



ΓΕΩΠΟΝΙΚΟ ΠΑΝΕΠΙΣΤΗΜΙΟ ΑΘΗΝΩΝ
AGRICULTURAL UNIVERSITY OF ATHENS

Μελέτη του μηχανισμού άμυνας των φυτών
εναντίον του μύκητα *Verticillium dahliae* με τη
χρήση μεταλλαγμένων φυτών *Arabidopsis thaliana*



Μεταπτυχιακή μελέτη

Δανάη Γκίζη

Εργαστήριο Φυτοπαθολογίας

Τμήμα Επιστήμης Φυτικής Παραγωγής

Γεωπονικό Πανεπιστήμιο Αθήνας, 2015

ΕΥΧΑΡΙΣΤΙΕΣ

Ευχαριστώ τον Καθηγητή Samuel C. Zeeman, από το Institute of Plant Sciences, ETH Zurich, στην Ελβετία, που μας παρείχε τους σπόρους για όλες τις μεταλλαγμένες σειρές των φυτών *A. thaliana* στα γονίδια των β-αμυλασών, τον Επίκουρο Καθηγητή Σ. Τζάμο για την επίβλεψη της μεταπτυχιακής μου μελέτης και τον Antonio Santos Rufo για την βοήθειά του στα πειράματα. Τέλος ευχαριστώ τον Επίκουρο Καθηγητή Δ. Τσιτσιγιάννη και τον Διευθυντή του Εργαστηρίου Φυτοπαθολογίας Καθηγητή Ε. Παπλωματά.

ΠΕΡΙΛΗΨΗ

Ο μύκητας *Verticillium dahliae* είναι ένα από τα σημαντικότερα παθογόνα των φυτών, καθώς προκαλεί κάθε χρόνο μεγάλες οικονομικές απώλειες παγκοσμίως. Η χημική αντιμετώπισή του είναι πρακτικά αδύνατη και συνεπώς τις τελευταίες δεκαετίες γίνονται προσπάθειες για την ανάπτυξη νέων μεθόδων αντιμετώπισής του. Για τον σκοπό αυτό είναι πολύ χρήσιμη η κατανόηση της αλληλεπίδρασης του φυτού ξενιστή με το παθογόνο. Μέχρι σήμερα δεν είναι ξεκάθαρη η σχέση του πρωτογενούς μεταβολισμού των φυτών με τους μηχανισμούς άμυνάς τους. Στη παρούσα μελέτη διερευνήθηκε ο ρόλος των γονιδίων της β-αμυλάσης 1, 2, 3 και 4 (B-Amylase-BAM), της γλυκοτρανσφεράσης 2 (Disproportionating Enzyme 2-DPE2) και της δικινάσης της φωσφογλυκάνης (Phosphoglucan Water Dikinase-PWD) κατά την προσβολή των φυτών *Arabidopsis thaliana* από τον μύκητα *V. dahliae*. Για τον σκοπό αυτό πραγματοποιήθηκαν πειράματα παθογένειας κατά τα οποία φυτά *A. thaliana* άγριου τύπου (Col-0) και φυτά μεταλλαγμένα για τα γονίδια που κωδικοποιούν τα παραπάνω ένζυμα, μολύνθηκαν με τον μύκητα *V. dahliae* και έγινε καταγραφή των συμπτωμάτων που εμφάνισαν. Στην συνέχεια ακολούθησε ποσοτικοποίηση του μύκητα εντός του υπέργειου μέρους των μολυσμένων φυτών με την χρήση της μεθόδου qPCR για όλες τις μεταλλαγμένες σειρές και μελέτη της έκφρασης 2 γονιδίων που σχετίζονται με την άμυνα των φυτών, *PR1* και *PDF1.2*, στο υπέργειο και υπόγειο τμήμα των μολυσμένων και μη, φυτών από τις περισσότερες και λιγότερες ανθεκτικές σειρές *bam*, επίσης με την χρήση της qPCR. Επιπλέον μελετήθηκε η έκφραση των γονιδίων *BAM 1, 2, 3* και *4* σε Col-0 φυτά μετά από μόλυνση με τον μύκητα *V. dahliae*. Όλες οι μεταλλαγμένες σειρές βρέθηκαν ανθεκτικότερες από τα αγρίου τύπου φυτά στον μύκητα *V. dahliae*, κάτι το οποίο επιβεβαιώθηκε και από την ποσοτικοποίηση του μύκητα ενδοφυτικά ενώ η αυξημένη έκφραση των γονιδίων *PR1* και *PDF1.2* στις ρίζες των μεταλλαγμένων φυτών ως προς τα γονίδια των β-αμυλασών υπέδειξε ενεργοποίηση του αμυντικού συστήματος των φυτών. Οι παραπάνω παρατηρήσεις σε συνδυασμό με την αυξημένη έκφραση,

στο υπέργειο μέρος των φυτών, γονιδίων που κωδικοποιούν β-αμυλάσες συνηγορούν στην εξαγωγή του συμπεράσματος ότι η έκφραση των γονιδίων *BAM* έχει ενεργό ρόλο στην αλληλεπίδραση του φυτού *Arabidopsis thaliana* με τον μύκητα *V. dahliae*.

ΠΕΡΙΕΧΟΜΕΝΑ

- 1. Εισαγωγή**
 - 1.1 Ο μύκητας *Verticillium dahliae*
 - 1.2 Αντιμετώπιση του μύκητα *Verticillium dahliae*
 - 1.3 Η άμυνα των φυτών
 - 1.4 Ο ρόλος των γονιδίων *PR1* και *PDF1.2* στην άμυνα των φυτών
 - 1.5 *Arabidopsis thaliana*
 - 1.6 Ο μεταβολισμός του αμύλου και ο ρόλος των γονιδίων *BAM*, *PWD*, *GWD*, *DPE2* και *ISA1* σε αυτόν
 - 1.7 Σκοπός εργασίας

- 2. Υλικά και μέθοδοι**
 - 2.1 Γενετικά τροποποιημένα φυτά *Arabidopsis thaliana*
 - 2.2 Ο μύκητας *Verticillium dahliae* και η προετοιμασία του μολύσματος
 - 2.3 Θρεπτικά υλικά και διαλύματα για εξαγωγή DNA και RNA
 - 2.4 Έλεγχος ομοζυγωτίας
 - 2.5 Πείραμα 1: Αξιολόγηση της ανθεκτικότητας μεταλλαγμένων φυτών *Arabidopsis thaliana* στον μύκητα *Verticillium dahliae*
 - 2.6 Πείραμα 2: Ποσοτικοποίηση της ενδοφυτικής παρουσίας του μύκητα *Verticillium dahliae* στα μολυσμένα φυτά
 - 2.7 Πείραμα 3: Μελέτη της έκφρασης των γονιδίων *PR1* και *PDF1.2*
 - 2.8 Πείραμα 4: Μελέτη της έκφρασης των γονιδίων *BAM1*, *BAM2*, *BAM3* και *BAM4* σε φυτά *Arabidopsis thaliana* Col-0 μετά από μόλυνση με τον μύκητα *Verticillium dahliae*
 - 2.9 Στατιστική ανάλυση αποτελεσμάτων

- 3. Αποτελέσματα**
 - 3.1 Έλεγχος ομοζυγωτίας
 - 3.2 Πειράματα παθογένειας
 - 3.3 Ποσοτικοποίηση του μύκητα *Verticillium dahliae* εντός των φυτικών ιστών
 - 3.4 Έκφραση γονιδίων *PR1* και *PDF1.2*
 - 3.5 Έκφραση των γονιδίων *BAM1*, *BAM2*, *BAM3* και *BAM4*

- 4. Συζήτηση**

- 5. Βιβλιογραφία**

1. Εισαγωγή

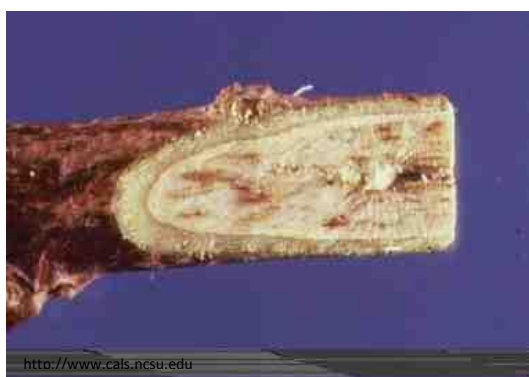
1.1 Ο μύκητας *Verticillium dahliae*

Η βερτισιλλίωση, μία από τις σοβαρότερες ασθένειες των καλλιεργούμενων φυτών, προκαλείται στη χώρα μας από τον μύκητα *Verticillium dahliae* και προσβάλλει ένα μεγάλο εύρος φυτών ξενιστών, από δένδροκομικές και ετήσιες καλλιέργειες μέχρι αυτοφυή φυτά (Ligoxigakis, 2002a; 2002b). Ανήκει στην κατηγορία των αδρομυκώσεων οι οποίες συνήθως εξελίσσονται με βραδύ ρυθμό και τα συμπτώματα που προκαλούν οφείλονται σε προσβολή των αγγείων των φυτών (Παναγόπουλος, 2007).

Χαρακτηριστικό σύμπτωμα της ασθένειας αποτελεί ο καστανός μεταχρωματισμός των αγγείων του ξύλου, ο οποίος εμφανίζεται σε επιμήκη ή εγκάρσια τομή του στελέχους και των ριζών, όχι όμως σε όλους τους ξενιστές. Ο μεταχρωματισμός αυτός μπορεί να εμφανίζεται σε όλη την έκταση των αγγείων ή μόνο στη μία πλευρά του στελέχους (Παναγόπουλος, 2007). Τα κυριότερα συμπτώματα είναι: χλώρωση, μάρανση (επιναστία) και ξήρανση των κατώτερων φύλλων, νανισμός των προσβεβλημένων φυτών, καθώς και καστανός μεταχρωματισμός των αγγείων του ξύλου. Τα συμπτώματα και η εξέλιξή τους διαφέρουν ανάλογα με τον ξενιστή όπου συνήθως στα ετήσια φυτά παρατηρείται το σύνδρομο του βραδέος μαρασμού ενώ στις δένδρωδεις καλλιέργειες παρατηρείται το σύνδρομο της ημιπληγίας (Τζάμος, 2007).

Τα συμπτώματα των αδρομυκώσεων οφείλονται στην εγκατάσταση και δράση των παθογόνων μέσα στα αγγεία του ξύλου, εμποδίζοντας τη διακίνηση του ανοδικού ρεύματος χυμού. Όσο προχωράει η ανάπτυξη του μύκητα μέσα στους ιστούς του ξενιστή, τα συμπτώματα εντείνονται λόγω αδυναμίας του φυτού να απορροφήσει νερό και θρεπτικά στοιχεία από το έδαφος. Έτσι προκαλείται μάρανση

και χλώρωση του φυτού λόγω έλλειψης νερού και ελλιπούς θρέψης αλλά και ως επακόλουθο της δράσης ενζύμων που διασπούν το κυτταρικό τοίχωμα των φυτών και φυτοτοξινών, που παράγονται από τον μύκητα (Fradin and Thomma, 2006) καθώς και λόγω έκλυσης αιθυλενίου (Robison *et al.* 2001). Έχει επίσης βρεθεί ότι ο διεγέρτης VdNEP προκαλεί μάρανση σε διάφορα φυτικά είδη, όταν εγχυθεί στα φύλλα τους (Wang *et al.* 2004; Yao *et al.* 2011). Στο τελευταίο στάδιο τα παθογόνα αποκλείουν και καταστρέφουν εντελώς το αγγειακό σύστημα του φυτού νεκρώνοντάς το (Fradin and Thomma, 2006).



Εικόνα 1: Μεταχρωματισμός των αγγείων του ξύλου, που προκαλείται από το μύκητα *V. dahliae*

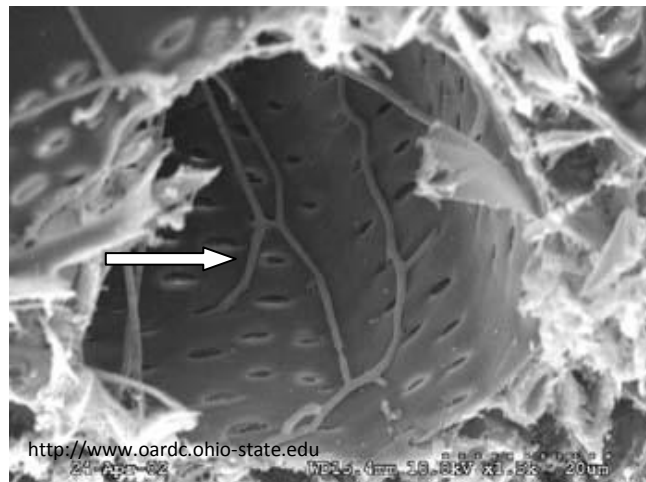
Εικόνα 2: Χαρακτηριστική μάρανση που προκλήθηκε σε φυτά αγγουριού από τον μύκητα *V. dahliae*



Εικόνα 3: Χλωρώσεις και νεκρώσεις που προκάλεσε ο μύκητας *V. dahliae* σε φύλλα μελιτζάνας

Εικόνα 4: Χαρακτηριστικά συμπτώματα που προκαλεί ο μύκητας *V. dahliae* σε ελαιόδεντρα

Σε μικροσκοπική παρατήρηση εγκαρσίων τομών του στελέχους προσβεβλημένων φυτών, παρατηρούνται άφθονες μυκηλιακές υφές μέσα στα αγγεία του ξύλου καθώς και σπόρια του μύκητα (Παναγόπουλος, 2007). Για την φραγή των αγγείων ευθύνεται κυρίως η ανάπτυξη του μυκηλίου μέσα σε αυτά αλλά και ουσίες που παράγονται από τον μύκητα καθώς και ουσίες που παράγονται από τον ξενιστή ως αντίδραση στην παρουσία του παθογόνου (Fradin and Thomma, 2006).



Εικόνα 5: Φωτογραφία από ηλεκτρονικό μικροσκόπιο σάρωσης όπου φαίνεται ο αποικισμός των αγγείων της ρίζας σε φυτά πατάτας. Το βέλος δείχνει τις υφές του μύκητα *V. dahliae*

Ετήσια φυτά μπορούν να νεκρωθούν σε διάστημα λίγων μόνο εβδομάδων από τη μόλυνσή τους ενώ τα πολυετή μπορούν να ανθίστανται για μερικούς μήνες ή και χρόνια με ασθενική βέβαια βλάστηση. Υπάρχουν ωστόσο και περιπτώσεις ανάρρωσης στις οποίες τα φυτά απομονώνουν το παθογόνο με αποτέλεσμα να περιορίσουν την ανάπτυξή του και τελικά το φυτό να συνεχίσει την ανάπτυξή του κανονικά. Αυτό συμβαίνει συνήθως σε δενδρώδεις ξενιστές όπως η ελιά (Τζάμος, 2007).

Ο μύκητας *V. dahliae* ανήκει στο γένος *Verticillium* που παλαιότερα περιελάμβανε μυκητοπαθογόνους, εντομοπαθογόνους, φυτοπαθογόνους και

σαπροφυτικούς μύκητες. Ωστόσο πρόσφατα το γένος υπέστη αναθεώρηση και πλέον οι περισσότερες εντομοπαθογόνες και μυκητοπαθογόνες απομονώσεις εμπίπτουν στο γένος *Lecanicillium*. Οι μύκητες του γένους *Verticillium*, ανήκουν στην κλάση *Adelomycetes*, στην τάξη *Moniliales* (*Hyphomycetes*) και στην οικογένεια *Moniliaceae*. Τα είδη που αναφέρονται είναι τα εξής: *V. albo-atrum*, *V. dahliae*, *V. nigrescens*, *V. nubilum*, *V. tricorpus* και *V. longisporum* και μέχρι σήμερα δεν έχει αναφερθεί η παρουσία τέλειας μορφής σε κανένα από τα παραπάνω. Τα είδη *V. albo-atrum* και *V. dahliae* προκαλούν σοβαρές απώλειες στα καλλιεργούμενα φυτά (Τζάμος, 2007).

Οι μύκητες του γένους *Verticillium* έχουν λευκό βαμβακώδες πολυκύτταρο μυκήλιο (με εγκάρσια χωρίσματα) και σχηματίζουν κονίδια (φιαλιδοσπόρια) μέσα σε φιαλίδια, πάνω σε ελεύθερους, ανορθωμένους, υαλώδεις, πολυκύτταρους κονιδιοφόρους που διακλαδίζονται χαρακτηριστικά κατά σπονδύλους. Τα φιαλίδια είναι κοντά και μονοκύτταρα με διαστάσεις 16-35 x 1-2,5 μm και σχηματίζονται ανά 3-4, πλάγια στις θέσεις των εγκαρσίων χωρισμάτων του κονιδιοφόρου. Τα κονίδια είναι μονοκύτταρα, υαλώδη, ωοειδή μέχρι ελλειψοειδή και έχουν διαστάσεις 2,5-8 x 1,4-3,2 μm. Στην κορυφή κάθε φιαλιδίου παράγονται διαδοχικά πολλά κονίδια, τα οποία συγκρατούνται μεταξύ τους με μία κολλώδη ουσία. Με αυτό τον τρόπο σχηματίζονται συχνά μικρές κεφαλές (ομάδες) κονιδίων (Τζάμος, 2007).



Εικόνα 6: Κονιδιοφόρος του μύκητα *V. dahliae* που φέρει φιαλίδια με κονίδια

Σχηματίζει επίσης μαύρα μικροσκληρώτια διαστάσεων 15-150 x 15-50 μm, με παχιά κυτταρικά τοιχώματα, σκοτεινό καφέ μέχρι μαύρο χρώμα που οφείλεται στη συσσώρευση μελανίνης, ακανόνιστο σχήμα και μέγεθος και ανώμαλη επιφάνεια, ικανά να διατηρηθούν στο έδαφος για πάνω από 10 χρόνια, ακόμα και χωρίς την παρουσία ευπαθών ξενιστών (Τζάμος, 2007). Η μελανίνη προστατεύει τα κυτταρικά τοιχώματα του μύκητα από τη δράση των ενζύμων, που παράγουν άλλοι μικροοργανισμοί στο έδαφος και αυξάνει την αντοχή του σε αντίξοες συνθήκες περιβάλλοντος (Wheeler, 1982).

Τα κυριότερα είδη που προσβάλλει ο μύκητας ανήκουν στις οικογένειες *Asteraceae*, *Brassicaceae*, *Cucurbitaceae*, *Fabaceae*, *Malvaceae* και *Solanaceae*. Αξίζει να σημειωθεί, ότι ο αριθμός των ειδών που προσβάλλονται από τον μύκητα συνεχώς αυξάνεται, καθώς η εκδήλωση της ασθένειας καταγράφεται σε νέους ξενιστές (Bhat and Subbarao, 1999).

Τα πιο ευπαθή λαχανοκομικά είδη, που προσβάλλονται από τον μύκητα είναι: τομάτα, πατάτα, μελιτζάνα, πιπεριά, αγγουριά, πεπονια, καρπουζιά, κολοκυθιά, μπάμια, φασόλι, αγκινάρα κ.ά., ενώ σπάνια προσβάλλονται το σινάπι, το κρεμμύδι, το πράσο, το σκόρδο, το σπαράγγι, το σέλινο κ.ά. (Sherf and MacNab, 1986). Επίσης, σε μελέτη που αφορούσε τον προσδιορισμό των νέων ξενιστών του μύκητα μεταξύ καλλιεργούμενων ειδών στην Κρήτη, διαπιστώθηκε ότι ο μύκητας προσβάλλει και τα εξής φυτικά είδη: άνηθο, βίκο, παπούλα, σπανάκι, αντίδι, μαρούλι, ραδίκι, ραπάνι, λάχανο, κουνουπίδι, μπρόκολο κ.ά. (Ligoixakis *et al.* 2002). Από τις δένδροκομικές καλλιέργειες, ο μύκητας *V. dahliae*, έχει παρατηρηθεί ότι προσβάλλει τα εξής είδη: βερικοκιά, ελιά, φιστικιά, αμυγδαλιά, ροδακινιά και δαμασκηλιά (Παναγόπουλος, 2007). Αυτοφυή φυτά ξενιστές του *V. dahliae*, είναι: το βλίτο, η καφέλα, η μολόχα, η περιπλοκάδα, ο στύφνος, το βρωμολάχανο, η λουβουδιά, η ανθεμίδα κ.ά. (Ligoixakis *et al.* 2002). Επίσης, ο μύκητας είναι ικανός να επιβιώσει σε μερικά είδη καλλιεργούμενων και αυτοφυών φυτών που είναι

ασυμπτωματικά, δηλαδή παρόλο που φιλοξενούν το παθογόνο δεν παρουσιάζουν συμπτώματα της ασθένειας. Είδη της οικογένειας *Roaceae* έχουν αναφερθεί ως ασυμπτωματικοί φορείς του μύκητα, ενώ παλαιότερα θεωρούνταν ότι ανήκουν στα ανθεκτικά είδη, όπως για παράδειγμα η βρώμη και η αγριοβρώμη (Thanassoulopoulos *et al.* 1981).

Η βερτισιλλίωση ευνοείται ιδιαίτερα σε συνθήκες υγρασίας γιατί ο μύκητας έχει ανάγκη από την παρουσία νερού για τον σχηματισμό των αναπαραγωγικών του οργάνων, για την απελευθέρωση των κονιδίων και την πραγματοποίηση των μολύνσεων. Περίοδοι που οι μέσες μέγιστες ημερήσιες θερμοκρασίες κυμαίνονται μεταξύ 20-24°C είναι ιδιαίτερα κρίσιμες για την εξέλιξη της ασθένειας. Ωστόσο η βέλτιστη θερμοκρασία ανάπτυξης μπορεί να διαφέρει από φυλή σε φυλή και από είδος σε είδος. Ο μύκητας *V. dahliae* επικρατεί και προκαλεί σοβαρές ζημιές στις περιοχές με μεσογειακό κλίμα, ενώ ο μύκητας *V. albo-atrum* σε πιο ψυχρές. Εδάφη ουδέτερα ως αλκαλικά ευνοούν την ασθένεια (Παναγόπουλος, 2007). Η επίδραση της αζωτούχου λίπανσης στην εμφάνιση και εξέλιξη της ασθένειας δεν είναι πολύ σαφής καθώς οι Sivaprakasam και Soumini Rajagopalanto το 1974 ανέφεραν ότι η υπερβολική αζωτούχος λίπανση μειώνει την αντοχή των φυτών μελιτζάνας στην ασθένεια, ωστόσο το 2000 ο Elmer W.H. ανέφερε το αντίθετο ενώ οι Platt H.W. και Arsenault W.J. το 2001 ανέφεραν ότι η αυξημένη ή μειωμένη αζωτούχος και φωσφορούχος λίπανση δεν είχαν καμία επίδραση στην ανθεκτικότητα της ποικιλίας πατάτας Yukon Gold στους μύκητες *V. albo-atrum* και *V. dahliae*.

Η ένταση των συμπτωμάτων εξαρτάται από το βαθμό μολυσματικότητας του στελέχους το οποίο έχει προκαλέσει τη μόλυνση, την ποσότητα του μολύσματος στο έδαφος, το βαθμό αντοχής ή ανοχής του φυτού, τη θερμοκρασία εδάφους και αέρα που επικρατεί κατά τη διάρκεια της καλλιέργειας, την παρουσία νερού από βροχοπτώσεις και αρδεύσεις, τα ζιζάνια που λειτουργούν σαν φυτά εθελοντές, την συγκαλλιέργεια με άλλες ευπαθείς καλλιέργειες και τις καλλιεργητικές επεμβάσεις.

(Παναγόπουλος, 2007). Το ύψος των απωλειών εξαρτάται και από την πρωιμότητα ή οψιμότητα της προσβολής. Σε πειράματα που πραγματοποιήθηκαν σε φυτά βαμβακιού όσο πιο πρώιμη ήταν η προσβολή τόσο μεγαλύτερες ήταν οι απώλειες (Bejarano Alcazar, 1997).

Ο μύκητας διατηρείται στο έδαφος κυρίως με τη μορφή μικροσκληρωτίων για μεγάλο χρονικό διάστημα (10-15 χρόνια) αλλά και με τη μορφή μυκηλιακών υφών για μικρότερο όμως χρονικό διάστημα, πάνω σε προσβεβλημένα υπολείμματα. Τα όργανα αυτά επιβίωσης του μύκητα διατηρούνται είτε ελεύθερα στο έδαφος είτε σε υπολείμματα μολυσμένων φυτικών ιστών. Μπορεί ακόμα να επιβιώσει και σε ζιζάνια (φυτά εθελοντές) εφόσον αυτά υπάρχουν στο χωράφι την περίοδο που δεν υπάρχουν καλλιεργούμενα φυτά (Fradin and Thomma, 2006). Η διασπορά του γίνεται με το μολυσμένο έδαφος που μπορεί να υπάρχει προσκολλημένο πάνω σε γεωργικά μηχανήματα, με μολυσμένα φυτικά υπολείμματα, με το νερό απορροής, άρδευσης και βροχής, με μολυσμένο αγενές πολλαπλασιαστικό υλικό και σπανιότερα με τον άνεμο (Παναγόπουλος, 2007).

Οι εκκρίσεις των ριζών του ξενιστή προκαλούν τη δραστηριοποίηση των οργάνων του μύκητα που βλαστάνοντας δίνουν μολυσματική υφή, όταν οι συνθήκες είναι ευνοϊκές. Μικροσκληρώτια και υφές με μελανίνη είναι συνήθως τα όργανα εκείνα του μύκητα που προκαλούν την μόλυνση (Fradin and Thomma, 2006). Η βλαστική υφή διατρύπια απ' ευθείας τους ιστούς της ρίζας και δια μέσου του φλοιώδους παρεγχύματος της ρίζας φθάνει στα αγγεία. Η είσοδος του παθογόνου διευκολύνεται από πληγές στις ρίζες οι οποίες είναι συχνά αποτέλεσμα προσβολών από έντομα και νηματώδεις (Fradin and Thomma, 2006). Το μυκήλιο που φθάνει στις αγγειώδεις δεσμίδες συνεχίζει τον αποικισμό μέσα στα αγγεία και παράγει κονίδια τα οποία με το ανοδικό ρεύμα χυμού φθάνουν ταχύτατα στα ανώτερα μέρη του φυτού. Μετά την ανάπτυξη των συμπτωμάτων και το θάνατο των ιστών του

ξενιστή ο μύκητας σχηματίζει πάνω τους μικροσκληρώτια τα οποία καταλήγουν στο έδαφος μαζί με τους νεκρούς ιστούς (Fradin and Thomma, 2006).

1.2 Αντιμετώπιση του μύκητα *Verticillium dahliae*

Στην περίπτωση της τομάτας, η επιλογή ανθεκτικών ποικιλιών είναι ένας από τους σημαντικότερους τρόπους αποφυγής προσβολής από τους μύκητες που προκαλούν τη βερτισιλλίωση. Σήμερα διατίθενται στο εμπόριο αρκετές ποικιλίες που περιέχουν γονίδια ανθεκτικότητας ανάλογα με τη φυλή του μύκητα που αποτελεί πρόβλημα στην περιοχή που θα εγκατασταθεί η καλλιέργεια. Πρέπει να δίνεται ιδιαίτερη προσοχή ώστε ανάλογα με τη φυλή του παθογόνου που υπάρχει στο εκάστοτε έδαφος να γίνεται η επιλογή της κατάλληλης ανθεκτικής ποικιλίας, εφόσον αυτή υπάρχει και είναι προσαρμοσμένη στις εδαφοκλιματικές συνθήκες της περιοχής (Παναγόπουλος, 2000).

Παλαιότερα γίνονταν απολύμανση του εδάφους με χημικά μέσα όπως χλωροπικρίνη, metham sodium και βρωμιούχο μεθύλιο. Το τελευταίο με την κοινοτική Οδηγία 91/414, το 1991 απαγορεύτηκε όμως στην εν λόγω Οδηγία δινόταν δωδεκαετής παράταση στα κράτη μέλη (μεταξύ των οποίων και η χώρα μας) να μπορούν να κάνουν περιορισμένη χρήση σκευασμάτων που περιείχαν βρωμιούχο μεθύλιο. Σήμερα η χρήση του έχει απαγορευτεί οριστικά. Τα διάφορα χημικά μέσα αρχικά φαίνονταν αποτελεσματικά όμως είχαν πολύ βραχυπρόθεσμα αποτελέσματα λόγω της ταχύτατης επανεγκατάστασης του παθογόνου και της καταστροφής ανταγωνιστικών μικροοργανισμών (Ζιώγας και Μαρκόγλου, 2007).

Αποτελεσματική μέθοδος αντιμετώπισης της ασθένειας θεωρείται αυτή της ηλιοαπολύμανσης. Με τη μέθοδο αυτή επιτυγχάνεται καταστροφή των φυτοπαθογόνων μικροοργανισμών που διαβιούν στο έδαφος, καθώς και ορισμένων εντόμων, νηματωδών και ζιζανίων που υπάρχουν κυρίως στα ανώτερα 5-10 cm του

εδάφους, λόγω ανάπτυξης απαγορευτικών για την επιβίωση τους θερμοκρασιών και υψηλής υγρασίας. Η αρχή της συγκεκριμένης μεθόδου είναι η εκμετάλλευση της ηλιακής ακτινοβολίας η οποία προκαλεί αύξηση της θερμοκρασίας του εδάφους, του οποίου η επιφάνεια καλύπτεται με ειδικά διάφανα πλαστικά φύλλα πολυαιθυλενίου αφού προηγουμένως έχει εφαρμοστεί άρδευση. Η θερμότητα που προέρχεται από την ηλιακή ακτινοβολία, παγιδεύεται με αποτέλεσμα η θερμοκρασία στα πρώτα 5 cm του εδάφους να φθάνει μέχρι και τους 52-53°C . Ενώ στο ακάλυπτο έδαφος η μέγιστη θερμοκρασία του εδάφους είναι 37-38°C. Η μέθοδος αυτή μειώνει σημαντικά την ποσότητα του μολύσματος στο έδαφος συνεπώς και τις πιθανότητες να εκδηλωθεί η ασθένεια. Η παραπάνω διαδικασία εφαρμόζεται κυρίως σε περιοχές της εύκρατης ζώνης κατά τους καλοκαιρινούς μήνες (Ιούλιο-Αύγουστο), γιατί για να γίνει σωστή εφαρμογή της, πρέπει στην περιοχή να επικρατεί υψηλή ηλιοφάνεια και υψηλές θερμοκρασίες. Σε πολλές περιπτώσεις ταυτόχρονη εφαρμογή ηλιοαπολύμανσης και ενός χημικού απολυμαντικού εδάφους όπως το metham sodium (Benyehet *et al.* 1988) ή ενός θερμοανθεκτικού βιολογικού παράγοντα όπως το βακτήριο *Paenibacillus alvei* K165, μπορεί να δώσει καλύτερα αποτελέσματα και να καθυστερήσει την επανεγκατάσταση του παθογόνου (Antoniou *et al.* 1993; Rodrigo *et al.* 2009).

Η αποστείρωση του εδάφους με θερμό ατμό σε μερικές χώρες είναι εφαρμόσιμη και οικονομικά συμφέρουσα σε θερμοκήπια κηπευτικών, όμως σπάνια εφαρμόζεται στη χώρα μας λόγω υψηλού κόστους. Πειράματα στα οποία χώμα μολυσμένο με τα παθογόνα *V. dahliae*, *Sclerotinia sclerotiorum*, *Sclerotium cepivorum*, *Pythium ultimum*, νηματώδεις *Globodera rostochiensis* και *G. pallida* και ζιζάνια *Chenopodium album* και *Agropyron repens* αποστειρώθηκαν με ατμό θερμοκρασίας 40-80°C έδειξαν ότι η μέθοδος έχει 100% επιτυχία στην θανάτωση όλων των παραπάνω (Van Loenen *et al.* 2003). Ωστόσο η μέθοδος αυτή δεν είναι ιδιαίτερα οικολογική γιατί, εκτός από παθογόνους μικροοργανισμούς, έντομα,

νηματώδεις και όλα τα ζιζάνια, θανατώνονται επίσης ζύμες, γαιοσκώληκες και πολλοί ωφέλιμοι μικροοργανισμοί π.χ. νιτροποιητικά και απονιτροποιητικά βακτήρια (Roux-Michollet *et al.* 2008).

Φιλικότερη προς το περιβάλλον μέθοδο αποτελεί η βιολογική αντιμετώπιση, η οποία στηρίζεται στην χρήση μικροοργανισμών που περιορίζουν ή παρεμποδίζουν την ανάπτυξη των παθογόνων. Οι μικροοργανισμοί αυτοί, που ονομάζονται βιολογικοί παράγοντες, δρουν με τους εξής τρόπους: ανταγωνισμός για θέση και θρεπτικά στοιχεία, αντιβίωση, παρασιτισμός, και επαγωγή της άμυνας του φυτού (Azcon Aguilar and Barea, 1996). Μέχρι σήμερα ο μύκητας *V. dahliae* στην πράξη δεν αντιμετωπίζεται αποτελεσματικά με τη χρήση κάποιου βιολογικού παράγοντα, όμως γίνονται συνεχείς προσπάθειες από πολλούς ερευνητές για την εύρεση βιολογικών παραγόντων οι οποίοι θα συμβάλλουν σε μεγάλο βαθμό στην αντιμετώπιση της ασθένειας (Tjamos *et al.* 2005; Gizi *et al.* 2011)

Η καλύτερη αντιμετώπιση είναι η πρόληψη της εξάπλωσης της ασθένειας, η οποία μπορεί να γίνει με τις εξής καλλιεργητικές τεχνικές (Παναγόπουλος 2000; 2007; Fradin and Thomma, 2006):

- Χρήση φυτών εμβολιασμένων σε ανθεκτικά υποκείμενα. Η μέθοδος αυτή χρησιμοποιείται κυρίως σε δενδρώδεις καλλιέργειες αλλά και σε ορισμένα κηπευτικά.
- Εκρίζωση και καταστροφή μολυσμένων φυτών ή μολυσμένων τμημάτων αυτών (ελιά) με φωτιά μαζί με το ριζικό σύστημα ώστε το παθογόνο να μην μεταδοθεί και στα υπόλοιπα φυτά της καλλιέργειας.
- Αποφυγή υπερβολικής εδαφικής υγρασίας, ισοπέδωση εδάφους για καλή αποστράγγιση. Άρδευση με συστήματα που δεν ευνοούν την μετάδοση του μολύσματος. (π.χ. στάγδην)
- Αποφυγή υπερβολικής αζωτούχου λίπανσης αυξάνει την αντοχή των φυτών

- Αμειψισπορά με φυτικά είδη που δεν προσβάλλονται από τον μύκητα *V. dahliae*. (π.χ. σιτηρά) Οι κύκλοι της αμειψισποράς εξασφαλίζουν τον απαιτούμενο χρόνο για καταστροφή μεγάλου μέρους του μολύσματος και αύξηση των υπαρχόντων πληθυσμών ανταγωνιστικών μικροοργανισμών στο έδαφος.
- Συστηματική καταπολέμηση των ζιζανίων τα οποία όπως αναφέρθηκε παραπάνω μπορούν να αποτελέσουν θέσεις επιβίωσης του μύκητα.
- Καταστροφή των υπολειμμάτων της προηγούμενης καλλιέργειας που λειτουργούν σαν θέσεις επιβίωσης του μύκητα. Αποφυγή καλλιέργειας σε εδάφη που παλαιότερα καλλιεργούνταν άλλα ευπαθή στη βερτισιλλίωση είδη. Αποφυγή συγκαλλιέργειας ευπαθών ειδών με άλλα ευπαθή είδη (π.χ. ελιά με σολανώδη ή βαμβάκι κ.α.)
- Αποφυγή καλλιέργειας σε εδάφη που ευνοούν την ασθένεια (ουδέτερο προς αλκαλικό pH) ή διόρθωση του pH με κατάλληλη λίπανση.
- Λήψη μέτρων υγιεινής για αποφυγή μετάδοσης της ασθένειας. Μερικά από αυτά είναι καθαρισμός και απολύμανση των γεωργικών μηχανημάτων και των εργαλείων που χρησιμοποιούνται για την καλλιέργεια του εδάφους και τις καλλιεργητικές εργασίες αντίστοιχα.

Όσον αφορά την χημική φυτοπροστασία, η αλόγιστη χρήση χημικών φυτοπροστατευτικών προϊόντων, ειδικά όταν αυτά δεν παρουσιάζουν μεγάλη εξειδίκευση ως προς τον οργανισμό-στόχο περιορίζει τον πληθυσμό των φυσικών εχθρών-ανταγωνιστών του, οδηγώντας σε διατάραξη της οικολογικής ισορροπίας του οικοσυστήματος. Επιπλέον η έκθεση ενός μικροοργανισμού σε μία συγκεκριμένη χημική ουσία για μεγάλο χρονικό διάστημα προκαλεί την ανάπτυξη στελεχών του, ανθεκτικών στη συγκεκριμένη ουσία.

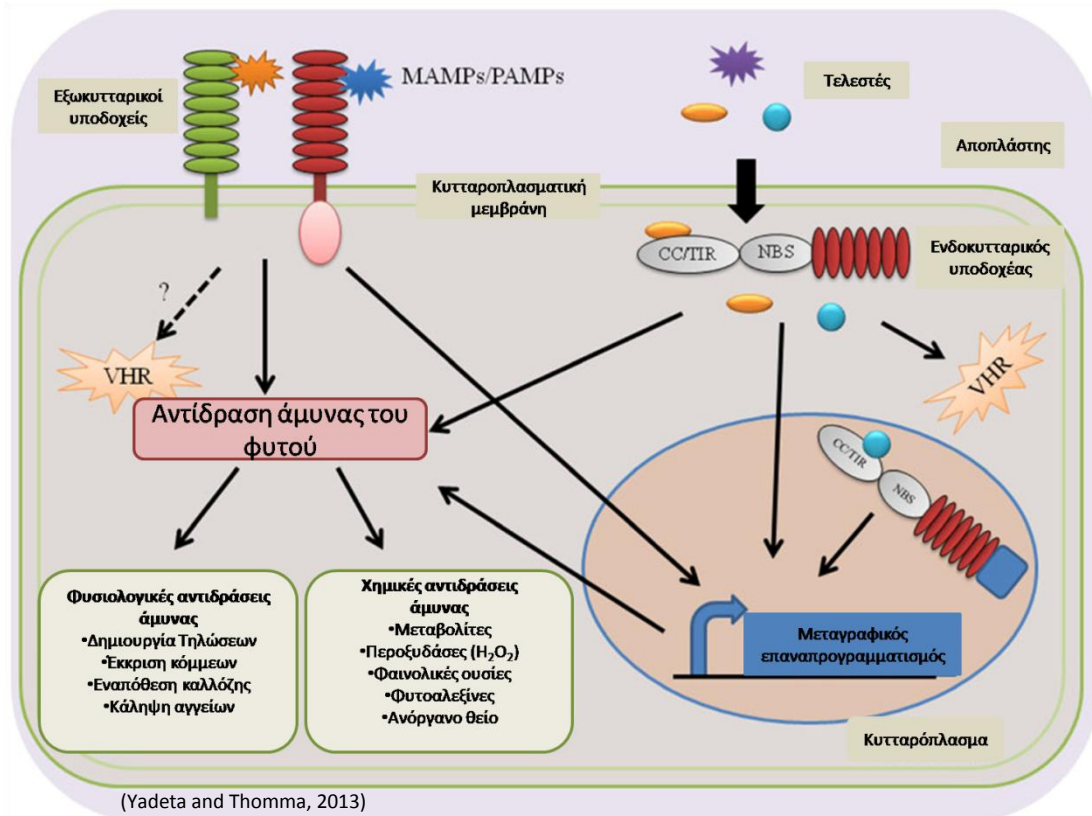
Σήμερα πλέον είναι σαφής η ζημιά που μπορεί να προκαλέσει η χρήση χημικών σκευασμάτων στο περιβάλλον, καθώς και η υποβάθμιση της ποιότητας των γεωργικών προϊόντων. Η ζήτηση που υπάρχει στη σύγχρονη αγορά για προϊόντα υψηλής ποιότητας (χωρίς υπολείμματα γεωργικών φαρμάκων), σε συνδυασμό με την ανάγκη μείωσης του κόστους παραγωγής αλλά και αποτελεσματικής αντιμετώπισης των εχθρών και παθογόνων των καλλιεργειών, οδήγησε στη σύγχρονη τάση μείωσης της χρήσης χημικών σκευασμάτων στο ελάχιστο δυνατόν.

Για όλους τους παραπάνω λόγους η αντιμετώπιση της ασθένειας που προκαλείται από τον μύκητα *V. dahliae* είναι δύσκολη και με αρκετά μεγάλο κόστος, γι' αυτό γίνονται παγκοσμίως προσπάθειες για την εξεύρεση νέων βιώσιμων τρόπων αντιμετώπισής της, φιλικών προς το περιβάλλον. Η δημιουργία ανθεκτικών ποικιλιών, η ανακάλυψη νέων βιολογικών παραγόντων που ανταγωνίζονται το παθογόνο και η ανακάλυψη νέων δραστικών ουσιών για την δημιουργία χημικών σκευασμάτων με υψηλή εξειδίκευση ως προς τον οργανισμό στόχο ή με στόχο την ενεργοποίηση της άμυνας του φυτού, είναι οι σημαντικότεροι στόχοι των ερευνητών πλέον προς την κατεύθυνση αυτή. Για τον σκοπό αυτό η μελέτη των μοριακών αλληλεπιδράσεων μεταξύ φυτών και παθογόνων είναι ιδιαίτερα χρήσιμη.

1.3 Η άμυνα των φυτών

Στην φύση η ικανότητα ενός παθογόνου να μολύνει ένα φυτό και να προκαλεί την εμφάνιση συμπτωμάτων είναι εξαίρεση και όχι κανόνας. Αυτό συμβαίνει επειδή τα φυτά έχουν την ικανότητα να αναγνωρίζουν τα παθογόνα που τα απειλούν και να ενεργοποιούν την άμυνά τους ώστε να αποκρούσουν την απειλή (Staskawicz, 2001). Τα παθογόνα που καταφέρνουν να μην αναγνωρισθούν από το φυτό ή να παρακάμψουν την άμυνα του φυτού είναι αυτά τα οποία έχουν την ικανότητα να το μολύνουν. Σύμφωνα με την θεωρία “γονίδιο-προς-γονίδιο” τα ανθεκτικά φυτά

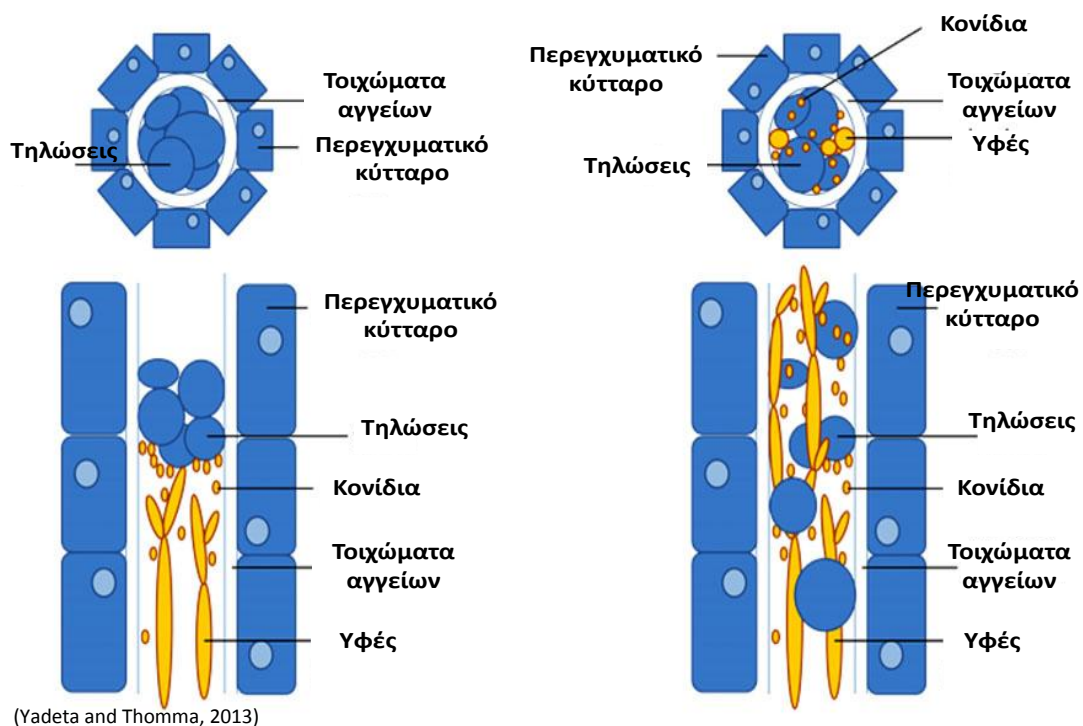
διαθέτουν γονίδια ανθεκτικότητας (R genes) τα οποία χρησιμεύουν στο να αναγνωρίσει το φυτό παθογόνα τα οποία διαθέτουν το αντίστοιχο Avr γονίδιο (Staskawicz, 2001; Dangl *et al.* 2013). Σήμερα γνωρίζουμε ότι τα φυτά αναγνωρίζουν μόρια των παθογόνων μικροοργανισμών (microbe-associated molecular patterns-MAMPs/pathogen-associated molecular patterns-PAMPs) και μόρια-τελεστές (effectors) που εκκρίνονται από το παθογόνο ή είναι μόρια φυτικής προέλευσης που απελευθερώνονται από το φυτό ως αποτέλεσμα της ζημιάς την οποία υπέστη (Dangl *et al.* 2013; Yadeta and Thomma, 2013). Η αναγνώριση γίνεται είτε μέσω εξωκυτταρικών είτε μέσω ενδοκυτταρικών υποδοχέων. Τέτοιοι υποδοχείς έχουν βρεθεί και χαρακτηρισθεί σε διάφορα φυτά, μεταξύ αυτών η τομάτα και *Arabidopsis thaliana* (Yadeta and Thomma, 2013). Η αναγνώριση του παθογόνου έχει σαν επακόλουθο αλυσιδωτές μεταβολές στην έκφραση διαφόρων γονιδίων που οδηγούν σε ενεργοποίηση των μηχανισμών άμυνας του φυτού εξαρτώμενων, από το μόριο το οποίο προκάλεσε την ενεργοποίησή τους (PAMP, Effector-triggered immunity). Τέτοιοι μηχανισμοί είναι η δημιουργία τηλώσεων και η εναπόθεση λιγνίνης και καλλόζης καθώς και η παραγωγή χημικών ενώσεων από το φυτό που νεκρώνουν το παθογόνο ή περιορίζουν την εξάπλωσή του (Yadeta and Thomma, 2013). Φυτά τα οποία δεν αναγνωρίζουν το παθογόνο, δεν είναι σε θέση να ενεργοποιήσουν τους μηχανισμούς άμυνας τους με αποτέλεσμα να προσβάλλονται ευκολότερα από αυτό (Staskawicz, 2001; Yadeta and Thomma, 2013). Οι πρωτεΐνες Ve1 της τομάτας και Xa21 του ρυζιού έχει αποδειχθεί ότι αποτελούν εξωκυτταρικούς υποδοχείς που αναγνωρίζουν τις πρωτεΐνες Ave1 του μύκητα *V. dahliae* και Xa21 του βακτηρίου *Xanthomonas oryzae* pv. *oryzae*, αντίστοιχα (Yadeta and Thomma, 2013). Η πρωτεΐνη I-2 της τομάτας και η RRS1-R του φυτού *A. thaliana* είναι παραδείγματα ενδοκυτταρικών NB-LRR υποδοχέων που αναγνωρίζουν τον τελεστή Avr2 του μύκητα *F.oxysporum* f.sp. *lycopersici* και τον PopP2 του βακτηρίου *Ralstonia solanacearum* (Yadeta and Thomma, 2013).



Εικόνα 6: Γραφική απεικόνιση του μηχανισμού αναγνώρισης των παθογόνων που προσβάλλουν τα αγγεία των φυτών και ενεργοποίηση των μηχανισμών άμυνας του φυτού. Το φυτό αναγνωρίζει μόρια PAMPs/MAMPs στην επιφάνεια των παθογόνων και τους τελεστές που εκκρίνουν τα παθογόνα μέσω ενδοκυτταρικών και εξωκυτταρικών υποδοχέων και ενεργοποιούνται οι μηχανισμοί άμυνας του φυτού (Yadeta and Thomma, 2013).

Η δημιουργία τηλώσεων δεν συνεπάγεται απαραίτητα ανθεκτικότητα, καθώς τυλώσεις δεν δημιουργούνται μόνο σε ανθεκτικά φυτά. Ο χρόνος δημιουργίας τους καθώς και η έκτασή τους διαφέρουν από φυτό σε φυτό συνεπώς ο βαθμός ανθεκτικότητας διαφέρει μεταξύ των διαφόρων φυτών. Φυτά τα οποία δεν σχηματίζουν τυλώσεις ή σχηματίζουν αλλά με βραδύ ρυθμό θεωρούνται ευπαθή στις αδρομυκώσεις (Yadeta and Thomma, 2013). Οι τηλώσεις είναι διατάξεις και διογκώσεις της κυτταρικής μεμβράνης των παρεγχυματικών κυττάρων των αγγειωδών δεσμίδων στα σημεία των πλάγιων βοθρίων προς το εσωτερικό των αγγείων, που δυσχεραίνουν την προέλαση του παθογόνου στα αγγεία και την αποίκισή τους. Προκαλούνται από επίδραση ουσιών προερχόμενων από το φυτό ή

το παθογόνο στις κυτταρικές μεμβράνες του ξενιστή (Τζάμος, 2007; Yadeta and Thomma, 2013). Η εναπόθεση λιγνίνης αυξάνει την μηχανική αντοχή των κυτταρικών τοιχωμάτων των φυτών και μειώνει την ευαισθησία τους στην δράση υδρολυτικών ενζύμων. Επίσης περιορίζει την διάχυση των τοξινών και την διαθεσιμότητα θρεπτικών στοιχείων για τον μύκητα (Vance *et al.* 1980). Ουσίες πρόδρομες της λιγνίνης (φυτοαλεξίνες) περιορίζουν την ανάπτυξη του παθογόνου. Η εναπόθεση καλλόζης στις θέσεις διείσδυσης των μυκηλιακών υφών στα φυτικά κύτταρα είναι ένας ακόμα σημαντικός μηχανισμός άμυνας (Τζάμος, 2007).



Εικόνα 7: Σχηματική απεικόνιση εγκάρσιας τομής (πάνω) και επιμήκους τομής (κάτω) αγγείων ανθεκτικού (αριστερά) και ευαίσθητου (δεξιά) φυτού κατά την προσβολή από παθογόνο μύκητα. Στο ανθεκτικό φυτό, η δημιουργία τηλώσεων στο εσωτερικό των αγγείων, περιορίζει την ανάπτυξη του μύκητα και την περαιτέρω εξάπλωσή του. Εφόσον ο αριθμός των αγγείων που έχουν φραχθεί είναι περιορισμένος, το φυτό δεν υποφέρει από υδατική καταπόνηση. Στα ευαίσθητα φυτά, οι τηλώσεις που δημιουργούνται δεν επιτυγχάνουν να περιορίσουν την ανάπτυξη του παθογόνου (Yadeta and Thomma, 2013).

Η προσβολή των αγγείων έχει σαν επακόλουθο μεταβολικές αλλαγές στα παρεγχυματικά κύτταρα των γειτονικών μη προσβεβλημένων αγγείων οι οποίες οδηγούν σε συσσώρευση πρωτεϊνών και δευτερογενών μεταβολιτών, στον χυμό των φυτών, που συνεισφέρουν άμεσα ή έμμεσα στην άμυνα των φυτών και παρεμποδίζουν ή περιορίζουν την ανάπτυξη του παθογόνου. Τέτοιες πρωτεΐνες και μεταβολικές ουσίες είναι οι PR1, PR2, PR3, PR4 και PR5 (pathogenesis related proteins) και διάφορες περοξυδάσες, πρωτεάσες, φαινόλες, φυτοαλεξίνες κ.α. (Yadeta and Thomma, 2013).

1.4 Ο ρόλος των γονιδίων *PR1* και *PDF1.2* στην άμυνα των φυτών

Η έκφραση του γονιδίου *PR1* (*pathogenesis-related gene 1, At2g14610*, στα αγρίου τύπου φυτά *A. thaliana* Col-0) επάγεται σαν αντίδραση του φυτού στην μόλυνση από διάφορα παθογόνα και δεν εντοπίζεται μόνο τοπικά αλλά επάγεται και διασυστηματικά. Είναι επίσης ένας χρήσιμος μοριακός δείκτης για την επίκτητη διασυστηματική αντοχή (SAR) εναντίον φυτοπαθογόνων μικροοργανισμών, καθώς η έκφρασή του συνδέεται με την εμφάνισή της (Van Loon and Van Strien, 1999). Την έκφραση του γονιδίου αυτού επάγει η παρουσία του σαλικυλικού οξέος και συνεπώς η υπερέκφρασή του είναι δείκτης της ενεργοποίησης του μηχανισμού άμυνας που εξαρτάται από το σαλικυλικό οξύ (Feys *et al.* 2000; Schenk *et al.* 2000).

Η πρωτεΐνη που κωδικοποιεί το γονίδιο *PDF1.2a* (plant defensin, *At5g44420*) ανήκει στην οικογένεια των plant defensin πρωτεϊνών. Η έκφραση του επίσης επάγεται σαν αντίδραση του φυτού στην μόλυνση από διάφορα παθογόνα. Την έκφραση του γονιδίου αυτού επάγει η παρουσία του ιασμονικού οξέος και του αιθυλενίου και συνεπώς η υπερέκφρασή του είναι δείκτης της ενεργοποίησης του μονοπατιού του ιασμονικού οξέος/αιθυλενίου (Feys *et al.* 2000; Schenk *et al.* 2000).

1.5 *Arabidopsis thaliana*

Το φυτό *A. thaliana* είναι ένα μικρό φυτό ιθαγενές της Ευρώπης, της Ασίας και της νοτιοδυτικής Αφρικής. Αναπτύσσεται τον χειμώνα και είναι μονοετές. Μπορεί να συμπληρώσει τον βιολογικό του κύκλο σε διάστημα μόλις 6 εβδομάδων. Είναι διπλοειδές, το γονιδίωμά του έχει μέγεθος περίπου 135 Mbp, περιλαμβάνει 5 χρωμοσώματα και ήταν το πρώτο φυτό του οποίου το γονιδίωμα αλληλουχήθηκε. Το μικρό μέγεθος του γονιδιώματος του (έχει το μικρότερο γνωστό φυτικό γονιδίωμα) το κατέστησε ιδανικό για αλληλούχιση και χαρτογράφηση (<http://www.arabidopsis.org>). Μπορεί να αναπτυχθεί καλά σε μικρή ποσότητα χώματος, σε ιστοκαλλιέργεια και σε υδροπονική καλλιέργεια με τεχνητό ή φυσικό φως, σε ειδικό θάλαμο ελεγχόμενων συνθηκών αλλά και σε θερμοκήπιο. Όλα τα παραπάνω χαρακτηριστικά έκαναν το φυτό *A. thaliana* ιδανικό για πειράματα βιολογίας και γενετικής. Η χρήση του βοήθησε στην κατανόηση πολλών βιοχημικών χαρακτηριστικών των φυτών (Meinke *et al.* 1998; Streb and Zeeman, 2012).

Μορφολογικά, είναι μικρό φυτό που φθάνει σε μέγεθος μέχρι 20–25 cm. Τα φύλλα φύονται σε μορφή ροζέτας στην βάση του φυτού, με μερικά φύλλα επίσης πάνω στον ανθοφόρο βλαστό. Τα φύλλα του έχουν μήκος 1.5–5 cm και πλάτος 2–10 mm, με λεία ή ελαφρώς κυματιστή περιφέρεια και καλύπτονται από μικρές μονοκύτταρες τρίχες. Τα άνθη του έχουν διάμετρο 3 mm, και οι ταξιανθίες του έχουν μορφή κορύμβου. Εμφανισιακά είναι ένας τυπικός εκπρόσωπος της οικογένειας *Brassicaceae*. Ο καρπός είναι κέρας μήκους 5–20 mm και περιέχει 20–30 σπόρους. Το ανθικό στέλεχος αναπτύσσεται σε περίπου 3 εβδομάδες και τα άνθη αυτογονιμοποιούνται (Blamey and Grey-Wilson, 1989).

Έχει γίνει σημαντική προσπάθεια για να χαρακτηρισθούν τα 25.498 γονίδια του φυτού που κωδικοποιούν πρωτεΐνες από 11.000 οικογένειες (The Arabidopsis

Genome Initiative, 2000). Είναι ιδανικό για πειράματα με χρήση συνεστιακού μικροσκοπίου (confocal) και μικροσκοπίου φθορισμού καθώς τα νεαρά φυτά και ειδικά οι ρίζες τους είναι αρκετά διαφανή ώστε να τα διαπερνά το φως. (Moreno *et al.* 2006)

Το φυτό *A. thaliana* έχει συμβάλει σημαντικά στην απόκτηση γνώσης πάνω στον μεταβολισμό των φυτών και στην επίδραση του περιβάλλοντος πάνω στα μεταβολικά μονοπάτια τους. Χρησιμοποιείται ευρύτατα σε φυτοπαθολογικά πειράματα για την διερεύνηση των αλληλεπιδράσεων φυτών-παθογόνων και την μελέτη των μηχανισμών άμυνας των φυτών (Dangl *et al.* 2013).

Η δημιουργία μεταλλαγμένων φυτών *A. thaliana* γίνεται με τη χρήση του βακτηρίου *Agrobacterium tumefaciens* το οποίο μεταφέρει το επιθυμητό τμήμα DNA μέσα στο γονιδίωμα του φυτού. Το άνθος βυθίζεται μέσα σε ένα διάλυμα που περιέχει το βακτήριο *A. tumefaciens*, το τμήμα DNA που πρέπει να ενσωματωθεί στο γονιδίωμα του φυτού και μία επιφανειοδραστική ουσία (Clough and Bent, 1998). Το σημείο της εισαγωγής του T-DNA έχει προσδιοριστεί για πάνω από 300.000 διαφορετικές μεταλλαγμένες σειρές, πληροφορίες για τις οποίες μπορεί να βρει κανείς σε διαδικτυακές βάσεις δεδομένων (<http://signal.salk.edu>) Σε αυτές τις συλλογές υπάρχουν διαθέσιμες μεταλλαγμένες σειρές για τα περισσότερα γονίδια του φυτού.

Τις πιο πρόσφατες πληροφορίες σχετικά με το γονιδίωμα του φυτού *A. thaliana* διαθέτει η βάση δεδομένων TAIR (The Arabidopsis Information Resource, <http://www.arabidopsis.org>). Μεταλλαγμένες σειρές καθώς και πληροφορίες σχετικά με αυτές είναι διαθέσιμες συνήθως μέσω του Nottingham Arabidopsis Stock Center-NASC (<http://arabidopsis.info>) και του Arabidopsis Biological Resource Center-ABR (<https://abrc.osu.edu>).

1.6 Ο μεταβολισμός του αμύλου και ο ρόλος των γονιδίων *BAM*, *PWD*, *GWD*, *DPE2* και *ISA1* σε αυτόν

Στον καταβολισμό του αμύλου εμπλέκεται μία πληθώρα πρωτεϊνών, των περισσότερων από των οποίων ο ρόλος δεν έχει αποσαφηνιστεί ακόμα πλήρως, λόγω του ότι εμπλέκονται σε πολύπλοκα μεταβολικά μονοπάτια και πολλά βρίσκονται υπό μορφή ισοενζύμων εντοπιζόμενων είτε εντός είτε εκτός των χλωροπλαστών (Lloyd *et al.* 2005; Bolouri Moghaddam *et al.* 2012). Αυτό αποδεικνύεται και από το γεγονός ότι ορισμένες μεταλλάξεις σε γονίδια που κωδικοποιούν ένζυμα που εμπλέκονται στον μεταβολισμό του αμύλου σε φυτά *A. thaliana* φαίνεται να μην έχουν τόσο έντονη επίδραση στον ρυθμό αποδόμησης του, ενώ μεταλλάξεις σε άλλα γονίδια που κωδικοποιούν ένζυμα με φαινομενικά μειωμένη δραστηριότητα, φαίνεται πως επηρεάζουν σημαντικά την διάσπαση του (Lloyd *et al.* 2005; Fulton *et al.* 2008). Στην περίπτωση των β-αμυλασών για παράδειγμα, η δραστηριότητα ορισμένων ενζύμων δεν είναι χαρακτηριστική για την χρησιμότητα τους καθώς π.χ. το γονίδιο της β-αμυλάσης 5 (*At4g15210*) που κωδικοποιεί την πρωτεΐνη που συνεισφέρει περισσότερο από όλες ως προς την δραστηριότητα του ενζύμου στα φύλλα φυτών *A. thaliana*, φαίνεται να μην επηρεάζει την αποδόμηση του αμύλου, αφού όταν τροποποιηθεί δεν επηρεάζεται σημαντικά η διάσπαση του αμύλου (Lloyd *et al.* 2005). Αντιθέτως η β-αμυλάση 4, λόγω της αντικατάστασης ενός αμινοξέος απαραίτητου για την καταλυτική δράση του ενζύμου έχει χάσει την δραστηριότητα β-αμυλάσης μέσω της εξέλιξης των ειδών, παρόλα αυτά αν μεταλλαχθεί το γονίδιο που είναι υπεύθυνο για την παραγωγή της (*At5g55700*) αυξάνονται σημαντικά τα επίπεδα αμύλου στους ιστούς των φυτών, γεγονός που αποδεικνύει ότι η β-αμυλάση 4 διευκολύνει ή ρυθμίζει με κάποιο τρόπο την διάσπαση του αμύλου (Fulton *et al.* 2008).

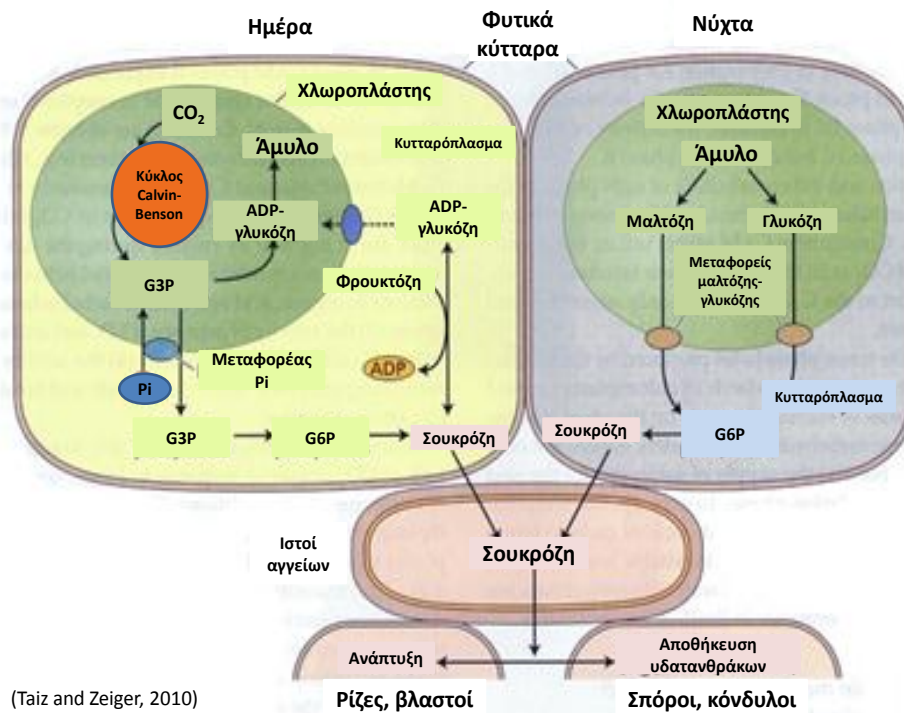
Δεν έχει αποσαφηνιστεί ακόμα ο ρόλος των ενζύμων που εμπλέκονται στον μεταβολισμό του αμύλου σε άλλα φυτικά είδη είναι όμως πολύ πιθανόν το μονοπάτι μεταβολισμού του αμύλου να μην είναι το ίδιο για όλα τα είδη φυτών (Lloyd *et al.* 2005). Έχει αποδειχθεί επίσης ότι η δραστηριότητα των ενζύμων που εμπλέκονται στην βιοσύνθεση του αμύλου ελέγχεται από τροποποιήσεις που γίνονται μετά την μετάφραση των ενζύμων (post-translation) π.χ. με φωσφορυλίωση. Είναι επομένως πιθανόν και η αποδόμηση του αμύλου να απαιτεί τέτοιες τροποποιήσεις (Lloyd *et al.* 2005).

Το άμυλο είναι ένας πολυσακχαρίτης αποτελούμενος από δεκάδες χιλιάδες μόρια γλυκόζης, που ενώνονται με γλυκοσιδικούς δεσμούς και σχηματίζουν σπειροειδή και διακλαδισμένη αλυσίδα. Συναντάται σε μορφή αμυλοκόκκων οι οποίοι περιλαμβάνουν την αμυλόζη (πολλά μόρια γλυκόζης σε ευθεία διάταξη) και την αμυλοπηκτίνη (πολλά μόρια γλυκόζης σε διακλαδισμένη διάταξη). Οι αμυλόκοκκοι αποτελούνται από αμυλοπηκτίνη σε ποσοστό πάνω από 90%. Τα μόρια γλυκόζης από τα οποία αποτελείται η αμυλοπηκτίνη ενώνονται μεταξύ τους με α -1,4 και α -1,6 γλυκοσιδικούς δεσμούς, ενώ η αμυλόζη δεν διαθέτει καθόλου α -1,6 γλυκοσιδικούς δεσμούς. Το άμυλο αποτελεί αποταμιευτικό πολυσακχαρίτη των φυτών, και όταν διασπαστεί αποδίδει μόρια γλυκόζης τα οποία το φυτό χρησιμοποιεί για την παραγωγή ενέργειας (Lloyd *et al.* 2005).

Η αποδόμηση του αμύλου ξεκινά με την απελευθέρωση διαλυτών γλυκανών από την επιφάνεια του αμυλόκοκκου κατά την διάρκεια της νύχτας. Σε συνθήκες σκότους ξεκινά μια διαδικασία τροποποίησης της επιφάνειας των κρυστάλλων του αμύλου, από τα ένζυμα *GWD* και *PWD*, απαραίτητη για την περαιτέρω διαλυτοποίηση του από α και β -αμυλάσες καθώς και διάφορα άλλα ένζυμα όπως η α -(1,4) γλυκοτρανσφεράσες (Disproportionating Enzyme-DPE), οι ισοαμυλάσες κ.α. Η διαδικασία αυτή ξεκινά με την φωσφορυλίωση μέρους των γλυκοσιδίων που σχηματίζουν το άμυλο, από τα ένζυμα δικινάση της γλυκάνης (Glucan Water

Dikinase-GWD) και δικινάση της φωσφογλυκάνης (Phosphoglucan Water Dikinase-PWD) (Lloyd *et al.* 2005). Ωστόσο για την δράση του ενζύμου PWD προαπαιτείται η φωσφορυλίωση του αμύλου από το ένζυμο GWD (Kötting *et al.* 2005). Παρεμπόδιση της δράσης οποιουδήποτε από τα 2 ένζυμα οδηγεί σε υπερβολική συσσώρευση αμύλου στα φύλλα φυτών *A. thaliana* γεγονός που αποδεικνύει ότι και τα 2 ένζυμα έχουν σημαντικό ρόλο στον καταβολισμό του αμύλου. Φυτά *A. thaliana* μεταλλαγμένα ως προς το γονίδιο *GWD1* (*At1g10760*) και ως προς το γονίδιο *PWD* (*At5g26570*) συσσωρεύουν μεγάλη ποσότητα αμύλου στα φύλλα τους, ωστόσο τα δεύτερα συσσωρεύουν λιγότερο άμυλο όταν αναπτύσσονται κάτω από ίδιες συνθήκες (Kötting *et al.* 2005). Η έλλειψη του ενζύμου PWD έχει μικρή επίδραση στην ανάπτυξη του φυτού ενώ η έλλειψη του GWD προκαλεί σοβαρή καθυστέρηση στην ανάπτυξη των φυτών σε συνθήκες 12h σκότους/12h φωτός (Kötting *et al.* 2005). Το ένζυμο GWD φωσφορυλιώνει την αμυλοπηκτίνη μεταφέροντας μία φωσφορική ομάδα από το ATP στη θέση 6 ή την θέση 3 των γλυκοζιτικών καταλοίπων της (Lloyd *et al.* 2005). Οι α-αμυλάσες υδρολύουν τους α-1,4 γλυκοσιδικούς δεσμούς όπως και οι β-αμυλάσες αλλά ο ακριβής ρόλος των α-αμυλασών στον καταβολισμό του αμύλου δεν έχει ακόμα αποσαφηνιστεί πλήρως. Οι β-αμυλάσες είναι ένζυμα των οποίων η δράση έχει ως αποτέλεσμα την σύνθεση, σχεδόν αποκλειστικά, μαλτόζης (Lloyd *et al.* 2005). Το γονιδίωμα του φυτού *A. thaliana* περιέχει συνολικά 9 γονίδια που κωδικοποιούν 9 ισoenζυμα β-αμυλάσης (Lloyd *et al.* 2005). Από αυτές τις 9 β-αμυλάσες, μόνο οι 4 (β-amylases 1,2,3 και 4) είναι εντοπισμένες στους χλωροπλάστες (Fulton *et al.* 2008).

Οι α-1,6 γλυκοσιδικοί δεσμοί διασπώνται από άλλα ένζυμα (debranching enzymes) που χωρίζονται σε 2 κατηγορίες ανάλογα με την εξειδίκευσή τους ως προς το υπόστρωμα στο οποίο δρουν: τις ισοαμυλάσες (isoamylases-ISA) και τις οριακές δεξτρινάσες (limit dextrinases-LDA) (Lloyd *et al.* 2005).



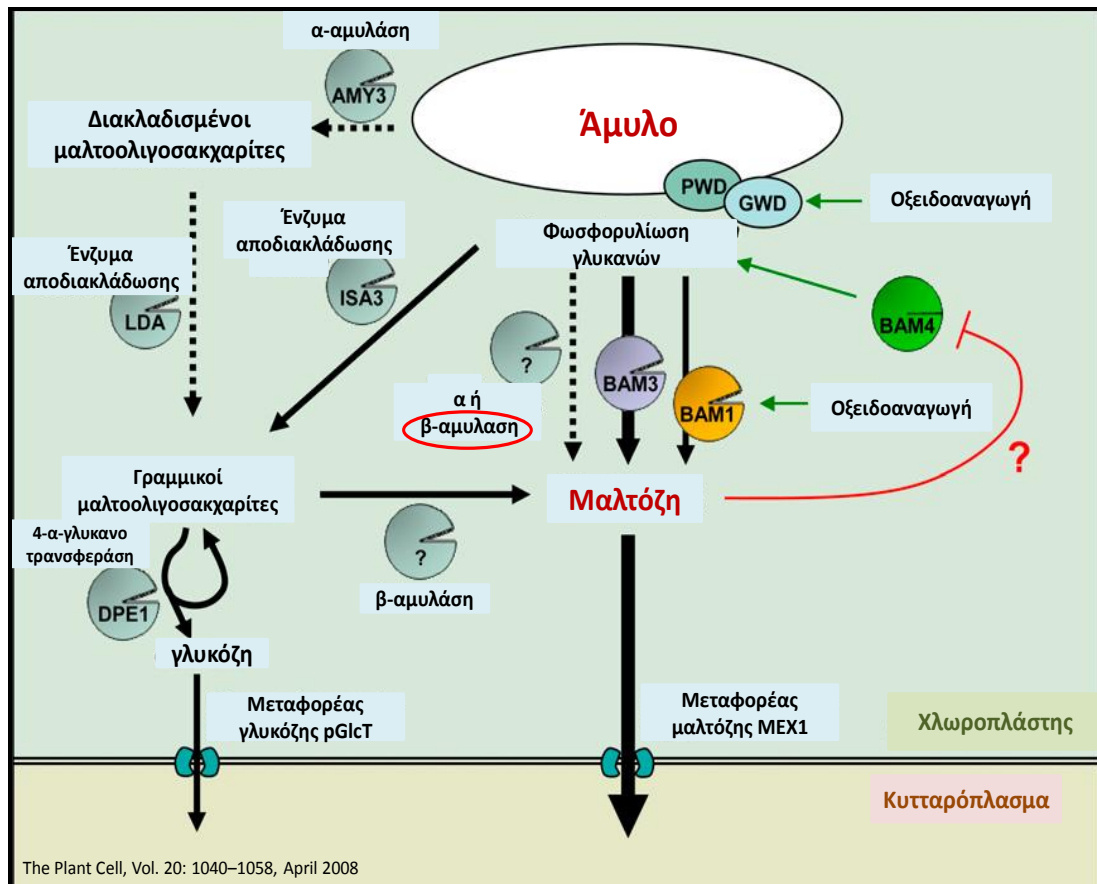
Εικόνα 8: Η διαδικασία σύνθεσης του αμύλου κατά την διάρκεια της ημέρας και η διαδικασία διάσπασης του αμύλου κατά την διάρκεια της νύχτας. οι 2 διαδικασίες λαμβάνουν χώρα στο στρώμα του χλωροπλάστη (Taiz and Zeiger, 2010).

Μεταλλαγμένα φυτά στους χλωροπλάστες των οποίων δεν παράγονται ισοαμυλάσες τείνουν να συσσωρεύουν μεγάλες ποσότητες αμύλου αλλά και φυτογλυκογόνου, το οποίο είναι ένα έντονα διακλαδιζόμενο πολυμερές αποτελούμενο από μονομερή D-γλυκόζης και έχει δομή παρόμοια με αυτή του ζωικού γλυκογόνου (Zeeman *et al.* 1998).

Μετά την δράση των ενζύμων (debranching enzymes) που διασπούν το άμυλο σε μικρότερες αλυσίδες ολιγομερών μαλτόζης (malto-oligosaccharides-MOSs) οι οποίες συσσωρεύονται στο στρώμα του χλωροπλάστη, πιθανόν να αναλαμβάνουν δράση οι β-αμυλάσες οι οποίες διασπούν τα ολιγομερή αυτά σε μικρότερα τμήματα αλλά και οι α-(1,4) γλυκοτρανσφεράσες (DPE) (Lloyd *et al.* 2005). Το ένζυμο DPE1 μεταφέρει α-1,4 δεσμούς από ένα ολιγομερές μαλτόζης σε ένα άλλο υποκαταστάτη ο οποίος μπορεί να είναι είτε μια φωσφογλυκάνη, είτε ένα μόριο

μαλτόζης ή γλυκόζης (Lloyd *et al.* 2005). Το ένζυμο DPE2 συσσωρεύεται στο κυτταρόπλασμα και εμπλέκεται στην διαδικασία μεταβολισμού της μαλτόζης η οποία εξέρχεται από τους χλωροπλάστες κατά την διαδικασία διάσπασης του αμύλου (Chia *et al.* 2004). Το DPE2 διασπά την μαλτόζη και έχει αποδειχθεί ότι φυτά μεταλλαγμένα ως προς το γονίδιο που κωδικοποιεί το συγκεκριμένο ένζυμο, έχουν μεγαλύτερες ποσότητες αμύλου στο τέλος της νύχτας σε σχέση με τα αγρίου τύπου φυτά, ενώ συσσωρεύουν και μεγαλύτερες ποσότητες μαλτόζης και μαλτοτριόζης αλλά είναι ελλιπή σε σουκρόζη, γεγονός που υποδεικνύει ότι ο ρόλος του DPE2 είναι σημαντικός για την διάσπαση ολιγομερών μαλτόζης και συνεπώς για τον καταβολισμό του αμύλου (Chia *et al.* 2004). Ωστόσο πειράματα που έγιναν σε μεταλλαγμένα στελέχη *Chlamydomonas reinhardtii* και που αφορούσαν την δράση ενός γονιδίου ομόλογου του *DPE1* του φυτού *A. thaliana* έδειξαν ότι το συγκεκριμένο ένζυμο (D-enzyme) εμπλέκεται και στην σύνθεση του αμύλου (Wattebled *et al.* 2003). Επομένως είναι πολύ πιθανό το ένζυμο DPE1 του φυτού *A. thaliana* να εμπλέκεται όχι μόνο στην διαδικασία διάσπασης του αμύλου αλλά και σε αυτήν της βιοσύνθεσής του (Lloyd *et al.* 2005).

Η μαλτόζη και η γλυκόζη είναι τα βασικά προϊόντα του μεταβολισμού του αμύλου. Η μαλτόζη παράγεται μέσω της δράσης των β-αμυλασών και η γλυκόζη μέσω της περαιτέρω διάσπασης των ολιγομερών μαλτόζης από τις γλυκοτρανσφεράσες (DPE) ή της μαλτοτριόζης από τις β-αμυλάσες (Lloyd *et al.* 2005). Μεταλλαγμένα φυτά *A. thaliana* στα γονίδια που είναι υπεύθυνα για την σύνθεση των 4 β-αμυλασών που εντοπίζονται στους χλωροπλάστες καθώς και σε όλους τους πιθανούς συνδυασμούς αυτών των γονιδίων, συσσωρεύουν σημαντικές ποσότητες αμύλου στους ιστούς τους, το οποίο κατά την διάρκεια της νύχτας αδυνατεί να διασπασθεί σε μαλτόζη (Fulton *et al.* 2008).



Εικόνα 11: Το μονοπάτι της διάσπασης του αμύλου και ο ρόλος ορισμένων ενζύμων στα οποία γίνεται αναφορά στην παρούσα μελέτη. (Fulton *et al.* 2008).

Πρωτεΐνη	Γονίδιο	Γονιδιακή θέση
α-αμυλάση 1	<i>AMY1</i>	<i>At4g25000</i>
α-αμυλάση 2	<i>AMY2</i>	<i>At1g76130</i>
α-αμυλάση 3	<i>AMY3</i>	<i>At1g69830</i>
β-αμυλάση 1	<i>BAM1</i>	<i>At3g23920</i>
β-αμυλάση 2	<i>BAM2</i>	<i>At4g00490</i>
β-αμυλάση 3	<i>BAM3</i>	<i>At4g17090</i>
β-αμυλάση 4	<i>BAM4</i>	<i>At5g55700</i>
β-αμυλάση 5	<i>BAM5</i>	<i>At4g15210</i>
β-αμυλάση 6	<i>BAM6</i>	<i>At2g32290</i>
β-αμυλάση 7	<i>BAM7</i>	<i>At2g45880</i>
β-αμυλάση 8	<i>BAM8</i>	<i>At5g45300</i>
β-αμυλάση 9	<i>BAM9</i>	<i>At5g18670</i>
πλαστιδιακή φωσφορυλάση της γλυκάνης	<i>PHS1</i> ή <i>PHO1</i>	<i>At3g29320</i>
κυτταροπλασματική φωσφορυλάση της γλυκάνης	<i>PHS2</i> ή <i>PHO2</i>	<i>At3g46970</i>
ισοαμυλάση 1	<i>ISA1</i>	<i>At2g39930</i>
ισοαμυλάση 2	<i>ISA2</i>	<i>At1g03310</i>
ισοαμυλάση 3	<i>ISA3</i>	<i>At4g09020</i>
Πουλουλανάση ή οριακή δεξτρινάση	<i>LDA1</i>	<i>At5g04360</i>
Γλυκοτρανοσφεράσες	<i>DPE1, DPE2</i>	<i>At5g64860</i> <i>At2g40840</i>
δικινάσες της γλυκάνης	<i>GWD1</i> ή <i>SEX1, GWD2</i>	<i>At1g10760</i> <i>At4g24450</i>
δικινάση της φωσφογλυκάνης	<i>PWD</i> ή <i>GWD3</i>	<i>At5g26570</i>

Πίνακας 1: Ένζυμα που εμπλέκονται στον μεταβολισμό του αμύλου του φυτού *A. thaliana* διασπώντας είτε τους α-1,4 είτε τους α-1,6 γλυκοσιδικούς δεσμούς ή δρώντας πάνω στην επιφάνεια των αμυλόκοκκων.

1.7 Σκοπός εργασίας

Στην παρούσα εργασία μελετήθηκαν τα εξής:

- Ο ρόλος των γονιδίων των β-αμυλασών 1,2,3 και 4 καθώς και των *DPE2* και *PWD* στην αλληλεπίδραση του φυτού *A. thaliana* με τον μύκητα *V. dahliae*.
- Ο ρόλος των γονιδίων των β-αμυλασών 1,2,3 και 4 στα αγρίου τύπου φυτά μετά από μόλυνση με τον μύκητα
- Κατά πόσον η ανθεκτικότητα που παρατηρήθηκε στα μεταλλαγμένα φυτά οφείλεται σε επαγωγή της άμυνας των φυτών.

2. Υλικά και μέθοδοι

2.1 Γενετικά τροποποιημένα φυτά *Arabidopsis thaliana*

Για την συγκεκριμένη μελέτη χρησιμοποιήθηκαν φυτά *Arabidopsis thaliana* που έχουν υποστεί γενετική τροποποίηση με την χρήση του Τί πλασμιδίου σε μια σειρά γονιδίων που εμπλέκονται στον μεταβολισμό του αμύλου. Οι σπόροι των γενετικά τροποποιημένων φυτών για τις β-αμυλάσες ήταν προσφορά του Καθηγητή S.C. Zeeman (Institute of Plant Sciences, ETH Zurich, Ελβετία). Οι σειρές SALK προέρχονται από το Salk Institute Genomic Analysis Laboratory και μαζί με τις σειρές GABI-kat, που προέρχονταν αρχικά από το Max-Planck-Institute of Plant Breeding Research και πλέον από το Bielefeld University, διακινούνται από το Nottingham Arabidopsis Stock Centre (NASC) (Alonso *et al.* 2003; Kleinboelting *et al.* 2012). Όλοι οι σπόροι διατηρήθηκαν πριν την διεξαγωγή των πειραμάτων στους 4 °C.

Συνοπτικά χρησιμοποιήθηκαν οι παρακάτω μεταλλαγμένες σειρές φυτών *Arabidopsis thaliana*

A) Φυτά που φέρουν μετάλλαξη στα γονίδια *BAM1*, *BAM2*, *BAM3*, *BAM4* καθώς και πολλαπλές μεταλλάξεις στα παραπάνω γονίδια.

- *bam1*, *bam2*, *bam3*, *bam4*, *bam12*, *bam13*, *bam14*, *bam123*, *bam124*, *bam134*, *bam1234*, *bam23*, *bam234* και *bam34*

B) Φυτά μεταλλαγμένα ως προς το γονίδιο *GWD* (*glucan water dikinase*)

- *gwd* (ή *starch excess 1-sex1*) μεταλλαγμένα ως προς τα γονίδια *At1g10760* (NASK stock ID: N658720-SALK, N663026-SALK) και *At4g24450* (NASK stock ID: N668540-SALK, N321290-GABI-Kat GK_257 E09)

Γ) Φυτά μεταλλαγμένα ως προς το γονίδιο *PWD* (*phosphoglucan water dikinase*)

- *rwd* μεταλλαγμένα ως προς το γονίδιο *At5g26570* (NASK stock ID: N682776-SALK)

Δ) Φυτά μεταλλαγμένα ως προς το γονίδιο *ISA1* (*isoamylase 1*)

- *isa1* μεταλλαγμένα ως προς το γονίδιο *At2g39930* (NASK stock ID: N679000-SALK, N322999-GABI-Kat GK_453 F04)

Ε) Φυτά μεταλλαγμένα ως προς το γονίδιο *DPE2* (*disproportionating enzyme 2*)

- *dpe2* μεταλλαγμένα ως προς το γονίδιο *At2g40840* (NASK stock ID: N686432-SALK, N662960-SALK)

2.2 Ο μύκητας *V. dahliae* και η προετοιμασία του μολύσματος

Για την διεξαγωγή των πειραμάτων παθογένειας χρησιμοποιήθηκε μια απομόνωση του μύκητα *Verticillium dahliae* με επιβεβαιωμένη παθογένεια σε φυτά *A. thaliana* (Tjamos *et al.* 2005). Ο μύκητας είχε διατηρηθεί ως αιώρημα κονιδίων σε υδατικό διάλυμα γλυκερόλης 25% στους -80 °C (Maniatis *et al.* 1982). Πριν τη χρήση του στα πειράματα παθογένειας είχε μεταφερθεί σε θρεπτικό υλικό από εκχύλισμα πατάτας (Potato Dextrose Agar, PDA) και αναπτύχθηκε στους 25 °C για 5 ημέρες. Για τα πειράματα παθογένειας χρησιμοποιήθηκε αιώρημα κονιδίων του μύκητα, συγκέντρωσης 10^7 κονίδια/ml από υγρή καλλιέργεια του μύκητα στο θρεπτικό υλικό των Sinha and Wood 1968, Sucrose Sodium Nitrate (SSN).

2.3 Θρεπτικά υλικά και διαλύματα για εξαγωγή DNA και RNA

Για την καλλιέργεια του μύκητα χρησιμοποιήθηκαν τα εξής θρεπτικά υλικά:

1. Potato Dextrose Agar (PDA)
2. Sucrose Sodium Nitrate (SSN)

PDA:

Χρησιμοποιήθηκε PDA σε μορφή σκόνης (Merck, Darmstadt, Germany).

SSN:

- Σακχαρόζη 15 g
- K_2HPO_4 (όξινο φωσφορικό κάλιο) 1 g
- $MgSO_4 \cdot 7H_2O$ (θειικό μαγνήσιο) 0,5 g
- $NaNO_3$ (νιτρικό νάτριο) 2 g
- KCl (χλωριούχο κάλιο) 0,5 g
- Διάλυμα ιχνοστοιχείων 1 ml
- Απιονισμένο νερό μέχρι τελικό όγκο 1lt

Τα θρεπτικά υλικά αποστειρώθηκαν σε κλίβανο στους 120°C για 20 λεπτά.

Για την παρασκευή 100 ml διαλύματος ιχνοστοιχείων απαιτούνται:

- $FeSO_4 \cdot 7H_2O$ 249 mg
- $CuSO_4 \cdot 5H_2O$ 40 mg
- $ZnSO_4 \cdot 7H_2O$ 44 mg
- $MnSO_4 \cdot 4H_2O$ 41 mg
- $Na_2MoO_4 \cdot 2H_2O$ 51 mg

Για την εξαγωγή DNA και RNA από τους φυτικούς ιστούς χρησιμοποιήθηκαν τα εξής

διαλύματα:

1. Διάλυμα εξαγωγής DNA
2. Διάλυμα λύσης κυττάρων
3. Διάλυμα καθίζησης πρωτεϊνών και DNA

Διάλυμα εξαγωγής DNA

- 200mM Tris
- 250mM NaCl
- 25mM EDTA
- 0,5% SDS

Διάλυμα λύσης κυττάρων

- 2% SDS (pH 7,2)
- 68mM κιτρικό νάτριο
- 132mM κιτρικό οξύ
- 1mM EDTA

Το pH του διαλύματος πρέπει να ρυθμιστεί στο 4-4,5. Το χαμηλό pH είναι σημαντικό για την απενεργοποίηση των ενζύμων που καταστρέφουν το RNA.

Διάλυμα καθίζησης πρωτεϊνών και DNA

- 4M χλωριούχο νάτριο
- 16mM κιτρικό νάτριο
- 32mM κιτρικό οξύ

Πυκνά διαλύματα

- 1M citric acid: Για 100 ml απαιτούνται 21,04 g κιτρικού οξέος (M.B. 210,14 g / mol)
- 0,5M sodium citrate: Για 100 ml απαιτούνται 14,706 g κιτρικού νατρίου (M.B. 294,10 g/ mol)
- 5M NaCl: Για 100ml απαιτούνται 29,22 g χλωριούχου νατρίου (M.B. 58,44 g/ mol)

2.4 Έλεγχος ομοζυγωτίας

Πριν πραγματοποιηθούν πειράματα παθογένειας για τα μεταλλαγμένα φυτά *gwd2*, *gwd*, *isa1*, *pwd* και *dpe2* έγινε έλεγχος ομοζυγωτίας όπου οι σειρές N65870 και N663026 (*gwd* ή *sex1- AT1G10760*), N686432 και N662960 (*dpe2-AT2G40840*), N668540 (*gwd2-AT4G24450*), N682776 (*pwd-AT5G26570*) και N679000 (*isa1-AT2G39930*) ελέγχθηκαν με την μέθοδο PCR με την χρήση κατάλληλων εκκινητών (πίνακας 2) ώστε να επιβεβαιωθεί ότι οι μεταλλαγμένες σειρές που χρησιμοποιήθηκαν στο συγκεκριμένο πείραμα είχαν το T-DNA ενσωματωμένο στο

επιθυμητό γονίδιο και ότι ήταν ομοζυγωτές. Ωστόσο μόνο οι σειρές N662960 (*dpe2*) και N682776 (*rho1*) βρέθηκαν ομοζυγωτές και χρησιμοποιήθηκαν στα πειράματα παθογένειας. Τα βήματα που ακολουθήθηκαν για την απομόνωση του ολικού DNA από τους φυτικούς ιστούς ήταν τα εξής:

- Κονιορτοποίηση του φυτικού ιστού σε γουδί από πορσελάνη με υγρό άζωτο και τοποθέτηση 80-100mg κονιορτοποιημένου φυτικού ιστού σε σωληνάριο τύπου errendorf χωρητικότητας 1,5 ml
- Προσθήκη 500 μl από το διάλυμα εξαγωγής DNA (500μl ανά 100mg ιστού)
- Έντονη ανάμειξη (vortex) για 2 min
- Φυγοκέντρηση για 15 min στην πλήρη ταχύτητα της φυγοκέντρου
- Μεταφορά υπερκείμενου (περίπου 450μl) σε καινούριο σωληνάριο τύπου errendorf αποφεύγοντας την ενδιάμεση φάση
- Προσθήκη 500μl φαινόλης:χλωροφόρμιου:ισοαμυλαλκοόλης
- Έντονη ανάμειξη (vortex) για 10 sec
- Φυγοκέντρηση για 10 λεπτά στην πλήρη ταχύτητα της φυγοκέντρου
- Μεταφορά υπερκείμενου (περίπου 450μl) σε καινούριο σωληνάριο τύπου errendorf αποφεύγοντας την ενδιάμεση φάση
- Προσθήκη ίσου όγκου ισοπροπανόλης για κατακρήμιση του DNA (περίπου 450μl)
- Ελαφριά ανάμειξη για λίγο χρονικό διάστημα αναστρέφοντας τα σωληνάρια τύπου errendorf
- Αναμονή σε θερμοκρασία δωματίου για 10 min
- Φυγοκέντρηση για 10 min στην πλήρη ταχύτητα της φυγοκέντρου
- Απομάκρυνση υπερκείμενου
- Στέγνωμα του ιζήματος
- Επαναιωρηματοποίηση του ιζήματος σε 25 μl αποστειρωμένο δις-απεσταγμένο νερό και ανάμειξη μέχρι να διαλυθεί το ίζημα
- Φυγοκέντρηση για ελάχιστα δευτερόλεπτα

Μέτρηση της συγκέντρωσης DNA:

Μετά την απομόνωση του ολικού DNA από τα φυτά, πραγματοποιήθηκε μέτρηση της συγκέντρωσης του κάθε δείγματος με την χρήση φασμοτοφωτόμετρου

Nanodrop, η λειτουργία του οποίου βασίζεται στην μέτρηση της απορρόφησης του δείγματος ώστε να προσδιοριστεί η συγκέντρωσή του και η καθαρότητά του. Η απορρόφηση στα 260 nm μετράει τη συγκέντρωση του DNA και η απορρόφηση στα 280 nm μετράει τις δευτερεύουσες ουσίες που απομονώθηκαν μαζί με το DNA, π.χ. πρωτεΐνες. Ο λόγος 260/280 αποτελεί μέτρηση της καθαρότητας του δείγματος DNA. Στη συνέχεια τα δείγματα DNA αραιώθηκαν με δις-απεσταγμένο και αποστειρωμένο νερό μέχρι τελικής συγκέντρωσης 500 ng/μl.

Καθαρισμός δειγμάτων DNA:

Για να είναι τα δείγματα DNA απαλλαγμένα από RNA πριν την χρήση τους για τον έλεγχο της ομοζυγωτίας με PCR, πραγματοποιήθηκε καθαρισμός με RNase A ως εξής:

- Σε κάθε δείγμα προστέθηκαν 2μl RNase A
- Ακολούθησε επώαση για 2 ώρες σε θερμοκρασία 37 °C

Σε κάθε αντίδραση PCR χρησιμοποιήθηκαν:

- | | |
|---|---------|
| • 10x ρυθμιστικό διάλυμα για PCR χωρίς Mg ⁺⁺ | 5 μl |
| • 10 mM διάλυμα νουκλεοτιδίων (dNTPs) | 1 μl |
| • 50mM MgCl ₂ | 1,5μl |
| • Μείγμα εκκινητών (2,5 pmol/μl) | 3 μl |
| • Taq DNA Πολυμεράση (5u/μl) | 0,2 μl |
| • DNA | 1 μl |
| • Δις απεσταγμένο αποστειρωμένο νερό | 38,3 μl |

Κάθε αντίδραση έγινε σε όγκο 50μl.

Η αντίδραση πραγματοποιήθηκε στις εξής συνθήκες, με βάση τις οδηγίες του κατασκευαστή των αντιδραστηρίων (INVITROGEN, Paisley, Renfrewshire, UK):

- 45 sec στους 94°C για να γίνει η αποδιάταξη
- 30 sec στους 55°C για να γίνει η πρόσδεση των εκκινητών στο DNA
- 1,5 min στους 72°C για να γίνει η επιμήκυνση
- 35x τα βήματα 1,2 και 3
- 8°C επ' αόριστον

Ζεύγη εκκινητών που χρησιμοποιήθηκαν στα πειράματα επιβεβαίωσης της ομοζυγωτίας των μεταλλαγμένων σειρών <i>Arabidopsis thaliana</i> (http://signal.salk.edu)			
Γονίδιο στόχος/ Κωδικός σειράς	Ζεύγος εκκινητών	Μέγεθος προϊόντος στα φυτά Col-0 (ζεύγη βάσεων)	Μέγεθος προϊόντος στα μεταλλαγμένα φυτά (ζεύγη βάσεων)
<i>DPE2</i> (<i>At2g40840</i>) N662960 (SALK_073273)	5'-AAG-ATG-ATG-TTG-GTG-TGG-GAG-3' 5'-GAA-GCA-GAA-AGC-TGC-ATA-TGG-3'	1151	599-899
<i>DPE2</i> (<i>At2g40840</i>) N686432 (SALK 084169)	5'-ACA-TCA-CGT-CGA-ACT-TTG-TCC-3' 5'-CCA-AAT-AAC-ATT-TGC-CAC-AGC-3'	1231	596-896
<i>ISA1</i> (<i>At2g39930</i>) N679000 (SALK 117080)	5'-GAC-TTC-CTT-CTC-CAT-TCG-GAC-3' 5'-ATG-GAA-ATG-GCC-TAA-ATC-ACC-3'	1175	522-822
<i>GWD</i> (<i>At1g10760</i>) N663026 (SALK 077211)	5'-TCC-GGT-ATG-ACA-AGT-CGA-ATC-3' 5'-GTC-AGT-CTA-TCC-TGC-GCT-TTG-3'	1017	464-764
<i>PWD</i> ή <i>GWD3</i> ή <i>ATGWD2</i> (<i>At4g24450</i>) N668540 (SALK 080260)	5'-CAA-ATG-TTC-CGA-ATG-GAA-GAG-3' 5'-AGG-TTA-TAA-GAG-CAG-GGC-CAG-3'	1010	446-746
<i>PWD</i> ή <i>ATGWD3</i> (<i>At5g26570</i>) N682776 (SALK 110814)	5'-GCT-AGG-GTA-GCC-ACC-GTA-AAG-3' 5'-TCC-GAT-ATG-TCC-TTT-TTC-TGG-3'	1206	568-868

Πίνακας 2: Τα ζεύγη εκκινητών που χρησιμοποιήθηκαν για την επιβεβαίωση της ομοζυγωτίας των μεταλλαγμένων σειρών.

Για τις σειρές SALK ο εκκινητής που χρησιμοποιήθηκε για το αριστερό όριο του T-DNA ήταν ο 5'-ATTTTGCCGATTTTCGGAAC-3' ενώ για τις σειρές GABI ο 5'-ATATTGACCATCATACTCATTGC-3' (<http://signal.salk.edu>).

2.5 Πείραμα 1: Αξιολόγηση της ανθεκτικότητας μεταλλαγμένων φυτών *Arabidopsis thaliana* στον μύκητα *Verticillium dahliae*

α) *bam1*, *bam2*, *bam3*, *bam4*, *bam 12*, *bam13*, *bam14*, *bam23*, *bam24*, *bam34*, *bam123*, *bam234*, *bam134*, *bam124*, *bam1234*

β) *pwd* και *dpe2*

Για να αξιολογηθεί η ανθεκτικότητα των μεταλλαγμένων φυτών στον μύκητα *V. dahliae*, πραγματοποιήθηκαν πειράματα παθογένειας και καταγραφή των συμπτωμάτων βερτισιλλίωσης σε φυτά που μολύνθηκαν με τον μύκητα. Ως μάρτυρες χρησιμοποιήθηκαν μη μολυσμένα φυτά. Κάθε μεταλλαγμένη σειρά συγκρίθηκε με τα αγρίου τύπου φυτά Col-0.

Κάθε φυτό μολύνθηκε με 10ml αιωρήματος κονιδίων του μύκητα *V. dahliae* συγκέντρωσης 10^7 κονίδια/ml. Το μόλυσμα τοποθετήθηκε με σύριγγα στο χώμα σε διάφορα σημεία γύρω από τη ρίζα του φυτού. Η επέμβαση έγινε σε φυτά ηλικίας 20 ημερών και οι μετρήσεις γίνονταν κάθε 2 ημέρες από την 7η μέχρι την 25η ημέρα μετά τη μόλυνση με τον μύκητα για τις σειρές *pwd* και *dpe2* και από την 9η μέχρι την 24η ημέρα για τις σειρές *bam*.

Στα πειράματα παθογένειας χρησιμοποιήθηκαν για κάθε γονότυπο:

- 15 φυτά ως αρνητικοί μάρτυρες
- 30 φυτά στα οποία έγινε εφαρμογή του μύκητα *V. dahliae*

2.6 Πείραμα 2: Ποσοτικοποίηση της ενδοφυτικής παρουσίας του μύκητα *Verticillium dahliae* στα μολυσμένα φυτά

Για να διαπιστωθεί αν η μείωση των συμπτωμάτων στα μεταλλαγμένα φυτά σε σχέση με τα άγριου τύπου οφείλεται σε ανθεκτικότητα ή απλά ανεκτικότητα των φυτών στον συγκεκριμένο μύκητα ελέγχθηκε η ποσότητα DNA του μύκητα στους φυτικούς ιστούς των μολυσμένων φυτών. Τα δείγματα που χρησιμοποιήθηκαν συλλέχθηκαν από τα μολυσμένα με τον μύκητα φυτά στο τέλος του πειράματος παθογένειας. Για τα φυτά *dpe2* και *rw4* από κάθε γονότυπο συλλέχθηκαν 6 δείγματα από μολυσμένα με τον μύκητα *V. dahliae* φυτά. Κάθε δείγμα αποτελούνταν από 5 φυτά. Για τα φυτά *bam2*, *bam3*, *bam4*, *bam12*, *bam13*, *bam14*, *bam123*, *bam124*, *bam134*, *bam1234*, *bam23*, *bam234* και *bam34*, από κάθε γονότυπο συλλέχθηκαν 5 δείγματα από μολυσμένα με τον μύκητα φυτά και κάθε δείγμα αποτελούνταν από 5 φυτά.

Τα βήματα που ακολουθήθηκαν για την απομόνωση του ολικού DNA από τους φυτικούς ιστούς ήταν τα ίδια με αυτά που αναφέρθηκαν για τον έλεγχο της ομοζυγωτίας. Ακολούθησε μέτρηση της συγκέντρωσης DNA των δειγμάτων και καθαρισμός τους με RNase

Εφαρμογή της Real-time PCR:

Η qPCR έγινε σε θερμοκυκλοποιητή της Stratagene Mx3005PTM και για τις αντιδράσεις ενίσχυσης χρησιμοποιήθηκε master mix της QuantiFast™ SYBR® Green PCR (Qiagen, Valencia, CA, USA), ενώ τα αποτελέσματα αναλύθηκαν με το λογισμικό MxPro QPCR. Τα επίπεδα έκφρασης του γονιδίου της τουμπουλίνης 4 (*tubulin 4*, *At4g26410*) του φυτού *A. thaliana*, που είναι γονίδιο αναφοράς και χρησιμοποιείται σαν σταθερά για την ποσοτικοποίηση της έκφρασης άλλων γονιδίων (Czechowski *et al.* 2005; Wang *et al.* 2014), ανιχνεύθηκαν με τη χρήση κατάλληλου

ζεύγους εκκινητών (Πίνακας 6). Τα αντιδραστήρια που χρησιμοποιήθηκαν στις αντιδράσεις της RT-PCR, σύμφωνα με τις οδηγίες της εταιρίας της οποίας το master mix χρησιμοποιήθηκε, δίνονται στον πίνακα 3:

Η ποσοτικοποίηση του μύκητα *V. dahliae* έγινε με τη χρήση ενός ζεύγους εκκινητών σχεδιασμένων για τις περιοχές ITS1 και ITS2 του γονιδίου Z29511 που κωδικοποιεί το 5.8S ριβοσωμικό RNA του μύκητα *V. dahliae*. (Πίνακας 4).

Εκκινητές για <i>V. dahliae</i>		
<i>ITS1/ITS2 5.8S rRNA (Z29511)</i>	5'-CCGCCGGTCCATCAGTCTCTCTGTTTATAC-3'	Pantelides <i>et al.</i> 2010
	5'-CGCCTGCGGGACTCCGATGCGAGCTGTAAC-3'	

Πίνακας 3: Το ζεύγος εκκινητών που χρησιμοποιήθηκε για την ποσοτικοποίηση του DNA του μύκητα *V. dahliae* με την μέθοδο της Real time PCR.

Αντιδραστήρια	Ποσότητα/Αντίδραση
2x QuantiFast SYBR Green PCR Master mix	5μl
Rox low	0,2μl
Εκκινητής A	0,5μl
Εκκινητής B	0,5μl
Δείγμα DNA	1μl
H ₂ O	2,8μl
τελικός όγκος	10 μl

Πίνακας 4: Τα αντιδραστήρια και οι αντίστοιχες ποσότητες που χρησιμοποιήθηκαν ανά αντίδραση.

Οι συνθήκες της αντίδρασης RT-PCR δίνονται στον ακόλουθο πίνακα:

	Χρόνος	Θερμοκρασία (°C)	Αποτέλεσμα
Βήμα 1	3 min	95	ενεργοποίηση της HotStarTaq DNA πολυμεράσης
Βήμα 2*	3 sec	95	αποδιάταξη του DNA
	30 sec	60	Υβριδισμός εκκινητών / επιμήκυνση αλυσίδας
Βήμα 3	1 min	95	Δημιουργία της καμπύλης διαχωρισμού των προϊόντων της RT-PCR (Dissociation curve)*2
	30 sec	60	
	30 sec	95	

Πίνακας 5: Οι θερμοκρασίες και οι αντίστοιχοι χρόνοι για κάθε βήμα της RT-PCR σύμφωνα με τις οδηγίες του κατασκευαστή του master mix (QuantiFast™ SYBR® Green PCR, Qiagen, Valencia, CA, USA).

*Το βήμα 2 επαναλήφθηκε για 40 κύκλους.

*Η εξειδίκευση των εκκινητών και ο σχηματισμός των διμερών των εκκινητών παρακολουθήθηκαν από την καμπύλη διαχωρισμού των προϊόντων της RT-PCR

2.7 Πείραμα 3: Μελέτη της έκφραση των γονιδίων *PR1* και *PDF1.2*

Για να διαπιστωθεί κατά πόσον η ανθεκτικότητα που παρατηρήθηκε στα μεταλλαγμένα φυτά ως προς τις β-αμυλάσες οφείλονταν σε επαγωγή της άμυνας των φυτών πραγματοποιήθηκε μελέτη της έκφρασης των γονιδίων *PR1* και *PDF1.2* στα φυτά *bam3*, *bam14* και *bam1234*. Τα δείγματα που χρησιμοποιήθηκαν συλλέχθηκαν από μολυσμένα και μη μολυσμένα φυτά στις 7 και 14 ημέρες μετά την μόλυνση. Η έκφραση των γονιδίων *PR1* και *PDF1.2*, στα φύλλα και στις ρίζες μολυσμένων φυτών Col-0, *bam3*, *bam14* και *bam1234* συγκρίθηκε με αυτήν στα φυτά μάρτυρες των ίδιων γονοτύπων. Για κάθε γονότυπο και κάθε χρονική στιγμή συλλέχθηκε ένα δείγμα φύλλων και ένα δείγμα ρίζας από μολυσμένα φυτά καθώς και ένα δείγμα φύλλων και ένα δείγμα ρίζας από μη μολυσμένα φυτά, και έγιναν 3 τεχνικές επαναλήψεις. Κάθε δείγμα αποτελούνταν από 7 φυτά.

Η απομόνωση του ολικού RNA από τους φυτικούς ιστούς έγινε ως εξής (τροποποίηση του πρωτοκόλλου των Oñate-Sánchez and Vicente-Carbajosa, 2008):

- Κονιορτοποίηση του φυτικού ιστού σε πορσελάνινο γουδί με υγρό άζωτο και τοποθέτηση 80-100mg (300-400μl) κονιορτοποιημένου φυτικού ιστού σε σωληνάριο τύπου erendorf χωρητικότητας 1,5 ml
- Προσθήκη 300μl διαλύματος λύσης κυττάρων
- Έντονη ανάμειξη (vortex) για 20 sec και ανάμειξη με αναστροφή των σωληναρίων τύπου erendorf
- Επώαση για 5 min σε θερμοκρασία δωματίου σε συνεχή αναστροφή για καλύτερη ανάμειξη
- Προσθήκη 100 μl διαλύματος καθίζησης πρωτεϊνών και DNA, το οποίο έχει προ-ψυχθεί σε πάγο
- Ελαφριά ανάμειξη, χτυπώντας και αναστρέφοντας τα σωληνάκια τύπου erendorf
- Επώαση για 10 min σε θερμοκρασία 4 °C
- Φυγοκέντρηση για 15 min στην πλήρη ταχύτητα της φυγοκέντρου (14.000 rpm) σε θερμοκρασία 4 °C
- Μεταφορά υπερκείμενου (περίπου 300μl) σε καινούριο σωληνάριο τύπου erendorf αποφεύγοντας την ενδιάμεση φάση. Αν υπάρχουν υπολείμματα ιστών στο υπερκείμενο μετά την μεταφορά του, ακολουθεί δεύτερη φυγοκέντρηση για 5 min σε θερμοκρασία 4 °C στην πλήρη ταχύτητα της φυγοκέντρου και μεταφορά του υπερκείμενου σε νέο σωληνάριο τύπου erendorf
- Προσθήκη ίσου όγκου ισοπροπανόλης για κατακρήμιση του RNA (περίπου 300μl) και ελαφριά ανάδευση με αναστροφή
- Επώαση για 10 min σε θερμοκρασία 4 °C
- Φυγοκέντρηση για 5 min στην πλήρη ταχύτητα της φυγοκέντρου και σε θερμοκρασία 4 °C
- Απομάκρυνση υπερκείμενου
- Προσθήκη 300 μl αιθανόλης 70% για καθαρισμό του ιζήματος
- Φυγοκέντρηση για 5 λεπτά στην πλήρη ταχύτητα της φυγοκέντρου και σε θερμοκρασία 4 °C
- Απομάκρυνση υπερκείμενου
- Στέγνωμα του ιζήματος

- Επαναιωρηματοποίηση του ιζήματος σε 25μl αποστειρωμένο δισαπτεσταγμένο νερό και ανάμειξη μέχρι να διαλυθεί το ίζημα
- Φυγοκέντρηση για ελάχιστα δευτερόλεπτα

Προσδιορισμός της συγκέντρωσης του RNA

Μετά την απομόνωση του ολικού RNA από τα φυτά, πραγματοποιήθηκε μέτρηση της συγκέντρωσης του κάθε δείγματος με την χρήση φασμοτοφωτόμετρου Nanodrop όπως έγινε και στην περίπτωση του DNA.

Στη συνέχεια τα δείγματα RNA, αραιώθηκαν με δις-απτεσταγμένο και αποστειρωμένο νερό μέχρι τελικής συγκέντρωσης 125 ng/μl (τελικός όγκος 8μl, συνολική ποσότητα RNA 1000ng), και πραγματοποιήθηκε καθαρισμός τους από DNA με την χρήση DNase I (HT BIOTECHNOLOGY LTD). Ο καθαρισμός των δειγμάτων από DNA έγινε ως εξής:

- Σε κάθε δείγμα προστέθηκε 1μl DNase I (1unit/μl)
- Τα δείγματα τοποθετήθηκαν για επώαση σε θερμοκρασία 37 °C για 15 min
- Στην συνέχεια σε κάθε δείγμα προστέθηκε 1μl EDTA
- Τα δείγματα τοποθετήθηκαν για επώαση σε υδατόλουτρο στους 65 °C για 10 min ώστε να απενεργοποιηθεί η DNase I.

Πριν την μελέτη της έκφρασης των γονιδίων, έγινε μετατροπή του mRNA σε cDNA με την χρήση του Prime Script RT reagent kit (TAKARA BIO INC) σύμφωνα με τις οδηγίες του κατασκευαστή, ως εξής:

Σε κάθε δείγμα προστέθηκαν

- 2μl ρυθμιστικό διάλυμα (5x prime script buffer)
- 0,5μl αντίστροφη μεταγραφάση (prime script RT enzyme)
- 0,5μl μείγμα εκκινήτων θυμίνης (oligo dT primer)

Η αντίδραση πραγματοποιήθηκε στις εξής συνθήκες:

- 15 min στους 37°C για να γίνει η αντίστροφη μεταγραφή
- 5 sec στους 85°C για απενεργοποίηση της αντίστροφης μεταγραφάσης
- 4°C επ' αόριστον

Εκκινητές για <i>Arabidopsis thaliana</i>		
Γονίδιο στόχος	Ζεύγος εκκινητών	Αναφορά
<i>PR1 (At2g14610)</i>	5'-TCACAACCAGGCACGAGGAG-3'	Pantelides <i>et al.</i> 2010
	5'-CACCGCTACCCCAGGCTAAG-3'	
<i>PDF1.2 (At5g44420)</i>	5'-CTGTTACGTCCCATGTTAAATCTACC-3'	Pantelides <i>et al.</i> 2010
	5'-CAACGGGAAAATAAACATTAACACAG-3'	
<i>TUBULIN 4 (At4g26410)</i>	5'-GAGCTGAAGTGGCTTCCATGAC-3'	Czechowski <i>et al.</i> 2005
	5'-GGTCCGACATACCCATGATCC-3'	

Πίνακας 6: Τα ζεύγη εκκινητών που χρησιμοποιήθηκαν για την μελέτη έκφρασης των γονιδίων *PR1* και *PDF1.2* με την μέθοδο της Real time PCR

2.8 Πείραμα 4: Μελέτη της έκφρασης των γονιδίων *BAM1*, *BAM2*, *BAM3* και *BAM4* σε φυτά *Arabidopsis thaliana* Col-0 μετά από μόλυνση με τον μύκητα *Verticillium dahliae*

Τα δείγματα που χρησιμοποιήθηκαν συλλέχθηκαν από μολυσμένα και μη μολυσμένα φυτά Col-0 στις 7 και 14 ημέρες μετά την μόλυνση. Η έκφραση των γονιδίων *BAM1*, *BAM2*, *BAM3* και *BAM4* στα φύλλα και στις ρίζες μολυσμένων φυτών Col-0 συγκρίθηκε με αυτήν στα φυτά μάρτυρες. Για κάθε χρονική στιγμή συλλέχθηκε ένα δείγμα φύλλων και ένα δείγμα ρίζας από μολυσμένα φυτά καθώς και ένα δείγμα φύλλων και ένα δείγμα ρίζας από μη μολυσμένα φυτά, και έγιναν 3 τεχνικές επαναλήψεις. Κάθε δείγμα αποτελούνταν από 7 φυτά.

Για την απομόνωση του ολικού RNA από τους φυτικούς ιστούς για το συγκεκριμένο πείραμα ακολουθήθηκε η ίδια διαδικασία με το πείραμα 3. Ακολούθησε μέτρηση της συγκέντρωσης RNA του κάθε δείγματος σε φασματοφωτόμετρο

nanodrop, καθαρισμός με DNase I και αραιώση των δειγμάτων όπως ακριβώς και στο πείραμα 3.

Γονίδιο στόχος	Ζεύγος εκκινήτων	Αναφορά
<i>TUBULIN 4</i> (<i>At4g26410</i>)	5'-GAGCTGAAGTGGCTTCCATGAC-3'	Czechowski <i>et al.</i> 2005
	5'-GGTCCGACATACCCATGATCC-3'	
<i>BAM1</i> (<i>At3g23920</i>)	5'-AGAACGTATAGAGAAGGAGGGATTG-3'	Fulton <i>et al.</i> 2008
	5'-CGTCTCTGAACCTTGTGTTGTAGTA-3'	
<i>BAM2</i> (<i>At4g00490</i>)	5'-GGCGATTAGGTTGAATCATAGTGTA-3'	Fulton <i>et al.</i> 2008
	5'-TGGTCTCTTGTGTCCCTGGAGCCAAACCAA-3'	
<i>BAM3</i> (<i>At4g17090</i>)	5'-GAGCTTATACAGATGGTTCAAAAGC-3'	Fulton <i>et al.</i> 2008
	5'-AATCTGACCTATTTGTTGCTACCAC-3'	
<i>BAM4</i> (<i>At5g55700</i>)	5'-GATGCTCGAGAGAAATCACGATCG-3'	Fulton <i>et al.</i> 2008
	5'-TCTGCACTCATCTGTCTAATGAAAG-3'	

Πίνακας 7: Τα ζεύγη εκκινήτων που χρησιμοποιήθηκαν για την μελέτη έκφρασης των γονιδίων *BAM1*, *BAM2*, *BAM3* και *BAM4* σε Col-0 φυτά με την μέθοδο της Real time PCR

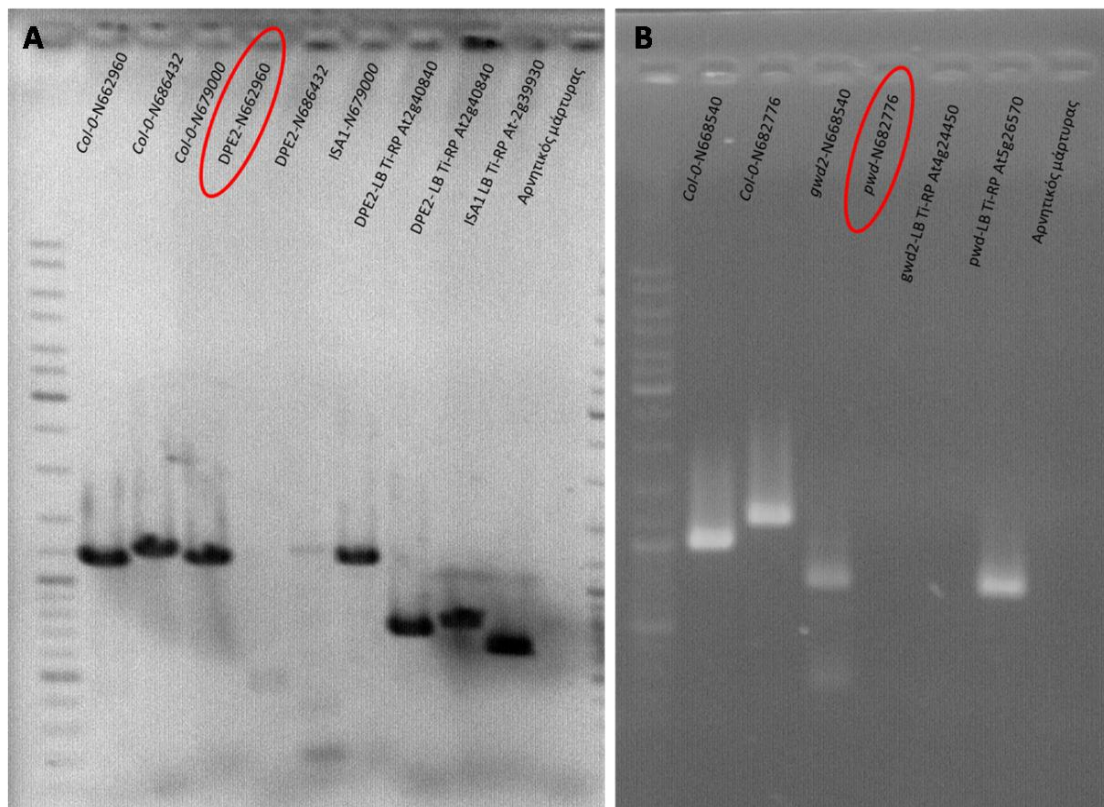
2.9 Στατιστική ανάλυση αποτελεσμάτων

Πριν την στατιστική ανάλυση των αποτελεσμάτων έγινε υπολογισμός του εμβαδού ασθενείας (Area Under Disease Progress Curve, AUDPC) (Campbell and Madden, 1990). Επίσης, υπολογίσθηκε η σχετική τιμή του εμβαδού ασθενείας, relative AUDPC, (η τιμή του εμβαδού ασθενείας εκφρασμένη ως ποσοστό του μέγιστου δυνατού εμβαδού ασθενείας για όλη την χρονική περίοδο των παρατηρήσεων). Οι τιμές του σχετικού εμβαδού ασθενείας της κάθε εφαρμογής αναλύθηκαν στατιστικά με το πρόγραμμα SGWIN και η σύγκριση των μέσων των επεμβάσεων πραγματοποιήθηκε με την μέθοδο ANOVA και ακολούθως με το στατιστικό έλεγχο Tukey ($p \leq 0.05$).

3. Αποτελέσματα

3.1 Έλεγχος ομοζυγωτίας

Σε κάθε περίπτωση όλα τα υπό εξέταση γονίδια ανιχνεύθηκαν στα αγρίου τύπου φυτά Col-0 ενώ δεν ανιχνεύθηκαν στις μεταλλαγμένες ομοζυγώτες σειρές N662960 και N682776. Επίσης η σειρά *gwd2* φαίνεται πως δεν είχε μετασχηματισθεί με το T-DNA καθώς το αντίστοιχο γονίδιο ανιχνεύθηκε στο δείγμα μεταλλαγμένων φυτών ενώ η προσθήκη εκκινητών για το αριστερό όριο του T-DNA και για το δεξί όριο του γονιδίου *At4g24450* έδειξε ότι δεν υπήρχε ενσωματωμένο T-DNA αφού δεν εμφανίστηκε η αναμενόμενη ζώνη.



Εικόνα 12: Φωτογραφία από πηκτή αгарόζης 1,5% όπου αποτυπώθηκαν τα προϊόντα PCR των σειρών Col-0, N662960, N686432, N679000, N668540, N682776 με ζεύγη εκκινητών για τα γονίδια *At2g40840*, *At2g39930*, *At4g24450* και *At5g26570* ή για το αριστερό όριο του T-DNA και το δεξί όριο του κάθε γονιδίου.

Στην εικόνα A τα 3 πρώτα δείγματα προέρχονται από φυτά Col-0. Στα 2 πρώτα είχαν προστεθεί εκκινητές για το γονίδιο *At2g40840* (*DPE2*) και στο τρίτο για το γονίδιο *At2g39930* (*ISA1*). Σε κάθε περίπτωση εμφανίστηκε ζώνη που αντιστοιχεί στο αναμενόμενο μέγεθος προϊόντος. Τα επόμενα τρία δείγματα προέρχονται από μεταλλαγμένα φυτά *dpe2* (N662960 και N686432) και *isa1* (N679000) στα οποία είχαν προστεθεί κατάλληλοι εκκινητές για το αντίστοιχο γονίδιο στο οποίο φέρει μετάλλαξη κάθε ένα από αυτά. Στην περίπτωση της ομοζυγωτής σειράς δεν εμφανίστηκε καμία ζώνη σε αντίθεση με τις ετεροζυγωτές. Τα επόμενα τρία δείγματα προέρχονται από μεταλλαγμένα φυτά *dpe2* (N662960 και N686432) και *isa1* (N679000) στα οποία είχαν προστεθεί κατάλληλοι εκκινητές για το αριστερό όριο του T-DNA το οποίο φέρουν στο γονιδίωμά τους και για το δεξί όριο του γονιδίου στο οποίο φέρουν την μετάλλαξη. Και στις 3 σειρές εμφανίστηκε ζώνη που αντιστοιχεί στο μέγεθος του προϊόντος που δίνουν οι αντίστοιχοι εκκινητές επομένως και στις 3 σειρές υπάρχει ενσωματωμένο το T-DNA σε έναν αλληλόμορφο του γονιδίου. Το τελευταίο δείγμα αποτελεί τον αρνητικό μάρτυρα στον οποίο δεν είχε προστεθεί DNA γι' αυτό και δεν εμφανίζεται καμία ζώνη.

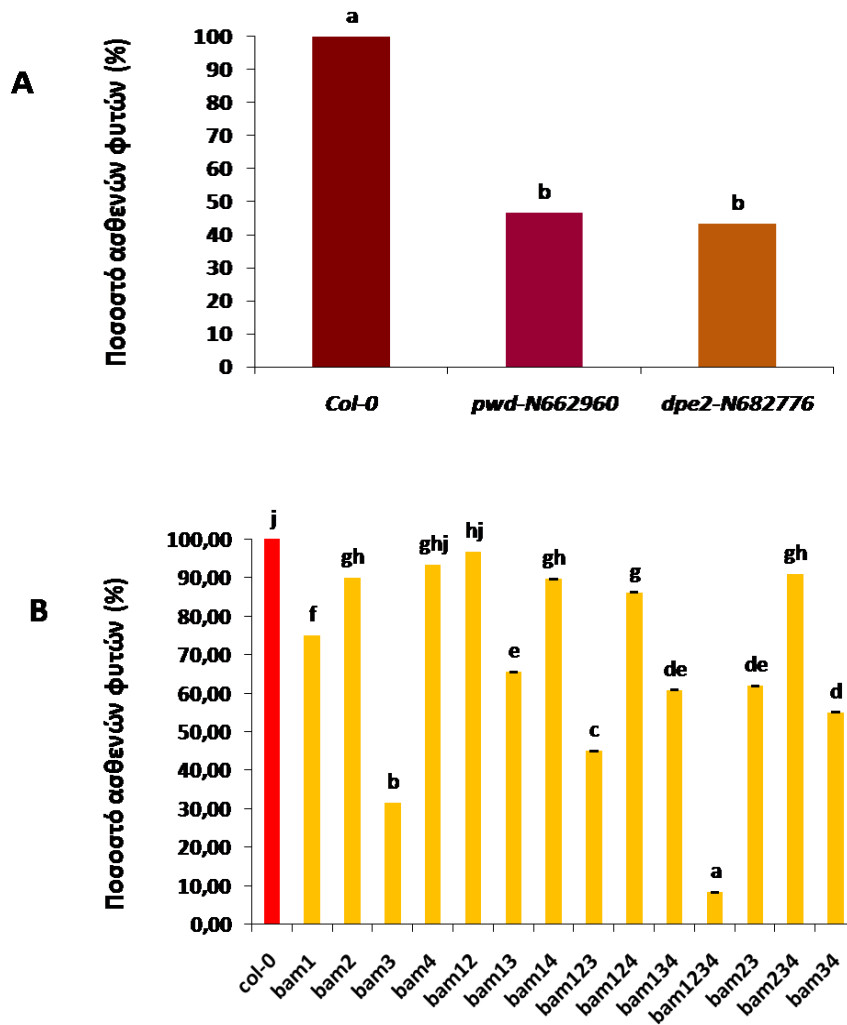
Στην εικόνα B στα 2 πρώτα δείγματα που προέρχονται από φυτά Col-0 είχαν προστεθεί εκκινητές για τα γονίδια *At4g24450* (*GWD2*) και *At5g26570* (*PWD*) και όπως και στην πρώτη εικόνα εμφανίστηκαν ζώνες που αντιστοιχούν στο αναμενόμενο μέγεθος προϊόντος. Τα επόμενα δύο δείγματα προέρχονται από μεταλλαγμένα φυτά *gwd2* (N668540) και *pwd* (N682776) στα οποία είχαν προστεθεί κατάλληλοι εκκινητές για το αντίστοιχο γονίδιο στο οποίο φέρει μετάλλαξη κάθε ένα από αυτά. Στο δείγμα *gwd2* εμφανίστηκε ζώνη ενώ στο *pwd* που φέρει το T-DNA δεν εμφανίστηκε. Τα επόμενα δύο δείγματα προέρχονται από μεταλλαγμένα φυτά *gwd2* (N668540) και *pwd* (N682776) στα οποία είχαν προστεθεί κατάλληλοι εκκινητές για το αριστερό όριο του T-DNA το οποίο φέρουν στο γονιδίωμά τους και για το δεξί όριο του γονιδίου στο οποίο φέρουν την μετάλλαξη. Στο δείγμα *gwd2* δεν εμφανίστηκε ζώνη που σημαίνει ότι σε κανέναν αλληλόμορφο του συγκεκριμένου γονιδίου δεν

είχε ενσωματωθεί το T-DNA ενώ στο *pwd* που φέρει το T-DNA εμφανίστηκε η αναμενόμενη ζώνη. Το τελευταίο δείγμα αποτελεί τον αρνητικό μάρτυρα στον οποίο δεν είχε προστεθεί DNA. Το μέγεθος των προϊόντων της PCR για τον κάθε συνδυασμό δείγματος εκκινητών δίνεται στον πίνακα 2.

3.2 Πειράματα παθογένειας

Τα αποτελέσματα του πειράματος παθογένειας στο οποίο συγκρίθηκαν τα αγρίου τύπου φυτά *A. thaliana* με τις μεταλλαγμένες σειρές *pwd* και *dpe2* ως προς την ανθεκτικότητά τους στον μύκητα *V. dahliae* έδειξαν ότι τα μεταλλαγμένα φυτά εμφάνισαν σημαντικά λιγότερα συμπτώματα σε σύγκριση με τα αγρίου τύπου καθ' όλη την διάρκεια του πειράματος. Τα μεταλλαγμένα φυτά *A. thaliana* είτε με απλές είτε με πολλαπλές μεταλλάξεις ως προς τα γονίδια των β-αμυλασών εμφάνισαν επίσης λιγότερα συμπτώματα σε σχέση με τα αγρίου τύπου φυτά επίσης καθ' όλη την διάρκεια του πειράματος.

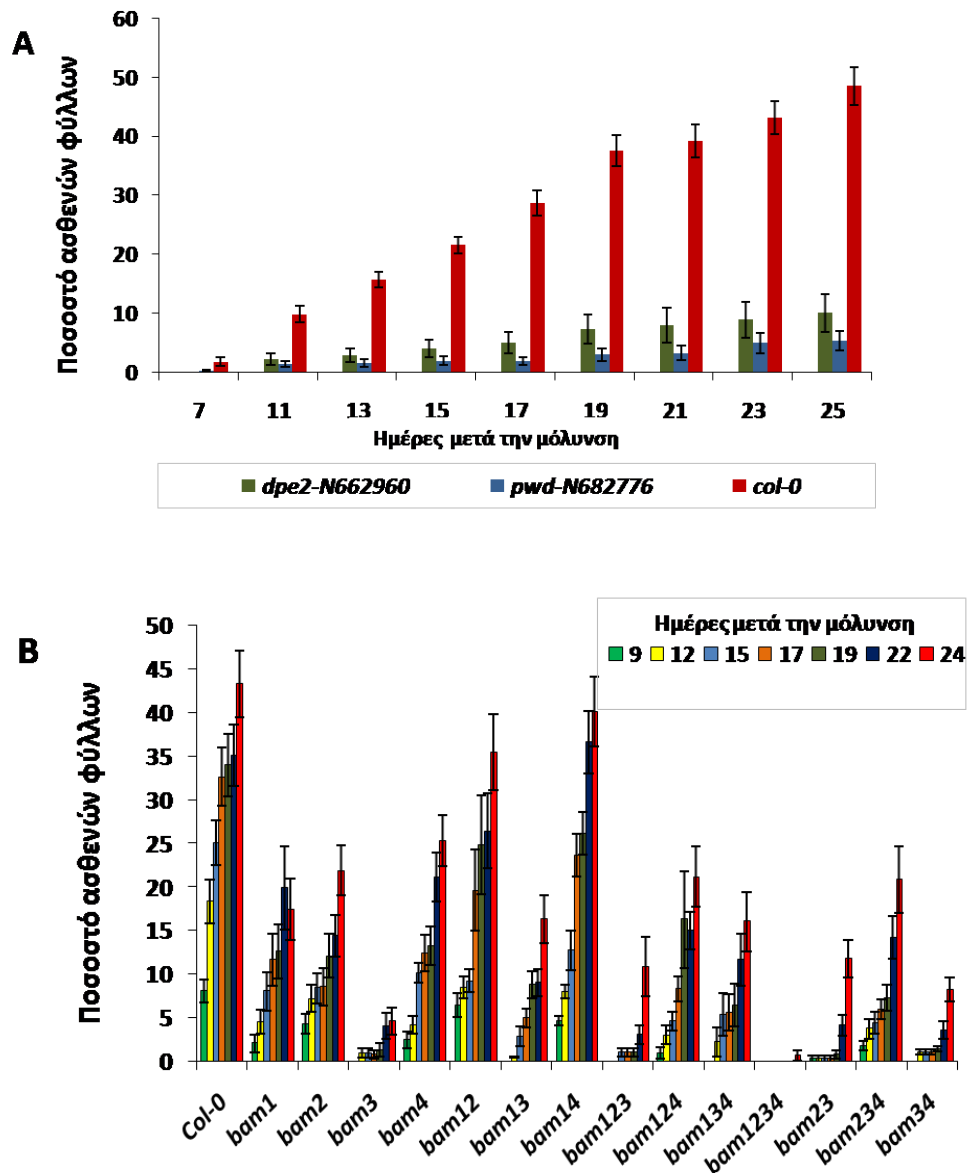
Στο γράφημα 1 το οποίο δείχνει το ποσοστό των ασθενών φυτών, φαίνεται ότι τα αγρίου τύπου φυτά Col-0 εμφάνισαν όλα συμπτώματα μάρανσης. Ενώ μόνο τα μισά φυτά *pwd* και *dpe2* εμφάνισαν συμπτώματα (γράφημα 1A). Όσον αφορά τα μεταλλαγμένα ως προς τις β-αμυλάσες φυτά σχεδόν σε όλες τις σειρές το ποσοστό των φυτών που εμφάνισαν συμπτώματα μέχρι το τέλος του πειράματος είναι αρκετά υψηλό. Εξαιρούνται όμως οι σειρές *bam3* και *bam1234*, οι οποίες εμφάνισαν συμπτώματα μόνο στο 31,5% και 8,3% των φυτών αντίστοιχα (γράφημα 1B), ενώ οι συγκεκριμένες σειρές είναι εμφανώς οι ανθεκτικότερες σε σχέση με όλες τις υπόλοιπες.



Γράφημα 1: Συγκριτική απεικόνιση του ποσοστού των φυτών τα οποία εμφάνισαν συμπτώματα μάρανσης στις σειρές Col-0 και *pwd*, *dpe2* (A), *bam1*, *bam2*, *bam3*, *bam4*, *bam12*, *bam13*, *bam14*, *bam123*, *bam124*, *bam134*, *bam1234*, *bam23*, *bam234* και *bam34* (B). Τα γράμματα πάνω από κάθε στήλη αντιπροσωπεύουν την στατιστική ομάδα στην οποία εντάσσεται ο αντίστοιχος χειρισμός.

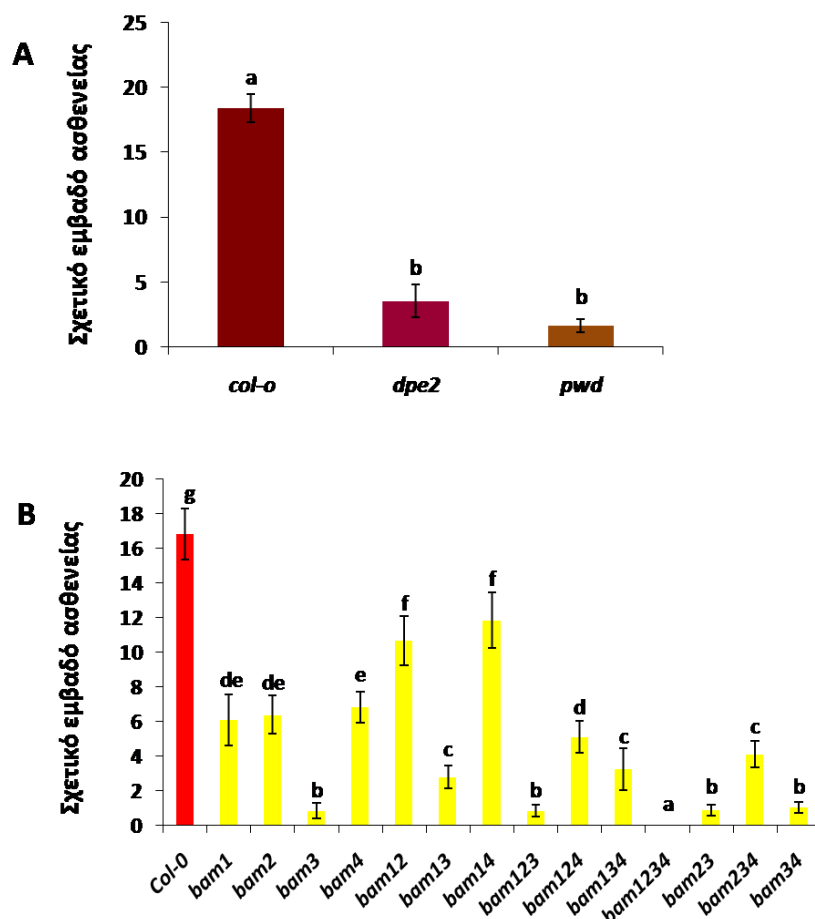
Όπως φαίνεται στο γράφημα 2A που δείχνει την εξέλιξη της ασθένειας στα φυτά Col-0, *pwd* και *dpe2*, τα πρώτα συμπτώματα παρατηρήθηκαν στα αγρίου τύπου φυτά Col-0 στις 7 ημέρες μετά την μόλυνση. Την ίδια ημέρα φαίνεται πως ξεκίνησε η εμφάνιση των πρώτων συμπτωμάτων και στα *pwd* φυτά αλλά με αμελητέο ποσοστό συμπτωμάτων, ενώ στις 11 ημέρες φαίνεται πως έχει ξεκινήσει η εμφάνιση της ασθένειας και στους 3 γονοτύπους. Στην περίπτωση των

μεταλλαγμένων ως προς τις β-αμυλάσες φυτών η εμφάνιση της ασθένειας ξεκίνησε σχεδόν ταυτόχρονα στα Col-0 φυτά και σε όλες σχεδόν τις μεταλλαγμένες σειρές στις 9 ημέρες μετά την μόλυνση (γράφημα 2B).



Γράφημα 2: Συγκριτική απεικόνιση της χρονικής εξέλιξης της ασθένειας στα μολυσμένα με τον μύκητα *V. dahliae* φυτά αγρίου τύπου Col-0 και στις μεταλλαγμένες σειρές *pwd* και *dpe2* (A) και *bam1*, *bam2*, *bam3*, *bam4*, *bam12*, *bam13*, *bam14*, *bam123*, *bam124*, *bam134*, *bam1234*, *bam23*, *bam234* και *bam34* (B). Η σοβαρότητα της ασθένειας για κάθε φυτό υπολογίστηκε από τον αριθμό των φύλλων που εμφάνισαν συμπτώματα ως ποσοστό του συνολικού αριθμού φύλλων για το αντίστοιχο φυτό. Κάθε στήλη αντιπροσωπεύει τον μέσο όρο για 30 φυτά και οι κάθετες γραμμές το τυπικό σφάλμα.

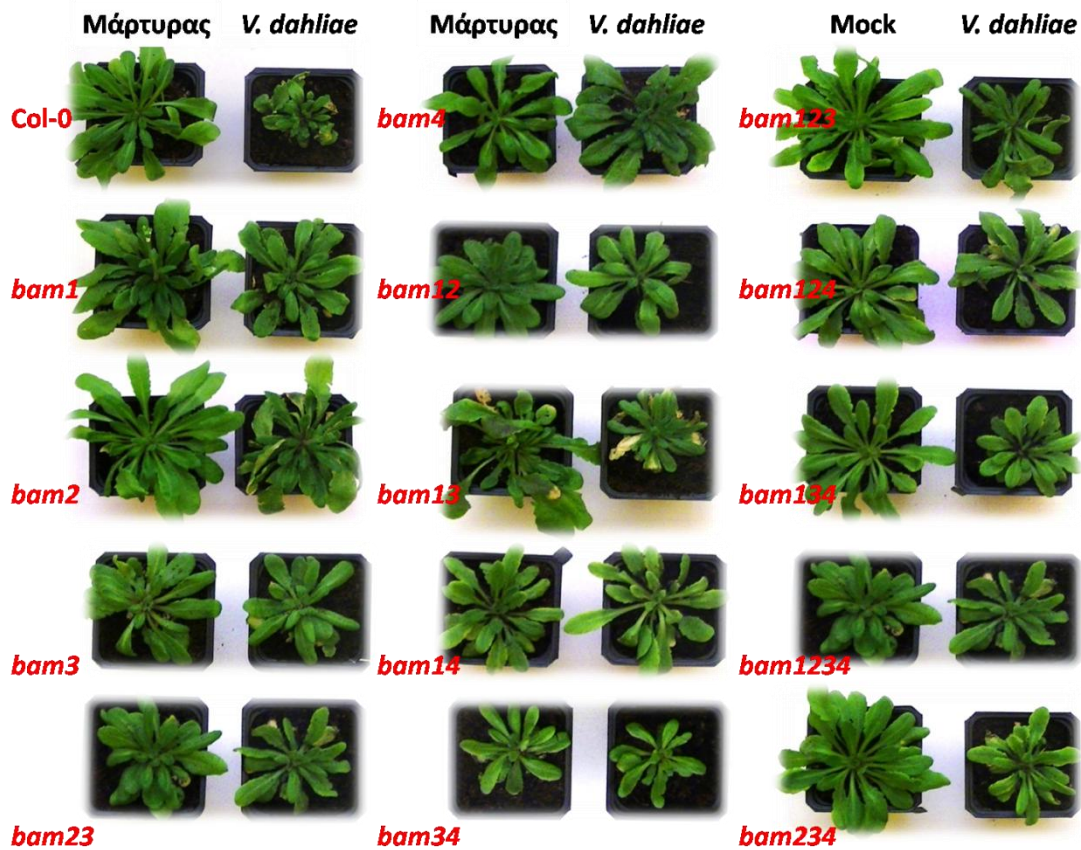
Όσον αφορά την σοβαρότητα της ασθένειας, τα αγρίου τύπου φυτά είχαν περίπου 6 φορές περισσότερα συμπτώματα από τις σειρές *pwd* και *dpe2* (γράφημα 3A) ενώ στα φυτά *bam* υπάρχουν μεγάλες διαφορές μεταξύ των διαφόρων γονοτύπων ως προς το σχετικό εμβαδό ασθeneίας. Συγκεκριμένα τα αγρίου τύπου φυτά είχαν 3 φορές περισσότερα συμπτώματα από τα *bam1*, *bam2* και *bam4*, 17 φορές περισσότερα από τα *bam3*, *bam123*, *bam23* και *bam34*, 2 φορές περισσότερα από τα *bam12* και *bam14*, 6 φορές περισσότερα από τα *bam13*, 5 φορές περισσότερα από τα *bam134*, *bam234*, 18 φορές περισσότερα από τα *bam1234* και 3 φορές περισσότερα από τα *bam 124* (γράφημα 3A).



Γράφημα 3: Συγκριτική απεικόνιση του εμβαδού της καμπύλης εξέλιξης της ασθένειας (Campbell and Madden, 1990) για τις μεταλλαγμένες σειρές *pwd* και *dpe2* (A) και για τις μεταλλαγμένες σειρές στις β-αμυλάσες 1,2,3 και 4 και όλους τους

συνδυασμούς τους (B) και τα φυτά αγρίου τύπου, εκφρασμένου ως ποσοστό του μέγιστου δυνατού εμβαδού για όλη την χρονική περίοδο του πειράματος (relative AUDPC)(Korolev *et al.*, 2001) Οι στήλες με διαφορετικά γράμματα εμφανίζουν στατιστικά σημαντικές διαφορές με βάση την μέθοδο Tukey σε επίπεδο σημαντικότητας $P < 0.05$

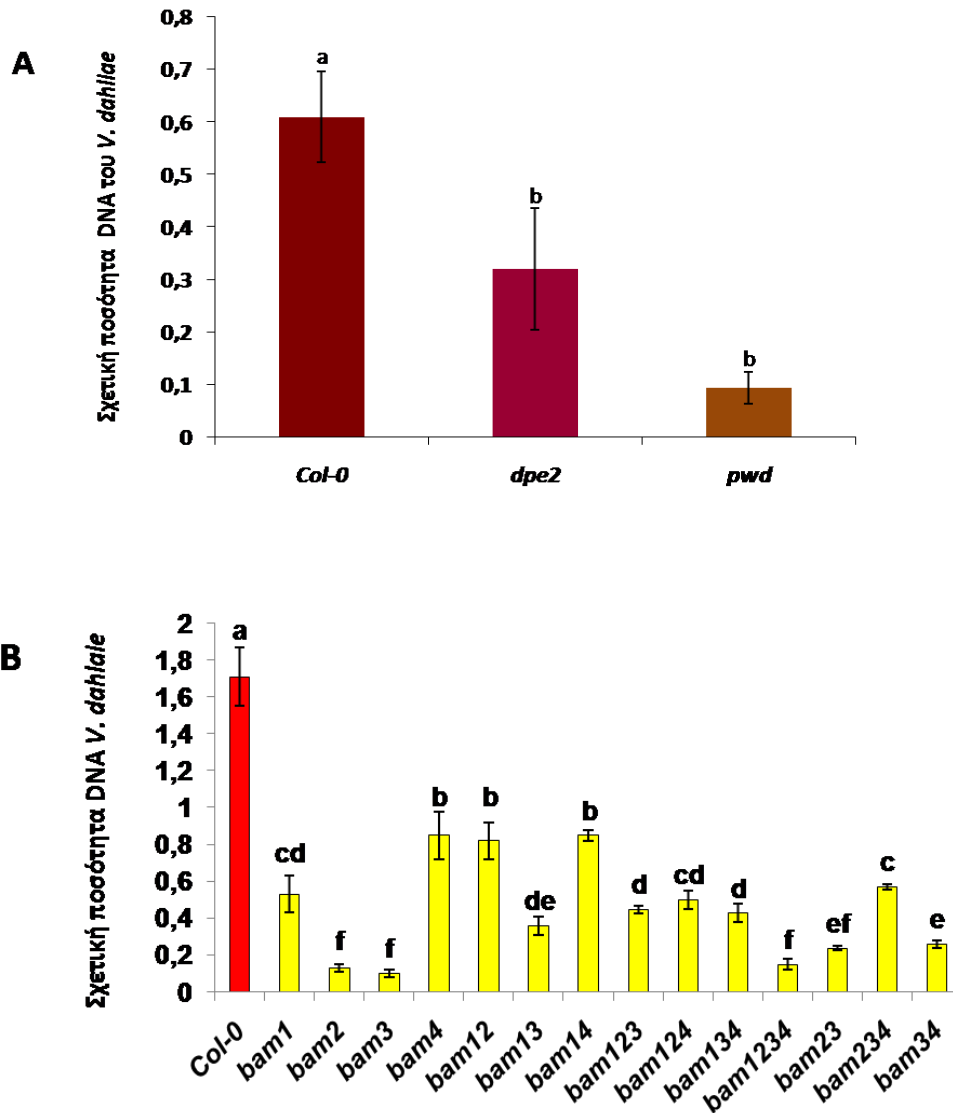
Επομένως φαίνεται πως τα γονίδια *BAM1*, *BAM2*, *BAM3*, *BAM4*, *DPE2* και *PWD* διαδραματίζουν σημαντικό ρόλο στην αλληλεπίδραση του φυτού *A. thaliana* με τον μύκητα *V. dahliae* και η μετάλλαξη τους με ένθεση T-DNA προκαλεί την ανθεκτικότητα των φυτών στον μύκητα.



Εικόνα 13: Φωτογραφία με τα πιο χαρακτηριστικά μεταλλαγμένα ως προς τις β-αμυλάσες φυτά 20 ημέρες μετά την μόλυνση με τον μύκητα *V. dahliae*. Για κάθε γονότυπο, αριστερά φαίνεται ο μάρτυρας (μη μολυσμένο φυτό) και δεξιά το μολυσμένο με τον μύκητα φυτό.

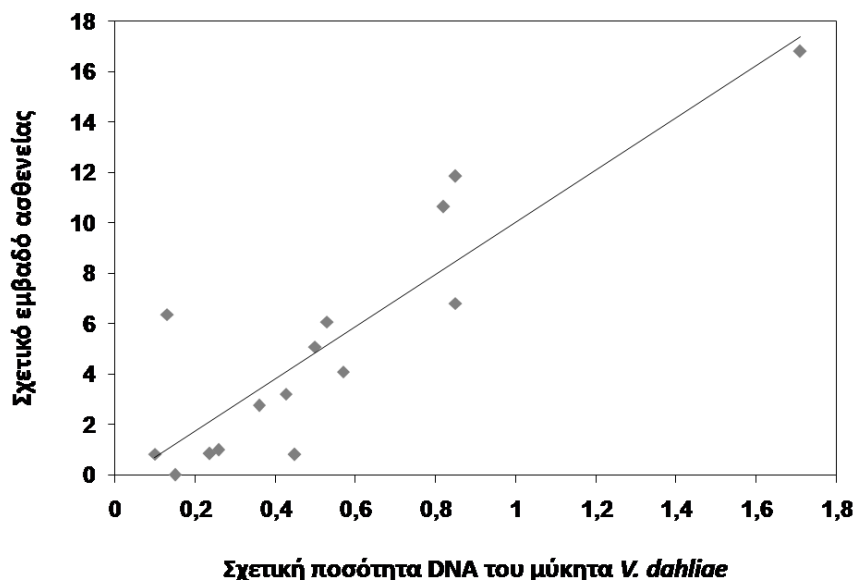
3.3 Ποσοτικοποίηση του μύκητα *Verticillium dahliae* εντός των φυτικών ιστών

Η χρήση της Real time PCR για ποσοτικοποίηση του μύκητα εντός των ιστών στο υπέργειο τμήμα των φυτών έδειξε ότι υπήρχε σημαντικά μικρότερη σχετική ποσότητα DNA του μύκητα *V. dahliae* στους ιστούς των μεταλλαγμένων φυτών σε σχέση με τα Col-0 φυτά. Συγκεκριμένα τα αγρίου τύπου φυτά είχαν 2 φορές περισσότερο DNA του μύκητα από τα φυτά *dpe2*, 6 φορές περισσότερο από τα *rwd* (γράφημα 4A), 3 φορές περισσότερο από τα *bam1* και *bam234*, 17 φορές περισσότερο από τα *bam2*, *bam3*, και *bam1234*, 2 φορές περισσότερο από τα *bam4*, *bam12* και *bam14*, 4 φορές περισσότερο από τα *bam13*, *bam123*, *bam124* και *bam134*, 8 φορές περισσότερο από τα *bam23* και *bam34* (γράφημα 4B). Οι σειρές *bam3* και *bam1234* που ήταν και οι πιο ανθεκτικές όπως ήταν αναμενόμενο είχαν και την μικρότερη ποσότητα του μύκητα, ενώ η σειρά *bam14* που ήταν και η λιγότερο ανθεκτική είχε και πολύ περισσότερο DNA του μύκητα.



Γράφημα 4: Συγκριτική απεικόνιση της σχετικής ποσότητας DNA του μύκητα *V. dahliae* στα φυτά αγρίου τύπου και στις μεταλλαγμένες σειρές *dpe2* και *pwd* στις 28 ημέρες μετά την μόλυνση (A) καθώς και στις *bam1*, *bam2*, *bam3*, *bam4*, *bam12*, *bam13*, *bam14*, *bam123*, *bam124*, *bam134*, *bam1234*, *bam23*, *bam234* και *bam34* στις 24 ημέρες μετά την μόλυνση (B). οι γραμμές αντιπροσωπεύουν το τυπικό σφάλμα. Στήλες με διαφορετικά γράμματα διαφέρουν στατιστικά σημαντικά μεταξύ τους με βάση τον στατιστικό έλεγχο Tukey σε επίπεδο σημαντικότητας 5% ($p \leq 0.05$).

Η ανάλυση συσχέτισης μεταξύ του σχετικού εμβαδού ασθeneίας και των ποσοτήτων DNA του μύκητα που ανιχνεύθηκαν έδειξε ότι η ποσότητα DNA του μύκητα εντός των ιστών των φυτών είναι ανάλογη του σχετικού εμβαδού ασθeneίας.



Γράφημα 5: Ανάλυση συσχέτισης μεταξύ της σχετικής ποσότητας DNA του μύκητα *Verticillium dahliae* και του σχετικού εμβαδού ασθeneίας (relative AUDPC), στις μεταλλαγμένες σειρές *A. thaliana bam1*, *bam2*, *bam3*, *bam4*, *bam12*, *bam13*, *bam14*, *bam123*, *bam124*, *bam134*, *bam1234*, *bam23*, *bam234*, *bam34* και στα αγρίου τύπου φυτά Col-0. Η γραμμική σχέση της ποσότητας DNA του μύκητα και του σχετικού εμβαδού ασθeneίας περιγράφεται από την εξίσωση: $Y = 10.36(X) - 0.33$, $r^2 = 0.78$

3.4 Έκφραση των γονιδίων *PR1* και *PDF1.2*

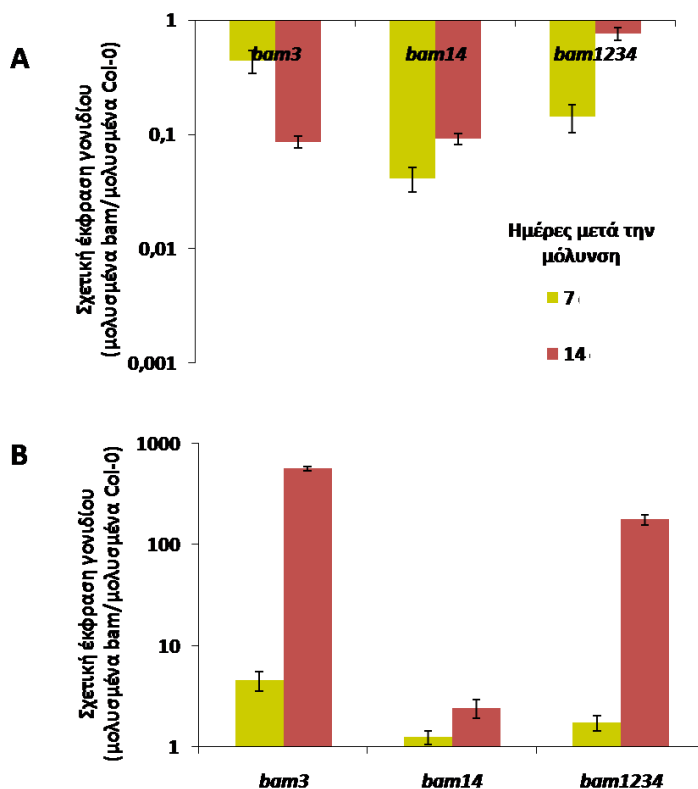
Για να ελεγχθεί εάν η ανθεκτικότητα που εμφάνισαν τα μεταλλαγμένα φυτά στα γονίδια των β-αμυλασών, οφείλεται σε ενεργοποίηση της άμυνας των φυτών επιλέχθηκαν τα φυτά *bam 3* και *bam1234* λόγω της ιδιαίτερα μεγάλης ανθεκτικότητας που εμφάνισαν στον μύκητα *V.dahliae* και τα φυτά *bam14* επειδή παρουσίασαν τα περισσότερα συμπτώματα σε σχέση με όλες τις υπόλοιπες μεταλλαγμένες σειρές, παρόλο που και αυτά ήταν σημαντικά ανθεκτικότερα σε σχέση με τα αγρίου τύπου

φυτά. Τα γονίδια *PR1* και *PDF1.2* επιλέχθηκαν γιατί είναι δείκτες της ενεργοποίησης των μονοπατιών του σαλικυλικού οξέος και του ιασμονικού/αιθυλενίου, αντίστοιχα (Feys *et al.* 2000; Schenk *et al.* 2000).

Η καταγραφή της έκφραση των γονιδίων *PR1* και *PDF1.2* στο υπέργειο μέρος και στις ρίζες των μεταλλαγμένων σειρών *bam3*, *bam14*, και *bam1234* σε σύγκριση με αυτήν στα αγρίου τύπου φυτά Col-0 πραγματοποιήθηκε σε δείγματα που συλλέχθηκαν στις 7 και 14 ημέρες μετά την μόλυνση με τον μύκητα *V. dahliae*. Το ολικό RNA απομονώθηκε από το υπέργειο μέρος και από τις ρίζες των φυτών και μετατράπηκε σε cDNA ώστε να χρησιμοποιηθεί για την μελέτη της έκφρασης του γονιδίου με την χρήση της Real time PCR. Τα επίπεδα έκφρασης του κάθε γονιδίου κανονικοποιήθηκαν σε σχέση με την έκφραση του γονιδίου τουμπουλίνη 4 (*tubulin 4*, *At4g26410*) στα ίδια δείγματα, και εκφράστηκαν σε σχέση με τα κανονικοποιημένα επίπεδα μεταγραφής των ίδιων γονιδίων στα μολυσμένα Col-0 φυτά.

Όσον αφορά την έκφραση του γονιδίου *PR1* στις μεταλλαγμένες σειρές *bam3*, *bam14* και *bam1234*, εμφανίζεται μειωμένη στο υπέργειο μέρος των φυτών και στις 3 σειρές τόσο στις 7 όσο και στις 14 ημέρες μετά την μόλυνση σε σχέση με τα αγρίου τύπου φυτά. Συγκεκριμένα η έκφραση του γονιδίου *PR1* εμφανίζεται ελαφρά μειωμένη στα φυτά *bam3* στις 7 ημέρες μετά την μόλυνση και στα *bam1234* στις 14 ημέρες. Στις 7 ημέρες η έκφραση του γονιδίου τόσο στα *bam14* όσο και στα *bam1234* είναι 10 φορές μικρότερη σε σχέση με τα αγρίου τύπου φυτά ενώ στις 14 ημέρες η έκφραση του γονιδίου στα *bam3* είναι 10 φορές μικρότερη σε σχέση με τα αγρίου τύπου φυτά (γράφημα 6A). Η αντίστροφη εικόνα εμφανίζεται στις ρίζες των φυτών όπου παρατηρείται υπερέκφραση του γονιδίου *PR1* και στις 3 σειρές τόσο στις 7 όσο και στις 14 ημέρες μετά την μόλυνση. Συγκεκριμένα στις 7 ημέρες μετά την μόλυνση παρατηρείται μια μικρή υπερέκφραση του γονιδίου και στις 3 σειρές, σε σχέση με τα αγρίου τύπου φυτά, η οποία αυξάνεται σημαντικά στις 14 ημέρες μετά την μόλυνση. Ειδικότερα στα *bam3* και *bam1234*, που είναι και οι σειρές που

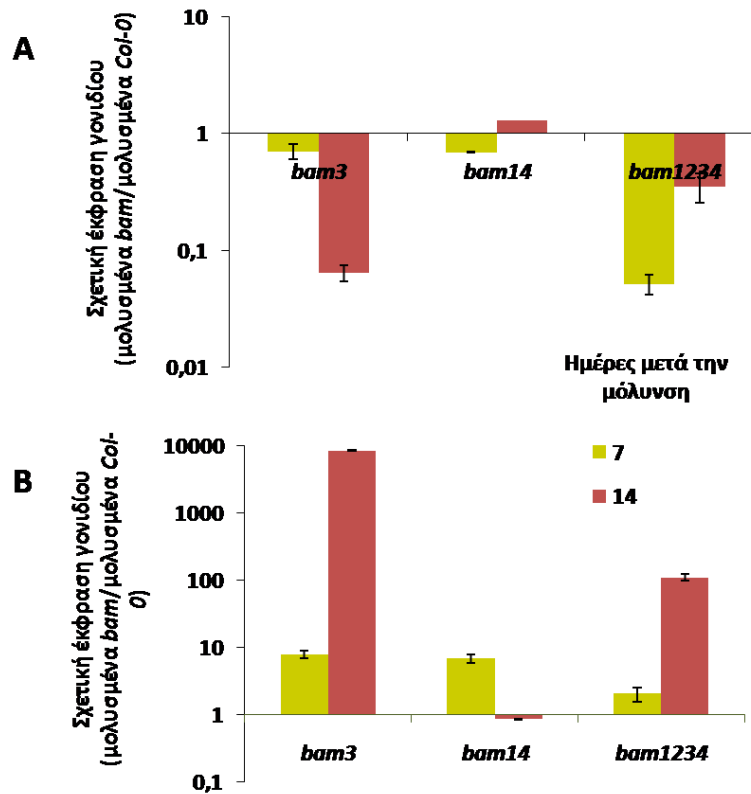
εμφάνισαν τα λιγότερα συμπτώματα στα πειράματα παθογένειας, η έκφραση του γονιδίου εμφανίζεται αυξημένη κατά 1000 και 100 φορές αντίστοιχα σε σχέση με τα αγρίου τύπου φυτά (γράφημα 6B).



Γράφημα 6: Σχετική έκφραση του γονιδίου *PR1* στο υπέργειο μέρος (A) και στις ρίζες (B) των μεταλλαγμένων σειρών *bam 3*, *bam14*, και *bam1234* σε σύγκριση με αυτήν στα αγρίου τύπου φυτά *Col-0* στις 7 και 14 ημέρες μετά την μόλυνση με τον μύκητα *V.dahliae*. Κάθε στήλη αντιπροσωπεύει την μέση έκφραση του γονιδίου *PR1* σε διαφορετική μεταλλαγμένη σειρά και οι κάθετες γραμμές αντιπροσωπεύουν το τυπικό σφάλμα για 3 επαναλήψεις.

Όσον αφορά την έκφραση του γονιδίου *PDF1.2*, παρατηρείται μειωμένη έκφραση στο υπέργειο μέρος (γράφημα 7A) των μολυσμένων μεταλλαγμένων φυτών σε σχέση με τα αγρίου τύπου φυτά και αυξημένη έκφραση στο ριζικό σύστημα (γράφημα 7B). Στο υπέργειο μέρος των φυτών *bam14*, τα οποία βρέθηκαν λιγότερο ανθεκτικά στα πειράματα παθογένειας, δεν υπάρχει σημαντική διαφοροποίηση σε

σχέση με τα Col-0 εκτός από μια πολύ μικρή μείωση της έκφρασης των γονιδίου στις 7 ημέρες μετά την μόλυνση και μία πολύ μικρή αύξηση στις 14. Στα φυτά *bam3* όπως και στα *bam1234*, παρόλο που βρέθηκαν εξαιρετικά ανθεκτικά στον μύκητα, η έκφραση του γονιδίου *PDF1.2* στο υπέργειο μέρος των φυτών ήταν μειωμένη σε σχέση με τα Col-0. Στα *bam3* υπήρχε μικρή υποέκφραση του γονιδίου στις 7 ημέρες μετά την μόλυνση και 10 φορές μειωμένη έκφραση σε σχέση με τα Col-0 στις 14 ημέρες. Στα *bam1234* η έκφραση του γονιδίου στις 7 ημέρες ήταν 10 φορές μειωμένη σε σχέση με τα Col-0 φυτά αλλά λιγότερο μειωμένη στις 14. Στις ρίζες των φυτών όμως τόσο στις 7 όσο και στις 14 ημέρες μετά την μόλυνση παρατηρείται αυξημένη έκφραση του γονιδίου *PDF1.2* σε σχέση με τα Col-0 φυτά, με εξαίρεση τα φυτά *bam14* στις 14 ημέρες μετά την μόλυνση όπου παρατηρείται πολύ μικρή υποέκφραση. Συγκεκριμένα τα *bam3* και στα *bam14* παρατηρείται 10 φορές αυξημένη έκφραση του γονιδίου στις 7 ημέρες μετά την μόλυνση ενώ στα *bam1234* αυτή η αύξηση είναι λίγο μικρότερη. Στις 14 ημέρες η έκφραση του γονιδίου στις σειρές *bam3* και *bam1234*, που ήταν και οι ανθεκτικότερες σύμφωνα με τα αποτελέσματα του πειράματος παθογένειας, ήταν αυξημένη σε σχέση με τα Col-0 φυτά κατά 10000 και 100 φορές αντίστοιχα.



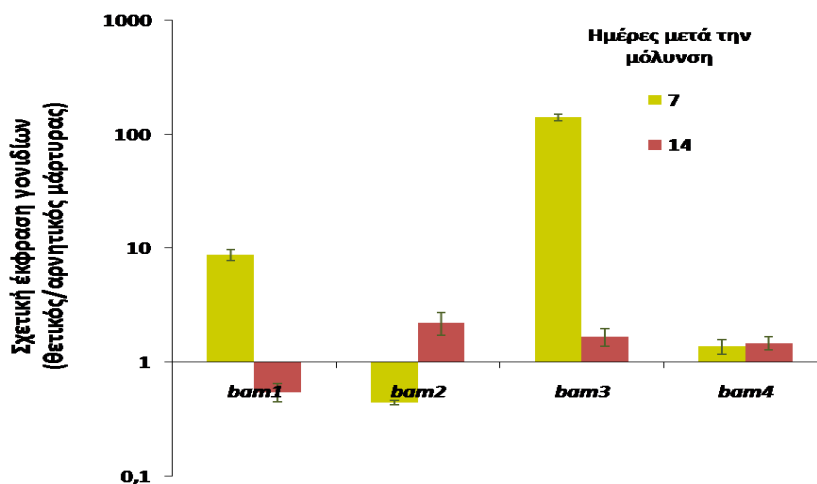
Γράφημα 7: Σχετική έκφραση του γονιδίου *PDF1.2* στο υπέργειο μέρος (A) και στις ρίζες (B) των μεταλλαγμένων σειρών *bam3*, *bam14*, και *bam1234* σε σύγκριση με αυτήν στα αγρίου τύπου φυτά *Col-0* στις 7 και 14 ημέρες μετά την μόλυνση με τον μύκητα *V.dahliae*. Κάθε στήλη αντιπροσωπεύει την μέση έκφραση του γονιδίου *PDF1.2* σε διαφορετική μεταλλαγμένη σειρά και οι κάθετες γραμμές αντιπροσωπεύουν το τυπικό σφάλμα για 3 τεχνικές επαναλήψεις.

3.5 Έκφραση των γονιδίων *BAM1*, *BAM2*, *BAM3* και *BAM4*

Η έκφραση των γονιδίων *BAM1* (*At3g23920*), *BAM2* (*At4g00490*), *BAM3* (*At4g17090*) και *BAM4* (*At5g55700*) σε φυτά *Col-0* μολυσμένα με τον μύκητα *V. dahliae* συγκρίθηκε με αυτήν στα μη μολυσμένα *Col-0* φυτά. Το ολικό RNA των φυτών απομονώθηκε στις 7 και 14 ημέρες μετά την μόλυνση και μετατράπηκε σε cDNA ώστε να χρησιμοποιηθεί για την μελέτη της έκφρασης των προαναφερθέντων γονιδίων με την χρήση της Real time PCR. Τα επίπεδα έκφρασης των γονιδίων στα μολυσμένα φυτά κανονικοποιήθηκαν σε σχέση με την έκφραση του γονιδίου τουμπουλίνη 4 (*tubulin 4*, *At4g26410*) στα ίδια δείγματα, και εκφράστηκαν σε σχέση

με τα κανονικοποιημένα επίπεδα μεταγραφής των ίδιων γονιδίων στα μη μολυσμένα φυτά. Το γονίδιο *At4g26410* επιλέχθηκε ως γονίδιο αναφοράς λόγω της σταθερής έκφρασης του στα φυτά *A. thaliana* (Wang *et al.* 2014).

Η έκφραση του γονιδίου *BAM1* στα μολυσμένα Col-0 φυτά στις 7 ημέρες μετά την μόλυνση είναι 10 φορές μεγαλύτερη σε σχέση με τα μη μολυσμένα φυτά, ενώ η έκφραση του *BAM3* είναι 100 φορές μεγαλύτερη. Η έκφραση των γονιδίων *BAM2* και *BAM4* την ίδια ημέρα δεν φαίνεται να επηρεάζεται ιδιαίτερα. Συγκεκριμένα το *BAM2* υποεκφράζεται ελάχιστα στις 7 ημέρες μετά την μόλυνση ενώ υπερεκφράζεται ελάχιστα στις 14 ημέρες. Η έκφραση του γονιδίου *BAM4* εμφανίζεται επίσης ελαφρά αυξημένη και στις 7 αλλά και στις 14 ημέρες μετά την μόλυνση. Στις 14 ημέρες μειώνεται κατακόρυφα η έκφραση των γονιδίων *BAM1* και *BAM4* σε σχέση με τις 7 ημέρες και ιδιαίτερα του *BAM1* εμφανίζεται ελαφρώς μειωμένη σε σχέση με αυτήν στα μη μολυσμένα φυτά (γράφημα 8). Αξίζει να σημειωθεί ότι στις ρίζες των φυτών δεν παρατηρήθηκε έκφραση κανενός από τα 4 γονίδια των β-αμυλασών τόσο στα μολυσμένα όσο και στα μη μολυσμένα φυτά.



Γράφημα 8: Σχετική έκφραση των γονιδίων *BAM1*, *BAM2*, *BAM3* και *BAM4* στο υπέργειο τμήμα των μολυσμένων με το μύκητα *V. dahliae* φυτών αγρίου τύπου Col-0 στις 7 και 14 ημέρες μετά την μόλυνση. Κάθε στήλη αντιπροσωπεύει την μέση έκφραση του αντίστοιχου γονιδίου και οι κάθετες γραμμές αντιπροσωπεύουν το τυπικό σφάλμα για 3 τεχνικές επαναλήψεις.

4. Συζήτηση

Τα φυτά διαθέτουν μηχανισμούς που τα βοηθούν να αμύνονται κατά των παθογόνων. Αρχικά για να πραγματοποιηθεί προσβολή πρέπει τα παθογόνα να ξεπεράσουν την πρώτη γραμμή άμυνας των φυτών που βασίζεται σε μορφολογικά χαρακτηριστικά των φυτών, (π.χ. κηρώδες στρώμα, τριχίδια). Ακολούθως έρχονται αντιμέτωπα με μία δεύτερη γραμμή άμυνας σε υποκυτταρικό επίπεδο (Dangl *et al.* 2013). Επειδή όμως τα παθογόνα συνεχώς βρίσκουν τρόπους να προσαρμόζονται και να προσπερνούν την άμυνα των φυτών ώστε να τα προσβάλλουν και συνεπώς να τραφούν και να αναπτυχθούν, τα φυτά πρέπει να προσαρμόζουν με την σειρά τους συνεχώς την άμυνα τους ώστε να ανταπεξέλθουν (Dangl *et al.* 2013). Τα παθογόνα συχνά εκμεταλλεύονται χημικές ουσίες που εκκρίνει το φυτό ξενιστής όπως φλαβονοειδή, λιπαρά οξέα, αλκοόλες και αλδεΐδες, ώστε να το αναγνωρίσουν, να προσκολληθούν στην επιφάνειά του και στην περίπτωση των μυκήτων χρησιμεύουν ως σήματα για την βλάστηση των σπορίων και την ανάπτυξη βλαστικής υφής (Hansjakob *et al.* 2010; 2011; Uppalapatia *et al.* 2012). Όταν ένα παθογόνο καταφέρει να περάσει την πρώτη γραμμή άμυνας του φυτού, πρέπει να τραφεί και να αναπτυχθεί ώστε να το αποικίσει και αυτό συμβαίνει συχνά με την συνεργασία του φυτού (Lapin and Ackerveken, 2013). Το φυτό προσφέρει πηγές άνθρακα (σάκχαρα) και άλλα θρεπτικά στοιχεία στο παθογόνο ώστε να αναπτυχθεί (Lapin and Ackerveken, 2013; Struck *et al.* 2002; 2004; Voegelé *et al.* 2001). Έχει παρατηρηθεί σε παλαιότερες μελέτες ότι η προσβολή φυτών πιπεριάς από τον μύκητα *V. dahliae*, οδήγησε σε αυξημένη συγκέντρωση διαλυτών σακχάρων στα φύλλα τους και μειωμένα επίπεδα αμύλου (Goicoechea *et al.* 2000).

Η βασικότερη πηγή άνθρακα που υπάρχει σε κάθε φυτό είναι το άμυλο, το οποίο τα φυτά παράγουν κατά την διάρκεια της ημέρας και διασπούν κατά την διάρκεια της νύχτας με σκοπό την παραγωγή ενέργειας για την δική τους ανάπτυξη.

Όπως ήδη αναφέρθηκε τα ένζυμα δικινάση της φωσφογλυκάνης (PWD), γλυκοτρανσφεράση 2 (DPE2), και οι β-αμυλάσες είναι μερικά από τα σημαντικότερα ένζυμα που εμπλέκονται στην διαδικασία διάσπασης του αμύλου (Fulton *et al.* 2008). Μέχρι σήμερα η διεθνής βιβλιογραφία που αφορά τον πρωτογενή μεταβολισμό των φυτών και την σχέση του με την άμυνά τους είναι αρκετά περιορισμένη. Η παρούσα μελέτη αφορά την πρώτη απόπειρα να ερευνηθεί ο ρόλος των β-αμυλασών, της δικινάσης της φωσφογλυκάνης (PWD), και της γλυκοτρανσφεράσης 2 (DPE2) στην αλληλεπίδραση του φυτού ξενιστή με το παθογόνο.

Είναι εμφανές από τα αποτελέσματα αυτής της μελέτης ότι υπάρχει σημαντική διαφορά, ως προς την εκδήλωση της ασθένειας που προκαλείται από τον μύκητα *V. dahliae*, μεταξύ φυτών *A. thaliana* αγρίου τύπου και φυτών με μεταλλάξεις σε γονίδια που κωδικοποιούν ένζυμα που εμπλέκονται στον μεταβολισμό του αμύλου. Επίσης υπάρχει θετική συσχέτιση της σχετικής ποσότητας DNA του μύκητα εντός των φυτικών ιστών και του σχετικού εμβαδού ασθeneίας. Φαίνεται δηλαδή ότι η εμφάνιση των συμπτωμάτων είναι ανάλογη της φυσικής παρουσίας του μύκητα εντός του φυτού επομένως θα μπορούσε να γίνει αναφορά για ανθεκτικότητα και όχι για απλή ανεκτικότητα του φυτού στον συγκεκριμένο μύκητα. Σε ανάλογα πειράματα όπου μελετήθηκε η ευαισθησία δύο ποικιλιών τομάτας στον μύκητα *V. dahliae* (Chen *et al.* 2004), στην ποικιλία που παρουσίασε το μικρότερο ποσοστό ασθeneίας δεν παρατηρήθηκε διαφορά στην ποσότητα DNA του μύκητα *V. dahliae* σε σχέση με την ευαίσθητη ποικιλία. Συνεπώς, η διαφορά που παρατηρήθηκε στην συμπτωματολογική εικόνα των δύο ποικιλιών οφείλεται σε μηχανισμούς ανεκτικότητας και όχι ανθεκτικότητας.

Συγκεκριμένα φαίνεται πως τα γονίδια *BAM1*, *BAM2*, *BAM3*, *BAM4*, *PWD* και *DPE2* διαδραματίζουν κάποιο ρόλο στην αλληλεπίδραση του φυτού *A. thaliana* με τον μύκητα *V. dahliae* καθώς μεταλλάξεις στα γονίδια που κωδικοποιούν τα

συγκεκριμένα ένζυμα περιορίζουν την εμφάνιση των συμπτωμάτων της ασθένειας και την ανάπτυξη του παθογόνου εντός του υπέργειου μέρους των φυτών.

Σύμφωνα με τους Fulton *et al.* (2008), μεταλλαγμένα φυτά *A. thaliana* στα οποία έχει γίνει μετάλλαξη σε γονίδια υπεύθυνα για την σύνθεση των β-αμυλασών 1, 2, 3 και 4, που εντοπίζονται στους χλωροπλάστες, καθώς και σε όλους τους πιθανούς συνδυασμούς αυτών των γονιδίων, συσσωρεύουν σημαντικές ποσότητες αμύλου στους ιστούς τους οι οποίες κατά την διάρκεια της νύχτας αδυνατούν να διασπαστούν σε μαλτόζη. Ωστόσο φυτά μεταλλαγμένα ως προς το γονίδιο *DPE2* (γλυκοτρανσφεράση 2) έχουν επίσης μεγαλύτερη ποσότητα αμύλου σε σχέση με τα αγρίου τύπου φυτά στο τέλος της νύχτας, έχουν όμως και αυξημένη ποσότητα μαλτόζης καθώς και μειωμένη ποσότητα σουκρόζης γεγονός που υποδεικνύει ότι το *DPE2* έχει σημαντικό ρόλο στην διάσπαση των ολιγομερών μαλτόζης (Chia *et al.* 2004). Από τα παραπάνω δεδομένα φαίνεται πως φυτά ελλιπή σε β-αμυλάσες συσσωρεύουν άμυλο το οποίο διασπάται μερικώς σε μαλτόζη. Αντιθέτως φυτά που υστερούν σε παραγωγή *DPE2* διασπούν μεν το άμυλο σε μαλτόζη αφού η δράση της εντοπίζεται σε μεταγενέστερα στάδια του μεταβολικού μονοπατιού της διάσπασης του αμύλου, αλλά συσσωρεύουν μαλτόζη εφόσον υστερούν στην περαιτέρω διάσπαση της, για αυτό και έχουν μειωμένη ποσότητα σουκρόζης γεγονός που συνδυάζεται με τον προτεινόμενο ρόλο του ενζύμου *DPE2* στο μονοπάτι βιοσύνθεσης της σουκρόζης (Chia *et al.* 2004).

Συνεπώς είναι πιθανόν η ανθεκτικότητα των μεταλλαγμένων φυτών *A. thaliana* που χρησιμοποιήθηκαν στα πειράματα παθογένειας να μην σχετίζεται με την συσσώρευση μαλτόζης, αφού τα ανθεκτικά *dpe2* φυτά συσσωρεύουν μαλτόζη ενώ οι σειρές *bam* συσσωρεύουν άμυλο και είναι ελλιπείς σε μαλτόζη. Η ανθεκτικότητα που παρατηρήθηκε είναι πιθανόν να οφείλεται σε χαμηλά επίπεδα γλυκόζης ή σουκρόζης στους ιστούς των φυτών αφού η διάσπαση της μαλτόζης από γλυκοτρανσφεράσες (*DPE2*) οδηγεί στην διάσπαση της μαλτόζης σε γλυκόζη. Η

περαιτέρω διάσπαση της γλυκόζης από της εξοκινάσες οδηγεί σε παραγωγή σουκρόζης (Granot, 2008). Συνεπώς παρόλο που δεν υπάρχουν επαρκή ερευνητικά δεδομένα για τα επίπεδα γλυκόζης και σουκρόζης στους ιστούς των μεταλλαγμένων σειρών που χρησιμοποιήθηκαν σε αυτή την μελέτη, μπορεί εύκολα να υποθέσει κανείς ότι εφόσον τα φυτά φέρουν μεταλλάξεις σε γονίδια που κωδικοποιούν ένζυμα απαραίτητα για την φωσφορυλίωση των αμυλόκκοκων (PWD), την διάσπαση του αμύλου σε μαλτόζη (β-αμυλάσες) και την διάσπαση της μαλτόζης σε γλυκόζη (DPE2), είναι πιθανόν όλα να υστερούν σε παραγωγή γλυκόζης και σουκρόζης.

Ωστόσο πειράματα σε μεταλλαγμένα στελέχη *Chlamydomonas reinhardtii* που αφορούσαν την δράση ενός γονιδίου ομόλογου του *DPE1* των φυτών *A. thaliana* (D-enzyme) έδειξαν ότι το συγκεκριμένο ένζυμο εμπλέκεται και στην σύνθεση του αμύλου (Wattebled *et al.* 2003). Επομένως είναι πολύ πιθανό το ένζυμο DPE1 να εμπλέκεται όχι μόνο στην διαδικασία διάσπασης του αμύλου αλλά και σε αυτήν της βιοσύνθεσής του επομένως η πολυπλοκότητα του μοριακού υποβάθρου της παρατηρούμενης ανθεκτικότητας είναι εμφανής.

Μεταλλαγμένα φυτά *A. thaliana* σε γονίδια που εμπλέκονται στην διάσπαση του αμύλου, βρέθηκαν πιο ευαίσθητα στον ημι-βιοτροφικό μύκητα *Colletotrichum higginsianum* σε σχέση με τα φυτά αγρίου τύπου, ενώ παράλληλα τα επίπεδα σαλικυλικού οξέος και καμαλεξίνης βρέθηκαν μειωμένα σε σχέση με αυτά στα αγρίου τύπου φυτά, επίσης μειωμένη βρέθηκε και η έκφραση γονιδίων *PR* (pathogenesis related proteins), γεγονός που υποδεικνύει ότι σε άλλα παθοσυστήματα η έλλειψη πηγών άνθρακα καθιστά τα φυτά πιο ευπαθή στις μολύνσεις και πιθανόν η έλλειψη πηγών άνθρακα να αμβλύνει την αντίδραση των φυτών που σχετίζεται με την άμυνα (Engelsdorf *et al.* 2013). Αντιθέτως, στην ίδια μελέτη, οι ίδιοι γονότυποι *A. thaliana* βρέθηκαν πιο ανθεκτικοί στον βιοτροφικό μύκητα *Erysiphe cruciferarum*. Επομένως φαίνεται πως η μειωμένη διαθεσιμότητα πηγών άνθρακα επηρεάζει την ευαισθησία των φυτών με διαφορετικό τρόπο στην περίπτωση των ημιβιοτροφικών και

βιοτροφικών παθογόνων (Engelsdorf *et al.* 2013). Όσον αφορά την ανθεκτικότητα που παρατηρήθηκε στις μεταλλαγμένες σειρές *bam*, πιθανότατα δεν οφείλεται σε μειωμένη ελκυστικότητα του φυτού για τον μύκητα, διότι σε πειράματα που πραγματοποιήθηκαν στο ερευνητικό κέντρο IFAPA, Cordoba, Ισπανία από τον A. Santos Rufo, παρατηρήθηκε ότι δεν υπάρχει διαφορά ως προς την έλξη και προσκόλληση των κονιδίων του μύκητα στις ρίζες των φυτών *bam* και Col-0 (προσωπική επικοινωνία με τον A. Santos Rufo, IFAPA, Cordoba).

Η μελέτη της έκφραση των γονιδίων των β-αμυλασών 1, 2, 3 και 4, στο υπέργειο τμήμα των φυτών Col-0, έδειξε ότι ο μύκητας *V. dahliae* επηρεάζει την έκφρασή τους (Γράφημα 7). Η ιδιαίτερα μεγάλη αύξηση της έκφρασης των *BAM1* και *BAM3* στις 7 ημέρες μετά την μόλυνση, υποδεικνύει ότι ο μύκητας πιθανόν να προωθεί την παθογένειά του επηρεάζοντας την έκφραση αυτών των γονιδίων. Στο ριζικό σύστημα των φυτών αντιθέτως η έκφραση και των 4 γονιδίων ήταν αμελητέα, παρατήρηση που εξηγείται εύκολα από το γεγονός ότι οι συγκεκριμένες 4 β-αμυλάσες συσσωρεύονται στους χλωροπλάστες. Το γεγονός ότι κυρίως η έκφραση των γονιδίων, *BAM1*, *BAM2* και *BAM3* επηρεάστηκε από την μόλυνση με τον μύκητα ενώ ελάχιστα επηρεάστηκε η έκφραση του *BAM4*, συμπίπτει με το γεγονός ότι σε πειράματα όπου αυτά τα 4 γονίδια ενσωματώθηκαν στο γονιδίωμα του βακτηρίου *Escherichia coli* μόνο τα *BAM1*, *BAM2* και *BAM3* είχαν μετρήσιμη δραστηριότητα β-αμυλάσης (Fulton *et al.* 2008). Επιπλέον στην ίδια μελέτη παρατηρήθηκε ότι η συνολική δραστηριότητα β-αμυλάσης ήταν μειωμένη στα φύλλα των μεταλλαγμένων φυτών *bam1* και *bam3* αλλά όχι στων *bam2* και *bam4*. Παρόλα αυτά τα μεταλλαγμένα *bam4* φυτά συσσωρεύουν μεγάλες ποσότητες αμύλου όπως και τα *bam3*, ενώ δεν φαίνεται να υπάρχει σημαντική διαφορά μεταξύ των ποσοτήτων αμύλου που συσσωρεύουν τα *bam1*, *bam2* και Col-0. Έτσι προτάθηκε από τους Fulton *et al.* (2008), ότι η *BAM4* έχει είτε βοηθητικό ρόλο στην διάσπαση του αμύλου είτε ρυθμιστικό, και ότι δρα ανεξάρτητα από τις *BAM1* και *BAM3*.

Στην παρούσα μελέτη τα αποτελέσματα των πειραμάτων παθογένειας και της ποσοτικοποίησης της παρουσίας του μύκητα *V. dahliae* στο υπέργειο τμήμα των φυτών κατέδειξαν ότι τα *bam3* φυτά όχι μόνο ήταν τα ανθεκτικότερα σε σχέση με τα Col-0 και όλες τις υπόλοιπες μεταλλαγμένες σειρές αλλά και η ενδοφυτική παρουσία του μύκητα ήταν ελάχιστη σε σχέση με όλα τα υπόλοιπα φυτά. Οι παρατηρήσεις αυτές σχετικά με την σημασία του *BAM3* γονιδίου, ταιριάζουν με τις παρατηρήσεις των Fulton *et al.* (2008), ότι η β-αμυλάση 3 έχει πολύ αυξημένη δραστηριότητα β-αμυλάσης, ενώ τα *bam3* φυτά παρουσίασαν μειωμένη συνολική δραστηριότητα β-αμυλάσης και συσσωρεύσαν μεγαλύτερες ποσότητες αμύλου από τα φυτά Col-0, *bam1* και *bam2* ενώ παράλληλα παρήγαγαν τις μικρότερες ποσότητες μαλτόζης σε σχέση με τα φυτά Col-0, *bam1*, *bam2* και *bam4*. Παρόμοια αποτελέσματα υπερέκφρασης του γονιδίου της β-αμυλάσης 3 στο φυτό *A. thaliana* μετά από προσβολή των ριζών από το πρωτόζωο *Plasmodiophora brassicae*, καθώς και άλλων γονιδίων εμπλεκόμενων στον πρωτογενή μεταβολισμό των φυτών αναφέρθηκαν από τους Jubault *et al.* (2013).

Επιπλέον φυτά *A. thaliana* μεταλλαγμένα στα γονίδια *AtcwINV1* και *Atbfruct4* που κωδικοποιούν ινβερτάσες, ένζυμα τα οποία καταλύουν την αντίδραση διάσπασης της σουκρόζης σε γλυκόζη και φρουκτόζη, βρέθηκαν ανθεκτικά στην προσβολή από το πρωτόζωο *P. Brassicae*, ενώ σε αγρίου τύπου φυτά η προσβολή από το ίδιο παθογόνο προκάλεσε την υπερέκφραση των παραπάνω γονιδίων στις ρίζες των φυτών (Siemens *et al.* 2011). Συνεπώς είναι πιθανόν, εκτός από πηγές άνθρακα και ενέργειας για το φυτό αλλά και το παθογόνο, τα σάκχαρα να μπορούν να χρησιμοποιηθούν από το παθογόνο ώστε να περιορίσουν την αντίδραση άμυνας του φυτού. Εξάλλου είναι γνωστό ότι σάκχαρα όπως η γλυκόζη, η φρουκτόζη και η σουκρόζη αναγνωρίζονται από τα φυτά ως σήματα, και σύμφωνα με διάφορες αναφορές στην διεθνή βιβλιογραφία είναι πιθανόν τα σάκχαρα, είτε φυτικής είτε

μικροβιακής προέλευσης, να επηρεάζουν την αλληλεπίδραση φυτού-παθογόνου (Bolouri Moghaddam and Van den Ende, 2012).

Στην παρούσα εργασία προκειμένου να εξετασθεί η αντίδραση άμυνας των φυτών *bam* εναντίον του μύκητα *V. dahliae*, μελετήθηκαν τα επίπεδα έκφρασης των γονιδίων *PR1* και *PDF1.2*, τα οποία συνδέονται με την ενεργοποίηση των μηχανισμών άμυνας του φυτού και συγκεκριμένα των μονοπατιών του σαλικυλικού οξέος και του ιασμονικού/αιθυλενίου, αντίστοιχα (Feys *et al.* 2000; Schenk *et al.* 2000). Για το πείραμα αυτό επιλέχθηκαν η λιγότερο ανθεκτική (*bam14*) και οι πιο ανθεκτικές (*bam1234* and *bam3*) μεταλλαγμένες σειρές *bam*, ώστε να συγκριθεί η έκφραση των προαναφερθέντων γονιδίων στις σειρές αυτές με την έκφραση τους στα φυτά Col-0 στις 7 και 14 ημέρες μετά την μόλυνση με τον μύκητα. Τα αποτελέσματα της qPCR έδειξαν σημαντικά μεγαλύτερη έκφραση και των 2 γονιδίων στο ριζικό σύστημα των φυτών, από όπου και εισέρχεται ο μύκητας *V. dahliae*, στις 2 ανθεκτικότερες σειρές (*bam1234* and *bam3*) σε σχέση με τα Col-0 φυτά ειδικά στις 14 ημέρες μετά την μόλυνση (Γραφήματα 5 και 6). Ο ρόλος των πρωτεϊνών PR1 στην άμυνα των φυτών εναντίον φυτοπαθογόνων μυκήτων είναι γνωστός αλλά παραμένει άγνωστος ο τρόπος δράσης τους καθώς και η αλληλεπίδραση τους με άλλες πρωτεΐνες (Van Loon and Van Strien, 1999). Ο ρόλος της πρωτεΐνης PR1 εναντίον του μύκητα *V. dahliae* προτάθηκε επίσης από τους Pantelides *et al.* (2010), όταν σε πειράματα με μεταλλαγμένα φυτά *A. thaliana etr1-1* ανθεκτικά στον συγκεκριμένο μύκητα παρατηρήθηκε υπερέκφραση του γονιδίου *PR1* αλλά και από τους Tjamos *et al.* (2005) σε μελέτη αλληλεπίδρασης του βιολογικού παράγοντα *Paenibacillus alvei* στέλεχος K165 με το φυτό ξενιστή.

Συμπερασματικά, η παρούσα μελέτη υποδεικνύει ότι ο πρωτογενής μεταβολισμός των φυτών, και συγκεκριμένα ο μεταβολισμός του αμύλου, επηρεάζει την αλληλεπίδραση του φυτού *A. thaliana* με το εδαφογενές παθογόνο *V. dahliae*. Για πρώτη φορά στην διεθνή βιβλιογραφία συνδέεται ο ρόλος των γονιδίων *BAM1*,

BAM2, *BAM3* και *BAM4* με την αλληλεπίδραση ενός φυτοπαθογόνου μύκητα με έναν ξενιστή του και συγκεκριμένα φαίνεται πως τα γονίδια αυτά επηρεάζουν αρνητικά την άμυνα του φυτού εναντίον του μύκητα *V. dahliae*. Αυτό που παραμένει άγνωστο ωστόσο είναι εάν η ανθεκτικότητα που παρατηρήθηκε οφείλεται σε έλλειψη θρεπτικών ουσιών για τον μύκητα ή αν η μόνη αιτία είναι η αποτελεσματικότερη ενεργοποίηση της άμυνας του φυτού.

5. Βιβλιογραφία

1. Alonso, J.M., Stepanova, A.N., Leisse, T.J., Kim, C.J., Chen, H.M., Shinn, P., Stevenson, D.K., Zimmerman, J., Barajas, P., Cheuk, R., Gadrinab, C., Heller, C., Jeske, A., Koesema, E., Meyers, C.C., Parker, H., Prednis, L., Ansari, Y., Choy, N., Deen, H., Geralt, M., Hazari, N., Hom, E., Karnes, M., Mulholland, C., Ndubaku, R., Schmidt, I., Guzman, P., Aguilar-Henonin, L., Schmid, M., Weigel, D., Carter, D.E., Marchand, T., Risseeuw, E., Brogden, D., Zeko, A., Crosby, W.L., Berry, C.C., and Ecker, J.R. 2003. Genome-wide Insertional mutagenesis of *Arabidopsis thaliana*. *Science* 301:653-657.
2. Antoniou, P. P., Tjamos, E. C., Skretis, L., and Paplomatas, E. J. 1993. Contribution of thermotolerant fungal and bacterial biocontrol agents in the biological activity of soil solarization against soilborne pathogens. Page 270 in: Abstracts of Papers of the Int. Congr. of Plant Pathol., 6th. International Society for Plant Pathology.
3. AzconAguilar, C., and Barea, J.M. 1996. Arbuscular mycorrhizas and biological control of soil-borne plant pathogens - An overview of the mechanisms involved. *Mycorrhiza* 6:457-464.
4. BejaranoAlcazar, J., BlancoLopez, M.A., Melerovera, J.M., and JimenezDiaz, R.M. 1997. The influence of verticillium wilt epidemics on cotton yield in southern Spain. *Plant Pathology* 46:168-178.
5. Benyephet, Y., Melerovera, J.M., and Devay, J.E. 1988. Interaction of soil solarization and metham-sodium in the destruction of *Verticillium dahliae* and *Fusarium oxysporum* f.sp. *vasinfectum*. *Crop Protection* 7:327-331.
6. Bhat R. G. and Subbarao K. V., 1999. Host Range Specificity in *Verticillium dahliae*. *Phytopathology* 89:1218-1225.
7. Blamey, M. and Grey-Wilson, C. 1989. *Flora of Britain and Northern Europe*.
8. Bolouri Moghaddam, M.R., and Van den Ende, W. 2012. Sugars and plant innate immunity. *Journal of Experimental Botany* 63:3989-3998.
9. Campbell, C.L., and Madden, L.V. 1990. *Introduction to Plant Disease Epidemiology*. New York: Wiley.
10. Chia, T., Thorneycroft, D., Chapple, A., Messerli, G., Chen, J., Zeeman, S.C., Smith, S.M., and Smith, A.M. 2004. A cytosolic glucosyltransferase is required for conversion of starch to sucrose in *Arabidopsis* leaves at night. *Plant Journal* 37:853-863.
11. Chen, P., Lee, B., and Robb, J. 2004. Tolerance to a non-host isolate of *Verticillium dahliae* in tomato. *Physiol. Mol. Plant Pathol.* 64: 283-291.

12. Clough, S.J., and Bent, A.F. 1998. Floral dip: a simplified method for Agrobacterium-mediated transformation of *Arabidopsis thaliana*. *Plant Journal* 16:735-743.
13. Czechowski, T., Stitt, M., Altmann, T., Udvardi, M.K., and Scheible, W.R. 2005. Genome wide identification and testing of superior reference genes for transcript normalization in Arabidopsis. *Plant Physiol.* 139: 5–17.
14. Dangl, J.L. 2013. Pivoting the plant immune system from dissection to deployment. *Science* 341:1175-1175.
15. Elmer, W.H. 2000. Comparison of plastic mulch and nitrogen form on the incidence of Verticillium wilt of eggplant. *Plant Disease* 84:1231-1234.
16. Engelsdorf, T., Horst, R.J., Proels, R., Proeschel, M., Dietz, F., Hueckelhoven, R., and Voll, L.M. 2013. Reduced Carbohydrate Availability Enhances the Susceptibility of Arabidopsis toward *Colletotrichum higginsianum*. *Plant Physiology* 162:225-238.
17. Feys, B.J., and Parker, J.E. 2000. Interplay of signaling pathways in plant disease resistance. *Trends in Genetics* 16:449-455.
18. Fradin, E.F., and Thomma, B. 2006. Physiology and molecular aspects of Verticillium wilt diseases caused by *V. dahliae* and *V. albo-atrum*. *Molecular Plant Pathology* 7:71-86.
19. Fulton, D.C., Stettler, M., Mettler, T., Vaughan, C.K., Li, J., Francisco, P., Gil, D., Reinhold, H., Eicke, S., Messerli, G., Dorken, G., Halliday, K., Smith, A.M., Smith, S.M., and Zeeman, S.C. 2008. beta-AMYLASE4, a noncatalytic protein required for starch breakdown, acts upstream of three active beta-amylases in Arabidopsis chloroplasts. *Plant Cell* 20:1040-1058.
20. Granot, D. 2008. Putting plant hexokinases in their proper place. *Phytochemistry* 69:2649-2654.
21. Gizi, D., Stringlis, I. A., Tjamos S. E., Paplomatas E. J. 2011. Seedling vaccination by stem injecting a conidial suspension of F2, a non-pathogenic *Fusarium oxysporum* strain, suppresses Verticillium wilt of eggplant. *Biological Control* 58:387.
22. Goicoechea, N., Aguirreolea, J., Cenoz, S., and Garcia-Mina, J.M. 2000. *Verticillium dahliae* modifies the concentrations of proline, soluble sugars, starch, soluble protein and abscisic acid in pepper plants. *Eur. J. Plant Pathol.* 106: 19–25.
23. Hansjakob, A., Bischof, S., Bringmann, G., Riederer, M., and Hildebrandt, U. 2010. Very-long-chain aldehydes promote in vitro prepenetration processes of *Blumeria graminis* in a dose- and chain length-dependent manner. *New*

- Phytol. 188: 1039–1054.
24. Hansjakob, A. Riederer, M., and Hildebrandt, U. 2011. Wax matters: absence of very-long-chain aldehydes from the leaf cuticular wax of the glossy11 mutant of maize compromises the prepenetration processes of *Blumeria graminis*. *Plant Pathol.* 60: 1151–1161.
 25. Jubault, M., Lariagon, C., Taconnat, L., Renou, J.P., Gravot, A., Delourme, R., and Manzanares-Dauleux, M.J. 2013. Partial resistance to clubroot in *Arabidopsis* is based on changes in the host primary metabolism and targeted cell division and expansion capacity. *Funct. Integr. Genomics* 13: 191–205.
 26. Karajeh, M.R. 2006. Seed transmission of *Verticillium dahliae* in olive as detected by a highly sensitive nested PCR-based assay. *Phytopathologia Mediterranea* 45:15-23.
 27. Kaul, S., Koo, H.L., Jenkins, J., Rizzo, M., Rooney, T., Tallon, L.J., Feldblyum, T., Nierman, W., Benito, M.I., Lin, X.Y., Town, C.D., Venter, J.C., Fraser, C.M., Tabata, S., Nakamura, Y., Kaneko, T., Sato, S., Asamizu, E., Kato, T., Kotani, H., Sasamoto, S., Ecker, J.R., Theologis, A., Federspiel, N.A., Palm, C.J., Osborne, B.I., Shinn, P., Conway, A.B., Vysotskaia, V.S., Dewar, K., Conn, L., Lenz, C.A., Kim, C.J., Hansen, N.F., Liu, S.X., Buehler, E., Altafi, H., Sakano, H., Dunn, P., Lam, B., Pham, P.K., Chao, Q., Nguyen, M., Yu, G.X., Chen, H.M., Southwick, A., Lee, J.M., Miranda, M., Toriumi, M.J., Davis, R.W., Wambutt, R., Murphy, G., Dusterhoft, A., Stiekema, W., Pohl, T., Entian, K.D., Terryn, N., Volckaert, G., Salanoubat, M., Choisine, N., Rieger, M., Ansorge, W., Unseld, M., Fartmann, B., Valle, G., Artiguenave, F., Weissenbach, J., Quetier, F., Wilson, R.K., de la Bastide, M., Sekhon, M., Huang, E., Spiegel, L., Gnoj, L., Pepin, K., Murray, J., Johnson, D., Habermann, K., Dedhia, N., Parnell, L., Preston, R., Hillier, L., Chen, E., Marra, M., Martienssen, R., McCombie, W.R., Mayer, K., White, O., Bevan, M., Lemcke, K., Creasy, T.H., Bielke, C., Haas, B., Haase, D., Maiti, R., Rudd, S., Peterson, J., Schoof, H., Frishman, D., Morgenstern, B., Zaccaria, P., Ermolaeva, M., Perteua, M., Quackenbush, J., Volfovsky, N., Wu, D.Y., Lowe, T.M., Salzberg, S.L., Mewes, H.W., Rounsley, S., Bush, D., Subramaniam, S., Levin, I., Norris, S., Schmidt, R., Acarkan, A., Bancroft, I., Brennicke, A., Eisen, J.A., Bureau, T., Legault, B.A., Le, Q.H., Agrawal, N., Yu, Z., Copenhaver, G.P., Luo, S., Pikaard, C.S., Preuss, D., Paulsen, I.T., Sussman, M., Britt, A.B., Selinger, D.A., Pandey, R., Mount, D.W., Chandler, V.L., Jorgensen, R.A., Pikaard, C., Juergens, G., Meyerowitz, E.M., Dangl, J., Jones, J.D.G., Chen, M., Chory, J., Somerville, M.C., and Ar Gen, I. 2000. Analysis of the genome sequence of

- the flowering plant *Arabidopsis thaliana*. *Nature* 408:796-815.
28. Kleinboelting, N., Huep, G., Kloetgen, A., Viehoveer, P., and Weisshaar, B. 2012. GABI-Kat SimpleSearch: new features of the *Arabidopsis thaliana* T-DNA mutant database. *Nucleic Acids Research* 40:D1211-D1215.
 29. Klimes, A., Neumann, M.J., Grant, S.J., and Dobinson, K.F. 2006. Characterization of the glyoxalase I gene from the vascular wilt fungus *Verticillium dahliae*. *Can. J. Microbiol.* 52, 816-822.
 30. Kötting, O., Pusch, K., Tiessen, A., Geigenberger, P., Steup, M., and Ritte, G. 2005. Identification of a novel enzyme required for starch metabolism in *Arabidopsis* leaves. The phosphoglucan water dikinase. *Plant Physiology* 137:242-252.
 31. Krikun, J., and Bernier, C.C. 1987. Infection of several crop species by two isolates of *Verticillium dahliae*. *Can. J. Plant Pathol.* 9: 241-245.
 32. Lapin, D., and Van den Ackerveken, G. 2013. Susceptibility to plant disease: more than a failure of host immunity. *Trends in Plant Sci.* 18: 546-554.
 33. Ligoxigakis, E.K., Vakalounakis, D.J., and Thanassouloupoulos, C.C. 2002a. Host range of *Verticillium dahliae* in cultivated species in Crete. *Phytoparasitica* 30:141-146.
 34. Ligoxigakis, E.K., Vakalounakis, D.J., and Thanassouloupoulos, C.C. 2002b. Weed hosts of *Verticillium dahliae* in Crete: Susceptibility, symptomatology and significance. *Phytoparasitica* 30:511-518.
 35. Lloyd, J.R., Kossmann, J., and Ritte, G. 2005. Leaf starch degradation comes out of the shadows. *Trends in Plant Science* 10:130-137.
 36. Lizotte, P. A., Henson, C. A., and Duke, S. H., 1990. Purification and Characterization of Pea Epicotyl β -Amylase. *Plant Physiol.* 92(3): 615–621.
 37. Maniatis, T., Fritsch, E.F., and Sambrook, J. 1982. *Molecular Cloning, A Laboratory Manual*. Cold Spring Harbor, NY: Cold Spring Harbor Laboratory Press.
 38. Meinke, D.W., Cherry, J.M., Dean, C., Rounsley, S.D., and Koornneef, M. 1998. *Arabidopsis thaliana*: A model plant for genome analysis. *Science* 282:662.
 39. Moreno, N., Bougourd, S., Haseloff, J. and Fiejo, J.A. 2006. Chapter 44: Imaging Plant Cells. In: Pawley JB (Editor). *Handbook of Biological Confocal Microscopy - 3rd edition*. SpringerScience+Business Media, New York. p.769-787.
 40. Oñate-Sánchez, L. and Vicente-Carbajosa, J. 2008. DNA-free RNA isolation protocols for *Arabidopsis thaliana* including seeds and siliques. *BMC*

Research Notes 1:93.

41. Pantelides, I.S., Tjamos, S.E., and Paplomatas, E.J. 2010. Ethylene perception via ETR1 is required in Arabidopsis infection by *Verticillium dahliae*. *Mol. Plant Pathol.* 11: 191–202.
42. Pegg, G.F., Brady, B.L. 2002. *Verticillium Wilts*. Wallingford, UK: CABI Publishing.
43. Platt, H.W., and Arsenault, W.J. 2001. Management of nitrogen and phosphorus rates does not suppress *Verticillium* wilt in Yukon Gold. *American Journal of Potato Research* 78:215-219.
44. Rodrigo, G., Smith, A., Chaves, B., Wyckhuys, K., Forero C. and Jiménez, J. 2009. Combined efficacy assessment of soil solarization and bio-fungicides for management of *Sclerotinia* spp. In lettuce (*Lactuca sativa* L.) *Agronomia Colbiana*.
45. Robison, M.M., Griffith, M., Pauls, K.P., and Glick, B.R. 2001. Dual role for ethylene in susceptibility of tomato to *Verticillium* wilt. *Journal of Phytopathology-Phytopathologische Zeitschrift* 149:385-388.
46. Roux-Michollet, D., Czarnes, S., Adam, B., Berry, D., Commeaux, C., Guillaumaud, N., Le Roux, X., and Clays-Josserand, A. 2008. Effects of steam disinfection on community structure, abundance and activity of heterotrophic, denitrifying and nitrifying bacteria in an organic farming soil. *Soil Biology & Biochemistry* 40:1836-1845.
47. Schenk, P.M., Kazan, K., Wilson, I., Anderson, J.P., Richmond, T., Somerville, S.C., and Manners, J.M. 2000. Coordinated plant defense responses in Arabidopsis revealed by microarray analysis. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 97:11655-11660.
48. Schnathorst, W.C. 1981. Life cycle and epidemiology of *Verticillium*. In: *Fungal Wilt Diseases of Plants* (Mace, M.A., Bell, A.A. and Beckman, C.H., eds), pp. 81–111. New York: Academic Press.
49. Sherf, A.F. and MacNab, A.A. 1986. *Vegetable Diseases and their Control*. (2nd ed.). John Wiley & sons, eds. New York, USA, pp. 728.
50. Staskawicz, B.J. 2001. Genetics of plant-pathogen interactions specifying plant disease resistance. *Plant Physiology* 125:73-76.
51. Streb S. and Zeeman S. C. 2012. Starch Metabolism in Arabidopsis. *The Arabidopsis Book* 10: e0160. DOI: 10.1199/tab.0160.
52. Struck, C., Ernst, M., Hahn, M. 2002 Characterization of a developmentally regulated amino acid transporter (AAT1p) of the rust fungus *Uromyces fabae*. *Mol Plant Pathol* 3: 23–30.

53. Subbarao, K.V., Chassot, A., Gordon, T.R., Hubbard, J.C., Bonello, P., Mullin, R., Okamoto, D., Davis, R.M., and Koike, S.T. 1995. Genetic relationship and cross pathogenicities of *Verticillium dahliae* isolates from cauliflower and other crops. *Phytopathology* 85: 1105-1112.
54. Siemens, J., González, M.C., Wolf, S., Hofmann, C., Greiner, S., Du, Y., Rausch, T., Roitsch, T., and Ludwig-Müller, J. 2011. Extracellular invertase is involved in the regulation of clubroot disease in *Arabidopsis thaliana*. *Mol. Plant Pathol.* 12: 247–262.
55. Sinha, A.K., and Wood, R.K.S. 1968. Studies on the nature of resistance in tomato plants to *Verticillium albo-atrum*. *Ann. Appl. Biol.* 62: 319–327.
56. Sivaprakasam K. and Soumini Rajagopalan C.K. 1974. Effect of nitrogen on the incidence of *Verticillium* wilt disease of egg plant caused by *Verticillium dahliae* Kleb. *Plant and Soil* 40:217-220.
57. Taiz, L. and Zeiger, E. 2010. *Plant Physiology*, Fifth Edition. Sinauer Associates. Sunderland, MA.
58. Thanassouloupoulos, C.C., Biris, D.A. and Tjamos, E.C. 1981. Weed hosts as inoculum source of *Verticillium* in olive orchards. *Phytopath. Medit.* 20:164-168.
59. Tjamos, S.E., Fliemetakis, E., Paplomatas, E.J., and Katinakis, P. 2005. Induction of resistance to *Verticillium dahliae* in *Arabidopsis thaliana* by the biocontrol agent K-165 and pathogenesis-related proteins gene expression. *Molecular Plant-Microbe Interactions* 18:555-561.
60. Uppalapatia, S.R., Ishigaa, Y., Doraiswamy, V., Bedaira, M., Mittala, S., Chena, J., Nakashimaa, J., Tanga, Y., Tadegea, M., Ratetb, P., Chena, R., Schultheissc, H., Mysorea, K. 2012. Loss of abaxial leaf epicuticular wax in *Medicago truncatula* *irg1/palm1* mutants results in reduced spore differentiation of anthracnose and nonhost rust pathogens. *Plant Cell* 24: 353-370.
61. Van Loon, L.C., and Van Strien, E.A. 1999. The families of pathogenesis-related proteins, their activities, and comparative analysis of PR-1 type proteins. *Physiological and Molecular Plant Pathology* 55:85-97.
62. Van Loenen, M.C.A., Turbett, Y., Mullins, C.E., Feilden, N.E.H., Wilson, M.J., Leifert, C., and Seel, W.E. 2003. Low temperature-short duration steaming of soil kills soil-borne pathogens, nematode pests and weeds. *European Journal of Plant Pathology* 109:993-1002.
63. Vance, C.P., Kirk, T.K., and Sherwood, R.T. 1980. Lignification as a mechanism of disease resistance. *Annual Review of Phytopathology* 18:259-

288.

64. Voegelé, R.T., Struck, C., Hahn, M., Mendgen, K. (2001) The role of haustoria in sugar supply during infection of broad bean by the rust fungus *Uromyces fabae*. *Proc Natl Acad Sci USA* 98: 8133–8138.
65. Wang, J.Y., Cai, Y., Gou, J.Y., Mao, Y.B., Xu, Y.H., Jiang, W.H., and Chen, X.Y. 2004. VdNEP, an elicitor from *Verticillium dahliae*, induces cotton plant wilting. *Applied and Environmental Microbiology* 70:4989-4995.
66. Wang, H., Wang, J., Jiang, J., Chen, S., Guan, Z., Liao, Y. and Chen, F. 2014. Reference genes for normalizing transcription in diploid and tetraploid *Arabidopsis*. *Scientific Reports* 4.
67. Wattedled, F., Ral, J.P., Dauvillee, D., Myers, A.M., James, M.G., Schlichting, R., Giersch, C., Ball, S.G., and D'Hulst, C. 2003. STA11, a *Chlamydomonas reinhardtii* locus required for normal starch granule biogenesis, encodes disproportionating enzyme. Further evidence for a function of alpha-1,4 glucanotransferases during starch granule biosynthesis in green algae. *Plant Physiology* 132:137-145.
68. Wheeler, M.H. 1982. Melanin biosynthesis in *Verticillium dahliae*: dehydration and reduction reactions in cell-free homogenates. *Experimental Mycology* 6:171-179.
69. Yadeta, K., and Thomma, B.P.H.J. 2013. The xylem as battleground for plant hosts and vascular wilt pathogens. *Frontiers in Plant Science* 4.
70. Yao, Z., Rashid, K.Y., Adam, L.R., and Daayf, F. 2011. *Verticillium dahliae*'s VdNEP acts both as a plant defence elicitor and a pathogenicity factor in the interaction with *Helianthus annuus*. *Canadian Journal of Plant Pathology- Revue Canadienne De Phytopathologie* 33:375-388.
71. Zeeman, S.C., Umemoto, T., Lue, W.L., Au-Yeung, P., Martin, C., Smith, A.M., and Chen, J. 1998. A mutant of *Arabidopsis* lacking a chloroplastic isoamylase accumulates both starch and phytoglycogen. *Plant Cell* 10:1699.
72. Ζιώγας, Β. Ν., Μαρκόγλου, Α. Ν. 2007. ΓΕΩΡΓΙΚΗ ΦΑΡΜΑΚΟΛΟΓΙΑ, Βιοχημεία, Φυσιολογία, Μηχανισμοί Δράσης και Χρήσεις των Φυτοπροστατευτικών Προϊόντων. Αθήνα, Απρίλιος.
73. Παναγόπουλος Χ.Γ. 2000. Ασθένειες κηπευτικών καλλιεργειών. Εκδ. Σταμούλης.
74. Παναγόπουλος, Χ.Γ. 2007. Ασθένειες καρποφόρων δέντρων και αμπέλου. Εκδ. Σταμούλης.
75. Τζάμος, Ε.Κ. 2007. Φυτοπαθολογία. Εκδ. Σταμούλη.