

ΓΕΩΠΟΝΙΚΟ ΠΑΝΕΠΙΣΤΗΜΙΟ ΑΘΗΝΩΝ
ΤΜΗΜΑ ΕΠΙΣΤΗΜΗΣ ΦΥΤΙΚΗΣ ΠΑΡΑΓΩΓΗΣ
ΚΑΤΕΥΘΥΝΣΗ ΦΥΤΟΠΡΟΣΤΑΣΙΑ ΚΑΙ ΠΕΡΙΒΑΛΛΟΝ
ΕΡΓΑΣΤΗΡΙΟ ΦΥΤΟΠΑΘΟΛΟΓΙΑΣ

“Μοριακή διερεύνηση του ρόλου των αυξινών στην βιολογική αντιμετώπιση και ανθεκτικότητα των φυτών *Arabidopsis thaliana* εναντίον του φυτοπαθογόνου μύκητα *Verticillium dahliae*”

ΜΕΤΑΠΤΥΧΙΑΚΗ ΜΕΛΕΤΗ

ΦΟΥΣΙΑ Σ. ΣΩΤΗΡΙΑ

Επιβλέπων : Σωτήρης Τζάμος, Επίκουρος Καθηγητής Γ.Π.Α

ΑΘΗΝΑ 2016

*Στην οικογένεια μου,
για την αγάπη και την υποστήριξη τους*

Ευχαριστίες

Η εκπόνηση της μεταπτυχιακής μου μελέτης δεν θα ήταν δυνατή χωρίς τη συνδρομή κάποιων ανθρώπων γι' αυτό θα ήθελα να τους απευθύνω τις θερμές ευχαριστίες μου...

Πρώτα απ' όλα θα ήθελα να ευχαριστήσω τον επιβλέποντα Επίκουρο Καθηγητή Σωτήριο Τζάμο τόσο για την ανάθεση της συγκεκριμένης μελέτης όσο για την επιστημονική καθοδήγηση και την καθοριστική του συμβολή καθ' όλη την διάρκεια εκπόνησης της. Επίσης θα ήθελα να τον ευχαριστήσω θερμά για το πολύτιμο χρόνο που αφιέρωσε, την συμπαράσταση του και για τις εύστοχες παρατηρήσεις του που με βοήθησαν στην ολοκλήρωση της μελέτης.

Ιδιαίτερες ευχαριστίες θα ήθελα να απευθύνω στον Καθηγητή και διευθυντή του εργαστηρίου Φυτοπαθολογίας Επαμεινώνδα Παπλωματά και στην Επίκουρο Καθηγήτρια Πολύμνια Αντωνίου για τις γνώσεις που μου προσέφεραν στα πλαίσια του μεταπτυχιακού κύκλου καθώς επίσης που δέχτηκαν να συμμετάσχουν ως μέλη στην εξεταστική επιτροπή. Ακόμα θα ήθελα να τους ευχαριστήσω θερμά γιατί ήταν πάντα πρόθυμοι να με βοηθήσουν καθώς και να μου λύσουν οποιαδήποτε απορία.

Θα ήθελα ακόμα να ευχαριστήσω την Επίκουρο Καθηγήτρια Ελισάβετ Χατζηβασιλείου που με βοήθησε να ανακαλύψω τον τομέα της ιολογίας και με έκανε να αγαπήσω ιδιαίτερα αυτό το κομμάτι της φυτοπαθολογίας.

Θα ήθελα να ευχαριστήσω επιπλέον τη Λέκτορα Αλίκη Τζίμα για τις πολύτιμες συμβουλές της, το ενδιαφέρον και την προθυμία της να με βοηθήσει σε ότι και αν χρειάστηκα κατά την διάρκεια της μεταπτυχιακής μου μελέτης.

Επιπλέον θα ήθελα να ευχαριστήσω ιδιαίτερα τον Επίκουρο Καθηγητή Πέτρο Ρούσσο του εργαστηρίου Δενδροκομίας καθώς επίσης και τον υποψήφιο διδάκτορα Θανάση Τσαφούρο που μας βοήθησαν στη διεκπεραίωση του τελευταίου μέρους του πειράματος που αφορούσε την Υγρή Χρωματογραφία.

Ακόμα θα ήθελα να ευχαριστήσω τους υποψήφιους διδάκτορες Δανάη Γκίζη και τον υποψήφιο Σταύρο Παλαβούζη για την πολύτιμη βοήθεια τους καθ' όλη την διάρκεια του πειράματος καθώς επίσης και τους μεταπτυχιακούς φοιτητές Βασίλη Δημητρακά και Νικόλαο Λεκάνη για την προθυμία τους να με βοηθήσουν σε ότι και αν χρειάστηκα.

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.

Περιεχόμενα

Περίληψη.....	3
Abstract	5
I. Εισαγωγή	6
1.1 Ο μύκητας <i>Verticillium dahliae</i>	6
1.2 Ο βιολογικός κύκλος της ασθένειας	11
1.3 Επιδημιολογία της ασθένειας.....	14
1.4 Τρόποι αντιμετώπισης της βερτισιλλίωσης.....	15
1.5 Βιολογική αντιμετώπιση.....	18
1.6 Επαγωγή της διασυστηματικής αντοχής των φυτών (Induced Systemic Resistance/ISR).....	21
1.6.1 Επαγόμενη από συντηρημένες δομές παθογόνων και μικροοργανισμών (PAMP) διασυστηματική άμυνα (P/MAMPs Triggered Immunity-PTI)	21
1.6.2 Επαγόμενη από τελεστές άμυνα ((Effector Triggered Immunity-ETI).....	22
1.6.3 Ενεργοποίηση αμυντικών αποκρίσεων	23
1.6.4 Η σημασία του σαλικυλικού οξέος και του ιασμονικού/αιθυλενίου ως σήματα για τη διέγερση λανθανόντων μηχανισμών αμύνης των φυτών.....	25
1.7 Ο βιολογικός παράγοντας <i>Paenibacillus alvei</i> K165.....	27
1.8 Το φυτό <i>Arabidopsis thaliana</i>	29
1.9 Ο ρόλος των αυξινών στα φυτά	30
1.9.1 Βιοσύνθεση ινδολ-3-οξικού οξέος	31
1.9.2 Μεταφορά του ινδολ-3-οξικού οξέος	33
1.9.3 Μονοπάτια μεταγωγής Σήματος της Αυξίνης.....	35
II. Σκοπός της μελέτης.....	42
III. Υλικά και μέθοδοι.....	44
3.1 Γενετικά τροποποιημένα φυτά <i>Arabidopsis thaliana</i>	44
3.2 Μικροβιολογικό υλικό.....	44
3.3 Θρεπτικά υλικά.....	44
3.4 Προετοιμασία του παθογόνου μολύσματος	46
3.5 Παρασκευή αιωρήματος του βακτηρίου K165.....	47
3.6 Πείραμα 1: Αξιολόγηση της ανθεκτικότητας μεταλλαγμένων φυτών <i>A. thaliana</i> στο μύκητα <i>V. dahliae</i> καθώς επίσης και την αποτελεσματικότητα του βιολογικού παράγοντα <i>P. alvei</i> K165	48
3.7 Πείραμα 2: Προσδιορισμός των επιπέδων έκφρασης των γονιδίων <i>PR1</i> και <i>PDF1.2</i> σε όλους τους υπό εξέταση γονότυπους.....	49
3.7.1 Απομόνωση RNA	49
3.7.2 Προσδιορισμός της συγκέντρωσης του RNA.....	51
3.7.3 Εφαρμογή DNase I (HT BIOTECHNOLOGY LTD)	51

3.7.4 Εφαρμογή αντίστροφης μεταγραφάσης.....	52
3.7.5 Εφαρμογή της Real-time PCR.....	52
3.8 Πείραμα 3: Μελέτη της έκφρασης των γονιδίων <i>TIR1-1</i> , <i>AFB1-3</i> , <i>AFB3-2</i> και <i>AXR4-2</i> στα φυτά άγριου τύπου Col-0	54
3.9 Πείραμα 4: Μέτρηση της συγκέντρωσης του μορίου του ινδολ-3-οξικό οξύ (IAA) στα φυτά άγριου τύπου Col-0 με τη χρήση της υγρής χρωματογραφίας υψηλής απόδοσης (HPLC)	55
3.9.1 Λυοφιλοποίηση (freeze-drying)	56
3.9.2 Εκχύλιση IAA.....	57
3.9.3 Χρωματογραφική ανάλυση	57
IV. Αποτελέσματα.....	58
4.1 Μελέτη της μολυσματικής ικανότητας του μύκητα <i>V. dahliae</i> καθώς επίσης και την επίδραση του βιολογικού παράγοντα <i>P. alvei</i> K165 στα μεταλλαγμένα φυτά <i>tir1-1</i> , <i>afb1-3</i> , <i>afb3-4</i> και <i>axr4-2</i>	58
4.2 Μέτρηση νωπού βάρους φυτών ανά γονότυπο και ανά επέμβαση	66
4.3 Αποτελέσματα των επιπέδων έκφρασης των γονιδίων <i>TIR1</i> , <i>AFB1</i> , <i>AFB3</i> και <i>AXR4</i> στα φυτά αγρίου τύπου κατά την διαδικασία αλληλεπίδρασης με το παθογόνο μύκητα <i>V.dahliae</i> και το ριζοβακτήριο <i>P. alvei</i> K165	68
4.4 Αποτελέσματα των επιπέδων έκφρασης των γονιδίων <i>PR1</i> και <i>PDF1.2</i> στην αλληλεπίδραση των γονοτύπων <i>tir1</i> , <i>afb1</i> , <i>afb3</i> και <i>axr4</i> με τον παθογόνο μύκητα <i>V. dahliae</i> και με τον βιολογικό παράγοντα <i>P.alvei</i> K165.....	73
4.4.1 Μελέτη της έκφρασης των γονιδίων <i>PR1</i> και <i>PDF1.2</i> στα μεταλλαγμένα φυτά <i>tir1</i>	73
4.4.2 Μελέτη της έκφρασης των γονιδίων <i>PR1</i> και <i>PDF1.2</i> στα μεταλλαγμένα φυτά <i>afb1</i>	74
4.4.3 Μελέτη της έκφρασης των γονιδίων <i>PR1</i> και <i>PDF1.2</i> στα μεταλλαγμένα φυτά <i>afb3</i>	75
4.4.4 Μελέτη της έκφρασης των γονιδίων <i>PR1</i> και <i>PDF1.2</i> στα μεταλλαγμένα φυτά <i>axr4</i>	76
4.5 Αποτελέσματα μέτρησης της συγκέντρωσης του μορίου του ινδολ-3-οξικό οξύ (IAA) στα φυτά άγριου τύπου Col-0	78
V. Συζήτηση-Συμπεράσματα.....	79
VI. Βιβλιογραφία	88

Περίληψη

Η αδρομύκωση που προκαλείται από τον εδαφογενή φυτοπαθόγονο μύκητα *Verticillium dahliae* είναι δύσκολα ελεγχόμενη και ταυτόχρονα καταστροφική εξαιτίας της ικανότητας του παθογόνου να προσβάλλει τους αγγειώδεις ιστούς των φυτών και να επιβιώνει για δεκαετίες στο έδαφος. Τα τελευταία χρόνια λόγω της αδυναμίας χημικής αντιμετώπισης του μύκητα, το ενδιαφέρον για τον έλεγχο της ασθένειας επικεντρώνεται στην ανακάλυψη βιολογικών ανταγωνιστών. Στην παρούσα μελέτη διερευνήθηκε ο ρόλος των αυξινών κατά την προσβολή των φυτών *Arabidopsis thaliana* από το μύκητα *V. dahliae* καθώς επίσης και η επίδραση τους στην βιολογική αντιμετώπιση του μύκητα με τη χρήση του ριζοβακτηρίου *Paenibacillus alvei* K165. Μελετήθηκαν γονίδια που εμπλέκονται στη σηματοδότηση (*TIR1*, *AFB1*, *AFB3*) καθώς και στη μεταφορά (*AXR4*) των αυξινών μέσα στο κύτταρο. Για το σκοπό αυτό πραγματοποιήθηκαν πειράματα παθογένειας κατά τα οποία φυτά *A.thaliana* άγριου τύπου (Col-0) και φυτά μεταλλαγμένα στα παραπάνω προς εξέταση γονίδια, μολύνθηκαν είτε μόνο με το παθογόνο μύκητα *V.dahliae* είτε σε συνδυασμό με τον βιολογικό παράγοντα *P. alvei* K165. Στη συνέχεια πραγματοποιήθηκε καταγραφή των συμπτωμάτων και αποτυπώθηκε το ποσοστό των ασθενών φύλλων, η συχνότητα εμφάνισης της ασθένειας και το σχετικό εμβαδό ασθενείας έτσι ώστε να υπάρξει μια ολοκληρωμένη εικόνα σχετικά με τον ρόλο αυτών των γονιδίων. Με αυτό τον τρόπο θα κατανοήσουμε το πώς συνδέονται τα συγκεκριμένα γονίδια με την μολυσματική ικανότητα του παθογόνου ή πως εμπλέκονται στην θετική επίδραση του βιολογικού παράγοντα. Έπειτα μελετήθηκε η έκφραση των γονιδίων *PR1* και *PDF1.2* που σχετίζονται με την επαγόμενη από το σαλικυλικό οξύ και το αιθυλένιο, αντίστοιχα, άμυνα των φυτών στα μεταλλαγμένα φυτά καθώς επίσης και η έκφραση των γονιδίων *TIR1*, *AFB1*, *AFB3* και *AXR4* σε φυτά άγριου στελέχους μετά τον εμβολιασμό μόνο του παθογόνου μύκητα ή μόνο του βιολογικού παράγοντα ή και σε συνδυασμό και των δύο, τόσο στο υπέργειο μέρος όσο και στο ριζικό σύστημα. Τέλος κρίθηκε σημαντικό να εξετασθεί κατά πόσο μεταβάλλεται η συγκέντρωση του ινδολ-3-οξικού οξέος στις προαναφερθείσες επεμβάσεις στο άγριο στέλεχος φυτών *A. thaliana* σε σύγκριση με τα μη μολυσμένα φυτά.

Τα αποτελέσματα της εργασίας απέδειξαν ότι τα μεταλλαγμένα φυτά *afb1*, *afb3* και *axr4* ήταν ανθεκτικότερα από τα άγριου τύπου φυτά στο μύκητα *V. dahliae* και παρατηρήθηκε αυξημένη έκφραση των γονιδίων *PR1* και *PDF1.2* υποδεικνύοντας ενεργοποίηση του αμυντικού συστήματος των φυτών. Επίσης αξίζει να αναφερθεί ότι δεν επιτεύχθηκε προστασία από τον βιολογικό παράγοντα *P. alvei* K165 στα μεταλλαγμένα φυτά *tir1* και *axr4* παρόλο που φαίνεται να ενεργοποιήθηκε ο αμυντικός μηχανισμός. Επιπλέον μελετώντας την έκφραση όλων των γονιδίων στο ριζικό σύστημα του άγριου στελέχους, όταν εφαρμόστηκε μόνο το παθογόνο, παρατηρήθηκε υπερέκφραση όλων των γονιδίων υποδεικνύοντας ότι το παθογόνο επεμβαίνει στη σηματοδότηση καθώς και στη μεταφορά της αυξίνης μέσα στο φυτό.

Επιπρόσθετα όσον αφορά το βακτήριο *P.alvei* K165 φαίνεται πώς διαφορετικά επεμβαίνει στην έκφραση όλων των προς εξέταση γονιδίων, όταν εφαρμόζεται μόνο του ή σε συνδυασμό με το παθογόνο. Τέλος οι παραπάνω παρατηρήσεις σε συνδυασμό με τη μελέτη της συγκέντρωσης του ινδολ-3-οξικού οξέος, επιβεβαιώνουν ότι το παθογόνο είναι ικανό να διαχειρίζεται τη σηματοδότηση και τη μεταφορά της αυξίνης προς όφελος του.

Abstract

The role of auxins in biological control and resistance of *A. thaliana* against the vascular wilt pathogen *Verticillium dahliae*

Sotiria S. Fousia, Polymnia P. Antoniou, Epaminondas J. Paplomatas and Sotirios E. Tjamos

Laboratory of Plant Pathology, Agricultural University of Athens, 75 Iera Odos str., 11855 Athens, Greece

In the last decades, due to the absence of chemical disease management of *V. dahliae*, the interest for the control of the pathogen focuses on the discovery of biological antagonists such as the bacterial strain *Paenibacillus alvei* K165. Taking into consideration that biocontrol interactions between soilborne fungal pathogens and their hosts have received little attention, it is essential to find out the molecular interaction of this rhizobacterium, K165, with *A. thaliana* and as a consequence to derive more information about the pathogenicity mechanism of *V. dahliae*. For this purpose, in the current study, the role of auxins during the attack of plants, *A. thaliana*, by this pathogen as well as their impact on the biological control of the fungus by *P. alvei* K165 was investigated. Genes involved in auxin signaling (*TIR1*, *AFB1*, *AFB3*) and transporting (*AXR4*) inside the plant cell were studied. In this way, we will comprehend how these specific genes are connected with the virulence of this pathogen or how they are involved in the positive effect of the biocontrol agent. It was proved that the mutant plants *afb1*, *afb3* and *axr4* were more resistant than wild type. Also an increased expression of *PR1* and *PDF1.2* was observed, indicating activation of the plant immune system. Moreover, it is worth mentioning that K165 did not protect the mutant plants *tir1* and *axr4*, despite the fact that defense mechanisms seem to have been activated. Furthermore, by studying the expression of all genes (*TIR1*, *AFB1*, *AFB3* and *AXR4*) in the root system of the wild plants, when only the pathogen was inoculated, it was observed over expression of all these genes, indicating that the pathogen intervenes in the signaling and transporting pathways of the auxin in plants. As far as *P. alvei* K165 is concerned, it seems that intervenes in the expression of all genes, in a way that depends on the absence or presence of the pathogen. To sum up, the above remarks in connection with the study of indole-3-acetic acid accumulation upon *V. dahliae* infection, it was confirmed that the pathogen is able to manipulate the signaling and transporting pathway of auxin in plant for its benefit.

1.1 Ο μύκητας *Verticillium dahliae*

Η βερτισιλλίωση είναι μία από τις πιο επικίνδυνες αδρομυκώσεις, προσβάλλοντας ένα ευρύτατο φάσμα φυτικών ειδών και για αυτό το λόγο αποτελεί μία από τις σοβαρότερες ασθένειες των καλλιεργούμενων φυτών. Στην Ελλάδα, αν και έχει αναφερθεί για πρώτη φορά από το 1935 ως ασθένεια, εντούτοις μόνο την τελευταία εικοσαετία έχει αρχίσει να απασχολεί έντονα τον παραγωγικό κόσμο με την επέκταση που έχει στις διάφορες καλλιέργειες. Οι αδρομυκώσεις συνήθως εξελίσσονται βραδέως και οφείλονται σε προσβολή των αγγειωδών ιστών. Στην χώρα μας υπεύθυνος για την ασθένεια είναι σχεδόν αποκλειστικά ο μύκητας *Verticillium dahliae* όπου πρόκειται για ένα από τα σπουδαιότερα παθογόνα του αγγειακού συστήματος των ανωτέρων φυτών (Παναγόπουλος, 1995). Ο κατάλογος των φυτικών ειδών που προσβάλλει το είδος *V. dahliae* είναι πολύ μεγάλος όπου συμπεριλαμβάνονται δενδροκομικές, ετήσιες καλλιέργειες καθώς και αυτοφυή φυτά (Ligoxigakis & Vakalounakis 1994).

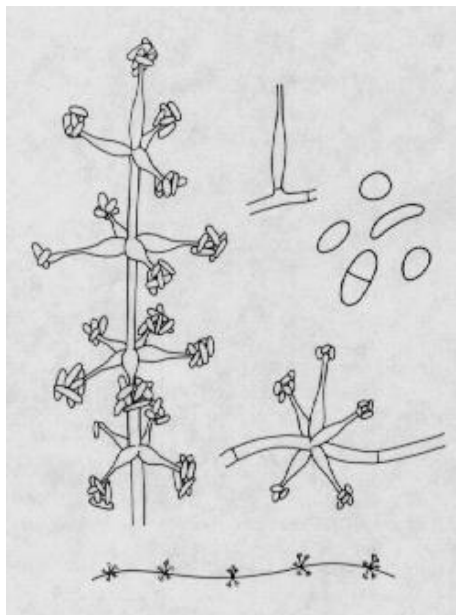
Οι μύκητες του γένους *Verticillium* ανήκουν στην κλάση Αδηλομύκητες (*Adelomycetes*), στην τάξη *Moniliales* (*Hyphomycetes*) και στην οικογένεια *Moniliaceae*. Αναφέρονται τα εξής είδη: *V. albo-atrum*, *V. dahliae*, *V. nigrescens*, *V. nubilum*, *V. tricorpus* και *V. longisporum* όπου μέχρι σήμερα δεν έχει αναφερθεί η παρουσία της τέλει μορφής τους σε κανένα από τα παραπάνω. Οι μύκητες αυτοί όταν καλλιεργηθούν σε θρεπτικό υλικό, σχηματίζουν λευκές βαμβακώδεις αποικίες που αναπτύσσονται αργά. Έπειτα από μια εβδομάδα εμφανίζονται υπόλευκες ενώ αργότερα γίνονται μαύρες λόγω σχηματισμού μικροσκληρωτίων (Hawksworth 1970a, 1970b, 1970c). Μεγαλύτερη φυτοπαθολογική σημασία παρουσιάζουν τα είδη *V. dahliae* (Kleb.) και *V. albo-atrum* (Reinke & Berth.) (Hawksworth & Talboys 1970a, 1970b; Pegg 1974; Schnathorst 1981; Wilhelm 1984).

Ο μύκητας *V. dahliae* έχει εκτεταμένη γεωγραφική εξάπλωση στις εύκρατες χώρες του κόσμου (Engelhard 1957; Sackston *et al.* 1957; Woolliams 1966; Pegg 1984). Κατά κανόνα, ο μύκητας *V. dahliae* βρίσκεται στις θερμότερες περιοχές των ΗΠΑ, του Καναδά, της Ευρώπης και της Ασίας. Αντίθετα με τον μύκητα *V. albo-atrum* που φαίνεται να είναι περιορισμένος σε περιοχές όπου η μέση θερμοκρασία δεν υπερβαίνει τους 21-24 °C για το μεγαλύτερο διάστημα της καλλιεργητικής περιόδου ενώ ο μύκητας *V. dahliae* μπορεί να προσβάλει τα φυτά τόσο σε ψυχρές όσο και σε θερμές περιοχές όπου η μέση θερμοκρασία υπερβαίνει τους 24 °C για το μεγαλύτερο διάστημα της καλλιεργητικής περιόδου (Schnathorst 1981). Όμως, είναι καταστροφικότερος σε θερμότερα κλίματα (Snyder & Smith 1981; Rowe 1985) ειδικά σε αρδευόμενες καλλιέργειες (Snyder & Smith 1981). Γι' αυτό, έχει αναφερθεί στο Ισραήλ,

Ι ΕΙΣΑΓΩΓΗ

σχεδόν αποκλειστικά σε ερημικές περιοχές που αρδεύονται και σε συνθήκες υψηλής εξατμισοδιαπνοής, ο μύκητας αποβαίνει ένας από τους κύριους περιοριστικούς παράγοντες στην παραγωγή των φυτών (Krikun, 1979). Επειδή ο μύκητας *V. dahliae* ευνοείται από υψηλές μέσες θερμοκρασίες, κυριαρχεί στις θερμές περιοχές της νότιας Ευρώπης και της Μεσογείου (Παναγόπουλος 1995) και μεταξύ αυτών και στην Κρήτη (Ligoxiakakis 1991; Ligoxiakakis & Vakalounakis 1992, 1994).

Οι μύκητες του γένους *Verticillium* έχουν αρχικά λευκό βαμβακώδες πολυκύτταρο μυκήλιο (με εγκάρσια χωρίσματα), που αργότερα γίνεται καστανό με διάμετρο 2-4,5 μm. Σχηματίζει ελεύθερους, ανορθωμένους, υαλώδεις, πολυκύτταρους κονιδιοφόρους που έχουν χαρακτηριστική διακλάδωση κατά σπονδύλους. Στα εγκάρσια χωρίσματα (septa) του κονιδιοφόρου σχηματίζονται 3-4 πλάγια, κοντά, μονοκύτταρα στηρίγματα (διαστάσεων 16-35 x 1-2,5 μm), που στην πραγματικότητα είναι φιαλίδια, στις κορυφές των οποίων σχηματίζονται τα κονίδια (φιαλιδοσπόρια) (εικόνα 1). Τα κονίδια είναι μονοκύτταρα, υαλώδη, ωοειδή μέχρι ελλειψοειδή και έχουν διαστάσεις 2,5-8 x 1,4-3,2 μm. Στην κορυφή κάθε φιαλιδίου παράγονται διαδοχικά πολλά κονίδια, τα οποία συγκρατούνται μεταξύ τους με μια κολλώδη ουσία και έτσι σχηματίζονται συχνά μικρές κεφαλές (ομάδες) κονιδίων (Παναγόπουλος, 2007).



Εικόνα 1: Κονιδιοφόρος του μύκητα *V. dahliae* με φιαλίδια που σχηματίζονται πλάγια στα εγκάρσια τοιχώματα όπου στην κορυφή τους φέρουν πολλά κονίδια. (<http://www.cals.ncsu.edu>)

Ι ΕΙΣΑΓΩΓΗ

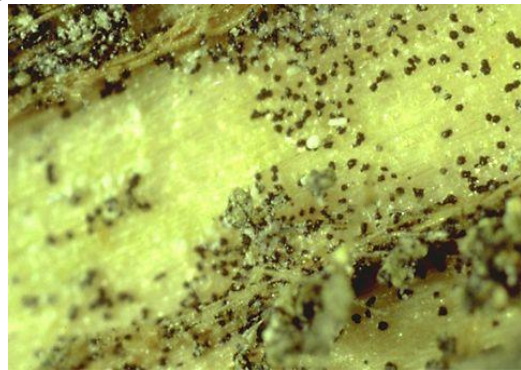
Στη διεθνή βιβλιογραφία παλιότερα γινόταν σύγχυση στην ταξινόμηση των ειδών *V. dahliae* και *V. albo-atrum*. Η σύγχυση οφειλόταν στο ερώτημα εάν ο μύκητας *V. dahliae* είναι ένα ξεχωριστό είδος ή θα πρέπει να συμπεριληφθεί στο είδος *V. albo-atrum*. Η πιο χαρακτηριστική διαφορά μεταξύ των εν λόγω ειδών, είναι ο τύπος των οργάνων διαχείμασης τους: ο μύκητας *V. dahliae* σχηματίζει μικροσκληρώτια, ενώ ο μύκητας *V. albo-atrum* σχηματίζει σκοτεινόχρωμο διατηρητικό μυκήλιο (Heale & Isaac 1965). Σύμφωνα με τους Berkeley *et al.*, (1931) διακρίνονται δυο τύποι κατασκευών διαχείμασης:

- Μυκήλιο: Μάζες σκοτεινών υφών με παχιά τοιχώματα, πολυάριθμα εγκάρσια τοιχώματα και βορτούμορφη εμφάνιση, που θυμίζουν χλαμυδοσπόρια.
- Μικροσκληρώτια: κατασκευές με παχιά τοιχώματα, που μοιάζουν με ιστό και προκύπτουν από τη διαδικασία διαφοροποίησης των υφών. Έχουν σκοτεινό καφέ μέχρι μαύρο χρώμα που οφείλεται στη συσσώρευση μελανίνης, ακανόνιστο σχήμα και μέγεθος με ανώμαλη επιφάνεια, ικανά να διατηρηθούν στο έδαφος για πάνω από 10 χρόνια, ακόμα και χωρίς την παρουσία ευπαθών ξενιστών (Τζάμος, 2007).

Τα μικροσκληρώτια που σχηματίζει ο μύκητας *V. dahliae* ποικίλλουν σε σχήμα και μέγεθος διαμέτρου περίπου 15-100 μm (εικόνα 2,3). Ευνοείται από μέσες θερμοκρασίες που κυμαίνονται μεταξύ 21-27 °C και για αυτό το λόγο θεωρούνται ιδιαίτερα κρίσιμες για την εξέλιξη της ασθένειας. Όμως η βέλτιστη θερμοκρασία ανάπτυξης μπορεί να διαφέρει από φυλή σε φυλή και από είδος σε είδος. Ο μύκητας *V. dahliae* επικρατεί και αποτελεί σοβαρό παθογόνο σε θερμότερες περιοχές όπως η Νότια Ευρώπη και η Μεσόγειος ενώ ο μύκητας *V. albo-atrum* αναπτύσσεται σε μέσες θερμοκρασίες από 20-24 °C και είναι περισσότερο διαδεδομένος σε ψυχρές περιοχές με υγρό κλίμα όπως εκείνες της Βόρειας Ευρώπης. Επίσης η βερτισιλλίωση ευνοείται ιδιαίτερα σε συνθήκες υγρασίας γιατί ο παράγοντας του νερού είναι απαραίτητος για το σχηματισμό των αναπαραγωγικών του οργάνων, την μολυσματικότητα του και την απελευθέρωση των κονιδίων του (Παναγόπουλος, 2007).



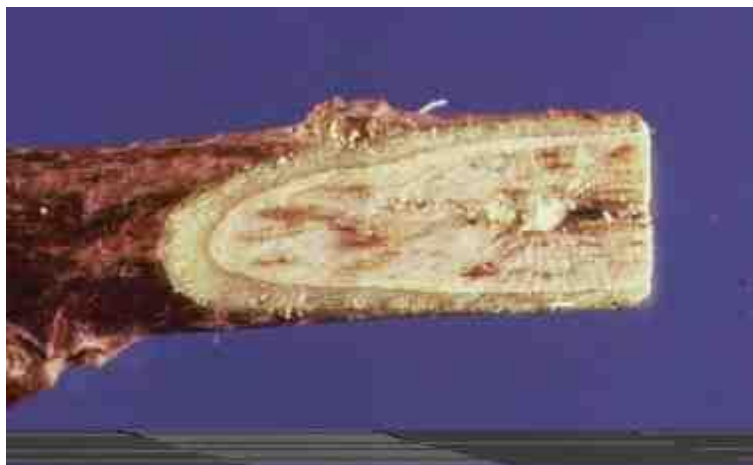
Εικόνα 2: Μικροσκληρώτια του μύκητα *V. dahliae* σε ρίζες μαρουλιού. (<https://www.APS.net.org>)



Εικόνα 3: Μικροσκληρώτια του μύκητα *V. dahliae* σε μολυσμένο βλαστό πατάτας. (<https://www.APS.net.org>)

Ι ΕΙΣΑΓΩΓΗ

Χαρακτηριστικό σύμπτωμα της ασθένειας αποτελεί ο καστανός μεταχρωματισμός των αγγείων του ξύλου, ο οποίος εμφανίζεται σε επιμήκη ή εγκάρσια τομή του στελέχους και των ριζών, όχι όμως σε όλους τους ξενιστές. Ο μεταχρωματισμός αυτός μπορεί να εμφανιστεί στη μια πλευρά του στελέχους ή σ ολόκληρη την έκταση των αγγείων (Παναγόπουλος, 2007) (εικόνα 4).



Εικόνα 4: Καστανός μεταχρωματισμός των αγγείων του ξύλου ύστερα από προσβολή του παθογόνου. (<https://www.cals.ncsu.edu>)

Τα κύρια συμπτώματα της βερτισιλλίωσης είναι:

- Μάρανση (επιναστία)
- Χλώρωση
- Ξήρανση των κατώτερων φύλλων
- Νανισμός των προσβεβλημένων φυτών.
- Καστανός μεταχρωματισμός των αγγείων του ξύλου

Η εξέλιξη της συμπτωματολογικής κατάστασης εξαρτάται: από το χρόνο προσβολής (πρώιμη ή όψιμη), τις κλιματολογικές συνθήκες, την πυκνότητα του μολύσματος, την παρουσία ή απουσία ενός εξειδικευμένου στελέχους, τη φυλή του μύκητα, τον ξενιστή και τις καλλιεργητικές φροντίδες. Συνήθως στα ετήσια φυτά παρατηρείται το σύνδρομο του βραδέως μαρασμού ενώ στις δενδρώδεις καλλιέργειες το σύνδρομο της ημιπληγίας (Τζάμος, 2007) (εικόνα 5,6).

Ι ΕΙΣΑΓΩΓΗ



Εικόνα 5: Σύμπτωμα ημιπληγιάς σε δένδρα ελιάς.
(<http://http://www.plantdirect.blogspot.gr>)



Εικόνα 6: Μάρανση σε φυτά αγγουριάς. (<https://www.APS net.org>)

Ο μύκητας *V. dahliae* είναι ένα από τα σπουδαιότερα παθογόνα του αγγειακού συστήματος των ανώτερων φυτών και έχει ευρύτατο φάσμα ξενιστών. Προσβάλλει περισσότερα από 400 είδη φυτών, στα οποία περιλαμβάνονται λαχανικά και ανθοκομικά φυτά με μεγάλη οικονομική σημασία, ψυχανθή και φυτά μεγάλης καλλιέργειας καθώς επίσης οπωροφόρα και καλλωπιστικά δένδρα και μεγάλο αριθμό αυτοφυών. Είδη των οικογενειών *Solanaceae*, *Cucurbitaceae*, *Malvaceae*, *Asteraceae*, *Brassicaceae* και *Fabaceae* περιλαμβάνονται μεταξύ των κυριότερων ξενιστών του μύκητα *V.dahliae* (Bhat & Subbarao,

Ι ΕΙΣΑΓΩΓΗ

1990). Αναφέρεται ότι ο αριθμός των ειδών που προσβάλλονται από το μύκητα συνεχώς αυξάνεται καθώς η εκδήλωση της ασθένειας καταγράφεται και σε νέους ξενιστές.

Μεταξύ των λαχανοκομικών ειδών που προσβάλλονται συνήθως από το μύκητα *V. dahliae* είναι τα εξής: τομάτα, πατάτα, μελιτζάνα, πιπεριά, μπάμια, αγγουριά, πεπονιά, καρπουζιά, κολοκυθιά, αντίδι, ραδίκι, ζαχαρότευτλα, ραπάνι, φασόλι, αγκινάρα κ.ά. Υπάρχουν όμως μερικά είδη λαχανοκομικών φυτών που προσβάλλονται σπάνια από το μύκητα, όπως: μαρούλι, γογγύλι, λάχανο, λάχανο Βρυξελλών, κουνουπίδι, μπρόκολο, σινάπι, σπανάκι, μπιζέλι, φασόλι, κρεμμύδι, σκόρδο, πράσο, σπαράγγι, μαϊντανός, σέλινο κ.ά. (Sherf & MacNab, 1986). Όσον αφορά τις δένδροκομικές καλλιέργειες ο μύκητας προσβάλλει συνήθως ελιά, βερικοκιά, αμυγδαλιά, ροδακινιά, δαμασκηνιά και φιστικιά με τη βερικοκιά και τη ελιά να υφίστανται τις σοβαρότερες απώλειες (Παναγόπουλος, 2007). Τέλος αναφέρεται ότι μπορεί να επιβιώσει σε μερικά είδη καλλιεργούμενων και αυτοφυών φυτών. Ως ασυμπτωματικοί φορείς του μύκητα αναφέρονται είδη της οικογένειας *Poaceae* όπως π.χ. η βρώμη και η αγριοβρώμη (Thanassouloupoulos *et al.*, 1981; Resende *et al.*, 1994).

1.2 Ο βιολογικός κύκλος της ασθένειας

Ο μύκητας *V. dahliae*, εισχωρεί στα φυτά από το ριζικό σύστημα και προκαλεί μονοκυκλική ασθένεια, δηλαδή μόνο ένας κύκλος ασθένειας και παραγωγής μολυσμάτων πραγματοποιείται σε κάθε καλλιεργητική περίοδο. Ο κύκλος ζωής του παθογόνου μπορεί να διακριθεί σε τρεις φάσεις: τη ληθαργική ή λανθάνουσα, την παρασιτική και τη σαπροφυτική. Κατά τη ληθαργική φάση, οι κατασκευές διαχείμασης του μύκητα δηλαδή τα μικροσκληρώτια παραμένουν σε λήθαργο, μέσω της λειτουργίας που ονομάζεται μυκόσταση (mycostasis). Με αυτό τον τρόπο αποτρέπεται η βλάστηση των μικροσκληρωτίων, και ενεργοποιείται μόνο με την επικράτηση περιβαλλοντικών συνθηκών που ευνοούν την βλάστηση και την ανάπτυξη του μύκητα. Η περίσσεια άνθρακα και αζώτου υποδηλώνουν την παρουσία ξενιστών φυτών που απελευθερώνουν αυτές τις ουσίες στη ριζόσφαιρα (Huisman, 1982; Mol *et al.*, 1995; Olsson & Nordbrin-Hertz, 1985; Schreiber & Green, 1963). Κάθε μεμονωμένο κύτταρο ενός μικροσκληρωτίου μπορεί να βλαστήσει έστω και μία φορά δίνοντας την ευκαιρία στο μικροσκληρώτιο να βλαστάνει πολλές φορές αυξάνοντας έτσι την πιθανότητα επιτυχούς μόλυνσης. Οι υφές που εξέρχονται από το βλαστώνον μικροσκληρώτιο μπορούν να διανύσουν περιορισμένη απόσταση (έχει υπολογισθεί ότι η σφαίρα επιρροής της ρίζας στο *V. dahliae* είναι πιθανό να είναι 300 μm ή λιγότερο) πιθανώς κατευθυνόμενες από τα θρεπτικά συστατικά, μέχρι να φτάσουν στον υπογήφιο ξενιστή (Huisman, 1982).

Ι ΕΙΣΑΓΩΓΗ

Τυπικά ο μύκητας *V. dahliae* εισέρχεται στη φάση του παρασιτισμού μολύνοντας τα ευπαθή φυτά είτε από το ακρορίζιο είτε από τα σημεία σχηματισμού των πλευρικών ριζών. Για να περάσει όμως στους ιστούς του ξύλου, ο μύκητας πρέπει πρώτα να διασχίσει την ενδοδερμίδα, που λειτουργεί σαν φυσικός φραγμός έναντι της προσβολής. Επομένως η είσοδος του μύκητα μπορεί να επιτευχθεί είτε στην περίπτωση που η ενδοδερμίδα δεν έχει αναπτυχθεί πλήρως είτε όταν είναι τραυματισμένη (π.χ. από τη δράση νηματωδών σκωλήκων) (Bowers *et al.*, 1996; Huisman, 1982; Pegg, 1974; Schnathorst, 1981). Αφού ξεπεράσει το εμπόδιο της ενδοδερμίδας, εισέρχεται στα αγγεία του ξύλου όπου σχηματίζει κονίδια. Στα αγγεία του ξύλου μολυσμένων βλαστών και ριζών παρατηρείται το μυκήλιο και τα κονίδια τα οποία συχνά φράζουν τα αγγεία, εμποδίζοντας τη διακίνηση του ανοδικού ρεύματος χυμού. Σε πολλές περιπτώσεις έχει παρατηρηθεί τα κύτταρα του παρεγχύματος που περιβάλλουν τα αγγεία να κινητοποιούνται από το εκκριτικό σύστημα του μύκητα σε υπερβολικό πολλαπλασιασμό, οδηγώντας έτσι τα αγγεία σε κατάρρευση. Η απόφραξη των αγγείων επιδεινώνεται και με τη συσσώρευση των προϊόντων της αποδόμησης των φυτικών ιστών που προκαλείται από τα ένζυμα του μύκητα, σχηματίζοντας μάζες με υψηλό ιξώδες. Πρόκειται για πηκτινολογικά ένζυμά όπου διασπούν τις πηκτινικές ουσίες του μεσοτοιχίου των κυττάρων (φαινόλες του παρεγχύματος), τις οποίες μετατρέπουν αρχικά σε μελανίνη, απ' όπου και ο κιτρινοπορτοκαλής μεταχρωματισμός και στη συνέχεια δημιουργούν πήγματα (πηκτίνης), όπου προκαλούν διόγκωση και κλείσιμο των αγγείων με τελικό αποτέλεσμα την παρεμπόδιση ή το σταμάτημα της κυκλοφορίας του νερού, απ' όπου και ο μαρασμός. Ακόμα αναφέρεται ότι προβλήματα στη μετακίνηση των στοιχείων μέσω των αγγείων δημιουργούν και οι τυλώσεις, από τη συνένωση δύο αντικριστών αγγείων, στην προσπάθεια του ξενιστή να ανακόψει την πορεία του μύκητα. Θεωρείται ότι η παρουσία πολλών τυλώσεων σχετίζεται με την αντοχή των φυτών στις αδρομυκώσεις, διότι δυσχεραίνει την αποίκιση και προέλαση του παθογόνου στα αγγεία του ξύλου. Η ανάπτυξη της τυλώσης φαίνεται ότι προκαλείται από την αυξημένη παραγωγή ινδολοξικού οξέος (IAA) και όσον αφορά την φυσιολογία του φυτού, η παρουσία τυλώσεων στα αγγεία του ξύλου συντελεί επιπλέον στο μερικό περιορισμό της πορείας του νερού στα φύλλα (Fradin & Thomma, 2006). Επίσης, όσο προχωράει η ανάπτυξη του μύκητα μέσα στους ιστούς τα συμπτώματα εντείνονται περισσότερο λόγω της δράσης των τοξινών που παράγονται από το μύκητα. Αυτές οι τοξίνες νεκρώνουν το πρωτόπλασμα και καταστρέφουν την ωσμωτική λειτουργία των κυττάρων, ιδίως των φύλλων. Τέλος σύμφωνα με τον Agrios 2005 υποστηρίζεται ότι οι τοξίνες που παράγονται από το μύκητα μεταφέρονται στα φύλλα, στα οποία προκαλούν μείωση της χλωροφύλλης κατά μήκος των νευρώσεων και μείωση της φωτοσυνθετικής δραστηριότητας, κατάρρευση των κυτταρικών μεμβρανών του φύλλου και συνεπώς την ικανότητα του να ρυθμίζει την υδατική του κατάσταση με αποτέλεσμα την επιναστία, τη μάρανση και τη νέκρωση.

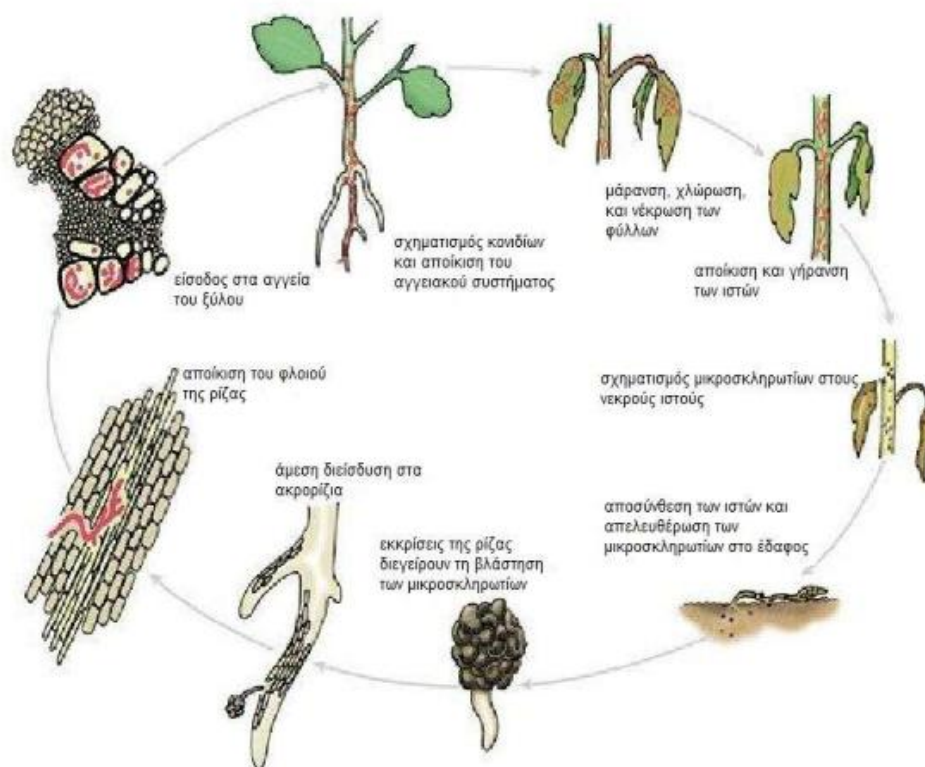
Ι ΕΙΣΑΓΩΓΗ

Τα υαλώδη κονίδια που σχηματίζονται από το μύκητα, μεταφέρονται σταδιακά σε νέες θέσεις με το ανοδικό ρεύμα μέσω των αγγείων όπου βλαστάνουν εκ νέου και διατρυπών γειτονικά όργανα ή ιστούς των αγγειωδών δεσμίδων, συνεχίζοντας έτσι τον αποικισμό. Κατά την διάρκεια νέκρωσης των ιστών ή της γήρανσης του φυτού, ο μύκητας εισέρχεται στη σαπροφυτική φάση. Εκτός από τους αγγειακούς ιστούς, οι βλαστοί και οι ρίζες του φυτού τώρα επίσης μπορούν να αποικιστούν. Σε αυτό το στάδιο ο μύκητας παράγει μεγάλες ποσότητες μικροσκληρωτίων τα οποία καταλήγουν στο έδαφος μαζί με τους νεκρούς ιστούς (Fradin & Thomma, 2006).

Συνοπτικά αναφέρεται ο βιολογικό κύκλος του παθογόνου που απαρτίζεται από τα εξής 9 στάδια (Rowe, 1985) (εικόνα 7):

1. Διέγερση της βλάστησης των μικροσκληρωτίων από τις απεκκρίσεις των ριζών του ξενιστή.
2. Παραγωγή μεγάλων απλοειδών κονιδίων που βλαστάνουν ταχέως και μολύνουν τις ρίζες.
3. Είσοδος του μύκητα με την εισχώρηση απλοειδών υφών.
4. Εγκατάσταση του μύκητα στα αγγεία και παραγωγή κονιδίων τα οποία μεταφέρονται και διαχέονται με το ανιόν ρεύμα.
5. Νέκρωση των ιστών του ξενιστή, ιδιαίτερα των φύλλων, από την απλοειδή μορφή του μύκητα.
6. Δευτερογενής εισβολή στους νεκρούς ιστούς του ξενιστή από απλοειδή μυκήλια, παραγωγή περισσότερων κονιδίων από σπονδυλωτούς πλέον κονιδιοφόρους.
7. Μετάπτωση του μυκηλίου από απλοειδές σε διπλοειδές εντός των ανεπτυγμένων υφών και κονιδίων για την παραγωγή ανθεκτικών μορφών (μικροσκληρωτίων) στους ήδη νεκρωμένους ιστούς.
8. Ενηλικίωση των μικροσκληρωτίων
9. Απελευθέρωση των ώριμων πλέον μικροσκληρωτίων από αποσυντεθημένα υπολείμματα προσβεβλημένων φυτών και βλάστηση τους από τα εκκρίματα των ριζών της νέας καλλιέργειας.

Ι ΕΙΣΑΓΩΓΗ



Drawing by Vickie Brewster, colored by Jesse Ewing.

Εικόνα 7: Στάδια του βιολογικού κύκλου του μύκητα *V.dahliae*. (<https://www.APSnet.org>)

1.3 Επιδημιολογία της ασθένειας

Το παθογόνο διατηρείται στο έδαφος και επιβιώνει για πάρα πολλά χρόνια ακόμα και χωρίς την παρουσία ευπαθών ξενιστών. Επιβιώνει κυρίως με τη μορφή μικροσκληρωτίων που έχουν την ικανότητα να επιζούν για 10-15 χρόνια στο έδαφος. Επιπρόσθετα η διαχείμαση του μπορεί να γίνει μέσω των μυκηλιακών υφών του ή μέσω των κονιδίων του στα προσβεβλημένα υπολείμματα της καλλιέργειας για μικρό χρονικό διάστημα. Αξίζει να αναφερθεί ότι τα κονίδια έχουν μικρή διάρκεια ζωής και για αυτό το λόγο δεν έχουν επιδημιολογική σημασία. Ο μύκητας δεν μπορεί να επιβιώσει μακριά από τον ξενιστή, με τη μορφή κονιδίων και μυκηλίου για περισσότερο από μερικές εβδομάδες. Ένας άλλος τρόπος διαίωσης του παθογόνου και αυξησεως των μολυσμάτων του στο έδαφος είναι τα διάφορα ζιζάνια-ξενιστές. Μερικά από αυτά όταν μολυνθούν εμφανίζουν συμπτώματα, ενώ αρκετά άλλα που έχουν στα αγγεία τους το μύκητα είναι ασυμπτωματικά αλλά συντελούν και αυτά με την ενσωμάτωσή τους στο

Ι ΕΙΣΑΓΩΓΗ

έδαφος στον εμπλουτισμό του με μολύσματα (κυρίως μικροσκληρωτία) (Παναγόπουλος, 2007).

Η ανάπτυξη και η ένταση της ασθένειας εξαρτάται από διάφορους παράγοντες όπως είναι η επιβίωση και η πυκνότητα του μολύσματος, ο βαθμός μολυσματικότητας του στελέχους, ο βαθμός αντοχής ή ανοχής του φυτού, η θερμοκρασία του εδάφους και του αέρα, τα ζιζάνια, οι βροχοπτώσεις και οι αρδεύσεις, η συγκαλλιέργεια και οι καλλιεργητικές επεμβάσεις (Παναγόπουλος, 2007). Όσον αφορά την αζωτούχο λίπανση δεν έχει διευκρινιστεί ακόμα η επίδραση της στην εμφάνιση και την εξέλιξη της ασθένειας και φαίνεται ότι ποικίλει από φυτό σε φυτό. Ο Elmer W.H 2000 ανέφερε ότι η υπερβολική αζωτούχος λίπανση αυξάνει την αντοχή φυτών μελιτζάνας στην ασθένεια ενώ ένα χρόνο αργότερα παρατηρήθηκε ότι η αζωτούχος (μειωμένη ή αυξημένη) και η φωσφορούχος λίπανση δεν επηρεάζει την ανάπτυξη της ασθένειας σε μια ποικιλία πατάτας (Platt H.W & Arsenault W.J 2001).

Η διασπορά των μολυσμάτων πραγματοποιείται με το νερό της βροχής καθώς και του ποτίσματος, τα υπολείμματα της καλλιέργειας, τα ζιζάνια, με το έδαφος που μεταφέρεται μέσω των γεωργικών μηχανημάτων και τέλος με το μολυσμένο πολλαπλασιαστικό υλικό (μοσχεύματα, εμβόλια, κόνδυλοι πατάτας, σπόρος) όπου πραγματοποιείται μεταφορά του παθογόνου σε μεγάλες αποστάσεις.

Η βερτισιλλίωση είναι μια τυπικά εδαφογενής ασθένεια. Όμως έχει παρατηρηθεί και μόλυνση των δένδρων (π.χ. ελιάς) μέσω πληγών κλαδέματος. Αυτό μπορεί να συμβεί μόνο στην περίπτωση όπου υπάρχει άφθονο μόλυσμα στο σημείο τομής του ασθενούς δένδρου και στη συνέχεια δεν ακολουθήσει απολύμανση των κλαδευτήρων. Σε φυσικές όμως συνθήκες οι πιθανότητες μόλυνσης των δένδρων από τα υπέργεια μέρη είναι πολύ μικρές (Παναγόπουλος, 2007).

1.4 Τρόποι αντιμετώπισης της βερτισιλλίωσης

Η βερτισιλλίωση είναι ευρύτατα διαδεδομένη σε όλο τον κόσμο εξαιτίας του μεγάλου εύρους ξενιστών που προσβάλλει και έχει ιδιαίτερη οικονομική σημασία στις περισσότερες χώρες εξαιτίας της αδυναμίας καταπολέμησης της με τα υπάρχοντα σήμερα διασυστηματικά μυκητοκτόνα (Παναγόπουλος, 1995) καθώς επίσης και την ικανότητα του μύκητα να επιβιώνει με την μορφή των μικροσκληρωτίων σε φυτικά υπολείμματα που βρίσκονται στην επιφάνεια του εδάφους ή σε κάποιο βάθος του κάνει ιδιαίτερα οξύ το πρόβλημα αντιμετώπισης της (Pegg, 1984).

Ι ΕΙΣΑΓΩΓΗ

Εξαιτίας του γεγονότος ότι δεν υπάρχει χημική καταπολέμηση, η αντιμετώπιση της ασθένειας πραγματοποιείται συνήθως με τη χρήση ανθεκτικών ποικιλιών και με καλλιεργητικές πρακτικές που στοχεύουν στη μείωση του πληθυσμού του παθογόνου στο έδαφος.

1.4.1 Ανθεκτικές ποικιλίες

Η ιδανική αντιμετώπιση ασθενειών που οφείλονται στην παρουσία εδαφογενών παθογόνων επιτυγχάνεται με τη χρησιμοποίηση ανθεκτικών ή ανεκτικών γενοτύπων, Η μέθοδος αυτή είναι οικονομική και προστατεύει το περιβάλλον (Krikun *et al.*, 1982). Για την αντιμετώπιση της βερτισιλώσης έχουν δημιουργηθεί ανθεκτικές ή ανεκτικές ποικιλίες και υβρίδια διαφόρων κηπευτικών, καθώς επίσης ανθεκτικές ποικιλίες καρποφόρων δένδρων που χρησιμοποιούνται ως υποκείμενα. Όμως στους περισσότερους ξενιστές, δεν έχει βρεθεί οικονομικά αποδεκτή αντοχή στο μύκητα *V. dahliae* (Fravel, 1989). Γι' αυτό η αντιμετώπιση της βασίζεται κυρίως σε διάφορες προληπτικές επεμβάσεις. Χαρακτηριστικό παράδειγμα αποτελεί η περίπτωση της τομάτας όπου η χρήση ανθεκτικών ποικιλιών αποτελεί ένας από τους σημαντικότερους τρόπους αποφυγής προσβολής μυκήτων που προκαλούν βερτισιλώση. Η φυλή 1 είναι εκείνη που είναι περισσότερο διαδεδομένη στην Ελλάδα αλλά όμως οι περισσότερες ποικιλίες ή υβρίδια τομάτας που καλλιεργούνται στη χώρα μας δεν προσβάλλονται γιατί έχουν το αντίστοιχο γονίδιο αντοχής στη φυλή 1 ενώ όσον αφορά τη φυλή 2 που διαπιστώθηκε σε μερικές περιοχές της Κρήτης φαίνεται να προσβάλλει τη τομάτα γιατί δεν υπάρχουν ποικιλίες τομάτας ανθεκτικές στη φυλή αυτή (Παναγόπουλος 2007).

1.4.2 Απολύμανση εδάφους

Παλαιότερα η απολύμανση του εδάφους γινόταν με χημικά όπως το βρωμιούχο μεθύλιο όπου και έδινε εξαιρετικά αποτελέσματα για την αντιμετώπιση της ασθένειας. Όμως η χρήση αυτού του ισχυρού απολυμαντικού εδάφους, βρέθηκε να είναι επικίνδυνη για την υγεία των χρηστών κατά την εφαρμογή, επιβαρύνει τα προϊόντα με επικίνδυνα για την υγεία των καταναλωτών υπολείμματα φαρμάκων, μολύνει το υπόγειο νερό και διαχέεται στην ατμόσφαιρα, όπου μειώνει τη στοιβάδα του όζοντος με αποτέλεσμα να αυξάνεται η υπεριώδης ακτινοβολία που φθάνει στην επιφάνεια της γης, η οποία προκαλεί καρκίνο του δέρματος. Γι' αυτό αποφασίστηκε η απαγόρευση του στη γεωργία το 2005 στην Ευρωπαϊκή Ένωση και στις υπόλοιπες αναπτυσσόμενες χώρες το έτος 2015 (Πρωτόκολλο του Μόντρεαλ) (Ζιώγας και Μαρκόγλου, 2007).

Ι ΕΙΣΑΓΩΓΗ

Σήμερα η πιο αποτελεσματική μέθοδος αντιμετώπισης της ασθένειας θεωρείται αυτή της ηλιοαπολύμανσης που έχει δώσει ως τώρα ενθαρρυντικά αποτελέσματα τόσο σε θερμοκηπιακές όσο και σε υπαίθριες καλλιέργειες. Αποτελεί μια υδροθερμική μέθοδο, που η θερμότητα της ηλιακής ακτινοβολίας απορροφάται από το υγρό έδαφος το οποίο τους καλοκαιρινούς μήνες είναι καλυμμένο με φύλλο λεπτού και διαφανούς πολυαιθυλενίου. Στη συνέχεια προκαλείται αύξηση της θερμοκρασίας του εδάφους με αποτέλεσμα τη δημιουργία δυσμενών συνθηκών θερμοκρασίας και υγρασίας στο έδαφος για την επιβίωση φυτοπαθογόνων μικροοργανισμών (Tjamos *et al.*, 1991; Lopez-Escudero & Blanco-Lopez, 2001). Η θερμότητα που προέρχεται από την ηλιακή ακτινοβολία παγιδεύεται με αποτέλεσμα η θερμοκρασία στα πρώτα 5 εκ. του εδάφους να φτάνει μέχρι και τους 52-53 °C ενώ στο απόλυτο η μέγιστη θερμοκρασία του εδάφους είναι 37-38 °C (Helena & Tjamos, 1992).

1.4.3 Καλλιεργητικές τεχνικές

Η έννοια της αμειψισποράς για τη διαχείριση της ασθένειας είναι ίσως μία από τις παλαιότερες καλλιεργητικές πρακτικές στο τομέα της γεωργίας (Cook, 1991). Η αμειψισπορά φαίνεται να αποτελεί σήμερα μια ενδιαφέρουσα μέθοδο αντιμετώπισης της βερτισιλλίωσης στα είδη των φυτών στα οποία δεν υπάρχουν ανθεκτικές ποικιλίες. Όμως η επιτυχία της εξαρτάται από πάρα πολλούς παράγοντες όπως π.χ. η πυκνότητα του μολύσματος, οι καλλιεργητικές συνθήκες της περιοχής καθώς επίσης και από τα φυτικά είδη που χρησιμοποιούνται. Ωστόσο η πολυετής επιβίωση του μύκητα μέσω των δομών που σχηματίζει (μικροσκληρώτια) και η ικανότητα του να μολύνει μεγάλο εύρος ξενιστών μπορεί να μειώσει την αποτελεσματικότητα αυτής της πρακτικής (Subbarao *et al.*, 2007). Επίσης συνιστώνται (Παναγόπουλος, 2007):

- 1) Αποφυγή συγκαλλιέργειας ευπαθών ειδών με άλλα ευπαθή είδη
- 2) Αποφυγή δημιουργίας πληγών με καλλιεργητικά εργαλεία στην περιοχή του λαιμού και των ριζών, η συστηματική καταπολέμηση των ζιζανίων,
- 3) Εκρίζωση και η καταστροφή των μολυσμένων φυτών
- 4) Καταστροφή των υπολειμμάτων της προηγούμενης καλλιέργειας.
- 5) Αποφυγή άρδευσης με τη μέθοδο της κατάκλισης αλλά με συστήματα που δεν ευνοούν τη μετάδοση του μολύσματος όπως στάγδην άρδευση
- 6) Αποφυγή υπερβολικής αζωτούχου λίπανσης
- 7) Χρήση υγιούς πολλαπλασιαστικού υλικού (σπόρος, υποκείμενα)

1.5 Βιολογική αντιμετώπιση

Ένας άλλος τρόπος αντιμετώπισης, πολλά υποσχόμενος με μελλοντικές ελπίδες που κατακτά όλο και περισσότερο έδαφος στον τομέα της γεωργίας, αποτελεί η χρήση βιολογικών παραγόντων έναντι φυτοπαθογόνων μυκήτων και βακτηρίων. Η βιολογική αντιμετώπιση αναφέρεται στη σκόπιμη χρήση εισαγόμενων ή διαβιούντων στο περιβάλλον του φυτού μικροοργανισμών, με σκοπό την καταστολή των δραστηριοτήτων του πληθυσμού ενός ή περισσότερων παθογόνων (Τζάμος, 2007).

Στις ημέρες μας αυξάνεται όλο και περισσότερο η απαίτηση των καταναλωτών για γεωργικά προϊόντα με όσον τον δυνατόν λιγότερα χημικά κατάλοιπα, η ανάγκη μείωσης του κόστους παραγωγής αλλά και η αποτελεσματική αντιμετώπιση των παθογόνων με κατεύθυνση την οικολογική ισορροπία των οικοσυστημάτων καθώς ο παράγον περιβάλλον και η προστασία του αποτελούν κύριο θέμα. Τα τελευταία χρόνια διερευνώνται διεξοδικώς διάφοροι βιολογικοί παράγοντες όπου η θετική βιολογική τους δράση μπορεί να οφείλεται στους εξής ακόλουθους μηχανισμούς (Ζιώγας και Μαρκόγλου, 2007):

- Ανταγωνισμός του βιολογικού παράγοντα με το παθογόνο για θρεπτικά συστατικά ή για θέση στο φυτό ξενιστή
- Παραγωγή διάφορων αντιμικροβιακών ενώσεων (αντιβίωση)
- Παρασιτισμός
- Επαγωγή της διασυστηματικής ανοχής των φυτών

Ανταγωνισμός για θέση ή θρεπτικά συστατικά

Ο τροφικός ανταγωνισμός των μικροοργανισμών πραγματοποιείται για τα βασικά θρεπτικά στοιχεία και για την περιοχή της ριζόσφαιρας ή της φυλλόσφαιρας. Αυτός ο ανταγωνισμός αποσκοπεί στην αποστέρηση των θρεπτικών συστατικών στο παθογόνο που μπορεί να οδηγήσει στη μείωση της δράσης του. Υπάρχει όμως και περίπτωση ο βιολογικός παράγοντας να ανταγωνίζεται το παθογόνο στην κατάληψη χώρου στην επιφάνεια ή στο εσωτερικό του φυτού ξενιστή λόγω της γρήγορης εξάπλωσης και ανάπτυξης του (Τζάμος, 2007).

Το πιο χαρακτηριστικό παράδειγμα αποτελεί ο θρεπτικός ανταγωνισμός για σίδηρο. Το στοιχείο του σιδήρου βρίσκεται σε άφθονες ποσότητες στο έδαφος με τις περισσότερες από αυτές να είναι σε μορφή του υδροξειδίου του σιδήρου όπου είναι αδιάλυτες στο νερό (pH 7,4) και η συγκέντρωση του σιδήρου μπορεί να είναι πολύ χαμηλή ($10^{-18}M$). Όμως αυτή η συγκέντρωση είναι πολύ χαμηλή για να στηρίξει την ανάπτυξη των μικροοργανισμών, οι

Ι ΕΙΣΑΓΩΓΗ

οποίοι χρειάζονται συγκεντρώσεις περίπου 10^{-6} Μ. Για να επιβιώσουν σε ένα τέτοιο περιβάλλον τα βακτήρια, έχουν αναπτύξει μηχανισμούς δέσμευσης σιδήρου όπου περιλαμβάνει ένα σιδηροφόρο που δεσμεύει τον τρισθενή σίδηρο και μία πρωτεΐνη που επανεισάγει το σίδηρο μέσα στο βακτηριακό κύτταρο (Neilands & Nakamura, 1991). Έτσι με αυτό τον τρόπο συμβάλλουν στο περιορισμό ιόντων σιδήρου στη ριζόσφαιρα όπου εμποδίζεται ο πολλαπλασιασμός πολλών φυτοπαθογόνων μικροοργανισμών λόγω έλλειψης σιδήρου (Chet *et al.*, 1990). Χαρακτηριστικό παράδειγμα αποτελεί το βακτήριο *Pseudomonas fluorescens*. Οι Kloeppe *et al.*, 1980 ήταν οι πρώτοι που απέδειξαν την σημαντικότητα της παραγωγής των σιδηροφόρων ως μηχανισμό βιολογικής αντιμετώπισης του βακτηρίου *Erwinia caratovora* από αρκετά στελέχη του βακτηρίου *Pseudomonas fluorescens* A1, BKQ, TL3B1 και B10. Επίσης μπορεί να αναφερθεί και η περίπτωση του στελέχους *Pseudomonas putida* το οποίο έχει την ικανότητα παραγωγής σιδηροφόρων οι οποίοι σε συγκέντρωση σιδήρου μικρότερη από 10^{-16} Μ μπορούν να εμποδίζουν την ανάπτυξη του παθογόνου μύκητα *Fusarium oxysporum* (Neilands & Nakamura, 1991).

Αντιβίωση

Η παραγωγή αντιμικροβιακών ενώσεων από βιολογικούς παράγοντες έχει σημαντικό ρόλο στην ανταγωνιστική δράση των βιολογικών παραγόντων κατά εδαφογενών φυτοπαθογόνων μικροοργανισμών. Ο μηχανισμός στηρίζεται στην παραγωγή τοξικών δευτερογενών μεταβολιτών που είναι ιδιαίτερα αποτελεσματικά στην καταστολή φυτοπαθογόνων μικροοργανισμών (Τζάμος, 2007). Η αντιβίωση είναι ένα πολύ κοινό φαινόμενο, υπεύθυνο για τη δράση πολλών βιολογικών παραγόντων όπως των φθορίζουσων στελεχών του βακτηρίου *Pseudomonas* spp. καθώς και των στελεχών των γενών *Bacillus* spp., *Streptomyces* spp. και *Trichoderma* spp. Τα αντιβιοτικά για να είναι αποτελεσματικά θα πρέπει να παράγονται σε επαρκείς ποσότητες κοντά στο παθογόνο (Thomashow *et al.*, 2002). Επίσης αρκετά στελέχη είναι γνωστό ότι παράγουν πολλαπλά αντιβιοτικά τα οποία μπορούν να καταστείλουν ένα ή περισσότερα παθογόνα. Χαρακτηριστικό παράδειγμα αποτελεί το στέλεχος *Bacillus cereus* UW85 το οποίο είναι γνωστό ότι παράγει zwittermycin (Silo-Suh *et al.*, 1994) και kanosamine (Milner *et al.*, 1996). Παρακάτω αναφέρονται μερικά παραδείγματα αντιβιοτικών:

Ι ΕΙΣΑΓΩΓΗ

Αντιβιοτικά	Βιολογικός παράγοντας	Παθογόνο	Βιβλιογραφία
2, 4-diacetyl-phloroglucinol	<i>Pseudomonas fluorescens</i> F113	<i>Pythium</i> spp.	Shanahan <i>et al.</i> , (1992)
Agrocin 84	<i>Agrobacterium radiobacter</i>	<i>Agrobacterium tumefaciens</i>	Kerr (1980)
Bacillomycin D	<i>Bacillus subtilis</i> AU195	<i>Aspergillus flavus</i>	Moyne <i>et al.</i> , (2001)
Bacillomycin, fengycin	<i>Bacillus amyloliquefaciens</i> FZB42	<i>Fusarium oxysporum</i>	Koumoutsis <i>et al.</i> , (2004)
Xanthobaccin A	<i>Lysobacter</i> sp. SB-K88	<i>Aphanomyces cochlioides</i>	Islam <i>et al.</i> , (2005)
Gliotoxin	<i>Trichoderma virens</i>	<i>Rhizoctonia solani</i>	Wilhite <i>et al.</i> , (2001)
Herbicolin	<i>Pantoea agglomerans</i> C9-1	<i>Erwinia amylovora</i>	Sandra <i>et al.</i> , (2001)
Iturin A	<i>B. subtilis</i> QST713	<i>Botrytis cinerea</i> and <i>R. solani</i>	Paulitz and Belanger (2001), Kloepper <i>et al.</i> , (2004)
Mycosubtilin	<i>B. subtilis</i> BBG100	<i>Pythium aphanidermatum</i>	Leclere <i>et al.</i> , (2005)
Phenazines	<i>P. fluorescens</i> 2-79 and 30-84	<i>Gaeumannomyces graminis</i> var. <i>tritici</i>	Thomashow <i>et al.</i> , (1990)
Pyoluteorin, pyrrolnitrin	<i>P. fluorescens</i> Pf-5	<i>Pythium ultimum</i> and <i>R. solani</i>	Howell and Stipanovic (1980)
Pyrrolnitrin, pseudane	<i>Burkholderia cepacia</i>	<i>R. solani</i> and <i>Pyricularia oryzae</i>	Homma <i>et al.</i> , (1989)
Zwittermicin A	<i>Bacillus cereus</i> UW85	<i>Phytophthora medicaginis</i> and <i>P. aphanidermatum</i>	Smith <i>et al.</i> , (1993)

Παρασιτισμός

Ο παρασιτισμός ενός φυτοπαθογόνου μικροοργανισμού από άλλους μικροοργανισμούς είναι πολύ γνωστό φαινόμενο. Οι μικροοργανισμοί που προκαλούν κυτταρόλυση άλλων μικροοργανισμών είναι ευρέως διαδεδομένοι στα φυσικά οικοσυστήματα. Τα βακτήρια παράγουν ένζυμα όπως πρωτεάσες και χιτινάσες, που προκαλούν αποδόμηση και λύση των τοιχωμάτων των κυττάρων του ξενιστή τους. Γι' αυτό το λόγο πολλά βακτήρια μπορούν να χρησιμοποιηθούν ως βιολογικοί παράγοντες διότι επικάθονται στις υφές ορισμένων μυκήτων και καταστρέφουν τα κυτταρικά τους τοιχώματα. Διάφοροι βιολογικοί ανταγωνιστές μπορούν να χρησιμοποιηθούν εναντίον του μύκητα *Fusarium* και του ωομύκητα *Pythium* (Τζάμος 2007). Επίσης ο παρασιτισμός φυτοπαθογόνων μυκήτων όπως ο *Rhizoctonia solani* από μύκητες που δρουν ως βιολογικοί παράγοντες όπως ο *Trichoderma* spp. (μυκοπαρασιτισμός) είναι μια πολύπλοκη διαδικασία και για αυτό έχουν μελετηθεί εκτενώς (Chet & Baker, 1981). Η αλληλεπίδραση αυτή περιλαμβάνει ανίχνευση, κατευθυνόμενη ανάπτυξη, επαφή και πρόσδεση, συσπείρωση των υφών του *Trichoderma* γύρω από τις υφές του *R. solani*, διάτρηση των κυτταρικών του τοιχωμάτων και αποδόμηση του με την βοήθεια λυτικών ενζύμων (Woo *et al.*, 2006). Παραδείγματα τέτοιων βιολογικών παραγόντων που χρησιμοποιούνται ως μυκοπαράσιτα είναι τα είδη *Coniothyrium minitans* (Jones *et al.*, 2004a) και *Sporidesmium sclerotivorum* (Adams & Fravel, 1993).

1.6 Επαγωγή της διασυστηματικής αντοχής των φυτών (Induced Systemic Resistance/ISR).

Οι διάφοροι μικροοργανισμοί που χρησιμοποιούνται για την αντιμετώπιση φυτοπαθογόνων μικροοργανισμών δραστηριοποιούν τους λανθάνοντες μηχανισμούς αντοχής με αποτέλεσμα να συμβαίνουν σημαντικές βιοχημικές αλλαγές μέσα στο φυτό ώστε να αυξάνουν την αντοχή του και να το προετοιμάζουν σε ενδεχόμενη μόλυνση από ένα δυνητικό παθογόνο (Τζάμος, 2007).

1.6.1 Επαγόμενη από συντηρημένες δομές παθογόνων και μικροοργανισμών (PAMP) διασυστηματική άμυνα (P/MAMPs Triggered Immunity-PTI)

Τα φυτά είναι συνεχώς εκτεθειμένα σε μια ποικιλία μικροβιακών παθογόνων όπως μύκητες, βακτήρια και ιούς. Για να μπορέσουν να αποκρούσουν αυτά τα παθογόνα, θα πρέπει να αναγνωρίσουν τους εισβολείς και να ενεργοποιήσουν γρήγορα και αποτελεσματικά τους μηχανισμούς της άμυνας. Μια πρώτη γραμμή ανθεκτικότητας (βασική ανθεκτικότητα) παρέχεται από ένα σύστημα που αναγνωρίζει ευρείες κατηγορίες παθογόνων. Η συγκεκριμένη

Ι ΕΙΣΑΓΩΓΗ

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). Αυτοί οι διεγέρτες είναι εξελικτικά συντηρημένα μόρια προερχόμενα από παθογόνα όπως, δομικά στοιχεία από το κυτταρικό τοίχωμα του μύκητα ή τα μαστίγια των βακτηρίων. Οι διεγέρτες που έχουν μελετηθεί περισσότερο είναι ο pep13 όπου είναι μια αλληλουχία από 13 αμινοξέα μιας τρανσγλουταμινάσης (transglutaminase) που βρίσκεται στο κυτταρικό τοίχωμα του ωομύκητα *Phytophthora* και ο flg22, που πρόκειται για ένα πεπτίδιο 22 αμινοξέων που προέρχεται από την βακτηριακή πρωτεΐνη φλατζελίνη (flagellin). Στη συνέχεια ειδικοί υποδοχείς αναγνωρίζουν τα PAMP όπου με τη σειρά τους θα ενεργοποιήσουν ειδικές φυτικές αμυντικές αποκρίσεις. Παραδείγματος χάρη ο πρωτεϊνικός υποδοχέας FLS2 αναγνωρίζει το βακατηριακό πεπτίδιο της φλατζελίνης (Bittel *et al.*, 2007, Boller *et al.*, 2009). 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).

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

Σε ένα δεύτερο σύστημα ανθεκτικότητας αναφέρεται η αλληλεπίδραση μεταξύ των προϊόντων των γονιδίων R (Resistance gene-γονίδιο ανθεκτικότητας) και των προϊόντων των γονιδίων Avr (avirulence gene, γονίδιο μη μολυσματικότητας) που προέρχονται από τα παθογόνα όπου στην ουσία είναι κάποιες πρωτεΐνες τελεστές που εισέρχονται 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 (εικόνα 8). Οι πρωτεΐνες ανθεκτικότητας (R πρωτεΐνες) τις κατέχουν τα φυτά ως απάντηση στην έκκριση τελεστών. Αυτή η διαδικασία αναγνώρισης είναι πολύ εξειδικευμένη και συχνά αναφέρεται ως ανθεκτικότητα γονιδίου-προς-γονίδιο (gene-for-gene resistance). Αυτός ο τύπος ανθεκτικότητας είναι εξειδικευμένος ως προς το γονότυπο, που σημαίνει ότι μόνο λίγες ποικιλίες διαθέτουν το κατάλληλο γονίδιο R που μπορεί να αναγνωρίζει ένα συγκεκριμένο προϊόν γονιδίου avr. Παρομοίως, μόνο μερικά στελέχη παθογόνων διαθέτουν γονίδια avr, των οποίων τα προϊόντα αναγνωρίζονται από μια συγκεκριμένη πρωτεΐνη R. Αυτή η συσχέτιση μπορεί να εξηγήσει γιατί συγκεκριμένα είδη φυτών είναι ευάλωτα σε προσβολές από συγκεκριμένα στελέχη παθογόνων και ανθεκτικά σε άλλα. Μια μεταλλαγή σε οποιοδήποτε από τα δύο γονίδια μπορεί να μεταβάλει τη σχέση αυτή (Taiz & Zeiger 2010). Το σύμπλοκο πρωτεΐνης ανθεκτικότητας/τελεστή ενεργοποιεί την επαγόμενη από τελεστές άμυνα (Effector Triggered Immunity-ETI) και την αντίδραση υπερευαισθησίας (Hypersensitive Response-

Ι ΕΙΣΑΓΩΓΗ

HR), η οποία αντιπροσωπεύει μία μορφή κυτταρικού θανάτου στο σημείο προσβολής. 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. Τα περισσότερα από τα γονίδια R κωδικοποιούν πρωτεϊνικούς υποδοχείς και στους εξειδικευμένους διεγέρτες των παθογόνων συμπεριλαμβάνονται πρωτεΐνες και πεπτίδια που προέρχονται από το κυτταρικό τοίχωμα του παθογόνου ή την εξωτερική μεμβράνη του ή από μία διεργασία έκκρισης. Η πρόσδεση αυτών των διεγερτών στους υποδοχείς προειδοποιεί το φυτό για την παρουσία των παθογόνων (Boller, 1995).

Τα προϊόντα των γονιδίων R είναι σχεδόν όλα πρωτεΐνες με μια επαναλαμβανόμενη αλληλουχία αμινοξέων, πλούσια σε λευκίνη, που επαναλαμβάνεται χωρίς ακρίβεια πολλές φορές. Τέτοιες αλληλουχίες μπορεί να συμμετέχουν στην πρόσδεση του διεγέρτη και στην αναγνώριση του παθογόνου. Τα προϊόντα αυτών των γονιδίων εντοπίζονται σε περισσότερες από μια θέσεις στο φυτικό κύτταρο. Άλλα φαίνεται να είναι προσδεμένα στην εξωτερική πλευρά της κυτταρικής μεμβράνης ενώ άλλα μπορεί να βρίσκονται στο κυτταρόπλασμα ανιχνεύοντας είτε μόρια από το παθογόνο που εισέρχονται στο κύτταρο ή αλλαγές στο μεταβολισμό που δείχνουν μόλυνση από παθογόνα (Young, 2000).

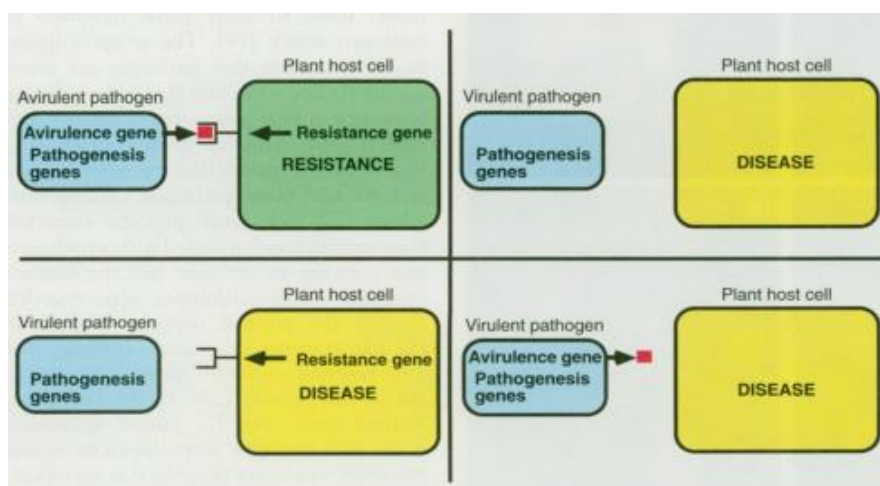
1.6.3 Ενεργοποίηση αμυντικών αποκρίσεων

Στη συνέχεια μέσα σε λίγα λεπτά και στην περίπτωση που αναγνωριστεί ο διεγέρτης του παθογόνου από το προϊόν ενός γονιδίου R ή από έναν άλλο υποδοχέα που λαμβάνει τους MAMPs, αρχίζουν πολύπλοκα μονοπάτια μεταγωγής σήματος που οδηγούν τελικά σε αμυντικές αποκρίσεις. Αφού ενεργοποιηθεί ο υποδοχέας, διεγείρει την είσοδο ιόντων Ca^{2+} και H^+ μέσα στο κύτταρο και την έξοδο ιόντων K^+ και Cl^- (Nurnberger & Scheel 2001). Έπειτα η είσοδος του Ca^{2+} ενεργοποιεί την οξειδωτική έκρηξη και τη παραγωγή μονοξειδίου του αζώτου (Nitric oxide, NO). Πρόκειται για διαδικασίες που προηγούνται πριν εκδηλωθεί η αντίδραση υπερευαισθησίας ή υπερευαίσθητη απόκριση (hypersensitive response).

Η αντίδραση υπερευαισθησίας είναι μία συνήθης αμυντική απόκριση στην οποία τα κύτταρα που γειτνιάζουν με τη θέση μόλυνσης νεκρώνονται γρήγορα, περιορίζοντας με αυτό τον τρόπο της εξάπλωση του παθογόνου στερώντας του θρεπτικά συστατικά. Έτσι παραμένει μια μικρή περιοχή νεκρού ιστού στη θέση της προσπάθειας εισβολής του παθογόνου αλλά το υπόλοιπο φυτό παραμένει ανεπηρέαστο. Το ερέθισμα για την ενεργοποίηση της αντίδρασης υπερευαισθησίας είναι η ταχεία συσσώρευση δραστικών μορφών οξυγόνου και μονοξειδίου του

Ι ΕΙΣΑΓΩΓΗ

αζώτου (NO). Τα κύτταρα στην περιοχή της μόλυνσης συνθέτουν μια αυξημένη ποσότητα τοξικών ουσιών που σχηματίζονται από την αναγωγή μοριακού οξυγόνου, συμπεριλαμβανομένων του σουπεροξειδικού ανιόντος ($O_2^{\cdot-}$) του υπεροξειδίου του υδρογόνου (H_2O_2) και της ελεύθερης ρίζας υδροξυλίου (HO). Μια εξαρτώμενη από το NADPH οξειδάση που εντοπίζεται στην κυτταρική μεμβράνη παράγει $O_2^{\cdot-}$ όπου στη συνέχεια μετατρέπεται σε O_2^- , OH^- και H_2O_2 (Taiz & Zeiger 2010). Οι πιο ισχυρές οξειδωτικές ενώσεις μεταξύ των δραστικών μορφών οξυγόνου είναι οι ελεύθερες ρίζες υδροξυλίου που μπορεί να οδηγήσουν στην υπεροξειδωση λιπιδίων, στην ανενεργοποίηση ενζύμων και στην αποικοδόμηση νουκλεϊκών οξέων (Lamb & Dixon 1997). Η αύξηση της συγκέντρωσης του ασβεστίου στο κυτταρόπλασμα είναι ικανή να ενεργοποιήσει το ένζυμο συνθάση του NO^- . Το μονοξειδίο του αζώτου (NO^-) λειτουργεί ως δευτερογενής αγγελιοφόρος και συντίθεται από το αμινοξύ αργινίνη με το ένζυμο συνθάση του NO^- . Για την ενεργοποίηση της αντίδρασης υπερευαισθησίας είναι απαραίτητη η αύξηση των ιόντων NO^- και των δραστικών μορφών οξυγόνου. Ύστερα από την αντίδραση υπερευαισθησίας επάγεται η επίκτητη διασυστηματική ανοχή όπου στην ουσία είναι η άμυνα των φυτών που αναπτύσσεται ύστερα από την αντίδραση υπερευαισθησίας σε κάποιο παθογόνο και μεταδίδεται διασυστηματικά σε μη προσβεβλημένα μέρη του φυτού (Agrios, 2005). Η διασυστηματική ανοχή μπορεί να ενεργοποιηθεί ύστερα από την αντίδραση υπερευαισθησίας καθώς επίσης από την παραγωγή ενεργών ριζών οξυγόνου (Reactive Oxygen Species, ROS), την παραγωγή αναστολέων πρωτεϊνών, τη δημιουργία τυλώσεων, και τέλος από τη συσσώρευση φυτοαλεξινών. Αναλύοντας τις πρωτεΐνες που σχηματίζονται κατά την επαγωγή της διασυστηματικής ανοχής παρατηρήθηκε ότι πολλές από αυτές ανήκουν στην κατηγορία των PR πρωτεϊνών οι οποίες και διακρίνονται σε 14 οικογένειες (Τζάμος, 2007).



Εικόνα 8: Ταυτόχρονη συμβατότητα γονιδίων αμολυσματικότητας και γονιδίων ανθεκτικότητας (AVR gene - R gene). (Staskawicz *et al.*, 1995)

Ι ΕΙΣΑΓΩΓΗ

Αλλα συστατικά των μονοπατιών μεταγωγής σήματος που διεγείρονται από παθογόνα περιλαμβάνουν το μονοξειδίο του αζώτου, πρωτεϊνικές κινάσες (MAPK) εξαρτώμενες από το ασβέστιο και διάφορες ορμόνες όπως το ιασμονικό οξύ, το αιθυλένιο και το σαλικυλικό οξύ τα οποία με τη σειρά τους ενεργοποιούν διάφορα βιοχημικά μονοπάτια που σχετίζονται με τη βιοσύνθεση αντιμικροβιακών ενώσεων (φυτοαλεξίνες, πρωτεΐνες παθογενέσεως) (Taiz & Zeiger 2010).

Μια άλλη αμυντική απόκριση σε μολύνσεις είναι ο σχηματισμός υδρολυτικών ενζύμων που προσβάλλουν το κυτταρικό τοίχωμα του παθογόνου. Πρόκειται για υδρολυτικά ένζυμα όπως γλυκανάσες, χιτινάσες κ.α που επάγονται από την εισβολή του μύκητα. Αυτά τα υδρολυτικά ένζυμα ανήκουν σε μια ομάδα πρωτεϊνών που σχετίζονται στενά με μολύνσεις παθογόνων και αναφέρονται ως «πρωτεΐνες παθογένεσης (PR proteins). Ο σχηματισμός αυτών των πρωτεϊνών επάγεται διασυστηματικά στο φυτό και όχι μόνο τοπικά στο σημείο μόλυνσης, με σκοπό τον περιορισμό της εξάπλωσης του παθογόνου (Van Loon & Van Strien 1999).

Αξίζει να αναφερθεί ότι ήταν δύσκολο να εκτιμηθεί πειραματικά η χρησιμότητα του κυτταρικού θανάτου στην ανθεκτικότητα γονιδίου προς γονίδιο επειδή ο κυτταρικός θάνατος είναι σημαντικό χαρακτηριστικό αυτής τις απόκρισης. Ωστόσο όμως κάποιες μελέτες έχουν δώσει ενδείξεις ότι η αντίδραση υπερευαισθησίας δεν απαιτείται πάντα στην ανθεκτικότητα γονιδίου προς γονίδιο. Αυτό συμβαίνει διότι η οξειδωτική έκρηξη, η παραγωγή σαλικυλικού οξέος και η επαγωγή της έκφρασης των PR γονιδίων, που αποτελούν απαραίτητα χαρακτηριστικά της ανθεκτικότητας γονιδίου προς γονίδιο, ενεργοποιούνται πριν από την αντίδραση υπερευαισθησίας (Hammond-Kosack & Jones 1996; Dixon *et al.*, 1994).

1.6.4 Η σημασία του σαλικυλικού οξέος και του ιασμονικού/αιθυλενίου ως σήματα για τη διέγερση λανθανόντων μηχανισμών αμύνης των φυτών

Την έκφραση του γονιδίου *PR1* (*Pathogenesis-related gene 1*) επάγει η παρουσία του σαλικυλικού οξέος και συνεπώς η υπερέκφραση του είναι δείκτης της ενεργοποίησης του μηχανισμού άμυνας που εξαρτάται από το σαλικυλικό οξύ (Feys *et al.*, 2000). Το σαλικυλικό οξύ παράγεται στους χλωροπλάστες των φυτών. Είναι προϊόν του μεταβολισμού των φαινυλοπροπανοειδών και έχει φυσικές ιδιότητες που το καθιστούν ιδανικό για τη μεταφορά του μέσα στον ηθμό. Πιστεύεται ότι το σαλικυλικό οξύ έχει καίριο λόγο στη διάχυση-μεταφορά του σήματος μετά τη μόλυνση από το παθογόνο. Τέλος θεωρείται ότι είναι διεγέρτης της συσσωρεύσεως και άλλων πρωτεϊνών σχετικών με την παθογένεση (PR πρωτεϊνών) εκτός από την PR1. (Τζάμος, 2007). Η οικογένεια πρωτεϊνών PR1 έχει μελετηθεί εκτενώς σε σχέση με

Ι ΕΙΣΑΓΩΓΗ

τις υπόλοιπες πρωτεΐνες παθογενέσεως παρόλο που η δράση της δεν έχει ακόμα διευκρινιστεί όπως παραδείγματος χάρη οι PR2, PR3 κ.α. που έχουν χαρακτηριστεί ως χιτινάσες και β-1,3-γλουκανάσες οι οποίες έχουν την ικανότητα να υδρολύουν το κυτταρικό τοίχωμα των μυκήτων. Η συσσώρευση των PR1 πρωτεϊνών 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.*, 2006). Επιπλέον αναφέρεται ότι 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 της πρωτεΐνης 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 & Mangiste 2010).

Το ιασμονικό οξύ (jasmonic acid, JA) και ο μεθυλιωμένος εστέρας του, παράγονται κατά το μεταβολισμό των λιπαρών οξέων από το λινολενικό οξύ και έχει παρατηρηθεί ότι παρουσία ιασμονικού οξέος παράγονται πληθώρα πρωτεϊνών που χαρακτηρίζονται από αντιμυκητιακή δράση όπως (Τζάμος, 2007). Αξίζει να αναφερθεί ότι η σύνδεση του αιθυλενίου με το ιασμονικό οξύ έγινε εμφανής στην περίπτωση των ντιφενσινών (defensin PDF 1.2) που παρατηρήθηκε ότι η παραγωγή αυτών των πρωτεϊνών είναι αποτέλεσμα συνεργασίας και των δύο μονοπατιών (Penninckx *et al.*, 1996). 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 αντιμυκητιακής 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).

Ι ΕΙΣΑΓΩΓΗ

Επίσης έχει αναφερθεί ότι η έκθεση σε μη παθογόνους μικροοργανισμούς μπορεί να αυξήσει την ανθεκτικότητα των φυτών σε μελλοντικές επιθέσεις παθογόνων, μέσω της ανάπτυξης της επαγόμενης συστηματικής αντοχής. Μη παθογόνοι μικροοργανισμοί όπως τα ριζοβακτήρια ενεργοποιούν σηματοδοτικά μονοπάτια, στα οποία συμμετέχουν το ιασμονικό οξύ και το αιθυλένιο, που πυροδοτούν την επαγόμενη διασυστηματική αντοχή σε όλη την έκταση του φυτού. Η επαγόμενη διασυστηματική αντοχή χαρακτηρίζεται μάλλον από αυξημένα επίπεδα προετοιμασίας του φυτού έναντι επιθέσεων από παθογόνους οργανισμούς, παρά από ενεργοποίηση άμεσων αμυντικών μέτρων (Taiz & Zeiger 2010). Επίσης σύμφωνα με τους Tuzun & Bent 2005 αναφέρεται ότι κάποια ριζοβακτήρια μπορούν να ενεργοποιήσουν και τη δράση του σαλικυλικού οξέος.

1.7 Ο βιολογικός παράγοντας *Paenibacillus alvei* K165

Έχει διαπιστωθεί ή ύπαρξη συγκεκριμένων στελεχών μη παθογόνων ριζοβακτηρίων τα οποία έχουν την ικανότητα να προστατεύουν τα φυτά από παθογόνα, διεγείροντας λανθάνοντες μηχανισμούς αντοχής των φυτών (Τζάμος, 2007). Τα ριζοβακτήρια τα οποία αποικίζουν τη ρίζα και επάγουν τη διασυστηματική αντοχή των φυτών ανήκουν στα είδη *Pseudomonas fluorescens*, *Pseudomonas putida*, *Bacillus pumilus*, *Serratia marcescens*, *Paenibacillus alvei*, *Acinetobacter lwoffii*, *Chryseobacterium balustinum* και *Azospirillum brasilense* (Van Loon, 2007).

Σύμφωνα με τους Kloepper & Schroth 1981 τα αυξητικά ριζοσφαιρικά βακτήρια (Plant Growth Promoting Rizobacteria, PGPR) προάγουν την ανάπτυξη των φυτών και αυτό λαμβάνει χώρα λόγω του ότι μεταβάλλει ολόκληρη την μικροβιακή κοινότητα στη ριζόσφαιρα μέσω της παραγωγής διάφορων ουσιών. Σε γενικές γραμμές τα αυξητικά ριζοσφαιρικά βακτήρια προάγουν την ανάπτυξη των φυτών είτε άμεσα διευκολύνοντας της απόκτηση στοιχείων (άζωτο, φώσφορο και βασικά μέταλλα) ή ρυθμίζοντας τα επίπεδα των ορμονών των φυτών είτε έμμεσα με τη μείωση των ανασταλτικών επιδράσεων των διάφορων παθογόνων στην ανάπτυξη των φυτών (Glick, 2012).

Έχει αναφερθεί ότι το 80% των μικροοργανισμών που απομονώνονται από τη ριζόσφαιρα διάφορων καλλιεργειών, κατέχουν την ικανότητα να συνθέτουν αλλά και να απελευθερώνουν αυξίνες ως δευτερογενείς μεταβολίτες (Patten & Glick, 1996). Το ινδολ-3-οξικό οξύ που εκκρίνεται από αυτά τα ριζοβακτήρια παρεμβαίνει στις αναπτυξιακές διαδικασίες των φυτών διότι το ινδολ-3-οξικό οξύ το οποία εκκρίνεται από τα βακτήρια του εδάφους μεταβάλλει το επίπεδο της ενδογενούς αυξίνης ενός φυτού (Glick, 2012; Spaepen *et al.*, 2007).

Ι ΕΙΣΑΓΩΓΗ

Τα βακτήρια του γένους *Paenibacillus* μπορεί να έχουν χρώση Gram θετική ή αρνητική και σχηματίζουν ενδοσπόριο. Έχουν άριστη θερμοκρασία ανάπτυξης 28-30 °C και μπορεί να είναι είτε προαιρετικά αναερόβιοι ή υποχρεωτικά αερόβιοι μικροοργανισμοί. Το 1993 κατατάχθηκε ως ξεχωριστό γένος αφού μέχρι τότε συμπεριλαμβανόταν στο γένος *Bacillus*. Πιο συγκεκριμένα τα βακτήρια του είδους *Paenibacillus alvei* είναι προαιρετικά αναερόβια με θετική ή αρνητική χρώση Gram (Ash *et al.*, 1993). Το γένος *Paenibacillus* περιλαμβάνει γνωστά είδη όπως το *P.larvae* το οποίο είναι υπεύθυνο για την αμερικάνικη σιπιγωνία της κυρήθρας της μέλισσας και το *P.polymyxa* που μετατρέπει το ατμοσφαιρικό άζωτο σε αμμωνία, παράγοντας αντιβιοτικά καθώς επίσης και αυξίνες (Iebuhn *et al.*, 1997).

Το στέλεχος K165 του βακτηρίου *P. alvei* απομονώθηκε το 2004 από τους Tjamos *et al.* από τα ακροορίζια φυτών *Lycopersicum esculentum* (τομάτα) που καλλιεργήθηκαν σε ηλιοαπολυμανθέν έδαφος. Μέσα από διάφορα πειράματα αποδείχθηκε η θετική του επίδραση στην ανάπτυξη φυτών *Solanum melongena* (μελιτζάνας) και *Solanum tuberosum* (πατάτας) (Tjamos *et al.*, 2004).

Στην προσπάθεια της βιολογικής αντιμετώπισης του μύκητα *V. dahliae* απομονώθηκε και αξιολογήθηκε το βακτήριο *P. alvei* K165 ως παράγοντας βιολογικής αντιμετώπισης (biocontrol agent, BCA) όπου και διαπιστώθηκε, τόσο σε φυτά θερμοκηπίου όσο και σε αγρού, η ικανότητά του να προστατεύει τα φυτά. Αποδείχθηκε ότι είναι ικανό να επάγει τους μηχανισμούς άμυνας των φυτών *A.thaliana* μέσω του μονοπατιού του σαλικυλικού οξέος ύστερα από απώλεια προστασίας του σε μεταλλαγμένα φυτά *eds5/sid1* (enhanced disease susceptibility), *sid2* (SA-induction deficient) και *npr1-1* (non-expressing NPR1 protein), ενώ σε μεταλλαγμένα *etr1-1* (insensitive to ethylene) και *jar1-1* (insensitive to jasmonate) φάνηκε ότι δεν επηρεάζεται η σοβαρότητα της ασθένειας με το K165 να συνεχίζει να προσδίδει ανθεκτικότητα στο φυτό (Tjamos *et al.*, 2005). Επίσης το βακτήριο K165 ήταν αναποτελεσματικό σε μεταλλαγμένα φυτά *Arabidopsis fls2, efr1, bak 1-4, mpk3, mpk6* και *wrky22* (Gkizi *et al.*, 2016). Ακόμα έχει παρατηρηθεί ότι το στέλεχος K165 μειώνει τη βλαστική ικανότητα των μικροσκληρωτίων του μύκητα *V. dahliae* (Antonopoulos *et al.*, 2008) Επίσης πρόσφατα αναφέρθηκε και ένα μη παθογόνου στέλεχος του *Fusarium oxysporum*, το F2, ως αποτελεσματικός παράγοντας για την αντιμετώπιση του μύκητα *V. dahliae* όπου αποδείχθηκε ότι μειώνει το σχετικό εμβαδό ασθένειας μέχρι και τέσσερις φορές σε σύγκριση με το μάρτυρα (Malandraki *et al.*, 2008; Pantelides *et al.*, 2009). Ακόμα το βακτήριο *Pseudomonas fluorescens* παρουσίασε σοβαρή παρεμπόδιση στην ανάπτυξη του παθογόνου (Mercado-Blanco *et al.*, 2004).

1.8 Το φυτό *Arabidopsis thaliana*

Το σημαντικότερο από επιστημονική άποψη μέλος της οικογένειας των *Brassicaceae* αποτελεί το *Arabidopsis thaliana* που χαρακτηρίζεται ως το καταλληλότερο φυτό πρότυπο για μελέτες βιοχημείας και φυσιολογίας φυτών. Είναι ένα μικρό δικοτυλήδονο σταυρανθές φυτό που ανακαλύφθηκε από τον Johannes Thal τον 16ο αιώνα. Είναι ιθαγενές της Ευρώπης, της Ασίας και της νοτιοδυτικής Αφρικής, αναπτύσσεται το χειμώνα και είναι μονοετές. Τα χαρακτηριστικά που το καθιστούν φυτό πρότυπο είναι τα εξής (Meinke *et al.*, 1998):

- Το γονιδίωμα του είναι διπλοειδές και έχει μέγεθος περίπου 135Mbp το οποίο συγκριτικά με άλλα φυτά είναι μικρό
- Το γονιδίωμα του δεν είναι ιδιαίτερα πολύπλοκο (λίγες επαναλήψεις μη κωδικού DNA)
- Μικρό βιολογικό κύκλο (διάστημα περίπου 6 εβδομάδων)
- Καλή προσαρμοστικότητα αφού μπορεί να αναπτυχθεί εύκολα σε θάλαμο ανάπτυξης που επικρατούν ιδανικές συνθήκες αλλά και σε θερμοκήπιο
- Παράγει μεγάλο αριθμό σπερμάτων ανά φυτό (περίπου 10,000)
- Δυνατότητα δημιουργίας διαγονιδιακών φυτών με τη χρήση του βακτηρίου *Agrobacterium tumefaciens*. Η δημιουργία μεταλλαγμένων φυτών *A. thaliana* πραγματοποιείται με την βοήθεια του βακτηρίου αυτού το οποίο φέρει το επιθυμητό DNA, με τη βοήθεια του ειδικού πλασμιδίου Ti (tumor inducing) που διαθέτει και εισέρχεται μέσα στο φυτό (Clough & Bent 1998).
- Επιπλέον, αποτελεί το πρώτο φυτό στο οποίο αποκωδικοποιήθηκε πλήρως η γονιδιωματική του ακολουθία, η οποία δημοσιεύτηκε το Δεκέμβριο του 2002 ως αποτέλεσμα της προσπάθειας ετών ερευνητικών ομάδων *Arabidopsis Genome Initiative* (AGI 2000). Το γονιδίωμα του περιλαμβάνει περίπου 27,000 γονίδια τα οποία κωδικοποιούν 35,000 πρωτεΐνες.

Το φυτό *A. thaliana* είναι μικρό σε μέγεθος (20-25cm) και αποτελείται από ένα κεντρικό βλαστό με τα φύλλα του να φύονται στη βάση του φυτού σε μορφή ροζέτας και είναι καλυμμένα με μικρά μονοκύτταρα τριχίδια. Τα άνθη του έχουν μήκος 3 mm και αποτελούνται από 4 σέπαλα, 4 πέταλα και 6 στήμονες. Ο καρπός του είναι κέρας μήκους 5-20 mm και περιέχει 20-30 σπέρματα. Το φυτό δεν έχει καμία εμπορική αξία σε σύγκριση με άλλα είδη της οικογένειας *Brassicaceae* όπως το λάχανο και το μπρόκολο και θεωρείται ζιζάνιο (Meinke *et al.*, 1998).

1.9 Ο ρόλος των αυξινών στα φυτά

Οι αυξίνες ρυθμίζουν πολλές αναπτυξιακές διαδικασίες, συμπεριλαμβανομένων την εμβρυογένεση (Friml *et al.* 2003), την κυριαρχία κορυφής (Reinhardt *et al.* 2000), την επιμήκυνση των κυττάρων (Depuydt & Hardtke 2011), βαρυτροπισμό (Wilson *et al.* 1990; Rashotte *et al.*, 2000), φωτοτροπισμό (Liscum & Briggs 1996), κυτταρική διαίρεση (Wightman & Lighty 1982), το σχηματισμό αγγειακού ιστού (Mattsson *et al.*, 2003) κ.α. Αυτές οι αποκρίσεις φαίνονται να ρυθμίζονται από διαφορετικές διακυμάνσεις των συγκεντρώσεων αυξίνης. Για παράδειγμα, η επιμήκυνση της ρίζας επάγεται από χαμηλότερες συγκεντρώσεις αυξίνης σε σύγκριση με την επιμήκυνση του βλαστού (Thimann, 1937), και η συγκέντρωση αυξίνης για την επιμήκυνση της ρίζας είναι ανεπαρκής για να επάγει το σχηματισμό πλευρικών ριζών (Dubrovsky *et al.*, 2008). Το γεγονός ότι συντίθεται σε μια θέση και μεταφέρεται σε απειροελάχιστες ποσότητες στο σημείο δράσης της την καθιστά αυθεντική φυτική ορμόνη (ενδοκρινείς ορμόνες).

Η πρώτη ουσία που αναγνωρίστηκε ως αυξίνη ήταν το ινδολ-3-οξικό οξύ (Indole-3-acetic acid, IAA), η οποία είναι και η πιο διαδεδομένη αλλά και η καλύτερα μελετημένη αυξίνη στα φυτά. Αρκετές άλλες αυξίνες αποκαλύφθηκαν αργότερα σε ανώτερα φυτά αλλά το ινδολ-3-οξικό οξύ είναι μακράν η αφθονότερη και η πιο σημαντική για το φυτό. Σήμερα έχουν αναγνωριστεί φυσικές αυξίνες, εκτός από το ινδολ-3-οξικό οξύ, το ινδολο-3-βουτυρικό οξύ (indole-3-butyric acid, IBA), το 4-χλωρο-ινδολοξικό οξύ (4-chloro-indole-3-acetic acid, 4-CL-IAA) και το φαινοξυοξικό οξύ (phenyl acetic acid, PAA) (Ludwig-Muller, 2000). Επειδή η δομή του ινδολ-3-οξικού οξέος είναι σχετικά απλή, πανεπιστημιακά και βιομηχανικά εργαστήρια γρήγορα συνέθεσαν ένα μεγάλο αριθμό χημικών ενώσεων με δραστηριότητα αυξίνης. Στις συνθετικές αυξίνες περιλαμβάνονται το 1-ναφθαλινοξικό οξύ (α -NAA), το 2-ναφθαλινοξικό οξύ (β -NAA), το 4-χλωροφαινοξυ-οξικό οξύ (4-CPA), το 2,4-διχλωροφαινοξυ-οξικό οξύ (2,4-D) και το τριχλωροφαινοξυ-οξικό οξύ (2,4,5-T). Οι συνθετικές αυξίνες χρησιμοποιούνται ευρύτατα στη γεωργία, για τη ριζοβολία μοσχευμάτων, την αύξηση ανθοφορίας και τη παρεμπόδιση βλάστησης οφθαλμών κονδύλων και βολβών. Επίσης χρησιμοποιούνται ευρύτατα ως ζιζανιοκτόνα. Τέλος αξίζει να αναφερθεί ότι το ινδολο-3-βουτυρικό οξύ θεωρείται ότι είναι μια μορφή αποθήκευσης που μετατρέπεται στη δραστηκή μορφή ινδολ-3-οξικό οξύ (Sauer *et al.*, 2013). Επίσης το 4-χλωρο-ινδολοξικό οξύ (4-Cl-IAA) εντοπίστηκε σε διάφορα όσπρια και στο *Pinus sylvestris* (Porter & Thimann 1965; Reinecke 1999) αλλά δεν έχει υπάρξει αναφορά για την παρουσία του στο φυτό *A. thaliana*.

Η ανάπτυξη των βλαστών και των ριζών τους ιστούς των φυτών είναι μια εξαιρετικά συντονισμένη διαδικασία που απαιτεί εκτεταμένη σηματοδότηση μεταξύ των διαφόρων ιστών

Ι ΕΙΣΑΓΩΓΗ

για την ενσωμάτωση των περιβαλλοντικών μηνυμάτων με ενδογενή αναπτυξιακό πρόγραμμα του φυτού. Για παράδειγμα, η ανάπτυξη των φύλλων λαμβάνει χώρα σε συμφωνία με τον συνεχή σχηματισμό νέων πλευρικών ριζών, οι οποίες αυξάνουν την ικανότητα των φυτών να προσλάβουν νερό και θρεπτικά συστατικά από το έδαφος. Παρόλο που πρακτικά όλοι οι φυτικοί ιστοί είναι ικανοί να παράγουν χαμηλά έστω επίπεδα ινδολ-3-οξικού οξέος, τα επάκρια μεριστώματα των βλαστών και τα νεαρά φύλλα είναι τα κύρια σημεία σύνθεσης τους. Για αυτό το λόγο πιστεύεται ότι τα εναέρια μέρη του φυτού και ιδιαίτερα τα νεαρά αναπτυσσόμενα φύλλα λειτουργούν ως σημαντική πηγή ινδολ-3-οξικού οξέος για το υπόλοιπο φυτό (Ljung *et al.*, 2001). Επίσης σημαντικά σημεία σύνθεσης της αυξίνης αποτελούν τα επάκρια μεριστώματα των ριζών, ιδιαίτερα καθώς οι ρίζες επιμηκύνονται και ωριμάζουν. Ωστόσο όμως, η ρίζα παραμένει εξαρτημένη από το βλαστό για ένα μεγάλο μέρος αυξίνης που χρειάζεται (Ljung *et al.*, 2005).

1.9.1 Βιοσύνθεση ινδολ-3-οξικού οξέος

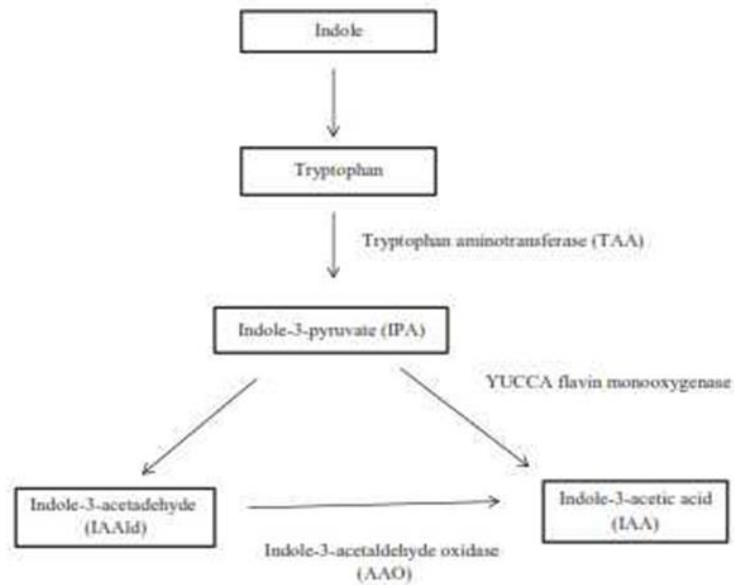
Το αμινοξύ τρυπτοφάνη αποτελεί το κύριο πρόδρομο μόριο για τη σύνθεση του ινδολ-3-οξικού οξέος στα φυτά (Zhao, 2010). Το ινδολ-3-οξικό οξύ βιοσυντίθεται από την τρυπτοφάνη μέσω πολλαπλών μονοπατιών. Η βιοσύνθεση από τη τρυπτοφάνη περιλαμβάνει τέσσερα μονοπάτια:

- το μονοπάτι του ινδολ-3-πυροσταφυλικού οξέος (indole-3-pyruvic acid - IPA)
- το μονοπάτι του ινδολ-3-ακεταλδοξιμικού (indole-3-acetamide - IAM)
- το μονοπάτι της τρυπταμίνης (tryptamine - TAM)
- το μονοπάτι του ινδολ-3-ακετονιτριλίου (indole-3-acetonitrile - IAN) (Park *et al.*, 2003; Lau *et al.*, 2008)

Το μονοπάτι του ινδολ-3-πυροσταφυλικού οξέος είναι το πιο κοινό και πιο καλά μελετημένο βιοσυνθετικό μονοπάτι ινδολ-3-οξικού οξέος στα φυτά (εικόνα 9). Η τρυπτοφάνη μετατρέπεται σε ινδολ-3-πυροσταφυλικό οξύ με τη βοήθεια του ενζύμου αμινοτρανσφεράση της τρυπτοφάνης (Tryptophan aminotransferase of arabidopsis (TAA) που ανήκει στην οικογένεια των αμινοτρανσερασών και στην συνέχεια το ινδολ-3-πυροσταφυλικό οξύ μετατρέπεται σε ινδολ-3-οξικό οξύ μέσω της δράσης του ενζύμου YUCCA (YUC) που ανήκει στην οικογένεια των φλαβινικών μονοξυγενασών (flavin monooxygenases-FMO) (Lau *et al.*, 2008; Stepanova *et al.*, 2008; Won *et al.*, 2011; Mashiguchi *et al.*, 2011; Brumos *et al.*, 2013; Dai *et al.*, 2013) (Εικόνα 9). Η ενζυμική μετατροπή του ινδολ-3-πυροσταφυλικού οξέος μέσω

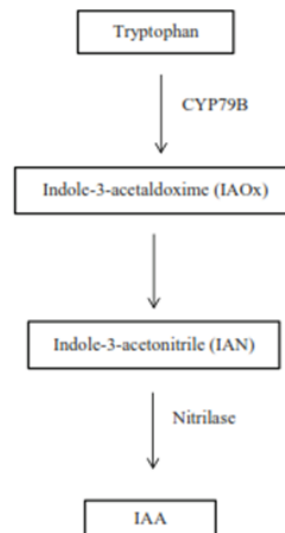
Ι ΕΙΣΑΓΩΓΗ

ενός ενδιάμεσου προϊόντος, την ινδολ-3-ακεταλδεΐδη (IAAld), θεωρείται ότι είναι παρόμοια με αυτήν που διεξάγεται στα βακτήρια, αλλά ακόμα δεν έχει αποδειχθεί άμεσα.



Εικόνα 9: Βιοσύνθεση ινδολ-3-οξικού οξέος μέσω του μονοπατιού ινδολ-3-πυροσταφυλικού οξέος. (Adapted from Won *et al.*, 2011; Mashiguchi *et al.*, 2011)

Το μονοπάτι του ινδολ-3-ακετονιτριλίου (indole-3-acetonitrile - IAN) λειτουργεί μόνο σε ένα μικρό αριθμό φυτικών ειδών, σε αυτό το μονοπάτι η τρυπτοφάνη μετατρέπεται σε ινδολ-3-ακεταλδοξίμη (indole-3-acetaldoxime - IAOx) μέσω της μονοξυγενάσης του κυτοχρώματος P450 της οικογένειας CYP79B (Sugawara *et al.*, 2009). Το IAOx στη συνέχεια μετατρέπεται σε ινδολ-3-ακετονιτριλίου μέσω της δράσης των ενζύμων νιτριλασών (nitrilases) (Park *et al.* 2003) (εικόνα 10).



Εικόνα 10: Βιοσύνθεση ινδολ-3-οξικού οξέος μέσω του μονοπατιού ινδολ-3-ακετονιτριλίου. (Adapted from Zhao *et al.*, 2001; Park *et al.*, 2003; O'Donnel *et al.* 2003; Mashigushi *et al.*, 2011)

Ι ΕΙΣΑΓΩΓΗ

Το μονοπάτι του ινδολ-3-ακεταλδοξιμικού (indole-3-acetamide - IAM) έχει αναφερθεί σε ένα μεγάλο εύρος φυτικών ειδών. Ωστόσο, δεν είναι ακόμα γνωστό πώς το ινδολ-3-ακεταλδοξιμικό παράγεται από την τρυπτοφάνη (Lehmann *et al.*, 2010). Το ινδολ-3-ακεταλδοξιμικό μετατρέπεται σε ινδολ-3-οξικό οξύ μέσω του ενζύμου αμιδάση (Amidase 1, AMI1) στο φυτό *A. thaliana* (Pollmann *et al.*, 2003).

Στο μονοπάτι της τρυπταμίνης (tryptamine - TAM) η τρυπτοφάνη με αποκαρβοξυλίωση μετατρέπεται ταχέως στη Ν-υδροξύ-τρυπταμίνη (N hydroxy TAM - HTAM) μέσω του ενζύμου YUCCA (YUC) που ανήκει στην οικογένεια των φλαβινικών μονοοξυγενασών (Cheng *et al.*, 2007; Quittenden *et al.*, 2009; Mashiguchi *et al.*, 2011). Όμως δεν είναι ακόμη γνωστό το βασικό μονοπάτι μετατροπής της Ν-υδροξύ-τρυπταμίνης σε ινδολ-3-οξικό οξύ (Mashiguchi *et al.*, 2011). Επίσης η βιοσύνθεση του ινδολ-3-οξικού οξέος, ανεξάρτητα από το μονοπάτι της τρυπτοφάνης, έχει προταθεί στα φυτά (Strader & Bartel 2008; Quittenden *et al.*, 2009).

Επειδή το ινδολ-3-οξικό οξύ ρυθμίζει ποικίλες κυτταρικές και αναπτυξιακές αποκρίσεις στα φυτά (κυτταρική διαίρεση-αύξηση-διαφοροποίηση, επιμήκυνση βλαστού-πλάγιων ριζών, ανάπτυξη και ωρίμανση καρπών κ.α) το μονοπάτι σηματοδότησης του ινδολ-3-οξικού οξέος είναι πολύ σημαντικό.

1.9.2 Μεταφορά του ινδολ-3-οξικού οξέος

Δύο κύρια μονοπάτια περιγράφουν την μεταφορά του ινδολ-3-οξικού οξέος, ένα γρήγορο, γνωστό και ως μη πολική μεταφορά όπου πραγματοποιείται μέσω του φλοιώματος και ένα αργό, γνωστό ως πολική μεταφορά (polar auxin transport PAT) που πραγματοποιείται από κύτταρο σε κύτταρο (Kidd *et al.*, 2011). Η απόδειξη για την μεταφορά αυξίνης μέσω του φλοιώματος θεσπίστηκε μέσω πειραμάτων με ραδιενεργά σημασμένο το μόριο της αυξίνης (Morris & Thomas 1978). Αυτή η μεταφορά λαμβάνει χώρα προς δύο κατευθύνσεις και περιγράφεται με τις κατευθύνσεις της κίνησης της, σε σχέση με τη βάση του φυτού. Η αυξίνη που κινείται καθοδικά από το βλαστό ακολουθεί βασιπεταλική φορά (προς τη βάση) ώσπου φθάνει στο κόμβο ρίζας-βλαστού. Επίσης έχει αποδειχθεί ότι κινείται σχετικά γρήγορα με ταχύτητα 5-20 cm/h προς τη βάση του φυτού (Lomax *et al.*, 1995). Από το σημείο αυτό, η καθοδική κίνηση περιγράφεται ως ακροπεταλική (προς το άκρο). Ενώ η ανοδική κίνηση της αυξίνης από το ακροορίζιο προς το κόμβο ρίζας-βλαστού περιγράφεται ως βασιπεταλική (προς τη βάση) (Rashotte *et al.*, 2000). Επίσης αποδείχθηκε ότι εκτός από τις ελεύθερες ενεργές αυξίνες μεταφέρει και τις ανενεργές συζευγμένες μορφές αυξίνης (Nowacki & Bandurski 1980). Πειράματα σε μπιζέλι έδειξαν ότι σημασμένη αυξίνη που μεταφέρεται εντός του

Ι ΕΙΣΑΓΩΓΗ

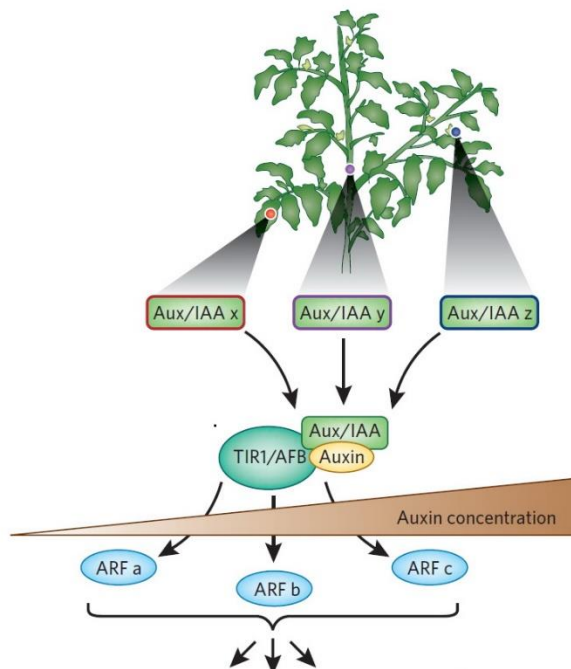
φλοιώματος αργότερα ανιχνεύθηκε και στο σύστημα PAT που δείχνει ότι αυτά τα δύο μονοπάτια μεταφοράς μπορεί να συνδέονται (Cambridge & Morris 1996). Σε αντίθεση με την μεταφορά μέσω του φλοιώματος, η PAT συμβάλλει στη μεταφορά μόνο ενεργών αυξινών που συμβαίνει από κύτταρο σε κύτταρο και όχι μέσω του συμπλάστη. Δηλαδή η αυξίνη εξέρχεται από το κύτταρο μέσω της πλασματικής μεμβράνης, διαχέεται στη μέση πλάκα και εισέρχεται στο επόμενο κύτταρο δια μέσου της πλασματικής του μεμβράνης. Η όλη διαδικασία (εισροή – εκροή αυξίνης) απαιτεί μεταβολική ενέργεια όπως αποδεικνύεται από την ευαισθησία της πολικής μεταφοράς στην έλλειψη O_2 , στη μειωμένη προσφορά σακχαρόζης και στους μεταβολικούς αναστολείς. Γι' αυτό το λόγο το χημειοσωμικό μοντέλο φαίνεται ότι κινεί την πολική μεταφορά (Raven, 1975). Το πρώτο βήμα της πολικής μεταφοράς είναι η εισροή αυξίνης. Εδώ η αυξίνη μπορεί να εισέλθει στο φυτικό κύτταρο μη κατευθυνόμενα, με παθητική διάχυση της πρωτονιωμένης μορφής της (IAAH) δια μέσου της διπλοστοιβάδας των φωσφολιπιδίων ή μέσω μιας δευτερογενούς ενεργητικής μεταφοράς της ανιοντικής μορφής IAA⁻ με έναν συμμετρικό μεταφορέα πρωτονίων ($2H^+ - IAA^-$). Αυτό συμβαίνει επειδή όταν η καρβοξυλομάδα είναι πρωτονιωμένη (IAAH), είναι λιπόφιλη και μπορεί και διαχέεται δια μέσω της διπλοστοιβάδας των μεμβρανών, ενώ το ανιόν της αυξίνης είναι αρνητικά φορτισμένο και δεν μπορεί να διαπεράσει τις μεμβράνες χωρίς βοήθεια διότι το κυτταρικό τοίχωμα διατηρείται σε όξινο pH εξαιτίας της δράσης της $H^+ - ATP$ άσης της πλασματικής μεμβράνης (Goldsmith, 1977). Ένας δευτερογενής, ενεργητικός μηχανισμός πρόσληψης, με τη διαμεσολάβηση μεμβρανικών διακινητών, έχει δειχθεί ότι κορεννύεται από τις δραστικές αυξίνες και εξειδικεύεται για αυτές. Μια μικρή οικογένεια περμεασών, οι πρωτεΐνες AUX1/LAX, είναι συμμεταφορείς που μεταφέρουν δύο πρωτόνια από κοινού με το ανιόν της αυξίνης ($2H^+ - IAA^-$). Εντοπίζονται στην πλασματική μεμβράνη και επιτρέπουν μεγαλύτερη συσσώρευση αυξίνης απ' ότι η απλή διάχυση (Swarup *et al.*, 2001). Επίσης η τοποθέτηση των AUX1 πρωτεϊνών στο ενδοπλασματικό δίκτυο γίνεται με την βοήθεια μιας πρωτεΐνης που εδράζεται στο ενδοπλασματικό δίκτυο η οποία είναι γνωστή ως AXR4 (Auxin Resistant4) (Dharmasiri *et al.*, 2006). Μετά την είσοδο του ινδολ-3-οξικού οξέος στο κυτταρόπλασμα του κυττάρου όπου έχει περίπου ουδέτερο pH (7,2) σχεδόν όλη η ποσότητα του διασπάται στη μορφή του ανιόντος (IAA⁻). Τα ανιόντα εξέρχονται από το κύτταρο μέσω φορέων εκροής, οι οποίοι είναι συγκεντρωμένοι στα άκρα βάσης κάθε κυττάρου κατά μήκος της οδού. Μέλη μιας κύριας υπο-ομάδας που ανήκουν στην οικογένεια πρωτεϊνών μεταφοράς αυξίνης είναι οι PIN πρωτεΐνες (Friml & Palme 2002). Επίσης τα φυτικά κύτταρα περιέχουν ATP- εξαρτώμενους μεταφορείς, που ανήκουν στην P-γλυκοπρωτεϊνική υπο-ομάδα της μεγάλης υπεροικογένειας των ολομεμβρανικών μεταφορέων τύπου ABC (ATP Binding Cassette). Το φυτό *Arabidopsis* περιλαμβάνει 21 μέλη της οικογένειας ABC μεταφορέων όπου τρία μέλη αυτής της οικογένειας έχουν διεξοδικά χαρακτηριστεί ως συμμετέχοντα στη μεταφορά αυξίνης σε καθορισμένους στόχους. Ωστόσο, όταν οι συγκεκριμένες ABC πρωτεΐνες συνυπάρχουν με τις PIN πρωτεΐνες

Ι ΕΙΣΑΓΩΓΗ

στην ίδια θέση του κυττάρου, η εξειδίκευση στη μεταφορά ενισχύεται και οι PIN πρωτεΐνες λειτουργούν συνεργικά με τις ABC ώστε να διεγείρουν την κατευθυνόμενη μεταφορά της αυξίνης (Blakeslee *et al.*, 2005). Επίσης έχουν αναγνωριστεί κάποιες ενώσεις που έχουν χαρακτηριστεί ως συνθετικοί αναστολείς της εκροής αυξίνης (Auxin Efflux Inhibitors, AEI) όπως οι NPA (N-1-ναφθυλοφθαλμικό οξύ), TIBA (2,3,5 τριωδοβενζοϊκό οξύ) και CPD (2-καρβοξυφαινυλο-3-φαινυλοπροπανο-1,3-διόνη) που παρεμποδίζουν την πολική μεταφορά ανταγωνίζοντας την αυξίνη για το ίδιο κέντρο πρόσδεσης στους διακινητές εκροής ενώ στις φυσικούς αναστολείς εκροής αυξίνης περιλαμβάνονται τα φλαβονοειδή όπως η κβερκετίνη (Murphy *et al.*, 2000). Τέλος, έχει αποδειχθεί ότι αναστέλλουν την ικανότητα μεταφοράς που έχουν οι πρωτεΐνες ABC ενώ δεν έχει βρεθεί άμεση αναστολή της ικανότητας που έχουν οι πρωτεΐνες PIN (Peer & Murphy 2007).

1.9.3 Μονοπάτια μεταγωγής Σήματος της Αυξίνης

Σκοπός του μοριακού μηχανισμού της ορμονικής δράσης είναι να ανακατασκευασθεί κάθε βήμα της οδού μεταγωγής σήματος, από την πρόσδεση του στους υποδοχείς ως τη φυσιολογική



Nature Chemical Biology 8, 415–416 (2012)
doi:10.1038/nchembio.943

απόκριση σε αυτό. Όμως στην περίπτωση των αυξινών κάτι τέτοιο δεν είναι δυνατόν, καθώς η αυξίνη επηρεάζει υπερβολικά πολλές φυσιολογικές και αναπτυξιακές διεργασίες. Ωστόσο τα αρχικά βήματα της σηματοδότησης είναι καλά μελετημένα. Τα φυτικά κύτταρα αντιλαμβάνονται το μόριο της αυξίνης ως σήμα χρησιμοποιώντας εξειδικευμένες πρωτεΐνες-αισθητήρες, οι οποίοι ονομάζονται υποδοχείς. Από τη στιγμή που θα γίνει αντιληπτό οι υποδοχείς θα πρέπει να το μεταφέρουν ώστε το σήμα να ενισχυθεί και τελικά να ενεργοποιηθεί η κατάλληλη κυτταρική απόκριση. Οι υποδοχείς το επιτυγχάνουν αυτό τροποποιώντας τη δραστηριότητα άλλων πρωτεϊνών ή χρησιμοποιώντας ενδοκυτταρικά μόρια σηματοδότησης, οι οποίοι ονομάζονται δευτερογενείς αγγελιοφόροι

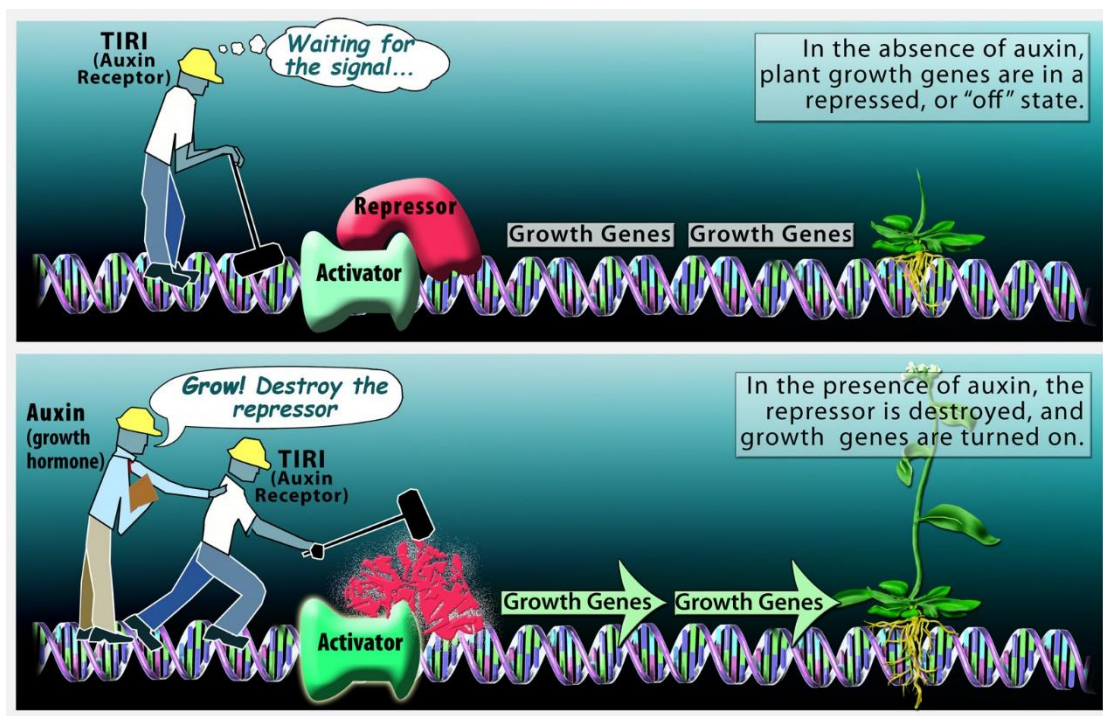
Ι ΕΙΣΑΓΩΓΗ

(second messengers) (Lincoln & Eduardo 2010). Τα μόρια με τη σειρά τους τροποποιούν κυτταρικές λειτουργίες όπως η μεταγραφή. Στα μονοπάτια μεταγωγής του σήματος συμπεριλαμβάνεται:



i. Υποδοχείς αυξίνης

Οι Transport Inhibitor Response 1 (TIR1)/Auxin Signaling F-Box (AFB) πρωτεΐνες, οι οποίες είναι F-box υπομονάδες του συμπλόκου της ουβικουτίνης E3 λιγάσης (Skp1/CUL1/F-Box protein-SCF) έχουν αναγνωρισθεί ως υποδοχείς της αυξίνης (Dharmasiri *et al.*, 2005; Tan *et al.*, 2007; Parry *et al.*, 2009; Hayashi, 2012). Η αυξίνη συνδέεται με τις πρωτεΐνες TIR1/AFB και πιο συγκεκριμένα το ινδολ-3-οξικό οξύ δεσμεύεται στην επιφάνεια των πρωτεϊνών TIR1/AFB μέσω υδρόφοβων δεσμών και δεσμών υδρογόνου (Hayashi, 2012). Στο φυτό *A. thaliana* η πρωτεΐνη TIR1 και πέντε ομόλογες της (AFB1, AFB2, AFB3, AFB4, και AFB5) λειτουργούν ως πυρηνικοί υποδοχείς (Parry *et al.*, 2009) (εικόνα 11). Το σύμπλοκο SCF δομείται από τουλάχιστον τέσσερις πρωτεΐνες: α) την πρωτεΐνη Cul1, μια επιμήκης και άκαμπτη υπομονάδα η οποία αποτελεί τον πυρήνα του συμπλόκου, β) την πρωτεΐνη Rbx1, που λειτουργεί ως η καταλυτική μονάδα του συμπλόκου και περιλαμβάνει μια RING-H2 περιοχή, γ) την πρωτεΐνη F-box, που περιλαμβάνει το μοτίβο στο οποίο συνδέεται το υπόστρωμα και τέλος δ) την πρωτεΐνη Skp1, η οποία παίζει σημαντικό ρόλο στην αναγνώριση και σύνδεση της F-box. Η πρωτεΐνη Rbx1 συνδέεται με το C-άκρο της πρωτεΐνης Cul1 και μέσω του RING-H2 τομέα αλληλοεπιδρά με το E2 ένζυμο ενώ όπως αναφέρθηκε η πρωτεΐνη F-box, ένας τομέας ~45αμινοξέων δεσμεύεται απευθείας στο υπόστρωμα μέσω περιοχών πλούσιων είτε σε κατάλοιπα λευκίνης (Fbls), είτε σε WD40 μοτίβα (Fbws) (Calderon-Villalobos *et al.*, 2010). Επίσης ως υποδοχέας αυξίνης λειτουργεί και άλλη μια πρωτεΐνη που εδράζεται στο ενδοπλασματικό δίκτυο. Πρόκειται για την δεσμευτική πρωτεΐνη ABP1 (Auxin Binding Protein 1) που όμως ο κύριος ρόλος της δεν έχει ακόμα διευκρινιστεί. Όμως δεν αποκλείεται η πιθανότητα η πρωτεΐνη ABP1 να συμβάλει στην ενίσχυση του σήματος ή ακόμα να συνδέεται και με την πολική μεταφορά της αυξίνης ώστε να μετριάξει το σήμα που θα φτάσει τελικά στο σύστημα των πρωτεϊνών TIR/AFB (Scherer, 2011).



Εικόνα 11: Ενεργοποίηση του TIR1 υποδοχέα για να εκφραστούν τα γονίδια που εξαρτώνται από τη συσσώρευση αυξίνης.

(http://www.nsf.gov/news/news_images.jsp?cntn_id=104205)

ii. Οι κατασταλτικές πρωτεΐνες AUX/IAA

Άλλη μια οικογένεια που αντικατοπτρίζει σημαντικό ρόλο στη μεταβίβαση του σήματος της αυξίνης είναι οι πρωτεΐνες Aux/IAA (Auxin/indole-3-acetic acid), οι οποίες ρυθμίζουν την έκφραση των γονιδίων που εξαρτώνται από τη συσσώρευση αυξίνης (Mockaitis & Estelle 2008). Αναφέρονται ως κατασταλτικές πρωτεΐνες διότι καταστέλλουν την μεταγραφή γονιδίων που επάγονται από την αυξίνη (Leyser, 2006). Η πρωτεΐνη TIR1 F-box λειτουργεί ως υποδοχέας αυξίνης και απευθείας συνδέει την αντίληψη της αυξίνης με τη διάσπαση αυτών των Aux/IAA κατασταλτικών πρωτεϊνών. Η αυξίνη λειτουργεί σαν «μοριακή κόλλα (molecular glue) για να αυξήσει τη δύναμη αλληλεπίδρασης μεταξύ TIR1 και Aux/ IAA πρωτεϊνών, προωθώντας έτσι την ουβικουιτίνωση και την καταστολή των Aux/IAA πρωτεϊνών (Tan *et al.*, 2007).

Οι πρωτεΐνες Aux/IAA βρίσκονται στο πυρήνα και παίζουν καθοριστικό ρόλο στη ρύθμιση της έκφρασης γονιδίων (Hagen & Guilfoyle 2002; Li *et al.*, 2011). Πιο συγκεκριμένα διαδραματίζουν σημαντικό ρόλο στη μεταγραφική ρύθμιση εξειδικευμένων ομάδων γονιδίων (Hayashi, 2012). Στο φυτό *A. thaliana* έχουν ανιχνευθεί είκοσι εννέα γονίδια που κωδικοποιούν Aux/IAA πρωτεΐνες (Li *et al.*, 2011). Το μέγεθος των Aux/IAA πρωτεϊνών κυμαίνεται μεταξύ 18-36 kDa (Liscum & Reed 2002). Όλες αυτές οι πρωτεΐνες λειτουργούν ως μεταγραφικοί

Ι ΕΙΣΑΓΩΓΗ

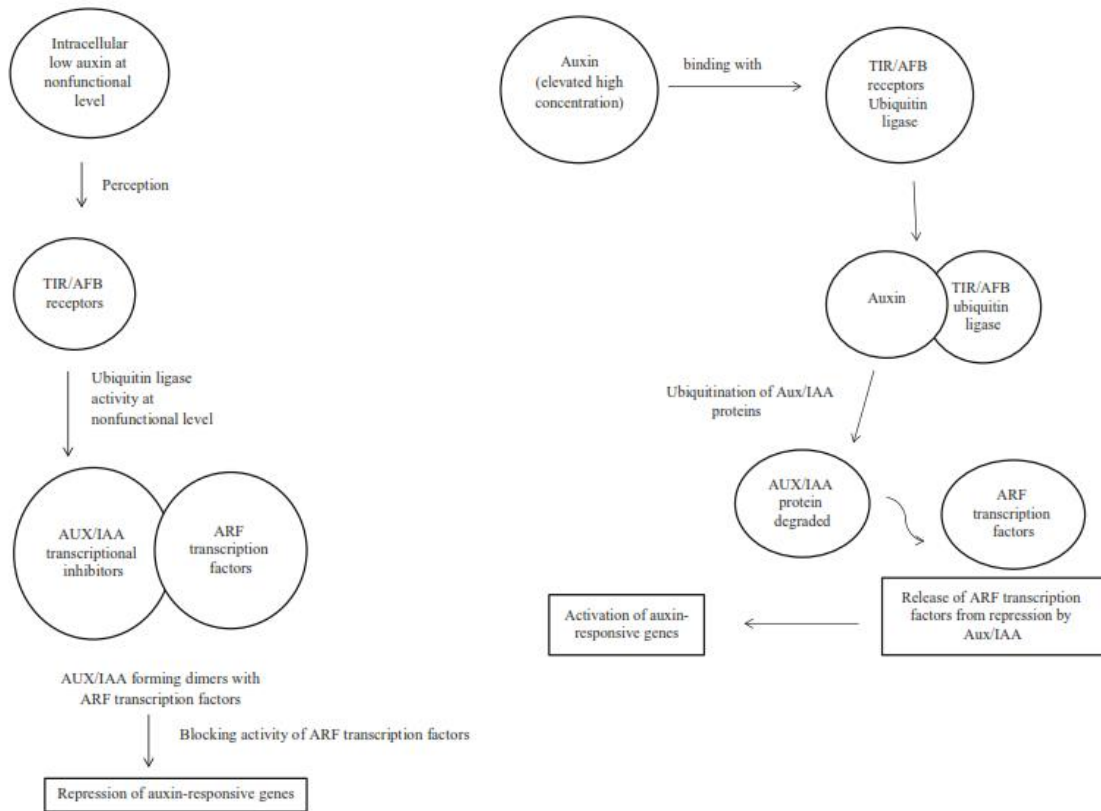
καταστολείς (Li *et al.*, 2011). Οι πρωτεΐνες Aux / IAA περιέχουν τέσσερις συντηρημένες περιοχές, I, II, III, και IV. Η σαφής λειτουργία του τομέα I δεν έχει αποδειχθεί (Szemenyei *et al.*, 2008). Ο τομέας II είναι υπεύθυνος για την σταθερότητα των Aux/IAA πρωτεϊνών και απευθείας συνδέεται με τους υποδοχείς αυξίνης TIR1/AFB (Dreher *et al.*, 2006; Li *et al.*, 2011). Οι τομείς III και IV περιέχουν ένα πεδίο αλληλεπίδρασης πρωτεϊνών με ομολογία με το καρβοξυτελικό άκρο των μεταγραφικών παραγόντων ARF ευνοώντας το σχηματισμό ετεροδιμερών (Muto *et al.*, 2006; Li *et al.*, 2011). Έχει προταθεί ότι σε χαμηλά επίπεδα αυξίνης, οι πρωτεΐνες Aux/IAA προσδένονται στους μεταγραφικούς παράγοντες ARF με αποτέλεσμα την καταστολή της έκφρασης των γονιδίων που εξαρτώνται από τη συσσώρευση αυξίνης αποτρέποντας με αυτόν τον τρόπο τη πρόσδεση των πρωτεϊνών ARF στο DNA (εικόνα 12). Ενώ σε αυξημένες συγκεντρώσεις αυξίνης, ακολουθεί αποικοδόμηση αυτών των καταστολέων μέσω του μονοπατιού ουβικουΐτινης – πρωτεασώματος 26S και συνεπώς αναδιάταξη του παραπάνω συμπλόκου. Έτσι οι μεταγραφικοί παράγοντες είναι πλέον ενεργοί και μπορούν να προσδεθούν στο DNA και να ενεργοποιήσουν τη μεταγραφή των γονιδίων που εξαρτώνται από τη συσσώρευση αυξίνης (εικόνα 13) (Li *et al.*, 2011).

iii. Οι μεταγραφικοί παράγοντες ARF

Οι μεταγραφικοί παράγοντες ARF (Auxin Response Factor) είναι μια οικογένεια πρωτεϊνών όπου προσδένονται στα στοιχεία απόκρισης στην αυξίνη (Auxin Response Elements, *AuxREs*). Τα στοιχεία απόκρισης *AuxRE* εμπεριέχουν συντηρημένη αλληλουχία TGTCT στους υποκινητές των γονιδίων πρωτογενούς ή αρχικής απόκρισης στην αυξίνη. Στο φυτό *A. thaliana* έχουν αναφερθεί 23 μεταγραφικοί παράγοντες ARF (Liscum & Reed 2002) όπου έχουν μια αμινοτελική περιοχή που τους βοηθάει να προσδεθεί με το DNA και μια καρβοξυτελική περιοχή που είναι υπεύθυνη για τον διμερισμό (Tiwari *et al.*, 2003). Επίσης η σύνθεση της μεσαίας περιοχής (μεταξύ της DNA-δεσμευτικής περιοχής και την περιοχή του διμερισμού) διαφέρει στους διάφορους μεταγραφικούς παράγοντες ARF (Leyser, 2006). Έχει αποδειχθεί ότι πέντε από τους 22 αυτούς μεταγραφικούς παράγοντες ARF όπου οι μεσαίες τους περιοχές είναι πλούσιες σε γλουταμίνη, ενεργοποιούν τη διαδικασία της μεταγραφής ενώ οι υπόλοιποι 17, οι οποίοι έχουν μεσαίες περιοχές πλούσιες σε σερίνη, σερίνη - γλυκίνη, σερίνη – προλίνη ή σερίνη – προλίνη – λευκίνη δρουν ως καταστολείς της μεταγραφής (Leyser, 2006). Η πρόσδεση των μεταγραφικών παραγόντων στα στοιχεία απόκρισης *AuxREs* έχει ως αποτέλεσμα την ενεργοποίηση ή την καταστολή της μεταγραφής των γονιδίων, ανάλογα με το συγκεκριμένο ARF που εμπλέκεται. Στην ουσία τα στοιχεία απόκρισης *AuxREs* έχουν αναγνωριστεί ως υποκινητές απόκρισης σε αυξίνη των πρόωρων γονιδίων όπου στην ουσία είναι ένα τμήμα DNA που βοηθάει την RNA πολυμεράση να προσδεθεί εκεί με την βοήθεια των μεταγραφικών παραγόντων. Το ενδοκυτταρικό επίπεδο των κατασταλτικών πρωτεϊνών Aux/IAA καθορίζει την δραστηριότητα των μεταγραφικών παραγόντων ARF (Mockaitis &

Ι ΕΙΣΑΓΩΓΗ

Estelle 2008) ενώ η αυξίνη είναι αυτή που προάγει την αποικοδόμηση αυτών των κατασταλτικών πρωτεϊνών και συνεπώς ταυτόχρονα ενεργοποιεί τους μεταγραφικούς παράγοντες (Hayashi, 2012).



Εικόνα 12: Η δράση των κατασταλτικών πρωτεϊνών AUX/IAA. Σχηματισμός ετεροδιμερών με τους μεταγραφικούς παράγοντες ARF (Li *et al.*, 2011)

Εικόνα 13: Αποικοδόμηση των κατασταλτικών πρωτεϊνών AUX/IAA μέσω του συμπλόκου της ουβικουΐτινης (Li *et al.*, 2011)

Ι ΕΙΣΑΓΩΓΗ

iv. Τα επαγόμενα από την αυξίνη γονίδια

Τα γονίδια απόκρισης στην αυξίνη υπάγονται σε δύο ομάδες, τα πρώιμα γονίδια (*early genes*) ή γονίδια πρωτογενούς απόκρισης (*primary response genes*) και στα γονίδια δευτερογενούς απόκρισης (*secondary response genes*) ή όψιμα γονίδια (*late genes*). Ο χρόνος που απαιτείται για την έκφραση των πρώιμων γονιδίων είναι αρκετά σύντομος και απαιτούνται λίγα λεπτά ενώ τα όψιμα γονίδια συνήθως αναγνωρίζονται 2-4 h ύστερα από την αύξηση της συγκέντρωσης της αυξίνης. Στα πρώιμα γονίδια συμπεριλαμβάνονται 3 βασικές οικογένειες γονιδίων (Abel & Theologis 1996):

1. Small auxin up RNA (*SAUR*) (δεν σχετίζονται με την άμυνα των φυτών)
2. *AUX/IAA* κατασταλτικά γονίδια
3. Gretchen hagggen 3 (*GH3*)

Τα γονίδια πρωτογενούς απόκρισης έχουν τρεις κύριες λειτουργίες:

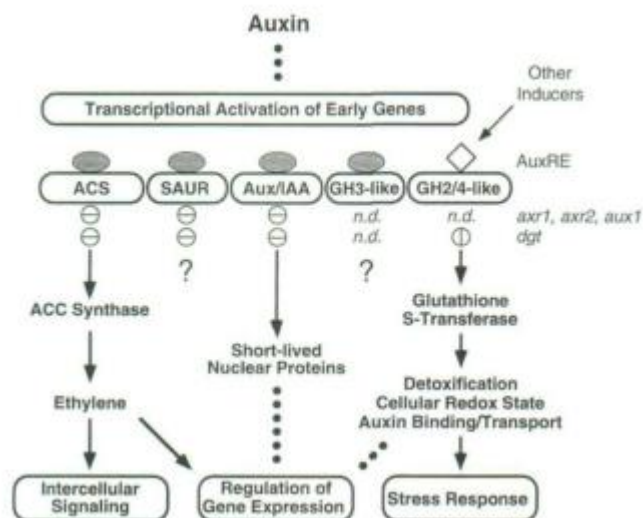
Μεταγραφή: Κάποια από αυτά κωδικοποιούν πρωτεΐνες που ρυθμίζουν τη μεταγραφή των γονιδίων δευτερογενούς απόκρισης

Σηματοδότηση: Κάποια άλλα εμπλέκονται στην επικοινωνία μεταξύ των κυττάρων ή στη σηματοδότηση από κύτταρο σε κύτταρο

Σύζευξη αυξίνης: Το ινδολ-3-οξικό οξύ εμφανίζεται στα φυτά κυρίως στη συζευγμένη του μορφή. Μπορεί να συζευχθεί με σάκχαρα ή αλκοόλες σακχάρου μέσω ενός εστερικού δεσμού ή με αμινοξέα ή πεπτίδια μέσω ενός αμιδικού δεσμού (*Arabidopsis*). Τα επίπεδα της ελεύθερης μορφής του ινδολ-3-οξικού οξέος (*IAA*⁻) διατηρούνται χαμηλά. Μόνο η ελεύθερη μορφή του είναι ενεργή ενώ όταν συζευχθεί αδρανοποιείται. Τα *GH3* γονίδια βοηθούν να μετατραπεί το ινδολ-3-οξικό οξύ στην ανενεργή μορφή του (Staswick *et al.*, 2005).

Επίσης όσον αφορά τα όψιμα γονίδια έχει αποδειχθεί ότι είναι γονίδια που δρουν αργότερα στις επαγόμενες από την αυξίνη αναπτυξιακές διαδικασίες, συνήθως 2-4 ώρες μετά την αύξηση της συγκέντρωσης της αυξίνης. Αρκετά από αυτά τα γονίδια κωδικοποιούν της τρανσφεράσες της S-γλουταθειόνης (*GST*) μιας ομάδας πρωτεϊνών που διεγείρονται από διάφορες καταπονήσεις και επάγονται και από αυξημένες συγκεντρώσεις αυξίνης. Παρομοίως υψηλές συγκεντρώσεις αυξίνης επάγουν το ένζυμο ACC συνθάση, η οποία επίσης ενεργοποιείται από καταπονήσεις και η οποία είναι το ένζυμο-κλειδί της βιοσύνθεσης του αιθυλενίου (Abel & Theologis 1996).

Ι ΕΙΣΑΓΩΓΗ



Εικόνα 14: Η λειτουργία των γονιδίων που επάγονται κατά τη συσσώρευση αυξινών (Abel & Theologis 1996)

Συνοψίζοντας, η φυτοορμόνη ινδολ-3-οξικό οξύ, είναι ένα απλό μόριο σηματοδότησης το οποίο εμπλέκεται στην ενεργοποίηση διαφορετικών μονοπατιών σηματοδότησης (Hayashi, 2012; Peer *et al.*, 2013; Sauer *et al.*, 2013; Tatsuki *et al.*, 2013). Η αυξίνη συνδέεται με τους πυρηνικούς υποδοχείς TIR1/AFB, που είναι υπομονάδες του συμπλόκου της ουβικουϊτίνης E3 λιγάσης (Dharmasiri *et al.*, 2005; Mockaitis & Estelle 2008; Parry *et al.*, 2009; Calderon-Villalobos *et al.*, 2010). Στη συνέχεια το σήμα της αυξίνης ρυθμίζεται από τις κατασταλτικές πρωτεΐνες AUX/IAA και από τους μεταγραφικούς παράγοντες ARF. Η έκφραση γονιδίων που επάγονται από την αυξίνη ρυθμίζεται από την έκφραση αυτών των ρυθμιστικών πρωτεϊνών (Hayashi, 2012). Ενώ όσον αφορά την σηματοδότηση της άμυνας φαίνεται ότι το σαλικυλικό οξύ (SA), το ιασμονικό οξύ (JA) και το αιθυλένιο (ET) είναι σαφώς αναπόσπαστα στοιχεία των αντιδράσεων μεταγωγής σήματος οδηγώντας σε ανθεκτικότητα στις ασθένειες, ενώ η αυξίνη παρουσιάζει μια πιο πολύπλοκη αλληλεπίδραση με τα διάφορα συστήματα σηματοδότησης της άμυνας (Bari & Jones 2009; Savatin *et al.*, 2011). Η αυξίνη εμπλέκεται στη διαμόρφωση των ενεργών ομάδων οξυγόνου (Reactive Oxygen Species – ROS) (Peer *et al.* 2013), στη σηματοδότηση του αιθυλενίου (Stepanova *et al.*, 2008; Tatsuki *et al.*, 2013), του σαλικυλικού οξέος (Wang *et al.*, 2007), του ιασμονικού οξέος (Tiryaki & Staswick 2002; Nagpal *et al.*, 2005; Tabata *et al.*, 2010) του αμπισισικού οξέος (ABA) (Rock & Sun 2005) και των κυτοκινινών (Naseem & Dandekar 2012).

II. ΣΚΟΠΟΣ ΤΗΣ ΜΕΛΕΤΗΣ

Οι φυτοορμόνες διαδραματίζουν πολύ σημαντικό ρόλο στην σηματοδότηση του ανοσοποιητικού συστήματος των φυτών, με το σαλικυλικό οξύ (SA), το ιασμονικό οξύ (JA) και το αιθυλένιο (ET) να είναι αναπόσπαστα στοιχεία των συστημάτων μεταγωγής του σήματος, τα οποία εμπλέκονται στην ενεργοποίηση της άμυνας των φυτών. Εκτός όμως από αυτές, αναφέρεται και το ινδολ-3-οξικό οξύ το οποίο εμπλέκεται στη ρύθμιση ποικίλων μονοπατιών σηματοδότησης της άμυνας. Όλες αυτές οι ορμόνες είναι ικανές να αλληλοεπιδρούν ή να ανταγωνίζονται μεταξύ τους για να σηματοδοτήσουν συγκεκριμένα βιοχημικά μονοπάτια που σχετίζονται με διαφορετικής φύσεως παθογόνα. Το μόριο του ινδολ-3-οξικού οξέος είναι ικανό να ρυθμίζει τα συστήματα σηματοδότησης του σαλικυλικού οξέος, του ιασμονικού οξέος, του αιθυλενίου, του αμπισισκού οξέος καθώς και των κυτοκίνων, επάγοντας ή καταστέλλοντας αυτά. Έτσι, το ινδολ-3-οξικό οξύ μπορεί να ρυθμίζει θετικά ή αρνητικά την άμυνα των φυτών με αποτέλεσμα να προσδίδει ευπάθεια ή ανθεκτικότητα στο φυτό ξενιστή. Επίσης, είναι γνωστό ότι αρκετά παθογόνα ρυθμίζουν το σύστημα σηματοδότησης του φυτού προς όφελος τους, έτσι ώστε να προκαλέσουν ασθένεια. Κάθε μονοπάτι, από τη βιοσύνθεση του ινδολ-3-οξικού οξέος, την αντίληψη του, την σύζευξη του, την μεταφορά του και τη σηματοδότηση του έχει συσχετισθεί με την άμυνα των φυτών. Χαρακτηριστικά αναφέρεται ότι η σηματοδότηση του ινδολ-3-οξικού οξέος όταν δεν αναστέλλεται και συνεχίζεται κανονικά μπορεί να προσφέρει στο φυτό-ξενιστή ανθεκτικότητα ή ευπάθεια, πράγμα το οποίο εξαρτάται από το παθογόνο που το προσβάλλει.

Στην παρούσα μεταπτυχιακή μελέτη διερευνήθηκε ο ρόλος του ινδολ-3-οξικού οξέος στην άμυνα των φυτών εναντίων του παθογόνου μύκητα *V. dahliae* σε φυτά *A. thaliana* καθώς επίσης και η επίδραση αυτών στο μοριακό μηχανισμό δράσης του βιολογικού παράγοντα *P. alvei* K165. Η παρούσα εργασία προσανατολίστηκε στην επίδραση τριών πυρηνικών υποδοχέων TIR1, AFB1 και AFB3 καθώς επίσης και στο γονίδιο *AXR4* που σχετίζεται με την μεταφορά της αυξίνης. Εξαιτίας αυτού, πραγματοποιήθηκαν πειράματα παθογένειας στα οποία χρησιμοποιήθηκαν τέσσερις μεταλλαγμένοι γονότυποι φυτών *A.thaliana* αντίστοιχα σε κάθε γονίδιο έτσι ώστε να διευκρινιστεί ο ρόλος αυτών των γονιδίων στην αλληλεπίδραση του φυτού με τον μύκητα *V.dahliae* καθώς και με το ριζοβακτήριο *P. alvei* K165. Στο τέλος του πειράματος παθογένειας πραγματοποιήθηκε μέτρηση του νωπού βάρους των φυτών. Στη συνέχεια, εξετάστηκε ο ρόλος των γονιδίων *TIR1*, *AFB1*, *AFB3* και *AXR4* στα άγριου τύπου φυτά ύστερα από τον εμβολιασμό μόνο του παθογόνου ή μόνο του βιολογικού παράγοντα ή τον συνδυασμό και των δύο. Επίσης, γνωρίζοντας ότι η σηματοδότηση της αυξίνης δρα ανταγωνιστικά με το μονοπάτι του σαλικυλικού οξέος και συνεργιστικά με το μονοπάτι του ιασμονικού/αιθυλενίου, κρίθηκε σημαντικό να μελετηθούν τα επίπεδα έκφρασης των γονιδίων *PR1* και *PDF1.2* τα οποία σχετίζονται με αυτά τα δύο μονοπάτια, έτσι ώστε να εξετασθεί κατά πόσον η ανθεκτικότητα που παρατηρήθηκε στα μεταλλαγμένα φυτά οφείλεται στην επαγωγή

II. ΣΚΟΠΟΣ ΤΗΣ ΜΕΛΕΤΗΣ

της άμυνας. Τέλος κρίθηκε απαραίτητο να εξετασθεί η συγκέντρωση του ινδολ-3-οξικού οξέος στο άγριος στέλεχος φυτών *A.thaliana* ύστερα από την εφαρμογή μόνο του παθογόνου ή μόνο του βιολογικού παράγοντα ή συνδυασμό και των δύο.

III. ΥΛΙΚΑ ΚΑΙ ΜΕΘΟΔΟΙ

3.1 Γενετικά τροποποιημένα φυτά *Arabidopsis thaliana*

Για την πραγματοποίηση των πειραμάτων χρησιμοποιήθηκαν φυτά *A. thaliana*, οικότυπος Columbia, της οικογένειας των Σταυρανθών που έχουν υποστεί γενετική τροποποίηση με τη χρήση του T1 πλασμιδίου σε μια σειρά γονιδίων που εμπλέκονται τόσο στη σηματοδότηση όσο και στη μεταφορά του ινδολ-3-οξικού οξέος. Οι σειρές SALK προέρχονται από το Salk Institute Genomic Analysis Laboratory και διακινούνται από το Nottingham Arabidopsis Stock Centre (NASC) (Alonso *et al.*, 2003). Όλοι οι σπόροι πριν την διεξαγωγή των πειραμάτων διατηρήθηκαν στους 4 °C.

Για την πραγματοποίηση των πειραμάτων χρησιμοποιήθηκαν μεταλλαγμένα φυτά *A. thaliana* στους πυρηνικούς υποδοχείς της αυξίνης, που εμπλέκονται με τη σηματοδότηση των αυξινών, αλλά και σε γονίδιο που εμπλέκεται με τη μεταφορά των αυξινών από κύτταρο σε κύτταρο. Πιο συγκεκριμένα χρησιμοποιήθηκαν φυτά μεταλλαγμένα ως προς το γονίδιο *TIR1-1* (Transport Inhibitor Response 1), *AFB1-3* (Auxin Signaling F Box Protein 1), *AFB3-4* (Auxin Signaling F-Box Protein 3) και *AXR4-2* (Auxin Resistant 4) τα οποία συγκρίθηκαν με το άγριο τύπο του φυτού *A.thaliana*.

Οι μεταλλαγμένες σειρές που χρησιμοποιήθηκαν στο συγκεκριμένο πείραμα είχαν το T-DNA ενσωματωμένο στο επιθυμητό γονίδιο και ήταν ομοζυγωτές.

3.2 Μικροβιολογικό υλικό

Στη παρούσα εργασία χρησιμοποιήθηκαν οι εξής μικροοργανισμοί:

- *Verticillium dahliae*
- *Paenibacillus alvei* (K165)

3.3 Θρεπτικά υλικά

- Εκχύλισμα πατάτας με δεξτρόζη και άγαρ (Potato dextrose Agar, PDA)
- Διάλυμα σουκρόζης και νιτρικού Νατρίου (Sucrose Sodium Nitrate, SSN)
- Διάλυμα θρεπτικού ζωμού και γλυκερόλης (Nutrient broth with Glycerol, NG)

III. ΥΛΙΚΑ ΚΑΙ ΜΕΘΟΔΟΙ

Παρασκευή Εκχύλισματος πατάτας με δεξτρόζη και άγαρ (PDA)

<i>Συστατικά</i>	<i>gr/L H₂O</i>
Εκχύλισμα πατάτας	200 g
Δεξτρόζη	20 g
Άγαρ	20 g

Διαδικασία: Μικροί κύβοι πατάτας διαμέτρου 0,5 cm τοποθετούνται σε υδατόλουτρο για 45 min και συλλέγεται το εκχύλισμα τους σε δεδομένο όγκο απιονισμένου νερού. Ακολουθεί η μίξη του ζωμού με τα υπόλοιπα συστατικά. Έπειτα πραγματοποιείται ομογενοποίηση του διαλύματος με τη χρήση μαγνητικού αναδευτήρα και αποστειρώνεται σε κλίβανο στους 120°C, πίεσης 1 atm για 20 λεπτά

Παρασκευή διαλύματος σουκρόζης και νιτρικού νατρίου (SSN):

<i>Συστατικά</i>	<i>gr/L H₂O</i>
Σακχαρόζη (ή Σουκρόζη)	15 g
K ₂ HPO ₄ (όξινο φωσφορικό κάλιο)	1 g
MgSO ₄ 7H ₂ O (θειικό μαγνήσιο)	0,5 g
NaNO ₃ (νιτρικό νάτριο)	2 g
KCl (χλωριούχο κάλιο)	0,5 g
Διάλυμα ιχνοστοιχείων	1 ml

Για την παρασκευή 100 ml διαλύματος ιχνοστοιχείων απαιτούνται:

FeSO ₄ x 7H ₂ O	249 mg
CuSO ₄ x 5H ₂ O	40 mg
ZnSO ₄ x 7H ₂ O	44 mg
MnSO ₄ x 4H ₂ O	41 mg
Na ₂ MoO ₄ x 2H ₂ O	51 mg

Ακολουθεί αποστείρωση σε κλίβανο στους 120°C, πίεσης 1 atm για 20 λεπτά

III. ΥΛΙΚΑ ΚΑΙ ΜΕΘΟΔΟΙ

Παρασκευή διαλύματος θρεπτικού ζωμού και γλυκερόλης (NG)

Συστατικά	gr/L H ₂ O
Θρεπτικός ζωμός	8 g
Γλυκερόλη	20 g

Ακολουθεί αποστείρωση σε κλίβανο στους 120°C, πίεσης 1 atm για 15 λεπτά.

3.4 Προετοιμασία του παθογόνου μολύσματος

Για την διεξαγωγή των πειραμάτων παθογένειας χρησιμοποιήθηκε απομόνωση του μύκητα *V. dahliae* από τη συλλογή του εργαστηρίου Φυτοπαθολογίας του Γεωπονικού Πανεπιστημίου Αθηνών με επιβεβαιωμένη παθογένεια σε φυτά *A. thaliana* (Tjamos *et al.*, 2005).

Διαδικασία:

- Μεταφορά, υπό ασηπτικές συνθήκες, 1-2 κεραμικών χαντρών, που περιείχαν το μύκητα *V. dahliae* και φυλάσσονταν στους -80 °C, σε τρυβλία με θρεπτικό υλικό από εκχύλισμα πατάτας (PDA)
- Τοποθέτηση των τρυβλίων για επώαση σε θερμοκρασία δωματίου 20-25 °C
- Αφού το μυκήλιο του βερτισιλλίου αναπτύχθηκε και κάλυψε μεγάλο μέρος του τρυβλίου, μεταφέρθηκε υπό ασηπτικές συνθήκες σε κωνικές φιάλες που περιείχαν θρεπτικό υλικό SSN
- Οι κωνικές φιάλες τοποθετήθηκαν σε ανακινούμε επωαστικό θάλαμο σε θερμοκρασία 25 °C με ταχύτητα ανάδευσης 100 στροφές/λεπτό
- Μετά από 5 ημέρες στις κωνικές φιάλες είχε σχηματισθεί πυκνό αιώρημα κονιδίων μαζί με μυκήλιο

Στην συνέχεια πραγματοποιήθηκε υπολογισμός πυκνότητας μολύσματος (κονίδια/ml):

- Το αιώρημα κονιδίων μεταφέρθηκε, μετά από φιλτράρισμα με τούλι, σε ποτήρι ζέσεως, το οποίο είχε τοποθετηθεί επί μαγνητικού αναδευτήρα, ώστε να επιτευχθεί ομοιόμορφη κατανομή των κονιδίων στο αιώρημα .
- Με πιπέτα έγινε παραλαβή 1 ml από το πυκνό αιώρημα και μεταφέρθηκε σε φιαλίδιο που περιείχε 9 ml νερό και στη συνέχεια πραγματοποιήθηκε και δεύτερη δεκαδική αραιώση (10⁻²) ώστε να εξασφαλιστεί ευκολότερη μέτρηση των κονιδίων.

III. ΥΛΙΚΑ ΚΑΙ ΜΕΘΟΔΟΙ

- Τοποθέτηση περίπου 25 μl από τη δεύτερη δεκαδική αραιώση σε ειδική αντικειμενοφόρο πλάκα μέτρησης κονιδίων (κυτταρόμετρο) για να εκτιμηθεί η τελική πυκνότητα του αιωρήματος. Η μέτρηση των κονιδίων στα τετραγωνάκια του κυτταρόμετρου έγινε σε μικροσκόπιο Carl Zeiss.
- Ο υπολογισμός του αριθμού των κονιδίων / ml γίνεται με βάση τον τύπο:
Άθροισμα κονιδίων σε z τετραγωνάκια / (αριθμός τετραγώνων (z) x 4 x 10⁻⁶).
- Η τιμή που βρέθηκε από τον παραπάνω τύπο πολλαπλασιάζεται επί 10 για να υπολογισθούν τα κονίδια / ml στο αρχικό αιώρημα πριν τη δεκαδική αραιώση.
- Στη συνέχεια μέσω του τύπου της αραιώσης $C_1V_X=C_2V_2$ υπολογίζεται πόσα ml από το αρχικό αιώρημα V_X θα χρησιμοποιηθεί έτσι ώστε ο τελικός αριθμός κονιδίων/ml να είναι 10⁷ σε τελικό συνολικό όγκο V_2 .
- Μέσω της αφαίρεσης (V_2-V_X) υπολογίζεται ο όγκος του νερού που πρέπει να προστεθεί έτσι ώστε να προκύψει τελικός όγκος V_2

3.5 Παρασκευή αιωρήματος του βακτηρίου K165

Στο συγκεκριμένο πείραμα χρησιμοποιήθηκε το στέλεχος *P. alvei* K165 με ανθεκτικότητα στο αντιβιοτικό ριφαμπικίνη. Η απομόνωση του βακτηρίου χρησιμοποιήθηκε από τη συλλογή του εργαστηρίου Φυτοπαθολογίας του Γεωπονικού Πανεπιστημίου Αθηνών.

Διαδικασία:

- Η μεταφορά του K165^{inf} έγινε από τους -80 °C, όπου διατηρούνταν σε διάλυμα 20% γλυκερόλης, σε τρυβλία με θρεπτικό υλικό PDA υπο ασηπτικές συνθήκες.
- Για να σχηματιστούν οι αποικίες τοποθετήθηκαν τα τρυβλία σε επωαστικό θάλαμο στους 28 °C για 2 ημέρες
- Έπειτα μεταφέρθηκε μάζα βακτηριακών κυττάρων με τη βοήθεια βακτηριολογικού κρίκου σε κωνικές φιάλες με θρεπτικό υλικό NG
- Οι κωνικές φιάλες τοποθετήθηκαν για επώαση σε ανακινούμενο επωαστικό θάλαμο σε θερμοκρασία 28 °C και με ταχύτητα ανάδευσης 150 στροφές/λεπτό για 2 ημέρες (με βάση την καμπύλη ανάπτυξης του βακτηρίου έχει αποδειχθεί ότι σε διάστημα 24 έως 48 ωρών η συγκέντρωση του είναι 10⁸ cfu/ml)

III. ΥΛΙΚΑ ΚΑΙ ΜΕΘΟΔΟΙ

3.6 Πείραμα 1: Αξιολόγηση της ανθεκτικότητας μεταλλαγμένων φυτών *A. thaliana* στο μύκητα *V. dahliae* καθώς επίσης και της αποτελεσματικότητας του βιολογικού παράγοντα *P. alvei* K165

Για να αξιολογηθεί η ανθεκτικότητα των μεταλλαγμένων φυτών *tir1-1*, *afb1-3*, *afb3-4* και *axr4-2* στο μύκητα *V. dahliae* καθώς επίσης και η αποτελεσματικότητα του βακτηρίου *P. alvei* K165 πραγματοποιήθηκαν πειράματα παθογένειας και καταγραφή των συμπτωμάτων της ασθένειας. Κάθε μεταλλαγμένη σειρά συγκρίθηκε με τα άγριου τύπου Col-0 φυτά.

Αρχικά πραγματοποιήθηκε ριζοπότισμα με 10ml από το αιώρημα του βακτηρίου συγκέντρωσης 10^8 cfu/ml, σε φυτά *A. thaliana* στο στάδιο των 3-4 φύλλων. Η επέμβαση έγινε σε φυτά ηλικίας περίπου 15 ημερών. Στη συνέχεια 5 ημέρες μετά κάθε φυτό μολύνθηκε με 10ml αιωρήματος κονιδίων του μύκητα *V. dahliae* συγκέντρωσης 10^7 κονίδια/ml. Στις μετρήσεις καταγράφονταν και ο συνολικός αριθμός των φύλλων του φυτού και η ασθένεια εκφράστηκε ως ποσοστό ασθενών φύλλων προς το σύνολο των φύλλων.

Στα πειράματα παθογένειας χρησιμοποιήθηκαν για τον κάθε γονότυπο :

- 30 φυτά ως μάρτυρες (φυτά που έχουν μολυνθεί μόνο με το παθογόνο)
- 30 φυτά στα οποία έγινε η εφαρμογή του μύκητα *V. dahliae* μαζί με τον βιολογικό παράγοντα
- 15 φυτά στα οποία δεν πραγματοποιήθηκε καμία επέμβαση (Mock)

Αξίζει να αναφερθεί ότι στην περίπτωση των μεταλλαγμένων φυτών στο γονίδιο *tir1-1* προστέθηκαν άλλα 15 φυτά στα οποία είχε προστεθεί μόνο ο βιολογικός παράγοντας K165.

Μετά το τέλος της καταμέτρησης των συμπτωμάτων έγινε παραλαβή του υπέργειου μέρους (βλαστός και φύλλα) των 30 φυτών για κάθε εφαρμογή και βρέθηκε το μέσο νωπό βάρος των φυτών για κάθε χειρισμό.

III. ΥΛΙΚΑ ΚΑΙ ΜΕΘΟΔΟΙ

3.7 Πείραμα 2: Προσδιορισμός των επιπέδων έκφρασης των γονιδίων *PR1* και *PDF1.2* σε όλους τους υπό εξέταση γονότυπους

Για να διαπιστωθεί αν η ανθεκτικότητα που παρατηρήθηκε στα μεταλλαγμένα φυτά ή η προστασία που φερόταν να προσφέρεται από το βιολογικό παράγοντα οφειλόταν σε επαγωγή της άμυνας των φυτών πραγματοποιήθηκε προσδιορισμός των επιπέδων έκφρασης των γονιδίων *PR1* και *PDF1.2*. Πραγματοποιήθηκε συλλογή ιστού του υπέργειου μέρους φυτών, σε όλους τους προς εξέταση γονότυπους καθώς και στο άγριο στέλεχος, σε φυτά που είχε εφαρμοστεί είτε μόνο το παθογόνο, είτε σε συνδυασμό με το βιολογικό παράγοντα. Τα δείγματα που χρησιμοποιήθηκαν συλλέχθηκαν 3, 7 και 14 ημέρες μετά τη μόλυνση. Η έκφραση των γονιδίων *PR1* και *PDF1.2* πραγματοποιήθηκε στα φύλλα των μεταλλαγμένων φυτών. Για κάθε γονότυπο και κάθε χρονική στιγμή συλλέχθηκε ένα δείγμα φύλλων που αποτελούνταν από 7 φυτά και έγιναν 3 τεχνικές επαναλήψεις. 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 .

3.7.1 Απομόνωση RNA

Η απομόνωση του ολικού RNA από τους φυτικούς ιστούς πραγματοποιήθηκε σύμφωνα με το πρωτόκολλο των Oñate-Sánchez and Vicente-Carbajosa, 2008 ύστερα από κατάλληλες τροποποιήσεις:

- Κονιορτοποίηση του φυτικού ιστού σε πορσελάνινο γουδί με υγρό άζωτο και τοποθέτηση 80-100 mg κονιορτοποιημένου φυτικού ιστού σε σωληνάριο τύπου erpendorf χωρητικότητας 1,5 ml
- Προσθήκη 300 μl διαλύματος λύσης κυττάρων (Cell lysis solution)
- Έντονη ανάμειξη (vortex) για 20 sec και ανάμειξη με αναστροφή των σωληναρίων τύπου erpendorf
- Επάωση για 5 min σε θερμοκρασία δωματίου σε συνεχή αναστροφή για καλύτερη ανάμειξη
- Προσθήκη 100μl διαλύματος καθίζησης πρωτεϊνών και DNA (protein-DNA precipitation solution), το οποίο έχει προψυχθεί σε πάγο
- Ελαφριά ανάμειξη, χτυπώντας και αναστρέφοντας τα σωληνάκια τύπου erpendorf
- Επάωση για 10 min σε θερμοκρασία 4°C

III. ΥΛΙΚΑ ΚΑΙ ΜΕΘΟΔΟΙ

- Φυγοκέντρωση για 15 min στην πλήρη ταχύτητα της φυγοκέντρου (14.000 rpm) σε θερμοκρασία 4 °C
- Μεταφορά υπερκείμενου (περίπου 300 μl) σε καινούριο σωληνάριο τύπου erpendorf αποφεύγοντας την ενδιάμεση φάση. Αν υπάρχουν υπολείμματα ιστών στο υπερκείμενο μετά την μεταφορά του, ακολουθεί δεύτερη φυγοκέντρωση για 5 min σε θερμοκρασία 4 °C στην πλήρη ταχύτητα της φυγοκέντρου και μεταφορά του υπερκείμενου σε νέο σωληνάριο τύπου erpendorf
- Προσθήκη ίσου όγκου ισοπροπανόλης για κατακρήμνιση του RNA (περίπου 300μl) και ομογενοποίηση (ανακινώντας ελαφρά τους σωλήνες τύπου erpendorf
- Επώαση 10 min σε θερμοκρασία 4 °C
- Φυγοκέντρωση για 5 min στην πλήρη ταχύτητα της φυγοκέντρου και σε θερμοκρασία 4 °C
- Απομάκρυνση υπερκείμενου
- Προσθήκη 300μl αιθανόλης 70% για καθαρισμό του ιζήματος
- Φυγοκέντρωση για 5 min στην πλήρη ταχύτητα της φυγοκέντρου και σε θερμοκρασία 4 °C
- Απομάκρυνση υπερκείμενου
- Στέγνωμα του ιζήματος (pellet)
- Επαναιωρηματοποίηση του ιζήματος σε 25μl αποστειρωμένο δισαπεσταγμένο νερό και ανάμειξη μέχρι να διαλυθεί το ίζημα
- Φυγοκέντρωση για ελάχιστα δευτερόλεπτα
- Το δείγμα αποθηκεύεται στους -20 °C

Για την παρασκευή 10 ml διαλύματος λύσης κυττάρων (*Cell lysis solution*) απαιτείται:

<i>Διάλυμα</i>	<i>Όγκος</i>	<i>Τελική συγκέντρωση</i>
10% SDS	2 ml	2%
0,5 κιτρικό νάτριο (sodium citrate)	1.36 ml	68 mM
1 M κιτρικό οξύ (citric acid)	1.32 ml	132 mM
0,5 M EDTA	20 μl	1 mM

Το pH του διαλύματος πρέπει να ρυθμιστεί στο 4-4,5. Το χαμηλό pH είναι σημαντικό για την απενεργοποίηση των ενζύμων που καταστρέφουν το RNA. Μετά την ανάμειξη όλων των συστατικών το τελικό διάλυμα αποστειρώθηκε σε κλίβανο στους 120°C για 20 λεπτά.

III. ΥΛΙΚΑ ΚΑΙ ΜΕΘΟΔΟΙ

Για την παρασκευή 10 ml διαλύματος καθίζησης πρωτεϊνών (*protein-DNA precipitation solution*) απαιτείται:

Διάλυμα	Όγκος	Τελική συγκέντρωση
5M NaCl	8 ml	4 M
0,5 κιτρικό νάτριο	320 μl	16 mM
1 M κιτρικό οξύ	320 μl	32 mM

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

3.7.2 Προσδιορισμός της συγκέντρωσης του RNA

Μετά την ολοκλήρωση της διαδικασίας απομόνωσης του ολικού RNA, το επόμενο κρίσιμο βήμα, είναι η εκτίμηση της ποιότητας και την καθαρότητας του απομονωμένου υλικού και ο υπολογισμός της συγκέντρωσης του, ώστε να χρησιμοποιηθεί στις αντιδράσεις που θα ακολουθήσουν. Αυτό επιτυγχάνεται με τη χρήση φασματοφωτομέτρου Nanodrop . Η απορρόφηση στα 260 nm μετράει τη συγκέντρωση του RNA και η απορρόφηση στα 280 nm μετράει τις δευτερεύουσες ουσίες που απομονώθηκαν μαζί με το RNA (πχ πρωτεΐνες). Ο λόγος 260/280 αποτελεί μέτρηση της καθαρότητας του δείγματος RNA.

Λόγος $A_{260nm}/A_{280nm} = 2$ είναι χαρακτηριστικός διαλύματος καθαρού RNA.

Η συγκέντρωση κάθε δείγματος RNA προκύπτει από τη σχέση:

$$C_{(ng/\mu l)} = 500_{ng/\mu l} \times \text{συντελεστής αραιώσης} \times \text{απορρόφηση } 260nm$$

Έπειτα τα δείγματα αραιώθηκαν με δις-απεσταγμένο και αποστειρωμένο νερό 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.

3.7.3 Εφαρμογή DNase I (HT BIOTECHNOLOGY LTD)

Για να καταστραφούν τα εναπομείναντα μόρια DNA πραγματοποιήθηκε χειρισμός του RNA με ένζυμο δεοξυριβοζονουκλεάση και ακολουθήθηκαν τα εξής βήματα:

- Σε κάθε δείγμα προστέθηκε 1μl DNase I (1unit/μl)

III. ΥΛΙΚΑ ΚΑΙ ΜΕΘΟΔΟΙ

- Τα δείγματα τοποθετήθηκαν για επώαση σε θερμοκρασία 37 °C για 15 min
- Στη συνέχεια σε κάθε δείγμα προστέθηκε 1μl EDTA
- Τα δείγματα τοποθετήθηκαν για επώαση σε υδατόλουτρο στους 65 °C για 10 min ώστε να απενεργοποιηθεί η DNase I

3.7.4 Εφαρμογή αντίστροφης μεταγραφάσης

Για τη μετατροπή του mRNA σε cDNA χρησιμοποιήθηκε το PrimeScript™ RT reagent kit της εταιρίας TAKARA BIO INC σύμφωνα με τις οδηγίες του κατασκευαστή. Σε κάθε δείγμα RNA (7 μl) προστέθηκαν τα εξής αντιδραστήρια:

- 2μl ρυθμιστικό διάλυμα (5x prime script buffer)
- 0,5μl αντίστροφης μεταγραφάσης (prime script RT enzyme)
- 0,5μl μείγμα ολιγονουκλεοτίδια θυμίνης (oligo dT primer)

Για τη μετατροπή του mRNA σε cDNA σε μηχανήμα PCR ακολουθήθηκαν τα παρακάτω στάδια:

	Χρόνος	Θερμοκρασία (°C)	
Στάδιο 1	15 min	37 °C	Υβριδισμός νουκλεοτιδίων θυμίνης με την ουρά πολύ-αδενίνης (poly-A) του mRNA, επιμήκυνση της αλυσίδας
Στάδιο 2	5 sec	85°C	Απενεργοποίηση της αντίστροφης μεταγραφάσης

3.7.5 Εφαρμογή της Real-time PCR

Η RT-PCR έγινε σε θερμοκυκλοποιητή της Stratagene Mx3005P™ και για τις αντιδράσεις ενίσχυσης χρησιμοποιήθηκε ένα master mix KAPA SYBR Fast Universal qPCR kit (KAPA biosystems, Woburn, MA, USA), ενώ τα αποτελέσματα αναλύθηκαν με το λογισμικό MxPro QPCR. Τα ζεύγη εκκινήτων που χρησιμοποιήθηκαν για τη μελέτη έκφρασης των γονιδίων *PRI* και *PDF1.2* απεικονίζονται στο παρακάτω πίνακα:

III. ΥΛΙΚΑ ΚΑΙ ΜΕΘΟΔΟΙ

<i>Γονίδιο Στόχος</i>	<i>Ζεύγος εκκινητών</i>	<i>Αναφορές</i>
<i>PR1</i> (<i>At2g14610</i>)	5'-TCACAACCAGGCACGAGGAG-3' 5'-CACCGCTACCCCAGGCTAAG-3'	Pantelides <i>et al.</i> , 2010
<i>PDF1.2</i> (<i>At5g44420</i>)	5'-CTGTTACGTCCCATGTTAAATCTACC-3' 5'-CAACGGGAAAATAAACATTTAAAACAG-3'	Pantelides <i>et al.</i> , 2010
<i>TUBULIN4</i> (<i>At4g26410</i>)	5'-GAGCTGAAGTGGCTTCCATGAC-3' 5'-GGTCCGACATACCCATGATCC-3'	Czechowski <i>et al.</i> , 2005

Τα αντιδραστήρια που χρησιμοποιήθηκαν ήταν τα εξής:

<i>Αντιδραστήρια</i>	<i>Όγκος</i>	<i>Τελική συγκέντρωση</i>
KAPA SYBR Fast Universal qPCR Master Mix	5 μl	
Rox low	0,2 μl	25 μM
Εκκινητής F	0,5 μl	25 μM
Εκκινητής R	0,5 μl	
Δείγμα cDNA	1 μl	50 ng/ml
H ₂ O	2,8 μl	
Τελικός όγκος	10 μl	

Τα επίπεδα έκφρασης του γονιδίου της τουμπουλίνης4 (*tubulin 4*, *At4g26410*) του φυτού *A. thaliana*, που είναι γονίδιο αναφοράς χρησιμοποιείται σαν σταθερά για την ποσοτικοποίηση της έκφρασης των άλλων γονιδίων (Czechowski *et al.*, 2005)

III. ΥΛΙΚΑ ΚΑΙ ΜΕΘΟΔΟΙ

Τέλος απεικονίζεται το πρόγραμμα θερμοκρασιών που χρησιμοποιήθηκαν στις αντιδράσεις Real-time PCR:

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

*Το στάδιο 2 επαναλήφθηκε για 40 κύκλους

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

Η κάθε αντίδραση πραγματοποιήθηκε σε τρεις επαναλήψεις.

3.8 Πείραμα 3: Μελέτη της έκφρασης των γονιδίων *TIR1-1*, *AFB1-3*, *AFB3-2* και *AXR4-2* στα φυτά άγριου τύπου Col-0

Τα δείγματα που χρησιμοποιήθηκαν για τη διεξαγωγή αυτού του πειράματος συλλέχθηκαν από:

1. Φυτά στα οποία είχε εφαρμοστεί μόνο ο βιολογικός παράγοντας
2. Φυτά στα οποία είχε πραγματοποιηθεί μόλυνση μόνο με το παθογόνο

III. ΥΛΙΚΑ ΚΑΙ ΜΕΘΟΔΟΙ

3. Φυτά στα οποία είχε εμβολιασθεί τόσο το παθογόνο όσο και ο βιολογικός παράγοντας
4. Μη μολυσμένα φυτά

Η δειγματοληψία πραγματοποιήθηκε 7 και 14 ημέρες μετά την μόλυνση τόσο σε φύλλα όσο και σε ρίζες κάθε δείγμα αποτελούνταν από 7 φυτά. Πραγματοποιήθηκαν 3 τεχνικές επαναλήψεις. Στη συνέχεια πραγματοποιήθηκε απομόνωση RNA από τους φυτικούς ιστούς, μέτρηση της συγκέντρωσης RNA του κάθε δείγματος σε φασματοφωτόμετρο Nanodrop, καθαρισμός με DNase I και αραίωση των δειγμάτων, εφαρμογή αντίστροφης μεταγραφάσης και τέλος εφαρμογή της Real-time PCR. Η διαδικασία είναι ακριβώς η ίδια που περιγράφηκε στο προηγούμενο πείραμα, με τη μόνη διαφορά ότι κατά την εφαρμογή της Real-time PCR χρησιμοποιήθηκαν διαφορετικοί εκκινητές. Οι εκκινητές που χρησιμοποιήθηκαν ήταν οι εξής:

<i>Γονίδιο Στόχος/Κωδικός σειράς</i>	<i>Ζεύγος εκκινητών</i>	<i>Αναφορές</i>
<i>TIR1-1 (At3g62980)</i>	5'-GCATTTGCAGGAGACAGTGA-3' 5'- GACCAGCCACTGTTCGGTAT-3'	Ruegger <i>et al.</i> , 1998
<i>AXR4-2 (At1g54990)</i>	5'- CTCACTCCCACCAGCTCTTC-3' 5'- CAAAAGCCCCAAAACACACCT-3'	Hobbie & Estelle 1995
<i>AFB1-3 (At4g03190)</i>	5'-GTCCGAATGCCTGATCCTTGT-3' 5'-TCACACAGAGACGGAAGCAC-3'	Parry <i>et al.</i> ,2009
<i>AFB3-4 (At1g12820)</i>	5'-TCGCTGCCACATGTAAAGAG-3' 5'-TGTGGCTCGAGAATGCATAG-3'	Parry <i>et al.</i> ,2009

3.9 Πείραμα 4: Μέτρηση της συγκέντρωσης του ινδολ-3-οξικό οξύ (IAA) στα φυτά άγριου τύπου Col-0 με τη χρήση της υγρής χρωματογραφίας υψηλής απόδοσης (HPLC)

Το ινδολ-3-οξικό οξύ (IAA) μπορεί να ανιχνευθεί με την εφαρμογή της υγρής χρωματογραφίας υψηλής απόδοσης. Πρόκειται για μία χρωματογραφική τεχνική όπου ο διαχωρισμός είναι αποτέλεσμα της συνδυαστικής δράσης μιας στατικής και μιας κινητής φάσης. Χρησιμοποιεί μια υγρή κινητή φάση (mobile phase) για το διαχωρισμό των συστατικών ενός μίγματος. Τα συστατικά διαλύονται αρχικά σε ένα διαλύτη και στη συνέχεια διέρχονται από μία στήλη (column) υπό πίεση. Το υλικό από το οποίο αποτελείται η στήλη ονομάζεται στατική φάση (stationary phase). Ο βαθμός αλληλεπίδρασης των διαφόρων συστατικών με τη

III. ΥΛΙΚΑ ΚΑΙ ΜΕΘΟΔΟΙ

στατική φάση επηρεάζει το διαχωρισμό τους. Όσο μεγαλύτερη η αλληλεπίδραση τόσο ισχυρότερα κατακρατούνται τα συστατικά με αποτέλεσμα να κινούνται με μικρότερη ταχύτητα μέσα στη στήλη. Οι αναλυόμενες ουσίες κατανέμονται μεταξύ της στατικής και της κινητής φάσης, με αποτέλεσμα να μετακινούνται με διαφορετικές ταχύτητες κατά μήκος της στήλης.

Στο συγκεκριμένο πείραμα πραγματοποιήθηκε Υγρή-στερεή-χρωματογραφία (LSC) ή αλλιώς χρωματογραφία προσρόφησης (σύμφωνα με τη φύση κινητής και στατικής φάσης) όπου η στατική φάση είναι ένας προσροφητής και ο διαχωρισμός βασίζεται στις συνεχείς προσροφήσεις-εκροφήσεις των συστατικών του μίγματος στην επιφάνεια της στερεής στατικής φάσης. Με βάση την πολικότητα της κινητής και στατικής φάσης χρησιμοποιήθηκε Χρωματογραφία ανάστροφης φάσης (Reverse phase) όπου η μη πολική στατική φάση είναι C₁₈, δηλαδή το μείγμα των ουσιών που εισάγεται στη στήλη, διαχωρίζεται από αλυσίδες 18 ατόμων άνθρακα. Ο διαχωρισμός επιτυγχάνθηκε με τη στήλη Inertsil ενώ η κινητή φάση αποτελούνταν από Νερό: Ακετονιτρίλιο: Οξικό οξύ σε αναλογία 76:23:1 και η ροή ήταν σταθερή στα 0,6ml min⁻¹.

Για τη διεξαγωγή του πειράματος χρησιμοποιήθηκαν δείγματα από τις εξής εφαρμογές.:

- Φυτά στα οποία είχε εφαρμοστεί μόνο ο βιολογικός παράγοντας
- Φυτά στα οποία είχε πραγματοποιηθεί μόλυνση μόνο με το μύκητα *V.dahliae*
- Φυτά στα οποία είχε εμβολιασθεί τόσο ο παθογόνος μύκητας όσο και ο βιολογικός παράγοντας K165
- Μη μολυσμένα φυτά

Συλλέχθηκε το υπέργειο μέρος 20 φυτών ανά εφαρμογή σε δύο χρονικές στιγμές 7 και 14 ημέρες μετά τη μόλυνση (επιθυμητή ποσότητα ήταν το 1 gr ξηρού φυτικού ιστού) και η διαδικασία που ακολουθήθηκε περιγράφεται παρακάτω.

3.9.1 Λυοφιλοποίηση (freeze-drying)

Η λυοφιλοποίηση είναι μια διαδικασία που επιτυγχάνεται η απομάκρυνσή του νερού από ένα δείγμα μέσω εξάχνωσης και διασποράς. Στην ουσία πρόκειται για μία ξήρανση δια καταψύξεως ή αλλιώς μια ψυχρή ξήρανση. Αυτή η διαδικασία πραγματοποιείται σε συσκευή λυοφιλοποίησης, η οποία αποτελείται από ένα συμπυκνωτή που παγιδεύει το νερό που απομακρύνεται από το δείγμα, ένα σύστημα ψύξης (προσεγγίζει τη θερμοκρασία των -20 °C) και ένα σύστημα κενού για να μειώνει την πίεση έτσι ώστε να διευκολύνεται η διαδικασία εξάχνωσης. Η λυοφιλίωση μπορεί να οδηγήσει σε εξαιρετικά χαμηλή περιεκτικότητα σε υγρασία, της τάξης του 1-4 % προλαμβάνοντας την ανάπτυξη μικροοργανισμών αλλά και τη δράση ενζύμων από το να προκαλέσουν χημικές αντιδράσεις που μπορούν καταστρέψουν το

III. ΥΛΙΚΑ ΚΑΙ ΜΕΘΟΔΟΙ

δείγμα. Η μέθοδος της ξήρανσης με κατάψυξη είναι νέα μέθοδος όπου το νερό μεταβαίνει από τη στερεά κατάσταση (πάγος) στην αέρια (υδρατμός) χωρίς τη μεσολάβηση της υγρής φάσης. Τα δείγματα παρέμειναν στον Freeze-dryer για περίπου 3 ημέρες.

3.9.2 Εκχύλιση ινδολ-3-οξικού οξέος

Για την εκχύλιση του ινδολ-3-οξικού οξέος χρησιμοποιήθηκε μεθανόλη 100% με 0.5 mg Butylated hydroxytoluene (BHT) ml⁻¹. Η εκχύλιση πραγματοποιήθηκε σε θερμοκρασία 4°C με περιστροφικό αναδευτήρα για 1 ώρα. Σε δοκιμαστικό σωλήνα τύπου falcon 15 ml προστέθηκαν 50 mg φυτικού ιστού και 2 ml μεθανόλης. Ύστερα από την εκχύλιση, στο διάλυμα προστέθηκαν 500 mg Polyclar (BDH, UK). Το μείγμα αναδεύτηκε, φυγοκεντρήθηκε για 4 λεπτά με 4,000 rpm και πραγματοποιήθηκε μεταφορά του υπερκειμένου σε νέο δοκιμαστικό σωλήνα. Ακολούθησε εξάτμιση του υπερκειμένου με ροή αζώτου σε θερμοκρασία 40°C και επαναδιάλυση σε 100 μl μεθανόλης. Στη συνέχεια το δείγμα φιλτραρίστηκε με φίλτρο 0,45 μ για την απομάκρυνση στερεών σωματιδίων τα οποία ίσως να βρίσκονται στο δείγμα και είναι πιθανόν να φράζουν τις μονάδες εισαγωγής ή ακόμα και τη στήλη και εισήχθη στο σύστημα της HPLC.

3.9.3 Χρωματογραφική ανάλυση

Για να ξεκινήσει η χρωματογραφική ανάλυση θα πρέπει το δείγμα να εισέλθει στην αρχή της στήλης όπου στη συνέχεια αφού εισέλθει και η κινητή φάση στη στήλη επιτρέπεται ο διαχωρισμός των συστατικών. Τα συστατικά αφού διαχωριστούν εισέρχονται στον ανιχνευτή. Η ανίχνευση πραγματοποιήθηκε με τον ανιχνευτή φθορισμού HP 1050 fluorescence detector με λ_{ex}=280 και λ_{em}=360. 2 τεχνικές επαναλήψεις πραγματοποιήθηκαν ανά δείγμα.

Με τη βοήθεια της χρωματογραφίας επιτρέπεται ο ποιοτικός και ο ποσοτικός προσδιορισμός μιας ουσίας. Αναλύοντας τη χρωματογραφία μπορούν να παρθούν πληροφορίες σχετικά με τον χρόνο κατακράτησης t_R, που είναι ο χρόνος που απαιτείται για την έκλυση μιας ουσίας από τη στήλη όπου εδώ στηρίζεται η ταυτοποίηση των συστατικών ενός δείγματος συγκρινόμενες με τις αντίστοιχες τιμές γνωστού δείγματος (standard mixture) καθώς και για το εμβαδό της κορυφής μιας ουσίας που είναι ανάλογο της συγκέντρωσης του συστατικού και η μέτρηση του γίνεται αυτόματα.

IV. ΑΠΟΤΕΛΕΣΜΑΤΑ

4.1 Μελέτη της μολυσματικής ικανότητας του μύκητα *V. dahliae* καθώς και της επίδρασης του βιολογικού παράγοντα *P. alvei* K165 στα μεταλλαγμένα φυτά *tir1-1*, *afb1-3*, *afb3-4* και *axr4-2*

Σε αυτό το πείραμα αξιολογήθηκε η μολυσματική ικανότητα του μύκητα *V.dahliae* καθώς επίσης και η επίδραση του βιολογικού παράγοντα *P. alvei* K165 στα μεταλλαγμένα φυτά *tir-1*, *afb1-3*, *afb3-2* και *axr4-2*. Πραγματοποιήθηκαν δοκιμές παθογένειας ανάμεσα σε φυτά που είχαν μολυνθεί με το μύκητα αλλά είχε εφαρμοστεί και το βακτήριο και σε φυτά που είχαν μολυνθεί μόνο με το βακτήριο, όπως περιεγράφηκε στην προηγούμενη ενότητα.

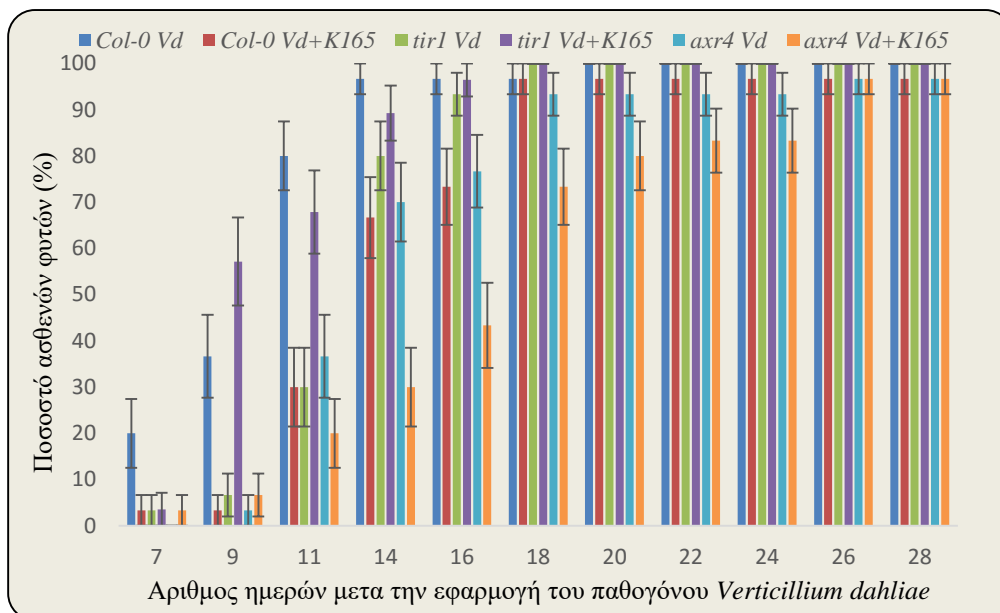
Για τη μελέτη των γονοτύπων *tir1* και *axr4* τα πρώτα συμπτώματα καταγράφηκαν στις 7 ημέρες μετά τη μόλυνση με το παθογόνο, κυρίως ως χλωρώσεις και μαράνσεις και η καταγραφή πραγματοποιούνταν ανά δύο ημέρες, έως τις 28 ημέρες μετά τη μόλυνση. Στη περίπτωση των γονοτύπων *afb1* και *afb3* τα πρώτα συμπτώματα εμφανίστηκαν 11 ημέρες μετά τη μόλυνση και συνεχίστηκε η καταγραφή των συμπτωμάτων έως 24 ημέρες μετά τη μόλυνση. Στις μετρήσεις καταγράφονταν τα ασθενή φύλλα προς το συνολικό αριθμό των φύλλων του κάθε φυτού καθώς επίσης και το σύνολο των ασθενών φυτών ανά επέμβαση σε όλους τους προς εξέταση γονότυπους.

Στα γραφήματα *IA,B* εκφράζεται η συχνότητα της ασθένειας στα μεταλλαγμένα φυτά *tir1*, *axr4* και *afb1*, *afb3* αντίστοιχα καθ' όλη τη διάρκεια του πειράματος σε σύγκριση με το άγριο στέλεχος. Πιο συγκεκριμένα στο γράφημα *IA* παρατηρείται ότι στα μεταλλαγμένα φυτά *tir1* όπου εφαρμόστηκε ο βιολογικός παράγοντας K165 φαίνεται το παθογόνο να παρουσιάζει μια πιο επιθετική εικόνα μόλυνσης από τις πρώτες κιόλας μέρες μετά τη μόλυνση. Εννέα ημέρες μετά την μόλυνση, το ποσοστό των ασθενών φυτών σε αυτή την εφαρμογή είναι ιδιαίτερα αυξημένο (~55%) σε σύγκριση με τα μεταλλαγμένα φυτά *tir1* όπου εφαρμόστηκε μόνο το παθογόνο (~5%). Στα μεταλλαγμένα φυτά-μάρτυρες *axr4* παρατηρείται ότι το ποσοστό των ασθενών φυτών παραμένει σχεδόν στα ίδια επίπεδα με το άγριο στέλεχος Col-0 όπου εφαρμόστηκε εκτός από το παθογόνο και ο βιολογικός παράγοντας K165. Τέλος όσον αφορά την επέμβαση *axr4* που εκτός από το παθογόνο εφαρμόστηκε και το ριζοβακτήριο, τα ασθενή φυτά είναι πολύ λιγότερα καθ' όλη την διάρκεια του πειράματος (μέχρι και 24 μέρες μετά τη μόλυνση) σε σύγκριση με όλες τις επεμβάσεις του άλλου γονότυπου.

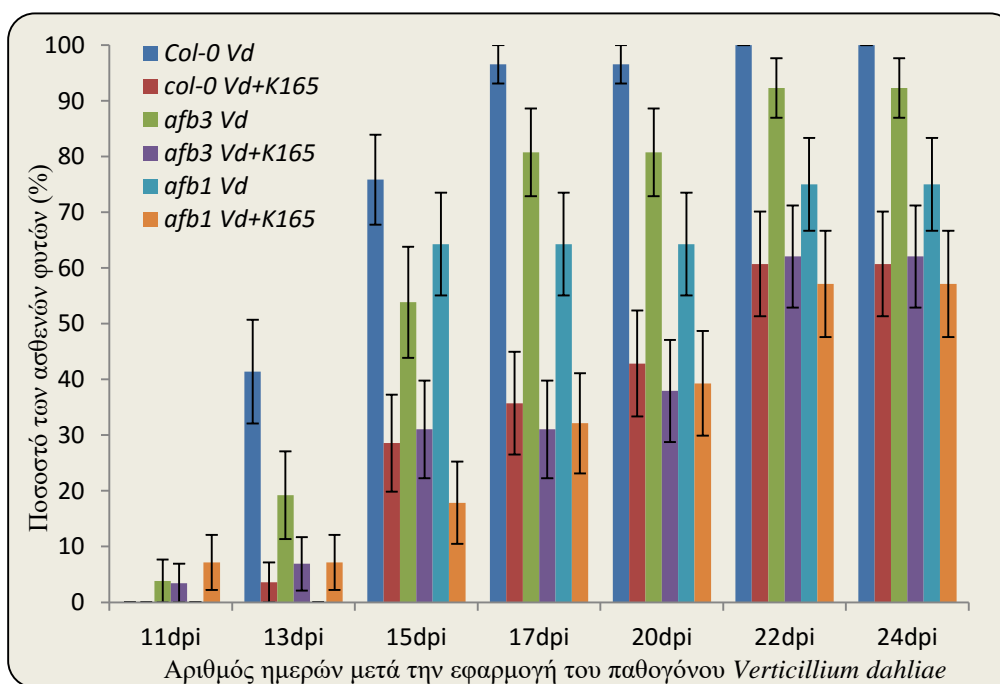
Στο γράφημα *IB* φαίνεται ότι στα μεταλλαγμένα φυτά *afb1* και *afb3* που εφαρμόστηκε ο βιολογικός παράγοντας, το ποσοστό των ασθενών φυτών κυμαίνεται σχεδόν στα ίδια επίπεδα με την αντίστοιχη επέμβαση στο άγριο στέλεχος. Όσον αφορά τα φυτά-μάρτυρες αυτών των δύο γονοτύπων, ο αριθμός των ασθενών φυτών φαίνεται να είναι μικρότερος καθ' όλη τη

IV. ΑΠΟΤΕΛΕΣΜΑΤΑ

διάρκεια του πειράματος σε σύγκριση με τα φυτά-μάρτυρες του άγριου στελέχους, με το γονότυπο *afb1* να παρουσιάζει τα λιγότερα ασθενή φυτά.



Γράφημα 1A: Απεικονίζεται το ποσοστό ασθενών φυτών τόσο στο άγριο στέλεχος όσο και στα μεταλλαγμένα *tir1* και *axr4* φυτών *A.thaliana*

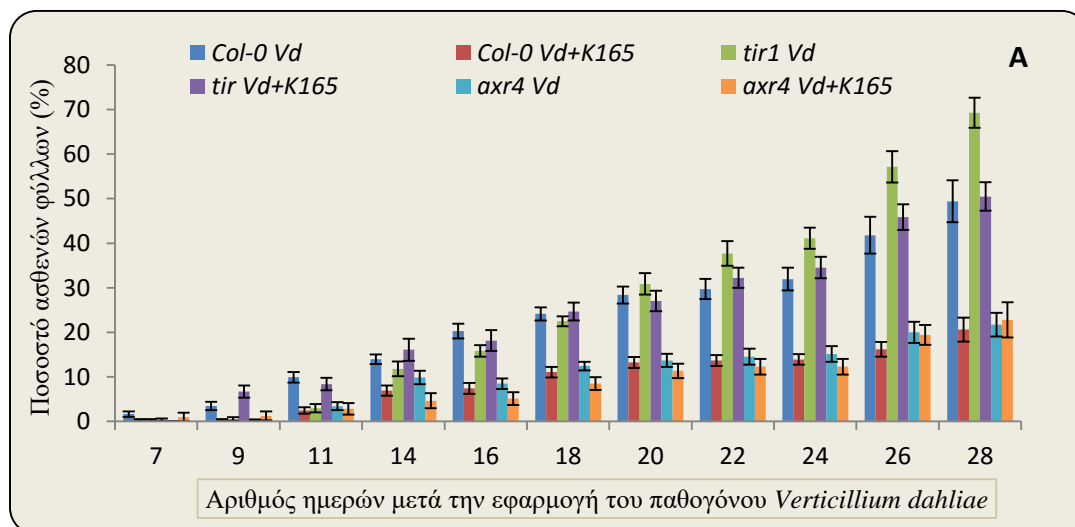


Γράφημα 1B: Απεικονίζεται το ποσοστό ασθενών φυτών τόσο στο άγριο στέλεχος όσο και στα μεταλλαγμένα *afb1* και *afb3* φυτών *A.thaliana*

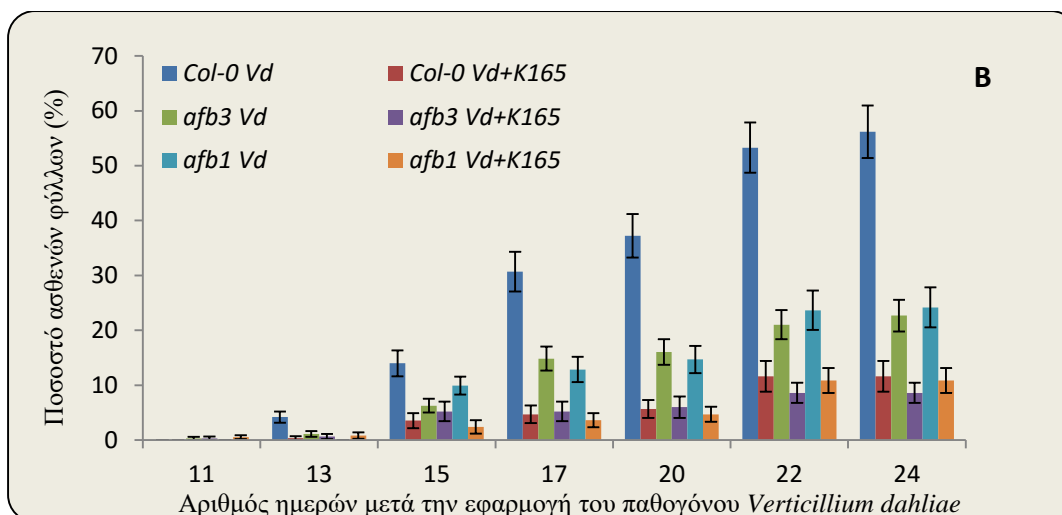
IV. ΑΠΟΤΕΛΕΣΜΑΤΑ

Στο γράφημα 2A (ένταση της ασθένειας) φαίνεται ότι η ασθένεια εμφανίζεται εντονότερη στα μεταλλαγμένα φυτά *tir1* που εμβολιάστηκαν με το παθογόνο. Αξίζει όμως να αναφερθεί ότι τα πρώτα συμπτώματα εκτός από τα άγριου τύπου φυτά Col-0, εμφανίστηκαν στο γονότυπο *tir1* στα οποία είχε εφαρμοσθεί ο βιολογικός παράγοντας. Αυτή η εικόνα παρατηρήθηκε και στο γράφημα 1A όπου αυτός ο γονότυπος με τη συγκεκριμένη εφαρμογή εμφάνισε υψηλό ποσοστό ασθενών φυτών τις πρώτες ημέρες μετά την μόλυνση. Στη συνέχεια όμως αυτή η εικόνα διαφοροποιείται παρατηρώντας μια σταδιακή αύξηση των συμπτωμάτων στα φυτά μάρτυρες του *tir1* γονότυπου όπου αφήνει πίσω του σχεδόν στα ίδια επίπεδα τα μεταλλαγμένα φυτά *tir1* στα οποία είχε εφαρμοσθεί το βακτήριο K165 αλλά και τα φυτά μάρτυρες του άγριου στελέχους. Ενώ το χαμηλότερο ποσοστό ασθενών φύλλων εμφανίζει ο γονότυπος *axr4* και στις δύο επεμβάσεις.

Τέλος όσον αφορά τους άλλους δύο υπό εξέταση γονότυπους φαίνεται στο γράφημα 2B ότι στους γονότυποι *afb1* και *afb3* το ποσοστό των ασθενών φύλλων παραμένει σε ιδιαίτερα χαμηλά επίπεδα καθ' όλη τη διάρκεια του πειράματος και στις 2 επεμβάσεις αλλά με μία ακόμα πιο χαμηλότερη τάση στην επέμβαση με το βακτήριο K165.



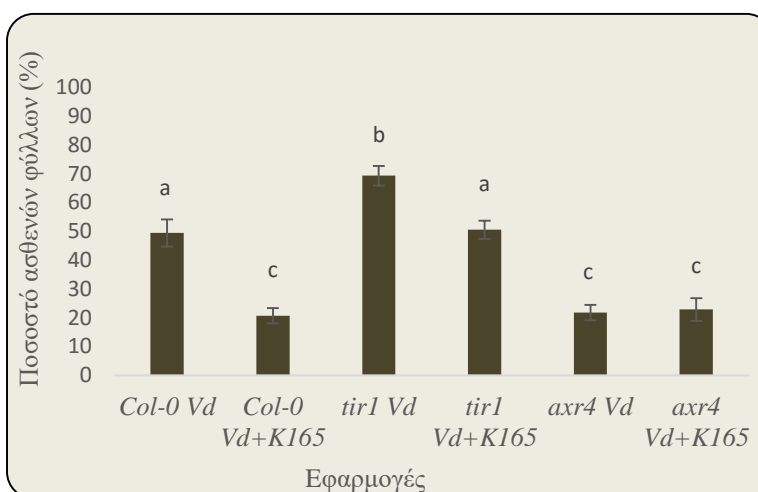
IV. ΑΠΟΤΕΛΕΣΜΑΤΑ



Γράφημα 2:: Συγκριτική απεικόνιση της χρονικής εξέλιξης της ασθένειας στις διάφορες επεμβάσεις στα μεταλλαγμένα φυτά *tir1*, *axr4* (A) και *afb1*, *afb3* (B) αντίστοιχα σε σύγκριση με το άγριο στέλεχος

Στη συνέχεια εκφράστηκε το ποσοστό των ασθενών φύλλων στο τέλος του πειράματος (28dpi) (Γράφηματα 3A,B). Οι τιμές εισήχθησαν σε πρόγραμμα στατιστικής ανάλυσης ANOVA και ακολουθήθηκε στατιστικός έλεγχος με Tukey ($p \leq 0.05$ (SGWIN)) για να διαπιστωθεί ποιοι από τους εξεταζόμενους γονότυπους στις διάφορες επεμβάσεις εμφανίζουν κάποια στατιστικά σημαντική διαφορά ως προς το ποσοστό των ασθενών φύλλων.

Στο γράφημα 3A παρατηρείται ότι τα φυτά μάρτυρες *tir1* εμφανίζουν το υψηλότερο ποσοστό ασθενών φύλλων (~70%) 28 ημέρες μετά τη μόλυνση συγκρινόμενο με τον άλλο γονότυπο καθώς και το άγριο στέλεχος στις εκάστοτε επεμβάσεις. Στα μεταλλαγμένα φυτά *tir1* που εφαρμόστηκε ο βιολογικός παράγοντας, το ποσοστό των ασθενών φύλλων δεν διαφέρει στατιστικά σημαντικά με τα φυτά μάρτυρες του άγριου στελέχους. Τέλος



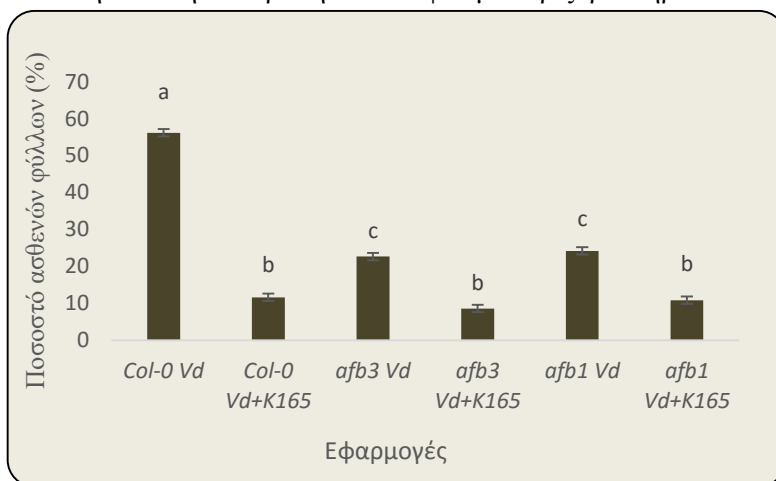
Γράφημα 3A: Συγκριτική απεικόνιση του ποσοστού των ασθενών φύλλων του άγριου στελέχους με τα μεταλλαγμένα φυτά *tir1* και *axr4* στο τέλος του πειράματος (28 ημέρες μετά την μόλυνση)

στα μεταλλαγμένα φυτά *axr4* που εμβολιάστηκαν είτε μόνο με το παθογόνο μύκητα είτε μαζί

IV. ΑΠΟΤΕΛΕΣΜΑΤΑ

και με τον βιολογικό παράγοντα, το ποσοστό των ασθενών φύλλων δεν διαφέρει στατιστικά σημαντικά μεταξύ τους αλλά ούτε και με τα φυτά μάρτυρες του άγριου στελέχους και κυμαίνεται περίπου στο 20 %.

Στο γράφημα 3B υποδηλώνεται η θετική επίδραση του ωφέλιμου ριζοβακτηρίου στα μεταλλαγμένα φυτά *afb1* και *afb3* με ποσοστό των ασθενών φυτών στο τέλος του πειράματος να κυμαίνεται περίπου στο 10% και δεν παρατηρείται σημαντική στατιστική διαφορά σε σύγκριση με το άγριο στέλεχος που προστέθηκε ο βιολογικός παράγοντας. Επίσης αξίζει να αναφερθεί ότι το ποσοστό των ασθενών φύλλων στα φυτά-μάρτυρες



Γράφημα 3B: Συγκριτική Απεικόνιση του ποσοστού των ασθενών φύλλων του άγριου στελέχους με τα μεταλλαγμένα *afb1* και *afb3* στο τέλος του πειράματος (24 ημέρες μετά την μόλυνση)

του *afb1* δεν παρουσιάζουν στατιστικά σημαντική διαφορά με τα αντίστοιχα του *afb3* ενώ σε σύγκριση με το άγριο στέλεχος διαφέρουν σημαντικά

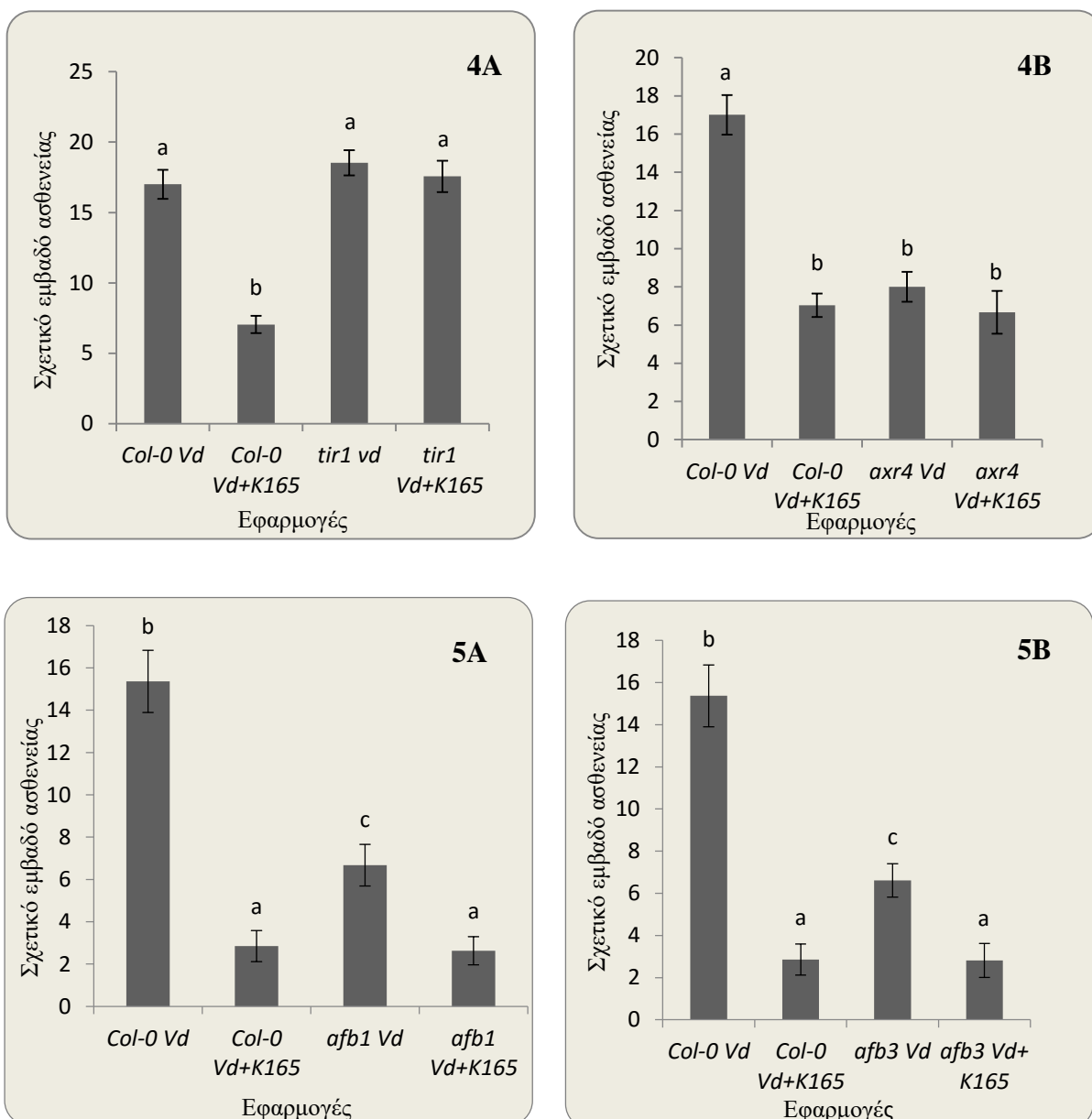
Στα γραφήματα 4A,B καθώς και 5A,B έχει υπολογιστεί η σχετική τιμή του εμβαδού ασθeneίας, Relative AUDPC (η τιμή του εμβαδού ασθeneίας εκφρασμένη ως ποσοστό του μέγιστου δυνατού εμβαδού ασθeneίας για όλη τη χρονική περίοδο των παρατηρήσεων) ώστε να δοθεί μια εικόνα του ποσού της ασθeneίας για τον κάθε γονότυπο αλλά και για την επίδραση του βιολογικού παράγοντα.

Στα γραφήματα 4 A, B απεικονίζεται το σχετικό εμβαδό ασθeneίας του ποσοστού των ασθενών φύλλων σε μεταλλαγμένα φυτά *tir1* και *axr4* όπου διακρίνεται ευαισθησία και ανθεκτικότητα αντίστοιχα, ως προς το παθογόνο σε σύγκριση με το άγριο στέλεχος. Στην περίπτωση του K165 δεν παρατηρήθηκε καμία προστασία σε κανέναν από τους δύο γονοτύπους. Αυτό μπορεί να θεωρηθεί λογικό στην περίπτωση του *axr4* διότι το ποσοστό των συμπτωμάτων ήταν σε ιδιαίτερα χαμηλά επίπεδα παρόμοια με της αντίστοιχης επέμβασης του άγριου στελέχους. Όσον αφορά την περίπτωση των *tir1* φαίνεται ότι και στις δύο επεμβάσεις του, η ένταση της ασθeneίας κυμαίνεται στα ίδια επίπεδα σε σύγκριση με το μάρτυρα του άγριου στελέχους ενώ στην περίπτωση των φυτών-μάρτυρες του *axr4*, τα αγρίου τύπου φυτά είχαν 2 φορές περισσότερα συμπτώματα. Επίσης αυτό που χρήζει ιδιαίτερης σημασίας είναι ότι στα *tir1* φυτά που εφαρμόστηκε ο βιολογικός

IV. ΑΠΟΤΕΛΕΣΜΑΤΑ

παράγοντας παρουσιάζουν 2 φορές περισσότερα συμπτώματα σε σύγκριση με την αντίστοιχη επέμβαση στο άγριο στέλεχος.

Η σοβαρότητα της ασθένειας που εκφράζεται στα *γραφήματα 5 A,B* φαίνεται να κυμαίνεται σε χαμηλά επίπεδα για τους γονοτύπους *afb1* και *afb3* όπου παρουσιάζουν ανθεκτικότητα ως προς το παθογόνο με τα συμπτώματα τους να είναι 2 φορές λιγότερα σε σύγκριση με το άγριο στέλεχος. Ακόμα παρατηρήθηκε και θετική επίδραση του ριζοβακτηρίου K165 όπου έδωσε μια επιπλέον προστασία στους συγκεκριμένους γονοτύπους, μη διαφέροντας στατιστικά όμως με την επέμβαση του K165 στο άγριο στέλεχος



Γραφήματα 4,5: Συγκριτική απεικόνιση του εμβαδού της καμπύλης εξέλιξης της ασθένειας της ασθένειας για τους μεταλλαγμένους γονοτύπους *tir1* (4A), *axr4* (4B) καθώς επίσης και για τους *afb1* (5A), *afb3* (5B).

IV. ΑΠΟΤΕΛΕΣΜΑΤΑ

Επομένως φαίνεται πως τα γονίδια *AFB1*, *AFB3* και *AXR4* διαδραματίζουν σημαντικό ρόλο στην αλληλεπίδραση του φυτού *A. thaliana* με το μύκητα *V.dahliae* και η μετάλλαξη τους με ένθεση T-DNA προκαλεί ανθεκτικότητα των φυτών στον μύκητα. Επίσης τα γονίδια *TIR1* και *AXR4* φαίνεται να είναι ύψιστης σημασίας για την θετική επίδραση του βιολογικού παράγοντα K165.

IV. ΑΠΟΤΕΛΕΣΜΑΤΑ



Εικόνα 15: Συμπτωματολογική εικόνα μεταλλαγμένων φυτών *tir1*, *afb1*, *afb3* και *axr4* σε σύγκριση με το άγριο στέλεχος (Col-0)

IV. ΑΠΟΤΕΛΕΣΜΑΤΑ

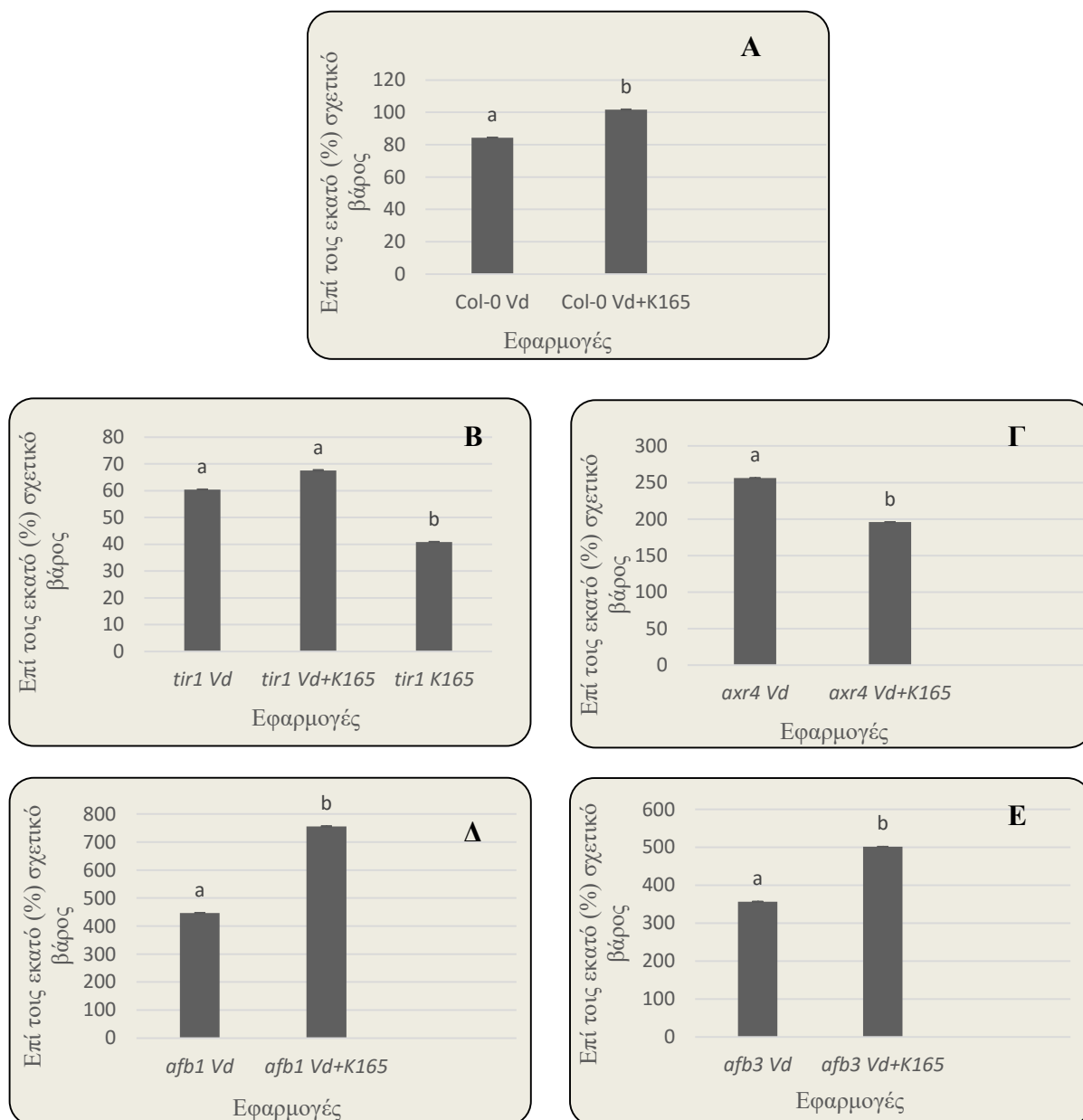
4.2 Μέτρηση νωπού βάρους φυτών ανά γονότυπο και ανά επέμβαση

Μετά το τέλος της καταμέτρησης των συμπτωμάτων έγινε παραλαβή του υπέργειου μέρους (βλαστός και φύλλα) 30 φυτών και βρέθηκε το μέσο νωπό βάρος κάθε φυτού ανά γονότυπο και επέμβαση. Το μέσο νωπό βάρος των μολυσμένων φυτών για κάθε γονότυπο εκφράστηκε ως επί τις % του μέσου νωπού βάρους των αμόλυντων φυτών (Mock), προκειμένου οι διαφορές τους να οφείλονται αποκλειστικά και μόνο στην ένταση της ασθένειας και όχι στον διαφορετικό φαινότυπο των φυτών του κάθε γονοτύπου.

Στα παρακάτω *γραφήματα 6 (A,B,Γ,Δ)* απεικονίζεται το νωπό βάρος για κάθε φυτό και στις δύο επεμβάσεις ανά γονότυπο. Παρατηρήθηκε ότι στα φυτά τα οποία εμφάνισαν ανθεκτικότητα ως προς το παθογόνο καθώς επίσης επιτεύχθηκε προστασία από τον βιολογικό παράγοντα, φάνηκε ότι το νωπό βάρος του κάθε φυτού ήταν ιδιαίτερα αυξημένο σε σύγκριση με τα μη μολυσμένα φυτά του κάθε γονοτύπου. Στα μεταλλαγμένα φυτά μάρτυρες *afb1*, *afb3* και *axr4* το μέσο νωπό βάρος του κάθε φυτού ήταν 1, 3.5 και 2.5 φορές μεγαλύτερο αντίστοιχα σε σύγκριση με τα αμόλυντα τους φυτά. Ενώ όταν εμβολιάστηκε και το ριζοβακτήριο παρουσιάστηκε ακόμα μεγαλύτερη αύξηση του μέσου νωπού βάρους του κάθε φυτού που υπολογίστηκε ότι ήταν περίπου 7, 5 και 2 φορές μεγαλύτερο αντίστοιχα. Αξίζει να αναφερθεί ότι στην περίπτωση του γονιδίου *TIR1* και στις δυο επεμβάσεις, το κάθε φυτό ζύγιζε περίπου το μισό του αμόλυντου. Όμως στην περίπτωση που εφαρμόστηκε μόνο ο βιολογικός παράγοντας το βάρος μειώθηκε ακόμα περισσότερο, έχοντας σημαντική στατιστική διαφορά σε σύγκριση με τις δύο άλλες επεμβάσεις του ίδιου γονοτύπου.

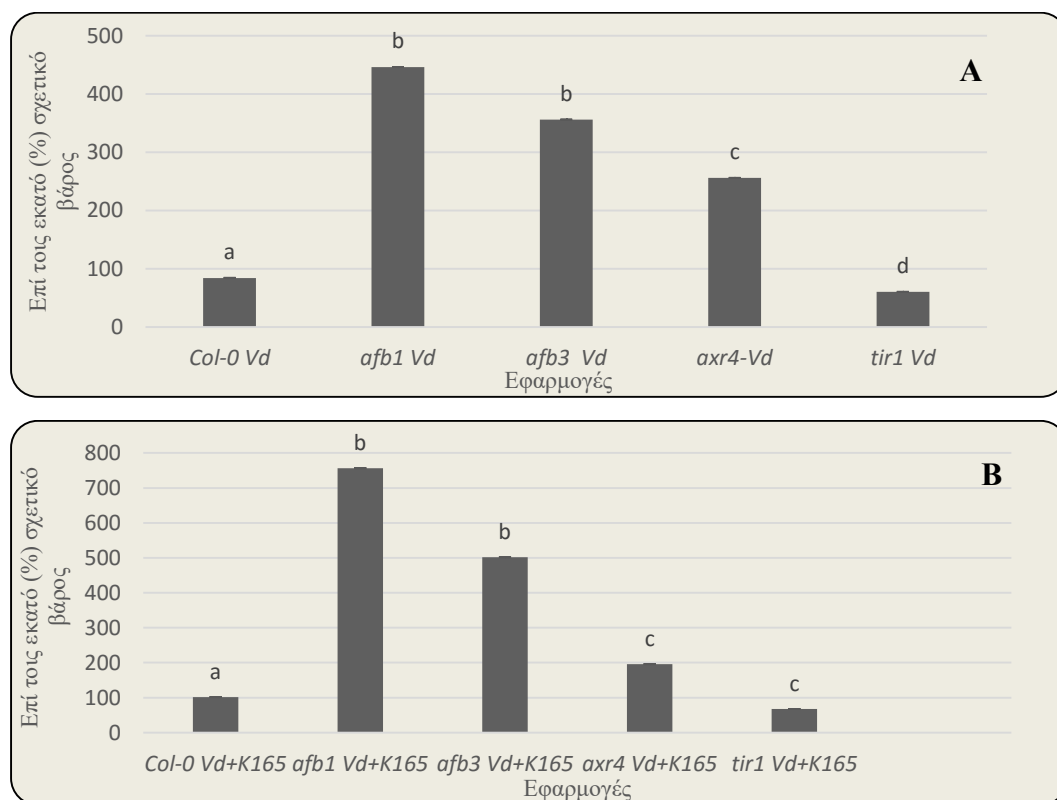
Στα *γραφήματα 7A,B* συγκρίνονται όλοι οι γονότυποι μεταξύ τους ανά επέμβαση. Έγινε αντιληπτό ότι όταν εφαρμόστηκε μόνο το παθογόνο το μέσο νωπό βάρος του κάθε φυτού στους γονότυπους *afb1* και *afb3* δεν διαφέρει στατιστικά σημαντικά όπως συμβαίνει στους υπόλοιπους γονοτύπους. Η ίδια ακριβώς εικόνα παρατηρήθηκε και όταν εφαρμόστηκε σε συνδυασμό με τον βιολογικό παράγοντα, με την μόνη διαφορά ότι οι γονότυποι *axr4* και *tir1* δεν εμφανίζουν στατιστικά σημαντική διαφορά.

IV. ΑΠΟΤΕΛΕΣΜΑΤΑ



Γράφημα 6: Μέσο νωπό βάρος κάθε φυτού ανά γονότυπο

IV. ΑΠΟΤΕΛΕΣΜΑΤΑ



Γράφημα 7: Συγκριτική απεικόνιση του μέσου νωπού βάρους ανά επέμβαση

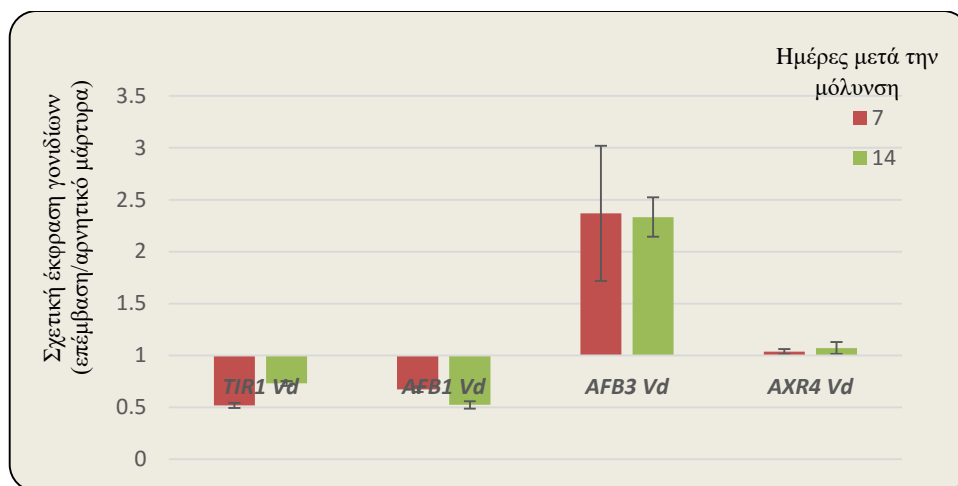
4.3 Αποτελέσματα των επιπέδων έκφρασης των γονιδίων *TIR1*, *AFB1*, *AFB3* και *AXR4* στα φυτά αγρίου τύπου κατά την διαδικασία αλληλεπίδρασης με το παθογόνο μύκητα *V.dahliae* και το ριζοβακτήριο *P. alvei* K165

Προκειμένου να διαπιστωθεί εάν ο παθογόνος μύκητας ή ο βιολογικός παράγοντας, ή και συνδυασμός και των δύο, επηρεάζουν την έκφραση των υπό εξέταση γονιδίων, διερευνήθηκαν τα επίπεδα έκφρασης των γονιδίων *TIR1*, *AFB1*, *AFB3* και *AXR4*. Για το σκοπό αυτό, συλλέχθηκε ιστός τόσο από το υπέργειο μέρος όσο και από το ριζικό σύστημα 7 και 14 ημέρες μετά την μόλυνση από φυτά στα οποία είχε εμβολιασθεί τόσο το παθογόνο όσο και ο βιολογικός παράγοντας ή είχε εφαρμοστεί μόνο το παθογόνο ή μόνο ο βιολογικός παράγοντας, όπως έχει ήδη αναφερθεί. Τα επίπεδα έκφραση των γονιδίων στις παραπάνω επεμβάσεις κανονικοποιήθηκαν σε σχέση με την έκφραση του γονιδίου τουμπουλίνη 4 (*tubulin 4*, *At4g26410* γονίδιο αναφοράς εξαιτίας της σταθερής του έκφρασης) στα ίδια δείγματα, και εκφράστηκαν σε σχέση με τα κανονικοποιημένα επίπεδα μεταγραφής των ίδιων γονιδίων στα μη μολυσμένα φυτά.

IV. ΑΠΟΤΕΛΕΣΜΑΤΑ

Έκφραση των γονιδίων στα φύλλα

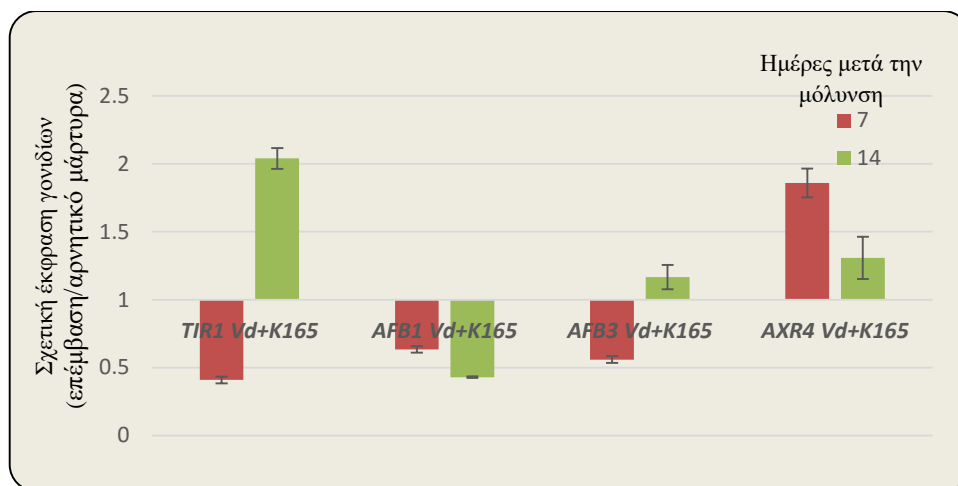
Η έκφραση των γονιδίων *TIR1*, *AFB1* και *AXR4* τόσο στις 7 όσο και στις 14 ημέρες μετά την μόλυνση με το παθογόνο δεν φαίνεται να επηρεάζεται ιδιαίτερα. Πιο συγκεκριμένα παρατηρείται μια μειωμένη έκφραση τόσο στο γονίδιο *TIR1* όσο και στο *AFB1* και στις δύο χρονικές στιγμές ενώ το γονίδιο *AXR4* φαίνεται να εκφράζεται ελάχιστα παραπάνω σε σύγκριση με τα αμόλυντα φυτά. Όμως το γονίδιο *AFB3* υπερεκφράζεται σταθερά και στις δύο χρονικές στιγμές (Γράφημα 8).



Γράφημα 8: Σχετική έκφραση των γονιδίων *TIR1*, *AFB1*, *AFB3* και *AXR4* στο υπέργειο τμήμα των μολυσμένων με το μύκητα *V. dahliae* αγρίου τύπου φυτά Col-0 στις 7 και 14 ημέρες μετά την μόλυνση

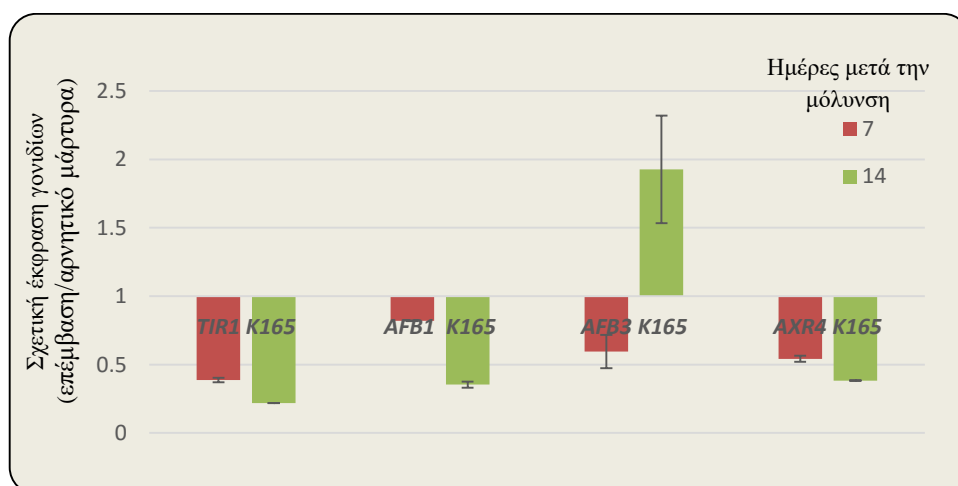
Όσον αφορά την περίπτωση που εφαρμόστηκε ο βιολογικός παράγοντας σε συνδυασμό με τον παθογόνο μύκητα, παρατηρείται ότι η παραπάνω εικόνα διαφοροποιείται για τα γονίδια *TIR1*, *AFB3* και *AXR4*. Το γονίδιο *TIR1* υποεκφράστηκε στις 7 ημέρες ενώ στις 14 παρατηρήθηκε μια αύξηση της έκφρασης αν εξετασθεί σε σύγκριση με την προηγούμενη εφαρμογή που εφαρμόστηκε μόνο του το παθογόνο. Η έκφραση του γονιδίου *AFB3* στις 7 ημέρες ήταν μειωμένη, σε σύγκριση με τα μη μολυσμένα φυτά καθώς επίσης και με τα φυτά της προηγούμενης επέμβασης, ενώ στις 14 ημέρες φαίνεται να εκφράζεται ελάχιστα. Επιπλέον, τόσο στις 7 όσο και στις 14 ημέρες τα επίπεδα έκφρασης του γονιδίου *AXR4* ήταν σαφώς πιο αυξημένα και στις 2 χρονικές στιγμές συγκρινόμενα τόσο με τα αμόλυντα φυτά όσο και με τα φυτά της προηγούμενης επέμβασης. Όμως παρατηρείται ότι το γονίδιο *AFB1* συνεχίζει να παρουσιάζει ακόμα πιο μειωμένα επίπεδα σε σύγκριση με την προηγούμενη επέμβαση, όπου φτάνει στις 17 ημέρες να παρατηρείται και η υποέκφραση του (Γράφημα 9).

IV. ΑΠΟΤΕΛΕΣΜΑΤΑ



Γράφημα 9: Σχετική έκφραση των γονιδίων *TIR1*, *AFB1*, *AFB3* και *AXR4* στο υπέργειο τμήμα των μολυσμένων με το μύκητα *V. dahliae* και με το βακτήριο *P. alvei* K165 αγρίου τύπου φυτά Col-0 στις 7 και 14 ημέρες μετά την μόλυνση

Εξετάζοντας και την περίπτωση που εφαρμόζεται μόνος του ο βιολογικός παράγοντας, γίνεται αντιληπτό ότι στις 14 ημέρες παρατηρείται υποέκφραση σχεδόν σε όλα τα γονίδια εκτός από την περίπτωση του *AFB3* όπου παρατηρείται μια αυξημένη έκφραση σε σχέση με τα αμόλυντα φυτά. Στις 7 ημέρες τα επίπεδα έκφρασης των γονιδίων *AFB1*, *AFB3* και *TIR1* είναι πιο χαμηλά ενώ το *TIR1* υποεκφράζεται ελάχιστα (Γράφημα10)

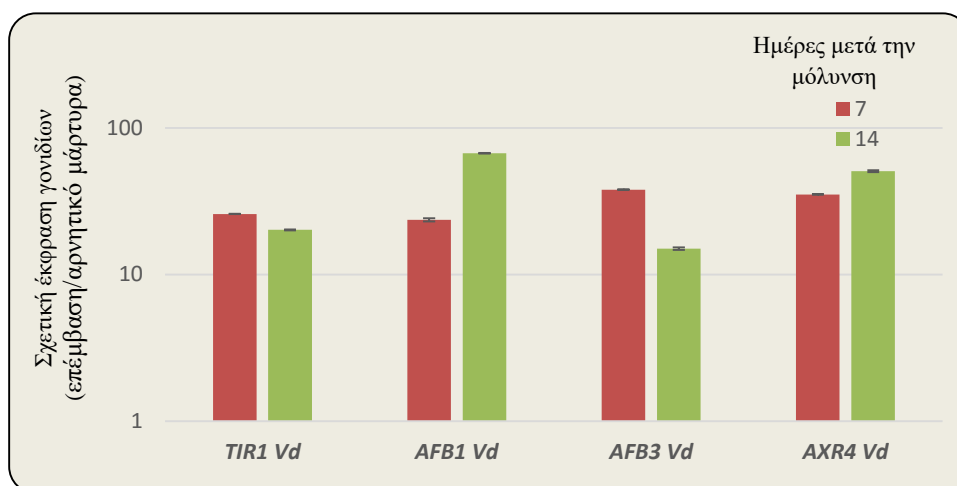


Γράφημα 10: Σχετική έκφραση των γονιδίων *TIR1*, *AFB1*, *AFB3* και *AXR4* στο υπέργειο τμήμα φυτών αγρίου τύπου Col-0 όπου εφαρμόστηκε μόνο το βακτήριο *P. alvei* K165 στις 7 και 14 ημέρες μετά την μόλυνση

IV. ΑΠΟΤΕΛΕΣΜΑΤΑ

Έκφραση των γονιδίων στις ρίζες

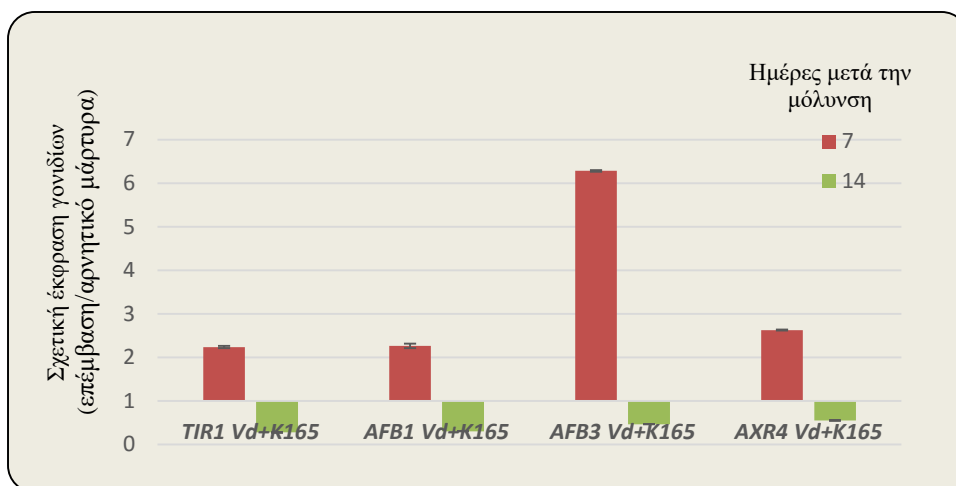
Εξετάζοντας την έκφραση αυτών των γονιδίων και στις ρίζες φαίνεται να δημιουργείται μια τελείως διαφορετική εικόνα. Πιο συγκεκριμένα αυξημένη υπερέκφραση παρατηρείται και στα τέσσερα γονίδια και στις δύο χρονικές στιγμές όταν πραγματοποιήθηκε επέμβαση στα φυτά μόνο με το παθογόνο. Η έκφραση αυτών των γονιδίων ήταν τουλάχιστον 10 φορές μεγαλύτερη σε σύγκριση με τα αμόλυντα φυτά (Γράφημα 11).



Γράφημα 11: Σχετική έκφραση των γονιδίων *TIR1*, *AFB1*, *AFB3* και *AXR4* στο ριζικό σύστημα των μολυσμένων με το μύκητα *V. dahliae* αγρίου τύπου Col-0 στις 7 και 14 ημέρες μετά την μόλυνση

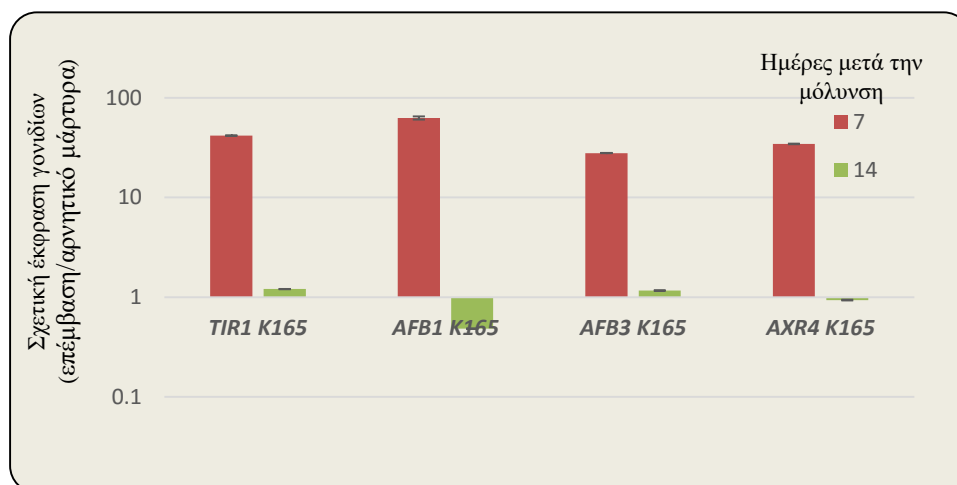
Συγκρίνοντας την επέμβαση του βιολογικού παράγοντα σε συνδυασμό με το παθογόνο και με την επέμβαση μόνο του παθογόνου παρατηρείται σημαντική μείωση της έκφρασης και τις δύο χρονικές στιγμές. Σαν μια πρώτη εικόνα τόσο στις 17 όσο και στις 14 ημέρες, ο βιολογικός παράγοντας προσπαθεί να μειώσει αυτή την έκφραση σε μεγαλύτερο (14^η ημέρα) και μικρότερο βαθμό (7^η μέρα). Όμως σε σύγκριση με τα μη μολυσμένα φυτά στις 7 ημέρες, υπερέκφραστηκαν ελάχιστα όλα τα γονίδια εκτός από το *AFB3* που υπερεκφράστηκε αρκετά σημαντικά ενώ στις 14 ημέρες φάνηκε μειωμένη έκφραση (Γράφημα 12).

IV. ΑΠΟΤΕΛΕΣΜΑΤΑ



Γράφημα 12: Σχετική έκφραση των γονιδίων *TIR1*, *AFB1*, *AFB3* και *AXR4* στο ριζικό σύστημα των μολυσμένων με το μύκητα *V. dahliae* και με το βακτήριο *P.alvei* K165 αγρίου τύπου Col-0 στις 7 και 14 ημέρες μετά την μόλυνση

Όταν όμως εφαρμόστηκε μόνος του ο βιολογικός παράγοντας παρατηρήθηκε η ίδια εικόνα με την περίπτωση που εφαρμόστηκε μόνο του το παθογόνο αλλά με τη μόνη διαφορά ότι στις 14 ημέρες τα επίπεδα έκφρασης όλων των γονιδίων μειώθηκαν αρκετά σημαντικά (Γράφημα 13).



Γράφημα 13: Σχετική έκφραση των γονιδίων *TIR1*, *AFB1*, *AFB3* και *AXR4* στο ριζικό σύστημα φυτών αγρίου τύπου Col-0 όπου εφαρμόστηκε μόνο το βακτήριο *P.alvei* K165 στις 7 και 14 ημέρες μετά την μόλυνση

IV. ΑΠΟΤΕΛΕΣΜΑΤΑ

4.4 Αποτελέσματα των επιπέδων έκφρασης των γονιδίων *PR1* και *PDF1.2* στην αλληλεπίδραση των γονοτύπων *tir1*, *afb1*, *afb3* και *axr4* με τον παθογόνο μύκητα *V. dahliae* και με τον βιολογικό παράγοντα *P.alvei* K165

Προκειμένου να διαπιστωθεί αν η συμπτωματολογική εικόνα των μεταλλαγμένων φυτών *tir1*, *afb1*, *afb3* και *axr4* οφείλεται στην επαγωγή της διασυστηματικής άμυνας, επιλέχθηκαν να διερευνηθούν τα επίπεδα έκφρασης των γονιδίων *PR1* και *PDF1.2*. Αυτά τα γονίδια χρησιμοποιήθηκαν γιατί είναι δείκτες της ενεργοποίησης των μονοπατιών του σαλικυλικού οξέος (*PR1*) και του ιασμονικού/αιθυλενίου (*PDF1.2*).

Για το σκοπό αυτό, συλλέχθηκε ιστός από το υπέργειο μέρος των μεταλλαγμένων φυτών καθώς και του άγριου στελέχους. Η καταγραφή της έκφρασης αυτών των γονιδίων πραγματοποιήθηκε στις 3, 7 και 14 ημέρες μετά την μόλυνση με τον παθογόνο μύκητα αλλά καθώς επίσης σε συνδυασμό με τον βιολογικό παράγοντα. Από κάθε δείγμα απομονώθηκε το σύνολο των μεταγραφημάτων (mRNA) έτσι ώστε να προσδιορισθούν αυτά τα γονίδια με την μέθοδο της Real-Time PCR. Τα επίπεδα έκφρασης του κάθε γονιδίου κανονικοποιήθηκαν σε σχέση με την έκφραση του γονιδίου τουμπουλίνη 4 (*tubulin 4*, *At4g26410*) στα ίδια δείγματα. Στα μεταλλαγμένα φυτά μάρτυρες τα επίπεδα έκφρασης των γονιδίων *PR1* και *PDF1.2* εκφράστηκαν σε σχέση με τα κανονικοποιημένα επίπεδα μεταγραφής των ίδιων γονιδίων στα φυτά μάρτυρες του άγριου στελέχους, ενώ στα μεταλλαγμένα φυτά που εφαρμόστηκε εκτός από τα παθογόνο και ο βιολογικός παράγοντας, τα αντίστοιχα γονίδια εκφράστηκαν σε σχέση με τα επίπεδα μεταγραφής των Col-0 φυτών στα οποία εφαρμόστηκε το παθογόνο και ο βιολογικός παράγοντας.

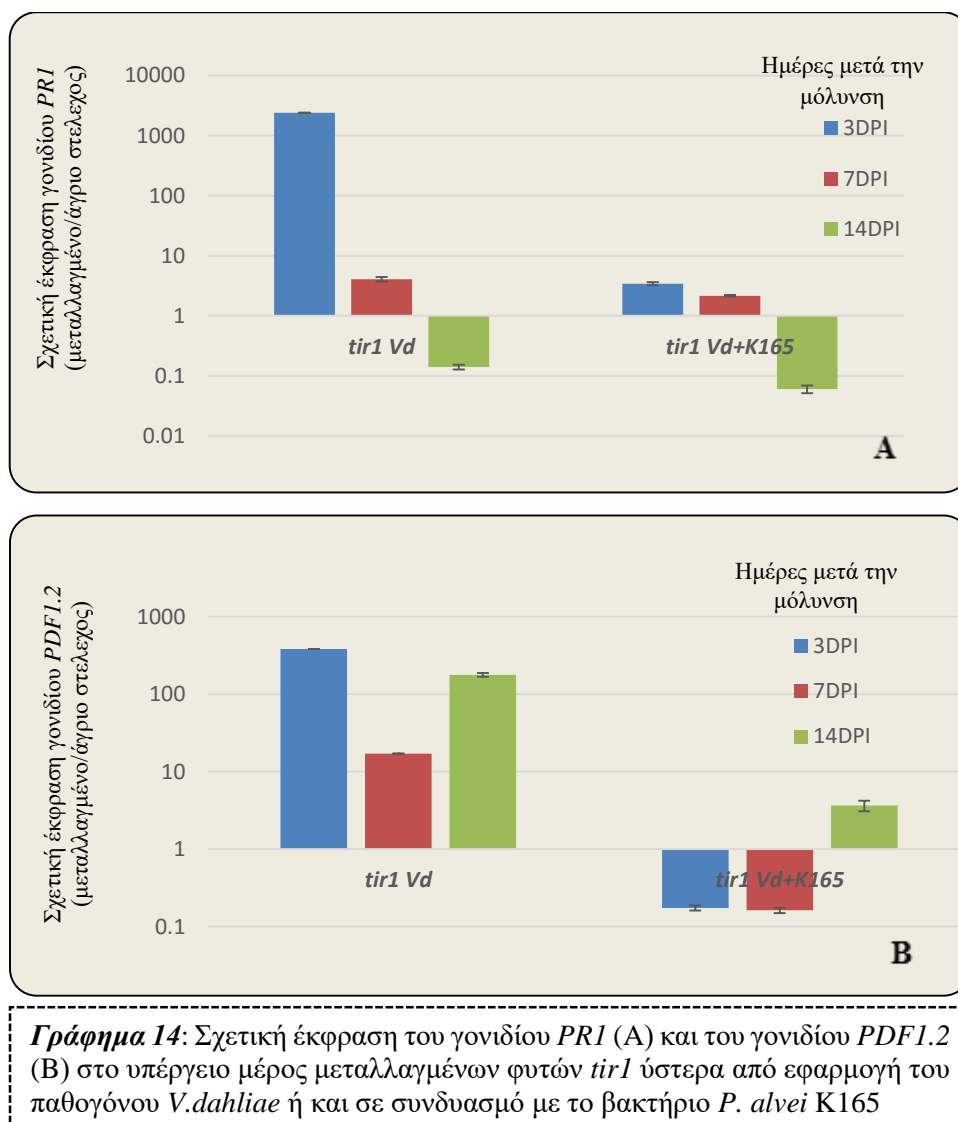
4.4.1 Μελέτη της έκφρασης των γονιδίων *PR1* και *PDF1.2* στα μεταλλαγμένα φυτά *tir1*

Η έκφραση του γονιδίου *PR1* στα μεταλλαγμένα φυτά μάρτυρες 3 ημέρες μετά την μόλυνση εμφανίζεται αυξημένη κατά 1000 φορές σε σχέση με τα άγριου τύπου φυτά που δέχθηκαν την ίδια επέμβαση. Όμως αυτή η έκφραση μειώνεται αξιοσημείωτα στις επόμενες χρονικές στιγμές. Στην περίπτωση που εφαρμόστηκε και ο βιολογικός παράγοντας παρατηρείται ότι στις 3 και στις 7 ημέρες τα επίπεδα έκφρασης του είναι ελαφρά αυξημένα, ενώ στις 14 ημέρες απεικονίζεται η έκφρασή του να είναι 10 φορές μικρότερη σε σχέση με τα άγριου τύπου φυτά διαχειριζόμενα την ίδια επέμβαση (Γράφημα 14 Α).

Επίσης η έκφραση του γονιδίου *PDF1.2* στα μεταλλαγμένα φυτά μάρτυρες φαίνεται να είναι ιδιαίτερα αυξημένη και στις τρεις χρονικές στιγμές. Πιο συγκεκριμένα την 3^η και την 14^η

IV. ΑΠΟΤΕΛΕΣΜΑΤΑ

ημέρα είναι αυξημένη 100 φορές ενώ την 7^η 10 φορές σε σύγκριση με τα φυτά μάρτυρες του άγριου στελέχους. Όταν όμως εφαρμόστηκε και το ριζοβακτήριο σημειώνεται η ακριβώς αντίθετη εικόνα σε σχέση με την έκφραση του γονιδίου *PR1* (Γράφημα 14 Β).



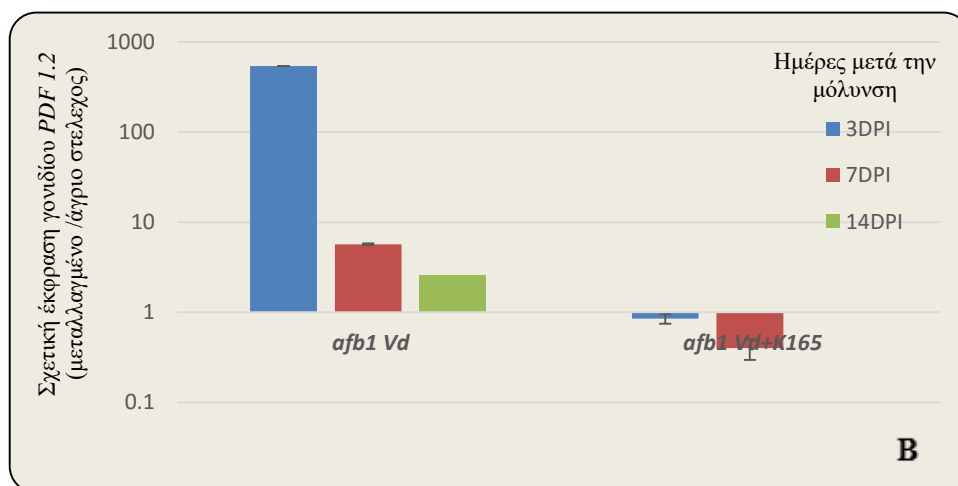
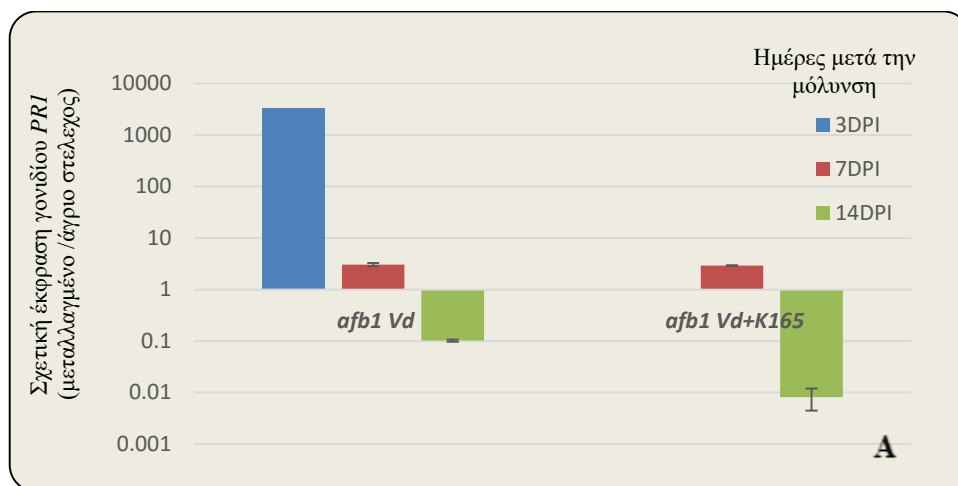
Γράφημα 14: Σχετική έκφραση του γονιδίου *PR1* (A) και του γονιδίου *PDF1.2* (B) στο υπέργειο μέρος μεταλλαγμένων φυτών *tir1* ύστερα από εφαρμογή του παθογόνου *V.dahliae* ή και σε συνδυασμό με το βακτήριο *P. alvei* K165

4.4.2 Μελέτη της έκφρασης των γονιδίων *PR1* και *PDF1.2* στα μεταλλαγμένα φυτά *afb1*

Στις 3 ημέρες η έκφραση του γονιδίου *PR1* στα μεταλλαγμένα φυτά μάρτυρες είναι 1000 φορές αυξημένη ενώ στις 14 ημέρες είναι 10 φορές μικρότερη σε σύγκριση με τα φυτά μάρτυρες του άγριου στελέχους. Όταν όμως εφαρμόστηκε και το ριζοβακτήριο η έκφρασή του φαίνεται να είναι μηδενική στις 3 ημέρες ενώ στις επόμενες χρονικές στιγμές ακολουθεί την ίδια πορεία όπως απεικονίστηκε στα φυτά μάρτυρες με την διαφορά ότι στις 14 ημέρες τα επίπεδα έκφρασης του είναι 100 φορές μικρότερα σε σχέση με το άγριο στέλεχος που επιδέχθηκαν την αντίστοιχη επέμβαση (Γράφημα 15 Α).

IV. ΑΠΟΤΕΛΕΣΜΑΤΑ

Το γονίδιο *PDF1.2*, όταν τα μεταλλαγμένα φυτά εμβολιάστηκαν μόνο με το παθογόνο εμφάνισε αυξημένα επίπεδα έκφρασης και στις τρεις χρονικές στιγμές όπου την 3^η μέρα είναι τουλάχιστον 100 φορές αυξημένη σε σύγκριση με τα φυτά μάρτυρες του άγριου στελέχους. Στην περίπτωση που εφαρμόστηκε και ο βιολογικός παράγοντας τα επίπεδα έκφρασης είναι ελαφρά μειωμένα (Γράφημα 15 Β).



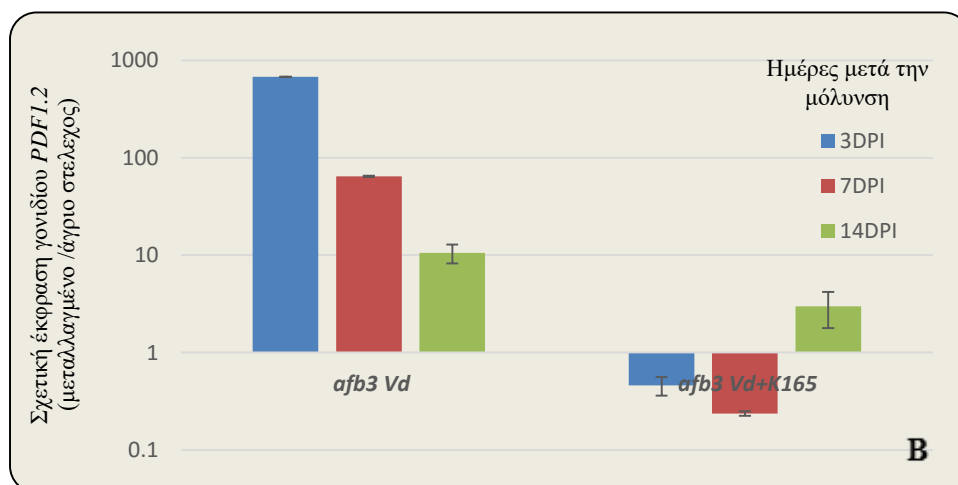
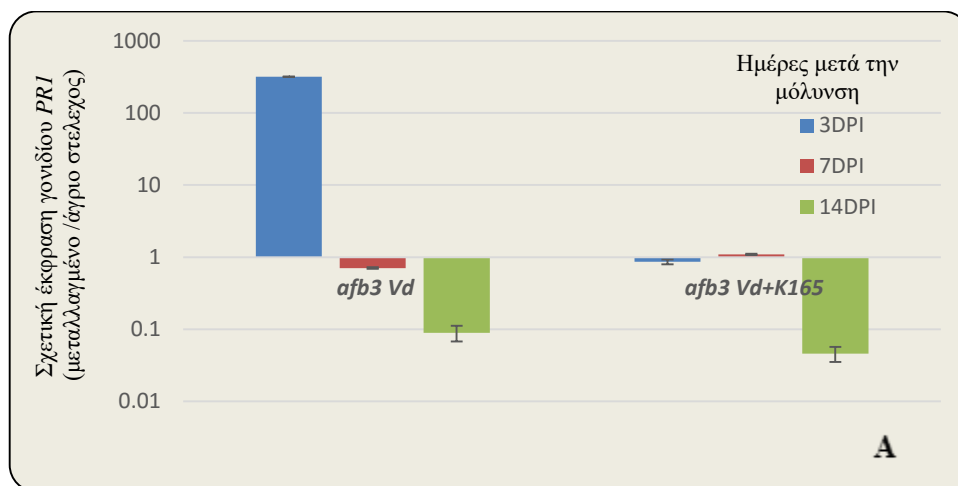
Γράφημα 15: Σχετική έκφραση του γονιδίου *PRI* (Α) και του γονιδίου *PDF1.2* (Β) στο υπέργειο μέρος μεταλλαγμένων φυτών *afb1* ύστερα από εφαρμογή του παθογόνου *V.dahliae* ή και σε συνδυασμό με το βακτήριο *P. alvei* K165

4.4.3 Μελέτη της έκφρασης των γονιδίων *PRI* και *PDF1.2* στα μεταλλαγμένα φυτά *afb3*

Η έκφραση του γονιδίου *PRI* στα μεταλλαγμένα φυτά μάρτυρες εμφανίζεται αυξημένη κατά 100 φορές την 3^η ημέρα ενώ την 14^η είναι μειωμένη κατά 10 φορές σε σύγκριση με τα φυτά μάρτυρες του άγριου στελέχους. Όταν όμως εφαρμόστηκε και το ριζοβακτήριο τα επίπεδα έκφρασης του είναι αρκετά μειωμένα έως και 10 φορές σε σύγκριση με άγριο στέλεχος στα οποία εφαρμόστηκε η ίδια επέμβαση (γράφημα 16 Α).

IV. ΑΠΟΤΕΛΕΣΜΑΤΑ

Η έκφραση του γονιδίου *PDF1.2* στα μεταλλαγμένα φυτά που εφαρμόστηκε μόνο το παθογόνο φαίνεται να είναι αρκετά αυξημένη και στις 3 χρονικές στιγμές (τουλάχιστον 100 φορές την 3^η μέρα, 10 φορές την 7^η και την 14^η) σε σύγκριση με τα Col-0 φυτά μάρτυρες. Στην περίπτωση που εφαρμόστηκε και το ριζοβακτήριο αντικατοπτρίζεται η εντελώς αντίθετη εικόνα σε σχέση με την έκφραση του γονιδίου *PR1* (γράφημα 16 B).



Γράφημα 16: Σχετική έκφραση του γονιδίου *PR1* (A) και του γονιδίου *PDF1.2* (B) στο υπέργειο μέρος μεταλλαγμένων φυτών *afb3* ύστερα από εφαρμογή του παθογόνου *V.dahliae* ή και σε συνδυασμό με το βακτήριο *P. alvei* K165

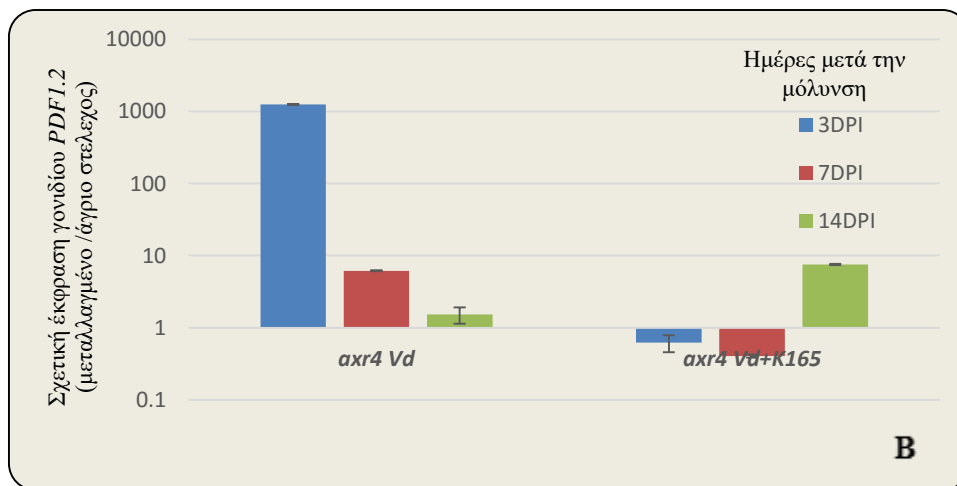
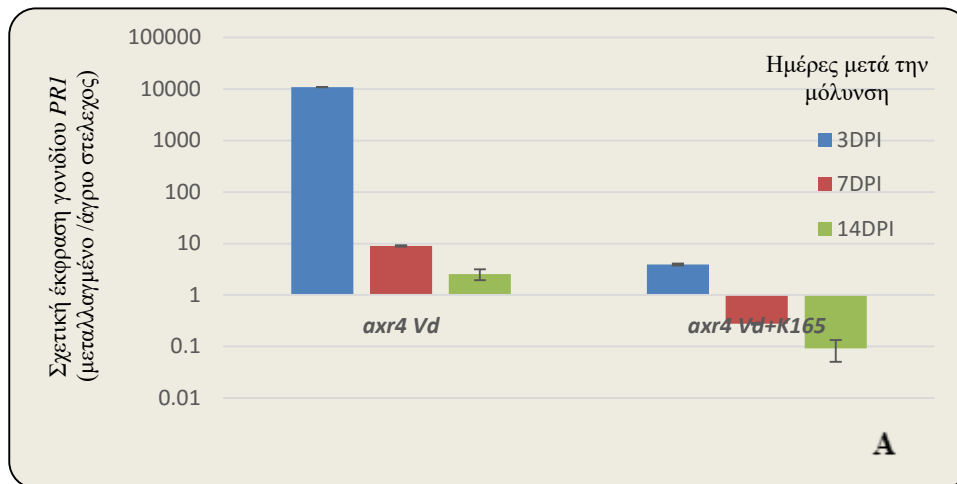
4.4.4 Μελέτη της έκφρασης των γονιδίων *PR1* και *PDF1.2* στα μεταλλαγμένα φυτά *axr4*

Τα επίπεδα έκφρασης του *PR1* στα μεταλλαγμένα φυτά που εμβολιάστηκαν μόνο με τον παθογόνο μύκητα είναι αυξημένα σε σύγκριση με τα φυτά μάρτυρες του άγριου στελέχους όπου τα υψηλότερα επίπεδα έκφρασης εμφανίζονται την 3^η ημέρα (1000 φορές αυξημένο). Από την άλλη πλευρά σε φυτά που εμβολιάστηκε και το ριζοβακτήριο, τα επίπεδα έκφρασης αυτού του γονιδίου είναι ελαφρά αυξημένα την 3^η ημέρα σε σχέση με την 14^η που ήταν

IV. ΑΠΟΤΕΛΕΣΜΑΤΑ

μειωμένα κατά 10 φορές συγκρινόμενα με το άγριο στέλεχος που επιδέχθηκε την ίδια επέμβαση (Γράφημα 17 A).

Όσον αφορά το γονίδιο *PDF1.2* παρατηρείται ότι στα μεταλλαγμένα φυτά μάρτυρες η έκφρασή του κυμαίνεται σχεδόν στα ίδια επίπεδα με το γονίδιο *PRI*. Στην εφαρμογή όμως του βιολογικού παράγοντα τα επίπεδα έκφρασης αυτού του γονιδίου είναι ελαφρά μειωμένα στις 3 και 7 ημέρες μετά την μόλυνση ενώ στις 14 ημέρες παρατηρείται μια αύξηση στα επίπεδα έκφρασής του συγκρινόμενο με το άγριο στέλεχος των φυτών που εφαρμόστηκε η ίδια επέμβαση (Γράφημα 17 B).

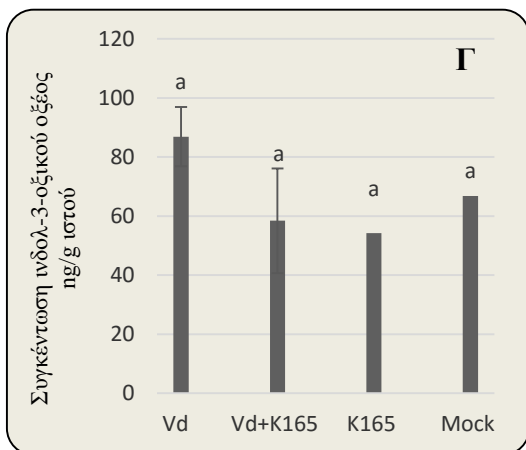
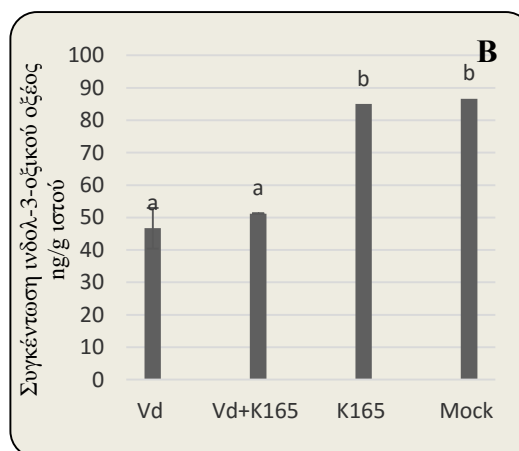
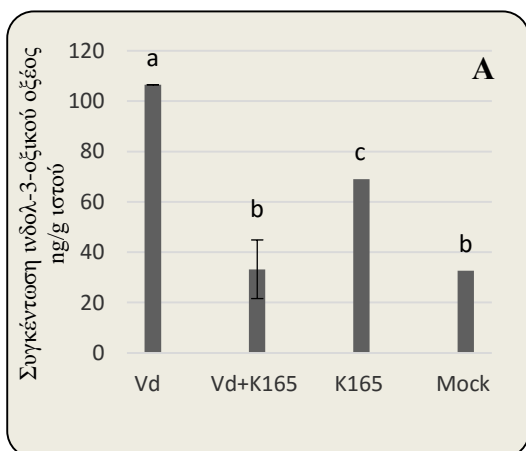


Γράφημα 17: Σχετική έκφραση του γονιδίου *PRI* (A) και του γονιδίου *PDF1.2* (B) στο υπέργειο μέρος μεταλλαγμένων φυτών *axr4* ύστερα από εφαρμογή του παθογόνου *V.dahliae* ή και σε συνδυασμό με το βακτήριο *P. alvei* K165

IV. ΑΠΟΤΕΛΕΣΜΑΤΑ

4.5 Αποτελέσματα μέτρησης της συγκέντρωσης του μορίου του ινδολ-3-οξικό οξύ (IAA) στα φυτά άγριου τύπου Col-0

Θεωρήθηκε αρκετά σημαντικό να εκτιμηθεί η συγκέντρωση του ινδολ-3-οξικού οξέος στο άγριο στέλεχος φυτών *A. thaliana*. Επιδίωξη του συγκεκριμένου πειράματος ήταν να εξετασθεί σε τρεις χρονικές στιγμές το πως μεταβάλλεται η συγκέντρωση του ινδολ-3-οξικού οξέος στα φυτά ύστερα από την εφαρμογή είτε μόνο του παθογόνου ή του βιολογικού παράγοντα είτε συνδυασμός και των δύο. Στα παρακάτω γραφήματα 18 Α,Β,Γ εκφράζεται η συγκέντρωση του ινδολ-3-οξικού οξέος στις παραπάνω επεμβάσεις ανά κάθε χρονική στιγμή. Σημαντικές στατιστικές διαφορές μεταξύ των επεμβάσεων παρατηρούνται 3 και 7 ημέρες μετά την μόλυνση. Πιο συγκεκριμένα 3 ημέρες μετά, φαίνεται ότι τόσο τα φυτά μάρτυρες όσο και στα φυτά στα οποία προστέθηκε μόνο ο βιολογικός παράγοντας, έχουν σημαντικές στατιστικές διαφορές μεταξύ τους. Το ίδιο παρατηρείται με τα αμόλυντα φυτά. Επτά ημέρες μετά αυτή η εικόνα μεταβάλλεται όπου στα φυτά μάρτυρες η συγκέντρωση του ινδολ-3-οξικού οξέος μειώνεται, διαφέροντας σημαντικά στατιστικά με τα αμόλυντα αλλά και με τα φυτά που προστέθηκε μόνο ο βιολογικός παράγοντας. Τέλος καμία στατιστική διαφορά δεν παρατηρείται 14 ημέρες μετά την μόλυνση.



Γράφημα 18: Απεικόνιση συγκέντρωσης (ng/g) ινδολο-3- οξικού οξέος σε φυτά άγριου στελέχους στις 3 (Α), 7 (Β) και στις 14 (Γ) ημέρες μετά την μόλυνση και στις τρεις επεμβάσεις

V. ΣΥΖΗΤΗΣΗ-ΣΥΜΠΕΡΑΣΜΑΤΑ

Ο μύκητας *V.dahliae* σύμφωνα με την στρατηγική επίθεσης που ακολουθεί ανήκει στα ημιβιοτροφικά παθογόνα, με την διαδικασία μόλυνσης του να είναι σύνθετη και πολυσταδιακή. Η μόλυνση ξεκινάει με μια αρχικά φαινομενική βιοτροφική φάση όπου σκοπός του παθογόνου είναι να αποικίσει το ριζικό σύστημα και στην συνέχεια διαμέσου του φλοιώδους παρεγχύματος να φτάσει στα αγγεία του ξύλου. Έτσι έχοντας εισχωρήσει πλέον στο βλαστό ακολουθεί μια νεκροτροφική φάση, με την εμφάνιση συμπτωμάτων μαρασμού, νεκρώσεις φύλλων κ.α (Fradin & Thomma 2006). Στην προσπάθεια κατανόησης του μοριακού μηχανισμού δράσης του, εξετάστηκε αν το συγκεκριμένο παθογόνο εμπλέκεται στη σηματοδότηση ή και στη μεταφορά του ινδολ-3-οξικού οξέος εντός του φυτού προσπαθώντας να το χειριστεί προς όφελος του. Επιπλέον διερευνήθηκε αν το ωφέλιμο βακτήριο *P. alvei* K165 χρησιμοποιεί γονίδια που εμπλέκονται στη σηματοδότηση ή στην μεταφορά της αυξίνης προκειμένου να προστατεύσει το φυτό από τη δράση του μύκητα. Για να διαλευκανθούν τα συγκεκριμένα σύστημα αλληλεπίδρασης ξενιστή-παθογόνου αλλά και ξενιστή-παθογόνο-βιολογικός παράγοντας, ως προς το ρόλο των αυξινών, πρωταρχικό βήμα ήταν η κατανόηση του μηχανισμού δράσης του ενδογενούς ινδολ-3-οξικού οξέος εντός του φυτού.

Μοριακές προσεγγίσεις για τη διαλεύκανση της δράσης του ινδολ-3-οξικού οξέος, πραγματοποιήθηκαν εντοπίζοντας γονίδια που παρουσιάζουν ταχεία και συγκεκριμένη αύξηση έκφρασης σε απόκριση εξωγενούς ινδολ-3-οξικού οξέος. Στις πιο ενδεδειγμένες οικογένειες γονιδίων ανήκουν οι *SAURs*, *GH₃* και *AUX/IAA*, οι οποίες επάγονται μέσα σε λίγα λεπτά ως απόκριση στο ινδολ-3-οξικό οξύ (Ulmasov *et al.*, 1995). Γενετικές μεταλλάξεις έχουν αποδείξει ότι εμπλέκονται διαφορετικοί μεταγραφικοί παράγοντες ARF σε κάθε αναπτυξιακή διαδικασία. Χαρακτηριστικά αναφέρονται τα εξής: κατά την διαδικασία της εμβρυογένεσης εμπλέκονται οι ARF5 (Hardtke *et al.*, 1998) και ARF17 (Mallory *et al.*, 2005), στην ανάπτυξη της ρίζας οι ARF7, ARF19 (Okushima *et al.*, 2005), ARF10 (Mallory *et al.*, 2005) και ARF16 (Wang *et al.*, 2005), για την ανάπτυξη του άνθους οι ARF2 (Schruff *et al.*, 2006), ARF3 (Sessions *et al.*, 1997), ARF6 (Ellis *et al.*, 2005) και ARF8 (Nagpal *et al.*, 2005) και στη διαδικασία γήρανσης του φυτού οι ARF1 και ARF2 (Ellis *et al.*, 2005). Λόγω του μερικού λειτουργικού τους πλεονασμού σε αρκετά στάδια ανάπτυξης, αρκετές μεταλλάξεις στους μεταγραφικούς παράγοντες δεν έχουν επιπτώσεις στον φαινότυπο αλλά επιδεινώνονται οι αναπτυξιακές ανωμαλίες σε διπλά μεταλλαγμένους συνδυασμούς (Nagpal *et al.*, 2005). Όσον αφορά τις κατασταλτικές πρωτεΐνες AUX/IAA έχει αποδειχθεί ότι αρκετές από αυτές δίνουν δραματικά χαρακτηριστικά στο φαινότυπο όπου μεταφράζεται ως ελάττωμα στο μηχανισμό σηματοδότησης της αυξίνης. Οι περισσότερες από αυτές τις κατασταλτικές πρωτεΐνες είναι εξαιρετικά βραχύβιες έχοντας μικρή διάρκεια ζωής, των οποίων ο χρόνος αυτός μειώθηκε ακόμα περισσότερο παρουσία αυξίνης (Zenser *et al.*, 2001). Επίσης όσον αφορά το γεγονός, αν υπάρχει εξειδίκευση της κατασταλτικής πρωτεΐνης με τον μεταγραφικό παράγοντα

V. ΣΥΖΗΤΗΣΗ-ΣΥΜΠΕΡΑΣΜΑΤΑ

δηλαδή αν κάθε πρωτεΐνη AUX/IAA συνδέεται με έναν συγκεκριμένο μεταγραφικό παράγοντα ARF, παρά το γεγονός ότι γενετικές μελέτες δείχνουν ότι κάθε μεταγραφικός παράγοντας ARF μπορεί να συνδέεται με οποιαδήποτε κατασταλακτική πρωτεΐνη, το γεγονός όμως ότι αρκετές μεταλλάξεις σε αυτούς, εμφανίζουν συγκεκριμένα ελαττώματα που σχετίζονται με τις πρωτεΐνες AUX/IAA, δείχνοντας ότι σαφώς υπάρχει κάποια λειτουργική εξειδίκευση. Παραδείγματος χάριν, μεταλλάξεις στο IAA12/BODENLOS(BDL) παρέχουν δραματικό φαινότυπο στο έμβryo όπου είναι παρόμοιες με εκείνες που σχετίζονται με μεταλλάξεις στον μεταγραφικό παράγοντα ARF5 (Hamann *et al.*, 2002). Αυτά τα ευρήματα δείχνουν μια ανταγωνιστική σχέση μεταξύ IAA12/BDL και του ARF5 όπου πράγματι βρέθηκε ότι η πρωτεΐνη IAA12 αλληλοεπιδρά με τον συγκεκριμένο μεταγραφικό παράγοντα ARF και ρυθμίζει αρνητικά τη δραστηριότητα του (Hardtke *et al.*, 2004).

Στην περίπτωση των υποδοχέων του ινδολ-3-οξικού οξέος, όπου ήταν το αντικείμενο μελέτης στην παρούσα εργασία, ο υποδοχέας TIR1 ήταν η πρώτη οικογένεια F-box πρωτεϊνών που ανακαλύφθηκε. Στην αρχή πίστευαν ότι το γονίδιο *TIR1* αναστέλλει τη μεταφορά της αυξίνης. Αυτό αποδείχθηκε όταν εφαρμόστηκαν εξωγενώς ουσίες που δρουν ως αναστολείς της μεταφοράς αυξίνης όπως π.χ NPA (N-1-naphthylphthalamic acid) σε μεταλλαγμένα *tir1* φυτά και παρατηρήθηκε ανθεκτικότητα. Οπότε συμπεράναν ότι το συγκεκριμένο γονίδιο αναστέλλει τη μεταφορά της αυξίνης. Αργότερα όμως ανακαλύφθηκε ότι ο ρόλος του είναι να διασπά τους αρνητικού ρυθμιστές στη σηματοδότηση της αυξίνης (AUX/IAA). Στην οικογένεια των F-box πρωτεϊνών εκτός από τον TIR1 περιέχονται και άλλες 7 πρωτεΐνες AFB1,2,3,4,5 καθώς και η CUL1 (Coronatine insensitive) που αποτελεί έναν υποδοχέα του JA (Xie *et al.*, 1998; Xu *et al.*, 2002) όπου αυτές οι AFB πρωτεΐνες λειτουργούν και αυτές ως υποδοχείς αυξίνης αποτελώντας μέρος του συμπλόκου SCF (λιγάση) όπως έχει ήδη αναφερθεί.

Από τα αποτελέσματα αυτής της μελέτης είναι εμφανές ότι υπάρχει σημαντική διαφορά ως προς την εκδήλωση της ασθένειας που προκαλείται από το μύκητα *V.dahliae*, μεταξύ φυτών *A.thaliana* αγρίου τύπου και φυτών με μεταλλάξεις σε γονίδια που εμπλέκονται στη σηματοδότηση και στη μεταφορά του ινδολ-3-οξικού οξέος. Πιο συγκεκριμένα μεταλλαγμένα φυτά στα γονίδια *AFB1*, *AFB3* και *AXR4* παρουσίασαν ανθεκτικότητα ως προς το παθογόνο ενώ μεταλλαγμένα στο γονίδιο *TIR1*, ευπάθεια. Επιπλέον όσον αφορά την επέμβαση με τον βιολογικό παράγοντα K165 φαίνεται ότι μόνο στα μεταλλαγμένα *tir1* καθώς και στα *axr4* φυτά δεν κατάφερε να προσφέρει προστασία. Έτσι, με βάση αυτά τα αποτελέσματα φαίνεται ότι οι AFB υποδοχείς πρέπει να κατέχουν σημαντικές διαφορές με τον TIR1.

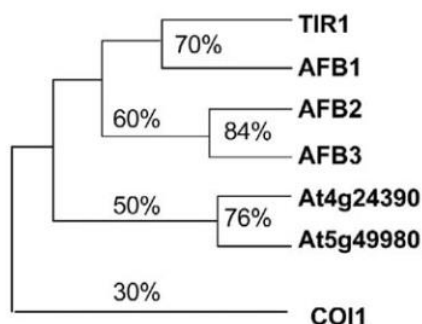
Προηγούμενες μελέτες έδειξαν ότι οι πρωτεΐνες TIR1, AFB1, AFB2 και AFB3 λειτουργούν ως υποδοχείς του ινδολ-3-οξικού οξέος και τα αντίστοιχα γονίδια τους είναι ευρέως μεταγραφόμενα σε ολόκληρο το φυτό. Γενετικά πειράματα δείχνουν ότι μειώνοντας

V. ΣΥΖΗΤΗΣΗ-ΣΥΜΠΕΡΑΣΜΑΤΑ

τον αριθμό των λειτουργικών TIR1/AFB πρωτεϊνών στα φυτά, έχει ως αποτέλεσμα να αυξάνει την ανθεκτικότητα στην εξωγενώς παρεχόμενη αυξίνη. Περαιτέρω η ανάλυση τριπλών και τετραπλών μεταλλάξεων *TIR1/AFB* έδειξε ότι αυτά τα γονίδια έχουν επικαλυπτόμενες λειτουργίες και όλα μαζί είναι απαραίτητα για την ανάπτυξη και την εξέλιξη στο φυτό *A.thaliana* (Dharmasiri *et al.*, 2005). Ωστόσο όμως, πολλά ερωτήματα παραμένουν σχετικά με την εξειδικευμένη λειτουργία του κάθε γονιδίου.

Μελέτες που πραγματοποιήθηκαν αποδεικνύουν ότι, αυτές οι μεμονωμένες πρωτεΐνες προσφέρουν μια άνιση συμβολή στην απόκριση αυξίνης και παρουσιάζουν σημαντικές διαφορές στην έκφραση και στην λειτουργία τους. Πιο συγκεκριμένα αποδείχθηκε ότι (Parry *et al.*, 2009):

1. Φυλογενετική ανάλυση απέδειξε ότι οι TIR1 και AFB πρωτεΐνες μπορούν να διαχωριστούν σε δύο κατηγορίες με τον υποδοχέα TIR1 και AFB1 να ανήκει στη μία κατηγορία και ο AFB2 μαζί με τον AFB3 στην άλλη. Οι υποδοχείς TIR1 και AFB1 έχουν 70% ομολογία αμινοξέων δείχνοντας παρόμοια έκφραση σε μεγάλο εύρος συνθηκών ενώ οι AFB2 και AFB3 έχουν 84% ομολογία αμινοξέων



2. Η κάθε πρωτεΐνη TIR1/AFB συμμετέχει στην απόκριση αυξίνης ποσοτικά με τα περισσότερα κύτταρα του φυτού να εκφράζουν και τα τέσσερα αυτά γονίδια. Αυτό υπονοεί ότι όλα τα κύτταρα είναι ικανά να αντιλαμβάνονται την αυξίνη αλλά και να εκφράζουν αυτούς τους υποδοχείς. Επίσης η αύξηση της συγκέντρωσης της αυξίνης εντός του φυτού, δεν μεταβάλλει την έκφραση των γονιδίων *TIR1/AFB* όπως συμβαίνει στην περίπτωση των *AUX/IAA* όπου έχει παρατηρηθεί ταχεία μεταγραφή αυτών των γονιδίων παρουσία αυξίνης
3. Σε προσπάθεια κατανόησης του γεγονότος, αν ο κάθε πυρηνικός υποδοχέας είναι απαραίτητος σε κάποιο συγκεκριμένο στάδιο της ζωής του φυτού, αποδείχθηκε ότι οι TIR1 και AFBs πρωτεΐνες έχουν επικαλυπτόμενες πλεονάζουσες λειτουργίες τόσο στην εμβρυογένεση όσο και σε ολόκληρη την ανάπτυξη του φυτού.

V. ΣΥΖΗΤΗΣΗ-ΣΥΜΠΕΡΑΣΜΑΤΑ

4. Όσον αφορά ως προς τη σηματοδότηση της αυξίνης έχει αποδειχθεί ότι οι διάφοροι υποδοχείς δεν συμβάλλουν ίσα στην απόκριση αυξίνης στη ρίζα με τους υποδοχείς TIR1 και AFB2 να παίζουν το σημαντικότερο ρόλο. Μεταξύ όμως του AFB1 και AFB3 φαίνεται ότι ο AFB3 κατέχει μεγαλύτερο ρόλο για την απόκριση της αυξίνης στη ρίζα.
5. Οι υποδοχείς TIR1 και AFB2 αποδείχθηκε ότι έχουν ισχυρότερη πρόσδεση με τις κατασταλτικές πρωτεΐνες AUX/IAA απ' ότι οι AFB1 και οι AFB3 που εμφανίζουν μειωμένη συγγένεια με αυτές.
6. Τέλος, οι υποδοχείς AFB1 και AFB3 δεν παρουσιάζουν τόσο ισχυρή πρόσδεση με το μόριο του ινδολ-3-οξικού οξέος κάνοντας το σήμα πιο αδύναμο.

Παλαιότερα ερευνητικά δεδομένα προσπάθησαν να συσχετίσουν τη σηματοδότηση της αυξίνης με την μολυσματική ικανότητα διάφορων παθογόνων, όπου προκύπτουν τα εξής στοιχεία:

- Η σηματοδότηση της αυξίνης απαιτείται έτσι ώστε να προσφέρει ανθεκτικότητα στα νεκροτροφικά παθογόνα όπως στο μύκητα *Botrytis cinerea* και *Plectosphaerella cucumerina* (Llorente *et al.*, 2008) ενώ στο παθογόνο *Pseudomonas syringae* και στο βιοτροφικό ωομύκητα *Hyaloperonospora parasitica* η σηματοδότηση της αυξίνης οδηγεί σε ευπάθεια στα φυτά *A.thaliana* (Wang *et al.*, 2007).
- Όσον αφορά τα ημιβιοτροφικά παθογόνα με μελέτη που πραγματοποιήθηκε στο μύκητα *Fusarium oxysporum* αποδείχθηκε ότι μεταλλαγμένα φυτά *tir1 A.thaliana* εμφάνισαν ευαισθησία. Εξαιτίας του γεγονότος ότι μεταλλαγμένα φυτά *sgt1b*, (το συγκεκριμένο γονίδιο κωδικοποιεί μια ρυθμιστική πρωτεΐνη που εμπλέκεται στο σύμπλοκο SCF), εμφάνισαν ανθεκτικότητα στο συγκεκριμένο παθογόνο πιστεύεται ότι συνέβη διότι καταστάλθηκε η σηματοδότηση. Έτσι συμέραναν ότι η ευπάθεια στα *TIR1* μεταλλαγμένα φυτά οφείλεται στο πλεονασμό των πυρηνικών υποδοχέων που είχε ως αποτέλεσμα η σηματοδότηση της αυξίνης να συνεχίζεται κανονικά.

Όμως με βάση τα αποτελέσματα της παρούσας εργασίας η ευπάθεια που παρατηρήθηκε στα *tir1* μεταλλαγμένα φυτά στο παθογόνο *V.dahliae* δεν μπορεί να ερμηνευτεί με βάση τη μελέτη που πραγματοποιήθηκε στο παθογόνο μύκητα *F.oxysporum* διότι, μελετώντας και άλλους υποδοχείς εκφράστηκαν διαφορετικά αποτελέσματα ως προς την ευαισθησία και την ανθεκτικότητα. Αν ίσχυε η επεξήγηση αυτού του πειράματος θα έπρεπε να παρατηρηθεί ευπάθεια και στους τρεις γονοτύπους αφού πραγματοποιήθηκαν μόνες μεταλλάξεις

V. ΣΥΖΗΤΗΣΗ-ΣΥΜΠΕΡΑΣΜΑΤΑ

Σύμφωνα όμως με μια άλλη πειραματική μελέτη που μελετούσαν τα επίπεδα των ενδογενών miRNA φυτών *A.thaliana* κατά την μόλυνση με το παθογόνο μύκητα *V.dahliae* αποδείχθηκε ότι παρεμποδίζοντας τη σηματοδότηση της αυξίνης ενισχύεται η ευπάθεια στο ξενιστή. Αυτό πραγματοποιήθηκε προσθέτοντας σαλικυλικό οξύ σε διάφορες συγκεντρώσεις (50-200 μM) γνωρίζοντας ότι το σαλικυλικό οξύ αναστέλλει τη σηματοδότηση της αυξίνης. Επίσης μελετώντας τα επίπεδα έκφρασης των *miR393*, *miR160* και *miR167* που παίζουν σημαντικό ρόλο στη ρύθμιση της αντίληψης καθώς και τη σηματοδότηση της αυξίνης, φάνηκε μειωμένη έκφραση αυτών και αυτός ίσως να είναι ένας τρόπος προστασίας του φυτού (Yang *et al.*, 2013). Έτσι θα μπορούσε να ειπωθεί ότι όσον αφορά τη σηματοδότηση της αυξίνης, το παθογόνο *V.dahliae* δρα περισσότερο ως νεκροτροφικό.

Βασιζόμενοι στα παραπάνω στοιχεία θα μπορούσε να εκφραστεί ένα υποθετικό μοντέλο σηματοδότησης του ινδολ-3-οξικού οξέος με το παθογόνο μύκητα *V.dahliae* : Στα μεταλλαγμένα φυτά *tir1* η σηματοδότηση του ινδολ-3-οξικού οξέος αναστέλλεται μερικώς (παρουσία του AFB2) εξαιτίας του γεγονότος ότι οι υποδοχείς AFB1 και AFB3 δεν έχουν τόσο ισχυρή πρόσδεση με τις κατασταλτικές πρωτεΐνες AUX/IAA με αποτέλεσμα τα γονίδια προς απόκριση σε αυξίνη να είναι αρκετά μειωμένα. Όσον αφορά τα μεταλλαγμένα φυτά *afb1* και *afb3* η σηματοδότηση συνεχίζεται κανονικά και προσδίδει ανθεκτικότητα. Είναι γνωστό ότι τα παθογόνα προσπαθούν να διαχειριστούν τη σηματοδότηση της αυξίνης προς όφελος τους. Το συγκεκριμένο παθογόνο για να μπορέσει να αναπτυχθεί θα πρέπει να αναστείλει τη σηματοδότηση και αυτό ίσως το επιτυγχάνει χρησιμοποιώντας τους υποδοχείς AFB1 και AFB3 έτσι ώστε να αυξήσει τον ανταγωνισμό για τον υποδοχέα TIR1. Επίσης στη συγκεκριμένη περίπτωση δεν είναι σίγουρο αν αυτή η μερική αναστολή της σηματοδότησης είναι ικανή να προσφέρει ευπάθεια στα φυτά ξενιστή ή άλλοι παράγοντες εμπλέκονται..

Μελετώντας την έκφραση των γονιδίων *TIR1*, *AFB1*, *AFB3* και *AXR4* που σχετίζονται με τη σηματοδότηση και την μεταφορά της αυξίνης, στο ριζικό σύστημα των φυτών Col-0 παρατηρείται ότι ο μύκητας επηρεάζει σημαντικά την έκφραση τους και στις δύο χρονικές στιγμές όπου φαίνεται ξεκάθαρα ότι η σηματοδότηση της αυξίνης πλέον ελέγχεται από το αυτόν προς όφελος του. Όσον αφορά τα γονίδια *AFB1*, *AFB3* και *AXR4* φαίνεται και από το πείραμα παθογένειας αλλά και από την έκφραση αυτών στα φυτά Col-0 ότι ο μύκητας πιθανόν να προωθεί την παθογένεια του επηρεάζοντας την έκφραση αυτών. Όμως στην περίπτωση του γονιδίου *TIR1* δεν είναι ξεκάθαρη η εικόνα σχετικά με τον ρόλο του στην παθογένεια του μύκητα και χρήζει επιπλέον διερεύνηση. Στο υπέργειο τμήμα των φυτών αντιθέτως η έκφραση και των 4 γονιδίων ήταν αμελητέα συγκρινόμενη με αυτή του ριζικού συστήματος, παρατήρηση που εξηγείται εύκολα από το γεγονός ότι το συγκεκριμένο παθογόνο εισέρχεται μέσω του ριζικού συστήματος, οπότε επηρεάζει τους συγκεκριμένους υποδοχείς στα κύτταρα της ρίζας ώστε να διευκολυνθεί η είσοδο του και με αυτόν τον τρόπο η παθογένεια του. Στην

V. ΣΥΖΗΤΗΣΗ-ΣΥΜΠΕΡΑΣΜΑΤΑ

περίπτωση που προστίθεται στο φυτό μόνο ο βιολογικός παράγοντας παρατηρείται ότι προσπαθεί να ενισχύσει την ανάπτυξη των φυτών υπερεκφράζοντας και τα 4 γονίδια στις 7 ημέρες μετά την μόλυνση. Όμως όταν εφαρμόζεται σε συνδυασμό με τον παθογόνο μύκητα φαίνεται ότι η έκφραση αυτών των γονιδίων μεταβάλλεται όπου φθάνει σχεδόν στα ίδια επίπεδα με τα αμόλυντα φυτά. Οπότε το K165 για να προστατεύσει το φυτό και κατ' επέκταση τον εαυτό του προσπαθεί να διατηρήσει την έκφραση αυτών των γονιδίων σταθερή έτσι ώστε να συνεχιστεί η σηματοδότηση της αυξίνης.

Το παθογόνο είναι ικανό να ρυθμίζει εκτός από τη σηματοδότηση της αυξίνης και την μεταφορά. Στην περίπτωση της μεταφοράς της αυξίνης φαίνεται ότι ορισμένα συστατικά που εμπλέκονται στην πολική μεταφορά της αυξίνης απαιτούνται για την ευπάθεια του παθογόνου. Αυτό θα μπορούσε να οφείλεται στο γεγονός ότι το ποσοστό της αυξίνης που βιοσυντίθεται τοπικά στις ρίζες είναι σχετικά μικρό συγκρινόμενο με το ποσό της αυξίνης που μεταφέρεται στις ρίζες από τα εναέρια μέρη. Έτσι, με αυτό τον τρόπο το παθογόνο στοχεύει σε συστατικά της PAT ώστε να μπορεί μόνο του να ρυθμίσει τα επίπεδα της αυξίνης σε συγκεκριμένα κύτταρα της ρίζας ώστε να προκαλέσει ασθένεια. Πράγματι παρατηρήθηκε ότι μεταλλαγμένα φυτά *axr4 A.thaliana* ήταν πιο ανθεκτικά στο μύκητα *V. dahliae*. Η συγκεκριμένη πρωτεΐνη AXR4 εδράζεται στο ενδοπλασματικό δίκτυο και ο ρόλος της είναι να κατευθύνει τον εντοπισμό της πρωτεΐνης AUX1 (AUXIN RESISTANT1) στην πλασματική μεμβράνη. Η πρωτεΐνη AUX1 καθώς επίσης και άλλες πρωτεΐνες που ανήκουν στην οικογένεια περμεασών AUX/LAX έχουν χαρακτηριστεί ως συµμεταφορείς και είναι υπεύθυνοι για την εισροή της αυξίνης εντός του κυττάρου. Η σημαντικότητα του γονιδίου AXR4 παρατηρήθηκε και στον μύκητα *F. oxysporum* (Kidd *et al.*, 2011). Επιπρόσθετα μελέτη που πραγματοποιήθηκε σε φυτά μελιτζάνας που μολύνθηκαν με το μύκητα *V. dahliae* απέδειξε ότι αναστέλλοντας την μεταφορά της αυξίνης, χρησιμοποιώντας συνθετικές ενώσεις όπως το NPA (N-1-Naphthylphthalamic Acid) έχει ως αποτέλεσμα να ενισχύεται η μόλυνση των φυτών από τον παθογόνο μύκητα. Έτσι το NPA όπου είναι γνωστό ως αναστολέας της εκροής αυξίνης σταματάει την έξοδο της αυξίνης από τα κύτταρα βιοσύνθεσης της. Αυτό έχει ως αποτέλεσμα να μειώνονται τα επίπεδα της αυξίνης στα κύτταρα που την χρειάζονται. Με αυτό τον τρόπο θα μπορούσε να ειπωθεί ότι η ανάπτυξη του ριζικού συστήματος των φυτών να μην είναι η αναμενόμενη και φυσιολογική, δημιουργώντας με αυτό τον τρόπο ένα αδύναμο ριζικό σύστημα ευάλωτο στους παθογόνους μικροοργανισμούς. Όμως αξίζει να αναφερθεί ότι με αυτό τον τρόπο δεν μπορούμε να βγάλουμε ασφαλή συμπεράσματα για το πώς η αναστολή της μεταφοράς της αυξίνης επηρεάζει την μολυσματική ικανότητα του παθογόνου γιατί η NPA επηρεάζει και άλλες πρωτεΐνες οι οποίες με την σειρά τους έμμεσα εμπλέκονται στις πρωτεΐνες εκροής (Vince & Zoltán 2011).

V. ΣΥΖΗΤΗΣΗ-ΣΥΜΠΕΡΑΣΜΑΤΑ

Επιπλέον, προκειμένου να εξετασθεί αν η ανθεκτικότητα που παρατηρήθηκε στα μεταλλαγμένα φυτά οφείλεται στην επαγωγή των μηχανισμών της άμυνας μελετήθηκαν τα επίπεδα έκφρασης των γονιδίων *PR1* και *PDF1.2* στους αντίστοιχους γονότυπους και στις αντίστοιχες επεμβάσεις. Στα μεταλλαγμένα φυτά *afb1* που εμβολιάστηκαν μόνο με τον παθογόνο μύκητα παρατηρείται ενεργοποίηση του μηχανισμού της άμυνας όπου και τα δύο γονίδια υπερεκφράστηκαν. Έτσι η προστασία που δόθηκε ίσως οφείλεται στην επαγωγή και των δύο μονοπατιών. Όμως σύμφωνα με τους Pantelides *et al.*, 2010 ο ρόλος της πρωτεΐνης *PR1* είναι πιο σημαντικός σε σχέση με την πρωτεΐνη *PDF1.2* εναντίον του μύκητα *V.dahliae*. Θα μπορούσε να ειπωθεί ότι στην παρούσα μελέτη η έκφραση του γονιδίου *PDF1.2* είναι πολύ λογική διότι η σηματοδότηση της αυξίνης δρα συνεργιστικά με το μονοπάτι του ιασμονικού οξέος/αιθυλενίου. Στην περίπτωση όμως που στο συγκεκριμένο μεταλλαγμένο γονότυπο προστέθηκε και το ριζοβακτήριο, παρατηρείται υπερέκφραση του γονιδίου *PR1* σε σύγκριση με το άγριο στέλεχος στο οποίο έχει προστεθεί εκτός από το παθογόνο και ο βιολογικός παράγοντας, υποδεικνύοντας τη σημαντικότητα της πρωτεΐνης *PR1*. Στα μεταλλαγμένα φυτά *afb3* και *axr4* όσον αφορά την έκφραση των γονιδίων που επάγουν τους μηχανισμούς της άμυνας, υποδεικνύεται ότι η ανθεκτικότητα που παρατηρήθηκε ύστερα από μόλυνση με το παθογόνο μύκητα ίσως να οφείλεται στην επαγωγή της άμυνας όπου στην αρχή προτάθηκε προστασία μέσα από το μονοπάτι του σαλικυλικού οξέος και στη συνέχεια ακολουθήθηκε μέσα από το μονοπάτι του ιασμονικού/αιθυλενίου. Η έκφραση του γονιδίου *PDF1.2* στις 14 ημέρες ίσως να οφείλεται στο γεγονός ότι πλέον το παθογόνο έχει εισέλθει στη νεκροτροφική του φάση. Επίσης η προστασία που επιτεύχθηκε και στους συγκεκριμένους γονότυπους όταν εφαρμόστηκε το K165 φαίνεται να οφείλεται και στη συγκεκριμένη περίπτωση στην επαγωγή της άμυνας όπου στη αρχή προσφέρεται μια μικρή προστασία μέσα από το μονοπάτι του σαλικυλικού και στη συνέχεια μέσα από το μονοπάτι του ιασμονικού. Το γεγονός όμως που στην περίπτωση του μεταλλαγμένου γονιδίου *AXR4* δεν προσφέρθηκε επιπλέον προστασία ίσως να οφείλεται στο γεγονός ότι το ποσοστό ασθeneίας ήταν αρκετά χαμηλό σχεδόν στα ίδια επίπεδα με την αντίστοιχη επέμβαση στο άγριο στέλεχος ή ότι το συγκεκριμένο γονίδιο εμπλέκεται στο μοριακό μηχανισμό δράσης του K165 και η απουσία του ήταν καθοριστικής σημασίας για τη δράση του. Στην περίπτωση των μεταλλαγμένων *tir1* φυτών φαίνεται ότι αυτή η εικόνα που παρατηρείται δεν οφείλεται στην επαγωγή της άμυνας και θα μπορούσε να ειπωθεί ότι κάτι άλλο συμβαίνει εντός του φυτού, το οποίο χρειάζεται επιπλέον διερεύνηση.

Επιπρόσθετα, σύμφωνα με τα αποτελέσματα που υπολογίστηκε η συγκέντρωση του ινδολ-3-οξικού οξέος (IAA) στο άγριο στέλεχος φυτών, γίνεται αντιληπτό ότι στην αρχή της μόλυνσης το φυτό προσπαθεί να καταπολεμήσει το παθογόνο παράγοντας περισσότερο ινδολ-3-οξικό οξύ έτσι ώστε να ενισχύσει το σήμα, να αποικοδομηθούν οι κατασταλτικές πρωτεΐνες

V. ΣΥΖΗΤΗΣΗ-ΣΥΜΠΕΡΑΣΜΑΤΑ

και να συνεχιστεί η απόκριση αυξίνης. Όμως απ' ό τι φαίνεται στη συνέχεια (7dpi) η συγκέντρωση της αυξίνης μειώνεται και ίσως να εξαναγκάζεται από το παθογόνο για να ανασταλεί η σηματοδότηση της αυξίνης όπου αυτό θα ευνοήσει την εξάπλωση του. Στη περίπτωση του K165, αλλιώς μεταβάλλει τη συγκέντρωση της αυξίνης μόνο του και αλλιώς σε συνδυασμό με το παθογόνο. Όταν εμβολιάζεται στο φυτό μαζί με το παθογόνο φαίνεται ότι προσπαθεί να διατηρήσει την συγκέντρωση της αυξίνης στα ίδια επίπεδα με τα αμόλυντα φυτά πράγμα το οποίο δεν το καταφέρνει στο 7 dpi.

Εν κατακλείδι θα μπορούσε να ειπωθεί ότι το σύμπλοκο της ουβικουϊτίνης σε συνδυασμό με αυτόν του πρωτεασώματος 26S είναι καθοριστικής σημασίας για την προστασία των φυτών από τον παθογόνο μύκητα *V.dahliae*. Έτσι η ευπάθεια που παρατηρείται στα μεταλλαγμένα *tir1* φυτά ίσως να συμβαίνει διότι:

- Από τη στιγμή που αναστέλλεται η σηματοδότηση έχει ως αποτέλεσμα να μην επάγονται τα πρώιμα γονίδια. Πιο συγκεκριμένα τα γονίδια *GH3* έχουν βρεθεί ότι εμπλέκονται στην αλληλεπίδραση ξενιστή-παθογόνου εξαιτίας της ικανότητας τους να μετατρέπουν τις ελεύθερες μορφές του IAA σε συζευγμένες με σάκχαρα ή αλκοόλες σακχάρου μέσω ενός εστερικού δεσμού ή με αμινοξέα ή πεπτίδια ενός αμιδικού δεσμού. Μόνο η ελεύθερη μορφή του είναι ενεργή ενώ όταν συζευχθεί αδρανοποιείται. Με αυτόν τον τρόπο τα επίπεδα της ελεύθερης μορφής διατηρούνται χαμηλά. Επίσης αναφέρθηκε ότι τα γονίδια *GH3* (*GH3-8*) είναι ικανά να καταστέλλουν την έκφραση των γονιδίων που ονομάζονται εξπανσίνες (expansines). Οι εξπανσίνες εντοπίζονται και στο φαινόμενο της όξινης αύξησης (acid growth) όπου ένα χαρακτηριστικό των αυξανόμενων κυτταρικών τοιχωμάτων είναι ότι αυτά επεκτείνονται ταχύτερα σε όξινο απ' ό τι σε ουδέτερο pH. Οι πρωτεΐνες εξπανσίνες χαλαρώνουν τα κυτταρικά τοιχώματα αποδυναμώνοντας τους δεσμούς υδρογόνου μεταξύ των συστατικών των πολυσακχαριτών του τοιχώματος, σε όξινο pH (McQueen-Mason *et al.*, 1992). Με αυτό τον τρόπο μπορεί να κάνει το κύτταρο πιο ευάλωτο σε εισβολείς και συνεπώς τα φυτά πιο ευπαθή σε παθογόνους οργανισμούς. Χαρακτηριστικά αναφέρεται η περίπτωση του ρυζιού όπου ύστερα από εμβολιασμό με το παθογόνο *Xanthomonas oryzae* pv. *oryzae* παρατηρήθηκε υπερέκφραση του γονιδίου *GH3-8* ενισχύοντας με αυτό τον τρόπο την ανθεκτικότητα στο παθογόνο, καταστέλλοντας παράλληλα την έκφραση αυτών των εξπανσίνων (Ding *et al.*, 2008)
- Εξαιτίας του γεγονότος ότι αναστέλλονται όλες οι αναπτυξιακές διαδικασίες με αποτέλεσμα το φυτό να είναι πιο ευάλωτο στο παθογόνο.

V. ΣΥΖΗΤΗΣΗ-ΣΥΜΠΕΡΑΣΜΑΤΑ

Συμπερασματικά φαίνεται ότι οι εδαφογενείς μικροοργανισμοί (παθογόνοι και ωφέλιμοι) μπορούν να μεταβάλλουν την βιοσύνθεση, την σηματοδότηση και την μεταφορά της αυξίνης στο φυτό ξενιστή κατά την διάρκεια των αλληλεπιδράσεων τους με αυτά. Από την μελέτη μας προκύπτει ότι διάφορα συστατικά που εμπλέκονται τόσο στη σηματοδότηση όσο και στη μεταφορά της αυξίνης εντός του φυτού, είναι απαραίτητα στην παθογένεια του φυτοπαθογόνου μύκητα *V.dahliae* καθώς επίσης και στην θετική επίδραση του βιολογικού παράγοντα K165. Όμως προκειμένου να έχουμε μια πιο ολοκληρωμένη εικόνα σχετικά με το ρόλο των αυξινών είναι απαραίτητο να πραγματοποιηθούν και άλλα πειράματα καθώς επίσης να μελετηθούν και άλλα γονίδια που εμπλέκονται στα μονοπάτια αυτά.

VI. ΒΙΒΛΙΟΓΡΑΦΙΑ

- Τζάμος, Ε. (2007).** Φυτοπαθολογία. Εκδόσεις ΑΘ. Σταμούλης, Αθήνα
- Παναγόπουλος, Χ. Γ. (1995).** Ασθένειες κηπευτικών καλλιεργειών. Εκδόσεις ΑΘ. Σταμούλης, Αθήνα
- Παναγόπουλος, Χ. Γ. (2007).** Ασθένειες καρποφόρων δένδρων και αμπέλων. Εκδόσεις ΑΘ. Σταμούλης, Αθήνα
- Abel, S., and Theologis, A. (1996).** Early genes and auxin action. *Plant Physiol.* **111**:9–17.
- Adams, P. B., and Fravel, D. R. (1993).** Dynamics of *Sporidesmium*, a naturally occurring fungal mycoparasite. In: R. D. Lumsden and J. L. Vaughn (eds.), Pest management: Biologically Based Technologies. *American Chemical Society, Washington, DC.* pp. 189-195
- Agrios, G. N. (2005).** Plant Pathology. Elsevier, CA, Academy Press
- Alonso, J. M., Stepanova, A. N., and Leisse, T. J., et al. (2003).** Genome-wide insertional mutagenesis of *Arabidopsis thaliana*. *Science.* **301**:653–657
- Antonopoulos, D. F., Tjamos, S. E., Antoniou, P. P., Rafeletos, P., and Tjamos, E.C. (2008).** Effect of *Paenibacillus alvei*, strain K165, on the germination of *Verticillium dahliae* microsclerotia in planta. *Biol Control.* **46**:166–170
- Ash, C., Priest, F. G., and Collins, M.D. (1993).** Molecular identification of rRNA group 3 bacilli (Ash, Farrow, Wallbanks and Collins) using a PCR probe test. Proposal for the creation of a new genus *Paenibacillus*. *Antonie Van Leeuwenhoek.* **64**:253-260
- Bari, R., and Jones, J. D. G. (2009).** Role of plant hormones in plant defence responses. *Plant Mol Biol.* **69**:473-488
- Berkeley, G. H., Madden, G. O., and Willison, R. S. (1931).** *Verticillium* wilts in Ontario. *Sci. Agr.* **11**:739-759
- Bhat, R. G., and Subbarao, K. V. (1999).** Host Range Specificity in *Verticillium dahliae*. *Phytopathology.* **89**:1218-1225
- Bittel, P., and Robatzek, S. (2007).** Microbe-associated molecular patterns (MAMPs) probe plant immunity. *Curr. Opin. Plant Biol.* **10**:335–341

VI. ΒΙΒΛΙΟΓΡΑΦΙΑ

- Blakeslee, J. J., Peer, W. A., and Murphy, A. S. (2005).** Auxin transport. *Curr Opin Plant Biol.* **8**:494-500
- Boller, T., and Felix, G. A. (2009).** A renaissance of elicitors: perception of microbe-associated molecular patterns and danger signals by pattern-recognition receptors. *Annu. Rev. Plant Biol.* **60**:379-406
- Boller, T. (1995).** Chemoperception of Microbial Signals in Plant Cells. *Annu. Rev. Plant Physiol. Plant Mol Biol.* **46**:189-214
- Bowers, J. H., Nameth, S. T., Riedel, R. M. and Rowe, R. C. (1996).** Infection and colonization of potato roots by *Verticillium dahliae* as affected by *Pratylenchus penetrans* and *P. crenatus*. *Phytopatholog.* **86**:614-621
- Brendan, N., Kidd, N., Kadoo, Y., Dombrecht, B., Tekeoğlu, D., Gardiner, L., Thatcher, F., Elizabeth, A. B., Aitken, P., Schenk, M., Manners, M., and Kemal, K. (2011).** Auxin signaling and transport promote susceptibility to the root-infecting fungal pathogen *Fusarium oxysporum* in *Arabidopsis*. *Molecular Plant-Microbe Interactions* **24**:733-748
- Brumos, A., Alonso, J. M., and Stepanova, A. N. (2013).** Genetic aspects of auxin biosynthesis and its regulation. *Physiol Plant.* **10**:1111-12098
- Calderón, A., Villalobos, L. I., Tan, X., Zheng, N., and Estelle, M. (2010).** Auxin perception structural insights. *Cold Spring Harb. Perspect. Biol.* **2**:5546
- Cambridge, A. P., and Morris, D. A. (1996).** Transfer of exogenous auxin from the phloem to the polar auxin transport pathway in pea (*Pisum sativum L.*). *Planta.* **199**: 583-588
- Cheng, Y., Dai, X., and Zhao, Y. (2007).** Auxin synthesized by the YUCCA flavin monooxygenases is essential for embryogenesis and leaf formation in *Arabidopsis*. *Plant Cell.* **19**:2430-2439
- Chet, I., and Baker, R. (1981).** Isolation and Biocontrol Potential of *Trichoderma hamatum* from Soil Naturally Suppressive to *Rhizoctonia solani*. *Phytopathology.* **71**:286-290
- Chet, I., Ordentlich, A., Shapira, R., and Oppenheim, A. (1990).** Mechanisms of biocontrol of soil-borne plant pathogens by Rhizobacteria. *Plant and Soil.* **129**:85-92
- Clough, S. J., and Bent, A. F. (1998).** Floral dip: a simplified method for *Agrobacterium*-mediated transformation of *Arabidopsis thaliana*. *Plant Journal.* **16**:735-743

VI. ΒΙΒΛΙΟΓΡΑΦΙΑ

- Cook, R. J. (1991).** Challenges and rewards of sustainable agriculture research and education. In: Sustainable agriculture research and education in the field: *A Proceedings. National Research Council, National Academy Press, Washington, DC.* Pp. 32–76.
- Czechowski, T., Stitt, M., Altmann, T., Udvardi, M. K., and Scheible, W. R. (2005).** Genome wide identification and testing of superior reference genes for transcript normalization in *Arabidopsis*. *Plant Physiol.* **139**: 5-17
- Dai, X., Mashiguchi, K., Chen, Q., Kasahara, H., Kamiya, Y., Ojha, S., DuBois, J., Ballou, D., and Zhao, Y. (2013).** The biochemical mechanism of auxin biosynthesis by an *Arabidopsis* YUCCA flavin-containing monooxygenase. *J Biol Chem* **288**:1448-1457
- Depuydt, S., and Hardtke, C. S. (2011).** Hormone signaling crosstalk in plant growth regulation. *Curr. Biol.* **21**: 365-373
- Dharmasiri, N., Dharmasiri, S., and Estelle, M. (2005).** The F-box protein TIR1 is an auxin receptor. *Nature* **435**:441-445
- Dharmasiri, N., Dharmasiri, S., Weijers D et al. (2005b).** Plant development is regulated by a family of auxin receptor F box proteins. *Dev Cell* **9**:109-119
- Dharmasiri, S., Swarup, R., Mockaitis, K., Dharmasiri, N., Singh, S. K., Kowalchuk, M., Marchant, A., Mills, S., Sandberg, G., Bennett, M. J., and Estelle, M. (2006).** AXR4 is required for localization of the auxin influx facilitator AUX1. *Science* **312**:1218-1220
- Ding, X., Cao, Y., Huang, L., Zhao, C., Li, X., and Wang, S. (2008).** Activation of the indole-3-acetic acid-amido synthetase GH3-8 suppresses expansin expression and promotes salicylate- and jasmonate- independent basal immunity in rice. *Plant Cell* **20**:228-240
- Dixon, R. A., Harrison, M. J., and Lamb, C. J. (1994).** *Annu Rev Phytopathol.* **32**:479-501
- Dreher, K. A., Brown, J., Saw, R. F., and Callis, J. (2006).** The *Arabidopsis* Aux/IAA protein family has diversified in degradation and auxin responsiveness. *Plant Cell.* **18**:699-714
- Dubrovsky, J. G., Sauer, M., Napsucialy-Mendivil, S., Ivanchenko, M. G., Friml, J., and Shishkova, S. et al. (2008).** Auxin acts as a local morphogenetic trigger to specify lateral root founder cells. *Proc. Natl Acad. Sci.* **105**:8790-8794

VI. ΒΙΒΛΙΟΓΡΑΦΙΑ

Helena, K. & Tjamos, E.C., 1992. Evaluation of soil solarization singly or in combination with fungal or bacterial biocontrol agents to control *Fusarium* wilt of carnation pp.75-78. In Biological Control of Plant Diseases: Progress and Challenges for the Future. Athens, Tjamos, Papavizas and Cook Editors

Ellis, C. M., Nagpal, P., Young, J. C., Hagen, G., Guilfoyle, T. J., and Reed, J. W. (2005). auxin response factor1 and auxin response factor2 regulate senescence and floral organ abscission in *Arabidopsis thaliana*. *Development* **132**:4563-4574

Elmer, W. H. (2000). Comparison of plastic mulch and nitrogen form on the incidence of *Verticillium* wilt of eggplant, *Plant Disease*. **84**:1231-1234

Engelhard, A. W. (1957). Host index of *Verticillium albo-atrum* Reinke and Berth.(including *Verticillium dahliae* Kleb). *Plant. Dis. Rep. Suppl.* **244**:23-49

Feys, B. J., and Parker, J. E. (2000). Interplay of signaling pathways in plant disease resistance. *Trends in Genetics* **16**:449-455

Fradin, E. F., and Thomma, B. P. H. J. (2006). Physiology and molecular aspects of *Verticillium* wilt diseases caused by *V. dahliae* and *V. albo-atrum*. *Mol Plant Pathology*. **7**:71-86

Friml, J., and Palme, K. (2002). Polar auxin transport – old questions and new concepts: *Plant Mol Biol*. **49**:273-284

Friml, J., Vieten, A., Sauer, M., Weijers, D., Schwarz, H., and Hamann, T. et al. (2003). Efflux-dependent auxin gradients establish the apical–basal axis of *Arabidopsis*. *Nature*. **426**:147-153

Gkizi, D., Lehmann, S., L’Haridon, F., Serrano, M., Paplomatas, E. J., Metraux, J. P., and Tjamos, S. E. (2016). The innate immune signaling system as a regulator of disease resistance and ISR activity against *Verticillium dahliae*. *Molecular Plant-Microbe Interaction*:<http://dx.doi.org/10.1094/MPMI-11-15-0261-R>

Glick, B. R. (2012). Plant Growth-Promoting Bacteria: Mechanisms and Applications. Hindawi Publishing Corporation, Scientifica.

VI. ΒΙΒΛΙΟΓΡΑΦΙΑ

- Goldsmith, M. H. M. (1977).** The polar transport of auxin. *Annu. Rev. Plant Physiol.* **28**:439-478
- Hagen, G., and Guilfoyle, T. (2002).** Auxin-responsive gene expression: genes, promoters and regulatory factors. *Plant Mol Biol* **49**:373-380
- Hamann, T., Benkova, E., Baurle, I., Kientz, M., and Jürgens, G. (2002).** The *Arabidopsis* *BODENLOS* gene encodes an auxin response protein inhibiting MONOPTEROS-mediated embryo patterning. *Genes Dev* **16**:1610-1615
- Hammond-Kosack, K. E., and Jones, J. D. G. (1996).** *Plant Cell.* **8**:1773-1791
- Hardtke, C. S., and Berleth, T. (1998).** The *Arabidopsis* gene MONOPTEROS encodes a transcription factor mediating embryo axis formation and vascular development. *EMBO J* **17**:1405-1411
- Hardtke, C. S., Ckurshumova, W., Vidaurre, D. P., Singh, S. A., Stamatiou, G., Tiwari, S. B., Hagen, G., Guilfoyle, T. J., and Berleth, T. (2004).** Overlapping and non-redundant functions of the *Arabidopsis* auxin response factors MONOPTEROS and NONPHOTOTROPIC HYPOCOTYL 4. *Development* **131**:1089-1100
- Hawksworth, D. L., and Talboys, P. W. (1970)a.** *Verticillium dahliae* Klebahn. In: C.M.I. Descriptions of pathogenic fungi and bacteria. No 256, pp2. Commonwealth Mycological Institute, Kew
- Hawksworth, D. L., and Talboys, P. W. (1970)b.** *Verticillium albo-atrum*. Reinke and Berthold. In: C.M.I. Descriptions of pathogenic fungi and bacteria No 255, pp2. Commonwealth Mycological Institute, Kew.
- Hayashi, K.I. (2012).** The interaction and integration of auxin signaling components. *Plant Cell Physiol.* **53**:965-975
- Heale, J. B., and Isaac, I. (1965).** Environmental factors in the production of dark resting structures in *Verticillium albo-atrum*, *V. dahliae* and *V. tricorpus*. *Trans. Br. Mycol. Soc.* **48**:39-50
- Hobble, L. and Estelle, M. (1995).** The *axr4* auxin-resistant mutants of *Arabidopsis thaliana* define a gene important for root gravitropism and lateral root initiation. *Plant J.* **7**:211-220

VI. ΒΙΒΛΙΟΓΡΑΦΙΑ

- Homma, Y., Kato, Z., Hirayama, F., Konno, K., Shirahama, H., and Suzui, T. (1989).** Production of antibiotics by *Pseudomonas cepacia* as an agent for biological control of soilborne plant pathogens. *Soil Biol. Biochem.* **21**:723-728
- Howell, C. R., and Stipanovic, R. D. (1980).** Suppression of *Pythium ultimum* induced damping - off of cotton seedlings by *Pseudomonas fluorescens* and its antibiotic, pyoluterin. *Phytopathology* **70**:712-715
- Huisman, O. C. (1982).** Interrelations of root growth dynamics to epidemiology of root invading fungi. *Annu. Rev. Phytopathol.* **20**:303-327
- Islam, T. M., Hashidoko, Y., Deora, A., Ito, T., and Tahara, S. (2005).** Suppression of damping-off disease in host plants by the rhizoplane bacterium *Lysobacter* sp. strain SB-K88 is linked to plant colonization and antibiosis against soilborne peronosporomycetes. *Appl. Environ. Microbiol.* **71**:3786-3796
- Jones, E. E., Mead, A., and Whipps, J. M. (2004).** Effect of inoculums type and timing of application of *Coniothyrium minitans* on *Sclerotinia sclerotiorum*: control of sclerotinia disease in glasshouse lettuce. *Plant Pathology* **53**:611-620
- Kerr, A. (1980).** Biological control of crown gall through production of agrocin 84. *Plant Dis.* **64**:25-30
- Kidd, B. N., Kadoo, N. Y., Dombrecht, B., Tekeoglu, M., Gardiner, D. M., Thatcher, L. F., Aitken, E. A., Schenk, P. M., Manners, J. M., and Kazan, K. (2011).** Auxin signaling and transport promote susceptibility to the root-infecting fungal pathogen *Fusarium oxysporum* in *Arabidopsis*. *Mol Plant Microbe Interact* **24**:733-748
- Kloepper, J. W., and Schroth, M. N. (1981).** Relationship of in vitro antibiosis of plant growth promoting rhizobacteria to plant growth and the displacement of root microflora. *Phytopathology* **71**:1020-1024
- Kloepper, J. W., Ryu, C. M., and Zhang, S. (2004).** Induce systemic resistance and promotion of plant growth by *Bacillus* spp. *Phytopathology* **94**:1259-1266
- Koumoutsis, A., Chen, X. H., Henne, A., Liesegang, H., Gabriele, H., Franke, P., Vater, J., and Borris, R. (2004).** Structural and functional characterization of gene clusters directing

VI. ΒΙΒΛΙΟΓΡΑΦΙΑ

nonribosomal synthesis of bioactive lipopeptides in *Bacillus amyloliquefaciens* strain FZB42. *J. Bact.* **186**:1084-1096

Krikun, J., and Orion, D. (1979). *Verticillium* wilt of potato: Importance and control. *Phytoparasitica* **7**:107-116

Laluk, K., and Mengiste, T. (2010). Necrotroph Attacks on Plants: Wanton Destruction or Covert Extortion. Arabidopsis Book 8

Lau, S., Jürgens, G., and De Smet, I. (2008). The evolving complexity of the auxin pathway. *Plant Cell* **20**:1738-1746

Lebuhn, M., Heulin, T., and Hartmann, A. (1997). Production of auxin and other indolic and phenolic compounds by *Paenibacillus polymyxa* strains isolated from different proximity to plant roots. *FEMS Microbiology Ecology* **22**:325-334

Leclere, V., Bechet, M., Adam, A., Guez, J. S., Wathelet, B., Ongena, M., Thonart, P., Gancel, F., Chollet-Imbert, M., and Jacques, P. (2005). Mycosubtilin overproduction by *Bacillus subtilis* BBG100 enhances the organism's antagonistic and biocontrol activities. *Appl. Environ. Microbiol.* **71**:4577-4584

Lehmann, T., Hoffmann, M., Hentrich, M., and Pollmann, S. (2010). Indole-3-acetamide-dependent auxin biosynthesis: a widely distributed way of indole-3-acetic acid production. *Eur J Cell Biol.* **89**:895-905

Leyser, O. (2006). Dynamic integration of auxin transport and signaling. *Curr Biol.* **16**:424-433

Ligoxigakis, E. C., and Vakalounakis, D. J. (1990). Occurrence of race 2 of *Verticillium dahliae* on tomatoes in Crete. *Plant Pathology* **41**: 774-776

Ligoxigakis, E. C. (1991). Identification of physiological races of *Verticillium dahliae* Kleb. On tomato in Crete. Master thesis, M.A.I.Ch. 64

Ligoxigakis, E. K., and Vakalounakis, D. J. (1994). The incidence and distribution of races of *Verticillium dahliae*. *Plant Pathology* **43**:755-758

VI. ΒΙΒΛΙΟΓΡΑΦΙΑ

- Li, H., Tiwari, S. B., Hagen, G., and Guilfoyle, T. J. (2011).** Identical amino acid substitutions in the repression domain of auxin/indole-3-acetic acid proteins have contrasting effects on auxin signaling. *Plant Physiol* **155**:1252-1263
- Lincoln, T., and Eduardo, Z. (2010).** Plant Physiology, Fifth Edition Sinauer Associates Inc., Publishers Sunderland, Massachusetts U.S.A.
- Liscum, E., and Reed, J. W. (2002).** Genetics of Aux/IAA and ARF action in plant growth and development. *Plant Mol Biol* **49**:387-400
- Liscum, E., and Briggs, W. R. (1996).** Mutations of *Arabidopsis* in potential transduction and response components of the phototropic signaling pathway. *Plant Physiol.* **112**:291-296
- Ljung, K., Bhalerao, R. P., and Sandberg, G. (2001).** Sites and homeostatic control of auxin biosynthesis in *Arabidopsis* during vegetative growth. *Plant J.* **28**:465-474
- Ljung, K., Hull, A. K., Celenza, J., Yamada, M., Estelle, M., Normanly, J., and Sandberg, G. (2005).** Sites and regulation of auxin biosynthesis in *Arabidopsis* roots. *Plant Cell* **17**:1090-1104
- Llorente, F., Muskett, P., Sánchez-Valleta, A., López, G., Ramos, B., Sánchez-Rodríguez, C., Jordá, L., Parker, J., and Molina, A. (2008).** Repression of the auxin response pathway increases *Arabidopsis* susceptibility to necrotrophic fungi. *Mol. Plant* **1**:496-509.
- Lomax, T. L., Muday, G. K., and Rubery, P. H. (1995).** Auxin transport. *In: Plant Hormones, Physiology Biochemistry and Molecular Biology* (ed. P.J. Davies) Martinus Nijhoff, Dordrecht. 509-530
- Lom, D. A., and Thomas, A. (1978).** Microautoradiographic study of auxin transport in the stem of intact pea seedlings (*Pisum sativum* L.). *J. Exp. Bot.* **29**:147-157
- Lopez-Escudero, F. J., and Blanco-Lopez, M. A. (2001).** Effect of a Single or Double Soil Solarization to Control *Verticillium* Wilt in Established Olive Orchards in Spain. *Plant Disease* **85**:489-496
- Ludwig-Muller, J. (2000).** Indole-3-butyric acid in plant growth and development. *J Plant Growth Regul* **32**:219-230

VI. ΒΙΒΛΙΟΓΡΑΦΙΑ

- Malandraki, I., Tjamos, S. E., Pantelides, I., and Paplomatas, E. J. (2008).** Thermal inactivation of compost suppressiveness implicates possible biological factors in disease management. *Biological Control* **44**:180-187
- Mallory, A. C., Bartel, D. P., and Bartel, B. (2005).** MicroRNA-directed regulation of *Arabidopsis* auxin response factor 17 is essential for proper development and modulates expression of early auxin response genes. *Plant Cell* **17**:1360-1375
- Mashiguchi, K., Tanaka, K., Sakai, T., Sugawara, S., Kawaide, H., Natsume, M., Hanada, A., Yaeno, T., Shirasu, K., Yao, H., McSteen, P., Zhao, Y., Hayashi, K. I., Kamiya, Y., and Kasahara, H. (2011).** The main auxin biosynthesis pathway in *Arabidopsis*. *Proc Natl Acad Sci* **108**:18512-18517
- Mattsson, J., Ckurshumova, W., and Berleth, T. (2003).** Auxin signaling in *Arabidopsis* leaf vascular development. *Plant Physiol.* **131**:1327-1339
- Meinke, D. W., Cherry, J. M., Dean, C., Rounsley, S. D., and Koornneef, M. (1998).** *Arabidopsis thaliana*: A Model Plant for Genome Analysis. *Science* **282**:662-682
- Mercado-Blanco, J., Rodriguez-Jurado, D., Hervás, A., and Jimenez-Diaz, R. M. (2004).** Suppression of *Verticillium* wilt in olive planting stocks by root-associated fluorescent *Pseudomonas* spp. *Biological Control* **30**:474-486.
- Milner, J. L., Silo-Suh, L., Lee, J. C., He, H. Y., Clardy, J., and Handelsman, J. (1996).** Production of kanosamine by *Bacillus cereus* UW85. *Appl. Environ. Microbiol.* **62**: 3061-3065
- Mockaitis, K., Estelle, M. (2008).** Auxin receptors and plant development: a new signaling paradigm. *Annu Rev Cell Dev Biol* **24**:55-80
- Mol, L., Scholte, K., and Vos, J. (1995).** Effects of crop rotation and removal of crop debris on the soil population of two isolates of *Verticillium dahliae*. *Plant Pathol* **44**: 1070-1074
- Moyne, A. L., Shelby, R., Cleveland, T. E., and Tuzun, S. (2001).** *Bacillomycin D*: an iturin with antifungal activity against *Aspergillus flavus*. *J. Appl. Microbiol.* **90**:622-629
- Murphy, A., Peer, W. A., and Taiz, L. (2000).** Regulation of auxin transport by aminopeptidases and endogenous flavonoids. *Planta*. **211**:315-324

VI. ΒΙΒΛΙΟΓΡΑΦΙΑ

- Muto, H., Nagao, I., Demura, T., Fukuda, H., Kinjo, M., and Yamamoto, K. T. (2006).** Fluorescence cross-correlation analyses of the molecular interaction between an Aux/protein, MSG2/IAA19, and protein-protein interaction domains of auxin response factors of *Arabidopsis* expressed in HeLa cells. *Plant Cell Physiol* **47**:1095-1101
- Nagpal, P., Ellis, C. M., Weber, H., Ploense, S. E., Barkawi, L. S., Guilfoyle, L. S., Hagen, G., Alonso, J. M., Cohen, J. D., Farmer, E. E., Ecker, J. R., and Reed, J. W. (2005).** Auxin response factors ARF6 and ARF8 promote jasmonic acid production and flower maturation. *Development* **132**:4107-4718
- Naseem, M., and Dandekar, T. (2012).** The role of auxin-cytokinin antagonism in plant-pathogen interactions. *PLoS Pathog* **8**:100-3026
- Navarro, L., Dunoyer, P., Jay, F., Arnold, B., Dharmasiri, N., Estelle, M., Voinnet, O., Jones, J. D. (2006).** A plant miRNA contributes to antibacterial resistance by repressing auxin signaling. *Science* **312**:436-439
- Neilands, J. B., and Nakamura, K. (1991).** Detection, determination, isolation, characterization and regulation of microbial iron chelates. In CRC Handbook of Microbial Iron Chelates Edited by G. Winkelmann London: CRC Press
- Nowacki, J. and Bandurski, R. S. (1980).** Myo-inositol esters of indole-3-acetic acid as seed auxin precursors of *Zea mays* L. *Plant Physiol* **65**: 422-427
- Nürnbergger, T., and Scheel, D. (2001).** Signal transmission in the plant immune response. *Trends Plant Sci* **6**:372-379
- Okushima, Y., Overvoorde, P. J., Arima, K., Alonso, J. M., Chan, A., Chang, C., Ecker, J. R., Hughes, B., Lui, A., and Nguyen, D., et al. (2005).** Functional genomic analysis of the auxin response factor gene family members in *Arabidopsis thaliana*: unique and overlapping functions of *ARF7* and *ARF19*. *Plant Cell* **17**:444-463
- Olsson, S., and Nordbring-Hertz, B. (1985).** Microsclerotial germination of *Verticillium dahliae* as affected by rape rhizosphere. *FEMS Microbiol. Ecol.* **31**:293-299
- Oñate-Sánchez, L., and Vicente-Carbajosa, J. (2008).** DNA-free RNA isolation

VI. ΒΙΒΛΙΟΓΡΑΦΙΑ

protocols for *Arabidopsis thaliana* including seeds and siliques. *BMC Research Notes* 1:93

Porter, W. L., and Thimann, K. V. (1965). Molecular requirements for auxin action-I. *Phytochemistry* 4:229-243

Pantelides, I. S., Tjamos, S. E., and Paplomatas, E. J. (2010). Ethylene perception via ETR1 is required in *Arabidopsis* infection by *Verticillium dahliae*. *Mol. Plant Pathol.* 11:191-202

Pantelides, I. S., Tjamos, S. E., Striglis, I. A., Chatzipavlidis, I., and Paplomatas, E. J. (2009). Mode of action of a non-pathogenic *Fusarium oxysporum* strain against *Verticillium dahliae* using Real Time QPCR analysis and biomarker transformation. *Biological control* 50:30-36

Park, W.J., Kriechbaumer, V., Müller, A., Piotrowski, M., Meeley, R. B., Gierl, A., and Glawischnig, E. (2003). The nitrilase ZmNIT2 converts indole-3-acetonitrile to indole-3-acetic acid. *Plant Physiol* 133:794-802

Parry, G., Calderon-Villalobos, L. I., Prigge, M., Peret, B., Dharmasiri, S., Itoh, H., Lechner, E., Gray, W. M., Bennett, M., and Estelle, M. (2009). Complex regulation of the TIR1/AFB family of auxin receptors. *Proc Natl Acad Sci* 106:22540-22545

Paulitz, T. C., and Belanger, R. R. (2001). Biological control in greenhouse systems. *Annu. Rev. Phytopathol.* 39:103-133

Peer, W. A., and Murphy, A. S., (2007). Flavonoids and auxin transport: modulators or regulators. *Trends in Plant Science* 12:556-563

Peer, W. A., Cheng, Y., and Murphy, A. S. (2013). Evidence of oxidative attenuation of auxin signaling. *J Exp Bot* 64:2629-2639

Pegg, G. F. (1974). *Verticillium* diseases. *Rev. Pl. Pathol.* 53:157-182 Commonwealth Mycological Institute

Pegg, G. F. (1984). The impact of *Verticillium* diseases in agriculture. *Phytopath. medit.* 23:176-192

Penninckx, I. A. M., Eggermont, K., Terras, F. R. G., Thomma, B. P. H. J., De Samblanx, G. W., Buchala, A., Métraux, J. b., Manners, J. M., and Broekaer, W. F. (1996). Pathogen-

VI. ΒΙΒΛΙΟΓΡΑΦΙΑ

Induced Systemic Activation of a Plant Defensin Gene in *Arabidopsis* Follows a Salicylic Acid-Independent Pathway. *Plant Cell* **8**:2309-2323

Platt, H. W., and Arsenault, W. J. (2001). Management of nitrogen and phosphorus rates does not suppress *Verticillium* wilt in Yukon Gold. *American Journal of Potato Research* **78**:215-219

Pollmann, S., Neu, D., and Weiler, E. W. (2003). Molecular cloning and characterization of an amidase from *Arabidopsis thaliana* capable of converting indole-3-acetamide into the plant growth hormone, indole-3-acetic acid. *Phytochemistry* **62**:293-300

Quittenden, L. J., Davies, N. W., Smith, J. A., Molesworth, P. P., Tivendale, N. D., and Ross, J. J. (2009). Auxin biosynthesis in pea: characterization of the tryptamine pathway. *Plant Physiol* **151**:1130-1138

Rashotte, A. M., Brady, S. R., Reed, R. C., Ante, S. J., and Muday, G. K. (2000). Basipetal auxin transport is required for gravitropism in roots of *Arabidopsis*. *Plant Physiol* **122**:481-490

Raven, J. A. (1975). Transport of indolacetic acid in plant cells in relation to pH and electrical potential gradients, and its significance for polar IAA transport. *New Phytol.* **74**:163-172

Reinhardt, D., Mandel, T., and Kuhlemeier, C. (2000). Auxin regulates the initiation and radial position of plant lateral organs. *Plant Cell* **12**:507-518

Reinecke, D. M. (1999). 4-Chloroindole-3-acetic acid and plant growth. *Plant Growth Regul.* **27**:3-13

Resende, M. L. V., Flood, J., and Cooper, R. M. (1994). Host specialization of *Verticillium dahliae*, with emphasis on isolates from cocoa (*Theobroma cacao*). *Plant Pathol.* **43**:104-111

Rock, C. D., and Sun, X. (2005). Crosstalk between ABA and auxin signaling pathways in roots of *Arabidopsis thaliana* (L.) Heynh. *Planta* **222**:98-106

Rowe, R. C. (1985). Potato early dying- a serious threat to the potato industry. *Am. Potato J.* **62**:157-161

VI. ΒΙΒΛΙΟΓΡΑΦΙΑ

Ruegger, M., Dewey, E., Gray W. M., Hobbie, L., Turner, J., and Estelle, M. (1998). The TIR1 protein of *Arabidopsis* functions in auxin response and is related to human SKP2 and yeast Grr1p. *Genes & Dev.* **12**:198–207.

Sackston, W. E., McDonald, W. C., and Martens, J. (1957). Leaf mottle or *Verticillium* wilt of sunflower. *Plant Dis. Reprt* **41**:337-343

Sandra, A. I., Wright, C. H., Zumoff, L. S., and Steven, V. B. (2001). *Pantoea agglomerans* strain EH318 produces two antibiotics that inhibit *Erwinia amylovora* in vitro. *Appl. Environ. Microbiol* **67**:282-292

Sauer, M., Robert, S., and Kleine-Vehn, J. (2013). Auxin: simply complicated. *J. Exp. Bot.* **64**:2565-2577

Savatin, D. V., Ferrari, S., Sicilia, E., and De Lorenzo, G. (2011). Oligogalacturonide auxin antagonism does not require post-transcriptional gene silencing or stabilization of auxin response repressors in *Arabidopsis thaliana*. *Plant Physiol* **157**:1163-1174

Scherer, G. F. E. (2011). Auxin-binding-protein1, the second auxin receptor: what is the significance of a two-receptor concept in plant signal transduction . *J Exp Bot* **62**:3339-3357

Schnathorst, W. C. (1981). Life cycle and epidemiology of *Verticillium*. Pages 81-111 in: Fungal Wilt Diseases of Plants. M.E. Mace, A.A.Bell, and C.H. Beckman, eds. Academic Press, New York. 640pp

Schreiber, L. R., and Green, R. J. Jr. (1963). Effect of root exudates on germination of conidia and microsclerotia of *Verticillium alboatrum* inhibited by the soil fungistatic principle. *Phytopathology* **53**:260-264

Schruff, M. C., Spielman, M., Tiwari, S., Adams, S., Fenby, N., and Scott, R. J. (2006). The *auxin response factor 2* gene of *Arabidopsis* links auxin signalling, cell division, and the size of seeds and other organs. *Development* **133**:251-261

Selitreffnikoff, C. P. (2001). Antifungal proteins. *Appl Environ Microbiol.* **67**:2883-2894

Sessions, A., Nemhauser, J. L., McColl, A., Roe, J. L., Feldmann, K. A., and Zambryski P. C. (1997). ETTIN patterns the *Arabidopsis* floral meristem and reproductive organs. *Development* **124**:4481-4491

VI. ΒΙΒΛΙΟΓΡΑΦΙΑ

- Shanahan, P., O'Sullivan, D. J., Simpson, P., Glennon, J. D., and O'Gara, F. (1992).** Isolation of 2,4-Diacetylphloroglucinol from a fluorescent pseudomonad and investigation of physio-logical parameters influencing its production. *Appl. Environ. Microbiol* **58**:353-358
- Sherf, A. F., and MacNab, A. A. (1986).** Vegetable Diseases and their Control. (2nd ed.). John Wiley & sons, eds. New York, USA, pp728
- Silo-Suh, L. A., Lethbridge, B. J., Raffel, S. J., He, H., Clardy, J., and Handelsman, J. (1994).** Biological activities of two fungistatic antibiotics produced by *Bacillus cereus* UW85. *Appl. Environ. Microbiol* **60**: 2023-2030
- Smith, K. P., Havey, M. J., and Handelsman, J. (1993).** Suppression of cottony leak of cucumber with *Bacillus cereus* strain UW85. *Plant Dis* **77**:139-142
- Snyder, W. C., and Smith, S. N. (1981).** Current Status. In: Fungal Wilt Diseases of Plants. M.E. Mace, A.A. Bell and C.H. Beckman, eds. Academic Press, Inc. 111 Fifth Ave., New York 10003, pp640
- Spaepen, S., Vanderleyden, J., and Remans, R. (2007).** Indole- 3-acetic acid in microbial and microorganism-plant signaling. *FEMS Microbiol Rev.* **31**:425-448
- Staskawicz, B. J., Ausubel, F. M., Baker, B. J., Ellis, J. G., and Jones, J. D. G. (1995).** Molecular genetics of plant disease resistance. *Science* **268**:661-667
- Staswick, P. E., Serban, B., Rowe, M., Tiriyaki, I., Maldonado, M. T., Maldonado, M. C., and Suza, W. (2005).** Characterization of an Arabidopsis enzyme family that conjugates amino acids to indole-3- acetic acid. *Plant Cell* **17**:616-627
- Stepanova, A. N., Robertson-Hoyt, J., Yun J., Benavente, L. M., Xie, D. Y., DoleZal, K., Schlereth, A., Jürgens, G., and Alonso, J. M. (2008).** TAA1-mediated auxin biosynthesis is essential for hormone crosstalk and plant development. *Cell* **133**:177-191
- Strader, L. C., and Bartel, B. (2008).** A new path to auxin. *Nat Chem Biol* **4**:337-339
- Subbarao, K. V., Kabir, Z., Martin, F. N., and Koike, S. T. (2007).** Management of soilborne diseases in strawberry using vegetable rotations. *Plant Dis* **91**:964-972

VI. ΒΙΒΛΙΟΓΡΑΦΙΑ

- Swarup, R., Friml, J., Marchant, A., Ljung, K., Sandberg, G., Palme, K., and Bennett, M. (2001).** Localization of the auxin permease AUX1 suggests two functionally distinct hormone transport pathways operate in the *Arabidopsis* root apex. *Genes Dev* **15**:2648-2653
- Szemenyei, H., Hannon, M., and Long, J. A. (2008).** TOPLESS mediates auxin-dependent transcriptional repression during *Arabidopsis* embryogenesis. *Science* **319**:1384-1388
- Tabata, R., Ikezaki, M., Fujibe, T., Aida, M., Tian, C. E., Ueno, Y., Yamamoto, K. T., Machida, Y., Nakamura, K., and Ishiguro, S. (2010).** *Arabidopsis* auxin response factor6 and 8 regulate jasmonic acid biosynthesis and floral organ development via repression of class 1 KNOX genes. *Plant Cell Physiol* **51**:164-175
- Tan, X., Calderon-Villalobos, L. I., Sharon, M., Zheng, C., Robinson, C. V., Estelle, M., and Zheng, M. (2007).** Mechanism of auxin perception by the TIR1 ubiquitin ligase. *Nature* **446**:640-645
- Tatsuki, M., Nakajima, N., Fujii, H., Shimada, T., Nakano, M., Hayashi, K., Hayama, I., and Nakamura, Y. (2013).** Increased levels of IAA are required for system 2 ethylene synthesis causing fruit softening in peach (*Prunus persica* L. Batsch). *J Exp Bot* **64**:1049-1059
- Thanassouloupoulos, C. C., Biris, D. A and Tjamos, E. C. (1981).** Weed hosts as inoculum source of *Verticillium* in olive orchards. *Phytopath. Medit.* **20**:164-168
- Thimann, K. V. (1937).** On the nature of inhibition caused by auxin. *Amer. J. Bot.* **24**: 407-412
- Thomashow, L. S., Bonsall, R. F., and Weller, D. M. (2002).** Antibiotic production by soil and rhizosphere microbes *in situ*. Pages 638-647 in: *Manual of Environmental Microbiology* (2nd ed.), ASM Press, Washington DC.
- Tiryaki, I., and Staswick, P. E. (2002).** An *Arabidopsis* mutant defective in jasmonate response is allelic to the auxin signaling mutant *axr1*. *Plant Physiol* **130**:887-894
- Tiwari, S. B., Hagen, G., and Guilfoyle, T. J. (2003).** The roles of auxin response factor domains in auxin-responsive transcription. *Plant Cell* **15**:533-543

VI. ΒΙΒΛΙΟΓΡΑΦΙΑ

- Tjamos, E. C., Biris, D. A, and Paplomatas, E. J. (1991).** Recovery of olive trees with *Verticillium* wilt after individual application of soil solarization in established olive orchards. *Plant Disease* **75**:557-562
- Tjamos, S. E., Fletmetakis, E., Paplomatas, E. J., and Katinakis, P. (2005).** Induction of resistance to *Verticillium dahliae* in *Arabidopsis thaliana* by the biocontrol agent K165 and pathogenesis-related proteins gene expression; *Mol. Plant Microbe In.* **18**: 555-561
- Tuzun, S., and Bent, E. (2005).** Multigenic and Induced Systemic Resistance in Plants. *Appl. Environ. Microbiol.* **56**:908-912
- Ulmasov, T., Liu, Z. B., Hagen, G., and Guilfoyle, T. J. (1995).** Composite structure of auxin response elements. *Plant Cell* **7**:1611-1623
- Van-Loon, L. C., and Van-Strien E. A. (1999).** The families of pathogenesis-related proteins, their activities, and comparative analysis of PR-1 type proteins. *Physiological and Molecular Plant Pathology* **55**:85-97
- Van-Loon, L. C., (2007).** Plant responses to plant growth-promoting rhizobacteria. *Plant Pathol* **119**:243-254
- Veronese, P., Nakagami, H., Bluhm, B., AbuQamar, S., Chen, X., Salmeron, J., Dietrich, R. A., Hirt, H., and 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
- Wang, D., Pajerowska-Mukhtar, K., Culler, A. H., and Dong, X. (2007).** Salicylic acid inhibits pathogen growth in plants through repression of the auxin signaling pathway. *Curr Biol* **17**:1784-1790
- Wang, J. W., Wang, L. J., Mao, Y. B., Cai, W. J., Xue, H. W., and Chen, X. Y. (2005).** Control of root cap formation by microRNA-targeted auxin response factors in *Arabidopsis*. *Plant Cell* **17**:2204-2216
- Wightman, F. and Lighty, D. L. (1982).** Identification of phenylacetic acid as a natural auxin in the shoots of higher plants. *Physiol. Plant.* **55**:17-24
- Wilhelm, S. (1984).** Sources and genetics of *Verticillium* wilt resistance in major crops. *Phytopath. medit.* **23**:220

VI. ΒΙΒΛΙΟΓΡΑΦΙΑ

- Wilhite, S. E., Lumsden, R. D., and Strancy, D. C. (2001).** Peptide synthetase gene in *Trichoderma virens*. *Appl. Environ. Microbiol* **67**:5055-5062
- Wilson, A. K., Pickett, F. B., Turner, J. C. and Estelle, M. (1990).** A dominant mutation in *Arabidopsis* confers resistance to auxin, ethylene and abscisic acid. *Mol. Gen. Genet.* **222**:377-383
- Won, C., Shen, X. L., Mashiguchi, K, Zheng, Z. Y., Dai, X. H., Cheng, Y.F., Kasahara, H., Kamiya, Y., Chory, J., and Zhao, Y. (2011).** Conversion of tryptophan to indole-3-acetic acid by tryptophan aminotransferases of *Arabidopsis* and YUCCAs in *Arabidopsis*. *Proc Natl Acad Sci*.**108**:18518-18523
- Woo, S. L., Scala, f., Ruocco, M., and Lorito, M. (2006).** The molecular biology of the interaction between *Trichoderma* spp. Phytopathogenic fungi and plants. *Phytopathol* **96**:181-185
- Woolliams, G. E. (1966).** Host range and syptomatology of *Verticillium dahliae* in economic, weed and native plants in interior British Columbia. *Can. J. Plant Sci.* **46**: 661-669
- Yang, L., Jue, D., Li, W., Zhang, R., Chen, M., and Yang, Q. (2013).** Identification of miRNA from eggplant (*Solanum melongena* L.) by small RNA deep sequencing and their response to *Verticillium dahliae* infection. *PLoS ONE* 8, e72840
- Young, N. D. (2000).** The genetic architecture of resistance. *Curr. Opin. Plant Biol.* **3**:285-290
- Zhao, Y. (2010).** Auxin biosynthesis and its role in plant development. *Annu Rev Plant Biol* **61**:49-64
- Zenser, N., Ellsmore, A., Leasure, C., and Callis, J. (2001).** Auxin modulates the degradation rate of aux/IAA proteins. *Proc Natl Acad Sci* **98**:11795-11800