

**ΓΕΩΠΟΝΙΚΟ ΠΑΝΕΠΙΣΤΗΜΙΟ ΑΘΗΝΩΝ
ΤΜΗΜΑ ΦΥΤΟΠΡΟΣΤΑΣΙΑΣ
ΕΡΓΑΣΤΗΡΙΟ ΦΥΤΟΠΑΘΟΛΟΓΙΑΣ**

«Διερεύνηση του ρόλου του αιθυλενίου στη παθογένεια του μύκητα *Verticillium dahliae* σε φυτά τομάτας μέσω της μελέτης του γονιδίου της *ACC* συνθάσης »

ΤΣΟΛΑΚΙΔΟΥ ΜΑΡΙΑ-ΔΗΜΗΤΡΑ

ΜΕΤΑΠΤΥΧΙΑΚΗ ΜΕΛΕΤΗ

που υποβλήθηκε στο Γεωπονικό Πανεπιστήμιο Αθηνών

Τριμελής Εξεταστική Επιτροπή:

1. Επαμεινώνδας Παπλωματάς, Αναπληρωτής Καθηγητής. Επιβλέπων
2. Έλενη Τσαντίλη, Αναπληρώτρια Καθηγήτρια, Μέλος
3. Δημήτρης Τσιτσιγιάννης, Λέκτορας, Μέλος

ΑΘΗΝΑ 2011

Πρόλογος

Η παρούσα μεταπτυχιακή μελέτη εκπονήθηκε στο εργαστήριο Φυτοπαθολογίας του Γεωπονικού Πανεπιστημίου Αθηνών, υπό την επίβλεψη του Αναπληρωτή Καθηγητή Ελαμεινώδα Παπλωματά.

Θέλω να εκφράσω την βαθιά ευγνωμοσύνη μου στον Δρ. Παπλωματά που με καθοδήγησε και επέβλεψε καθόλη τη διάρκεια της μεταπτυχιακής μου μελέτης και με εμπιστεύτηκε αναθέτοντάς μου ένα πολύ σύγχρονο και ενδιαφέρον θέμα. Το ενδιαφέρον του και οι συστάσεις του για την επίλυση προβλημάτων, συνέβαλαν καθοριστικά στην ολοκλήρωση της μελέτης. Επίσης ο χαρακτήρας του και το εξαιρετο επιστημονικό του υπόβαθρο με ενέπνευσαν για να ασχοληθώ με την έρευνα. Κατά την διόρθωση της μελέτης οι ουσιαστικές παρεμβάσεις και η επισήμανση λαθών από τον Δρ. Παπλωματά βελτίωσαν ιδιαίτερα το τελικό κείμενο.

Θα ήθελα να ευχαριστήσω ιδιαίτερα τον Λέκτορα Σωτήρη Τζάμο για τη διαρκή στήριξη του, το ειλικρινές ενδιαφέρον του και την άμεση συμμετοχή του στην έρευνα μου. Για την εκπόνηση και ολοκλήρωση της παρούσας μεταπτυχιακής μελέτης ήταν καθοριστική η συμβολή του Λέκτορα Δημήτρη Τσιτσιγιάννη ο οποίος ήταν πάντα πρόθυμος να συζητήσει οποιαδήποτε απορία ή πρόβλημα αντιμετώπιζα κατά τη διάρκεια της έρευνας μου.

Ευχαριστώ θερμά τον Ομότιμο Καθηγητή Φυτοπαθολογίας κ. Ελευθέριο Τζάμο για την φιλοξενία του στο εργαστήριο Φυτοπαθολογίας.

Ευχαριστώ επίσης το διδακτικό προσωπικό και τους φοιτητές του Εργαστηρίου Δενδροκομίας που ήταν πάντα εξυπηρετικοί για τη χρήση του αέριου χρωματογράφου. Ευχαριστώ ιδιαίτερα την υποφήφια διδάκτορα Μίνα Κραυκαλέτου για τη προθυμία της και τη βοήθειά της στην μέτρηση αιθυλενίου στο χρωματογράφο αέριας μάζας του εργαστηρίου.

Ευχαριστώ θερμά τον διδάκτορα Ιάκωβο Παντελίδη για την πολύτιμη βοήθεια του και την καθοδήγηση του κατά τη διάρκεια εκπόνησης της μεταπτυχιακής μου μελέτης. Ο Ιάκωβος με ατελείωτη υπομονή και συνέπεια με μύησε στη Μοριακή Φυτοπαθολογία, μαθαίνοντάς μου τις περισσότερες μοριακές τεχνικές. Η συμβολή του στην οργάνωση και ολοκλήρωση της παρούσας μελέτης ήταν καθοριστική, τόσο σε επιστημονικό όσο και σε προσωπικό επίπεδο.

Θα ήθελα να ευχαριστήσω επίσης τη διδάκτορα Αλίκη Τζίμα για την ουσιαστική βοήθειά της και το ειλικρινές ενδιαφέρον της, σε μια πολύ δύσκολη καμπή των πειραμάτων μου, καθώς η συμβολή της στην πραγματοποίηση πειραμάτων υβριδισμού κατά Southern ήταν καθοριστική. Η Αλίκη αποτελεί για μένα μια εξαιρετική ερευνήτρια και εξαιρετική φίλη.

Ευχαριστώ επίσης όλο το προσωπικό και τους φοιτητές του εργαστηρίου Φυτοπαθολογίας για το ευχάριστο περιβάλλον που μου προσέφεραν κατά την εργασία μου στο εργαστήριο. Ευχαριστώ ιδιαίτερα τους μεταπτυχιακούς φοιτητές Ιωάννη Στριγγλή και Σεβαστή Μαϊστρου για τη στήριξη τους εντός και εκτός του εργαστηρίου και για τις ατελείωτες ώρες που περάσαμε συζητώντας και ανταλλάσσοντας απόψεις για την πορεία των πειραμάτων μας.

Τέλος θα ήθελα να ευχαριστήσω τους γονείς μου Αναστάσιο και Χρυσούλα και τις αδερφές μου Βασιλική και Ιωάννα για την συμπαράσταση τους και την αγάπη τους!

Η παρούσα μεταπτυχιακή μελέτη πραγματοποιήθηκε με τις καλύτερες των εντυπώσεων!

ΠΕΡΙΕΧΟΜΕΝΑ

ABSTRACT	1
ΠΕΡΙΛΗΨΗ	2
1. ΕΙΣΑΓΩΓΗ.....	3
1.1 Ασθένειες του ξύλου	3
1.2 Κύκλος ασθένειας και μηχανισμοί παθογένειας του μύκητα <i>V. dahliae</i>	5
1.2.1 Ξενιστές του μύκητα <i>V. dahliae</i>	5
1.2.2 Συμπτώματα αδρομυκώσεων από το μύκητα <i>V. dahliae</i>	6
1.2.3 Ο κύκλος ζωής του μύκητα <i>V. dahliae</i>	9
1.2.4 Μηχανισμοί παθογένειας του μύκητα <i>V. dahliae</i>	12
1.2.5 Άμυνα των φυτών ενάντια στο μύκητα <i>V. dahliae</i>	15
1.2.6 Αντιμετώπιση του μύκητα <i>V. dahliae</i>	17
1.3 Το αιθυλένιο και ο ρόλος του στην αλληλεπίδραση ξενιστή παθογόνου	19
1.3.1 Εισαγωγή	19
1.3.2 Βιοσύνθεση του αιθυλενίου στους μύκητες.....	20
1.3.3 Εμπλοκή του αιθυλενίου στην άμυνα των φυτών	23
1.3.4 Ο ρόλος του αιθυλενίου στην αλληλεπίδραση ξενιστή – παθογόνου	26
1.4 Σκοπός της παρούσας μελέτης.....	27
2. ΜΕΘΟΔΟΛΟΓΙΑ.....	29
2.1 Φυτικό υλικό	29
2.2 Στελέχη φυτοπαθογόνων μυκήτων και προετοιμασία μολύσματος,	29
2.3 Δοκιμές παθογένειας των μεταλλαγμένων στελεχών.	30
2.4 Σχεδιασμός εκκινήτων.....	31
2.5 Απομόνωση DNA από φυτά τομάτας <i>Ailsa Craig</i>	32
2.6 Απομόνωση DNA από το μύκητα <i>V. dahliae</i>	32
2.7 Μέτρηση συγκέντρωσης νουκλεϊκών οξέων.....	33
2.8 Εφαρμογή αλυσιδωτής αντίδρασης πολυμεράσης (PCR).....	33
2.9 Ηλεκτροφόρηση τμημάτων DNA.....	34

2.10	Απομόνωση πλασμιδιακού DNA από το βακτήριο <i>Escherichia coli</i>	34
2.11	Υβριδισμός κατά Southern στα μετασχηματισμένα <i>V. dahliae</i> στελέχη	35
2.12	Απομόνωση RNA από το μύκητα <i>V. dahliae</i>	36
2.13	Αντίδραση αντίστροφης μεταγραφής.....	37
2.14	Εφαρμογή PCR πραγματικού χρόνου (Real-time PCR)	37
2.15	Μετασχηματισμός του μύκητα <i>V. dahliae</i> με το γονίδιο της πράσινης και κόκκινης φθορίζουσας πρωτεΐνης.....	39
2.16	Ιστοπαθολογική παρατήρηση της διαδικασίας αποίκησης του μύκητα στο ριζικό σύστημα και στα αγγεία του ξύλου φυτών τομάτας με συνεστιακό μικροσκόπιο φθορισμού (confocal fluorescence microscope)	41
2.17	Μέτρηση του ACC με αέριο χρωματογράφο	42
2.18	Φαινοτυπικός χαρακτηρισμός στελεχών με απενεργοποιημένο γονίδιο ACS.....	43
3.	ΑΠΟΤΕΛΕΣΜΑΤΑ.....	45
3.1	Έλεγχος απενεργοποίησης και επανενσωμάτωσης του γονιδίου της ACC συνθάσης στα στελέχη του <i>V. dahliae</i>	45
3.2	Έλεγχος επιπέδου έκφρασης του γονιδίου ACS στα μεταλλαγμένα στελέχη του <i>V. dahliae</i>	47
3.3	Ποσοτικοποίηση του άγριου στελέχους, του ΔACS 18.7 και του εκτοπικού στελέχους 18.9 του μύκητα <i>V. dahliae</i> σε φυτά τομάτας Ailsa Craig.	51
3.4	Πειράματα παθογένειας μεταλλαγμένων ACS στελεχών <i>V. dahliae</i> σε φυτά τομάτας ποικιλίας Ailsa Craig.....	52
3.5	Ιστοπαθολογική παρατήρηση της διαδικασίας μόλυνσης του άγριου στελέχους και του μεταλλαγμένου στελέχους ΔACS 18.7 σε φυτά τομάτας Ailsa Craig.....	56
3.6	Χαρακτηρισμός των μεταλλαγμένων στελεχών του <i>V. dahliae</i> ως προς την μυκηλιακή ανάπτυξη.	60
3.7	Αξιολόγηση των μεταλλαγμένων στελεχών ως προς την παραγωγή αιθυλενίου μέσω του βιοχημικού μονοπατιού της ACC συνθάσης.....	64
	ΣΥΖΗΤΗΣΗ.....	65
	ΒΙΒΛΙΟΓΡΑΦΙΑ	69
	ΠΑΡΑΡΤΗΜΑ.....	87

ABSTRACT

Several studies have shown that some plant pathogenic fungi are able to produce ethylene. Three biosynthesis pathways leading to ethylene production are known in fungi, suggesting an important role of this compound among those microorganisms, of which the one is characterized in higher plants and the other two pathways are found only in microorganisms. In the methionine dependent ethylene biosynthesis, methionine is first converted to the S-adenosyl methionine (S-AdoMet or SAM) intermediate by the SAM synthase, then SAM is converted to 1-aminocyclopropane-1-carboxylic acid (ACC) by the ACC synthase, and finally ethylene is produced from ACC by the ACC oxidase. This pathway, so called the ACC pathway, has been scarcely described in fungi. The second pathway has been first characterized in bacteria and is found too in several ethylene producing fungi. L-methionine is deaminated to α -keto- γ -methylthiobutyric acid (KMBA), which gives its name to this pathway and is further oxidized to ethylene. The third pathway which is a 2-oxoglutarate pathway is catalyzed by a single multifunction ethylene forming enzyme (EFE) in presence of other amino-acids as cofactors, such as arginine or lysine, depending on the fungus studied. This enzyme is an ascorbate oxidase catalyzing two reactions simultaneously. The primary reaction leads to ethylene production by oxygenation of the 2-oxoglutarate, while in a secondary reaction EFE catalyzes the production of succinate, guanidine, and pyrroline carboxylate.

The soil-borne fungi *Verticillium dahliae* is able to produce ethylene; however, it remains unclear whether the fungal ethylene produced *in planta* is required for the development of the pathogen or it acts as a virulence factor.

In order to investigate the role of ethylene in *Verticillium dahliae* pathogenicity, an ACS gene (encoding a key enzyme involved in ethylene biosynthesis) was inactivated in a *Verticillium* isolate through transposon mutagenesis. The inactivation of ACS was verified by Real-time PCR gene expression analysis.

Pathogenicity experiments showed that the $\Delta ACS18.7$ mutant caused typical symptoms in tomato plants; however, there was a statistically significant reduction in disease severity compared to that of the wild type strain. Complementation of ACS in ΔACS mutant restored the disease severity caused by the pathogen. Quantitative Real-time PCR analysis revealed that the decrease in symptom severity shown in tomato plants inoculated with $\Delta ACS18.7$ mutants was associated with significant reductions in the growth of the pathogen in the vascular tissues of the plants. Microscopic observation of the infection behavior of a red fluorescent protein (Ds-Red) - labeled $\Delta ACS 18.7$ mutant and a wild type strain showed that after 24 hours both wild type and mutant spores had attached at the root surface. However 5 days after inoculation the $\Delta ACS 18.7$ mutant showed less hyphal growth and colonized xylem vessels considerably less than the wild type strain.

The results of the present study suggest a role of ACS in virulence and vascular colonization of the soilborne fungus *V. dahliae*.

Key words: *Verticillium dahliae*, ethylene, 1-aminocyclopropane-1-carboxylic acid (ACC).

ΠΕΡΙΛΗΨΗ

Στα πλαίσια της παρούσας εργασίας διερευνήθηκε ο ρόλος του αιθυλενίου στην παθογένεια του μύκητα *V. dahliae* σε φυτά τομάτας, μέσω του γονιδίου της ACC συνθάσης, καθώς το ACC αποτελεί ένα πρόδρομο μόριο στο μεταβολικό μονοπάτι βιοσύνθεσης του αιθυλενίου.

Αρχικά πραγματοποιήθηκαν πειράματα ελέγχου απενεργοποίησης και επανενσωμάτωσης του γονιδίου ACC συνθάσης (ACS) σε μια σειρά μεταλλαγμένων στελεχών του μύκητα *Verticillium dahliae* στο γονίδιο ACS (χορηγία της Dr. Katherine Dobinson, Department of Agriculture and Agri-Food Canada, Department of Biology, The University Of Western Ontario, Canada) και πειράματα ελέγχου των επιπέδων έκφρασης του γονιδίου ACS με Real-Time PCR.

Στη συνέχεια πραγματοποιήθηκαν πειράματα παθογένειας αλλά και ιστοπαθολογικής παρατήρησης της διαδικασίας μόλυνσης, με επιλεγμένα μεταλλαγμένα στελέχη στο γονίδιο ACS καθώς και το άγριο στέλεχος του μύκητα *V. dahliae* σε φυτά τομάτας. Διαπιστώθηκε ότι το $\Delta ACS18.7$ στέλεχος με απενεργοποιημένο το γονίδιο της ACS παρουσίασε στατιστικά λιγότερο έντονα συμπτώματα και χαμηλότερο ποσοστό ασθένειας σε σχέση με το άγριο στέλεχος. Για να διερευνηθεί αν η μείωση αυτή οφείλεται σε μειωμένη ανάπτυξη των παθογόνων στους αγγειακούς ιστούς των φυτών, πραγματοποιήθηκαν πειράματα ποσοτικοποίησης των μυκήτων με αντιδράσεις Real-time PCR σε διάφορες χρονικές στιγμές μετά την μόλυνση τους σε φυτά τομάτας. Τα πειράματα αυτά έδειξαν ότι η ποσότητα του μεταλλαγμένου στελέχους ΔACS 18.7 ήταν σημαντικά μικρότερη από το άγριο στέλεχος υποδεικνύοντας την εμπλοκή του γονιδίου της ACS στην παθογένεια του μύκητα *V. dahliae*. Στα πειράματα ιστοπαθολογικής παρατήρησης της διαδικασίας μόλυνσης του άγριου στελέχους και του μεταλλαγμένου στελέχους ΔACS 18.7 σε φυτά τομάτας Ailsa Craig φάνηκε ότι δεν υπάρχει διαφορά ανάμεσα στο άγριο και στο ΔACS 18.7 μεταλλαγμένο στέλεχος ως προς την πρόσφυση και αποίκιση του ριζικού συστήματος στις 24 h μετά την εφαρμογή τους, ενώ στις 5 ημέρες μετά την μόλυνση οι υφές του άγριου στελέχους έχουν αποικήσει σε μεγαλύτερο βαθμό το ριζικό σύστημα των φυτών σε σχέση με το ΔACS 18.7.

Εν κατακλείδι η εργασία αυτή παρουσίασε το σημαντικό ρόλο του γονιδίου της ACC συνθάσης στην παθογένεια του μύκητα *V. dahliae* και την εμπλοκή του αιθυλενίου στην εκδήλωση συμπτωμάτων και την πρόκληση ασθένειας από το μύκητα *V. dahliae*.

1. ΕΙΣΑΓΩΓΗ

1.1 Ασθένειες του ξύλου

Οι ασθένειες του ξύλου είναι βραδέως εξελισσόμενες ασθένειες που όταν οφείλονται σε εδαφογενείς παθογόνους μικροοργανισμούς, αποτελούν από τις πιο καταστροφικές ασθένειες παγκοσμίως (Tjamos and Beckman, 1989, Panagopoulos 1997). Τα συμπτώματα τους εμφανίζονται συνήθως με τη μορφή μαρανσης, χλώρωσης και νέκρωσης των φύλλων που ακολουθείται από τη νέκρωση όλου του φυτού. Η νέκρωση των φυτών μπορεί να επέλθει μέσα σε μερικές εβδομάδες, μετά από αρκετούς μήνες ή και χρόνια μετά την προσβολή (Agrios, 2005). Η μεγάλη οικονομική και φυτοπαθολογική τους σημασία έγκειται στο ότι οι παθογόνοι μικροοργανισμοί που τις προκαλούν εγκαθίστανται στα αγγεία του ξύλου, κατά τη μολυσματική φάση του βιολογικού τους κύκλου, γεγονός που καθιστά τη χημική καταπολέμηση τους πολύ δύσκολη έως αδύνατη. Επιπλέον ο σχηματισμός ανθεκτικών μορφών επιβίωσης από αυτά τα παθογόνα, όπως μικροσκληρώτια, επιτρέπει την πολυετή επιβίωση τους στο έδαφος (Schathorst, 1981).

Οι ασθένειες του ξύλου (αδροβακτηριώσεις ή αδρομυκώσεις), προκαλούνται τόσο από προκαρυωτικούς όσο και από ευκαρυωτικούς μικροοργανισμούς και εμφανίζονται ως αποτέλεσμα της παρουσίας και δραστηριότητας των παθογόνων στα αγγεία του ξύλου των φυτών (Pegg, 1989). Ωστόσο ενώ οι προκαρυωτικοί οργανισμοί μετά από την εγκατάστασή τους στα αγγεία του ξύλου εξαπλώνονται αδιακρίτως στα παρεγχυματικά κύτταρα της ρίζας και του βλαστού (Pegg and Brady, 2002), οι ευκαρυωτικοί οργανισμοί παραμένουν στα αγγεία του ξύλου μέχρι τη νέκρωση των περιβαλλόντων ιστών ή του ξενιστή και μετά τον θάνατο των φυτών μετακινούνται σε άλλους ιστούς και σχηματίζουν σπόρια στην επιφάνεια των νεκρών φυτών (Agrios, 2005).

Προκαρυωτικοί μικροοργανισμοί που προκαλούν αδροβακτηριώσεις όπως τα είδη *Ralstonia solanacearum*, *Clavibacter michiganensis* και *Erwinia chrysanthemi* διαχειμάζουν σε υπολείμματα των καλλιεργειών και μολύνουν τους ξενιστές τους από πληγές στις ρίζες, από την περιοχή έκφυσης νέων ριζών με δράση υδρολυτικών ενζύμων αλλά και μέσω εντόμων - φορέων (όπως στην περίπτωση της φυλής 2 του *Pseudomonas solanacearum*) (Pegg, 1989).

Τα τέσσερα σημαντικότερα γένη μυκήτων που προκαλούν αδρομυκώσεις είναι τα *Ceratocystis*, *Ophiostoma*, *Fusarium* και *Verticillium* (Agrios, 2005), τα οποία διαθέτουν περιορισμένο φάσμα ξενιστών με την εξαίρεση των γενών *Fusarium* και *Verticillium*. Το γένος *Ceratocystis* προκαλεί την αδρομύκωση της βελανιδιάς (*Ceratocystis fagacearum*), του κακαόδεντρου (*Ceratocystis cacaofunesta*) και του ευκάλυπτου (*Ceratocystis fimbriata*). Το γένος *Ophiostoma* προκαλεί την αδρομύκωση της φτελιάς (*Ophiostoma novo-ulmi*) και το είδος *Phoma tracheiphila* την αδρομύκωση των εσπεριδοειδών (Agrios, 2005, Engelbrecht, 2007). Το γένος

Fusarium προκαλεί αδρομυκώσεις σε λαχανικά και ανθοκομικά φυτά, σε πολυετή και ποώδη, σε φυτά μεγάλης καλλιέργειας και στο βαμβάκι (Beckman, 1987).

Το γένος *Verticillium* καθορίστηκε το 1816 από τον Nees von Esenbeck με βάση τον χαρακτηριστικό του κονιδιοφόρο και αντιπροσωπεύει ένα από τα σημαντικότερα παθογόνα παγκοσμίως (Pegg and Brady, 2002). Με κριτήριο τον βερτισιλιοειδή κονιδιοφόρο τα επτά χαρακτηρισμένα είδη που προσβάλλουν δασικά και καρποφόρα δέντρα, ποώδη φυτά, φυτά μεγάλης καλλιέργειας και ανθοκομικά φυτά, είναι τα *V. dahliae*, *V. albo-atrum*, *V. nigrescens*, *V. nubilum*, *V. tricorpus*, *V. theobromae* και *V. fungicola* (Pegg and Brady, 2002, Barbara and Clewes, 2003). Πρόσφατα όμως τα είδη *V. nigrescens* και *V. theobromae* αποδόθηκαν στα γένη *Gibellulopsis* και *Musicillium* αντίστοιχα, μειώνοντας τον αριθμό των ειδών του γένους *Verticillium* σε τέσσερα (Zare, 2007, Klosterman and Subbarao, 2009).

Από αυτά τα είδη τα *V. dahliae* και *V. albo-atrum* προκαλούν αδρομυκώσεις σε περισσότερα από 200 είδη δικοτυλήδων φυτών (Pegg and Brady, 2002, Fradin and Thomma, 2006). Ο διαχωρισμός των δύο ειδών έγκειται στο σχηματισμό μικροσκληρωτίων για το είδος *V. dahliae* και σκούρου μυκηλίου διάπαυσης με παχύ τοίχωμα για το είδος *V. albo-atrum* (Green, 1981) και στο γεγονός ότι σε θερμοκρασία 30°C παρατηρείται αναστολή της ανάπτυξης του *V. albo-atrum* ενώ η ανάπτυξη και μολυσματικότητα του *V. dahliae* δεν φαίνεται να επηρεάζεται (Robinson, 1957, Isaac, 1967, Pegg and Brady, 2002). Και τα δύο είδη ευδοκιμούν σε περιοχές με εύκρατο και υποτροπικό κλίμα ενώ απαντώνται σπανιότερα σε περιοχές με τροπικό κλίμα. Ο *V. albo-atrum* αναπτύσσεται άριστα στους 20 με 25° C ενώ ο *V. dahliae* προτιμά ελαφρώς υψηλότερες θερμοκρασίες, στους 25 με 28°C περίπου.

A.



Εικόνα 1.1 : Μικροσκοπική παρατήρηση των χαρακτηριστικών κονιδιοφόρων του μύκητα *V. dahliae* καθώς και κονιδίων που απελευθερώνονται.

Πρόσφατα περιγράφηκε ένα νέο στέλεχος που χαρακτηρίζεται από ιδιαίτερα επιμήκη σπόρια συγκριτικά με τα στελέχη του *V. dahliae* και εξαιτίας της παραγωγής μικροσκληρωτίων ονομάστηκε *V. dahliae* var. *longisporum* (Klosterman and Subbarao, 2009). Ωστόσο επιπλέον μελέτες με μοριακούς δείκτες απέδειξαν ότι το εν λόγω στέλεχος αποτελεί αμφιαπλοειδές υβρίδιο μεταξύ των ειδών *V. dahliae* και *V. albo-atrum* και οδήγησαν στην ταξινόμηση του ως νέο είδος με το όνομα *V. longisporum* (Karapara, 1997, Typhas, 2001, Barbara and Clews, 2003, Fahleson et al., 2004).

1.2 Κύκλος ασθένειας και μηχανισμοί παθογένειας του μύκητα *V. dahliae*

Από το γένος *Verticillium*, το είδος *Verticillium dahliae* είναι το κυριότερο αίτιο αδρομυκώσεων σε περιοχές με εύκρατο και υποτροπικό κλίμα (Isaak, 1946, Bhat and Subbarao, 1999, Pegg and Brady, 2002) και προσβάλλει περισσότερα από 200 φυτικά είδη, με την λίστα των ξενιστών να αυξάνεται συνεχώς (Bhat and Subbarao, 2003, Du Toit, 2005).

Η ασθένεια που προκαλείται από τον μύκητα είναι μονοκυκλική, δηλαδή ο κύκλος της ασθένειας ολοκληρώνεται σε μία καλλιεργητική περίοδο (Tjamos, 2005).

1.2.1 Ξενιστές του μύκητα *V. dahliae*

Ο μύκητας *V. dahliae* προκαλεί αδρομυκώσεις σε ένα μεγάλο εύρος ξενιστών, που περιλαμβάνει καρποφόρα δέντρα (πυρηνόκαρπα, ελιά), λαχανικά (αγκινάρα, μελιτζάνα, πιπεριά, τομάτα, πατάτα), ανθοκομικά φυτά (χρυσάνθεμο), φυτά μεγάλης καλλιέργειας (ηλίανθος, βαμβάκι, λινάρι), ξυλώδη πολυετή φυτά (Schnathorst, 1981, Pegg and Brady, 2002) και ζιζάνια που μπορεί να εμφανίζουν συμπτώματα ή να παραμένουν ασυμπτωματικά (Ligoxigakis et al, 2002, Vallad et al, 2005). Εξαιτίας της γενετικής του πλαστικότητας η λίστα των ξενιστών του αυξάνεται συνεχώς. Ο *V. dahliae* θεωρήθηκε η αιτία των αδρομυκώσεων σε καλλιέργειες μαρουλιού και κουνουπιδιού που εμφανίστηκαν για πρώτη φορά στην California το 1995 και 1990 αντίστοιχα (Subbarao, 1997, Koike and Hubbard, 1994) και για τον μεταχρωματισμό της ρίζας σε καλλιέργειες χρένου στο Illinois (Eastburn and Chang, 1994).

Ωστόσο μερικά στελέχη του *V. dahliae* παρουσιάζουν εξειδίκευση ως προς τον ξενιστή, όπως στελέχη που προσβάλλουν τη μέντα, το κακαόδεντρο, την πιπεριά και τον καπνό (Isaac and Keyworth, 1958, Correl and McCain 1988) αλλά τα περισσότερα από αυτά μολύνουν μεγάλο εύρος ξενιστών (Subbarao et al, 1995, Bhat and Subbarao, 1999).

1.2.2 Συμπτώματα αδρομυκώσεων από το μύκητα *V. dahliae*

Τα συμπτώματα των αδρομυκώσεων που οφείλονται στο μύκητα *V. dahliae* μπορούν να διαφέρουν από ξενιστή σε ξενιστή, δεδομένου ότι δεν υπάρχουν μοναδικά συμπτώματα που να εκδηλώνονται σε όλους τους ξενιστές του παθογόνου (Fradin and Thomma, 2006). Η ταχύτητα εκδήλωσης των συμπτωμάτων, καθώς και η σοβαρότητα τους, εξαρτώνται τόσο από την μολυσματικότητα του παθογόνου όσο και από τις περιβαλλοντικές συνθήκες, την ηλικία και την διατροφική κατάσταση των φυτών (Pegg, 1989).

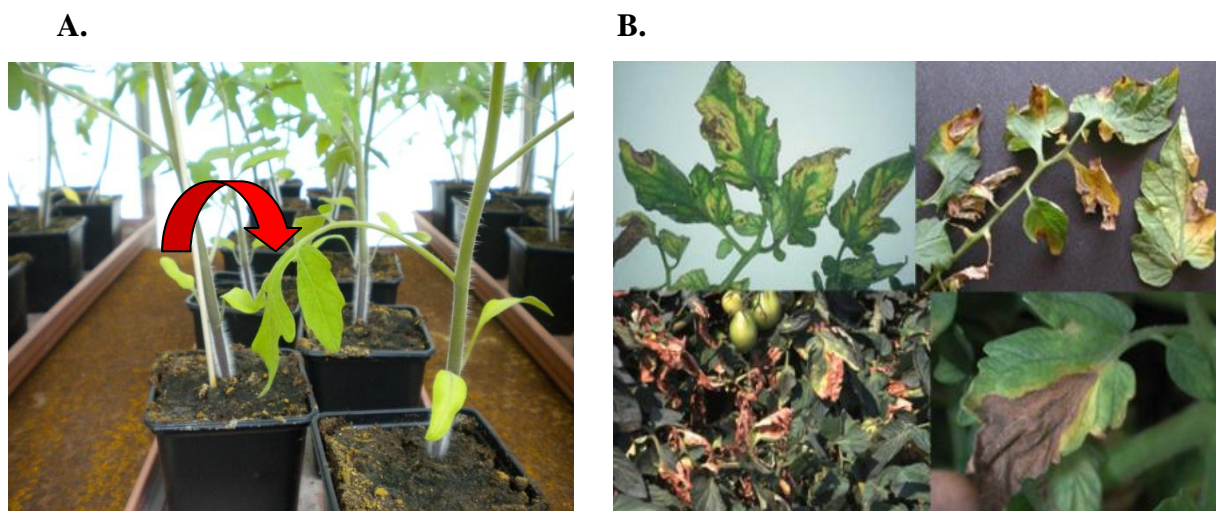
1.2.2.1 Ποώδεις ξενιστές

Τα ασθενή φυτά σε μια καλλιέργεια μπορεί να είναι μεμονωμένα ή σε ομάδες. Τα προσβεβλημένα φυτά εμφανίζουν το σύνδρομο του βραδέος μαρασμού, που πολλές φορές εμφανίζεται με τη μορφή ημιπληγίας (Παναγόπουλος, 2000).

Αρχικά η ασθένεια εκδηλώνεται στα κατώτερα φύλλα, με τη μάρανση μεμονωμένων φυλλαρίων ή φύλλων. Καθώς η ασθένεια εξελίσσεται, την απώλεια σπαργής διαδέχεται η χλόρωση των φύλλων και η νέκρωση των χλωρωτικών ιστών. (Pegg, 1989). Σε πολλές περιπτώσεις οι νευρώσεις των φύλλων εμφανίζουν καστανό ή ιώδη μεταχρωματισμό (Fradin and Thomma, 2006). Ακολούθως η νέκρωση εξαπλώνεται σε όλη την επιφάνεια του ελάσματος και συχνά παρατηρείται η απόπτωση των φύλλων από το φυτό (Pegg, 1989). Στη συνέχεια τα συμπτώματα εμφανίζονται και στα ανώτερα φύλλα, εξαιτίας της ακροπεταλικής κατεύθυνσης μόλυνσης του μύκητα (Fradin and Thomma, 2006). Τα μολυσμένα φυτά εμφανίζουν νανισμό, είναι καχεκτικά και ανάλογα με την ένταση της ασθένειας το ύψος της παραγωγής μειώνεται σημαντικά (Miller et al., 1996).

Σε φυτά τομάτας, τα κατώτερα φύλλα εμφανίζουν χλωρωτικές κηλίδες και στη συνέχεια νέκρωση στην άκρη του ελάσματος, προκαλώντας συμπτώματα με χαρακτηριστικό σχήμα V (Fradin and Thomma, 2006). Επίσης παρατηρείται τυχαία παραγωγή ριζών στα κατώτερα μεσογονάτια διαστήματα (Pegg, 1989).

Για πολλά φυτικά είδη τα συμπτώματα μαρασμού είναι πιο έντονα στις θερμές περιόδους της ημέρας και παρατηρείται επαναφορά της σπαργής των φύλλων κατά τη διάρκεια της νύχτας (Fradin and Thomma, 2006).



Εικόνα 1.2 : Α) Χαρακτηριστικό σύμπτωμα μάρανσης του μύκητα *V. dahliae* σε φυτά τομάτα Β) χαρακτηριστικά συμπτώματα χλωρώσεων και νεκρώσεων σε σχήμα V που προκαλούνται από μύκητες τους γένους *Verticillium* σε φυτά τομάτας.

Χαρακτηριστικό σύμπτωμα των αδρομυκώσεων είναι ένας καστανός ή βαθύς καστανός μεταχρωματισμός των αγγείων του ξύλου που εμφανίζεται σε επιμήκη ή εγκάρσια τομή του στελέχους. Ο μεταχρωματισμός είναι εμφανής στις ρίζες αλλά μπορεί να επεκτείνεται και σε όλο το μήκος των στελεχών, ακόμα και μέχρι τα αγγεία των καρπών τομάτας. (Παναγόπουλος, 2000). Στην τομάτα ο μεταχρωματισμός έχει αποδοθεί σε καφεϊκό οξύ (caffaic acid) στο βαμβάκι σε κατεχίνη και γαλοκατεχίνη (catechin & galocatechin) στην μπανάνα σε ντοπαμίνη (Pegg, 1989) ενώ στο μαρούλι σε πιθανή φυτοτοξική ουσία (Vallad and Subbarao, 2008). Τόσο στο βαμβάκι όσο και στη μπανάνα ανιχνεύτηκαν κύτταρα όπου συγκεντρώνονται αυτές οι ουσίες σε μη οξειδωμένη μορφή (Pegg, 1989).

Τα συμπτώματα από την αδρομύκωση έχουν αποδοθεί στη φραγή των αγγείων του ξύλου από την μεμονωμένη ή συνεργηστική δράση πολυσακχαριτών, πηγμάτων και μυκηλίων του μύκητα, που περιορίζουν την ροή του νερού με αποτέλεσμα να εκδηλώνονται συμπτώματα μάρανσης. Ωστόσο, τα συμπτώματα νέκρωσης έχουν συσχετιστεί σε πολλές εργασίες με την παραγωγή τοξίνης από το μύκητα (DeVay, 1989, Green, 1981), αλλά και από την επαγωγή κυτταρικού θανάτου από το φυτό – ξενιστή προκειμένου να περιοριστεί η είσοδος του παθογόνου (Robb et al., 2007).

1.2.2.2 Δενδρώδεις ξενιστές

Τα συμπτώματα της ασθένειας εξαρτώνται από το είδος του δενδρώδη ξενιστή. Γενικά παρατηρούνται τρεις κατηγορίες συμπτωμάτων: α) συμπτώματα στα φύλλα (μάρανση, χλώρωση, αποφύλλωση), β) συμπτώματα στα αγγεία του ξύλου (μεταχρωματισμός, φραγή των αγγείων) και γ) κατάπτωση (Hiemstra, 1998).

Η ασθένεια αρχικά εκδηλώνεται με μάρανση των φύλλων που ακολουθείται από καστανόχρωση, καρούλιασμα, φυλλόπτωση και τελικά αποξήρανση των προσβεβλημένων κλάδων. Τα συμπτώματα μπορούν να εκδηλωθούν μονόπλευρα με τη μορφή ημιπληγίας, ενώ στην ελιά μπορούν να εκδηλωθούν είτε με τη μορφή ημιπληγίας είτε με το σύνδρομο της βραδείας αποξήρανσης.

Στα αγγεία του ξύλου των προσβεβλημένων κλάδων ή βραχιόνων παρατηρείται έντονος καστανός ή καστανέρυθος μεταχρωματισμός, που σε επιμήκη ή εγκάρσια τομή εμφανίζεται με τη μορφή ραβδώσεων, τόξων ή κηλίδων.

A.



Photo 146. A. L. Jones and T. B. Sutton

B.



Εικόνα 1.3 : **A)** Καστανέρυθος μεταχρωματισμός των αγγείων του ξύλου σε κλάδους ροδακινιάς που προκαλούνται από μύκητες του γένους *Verticillium* **B)** Συμπτώματα βερτισιλλίωσης σε βραχίονες ελαιόδεντρων.

(Πηγές: http://www.caf.wvu.edu/kearneysville/disease_descriptions/disease_images/viskeyptbt.html και www.environment.gov-il)

Στην ελιά ωστόσο ο μεταχρωματισμός των αγγείων του ξύλου είναι σχεδόν ανύπαρκτος και για την ασφαλή διάγνωση της ασθένειας είναι απαραίτητη η απομόνωση του μύκητα ή η χρήση μοριακών τεχνικών. Η ανίχνευση της αποφυλλωτικής ή της μη αποφυλλωτικής φυλής του *V. dahliae* στην ελιά γίνεται με τη χρήση της αλυσιδωτής αντίδρασης πολυμεράσης (Mercado-Blanco et al, 2003).

Σε έντονες προσβολές μπορεί να προκληθεί η ολοκληρωτική ξήρανση των δέντρων, αλλά συχνά μπορούν να ανακάμψουν με ανάπτυξη νέου φυλλώματος και έκπτυξη λαίμαργων βλαστών από τη βάση των στελεχών, λίγες εβδομάδες μετά την αποφύλλωση (Goud, 2003). Η ανάκαμψη αυτή οφείλεται στη περιορισμένη σύνδεση των αγγείων του ξύλου και στην παραγωγή δευτερεύοντος ξυλώματος (Shigo, 1984).

1.2.3 Ο κύκλος ζωής του μύκητα *V. dahliae*

Ο κύκλος ζωής του μύκητα αποτελείται από τρεις περιόδους: α) την περίοδο διάπαυσης, β) την παρασιτική φάση και γ) την σαπροφυτική φάση (Fradin and Thomma, 2006).

1.2.3.1 Περίοδος διάπαυσης

Κατά την περίοδο διάπαυσης ο μύκητας επιβιώνει με τη μορφή μικροσκληρωτίων στο έδαφος ή σε φυτικά υπολείμματα (Ashworth, 1974, DeVay, 1974, Krikun, 1990).

Απουσία ξενιστή τα μικροσκληρώτια μπορούν να επιβιώσουν μέχρι 14 χρόνια στο έδαφος (Wilhelm, 1995). Η μυκοστατική αυτή δράση όμως διακόπτεται με την έκκριση ουσιών από τις ρίζες στη ριζόσφαιρα (Schreiber and Green, 1963, Huisman 1982, Nordbring-Hertz, 1985, Mol et al, 1995). Κάθε κύτταρο των μικροσκληρωτίων βλαστάνει μια φορά με αποτέλεσμα κάθε μικροσκληρώτιο να μπορεί να βλαστήσει πολλές φορές και να αυξάνει την πιθανότητα μόλυνσης (Fradin and Thomma, 2006). Οι υφές του μύκητα οδηγούνται στις ρίζες του ξενιστή από τις εκκρίσεις των ριζών. Στο μύκητα *V. dahliae* έχει υπολογιστεί ότι οι βλαστανούσες υφές δεν πρέπει να είναι σε απόσταση μεγαλύτερη των 300 μm για να μολύνουν τη ρίζα του ξενιστή (Huisman, 1982, Fradin and Thomma, 2006).

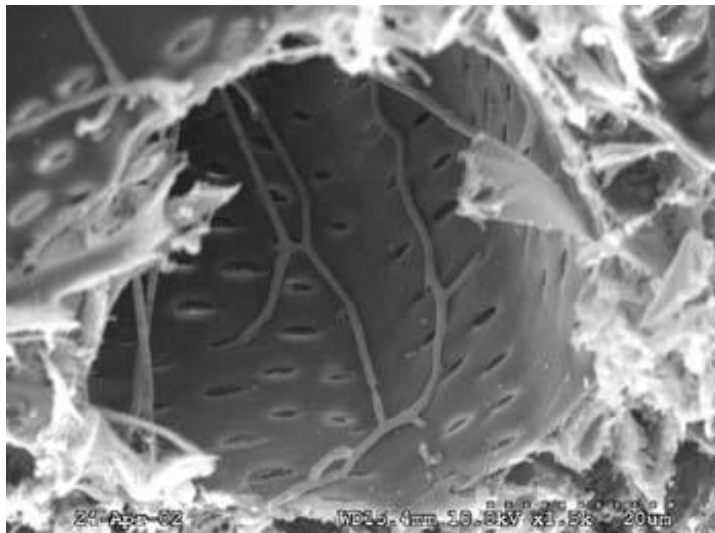
1.2.3.2 Παρασιτική φάση

Τυπικά το παθογόνο μπαίνει στην παρασιτική φάση μολύνοντας ευπαθή φυτά είτε από το ακρορίζιο, είτε από τις πλευρικές ρίζες (Bishop and Cooper, 1983). Στην παρασιτική φάση το παθογόνο συμπεριφέρεται σαν βιοτροφικό παράσιτο μη προκαλώντας νέκρωση κατά την μέσο- και ενδοκυττάρια ανάπτυξη δια μέσου των κυττάρων του φλοιού και της ενδοδερμίδας (Heale, 1989).

Το παθογόνο διαπερνά την ενδοδερμίδα, που δρα σαν φυσικό εμπόδιο των φυτών στη μόλυνση, είτε μέσω φυσικών πληγών στη ρίζα (Van Alfen, 1989), είτε όταν η ενδοδερμίδα δεν έχει αναπτυχθεί, είτε μέσω πληγών που προκαλούνται από νηματώδεις (Pegg, 1974, Schnathorst

1981, Huisman, 1982, Bowers et al., 1996). Ωστόσο έχει αναφερθεί ότι υφές του μύκητα *V. dahliae* έχουν την ικανότητα να διαπερνούν απευθείας τα κύτταρα της ενδοδερμίδας του υποκοτυλίου βαμβακιού που είναι κάτω από το έδαφος (Schnarthost, 1981).

Παρά το γεγονός ότι το παθογόνο μπορεί να διαπεράσει επιτυχώς την επιδερμίδα των ριζών των περισσότερων ξενιστών του, η μόλυνση των φυτών δεν είναι δεδομένη (Klosterman and Subbarao, 2009). Έρευνες έδειξαν ότι μόλις το 0,02% των μολυσμένων ριζών σε φυτά βαμβακιού οδήγησαν σε συστηματική μόλυνση ολόκληρου του φυτού (Gerik and Huisman, 1988) και μόλις 1 από τις 205 μολύνσεις φυτών μελιτζάνας με μικροσκληρώτια εξελίχθηκαν σε ασθένεια (Berajano-Alcazar, 1999). Οι Vallad και Subbarao παρατήρησαν ότι φυτά μαρουλιού εκδήλωσαν ασθένεια μόνο όταν μολύνονται από το ακρορίζιο ή τη ζώνη επιμήκυνσης με κονίδια του μύκητα *V. dahliae* (Vallad and Subbarao, 2008).



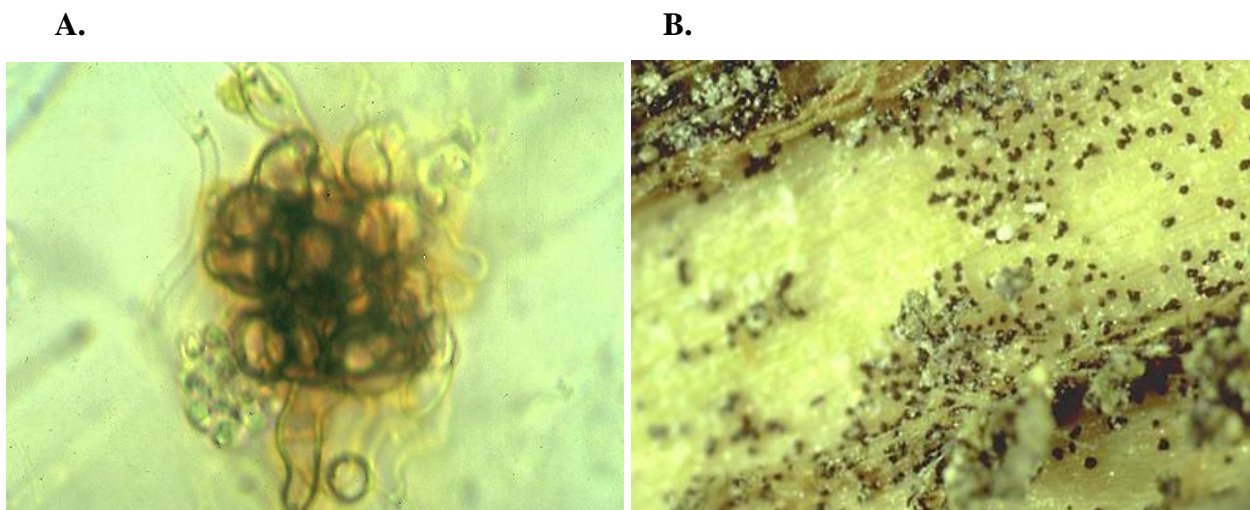
Εικόνα 1.4 : Μικροσκοπική απεικόνιση υφών του μύκητα *V. dahliae* σε αγγεία του ξύλου φυτού πατάτας με ηλεκτρονικό μικροσκόπιο. (Πηγή : www.oard.ohio-state.edu)

Μετά τη διάτρηση της επιδερμίδας, οι υφές του μύκητα αναπτύσσονται στους μεσοκυττάριους χώρους μέχρι να φτάσουν στα αγγεία του ξύλου. Ανάλογα με το αρχικό μόλυσμα και την αντίδραση του φυτού κάποιες υφές εισέρχονται στα αγγεία του ξύλου (Schnathorst, 1981, Huisman, 1982, Bishop and Cooper, 1983). Στο ρευστό περιβάλλον των αγγείων, ο *V. dahliae* εμφανίζει τόσο μυκηλιακή ανάπτυξη όσο και ανάπτυξη σε μορφή ζύμης. Μετά την είσοδο υφών στα αγγεία παράγονται κονίδια από απλούς κονιδιοφόρους ή διάσχιση (budding). Τα κονίδια αυτά

μεταφέρονται με το ανοδικό ρεύμα του αγγειακού υγρού, με αποτέλεσμα να παγιδεύονται σε θέσεις στο τέλος των αγγείων (trapping sites). Ακολουθεί βλάστηση των κονιδίων και οι βλαστικοί σωλήνες ή υφές διαπερνούν τα βοθρία ή τα κυτταρικά τοιχώματα των αγγείων και παράγουν κονίδια σε γειτονικά αγγεία, ξεκινώντας έναν νέο κύκλο μόλυνσης. Αυτή η διμορφική ανάπτυξη είναι χαρακτηριστική για παθογόνα αδρομυκώσεων και κρίσιμη για την διασυστηματική μόλυνση των αγγείων του ξύλου. Επίσης η παραπάνω διαδικασία παραγωγής διαδοχικών γενιών κονιδίων εξηγεί την ασυνέχεια στην παρουσία του μύκητα που έχει παρατηρηθεί στα αγγεία του ξύλου, αλλά και την ταχύτητα στη διασπορά του μολύσματος (Schnathorst, 1981, Puhalla and Bell, 1981, Green, 1981, Gold & Robb, 1995). Αυτή η ασυνέχεια στην παρουσία του μύκητα, με κυκλικές αυξομειώσεις στη βιομάζα του παθογόνου, οφείλεται πιθανώς στις αντιδράσεις άμυνας των φυτών (Heinz, 1998).

1.2.3.3 Σαπροφυτική φάση και σχηματισμός μικροσκληρωτίων

Ο μύκητας εισέρχεται στη σαπροφυτική φάση κατά τη νέκρωση των φυτικών ιστών ή τη γήρανση των φυτών, αποικίζοντας εκτός από τους ξυλώδεις ιστούς και άλλα φυτικά μέρη (Fradin and Thomma, 2006). Σε αυτή τη φάση ο μύκητας παράγει ένα μεγάλο αριθμό μικροσκληρωτίων, τα οποία απελευθερώνονται στο έδαφος με την αποσύνθεση των μολυσμένων φυτών και επιβιώνουν για 10 έως 15 χρόνια (Wilhelm, 1955) αν και το μόλυσμα μειώνεται σημαντικά μετά τα 9 χρόνια (Schnathorst, 1981).



Εικόνα 1.5 : **A)** Μικροσκοπική παρατήρηση μικροσκληρωτίου **B)** Παρατήρηση μικροσκληρωτίων σε στέλεχος.
(Πηγή : <http://www.cals.ncsu.edu/course/pp728/Verticillium/Verrtifin.htm>)

Τα μικροσκληρώτια του μύκητα *V. dahliae* αποτελούνται από ένα σύνολο μελανοποιημένων κυττάρων υφών με παχύ κυτταρικό τοίχωμα. Το σύνολο των υφών του μικροσκληρωτίου καλύπτεται από μελανοποιημένα στρώματα κυττάρων που προφυλάσσουν το εσωτερικό τμήμα (medulla). Σχηματίζονται από διόγκωση των υφών και δημιουργία εγκάρσιων χωρισμάτων (septa) στα κύτταρα που διογκώνονται με αποτέλεσμα να παράγονται πλευρικά (lateral) κύτταρα. Ακολουθεί απόθεση μελανίνης στα κυτταρικά τοιχώματα και στους μεσοκυττάριους χώρους (Gordee and Porter, 1961, Perry and Evert, 1982). Μελανίνες είναι σκούρες χρωστικές που παράγονται από οξειδωτικό πολυμερισμό φαινολικών και ινδολικών ουσιών (Fradin & Thomma, 2006).

Το γονίδιο *VDHI* που κωδικοποιεί υδροφοβίνη έχει βρεθεί ότι παίζει ρόλο στο σχηματισμό μικροσκληρωτίων στον μύκητα *V. dahliae*. Το γονίδιο αυτό, απομονώθηκε από γονιδιωματική βιβλιοθήκη εκφρασμένων αλληλουχιών του μύκητα *V. dahliae* κατά το στάδιο σχηματισμού μικροσκληρωτίων (Neumann & Dobinson, 2003). Απενεργοποίηση γονιδίου *VDHI* προκάλεσε σημαντική μείωση στην παραγωγή μικροσκληρωτίων αλλά δεν επέδρασε στην παθογένεια των μεταλλαγμένων στελεχών (Klimes & Dobinson, 2006). Επίσης το γονίδιο που κωδικοποιεί μια μιτοχονδριακή πρωτεϊνική MAP κινάση βρέθηκε ότι επηρεάζει το σχηματισμό μικροσκληρωτίων. Απενεργοποίηση του γονιδίου αυτού στο μύκητα *V. dahliae* οδήγησε σε μειωμένη παραγωγή μικροσκληρωτίων σε σχέση με τα άγρια στελέχη (Rauyaree et al., 2005).

1.2.4 Μηχανισμοί παθογένειας του μύκητα *V. dahliae*

Η παρουσία του παθογόνου στα αγγεία του ξύλου επάγει μηχανισμούς άμυνας στους ξενιστές. Έρευνες έχουν δείξει ότι ο μύκητας *V. dahliae* μπορεί να καταστείλει την άμυνα των φυτών στα προσβεβλημένα κύτταρα και αγγεία για μερικές ώρες έτσι ώστε να εξαπλωθεί στα παρακείμενα κύτταρα (Lee et al., 1992, Robb et al., 1989, Gold and Robb, 1995). Η καταστολή της άμυνας των φυτών από μύκητες του γένους *Verticillium*, καθώς και η παθογένεια του γένους *Verticillium*, έχει συσχετιστεί με την παραγωγή τοξινών, υδρολυτικών ενζύμων αλλά και άλλων ουσιών που φαίνεται να δρουν ως διεγέρτες (Fradin and Thomma, 2006).

1.2.4.1 Υδρολυτικά ένζυμα που εμπλέκονται στην παθογένεια του μύκητα *V. dahliae*

Ο μύκητας *Verticillium dahliae* παράγει έναν αριθμό ενζύμων που παίζουν σημαντικό ρόλο στην αποδόμηση των κυτταρικών τοιχωμάτων των κυττάρων του ξενιστή (Cooper and Wood, 1973, Bidochka et al., 1989, Dobinson et al., 1997, 2004). Από τα ένζυμα αυτά έχουν μελετηθεί πιο εκτεταμένα οι πηκτινάσες οι οποίες θεωρούνται σημαντικές για την εκδήλωση συμπτωμάτων της ασθένειας, κυρίως επειδή ο μύκητας διαπερνά τις μεμβράνες βοθρίων που περιέχουν πηκτινικές ύλες για να αποικήσει τα αγγεία του ξύλου (Pegg, 1981, Fradin and Thomma, 2006). Έτσι, θεωρείται ότι τα πηκτινικά προϊόντα της δράσης αυτών των ενζύμων πιθανόν να συμβάλλουν στην φραγή των ξυλωδών αγγείων (Green, 1981).

Φυτά τομάτας μολυσμένα με μεταλλαγμένα στελέχη του μύκητα *V. albo-atrum* που είχαν μειωμένη παραγωγή πηκτινάσης εμφάνισαν μειωμένα συμπτώματα σε σχέση με το άγριο στέλεχος. Ωστόσο ο βαθμός αποίκισμού ήταν ίδιος τόσο στο άγριο στέλεχος όσο και στα μεταλλαγμένα, υποδεικνύοντας ότι οι πηκτινάσες δρουν ως μολυσματικοί παράγοντες αλλά δεν επηρεάζουν την παθογένεια (Durrands and Cooper, 1988). Στο ίδιο πείραμα ένα από τα μεταλλαγμένα στελέχη του *V. albo-atrum* που εμφάνισε μειωμένη παραγωγή κι άλλων υδρολυτικών ενζύμων, όχι μόνο μείωσε δραστικά τα συμπτώματα της ασθένειας σε σχέση με το άγριο στέλεχος αλλά ο βαθμός αποίκισης του παθογόνου ήταν σημαντικά χαμηλότερος. Συνεπώς φαίνεται ότι ο μύκητας χρησιμοποιεί συνδυασμό υδρολυτικών ενζύμων που δρουν συνεργηστικά, προκειμένου να μολύνει τον ξενιστή (Durrands and Cooper, 1988, Fradin & Thomma, 2006). Πιθανόν για το λόγο αυτό τα μεταλλαγμένα στελέχη *V. dahliae* με μειωμένη δράση συγκεκριμένων ενζύμων όπως της πηκτινικής εστεράσης (PE), της ενδοπολυγαλακτουρονάσης (endo PG) και της πηκτινικής λυάσης (PL) αντίστοιχα, δεν παρουσίασαν μείωση της παθογένειας σε βαμβάκι σε σχέση με το άγριο στέλεχος (Puhalla and Howell, 1975, Howell, 1976).

Ο πλεονασμός αυτός στην λειτουργία υδρολυτικών ενζύμων φαίνεται ότι είναι ο κύριος λόγος που περιπλέκει την μελέτη του ρόλου τους στην παθογένεια φυτοπαθογόνων μυκήτων εφαρμόζοντας απενεργοποίηση των γονιδίων που κωδικοποιούν αυτά τα ένζυμα με μοριακές τεχνικές (Walton, 1994, Di Pietro et al., 2003).

Έτσι, στον μύκητα *V. dahliae* απενεργοποιήθηκε το γονίδιο της πρωτεάσης της τρυψίνης (trypsin protease), που έχει αναφερθεί σε άλλους μύκητες ότι εμπλέκεται στην αποδόμηση του κυτταρικού τοιχώματος του ξενιστή. Ωστόσο τα μεταλλαγμένα στελέχη δεν παρουσίασαν επίδραση στην παθογένεια και την αύξηση. Αυτό εξηγήθηκε από την παρουσία δύο άλλων γονιδίων που κωδικοποιούν πρωτεάσες, όπως έδειξε έρευνα γονιδιωματικής βιβλιοθήκης αλληλουχιών έκφρασης (ESTs) του μύκητα (Dobinson et al., 2004).

Επίσης σε πρόσφατες μελέτες οι Tzima et al. (2011) απέδειξαν ότι απενεργοποίηση του γονιδίου της πρωτεϊνικής κινάσης μη καταβολισμού της σακζαρόζης στο μύκητα *V. dahliae*, που ελέγχει την επαγωγή ενζύμων που αποδομούν το κυτταρικό τοίχωμα του ξενιστή και το γονίδιο VdNEP, οδήγησε σε μείωση της παθογένειας των μεταλλαγμένων στελεχών σε φυτά τομάτας έως 87%.

Αρκετά άλλα υδρολυτικά ένζυμα όπως η πολυγαλακτουρονάση, η πηκτινική λυάση, η πηκτινεστεράση και η κυτταρινάση έχουν χαρακτηριστεί στο μύκητα *V. dahliae* και η παραγωγή τους έχει συσχετιστεί με την μολυσματικότητα διάφορων στελεχών του γένους *Verticillium* (Carder et al., 1987).

1.2.4.2 Τοξίνες που εμπλέκονται στην παθογένεια του μύκητα *V. dahliae*

Οι τοξίνες είναι εξοκυτταρικοί μεταβολίτες των παθογόνων που διαπερνούν τις μεμβράνες των βοθρίων και μετακινούνται στο περιέγχυμα των φύλλων όπου επιδρούν στην διαπερατότητα των κυττάρων, προκαλώντας τη δυσλειτουργία τους και τελικά τη νέκρωσή τους (Pegg and Brady, 2002).

Η εκδοχή, ότι τα συμπτώματα που προκαλούνται από το γένος *Verticillium* οφείλονται στη δράση φυτοτοξικών ουσιών που παράγει ο μύκητας, είχε διατυπωθεί σε πολύ αρχικές μελέτες ως εναλλακτική αιτιολογία της αγγειακής απόφραξης που παρατηρείται στις αδρομυκώσεις (Stoddart and Carr, 1966, Zel'tser and Malysheva, 1966).

Ακατέργαστα εκχυλίσματα τοξινών του γένους *Verticillium* αναλύθηκαν και βρέθηκαν να περιέχουν μεγάλο μοριακού βάρους ουσίες όπως ένα σύμπλοκο πρωτεϊνικού λιποπολυσακχαρίτη (PLPC), γλυκοπρωτεΐνες και υδρολυτικά ένζυμα (Fradin and Thomma, 2006).

Μια πρωτεΐνη λιποπολυσακχαρίτη (PLP) απομονώθηκε από καλλιέργεια *V. dahliae* από βαμβάκι και αναπαρήγαγε τα συμπτώματα της ασθένειας μετά από εφαρμογή της σε φυτά βαμβακιού (Zel'tser and Malysheva, 1966, 1968, Krasil'nikov et al., 1969). Αργότερα οι Keen and Long (1972) η PLP που απομονώθηκε από καλλιέργεια *V. dahliae* 3 ημερών είχε μέγεθος 3000 kDa και αποτελούνταν σε ποσοστό 75% από πολυσακχαρίτες και σε ποσοστό 15% από πρωτεΐνες και λιπίδια.

Ένα παρόμοιο PLP σύμπλοκο απομονώθηκε από σύμπλοκο *V. dahliae* σε πατάτα. Το σύμπλοκο αποτελούνταν από μία γλυκοπεπτιδική τοξίνη η οποία σχετίστηκε με την εκδήλωση συμπτωμάτων σε ξενιστές του παθογόνου, αλλά δεν παρουσίασε φυτοτοξική δράση σε ανθεκτικά φυτά (Buchner et al., 1982). Μελέτες ανοσοαποτύπωσης (Immunolocalization) έδειξαν ότι η τοξίνη αυτή συγκεντρώνεται σε κυτταρικά τοιχώματα ξυλωδών αγγείων του στελέχους και

κονδύλων ευαίσθητων φυτών πατάτας (Nachmias et al., 1985), που υποστηρίζει την υπόθεση ότι το σύμπλοκο της συγκεκριμένης τοξίνης εμπλέκεται στην παθογένεια (Fradin and Thomma, 2006). Παρόμοια φυτοτοξική δράση της τοξίνης περιγράφηκε για στελέχη του *V. dahliae* από φυτά μελιτζάνας, καρπουζιού, ελιάς, αβοκάντο, βαμβακιού και τομάτας (Pegg and Brady, 2002).

Οι Davis et al. (1998) απομόνωσαν γλυκοπρωτεΐνη 65-kDa από καλλιέργεια του μύκητα *V. dahliae* που προκαλούσε επαγωγή σχηματισμού φυτοαλεξινών. Συνεπώς φαίνεται ότι υπάρχει ένα εύρος τοξινών και άλλων μεταβολιτών που σχετίζονται με την παθογένεια του *V. dahliae*.

Σε παρόμοιες έρευνες οι Chen et al. (1998) χαρακτήρισαν δύο πρωτεΐνες από στέλεχος *V. dahliae* σε βαμβάκι (VD8) μέσω υγρής χρωματογραφίας. Η πρώτη πρωτεΐνη προκάλεσε συμπτώματα χλώρωσης σε φυτάρια βαμβακιού 2-10 h μετά την εφαρμογή της ενώ η δεύτερη προκάλεσε συμπτώματα μάρανσης 24-64 h μετά την εφαρμογή τους.

Ωστόσο, οι ενδείξεις για το ρόλο τοξινών στην παθογένεια του *V. dahliae* είναι συχνά αντιφατικές και δεν έχουν τύχει ευρείας αποδοχής (Cooper, 2000, Fradin and Thomma, 2006). Δεδομένα άλλων εργασιών αναφέρουν σαν κύρια αιτία εκδήλωσης συμπτωμάτων αδρομύκωσης την έλλειψη νερού σαν συνέπεια της φραγής αγγείων από το παθογόνο ή αντιδράσεις του φυτού όπως η επαγωγή πηγμάτων (Street and Cooper, 1984). Επίσης η διαδικασία απομόνωσης των τοξικών μεταβολιτών δεν αποκλείει την παρουσία σακχάρων και αλάτων.

Οι σύγχρονες τεχνικές κλωνοποίησης γονιδίων και έκφρασης πρωτεϊνών σε βακτηριακούς φορείς, δίνουν την δυνατότητα μελέτης πρωτεϊνικών μεταβολιτών, που είναι απαλλαγμένα από την παρουσία άλλων πρωτεϊνών ή/και υδατανθράκων. Εφαρμόζοντας αυτή την προσέγγιση οι Wang και συνεργάτες (2004) απομόνωσαν ένα γονίδιο που κωδικοποιεί μια NEP πρωτεΐνη από γονιδιωματική βιβλιοθήκη εκφρασμένων αλληλουχιών του μύκητα *V. dahliae*. Στη συνέχεια αναπαρήγαγαν συμπτώματα μάρανσης και νέκρωσης σε φύλλα βαμβακιού με εφαρμογή της NEP πρωτεΐνης. NEP πρωτεΐνες έχουν μελετηθεί σε άλλους φυτοπαθογόνους οργανισμούς κι έχει βρεθεί ότι εμπλέκονται στην νέκρωση και επαγωγή αιθυλενίου σε φυτά – ξενιστές (Pemberton and Salmond, 2004).

1.2.5 Άμυνα των φυτών ενάντια στο μύκητα *V. dahliae*

Η παρουσία του παθογόνου στα αγγεία του ξύλου επάγει αντιδράσεις άμυνας στον ξενιστή, όπως την εναπόθεση επίστρωσης (coating) καλόζης, σουμπερίνης στα κυτταρικά τοιχώματα καθώς επίσης το σχηματισμό πηγμάτων (Gel) και τυλώσεων. Σε ανθεκτικούς ξενιστές οι αντιδράσεις αυτές παρουσιάζουν μεγαλύτερη ένταση και ταχύτητα, με αποτέλεσμα να

περιορίζουν την παραπέρα ανάπτυξη του παθογόνου. Σε ανθεκτικά φυτά με την επαγωγή μηχανισμών άμυνας ο μύκητας περιορίζεται στη ρίζα και στη βάση του βλαστού, όπου αναπτύσσεται μέσο- και ενδοκυτταρικά με τα φυτά να επηρεάζονται ελάχιστα, ενώ στα ευπαθή φυτά το παθογόνο εξακολουθεί να αναπτύσσεται και να εξαπλώνεται μέσα στο φυτό (Talboys, 1964, Heinz et al., 1998, Pegg and Brady, 2002).

Η ενδοδερμίδα, που κατά την ανάπτυξη του ριζικού συστήματος φελλοποιείται, δρα σαν φυσικό εμπόδιο ενάντια στην προσβολή του μύκητα (Talboys, 1958). Στα επιδερμικά και φλοιώδη κύτταρα της ρίζας καθώς και γύρω από τις βλαστικές υφές του παθογόνου εναποτίθεται λιγνίνη, σχηματίζοντας κονδύλους λιγνίνης και παγιδεύοντας το μύκητα (Griffiths, 1971). Σε αυτό το στάδιο το φυτό παράγει φυτοαλεξίνες και άλλες ουσίες στους ιστούς της ρίζας οι οποίες δρουν ως αντιμικροβιακοί παράγοντες (Bell 1969, Daayf, 1997).

Συγκεκριμένα σε ανθεκτικές ποικιλίες τομάτας (Ve^+) μολυσμένες με *V. dahliae* παρατηρήθηκε ταχεία εναπόθεση επίστρωσης (coating) σουμπερίνης και καλόζης σε μεσοκυττάριους χώρους παρακείμενους στο σημείο προσβολής του μολυσμένου αγγείου του ξύλου (trapping site vessel) που επεκτάθηκε στις μεμβράνες βοθρίων (pit membranes) και στα δευτερογενή κυτταρικά τοιχώματα του αγγείου, περιορίζοντας επιτυχώς την μόλυνση του παθογόνου (Gold and Robb, 1995). Την αντίδραση αυτή ακολούθησε η παραγωγή πηγμάτων (περίπου 24 – 48 ώρες μετά τη μόλυνση), που περιορίζουν τη ροή νερού και ταυτόχρονα ακινητοποιούν το παθογόνο (Beckman, 1989) και εν συνεχεία ο σχηματισμός τηλώσεων που παράχθηκαν 2 -3 μέρες μετά την μόλυνση από τα παρεγχυματικά κύτταρα που είναι σε επαφή με τα αγγεία, μέσα από τα τοιχώματα των βοθρίων, με αποτέλεσμα να αποκλείεται η πάνω πλευρά του αγγείου. Τα τοιχώματα από τις τυλώσεις έχει βρεθεί ότι περιέχουν φαινολικές ουσίες που πιθανόν συμβάλλουν στην λιγνιτοποίηση του ιστού, προσδίδοντας ανθεκτικότητα στη φυσική και χημική αποδόμηση (Beckman, 1989).

Σε ιστούς ρίζας και βλαστών προσβεβλημένων φυτών παρατηρείται συσσώρευση αντιμικροβιακών ουσιών, όπως πρωτεΐνες παθογένεσης (PR Proteins), φυτοαλεξίνες και φαινολικές ενώσεις (Bell, 1969, Talboys, 1972, Benhamon, 1995, Gold and Robb, 1995, Cooper et al., 1996, Daayf et al., 1997, Williams et al., 2002). Αυτές οι ουσίες παράγονται τόσο σε ανθεκτικά όσο και σε ευπαθή φυτά, ωστόσο ο ρυθμός και το επίπεδο παραγωγής τους είναι υψηλότερος στα ανθεκτικά φυτά (Fradin and Thomma, 2006).

Η πλέον αποτελεσματική φυτοαλεξίνη που εμπλέκεται στην άμυνα των φυτών είναι το θείο, το οποίο μετά από μόλυνση φυτών τομάτας και βαμβακιού με το μύκητα *V. dahliae* βρέθηκε σε υψηλές συγκεντρώσεις στα παρεγχυματικά κύτταρα του ξύλου (Cooper et al., 1996, Williams et al., 2002). Παρομοίως μετά από μόλυνση φυτών βαμβακιού με τον ίδιο μύκητα διαπιστώθηκε

παραγωγή τερπενοειδών φυτοαλεξινών στα παρεγχυματικά κύτταρα του ξύλου και συσσώρευσή τους στα τοιχωμάτων αγγείων του ξύλου (Mace et al., 1976). Επιπλέον στα κυτταρικά τοιχώματα πολλών φυτών παράγονται γλυκοπρωτεΐνες οι οποίες παρεμποδίζουν τη δράση υδρολυτικών ενζύμων του μύκητα *V. dahliae*, όπως τη δράση της ενδοπολυγαλακτουρονάσης (De Lorenzo et al., 2001).

Εκτός από την επαγωγή σχηματισμού μυκητοτοξικών ουσιών, ανθεκτικές ποικιλίες φαίνεται ότι χειρίζονται την μόλυνση από παθογόνο αδρομύκωσης και με έμμεσες αντιδράσεις. Ανάλυση μικροσυστοιχιών έδειξε ότι η ανθεκτική ποικιλία τομάτας αντιλαμβάνεται το μύκητα *V. dahliae* όσο και η ευαίσθητη, με αποτέλεσμα να παρατηρείται επαγωγή πρωτεϊνών παθογένεσης (PR, pathogenesis proteins) αλλά και αποίκιση από το μύκητα σε παρόμοια επίπεδα. Όμως η ανθεκτική ποικιλία φαίνεται σαν να ανέχεται την παρουσία του παθογόνου, μειώνοντας την έκφραση γονιδίων που σχετίζονται με αντιδράσεις άμυνας (όπως τη ρύθμιση επιπέδων γιασμονικού οξέως) και κυτταρικό θάνατο (όπως τη βιοσύνθεση αιθυλενίου) (Robb et al., 2007).

1.2.6 Αντιμετώπιση του μύκητα *V. dahliae*

Ο μύκητας *Verticillium dahliae* είναι δύσκολο να καταπολεμηθεί, εξαιτίας του μεγάλου εύρους ξενιστών που προσβάλλει, την αδυναμία των μυκητοκτόνων να περιορίσουν την ανάπτυξη του παθογόνου όταν έχει αποικήσει τα αγγεία του ξύλου, καθώς επίσης την δυνατότητα που έχει το παθογόνο να επιβιώνει για πολλά χρόνια στο έδαφος με τη μορφή μικροσκληρωτίων (Tjamos, 1989).

Τα μικροσκληρώτια αποτελούν επιθυμητούς στόχους για την καταπολέμηση των αδρομυκώσεων που οφείλονται στο μύκητα *V. dahliae* διότι αποτελούν πρωτογενή πηγή μόλυσματος και επιβιώνουν στο έδαφος για πολλά χρόνια (Hawke and Lazarovits, 1994). Έχει αναφερθεί ότι ενώ 1 γραμμάριο μολυσμένου εδάφους περιέχει πάνω από 100 μικροσκληρώτια (Easton et al., 1969, Evans et al., 1967), μόλις 6 ως 8 μικροσκληρώτια ανά γραμμάριο εδάφους είναι ικανά να προκαλέσουν ασθένεια σε πάνω από το 80% φυτών τομάτας και πατάτας (Grogan et al., 1979, Nicot and Rouse, 1987), ενώ 1 μικροσκληρώτιο ανά γραμμάριο εδάφους προκαλεί σημαντικά ποσοστά ασθένειας σε καλλιέργειες τομάτας και φράουλας (Grogan et al., 1979, Harris and Yang, 1996).

Γι' αυτό το λόγο επιδιώκεται η μείωση του μολύσματος είτε με ηλιοαπολύμανση, είτε με χημική απολύμανση του εδάφους ή με αμειψισπορά. Ωστόσο αυτές οι στρατηγικές έχουν αποδειχθεί σε πολλές περιπτώσεις μη αποτελεσματικές (Fradin and Thomma, 2006). Επίσης εξαιτίας της εμμονής των μικροσκληρωτίων στο έδαφος είναι απαραίτητες χρόνιες αμειψισπορές

με μονοκοτυλήδονα φυτά ώστε να μειωθεί η ποσότητα του μολύσματος (Wilhelm et al., 1955, Evans et al., 1967).

Η μείωση του μολύσματος του μύκητα *Verticillium dahliae* σε θερμοκηπιακές ή υψηλής προσόδου καλλιέργειες αγρού, στηριζόταν σε απολύμανση του εδάφους, με τη χρήση βρωμιούχου μεθυλίου. Ωστόσο, η παγκόσμια απαγόρευση της χρήσης αυτού του καταστρεπτικού για το όζον σκευάσματος, υποκίνησε την έρευνα εναλλακτικών χειρισμών για την αντιμετώπιση του μύκητα.

Η εφαρμογή ηλιοαπολύμανσης, σαν εναλλακτική μέθοδος μείωσης του μολύσματος του μύκητα είχε πολύ ενθαρυντικά αποτελέσματα στην Ελλάδα σε καλλιέργειες αγγινάρας (Tjamos and Paplomatas, 1988) και τομάτας. Σε εδάφη που έχει εφαρμοστεί ηλιοαπολύμανση είχαν επίσης αυξηθεί οι πληθυσμοί του ανταγωνιστικού παράγοντα *Talaromyces flavus* στην περιοχή ριζόσφαιρας (Tjamos, 1989). Ωστόσο, ηλιοαπολύμανση μπορεί να εφαρμοστεί μόνο σε περιοχές που έχουν κατάλληλες περιβαλλοντικές συνθήκες (Fradin and Thomma, 2006).

Εξαιτίας της δυσκολίας αντιμετώπισης του παθογόνου με χημικά μέσα, αναπτύχθηκαν εναλλακτικές στρατηγικές βασισμένες στην βιολογική καταπολέμηση. Η βιολογική αντιμετώπιση περιλαμβάνει τη χρήση ανταγωνιστικών μυκήτων (Nagtzaam et al., Narisawa et al., 2002), ανταγωνιστικών βακτηρίων (Berg et al., 2005, Tjamos et al., 2005) και αζωτούχων ή οργανικών επεμβάσεων στο έδαφος (Bailey and Lazarovits, 2003).

Οι μηχανισμοί δράσης των βιολογικών παραγόντων περιλαμβάνουν αντιβιοτική δράση, παρασιτισμό από μη παθογόνους μικροοργανισμούς, ανταγωνισμό με μη παθογόνους μικροοργανισμούς, έκκριση ενζύμων όπως οξειδάσες, χιτινάσες και γλουκανάσες και επαγωγή μηχανισμών ανθεκτικότητας των ξενιστών (Tjamos et al., 2000).

Οι μηχανισμοί δράσης των βιολογικών παραγόντων περιλαμβάνουν αντιβιοτική δράση, παρασιτισμό από μη παθογόνους μικροοργανισμούς, ανταγωνισμό με μη παθογόνους μικροοργανισμούς, έκκριση ενζύμων όπως οξειδάσες, χιτινάσες και γλουκανάσες και επαγωγή μηχανισμών ανθεκτικότητας των ξενιστών (Tjamos et al., 2000). Έρευνα των Tjamos et al. ανέφερε την απομόνωση ενός ριζοβακτηρίου του *Paenibacillus alvei* (K165) που επάγει την ανάπτυξη των φυτών (plant-growth-promoting rhizobacterium) και το οποίο βρέθηκε ότι δρα ως βιολογικός παράγοντας ενάντια στο μύκητα *V. dahliae* σε πειράματα θερμοκηπίου αλλά και στον αγρό. Πειράματα έδειξαν ότι το K165 βακτήριο επάγει, μέσω του σαλκυκλικού οξέος (SA), την επαγόμενη διασυστηματική ανοχή (ISR) σε φυτά *Arabidopsis thaliana*. Στην ίδια έρευνα παρατηρήθηκε επαγωγή των PR2 και PR5 πρωτεϊνών παθογένεσης μετά από εφαρμογή του βακτηρίου σε μεταλλαγμένα φυτά *Arabidopsis thaliana* (Tjamos et al., 2005).

Πρόσφατα αναφέρθηκε και ένα μη παθογόνο στέλεχος του μύκητα *Fusarium oxysporum* (F2) που έδωσε ικανοποιητικά αποτελέσματα στην καταπολέμηση του *V. dahliae* σε φυτά

μελιτζάνας τόσο στο θερμοκήπιο όσο και στον αγρό (Malandraki et al., 2008). Περαιτέρω έρυνα απέδειξε ότι ο μηχανισμός δράσης του μη παθογόνου στελέχους F2 οφείλεται σε ανταγωνισμό για θρεπτικά συστατικά στην επιφάνεια της ρίζας των φυτών (Pantelides et al., 2009).

Η χρήση ανθεκτικών ποικιλιών έχει αποδειχτεί αρκετά αποτελεσματική στην αντιμετώπιση του μύκητα *V. dahliae*. Ανθεκτικές ποικιλίες στην τομάτα χρησιμοποιούνται εκτεταμένα. Επίσης έχουν ταυτοποιηθεί ανθεκτικές ποικιλίες στο βαμβάκι, την πατάτα, τη φράουλα και τον ηλίανθο (Lynch κ.α., 1997). Ωστόσο, σε ένα μεγάλο αριθμό καλλιεργειών δεν είναι διαθέσιμες ανθεκτικές ποικιλίες (Fradin & Thomma, 2006).

1.3 Το αιθυλένιο και ο ρόλος του στην αλληλεπίδραση ξενιστή παθογόνου

1.3.1 Εισαγωγή

Το αιθυλένιο (ET) είναι ένας αέριος, ακόρεστος υδρογονάνθρακας που αναγνωρίστηκε για πρώτη φορά στις αρχές του εικοστού αιώνα. Αποτελεί ένα κοινό μεταβολίτη των περισσότερων ανώτερων φυτών και μικροοργανισμών (Hag, 1968, Lynch, 1972, Primose, 1979). Το αιθυλένιο απελευθερώνεται στο περιβάλλον από τους μεσοκυττάριους χώρους των κυττάρων όπου βρίσκεται σε ισορροπία με την συγκέντρωση του αιθυλενίου που υπάρχει διαλυμένο στο κυτόπλασμα (Fiserova et al., 2008)

Από όλες τις γνωστές ορμόνες έχει την πιο απλή δομή ($\text{CH}_2=\text{CH}_2$) και παίζει σημαντικό ρόλο στις φυσιολογικές διεργασίες του φυτού. Είναι παρεμποδιστής ανάπτυξης, είναι υπεύθυνο για την ωρίμανση των φρούτων, για τη φυσιολογική και παθολογική φυλλόπτωση, για την έναρξη της άνθησης και τη ρύθμιση εξωτερικών ερεθισμάτων όπως το αβιοτικό και βιοτικό στρες (Boller, 1991, Abeles et al., 1992, Chagué, 2010).

Στην γεωργία το αιθυλένιο χρησιμοποιείται για μετασυλλεκτική ωρίμανση καρπών, αυξάνοντας το μαλάκωμα και το χρώμα τους (Tudzynski and Sharon, 2002). Στον μύκητα *Aspergillus parasiticus* το αιθυλένιο παρεμποδίζει την βιοσύνθεση αφλατοξινών και θεωρείται ότι μειώνει την παραγωγή μυκοτοξινών τόσο στον αγρό όσο και κατά την αποθήκευση των γεωργικών προϊόντων (Gunterus et al., 2007).

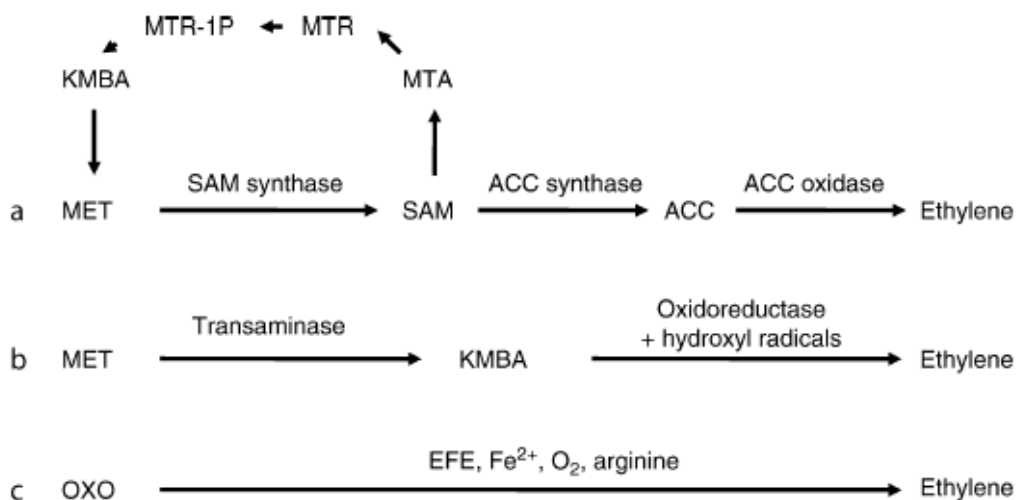
Το αιθυλένιο παίζει επίσης σημαντικό ρόλο στην άμυνα των φυτών εναντίων διάφορων φυτοπαθογόνων, εφόσον η είσοδος τους στους φυτικούς ιστούς προάγει πολλές φορές την αυξημένη παραγωγή αιθυλενίου. (Abele et al., 1992, Mauch et al., 1984, Cohn και Martin, 2005).

Έχει αναφερθεί ότι το αιθυλένιο που εκλύεται κατά την μόλυνση αποτελεί μια πρόωρη αντίδραση άμυνας των φυτών στην εισβολή του παθογόνου και σχετίζεται με την επαγωγή μηχανισμών άμυνας των φυτών (Boller, 1991). Σε αμπελώνες η εφαρμογή αιθυλενίου επάγει μηχανισμούς άμυνας του φυτού εναντίον του μύκητα *Erysiphe necator* (Belhady et al., 2008).

Επίσης πολλοί φυτοπαθογόνοι μύκητες και βακτήρια είναι ικανοί να παράγουν αιθυλένιο σαν μολυσματικό παράγοντα και έτσι ενισχύουν την ικανότητα τους να αποικίζουν μέσα στο φυτό. Βρέθηκε ότι σε φρούτα μπανάνας που είχαν μολυνθεί με το βακτήριο *Ralstonia solanacearum*, η περιεκτικότητα σε αιθυλένιο αυξήθηκε αναλογικά με την ανάπτυξη των συμπτωμάτων ενώ δεν ανιχνεύτηκε αιθυλένιο σε υγιείς καρπούς (Agris, 2005). Επίσης έχει βρεθεί ότι στελέχη του βακτηρίου *Pseudomonas syringae* pv *phaseolica* είναι παθογόνα έναντι του ζιζανίου *Pueraria lobata* εξαιτίας της υψηλής παραγωγής αιθυλενίου (Goto et al., 1985). Το αιθυλένιο, είναι υπεύθυνο για την επιναστία, την αποφύλλωση, την αναστολή ανάπτυξης και την πρόωρη γήρανση που παρατηρούνται στις αδρομυκώσεις (Wiese and DeVay, 1970, Hislop, 1973, Cronshaw and Pegg, 1976, Tzeng και DeVay, 1985). Επιπλέον ενεργοποιεί το σχηματισμό πηγμάτων (gelation) στα αγγεία του ξύλου μολυσμένων φυτών προκαλώντας συμπτώματα υδατικού στρες (Olien and Bucovac, 1982, VanderMolen et al., 1983).

1.3.2 Βιοσύνθεση του αιθυλενίου στους μύκητες

Οι μύκητες παράγουν αιθυλένιο μέσω τριών βιοσυνθετικών μονοπατιών, το ένα από τα οποία είναι χαρακτηρισμένο για τα ανώτερα φυτά, ενώ τα άλλα δύο απαντώνται μόνο σε μικροοργανισμούς (Chague et al., 2010). Τα τρία βιοσυνθετικά μονοπάτια διακρίνονται από τις πρόδρομες ουσίες από τις οποίες συντίθεται το αιθυλένιο, που για τα δύο είναι το αμινοξύ μεθειονίνη (L-methionine) ενώ για το τρίτο το α-κετογλουταρικό οξύ (2-oxoglutarate).



Εικόνα 1.6 : Μονοπάτια βιοσύνθεσης αιθυλενίου a) Μονοπάτι βιοσύνθεσης αιθυλενίου μέσω ACC b) Μονοπάτι βιοσύνθεσης αιθυλενίου μέσω KMBA c) Μονοπάτι βιοσύνθεσης αιθυλενίου από το α -κετογλουταρικό οξύ μέσω του ενζύμου EFE (Chague et al., 2010).

1.3.2.1 Βιοσύνθεση του αιθυλενίου μέσω του αμινοξέος της μεθειονίνης

Το βιοσυνθετικό μονοπάτι του ET μελετήθηκε σε μεγάλο βαθμό από τον Yang και τους συνεργάτες του τη δεκαετία 1970-1980 και χαρακτηρίστηκε για πρώτη φορά στα ανώτερα φυτά (Yang et al., 1979, Adams and Yang, 1981, Johnson and Ecker, 1998).

Σύμφωνα με αυτό το βιοσυνθετικό μονοπάτι το αιθυλένιο συντίθεται από το αμινοξύ μεθειονίνη το οποίο μετατρέπεται σε S-αδενοσυλομεθειονίνη (S-adenosyl-methionine, Adomet) μέσω του ενζύμου Adomet synthase. Η Adomet με τη σειρά της με τη δράση του ενζύμου ACC synthase (ACS) μετατρέπεται σε 1-αμινοκυκλοπροπάνιο-1-καρβοξυλικό οξύ (1-amino-cyclopropane-1-carboxylic acid, ACC) που είναι η πρόδρομος ουσία του αιθυλενίου. Το ACC τελικά οξειδώνεται από την ACC oxidase (ACO) και δίνει αιθυλένιο κυανίδιο και CO₂. Η μετατροπή της Adomet σε ACC από το ACS γενικά θεωρείται ως το όριο του ρυθμού βιοσύνθεσης του αιθυλενίου και γι αυτό έχει μελετηθεί πιο έντονα.

Το μονοπάτι του ACC, όπως αποκαλείται, έχει ωστόσο περιγραφεί ελάχιστα στους μύκητες. Έχει ταυτοποιηθεί μόνο στη ζύμη *Dictyoselium mucoroides* (Amagai and Maeda, 1992) και στο μύκητα *Penicillium digitatum*, από τον οποίο η ACC συνθάση έχει απομονωθεί και χαρακτηριστεί (Jia et al., 1999). Στα ανώτερα φυτά αυτό το μονοπάτι βιοσύνθεσης αιθυλενίου είναι τμήμα του κύκλου του Yang (Yang and Hoffman, 1984) στον οποίο το ACC ανακυκλώνεται και μέσω της μεθυλοθειοαδενοσίνης (MTA) μετατρέπεται σε μεθειονίνη, διατηρώντας σταθερά τα επίπεδα της μεθειονίνης στο φυτό.

Το δεύτερο βιοσυνθετικό μονοπάτι χαρακτηρίστηκε για πρώτη φορά σε βακτήρια (Primrose and Dilworth, 1976) αλλά απαντάται και σε αρκετούς μύκητες. Η μεθειονίνη απαμινώνεται σε α -κετο- γ -μεθυλοθειοβουτυρικό οξύ (α -keto- γ -methylthiobutyric acid, KMBA), το οποίο στη συνέχεια οξειδώνεται σε αιθυλένιο. Η πρώτη απαμίνωση της μεθειονίνης περιλαμβάνει την παρουσία μιας τρανσαμινάσης, ενώ η οξείδωση του KMBA πραγματοποιείται με μη ενζυματικό τρόπο και απαιτεί την παρουσία ριζών υδροξυλίου που παράγονται από το μοριακό οξυγόνο. Κατά ένα ενδιαφέροντα τρόπο, το KMBA σχετίζεται με την παραγωγή αιθυλενίου μέσω του μονοπατιού του ACC συμμετέχοντας στο μονοπάτι ανακύκλωσης της μεθειονίνης.

Αυτό το βιοσυνθετικό μονοπάτι έχει χαρακτηριστεί σε αρκετούς μύκητες όπως οι *Verticillium dahliae*, *Colletotrichum demathium*, *Fusarium oxysporum* (Tzeng and DeVay, 1984), ο *Penicillium digitatum* (Billington et al., 1979) και ο *Botrytis cinerea* (Chague, 2002, Critescu, 2002).

1.3.3.2 Βιοσύνθεση αιθυλενίου μέσω του α-κετογλουταρικού οξέος (2-oxoglucorate)

Το βιοσυνθετικό μονοπάτι του α-κετογλουταρικού οξέος καταλύεται από ένα πολυλειτουργικό ένζυμο, το EFE (Ethylene-Forming-Enzyme), παρουσία άλλων αμινοξέων όπως η αργινίνη (arginine) ή η λυσίνη (lysine) ανάλογα με τον υπό μελέτη μύκητα (Fukuda et al., 1986, Hottiger and Boller, 1991). Αυτό το ένζυμο είναι μια ασκορβική οξειδάση που καταλύει δύο αντιδράσεις ταυτόχρονα. Η πρώτη αντίδραση οδηγεί στην παραγωγή αιθυλενίου με οξυγόνωση του α-κετογλουταρικού οξέος ενώ στην δεύτερη αντίδραση το EFE καταλύει την παραγωγή βουτανιοδιοϊκού οξέος (succinate), γουανιδίνης (guanidine) και καρβοξυλικής πυρολίνης (pyrroline carbonate), (Fukuda et al., 1992). Αυτό το βιοσυνθετικό μονοπάτι έχει χαρακτηριστεί σε αρκετούς μύκητες όπως ο *Penicillium cyclopium* (Pazout and Pazoutova, 1989), ο *Penicillium digitatum* (Fukuda et al., 1989) και ο *Fusarium oxysporum* (Hottiger and Boller, 1991), (Εικόνα 1.7).

Species	Precursors ^a	Pathways ^b	References
<i>Acremonium falcifarum</i>	Met	Not identified	Arshad and Frankenberger (1988)
<i>Aspergillus terreus</i>	Met/KMBA	KMBA	Akhtar et al. (2005)
<i>Aspergillus flavus</i>	Met	Not identified	El-Sharouny (1984) ^c
	Not identified	Not identified	Ilag and Curtis (1968) ^d
<i>Aspergillus clavatus</i>	Not identified	Not identified	Ilag and Curtis (1968) ^d
<i>Botrytis cinerea</i>	Met	KMBA	Chagué et al. (2002)
			Cristescu et al. (2002)
<i>Cephalosporium gramineum</i>	Not identified	Not identified	Ilag and Curtis (1968) ^d
<i>Colletotrichum demathium</i>	Met	KMBA	Tzeng and DeVay (1984)
<i>Cryptococcus albidus</i>	KMBA	KMBA	Fukuda et al. (1989)
<i>Dictyoselium mucoroides</i>	Met	ACC	Amagai and Maeda (1992)
<i>Fusarium oxysporum</i>	Met/Et/Cys	Not identified	El-Sharouny (1984) ^c
	Met	KMBA	Tzeng and DeVay (1984)
	2-oxoglutarate	EFE	Hottiger and Boller (1991)
<i>Fusarium equiseti</i>	Met	Not identified	El-Sharouny (1984) ^c
<i>Penicillium digitatum</i>	Met/ACC	ACC	Jia et al. (1999)
	Met	KMBA	Billington et al. (1979)
	2-oxoglutarate	EFE	Fukuda et al. (1986)
<i>Penicillium cyclopium</i>	Met/Et/Lys	Not identified	El-Sharouny (1984) ^c
	2-oxoglutarate	EFE	Pazout et al. (1989)
<i>Pythium ultimum</i>	Met/Et/Cys	Not identified	El-Sharouny (1984) ^c
<i>Macrophomina phaseoli</i>	Met	Not identified	El-Sharouny (1984) ^c
<i>Myrothecium roridum</i>	Met	Not identified	El-Sharouny (1984) ^c
<i>Saccharomyces cerevisiae</i>	Met	KMBA	Billington et al. (1979)
<i>Thamnidium elegans</i>	Not identified	Not identified	Ilag and Curtis (1968) ^d
<i>Verticillium sp</i>	Met/Et/Cys	Not identified	El-Sharouny (1984) ^c
	Met	KMBA	Tzeng and DeVay (1984)

Εικόνα 1.7 : Μονοπάτια βιοσύνθεσης αιθυλενίου σε διάφορα είδη μυκήτων (Chagué et al., 2010).

1.3.3 Εμπλοκή του αιθυλενίου στην άμυνα των φυτών

Αν και έχει αποδειχθεί ότι το αιθυλένιο δεν συμμετέχει στην επαγωγή της SAR κάποιοι άλλοι αμυντικοί μηχανισμοί του φυτού όπως η παραγωγή αντιμικροβιακών πεπτιδίων (Pennickx et al. ,1998) ή η επαγόμενη διασυστηματική ανθεκτικότητα ISR (Pieterse et al. ,1996) χρειάζονται το αιθυλένιο για να εκφραστούν.

Εργασίες έχουν δείξει ότι οι χημικές ενώσεις όπως το JA, που παρουσιάζει ορμονική δράση, και η φυτική ορμόνη αιθυλένιο είναι σημαντικά στην επαγωγή της διασυστηματικής αντοχής των φυτών. Τόσο το JA όσο και το αιθυλένιο παράγονται άμεσα όταν τα φυτά μολύνονται από παθογόνα, ιδιαίτερα στις περιπτώσεις των νεκροτροφικών παθογόνων, όπου τα επίπεδα του JA αυξάνονται διασυστηματικά. Επίσης η εξωγενής εφαρμογή των JA και αιθυλενίου

ενεργοποίησε μια ομάδα γονιδίων άμυνας που επάγονται και κατά τη μόλυνση από παθογόνα, ανάμεσα στα οποία είναι γονίδια που κωδικοποιούν ντιφενσίνες και θειονίνες, που είναι μικρές πλούσιες σε κυστεΐνη βασικές πρωτεΐνες με αντιμικροβιακή δράση (Erple et al., 1997). Οι defensins είναι γενικά μικρά βασικά πεπτίδια που έχουν μια χαρακτηριστική τρισδιάστατη αναδιπλούμενη μορφή που σταθεροποιείται από 8 δισουλφιδικές κυστεΐνες και τυπικά παρεμποδίζουν την ανάπτυξη ενός φάσματος μυκήτων μετά από εξειδικευμένη πρόσδεση σε μεμβρανικούς στόχους. (Thomma et al., 2003).

Πρωτεΐνες πλούσιες σε υδροξυ-προλίνη συσσωρεύονται στα φυτά και ενδυναμώνουν το κυτταρικό τοίχωμα μετά από εφαρμογή αιθυλενίου (Esquerre-Tugaye et al., 1979, Ecker και Davis, 1987, Tagu et al., 1992). Τέτοιες πρωτεΐνες αποτελούν δομικά στοιχεία που εναποτίθενται στο κυτταρικό τοίχωμα και η παρουσία τους έχει συσχετιστεί με την οχύρωση του κυτταρικού τοιχώματος, ιδιαίτερα μετά από τον οξειδωτικό πολυμερισμό τους (Brisson et al., 1994). Επιπλέον το αιθυλένιο είναι απαραίτητο για την απόφραξη των αγγείων του ξύλου που συμβαίνει στα φυτά για να αντιμετωπίσουν την περαιτέρω εξάπλωση μυκήτων που προκαλούν αδρομυκώσεις .

Τα μόρια που έχουν μελετηθεί στο μεγαλύτερο βαθμό και που επάγονται από το αιθυλένιο κατά τις αντιδράσεις άμυνας των φυτών είναι οι PR πρωτεΐνες. Μέχρι σήμερα έχουν αναγνωρισθεί δεκαεφτά κλάσεις PR πρωτεϊνών (Van Loon and Van Strein, 1999) οι περισσότερες από τις οποίες έχουν δείξει άμεση αντιμικροβιακή δραστηριότητα εναντίων φυτοπαθογόνων μυκήτων και σε μερικές περιπτώσεις εναντίων φυτοπαθογόνων βακτηρίων (Broekaert et al., 2000). Ξεχωριστές κλάσεις PR γονιδίων που έχουν βρεθεί να σχετίζονται με το αιθυλένιο συμπεριλαμβάνουν τις ενδοκυττάρια β-1,3-γλουκανάσες, τις ενδοκυττάρια βασικές χιτινάσες, τις όξυνες hevein-like πρωτεΐνες και τις ντιφενσίνες. Η επαγωγή αυτών των γονιδίων πραγματοποιείται μέσω ενός μονοπατιού στο οποίο το αιθυλένιο και το ιασμονικό οξύ λειτουργούν συνεργιστικά.

Ο ρόλος του αιθυλενίου στην παραγωγή αντιμικροβιακών δευτερογενών μεταβολιτών (φυτοαλεξίνες) φαίνεται ότι εξαρτάται από τον τύπο της φυτοαλεξίνης και της εμπλεκόμενης μεταβολικής οδού (Pedras et. al., 2000). Για παράδειγμα σε φύλλα ρυζιού το αιθυλένιο επάγει την παραγωγή της φαινυλπροπανοειδούς φυτοαλεξίνης σακουρανετίνης. Γενικά οι φαινυλπροπανοειδείς φυτοαλεξίνες είναι επαγόμενες από το αιθυλένιο σε διάφορα φυτικά είδη.

Η επαγόμενη διασυστηματική ανθεκτικότητα επάγεται από συγκεκριμένα στελέχη μη παθογόνων ριζοβακτηρίων και δεν απαιτεί την παρουσία του SA αλλά εξαρτάται από την ανταπόκριση του φυτού στο JA και το αιθυλένιο. Η ISR είναι αποτελεσματική εναντίων παθογόνων τα οποία περιορίζονται από βασικούς μηχανισμούς ανθεκτικότητας που βασίζονται στο JA και το αιθυλένιο όπως ο μύκητας *Alternaria brassicola* στην Arabidopsis . Η ISR δεν σχετίζεται με την επαγωγή PR πρωτεϊνών αλλά με κάποιες άγνωστες μέχρι τώρα αμυντικές

ουσίες, παρόλο που η SAR όπως και η ISR απαιτούν την παρουσία μιας λειτουργικής NPR1 πρωτεΐνης.

Επιπλέον είναι αξιοσημείωτο ότι το φυτό φαίνεται να ενεργοποιεί διαφορετικές ομάδες γονιδίων για την επαγωγή της άμυνάς του με βάση το στέλεχος του ριζοβακτηρίου που αποικίζει το ριζικό του σύστημα. Μια πρόσφατη έρευνα στην ISR που επάγεται από το *P. Fluorescens* σε φυτά *Arabidopsis* έδειξε αξιοσημείωτες αλλαγές στην έκφραση αρκετών γονιδίων εξαρτώμενων από το ET και το JA, υποδεικνύοντας ότι αυτά τα γονίδια αντιδρούν έντονα και συνεπώς πιο αποτελεσματικά στη μόλυνση από παθογόνα.

Επίσης εφαρμογή 1mM ACC σε σπορόφυτα *Arabidopsis* αύξησε την ανθεκτικότητα ενάντια στο *P. Syringae pv tomato*. Αυτή η επαγόμενη ανθεκτικότητα μοιάζει πολύ με την ISR η οποία επάγεται από συγκεκριμένα στελέχη των μη παθογόνων ριζοσφαιρικών βακτηρίων όπως το στέλεχος WCS417 *P. Fluorescens*. Το ACC ενεργοποιεί ένα PR-4 τύπου *hevein* γονίδιο. Ωστόσο αυτά τα WCS417 βακτήρια δεν αυξάνουν την παραγωγή ET ούτε ενεργοποιούν PR πρωτεΐνες που εξαρτώνται από το ET (Van Loon et al., 2006).

Όμως μεταλλαγμένα φυτά *Arabidopsis etr1-1*, *ein2-1*, *ein7* στα οποία έχει απενεργοποιηθεί ο υποδοχέας του αιθυλενίου δεν εμφανίζουν ISR. Επίσης το *eir1-1* μεταλλαγμένο φυτό το οποίο δεν αντιλαμβάνεται το αιθυλένιο στη ρίζα αλλά στα φύλλα δεν εκφράζει ISR όταν το WCS417 εφαρμόζεται στη ρίζα αλλά όταν φιλτράρεται στα φύλλα γεγονός που αποδεικνύει το ρόλο του ET στην ISR. Τέλος είναι σημαντικό ότι το ET και το JA λειτουργούν συνεργιστικά στην επαγωγή ISR (Van Loon, et al., 2006).

Πρόσφατες εργασίες απέδειξαν ότι η μειωμένη πρόσληψη ET μέσω του υποδοχέα ETR1 επάγει την έκφραση μιας ομάδας γονιδίων που σχετίζονται με την άμυνα των φυτών *Arabidopsis thaliana* υποδεικνύοντας τη μοριακή βάση που ελέγχει την ανθεκτικότητα στους μύκητες *V. dahliae* (Pantelides et al., 2010). Αυτές οι μεταγραφικές μεταβολές οδήγησαν σε μειωμένη ανάπτυξη του παθογόνου μύκητα *V. dahliae* σε φυτά *Arabidopsis* στους αγγειακούς ιστούς και μειωμένη ένταση της ασθένειας στα *etr1-1* φυτά. Η ποσοτικοποίηση των μυκήτων έδειξε ότι τα επίπεδα των φυτοπαθογόνων στους ιστούς των *etr1-1* φυτών παρέμεναν σε σημαντικά χαμηλότερα επίπεδα από τα φυτά άγριου τύπου. Επιπλέον οι αντιδράσεις άμυνας εναντίον του μύκητα *V. dahliae* οφειλόταν στην υπερέκφραση οκτώ γονιδίων, των GSTF12, GSTU16, CHI-1, CHI-2, PR-1, PR-2, PR-5, Myb75.

1.3.4 Ο ρόλος του αιθυλενίου στην αλληλεπίδραση ξενιστή – παθογόνου

Ο ρόλος του αιθυλενίου στα αλληλεπιδράσεις ξενιστή παθογόνου έχει συνδεθεί με την αντίσταση των φυτών ξενιστών (Παράγραφος 1.3.4), την παθογόνο ικανότητα ενός παθογόνου ή απλά την έκταση της φυσικής ζημιάς των φυτών ξενιστών από ένα παθογόνο.

Το αιθυλένιο μπορεί να διαδραματίσει ρόλο στην ανάπτυξη των συμπτωμάτων, επειδή μπορεί να προκαλέσει χλώρωση, αποκοπή και γηρασμό και μπορεί έτσι να είναι σημαντικό στην προδιάθεση του φυτού για αθένεια (Stall et al., 1984, Davies, 1995). Αρκετές έρευνες επισημαίνουν πως όταν το αιθυλένιο εφαρμόζεται πριν την μόλυνση του ξενιστή από κάποιο παθογόνο μειώνει ή δεν έχει καμία επίδραση στην εξέλιξη της ασθένειας, ενώ όταν εφαρμόζεται μετά την μόλυνση η ασθένεια επιταχύνεται.. (Van Loon et al., 2006, Robison et al. , 2001).

Στο μύκητα *Colletotrichum glosporioides* το αιθυλένιο προάγει τη βλάστηση των κονιδίων και την ανάπτυξη των μυκηλιακών υφών, ενώ η εξωτερική εφαρμογή ενός συνθετικού χημικού που απελευθερώνει αιθυλένιο, του Ethephon, παρεμποδίζει την ανάπτυξη του παθογόνου (Tudzynski and Sharon, 2002). Πρόσφατα οι Chague et al. (2006) έδειξαν ότι το αιθυλένιο προκαλεί συγκεκριμένες μεταγραφικές αλλαγές σε ένα μεγάλο αριθμό γονιδίων του μύκητα *Botrytis cinerea*, υποστηρίζοντας την ύπαρξη ενός μονοπατιού μετάδοσης σήματος εξαρτημένου από το αιθυλένιο. Επιπλέον το αιθυλένιο επάγει τη μεταγραφή ενός γονιδίου παθογένειας του bcr1 μετά από μόλυνση των φυτών. Το γονίδιο αυτό στα αρχικά στάδια της μόλυνσης λειτουργεί ως επαγωγέας των αμυντικών μηχανισμών του φυτού, ενώ κατά τον αποικισμό των φυτών συμπεριφέρεται ως μολυσματικός παράγοντας (Chague et al., 2010). Επίσης έρευνες των Critescu et al. (2002) έδειξαν ότι το αιθυλένιο που παράγεται από το μύκητα *Botrytis cinerea* , κυρίως μέσω του KMBA μονοπατιού, σχετίζονται με την ανάπτυξη των υφών του.

1.3.5.1 Ο ρόλος του αιθυλενίου στην παθογένεια μυκήτων του γένους *Verticillium*

Ανάμεσα στους ρυθμιστές ανάπτυξης των φυτών το αιθυλένιο παίζει σημαντικό ρόλο στην εξέλιξη των αδρομυκώσεων, αλλά ταυτόχρονα συμβάλλει σε μηχανισμούς ανθεκτικότητας των φυτών (DeVay, 1989). Τόσο τα παθογόνα όσο και οι ξενιστές τους παράγουν αιθυλένιο. Θεωρείται ότι αιθυλένιο που ελευθερώνεται από πρόκληση πληγών στις ρίζες των φυτών, επάγει την μόλυνση στην περίπτωση που το επίπεδο του μολύσματος είναι χαμηλό (Pegg, 1989).

Έκθεση των φυτών σε αιθυλένιο προκαλεί (ανάλογα με το χρόνο έκθεσης) μάρανση, χλώρωση, αποκοπή και νέκρωση φύλλων, αλλά και δημιουργία πηγμάτων στα αγγεία του ξύλου που μοιάζουν με συμπτώματα από παθογόνο αδρομύκωσης (Pegg, 1981, Vander Molen et al., 1983, DeVay, 1989). Για το λόγο αυτό θεωρήθηκε ότι το αιθυλένιο είναι η κύρια αιτία για την εκδήλωση συμπτωμάτων από παθογόνα αδρομύκωσης (Pegg, 1981).

Επίσης, φαίνεται ότι το αιθυλένιο σχετίζεται με τη μολυσματικότητα και την αποκοπή των φύλλων που προκαλεί η αποφυλλωτική φυλή του *V. dahliae* σε βαμβάκι. Συγκεκριμένα, φυτά βαμβακιού μολυσμένα με την αποφυλλωτική φυλή T9 παρουσίασαν πέντε φορές αύξηση στη συγκέντρωση αιθυλενίου δέκα με δώδεκα μέρες μετά την μόλυνση, ενώ φυτά μολυσμένα με στέλεχος SS4 της μη αποφυλλωτικής φυλής παρουσίασαν δύο φορές αύξηση (Pegg, 1981, 1989, Wiese and DeVay, 1970). Αύξηση της συγκέντρωσης αιθυλενίου προκάλεσε επίσης χειρισμός με μικρού μοριακού βάρους τοξίνη που απομονώθηκε από καλλιέργεια του μύκητα *Verticillium albo-atrum* σε φυτά πατάτας ευαίσθητης ποικιλίας, ενώ δεν παρουσίασε επίδραση σε ανθεκτική ποικιλία (Mansoori and Smith, 2005).

Μεταλλαγμένα φυτά τομάτας στα οποία παρεμποδίζονταν η παραγωγή αιθυλενίου μέσω της έκφρασης μια βακτηριακής ACC απαμινάσης έδωσαν λιγότερα συμπτώματα από τους μάρτυρες επιβεβαιώνοντας τη σημασία του αιθυλενίου σε συμπτώματα που προκαλούνται από μύκητες του γένους *Verticillium* (Robison, 2001).

Ωστόσο, εφαρμογή αιθυλενίου σε φυτά τομάτας πριν ή ταυτόχρονα με την μόλυνση από το μύκητα *V. albo - atrum* προκάλεσε μείωση των συμπτωμάτων της ασθένειας (Pegg & Cronshaw, 1976).

Συνεπώς φαίνεται ότι ο ρόλος του αιθυλενίου στην παθογένεια μυκήτων αδρομυκώσεων είναι πολλαπλός. Όταν εφαρμόζεται στο φυτό πριν τη μόλυνση από ένα παθογόνο δρα σαν επαγωγέας ανθεκτικότητας, ενώ όταν πραγματοποιείται χειρισμός μετά την μόλυνση επιταχύνει την ανάπτυξη της ασθένειας, δρώντας συνεργιστικά με άλλους μεταβολίτες σαν τοξίνη (Pegg and Cronshaw, 1976, Van Loon et al., 2006).

1.4 Σκοπός της παρούσας μελέτης

Ο μύκητας *Verticillium dahliae* είναι ένα εδαφογενές παθογόνο με παγκόσμια εξάπλωση, που προσβάλλει ένα μεγάλο εύρος ξενιστών, συμπεριλαμβανομένων πολλών οικονομικά σημαντικών καλλιεργειών.

Τα συμπτώματα που προκαλούνται μετά από προσβολή του μύκητα *V. dahliae* είναι ποικίλα αλλά πολλά από αυτά όπως η επιναστία, ο νανισμός, η χλώρωση και η αποφύλλωση παρατηρούνται και μετά από εξωγενή εφαρμογή αιθυλενίου (Abeles, 1973). Για το λόγο αυτό θεωρήθηκε ότι το αιθυλένιο είναι η κύρια αιτία για την εκδήλωση συμπτωμάτων από παθογόνα αδρομύκωσης (Pegg, 1981).

Σκοπός της παρούσας εργασίας είναι η διερεύνηση του ρόλου του αιθυλενίου στην παθογένεια του μύκητα *V. dahliae* σε φυτά τομάτας, μέσω του γονιδίου της ACC συνθάσης, καθώς το ACC αποτελεί ένα πρόδρομο μόριο στο μεταβολικό μονοπάτι βιοσύνθεσης του αιθυλενίου. Για το λόγο αυτό θα χρησιμοποιηθούν σε βιοδοκιμές μεταλλαγμένα στελέχη του μύκητα *V. dahliae* με απενεργοποιημένο το γονίδιο *ACS* καθώς και το άγριο στέλεχος από το οποίο προέκυψαν, ώστε να προσδιοριστεί ο ρόλος του γονιδίου *ACS* στην παθογένεια του μύκητα *V. dahliae*. Συνεπώς η μελέτη αυτών των μεταλλαγμένων στελεχών θα δώσει πληροφορίες για το εάν το αιθυλένιο επηρεάζει άμεσα ή έμμεσα την εκδήλωση συμπτωμάτων σε φυτά τομάτας και την παθογένεια του μύκητα *V. dahliae*.

2. ΜΕΘΟΔΟΛΟΓΙΑ

2.1 Φυτικό υλικό

Για την πραγματοποίηση των πειραμάτων παθογένειας, ποσοτικοποίησης και ιστοπαθολογικής παρατήρησης της διαδικασίας μόλυνσης και αποίκησης του ριζικού συστήματος, χρησιμοποιήθηκαν φυτά τομάτας *Solanum lycopersicum* της ποικιλίας Ailsa Craig που παραγγέλθηκαν από την Thomson and Morgan Ltd (U.K.).

Οι σπόροι για σκοπούς αποθήκευσης τοποθετήθηκαν σε ψυγείο στους 4° C. Για τα πειράματα παθογένειας και ποσοτικοποίησης οι σπόροι τοποθετήθηκαν κατευθείαν σε γλαστράκια διαμέτρου 15 cm, τα οποία περιείχαν χώμα 300 cm³ περίπου ενώ για τα πειράματα ιστοπαθολογικής παρατήρησης προηγήθηκε προβλάστηση των σπόρων σε τριβλία στα οποία είχε τοποθετηθεί αποστειρωμένο διηθητικό χαρτί εμποτισμένο με απιονισμένο αποστειρωμένο νερό. Στη συνέχεια τα τριβλία μεταφέρθηκαν σε επωαστικό θάλαμο στους 25° C και μετά από δύο ημέρες ακολούθησε η φύτευση ως άνω. Τα φυτά ποτίστηκαν και λιπάνθηκαν με θρεπτικό διάλυμα (XL 60, Hortifeeds, Lincoln, UK) όποτε κρίθηκε απαραίτητο.

2.2 Στελέχη φυτοπαθογόνων μυκήτων και προετοιμασία μολύσματος.

Στα πειράματα χρησιμοποιήθηκαν άγρια και μεταλλαγμένα στελέχη του μύκητα *Verticillium dahliae* (χορηγία της Dr. Katherine Dobbinson, Department of Agriculture and Agri-Food Canada, Department of Biology, The University Of Western Ontario, Canada) με γνωστή παθογένεια σε φυτά τομάτας (Πίνακας 1.1). Όλα τα στελέχη διατηρήθηκαν στους -80°C ως αιώρημα κονιδίων 4x10⁷ ml⁻¹ σε 25% υδατική γλυκερόλη (Maniatis et al., 1982). Πριν χρησιμοποιηθούν, οι μύκητες μεταφέρθηκαν σε θρεπτικό υλικό PDA (Merck) και τοποθετήθηκαν σε επωαστικό θάλαμο στους 25°C για πέντε ημέρες. Για την παρασκευή του μολύσματος των πειραμάτων παθογένειας, συλλέχθηκε τμήμα της αναπτυσσόμενης καλλιέργειας των υπό μελέτη στελεχών από τριβλίο και μεταφέρθηκε για επώαση σε φιάλη Earlenmayer 1000 ml που περιείχε 500 ml θρεπτικού υποστρώματος sucrose sodium nitrate (SSN) (Sinha και Wood, 1968). Όλα τα στελέχη *V. dahliae* επώαστηκαν σε περιστρεφόμενο επωαστικό κλίβανο στις 120 στροφές ανά λεπτό στους 23 °C για πέντε μέρες. Πριν την εφαρμογή τους στα φυτά, ακολούθησε διήθηση των καλλιεργειών σε τυρόπανο και δημιουργία αιωρήματος συγκέντρωσης 10⁷ κονιδίων ανά ml με τη βοήθεια αιματοκυτόμετρου.

Άγριο στέλεχος <i>Verticillium dahliae</i>	WT
Μεταλλαγμένα στελέχη με απενεργοποιημένο το γονίδιο ACS	ΔACS 18.1-18.7
Συμπληρωματικά στελέχη	AT 70-5, AT 70-30 AT 70-49 AT 70-56
Εκτοπικό στέλεχος	18.9

Πίνακας 1.1 : Στελέχη του μύκητα *Verticillium dahliae* που μελετήθηκαν στην παρούσα μελέτη

2.3 Δοκιμές παθογένειας των μεταλλαγμένων στελεχών.

Για την διερεύνηση του ρόλου του γονιδίου της ACC συνθάσης (ACS) στην παθογένεια του μύκητα *V. dahliae*, φυτά τομάτας ηλικίας τεσσάρων εβδομάδων μολύνθηκαν με 10 ml αιωρήματος κονιδίων συγκέντρωσης 10^7 κονίδια ανά ml των μυκήτων με ριζοπότισμα και εξετάστηκε η παθογένεια του άγριου στελέχους, δύο στελεχών με απενεργοποιημένο το γονίδιο ACS (ΔACS 18.7 και ΔACS 18.6) και δύο συμπληρωματικών στελεχών (complemented strains) με επανενσωματωμένο το λειτουργικό γονίδιο ACS (AT 70-49 και AT 70-56). Για την πραγματοποίηση του πειράματος χρησιμοποιήθηκαν 20 φυτά ανά στέλεχος *V. dahliae*. Το ποσοστό της ασθένειας σε κάθε μέτρηση υπολογίστηκε ως ποσοστό του αριθμού των φύλλων που παρουσίασαν συμπτώματα ως προς το συνολικό αριθμό φύλλων κάθε φυτού. Η πρόοδος της ασθένειας καταγράφηκε για κάθε παθογόνο σε συγκεκριμένα χρονικά διαστήματα (5, 8, 11, 14, 17 και 20 ημέρες μετά τη μόλυνση) και υπολογίστηκε ο δείκτης AUDPC (area under the disease progress curve, εμβαδόν κάτω από την καμπύλη προόδου της ασθένειας). Ακολούθως αναπαριστάθηκαν γραφικά οι τιμές των ποσοστών ασθένειας κάθε επέμβασης σε σχέση με το χρόνο. Με βάση το εμβαδόν της καμπύλης προόδου της ασθένειας που προέκυψε υπολογίστηκε ο δείκτης AUDPC, σύμφωνα με τη μέθοδο των Campbell και Madden (1990). Προκειμένου να συσχετιστεί ο δείκτης AUDPC με την σοβαρότητα της ασθένειας, ο δείκτης αυτός εκφράστηκε ως ποσοστό της μέγιστης τιμής AUDPC για όλη την διάρκεια του πειράματος (που αντιστοιχεί σε 100 % προσβολή) και αναφέρθηκε ως ποσοστό ασθένειας βάση AUDPC (Korolev et al., 2001). Οι

τιμές των AUDPC δεικτών υποβλήθηκαν σε στατιστική ανάλυση με τη μέθοδο ANOVA και οι μέσοι όροι διαχωρίστηκαν με πολλαπλή δοκιμή κατά Tukey (Tukey's multiple range test).

2.4 Σχεδιασμός εκκινήτων

Για τον έλεγχο απενεργοποίησης του γονιδίου ACS σχεδιάστηκε ζεύγος εκκινήτων πάνω στο γονίδιο ACS, πριν και μετά το μεταθετό στοιχείο TN5, που στο άγριο στέλεχος ενίσχυαν τμήμα 639 βάσεων.

Για τα πειράματα ποσοτικοποίησης της βιομάζας των παθογόνων στα φυτά τομάτας με Real Time PCR χρησιμοποιήθηκαν οι εκκινήτες Vd-F και Vd-R (Pantelides et al., 2010) που ενισχύουν τμήμα μήκους 347 ζευγών βάσεων της περιοχής ITS του γονιδίου 5.8S ριβοσωμικού RNA (Z29511) του μύκητα *V. dahliae*. Για την κανονικοποίηση διαφορών στις αρχικές ποσότητες DNA χρησιμοποιήθηκαν οι εκκινήτες LeTUB-F και LeTUB-R (Pantelides et al., 2009) που ενισχύουν τμήμα του γονιδίου β-τουμπουλίνης της τομάτας (DQ205342) ποικιλίας Ailsa Craig.

Τέλος, σχεδιάστηκαν και χρησιμοποιήθηκαν εξειδικευμένοι εκκινήτες για το γονίδιο ACS του *V. dahliae* ώστε να ενισχύουν τμήμα του γονιδίου πριν το μεταθετό στοιχείο TN5 (μήκος 236 βάσεων) και μετά το μεταθετό στοιχείο (μήκος 356 βάσεων), για τη μελέτη των επιπέδων έκφρασης του γονιδίου ACS. Για την κανονικοποίηση διαφορών στις αρχικές ποσότητες cDNA, στις αντιδράσεις Real Time PCR χρησιμοποιήθηκαν εκκινήτες που ενισχύουν τμήμα του γονιδίου β-τουμπουλίνης (VDAG_10074.1) του μύκητα *V. Dahliae* (Tzima et. al., 2011). Στον Πίνακα 1 παρουσιάζονται συγκεντρωτικά οι αλληλουχίες όλων των εκκινήτων που χρησιμοποιήθηκαν στα πειράματα. Στο [Παράρτημα](#) δίνονται όλες οι αλληλουχίες των υπό μελέτη γονιδίων όπου έχουν επισημανθεί οι περιοχές πάνω στις οποίες σχεδιάστηκαν οι εκκινήτες.

Γονίδιο	GenBank accession no	Εκκινήτες	Ζεύγη εκκινήτων
5.8S rRNA	Z29511	Vd-F Vd-R	5'-CCGCCGGTCCATCAGTCTCTCTGTTTATAC-3' 5'-CGCCTGCGGGACTCCGATGCGAGCTGTAAC-3'
ACS	VDAG_05021.11	ACS_DNA-F ACS_DNA-R	5'-AACTCGGGCCGCCACAACATT-3' 5'-AACGTCTCGCGGGGGTAGCA-3'
ACS	VDAG_05021.11	ACS_RNA_af-F ACS_RNA_af-R	5'-GGGGGCGCTCATAACCAAGAAT-3' 5'-CCCCGGATGCAAGAAAACC-3'

ACS	VDAG_05021.11	ACS_RNA_F ACS_RNA_R	5'-AACTCGGGCCGCCACAACATT-3' 5'-TGAAGGAAGCAGGCGGAAACTCTA-3'
<i>β-tubulin</i>	VDAG_10074.1	VdBt-F VdBt-R	5'-TTCCCCCGTCTCCACTTCTTCATG-3' 5'-GACGAGATCGTTCATGTTGAACTC-3'
<i>β2-tubulin</i>	DQ205342	LeTUB-F LeTUB-R	5'-GATTTGCCCCACTAACCTCTCGT-3' 5'-ACCTCCTTTGTGCTCATCTTACCC-3'

Πίνακας 1.2 : Λίστα όλων των υπό εξέταση γονιδίων και τα ζεύγη εκκινητών που χρησιμοποιήθηκαν στις αντιδράσεις Real-Time PCR.

2.5 Απομόνωση DNA από φυτά τομάτας *Ailsa Craig*

Η απομόνωση γονιδιακού DNA από φυτά τομάτας πραγματοποιήθηκε σύμφωνα με το πρωτόκολλο των Dellaporta et al., (1983) για την ποσοτικοποίηση του παθογόνου *in planta*. Συγκεκριμένα, το υπέργειο μέρος κάθε φυτού κόπηκε στο επίπεδο του χώματος, αφαιρέθηκαν τα φύλλα και ακολούθως το στέλεχος ξεπλύθηκε με αποστειρωμένο απιονισμένο νερό και κονιορτοποιήθηκε με χρήση υγρού αζώτου σε αποστειρωμένα ιγδία. Περίπου 200 mg κονιορτοποιημένου ιστού αναμίχθηκαν με 1 ml ρυθμιστικού διαλύματος απομόνωσης (50 mM EDTA pH 8, 500 mM NaCl, 10 mM β-mercaptoethanol) και 66 μl SDS 20% και επώαση στους 65°C για 20 λεπτά. Στη συνέχεια προστέθηκαν 320 μl ρυθμιστικού διαλύματος οξικού καλίου (pH 4.5) και μετά από ανάδευση τοποθετήθηκαν στον πάγο για 20 λεπτά. Ακολούθησε φυγοκέντρηση των δειγμάτων στις 10.000g για 10 λεπτά στους 4°C και μεταφορά της υπερκείμενης φάσης. Στη συνέχεια έγινε κατακρήμνιση των νουκλεϊκών οξέων με 0.5 όγκους ισοπροπανόλης. Το DNA παραλήφθηκε ως ίζημα μετά από φυγοκέντρηση για 15min στις 10.000g και απομάκρυνση των αλάτων με έκπλυση με 750 μl διάλυμα αιθανόλης 70%. Ακολούθησε στέγνωμα του ιζήματος DNA για 5-10 min σε θερμοκρασία δωματίου και επαναιώρηση του σε 30μl HPLC νερό.

2.6 Απομόνωση DNA από το μύκητα *V. dahliae*

Η απομόνωση γονιδιακού DNA από το μύκητα *V. dahliae* πραγματοποιήθηκε σύμφωνα με το πρωτόκολλο των Yelton et al. (1984). Αρχικά, 100-200 mg λυοφιλιωμένου μυκηλίου αναμείχθηκαν με 700 μl Lezz buffer (20 Mm EDTA pH 8, 0,5% SDS, 10 mM Tris HCl pH 8 και 0,1 mM LiCl) και αφού αναδεύτηκαν ελαφρώς παρέμειναν σε θερμοκρασία δωματίου για 5 λεπτά. Ακολούθως πραγματοποιήθηκε εκχύλιση πρωτεϊνών με 700 μl φαινόλη: χλωροφόρμιο: ισοαμυλική αλκοόλη σε αναλογία όγκων 25:24:1 αντίστοιχα, ανάδευση και παραμονή των δειγμάτων σε θερμοκρασία δωματίου για 5 λεπτά και φυγοκέντρηση στις 13.000 rpm για 10 λεπτά

στους 4°C. Μετά τη μεταφορά της υπερκείμενης φάσης προστέθηκε ίσος όγκος φαινόλης: χλωροφορμίου: ισοαμυλικής αλκοόλης (25:24:1) και τα δείγματα φυγοκεντρήθηκαν στις 13.000 rpm για 10 λεπτά στους 4°C. Η υπερκείμενη φάση μεταφέρθηκε εκ νέου και στη συνέχεια πραγματοποιήθηκε κατακρήμνιση των νουκλεϊκών οξέων με την προσθήκη 1 ml 95% αιθανόλης. Το DNA παραλήφθηκε ως ίζημα μετά από φυγοκέντρηση για 10 λεπτά στις 13.000 rpm και απομάκρυνση των αλάτων με έκπλυση με διάλυμα αιθανόλης 70%. Ακολούθησε στέγνωμα του ιζήματος DNA για 5-10 min σε θερμοκρασία δωματίου και επαναιώρηση του σε 30μl HPLC νερό.

2.7 Μέτρηση συγκέντρωσης νουκλεϊκών οξέων

Ο υπολογισμός της συγκέντρωσης του DNA πραγματοποιήθηκε με τη μέτρηση της οπτικής πυκνότητας των δειγμάτων στα 260 nm. Είναι γνωστό ότι οπτική απορρόφηση στα 260 nm ίση με τη μονάδα ($O.D_{260} = 1,0$) αντιστοιχεί σε συγκέντρωση σε DNA ίση με 50 μg/ml. Συνεπώς ο προσδιορισμός της συγκέντρωσης DNA υπολογίστηκε με βάση την εξίσωση 50 μg/ml (DNA) X $O.D_{260}$ του δείγματος X Συντελεστής αραιώσης.

Η συγκέντρωση του RNA υπολογίστηκε σε Nanodrop ND-1000 Spectrophotometer (Saveen Werner, Malmö, Sweden).

2.8 Εφαρμογή αλυσιδωτής αντίδρασης πολυμεράσης (PCR)

Η αλυσιδωτή αντίδραση πολυμεράσης εφαρμόστηκε για τον έλεγχο των μετασηματισμένων *V. dahliae* στελεχών, ως προς την αντικατάσταση του υπό μελέτη γονιδίου της *ACC συνθάσης* από τον αντίστοιχο αλληλόμορφο αντικατάστασης. Για την ενίσχυση τμήματος του γονιδίου *ACC συνθάση* πραγματοποιήθηκε αντίδραση PCR σε 25 -50 ng ολικό γονιδιακό DNA όλων των στελεχών του μύκητα *V. dahliae* (wild type, ΔACS 18.1-18.7 και συμπληρωματικά AT 70-5, AT 70-30, AT 70-49, AT 70-56). Για την αντίδραση χρησιμοποιήθηκε ένζυμο πολυμεράσης της εταιρείας Finzyme (Φινλανδία), με τη συνιστώμενη συγκέντρωση των αντιδραστηρίων (1 U DNA πολυμεράση, 2mM $MgCl_2$, 1X συγκέντρωση ρυθμιστικού διαλύματος, 200μM νουκλεοτίδια). Οι εκκινητές χρησιμοποιήθηκαν σε συγκέντρωση 0,8-1μM. Μια τυπική αντίδραση περιελάμβανε αρχική αποδιάταξη στους 94°C για 2-3 min, 30 κύκλους με αποδιάταξη 1 min στους 94°C, υβριδισμό 1 min στους 59°C και επέκταση 3 min (ή ανάλογα με το μήκος του τμήματος) στους 72°C κι ένα τελικό βήμα επέκτασης στους 72 °C για 10 min.

Τέλος, PCR πραγματοποιήθηκε στα cDNA όλων των στελεχών του μύκητα *V. dahliae* με τους εκκινητές της β -τουμπουλίνης για τον έλεγχο πιθανής παρουσίας μορίων DNA και ακολούθως για τον προσδιορισμό της έκφρασης του γονιδίου *ACC συνθάση*

2.9 Ηλεκτροφόρηση τμημάτων DNA

Τα δείγματα DNA αναμείχθηκαν με διάλυμα φόρτωσης (loading buffer) (0,1% bromophenyl blue, 50% γλυκερίνη, 10mM Tris-HCl pH 8) πυκνότητας 6X, τέτοιου όγκου, ώστε η περιεκτικότητα του διαλύματος φόρτωσης στον τελικό όγκο δείγματος που ηλεκτροφορείται να είναι 1X. Ως σταθερά χρησιμοποιήθηκε η κλίμακα μοριακών βαρών Gene Ruler 1Kb DNA ladder (Fermentas). Το πήγμα ηλεκτροφόρησης περιείχε 1% αгарόζη σε 1X ρυθμιστικό διάλυμα TAE (Sambrook *et al*, 1989). Η ηλεκτροφόρηση του πηγματος πραγματοποιήθηκε στο ίδιο ρυθμιστικό διάλυμα με εφαρμογή τάσης 100 Volt στα άκρα της συσκευής ηλεκτροφόρησης.

Μετά την ηλεκτροφόρηση ακολούθησε χειρισμός των πηγμάτων αгарόζης με υδατικό διάλυμα βρωμιούχου αιθιδίου (συγκέντρωσης περίπου 1μg/ml) για 20-30 min και παρατήρηση τους σε τράπεζα UV ακτινοβολίας (365 nm).

2.10 Απομόνωση πλασμιδιακού DNA από το βακτήριο *Escherichia coli*

Απομόνωση μικρής κλίμακας πλασμιδιακού DNA από το βακτήριο *E. coli* πραγματοποιήθηκε για την απομόνωση πλασμιδίων στα οποία είχε κλωνοποιηθεί το λειτουργικό γονίδιο της *ACC συνθάσης* για την επανενσωμάτωση του λειτουργικού αντιγράφου του γονιδίου *ACS* στα ΔACS μετασχηματισμένα στελέχη (χορηγία της Dr. Katherine Dobbison, Department of Agriculture and Agri-Food Canada, Department of Biology, The University Of Western Ontario, Canada). Με τον τρόπο αυτό παραλήφθηκε το πλασμίδιο με το υπό μελέτη γονίδιο, τμήμα του οποίου χρησιμοποιήθηκε ως ανιχνευτής για τον έλεγχο των μετασχηματισμένων στελεχών με υβριδισμό κατά Southern. Για την απομόνωση πλασμιδιακού DNA, κύτταρα από 1.5 ml καλλιέργειας του βακτηρίου *E. coli* (που αναπτύχθηκε για 24 h σε υλικό LB), αναδιαλύθηκε σε 100μl διαλύματος I (50mM γλυκόζη, 25mM Tris-HCl pH 8.0, 10mM EDTA pH 8.0). Μετά την πάροδο 5 min σε θερμοκρασία δωματίου ακολούθησε προσεκτική ανάμειξη με 200μl φρεσκοπαρασκευασμένου διαλύματος II (0.2N NaOH, 1% SDS, H₂O) και τοποθέτηση των σωληνίσκων σε πάγο για 5min. Στη συνέχεια τα κύτταρα αναμείχθηκαν προσεκτικά με 150μl Διαλύματος III (CH₃ COOK, με συγκέντρωση 5 M CH₃ COO⁻ και 3 M K⁺) και τοποθετήθηκαν σε πάγο για 5min. Οι πρωτεΐνες και τα κυτταρικά τοιχώματα των βακτηριακών κυττάρων αφαιρέθηκαν με φυγοκέντρηση για 5min στις 12.000 g και έγινε μεταφορά της υπερκείμενης υδατινής φάσης (περίπου 0.4 ml) σε νέο σωληνάκι. Ακολούθησε μία επιπλέον εκχύλιση με ίσο

όγκο φαινόλη: χλωροφόρμιο (1:1) για την απομάκρυνση εναπομείναντων πρωτεϊνών. Μετά από ανάδευση, φυγοκέντρηση και μεταφορά της υπερκείμενης φάσης, πραγματοποιήθηκε κατακρήμνιση των νουκλεϊκών οξέων με προσθήκη 700μl απόλυτης αιθυλικής αλκοόλης (σε θερμοκρασία δωματίου), καλή ανάμειξη και παραμονή για 2 min σε θερμοκρασία δωματίου. Το ίζημα πλασμιδιακού DNA παραλήφθηκε μετά από φυγοκέντρηση για 5min στις 10.000g και απομάκρυνση των αλάτων με διάλυμα αιθανόλης 70%. Ακολούθησε στέγνωμα του ιζήματος για 5-15 min σε θερμοκρασία δωματίου και επαναιώρηση του σε 30μl TE (10mM Tris-HCl, 0.1M EDTA), που περιείχε Ριβοζονουκλεάση σε συγκέντρωση 10μg/ml. Το πλασμιδιακό DNA αποθηκεύτηκε στους -20 °C.

2.11 Υβριδισμός κατά Southern στα μετασηματισμένα *V. dahliae* στελέχη

Υβριδισμός κατά Southern εφαρμόστηκε προκειμένου να επιβεβαιωθεί η αντικατάσταση του γονιδίου της *ACC συνθάσης* από τον αλληλόμορφο αντικατάστασης, όπως επίσης και ο αριθμός των ενθέσεων του αλληλομόρφου αντικατάστασης στο γονιδίωμα του μύκητα *V. dahliae*.

Για το σκοπό αυτό πραγματοποιήθηκε πέψη σε 20 μg γονιδιακού DNA αντιπροσωπευτικών μετασηματισμένων και αγρίων στελεχών του μύκητα με το περιοριστικό ένζυμο *Bam*HI για 12-16 h σε θερμοκρασία 37 °C. Τα τμήματα που προέκυψαν διαχωρίστηκαν με ηλεκτροφόρηση σε πηκτή αγαρόζης (0,7%) σε ρυθμιστικό διάλυμα TAE 1X, με εφαρμογή τάσης 20 Volt για 16-20 h. Μετά από χειρισμό της πηκτής με διάλυμα 0,25 M HCl για 10 min, διάλυμα αποδιάταξης (1,5 M NaCl & 0,5 M NaOH) για 20 min και διάλυμα εξουδετέρωσης (1,5 M NaCl & 0,5 M Tris, 1 mM EDTA) για 20 min, ακολούθησε αποτύπωση της πηκτής σε μεμβράνη Hybond (Nitrocellulose) με τριχοειδή μεταφορά (capillary blot) των τμημάτων DNA για 12-16 h. Μετά από προσήλωση του DNA στη μεμβράνη με εφαρμογή ακτινοβολίας UV για 3 min, η μεμβράνη τοποθετήθηκε σε σωλήνα υβριδισμού και πραγματοποιήθηκε προϋβριδισμός για 1 h στους 42°C σε διάλυμα υβριδισμού (5X SSC, 50% φορμαμίδιο, 0.01% N-Laurylsarconsine, 2% Blocking, 0.2 % SDS). Το τμήμα DNA που χρησιμοποιήθηκε ως ανιχνευτής είχε σημανθεί με διγοξυγενίνη (DIG) με αντίδραση PCR σύμφωνα με το nonradioactive Dig labeling and detection kit (Cat No. 1093657, Roche Diagnostics). Ποσότητα 300-400 ng ανιχνευτή DNA σε 7 μl διάλυμα υβριδισμού αποδιάταχθηκε σε κοχλάζων νερό για 10 min και προστέθηκε μαζί με νέο διάλυμα υβριδισμού (20 ml) στο σωλήνα που περιείχε τη μεμβράνη. Ακολούθησε υβριδισμός στους 42°C και περιστροφή 8 rev/min για 12-16 h. Ακολούθως, πραγματοποιήθηκε έκπλυση της περίσσειας ανιχνευτή με ανάδευση της μεμβράνης αρχικά σε wash solution I (2XSSC, 0.1% SDS) - δύο φορές

για 5 min σε θερμοκρασία δωματίου - και ακολούθως σε wash solution II (0.1XSSC, 0.1% SDS) - δύο φορές για 15 min σε θερμοκρασία 65°C.

Για την εμφάνιση, πραγματοποιήθηκε χειρισμός της μεμβράνης με Buffer 1 (maleic acid buffer, pH 7.5) για 1 min, ακολούθησε μπλοκάρισμα (blocking) της μεμβράνης με ανάδευση σε 100 ml Buffer 2 (1% Blocking reagent in Buffer 1) για 30 min. Το σύζευγμα DIG αντίσωματος - αλκαλικής φωσφατάσης διαλύθηκε σε συγκέντρωση 150 mU/ml (1:5000) σε 20 ml Buffer 2 και ακολούθησε επώαση της μεμβράνης με ανάδευση για 30 min σε θερμοκρασία 25°C. Το σύζευγμα DIG αντίσωματος-αλκαλικής φωσφατάσης απομακρύνθηκε με διπλή έκπλυση της μεμβράνης με ανάδευση για 15 min σε 100 ml Buffer 1. Μετά από εξισσορόπηση της μεμβράνης σε 20 ml Buffer 3 (0.1M NaCl, 0.1 Tris, 50mM MgCl₂) για 2 min ακολούθησε παραγωγή σήματος με CPD star (30 – 40 μl / cm² μεμβράνης) της εταιρείας Ammersham (Αγγλία) (RPN 3682, for chemiluminescent detection of alkaline phosphatase), μετά από έκθεση ειδικού φιλμ (X-Ray) για 15 – 30 min παρουσία της μεμβράνης και εμφάνιση σε σκοτεινό θάλαμο με κατάλληλα φωτογραφικά υγρά εμφάνισης και στερέωσης.

2.12 Απομόνωση RNA από το μύκητα *V.dahliae*

Η απομόνωση ολικού RNA από τα στελέχη του μύκητα *V. dahliae* πραγματοποιήθηκε με τη χρήση Trizol της εταιρείας Ambion (Αμερική) σύμφωνα με τις οδηγίες του κατασκευαστή. Για τη διαδικασία αυτή, όλα τα στελέχη αναπτύχθηκαν σε 50 ml θρεπτικού υποστρώματος SSN σε κωνικές φιάλες και μετά από 4-5 ημέρες συλλέχθηκε ο μυκηλιακός δακτύλιος από κάθε φιάλη και κονιορτοποιήθηκε με χρήση υγρού αζώτου σε αποστειρωμένα ιγδία. Ακολούθως, 80-100 mg κονιορτοποιημένου μυκηλίου τοποθετήθηκαν σε πλαστικό σωλήνα 1.5 ml και αναμείχθηκαν με 1 ml Trizol. Μετά από 5 min, ακολούθησε ανάμειξη με 200 μl χλωροφόρμιο, παραμονή για 3 min σε θερμοκρασία δωματίου και φυγοκέντρηση στις 12.000 rpm στους 4°C για 15 min. Η υπερκείμενη φάση μεταφέρθηκε σε νέο σωλήνα 1.5 ml και ακολούθησε εκχύλιση με ίσο όγκο φαινόλη: χλωροφόρμιο (1:1, v:v). Μετά από ανάδευση, φυγοκέντρηση (για 15 min στις 12.000 rpm και 4 °C) και μεταφορά της υπερκείμενης φάσης, ακολούθησε κατακρήμνιση των νουκλεϊκών οξέων με προσθήκη 500μl ισοπροπανόλης, ανάμειξη και παραμονή για 10 min σε θερμοκρασία δωματίου. Το ίζημα RNA παραλήφθηκε μετά από φυγοκέντρηση για 15 min στις 12.000 rpm και 4°C και απομάκρυνση των αλάτων με έκπλυση με διάλυμα αιθανόλης 70%. Ακολούθησε στέγνωμα του ιζήματος RNA για 5 – 10 min σε θερμοκρασία δωματίου και επαναιώρηση του σε 20μl αποστειρωμένο, απιονισμένο Mili-Q νερό (Millipore, USA), απαλλαγμένο από ριβοζονουκλεάσες (RNase free water). Το RNA φυλάχτηκε σε βαθιά κατάψυξη (-80°C) για περαιτέρω χρήση.

2.13 Αντίδραση αντίστροφης μεταγραφής

Η αντίδραση αντίστροφης μεταγραφής εφαρμόστηκε για τον καθορισμό του επιπέδου μεταγραφής (επίπεδα mRNA) του υπό μελέτη γονιδίου καθώς και του γονιδίου της β -τουμπουλίνης στο μύκητα *Verticillium dahliae* που χρησιμοποιήθηκε σαν γονίδιο αναφοράς.

Προκειμένου να αποφευχθεί η επιμόλυνση του RNA με DNA, πραγματοποιήθηκε αρχικά χειρισμός του RNA με ένζυμο δεσοξυριβοζονουκλεάσης (DNase, Invitrogen) και επώαση σε θερμοκρασία δωματίου για 15 min. Στη συνέχεια προστέθηκε 1μl EDTA και τα δείγματα επώαστηκαν στους 65 °C για 10 min έτσι ώστε να σταματήσει η αντίδραση. Για την αντίδραση αντίστροφης μεταγραφής χρησιμοποιήθηκε το ένζυμο της RevertAid MMLV αντίστροφης μεταγραφάσης της εταιρείας Fermentas.

Μετά την αποδιάταξη στους 65 °C για 5 min ποσότητας 0,1-5μg ολικού RNA με 0.5μg εκκινητή oligo-dT σε τελικό όγκο 11μl, η αντίδραση τοποθετήθηκε σε πάγο. Ακολούθησε προσθήκη των υπόλοιπων αντιδραστηρίων (Ρυθμιστικό διάλυμα αντίδρασης RT τελικής συγκέντρωσης 1X, DTT 10μM, μείγμα νουκλεοτιδίων τελικής συγκέντρωσης 1mM, 20 U παρεμποδιστή ριβοζονουκλεασών, 200 U ένζυμο RevertAid MMLV). Η αντίδραση πραγματοποιήθηκε σε τελικό όγκο 20 μl και επώαστηκε για 1 h στους 42 °C. Ακολούθησε απενεργοποίηση του ενζύμου στους 75 °C για 15 min. Για την ενίσχυση του μετάγραφου του υπό μελέτη γονιδίου πραγματοποιήθηκε αντίδραση PCR σε 1 μl από προϊόν της αντίδρασης αντίστροφης μεταγραφής (cDNA) χρησιμοποιώντας εκκινητές που είχαν σχεδιαστεί στις κωδικές περιοχές των υπό μελέτη γονιδίων.

2.14 Εφαρμογή PCR πραγματικού χρόνου (Real-time PCR)

Οι αντιδράσεις Real-time PCR πραγματοποιήθηκαν στο θερμοκυκλοποιητή Mx3005P™ (Stratagene) χρησιμοποιώντας κατάλληλα αντιδραστήρια (QuantiFast™ SYBR® Green PCR kit, QIAGEN). Σε κάθε σωλήνα αντίδρασης προστέθηκαν 100 ng ολικού DNA από τους ιστούς του υπέργειου τμήματος των φυτών τομάτας Ailsa Craig ή 1 μl cDNA από το άγριο και τα μεταλλαγμένα στελέχη στο ACS γονίδιο του μύκητα *V. dahliae*. Οι αντιδράσεις εκτελέστηκαν με τα αντιδραστήρια και τις αναλογίες όπως συνιστά η εταιρεία QIAGEN:

Αντιδραστήρια	Όγκος σε µl	Συγκέντρωση πυκνού δ/τος (stock)
RNase free H ₂ O	Έως τα 25 µl	
Ανοδικός εκκινητής	1	25µM
Καθοδικός εκκινητής	1	25µM
2X QuantiFast SYBR Green PCR Master Mix	12.5	-
DNA ή cDNA	1	100 ng/µl
Τελικός όγκος αντίδρασης	25	

Για τη ποσοτικοποίηση του άγριου και των μεταλλαγμένων στελεχών του μύκητα *V. dahliae* και για τον προσδιορισμό έκφρασης του γονιδίου της *ACC συνθάσης*, το πρόγραμμα θερμοκρασιών που χρησιμοποιήθηκε στις αντιδράσεις Real-time PCR περιελάμβανε τα εξής στάδια:

1. Αρχικό βήμα ενεργοποίησης της HotStarTaq Plus DNA πολυμεράσης για 5 λεπτά στους 95°C,
2. 40 κύκλοι που στον κάθε ένα πραγματοποιούνταν αποδιάταξη του DNA ή cDNA για 10 δευτερόλεπτα στους 95°C και ακολούθως συνδυασμένος υβριδισμός και επέκταση για 30 δευτερόλεπτα στους 60°C,
3. Στον τελευταίο κύκλο της αντίδρασης μετά από 1 λεπτό στους 95 °C και 30 δευτερόλεπτα στους 60°C πραγματοποιούνταν σταδιακή αύξηση της θερμοκρασίας κατά 0.5 °C κάθε 30 δευτερόλεπτα μέχρι τους 95°C προκειμένου να διαχωριστούν τα πιθανά διμερή που σχηματίζουν οι εκκινητές ή άλλα μη εξειδικευμένα προϊόντα.

Για την ποσοτικοποίηση του DNA του μύκητα στις επιμέρους αντιδράσεις, ως πρότυπα δείγματα (γνωστών συγκεντρώσεων) χρησιμοποιήθηκαν πλασμίδια στα οποία είχε κλωνοποιηθεί το γονίδιο ενδιαφέροντος (τμήμα της υπομονάδας 5.8S rRNA του *V. dahliae*). Η συγκέντρωση των ανασυνδυασμένων πλασμιδίων προσδιορίστηκε σε φασματοφωτόμετρο υπεριώδους ορατού (Helios Gamma & Delta, Spectronic Unicam, Cambridge, UK) με τη μέτρηση της οπτικής πυκνότητας των δειγμάτων στα 260 και 280 nm. Δείγματα γνωστών συγκεντρώσεων από τα ανασυνδυασμένα πλασμίδια (10 ng, 1 ng, 100 pg, ..., 1 fg/25 µl αντίδρασης) χρησιμοποιήθηκαν για τη δημιουργία πρότυπης καμπύλης βάση της οποίας έγινε η ποσοτικοποίηση του DNA του παθογόνου στα άγνωστα δείγματα. Για να διασφαλιστεί η ακρίβεια των μετρήσεων του φωτόμετρου που χρησιμοποιήθηκε ώστε να προσδιοριστούν οι συγκεντρώσεις των δειγμάτων

ολικού DNA από τους ιστούς, σχεδιάστηκε ζεύγος εκκινητών πάνω στο γονίδιο της β -τουμπουλίνης της τομάτας, το οποίο ενισχύει προϊόν μήκους 172 ζευγών βάσεων. Με αυτό τον τρόπο διασφαλίστηκε ότι οι αρχικές ποσότητες ολικού DNA οι οποίες χρησιμοποιήθηκαν ως εκμαγείο για το προσδιορισμό του παθογόνου σε όλες τις επιμέρους επεμβάσεις ήταν παρόμοιες, και καθιστούσαν δυνατή τη σύγκριση των αποτελεσμάτων ποσοτικοποίησης των μυκήτων. Η ποσοτικοποίηση της β -τουμπουλίνης πραγματοποιούνταν στην ίδια αντίδραση με τα αντίστοιχα δείγματα ποσοτικοποίησης του μύκητα.

Στα πειράματα ελέγχου του επιπέδου έκφρασης του γονιδίου της *ACC συνθάσης* στα μεταλλαγμένα στελέχη του *V. dahliae* η αποδοτικότητα (efficiency, E) για το κάθε ενισχυμένο προϊόν υπολογίστηκε με τη μέθοδο της γραμμικής παλινδρόμησης πάνω στα δεδομένα του λογαρίθμου φθορισμού ανά κύκλο με τη χρήση του λογισμικού LinRegPCR (Remakers et al., 2003). Η ενίσχυση της β -τουμπουλίνης πραγματοποιήθηκε με εξειδικευμένους εκκινητές. Η β -τουμπουλίνη χρησιμοποιήθηκε σαν εσωτερική σταθερά για την κανονικοποίηση μικρών διαφορών στις αρχικές ποσότητες cDNA. Για την ανάλυση των αποτελεσμάτων υπολογίστηκε η τιμή του μέσου όρου του οριακού κύκλου (threshold cycle, Ct) για κάθε γονίδιο. Η έκφραση του υπό μελέτη γονιδίου υπολογίστηκε με τη μέθοδο $DCt [(1+E)^{-}]$ (Pfaffl, 2001) ως εξής:

1. υπολογίζεται ο μέσος όρος Ct από τα βιολογικά δείγματα για κάθε στέλεχος.
2. Οι τιμές Ct της β -τουμπουλίνης αφαιρέθηκαν από τις αντίστοιχες τιμές Ct του κάθε στελέχους (DCt).
3. Τα επίπεδα έκφρασης των υπό μελέτη γονιδίων προκύπτουν από την εξίσωση $(1+E)$ (όπου E είναι η αποδοτικότητα για το κάθε ενισχυμένο προϊόν).

Οι τιμές των κύκλων (Ct) όπου οι καμπύλες των δειγμάτων προσέγγιζαν την βασική γράμμη (Ct) εκτιμούνται από το φθορισμό της χρωστικής SYBR Green με την χρήση του λογισμικού MxPro (Stratagene).

2.15 Μετασηματισμός του μύκητα *V. dahliae* με το γονίδιο της πράσινης και κόκκινης φθορίζουσας πρωτεΐνης

Δύο από τα στελέχη του μύκητα *V. dahliae*, που χρησιμοποιήθηκαν στα πειράματα παθογένειας (wild type, $\Delta ACS 18.7$), μετασηματίστηκαν με την κασέτα έκφρασης του γονιδίου της πράσινης και κόκκινης φθορίζουσας πρωτεΐνης (GFP, DS-Red), προκειμένου να είναι δυνατή η ιστοπαθολογική παρατήρηση της διαδικασίας μόλυνσης, ώστε να διερευνηθεί περαιτέρω ο ρόλος του υπό μελέτη γονιδίου στην παθογένεια.

Για τον μετασηματισμό του μύκητα *V. dahliae* (Mullins et al., 2001), παρασκευάστηκαν τα απαραίτητα υλικά σύμφωνα με τον πίνακα X. Στη συνέχεια, κλώνος *Agrobacterium*, που έφερε

δυναμικό φορέα με το γονίδιο ανθεκτικότητας στην γενετισίνη και την κασέτα έκφρασης του γονιδίου *GFP* υπό τον έλεγχο του υποκινητή *GAPD* του μύκητα *Cochliobolus heterostrophus* και κλώνος *Agrobacterium* που έφερε το δυναμικό φορέα με το γονίδιο ανθεκτικότητας στη γενετισίνη και την κασέτα έκφρασης του γονιδίου *DS-Red* υπό τον έλεγχο του υποκινητή *GAPD* (*Cochliobolus heterostrophus*) (που μας παραχώρησε ο καθηγητής S. Kang, Pennsylvania State University, USA), επώαστηκε σε Minimal Medium (MM) στους 28°C με περιστροφή 250 rpm για 2 ημέρες. Τα κύτταρα του *Agrobacterium* (φυλή AGL1) αραιώθηκαν σε υλικό Induction Medium (IM), που περιείχε καναμυκίνη και ακετοσυρινγκόνη, μέχρι να αποκτήσουν οπτική πυκνότητα (OD) 0.15 και επώαστηκαν για 6 h στους 28°C με περιστροφή 250 rpm. Ακολούθησε ανάμειξη 400μl αιωρήματος κονιδίων του μύκητα *V. dahliae* (συγκέντρωσης 10⁶ κονίδια/ml) με 400μl ανεπτυγμένης καλλιέργειας *Agrobacterium* και άπλωμα 200 μl σε αποστειρωμένη μεμβράνη Hybond που είχε τοποθετηθεί σε υλικό συγκαλλιέργειας (Co-cultivation medium). Μετά από συγκαλλιέργεια δύο ημερών οι μεμβράνες Hybond μεταφέρθηκαν σε υλικό επιλογής (PDA) που περιείχε κατάλληλη συγκέντρωση του αντιβιοτικού γενετισίνη, 200 μM σεφοταξίμη και 100 μg/ml μοξαλακτάμη. Οι μετασηματισμένες αποικίες του μύκητα εμφανίστηκαν μετά από 3-4 μέρες επώασης στο υλικό επιλογής. Οι αποικίες που αναπτύχθηκαν υποβλήθηκαν σε διαδοχικές αραιώσεις και τα *GFP* και *Ds-Red* στελέχη που προέκυψαν από βλάστηση μεμονωμένου κονιδίου επιλέχθηκαν με βάση τον ικανοποιητικό *GFP* και *Ds-Red* φθορισμό. Ακολούθως επιβεβαιώθηκε ότι η παθογόνος ικανότητα των μετασηματισμένων *GFP* και *Ds-Red* στελεχών ήταν όμοια σε σχέση με το άγριο στέλεχος.

Πίνακας 1.3 : Παρασκευή πυκνών διαλυμάτων και υλικών για ATMT μετασηματισμό

Διαλύματα Αντιδραστήρια	Πυκνό διάλυμα (100 ml) ¹		MM ²	IM ³	CM ⁴
	Χημική Ουσία	Ποσότητα	Ποσότητα για παρασκευή 100 ml		
Phosphate-buffer (pH 7.0)	K ₂ HPO ₄	20,00 g	1,00 ml	1,00 ml	1,00 ml
	KH ₂ PO ₄	14,50 g			
M-N	MgSO ₄ 7H ₂ O	3,00 g	2,00 ml	2,00 ml	2,00 ml
	NaCl	1,50 g			
1% CaCl ₂ · 2H ₂ O	CaCl ₂ · 2H ₂ O	1,00 g	0,10 ml	0,10 ml	0,10 ml
Διάλυμα ιχνοστοιχείων	ZnSO ₄ 7H ₂ O	0,01 g	1,00 ml	1,00 ml	1,00 ml

	CuSO ₄ 5H ₂ O	0,01 g			
	H ₃ BO ₃	0,01 g			
	MnSO ₄ H ₂ O	0,01 g			
	Na ₂ MoO ₄ 2H ₂ O	0,01 g			
20% NH ₄ NO ₃	NH ₄ NO ₃	20,00 g	0,25 ml	0,25 ml	0,25 ml
20% Γλυκόζη	Γλυκόζη	20,00 g	1,00 ml	1,00 ml	1,00 ml
0.01% FeSO ₄	FeSO ₄	0,01 g	1,00 ml	1,00 ml	1,00 ml
50% Γλυκερόλη	Γλυκερόλη	50 ml	-	1,00 ml	1,00 ml
1M MES (pH 5.3)	MES	21,32 g	-	4,00 ml	4,00 ml
Αποστειρωμένο H ₂ O			93,5 ml	88,5 ml	88,50 ml
Καναμυκίνη (50mg/ml)			0.15 ml	0.15 ml	0,15 ml
Ακετοσυριγγκόνη (200 μM)			-	0.2 ml	0,20 ml
Agar			-	-	1,50 g

¹ Όλα τα πυκνά διαλύματα παρασκευάστηκαν σε απιονισμένο νερό, με εξαίρεση την ακετοσυριγγκόνη που παρασκευάστηκε σε 95% αιθανόλη. Το πυκνό αυτό διάλυμα δεν αποστειρώθηκε επιπλέον. Τα διαλύματα καναμυκίνης και MES αποστειρώθηκαν με διέλευση από φίλτρο 0.22-μm. ^{2, 3, 4} Τα υλικά MM (minimal medium), IM (induction medium, υλικό επαγωγής) και CM (co-cultivation medium, υλικό συγκαλλιέργειας) παρασκευάστηκαν σύμφωνα με τον πίνακα 2.3.1, χωρίς την προσθήκη καναμυκίνης, ακετοσυριγγκόνης και MES (τα οποία προστέθηκαν κατά τον μετασχηματισμό). Ακολούθησε αποστείρωση για 20 λεπτά στους 120 °C, με πίεση 1 atm. Όλα τα παραπάνω υλικά και διαλύματα διατηρήθηκαν στους 4°C, με εξαίρεση τα διαλύματα καναμυκίνης, ακετοσυριγγκόνης και MES που αποθηκεύτηκαν στους -20°C.

2.16 Ιστοπαθολογική παρατήρηση της διαδικασίας αποίκησης του μύκητα στο ριζικό σύστημα και στα αγγεία του ξύλου φυτών τομάτας με συνεστιακό μικροσκόπιο φθορισμού (confocal fluorescence microscope)

Προκειμένου να οπτικοποιηθεί η διαδικασία μόλυνσης του άγριου και του μεταλλαγμένου ΔACS 18.7 στελέχους του μύκητα *V. dahliae* πραγματοποιήθηκε ιστοπαθολογική παρατήρηση της διαδικασίας αποίκησης του μύκητα σε φυτά τομάτας με συνεστιακό μικροσκόπιο φθορισμού.

Σπόροι τομάτας της ποικιλίας Ailsa Craig τοποθετήθηκαν μετά από προβλάστηση 2 ημερών σε γλαστράκια διαμέτρου 6 cm που περιείχαν περίπου 200 cm³ χαλαζιακή άμμο (για την

ιστοπαθολογική παρατήρηση στο ριζικό σύστημα) και σε γλαστράκια διαμέτρου 15 cm που περιείχαν περίπου 300 cm³ χώμα (για την ιστοπαθολογική παρατήρηση των αγγείων του ξύλου). Τέσσερις εβδομάδες μετά τη φύτευση τα φυτά ξεριζώθηκαν και εμβαπτίστηκαν για 20 min σε αιώρημα κονιδίων συγκέντρωσης 10⁷ κονίδια/ml των υπό μελέτη στελεχών που είχαν μετασηματιστεί με την κασέτα έκφρασης της κόκκινης φθορίζουσας πρωτεΐνης, Ds-Red.

Επιμήκης τομή τμήματος του ριζικού συστήματος και ιστού από το στέλεχος των φυτών τοποθετήθηκε σε αντικειμενοφόρους πλάκες και η παρακολούθηση της αλληλεπίδρασης πραγματοποιήθηκε 24 h, 5 και 10 ημέρες μετά τη μόλυνση των φυτών σε μικροσκόπιο φθορισμού Confocal Leica TCS SP5 (Leica Microsystems GmbH, Wetzlar, Germany) με 63.0 x καταδυτικό φακό ύδατος NA 1.2, με εστίαση 20X. Η παρατήρηση πραγματοποιήθηκε με κατάλληλα φίλτρα (excitation 561 nm laser line, emission 573-624 nm, channel 1).

2.17 Μέτρηση του ACC με αέριο χρωματογράφο

Για να διερευνηθεί αν τα απενεργοποιημένα στο ACS γονίδιο στελέχη του μύκητα *V. dahliae* εμφανίζουν μειωμένη παραγωγή αιθυλενίου σε σχέση με το άγριο στέλεχος, πραγματοποιήθηκε εκτίμηση της παραγωγής αιθυλενίου μέσω της πρόδρομης ουσίας ACC (1-aminocyclopropane-1-carboxylic-acid).

Το άγριο στέλεχος καθώς και τα μεταλλαγμένα στελέχη ΔACS 18.6-18.7, AT 70-49 και AT 70-56 εμβολιάστηκαν σε κωνικές φιάλες που περιείχαν 1 lt θρεπτικό υπόστρωμα SSN και καλλιεργήθηκαν υπό ανάδευση στις 140 rpm και στους 25°C ώστε να παραχθεί ικανοποιητική ποσότητα μυκηλίου. Ακολούθησε λυοφιλίωση του μυκηλίου, ομογενοποίηση 0.8 gr λυοφιλιωμένου ιστού με 16 ml HCl σε Ultra Turax για 2 λεπτά και διήθηση με φίλτρα Whatman. Ακολούθως, 3 ml ομογενοποιημένου φιλτραρισμένου δείγματος μεταφέρθηκε σε φιαλίδια με ειδικά πώματα από σιλικόνη (rubber septum). Η αντίδραση απελευθέρωσης - μετατροπής αιθυλενίου μέσω του ACC πραγματοποιήθηκε με την προσθήκη 0,5 ml χλωριούχου υδράργυρου (HgCl₂) 0.1M και 0,5 ml διαλύματος χλωρίνης-καυστικού νατρίου (NaOH) σε αναλογία 2:1. Ακολούθησε έντονη ανάδευση (vortex) διάρκειας 1 λεπτού για την απελευθέρωση του αερίου και στη συνέχεια 1 ml από τον υπερκείμενο του δείγματος χώρο του φιαλιδίου, αναρροφήθηκε με κατάλληλη σύριγγα και εφαρμόστηκε στον αέριο χρωματογράφο. Από κάθε αντίδραση πραγματοποιούνταν 2 ενέσεις, ενώ πραγματοποιήθηκαν 3 επαναλήψεις για κάθε στέλεχος.

Από τα χρωματογραφήματα που προέκυψαν μετρήθηκαν τα ύψη των κορυφών, και η ποσότητα του αιθυλενίου υπολογίστηκε για κάθε στέλεχος ως αναλογία του ύψους της κορυφής που προέκυψε από το πρότυπο δείγμα (standard) ACC γνωστής συγκέντρωσης.

Αν συμβολισθεί με :

- H_s , το ύψος της κορυφής, όπως προκύπτει από τη μέτρηση του αιθυλενίου για το standard ACC συγκέντρωσης 1 μMH_A , το ύψος της κορυφής όπως προκύπτει από τη μέτρηση του αιθυλενίου, για το κάθε δείγμα
- X , τη συγκέντρωση ACC που περιέχεται σε κάθε δείγμα που εξετάζεται, προκύπτει:

Από 1 μM ACC προκύπτει H_s

Από $x=?$ μM ACC προκύπτει H_A

Έτσι υπολογίστηκε η συγκέντρωση σε μM του ACC για κάθε στέλεχος.

2.18 Φαινοτυπικός χαρακτηρισμός στελεχών με απενεργοποιημένο γονίδιο ACS

Για την αξιολόγηση των φαινοτυπικών χαρακτηριστικών των μετασχηματισμένων στελεχών στο γονίδιο της ACC συνθάσης καταγράφηκε η μυκηλιακή τους αύξηση και η ικανότητα σχηματισμού μικροσκληρωτίων σε σχέση με το άγριο στέλεχος. Για το σκοπό αυτό, δίσκος 6 mm από την περιφέρεια ανεπτυγμένης καλλιέργειας (10 – 15 ημερών) των υπό μελέτη στελεχών τοποθετήθηκε στο κέντρο τριβλίων που περιείχαν Minimal Medium (Puhalla and Mayfield, 1974), SSN agar και Czapek dox agar (Tuite, 1969). Πραγματοποιήθηκαν πέντε επαναλήψεις ανά στέλεχος για κάθε θρεπτικό υλικό. Η διάμετρος της αποικίας καταγράφηκε σε χρονικά διαστήματα 2 ημερών για 21 ημέρες μέχρι οι μύκητες να καλύψουν όλη την επιφάνεια του τριβλίου. Επίσης, καταγράφηκε η χρονική στιγμή έναρξης σχηματισμού μικροσκληρωτίων καθώς

και η πυκνότητα τους τόσο για τα υπό εξέταση μετασχηματισμένα στελέχη όσο και για το αγρίου τύπου στέλεχος.

3. ΑΠΟΤΕΛΕΣΜΑΤΑ

3.1 Έλεγχος απενεργοποίησης και επανενσωμάτωσης του γονιδίου της *ACC* συνθάσης στα στελέχη του *V. dahliae*.

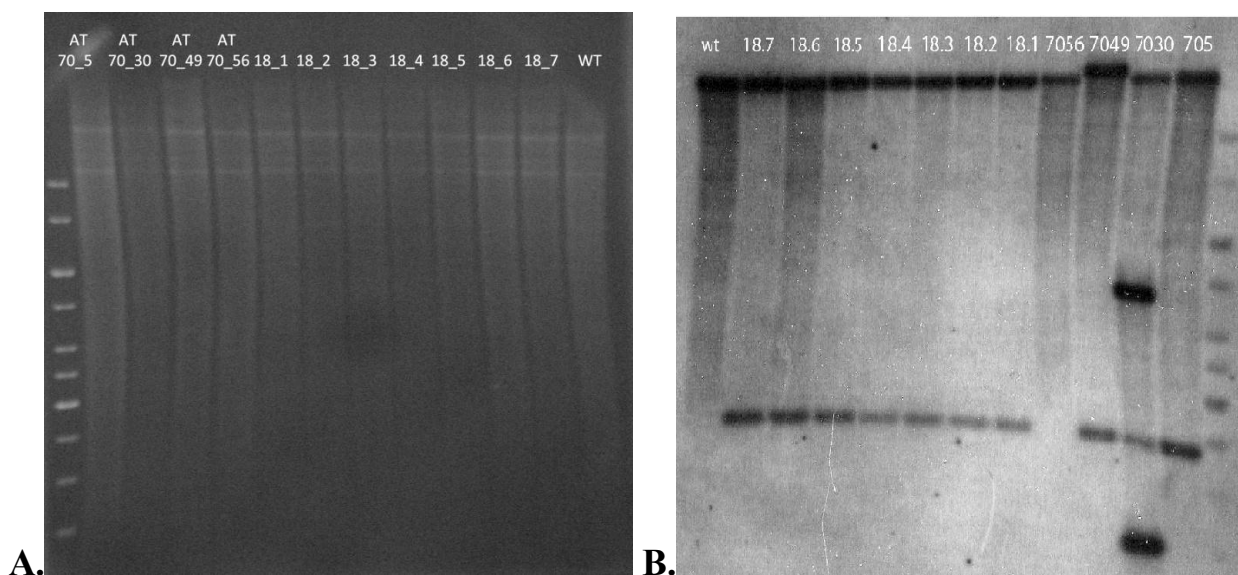
Όλα τα μεταλλαγμένα στελέχη του *V. dahliae* στο γονίδιο της *ACC* συνθάσης (*ACS*) μετασηματίστηκαν με τη χρήση του μεταθετού στοιχείου TN5. Η θέση ένθεσης του TN5 μεταθετού στοιχείου και της κασέτας ανθεκτικότητας στην υγρομυκίνη, εντοπίστηκαν στο δεύτερο εξόνιο του γονιδίου ανάμεσα στο 1113 και 1122 νουκλεοτίδιο μετά από αλληλούχιση.

Για τον έλεγχο απενεργοποίησης του γονιδίου *ACS* και επανενσωμάτωσης του λειτουργικού αντιγράφου του γονιδίου, πραγματοποιήθηκε αντίδραση PCR με εξειδικευμένους εκκινητές, όπου ο ανοδικός εκκινητής σχεδιάστηκε έτσι ώστε να υβριδίζει σε περιοχή του γονιδίου πριν τη θέση ένθεσης του TN5 ενώ ο καθοδικός εκκινητής να υβριδίζει σε περιοχή μετά τη θέση ένθεσης του TN5. Τα προϊόντα της αντίδρασης ήταν τα αναμενόμενα αφού στο άγριο στέλεχος ενισχύθηκε τμήμα 636 βάσεων του γονιδίου *ACS* (Εικόνα 3.1, διαδρομές 1, 2), ενώ το προϊόν ενίσχυσης στα απενεργοποιημένα στελέχη ήταν μεγαλύτερο εφόσον περιελάμβανε το μεταθετό στοιχείο και την κασέτα ανθεκτικότητας στην υγρομυκίνη (Εικόνα 3.1, διαδρομές 3-9).



Εικόνα 3.1 : Έλεγχος μετασηματισμένων στελεχών για την απενεργοποίηση του γονιδίου *ACS* εφαρμόζοντας PCR σε γονιδιακό DNA του άγριου και των μετασηματισμένων στελεχών *V. dahliae*. Διαδρομές 1, 2 : ενίσχυση τμήματος 636 βάσεων στο άγριο στέλεχος. Διαδρομές 3-9: ενίσχυση του ίδιου τμήματος στα μεταλλαγμένα στελέχη το οποίο περιείχε το μεταθετό στοιχείο και την κασέτα ανθεκτικότητας στην υγρομυκίνη. Διαδρομή 10: ενίσχυση του ίδιου τμήματος στο συμπληρωματικό στέλεχος 70-5 Διαδρομές 11, 12 : ενίσχυση τμήματος 639 βάσεων στα συμπληρωματικά στελέχη AT 70-30 και AT 70-49. Διαδρομή 15 : ενίσχυση τμήματος 639 βάσεων σε πλασμίδιο στο οποίο είχε κλωνοποιηθεί το λειτουργικό γονίδιο *ACS*.

Επιπλέον, πραγματοποιήθηκε υβριδισμός κατά Southern ώστε να διαπιστωθεί ο αριθμός των ενθέσεων του TN5 στο γονιδίωμα των ACS μεταλλαγμένων στελεχών. Για τη διαδικασία αυτή χρησιμοποιήθηκε το παραπάνω τμήμα 636 βάσεων του ACS γονιδίου ως ανιχνευτής. Ο ανιχνευτής ενισχύθηκε από πλασμίδιο που έφερε τον αλληλόμορφο επανενσωμάτωσης του λειτουργικού ACS γονιδίου. Τα αποτελέσματα του υβριδισμού κατά Southern επιβεβαίωσαν την ενσωμάτωση του TN5 μεταθετού στοιχείου και απέκλεισαν το ενδεχόμενο περισσότερων ενθέσεων στα απενεργοποιημένα στελέχη ΔACS 18.1-18.7 όπως φαίνεται στην εικόνα 3.2B όπου όλα τα απενεργοποιημένα στελέχη εμφανίζουν δύο πανομοιότυπες ζώνες. Επίσης επιβεβαιώθηκε ότι η επανενσωμάτωση του λειτουργικού αντιγράφου του ACS γονιδίου στο συμπληρωματικό στέλεχος AT 70-30 έγινε εκτοπικά (εικόνα 3.2 B, διαδρομή 11)), ενώ στα στελέχη AT 70-49 και AT 70-56 με αντικατάσταση αφού παρουσιάζουν ίδια εικόνα με το άγριο στέλεχος (εικόνα 3.2 B διαδρομές 1,9,10). Πιο συγκεκριμένα η μεμονωμένη ζώνη που ανιχνεύτηκε (Εικόνα 3.2 B , διαδρομή 1) αντιστοιχεί στο άγριο στέλεχος, οι διπλές ζώνες (Εικόνα 3.2 B, διαδρομές 2-8) στα ΔACS 18.1-18.7 και οι υπόλοιπες στα συμπληρωματικά στελέχη AT 70-56, AT 70-49, AT 70-30 και AT 70-5 αντίστοιχα (Εικόνα 3.2 B, διαδρομές 9-12). Η εικόνα του συμπληρωματικού στελέχους AT 70-5 δεν ήταν δυνατόν να εξηγηθεί από την παρούσα ανάλυση.



Εικόνα 3.2 : Ανάλυση μετασηματισμένων *V. dahliae* στελεχών ως προς την απενεργοποίηση του γονιδίου ACS με υβριδισμό κατά Southern **A)** Ηλεκτροφόρηση της πένης, με BamHI, γονιδιακού DNA του άγριου στελέχους (διαδρομή 12), των μεταλλαγμένων στελεχών με απενεργοποιημένο το γονίδιο ACS (Διαδρομές 5-11) και των συμπληρωματικών στελεχών (Διαδρομές 1-4) **B)** Υβριδισμός κατά Southern στο αποτύπωμα πηκτής αгарόζης που ανιχνεύει διπλή ζώνη στα μεταλλαγμένα στελέχη ΔACS 18.1-18.7(διαδρομές 2-8). Το ενδογενές γονίδιο ACS ανιχνεύεται τόσο στο άγριο στέλεχος όσο και στα συμπληρωματικά στελέχη

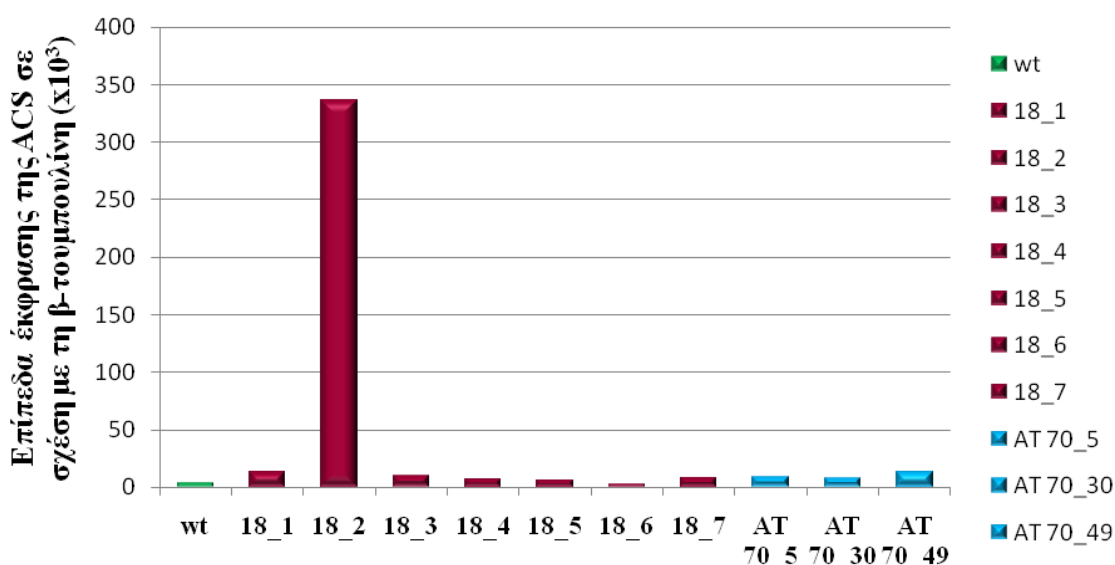
AT 70-56 και AT 70-49 (διαδρομές 1,9,10), ενώ στο στέλεχος AT 70-30 φαίνονται οι εκτοπικές ενθέσεις του ACS αλληλόμορφου αντικατάστασης (διαδρομή 11).

3.2 Έλεγχος επιπέδου έκφρασης του γονιδίου ACS στα μεταλλαγμένα στελέχη του *V. dahliae*

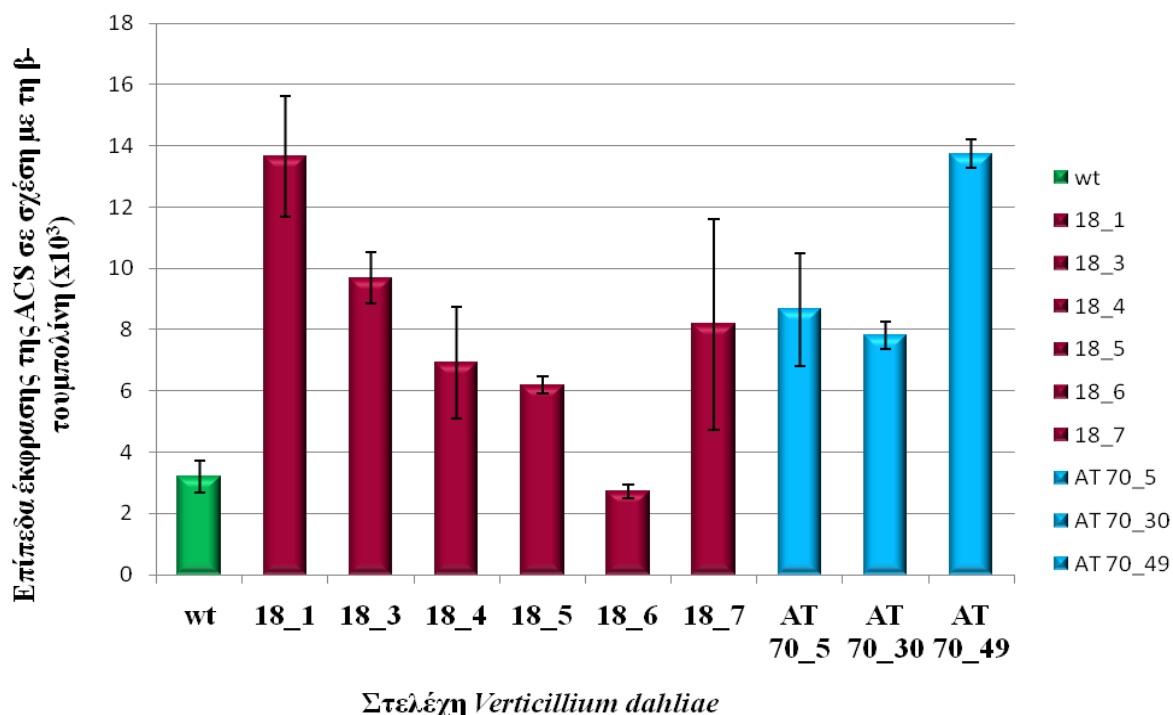
Τα μεταλλαγμένα στελέχη καθώς και το άγριο στέλεχος του μύκητα *V. dahliae* μελετήθηκαν ως προς τα επίπεδα έκφρασης του γονιδίου ACS, με αντιδράσεις Real Time PCR (RT-PCR). Για τον έλεγχο του επιπέδου έκφρασης του ACS πραγματοποιήθηκαν συνολικά τρία πειράματα.

Στο πρώτο πείραμα χρησιμοποιήθηκαν οι εκκινητές ACS-RNA-F και ACS_RNA-R (Πίνακας 1) που ενίσχυαν τμήμα 236 βάσεων του γονιδίου ACS πριν το μεταθετό στοιχείο. Στο πείραμα αυτό πραγματοποιήθηκαν τρεις επαναλήψεις ανά στέλεχος. Στα ίδια στελέχη υπολογίστηκαν επίσης τα επίπεδα έκφρασης του γονιδίου αναφοράς β -τουμπουλίνη χρησιμοποιώντας τους εκκινητές VdBt-F και VdBt-R (Πίνακας 1). Τα αποτελέσματα του πρώτου πειράματος δεν ήταν τα αναμενόμενα, καθώς τα επίπεδα έκφρασης του γονιδίου ACS για το άγριο στέλεχος διέφεραν από τα Δ ACS 18.1-18.7 στελέχη τα οποία εμφάνισαν παραδόξως υψηλότερα επίπεδα έκφρασης (εικόνα 3.3A). Από τα Δ ACS στελέχη κανένα δεν έδωσε μηδενική έκφραση. Αντιθέτως τα Δ ACS 18.1, 18.2 και 18.3 δεν διέφεραν σημαντικά με τα συμπληρωματικά στελέχη που έδωσαν υψηλά επίπεδα έκφρασης σε σχέση με το άγριο στέλεχος αλλά και τα μετασηματισμένα στελέχη στο ACS γονίδιο (εικόνα 3.3B). Σημαντική διαφορά παρουσίασε το στέλεχος Δ ACS 18.6 με 80% χαμηλότερη έκφραση από το AT 70-49 συμπληρωματικό στέλεχος, όπως και το Δ ACS 18.7 στέλεχος με 40% χαμηλότερη έκφραση (Εικόνα 3.3B).

A.



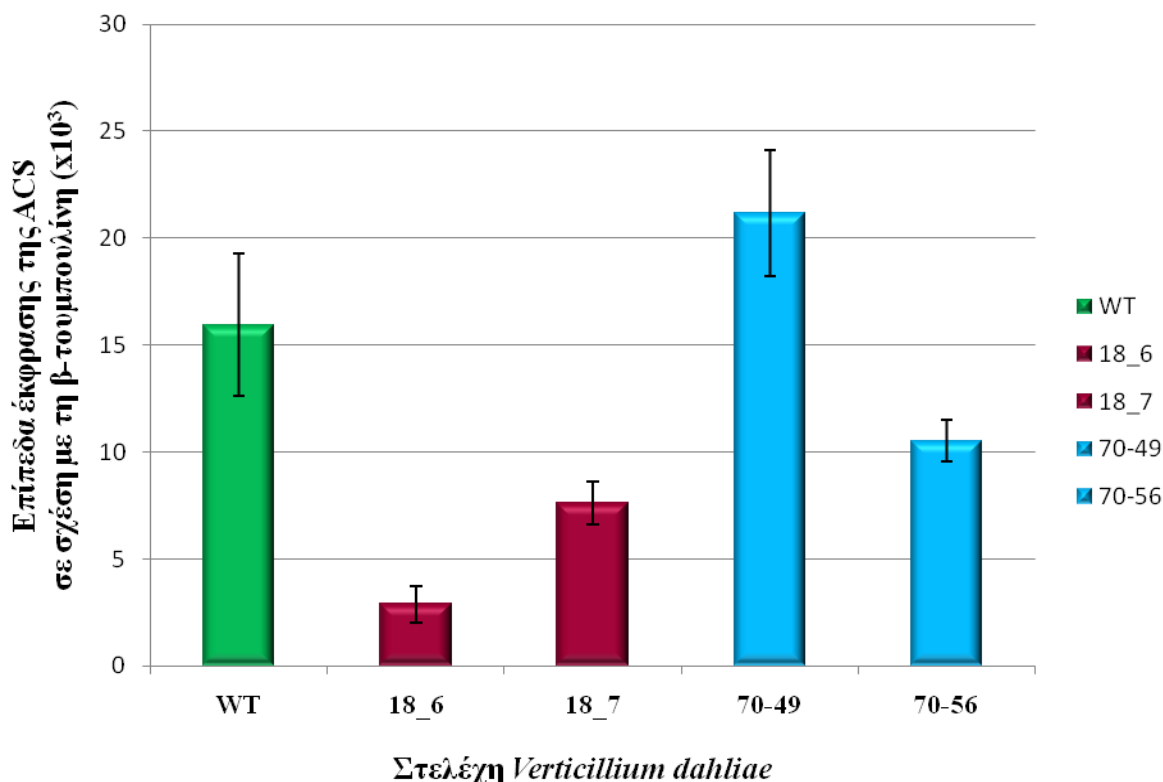
B.



Εικόνα 3.3 : Α) Επίπεδα έκφρασης του γονιδίου ACS στο άγριο στέλεχος WT, στα μετασχηματισμένα στελέχη Δ ACS 18.1-18.7 και στα συμπληρωματικά στελέχη AT 70-5, AT 70-30, AT 70-49 του μύκητα *V. dahliae*. Απομονώθηκε RNA από μία καλλιέργεια ανά στέλεχος. Έγινε αντίστροφη μεταγραφή του poly (A)⁺ - RNA σε cDNA που χρησιμοποιήθηκε σε αντιδράσεις Real- Time PCR. Τα επίπεδα μεταγραφών στα διαφορετικά δείγματα κανονικοποιήθηκαν με βάση το γονίδιο αναφοράς B-tubulin του μύκητα *V. dahliae*. Οι στήλες αντιπροσωπεύουν τους μέσους όρους των καλλιεργειών των μυκήτων και οι κάθετες ράβδοι την απόκλιση από το μέσο όρο με βάση το τυπικό σφάλμα. **Β)** Επίπεδα έκφρασης του γονιδίου ACS ως άνω χωρίς το μετασχηματισμένο στέλεχος Δ ACS 18.2.

Το δεύτερο πείραμα έκφρασης επαναλήφθηκε για ορισμένα στελέχη. Με βάση τα αποτελέσματα της πρώτης αντίδρασης RT-PCR, επιλέχθηκαν τα Δ ACS 18.6 και 18.7 (το οποίο σε παλαιότερα πειράματα παθογένειας που πραγματοποιήθηκαν στο εργαστήριο Φυτοπαθολογίας σε επίπεδο πτυχιακών μελετών) προκάλεσε μικρότερο ποσό ασθένειας σε φυτά τομάτας (σε σχέση με το άγριο στέλεχος) και τα συμπληρωματικά στελέχη AT 70-49 και AT 70-56. Πραγματοποιήθηκαν τρεις επαναλήψεις ανά στέλεχος τόσο για το υπό μελέτη γονίδιο όσο και για το γονίδιο αναφοράς, β -τουμπολίνη. Τα αποτελέσματα ήταν τα αναμενόμενα. Το Δ ACS 18.7 στέλεχος έδωσε 43% χαμηλότερη έκφραση από το άγριο στέλεχος, το Δ ACS 18.6 82% χαμηλότερη έκφραση, ενώ τα επίπεδα έκφρασης των συμπληρωματικών στελεχών ήταν ίδια ή

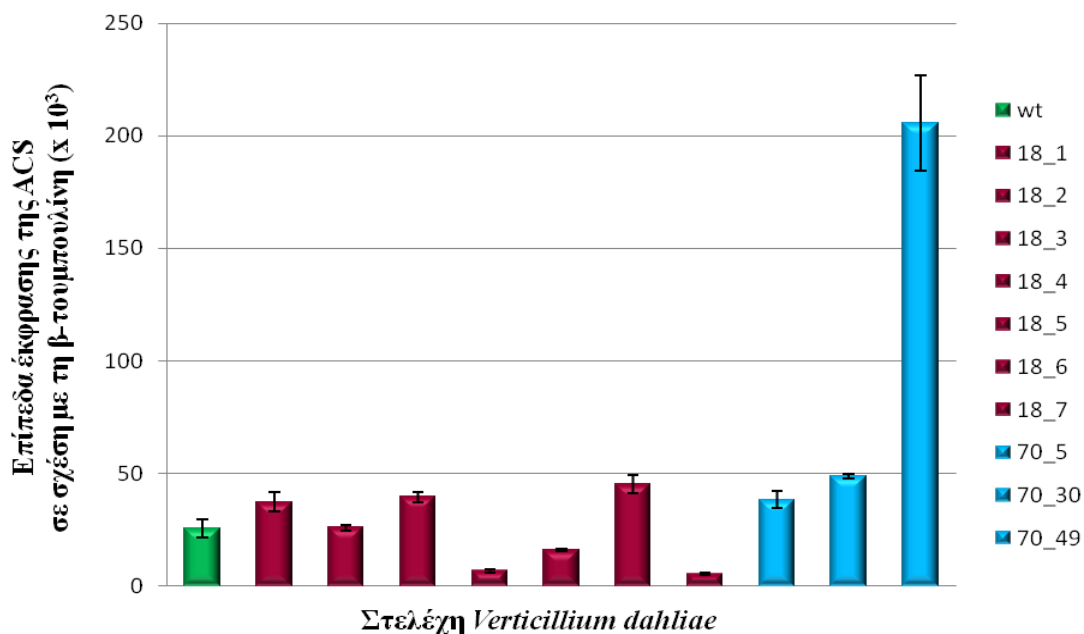
υψηλότερα με αυτά του άγριου στελέχους, με το AT 70-49 να δίνει υψηλότερα επίπεδα έκφρασης (Εικόνα 3.4).



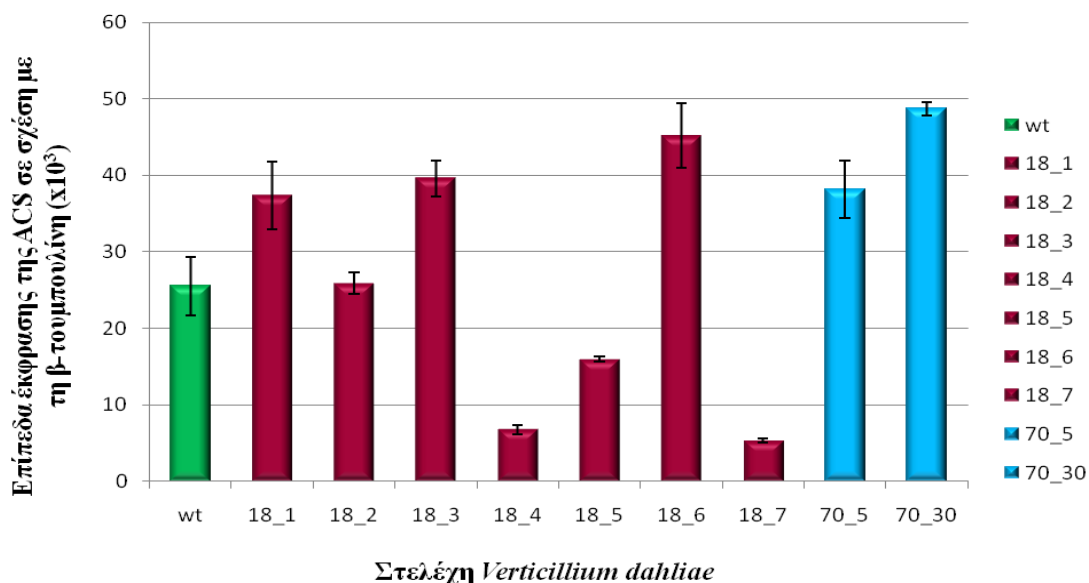
Εικόνα 3.4 : Επίπεδα έκφρασης του γονιδίου ACS στο άγριο στέλεχος WT, στα μετασηματισμένα στελέχη ΔACS 18.6 και ΔACS 18.7 και στα συμπληρωματικά στελέχη AT 70-49 και AT 70-56 του μύκητα *V. dahliae*. Απομονώθηκε RNA από μία καλλιέργεια ανά στέλεχος. Έγινε αντίστροφη μεταγραφή του poly (A)⁺ - RNA σε cDNA που χρησιμοποιήθηκε σε αντιδράσεις Real- Time PCR. Τα επίπεδα μεταγραφών στα διαφορετικά δείγματα κανονικοποιήθηκαν με βάση το γονίδιο αναφοράς B-tubulin του μύκητα *V. dahliae*. Οι στήλες αντιπροσωπεύουν τους μέσους όρους των καλλιεργειών των μυκήτων και οι κάθετες ράβδοι την απόκλιση από το μέσο όρο με βάση το τυπικό σφάλμα.

Το τρίτο πείραμα ελέγχου των επιπέδων έκφρασης του γονιδίου της *ACC* συνθάσης πραγματοποιήθηκε για όλα τα στελέχη με τη χρήση διαφορετικού ζεύγους εκκινητών που ενίσχυε τμήμα 356 βάσεων του γονιδίου, μετά τη θέση ένθεσης του μεταθετού στοιχείου TN5. Πραγματοποιήθηκαν ομοιοτρόπως τρεις επαναλήψεις ανά στέλεχος τόσο για το υπό μελέτη γονίδιο όσο και για το γονίδιο αναφοράς, β-τουμπουλίνη. Τα αποτελέσματα ήταν αρκετά διαφοροποιημένα από τα δύο προηγούμενα πειράματα,. Τα ΔACS 18.7 και ΔACS 18.4 στελέχη έδωσαν 80% χαμηλότερη έκφραση από το άγριο στέλεχος, το ΔACS 18.5 40% χαμηλότερη έκφραση ενώ τα ΔACS 18.1, 18.2, 18.3 και 18.6 στελέχη έδωσαν ίδια ή υψηλότερη έκφραση σε σχέση με το άγριο στέλεχος. Τα συμπληρωματικά στελέχη εμφάνισαν υψηλά επίπεδα έκφρασης του γονιδίου ACS με το AT 70-49 να δίνει 90% υψηλότερη έκφραση από το άγριο στέλεχος (Εικόνα 3.5 A και 3.6 B).

A.



B.



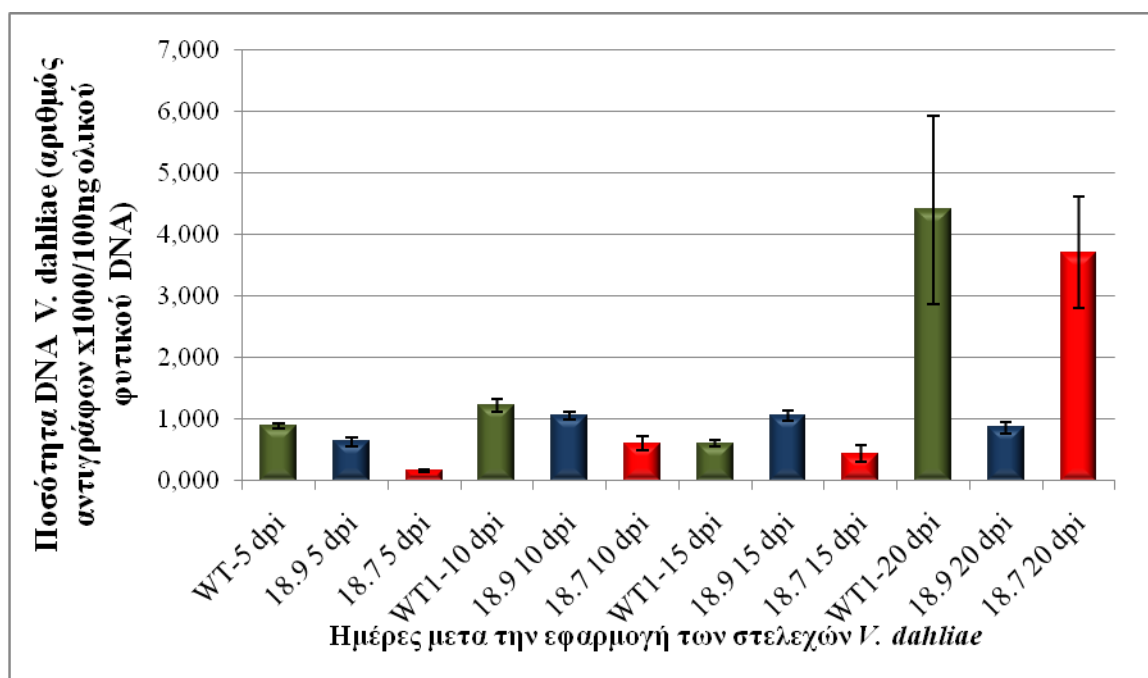
Εικόνα 3.5 : **A)** Επίπεδα έκφρασης του γονιδίου ACS στο άγριο στέλεχος WT, στα μετασηματισμένα στελέχη Δ ACS 18.1-18.7 και στα συμπληρωματικά στελέχη AT 70-5, AT 70-30 και AT 70-49 του μύκητα *V. dahliae*. Απομονώθηκε RNA από μία καλλιέργεια ανά στέλεχος. Έγινε αντίστροφη μεταγραφή του poly (A)⁺ - RNA σε cDNA που χρησιμοποιήθηκε σε αντιδράσεις Real- Time PCR. Τα επίπεδα μεταγραφών στα διαφορετικά δείγματα κανονικοποιήθηκαν με βάση το γονίδιο αναφοράς B-tubulin του μύκητα *V. dahliae*. Οι στήλες αντιπροσωπεύουν τους μέσους όρους των καλλιεργειών των μυκήτων και οι κάθετες ράβδοι την απόκλιση από το μέσο όρο με βάση το τυπικό σφάλμα. **B)** Επίπεδα έκφρασης του γονιδίου ACS ως άνω χωρίς το συμπληρωματικό στέλεχος AT 40-49.

3.3 Ποσοτικοποίηση του άγριου στελέχους, του ΔACS 18.7 και του εκτοπικού στελέχους 18.9 του μύκητα *V. dahliae* σε φυτά τομάτας Ailsa Craig.

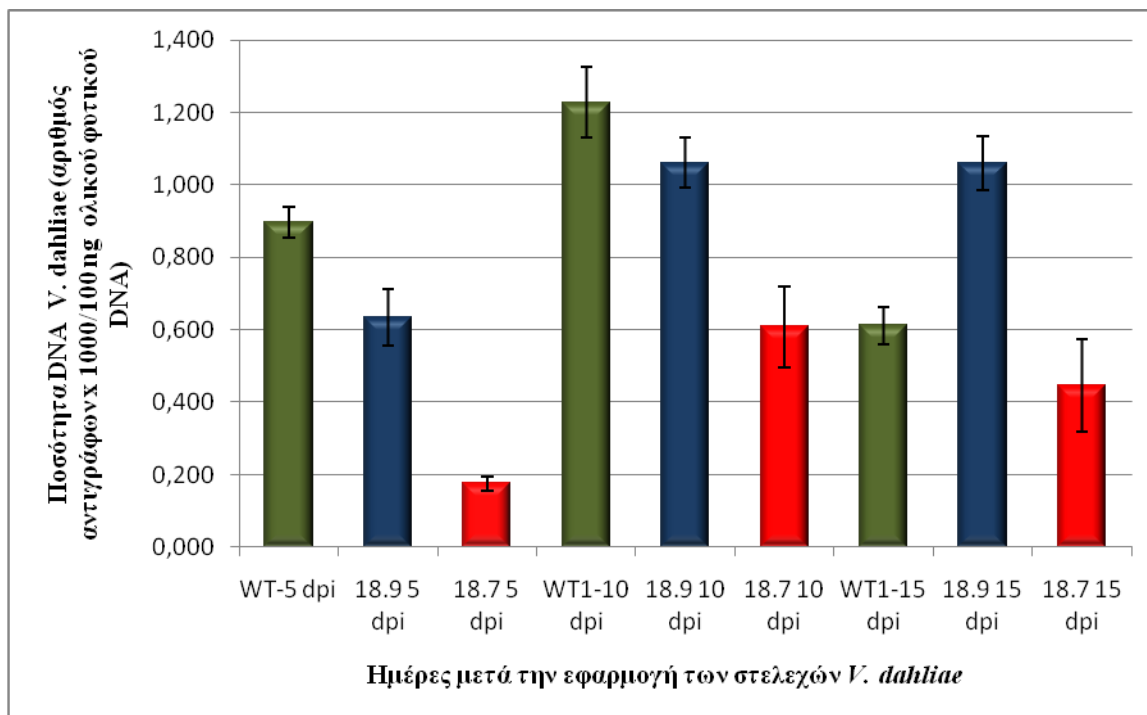
Για να διαπιστωθεί εάν η χαμηλή έκφραση του γονιδίου της ACC συνθάσης επηρεάζει την αποίκιση και ανάπτυξη του μύκητα *V. dahliae* στους αγγειακούς ιστούς, φυτά τομάτας της ποικιλίας Ailsa Craig μολύνθηκαν με το άγριο στέλεχος *V. dahliae*, με το ΔACS 18.7 και το εκτοπικό στέλεχος 18.9., όπως αναφέρεται στην παράγραφο 2.3. Η ποσοτικοποίηση της βιομάζας πραγματοποιήθηκε για τα παραπάνω στελέχη με αντιδράσεις Real Time PCR σε τέσσερις χρονικές στιγμές 5, 10, 15 και 20 ημέρες μετά τη μόλυνση. Πραγματοποιήθηκαν τρεις επαναλήψεις ανά στέλεχος για κάθε χρονική στιγμή. Ως εσωτερική σταθερά για την κανονικοποίηση μικρών διαφορών στις αρχικές ποσότητες DNA που χρησιμοποιήθηκαν στις αντιδράσεις Real Time PCR χρησιμοποιήθηκε το γονίδιο της *β-τουμπουλίνης*, η ποσότητα της οποίας ήταν σταθερή για όλα τα δείγματα και ως συνέπεια τα αποτελέσματα της ποσοτικοποίησης ήταν αξιόπιστα.

Η ανάλυση των αποτελεσμάτων της Real Time PCR έδειξε ότι στις 5 ημέρες μετά τη μόλυνση, το άγριο στέλεχος και το εκτοπικό στέλεχος 18.9 είχαν ήδη αποικίσει και αναπτυχθεί μέσα στο αγγειακό σύστημα σε σημαντικά μεγαλύτερο βαθμό από το ΔACS 18.7 στέλεχος. Η ίδια εικόνα παρατηρήθηκε μέχρι και τη χρονική στιγμή των 15 ημερών, με το ΔACS 18.7 να παρουσιάζει χαμηλότερα ποσοστά αποίκησης από το άγριο στέλεχος και το 18.9. Στις 20 ημέρες ωστόσο παρατηρήθηκε απότομη αύξηση της βιομάζας τόσο του άγριου στελέχους όσο και του μεταλλαγμένου ΔACS 18.7.

A.



B.



Εικόνα 3.6 : Α) Ποσοτικοποίηση DNA του άγριου στελέχους WT του μετασχηματισμένου στελέχους Δ ACS 18.7 και του εκτοπικού στελέχους 18.9 του μύκητα *Verticillium dahliae* σε φυτά τομάτας ποικιλίας Ailsa Craig. Τα επίπεδα του DNA του μύκητα υπολογίστηκαν με Real-time PCR σε ολικό DNA που απομονώθηκε από τα στελέχη 5 φυτών ανά στέλεχος 5, 10, 15 και 20 ημέρες μετά την εφαρμογή του μύκητα. Το πείραμα επαναλήφθηκε τρεις φορές. Οι στήλες αναπαριστούν τους μέσους όρους από 15 φυτά και οι κάθετες ράβδοι αντιπροσωπεύουν την απόκλιση από το μέσο όρο με βάση το τυπικό σφάλμα. **Β)** Ποσοτικοποίηση DNA του άγριου στελέχους WT του μετασχηματισμένου στελέχους Δ ACS 18.7 και του εκτοπικού στελέχους 18.9 του μύκητα *Verticillium dahliae* σε φυτά τομάτας ποικιλίας Ailsa Craig ως άνω χωρίς την επέμβαση των 20 ημερών.

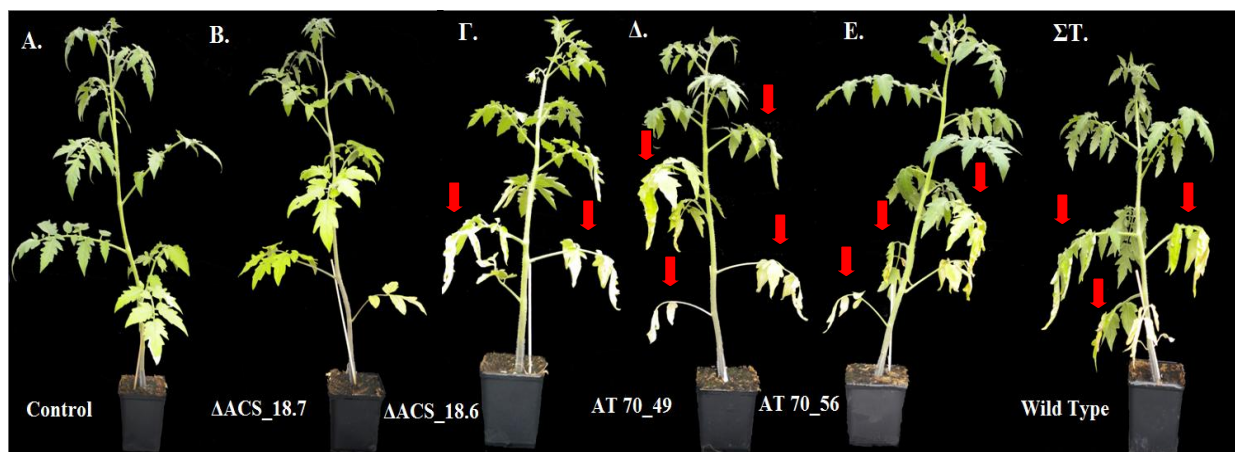
3.4 Πειράματα παθογένειας μεταλλαγμένων ACS στελεχών *V. dahliae* σε φυτά τομάτας ποικιλίας Ailsa Craig.

Για να διερευνηθεί ο ρόλος του γονιδίου της *ACC συνθάσης* στην παθογένεια του μύκητα *V. dahliae*, φυτά τομάτας της ποικιλίας Ailsa Craig μολύνθηκαν με το άγριο στέλεχος, τα μεταλλαγμένα Δ ACS 18.6 και 18.7 στελέχη και με τα συμπληρωματικά AT 70-49 και AT 70-56 με τον τρόπο που περιγράφεται στην παράγραφο 2.3. Τα συμπτώματα καταγράφηκαν στις 5, 8, 11, 14, και 20 ημέρες μετά την εφαρμογή των στελεχών *V. dahliae*.



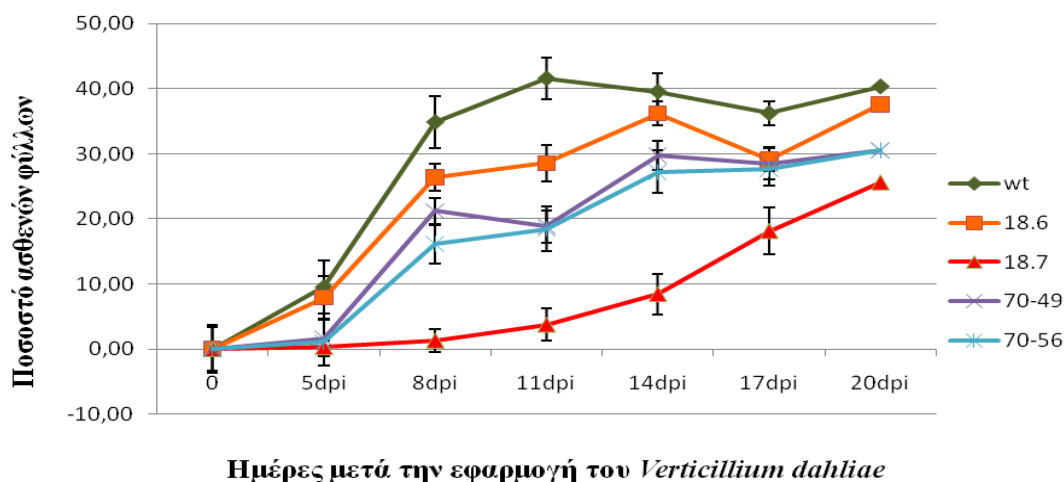
Εικόνα 3.7 : Φαινοτυπική εικόνα φυτών τομάτας ποικιλίας Ailsa Craig στο θερμοκήπιο, 18 ημέρες μετά τη μόλυνση τους με το άγριο στέλεχος WT, τα μεταλλαγμένα στελέχη $\Delta ACS18.6$ και $\Delta ACS 18.7$ και τα συμπληρωματικά στελέχη AT 70-49 και AT 70-56 του μύκητα *V. dahliae*.

Τα πρώτα συμπτώματα μάρανσης εμφανίστηκαν στα φυτά που είχαν μολυνθεί με το άγριο και το $\Delta ACS 18.6$ στέλεχος στις 5 ημέρες μετά την εφαρμογή τους. Τα φυτά που είχαν μολυνθεί με τα στελέχη AT 70-49 και AT 70-56 έδειξαν τα πρώτα συμπτώματα στις 8 ημέρες μετά τη μόλυνση και παρέμειναν κοντά στα επίπεδα του άγριου στελέχους καθ' όλη τη διάρκεια του πειράματος. Τα φυτά που μολύνθηκαν με το $\Delta ACS 18.7$ στέλεχος παρουσίασαν σημαντικά λιγότερα συμπτώματα σε σχέση με αυτά που μολύνθηκαν με το άγριο στέλεχος μέχρι και τις 11 ημέρες μετά την εφαρμογή τους. Πιο αναλυτικά, την 11^η ημέρα η σοβαρότητα της ασθένειας (ποσοστό ασθενών φύλλων προς το συνολικό αριθμό των φύλλων) στα φυτά που είχαν μολυνθεί με το $\Delta ACS 18.7$ στέλεχος ήταν 4% σε σχέση με το άγριο στέλεχος που ήταν 41%. Επίσης η ασθένεια που προκάλεσε το $\Delta ACS18.7$ ήταν στατιστικά χαμηλότερη από όλα τα υπόλοιπα στελέχη που χρησιμοποιήθηκαν σε κάθε χρονική στιγμή που πραγματοποιήθηκε καταμέτρηση της ασθένειας. Το $\Delta ACS 18.6$ στέλεχος σε όλες τις μετρήσεις ήταν κοντά στα επίπεδα ασθένειας του άγριου στελέχους στις 5, 14, 17 και 20 ημέρες μετά τη μόλυνση (Εικόνα 3.9).



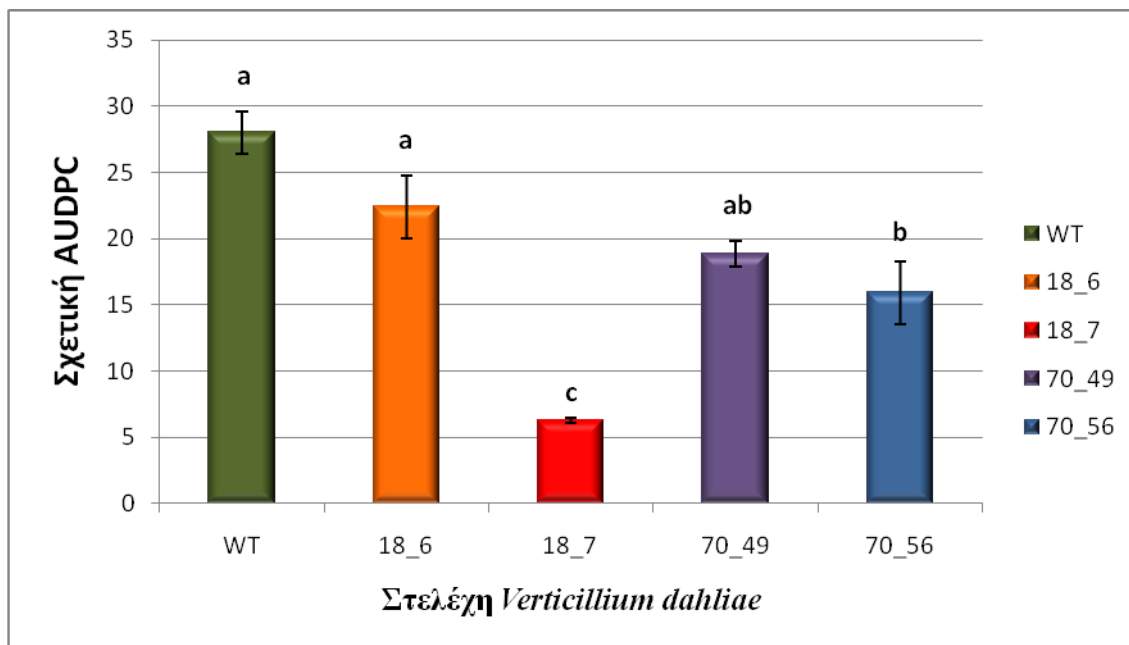
Εικόνα 3.8 : Αντιπροσωπευτικά φυτά τομάτας ποικιλίας Ailsa Craig, 18 ημέρες μετά τη μόλυνση τους με το άγριο στέλεχος WT, τα μετασχηματισμένα στελέχη *ΔACS 18.7* και *ΔACS18.6* και τα συμπληρωματικά στελέχη AT 70-49 και AT 70-56 του μύκητα *V. dahliae*. Τα φυτά μολύνθηκαν με 10 ml αιωρήματος 1×10^7 κονίδια *V. dahliae* και η εξέλιξη της ασθένειας καταγράφηκε μέχρι 20 ημέρες μετά τη μόλυνση. Τα φυτά που είχαν μολυνθεί με τα *ΔACS 18.6*, wild type και AT 40-49 και AT 70-56 ανέπτυξαν αντιπροσωπευτικά συμπτώματα μάρανσης των φύλλων (Γ, Δ, Ε, ΣΤ) σε σχέση με τα φυτά του αμόλυντου μάρτυρα (Α) και στα φυτά στα οποία είχε εφαρμοστεί το στέλεχος *ΔACS 18.7* (Β) που εμφάνισαν μειωμένα συμπτώματα χλώρωσης και μάρανσης.

Στις 20 ημέρες μετά τη μόλυνση το ποσοστό των ασθενών φυτών που είχαν μολυνθεί με το άγριο στέλεχος, το *ΔACS 18.6* και τα AT 70-49 και AT 70-56 στελέχη ήταν 100% και η σοβαρότητα της ασθένειας 40.3%, 37.6%, 30.6% και 30.5% αντίστοιχα, ενώ το ποσοστό ασθενών φυτών για το *ΔACS18.7* στέλεχος ήταν 85% με σοβαρότητα ασθένειας 25.6%.



Εικόνα 3.9 : Ποσοστό ασθενών φύλλων σε φυτά τομάτας Ailsa Craig μετά την εφαρμογή του άγριου στελέχους WT, των μεταλλαγμένων στελεχών *ΔACS 18.6* και *ΔACS 18.7* και των συμπληρωματικών στελεχών AT 70-49 και AT 70-56 του μύκητα *Verticillium dahliae*. Η ένταση της ασθένειας υπολογίστηκε για κάθε μέρα καταγραφής των συμπτωμάτων ως ποσοστό (%) του αριθμού των ασθενών φύλλων ως προς τον συνολικό αριθμό των φύλλων για κάθε φυτό. Για το κάθε στέλεχος χρησιμοποιήθηκαν 10 φυτά και τα πειράματα επαναλήφθηκαν 2 φορές. Οι στήλες αντιπροσωπεύουν τους μέσους όρους 20 φυτών και οι κάθετες ράβδοι αντιπροσωπεύουν την απόκλιση από το μέσο όρο με βάση το τυπικό σφάλμα.

Όταν η εξέλιξη της ασθένειας εκφράστηκε σε ποσοστό ασθένειας βάση AUDPC διαπιστώθηκε ότι η ασθένεια που προκλήθηκε από το στελέχος ΔACS 18.7 ήταν στατιστικά χαμηλότερη τόσο από το άγριο όσο και από τα υπόλοιπα στελέχη που χρησιμοποιήθηκαν. Η σχετική AUDPC του στελέχους ΔACS 18.7 ήταν 6.3%, του άγριου στελέχους 28%, του ΔACS 18.6 22.4% και των AT 70-49 και AT 70-56 18.8% και 15.9% αντίστοιχα.



Εικόνα 3.10 : Οι τιμές της ασθένειας αναπαραστάθηκαν γραφικά στην εξέλιξη του χρόνου για τη δημιουργία καμπύλης της εξέλιξης της ασθένειας. Ακολούθως υπολογίστηκε το εμβαδόν κάτω από τη καμπύλη εξέλιξης της ασθένειας (AUDPC) με τη μέθοδο της τραπεζοειδούς ολοκλήρωσης (Campbell και Madden, 1990) και η ασθένεια εκφράστηκε ως το ποσοστό του μέγιστου εμβαδού για όλη τη διάρκεια του πειράματος, που αναφέρεται ως σχετική AUDPC (Korolev et al., 2001). Οι στήλες που συνοδεύονται από διαφορετικό γράμμα διαφέρουν σημαντικά σύμφωνα με τη μέθοδο πολλαπλών μέσων κατά Tukey, σε επίπεδο σημαντικότητας $P \leq 0,05$.

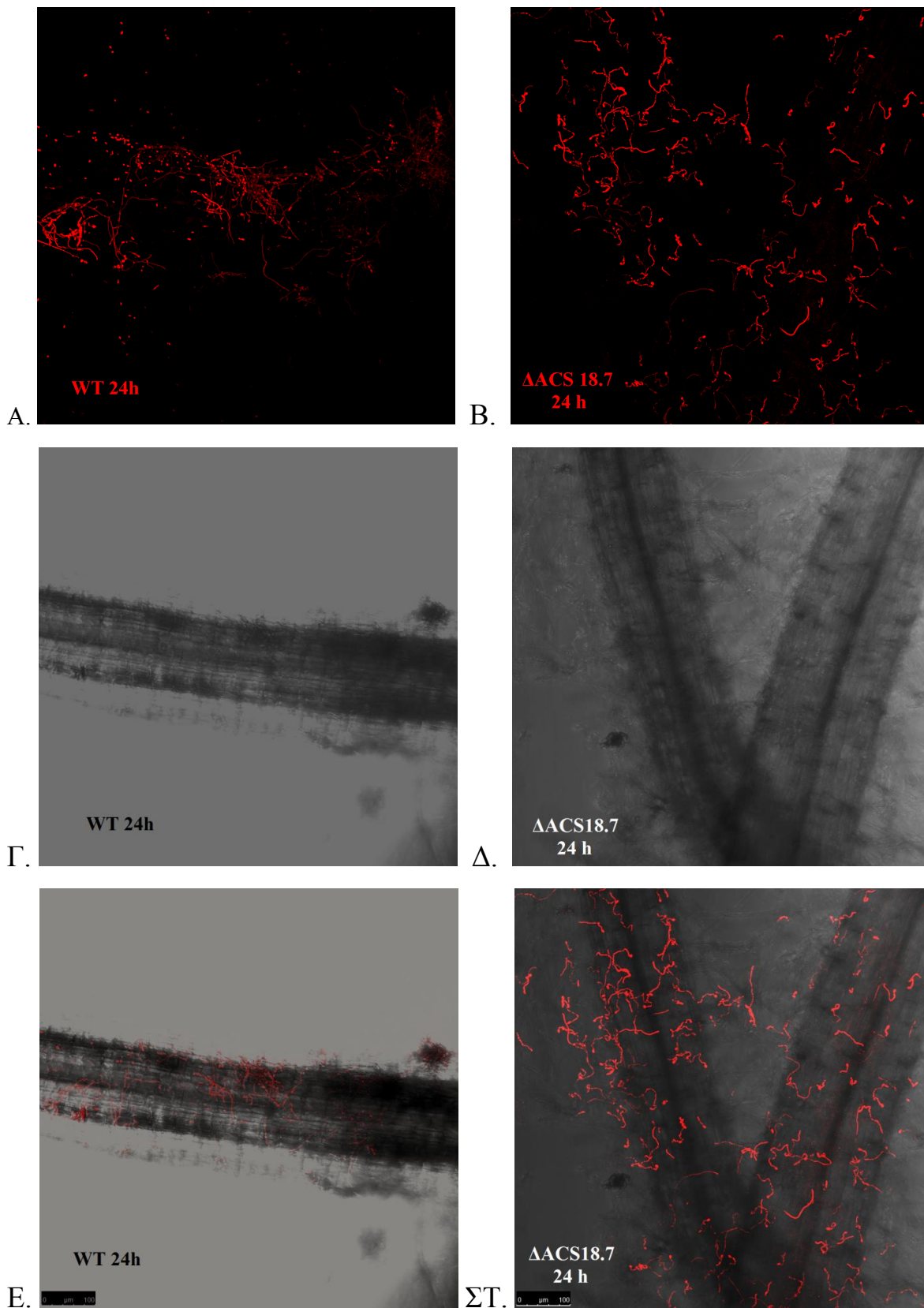
3.5 Ιστοπαθολογική παρατήρηση της διαδικασίας μόλυνσης του άγριου στελέχους και του μεταλλαγμένου στελέχους ΔACS 18.7 σε φυτά τομάτας Ailsa Craig.

Για την ιστοπαθολογική παρατήρηση της διαδικασίας μόλυνσης, το άγριο στέλεχος του μύκητα *V. dahliae* και το ΔACS 18.7 μετασηματίστηκαν με τη κασέτα έκφρασης του γονιδίου Ds-Red έτσι ώστε να φθορίζουν κόκκινα (Εικόνα 3.11), όπως αναφέρεται στην παράγραφο 2.15. Τα στελέχη αυτά χρησιμοποιήθηκαν για τη μόλυνση φυτών τομάτας ποικιλίας Ailsa Craig και ακολούθησε μικροσκοπική παρατήρηση της αλληλεπίδρασης σε συνεστιακό μικροσκόπιο φθορισμού ηλεκτρονικής απεικόνισης. Έγιναν παρασκευάσματα από ρίζες και στελέχη μολυσμένων φυτών τομάτας σε αντικειμενοφόρους πλάκες 1, 5 και 10 ημέρες μετά τη μόλυνση.

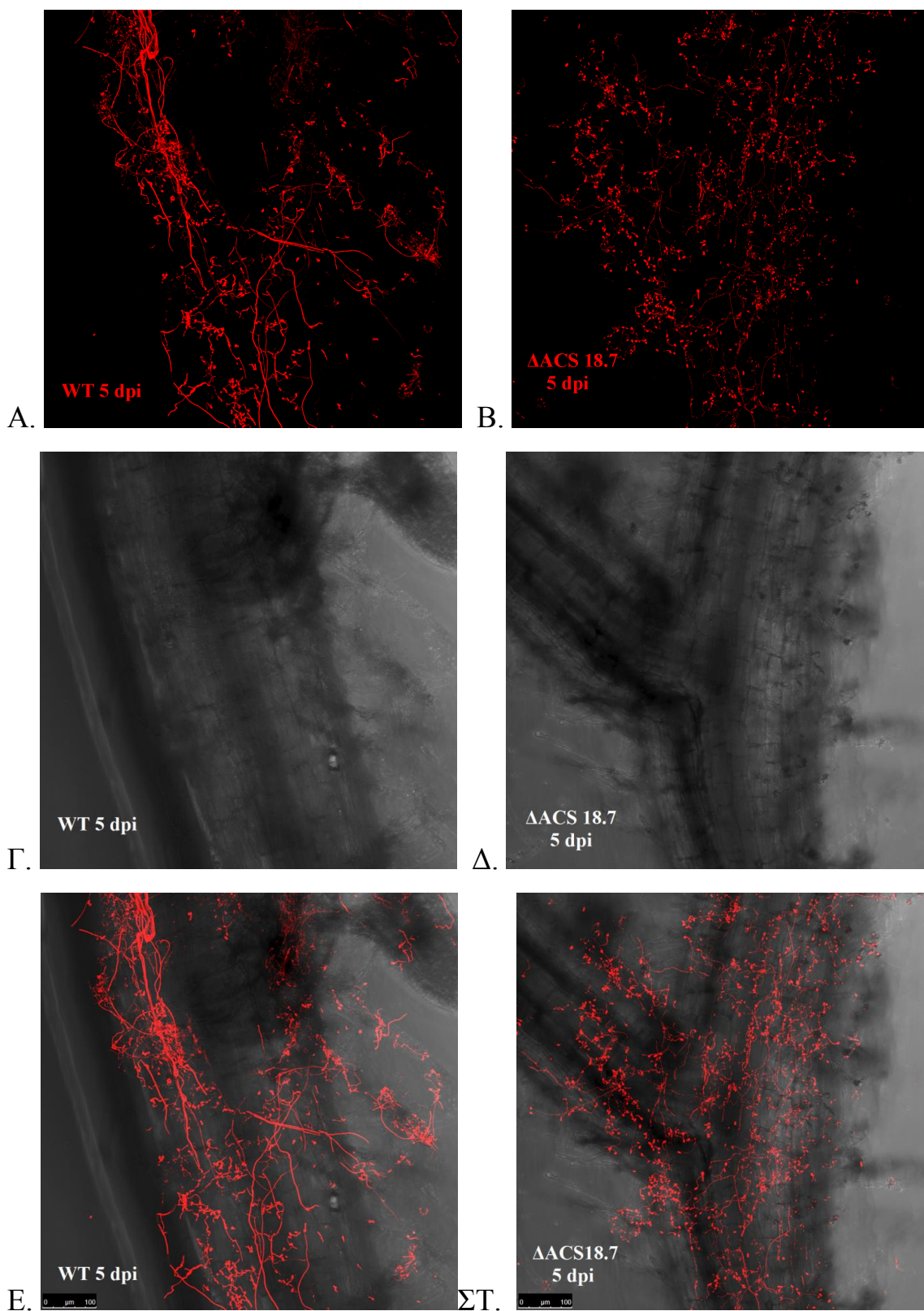


Εικόνα 3.11 : Καλλιέργειες σε υγρό θρεπτικό υπόστρωμα SSN του άγριου στελέχους WT και του ΔACS 18.7 μετασηματισμένα με την κασέτα έκφρασης του γονιδίου Ds-Red.

Πιο αναλυτικά 24 ώρες μετά τη μόλυνση, πολυάριθμα βλαστημένα κονίδια και των δύο στελεχών βρίσκονταν προσκολλημένα στα ριζίδια και την επιφάνεια των ριζών (Εικόνα 3.12 Ε και ΣΤ). Στις 5 ημέρες μετά τη μόλυνση, υφές τόσο του άγριου στελέχους όσο και του ΔACS 18.7 είχαν αναπτυχθεί επί των ριζών, ωστόσο οι υφές του άγριου στελέχους ήταν εμφανώς περισσότερες σε σχέση με το ΔACS 18.7 (Εικόνα 3.13 Ε και ΣΤ).

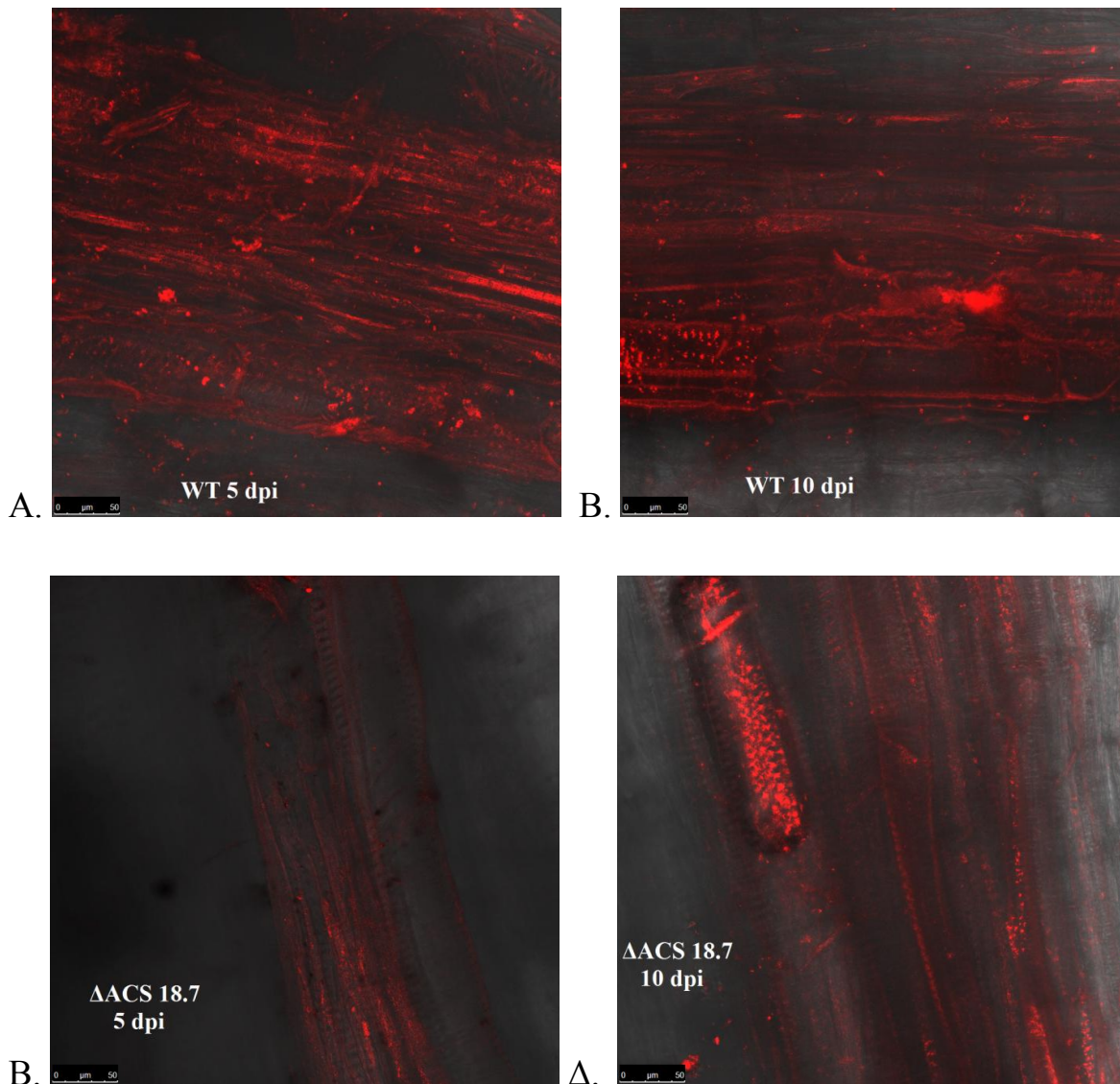


Εικόνα 3.12 : Μικροσκοπική παρατήρηση αποικισμού ριζών φυτών τομάτας ποικιλίας Ailsa Craig από το άγριο στέλεχος WT και το $\Delta ACS 18.7$ του μύκητα *V. dahliae* 24 ώρες μετά τη μόλυνση με συνεστιακό μικροσκόπιο φθορισμού ηλεκτρονικής απεικόνισης. Κονίδια και των δύο Ds-Red στελεχών του *V. dahliae* έχουν εγκατασταθεί πάνω στη ρίζα των φυτών (Ε, ΣΤ). Α-Β : Απεικόνιση των Ds-Red στελεχών WT και $\Delta ACS 18.7$,Γ-Δ : Brightfield απεικόνιση των ριζών φυτών τομάτας.



Εικόνα 3.13 : Μικροσκοπική παρατήρηση αποικισμού ριζών φυτών τομάτας ποικιλίας Ailsa Craig από το άγριο στέλεχος WT και το ΔACS 18.7 του μύκητα *V. dahliae* 5 ημέρες μετά τη μόλυνση, με συνεστιακό μικροσκόπιο φθορισμού ηλεκτρονικής απεικόνισης. Υφές τόσο του άγριου στελέχους όσο και του ΔACS 18.7 είχαν αναπτυχθεί επί των ριζών, ωστόσο οι υφές του άγριου στελέχους ήταν εμφανώς περισσότερες σε σχέση με το ΔACS 18.7 (Ε, ΣΤ). Α-Β : Απεικόνιση των Ds-Red στελεχών WT και ΔACS 18.7 ,Γ-Δ : Brightfield απεικόνιση των ριζών φυτών τομάτας.

Ανάπτυξη υφών παρατηρήθηκε και κατά μήκος των αγγείων του υπέργειου στελέχους, με εμφανείς διαφορές όμως ανάμεσα στα δύο στελέχη τόσο στις 5 όσο και στις 10 ημέρες μετά τη μόλυνση. Το ΔACS 18.7 στέλεχος φάνηκε να αποικίζει λιγότερο το στέλεχος των φυτών και στις δύο επεμβάσεις 5 και 10 ημέρες μετά την εφαρμογή του, (Εικόνα 3.14 Γ και 3.14 Δ) σε σύγκριση με το άγριο στέλεχος όπου οι ιστοί των φυτών φαίνονταν να έχουν αποικηθεί εξολοκλήρου (Εικόνα 3.14 Α και 3.14 Β).



Εικόνα 3.14 : Μικροσκοπική παρατήρηση αποικισμού στελεχών φυτών τομάτας ποικιλίας Ailsa Craig από το άγριο στέλεχος WT και το ΔACS 18.7 του μύκητα *V. dahliae* 5 και 10 ημέρες μετά τη μόλυνση, με συνεστιάκο μικροσκόπιο φθορισμού ηλεκτρονικής απεικόνισης. Το ΔACS 18.7 στέλεχος φάνηκε να αποικίζει λιγότερο το στέλεχος των φυτών και στις δύο επεμβάσεις 5 και 10 ημέρες μετά την εφαρμογή του (Γ,Δ), σε σύγκριση με το WT στέλεχος όπου οι ιστοί των φυτών φαίνονταν να έχουν αποικηθεί εξολοκλήρου (Α, Β).

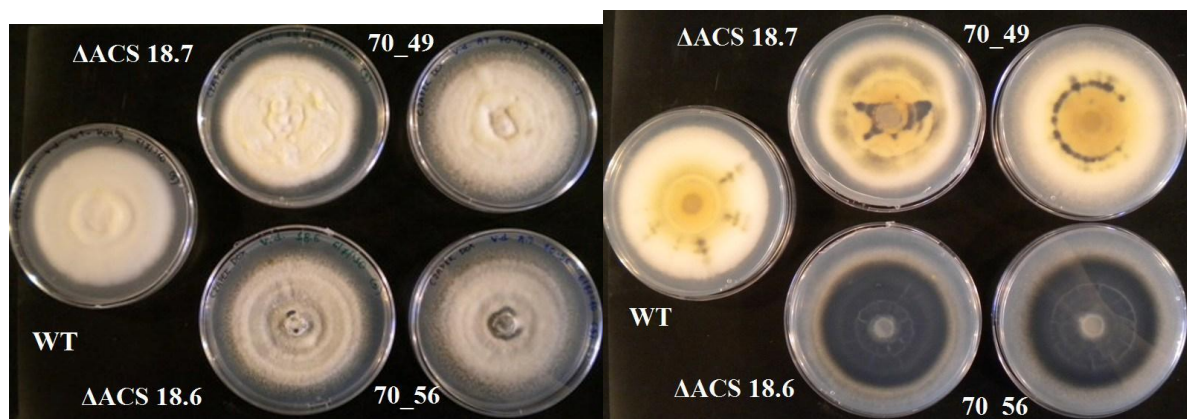
Από τα παραπάνω πειράματα φαίνεται ότι δεν υπάρχει διαφορά ανάμεσα στο άγριο και στο ΔACS18.7 μεταλλαγμένο στέλεχος ως προς την πρόσφυση και αποίκιση του ριζικού συστήματος στις 24 h μετά την εφαρμογή τους, ενώ στις 5 ημέρες μετά την μόλυνση οι υφές του άγριου στελέχους έχουν αποικήσει σε μεγαλύτερο βαθμό το ριζικό σύστημα των φυτών σε σχέση με το ΔACS 18.7. Επίσης, το άγριο στέλεχος αναπτύχθηκε περισσότερο και αποίκησε σε μεγαλύτερο βαθμό το στέλεχος των φυτών σε σχέση με το μεταλλαγμένο στέλεχος ΔACS 18.7.

3.6 Χαρακτηρισμός των μεταλλαγμένων στελεχών του *V. dahliae* ως προς την μυκηλιακή ανάπτυξη.

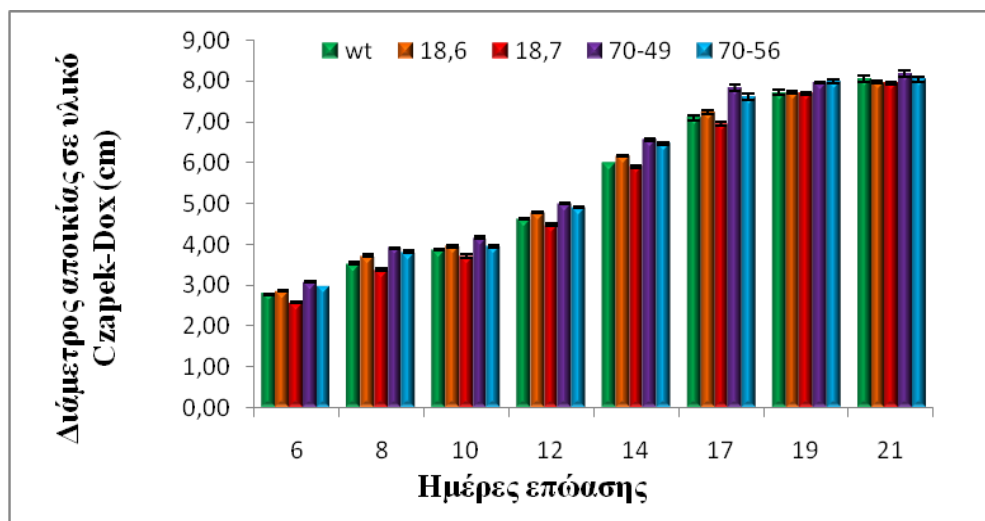
Για την αξιολόγησή των στελεχών του *V. dahliae* ως προς την μυκηλιακή ανάπτυξη και την παραγωγή μικροσκληρωτίων, τα απενεργοποιημένα στελέχη ΔACS 18.6 και ΔACS 18.7, τα συμπληρωματικά στελέχη AT 70-49 και AT 70-56 και το άγριο στέλεχος καλλιεργήθηκαν σε τρία διαφορετικά θρεπτικά υποστρώματα czarek-dox agar, SSN agar, minimal medium agar, όπως αναφέρεται στην παράγραφο 2.18) και οι διάμετροι των αποικιών μετρήθηκαν σε χρονικά διαστήματα των 2 ημερών για 21 ημέρες.

Κατά την ανάπτυξη σε υλικό Czarek-Dox agar τα στελέχη δεν παρουσίασαν καμιά διαφορά ως προς την μυκηλιακή τους ανάπτυξη, καθ' όλη τη διάρκεια του πειράματος (Εικόνα 3.15 B). Στις 21 ημέρες επώασης το άγριο στέλεχος και τα στελέχη ΔACS 18.7 και AT 70-49 παρουσίασαν υποτυπώδη παραγωγή μικροσκληρωτίων σε αντίθεση με τα στελέχη ΔACS 18.6 και AT 70-56 στα οποία φάνηκε να επάγεται ο σχηματισμός μικροσκληρωτίων με αποτέλεσμα το σκούρο χρωματισμό των αποικιών (Εικόνα 3.15 A).

A.



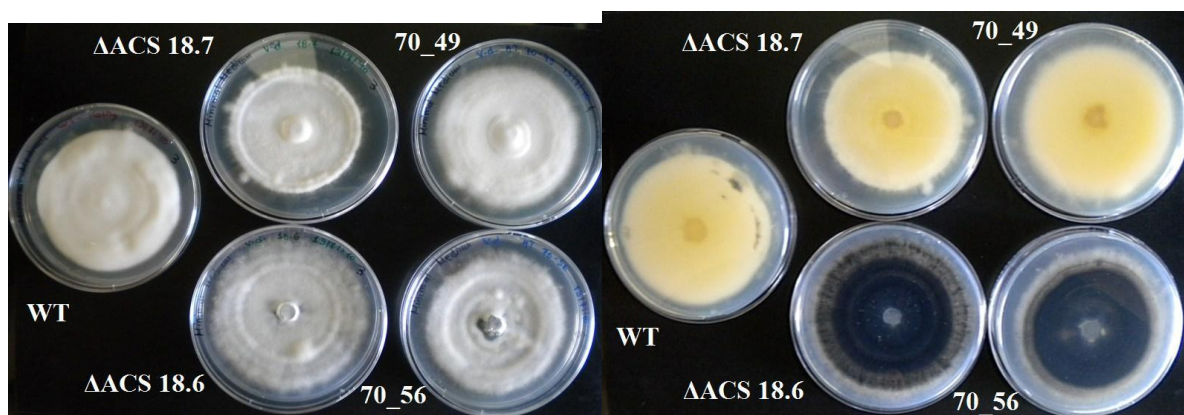
B.



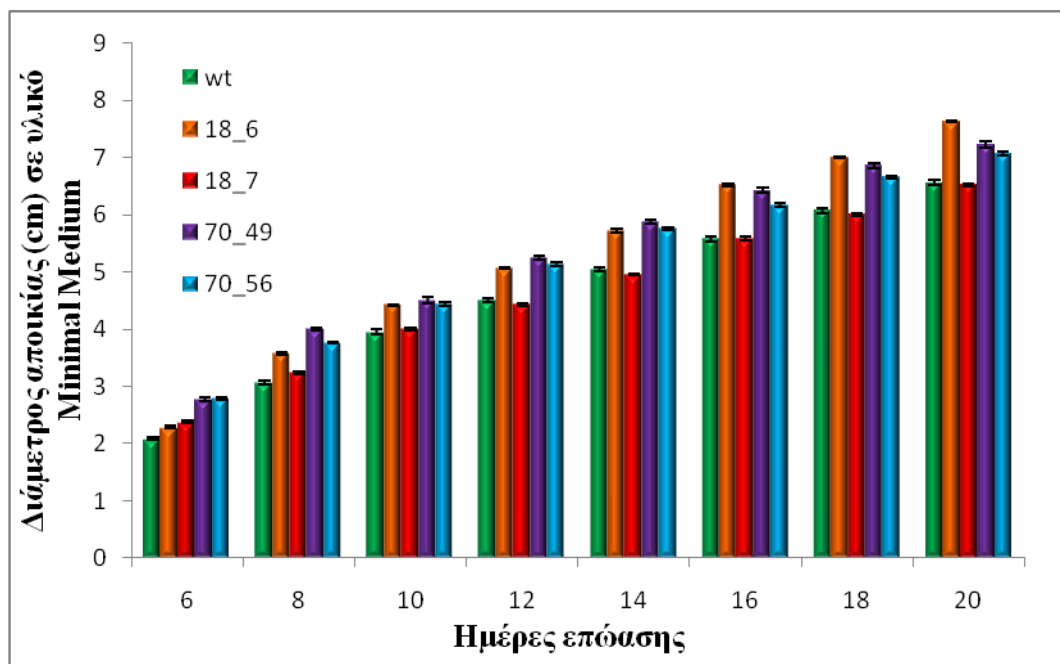
Εικόνα 3.15 : **A)** Διάγραμμα της μυκηλιακής αύξησης του άγριου στελέχους WT, των μεταλλαγμένων στελεχών ΔACS 18.6 και ΔACS 18.7 και των συμπληρωματικών στελεχών AT 70-49 και AT 70-56 του μύκητα *V. dahliae* , σε θρεπτικό υπόστρωμα Czapek-Dox agar, σε σχέση με το χρόνο. **B)** Εκτίμηση της μυκηλιακής ανάπτυξης των στελεχών σε υλικό Czapek-Dox, ως προς τη μορφολογία της αποικίας σε τριβλίο.

Κατά την ανάπτυξη σε θρεπτικό υλικό Minimal Medium agar υπήρχαν διαφοροποιήσεις ως προς την μυκηλιακή ανάπτυξη των στελεχών από τις 10 ημέρες και μετά, με τα στελέχη ΔACS 18.6, AT 70-49 και AT 70-56 να αναπτύσσονται ελαφρώς ταχύτερα (Εικόνα 3.16 B). Ως προς την παραγωγή μικροσκληρωτίων ο φαινότυπος των στελεχών δεν διαφοροποιήθηκε ιδιαίτερα από τον φαινότυπο στο Czapek-Dox agar. Οι αποικίες των ΔACS 18.7, AT 70-49 και του άγριου στελέχους παρέμειναν λευκές μέχρι και τις 21 ημέρες, ενώ οι αποικίες των ΔACS 18.6 και AT 70-56 εμφάνισαν σκούρο χρωματισμό που δηλώνει άφθονη παραγωγή μικροσκληρωτίων (Εικόνα 3.16 A).

A.

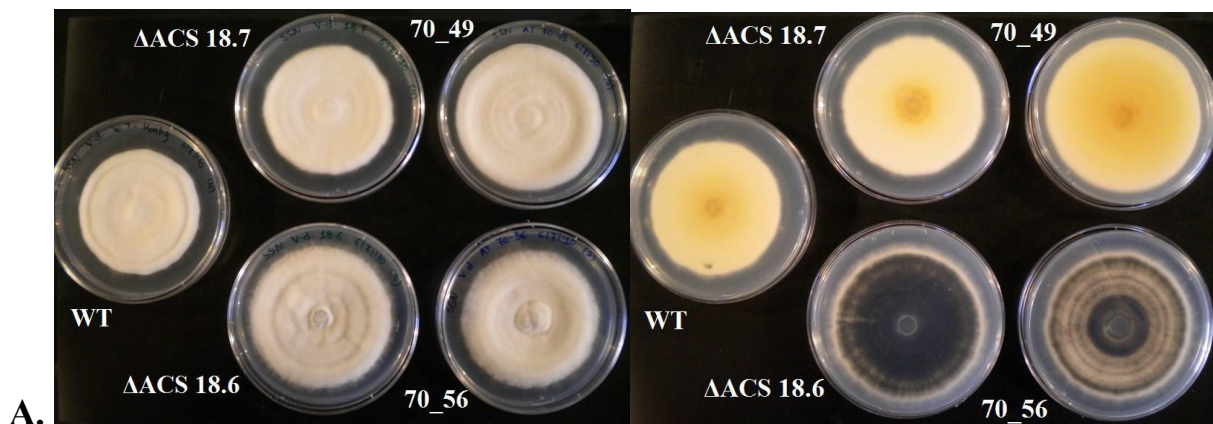


B.

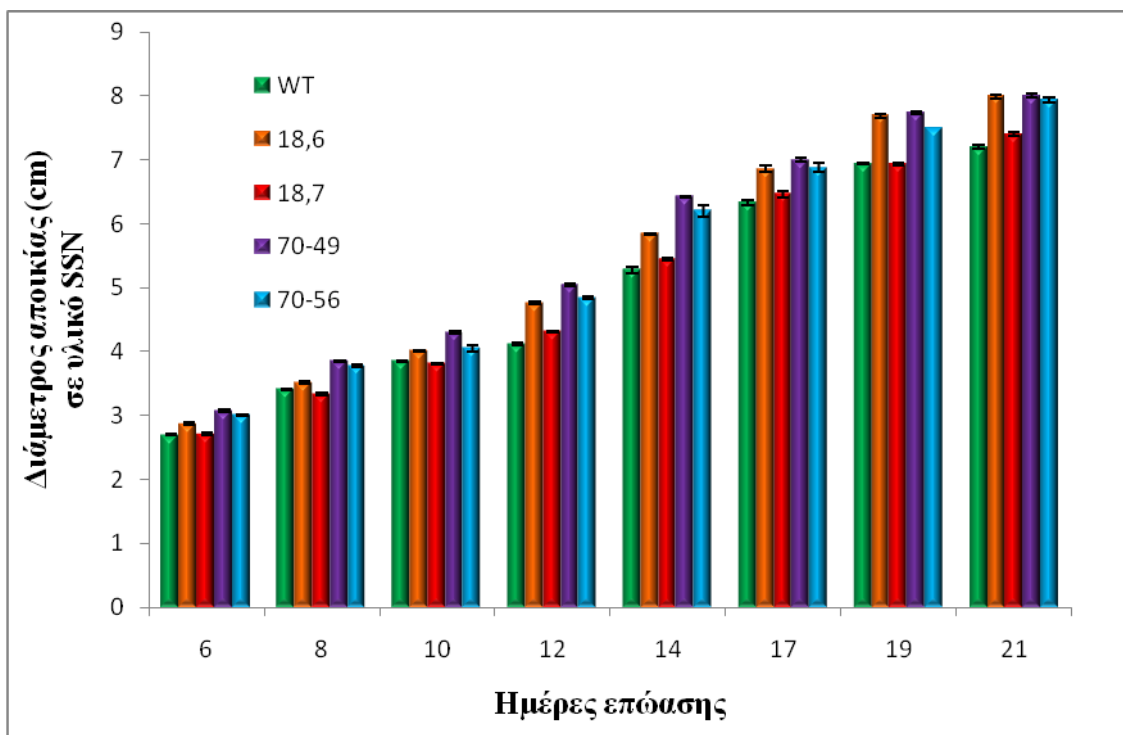


Εικόνα 3.16 : **A)** Διάγραμμα της μυκηλιακής αύξησης του άγριου στελέχους WT, των μεταλλαγμένων στελεχών ΔACS 18.6 και ΔACS 18.7 και των συμπληρωματικών στελεχών AT 70-49 και AT 70-56 του μύκητα *V. dahliae*, σε θρεπτικό υπόστρωμα Minimal medium, σε σχέση με το χρόνο. **B)** Εκτίμηση της μυκηλιακής ανάπτυξης των στελεχών σε υλικό Minimal medium, ως προς τη μορφολογία της αποικίας σε τριβλίο.

Τέλος παρόμοια ήταν η εικόνα και κατά την ανάπτυξη σε θρεπτικό υπόστρωμα SSN agar, με τα ΔACS 18.6, AT 70-49 και AT 70-56 να παρουσιάζουν ελαφρώς μεγαλύτερη μυκηλιακή ανάπτυξη μετά τις 10 ημέρες (Εικόνα 3.17 B). Η μυκηλιακή ανάπτυξη του άγριου στελέχους και του ΔACS 18.7 παρέμειναν στα ίδια επίπεδα και οι αποικίες τους στο τριβλίο παρέμειναν λευκές μέχρι τις 21 ημέρες. Η ανάπτυξη των ΔACS 18.6 και AT 70-56 σε Minimal Medium φάνηκε να επάγει το σχηματισμό μικροσκληρωτίων, όμως ενώ η ανάπτυξη του ΔACS 18.6 στελέχους ήταν ομοιόμορφη στο τριβλίο, το AT 70-56 αναπτύχθηκε σχηματίζοντας δακτυλίους (Εικόνα 3.17 A).



B.

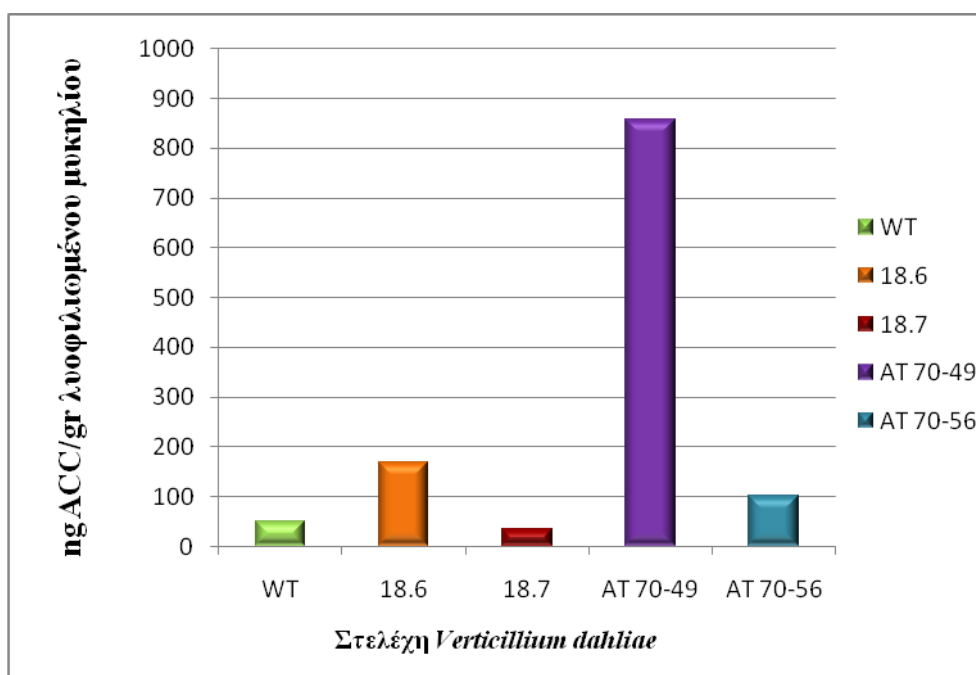


Εικόνα 3.17 : **A)** Διάγραμμα της μυκηλιακής αύξησης του άγριου στελέχους WT, των μεταλλαγμένων στελεχών *ΔACS* 18.6 και *ΔACS* 18.7 και των συμπληρωματικών στελεχών AT 70-49 και AT 70-56 του μύκητα *V. dahliae* , σε θρεπτικό υπόστρωμα SSN agar, σε σχέση με το χρόνο. **B)** Εκτίμηση της μυκηλιακής ανάπτυξης των στελεχών σε υλικό SSN agar, ως προς τη μορφολογία της αποικίας σε τριβλίο

3.7 Αξιολόγηση των μεταλλαγμένων στελεχών ως προς την παραγωγή αιθυλενίου μέσω του βιοχημικού μονοπατιού της ACC συνθάσης.

Το άγριο στέλεχος, τα μεταλλαγμένα ΔACS 18.6 και ΔACS 18.7 στελέχη και τα συμπληρωματικά AT 70-49 και AT 70-56 στελέχη αξιολογήθηκαν ως προς την παραγωγή αιθυλενίου μέσω του βιοχημικού μονοπατιού της ACC συνθάσης με τη χρήση αέριου χρωματογράφου (Παράγραφος 2.17). τα αποτελέσματα προέκυψαν σε μM ACC αλλά για να επιτευχθεί η σύγκριση των αποτελεσμάτων έγινε η αντιστοιχία τους σε ng ACC/gr λυοφιλιωμένου μυκηλίου του μύκητα *V. dahliae*.

Το μεταλλαγμένο στέλεχος ΔACS 18.7 παρήγαγε 35 ng ACC/gr λυοφιλιωμένου μυκηλίου, ενώ το άγριο στέλεχος παρήγαγε μόλις 50 ng ACC/gr λυοφιλιωμένου μυκηλίου. Στο ίδιο πείραμα το μεταλλαγμένο στέλεχος ΔACS 18.6 παρήγαγε 169 ng ACC/ gr λυοφιλιωμένου ιστού και τα συμπληρωματικά στελέχη AT 70-49 και AT 70-56 858 και 101 ng ACC/gr λυοφιλιωμένου μυκηλίου αντίστοιχα.



Εικόνα 3.18 : Απεικόνιση της συγκέντρωσης ACC σε μυκήλιο του *V. dahliae* για το άγριο στέλεχος, τα ΔACS 18.6 και ΔACS 18.7 στελέχη και για τα συμπληρωματικά AT 70-49 και AT 70-56 στελέχη.

ΣΥΖΗΤΗΣΗ

Ο μύκητας *Verticillium dahliae* είναι ένα εδαφογενές παθογόνο με παγκόσμια εξάπλωση, που προκαλεί αδρομυκώσεις τόσο σε εύκρατες όσο και σε υποτροπικές περιοχές, οδηγώντας σε σημαντικές απώλειες της παραγωγής σε ένα ευρύ φάσμα καλλιεργειών με μεγάλη οικονομική σημασία.

Κατά τη μόλυνση των φυτών από παθογόνους μικροοργανισμούς απελευθερώνεται αιθυλένιο και υπάρχουν στοιχεία ότι τόσο το φυτό όσο και οι μικροοργανισμοί συνεισφέρουν στην παραγωγή του (Achilea et al., 1985).

Το αιθυλένιο, αλλά κι άλλες φυτικές ορμόνες όπως οι γιβερελίνες, οι αυξίνες και το αψισικό οξύ, εκκρίνονται επίσης κι από μικροοργανισμούς (Tudzynski and Sharon, 2002). Το αιθυλένιο συγκεκριμένα παράγεται από τρία διαφορετικά μεταβολικά μονοπάτια. Στα ανώτερα φυτά το αιθυλένιο παράγεται από το αμινοξύ μεθειονίνη με ενδιάμεσο προϊόν το 1-αμινοκυκλοπροπάνιο-1-καρβοξυλικό οξύ (1-amino - cyclopropane-1-carboxylic acid, ACC). Ωστόσο αυτό το μονοπάτι δεν έχει μελετηθεί επαρκώς στους μικροοργανισμούς. Τα επόμενα δύο μονοπάτια έχουν χαρακτηριστεί σε βακτήρια αλλά και μύκητες. Στο πρώτο μονοπάτι το αιθυλένιο παράγεται επίσης από το αμινοξύ μεθειονίνη αλλά περιλαμβάνει ως ενδιάμεσο προϊόν το α-κετο-γ-μεθυλοθειοβουτυρικό οξύ (α-keto-γ-methylthiobutyric acid, KMBA), ενώ στο δεύτερο μονοπάτι το αιθυλένιο συντίθεται από το α-κετογλουταρικό οξύ, μέσω του ενζύμου EFE (Ethylene-Forming-Enzyme) (Chague et al., 2010).

Το αιθυλένιο παίζει σημαντικό ρόλο στην άμυνα των φυτών εναντίων διάφορων φυτοπαθογόνων, εφόσον η είσοδος τους στους φυτικούς ιστούς προάγει πολλές φορές την αυξημένη παραγωγή αιθυλενίου. (Abele et al., 1992, Mauch et al., 1984, Cohn και Martin, 2005). Επίσης πολλοί φυτοπαθογόνοι μύκητες και βακτήρια είναι ικανοί να παράγουν αιθυλένιο σαν μολυσματικό παράγοντα και έτσι ενισχύουν την ικανότητα τους να αποικίζουν μέσα στο φυτό. Έρευνες έχουν δείξει ότι τα συμπτώματα που προκαλούνται από παθογόνα αδρομυκώσεων όπως επιναστία, χλώρωση και φυλλόπτωση μπορούν να αναπαραχθούν και με την εφαρμογή αιθυλενίου (Wiese and DeVay, 1970, Pegg, 1981, Vander Molen et al., 1983, DeVay, 1989). Για το λόγο αυτό θεωρήθηκε ότι το αιθυλένιο είναι η κύρια αιτία για την εκδήλωση συμπτωμάτων από παθογόνα αδρομύκωσης (Pegg, 1981).

Ωστόσο ενώ πολλές εργασίες έχουν πραγματοποιηθεί για το ρόλο του αιθυλενίου στην άμυνα των φυτών εναντίων παθογόνων αδρομυκώσεων (Robison et al. 2001, Thomma et al. 2003, Tjamos et al., 2005, Van Loon et al., 2006, Pantelides et al., 2010) ελάχιστες μελέτες αναφέρονται στο ρόλο του αιθυλενίου ως μολυσματικό παράγοντα ή ως γονίδιο παθογένειας των αδρομυκώσεων.

Η πρωτοτυπία της παρούσας μελέτης έγκειται στη διερεύνηση του ρόλου του αιθυλενίου, που παράγεται μέσω του ACC μονοπατιού, στην παθογένεια του μύκητα *Verticillium dahliae* σε φυτά τομάτας. Για την διερεύνηση του ρόλου της ACC συνθάσης (ACS) στην ανάπτυξη και παθογένεια του μύκητα *Verticillium dahliae* χρησιμοποιήθηκαν μεταλλαγμένα στελέχη του *V. dahliae* στα οποία είχε απενεργοποιηθεί το γονίδιο ACS (ΔACS 18.1-18.7), στελέχη στα οποία είχε επανενσωματωθεί το λειτουργικό γονίδιο ACS (AT 70-5, AT 70-30, AT 70-49, AT 70-56) και το εκτοπικό στέλεχος 18.9 (Παράγραφος 2.2).

Αρχικά εξετάστηκαν τα επίπεδα έκφρασης του γονιδίου ACS σε όλα τα στελέχη, με αντιδράσεις Real Time PCR χρησιμοποιώντας ζεύγος εκκινητών που ενίσχυε τμήμα 356 βάσεων του γονιδίου, μετά τη θέση ένθεσης του μεταθετού στοιχείου TN5. Με βάση τα αποτελέσματα τα ΔACS 18.7 και ΔACS 18.4 στελέχη έδωσαν 80% χαμηλότερη έκφραση από το άγριο στέλεχος, το ΔACS 18.5 40% χαμηλότερη έκφραση ενώ τα ΔACS 18.1, 18.2, 18.3 και 18.6 στελέχη έδωσαν ίδια ή υψηλότερη έκφραση σε σχέση με το άγριο στέλεχος (Εικόνες 3.6 A και 3.6 B). Η υψηλή έκφραση των στελεχών ΔACS 18.1, 18.2, 18.3 και 18.6 πιθανώς να οφείλεται στο ότι η ένθεση του μεταθετού στοιχείου γίνεται σε τέτοιο σημείο στο γονίδιο ACS ώστε να μην επηρεάζεται η μεταγραφή του γονιδίου και να καθίσταται λειτουργική η παραχθείσα πρωτεΐνη. Τα συμπληρωματικά στελέχη εμφάνισαν υψηλά επίπεδα έκφρασης του γονιδίου ACS με το AT 70-49 να δίνει 90% υψηλότερη έκφραση από το άγριο στέλεχος (Εικόνες 3.6 A και 3.6 B).

Ωστόσο τα αποτελέσματα παραγωγής ACC με χρήση αέριου χρωματογράφου δεν ήταν σε αντιστοιχία με τα αποτελέσματα έκφρασης του γονιδίου ACS για όλα τα στελέχη. Πιο αναλυτικά μετά από μέτρηση του ACC, βρέθηκε ότι το μεταλλαγμένο στέλεχος ΔACS 18.7 παρήγαγε 35 ng ACC/gr λυοφιλιωμένου μυκηλίου, ενώ το άγριο στέλεχος, το οποίο στα πειράματα έκφρασης είχε δώσει υψηλότερα επίπεδα έκφρασης του γονιδίου ACS από το ΔACS 18.7, παρήγαγε μόλις 50 ng ACC/gr λυοφιλιωμένου μυκηλίου. Η μειωμένη παραγωγή ACC στο άγριο στέλεχος πιθανώς να οφείλεται στο γεγονός ότι ο μύκητας *in vitro* στο συγκεκριμένο θρεπτικό υπόστρωμα χρησιμοποιεί κάποιο άλλο βιοσυνθετικό μονοπάτι του αιθυλενίου από αυτό που χρησιμοποιεί *in planta* ενώ η παραγωγή αιθυλενίου στο ΔACS 18.7 στέλεχος ενδεχομένως να οφείλεται στην ύπαρξη δύο ακόμα ACS γονιδίων στο μύκητα *V. dahliae*, (locus) *V DAG_05504.1 V DAG_04886*. Στο ίδιο πείραμα το μεταλλαγμένο στέλεχος ΔACS 18.6 παρήγαγε 169 ng ACC/ gr λυοφιλιωμένου ιστού και τα συμπληρωματικά στελέχη AT 70-49 και AT 70-56 858 και 101 ng ACC/gr λυοφιλιωμένου μυκηλίου αντίστοιχα, ποσότητες που δικαιολογούνται πλήρως από την υψηλή έκφραση του γονιδίου ACS στα πειράματα έκφρασης.

Πρόσφατες εργασίες απέδειξαν ότι η μειωμένη πρόσληψη αιθυλενίου μέσω του υποδοχέα ETR1 των φυτών επάγει την έκφραση μιας ομάδας γονιδίων που σχετίζονται με την άμυνα των

φυτών *Arabidopsis thaliana* υποδεικνύοντας τη μοριακή βάση που ελέγχει την ανθεκτικότητα στους μύκητες *V. dahliae*. Αυτές οι μεταγραφικές μεταβολές οδήγησαν σε μειωμένη ανάπτυξη του παθογόνου μύκητα *V. dahliae* σε φυτά *Arabidopsis* στους αγγειακούς ιστούς και μειωμένη ένταση της ασθένειας στα *etr1-1* φυτά. Η ποσοτικοποίηση των μυκήτων έδειξε ότι τα επίπεδα των φυτοπαθογόνων στους ιστούς των *etr1-1* φυτών παρέμεναν σε σημαντικά χαμηλότερα επίπεδα από τα φυτά άγριου τύπου (Pantelides et al., 2010). Επίσης μεταλλαγμένα φυτά τομάτας στα οποία παρεμποδίζονταν η παραγωγή αιθυλενίου μέσω της έκφρασης μια βακτηριακής ACC απαμινάσης έδωσαν λιγότερα συμπτώματα από τους μάρτυρες επιβεβαιώνοντας τη σημασία του αιθυλενίου σε συμπτώματα που προκαλούνται από μύκητες του γένους *Verticillium* (Robison, 2001). Παρομοίως τα αποτελέσματα της παρούσας εργασίας έδειξαν σε πειράματα παθογένειας σε φυτά τομάτας ότι το μεταλλαγμένο στέλεχος στο γονίδιο ACS, ΔACS 18.7 παρουσίασε σημαντικά λιγότερα συμπτώματα σε σχέση με αυτά που μολύνθηκαν με το άγριο στέλεχος μέχρι και τις 11 ημέρες μετά την εφαρμογή τους. Συγκεκριμένα, την 11^η ημέρα η σοβαρότητα της ασθένειας (ποσοστό ασθενών φύλλων προς το συνολικό αριθμό των φύλλων) στα φυτά που είχαν μολυνθεί με το ΔACS 18.7 στέλεχος ήταν 4% σε σχέση με το άγριο στέλεχος που ήταν 41% (Εικόνα 3.9), ενώ η ασθένεια που προκάλεσε το ΔACS18.7 γενικά ήταν στατιστικά χαμηλότερη από όλα τα υπόλοιπα στελέχη που χρησιμοποιήθηκαν σε κάθε χρονική στιγμή που πραγματοποιήθηκε καταμέτρηση της ασθένειας. Ωστόσο το μεταλλαγμένο στέλεχος ΔACS 18.6 ήταν κοντά στα επίπεδα ασθένειας του άγριου στελέχους στις 5, 14, 17 και 20 ημέρες μετά τη μόλυνση φαινότυπος που δικαιολογείται από την υψηλή έκφραση του γονιδίου ACS στα πειράματα έκφρασης (Εικόνα 3.9). Τα φυτά που είχαν μολυνθεί με τα συμπληρωματικά στελέχη AT 70-49 και AT 70-56 παρέμειναν κοντά στα επίπεδα του άγριου στελέχους καθ' όλη τη διάρκεια του πειράματος (Εικόνα 3.9).

Η έλλειψη θετικής συσχέτισης μεταξύ τη ανάπτυξης της βιομάζας του παθογόνου μέσα στους φυτικούς ιστούς και της έντασης των συμπτωμάτων έχει παρατηρηθεί σε πολλές αλληλεπιδράσεις φυτών με μύκητες (Schnathorst, 1981, Brandt et al., 1984, Corsini et al., 1988, Gold et al., 1996, Lynch et al., 1997, Heinz et al., 1998, Veronese et al., 2003), βακτήρια (Bent et al., 1992, Lund et al., 1998, O'Donnell et al., 2001) και ιούς (Cecchini et al., 2002). Ωστόσο, σε αυτή την εργασία, η ανάπτυξη του μύκητα *V. dahliae* μέσα στους αγγειακούς ιστούς των φυτών προσδιορίστηκε να έχει θετική συσχέτιση, με την ένταση της ασθένειας. Η ανάλυση των αποτελεσμάτων της Real Time PCR έδειξε ότι στις 5 ημέρες μετά τη μόλυνση, το άγριο στέλεχος και το εκτοπικό στέλεχος 18.9 είχαν ήδη αποικίσει και αναπτυχθεί μέσα στο αγγειακό σύστημα σε σημαντικά μεγαλύτερο βαθμό από το ΔACS 18.7 στέλεχος. Πιο αναλυτικά η βιομάζα του άγριου στελέχους ήταν 4 φορές υψηλότερη από την βιομάζα του ΔACS 18.7 στελέχους. Η ίδια εικόνα

παρατηρήθηκε μέχρι και τη χρονική στιγμή των 15 ημερών, με το ΔACS 18.7 να παρουσιάζει 2 φορές χαμηλότερη βιομάζα από το άγριο στέλεχος στις 10 μέρες (Εικόνες 3.7 A και 3.7 B). Στις 20 ημέρες ωστόσο παρατηρήθηκε απότομη αύξηση της βιομάζας τόσο του άγριου στελέχους όσο και του μεταλλαγμένου ΔACS 18.7 που συμπίπτει με τις κυκλικές περιόδους αύξησης που χαρακτηρίζουν τον τρόπο συμπεριφοράς του μύκητα *V. dahliae* μέσα στο αγγειακό σύστημα των φυτών (Heinz et al., 1998).

Στα πειράματα ιστοπαθολογικής παρατήρησης της διαδικασίας μόλυνσης του άγριου στελέχους και του μεταλλαγμένου στελέχους ΔACS 18.7 σε φυτά τομάτας Ailsa Craig φάνηκε ότι δεν υπάρχει διαφορά ανάμεσα στο άγριο και στο ΔACS18.7 μεταλλαγμένο στέλεχος ως προς την πρόσφυση και αποίκιση του ριζικού συστήματος στις 24 h μετά την εφαρμογή τους, ενώ στις 5 ημέρες μετά την μόλυνση οι υφές του άγριου στελέχους έχουν αποικήσει σε μεγαλύτερο βαθμό το ριζικό σύστημα των φυτών σε σχέση με το ΔACS 18.7 (Εικόνες 3.12 και 3.13). Επίσης, το άγριο στέλεχος αναπτύχθηκε περισσότερο και αποίκησε σε μεγαλύτερο βαθμό το στέλεχος των φυτών σε σχέση με το μεταλλαγμένο στέλεχος ΔACS 18.7 επιβεβαιώνοντας τα πειράματα ποσοτικοποίησης των μυκήτων (Εικόνα 3.14).

Για να εξεταστεί αν τα φαινοτυπικά χαρακτηριστικά των μεταλλαγμένων στελεχών του μύκητα *V. dahliae* που χρησιμοποιήθηκαν στην παρούσα μελέτη διαφέρουν *in vitro*, σε σχέση με το άγριο στέλεχος από το οποίο προέκυψαν, αξιολογήθηκαν ως προς τη μυκηλιακή αύξηση και τη μορφολογία της αποικίας. Έπειτα από παρατήρηση και μετρήσεις της διαμέτρου των αποικιών, δεν διαπιστώθηκαν σημαντικές διαφορές στα φαινοτυπικά χαρακτηριστικά των μεταλλαγμένων στελεχών σε σχέση με το άγριο στέλεχος (Εικόνες 3.15 A και B, 3.16 A και B, 3.17 A και B).

Για να διευκρινιστεί πλήρως ο ρόλος του αιθυλενίου στην παθογένεια του μύκητα *V. dahliae* μέσω του γονιδίου της ACC συνθάσης είναι απαραίτητη η επανάληψη πειραμάτων παθογένειας και ποσοτικοποίησης των υπόλοιπων ΔACS μεταλλαγμένων στελεχών, τα οποία εμφάνισαν χαμηλή έκφραση του γονιδίου ACS, σε φυτά τομάτας αλλά και στο φυτό πρότυπο *Arabidopsis thaliana*, που εξαιτίας του μικρού του βιολογικού κύκλου δίνει αποτελέσματα σε σύντομο χρονικό διάστημα.

Μεγάλο ενδιαφέρον θα παρουσίαζε η μελέτη παραγωγής αιθυλενίου μέσω του KMBA μονοπατιού τόσο στα ΔACS μεταλλαγμένα στελέχη όσο και στο άγριο στέλεχος, ώστε να προσδιοριστεί το κύριο μονοπάτι βιοσύνθεσης αιθυλενίου στο μύκητα *V. dahliae*. Επιπλέον η βιοχημική ή μοριακή παρεμπόδιση βιοσύνθεσης αιθυλενίου μέσω του KMBA μονοπατιού θα έδινε σημαντικές πληροφορίες για τον ρόλο του αιθυλενίου στην παθογένεια του μύκητα *V. dahliae*.

BIBΛΙΟΓΡΑΦΙΑ

Abeles F. B., P. W. Morgan, and M. E. Saltveit Jr, 1992, Ethylene in plant biology, 2nd ed. Academic Press, San Diego, Calif.

Adams D, Yang S, 1981, Ethylene the gaseous plant hormone: Mechanisms and regulation of biosynthesis. Trends Biochem Sci 4: 161–164.

Agrios G. N., 2005, Plant Pathology, 5th edition, Academic Press.

Amagai A, Maeda Y, 1992, The ethylene action in the development of cellular slime molds: an analogy to higher plants. Protoplasma 167: 159–168.

Ashworth LJ, Huisman OC, Harper DM, Stromber LK, 1974, Free and bound microsclerotia of *Verticillium albo-atrum* in soils. Phytopathology 64:563–64

Bailey K.L. and Lazarovits G., 2003, Suppressing soil-borne diseases with residue management and organic amendements. Soil Till. Res. 72, 169–180.

Barbara DJ, Clewes E, 2003, Plant pathogenic *Verticillium* species: How many of them are there? Mol. Plant Pathol. 4:297–305

Beckman CH, Talboys PW, 1981, Anatomy of resistance. In, Fungal wilt disease of plants Mace ME, Bell AA, Beckman CH, eds.. New York, Academic Press, pp. 431-486.

Bejarano-Alcazar J, Termorshuizen AJ, Jimenez-Diaz RM, 1999, Single-site root inoculations on eggplant with microsclerotia of *Verticillium dahliae*. Phytoparasitica 27:279–89

Belhadj A, Telef N, Cluzet S, Bouscaut J, Corio-Costet MF, Mérillon JM, 2008, Ethephon elicits protection against *Erysiphe necator* in grapevine. *J Agric Food Chem* 56: 5781–5787.

Bell A.A., 1969, Phytoalexin production and *Verticillium* wilt resistance in cotton. *Phytopathology*, 59, 1119–1127.

Benhamou N., 1995, Ultrastructural and cytochemical aspects of the response of eggplant parenchyma cells in direct contact with *Verticillium* infected xylem vessels. *Physiol. Mol. Plant Pathol.* 46, 321–338.

Berg G., Zachow C., Lottmann J., Götz M., Costa R. and Smalla K., 2005, Impact of plant species and site on rhizosphere-associated fungi antagonistic to *Verticillium dahliae* Kleb. *Appl. Environ. Microbiol.* 71, 4201–4213.

Bhat RG, Subbarao KV, 1999, Host range specificity in *Verticillium dahliae*. *Phytopathology* 89:1218–25

Bidochka, M.J., Burke, S. and Ng, L., 1999, Extracellular hydrolytic enzymes in the fungal genus *Verticillium*: adaptations for pathogenesis. *Can. J. Microbiol.* **45**, 856–864.

Bishop C.D. and Cooper R.M., 1983a, An ultrastructural study of root invasion in three vascular wilt diseases. *Physiol. Plant Pathol.* 22, 15–27.

Bishop C.D. and Cooper R.M., 1983b, An ultrastructural study of root invasion in three vascular wilt diseases I. Colonization of susceptible cultivars. *Physiol. Plant Pathol.* **23**, 323–343.

Boller T., 1991, Ethylene in pathogenesis and disease resistance, p. 293–324. In A. K. Mattoo and J. C. Suttle (ed.), *The plant hormone ethylene*. CRC Press, Boca Raton, Fla.

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*. *Phytopathology*, 86, 614–621.

Brisson LF, Tenhaken R, Lamb C, 1994, Function of oxidative cross-linking of cell wall structural proteins in plant disease resistance. *Plant Cell* 6, 1703–712.

Broekaert WF, Terras FRG, Cammue BPA, 2000, Induced and preformed antimicrobial proteins. In *Mechanisms of Resistance to Plant Disease*, ed. AJ Slusarenko, RSS Fraser, LC van Loon, pp. 371–478. Berlin/Heidelberg/New York, Springer.

Buchner V., Nashmias A., and Burstein Y., 1982, Isolation and partial characterization of a phytotoxic glycopeptide from a protein-lipopolysaccharide complex produced by a potato isolate of *Verticillium dahliae*. *FEBS Letters*, 138: 261 – 264.

Campbell CL, Madden LV, 1990, *Introduction to Plant Disease Epidemiology*. John Wiley & Sons Inc., New York.

Carder, J.H., Hignett, R.C. and Swinburne, T.R., 1987, Relationship between the virulence of hop isolates of *Verticillium albo-atrum* and their in vitro secretion of cell-wall degrading enzymes. *Physiol. Mol. Plant Pathol.* **31**, 441–452.

Chagué V, LevanoniD, Siewers V, Schulze GC, Tudzynski P, Tudzynski B, Sharon A, 2006, Ethylene sensing and gene activation in *Botrytis cinerea*: the missing link in ethylene regulation of fungal – plant interactions? *Mol Plant-Microbe Interact* 19: 33–42.

Chagué V,2010, Ethylene production by fungi:Biological questions and future developments towards a sustainable polymers industry, *Handbook of Hydrocarbon and Lipid Microbiology*.

Cohn JR, Martin GB, 2005, *Pseudomonas syringae* pv. tomato type III effectors AvrPto and AvrPtoB promote ethylene-dependent cell death in tomato. *Plant Journal* 44, 139-154.

Cooper R.M., and Wood R.K.S., 1973, Induction of synthesis of extracellular cell-wall degrading enzymes in vascular wilt fungi. *Nature*, 246: 309 – 311.

Cooper R.M., 2000, Verticillium –host interactions: past achievements and future molecular prospects. In Advances in Verticillium Research and Disease Management (Tjamos, E., Rowe, R., Heale, J., Fravel, D., eds), pp. 144–150. St Paul, MN: APS Press.

Correll JC, Gordon TR, McCain AH., 1988, Vegetative compatibility and pathogenicity of *Verticillium albo-atrum*. *Phytopathology* 78:1017–21

Cristescu SM, De Martinis D, Hekkert SL, Parker DH, Harren FJM, 2002, Ethylene production by *Botrytis cinerea* in vitro and in tomatoes. *Appl Environ Microbiol* 68: 5342–5350.

Cronshaw D. K. & Pegg G. F., 1976, Ethylene as a toxin synergist in *Verticillium* with of tomato. - *Physiol. Plant. Pathol.* 9: 33-44

Daayf F., Nicole M., Boher B., Pando A. and Geiger J.P., 1997, Early vascular defense reactions of cotton roots infected with defoliating mutant strain of *Verticillium dahliae*. *Eur. J. Plant Pathol.* 103, 125–136.

Davies P., 1995, Plant hormones, Physiology, Biochemistry, and Molecular Biology. 2nd edn, 883 pp, Kluwer Academic Publishers, Dordrecht.

De Lorenzo G., D'Ovidio R. and Cervone F., 2001, The role of polygalacturonase-inhibiting proteins (PGIPs) in defense against pathogenic fungi. *Annu. Rev. Phytopathol.* 39, 313–335.

Devay JE, Forrester LL, Garber RH, Butterfield EJ, 1974, Characteristics and concentration of propagules of *Verticillium dahliae* in air-dried field soils in relation to prevalence of *Verticillium* wilt in cotton. *Phytopathology* 64:22–29

DeVay J.E., 1989, Selection, characterization, pathogenicity and virulence of pectinase –deficient mutants of *Verticillium albo – atrum* In: Tjamos E.C., and Beckman C.H. (Eds.), Vascular wilt diseases of plants. Springer-Verlag, Berlin, p197 – 217.

Di Pietro A., Madrid M.P., Caracuel Z., Delgado-Jarana J., and Rocerno M.I.G., 2003, *Fusarium oxysporum*: exploring the molecular arsenal of a vascular wilt fungus. *Molecular Plant Pathology*, 4(5): 315 – 325.

Dobinson K.F., Grant S.J. and Kang S., 2004, Cloning and targeted disruption, via *Agrobacterium tumefaciens*-mediated transformation, of a trypsin protease gene from the vascular wilt fungus *Verticillium dahliae*. *Curr. Genet.* **45**, 104–110.

Dobinson K.F., Lecomte N. and Lazarovits, G., 1997, Production of an extracellular trypsin-like protease by the fungal plant pathogen *Verticillium dahliae*. *Can. J. Microbiol.* **43**, 227–233.

Durrands P.K., and Cooper R.M., 1988, The role of pectinases in vascular wilt disease as determined by defined mutants of *Verticillium albo-atrum*. *Physiological and Molecular Plant Pathology*, **32**: 363–371.

Du Toit LJ, Derie ML, Hernandez-Perez P., 2005, *Verticillium* wilt in spinach seed production. *Plant Dis.* **89**:4–11.

Eastburn DM, Chang RJ., 1994, *Verticillium dahliae*: a causal agent of root discoloration of horseradish in Illinois. *Plant Dis.* **78**:496–98

Easton G.D., Nagle M.E. and Bailey D.L., 1969, A method of estimating *Verticillium albo-atrum* propagules in field soil and irrigation waste water. *Phytopathology*, **59**, 1171–1172.

Ecker JR, Davis RW. 1987, Plant defense genes are regulated by ethylene. *Proc. Natl.Acad. Sci. USA* **84**, 5202–6.

Epple P, Apel K, Bohlmann H, 1997, Overexpression of an endogenous thionin enhances resistance of *Arabidopsis* against *Fusarium oxysporum*, *Plant Cell* 9, 509–520.

Esquerre-Tugaye MT, Lafitte C, Mazau D, Toppan A, Touze A, 1979, Cell surfaces in plant-microorganism interactions. II. Evidence for the accumulation of hydroxyproline rich glycoproteins in the cell wall of diseased plants as a defense mechanism. *Plant Physiol.* 64, 320–26.

Evans G., Wilhelm S. and Snyder W.C., 1967, Quantitative studies by plate counts of propagules of the *Verticillium* wilt fungus in cotton field soils. *Phytopathology*, 57, 1250–1255.

Fahleson J, Hu Q, Dixelius C., 2004, Phylogenetic analysis of *Verticillium* species based on nuclear and mitochondrial sequences. *Arch. Microbiol.* 181:435–42

Fiserova H., Mikusova Z., Klems M., 2008, Estimation of ethylene production and 1-aminocyclopropane-1- carboxylic acid content in plants by means of gas chromatography, *Plant Soil Environ.*, 54, 2008 (2): 55-60

Fradin EF, Thomma BPHJ., 2006. Physiology and molecular aspects of *Verticillium* wilt diseases caused by *V. dahliae* and *V. albo-atrum*. *Mol. Plant Pathol.* 7:71–86

Fukuda H, Fujii T, Ogawa T., 1986, Preparation of a cellfree ethylene forming system from *Penicillium digitatum*. *Agric Biol Chem* 50: 977–981.

Fukuda H, Takahashi M, Fujii T, Tazaki M, Ogawa T., 1989, An NADH:Fe(III)EDTA oxidoreductase from *Cryptococcus albidus*: an enzyme involved in ethylene production in vivo? *FEMS Microbiol Lett* 51: 107–111.

Fukuda H, Ogawa Y, Tazaki M, Nagahama K, Fujii T, Tanase S, Morino Y., 1992, two reactions are simultaneously catalyzed by a single enzyme: the arginine dependent simultaneous formation of two products, ethylene and succinate, from 2-oxoglutarate by an enzyme from *Pseudomonas syringae*. *Biochem Biophys Res Commun* 188: 483–489.

Gerik JS, Huisman OC., 1988, Study of field-grown cotton roots infected with *Verticillium dahliae* using an immunoenzymatic staining technique. *Phytopathology* 78:1174–78

Gold J. and Robb J., 1995, The role of the coating response in *Craigella* tomatoes infected with *Verticillium dahliae*, races 1 and 2. *Physiological and Molecular Plant Pathology* 47: 141–157.

Gordee R.S., and Porter C.L., 1961, Structure, germination, and physiology of microsclerotia of *Verticillium albo-atrum*. *Mycologia*, 53: 171–182.

Goud J.C. and Termorshuizen A.J., 2003, Quality of methods to quantify microsclerotia of *Verticillium dahliae* in soil. *Eur. J. Plant Pathol.* 109, 523–534.

Green R.J., 1981, An Overview. In: Mace, M.E., Bell, A.A., Beckman, C.H. (Eds.), *Fungal Wilt Diseases of Plants*. Academic Press, New York, pp. 1 – 20.

Grogan R.G., Ioannou N., Schneider R.W., Sall M.A. and Kimble K.A., 1979, *Verticillium* wilt on resistant tomato cultivars in California: virulence of isolates from plants and soil and relationship of inoculum density to disease incidence. *Phytopathology*, 69, 1176–1180.

Gunterus A, Roze LV, Beaudry R, Linz JE, 2007, Ethylene inhibits aflatoxin biosynthesis in *Aspergillus parasiticus* grown on peanuts. *Food Microbiol* 24: 658–663.

Hag L. and Curtis R.W., 1968, Production of Ethylene by fungi, *Science*, 159: 1357-1358

Harris D.C. and Yang J.R., 1996, The relationship between the amount of *Verticillium dahliae* in soil and the incidence of strawberry wilt as a basis for disease risk prediction. *Plant Pathol.* 45, 106–114.

Hawke M.A. and Lazarovits G., 1995, The role of melanin in the survival of microsclerotia of *Verticillium dahliae*. *Phytoparasitica*, 23, 54.

Heinz R., Lee S.W., Saparno A., Nazar R.N., Robb J., 1998, Cyclical systemic colonization in *Verticillium*-infected tomato. *Physiological and Molecular Plant Pathology* 52, 385–396

Hiemsta J.A., Harris D.C., 1998, a competition of *Verticillium* Wilts in tree species, (eds.), CPRO-DLO/HRI, Ponsen and Looijen, Wageningen/West-Malling the Netherland, 80 p.p.

Hislop E. C., Hoad G. V. & Archer S. A., 1973, The involvement of ethylene in plant disease. – In *Fungal Pathogenicity and the Plant's Reponse* (R. J. W. Byrde and C.V. Cutting, eds), pp. 87-117. Academic Press, New York. ISBN 0-12-148850-0

Hottiger T, Boller T, 1991, Ethylene biosynthesis in *Fusarium oxysporum* sp *tulipae* proceeds from glutamate/2-oxoglutarate and requires oxygen and ferrous ions in vivo. *Arch Microbiol* 157: 18–22.

Howell C.R., 1976. Use of enzyme deficient mutants of *Verticillium dahliae* to assess the importance of pectolytic enzymes in symptom expression of *Verticillium* wilt of cotton. *Physiological Plant Pathology*, 9: 279 – 283.

Huisman O.C., 1988, Seasonal colonization of roots of field-grown cotton by *Verticillium dahliae* and *V. tricorpus*. *Phytopathology*, 78, 708–716.

Isaac I., 1946, Verticillium wilt of sainfoin. *Ann. Appl. Biol.* 33:28–34

Isaac I., 1967, Speciation in Verticillium. *Annu. Rev. Phytopathol.* 5:201–22

Isaac I. and Keyworth W.G., 1958, Verticillium wilt of the hop (*Humulus lupulus*). III. A study of the pathogenicity of isolates from fluctuating and from progressive outbreaks. *Ann. Appl. Biol.* 35, 243–249.

Jia Y et al., 1999, Synthesis and degradation of 1-aminocyclopropane-1-carboxylic acid by *Penicillium citrinum*. *Biosci Biotechnol Biochem* 63: 542–549.

Johnson PR, Ecker JR., 1998, The ethylene gas signal transduction pathway: a molecular perspective. *Annu Rev Genet* 32: 227–254.

Karapapa VK, Bainbridge BW, Heale JB, 1997, Morphological and molecular characterization of *Verticillium longisporum* comb. nov., pathogenic to oilseed rape. *Mycol. Res.* 101:1281–94

Karapapa VK, Typas MA., 2001, Molecular characterization of the host-adapted pathogen *Verticillium longisporum* on the basis of a group-I intron found in the nuclear SSU-rRNA gene. *Curr. Microbiol.* 42:217–24

Kim YK, Kawano T, Li D, Te Lintel Hekkert S, Parker DH, Harren FJM, 2000, A mitogen-activated protein kinase kinase required for induction of cytokinesis and appressorium formation by host signals in the conidia of *Colletotrichum gloeosporioides*. *Plant Cell* 12: 1331–1343.

Klimes A, Dobinson KF., 2006, A hydrophobin gene, VDH1, is involved in microsclerotial development and spore viability in the plant pathogen *Verticillium dahliae*. *Fungal Genet. Biol.* 43:283–94

Koike S.T., Subbarao K.V., Davis R.M., Gordon T.R. and Hubbard J.C., 1994, Verticillium wilts of cauliflower in California. *Plant Dis.* 78, 116–1121.

Korolev N., Pérez-Artés E., Bejarano-Alcázar J., Rodríguez-Jurado D., Katan J., Katan T., and Jiménez-Díaz R.M., 2001. Comparative study of genetic diversity and pathogenicity among populations of *Verticillium dahliae* from cotton in Spain and Israel. *European Journal of Plant Pathology*, 107, 443–456.

Krikun J, Bernier CC, 1990, Morphology of microsclerotia of *Verticillium dahliae* in roots of gramineous plants. *Can. J. Plant Pathol.* 12:439–41

Lee S.W., Mazar R.N., Powell D.A. and Robb J., 1992, Reduced PAL gene expression in *Verticillium*-infected resistant tomatoes. *Plant Mol. Biol.* 18, 345–352.

Ligoxigakis EK, Fragkiadakis GA, Manganaris AG, Vakalounakis DJ, Thanassouloupoulos KK, 2002, Isozyme variation in *Verticillium dahliae* isolates from Crete. *Folia Microbiol.* 47:167–70

Lynch D.R., Kawchuk L.M., Hachey J., Bains P.S., Howard R.J., 1997, Identification of a gene conferring high levels of resistance to *Verticillium* wilt in *Solanum chacoense*. *Plant Dis.* 81:1011–14

Lynch J.M., 1972, Identification of substrates and isolation of microorganisms responsible for ethylene production in the soil *Nature*, 240: 45-46

Mace M.E., Bell A.A. and Beckman C.H., 1976, Histochemistry and identification of disease-induced terpenoid aldehydes in *Verticillium*-wiltresistant and -susceptible cottons. *Can. J. Bot.* 54, 2095–2099.

Malandraki I., Tjamos S.E., Pantelides I., Paplomatas E.J., 2008. Thermal inactivation of compost suppressiveness implicates possible biological factors in disease management. *Biological Control* 44, 180–187.

Maniatis T, Fritsch EF, Sambrook J, 1982, Molecular cloning, a laboratory manual.

Cold Spring Harbour, New York.

Mauch F, Hadwiger LA, Boller T, 1984, Ethylene, symptom, not signal for the induction of chitinase and β -1,3-glucanase in pea pods by pathogens and elicitor. *Plant Physiol.*76, 607–11.

Mercando-Blanco J., Collado-Romero M., Parrilla-Araujo S., Rodriguez- Jurado D. and Jimenez-Diaz R.M., 2003, Quantative monitoring of colonization of olive genotypes by *Verticillium dahliae* pathotypes with real-time polymerase chain reaction., *Physiological and Molecular Plant Pathology*. 63: 91-105

Miller S.A., Rowe R.C. and Riedel R.M., 1996, *Fusarium* and *Verticillium* Wilts of Tomato, Potato, Pepper and Eggplant (HYG-3122-96) *Plant Pathology*, The Ohio State University Extension

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.

Mullins E.D., Chen X., Romaine P., Raina R., Geiser D.M. and Kang S., 2001, Agrobacterium-mediated transformation of *Fusarium oxysporum*: an efficient tool for insertional mutagenesis and gene transfer. *Phytopathology*, 91, 173–180.

Nachmias A., Buchner V., andBurstein Y., 1985, Biological and immunochemical characterization of a low molecular weight phytotoxin isolated from a protein-lipopolsaccharide complex produced by a potato isolate of *Verticillium dahliae* Kleb. *Physiological and Molecular Plant Pathology*, 26:43–55.

Nagtzaam M.P.M., Bollen G.J. and Termorshuizen A.J., 1998, Efficacy of *Talaromyces flavus* alone or in combination with other antagonists in controlling *Verticillium dahliae* in growth chamber experiments. *J. Phytopathol.* 146, 165–173.

Narisawa K., Kawamata H., Currah R.S. and Hashiba T., 2002, Suppression of *Verticillium* wilt in eggplant by some fungal root endophytes. *Eur. J. Plant Pathol.* 108, 103–109.

Neumann M.J. and Dobinson K.F., 2003, Sequence tag analysis of gene expression during pathogenic growth and microsclerotia development in the vascular wilt pathogen *Verticillium dahliae*. *Fung. Genet. Biol.* 38, 54–62.

Pantelides I.S. , Sotirios E. Tjamos, Ioannis A. Striglis, Iordanis Chatzipavlidis, Epaminondas J.Paplomatas, 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 (2009) 30-36.

Pantelides I. S., Tjamos S. E. and Paplomatas E. J., 2010, Insights into the role of ethylene perception in tomato resistance to vascular infection by *Verticillium dahliae*, *Plant Pathology*, 59: 130-138.

Pantelides I. S., Tjamos S. E. and Paplomatas E. J., 2010, Ethylene perception via *ETR1* is required in *Arabidopsis* infection by *Verticillium dahliae*, *Molecular Plant Pathology*, 11(2): 191-202.

Pazout J, Pazoutova S, 1989, Ethylene is synthesised by vegetative mycelium in surface cultures of *Penicillium-cyclopium* westling. *Can J Microbiol* 35: 384–387.

Pedras MSC, Okanga FI, Zaharia IL, Khan AQ, 2000, Phytoalexins from crucifers, synthesis, biosynthesis, and biotransformation. *Phytochemistry* 53, 161–76.

Pegg G.F., 1981, Biochemistry and physiology of pathogenesis. In: Mace, M.E., Bell, A.A., Beckman, C.H. (Eds.), *Fungal Wilt Diseases of Plants*. Academic Press, New York, p. 193 – 253.

Pegg G.F., 1989. Pathogenesis in vascular diseases of plants. In: *Tjamos, E.C., and Beckman, C.H. (Eds.), Vascular wilt diseases of plants. Springer-Verlag, Berlin, p51 – 94.*

Pegg G.F. and Cronshaw D.K., 1976, Relationship of in vitro to in vivo ethylene production in *Pseudomonas solanacearum* infection of tomato. *Physiol. Plant Pathol.* 9, 145–154.

Pegg GF, Brady BL, 2002, *Verticillium wilts*. New York: CABI Publishing. 432 pp.

Pemberton C.L., and Salmond G.P.C., 2004, The *NEP1*-like proteins – A growing family of microbial elicitors of plant necrosis. *Molecular Plant Pathology*, 5(4): 353–359.

Penninckx IA, Thomma BP, Buchala A, Mettraux JP, Broekaert WF, 1998. Concomitant activation of jasmonate and ethylene response pathways is required for induction of a plant defensin gene in *Arabidopsis*. *Plant Cell* 10, 2103–13.

Perry J.W., and Evert R.F., 1982. Structure of microsclerotia of *Verticillium dahliae* in roots of ‘Russett Burbank’ potatoes. *Canadian Journal of Botany*, 62: 396–401.

Pieterse CMJ, van Wees SCM, Hoffland E, van Pelt JA, van Loon LC, 1996, Systemic resistance in *Arabidopsis* induced by biocontrol bacteria is independent of salicylic acid accumulation and pathogenesis-related gene expression. *Plant Cell* 8, 1225-1237.

Pfaffl MW, 2001. A new mathematical model for relative quantification in real-time RT-PCR. *Nucleic Acids Res.* 29, 2002-2007.

Primrose S. and Dilworth M., 1976, Ethylene Production by bacteria, *Journal of General Microbiology*, 93: 177-181

Primrose S, 1977, Evaluation of the role of methional, 2-keto-4-methylthiobutyric acid and peroxidase in ethylene formation by *Escherichia coli*. *J Gen Microbiol* 98: 519–528.

Puhalla J.E., and Howell C.R., 1975. Significance of endopolygalacturonase activity to symptom expression of Verticillium wilt in cotton, assessed by the use of mutants of Verticillium dahliae Kleb. *Physiological Plant Pathology*, 7: 147 – 152.

Rauyaree P, Bhat RG, Ospina-Giraldo MD, Grant SJ, Dobinson K, et al., 2005, Mutations in VMK1, a mitogen-activated protein kinase gene, affect microsclerotia formation and pathogenicity in Verticillium dahliae. *Curr. Genet.* 48:109–116

Robb J., Lee B., and Nazar R. N., 2007, Gene suppression in a tolerant tomato–vascular pathogen interaction. *Planta*, 226: 299 – 309.

Robb E.J., Powell D.A. and Street P.F.S., 1989, Vascular coating: a barrier to colonization by the pathogen in Verticillium wilt of tomato. *Can. J. Bot.* 67, 600–607.

Robinson DB, Larson RH, Walker J.C., 1957, Verticillium wilt of potato in relation to symptoms, epidemiology and variability of pathogen. *Wis. Exp. Stn. Res. Bull.* Issue 202. 49 pp.

Robison MM, Shah S, Tamot B, Pauls KP, Moffatt BA, Glick BR, 2001β. Reduced symptoms of Verticillium wilt in transgenic tomato expressing a bacterial ACC deaminase. *Molecular Plant Pathology* 2, 135-145.

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.

Schnathorst WC, 1981, Life cycle and epidemiology of Verticillium. In *Fungal Wilt Diseases of Plants*, ed. ME Mace, AA Bell, CH Beckman, pp. 81–111. New York: Academic Press

Stall R. E. and Hall C. B., 1984, Chlorosis and ethylene production in pepper leaves infected by *Xanthomonas Campestris* pv. *Vesicatoria*, *Phytopathology*, 74: 373-375.

Subbarao KV, Chassot A, Gordon TR, Hubbard JC, Bonello P, et al., 1995, Genetic relationships and cross pathogenicities of *Verticillium dahliae* isolates from cauliflower and other crops. *Phytopathology* 85:1105–12

Subbarao KV, Hubbard JC, Greathead AS, Spencer GA, 1997, *Verticillium* wilt. In *Compendium of Lettuce Diseases*, ed. RM Davis, KV Subbarao, RN Raid, EA Kurtz, pp. 26–27. St Paul, MN: The American Phytopathological Society

Talboys P.W., 1958, Some mechanisms contributing to *Verticillium* resistance in the hop root. *Trans. Br. Mycol. Soc.* 41, 227–241.

Talboys P.W., 1964, A concept of the host-parasite relationship in *Verticillium* wilt diseases. *Nature*, 202, 361–362.

Tagu D, Walker N, Ruiz-Avila L, Burgess S, Martinez-Izquierdo JA, Leguay JJ, Netter P, Puigdomènech P, 1992, Regulation of the maize HRGP gene expression by ethylene and wounding mRNA accumulation and qualitative expression analysis of the promoter by microprojectile bombardment. *Plant Mol. Biol.* 20, 529–38.

Thomma BP, Cammue BP, Thevissen K, 2003. Mode of action of plant defensins suggests therapeutic potential. *Curr. Drug Targets Infect. Disord.* 3, 1–8.

Tjamos E. C., 1989, Problems and prospects in controlling *Verticillium* wilt. Pages 441-456 in: *Vascular Wilt Diseases of Plants*. E. C. Tjamos and C. Beckman, eds. Springer-Verlag, Berlin.

Tjamos, E. C., 2000, Strategies in developing methods and applying techniques for the biological of *Verticillium dahliae*. Pages 249-252 in: Advances in Verticillium Research and Disease Management. E. C. Tjamos, R.C. Rowe, J. B. Heale, and D. R. Fravel, eds. American Phytopathological Society, St. Paul, MN, U.S.A.

Tjamos E.C., and Paplomatas E.J., 1988, Long term effect of soil solarization in controlling Verticillium wilt of globe artichokes in Greece. *Plant Pathology* 37: 507 – 515.

Tjamos E. C., Tsitsigiannis D. I., Tjamos S. E., Antoniou P. P., and Katinakis P., 2004, Selection and screening of endorhizosphere bacteria from solarized soils as biocontrol agents against *Verticillium dahliae* of solanaceous hosts. *Eur. J. Plant Pathol.* 110:35-44.

Τζάμος Ε., 2005, Γενική Φυτοπαθολογία. Εκδόσεις Σταμούλη.

Tzima A., Paplomatas E. J., Rauyaree P., Ospina- Giraldo M., Kang S., 2011, VdSNF1, the Sucrose Nonfermenting Protein Kinase Gene of *Verticillium dahliae* is required for virulence and expression of genes involved in cell-wall degradation, *MPMI*, 24: p129-142.

Tzeng D, DeVay J, 1984, Ethylene production and toxigenicity of methionine and its derivatives with riboflavin in cultures of *Verticillium*, *Fusarium* and *Colletotrichum* species exposed to light. *Physiol Plant* 62: 545–552.

Tudzynski B, Sharon A, 2002, Biosynthesis, biological rôle and application of fungal phytohormones. In *The Mycota X, Industrial applications*, HD Osiewacz (ed.). Berlin: Springer-Verlag, pp. 183–211.

Vallad GE, Bhat RG, Koike ST, Ryder EJ, Subbarao KV., 2005, Weedborne reservoirs and seed transmission of *Verticillium dahliae* in lettuce. *Plant Dis.* 89:317–24

Vallad GE, Subbarao KV., 2008, Colonization of resistant and susceptible lettuce cultivars by a green fluorescent protein-tagged isolate of *Verticillium dahliae*. *Phytopathology* 98:871–85

Van Alfen N.K., 1989, Molecular bases for virulence and avirulence of fungal wilt pathogens. In: Tjamos, E.C., Beckman, C. (Eds.), *Vascular Wilt Diseases of Plants*. Springer, Berlin, p276 – 289.

VanderMolen G. E., Labavitch J. M., Strand L. L. & DeVay J. E., 1983, Pathogen- induced vascular gels: Ethylene as a host intermediate. – *Physiol. Plant.* 59: 573-580

Van Loon LC, Geraats BPJ, and Linthorst HJM, 2006 Ethylene as a modulator of disease resistance in plants. *TRENDS in Plant Science* 11, 184-191.

Van Loon LC, Van Strein EA, 1999. The families of pathogenesis-related proteins, their activities, and comparative analysis of PR-1 type proteins. *Physiol. Mol. Plant Pathol.* 55, 85-97.

Walton J. D., 1994, Deconstructing the Cell Wall. *Plant Physiology*, 104: 1113 – 1118.

Wang J.-Y., Cai Y., Gou J.-Y., Mao Y.-B., Xu Y.-H., Jiang W.-H., and Chen,X.-Y., 2004, *VdNEP*, an elicitor from *Verticillium dahliae*, induces cotton plant wilting. *Applied and Environmental Microbiology*, 70: 4989–4995.

Wiese M. V. & DeVay J. E., 1970, Growth regulator changes in cotton associated with defoliation caused by *Verticillium albo-atrum*. – *Plant Physiol.* 45: 304-309

Wilhelm S., 1955, Longevity of the *Verticillium* wilt fungus in the laboratory and in the field. *Phytopathology*, 45, 180–181.

Williams J., Hall S.A., Hawkesford M.J., Beale M.H. and Cooper R.M., 2002, Elemental sulfur and thiol accumulation in tomato and defense against a fungal vascular pathogen. *Plant Physiol.* 128, 150–159.

Yang S, Hoffman N., 1984, Ethylene biosynthesis and its regulation in higher plants. *Annu Rev Plant Physiol* 35: 155–189.

Zare R, Gams W, Starink-Willemse M, Summerbell RC., 2007, Gibellulopsis, a suitable genus for *Verticillium nigrescens*, and Musicillium, a new genus for *V. theobromae*. *Nova Hedwigia* 85:463–89

ΠΑΡΑΡΤΗΜΑ

ATG = Translational Start/Stop

atgc = UTR

ATGC = Exon

atgc = Intron

ATGC = Forward primer

ATGC = Reverse primer

V.dahliae gene for 5.8S ribosomal RNA (Z29511)

ccgagtatctactcataacccttgtgaaccatattgtgcttcggcggctcgttctgcgagc**ccgcccgggccatcagtcctctgtttatcaacg**
atactctgagtgcttagcgaactatta**AAACTTTTAAACAACGGATCTCTTGGCTCTAGCATCGATGAA**
GAACGCAGCGAAACGCGATATGTAGTGTGAATTGCAGAATTCAGTGAATCATCGAAT
CTTTGAACGCACATGGCGCCTTCCAGTATCCTGGGAGGCATGCCTGTCCGAGCGTCGT
TTCAACCCTCGAGCCCCAGTGGCCCGGTGTTGGGGATCTACGTCTGTAGGCCCTTAAA
AGCAGTGGCGGACCCGCGTGGCCCTTCCTTGCGTAGTA**GTACAGCTCCCATCGGAGT**
CCCGCAGGGCTTGCCCTCTAAACCCCTACAAGCCCGCCTCGTGCGGCAACG

ATGC = ITS1

ATGC = ITS2

Primers

Vd-F: 5'-CCGCCGGTCCATCAGTCTCTCTGTTTATAC-3'

Vd-R: 5'-CGCCTGCGGGACTCCGATGCGAGCTGTAAC-3'

V.dahliae ACS (VDAG_05021.11)

tgtttctaaacctcgagcacattctgcgtcatcattcaaaagagttcactctccctgtgcagccaggactggacgtgaaaaca**ATGTTA**
TCAACTCGGGCCGCCACAACATTGGCGCAACTGGACATCCCCTGGCGATTTACCCCAG
CCGCCAGGGATCTGTTCGATGCCGAATCCAATCCCGGAGGTATCATCTCTCTTGCAAA
GGCTGCGAACCCTTGATGTACGATGATCTCGTCGAGTTTTCTTCGAAG**gtaatcgattatcaa**
aggcgggtttaccgacctaacatcgttttagGTAGAGTTTCCGCCTGCTTCCTTCACATATGGCTACAGC
AGCTTTGGCGGACCCCGCCTCGCTGCTGCTCTCGCAACACACGTCAACGAGACATTCA
ACCCATTCTCCCCAGTCTTGCCCTCGGATATACAGATTGTCAATGGTGCTACTTCTCTC
CATTCCGTCTCGCCTTTTCCCTAGCCGAGCAGGGCGATGCCATCCTTGCTCCGCGCCC
TGTGTATGGTCGTTTCGAACTAGACCTGGGCAACGCCATGGGCGTCAAAGTGGCTTAT

ΠΑΡΑΡΤΗΜΑ

GCCGACTGCGCCTCTGCAGAAGCGCTTGAACCTTCTGTCGTTGTTCTTTGTGAAGAGG
CCTTGCAGAAGGCCAAGGTTGGCGGTATCAATGTGAAGGCGGTGCTAGTTGTGAATC
CAAGTAACCCCTGGGTCGT**TGCTACCCCCGCGAGACGTT**GGTGGGATTGCTCGAGTT
CTGTCAGAGGCACCGGCTCCATCTCATCAGTGATGAGGTATACGGTCTCTCAGTCTTT
GGCCCCGGAACGGGCTCAAGCCGTGGCTTGCACCCCTTCACATCGGTGCTGTCTATCG
ACCTTACGAATCTCATCGACCCGAACCTGGTTCACGTCGAGTACGGCACGAGCAAGG
ACTTTGCAGCCGCAGGACTGCGTCTGGGGGCGCTCATAACCAAGAATCGCGAGCTGC
AGCGCTCCGTCCAGGCTGTCGGCCGGTTTACGAACCTTCGGGTATGTCCGTCCCAT
CGGCACAGCTATGTTTCGAGGACCGAGAGTGGTGTGCGCCTTCATACTGAATGCACG
AGCACGCATCGGCGACGCATAACAAGTTTGTACACGGGAGGTTGAGTGAGATTGGAAT
ATCGTATCTCGAGGCCAATGCTGGGTACTTTGTCTGATCGACCTGGCGCCCTGGCTG
CCACCTGAAGGCAAAGTATATGATACTACGCAGCAGAGAGAGTTTTCGCTGGCTGAG
AAACTGGTTGAAGGTGGGGTTTTCTTGCATCCGGGGGAGGAGCATGCTCTTGAGGCTG
GGAAGTTTCGTCTCGTTTACACGCAACAGCGGCCGATCATCACCGAAGGCTTGAAGA
GgtattttgatattgttcggcgtgtttctacggtcagcactgacaaactgatagGCTCGATGCTGTTCTGAAGAGCGTG
GATTGGTCCGTG**TAG**cttgcgaaggaaacctatggctaccttggcgtagctgctctatatgcacgtgtcctcgcgaggtttgt
tcacgcgatactgtcctatttcccc

Primers

ACS_DNA-F: 5'- AACTCGGGCCGCCACAACATT -3'

ACS_DNA-R: 5'- AACGTCTCGCGGGGGTAGCA - 3'

V.dahliae ACS (VDAG_05021.11)

tgttctcaaacctcgagcacattctgcgtcatcattcaaaagagtttactctccctgtgcagccaggactggacgtgaaaaca**ATGTTA**
TC**AACTCGGGCCGCCACAACATI**GGCGCAACTGGACATCCCCTGGCGATTACCCAG
CCGCCAGGGATCTGTTTCGATGCCGAATCCAATCCCGGAGGTATCATCTCTTTGCAAA
GGCTGCGAACCCTTGATGTACGATGATCTCGTCGAGTTTTCTTCGAAGgtaatcgattatcaa
aggcgggtttcaccgacctaacatcgtttagG**TAGAGTTTCCGCCTGCTTCCTTCA**CATATGGCTACAGC
AGCTTTGGCGGACCCCGCCTCGCTGCTGCTCTCGCAACACACGTCAACGAGACATTCA
ACCCATTCTCCCCAGTCTTGCCCTCGGATATACAGATTGTCAATGGTGCTACTTCTCTC
CATTCCGTCTCGCCTTTTCCCTAGCCGAGCAGGGCGATGCCATCCTTGCTCCGCGCCC
TGTGTATGGTCGTTTCGAACTAGACCTGGGCAACGCCATGGGCGTCAAAGTGGCTTAT
GCCGACTGCGCCTCTGCAGAAGCGCTTGAACCTTCTGTCGTTGTTCTTTGTGAAGAGG
CCTTGCAGAAGGCCAAGGTTGGCGGTATCAATGTGAAGGCGGTGCTAGTTGTGAATC
CAAGTAACCCCTGGGTCGTTGCTACCCCGCGAGACGTTGGTGGGATTGCTCGAGTT
CTGTCAGAGGCACCGGCTCCATCTCATCAGTGATGAGGTATACGGTCTCTCAGTCTTT
GGCCCCGGAACGGGCTCAAGCCGTGGCTTGCACCCCTTCACATCGGTGCTGTCTATCG
ACCTTACGAATCTCATCGACCCGAACCTGGTTCACGTCGAGTACGGCACGAGCAAGG
ACTTTGCAGCCGCAGGACTGCGTCTGGGGGCGCTCATAACCAAGAATCGCGAGCTGC
AGCGCTCCGTCCAGGCTGTCGGCCGGTTTACGAACCTTCGGGTATGTCCGTCCCAT
CGGCACAGCTATGTTTCGAGGACCGAGAGTGGTGTGCGCCTTCATACTGAATGCACG

IIAPAPTHMA

AGCACGCATCGGCGACGCATACAAGTTTGTACACGGGCAGGTTGAGTGAGATTGGAAT
ATCGTATCTCGAGGCCAATGCTGGGTACTTTGTCTGATCGACCTGGCGCCCTGGCTG
CCACCTGAAGGCAAAGTATATGATACTACGCAGCAGAGAGAGTTTGCCTGGCTGAG
AAACTGGTTGAAGGTGGGGTTTTCTTGCATCCGGGGGAGGAGCATGCTCTTGAGGCTG
GGAAGTTTCGTCTCGTTTACACGCAACAGCGGCCGATCATCACCGAAGGCTTGAAGA
GgtatattgatattgtttcggcgtgtttctacggtcacgactgacaaactgatagGCTCGATGCTGTTCTGAAGAGCGTG
GATTGGTCCGTGTAGcttgcgaaggaaacctatggctaccttggcgtagctgctctatatgcacgtgtcctcgcgaggctttgt
tcacgcgatactgtcctatttcccc

Primers

ACS_RNA_F: 5'- AACTCGGGCCGCCACAACATT – 3'

ACS_RNA_R: 5'- TGAAGGAAGCAGGCGGAAACTCTA – 3'

V.dahliae ACS (VDAG_05021.11)

agctaccttttggcctgtttctcaaacctcgacacattctgcgtcatcattcaaaagagtttactctccctgtgcagccaggactggacgtg
aaaacaATGTTATCAACTCGGGCCGCCACAACATTGGCGCAACTGGACATCCCCTGGCGA
TTTACCCCAGCCGCCAGGGATCTGTTTCGATGCCGAATCCAATCCCGGAGGTATCATCT
CTCTTGCAAAGGCTGCGAACCCCTTGATGTACGATGATCTCGTCGAGTTTTCTTCGAA
GgtaatcgtattatcaaaggcgggtttcaccgacctaacatcgttttagGTAGAGTTTCCGCCTGCTTCCTTCACATA
TGGCTACAGCAGCTTTGGCGGACCCCGCCTCGCTGCTGCTCTCGCAACACACGTCAAC
GAGACATTCAACCCATTCTCCCCAGTCTTGCCCTCGGATATACAGATTGTCAATGGTG
CTACTTCTCTCCATTCCGTCCCTCGCCTTTTCCCTAGCCGAGCAGGGCGATGCCATCCTT
GCTCCGCGCCCTGTGTATGGTCGTTTCGAACTAGACCTGGGCAACGCCATGGGCGTCA
AAGTGGCTTATGCCGACTGCGCCTCTGCAGAAGCGCTTGAACCTTCTGTCTGTTGTTCTT
TGTGAAGAGGCCTTGCAGAAGGCCAAGGTTGGCGGTATCAATGTGAAGGCGGTGCTA
GTTGTGAATCCAAGTAACCCCTGGGTGCTTACCCCGCGAGACGTTGGTGGGAT
TGCTCGAGTTCTGTGAGAGGCACCGGCTCCATCTCATCAGTGATGAGGTATACGGTCT
CTCAGTCTTTGGCCCCGGAACGGGCTCAAGCCGTGGCTTGCACCCCTTCACATCGGTG
CTGTCTATCGACCTTACGAATCTCATCGACCCGAACCTGGTTCACGTCGAGTACGGCA
CGAGCAAGGACTTTGCAGCCGCAGGACTGCGTCTGGGGCGCTCATAACCAAGAATC
GCGAGCTGCAGCGCTCCGTCCAGGCTGTCGGCCGGTTTCACGAACCTTCGGGTATGTC
CGTCGCCATCGGCACAGCTATGTTTCGAGGACCGAGAGTGGTGTGCGCCTTCATACTG
AATGCACGAGCACGCATCGGCGACGCATACAAGTTTGTACGGGCAGGTTGAGTGAG
ATTGGAATATCGTATCTCGAGGCCAATGCTGGGTACTTTGTCTGATCGACCTGGCGC
CCTGGCTGCCACCTGAAGGCAAAGTATATGATACTACGCAGCAGAGAGAGTTTGC
TGGCTGAGAACTGGTTGAAGGTGGGGTTTTCTTGCATCCGGGGAGGAGCATGCTCT
TGAGGCTGGGAAGTTTCGTCTCGTTTACACGCAACAGCGGCCGATCATCACCGAAGGC
TTGAAGAGgtatattgatattgtttcggcgtgtttctacggtcacgactgacaaactgatagGCTCGATGCTGTTCTGAA
GAGCGTGGATTGGTCCGTGTAGcttgcgaaggaaacctatggctaccttggcgtagctgctctatatgcacgtgtcctc
gcgaggctttgttcacgcgatactgtcctatttccccaggtttgagactgttgtatga

Primers

ACS_RNA_af_F: 5'-GGGGGCGCTCATAACCAAGAAT-3'

ACS_RNA_af_R: 5'-GGTTTCTTGCATCCGGGGG-3'

Solanum lycopersicum beta-tubulin (TUB) (DQ205342)

ggctcttccatttctccctcatcttcatcttcatcttcttcttcttattctctcattcctctcatcaatTTTTTCATCAAAAACTAAGAGAA
 aATGagagaaattcttcaatcaaggaggacaatgtggaaacaaatcggtccaaattctgggaagtatctgtgatgaacacgggtgtga
 tctaccggacgftacaaggaaccgccgctgagtcagatcttcagcttgaacgtatcaatgtttattcaatgaagcttctggtggacgtaattgt
 cctagggcggtttgatggatctagagcctggtacgatggatagatcagatctggtccctatggacagatctccgctctgataactttgctttg
 gacagctggtgctgtaataactgggcaaaaggtcattatactgaaggcgtgagtgattgatgctgttctagatgtttcgtaaagaagcgg
 agaattgtgattgctgcaaggattccagggttccactcacttgggtggaggactggatctggcatgggaacactactgattccaaggttaagg
 gaggagtatccagacaggatgatgtcacattctgtttcccttctcaaagggtctgacactgtttagaaccatacaatgctacactgtcgg
 tgcaccaattggtggagaatccgatgaatgtatggtccttgacaacgaagctctatatgatattgtttcagaacttgaagctcactactccaag
 tttggtgacttgaaccatttgcactctgaaccatgagtggtgttacttctgtttgagattccctggtcagctgaactcagacctgaggaaattgg
 ctgtgaatttaattccctccacgtcttcaattcttcatggtgggatttgccttactaactctctggatcacagcaatacatatcctaacagt
 ccagagcttactcaacaatgtgggatgccaaagaacatgatgtgcgcgagatccccgctatggacgttacctgacagcttctgcatgttta
 gggtaagatgagcaaaaaggaggatagatgaacagatgatcaatgtgcagaacaagaactcgtcctactttgtggaatggatccctaacaatgt
 caagtctagtgtgtgatatcccactgaggctgaagatggcatccacgtttgttgaaattcaactccattcaggagatgtttagaagggt
 gagtgagcagtttactgcatgttcaggcgcgaaggcttcttgcattggtacacaggtgaaggatggatgaaatggagtctactgaagccgag
 agcaacatgaatgatttgggtgcagaatatcaacaataaccaggatgctacagcagatgatgaggaagagatgatgatgatgaggttctgatg
 atcaataccaatcTAAaaactctctacatttgcattatattgttggtttgcatttctgccaagtgaactgttatgttctattgtcttcttctatt
 gaacttctgtttggtttggtgagaaatgaatgtctttattgtctatagaatatactgtattacagtaaaaaaaaaaaaaaaaaaaaaaaaaaa
 aaaaaaa

Primers

LeTUB-F: 5'-GATTTGCCCCACTAACCTCTCGT-3'

LeTUB-R: 5'-ACCTCCTTTGTGCTCATCTTACCC-3'

Verticillium dahliae beta-tubulin (VDAG 10074.1)

CCACCCGCGTCTTCTGAAGCTGTCCTCTGCTTCCAAGCTCTTCCCAGCCTTGCCTATC
 GTCGTTACGCTTCCTCAGCCTTCCAACATCAAGATGCGTGAGATTGTAAGTCACTCC
 CATTCCAGCCCAACTCGACGCGTCTCTTCCACCCATTTCGGCCGCCCTGAACTCT
 ACCCCGCTGAGTCCTGAACCACGTTGTCCCGACCTCGCCCGCGATCACGACGGCACTC
 GAAAAACGACGTCAAACCTGACCGTGCTACACTCCTCCTGAAGTCCATGGACTGACCT
 TGGTTTCCCTCTCTTAAAGGTCACCCTCCCAGANNNNNNNNNNNNNNNNNNNNNNNN
 NNN
 NNNNNNNNNNNNNNNNNNNNNNTCACTGGATGAACAGGGTAACCAGATCGGTGCT
 GCTTTCTGGCAGAACATCTCTGGCGAGCACGGCCTCGACAGCAATGGCGTGTATGCTT
 TCCCTCCCAGTACGAAACCTACGGGGCCATTTCGTTGCTGTAGACCGGTTACTGAC
 GCGATGACAGCTACAACGGCACTTCCGAGCTCCAGCTCGAGCGCATGAACGTCTACTT
 CAACGAGGTATGTCAAACAACAGTCCGATGGATAATTCTCAGCAGCATTGTGCTCATG
 GTTTTCTTTCTTTGCAGGCCTCTGGCAACAAGTACGTTCCCCGTGCCGTCTCGTCGAT
 CTCGAGCCCGGTACCATGGACGCCGTCCGCGCTGGTCCCTTCGGCCAGCTCTTCCGCC
 CCGACAACCTTCGTCTTCGGCCAGTCCGGCGCCGGCAACAACCTGGGCAAAGGGTCACT

ΠΑΡΑΡΤΗΜΑ

ACACTGAGGGTGCCGAGCTCGTTCGACCAGGTTCTCGATGTCGTCCGTTCGTGAGGCTGA
GGGCTGCGATTGCCTCCAGGGTTTCCAGATCACCCACTCCCTCGGTGGTGGTACCGGT
GCCGGTATGGGTACTCTGCTGATCTCCAAGATCCGCGAGGAGTTCCCTGACCGCATGA
TGGCTACCTTCTCGGTTCGTTCCCTCGCCCAAGGTTTCCGACACCGTTGTCGAGCCCTAC
AACGCCACCCTCTCCGTGCACCAGCTCGTTGAGAACTCCGACGAGACCTTCTGCATTG
ACAACGAGGCTCTCTACGACATTTGCATCCGCACCCTCAAGCTGTCCAACCCCTCGTA
CGGCGACCTTAACCACCTCGTTTCCGCCGTTCATGTCCGGCGTCTCGACCTCGCTTCGTT
TCCCCGGCCAGCTCAACTCCGATCTCCGCAAGCTCGCCGTCAACATGGTTCCC **TTCCC**
CCGTCTCCACTTCTTCATG GTCGGCTTCGCTCCTCTGACCAGCCGCGGCTCGCACTCTT
TCCGTGCCGTCAGCGTTCCCTGAGCTCACCCAGCAGATGTTTCGACCCCAAGAACATGAT
GGCCGCCTCTGACTTCCGTAACGGTCGCTACCTGACCTGCTCCGCCATCTTGTAAGCTC
TACCACCCCCCTAAGCTCGTCCAAATTTGCTCTTTTCTAACAAGTTTCCCTTCACAG
CCGTGGCAAGGTTGCCATGAAGGAGGTCGAGGACCAGATGCGCAACGTCCAGAGCAA
GAACTCTTCGTA CTTCGTTGAGTGGATCCCCAACAAACGTCCAGACCCGCCCTTTGCTCC
ATCCCTCCCCGTGGCCTCAAGATGTCCTCCACCTTCGTTCGGTAACTCCACCGCCATCCA
GGAGCTCTTCAAGCGTATCGGCGAGCAGTTCACTGCCATGTTCCGGCGCAAGGCTTTC
CTTCACTGGTACACTGGTGAGGGTATGGACGAGATGGAGTTCACTGAGGCT **GAGTCC**
AACATGAACGATCTTGTC TCGGAGTACCAGCAGTACCAGGATGCTGGTGTTCGATGAG
GAGGAGGAGGAGTACGAGGAGGAGGCTCCTCTCGACGAGGAGCCT **TAG** ATGGCTTCT
CTCGATGCATTGCTATGCAGTCCTTCTGCAGTGGCGATTGATGATCAAGCGCGGTGAC
AAGCGATCAGTCCAGAATGTGGACTTTCAATTCGGGCCTGTGGCCAAGAAACCGATA
CGGGGGCCTTCTACATATACCTCTTAGTAGTGTGAGTGGCGTCTTAAT

Primers

VdBt-F : 5' - TTCCCCCGTCTCCACTTCTTCATG -3'

VdBt-R : 5' - GACGAGATCGTTCATGTTGAACTC -3'
