

ΓΕΩΠΟΝΙΚΟ ΠΑΝΕΠΙΣΤΗΜΙΟ ΑΘΗΝΩΝ
ΠΜΣ ΤΜΗΜΑΤΟΣ ΕΠΙΣΤΗΜΗΣ ΦΥΤΙΚΗΣ ΠΑΡΑΓΩΓΗΣ
ΕΠΙΣΤΗΜΗ ΚΑΙ ΣΥΓΧΡΟΝΑ ΣΥΣΤΗΜΑΤΑ ΦΥΤΙΚΗΣ ΠΑΡΑΓΩΓΗΣ
ΦΥΤΟΠΡΟΣΤΑΣΙΑΣ ΚΑΙ ΑΡΧΙΤΕΚΤΟΝΙΚΗΣ ΤΟΠΙΟΥ
ΕΡΓΑΣΤΗΡΙΟ ΦΥΤΟΠΑΘΟΛΟΓΙΑΣ

ΜΕΤΑΠΤΥΧΙΑΚΗ ΜΕΛΕΤΗ

με τίτλο:

**Αξιολόγηση του ρόλου της πρωτεΐνης VdNEP στην
παθογένεια του μύκητα *Verticillium dahliae***

Εμμανουήλ Γ. Τσαγγούρης



Τριμελής Εξεταστική Επιτροπή:

κ. Επαμεινώνδας Παπλωματάς, Αν. Καθηγητής, Επιβλέπων

κ. Ελευθέριος Τζάμος, Ομότιμος Καθηγητής

κ. Δημήτριος Τσιτσιγιάννης, Λέκτορας

ΑΘΗΝΑ 2011

ΕΥΧΑΡΙΣΤΙΕΣ

Ξεκινώντας την παρούσα μεταπτυχιακή μελέτη είναι αναγκαίο να ευχαριστήσω μερικούς ανθρώπους χωρίς την παρότρυνση των οποίων δεν θα κατάφερα να γράψω τις ευχαριστίες της μελέτης αυτής.

Ξεκινώντας από τον επιβλέποντα μου, τον αναπληρωτή Καθηγητή και προσφάτως εκλεγέντα ως Αντιπρύτανη επί των Ακαδημαϊκών υποθέσεων και του Προσωπικού κκ. Επαμεινώνδα Πάπλωματά και αφού πρώτα τον συγχαρώ και του ευχηθώ πολύ καλή επιτυχία σε μια ακόμη δύσκολη θέση που αναλαμβάνει, να του ευχαριστήσω ιδιαίτερα για το ενδιαφέρον του ώστε να ολοκληρωθεί το παρόν έργο παρά τις δικές μου ολιγορίες.

Στη συνέχεια να ευχαριστήσω πολύ τον Λέκτορα του εργαστηρίου Φυτοπαθολογίας κκ. Δημήτρη Τσιτσιγιάννη για την υπομονή αλλά και την γνωστική και εργαστηριακή υποστήριξη που μου προσέφερε σε ανύποπτες χρονικές στιγμές κατά τη διάρκεια της περασμένης διατίας.

Να ευχαριστήσω ιδιαίτερα και τον ομότιμο Καθηγητή Φυτοπαθολογίας κκ. Ελευθέριο Τζάμο για τις καίριες και σημαντικές υποδείξεις του κατά τη συγγραφή της μελέτης αλλά και την προσπάθεια του να βοηθήσει την ολοκλήρωση της παρούσας εργασίας ακόμα και όταν τα σημεία ήταν αντίθετα προς αυτό.

Επίσης, να ευχαριστήσω θερμά την Δρ Αλίκη Τζίμα για την διαρκή βοήθεια, τη συμμετοχή και το άμεσο ενδιαφέρον σε ότι χρειάστηκε στο κομμάτι της έρευνας μου και για την ώθηση που μου προσέφερε να προχωρήσω παραπέρα σε στιγμές που είχα πραγματικά πελαγώσει.

Τέλος, αλλά όχι τελευταίους, θα ήθελα να ευχαριστήσω τον Δρ. Ιάκωβο Παντελίδη και τον Λέκτορα κ Σωτήριο Τζάμο για το συνεχές ενδιαφέρον τους στην πορεία της έρευνας μου και την προσφορά γνώσης σε στιγμές αμηχανίας και ατονίας. Ιάκωβε, ευχαριστώ για τους φορείς της VIGS.

Κλείνοντας, ευχαριστώ όλο το δυναμικό του εργαστηρίου Φυτοπαθολογίας για τη φιλοξενία και την υποστήριξη που μου παρείχαν.

Ευχαριστώ κα Αυτωνίου,

Ευχαριστώ κα Δημακοπούλου.

Δεν ξεχνώ και τις εντός και εκτός θέματος, εντός και εκτός Εργαστηρίου, συζητήσεις, οπότε,

Ευχαριστώ Μαριέττα.

ΠΕΡΙΕΧΟΜΕΝΑ

ΠΕΡΙΛΗΨΗ

1. ΕΙΣΑΓΩΓΗ	1
1.1 ΠΑΘΟΛΟΓΙΑ ΤΟΥ ΜΥΚΗΤΑ <i>VERTICILLIUM DAHLIAE</i>	1
1.1.1 Βιολογικός κύκλος	1
1.1.2 Μηχανισμοί παθογένειας	5
1.1.3 Οι πρωτεΐνες NLP και ο πιθανός ρόλος τους στην παθογένεια	9
1.1.4 Φυσιολογία των αμυντικών μηχανισμών που επάγει ο μύκητας <i>Verticillium dahliae</i>	12
1.1.5 Σηματοδοτικοί μηχανισμοί της άμυνας των φυτών στην προσβολή από το μύκητα <i>Verticillium dahliae</i>	16
1.1.6 Τα <i>Ve</i> γονίδια ανθεκτικότητας	19
1.1.7 Προοπτικές για την αντιμετώπιση του μύκητα <i>Verticillium dahliae</i>	23
1.2 ΣΚΟΠΟΣ ΤΗΣ ΠΑΡΟΥΣΑΣ ΜΕΤΑΠΤΥΧΙΑΚΗΣ ΜΕΛΕΤΗΣ	26
2. ΥΛΙΚΑ ΚΑΙ ΜΕΘΟΔΟΙ	27
2.1 ΔΙΑΣΥΣΤΗΜΑΤΙΚΗ ΕΚΦΡΑΣΗ ΤΗΣ ΠΡΩΤΕΙΝΗΣ <i>VdNEP</i> ΣΕ ΦΥΤΑ ΤΟΜΑΤΑΣ	27
2.1.1 Εκκινήτες <i>VdNEP</i>	27
2.1.2 Ενίσχυση <i>VdNEP</i> με αλυσιδωτη αντίδραση πολυμεράσης	28
2.1.3 Κλωνοποίηση των προϊόντων PCR	28
2.1.4 Απομόνωση πλασμιδιακού DNA από το βακτήριο <i>Escherichia coli</i>	29
2.1.5 Πέψη νουκλεϊκών οξέων με περιοριστικά ένζυμα	30
2.1.6 Ηλεκτροφόρηση τμημάτων DNA	30
2.1.7 Υποκλωνοποίηση του <i>VdNEP</i> στο δυαδικό φορέα <i>Ptrv</i>	32
2.1.8 Εισαγωγή φορέα σίγησης στο βακτήριο <i>Agrobacterium tumefaciens</i>	33
2.1.9 Έκφραση του <i>VdNEP</i> στα φυτά τομάτας	34
2.2 ΜΟΛΥΝΣΗ ΦΥΤΩΝ ΤΟΜΑΤΑΣ, ΒΑΜΒΑΚΙΟΥ ΚΑΙ <i>ARABIDOPSIS THALIANA</i> ΜΕ ΦΥΛΕΣ ΤΟΥ ΜΥΚΗΤΑ <i>VERTICILLIUM DAHLIAE</i> ΠΟΥ ΥΠΕΡΕΚΦΡΑΖΑΝ ΤΟ ΓΟΝΙΔΙΟ <i>VDNEP</i>	36
2.2.1 Η κασέτα υπερέκφρασης του γονιδίου <i>VdNEP</i>	36
2.2.2 Δοκιμές παθογένειας στελεχών <i>Verticillium dahliae</i> που υπερέκφραζαν τη <i>VdNEP</i> σε ξενιστές του	36
3. ΑΠΟΤΕΛΕΣΜΑΤΑ	39
3.1 ΔΙΑΣΥΣΤΗΜΑΤΙΚΗ ΕΚΦΡΑΣΗ ΤΗΣ ΠΡΩΤΕΙΝΗΣ <i>VdNEP</i> ΣΕ ΦΥΤΑ ΤΟΜΑΤΑΣ	39
3.1.1 Ενίσχυση του γονιδίου <i>VdNEP</i> και κλωνοποίηση του στον φορέα <i>pTRV</i>	39
3.1.2 Εισαγωγή του φορέα <i>pTRV2 - VdNEP</i> στο <i>Agrobacterium tumefaciens</i>	41
3.1.3 Έκφραση της πρωτεΐνης <i>VdNEP</i> σε φυτά τομάτας	43

3.2 ΑΠΟΤΕΛΕΣΜΑΤΑ ΜΟΛΥΝΣΗΣ ΦΥΤΩΝ ΤΟΜΑΤΑΣ, ΒΑΜΒΑΚΙΟΥ ΚΑΙ ARABIDOPSIS THALIANA ΜΕ ΦΥΛΕΣ ΤΟΥ ΜΥΚΗΤΑ VERTICILLIUM DAHLIAE ΠΟΥ ΥΠΕΡΕΚΦΡΑΖΑΝ ΤΟ ΓΟΝΙΔΙΟ VdNEP	46
3.2.1 Το γονίδιο <i>VdNEP</i> εμπλέκεται στην παθογένεια του <i>Verticillium dahliae</i> .	46
4. ΣΥΖΗΤΗΣΗ-ΣΥΜΠΕΡΑΣΜΑΤΑ	59
5. ΒΙΒΛΙΟΓΡΑΦΙΑ	63
ΠΑΡΑΡΤΗΜΑ	73

ΠΙΝΑΚΕΣ

Πίνακας 2.1: Οι εκκινήτες ενίσχυσης του γονιδίου <i>VdNEP</i> με τις θέσεις περιορισμού των ενδονουκλεασών <i>EcoRI</i> και <i>BamHI</i> στο 5' άκρο τους (πράσινο χρώμα).	27
Πίνακας 2.2: Συγκεντρώσεις αντιδραστηρίων PCR.	28
Πίνακας 2.3: Συγκεντρώσεις αντιδραστηρίων αντίδρασης συνένωσης.	29
Πίνακας 2.4: Συγκεντρώσεις αντιδραστηρίων αντίδρασης πέψης.	30
Πίνακας 2.5: Διάλυμα επαγωγής (Induction medium, IM)	35
Πίνακας 2.6: Διάλυμα αλάτων AB (AB salts)	35
Πίνακας 2.7: 200 mM ακετοσυριγκόνη	35
Πίνακας 2.8: Αντιστοίχιση στελεχών που έφεραν την κασέτα υπερέκφρασης <i>VdNEP</i> και φυλών προέλευσης του μύκητα <i>V. dahliae</i> .	37
Πίνακας Π.1: Αποτελέσματα εξέλιξης ποσοστού ασθένειας, μέσοι όροι ποσοστού ασθένειας, AUDPC και σχετικού AUDPC, σε φυτά βαμβακιού.	85
Πίνακας Π.2: Αποτελέσματα εξέλιξης ποσοστού ασθένειας, μέσοι όροι ποσοστού ασθένειας, AUDPC και σχετικού AUDPC, σε φυτά <i>A. thaliana</i> .	88
Πίνακας Π.3: Αποτελέσματα εξέλιξης ποσοστού ασθένειας, μέσοι όροι ποσοστού ασθένειας, μέσοι όροι ύψους, AUDPC και σχετικού AUDPC, σε φυτά τομάτας.	94
Πίνακας Π.4: Αποτελέσματα εξέλιξης ποσοστού ασθένειας, μέσοι όροι ποσοστού ασθένειας, AUDPC και σχετικού AUDPC, σε φυτά βαμβακιού.	102

ΕΙΚΟΝΕΣ

Εικόνα 1.1: Συμπτώματα του μύκητα <i>Verticillium dahliae</i>	1
Εικόνα 1.2: Βιολογικός κύκλος του μύκητα <i>V. dahliae</i>	2
Εικόνα 1.3: Είσοδος του μύκητα <i>V. dahliae</i> μέσω της ρίζας του φυτού	3
Εικόνα 1.4: Εγκατάσταση του μύκητα <i>V. dahliae</i> στα αγγεία του ξύλου	4
Εικόνα 1.5: Λύση του φυτικού κυτταρικού τοιχώματος από πηκτινολυτικά ένζυμα που εκκρίνει ο μύκητας <i>V. dahliae</i>	7
Εικόνα 1.6: Επαγωγή του μηχανισμού άμυνας του φυτού από την έκφραση της πρωτεΐνης VdNEP	9
Εικόνα 1.7: Στοίχιση ακολουθιών NLP πρωτεϊνών με CLUSTALW (www.ebi.ac.uk).	10
Εικόνα 1.8: Η εγκατάσταση του μύκητα <i>V. dahliae</i> στα κύτταρα ευαίσθητου ξενιστή	13
Εικόνα 1.9: Το ζιγκ-ζαγκ μοντέλο περιγράφει το ποσοτικό αποτέλεσμα της ανθεκτικότητας από τη δράση της άμυνας του φυτού	17
Εικόνα 1.10: Κύρια μονοπάτια σηματοδότησης για την ενίσχυση της βασικής άμυνας του φυτού	18
Εικόνα 1.11: Φυτά τετραπλοειδούς πατάτας 4 εβδομάδες μετά τη μόλυνση με το μύκητα <i>V. dahliae</i>	21
Εικόνα 2.2: Κλίμακες μοριακών βαρών 1kb των εταιριών Fermentas (αριστερά) και Biolabs (δεξιά)	31
Εικόνα 2.3: Ο ιόςTRV (A), Οι pTRV1 και pTRV2 (B)	33
Εικόνα 3.1: Ηλεκτροφόρηση απομόνωσης μικρής κλίμακας πλασμιδιακού DNA (αριστερά). Πέψεις προιόντων απομόνωσης πλασμιδιακού DNA με περιοριστικά ένζυμα <i>EcoRI</i> , <i>BamHI</i> (δεξιά).	39
Εικόνα 3.2: Αντίδραση ενίσχυσης κλώνου <i>pTRV2-VdNEP</i> και πέψεις κλώνου με ένζυμα περιορισμού <i>EcoRI</i> , <i>BamHI</i> και <i>EcoRI-BamHI</i> .	40
Εικόνα 3.3: Πέψεις με κατάλληλα ένζυμα περιορισμού (<i>HpaI-ScaI</i> , <i>PstI</i>) για την ταυτοποίηση της ύπαρξης επιθυμητού κλώνου <i>pTRV2-VdNEP</i> .	41

Εικόνα 3.4: Εισαγωγή του κλώνου <i>pTRV2 - VdNEP</i> στο <i>Agrobacterium tumefaciens</i>	42
Εικόνα 3.5: Αρχικά συμπτώματα μάρανσης και νέκρωσης σε φυτά τομάτας που είχαν εμβολιαστεί με <i>pTRV-VdNEP</i> .	44
Εικόνα 3.6: (Α) Νεκρώσεις σε φύλλα τομάτας. (Β) Διαδοχικά στάδια μάρανσεως σε σύνθετο φύλλο τομάτας. (Γ) Φαινότυπος φωτολεύκανσης σε φυτά τομάτας μετά από εμβολιασμό με <i>pTRV-PDS</i>	45
Εικόνα 3.7: (Γ) Φαινότυπος φωτολεύκανσης σε φυτά τομάτας μετά από εμβολιασμό με <i>pTRV-PDS</i> .	46

ΣΧΗΜΑΤΑ

Σχήμα 2.1: Α. Η αλληλουχία του γονιδίου VdNEP στην οποία έχουν επισημανθεί οι περιοχές υβριδισμού εκκινητων VdNEP-κωδικός και VdNEP-αντικωδικός (γκρι χρώμα) και οι περιοχή εσονίου (πρασινο χρώμα). Β. Η πρωτεΐνη VdNEP. 27

Σχήμα 2.2: Απεικόνιση του ανοιχτού πλαισίου ανάγνωσης (open reading frame, orf) του γονιδίου VdNEP σε κατάλληλες θέσεις περιορισμού *Bam*HI, *Xba*I του φορέα SK1726 που φέρει τον ισχυρό υποκινητή του *Magnaporthe grisea* και τερματιστή του γονιδίου της β-τουμπουλίνης του μύκητα *Neurospora crassa* 36

Σχήμα 3: Συνοπτική παρουσίαση διαδικασίας agro-εμβολιασμού του κλώνου *pTRV-VdNEP* σε φυτά-ξενιστές 43

Σχήμα 3.1: Η εξέλιξη της ασθένειας και η εικόνα των φυτών *A. thaliana* μολυσμένα με το υπερεκφράζον στέλεχος (δεξιά) και το άγριο στέλεχος (αριστερά) της αποφυλλωτικής φυλής του βαμβακιού του μύκητα *V. dahliae*, 24 η.μ.μ. 50

Σχήμα 3.2: Η εξέλιξη της ασθένειας και η εικόνα των φυτών βαμβακιού μολυσμένα με το υπερεκφράζον στέλεχος (δεξιά) και το άγριο στέλεχος (αριστερά) της αποφυλλωτικής φυλής του βαμβακιού του μύκητα *V. dahliae*, 15 η.μ.μ. 51

Σχήμα 3.3: Η εξέλιξη της ασθένειας και η εικόνα των φυτών *A. thaliana* μολυσμένα με τα υπερεκφράζοντα στελέχη (δεξιά) και το άγριο στέλεχος (αριστερά), της μη αποφυλλωτικής φυλής του βαμβακιού του μύκητα *V. dahliae*, 24 η.μ.μ. 52

Σχήμα 3.4: Η εξέλιξη της ασθένειας και η εικόνα των φυτών βαμβακιού μολυσμένα με τα υπερεκφράζοντα στελέχη (αριστερά) και της άγριας φυλής (δεξιά) της μη αποφυλλωτικής φυλής του βαμβακιού του μύκητα *V. dahliae*, 14 η.μ.μ. 53

Σχήμα 3.5: Η εξέλιξη της ασθένειας και η εικόνα των φυτών τομάτας μολυσμένα με τα υπερεκφράζοντα στελέχη (δεξιά) και το άγριο στέλεχος (αριστερά), της μη αποφυλλωτικής φυλής του βαμβακιού του μύκητα *V. dahliae*, 16 η.μ.μ. 54

Σχήμα 3.6: Η εξέλιξη της ασθένειας και η εικόνα των φυτών *A. thaliana* μολυσμένα με το υπερεκφράζον στέλεχος (δεξιά) και το άγριο στέλεχος (αριστερά) της φυλής 1 της τομάτας του μύκητα *V. dahliae*, 21 η.μ.μ. 55

Σχήμα 3.7: Η εξέλιξη της ασθένειας και η εικόνα των φυτών βαμβακιού μολυσμένα με το υπερεκφράζον στέλεχος (δεξιά) και το άγριο στέλεχος (αριστερά) της φυλής 1 της τομάτας, του μύκητα *V. dahliae*, 16 η.μ.μ. 56

Σχήμα 3.8: Ανάλυση διασποράς και συγκρίσεις μέσω του τελικού ποσοστού ασθένειας και της σχετικής τιμής του AUDPC του αγρίου (αριστερά) και του μεταλλαγμένου στελέχους (δεξιά) της φυλής 1 της τομάτας σε φυτά τομάτας, 22 η.μ.μ. 57

Σχήμα 3.9: Η εξέλιξη του ύψους φυτών τομάτας που ήταν μολυσμένα με τα υπερεκφράζοντα στελέχη και το άγριο στέλεχος της μη αποφυλλωτικής φυλής του βαμβακιού του μύκητα <i>V. dahliae</i> 26 η.μ.μ. Σύγκριση των μέσων τιμών της AUDPC των τριών παραπάνω στελεχών με τη δοκιμασία Tukey-Kramer	58
Σχήμα Π.1: Ανάλυση διασποράς και συγκρίσεις μέσων του τελικού ποσοστού ασθένειας και της σχετικής τιμής του AUDPC του αγρίου και των μεταλλαγμένων στελεχών της αποφυλλωτικής φυλής του βαμβακιού, σε φυτά βαμβακιού.	73
Σχήμα Π.2: Ανάλυση διασποράς και συγκρίσεις μέσων του τελικού ποσοστού ασθένειας και της σχετικής τιμής του AUDPC του αγρίου και των μεταλλαγμένων στελεχών της αποφυλλωτικής φυλής του βαμβακιού, σε φυτά βαμβακιού	74
Σχήμα Π.3: Ανάλυση διασποράς και συγκρίσεις μέσων του τελικού ποσοστού ασθένειας και της σχετικής τιμής του AUDPC του αγρίου και των μεταλλαγμένων στελεχών της φυλής 1 της τομάτας, σε φυτά βαμβακιού.	75
Σχήμα Π.4: Ανάλυση διασποράς και συγκρίσεις μέσων του τελικού ποσοστού ασθένειας και της σχετικής τιμής του AUDPC του αγρίου και των μεταλλαγμένων στελεχών της αποφυλλωτικής φυλής του βαμβακιού, σε φυτά βαμβακιού.	76
Σχήμα Π.5: Ανάλυση διασποράς και συγκρίσεις μέσων του τελικού ποσοστού ασθένειας και της σχετικής τιμής του AUDPC του αγρίου και των μεταλλαγμένων στελεχών της αποφυλλωτικής φυλής του βαμβακιού, σε φυτά βαμβακιού	77
Σχήμα Π.6: Ανάλυση διασποράς και συγκρίσεις μέσων του τελικού ποσοστού ασθένειας και της σχετικής τιμής του AUDPC του αγρίου και των μεταλλαγμένων στελεχών της φυλής 1 της τομάτας, σε φυτά βαμβακιού.	78
Σχήμα Π.7: Ανάλυση διασποράς και συγκρίσεις μέσων του τελικού ποσοστού ασθένειας και της σχετικής τιμής του AUDPC του αγρίου και των μεταλλαγμένων στελεχών της αποφυλλωτικής φυλής του βαμβακιού σε φυτά τομάτας	79
Σχήμα Π.8: Ανάλυση διασποράς και συγκρίσεις μέσων του τελικού ποσοστού ασθένειας και της σχετικής τιμής του AUDPC του αγρίου και των μεταλλαγμένων στελεχών της φυλής 1 της τομάτας, σε φυτά τομάτας	80
Σχήμα Π.9: Ανάλυση διασποράς και συγκρίσεις μέσων του τελικού ποσοστού ασθένειας και της σχετικής τιμής του AUDPC, του αγρίου και των μεταλλαγμένων στελεχών της αποφυλλωτικής φυλής του βαμβακιού, σε φυτά <i>A. thaliana</i> .	81
Σχήμα Π.10: Ανάλυση διασποράς και συγκρίσεις μέσων του τελικού ποσοστού ασθένειας και της σχετικής τιμής του AUDPC, του αγρίου και των μεταλλαγμένων στελεχών της μη αποφυλλωτικής φυλής του βαμβακιού, σε φυτά <i>A. thaliana</i> .	82

Σχήμα Π.11: Ανάλυση διασποράς και συγκρίσεις μέσω του τελικού ποσοστού ασθένειας και της σχετικής τιμής του AUDPC, του αγρίου και των μεταλλαγμένων στελεχών της φυλής 1 της τομάτας, σε φυτά *A.thaliana*. 83

ΠΕΡΙΛΗΨΗ

Ο μύκητας *Verticillium dahliae* προσβάλλει πολλά αυτοφυή και καλλιεργούμενα φυτά μεταξύ των οποίων είναι η τομάτα και το βαμβάκι. Επίσης, παράγει μικρού και μεγάλου μοριακού βάρους τοξικούς μεταβολίτες των φυτών που λειτουργούν ως υποκινητές της φυτικής άμυνας χωρίς ωστόσο να έχουν απομονωθεί συγκεκριμένες χημικές ουσίες με συγκεκριμένο μηχανισμό δράσης.

Σχετικά πρόσφατα, έχουν απομονωθεί πρωτεΐνες από ωομύκητες, μύκητες και βακτήρια που λειτουργούν ως επαγωγείς της άμυνας των φυτών και οι οποίες έχουν καταταγεί στην οικογένεια των NLP (Nep1 like proteins). Ο ρόλος των NLP πρωτεϊνών στην παθογένεια των οργανισμών που τις παράγουν δεν είναι ξεκάθαρος. Όταν οι πρωτεΐνες αυτές εκφραστούν *in planta* είναι πιθανό, να ενεργοποιούν τους μηχανισμούς άμυνας των ξενιστών τους καθοδηγώντας τον περιορισμό της εξάπλωσης του παθογόνου και κατά συνέπεια τον περιορισμό της εξέλιξης της ασθένειας. Επιπλέον, τα παθογόνα μπορούν να κατευθύνουν την εκδήλωση της αντίδρασης υπερευαισθησίας (μορφή προγραμματισμένου κυτταρικού θανάτου) προς όφελος τους, ώστε να αντλήσουν απαραίτητα για αυτά θρεπτικά στοιχεία ή και να προφυλαχθούν από τους αμυντικούς μηχανισμούς του φυτού.

Η NLP πρωτεΐνη 233 αμινοξέων, του μύκητα *V. dahliae* ονομάστηκε VdNEP (*Verticillium dahliae* Necrosis and ethylene inducing peptide, VdNep). Η VdNep είναι ισχυρός ενεργοποιητής της άμυνας σε φυτά *Nicotiana benthamiana*, *Arabidopsis thaliana* και βαμβάκι και επάγει τον σχηματισμό συμπτωμάτων νέκρωσης και μάρανσης σε κοτυληδόνες και φύλλα βαμβακιού. Όταν απομονώθηκε και εφαρμόστηκε σε φυτά *N. benthamiana* και *A. thaliana* επήγαγε το σχηματισμό ενεργών μορφών οξυγόνου και πρωτεϊνών παθογένειας που εμπλέκονται στα μονοπάτια φυτικής άμυνας του σαλικυλικού οξέος και ιασμονικού οξέος. Τέλος, η εφαρμογή της VdNEP, ως πρωτεΐνη σύντηξης με κατάλυπα ιστιδίνης (His-VdNEP), σε φυτά *A. thaliana* οδήγησε σε αύξηση της παραγωγής αιθυλενίου στα φυτά αυτά (Wang et al., 2004).

Η μελέτη της λειτουργίας της VdNEP πραγματοποιήθηκε με την *in planta* υπερέκφραση της, μετά την κλωνοποίηση της σε κατάλληλο ιικό φορέα. Για το σκοπό αυτό χρησιμοποιήθηκε ένας T1 φορέας που κωδικοποιούσε το cDNA του ιού TRV, στο T-DNA του, υπό τον έλεγχο κατάλληλου υποκινητή και τερματιστή που να είναι λειτουργικοί στα φυτικά κύτταρα. Όταν το T-DNA ενσωματωθεί στα κύτταρα του φυτού, ο ιός μεταγράφεται και έχει τη δυνατότητα πλέον να μετακινείται διασυστηματικά στους ιστούς του φυτού. Η μετακίνηση του ιού διασπείρει και τη VdNEP η οποία εκφράζεται διασυστηματικά στους ιστούς του φυτού. Επίσης, χρησιμοποιήθηκε ως θετικός μάρτυρας και ένας TRV φορέας που κωδικοποιούσε

τμήμα του γονιδίου της δεσατουράσης του φυτοενίου που δίνει τον φαινότυπο της φωτολεύκανσης στα φυτά στα οποία θα εκφραστεί.

Τα φυτά τομάτας που είχαν εμβολιαστεί με το φορέα *pTRV-VdNEP*, σε διάστημα τριών περίπου εβδομάδων εμφάνισαν διασυστηματικά συμπτώματα αδρομύκωσης όπως μαράνσεις, χλωρώσεις, νεκρώσεις που ομοιάζαν με αυτά που δίνει ο μύκητας *V. dahliae*. Τα φυτά που είχαν εμβολιαστεί με το φορέα *pTRV-PDS* σε λιγότερο από τρεις εβδομάδες έδωσαν τον τυπικό φαινότυπο της φωτολεύκανσης.

Επίσης, πραγματοποιήθηκε αξιολόγηση της παθογένειας τεσσάρων στελεχών από τρεις φυλές του μύκητα *V. dahliae* που υπερέκφραζαν την πρωτεΐνη VdNEP, επί τριών ξενιστών του μύκητα *V. dahliae*, δηλαδή της τομάτας, του βαμβακιού και του *A. thaliana*.

Από τα αποτελέσματα προέκυψε πως η υπερέκφραση της πρωτεΐνης VdNEP σε στελέχη της αποφυλλωτικής φυλής του βαμβακιού (22V), της μη αποφυλλωτικής του βαμβακιού (25V) και τη φυλή 1 της τομάτας οδήγησε σε αύξηση του σχετικού AUDPC, σε σχέση με τις αντίστοιχες άγριες φυλές του μύκητα, στα φυτά που μολύνθηκαν ενώ διεύρυνε και τον κύκλο των ξενιστών της φυλής 1 της τομάτας. Επίσης, τα συμπτώματα που παρατηρήθηκαν στην τομάτα και το βαμβάκι είχαν την αλληλουχία των συμπτωμάτων του συνδρόμου των αδρομυκώσεων. Πιο συγκεκριμένα, το στέλεχος της αποφυλλωτικής φυλής που υπερέκφραζε το VdNEP δε μόλυνε την τομάτα ενώ στο βαμβάκι και το *A. thaliana* έδωσε υψηλά ποσοστά ασθένειας. Τα δύο στελέχη της μη αποφυλλωτικής φυλής που υπερέκφραζαν το VdNEP έδωσαν τα χαμηλότερα ποσοστά ασθένειας στα τρία φυτά, ενώ η εμφάνιση των συμπτωμάτων εμφάνισε μια χρονική υστέρηση σε σχέση με τα άλλα υπερεκφράζοντα στελέχη του μύκητα. Το στέλεχος της φυλής 1 της τομάτας που υπερέκφραζε το VdNEP εμφάνισε τα υψηλότερα ποσοστά ασθένειας στη τομάτα ενώ μόλυνε εξίσου ισχυρά και το βαμβάκι. Τέλος, παρατηρήθηκε σημαντική διαφοροποίηση στο ύψος των φυτών τομάτας που μολύνθηκαν με το υπερεκφράζον στέλεχος της φυλής 1 της τομάτας και το αντίστοιχο άγριο.

Φαίνεται λοιπόν από τα παραπάνω, πως η πρωτεΐνη VdNEP εμπλέκεται στην παθογένεια του μύκητα *V. dahliae*.

ABSTRACT

V. dahliae causes wilt in a wide range of plants, including tomato and cotton. It is reported to produce molecules that induce host cell death. Until now crude extracts that contain *Verticillium* toxin complexes have been used to elicit plant defence responses or to study physiological responses of the plants. However, the exact nature of the components of the complexes is often unclear.

Recently, in several different fungi, oomycetes and bacteria, proteins have been identified that appear to belong to a newly recognized family of elicitor molecules called NLPs (Nep1-like proteins, necrosis and ethylene inducing proteins).

The role of the NLPs in plant pathogenicity, if any, remains uncertain. If expressed *in planta*, these proteins could alert plants to the presence of invading microbes by triggering plant defences, potentially bringing any infection to an untimely end.

On the other hand, the induction of a hypersensitivity response could be used to the advantage of the pathogen so as to release nutrients for the invading microbe population. It has also been proposed that dead plant cells act as a protective barrier for invading microbes against plant defences.

This protein, named *V. dahliae* necrosis- and ethylene-inducing protein (VdNEP), is composed of 233 amino acids and has a high activity in triggering plant defense responses in *Nicotiana benthamiana*, *Arabidopsis thaliana*, and cotton. It also induces wilting of cotton leaves and cotyledons. In *A. thaliana* and *N. benthamiana*, VdNEP also triggered production of reactive oxygen species and induced the expression of *PR* genes. Finally, when VdNEP (as a HIS-Tag fusion protein) was infiltrated into leaves of *A. thaliana* it induced ethylene biosynthesis (Wang et al., 2004).

Here, we demonstrate the *in planta* overexpression of VdNEP protein in tomato plants by using the agroinoculation technique. For this we used a disarmed TRV vector which was modified with *VdNEP* sequence and was introduced in *Agrobacterium tumefaciens* engineered T-DNA plasmids. The *Agrobacterium* cells carrying the insert can be inoculated directly into the plant. The plant cells at the site of inoculation are transformed with the virus vector. These cells would then serve as a reservoir of infection, which spreads systemically throughout the plant. We also used as a positive marker of VdNEP expression, the TRV vector, carrying tomato phytoene desaturase (*PDS*) gene fragment, in order to suppress the expression of the endogenous *PDS* gene in tomato plants. A 1:1 mixture of *Agrobacterium* cultures containing *pTRV2*, *pTRV2-PDS*, *pTRV2-VdNEP* and *pTRV1*, was infiltrated onto the cotyledons of tomato plants.

Tomato plants infected with *pTRV-VdNEP* developed in about three weeks systemic wilting chlorosis and necrosis symptoms, which were alike those observed in the *Verticillium* wilt syndrome. Tomato plants infected with *pTRV-PDS* vector expressed the photo-bleached phenotype in the upper leaves, sooner than 3 weeks post Agro-infiltration and remained white for at least 1 month.

We also examined the phytopathogenicity of three pathotypes of *V. dahliae* that overexpressed VdNEP in cotton, tomato and *A. thaliana* plants.

Four isolates, one of the defoliating *V. dahliae* pathotype (22V6NEP16), two of the non-defoliating *V. dahliae* pathotype (25V6NEP74, 25V6NEP77) and one of the tomato race 1 pathotype (70V6NEP1) were examined for their ability to increase disease severity in *Verticillium* hosts and broaden their host cycle. Here, we report, that all four isolates of the three pathotypes of *V. dahliae* that overexpressed the VdNEP protein increased the relative AUDPC in the inoculated three hosts and broadened the host range of the race 1 of tomato pathotype. Symptoms in tomato and cotton were similar with those observed in the *Verticillium* wilt syndrome. The defoliating *V. dahliae* pathotype that overexpressed VdNEP was not virulent in tomato whilst in cotton and *A. thaliana* produced severe symptoms. The two isolates that overexpressed VdNEP of the non-defoliating pathotype of *V. dahliae* produced lower disease severity percentages than those of the defoliating and the race 1 pathotypes that also overexpressed VdNEP protein. We also recorded a delay in expression of increased severity in the symptomatology of the the non-defoliating pathotype of *V. dahliae* that overexpressed VdNEP compared with the wild type isolate. The higher disease severity percentages were observed in tomato plants inoculated with *Verticillium* race 1 pathotype that overexpressed the VdNEP protein. They were of similar significance with those of the defoliating *Verticillium* pathotype. Finally, there was significant difference in tomato plant height between the overexpressing isolate of race 1 pathotype of tomato and the wild one of this pathotype.

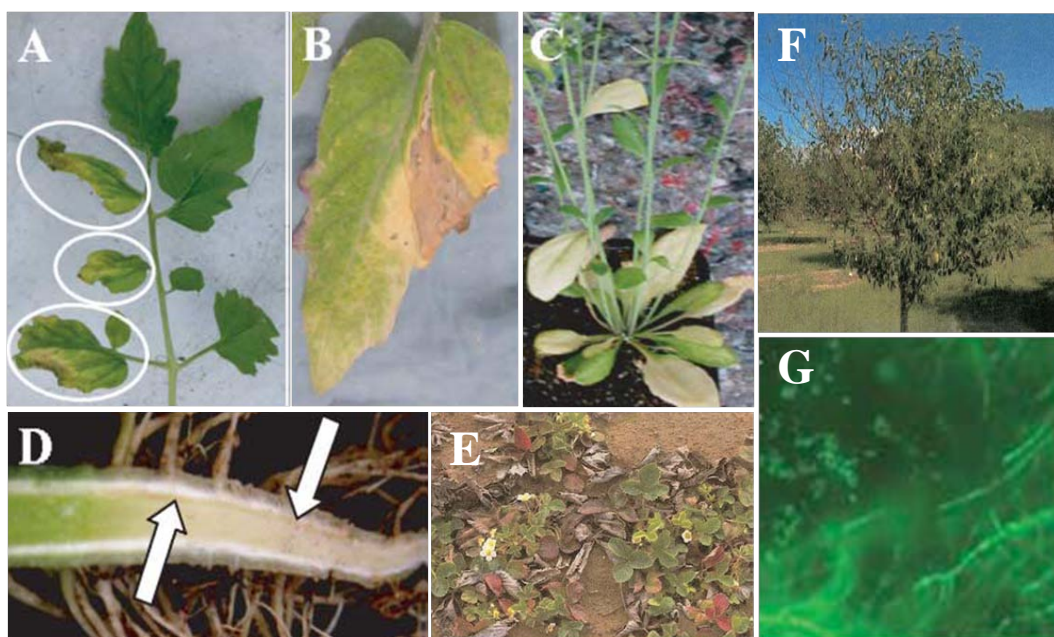
From all these we conclude that the VdNEP protein seems to be severely implicated in *V. dahliae* pathogenicity in its hosts.

1. ΕΙΣΑΓΩΓΗ

1.1 ΠΑΘΟΛΟΓΙΑ ΤΟΥ ΜΥΚΗΤΑ *VERTICILLIUM DAHLIAE*

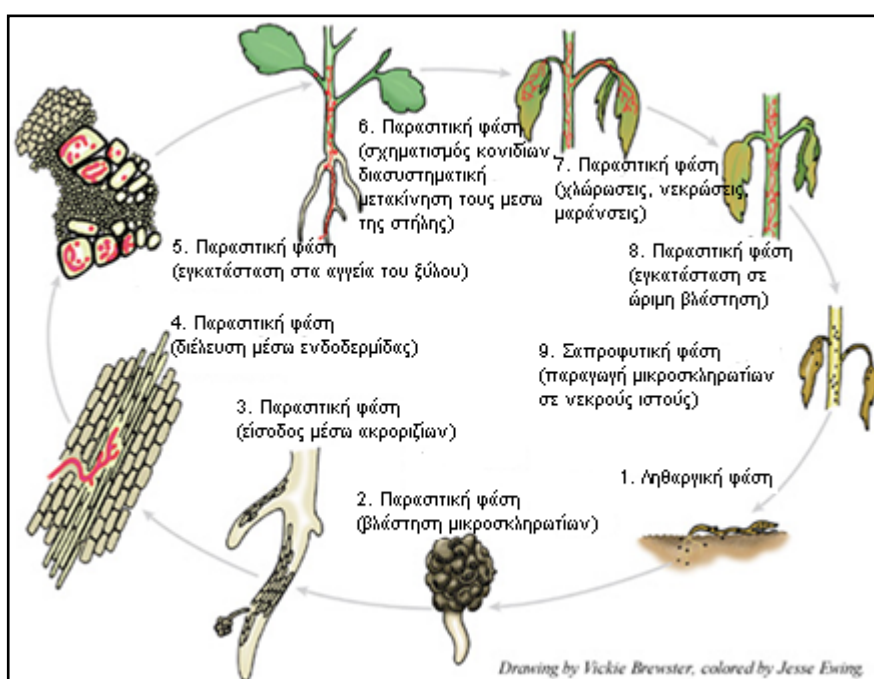
1.1.1 Βιολογικός κύκλος

Ο μύκητας *Verticillium dahliae* είναι ένα εδαφογενές παθογόνο που προσβάλλει τα φυτά σχεδόν αποκλειστικά μέσω του ριζικού συστήματος. Προκαλεί μονοκυκλική ασθένεια, δηλαδή εμφανίζει έναν πλήρη βιολογικό κύκλο και παράγει μία φορά νέο μόλυσμα, στην διάρκεια μιας καλλιεργητικής περιόδου. Η ασθένεια αυτή που καλείται αδρομύκωση, εμφανίζεται ως συνέπεια της δραστηριότητας του μύκητα στα αγγεία του ξύλου των φυτών που προσβάλλει. Τα κύρια συμπτώματα της ασθένειας που προκαλεί ο μύκητας εμφανίζονται με τη μορφή χλωρώσεων, νεκρώσεων και μαράνσεων των φύλλων που συχνά ακολουθείται από νέκρωση ολόκληρου του φυτού (Εικ. 1.1).



Εικόνα 1.1: Φύλλο τομάτας μολυσμένο με τον μύκητα *V. dahliae* που εμφανίζει συμπτώματα χλώρωσης, νέκρωσης και μάρανσης μόνο στη μισή του επιφάνεια (A). Φυλλίδιο από κατώτερο φύλλο φυτού τομάτας που εμφανίζει χαρακτηριστική νεκρωτική κηλίδα σχήματος V. Τα φύλλα αυτά στη συνέχεια μαραίνονται και πέφτουν (B). Φυτό *Arabidopsis thaliana* 23 ημέρες μετά τη μόλυνση με το *V. dahliae* που εμφανίζει χλωρώσεις στα φύλλα ροζέτας και πρόωμη ωρίμανση (C). Καστανός μεταχρωματισμός στα αγγεία του ξύλου στην περιοχή του λαμού φυτού τομάτας προσβεβλημένο από τον *V. albo-atrum* (D). Χλωρώσεις, μαράνσεις και νεκρώσεις σε φυτά φράουλας (E) και ροδακινιάς (F) από την προσβολή του μύκητα *V. dahliae*. Υφές και κονίδια μετασηματισμένου μύκητα *V. dahliae*, σε καλλιέργεια *in vitro*, που εκφράζει μόνιμα την πρωτεΐνη της πράσινης χρωστικής (Green Fluorescent Protein, GFP), όπως φαίνεται σε μικροσκόπιο φθορισμού (G). (Προσαρμογή από Fradin and Thomma, 2006, (A-D, G) και Agrios, 2005, (E,F).

Σε νεαρά φυτά (π.χ. πατάτας) ο μύκητας μπορεί να προκαλέσει την άμεση νέκρωση τους, ενώ σε ώριμα φυτά να προκαλέσει νανισμό και καστανό μεταχρωματισμό στους αγγειακούς τους ιστούς (Εικ. 1.1D). Σε μέσης ηλικίας φυτά η μόλυνση συχνά εκδηλώνεται με το σύμπτωμα του φύλλου σημαίας ή με χλωρωτικές κηλίδες στα φύλλα που αργότερα εξελίσσονται σε νεκρωτικές (Εικ. 1.A,B). Τα ετήσια φυτά που ολοκληρώνουν τον κύκλο τους εμφανίζουν χλωρώσεις, νανισμό και πρώιμη άνθηση (Εικ. 1.1C). Τέλος, η μόλυνση μπορεί να οδηγήσει σε πλήρη αποφύλλωση, σταδιακή μάρανση, νέκρωση διαδοχικών βραχιόνων ή και αιφνίδια νέκρωση ολόκληρων φυτών (Εικ. 1.1E,F)(Agrios, 2005).

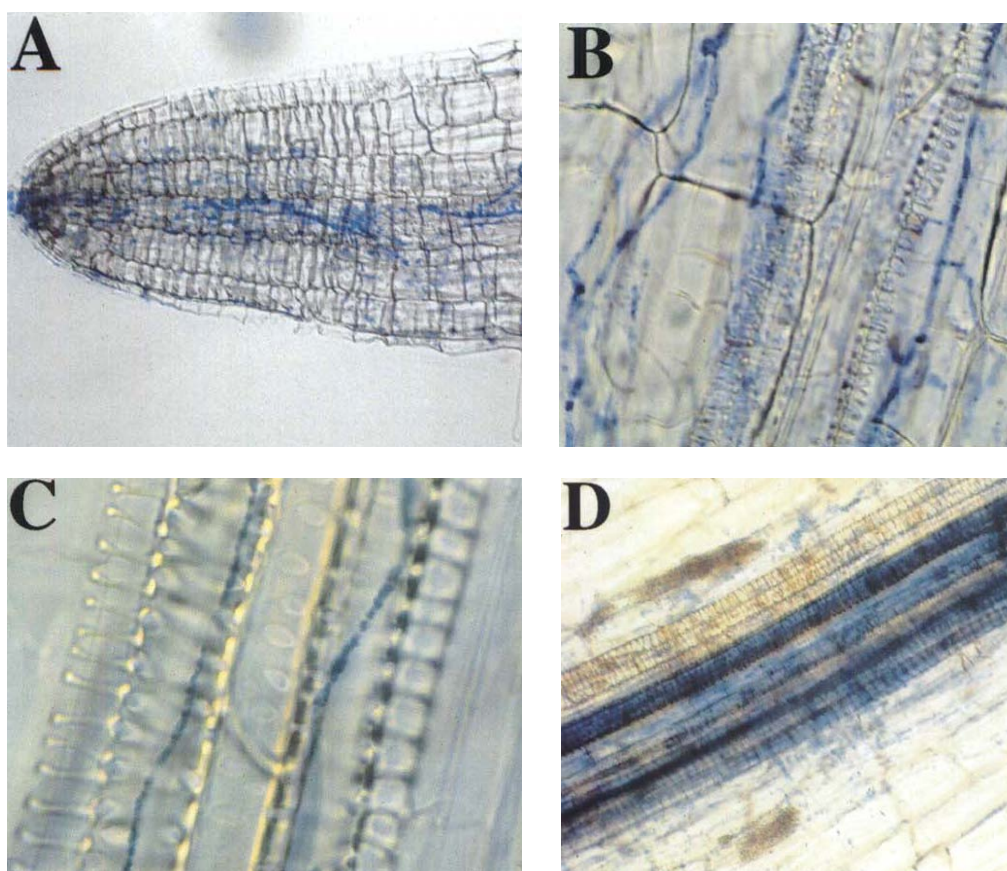


Εικόνα 1.2: Ο βιολογικός κύκλος του μύκητα *Verticillium dahliae* (1, ληθαργική φάση, 2-8, παρασιτική φάση, 9, σαπροφυτική φάση).

Ο βιολογικός του κύκλος μπορεί να χωριστεί σε τρεις φάσεις, την ληθαργική, την παρασιτική και την σαπροφυτική (Εικόνα 1.2). Κατά την πρώτη φάση, η βλάστηση των μικροσκληρωτίων του μύκητα παρεμποδίζεται μέσω μικροβιοστάσης ή μυκοστάσης, η οποία υπερνικάται από την περίσσεια σε άνθρακα και άζωτο των εκκρίσεων των ριζών στο έδαφος.

Κάθε κύτταρο ενός μικροσκληρωτίου έχει την ικανότητα να βλαστήσει μία φορά, με συνέπεια το κάθε μικροσκληρώτιο να βλαστάνει πολλές φορές, αυξάνοντας έτσι την πιθανότητα επιτυχούς εγκατάστασης του παθογόνου σε κάποιον ξενιστή. Η απόσταση που μπορεί να διανύσει μια βλαστανούσα υφή είναι γενικά

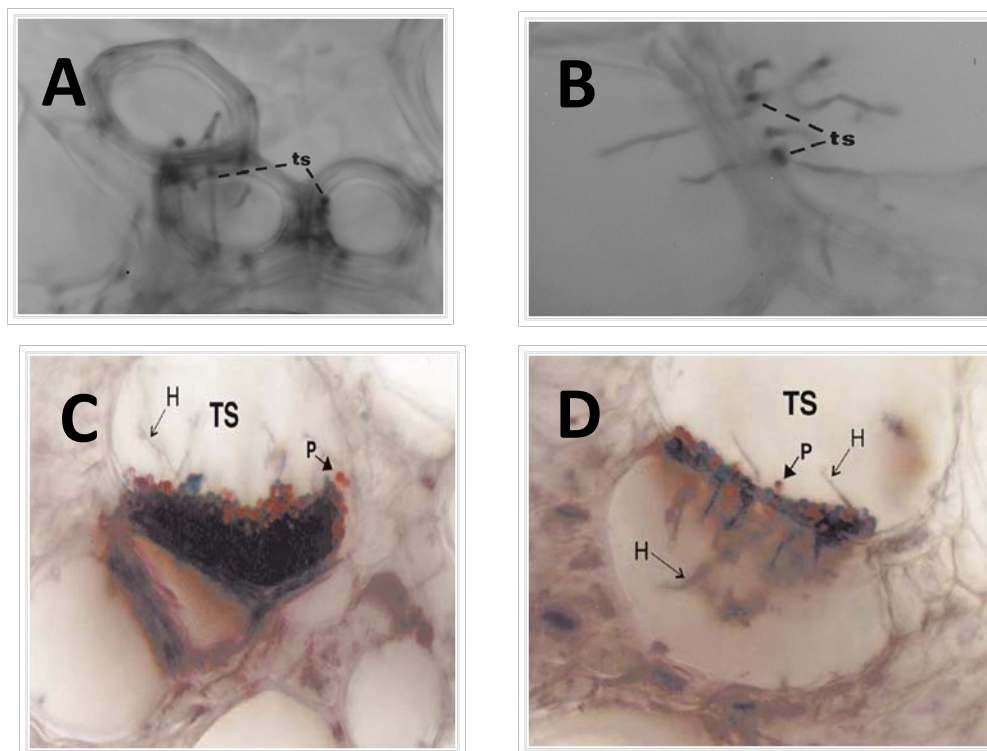
περιορισμένη και μπορεί να φτάσει τα 300μm κατευθυνόμενη προς την διαβάθμιση συγκέντρωσης των ανοργάνων στοιχείων, των ριζικών εκκρίσεων, των ξενιστών του (Huisman, 1982). Συνήθως ο μύκητας περνάει στην παρασιτική του φάση με την είσοδο στις ρίζες είτε μέσω του ακροριζίου είτε από τα σημεία της δευτερογενούς ανάπτυξης τους (Εικ. 1.3). Για να φτάσει στα αγγεία του ξύλου πρέπει πρώτα να διέλθει του στρώματος της ενδοδερμίδας. Αυτό μπορεί να επιτευχθεί μόνο όταν η ενδοδερμίδα δεν έχει αναπτυχθεί πλήρως (στο ακρορίζιο) ή όταν αυτή έχει τραυματιστεί (π.χ. προσβολή από νηματώδεις) (Bowers et al., 1996).



Εικόνα 1.3: Είσοδος του μύκητα μέσω του ακροριζίου (A), εγκατάσταση του μύκητα στα κύτταρα του φλοιού ακριβώς μετά το ακρορίζιο (B), εγκατάσταση του μύκητα σε αγγείο της ρίζας (C), κυριαρχία του μύκητα στα αγγεία της ρίζας (D).

Μετά την εγκατάσταση του στα αγγεία του ξύλου ο μύκητας σποροποιεί παράγοντας κονίδια, τα οποία μετακινούνται με το ανιόν ρεύμα και παγιδεύονται τελικά στα βοθρία τους ή στις πλάκες διατρήσεως τους. Εκεί βλαστάνουν και διεισδύουν στα συνοδά κύτταρα των αγγείων του ξύλου, συνεχίζοντας την εξάπλωση του μύκητα (Bishop and Cooper, 1983). Σε χρονικό διάστημα 2 - 4 ημερών ο μύκητας έχει εγκατασταθεί στα αγγεία του ξύλου της ρίζας και σε 1 ακόμη ημέρα έχει περάσει στα συνοδά κύτταρα των αγγείων και έχει παράξει κονίδια. Η

παραγωγή των κονιδίων στη ρίζα φαίνεται ότι παίζει πολύ σημαντικό ρόλο στην ανάπτυξη του μύκητα στα αγγεία του βλαστού και στην ταχεία αύξηση της βιομάζας του. Περίπου 1 εβδομάδα από την έναρξη της μόλυνσης του ευαίσθητου ξενιστή με τον μύκητα εμφανίζεται η πρώτη μείωση του μολύσματος από την ενεργοποίηση της άμυνας του ξενιστή (Εικ. 1.4) (Chen et al., 2004). Η ανάπτυξη του *V. dahliae* στο στάδιο αυτό, φαίνεται πως είναι το αποτέλεσμα μιας επάλληλης εξάπλωσης και αποκλεισμού του μύκητα από την δράση της άμυνας του φυτού (Heinz et al., 1998).



Εικόνα 1.4: Ο μύκητας σε 2-4 ημέρες μετά τη μόλυνση έχει εγκατασταθεί στα αγγεία του ευαίσθητου ξενιστή (A), σε μία ακόμη ημέρα έχει περάσει στα συνοδά κύτταρα των αγγείων (B). Ένας ανθεκτικός ξενιστής στο διάστημα αυτό έχει ενεργοποιήσει την άμυνα του παρεμποδίζοντας την εξάπλωση του μύκητα (C), ενώ ένας ευαίσθητος όχι (D).

Με την έναρξη της νέκρωσης των ιστών ή και της ξήρανσης του φυτού, ο μύκητας εισέρχεται στην σαπροφυτική του φάση. Ο *V. dahliae* παράγει μεγάλους αριθμούς μικροσκληρωτίων που ελευθερώνονται με την αποσύνθεση των φυτικών ιστών στο έδαφος, όπου παραμένουν ενεργά για 10 – 15 έτη. Σε πολυετή φυτά ή σε όργανα πολλαπλασιασμού ο μύκητας μπορεί να επιβιώσει ως μυκήλιο (Fradin and Thomma, 2006).

Τα μικροσκληρώτια του *V. dahliae* είναι μικροσκοπικές πυκνές μάζες, σκοτεινού χρώματος και παχέων τοιχωμάτων κυττάρων μυκηλιακών υφών. Το σκούρο χρώμα τους προέρχεται από την εναπόθεση μελανίνης στα τοιχώματα αλλά και

μεσοκυτταρικά αρκετών στρώσεων εξωτερικών κυττάρων του μικροσκληρωτίου (Perry and Evert, 2002). Οι μελανίνες αποτελούν χρωστικές που παράγονται από τον οξειδωτικό πολυμερισμό φαινολικών και ινδολικών συστατικών. Πρόδρομη μορφή των περισσότερων μυκηλιακών μελανινών αποτελεί το 1,8 διυδροξυναφθαλένιο (1,8 dihydroxynaphthalene, DHN) που παράγεται στο κυτόπλασμα και πολυμερίζεται τελικά στο σημείο απόθεσής του. Στο μύκητα *V. dahliae* ο ρόλος της μελανίνης του, έχει κατανοηθεί μόνο ως προς την επιβίωση των μικροσκληρωτίων σε αντίξοες συνθήκες και όχι για την εμπλοκή της στην παθογένεια του μύκητα, όπως συμβαίνει σε άλλες περιπτώσεις μυκήτων (Butler and Day, 1998).

Ωστόσο, πολύ λίγα είναι γνωστά για τον μοριακό έλεγχο της παραγωγής μικροσκληρωτίων του *V. dahliae*. Έχει ήδη δημιουργηθεί μια βιβλιοθήκη αλληλουχιών έκφρασης επισήμανσης (Expressed sequence tags, EST) 1000 κλώνων *V. dahliae* από ανεπτυγμένο σε συνθήκες *in vitro* μυκήλιο κατά την φάση σχηματισμού μικροσκληρωτίων. Περίπου τα μισά από τα γονίδια εμπλέκονται στην παραγωγή ενέργειας, στον πρωτογενή μεταβολισμό και στην πρωτεϊνοσύνθεση ενώ περίπου 30 κλώνοι αντιστοιχούσαν στα 3 γονίδια που εμπλέκονται στη βιοσύνθεση μελανίνης (Neumann and Dobinson, 2003). Το γονίδιο *VDH1* που κωδικοποιεί μια υδροφοβική παίζει πάρα πολύ σημαντικό ρόλο στην ανάπτυξη των μικροσκληρωτίων καθώς η έκφραση του συμπίπτει με την έναρξη σχηματισμού μικροσκληρωτίων ενώ η απενεργοποίηση του παρεμποδίζει τον σχηματισμό τους (Klimes and Dobinson, 2003). Επίσης, μια πρωτεϊνική κινάση ενεργοποιούμενη από μιτογόνα (mitogen-activated protein kinase, MAP κινάση), η *VMK1*, φαίνεται ότι εμπλέκεται στον σχηματισμό μικροσκληρωτίων. Συγκεκριμένα, μεταλλάξεις του γονιδίου *vmk1* παράγουν σημαντικά μειωμένο αριθμό τόσο κονιδίων όσο και μικροσκληρωτίων ενώ και η παθογένεια τους ήταν αισθητά μειωμένη. Άρα η *VMK1* MAP κινάση φαίνεται πως επηρεάζει πολλές βιοχημικές διαδικασίες εντός του κυττάρου του *V. dahliae* (Rauyaree et al, 2005).

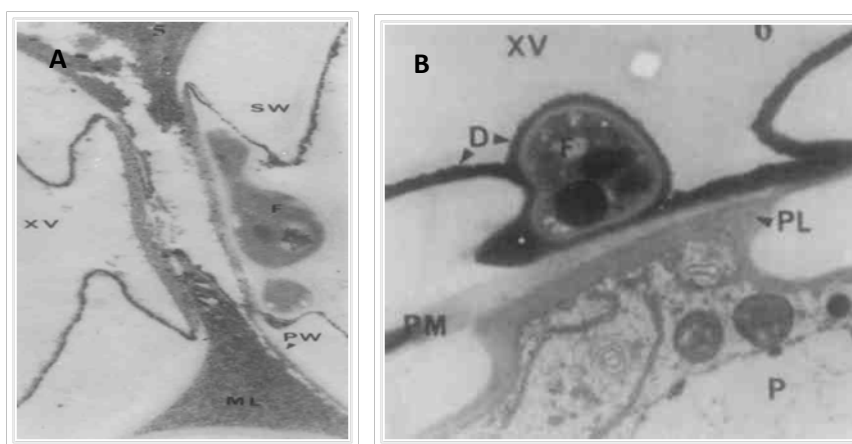
1.1.2 Μηχανισμοί παθογένειας

Ο μύκητας *V. dahliae* φαίνεται ότι έχει την ικανότητα να καταστέλλει για αρκετές ώρες την άμυνα του φυτού στα σημεία “παγίδευσης” των κονιδίων κατά τη μετακίνηση τους με το ανιόν ρεύμα. Με τον τρόπο καταφέρνει να μετακινηθεί στα συνοδά κύτταρα των αγγείων και να συνεχίζει την ανάπτυξη του (Gold and Robb, 1995). Γενικά, η μελέτη των μηχανισμών παθογένειας του *V. dahliae* αφορά ως τώρα, κυρίως, ένζυμα αποδόμησης του κυτταρικού τοιχώματος, την παραγωγή τοξινών καθώς και την ενεργοποίηση υποκινητών γονιδίων της άμυνας του ξενιστή του (Dobinson et al., 2004).

Από τα ένζυμα αποδόμησης του κυτταρικού τοιχώματος το σημαντικότερο ρόλο στην παθογένεια του μύκητα *V. dahliae* φαίνεται πως παίζουν τα πηκτινολυτικά. Αυτό κυρίως προκύπτει από παρατηρήσεις πως ο μύκητας για να μετακινηθεί στα αγγεία πρέπει να αποπολυμερίσει τις πηκτίνες μεταξύ των βοθρίων κατά μήκος των αγγείων ή στις πλάκες διατρήσεως τους. Επίσης, πρέπει να αντιμετωπίσει και τις πλούσιες σε πηκτίνες, ουσίες που εκκρίνει ο ξενιστής, για να εμποδίσει τη διασυστηματική μετακίνηση του (Εικ. 1.5) (Bishop and Cooper, 1983). Τα κυριότερα πηκτινολυτικά ένζυμα που εκκρίνουν τα είδη του γένους *Verticillium*, ανήκουν στις πολυγαλακτουρονάσες, στις πηκτινικές λυάσες και στις πηκτινεστεράσες (Huang and Mahoney, 1999). Σε αυτές τις κατηγορίες ενζύμων ανήκουν και εκείνα που προκαλούν νεκρώσεις και μαράνσεις φυτικών ιστών (Cooper and Wood, 1980). Επιπρόσθετα, φαίνεται να υπάρχει άμεση συσχέτιση μεταξύ του επιπέδου παραγωγής ενζύμων (πολυγαλακτουρονάσες, πηκτινικές λυάσες, κυτταρινάσες), διαφόρων απομονώσεων του μύκητα *V. albo-atrum* και της μολυσματικότητας τους (Carder et al., 1987). Μάλιστα, μεταλλαγμένα στελέχη του που παρήγαγαν μειωμένα επίπεδα πηκτινασών, προκάλεσαν λιγότερα συμπτώματα σε φυτά τομάτας, που εμφανίστηκαν πιο αργά, σε σχέση με τα συμπτώματα που προκάλεσε το άγριο στέλεχος. Η εγκατάσταση, ωστόσο, τόσο των μεταλλαγμένων όσο και του άγριου στελέχους του μύκητα στα αγγεία των φυτών της τομάτας δεν εμφάνισε στατιστικώς σημαντικές διαφορές. Φαίνεται λοιπόν πως οι πηκτινάσες εμπλέκονται στη μολυσματικότητα των στελεχών του μύκητα *V. albo-atrum* όχι όμως και με την παθογένεια του. Τέλος, ένα από τα μεταλλαγμένα στελέχη του μύκητα που εμφάνιζε αδυναμία παραγωγής πηκτινασών αλλά και άλλων ενζύμων αποδόμησης του κυτταρικού τοιχώματος εμφάνιζε υστέρηση τόσο στην παραγωγή συμπτωμάτων όσο και στην εγκατάσταση του μύκητα στα αγγεία των φυτών τομάτας σε σχέση με το άγριο στέλεχος. Φαίνεται λοιπόν, πως ο μύκητας χρησιμοποιεί ένα συνδυασμό ενζύμων αποδόμησης του κυτταρικού τοιχώματος, για να καταφέρει να εγκατασταθεί επιτυχώς σε κάποιον ξενιστή του (Durrands and Cooper, 1988).

Ο *V. dahliae* παράγει τοξίνες και άλλα μόρια που ενεργοποιούν την άμυνα του ξενιστή επάγοντας τον κυτταρικό θάνατο. Από διάφορες ερευνητικές εργασίες προκύπτει πως εκχυλίσματα χυμών φυτών μολυσμένων με το μύκητα *Verticillium dahliae*, περιείχαν τοξίνες του μύκητα οι οποίες φαίνεται πως είχαν την ικανότητα να ενεργοποιούν την άμυνα των φυτών στα οποία εφαρμόστηκαν, χωρίς ωστόσο να προσδιορίζεται η ακριβής τους βιοχημική σύσταση. Πιο συγκεκριμένα, ένα υψηλού μοριακού βάρους σύμπλοκο πρωτεϊνών-λιποπολυσακχαριτών (protein-lipopolysaccharide complex, PLP σύμπλοκο), απομονώθηκε από φυτό πατάτας προσβεβλημένο από τον *V. dahliae*. Το σύμπλοκο περιείχε ένα τοξικό γλυκοπεπτίδιο, του οποίου η παρουσία είναι συνδεδεμένη με την έκφραση των συμπτωμάτων της βερτσιλλίωσης (Buchner et al., 1982). Εν συνεχεία, το σύμπλοκο διεσπάτο, κάτω από μη αναγωγικές συνθήκες, με την φυτοτοξικότητα να

διατηρείται σε ένα μικρομοριακό πολυπεπτιδικό κλάσμα του αρχικού PLP συμπλόκου (Nachmias et al., 1985). Αυτό το μικρομοριακό πολυπεπτιδικό κλάσμα εμφάνιζε διαφορετική τοξικότητα στους διάφορους ξενιστές του βερτισιλλίου, ανάλογα με την εξειδίκευση της εκάστοτε απομόνωσης του μύκητα ενώ ανθεκτικά ή ανεκτικά φυτά δεν εμφάνιζαν ευαισθησία στην τοξίνη. Τέλος, η τοξίνη δεν παραγόταν από μη παθογόνες μεταλλάξεις της ίδιας απομόνωσης του μύκητα (Buchner et al., 1989).



Εικόνα 1.5: Ο μύκητας (F) παράγει ηκτηνολυτικά ένζυμα τα οποία έχουν λύσει μερικώς την μέση πλάκα (ML) (διακοπή σκούρου χρωματισμού) στο ζεύγος βοθρίων, δύο γειτονικών αγγείων του ξύλου (XV) ευαίσθητης ποικιλίας τομάτας (A). Σε ανθεκτική ποικιλία τομάτας, ενδοκυτταρικές αποθέσεις σκούρου χρώματος (D) εγκλωβίζουν το μύκητα, ενώ ένα προστατευτικό στρώμα (PL), στο εσωτερικό της μεμβράνης βοθρίου (PM), έχει αποθεθεί από το γειτονικό παρεγχυματικό κύτταρο (P), εμποδίζοντας της εξάπλωση του, (B) (Προσαρμογή από Cooper and Wood, 1980).

Παράλληλα, από πειράματα ανοσοεντόπισης προέκυψε ότι η τοξική ουσία συσσωρευόταν στα κυτταρικά τοιχώματα των ξυλωδών αγγείων βλαστών και κονδύλων των ευαίσθητων φυτών πατάτας. Από όλα τα παραπάνω προκύπτει πως ο μύκητας *V. dahliae* παράγει ένα τοξικό σύμπλοκο που είναι απαραίτητο για την παθογένεια του (Buchner et al., 1989). Αντίστοιχη εργασία πραγματοποιήθηκε και σε φυτά βαμβακιού προσβεβλημένα από τον μύκητα *V. dahliae*, από τα οποία απομονώθηκε ένα PLP σύμπλοκο 197-kDa, αποτελούμενο από 5 πρωτεϊνικά τμήματα, το οποίο επήγαγε συμπτώματα νέκρωσης και μαρασμού σε σπορόφυτα βαμβακιού, ενώ ενεργοποίησε και την *de novo* σύνθεση της αμμωνιολυάσης της φαινυλαλανίνης σε κυτταροκαλλιέργεια βαμβακιού (Meyer et al., 1994).

Αναφορές υπάρχουν επίσης και για την επαγωγή μηχανισμών άμυνας φυτών βαμβακιού και σόγιας από ενεργοποιητές που απομονώθηκαν από υγρές καλλιέργειες του μύκητα *V. dahliae* (Apostol et al., 1987; Low and Heinstejn, 1986). Εργαστηριακά πειράματα, τελικά, οδήγησαν στην απομόνωση μιας 65-kDa

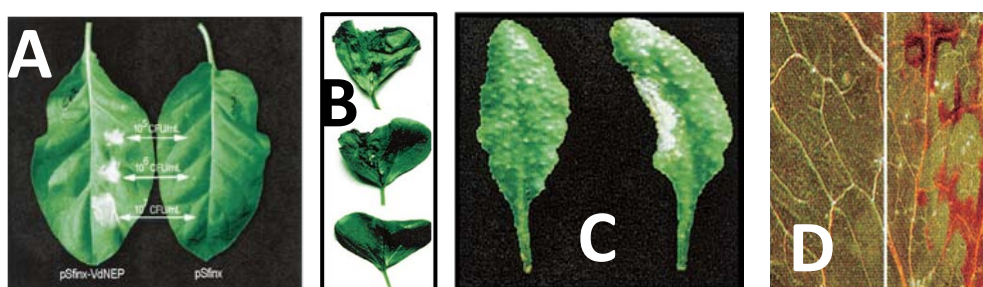
γλυκοπρωτεΐνης, της οποίας το μοριακού βάρους 53-kDa απογλυκοζυλιωμένο τμήμα της ήταν υπεύθυνο για την παραγωγή φυτοαλεξινών σε κυτταροκαλιέργεια βαμβακιού. (Davis et al. 1998).

Φαίνεται λοιπόν, πως ο μύκητας *V. dahliae* χρησιμοποιεί ένα μεγάλο εύρος φυτοτοξινών και ενεργοποιητών των γονιδίων άμυνας του φυτού που εμπλέκονται στους μηχανισμούς παθογένειας του. Για παράδειγμα, μερικώς καθαρά δείγματα τοξινών του μύκητα επήγαγαν το σχηματισμό χλωρώσεων και νεκρώσεων σε φύλλα ευαίσθητων ποικιλιών πατάτας και τομάτας (Mansoori et al., 1995). Επίσης, ακατέργαστα εκχυλίσματα που περιείχαν τοξίνες του μύκητα επέδρασαν στη λειτουργία των καναλιών ιόντων (H^+ -ATPάση) κυτταρικών μεμβρανών φύλλων βαμβακιού, με αποτέλεσμα την απώλεια πρωτονίων, τον απομαγνητισμό της μεμβράνης και τελικά το θάνατο του κυττάρου. Αυτή η επίδραση της τοξίνης στο κύτταρο, πιθανώς να είναι και η αιτία των περισσότερων συμπτωμάτων του *V. dahliae* συμπεριλαμβανομένου και του συνδρόμου του βραδέως μαρασμού και όχι αυτή καθ' αυτή η απόφραξη των αγγείων (Meyer et al., 1994). Το ίδιο πιθανότατα συμβαίνει και στην περίπτωση του νανισμού των ριζών της πατάτας, όπως παρατηρήθηκε σε πειράματα ριζών χωρίς την παρουσία του παθογόνου (Buchner et al., 1989). Ωστόσο, το σύμπτωμα του νανισμού των ριζών στις ασθένειες που προκαλεί το βερτισίλλιο θα μπορούσε να αποδοθεί και στον μειωμένο ρυθμό φωτοσύνθεσης των φυτών λόγω μείωσης των εισροών CO_2 , από το κλείσιμο των στοματίων, λόγω της έλλειψης νερού στους ιστούς τους (Flexas and Medrano, 2002).

Από την άλλη πλευρά, η αδυναμία προσδιορισμού συγκεκριμένων χημικών ουσιών, που παράγονται από το βερτισίλλιο, με συγκεκριμένο τοξικό μηχανισμό δράσης σε κυτταρικό ή υποκυτταρικό επίπεδο, δεν μπορεί να δώσει μια σαφή εικόνα για τον ακριβή ρόλο των τοξινών στην παθογένεια του μύκητα. Επίσης, η δυσκολία κατανόησης του ακριβούς λόγου αλλά και ρόλου της απόφραξης των αγγείων του ξενιστή από τον μύκητα *V. dahliae*, δεν μπορεί να δώσει μια ξεκάθαρη εικόνα για το αν το σύνδρομο του βραδέως μαρασμού για παράδειγμα, έχει σαν πρωτογενές αίτιο την απόφραξη των αγγείων του φυτού αλλά και για το αν η απόφραξη αυτή καθ' αυτή προκαλείται από την επέλαση του μύκητα ή από την ενεργοποίηση των μηχανισμών άμυνας του φυτού (van Alfen, 1989).

Σχετικά πρόσφατα έχει ξεκινήσει και η έρευνα γύρω από μια νέα οικογένεια πρωτεϊνών, των NLPs (Nep1-like proteins), που λειτουργούν ως ενεργοποιητές των γονιδίων άμυνας του φυτού. Αυτές έχουν απομονωθεί από διάφορους μύκητες, ωομύκητες και βακτήρια συμπεριλαμβανομένου και του *V. dahliae*. Μία από τις NLP πρωτεΐνες του *V. dahliae* που χαρακτηρίστηκε και κλωνοποιήθηκε είναι η VdNep (Verticillium dahliae Necrosis and ethylene inducing peptide), μια πρωτεΐνη 233 αμινοξέων που εκφράζεται γενικά σε χαμηλό επίπεδο στον μύκητα. Σε φυτά μη

ξενιστές του μύκητα η εισαγωγή της προκάλεσε συμπτώματα νέκρωσης ενώ σε φυτά ξενιστές του μύκητα μάρανση. Επίσης, σε κυτταροκαλιέργεια βαμβακιού ενεργοποίησε την παραγωγή φυτοαλεξινών σε χαμηλές συγκεντρώσεις της, ενώ σε υψηλές οδήγησε στην εκδήλωση της αντίδρασης υπερευαισθησίας (Εικόνα 1.6). Συνεπώς, η VdNep φαίνεται να παίζει ρόλο στην ενεργοποίηση του εγγενούς ανοσοποιητικού συστήματος στο βαμβάκι (Wang *et al.*, 2004a). Ωστόσο, είναι απαραίτητο να αποδειχθεί το κατά πόσον εκφράζεται η πρωτεΐνη αυτή σε συνθήκες *in planta* και το κατά πόσον εμπλέκεται στην παθογένεια του μύκητα *V. dahliae*, όπως και για όλες τις NLPs (Pemberton and Salmond, 2004).



Εικόνα 1.6: Επαγωγή νεκρωτικών κηλίδων σε φύλλα *Nicotiana benthamiana* μετά από εφαρμογή μετασχηματισμένου στελέχους του *Agrobacterium tumefaciens* που έφερε το γονίδιο *VdNEP*, (A). Εφαρμογή της πρωτεΐνης VdNEP (ως πρωτεΐνη σύντηξης με ουρά καταλοίπων ιστιδίνης, His-Tag VdNEP) σε κοτυληδόνες βαμβακιού προκάλεσε συμπτώματα μάρανσης, (B). Επαγωγή νεκρωτικών κηλίδων 48h μετά την εφαρμογή της His-VdNEP, (C) και παραγωγή ενεργών ριζών οξυγόνου 6h μετά την εφαρμογή της His-VdNEP, (D), σε φύλλα *Arabidopsis thaliana*.

1.1.3 Οι πρωτεΐνες NLP και ο πιθανός ρόλος τους στην παθογένεια

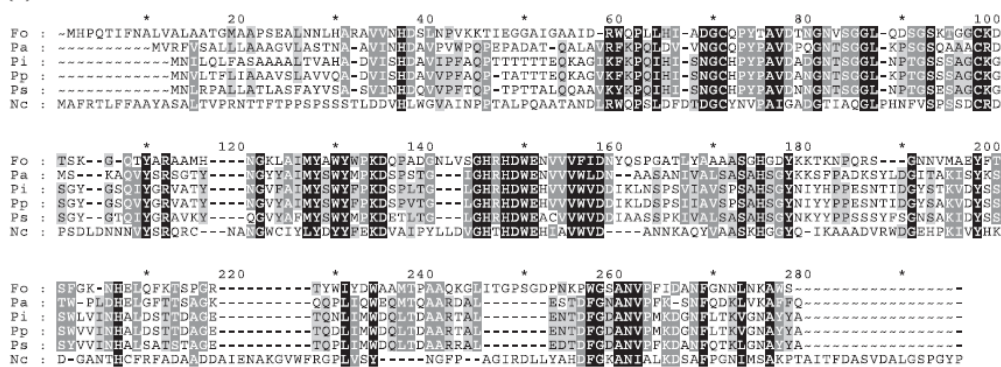
Οι πρωτεΐνες NLP εμφανίζουν έντονα συντηρημένες περιοχές στις αλληλουχίες τους σε διαφορετικούς οργανισμούς (Εικόνα 1.7). Συγκεκριμένα, πανομοιότυπες περιοχές ωμοκυκίων, μυκήτων και βακτηρίων στις NLP αλληλουχίες όπως κατάλοιπα κυστεΐνης με N-τελικό άκρο, φαίνεται να εμπλέκονται στην ενεργοποίηση γονιδίων άμυνας των φυτών που προσβάλλουν (Fellbrich *et al.*, 2002). Επίσης, συντηρημένα μοτίφ (GHRHDWE) της κεντρικής περιοχής των NLP που ωστόσο δεν εντοπίζονται σε κάποια γνωστής λειτουργίας πρωτεΐνη, εμφανίζονται σε όλους τους οργανισμούς με τέτοιες πρωτεΐνες, πλην του μύκητα *Neurospora crassa* (Pemberton and Salmond, 2004).

Πολύ λίγα είναι γνωστά ωστόσο για την έκφραση των NLP πρωτεϊνών υπό συνθήκες *in vivo* καθώς και ο ρόλος τους στην παθογένεια των οργανισμών που εντοπίζονται παραμένει αβέβαιος. Συγκεκριμένα, μια NLP πρωτεΐνη του μύκητα *Phytophthora sojae*, η PsojNIP, ξεκινά να μεταγράφεται από το σημείο που ο

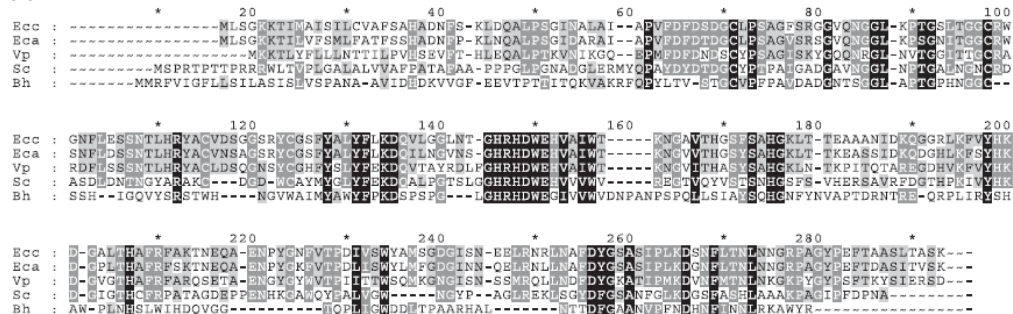
μύκητας μεταπηδά από βιοτροφισμό στο νεκροτροφισμό, σε φυτά σόγιας. Αυτό σημαίνει πως η πρωτεΐνη PsojNIP εμπλέκεται στην παθογένεια του *P. sojae* στη σόγια, είτε άμεσα είτε ως ενεργοποιητής της άμυνας του φυτού, μέσω της αλλαγής των διατροφικών προτιμήσεων του.

Η ύπαρξη δύο ακόμα γονιδίων που εκφράζονται πριν από το *PsojNIP* και τα οποία κωδικοποιούν πρωτεΐνες NLP που δεν εκφράζονται στη σόγια, καταδεικνύει πως διαφορετικές NLP μπορούν να χρησιμοποιούνται από τον μύκητα *P. sojae*, σε διαφορετικά περιβάλλοντα και ίσως σε διαφορετικούς ξενιστές (Qutob et al., 2002).

(a)



(b)



Εικόνα 1.7: Στοιχίση ακολουθιών NLP πρωτεϊνών με CLUSTALW (www.ebi.ac.uk). Έντονα συντηρημένες περιοχές (μαύρο), 80–99% συντηρημένες περιοχές (γκρι σκούρο), 60–79% συντηρημένες περιοχές (γκρι ανοιχτό) αλληλουχιών NLP:

(a) μυκήτων και ωομυκήτων, *Fusarium oxysporum* (Fo), *Pythium aphanidermatum* (Pa), *Phytophthora infestans* (Pi), *Phytophthora parasitica* (Pa), *Phytophthora sojae* (Ps), *Neurospora crassa* (Nc)

(b) βακτηρίων *Bacillus halodurans* (Bh), *Streptomyces coelicolor* (Sc), *Erwinia carotovora* sub. *carotovora* (Ecc), *Erwinia carotovora* sub. *atroseptica* (Eca) and *Vibrio pommerensis* sp. CH-291 (V).

Αντίθετα, στην περίπτωση μιας NPL πρωτεΐνης του *Fusarium oxysporum* η απενεργοποίηση του αντίστοιχου γονιδίου δεν είχε καμία επίδραση στην παθογένεια του μύκητα, στο φυτό *Erythroxylon coca*. Επίσης, ούτε στελέχη του μύκητα που υπερέκφραζαν την ίδια πρωτεΐνη εμφάνισαν κάποια αλλαγή στην

παθογένεια τους στο ίδιο φυτό σε συνθήκες *in vivo*, ενώ η πρωτεΐνη δεν ήταν δυνατό να ανιχνευτεί στα αγγεία του φυτού. Η αδυναμία ανίχνευσης της πρωτεΐνης στα αγγεία του ξύλου αποδόθηκε σε ελλείψεις θρεπτικών στοιχείων στο χυμό των αγγείων που καθιστά απαγορευτική την παραγωγή της NLP πρωτεΐνης (Bailey et al., 2002).

Συνεπώς, οι NLP πρωτεΐνες, όταν εκφράζονται εντός του φυτού, πιστεύεται ότι ενεργοποιούν την άμυνα των ξενιστών, για την παρουσία φυτοπαθογόνων οργανισμών, παρεμποδίζοντας την εξέλιξη της ασθένειας. Ωστόσο, η επαγωγή της αντίδρασης υπερευαισθησίας (Hypersensitivity Response, HR) μπορεί να χρησιμοποιηθεί επωφελώς και για το παθογόνο, όπως συμβαίνει στην περίπτωση μη συμβατής αλληλεπίδρασης νεκροτροφικού παθογόνου - ξενιστή. Σε τέτοιες αλληλεπιδράσεις, πιστεύεται ότι το νεκροτροφικό παθογόνο επάγει την HR για να απελευθερώσει θρεπτικά στοιχεία από τα κύτταρα του ξενιστή, που θα χρησιμοποιηθούν από τον αναπτυσσόμενο πληθυσμό του ενώ ταυτόχρονα θωρακίζεται από την άμυνα του ξενιστή μετατρέποντας την αλληλεπίδραση σε συμβατή (Mayer et al., 2001). Η παρεμπόδιση της επαγωγής της HR σε διαγονιδιακά φυτά καπνού που εξέφραζαν αναστολείς της απόπτωσης, ήταν ανθεκτικά σε μόλυνση από νεκροτροφικά παθογόνα. Φαίνεται λοιπόν, πως τα νεκροτροφικά παθογόνα επάγουν την HR για να επιτύχουν να μολύνουν τους ξενιστές τους (Dickman et al., 2001).

Οι νεκρώσεις που προκαλούνται από τις NLP πρωτεΐνες, εξαρτώνται σε υψηλό βαθμό από την δομή τους. Θέρμανση της NPP1, της NLP πρωτεΐνης του μύκητα *Phytophthora infestans*, για 15' στους 65 °C μειώνει τη δραστηριότητα της κατά 92% (Fellbrich et al., 2002). Ημιτελείς NLP πρωτεΐνες του μύκητα *Pythium arhanidermatum*, όταν εκφράστηκαν στο *Escherichia coli* δεν ενεργοποίησαν την άμυνα κυττάρων καρότου σε συνθήκες *in vitro* (Veit et al., 2001). Επίσης, τόσο ημιτελείς NPP1 όσο και συνθετική NPP1, δεν ενεργοποίησαν την άμυνα πρωτοπλάστων καπνού (*Nicotiana tabacum*) και μαϊντανού (*Petroselinum crispum*) σε αντίθεση με το λειτουργικό NPP1, που επήγαγε την HR και την παραγωγή φυτοαλεξινών (Fellbrich et al., 2002). Οι NLP πρωτεΐνες, φαίνεται λοιπόν πως είναι ιδιαίτερα ευαίσθητες σε αλλαγές της αλληλουχίας τους και πως η επαγωγή της HR εξαρτάται από την αλληλεπίδραση τους με άλλα μόρια του παθογόνου ή του ξενιστή.

Υπάρχουν δεδομένα που δείχνουν πως υποδοχείς του ξενιστή που ενδεχομένως απαντώνται στην επιφάνεια των φυτικών κυττάρων, αλληλεπιδρούν με τις NLP πρωτεΐνες, για να επάγουν την HR. Τα συμπτώματα της νέκρωσης όπως εμφανίζονται στα φύλλα των φυτών, ακολουθούν την πορεία των αγγείων των φύλλων του ξενιστή, πιθανολογώντας την μετακίνηση των ίδιων των NLP πρωτεϊνών ή μιας σηματοδοτικής πρωτεΐνης που θα έχει την ικανότητα να μετακινείται εντός

του αγγειακού συστήματος του φυτού (Jennings et al., 2000). Ο υδρόφιλος ωστόσο, χαρακτήρας των NLP πρωτεϊνών καθιστά δύσκολη την ελεύθερη μετακίνηση τους μέσα από τις μεμβράνες των φυτικών κυττάρων. Μόνο όταν κατανοηθούν η ακριβής θέση δράσης και ο ρόλος των NLP πρωτεϊνών σε συνθήκες *in planta*, θα αποσαφηνιστεί και ο ρόλος τους στην παθογένεια των φυτικών οργανισμών.

Η παρουσία NLP πρωτεϊνών σε μη φυτοπαθογόνους οργανισμούς μειώνει την πιθανότητα οι πρωτεΐνες αυτές να εμπλέκονται αποκλειστικά στην παθογένεια τους. Πιθανότατα να εμπλέκονται στην παθογένεια των βιοτροφικών παθογόνων ενώ συμμετέχουν και σε άλλες φυσιολογικές λειτουργίες νεκροτροφικών παθογόνων (Pemberton and Salmond, 2004).

1.1.4 Φυσιολογία των αμυντικών μηχανισμών που επάγει ο μύκητας *Verticillium dahliae*

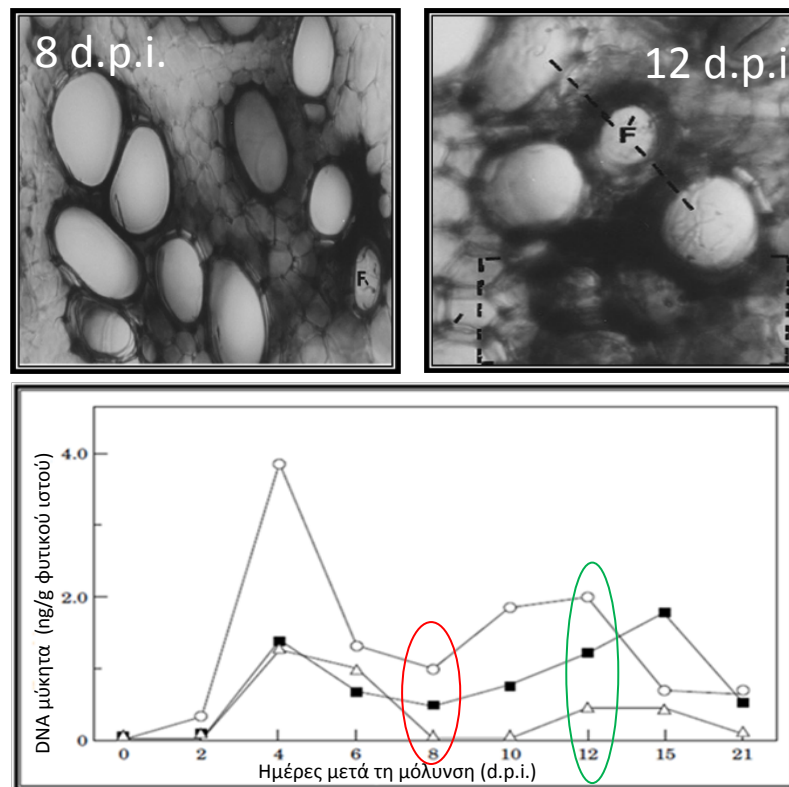
Η ανοχή, ως αποτέλεσμα του μηχανισμού άμυνας των φυτών, έχει συχνά χρησιμοποιηθεί για να περιγράψει την αλληλεπίδραση ξενιστή-παθογόνου, στις προσβολές από τον μύκητα *V. dahliae*. Άλλοτε όμως, ως ανοχή περιεγράφη η εικόνα ενός ασυμπτωματικού ξενιστή και άλλοτε αυτή της μερικής ανθεκτικότητας. Επίσης, ενώ είναι σαφές πως η ανοχή περιγράφει ένα ποσοτικό φαινόμενο που συσχετίζει την ανάπτυξη του παθογόνου με τα συμπτώματα και την παραγωγή των φυτών, δεν είναι εξίσου σαφής η μέθοδος που θα χρησιμοποιηθεί επαναληπτικά για να την προσδιορίσει στις αδρομυκώσεις (Chen et al., 2004).

Η σύγκριση συμβατών και μη συμβατών αλληλεπιδράσεων τομάτας-βερτισιλλίου δείχνει πως η ανοχή αποτελεί πιθανά περίπτωση μερικής ανθεκτικότητας. Ο αμυντικός μηχανισμός περιορισμού του μύκητα στα αγγεία του φυτού λειτουργεί παρόμοια τόσο στα ανεκτικά όσο και στα ανθεκτικά φυτά. Η εξάλειψη ωστόσο του παθογόνου που παρατηρείται κατά τη συμβατή αλληλεπίδραση αργεί να συμβεί ή δεν συμβαίνει καθόλου κατά τη μη συμβατή αλληλεπίδραση (Chen et al., 2004).

Γενικά, οι μηχανισμοί άμυνας των φυτών έναντι του *V. dahliae* έχουν μελετηθεί κυρίως στην τομάτα και το βαμβάκι και βοηθούν σημαντικά στον περιορισμό ή την εξάλειψη του παθογόνου είτε σε προαγγειακό είτε σε αγγειακό επίπεδο. Συχνά, η ανάπτυξη του μύκητα περιορίζεται μεσοκυτταρικά ή ενδοκυτταρικά στον φλοιό της ρίζας, λόγω της εναπόθεσης σουβερίνης στην ενδοδερμίδα, την οποία αδυνατεί να διατρύψει και τελικά επηρεάζει ελάχιστα την ανάπτυξη των φυτών (Huisman, 1998). Επιπρόσθετα, με την εναπόθεση λιγνίνης, στα κύτταρα της επιδερμίδας και του φλοιού της ρίζας, αλλά και γύρω από τις υφές διατρήσεως του βερτισιλλίου, σχηματίζονται οι λεγόμενες θηλές (papillae) που παγιδεύουν το μύκητα και εμποδίζουν την εξάπλωση του. Σε αυτό το στάδιο της μόλυνσης ο ξενιστής παράγει

διάφορες τοξικές ουσίες για το μύκητα όπως φυτοαλεξίνες, ως αντίδραση στην ανάπτυξη του παθογόνου. Ο περιορισμός συνεπώς του παθογόνου σε προαγγειακό επίπεδο στην εξέλιξη της ασθένειας, οδηγεί στην ελαχιστοποίηση των συμπτωμάτων και στην κανονική ανάπτυξη του ξενιστή (Daayf et al., 1997).

Στην περίπτωση που το παθογόνο ξεπεράσει τον πρώτο αυτό μηχανισμό άμυνας του φυτού και φτάσει στα αγγεία του ξύλου, τότε η ασθένεια περνά στην δεύτερη της φάση, την καλούμενη αγγειακή. Κατά την φάση αυτή όπως ανεφέρθη παραπάνω, η εγκατάσταση του παθογόνου της αδρομύκωσης ολοκληρώνεται σε κύκλους κυριαρχίας του, έναντι της άμυνας του παθογόνου και αντιστρόφως (Εικ. 1.8) (Heinz et al., 1998).



Εικόνα 1.8: Η γραφική παράσταση απεικονίζει την εγκατάσταση του μύκητα *V.albo-atrum* (ως ποσό DNA του μύκητα ανά γραμμάριο φυτικού ιστού) στους ιστούς φυτών τομάτας, 0 - 21 ημέρες μετά τη μόλυνση τους από εδάφους, με κονίδια του μύκητα, όπως προσδιορίστηκε με αυτοραδιογραφία. Επίσης, απεικονίζονται δύο εγκάρσιες τομές στελέχους τομάτας κάτω από το 4^ο γόνατο, όπως παρατηρήθηκαν σε οπτικό μικροσκόπιο (ca x300) 8 (αριστερά) και 12 (δεξιά) ημέρες μετά τη μόλυνση (d.p.i.) με τον μύκητα *V.albo-atrum*. 8 d.p.i. μόνο ένα αγγείο εμφανίζεται προσβεβλημένο με τον μύκητα (F), κάτι που απεικονίζεται και στο ποσό του DNA του μύκητα που ανιχνεύτηκε με την αυτοραδιογραφία (κόκκινος κύκλος) ενώ 12 d.p.i. περισσότερα αγγεία εμφανίζονται μολυσμένα (F), κάτι που επίσης απεικονίζεται στο ποσό του DNA του μύκητα που ανιχνεύτηκε με την αυτοραδιογραφία (πράσινος κύκλος) (Προσαρμογή από Heinz et al., 1998).

Σε ένα ανθεκτικό φυτό ο μύκητας εγκλωβίζεται εντός των αγγείων ως αποτέλεσμα της δράσης του φυτού, ενώ σε ένα ευαίσθητο εγκαθίσταται στα αγγεία και προχωρά στα συνοδά τους κύτταρα εξελίσσοντας την ασθένεια. Η οριζόντια μετακίνηση των υφών του μύκητα παρεμποδίζεται με την αποφέλλωση των κυττάρων των αγγείων και την ταυτόχρονη απόφραξη τους με κόμμεα, ζελατίνες, ρητίνες ως εκκρίσεις του παραγγειακού παρεγχύματος, καθώς και με τυλώσεις (Benhamou, 1995).

Η επίδραση της απόφραξης των αγγείων στην επέλαση του βερτισιλλίου εξαρτάται από τον βαθμό που ο μύκητας έχει εγκατασταθεί στα αγγεία του φυτού. Αν δηλαδή συμβεί πριν ο μύκητας σχηματίσει κονίδια, τότε η έγκαιρη απόφραξη των προσβεβλημένων αγγείων οδηγεί σε ανθεκτικότητα του φυτού έναντι του μύκητα. Αν όμως συμβεί ταχεία εγκατάσταση του μύκητα σε μεγάλο αριθμό αγγείων που δεν μπορούν να αντικατασταθούν με νέα λειτουργικά τότε το φυτό καταρρέει (Talboys, 1972). Φαίνεται επίσης πως και η αύξηση του μεγέθους των αγγείων επηρεάζει αρνητικά την ταχύτητα εξάπλωσης του μύκητα (van Alfen, 1989).

Τα μολυσμένα φυτά, μετά την ενεργοποίηση του αμυντικού τους μηχανισμού συσσωρεύουν στα κύτταρα τους αντιμικροβιακές ουσίες όπως φυτοαλεξίνες, φαινολικά συστατικά, πρωτεΐνες (χιτινάσες, γλουκανάσες) που σχετίζονται με την παθογένεια (Pathogenesis-related proteins, PR πρωτεΐνες) (Talboys, 1972; Benhamou, 1995; Gold and Robb, 1995; Daayf et al., 1997; Williams et al., 2002). Οι αντιμικροβιακές αυτές ουσίες παράγονται τόσο στα ανθεκτικά όσο και στα ευαίσθητα φυτά, με τα δεύτερα να εμφανίζουν χαμηλότερο ρυθμό συσσώρευσής τους στα κύτταρά τους. Το ίδιο φαίνεται να συμβαίνει και με την σύνθεση λιγνίνης και σουβερίνης στα ενεργοποιημένα κύτταρα λόγω της δράσης του ενζύμου αμμωνιακής λυάσης της φαινυλαλανίνης (Phenylalanine ammonia-lyase, PAL) (Hahlbrock and Scheel, 1989). Ο συνδυασμός φυσικών και χημικών αμυντικών μηχανισμών αποτελεί μια καλή προσέγγιση για το πώς αντιμετωπίζουν τα φυτά μια εισβολή από τον μύκητα *V. dahliae*. Αρχικά, δηλαδή ο μύκητας παγιδεύεται εντός των αγγείων από την δράση των φυσικών αμυντικών μηχανισμών και στη συνέχεια με την παραγωγή αντιμικροβιακών ουσιών καταστρέφονται οι υφές του. Μάλιστα, είναι χαρακτηριστική η περίπτωση συσσώρευσης στοιχειακού S στα παρατραχειακά παρεγχυματικά κύτταρα, στα τοιχώματα των αγγείων στα κόμμεα και στις ζελατινώδεις ουσίες απόφραξης τους. Το S φαίνεται να λειτουργεί ως φυτοαλεξίνη ενάντια στον *V. dahliae*, προστατεύοντας τα ανθεκτικά φυτά τομάτας (Williams et al., 2002). Συσσώρευση δευτερογενών μεταβολικών, λιπόφιλων στοιχείων, παρατηρήθηκε και στα τοιχώματα, προσβεβλημένων με τον μύκητα *V. albo-atrum*, αγγείων, φυτών μελιτζάνας (Benhamou, 1995). Με την απομόνωση και την καταστροφή του παθογόνου από την άμυνα του φυτού αποτρέπεται η περαιτέρω εξάπλωση του μύκητα και η διασυστηματική προσβολή του φυτού η οποία χαρακτηρίζει τους μύκητες που προκαλούν αδρομυκώσεις (Cooper, 2000).

Σε μια συμβατή αλληλεπίδραση ξενιστή-παθογόνου ο *V. dahliae* φαίνεται πως μπορεί να καταστείλει την άμυνα του φυτού και να παρεμποδίσει την εναπόθεση σουβερίνης επί των αγγείων του ξύλου, διευκολύνοντας έτσι την οριζόντια εξάπλωση του και την καλύτερη εγκατάσταση του στα αγγεία του λαϊμού των φυτών. Ο περιορισμένος ρυθμός εναπόθεσης σουβερίνης επί των αγγείων συχνά δίνει την δυνατότητα στο παθογόνο να λύσει τα τοιχώματα τους, έστω κι αν αυτή έχει προχωρήσει σε κάποιο βαθμό (Gold and Robb, 1995). Υπάρχουν δεδομένα που δείχνουν πως ο μύκητας έχει τη δυνατότητα να καταστέλλει την έκφραση συγκεκριμένων γονιδίων στα ευαίσθητα φυτά και να τροποποιεί την έκφραση αντίστοιχων γονιδίων στα ανθεκτικά, σε κάποιο μετα-μεταγραφικό επίπεδο (π.χ. παρεμπόδιση της περαιτέρω σύνθεσης πρωτεϊνών από ήδη μεταγραμμένα μόρια mRNA) (Lee et al., 1992).

Πολλά φυτά έχουν βρεθεί να παράγουν ενδοπολυγαλακτουρονασικές ανασταλτικές γλυκοπρωτεΐνες (Polygalacturonase-inhibiting proteins, PGIP πρωτεΐνες), εξωκυτταρικές φυτικές πρωτεΐνες που έχουν την ικανότητα να αναστέλλουν τη δράση των ενδοπολυγαλακτουρασών (Polygalacturonase, PGs) των μυκήτων. Οι PGs των μυκήτων είναι ενζυμα που χρησιμοποιούνται στη λύση των κυτταρικών τοιχωμάτων και στην αύξηση της διαπερατότητας των φυτικών ιστών. Η δράση τους επί των τοιχωμάτων απελευθερώνει ολιγογαλακτουρονίδια (Oligogalacturonides, OGs) τα οποία λειτουργούν ως ενεργοποιητές γονιδίων της άμυνας των φυτών. Για να λειτουργήσουν βέβαια ως ενεργοποιητές τα OGs πρέπει να προκύψουν από την δράση PGs, που η δράση τους ελέγχεται από PGIP πρωτεΐνες. Οι πρωτεΐνες αυτές που εδράζονται στα κυτταρικά τοιχώματα λειτουργούν τόσο ως παρεμποδιστές όσο και ως ρυθμιστικοί παράγοντες της παραγωγής των PGs, ευνοώντας την παραγωγή των OGs. Συνεπώς οι PGs είναι ένζυμα που εμπλέκονται στην παθογένεια και οι PGIP πρωτεΐνες αποτελούν μια αποτελεσματική στρατηγική στην άμυνα των φυτών. Αρκετά είναι τα παραδείγματα αύξησης της ανθεκτικότητας του ξενιστή έναντι μυκήτων από την δράση PGIP πρωτεϊνών (De Lorenzo et al., 2001). Για τον *V. dahliae*, ενώ PGIP πρωτεΐνες από την μηλιά παρεμπόδισαν τη δράση πολυγαλακτουρορασών του μύκητα σε θρεπτικό διάλυμα πηκτινών, ωστόσο ετερόλογη έκφραση των γονιδίων τους σε διαγονιδιακά φυτά πατάτας σε υψηλά επίπεδα, δεν κατάφερε να αυξήσει την ανθεκτικότητά τους, σε συνθήκες *in vivo*, απέναντι στον μύκητα (Gazendam et al., 2004).

Η πρωτεϊνική κινάση SNF (Sucrose nonfermenting protein kinase) που καταστέλλει το μεταβολισμό της σακχαρόζης σε πολλούς οργανισμούς, στους μύκητες καθορίζει επίσης και την ενεργοποίηση ενζύμων που αποδομούν το κυτταρικό τοίχωμα των φυτών - ξενιστών τους. Η απενεργοποίηση του γονιδίου *SNF1* στη φυλή 1 της τομάτας, του μύκητα *V. dahliae*, είχε ως αποτέλεσμα, τα μεταλλαγμένα στελέχη να μην επάγουν την παραγωγή ενζύμων αποδόμησης του κυτταρικού τοιχώματος, όταν καλλιεργήθηκαν σε θρεπτικό διάλυμα που περιείχε

πηκτίνη, σε σχέση με τα αντίστοιχα άγρια. Επίσης, όταν τα μεταλλαγμένα αυτά στελέχη καλλιεργήθηκαν σε θρεπτικό διάλυμα προσομοίωσης του χυμού των αγγείων του ξύλου, επήγαγαν την παραγωγή ενζύμων αποδόμησης του κυτταρικού τοιχώματος σε μικρότερο βαθμό από τα αντίστοιχα άγρια στελέχη. Φαίνεται λοιπόν πως το γονίδιο SNF1 εμπλέκεται στην παθογένεια του μύκητα *V. dahliae* (Tzima et al., 2010).

1.1.5 Σηματοδοτικοί μηχανισμοί της άμυνας των φυτών στην προσβολή από τον μύκητα *Verticillium dahliae*

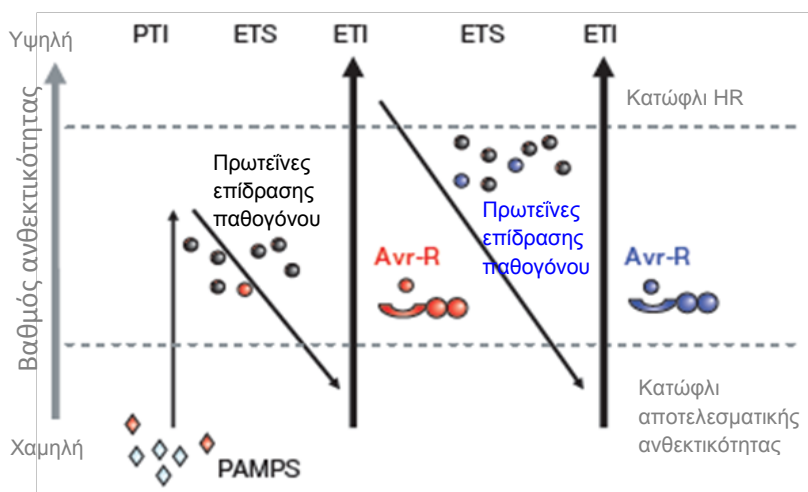
Η αναγνώριση ενός παθογόνου από την άμυνα του φυτού (Εικ. 1.9) ενεργοποιεί ένα ή περισσότερα μονοπάτια σηματοδότησης του αμυντικού συστήματος των φυτών (Εικ. 1.10). Τα μονοπάτια αυτά μέσω μορίων όπως το σαλικυλικό οξύ (Salicylic acid, SA), το ιασμονικό οξύ (jasminoate acid, JA), το αιθυλένιο, η συστεμίνη κ.α., πρωτεϊνικές κινάσες (MAP κινάσες κυρίως), κανάλια ιόντων (Ca^{+2}) και/ή δευτερογενείς μεταφορείς (διάκυκλογλυκερόλη) ενεργοποιούν τα γονίδια της φυτικής άμυνας που κωδικοποιούν αντιμικροβιακές πρωτεΐνες (Rivas and Thomas, 2005).

Αναφέρθηκε ήδη πως τα ανθεκτικά φυτά στην προσβολή από παθογόνα εκφράζουν σε υψηλό βαθμό το ένζυμο PAL. Το ένζυμο αυτό δεν είναι μόνο υπεύθυνο για την σύνθεση σουβερίνης και λιγνίνης αλλά εμπλέκεται ενεργά και στη σύνθεση του SA και στην ενεργοποίηση της επίκτητης διασυστηματικής αντοχής (Systemic acquired resistance, SAR) στα προσβεβλημένα φυτά (Mauch-Mani and Slusarenco, 1996).

Το σηματοδοτικό μόριο SA, επίσης, έχει αναγνωριστεί ως απαραίτητο για την ενεργοποίηση της SAR στα προσβεβλημένα φυτά, καθώς συσσωρευόμενο στους προσβεβλημένους ιστούς έχει συνδεθεί τόσο με την αυξημένη ανθεκτικότητα των φυτών όσο και με την επαγωγή γονιδίων δεικτών της SAR, περιλαμβανομένων και των γονιδίων παθογένειας (pathogenesis-related genes, PR γονίδια) PR-1, PR-2 και PR-5, που κωδικοποιούν αντιμικροβιακές πρωτεΐνες (Thomma et al., 2001).

Ωστόσο, δεν παρατηρήθηκε αυξημένη ανθεκτικότητα ή ανεκτικότητα στον μύκητα *V. dahliae* σε γονότυπους *Arabidopsis thaliana* σε διάφορα επίπεδα σηματοδότησης με το SA σε σχέση με τους άγριους γονότυπους (Veronese et al., 2003). Τέλος, το SA παίζει πάρα πολύ σημαντικό ρόλο στην ανθεκτικότητα κυτταροκαλιέργειας βαμβακιού στην τοξίνη του *V. dahliae*, αυξάνοντας την έκφραση του γονιδίου της β-1,3-γλουκανάσης (β-1,3-glucanase) αφενός και αφετέρου διατηρώντας την λειτουργικότητα και τη συνοχή των κυτταρικών τοιχωμάτων και μεμβρανών (Zhen and Li, 2004).

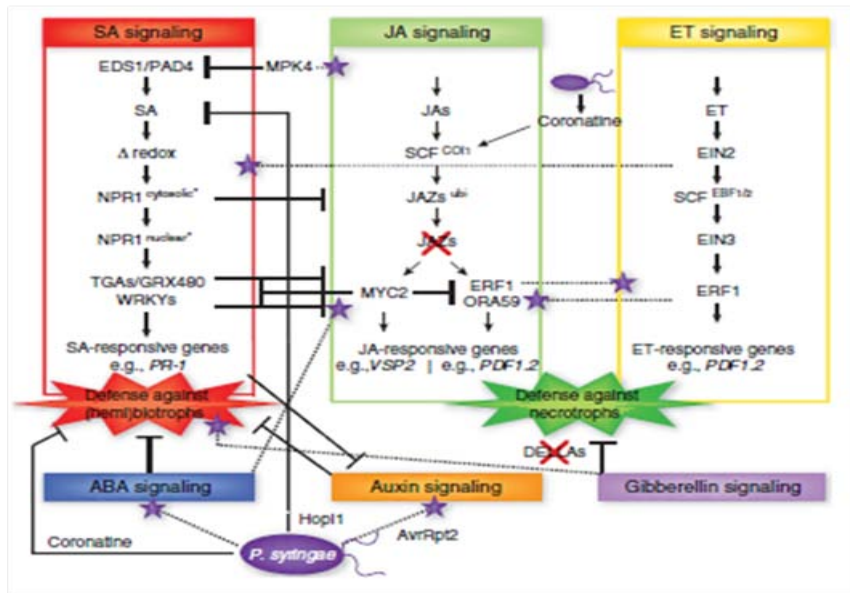
Η παραγωγή αιθυλενίου αυξάνει με γρήγορους ρυθμούς σε μολυσμένα φυτά με τον μύκητα *V. dahliae*. Παρόλο, που ο ακριβής του ρόλος στην εμφάνιση ανθεκτικότητας, γενικά, δεν είναι απόλυτα ξεκάθαρος, φαίνεται πως εμπλέκεται στην ανθεκτικότητα ενάντια σε συγκεκριμένες κλάσεις παθογόνων. Επίσης, φαίνεται ότι ελέγχει και την παραγωγή συμπτωμάτων σε πολλές αλληλεπιδράσεις παθογόνου-ξενιστή (Hoffman et al., 1999).



Εικόνα 1.9: Το ζιγκ-ζαγκ μοντέλο περιγράφει το ποσοτικό αποτέλεσμα της ανθεκτικότητας από τη δράση του αμυντικού συστήματος του φυτού. Στην πρώτη φάση, τα φυτά αναγνωρίζουν διεγέρτες του παθογόνου που ονομάζονται PAMPs (Pathogen associated molecular patterns) οι οποίοι προσδένονται σε διαμεμβρανικούς υποδοχείς της κυτταρικής μεμβράνης του φυτού (Pattern recognition receptors, PRR) και ενεργοποιούν την βασική άμυνα του φυτού (PAMP-triggered immunity, PTI). Στη δεύτερη φάση, τα παθογόνα μέσω πρωτεϊνών επίδρασης (effectors) καταστέλλουν την PTI, υπερνικώντας την φυτική άμυνα, με αποτέλεσμα την ευαισθησία του ξενιστή (Effector-triggered susceptibility). Στην τρίτη φάση, η αναγνώριση μιας πρωτεΐνης επίδρασης (κόκκινη σφαίρα) από τις διαμεμβρανικές NB-LRR πρωτεΐνες, ενεργοποιεί την ETI (Effector-triggered immunity), μια ισχυροποιημένη αμυντική λειτουργία που μπορεί να οδηγήσει στην HR στο σημείο της προσβολής. Στην τέταρτη φάση, με φυσική επιλογή τα παθογόνα υπερνικούν την ETI πιθανώς με διαφοροποίηση της πρωτεΐνης επίδρασης (μπλε σφαίρα). Αντίστοιχα το φυτό, με φυσική επιλογή, διαφοροποιεί τις πρωτεΐνες υποδοχής ώστε να αναγνωρίζουν τις νέες πρωτεΐνες επίδρασης, εγκαθιστώντας πάλι την ETI. Στο μοντέλο αυτό η ανθεκτικότητα ή η ευαισθησία καθορίζεται ποσοτικά, από το αποτέλεσμα [PTI-ETS+ETI] (Προσαρμογή από Jones and Dangl, 2006).

Πρέπει πάντως να σημειωθεί, πως τα συμπτώματα που εμφανίζουν τα φυτά μετά τη μόλυνση με τοξίνες του *V. dahliae* είναι τα ίδια με αυτά που εμφανίζουν τα φυτά μετά από εξωγενή εφαρμογή αιθυλενίου ενώ και η εξωγενής εφαρμογή τοξινών ενεργοποιεί την παραγωγή αιθυλενίου (Mansoori and Smith, 2005). Η σημασία του αιθυλενίου στην παραγωγή συμπτωμάτων των αδρομυκώσεων που προκαλούνται από το *V. dahliae*, έχει ερευνηθεί σε διαγονιδιακά φυτά τομάτας που εξέφραζαν μια βακτηριακή απαμινάση του 1-άμινο 1 κυκλοπρόπανο καρβοξυλικού

οξέος (1-αmino 1 cyclopropano carboxylic acid, ACC) που παρεμποδίζει τη βιοσύνθεση αιθυλενίου. Συγκεκριμένα, διαγονιδιακά φυτά που παρεμπόδιζαν τον σχηματισμό αιθυλενίου είτε τοπικά (ρίζα) είτε μετά την επαγωγή της μόλυνσης με το *V. dahliae*, εμφάνιζαν σημαντική μείωση ή καθυστέρηση στην εμφάνιση συμπτωμάτων από το μύκητα. Η έκφραση των γονιδίων αυτών δεν κατάφερε να αποτρέψει την προαγωγή της ασθένειας (Robinson et al., 2001).



Εικόνα 1.10: Κύρια μονοπάτια μεταγωγής του σήματος αλληλεπίδρασης ξενιστή-παθογόνου που οδηγούν στην ενίσχυση της αρχικής φυτικής άμυνας. Η επικοινωνία μεταξύ των μονοπατιών μετάδοσης του σήματος βοηθά το φυτό να προσαρμόζει τον αμυντικό του μηχανισμό έναντι των διαφορετικών παθογόνων. Αντίστοιχα, τα παθογόνα, μέσω πρωτεϊνών επίδρασης παρεμβαίνουν στα μονοπάτια σηματοδότησης καταστέλλοντας τον αμυντικό μηχανισμό. Τα μονοπάτια του σαλικυλικού οξέος (SA), του ιασμονικού οξέος (JA) και του αιθυλενίου (ET) αποτελούν το βασικό κορμό του δικτύου μεταγωγής του σήματος της φυτικής άμυνας. ⊥, καταστολή της μετάδοσης του σήματος, ★, επαγωγή της μετάδοσης του σήματος (Προσαρμογή από Pietresse et al., 2009).

Βακτηριωμένα φυτά *A. thaliana* με το μη παθογόνο στέλεχος K-165 του *Raenibacillus alvei*, που δεν αντιλαμβάνονται την έκκριση αιθυλενίου, εμφάνιζαν λιγότερα συμπτώματα χλώρωσης, μετά από μόλυνση με το *V. dahliae* (Tjamos et al., 2005). Τέλος, το γονίδιο *etr1-1* που κωδικοποιεί έναν από τους υποδοχείς του αιθυλενίου και εμπλέκεται στην πρόσληψη και μετάδοση του σήματος του, παίζει σημαντικό ρόλο στην ασθένεια που προκαλεί ο μύκητας *V. dahliae*. Πιο συγκεκριμένα η αδυναμία πρόσληψης αιθυλενίου σε φυτά *A. thaliana* μέσω του υποδοχέα *ETR1*, λόγω απενεργοποίησης του γονιδίου που τον κωδικοποιεί είχε σαν αποτέλεσμα τα φυτά να εκδηλώσουν μικρότερα ποσοστά ασθένειας. Τα μικρότερα ποσοστά ασθένειας μάλιστα, συνδυάζοντουσαν και με μειωμένη ανάπτυξη του παθογόνου στα αγγεία του ξενιστή. Φαίνεται λοιπόν πως η αδυναμία πρόσληψης

αιθυλενίου από τα φυτά *A. thaliana* που δεν εξέφραζαν τον υποδοχέα *ETR1* έχει ως αποτέλεσμα την εμφάνιση ανθεκτικότητας στη μόλυνση με το μύκητα *V. dahliae* (Pantelides et al., 2010).

Ανάλογα με το αιθυλένιο και το JA φαίνεται να εμπλέκεται στην ανάπτυξη ανθεκτικότητας στον μύκητα *V. dahliae*. Πιο συγκεκριμένα, μεταλλαγές τομάτας που δεν παρήγαγαν JA καθώς και μεταλλαγές αραβίδοψης που δεν αντιλαμβάνονταν το JA, εμφάνιζαν ισχυρά συμπτώματα από το *V. dahliae* (Thaler et al., 2004; Tjamos et al., 2005).

Τέλος, διαγονιδιακά φυτά μελιτζάνας που εξέφραζαν το γονίδιο της Δ-9 δεσατουράσης μιας ζύμης, εμφάνισαν αύξηση στην παραγωγή 16:1, 18:1 και 16:3 λιπαρών οξέων και αύξησαν την ανθεκτικότητα των φυτών στην προσβολή από τον *V. dahliae*. Τα φυτά μελιτζάνας μετά την μόλυνση με τον μύκητα εμφάνισαν αύξηση της δραστηριότητας λιπασών και περοξειδασών καθώς και αύξηση παραγωγής λιπαρών οξέων. Τα 16:1 και 16:3 παρήχθησαν σε μεγαλύτερο βαθμό, ενώ το cis-D9 16:1 παρεμπόδιζε σημαντικά την ανάπτυξη του μύκητα (Xing and Chin, 2000).

1.1.6 Τα *Ve* γονίδια ανθεκτικότητας

Πολυγονική ανθεκτικότητα έχει διαπιστωθεί σε αρκετά φυτικά είδη τα οποία προσβάλλει ο μύκητας *V. dahliae*. Μονογονική ανθεκτικότητα έχει διαπιστωθεί στην τομάτα, την πατάτα, το βαμβάκι για τον ίδιο μύκητα. Στην τομάτα, ένα κυρίαρχο γονίδιο που προσδίδει ανθεκτικότητα στην αδρομύκωση από τον *V. dahliae*, χρησιμοποιείται πάνω από 60 χρόνια στα προγράμματα βελτίωσης του είδους (Jansky et al., 2006). Οι απομονώσεις του βερτισιλλίου που αναχαιτίζονται από την *Ve* γονιδιακή θέση παραδοσιακά κατατάσσονται στην φυλή 1 του μύκητα ενώ όλες οι υπόλοιπες στη φυλή 2. Υπάρχουν αναφορές παντελούς έλλειψης ανάπτυξης του βερτισιλλίου σε φυτά τομάτας που έφεραν το *Ve* γονίδιο (Williams et al., 2002). Άλλες αναφέρουν πως δεν εντόπισαν διαφορές στην εγκατάσταση της φυλής 1 του μύκητα τόσο σε ευαίσθητες όσο και σε ανθεκτικές ποικιλίες τομάτας. Μάλιστα, ο μύκητας εισέρχεται στα αγγεία του ξύλου και προσπαθεί να αναπτυχθεί οριζόντια. Στο στάδιο αυτό τόσο οι ανθεκτικές τομάτες όσο και οι ευαίσθητες αντιδρούν απομονώνοντας τον μύκητα, προσπαθώντας να τον καταστρέψουν (Chen et al., 2004). Στα ευαίσθητα φυτά, η εγκατάσταση του παθογόνου στα αγγεία του ξενιστή είναι το αποτέλεσμα διαδοχικών κύκλων κυριαρχίας μεταξύ ξενιστή και παθογόνου, όπως ήδη αναφέρθηκε παραπάνω (Heinz et al., 1998). Στα ανθεκτικά φυτά ο μύκητας δεν ξεπερνά την άμυνα του φυτού και δεν αναπτύσσεται περαιτέρω (Chen et al., 2004).

Το *Ve* γονίδιο της τομάτας χαρακτηρίστηκε πλήρως πριν λίγα χρόνια. Με κλωνοποίηση θέσης απομονώθηκαν δύο στενά συνδεδεμένα επαναλαμβανόμενα γονίδια τα *Ve1* και *Ve2*, τα οποία όταν εκφράστηκαν σε ευαίσθητα φυτά πατάτας προσέδωσαν ανθεκτικότητα σε μια ιδιαίτερα επιθετική απομόνωση της φυλής 1 του *V. albo-atrum*. Τα *Ve1* και *Ve2* κωδικοποιούν διαμεμβρανικούς υποδοχείς με περιοχές πλούσιες στο αμινοξύ λευκίνη, οι οποίες κατατάσσονται στις πρωτεΐνες-υποδοχείς RLP (Receptor-like proteins) που έχουν ήδη χαρακτηριστεί ως πρωτεΐνες ανθεκτικότητας (Kawchuk et al., 2001; Wang et al., 2008). Πρόσφατα δεδομένα έδειξαν πως το γονίδιο *Ve1* και όχι το *Ve2* είναι υπεύθυνο για την ανθεκτικότητα φυτών τομάτας στη μόλυνση από τη φυλή 1 της τομάτας, τόσο του μύκητα *V. dahliae* όσο και του *V. albo-atrum*. Το γονίδιο *Ve1* δεν προσέδωσε ανθεκτικότητα στη φυλή 2 της τομάτας των δύο παραπάνω μυκήτων (Fraddin et al., 2009). Ωστόσο, δεν είναι ακόμα γνωστό που εγκαθίσταται η ανθεκτικότητα των *Ve* γονιδίων εντός του φυτού. Η παρουσία όμως του μύκητα στα κύτταρα των αγγείων ακόμα και στα ανθεκτικά φυτά, οδηγεί στην πεποίθηση πως οι *Ve* πρωτεΐνες εκφράζονται στα παραγγειακά παρεγχυματικά κύτταρα. Άλλωστε και στην περίπτωση της αδροφουζαρίωσης της τομάτας η έκφραση του αντίστοιχου γονιδίου ανθεκτικότητας I-2 γίνεται στα παραγγειακά παρεγχυματικά κύτταρα (Mes et al., 2000).

Διάφορα *Ve* ομόλογα γονίδια έχουν αναγνωρισθεί στην άγρια τομάτα *Solanum lycopersoides* (*SlVe1*) και στην άγρια πατάτα *Solanum torvum* (*StVe*). Στην τετραπλοειδή πατάτα μια θέση ποσοτικού χαρακτηριστικού (Quantitative trait locus, QTL θέση) που εμπλέκεται στην ανθεκτικότητα του βερτισιλλίου, εντοπίστηκε χρησιμοποιώντας το γονίδιο *Ve1* ως ανιχνευτή. Η θέση αυτή βρέθηκε πως περιέχει 11 γονίδια που όλα κωδικοποιούν πρωτεΐνες-υποδοχείς LRR (Leucine-rich repeat, LRR). Τα γονιδιώματα τομάτας και πατάτας λόγω του μεγάλου βαθμού ομολογίας που εμφανίζουν, έχουν την QTL θέση να εδράζεται στο χρωμόσωμα 9 το οποίο στην τομάτα φέρει τα *Ve* γονίδια . Αυτό πιθανώς σημαίνει πως η QTL θέση της τετραπλοειδούς πατάτας φέρει τα γονίδια ανθεκτικότητας στο βερτισίλλιο υπό την προϋπόθεση βέβαια ότι τα ομόλογα *Ve* γονίδια είναι γονίδια ανθεκτικότητας (Εικ. 1.11) (Simko et al., 2004).

Εκτός από τα *Ve* γονίδια που προσδίδουν ανθεκτικότητα στα φυτά ενάντια στο μύκητα *V. dahliae*, RLP πρωτεΐνες, έχουν ανιχνευτεί και σε άλλα γονίδια ανθεκτικότητας στην τομάτα όπως το *Cf* γονίδιο ανθεκτικότητας έναντι του μύκητα *Cladosporium fulvum* και το *LeEix* γονίδιο που εμπλέκεται στην αντίληψη του ενεργοποιητή της ξυλανάσης του αιθυλενίου (Ethylene-inducing xylanase elicitor, EIX) του μη παθογόνου μύκητα *Trichoderma viridae* (Kruijt et al., 2005). Όλα τα παραπάνω γονίδια κωδικοποιούν εξωκυτταρικούς LLR υποδοχείς που εμπλέκονται στην αναγνώριση ενεργοποιητών γονιδίων, μια περιοχή που κωδικοποιεί

διαμεμβρανικές πρωτεΐνες (membrane-spanning domain) και μια κυτοπλασματική ουρά που γενικά δεν φέρει περιοχές σηματοδότησης.

Παρόλα αυτά, πολλά RLP γονίδια φέρουν συντηρημένες περιοχές, εντός των μικρών κυτοπλασματικών ουρών τους, που εμπλέκονται στο φαινόμενο της ενδοκύτωσης στα κύτταρα των θηλαστικών (Kawchuk et al., 2001). Για παράδειγμα, ο ενεργοποιητής του αμυντικού συστήματος των φυτών, EIX, του μύκητα *T. viridae* ενσωματώνεται άμεσα στα κύτταρα της τομάτας, πιθανώς μέσω μιας άμεσης αντίδρασης ενδοκύτωσης, μετά την αντίδραση του με την RLP πρωτεΐνη LeEix2 (Ron and Anni, 2004). Επίσης, ένα σύμπλοκο που περιείχε ραδιενεργά σημασμένους ενεργοποιητές του *V. dahliae*, ανιχνεύτηκε σε κυτταροκαλλιέργεια σόγιας να συσσωρεύεται πρώτα στην πλασματική μεμβράνη και μετά από 1 ώρα στο χυμοτόπιο των κυττάρων.



Εικόνα 1.11: Φυτά τετραπλοειδούς πατάτας 4 εβδομάδες μετά τη μόλυνση με το μύκητα *V. dahliae*. Τα ανθεκτικά φυτά (αριστερά) φέρουν *Ve* γονίδια στην ίδια θέση που εδράζονται και τα αντίστοιχα στην τομάτα (Προσαρμογή από Simko et al., 2004).

Επειδή τα *Ve* γονίδια έχουν εμπλακεί στην ανάπτυξη ανθεκτικότητας έναντι των τοξινών της φυλής 1 του *V. dahliae*, είναι πιθανή και η εμπλοκή τους στην σύνδεση και μεταφορά του ενεργοποιητή του βερτισιλλίου από την πλασματική μεμβράνη στο χυμοτόπιο. Ωστόσο, η μετακίνηση ενός υποκινητή εντός του χυμοτοπίου είναι μια μάλλον βραδεία διαδικασία και επειδή η αντίδραση της άμυνας του φυτού (παραγωγή H_2O_2) είναι πιο γρήγορη, συνάγεται πως η μεταφορά του υποκινητή γίνεται για λόγους συσσώρευσης (Horn et al., 1989).

Δεν είναι πολλά πράγματα γνωστά για τα μόρια σηματοδότησης που βρίσκονται καθοδικά των *Ve* γονιδίων της τομάτας. Ένα τέτοιο γονίδιο που ανιχνεύτηκε με αντίστροφη γενετική, φαίνεται πως εμπλέκεται στην ανάπτυξη ανθεκτικότητας που

επάγεται από τα *Ve* γονίδια. Συγκεκριμένα το γονίδιο *EDS1*, ενεργοποιείται ανοδικά της συσσώρευσης SA και της επαγωγής PR γονιδίων από την αναγνώριση του παθογόνου στους ιστούς του ξενιστή. Επίσης, είναι απαραίτητο για την ενεργοποίηση του βασικού αμυντικού συστήματος του φυτού όπως επίσης και για την ανθεκτικότητα που επάγεται από γονίδια ανθεκτικότητας που κωδικοποιούν πρωτεΐνες με TIR περιοχή (*Drosophila Toll* and mammalian *Interleukin-1 Receptor domain*) (Hu et al., 2005). Στην τομάτα επίσης η ανθεκτικότητα που επάγεται από το *Ve1* απαιτεί την ενεργοποίηση εκτός του *EDS1* και του *NDR1*, ενός γονιδίου που είναι απαραίτητο για την μετάδοση του σήματος που επάγεται από πρωτεΐνες ανθεκτικότητας με CC περιοχή (*Coiled coil domain*). Φαίνεται δηλαδή πως το *Ve1* που κωδικοποιεί πρωτεΐνες ανθεκτικότητας με εξωκυτταρικές LRR, επάγει γονίδια που έχουν συνδεθεί μέχρι σήμερα με τη μετάδοση του σήματος που επάγεται από κυτοπλασματικές πρωτεΐνες τόσο με TIR περιοχές όσο και με CC περιοχές (Fradin et al., 2009). Επιπρόσθετα, καθοδικά στο μονοπάτι σηματοδότησης του *Ve1* ενεργοποιούνται γονίδια όπως το *Mec2*, που κωδικοποιεί μια MAP κινάση, το *Ncr1* που κωδικοποιεί μια NB-LRR πρωτεΐνη και το *Acif1* που κωδικοποιεί μια F-box πρωτεΐνη. Ωστόσο, το μονοπάτι σηματοδότησης της ανθεκτικότητας που επάγεται από το *Ve1* είναι αρκετά διαφορετικό του μονοπατιού ανθεκτικότητας που επάγεται από Cf πρωτεΐνες οι οποίες αποτελούν τυπικά μέλη των RLP πρωτεϊνών ανθεκτικότητας (Fradin et al., 2009).

Από ανεξάρτητες ερευνητικές εργασίες προκύπτει πως η κινάση-υποδοχέας BAK1/SERK3 παίζει σημαντικό ρόλο στην εγκατάσταση της PTI στο φυτό. Πιο συγκεκριμένα η BAK1/SERK3 φαίνεται πως αλληλεπιδρά με τον υποδοχέα της φλατζελίνης FLS2 σε φυτά *A. thaliana* και φυτά *N. benthamiana* (Chinchilla et al., 2007; Heese et al., 2007). Επίσης, η BAK1 περιορίζει την επέκταση της νέκρωσης που προκλήθηκε από μύκητες και βακτήρια σε φυτά *A. thaliana* μέσω ενός μονοπατιού που είναι ανεξάρτητο της ρύθμισης της φυτικής ανάπτυξης από τα μπρασινοστεροειδή (Brassinosteroids) (Kemmerling et al., 2007). Πρόσφατα ερευνητικά δεδομένα δείχνουν πως η BAK1 εμπλέκεται στην ανθεκτικότητα της τομάτας έναντι του μύκητα *V. dahliae*, η οποία επάγεται από το *Ve1* (Fraddin et al., 2009).

Η μεταφορά R γονιδίων ανθεκτικότητας από ένα φυτικό είδος σε ένα άλλο είναι μέχρι σήμερα επιτυχής μόνο στην περίπτωση που τα δύο φυτικά είδη είναι συγγενή φυλογενετικά. Για παράδειγμα, η μεταφορά του γονιδίου *Rx* που παρέχει ανθεκτικότητα στον ιό X της πατάτας (*Potato Potyvirus X*, PVX), όταν μεταφέρθηκε από την πατάτα στο επίσης σολανώδες *N. benthamiana*, του προσέδωσε ανθεκτικότητα στον ιό PVX (Bandahmane et al., 1999). Αντίθετα, η μεταφορά R γονιδίων ανθεκτικότητας μεταξύ δύο φυτικών ειδών που ανήκουν σε διαφορετική οικογένεια δεν ήταν επιτυχής (Gust et al., 2010). Κάτι τέτοιο δεν φαίνεται να συμβαίνει στην περίπτωση μεταφοράς PAMPs μεταξύ φυτικών ειδών που ανήκουν

σε διαφορετικές οικογένειες. Η έκφραση των PRR υποδοχέων του *A. thaliana*, EFR και FLS2 που αναγνωρίζουν τον βακτηριακό παράγοντα επιμήκυνσης EF-Tu το πρώτο και τη φλατζελίνη το δεύτερο, στο *N. benthamiana* και στην τομάτα, τους προσέδωσε αυξημένη ανθεκτικότητα στα φυτοπαθογόνα αυτά βακτήρια (Chinchilla et al., 2007; Lacombe et al., 2010). Επίσης, η έκφραση του γονιδίου *Ve1* σε διαγονιδιακά φυτά *A. thaliana* τους προσέδωσε ανθεκτικότητα έναντι της φυλής 1 τόσο του *V. dahliae* όσο και του *V. albo-atrum* (Thomma et al., 2010).

Συμπερασματικά από τα παραπάνω ερευνητικά δεδομένα, προκύπτει πως ο άγνωστος μέχρι σήμερα ενεργοποιητής της ανθεκτικότητας που επάγεται από το γονίδιο *Ve1*, είναι πιθανώς ένα PAMP και κατά συνέπεια πως η *Ve1* ένας υποδοχέας PRR.

1.1.7 Προοπτικές αντιμετώπισης του μύκητα *Verticillium dahliae*

Οι αδρομυκώσεις αποτελούν ασθένειες που είναι δύσκολο να αντιμετωπιστούν λόγω του μεγάλου χρόνου επιβίωσης του πολλαπλασιαστικού υλικού τους, το μεγάλο εύρος των ξενιστών τους καθώς και από την αδυναμία των μυκητοκτόνων να επιδράσουν επί παθογόνων που εδράζονται στα αγγεία του ξύλου. Ο αποτελεσματικότερος τρόπος αντιμετώπισης τους είναι η απομάκρυνση και καταστροφή του προσβεβλημένου φυτικού υλικού, σε συνδυασμό με την ηλιοαπολύμανση όπου αυτή μπορεί να εφαρμοστεί, την εναλλαγή καλλιεργειών όπου αυτή είναι εφικτή και με τα λίγα πλέον εγκεκριμένα χημικά υποκαπνιστικά. Κύριος στόχος όλων των παραπάνω μεθόδων αποτελεί η καταστροφή του πρωτογενούς μολύσματος του παθογόνου λόγω κυρίως των βιολογικών χαρακτηριστικών τους. Εναλλακτικά, έχουν χρησιμοποιηθεί για την αντιμετώπιση του βερτισιλλίου και κάποιες βιολογικές μέθοδοι και οι οποίες φαίνεται να επάγουν λανθάνοντες μηχανισμούς ανοχής από την πλευρά του φυτού (Pegg and Brady, 2002).

Μία απομόνωση ενός μύκητα με σκουρόχρωμα διαφράγματα (Dark septate endophyte, DSE) από τη βρώμη χρησιμοποιήθηκε για τον έλεγχο του μύκητα *V. longisporum* στο κινέζικο λάχανο (*Brassica campestris* L.). Ο DSE μύκητας εγκαταστάθηκε ισχυρά στα κύτταρα της επιδερμίδας και του φλοιού του ξενιστή, εμφανίζοντας παχύνσεις κυτταρικών τοιχωμάτων και αποθέσεις δευτερογενών μεταβολιτών, μειώνοντας σε σημαντικό ποσοστό τόσο την εγκατάσταση όσο και την εκδήλωση συμπτωμάτων από το παθογόνο (Narisawa et al., 2002). Φαίνεται δηλαδή πως το φυτό ενεργοποίησε την πολύπλευρη άμυνα του στην σηματοδότηση της ανάπτυξης του μη παθογόνου μύκητα εντός των ιστών του, μέσω της ταχύτατης τροποποίησης της δομής των κυτταρικών τοιχωμάτων της ρίζας, της συσσώρευσης αντιμυκωτικών ουσιών και της παραγωγής PR πρωτεϊνών (συσσώρευση χιτινασών)

(Benhamou et al., 2001). Επιπρόσθετα, εκτός από την συσσώρευση αμυντικών μεταβολιτών τόσο η δραστηριότητα του ενζύμου PAL όσο και η παραγωγή H₂O₂ ήταν αυξημένη γύρω από τους ιστούς ανάπτυξης του ενδοφυτικού μύκητα (Schulz et al., 1999). Είναι πιθανό επίσης, ο ενδοφυτικός μύκητας να λειτουργεί ως μηχανικό εμπόδιο στην ανάπτυξη του παθογόνου μύκητα, έχοντας καταλάβει ιστούς που πρέπει και ο παθογόνος να προσπελάσει για να φτάσει στα αγγεία του ξύλου και να προάγει την ασθένεια (Narisawa et al., 2002).

Δεδομένα από την ποικιλία Piquillo της πιπεριάς (*Capsicum annuum*) δείχνουν ότι η παρουσία νέων ισομορφών υπεροξειδικής δισμουτάσης και χιτινασών καθώς και αυξημένη δραστηριότητα περοξειδασών και του ενζύμου PAL, επαγόμενη από την εγκατάσταση μυκόριζας *Glomus deserticola*, εμπλέκονται στην ανθεκτικότητα τους απέναντι στον μύκητα *V. dahliae*. Δεν είναι σαφές βέβαια, κατά πόσο η συμβίωση με ενδότροφες μυκόρριζες (Arbuscular mycorrhizal fungi, AMF) επηρεάζει περιστασιακά και τοπικά τη μόλυνση από τον παθογόνο μύκητα (Garmendia et al., 2006).

Ερευνητικά δεδομένα υπάρχουν και για την επαγωγή διασυστηματικής αντοχής σε φυτά *A. thaliana* εναντίον του μύκητα *V. dahliae*, με την χρήση του βακτηριακού στελέχους K-165 του ανταγωνιστικού βακτηρίου *Paenibacillus alvei*. Ο μηχανισμός δράσης της ανθεκτικότητας στηρίζεται στην έκφραση PR1, PR2 και PR5 πρωτεϊνών και ελέγχεται από ένα βιοχημικό μονοπάτι σηματοδότησης του SA εξαρτώμενο από το γονίδιο NPR1 (Tjamos et al., 2005).

Σε κάθε περίπτωση, η χρήση βιολογικών παραγόντων για την αντιμετώπιση του *V. dahliae* θα ήταν ιδανική αν καταφέρει να εμφανίσει το ίδιο καλά αποτελέσματα και σε ευρεία κλίμακα εφαρμογής υπό συνθήκες αγρού ή θερμοκηπίου (Berg et al., 2000).

Από τα παραπάνω προκύπτει πως η αντιμετώπιση του *V. dahliae* με την μείωση του μολύσματος είναι πολύ δύσκολο να επιτευχθεί. Η μόνη λύση φαίνεται πως μπορεί να προέλθει από την δημιουργία και χρήση ανθεκτικών ποικιλιών στο παθογόνο. Ωστόσο, η ενσωμάτωση γονιδίων ανθεκτικότητας στον μύκητα έχει γίνει μόνο στην περίπτωση της τομάτας, ενώ γονίδια ανθεκτικότητας έχουν εντοπιστεί και στην μηδική, στην πατάτα, την φράουλα, το βαμβάκι, και τον ηλιάνθο (Lynch et al., 1997). Δηλαδή, στην πλειονότητα των καλλιεργούμενων φυτών που προσβάλλει το βερτισίλλιο δεν έχουν βρεθεί γονίδια ανθεκτικότητας. Βέβαια δεν πρέπει να παραγνωρίζεται το γεγονός πως γονότυποι μερικώς ανθεκτικοί ή ανεκτικοί δεν συμβάλλουν λιγότερο στην συσσώρευση του μολύσματος στο έδαφος (Heinz et al., 1998).

Η αδυναμία χρησιμοποίησης διαγονιδιακών φυτών ανθεκτικών στον *V. dahliae* σε εμπορική κλίμακα δεν έχει δώσει στην έρευνα την ώθηση που θα μπορούσε να

έχει προς αυτήν την κατεύθυνση, σε σχέση με τα πολύ ενθαρρυντικά αποτελέσματα που υπάρχουν σε διάφορες καλλιέργειες. Υπάρχουν μάλιστα παραδείγματα αυξημένης ανθεκτικότητας φυτών, σε μεγάλη κλίμακα, υπό συνθήκες αγρού. Συγκεκριμένα, διαγονιδιακά φυτά πατάτας στα οποία είχε ενσωματωθεί ώστε να υπερεκφράζεται το γονίδιο της ντιφενσίνης της μηδικής, εμφάνιζαν υψηλού βαθμού ανθεκτικότητα εναντίον του *V. dahliae* (Gao et al., 2000). Βέβαια, λόγω της εδωδιμότητας της πατάτας απαιτείται περαιτέρω έρευνα για τα πιθανά προβλήματα που μπορεί να προκαλέσει το γονίδιο αυτό. Υψηλού βαθμού ανθεκτικότητα έχει επιτευχθεί και από την ενσωμάτωση ενός γονιδίου του *Gastrodia elata* που κωδικοποιεί μια αντιμικροβιακή πρωτεΐνη στο βαμβάκι πάλι σε συνθήκες αγρού (Wang et al., 2004c).

Συμπερασματικά, πολύ λίγα πράγματα γνωρίζουμε για το γονιδίωμα και την λειτουργία του *V. dahliae* αν λάβουμε υπόψη μας πως αποτελεί αντικείμενο εντατικής έρευνας για περισσότερο από 50 χρόνια. Αποτελείται από 8 χρωμοσώματα, μεγέθους από 3.2 Mb έως 6 Mb, δηλαδή έχει ένα συνολικό μέγεθος γονιδιώματος 33.83 Mb. Ο *V. dahliae* μπορεί να αναπτυχθεί σε τεχνητά υποστρώματα και να τροποποιηθεί γενετικά μέσω του δυαδικού φορέα *Agrobacterium tumefaciens* (Εικ. 1.1G). Επίσης, με την απενεργοποίηση μεμονωμένων γονιδίων του μύκητα, δίνεται η δυνατότητα να κατανοηθεί ο λειτουργικός τους ρόλος (Dobinson et al., 2004). Τέλος, μεγαλώνει συνεχώς η βιβλιοθήκη αλληλουχιών EST, παρέχοντας σημαντική βοήθεια στην ανάλυση της γονιδιακής λειτουργίας του μύκητα (<http://cogeme.ex.ac.uk/index.html>). Δεν πρέπει να παραβλέπεται το γεγονός πως το πρότυπο φυτό *A. thaliana* είναι ευαίσθητο στον *V. dahliae*, οπότε φαντάζει πιο εύκολη η κατανόηση των μηχανισμών άμυνας του ξενιστή απέναντι στο παθογόνο (Veronese et al., 2003; Tjamos et al., 2005).

1.2 ΣΚΟΠΟΣ ΤΗΣ ΠΑΡΟΥΣΑΣ ΜΕΤΑΠΤΥΧΙΑΚΗΣ ΜΕΛΕΤΗΣ

Ο μύκητας *Verticillium dahliae* επιβιώνει στο έδαφος για πολλά χρόνια με τη μορφή μικροσκληρωτίων. Στους ξενιστές του εγκαθίσταται στα αγγεία του ξύλου καθιστώντας σχεδόν αδύνατη, κάθε προσπάθεια αντιμετώπισης του. Συνεπώς, η κατανόηση των μοριακών μηχανισμών παθογένειας του μύκητα σε σημαντικούς ξενιστές του όπως η τομάτα και το βαμβάκι, θα μπορούσε να αποτελέσει οδηγό στην ανάπτυξη στρατηγικών αντιμετώπισης του.

Για την διερεύνηση των μηχανισμών παθογένειας επιλέχθηκε το γονίδιο *VdNEP*, ένα γονίδιο που ανήκει στη νέα οικογένεια των ενεργοποιητών της φυτικής άμυνας τις NLP (NEP1 like proteins) πρωτεΐνες. Οι πρωτεΐνες αυτές εμφανίζουν υψηλό βαθμό ομολογίας στις αλληλουχίες τους και η πλειοψηφία τους επάγει την αντίδραση υπερευαισθησίας στους ξενιστές τους. Το γονίδιο *VdNEP* είναι γνωστό ότι εμπλέκεται στη συμπτωματολογία των ξενιστών του. Συγκεκριμένα, ο εμβολιασμός της πρωτεΐνης *VdNEP* ως πρωτεΐνη διαχύσεως σε φύλλα *Nicotiana benthamiana* και *Arabidopsis thaliana* έδωσε νεκρωτικές κηλίδες ενώ επήγαγε την παραγωγή ενεργών ριζών οξυγόνου και πρωτεϊνών παθογένειας. Σε κοτυληδόνες και φύλλα βαμβακιού επήγαγε συμπτώματα αδρομύκωσης σε συνθήκες *in vitro* (Wang et al., 2004).

Η μελέτη του γονιδίου *VdNEP* ξεκίνησε με τη διασυστηματική έκφραση του σε φυτά τομάτας. Αρχικά το γονίδιο *VdNEP* κλωνοποιήθηκε σε πλασμιδιακό φορέα που περιείχε τον απενεργοποιημένο ιό TRV. Ακολούθησε, μετασχηματισμός του *Agrobacterium tumefaciens* με τον κλώνο *pTRV-VdNEP* και εμβολιασμός σε φυτά τομάτας. Ο στόχος της υπερέκφρασης του γονιδίου *VdNEP* στα φυτά τομάτας ήταν να διαπιστωθεί αν το γονίδιο θα προκαλούσε συμπτώματα ανάλογα με αυτά που προκαλεί ο μύκητας *Verticillium dahliae*.

Στη συνέχεια, με υπερέκφραση του γονιδίου *VdNEP* σε στελέχη της αποφυλλωτικής φυλής του βαμβακιού, της μη αποφυλλωτικής φυλής του βαμβακιού και της φυλής 1 της τομάτας και μόλυνση φυτών ξενιστών του μύκητα *V. dahliae*, θα ελεγχθεί αν η πρωτεΐνη *VdNEP* επάγει την παραγωγή συμπτωμάτων αδρομύκωσης. Τα φυτά που επελέγησαν για μόλυνση με τις υπερεκφράζουσες το *VdNEP*, φυλές του μύκητα θα είναι το *A. thaliana*, η τομάτα και το βαμβάκι. Επίσης, θα διαπιστωθεί αν η υπερέκφραση του γονιδίου *VdNEP* μπορεί να διευρύνει τον κύκλο των ξενιστών συγκεκριμένων φυλών ή αν αυξάνει το ποσοστό ασθένειας των ήδη μολυσματικών φυλών του μύκητα.

2. ΥΛΙΚΑ ΚΑΙ ΜΕΘΟΔΟΙ

2.1 ΔΙΑΣΥΣΤΗΜΑΤΙΚΗ ΕΚΦΡΑΣΗ ΤΗΣ ΠΡΩΤΕΪΝΗΣ VdNEP ΣΕ ΦΥΤΑ ΤΟΜΑΤΑΣ

2.1.1 Εκκινητές VdNEP

Για την κλωνοποίηση του γονιδίου VdNEP στους φορείς του, χρησιμοποιήθηκαν κατάλληλοι εκκινητές που σχεδιάστηκαν από την Δρ. Αλίκη Τζίμα με βάση τα υπάρχοντα δεδομένα για την αλληλουχία του. Οι εκκινητές αυτοί ενίσχυαν τμήμα 702 ζευγών βάσεων και έφεραν θέσεις περιορισμού για τις ενδονουκλεάσες EcoRI και BamHI για την κλωνοποίηση τους στον TRV φορέα, όπως φαίνεται στον ακόλουθο πίνακα.

ΕΚΚΙΝΗΤΗΣ	ΑΛΛΗΛΟΥΧΙΑ	ΕΝΔΟΝΟΥΚΛΕΑΣΗ ΠΕΡΙΟΡΙΣΜΟΥ
VdNEP-κωδικός	5'-GAGGAATTCATGCTTCCCTCCGCAGTCT-3'	EcoRI
VdNEP-αντικωδικός	5'-GAGCGATCCCTTAAACGCGCGCGCATG-3	BamHI

Πίνακας 2.1: Οι εκκινητές ενίσχυσης του γονιδίου VdNEP με τις θέσεις περιορισμού των ενδονουκλεασών EcoRI και BamHI στο 5' άκρο τους (πράσινο χρώμα).

Οι εκκινητές σχεδιάστηκαν με το λογισμικό primer3 (<http://frodo.wi.mit.edu/primer3>). Στο ακόλουθο σχήμα φαίνεται η αλληλουχία του γονιδίου VdNEP και η πρωτεΐνη που αυτή κωδικοποιεί.

A.

```
ATGCTTCCCTCCGCAGTCTTCTCGGTCTTTGCCCTCGTCGGCATCGCCTTGGCTCAGCAGCCCCCAAGGTTAACCAAGACAG  
TATCAACCCCGTCCGCGATACTCTGGGGCCCAACGGCGACATGATCAGGAAGTCCAGCCTCTGCTTCAATTGCCACCGG  
TTGCCAGCCTTACTCCGCTGTCAACACCCCGGGTGAAGTCAAATAAGATACGCAAGCACTCCCTTCAAGCTTACAGGAAGCTCC  
ACGCTAACACATATTTCTGACGCGCCGGTCTCCAAGACAGCGGTACCAACCGCAGGCGGCTGCAAGGAAACAGCAAGGGCC  
AGACCTACGCCCGCTCCATGACCCCTGAACGGCCAGTTCGGCATCATGTACGCTGGTACTGGCCCAAGGACAGCCCGCCG  
ACGGCAACCTCGCCAGCGGGCCACCGCCACGACTGGGAGAACGTCGTCATCTGGTTCAACTCGAACCAACGCAAAACAGGCC  
GGCATCCTGCGCGGGCGCCGCTCGGGCCACGGCGACTACAAGAAGGTCAACAACCCCAAGCGCAACAACAACCTCCA  
CGTCGAGTACTTACCAAGCCTCGGCAAGAACCACGAGTGCAGTTCAAGACGTCGCCCGGCCGACCTACTGGATCTGGG  
ACTGGGACAGGATGGACACCACCGTCCAGGGCGCCCTCAACCGCGCCGACTTTGGCAGCGCCAAGTGCCTTCAACAAC  
AACAATTTTGAAGGAAACATGCGCGCCGCTTTTAA
```

B.

```
MLPSAVFSVFLVGSALAQPPKVNHDSINPVRDTLGPNGDMIRKFPQLLHIAHGCQPYSVAVNTRGEVNAQLQDSGTTAGGC  
KETSQKQTYARSMTLNGQFIMYAWYWPKDQPADGNLASGHRHDWENVVWFNSNNANQAGILRGAASGHGDKKVN  
NPQRNNNNLHVEYFTSLGKNHELQFKTSPGRTYWIWDWRMDTTVQALNRADFGSANCPFNNNNFERNMRAAF
```

Σχήμα 2.1: A. Η αλληλουχία του γονιδίου VdNEP στην οποία έχουν επισημανθεί οι περιοχές υβριδισμού εκκινητών VdNEP-κωδικός και VdNEP-αντικωδικός (γκρι χρώμα) και οι περιοχές εσονίου (πρασινό χρώμα). B. Η πρωτεΐνη VdNEP.

2.1.2 Ενίσχυση *VdNEP* με αλυσιδωτή αντίδραση πολυμεράσης

Για την ενίσχυση του *VdNEP* πραγματοποιήθηκε αλυσιδωτή αντίδραση πολυμεράσης (Polymerase χain ρeaction, PCR) σε περίπου 30 ngr ολικό DNA της φυλής 1 του μύκητα *V. dahliae*. Για την αντίδραση ενίσχυσης του *VdNEP* χρησιμοποιήθηκε το ένζυμο της πολυμεράσης *Pfu* της εταιρίας Fermentas με τα χαρακτηριστικά μιας αντίδρασης να περιγράφονται στον παρακάτω πίνακα. Η *Pfu* DNA πολυμεράση είναι ένα ισχυρά σταθερό θερμικά ένζυμο που απομονώθηκε από το αρχαίο *Pyrococcus furiosus*. Το ένζυμο καταλύει τον πολυμερισμό των νουκλεοτιδίων δίκλωνου DNA στην κατεύθυνση 5'→3'. Η *Pfu* εμφανίζει ικανότητα διορθωτικής ανάγνωσης μόνο στην κατεύθυνση 3'→5', διορθώνοντας λάθη μη νοηματικών μορίων DNA σε συχνότητα 2.6×10^6 λάθη ανά κύκλο αντίδρασης.

ΑΝΤΙΔΡΑΣΤΗΡΙΟ	ΣΥΓΚΕΝΤΡΩΣΗ	Όγκος (μl)
Αντίδραση PCR		50
Pfu Buffer με MgSO ₄	10x	5
Νουκλεοτίδια (εκ του καθενός)	0.2 mM	5
<i>VdNEP</i> κωδικός εκκινητής	0.8 μM	2
<i>VdNEP</i> αντικωδικός εκκινητής	0.8 μM	2
DNA	30 ngr	1
Pfu Fermentas	1 U	0,5

Πίνακας 2.2: Συγκεντρώσεις αντιδραστηρίων PCR.

Μια τυπική αντίδραση PCR περιελάμβανε αρχική αποδιάταξη διπλής έλικας για 4' στους 94°C, 32 κύκλους τριών σταδίων, δηλαδή αποδιάταξη διπλής έλικας 1' στους 94°C, υβριδισμό 1°C στους 58°C και επέκταση 2' στους 72°C (αφού για κάθε 700 βάσεις απαιτείται περίπου 1' επέκτασης στους 72°C).

Με αντίδραση PCR ελέγχθηκε ο σωστός μετασχηματισμός των βακτηρίων με πλασμίδια που φέρουν το γονίδιο *VdNEP*, χρησιμοποιώντας τους εξειδικευμένους για το γονίδιο εκκινητές.

2.1.3 Κλωνοποίηση των προϊόντων PCR

Για την κλωνοποίηση των προϊόντων PCR χρησιμοποιήθηκε ο φορέας pGEM-T Easy της εταιρίας Promega. Ο καθαρισμός των αντιδράσεων ενίσχυσης με PCR του γονιδίου *VdNEP* έγινε με χρήση του MinElute PCR purification kit της εταιρίας Qiagen. Ακολούθησε αντίδραση συνένωσης του γονιδίου *VdNEP* με τον φορέα pGEM-T σε μια αναλογία εισδοχής προς φορέα 3:1 χρησιμοποιώντας το ένζυμο λιγάση της εταιρίας Fermentas. Μια τυπική αντίδραση συνένωσης περιγράφεται στον παρακάτω πίνακα.

ΑΝΤΙΔΡΑΣΤΗΡΙΟ	ΣΥΓΚΕΝΤΡΩΣΗ	Όγκος (μl)
Αντίδραση συνένωσης		10
Φορέας	20 – 100 ngr	1
Εισδοχή	(3:1) x φορέας	1,5
T4 DNA Ligase buffer	10x	1
T4 DNA Ligase	1 U	1,5

Πίνακας 2.3: Συγκεντρώσεις αντιδραστηρίων αντίδρασης συνένωσης.

Η αντίδραση συνένωσης πραγματοποιήθηκε κατά την διάρκεια της νύχτας σε θερμοκρασία επώασης 16°C. Εν συνεχεία, το προϊόν της αντίδρασης συνένωσης, το ανασυνδυασμένο πλασμίδιο δηλαδή, προστέθηκε σε επιλεκτικά κύτταρα της φυλής DH5a του *E. coli*. Η διαδικασία μετασχηματισμού των επιλεκτικών κυττάρων DH5a πραγματοποιήθηκε όπως περιγράφεται παρακάτω. Προστέθηκαν 5 μl του προϊόντος της αντίδρασης συνένωσης σε 50 μl επιλεκτικών κυττάρων και παρέμειναν για 30' στον πάγο. Ακολούθησε θερμική αντίδραση σε υδατόλουτρο στους 42°C για 50' και καλλιέργεια σε υγρό διάλυμα LB με επώαση για 60' στους 37°C υπό ανάδευση 225 r.p.m. Τέλος, μεταφέρθηκαν 200 μl υγρής καλλιέργειας σε τρυβλία με στερεό διάλυμα LB με αντιβιοτικό αμικιλίνη (50 μgr/ml) τα οποία επώαστηκαν για 24 h στους 37°C. Το αντιβιοτικό αμικιλίνη επιλέγει τον φορέα *pGEM* καθώς φέρει γονίδιο ανθεκτικότητας. Οι λευκές αποικίες που προέκυψαν ελέγχθησαν για την επιτυχή κλωνοποίηση στον φορέα του γονιδίου *VdNEP* με ανάλυση PCR.

2.1.4 Απομόνωση πλασμιδιακού DNA από το βακτήριο *Escherichia coli*

Με την απομόνωση μικρής κλίμακας πλασμιδιακού DNA από το βακτήριο *E. coli* ελέγχθηκε η παρουσία κλώνου που έφερε το γονίδιο *VdNEP* και ταυτόχρονα απομονώθηκε το πλασμίδιο για τους επόμενους χειρισμούς του. Η διαδικασία απομόνωσης πλασμιδιακού DNA ξεκίνησε με αρχική καλλιέργεια του μετασχηματισμένου με το γονίδιο *VdNEP*, βακτηρίου *E. coli* σε υγρό διάλυμα LB που περιείχε 100 μg/ml αμικιλίνη και επώαση για 24h στους 37°C υπό ανάδευση 225 r.p.m. Σε μικροφυγοκεντρικό σωλήνα μεταφέρθηκαν 1.5 ml καλλιέργειας και φυγοκεντρήθηκαν στις 12.000 r.p.m. για 2' σε θερμοκρασία δωματίου. Τα κύτταρα επαναιωρηματοποιήθηκαν σε 100 μl διαλύματος I (50 mM γλυκόζη, 25 mM Tris - HCl pH 8.0, 10 mM EDTA) για τη διάσπαση του κυτταρικού τοιχώματος και ακολούθησε επώαση 5' σε θερμοκρασία δωματίου. Στη συνέχεια, προστέθηκε 200 μl διαλύματος II (0.2 N NaOH, 1% SDS) για τη διάσπαση της κυτταρικής μεμβράνης, ακολούθησε ήπια ανάδευση και επώαση σε πάγο για 5'. Κατόπιν προστέθηκαν 150 μl διαλύματος III (3 M CH₃COOK, 2 M CH₃COOH) και ακολούθησε ήπια ανάδευση και επώαση σε πάγο για 5'. Με την προσθήκη του διαλύματος III επετεύχθη η κατακρήμνιση του χρωμοσωμικού DNA, ενώ το πλασμιδιακό παρέμεινε στο

εναιώρημα. Το μίγμα φυγοκεντρήθηκε στις 12.000 r.p.m. για 10' σε θερμοκρασία δωματίου. Ακολούθως, 400 μl από το υπερκείμενο μεταφέρθηκαν σε νέο μικροφυγοκεντρικό σωλήνα, όπου προστέθηκαν 400 μl ισομοριακού διαλύματος φαινόλης – χλωροφορμίου για την τελική απομάκρυνση πρωτεϊνών και ανάδευση 2'. Το μίγμα φυγοκεντρήθηκε στις 12.000 r.p.m. για 3' και το υπερκείμενο τοποθετήθηκε σε νέο μικροφυγοκεντρικό σωλήνα με προσοχή στην ενδιάμεση φάση. Τα νουκλεϊκά οξέα κατακρημνίστηκαν με την προσθήκη 700 μl απόλυτης αιθυλικής αλκοόλης (σε θερμοκρασία δωματίου) και παραμονή του μίγματος σε θερμοκρασία δωματίου για 2'. Το ίζημα πλασμιδιακού DNA παραλήφθηκε μετά από φυγοκέντρηση του μίγματος, στις 10000 r.p.m. για 5' και έκπλυση των αλάτων, με διάλυμα αιθανόλης 70%. Το ίζημα στέγνωσε σε θερμοκρασία δωματίου για 15' και επαναιωρηματοποιήθηκε σε 30 μl TE (10mM Tris - HCl, 0.1M EDTA) που περιείχε και 10 μg/ml ριβονουκλεάση, για την καταστροφή του RNA. Το πλασμιδιακό DNA αποθηκεύτηκε στους -20°C.

2.1.5 Πέψη νουκλεϊκών οξέων με περιοριστικά ένζυμα

Η πέψη νουκλεϊκών οξέων με ένζυμα περιορισμού, χρησιμοποιήθηκε για τον έλεγχο της παρουσίας του γονιδίου *VdNEP* στους πλασμιδιακούς φορείς *pGEM* και *pTRV* καθώς και για την περαιτέρω υποκλωνοποίηση του στο δυαδικό φορέα *pTRV*. Μια τυπική αντίδραση πέψης περιγράφεται στον παρακάτω πίνακα.

ΑΝΤΙΔΡΑΣΤΗΡΙΟ	ΣΥΓΚΕΝΤΡΩΣΗ
K buffer	10x
Περιοριστικά ένζυμα	1 U
Πλασμιδιακό DNA	1μg

Πίνακας 2.4: Συγκεντρώσεις αντιδραστηρίων αντίδρασης πέψης.

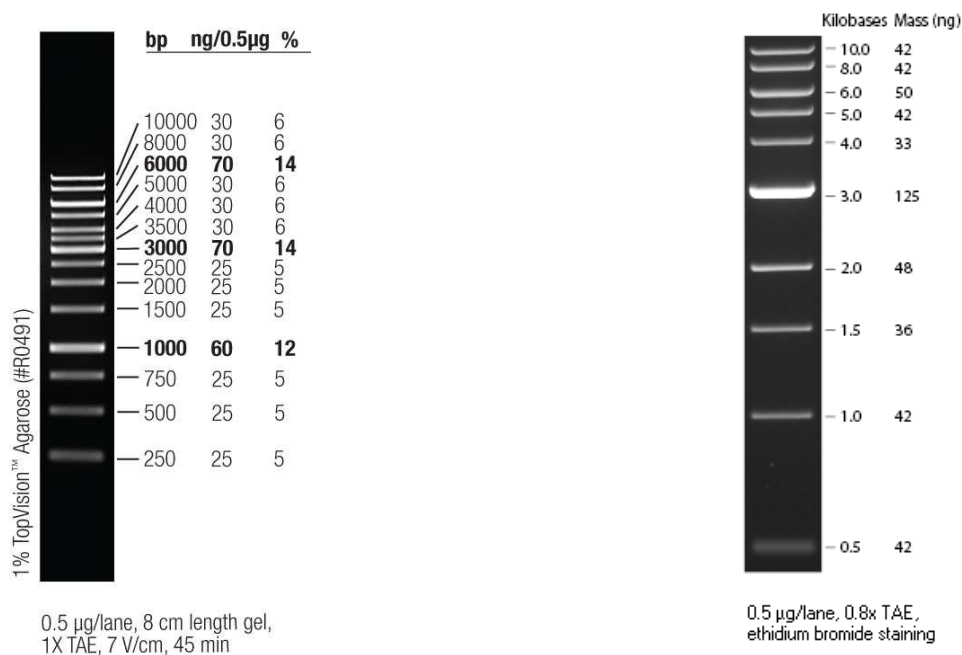
Η επώαση της αντίδρασης πραγματοποιήθηκε σε θερμοκρασία που καθοριζόταν ανάλογα με το ένζυμο (συνήθως 37°C) κατά τη διάρκεια της νύχτας.

2.1.6 Ηλεκτροφόρηση τμημάτων DNA

Η ανίχνευση και ο ποσοτικός προσδιορισμός του απομονωθέντος DNA έγινε με τη μέθοδο ηλεκτροφόρησης. Η ηλεκτροφόρηση είναι μια μέθοδος που στηρίζεται στο διαχωρισμό του αρνητικά φορτισμένου DNA, λόγω των φωσφορικών ομάδων που υπάρχουν στο μόριο του, ανάλογα με το μέγεθός του, όταν βρεθεί μέσα σε ηλεκτρικό πεδίο. Συνεπώς, όταν τοποθετηθούν τμήματα DNA εντός ηλεκτρικού

πεδίου, κινούνται με ταχύτητα που εξαρτάται από τον λόγο του φορτίου τους προς την μάζα τους. Από μια αντίδρασης περιορισμού ή μια αντίδραση PCR προκύπτουν τέτοια τμήματα DNA αρνητικά φορτισμένα. Τα τμήματα αυτά κινούνται προς τον θετικό πόλο του πεδίου, κατά την διάρκεια της ηλεκτροφόρησης σε πηκτή αγαρόζης (ένα φυτικό πολυσακχαρίτη που παράγεται από θαλάσσια φύκη). Η πηκτή αυτή φέρει στο εσωτερικό της, πόρους μεγέθους που εξαρτώνται άμεσα με την συγκέντρωση της αγαρόζης. Όσο μικρότερη είναι η συγκέντρωση της χρησιμοποιούμενης αγαρόζης τόσο μεγαλύτερο είναι το μέγεθος των πόρων του σχηματιζόμενου πλέγματος και τόσο μικρότερος ο διαχωρισμός των τμημάτων DNA.

Για την ηλεκτροφόρηση τμημάτων DNA σε πηκτή αγαρόζης τα δείγματα DNA αναμείχτηκαν με διάλυμα φόρτωσης 6x (0.1% bromophenol blue , 50% γλυκερίνη, 10 mM Tris - HCl pH 8.0). Ως δείκτες στην πηκτή αγαρόζης για έλεγχο, ταυτοποίηση και επαλήθευση των αποτελεσμάτων της ηλεκτροφόρησης χρησιμοποιήθηκαν οι κλίμακες μοριακών βαρών Gene Ruler 1Kb DNA Ladder της εταιρίας Fermentas και 1 Kb DNA Ladder της εταιρίας New England Biolabs, Inc. όπως φαίνονται παρακάτω.



Εικόνα 2.2: Κλίμακες μοριακών βαρών 1kb των εταιριών Fermentas (αριστερά) και Biolabs (δεξιά)

Το πήγμα της ηλεκτροφόρησης περιείχε 1% αγαρόζη σε ρυθμιστικό διάλυμα 1x TAE (40 mM Tris, 20 mM CH₃COOH, 2 mM EDTA, pH 8.1). Η ηλεκτροφόρηση πραγματοποιήθηκε σε 1x TAE με εφαρμογή διαφοράς δυναμικού 100 V στα άκρα της συσκευής της.

Ακολούθησε χειρισμός των πηγμάτων αφαρόζης με υδατικό διάλυμα βρωμιούχου αιθιδίου σε συγκέντρωση 1 µg/ml για 20' - 30' και παρατήρηση σε τράπεζα UV ακτινοβολίας σε μήκος κύματος 365 nm.

2.1.7 Υποκλωνοποίηση του *VdNEP* στο δυαδικό φορέα *pTRV*

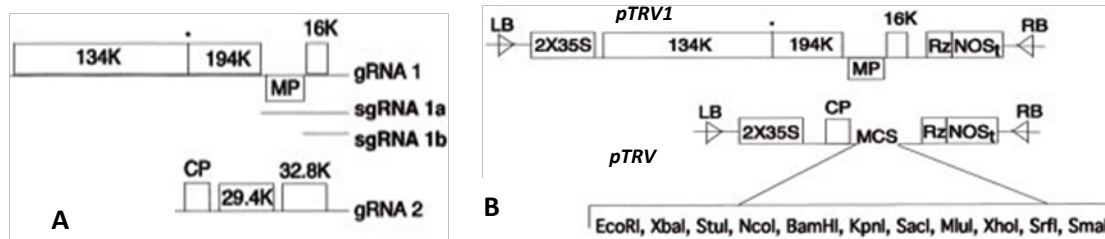
Ο TRV είναι ένας διμερής, κωδικής αλυσίδας RNA ιός. Το πρώτο ισωματίδιο RNA, γνωστό ως RNA1, κωδικοποιεί δύο RdRP πρωτεΐνες μία 134 kDa και μία 194 kDa, μία πρωτεΐνη μεταφοράς 29 kDa και μία πρωτεΐνη υψηλής περιεκτικότητας σε κυστεΐνη 16 kDa, υπογενωματικών RNA. Το δεύτερο ισωματίδιο RNA, γνωστό ως RNA2, κωδικοποιεί την καψιδιακή πρωτεΐνη του γενωματικού RNA και δύο μη δομικές πρωτεΐνες των υπογενωματικών RNA. Το RNA1 του TRV μπορεί να πολλαπλασιάζεται και να μετακινείται διασυστηματικά στα φυτά, ανεξάρτητα της παρουσίας του RNA2.

Για την έκφραση του γονιδίου *VdNEP* στα φυτά δείκτες χρησιμοποιήθηκε ένας φορέας που βασίζεται στον ιό TRV, ο *pTRV*. Ο φορέας αυτός είναι αποτελεσματικός σε αρκετά φυτά δείκτες μεταξύ των οποίων τα *N. benthamiana* και τομάτα (Liu et al., 2002). Το T-DNA των φορέων που βασίζονται στον ιό TRV (Tobacco Rattle Tobrayirus) εμφανίζει καλή εξάπλωση εντός των φυτικών ιστών, ακόμα και σε μεριστωματικές περιοχές ενώ δεν εμφανίζει έντονα συμπτώματα μόλυνσης στα φυτά δείκτες. Μάλιστα, οι νέες γενιάς TRV φορείς που φέρουν δύο αντίγραφα του φυτικού 35S υποκινητή της μεταγραφής τους και ενός ριβόζυμου (ribozyme), δηλαδή ενός μορίου RNA με ενζυμική δράση, για τον αποτελεσματικότερο πολλαπλασιασμό του ιού, οδηγούν σε αποτελεσματικότερη μετακίνηση του στους φυτικούς ιστούς (Liu et al., 2002).

Ο φορέας *pTRV2* που χρησιμοποιήθηκε για την κλωνοποίηση του γονιδίου *VdNEP* καθώς και οι φορείς *pTRV1* και *pTRV2 - PDS* παραχωρήθηκαν ευγενικά από το Δρ. Dinesh Kumar. Ο φορέας *pTRV2 - PDS* φέρει ως ένθεμα τμήμα του γονιδίου της δισατουράσης του φυτοενίου ένα ένζυμο που εμπλέκεται στη βιοσύνθεση των καροτενοειδών χρωστικών, της χλωροφύλλης και στη βιοσύνθεση γιββερελλινών (Qin et al., 2007).

Για τη δημιουργία του φορέα *pTRV - VdNEP*, έγινε διπλή πέψη του γονιδίου *VdNEP* που είχε προηγουμένως κλωνοποιηθεί στον *pGEM - T* πλασμιαδικό φορέα και του φορέα *pTRV2* με τα περιοριστικά ένζυμα *EcoRI* και *BamHI* όπως περιγράφεται παραπάνω. Ακολούθησε ηλεκτροφόρηση των αντιδράσεων των πέψεων για την επιβεβαίωση του επιτυχούς των αντιδράσεων και καθαρισμός των αντιδράσεων με τη χρήση του MinElute PCR purification kit της εταιρίας Qiagen. Εν συνεχεία, πραγματοποιήθηκε αντίδραση σύνδεσης όπως περιγράφηκε παραπάνω, του

γονιδίου *VdNEP* στον φορέα *pTRV2*. Η αναλογία εισδοχής προς φορέα ήταν αυτή τη φορά, περίπου 6:1.



Εικόνα 2.3: Ο ιός TRV (A), Οι φορείς *pTRV1* και *pTRV2* (B).

2.1.8 Εισαγωγή φορέα *pTRV2-VdNEP* στο βακτήριο *Agrobacterium tumefaciens*

Ο ανασυνδυασμένος φορέας *pTRV2-VdNEP* κλωνοποιήθηκε στο βακτήριο *Agrobacterium tumefaciens* αφού πρώτα δημιουργήθηκαν επιδεκτικά κύτταρα του βακτηρίου για την εισαγωγή του δυαδικού φορέα.

Η διαδικασία δημιουργίας επιδεκτικών κυττάρων του βακτηρίου *A. tumefaciens*, ξεκίνησε με τον εμβολιασμό μίας μεμονωμένης αποικίας 2 ημερών του στελέχους SC502 του *A. tumefaciens* σε 4 ml μη στερεοποιημένου διαλύματος LB που περιείχε 50 µg/ml καναμυκίνη. Η καλλιέργεια επώαστηκε στους 28°C κατά τη διάρκεια της νύχτας υπό περιστροφή 250 r.p.m. Εν συνεχεία η καλλιέργεια των 4 ml εμβολιάστηκε σε 100 ml υγρό διάλυμα LB και επώαστηκε στους 28°C υπό περιστροφή 250 r.p.m. έως ότου η οπτική πυκνότητα σε μήκος κύματος 600 nm να έχει τιμή 0.5 ($OD_{600} = 0.5$). Η καλλιέργεια παρέμεινε για 10' στον πάγο και έπειτα φυγοκεντρήθηκε για 10' στις 3000 r.p.m. σε θερμοκρασία 4°C. Το ίζημα αναδιαλύθηκε σε 2 ml 20 mM $CaCl_2$ και μεταφέρθηκε σε μικροφυγοκεντρικούς σωλήνες του 1.5 ml. Οι μικροφυγοκεντρικοί σωλήνες με τα επιδεκτικά κύτταρα του *A. tumefaciens* αφού βυθίστηκαν σε υγρό άζωτο διατηρήθηκαν σε θερμοκρασία -80°C.

Για την εισαγωγή του ανασυνδυασμένου με το *VdNEP*, φορέα *pTRV2*, 50 µl επιδεκτικών κυττάρων του *A. tumefaciens* υγροποιήθηκαν σε πάγο. Στη συνέχεια, περίπου 1 µg του ανασυνδυασμένου φορέα αναδεύτηκε προσεκτικά με τα επιδεκτικά κύτταρα. Οι μικροφυγοκεντρικοί σωλήνες, που περιείχαν μίγμα του *pTRV2 - VdNEP* και επιδεκτικών κυττάρων, αφού βυθίστηκαν για 5' σε υγρό άζωτο, τοποθετήθηκαν στους 37°C για 25'. Ακολούθησε προσθήκη 1 ml LB και επώαση 3h, στους 28°C, υπό περιστροφή 250 r.p.m. Η καλλιέργεια απλώθηκε σε υλικό LB που

περιείχε 50 µg/ml καναμυκίνη και επώαστηκε στους 28°C για 2 ημέρες, οπότε και παρατηρήθηκαν οι αποικίες του *A. tumefaciens* μετασχηματισμένες με τον ανασυνδυασμένο με το *VdNEP* φορέα *pTRV2*.

2.1.9 Υπερέκφραση του *VdNEP* στα φυτά τομάτας

Μετά τη διαδικασία του μετασχηματισμού των επιδεκτικών κυττάρων του *A. tumefaciens* με τον ανασυνδυασμένο με το *VdNEP*, φορέα *pTRV2* και έχοντας μετασχηματισμένα στελέχη του βακτηρίου με τους φορείς *pTRV1*, *pTRV2* και *pTRV2-PDS* ξεκίνησε η διαδικασία μόλυνσης σε φυτά τομάτας (*Lycopersicon esculentum*), ποικιλιών Torpper και Ailsa Craig και σε φυτά *Nicotiana benthamiana*.

Τα 4 στελέχη του *A. tumefaciens* που είχαν μετασχηματιστεί με τους αντίστοιχους φορείς (*pTRV1*, *pTRV2*, *pTRV2-PDS* και *pTRV2-VdNEP*) αναπτύχθηκαν σε τρυβλία με στερεοποιημένο διάλυμα LB που περιείχε 50 µg/ml καναμυκίνη και 50 µg/ml ριφαμπικίνη. Η καναμυκίνη επιλέγει το φορέα *pTRV* ενώ η ριφαμπικίνη το βακτήριο *A. tumefaciens*. Τα τρυβλία επώαστηκαν για 2 ημέρες στους 28°C. Η σίγηση του γονιδίου *PDS* οδηγεί τα φυτά να εμφανίσουν τον φαινότυπο της “φωτολεύκανσης” (photobleaching) και χρησιμοποιήθηκε ως μάρτυρας της αποτελεσματικής μεταφοράς του T-DNA με τον ιό TRV στα φυτικά κύτταρα.

Κάθε ένα από τα παραπάνω τέσσερα στελέχη μεταφέρθηκε σε υγρή καλλιέργεια LB με 50 µg/ml καναμυκίνη και 50 µg/ml ριφαμπικίνη. Οι καλλιέργειες επώαστηκαν για 16-18 ώρες στους 28°C, υπό ανάδευση 200 r.p.m.

Αραίωση 1:25 της παραπάνω υγρής καλλιέργειας (αρχική) των τεσσάρων ανωτέρω στελεχών του βακτηρίου *A. tumefaciens* μεταφέρθηκε σε δεύτερη υγρή καλλιέργεια διαλύματος επαγωγής (Induction medium, IM) (Πίνακας 2.5) με 50 µg/ml καναμυκίνη, 50 µg/ml ριφαμπικίνη και 200 µM ακετοσυριγκόνης (Πίνακας 2.7). Η ακετοσυριγκόνη χρησιμοποιείται για την επαγωγή των γονιδίων μολυσματικότητας του *A. tumefaciens* που είναι απαραίτητα για την μεταφορά του T-DNA του βακτηρίου στα φυτά, ενώ το IM μιμείται το περιβάλλον του αποπλάστη του ξενιστή. Οι καλλιέργειες επώαστηκαν για 20-24 ώρες στους 28°C, υπό ανάδευση 200 r.p.m.

Τα βακτηριακά κύτταρα συλλέχθηκαν σε ίζημα με φυγοκέντριση 10' στις 3000 r.p.m. Τα κύτταρα αναδιαλύθηκαν στον όγκο της αρχικής καλλιέργειας σε 10 mM MgCl₂ και 10 mM MES pH 5.5. Τα βακτηριακά κύτταρα επαναφυγοκεντρήθηκαν για 10' στις 3000g. Τα κύτταρα αναδιαλύθηκαν στο μισό όγκο της πρωτογενούς καλλιέργειας σε ρυθμιστικό διάλυμα διήθησης (10 mM MgCl₂, 10 mM MES pH 5.5). Ετοιμάστηκαν τέσσερα βακτηριακά αιωρήματα με οπτική πυκνότητα στα 600 nm (O.D.₆₀₀) 0.3. Στην καλλιέργεια με φορέα τον *pTRV1* προστέθηκαν 400 µM ακετοσυριγκόνης. Οι τρεις βακτηριακές καλλιέργειες με φορέα τον *pTRV2* (*pTRV2*,

pTRV2-PDS και *pTRV2-VdNEP*) αναμείχτηκαν με αυτή του *pTRV1* σε αναλογία 1:1. Συνεπώς, η τελική συγκέντρωση της ακετοσυριγκόνης ήταν 200 μM και η τελική τιμή της O.D._{600} , 0.15. Ακολούθησε εμβολιασμός του βακτηριακού αιωρήματος με σύριγγες του 1 ml, στις δύο κοτυληδόνες των φυτών της τομάτας και στα δύο μεγαλύτερα φύλλα των φυτών *N. benthamiana*. Περίπου 5 ml βακτηριακού αιωρήματος ήταν αρκετά για να εμβολιαστούν 15 φυτά *N. benthamiana* και 25 σπορόφυτα τομάτας. Τα φυτά διατηρήθηκαν σε θάλαμο ανάπτυξης στους 20-22°C, με φωτοπερίοδο 16h και 50% σχετική υγρασία.

d H ₂ O	400 ml	Φέρνω το διάλυμα σε τελικό όγκο 475 ml με dH ₂ O και το pH στο 5.6 με NaOH. Αποστειρώνω. Αφού κρυώσει το διάλυμα προσθέτω 25 ml διαλύματος αλάτων AB (Πίν. 2.6).
MES (2-(4 morpholino)-ethane sulfonic acid)	4.88 gr	
Γλυκόζη	2.5 gr	
NaH ₂ PO ₄	0.12 gr	

Πίνακας 2.5: Διάλυμα επαγωγής (Induction medium, IM)

NH ₄ Cl	20 gr	Φέρνω το διάλυμα σε τελικό όγκο 1 lt. Αποστειρώνω. Τα άλατα AB κατακρημνίζονται ως πορτοκαλί σκόνη οπότε πριν χρησιμοποιηθεί το διάλυμα πρέπει να αναδεύεται.
MgSO ₄ x7H ₂ O	6 gr	
KCl	3 gr	
CaCl ₂	0.2 gr	
FeSO ₄ x7H ₂ O	0.05 gr	

Πίνακας 2.6: Διάλυμα αλάτων AB (AB salts)

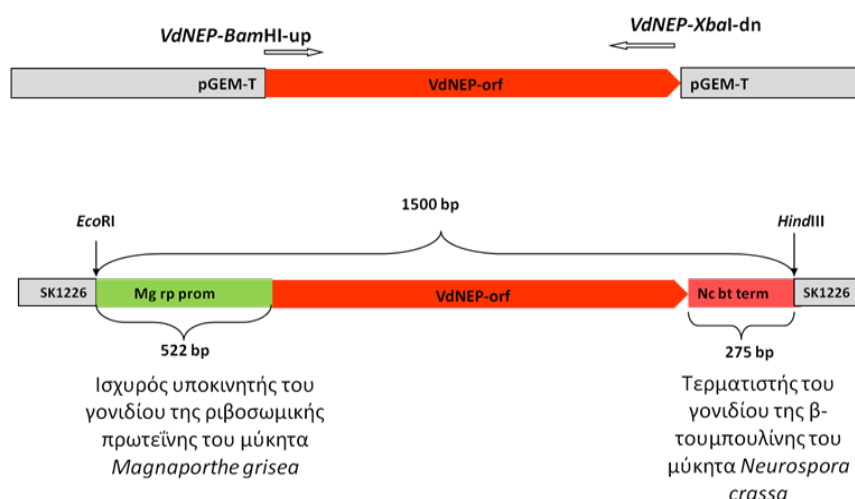
Ακετοσυριγκόνη (3,5-dimethoxy-4-hydroxyacetophenone)	19.6 mg	Η ακετοσυριγκόνη πρέπει να παρασκευάζεται την ημέρα που θα χρησιμοποιηθεί.
DMSO (dimethyl sulfoxide)	500 μl	

Πίνακας 2.7: 200 mM ακετοσυριγκόνη

2.2 ΜΟΛΥΝΣΗ ΦΥΤΩΝ ΤΟΜΑΤΑΣ, ΒΑΜΒΑΚΙΟΥ ΚΑΙ *ARABIDOPSIS THALIANA* ΜΕ ΦΥΛΕΣ ΤΟΥ ΜΥΚΗΤΑ *VERTICILLIUM DAHLIAE* ΠΟΥ ΥΠΕΡΕΚΦΡΑΖΑΝ ΤΟ ΓΟΝΙΔΙΟ *VDNEP*

2.2.1 Η κασέτα υπερέκφρασης του γονιδίου *VdNEP*

Το ανοιχτό πλαίσιο ανάγνωσης που εκφράζει της πρωτεΐνη *VdNEP* ενσωματώθηκε στο γονιδίωμα διαφόρων φυλών του μύκητα *V. dahliae* υπό τον έλεγχο του ισχυρού υποκινητή του γονιδίου της ριβοσωμικής πρωτεΐνης του μύκητα *Magnaporthe grisea* και του τερματιστή της β-τουμπουλίνης του μύκητα *Neurospora crassa*. Η κασέτα αυτή υπερέκφρασης του γονιδίου της *VdNEP* είχε προηγουμένως υποκλωνοποιηθεί από τη Δρ. Αλίκη Τζήμα στις θέσεις περιορισμού *HindIII/EcoRI* του δυαδικού φορέα SK879 *A. tumefaciens* που έφερε ανθεκτικότητα στο αντιβιοτικό γενετισίνη και ενσωματωθεί σε στελέχη του μύκητα όπως φαίνεται στο παρακάτω σχήμα.



Σχήμα 2.2: Απεικόνιση του ανοιχτού πλαισίου ανάγνωσης (open reading frame, orf) του γονιδίου *VdNEP* σε κατάλληλες θέσεις περιορισμού *BamHI*, *XbaI* του φορέα SK1226 που φέρει τον ισχυρό υποκινητή του *Magnaporthe grisea* και τερματιστή του γονιδίου της β-τουμπουλίνης του μύκητα *Neurospora crassa* (Προσφορά της Δρ. Αλίκης Τζήμα).

2.2.2 Δοκιμές παθογένειας στελεχών *Verticillium dahliae* που υπερέκφραζαν τη *VdNEP* σε ξενιστές του

Για να διερευνηθεί η εμπλοκή της πρωτεΐνης *VdNEP* στην παθογένεια του *V. dahliae* στελέχη του μύκητα που υπερέκφραζαν την πρωτεΐνη δοκιμάστηκαν σε πειράματα παθογένειας με μόλυνση σε φυτά *A. thaliana*, βαμβακιού (*Gossypium hirsutum* cv. Jeta 2) και τομάτας (*Lycopersicon esculentum* cv. Torpper). Τα στελέχη του μύκητα *V.*

dahliae που χρησιμοποιήθηκαν για την μελέτη της υπερέκφρασης της πρωτεΐνης VdNEP φαίνονται στον παρακάτω πίνακα.

ΦΥΛΗ <i>Verticillium dahliae</i>	ΥΠΕΡΕΚΦΡΑΖΟΝ ΣΤΕΛΕΧΟΣ	ΑΓΡΙΟ ΣΤΕΛΕΧΟΣ
φυλή 1 τομάτας	70V6NEP1	70WT
αποφυλλωτική βαμβακιού	22V6NEP16	22V
μη αποφυλλωτική βαμβακιού	25V6NEP74	25V
μη αποφυλλωτική βαμβακιού	25V6NEP77	

Πίνακας 2.8: Αντιστοίχιση στελεχών που έφεραν την κασέτα υπερέκφρασης VdNEP και φυλών προέλευσης του μύκητα *V. dahliae*.

Τα τέσσερα υπερεκφράζοντα στελέχη των φυλών του *V. dahliae* εξετάστηκαν ως προς την παθογένεια τους σε φυτά του *A. thaliana*. Η διαδικασία ξεκίνησε με την παρασκευή του μολύσματος, με μεταφορά των μεταλλαγμένων στελεχών από τους -80°C όπου βρίσκονταν ως αιώρημα κονιδίων (4×10^7 κονίδια/ml, 25% γλυκερόλη) σε θρεπτικό υλικό PDA (Merck) και επώαση στους 25°C για 5 ημέρες. Εν συνεχεία, τμήμα της υπό ανάπτυξη καλλιέργειας των μυκήτων μεταφέρθηκε σε κωνική φιάλη των 250 ml που περιείχε διάλυμα ανάπτυξης SSN (1.5% $\text{C}_{12}\text{H}_{22}\text{O}_{11}$, 0.1% KH_2PO_4 , 0.05% $\text{MgSO}_4 \times 7\text{H}_2\text{O}$, 0.2% NaNO_3 , 0.05% KCl , 0.1% διάλυμα ιχνοστοιχείων (0.249% $\text{FeSO}_4 \times 7\text{H}_2\text{O}$, 0.04% $\text{CuSO}_4 \times 5\text{H}_2\text{O}$, 0.044% $\text{ZnSO}_4 \times 7\text{H}_2\text{O}$, 0.041% $\text{MnSO}_4 \times 4\text{H}_2\text{O}$, 0.051% $\text{Na}_2\text{MoO}_4 \times 2\text{H}_2\text{O}$) και επώαστηκε υπό ανάδευση στις 180 r.p.m. στους 25°C για 5 ημέρες. Ακολούθησε διήθηση την καλλιέργειών με τυρόπανο και δημιουργία αιωρήματος συγκέντρωσης 10^7 κονίδια/ml με τη βοήθεια αιμοκυτταρομέτρου.

Φυτά *A. thaliana* ηλικίας τριών εβδομάδων, μολύνθηκαν με 10 ml αιωρήματος κονιδίων, συγκέντρωσης 10^7 κονιδίων/ml, με ριζοπότισμα ενώ ο μάρτυρας με 10 ml αποστειρωμένου απιονισμένου H_2O . Το ποσοστό της ασθένειας υπολογίστηκε με βάση το ποσοστό των φύλλων που εμφάνισαν συμπτώματα επί του συνόλου των φύλλων του φυτού. Η πρόοδος της ασθένειας καταγράφηκε σε σταθερά χρονικά διαστήματα 2-3 ημερών, υπολογίστηκε ο δείκτης AUDCP (Area Under the Disease Progress Curve, εμβαδόν κάτω από την καμπύλη προόδου της ασθένειας) και χαραχτηκε καμπύλη που εμφάνιζε τα ποσοστά της ασθένειας σε σχέση με το χρόνο. Βάσει του εμβαδού της καμπύλης προόδου προέκυψε ο δείκτης AUDCP (Campbell and Madden, 1990). Επίσης, συσχετίστηκε ο δείκτης AUDCP με την ένταση της ασθένειας μέσω της έκφρασης του ως ποσοστό επί της καθολικής προσβολής (δηλαδή προσβολής του 100% των φύλλων) το οποίο και περιγράφεται ως ποσοστό ασθένειας βάσει AUDCP ή αλλιώς σχετική AUDPC (Korolev et al., 2001). Οι τιμές αυτές με βάση το παραπάνω ποσοστό ανά επέμβαση υποβλήθηκαν σε στατιστική

ανάλυση με τη μέθοδο ANOVA και οι μέσοι όροι διαχωρίστηκαν με πολλαπλή δοκιμή κατά Duncan (Duncan multiple range test).

Τα μεταλλαγμένα στελέχη του μύκητα *V. dahliae* που υπερέκφραζαν την πρωτεΐνη VdNEP εξετάστηκαν και ως προς την παθογένεια τους επί φυτών βαμβακιού ποικιλίας Jeta2. Φυτά βαμβακιού στο στάδιο του δεύτερου πραγματικού φύλλου μολύνθηκαν με αιώρημα κονιδίων μεταλλαγμένων στελεχών που είχε συγκέντρωση 10^5 . Το αιώρημα παρασκευάστηκε όπως και παραπάνω μόνο που η συγκέντρωση των κονιδίων αραιώθηκε με αποστειρωμένο απιονισμένο H_2O ώστε να πέσει στα επιθυμητά επίπεδα. Τα φυτά μολύνθηκαν με εμβολιασμό ποσότητας 5 μl σε δύο σημεία του στελέχους τους, στο διάστημα από το λαιμό ως το σημείο έκφυσης των κοτυληδόνων. Η εκτίμηση της παθογένειας των μεταλλαγμένων στελεχών του *V. dahliae* επί των φυτών βαμβακιού έγινε με τη διαδικασία που περιγράφηκε παραπάνω, μέσω της καταγραφής της προόδου της ασθένειας και του υπολογισμού του δείκτη AUDPC.

Τέλος, έγινε αξιολόγηση της παθογένειας των τριών μεταλλαγμένων στελεχών που υπερέκφραζαν την πρωτεΐνη VdNEP σε φυτά τομάτας της ποικιλίας Torper. Το μόλυσμα παρασκευάστηκε όπως παραπάνω, όπου ύστερα από καλλιέργεια των μεταλλαγμένων στελεχών επί πέντε ημέρες σε θρεπτικό υλικό SSN υπό ανάδευση 200 r.p.m. σε θερμοκρασία $25^{\circ}C$, έγινε διήθηση των καλλιεργειών σε τυρόπανο και δημιουργήθηκε αιώρημα 10^7 κονιδίων/ml. Τα φυτά τομάτας που βρίσκονταν στο στάδιο του δεύτερου πραγματικού φύλλου εκριζώθηκαν και εμβολιάστηκαν για 20' στο αιώρημα κονιδίων του κάθε ενός από τα τρία μεταλλαγμένα στελέχη. Η εκτίμηση της παθογένειας των μεταλλαγμένων στελεχών του *V. dahliae* επί των φυτών τομάτας έγινε και σε αυτή την περίπτωση με τη διαδικασία που περιγράφηκε παραπάνω, μέσω της καταγραφής της προόδου της ασθένειας και του υπολογισμού του δείκτη AUDPC.

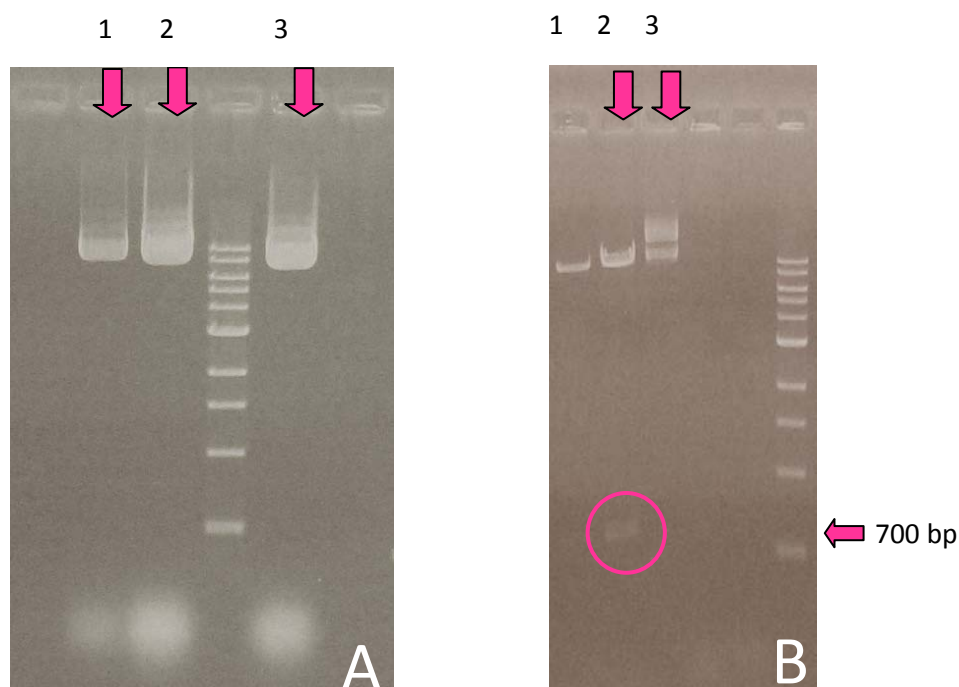
3. ΑΠΟΤΕΛΕΣΜΑΤΑ

3.1 ΔΙΑΣΥΣΤΗΜΑΤΙΚΗ ΕΚΦΡΑΣΗ ΤΗΣ ΠΡΩΤΕΪΝΗΣ VdNEP ΣΕ ΦΥΤΑ ΤΟΜΑΤΑΣ

3.1.1 Ενίσχυση του γονιδίου *VdNEP* και κλωνοποίηση του στον φορέα *pTRV*

Το γονίδιο της πρωτεΐνης VdNEP ενισχύθηκε με μια αντίδραση PCR με τους εκκινητές που περιγράφονται παραπάνω (Πίνακας 2.1) εφαρμόζοντας θερμοκρασία υβριδισμού 58°C σε cDNA του γονιδίου, κλωνοποιημένο στον φορέα pGEM - T, αραίωσης 1:50, το οποίο παραχωρήθηκε από τη Δρ. Αλίκη Τζήμα. Στη συνέχεια, με διπλή πέψη με περιοριστικά ένζυμα *EcoRI* και *BamHI* δημιουργήθηκαν συμβατά άκρα τόσο στο γονίδιο όσο και στον φορέα *pTRV2*. Με αντίδραση συνένωσης και κλωνοποίηση σε επιδεικτικά κύτταρα DH5A του *E. coli* προέκυψε κλώνος *pTRV2 - VdNEP* (που ονομάστηκε 5.21).

Για τον έλεγχο της κλωνοποίησης του γονιδίου *VdNEP* στον φορέα *pTRV2* πραγματοποιήθηκε απομόνωση πλασμιδιακού DNA όπως περιγράφηκε παραπάνω και πέψη με τα περιοριστικά ένζυμα *EcoRI* και *BamHI* (Εικ. 3.1).

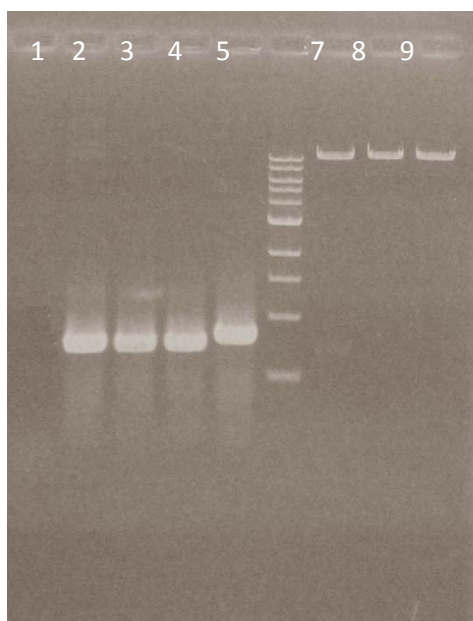


Εικόνα 3.1: (Α). Ηλεκτροφόρηση απομόνωσης μικρής κλίμακας πλασμιδιακού DNA του φορέα *pTRV2*. Διαδρομές 1,2, κλώνοι *pTRV2-VdNEP*. Διαδρομή 3, άκοπος φορέας *pTRV*. (Β) Πέψεις προϊόντων απομόνωσης πλασμιδιακού DNA με περιοριστικά ένζυμα *EcoRI*, *BamHI*. Διαδρομές 1,2, κλώνοι *pTRV2-VdNEP*. Διαδρομή 3, φορέας *pTRV2*. Επισημαίνεται ένα προϊόν περίπου 700 bp στο κλώνο *pTRV2-VdNEP*, 5.21 (διαδρομή 2).

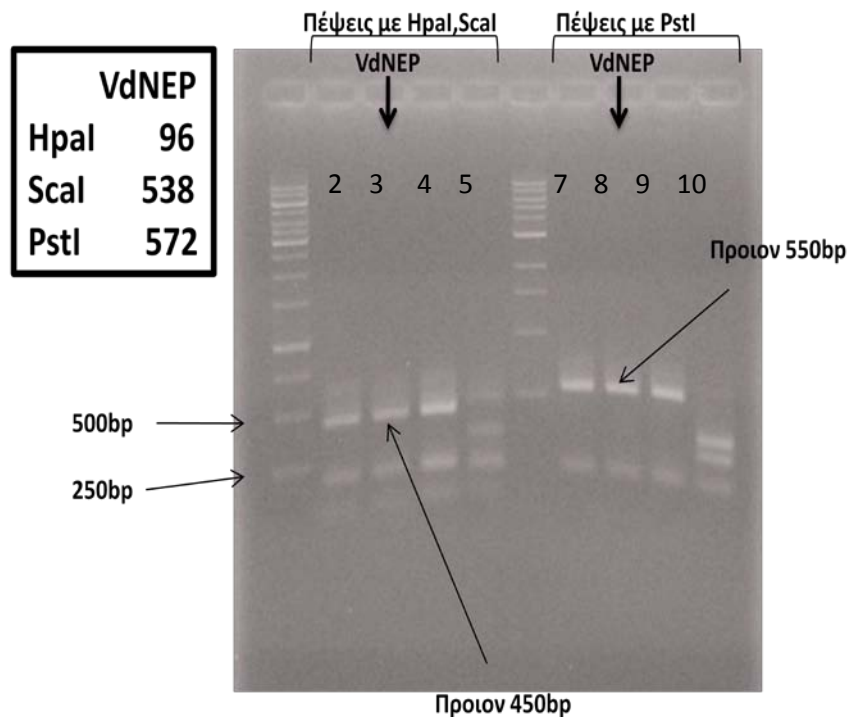
Ακολούθησε αντίδραση ενίσχυσης με PCR του γονιδίου *VdNEP* ώστε να επιβεβαιωθεί ότι ο κλώνος 5.21 φέρει την ένθεση *VdNEP*. Χρησιμοποιήθηκαν εκ νέου οι εκκινητές που περιγράφονται παραπάνω (Πίν. 2.1) ενώ η θερμοκρασία υβριδισμού ήταν 58°C. Στην αντίδραση χρησιμοποιήθηκαν ως μάρτυρες το cDNA του γονιδίου *VdNEP* που είχε αλληλουχηθεί (ως θετικός μάρτυρας), ένας κενός φορέας *pTRV2* (ως αρνητικός μάρτυρας), ενώ στην ηλεκτροφόρηση χρησιμοποιήθηκε και ένας κλώνος *prot3 - VdNEP* (1:100) σε υπερελικωμένη μορφή (Εικ. 3.2).

Ο κλώνος *pTRV2 - VdNEP*, 5.21, ελέγχθηκε για το αν φέρει την ένθεση *VdNEP* και με πέψεις με ένζυμα περιορισμού ώστε να διαπιστωθεί αν τα προϊόντα τους είναι τα αναμενόμενα, με βάση τους χάρτες περιορισμού του γονιδίου *VdNEP* και του *pTRV2*. Συγκεκριμένα, χρησιμοποιήθηκαν σε μία πέψη τα ένζυμα *HpaI* και *ScaI* τα οποία κόβουν το *VdNEP* στις θέσεις περιορισμού 96 και 538 και μια δεύτερη πέψη με τα ένζυμα *EcoRI* και *PstI* τα οποία κόβουν το *VdNEP* στις θέσεις 0 και 572.

Από τις δύο αντιδράσεις προέκυψαν τμήματα περιορισμού περίπου 450 βάσεων και 550 βάσεων αντίστοιχα, όπως δηλαδή αναμενόταν με βάση τους χάρτες περιορισμού τόσο του *VdNEP* όσο και του *TRV2*, με αποτέλεσμα να θεωρείται πως ο 5.21 ήταν *pTRV2 - VdNEP* κλώνος που έφερε την ένθεση *VdNEP*.



Εικόνα 3.2: Ηλεκτροφόρηση αντίδρασης ενίσχυσης κλώνου *pTRV2-VdNEP* με PCR. Διαδρομή 1, κενός φορέας *pTRV2*, διαδρομή 2, κλώνος *pTRV2-VdNEP*, 5.21, διαδρομή 3, cDNA *VdNEP* (θετικός μάρτυρας), διαδρομή 4, κλώνος *prot3-VdNEP* (1:100), διαδρομή 5, κλώνος *prot3-VdNEP* (1:100) σε υπερελικωμένη μορφή. Ηλεκτροφόρηση πέψεων κλώνου *pTRV2-VdNEP* με ένζυμα περιορισμού *EcoRI*, *BamHI* και *EcoRI-BamHI*. Διαδρομή 7, διπλή πέψη του κλώνου με *EcoRI*, *BamHI*, διαδρομή 8, πέψη με *EcoRI*, διαδρομή 9, πέψη με *BamHI*.

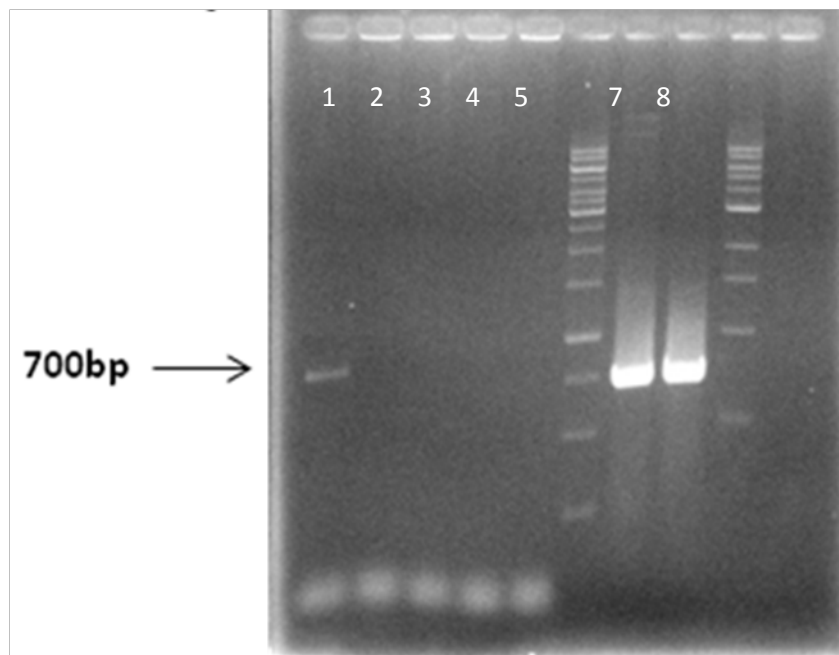


Εικόνα 3.3: Πέψεις με κατάλληλα ένζυμα περιορισμού (*HpaI-Scal*, διαδρομές 2-5 και *PstI*, διαδρομές 7-10) του κλώνου 5,21 ώστε να ταυτοποιηθεί η παρουσία της ένθεσης *VdNEP*. Διαδρομές 2,3, κλώνος *pTRV2-VdNEP*, 5,21, διαδρομή 4, cDNA *VdNEP*, διαδρομή 5, κλώνος *prot3-VdNEP*. Διαδρομές 7,8 κλώνος *pTRV2-VdNEP*, 5,21, διαδρομή 9, cDNA *VdNEP*, διαδρομή 10, κλώνος *prot3-VdNEP*.

3.1.2 Εισαγωγή του φορέα *pTRV2 - VdNEP* στο *Agrobacterium tumefaciens*

Προκειμένου να πιστοποιηθεί η επιτυχής εισαγωγή του φορέα *pTRV2-VdNEP* στο βακτήριο *A. tumefaciens* πραγματοποιήθηκε ενίσχυση του γονιδίου *VdNEP* με αντίδραση PCR, σε 1 μl καλλιέργειας μετασχηματισμένου βακτηρίου, σε υγρό υλικό LB. Η αντίδραση PCR πραγματοποιήθηκε όπως περιγράφεται στην παράγραφο 2.1.3 ενώ ως ένζυμο χρησιμοποιήθηκε η *Taq* (*Thermus aquaticus*) πολυμεράση.

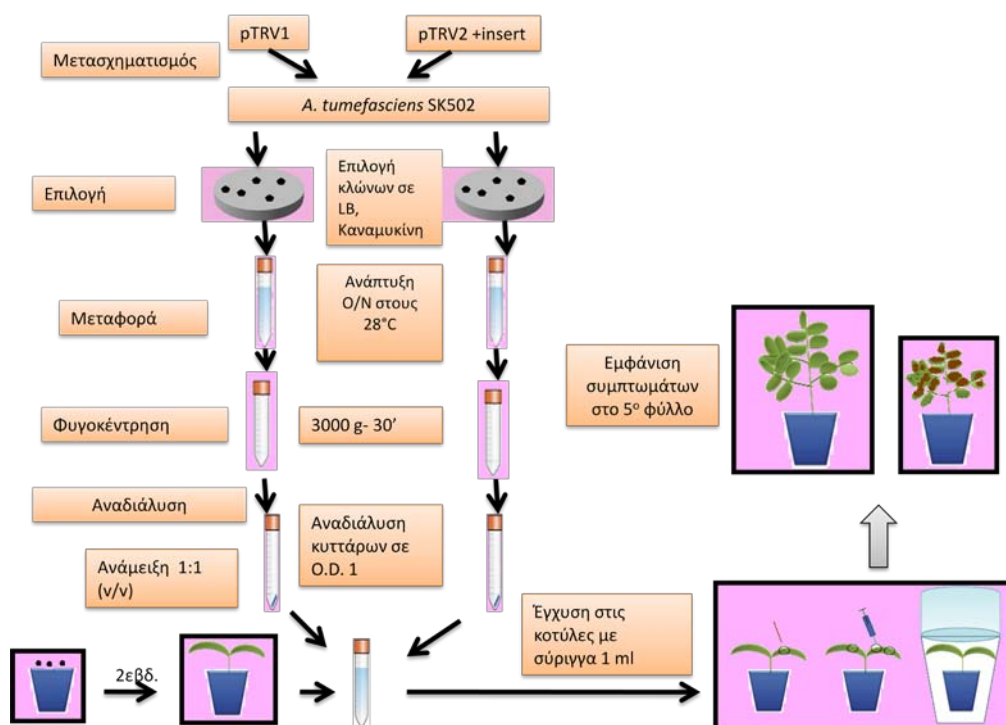
Από την ηλεκτροφόρηση της αντίδρασης ενίσχυσης του γονιδίου *VdNEP* από το μετασχηματισμένο βακτήριο *A. tumefaciens* προέκυψε τμήμα περίπου 700 βάσεων, καταδεικνύοντας την παρουσία του κλώνου *pTRV2 - VdNEP* στο βακτήριο (Εικ. 3.4).



Εικόνα 3.4: Έλεγχος εισαγωγής του κλώνου *pTRV2 - VdNEP* στο *Agrobacterium tumefaciens*. Διαδρομές 1-5, αποικίες *A. tumefaciens* που αναπτύχθηκαν σε υλικό LB με 50 $\mu\text{g}/\text{ml}$ αμπικιλίνη. Από την αντίδραση ενίσχυσης του γονιδίου *VdNEP*, η αποικία στη διαδρομή 1 έδωσε προϊόν με μέγεθος 700 bp. Διαδρομή 7, κλώνος *pTRV2-VdNEP*, 5,21, διαδρομή 8, cDNA *VdNEP*.

3.1.3 Έκφραση της πρωτεΐνης VdNEP σε φυτά τομάτας

Σε σύνοψη, η παρακάτω σχηματική αναπαράσταση απεικονίζει τη διαδικασία εμβολιασμού του μετασχηματισμένου, με τον κλώνο *pTRV* - *VdNEP*, *A. tumefaciens* στα φυτά τομάτας.



Σχήμα 3.1: Συνοπτική παρουσίαση διαδικασίας agro-εμβολιασμού του κλώνου *pTRV*-*VdNEP* σε φυτά-ξενιστές.

Στα φυτά τομάτας της ποικιλίας Torper εμβολιάστηκαν με καλλιέργεια μετασχηματισμένου βακτηρίου *A. tumefaciens* που έφερε τον κλώνο *pTRV2* - *VdNEP* και βακτηρίου με το φορέα *pTRV1* σε αναλογία 1:1, για τον έλεγχο της έκφρασης του γονιδίου *VdNEP*. Χρησιμοποιήθηκε επίσης, καλλιέργεια βακτηρίου *A. tumefaciens* που έφερε το φορέα σίγησης *pTRV2* - *PDS* και καλλιέργεια βακτηρίου με το φορέα *pTRV1* σε αναλογία 1:1, ως θετικός μάρτυρας επιτυχίας της μόλυνσης. Ο ιός TRV ενεργοποιεί τη διαδικασία σίγησης γονιδίων εντός του φυτού, με συνέπεια η έκφραση του γονιδίου *PDS* να παρεμποδίζει τη βιοσύνθεση καροτενοειδών και να οδηγεί στην εμφάνιση του χαρακτηριστικού φαινοτύπου της φωτο-λεύκανσης στα φύλλα των φυτών τομάτας. Ως αρνητικός μάρτυρας χρησιμοποιήθηκε καλλιέργεια βακτηρίου με κενό φορέα *pTRV2*, σε αναλογία 1:1 με καλλιέργεια βακτηρίου που έφερε το φορέα *pTRV1*. Τέλος, εμβολιάστηκαν φυτά τομάτας με ρυθμιστικό διάλυμα διήθησης, ως μάρτυρας αναφοράς (blank control). Ο εμβολιασμός πραγματοποιήθηκε στις δύο κοτυληδόνες των φυτών τομάτας με σύριγγα του 1 ml.

Τα φυτά τομάτας της ποικιλίας Torper που εμβολιάστηκαν με καλλιέργεια *A. tumefaciens* μετασχηματισμένου με το *pTRV - VdNEP* εμφάνισαν συμπτώματα μάρανσης και νέκρωσης 21 ημέρες μετά την εφαρμογή. Ανάλογο ήταν και το διάστημα εμφάνισης του φαινοτύπου της φωτο-λεύκανσης στα φυτά τομάτας (19 ημέρες). Τα φυτά όταν εμφάνισαν τα παραπάνω συμπτώματα διατηρήθηκαν σε θερμοκρασία δωματίου 23°C και με φυσικό φωτισμό, ενώ φυτά της ίδιας επανάληψης που διατηρήθηκαν σε 18°C και σε 16h φωτός δεν εμφάνισαν, στο ίδιο διάστημα, συμπτώματα, παρά μόνο όταν μεταφέρθηκαν στις παραπάνω συνθήκες.

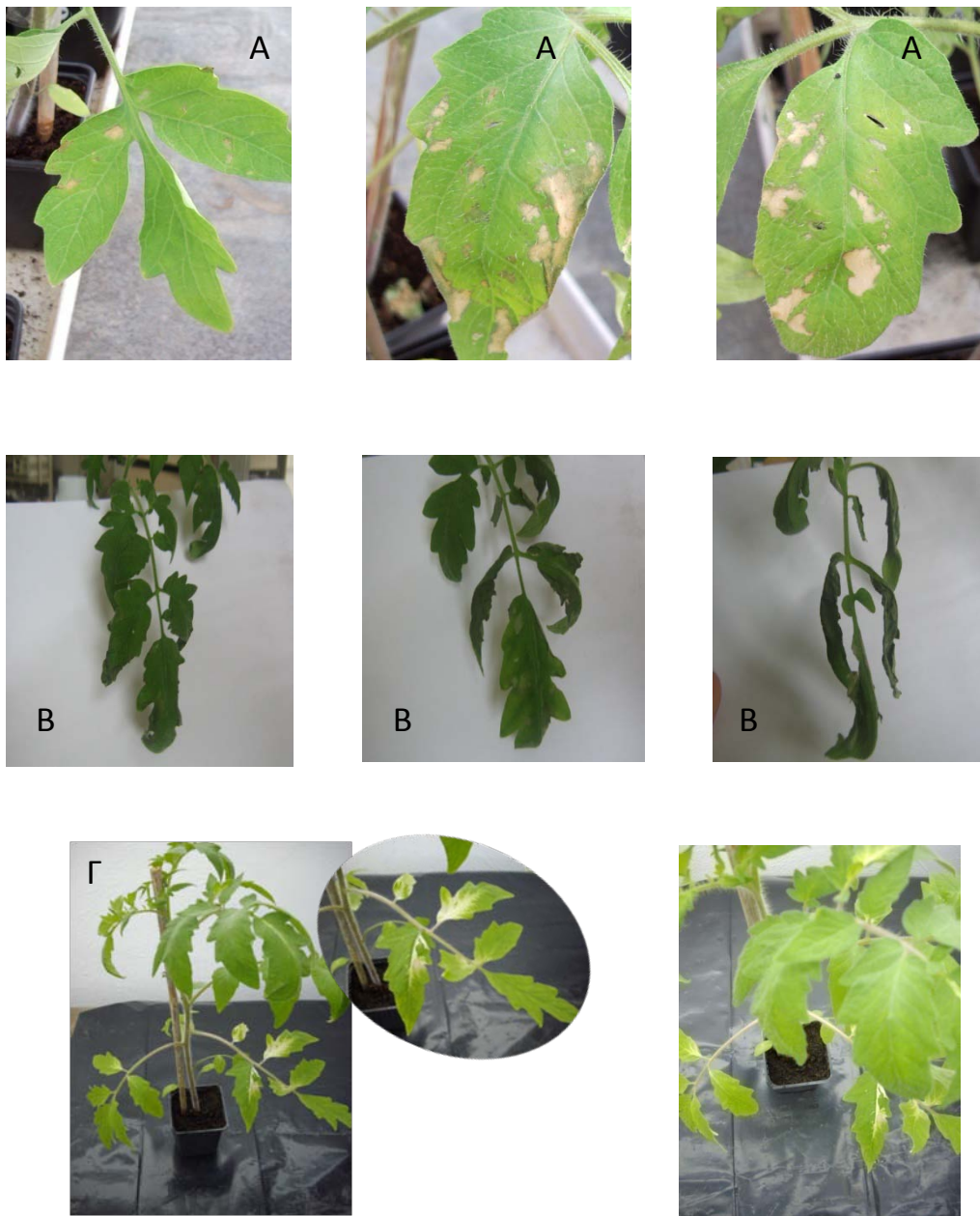
Ο αρνητικός μάρτυρας και ο μάρτυρας αναφοράς δεν έδωσαν κάποια συμπτώματα.



Εικόνα 3.5: Αρχικά συμπτώματα μάρανσης και νέκρωσης σε φυτό τομάτας που είχε εμβολιαστεί με *pTRV-VdNEP* (δεξιά) σε σχέση με ίδιας ηλικίας υγιές φυτό τομάτας (αριστερά).

Τα φυτά τομάτας της ποικιλίας Torper που είχαν εμβολιαστεί με το *pTRV - VdNEP* και εμφάνισαν συμπτώματα μάρανσης και νέκρωσης συνέχισαν να εμφανίζουν συμπτώματα και στα ανώτερα φύλλα, ο ρυθμός ανάπτυξης τους μειώθηκε και κάποια από αυτά νεκρώθηκαν μετά από περίπου δύο μήνες. Τα αποτελέσματα αυτά υποδηλώνουν τη διασυστηματική μετακίνηση του ιού TRV και τη ταυτόχρονη έκφραση της πρωτεΐνης *VdNEP* διασυστηματικά στους ιστούς των φυτών τομάτας. Επίσης, τα φυτά που είχαν εμβολιαστεί με το *pTRV - PDS* και εμφάνισαν το φαινότυπο της φωτο-λεύκανσης, εξακολούθησαν να είναι λευκά για περισσότερο από ενάμιση μήνα.

Το πείραμα αυτό επαναλήφθηκε ακόμα 3 φορές χωρίς ωστόσο να επιτευχθούν ανάλογα αποτελέσματα. Οι συνθήκες ανάπτυξης των φυτών φαίνεται πως επηρέασαν σημαντικά την εκδήλωση των συμπτωμάτων καθώς πραγματοποιήθηκαν σε χώρο θερμοκηπίου που η θερμοκρασία ήταν υψηλή κατά την διάρκεια της ημέρας (άνω των 28°C) ενώ στους θαλάμους ανάπτυξης των φυτών όπου η θερμοκρασία ήταν κατάλληλη δεν υπήρχε η κατάλληλη φωτοπερίοδος (κάτω των 16h). Κατά το πρωτόκολλο έκφρασης γονιδίων μέσω ενός φορέα *pTRV*, η θερμοκρασία ανάπτυξης των φυτών είναι 18°C και η φωτοπερίοδος 16h.



Εικόνα 3.6: (Α) Νεκρώσεις σε φύλλα τομάτας. (Β) Διαδοχικά στάδια μαράνσεως σε σύνθετο φύλλο τομάτας. (Γ) Φαινότυπος φωτολευκάνσης σε φυτά τομάτας μετά από εμβολιασμό με *pTRV-PDS*



Εικόνα 3.7: (Γ) Φαινότυπος φωτολεύκανσης σε φυτά τομάτας μετά από εμβολιασμό με *pTRV-PDS*.

3.2 ΜΟΛΥΝΣΗ ΦΥΤΩΝ ΤΟΜΑΤΑΣ, ΒΑΜΒΑΚΙΟΥ ΚΑΙ *ARABIDOPSIS THALIANA* ΜΕ ΦΥΛΕΣ ΤΟΥ ΜΥΚΗΤΑ *VERTICILLIUM DAHLIAE* ΠΟΥ ΥΠΕΡΕΚΦΡΑΖΑΝ ΤΟ ΓΟΝΙΔΙΟ *VDNEP*

3.2.1 Το γονίδιο *VdNEP* εμπλέκεται στην παθογένεια του *Verticillium dahliae*.

Το γονίδιο *VdNEP* υπερέκφράστηκε σε απομονώσεις τριών φυλών του μύκητα *V. dahliae*, στην αποφυλλωτική (22V6) του βαμβακιού, στη μη αποφυλλωτική (25V6) του βαμβακιού και στη φυλή 1 της τομάτας (70V6), υπό τον έλεγχο του ισχυρού υποκινητή του γονιδίου της ριβοσωμικής πρωτεΐνης του μύκητα *Magnaporthe grisea*, με σκοπό να διερευνηθεί η εμπλοκή του στην παθογένεια του μύκητα.

Τα μεταλλαγμένα στελέχη που υπερέκφραζαν την πρωτεΐνη *VdNEP* ελέγχθηκαν ως προς τη μολυσματικότητά τους σε φυτά βαμβακιού (cv. Jetta2), *A. thaliana* και τομάτας (cv. Ailsa Craig). Η μόλυνση των φυτών βαμβακιού πραγματοποιήθηκε με εμβολιασμό στελέχους όπως περιγράφηκε παραπάνω, με τα τέσσερα μεταλλαγμένα στελέχη και τα αντίστοιχα άγρια στελέχη του μύκητα *V. dahliae*. Τα φυτά βαμβακιού που είχαν μολυνθεί με τις υπερέκφράζουσες φυλές του μύκητα εμφάνισαν σταθερά υψηλότερο ποσοστό ασθένειας από τα φυτά βαμβακιού μολυσμένα με τις αντίστοιχες άγριες φυλές. Η συσχέτιση της σημαντικότητας των διαφορών, των ποσοστών ασθένειας, μεταξύ των υπερέκφράζουσων φυλών του γονιδίου *VdNEP* και των αντίστοιχων άγριων φυλών του μύκητα πραγματοποιήθηκε με βάση τις σχετικές τιμές των μέσων όρων του εμβαδού κάτω της καμπύλης προόδου της ασθένειας (AUDPC). Για τη στατιστική ανάλυση χρησιμοποιήθηκε το λογισμικό JMP 8.0 (Statistical Analysis System, SAS Institute Inc.)

Από τις συγκρίσεις των μέσων όρων του σχετικού AUDPC προκύπτει ότι τα μεταλλαγμένα στελέχη που υπερέκφραζαν το γονίδιο *VdNEP* παρουσίαζαν

στατιστικά σημαντική αύξηση στην παθογένεια τους σε σχέση με τα αντίστοιχα άγρια στελέχη του μύκητα *V. dahliae* τόσο στην τομάτα και στο βαμβάκι όσο και στην αραβίδοψη.

Στην περίπτωση της τομάτας, η μόλυνση με το στέλεχος της φυλής 1 της τομάτας (70V6NEP1) που υπερέκφραζε το γονίδιο *VdNEP* έδωσε στατιστικά σημαντική αύξηση στην παθογένεια του μύκητα σε σχέση με το άγριο στέλεχος (Σχ. 3.8). Ωστόσο, τα δύο παραπάνω στελέχη συμβάδισαν ως προς τη μολυσματικότητα τους κατά τις 12 πρώτες μέρες μετά τη μόλυνση των φυτών. Τα συμπτώματα στα φύλλα της τομάτας ήταν αρκετά ισχυρά και αφορούσαν επινασσία, χλωρώσεις και νεκρώσεις. Διαφοροποίηση στο ύψος των φυτών τομάτας μετά την υπερέκφραση του γονιδίου *VdNEP* στους ιστούς τους, δεν παρατηρήθηκε μέσω της φυλής 1 της τομάτας ή της αποφυλλωτικής του βαμβακιού. Αντίθετα, φυτά τομάτας που είχαν μολυνθεί με το μεταλλαγμένο στέλεχος της μη αποφυλλωτικής φυλής του βαμβακιού εμφάνιζαν σημαντική διαφοροποίηση στο ύψος τους που άγγιξε το 30% σε σχέση με το αντίστοιχο άγριο στέλεχος. Για τη σύγκριση του ύψους των φυτών χρησιμοποιήθηκε ο αντίστοιχος δείκτης της AUDPC που καλείται, AUDHC (area under the height progress curve). Από τη σύγκριση της AUDHC διαπιστώθηκε σημαντική διαφοροποίηση του ύψους των φυτών τομάτας που μολύνθηκαν με το μεταλλαγμένο και το άγριο στέλεχος, της μη αποφυλλωτικής φυλής του βαμβακιού (Σχ. 3.10). Εκτός αυτού, η μη αποφυλλωτική του βαμβακιού, μόλυνε εξίσου ισχυρά με τη φυλή 1, την τομάτα. Πιο συγκεκριμένα το στέλεχος 25V6NEP77 εμφάνιζε ποσοστά ασθένειας στα φυτά τομάτας που ήταν 25% υψηλότερα του αγρίου και 10% υψηλότερα του άλλου μεταλλαγμένου στελέχους 22V6NEP74. Τα δύο αυτά υπερεκφράζοντα στελέχη της μη αποφυλλωτικής φυλής του βαμβακιού είχαν στατιστικά υψηλότερες τιμές της AUDPC σε σχέση με το άγριο (Σχ. 3.5). Τέλος, το στέλεχος 22V6NEP16 της αποφυλλωτικής του βαμβακιού που υπερέκφραζε το γονίδιο *VdNEP*, δεν προσέβαλλε την τομάτα, όπως και το άγριο στέλεχος της.

Στο βαμβάκι, τόσο η φυλή 1 της τομάτας όσο και η μη αποφυλλωτική του βαμβακιού έδωσαν ξεκάθαρα υψηλότερη μολυσματικότητα όταν υπερέκφρασαν το γονίδιο *VdNEP*, με βάση τις τιμές της σχετικής AUDPC. Τα δύο μεταλλαγμένα στελέχη της μη αποφυλλωτικής φυλής του βαμβακιού εμφάνισαν παραπλήσια αύξηση της σχετικής τιμής της AUDPC σε σχέση με το άγριο στέλεχος, όπως φαίνεται στο σχήμα 3.4. Ωστόσο, το 70V6NEP1 προκάλεσε τα υψηλότερα ποσοστά ασθένειας στο βαμβάκι που ήταν ως 30% υψηλότερα, των ποσοστών του αγρίου στελέχους. Αντίστοιχη ήταν και η διαφορά της σχετικής τιμής της AUDPC μεταξύ των δύο παραπάνω στελεχών (Σχ. 3.7). Στατιστικά σημαντική διαφορά προέκυψε από τη σύγκριση των μέσων τιμών της σχετικής AUDPC που καταγράφηκε για το 22V6NEP16 σε σχέση με το αντίστοιχο άγριο (Σχ. 3.2). Ωστόσο, τα ποσοστά ασθένειας του στο βαμβάκι δεν ήταν τόσο υψηλά όσο των υπολοίπων μεταλλαγμένων στελεχών. Τα συμπτώματα που καταγράφηκαν στο βαμβάκι από

την μόλυνση τόσο των μεταλλαγμένων όσο και των αγρίων στελεχών του μύκητα *V. dahliae* αφορούσαν το φύλλο σημαίας, χλωρώσεις, μαράνσεις και νεκρώσεις. Τα στελέχη που υπερέκφραζαν το γονίδιο *VdNEP* προκαλούσαν τα παραπάνω συμπτώματα πιο συχνά σε νεότερα φύλλα των φυτών βαμβακιού, σε αντίθεση με τα άγρια στελέχη, που τα συμπτώματα παρατηρούνταν κυρίως στα κατώτερα φύλλα. Τέλος, αποφύλλωση παρατηρήθηκε μόνο στη μόλυνση φυτών βαμβακιού από τα στελέχη 22V6NEP16 και 22V, στα τελικά στάδια της ασθένειας.

Στο *A. thaliana*, τόσο το στέλεχος της φυλής 1 της τομάτας όσο και της αποφυλλωτικής του βαμβακιού που υπερέκφραζαν το γονίδιο *VdNEP* προκάλεσαν αυξημένη ασθένεια σε σχέση με τα άγρια στελέχη τους, όπως προέκυψε από τη σύγκριση των μέσων τιμών της σχετικής AUDPC (Σχ.3.1, Σχ. 3.6). Τα δύο παραπάνω μεταλλαγμένα στελέχη υπερείχαν στα ποσοστά ασθένειας που προκάλεσαν, των αγρίων, περίπου 20% σχεδόν καθ' όλη τη διάρκεια καταγραφής των συμπτωμάτων στα φύλλα της αραβίδοψης. Τα δύο στελέχη της μη αποφυλλωτικής φυλής του βαμβακιού έδωσαν επίσης, σημαντικά αυξημένα ποσοστά ασθένειας σε σχέση με το άγριο. Στην περίπτωση αυτή η διαφορά των μέσων τιμών της σχετικής AUDPC ήταν ελαφρά μειωμένη (Σχ. 3.3). Τα συμπτώματα που καταγράφηκαν από τη μόλυνση των φυτών *A. thaliana* ήταν κυρίως χλωρώσεις, μαράνσεις και νεκρώσεις.

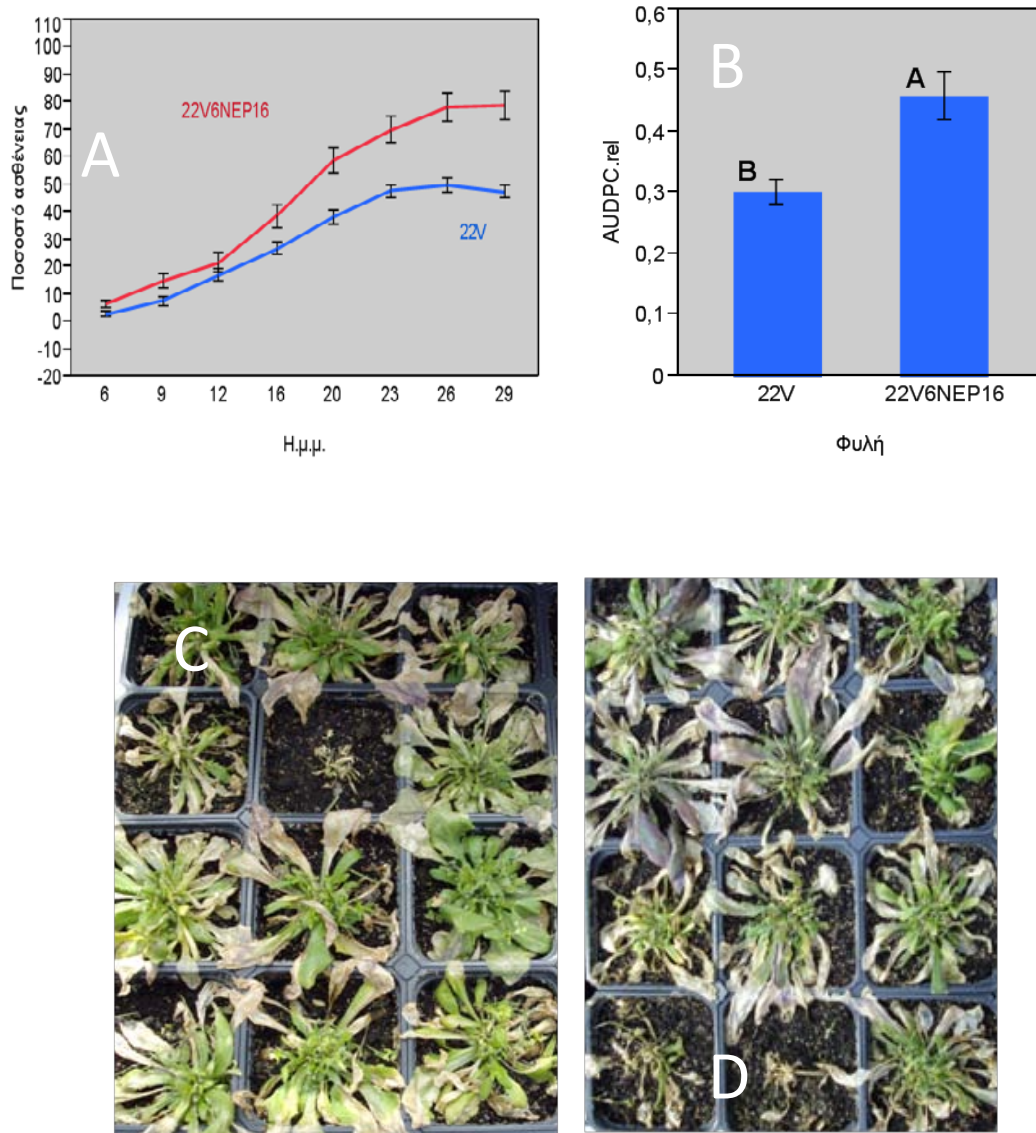
Από τα παραπάνω γίνεται σαφές πως τα στελέχη των φυλών που υπερέκφραζαν το γονίδιο *VdNEP* και μόλυναν φυτά τομάτας, βαμβακιού και αραβίδοψης, προκάλεσαν στατιστικώς σημαντικές διαφορές στις τιμές της σχετικής AUDPC σε σχέση με τις αντίστοιχες τιμές των αγρίων στελεχών τους. Το μεταλλαγμένο στέλεχος που προκάλεσε τα υψηλότερα ποσοστά ασθένειας στην τομάτα, στην αραβίδοψη και στο βαμβάκι, ήταν το 70V6NEP1 το οποίο υπερείχε από 10% - 25% ου άγριου στελέχους καθ' όλη τη διάρκεια καταγραφής των αποτελεσμάτων του πειράματος. Αυτό άλλωστε αντικατοπτρίζεται από τη σύγκριση των μέσων τιμών της σχετικής AUDPC όπως φαίνεται στα σχήματα 3.6, 3.7 και 3.8.

Επίσης, παρατηρήθηκε πως στις περισσότερες περιπτώσεις της μόλυνσης με τις φυλές που υπερέκφραζαν το γονίδιο *VdNEP*, τα φυτά καθυστερούσαν να εμφανίσουν συμπτώματα της ασθένειας (χλωρώσεις, νεκρώσεις) σε ποσοστά σημαντικά υψηλότερα των αγρίων φυλών όπως περιγράφεται και στους πίνακες Π.1 - Π.4 του παραρτήματος. Αντίθετα, όταν οι άγριες φυλές εμφάνιζαν σταθεροποίηση ή μείωση του ρυθμού προόδου της ασθένειας, οι υπερεκφράζουσες φυλές του μύκητα συνέχιζαν να αυξάνουν την παραγωγή συμπτωμάτων με διασυστηματικές μολύνσεις.

Η γενική εικόνα των φυτών μετά τη μόλυνση με τις υπερεκφράζουσες φυλές του *V. dahliae* αφορούσε ισχυρά συμπτώματα στα φύλλα, νανισμό και επιναστία και στη συνέχεια μαράνσεις, χλωρώσεις και τελικά νεκρώσεις. Οι υπερεκφράζουσες φυλές συμβάδισαν ως προς την ένταση της ασθένειας που προκαλούσαν στα φυτά μέχρι

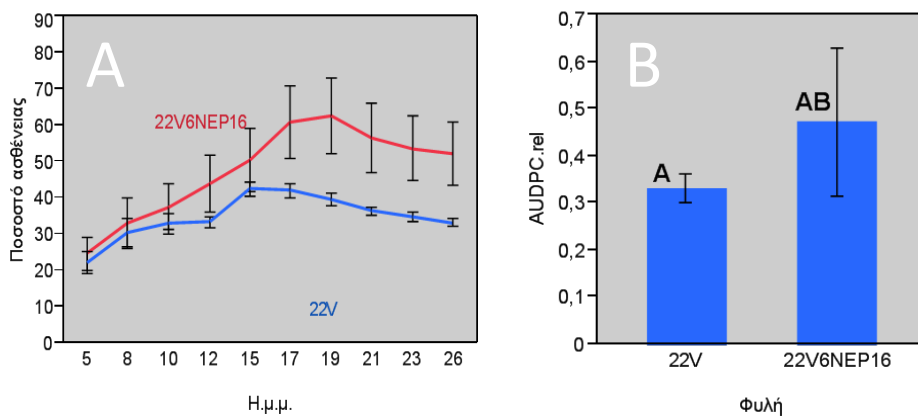
τις 12 πρώτες περίπου μέρες μετά τη μόλυνση, ενώ στη συνέχεια, εμφάνιζαν ραγδαία αύξηση ως το πλατό που εμφανιζόταν στις 20 με 25 μέρες μετά τη μόλυνση (Σχήματα 3.2-3.9). Περίπου, 30% των φυτών του *A. thaliana* είχαν νεκρωθεί με το τέλος των παρατηρήσεων, 30 περίπου μέρες μετά τη μόλυνση (Πίνακας Π.2). Δεν παρατηρήθηκαν ξηράνσεις φυτών τομάτας μέχρι το τέλος των παρατηρήσεων ενώ στο βαμβάκι περίπου 20% των φυτών είχαν νεκρωθεί 30 μέρες μετά τη μόλυνση (Πίνακας Π.4).

Η ΑΠΟΦΥΛΛΩΤΙΚΗ ΦΥΛΗ ΤΟΥ ΒΑΜΒΑΚΙΟΥ ΤΟΥ ΜΥΚΗΤΑ *V. DAHLIAE* ΣΕ ΦΥΤΑ ΑΡΑΒΙΔΟΨΗΣ



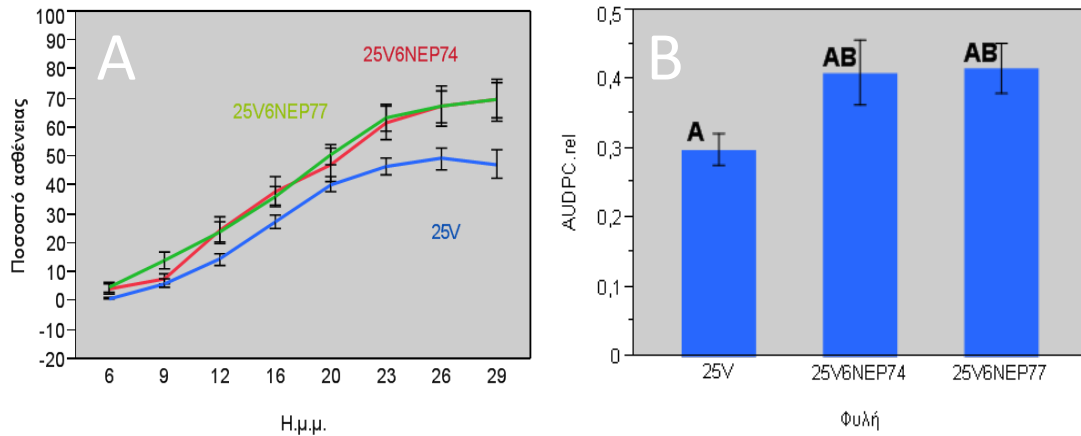
Σχήμα 3.1: (A), Η εξέλιξη της ασθένειας φυτών *A. thaliana* μολυσμένα με το υπερεκφράζον στέλεχος (22V6NEP16) και το άγριο στέλεχος (22V), της αποφυλλωτικής φυλής του βαμβακιού του μύκητα *V. dahliae*. Η γραφική παράσταση απεικονίζει το μέσο ποσοστό ασθένειας των φυτών *A. thaliana* 6-29 ημέρες μετά τη μόλυνση (η.μ.μ.) με το μύκητα. (B), Σύγκριση των μέσων τιμών της σχετικής AUDPC των δύο παραπάνω στελεχών με τη δοκιμασία Tukey-Kramer. Φυτά *A. thaliana* μολυσμένα με το άγριο στέλεχος της αποφυλλωτικής φυλής του βαμβακιού (C) και το αντίστοιχο υπερεκφράζον στέλεχος (D), 24 η.μ.μ.

Η ΑΠΟΦΥΛΛΩΤΙΚΗ ΦΥΛΗ ΤΟΥ ΒΑΜΒΑΚΙΟΥ ΤΟΥ ΜΥΚΗΤΑ *V. DAHLIAE* ΣΕ ΦΥΤΑ ΒΑΜΒΑΚΙΟΥ



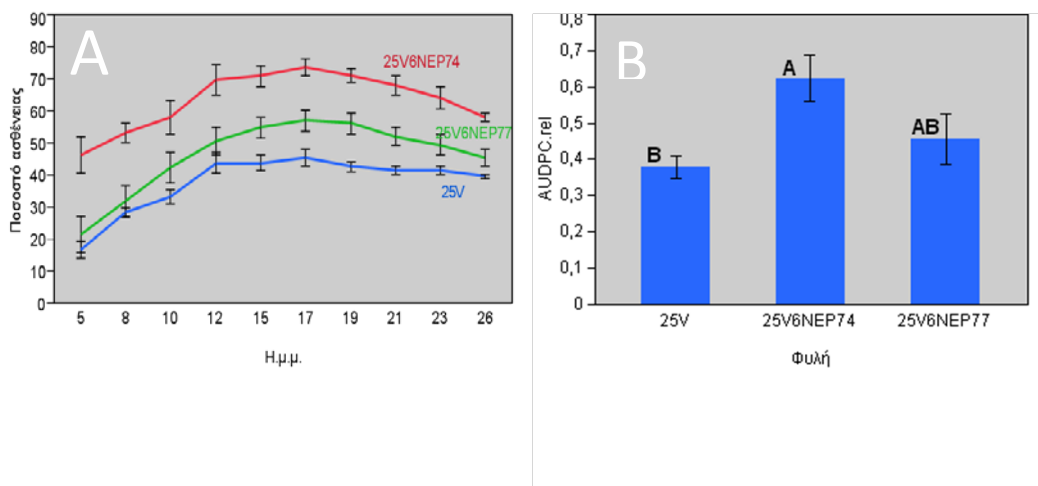
Σχήμα 3.2: (A), Η εξέλιξη της ασθένειας φυτών βαμβακιού μολυσμένα με το υπερεκφράζον στέλεχος (22V6NEP16) και το άγριο στέλεχος (22V), της αποφυλλωτικής φυλής του βαμβακιού του μύκητα *V. dahliae*. Η γραφική παράσταση απεικονίζει το μέσο ποσοστό ασθένειας των φυτών βαμβακιού 5-26 ημέρες μετά τη μόλυνση (η.μ.μ.) με το μύκητα. (B), Σύγκριση των μέσων τιμών της σχετικής AUDPC των δύο παραπάνω στελεχών με τη δοκιμασία Tukey-Kramer. Φυτά βαμβακιού μολυσμένα με το άγριο στέλεχος της αποφυλλωτικής φυλής του βαμβακιού (C) και το αντίστοιχο υπερεκφράζον στέλεχος (D), 15 η.μ.μ.

Η ΜΗ ΑΠΟΦΥΛΛΩΤΙΚΗ ΦΥΛΗ ΤΟΥ ΒΑΜΒΑΚΙΟΥ ΤΟΥ ΜΥΚΗΤΑ *V. DAHLIAE* ΣΕ ΦΥΤΑ ΑΡΑΒΙΔΟΨΗΣ



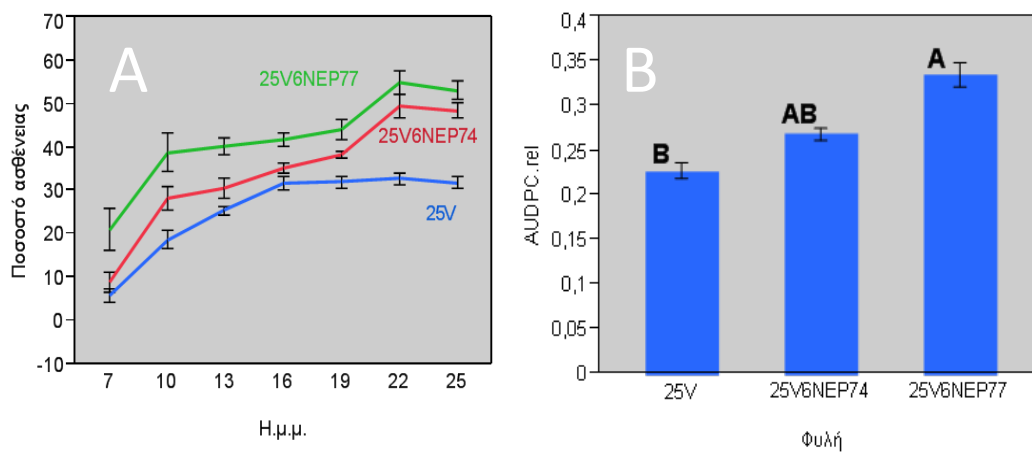
Σχήμα 3.3: (A), Η εξέλιξη της ασθένειας φυτών *A. thaliana* μολυσμένα με τα υπερεκφράζοντα στελέχη (25V6NEP74, 25V6NEP77) και το άγριο στέλεχος (25V), της μη αποφυλλωτικής φυλής του βαμβακιού του μύκητα *V. dahliae*. Η γραφική παράσταση απεικονίζει το μέσο ποσοστό ασθένειας των φυτών *A. thaliana* 6-29 ημέρες μετά τη μόλυνση (η.μ.μ.) με το μύκητα. (B), Σύγκριση των μέσων τιμών της σχετικής AUDPC των τριών παραπάνω στελεχών με τη δοκιμασία Tukey-Kramer. Φυτά *A. thaliana* μολυσμένα με το άγριο στέλεχος της αποφυλλωτικής φυλής του βαμβακιού (C) και τα αντίστοιχα υπερεκφράζοντα στελέχη, 25V6NEP74 (D) και 25V6NEP77 (E), 24 η.μ.μ.

Η ΜΗ ΑΠΟΦΥΛΛΩΤΙΚΗ ΦΥΛΗ ΤΟΥ ΒΑΜΒΑΚΙΟΥ ΤΟΥ ΜΥΚΗΤΑ *V. DAHLIAE* ΣΕ ΦΥΤΑ ΒΑΜΒΑΚΙΟΥ



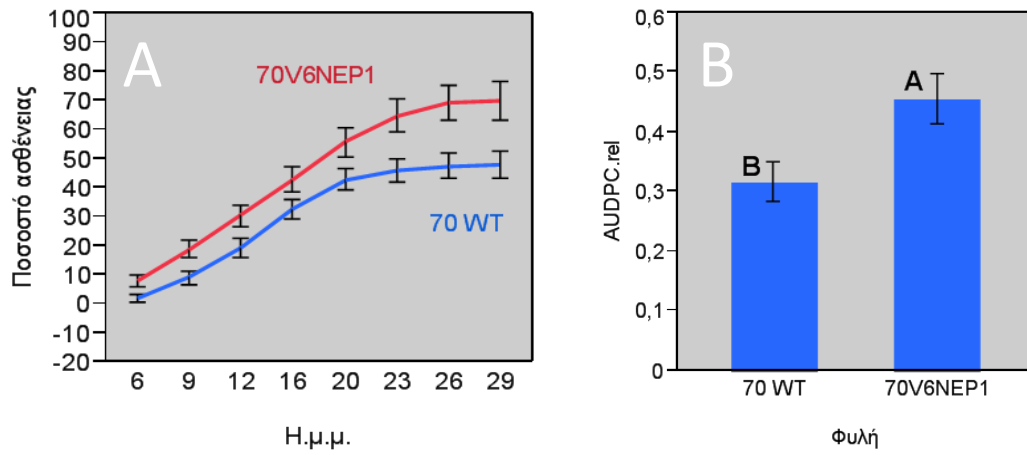
Σχήμα 3.4: (Α), Η εξέλιξη της ασθένειας φυτών βαμβακιού μολυσμένα με τα υπερεκφράζοντα στελέχη (25V6NEP74, 25V6NEP77) και το άγριο στέλεχος (25V), της μη αποφυλλωτικής φυλής του βαμβακιού του μύκητα *V. dahliae*. Η γραφική παράσταση απεικονίζει το μέσο ποσοστό ασθένειας των φυτών βαμβακιού 5-26 ημέρες μετά τη μόλυνση (η.μ.μ.) με το μύκητα. (Β), Σύγκριση των μέσων τιμών της σχετικής AUDPC των τριών παραπάνω στελεχών με τη δοκιμασία Tukey-Kramer. Φυτά βαμβακιού μολυσμένα με το άγριο στέλεχος της μη αποφυλλωτικής φυλής του βαμβακιού (C) το υπερεκφράζον στέλεχος 25V6NEP74 (D) και το υπερεκφράζον στέλεχος 25V6NEP77 (E), 15 η.μ.μ.

Η ΜΗ ΑΠΟΦΥΛΛΩΤΙΚΗ ΦΥΛΗ ΤΟΥ ΒΑΜΒΑΚΙΟΥ ΤΟΥ ΜΥΚΗΤΑ *V. DAHLIAE* ΣΕ ΦΥΤΑ ΤΟΜΑΤΑΣ



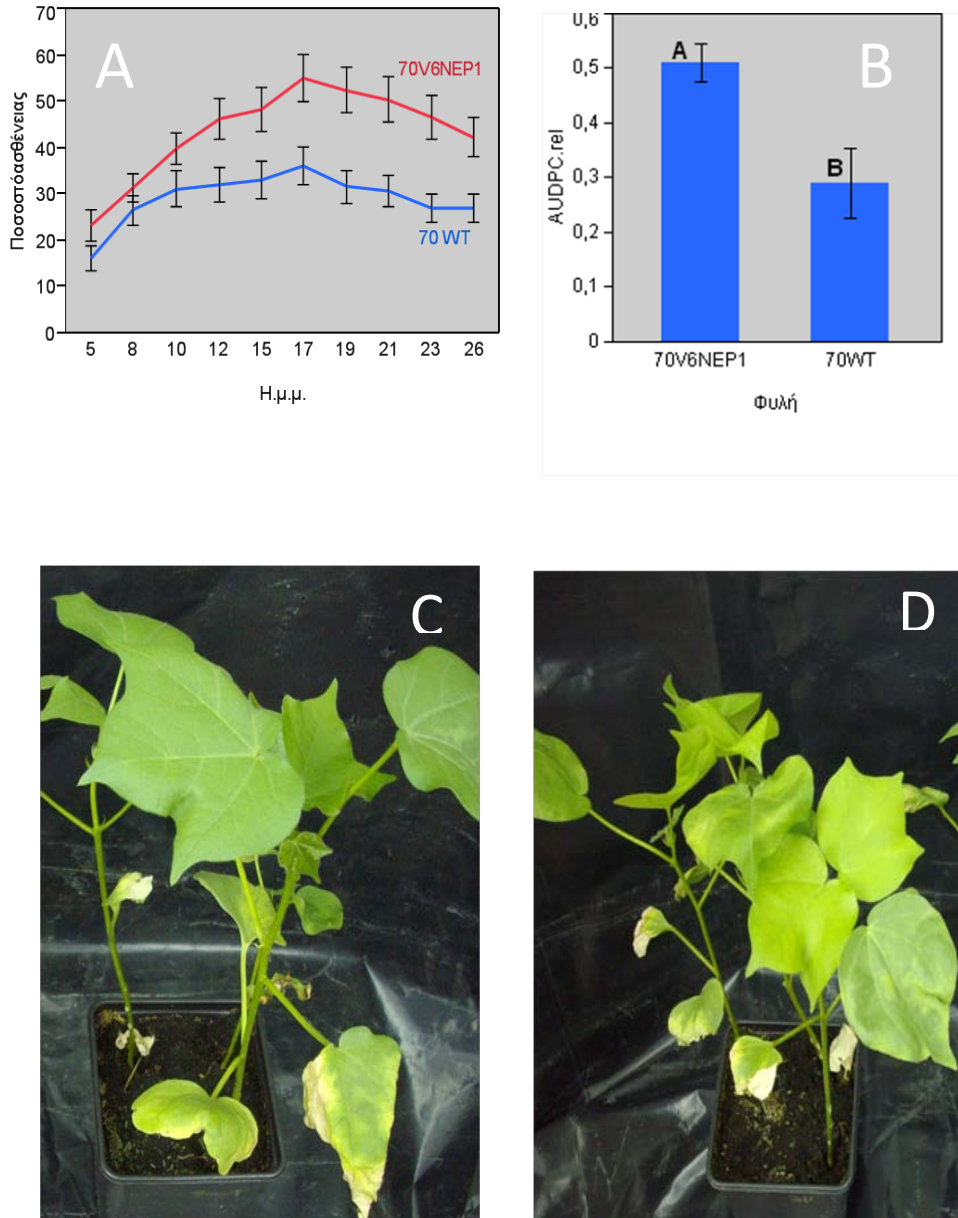
Σχήμα 3.5: (Α), Η εξέλιξη της ασθένειας φυτών τομάτας μολυσμένα με τα υπερεκφράζοντα στελέχη (25V6NEP74, 25V6NEP77) και το άγριο στέλεχος (22V), της μη αποφυλλωτικής φυλής του βαμβακιού του μύκητα *V. dahliae*. Η γραφική παράσταση απεικονίζει το μέσο ποσοστό ασθένειας των φυτών τομάτας, 7-28 ημέρες μετά τη μόλυνση (η.μ.μ.) με το μύκητα. (Β), Σύγκριση των μέσων τιμών της σχετικής AUDPC των τριών παραπάνω στελεχών με τη δοκιμασία Tukey-Kramer. Φυτά τομάτας μολυσμένα με το άγριο στέλεχος της μη αποφυλλωτικής φυλής του βαμβακιού (C) το υπερεκφράζον στέλεχος 25V6NEP74 (D) και το υπερεκφράζον στέλεχος 25V6NEP77 (E), 16 η.μ.μ.

Η ΦΥΛΗ 1 ΤΗΣ ΤΟΜΑΤΑΣ ΤΟΥ ΜΥΚΗΤΑ *V. DAHLIAE* ΣΕ ΦΥΤΑ ΑΡΑΒΙΔΟΨΗΣ



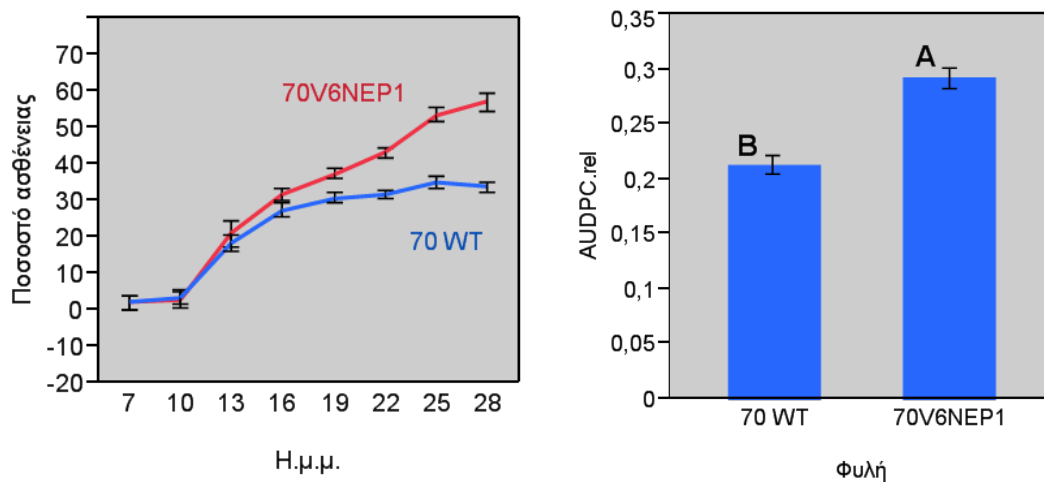
Σχήμα 3.6: (A), Η εξέλιξη της ασθένειας φυτών *A. thaliana* μολυσμένα με το υπερεκφράζον στέλεχος (70V6NEP1) και το άγριο στέλεχος (70WT), της φυλής 1 της τομάτας του μύκητα *V. dahliae*. Η γραφική παράσταση απεικονίζει το μέσο ποσοστό ασθένειας των φυτών *A. thaliana* 6-29 ημέρες μετά τη μόλυνση (η.μ.μ.) με το μύκητα. (B), Σύγκριση των μέσων τιμών της σχετικής AUDPC των δύο παραπάνω στελεχών με τη δοκιμασία Tukey-Kramer. Φυτά *A. thaliana* μολυσμένα με το άγριο στέλεχος της φυλής 1 της τομάτας (C) το υπερεκφράζον στέλεχος 70V6NEP1 (D), 21 η.μ.μ.

Η ΦΥΛΗ 1 ΤΗΣ ΤΟΜΑΤΑΣ ΤΟΥ ΜΥΚΗΤΑ *V. DAHLIAE* ΣΕ ΦΥΤΑ ΒΑΜΒΑΚΙΟΥ



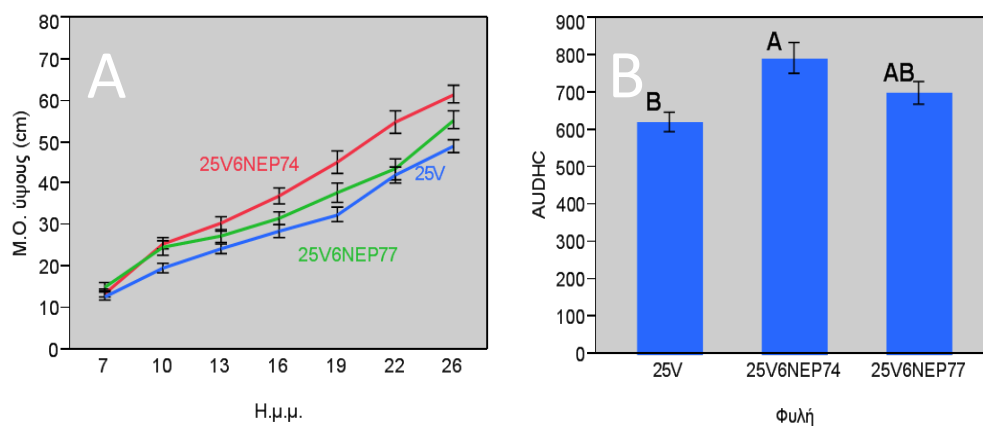
Σχήμα 3.7: (A), Η εξέλιξη της ασθένειας φυτών βαμβακιού μολυσμένα με το υπερεκφράζον στέλεχος (70V6NEP1) και το άγριο στέλεχος (70WT), της φυλής 1 της τομάτας του μύκητα *V. dahliae*. Η γραφική παράσταση απεικονίζει το μέσο ποσοστό ασθένειας των φυτών βαμβακιού 5-26 ημέρες μετά τη μόλυνση (η.μ.μ.) με το μύκητα. (B), Σύγκριση των μέσων τιμών της σχετικής AUDPC των δύο παραπάνω στελεχών με τη δοκιμασία Tukey-Kramer. Φυτά βαμβακιού μολυσμένα με το άγριο στέλεχος της φυλής 1 της τομάτας (C) το υπερεκφράζον στέλεχος 70V6NEP1 (D), 15 η.μ.μ.

Η ΦΥΛΗ 1 ΤΗΣ ΤΟΜΑΤΑΣ ΤΟΥ ΜΥΚΗΤΑ *V. DAHLIAE* ΣΕ ΦΥΤΑ ΤΟΜΑΤΑΣ



Σχήμα 3.8: (A), Η εξέλιξη της ασθένειας φυτών τομάτας μολυσμένα με το υπερεκφράζον στέλεχος (70V6NEP1) και το άγριο στέλεχος (70WT), της φυλής 1 της τομάτας του μύκητα *V. dahliae*. Η γραφική παράσταση απεικονίζει το μέσο ποσοστό ασθένειας των φυτών τομάτας, 7-28 ημέρες μετά τη μόλυνση (η.μ.μ.) με το μύκητα. (B), Σύγκριση των μέσων τιμών της σχετικής AUDPC των δύο παραπάνω στελεχών με τη δοκιμασία Tukey-Kramer. Φυτά τομάτας μολυσμένα με το άγριο στέλεχος της φυλής 1 της τομάτας (C) το υπερεκφράζον στέλεχος 70V6NEP1 (D), 22 η.μ.μ.

**ΔΙΑΦΟΡΟΠΟΙΗΣΗ ΤΟΥ ΥΨΟΥΣ, ΦΥΤΩΝ ΤΟΜΑΤΑΣ ΜΟΛΥΣΜΕΝΩΝ
ΜΕ ΤΙΣ ΜΗ ΑΠΟΦΥΛΛΩΤΙΚΕΣ ΦΥΛΕΣ ΤΟΥ ΒΑΜΒΑΚΙΟΥ ΠΟΥ
ΥΠΕΡΕΚΦΡΑΖΑΝ ΤΟ ΓΟΝΙΔΙΟ *VdNEP*, ΣΕ ΣΧΕΣΗ ΜΕ ΤΗΝ ΑΓΡΙΑ ΦΥΛΗ**



Σχήμα 3.9: (Α), Η εξέλιξη του ύψους φυτών τομάτας που ήταν μολυσμένα με τα υπερεκφράζοντα στελέχη (25V6NEP74, 25V6NEP77) και το άγριο στέλεχος (25V), της μη αποφυλλωτικής φυλής του μύκητα *V. dahliae*, 7-26 ημέρες μετά τη μόλυνση (η.μ.μ.) με το μύκητα. (Β), Σύγκριση των μέσων τιμών της AUDHC των τριών παραπάνω στελεχών με τη δοκιμασία Tukey-Kramer. (C) Φυτά τομάτας μολυσμένα με το άγριο στέλεχος της μη αποφυλλωτικής φυλής βαμβακιού, 25V (δεξιά) σε σχέση με το υπερεκφράζον στέλεχος 25V6NEP74 (αριστερά), 22 η.μ.μ.

4. ΣΥΖΗΤΗΣΗ - ΣΥΜΠΕΡΑΣΜΑΤΑ

Οι NLPs αποτελούν μια ομάδα πρωτεϊνών που έχουν απομονωθεί από αρκετούς μικροοργανισμούς και παρουσιάζουν ιδιαίτερο ενδιαφέρον λόγω της ιδιότητας τους αφενός να ενεργοποιούν τους μηχανισμούς άμυνας των φυτών, αφετέρου να παράγουν συμπτώματα νέκρωσης και να επάγουν το κυτταρικό θάνατο (Pemberton and Salmon, 2004). Ωστόσο, ο ακριβής ρόλος τους στην παθογένεια των μικροοργανισμών δεν έχει ακόμα διευκρινιστεί. Η NLP πρωτεΐνη VdNEP έχει βρεθεί ότι προκαλεί νέκρωση και επάγει τους μηχανισμούς άμυνας σε φυτά *N. benthamiana*, *A. thaliana* και καπνού. Ως σύμπτωμα έχει καταγραφεί και η μάρανση όμως μόνο σε συνθήκες *in vitro* και σε φύλλα βαμβακιού (Wang et al., 2004).

Συνεπώς, η υπερέκφραση της VdNEP σε φυτά τομάτας θα μπορούσε να βοηθήσει σημαντικά στην κατανόηση του ρόλου της στην παθογένεια του μύκητα *V. dahliae*. Για το σκοπό αυτό χρησιμοποιήθηκε ένας Τι φορέας που κωδικοποιούσε το cDNA του ιού TRV, στο T-DNA του, υπό τον έλεγχο κατάλληλου υποκινητή και τερματιστή που να είναι λειτουργικοί στα φυτικά κύτταρα. Το VdNEP κλωνοποιήθηκε στην κατάλληλη θέση του ιικού φορέα ο οποίος μεταφέρεται στα φυτικά κύτταρα με το T-DNA. Ο ιός στη συνέχεια μεταδίδεται διασυστηματικά εκφράζοντας ταυτόχρονα και το ένθετο γονίδιο VdNEP στους ιστούς της τομάτας. και ως φορέα έκφρασης τον αφοπλισμένο ιό TRV, εξασφάλισε κατάλληλες συνθήκες για την λειτουργική έκφραση της πρωτεΐνης VdNEP στα φυτά τομάτας.

Η πρωτεΐνη VdNEP εκφράστηκε στους ιστούς της τομάτας προκαλώντας συμπτώματα τυπικά των αδρομυκώσεων. Πιο συγκεκριμένα παρατηρήθηκαν μαράνσεις, χλωρώσεις και νεκρώσεις που συνέχιζαν να εξελίσσονται παράλληλα με την εξέλιξη του φυτού. Επίσης, τα φυτά τομάτας εμφάνιζαν μειωμένη ανάπτυξη και κάποια από αυτά τελικά νεκρώθηκαν (Εικ. 3.6).

Τα φυτά που είχαν εμβολιαστεί με το φορέα *pTRV-PDS* εμφάνισαν το φαινότυπο της φωτολευκανσης (Εικ. 3.7) επιβεβαιώνοντας έτσι, ότι τα συμπτώματα που παρατηρήθηκαν στα φυτά τομάτας προέρχονται από το ένθετο γονίδιο στο *pTRV* φορέα. Επίσης, η έλλειψη συμπτωμάτων σε φυτά τομάτας που εμβολιάστηκαν με κενό φορέα *pTRV* επιβεβαιώνει πως ο φορέας-ιός TRV ήταν αφοπλισμένος.

Το σημαντικό ζήτημα που προέκυψε στο παραπάνω πείραμα είναι η έλλειψη επαναληψιμότητας των αποτελεσμάτων του. Σε όλες τις περιπτώσεις επανάληψης δεν κατέστη δυνατό να παραχθούν συμπτώματα από τους ανασυνδυασμένους φορείς *pTRV-VdNEP*, *pTRV-PDS*. Το πιθανότερο πρόβλημα που οδήγησε στην αδυναμία επανάληψης των αποτελεσμάτων αποτελούν οι συνθήκες διεξαγωγής του. Η έκφραση των NLP πρωτεϊνών και η παραγωγή συμπτωμάτων μετά από εμβολιασμό στα φύλλα του ξενιστή, εξαρτάται σημαντικά από τις συνθήκες φωτισμού. Αν ο εμβολιασμός πραγματοποιηθεί σε συνθήκες έλλειψης φωτός, η

εμφάνιση των συμπτωμάτων είναι καθυστερημένη ή μηδαμινή. Επίσης, η διατήρηση των φυτών στο σκοτάδι για 30' πριν τον εμβολιασμό τους και 24h μετά τον εμβολιασμό τους εμποδίζει τελικά την παραγωγή συμπτωμάτων σε αυτά (Qutob et al., 2006). Πολύ σημαντική στην έκφραση των ένθετων γονιδίων σε ικούς φορείς είναι και η θερμοκρασία. Τα φυτά πρέπει να διατηρούνται σε θερμοκρασίες γύρω στους 21°C ώστε να εμφανιστούν τα πρώτα συμπτώματα σε 10 μέρες μετά τη μόλυνση και για να μετακινηθεί ο ιός διασυστηματικά σε 2-3 εβδομάδες (Burch-Smith et al., 2004).

Παρά την αδυναμία επανάληψης των αρχικών αποτελεσμάτων είναι πολύ σημαντική η καταγραφή συμπτωμάτων αδρομύκωσης διασυστηματικά, σε φυτά τομάτας μετά τον εμβολιασμό τους με έναν ικό φορέα που φέρει ως ένθετο, το γονίδιο *VdNEP*.

Η πρωτεΐνη *VdNEP* είναι μέλος της οικογένειας των *NEP* πρωτεϊνών, οι οποίες προκαλούν τον κυτταρικό θάνατο και επάγουν τους μηχανισμούς άμυνας των φυτών. Ο ακριβής μηχανισμός δράσης τους σε μοριακό επίπεδο δεν είναι σαφής, ωστόσο η πλειοψηφία των γονιδίων που επάγουν οι *NEP1* πρωτεΐνες συνδέονται με μια φυσιολογική κατάσταση στρες από την πλευρά των φυτών στα οποία εκφράζονται (Bae et al., 2006). Οι πρωτεΐνες *NEP1* έχουν ευθέως συνδεθεί με προσβολές από νεκροτροφικά παθογόνα και παθογόνα με παρόμοιες διατροφικές προτιμήσεις εμφανίζουν συγγένεια ως προς τις *NEP* πρωτεΐνες που παράγουν (Gijzen and Nürbenger, 2006). Η *VdNEP* πρωτεΐνη εμφανίζει 62% ομολογία με αυτή του *Fusarium oxysporum* f.sp. *erythroxyli* την πρωτεΐνη ενός μύκητα που εμφανίζει παρόμοια παθολογία και συμπτωματολογία με αυτή του *V. dahliae* (Wang et al., 2004).

Η απενεργοποίηση *NEP1* γονιδίων σε στελέχη του βακτηρίου *Erwinia carotovora*, είχε ως αποτέλεσμα την μειωμένη παραγωγή συμπτωμάτων μαλακής σήψης σε κονδύλους πατάτας. Φαίνεται λοιπόν πως οι *NEP1* πρωτεΐνες συνδέονται με την ικανότητα παραγωγής συμπτωμάτων σε νεκροτροφικά παθογόνα (Pemberton et al., 2005). Επίσης, η υπερέκφραση μιας *NEP1* πρωτεΐνης σε ένα υπομολυσματικό μύκητα *Colletotrichum coccodes*, αύξησε σε μεγάλο βαθμό την ικανότητα του να προσβάλλει το φυσικό ξενιστή του *Abutilon theophrasti* ενώ διεύρυνε και τον κύκλο των ξενιστών του (Amsellem et al., 2002).

Η μόλυνση φυτών βαμβακιού, τομάτας και *A. thaliana* με στελέχη που υπερέκφραζαν το γονίδιο *VdNEP*, της αποφυλλωτικής (22V6NEP16) και της μη αποφυλλωτικής (22V6NEP74, 22V6NEP77) φυλής του βαμβακιού και της φυλής 1 (70V6NEP1) της τομάτας, του μύκητα *V. dahliae*, οδήγησε σε αυξημένη μολυσματικότητα των μεταλλαγμένων στελεχών σε σχέση με τα αντίστοιχα άγρια στελέχη.

Το μεταλλαγμένο στέλεχος της αποφυλλωτικής φυλής του βαμβακιού έδωσε στατιστικά σημαντική αύξηση στη μολυσματικότητα ως προς τις τιμές της σχετικής AUDPC σε σχέση με το άγριο στέλεχος, τόσο στο *A. thaliana* όσο και στο βαμβάκι, όχι όμως και στη τομάτα. Η αλληλουχία συμπτωμάτων στα φυτά βαμβακιού ήταν φύλλο σημαίας, μάρανση, επινασσία, χλώρωση, κιτρίνισμα, νέκρωση και φυλλόπτωση. Ωστόσο, η φυλλόπτωση δεν ήταν σημαντικά αυξημένη στο μεταλλαγμένο στέλεχος της αποφυλλωτικής του βαμβακιού σε σχέση με το άγριο στέλεχος. Πιθανότατα, η θερμοκρασία ανάπτυξης των φυτών βαμβακιού να μην ήταν αρκετά υψηλή ώστε να αυξήσει την ένταση των συμπτωμάτων. Η αποφυλλωτική φυλή του βαμβακιού που υπερέκφραζε το γονίδιο VdNEP δεν έδωσε συμπτώματα στη τομάτα, κάτι που είναι σε συμφωνία με προηγούμενα δεδομένα (Korolev et al., 2008).

Τα δύο μεταλλαγμένα στελέχη της μη αποφυλλωτικής φυλής του βαμβακιού έδωσαν στατιστικά σημαντική αύξηση στην ασθένεια που προκάλεσαν στα τρία φυτικά είδη στα οποία εφαρμόστηκαν σε σχέση με το άγριο στέλεχος. Πιο συγκεκριμένα, οι τιμές της σχετικής AUDPC των μεταλλαγμένων στελεχών 25V6NEP74 και 25V6NEP77 ήταν σημαντικά αυξημένες σε σχέση με το στέλεχος 25V. Γενικά όμως, τα δύο αυτά μεταλλαγμένα στελέχη δεν εμφάνισαν ταχεία αύξηση στο ποσό της ασθένειας που προκάλεσαν, τις πρώτες δύο εβδομάδες μετά τη μόλυνση. Κατά το πρώτο αυτό διάστημα οι μέσοι όροι του ποσού ασθένειας δεν διέφεραν από αυτούς του αγρίου στελέχους. Στα φυτά βαμβακιού καταγράφηκε μια μείωση του ύψους τους, ως αποτέλεσμα της μόλυνσης από τα τέσσερα μεταλλαγμένα στελέχη, σε σχέση με τα αντίστοιχα άγρια η οποία όμως δεν ήταν στατιστικά σημαντική. Αντίθετα, η μόλυνση των φυτών τομάτας με τα υπερεκφράζοντα στελέχη της αποφυλλωτικής φυλής του βαμβακιού οδήγησε σε στατιστικά σημαντική αύξηση του ύψους των φυτών τομάτας, σε σχέση με το άγριο στέλεχος (Σχ. 3.10).

Τα υψηλότερα ποσοστά ασθένειας από τα τέσσερα μεταλλαγμένα στελέχη προκλήθηκε από το στέλεχος της φυλής 1 της τομάτας. Το στέλεχος αυτό έδωσε στατιστικά σημαντική αύξηση στην τιμή της σχετικής AUDPC στα φυτά τομάτας, βαμβακιού και αραβίδοψης, σε σχέση με το άγριο στέλεχος. Οι μέσες τιμές της σχετικής AUDPC του μεταλλαγμένου στελέχους της φυλής 1 της τομάτας, ήταν εξίσου υψηλές με τις αντίστοιχες μέσες τιμές της αποφυλλωτικής φυλής του βαμβακιού. Φαίνεται συνεπώς, πως η φυλή 1 της τομάτας έχει την ικανότητα να προσβάλλει το βαμβάκι τουλάχιστον όσο ισχυρά το προσβάλλει και η αποφυλλωτική φυλή του βαμβακιού. Η αύξηση αυτή στα ποσοστά ασθένειας που προκάλεσε η φυλή 1 της τομάτας στα φυτά που μολύνθηκαν, συνοδεύτηκε από διαφοροποίηση στο ύψος των φυτών μόνο στην περίπτωση του βαμβακιού και όχι της τομάτας. Τα φυτά της τομάτας που είχαν μολυνθεί με το υπερεκφράζον

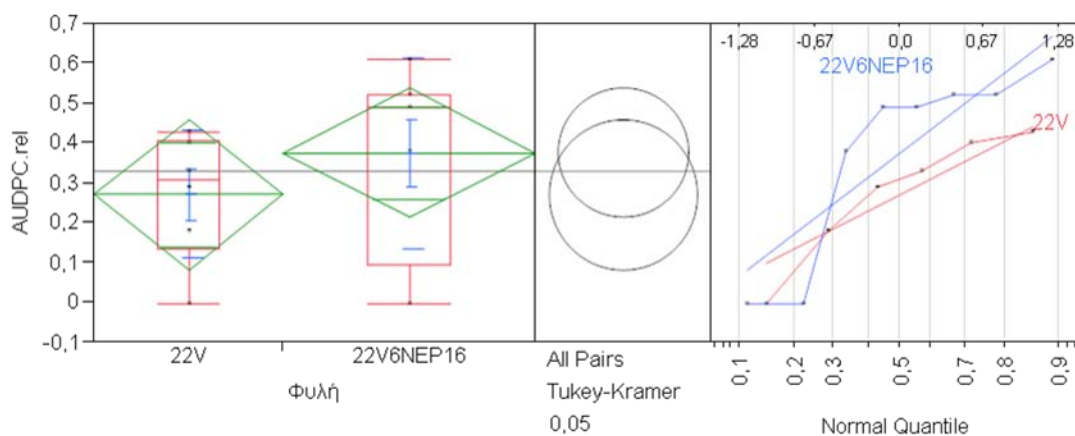
στέλεχος της φυλής 1 της τομάτας δεν εμφάνισαν μείωση στο τελικό ύψος τους παρά το γεγονός ότι εμφάνισαν τα τυπικά συμπτώματα αδρομύκωσης.

Συνολικά, από τα παραπάνω προκύπτει πως η υπερέκφραση του γονιδίου *VdNEP* σε φυτά τομάτας προκάλεσε διασυστηματικά συμπτώματα μάρανσης και νέκρωσης. Επίσης, η υπερέκφραση του, σε στελέχη του μύκητα *V. dahliae*, αύξησε στατιστικώς σημαντικά, το σχετικό AUDPC σε σχέση με τα αντίστοιχα άγρια στελέχη και διεύρυνε τον κύκλο των ξενιστών της φυλής 1, του μύκητα.

Φαίνεται δηλαδή, πως η πρωτεΐνη *VdNEP* εμπλέκεται σημαντικά στην παθογένεια του μύκητα *V. dahliae*.

ΠΑΡΑΡΤΗΜΑ

ΑΠΟΦΥΛΛΩΤΙΚΗ ΦΥΛΗ ΤΟΥ ΒΑΜΒΑΚΙΟΥ ΤΟΥ ΜΥΚΗΤΑ *V. DAHLIAE* ΜΟΛΥΝΣΗ ΦΥΤΩΝ ΒΑΜΒΑΚΙΟΥ 25/2/2010



Ανάλυση Διασποράς AUDPC.rel φυτών βαμβακιού μολυσμένων με την αποφυλλωτική φυλή του βαμβακιού και την αντίστοιχη άγρια, του μύκητα *V. dahliae*

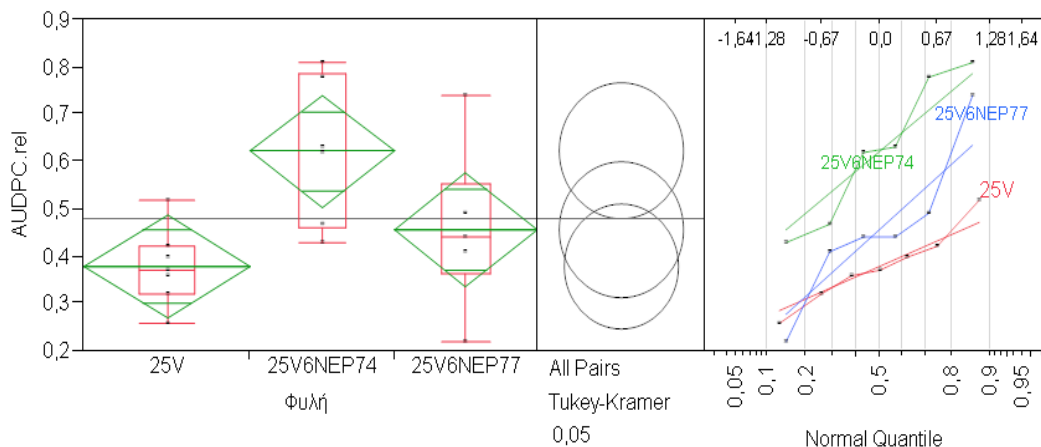
Source	DF	Sum of Squares	Mean Square	F Ratio	Prob > F
Φυλή	1	0,0375006	0,037501	0,8451	0,376
Error	12	0,53247083	0,044373		
C. Total	13	0,56997143			

Σύγκριση μέσω AUDPC.rel φυτών βαμβακιού μολυσμένων με την αποφυλλωτική φυλή του βαμβακιού και την αντίστοιχη άγρια, του μύκητα *V. dahliae*, κατά Tukey-Kramer

Level	Mean
22V6NEP16	0,37625
22V	0,27166667

Σχήμα Π.1: Ανάλυση διασποράς και συγκρίσεις μέσω της σχετικής τιμής του AUDPC, του αγρίου (22V) και του μεταλλαγμένου στελέχους (22V6NEP16) της αποφυλλωτικής φυλής του βαμβακιού, του μύκητα *V. dahliae*, σε φυτά βαμβακιού.

ΜΗ ΑΠΟΦΥΛΛΩΤΙΚΗ ΦΥΛΗ ΤΟΥ ΒΑΜΒΑΚΙΟΥ ΤΟΥ ΜΥΚΗΤΑ *V. DAHLIAE*
ΜΟΛΥΝΣΗ ΦΥΤΩΝ ΒΑΜΒΑΚΙΟΥ 25/2/2010



Ανάλυση Διασποράς AUDPC.rel φυτών βαμβακιού μολυσμένων με την μη αποφυλλωτική φυλή του βαμβακιού και την αντίστοιχη άγρια, του μύκητα *V. dahliae*

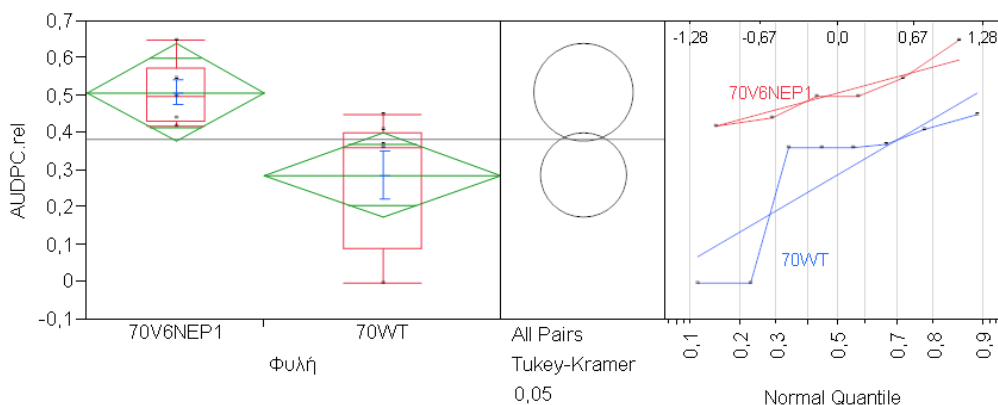
Source	DF	Sum of Squares	Mean Square	F Ratio	Prob > F
Φυλή	2	0,19854236	0,099271	5,2847	0,0173
Error	16	0,30055238	0,018785		
C. Total	18	0,49909474			

Σύγκριση μέσω AUDPC.rel φυτών βαμβακιού μολυσμένων με την μη αποφυλλωτική φυλή του βαμβακιού και την αντίστοιχη άγρια, του μύκητα *V. dahliae*, κατά Tukey-Kramer

Level		Mean
25V6NEP74	A	0,623333
25V6NEP77	AB	0,456667
25V	B	0,378571

Σχήμα Π.2: Ανάλυση διασποράς και συγκρίσεις μέσω της σχετικής τιμής του AUDPC, του αγρίου (25V) και των μεταλλαγμένων στελεχών (25V6NEP74, 25V6NEP77) της μη αποφυλλωτικής φυλής του βαμβακιού, του μύκητα *V. dahliae*, σε φυτά βαμβακιού.

ΦΥΛΗ 1 ΤΗΣ ΤΟΜΑΤΑΣ ΤΟΥ ΜΥΚΗΤΑ *V. DAHLIAE*
ΜΟΛΥΝΣΗ ΦΥΤΩΝ ΒΑΜΒΑΚΙΟΥ 25/2/2010



Ανάλυση Διασποράς AUDPC.rel φυτών βαμβακιού μολυσμένων με τη φυλή 1 της τομάτας και την αντίστοιχη άγρια, του μύκητα *V. dahliae*

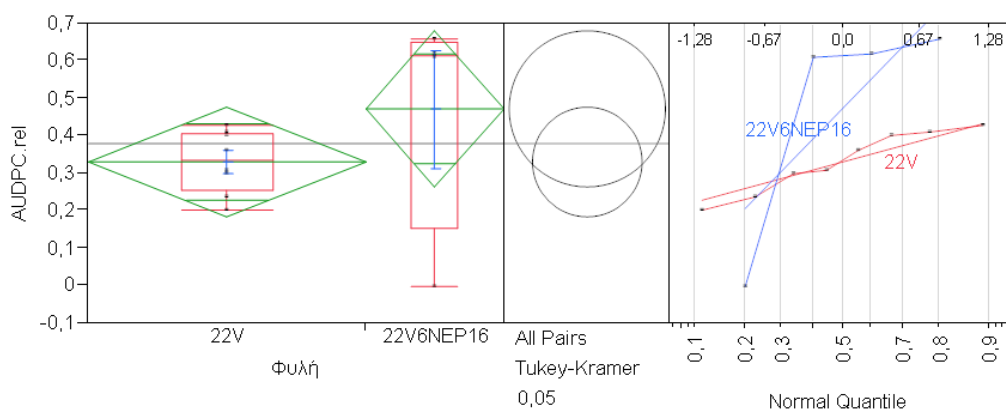
Source	DF	Sum of Squares	Mean Square	F Ratio	Prob > F
Φυλή	1	0,16783393	0,167834	7,6379	0,0172
Error	12	0,2636875	0,021974		
C. Total	13	0,43152143			

Σύγκριση μέσω AUDPC.rel φυτών βαμβακιού μολυσμένων με την αποφυλλωτική φυλή του βαμβακιού και την αντίστοιχη άγρια, του μύκητα *V. dahliae*, κατά Tukey-Kramer

Level		Mean
70V6NEP1	A	0,51
70WT	B	0,28875

Σχήμα Π.3: Ανάλυση διασποράς και συγκρίσεις μέσω της σχετικής τιμής του AUDPC, του αγρίου (70WT) και του μεταλλαγμένου στελέχους (70V6NEP1) της φυλής 1 της τομάτας, του μύκητα *V. dahliae*, σε φυτά βαμβακιού.

**ΑΠΟΦΥΛΛΩΤΙΚΗ ΦΥΛΗ ΤΟΥ ΒΑΜΒΑΚΙΟΥ ΤΟΥ ΜΥΚΗΤΑ *V. DAHLIAE*
ΜΟΛΥΝΣΗ ΦΥΤΩΝ ΒΑΜΒΑΚΙΟΥ 8/4/2010**



Ανάλυση Διασποράς AUDPC.rel φυτών βαμβακιού μολυσμένων με την αποφυλλωτική φυλή του βαμβακιού και την αντίστοιχη άγρια, του μύκητα *V. dahliae*

Source	DF	Sum of Squares	Mean Square	F Ratio	Prob > F
Φυλή	1	0,05320417	0,053204	1,5308	0,2443
Error	10	0,3475625	0,034756		
C. Total	11	0,40076667			

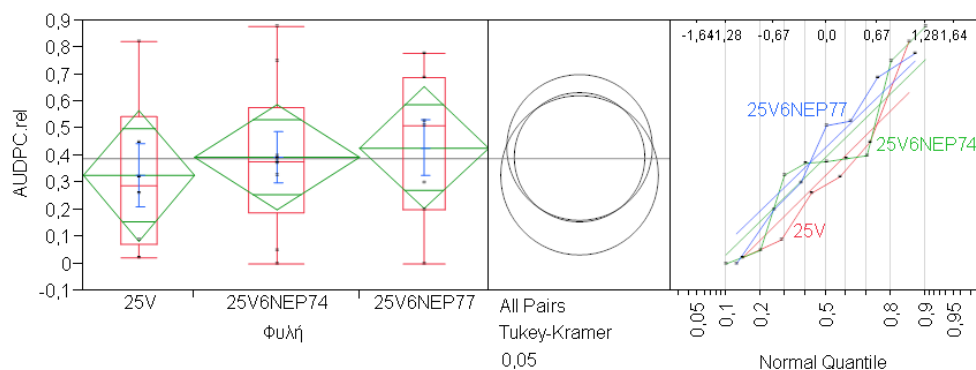
Σύγκριση μέσω AUDPC.rel φυτών βαμβακιού μολυσμένων με την αποφυλλωτική φυλή του βαμβακιού και την αντίστοιχη άγρια, του μύκητα *V. dahliae*, κατά Tukey-Kramer

Level		Mean
22V6NEP16	AB	0,4725
22V	A	0,33125

Σχήμα Π.4: Ανάλυση διασποράς και συγκρίσεις μέσω της σχετικής τιμής του AUDPC, του αγρίου (22V) και του μεταλλαγμένου στελέχους (22V6NEP16) της αποφυλλωτικής φυλής του βαμβακιού, του μύκητα *V. dahliae*, σε φυτά βαμβακιού.

ΜΗ ΑΠΟΦΥΛΛΩΤΙΚΗ ΦΥΛΗ ΤΟΥ ΒΑΜΒΑΚΙΟΥ ΤΟΥ ΜΥΚΗΤΑ *V. DAHLIAE*

ΜΟΛΥΝΣΗ ΦΥΤΩΝ ΒΑΜΒΑΚΙΟΥ 8/4/2010



Ανάλυση Διασποράς AUDPC.rel φυτών βαμβακιού μολυσμένων με την μη αποφυλλωτική φυλή του βαμβακιού και την αντίστοιχη άγρια, του μύκητα *V. dahliae*

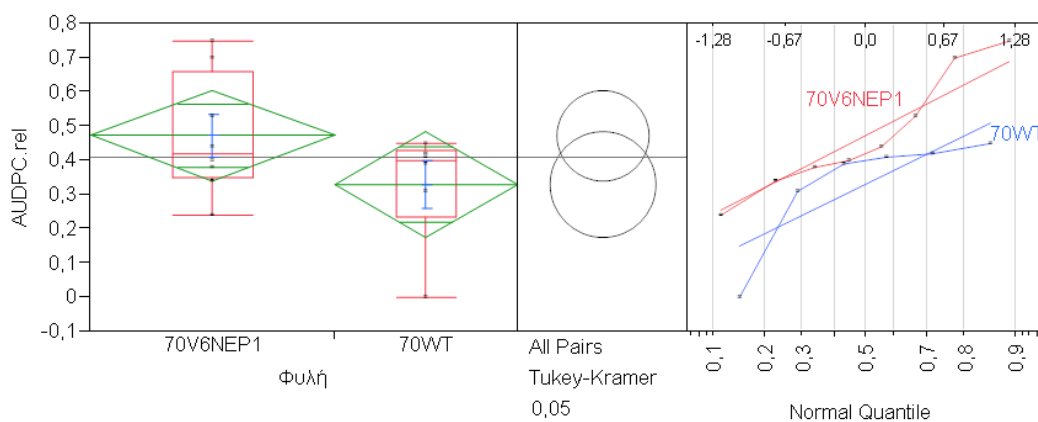
Source	DF	Sum of Squares	Mean Square	F Ratio	Prob > F
Φυλή	2	0,0352808	0,01764	0,2211	0,8037
Error	19	1,5157556	0,079777		
C. Total	21	1,5510364			

Σύγκριση μέσω AUDPC.rel φυτών βαμβακιού μολυσμένων με την μη αποφυλλωτική φυλή του βαμβακιού και την αντίστοιχη άγρια, του μύκητα *V. dahliae*, κατά Tukey-Kramer

Level		Mean
25V6NEP77	A	0,43
25V6NEP74	A	0,394444
25V	A	0,326667

Σχήμα Π.5: Ανάλυση διασποράς και συγκρίσεις μέσω της σχετικής τιμής του AUDPC, του αγρίου (25V) και των μεταλλαγμένων στελεχών (25V6NEP74, 25V6NEP77) της μη αποφυλλωτικής φυλής του βαμβακιού, του μύκητα *V. dahliae*, σε φυτά βαμβακιού.

ΦΥΛΗ 1 ΤΗΣ ΤΟΜΑΤΑΣ ΤΟΥ ΜΥΚΗΤΑ *V. DAHLIAE*
ΜΟΛΥΝΣΗ ΦΥΤΩΝ ΒΑΜΒΑΚΙΟΥ 25/2/2010



Ανάλυση Διασποράς AUDPC.rel φυτών βαμβακιού μολυσμένων με τη φυλή 1 της τομάτας και την αντίστοιχη άγρια, του μύκητα *V. dahliae*

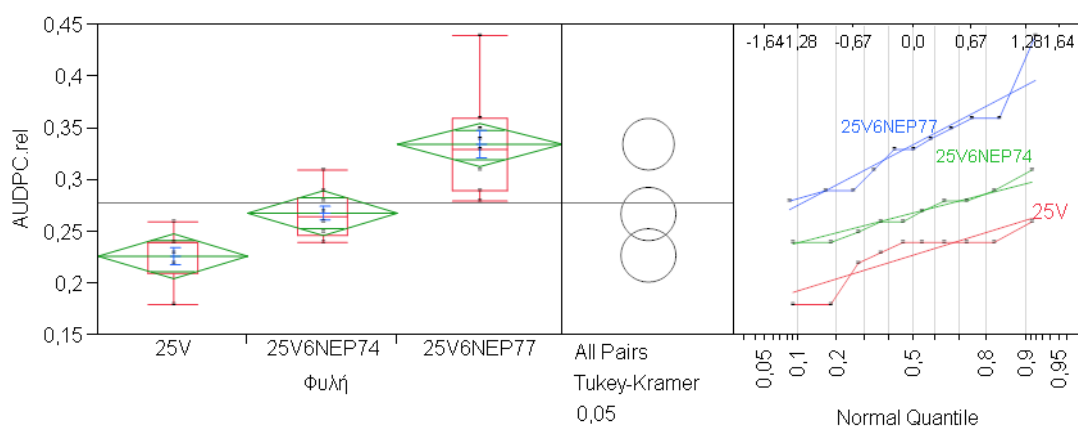
Source	DF	Sum of Squares	Mean Square	F Ratio	Prob > F
Φυλή	1	0,06962143	0,069621	2,3185	0,1538
Error	12	0,36035	0,030029		
C. Total	13	0,42997143			

Σύγκριση μέσων AUDPC.rel φυτών βαμβακιού μολυσμένων με την φυλή 1 της τομάτας και την αντίστοιχη άγρια, του μύκητα *V. dahliae*, κατά Tukey-Kramer

Level		Mean
70V6NEP1	AB	0,4725
70WT	A	0,33

Σχήμα Π.6: Ανάλυση διασποράς και συγκρίσεις μέσω της σχετικής τιμής του AUDPC, του αγρίου (70WT) και του μεταλλαγμένου στελέχους (70V6NEP1) της φυλής 1 της τομάτας, του μύκητα *V. dahliae*, σε φυτά βαμβακιού.

ΜΗ ΑΠΟΦΥΛΛΩΤΙΚΗ ΦΥΛΗ ΤΟΥ ΒΑΜΒΑΚΙΟΥ ΤΟΥ ΜΥΚΗΤΑ *V. DAHLIAE*
ΜΟΛΥΝΣΗ ΦΥΤΩΝ ΤΟΜΑΤΑΣ 8/4/2010



Ανάλυση Διασποράς AUDPC.rel φυτών τομάτας μολυσμένων με την μη αποφυλλωτική φυλή του βαμβακιού και την αντίστοιχη άγρια, του μύκητα *V. dahliae*

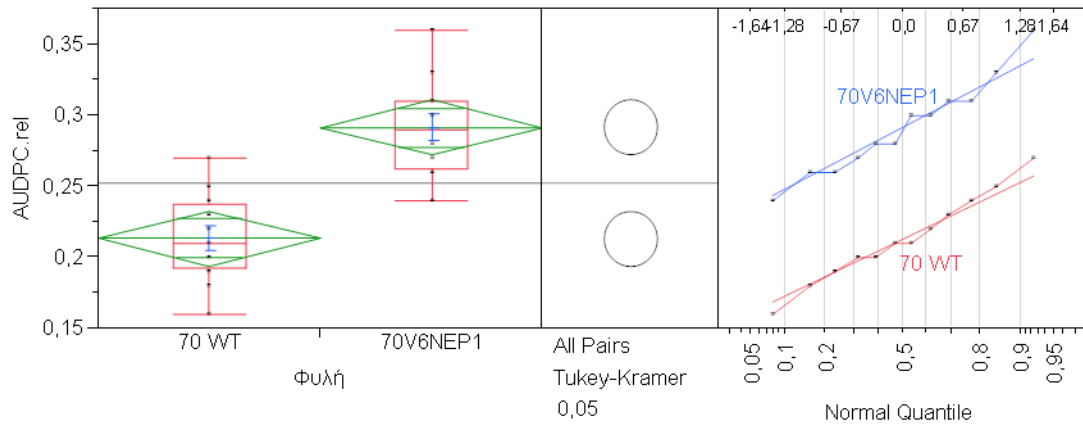
Source	DF	Sum of Squares	Mean Square	F Ratio	Prob > F
Φυλή	2	0,06217663	0,031088	27,8616	<,0001
Error	28	0,03124273	0,001116		
C. Total	30	0,09341935			

Σύγκριση μέσω AUDPC.rel φυτών τομάτας μολυσμένων με την αποφυλλωτική φυλή του βαμβακιού και την αντίστοιχη άγρια, του μύκητα *V. dahliae*, κατά Tukey-Kramer

Level			Mean
25V6NEP77	A		0,334545
25V6NEP74		AB	0,268
25V		B	0,227

Σχήμα Π.7: Ανάλυση διασποράς και συγκρίσεις μέσω της σχετικής τιμής του AUDPC, του αγρίου (25V) και των μεταλλαγμένων στελεχών (25V6NEP74, 25V6NEP77) της μη αποφυλλωτικής φυλής του βαμβακιού, του μύκητα *V. dahliae*, σε φυτά τομάτας.

ΦΥΛΗ 1 ΤΗΣ ΤΟΜΑΤΑΣ ΤΟΥ ΜΥΚΗΤΑ *V. DAHLIAE*
ΜΟΛΥΝΣΗ ΦΥΤΩΝ ΤΟΜΑΤΑΣ 25/2/2010



Ανάλυση Διασποράς AUDPC.rel φυτών τομάτας μολυσμένων με τη φυλή 1 της τομάτας και την αντίστοιχη άγρια, του μύκητα *V. dahliae*

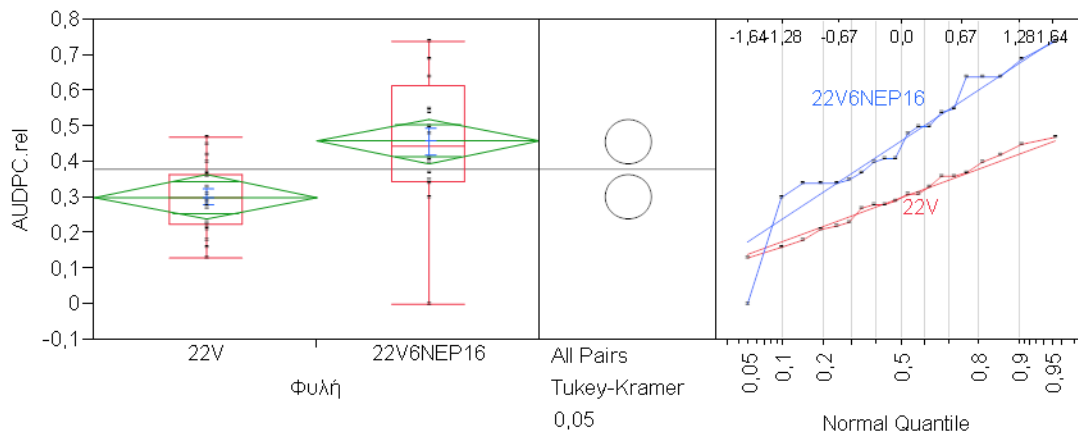
Source	DF	Sum of Squares	Mean Square	F Ratio	Prob > F
Φυλή	1	0,03681667	0,036817	35,473	<,0001
Error	22	0,02283333	0,001038		
C. Total	23	0,05965			

Σύγκριση μέσω AUDPC.rel φυτών τομάτας, μολυσμένων με την φυλή 1 της τομάτας και την αντίστοιχη άγρια, του μύκητα *V. dahliae*, κατά Tukey-Kramer

Level		Mean
70V6NEP1	A	0,291667
70 WT	B	0,213333

Σχήμα Π.8: Ανάλυση διασποράς και συγκρίσεις μέσω της σχετικής τιμής του AUDPC, του αγρίου (70WT) και του μεταλλαγμένου στελέχους (70V6NEP1) της φυλής 1 της τομάτας, του μύκητα *V. dahliae*, σε φυτά τομάτας.

**ΑΠΟΦΥΛΛΩΤΙΚΗ ΦΥΛΗ ΤΟΥ ΒΑΜΒΑΚΙΟΥ ΤΟΥ ΜΥΚΗΤΑ *V. DAHLIAE*
ΜΟΛΥΝΣΗ ΦΥΤΩΝ ΑΡΑΒΙΔΟΨΗΣ 1/4/2010**



Ανάλυση Διασποράς AUDPC.rel φυτών αραβίδοψης μολυσμένων με την αποφυλλωτική φυλή του βαμβακιού και την αντίστοιχη άγρια, του μύκητα *V. dahliae*

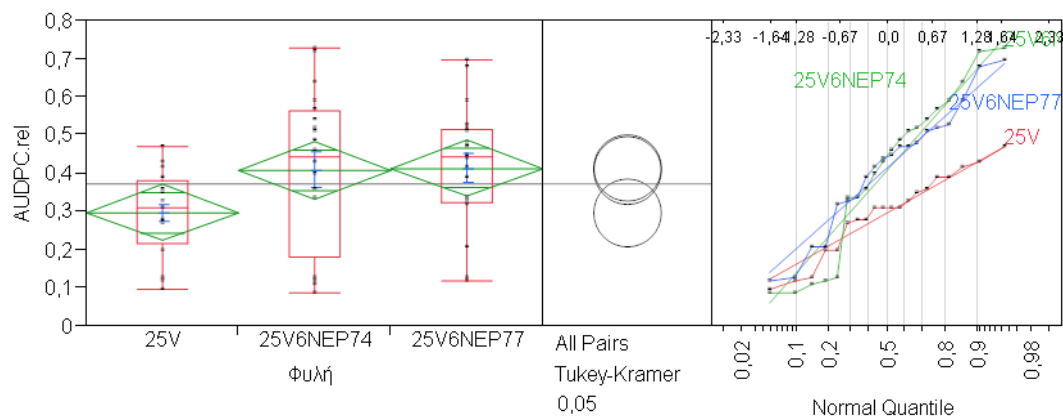
Source	DF	Sum of Squares	Mean Square	F Ratio	Prob > F
Φυλή	1	0,2480625	0,248062	12,9335	0,0009
Error	38	0,728835	0,01918		
C. Total	39	0,9768975			

Σύγκριση μέσω AUDPC.rel φυτών αραβίδοψης, μολυσμένων με την αποφυλλωτική φυλή του βαμβακιού και την αντίστοιχη άγρια, του μύκητα *V. dahliae*, κατά Tukey-Kramer

Level		Mean
22V6NEP16	A	0,459
22V	B	0,3015

Σχήμα Π.9: Ανάλυση διασποράς και συγκρίσεις μέσω της σχετικής τιμής του AUDPC, του αγρίου (22V) και του μεταλλαγμένου στελέχους (22V6NEP16) της αποφυλλωτικής φυλής του βαμβακιού, του μύκητα *V. dahliae*, σε φυτά αραβίδοψης.

ΜΗ ΑΠΟΦΥΛΛΩΤΙΚΗ ΦΥΛΗ ΤΟΥ ΒΑΜΒΑΚΙΟΥ ΤΟΥ ΜΥΚΗΤΑ *V. DAHLIAE*
ΜΟΛΥΝΣΗ ΦΥΤΩΝ ΑΡΑΒΙΔΟΨΗΣ 1/4/2010



Ανάλυση Διασποράς AUDPC.rel φυτών αραβίδοψης μολυσμένων με την μη αποφυλλωτική φυλή του βαμβακιού και την αντίστοιχη άγρια, του μύκητα *V. dahliae*

Source	DF	Sum of Squares	Mean Square	F Ratio	Prob > F
Φυλή	2	0,1744633	0,087232	3,2363	0,0466
Error	57	1,536395	0,026954		
C. Total	59	1,7108583			

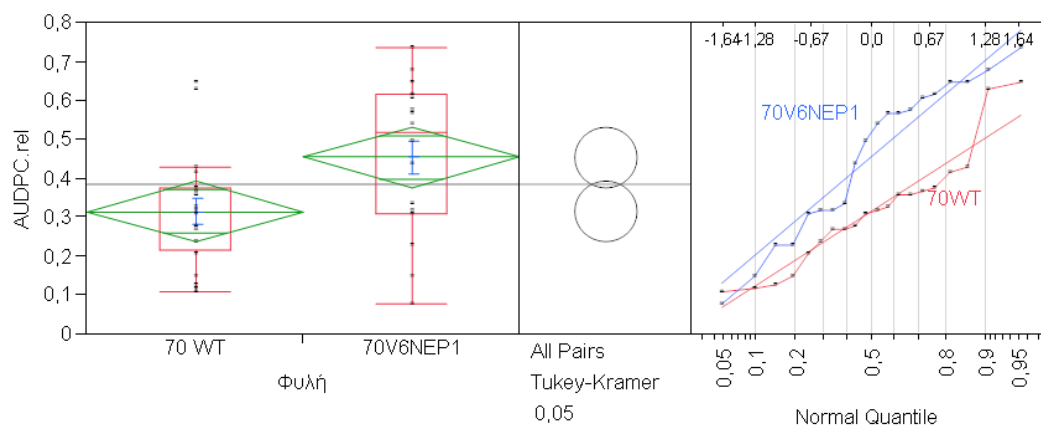
Σύγκριση μέσω AUDPC.rel φυτών αραβίδοψης, μολυσμένων με τη μη αποφυλλωτική φυλή του βαμβακιού και την αντίστοιχη άγρια, του μύκητα *V. dahliae*, κατά Tukey-Kramer

Level		Mean
25V6NEP77	AB	0,4155
25V6NEP74	AB	0,409
25V	A	0,298

Σχήμα Π.10: Ανάλυση διασποράς και συγκρίσεις μέσω της σχετικής τιμής του AUDPC, του αγρίου (25V) και των μεταλλαγμένων στελεχών (25V6NEP74, 25V6NEP77) της μη αποφυλλωτικής φυλής του βαμβακιού, του μύκητα *V. dahliae*, σε φυτά αραβίδοψης.

ΦΥΛΗ 1 ΤΗΣ ΤΟΜΑΤΑΣ ΤΟΥ ΜΥΚΗΤΑ *V. DAHLIAE*

ΜΟΛΥΝΣΗ ΦΥΤΩΝ ΑΡΑΒΙΔΟΨΗΣ 25/2/2010



Ανάλυση Διασποράς AUDPC.rel φυτών αραβίδοψης, μολυσμένων με τη φυλή 1 της τομάτας και την αντίστοιχη άγρια, του μύκητα *V. dahliae*

Source	DF	Sum of Squares	Mean Square	F Ratio	Prob > F
Φυλή	1	0,1946025	0,194602	6,5623	0,0145
Error	38	1,126875	0,029655		
C. Total	39	1,3214775			

Σύγκριση μέσω AUDPC.rel φυτών αραβίδοψης, μολυσμένων με την φυλή 1 της τομάτας και την αντίστοιχη άγρια, του μύκητα *V. dahliae*, κατά Tukey-Kramer

Level		Mean
70V6NEP1	A	0,4565
70 WT	B	0,317

Σχήμα Π.11: Ανάλυση διασποράς και συγκρίσεις μέσω της σχετικής τιμής του AUDPC, του αγρίου (70WT) και του μεταλλαγμένου στελέχους (70V6NEP1) της φυλής 1 της τομάτας, του μύκητα *V. dahliae*, σε φυτά αραβίδοψης.

Πίνακας Π.1: Αποτελέσματα εξέλιξης ποσοστού ασθένειας, μέσοι όροι ποσοστού ασθένειας, AUDPC και σχετικού AUDPC, σε φυτά βαμβακιού. Στον πίνακα καταγράφεται ο αριθμός των φύλλων με συμπτώματα του μύκητα *V. dahliae*, επί του συνόλου των φύλλων του φυτού.

Βαμβάκι (μόλυνση 25/2/2010)								Ημερομηνία
Φυλή	22V6NEP16	25V6NEP74	25V6NEP77	70V6NEP1	22V	25V	70WT	
Φυτό								
Φ1	—	4/4	0/5	1/4	0/3	1/6	0/5	5/3/2010
Φ2	—	1/4	0/5	2/4	2/5	1/5	1/4	
Φ3	—	1/4	3/5	0/4	1/4	0/5	1/5	
Φ4	1/3	2/5	2/4	1/4	1/5	2/5	0/3	
Φ5	1/4	2/4	0/3	1/5	2/4	1/4	0/3	
Φ6	2/5	2/5	1/5	1/5	0/4	1/6	2/5	
Φ7	0/2	—	—	—	1/4	0/5	1/5	
Φ8	—	—	—	—	1/6	—	1/4	
Σύνολο	4/13	12/26	6/27	6/26	8/35	6/36	6/34	
Ποσοστό	30,77%	46,15%	22,22%	23,08%	22,86%	16,67%	17,65%	
Φ1	—	4/5	1/5	2/4	0/4	2/6	0/5	8/3/2010
Φ2	—	2/4	1/5	2/5	2/5	1/5	1/4	
Φ3	—	2/4	3/5	1/4	2/4	1/5	2/5	
Φ4	2/3	2/5	3/5	1/4	1/5	1/3	1/4	
Φ5	1/4	2/5	0/3	2/5	2/4	2/5	0/4	
Φ6	2/5	3/5	2/6	2/5	0/4	2/6	2/6	
Φ7	0/3	—	—	—	2/4	1/5	2/5	
Φ8	—	—	—	—	2/6	—	2/4	
Σύνολο	5/15	15/28	10/29	10/27	11/36	10/35	10/32	
Ποσοστό	33,33%	53,57%	34,48%	37,04%	30,56%	28,57%	31,25%	
Φ1	—	5/5	2/5	2/5	1/5	2/6	0/6	10/3/2010
Φ2	—	2/4	2/5	2/5	2/5	1/6	2/5	
Φ3	—	2/5	4/6	2/4	2/5	2/5	2/5	
Φ4	2/4	2/5	3/5	2/4	2/5	2/4	1/5	
Φ5	2/4	2/5	0/4	3/6	2/5	2/5	0/4	
Φ6	3/6	4/5	3/6	3/6	0/5	2/6	3/6	
Φ7	0/3	—	—	—	2/4	1/5	3/5	
Φ8	—	—	—	—	2/6	—	2/5	
Σύνολο	7/17	17/29	14/31	14/30	13/40	12/37	13/41	
Ποσοστό	41,18%	58,62%	45,16%	46,67%	32,50%	32,43%	31,71%	
Φ1	—	5/5	2/5	2/5	1/5	2/6	0/6	12/3/2010
Φ2	—	3/5	2/5	3/5	2/6	2/6	2/6	
Φ3	—	3/5	5/6	2/4	2/5	3/5	2/5	
Φ4	2/4	2/5	3/6	2/5	2/5	3/4	2/5	
Φ5	3/4	3/5	1/4	4/6	2/5	2/5	0/5	
Φ6	3/6	5/5	4/6	4/6	1/5	2/6	3/6	
Φ7	0/4	—	—	—	2/5	2/6	3/5	

Βαμβάκι (μόλυνση 25/2/2010)							
Φυλή	22V6NEP16	25V6NEP74	25V6NEP77	70V6NEP1	22V	25V	70WT
Φ8	—	—	—	—	2/6	—	2/6
Σύνολο	8/18	21/30	17/32	17/31	14/42	16/38	14/44
Ποσοστό	44,44%	70,00%	53,13%	54,84%	33,33%	42,11%	31,82%
Φ1	—	5/6	3/5	2/5	2/5	2/7	0/7
Φ2	—	4/5	2/5	3/5	2/6	3/7	2/6
Φ3	—	4/5	5/6	3/4	2/6	3/5	3/5
Φ4	3/4	3/6	3/6	2/5	3/5	3/5	3/6
Φ5	3/5	3/6	2/5	4/6	3/5	2/6	0/6
Φ6	4/6	5/6	4/7	4/7	2/5	3/6	3/7
Φ7	0/4	—	—	—	2/5	2/6	3/6
Φ8	—	—	—	—	2/6	—	2/7
Σύνολο	10/19	24/34	19/34	18/32	18/41	18/42	16/50
Ποσοστό	52,63%	70,59%	55,88%	56,25%	43,90%	42,86%	32,00%
Φ1	—	5/6	3/5	3/5	2/5	2/7	0/7
Φ2	—	4/6	3/5	3/6	3/7	3/7	3/7
Φ3	—	4/5	5/6	3/4	2/6	3/6	3/5
Φ4	4/5	3/6	3/7	3/5	3/5	3/5	3/6
Φ5	4/5	3/6	2/5	5/6	3/5	3/6	0/6
Φ6	5/6	5/6	4/7	4/7	2/6	3/6	3/7
Φ7	0/5	—	—	—	2/6	2/7	3/6
Φ8	—	—	—	—	2/6	—	3/7
Σύνολο	13/21	24/35	20/35	21/33	19/46	19/44	17/51
Ποσοστό	61,90%	68,57%	57,14%	63,64%	41,30%	43,18%	33,33%
Φ1	—	5/6	3/6	3/6	2/6	3/7	0/8
Φ2	—	4/6	3/6	4/6	3/7	3/7	3/7
Φ3	—	5/7	5/6	3/5	2/6	3/6	3/6
Φ4	5/6	3/7	4/7	3/6	3/6	3/6	3/7
Φ5	5/6	4/7	2/6	5/6	3/6	3/7	0/7
Φ6	5/6	5/6	4/7	4/8	2/7	3/7	3/8
Φ7	0/6	—	—	—	3/6	2/7	3/7
Φ8	—	—	—	—	2/7	—	3/8
Σύνολο	15/24	26/38	21/38	22/37	20/51	20/47	18/58
Ποσοστό	62,50%	68,42%	55,26%	59,46%	39,22%	42,55%	31,03%
Φ1	—	5/7	4/7	3/7	2/6	3/7	0/8
Φ2	—	5/6	3/7	4/6	3/7	3/7	3/7
Φ3	—	5/7	5/7	3/5	2/7	3/7	3/7
Φ4	5/6	3/7	4/7	3/6	3/7	3/6	3/7
Φ5	5/7	4/7	2/7	5/6	3/7	3/7	0/7
Φ6	5/7	5/6	4/7	4/8	2/7	3/7	3/8
Φ7	0/6	—	—	—	3/7	2/7	3/7
Φ8	—	—	—	—	2/7	—	3/8

Βαμβάκι (μόλυνση 25/2/2010)								
Φυλή	22V6NEP16	25V6NEP74	25V6NEP77	70V6NEP1	22V	25V	70WT	
Σύνολο	15/26	27/40	22/42	22/38	20/55	20/48	18/59	
Ποσοστό	57,69%	67,50%	52,38%	57,89%	36,36%	41,67%	30,51%	
Φ1	—	5/7	4/7	3/7	2/7	3/7	0/8	23/3/2010
Φ2	—	5/7	3/8	4/7	3/7	3/7	3/8	
Φ3	—	5/7	5/7	3/6	2/8	3/7	3/8	
Φ4	5/7	3/8	4/7	3/7	3/8	3/6	3/8	
Φ5	5/7	4/8	2/8	5/6	3/8	3/7	0/8	
Φ6	5/7	5/6	4/8	4/8	2/8	3/7	3/9	
Φ7	0/7	—	—	—	3/7	2/8	3/8	
Φ8	—	—	—	—	3/8	—	3/9	
Σύνολο	15/28	27/44	22/45	22/41	21/61	20/49	18/66	
Ποσοστό	53,57%	61,36%	48,89%	53,66%	34,43%	40,82%	27,27%	
Φ1	—	5/8	4/8	3/8	2/7	3/8	0/9	26/3/2010
Φ2	—	5/8	3/8	4/7	3/8	3/7	3/8	
Φ3	—	5/8	5/8	3/7	2/8	3/8	3/8	
Φ4	5/8	4/8	4/8	3/8	3/8	3/7	3/8	
Φ5	6/8	4/8	2/8	5/7	3/8	3/8	0/8	
Φ6	5/7	5/8	4/8	4/8	2/8	3/7	3/9	
Φ7	0/8	—	—	—	3/8	3/8	3/8	
Φ8	—	—	—	—	3/8	—	3/9	
Σύνολο	16/31	28/48	22/48	22/45	21/63	21/53	18/67	
Ποσοστό	51,61%	58,33%	45,83%	48,89%	33,33%	39,62%	26,87%	
M.O.	48,96%	62,31%	47,04%	50,14%	34,78%	37,05%	29,34%	
Φυλή	22V6NEP16	25V6NEP74	25V6NEP77	70V6NEP1	22V	25V	70WT	max.
d.a.i.	Μέσοι όροι (%) του ποσοστού ασθένειας							
8	30,77	46,15	22,22	23,08	22,86	16,67	17,65	100
11	33,33	53,57	34,48	37,04	30,56	28,57	31,25	100
13	41,18	58,62	45,16	46,67	32,50	32,43	31,71	100
15	44,44	70,00	53,13	54,84	33,33	42,11	31,82	100
18	52,63	70,59	55,88	56,25	43,90	42,86	32,00	100
20	61,90	68,57	57,14	63,64	41,30	43,18	33,33	100
22	62,50	68,42	55,26	59,46	39,22	42,55	31,03	100
24	57,69	67,50	52,38	57,89	36,36	41,67	30,51	100
26	53,57	61,36	48,89	53,66	34,43	40,82	27,27	100
28	51,61	58,33	45,83	48,89	33,33	39,62	26,87	100
AUDPC	977,48	1261,92	955,57	1016,47	704,72	749,76	598,72	2000,00
AUDPC.rel	0,49	0,63	0,48	0,51	0,35	0,37	0,30	1,00

Φυλή	22V6NEP16	25V6NEP74	25V6NEP77	70V6NEP1	22V	25V	70WT
Φυτό	AUDPC						
1	—	1629,91	878,57	871,43	489,06	639,93	0,00
2	—	1251,20	814,88	1093,10	713,75	722,90	716,37
3	—	1243,58	1471,60	1007,86	612,19	838,94	828,21
4	1327,88	861,43	879,42	843,22	828,21	1043,71	711,43
5	1224,88	946,07	441,31	1301,46	869,06	795,50	0,00
6	1242,16	1557,56	974,05	1003,81	405,95	741,72	722,06
7	0,00	—	—	—	795,25	522,77	908,93
8	—	—	—	—	606,84	—	733,01
Φυλή	22V6NEP16	25V6NEP74	25V6NEP77	70V6NEP1	22V	25V	70WT
Φυτό	AUDPC.rel						
1	—	0,81	0,44	0,44	0,24	0,32	0,00
2	—	0,63	0,41	0,55	0,36	0,36	0,36
3	—	0,62	0,74	0,50	0,31	0,42	0,41
4	0,66	0,43	0,44	0,42	0,41	0,52	0,36
5	0,61	0,47	0,22	0,65	0,43	0,40	0,00
6	0,62	0,78	0,49	0,50	0,20	0,37	0,36
7	0,00	—	—	—	0,40	0,26	0,45
8	—	—	—	—	0,30	—	0,37

Πίνακας Π.2: Αποτελέσματα εξέλιξης ποσοστού ασθένειας, μέσοι όροι ποσοστού ασθένειας, AUDPC και σχετικού AUDPC, σε φυτά *A. thaliana*. Στον πίνακα καταγράφεται ο αριθμός των φύλλων με συμπτώματα του μύκητα *V. dahliae*, επί του συνόλου των φύλλων του φυτού.

<i>Arabidopsis thaliana</i> (μόλυνση 1/4/2010)								Ημερομηνία
Φυλή	22V6NEP16	25V6NEP74	25V6NEP77	70V6NEP1	22V	25V	70WT	
Φυτό								7/4/2010
Φ1	0/20	0/13	0/14	0/12	0/20	0/12	0/12	
Φ2	1/16	1/15	0/13	0/14	0/19	1/17	0/13	
Φ3	2/17	0/10	0/12	1/13	0/21	0/12	1/12	
Φ4	2/16	0/15	2/14	0/14	0/18	0/13	0/12	
Φ5	0/16	0/13	0/12	0/12	2/19	0/15	0/15	
Φ6	3/18	1/17	1/15	1/15	0/19	0/13	0/15	
Φ7	1/20	0/14	0/14	2/16	1/22	0/13	0/15	
Φ8	0/19	0/13	0/12	0/13	0/19	1/18	1/13	
Φ9	2/15	2/17	0/15	3/17	2/17	0/16	0/12	
Φ10	1/15	0/19	1/13	3/17	0/22	0/14	0/15	
Φ11	0/20	0/12	0/12	1/14	0/19	0/17	1/15	
Φ12	1/20	3/12	1/11	0/15	0/16	0/18	0/14	
Φ13	2/12	0/14	2/16	3/18	1/20	0/10	0/13	
Φ14	0/18	0/12	0/10	4/17	0/17	0/13	0/12	
Φ15	2/14	0/13	0/10	3/18	1/19	1/18	0/9	
Φ16	2/20	0/11	3/11	3/16	0/18	0/13	0/12	
Φ17	2/18	3/19	2/15	0/16	1/22	0/18	0/16	
Φ18	0/16	3/17	1/14	0/11	2/17	0/17	2/11	
Φ19	0/18	1/15	0/7	0/13	0/20	1/17	0/13	
Φ20	1/19	0/16	0/11	2/11	0/18	0/12	0/13	
Σύνολο	22/347	14/289	14/251	26/292	9/382	4/295	5/252	
Ποσοστό	6,34%	4,84%	5,58%	8,90%	2,36%	1,36%	1,98%	
								10/4/2010
Φ1	0/22	1/15	2/16	0/14	0/22	0/14	0/14	
Φ2	2/18	4/17	0/15	2/15	1/21	4/19	0/15	
Φ3	5/19	0/12	1/13	3/15	1/23	0/14	4/14	
Φ4	3/18	1/17	4/16	3/16	0/20	0/14	0/15	
Φ5	1/18	1/15	0/14	0/15	3/21	2/17	2/17	
Φ6	6/20	5/19	3/17	3/17	0/21	1/14	0/17	
Φ7	2/22	0/16	3/17	3/18	2/24	0/15	2/17	
Φ8	0/21	0/15	1/13	2/15	1/20	3/20	3/16	
Φ9	5/17	5/19	2/17	5/19	3/17	2/18	1/14	
Φ10	3/17	3/21	3/15	7/20	0/24	0/16	1/18	
Φ11	1/22	0/14	2/14	4/16	1/20	1/19	2/17	
Φ12	3/22	6/14	4/13	2/17	1/18	1/19	2/17	
Φ13	5/14	0/17	5/18	7/20	3/20	0/12	1/15	
Φ14	0/20	1/14	0/12	7/19	2/17	1/15	2/14	
Φ15	5/16	1/15	0/12	5/20	3/19	3/20	0/12	
Φ16	5/23	0/13	6/13	6/18	1/19	0/15	1/14	
Φ17	4/20	8/21	4/17	1/19	3/22	1/20	0/18	
Φ18	1/18	6/19	3/16	0/13	4/17	2/19	5/13	
Φ19	1/20	4/17	0/9	1/15	0/22	1/19	0/15	
Φ20	3/21	0/19	0/13	5/13	0/20	1/14	1/15	
Σύνολο	55/388	55/329	44/290	67/334	29/406	23/333	27/307	
Ποσοστό	14,18%	16,72%	15,17%	20,06%	7,14%	6,91%	8,79%	

Arabidopsis thaliana (μόλυνση 1/4/2010)								
Φυλή	22V6NEP16	25V6NEP74	25V6NEP77	70V6NEP1	22V	25V	70WT	
Φ1	2/22	3/17	5/18	2/17	2/23	2/15	3/16	13/4/2010
Φ2	3/19	9/19	0/17	6/18	3/21	6/20	1/17	
Φ3	9/18	0/14	3/15	7/19	4/23	0/16	8/16	
Φ4	3/20	4/19	7/18	7/20	2/20	0/16	1/17	
Φ5	2/20	4/17	2/16	1/17	5/21	4/18	5/19	
Φ6	9/22	8/21	5/19	5/19	2/21	3/15	1/19	
Φ7	2/24	3/18	5/20	5/21	4/24	1/17	4/20	
Φ8	2/23	0/16	4/15	3/17	3/20	5/21	6/18	
Φ9	8/19	7/21	4/19	8/21	5/17	4/19	3/15	
Φ10	6/19	5/23	5/17	10/22	1/24	2/18	3/20	
Φ11	1/24	3/16	5/15	8/18	3/20	3/21	4/19	
Φ12	4/24	9/14	7/15	4/20	3/18	3/20	3/20	
Φ13	7/14	0/20	8/20	10/22	5/20	0/14	3/16	
Φ14	0/21	5/16	2/14	11/20	5/17	3/17	5/16	
Φ15	7/18	3/17	0/14	8/21	5/19	5/21	0/15	
Φ16	7/25	0/15	8/15	8/20	4/19	0/16	3/15	
Φ17	7/22	13/22	6/18	3/21	5/22	3/21	0/21	
Φ18	2/20	9/21	5/18	1/15	6/17	4/20	8/14	
Φ19	1/22	7/18	0/11	2/17	0/23	4/21	1/17	
Φ20	3/22	0/22	1/15	9/15	0/20	3/15	3/17	
Σύνολο	83/418	92/366	82/329	118/380	67/408	55/361	57/347	
Ποσοστό	19,86%	25,14%	24,92%	31,05%	16,42%	15,24%	16,43%	
Φ1	5/23	6/18	7/19	5/19	4/24	4/16	5/18	17/4/2010
Φ2	7/19	13/19	2/19	10/19	6/21	8/21	4/19	
Φ3	12/18	1/16	5/17	11/19	6/23	3/18	11/18	
Φ4	7/20	8/20	9/18	10/21	4/21	1/18	4/19	
Φ5	6/21	7/18	5/17	1/19	7/21	7/19	8/21	
Φ6	13/22	10/21	8/20	8/20	4/21	6/16	3/21	
Φ7	6/24	6/19	7/21	7/23	6/24	4/18	7/22	
Φ8	5/23	2/18	6/17	5/19	6/21	7/22	9/20	
Φ9	11/19	10/21	7/19	11/21	7/17	7/20	7/17	
Φ10	9/19	8/24	7/18	13/22	3/25	4/19	6/22	
Φ11	6/25	6/16	7/17	10/18	5/21	7/22	6/21	
Φ12	9/24	11/14	10/15	6/21	5/19	6/20	7/22	
Φ13	10/14	2/22	10/20	13/22	7/20	2/15	7/18	
Φ14	0/23	8/16	5/16	14/21	7/18	5/18	8/17	
Φ15	10/18	6/17	1/16	12/21	7/19	8/21	2/18	
Φ16	11/25	1/17	10/16	12/21	6/20	1/18	6/17	
Φ17	12/23	16/22	8/19	5/22	7/22	6/22	3/23	
Φ18	6/20	11/21	8/19	2/16	8/17	7/20	10/16	
Φ19	6/23	10/18	2/13	4/18	2/24	7/22	3/19	
Φ20	7/22	1/23	4/16	12/16	2/22	6/15	7/19	
Σύνολο	158/425	143/380	128/352	171/398	109/419	105/380	113/387	
Ποσοστό	37,18%	37,63%	36,36%	42,96%	26,01%	27,63%	29,20%	
Φ1	10/23	8/18	10/19	8/20	6/24	6/16	8/19	21/4/2010
Φ2	12/19	14/19	4/21	14/19	8/21	11/21	6/20	
Φ3	15/18	3/17	8/19	14/19	8/23	6/18	14/19	

<i>Arabidopsis thaliana</i> (μόλυνση 1/4/2010)							
Φυλή	22V6NEP16	25V6NEP74	25V6NEP77	70V6NEP1	22V	25V	70WT
Φ4	12/20	11/20	12/18	14/21	6/22	3/19	6/19
Φ5	11/21	11/18	8/19	2/21	10/21	10/19	10/21
Φ6	17/22	12/21	11/20	11/20	6/21	8/16	5/23
Φ7	11/24	9/19	10/21	10/24	8/24	7/19	10/22
Φ8	10/23	4/18	9/17	8/20	8/22	9/22	11/20
Φ9	15/19	12/21	11/19	15/21	9/17	9/20	9/17
Φ10	13/19	10/24	10/18	15/22	6/25	6/19	8/22
Φ11	11/25	9/16	9/18	13/18	8/21	10/22	8/23
Φ12	13/24	14/14	12/15	9/22	7/19	8/20	9/24
Φ13	14/14	4/23	12/20	16/22	9/20	4/16	10/19
Φ14	0/25	10/16	8/17	16/21	10/18	8/18	10/17
Φ15	14/18	9/17	4/18	14/21	9/19	11/21	4/20
Φ16	15/25	2/18	12/16	17/21	9/20	4/19	8/17
Φ17	16/23	19/22	11/19	7/22	10/22	8/22	5/24
Φ18	11/20	13/21	12/19	4/18	10/17	9/20	12/16
Φ19	11/23	12/18	5/14	5/18	4/25	10/22	4/20
Φ20	12/22	3/23	6/17	14/16	5/22	9/15	10/19
Σύνολο	243/427	189/383	184/364	226/406	156/422	156/384	167/401
Ποσοστό	56,91%	49,35%	50,55%	55,67%	36,97%	40,63%	41,65%
Φ1	14/23	10/18	13/19	10/20	9/24	8/16	10/19
Φ2	15/19	16/19	5/22	16/19	11/21	12/21	7/20
Φ3	18/18	4/18	10/19	18/19	10/23	7/18	16/19
Φ4	15/20	13/20	15/18	15/21	8/22	4/20	8/19
Φ5	13/21	14/18	10/19	3/21	12/21	11/19	11/21
Φ6	19/22	14/21	13/20	13/20	8/21	10/16	6/23
Φ7	14/24	11/19	13/21	11/24	10/25	9/19	10/22
Φ8	14/23	5/20	13/17	10/20	9/22	10/22	11/20
Φ9	17/19	15/21	14/19	18/21	11/17	11/20	9/17
Φ10	15/19	12/24	13/18	16/22	9/25	6/19	9/22
Φ11	13/25	12/16	11/18	14/18	10/21	11/22	9/23
Φ12	15/24	14/14	15/15	11/22	10/19	9/20	9/24
Φ13	14/14	6/23	14/20	19/22	10/20	4/17	10/19
Φ14	0/26	13/16	10/17	18/21	12/18	8/18	10/17
Φ15	16/18	12/17	5/19	15/21	11/19	13/21	4/21
Φ16	18/25	4/19	15/16	19/21	10/20	5/19	8/17
Φ17	18/23	22/22	14/19	8/22	12/22	10/22	5/25
Φ18	14/20	16/21	15/19	5/18	11/17	10/20	13/16
Φ19	14/23	15/18	6/14	7/18	7/25	10/22	4/20
Φ20	15/22	5/24	6/18	16/16	8/23	11/15	10/19
Σύνολο	291/428	232/388	230/367	262/406	198/424	176/386	179/403
Ποσοστό	67,99%	59,79%	62,67%	64,53%	46,70%	45,60%	44,42%
Φ1	17/23	12/18	15/19	12/20	10/25	10/16	11/19
Φ2	19/19	19/19	5/23	18/19	12/22	13/21	8/20
Φ3	18/18	4/19	10/19	19/19	11/23	7/19	17/19
Φ4	18/20	13/20	17/18	15/21	9/22	4/21	9/19
Φ5	15/21	16/18	11/19	4/23	12/22	12/19	12/21
Φ6	22/22	16/21	14/20	14/20	8/22	10/16	6/24
Φ7	16/24	11/19	13/21	12/24	11/25	10/19	10/22

24/4/2010

27/4/2010

Arabidopsis thaliana (μόλυνση 1/4/2010)								
Φυλή	22V6NEP16	25V6NEP74	25V6NEP77	70V6NEP1	22V	25V	70WT	
Φ8	16/23	5/21	15/17	11/20	10/22	11/22	11/20	
Φ9	19/19	17/21	16/19	21/21	12/17	11/20	10/17	
Φ10	16/19	12/24	14/18	16/22	9/26	6/20	9/22	
Φ11	14/25	15/16	11/18	15/18	11/21	11/22	9/24	
Φ12	17/24	14/14	15/15	11/22	11/19	9/21	9/24	
Φ13	14/14	6/24	14/20	22/22	11/20	4/19	10/19	
Φ14	0/27	16/16	10/17	20/21	12/19	9/18	10/17	
Φ15	18/18	14/17	5/20	15/21	12/19	15/21	4/22	
Φ16	20/25	4/20	16/16	21/21	11/20	5/20	8/17	
Φ17	20/23	22/22	16/19	8/23	12/22	10/22	5/26	
Φ18	15/20	18/21	17/19	5/20	11/18	11/20	14/16	
Φ19	15/23	17/18	6/15	7/19	7/25	10/22	4/21	
Φ20	16/22	5/24	6/19	16/16	8/24	13/15	11/19	
Σύνολο	325/429	255/392	246/371	282/412	210/432	187/393	185/408	
Ποσοστό	75,76%	65,05%	66,31%	68,45%	48,61%	47,58%	45,34%	
Φ1	17/23	12/18	17/19	12/20	10/26	10/16	11/19	
Φ2	19/19	19/19	5/24	19/19	12/22	14/21	8/21	
Φ3	18/18	4/20	10/19	19/19	11/23	7/20	19/19	
Φ4	18/20	13/20	18/18	16/21	9/23	4/22	9/20	
Φ5	15/21	18/18	11/19	4/24	12/22	12/19	12/21	
Φ6	22/22	17/21	14/20	14/20	8/23	11/16	6/25	
Φ7	16/24	11/19	13/22	12/24	11/26	10/19	10/23	
Φ8	18/23	5/21	17/17	11/20	10/22	11/22	11/20	
Φ9	19/19	19/21	18/19	21/21	12/17	11/20	10/17	
Φ10	19/19	12/24	16/18	16/22	9/27	6/21	9/23	
Φ11	14/26	16/16	11/18	16/18	11/21	11/23	9/26	
Φ12	17/24	14/14	15/15	11/23	11/20	9/22	9/25	
Φ13	14/14	6/25	14/21	22/22	11/20	4/20	10/19	
Φ14	0/29	16/16	10/18	21/21	12/19	9/19	11/17	
Φ15	18/18	15/17	5/21	15/21	12/20	15/21	4/23	
Φ16	20/25	4/21	16/16	21/21	11/20	5/21	8/17	
Φ17	20/23	22/22	17/19	8/24	12/22	10/22	5/26	
Φ18	15/20	19/21	19/19	5/21	11/18	11/20	15/16	
Φ19	15/25	18/18	6/17	7/20	7/25	10/22	4/22	
Φ20	16/22	5/25	6/20	16/16	8/25	14/15	11/19	
Σύνολο	330/434	264/395	258/378	286/417	210/440	190/401	189/419	
Ποσοστό	76,04%	66,84%	68,25%	68,59%	47,73%	47,38%	45,11%	
M.O.	44,28%	40,67%	41,23%	45,03%	28,99%	29,04%	29,11%	
30/4/2010								
Φυλή	22V6NEP16	25V6NEP74	25V6NEP77	70V6NEP1	22V	25V	70WT	max.
d.a.i.	Μέσοι όροι (%) του ποσοστού ασθένειας							
6	6,34	4,84	5,58	8,90	2,36	1,36	1,98	100
9	14,18	16,72	15,17	20,06	7,14	6,91	8,79	100
12	19,86	25,14	24,92	31,05	16,42	15,24	16,43	100
16	37,18	37,63	36,36	42,96	26,01	27,63	29,20	100
20	56,91	49,35	50,55	55,67	36,97	40,63	41,65	100
23	67,99	59,79	62,67	64,53	46,70	45,60	44,42	100

Φυλή	22V6NEP16	25V6NEP74	25V6NEP77	70V6NEP1	22V	25V	70WT	max.
26	75,76	65,05	66,31	68,45	48,61	47,58	45,34	100
29	76,04	66,84	68,25	68,59	47,73	47,38	45,11	100
AUDPC	1014,72	943,43	952,81	1050,72	673,40	679,40	686,35	2300,00
AUDPC.rel	0,44	0,41	0,41	0,46	0,29	0,30	0,30	1,00

Φυλή	22V6NEP16	25V6NEP74	25V6NEP77	70V6NEP1	22V	25V	70WT
Φυτό	AUDPC						
1	786,17	837,32	1042,62	706,44	522,41	709,17	742,53
2	1153,23	1480,59	273,42	1311,93	714,50	969,84	491,94
3	1579,93	246,59	752,83	1424,17	645,65	469,89	1446,61
4	1101,25	931,33	1349,21	1145,42	497,16	221,90	551,25
5	856,43	1121,80	727,19	195,01	858,86	902,55	860,73
6	1474,09	1161,58	1017,55	1017,55	485,07	894,55	347,77
7	799,36	784,65	900,51	782,16	622,28	617,37	723,67
8	778,26	304,37	1087,00	744,53	636,33	768,48	969,46
9	1481,92	1196,59	1074,77	1405,42	1035,29	817,02	864,96
10	1241,89	773,11	1107,81	1311,02	408,43	461,22	609,68
11	682,99	1068,75	957,56	1332,94	674,64	723,89	643,59
12	952,58	1659,52	1565,94	734,50	723,29	653,22	625,32
13	1692,86	286,49	1172,08	1489,09	835,00	304,58	820,13
14	0,00	1243,30	775,98	1564,51	972,45	702,82	996,35
15	1462,40	999,41	292,44	1230,95	913,68	979,52	252,22
16	1140,22	214,15	1609,79	1501,46	764,47	285,57	750,25
17	1266,29	1687,97	1186,20	531,50	822,73	642,27	271,63
18	911,67	1318,83	1208,92	345,16	1075,00	796,58	1502,03
19	770,91	1355,59	488,05	526,98	299,33	718,55	298,16
20	948,48	218,04	486,60	1708,91	368,26	1081,43	831,76

Πίνακας Π.2: Αποτελέσματα εξέλιξης ποσοστού ασθένειας, μέσοι όροι ποσοστού ασθένειας, AUDPC και σχετικού AUDPC, σε φυτά τομάτας. Στον πίνακα καταγράφεται ο αριθμός των φύλλων με συμπτώματα του μύκητα *V. dahliae*, επί του συνόλου των φύλλων του φυτού.

Τομάτα (μόλυνση 8/4/2010)																Ημερομηνία
Φυλή	22V6NEP16		25V6NEP74		25V6NEP77		70V6NEP1		22V		25V		70WT			
Φυτό	Προσβολή	Ύψος	Προσβολή	Ύψος	Προσβολή	Ύψος	Προσβολή	Ύψος	Προσβολή	Ύψος	Προσβολή	Ύψος	Προσβολή	Ύψος		
	Φ1	0/4	32	0/4	15	0/4	12	0/4	17	0/4	24	0/4	13	0/4	20	15/4/2010
	Φ2	0/4	23	0/4	14	0/4	21	0/4	21	0/4	30	0/4	10	0/4	25	
	Φ3	0/4	25	0/4	16	0/4	20	0/4	20	0/4	31	0/4	13	0/4	21	
	Φ4	0/4	29	0/4	12	0/4	20	0/4	21	0/4	30	0/4	19	0/4	27	
	Φ5	0/4	29	0/4	15	0/4	14	0/4	20	0/4	27	0/4	14	0/4	21	
	Φ6	0/4	21	0/4	15	0/4	14	0/4	19	0/4	23	0/4	9	0/4	18	
	Φ7	0/4	21	0/4	16	0/4	15	1/4	18	0/4	18	0/4	13	0/4	16	
	Φ8	0/4	22	0/4	17	0/4	12	0/4	18	0/4	23	0/4	10	1/4	21	
	Φ9	0/4	27	0/4	9	0/4	14	0/4	20	0/4	21	0/4	17	0/4	24	
	Φ10	0/4	26	0/4	8	0/4	11	0/4	19	0/4	25	0/4	12	0/4	25	
	Φ11	0/4	27	0/4	13	0/4	14	0/4	14	0/4	26	0/4	12	0/4	28	
	Φ12	0/4	29	—	—	—	—	0/4	21	0/4	28	0/4	12	0/4	22	
	M.O. Ύψους		25,92		13,64		15,18		19,00		25,50		12,83		22,33	
	Σύνολο	0/48		0/48		0/48		1/48		0/48		0/48		1/48		
	Ποσοστό	0,00%		0,00%		0,00%		2,08%		0,00%		0,00%		2,08%		
	Φ1	0/7	39	1/5	20	2/5	17	0/6	24	0/7	36	2/6	16	0/7	30	18/4/2010
	Φ2	0/7	38	0/5	19	1,34/6	26	0/6	25	0/7	36	1,75/6	12	0/7	29	
	Φ3	0/7	38	0,34/5	20	0/6	24	0/6	24	0/7	39	1,34/6	16	0,34/7	31	
	Φ4	0/7	37	0/5	18	1,17/6	24	0/6	26	0/7	38	1,4/6	23	0,67/7	33	
	Φ5	0/7	35	0/5	20	2/5	18	0/6	25	0/7	36	1/6	19	0/7	29	
	Φ6	0/6	29	0/5	20	0/5	19	0,54/6	23	0/7	33	0,34/5	11	0/7	24	
	Φ7	0/6	26	0,34/5	20	1,17/5	18	1,57/6	23	0/7	22	0,34/6	18	0/7	22	
	Φ8	0/7	33	0,34/5	21	0,67/5	16	0/6	22	0/7	32	1,67/6	15	0/7	28	

Πίνακας Π.2: Αποτελέσματα εξέλιξης ποσοστού ασθένειας, μέσοι όροι ποσοστού ασθένειας, AUDPC και σχετικού AUDPC, σε φυτά τομάτας. Στον πίνακα καταγράφεται ο αριθμός των φύλλων με συμπτώματα του μύκητα *V. dahliae*, επί του συνόλου των φύλλων του φυτού.

Τομάτα (μόλυνση 8/4/2010)															
Φυλή	22V6NEP16		25V6NEP74		25V6NEP77		70V6NEP1		22V		25V		70WT		
Φ9	0/7	34	0/5	11	0,34/5	20	0/6	24	0/7	28	0,34/6	19	0/7	32	
Φ10	0/7	37	0,34/5	10	1,17//5	16	0/6	25	0/7	32	0,2/5	16	0,67/7	32	
Φ11	0/7	39	0/5	20	2,6/6	24	0/6	20	0/7	35	1,8/6	15	1,34/7	32	
Φ12	0/7	35	—	—	—	—	0/6	25	0/7	34	1/6	16	0/7	29	
Μ.Ο. Ύψους		35,00		18,09		20,18		23,83		33,42		16,33		29,25	
Σύνολο	0/82		2,36/55		12,46/59		2,11/72		0/84		13,18/70		27/307		
Ποσοστό	0,00%		4,29%		21,12%		2,93%		0,00%		18,83%		8,79%		
Φ1	0/8	46	2,8/7	28	2,2/6	20	0,57/7	29	0/8	45	2,2/7	19	1,34/8	38	21/4/2010
Φ2	0/8	43	2,2/7	28	1,8/7	29	1,34/7	31	0/8	45	2,2/7	16	2,4/7	33	
Φ3	0/8	43	1,8/7	27	3/7	31	0,45/7	34	0/8	47	2,2/7	19	2/8	35	
Φ4	0/8	43	1,34/7	27	3,6/7	29	2,2/7	32	0/8	45	2,4/9	25	2,2/8	37	
Φ5	0/8	40	0,94/6	24	2,2/7	27	0,34/7	29	0/8	43	2,2/8	24	1/8	33	
Φ6	0/7	32	2,8/7	27	0,94/6	18	3,18/7	28	0/7	29	1,2/7	13	2,17/7	27	
Φ7	0/7	31	1,67/7	26	2,4/5	16	2,6/7	28	0/7	28	3/7	21	1,34/7	28	
Φ8	0/8	40	1,6/7	27	2,6/6	23	1,8/7	31	0/8	42	2,6/7	18	2,6/7	33	
Φ9	0/8	41	2/5	13	2,8/7	30	0,59/7	28	0/8	36	2,2/9	24	0,34/8	38	
Φ10	0/8	44	2,34/7	24	1,4/6	19	1,8/7	34	0/8	34	2,6/8	22	2,2/8	38	
Φ11	0/8	40	1,34/7	30	4,8/7	29	0,59/7	32	0/8	44	2,4/8	17	2,8/7	33	
Φ12	0/8	44	—	—	—	—	0,67/7	32	0/8	41	2,2/7	19	0,34/7	33	
Μ.Ο. Ύψους		40,58		25,55		24,64		30,67		39,92		19,75		33,83	
Σύνολο	0/94		20,83/74		27,74/71		16,13/84		0/94		27,4/91		20,73/90		
Ποσοστό	0,00%		28,15%		39,07%		19,20%		0,00%		30,11%		23,03%		
Φ1	0/9	52	2,2/8	32	3/7	24	2,6/8	34	0/9	50	2,2/8	23	2,1/9	43	24/4/2010

Πίνακας Π.2: Αποτελέσματα εξέλιξης ποσοστού ασθένειας, μέσοι όροι ποσοστού ασθένειας, AUDPC και σχετικού AUDPC, σε φυτά τομάτας. Στον πίνακα καταγράφεται ο αριθμός των φύλλων με συμπτώματα του μύκητα *V. dahliae*, επί του συνόλου των φύλλων του φυτού.

Τομάτα (μόλυνση 8/4/2010)															
Φυλή	22V6NEP16	25V6NEP74	25V6NEP77	70V6NEP1	22V	25V	70WT								
Φ2	0/9	47	3/8	32	3,2/8	31	2,8/8	34	0/9	52	2,2/7	19	2,8/9	38	
Φ3	0/9	46	2,4/8	33	3,4/8	33	2,2/8	41	0/9	52	2,2/7	22	3,6/9	38	
Φ4	0/9	49	2,2/8	34	3,4/8	32	2,8/8	36	0/9	52	2,8/8	31	2/9	41	
Φ5	0/9	45	2/8	29	2,2/7	22	2/8	33	0/9	49	2,6/8	28	2,2/9	38	
Φ6	0/8	39	1,6/8	31	3/7	26	3,43/8	32	0/8	33	2/7	17	3/8	30	
Φ7	0/8	32	2,6/8	31	2,6/7	18	3,2/8	30	0/8	32	3/8	24	1,4/8	30	
Φ8	0/9	44	2/8	32	3/8	28	2,8/8	33	0/9	44	2,6/8	22	2,6/9	37	
Φ9	0/9	47	2/8	13	3,2/8	34	2/8	36	0/9	39	2,2/9	31	2,2/9	43	
Φ10	0/9	52	3,8/8	31	2,2/7	23	2,23/8	37	0/9	40	2,8/8	24	2,2/9	44	
Φ11	0/9	51	3/8	35	4,4/8	33	2,4/8	36	0/9	49	2,6/8	27	2,4/9	41	
Φ12	0/9	51	—	—	—	—	2/8	38	0/9	47	1,8/8	23	2,6/9	39	
Μ.Ο. Ύψους		46,25		30,27		27,64		35,00		44,92		24,25		38,50	
Σύνολο	0/106		26,8/88		33,6/83		30,46/96		0/106		29/94		29,1/106		
Ποσοστό	0,00%		30,45%		40,48%		31,73%		0,00%		30,85%		27,45%		
Φ1	0/10	55	3,29/8	39	3,29/8	29	3,14/8	39	0/9	55	2,29/8	26	2,57/9	48	27/4/2010
Φ2	0/9	53	3,14/8	39	3,86/8	35	3,14/8	38	0/10	57	2,29/8	22	3,29/9	44	
Φ3	0/10	54	3/9	42	3,43/9	38	3,14/9	47	0/10	56	2,29/8	25	3,71/9	43	
Φ4	0/10	54	2,86/9	42	3,71/9	37	3,14/9	40	0/10	58	3/9	36	2,71/9	45	
Φ5	0/9	48	2,86/8	37	3/8	24	2,86/8	38	0/9	53	2,86/9	35	2,57/9	41	
Φ6	0/8	40	3/8	35	3,14/8	30	3,71/8	37	0/8	40	2,14/7	21	3/8	35	
Φ7	0/8	33	3/9	36	3/8	23	3,4/8	34	0/8	37	3/8	27	2/9	35	
Φ8	0/9	49	2,71/9	40	3,86/8	33	3,29/8	37	0/9	47	2,6/8	28	2,71/9	43	
Φ9	0/9	52	2,71/8	17	3,71/9	40	2,43/9	42	0/9	41	2,29/9	35	2,43/9	48	
Φ10	0/10	57	3,29/9	39	2,43/7	28	3,14/9	41	0/9	45	3,29/8	30	2,43/9	48	

Πίνακας Π.2: Αποτελέσματα εξέλιξης ποσοστού ασθένειας, μέσοι όροι ποσοστού ασθένειας, AUDPC και σχετικού AUDPC, σε φυτά τομάτας. Στον πίνακα καταγράφεται ο αριθμός των φύλλων με συμπτώματα του μύκητα *V. dahliae*, επί του συνόλου των φύλλων του φυτού.

Τομάτα (μόλυνση 8/4/2010)														
Φυλή	22V6NEP16		25V6NEP74		25V6NEP77		70V6NEP1		22V		25V		70WT	
Φ11	0/10	56	3,14/9	42	4,57/9	35	3,29/9	43	0/10	55	3/8	33	2,57/9	46
Φ12	0/10	56	—	—	—	—	3,29/9	43	0/10	54	2/8	26	2,86/9	46
Μ.Ο. Ύψους		50,58		37,09		32,00		39,92		49,83		28,67		43,50
Σύνολο	0/112		33/94		38/91		37,97/102		0/111		31,05/98		32,85/107	
Ποσοστό	0,00%		35,11%		41,76%		37,23%		0,00%		31,68%		30,70%	
Φ1	0/10	62	4,14/9	48	3,6/9	35	3,6/9	46	0/10	61	2,6/9	30	3,2/9	53
Φ2	0/10	62	3,6/9	49	4,6/9	40	3,6/9	46	0/10	61	2,57/9	24	3,71/10	52
Φ3	0/10	63	3,4/9	51	3,49/9	45	4,6/9	52	0/10	60	2,57/9	29	4/10	49
Φ4	0/10	61	3,2/9	51	4,29/9	42	3,8/9	46	0/10	63	3,14/9	40	3,29/10	49
Φ5	0/9	50	3,2/9	47	3,6/8	28	3,6/9	42	0/10	59	3,03/9	38	3,29/10	46
Φ6	0/9	42	3,57/9	39	3,29/9	34	4,14/9	42	0/9	56	2,2/8	25	3/9	39
Φ7	0/8	34	3,4/9	43	3,4/9	26	3,57/8	38	0/9	42	3,14/8	31	2,54/9	38
Φ8	0/9	50	3,2/9	47	4,6/9	40	3,57/9	42	0/10	51	2,6/9	35	2,77/10	48
Φ9	0/10	57	3,2/9	22	4,4/9	53	3,14/9	49	0/9	43	2,4/9	39	2,6/10	52
Φ10	0/10	62	3,6/9	48	2,6/8	34	4,14/9	47	0/10	50	3,6/9	35	2,6/10	53
Φ11	0/10	64	3,4/9	52	5/9	38	4,29/9	47	0/10	62	2,4/8	33	2,89/10	49
Φ12	0/10	64	—	—	—	—	4,14/9	48	0/10	61	2/8	30	3,14/10	52
Μ.Ο. Ύψους		55,92		45,18		37,73		45,42		55,75		32,42		48,33
Σύνολο	0/115		37,91/99		42,87/97		46,19/107		0/117		32,25/104		37,13/117	
Ποσοστό	0,00%		38,29%		44,20%		43,17%		0,00%		31,01%		31,74%	
Φ1	0/10	70	4,43/10	61	3,43/10	49	4,57/9	56	0/10	69	3,29/10	45	3,71/11	61
Φ2	0/10	69	3,74/10	61	5,57/10	48	5,43/9	59	0/10	69	3,43/10	37	5/11	61

30/4/2010

3/5/2010

Πίνακας Π.2: Αποτελέσματα εξέλιξης ποσοστού ασθένειας, μέσοι όροι ποσοστού ασθένειας, AUDPC και σχετικού AUDPC, σε φυτά τομάτας. Στον πίνακα καταγράφεται ο αριθμός των φύλλων με συμπτώματα του μύκητα *V. dahliae*, επί του συνόλου των φύλλων του φυτού.

Τομάτα (μόλυνση 8/4/2010)														
Φυλή	22V6NEP16		25V6NEP74		25V6NEP77		70V6NEP1		22V		25V		70WT	
Φ3	0/10	70	4,57/10	60	5,29/10	56	4,43/10	61	0/10	69	3,43/10	41	4,14/10	55
Φ4	0/10	68	4,29/10	61	5,43/10	32	4,57/10	57	0/10	65	3,57/10	37	4,03/10	55
Φ5	0/10	60	4,43/10	56	6,14/10	35	3,71/9	48	0/10	63	3,57/10	45	4/10	52
Φ6	0/9	50	5,71/10	47	4,43/9	39	4,86/9	42	0/9	47	3,6/10	30	3,43/10	43
Φ7	0/8	40	5,14/10	52	6,29/10	37	4,71/9	45	0/9	44	4/10	39	3,14/11	49
Φ8	0/9	58	4,43/10	50	6,29/11	46	5,71/9	50	0/10	60	3,29/11	44	3,57/11	52
Φ9	0/10	62	5,43/8	31	6/10	52	5,14/9	57	0/9	45	3/11	53	3,29/11	61
Φ10	0/10	72	5,29/10	56	5/10	49	5,14/10	60	0/10	57	2,86/11	51	3,2/11	57
Φ11	0/10	70	5,71/10	62	6,57/10	30	5,14/9	58	0/10	69	3,71/10	39	3,43/11	57
Φ12	0/10	71	—	—	—	—	5,86/9	57	0/10	65	2,71/11	45	3,71/11	60
Μ.Ο. Ύψους		63,33		54,27		43,00		54,17		60,17		42,17		55,25
Σύνολο	0/116		53,17/108		60,44/110		59,27/111		0/117		40,46/124		44,65/128	
Ποσοστό	0,00%		49,23%		54,95%		53,40%		0,00%		32,63%		34,88%	
Φ1	0/11	72	4,71/11	65	4/11	60	5,71/10	62	0/12	76	3,43/11	50	3,86/12	66
Φ2	0/11	72	4,43/11	65	5,71/11	57	6,71/10	65	0/12	76	3,57/11	43	5,12/12	65
Φ3	0/11	75	4,57/11	66	6/11	63	5,29/10	68	0/12	75	3,6/11	49	4,29/11	66
Φ4	0/12	73	5,14/11	65	5,57/11	55	4,29/10	64	0/11	69	3,71/11	45	4,2/11	60
Φ5	0/11	64	5/11	64	6,57/11	42	4,71/10	54	0/11	69	3,71/11	51	4/11	57
Φ6	0/11	60	5,71/11	50	5/11	42	4,71/10	55	0/11	67	3,86/11	39	4/11	46
Φ7	0/12	42	5,57/11	61	6,29/11	54	5,14/10	52	0/10	50	4,29/11	44	3,29/12	46
Φ8	0/12	66	5,57/10	65	6,57/11	57	6,71/10	55	0/10	57	3,57/12	52	3,71/11	58
Φ9	0/12	70	6/11	41	6,43/11	70	5,86/10	64	0/10	55	3,29/12	59	3,43/12	66
Φ10	0/12	75	5,43/11	63	5,43/11	50	6,29/10	62	0/11	62	3,14/12	57	3,43/12	64
Φ11	0/12	76	6/11	66	6,71/11	52	6,71/10	63	0/12	68	4/11	46	3,57/12	64

6/5/2010

Πίνακας Π.2: Αποτελέσματα εξέλιξης ποσοστού ασθένειας, μέσοι όροι ποσοστού ασθένειας, AUDPC και σχετικού AUDPC, σε φυτά τομάτας. Στον πίνακα καταγράφεται ο αριθμός των φύλλων με συμπτώματα του μύκητα *V. dahliae*, επί του συνόλου των φύλλων του φυτού.

Τομάτα (μόλυνση 8/4/2010)														
Φυλή	22V6NEP16		25V6NEP74		25V6NEP77		70V6NEP1		22V		25V		70WT	
Φ12	0/12	74	—	—	—	—	6,43/10	62	0/12	75	3/12	52	4/12	65
M.O. Ύψους		68,25		61,00		54,73		60,50		66,58		48,92		60,25
Σύνολο	0/139		58,13/120		64,28/121		68,56/120		0/134		39,46/125		46,9/128	
Ποσοστό	0,00%		48,44%		53,12%		57,13%		0,00%		31,57%		36,64%	
M.O.	0,00%	48,23	31,38%	35,64	38,65%	31,89	33,78%	38,56	0,00%	47,01	26,47%	28,17	25,77%	41,41

Φυλή	22V6NEP16	25V6NEP74	25V6NEP77	70V6NEP1	22V	25V	70WT	max.
d.a.i.	Μέσοι όροι (%) του ποσοστού ασθένειας							
7	0,00	0,00	0,00	2,08	0,00	0,00	2,08	100
10	0,00	4,29	21,12	2,93	0,00	18,83	8,79	100
13	0,00	28,15	39,07	19,20	0,00	30,11	23,03	100
16	0,00	30,45	40,48	31,73	0,00	30,85	27,45	100
19	0,00	35,11	41,76	37,23	0,00	31,68	30,70	100
22	0,00	38,29	44,20	43,17	0,00	31,01	31,74	100
26	0,00	49,23	54,95	53,40	0,00	32,63	34,88	100
29	0,00	48,44	53,12	57,13	0,00	31,57	36,64	100
AUDPC	0,00	835,20	1154,91	810,73	0,00	849,20	720,33	3200,00
AUDPC.rel	0,00	0,26	0,36	0,25	0,00	0,27	0,23	1,00

Φυλή	22V6NEP16	25V6NEP74		25V6NEP77		70V6NEP1			22V	25V		70WT		
Φυτό	AUDPC													
1	0,00				687,64			618,87	0,00		532,35		446,91	
2	0,00	1144,00	562,50	857,50	784,22	788,00	675,14	880,50	0,00	1184,00	537,28	500,00	556,97	962,50
3	0,00	1158,50	565,66	877,50	645,81	856,00	600,65	965,50	0,00	1192,50	517,19	584,00	602,39	935,50
4	0,00	1153,50	523,09	870,50	744,05	737,50	582,69	890,00	0,00	1175,50	573,45	710,50	500,01	962,50
5	0,00	1028,50	530,40	809,00	789,72	577,50	537,32	801,00	0,00	1114,00	537,03	706,00	469,07	883,00
6	0,00	863,50	590,25	737,50	615,20	618,50	716,76	765,00	0,00	900,50	473,23	450,50	517,19	731,00
7	0,00	719,50	606,69	787,00	733,71	549,00	781,07	740,50	0,00	760,00	579,16	600,50	359,55	742,50
8	0,00	1008,00	549,46	822,50	767,37	704,50	690,69	800,50	0,00	1003,50	530,03	618,50	439,62	891,50
9	0,00	1084,00	621,65	422,50	734,06	865,50	566,15	887,00	0,00	854,00	397,31	763,00	393,02	1013,50
10	0,00	1190,50	672,76	782,50	632,12	640,00	624,31	907,00	0,00	958,00	511,60	680,50	419,57	1004,50
11	0,00	1181,50	631,63	898,50	965,28	700,00	667,29	876,00	0,00	1148,50	590,30	615,00	479,21	965,00
12	0,00	1185,00	—	—	—	—	670,29	906,00	0,00	1123,50	404,67	610,50	460,09	963,50

Φυλή	22V6NEP16	25V6NEP74	25V6NEP77	70V6NEP1	22V	25V	70WT
Φυτό	AUDPC.rel						
1	0,00	0,00	0,31	0,28	0,00	0,24	0,20
2	0,00	0,26	0,36	0,31	0,00	0,24	0,25
3	0,00	0,26	0,29	0,27	0,00	0,24	0,27
4	0,00	0,24	0,34	0,26	0,00	0,26	0,23
5	0,00	0,24	0,36	0,24	0,00	0,24	0,21
6	0,00	0,27	0,28	0,33	0,00	0,22	0,24
7	0,00	0,28	0,33	0,36	0,00	0,26	0,16
8	0,00	0,25	0,35	0,31	0,00	0,24	0,20
9	0,00	0,28	0,33	0,26	0,00	0,18	0,18
10	0,00	0,31	0,29	0,28	0,00	0,23	0,19
11	0,00	0,29	0,44	0,30	0,00	0,27	0,22
12	0,00	—	—	0,30	0,00	0,18	0,21

Πίνακας Π.3: Αποτελέσματα εξέλιξης ποσοστού ασθένειας, μέσοι όροι ποσοστού ασθένειας, AUDPC και σχετικού AUDPC, σε φυτά βαμβακιού. Στον πίνακα καταγράφεται ο αριθμός των φύλλων με συμπτώματα του μύκητα *V. dahliae*, επί του συνόλου των φύλλων του φυτού.

Βαμβάκι (μόλυνση 8/4/2010)															
Φυλή	22V6NEP16		25V6NEP74		25V6NEP77		70V6NEP1		22V		25V		70WT		Ημερομηνία
Φυτό	Προσβολή	Ύψος	Προσβολή	Ύψος	Προσβολή	Ύψος	Προσβολή	Ύψος	Προσβολή	Ύψος	Προσβολή	Ύψος	Προσβολή	Ύψος	
Φ1	1/4	19	0/3	18	0/3	17	0/3	14	0/3	26	0/4	24	1/3	14	15/4/2010
Φ2	0/3	19	0/3	19	0/3	15	1/3	15	0/3	24	1/4	25	0/3	14	
Φ3	0/3	25	1/3	16	1/4	20	0/3	15	1/3	31	0/3	21	1/4	16	
Φ4	0/4	29	0/3	12	1/3	20	1/3	18	0/3	30	0/3	19	0/4	23	
Φ5	1/4	29	0/2	15	1/3	15	0/3	20	0/3	27	1/3	14	1/3	22	
Φ6	1/4	21	2/3	15	1/3	15	1/3	19	1/4	23	1/3	13	0/3	16	
Φ7	2/3	21	0/4	16	0/4	15	1/3	18	—	—	—	—	—	—	
Φ8	0/3	22	0/3	17	—	—	0/3	18	—	—	—	—	—	—	
Φ9	—	—	0/3	18	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	
M.O. Ύψους		23,13		16,22		16,71		17,13		26,83		19,33		17,50	
Σύνολο	5/28		3/27		3/23		4/24		2/19		3/20		3/20		
Ποσοστό	17,86%		11,11%		13,04%		16,67%		10,53%		15,00%		15,00%		
Φ1	1/4	21	0/3	20	1/4	18	1/4	15	0/4	28	1/4	26	1/4	15	18/4/2010
Φ2	0/3	21	0/4	22	0/4	17	1/3	16	0/4	26	0/4	26	0/3	16	
Φ3	1/3	16	2/4	18	2/4	18	0/4	15	1/4	26	0/4	23	1/4	18	
Φ4	0/4	19	1/4	20	1/3	15	1/4	19	1/4	28	1/4	21	0/4	25	
Φ5	1/5	30	1/3	16	1/3	18	1/4	21	0/4	26	2/4	28	2/4	24	
Φ6	1/4	23	2/4	18	1/3	16	1/4	20	2/4	26	1/3	15	1/4	18	
Φ7	2/4	15	0/4	26	0/4	23	1/4	20	—	—	—	—	—	—	
Φ8	0/4	26	0/4	21	—	—	1/4	19	—	—	—	—	—	—	
Φ9	—	—	1/3	19	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	
M.O. Ύψους		21,38		20,86		17,86		18,13		26,67		23,17		19,33	

Βαμβάκι (μόλυνση 8/4/2010)															
Φυλή	22V6NEP16		25V6NEP74		25V6NEP77		70V6NEP1		22V		25V		70WT		
Σύνολο	6/31		7/33		6/25		7/31		4/25		5/23		5/23		
Ποσοστό	19,35%		21,21%		24,00%		22,58%		16,00%		21,74%		21,74%		
Φ1	2/5	23	1/4	20	1/4	19	2/4	16	0/5	32	1/5	33	1/4	17	21/4/2010
Φ2	0/4	23	0/4	24	1/5	19	3/4	16	1/5	24	0/5	29	1/3	13	
Φ3	1/3	17	3/4	18	3/5	18	1/4	18	1/4	28	1/4	26	1/4	20	
Φ4	0/4	21	1/5	22	2/3	12	1/4	19	1/4	24	1/4	31	0/4	34	
Φ5	1/5	32	1/4	18	0/3	17	2/4	24	0/4	28	0/4	26	2/4	26	
Φ6	2/5	25	3/4	19	1/3	17	2/4	16	2/4	28	2/3	11	1/4	20	
Φ7	1/4	16	0/5	28	0/4	30	2/4	17	—	—	—	—	—	—	
Φ8	1/4	28	1/5	23	—	—	2/4	19	—	—	—	—	—	—	
Φ9	—	—	0/4	22	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	
Μ.Ο. Υψους	23,13		21,56		18,86		18,13		27,20		26,00		21,67		
Σύνολο	8/34		10/39		8/27		15/32		5/26		5/25		6/24		
Ποσοστό	23,53%		25,64%		29,63%		46,88%		19,23%		20,00%		25,00%		
Φ1	3/5	25	1/4	22	2/4	20	3/4	18	0/4	33	1/5	35	2/4	15	24/4/2010
Φ2	0/4	25	1/5	26	1/5	21	4/5	17	2/5	24	0/4	32	1/3	15	
Φ3	2/3	17	4/4	19	4/5	19	1/5	19	1/4	30	1/4	29	1/4	22	
Φ4	0/5	22	2/5	24	3/4	12	1/4	19	1/4	32	2/5	35	0/5	36	
Φ5	2/5	34	1/4	20	0/3	19	1/5	24	0/4	28	0/4	27	2/4	27	
Φ6	2/5	27	4/4	19	2/3	19	2/5	16	2/5	31	4/4	13	2/4	19	
Φ7	2/5	17	0/5	29	0/5	32	3/4	18	—	—	—	—	—	—	
Φ8	2/4	30	2/5	25	—	—	2/5	18	—	—	—	—	—	—	
Φ9	—	—	0/4	23	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	

Βαμβάκι (μόλυνση 8/4/2010)															
Φυλή	22V6NEP16	25V6NEP74	25V6NEP77	70V6NEP1	22V	25V	70WT								
M.O. Ύψους	24,63	23,00	20,29	18,63	29,67	28,50	22,33								
Σύνολο	13/36	16/40	10/25	17/37	5/26	8/27	8/24								
Ποσοστό	36,11%	40,00%	40,00%	45,95%	19,23%	29,63%	33,33%								
Φ1	4/5	25	2/4	23	3/4	21	3/5	20	0/4	33	1/5	36	2/4	15	27/4/2010
Φ2	0/4	27	2/5	30	1/5	22	4/5	19	2/5	25	0/5	34	2/4	17	
Φ3	2/3	17	4/5	20	4/5	20	1/5	21	2/4	31	2/4	30	2/5	22	
Φ4	0/5	23	2/5	25	4/4	13	2/4	19	2/5	33	2/5	36	0/6	38	
Φ5	3/5	35	2/4	20	1/3	20	2/5	25	1/4	28	0/5	29	2/5	29	
Φ6	2/5	27	4/4	19	2/3	20	2/5	17	2/5	31	4/4	14	2/4	19	
Φ7	3/5	32	0/5	30	0/5	33	4/4	18	—	—	—	—	—	—	
Φ8	2/4	17	3/5	25	—	—	2/5	19	—	—	—	—	—	—	
Φ9	—	—	0/4	24	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	
M.O. Ύψους	25,38	24,00	21,29	19,75	30,17	29,83	23,33								
Σύνολο	16/36	19/41	15/29	20/38	9/27	9/28	10/28								
Ποσοστό	44,44%	46,34%	51,72%	52,63%	33,33%	32,14%	35,71%								
Φ1	4/5	26	2/4	25	3/4	22	3/5	22	0/5	35	2/5	37	2/4	16	30/4/2010
Φ2	0/5	30	3/5	31	2/5	23	4/5	19	2/5	26	0/6	36	2/5	18	
Φ3	2/4	19	4/5	21	4/5	20	2/5	22	2/5	33	2/4	30	3/5	23	
Φ4	0/5	26	3/5	26	4/4	13	2/5	21	3/5	33	3/5	36	0/6	38	
Φ5	4/5	35	2/5	22	1/4	23	2/5	26	2/5	30	0/5	31	2/5	30	
Φ6	3/5	28	4/4	19	2/3	20	2/5	19	2/5	32	4/4	14	2/4	21	
Φ7	3/5	33	0/5	32	0/5	35	4/4	18	—	—	—	—	—	—	
Φ8	2/4	19	3/5	26	—	—	3/5	20	—	—	—	—	—	—	

Βαμβάκι (μόλυνση 8/4/2010)														
Φυλή	22V6NEP16		25V6NEP74		25V6NEP77		70V6NEP1		22V		25V		70WT	
Φ9	—	—	0/5	27	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—
M.O. Υψους	27,00		25,44		22,29		20,88		31,50		30,67		24,33	
Σύνολο	18/38		21/43		16/30		22/39		11/30		11/29		11/29	
Ποσοστό	47,37%		48,84%		53,33%		56,41%		36,67%		37,93%		37,93%	
Φ1	4/5	27	3/4	25	3/4	22	3/5	23	0/6	37	2/6	39	2/4	17
Φ2	0/5	32	3/5	31	3/5	23	4/5	20	2/5	28	0/6	37	2/5	20
Φ3	3/4	19	4/5	21	4/5	20	2/5	23	2/6	35	2/4	32	4/5	23
Φ4	0/5	28	3/5	26	4/4	13	2/5	22	4/5	34	4/5	36	0/6	40
Φ5	4/5	35	3/5	23	1/5	25	3/5	28	2/5	32	0/6	34	2/6	32
Φ6	4/5	29	4/4	19	2/4	22	2/5	20	2/6	34	4/4	14	2/4	23
Φ7	3/6	35	0/6	34	0/6	37	4/4	18	—	—	—	—	—	—
Φ8	2/4	21	3/6	28	—	—	3/6	23	—	—	—	—	—	—
Φ9	—	—	0/5	29	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—
M.O. Υψους	28,25		26,22		23,14		22,13		33,33		32,00		25,83	
Σύνολο	20/39		23/45		17/33		23/40		12/33		12/31		12/30	
Ποσοστό	51,28%		51,11%		51,52%		57,50%		36,36%		38,71%		40,00%	
Φ1	4/5	28	3/4	25	3/4	23	4/5	23	0/6	38	2/6	40	2/5	19
Φ2	0/6	35	4/5	31	4/5	23	4/5	20	2/6	30	0/6	38	2/5	21
Φ3	3/4	20	4/5	22	4/5	20	2/6	25	2/6	36	2/5	34	4/5	23
Φ4	0/6	31	3/5	26	4/4	13	2/6	24	4/5	34	4/5	36	0/6	42
Φ5	4/5	35	3/5	23	1/6	27	4/5	28	2/6	34	0/6	35	2/6	34
Φ6	4/5	29	4/4	19	2/5	24	2/6	22	2/6	34	4/4	14	2/5	26
Φ7	3/6	35	0/6	36	0/6	38	4/4	18	—	—	—	—	—	—

3/5/2010

6/5/2010

Βαμβάκι (μόλυνση 8/4/2010)														
Φυλή	22V6NEP16		25V6NEP74		25V6NEP77		70V6NEP1		22V		25V		70WT	
Φ8	3/4	22	3/6	30	—	—	3/6	24	—	—	—	—	—	—
Φ9	—	—	0/6	31	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—
Μ.Ο. Ύψους		29,38		26,50		24,00		23,00		34,33		32,83		27,50
Σύνολο	21/41		24/46		18/35		25/43		12/35		12/32		12/32	
Ποσοστό	51,22%		52,17%		51,43%		58,14%		34,29%		37,50%		37,50%	
Μ.Ο.	36,40%	25,28	38,73%	22,98	40,68%	20,55	56,82%	19,72	26,66%	29,96	30,02%	27,79	31,52%	22,73
Φυλή	22V6NEP16	25V6NEP74	25V6NEP77	70V6NEP1	22V	25V	70WT	max.						
d.a.i.	Μέσοι όροι (%) του ποσοστού ασθένειας													
7	17,86	11,11	13,04	16,67	10,53	15,00	15,00	100						
10	19,35	21,21	24,00	22,58	16,00	21,74	21,74	100						
13	23,53	25,64	29,63	46,88	19,23	20,00	25,00	100						
16	36,11	40,00	40,00	45,95	19,23	29,63	33,33	100						
19	44,44	46,34	51,72	52,63	33,33	32,14	35,71	100						
22	47,37	48,84	53,33	56,41	36,67	37,93	37,93	100						
26	51,28	51,11	51,52	57,50	36,36	38,71	40,00	100						
29	51,22	52,17	51,43	58,14	34,29	37,50	37,50	100						
AUDPC	819,21	844,33	899,74	1014,99	586,21	657,53	698,87	2200,00						
AUDPC.rel	0,37	0,38	0,41	0,46	0,27	0,30	0,32	1,00						

Φυλή	22V6NEP16	25V6NEP74	25V6NEP77	70V6NEP1	22V	25V	70WT							
Φυτό	AUDPC													
1	1332,50	538,00	850,00	494,50	1162,50	448,00	1170,00	420,00	0,00	726,00	561,67	752,00	910,00	351,00
2	0,00	586,00	720,00	598,00	650,00	455,00	1535,00	393,00	630,00	567,00	37,50	713,00	690,00	368,50
3	1150,00	401,50	1645,00	429,00	1527,50	425,00	525,00	436,50	731,67	683,50	710,00	623,50	992,50	465,50
4	0,00	534,00	885,00	512,00	1725,00	296,50	755,00	441,50	955,00	681,50	1000,00	703,50	0,00	769,50
5	1137,50	734,00	840,00	436,50	432,50	453,00	875,00	543,00	405,00	638,50	200,00	631,00	926,67	619,00
6	1082,50	580,50	1925,00	409,00	1118,33	421,50	845,00	405,00	884,17	664,50	1800,00	297,50	860,00	445,00
7	1085,00	562,00	0,00	648,00	0,00	685,50	1650,00	399,00	—	—	—	—	—	—
8	837,50	509,00	820,00	541,50	—	—	925,00	438,50	—	—	—	—	—	—
9	—	—	100,00	533,50	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—

Φυλή	22V6NEP16	25V6NEP74	25V6NEP77	70V6NEP1	22V	25V	70WT
Φυτό	AUDPC.rel						
1	0,61	0,39	0,53	0,53	0,00	0,26	0,41
2	0,00	0,33	0,30	0,70	0,29	0,02	0,31
3	0,52	0,75	0,69	0,24	0,33	0,32	0,45
4	0,00	0,40	0,78	0,34	0,43	0,45	0,00
5	0,52	0,38	0,20	0,40	0,18	0,09	0,42
6	0,49	0,88	0,51	0,38	0,40	0,82	0,39
7	0,49	0,00	0,00	0,75	—	—	—
8	0,38	0,37	—	0,42	—	—	—
9	—	0,05	—	—	—	—	—

