

Γεωπονικό Πανεπιστήμιο Αθηνών
Τμήμα Επιστήμης Φυτικής Παραγωγής
Εργαστήριο Φυτοπαθολογίας

Διερεύνηση του ρόλου των γονιδίων
των β-αμυλασών στην ανθεκτικότητα
των φυτών εναντίον βιοτροφικών,
ημιβιοτροφικών και νεκροτροφικών
φυτοπαθογόνων μικροοργανισμών

Νικόλαος Λεκάνης
Αθήνα 2016

Γεωπονικό Πανεπιστήμιο Αθηνών
Κατεύθυνση Φυτοπροστασία και Περιβάλλον

Τμήμα Επιστήμης Φυτικής Παραγωγής
Εργαστήριο Φυτοπαθολογίας

ΔΙΕΡΕΥΝΗΣΗ ΤΟΥ ΡΟΛΟΥ ΤΩΝ ΓΟΝΙΔΙΩΝ ΤΩΝ Β-ΑΜΥΛΑΣΩΝ
ΣΤΗΝ ΑΝΘΕΚΤΙΚΟΤΗΤΑ ΤΩΝ ΦΥΤΩΝ ΕΝΑΝΤΙΟΝ
ΒΙΟΤΡΟΦΙΚΩΝ, ΗΜΙΒΙΟΤΡΟΦΙΚΩΝ ΚΑΙ ΝΕΚΡΟΤΡΟΦΙΚΩΝ
ΦΥΤΟΠΑΘΟΓΟΝΩΝ ΜΙΚΡΟΟΡΓΑΝΙΣΜΩΝ

Μεταπτυχιακή Μελέτη

Φοιτητής : Νικόλαος Λεκάνης

Επιβλέπων Καθηγητής : Σωτήρης Τζάμος

ΕΥΧΑΡΙΣΤΙΕΣ

Για την επιτυχή διεκπεραίωση της παρούσας μεταπτυχιακής μελέτης πολύτιμη ήταν η βοήθεια ορισμένων ανθρώπων τους οποίους θα ήθελα να ευχαριστήσω.

Αρχικά θα ήθελα να ευχαριστήσω τον επίκουρο καθηγητή Σωτήριο Τζάμο που με εμπιστεύθηκε για την ανάθεση του συγκεκριμένου πειράματος και τη συνεχή καθοδήγηση του σε όλα τα στάδια της εργασίας μου, τόσο στο πειραματικό μέρος όσο και κατά τη διάρκεια συγγραφής της εργασίας μου. Οι υποδείξεις του με βοήθησαν να δώσω το καλύτερο αποτέλεσμα ενώ ήταν πάντα πρόθυμος και διαθέσιμος να λύσει οποιαδήποτε απορία μου. Παράλληλα ο άμεσος χαρακτήρας του δημιουργούσε ένα ευχάριστο και οικείο κλίμα κατά τη διάρκεια της συνεργασίας μας.

Επίσης ιδιαίτερες ευχαριστίες θα ήθελα να απευθύνω στον Καθηγητή και διευθυντή του Εργαστηρίου Φυτοπαθολογίας Επαμεινώνδα Παπλωματά και τον επίκουρο καθηγητή Δημήτριο Τσιτσιγιάννη που δέχτηκαν να συμμετάσχουν ως μέλη στην εξεταστική επιτροπή, ενώ ήταν πάντα πρόθυμοι να λύσουν οποιαδήποτε απορία μου σχετικά με το αντικείμενο της μελέτης μου.

Επιπλέον, θα ήθελα να ευχαριστήσω ιδιαίτερα την υποψήφια διδάκτορα Δανάη Γκίζη για τη συνεχή καθοδήγηση και βοήθεια στις μοριακές μεθόδους που χρησιμοποίησα καθώς μου παρείχε σημαντικές συμβουλές για τη διεκπεραίωση του πειράματος.

Ακόμη θα ήθελα να ευχαριστήσω ιδιαίτερα τη μεταπτυχιακή φοιτήτρια Χριστίνα Λαγογιάννη για τη χρήσιμη βοήθεια της σε όλα τα στάδια του πειραματικού μέρους και για την προθυμία της να μου λύσει οποιαδήποτε απορία μου σχετικά με την προετοιμασία των μολυσμάτων.

Επιπλέον θα ήθελα να ευχαριστήσω ιδιαίτερα τον υποψήφιο διδάκτορα Σταύρο Παλαβούζη, τη μεταπτυχιακή φοιτήτρια Σωτηρία Φούσια και το μεταπτυχιακό φοιτητή Βασίλη Δημητρακά για την προθυμία τους να με βοηθήσουν ανά πάσα στιγμή κατά τη διάρκεια του πειραματικού μέρους.

Τέλος θα ήθελα να ευχαριστήσω όλους τους φοιτητές, το προσωπικό και τους καθηγητές του εργαστηρίου για το ευχάριστο κλίμα που δημιουργούσαν στο εργαστήριο καθώς και για το ειλικρινές ενδιαφέρον τους για την πρόοδο της εργασίας μου.

A. ΕΙΣΑΓΩΓΗ	11
1. β-αμυλάσες	11
1.1 Άμυλο	11
1.2 Η σύνθεση του Αμύλου	12
1.3 Ο καταβολισμός του αμύλου	12
1.4 Μεταβολισμός Μαλτόζης	13
1.5 Ο κυρίαρχος ρόλος της β-αμυλάσης στην αποδόμηση του αμύλου	14
1.6 Το φυτό <i>Arabidopsis thaliana</i> κωδικοποιεί πολλαπλές β-αμυλάσες	14
1.7 β-αμυλάση 1 (BAM1) και β-αμυλάση 3 (BAM3)	15
1.8 β-αμυλάση 2 (BAM2)	15
1.9 β-αμυλάση 4 (BAM4)	15
2. Αλληλεπίδραση Παθογόνου-Ξενιστή	17
2.1 Σχέσεις παρασιτισμού μεταξύ των παθογόνων και των ξενιστών τους	17
3. Μηχανισμοί Άμυνας των Φυτών Έναντι Παθογόνων Μικροοργανισμών	19
3.1 Παθητική άμυνα των φυτών	19
3.2 Ενεργοί Μηχανισμοί Άμυνας	19
4. Επίκτητη διασυστηματική ανοχή (Systemic Acquired Resistance-SAR)	23
4.1 Επαγόμενη από συντηρημένες δομές παθογόνων και μικροοργανισμών (Pathogen/Microbe Associated Molecular Patterns-P/MAMPs) διασυστηματική άμυνα (P/MAMPs Triggered Immunity-PTI)	23
4.2 Επαγόμενη από τελεστές άμυνας ((Effector Triggered Immunity-ETI)	23
5. Ο ρόλος των φυτορμονών στην ενεργοποίηση της άμυνας	25
5.1 Η εξαρτώμενη από το σαλικυλικό οξύ άμυνα των φυτών	25
5.2 Η εξαρτώμενη από το αιθυλένιο διασυστηματική άμυνα των φυτών	26
5.3 Ο Συνεργιστικός Ρόλος μεταξύ του Αιθυλενίου και του Ιασμονικού Οξέος στην επαγωγή άμυνας έναντι νεκροτροφικών παθογόνων	27
5.4 Το Αμπσισικό Οξύ (abscisic acid, ABA) ως θετικός και αρνητικός ρυθμιστής της άμυνας των φυτών	27
5.5 Η λειτουργία των Μπρασινοστεροειδών (BRs) στην άμυνα των φυτών	28
6. Η προσβολή των φυτών από παθογόνα αίτια μεταβάλλει το βασικό μεταβολισμό των φυτών	29
6.1 Σάκχαρα ως ρυθμιστικοί παράγοντες στην άμυνα των φυτών	29
7. Βιοτροφικά – Ημιβιοτροφικά – Νεκροτροφικά Παθογόνα-Προτυπα Στη Μελέτη Των Αλληλεπιδρασεων Παθογόνου - Ξενιστή	31
7.1 <i>Hyaloperonospora arabidopsidis</i>	33
7.2 <i>Pseudomonas syringae</i> pv. <i>tomato</i>	34
7.3 <i>Botrytis cinerea</i>	
B. ΣΚΟΠΟΣ ΤΗΣ ΜΕΛΕΤΗΣ	37
Γ. ΥΛΙΚΑ ΚΑΙ ΜΕΘΟΔΟΙ	39
1. Γενικά	39
1.1 Φυτικό υλικό	39
1.2 Μικροβιολογικό Υλικό	39

1.3 Θρεπτικά Υποστρώματα και Αντιβιοτικά	39
2. Προετοιμασία φυτικού υλικού	40
2.1 Προετοιμασία σπορόφυτων	40
2.2 Μεταφύτευση σπορόφυτων στις τελικές θέσεις φύτευσης	40
3. Πειράματα Παθογένειας με τον ωμούκητα <i>H. arabidopsidis</i>	41
3.1 Προετοιμασία μολύσματος του ωμούκητα <i>H. arabidopsidis</i>	41
3.2 Εφαρμογή μολύσματος στους υπό εξέταση γονότυπους	41
3.3 Καταμέτρηση ζωοσποριαγγείων ανά γονότυπο	42
3.4 Χρώση Trypan Blue (Trypan Blue Staining)	42
4. Πειράματα Παθογένειας με το βακτήριο <i>P. syringae pv. tomato</i> DC3000	43
4.1 Καλλιέργεια και ανάπτυξη του βακτηρίου <i>P. syringae pv. tomato</i> DC3000	43
4.2 Παραλαβή βακτηριακών κυττάρων	43
4.3 Μόλυνση των υπό εξέταση γονοτύπων με το παθογόνο βακτηριακό στέλεχος <i>Pst</i> DC3000	43
4.4 Μέτρηση Νωπού βάρους φυτών των υπό εξέταση γονοτύπων	44
4.5 Ποσοτικοποίηση ενδοφυτικού βακτηριακού πληθυσμού	44
5. Πειράματα Παθογένειας με το μύκητα <i>Botrytis cinerea</i>	45
5.1 Ανάπτυξη του μύκητα <i>Botrytis cinerea</i>	45
5.2 Μόλυνση φυτών με το μύκητα <i>Botrytis cinerea</i>	45
5.3 Καταμέτρηση της συχνότητας εμφάνισης νεκρωτικής κηλίδας για κάθε γονότυπο	45
5.4 Προσδιορισμός της μέσης διαμέτρου των νεκρωτικών κηλίδων για κάθε γονότυπο	46
6. Προσδιορισμός των επιπέδων έκφρασης των γονιδίων <i>PR1</i> και <i>PDF1.2</i> σε όλους τους υπό εξέταση γονό- τυπους και των γονιδίων <i>BAM1</i> , <i>BAM2</i> , <i>BAM3</i> και <i>BAM4</i> στα φυτά αγρίου τύπου Col-0.	47
6.1 Συλλογή ιστού για κάθε υπό εξέταση γονότυπο στα διάφορα παθοσυστήματα παθογόνου/ξενιστή	47
6.2 Απομόνωση RNA	47
6.3 Εφαρμογή DNase (με βάση το πρωτόκολλο της εταιρείας Invitrogen)	48
6.4 Προσδιορισμός της συγκέντρωσης του RNA	48
6.5 Αντίδραση αντίστροφης μεταγραφάσης	48
6.6 Εφαρμογή της Real-time PCR	49
Δ. ΑΠΟΤΕΛΕΣΜΑΤΑ	51
1. Αποτελέσματα Πειραμάτων Παθογένειας με τον Ωμούκητα <i>H. arabidopsidis</i>	51
1.1 Ποσοτικοποίηση των ζωοσποριαγγείων του ωμούκητα <i>H. arabidopsidis</i> στα φυτά <i>bam1</i> , <i>bam2</i> , <i>bam3</i> , <i>bam4</i> και Col-0	51
1.2 Χρώση Trypan Blue	52
2. Αποτελέσματα Πειραμάτων Παθογένειας με το Βακτήριο <i>Pst</i> DC3000	53
2.1 Μέτρηση του νωπού βάρους των μολυσμένων με το βακτήριο <i>Pst</i> DC3000 φυτών <i>bam1</i> , <i>bam2</i> , <i>bam3</i> , <i>bam4</i> και Col-0	53
2.2 Ποσοτικοποίηση του ενδοφυτικού πληθυσμού του βακτηρίου <i>Pst</i> DC3000 στα φύλλα των φυτών <i>bam1</i> , <i>bam2</i> , <i>bam3</i> , <i>bam4</i> και Col-0	53
3. Αποτελέσματα πειραμάτων παθογένειας με το μύκητα <i>B. cinerea</i>	56
4. Αποτελέσματα των επιπέδων έκφρασης των γονιδίων <i>PR1</i> και <i>PDF1.2</i> στα φυτά <i>bam1</i> , <i>bam2</i> , <i>bam3</i> , <i>bam4</i> και Col-0	58
4.1 Αποτελέσματα των επιπέδων έκφρασης των γονιδίων <i>PR1</i> και <i>PDF1.2</i> στην αλληλεπίδραση των γονοτύ- πων <i>bam1</i> , <i>bam2</i> , <i>bam3</i> , <i>bam4</i> και Col-0 με τον ωμούκητα <i>H. arabidopsidis</i>	58

4.2 Αποτελέσματα των επιπέδων έκφρασης των γονιδίων PR1 και PDF1.2 στην αλληλεπίδραση των γονοτύπων <i>bam1</i> , <i>bam2</i> , <i>bam3</i> <i>bam4</i> και Col-0 με το μύκητα <i>B. cinerea</i>	59
4.3 Αποτελέσματα των επιπέδων έκφρασης των γονιδίων PR1 και PDF1.2 στην αλληλεπίδραση των γονοτύπων <i>bam1</i> , <i>bam2</i> , <i>bam3</i> , <i>bam4</i> και Col-0 με το βακτήριο <i>Pst</i> DC3000.....	59
5. Αποτελέσματα των επιπέδων έκφρασης των γονιδίων <i>BAM1</i> , <i>BAM2</i> , <i>BAM3</i> και <i>BAM4</i> στα φυτά αγρίου τύπου κατά τη διαδικασία αλληλεπίδρασης με τα παθογόνα <i>H. arabidopsidis</i> , <i>Pst</i> DC3000 και <i>B. cinerea</i>	61
5.1 Αποτελέσματα των επιπέδων έκφρασης των γονιδίων <i>BAM1</i> , <i>BAM2</i> , <i>BAM3</i> και <i>BAM4</i> στα φυτά αγρίου τύπου κατά τη διαδικασία αλληλεπίδρασης τους με τον ωομύκητα <i>H. arabidopsidis</i>	61
5.2 Αποτελέσματα των επιπέδων έκφρασης των γονιδίων <i>BAM1</i> , <i>BAM2</i> , <i>BAM3</i> και <i>BAM4</i> στα φυτά αγρίου τύπου κατά τη διαδικασία αλληλεπίδρασης τους με το βακτήριο <i>Pst</i> DC3000.....	61
5.3 Αποτελέσματα των επιπέδων έκφρασης των γονιδίων <i>BAM1</i> , <i>BAM2</i> , <i>BAM3</i> και <i>BAM4</i> στα φυτά αγρίου τύπου κατά τη διαδικασία αλληλεπίδρασης τους με τον μύκητα <i>B. cinerea</i>	62
E. ΣΥΖΗΤΗΣΗ	63
ΣΤ. ΒΙΒΛΙΟΓΡΑΦΙΑ	67

A. ΕΙΣΑΓΩΓΗ

1. β-αμυλάσες

1.1 Άμυλο

Το άμυλο είναι ένα από τα κυριότερα προϊόντα της φωτοσύνθεσης μαζί με τη σακχαρόζη, συντίθεται στο στρώμα του χλωροπλάστη κατά τη διάρκεια της ημέρας όταν η ταχύτητα παραγωγής της σακχαρόζης στο κυτταρόπλασμα είναι μικρότερη από την ταχύτητα αφομοίωσης του CO₂ κατά τη φωτοσύνθεση (Ridge, 2005). Το άμυλο συντίθεται από ενώσεις άνθρακα οι οποίες προέρχονται από την αφομοίωση του άνθρακα κατά τη διαδικασία των φωτεινών αντιδράσεων (Κύκλος του Calvin-Benson), ενώ η αποδόμηση του κατά τη διάρκεια της νύχτας είναι απαραίτητη για την επιτυχή διεκπεραίωση όλων των μεταβολικών λειτουργιών που λαμβάνουν χώρα κατά τη διάρκεια της νύχτας (Zeeman et al., 2007).

Τα φυτά συγκεντρώνουν και μεταφέρουν άμυλο τόσο σε φωτοσυνθετικά ικανούς ιστούς (φύλλα) όσο και σε μη φωτοσυνθετικά ικανούς ιστούς (βολβούς, κονδύλους και ενδοσπέρμιο σπόρων). Ανάλογα με την παρουσία του αμύλου στους φωτοσυνθετικούς ή μη ιστούς, το άμυλο διακρίνεται σε δύο τύπους, το αποθηκευτικό άμυλο (storage starch) και το μεταβατικό άμυλο (transitory starch). Οι δύο τύποι αμύλου διαφοροποιούνται ως προς τη θέση τους στο φυτό, την λειτουργία τους ως προς τις ανάγκες του φυτού, το χρόνο που απαιτείται για τη σύνθεση τους, το μέγεθος, το σχήμα, την δομή και την σύσταση τους σε αμυλόζη και αμυλοπηκτίνη (Smith et al., 2005; Smith and Stitt, 2007).

Στους αποθηκευτικούς ιστούς το άμυλο αποδομείται κατά την βλάστηση των σπόρων ή κατά τη βλάστηση του φυτού μετά τη λήξη του ληθάργου μετά από δυσμενείς συνθήκες περιβάλλοντος (π.χ. ψύχος). Στα φύλλα, το άμυλο συντίθεται και συγκεντρώνεται στον χλωροπλάστη κατά την διάρκεια της ημέρας, ενώ αποδομείται κατά την διάρκεια του σκότους απελευθερώνοντας τον δισακχαρίτη μαλτόζη. Η μαλτόζη αποτελεί την κυριότερη πηγή άνθρακα για τις μεταβολικές λειτουργίες των κυττάρων και την ετερότροφη ανάπτυξη του φυτού κατά την διάρκεια της νύχτας, όπου η σύνθεση των σακχάρων de novo από το CO₂ μέσω της φωτοσυνθετικής αλυσίδας μεταφοράς ηλεκτρονίων είναι αδύνατη (Ruzanski, 2011).

Το μεταβατικό άμυλο αποτελεί ενδιάμεσο προϊόν της ημερήσιας φωτοπεριόδου, ενώ το αποθηκευτικό άμυλο συντίθεται κατά την διάρκεια πολλών ημερών ή εβδο-

μάδων. Το μήκος των αμυλόκοκκων του αποθηκευτικού αμύλου κυμαίνεται μεταξύ 0,3 και 100 μm (Lindeboom 2004) και το σχήμα τους ποικίλει, καθώς μπορεί να είναι ωοειδές (αμυλόκοκκοι πατάτας), ακανόνιστο, λείο ή τραχύ και σχήμα πολύγωνου (Jane et al., 1994). Ενώ αντίθετα οι αμυλόκοκκοι του μεταβατικού αμύλου είναι πεπλατυσμένου σχήματος και έχουν τη μορφή δισκίου και η διάμετρος τους κυμαίνεται μεταξύ 1-2 μm, ανεξαρτήτως είδους φυτού (Grange et al., 1989b; Santacruz et al., 2004; Steup et al., 1983; Wildman et al., 1980).

Το αποθηκευτικό άμυλο διαφέρει σε σχέση με το μεταβατικό ως προς την δομή και την σύνθεση του. Παρόλο που και οι δύο τύποι αμύλου αποτελούνται από αμυλόζη και αμυλοπηκτίνη, το ποσοστό των παραπάνω δύο πολυμερών ποικίλει σημαντικά. Το αποθηκευτικό άμυλο έχει σύσταση 20-30% αμυλόζη και 70-80% αμυλοπηκτίνη, ενώ η σύσταση του μεταβατικού αμύλου σε αμυλόζη και αμυλοπηκτίνη ποικίλει ανάλογα με το είδος του φυτού. Για παράδειγμα στο φυτό *Arabidopsis thaliana* το περιεχόμενο του μεταβατικού αμύλου σε αμυλόζη είναι σχεδόν 6% (Zeeman et al., 2002), ενώ στα φύλλα καπνού κυμαίνεται μεταξύ 15 και 20% (Matheson, 1996).

Το άμυλο αποτελείται από δύο γλυκάνες (πολυμερή της α-D-γλυκόζης), την αμυλόζη και την αμυλοπηκτίνη. Η αμυλόζη είναι γραμμικό πολυμερές, οι δομικές μονάδες του οποίου ενώνονται με γλυκοζιδικούς δεσμούς τύπου 1-4 και σχηματίζουν μακρομόριο χωρίς διακλαδώσεις με βαθμό πολυμερισμού 100-2000. Η αμυλοπηκτίνη είναι διακλαδισμένο πολυμερές, σχηματίζεται από γραμμικά πολυμερή με μικρό βαθμό πολυμερισμού (μέχρι 20), τα οποία αποτελούνται από μονάδες α-D γλυκόζης ενωμένες με γλυκοζιδικούς δεσμούς τύπου 1-4. Τα μικρά αυτά γραμμικά πολυμερή ενώνονται με γλυκοζιδικούς δεσμούς τύπου 1-6 και έτσι το μόριο της αμυλοπηκτίνης αποτελείται από διακλαδισμένες αλυσίδες (Bouranis, 2009). Οι διακλαδώσεις, σε αντίθεση με τη γραμμική αλυσίδα της αμυλόζης, καθιστούν την αμυλοπηκτίνη διαλυτή στο νερό (Berg et al., 2005).

*Στη συνέχεια της εργασίας όπου αναγράφεται η λέξη άμυλο, θα υποδηλώνεται το μεταβατικό άμυλο

1.2 Η σύνθεση του Αμύλου

Η σύνθεση του αμύλου επιτυγχάνεται με την δράση τριών ενζύμων, της συνθάσης του αμύλου (Starch Synthase-SS) (EC 2.4.1.21), του ενζύμου διακλάδωσης του αμύλου (Starch Branching Enzyme-SBE) (EC 2.4.1.18) και την αδενοσυλο-τρανσφεράση της γλυκόζης-1P ή πυροφωσφατάση της ADP γλυκόζης (EC 2.7.7.27), (Nakamura et al. 1996). Η πυροφωσφατάση της ADP-γλυκόζης φωσφορυλιώνει την α-D-γλυκόζη-1P και την μετατρέπει σε ADP-γλυκόζη καταναλώνοντας ATP (Διαμαντίδης, 2007). Η συνθάση του αμύλου συνενώνει με την σειρά της την ADP-γλυκόζη με την α-D-γλυκόζη, ενώνοντας τον 1^ο άνθρακα (αναγωγικό σημείο) κάθε νέου μορίου ADP-γλυκόζης με τον 4^ο άνθρακα (μη αναγωγικό σημείο) της α-D-γλυκόζης (Bouranis, 2007). Με αυτόν τον τρόπο παράγονται γραμμικά πολυμερή γλυκόζης (μαλτόζη). Η σύνθεση της αμυλοπηκτίνης πραγματοποιείται με την συνδυαστική δράση του ενζύμου

διακλάδωσης και της συνθάσης του αμύλου. Το ένζυμο διακλάδωσης (SBE) καταλύει τη δημιουργία 1-4, α-γλυκοζιδικών δεσμών στο μόριο της αμυλοπηκτίνης, καταλύοντας μία αντίδραση γλυκοτρανσφεράσης στην οποία μέρος της προϋπάρχουσας αλυσίδας 1-4, α-γλυκοζιδικών δεσμών η οποία έχει υποστεί διάσπαση ως αποτέλεσμα της αποκοπής ενός 1-4, α-γλυκοζιδικού δεσμού, μεταφέρεται στην θέση του C6 ενός γειτονικού υπό κατασκευή πολυμερούς γλυκόζης (Ruzanski, 2011) με βαθμό πολυμερισμού τουλάχιστον 7 μονάδων γλυκόζης ή της παρακείμενης αλυσίδας η οποία υπέστη διάσπαση, σχηματίζοντας ένα 1-6, α-γλυκοζιδικό δεσμό μεταξύ των δύο γραμμικών πολυμερών γλυκόζης και σε απόσταση περίπου 30 μονάδων γλυκόζης από προϋπάρχουσα διακλάδωση (Διαμαντίδης, 2007). Έπειτα η μεταφερόμενη αλυσίδα επιμηκύνεται περαιτέρω με την δράση του ενζύμου SS (Ruzanski, 2011).

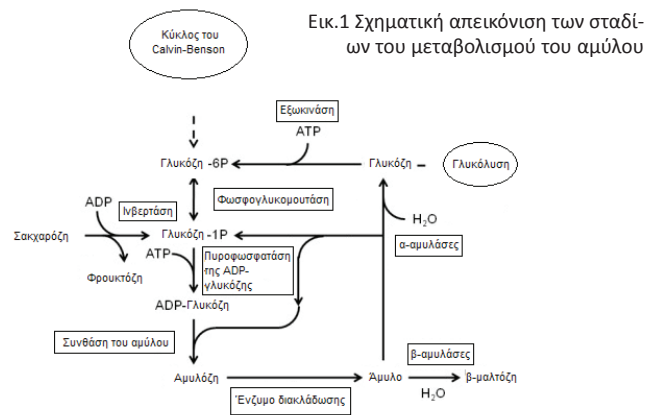
1.3 Ο καταβολισμός του αμύλου

Η ενέργεια και τα δομικά συστατικά του αμύλου είναι διαθέσιμα μόνο μετά από την διάσπαση των μορίων του αμύλου με ειδικά υδρολυτικά ένζυμα, τις αμυλάσες. Οι αμυλάσες διακρίνονται ανάλογα με τον τρόπο δράσης τους στους δεσμούς των συστατικών του αμύλου σε α-αμυλάση, β-αμυλάση και ισοαμυλάση ή R-ένζυμο (Weise et al., 2005).

Η αποδόμηση του αμύλου αρχίζει με την φωσφορυλίωση της αμυλοπηκτίνης στην επιφάνεια των αμυλόκοκκων από δύο κινάσες, τη δικινάση της γλυκάνης (Glucan Water Dikinase-GWD) και τη φωσφορική δικινάση της γλυκάνης (Phosphor Glucan Water dikinase-PWD) (Baunsgaard et al., 2005).

Η β-αμυλάση διασπά τους 1-4, α-γλυκοζιδικούς δεσμούς των πολυσακχαριτών της α-D-γλυκόζης προοδευτικά από το μη-αναγωγικό άκρο των αλυσίδων, με την απόσπαση δι-αδοχικών μορίων του δισακχαρίτη μαλτόζη μέχρι την πλήρη αποδόμηση των αλυσίδων. Η β-αμυλάση πήρε το όνομα της από την μορφή του μορίου της γλυκόζης (β-ανωμερές) στο μη-αναγωγικό άκρο της μαλτόζης την οποία απελευθερώνει κατά την υδρόλυση της (Kossmann and Lloyd, 2000). Η αμυλοπηκτίνη υδρολύεται μερικώς με την προοδευτική απόσπαση μορίων μαλτόζης από τις πλάγιες αλυσίδες μέχρι τις διακλαδώσεις. Στα σημεία διακλάδωσης υπάρχουν γλυκοζιδικοί δεσμοί τύπου 1-6, τους οποίους η β-αμυλάση αδυνατεί να διασπάσει. Κατά συνέπεια, τα προϊόντα που λαμβάνονται από την δράση της β-αμυλάσης πάνω στα συστατικά του αμύλου είναι β-μαλτόζη και οριακές δεξτρίνες (Weise et al., 2005). Οι οριακές δεξτρίνες είναι μικρά πολυμερή, τα οποία διαθέτουν τουλάχιστον ένα γλυκοζιδικό δεσμό τύπου 1-6 (Bouranis, 2009).

Η α-αμυλάση διασπά τους γλυκοζιδικούς δεσμούς πολυ-



Εικ.1 Σχηματική απεικόνιση των σταδίων του μεταβολισμού του αμύλου

μερών της α-D-γλυκόζης σε θέσεις 1-4 όπως και η β-αμυλάση, με τη διαφορά ότι δρα τυχαία. Με τη δράση της α-αμυλάσης η αμυλόζη διασπάται γρήγορα σε μόρια μικρότερου μεγέθους, τις δεξτρίνες. Με την περαιτέρω δράση του ενζύμου πάνω στα μόρια αυτά λαμβάνονται ως προϊόντα κυρίως η μαλτόζη και η μαλτοτριόζη και δευτερευόντως η γλυκόζη. Το ένζυμο αυτό δεν δρα πάνω σε δεσμούς 1-6 (Bouranis, 2009).

Το μόριο της αμυλοπηκτίνης εκτός από δεσμούς 1-4, περιέχει διακλαδώσεις οι οποίες αποτελούνται από γραμμικά πολυμερή α-D-γλυκόζης ενωμένα μεταξύ τους με δεσμούς 1-6 στους οποίους καμία από τις παραπάνω υδρολάσες δεν δρα. Οι δεσμοί 1-6 διασπώνται κυρίως από το υδρολυτικό ένζυμο ισοαμυλάση και δευτερευόντως από τις οριακές δεξτρινάσες (LDA) (Wattebled et al., 2005), επομένως με την συνδυαστική δράση των παραπάνω υδρολασών επιτυγχάνεται η πλήρης αποδόμηση του κεντρικού κορμού της αμυλοπηκτίνης και των β-οριακών δεξτρινών (Nakamura et al., 1996).

Η μαλτόζη είναι το κυριότερο προϊόν κατά την διαδικασία αποδόμησης του αμύλου εσωτερικά του χλωροπλάστη. Σχεδόν τα 2/3 του άνθρακα ο οποίος εξέρχεται από τους χλωροπλάστες κατά τις νυχτερινές ώρες είναι στη μορφή της β-μαλτόζης. Η β-μαλτόζη είναι προϊόν αποδόμησης του αμύλου ως αποτέλεσμα της δράσης των β-αμυλασών (Weise et al., 2004).

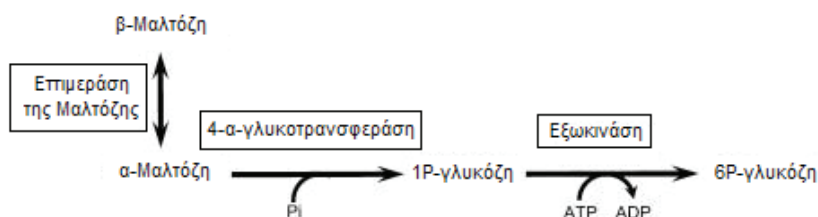
Με το που εξέλθει από το χλωροπλάστη η β-μαλτόζη μετατρέπεται στο κυτταρόπλασμα στην α-ανωμερή μορφή της με την δράση του ενζύμου της επιμεράσης της μαλτόζης* και στην συνέχεια μετατρέπεται σε 1P-γλυκόζη με την δράση του ενζύμου της 4-α-γλυκοτρανσφεράσης (Weise et al., 2004).

Σύμφωνα με την μελέτη των Weise et al. (2005), κατά τις νυχτερινές ώρες, η συγκέντρωση της α-μαλτόζης εσωτερικά του χλωροπλάστη ήταν παρόμοια με αυτή στο κυτταρόπλασμα, ενώ αντίθετα η συγκέντρωση της β-μαλτόζης εσωτερικά του χλωροπλάστη ήταν πολύ μεγαλύτερη από αυτήν στο κυτταρόπλασμα και με τις αντίστοιχες συγκεντρώσεις της α-μαλτόζης. Κατά την διάρκεια της ημέρας, η συγκέντρωση της α-μαλτόζης δεν μεταβλήθηκε σημαντικά στα παραπάνω υποκυτταρικά διαμερίσματα σε αντίθεση με την β-μαλτόζη η οποία ήταν κάτω από το όριο ανίχνευσης και στα δύο υποκυτταρικά διαμερίσματα. Επιπλέον, ακόμη και σε μεταλλαγμένα φυτά *Arabidopsis* με μικρή ικανότητα μεταβολισμού του αμύλου σε μαλτόζη (bam1, bam2, bam3, bam4) υπήρχαν χαμηλά επίπεδα μαλτόζης εκ των οποίων η κυρίαρχη μορφή ήταν η α-μαλτόζη (Weise et al., 2004). Σε αυτήν την περίπτωση, πιθανότατα η δράση κυτταροπλασματικών α-αμυλασών και συγκεκριμένα της α-αμυλάσης 3 (AMY3) η οποία φαίνεται να έχει θέση δράσης και στο εσωτερικό του χλωροπλάστη εξαιτίας της ύπαρξης ενός μεταβατικού πεπτιδίου (transit peptide) με λειτουργία πρόσδεσης στον χλωροπλάστη (Zeeman et al.,

2004), πιθανόν να συμβάλει στην παραγωγή μαλτόζης ακόμη και κατά την έλλειψη βασικών β-αμυλασών στην αποδόμηση του αμύλου (BAM1, BAM3) (Weise et al., 2005).

Η μαλτόζη για να εξέλθει από τους χλωροπλάστες στο κυτταρόπλασμα και να μεταβολιστεί σε φωσφορικές εξόζες, απαιτεί την ύπαρξη κάποιων συγκεκριμένων ενζύμων. Οι δύο πρωτεΐνες-ένζυμα, οι οποίες διαδραματίζουν κυρίαρχο ρόλο κατά την διαδικασία εξαγωγής της μαλτόζης από τον χλωροπλάστη στο κυτταρόπλασμα και της μετατροπής της σε φωσφορικές εξόζες είναι οι MEX1 και DPE2. Η θέση δράσης της τρανσφεράσης MEX1 (maltose excess 1) είναι στην επιφάνεια του χλωροπλάστη. Απουσία του μεταφορέα MEX1 σε φυτά *A. thaliana* είχε ως αποτέλεσμα την υπερσυσσώρευση της μαλτόζης στο στρώμα του χλωροπλάστη και χαμηλότερο ρυθμό αποδόμησης του αμύλου στα φύλλα (Niittyla et al., 2004; Lu et al., 2006). Το ένζυμο το οποίο φαίνεται να εμπλέκεται στην μετατροπή της μαλτόζης σε εξόζες-P είναι το κυτταροπλασματικό ένζυμο-D (DPE2) (Chia et al., 2004; Lu & Sharkey 2004). Το DPE2 έχει σχετικά μεγάλο ποσοστό ομολογίας (25%) με το αντίστοιχο ένζυμο της 4-α-γλυκοτρανσφεράσης (MalQ) (Chia et al., 2004; Lu & Sharkey 2004), το οποίο μεταβολίζει την μαλτόζη σε γλυκόζη-1P και γλυκόζη-6P στο εντεροβακτήριο, *Escherichia coli* (Boos & Shuman 1998). Τα φυτά υπό την απουσία του γονιδίου *DPE2* εμφανίζουν μικρή ανάπτυξη, μεγάλα επίπεδα μαλτόζης (>500 φορές μεγαλύτερα από τα αντίστοιχα στα αγρίου τύπου φυτά) και υψηλά επίπεδα αμύλου στα φύλλα (Chia et al., 2005).

*Μέχρι στιγμής δεν έχει βρεθεί στα φυτά κάποια συγκεκριμένη επιμεράση η οποία να έχει υψηλή εξειδίκευση ως προς την μαλτόζη, ενώ άλλες γνωστές επιμεράσεις όπως αυτή των εξοζών της γλυκόζης και της λακτόζης (aldose 1-epimerase) έχουν λίγη έως καθόλου εξειδίκευση ως προς την μαλτόζη (Weise et al., 2005).



Εικ.2 Σχηματική απεικόνιση των σταδίων του μεταβολισμού της μαλτόζης

1.5 Ο κυρίαρχος ρόλος της β-αμυλάσης στην αποδόμηση του αμύλου

Το γονιδίωμα των ανώτερων φυτών όπως αυτό του φυτού *A. thaliana* κωδικοποιεί πολλαπλές ένδο- και έξω-αμυλάσες. Πιο συγκεκριμένα, το φυτό *A. thaliana* κωδικοποιεί εννέα β-αμυλάσες και τρεις α-αμυλάσες. Στο ενδοσπέρμιο των σπόρων κατά την διαδικασία βλάστησης αυτών, οι ένδο-αμυλάσες (AMY) υδρολύουν τους 1-4, α-γλυκοζιδικούς δεσμούς εντός των πολυμερών της α-D-γλυκόζης απελευθερώνοντας στην επιφάνεια των αμυλόκοκκων διαλυτά μόρια γλυκάνης τα οποία αποτελούν υπόστρωμα για περαιτέρω καταβολισμό. Έρευνες όμως έχουν δείξει, ότι οι α-αμυλάσες επιτελούν δευτερεύοντα ρόλο στην αποδόμηση του αμύλου στα φύλλα (Streb et al., 2008; Yu et al., 2005). Πολλαπλή μετάλλαξη και στα τρία γονίδια

της α-αμυλάσης (AMY1, AMY2, AMY3) δεν απέφερε καμία ουσιαστική μεταβολή στα φυσιολογικά επίπεδα αποδόμησης του αμύλου στα φύλλα (Yu et al, 2005). Ενώ αντίθετα σίγηση σε ένα από τα τέσσερα γονίδια που κωδικοποιούν β-αμυλάσες με θέση δράσης στον χλωροπλάστη (BAM3 ή CT-BMY) στο φυτό *A. thaliana*, είχε ως αποτέλεσμα υψηλά επίπεδα αμύλου στα φύλλα κατά τις βραδινές ώρες και σημαντική μείωση στα επίπεδα της μαλτόζης κυρίως κατά τις πρώτες βραδινές ώρες (Scheidig et al., 2002; Zeeman et al., 1998a). Επομένως, η β-αμυλάση φαίνεται να επιτελεί κυρίαρχο ρόλο στην υδρόλυση του αμύλου και την παραγωγή της β-μαλτόζης εντός του χλωροπλάστη (Weise et al., 2005).

1.6 Το φυτό *Arabidopsis thaliana* κωδικοποιεί πολλαπλές β-αμυλάσες

Στο φυτό *A. thaliana* έχουν βρεθεί εννέα γονίδια που κωδικοποιούν β-αμυλάσες στα οποία οι Smith et al. (2004) έδωσαν μία ενιαία ονοματολογία BAM1-BAM9. Σύμφωνα με φυλογενετική ανάλυση η οποία πραγματοποιήθηκε από τους Fulton et al. (2008) στη συντηρημένη υπομονάδα της γλυκοσιδικής υδρολάσης των εννέα γονιδίων διαχώρισε τα γονίδια σε τέσσερις επιμέρους υποοικογένειες. Στην υποοικογένεια I εμπεριέχονται οι β-αμυλάσες BAM5 και BAM6, εξαιτίας του γεγονότος ότι ανοδικά και καθοδικά των δύο γονιδίων υπάρχουν συντηρημένες χρωμοσωμικές περιοχές, πράγμα το οποίο οδήγησε τους επιστήμονες να συμπεράνουν ότι πρόκειται για παράλογα γονίδια, γονίδια δηλαδή τα οποία προήλθαν από την διπλοποίηση μίας συγκεκριμένης χρωμοσωμικής περιοχής εντός του ίδιου γονιδιώματος. Στην Υποοικογένεια II εμπεριέχονται οι β-αμυλάσες BAM1 και BAM3, οι οποίες χαρακτηρίζονται για τις καταλυτικά ενεργές υπομονάδες και για το πεπτίδιο οδηγητή με θέση πρόσδεσης στον χλωροπλάστη (Lao et al., 1999; Sparla et al., 2006). Και οι δύο πρωτεΐνες έχουν ορθόλογα γονίδια σε άλλα φυτά όπως το ρύζι (*Oryza sativa*) και την λεύκα (*Populus sp.*). Στην υποοικογένεια III υπάγονται οι πρωτεΐνες BAM4 και BAM6 οι οποίες αποκλίνουν πολύ περισσότερο από τις β-αμυλάσες των προηγούμενων υποοικογενειών. Τέλος, οι πρωτεΐνες BAM2,-7, και -8 εμπεριέχονται στην υποοικογένεια IV. Τα συγκεκριμένα γονίδια διαφέρουν ως προς τα 5' και 3' άκρα ως αποτέλεσμα της μεταβολής στη χρωμοσωμική δομή (γεγονότα ένθεσης, διαγραφής μετάθεσης κ.α.), αυτό εξηγεί και το γεγονός ότι το BAM2 έχει πεπτίδιο οδηγητή με θέση πρόσδεσης στον χλωροπλάστη στο N-τελικό άκρο σε αντίθεση με τα άλλα δύο. Τα γονίδια BAM2 και BAM7 θεωρούνται επίσης παράλογα, καθώς φαίνεται να έχουν προκύψει από πρόσφατη διπλοποίηση ενός συγκεκριμένου γενετικού τόπου εντός του ίδιου γονιδιώματος. Τα παραπάνω δεδομένα επαληθεύτηκαν με την πραγματοποίηση φυλογενετικής ανάλυ-

σης μεταξύ εσονίων και εξονίων τα οποία βρίσκονται ανοδικά και καθοδικά των υπό εξέταση γονιδίων (Fulton et al., 2005).

Από τα εννέα γονίδια τα οποία κωδικοποιούν β-αμυλάσες στο φυτό *A. thaliana*, τα τέσσερα έχουν θέση δράσης στο χλωροπλάστη (BAM1, -2, -3, -4) (Fulton et al., 2008), ενώ οι πρωτεΐνες BAM7 και BAM8 έχουν θέση δράσης στον πυρήνα (Reinhold et al., 2011). Το τελευταίο σε συνδυασμό με την υψηλή ομολογία των N-τελικών άκρων τους με μεταγραφικούς παράγοντες όπως τον BZR1 (Brassinazole Resistant1), στον οποίο δεσμεύονται τα μπρασινοστεροειδή, εξηγεί και τον ρόλο τους στην θετική και αρνητική ρύθμιση συγκεκριμένων γονιδίων που εμπλέκονται στην ανάπτυξη των φυτών (Reinhold et al., 2011). Η β-αμυλάση3 (BAM3) φαίνεται να κατέχει κυρίαρχο ρόλο στην αποδόμηση του αμύλου, καθώς σίγηση του συγκεκριμένου γονιδίου είχε ως αποτέλεσμα φαινοτυπικές αλλαγές που σχετίζονται με συσσώρευση του αμύλου στα φύλλα και χαμηλά επίπεδα β-μαλτόζης κατά τις βραδινές ώρες. Το γονίδιο BAM1 φαίνεται να κατέχει και αυτό σημαντικό ρόλο στην αποδόμηση του αμύλου σε β-μαλτόζη, όχι όμως στα επίπεδα του BAM3. Σίγηση του γονιδίου BAM1 δεν επηρέασε σημαντικά την αποδόμηση του αμύλου στα φύλλα, όμως διπλή μετάλλαξη στα γονίδια BAM1/BAM3 είχε ως αποτέλεσμα την αύξηση της έντασης των φαινοτυπικών αλλαγών που σχετίζονται με την αποδόμηση του αμύλου στα φύλλα. Ο ρόλος του γονιδίου BAM2 παραμένει άγνωστος, καθώς σίγηση του συγκεκριμένου γονιδίου σε συνδυασμό και με άλλες ταυτόχρονες μεταλλάξεις στα διάφορα BAMs δεν επηρέασε τον φαινότυπο. Το γονίδιο BAM4 ενώ κατέχει υπομονάδα γλυκοσιδικής υδρολάσης είναι καταλυτικά ανενεργό εξαιτίας μίας αντικατάστασης στο αμινοξύ 380 (Glu-Arg). Παρ' όλα αυτά σίγηση του συγκεκριμένου γονιδίου έχει αρνητική επίπτωση ως προς τον μεταβολισμό του αμύλου (Fulton et al., 2008).

1.7 β-αμυλάση 1 (BAM1) και β-αμυλάση 3 (BAM3)

Οι πρωτεΐνες BAM1 και BAM3 αν και ισοένζυμα (καταλύουν την υδρόλυση των 1-4, α-γλυκοζιδικών δεσμών εντός των πολυμερών γλυκόζης) φαίνεται να κατέχουν διαφορετικό ρόλο ως προς την υδρόλυση του αμύλου εντός των χλωροπλαστών. Αυτή η υπόθεση επιβεβαιώνεται από το γεγονός ότι οι δύο πρωτεΐνες συσσωρεύονται σε διαφορετικές συνθήκες. Πιο συγκεκριμένα, η πρωτεΐνη BAM3 υπερεκφράζεται σε συνθήκες παγετού (Kreps et al., 2002; Kaplan and Guy, 2005), ενώ η έκφραση του γονιδίου *BAM1* επάγεται κυρίως υπό συνθήκες ωσμωτικής και οξειδωτικής καταπόνησης και υψηλών θερμοκρασιών. Το τελευταίο ίσως να συνδέεται με το γεγονός ότι η πρωτεΐνη BAM1 ενεργοποιείται μέσω της θειορεδοξίνης (Sparla et al., 2006), και η ρύθμιση της έκφρασης της συνδέεται με τις οξειδοαναγωγικές μεταβολές στο στρώμα του χλωροπλάστη ως αποτέλεσμα της φωτοσυνθετικής αλυσίδας μεταφοράς ηλεκτρονίων μέσω του δότη ηλεκτρονίων φερρεδοξίνη (Buchanan and Balmer, 2005).

Επιπλέον, η έκφραση των δύο πρωτεϊνών φαίνεται να μεταβάλλεται ανάλογα με τον τύπο του ιστού και των επιμέρους κυττάρων. Σε μεταλλαγμένες σειρές στις οποίες είχε αποσιωπηθεί το γονίδιο *BAM1* βρέθηκε συσσωρευμένο άμυλο στα καταφρακτικά κύτταρα των στοματίων

(Valerio et al., 2011). Με βάσει τις προηγούμενες παρατηρήσεις, υποστηρίζεται ότι η δράση της β-αμυλάσης 1 ως προς την αποδόμηση του αμύλου, λαμβάνει χώρα κατά την διάρκεια της ημέρας, παρέχοντας σκελετούς άνθρακα για την παραγωγή μηλικού οξέος και σακχαρόζης τα οποία εμπλέκονται στην εισροή και την εκροή ιόντων K^+ στα καταφρακτικά κύτταρα κατά τη διαδικασία της ρύθμισης του ανοίγματος των στοματίων (Valerio et al., 2011). Το τελευταίο ίσως να εξηγεί και το γεγονός ότι τα επίπεδα έκφρασης του *BAM1* επηρεάζονται από αβιοτικούς παράγοντες όπως ωσμωτική καταπόνηση, υψηλές θερμοκρασίας και συνθήκες ξηρασίας, παράγοντες οι οποίοι έχουν άμεση σχέση με το άνοιγμα και το κλείσιμο των στοματίων ως απόκριση του φυτού σε συνθήκες καταπόνησης (Kaplan and Guy, 2004; Maruyama et al., 2009; Valerio et al., 2011). Σύμφωνα με τα παραπάνω δεδομένα είναι εμφανής ο πιθανός δευτερογενής ρόλος των β-αμυλασών BAM1 και BAM3 στην συσσώρευση ωσμωρυθμιστικών, κρυσταλλικών και θερμοανεκτικών μορίων τα οποία πιθανόν να προέρχονται από τον μεταβολισμό της μαλτόζης (Kaplan and Guy, 2005; Kaplan et al., 2006; Kempa et al., 2008; Sicher, 2011).

1.8 β-αμυλάση 2 (BAM2)

Το γονίδιο *BAM2* επίσης κωδικοποιεί μία β-αμυλάση με θέση δράσης στον χλωροπλάστη, αλλά αντίθετα με τις υπόλοιπες β-αμυλάσες με θέση δράσης στο στρώμα του χλωροπλάστη (*BAM1* - 4) δεν φαίνεται να συμβάλει ουσιαστικά στην υδρόλυση του αμύλου όπως και στην συνολική ενζυμική δραστηριότητα των β-αμυλασών (Fulton et al., 2008; Li et al., 2009). Σύμφωνα με τους Li et al. (2009), η χαμηλή ενζυμική δραστηριότητα της πρωτεΐνης BAM2 πιθανόν να οφείλεται στη μειωμένη εξειδίκευση της με τα μόρια του αμύλου και στην χαλαρή πρόσδεση της με τις

διάφορες γλυκάνες εξαιτίας της ένθεσης τεσσάρων αμινοξέων που έχει υποστεί σε μία φουρκέτα αμινοξέων γειτονικά του ενεργού κέντρου της. Ενώ οι Fulton et al. (2008) υποστηρίζουν ότι το γονίδιο *BAM2* έχει υποστεί μία σημειακή διαγραφή νουκλεοτιδίου ή κωδικονίου η οποία είχε ως αποτέλεσμα την δημιουργία ενός πεπτιδίου οδηγητή με θέση πρόσδεσης στον χλωροπλάστη, γεγονός το οποίο διαφοροποιεί την BAM2 σε σχέση με τις υπόλοιπες β-αμυλάσες BAM7 και BAM8 της ίδιας υποοικογένειας ως προς το N-τελικό άκρο.

1.9 β-αμυλάση 4 (BAM4)

Το γονίδιο *BAM4* επιτελεί σημαντικό ρόλο στην αποδόμηση του αμύλου, καθώς μεταλλαγμένες σειρές στο συγκεκριμένο γονίδιο εμφανίζουν φαινοτύπους με συσσωρευμένο άμυλο στα φύλλα και μειωμένα επίπεδα μαλτόζης κατά τις βραδινές ώρες. Σύμφωνα με τη μελέτη των Fulton et al. (2008) υποστηρίζεται ότι το γονίδιο *BAM4* δεν

έχει ενεργή καταλυτική δράση αλλά συμβάλει ενεργά στον έλεγχο και στην επαγωγή της αποδόμησης του αμύλου πιθανότατα ως συμπαράγοντας άλλων ενεργών β-αμυλασών ή ως υπομονάδα μίας ενεργά καταλυτικής πολυπρωτεΐνης περιέχοντας άλλες ενεργές υπομονάδες με δράση β-αμυλάσης (BAMs).

2. Αλληλεπίδραση Παθογόνου-Ξενιστή

Τα φυτά έρχονται μονίμως σε επαφή με μία πληθώρα μικροοργανισμών συμπεριλαμβανομένων ιών, μυκήτων, βακτηρίων και ωομυκήτων. Παρ' όλα αυτά η πλειοψηφία όλων των δυνητικά επικείμενων μολύνσεων οδηγεί σε αποφυγή ευπάθειας από την μεριά των φυτών ξενιστών, με αποτέλεσμα η επιτυχής μόλυνση του φυτού ξενιστή από ένα φυτοπαράσιτο να αποτελεί περισσότερο εξαίρεση παρά κανόνας.

Στην περίπτωση των μυκήτων, γνωρίζουμε ότι λιγότερο από το 2% του συνόλου των 100.000 ειδών μυκήτων που υπάρχουν είναι σε θέση να πραγματοποιήσουν επιτυχή μόλυνση. Το υπόλοιπο ποσοστό αποτελείται από συμβιωτικά είδη (μυκόριζες) και σαπροφυτικά είδη τα οποία συμβάλουν στην αποδόμηση της νεκρής φυτικής ύλης. Από τους φυτοπαθογόνους μικροοργανισμούς μόνο ένα μικρό ποσοστό είναι σε θέση να μολύνει μεγάλο εύρος ξενιστών, ενώ το μεγαλύτερο ποσοστό μπορεί να προκαλέσει ασθένεια

μόνο σε ένα μικρό εύρος ξενιστών (Dodds et al., 2009).

Η συνεχής συνεξελικτική πορεία μεταξύ του συστήματος των φυτών-ξενιστών και των φυτοπαθογόνων μικροοργανισμών οδήγησε στη δημιουργία ενός πολύπλοκου και ποικιλόμορφου συστήματος αλληλεπίδρασης παθογόνου-ξενιστή. Από τη μεριά των φυτών-ξενιστών έχουν αναπτυχθεί πολύπλοκοι μηχανισμοί αναγνώρισης των παθογόνων αλλά και στρατηγικές άμυνας έναντι επικείμενων προσβολών ή καταστολή προουπαρχουσών προσβολών (εναπόθεση καλλόζης, αντίδραση υπερευαισθησίας, κ.α.). Από την άλλη μεριά, οι παθογόνοι μικροοργανισμοί έχουν αναπτύξει μηχανισμούς έτσι ώστε να μην γίνονται αντιληπτοί από τα φυτά ξενιστές με σκοπό να παρακάμπτουν την διέγερση λανθανόντων μηχανισμών άμυνας του φυτού και την παραγωγή αντιμικροβιακών ουσιών (φυτοαλεξίνες, πρωτεΐνες παθογενέσεως, κ.α.) (Dodds et al., 2009).

2.1 Σχέσεις παρασιτισμού μεταξύ των παθογόνων και των ξενιστών τους

Βιοτροφικά παθογόνα

Οι φυτοπαθογόνοι μικροοργανισμοί ανάλογα με την ταχύτητα εκδήλωσης της μολυσματικής τους ικανότητας διαφοροποιούνται σε δύο μεγάλες κατηγορίες, στα βιοτροφικά και τα νεκροτροφικά παθογόνα.

Τα βιοτροφικά παθογόνα χαρακτηρίζονται από την αποίκιση ζωντανών φυτικών ιστών αποφεύγοντας την ταχεία νέκρωση των κυττάρων του ξενιστή ενώ ταυτόχρονα λειτουργούν υπονομευτικά ως προς αυτόν μεταβάλλοντας ποικίλες λειτουργίες του (Vleeshouwers and Oliver, 2013). Έτσι με αυτόν τον τρόπο, τα βιοτροφικά παθογόνα εγκαθίστανται στα υγιή κύτταρα του ξενιστή χωρίς να γίνεται αντιληπτή η παρουσία τους από το φυτό, καταστέλλοντας αμυντικούς μηχανισμούς του φυτού οι οποίοι καθιστούν δύσκολη μέχρι και αδύνατη την περαιτέρω εξάπλωση του παθογόνου σε γειτονικά κύτταρα, ιστούς ή όργανα του ξενιστή (Gan et al., 2008). Οι βιοτροφικοί μύκητες σχηματίζουν εξειδικευμένες κατασκευές επικοινωνίας με τα κύτταρα του ξενιστή (μυζητήρες), ενώ περιορίζονται σε μικρό κύκλο ξενιστών. Επιπλέον, έχουν την ικανότητα να διεισδύουν στα κύτταρα και τους μεσοκυττάρους χώρους απευθείας ή μέσω φυσικών ανοιγμάτων (υδατώδη, στομάτια, κ.α.) (Τζάμος, 2007).

Υπάρχουν όμως και περιπτώσεις παθογόνων τα οποία

στερούνται εξειδικευμένων κατασκευών επικοινωνίας με τα κύτταρα του ξενιστή (μυζητήρες) και ταυτόχρονα εκκρίνουν δευτερογενείς μεταβολίτες με φυτοτοξική και κυτταρολυτική δράση, αλλά υπάγονται στην κατηγορία των βιοτροφικών παθογόνων, εξαιτίας του γεγονότος ότι η ανάπτυξη τους περιορίζεται στους μεσοκυττάρους χώρους χωρίς να προκαλούν ταχεία νέκρωση των προσβεβλημένων ιστών (Collemare et al., 2014; Griffiths et al., 2015). Μία τέτοια περίπτωση είναι αυτή του μύκητα *Cladosporium fulvum*, παθογόνο αίτιο της ασθένειας της κλαδοσπορίωσης στην τομάτα το οποίο στερείται μυζητήρες αλλά αναπτύσσεται κυρίως στον αποπλάστη καταστέλλοντας ταυτόχρονα την ενεργοποίηση της άμυνας και την δράση χιτινασών και πρωτεασών εκκρίνοντας μολυσματικούς παράγοντες/τελεστές (Ecr6 και Avr4) (van Esse et al., 2007; van den Burg et al., 2006).

Στα βιοτροφικά παθογόνα ανήκουν ιοί, μύκητες οι οποίοι ανήκουν κυρίως στα φύλλα των Βασιδιομυκήτων (Σκωριάσεις) και των Ασκομυκήτων (Ωίδια, *Cladosporium fulvum* κ.α.), όπως επίσης και ωομύκητες που ανήκουν κυρίως στην τάξη *Peronosporales* (Περονόσποροι) με εξαίρεση είδη που ανήκουν στα γένη *Phytophthora* και *Pythium* (Vleeshouwers and Oliver, 2013).

Νεκροτροφικά παθογόνα

Ο νεκροτροφισμός χαρακτηρίζεται από την ταχύτατη νέκρωση των κυττάρων του ξενιστή ως αποτέλεσμα της ικανότητας παραγωγής κυτταρολυτικών τοξινών και υψηλών επιπέδων ενεργών μορφών οξυγόνου (reactive oxygen species-ROS), ικανές να προκαλέσουν κυτταρικό θάνατο στον ξενιστή (Vleeshouwers and Oliver, 2013). Τα νεκροτροφικά παράσιτα είναι ευκαιριακά παθογόνα τα οποία χαρακτηρίζονται από την ικανότητα τους να πραγματοποιούν μόλυνση σε μεγάλο εύρος ξενιστών και να επιβιώνουν ως σαπρόφυτα μακράν των ξενιστών τους. Σε αντίθεση με τα βιοτροφικά παθογόνα, τα νεκροτροφικά παράσιτα διαθέτουν λιγότερο εξειδικευμένες κατασκευές επικοινωνίας με τα κύτταρα του ξενιστή, ενώ η είσοδος τους στα κύτταρα του ξενιστή περιορίζεται κυρίως από φυσικά ανοίγματα ή πληγές (Τζάμος, 2007).

Στα νεκροτροφικά παθογόνα ταξινομούνται γένη βακτηρίων, μυκήτων και ωομυκήτων τα οποία έχουν επιθετικές στρατηγικές παθογένεσης προκαλώντας εκτεταμένη νέκρωση και σήψη ιστών. Τα νεκροτροφικά παθογόνα για να προκαλέσουν ασθένεια εκκρίνουν παράγοντες παθογένειας συμπεριλαμβανομένων φυτοτοξινών, κυτταρολυτικών ενζύμων και άλλων εξωκυτταρικών ενζύμων στους ιστούς του ξενιστή πριν αλλά και κατά την διάρκεια της αποίκισης, με αρχικό στάδιο αυτό του σχηματισμού νεκρωτικών κηλίδων. Ενώ αντίθετα, τα βιοτροφικά παθογόνα χρησιμοποιούν πολύπλοκες στρατηγικές παρασιτισμού ως αποτέλεσμα της συνεξελικτικής τους πορείας με τους ξενιστές τους, για να κατευθύνουν τις κυτταρικές λειτουργίες αυτών, ως προς το όφελος τους, διατηρώντας ταυτόχρονα μία συνεχή ισορροπία μεταξύ μολυσματικότητας και αποφυγή ανίχνευσης της παρουσίας τους από το φυτό ξενιστή (Alfano and Collmer, 1996; Walton, 1996).

Η μόλυνση του ξενιστή από ένα νεκροτροφικό παθογόνο περιλαμβάνει τα στάδια της επαφής του σπορίου με τον ξενιστή, της βλάστησης των σπορίων, της διείσδυσης του μύκητα στο εσωτερικό του ξενιστή, του πρώιμου σχηματισμού νεκρωτικής κηλίδας, της επέκτασης της κηλίδας, της σήψης των ιστών με τελικό στάδιο αυτό της σποροποίησης του μύκητα (Prins et al., 2000). Η διάτρηση της φυτικής επιφάνειας και η διείσδυση του μύκητα στο εσωτερικό του ξενιστή επιτυγχάνεται μέσω διαφόρων ενεργών μηχανισμών, όπως αυτόν του σχηματισμού της πλάκας συγκρατήσεως (appressorium) συνοδευόμενη από την έκκριση διαφόρων πηκτινολυτικών και κυτταρολυτικών ενζύμων ή παθητικά μέσω πληγών και φυσικών ανοιγμάτων (Prins et al., 2000). Μετά την είσοδο του ο μύκητας εκκρίνει περαιτέρω λυτικά ένζυμα σε συνδυασμό με υψηλά επίπεδα ενεργών ριζών οξυγόνου (ROS) για αποδιοργάνωση της κυτταρικής συνοχής και αποσύνθεση των ιστών. Πολλά νεκροτροφικά παθογόνα παράγουν ποικίλες φυτοτοξίνες μικρού μοριακού βάρους, οι οποίες μπορεί να είναι εξειδικευμένες ή μη ως προς το είδος του ξενιστή, συμβάλλοντας στη μολυσματικότητα του παθογόνου (van Kan, 2006). Κατά την διάρκεια

της μόλυνσης, πολλοί νεκροτροφικοί μύκητες μεταβάλουν τα επίπεδα φυτοορμονών του ξενιστή ή εκκρίνουν μολυσματικούς παράγοντες οι οποίοι μιμούνται την δράση των φυτοορμονών που εμπλέκονται στον έλεγχο της ενεργής άμυνας των φυτών (Prins et al., 2000; Sharon et al., 2004), ενώ άλλοι έχουν την ικανότητα να αποτοξικοποιούν τα κύτταρα τους από τοξικούς μεταβολίτες του ξενιστή (π.χ. χιτινάσες) (Morrissey and Osbourn, 1999).

Τα βακτήρια ακολουθούν παρόμοιο μηχανισμό παθογένεσης με τους νεκροτροφικούς μύκητες, εκκρίνοντας μολυσματικούς παράγοντες εσωτερικά των κυττάρων του ξενιστή, προκαλώντας νέκρωση και αποικισμό των νεκρών ιστών του ξενιστή (Alfano and Collmer, 1996). Κάποιοι από αυτούς τους μολυσματικούς παράγοντες είναι πηκτινοπλυτικά ένζυμα, φυτοτοξίνες και πρωτεΐνες που επάγουν νέκρωση και σήψη ιστών (Alfano and Collmer, 1996; Pemberton and Salmond, 2004).

Ημιβιοτροφικά παθογόνα

Υπάρχουν παθογόνα, τα οποία κατά τα πρώτα στάδια εγκατάστασης τους αναπτύσσουν μία βιοτροφική σχέση με τον ξενιστή τους, η οποία σε μεταγενέστερα στάδια μόλυνσης είναι όμοια περισσότερο με αυτή των νεκροτροφικών παθογόνων (Vleeshouwers and Oliver, 2013). Τα συγκεκριμένα παθογόνα καλούνται ημιβιοτροφικά, καθώς διαθέτουν χαρακτηριστικά και από τις δύο κατηγορίες παρασιτισμού (Vleeshouwers and Oliver, 2013).

Χαρακτηριστικό παράδειγμα ημιβιοτροφικού παρασίτου είναι ο ωομύκητας *Phytophthora infestans* ο οποίος προκαλεί την ασθένεια του περονόσπορου στην τομάτα και την πατάτα. Ο ωομύκητας *P. infestans* είναι ημιβιοτροφικό παράσιτο, καθότι διαθέτει μυζητήρες, όμως σε προχωρημένα στάδια μόλυνσης προκαλεί σήψεις ιστών και οργάνων. Εναλλακτικές περιπτώσεις ημιβιοτροφικών παρασίτων είναι μύκητες και βακτήρια τα οποία κατά τα πρώτα στάδια ανάπτυξής τους περιορίζονται στο χώρο μεταξύ εφυμενίδας και επιδερμικών κυττάρων ή στους μεσοκυττάρους χώρους χωρίς να προκαλούν ορατά συμπτώματα. Σε μεταγενέστερα στάδια όμως, προκαλούν χλωρώσεις και νεκρώσεις σε προσβεβλημένους ιστούς και όργανα του ξενιστή. Χαρακτηριστικά παραδείγματα παρασίτων που ακολουθούν την τακτική της τελευταίας περίπτωσης είναι μύκητες οι οποίοι προκαλούν εφυμενιδώσεις όπως ο *Spilocaea romi* και βακτήρια που ανήκουν στο είδος *Pseudomonas syringae* (Τζάμος, 2007).

3. Μηχανισμοί Άμυνας των Φυτών Έναντι Παθογόνων Μικροοργανισμών

3.1 Παθητική άμυνα των φυτών

Η άμυνα των φυτών έναντι παθογόνων μικροοργανισμών περιλαμβάνει προϋπάρχων στρατηγικές φυσικών και βιοχημικών διεργασιών, όπως επίσης και επαγόμενα βιοχημικά μονοπάτια βιοσύνθεσης αντιμικροβιακών παραγόντων. Τα επιδερμικά κύτταρα και το κυτταρικό τοίχωμα των φυτών παρέχουν παθητική προστασία στα φυτά έναντι επικείμενων προσβολών από παθογόνα αίτια κατά τα αρχικά στάδια εγκατάστασής τους (Sanabria et al., 2010).

Παράγοντες παθητικής άμυνας αποτελούν στοιχεία του κυτταρικού τοιχώματος και των επιδερμικών κυττάρων τα

οποία καθιστούν δύσκολη την πρόσφυση και την προσκόλληση ενός παθογόνου στην επιφάνεια του ξενιστή καθώς επίσης και την είσοδο ενός παθογόνου στους εσωτερικούς ιστούς των οργάνων (Laluk and Mengiste, 2010). Σε αυτά επάγονται οι φυσικές κηρώδεις ουσίες που καλύπτουν την επιφάνεια των υπέργειων οργάνων, η εφυμενίδα, το πάχος και η σύσταση του κυτταρικού τοιχώματος και της ενδοδερμίδας σε ληγνίνη, τα στομάτια και τα επιφανειακά τριχίδια (Τζάμος, 2007).

3.2 Ενεργοί Μηχανισμοί Άμυνας

3.2.1 Ιστολογικοί Μηχανισμοί Αντοχής

Εκτός όμως από τα παραπάνω, το κυτταρικό τοίχωμα και τα επιδερμικά κύτταρα των φυτών ταυτόχρονα παρέχουν ένα μεγάλο αριθμό υποδοχέων που αντιλαμβάνονται εξωγενούς φύσεως διεγέρτες οι οποίοι σηματοδοτούν την διέγερση ιστολογικών αλλά και βιοχημικών μονοπατιών αμυντικής φύσεως (Laluk and Mengiste, 2010). Στους ιστολογικούς μηχανισμούς αντοχής επάγονται η εναπόθεση λιγνίνης στο κυτταρικό τοίχωμα γύρω από το σημείο προσβολής, η εναπόθεση καλλόζης στις θέσεις διεισδύσεων των μυκηλιακών υφών, η δημιουργία τυλώσεων στις ηθμαγγειώδεις δεσμίδες και η φελλοποίηση κυττάρων σε θέσεις πληγών (Τζάμος, 2007).

3.2.2 Βιοσυνθετικά μονοπάτια αντιμικροβιακών ενώσεων

i. Φυτοαλεξίνες

Στα βιοχημικά μονοπάτια κατατάσσεται η βιοσύνθεση φυτοαλεξινών και πρωτεϊνών παθογενέσεως (Pathogenesis Related Proteins, PR-proteins) ως απόκριση του φυτού-ξενιστή σε βιοτικούς και αβιοτικούς παράγοντες καταπόνησης.

Οι φυτοαλεξίνες είναι ενώσεις χαμηλού μοριακού βάρους οι οποίες συντίθενται μέσω του βιοσυνθετικού μονοπατιού των φαινυλπροπανοειδών και συσσωρεύονται στα φυτικά κύτταρα είτε ως αποτέλεσμα μόλυνσεως από φυτοπαθογόνους μικροοργανισμούς είτε ως απόρροια επιδράσεως χημικών ή άλλης φύσεως μη παρασιτικών αιτιών (π.χ. μηχανική καταπόνηση). Πρόκειται για δευτερογενείς μεταβολίτες που αποτελούν σημαντικότατο συ-

στατικό του φυτικού αμυντικού δυναμικού. Πάνω από 300 φυτοαλεξίνες έχουν ταυτοποιηθεί και χαρακτηριστεί, ενώ οι περισσότερες από αυτές είναι ουσίες οι οποίες επάγονται στις ομάδες των φλαβονοειδών και συσκετερεπινών (Ahuja et al., 2012).

Η αμμωνιο-λυάση της φαινυλαλανίνης (phenylalanine ammonia lyase, PAL) και η συνθετάση της χαλκόνης (chalcone synthase, CHS) είναι δύο ένζυμα κλειδιά στη σύνθεση φυτοαλεξινών. Η PAL είναι το πρώτο ένζυμο του μονοπατιού των φαινυλπροπανοειδών. Μετατρέπει τη φαινυλαλανίνη σε κινναμικό οξύ, το οποίο είναι πρόδρομη ένωση για ένα μεγάλο αριθμό φαινολικών ουσιών που περιλαμβάνουν τη λιγνίνη, τις ταννίνες και τις φυτοαλεξίνες. Η CHS είναι το πρώτο ένζυμο του σκέλους που παράγει φλαβονοειδή και ισοφλαβονοειδή, από το οποία προέρχονται φυτοαλεξίνες όπως η γλυκεολίνη και η μεντικαρπίνη (Ridge, 2005).

Οι φυτοαλεξίνες είναι αντιβιοτικά μικρής δραστηριότητας και χαμηλής εξειδίκευσης. Μπορεί να είναι αποτελεσματικά έναντι βακτηρίων και κυρίως μυκήτων (Ahuja et al., 2012). Ο αριθμός, η φυσική, αλλά και η χημική ανομοιομορφία των παραγόντων που μπορεί να δράσουν ως διεγέρτες των μηχανισμών συνθέσεως των φυτοαλεξινών είναι σήμερα τεράστιος. Στον κατάλογο περιλαμβάνονται ουσίες, όπως ανόργανα άλατα, ολιγογλυκάνες (γλυκάνες, μαννάνες), αιθυλένιο, ακόρεστα λιπαρά οξέα, ολιγομερή της χιτοζάνης κ.α.. Πάνω από 200 ενώσεις, μικροοργανισμοί ή φυσιολογικές καταπονήσεις έχουν αναφερθεί ως διεγέρτες της πρισσατίνης, της φασειολίνης, της κιβιτόνης και της γλυκεολίνης. Επιπλέον συστατικά των ίδιων των φυτών μπορούν να δράσουν ως ενδογενείς διεγέρτες. Μυκητοκτόνα, όπως τα βενζιμιδιαζολικά, χαμηλές θερμοκρασίες, υπεριώδης ακτινοβολία, προκαλούν επίσης συσσώρευση των φυτοαλεξινών. Είναι ως εκ τούτου πιθανότερο

η σύνθεση και η συσσώρευση των φυτοαλεξινών να είναι αποτέλεσμα μεταβολικής διαταραχής και όχι της χημικής σύστασης των διεγερτών (Τζάμος, 2007).

ii. Πρωτεΐνες Παθογενέσεως (PR-proteins)

Τα φυτά συσσωρεύουν στα κύτταρα τους πολλές κατηγορίες πρωτεϊνών παθογενέσεως ως αποτέλεσμα προσβολών από παθογόνους μικροοργανισμούς ή αβιοτικών παραγόντων καταπονήσεως. Μέχρι στιγμής, έχουν καταγραφεί 17 οικογένειες πρωτεϊνών παθογενέσεως οι οποίες περιλαμβάνουν αντιμυκητιακές πρωτεΐνες (χιτινάσες), παρεμποδιστές πρωτεασών, ντιφενσίνες (defensins) και άλλα μικρά πεπτίδια που εμπλέκονται στην ενεργή άμυνα του φυτού (Van Loon and Van Strien, 1999; van Loon et al., 2006a).

Οικογένεια PR-1

Η οικογένεια PR-1 έχει μελετηθεί εκτενώς σε σχέση με τις υπόλοιπες πρωτεΐνες παθογενέσεως ως προς τη συσχέτιση τους στην επαγόμενη διασυστηματική άμυνα. Η έκφραση των πρωτεϊνών PR-1 επιτυγχάνεται μέσω της σηματοδότησης του μονοπατιού του σαλικυλικού οξέος, ενώ η έκφραση τους είναι συνδεδεμένη με την ανθεκτικότητα έναντι βιοτροφικών και ημιβιοτροφικών παθογόνων (Veronese et al., 2004). Παρ' όλα αυτά αυξημένα επίπεδα έκφρασης του PR-1 έχουν παρατηρηθεί κατά τα πρώτα στάδια προσβολής από νεκροτροφικά παθογόνα αίτια (*B. cinerea*, *Alternaria brassicicola* και *Plectosphaerella cucumerina*). Τα υψηλά επίπεδα έκφρασης του PR-1, σχετίζονται με αύξηση της ευπάθειας των φυτών ξενιστών στην περίπτωση προσβολών από νεκροτροφικά παθογόνα. Πιο συγκεκριμένα, το μονοπάτι του σαλικυλικού οξέος λειτουργεί ανταγωνιστικά έναντι των μονοπατιών του ιασμονικού οξέος και του αιθυλενίου, τα οποία ευθύνονται για αύξηση της ανθεκτικότητας του ξενιστή έναντι προσβολών από νεκροτροφικά παθογόνα. Επομένως αύξηση των ενδογενών επιπέδων του σαλικυλικού οξέος έχει ως αποτέλεσμα την καταστολή των επιπέδων έκφρασης των πρωτεϊνών παθογενέσεως των οποίων η έκφραση τους ελέγχεται από τα μονοπάτια του ιασμονικού οξέος και του αιθυλενίου. Αντίστοιχα όμως, και τα μονοπάτια του ιασμονικού οξέος και του αιθυλενίου καταστέλλουν το αντίστοιχο μονοπάτι του σαλικυλικού οξέος, ενδογενής αύξηση των επιπέδων του ιασμονικού οξέος και του αιθυλενίου λειτουργούν κατασταλτικά ως προς την επαγωγή της έκφρασης του PR1. Πολλά παθογόνα εκμεταλλεύονται τον ενδογενή ανταγωνισμό μεταξύ των μονοπατιών άμυνας που σχετίζονται με τις παραπάνω φυτοορμόνες εκκρίνοντας μολυσματικούς παράγοντες οι οποίοι μιμούνται τον τρόπο δράσης μίας φυτοορμόνης για να καταστείλουν την συσσώρευση της άλλης (Laluk and Mangiste, 2010).

β-1,3-γλουκανάσες (PR2)

Πολλοί ερευνητές υποστηρίζουν ότι οι χιτινάσες δρουν συνεργιστικά με τις β-1,3-γλουκανάσες (PR2), κι αυτό γιατί δεν είναι ικανές να αποδυναμώσουν από μόνες τους το κυτταρικό τοίχωμα των μυκήτων. In vitro βιοδοκιμές με CHI-B δεν κατάφεραν να παρεμποδίσουν σημαντικά την ανάπτυξη των μυκήτων *Alternaria*, *Fusarium* και *Sclerotinia* (Mauch et al., 1988; Sela-Buurlage et al., 1993; Jach et al., 1995), ενώ συνδυαστική ενσωμάτωση των πρωτεϊνών CHI-B και β-1,3-γλουκανάσης στο θρεπτικό υπόστρωμα κατάφερε να μειώσει την ανάπτυξη του μύκητα *Fusarium solani* (Sela-Buurlage et al., 1993). Οι γλυκάνες αποτελούν το εξωτερικό στρώμα του κυτταρικού τοιχώματος προστατεύοντας το χιτινικό περίβλημα του κυτταρικού τοιχώματος, με αποτέλεσμα οι χιτινάσες να μην έχουν πρόσβαση στην εσωτερική δομή του κυτταρικού τοιχώματος. Επομένως με την πρόδρομη δράση των β-1,3-γλουκανασών επιτυγχάνεται η αποδόμηση της χιτίνης από τις χιτινάσες (Selitrennikoff, 2001).

Χιτινάσες τύπου I (PR-3, PR-4)

Το ιασμονικό οξύ και το αιθυλένιο, εκτός από την έκφραση του PDF1.2 ελέγχουν συνεργιστικά και την έκφραση των γονιδίων *CHI-B*, *HEL* και *Thi2.1* ως αποτέλεσμα της προσβολής του φυτού από παθογόνα αίτια. Τα γονίδια *CHI-B* και *HEL* κωδικοποιούν αντίστοιχα, μία χιτινάση τύπου Ib που υπάγεται στην ομάδα PR-3 και μία επίσης χιτινάση τύπου I (acidic hevein protein) η οποία υπάγεται στην ομάδα PR-4 (Van Loon and Van Strien, 1999; Selitrennikoff, 2001).

Οι χιτινάσες τύπου I συντίθενται στο κυτταρόπλασμα ως πρόδρομα πεπτίδια τα οποία μεταφέρονται στο χυμοτόπιο, όπου και μετατρέπονται στην τελική λειτουργική τους μορφή (Sticher et al., 1993). Κατά την προσβολή του φυτού από παθογόνους μικροοργανισμούς και έντομα, το χυμοτόπιο των κυττάρων διαρρηγνύεται απελευθερώνοντας τα συγκεκριμένα ένζυμα τα οποία αποδομούν τη χιτίνη, συστατικό στοιχείο του κυτταρικού τοιχώματος των μυκήτων και του εξωσκελετού των εντόμων (Collinge et al., 1993; Kasprzewska, 2003).

Οι χιτινάσες καταλύουν την διάσπαση των β-1,4 δεσμών εντός των πολυμερών της χιτίνης, καθιστώντας τις υφές των μυκήτων πιο ευπαθείς στο ωσμωτικό στρες με αποτέλεσμα να καταστέλλεται η ανάπτυξη τους (Selitrennikoff, 2001). Τα κατάλοιπα των πολυμερών της χιτίνης από τη δράση των χιτινασών (ολιγοσακχαρίδια της χιτίνης) είναι επαρκή από μόνα τους να λειτουργήσουν ως διεγέρτες (Pathogen Associated Molecular Patterns-PAMPs) και να επάγουν διασυστηματική άμυνα (PAMPs Triggered Immunity-PTI) (Miya et al., 2007; Eckardt, 2008; Wan et al., 2008). Έτσι οι χιτινάσες διαδραματίζουν διττό ρόλο ως προς την ενεργή άμυνα του φυτού, αφενός καταστέλλουν άμεσα την ανάπτυξη των παθογόνων και αφετέρου ενεργοποιούν έμμεσα την

άμυνα των φυτών (PTI) (Kasprzewska, 2003; Huckelhoven, 2007; Miya et al., 2007; Eckardt, 2008; Wan et al., 2008).

Παρεμποδιστές πρωτεασών (PR-6)

Οι παρεμποδιστές πρωτεασών (Protease Inhibitors-PIs) οι οποίοι ανήκουν στην οικογένεια PR-6 (Protease Inhibitors-PIs) έχουν μελετηθεί εις βάθος ως μόρια τα οποία εμπλέκονται στην ενεργή άμυνα του φυτού έναντι φυτοφάγων εντόμων και νεκροτροφικών παθογόνων μικροοργανισμών, λειτουργώντας ως παρεμποδιστές της τροφικής δραστηριότητας έναντι φυτοφάγων εντόμων και αντιμικροβιακοί παράγοντες (Ryan, 1990; Koiwa et al., 1997; Joshi et al., 1999; Kim et al., 2009).

Τα έντομα προκειμένου να λάβουν τα θρεπτικά συστατικά, εκκρίνουν πρωτεάσες για να πέψουν τους ιστούς του ξενιστή τους (Botella et al., 1996). Από την άλλη μεριά, τα φυτά έχουν αναπτύξει μέσω της συνεξέλιξης τους με τους εχθρούς τους, στρατηγικές άμυνας που σχετίζονται με τη συσσώρευση παρεμποδιστών πρωτεασών είτε στο σημείο προσβολής είτε διασυστηματικά. Επομένως, μέσω της κατάποσης των παρεμποδιστών πρωτεασών από τα έντομα, καθίστανται δύσκολη η πέψη των φυτικών ιστών από την πλευρά του εντόμου με αποτέλεσμα να μειώνονται τα ποσοστά της πρόσληψης θρεπτικών στοιχείων και ο ρυθμός ανάπτυξης των εντόμων (Botella et al., 1996).

Τα παθογόνα επίσης χρησιμοποιούν πρωτεάσες προκειμένου να διεισδύσουν εσωτερικά του ξενιστή τους και να καταστείλουν αμυντικές αποκρίσεις του φυτού-ξενιστή, επομένως πολλοί παρεμποδιστές πρωτεασών έχουν διττό ρόλο ως προς την άμυνα του φυτού, αφενός λειτουργούν ως καταστολείς της τροφικής δραστηριότητας και αφετέρου λειτουργούν ως αντιμικροβιακές ουσίες. Για παράδειγμα, ο παρεμποδιστής της πρωτεάσης της κυστεΐνης έναντι του εντόμου *Pennisetum glaucum* ο οποίος δρα ως καταστολέας της τροφικής δραστηριότητας, κατέχει ταυτόχρονα και αντιμικροβιακή δράση έναντι μυκήτων του γένους *Trichoderma*, *Fusarium* και *Alternaria* (Joshi et al., 1999). Στην περίπτωση των φυτοπαθογόνων βακτηρίων του γένους *Pseudomonas*, *Erwinia*, *Xanthomonas* και *Ralstonia*, οι πρωτεάσες της κυστεΐνης δρουν ως μολυσματικοί παράγοντες ή παράγοντες αμολυσματικότητας οι οποίοι καταστέλλουν την άμυνα των φυτών (Hotson and Mudgett, 2004).

Στο φυτό *Arabidopsis*, ο αριθμός των παρεμποδιστών πρωτεασών που έχουν χαρακτηριστεί είναι περιορισμένος, παρ' όλα αυτά όμως, τελευταία έχουν αναφερθεί αρκετές πρωτεΐνες οι οποίες φαίνεται να διαδραματίζουν κυρίαρχο ρόλο στην ενεργή άμυνα των φυτών με κυρίαρχες αυτών, τον παρεμποδιστή της Θρυψίνης 1 (Kunitz Trypsin Inhibitor 1-KTI1) και τον "ασυνήθιστο" παρεμποδιστή της πρωτεάσης της σερίνης (Unusual Serine Protease Inhibitor-UPI). Οι τελευταίοι παρεμποδίζουν τον κυτταρικό θάνατο ο οποίος επάγεται από νεκροτροφικά παθογόνα, ως απο-

τέλεσμα της παρεμπόδισης Θρυψινών και Χυμο-Θρυψινών, ενώ μεταλλαγμένα φυτά *Arabidopsis* στο γονίδιο UPI, εμφάνιζαν αυξημένη ευπάθεια στους μύκητες *B. cinerea* και *A. Brassicicola* (Laluk and Mengiste, 2011). Η έκφραση των PR-6 επάγεται μέσω της σηματοδότησης η οποία ελέγχεται από τα μονοπάτια του ιασμονικού οξέος και του σαλικυλικού οξέος, ενώ η έκφραση τους καταστέλλεται από την ενδογενή αύξηση του αιθυλενίου και του μεταγραφικού παράγοντα MYC2 (Laluk and Mengiste, 2011).

Ντιφενσίνες (PR-12)

Οι φυτικές ντιφενσίνες (PR-12) είναι μικρά πεπτίδια πλούσια σε κυστεΐνη ενωμένα μεταξύ τους με δισουλφιδικούς δεσμούς (Selitrennikoff, 2001). Στο φυτό *Arabidopsis*, οι ντιφενσίνες κωδικοποιούνται από πολλαπλά γονίδια, από τα οποία τα δεκατρία συμπεριλαμβανομένων και των τριών γονιδίων που σχετίζονται με την έκφραση του *PDF1.2* (*PDF1.2a*, *PDF1.2b* και *PDF1.2c*) κωδικοποιούν 11 διαφορετικές ντιφενσίνες. Ο ακριβής μηχανισμός της αντιμικροβιακής τους δράσης δεν έχει κατανοηθεί πλήρως εξαιτίας της μεγάλης παραλλακτικότητας τους ως προς το μηχανισμό δράσης σε κάθε φυτικό είδος. Παρ' όλα αυτά έχουν αναφερθεί διάφοροι μηχανισμοί δράσης συμπεριλαμβανομένου αυτού της διατάραξης της φυσιολογικής ροής ιόντων ασβεστίου που απαιτούνται για την ανάπτυξη του ακραίου τμήματος των υφών, καθώς επίσης και της επίδρασης τους στη διατάραξη της διαπερατότητας της κυτταρικής μεμβράνης ως προς την ανταλλαγή ιόντων (Selitrennikoff, 2001). Η έκφραση του *PDF1.2* απαιτεί την ενδογενή αύξηση της συγκέντρωσης των φυτοορμονών του αιθυλενίου και του ιασμονικού οξέος, ενώ στη μεταγωγή του σήματος και κατ' επέκταση στα επίπεδα έκφρασης του *PDF1.2* φαίνεται να εμπλέκονται ο μεταγραφικός παράγοντας WRKY33, η πρωτεϊνική κινάση BIK1 η οποία φωσφορυλιώνει συγκεκριμένους υποδοχείς διεγερτών (Pattern Recognition Receptors-PRRs) όπως αυτό του FLS2, ο BAK1, η καταλυτική υπομονάδα ESA1 της ακέτυλο-τρανσφεράσης της ιστόνης NuA4 (HAT) και το ένζυμο SSI2 (Tierens et al., 2002; Veronese et al., 2004; Veronese et al., 2006; Zheng et al., 2006).

Θειονίνες (PR-13)

Η οικογένεια PR-13 αποτελείται από αντιμικροβιακές θειονίνες πλούσιες σε κυστεΐνη οι οποίες προκαλούν λύση των κυττάρων του μύκητα αυξάνοντας τη διαπερατότητα των κυτταρικών μεμβρανών. Ο ακριβής μηχανισμός δράσης σχετικά με το πως τα συγκεκριμένα μόρια διεκπεραιώνουν τη συγκεκριμένη λειτουργία δεν έχει αποσαφηνιστεί πλήρως, αλλά έχουν προταθεί διάφορα μοντέλα δράσης στο παρελθόν (Thevissen et al., 1999; Stec, 2006). Οι θειονίνες πιθανόν να επάγουν με κάποιο τρόπο την αφαίρεση

φωσφολιπιδίων από την κυτταρική μεμβράνη καθιστώντας την πιο εκτεθειμένη σε παράγοντες καταπόνησης (οξειδωτικό και ωσμωτικό στρες) με τελικό στάδιο τη λύση των κυττάρων (Stec, 2006). Η παραπάνω υπόθεση συμπίπτει με την υπόθεση των Molina et al. (1993) σχετικά με το ότι οι θειονίνες δρουν συνεργιστικά με τις πρωτεΐνες μεταφοράς λιπιδίων (LTPs) στη δέσμευση και τη μεταφορά φωσφολιπιδίων από την κυτταρική μεμβράνη.

Πρωτεΐνες μεταφοράς λιπιδίων (LTPs) (PR-14)

Οι LTDs υπάγονται στην οικογένεια των PR-14, ενώ εκτός από την αντιμυκητιακή τους δράση έχει αναφερθεί ότι εμπλέκονται στην επαγωγή διασυστηματικής άμυνας ως υποδοχείς και ρυθμιστικά σήματα (Segura et al., 1993b; Arondel et al., 2000; Buhot et al., 2001; Maldonado et al., 2002; Chassot et al., 2007). Η επαγωγή της έκφρασης των συγκεκριμένων πρωτεϊνών παρέχει προστασία στα φυτά έναντι νεκροτροφικών μυκήτων (Epple et al., 1997; Chassot et al., 2007).

4. Επίκτητη διασυστηματική αντοχή (Systemic Acquired Resistance-SAR)

4.1 Επαγόμενη από συντηρημένες δομές παθογόνων και μικροοργανισμών (Pathogen/Microbe Associated Molecular Patterns-P/MAMPs) διασυστηματική άμυνα (P/MAMPs Triggered Immunity-PTI)

Τα παθογόνα διεγείρουν την επίκτητη διασυστηματική άμυνα ανάλογα με τη φύση του εκάστοτε διεγέρτη. Η επαγόμενη από συντηρημένες δομές των παθογόνων μικροοργανισμών (Pathogen/Microbe Associated Molecular Patterns-P/MAMPs) διασυστηματική άμυνα των φυτών (P/MAMPs Triggered Immunity-PTI) αποτελεί την πρώτη γραμμή επαγόμενης άμυνας έναντι μολυσματικών παθογόνων μικροοργανισμών (Shan et al., 2007). Η συγκεκριμένη άμυνα αναφέρεται σε όλες εκείνες τις επαγόμενες βιοχημικές διεργασίες οι οποίες σηματοδοτούνται μέσω της αναγνώρισης συντηρημένων δομών και μοτίβων των παθογόνων (Pathogen/Microbe Associated Molecular Patterns-PAMPs) από διαφορετικούς υποδοχείς αναγνώρισης (Pattern Recognition Receptors-PRRs). Οι δομές αυτές των παθογόνων, είναι εξελικτικά συντηρημένα μοριακά συστατικά των μικροοργανισμών αλλά και συστατικά στοιχεία του κυτταρικού τοιχώματος μικροοργανισμών, τα οποία συνθέτουν το σύστημα της επίκτητης άμυνας στα φυτά, τα θηλαστικά και τα έντομα (Medzhitov and Janeway, 1997; Aderem and Ulevitch, 2000).

Δομές των παθογόνων που λειτουργούν ως διεγέρτες άμυνας κατέχουν μικρά συντηρημένα μοτίβα αμινοξέων, όπως η περίπτωση των N-τελικών άκρων της φλατζελίνης (flg22) και του παράγοντα επιμήκυνσης EF-Tu (elf 18), τα

οποία είναι συντηρημένα σε όλα τα βακτήρια και αναγνωρίζονται από τους αντίστοιχους πρωτεϊνικούς υποδοχείς FLS2 και EFR στην επιφάνεια των φυτών (Gomez-Gomez and Boller, 2000; Kunze et al., 2004; Zipfel et al., 2006). Επιπλέον, συντηρημένα ολιγοσακχαρίδια των πολυσακχαριτών της χιτίνης και των γλυκανών που συνθέτουν το κυτταρικό τοίχωμα των μυκήτων αλλά και διάφορες στερόλες (εργοστερόλη) ή γλυκοπρωτεΐνες μυκήτων, μπορεί να λειτουργήσουν ως διεγέρτες της άμυνας (Τζάμος, 2007).

Οι συντηρημένες αυτές δομές των παθογόνων αποτελούν τους εξωγενείς διεγέρτες της άμυνας των φυτών οι οποίοι αναγνωρίζονται από τους πρωτεϊνικούς υποδοχείς, οι οποίοι είναι προσαρμοσμένοι στην επιφάνεια του φυτικού κυττάρου, σηματοδοτώντας την ενεργοποίηση διαφόρων διεργασιών που σχετίζονται με ιστολογικούς μηχανισμούς αντοχής (εναπόθεση καλλόζης στο σημείο διείσδυσης του παθογόνου), την παραγωγή ενεργών ριζών οξυγόνου και την ενεργοποίηση MAP κινασών (mitogen activated protein kinases-MAPK), οι οποίες με τη σειρά τους ενεργοποιούν διάφορα βιοχημικά μονοπάτια που σχετίζονται με τη βιοσύνθεση αντιμικροβιακών ενώσεων (φυτοαλεξίνες, πρωτεΐνες παθογενέσεως) (Jones and Dangl, 2006; Τζάμος, 2007).

4.2 Επαγόμενη από τελεστές άμυνα ((Effector Triggered Immunity-ETI)

Στην περίπτωση των παθογόνων μικροοργανισμών εκκρίνονται πρωτεΐνες τελεστές εντός των κυττάρων του ξενιστή προκειμένου να καταστείλουν την άμυνα των φυτών, κατά τη διαδικασία της ολοκλήρωσης της επιτυχούς αποίκησης του ξενιστή από το παθογόνο.

Οι τελεστές, είναι πρωτεΐνες μικρού μοριακού βάρους οι οποίες δεσμεύονται σε ένζυμα, μεταγραφικούς παράγοντες ή ρυθμιστικές περιοχές του γονιδιώματος του ξενιστή αυξάνοντας ή μειώνοντας την ενζυμική δραστηριότητα, τη γονιδιακή έκφραση ή παρεμβάλλονται στην σηματοδότηση διαφόρων βιοσυνθετικών μονοπατιών που εμπλέκονται στην ενεργή άμυνα του φυτού έναντι παθογόνων μικροοργανισμών (Vleeshouwers and Oliver, 2014).

Ως απάντηση στην έκκριση τελεστών, τα φυτά κατέχουν πρωτεΐνες ανθεκτικότητας (R proteins), οι οποίες αναγνωρίζουν τις πρωτεΐνες τελεστές. Οι τελεστές οι οποίοι έχουν συμβατή σχέση με εξειδικευμένες πρωτεΐνες ανθεκτικότητας του ξενιστή λειτουργούν ως ενδογενείς διεγέρτες οι οποίοι είναι εξειδικευμένοι ως προς τη φυλή του εκάστοτε παθογόνου γι' αυτό και καλούνται και ως

Race Specific Elicitors/Effectors. Το σύμπλοκο πρωτεΐνης ανθεκτικότητας/τελεστή ενεργοποιεί την επαγόμενη από τελεστές άμυνα (Effector Triggered Immunity-ETI) και την αντίδραση υπερευαισθησίας (Hypersensitive Response-HR), η οποία αντιπροσωπεύει μία μορφή κυτταρικού θανάτου στο σημείο προσβολής (Shan et al., 2007). Επομένως οι τελεστές ανάλογα με το αν έχουν συμβατή σχέση με τις πρωτεΐνες ανθεκτικότητας, λειτουργούν ως πρωτεΐνες αμολυσματικότητας ή ως μολυσματικοί παράγοντες στην περίπτωση όπου έχουν ασύμβατη σχέση με τις αντίστοιχες πρωτεΐνες ανθεκτικότητας του φυτού-ξενιστή.

Οι μολυσματικοί παράγοντες, επιτελούν όλες εκείνες τις ενέργειες οι οποίες θα οδηγήσουν στην αποτελεσματική παρασιτική σχέση μεταξύ παθογόνου-ξενιστή ως προς το όφελος του παθογόνου. Η επιτυχής εγκατάσταση ενός παθογόνου σε ένα ξενιστή χαρακτηρίζεται από την αποτελεσματική θρέψη του παθογόνου, την εξάπλωση του παθογόνου σε όλη την φυτική επιφάνεια του ξενιστή και τον πολλαπλασιασμό του (αγενή-εγγενή).

4.2.1 Διαφοροποίηση έκκρισης τελεστών μεταξύ παθογόνων βακτηρίων, ωμοκυκίων και μυκήτων

Οι τελεστές των βιοτροφικών και ημιβιοτροφικών ωμοκυκίων έχουν ένα συντηρημένο πρότυπο αμινοξέων στην αμινοξική τους αλληλουχία τους, το λεγόμενο Ruler (Arg-x-Leo-Arg) το οποίο λειτουργεί ως σήμα πρόσδεσης των τελεστών με πρωτεϊνικούς μεταφορείς του ξενιστή γι' αυτό και καλείται και HTS (Host Targeting Signal) (Morgan and Kamoun, 2007). Αυτή η περιοχή σε συνδυασμό με το αμινοξικό πρότυπο dEER (Asp-Glu-Glu-Arg), το οποίο βρίσκεται καθοδικά του RxLR, απαιτούνται για την είσοδο του μολυσματικού παράγοντα Avr3a (*Phytophthora infestans*) εσωτερικά των κυττάρων του ξενιστή (Whisson et al., 2007). Η περιοχή RxLR είναι συντηρημένη σε πολλά είδη βιοτροφικών και ημιβιοτροφικών ωμοκυκίων και πιστεύεται ότι δεσμεύεται με μία ομάδα πολύ-φωσφολιπιδίων στην κυτταρική μεμβράνη των κυττάρων του φυτού ξενιστή τα οποία μεσολαβούν στην ενεργή μεταφορά της πρωτεΐνης-τελεστή εντός του κυτταροπλάσματος (ενδοκύτωση) (Dou et al., 2008). Kale et al (2010).

Σε αντίθεση με τους παθογόνους μύκητες, τα βακτήρια κατέχουν ένα πολυπρωτεϊνικό σύστημα έκκρισης το λεγόμενο εκκριτικό σύστημα τύπου III (SSTIII), μέσω του οποίου πραγματοποιείται η μεταφορά πρωτεϊνών τελεστών εσωτερικά των κυττάρων του ξενιστή (Alfano and Collmer, 2004). Επιπλέον, τα βακτήρια χρησιμοποιούν φυσικά ανοίγματα των φυτών και πληγές για να εισέλθουν εσωτερικά του ξενιστή καθώς δεν είναι ικανά από μόνα να πραγματοποιήσουν διάτρηση της φυτικής επιφάνειας. Επίσης τα βακτήρια χρησιμοποιούν το σύστημα αίσθησης του πληθυσμού τους (quorum sensing) έτσι ώστε να εκκρίνουν μολυσματικούς παράγοντες. Επομένως, μόνο όταν η

πυκνότητα των βακτηρίων είναι σε υψηλά επίπεδα σηματοδοτείται η έκφραση μολυσματικών παραγόντων καθώς μόνο σε αυτήν την περίπτωση μπορούν συνεργιστικά τα άτομα του πληθυσμού να παρακάμψουν την άμυνα των φυτών (Alfano and Collmer, 1996).

4.2.2 Διαφοροποίηση κάθετης ανθεκτικότητας μεταξύ βιοτροφικών και νεκροτροφικών παθογόνων

Η κάθετη ανθεκτικότητα των φυτών-ξενιστών έναντι παθογόνων με εξειδικευμένο εύρος ξενιστών πραγματοποιείται μέσω αλληλεπιδράσεων γόνου προς γόνου, ενώ αντίθετα η κάθετη ανθεκτικότητα των φυτών-ξενιστών έναντι παθογόνων με μεγάλο εύρος ξενιστών απαιτεί πολυγονική συμβατότητα, δηλαδή ταυτόχρονη συμβατότητα δύο ή περισσότερων ζευγών γονιδίων αμολυσματικότητας και γονιδίων ανθεκτικότητας (AVR gene - R gene) (Vleeshouwers and Oliver, 2014).

Στην περίπτωση των βιοτροφικών ή ημιβιοτροφικών αλληλεπιδράσεων μεταξύ παθογόνου-ξενιστή, ο κυρίαρχος μηχανισμός κάθετης ανθεκτικότητας ως αποτέλεσμα της συμβατής σχέσης μεταξύ γονιδίων αμολυσματικότητας του παθογόνου και γόνων ανθεκτικότητας του φυτού ξενιστή είναι η αντίδραση υπερευαισθησίας. Στην περίπτωση των νεκροτροφικών παθογόνων, η αντίδραση υπερευαισθησίας λειτουργεί ως συνεργιστικός μηχανισμός κυτταρικού θανάτου εις βάρος του ξενιστή. Τα νεκροτροφικά παθογόνα επάγουν την αντίδραση υπερευαισθησίας εκκρίνοντας υψηλά επίπεδα ενεργών ριζών οξυγόνου έτσι ώστε να αυξήσουν την ευπάθεια του ξενιστή (Govrin and Levine, 2000; Mengiste, 2012; Coll et al., 2011).

5. Ο ρόλος των φυτοορμονών στην ενεργοποίηση της άμυνας

Η ενεργοποίηση των βιοχημικών μονοπατιών που σχετίζονται με την ενεργή άμυνα του φυτού έναντι φυτοπαρασίτων διεκπεραιώνεται από ένα σύμπλεγμα φυτοορμονών, οι οποίες αλληλεπιδρούν ή ανταγωνίζονται μεταξύ τους για να σηματοδοτήσουν συγκεκριμένα βιοχημικά μονοπάτια που σχετίζονται με διαφορετικής φύσεως παθογόνα (Pieterse et al., 2009; Santner et al., 2009; Jaillais and Chory, 2010). Διαφορετικά βιοχημικά μονοπάτια ενεργής άμυνας ελέγχονται από διαφορετική φυτοορμόνη ή διαφορετικό σύμπλεγμα φυτοορμονών. Η συνεχής ενεργοποίηση όλων των διεργασιών που σχετίζονται με το προϋπάρχον σύστημα άμυνας των φυτών, είναι αδύνατη, εξαιτίας της υψηλής απαίτησης σε ενεργειακά μόρια και μεταβολίτες που απαιτούνται για τη διεκπεραίωση όλων των βιοσυνθετικών μονοπατιών που σχετίζονται με τη βιοσύνθεση όλων των φυτοαλεξινών και πρωτεϊνών παθογενέσεως

που κατέχει το κάθε φυτό στο δυναμικό του (Walters and Heil, 2007; Kempel et al., 2011).

Επομένως τα φυτά έχουν αναπτύξει έναν εκλεπτυσμένο μηχανισμό να ενεργοποιούν συγκεκριμένα μονοπάτια άμυνας, όταν αυτά καθίστανται απαραίτητα για την προστασία του φυτού σε συγκεκριμένα φυτοπαράσιτα (Jones and Dangl, 2006; Dodds and Rathjen, 2010). Στο επίκεντρο του μηχανισμού σηματοδότησης συγκεκριμένων μονοπατιών βρίσκονται οι φυτοορμόνες, σαλικυλικό οξύ, αιθυλένιο και ιασμονικό οξύ (Robert-Seilaniantz et al., 2011a), ενώ σημαντικό ρόλο στην αλληλεπίδραση των φυτών-ξενιστών με διάφορα παθογόνα φαίνεται να διαδραματίζουν οι φυτοορμόνες, αμψισικό οξύ, αυξίνες, κυτοκίνινες, γιββερελλίνες και μπρασινοστεροειδή (Mauch-Mani and Mauch, 2005; Kazan and Manners, 2009; Ton et al., 2009; Fu and Wang, 2011).

5.1 Η εξαρτώμενη από το σαλικυλικό οξύ άμυνα των φυτών

Η λειτουργία του σαλικυλικού οξέος στην επαγωγή της άμυνας των φυτών έχει μελετηθεί εις βάθος. Στο φυτό *Arabidopsis*, το σαλικυλικό οξύ συντίθενται από το χωριστικό οξύ (πρόδρομη ένωση της τρυπτοφάνης), είτε μέσω του μονοπατιού της φαινολανίνης είτε μέσω του μονοπατιού του ισοχωρισμικού οξέος. Στο δεύτερο μονοπάτι, το ένζυμο κλειδί το οποίο διαδραματίζει κυρίαρχο ρόλο στην σύνθεση του σαλικυλικού οξέος είναι η συνθετάση του ισοχωρισμικού οξέος (isochorismate synthase-ICS1) το οποίο μετατρέπει το χωριστικό οξύ σε ισοχωρισμικό οξύ. Η σύνθεση του ενζύμου ICS1 επάγεται ως αποτέλεσμα της προσβολής των φυτών από διάφορα παθογόνα, όπως το *Erysiphe* ή το *Pseudomonas syringae* pv. *tomato*, είτε ως αποτέλεσμα της αναγνώρισης διαφόρων πρωτεϊνών τελειωτών ή συντηρημένων δομών των παθογόνων από το φυτό (Tsuda et al., 2008; Vlot et al., 2009). Ανικανότητα βιοσύνθεσης σαλικυλικού οξέος σε μεταλλαγμένα φυτά *sid2-1* είχε ως αποτέλεσμα αύξηση της ευπάθειας σε διάφορα παθογόνα στα φυτά *Arabidopsis* (Nawrath and Métraux, 1999). Το σαλικυλικό οξύ προάγει την ανθεκτικότητα των φυτών έναντι προσβολών από βιοτροφικά ή ημιβιοτροφικά παθογόνα, όπως ο ωμούκητας *Hyaloperonospora arabidopsidis* και το βακτήριο *P. syringae*, ενώ σηματοδοτεί βιοχημικά μονοπάτια της επαγόμενης διασυστηματικής άμυνας (SAR) (Glazebrook, 2005).

Οι μεταγραφικοί παράγοντες NPR1 (non-expressor of PR genes 1), NPR3 και NPR4 επηρεάζονται από την ενδοκυτταρική συγκέντρωση σαλικυλικού οξέος (Fu et al., 2012; Wu et al., 2012). Ο μεταγραφικός παράγοντας NPR1 υπό την απουσία σαλικυλικού οξέος βρίσκεται στο κυτταρόπλασμα

ως ολιγομερές, η ενδογενής αύξηση του σαλικυλικού οξέος έχει ως αποτέλεσμα τη διάσπαση του ολιγομερούς NPR1 σε επιμέρους μονομερή NPR1, τα οποία μετατοπίζονται στον πυρήνα όπου και ενεργοποιούν έμμεσα την έκφραση γονιδίων που κωδικοποιούν πρωτεΐνες παθογενέσεως (SA-regulated PR-proteins). Τα μονομερή NPR1 συμπλοκοποιούνται με διάφορους TGA μεταγραφικούς παράγοντες (TGACG sequence-specific binding protein) οι οποίοι δεσμεύονται στην περιοχή του χειριστή των PR γονιδίων ενεργοποιώντας τα (Dong, 2004; Tada et al., 2008; Robert-Seilaniantz et al., 2011a).

Μετάλλαξη στο γονίδιο *EDS1* οδήγησε σε μείωση της ανθεκτικότητας των μεταλλαγμένων φυτών έναντι διαφόρων παθογόνων όπως στον ωμούκητα *Hyaloperonospora parasitica* (Parker et al., 1996; Falk et al., 1999; Jirage et al., 1999). Στον έλεγχο της έκφρασης των γονιδίων που κωδικοποιούνται ως αποτέλεσμα της σηματοδότησης του σαλικυλικού οξέος μεσολαβεί και η διακετυλάση-19 της ιστόνης (histone deacetylase19- HDA19), η οποία καταστέλλει τη διασυστηματική άμυνα (Choi et al., 2012). Σε μεταλλαγμένες σειρές φυτών *Arabidopsis* στο γονίδιο *HDA19*, παρατηρήθηκε υπερσυσσώρευση σαλικυλικού οξέος και υπερέκφραση γονιδίων (*PR1*, *PR2*, *ICS1*, *EDS1*, *PAD4*) των οποίων η έκφραση τους σχετίζεται με την ενδογενή αύξηση του σαλικυλικού οξέος συνοδευόμενη με ανθεκτικότητα έναντι του παθογόνου βακτηρίου *Pst* DC3000 (Choi et al., 2012).

Η αρνητική αλληλεπίδραση μεταξύ των μονοπατιών σηματοδότησης του σαλικυλικού οξέος και του ιασμονικού οξέος έχει μελετηθεί σε έκταση τις τελευταίες δεκαετίες. Ο μεταγραφικός παράγοντας WRKY33 έχει διττό ρόλο ως

προς την επαγωγή γονιδίων τα οποία σχετίζονται με τη διασυστηματική άμυνα των φυτών. Αφενός λειτουργεί ως θετικός ρυθμιστής των γονιδίων που επάγονται από τη σηματοδότηση του ιασμονικού οξέος και αφετέρου καταστέλλει την έκφραση των γονιδίων τα οποία επάγονται από το μονοπάτι σηματοδότησης του σαλικυλικού οξέος (*SID2/ICS1, EDS5/SID1, PAD4, EDS1, NIMIN1-NPR1, PR1, PR2, PR3*). Από την άλλη, ενδογενής αύξηση του σαλικυλικού οξέος είναι ικανή να καταστείλει το μονοπάτι σηματοδότησης του ιασμονικού οξέος, αυξάνοντας την ευπάθεια των φυτών σε προσβολές νεκροτροφικών παθογόνων (Birkenbihl et al., 2012; Sánchez-Vallet et al., 2012).

Πολλά παθογόνα εκμεταλλεύονται την αρνητική συσχέτιση μεταξύ των μονοπατιών σηματοδότησης του σαλικυλικού οξέος και του ιασμονικού οξέος, αντιγράφοντας τον τρόπο δράσης της μίας φυτοορμόνης εις βάρος της άλλης, έτσι ώστε να καταστείλουν τη διασυστηματική άμυνα του φυτού ως αποτέλεσμα της προσβολής. Μία τέτοια περίπτωση είναι αυτή του παθογόνου βακτηρίου *Pseudomonas syringae* pv. *tomato* (*Pst*) το οποίο προκαλεί την ασθένεια της βακτηριακής στιγμάτωσης στην τομάτα και το φυτό *Arabidopsis thaliana*. Το βακτήριο *Pst* εκκρίνει μέσω του συστήματος έκκρισης τύπου III την κορονατίνη, ένα μολυσματικό παράγοντα ο οποίος μιμείται τη δράση του ιασμονικού οξέος, είτε για να επάγει το άνοιγμα των

στομάτων για την είσοδο των βακτηρίων είτε για την προώθηση της ανάπτυξης των βακτηρίων στην περιοχή του αποπλάστη μέσω της καταστολής της διασυστηματικής άμυνας η οποία επάγεται ως αποτέλεσμα της συσσώρευση σαλικυλικού οξέος (Zheng et al., 2012). Η κορονατίνη ενεργοποιεί συγκεκριμένους μεταγραφικούς παράγοντες οι οποίοι εμπλέκονται στον έλεγχο του ανοίγματος των στομάτων και τα βιοσυνθετικά μονοπάτια του σαλικυλικού οξέος. Πιο συγκεκριμένα, η κορονατίνη ενεργοποιεί άμεσα το μεταγραφικό παράγοντα MYC2, ο οποίος με τη σειρά του ενεργοποιεί τους μεταγραφικούς παράγοντες ANAC019, ANAC055 και ANAC072. Οι τελευταίοι καταστέλλουν την έκφραση του ενζύμου της συνθετάσης του ισοχωρισμικού οξέος, το οποίο είναι πρόδρομη ένωση του σαλικυλικού οξέος, ενώ ταυτόχρονα υπερεκφράζουν την μεθυλτρασφραράση του σαλικυλικού οξέος (*SA methyl transferase 1-BSMT1*) και τη γλυκοτρασφραράση του σαλικυλικού οξέος, τα οποία μεθυλιώνουν και γλυκοσιδιώνουν αντίστοιχα το σαλικυλικό οξύ, μετατρέποντας το σε μη ενεργές αποθηκευτικές μορφές (*SA glucose ester-SGE, SA-β-glucoside-SAG* και *methyl SA-MeSA*). Έτσι με αυτόν τον τρόπο το βακτήριο *P. syringae* pv. *tomato* μέσω της κορονατίνης μπορεί να παρακάμψει τη διασυστηματική άμυνα του φυτού, μειώνοντας την ενδογενή συσσώρευση του σαλικυλικού οξέος (Zheng et al., 2012).

5.2 Η εξαρτώμενη από το αιθυλένιο διασυστηματική άμυνα των φυτών

Στα φυτά, η κυρίαρχη φυτοορμόνη η οποία εμπλέκεται στον έλεγχο της άμυνας του φυτού έναντι νεκροτροφικών παθογόνων, είναι το αιθυλένιο (Laluk and Mengiste, 2010). Τα φυτά αντιλαμβάνονται το αιθυλένιο μέσω του υποδοχέα ETR1, ο οποίος με τη σειρά του ενεργοποιεί τον μεταγραφικό παράγοντα ERF104 (Ethylene Response Factor 104) (Oh et al., 2005; Kwon et al., 2009).

Ο παράγοντας ERF104 είναι απαραίτητος για την ενεργοποίηση της έκφρασης γονιδίων που σχετίζονται με την ενεργή άμυνα του φυτού επαγόμενη από τα μονοπάτια σηματοδότησης του αιθυλενίου. Ο μεταγραφικός παράγοντας ERF104 προσδένεται στους υποκινητές των γονιδίων που κωδικοποιούν πρωτεΐνες παθογενέσεως στην περιοχή η οποία εμφανίζει επαναλαμβανόμενα πρότυπα GCC, με αποτέλεσμα την υπερέκφραση τους (Bethke et al., 2009). Η ενδογενής αύξηση του αιθυλενίου είναι αποτέλεσμα της ενεργοποίησης του μεταγραφικού παράγοντα EIN2 (Ethylene Insensitive 2), ο οποίος με τη σειρά του είναι υπεύθυνος για την ενεργοποίηση των γονιδίων που εμπλέ-

κονται στη βιοσύνθεση του αιθυλενίου (Thomma et al., 1999a). Η ενεργοποίηση των μεταγραφικών παραγόντων EIN2 και ERF104 επιτελείται από τις MAP κινάσες 6 και 3, οι οποίες φωσφορυλιώνουν τους μεταγραφικούς παράγοντες και τους καθιστούν ενεργούς (Ren et al., 2008; Yoo et al., 2008, Bethke et al., 2009).

Η ενδογενής αύξηση του αιθυλενίου έχει ως αποτέλεσμα την επαγωγή συγκεκριμένων πρωτεϊνών παθογενέσεως (*PDF1.2*), φυτοαλεξινών και της εναπόθεσης καλλόζης στο σημείο προσβολής του φυτού από το παθογόνο. Η εναπόθεση καλλόζης είναι αποτέλεσμα της συσσώρευσης του μεταγραφικού παράγοντα MYB51 (Clay et al., 2009), ο οποίος σχετίζεται με την ενεργοποίηση των γονιδίων που εμπλέκονται στο βιοσυνθετικό μονοπάτι των γλυκοσινολικών της ινδόλης (*indolic glucosinolate-IGs*) μέσω του οποίου συνθέτονται επίσης και άλλοι δευτερογενείς μεταβολίτες που εμπλέκονται στη άμυνα του φυτού (Celenza et al., 2005).

5.3 Ο Συνεργιστικός Ρόλος μεταξύ του Αιθυλενίου και του Ιασμονικού Οξέος στην επαγωγή άμυνας έναντι νεκροτροφικών παθογόνων

Σε πολλές ερευνητικές εργασίες έχει δειχθεί ότι το αιθυλένιο δρα συνεργιστικά με το ιασμονικό οξύ για να επάγει βιοχημικά μονοπάτια που εμπλέκονται στην ανθεκτικότητα έναντι νεκροτροφικών παθογόνων. Για την επαγωγή της έκφρασης του *PDF1.2* κατά τη διάρκεια της προσβολής από παθογόνα αίτια, απαιτείται η ενδογενής αύξηση και των δύο φυτοορμονών (Laluk and Mengiste, 2011). Το σημείο σύγκλισης μεταξύ των δύο φυτοορμονών είναι ο υποδοχέας COI1 (Coronatine Insensitive 1), ο οποίος αντιλαμβάνεται το ιασμονικό οξύ και έχει διττό ρόλο ως προς τη συνεργιστική δράση του αιθυλενίου/ιασμονικού οξέος (Lorenzo et al., 2003). Η ενδογενής αύξηση του ιασμονικού οξέος και η πρόσδεση του με τον υποδοχέα COI1 έχει ως αποτέλεσμα, αφενός την υπερέκφραση του μεταγραφικού παράγοντα ERF1, ο οποίος με τη σειρά του ενεργοποιεί την

έκφραση πρωτεϊνών παθογένεσης που σχετίζονται με νεκροτροφικά παθογόνα και αφετέρου την υπερέκφραση του μεταγραφικού παράγοντα MYC2, ο οποίος μειώνει τη συσσώρευση του σαλικυλικού οξέος με τον τρόπο ο οποίος προαναφέρθηκε παραπάνω. Η συσσώρευση σαλικυλικού οξέος από την άλλη, καταστέλλει την έκφραση του μεταγραφικού παράγοντα ORA59, ο οποίος ενσωματώνει τη σηματοδότηση των φυτοορμονών ET και JA για την επαγωγή της έκφρασης του *PDF1.2* (Pre et al., 2008).

Η διασυστηματική άμυνα η οποία ελέγχεται από την διαμεσολάβηση του ιασμονικού οξέος συνδέεται με την επαγωγή παρεμποδιστών πρωτεασών και με τη βιοσύνθεση δευτερογενών μεταβολιτών, συμπεριλαμβανομένων ανθοκυανών και αντιμικροβιακών φλαβονοειδών (Laluk and Mengiste, 2010).

5.4 Το Αμπσιαικό Οξύ (abscisic acid, ABA) ως θετικός και αρνητικός ρυθμιστής της άμυνας των φυτών

Το αμπσιαικό οξύ είναι μία ουσία η οποία ανήκει στα ισοπρενοειδή και ελέγχει διάφορες διεργασίες στα φυτά οι οποίες σχετίζονται με την ανάπτυξη των σπόρων, την αποξήρανση, την διαδικασία του ληθάργου και την απόκριση των φυτών σε παράγοντες αβιοτικού στρες (Wasilewska et al., 2008). Τελευταία όμως, έχει μελετηθεί και ο ρόλος του αμπσιαικού οξέος ως προς τις αποκρίσεις των φυτών έναντι παθογόνων μικροοργανισμών. Το αμπσιαικό οξύ μπορεί να λειτουργήσει ως θετικός αλλά και ως αρνητικός ρυθμιστής του αμυντικού συστήματος των φυτών ανάλογα με το εκάστοτε σύστημα αλληλεπίδρασης παθογόνου-ξενιστή (Mauch-Mani and Mauch, 2005; Asselbergh et al., 2008; Ton et al., 2009).

Μετάλλαξη των γονιδίων τα οποία εμπλέκονται στα μονοπάτια βιοσύνθεσης αλλά και σηματοδότησης του αμπσιαικού οξέος είχαν ως αποτέλεσμα την υπερέκφραση γονιδίων τα οποία εμπλέκονται στην ενεργή άμυνα των φυτών έναντι παθογόνων μικροοργανισμών όπως του *B. cinerea*, *P. syringae*, *Fusarium oxysporum*, *Plectosphaerella cucumerina* και *Hyaloperonospora arabidopsidis* (Audenaert et al., 2002; Mohr and Cahill, 2003; de Torres-Zabala et al., 2007; de Torres Zabala et al., 2009; Garcia-Andrade et al., 2011; Sánchez-Vallet et al., 2012).

Το αμπσιαικό οξύ όμως, μπορεί να είναι ταυτόχρονα θετικός ρυθμιστής της ανθεκτικότητας των φυτών έναντι των παθογόνων *Alternaria brassicicola*, *Ralstonia solanacearum* και *Pythium irregular*, καθώς μεταλλαγμένες σειρές στα γονίδια που εμπλέκονται στα μονοπάτια βιοσύνθεσης και σηματοδότησης του αμπσιαικού οξέος (*abi1-1*, *abi2-1*, *abi4-1*, *aba1-6*, *aba2-12*, *aos3-2*, και *nrq2-1*) ήταν περισσότερο ευπαθείς από τα αντίστοιχα φυτά αγρίου τύπου στα συγκεκριμένα παθογόνα (Adie et al., 2007; Hernandez-

Blanco et al., 2007; Flors et al., 2008; Garcia-Andrade et al., 2011).

Στο φυτό *Arabidopsis*, το αμπσιαικό οξύ έχει βρεθεί ότι απαιτείται για τη βιοσύνθεση του ιασμονικού οξέος, το οποίο με τη σειρά του απαιτείται για την επαγωγή της διασυστηματικής άμυνας έναντι του παθογόνου *Pythium irregulare* (Adie et al., 2007). Αυτό όμως δεν συμπίπτει με την αναφορά των Sánchez-Vallet et al. (2012) οι οποίοι υποστηρίζουν ότι υπάρχει αρνητική αλληλεπίδραση μεταξύ των μονοπατιών σηματοδότησης του αμπσιαικού οξέος και του ιασμονικού οξέος στην επαγωγή διασυστηματικής άμυνας των φυτών έναντι του νεκροτροφικού μύκητα *Plectosphaerella cucumerina*.

Το αμπσιαικό οξύ, παρόλο που λειτουργεί ανταγωνιστικά ως προς τα μονοπάτια σηματοδότησης του σαλικυλικού οξέος συμβάλει έμμεσα στην αύξηση της ανθεκτικότητας έναντι παθογόνων βακτηρίων (*P. syringae*), προκαλώντας το κλείσιμο των στοματίων και παρεμποδίζοντας την είσοδο των βακτηρίων στο εσωτερικό των φυτών (Melotto et al., 2006). Επιπλέον είναι γνωστό ότι η εφαρμογή της φλατζελίνης επιφέρει το κλείσιμο των στοματίων το οποίο ελέγχεται από τη σηματοδότηση του αμπσιαικού οξέος. Το αμπσιαικό οξύ εμπλέκεται επίσης στην επαγωγή διασυστηματικής άμυνας ως αποτέλεσμα της προσβολής από το παθογόνο βακτήριο *R. solanacearum*, καθώς η επαγωγή της ανθεκτικότητας των φυτών είχε συσχέτιση με την αύξηση των επιπέδων έκφρασης των γονιδίων που εμπλέκονται στη βιοσύνθεση του αμπσιαικού οξέος (9-cis-epoxycarotenoid dioxygenase3, NCED3) αλλά και τη σηματοδότηση του (ABA-insensitive1-ABI1 και ABI5) (Feng et al., 2012).

Τα Μπρασινοστεροειδή είναι σημαντικές φυτοορμόνες οι οποίες ρυθμίζουν πολλές αναπτυξιακές και φυσιολογικές λειτουργίες, όπως η κυτταρική επιμήκυνση, η διαφοροποίηση των κυττάρων του ηθμού, η απόκριση του φυτού στο φως, η γήρανση των κυττάρων αλλά και λειτουργίες που σχετίζονται με την ανοχή του φυτού στο βιοτικό αλλά και αβιοτικό στρες (Kim and Wang, 2010). Ο υποδοχέας BRI1 (BR Insensitive 1), μία κινάση πλούσια σε λευκίνη που λειτουργεί σαν υποδοχέας μπρασινοστεροειδών όταν δεσμευτεί με κάποιο μπρασινοστεροειδές αυτοφωσφορυλιώνεται και με την σειρά του προκαλεί φωσφορυλίωση στο συνυποδοχέα BAK1 (Li et al., 2002; Nam and Li, 2002). Η πρωτεΐνη BAK1 αλληλεπιδρά με διάφορους υποδοχείς, όπως οι υποδοχείς FLS2, EFR και Pep1 που ενεργοποιούν την άμυνα των φυτών (Chinchilla et al., 2007; Schulze et al., 2010). Εφαρμογή μπρασινολίδης (brassinolide) σε φυτά *Oryza sativa* προκάλεσε ανθεκτικότητα έναντι των παθογόνων *Magnaporthe oryzae* και *Xanthomonas oryzae pv. oryzae* (Nakashita et al., 2003). Πιθανόν, η εφαρμογή με Μπρασινοστεροειδή να έχει ως αποτέλεσμα την αλληλεπίδραση του συμπλέγματος BRI1-BAK1 το οποίο με τη σειρά του είναι υπεύθυνο για τη θετική ρύθμιση κάποιων γονιδίων που εμπλέκονται με τον κυτταρικό θάνατο και της διασυστηματικής άμυνας (Nakashita et al., 2003).

Η πρωτεΐνη BAK1 σχετίζεται με τη μεταγωγή σημάτων τα οποία προέρχονται από τους εξωκυττάριους υποδοχείς αναγνώρισης (PRRs) και από διαφορετικά γεγονότα φωσφορυλίωσης (Schulze et al., 2010; Schwessinger et al., 2011; Jaillais et al., 2011). Επιπλέον, η πρωτεΐνη BAK1 ταυτοποιήθηκε ότι παρεμβάλλεται στη μεταγωγή του σήματος κατά τη διαδικασία δέσμευσης της μπρασινολίδης (BL) στον υποδοχέα BRI1 (Brassinosteroid- Insensitive 1). Κατά την διαδικασία δέσμευσης της μπρασινολίδης, ο υποδοχέας BRI1 αυτοφωσφορυλιώνεται και ενεργοποιεί την πρωτεΐνη BAK1 μέσω τρανσφωσφορυλίωσης. Με αποτέλεσμα το σχηματισμό του συμπλόκου BL-BRI1-BAK1 (Wang et al., 2008).

Αντίθετα, εξωγενής εφαρμογή παρεμποδιστών βιοσύνθεσης μπρασινοστεροειδών αύξησε την ανθεκτικότητα των φυτών έναντι του ωμούκητα *Pythium graminicola*. Παρομοίως, μεταλλαγμένα φυτά ως προς τα γονίδια που βιοσυνθέτουν μπρασινοστεροειδή παρουσίασαν μεγαλύτερη ανθεκτικότητα έναντι του μύκητα *P. graminicola*. Σύμφωνα με τους De Vleesschauwer et al. (2012) η ευπάθεια των φυτών σε ασθένειες στις οποίες μεσολαβούν τα μπρασινοστεροειδή ευθύνεται στην καταστολή των μονοπατιών του σαλικυλικού οξέος και του γιββερελινικού οξέος.

6. Η προσβολή των φυτών από παθογόνα αίτια μεταβάλλει το βασικό μεταβολισμό των φυτών.

Η επαγωγή της άμυνας των φυτών σε συνδυασμό με τον αποπροσανατολισμό που υπόκεινται τα φυτά από τα παθογόνα ως προς το μεταβολισμό των υδατανθράκων αυξάνουν τις απαιτήσεις του φυτού σε ιόντα και πηγές άνθρακα (Heil and Bostock, 2002; Swarbick et al., 2006). Τα φυτά προκειμένου να ανταπεξέλθουν στις αυξημένες απαιτήσεις σε πηγές άνθρακα ως αποτέλεσμα της προσβολής τους από παθογόνα μειώνουν το φωτοσυνθετικό τους ρυθμό, αυξάνοντας ταυτόχρονα την αναπνοή και τη δραστικότητα της ινβερτάσης (ένζυμο το οποίο καταλύει την υδρόλυση της σακχαρόζης σε γλυκόζη και φρουκτόζη) (Bonfig et al., 2006).

Μείωση ως προς το φωτοσυνθετικό ρυθμό παρατηρείται τόσο σε συμβατές όσο και ασύμβατες σχέσεις παθογόνου-ξενιστή, με τη μόνη διαφορά, ότι στην περίπτωση προσβολής από μη μολυσματικά στελέχη, παρατηρείται μείωση στο φωτοσυνθετικό ρυθμό νωρίτερα από την περίπτωση των μολυσματικών στελεχών (Scharte et al., 2005; Bonfig et al., 2006). Τα φυτά στην περίπτωση προσβολής τους από παθογόνους μικροοργανισμούς, μειώνουν το φωτοσυνθετικό τους ρυθμό προκειμένου να αυξήσουν το ρυθμό της αναπνοής τους και άλλες μεταβολικές διαδικα-

σίες που σχετίζονται με την άμυνα των φυτών. Τα επίπεδα έκφρασης συγκεκριμένων γονιδίων που εμπλέκονται στην φωτοσύνθεση όπως αυτά της μικρής υπομονάδας της ρουμπίσκο (rubisco, ribulose-1,5-bisphosphate carboxylase-RbcS) και της πρωτεΐνης η οποία δεσμεύεται στη χλωροφύλλη a,b μειώνονται ως αποτέλεσμα της προσβολής των φυτών από παθογόνους μικροοργανισμούς (Bonfig et al., 2006).

Οι μειωμένοι φωτοσυνθετικοί ρυθμοί και η αύξηση των απαιτήσεων των φυτών σε πηγές άνθρακα ως αποτέλεσμα της προσβολής τους από παθογόνους μικροοργανισμούς συχνά συνοδεύεται με αυξημένη εκροή σακχάρων από τους προσβεβλημένους ικανά φωτοσυνθετικούς ιστούς και ταυτόχρονη μεταφορά αυτών στους μη ικανά φωτοσυνθετικούς ιστούς (Scharte et al., 2005). Οι εξόζες μεταφέρονται στους μη φωτοσυνθετικά ικανούς ιστούς σε μορφή σακχαρόζης και εκεί μεταβολίζονται πάλι στη μορφή εξόζης με τη δράση του ενζύμου της ινβερτάσης. Έχει παρατηρηθεί αυξημένη έκφραση και δραστικότητα της ινβερτάσης σε φυτά στα οποία έχει προηγηθεί προσβολή από παθογόνα αίτια (Benhamou et al., 1991; Chou et al., 2000; Fotopoulos et al., 2003; Swarbick et al., 2006).

6.1 Σάκχαρα ως ρυθμιστικοί παράγοντες στην άμυνα των φυτών

Τα σάκχαρα δεν αποτελούν μόνο θρεπτικά υποστρώματα απαραίτητα για την ανάπτυξη, την αναπνοή και την δημιουργία αποθηκευτικών μορίων (άμυλο), αλλά επιτελούν και ρυθμιστικό ρόλο ως προς την έκφραση συγκεκριμένων γονιδίων (Koch, 1996). Στην περίπτωση της υπό-έκφρασης των γονιδίων που εμπλέκονται στη φωτοσύνθεση μετά τη μόλυνση από παθογόνα αίτια, παρατηρείται η συσώρευση εξοζών ως αποτέλεσμα της αυξημένης έκφρασης και δραστικότητας του ενζύμου της ινβερτάσης (Scholes et al., 1994; Chou et al., 2000; Pego et al., 2000; Berger et al., 2004).

Επιπλέον υπάρχουν αναφορές οι οποίες υποστηρίζουν το ρυθμιστικό ρόλο των σακχάρων ως προς την υπερέκφραση γονιδίων τα οποία εμπλέκονται στην άμυνα του φυτού έναντι παθογόνων μικροοργανισμών. Σύμφωνα με τους Herbers et al. (1996), σε φυτά *Arabidopsis thaliana* και καπνού στα οποία υπερεκφραζόταν το ένζυμο της ινβερτάσης υπήρχε συσχέτιση μεταξύ της συσώρευσης υδατανθράκων, της καταστολής της φωτοσύνθεσης και των αυξημένων επιπέδων έκφρασης γονιδίων που σχετίζονται με την άμυνα και την ανθεκτικότητα των φυτών έναντι του ιού του μωσαϊκού του καπνού (TMV).

Παρόλο που αρκετές αναφορές υποστηρίζουν την επίδραση του μεταβολισμού των υδατανθράκων στην παθογένεια διάφορων παθογόνων, δεν έχει κατανοηθεί πλήρως

ο μηχανισμός με τον οποίο τα σάκχαρα επιτυγχάνουν να επάγουν την έκφραση γονιδίων που σχετίζονται με την άμυνα. Υπάρχουν πολλές παράμετροι, οι οποίες συμβάλλουν στην πολυπλοκότητα της συσχέτισης μεταξύ του επιπέδου των σακχάρων και της ανάπτυξης μιας ασθένειας ή της ανθεκτικότητας έναντι ενός παθογόνου. Όπως προαναφέρθηκε, τα επίπεδα των σακχάρων επηρεάζουν τόσο την άμυνα όσο και τον γενικό μεταβολισμό των φυτών, επομένως οι μεταβολές στην έκφραση των γονιδίων άμυνας μπορεί να επηρεάζονται έμμεσα μέσω ενός άλλου μηχανισμού ο οποίος με τη σειρά του επηρεάζεται από τα αυξημένα επίπεδα σακχάρων. Επιπλέον, τα σάκχαρα δεν αποτελούν θρεπτικά υποστρώματα και ρυθμιστικοί παράγοντες μόνο για τα φυτά αλλά και για τους παθογόνους μικροοργανισμούς. Επομένως, οι μεταβολές στα επίπεδα αφομοίωση πηγών άνθρακα ίσως επηρεάζουν και την εξάπλωση του παθογόνου στο φυτό-ξενιστή και ίσως μεταβάλλουν με τη σειρά τους και την έκφραση των γονιδίων του παθογόνου. Τέλος, συγκεκριμένα παθογόνα εκκρίνουν εξωκυτταρικά σουκρολυτικά ένζυμα όπως ινβερτάσες, φρουκτοεξωυδρολάσες κ.α. Επομένως η μεταβολή στα επίπεδα των εξοζών μπορεί να μην είναι αποτέλεσμα αποκλειστικά και μόνο της δράσης των ενδοκυτταρικών ινβερτασών που συνθέτει το φυτό αλλά και λόγω των εξωκυτταρικών ινβερτασών που συνθέτουν τα παθογόνα (Berger et al., 2007).

7.1 *Hyaloperonospora arabidopsidis*

7.1.1 Ταξινομικά χαρακτηριστικά

Το παθογόνο *Hyaloperonospora arabidopsidis* ανήκει στην οικογένεια *Peronosporaceae* μαζί με άλλα γένη τα οποία προκαλούν την ασθένεια του περονόσπορου, όπως οι ωμούκητες *Plasmopara viticola* (περονόσπορος της αμπέλου), *Bremia lactuceae* (περονόσπορος του μαρουλιού) και *Pseudoperonospora cubensis* (περονόσπορος των κολοκυνθοειδών). Η οικογένεια *Peronosporaceae* ανήκει στο βασίλειο των Χρωμίστων, στην κλάση των Ωμομυκήτων και στην τάξη *Peronosporales* (McDowell, 2014).

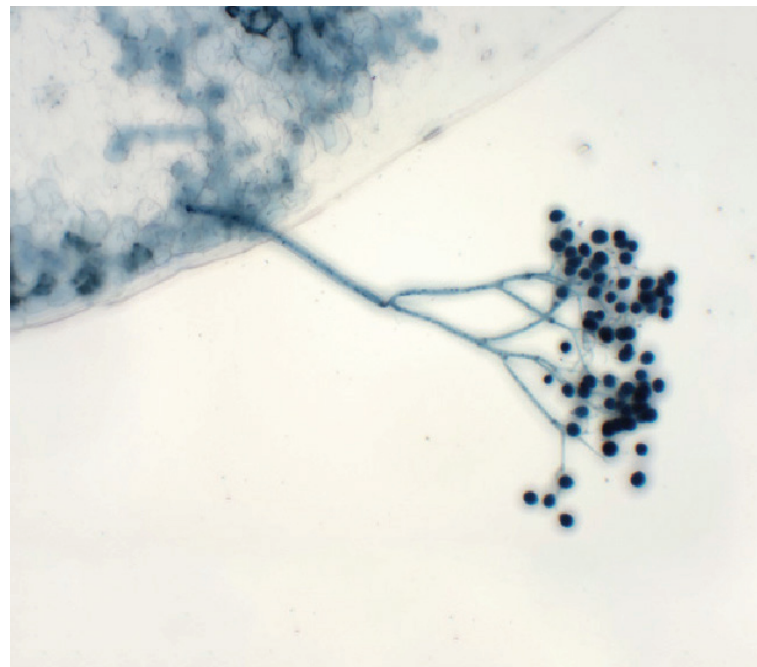
Στο παρελθόν το συγκεκριμένο παθογόνο μαζί και με άλλα είδη του γένους *Hyaloperonospora* ανήκαν στο είδος *Hyaloperonospora parasitica*. Το είδος *H. parasitica* αναφερόταν σε ένα παθογόνο, το οποίο προκαλεί την ασθένεια του περονόσπορου στα είδη της οικογένειας των σταυρανθών (*Brassicaceae*). Στην πραγματικότητα όμως, σύμφωνα με πρόσφατη φυλογενετική ανάλυση, το γένος *Hyaloperonospora* περιλαμβάνει πολλά είδη τα οποία είναι εξειδικευμένα ως προς τον ξενιστή τους ή προσβάλλουν περιορισμένο εύρος ξενιστών, ενώ συγκεκριμένα το είδος *Hyaloperonospora parasitica* είναι αποκλειστικά παθογόνο του ζιζανίου *Capsella bursa-pastoris* (Goker et al., 2007). Κατά συνέπεια, το είδος *Hyaloperonospora parasitica* διαχωρίστηκε σε πολλά επιμέρους είδη όπως αυτό του *Hyaloperonospora arabidopsidis*, το οποίο προσβάλλει αποκλειστικά το φυτό, *Arabidopsis thaliana* (Goker et al., 2007). Ο ωμούκητας *H. arabidopsidis*, έχει καθιερωθεί στον τομέα της έρευνας ως εργαστηριακό πρότυπο, προκειμένου να ερευνηθεί η αλληλεπίδραση παθογόνου-ξενιστή σε βιοτροφικές σχέσεις παρασιτισμού (McDowell, 2014).

7.1.2 Βιολογία του ωμούκητα *Hyaloperonospora arabidopsidis*

Τα σπόρια αγενούς αναπαραγωγής (ζωοσποριάγγεια) διασπείρονται μέσω του αέρα και του νερού στα φύλλα, όπου και προσκολλούνται στην επιφάνεια αυτών. Μέσω του ράμφους διείσδυσης (infection peg), ο ωμούκητας διέρχεται στο εσωτερικό των παρασιτούμενων ιστών και στη συνέχεια αναπτύσσει νηματοειδής υφές στους μεσοκυττάρους χώρους του μεσόφυλλου. Η επικοινωνία μεταξύ των υφών και των κυττάρων του ξενιστή, επιτυγχάνεται μέσω εξειδικευμένων μυκηλιακών κατασκευών, τους μυζητήρες (haustoria), οι οποίοι εισέρχονται εντός των κυττάρων και

εγκοιλώνονται στην κυτταρική μεμβράνη των παρασιτούμενων κυττάρων, προσλαμβάνοντας θρεπτικά στοιχεία απαραίτητα για την ανάπτυξη και την αναπαραγωγή του ωμούκητα, εκκρίνοντας ταυτόχρονα τελεστές οι οποίοι καταστέλλουν τη επαγόμενη διασυστηματική άμυνα των φυτών (McDowell, 2014).

Το επάκριο τμήμα των υφών εξέρχεται μέσω του ανοίγματος των στομάτων και εκεί διαφοροποιείται το καθένα σε τρεις ζωοσποριαγγειόφορους οι οποίοι φέρουν μεγάλο αριθμό ζωοσποριαγγείων, οι οποίοι με τη σειρά τους μολύνουν άλλους ιστούς του ίδιου ή διαφορετικού φυτού ξενιστή. Τα ωοσπόρια (σπόρια εγγενούς αναπαραγωγής) σχηματίζονται στο μεσόφυλλο μέσω της σύζευξης των ωογονίων με τα ανθηρίδια. Τα ωοσπόρια είναι ικανά να διαχειμάσουν στο έδαφος ή στα υπολείμματα των παρασιτούμενων φυτών για μεγάλο χρονικό διάστημα και να μολύνουν εκ νέου φυτά (McDowell, 2014).



Εικ.3 Ζωοσποριαγγειόφορος του ωμούκητα *Hyaloperonospora arabidopsidis*, ο οποίος επάκρια φέρει μεγάλο αριθμό ζωοσποριαγγείων (<http://www.zdnet.com>)

7.1.3 Συμπτώματα-σημεία της ασθένειας

Το χαρακτηριστικό σημείο της ασθένειας του περονόσπορου η οποία προκαλείται από το παθογόνο, *H. arabidopsidis*, είναι η εξάνθηση από ζωοσποριαγγειοφόρους που καλύπτουν τις άνω και κάτω επιφάνειες των φύλλων και των μίσχων (McDowell, 2014).

7.1.4 Συνθήκες ανάπτυξης

Οι περονόσποροι παρατηρούνται συνήθως σε δροσερά, υγρά κλίματα, κυρίως την άνοιξη και το φθινόπωρο. Η διείσδυση του ωμούκητα στο εσωτερικό των ιστών ευνοείται

στους 16 °C , ενώ η δημιουργία μυζητήρων επιτυγχάνεται σε θερμοκρασίες 20-24 °C. Σε εργαστηριακές συνθήκες ανάπτυξης του παθογόνου, οι συνήθεις θερμοκρασίες που πραγματοποιείται η ανάπτυξη και η παραγωγή ζωοσποριαγγειοφόρων είναι 16-18 °C και σχετική υγρασία που πλησιάζει το 100%. Η παραγωγή ζωοσποριαγγείων πραγματοποιείται κυρίως κατά τη διάρκεια της νύχτας και τα σπόρια απελευθερώνονται την ημέρα, καθώς οι ζωοσποριαγγειοφόροι πριν καταστραφούν συστρέφονται βίαια και εκτοξεύουν τα ζωοσποριάγγεα στον αέρα (McDowell, 2014).

Εικ.4 Εξάνθηση από ζωοσποριαγγειοφόρους του ωμούκητα *Hyaloperonospora arabidopsidis* (<http://www.pnas.org>)



Το βακτήριο *Pseudomonas syringae* pv. *tomato* είναι το παθογόνο αίτιο της ασθένειας της βακτηριακής σιγμάτωσης στην τομάτα. Πρόκειται για ένα Gram αρνητικό βακτήριο το οποίο έχει καθιερωθεί ως εργαστηριακό πρότυπο στον τομέα της έρευνας με σκοπό να παρέχει πληροφορίες σχετικά με την αλληλεπίδραση των παθογόνων βακτηρίων με τα φυτά-ξενιστές. Η ευκολία του στον τρόπο καλλιέργειας σε συνδυασμό με τις δυνατότητες που παρέχει για μεγάλο εύρος μοριακών τεχνικών, το καθιστούν ένα πολύ ευέλικτο και χρήσιμο εργαλείο στον τομέα της Φυτοπαθολογίας. Επιπλέον, το γεγονός ότι είναι φυσικό παθογόνο της τομάτας, η οποία υπόκεινται σε μετασχηματισμό αλλά και άλλες γενετικές αναλύσεις, δίνει τη δυνατότητα εύρεσης, ταυτοποίησης και χαρακτηρισμού νέων μολυσματικών παραγόντων ή πρωτεϊνών ανθεκτικότητας από τη μεριά του ξενιστή. Αλλά τελευταίο και πιο σημαντικό, είναι ότι εξαιτίας του γεγονότος ότι τα στελέχη *P. syringae* pv. *tomato* και *P. syringae* pv. *maculicola* (φυσικό παθογόνο βακτήριο του φυτού *A. thaliana*) έχουν κοινή εξειδίκευση ως προς τους φυσικούς ξενιστές τους, δίνει τη δυνατότητα να μελετηθεί εις βάθος η αλληλεπίδραση μεταξύ του συστήματος *P. syringae* pv. *tomato*/*A. thaliana* ως προς τη λειτουργία συγκεκριμένων γονιδίων στη διαδικασία παθογένεσης ή ανθεκτικότητας έναντι παθογόνων βακτηρίων (Preston, 2000).

Οι παθότυποι του είδους *P. syringae* όπως και άλλα φυτοπαθογόνα βακτήρια εισέρχονται στο εσωτερικό των ιστών του φυτού από φυσικά ανοίγματα (στομάτια, φακίδια, υδατώδη κ.α.) και πληγές καθώς δεν είναι ικανά από μόνα τους να πραγματοποιήσουν διάτρηση της φυτικής επιφάνειας. Το συγκεκριμένο βακτήριο ακολουθεί μία ημι-

βιοτροφική σχέση παρασιτισμού με το ξενιστή του. Κατά τα πρώτα στάδια αποίκησης του φυτού-ξενιστή, το βακτήριο πολλαπλασιάζεται στους μεσοκυττάρους χώρους, ακολουθώντας την τακτική του βιοτροφισμού. Αργότερα όμως, εκκρίνει μολυσματικούς παράγοντες, η έκκριση των οποίων γίνεται μαζικά από τα άτομα του εν δυνάμει πληθυσμού και σηματοδοτείται μέσω του συστήματος της αίσθησης του πληθυσμού (quorum sensing). Με αυτόν τον τρόπο, τα άτομα του πληθυσμού εκκρίνουν μολυσματικούς παράγοντες, μόνο όταν η πυκνότητα του πληθυσμού είναι σε υψηλά επίπεδα προκειμένου να αποικίσουν αποτελεσματικά το φυτό-ξενιστή παρακάμπτοντας συνεργιστικά, τη διασυστηματική άμυνα των φυτών ως απόκριση της έκκρισης μολυσματικών παραγόντων (Alfano and Collmer, 1996).

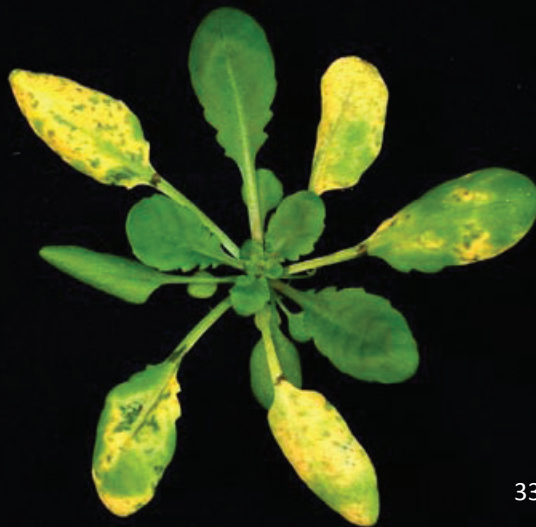
Έχουν ταυτοποιηθεί πολλοί δευτερογενείς μεταβολίτες που δρουν ως μολυσματικοί παράγοντες και ονομάζονται τελεστές του συστήματος έκκρισης τύπου 3 (type III secretion system, T3SS effector proteins) επειδή εκκρίνονται μέσω του συστήματος έκκρισης τύπου 3. Οι μολυσματικοί παράγοντες εκκρίνονται από τα βακτηριακά κύτταρα για να παρακάμψουν την επαγόμενη επίκτητη ή λανθάνουσα διασυστηματική άμυνα του φυτού έτσι ώστε να αποικήσουν αποτελεσματικά τον εκάστοτε ξενιστή. Κάθε παθότυπος εκκρίνει συγκεκριμένες πρωτεΐνες που δρουν ως μολυσματικοί παράγοντες και είναι εξειδικευμένες για τον κάθε ξενιστή, ενδεικτικά τέτοιες πρωτεΐνες είναι ταμπτοξίνη (tabtoxin), κορονατίνη (coronatine), συρινγκοτοξίνη (syringotoxin), φασεολοτοξίνη (phaseolotoxin) (Preston, 2000).

7.2.1 Συμπτώματα

Το παθογόνο προσβάλλει τα στελέχη, τα φύλλα, τους μίσχους, τους ποδίσκους, τα σέπαλα και τους καρπούς. Στους βλαστούς και τους μίσχους των σύνθετων φύλλων εμφανίζονται κυκλικές ή ελλειψοειδείς κηλίδες χρώματος βαθέως καστανού μέχρι μαύρου και διαμέτρου 1-3 mm. Πολλές φορές, επί των τρυφερών ιδιαίτερα βλαστών σχηματίζονται μαύρες, νεκρωτικές περιοχές μήκους 7-8 cm ή και πολύ μεγαλύτερες με τη συνένωση πολλών και ακανόνιστης περιφέρειας. Στην αρχή έχουν χρώμα βαθύ πράσινο ελαιώδες και είναι πολύ επιφανειακές. Αργότερα όμως η προσβολή εξαπλώνεται βαθύτερα μέσα στους ιστούς του φλοιού και των αγγείων. Όταν η προσβολή περιβάλλει το βλαστό προκαλείται αποξήρανση του πάνω από την προσβολή μέρους του βλαστού (Παναγόπουλος, 1995).

Στο έλασμα των φύλλων η μόλυνση εκδηλώνεται με τη μορφή νεκρωτικών κηλίδων χρώματος καστανού μαύρου.

Εικ.5 Χαρακτηριστική συμπτωματολογική εικόνα φυτού *Arabidopsis thaliana* μετά από μόλυνση με το παθογόνο βακτήριο *Pseudomonas syringae* pv. *tomato* (<http://www.pseudomonas-syringae.org>)



Οι κηλίδες περιβάλλονται συνήθως από χλωρωτική ζώνη (άλω) διαμέτρου 0,5-3 mm. Με τη συνένωση πολλών κηλίδων σχηματίζονται στο έλασμα μεγαλύτερες νεκρωτικές περιοχές. Οι μολύνσεις στην περιφέρεια και την κορυφή του ελάσματος είναι πιο συχνές. Σε προχωρημένο στάδιο της προσβολής παρατηρείται απόπτωση των φύλλων (Παναγόπουλος, 1995).

Στους καρπούς παρατηρούνται κυκλικές κηλίδες διαμέτρου 1-2 mm, επίπεδες ή ελαφρά βυθισμένες οι οποίες φέρουν ανοικτό μέχρι βαθύ καστανό χρωματισμό. Στη συνέχεια, γίνονται σκούρες καστανές ή μαύρες και σχίζονται στο κέντρο, ενώ έχουν σύσταση σπογγώδη και δεν περιβάλλονται από άλω. Υπό συνθήκες ψηλής υγρασίας οι κηλίδες γίνονται γυαλιστερές λόγω εξόδου βλεννώδους βακτηριακής εκκρίσεως από τους παρασιτισμένους ιστούς (Παναγόπουλος, 1995).

7.3 *Botrytis cinerea*

Ο μύκητας *Botrytis cinerea*, είναι το παθογόνο αίτιο της ασθένειας της τεφράς σήψης, έχοντας μεγάλο φάσμα ξενιστών. Πρόκειται για ένα μύκητα, ο οποίος ανήκει στο φύλο των ασκομυκήτων, αλλά εντάσσεται στην κατηγορία των αδηλομυκήτων, εξαιτίας του γεγονότος ότι η τέλεια μορφή του (*Botryotinia fuckeliana*), είναι σπάνια έως απύσχα στη φύση (Kars et al., 2005).. Η μόλυνση, ο αποικισμός και η καταστολή της διασυστηματικής άμυνας του φυτού-ξενιστή επιτελείται από ένα μεγάλο αριθμό λυτικών ενζύμων, τοξινών, ενεργών ριζών οξυγόνου (ROS) και μια σειρά από δευτερογενείς μεταβολίτες, τα οποία προσδίδουν στο παθογόνο νεκροτροφικό χαρακτήρα (van Kan, 2006; Choquer et al., 2007). Ο μύκητας *B. cinerea*, έχει την ικανότητα να

7.2.2 Συνθήκες ανάπτυξης και εμφάνισης της ασθένειας

Το βακτήριο έχει άριστη θερμοκρασία ανάπτυξης μεταξύ 20 και 25 °C, μέγιστη στους 35 °C και ελάχιστη στους 5 °C. Η ασθένεια ευνοείται με υγρό καιρό (σχετική υγρασία πάνω από 80%) και σε θερμοκρασίες μεταξύ 18-24 °C. Εν τούτοις η ασθένεια μπορεί να εκδηλωθεί και σε θερμοκρασίες που κυμαίνονται μεταξύ 15-32 °C (Παναγόπουλος, 1995).

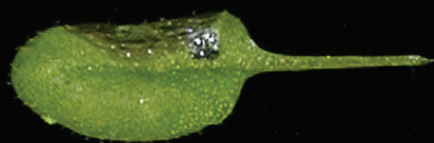
εκκρίνει διαφορετικούς μολυσματικούς παράγοντες ανάλογα τον ιστό, αλλά και το ξενιστή που προσβάλλει. Το γεγονός αυτό σε συνδυασμό με το ότι έχει την ικανότητα να προσβάλλει όλα τα υπέργεια όργανα των φυτών, του δίνει την ικανότητα προσαρμογής σε διαφορετικά περιβάλλοντα (Kars et al., 2005).

Ο μύκητας *B. cinerea*, είναι ικανός να μολύνει πάνω από 235 είδη ξενιστών σε όλα τα γεωγραφικά μήκη και πλάτη στον κόσμο, ενώ η μολυσματικότητα του δεν περιορίζεται μόνο σε δικοτυλήδονα φυτά αλλά και σε κάποια είδη μονοκοτυλήδονων (κρεμμύδι, λιλίου κ.α.) (Prins et al., 2000; Staats et al., 2005).

7.3.1 Συμπτώματα

Αναπτύσσεται επί υγιών, εξασθετισμένων ή νεκρών φυτικών ιστών. Προσβάλλει φυτά όλων των ηλικιών και όλα σχεδόν τα υπέργεια μέρη τους όπως τα φύλλα, τα άνθη, τους καρπούς, τα στελέχη, ενώ στην περίπτωση των βολβωδών λαχανικών προσβάλλει και τις ρίζες. Στους υδαρείς καρπούς και τρυφερούς βλαστούς, η προσβεβλημένη περιοχή αρχικά έχει ανοιχτό πράσινο χρώμα, το οποίο αργότερα μετατρέπεται σε ανοιχτό καστανό χρώμα. Η επιδερμίδα δεν σκίζεται, αλλά οι ευρισκόμενοι κάτω από αυτήν ιστοί γίνονται μαλακοί και υδαρείς. Στην περίπτωση της τομάτας, οι πρώτες προσβολές εμφανίζονται συνήθως στο λαιμό των φυταρίων του σπορείου. Οι προσβεβλημένοι ιστοί γίνονται μαλακοί, συρρικνώνονται, νεκρώνονται και καλύπτονται από την πυκνή, χαρακτηριστική τεφρά εξάνθηση.

Εικ.6 Προσβολή φύλλου *Arabidopsis thaliana* από το μύκητα *Botrytis cinerea* μετά τη δράση κυτταρολυτικών ενζύμων (<http://www.unifr.ch/plantbiology>)



Στα νεαρά φυτά, τα πρώτα συμπτώματα της προσβολής από το μύκητα *B. cinerea* εμφανίζονται στο λαϊμό. Οι ιστοί που έχουν προσβληθεί γίνονται μαλακοί, ενώ στη συνέχεια, λόγω της αφυδατώσεως, παρατηρείται στένωση και χρώμα καστανό της προσβεβλημένης περιοχής. Οι προσβολές στα φύλλα προχωρούν στους μίσχους και από τους μίσχους καταλήγουν στο στέλεχος, στο οποίο αρχικά σχηματίζεται μικρό, ανοικτού καστανού ή καστανού χρώματος, έλκος. Το έλκος, υπό ευνοϊκές συνθήκες μεγαλώνει και στην συνέχεια καλύπτεται από την γκρίζα εξάνθηση του μύκητα. Σε πολύ ευνοϊκές συνθήκες προσβάλλονται και τα άνθη. Τα προσβεβλημένα μέρη του άνθους (σέπαλα, πέταλα, ποδίσκος κ.α.), αποκτούν χρώμα καστανό και στη συνέχεια νεκρώνονται και πέφτουν. Στους καρπούς, η προσβολή αρχίζει από τα μολυσμένα μέρη του άνθους (σέπαλα) και μέσω αυτών προχωρεί στον καρπό, του οποίου οι ιστοί γίνονται μαλακοί, υδαρείς και καλύπτονται από άφθονη εξάνθηση των καρποφοριών του παθογόνου (Παναγόπουλος, 1995).

7.3.2 Βιολογία του μύκητα *B. cinerea*

Ο μύκητας, προσκολλάται στη φυτική επιφάνεια μέσω του σχηματισμού της πλάκας συγκρατήσεως και στη συνέχεια διατρύπεί την εφυμενίδα μέσω του ράμφους διείσδυσης, εκκρίνοντας ταυτόχρονα διάφορα λυτικά ένζυμα όπως οξειδάσες, κουτινάσες και λιπάσες, τα οποία αποδιοργανώνουν την εφυμενίδα και τις κηρώδεις ουσίες του φυτού (van Kan et al., 1997; Tenberge, 2004). Μόλις αποδυναμωθεί η εφυμενίδα των προσβεβλημένων ιστών, ο μύκητας εκκρίνει μια σειρά από λυτικά ένζυμα συμπεριλαμβανομένων ενδο-πολυγαλακτουρονασών, πρωτεασών, πηκτινολυτικών κ.α., προκειμένου να αποδιοργανωθούν τα επιδερμικά κύτταρα για να εισχωρήσει ο μύκητας εσωτερικά των προσβεβλημένων ιστών (Kars et al., 2005).

Ο μύκητας κατά τη διαδικασία διείσδυσης στο εσωτερικό των ιστών εκκρίνει μία μη εξειδικευμένη ως προς το ξενιστή τοξίνη (botrydial), η οποία δρα ως μολυσματικός παράγοντας, προωθώντας τη χλωρίωση των φύλλων και τη λύση των κυττάρων (Colmenares et al., 2002). Ο μύκητας *B. cinerea*, στην προσπάθειά του να νεκρώσει τους ιστούς προκειμένου να τους αποικίσει, εκκρίνει οξαλικό οξύ (OA), το οποίο προωθεί τη μόλυνση δημιουργώντας ένα άριστο περιβάλλον οξύτητας για την αύξηση της δραστηριότητας των κυτταρολυτικών ενζύμων, ενώ ταυτόχρονα επάγει τη νέκρωση των κυττάρων, διαταράσσοντας την ακεραιότητα του κυτταρικού τοιχώματος των κυττάρων, αδρανοποιώντας τους διαύλους ασβεστίου που είναι προσκολλημένοι σε αυτό (Prins et al., 2000; Manteau et al., 2003; van Kan, 2006).

Ο μύκητας, διαχειμάζει στα νεκρά υπολείμματα των προσβεβλημένων φυτών είτε με τη μορφή σαπροφυτικού μυκηλίου, είτε με τη μορφή σκληρωτίων. Τα βλαστώνοντα σκληρώτια σχηματίζουν μυκήλιο και κονιδιοφόρους, οι

οποίες φέρουν στο επάκριο τμήμα τους μεγάλο αριθμό μονοκύτταρων σπορίων, τα οποία αποτελούν το πρώτο μόλυσμα του νέου κύκλου της ασθένειας. Τα σπόρια μεταφέρονται μέσω του αέρα ή του νερού σε εξασθενημένους ιστούς φυτών ή σε σημεία πληγών, όπου και δημιουργούν εστίες μόλυνσης. Υπό συνθήκες χαμηλής θερμοκρασίας και υψηλής υγρασίας, το μυκήλιο του μύκητα αναπτύσσεται πολύ γρήγορα, προσδίδονται ακόμη πιο επιθετικό χαρακτήρα στην ασθένεια. Πάνω στους προσβεβλημένους ιστούς, σχηματίζεται νέο μόλυσμα, το οποίο με τη σειρά του μολύνει άλλους εξασθενημένους ιστούς του ίδιου φυτού ή και άλλων φυτών (Παναγόπουλος, 1995; Τζάμος, 2005).



Εικ.7 Κονιδιοφόρος του μύκητα *Botrytis cinerea*, ο οποίος επάκρια φέρει μεγάλο αριθμό μονοκύτταρων σπορίων (<http://www.apsnet.org>)

7.3.3 Συνθήκες ανάπτυξης

Απαραίτητες συνθήκες για την ανάπτυξη της ασθένειας είναι η υψηλή σχετική υγρασία του περιβάλλοντος και ο σχετικά ψυχρός καιρός. Ο μύκητας δεν είναι ιδιαίτερα ευαίσθητος στις διακυμάνσεις της θερμοκρασίας γιατί μπορεί να αναπτυχθεί σε θερμοκρασίες που κυμαίνονται μεταξύ 1-30 °C. Εν τούτοις η άριστη θερμοκρασία για την ανάπτυξη του μύκητα κυμαίνεται μεταξύ των 18-23 °C. Σε θερμοκρασίες 32 °C και άνω η ανάπτυξη του παθογόνου παρεμποδίζεται (Παναγόπουλος, 1995). Ο μύκητας απαιτεί φως για να σποροποιήσει και συνθήκες σκότους για να πραγματοποιήσει μόλυνση (Stewart and Long, 2012).

Β. ΣΚΟΠΟΣ ΤΗΣ ΜΕΛΕΤΗΣ

Τα σάκχαρα αποτελούν το τελικό προϊόν της φωτοσύνθεσης, ενώ μέσα από μία σειρά αντιδράσεων καταβολισμού και αναβολισμού απελευθερώνεται ενέργεια, η οποία είναι απαραίτητη για ποικίλες λειτουργίες του φυτού, που σχετίζονται με την αναπνοή, την ανάπτυξη, την βιοσύνθεση μορίων κ.α.. Τα σάκχαρα όμως, φαίνεται να επιτελούν και ρυθμιστικό ρόλο ως προς την επαγωγή ή την καταστολή της έκφρασης γονιδίων ή μεταγραφικών παραγόντων που σχετίζονται με τη φωτοσύνθεση και την ανάπτυξη του φυτού. Υπάρχουν αρκετές αναφορές, οι οποίες υποστηρίζουν το ρυθμιστικό ρόλο του επιπέδου των σακχάρων στην επαγωγή γονιδίων τα οποία εμπλέκονται στην ενεργή άμυνα των φυτών έναντι προσβολών από παθογόνους μικροοργανισμούς. Ο ρόλος των σακχάρων στην ενεργοποίηση της άμυνας των φυτών όσο και ο μηχανισμός με τον οποίο τα σάκχαρα επιτυγχάνουν να ενεργοποιήσουν ή να καταστείλουν την έκφραση συγκεκριμένων γονιδίων, τα οποία σχετίζονται άμεσα ή έμμεσα με την ενεργή άμυνα των φυτών δεν έχει μελετηθεί εις βάθος, με αποτέλεσμα να υπάρχουν αντιφατικές αναφορές ως προς τον θετικό ή αρνητικό ρόλο αυτών στην ενεργοποίηση της άμυνας.

Στην παρούσα μεταπτυχιακή μελέτη, διερευνήθηκε ο ρόλος των β-αμυλασών στην άμυνα των φυτών εναντίον βιοτροφικών, ημιβιοτροφικών και νεκροτροφικών παθογόνων. Οι β-αμυλάσες κατέχουν κυρίαρχο ρόλο στον καταβολισμό του αμύλου και την απελευθέρωση μορίων του δισακχαρίτη της μαλτόζης κατά τη διάρκεια της νύχτας, όταν η σύνθεση των σακχάρων *de novo* από την αφομοίωση του CO² μέσω της φωτοσυνθετικής αλυσίδας μεταφοράς ηλεκτρονίων καθίστανται αδύνατη. Η σίγηση συγκεκριμένων γονιδίων τα οποία κωδικοποιούν β-αμυλάσες στο φυτό *A. thaliana*, έχει ως αποτέλεσμα φαινότυπους με συσσωρευμένο άμυλο στα φύλλα κατά τη διάρκεια της νύχτας και μικρή συσσώρευση του δισακχαρίτη της μαλτόζης τόσο στο χλωροπλάστη, όσο και στο κυτταρόπλασμα. Επομένως μέσω μεταλλαγμένων σειρών σε συγκεκριμένα γονίδια των β-αμυλασών μπορεί να διερευνηθεί ο ρόλος των διαφορετικών επιπέδων τόσο του δισακχαρίτη της μαλτόζης, όσο και του αμύλου ως προς την επαγόμενη από το σαλικυλικό οξύ ή το αιθυλένιο άμυνα των φυτών.

Στη μεταπτυχιακή μελέτη, ελέγχθηκαν πέντε διαφορετικοί γονότυποι του φυτού *A. thaliana* ως προς την ανθεκτικότητα τους έναντι βιοτροφικών, ημι-βιοτροφικών και νεκροτροφικών παθογόνων. Οι τέσσερις γονότυποι ήταν μεταλλαγμένοι αντίστοιχα σε κάθε ένα γονίδιο που κωδικοποιεί μία διαφορετική β-αμυλάση (*bam1*, *bam2*, *bam3*, *bam4*) και ο πέμπτος ήταν ο γονότυπος των φυτών του αγρίου τύπου (*A. thaliana* Col-0), ο οποίος χρησιμοποιήθηκε ως μάρτυρας σε όλες τις επεμβάσεις του πειράματος. Ως παθογόνα, χρησιμοποιήθηκαν ο ωομύκητας *Hyaloperonospora arabidopsidis*, το βακτήριο *Pseudomonas syringae* *pv. tomato* DC3000 και ο μύκητας

Botrytis cinerea, τα οποία αντιπροσωπεύουν βιοτροφική, ημι-βιοτροφική και νεκροτροφική σχέση παρασιτισμού με το ξενιστή τους, αντίστοιχα.

Πραγματοποιήθηκαν πειράματα παθογένειας όπου αξιολογήθηκε η ανθεκτικότητα των μεταλλαγμένων φυτών *bam1*, *bam2*, *bam3* και *bam4* έναντι των παθογόνων *Hyaloperonospora arabidopsidis*, *Pseudomonas syringae* *pv. tomato* DC3000 και *Botrytis cinerea* σε σχέση με τα αγρίου τύπου φυτά Col-0. Στα πειράματα παθογένειας όπου εφαρμόστηκε ο ωομύκητας *H. arabidopsidis* στους διάφορους γονότυπους, πραγματοποιήθηκε ποσοτικοποίηση των ζωοσποριαγγείων ανά mg νωπού ιστού σε φυτά ηλικίας 3 εβδομάδων, 7 ημέρες μετά τη μόλυνση με τον ωομύκητα και χρώση Trypan Blue σε φύλλα φυτών ηλικίας 2 εβδομάδων για να αξιολογηθεί ποιοτικά η ύπαρξη διαφοροποίησης μεταξύ των διαφορετικών γονότυπων, ως προς την εξάπλωση του ωομύκητα στους μεσοκυττάρους χώρους του ελάσματος των φύλλων. Στα πειράματα παθογένειας με το βακτήριο *P. syringae* *pv. tomato* DC3000, πραγματοποιήθηκε μέτρηση του νωπού βάρους των φυτών και ποσοτικοποίηση του ενδοφυτικού πληθυσμού του βακτηρίου στις 2 και 4 ημέρες μετά τη μόλυνση στους διαφορετικούς γονότυπους. Στα πειράματα παθογένειας με το μύκητα *B. cinerea* πραγματοποιήθηκε μέτρηση της συχνότητας εμφάνισης νεκρωτικών κηλίδων και μέτρηση της διαμέτρου αυτών σε κάθε φύλλο στο οποίο προηγήθηκε εφαρμογή αιωρήματος σπορίων του μύκητα. στις 4 και 5 ημέρες μετά τη μόλυνση.

Τέλος, γνωρίζοντας ότι η ανθεκτικότητα των φυτών έναντι βιοτροφικών και ημιβιοτροφικών παθογόνων συνδέεται με το μονοπάτι σηματοδότησης του σαλικυλικού οξέος και αντίστοιχα η ανθεκτικότητα των φυτών έναντι νεκροτροφικών παθογόνων συνδέεται με το μονοπάτι σηματοδότησης του αιθυλενίου/ιασμονικού οξέος, πραγματοποιήθηκε ποσοτικοποίηση των επιπέδων έκφρασης των γονιδίων *PR1* και *PDF1.2*, τα οποία σχετίζονται με εξαρτώμενη από το σαλικυλικό οξύ και αιθυλένιο/ιασμονικό οξύ διασυστηματική άμυνα, αντίστοιχα, στα διάφορα παθοσυστήματα με τη μέθοδο της Real Time qPCR. Επιπλέον, σε κάθε εφαρμογή των φυτών του αγρίου τύπου με τα υπό μελέτη παθογόνα, πραγματοποιήθηκε ποσοτικοποίηση των επιπέδων έκφρασης των γονιδίων *BAM1*, *BAM2*, *BAM3* και *BAM4*, αντίστοιχα, για να διερευνηθεί εάν τα παθογόνα επηρεάζουν την έκφραση των υπό εξέταση γονιδίων των β-αμυλασών στην προσπάθειά τους να αποικίσουν αποτελεσματικά τον ξενιστή του.

Γ. ΥΛΙΚΑ ΚΑΙ ΜΕΘΟΔΟΙ

1. Γενικά

1.1 Φυτικό υλικό

Για την πραγματοποίηση των πειραμάτων χρησιμοποιήθηκαν τα μεταλλαγμένα φυτά *Arabidopsis thaliana* *bam1*, *bam2*, *bam3* και *bam4* (ευγενική προσφορά του Dr. Samuel Zeeman, ETH Zurich, Switzerland), τα οποία είναι μεταλλαγμένα στα γονίδια των β-αμυλασών BAM1, BAM2, BAM3 και BAM4, αντίστοιχα. Ως μάρτυρας στις διάφορες εφαρμογές, χρησιμοποιήθηκαν τα φυτά αγρίου τύπου *A. thaliana* οικότυπος Columbia (Col-0). Ενώ, κατά τη διαδικασία της δημιουργίας μολύσματος του ωμούκητα *H.*

arabidopsidis, χρησιμοποιήθηκαν μεταλλαγμένα φυτά *eds1*, στα οποία έχει διαγραφεί το γονίδιο *EDS1* (enhanced disease susceptibility 1), το οποίο κωδικοποιεί την πρωτεΐνη EDS1 η οποία είναι απαραίτητη για την πρόσδεση της πρωτεΐνης ανθεκτικότητας RPS4 του φυτού *A. thaliana* με την αντίστοιχη πρωτεΐνη τελεστή AnrRps4 του ωμούκητα *H. arabidopsidis*, προκειμένου να ενεργοποιηθεί η επαγόμενη από τελεστές διασυστηματική άμυνα (ETI)(Heidrich et al., 2011).

1.2 Μικροβιολογικό Υλικό

- *Hyaloperonospora arabidopsidis* φυλή Noco2
- *Pseudomonas syringae* pv. *tomato* DC3000
- *Botrytis cinerea*

1.3 Θρεπτικά Υποστρώματα και Αντιβιοτικά

- Θρεπτικό υλικό King's B (King's B Medium)
- Εκχύλισμα πατάτας με δεξτρόζη και άγαρ (Potato Dextrose Agar, PDA)
- Εκχύλισμα πατάτας με δεξτρόζη (Potato Dextrose Broth, PDB)
- Ριφαμπικίνη (50mg/ml)
- Καναμυκίνη (50μg/ml)

Παρασκευή θρεπτικού υποστρώματος King's B

Συστατικά	gr/L H ₂ O
Πρωτεόζη Πεπτόνης	20
Γλυκερόλη	10
K ₂ HPO ₄	1.5
Άγαρ	15

Ρυθμίζεται σε pH 7 και αποστειρώνεται στους 120 °C σε υγρό κλίβανο για 20 λεπτά.

Παρασκευή Εκχυλίσματος πατάτας με δεξτρόζη και Άγαρ (PDA)

Συστατικά	gr/L H ₂ O
Εκχύλισμα πατάτας	200
Δεξτρόζη	20
Άγαρ	20

Βήματα παρασκευής PDA:

1. Προστίθενται 200 gr αποφλοιωμένης πατάτας σε 1L αποσταγμένου νερού και αφήνονται να βράσουν για 30 λεπτά
2. Μετά το πέρας των 30 λεπτών, το εκχύλισμα πατάτας διαχωρίζεται από τους φυτικούς ιστούς με τη χρήση διηθητικού τουλιού
3. Στη συνέχεια συμπληρώνεται όγκος νερού έως 1L και προστίθενται 20 gr δεξτρόζης και άγαρ
4. Γίνεται ομογενοποίηση του διαλύματος με τη χρήση μηχανητικού αναδευτήρα
5. Αποστειρώνεται στους 120 °C σε υγρό κλίβανο για 20 λεπτά

2. Προετοιμασία φυτικού υλικού

2.1 Προετοιμασία σπορόφυτων

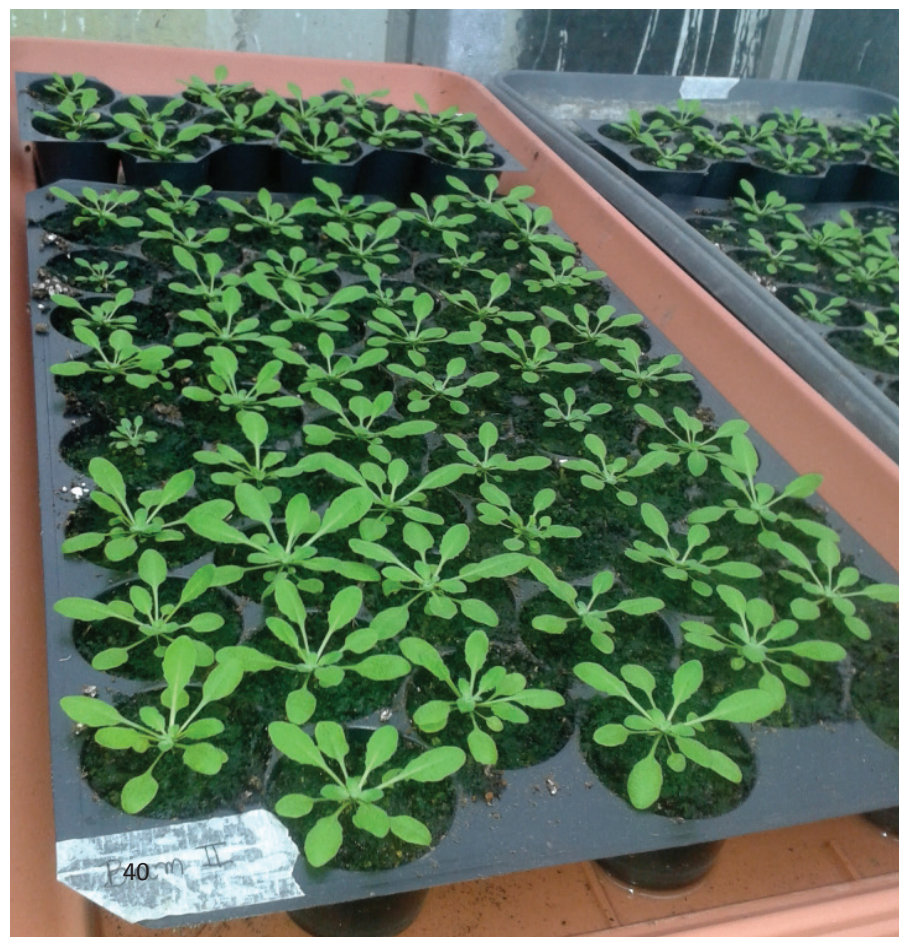
Οι σπόροι των διαφορετικών γονοτύπων τοποθετήθηκαν σε γλαστράκια με τύρφη συνολικού όγκου 350 ml τα οποία ποτίστηκαν μέχρι τον υδατοκορεσμό τους. Έπειτα καλύφθηκαν με διαφανές νάιλον και μεταφέρθηκαν σε θάλαμο ψύξης (cold room) θερμοκρασίας 4 °C προκειμένου να δημιουργηθούν οι κατάλληλες συνθήκες υψηλής υγρα-

σίας και θερμοκρασίας για διακοπή του λήθαργου τους. Οι σπόροι παρέμειναν συνολικά 2 ημέρες στον θάλαμο ψύξης και έπειτα μεταφέρθηκαν στο σπορείο, στο οποίο επικρατούσαν ελεγχόμενες συνθήκες θερμοκρασίας 25 °C και 12 ώρες φωτός. Το διαφανές νάιλον αφαιρέθηκε μετά τις 5 ημέρες μετά τη βλάστηση των σπόρων.

2.2 Μεταφύτευση σπορόφυτων στις τελικές θέσεις φύτευσης

Μία εβδομάδα μετά την αφαίρεση του διαφανούς πλαστικού και όταν τα φυτά βρίσκονταν στο στάδιο των 2 πραγματικών φύλλων μεταφυτεύθηκαν στις τελικές θέσεις φύτευσης. Στην περίπτωση των πειραμάτων με τον ωμούκητα *H. arabidopsidis*, τα σπορόφυτα μεταφυτεύθηκαν σε τετράγωνους δίσκους διαχωριζόμενων θέσεων, μεταφυτεύοντας 5 σπορόφυτα ανά γλαστράκι. Στην περίπτωση των πειραμάτων με το βακτήριο *P. syringae* pv. *tomato* DC3000 μεταφυτεύθηκαν σε δίσκους σπορείων 51 θέσεων διαστάσεων 50x30cm μεταφυτεύοντας ένα σπορόφυτο ανά μία

θέση φύτευσης, ενώ στην περίπτωση των πειραμάτων παθογένειας με τον μύκητα *Botrytis cinerea* μεταφυτεύθηκαν σε πλαστικά γλαστράκια συνολικού όγκου 350 ml, μεταφυτεύοντας 1 φυτό ανά γλαστράκι. Στις θέσεις φύτευσης τοποθετήθηκε φυτόχωμα στο οποίο εφαρμόστηκε υγρασία πριν τη μεταφύτευση των σπορόφυτων, ενώ 2 ημέρες πριν τη μεταφύτευση πραγματοποιήθηκε ριζοπότισμα με το διασυστηματικό εντομοκτόνο Actara (δ.ο.thiametoxam) προκειμένου να καταπολεμηθούν οι προνύμφες των δίπτερων εντόμων της οικογένειας *Sciaridae*.



Εικ.8 Φυτάρια *A. thaliana* σε δίσκους σπορείων 51 θέσεων διαστάσεων 50x30cm για τα πειράματα παθογένειας με το βακτήριο *Pst* DC3000.

3. Πειράματα Παθογένειας με τον ωομύκητα *H. arabidopsidis*

3.1 Προετοιμασία μολύσματος του ωομύκητα *H. arabidopsidis*

Για το συγκεκριμένο πείραμα χρησιμοποιήθηκε η φυλή Noco2 του ωομύκητα *H. arabidopsidis*, η οποία είναι μολυσματική έναντι των φυτών *A. thaliana* Col-0, καθώς τα φυτά αγρίου τύπου δεν έχουν κάποια συμβατή πρωτεΐνη ανθεκτικότητας με τις αντίστοιχες πρωτεΐνες τελεστές του ωομύκητα, όπως στην περίπτωση της φυλής Emwa1, όπου υπάρχει συμβατότητα των γονιδίων αμολυσματικότητας αυτής με τα αντίστοιχα γονίδια ανθεκτικότητας του φυτού *A. thaliana* Col-0. Τα μεταλλαγμένα φυτά *eds1* χρησιμοποιήθηκαν κατά τη διαδικασία της ανακαλλιέργειας του ωομύκητα μέχρι να γίνει παραλαβή επαρκούς ποσότητας μολύσματος για να εφαρμοστεί το μολύσμα στους υπό-εξέταση γονότυπους. Τα φυτά *eds1* είναι πιο ευπαθή στη μόλυνση με τον ωομύκητα, δίνοντας μεγαλύτερη ποσότητα μολύσματος, ενώ παρέχουν ικανοποιητικά αποτελέσματα μολύνσεως ακόμα και στην περίπτωση όπου ο ωομύκητας έχει χάσει τη μολυσματική του ικανότητα μετά από βαθειά ψύξη (-80 °C).

Ο ωομύκητας *H. arabidopsidis* είναι υποχρεωτικό παράσιτο, επομένως η καλλιέργεια του γίνεται αποκλειστικά *in vivo*, σε ζωντανούς ιστούς *A. thaliana*. Το παθογόνο ήταν αποθηκευμένο στους -80 °C με τη μορφή μολυσμένων ιστών *A. thaliana*. Οι μολυσμένοι ιστοί αιωρηματοποιήθηκαν σε 10 ml δισ-αποσταγμένου νερού σε πλαστικό σωληνάκι τύπου Falcon και στη συνέχεια αναδεύτηκαν έντονα με τη χρήση vortex, προκειμένου να αιωρηματοποιηθούν τα ζωοσποριαγγεία τα οποία αποτέλεσαν το πρώτο μολύσμα για την ανακαλλιέργεια του ωομύκητα. Με τη βοήθεια διηθητικού πανιού Miracloth, διαχωρίστηκαν τα φυτικά

στελέχη και τα υπολείμματα χώματος από το υπόλοιπο αιώρημα. Το μολύσμα ψεκάστηκε πάνω σε μεταλλαγμένα σπορόφυτα *eds1* στο στάδιο των 2-3 πραγματικών φύλλων με τη χρήση ειδικού ψεκαστικού χρωμάτων, τα οποία σχηματίζουν πολύ μικρού μεγέθους σταγονίδια, επιτρέποντας την καλύτερη διασπορά του μολύσματος πάνω στη φυτική επιφάνεια. Τα γλαστράκια με τα σπορόφυτα *eds1* τοποθετήθηκαν σε ειδικό πλαστικό κουτί, η κάτω επιφάνεια του οποίου ήταν στρωμένη με φύλλα διηθητικού χαρτιού, κορεσμένα με νερό, παρέχοντας την απαραίτητη υγρασία στα σπορόφυτα κατά τη διάρκεια της καλλιέργειας του ωομύκητα. Μετά το ψεκασμό του μολύσματος πάνω στην φυτική επιφάνεια των φυτών, εφαρμόστηκαν στο εσωτερικό του πλαστικού κουτιού υψηλά επίπεδα υγρασίας με τη χρήση του ψεκαστικού χρωμάτων δημιουργώντας νέφος νερού. Έπειτα το πλαστικό κουτί σφραγίστηκε με χρήση χαρτοτενίας, προκειμένου να μην υπάρχουν απώλειες υγρασίας. Στη συνέχεια το πλαστικό κουτί με τα ψεκασμένα σπορόφυτα, τοποθετήθηκε σε ειδικό θάλαμο ανάπτυξης υπό ελεγχόμενες συνθήκες θερμοκρασίας 18 °C και αναλογία ωρών φωτός-σκότους 10:14. Την 7^η ημέρα μετά τη μόλυνση ο ωομύκητας είχε αποικίσει αποτελεσματικά τους ζωντανούς ιστούς των σπορόφυτων και είχε σποροποιήσει. Η διαδικασία επαναλήφθηκε όπως προαναφέρθηκε παραπάνω, τουλάχιστον 2-3 φορές σε φυτά *eds1*, προκειμένου να συλλεχτεί επαρκής ποσότητα μολύσματος και να ανακτηθεί ο μύκητας την πλήρη μολυσματική του ικανότητα.

3.2 Εφαρμογή μολύσματος στους υπό εξέταση γονότυπους

Για τα πειράματα παθογένειας συλλέχτηκαν όσο το δυνατόν περισσότερα φυτά *eds1* σε σωληνάκι τύπου Falcon 50 ml. Η μόλυνση πραγματοποιήθηκε με αιώρημα ζωοσποριαγγείων συγκέντρωσης 5×10^4 ζωοσποριαγγεία/ml, η συγκέντρωση του οποίου προσδιορίστηκε με τη χρήση αιματοκυτταρόμετρου. Το μολύσμα εφαρμόστηκε με τον τρόπο που προαναφέρθηκε παραπάνω σε φυτά *A. thaliana* Col-0, *bam1*, *bam2*, *bam3* και *bam4*, αντίστοιχα, ηλικίας 3 εβδομάδων. Μετά το ψεκασμό του μολύσματος στους αντίστοιχους γονότυπους, οι δίσκοι φύτευσης καλύφθηκαν με διαφανείς πλαστικές σακούλες στο εσωτερικό των οποίων εφαρμόστηκε υγρασία με τη χρήση του ψεκαστικού χρωμάτων με τη μορφή νέφους, έτσι ώστε να επικρατήσουν συνθήκες σχεδόν 100% σχετικής υγρασίας. Αφού σφραγίστηκε η πλαστική σακούλα με τρόπο τέτοιο ώστε να μην υπάρχουν απώλειες ως προς την υγρασία, τοποθετήθηκαν τα φυτά στον θάλαμο ανάπτυξης.

Εικ.9 Ψεκασμός των υπό εξέταση γονότυπων με αιώρημα ζωοσποριαγγείων του ωομύκητα *H. arabidopsidis*.



3.3 Καταμέτρηση ζωοποριαγγείων ανά γονότυπο

Μετά το πέρας των 7 ημερών συλλέχθηκαν 5 ομάδες των 5 φυτών ανά γονότυπο και πραγματοποιήθηκε μέτρηση του νωπού τους βάρους, προκειμένου να αναχθούν οι τιμές του αριθμού των ζωοποριαγγείων ανά mg νωπού ιστού. Στη συνέχεια τα φυτά κάθε ομάδας τοποθετήθηκαν σε πλαστικό σωληνάκι τύπου Falcon, στο οποίο προστέθηκαν 10 ml αποσταγμένου νερού και μέσω έντονης ανάδευσης με τη χρήση vortex, επιτεύχθηκε η αιωρηματοποίηση των ζωοποριαγγείων στα 10 ml νερού. Έπειτα, διαχωρίστηκε ο φυτικός ιστός και τα υπολείμματα χρώματος από το αιώρημα ζωοποριαγγείων με τη χρήση διηθητικού πανιού Miracloth και 30 ml από το αιώρημα τοποθετήθηκαν στο αιματοκυτταρόμετρο με τη χρήση πιπέτας, προκειμένου να καταμετρηθεί ο αριθμός των ζωοποριαγγείων ανά

ml στο οπτικό μικροσκόπιο. Συνολικά, πραγματοποιήθηκαν 3 ανεξάρτητες επαναλήψεις για κάθε γονότυπο, προκειμένου να μειωθεί το στατιστικό σφάλμα. Στο τέλος του πειράματος ο αριθμός των ζωοποριαγγείων /ml για κάθε γονότυπο ανάχθηκε ανά mg νωπού ιστού προκειμένου να αποφευχθεί η περίπτωση υπερεκτίμησης ή υποτίμησης του αριθμού των ζωοποριαγγείων στους διάφορους γονότυπους λόγω διαφορετικών φαινοτύπων ως προς το μέγεθος και το νωπό τους βάρος. Στο τέλος, πραγματοποιήθηκε στατιστική ανάλυση ANOVA (StatGraphics Plus 2.1 Version), για να διαπιστωθεί αν κάποιος από τους υπό εξέταση γονότυπους εμφανίζει κάποια στατιστικά σημαντική διαφορά ως προς τον αριθμό ζωοποριαγγείων.

3.4 Χρώση Trypan Blue (Trypan Blue Staining)

Η χημική ένωση Trypan Blue (TB) έχει την ιδιότητα να βάφει τα νεκρά κύτταρα με κυανό χρώμα. Αυτό δίνει τη δυνατότητα της διαφοροποίησης των νεκρών κυττάρων από τα ζωντανά σε έναν ιστό. Η συγκεκριμένη χημική ένωση εισέρχεται εντός των κυττάρων μόνο εάν η κυτταρική μεμβράνη αυτών έχει υποστεί κάποια βλάβη ως προς την περατότητα της, δηλαδή της ικανότητας που έχει η κυτταρική μεμβράνη να επιτρέπει την είσοδο σε συγκεκριμένα μόρια εντός του κυττάρου. Όταν το κύτταρο είναι νεκρό η κυτταρική μεμβράνη αυτού, έχει χάσει την περατότητα της, με αποτέλεσμα να εισέρχονται μη επιλεκτικά μόρια εντός των κυττάρων. Η χρωστική TB έχει επίσης την ιδιότητα να βάφει με κυανό χρώμα τις υφές των μυκήτων. Αυτό οφείλεται στο γεγονός ότι η συγκεκριμένη ένωση αντιδρά εξειδικευμένα με τα λιπίδια των μυκήτων, τα οποία βρίσκονται εντός της κυτταροπλασματικής μεμβράνης των κυττάρων αυτών, προσδίδοντας στις υφές των μυκήτων και των ωμομυκήτων, χαρακτηριστικό κυανό χρώμα (Barrow and Aaltonen, 2004).

Στο πείραμα χρησιμοποιήθηκε η συγκεκριμένη χρωστική, προκειμένου να αξιολογηθεί ποιοτικά η ύπαρξη διαφοροποίησης μεταξύ των διαφορετικών γονοτύπων, ως προς την εξάπλωση του ωμομυκήτα στους μεσοκυττάρους χώρους του ελάσματος των φύλλων.

Πραγματοποιήθηκε χρώση TB σε κοτυληδόνες και φύλλα φυτών ηλικίας 7-10 ημερών, 7 ημέρες μετά τη μόλυνση. Συλλέχθηκαν 5-10 φύλλα από κάθε γονότυπο και κάθε χρονική στιγμή και τοποθετήθηκαν σε σωληνάκια τύπου Falcon 15 ml. Στη συνέχεια προστέθηκε ίσος όγκος καθαρής αιθανόλης και διαλύματος Trypan Blue μέχρι να καλυφθούν όλα τα φύλλα και έπειτα τοποθετήθηκαν για 1 λεπτό, σε ποτήρι ζέσεως το οποίο περιείχε νερό το οποίο έβραζε στους 100 °C. Μετά το πέρας του 1 λεπτού τα σωληνάκια τύπου Falcon απομακρύνθηκαν από το ποτήρι ζέσε-

ως και παρέμειναν για μία ώρα σε θερμοκρασία δωματίου (25 °C). Μετά το πέρας της μίας ώρας το διάλυμα Trypan Blue/αιθανόλης 1:1 απορρίφτηκε με προσοχή και αντικαταστάθηκε με ίσο όγκο διαλύματος Chloral Hydrate, προκειμένου να ξεβάψουν οι ιστοί από τη χρώση TB, παραμένοντας με κυανό χρώμα μόνο τα νεκρά κύτταρα του φυτού και οι υφές του ωμομυκήτα. Τα σωληνάκια τύπου Falcon τοποθετήθηκαν σε ανακινούμενο επωαστικό θάλαμο θερμοκρασίας 25 °C και παρέμειναν εκεί περίπου 24 ώρες. Την επόμενη ημέρα, απορρίφτηκε προσεκτικά το διάλυμα Chloral Hydrate και αντικαταστάθηκε με ίσο όγκο διαλύματος 60% γλυκερόλης. Μετά από 1 ώρα τα φύλλα ήταν διαθέσιμα για μικροσκοπική παρατήρηση σε οπτικό μικροσκόπιο. Η λήψη των φωτογραφιών πραγματοποιήθηκε σε μεγέθυνση 6X με τη χρήση φωτογραφικής μηχανής τύπου Panasonic Lumix DMC-FS12(12 MEGA PIXELS).

Διάλυμα Trypan Blue (300ml)

Διάλυμα	Όγκος (ml)	gr/100ml dH ₂ O
Lactic acid	100	
Phenol		100
Glycerol	100	
Trypan Blue		0.1

Διάλυμα Chloral hydrate

Διάλυμα	gr/ml dH ₂ O
Chloral hydrate	2.5

4. Πειράματα Παθογένειας με το βακτήριο *P. syringae* pv. *tomato* DC3000

4.1 Καλλιέργεια και ανάπτυξη του βακτηρίου *P. syringae* pv. *tomato* DC3000

Στο συγκεκριμένο πείραμα χρησιμοποιήθηκε το στέλεχος *P. syringae* pv. *tomato* DC3000 με ανθεκτικότητα στα αντιβιοτικά ριφαμπικίνη και καναμυκίνη. Οι απομονώσεις του βακτηρίου βρίσκονταν σε σωλήνες τύπου errendorf στους -80 °C, σε διάλυμα 20% γλυκερόλης. Βακτηριακά κύτταρα μεταφέρθηκαν από τον σωλήνα errendorf με την απομόνωση του βακτηρίου σε 3 τριβλία Petri με θρεπτικό υπόστρωμα King's B και τα αντιβιοτικά επιλογής (ριφαμπικίνη, καναμυκίνη), εφαρμόζοντας γραμμική διασπορά

(streaking), χρησιμοποιώντας βακτηριακό κρίκο, υπό ασηπτικές συνθήκες. Τα τριβλία τοποθετήθηκαν σε σκοτεινό επωαστικό θάλαμο με σταθερή θερμοκρασία 28 °C, για 2 ημέρες. Μετά το πέρας των δύο ημερών, βακτηριακά κύτταρα από τα τριβλία μεταφέρθηκαν σε κωνική φιάλη με υγρό θρεπτικό υπόστρωμα King' B με ριφαμπικίνη και καναμυκίνη. Η κωνική φιάλη με την υγρή καλλιέργεια τοποθετήθηκε σε περιστροφικό επωαστικό θάλαμο στους 28 °C, στις 180 rpm για 1 ημέρα.

4.2 Παραλαβή βακτηριακών κυττάρων

Μετά το πέρας της 1 ημέρας, προσδιορίστηκε η συγκέντρωση του πληθυσμού των βακτηρίων (cfu/ml) μέσω πρότυπης καμπύλης αναφοράς συναρτήσεως της οπτικής πυκνότητας στα 600nm. Στο συγκεκριμένο πείραμα, η επιθυμητή οπτική πυκνότητα (OD_{600}) ήταν μεταξύ των τιμών 0,6 και 0,8 που αντιστοιχεί σε συγκέντρωση βακτηριακού πληθυσμού $\sim 1,2 - 1,6 \times 10^8$ cfu/ml. Στη συνέχεια πραγματοποιήθηκε φυγοκέντρηση της υγρής καλλιέργειας στις 6000 rpm για 10 λεπτά, για παραλαβή βακτηριακών κυττάρων

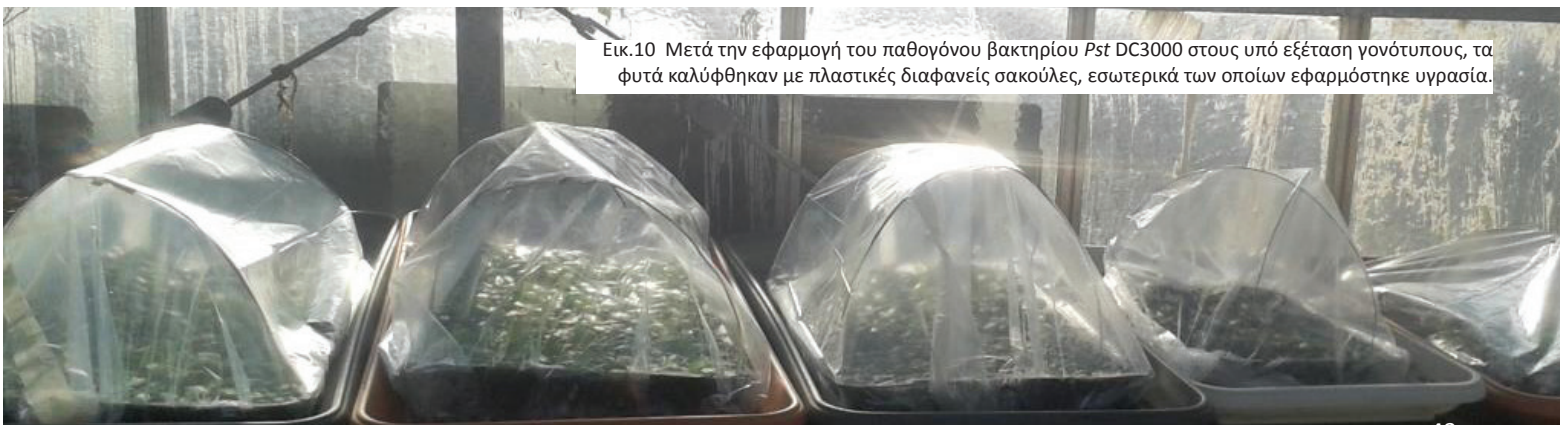
απαλλαγμένων από μεταβολίτες, αντιβιοτικά και στοιχεία του θρεπτικού υποστρώματος. Μετά το τέλος της φυγοκέντρησης τα βακτηριακά κύτταρα επαναιωρηματοποιούνται σε ίσο όγκο νερού, προσθέτοντας 500μl/L επιφανειοδραστικής ουσίας Silwet® (organosilicone surfacant), για πιο ομοιόμορφη διασπορά των βακτηριακών κυττάρων στην φυτική επιφάνεια και πιο εύκολη διείσδυση των βακτηρίων στο εσωτερικό των ιστών του φυτού.

4.3 Μόλυνση των υπό εξέταση γονότυπων με το παθογόνο βακτηριακό στέλεχος *Pst* DC3000

Τα φυτά *A. thaliana* (Col-0, *bam1*, *bam2*, *bam3*, *bam4*) ψεκάστηκαν με το αιώρημα βακτηρίων στο στάδιο των 3-4 πραγματικών φύλλων μέχρι απορροής, με τη χρήση ψεκαστήρα τύπου σπρέι. Μετά τον ψεκασμό των φυτών οι δίσκοι φύτευσης καλύφθηκαν με διαφανείς πλαστικές σακούλες, εσωτερικά των οποίων εφαρμόστηκε υγρασία με τη χρήση του ψεκαστικού σπρέι προκειμένου να επικρατήσουν συνθήκες υψηλής σχετικής υγρασίας για να ευνοηθεί η ανάπτυξη της ασθένειας στους διάφορους υπό εξέταση

γονότυπους. Τα φυτά διατηρήθηκαν στο θερμοκήπιο υπό ελεγχόμενες συνθήκες θερμοκρασίας 25 °C και 12 ώρες φωτός, και παρέμειναν στις διαφανείς σακούλες 2 ημέρες μετά τη μόλυνση. Μετά το πέρας των 2 ημερών πραγματοποιήθηκε συλλογή μολυσμένων φυτών για κάθε γονότυπο, για μέτρηση του νωπού βάρους και ποσοτικοποίηση του ενδοφυτικού βακτηριακού πληθυσμού στις διάφορες χρονικές στιγμές.

Εικ.10 Μετά την εφαρμογή του παθογόνου βακτηρίου *Pst* DC3000 στους υπό εξέταση γονότυπους, τα φυτά καλύφθηκαν με πλαστικές διαφανείς σακούλες, εσωτερικά των οποίων εφαρμόστηκε υγρασία.



4.4 Μέτρηση Νωπού βάρους φυτών των υπό εξέταση γονοτύπων

Στις 2 και 4 ημέρες μετά τη μόλυνση συλλέχτηκε το υπέργειο μέρος ενός συνόλου 15 φυτών για κάθε γονότυπο τόσο από τους αμόλυντους μάρτυρες όσο και από τα φυτά στα οποία εφαρμόστηκε το παθογόνο βακτήριο. Στη συνέχεια μετρήθηκε και καταγράφηκε το νωπό βάρος κάθε φυτού ανά γονότυπο. Συνολικά πραγματοποιήθηκαν 3 ανεξάρτητες επαναλήψεις για κάθε γονότυπο, προκειμένου να μειωθεί το στατιστικό σφάλμα. Στο τέλος, πραγματοποιήθηκε στατιστική ανάλυση ANOVA (StatGraphics Plus

2.1 Version), για να διαπιστωθεί αν κάποιος από τους υπό εξέταση γονότυπους εμφανίζει κάποια στατιστικά σημαντική διαφορά ως προς το μέσο νωπό βάρος του μετά την εφαρμογή με το παθογόνο βακτήριο. Το μέσο νωπό βάρος για κάθε γονότυπο και χρονική στιγμή, εκφράστηκε ως το επί % του μέσου νωπού βάρους του αμόλυντου μάρτυρα, καθώς τα φυτά των υπό εξέταση γονοτύπων, εμφανίζουν διαφορετικό φαινότυπο ως προς το μέγεθος αλλά και ως προς το νωπό τους βάρος.

4.5 Ποσοτικοποίηση ενδοφυτικού βακτηριακού πληθυσμού

Στις 2 και 4 ημέρες μετά τη μόλυνση συλλέχτηκε 1gr νωπών φύλλων για κάθε γονότυπο, τα οποία έφεραν συμπτώματα προσβολής από το παθογόνο βακτήριο. Τα φύλλα προέκυψαν από τυχαία δειγματοληψία από ένα σύνολο 20 φυτών ανά γονότυπο στα οποία προηγήθηκε μόλυνση με το παθογόνο βακτήριο. Στη συνέχεια, τα φύλλα εμβαπτίστηκαν σε ποτήρι ζέσεως με διάλυμα 70% αιθανόλης για 2 λεπτά, προκειμένου να απολυμανθεί η επιφάνεια των φύλλων από την επιφυτική μικροχλωρίδα έτσι ώστε να αποφευχθεί η περίπτωση της υπερεκτίμησης του ενδοφυτικού βακτηριακού πληθυσμού. Μετά το πέρας των 2 λεπτών, τα φύλλα απομακρύνθηκαν από το διάλυμα της αιθανόλης και ταυτόχρονα εμβαπτίστηκαν σε αποστειρωμένο δισ-αποσταγμένο νερό, προκειμένου να ξεπλυθεί η επιφάνεια των φύλλων από τυχόν υπολείμματα αιθανόλης. Στη συνέχεια, υπό ασηπτικές συνθήκες, τα φύλλα λειοστρηβήθηκαν σε αποστειρωμένο γουδί στο οποίο προστέθηκαν 10ml αποστειρωμένου δισ-αποσταγμένου νερού. Μετά από 6 δεκαδικές αραιώσεις, 500μl του αιωρήματος

της ενδοφυτικής μικροχλωρίδας μεταφέρθηκαν σε τριβλίο Petri με θρεπτικό υπόστρωμα King's B και τα αντιβιοτικά επιλογής (ριφαμπικίνη [50mg/ml], καναμυκίνη [50μg/ml]) και στη συνέχεια απλώθηκαν ομοιόμορφα σε όλη την επιφάνεια του τριβλίου. Σε κάθε γονότυπο ανά χρονική στιγμή πραγματοποιήθηκαν 3 βιολογικές επαναλήψεις στην 4^η και 6^η δεκαδική αραιώση. Τα τριβλία σφραγίστηκαν με ταινία τύπου παραφίλμ και μεταφέρθηκαν σε σκοτεινό επωαστικό θάλαμο θερμοκρασίας 27 °C για 2-3 ημέρες. Μετά το πέρας των 2-3 ημερών καταμετρήθηκε ο αριθμός των αποικιών σε κάθε τριβλίο για κάθε γονότυπο. Συνολικά, πραγματοποιήθηκαν 3 ανεξάρτητες επαναλήψεις για κάθε γονότυπο, προκειμένου να μειωθεί το στατιστικό σφάλμα. Στο τέλος, πραγματοποιήθηκε στατιστική ανάλυση ANOVA (StatGraphics Plus 2.1 Version), για να διαπιστωθεί αν κάποιος από τους υπό εξέταση γονότυπους εμφανίζει κάποια στατιστικά σημαντική διαφορά ως προς την ενδοφυτική συγκέντρωση βακτηριακού πληθυσμού (cfu/ml).

5. Πειράματα Παθογένειας με το μύκητα *Botrytis cinerea*

5.1 Ανάπτυξη του μύκητα *Botrytis cinerea*

Στο συγκεκριμένο πείραμα χρησιμοποιήθηκε απομόνωση του μύκητα *B. cinerea* από τη συλλογή του εργαστηρίου Φυτοπαθολογίας του Γεωπονικού Πανεπιστημίου Αθηνών. Σπόρια τα οποία ήταν αποθηκευμένα στους -80 °C σε σωλήνα τύπου errendorf σε διάλυμα 75% γλυκερόλης μεταφέρθηκαν σε τριβλία με θρεπτικό υπόστρωμα PDA, υπό ασηπτικές συνθήκες. Τα τριβλία επώαστηκαν σε θερμοκρασία δωματίου (20-25 °C) με σχετικά άμεση έκθεση στο φως, για να παράγουν σπόρια. Όταν το μυκήλιο του μύκητα κάλυψε όλη την επιφάνεια του τριβλίου, έγινε παραλαβή κονιδίων, με αιωρηματοποίηση αυτών άμεσα

από το μυκήλιο του μύκητα μέσω της εμβάπτισης του σε νερό. Μετά από έντονη ανάδευση, τα σπόρια αιωρηματοποιήθηκαν στο νερό και στη συνέχεια, πραγματοποιήθηκε διαχωρισμός του μυκηλίου από το αιώρημα σπορίων, μέσω διήθησης με τούλι. Στη συνέχεια, προσδιορίστηκε η συγκέντρωση σπορίων/ml με τη χρήση αιματοκυτταρόμετρου και έγινε παραλαβή συγκεκριμένου όγκου αιωρήματος κονιδίων τα οποία αραιώθηκαν σε διάλυμα 25% PDB (Potato Dextrose Broth), φτάνοντας τη τελική συγκέντρωση 10⁷ σπόρια/ml.

5.2 Μόλυνση φυτών με το μύκητα *Botrytis cinerea*

Φυτά *A. thaliana* (Col-0, *bam1*, *bam2*, *bam3* και *bam4*), ηλικίας 4 εβδομάδων μολύνθηκαν με αιώρημα σπορίων συγκέντρωσης 10⁷ κονίδια/ml. Σε κάθε φυτό τοποθετήθηκαν 10 μl αιωρήματος σπορίων στη μέση του ελάσματος των κατώτερων φύλλων, με χρήση πιπέτας, αποφεύγοντας ταυτόχρονα τον τραυματισμό των φύλλων. Συνολικά μολύνθηκαν 4 κατώτερα φύλλα για κάθε φυτό, ενώ για κάθε γονότυπο εξετάστηκε ένα δείγμα των 10 φυτών για κάθε ανεξάρτητη επανάληψη. Στο τέλος, τα φυτά καλύφθηκαν με μαύρη πλαστική σακούλα, έτσι ώστε να αποφευχθεί η έκθεση στο φως, προκειμένου να ευνοηθεί η διείσδυση του μύκητα εντός των ιστών και ο σχηματισμός νεκρωτικής κηλίδας. Εσωτερικά της κάθε πλαστικής σακούλας, εφαρμόστηκε υγρασία με τη μορφή νέφους νερού, έτσι ώστε επικρατήσουν συνθήκες σχεδόν 100% σχετικής υγρασίας για να ευνοηθεί η μόλυνση των φυτών από το μύκητα. Τα φυτά μεταφέρθηκαν σε σκοτεινό επωαστικό θάλαμο θερμοκρασίας 21 °C.

Εικ.11 Μόλυνση των κατώτερων φύλλων των φυτών για κάθε υπό εξέταση γονότυπο με αιώρημα σπορίων του μύκητα *B. cinerea*.



5.3 Καταμέτρηση της συχνότητας εμφάνισης νεκρωτικής κηλίδας για κάθε γονότυπο

Στις 5 και 6 ημέρες μετά τη μόλυνση με το μύκητα πραγματοποιήθηκε καταμέτρηση των φύλλων στα οποία σχηματίστηκε νεκρωτική κηλίδα στο σημείο εμβολιασμού των κονιδίων. Η καταμέτρηση έγινε για κάθε φυτό ξεχωριστά

καταγράφοντας τον αριθμό των φύλλων τα οποία έφεραν νεκρωτικές κηλίδες ως προς τον αριθμό του συνόλου των φύλλων στα οποία πραγματοποιήθηκε εφαρμογή σπορίων σε κάθε φυτό. Στο τέλος ο μέσος όρος της συχνότητας

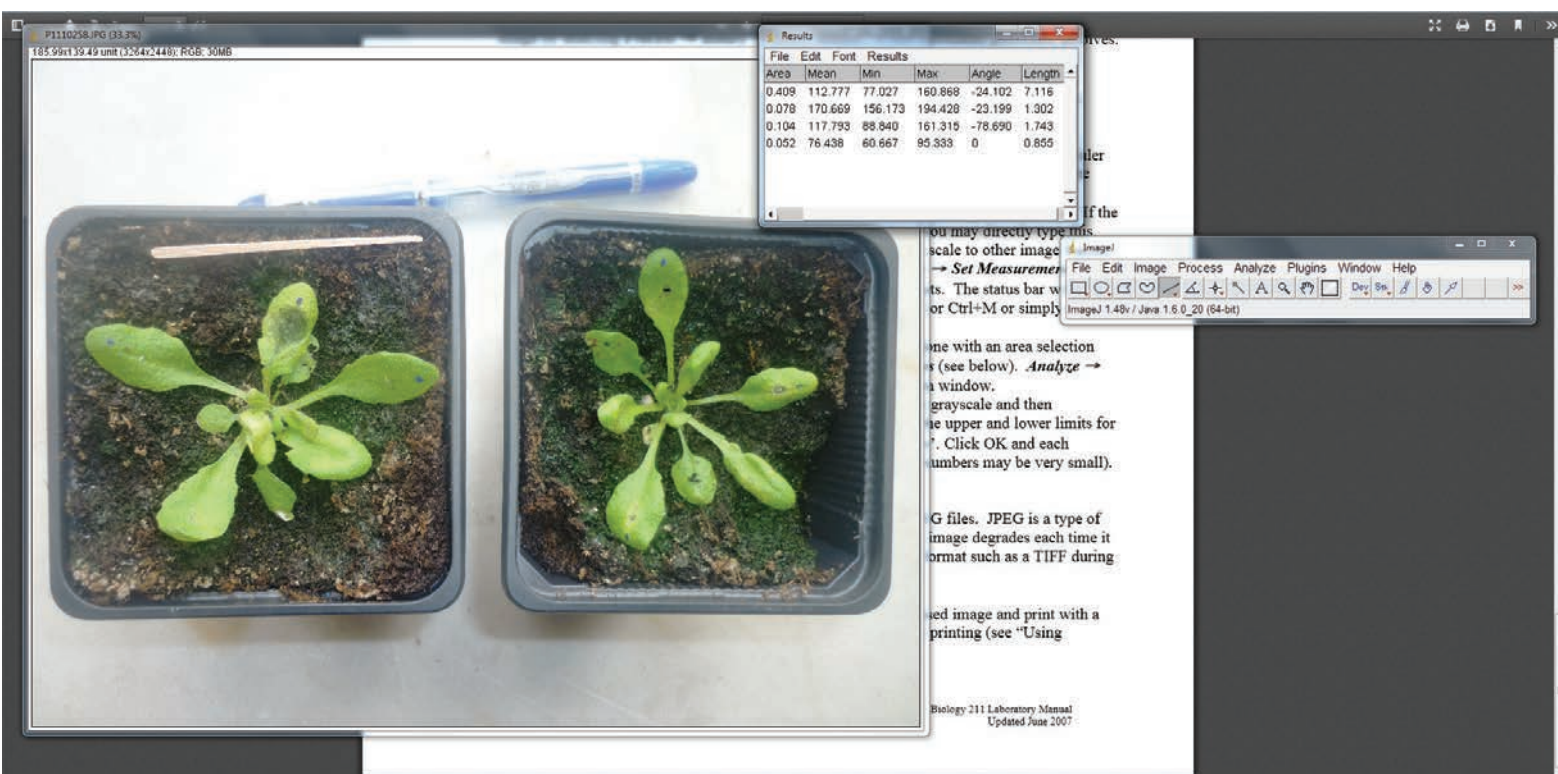
εμφάνιση νεκρωτικής κηλίδας για κάθε γονότυπο εκφράστηκε σε ποσοστό επί % του συνόλου των φύλλων στα οποία πραγματοποιήθηκε εφαρμογή με σπόρια, και πραγματοποιήθηκε στατιστική ανάλυση ANOVA (StatGraphics Plus 1.2 Version), για να διαπιστωθεί αν κάποιος από τους

υπό εξέταση γονότυπους εμφανίζει κάποια στατιστικά σημαντική διαφορά ως προς τη συχνότητα εμφάνισης νεκρωτικής κηλίδας στα φύλλα η οποία υποδηλώνει ευπάθεια ή ανθεκτικότητα των συγκεκριμένων γονοτύπων έναντι της προσβολής τους από το νεκροτροφικό μύκητα.

5.4 Προσδιορισμός της μέσης διαμέτρου των νεκρωτικών κηλίδων για κάθε γονότυπο

Στις 5 και 6 ημέρες μετά τη μόλυνση με το μύκητα πραγματοποιήθηκε μέτρηση της διαμέτρου της κάθε κηλίδας με τη χρήση του προγράμματος Image J. Στα φύλλα τα οποία δεν υπήρχε ανάπτυξη νεκρωτικής κηλίδας σημειωνόταν μηδενική διάμετρος. Στο τέλος προσδιορίστηκε η μέση διάμετρος των νεκρωτικών κηλίδων και πραγματοποιή-

θηκε στατιστική ανάλυση ANOVA (StatGraphics Plus 1.2 Version), για να διαπιστωθεί αν κάποιος από τους υπό εξέταση γονότυπους εμφανίζει κάποια στατιστικά σημαντική διαφορά ως προς το μέγεθος των νεκρωτικών κηλίδων, η οποία υποδηλώνει ευπάθεια ή ανθεκτικότητα των φυτών έναντι της προσβολής τους από το νεκροτροφικό μύκητα.



Εικ.12 Μέτρηση της διαμέτρου των νεκρωτικών κηλίδων για κάθε υπό εξέταση γονότυπο με τη χρήση του προγράμματος Image J.

6. Προσδιορισμός των επιπέδων έκφρασης των γονιδίων *PR1* και *PDF1.2* σε όλους τους υπό εξέταση γονότυπους και των γονιδίων *BAM1*, *BAM2*, *BAM3* και *BAM4* στα φυτά αγρίου τύπου Col-0.

6.1 Συλλογή ιστού για κάθε υπό εξέταση γονότυπο στα διάφορα παθοσυστήματα παθογόνου/ξενιστή

Πραγματοποιήθηκε συλλογή ιστού του υπέργειου μέρους ενός συνόλου 10 φυτών από κάθε γονότυπο σε κάθε παθοσυστήμα παθογόνου/ξενιστή. Στις εφαρμογές τόσο του ωμόκητα *H. arabidopsidis*, όσο και του μύκητα *B. cinerea* στους διάφορους γονότυπους πραγματοποιήθηκε συλλογή ιστού στις 3 και 5 ημέρες μετά τη μόλυνση. Στις εφαρμογές με το βακτήριο *Pst* DC3000 στους διάφορους γονότυπους πραγματοποιήθηκε συλλογή ιστών στις 1, 2 και 4 ημέρες μετά τη μόλυνση με το παθογόνο βακτήριο. Σε όλες τις χρονικές στιγμές συλλέχτηκε ιστός τόσο από μολυσμένα φυτά όσο και από τους αμόλυντους μάρτυρες (MOCK), στους οποίους δεν είχε προηγηθεί καμία εφαρμογή με τους παθογόνους μικροοργανισμούς. Οι αμόλυντοι μάρτυρες αποτελούσαν φυτά τα οποία είχαν εκτεθεί στις

ίδιες συνθήκες υγρασίας, φωτός και θερμοκρασίας με τα αντίστοιχα φυτά στα οποία εφαρμόστηκαν τα παθογόνα, έτσι ώστε οι μεταβολές στα επίπεδα έκφρασης των υπό εξέταση γονιδίων στους διάφορους γονότυπους να ευθύνονται αποκλειστικά στην παρουσία των παθογόνων. Κατά τη συλλογή ιστού έγινε παραλαβή του υπέργειου μέρους 10 φυτών από κάθε γονότυπο και κάθε χρονική στιγμή. Το σύνολο του ιστού για κάθε δείγμα εμβαπτίστηκε κατευθείαν σε υγρό άζωτο, προκειμένου να αποφευχθεί η μεταβολή των μεταγραφημάτων των κυττάρων λόγω των χειρισμών που υπόκεινται τα φυτά κατά τη συλλογή τους. Μετά το τέλος της συλλογής, τα δείγματα αποθηκεύτηκαν σε θερμοκρασία -80 °C.

6.2 Απομόνωση RNA

Διαλύματα εξαγωγής RNA

Διάλυμα Cell lysis solution (10ml)

Διάλυμα	Όγκος	Τελική συγκέντρωση
10 % SDS	2ml	2 %
0,5 M sodium citrate	1.36 ml	68mM
1 M citric acid	1.32 ml	132 mM
0,5 M EDTA	20 μl	1mM

Το pH του διαλύματος θα πρέπει να είναι 4 - 4,5 για να απενεργοποιείται η δράση των RNAase. Μετά την ανάμειξη όλων των συστατικών το τελικό διάλυμα αποστειρώθηκε σε κλίβανο στους 120 °C για 20 λεπτά.

Διάλυμα Protein-DNA precipitation solution (10ml)

Διάλυμα	Όγκος	Τελική συγκέντρωση
5M NaCl	8 ml	4 M
0,5 M sodium citrate	320 μl	16mM
1 M citrid acid	320 μl	32 mM

Μετά την ανάμειξη όλων των συστατικών, το τελικό διάλυμα αποστειρώθηκε σε κλίβανο στους 120 °C για 20 λεπτά.

6.2.1 Μεθοδολογία απομόνωσης RNA

Το RNA των δειγμάτων απομονώθηκε σύμφωνα με το πρωτόκολλο των Sanchez and Carbajosa (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC2613888/>), μετά από κατάλληλες τροποποιήσεις. Τα βήματα που ακολουθούνται σε αυτό το πρωτόκολλο είναι τα εξής :

- Κονιορτοποίηση του φυτικού ιστού σε πορσελάνινο ιγδίο με τη χρήση υγρού αζώτου.
- Μεταφορά σχεδόν 100 mg κονιορτοποιημένου ιστού σε σωλήνα τύπου erpendorf 1,5 ml.
- Προσθήκη 300μl διαλύματος (Cell lysis solution) και έντονη ανάδευση δειγμάτων με χρήση vortex τουλάχιστον για 20 δευτερόλεπτα και επώαση σε θερμοκρασία δωματίου (20-25 °C) για 5 λεπτά.
- Προσθήκη 100 μl προψυγμένου στον πάγο διαλύματος (protein-DNA precipitation solution) και τοποθέτηση δειγμάτων στον πάγο (4 °C) για 10 λεπτά
- Φυγοκέντρηση δειγμάτων στις 13.000 rpm για 15 λεπτά στους 4 °C
- Μεταφορά του υπερκείμενου (300 μl) σε καινούριο σωλήνα τύπου erpendorf 1,5 ml (εάν θραύσματα ιστού έχουν παραμείνει στο υπερκείμενο, φυγοκέντρωση ξανά στις 13.000 rpm για 5 λεπτά και μεταφορά υπερκείμενου σε καινούριο σωλήνα τύπου erpendorf
- Προσθήκη 300 μl (ίσης ποσότητας με το υπερκείμενο) ισοπροπανόλης και ομογενοποίηση (ανακινώντας ελαφρά

τους σωλήνες τύπου eppendorf)

- Φυγοκέντρωση στις 13.000 rpm για 5 λεπτά στους 4 °C
- Απομάκρυνση του υπερκείμενου και πλύσιμο ιζήματος με 300 μl 70% αιθανόλης
- Φυγοκέντρωση στις 13.000 rpm στους 4 °C για ένα λεπτό
- Απομάκρυνση του υπερκείμενου
- Επαναυωρηματοποίηση του ιζήματος (pellet) σε 25 μl απιονισμένου και αποστειρωμένου νερού

6.3 Εφαρμογή DNase (με βάση το πρωτόκολλο της εταιρείας Invitrogen)

Για να καταστραφούν τα εναπομείναντα μόρια DNA για κάθε δείγμα ακολουθήθηκαν τα εξής βήματα:

- Προσθήκη 1 μl DNase
- Προσθήκη 1 μl ρυθμιστικού διαλύματος DNase buffer
- Επώαση σε θερμοκρασία 32 °C για 15 λεπτά
- Μετά το πέρας των 15 λεπτών, προσθήκη 1 μl EDTA (το EDTA δεσμεύει όλα τα ιόντα τα οποία λειτουργούν ως συμπαραγοντες του ενζύμου DNaseI)
- τοποθέτηση των δειγμάτων σε υδατόλουτρο θερμοκρασίας 68 °C για 10 λεπτά

6.4 Προσδιορισμός της συγκέντρωσης του RNA

Μετά την απομόνωση του RNA από τα φυτά, πραγματοποιήθηκε μέτρηση της απορρόφησης αυτού σε φωτόμετρο (NanoDrop), ώστε να προσδιοριστεί η συγκέντρωση και η καθαρότητα του. Η απορρόφηση στα 260 nm δίνει τη συγκέντρωση των νουκλεϊκών οξέων και η απορρόφηση στα 280 nm δίνει τις δευτερεύουσες ουσίες που απομονώθηκαν μαζί με το RNA(π.χ. πρωτεΐνες). Ο λόγος 260/280 δίνει μια εκτίμηση της καθαρότητας του δείγματος RNA, όσο περισσότερο προσεγγίζει το 2 τόσο υψηλότερη είναι η καθαρότητα του. Η συγκέντρωση κάθε δείγματος RNA προκύπτει από τη σχέση:

$$C(\text{ng}/\mu\text{l}) = 500 \text{ ng}/\mu\text{l} \times \text{συντελεστής αραίωσης} \times \text{απορρόφηση } 260\text{nm}$$

Αφού προσδιορίστηκε η συγκέντρωση του RNA (C(ng/μl)) για κάθε δείγμα, τα δείγματα αραιώθηκαν με δισαποσταγμένο και αποστειρωμένο νερό έτσι ώστε η τελική συγκέντρωση του RNA μετά την προσθήκη των αντιδραστηρίων για την αντίδραση της αντίστροφης μεταγραφάσης να είναι σε όλα τα δείγματα 500 ng/10μl.

6.5 Αντίδραση αντίστροφης μεταγραφάσης

Για τη μετατροπή του RNA σε cDNA χρησιμοποιήθηκαν τα αντιδραστήρια (PrimeScript™ RT reagent kit) της εταιρείας TaKaRa®. Τα αντιδραστήρια που χρησιμοποιήθηκαν αναφέρονται παρακάτω:

- 2 μl Ρυθμιστικού διαλύματος (buffer)
- 0.5μl αντίστροφης μεταγραφάσης (RT enzyme)
- 0,5μl ολιγονουκλεοτίδια θυμίνης (oligo dT) και
- 7μl δείγματος RNA (template)

Για τη μετατροπή του mRNA σε cDNA πραγματοποιήθηκαν τα παρακάτω:

	Χρόνος	Θερμοκρασία (°C)	Αποτέλεσμα
Στάδιο 1	15 min	42	Υβριδισμός νουκλεοτιδίων θυμίνης με την ουρά πολυ-αδενίνης του mRNA και επιμήκυνση της cDNA αλυσίδας
Στάδιο 2	5 sec	85	Τερματισμός της αντίδρασης

6.6 Εφαρμογή της Real-time PCR

Η μέθοδος RT-PCR για τη ποσοτικοποίηση των μεταγραφημάτων των γονιδίων *PR1*, *PDF1.2*, *BAM1*, *BAM2*, *BAM3*, *BAM4* και του γονιδίου αναφοράς *tubulin* (AT4G26410) για κάθε εφαρμογή έγινε με τη χρήση των παρακάτω ζευγών εκκινητών:

Γονίδιο Στόχος	Ζεύγος εκκινητών	Βιβλιογραφία
<i>PR1</i> (AT2G14610)	5'-TCACAACCAGGCACGAGGAG-3' 5'-CACCGCTACCCAGGCTAAG-3'	Pantelides et al. 2010
<i>PDF1.2</i> (AT5G44420)	5'-CTGTTACGTCCCATGTAAATCTACC-3' 5'-CAACGGGAAAATAAACATTAACAG-3'	Pantelides et al. 2010
<i>tubulin</i> (AT4G26410)	5'-GAGCTGAAGTGGCTTCCATGAC-3' 5'-GGTCCGACATACCCATGATCC-3'	Czechowski et al. 2005
<i>BAM1</i> (AT3G23920)	5'-AGAACGTATAGAGAAGGAGGGATTG-3' 5'-CGTCTCTGAACCTTGTGTGTAGTA-3'	Fulton et al. 2008
<i>BAM2</i> (AT4G00490)	5'-GGCGATTAGGTTGAATCATAGTGTA-3' 5'-TGGTCTCTTGTGTCCCTGGAGCCAAACCA-3'	Fulton et al. 2008
<i>BAM3</i> (AT4G17090)	5'-GAGCTTATACAGATGGTTCAAAAGC-3' 5'-AATCTGACCTATTTGTGCTACCAC-3'	Fulton et al. 2008
<i>BAM4</i> (AT5G55700)	5'-GATGCTCGAGAGAAATCACGATCG-3' 5'-TCTGCACTCATCTGTCTAATGAAAG-3'	Fulton et al. 2008

Η RT-PCR έγινε σε ένα θερμοκυκλοποιητή της Stratagene Mx3005PTM και για τις αντιδράσεις ενίσχυσης χρησιμοποιήθηκαν τα αντιδραστήρια (master mix KAPA SYBR Fast Universal qPCR kit) της εταιρίας KAPABiosystems®, ενώ τα αποτελέσματα αναλύθηκαν με το λογισμικό MxPro QPCR. Τα αντιδραστήρια που χρησιμοποιήθηκαν αναφέρονται στον παρακάτω πίνακα:

Αντιδραστήρια	Όγκος	Τελική συγκέντρωση
KAPA SYBR Fast Universal qPCR Master Mix	5 μl	
Εκκινητής F	0,5 μl	25 μM
Εκκινητής R	0,5 μl	25μM
ROX Low	0,2 μl	
Δείγμα cDNA (template)	1 μl	50ng/μl
H ₂ O χωρίς RNA-όσες	2,8 μl	
Τελικός όγκος	10 μl	

Το πρόγραμμα θερμοκρασιών που χρησιμοποιήθηκε στις αντιδράσεις Real-time PCR περιλάμβανε τα εξής στάδια:

	Χρόνος	Θερμοκρασία (°C)	Αποτέλεσμα
Στάδιο 1	3 min	95	Ενεργοποίηση της HotStarTaq DNA πολυμεράσης Αποδιάταξη του cDNA
	3 sec		
Στάδιο 2	30 sec	60	Υβριδισμός εκκινητών/ επιμήκυνση αλυσίδας
Τελευταίος κύκλος 2ου σταδίου	1 min	95	Δημιουργία καμπύλης διαχωρισμού των προϊόντων της RT-PCR
	30 sec	60	
Στάδιο 3	30 sec	95	

Για την ανάλυση των αποτελεσμάτων υπολογίστηκε η τιμή του μέσου όρου του κύκλου αναφοράς (Ct) για κάθε υπό εξέταση γονίδιο με βάση 3 ανεξάρτητα βιολογικά δείγματα.

Δ. ΑΠΟΤΕΛΕΣΜΑΤΑ

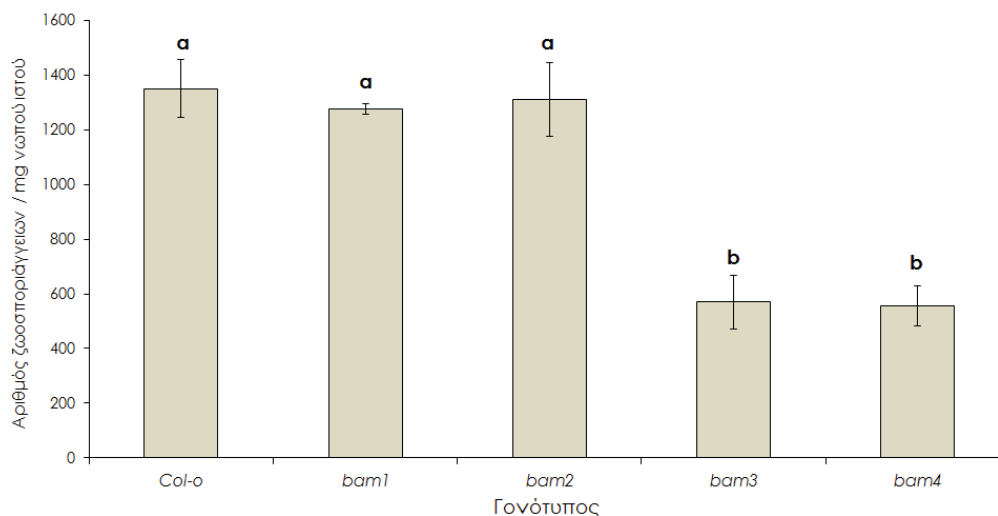
1. Αποτελέσματα Πειραμάτων Παθογένειας με τον Ωμούκητα *H. arabidopsis*

1.1 Ποσοτικοποίηση των ζωοσποριαγγείων του ωμούκητα *H. arabidopsis* στα φυτά *bam1*, *bam2*, *bam3*, *bam4* και Col-0

Για να διαπιστωθεί εάν υπάρχει κάποια διαφοροποίηση μεταξύ των υπό εξέταση γονοτύπων ως προς την ανθεκτικότητα τους έναντι του ωμούκητα *H. arabidopsis*, πραγματοποιήθηκε μέτρηση των ζωοσποριαγγείων/mg νωπού ιστού στις 7 ημέρες μετά τη μόλυνση των γονοτύπων με τον ωμούκητα, για κάθε γονότυπο ξεχωριστά. Συνολικά, πραγματοποιήθηκαν 3 ανεξάρτητες επαναλήψεις για κάθε γονότυπο. Ο αριθμός των ζωοσποριαγγείων ανάχθηκε σε ζωοσπόρια/mg νωπού ιστού, προκειμένου να αποφευχθεί η περίπτωση υπερεκτίμησης ή υποτίμησης του αριθμού των ζωοσποριαγγείων στους διάφορους γονότυπους λόγω διαφορετικών φαινοτύπων ως προς το μέγεθος και το νωπό τους βάρος. Στο τέλος, όλες οι τιμές εισήχθησαν σε πρόγραμμα στατιστικής ανάλυσης ANOVA (StatGraphics Plus 2.1 Version), για να διαπιστωθεί αν κάποιος από τους υπό εξέταση γονότυπους εμφανίζει κάποια στατιστικά σημαντική διαφορά ως προς τον αριθμό ζωοσποριαγγείων.

Τα αποτελέσματα και των 3 ανεξάρτητων επαναλήψεων του πειράματος παθογένειας, κατέδειξαν στατιστικώς σημαντική διαφοροποίηση των γονοτύπων *bam3* και *bam4* ως προς την ύπαρξη ζωοσποριαγγείων του ωμούκητα σε σχέση με τα φυτά αγρίου τύπου (Col-0), αποτελέσματα τα οποία συμπίπτουν με τη συμπτωματολογική εικόνα των φυτών ανά γονότυπο στις 12 ημέρες μετά τη μόλυνση. Οι γονότυποι *bam1* και *bam2* δεν διαφοροποιήθηκαν σημαντικά σε σχέση με τον αριθμό των ζωοσποριαγγείων των φυτών του αγρίου τύπου. Οι γονότυποι *bam3* και *bam4* δεν εμφάνισαν στατιστικώς σημαντικές διαφορές μεταξύ τους ως προς τον αριθμό των ζωοσποριαγγείων του ωμούκητα, ενώ οι δύο τελευταίοι είχαν λιγότερο από τα μισά ζωοσποριάγγεια σε σχέση με τους υπόλοιπους γονότυπους.

Εικ.13 Απεικόνιση τη διαφοροποίησης των υπό εξέταση γονοτύπων ως προς τον αριθμό ζωοσποριαγγείων/mg νωπού ιστού στις 7 ημέρες μετά τη μόλυνση με τον ωμούκητα *H. arabidopsis*. Το διαφορετικό γράμμα πάνω από κάθε στήλη υποδηλώνει ότι υπάρχει στατιστικά σημαντική διαφορά σε επίπεδο σημαντικότητας $P \leq 0.05$, σύμφωνα με τη μέθοδο LSD.



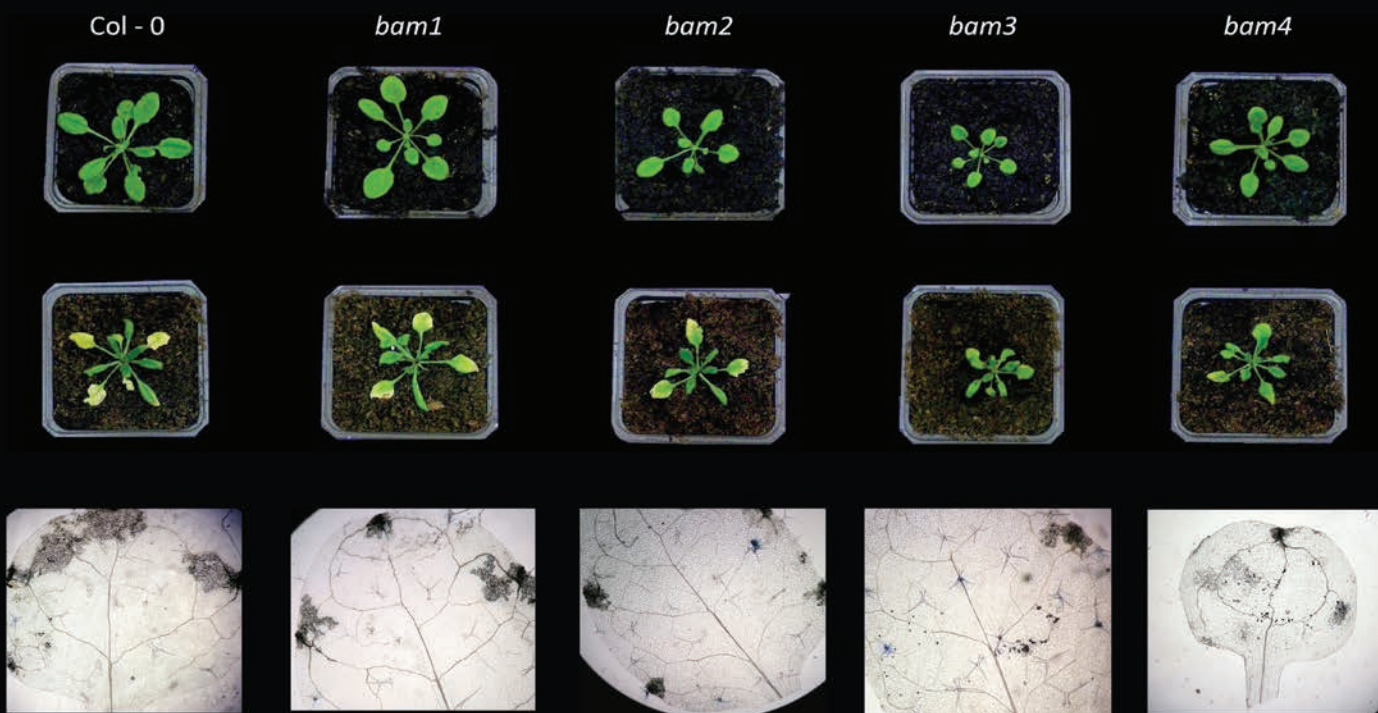
1.2 Χρώση Trypan Blue

Προκειμένου, να διαπιστωθεί εάν υπάρχει διαφοροποίηση ως προς την εξάπλωση του ωμούκητα *H. arabidopsidis* στους προσβεβλημένους ιστούς των υπό εξέταση γονότυπων, πραγματοποιήθηκε χρώση Trypan Blue σε φύλλα και κοτηλιδόνες των φυτών Col-0, *bam1*, *bam2*, *bam3* και *bam4* στις 7 ημέρες μετά τη μόλυνση των φυτών με τον ωμούκητα.

Τα αποτελέσματα τόσο των φωτογραφιών όσο και της μικροσκοπικής παρατήρησης των προσβεβλημένων φύλλων, κατέδειξαν μειωμένη εξάπλωση του ωμούκητα στους μεσοκυττάριους χώρους των φύλλων του γονότυπου *bam3*, σε σχέση με τους γονότυπους Col-0, *bam1*, *bam2* και *bam4*, αποτελέσματα τα οποία συμπίπτουν τόσο με τη συμπτωματολογική εικόνα των φυτών στις 12 ημέρες μετά τη μόλυνση με τον ωμούκητα, όσο και με τα αποτελέσματα

της ποσοτικοποίησης των ζωοσποριαγγείων στους υπό εξέταση γονότυπους στις 7 ημέρες μετά τη μόλυνση. Στην περίπτωση του γονότυπου *bam4* δεν διαπιστώθηκε κάποια σημαντική διαφοροποίηση ως προς την εξάπλωση του ωμούκητα στους προσβεβλημένους ιστούς, σε σύγκριση με τους γονότυπους Col-0, *bam1* και *bam2*.

Εικ.14 Συμπτωματολογική εικόνα μολυσμένων από τον ωμούκητα *H. arabidopsidis* φυτών για κάθε υπό εξέταση γονότυπο 12 ημέρες μετά τη μόλυνση. Στο κάτω μέρος της εικόνας απεικονίζονται οι φωτογραφίες πραγματικών φύλλων και κοτυληδόνων για κάθε υπό εξέταση γονότυπο μετά από χρώση Trypan Blue, 7 ημέρες μετά τη μόλυνση των φυτών με τον ωμούκητα *H. arabidopsidis*.



2. Αποτελέσματα Πειραμάτων Παθογένειας με το Βακτήριο *Pst* DC3000

2.1 Μέτρηση του νωπού βάρους των μολυσμένων με το βακτήριο *Pst* DC3000 φυτών *bam1*, *bam2*, *bam3*, *bam4* και Col-0

Για να διαπιστωθεί εάν κάποιος από τους γονότυπους παρουσίασε ανθεκτικότητα έναντι του παθογόνου βακτηρίου *Pst* DC3000, πραγματοποιήθηκε μέτρηση του νωπού βάρους των φυτών στα οποία εφαρμόστηκε το παθογόνο βακτήριο, στις 2 και 4 ημέρες μετά τη μόλυνση. Το μέσο νωπό βάρος των μολυσμένων φυτών για κάθε γονότυπο εκφράστηκε ως επί τις % του μέσου νωπού βάρους των αμόλυντων μαρτύρων (MOCK), προκειμένου οι διαφοροποιήσεις μεταξύ των υπό εξέταση γονότυπων ως προς το μέσο νωπό βάρος των φυτών μετά την εφαρμογή με το παθογόνο βακτήριο να οφείλονται αποκλειστικά και μόνο στην ένταση τη ασθένειας και όχι στο διαφορετικό φαινότυπο των φυτών του κάθε γονότυπου ως προς το μέγεθος και το νωπό βάρος. Συνολικά, πραγματοποιήθηκαν 3 ανεξάρτητες επαναλήψεις του πειράματος παθογένειας. Τέλος, όλες οι τιμές για κάθε χρονική στιγμή, εισήχθησαν σε πρόγραμμα στατιστικής ανάλυσης ANOVA (StatGraphics Plus 2.1 Version), για να διαπιστωθεί αν κάποιος από τους υπό εξέταση γονότυπους εμφανίζει κάποια στατιστικά σημαντική διαφορά ως προς το μέσο νωπό βάρος μετά την εφαρμογή του παθογόνου βακτηρίου.

Τα αποτελέσματα των 3 ανεξάρτητων επαναλήψεων, κατέδειξαν στατιστικά σημαντική διαφορά του γονότυπου *bam3* σε σχέση με τους υπόλοιπους γονότυπους ως προς το μέσο νωπό βάρος των φυτών τα οποία προσβλήθηκαν

από το παθογόνο βακτήριο. Η διαφοροποίηση του γονότυπου *bam3* σε σχέση με τους υπόλοιπους υπό εξέταση γονότυπους ως προς το μέσο νωπό βάρος ήταν πιο εμφανής την τέταρτη ημέρα μετά τη μόλυνση κατά την οποία οι υπόλοιποι γονότυποι εμφάνισαν μείωση περίπου κατά 70% ως προς το νωπό τους βάρους σε σχέση με το αντίστοιχο νωπό βάρος των φυτών στα οποία δεν προηγήθηκε καμία εφαρμογή με το παθογόνο βακτήριο. Το νωπό βάρος των μολυσμένων με το βακτήριο φυτών του γονότυπου *bam3* μειώθηκε περίπου κατά 15% του αντίστοιχου νωπού βάρους των αμόλυντων φυτών την δεύτερη ημέρα μετά την εφαρμογή του παθογόνου βακτηρίου, ενώ την τέταρτη ημέρα μετά τη μόλυνση το ποσοστό μείωσης του νωπού βάρους δεν διαφοροποιήθηκε στατιστικά σημαντικά σε σχέση με τη δεύτερη ημέρα μετά τη μόλυνση. Τα φυτά των γονότυπων Col-0, *bam1* και *bam2* δεν είχαν στατιστικά σημαντικές διαφορές μεταξύ τους ως προς το νωπό τους βάρος τόσο τη δεύτερη όσο και την τέταρτη ημέρα μετά τη μόλυνση. Ο γονότυπος *bam4* διαφοροποιήθηκε στατιστικά σημαντικά σε σχέση με τους υπόλοιπους γονότυπους τη δεύτερη ημέρα μετά τη μόλυνση, παρουσιάζοντας αυξημένη ευπάθεια στην προσβολή από το παθογόνο, ενώ την τέταρτη ημέρα μειώθηκε στα επίπεδα των γονότυπων Col-0, *bam1* και *bam2*.

2.2 Ποσοτικοποίηση του ενδοφυτικού πληθυσμού του βακτηρίου *Pst* DC3000 στα φύλλα των φυτών *bam1*, *bam2*, *bam3*, *bam4* και Col-0

Προκειμένου να διαπιστωθεί αν υπάρχει κάποια διαφοροποίηση ως προς τον ενδοφυτικό πληθυσμό του παθογόνου βακτηρίου *Pst* DC3000 μεταξύ των υπό εξέταση γονότυπων, πραγματοποιήθηκε μέτρηση των αποικιών του βακτηρίου (cfu/ml) σε 1 gr νωπών φύλλων τα οποία έφεραν συμπτώματα της βακτηριακής κηλίδωσης, στις 2 και 4 ημέρες μετά τη μόλυνση των φυτών με το παθογόνο βακτήριο. Συνολικά πραγματοποιήθηκαν 3 ανεξάρτητες επαναλήψεις. Οι τιμές εισήχθησαν σε πρόγραμμα στατιστικής ανάλυσης ANOVA (StatGraphics Plus 2.1 Version), για να διαπιστωθεί αν κάποιος από τους υπό εξέταση γονότυπους εμφανίζει κάποια στατιστικά σημαντική διαφορά ως προς την ενδοφυτική συγκέντρωση βακτηριακού πληθυσμού (cfu/ml).

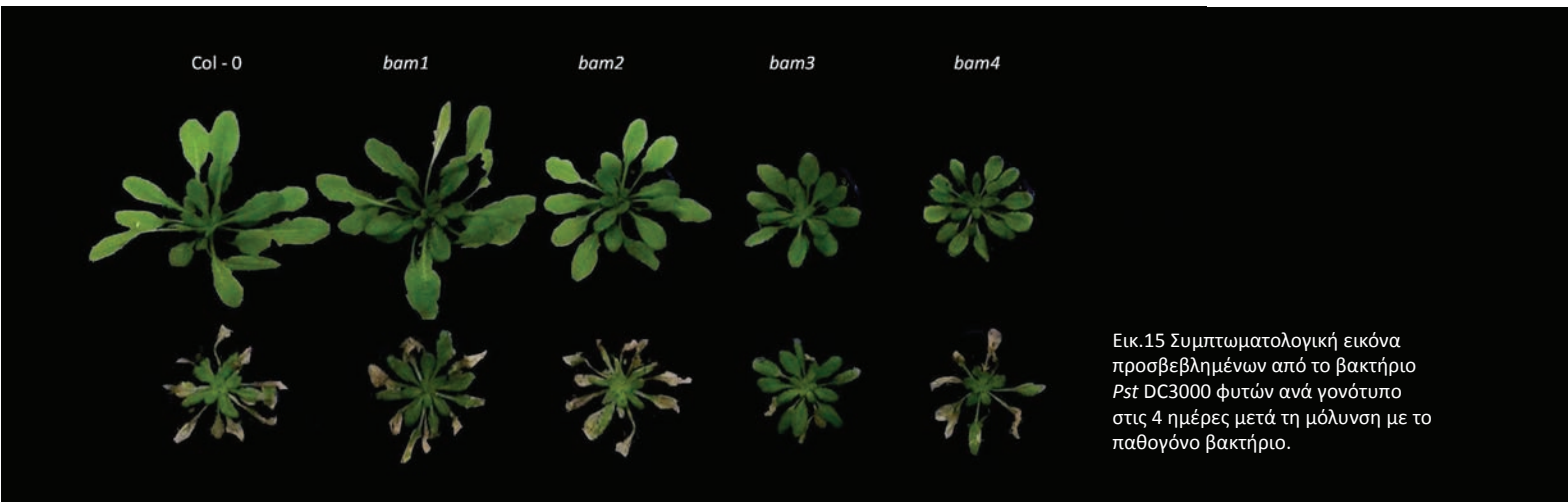
Τα αποτελέσματα και των 3 ανεξάρτητων επαναλήψεων του πειράματος παθογένειας, κατέδειξαν στατιστικώς σημαντική διαφοροποίηση των γονότυπων *bam1*, *bam2*, *bam3* και *bam4* ως προς τον αριθμό των αποικιών (cfu/

ml) σε σχέση με τα φυτά του αγρίου τύπου (Col-0). Ο γονότυπος *bam3* παρουσίασε το μικρότερο αριθμό αποικιών (cfu/ml) σε σχέση με τον αντίστοιχο αριθμό αποικιών των υπόλοιπων γονότυπων και στις δύο χρονικές στιγμές, αποτελέσματα τα οποία συμπίπτουν και με τη συμπτωματολογική εικόνα των φυτών στα διάφορα πειράματα παθογένειας, αλλά και με τα αποτελέσματα της μέτρησης του νωπού βάρους των φυτών στις 2 και 4 ημέρες μετά τη μόλυνση (εικόνα). Επιπλέον στο γονότυπο των φυτών *bam3* τα επίπεδα του ενδοφυτικού βακτηριολογικού πληθυσμού δεν διαφοροποιήθηκαν στατιστικώς σημαντικά μεταξύ των δύο χρονικών στιγμών (Εικόνα.16.C).

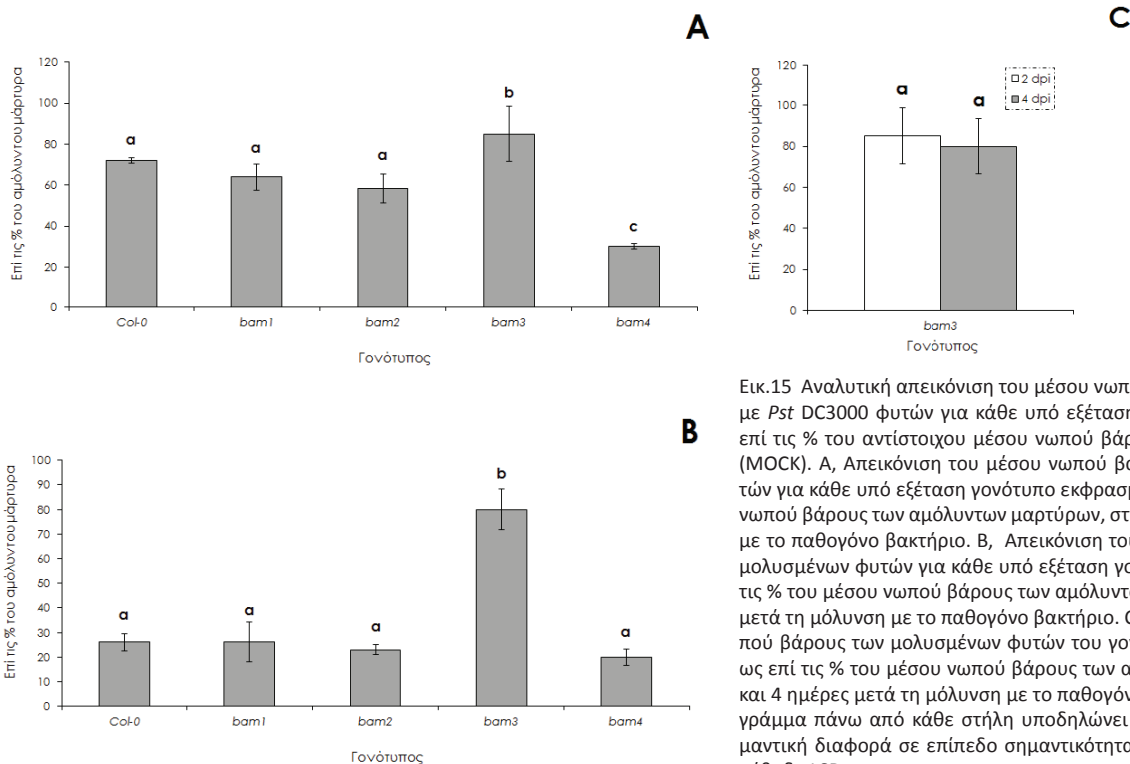
Οι γονότυποι *bam1* και *bam4* παρουσίασαν το μεγαλύτερο αριθμό αποικιών του ενδοφυτικού βακτηριακού πληθυσμού στις 2 ημέρες μετά τη μόλυνση σε σχέση με τους υπόλοιπους γονότυπους. Στις 4 ημέρες μετά τη μόλυνση στο γονότυπο *bam4*, παρατηρήθηκε μία φθίνουσα πορεία του πληθυσμού του βακτηρίου στα επίπεδα του γονότυπου

bam3. Η φθίνουσα πορεία του πληθυσμού του βακτηρίου στο γονότυπο *bam4* πιθανότατα προέκυψε ως αποτέλεσμα της έντονης νέκρωσης των ιστών των φυτών λόγω αυξημένης ευπάθειας του συγκεκριμένου γονότυπου έναντι του παθογόνου βακτηρίου. Παρόμοια εικόνα μεταξύ των δύο χρονικών στιγμών παρατηρήθηκε και στους γονότυπους Col-0 και *bam2*, το οποίο συμπίπτει με την αυξημένη ένταση της ασθένειας στους συγκεκριμένους γονότυπους. Σε αντίθεση με τους γονότυπους Col-0, *bam2* και *bam4*, τα επίπεδα του πληθυσμού του παθογόνου βακτηρίου στο γονότυπο *bam1* μεταξύ των δύο χρονικών στιγμών δεν μεταβλήθηκαν στατιστικώς σημαντικά, ανεξαρτήτως της παρόμοιας εξέλιξης της έντασης των συμπτωμάτων με τα αντίστοιχα φυτά των γονοτύπων Col-0, *bam2* και *bam4*.

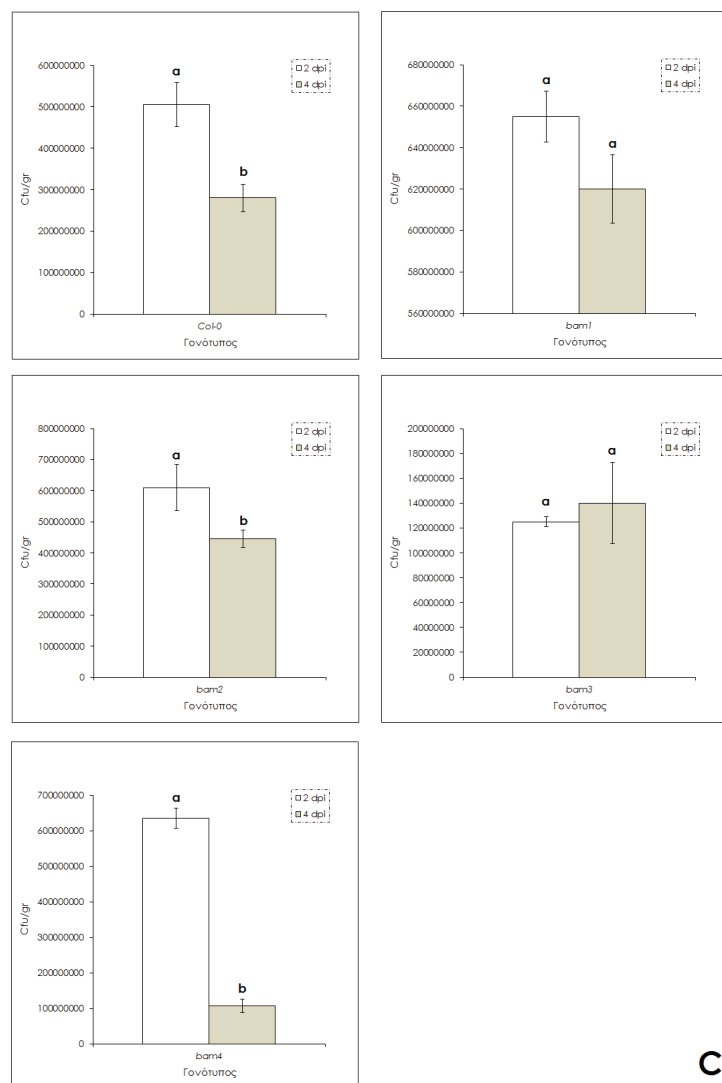
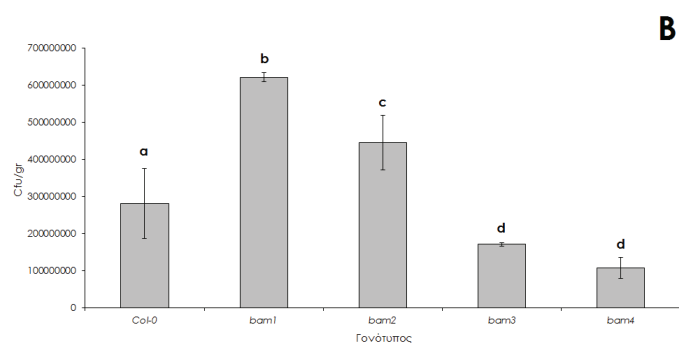
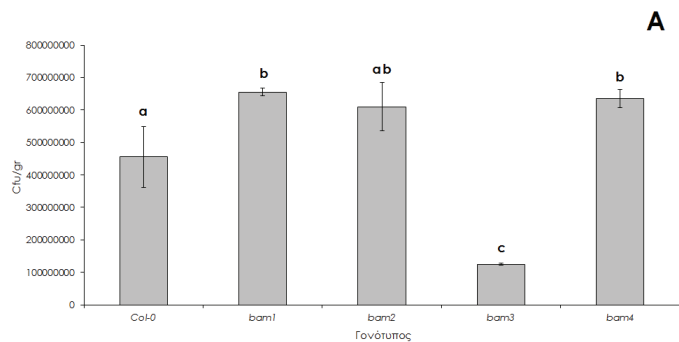
Γενικότερα, στα πειράματα παθογένειας με το παθογόνο βακτήριο *Pst* DC3000, παρατηρήθηκε αυξημένη ευπάθεια των γονοτύπων *bam1*, *bam2* και *bam4* έναντι της προσβολής τους από το παθογόνο βακτήριο σε σχέση με τα φυτά του αγρίου τύπου και τα μεταλλαγμένα φυτά *bam3*. Ο γονότυπος *bam3* εμφάνισε αυξημένη ανθεκτικότητα έναντι του παθογόνου, σε σχέση με τους υπόλοιπους γονότυπους, συμπεράσμα το οποίο προκύπτει και από την ποσοτικοποίηση του ενδοφυτικού πληθυσμού των υπό εξέταση γονοτύπων και από τα αποτελέσματα της μέτρησης του νωπού βάρους των φυτών αλλά και από τη συμπτωματολογική εικόνα των φυτών στις 4 ημέρες μετά τη μόλυνση με το παθογόνο βακτήριο.



Εικ.15 Συμπτωματολογική εικόνα προσβεβλημένων από το βακτήριο *Pst* DC3000 φυτών ανά γονότυπο στις 4 ημέρες μετά τη μόλυνση με το παθογόνο βακτήριο.



Εικ.15 Αναλυτική απεικόνιση του μέσου νωπού βάρους των μολυσμένων με *Pst* DC3000 φυτών για κάθε υπό εξέταση γονότυπο εκφρασμένο ως επί τις % του αντίστοιχου μέσου νωπού βάρους των αμόλυντων φυτών (MOCK). Α, Απεικόνιση του μέσου νωπού βάρους των μολυσμένων φυτών για κάθε υπό εξέταση γονότυπο εκφρασμένο ως επί τις % του μέσου νωπού βάρους των αμόλυντων μαρτύρων, στις 2 ημέρες μετά τη μόλυνση με το παθογόνο βακτήριο. Β, Απεικόνιση του μέσου νωπού βάρους των μολυσμένων φυτών για κάθε υπό εξέταση γονότυπο εκφρασμένο ως επί τις % του μέσου νωπού βάρους των αμόλυντων μαρτύρων, στις 4 ημέρες μετά τη μόλυνση με το παθογόνο βακτήριο. C, Απεικόνιση του μέσου νωπού βάρους των μολυσμένων φυτών του γονότυπου *bam3* εκφρασμένο ως επί τις % του μέσου νωπού βάρους των αμόλυντων μαρτύρων, στις 2 και 4 ημέρες μετά τη μόλυνση με το παθογόνο βακτήριο. Το διαφορετικό γράμμα πάνω από κάθε στήλη υποδηλώνει ότι υπάρχει στατιστικά σημαντική διαφορά σε επίπεδο σημαντικότητας $P \leq 0.05$, σύμφωνα με τη μέθοδο LSD.



Εικ.16 Απεικόνιση του αριθμού των αποικιών (cfu) του βακτηρίου *Pst* DC3000 ανά gr νωπών φύλλων για κάθε γονότυπο. Α, Απεικόνιση του αριθμού των αποικιών του βακτηρίου *Pst* DC3000 (cfu/gr νωπού ιστού) των υπό εξέταση γονότυπων στις 2 ημέρες μετά τη μόλυνση με το παθογόνο βακτήριο. Β, Απεικόνιση του αριθμού των αποικιών του βακτηρίου *Pst* DC3000 (cfu/gr νωπού ιστού) των υπό εξέταση γονότυπων στις 4 ημέρες μετά τη μόλυνση με το παθογόνο βακτήριο. C, Απεικόνιση του αριθμού των αποικιών του βακτηρίου *Pst* DC3000 (cfu/gr νωπού ιστού) για κάθε υπό εξέταση γονότυπο ξεχωριστά στις 2 και 4 ημέρες μετά τη μόλυνση με το παθογόνο βακτήριο. Το διαφορετικό γράμμα πάνω από κάθε στήλη υποδηλώνει ότι υπάρχει στατιστικά σημαντική διαφορά σε επίπεδο σημαντικότητας $P \leq 0.05$, σύμφωνα με τη μέθοδο LSD.

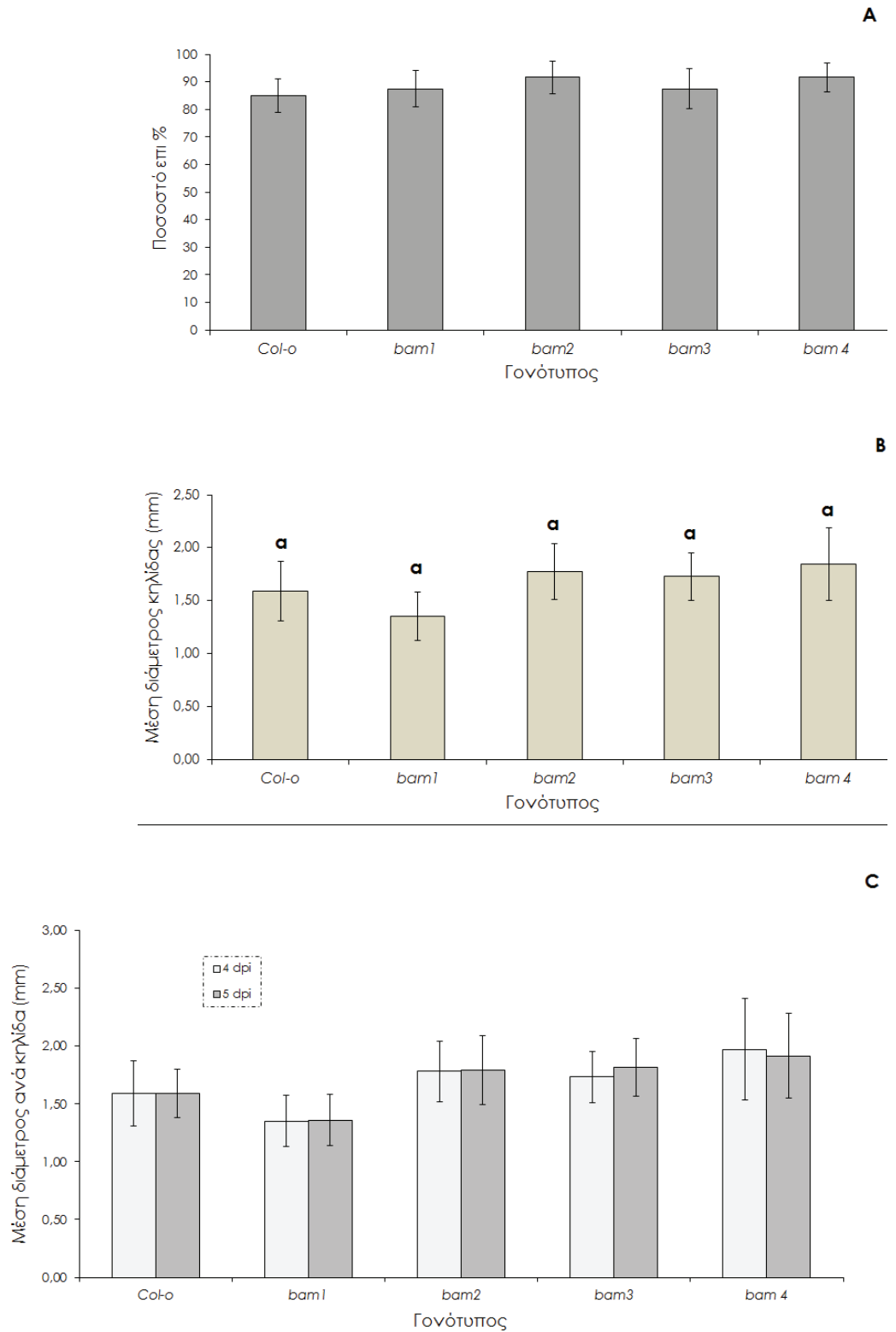
3. Αποτελέσματα πειραμάτων παθογένειας με το μύκητα *B. cinerea*

Προκειμένου να διαπιστωθεί εάν υπάρχει κάποια διαφοροποίηση μεταξύ των υπό εξέταση γονότυπων ως προς την ανθεκτικότητα τους έναντι του νεκροτροφικού μύκητα *B. cinerea*, πραγματοποιήθηκε μέτρηση του ποσοστού εμφάνισης νεκρωτικής κηλίδας στα φύλλα τα οποία προηγήθηκε εμβολιασμός των σπορίων του μύκητα και προσδιορισμός της μέσης διαμέτρου των νεκρωτικών κηλίδων ανά γονότυπο στις 4 και 5 ημέρες μετά τον εμβολιασμό των σπορίων στα φύλλα. Οι τιμές εισήχθησαν σε πρόγραμμα στατιστικής ανάλυσης ANOVA (StatGraphics Plus 2.1 Version), για να διαπιστωθεί αν κάποιος από τους υπό εξέταση γονότυπους εμφανίζει κάποια στατιστικά σημαντική διαφορά ως προς τη συχνότητα και το μέγεθος των νεκρωτικών κηλίδων που προκλήθηκαν ως αποτέλεσμα της αποίκησης του μύκητα *B. cinerea* στους προσβεβλημένους ιστούς.

Τόσο τα αποτελέσματα της συχνότητας εμφάνισης νεκρωτικών κηλίδων στα μολυσμένα φύλλα όσο και η μέση διάμετρος αυτών στους υπό εξέταση γονότυπους κατέδειξαν ότι δεν υπάρχει καμία στατιστικά σημαντική διαφοροποίηση μεταξύ των υπό εξέταση γονότυπων ως προς τη συχνότητα εμφάνισης και το μέγεθος των νεκρωτικών κηλίδων στα προσβεβλημένα φύλλα, η οποία να υπονοεί την ύπαρξη ανθεκτικότητας ή ευπάθειας κάποιου γονότυπου ως προς την προσβολή του μύκητα. Τα αποτελέσματα δεν διαφοροποιήθηκαν στατιστικά σημαντικά μεταξύ των δύο χρονικών στιγμών, ενώ η ένταση της ασθένειας ήταν παρόμοια και στους 5 διαφορετικούς γονότυπους.

Εικ.17 Συμπτωματολογική εικόνα προσβεβλημένων φυτών και φύλλων από το μύκητα *B. cinerea* για κάθε υπό εξέταση γονότυπο στις 6 ημέρες μετά τη μόλυνση.





Εικ.18 Απεικόνιση της συχνότητας εμφάνισης νεκρωτικών κηλίδων στα φυτά τα οποία προηγήθηκε μόλυνσής τους με σπόρια του μύκητα *B. cinerea* και της μέσης διαμέτρου αυτών μεταξύ των υπό εξέταση γονότυπων. Α, Απεικόνιση του ποσοστού εμφάνισης νεκρωτικών κηλίδων στα φύλλα των μολυσμένων με το μύκητα φυτών στις 4 ημέρες μετά τη μόλυνση. Β, Απεικόνιση της μέσης διαμέτρου (mm) των νεκρωτικών κηλίδων για κάθε γονότυπο στις 4 ημέρες μετά τη μόλυνση των φυτών με το μύκητα *B. cinerea*. C, Απεικόνιση της μέσης διαμέτρου (mm) των νεκρωτικών κηλίδων για κάθε γονότυπο στις 4 και 5 ημέρες μετά τη μόλυνση των φυτών με το μύκητα *B. cinerea*. Το ίδιο γράμμα πάνω από κάθε στήλη υποδηλώνει ότι δεν υπάρχει στατιστικά σημαντική διαφορά σε επίπεδο σημαντικότητας $P \leq 0.05$, σύμφωνα με τη μέθοδο LSD.

4. Αποτελέσματα των επιπέδων έκφρασης των γονιδίων *PR1* και *PDF1.2* στα φυτά *bam1*, *bam2*, *bam3*, *bam4* και Col-0

Προκειμένου να διαπιστωθεί εάν η συμπτωματολογική εικόνα των *bam1*, *bam2*, *bam3* και *bam4* οφείλεται στην επαγωγή της διασυστηματικής άμυνας, επιλέχθηκαν να διερευνηθούν τα επίπεδα έκφρασης των γονιδίων *PR1* και *PDF1.2*, τα οποία σχετίζονται με την επαγόμενη από το σαλικυλικό οξύ και αιθυλένιο διασυστηματική άμυνα, αντίστοιχα, στους υπό εξέταση γονότυπους στα διάφορα

συστήματα αλληλεπίδρασης παθογόνου-ξενιστή. Για το σκοπό αυτό, συλλέχτηκε ιστός του υπέργειου μέρους των φυτών από κάθε γονότυπο σε κάθε σύστημα παθογόνου/ξενιστή και στη συνέχεια από κάθε δείγμα απομονώθηκε το σύνολο των μεταγραφημάτων (mRNA), προκειμένου να προσδιοριστούν τα επίπεδα έκφρασης των γονιδίων *PR1* και *PDF1.2* με τη μέθοδο της Real time PCR.

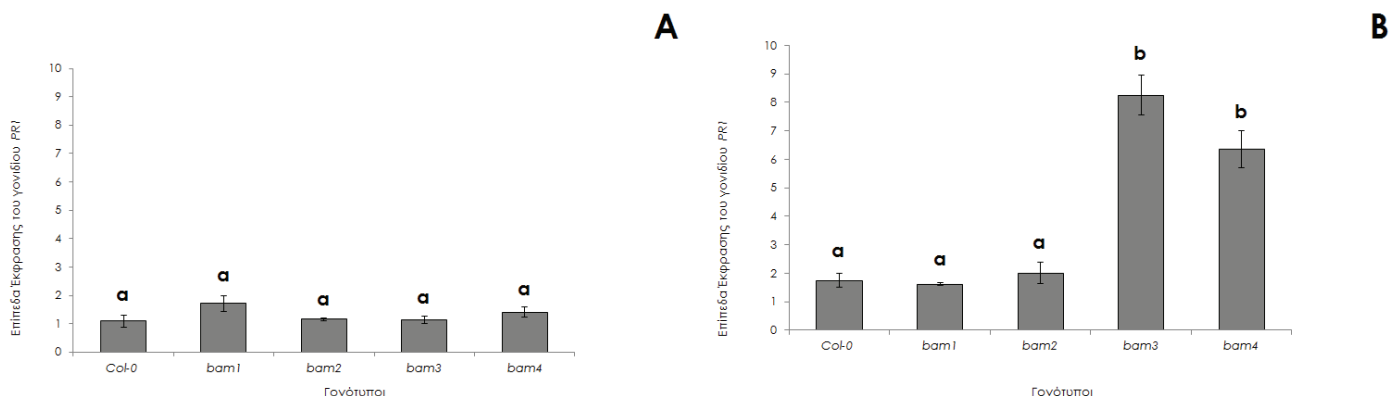
4.1 Αποτελέσματα των επιπέδων έκφρασης των γονιδίων *PR1* και *PDF1.2* στην αλληλεπίδραση των γονοτύπων *bam1*, *bam2*, *bam3*, *bam4* και Col-0 με τον ωμόκητα *H. arabidopsidis*

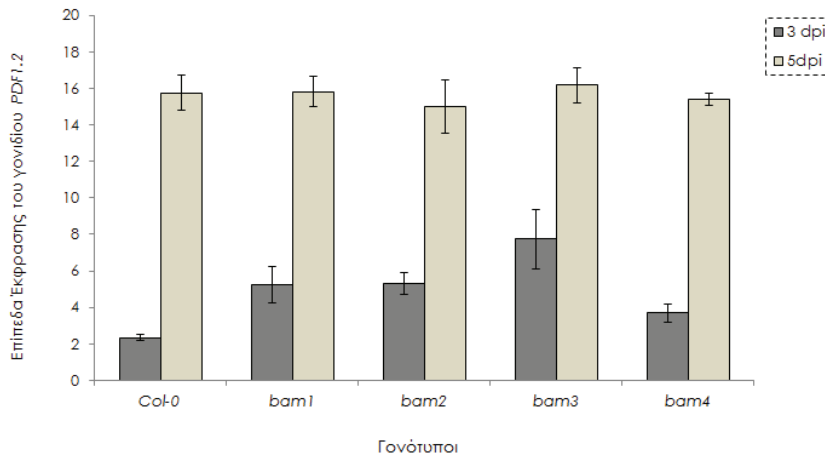
Διερευνήθηκαν τα επίπεδα έκφρασης των γονιδίων *PR1* και *PDF1.2* στους υπό εξέταση γονότυπους στις 3 και 5 ημέρες μετά τη μόλυνση των φυτών με ζωοσποριάγγεια του ωμόκητα *H. arabidopsidis*. Τα επίπεδα έκφρασης του γονιδίου *PR1* στις 3 ημέρες μετά τη μόλυνση δεν διαφοροποιήθηκαν μεταξύ των γονότυπων Col-0, *bam1*, *bam2*, *bam3* και *bam4*. Στις 5 ημέρες μετά τη μόλυνση τα επίπεδα έκφρασης του γονιδίου *PR1* στους γονότυπους *bam3* και *bam4* αυξήθηκαν στατιστικά σημαντικά σε σχέση με τους γονότυπους Col-0, *bam1* και *bam3*, αποτελέσματα τα οποία συμπίπτουν με τη διαφοροποίηση μεταξύ των γονοτύπων ως προς την ποσοτικοποίηση των ζωοσποριαγγείων του ωμόκητα στις 7 ημέρες μετά τη μόλυνση και τη συμπτωματολογική εικόνα των φυτών στις 12 ημέρες μετά

τη μόλυνση. Οι διαφορές μεταξύ των γονοτύπων *bam3* και *bam4* ως προς τα επίπεδα έκφρασης του γονιδίου *PR1* στις 5 ημέρες μετά τη μόλυνση δεν ήταν στατιστικά σημαντικές.

Τα επίπεδα έκφρασης του γονιδίου *PDF1.2* για τους γονότυπους *bam1*, *bam2*, *bam3* και *bam4* εκφράστηκαν σε σχέση με τα αντίστοιχα επίπεδα έκφρασης του *PDF1.2* στα φυτά του αγρίου τύπου. Τόσο στις 3 όσο και τις 5 ημέρες μετά τη μόλυνση δεν παρατηρήθηκαν υψηλά επίπεδα έκφρασης του γονιδίου *PDF1.2* στους γονότυπους *bam1*, *bam2*, *bam3* και *bam4* σε σχέση με τα αντίστοιχα επίπεδα έκφρασης των φυτών του αγρίου τύπου, ενώ μεταξύ των γονοτύπων *bam1*, *bam2*, *bam3* και *bam4* δεν υπήρχαν στατιστικά σημαντικές διαφορές ως προς τα επίπεδα έκφρασης του *PDF1.2* και στις δύο χρονικές στιγμές.

Εικ.19 Απεικόνιση των επιπέδων έκφρασης του γονιδίου *PR1* μεταξύ των υπό εξέταση γονοτύπων μετά τη μόλυνση τους με τον ωμόκητα *H. arabidopsidis*. Α, Απεικόνιση των επιπέδων έκφρασης του γονιδίου *PR1* μεταξύ των υπό εξέταση γονοτύπων 3 ημέρες μετά τη μόλυνση τους με τον ωμόκητα *H. arabidopsidis*. Β, Απεικόνιση των επιπέδων έκφρασης του γονιδίου *PR1* μεταξύ των υπό εξέταση γονοτύπων 5 ημέρες μετά τη μόλυνση τους με τον ωμόκητα *H. arabidopsidis*. Το διαφορετικό γράμμα πάνω από κάθε στήλη υποδηλώνει ότι υπάρχει στατιστικά σημαντική διαφορά σε επίπεδο σημαντικότητας $P \leq 0.05$, σύμφωνα με τη μέθοδο LSD.



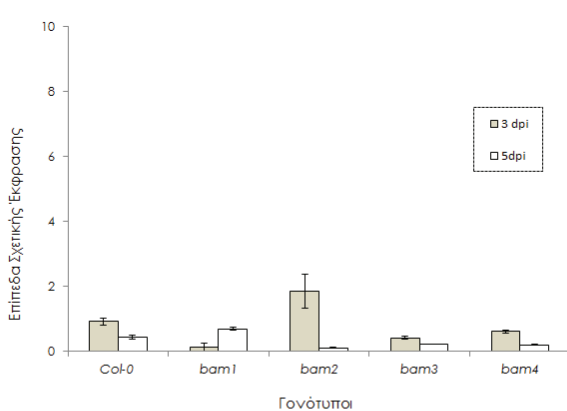


Εικ.20 Απεικόνιση των επιπέδων έκφρασης του γονιδίου *PDF1.2* στους υπό εξέταση γονότυπους 3 και 5 ημέρες μετά τη μόλυνση τους με τον ωομύκητα *H. arabidopsidis*

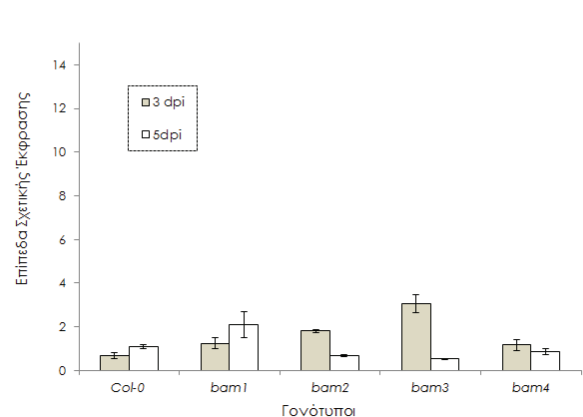
4.2 Αποτελέσματα των επιπέδων έκφρασης των γονιδίων *PR1* και *PDF1.2* στην αλληλεπίδραση των γονοτύπων *bam1*, *bam2*, *bam3* *bam4* και *Col-0* με το μύκητα *B. cinerea*

Διερευνήθηκαν τα επίπεδα έκφρασης των γονιδίων *PR1* και *PDF1.2* στους υπό εξέταση γονότυπους στις 3 και 5 ημέρες μετά τη μόλυνση των φυτών με αιώρημα σπορίων του μύκητα *B. cinerea*. Τα επίπεδα έκφρασης του γονιδίου *PR1* δεν διαφοροποιήθηκαν στατιστικά σημαντικά μεταξύ των υπό εξέταση γονοτύπων τόσο στις 3 όσο και στις 5 ημέρες

μετά τη μόλυνση. Παρόμοια εικόνα παρατηρήθηκε και στα επίπεδα έκφρασης του γονιδίου *PDF1.2* μεταξύ των υπό εξέταση γονοτύπων στις 3 και 5 ημέρες μετά τη μόλυνση, αποτελέσματα τα οποία συμπίπτουν με τη μη ύπαρξη διαφοροποιήσεων μεταξύ της έντασης της ασθένειας στους υπό εξέταση γονότυπους.



A



B

Εικ.21 Απεικόνιση των επιπέδων έκφρασης των γονιδίων *PR1* και *PDF1.2* στους υπό εξέταση γονοτύπους μετά τη μόλυνση τους με το μύκητα *B. cinerea*. A, Απεικόνιση των επιπέδων έκφρασης του γονιδίου *PR1* στους υπό εξέταση γονοτύπων 3 και 5 ημέρες μετά τη μόλυνση τους με το μύκητα *B. cinerea*. B, Απεικόνιση των επιπέδων έκφρασης του γονιδίου *PDF1.2* στους υπό εξέταση γονοτύπων 3 και 5 ημέρες μετά τη μόλυνση τους με το μύκητα *B. cinerea*.

4.3 Αποτελέσματα των επιπέδων έκφρασης των γονιδίων *PR1* και *PDF1.2* στην αλληλεπίδραση των γονοτύπων *bam1*, *bam2*, *bam3*, *bam4* και *Col-0* με το βακτήριο *Pst* DC3000

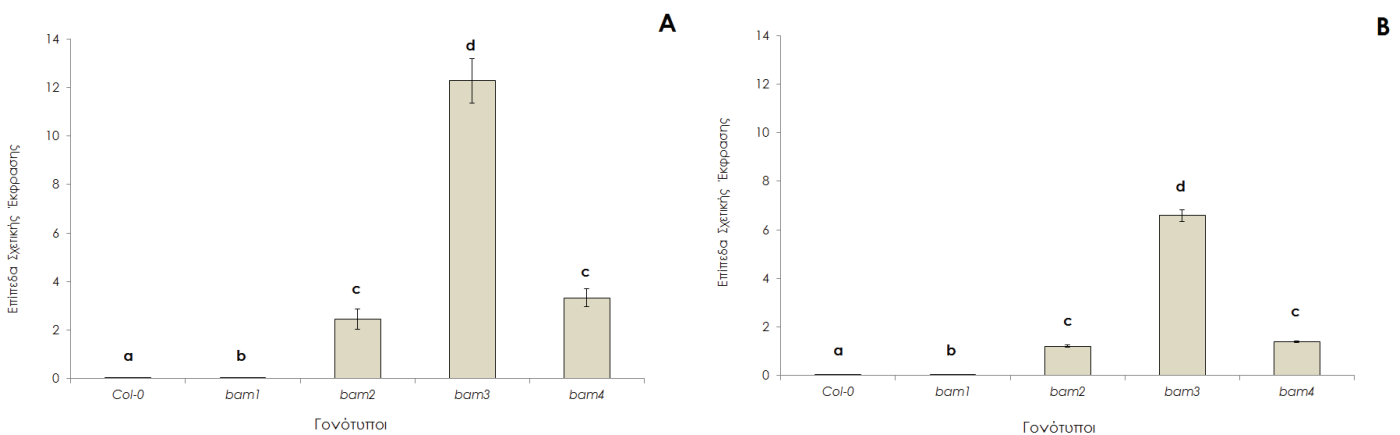
Διερευνήθηκαν τα επίπεδα έκφρασης των γονιδίων *PR1* και *PDF1.2* στους υπό εξέταση γονότυπους στη 1 και 4 ημέρες μετά τη μόλυνση των φυτών με αιώρημα βακτηρίων *Pst* DC3000. Οι γονότυποι *bam2*, *bam3* και *bam4* παρουσίασαν υψηλά επίπεδα έκφρασης τόσο στη 1 όσο και στις 4 ημέρες μετά τη μόλυνση. Ο γονότυπος *bam3* εμφάνισε

τα υψηλότερα επίπεδα έκφρασης του γονιδίου *PR1* τόσο στη 1 όσο και στις 4 ημέρες μετά τη μόλυνση, υπερεκφράζοντας το γονίδιο *PR1* κατά περίπου 350 φορές σε σχέση με τα φυτά του αγρίου τύπου τη 1^η ημέρα μετά τη μόλυνση και περίπου 3000 φορές τη 4^η ημέρα μετά τη μόλυνση, αποτελέσματα τα οποία συμπίπτουν τόσο με τα αντίστοιχα

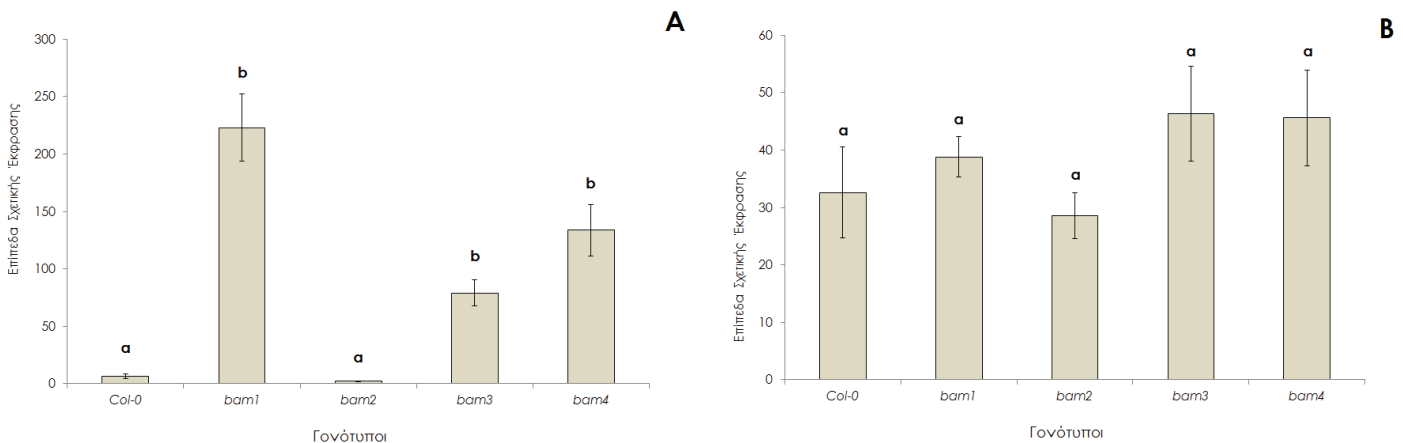
αποτελέσματα του μέσου νωπού βάρους των γονοτύπων στις 2 και 4 ημέρες μετά τη μόλυνση, όσο και με τα αντίστοιχα αποτελέσματα της ποσοτικοποίησης του ενδοφυτικού πληθυσμού του βακτηρίου στους υπό εξέταση γονότυπους στις 2 και 4 ημέρες μετά τη μόλυνση. Οι διαφορές μεταξύ των επιπέδων έκφρασης του γονιδίου *PR1* στους γονότυπους *bam2* και *bam4* δεν ήταν στατιστικά σημαντικές και στις δύο χρονικές στιγμές, ενώ τα επίπεδα έκφρασης του *PR1* στο γονότυπο *bam1* δεν διαφοροποιήθηκαν στατιστικά σημαντικά σε σχέση με τα αντίστοιχα επίπεδα έκφρασης του *PR1* στα φυτά του αγρίου τύπου, τόσο στη 1 όσο και στις 4 ημέρες μετά τη μόλυνση.

Οι γονότυποι *bam1*, *bam3* και *bam4* διαφοροποιήθηκαν στατιστικά σημαντικά ως προς τα επίπεδα έκφρασης του

γονιδίου *PDF1.2* σε σχέση με τους γονότυπους Col-0 και *bam2* τη 1η ημέρα μετά τη μόλυνση. Οι διαφορές μεταξύ των επιπέδων έκφρασης του *PDF1.2* των γονοτύπων *bam1*, *bam3* και *bam4* δεν ήταν στατιστικά σημαντικές, ενώ ήταν 10-20 φορές μεγαλύτερα από τα αντίστοιχα επίπεδα έκφρασης του *PDF1.2* στα φυτά αγρίου τύπου. Τα επίπεδα έκφρασης του γονιδίου *PDF1.2* στα φυτά του γονότυπου *bam2* δεν διαφοροποιήθηκαν στατιστικά σημαντικά σε σχέση με τα αντίστοιχα επίπεδα έκφρασης του *PDF1.2* στα φυτά αγρίου τύπου. Στις 4 ημέρες μετά τη μόλυνση δεν υπήρχαν στατιστικά σημαντικές διαφοροποιήσεις μεταξύ των υπό εξέταση γονοτύπων ως προς τα επίπεδα έκφρασης του γονιδίου *PDF1.2*.



Εικ.22 Απεικόνιση των επιπέδων έκφρασης του γονιδίου *PR1* στους υπό εξέταση γονοτύπους μετά τη μόλυνση τους με το βακτήριο *P. syringae pv. tomato* DC3000. Α, Απεικόνιση των επιπέδων έκφρασης του γονιδίου *PR1* στους υπό εξέταση γονοτύπους 1 ημέρα μετά τη μόλυνση τους με το βακτήριο *Pst* DC3000. Β, Απεικόνιση των επιπέδων έκφρασης του γονιδίου *PR1* στους υπό εξέταση γονοτύπους 4 ημέρες μετά τη μόλυνση τους με το βακτήριο *Pst* DC3000. Το διαφορετικό γράμμα πάνω από κάθε στήλη υποδηλώνει ότι υπάρχει στατιστική σημαντική διαφορά σε επίπεδο σημαντικότητας $P \leq 0.05$, σύμφωνα με τη μέθοδο LSD.



Εικ.23 Απεικόνιση των επιπέδων έκφρασης του γονιδίου *PDF1.2* στους υπό εξέταση γονοτύπους μετά τη μόλυνση τους με το βακτήριο *P. syringae pv. tomato* DC3000. Α, Απεικόνιση των επιπέδων έκφρασης του γονιδίου *PDF1.2* στους υπό εξέταση γονοτύπους 1 ημέρα μετά τη μόλυνση τους με το βακτήριο *Pst* DC3000. Β, Απεικόνιση των επιπέδων έκφρασης του γονιδίου *PDF1.2* στους υπό εξέταση γονοτύπους 4 ημέρες μετά τη μόλυνση τους με το βακτήριο *Pst* DC3000. Το διαφορετικό γράμμα πάνω από κάθε στήλη υποδηλώνει ότι υπάρχει στατιστική σημαντική διαφορά σε επίπεδο σημαντικότητας $P \leq 0.05$, σύμφωνα με τη μέθοδο LSD.

5. Αποτελέσματα των επιπέδων έκφρασης των γονιδίων *BAM1*, *BAM2*, *BAM3* και *BAM4* στα φυτά αγρίου τύπου κατά τη διαδικασία αλληλεπίδρασης με τα παθογόνα *H. arabidopsidis*, *Pst* DC3000 και *B. cinerea*

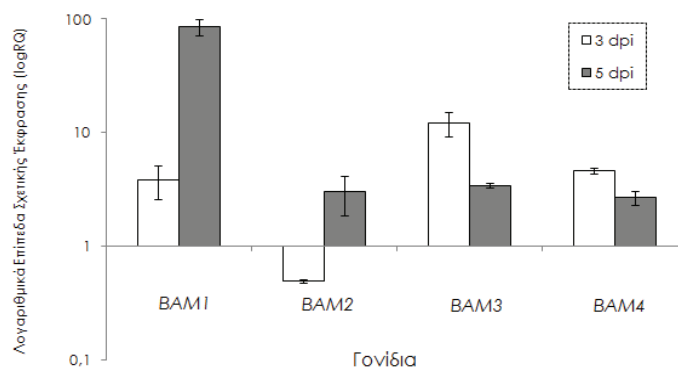
Προκειμένου να διαπιστωθεί εάν κάποιο από τα υπό εξέταση παθογόνα, επηρεάζει την έκφραση των υπό εξέταση β-αμυλασών, διερευνήθηκαν τα επίπεδα έκφρασης των γονιδίων *BAM1*, *BAM2*, *BAM3* και *BAM4*. Για το σκοπό αυτό, συλλέχθηκε ιστός του υπέργειου μέρους φυτών από κάθε γονότυπο σε κάθε σύστημα παθογόνου/ξενιστή και

στη συνέχεια από κάθε δείγμα απομονώθηκε το σύνολο των μεταγραφημάτων (mRNA), προκειμένου να προσδιοριστούν τα επίπεδα έκφρασης των γονιδίων *BAM1*, *BAM2*, *BAM3* και *BAM4* με τη μέθοδο της Real time PCR.

5.1 Αποτελέσματα των επιπέδων έκφρασης των γονιδίων *BAM1*, *BAM2*, *BAM3* και *BAM4* στα φυτά αγρίου τύπου κατά τη διαδικασία αλληλεπίδρασης τους με τον ωομύκητα *H. arabidopsidis*

Διερευνήθηκαν τα επίπεδα έκφρασης των γονιδίων *BAM1*, *BAM2*, *BAM3* και *BAM4* στα φυτά αγρίου τύπου στις 3 και 5 ημέρες μετά τη μόλυνση των φυτών με ζωοσποριάγγεια του ωομύκητα *H. arabidopsidis*. Τα επίπεδα έκφρασης των γονιδίων *BAM1*, *BAM2*, *BAM3* και *BAM4* των μολυσμένων φυτών εκφράστηκαν σε σχέση με τα αντίστοιχα επίπεδα έκφρασης των αμόλυντων φυτών (MOCK). Τα αποτελέσματα έδειξαν ότι στις 3 ημέρες μετά τη μόλυνση τα φυτά αγρίου τύπου παρουσίασαν υψηλά επίπεδα έκφρασης του γονιδίου *BAM3*, ενώ τα επίπεδα έκφρασης των γονιδίων *BAM1* και *BAM4* δεν διαφοροποιήθηκαν στατιστικά σημαντικά μεταξύ τους. Το γονίδιο *BAM2* υποεκφράστηκε στις 3 ημέρες μετά τη μόλυνση. Στις 5 ημέρες μετά τη μόλυνση ενώ τα επίπεδα έκφρασης των γονιδίων *BAM2*, *BAM3* και *BAM4* δεν διαφοροποιήθηκαν στατιστικά σημαντικά μεταξύ τους, παρατηρήθηκαν υψηλά επίπεδα έκφρασης του γονιδίου *BAM1* περίπου 85 φορές υψηλότερα από τα αντίστοιχα επίπεδα έκφρασης του γονιδίου *BAM1* στα αμόλυντα φυτά.

Εικ.24 Απεικόνιση των επιπέδων έκφρασης των γονιδίων *BAM1*, *BAM2*, *BAM3* και *BAM4* στα φυτά αγρίου τύπου 3 και 5 ημέρες μετά τη μόλυνση τους με τον ωομύκητα *H. arabidopsidis*.



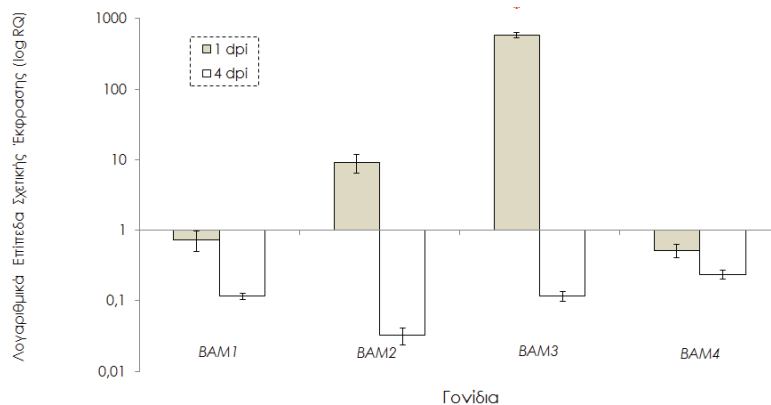
5.2 Αποτελέσματα των επιπέδων έκφρασης των γονιδίων *BAM1*, *BAM2*, *BAM3* και *BAM4* στα φυτά αγρίου τύπου κατά τη διαδικασία αλληλεπίδρασης τους με το βακτήριο *Pst* DC3000

Διερευνήθηκαν τα επίπεδα έκφρασης των γονιδίων *BAM1*, *BAM2*, *BAM3* και *BAM4* στα φυτά αγρίου τύπου στη 1 και 4 ημέρες μετά τη μόλυνση των φυτών με αιώρημα βακτηρίων *Pst* DC3000. Τα επίπεδα έκφρασης των γονιδίων *BAM1*, *BAM2*, *BAM3* και *BAM4* των μολυσμένων φυτών εκφράστηκαν σε σχέση με τα αντίστοιχα επίπεδα έκφρασης των αμόλυντων φυτών (MOCK).

Τα φυτά αγρίου τύπου τη 1η ημέρα μετά τη μόλυνση, εμφάνισαν υψηλά επίπεδα έκφρασης του γονιδίου *BAM3*, περίπου 587 φορές υψηλότερα σε σχέση με τα αντίστοιχα επίπεδα έκφρασης του γονιδίου *BAM3* στα αμόλυντα

φυτά αγρίου τύπου. Τα γονίδια *BAM1* και *BAM4* υποεκφράστηκαν τόσο στη 1 όσο και στις 4 ημέρες μετά τη μόλυνση. Το γονίδιο *BAM2* υπερεκφράστηκε περίπου 9 φορές περισσότερο σε σχέση με τα αμόλυντα φυτά αγρίου τύπου την 1η ημέρα μετά τη μόλυνση. Στις 4 ημέρες μετά τη μόλυνση, τα γονίδια *BAM2* και *BAM3* υποεκφράστηκαν στα επίπεδα των γονιδίων *BAM1* και *BAM4*. Στις 4 ημέρες μετά τη μόλυνση δεν παρατηρήθηκαν στατιστικά σημαντικές διαφοροποιήσεις μεταξύ των επιπέδων έκφρασης των γονιδίων *BAM1*, *BAM2*, *BAM3* και *BAM4*.

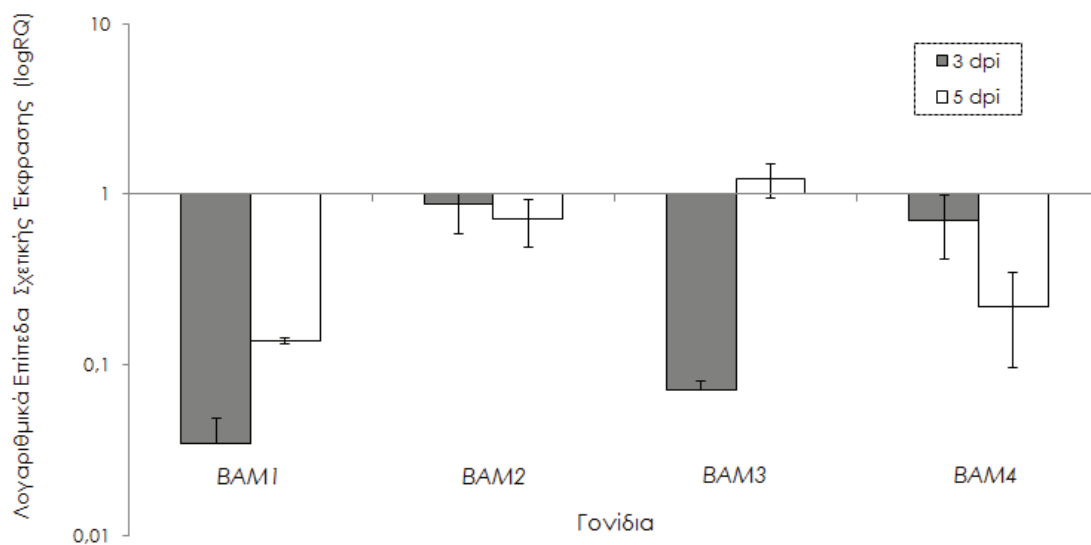
Εικ.25 Απεικόνιση των επιπέδων έκφρασης των γονιδίων *BAM1*, *BAM2*, *BAM3* και *BAM4* στα φυτά αγρίου τύπου 1 και 4 ημέρες μετά τη μόλυνση τους με το βακτήριο *Pst* DC3000.



5.3 Αποτελέσματα των επιπέδων έκφρασης των γονιδίων *BAM1*, *BAM2*, *BAM3* και *BAM4* στα φυτά αγρίου τύπου κατά τη διαδικασία αλληλεπίδρασης τους με τον μύκητα *B. cinerea*

Διερευνήθηκαν τα επίπεδα έκφρασης των γονιδίων *BAM1*, *BAM2*, *BAM3* και *BAM4* στα φυτά αγρίου τύπου στις 3 και 5 ημέρες μετά τη μόλυνση των φυτών με αιώρημα κονιδίων του μύκητα *B. cinerea*. Τα επίπεδα έκφρασης των γονιδίων *BAM1*, *BAM2*, *BAM3* και *BAM4* των μολυσμένων φυτών εκφράστηκαν σε σχέση με τα αντίστοιχα επίπεδα έκφρασης των αμόλυντων φυτών (MOCK).

Σύμφωνα με τα αποτελέσματα, διαπιστώθηκε η υπο-έκφραση των γονιδίων *BAM1*, *BAM2*, *BAM3* και *BAM4* στα μολυσμένα φυτά σε σχέση με τα αντίστοιχα επίπεδα έκφρασης των αμόλυντων φυτών.



Εικ.26 Απεικόνιση των επιπέδων έκφρασης των γονιδίων *BAM1*, *BAM2*, *BAM3* και *BAM4* στα φυτά αγρίου τύπου 3 και 5 ημέρες μετά τη μόλυνση τους με το μύκητα *B.cinerea*.

Ε. ΣΥΖΗΤΗΣΗ

Η συνεχής συνεξελικτική πορεία μεταξύ του συστήματος των φυτών-ξενιστών και των φυτοπαθόνων μικροοργανισμών οδήγησε στη δημιουργία ενός πολύπλοκου και ποικιλόμορφου συστήματος αλληλεπίδρασης παθογόνου-ξενιστή. Η αλληλεπίδραση μεταξύ παθογόνων-ξενιστών περιλαμβάνει ποικίλα στάδια τα οποία ανάλογα με το εκάστωτε σύστημα παθογόνου ξενιστή οδηγεί σε ανθεκτικότητα του φυτού, ανεκτικότητα ή ευπάθεια του ξενιστή στην προσβολή από ποικίλα παθογόνα αίτια. Ο κατάλογος των μορίων που διαμεσολαβούν τόσο στη σηματοδότηση αλλά και τη μεταγωγή σήματος κατά τη διαδικασία αναγνώρισης ενός παθογόνου μικροοργανισμού από το φυτό συνεχώς αυξάνεται, ενώ πολλές ενώσεις φαίνεται να διαδραματίζουν πολλαπλό ρόλο αφενός ως προς τον κύριο μεταβολισμό των φυτών και αφετέρου ως προς την επαγωγή συγκεκριμένων γονιδίων που εμπλέκονται στην άμυνα του φυτού. Τέτοια μόρια μπορεί να είναι ένζυμα, μεταγραφικοί παράγοντες, φυτοορμόνες αλλά και προϊόντα του βασικού μεταβολισμού όπως τα σάκχαρα. Ο ρόλος των προϊόντων του βασικού μεταβολισμού ως προς την ενεργοποίηση της άμυνας των φυτών δεν έχει κατανοηθεί πλήρως. Τα σάκχαρα αποτελούν κυρίαρχο προϊόν των φωτεινών αντιδράσεων, ενώ μέσω του μεταβολισμού τους απελευθερώνεται ενέργεια, απαραίτητη για ποικίλες λειτουργίες των φυτών όπως η αναπνοή ή η βιοσύνθεση μορίων. Ο ρυθμιστικός ρόλος των σακχάρων ως προς την καταστολή γονιδίων που εμπλέκονται στη φωτοσύνθεση κατά την προσβολή των φυτών από παθογόνα αίτια είναι γνωστός, ενώ υπάρχουν αναφορές οι οποίες συσχετίζουν τη συσσώρευση εξοζών ως αποτέλεσμα της αυξημένης έκφρασης και ενζυμικής δραστηριότητας του ενζύμου της ινβερτάσης με θέση δράσης στο κυτταρικό τοίχωμα με την υπερέκφραση γονιδίων τα οποία σχετίζονται με την ανθεκτικότητα των φυτών έναντι παθογόνων μικροοργανισμών (Scholes et al., 1994; Jang and Sheen, 1994; Herbers et al., 1996; Chou et al., 2000; Pego et al., 2000; Berger et al., 2004). Οι β-αμυλάσες επιτελούν κυρίαρχο ρόλο ως προς την υδρόλυση του αμύλου και την απελευθέρωση μορίων του δισακχαρίτη της μαλτόζης κατά τη διάρκεια της νύχτας, όταν η σύνθεση των σακχάρων *de novo* από την αφομοίωση του CO₂ μέσω της φωτοσυνθετικής αλυσίδας μεταφοράς ηλεκτρονίων καθίστανται αδύνατη, επομένως η έλλειψη βασικών β-αμυλασών στα φυτά πιθανόν να έχει ως αποτέλεσμα τη μεταβολή των επιπέδων των υδατανθράκων, επηρεάζοντας τόσο το βασικό όσο και το δευτερογενή μεταβολισμό των φυτών (Berger et al., 2007). Κατά τη διάρκεια του ημερήσιου κύκλου, μεταβολές στα ενδογενή επίπεδα των σακχάρων απέφεραν σημαντικές μεταβολές στα μεταγραφήματα του φυτού *A. thaliana* (Blasing et al., 2005).

Σύμφωνα με τη μελέτη των Fulton et al. (2008), η σίγηση συγκεκριμένων γονιδίων τα οποία κωδικοποιούν β-αμυλά-

σες στο φυτό *A. thaliana*, είχε ως αποτέλεσμα φαινότυπους με συσσωρευμένο άμυλο στα φύλλα κατά τη διάρκεια της νύχτας και μικρή συσσώρευση του δισακχαρίτη της μαλτόζης τόσο στο χλωροπλάστη, όσο και στο κυτταρόπλασμα. Επομένως, μέσω της σίγησης συγκεκριμένων β-αμυλασών μπορεί να διερευνηθεί ο ρόλος τόσο του αμύλου όσο και του δισακχαρίτη της μαλτόζης στην εγγενή άμυνα των φυτών έναντι παθογόνων αιτιών. Σύμφωνα με τη μελέτη των Engelsdorf et al. (2013), μεταλλαγμένες σειρές *A. thaliana* στα γονίδια τα οποία είναι υπεύθυνα για τον καταβολισμό του αμύλου παρουσίασαν αυξημένη ανθεκτικότητα έναντι του βιοτροφικού μύκητα *Erysiphe cruciferarum* και αυξημένη ευπάθεια στην προσβολή τους από τον ημιβιοτροφικό μύκητα *Colletotrichum higginsianum*. Επιπλέον, σύμφωνα με τη μελέτη των Gkizi et al. (2015), μονές και πολλαπλές μεταλλάξεις στα γονίδια *BAM1*, *BAM2*, *BAM3* και *BAM4* είχαν ως αποτέλεσμα τη μείωση των συμπτωμάτων της ασθένειας της βερτισιλλίωσης στο φυτό *A. thaliana*, που προκαλείται από τον εδαφογενή μύκητα *Verticillium dahliae*, ενώ απέδειξαν ότι υπάρχει γραμμική συσχέτιση μεταξύ της μείωσης του εμβαδού ασθένειας στα μεταλλαγμένα φυτά και της μείωσης της ενδοφυτικής ποσότητας του μύκητα. Κατά συνέπεια, οι μεταβολές των ενδογενών επιπέδων των υδατανθράκων πιθανόν να έχουν διαφορετικό αντίκτυπο στα διάφορα συστήματα παθογόνου-ξενιστή.

Η παρούσα μελέτη εστίασε στον ρόλο των β-αμυλασών ως προς την αύξηση ή τη μείωση της ανθεκτικότητας των φυτών *A. thaliana* έναντι βιοτροφικών, ημιβιοτροφικών και νεκροτροφικών παθογόνων μικροοργανισμών. Επιπλέον διερευνηθηκε εάν τα διαφορετικά επίπεδα υδατανθράκων ως αποτέλεσμα της σίγησης συγκεκριμένων β-αμυλασών με θέση δράσης στο πλαστίδιο του χλωροπλάστη είναι ικανά να επάγουν την έκφραση συγκεκριμένων γονιδίων που σχετίζονται με την επαγόμενη από το σαλικυλικό ή το αιθυλένιο/ιασμονικό οξύ διασυστηματική άμυνα στα διάφορα συστήματα παθογόνου-ξενιστή. Επίσης διερευνήθηκε, εάν κάποιο από τα υπό εξέταση παθογόνα είναι σε θέση να επηρεάσει την έκφραση των γονιδίων των β-αμυλασών του φυτού ξενιστή.

Σύμφωνα με τα δεδομένα της παρούσας μελέτης η απόκριση των μεταλλαγμένων φυτών *bam1*, *bam2*, *bam3* και *bam4* στην προσβολή τους από το βιοτροφικό ωομύκητα *H. arabidopsidis*, το ημιβιοτροφικό βακτήριο *Pst* DC3000 και το νεκροτροφικό μύκητα *B. cinerea* ήταν διαφορετική.

Οι γονότυποι *bam3* και *bam4* παρουσίασαν μειωμένο αριθμό σπορίων του ωομύκητα *H. arabidopsidis* στις 7 ημέρες μετά τη μόλυνση ενώ η συμπτωματολογική εικόνα των φυτών *bam3* και *bam4* ήταν σαφώς καλύτερη σε σχέση με τους γονότυπους Col-0, *bam1* και *bam2*, στους οποίους φαίνονται χαρακτηριστικά οι χλωρώσεις στα φύλλα εξαιτίας της παρουσίας του ωομύκητα. Η χρώση Trypan

Blue σε φύλλα φυτών ηλικίας 2 εβδομάδων έδειξε ότι η εξάπλωση του ωμούκητα στους μεσοκυττάρους χώρους ήταν σχετικά μειωμένη στο γονότυπο *bam3*, ενώ ο γονότυπος *bam4* δεν παρουσίασε σημαντικές διαφορές σε σύγκριση με τους γονότυπους Col-0, *bam1* και *bam2*. Τα φυτά *bam1* και *bam2* δεν είχαν στατιστικά σημαντικές διαφορές ως προς τον αριθμό των σπορίων του ωμούκητα σε σχέση με τα φυτά αγρίου τύπου ενώ η συμπτωματολογική εικόνα αυτών στις 12 ημέρες μετά τη μόλυνση δεν είχε μεγάλες αποκλίσεις σε σχέση με αυτήν των φυτών του αγρίου τύπου.

Στα πειράματα παθογένειας με το βακτήριο *Pst* DC3000, ο γονότυπος *bam3* παρουσίασε αυξημένη ανθεκτικότητα σε σχέση με τους υπόλοιπους υπό εξέταση γονότυπους. Τόσο τα αποτελέσματα της μέτρησης του νωπού βάρους των φυτών στις 2 και 4 ημέρες μετά τη μόλυνση όσο και τα αποτελέσματα της ποσοτικοποίησης του ενδοφυτικού πληθυσμού του βακτηρίου κατέδειξαν την αυξημένη ανθεκτικότητα των φυτών *bam3* σε σχέση με τους γονότυπους Col-0, *bam1*, *bam2* και *bam4*, ενώ ο αριθμός των αποικιών του βακτηρίου (cfu/gr) στα φυτά *bam3* δεν διαφοροποιήθηκε στατιστικά σημαντικά μεταξύ των δύο χρονικών στιγμών, διατηρώντας χαμηλά επίπεδα πληθυσμού σε σχέση με τους υπόλοιπους γονότυπους. Σύμφωνα με τα αποτελέσματα της ποσοτικοποίησης του πληθυσμού του βακτηρίου στις 2 και 4 ημέρες μετά τη μόλυνση οι γονότυποι *bam1*, *bam2* και *bam4* παρουσίασαν αυξημένη ευπάθεια στην προσβολή τους από το βακτήριο, ενώ τα αποτελέσματα του μέσου νωπού βάρους των φυτών *bam1*, *bam2* και *bam4* δεν κατέδειξαν κάποια στατιστικά σημαντική διαφοροποίηση σε σχέση με τα φυτά αγρίου τύπου. Σύμφωνα με τη συμπτωματολογική εικόνα των φυτών, 4 ημέρες μετά τη μόλυνση φαίνεται χαρακτηριστικά η αυξημένη ένταση της ασθένειας στα φυτά Col-0, *bam1*, *bam2* και *bam4* σε σχέση με τα φυτά *bam3* στα οποία τόσο οι νεκρώσεις όσο και οι χλωρώσεις στα φύλλα είναι σαφώς περιορισμένες σε σχέση με τους υπόλοιπους υπό εξέταση γονότυπους.

Στα πειράματα παθογένειας των υπό εξέταση γονότυπων με το μύκητα *B. cinerea* δεν παρατηρήθηκαν στατιστικά σημαντικές διαφορές μεταξύ των υπό εξέταση γονότυπων τόσο στη συχνότητα εμφάνισης νεκρωτικών κηλίδων στα φύλλα κάθε γονότυπου όσο και στη μέση διάμετρο των νεκρωτικών κηλίδων σε κάθε υπό εξέταση γονότυπο. Η συμπτωματολογική εικόνα τόσο των προσβεβλημένων φυτών όσο και των προσβεβλημένων φύλλων, 5 ημέρες μετά τη μόλυνση με το μύκητα δεν εμφάνισε κάποια σημαντική διαφοροποίηση μεταξύ των υπό εξέταση γονότυπων.

Τα αποτελέσματα των επιπέδων έκφρασης του *PR1* μεταξύ των γονότυπων *bam1*, *bam2*, *bam3* και *bam4* ενισχύουν την υπόθεση σχετικά με το ότι τα διαφορετικά επίπεδα υδατανθράκων μεταξύ των υπό εξέταση γονότυπων επηρεάζουν τα επίπεδα έκφρασης των πρωτεϊνών παθογενέσεως οι οποίες εκφράζονται από το μονοπάτι σηματοδότησης του σαλικυλικού οξέος τόσο στις βιοτροφικές όσο και τις ημιβιοτροφικές σχέσεις παρασιτισμού. Η εφαρμογή

του ωμούκητα *H. arabidopsidis* στους διάφορους υπό εξέταση γονότυπους είχε ως αποτέλεσμα την υπερέκφραση του γονιδίου *PR1* στους γονότυπους *bam3* και *bam4*, οι οποίοι εμφάνισαν αυξημένη ανθεκτικότητα έναντι του ωμούκητα. Αντίστοιχα η εφαρμογή του βακτηρίου *Pst* DC3000 στους διάφορους υπό εξέταση γονότυπους είχε ως αποτέλεσμα την υπερέκφραση του γονιδίου *PR1* στο γονότυπο *bam3* όπου παρατηρήθηκε και αυξημένη ανθεκτικότητα έναντι του βακτηρίου. Το γεγονός αυτό μας παραπέμπει να συμπεράνουμε ότι η ανθεκτικότητα τόσο των γονότυπων *bam3* και *bam4* στο σύστημα αλληλεπίδρασης αυτών με τον ωμούκητα *H. arabidopsidis*, όσο και του γονότυπου *bam3* στο σύστημα αλληλεπίδρασης αυτού με το βακτήριο *Pst* DC3000 οφείλεται σε ένα βαθμό στην επαγόμενη από το σαλικυλικό οξύ διασυστηματική άμυνα των φυτών ως αποτέλεσμα της προσβολής αυτών από παθογόνα με βιοτροφικό χαρακτήρα. Η υπερέκφραση της πρωτεΐνης παθογενέσεως *PR1* στους συγκεκριμένους γονότυπους μπορεί να είναι αποτέλεσμα των αυξημένων ενδογενών επιπέδων σαλικυλικού οξέος ως αποτέλεσμα των διαφορετικών ενδογενών επιπέδων των υδατανθράκων στις συγκεκριμένες μεταλλαγμένες σειρές των φυτών *A. thaliana*. Τα διαφορετικά επίπεδα υδατανθράκων πιθανότατα εμπλέκονται στη ρύθμιση συγκεκριμένων γονιδίων που κωδικοποιούν συγκεκριμένους μεταγραφικούς παράγοντες ή ένζυμα που σχετίζονται με την επαγόμενη από το σαλικυλικό οξύ διασυστηματική άμυνα των φυτών. Τέτοια ένζυμα ή μεταγραφικοί παράγοντες μπορεί να είναι το ένζυμο της συνθετάσης του ισοχωρισμικού οξέος (isochorismate synthase-ICS1) το οποίο μετατρέπει το χωρισμικό οξύ σε ισοχωρισμικό οξύ, το οποίο αποτελεί πρόδρομη ένωση του σαλικυλικού οξέος ή οι μεταγραφικοί τελεστές (ενεργοποιητές) NPR1 (non-expressor of PR genes 1), NPR3 και NPR4 λειτουργούν ως υποδοχείς σαλικυλικού οξέος (Fu et al., 2012; Wu et al., 2012), αυξάνοντας τα επίπεδα έκφρασης των πρωτεϊνών παθογενέσεως που σχετίζονται με την επαγόμενη από το σαλικυλικό οξύ διασυστηματική άμυνα των φυτών.

Στη συγκεκριμένη έρευνα διερευνήθηκε επίσης εάν τα υπό εξέταση παθογόνα κατά τη διαδικασία μόλυνσης τους επηρεάζουν την έκφραση των γονιδίων των β-αμυλασών προκειμένου να αποπροσανατολίσει το μεταβολισμό των υδατανθράκων με σκοπό την αύξηση της διαθεσιμότητας αφομοιώσιμων από το παθογόνο πηγών άνθρακα. Σύμφωνα με τη μελέτη των Jubault et al. (2013), φυτά *A. thaliana* τα οποία μολύνθηκαν με το βιοτροφικό παθογόνο *Plasmidiophora brassicae*, εμφάνισαν αυξημένα επίπεδα έκφρασης του γονιδίου της β-αμυλάσης 3 (*BAM3*). Ομοίως, φυτά *A. thaliana* τα οποία μολύνθηκαν με τον εδαφογενή μύκητα *V. dahliae* εμφάνισαν αυξημένα επίπεδα του γονιδίου της β-αμυλάσης 3 (*BAM3*) (Gkizi et al., 2015).

Σύμφωνα με τα δεδομένα της παρούσας εργασίας στις αλληλεπιδράσεις των φυτών με τον ωμούκητα *H. arabidopsidis* και το βακτήριο *Pst* DC3000 παρατηρήθηκε υπερέκφραση του γονιδίου της β-αμυλάσης 3 (*BAM3*), κατά τα πρώτα στάδια της μόλυνσης. Πιο συγκεκριμέ-

να, στην αλληλεπίδραση των φυτών με τον ωμούκητα *H. arabidopsidis* παρατηρήθηκε υπερέκφραση του γονιδίου *BAM3* στις 3 ημέρες μετά τη μόλυνση. Ενώ στις 5 ημέρες μετά τη μόλυνση παρόλο που τα επίπεδα έκφρασης του γονιδίου *BAM3* μειώθηκαν στα επίπεδα του αμόλυντου μάρτυρα παρατηρήθηκε υπερέκφραση του γονιδίου *BAM1*.

Σύμφωνα με τη μελέτη των Valerio et al. (2010), σε μεταλλαγμένα φυτά *A. thaliana* στο γονίδιο της β-αμυλάσης 1 (*BAM1*) παρατηρήθηκαν αυξημένα επίπεδα αμύλου στα καταφρακτικά κύτταρα και μειωμένο άνοιγμα των στοματίων κατά τη διάρκεια της ημέρας. Εξαιτίας του γεγονότος ότι η β-αμυλάση 1 έχει δράση κυρίως στα καταφρακτικά κύτταρα κατά τη διάρκεια της ημέρας, πιστεύεται ότι ο κυρίαρχος ρόλος της είναι να παρέχει σκελετούς άνθρακα μέσω της υδρόλυσης του αμύλου κατά τη διάρκεια της ημέρας στα καταφρακτικά κύτταρα, για τη βιοσύνθεση σακχαρόζης και μηλικού οξέος τα οποία αποτελούν συνοδές ενώσεις των ιόντων K^+ κατά την είσοδό του K^+ στα καταφρακτικά κύτταρα στη διαδικασία του ανοίγματος των στοματίων (Outlaw and De Vlieghere-He, 2001; Valerio et al., 2010). Μία πιθανή εξήγηση για τα υψηλά επίπεδα έκφρασης της β-αμυλάσης 1 στις 5 ημέρες μετά τη μόλυνση με τον ωμούκητα είναι ότι πιθανόν ο ωμούκητας μέσω της συνεξέλιξης του με το ξενιστή του να υπερεκφράζει την β-αμυλάση 1 στα καταφρακτικά κύτταρα στην προσπάθειά του να ανοίξει τα στομάτια των προσβεβλημένων φύλλων προκειμένου να εξέλθουν οι ζωοσποριαγγειοφόροι από αυτά, έτσι ώστε να μεταφερθούν τα σπόρια αγενούς παραγωγής μέσω του αέρα σε άλλες εστίες μόλυνσης.

Στην αλληλεπίδραση των φυτών αγρίου τύπου με το βακτήριο *Pst* DC3000 παρατηρήθηκε υπερέκφραση της β-αμυλάσης 3 (*BAM3*), 24 ώρες μετά την εφαρμογή του βακτηρίου, ενώ στις 4 ημέρες μετά τη μόλυνση των φυτών με το παθογόνο βακτήριο παρατηρήθηκε μείωση των επιπέδων έκφρασης των β-αμυλασών, κάτω από τα επίπεδα του αμόλυντου μάρτυρα. Στην εφαρμογή με το νεκροτροφικό μύκητα *B. cinerea* δεν παρατηρήθηκε κάποια στατιστικά σημαντική αύξηση των β-αμυλασών.

Τα φυτά κατά τη διαδικασία προσβολής τους από παθογόνα αίτια, αυξάνουν την εκροή σακχάρων από το σημείο προσβολής τους σε μη ικανά φωτοσυνθετικά ιστούς, ενώ ταυτόχρονα αυξάνουν τα επίπεδα εξοζών έτσι ώστε να επάγουν τη δημιουργία αποθηκευτικών υδατανθράκων (Scharte et al., 2005; Berger et al., 2007). Μία πιθανή εξήγηση για την υπερέκφραση του γονιδίου της β-αμυλάσης 3 στα προσβεβλημένα φυτά αγρίου τύπου στα συστήματα αλληλεπίδρασης με τον ωμούκητα *H. arabidopsidis* και το βακτήριο *P. syringae*, είναι ότι τα παθογόνα υπερεκφράζουν το γονίδιο της β-αμυλάσης 3, προκειμένου να αυξηθεί η συνολική ενζυμική δραστηριότητα των β-αμυλασών στους προσβεβλημένους ιστούς, έτσι ώστε να παρακάμψουν τη στρατηγική των φυτών να μειώνουν τη διαθεσιμότητα των άμεσα αφομοιώσιμων από τα παθογόνα πηγών άνθρακα (σακχαρόζη, γλυκόζη κ.α.) στο σημείο προσβολής και να εξασφαλίσουν επαρκή ποσότητα αφομοιώσιμων από το

παθογόνο πηγών άνθρακα, απαραίτητες για την ανάπτυξη και τον πολλαπλασιασμό τους, κατά τα αρχικά στάδια της μόλυνσης.

Η συσχέτιση του επιπέδου των υδατανθράκων στην ενεργοποίηση της άμυνας των φυτών όσο και ο μηχανισμός με τον οποίο τα σάκχαρα επιτυγχάνουν να ενεργοποιηθούν ή να καταστείλουν γονίδια τα οποία σχετίζονται άμεσα ή έμμεσα με την ενεργή άμυνα των φυτών δεν έχει κατανοηθεί πλήρως. Στη παρούσα μελέτη παρατηρήθηκε ο ρόλος των β-αμυλασών σε διάφορα συστήματα παθογόνου-ξενιστή, ενώ φαίνεται να είναι εξειδικευμένος ως προς τις σχέσεις παρασιτισμού μεταξύ των παθογόνων και του ξενιστή. Στις παρασιτικές σχέσεις του ξενιστή με βιοτροφικά και ημιβιοτροφικά παθογόνα, η β-αμυλάση 3 φαίνεται να κατέχει κατασταλτικό ρόλο ως προς την επαγωγή της διασυστηματικής άμυνας που εξαρτάται από την ενδογενή αύξηση του σαλικυλικού οξέος. Τα παθογόνα μέσω της συνεξέλιξης τους με τους ξενιστές τους πιθανόν να απέκτησαν την ικανότητα να αποπροσανατολίζουν το μεταβολισμό των υδατανθράκων του ξενιστή τους, υπερεκφράζοντας τη β-αμυλάση 3, αυξάνοντας τη διαθεσιμότητα συγκεκριμένων πηγών άνθρακα οι οποίες είναι άμεσα αφομοιώσιμες από τα παθογόνα. Επιπλέον, το γεγονός ότι ο ωμούκητας υπερεκφράζει τη β-αμυλάση 1 στις 5 ημέρες μετά τη μόλυνση πιθανόν να αποτελεί μία στρατηγική του παθογόνου να προγραμματίζει το άνοιγμα των στοματίων στα προσβεβλημένα φύλλα προκειμένου να διασπείρει τα αγενή σπόρια του σε άλλους ξενιστές ή ιστούς με τη βοήθεια του αέρα.

Τέλος, προκειμένου να επιβεβαιωθούν οι παραπάνω υποθέσεις μας, θα πρέπει να μελετηθεί η συσχέτιση μεταξύ των επιπέδων του διασακχαρίτη της μαλτόζης και των ενδογενών επιπέδων των σακχάρων σε κάθε σύστημα αλληλεπίδρασης παθογόνου ξενιστή, έτσι ώστε να επιβεβαιωθεί η υπόθεση σχετικά με το ότι τα διαφορετικά επίπεδα σακχάρων επιτελούν ρυθμιστικό ρόλο ως προς την έκφραση συγκεκριμένων γονιδίων που εμπλέκονται στην ενεργή άμυνα του φυτού. Επιπλέον, προκειμένου να μελετηθεί εις βάθος ποιοι από τους μεταγραφικούς παράγοντες επηρεάζονται από τα διαφορετικά επίπεδα υδατανθράκων, θα πρέπει να διερευνηθούν τα επίπεδα έκφρασης γονιδίων που σχετίζονται με την επαγόμενη από το σαλικυλικό οξύ διασυστηματική άμυνα όπως αυτά των γονιδίων *NPR1*, *PAD4*, *EDS1*, *ICS1* και *WRKY33* στα συστήματα αλληλεπίδρασης των γονότυπων *bam3* και *bam4* με βιοτροφικά ή ημιβιοτροφικά παθογόνα αίτια. Τέλος, θα ήταν χρήσιμο να διερευνηθεί η συγκέντρωση του αμύλου, της μαλτόζης, της σακχαρόζης, της γλυκόζης και της φρουκτόζης σε προσβεβλημένα και αμόλυντα φύλλα των φυτών των γονότυπων *Col-0*, *bam3* και *bam4* στα διάφορα συστήματα παθογόνου-ξενιστή, προκειμένου να επιβεβαιωθεί η υπόθεση μας σχετικά με το ότι τα παθογόνα υπερεκφράζουν τη β-αμυλάση 3 για αύξηση της διαθεσιμότητας αφομοιώσιμων από το παθογόνο πηγών άνθρακα.

- Alfano J.R., Collmer A.**, 1996. Bacterial Pathogens in Plants: Life up against the Wall. *Plant Cell* 88, 1683–1698
- Alfano J.R., Collmer A.**, 2004. Type III secretion system effector proteins: Double agents in bacterial disease and plant defense. *Annual Review of Phytopathology* 428, 385–414.
- Alonso J.M., Stepanova A.N., Solano R., Wisman E., Ferrari S., Ausubel F.M., Ecker J.R.**, 2003. Five components of the ethylene response pathway identified in a screen for weak ethylene-insensitive mutants in *Arabidopsis*. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 1008, 2992–2997
- Anderson J.P., Badruzsaufari E., Schenk P.M., Manners J.M., Desmond O.J., Ehlert C., Maclean D.J., Ebert P.R., Kazan K.**, 2004. Antagonistic Interaction between Abscisic Acid and Jasmonate-Ethylene Signaling Pathways Modulates Defense Gene Expression and Disease Resistance in *Arabidopsis*. *Plant Cell* 168, 3460–3479
- Baunsgaard, L., Lutken, H., Mikkelsen, R., Glaring, M.A., Pham, T.T. and Blennow, A.**, 2005. A novel isoform of glucan, water dikinase phosphorylates pre-phosphorylated alpha-glucans and is involved in starch degradation in *Arabidopsis*. *Plant J*, 41, 595-605.
- Benhamou N, Grenier J, Chrispeels MJ.**, 1991. Accumulation of beta-fructosidase in the cell walls of tomato roots following infection by a fungal wilt pathogen. *Plant Physiology* 97, 739–750.
- Bonfig KB, Schreiber U, Gabler A, Roitsch T, Berger S.**, 2006. Infection with virulent and avirulent *P. syringae* strains differentially affects photosynthesis and sink metabolism in *Arabidopsis* leaves. *Planta* 225, 1–12.
- Boller T., Felix G.**, 2009. A renaissance of elicitors: perception of microbe-associated molecular patterns and danger signals by pattern recognition receptors. *Annu Rev Plant Biol.* 608, 379–406.
- Bolton M.D., Thomma B.P.H.J., Nelson B.D.**, 2006. *Sclerotinia sclerotiorum* (Lib.) de Bary: biology and molecular traits of a cosmopolitan pathogen. *Molecular Plant Pathology*. 78, 1–16
- Cao H., Glazebrook J., Clarke J. D., Volko S., Dong X.**, 1997. The *Arabidopsis* *NPR1* gene that controls systemic acquired resistance encodes a novel protein containing ankyrin repeats. *Cell* 88, 57–63
- Chen H., Xue L., Chintamanani S., Germain H., Lin H., Cui H., Cai R., Zuo J., Tang X., Li X., Guo H., Zhou J.M.**, 2008. ETHYLENE INSENSITIVE3 and ETHYLENE INSENSITIVE3-LIKE1 repress SALICYLIC ACID INDUCTION DEFICIENT2 expression to negatively regulate plant innate immunity in *Arabidopsis*. *Plant Cell*. 218, 2527–2540
- 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 J*. 37, 853-863.
- Choi S.-M., Song H.-R., Han S.-K., Han M., Kim C.-Y., Park J., et al.**, 2012. HDA19 is required for the repression of salicylic acid biosynthesis and salicylic acid-mediated defense responses in *Arabidopsis*. *Plant J*. 71, 135–146
- Cho Y., Kim K.H., La Rota M., Scott D., Santopietro G., Callihan M., Mitchell T.K., Lawrence C.B.**, 2009. Identification of novel virulence factors associated with signal transduction pathways in *Alternaria brassicicola*. *Mol Microbiol*. 728, 1316–1333.
- Collinge D.B., Kragh K.M., Mikkelsen J.D., Nielsen K.K., Rasmussen U., Vad K.**, 1993. Plant chitinases. *Plant J*. 38, 31–40.
- Deslandes L., Olivier J., Theulieres F., Hirsch J., Feng D.X., Bittner-Eddy P., Beynon J., Marco Y.**, 2002. Resistance to *Ralstonia solanacearum* in *Arabidopsis thaliana* is conferred by the recessive *RRS1-R* gene, a member of a novel family of resistance genes. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 998, 2404–2409

- Dodds P. N., Rathjen J. P.**, 2010. Plant immunity: towards an integrated view of plant–pathogen interactions. *Nat. Rev. Genet.* 11, 539–548
- Dong X.**, 2004. NPR1, all things considered. *Curr. Opin. Plant Biol.* 7, 547–552
- Edgar C.I., McGrath K.C., Dombrecht B., Manners J.M., Maclean D.C., Schenk P.M., Kazan K.**, 2006. Salicylic acid mediates resistance to the vascular wilt pathogen *Fusarium oxysprum* in the model host *Arabidopsis thaliana*. *Australian Plant Pathology.* 358, 581–591.
- Engelsdorf T, Horst RJ, Pr€ols R et al.**, 2013. Reduced carbohydrate availability enhances the susceptibility of *Arabidopsis* toward *Colletotrichum higginsianum*. *Plant Physiology* 162, 225–38.
- Epple P., Apel K., Bohlmann H.**, 1997. Overexpression of an endogenous thionin enhances resistance of *Arabidopsis* against *Fusarium oxysporum*. *Plant Cell.* 98, 509–520.
- Feys B., Benedetti C.E., Penfold C.N., Turner J.G.**, 1994. Arabidopsis Mutants Selected for Resistance to the Phytotoxin Coronatine Are Male Sterile, Insensitive to Methyl Jasmonate, and Resistant to a Bacterial Pathogen. *The Plant cell.* 68, 751–759
- Fotopoulos V, Gilbert MJ, Pittman JK, Marvier AC, Buchanan AJ, Sauer N, Hall JL, Williams LE.**, 2003. The monosaccharide transporter gene, *AtSTP4*, and the cell-wall invertase, *Atbetafruct1*, are induced in *Arabidopsis* during infection with the fungal biotroph *Erysiphe cichoracearum*. *Plant Physiology* 132, 821–829.
- Fu Z. Q., Yan S., Saleh A., Wang W., Ruble J., Oka N., et al.**, 2012. NPR3 and NPR4 are receptors for the immune signal salicylic acid in plants. *Nature* 486, 228–232
- Fulton, D.C., Stettler, M., Mettler, T., Vaughan, C.K., Li, J., Francisco, P., Gil, M., 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.
- Garcia A. V., Blanvillain-Baufumé S., Huibers R. P., Wiermer M., Li G., Gobbato E., et al.**, 2010. Balanced nuclear and cytoplasmic activities of *EDS1* are required for a complete plant innate immune response. *PLoS Pathog.* 6
- Gkizi D., Santos-Rufo A., Rodriguez-Jurado D., Paplomatas E. J. and Tjamos S. E.**, 2015. The b-amylase genes: negative regulators of disease resistance for *Verticillium dahliae*. *Plant Pathology* 10, 1-7
- Gimenez-Ibanez S., Solano R.**, 2013. Nuclear jasmonate and salicylate signaling and crosstalk in defense against pathogens. *Front. Plant Sci.* 4
- Glazebrook J.**, 2005. Contrasting mechanisms of defense against biotrophic and necrotrophic pathogens. *Annu. Rev. Phytopathol.* 43, 205–227
- Göker, M.; Voglmayr, H.; Riethmüller, A.; Oberwinkler, F.**, 2007. How do obligate parasites evolve? A multi-gene phylogenetic analysis of downy mildews., *Fungal Genetics and Biology* 44, 105–122
- Heidrich K., Wirthmueller L., Tasset C., Pouzet C., Deslandes L., Parker J. E.**, 2011. *Arabidopsis EDS1* connects pathogen effector recognition to cell compartment-specific immune responses. *Science* 334, 1401–1404
- Heil M, Bostock RM.**, 2002. Induced systemic resistance (ISR) against pathogens in the context of induced plant defences. *Annals of Botany* 89, 503–512.
- Hu J., Barlet X., Deslandes L., Hirsch J., Feng D.X., Somssich I., Marco Y.**, 2008. Transcriptional responses of *Arabidopsis thaliana* during wilt disease caused by the soil-borne phytopathogenic bacterium, *Ralstonia solanacearum*. *PLoS One.* 38, 25-89

- Jones J.D., Dangl J.L.**, 2006. The plant immune system. *Nature*.4448, 323–329
- Jubault M, Lariagon C, Taconnat L et al.**, 2013. Partial resistance to clubroot in *Arabidopsis* is based on changes in the host primary metabolism and targeted cell division and expansion capacity. *Functional & Integrative Genomics* 13, 191–205.
- Kaplan F, Guy CL.**, 2005. RNA interference of *Arabidopsis* beta-amylase 8 prevents maltose accumulation upon cold shock and increases sensitivity of PSII photochemical efficiency to freezing stress. *The Plant Journal* 44, 730–743
- Kars I., Krooshof G.H., Wagemakers L., Joosten R., Benen J.A., van Kan J.A.**, 2005. Necrotizing activity of five *Botrytis cinerea* endopolygalacturonases produced in *Pichia pastoris*. *Plant J.* 438, 213–225.
- Kasprzewska A.**, 2003. Plant chitinases--regulation and function. *Cell Mol Biol Lett.* 88, 809–824
- Kim J.Y., Park S.C., Hwang I., Cheong H., Nah J.W., Hahm K.S., Park Y.**, 2009. Protease inhibitors from plants with antimicrobial activity. *Int J Mol Sci.* 108, 2860–2872
- Koch E., Slusarenko A.J.**, 1990. Fungal Pathogens of *Arabidopsis-Thaliana* (L). Heyhn. *Botanica Helvetica.* 1008, 257–268.
- Kwon S.J., Jin H.C., Lee S., Nam M.H., Chung J.H., Kwon S.I., Ryu C.M., Park O.K.**, 2009. GDSL lipase-like 1 regulates systemic resistance associated with ethylene signaling in *Arabidopsis*. *Plant J.* 588, 235–245
- Laluk K., Mengiste T.**, 2010. Necrotroph Attacks on Plants: Wanton Destruction or Covert Extortion?. *Arabidopsis Book* 8
- Lee D.S., Kim B.K., Kwon S.J., Jin H.C., Park O.K.**, 2009a. *Arabidopsis* GDSL lipase 2 plays a role in pathogen defense via negative regulation of auxin signaling. *Biochem Biophys Res Commun.* 3798, 1038–1042
- Lloyd, J.R., Blennow, A., Burhenne, K. and Kossmann, J.**, 2004. Repression of a novel isoform of disproportionating enzyme (stDPE2) in potato leads to inhibition of starch degradation in leaves but not tubers stored at low temperature. *Plant Physiol*, 134, 1347-1354.
- Li J., Brader G., Palva E.T.**, 2008. Kunitz trypsin inhibitor: an antagonist of cell death triggered by phytopathogens and fumonisin b1 in *Arabidopsis*. *Mol Plant.* 18, 482–495
- Liu Y., Jiang G., Cui Y., Mukherjee A., Ma W.L., Chatterjee A.K.**, 1999. kdgREcc negatively regulates genes for pectinases, cellulase, protease, HarpinEcc, and a global RNA regulator in *Erwinia carotovora* subsp. *carotovora*. *J Bacteriol.* 1818, 2411–2421
- Lorenzo O., Solano R.**, 2005. Molecular players regulating the jasmonate signalling network. *Current Opinion in Plant Biology.* 88, 532–540
- Lu D., Wu S., Gao X., Zhang Y., Shan L., He P.**, 2005. A receptor-like cytoplasmic kinase, BIK1, associates with a flagellin receptor complex to initiate plant innate immunity. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 1078, 496–501
- Lu, Y. and Sharkey, T.D.**, 2004. The role of amyloamylase in maltose metabolism in the cytosol of photosynthetic cells. *Planta*, 218, 466-473.
- McDowell J. M., Hoff T., Anderson R.G., Deegan D.**, 2011. Propagation, storage, and assays with *Hyaloperonospora arabidopsidis*: A model oomycete pathogen of *Arabidopsis*. *Methods Mol Biol.* 712, 137-151
- Melotto M., Underwood W., Koczan J., Nomura K., He S.Y.**, 2006. Plant stomata function in innate immunity against bacterial invasion. *Cell.* 1268, 969–980
- Mengiste T., Chen X., Salmeron J.M., Dietrich R.A.**, 2003. The *BOS1* gene encodes an R2R3MYB transcription factor protein that is required for biotic and abiotic stress responses in *Arabidopsis*. *The Plant cell.* 158, 2551–2565.

- Molina A., Segura A., Garcia-Olmedo F.**, 1993. Lipid transfer proteins (nsLTPs) from barley and maize leaves are potent inhibitors of bacterial and fungal plant pathogens. *FEBS Lett.* 3168, 119–122
- Molina A., Segura A., Garcia-Olmedo F.**, 1993. Lipid transfer proteins (nsLTPs) from barley and maize leaves are potent inhibitors of bacterial and fungal plant pathogens. *FEBS Lett.* 3168, 119–122
- Morrissey J.P., Osbourn A.E.**, 1999. Fungal resistance to plant antibiotics as a mechanism of pathogenesis. *Microbiol Mol Biol Rev.* 638, 708–724
- Nakashita, H., Yasuda, M., Nitta, T., Asami, T., Fujioka, S., Arai, Y., Sekimata, K., Takatsuto, S., Yamaguchi, I., and Yoshida, S.**, 2003. Brassinosteroid functions in a broad range of disease resistance in tobacco and rice. *Plant J.* 33, 887–898.
- Nawrath C., Métraux J. P.**, 1999. Salicylic acid induction-deficient mutants of *Arabidopsis* express PR-2 and PR-5 and accumulate high levels of camalexin after pathogen inoculation. *Plant Cell* 11, 1393–1404
- Nishimura S., Kohmoto K.**, 1983. Host-Specific Toxins and Chemical Structures from *Alternaria* Species. *Annual Review of Phytopathology.* 218, 87–116.
- Niittyla, T., Messerli, G., Trevisan, M., Chen, J., Smith, A.M. and Zeeman, S.C.**, 2004. A previously unknown maltose transporter essential for starch degradation in leaves. *Science New York, N.Y.* 303, 87-89.
- Outlaw Jr. WH.**, 2003. Integration of cellular and physiological functions of guard cells. *Critical Reviews in Plant Sciences* 22, 503–529.
- Outlaw Jr. WH, Manchester J.**, 1979. Guard cell starch concentration quantitatively related to the stomatal aperture. *Plant Physiology* 64, 79–82.
- Parker J. E., Holub E. B., Frost L. N., Falk A., Gunn N. D., Daniels M. J.**, 1996. Characterization of eds1, a mutation in *Arabidopsis* suppressing resistance to *Peronospora parasitica* specified by several different RPP genes. *Plant Cell* 8, 2033–2046
- Reinhold, H., Soyk, S., Simkova, K., Hostettler, C., Marafino, J., Mainiero, S., Vaughan, C.K., Monroe, J.D. and Zeeman, S.C.**, 2011. β -amylase-like proteins function as transcription factors in *Arabidopsis*, controlling shoot growth and development. *Plant Cell*, 23, 1391-1403.
- Ruzanski, C.**, 2011. The metabolism of maltose in *Arabidopsis thaliana* leaves at night. *John Innes Centre.* 10-28.
- Sanabria N, Huang J.C., Dubery IA.**, 2010. Self/nonself perception in plants in innate immunity and defense. *Landes Bioscience* 1, 40-54
- Scholes JD, Lee PJ, Horton P, Lewis DH.**, 1994. Invertase understanding changes in the photosynthetic and carbohydrate metabolism of barley leaves infected with powdery mildew. *New Phytologist* 126, 213–222.
- Selitrennikoff C.P.**, 2001. Antifungal proteins. *Appl Environ Microbiol.* 678, 2883–2894.
- Shan X., Zhang Y., Peng W., Wang Z., Xie D.**, 2009. Molecular mechanism for jasmonate-induction of anthocyanin accumulation in *Arabidopsis*. *J Exp Bot.* 608, 3849–3860.
- Smith AM, Zeeman SC.**, 2006. Quantification of starch in plant tissues. *Nature Protocols* 1, 1342–1345.
- Sparla F, Costa A, Lo Schiavo F, Pupillo P, Trost P.**, 2006. Redox regulation of a novel plastid-targeted b-amylase of *Arabidopsis thaliana*. *Plant Physiology* 141, 840–850.
- Spoel S. H., Koornneef A., Claessens S. M., Korzelius J. P., Van Pelt J. A., Mueller M. J., et al.**, 2003. *NPR1* modulates cross-talk between salicylate- and jasmonate-dependent defense pathways through a novel function in the cytosol. *Plant*

Swarbrick PJ, Schulze-Lefert P, Scholes JD., 2006. Metabolic consequences of susceptibility and resistance in barley leaves challenged with powdery mildew. *Plant, Cell and Environment* 29, 1061–1076.

Tsuda K., Sato M., Glazebrook J., Cohen J. D., Katagiri F., 2008. Interplay between MAMP-triggered and SA-mediated defense responses. *Plant J.* 53, 763–775

Valerio C., Costa A., Marri L., Issakidis-Bourguet E., Pupillo P., Trost P. and Sparla F., 2011. Thioredoxin-regulated b-amylase (BAM1) triggers diurnal starch degradation in guard cells, and in mesophyll cells under osmotic stress. *Journal of Experimental Botany* 62, 545–555

van Kan J.A., 2006. Licensed to kill: the lifestyle of a necrotrophic plant pathogen. *Trends. Plant Sci* 118, 247–253.

van Kan J.A., van't Klooster J.W., Wagemakers C.A., Dees D.C., van der Vlugt-Bergmans C.J., 1997. Cutinase A of *Botrytis cinerea* is expressed, but not essential, during penetration of gerbera and tomato. *Mol Plant Microbe Interact.* 108, 30–38

Van Loon L.C., Van Strien E.A., 2001. The families of pathogenesis-related proteins, their activities, and comparative analysis of PR-1 type proteins. *Physiological and Molecular Plant Pathology*

van Loon L.C., Rep M., Pieterse C.M.J., 2006. Significance of inducible defense-related proteins in infected plants. *Annual review of phytopathology.* 448, 135–162

Veronese P., Nakagami H., Bluhm B., AbuQamar S., Chen X., Salmeron J., Dietrich R.A., Hirt H., Mengiste T., 2006. Distinct roles of the membrane anchored *Botrytis* Induced Kinase 1 in *Arabidopsis* resistance to necrotrophic and biotrophic pathogens. *The Plant Cell* 188, 257–273.

Yao C.L., Koller W., 1995. Diversity of Cutinases from Plant-Pathogenic Fungi - Different Cutinases Are Expressed during Saprophytic and Pathogenic Stages of *Alternaria-Brassicicola*. *Molecular Plant-Microbe Interactions.* 88, 122–130.

Yu, T.-S., et al., 2005. a-Amylase is not required for breakdown of transitory starch in *Arabidopsis* leaves. *J. Biol. Chem.* 280, 9773–9779.

Weise SE, Weber A, Sharkey T.D., 2004. Maltose is the major form of carbon exported from the chloroplast at night. *Planta* 218, 474–482

Weise, S.E., Kim, K.S., Stewart, R.P. and Sharkey, T.D., 2005. beta-Maltose is the metabolically active anomer of maltose during transitory starch degradation. *Plant Physiol*, 137, 756-761.

Zeeman, S.C., Smith, S.M. and Smith, A.M., 2007. The diurnal metabolism of leaf starch. *Biochem J*, 401, 13-28.

Zeeman, S.C., Tiessen, A., Pilling, E., Kato, K.L., Donald, A.M. and Smith, A.M., 2002. Starch synthesis in *Arabidopsis*. Granule synthesis, composition, and structure. *Plant Physiol*, 129, 516-529.

Zhang, X., Szydlowski, N., Delvalle, D., D'Hulst, C., James, M.G. and Myers, A.M., 2008. Overlapping functions of the starch synthases SSII and SSIII in amylopectin biosynthesis in *Arabidopsis*. *BMC Plant Biol*, 8, 96.

Βιβλία:

Διαμαντίδης Γ., 2007. Εισαγωγή στη Βιοχημεία. *University Studio Press*

Παναγόπουλος Χ. Γ., 2007. Ασθένειες Καρποφόρων Δένδρων και Αμπέλου. *Εκδόσεις Σταμούλη*

Παναγόπουλος Χ. Γ., 2007. Ασθένειες Κηπευτικών Καλλιεργειών. *Εκδόσεις Σταμούλη*

Ridge I., Μανέτας Γιάννης, Γραμματικόπουλος Γ., Ψαράς Γιώργος, Πετροπούλου Γ., 2005. Φυσιολογία Φυτών. *Εκδόσεις Ιών*

Μπουράνης Δ., 2007. Σημειώσεις Φυσιολογίας Φυτών

Ταμπακάκη Α., Γεωργακόπουλος Δ.Γ., 2009. Σημειώσεις Βιοτεχνολογίας Μικροοργανισμών

Τζάμος Ε. Κ., 2007. ΦΥΤΟΠΑΘΟΛΟΓΙΑ. *Εκδόσεις Αθ. Σταμούλης*

Ο ρυθμιστικός ρόλος των προϊόντων του βασικού μεταβολισμού στην ενεργή άμυνα των φυτών δεν έχει κατανοηθεί πλήρως, ενώ φαίνεται να είναι εξειδικευμένος στις διάφορες σχέσεις παρασιτισμού μεταξύ των παθογόνων και των φυτών-ξενιστών. Στην παρούσα μελέτη, διερευνήθηκε ο ρόλος των γονιδίων των β-αμυλασών (BAMs) με θέση δράσης στο στρώμα του χλωροπλάστη ως προς την αύξηση της ανθεκτικότητας ή της ευπάθειας των φυτών έναντι βιοτροφικών, ημιβιοτροφικών και νεκροτροφικών παθογόνων μικροοργανισμών. Για το σκοπό αυτό, πραγματοποιήθηκαν πειράματα παθογένειας σε μεταλλαγμένες στα γονίδια *BAM1*, *BAM2*, *BAM3* και *BAM4* σειρές *A. thaliana* με το βιοτροφικό παθογόνο ωομύκητα *Hyaloperonospora arabidopsidis*, το παθογόνο βακτήριο *Pseudomonas syringae* pv. *tomato* DC3000 (*Pst* DC3000) και το νεκροτροφικό μύκητα *Botrytis cinerea*.

Στα πειράματα παθογένειας με τον ωομύκητα *H. arabidopsidis*, τα αποτελέσματα τόσο της ποσοτικοποίησης των ζωοσποριαγγείων όσο και η συμπτωματολογική εικόνα των φυτών στις 12 ημέρες μετά τη μόλυνση κατέδειξαν αυξημένη ανθεκτικότητα των γονότυπων *bam3* και *bam4*. Η μικροσκοπική παρατήρηση σε φύλλα και κοτηλιδόνες των μολυσμένων με τον ωομύκητα φυτών μετά από χρώση Trypan Blue, έδειξε μειωμένη εξάπλωση των υφών στα μολυσμένα φύλλα των φυτών *bam3*, ενώ ο γονότυπος *bam4* δεν διαφοροποιήθηκε ιδιαίτερα σε σχέση με τους γονότυπους Col-0, *bam1* και *bam2*, ως προς την εξάπλωση του ωομύκητα στους μεσοκυττάριους χώρους των προσβεβλημένων φύλλων. Στα πειράματα παθογένειας των υπό εξέταση γονότυπων με το βακτήριο *Pst* DC3000, τα αποτελέσματα τόσο του νωπού βάρους των φυτών για κάθε γονότυπο, όσο και η ποσοτικοποίηση του ενδοφυτικού πληθυσμού του βακτηρίου στα προσβεβλημένα από το βακτήριο φύλλα για κάθε γονότυπο κατέδειξαν την αυξημένη ανθεκτικότητα του γονότυπου *bam3*. Στην αλληλεπίδραση των υπό εξέταση γονότυπων με το μύκητα *B. cinerea*, οι γονότυποι δεν διαφοροποιήθηκαν στατιστικά σημαντικά μεταξύ τους ως προς τη συχνότητα εμφάνισης και τη μέση διάμετρο των νεκρωτικών κηλίδων στα φύλλα. Σύμφωνα με τα αποτελέσματα της ποσοτικοποίησης των επιπέδων έκφρασης των γονιδίων *PR1* και *PDF1.2* με τη μέθοδο Real Time qPCR, η ανθεκτικότητα των γονότυπων *bam3* και *bam4* στην αλληλεπίδραση των φυτών με τον ωομύκητα *H. arabidopsidis* και του *bam3* στην αλληλεπίδραση των φυτών με το βακτήριο *Pst* DC3000 ευθύνεται σε ένα βαθμό στην υπερέκφραση του γονιδίου *PR1*, το οποίο σχετίζεται με την επαγόμενη από το σαλικυλικό οξύ διασυστηματική άμυνα των φυτών. Η παρουσία των παθογόνων *H. arabidopsidis* και *Pst* DC3000 είχε ως αποτέλεσμα την υπερέκφραση του γονιδίου *BAM3* στα φυτά αγρίου τύπου κατά τα πρώτα στάδια της μόλυνσης.

Συμπερασματικά, η απόκριση των φυτών σε προσβολές από παθογόνα αίτια, πιθανόν να συνδέεται με τις μεταβολές των ενδογενών επιπέδων των υδατανθράκων. Αφενός, τα διαφορετικά ενδογενή επίπεδα υδατανθράκων πιθανόν να σχετίζονται με τη ρύθμιση της έκφρασης γονιδίων που εμπλέκονται στην επαγόμενη διασυστηματική άμυνα των φυτών και αφετέρου τα παθογόνα μεταβάλλοντας τα επίπεδα υδατανθράκων προσανατολίζουν το μεταβολισμό των φυτών ως προς το όφελος τους.

