

ΓΕΩΠΟΝΙΚΟ ΠΑΝΕΠΙΣΤΗΜΙΟ ΑΘΗΝΩΝ
ΣΧΟΛΗ ΑΓΡΟΤΙΚΗΣ ΠΑΡΑΓΩΓΗΣ, ΥΠΟΔΟΜΩΝ ΚΑΙ ΠΕΡΙΒΑΛΛΟΝΤΟΣ
ΤΜΗΜΑ ΕΠΙΣΤΗΜΗΣ ΦΥΤΙΚΗΣ ΠΑΡΑΓΩΓΗΣ
ΕΡΓΑΣΤΗΡΙΟ ΦΥΤΟΠΑΘΟΛΟΓΙΑΣ

ΜΕΤΑΠΤΥΧΙΑΚΗ ΜΕΛΕΤΗ

**Ο ρόλος του γονιδίου του δευτερογενούς μεταβολισμού *VdLaeA*
στη μορφολογία και παθογένεια του φυτοπαθογόνου μύκητα
*Verticillium dahliae***

ΕΙΡΗΝΗ-ΧΡΥΣΟΒΑΛΑΝΤΟΥ Σ. ΚΙΣΣΑ

ΑΘΗΝΑ 2017

ΓΕΩΠΟΝΙΚΟ ΠΑΝΕΠΙΣΤΗΜΙΟ ΑΘΗΝΩΝ
ΣΧΟΛΗ ΑΓΡΟΤΙΚΗΣ ΠΑΡΑΓΩΓΗΣ, ΥΠΟΔΟΜΩΝ ΚΑΙ ΠΕΡΙΒΑΛΛΟΝΤΟΣ
ΤΜΗΜΑ ΕΠΙΣΤΗΜΗΣ ΦΥΤΙΚΗΣ ΠΑΡΑΓΩΓΗΣ
ΕΡΓΑΣΤΗΡΙΟ ΦΥΤΟΠΑΘΟΛΟΓΙΑΣ

ΕΙΡΗΝΗ-ΧΡΥΣΟΒΑΛΑΝΤΟΥ Σ. ΚΙΣΣΑ

ΜΕΤΑΠΤΥΧΙΑΚΗ ΜΕΛΕΤΗ
που υποβλήθηκε στο
Γεωπονικό Πανεπιστήμιο Αθηνών

Ο ρόλος του γονιδίου του δευτερογενούς μεταβολισμού *VdLaeA*
στη μορφολογία και παθογένεια του φυτοπαθογόνου μύκητα
Verticillium dahliae

Τριμελής Εξεταστική Επιτροπή:

- 1. Δημήτριος Τσιτσιγιάννης, Αναπληρωτής Καθηγητής, Επιβλέπων**
- 2. Σωτήριος Τζάμος, Επίκουρος Καθηγητής, Μέλος**
- 3. Αλίκη Τζίμα, Λέκτορας, Μέλος**

ΕΥΧΑΡΙΣΤΙΕΣ

Η υλοποίηση αυτής της μεταπτυχιακής μελέτης θα ήταν αδύνατη χωρίς τη βοήθεια πολλών ανθρώπων. Θα ήταν παράλειψή μου να μην αναφερθώ σ'αυτούς. Το συνεχές ενδιαφέρον και η καθοδήγηση που επέδειξαν, με οδήγησε σε ορθά και ουσιαστικά αποτελέσματα καταστρώντας εφικτή την ολοκλήρωσή της.

Θα ήθελα αρχικά να εκφράσω τη βαθιά μου ευγνωμοσύνη στον Επιβλέποντα Καθηγητή μου Δημήτριο Τσιτσιγιάννη, ο οποίος με εμπιστεύτηκε και με παρότρυνε να συνεχίσω τις σπουδές μου, σε μεταπτυχιακό επίπεδο στο χώρο του εργαστηρίου της Φυτοπαθολογίας και μου ανέθεσε την παρούσα μεταπτυχιακή μελέτη. Το απaráμιλλο ενδιαφέρον του και η αγάπη του στο διδακτικό έργο τον καθιστούν ένα εξάαιρετο καθηγητή και ερευνητή, που σου εμπνέει το σεβασμό και την εμπιστοσύνη να συνεχίσεις και εσύ την επιστημονική σου κατάρτιση. Το ενδιαφέρον του, η καθοδήγησή του και οι πολύτιμες παρατηρήσεις του ήταν συνεχείς καθ'όλη τη διάρκεια της έρευνας. Κατά τη διόρθωση της μελέτης οι παρατηρήσεις βελτίωσαν το τελικό κείμενο.

Ευχαριστώ θερμά τον Καθηγητή και Διευθυντή του Εργαστηρίου Φυτοπαθολογίας Επαμεινώνδα Παπλωματά που συνέβαλε στο να μου δοθεί η ευκαιρία να πραγματοποιήσω τη μεταπτυχιακή μελέτη αυτή και πίστεψε από την αρχή στις δυνατότητες μου. Τον ευχαριστώ για το συνεχές και ειλικρινό ενδιαφέρον του.

Επιπλέον, θα ήθελα να ευχαριστήσω ιδιαίτερα την Αναπληρώτρια Καθηγήτρια Πολύμνια Αντωνίου και την Επίκουρο Καθηγήτρια Ελισάβετ Χατζηβασιλείου, για τη συμβολή τους, η οποία υπήρξε πολύτιμη.

Ευχαριστίες οφείλω και στον Επίκουρο Καθηγητή Σωτήριο Τζάμο για την πολύτιμη βοήθεια και συνεργασία του, καθώς και το χρόνο που διέθεσε για την ανάγνωση της μεταπτυχιακής μου μελέτης, ως μέλος της τριμελούς επιτροπής.

Ιδιαίτερα ευγνώμων αισθάνομαι για τη Λέκτορα του Εργαστηρίου Φυτοπαθολογίας Αλίκη Τζίμα της οποίας το ενδιαφέρον της για τη δουλειά μου, η συνεργασία και η καθοδήγησή της συνέβαλαν στην ολοκλήρωση του πειράματος.

Θερμές ευχαριστίες οφείλω στο διδακτικό προσωπικό του Εργαστηρίου την κυρία Γαρυφαλλιά Φραγκογεώργη και τον κύριο Εμμανουήλ Μαρκάκη για την άψογη συνεργασία και το φιλικό περιβάλλον που δημιούργησαν.

Τέλος ευχαριστώ θερμά όλους τους προπτυχιακούς, μεταπτυχιακούς και υποψήφιους διδάκτορες του εργαστηρίου Φυτοπαθολογίας που ήταν πάντα δίπλα μου πρόθυμοι να συμβάλλουν με τις γνώσεις τους αλλά και με το υπέροχο κλίμα μέσα στο οποίο εργάστηκα, στην εκπόνηση αυτής της μεταπτυχιακής μου μελέτης.

ΠΕΡΙΕΧΟΜΕΝΑ

ΠΕΡΙΛΗΨΗ	7
1. ΕΙΣΑΓΩΓΗ.....	9
1.1 Ο ΦΥΤΟΠΑΘΟΓΟΝΟΣ ΜΥΚΗΤΑΣ <i>VERTICILLIUM DAHLIAE</i>	9
1.1.1 ΑΔΡΟΜΥΚΩΣΕΙΣ.....	9
1.1.2 ΒΙΟΛΟΓΙΚΟΣ ΚΥΚΛΟΣ ΤΟΥ ΜΥΚΗΤΑ <i>VERTICILLIUM DAHLIAE</i> , ΤΡΟΠΟΙ ΑΠΟΙΚΙΣΗΣ, ΕΓΚΑΤΑΣΤΑΣΗΣ ΚΑΙ ΔΙΑΧΕΙΜΑΝΣΗΣ	10
1.1.3 ΞΕΝΙΣΤΕΣ	15
1.1.4 ΣΥΜΠΤΩΜΑΤΟΛΟΓΙΑ.....	15
1.1.5 ΣΥΝΘΗΚΕΣ ΑΝΑΠΤΥΞΗΣ ΤΟΥ ΜΥΚΗΤΑ <i>VERTICILLIUM DAHLIAE</i>	19
1.1.6 ΜΗΧΑΝΙΣΜΟΙ ΠΑΘΟΓΕΝΕΙΑΣ ΤΟΥ ΜΥΚΗΤΑ <i>V. DAHLIAE</i>	22
1.2 ΦΥΣΙΟΛΟΓΙΑ ΤΗΣ ΑΜΥΝΑΣ ΤΟΥ ΦΥΤΟΥ ΕΝΑΝΤΙΑ ΣΤΗ ΜΟΛΥΝΣΗ ΑΠΟ ΕΙΔΗ ΤΟΥ ΓΕΝΟΥΣ <i>VERTICILLIUM SPP.</i>	24
1.2.1 Ο ΡΟΛΟΣ ΤΩΝ ΜΟΡΙΩΝ ΣΗΜΑΤΩΝ ΤΟΥ ΦΥΤΟΥ	27
1.2.2 ΤΑ ΓΟΝΙΔΙΑ ΑΝΘΕΚΤΙΚΟΤΗΤΑΣ <i>VE</i>	29
1.3 ΑΝΤΙΜΕΤΩΠΙΣΗ ΤΟΥ ΜΥΚΗΤΑ <i>V. DAHLIAE</i>	29
1.4 Η ΠΡΩΤΕΙΝΗ <i>LAEΑ</i> ΚΑΙ Ο ΔΕΥΤΕΡΟΓΕΝΗΣ ΜΕΤΑΒΟΛΙΣΜΟΣ	32
1.4.1 ΤΟ ΓΟΝΙΔΙΟ <i>LAEΑ</i> ΣΤΟΥΣ ΜΥΚΗΤΕΣ <i>A. FUMIGATUS</i> ΚΑΙ <i>A. FLAVUS</i> ..	35
1.5 ΚΥΤΤΑΡΙΚΟΣ ΘΑΝΑΤΟΣ-ΑΝΤΙΔΡΑΣΗ ΥΠΕΡΕΥΑΙΣΘΗΣΙΑΣ.....	37
1.6 ΤΟ ΣΤΕΛΕΧΟΣ K165 ΤΟΥ ΒΑΚΤΗΡΙΟΥ <i>PAENIBACILLUS ALVEI</i>	39
2. ΣΚΟΠΟΣ ΤΗΣ ΠΑΡΟΥΣΑΣ ΜΕΛΕΤΗΣ	41

3. ΥΛΙΚΑ ΚΑΙ ΜΕΘΟΔΟΙ	43
3.1 ΥΠΕΡΕΚΦΡΑΣΗ ΤΟΥ ΓΟΝΙΔΙΟΥ <i>VDLAE</i> ΣΤΟ ΜΥΚΗΤΑ <i>VERTICILLIUM DAHLIAE</i>	43
3.1.1 ΣΧΕΔΙΑΣΜΟΣ ΕΚΚΙΝΗΤΩΝ	43
3.2 ΜΙΚΡΟΒΙΟΛΟΓΙΚΟ ΥΛΙΚΟ - ΣΥΝΘΗΚΕΣ ΔΙΑΤΗΡΗΣΗΣ	45
3.3 ΑΠΟΜΟΝΩΣΗ ΓΕΝΩΜΙΚΟΥ DNA ΑΠΟ ΤΟ ΜΥΚΗΤΑ <i>V.DAHLIAE</i>	46
3.4 ΕΦΑΡΜΟΓΗ ΑΛΥΣΙΔΩΤΗΣ ΑΝΤΙΔΡΑΣΗΣ ΠΟΛΥΜΕΡΑΣΗΣ (POLYMERASE CHAIN REACTION-PCR)	47
3.5 ΚΑΘΑΡΙΣΜΟΣ ΠΡΟΪΟΝΤΟΣ PCR-MIN ELUTE PCR PURIFICATION KIT (QIAGEN)	48
3.5.1 ΠΕΨΗ ΝΟΥΚΛΕΪΚΩΝ ΟΞΕΩΝ ΜΕ ΠΕΡΙΟΡΙΣΤΙΚΑ ENZYMA	48
3.5.2 ΗΛΕΚΤΡΟΦΟΡΗΣΗ ΤΜΗΜΑΤΩΝ DNA	49
3.5.3 ΚΑΘΑΡΙΣΜΟΣ ΚΑΙ ΑΠΟΜΟΝΩΣΗ DNA ΑΠΟ ΠΗΓΜΑ ΑΓΑΡΟΖΗΣ- QIAQUICK GEL EXTRACTION KIT PROTOCOL USING A MICROCENTRIFUGE-QIAGEN	49
3.5.4 ΑΝΤΙΔΡΑΣΗ ΣΥΝΕΝΩΣΗΣ.....	50
3.5.5 ΜΕΤΑΣΧΗΜΑΤΙΣΜΟΣ ΣΕ ΕΠΙΔΕΚΤΙΚΑ ΚΥΤΤΑΡΑ DH5A ΤΟΥ ΒΑΚΤΗΡΙΟΥ <i>E.COLI</i>.....	50
3.5.6 ΑΠΟΜΟΝΩΣΗ ΚΑΙ ΚΑΘΑΡΙΣΜΟΣ ΠΛΑΣΜΙΔΙΑΚΩΝ ΦΟΡΕΩΝ ΑΠΟ <i>E.COLI</i>.....	51
3.5.7 COLONY BLOTTING ΓΙΑ ΤΗΝ ΕΠΙΒΕΒΑΙΩΣΗ ΤΟΥ ΜΕΤΑΣΧΗΜΑΤΙΣΜΟΥ	53
3.6 ΦΑΙΝΟΤΥΠΙΚΟΣ ΧΑΡΑΚΤΗΡΙΣΜΟΣ ΤΩΝ ΜΕΤΑΛΛΑΓΜΕΝΩΝ Δ<i>VDLAE</i> ΣΤΕΛΕΧΩΝ ΚΑΙ ΤΟΥ <i>V. DAHLIAE</i>	55
3.7 ΠΕΙΡΑΜΑΤΑ ΠΑΘΟΓΕΝΕΙΑΣ ΣΕ ΕΠΙΛΕΓΜΕΝΟΥΣ ΞΕΝΙΣΤΕΣ	56

3.7.1 ΠΡΟΕΤΟΙΜΑΣΙΑ ΦΥΤΙΚΟΥ ΥΛΙΚΟΥ	56
3.7.2 ΚΑΤΑΓΡΑΦΗ ΣΥΜΠΤΩΜΑΤΩΝ	58
3.7.3 ΕΚΤΙΜΗΣΗ ΠΑΘΟΓΟΝΟΥ ΙΚΑΝΟΤΗΤΑΣ ΚΑΙ ΔΕΙΚΤΗ ΑΣΘΕΝΕΙΑΣ.....	60
3.8 ΔΟΚΙΜΕΣ ΚΥΤΤΑΡΙΚΟΥ ΘΑΝΑΤΟΥ	60
3.9 ΔΟΚΙΜΕΣ ΠΑΘΟΓΕΝΕΙΑΣ ΜΕ ΜΙΚΡΟΣΚΛΗΡΩΤΙΑ ΣΤΟ ΧΩΜΑ ΣΕ ΦΥΤΑ ΜΕΛΙΤΖΑΝΑΣ	62
3.10 ΠΑΡΕΜΠΟΔΙΣΤΙΚΗ ΔΡΑΣΗ ΤΟΥ K-165.....	64
3.11 ΘΡΕΠΤΙΚΑ ΥΛΙΚΑ-ΡΥΘΜΙΣΤΙΚΑ ΔΙΑΛΥΜΑΤΑ.....	64
4. ΑΠΟΤΕΛΕΣΜΑΤΑ.....	67
4.1 ΚΛΩΝΟΠΟΙΗΣΗ ΤΜΗΜΑΤΩΝ DNA ΣΕ ΠΛΑΣΜΙΔΙΑΚΟ ΦΟΡΕΑ.....	67
4.1.1 ΕΝΙΣΧΥΣΗ ΜΕ PCR ΚΑΙ ΚΛΩΝΟΠΟΙΗΣΗ ΤΗΣ ΠΕΡΙΟΧΗΣ F1R1	67
4.1.2 ΠΕΨΗ ΝΟΥΚΛΕΪΚΩΝ ΟΞΕΩΝ	68
4.1.3 ΗΛΕΚΤΡΟΦΟΡΗΣΗ ΤΩΝ ΠΕΨΕΩΝ, ΚΑΘΑΡΙΣΜΟΣ ΚΑΙ ΑΠΟΜΟΝΩΣΗ DNA ΑΠΟ ΤΟ ΠΗΓΜΑ ΑΓΑΡΟΖΗΣ	68
4.1.4 ΑΝΤΙΔΡΑΣΗ ΣΥΝΕΝΩΣΗΣ (LIGATION)	70
4.1.5 ΜΕΤΑΣΧΗΜΑΤΙΣΜΟΣ ΣΕ ΕΠΙΛΕΚΤΙΚΑ ΚΥΤΤΑΡΑ (DH5A) ΤΟΥ ΒΑΚΤΗΡΙΟΥ <i>E.COLI</i>, ΑΠΟΜΟΝΩΣΗ ΚΑΙ ΚΑΘΑΡΙΣΜΟΣ ΠΛΑΣΜΙΔΙΑΚΩΝ ΦΟΡΕΩΝ.....	70
4.1.6 ΕΝΣΩΜΑΤΩΣΗ ΤΟΥ ΚΛΩΝΟΠΟΙΗΜΕΝΟΥ ΤΜΗΜΑΤΟΣ <i>VDLAE</i> ΣΤΟ ΔΥΑΔΙΚΟ ΦΟΡΕΑ SK879.....	72
4.1.7 ΠΡΑΓΜΑΤΟΠΟΙΗΣΗ COLONY BLOTTING ΓΙΑ ΤΗΝ ΕΠΙΒΕΒΑΙΩΣΗ ΤΟΥ ΜΕΤΑΣΧΗΜΑΤΙΣΜΟΥ ΚΑΙ ΕΜΦΑΝΙΣΗ ΤΟΥ ΦΙΑΜ.....	76
4.2 ΦΥΣΙΟΛΟΓΙΚΟΣ ΚΑΙ ΜΟΡΦΟΛΟΓΙΚΟΣ ΧΑΡΑΚΤΗΡΙΣΜΟΣ ΤΩΝ ΜΕΤΑΛΛΑΓΜΕΝΩΝ Δ<i>VDLAE</i> ΣΤΕΛΕΧΩΝ	77

4.2.1 ΜΕΤΡΗΣΕΙΣ ΔΙΑΜΕΤΡΟΥ ΜΥΚΗΛΙΑΚΗΣ ΑΥΞΗΣΗΣ ΚΑΙ ΑΝΑΠΤΥΞΗΣ	78
4.2.2 ΟΠΤΙΚΗ ΠΑΡΑΤΗΡΗΣΗ ΑΝΑΠΤΥΞΗΣ ΚΑΙ ΣΧΗΜΑΤΙΣΜΟΥ ΜΙΚΡΟΣΚΛΗΡΩΤΙΩΝ ΣΕ ΔΙΑΦΟΡΕΤΙΚΑ ΘΡΕΠΤΙΚΑ ΥΠΟΣΤΡΩΜΑΤΑ PDA, SSN-AGAR, ROSE BENGAL ΚΑΙ CZAPEK.....	81
4.3 ΠΕΙΡΑΜΑΤΑ ΠΑΘΟΓΕΝΕΙΑΣ.....	88
4.3.1 ΑΞΙΟΛΟΓΗΣΗ ΤΩΝ ΔVDLAΕΑ ΣΤΕΛΕΧΩΝ ΣΕ ΦΥΤΑ ΑΡΑΒΙΔΟΥΣΗΣ.....	88
4.3.2 ΑΞΙΟΛΟΓΗΣΗ ΤΩΝ ΔVDLAΕΑ ΣΤΕΛΕΧΩΝ ΣΕ ΦΥΤΑ ΜΕΛΙΤΖΑΝΑΣ	90
4.3.3 ΑΞΙΟΛΟΓΗΣΗ ΤΩΝ ΔVDLAΕΑ ΣΤΕΛΕΧΩΝ ΣΕ ΦΥΤΑ ΤΟΜΑΤΑΣ.....	94
4.3.4 ΑΞΙΟΛΟΓΗΣΗ ΤΩΝ ΔVDLAΕΑ ΣΤΕΛΕΧΩΝ ΣΕ ΦΥΤΑ ΜΕΛΙΤΖΑΝΑΣ ΜΕ ΜΟΛΥΝΣΗ ΜΕ ΜΙΚΡΟΣΚΛΗΡΩΤΙΑ.....	97
4.4 ΚΥΤΤΑΡΙΚΟΣ ΘΑΝΑΤΟΣ ΣΕ ΦΥΛΛΑ ΚΑΠΝΟΥ	100
4.5 ΦΑΙΝΟΤΥΠΙΚΗ ΑΞΙΟΛΟΓΗΣΗ ΤΗΣ ΠΑΡΕΜΠΟΔΙΣΗΣ ΤΩΝ ΔVDLAΕΑ ΣΤΕΛΕΧΩΝ ΑΠΟ ΤΟ ΑΝΤΑΓΩΝΙΣΤΙΚΟ ΒΑΚΤΗΡΙΟ K-165	102
5. ΣΥΖΗΤΗΣΗ–ΣΥΜΠΕΡΑΣΜΑΤΑ	103
6. ΒΙΒΛΙΟΓΡΑΦΙΑ.....	107

ΠΕΡΙΛΗΨΗ

Ο μύκητας *Verticillium dahliae* προσβάλλει πολλά αυτοφυή και καλλιεργούμενα φυτά μεταξύ των οποίων η μελιτζάνα, η τομάτα και το βαμβάκι. Παράγει μικρού και μεγάλου μοριακού βάρους τοξικούς μεταβολίτες των φυτών που λειτουργούν ως υποκινητές της φυτικής άμυνας. Στο πλαίσιο της παρούσας μελέτης διερευνήθηκε ο ρόλος του γονιδίου *VdLaeA* στη μορφολογία και παθογένεια του φυτοπαθογόνου μύκητα *V. dahliae*. Σύμφωνα με προηγούμενες μελέτες, ο φυτοπαθογόνος μύκητας *V. dahliae* παράγει φυτοτοξίνες και άλλα μόρια τα οποία οδηγούν στο θάνατο του κυττάρου ή σε άλλες μορφές άμυνας του φυτού-ξενιστή. Η παραγωγή τοξινών, η κονιδιοποίηση και η παραγωγή ουσιών με βιοτεχνολογικό και φαρμακευτικό ενδιαφέρον, σχετίζονται άμεσα με τους δευτερογενείς μεταβολίτες των μυκήτων των οποίων ο ουσιαστικός ρόλος τους στους μικροοργανισμούς παραμένει ακόμα άγνωστος. Σε μελέτες που έχουν διεξαχθεί στο παρελθόν στο μύκητα *Aspergillus spp.* έχει παρατηρηθεί η ύπαρξη ενός κεντρικού ρυθμιστή του δευτερογενούς μεταβολισμού το γονίδιο *laeA* το οποίο κωδικοποιεί μια πυρηνική μεθυλτρανσφεράση η οποία είναι απαραίτητη για την έκφραση πολλών γονιδίων του δευτερογενούς μεταβολισμού. Η παρουσία του γονιδίου *laeA* κρίνεται απαραίτητη για τη βιοσύνθεση μυκοτοξινών, αντιβιοτικών και διαφόρων μυκηλιακών χρωστικών. Για την περαιτέρω διερεύνηση του ρόλου του γονιδίου *laeA*, βρέθηκε το ορθόλογο γονίδιο *VdLaeA* μετά από ανάλυση του γονιδιώματος του μύκητα *V. dahliae* με το γονίδιο *laeA* του *A. nidulans*. Σε στελέχη που είχε απενεργοποιηθεί το γονίδιο *VdLaeA* από το άγριο στέλεχος του μύκητα που είχε απομονωθεί από ραπανάκι πραγματοποιήθηκαν πειράματα παθογένειας και μελέτη της φυσιολογίας του μύκητα *V. dahliae*, με στόχο την αποσαφήνιση του ρόλου των προϊόντων του δευτερογενούς μεταβολισμού. Οι δοκιμές παθογένειας έδειξαν ότι τα μεταλλαγμένα στελέχη $\Delta VdLaeA$ προκαλούν τυπικά συμπτώματα της ασθένειας σε φυτά *Arabidopsis thaliana*, μελιτζάνας και τομάτας αλλά το ποσοστό των συμπτωμάτων σε σύγκριση με το άγριο στέλεχος είναι σημαντικά μειωμένο. Ακόμη παρατηρήθηκαν διαφοροποιήσεις ως προς τη μορφολογία της μυκηλιακής ανάπτυξης και της παραγωγής μικροσκληρωτίων σε διάφορα θρεπτικά υλικά όταν αυτά μολύνθηκαν με το άγριο και τα μεταλλαγμένα $\Delta VdLaeA$ στελέχη. Σε ακόλουθα πειράματα παρατηρήθηκε σημαντική μείωση του κυτταρικού θανάτου σε φυτά καπνού όταν αυτά μολύνθηκαν με εκχυλίσματα υγρών καλλιεργειών των μετασχηματισμένων στελεχών $\Delta VdLaeA$ συγκριτικά με το άγριο στέλεχος. Η μελέτη του ρυθμιστικού γονιδίου *VdLaeA* και η προσπάθεια υπερέκφρασης αυτού του γονιδίου μπορεί να συμβάλει στη διερεύνηση των μοριακών μηχανισμών που σχετίζονται με την παραγωγή δευτερογενών μεταβολιτών και ειδικότερα στην εξακρίβωση του ρόλου τους στην παθογένεια του *V. dahliae*.

ABSTRACT

Verticillium dahliae affects a number of crops, including eggplants, tomatoes and cotton. It produces low and high molecular weight toxic metabolites which interfere with plant defence. The role of the *VdLaeA* gene in the morphology and pathogenesis of *V. dahliae* has been investigated in the present study. According to previous studies, *V. dahliae* produces phytotoxins and other molecules which lead to cell death. In studies previously conducted on *Aspergillus spp.*, a central regulator of the secondary metabolism has been observed to be the *IaeA* gene, which encodes a nuclear methyltransferase, which is essential for the expression of many secondary metabolism genes. The presence of the *IaeA* gene is considered essential for the biosynthesis of mycotoxins, antibiotics and various mycelial pigments. To further investigate the role of the *laeA* gene, the orthologous *VdLaeA* gene was found after the analysis of the *V. dahliae* genome with the *A. nidulans laeA* gene. Pathogenicity tests have shown that mutant strains of the $\Delta VdLaeA$ cause typical symptoms of the disease in *Arabidopsis thaliana*, eggplant and tomato plants, but the percentage of symptoms compared to the wild strain was significantly reduced. Furthermore, variations in the morphology of the mycelia growth and microsclerotia production in various growth media were observed, between the wild type and mutated $\Delta VdLaeA$ strains. In subsequent experiments, it was observed a significant reduction in cell death in tobacco plants, when they were infected with liquid culture extracts of the transformed strains of $\Delta VdLaeA$, compared to the wild-type strain. The study of the *VdLaeA* regulatory gene and the attempt to overexpress this gene may help to investigate the molecular mechanisms involved in the production of secondary metabolites and, in particular, to verify their role in the pathogenesis of *V. dahliae*.

1. ΕΙΣΑΓΩΓΗ

1.1 Ο ΦΥΤΟΠΑΘΟΓΟΝΟΣ ΜΥΚΗΤΑΣ *VERTICILLIUM DAHLIAE*

1.1.1 ΑΔΡΟΜΥΚΩΣΕΙΣ

Οι αδρομυκώσεις είναι μια κατηγορία ιδιαίτερα καταστροφικών ασθενειών, τόσο για τα ποώδη όσο και για τα ξυλώδη φυτά και προκαλούνται κυρίως από μύκητες εδάφους, με σημαντικότερους αυτούς που ανήκουν στα γένη *Verticillium spp.* και *Fusarium spp.* Η προσβολή από τους συγκεκριμένους μύκητες εντοπίζεται κυρίως στο αγγειακό σύστημα των ανώτερων φυτών (Παναγόπουλος, 2007). Οι αδρομυκώσεις που προκαλούνται από το μύκητα *V. dahliae* έχουν παρατηρηθεί σε παγκόσμιο επίπεδο, ωστόσο η εμφάνισή τους στις εύκρατες περιοχές είναι σημαντικότερες.

Ο μύκητας *V. dahliae* έχει πλήθος ξενιστών, καθώς έχουν καταμετρηθεί περισσότερα από 200 είδη φυτών τα οποία προσβάλλονται από το συγκεκριμένο παθογόνο (Agrios, 2005). Στους ξενιστές συμπεριλαμβάνονται αρκετές ετήσιες και δενδρώδεις καλλιέργειες. Στις ευπαθείς δενδρώδεις καλλιέργειες ανήκει και η ελιά. Στην Ελλάδα η ασθένεια στην ελιά διαπιστώθηκε και μελετήθηκε για πρώτη φορά στη Στυλίδα Φθιώτιδας το 1952 και από τότε έχει παρατηρηθεί σε όλη τη χώρα όπου υπάρχουν ελαιώνες, φιστικιές, αμπέλια και πυρηνόκαρπα. Από τις ετήσιες καλλιέργειες ευπαθείς είναι αυτές των κηπευτικών φυτών, όπως η πατάτα, η τομάτα, η μελιτζάνα, τα κολοκυνθοειδή και η φράουλα. Σημαντικό βέβαια είναι το πρόβλημα και στα βιομηχανικά φυτά, όπως το βαμβάκι και η μηδική, αλλά και σε ορισμένα καλλωπιστικά φυτά, όπως η τριανταφυλλιά (Παναγόπουλος, 2007).

Τα συμπτώματα των βερτισιλλίωσεων είναι παρόμοια με αυτά των αδρομυκώσεων που προκαλούνται από μύκητες του γένους *Fusarium*, ωστόσο σε αρκετούς ξενιστές και σε αρκετές περιοχές το *Verticillium* επάγει μάρανση σε χαμηλότερες θερμοκρασίες από το *Fusarium* (Agrios, 2005). Ακόμη τα συμπτώματα της βερτισιλλίωσης αναπτύσσονται πιο αργά και συχνά εμφανίζονται στο κατώτερο ή στο εξωτερικό μέρος του φυτού ή σε μερικά από τα κλαδιά του (Agrios, 2005). Σε κάποιους ξενιστές οι βερτισιλλίωσεις αναπτύσσονται αρχικά στα σπορόφυτα, τα οποία πεθαίνουν σε λίγο χρονικό διάστημα από τη μόλυνση. Οι μολύνσεις από το μύκητα *V. dahliae* όταν εντοπίζονται σε φυτά μεγαλύτερης ηλικίας, έχουν σαν αποτέλεσμα να τα διατηρούν νάνα και να προσδίδουν τον καφέ χαρακτηριστικό μεταχρωματισμό στους αγγειώδεις ιστούς (Agrios, 2005). Οι βερτισιλλίωσεις προκαλούν μάρανση-χλώρωση-νέκρωση των φύλλων και μπορεί να οδηγήσει σε συμπτώματα αποπληξίας. Το πρόβλημα των βερτισιλλίωσεων, σε αρχικό στάδιο δεν είναι οξύ και εκτενές σε έναν αγρό. Με την πάροδο του χρόνου όμως, όσο το μόλυσμα αυξάνεται εντός του αγρού εξαιτίας της παραμονής των υπολειμμάτων, παρατηρείται μία βαθμιαία αύξηση και επέκταση των προσβολών. Για να περιοριστεί η ανάπτυξη του μύκητα και η εκδήλωση της ασθένειας, είναι ανάγκη να γίνει καταστροφή των προσβεβλημένων φυτών και αντικατάστασή τους με νέες ανεκτικές-ανθεκτικές ποικιλίες ή υποκείμενα (Agrios, 2005).

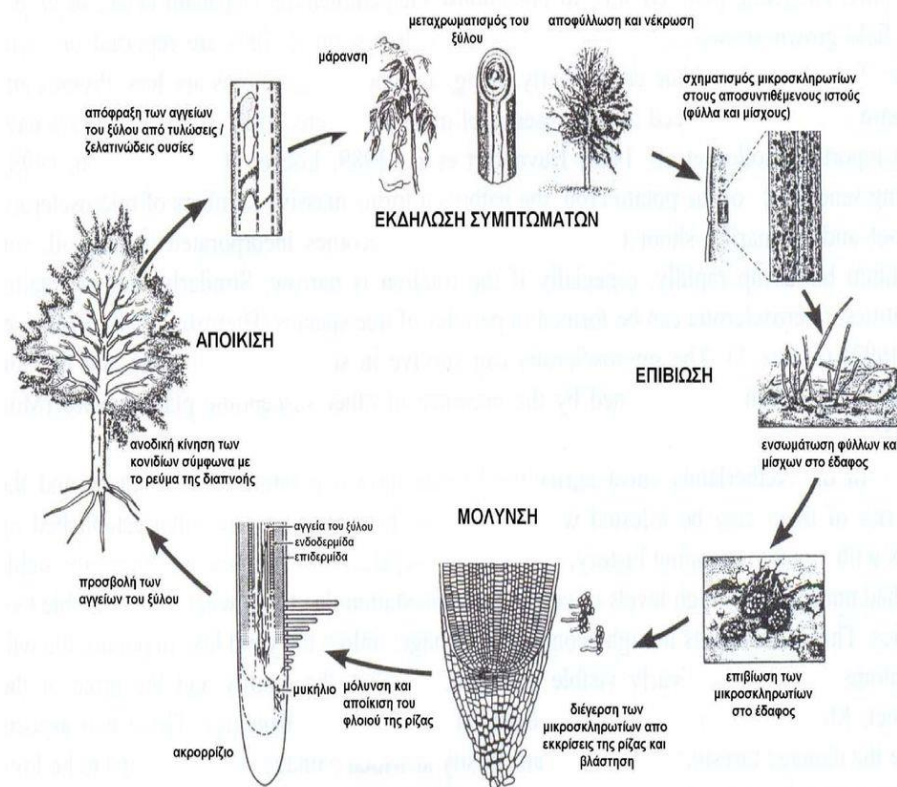
Η ασθένεια της βερτισιλλίωσης των περισσότερων φυτών οφείλεται στα είδη *V. dahliae* και *V. albo-atrum*, τα οποία έχουν την ικανότητα να παράγουν κονίδια με μικρή διάρκεια ζωής. Το χαρακτηριστικό όμως εκείνο που διαφοροποιεί τα δύο είδη μεταξύ τους είναι, ότι ο μύκητας *V. dahliae* παράγει μικροσκληρώτια ενώ ο μύκητας *V. albo-atrum* σχηματίζει ένα σκούρο, με παχύ τοίχωμα μυκήλιο, χωρίς όμως να παράγει μικροσκληρώτια (Agrios, 2005).

Ωστόσο, ένα ακόμη είδος, το *V. longisporum*, έχει μελετηθεί, το οποίο φαίνεται να παρουσιάζει επιμήκη σπόρια, διπλάσιου σχεδόν μεγέθους από το *V. dahliae* και με διαφοροποίηση ως προς τα στελέχη με βραχεία σπόρια, καθώς αυτό έχει υψηλότερη περιεκτικότητα σε γενετικό υλικό. Περαιτέρω μελέτες, με χρήση μοριακών δεικτών, έδειξαν ότι αυτό το στέλεχος αποτελεί αμφι-απλοειδές υβρίδιο μεταξύ των ειδών *V. dahliae* και *V. albo-atrum*. Για τα υπόλοιπα είδη η κατάταξη είναι επιβεβαιωμένη από μοριακές μελέτες (Barbara and Clewes, 2003 and Fradin and Thomma, 2006). Το είδος *V. dahliae* όπως έχει βρεθεί μέχρι τώρα αποτελεί τη μόνη αιτία βερτισιλλίωσης στις δενδρώδεις και πολυετείς καλλιέργειες (Παναγόπουλος, 2007).

1.1.2 ΒΙΟΛΟΓΙΚΟΣ ΚΥΚΛΟΣ ΤΟΥ ΜΥΚΗΤΑ *VERTICILLIUM DAHLIAE*, ΤΡΟΠΟΙ ΑΠΟΙΚΙΣΗΣ, ΕΓΚΑΤΑΣΤΑΣΗΣ ΚΑΙ ΔΙΑΧΕΙΜΑΝΣΗΣ

Η ασθένεια που προκαλείται από το μύκητα *V. dahliae* είναι μονοκυκλική, καθώς το παθογόνο απαιτεί μία καλλιεργητική περίοδο προκειμένου να συμπληρώσει το βιολογικό του κύκλο, όπως φαίνεται στην Εικόνα 1 (Παναγόπουλος, 2007, Τζάμος, 2007). Ο βιολογικός κύκλος του μύκητα διακρίνεται σε τρεις φάσεις: τη φάση της διάπαυσης, την παρασιτική και τη σαπροφυτική φάση.

Στη φάση της διάπαυσης η επιβίωση επιτυγχάνεται με τα μικροσκληρώτια τα οποία βλαστάνουν σε μικρότερο ποσοστό λόγω της παρεμποδιστικής επίδρασης του εδάφους. Η δράση αυτή εξουδετερώνεται από την έκκριση ουσιών από τις ρίζες, των φυτών-ξενιστών, αλλά και μη ξενιστών, γεγονός που δείχνει ότι οι εκκρίσεις αυτές δεν παρουσιάζουν εξειδίκευση (Schnathorst, 1981, Olsson and Nordbring-Hertz, 1985) εκτός ίσως από την περίπτωση ποσοτικών διαφορών στα επίπεδα των συγκεντρώσεων (Schnathorst, 1981). Παρόλα αυτά η επίδρασή τους στη βλάστηση των υφών φαίνεται να περιορίζεται σε συγκεκριμένη απόσταση. Συγκεκριμένα έχει υπολογιστεί ότι για να μολυνθεί η ρίζα του ξενιστή, από το *V. dahliae*, οι βλαστανούσες υφές δεν πρέπει να είναι σε απόσταση μεγαλύτερη από τα 300 μm (Fradin and Thomma, 2006).



Εικόνα 1: Διαγραμματική απεικόνιση του βιολογικού κύκλου του μύκητα *V. dahliae*, του τρόπου αποίκησης, εγκατάστασης και διαχείμανσής του, (docplayer.gr)

Ο μύκητας εισέρχεται στην παρασιτική φάση, με την έναρξη της μόλυνσης. Κατά τη φάση αυτή πραγματοποιείται είσοδος του μύκητα στο φυτό, κυρίως παθητικά, μέσα από πληγές ή άλλα ανοίγματα που έχουν δημιουργηθεί στην επιφάνεια της ρίζας (Van Alfén *et al.*, 1989). Ωστόσο έχει αποδειχθεί ότι οι υφές του μύκητα μπορούν και διαπερνούν απευθείας επιδερμικά κύτταρα (Schnathorst, 1981) με τις περιοχές διαμόρφωσης πλευρικών ριζών και του ακρορριζίου ως πιθανές κύριες πύλες εισόδου. Με την είσοδο στο φυτό, ο μύκητας αποικίζει αρχικά την εσωτερική περιοχή του φλοιού, ενώ στη συνέχεια οι υφές προχωρούν στους μεσοκυττάριους χώρους αλλά και ενδοκυτταρικά στο φλοιό μέχρι να φθάσουν στα αγγεία του ξύλου, όπως φαίνεται χαρακτηριστικά στην Εικόνα 2 ο καστανός μεταχρωματισμός των αγγείων.



Εικόνα 2: Μεταχρωματισμός των αγγείων του ξύλου έπειτα από προσβολή του μύκητα *V. dahliae* (<https://www.plantdirect.gr/>)

Όπως για τα υπόλοιπα παθογόνα αδρομυκώσεων έτσι και για το *V. dahliae*, αδρομύκωση μπορεί να προκληθεί μόνο σε ποώδη και ξυλώδη αγγειόσπερμα και όχι σε γυμνόσπερμα. Αυτό συμβαίνει διότι στα γυμνόσπερμα αγωγός για τη μεταφορά του νερού είναι οι τραχείδες, οι οποίες είναι μικρότερες σε μέγεθος σε σχέση με τα αγγεία του ξύλου και έχουν κλειστά βοηθία. Ως αποτέλεσμα παρεμποδίζεται η παθητική μεταφορά των μυκήτων με το ανοδικό ρεύμα της διαπνοής γεγονός που οδηγεί σε περιορισμένη αποίκιση των αγγείων (Green, 1981, Pegg, 1981). Στα αγγειόσπερμα ο *V. dahliae* κατακλύζει τα αγγεία του ξύλου μέσω των βοηθίων, και από εκεί μέσα από τα κονίδια που παράγει τα οποία μεταφέρονται στα διάφορα μέρη του φυτού με το ανοδικό ρεύμα των χυμών, επιτυγχάνει την αποίκιση του ξενιστή.

Με την πρόοδο της προσβολής ακολουθεί η αποίκιση και άλλων φυτικών ιστών από το μύκητα πέραν των αγγειωδών ιστών, γεγονός που οδηγεί σε γήρανση και σταδιακή νέκρωση των φυτών. Τότε το παθογόνο περνά στη σαπροφυτική του φάση σχηματίζοντας πάνω στους γηρασμένους και νεκρούς ιστούς την ανθεκτική του μορφή τα μικροσκληρώτια. Έχει αναφερθεί ότι στα περισσότερα είδη φυτών που εμφανίζουν μόλυνση από το *V. dahliae*, για το σχηματισμό των μικροσκληρωτίων είναι απαραίτητη η ενυδάτωση του ιστού ή η κάλυψή του με χώμα (Schnathorst, 1981). Σε κάθε περίπτωση, η όποια τυχόν ενσωμάτωση μολυσμένων φυτικών μερών στο έδαφος οδηγεί σε αύξηση του μολύσματος και της πιθανότητας μόλυνσης κάθε μετέπειτα καλλιέργειας.

Η ένταση και η ανάπτυξη των συμπτωμάτων της ασθένειας εξαρτάται από διάφορους παράγοντες όπως η επιβίωση του μολύσματος, η αρχική ποσότητα του οποίου έχει αναλογική επίδραση στην ένταση της ασθένειας, η πυκνότητα του μολύσματος, η φυλή του παθογόνου, η ποικιλία του ξενιστή, το έδαφος, η θερμοκρασία εδάφους και αέρα, οι

βροχοπτώσεις, οι αρδεύσεις, τα ζιζάνια, οι καλλιεργητικές επεμβάσεις ακόμα και η όποια συγκαλλιέργεια τυχόν εφαρμόζεται (Παναγόπουλος, 2007).

Τρόποι αποίκησης, εγκατάστασης και διαχείμασης του μύκητα *V. dahliae*

Αποίκηση ριζικού συστήματος

Κατά τη διάρκεια της πρώτης φάσης, η βλάστηση των υπαρχόντων μικροσκληρωτίων στο έδαφος παρεμποδίζεται από τη μικροχλωρίδα του εδάφους. Η παρεμποδιστική αυτή δράση ξεπερνιέται από τη διαθεσιμότητα μεγάλων ποσοτήτων άνθρακα και αζώτου που απελευθερώνονται στη ριζόσφαιρα ξενιστών και μη-ξενιστών φυτών από τις ρίζες (Mol *et al.*, 1995, Schreiber and Green, 1963). Τα διάφορα είδη του μύκητα *Verticillium spp.* εισέρχονται στην παρασιτική φάση μολύνοντας ευπαθή φυτά, είτε από το ακρορρίζιο, είτε από τα σημεία σχηματισμού των πλευρικών ριζών (Bishop and Copper, 1983).

Είσοδος στην ενδοδερμίδα

Στην προσπάθειά του ο μύκητας να φτάσει στους αγγειακούς ιστούς, συγκεκριμένα στο ξύλο, πρέπει να διαπεράσει την ενδοδερμίδα, η οποία λειτουργεί σαν ένα φυσικό φράγμα απέναντι στη μόλυνση. Η διάσχιση της ενδοδερμίδας μπορεί να επιτευχθεί μόνο όταν αυτή δεν έχει αναπτυχθεί ακόμη στο ακρορρίζιο ή σε περίπτωση πληγής αυτής με χαρακτηριστικό παράδειγμα τη μόλυνση από νηματώδεις (Bowers *et al.*, 1996, Huisman, 1982, Pegg, 1974, Schnathorst, 1981).

Το περιβάλλον του ριζικού συστήματος είναι ιδιαίτερα ανταγωνιστικό μεταξύ του μύκητα *V. dahliae* και των άλλων μυκήτων. Έτσι είναι ένας πιθανός λόγος για τον οποίο ο μύκητας αποικίζει αρχικά την εσωτερική περιοχή του φλοιού, όπου δεν απαντώνται άλλοι σαπροφυτικοί μύκητες, οι οποίοι ενδέχεται να δράσουν παρεμποδιστικά. Κατόπιν οι υφές αναπτύσσονται στους μεσοκυττάριους χώρους αλλά και ενδοκυτταρικά στο φλοιό μέχρι να φτάσουν στα αγγεία του ξύλου. Η παρουσία ουσιών όπως της σουμπερίνης, πολυμερές που περιέχει λιπαρά οξέα και εστέρες γλυκερίνης και από την εναπόθεση καλόζης, κολλώδους ουσίας στα κυτταρικά τοιχώματα του φλοιού και της ενδοδερμίδας του φυτού είναι ικανή να παρεμποδίσει την είσοδο ενός ποσοστού των υφών.

Όταν ο μύκητας περάσει την ενδοδερμίδα, εισέρχεται στο αγγειακό σύστημα, όπου μπορεί να σχηματίσει κονίδια, μια διαδικασία που αναφέρεται ως “διάσχιση” ή “budding”. Τα κονίδια αυτά μεταφέρονται με το ανοδικό ρεύμα με αποτέλεσμα να παγιδεύονται σε θέσεις στο τέλος των αγγείων (trapping sites) όπου πρέπει να βλαστήσουν και να διεισδύσουν σε παρακείμενα βοθρία προκειμένου να συνεχίσουν τον αποικισμό. Η παραγωγή σπορίων είναι η διαδικασία που ακολουθεί έτσι ώστε να ξεκινήσει ένας ακόμη κύκλος μόλυνσης (Bishop and Cooper, 1983). Μελέτες έχουν αποδείξει ότι το ποσοστό της παραγωγής κονιδίων στα φυτά βρίσκεται σε άμεση συσχέτιση με την επιθετικότητα και τη μολυσματικότητα του στελέχους, με τα μεγαλύτερα ποσοστά παραγωγής κονιδίων να

συσχετίζονται με στελέχη του γένους *Verticillium spp.* που χαρακτηρίζονται ως πιο επιθετικά (Schnathorst, 1963).

Σύμφωνα με πειράματα που έχουν διεξαχθεί φαίνεται πως απαιτείται ένα χρονικό διάστημα περίπου 2-4 ημερών πριν ο μύκητας εισέλθει στα αγγεία του ξύλου της ρίζας και περίπου μια ακόμη ημέρα για να διαδοθεί σε γειτονικά βοθρία του ξύλου και να παράγει κονίδια (Gold & Robb, 1995).

Σαπροφυτική φάση

Στην περίπτωση του μύκητα *V.dahliae*, παράγονται μεγάλες ποσότητες μικροσκληρωτίων, τα οποία απευλευθερώνονται στο έδαφος με την αποσύνθεση των φυτικών υλικών και έχουν την ικανότητα να επιβιώσουν για 10-15 χρόνια (Wilhelm, 1955). Ο μύκητας εισέρχεται σε ένα σαπροφυτικό στάδιο κατά τη διάρκεια της νέκρωσης των ιστών ή της γήρανσης του φυτού. Στο στάδιο αυτό πέρα από το αγγειακό σύστημα, αποικίζονται οι βλαστοί και οι ρίζες του φυτού. Ο μύκητας *V. albo-atrum* στο αντίστοιχο στάδιο, παράγει τα κονίδιά του σε μολυσμένους ιστούς του φυτού, τα οποία μπορεί να διασπαρούν από ρεύματα αέρα ξεκινώντας έτσι ένα νέο κύκλο. Και τα δύο είδη μπορούν να διαχειμάσουν με τη μορφή μυκηλίου μέσα σε πολυετείς ξενιστές, ή σε πολλαπλασιαστικά όργανα του φυτού, όπως σε κονδύλους, βολβούς ή σπόρους, όμως στην περίπτωση του μύκητα *V. albo-atrum*, η δυνατότητα επιβίωσης του ισχυρά μελανοποιημένου, σκούρου μυκηλίου του είναι πιο σύντομη.

Σχηματισμός μικροσκληρωτίων

Τα μικροσκληρώτια αναπτύσσονται από τη διόγκωση των υφών και το χωρισμό των κυττάρων, που έχει σαν αποτέλεσμα τη μεγέθυνση και την παραγωγή πλευρικών κυττάρων. Ο μύκητας *V. dahliae* παράγει μικροσκληρώτια που αποτελούνται από μικροσκοπικά, σκοτεινά χρωματισμένα, παχιά τοιχώματα κυτταρικών υφών. Στη συνέχεια, η μελανίνη η οποία είναι μία σκούρα χρωστική που σχηματίζεται από τον οξειδωτικό πολυμερισμό φαινολικών ενώσεων, εναποτίθεται στα κυτταρικά τοιχώματα και στο μεσοκυττάριο χώρο (Perry and Evert, 1982). Οι περισσότερες μελανίνες που απαντώνται στους μύκητες προκύπτουν από την πρόδρομη ουσία 1,8-dihydroxynaphthalene (DHN) που παράγεται στο κυτταρόπλασμα και ακολούθως εναποτίθεται στην εξωκυτταρική μεμβράνη όπου οι λακάσες καταλύουν τον τελικό πολυμερισμό. Η βιοσύνθεση DHN-προερχόμενης μελανίνης χαρακτηρίστηκε για πρώτη φορά στο μύκητα *V. dahliae* με μεταλλαγμένα στελέχη, ελλειπή σε μελανίνη (Bell *et al.*, 1976). Σύμφωνα λοιπόν με τις μελέτες που έγιναν, η μελανίνη στο μύκητα *V. dahliae* φαίνεται να συνεισφέρει σε μία μακράς διάρκειας επιβίωση ανθεκτικών κατασκευών, καθώς μη μελανοποιημένα μικροσκληρώτια χάνουν γρήγορα την ανθεκτικότητά τους.

Έχει αποδειχθεί ακόμη ότι το γονίδιο VDH1, το οποίο κωδικοποιεί μία υδροφοβίνη, παίζει σημαντικό ρόλο στην ανάπτυξη των μικροσκληρωτίων. Η έκφραση του συγκεκριμένου γονιδίου συμπίπτει με το σχηματισμό μικροσκληρωτίων, ενώ η

απενεργοποίησή του οδηγεί σε παρεμπόδοση παραγωγής μικροσκληρωτίων (Klimes and Dobinson, 2003).

1.1.3 ΞΕΝΙΣΤΕΣ

Οι πλέον ευαίσθητοι ξενιστές στο μύκητα *V. dahliae* με έντονη και άμεση εμφάνιση συμπτωμάτων και παρουσίαση σημαντικών απωλειών στην παραγωγή της καλλιέργειας είναι η μελιτζάνα και το βαμβάκι όπως φαίνεται στην Εικόνα 3 (Pegg, 1984). Οι ξενιστές του μύκητα είναι πάνω από 200 δικοτυλήδονα φυτά συμπεριλαμβανομένων των ποωδών μονοετών, των πολυετών φυτών και των ξυλωδών. Ξενιστές του παθογόνου οι οποίοι δεν παρουσιάζουν συμπτώματα και δεν έχουν παρατηρηθεί επιπτώσεις στην παραγωγή τους, είναι και τα μονοκοτυλήδονα φυτά, π.χ.σιτάρι, κριθάρι κ.α. (Agrios, 1988).



Εικόνα 3: Συμπτώματα από *V. dahliae* σε καλλιέργειες αγρού μελιτζάνας (Α) και καλλιέργεια βαμβακιού (Β), (www.giantsakiplants.gr)

1.1.4 ΣΥΜΠΤΩΜΑΤΟΛΟΓΙΑ

Τα συμπτώματα που προκαλούνται από το μύκητα *V. dahliae* διαφέρουν, καθώς οι ξενιστές του είναι πολλοί. Τα κύρια συμπτώματα της ασθένειας είναι η χλώρωση, ο μαρασμός, η νέκρωση σε προχωρημένο στάδιο και ο αποχρωματισμός των νεύρων. Δεν είναι λίγες οι περιπτώσεις εκείνες που παρατηρείται καστανός μεταχρωματισμός των αγγειωδών ιστών του ξύλου, όταν εφαρμόσουμε εγκάρσια τομή σε προσβεβλημένο φυτό. Η μάρανση, το κιτρίνισμα και ο θάνατος των φύλλων, των κλάδων ή ακόμα και ολόκληρων των φυτών είναι πιθανό να εντοπιστούν παράλληλα με το μεταχρωματισμό του ξύλου (Pataky, 1997). Υπό ορισμένες συνθήκες πέραν των άμεσων συμπτωμάτων εμφανίζονται και

χρόνια συμπτώματα όπως ξήρανση των φύλλων, παραμόρφωση του φυλλώματος, νανισμός και καθυστέρηση της ανάπτυξης του φυτού.

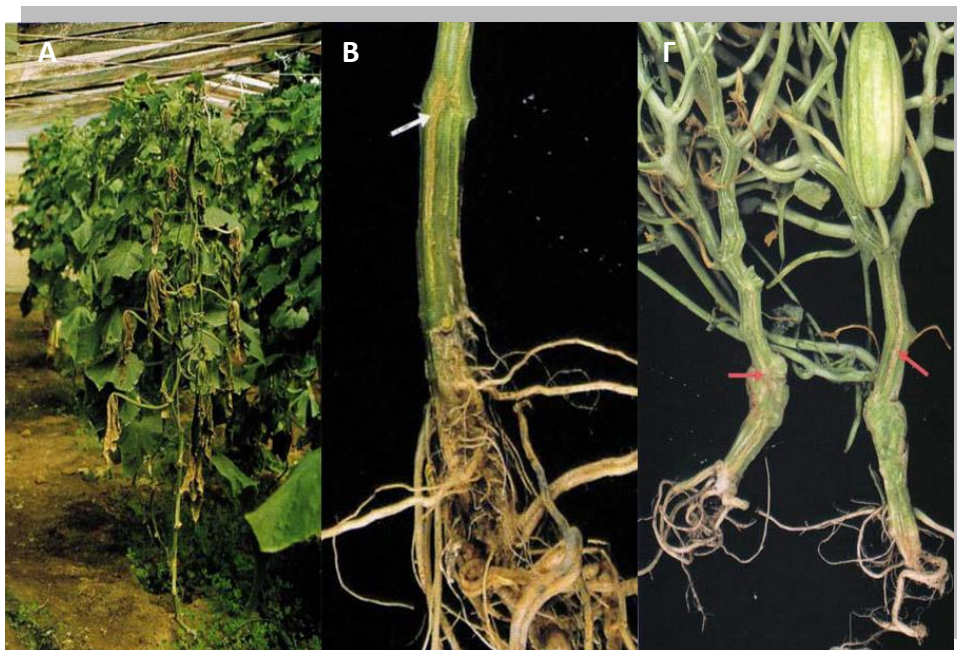
Ποώδεις ξενιστές

Οι προσβολές στα ποώδη φυτά δρούν με παρόμοιο τρόπο, με ελάχιστες εξαιρέσεις. Σε μεμονωμένα φυτά εμφανίζεται αρχικά η ασθένεια ή σε μια περιορισμένη ομάδα εντός μιας καλλιέργειας. Τα παλαιότερα φύλλα των ασθενών φυτών συχνά εμφανίζουν χλώρωση μεταξύ των νευρώσεων και αργότερα μαραίνονται με αποτέλεσμα να αποκόπτονται, δηλαδή παρατηρείται το σύνδρομο της ημιπληγίας. Στη συνέχεια, παρατηρείται μετατόπιση των συμπτωμάτων στα ανώτερα τμήματα του φυτού μέχρι την καθολική μάρανση των φυτών όπως φαίνεται στην Εικόνα 4 σε καλλιέργεια αγγουριάς. Τα ασθενή φυτά είναι νάνα και αν μολυνθούν σε πολύ νεαρό στάδιο, τότε νεκρώνονται πρώιμα. Έχει διαπιστωθεί πως κατά τις μεσημεριανές ώρες παρατηρείται έντονη μάρανση, η οποία μειώνεται το βράδυ, όμως αυτό το φαινόμενο διαρκεί για περιορισμένο διάστημα (Pataky, 1997).



Εικόνα 4: Βερτισιλλίωση αγγουριάς προκαλούμενη από το *V. dahliae*. Καθολική μάρανση των φυτών (www.giantsakiplants.gr)

Σε ξενιστές όπως είναι η τομάτα, απαιτείται μεγάλο επίπεδο προσβολής ή εφαρμογή υδατικής καταπόνησης, ώστε να γίνουν εμφανή τα εξωτερικά συμπτώματα (Pataky, 1997). Μπορούν όμως, αρχικά να αναπτυχθούν σε παλαιότερα φύλλα κίτρινες κηλίδες και στις αντίστοιχες χλωρωτικές περιοχές εντός των αγγείων, εμφανίζεται καφέ μεταχρωματισμός. Αργότερα οι κηλίδες αυτές ενώνονται μεταξύ τους και αναπτύσσονται καφετί, νεκρωτικές περιοχές. Μετά το κιτρίνισμα και τη μάρανση των κατώτερων φύλλων, που γίνεται αρχικά, αρχίζει η ασθένεια να επιδρά και στα ανώτερα φύλλα με αποτέλεσμα να γίνονται φαιοπράσινα και το έλασμά τους παραμορφώνεται, ενώ παράλληλα δημιουργείται εσωτερικός μεταχρωματισμός των αγγείων του ξύλου όπως παρατηρούμε στην Εικόνα 5 (Pataky, 1997).



Εικόνα 5: Βερτισιλλίωση - *Verticillium dahliae* αγγουριάς (Α) συστροφή και μάρανση των φύλλων, (Β) μεταχρωματισμός των αγγείων και του στελέχους, (Γ) διαφοροποίηση της ανάπτυξης του στελέχους με εμφανή μεταχρωματισμό των αγγείων, (www.giantsakiplants.gr)

Όταν αναφερόμαστε σε ποώδεις ξενιστές, σε πολλές περιπτώσεις τα συμπτώματα της βερτισιλλίωσης συγχέονται με συμπτώματα άλλων ασθενειών, όπως αυτά της φουζαρίωσης, της βακτηριακής μάρανσης και του βακτηριακού έλκους. Σ' αυτές τις περιπτώσεις απαιτείται περαιτέρω διερεύνηση, με απομόνωση και καλλιέργεια στο εργαστήριο για την περαιτέρω ταυτοποίηση του παθογόνου αιτίου (Pataky, 1997). Έχει παρατηρηθεί ότι ταυτόχρονα με τη βερτισιλλίωση μπορεί να δράσουν συνεργιστικά οι νηματώδεις σε φυτά όπως η μελιτζάνα, η πιπεριά, η τομάτα, η πατάτα και τότε η εμφάνιση και η εξέλιξη των συμπτωμάτων είναι εντονότερη (Pataky, 1997).

Δενδρώδεις ξενιστές

Μία από τις ιδιότητες που έχει η βερτισιλλίωση είναι να προκαλεί στους δενδρώδεις ξενιστές ημιπληγία, κατά την οποία τα συμπτώματα εμφανίζονται μονόπλευρα στο δένδρο. Αυτό το χαρακτηριστικό σύμπτωμα έχει σαν αποτέλεσμα η μια πλευρά του δένδρου να είναι τελείως ασυμπτωματική, ενώ στην άλλη να παρατηρούμε προσβεβλημένα φύλλα και κλάδους. Όσο βέβαια η προσβολή προχωρά, αρχίζει και η σταδιακή εμφάνιση των συμπτωμάτων σε όλη την κόμη του δένδρου (Παναγόπουλος 2007).

Στα δέντρα, τα συμπτώματα της βερτισιλλίωσης ποικίλουν και συχνά είναι δύσκολα στην αναγνώριση. Το φύλλωμα σε έναν ή περισσότερους κλαδίσκους ενός κλάδου μαραίνεται ξαφνικά και ένα γενικό κιτρίνισμα του φυλλώματος επέρχεται. Εικόνα 6 σε φύλλα ελιάς, το οποίο συχνά προηγείται της μάρανσης. Σε πολλές περιπτώσεις, παρατηρείται μείωση της ανάπτυξης των κλαδίσκων, καθώς και νέκρωση κλαδίσκων και κλάδων. Σε ορισμένα δένδρα υπάρχει ποικιλία συμπτωμάτων, δεν είναι λίγες οι περιπτώσεις εκείνες όπου η ασθένεια είναι απρόβλεπτη και ενώ φαίνεται πως υπάρχει μείωση των

συμπτωμάτων για ένα χρονικό διάστημα, αυτά κάνουν την επανεμφάνισή τους σε μεγαλύτερο βαθμό (Pataky, 1997).



Εικόνα 6: Η βερτισιλλίωση της ελιάς που προκαλείται από το παθογόνο *V. dahliae* στο φύλλωμα σε έναν ή περισσότερους κλαδίσκους ενός κλάδου όπου μαραίνεται ξαφνικά και παρατηρείται ένα γενικό κιτρίνισμα και νέκρωση του φυλλώματος. (www.eleagro.com)

Το χαρακτηριστικό σύμπτωμα της βερτισιλλίωσης σε ξυλώδεις ξενιστές είναι συχνά ο καστανός ή καστανέρυθρος μεταχρωματισμός του ξυλώδους παρεγχύματος που εμφανίζεται στους κλαδίσκους, στους κλάδους και τον κορμό κατά τα μεταγενέστερα στάδια εξέλιξης της ασθένειας. Ο μεταχρωματισμός σε επιμήκη ή εγκάρσια τομή εμφανίζεται σε μορφή ραβδώσεων ή τόξου ή κηλίδων (Παναγόπουλος, 2007).

Στην Ελλάδα η καλλιέργεια της ελιάς υποφέρει από την ασθένεια της βερτισιλλίωσης. Η προσβολή μπορεί να συμβεί, τόσο σε φυτώρια, όσο και σε ελαιώνες. Προκαλεί το μαρασμό των κλάδων και των βραχιόνων, καθώς και χλώρωση των φύλλων που εμφανίζεται στις αρχές του καλοκαιριού Εικόνα 6. Η ασθένεια μπορεί να παρουσιαστεί σε μεμονωμένα δένδρα ή και σε μέρος της καλλιέργειας. Η προσβολή μπορεί να γίνει αντιληπτή, είτε λόγω ημιπληγίας είτε λόγω αποπληξίας. Στην αποπληξία που εμφανίζεται, κυρίως σε νεαρά δενδρύλλια, τα φύλλα καρουλιάζουν, στρέφονται προς το εσωτερικό τους και το χρώμα τους γίνεται καστανό ενώ παραμένουν στα κλαδιά, Εικόνα 7. Στην περίπτωση της ημιπληγίας, η ασθένεια εκδηλώνεται σε μερικούς μόνο κλάδους του δένδρου και στα φύλλα τα οποία για μικρό χρονικό διάστημα παρουσιάζουν χλώρωση, οδηγούνται σε αποξήρανση και τελικά σε πτώση. Αποξήρανση μπορεί να διαπιστωθεί και σε προσβεβλημένους κλάδους, ενώ πολύ σπάνια θα παρατηρηθεί μεταχρωματισμός του ξύλου των προσβεβλημένων οργάνων (Παναγόπουλος, 2007).



Εικόνα 7: Κλάδος ελιάς προσβεβλημένος από το μύκητα *Verticillium dahliae*, (www.eleagro.com)

Η ασθένεια εντοπίζεται εκτός της ελιάς και σε άλλα πυρηνόκαρπα, προκαλώντας σε αρχικό στάδιο χλώρωση των φύλλων, μαρασμό κλάδων και βραχιόνων. Στη συνέχεια, ακολουθούν συμπτώματα όπως το καρούλιασμα και η πτώση των φύλλων ενώ τελικά επέρχεται εξ'ολοκλήρου αποξήρανση των κλάδων. Στα αγγεία του ξύλου των προσβεβλημένων οργάνων του δένδρου παρατηρείται μεταχρωματισμός. Συχνά στα πυρηνόκαρπα μπορεί να υπάρξει το φαινόμενο της ανάρρωσης όπου παρατηρείται βελτίωση στην κατάσταση του δένδρου και στη συνέχεια χωρίς προφανή λόγο επανεμφάνιση των συμπτωμάτων (Παναγόπουλος, 2007).

Τους καλοκαιρινούς μήνες η ασθένεια εμφανίζεται στο αμπέλι με απότομο μαρασμό και ξήρανση του φυλλώματος σε μερικές ή σε όλες τις κληματίδες, ενώ στη φυστικιά τα συμπτώματα είναι παρόμοια με αυτά των πυρηνόκαρπων αλλά δεν παρατηρείται συχνά μεταχρωματισμός των αγγείων του ξύλου (Παναγόπουλος, 2007).

1.1.5 ΣΥΝΘΗΚΕΣ ΑΝΑΠΤΥΞΗΣ ΤΟΥ ΜΥΚΗΤΑ *VERTICILLIUM DAHLIAE*

Ο μύκητας *V. dahliae* ανήκει στους Αδηλομύκητες (*Hyphomycetes*) στην τάξη *Moniliales* και ως εδαφογενής μύκητας έχει την ιδιότητα να διατηρείται στο έδαφος για μεγάλο χρονικό διάστημα (Agris, 2005) σχηματίζοντας ανθεκτικές μορφές επιβίωσης, τα μικροσκληρώτια. Ο μύκητας αυτός δημιουργεί πολυκύτταρο μυκήλιο, το οποίο αρχικά είναι υαλώδες και αργότερα γίνεται καστανό-μαύρο, κατά το σχηματισμό των μικροσκληρωτίων. Σχηματίζει ελεύθερους, ανορθωμένους, υαλώδεις, πολυκύτταρους κονιδιοφόρους που έχουν χαρακτηριστική διακλάδωση κατά σπονδύλους, Εικόνα 8. Ο κονιδιοφόρος φέρει εγκάρσια διαφράγματα (septa) στα οποία σχηματίζονται 3-4 πλάγια, κοντά, μονοκύτταρα στηρίγματα που στην πραγματικότητα είναι φιαλίδια, στις κορυφές των οποίων σχηματίζονται τα κονίδια-φιαλιδόσπορια (Τζάμος, 2005).



Εικόνα 8: Κονidioφόροι με κονίδια του μύκητα *Verticillium dahliae*, (www.DocPlayer.gr).

Τα κονίδια είναι μονοκύτταρα, υαλώδη, ωοειδή μέχρι ελλειψοειδή, διαστάσεων 2,5-8μm x 1.4-3.2μm. Στην κορυφή κάθε στηρίγματος (φιαλιδίου) παράγονται διαδοχικά πολλά κονίδια τα οποία όμως συγκρατούνται μεταξύ τους, με μία κολλώδη ουσία και έτσι σχηματίζονται μικρές κεφαλές κονιδίων. Η διασπορά των κονιδίων γίνεται με το νερό. Η διακλάδωση των κονιδιοφόρων εμφανίζεται σε σπείρες σε διάφορα επίπεδα Εικόνα 9. Από αυτή την επονομαζόμενη «verticillate» τοποθέτηση των κονιδιοφόρων, των διακλαδώσεων και των φιαλιδίων έχει προέλθει το όνομα του γένους *Verticillium* (Fradin and Thomma, 2006). Αυτή η δομή του σπονδυλωτού κονιδιοφόρου χαρακτηρίζει όχι ένα είδος αλλά έξι, τα οποία είναι όλα παθογόνα αδρομυκώσεων. Τα σημαντικότερα είναι το *V. dahliae* και το *V. albo-atrum*, επειδή προκαλούν ασθένεια σε ένα μεγάλο εύρος ξενιστών, τόσο σε καλλιέργούμενα όσο και σε καλλωπιστικά φυτά, σε εύκρατες και ψυχρές περιοχές. Τα άλλα είδη, το *V. nigrescens*, *V. nubilum*, *V. tricorpus* και το *V. theobromae* παρουσιάζουν περιορισμένη ένταση της ασθένειας και μικρότερο εύρος ξενιστών (Green 1981, Pegg. 1989, Barbara and Clewes, 2003).



Εικόνα 9: Σπονδυλωτός κονιδιοφόρος του μύκητα *V. dahliae* στο οποίο διακρίνεται η χαρακτηριστική διακλάδωση κατά σπονδύλους, τα φιαλίδια και τα μεμονωμένα κονίδια φιαλιδοσπόρια, (www.cals.ncsu.edu).

Τα μικροσκληρώτια είναι σκληρές μυκηλιακές κατασκευές που προέρχονται από συμπαγείς συναθροίσεις μικρού αριθμού υφών με καθορισμένη ή ακαθόριστη διάταξη. Αυτά φέρουν στο εξωτερικό τμήμα τους ψευδοπαρέγχυμα που περιβάλλει το εσωτερικό παρέγχυμα και ασκούν ρόλο διατήρησης και διαιώνησης του παθογόνου. Κάθε μικροσκληρώτιο σχηματίζεται από μία υφή, έχει σκούρο καφέ έως μαύρο χρώμα και αποτελείται από διογκωμένα κύτταρα Εικόνα 10. Ο μύκητας σχηματίζει μικροσκληρώτια ποικίλου σχήματος και μεγέθους και χάρη σ' αυτά διατηρείται στο έδαφος, ακόμα και χωρίς την παρουσία ευπαθών ξενιστών. Ο μύκητας έχει την ικανότητα να επιβιώνει και ως μυκήλιο και μέσω των κονιδίων στα προσβεβλημένα υπολείμματα της καλλιέργειας κυρίως των ετήσιων φυτών. Τέλος, ένας εναλλακτικός τρόπος διατήρησης και αύξησης των μολυσμάτων του παθογόνου σε μια καλλιέργεια είναι τα διάφορα ζιζάνια-ξενιστές του.



Εικόνα 10: Μικροσκληρώτια του μύκητα *V. dahliae* (www.cals.ncsu.edu)

Την ανάπτυξη του μύκητα ευνοούν οι θερμοκρασίες που επικρατούν στην εύκρατη ζώνη, δηλαδή μεταξύ 21-27°C, 25-28°C για ορισμένες φυλές και φαίνεται ότι για αυτό το λόγο ο μύκητας *V. dahliae* επικρατεί και αποτελεί το μεγαλύτερο πρόβλημα σε θερμότερες

περιοχές όπως η Νότια Ευρώπη και η Μεσόγειος. Ερευνητικά δεδομένα υποστηρίζουν ότι η μόλυνση αρχίζει με μικροσκληρώτια τα οποία βλαστάνουν χάρη στην ευνοϊκή επίδραση των εκκρίσεων της ρίζας. Έχει αποδειχθεί ότι στη ζώνη επιμήκυνσης οι εκκρίσεις είναι μεγαλύτερες, ως εκ τούτου από αυτή την περιοχή ξεκινά η επαφή με τα μικροσκληρώτια. Ο μύκητας έχει τη δυνατότητα να διαπερνά απ'ευθείας τα κύτταρα τα οποία σχηματίζουν ριζικά τριχίδια, την καλύπτρα της ρίζας και επιδερμικά κύτταρα της περιοχής αύξησης της ρίζας (Casarini, 1966, Huisman and Gerik, 1988).

1.1.6 ΜΗΧΑΝΙΣΜΟΙ ΠΑΘΟΓΕΝΕΙΑΣ ΤΟΥ ΜΥΚΗΤΑ *V. DAHLIAE*

Με τις μελέτες που έχουν πραγματοποιηθεί, έχει βγεί το συμπέρασμα ότι τα είδη του γένους *Verticillium spp.* μπορούν να καταστείλουν την άμυνα του φυτού, μέσω της ικανότητάς τους για πλευρική διαφυγή σε παρακείμενα αγγεία του φυτού (Gold and Robb, 1995, Lee *et al.*, 1992, Robb *et al.*, 1989). Ωστόσο, ελάχιστα μέχρι τώρα είναι γνωστά για το μοριακό έλεγχο και τις βασικές συνιστώσες στην παθογένεια των ειδών *Verticillium spp.* Ο ρόλος των υδρολυτικών ενζύμων, η παραγωγή τοξινών και διεγερτών φαίνεται ότι διαδραματίζει σημαντικό ρόλο στην παθογένεια και μολυσματικότητα διαφόρων ειδών του *Verticillium spp.*

Τοξίνες και Διεγέρτες

Σε πολλές έρευνες έχουν χρησιμοποιηθεί φυτικά εκχυλίσματα που περιέχουν σύμπλοκα τοξινών των ειδών του γένους *Verticillium spp.*, με στόχο την πρόκληση των μηχανισμών άμυνας του φυτού ή τη μελέτη της φυσιολογίας της άμυνας αυτών. Ωστόσο, η ακριβής φύση των συστατικών των συμπλόκων αυτών δεν είναι ξεκάθαρη (Pegg, 1965). Τόσο ο μύκητας *V. albo-atrum*, όσο και ο μύκητας *V. dahliae*, αναφέρονται να παράγουν φυτοτοξίνες και άλλα μόρια που επάγουν το θάνατο του φυτού-ξενιστή.

Τα εκχυλίσματα αυτά φαίνεται να περιέχουν μεγάλου μοριακού βάρους σύμπλοκα πρωτεΐνης-λιποπολυσακχαρίτη [protein-lipopolysaccharide (PLP)], γλυκοπρωτεΐνες ή και λυτικά ένζυμα των κυτταρικών τοιχωμάτων. Πατάτα μολυσμένη από το μύκητα *V. dahliae* βρέθηκε να περιέχει ένα γλυκοπεπτίδιο-τοξίνη που είναι συνδεδεμένο με την παραγωγή συμπτωμάτων σε ευπαθείς ξενιστές. Το σύμπλοκο (PLP) βρέθηκε ότι απομακρύνεται υπό μη ευνοϊκές συνθήκες για τη μείωσή του, ενώ αντίθετα η φυτοτοξική του δραστηριότητα παρέμεινε σε ένα χαμηλού μοριακού βάρους πολυπεπίδιο. Αυτό το πολυπεπίδιο βρέθηκε να επιφέρει διαφορετική τοξική δραστηριότητα σε φυτά, σχετιζόμενη με την εξειδίκευση της απομόνωσης του παθογόνου στο ξενιστή. Πειράματα ανοσοεντοπισμού έδειξαν συσσώρευση της τοξίνης στα κυτταρικά τοιχώματα ιστών του ξύλου σε στελέχη και κονδύλους ευπαθών φυτών. Η τοξίνη επίσης, δεν ανιχνεύτηκε σε μη παθογόνα στελέχη της ίδιας απομόνωσης. Όλα τα παραπάνω στηρίζουν την υπόθεση ότι το τοξικό σύμπλοκο είναι απαραίτητο για την πρόκληση παθογένειας (Buchner *et al*, 1982, Nachmias *et al.*, 1985). Σε αρκετές έρευνες χρησιμοποιήθηκαν άλλοι ενεργοί διεγέρτες του μύκητα *V.dahliae*, όπως μία

γλυκοπρωτεΐνη μεγέθους 65kDa, όπου μόνο το πρωτεϊνικό συστατικό (53kDa απογλυκοζιωμένη πρωτεΐνη) βρέθηκε υπεύθυνο για τη δραστηριότητα του διεγέρτη (Davis *et al.*, 1998).

Φαίνεται από τα παραπάνω ότι τα είδη του γένους *Verticillium spp.* χρησιμοποιούν ένα ευρύ φάσμα φυτοτοξινών και διεγερτών ή επαγωγών κυτταρικού θανάτου που μπορεί να συνδέονται με την παθογένεια του οργανισμού. Αρκετές μελέτες σε μερικώς καθαρισμένες τοξίνες έδειξαν ότι προκαλούν χλώρωση και νέκρωση σε φύλλα ευπαθών ποικιλιών τομάτας και πατάτας. Ευπαθείς ποικιλίες βαμβακιού φαίνεται πως είναι ευαίσθητες στην τοξική δραστηριότητα εκχυλισμάτων από το μύκητα με αποτέλεσμα, η ομοιόσταση να διαταράσσεται με ποικίλα συμπτώματα συμπεριλαμβανομένου και του μααρασμού (Mansoori *et al.*, 1995).

Οι παρατηρήσεις αυτές επιβεβαιώνουν την υπόθεση πολλών ερευνητών ότι τα συμπτώματα που προκαλούνται από την αδρομύκωση των ειδών του γένους *Verticillium spp.* οφείλονται στη δραστηριότητα της τοξίνης παρά στο φράξιμο των αγγείων (Keen *et al.*, 1972). Πειράματα διαχωρισμού ριζών, έδειξαν μείωση του μεγέθους των ριζών στην περίπτωση μόλυνσης πατάτας με μύκητες του γένους *Verticillium spp.* και αυτό αποδόθηκε στη δραστηριότητα της τοξίνης, δεδομένου ότι επιδρά ανεξάρτητα από τον αποικισμό του παθογόνου. Ο νανισμός επίσης σαν σύμπτωμα μπορεί να εξηγηθεί από τη μείωση της φωτοσύνθεσης που συμβαίνει στο κλείσιμο των στοματιών λόγω υδατικής καταπόνησης. Η παρατήρηση ότι ανθεκτικά είδη φυτών συχνά δεν παρουσιάζουν ευαισθησία στην τοξίνη που εκκρίνεται από είδη *Verticillium spp.*, οδήγησε στην υπόθεση ότι η έλλειψη ευαισθησίας στην τοξίνη θα μπορούσε να αποτελέσει τη βάση της ανθεκτικότητας ή της ανεκτικότητας (Buchner *et al.*, 1989).

Μέχρι στιγμής υπάρχει αβεβαιότητα ως προς την καθαρότητα των εκχυλισμάτων και τα ακριβή συστατικά που προκαλούν τα παρατηρούμενα συμπτώματα. Επιπλέον, δεδομένα από ορισμένες μελέτες εμπλέκουν την απόφραξη των αγγείων ως την πρωταρχική αιτία της υδατικής καταπόνησης στην αδρομύκωση που προκαλείται από είδη *Verticillium spp.*, ενώ η απόφραξη αυτή μπορεί να οφείλεται σε φυσικό μπλοκάρισμα των αγγείων του ξύλου του φυτού από το παθογόνο αυτό καθ'αυτό ή σε μηχανισμούς άμυνας του ξενιστή που στοχεύουν σε φράξιμο των αγγείων (Cooper, 2000, Pegg and Brady, 2002).

Έρευνες που έχουν διεξαχθεί τελευταία, έδειξαν πως πρωτεΐνες που εντοπίστηκαν σε διάφορους μύκητες, ωομύκητες και βακτήρια, φαίνεται ότι ανήκουν σε μία οικογένεια μορίων-επαγωγών που ονομάζεται NLPs (Nep1-like proteins). Ένα NPL μέλος έχει απομονωθεί και από τον μύκητα *V. dahliae* και ονομάστηκε *VdNep*. Μέλη της οικογένειας των μορίων NLP φαίνεται πως οδηγούν σε κυτταρικό θάνατο, δηλαδή σε πιθανή αντίδραση υπερευαισθησίας σε διάφορα φυτικά είδη. Επιπλέον η πρωτεΐνη *VdNep* βρέθηκε να επιφέρει μααρασμό σε φύλλα βαμβακιού, ωστόσο λίγα είναι γνωστά σχετικά με την έκφρασή της κατά τη διάρκεια της μόλυνσης. Μέχρι στιγμής ο ρόλος του γονιδίου *VdNep* στην παθογένεια του μύκητα δεν έχει αποδειχθεί για κανένα από τα μέλη της οικογένειας των NLP πρωτεϊνών στο *V. dahliae* (Pemberton and Salmond, 2004, Wang *et al.*, 2004).

Υδρολυτικά Ένζυμα

Κάποια ένζυμα που παράγονται από είδη του γένους *Verticillium spp.* παίζουν σημαντικό ρόλο στην καταστροφή των κυτταρικών τοιχωμάτων (Cooper and Wood, 1973). Από όλα αυτά τα ένζυμα, τα πηκτινολυτικά έχουν μελετηθεί περισσότερο και θεωρείται ότι είναι κυρίαρχα της παθογένειας. Με τις μελέτες που έχουν γίνει φαίνεται ότι οι μύκητες του γένους *Verticillium spp.* πρέπει να διαπεράσουν τις πλούσιες σε πηκτίνη μεμβράνες που βρίσκονται μεταξύ των αγγείων προκειμένου να εξαπλωθούν στο φυτό. Για την αγγειακή απόφραξη ιδιαίτερα σημαντικός είναι ο ρόλος που παίζουν, συχνά πλούσιες σε πηκτίνη περιοχές, που πρέπει να διαπεραστούν από το παθογόνο προκειμένου να επιτευχθεί συστηματική αποίκιση στο φυτό-ξενιστή. Αρκετά πηκτινολυτικά ένζυμα έχουν χαρακτηριστεί, περιλαμβανομένης της πολυγαλακτορουνάσης, της λυάσης της πηκτίνης και της πηκτινεστεράσης. Ορισμένα από αυτά τα ένζυμα έχει αποδειχτεί ότι έχουν την ικανότητα να νεκρώνουν φυτικούς ιστούς *in vitro* και να προκαλούν συμπτώματα αδρομυκώσεων. Τα ένζυμα αυτά έχει αποδειχθεί ότι σχετίζονται με το βαθμό μολυσματικότητας σε διαφορετικά στελέχη *Verticillium spp.* (Bishop and Cooper, 1983, Pegg *et al.*, 1976).

Αρκετές μελέτες κατέληξαν πως οι μύκητες του γένους *Verticillium spp.* χρησιμοποιούν ένα συνεργιστικά δρώντα συνδυασμό υδρολυτικών ενζύμων για τον αποικισμό του ξενιστή (Durrands and Cooper, 1988). Πρόσφατη επίσης μελέτη έδειξε ότι η απενεργοποίηση του γονιδίου της πρωτεϊνικής κινάσης μη καταβολισμού της σακχαρόζης (SNF1, sucrose non fermenting gene), γονίδιο υπεύθυνο για την επαγωγή ενζύμων που αποδομούν το κυτταρικό τοίχωμα του ξενιστή, σε διάφορες φυλές του μύκητα *V. dahliae* είχε σαν αποτέλεσμα μείωση έως και απώλεια εμφάνισης συμπτωμάτων σε ξενιστές του παθογόνου. Έχει αποδειχθεί επίσης ότι η πρωτεΐνη VdNEP προκαλεί νέκρωση και επαγωγή αιθυλενίου στο φυτό ξενιστή, συμβάλλει στην εκδήλωση συμπτωμάτων του μύκητα *V. dahliae*, ενώ υπερέκφραση του εν λόγω γονιδίου σε διάφορες φυλές του μύκητα οδήγησε σε έντονα συμπτώματα στους ξενιστές του παθογόνου (Τζίμα, 2009).

1.2 ΦΥΣΙΟΛΟΓΙΑ ΤΗΣ ΑΜΥΝΑΣ ΤΟΥ ΦΥΤΟΥ ΕΝΑΝΤΙΑ ΣΤΗ ΜΟΛΥΝΣΗ ΑΠΟ ΕΙΔΗ ΤΟΥ ΓΕΝΟΥΣ *VERTICILLIUM* *SPP.*

Στους μηχανισμούς άμυνας του φυτού υπάγεται και η ανοχή η οποία έχει συνδεθεί με ασθένειες που προκαλούνται από μύκητες του γένους *Verticillium spp.* Φυτά τα οποία παρουσιάζουν ευπάθεια χαρακτηρίζονται από έντονη μυκηλιακή εξάπλωση και έντονα συμπτώματα, ενώ τα ανεκτικά φυτά χαρακτηρίζονται από μικρό αποικισμό και εμφανίζουν μειωμένη έκφραση συμπτωμάτων. Τα ανεκτικά φυτά ωστόσο δείχνουν λίγα συμπτώματα παρά τον έντονο αποικισμό από τον μύκητα. Ως ανοχή μπορεί να οριστεί η διαδικασία της μόλυνσης ενός παθογόνου με ταυτόχρονη παραγωγή καλής σοδειάς, δηλαδή δεν προκαλείται δραματική μείωση της παραγωγής (Agris, 1997). Προφανώς ο ορισμός αυτός δεν αποκλείει το γεγονός πως η παραγωγή χωρίς την παρουσία του παθογόνου θα ήταν

ακόμα καλύτερη και για το λόγο αυτό η ανοχή μπορεί να χαρακτηριστεί ως μερική ανοχή. Στις προσπάθειες διαχωρισμού ανοχής και ανοχής που έγιναν, βρέθηκε ότι οι μηχανισμοί άμυνας του ξενιστή δρούν παρόμοια σε ανεκτικά και ανθεκτικά φυτά. Αν και, η ακόλουθη μείωση του παθογόνου που παρατηρήθηκε στα ανθεκτικά φυτά παρατηρήθηκε αργά ή και καθόλου στα ανεκτικά φυτά, γεγονός που υποστηρίζει την ιδέα ότι η ανοχή είναι πράγματι μερική ανοχή (Chen *et al.*, 2004).

Στους μύκητες του γένους *Verticillium spp.* για τον αποσαφηνισμό των μηχανισμών άμυνας, έγιναν πολλές μελέτες χρησιμοποιώντας φυτά βαμβακιού, τομάτας και λυκίσκου και βρέθηκαν αρκετά διαφορετικές διαδικασίες, είτε στην προαγγειακή φάση της μόλυνσης, είτε στην αγγειακή. Αποτελέσματα έδειξαν ότι πολλές μολύνσεις παραμένουν στην προαγγειακή φάση και ο μύκητας βρίσκεται και αναπτύσσεται μεταξύ και ενδοκυτταρικά του φλοιού της ρίζας και έτσι τα φυτά μολύνονται σε ένα περιορισμένο βαθμό.

Κατά τη φυσιολογική διαδικασία της ανάπτυξης της ρίζας η ενδοδερμίδα που είναι σουμπερινοποιημένη λειτουργεί σαν ένα φυσικό φράγμα κατά της μόλυνσης προκαλούμενη από μύκητες *Verticillium spp.* Ταυτόχρονα, η λιγνίνη εναποτίθεται γρήγορα στα επιδερμικά και φλοιώδη κυτταρικά τοιχώματα της ρίζας και γύρω από τη διεισδύουσα υφή για να σχηματίσει κονδύλους λιγνίνης για να παγιδεύσει το μύκητα. Σ'ολόκληρο το στάδιο της μόλυνσης η παραγωγή φυτοαλεξινών και σχετιζόμενων ουσιών που μπορεί να επιφέρουν αντιμικροβιακή δραστηριότητα, παράγονται στους ιστούς της ρίζας. Θεωρείται, σε πολλές έρευνες, ότι η ανοχή προκαλείται από μη ευαισθησία του ξενιστή στα σύμπλοκα τοξινών των μυκήτων *Verticillium spp.* (Buchner *et al.*, 1982, 1989, Nachmias *et al.*, 1985, 1987, Huisman, 1988). Πολλές μολύνσεις από μύκητες του γένους *Verticillium spp.* παραμένουν απαρατήρητες εξαιτίας της μόλυνσης στην προαγγειακή φάση της ασθένειας.

Οι μύκητες του γένους *Verticillium spp.* κατά τον αποικισμό τους εμφανίζουν ένα κυκλικό μοτίβο εναλλάξ μεταξύ των φάσεων της ανάπτυξης του μύκητα αλλά και της εξάλειψής του λόγω του αμυντικού μηχανισμού του φυτού (Heinz *et al.*, 1998). Σε ανθεκτικά φυτά ο μύκητας εγκλωβίζεται στη ρίζα και στο λαιμό ως αποτέλεσμα των γρήγορων μηχανισμών άμυνας, ενώ διαφεύγει της άμυνας όταν το φυτό είναι ευπαθές. Η εναπόθεση σουμπερίνης και άλλων συστατικών επίστρωσης στα αγγειακά κυτταρικά τοιχώματα, συμπεριλαμβανομένων και των χώρων παγίδευσης (trapping sites), δημιουργούν ένα φράγμα εναντίον της διείσδυσης του μύκητα και έτσι μπορεί να εμποδίσουν την οριζόντια εξάπλωση του μύκητα (Robb *et al.*, 1989). Στο στάδιο αυτό η μόλυνση καταλήγει σε φράξιμο των αγγείων από καταθέσεις που εκκρίνονται από τα γειτονικά παρεγχυματικά κύτταρα και τυλώσεις. Τυλώσεις ή θηλίδες είναι διατάσεις και διογκώσεις της κυτταρικής μεμβράνης των παρεγχυματικών κυττάρων των αγγειωδών δεσμίδων στα σημεία των πλάγιων βοθρίων προς το εσωτερικό των αγγείων, ως αποτέλεσμα ορμονικών διαταραχών στο φυτό ή και επιδράσεων ορμονικών ουσιών των παθογόνων στις κυτταρικές μεμβράνες του ξενιστή (Τζάμος, 2007). Οι εκκρίσεις αυτές των παρεγχυματικών κυττάρων συσσωρεύουν διάφορες ρητίνες που επεκτείνονται μεταξύ των βοθρίων (Robb *et al.*, 1989). Όλα αυτά τα στάδια μπλοκάρουν τη μεταφορά μέσω των βοθρίων και ως αποτέλεσμα περιορίζεται η κίνηση του μύκητα. Αν η παραπάνω διαδικασία συμβεί πριν το παθογόνο

απελευθερώσει κονίδια, το παθογόνο εγκλωβίζεται και συμβάλει το φράξιμο των αγγείων στην αντοχή. Αν όμως μολυνθούν πολλά αγγεία ταυτόχρονα και δεν μπορεί να επέλθει η ομαλή φυσιολογία και ανάπτυξη του φυτού, με την παραγωγή νέων βοθρίων, τότε η μόλυνση προχωράει και τα φυτά ενδέχεται να μην μπορέσουν να την αντιμετωπίσουν.

Δεν είναι πλήρως αποδεκτό ότι η ανατομία των αγγείων επηρεάζει την ανάπτυξη της ασθένειας καθώς δεν έχει γίνει ολοκληρωμένη μελέτη για το γένος *Verticillium spp.* Όμως για το παθογόνο *Ophiostoma novo-ulmi* παθογόνο υπεύθυνο για τη γραφίωση της φτελιάς έχει αποδειχθεί ότι φαρδύτερα και συνεχόμενα αγγεία του ξενιστή ευνοούν την εξάπλωση του μύκητα των τοξινών και των ενζύμων (Elgersma, 1970, McNabb *et al.*, 1970, Solla and Gil, 2002).

Από μελέτες έχει διαπιστωθεί ότι μολυσμένα φυτά συσσωρεύουν δυνητικά αντιμικροβιακά συστατικά, όπως πρωτεΐνες παθογένειας-PR πρωτεΐνες π.χ γλουκανάσες και χιτινάσες, φυτοαλεξίνες και φαινολικές ουσίες σε ιστούς της ρίζας και του βλαστού. Αυτές οι ουσίες παράγονται και σε ανθεκτικά και σε ευπαθή φυτά ο ρυθμός όμως και το επίπεδο παραγωγής τους είναι υψηλότερος στα ανθεκτικά φυτά. Ισχύει το ίδιο και στην περίπτωση της παραγωγής της λυάσης της φαινυλαλανινικής αμμωνίας [phenylalanine ammonia-lyase (PAL)] , ένα βασικό ένζυμο για τη σύνθεση λιγνίνης και σουμπερίνης (Bell, 1969, Cooper *et al.*, Gold and Robb, 1995, Williams *et al.*, 2002).

Η απελευθέρωση αντιμικροβιακών μορίων συμβάλει στην εξάλειψη υφών του μύκητα. Για την συγκράτηση της μυκηλιακής εξάπλωσης φαίνεται πως είναι σημαντική η αλληλεπίδραση μεταξύ φυσικών και αντιμικροβιακών μηχανισμών άμυνας του φυτού, γιατί ο μύκητας παγιδεύεται σε ένα καθορισμένο μέρος ενός αγγείου του ξύλου. Έχει συσχετιστεί η εξάλειψη αυτή με τη δραστηριότητα χιτινασών αλλά και με φυτοαλεξίνες στην τομάτα και το βαμβάκι (Pegg and Vessey, 1973., Williams *et al.*, 2002, Cooper *et al.*, 1996).

Στη γεωργία έχει χρησιμοποιηθεί ως μυκητοκτόνο το στοιχειακό θείο, το οποίο φαίνεται πως αποτελεί την πιο εντυπωσιακή φυτοαλεξίνη που εμπλέκεται στην ανθεκτικότητα σε μύκητες του γένους *Verticillium spp.* Το στοιχείο αυτό έχει βρεθεί σε υψηλές συγκεντρώσεις στα παρεγχυματικά κύτταρα του ξύλου που είναι σε επαφή με βοθρία του ξύλου, στα αγγειακά τοιχώματα του ξύλου και σε πηκτώματα απόφραξης του ξύλου, τόσο στις ανθεκτικές ποικιλίες τομάτας, όσο και στις ανθεκτικές ποικιλίες βαμβακιού (Cooper *et al.*, 1996, Williams *et al.*, 2002).

Βρέθηκαν να παράγονται φυτοαλεξίνες που ανήκουν στην ομάδα των τερπενοειδών, στα παρεγχυματικά κύτταρα του ξύλου και να συσσωρεύονται στα τοιχώματα των αγγείων του ξύλου και σε αποφράξεις στο βαμβάκι, μετά από μόλυνση με το μύκητα *V. dahliae*. Ο εμποτισμός των τοιχωμάτων του ξύλου και των αποφράξεων με αντιμικροβιακές ουσίες, ίσως να παρεμποδίζει την εξάπλωση του παθογόνου και έτσι να εμποδίζει τη συστηματική διάδοση αυτού (Cooper *et al.*, 1996). Αλληλεπίδραση ευπαθών φυτών με το παθογόνο εμφανίζεται δυνατό να καταστείλει το στρώμα σουμπερίνης των αγγείων από το ξενιστή σε τέτοια έκταση που να μπορεί να διαδοθεί και σε νέα βοθρία. Στα ευπαθή φυτικά είδη το παθογόνο συχνά είναι ικανό να καταστρέψει τα κυτταρικά τοιχώματα ακόμα και μετά από

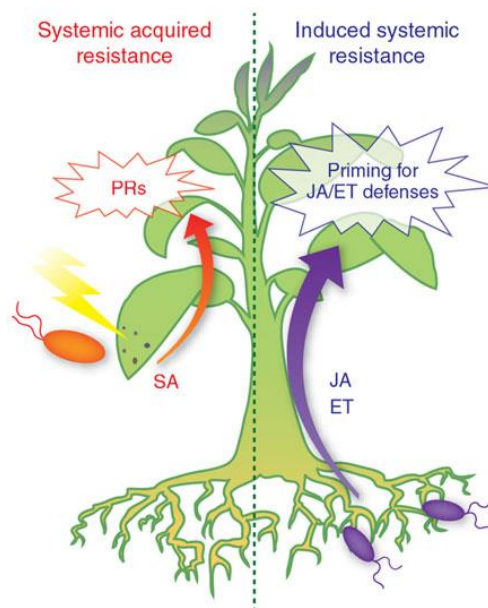
ενδυνάμωσή τους. Φαίνεται ότι η έκφραση κάποιων γονιδίων ανθεκτικότητας καταστέλλεται από το παθογόνο (Gold and Robb, 1995).

Πολλά φυτά έχει βρεθεί ότι παράγουν γλυκοπρωτεΐνες που σχετίζονται με το κυτταρικό τοίχωμα και μπορούν με διάφορους τρόπους να παρεμποδίσουν τις ενδοπολυγαλακτορουνάσες (polygalacturonase-inhibiting proteins PGIPs), που παράγονται από τον μύκητα (De Lorenzo *et al.*, 2001). Ειδικότερα για το μύκητα *V. dahliae*, από σπορόφυτα βαμβακιού απομονώθηκε μία PGIP η οποία βρέθηκε να παρεμποδίζει την πολυγαλακτορουνάση μιας απομόνωσης του μύκητα από βαμβάκι με *in vitro* πειράματα. Παρ'όλα αυτά, η *in vivo* επίδραση της πρωτεΐνης αυτής δεν είναι γνωστή. Άλλο παράδειγμα αποτελεί η περίπτωση καθαρής PGIP από μήλο που βρέθηκε να παρεμποδίζει με τον ίδιο τρόπο πολυγαλακτορουνάσες από το μύκητα *V. dahliae* όταν αυτός αναπτύχθηκε σε θρεπτικό υλικό πηκτίνης. Ετερόλογη έκφραση αυτής της PGIP σε διαγονιδιακές σειρές πατάτας σε υψηλά επίπεδα δεν οδήγησε ωστόσο σε ενισχυμένη ανθεκτικότητα στο γένος *Verticillium spp.* (Gaze dam *et al.*, 2004). Σε άλλες περιπτώσεις έχει αποδειχθεί ότι ετερόλογη έκφραση της PGIP μπορεί να αυξήσει την ανθεκτικότητα κατά παθογόνων μυκήτων με χαρακτηριστική την περίπτωση του μύκητα *Botrytis cinerea*.

1.2.1 Ο ΡΟΛΟΣ ΤΩΝ ΜΟΡΙΩΝ ΣΗΜΑΤΩΝ ΤΟΥ ΦΥΤΟΥ

Σαλικυλικό οξύ

Τα ανθεκτικά φυτά χαρακτηρίζονται από μία γρήγορη αύξηση στη δραστηριότητα της PAL αφού το ένζυμο αυτό εκτός από τη σύνθεση λιγνίνης και σουμπερίνης αποτελεί ένα ρυθμιστικό ένζυμο-κλειδί στη σύνθεση του σαλικυλικού οξέος-SA και στην εγκατάσταση της επαγόμενης διασυστηματικής αντοχής-systemic acquired resistance-SAR, Εικόνα 11. Το SA, όπως το ιασμονικό οξύ-JA και το αιθυλένιο, είναι μία φυτική ορμόνη που δρά σαν ένα μόριο σήμα στη βασική άμυνα του φυτού, όπως ακριβώς και στη γόνο-προς-γόνο διαμεσολαβούμενη άμυνα (gene-for-gene defense). Η επαγόμενη ανοχή ή αντοχή κατά του μύκητα *V. dahliae* δεν παρατηρήθηκε σε γονοτύπους *Arabidopsis spp.* που επηρεάστηκαν σε διάφορα στάδια της βιοσύνθεσης του μορίου SA όταν συγκρίθηκαν με φυτά άγριου τύπου. Ωστόσο, το SA εμπλέκεται στην προστασία φυτικών ιστών κατά τοξινών που παράγονται από μύκητες του γένους *Verticillium* (Thomma *et al.*, 2001).



Εικόνα 11: Σχηματική απεικόνιση της επαγόμενης διασυστηματικής αντοχής (systemic acquired resistance-SAR (Pieterse et al. 2009)

Αιθυλένιο

Η παραγωγή αιθυλενίου αυξάνεται γρήγορα στην περίπτωση μόλυνσης από μύκητες του γένους *Verticillium spp.* Δεν έχει γίνει ξεκάθαρο μέχρι στιγμής ο ακριβής ρόλος του αιθυλενίου στην ανθεκτικότητα των φυτών κατά του παθογόνου. Η επικρατούσα άποψη είναι ότι το αιθυλένιο εμπλέκεται στην ανθεκτικότητα των ξενιστών, σε συγκεκριμένες κλάσεις παθογόνων. Εκτός από τη συνεισφορά του στην ανθεκτικότητα, φαίνεται ότι το αιθυλένιο ελέγχει την έκφραση συμπτωμάτων σε πολλές αλληλεπιδράσεις ξενιστή-παθογόνου. Παρατηρήθηκε ότι τα συμπτώματα που προκαλούνται σε φυτά με τοξίνες από μύκητες *Verticillium spp.* είναι παρόμοια με εκείνα που παρατηρούνται μετά από χειρισμό φυτών με αιθυλένιο, ενώ ο ταυτοχρόνος χειρισμός φυτικών ιστών με τοξίνες του γένους *Verticillium spp.* ενεργοποιεί την παραγωγή του (Pegg and Cronshaw, 1976, Thomma *et al*, 1999, Mansoori and Smith, 2005).

Η σπουδαιότητα του αιθυλενίου για την παραγωγή συμπτωμάτων μαρασμού στο γένος *Verticillium spp.* έχει αποδειχθεί με πειράματα που πραγματοποιήθηκαν σε φυτά τομάτας, τα οποία είχαν κατασκευαστεί ώστε να εκφράζουν μια βακτηριακή ACC αμινάση, που εμποδίζει τη βιοσύνθεση αιθυλενίου. Η έκφραση ACC αμινάσης που επάγεται μετά από μόλυνση είχε σαν αποτέλεσμα μειωμένη έκφραση συμπτωμάτων (Robinson *et al.*, 2001). Μελέτη σε μεταλλαγμένα στελέχη *Arabidopsis etr1-1* [ethylene (ET) receptor mutant] έδειξε αυξημένη αντοχή των φυτών αυτών στον μύκητα *V.dahliae* αποδεικνύοντας το σημαντικό ρόλο του ETR1 στην άμυνα, ενάντια σε αυτό το παθογόνο. Ακόμη παρατηρήθηκε ότι η μείωση της σοβαρότητας των συμπτωμάτων που εμφανίζονται σε *etr1-1* φυτά συνδέθηκε με σημαντική μείωση στην ανάπτυξη του παθογόνου στους αγγειακούς ιστούς των φυτών, γεγονός που υποδηλώνει ότι η μειωμένη πρόσληψη

αιθυλενίου έχει ως αποτέλεσμα την αυξημένη ανθεκτικότητα αυτών των φυτών (Pantelides, 2009).

Ιασμονικό οξύ

Το αιθυλένιο έχει συνδεθεί με την ανάπτυξη συμπτωμάτων ασθένειας στις αλληλεπιδράσεις μυκήτων *Verticillium spp.* με τους ξενιστές τους. Το ιασμονικό οξύ (JA) εμπλέκεται στην πραγματική αντοχή, δεδομένου ότι η τομάτα ελλειπή σε JA και φυτά *Arabidopsis* μη ευαίσθητα στο JA βρέθηκαν να υποφέρουν πιο σοβαρά από μολύνσεις μυκήτων του γένους *Verticillium spp.* (Tjamos *et al.*, 2005).

1.2.2 ΤΑ ΓΟΝΙΔΙΑ ΑΝΘΕΚΤΙΚΟΤΗΤΑΣ *Ve*

Έχει εξακριβωθεί η ύπαρξη πολυγονικής ανθεκτικότητας σε διάφορα γένη *Verticillium spp.* σε αρκετά φυτικά είδη, συμπεριλαμβανομένων της μηδικής, του βαμβακιού, της πατάτας και της φράουλας (Hunter *et al.*, 1968). Κυρίαρχα γονίδια ανθεκτικότητας έχουν βρεθεί όμως και στο βαμβάκι, στον ηλίανθο, στην πατάτα και στην τομάτα αλλά και σε άλλα είδη. Στην τομάτα (*Lycopersicon esculentum*), ο *Ve* γενετικός τύπος παρέχει ανθεκτικότητα κατά των αδρομυκώσεων που προκαλούνται από τους μύκητες *Verticillium spp.* Η *Ve* περιοχή έχει χρησιμοποιηθεί από βελτιωτές φυτών και έχει εισαχθεί στις περισσότερες καλλιεργούμενες ποικιλίες με σκοπό να προσδώσει ανθεκτικότητα. Απομονώσεις των μυκήτων *V. dahliae* και *V. albo-atrum* από είδη που περιέχουν τον γενετικό τύπο *Ve* έχουν οριστεί ως φυλή 1, ενώ όλες οι υπόλοιπες ως φυλή 2. Αν και μερικές μελέτες δεν καταγράφουν καμία ανάπτυξη του μύκητα *Verticillium* σε φυτά τομάτας που φέρουν το γονίδιο *Ve*, άλλες σημειώνουν ότι ο αρχικός αποικισμός τόσο των ανθεκτικών όσο και των ευπαθών ποικιλιών τομάτας από την φυλή 1 του μύκητα *V. dahliae* είναι παρόμοιος. Ο μύκητας εισέρχεται στο ξύλο και επιχειρεί να διαδοθεί. Στο στάδιο αυτό στην τομάτα που παρουσιάζει ανθεκτικότητα μία γρήγορη τοπική άμυνα εμποδίζει την εξάπλωση του μύκητα και η εξάλειψη (eradication) του μύκητα συμβαίνει παρόμοια, όπως και με τα ευπαθή φυτά. Ενώ στα ευπαθή φυτά ο μύκητας ανακάμπτει και ξεκινά να εξαπλώνεται πάλι, καταλήγοντας σε κυκλικό αποικισμό, στην περίπτωση των ανθεκτικών ποικιλιών τομάτας ο μύκητας δεν ξεπερνά ουσιαστικά την εξάλειψη (Williams *et al.*, 2002, Chen *et al.*, 2004, Gold and Robb, 1995).

1.3 ΑΝΤΙΜΕΤΩΠΙΣΗ ΤΟΥ ΜΥΚΗΤΑ *V. DAHLIAE*

Οι ασθένειες που προκαλούνται από τους μύκητες του γένους *Verticillium spp.* είναι δύσκολο να αντιμετωπιστούν και η δυσκολία αυτή οφείλεται σε ένα σύνολο παραγόντων όπως η αδυναμία ελέγχου της ασθένειας με μυκητοκτόνα από τη στιγμή που ο μύκητας εισέλθει και αποικίσει τα αγγεία του ξύλου, η μεγάλη διάρκεια ζωής (8-14 χρόνια) των κατασκευών επιβίωσης του παθογόνου (μικροσκληρώτια στο έδαφος) και το μεγάλο εύρος ξενιστών που προσβάλλει (Tjamos, 1989).

Η ύπαρξη μικροσκληρωτίων στο έδαφος ακόμα και σε πολύ μικρές συγκεντρώσεις μπορεί να προκαλέσει ασθένεια με πιθανή καταστροφή της καλλιέργειας. Στα μολυσμένα εδάφη μπορεί να βρίσκονται πάνω από 100 μικροσκληρώτια ανά γραμμάριο εδάφους. Ένα πολύ χαμηλό ποσό αυτών, ακόμα της τάξης των 6-10 μικροσκληρωτίων ανά γραμμάριο εδάφους είναι ικανό να οδηγήσει σε 80% ασθένεια σε φυτά πατάτας και τομάτας, ενώ έχει αναφερθεί ότι ακόμα 2 μικροσκληρώτια ανά γραμμάριο εδάφους είναι ικανά να προκαλέσουν προσβολή σε 50% φυτών καλλιέργειας φράουλας (Harris and Yang, 1996).

Σε θερμοκηπιακές ή υψηλής προσόδου καλλιέργειες αγρού η μείωση του μολύσματος του μύκητα *Verticillium dahliae* γινόταν με απολύμανση του εδάφους, με τη χρήση βρωμιούχου μεθυλίου. Η απαγόρευση ωστόσο της χρήσης του βρωμιούχου μεθυλίου οδήγησε στην έρευνα εναλλακτικών χειρισμών για την αντιμετώπιση του μύκητα. Ως εναλλακτική μέθοδος μείωσης του μολύσματος του μύκητα *V. dahliae* είναι η εφαρμογή της ηλιοαπολύμανσης με πολύ ενθαρρυντικά αποτελέσματα στην Ελλάδα, σε καλλιέργειες αγκινάρας, τομάτας Εικόνα 12 και ελιάς Εικόνα 13. Σε εδάφη που έχει εφαρμοστεί η ηλιοαπολύμανση είχαν αυξηθεί οι πληθυσμοί του ανταγωνιστικού παράγοντα *Talaromyces flavus* στην περιοχή της ριζόσφαιρας. Όμως, η ηλιοαπολύμανση μπορεί να εφαρμοστεί μόνο σε περιοχές που έχουν κατάλληλες περιβαλλοντικές συνθήκες, αλλιώς είναι αναποτελεσματική και δαπανηρή μέθοδος (Tjamos and Paplomatas, 1988, Tjamos, 1989).



Εικόνα 12: Εφαρμογή ηλιοαπολύμανσης σε θερμοκήπιο, (www.Agrotypos.gr)



Εικόνα 13: Εφαρμογή ηλιοαπολύμανσης σε καλλιέργεια ελιάς στον αγρό, (E.C Tjamos).

Στο εμπόριο τα μυκητοκτόνα που είναι διαθέσιμα ως τώρα δεν παρουσιάζουν αποτελεσματική δράση για να αντιμετωπίσουν τις αδρομυκώσεις εξαιτίας της αποπλαστικής κίνησης των υδρόφιλων σκευασμάτων, με αποτέλεσμα να συγκεντρώνονται σε σημεία υψηλής διαπνοής (κορυφές και άκρα φύλλων). Ίσως σκευάσματα με λιπόφιλες ιδιότητες που θα κινούνται μέσω του καμβίου (phloem mobile) να είναι πιο αποτελεσματικά στην αντιμετώπιση των αδρομυκώσεων. Ακόμη, εφαρμογή σκευάσματος που περιέχει 1,3 διχλωροπροπάνιο (1,3-D, 61%) και χλωροπικρίνη (33%) ως εναλλακτικός χειρισμός για την αντικατάσταση της χρήσης του βρωμιούχου μεθυλίου παρουσίασε τη μικρότερη επίδραση στη μείωση μικροσκληρωτίων του μύκητα *V. dahliae*, ανάμεσα στα παθογόνα που εξετάστηκαν (Tjamos, 1989).

Σε εξέλιξη βρίσκονται ακόμα έρευνες με σκοπό την εξακρίβωση της δράσης της εφαρμογής βιολογικών παραγόντων και οργανικών υποστρωμάτων για την αντιμετώπιση του μύκητα *V. dahliae*, ωστόσο η εφαρμογή τους στον αγρό παρουσιάζει δυσκολίες και απαιτείται περεταίρω διερεύνηση (Tjamos *et al.*, 2005, Malandraki *et al.*, 2007, Paplomatas *et al.*, 2005).

Για την αντιμετώπιση του μύκητα *V. dahliae* έχει διαπιστωθεί ότι η χρήση ανθεκτικών ποικιλιών είναι μία αρκετά αποτελεσματική μέθοδος. Έχουν χρησιμοποιηθεί ανθεκτικές ποικιλίες τομάτας στον μύκητα και τα αποτελέσματα είναι ικανοποιητικά. Επίσης, γενετική ανθεκτικότητα έχει προσδιοριστεί στη μηδική, στο βαμβάκι, στην πατάτα και στον ηλιάνθο. Όμως, σε πολλά άλλα φυτικά είδη ανθεκτικές ποικιλίες δεν είναι διαθέσιμες, οπότε είναι αναγκαία η εύρεση άλλων μεθόδων αντιμετώπισης.

Έχει αναφερθεί ότι οι ευπαθείς, όπως και οι μερικώς ανθεκτικοί ή ανεκτικοί γονότυποι συχνά προσβάλλονται με τον ίδιο τρόπο από μύκητες του γένους *Verticillium spp.*, ωστόσο, μόνο οι ευπαθείς γονότυποι παρουσιάζουν σοβαρά συμπτώματα της ασθένειας. Παρόλα αυτά, στις μερικώς ανθεκτικές ή ανεκτικές ποικιλίες ξενιστών, το παθογόνο είναι παρόν, μπορεί να αναπαραχθεί και συνεπώς να διατηρήσει ή και να αυξήσει την πυκνότητα του μολύσματος στο έδαφος (Fradin and Thomma, 2006). Βρέθηκαν να εμφανίζουν ισχυρή ανθεκτικότητα στο μύκητα στον αγρό, διαγονιδιακά φυτά πατάτας τα οποία υπερεκφράζουν το γονίδιο *defensin* της μηδικής. Επειδή η πατάτα είναι εδωδιμη καλλιέργεια, χρειάζεται να αποδειχθεί ότι το γονίδιο αυτό δεν έχει δυσμενείς επιπτώσεις στον άνθρωπο από την κατανάλωσή του (Gao *et al.*, 2000).

Τελικά, έχει γίνει σαφές ότι δεν υπάρχει αποτελεσματική χημική αντιμετώπιση της ασθένειας που προκαλεί ο μύκητας *V. dahliae*. Η αντιμετώπιση της βασίζεται στη χρησιμοποίηση υγιούς πολλαπλασιαστικού υλικού (φυτών, μοσχευμάτων, εμβολίων), σε μη προσβεβλημένο αγρό, στη χρήση ανθεκτικών ποικιλιών ή ανθεκτικών υποκειμένων και στην αποφυγή εγκαταστάσεως των φυτών σε εδάφη που καλλιεργήθηκαν για μεγάλο χρονικό διάστημα με ευπαθή ετήσια φυτά (σολανώδη, βαμβάκι κ.α). Προτείνεται, η αποφυγή συγκαλλιέργειας ή γειτνίασης με άλλα ευπαθή στην ασθένεια φυτά, η άρδρευση να γίνεται με σταγόνες και να αποφεύγεται η άρδευση με κατάκλυση ή αυλάκια γιατί το μόλυσμα μεταφέρεται με το νερό στα υγιή δέντρα. Επίσης θα πρέπει να αποφεύγονται τα οργώματα

και οι πληγές με τα καλλιεργητικά εργαλεία στην περιοχή του λαιμού και των ριζών. Η συστηματική καταπολέμηση των ζιζανίων που μπορεί να αποτελέσουν πηγές διατήρησης του μολύσματος, είναι επίσης αναγκαία. Στην περίπτωση εκδήλωσης συμπτωμάτων θα πρέπει να γίνεται αφαίρεση των προσβεβλημένων κλάδων σε απόσταση 20-30 cm από το σημείο μαρασμού και καταστροφή με φωτιά. Στα ίδια δέντρα ιδιαίτερα στην περίπτωση της ελιάς μπορεί να εφαρμοστεί συμπληρωματικά και η εφαρμογή ηλιοαπολύμανσης του εδάφους. Επίσης η εκρίζωση των αποξηραμένων δέντρων μαζί με το ριζικό σύστημα που ακολουθείται από απολύμανση του εδάφους θεωρείται πολύ σημαντική για τη διατήρηση του μολύσματος σε χαμηλά επίπεδα (Παναγόπουλος, Τζάμος, 2007).

1.4 Η ΠΡΩΤΕΙΝΗ *LaeA* ΚΑΙ Ο ΔΕΥΤΕΡΟΓΕΝΗΣ ΜΕΤΑΒΟΛΙΣΜΟΣ

Στους βιοχημικούς δείκτες της ανάπτυξης των μυκήτων ανήκουν οι δευτερογενείς μεταβολίτες. Οι δευτερογενείς μεταβολίτες είναι ενώσεις που θεωρούνται μέρος του χημικού οπλοστασίου που απαιτείται για την προσαρμοστικότητα των μυκήτων όπου η εξέλιξη μέσω της φυσικής επιλογής προσαρμόζει ένα είδος σε ένα συγκεκριμένο σύνολο βιοτικών και αβιοτικών παραγόντων και καταπονήσεων, μέσα σε ένα περιβάλλον. Οι μεταβολίτες αυτοί συνδέονται συχνά με τις διαδικασίες σποριοποίησης και χρήζουν ιδιαίτερης εκτίμησης από το ανθρώπινο είδος, εξαιτίας των φαρμακευτικών ή και των τοξικών ιδιοτήτων που διαθέτουν. Αρκετές από τις ενώσεις αυτές διαθέτουν μεγάλο εύρος χρήσιμων αντιβιοτικών και αντιϊκών ιδιοτήτων, ιδιότητες κατά της ογκογένεσης και της υπερχοληστερολαιμίας, ανοσοκατασταλτικές ιδιότητες αλλά και λιγότερο επιθυμητές φυτοτοξικές και μυκοτοξικές ιδιότητες. Η εύρεση γενικών ρυθμιστών της παραγωγής δευτερογενών μεταβολιτών στους μύκητες είναι μεγάλης σημασίας, καθώς θα επιτρέψει τον καθολικό χειρισμό της παραγωγής δευτερογενών μεταβολιτών (Keller, 2003).

Μεγάλος αριθμός δευτερογενών μεταβολιτών των μυκήτων έχει αποδοθεί στο γένος *Aspergillus spp.* Αρκετές μελέτες στον μύκητα *Aspergillus nidulans* έχουν αποδείξει τη δυναμική ενός συστήματος-μοντέλου για τη διεκρίνιση της βιοχημείας και της μοριακής γενετικής των δευτερογενών μεταβολιτών μυκήτων και συγκεκριμένα στη βιοσύνθεση πενικιλίνης (penicillin, PN) και στεριγματοκυστίνης (sterigmatocystin, ST) μία καρκινογόνος ουσία που βιοχημικά συνδέεται με τη γεωργικής σημασίας αφλατοξίνη.

Το γονίδιο *laeA* είναι προϊόν επανενσωμάτωσης (complementation) ενός τυχαίου μεταλλάγματος (mutant) του *A. nidulans* που εμφάνιζε φαινότυπο έλλειψης παραγωγής μυκοτοξίνης ST (πρόδρομης ουσίας της αφλατοξίνης, AF), με φυσιολογική ωστόσο ικανότητα σποριοποίησης. Το γονίδιο *laeA* κωδικοποιεί μία πυρηνική πρωτεΐνη που απαιτείται για την έκφραση γονιδίων του δευτερογενούς μεταβολισμού. Το γονίδιο αυτό θεωρείται γενικός ρυθμιστής του δευτερογενούς μεταβολισμού στο γένος *Aspergillus spp.*, αφού απαιτείται όχι μόνο για τη βιοσύνθεση της στεριγματοκυστίνης, αλλά και για τη βιοσύνθεση της πενικιλίνης και μυκηλιακών χρωστικών στο μύκητα *A. nidulans* και στη βιοσύνθεση της γλιοτοξίνης και μυκηλιακών χρωστικών στο μύκητα *A. fumigatus* (Bok and Keller, 2004).

Ακόμη, η πρωτεΐνη αυτή απαιτείται για την έκφραση του συμπλέγματος γονιδίων της βιοσύνθεσης της λοβαστατίνης (Iovastatin-LOV) στο μύκητα *A. nidulans* και στο μύκητα *A. terreus*. Προκαλεί ενδιαφέρον η παρατήρηση ότι η πρωτεΐνη αυτή εμφανίζεται συντηρημένη στους μυκηλιακούς μύκητες (filamentous fungi), ωστόσο δεν είναι παρούσα στη ζύμη *Saccharomyces cerevisiae*, ένα ασκομύκητα απαλλαγμένο από δευτερογενείς μεταβολίτες. Σε αντίθεση με άλλα γονίδια που ρυθμίζουν το δευτερογενή μεταβολισμό, έλλειψη του γονιδίου *laeA* έχει αμελητέα επίδραση στη μορφολογική ανάπτυξη. Αναλύσεις των διαθέσιμων γονιδιωματικών βάσεων δεδομένων έδειξαν ότι μόνο οι μυκηλιακοί μύκητες συμπεριλαμβανομένων των *A. fumigatus*, *Magnaporthe grisea*, *Coccidioides immitis* και *Fusarium sporotrichioides* έχουν πιθανά *laeA* ομόλογα γονίδια.

Απενεργοποίηση του γονιδίου *laeA* στους μύκητες *A. nidulans* και *A. fumigatus* είχε σαν αποτέλεσμα και στους δύο μύκητες τα μεταλλαγμένα στελέχη $\Delta laeA$ δεν παρήγαγαν μυκηλιακές χρωστικές στο πίσω μέρος των αποικιών, που αναπτύσσονταν σε διάφορα θρεπτικά υποστρώματα. Στο μύκητα *A. nidulans* η παραγωγή αρκετών δευτερογενών μεταβολιτών, συμπεριλαμβανομένων και της ST, ήταν σημαντικά μειωμένη σε όλα τα $\Delta laeA$ στελέχη.

Η παραγωγή της ανοσοτοξίνης γλιοτοξίνης στο μύκητα *A. fumigatus* εμφάνισε μείωση σε όλα τα $\Delta laeA$ στελέχη. Από την εξέταση των $\Delta laeA$ στελεχών του μύκητα *A. nidulans* έδειξε ότι τα στελέχη αυτά ήταν πιο ευπαθή στη θανάτωσή τους από ουδετερόφιλα (neutrophils) *in vitro*, συγκριτικά με το άγριο στέλεχος. Το φαινόμενο αυτό οφείλεται, πιθανώς, στην έλλειψη τοξικών δευτερογενών μεταβολιτών ή μελανίνης, γνωστών παραγόντων μολυσματικότητας σε αρκετά συστήματα μυκήτων. Κατόπιν σύγκρισης ανάλυσης μικροσυστοιχιών του άγριου στελέχους και των $\Delta laeA$ στελεχών στο μύκητα *A. nidulans* (Bok et al., 2006) εντοπίστηκε μια ομάδα 5 γονιδίων που ρυθμίζονται αρνητικά στα $\Delta laeA$ στελέχη. Ακόλουθη ανάλυση των μεταλλαγών επιβεβαίωσε ότι μόνο τα 5 γονίδια που ρυθμίζονται από το γονίδιο *laeA* και όχι παρακαείμενα, ήταν απαραίτητα για την παραγωγή του δευτερογενούς μεταβολίτη τερρεκινόνης A-terrequinone A-ένανς αντί-ογκογόνος παράγοντας (Keller, 2003).

Μεταγραφική ρύθμιση συστάδων γονιδίων του δευτερογενούς μεταβολισμού από το γονίδιο *laeA*

Σε πειράματα που πραγματοποιήθηκαν στα μεταλλαγμένα $\Delta laeA$ και OE::*laeA* (στελέχη που υπερεκφράζουν το γονίδιο *laeA*) στελέχη σχετικά με την έκφραση γονιδίων ST, PN και LOV στους μύκητες *A. nidulans* και *A. terreus* βρέθηκε ότι η ρύθμιση του γονιδίου *laeA* στην παραγωγή μεταβολιτών είναι σε μεταγραφικό επίπεδο. Σε όλες τις περιπτώσεις παρατηρήθηκε μείωση ή εξάλειψη της μεταγραφής των αντίστοιχων γονιδίων στα $\Delta laeA$ στελέχη. Αν και η υπερέκφραση του γονιδίου *laeA* οδήγησε σε αύξηση της μεταγραφής των γονιδίων PN και LOV, καθώς και στην ταυτόχρονη αύξηση της παραγωγής της PN και LOV, δε συνέβη το ίδιο στην περίπτωση της μεταγραφής των γονιδίων βιοσύνθεσης της ST. Το σταθερές κατάστασης επίπεδο μεταγραφής των γονιδίων

βιοσύνθεσης ST και της παραγωγής του τελικού προϊόντος της μυκοτοξίνης στο OE::*laeA* στέλεχος, σε αντίθεση με τα αυξημένα επίπεδα μεταγραφής και παραγωγής προϊόντος στις περιπτώσεις των PN και LOV, προτείνει την ύπαρξη μοναδικής αλληλεπίδρασης μεταξύ του γονιδίου *laeA* και της γονιδιακής ρύθμισης της ST.

Ρύθμιση ανατροφοδότησης του γονιδίου *laeA* από το γονίδιο *aflR*

Τα γονίδια βιοσύνθεσης της μυκοτοξίνης ST (όπως και το AF) εδράζουν όλα μαζί σε ένα γενετικό τόπο (gene cluster) και η έκφρασή τους ρυθμίζεται από ένα μεταγραφικό παράγοντα που ονομάζεται *aflR*. Η πρωτεΐνη *aflR* προσδένεται στους υποεκκινητές των βιοσυνθετικών γονιδίων *stc* της ST και ρυθμίζει την έκφρασή τους. Απενεργοποίηση του γονιδίου *aflR* οδηγεί σε μηδενική παραγωγή ST ή και AF, ενώ αντίθετα υπερέκφραση του γονιδίου *aflR* οδηγεί σε σημαντική αύξηση της παραγωγής των μυκοτοξινών ST και AF.

Λόγω της ύπαρξης δυνητικών *aflR* (Aflatoxin Regulatory gene) θέσεων πρόσδεσης στο γονίδιο *laeA* του μύκητα *A. nidulans* και της έλλειψης θετικής επίδρασης στη ρύθμιση των γονιδίων *stc* στην περίπτωση της υπερέκφρασης του γονιδίου *laeA* (OE::*laeA*), θεωρήθηκε πιθανό ότι τα γονίδια *aflR* ρυθμίζουν αρνητικά την έκφραση του γονιδίου *laeA*. Πιο αναλυτικά, όταν τα γονίδια *aflR* υπερεκφραστούν (OE::*aflR*) δρουν κατασταλτικά μειώνοντας την έκφραση του γονιδίου *laeA*, ενώ η εξάλειψη των γονιδίων *aflR* (Δ *aflR*) δεν επηρεάζει τα μεταγραφικά επίπεδα του γονιδίου *laeA* (Keller, 2003).

Τα αποτελέσματα αυτά αποδεικνύουν ότι υπάρχουν τόσο αρνητικές (*laeA*) όσο και θετικές (*stc* genes) ρυθμιστικές επιδράσεις των γονιδίων *aflR* στη μεταγραφή γονιδίων. Αξίζει να αναφερθεί ότι η παραπάνω περίπτωση αποτελεί την πρώτη περιγραφή ενός υποθετικού μηχανισμού ανατροφοδότησης του δευτερογενούς μεταβολισμού. Ακόλουθες μελέτες έδειξαν ότι στην περίπτωση εναπόθεσης ενός αντιγράφου *aflR* σε μία τοποθεσία έξω από την συστάδα των ST γονιδίων επανορθώνεται η απώλεια παραγωγής στεριγματοκυστίνης στα Δ *laeA* στελέχη, ενώ η εναπόθεση ενός επιπλέον αντιγράφου μέσα στην συστάδα δεν έχει ανάλογη επίδραση (Bok *et al.*, 2006).

Αλληλεπίδραση του γονιδίου *laeA* και των πρωτεϊνών PkaA και RasA

Η ρύθμιση του γονιδίου *laeA* από την πρωτεΐνη RasA μπορεί να συμβαίνει μέσω του PkaA ή και άλλων βιοχημικών μονοπατιών (Keller, 2001). Άλλα δύο μόρια-μεταγωγείς σημάτων, η πρωτεϊνική κινάση A (PkaA-protein Kinase A) και η RasA, ρυθμίζουν αρνητικά την έκφραση του γονιδίου *laeA*. Και οι δύο πρωτεΐνες έχει αποδειχθεί πως ρυθμίζουν μεταγραφικά και μετά-μεταγραφικά τα γονίδια *aflR*. Φαίνεται ότι το γονίδιο *laeA* μεσολαβεί στη μεταγραφική ρύθμιση του *aflR* μέσω της πρωτεΐνης PkaA, εφόσον η υπερέκφραση του γονιδίου *laeA* σε ένα μεταλλαγμένο στέλεχος που υπερεκφράζει το γονίδιο PkaA, κατάσταση η οποία φυσιολογικά καταστέλλει την *stc* έκφραση, μερικώς αποκατέστησε την έκφραση των *stc* γονιδίων. Αναφορικά με τη ρύθμιση της έκφρασης του γονιδίου *laeA* από την PkaA η έλλειψη συμβατικών PkaA αλληλουχιών φωσφορυλλίωσης στο γονίδιο *laeA* υποδεικνύει ότι η ρύθμιση του γονιδίου από την πρωτεΐνη PkaA δεν είναι άμεση.

Εναλλακτικά, το γονίδιο *laeA* μπορεί να περιέχει μη συμβατικές PkaA θέσεις φωσφορυλλίωσης.

Η ρυθμιστική επίδραση του γονιδίου *laeA* πραγματοποιείται σε μεταγραφικό επίπεδο, χωρίς ωστόσο να δείχνει ομολογία με κανέναν μεταγραφικό παράγοντα. Σε όλες τις εξετασθείσες συστάδες γονιδίων η ρύθμιση από το γονίδιο *laeA* είναι μερικώς περιορισμένη στα γονίδια μέσα στην συστάδα και δεν εκτείνεται σε γονίδια άμεσα παρακείμενα (Bok *et al.*, 2006, Bok & Keller, 2004, Perrin *et al.*, 2007). Το γεγονός ότι α) η πρωτεΐνη LaeA εδράζει στον πυρήνα, β) έχει σημαντικό ρόλο στη μεταγραφική ρύθμιση διαφόρων γονιδίων και γ) παρουσιάζει στην πρωτεϊνική της αλληλουχία το συντηρημένο μοτίβο (Sterile Alpha Motif-περιοχή αλληλεπίδρασης με άλλες πρωτεΐνες παρούσα σε διάφορες πρωτεΐνες των βιολογικών συστημάτων), δηλώνει ότι είναι μια μεθυλτρανσφεράση, μία κατηγορία ενζύμων που είναι γνωστό ότι παίζει σημαντικό ρόλο στην επιγενετική ρύθμιση γονιδίων. Ακόλουθες μελέτες επιβεβαίωσαν την υπόθεση ότι πρόκειται για μεθυλτρανσφεράση, δεδομένου ότι μια μεταλλαγή του adenosylmethionine binding site (s-αδενοσυλο θέση πρόσδεσης της μεθειονίνης) καταλήγει σε $\Delta laeA$ φαινότυπο (Bok *et al.*, 2006; Keller, 2003). Η ρυθμιστική επίδραση του γονιδίου *laeA* συμβαίνει σε μεταγραφικό επίπεδο, χωρίς ωστόσο να δείχνει ομολογία με κανέναν μεταγραφικό παράγοντα. Σε όλες τις εξετασθείσες συστάδες γονιδίων, η ρύθμιση από το γονίδιο *laeA* είναι μερικώς περιορισμένη στα γονίδια μέσα στη συστάδα και δεν εκτείνεται σε γονίδια άμεσα παρακείμενα.

Έχει υποτεθεί ότι η πρωτεΐνη LaeA εμπλέκεται στην τροποποίηση της δομής της χρωματίνης σε τόπους συστάδων δευτερογενών μεταβολιτών και πολλά ερευνητικά δεδομένα υποστηρίζουν την υπόθεση αυτή. Ακόμη, υπάρχουν αποδεικτικά στοιχεία για την πιθανότητα η πρωτεΐνη LaeA να μετατρέπει το ποσοστό μεθυλίωσης συγκεκριμένων πυρηνικών πρωτεϊνών, πιθανά ιστονών ή άλλων συναφών της χρωματίνης πρωτεϊνών (Bok *et al.*, 2006, Keller, 2003).

1.4.1 ΤΟ ΓΟΝΙΔΙΟ *LaeA* ΣΤΟΥΣ ΜΥΚΗΤΕΣ *A. FUMIGATUS* ΚΑΙ *A. FLAVUS*

Σχετικά με το παθογόνο *A. fumigatus* τα $\Delta laeA$ στελέχη του, έχουν χάσει την ικανότητα παραγωγής αρκετών τοξινών, συμπεριλαμβανομένης της γλιοτοξίνης, που όπως έχει αποδειχτεί είναι ένας ανοσοκατασταλτικός παράγοντας *in vitro*, και παρουσιάζουν μειωμένη μολυσματική ικανότητα στα ποντίκια. Η διαγραφή του συγκεκριμένου γονιδίου *laeA* στο μύκητα *A. fumigatus* είχε σαν αποτέλεσμα τη μειωμένη μολυσματική ικανότητά του στο αναπνευστικό σύστημα του ποντικίου (mouse pulmonary level), που σχετίστηκε με μειωμένη θανάτωση των ουδετερόφιλων κυττάρων, υποστηρίζοντας έτσι το σημαντικό ρόλο της πρωτεΐνης LaeA στην ασθένεια της ασπεργίλλωσης από το μύκητα *A. fumigatus* στα θηλαστικά (Bok *et al.*, 2005).

Ένας άλλος μύκητας ο *A. flavus* είναι ιδιαίτερος γνωστός λόγο των καρκινογόνων και μεταλλαξιογόνων ουσιών που παράγει, των αφλατοξινών. Τα $\Delta laeA$ στελέχη του μύκητα

αδυνατούν να παράγουν δευτερογενείς μεταβολίτες, ενώ τα OE::*laeA* στελέχη που υπερεκφράζουν το γονίδιο *laeA* υπερπαράγουν αρκετούς από τους μεταβολίτες συμπεριλαμβανομένης και της καρκινογόνου αφλατοξίνης (Shwab *et al.*, 2008). Εκτός από τα προαναφερθέντα δεδομένα, τα στελέχη $\Delta laeA$ παρουσιάζουν μειωμένη δραστηριότητα, είναι λιγότερο ικανά στο να αποικίσουν σπόρους αραχίδας και αραβοσίτου και αδυνατούν να σχηματίσουν μικροσκληρώτια.

Το χαρακτηριστικό αυτό της έλλειψης μικροσκληρωτίων και δευτερογενών μεταβολιτών έχει παρουσιαστεί και σε στελέχη ΔveA , στελέχη με απενεργοποιημένο το *velvet* γονίδιο, στον *A.flavus* (Duran *et al.*, 2007). Τόσο το $\Delta laeA$, όσο και το ΔveA έχουν αναγνωρισθεί ως μέλη ενός συμπλόκου του μύκητα *A. nidulans* και η ρύθμιση της έκφρασης του *veA* από το *laeA* φαίνεται πως αντιπροσωπεύει έναν εσωτερικό μηχανισμό δράσης για τη διατήρηση του ανώτερου συμπλόκου, συνδέοντας τη μορφολογία με το δευτερογενή μεταβολισμό. Το γονίδιο *veA* είναι ένα φωτορυθμισμένο γονίδιο με παρόμοιες επιδράσεις στην παραγωγή των δευτερογενών μεταβολιτών με αυτές του *laeA* σε όλους τους μύκητες του γένους *Aspergillus spp.* Επίσης, το *veA* είναι απαραίτητο για την παραγωγή αφλατοξίνης και την έκφραση των *aflR* γονιδίων στον *A. parasiticus*. Όσον αφορά το γονίδιο *laeA* στο μύκητα *A. flavus* έχει διαπιστωθεί πως είναι απαραίτητο για την παραγωγή αφλατοξίνης, την έκφραση του *aflR* αλλά και την φυσιολογική έκφραση του *veA*. Ειδικότερα, ενώ τα $\Delta laeA$ δεν έδειξαν ανιχνεύσιμη παραγωγή αφλατοξίνης, τα στελέχη με επανενσωματωμένο το γονίδιο τα *laeA* (complemented strains) εμφάνισαν επαναφορά ακόμα και αύξηση σε σχέση με το άγριο στέλεχος. Αναφορικά με την έκφραση των *laeA* και *aflR*, τα $\Delta laeA$ δεν παρουσίασαν ανιχνεύσιμη έκφραση σε κανένα από τα δύο γονίδια, ενώ όταν έγινε επανενσωμάτωσή τους σημειώθηκε αύξηση της έκφρασης. Σχετικά με την έκφραση του *veA*, τα $\Delta laeA$ παρουσίασαν αύξηση της έκφρασης, ενώ μετά την επανενσωμάτωση του *veA* σημειώθηκε μείωση (Bayram *et al.*, 2008, Schwab *et al.*, 2008). Πειράματα που έγιναν έδειξαν πως τα $\Delta laeA$ στον *A. flavus* παρουσίασαν απώλεια χρωματισμού στο πίσω μέρος των τρυβλίων, χωρίς διαφοροποίηση της ακτινωτής ανάπτυξης. Εντυπωσιακοί ήταν οι φαινότυποι, τόσο στα $\Delta laeA$, όσο και στα OE::*laeA*, με τα πρώτα να στερούνται μικροσκληρωτίων όπως φαίνεται στην Εικόνα 14, ενώ τα δεύτερα να έχουν αύξηση σε σχέση με το άγριο στέλεχος (Shwab *et al.*, 2008).

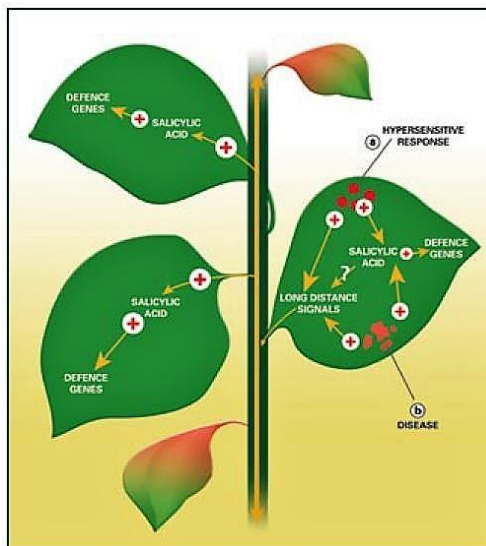


Εικόνα 14: Φαινότυποι αγρίου στελέχους, $\Delta laeA$ και OE: $laeA$ στελεχών του *A.flavus*. Είναι εμφανής η απώλεια μικροσκληρωτίων στην περίπτωση των $\Delta laeA$ στελεχών, ενώ παρατηρείται αυξημένη η παραγωγή παρατηρείται στα OE: $\Delta laeA$ στελέχη (Requirement of *LaeA* for secondary metabolism and sclerotial production in *A. flavus*, Shubha et al., 2008).

1.5 ΚΥΤΤΑΡΙΚΟΣ ΘΑΝΑΤΟΣ-ΑΝΤΙΔΡΑΣΗ ΥΠΕΡΕΥΑΙΣΘΗΣΙΑΣ

Η αντίδραση υπερευαισθησίας ή HR (Hypersensitive response) είναι μία μορφή κυτταρικού θανάτου (Programmed Cell Death) που μοιάζει με την απόπτωση των θηλαστικών και συνδέεται με την αντοχή των φυτών σε μυκητολογικές, βακτηριολογικές και ιολογικές προσβολές (Lamb and Dixon, 1997). Η ταχύτητα εκδήλωσης της HR εξαρτάται από το παθογόνο και τη φυτική επιφάνεια. Έχει αποδειχθεί ότι στους ιούς η HR λαμβάνει χώρα μετά την είσοδό τους στο φυτό, τον πολλαπλασιασμό και τη μετακίνησή τους σε γειτονικά κύτταρα μέσω των πλασμοδεσμάτων (Τζάμος, 2005). Μέχρι στιγμής πολλά πειράματα έχουν χρησιμοποιήσει τη μέθοδο HR για τον περιορισμό των παθογόνων (Morel and Dangl, 1997), στηριζόμενα στην ικανότητα των φυτών να αναγνωρίζουν τον εισβολέα-παθογόνο σε αρχικό στάδιο αν και έχει αποδειχτεί ότι απαιτείται ορισμένο χρονικό διάστημα αλληλεπίδρασης μεταξύ των παθογόνων και των κυττάρων του ξενιστή (Mehdy, 1994).

Η HR ενεργοποιείται από ουσίες των παθογόνων που ονομάζονται διεγέρτες (elicitors) Εικόνα 15 και καθεμία απ'αυτές βρίσκεται πάνω ή πλησίον της επιφάνειας του παθογόνου. Σε πολλές περιπτώσεις είναι γνωστή η χημική φύση των διεγερτών της HR οι οποίοι συγκαταλέγονται στην ομάδα των γόνων αμολυσματικότητας ή τελεστών.



Εικόνα 15: Η απεικόνιση της αντίδρασης υπερευαισθησίας σε φύλλα καπνού (<http://intobiology.org.uk>)

Οι βιοχημικές αντιδράσεις που λαμβάνουν χώρα κατά την εκδήλωση της HR φαίνεται πως είναι παρόμοιες ανεξαρτήτως της φύσεως του παθογόνου. Μετά τη μόλυνση παρατηρείται το φαινόμενο της οξειδωτικής έκρηξης (oxidative burst) με συμμετοχή των ιόντων Ca^{2+} , που επιδρούν στην έναρξη της HR με τελικό αποτέλεσμα τον περιορισμό της θρέψης των παθογόνων και τη διατήρησή τους στην αρχική θέση μόλυνσης (Baker and Orlandi, 1995). Ταυτόχρονα μία σειρά πρωτεϊνικών κινασών είναι επίσης υπεύθυνη για τη διαδικασία της μεταγωγής του σήματος της HR λόγω της συμβολής της φωσφορυλίωσης στο σχηματισμό του ατομικού οξυγόνου. Οι συνδυασμένες δράσεις των ενζύμων αφυδρογονάσης του μηλικού και των περοξειδασών στηρίζουν το σχηματισμό του H_2O_2 . Η δεσμευμένη στα κυτταρικά τοιχώματα περοξειδάση χρησιμοποιεί NADH ή NADPH ως δότη ηλεκτρονίων. Η αντίδραση του H_2O_2 με υπεροξειδίο για το σχηματισμό υδροξυλικής ρίζας θεωρείται πρωταρχικός παράγοντας για την καταστροφή της πρωτοπλασματικής μεμβράνης. Παράλληλα ενεργοποιούνται και μηχανισμοί για τη σύνθεση αντιμικροβιακών ενώσεων που καλούνται φυτοαλεξίνες και υδρολυτικά ένζυμα ώστε να απομονωθεί το παθογόνο (Mehdy, 1994).

Η αυξανόμενη συγκέντρωση κυτταροπλασματικού Ca^{2+} δραστηριοποιεί πρωτεΐνες-κινάσες και ξεπερνά τη συντονισμένη δομή και λειτουργία του κυττάρου. Η μεταγωγή του σήματος μέσω των κινασών οδηγεί στην ενεργοποίηση λιποξυγενασών, συμβάλλοντας στην παραγωγή ελεύθερων ριζών. Η διαταραχή της πρωτοπλασματικής μεμβράνης από το ενεργό ατομικό οξυγόνο είναι υπεύθυνη για την είσοδο των ιόντων ασβεστίου στο κύτταρο (Keppler and Baker, 1989). Η μη αναστρέψιμη εναλλαγή των λειτουργικών τους δραστηριοτήτων, με δισμουτάση του υπεροξειδίου, καταλάση, περοξειδάση, λιποξυγενάση

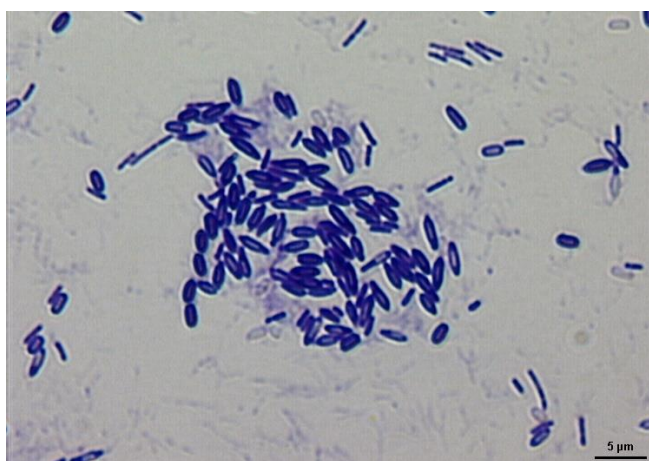
ίσως είναι υπεύθυνη για την καταστροφή της μεμβράνης και της νέκρωσης των κυττάρων που χαρακτηρίζει την HR (Τζάμος, 2005).

Η επίδραση της HR ευνοεί την εγκατάσταση και επέκταση του παθογόνου σε διάφορους μύκητες όπως συμβαίνει στην περίπτωση των *Botrytis cinerea* και *Sclerotinia sclerotiorum*, όπου επιβιώνουν σε νεκρό ιστό (Govrin and Levine, 2002). Σε πειράματα που πραγματοποιήθηκαν σε φύλλα φυτού *Arabidopsis thaliana* μετά τη μόλυνση με *B. cinerea* παρατηρήθηκε συσσώρευση υπεροξειδίου του υδρογόνου σε αναλογία με την ποσότητα του μολύσματος (Govrin and Levine, 2002).

Ο κυτταρικός θάνατος που προκαλείται από την HR έχει παρατηρηθεί πως παρουσιάζει ποικιλομορφία, και αυτό υποδηλώνει πως είναι πολλαπλά τα μονοπάτια που την ενεργοποιούν, τα οποία ενδεχομένως καθορίζονται από τα σήματα του εκάστοτε παθογόνου. Επίσης η HR φαίνεται ότι ρυθμίζει την άμυνα του φυτού τόσο τοπικά (στο σημείο εφαρμογής του μολύσματος) όσο και σε γειτονικούς ιστούς του φύλλου (Morel and Dangl, 1997).

1.6 ΤΟ ΣΤΕΛΕΧΟΣ K165 ΤΟΥ ΒΑΚΤΗΡΙΟΥ *PAENIBACILLUS ALVEI*

Το είδος *Paenibacillus alvei* φαίνεται στην Εικόνα 16 ανήκει στην κατηγορία των αυξητικών ριζοσφαιρικών βακτηρίων τα οποία εντοπίζονται στα ακρορρίζια των φυτών αλλά και ενδοφυτικά αυτών. Το είδος *P. alvei* επάγει τη διασυστηματική άμυνα των φυτών καθώς επίσης παράγει πλήθος ενζύμων όπως η χιτινάση και τοξινών όπως η αλβεολυσίνη, με μυκητοκτόνο δράση και εντομοκτόνο δράση (Djukic, 2012). Επιπλέον παράγει ινδολοξικό οξύ (IAA) και φαινιλικές ενώσεις (Lebuhn *et al.*, 2006).



Εικόνα 16: *Paenibacillus alvei*, (Envis centre on Environmental Biotechnology)

Το στέλεχος K165 του βακτηρίου *P. alvei* απομονώθηκε το 2004 από τους (Tjamos *et al.*, 2004). Το στέλεχος βρέθηκε στα ακρορρίζια φυτών *Lycopersicum esculentum*, που καλλιεργήθηκαν σε ηλιοαπολυμανθέν έδαφος. Από διάφορα πειράματα έχει αποδειχτεί η

θετική επίδρασή του στην ανάπτυξη φυτών *Solanum melongena* και *Solanum tuberosum* (Tjamos *et al.*, 2004). Επίσης διαπιστώθηκε η συμβολή του βακτηρίου στην προστασία των φυτών σε φυσική ή τεχνηκή μόλυνση από το παθογόνο μύκητα *V. dahliae* σε πειράματα θερμοκηπίου και αγρού (Tjamos *et al.*, 2004).

Έχει βρεθεί ότι το στέλεχος K165 επάγει τους αμυντικούς μηχανισμούς του φυτού *A. thaliana* εναντίον του βερτισιλλίου. Επίσης έχει παρατηρηθεί ότι το στέλεχος K165 μειώνει τη βλαστική ικανότητα των μικροσκλητωτίων του μύκητα *V. dahliae* (Antonopoulos *et al.*, 2007).

Η ανοσοποίηση με τα ριζοσφαιρικά βακτήρια εκδηλώνεται ως καθυστέρηση στην έκφραση των συμπτωμάτων και μείωση στην ένταση και εξέλιξη της ασθένειας με παράλληλη ενεργοποίηση μηχανισμών που συμβάλουν στη διασυστηματική προστασία των φυτών εναντίων φυτοπαθογόνων μυκήτων, βακτηρίων ή ιών. Τα ριζοβακτήρια τα οποία αποικίζουν τη ρίζα και επάγουν τη διασυστηματική αντοχή των φυτών ανήκουν τα είδη *Pseudomonas fluorescens*, *Pseudomonas putida*, *Bacillus pumilus*, *Serratia marcescens*, *Paenibacillus alvei*, *Chryseobacterium balustinum* (Van Loon, 2007). Τα ριζοβακτήρια δεν προκαλούν κανένα ορατό σύμπτωμα στον ξενιστή και συνήθως αυξάνουν τον ρυθμό ανάπτυξής του (Τζάμος, 2007).

Η επαγωγή της διασυστηματικής αντοχής εξαρτάται από το επαρκές ύψος αποικίσεως του ριζικού συστήματος από το ριζοσφαιρικό βακτήριο. Αυτό τις περισσότερες φορές επιτυγχάνεται με την προσθήκη βακτηρίων στο έδαφος υπό μορφή υγρού αιωρήματος πριν από τη σπορά, κατά τη μεταφύτευση ή με την επίταση του σπόρου με μεγάλο αριθμό βακτηρίων. Στόχος αυτού είναι η διευκόλυνση της εγκαταστάσεως και η επικράτηση του επαγωγικού βακτηρίου έναντι των προϋπαρχόντων μικροοργανισμών. Μερικά από τα ριζοβακτήρια έχουν την ικανότητα να εισέρχονται εντός του φυτού από τις ρίζες και να αποικίζουν ενδοφυτικά το φυτό. Τα ενδοφυτικά ριζοβακτήρια θεωρούνται ότι έχουν μεγαλύτερη επαγωγική ικανότητα σε σύγκριση με στελέχη που εντοπίζονται αποκλειστικά στη ριζόσφαιρα. Ερευνητικά δεδομένα αποδεικνύουν ότι ριζοβακτήρια που ανήκουν στα γένη *Bacillus spp.* και *Paenibacillus spp.* συνθέτουν χιτινάσες, παράγουν ινδολοξεικό οξύ και επάγουν τη διασυστηματική αντοχή εναντίον φυτοπαθογόνων μυκήτων (Τζάμος, 2007).

2. ΣΚΟΠΟΣ ΤΗΣ ΠΑΡΟΥΣΑΣ ΜΕΛΕΤΗΣ

Ο εδαφογενής μύκητας *Verticillium dahliae* είναι ένας σημαντικός φυτοπαθογόνος μικροοργανισμός που είναι ιδιαίτερα καταστροφικός για περισσότερα από 200 είδη φυτών, πολλά από τα οποία είναι υψηλής εμπορικής σημασίας. Η σοβαρότητα της ασθένειας για την αγροτική παραγωγή εντοπίζεται στην παγκόσμια εξάπλωση του μύκητα *V. dahliae* καθώς και στο γεγονός ότι δεν υπάρχουν αποτελεσματικά χημικά μέτρα για την αντιμετώπισή του. Η αδυναμία αντιμετώπισης του *V. dahliae* οφείλεται στη βιολογία του παθογόνου. Ο μύκητας ζει στο έδαφος, επιβιώνει σε πολύ ανθεκτικές μυκηλιακές κατασκευές, τα μικροσκληρώτια για 10-15 χρόνια και εισέρχεται από τις ρίζες στο αγγειακό σύστημα του φυτού. Εκεί η πρόσβαση χημικών φυτοπροστατευτικών ουσιών είναι πολύ δύσκολη. Για το λόγο αυτό καθίσταται πλέον σημαντική η κατανόηση των μηχανισμών σε μοριακό και βιοχημικό επίπεδο. Έτσι δημιουργείται η ανάγκη εύρεσης νέων, εναλλακτικών μεθόδων αντιμετώπισης της ασθένειας και στο πλαίσιο αυτό, πολλές έρευνες έχουν πραγματοποιηθεί σε μοριακό επίπεδο για την ανεύρεση συσχετισμού μεταξύ δευτερογενούς μεταβολισμού και παθογένειας του μύκητα.

Σκοπός της παρούσας μελέτης ήταν η περαιτέρω διερεύνηση του ρόλου του γονιδίου *VdLaeA* στη μορφολογία και την παθογένεια του φυτοπαθογόνου μύκητα *V. dahliae*. Βασικός στόχος ήταν να καθοριστεί αν το γονίδιο *VdLaeA*, ενός πιθανού γενικού ρυθμιστή του δευτερογενούς μεταβολισμού στο μύκητα *V. dahliae* παίζει ρόλο στην παθογένεια, στη μολυσματικότητα αλλά και σε άλλα φυσιολογικά και μορφολογικά χαρακτηριστικά του παθογόνου. Για να επιτευχτεί αυτός ο στόχος εφαρμόστηκαν πειράματα σε υπάρχοντα μεταλλαγμένα στελέχη στα οποία είχε προηγηθεί απενεργοποίηση του γονιδίου *VdLaeA* στο εργαστήριο Φυτοπαθολογίας σε προηγούμενα πειράματα στα πλαίσια της πτυχιακής μελέτης της Δρ Α. Γιαννακοπούλου. Επιπλέον στόχος ήταν η υπερέκφραση του γονιδίου *VdLaeA* και η μελέτη του μεταλλαγμένου στελέχους ως προς τη μορφολογία και την παθογένεια του μύκητα *V. dahliae*.

Για την αποσαφήνιση του ρόλου του γονιδίου *VdLaeA* πραγματοποιήθηκαν τα παρακάτω πειράματα στα μεταλλαγμένα στελέχη όπου είχε απενεργοποιηθεί το γονίδιο αυτό:

- Κατασκευή πλασμιδιακών φορέων υπερέκφρασης του *VdLaeA*
- Πειράματα παθογένειας των μεταλλαγμένων στελεχών σε φυτά *Arabidopsis thaliana*, *Solanum melongena*, *Solanum lycopersicum*.
- Μελέτη μορφολογικών χαρακτηριστικών των στελεχών $\Delta VdLaeA$ σε διάφορα θρεπτικά υποστρώματα.
- Επίδραση της μετάλλαξης $\Delta VdLaeA$ στην πρόκληση κυτταρικού θανάτου σε φύλλα καπνού.
- Πειράματα παθογένειας με ενσωμάτωση μικροσκληρωτίων στο χρώμα του άγριου και των μεταλλαγμένων στελεχών σε φυτά *Solanum melongena*.

- Έλεγχος της ανταγωνιστικής ικανότητας του στελέχους *P.alvei* K-165 στα μεταλλαγμένα $\Delta VdLaeA$ στελέχη του *V. dahliae*.

Αποτέλεσμα της παρούσας μελέτης ήταν η εκτενέστερη και βαθύτερη αντίληψη των διαδικασιών που απαιτούνται για την παραγωγή των δευτερογενών μεταβολιτών στο μύκητα *V. dahliae*.

3. ΥΛΙΚΑ ΚΑΙ ΜΕΘΟΔΟΙ

3.1 ΥΠΕΡΕΚΦΡΑΣΗ ΤΟΥ ΓΟΝΙΔΙΟΥ *VdlaeA* ΣΤΟ ΜΥΚΗΤΑ *VERTICILLIUM DAHLIAE*

Στην πορεία αυτής της μελέτης πραγματοποιήθηκαν πειράματα με στόχο την υπερέκφραση του γονιδίου *VdLaeA* του μύκητα *V. dahliae*. Για το σκοπό αυτό το γονίδιο *VdLaeA* υποκλωνοποιήθηκε επιτυχώς στον πλασμιδιακό φορέα SK1226, ο οποίος διαθέτει έναν πολύ ισχυρό υποκινητή της ριβοσωμικής πρωτεΐνης του μύκητα *Magnaporthe grisea* και ένα τερματιστή της βήτα τουμπουλίνης του μύκητα *Neurospora crassa*. Επόμενα βήματα για την ολοκλήρωση της υπερέκφρασης είναι η μεταφορά της κασέτας υπερέκφρασης του γονιδίου *VdLaeA* στο δυαδικό φορέα SK879 και ακολούθως ενσωμάτωση αυτής μέσω γενετικού ανασυνδιασμού με το βακτήριο *Agrobacterium tumefaciens*, στο γονιδίωμα του άγριου στελέχους *V. dahliae*.

3.1.1 ΣΧΕΔΙΑΣΜΟΣ ΕΚΚΙΝΗΤΩΝ

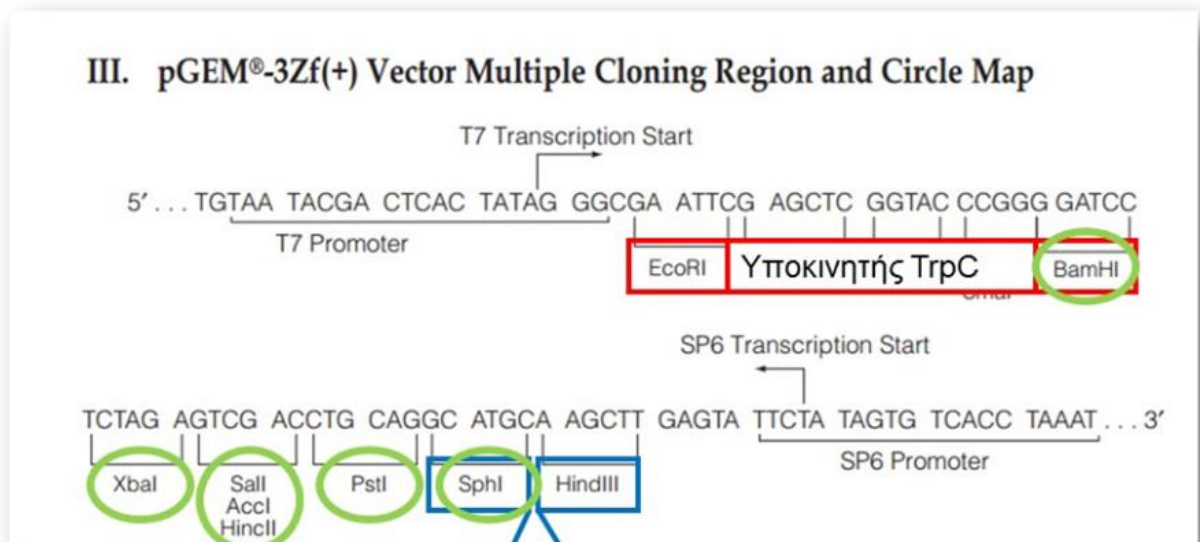
Για τη δημιουργία της κασέτας υπερέκφρασης του γονιδίου *VdLaeA*, σχεδιάστηκαν εκκινητές, με στόχο την απομόνωσή του από το άγριο στέλεχος του μύκητα *V. dahliae* και την κλωνοποίηση σε κατάλληλο πλασμιδιακό φορέα. Οι εκκινητές αυτοί σχεδιάστηκαν με τέτοιο τρόπο Εικόνα 17, ώστε να ενισχύουν μια περιοχή 1955 βάσεων (bp) λίγο πριν το κωδικόνιο έναρξης και μετά το κωδικόνιο λήξης. Οι εκκινητές σχεδιάστηκαν ώστε να διαθέτουν κατάλληλα ένζυμα περιορισμού για την κλωνοποίησή τους στο φορέα SK1226.

```
CGTTTCGCGTGTCAGCTATCATGTCTATCAACGGGTATGGCTCTCCCCCGCCGCGCCCC
CTGACTCAGAATGTAGTTATCTTGCTAACTAATCGTCGGTCATCAGCAGAAATGCAGGAT
CGCAAGGTTATCGGGAAAATGGACGTGTTTATGGAGAGTTTCGTCTGGACGTTATTTAT
TCCCCATCGATGAGGTGAGTCAACTTGCAAACCTGGAGTTATTCGGACGTCTTGCTGAAGT
CACTCATGTGCATAGGAAGAAAAGACAGGTTTGACGTCCTTCACCGAGTTGTGTCTGTG
GCTCGGCAGAAATAAGCACTTCGACAACGAGGTTCCGGACCGCGCCCGAGTTCTCGATCTC
GGCACGGGCACTGGCATATGGGCAATCGATGTTTCCGAGTAAGACACTGCTTGTGTGTAT
TTCAAGGTGACTATATCCACTGACGACACATGCAGCGCCCTCTGGAAGGGACCTGAGAAC
CACGGTCTCGTACATGGACTAGATCTTGCTTATATACAGCCCGCCGAGTGAGTTTCGGACA
ACTTGCTGCAATGGCTGAAATCTCACTGGCTGACACACTCCAGCGTACCATCTACAGTGT
CTTTTATGCAGGCAGATGTAGAAGAACCCTGGCCGCTGCGCGAGAATGATTACGACATGA
TACATATTCAGCTTTTGAAGGGTGGGATTCGGGATTGGACGGATCTCTACCGGAAGATTT
TCAGGTAAGCACTGATTCGCAACCAAGGACTACTCGATCATCTGCTAAAGCACCGATCAG
GCATCTGAAACCTGGAGGCTATCTGGAACATGTAGAGATCGACTGGACGTTCCGGTCTGA
CGACAACACACTCACCTCCGACACAGCTCTGGTGGCTTGGAGCGAAGCTGTGCATCGGGC
GTTACGGACCTTTGGCACGCCACTGGACATCAATGACAGAATCAAAGGTGACCTCCAAGC
GCTTGGTTTCACGGACGTAACCGAGACAATTGTCAAGCTCCCGATCAACCCCTGGGCCGA
CAATAAGCATGACCAAGAGTTGGGTTCGATGGTTCAATCTTGACGCCACTCATGCCGTCAA
CGCCATGAGCCTAGCACCCTCACCCGGGTTGAGGGTTGGCCCGTCGAACAAGTACAGAG
TCTCGGAAGCGAGGTGAAGAAGAACCCTTGCAAACCTAAGCATCCATGCATACTGCAGACT
GTAAGTTGGCCCCCTATGCAGTTACCCGCCGAGAAGGCGCAGACACGCTAATAGTCGAGCG
CAGACATGTATGGACAGCAAAGAAACCGAGCCAATGATGAGGGCGAAGGAGCTTGGCCCA
ATTACCGATCCTCGGCATGTGTTGTATTTCCACCTTCTCGGACAGCTCAAAAGCTTTCA
```

GTCGACGGAGGGGAAGAGGGCTTCATGGCATCCCGCGCTCGAAAACGCGTCGCGAGCAAGT
 GTTGGTGACCCTGTCGTTACCCTCCCGTCATTATAACACGTTGTTCGATACTGGTGCTGGT
 GACCAGAAAACCGCACTACAGACCAGACGCCCTAAACTGGACGAAAGCACAACATCGATT
 GGGTCATCGAGCCTTTTCCAGCCTCTGTATACTACCACTATCATCACCGCCTTTGCCATA
 TATCATCACTTTATTACCAATATCTCATCGTCCTTAGAATACATCCTGGTAGCCTTCGC
 TTCGAGGTGCGCTCTAGAAAGCGAGGGGGCGCCCTACACAGCGAGGTCATCCTCCCTTTT
 GGCTGCGACAACATTTGCTGCGTTCTGAAGCATACCGCATGAAGCCCTCCTATCAATTTT
 CGGACGGCATGGAAAATTCAATATCTGTCTGGTTTACTAGGCCAGCTTGGGGCTCGACAT
 TGGCCAGCGAGTTCGCTATAGTGAAGAATCTCACTGTCCAACGCAACCGCGGCCTCTAAG
 GATCATCTGATCTCTTGACTAGACCCACAGGATGTGGTTGCCCGCTTTGGTTCGGGAAG

Εικόνα 17: Αλληλουχία του γενωματικού DNA του μύκητα *V. dahliae*. Επισημάνση των περιοχών με βάση τις οποίες σχεδιάστηκαν οι εκκινητές για την υπερέκφραση του γονιδίου *VdLaeA* (ATG: κωδικόνιο έναρξης, TAA: κωδικόνιο λήξης)

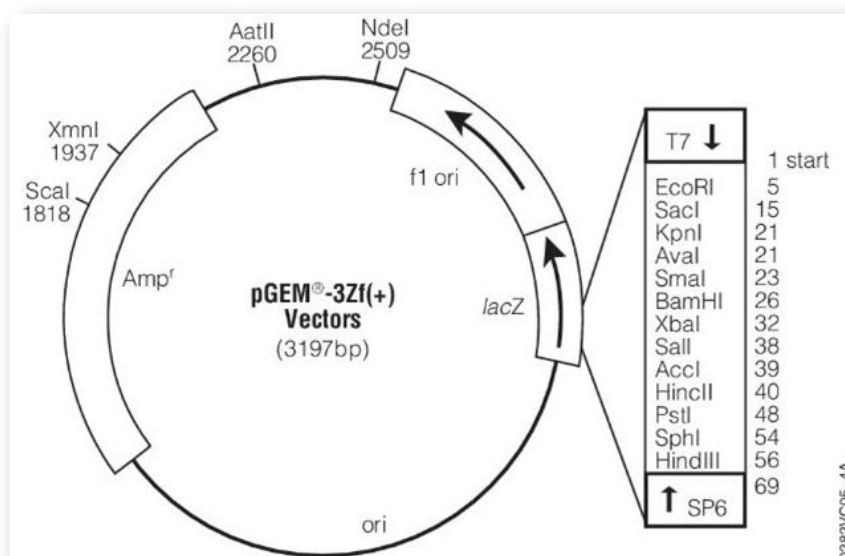
Οι εκκινητές VD_OE_LaeA-F1-BamHI και VD_OE_LaeA-R1-SphI ενίσχυαν τμήμα DNA 1955 βάσεων, Εικόνες 17, 19 το οποίο στη συνέχεια κλωνοποιήθηκε στο φορέα SK1226 που προέρχεται από το φορέα pGEM Εικόνα 20. Το DNA του γονιδίου *VdLaeA* ενισχύθηκε με PCR χρησιμοποιώντας εκκινητές που ενισχύουν το αναγνωστικό πλαίσιο του γονιδίου το οποίο κοβόταν από τα ένζυμα BamHI (ο ανοδικός εκκινητής) και SphI (ο καθοδικός εκκινητής). Στη συνέχεια, υποκλωνοποιήθηκε στις αντίστοιχες θέσεις περιορισμού στο φορέα SK1226 Εικόνες 18, 20 κάτω από τον έλεγχο του υποκινητή του γονιδίου της ριβοσωμικής πρωτεΐνης του μύκητα *Magnaporthe grisea* και του τερματιστή της βήτα τουμπουλίνης του μύκητα *Neurospora crassa*. Απώτερος στόχος ήταν η κλωνοποίηση της κασέτας υπερέκφρασης στο δυαδικό φορέα SK879 με τη χρήση των περιοριστικών ενζύμων EcoRI και HindIII και εν συνεχεία χρήση του HindIII, εισαγωγή του τελικού φορέα στο βακτήριο *A.tumefaciens* και τελικός μετασχηματισμός του μύκητα *V. dahliae*.



Εικόνα 18: Σχεδιασμός θέσης κοπής των περιοριστικών ενζύμων στο φορέα κλωνοποίησης SK 1226 (Δ.Ι. Τσιτσιγιάννης)

ΕΚΚΙΝΗΤΕΣ	ΑΛΛΗΛΟΥΧΙΑ
LaeA-F2	5'-AGCACTTCGACAACGAGGTT-3'
LaeA-R1-RT	5'-TGTGTCGGAGGTGAGTGTGT-3'
VD_OE_LaeA-F1-BamHI	5'-ATCGCGGGATCCGCGTGTCAGCTATCATGTC-3'
VD_OE_LaeA-R1-SphI	5'-GCAACCGCATGCTGTGGGGTCTAGTCAAGA-3'

Εικόνα 19: Οι εκκινήτες VD_OE_LaeA-F1-BamHI και οι VD_OE_LaeA-R1-SphI οι οποίοι ενίσχυσαν τμήμα DNA 1955. Οι εκκινήτες LaeAF2, LaeAR1RT ενίσχυσαν τμήμα 532 βάσεων



Εικόνα 20: Σχηματική παράσταση της περιοχής κλωνοποίησης του φορέα SK1226.

3.2 ΜΙΚΡΟΒΙΟΛΟΓΙΚΟ ΥΛΙΚΟ - ΣΥΝΘΗΚΕΣ ΔΙΑΤΗΡΗΣΗΣ

Στην παρούσα μελέτη χρησιμοποιήθηκε μια απομόνωση από ραπανάκι του φυτοπαθογόνου μύκητα *V. dahliae*, που έχει την ικανότητα να μολύνει το φυτό *Arabidopsis thaliana* και άλλους ξενιστές. Η ενεργοποίηση του στελέχους σε κάθε διαδικασία πραγματοποιούνταν σε τρυβλίο με θρεπτικό υλικό PDA ως εξής:

- ❖ Ο μύκητας φυλασσόταν σε ειδικό φιαλίδιο (cryogenic tube) υπό τη μορφή αιωρήματος κονιδίων αναμεμιγμένο με διάλυμα γλυκερόλης 50%, σε αναλογία 1:1 (glycerol stock), στους -80 °C, ώστε η τελική συγκέντρωση γλυκερόλης να είναι 25%.
- ❖ Υπό ασηπτικές συνθήκες στο θάλαμο οριζόντιας νηματικής ροής (laminar) γινόταν μεταφορά και γραμμική διασπορά με τη χρήση αποστειρωμένης οδοντογλυφίδας

μικρής ποσότητας καλλιέργειας του μύκητα από το glycerol stock, σε τρυβλίο με θρεπτικό υλικό PDA.

- ❖ Ακολούθησε κλείσιμο του τρυβλίου με τη χρήση parafilm, για αποφυγή μολύνσεων και το τρυβλίο τοποθετήθηκε σε θάλαμο σταθερής θερμοκρασίας 28°C και σταθερής φωτοπεριόδου 12 ωρών για την ανάπτυξη του μύκητα.
- ❖ Στη συνέχεια, υπό ασηπτικές συνθήκες στο θάλαμο νηματικής ροής πραγματοποιήθηκε με τη χρήση αποστειρωμένου νυστεριού μεταφορά 2-3 κομματιών θρεπτικού υλικού με μυκήλιο του μύκητα (περιφερειακές υφές) σε τρυβλίο που περιείχε υγρό θρεπτικό υλικό 50 ml SSN.
- ❖ Τα τρυβλία στη συνέχεια τοποθετήθηκαν σε ανακινούμενο επωαστικό θάλαμο σταθερής θερμοκρασίας 24°C, κατάλληλης για την ανάπτυξη και παραγωγή κονιδίων του μύκητα, με ταχύτητα ανάδευσης 150-200 στροφές/λεπτό.
- ❖ Μετά την πάροδο 3-4 ημερών είχε σχηματιστεί πυκνό αιώρημα κονιδίων του μύκητα *V.dahliae*.

Για την παραλαβή του μυκηλίου με τα κονίδια του μύκητα για περαιτέρω χρήση αυτού ακολουθήθηκε η παρακάτω διαδικασία:

- ❖ Το περιεχόμενο του τρυβλίου διηθήθηκε με κατάλληλο μέσο (τουλπάνι) σε ποτήρι ζέσεως.
- ❖ Έγινε παραλαβή του μυκηλίου με τα κονίδια και αφού πιέστηκε μεταξύ απορροφητικών χαρτιών για την αποβολή της εναπομείνουσας υγρασίας, τοποθετήθηκε σε erpendorf σωληνάκι του 1,5 ml.
- ❖ Στη συνέχεια, με τη βοήθεια πυρακτωμένης βελόνας ανοίχθηκαν οπές στην επιφάνεια του πώματος του erpendorf σωληνίσκου και αυτό τοποθετήθηκε, είτε στους -80° C για 4 και πλέον ώρες, είτε σε υγρό άζωτο για 5 λεπτά έτσι ώστε να ακολουθήσει η διαδικασία της λυοφιλίωσης, για 12-24h.
- ❖ Αφού ολοκληρώθηκε η λυοφιλίωση το erpendorf σωληνάκι τοποθετήθηκε στους -80°C για φύλαξη.

3.3 ΑΠΟΜΟΝΩΣΗ ΓΕΝΩΜΙΚΟΥ DNA ΑΠΟ ΤΟ ΜΥΚΗΤΑ *V.DAHLIAE*

LETS buffer DNA extraction

1. Χρήση λυοφυλιωμένου μυκηλίου 100mg.
2. Κονιορτοποίηση λυοφυλιωμένων υφών σε λεπτή σκόνη, με τη χρήση δύο μυτερών αποστειρωμένων οδοντογλυφίδων.

3. Προσθήκη 700 μ l LETS buffer (20 mM EDTA-pH 8.0, 0.5% SDS, 10 mM Tris-HCl pH-8.0, 0.1 M LiCl). Ανακίνηση των σωληνίσκων για την πλήρη διαβροχή των δειγμάτων. Επώαση για 5 λεπτά σε θερμοκρασία δωματίου.
4. Προσθήκη 700 μ l phenol:CHCl₃:isoamyl alcohol (25:24:1). Καλή ανακίνηση αναστρέφοντας 10-15 φορές τους σωληνίσκους με τα δείγματα. Επώαση για 5 λεπτά σε θερμοκρασία δωματίου.
5. Φυγοκέντρωση για 10 λεπτά στους 4° C.
6. Μεταφορά υπερκείμενης φάσης σε νέο σωληνίσκο και προσθήκη ίσου όγκου phenol:CHCl₃:isoamyl alcohol (25:24:1). Φυγοκέντρωση για 10 λεπτά στους 4° C.
7. Μεταφορά υπερκείμενης φάσης σε νέο σωληνίσκο και προσθήκη 1 ml 95% EtOH. Ανακίνηση και φυγοκέντρωση για 10 λεπτά, στους 4° C.
8. Απομάκρυνση υπερκείμενης φάσης και προσθήκη 70% EtOH για πλύση του ιζήματος, που σχηματίστηκε από το βήμα 7.
9. Φυγοκέντρωση για 2 λεπτά σε θερμοκρασία δωματίου (RT).
10. Απόρριψη υπερκείμενης φάσης (προσεχτικά για να μη χαθεί το ίζημα) και στέγνωμα του ιζήματος για 5 λεπτά σε RT.
11. Επαναδιαλυτοποίηση του ιζήματος με 40 μ l, 10 mM Tris buffer (pH 8.0) και προσθήκη 2 μ l RNase (10 mg/ml stock).
12. Θερμική αδρανοποίηση της DNase και καταστροφή του RNA για 30 λεπτά στους 50°C.

3.4 ΕΦΑΡΜΟΓΗ ΑΛΥΣΙΔΩΤΗΣ ΑΝΤΙΔΡΑΣΗΣ ΠΟΛΥΜΕΡΑΣΗΣ (POLYMERASE CHAIN REACTION-PCR)

Για την ενίσχυση του γονιδίου *VdLaeA* και την πραγματοποίηση της υπερέκφρασής του, έγινε αντίδραση PCR σε 50-100ng ολικό γενωματικό DNA του μύκητα *V. dahliae* (απομόνωση από ραπανάκι). Το ένζυμο που χρησιμοποιήθηκε στην αλυσιδωτή αντίδραση πολυμεράσης ήταν η Taq πολυμεράση της εταιρείας Qiagen και η συγκέντρωση των αντιδραστηρίων ήταν η συνιστώμενη (1 μ l DNA, 0.2 μ l Taq πολυμεράση, 1.5 μ l MgCl₂, 5 μ l (1X συγκέντρωση) ρυθμιστικού διαλύματος, 200 μ M νουκλεοτιδίων). Η συγκέντρωση των εκκινητών ήταν 10 mM (προσθήκη 2 μ l, για κάθε εκκινητή). Ο τελικός όγκος της αντίδρασης ήταν 50 μ l. Οι εκκινητές χρησιμοποιήθηκαν σε αρχική συγκέντρωση 10 μ M, ενώ οι συνθήκες της αντίδρασης καθορίστηκαν από την θερμοκρασία τήξεως του κάθε ζεύγους εκκινητών (με τη θερμοκρασία υβριδισμού στους 55°C) και το μήκος του τμήματος που έπρεπε να ενισχύσουν (επέκταση στους 72°C, 1 min για κάθε 1000 βάσεις). Μία τυπική αντίδραση περιελάμβανε αρχική αποδιάταξη στους 94°C για 2 min, 40 κύκλους με

αποδιάταξη 30 sec στους 94°C, υβριδισμό 30 sec στους 55°C (ή ανάλογη θερμοκρασία υβριδισμού των εκάστοτε εκκινητών) και επέκταση 2 min (ή ανάλογα με το μήκος του τμήματος) στους 72°C κι ένα τελικό βήμα επέκτασης στους 72°C για 10 min. Η αλυσιδωτή αντίδραση πολυμεράσης εφαρμόστηκε επιπλέον για τον έλεγχο ύπαρξης του τμήματος της υπερέκφρασης του υπό μελέτη γονιδίου στο φορέα SK1226. Μετά το τέλος της PCR έγινε ηλεκτροφόρηση, με στόχο την επιβεβαίωση της επιτυχίας της αντίδρασης.

3.5 ΚΑΘΑΡΙΣΜΟΣ ΠΡΟΪΟΝΤΟΣ PCR-MIN ELUTE PCR PURIFICATION KIT (QIAGEN)

1. Προσθήκη 5 όγκων Buffer PB σε έναν όγκο PCR προϊόντος και ανακίνηση.
2. Έλεγχος χρώματος μετά τη μίξη ώστε να είναι κίτρινο (παρεμφερές με το χρώμα PB, χωρίς το PCR προϊόν).
3. Τοποθέτηση μιας στήλης Min Elute σε ένα παρεχόμενο συλλεκτικό σωληνίσκο σε κατάλληλο στήριγμα.
4. Για τη δέσμευση του DNA, τοποθέτηση του δείγματος στη στήλη Min Elute και φυγοκέντρηση για 1 λεπτό.
5. Απομάκρυνση του διερχόμενου υγρού και επανατοποθέτηση της στήλης στο συλλεκτικό σωληνίσκο.
6. Προσθήκη 750μl Buffer PE στη στήλη Min Elute και φυγοκέντρηση για 1 λεπτό.
7. Απόρριψη του διηθήματος και τοποθέτηση της στήλης πίσω στο συλλεκτικό σωληνίσκο. Φυγοκέντρηση της στήλης για 1 λεπτό στις 13.000 rpm.
8. Τοποθέτηση της στήλης Min Elute, σε ένα καθαρό eppendorf σωληνίσκο μικροφυγοκέντρου των 1.5 ml.
9. Για την έκλυση του DNA ακολούθησε προσθήκη 10-50 μl Buffer EB (10 mM Tris-HCl, pH 8.5), ή νερού (pH 7.0-8.5) στο κέντρο της μεμβράνης, παραμονή για 1 λεπτό και μετά φυγοκέντρηση για 1 λεπτό.

3.5.1 ΠΕΨΗ ΝΟΥΚΛΕΪΚΩΝ ΟΞΕΩΝ ΜΕ ΠΕΡΙΟΡΙΣΤΙΚΑ ENZYMA

Η πέψη (digestion) νουκλεϊκών οξέων με περιοριστικά ένζυμα (restriction enzymes) πραγματοποιήθηκε για να ελεγχθεί η παρουσία του επιθυμητού τμήματος DNA στον εκάστοτε φορέα κατά τη διάρκεια των κλωνοποιήσεων, καθώς και το χειρισμό του τμήματος αυτού προκειμένου να χρησιμοποιηθεί για την κατασκευή του αλληλόμορφου υπερέκφρασης του υπό μελέτη γονιδίου.

Μία τυπική αντίδραση πέψης σε τελικό όγκο 10 μl περιλάμβανε το ρυθμιστικό διάλυμα συγκέντρωσης 1X, 0.5 μl του περιοριστικού ενζύμου και 1 μg πλασμιδιακού DNA. Η επώαση της αντίδρασης πραγματοποιήθηκε για 4-16 ώρες, χρονικό διάστημα που ποικίλει ανάλογα με τις ιδιότητες του εκάστοτε ενζύμου, σε θερμοκρασία που καθοριζόταν από τα περιοριστικά ένζυμα που χρησιμοποιήθηκαν, συνήθως στους 37°C.

3.5.2 ΗΛΕΚΤΡΟΦΟΡΗΣΗ ΤΜΗΜΑΤΩΝ DNA

Στη διαδικασία της ηλεκτροφόρησης, τα δείγματα DNA αναμειγνύονταν με διάλυμα φόρτωσης (loading buffer) (0.1% bromophenyl blue, 50% γλυκερίνη, 10 mM Tris-HCl pH 8) πυκνότητας 10X, τέτοιου όγκου, ώστε η περιεκτικότητα του διαλύματος φόρτωσης στον τελικό όγκο δείγματος που ηλεκτροφορήθηκε να είναι 1X. Ως σταθερές χρησιμοποιήθηκαν οι κλίμακες μοριακών βαρών 1 Kb DNA ladder και Gene Ruler 1 Kb DNA ladder. Το πηγμα ηλεκτροφόρησης περιείχε 0,8% αγαρόζη σε 1X ρυθμιστικό διάλυμα TAE (Sambrook *et al.*, 1989). Η ηλεκτροφόρηση του πηγματος πραγματοποιήθηκε στο ίδιο ρυθμιστικό διάλυμα με εφαρμογή τάσης 80-110 Volt στα άκρα της συσκευής ηλεκτροφόρησης. Μετά την ηλεκτροφόρηση ακολούθησε χειρισμός των πηγμάτων αγαρόζης με υδατικό διάλυμα βρωμιούχου αιθυδίου (συγκέντρωσης περίπου 1 µg/ml) για 20-30 min και παρατήρηση σε τράπεζα UV ακτινοβολίας (365nm).

3.5.3 ΚΑΘΑΡΙΣΜΟΣ ΚΑΙ ΑΠΟΜΟΝΩΣΗ DNA ΑΠΟ ΠΗΓΜΑ ΑΓΑΡΟΖΗΣ-QIAQUICK GEL EXTRACTION KIT PROTOCOL USING A MICROCENTRIFUGE-QIAGEN

1. Αποκοπή του τμήματος DNA από το πηγμα αγαρόζης με ένα καθαρό, κοφτερό νυστέρι ή ξυράφι.
2. Ζύγιση του τμήματος πηγματος σε ένα σωληνάκι eppendorf.
3. Προσθήκη 3 όγκων Buffer QG σε ένα όγκο του πηγματος, (θεωρήθηκε ότι 100 mg πηγματος αντιστοιχούσαν σε 100 µl διαλύματος).
4. Επώαση σε υδατόλουτρο 50°C για 10 λεπτά (ή μέχρι την πλήρη διάλυση του τμήματος πηγματος). Για τη διευκόλυνση της διάλυσης του πηγματος, πραγματοποιήθηκε ανάμιξη με στροβιλισμό, κάθε 2-3 λεπτά κατά τη διάρκεια της επώασης.
5. Μετά την πλήρη διάλυση του τμήματος πηγματος, έγινε έλεγχος του χρώματος του μίγματος και αυτό έπρεπε να παραμένει κίτρινο, παρόμοιο με το Buffer QG χωρίς το τμήμα του πηγματος.
6. Προσθήκη ίσου όγκου ισοπροπανόλης με τον όγκο του δείγματος στο δείγμα και ανάμιξη.
7. Τοποθέτηση μιας QIAquick spin στήλης σε ένα παρεχόμενο συλλεκτικό σωληνάκι των 2 ml.
8. Για τη δέσμευση του DNA τοποθέτηση του δείγματος στην QIAquick στήλη και φυγοκέντρηση για 1 λεπτό.
9. Απόρριψη του διηθήματος και τοποθέτηση της QIAquick στήλης πίσω στο ίδιο συλλεκτικό σωληνάκι.
10. Προαιρετικά προσθήκη 0,5 ml Buffer QG στην QIAquick στήλη και φυγοκέντρηση για 1 λεπτό.

11. Προσθήκη 0,75 ml Buffer PE στην QIAquick στήλη για ξέπλυμα και φυγοκέντρωση για 1 λεπτό κατόπιν παραμονής του Buffer στη στήλη για 5 λεπτά.
12. Απόρριψη του διηθήματος και φυγοκέντρωση της QIAquick στήλης, για 1 ακόμη λεπτό, στις 13.000 rpm.
13. Τοποθέτηση της QIAquick στήλης σε ένα καθαρό σωληνάκι eppendorf των 1.5 ml.
14. Για την έκλυση του DNA προσθήκη 50 µl Buffer EB (10 mM Tris-HCl, pH 8.5) ή νερού (pH 7.0-8.5) στο κέντρο του φίλτρου της QIAquick στήλης και φυγοκέντρωση για 1 λεπτό στις 13.000 rpm. Εναλλακτικά, για αυξημένη συγκέντρωση DNA, προσθήκη 50 µl Buffer EB στο κέντρο του φίλτρου της QIAquick στήλης, παραμονή του Buffer EB για 1 λεπτό στο φίλτρο και φυγοκέντρωση για 1 λεπτό.

3.5.4 ΑΝΤΙΔΡΑΣΗ ΣΥΝΕΝΩΣΗΣ

Μετά τον καθαρισμό των αντιδράσεων με τη χρήση του Min Elute PCR purification kit (Qiagen), ακολούθησε αντίδραση συνένωσης (ligation) των τμημάτων DNA με τον πλασμιδιακό φορέα σε αναλογία εισδοχή/φορέα 3/1, περίπου, χρησιμοποιώντας το ένζυμο της λιγάσης (New England Biolabs). Η αντίδραση πραγματοποιήθηκε σε όγκο 10 µl και η επώαση έγινε στους 16°C για 12-16 ώρες. Στη συνέχεια, πραγματοποιήθηκε εισαγωγή του ανασυνδιασμένου πλασμιδίου, από την αντίδραση συνένωσης, σε επιδεκτικά κύτταρα (competent cells) DH5a του βακτηρίου *Escherichia coli*.

3.5.5 ΜΕΤΑΣΧΗΜΑΤΙΣΜΟΣ ΣΕ ΕΠΙΔΕΚΤΙΚΑ ΚΥΤΤΑΡΑ DH5a ΤΟΥ ΒΑΚΤΗΡΙΟΥ *E. COLI*

Πραγματοποιήθηκε εισαγωγή του ανασυνδιασμένου πλασμιδίου, από την αντίδραση συνένωσης σε επιδεκτικά κύτταρα (competent cells) DH5a του βακτηρίου *E. coli*. Για το σκοπό αυτό 5 µl της αντίδρασης συνένωσης (ligation) αναμείχθηκαν με 50-100 µl επιδεκτικών κυττάρων και μετά από παραμονή 30 min στον πάγο πραγματοποιήθηκε επώαση (θερμική αντίδραση), σε υδατόλουτρο, στους 42°C, για 50 sec και ακολούθησε τοποθέτηση των δειγμάτων ξανά στον πάγο για 5 λεπτά.

Μετά από καλλιέργεια των κυττάρων σε θρεπτικό υλικό LB για 1 ώρα με ανακίνηση τα κύτταρα επώαστηκαν για 24 ώρες σε στερεό θρεπτικό υλικό παρουσία του ανάλογου αντιβιοτικού, του οποίου το γονίδιο ανθεκτικότητας φέρει ο εκάστοτε φορέας (SK1226: γονίδιο ανθεκτικότητας στην καναμυκίνη, SK879: γονίδιο ανθεκτικότητας στην αμπικιλίνη) Εικόνα 21. Στη συνέχεια ελέγχθηκαν οι αποικίες με colony PCR ή με απομόνωση και πέψη του πλασμιδιακού DNA με περιοριστικά ένζυμα για τον έλεγχο της επιτυχούς ενσωμάτωσης, στο πλασμίδιο του τμήματος DNA επιθυμητού μεγέθους.



Εικόνα 21: Τρυβλία με θρεπτικό υλικό LB μαζί με το εκάστοτε αντιβιοτικό για την ανάπτυξη των επιθυμητών αποικιών.

3.5.6 ΑΠΟΜΟΝΩΣΗ ΚΑΙ ΚΑΘΑΡΙΣΜΟΣ ΠΛΑΣΜΙΔΙΑΚΩΝ ΦΟΡΕΩΝ ΑΠΟ *E.COLI*

Μετά από κάθε προσπάθεια κλωνοποίησης της κασέτας υπερέκφρασης του γονιδίου *VdLaeA*, πραγματοποιήθηκε απομόνωση μικρής κλίμακος πλασμιδιακού DNA από το βακτήριο *E.coli*. Με τον τρόπο αυτό ελέγχθηκε η παρουσία κλώνου με το επιθυμητό τμήμα DNA, και ταυτόχρονα παραλήφθηκε το πλασμίδιο με το τμήμα αυτό για περαιτέρω χειρισμούς. Η διαδικασία της απομόνωσης έγινε είτε με βάση το πρωτόκολλο (Α) Plasmid DNA Purification (Qiagen), είτε (Β) με το Mini preps Solutions.

(Α) Plasmid Purification (Qiagen):

1. Καλλιέργεια βακτηριακής αποικίας σε 4 ml θρεπτικού υποστρώματος LB με κατάλληλο αντιβιοτικό (αμπικιλίνη ή καναμυκίνη), στους 37°C, για 12-16 ώρες.
2. Συλλογή βακτηριακών κυττάρων από 3 ml βακτηριακής καλλιέργειας, κατόπιν φυγοκέντρησης, στις 13.000 rpm.
3. Αφαίρεση υπερκείμενης φάσης, προσθήκη 250 µl Buffer P1 και μεταφορά σε ένα σωληνάκι eppendorf.
4. Προσθήκη 250 µl Buffer P2 και επιμελής μίξη αναστρέφοντας τα σωληνάκια 4-6 φορές.
5. Προσθήκη 350 µl Buffer N3, άμεση και επιμελής μίξη αναστρέφοντας τα σωληνάκια 4-6 φορές.
6. Φυγοκέντρηση για 10 λεπτά στις 13.000 rpm.

7. Τοποθέτηση της υπερκείμενης φάσης του βήματος 6 στην QIAprep Spin στήλη με πιπέτα.
8. Φυγοκέντρηση για 60 δευτερόλεπτα. Απόρριψη διηθήματος.
9. Ξέπλυμα της QIAprep Spin στήλης με προσθήκη 0,75 ml Buffer PE και φυγοκέντρηση για 60 δευτερόλεπτα.
10. Απόρριψη διηθήματος και φυγοκέντρηση για 1 ακόμη λεπτό για απομάκρυνση των υπολειμμάτων του Buffer PE.
11. Τοποθέτηση της QIAprep Spin στήλης σε ένα καθαρό σωληνάκι eppendorf των 1,5 ml. Για την έκλυση του DNA, προσθήκη 50 μl Buffer EB στο κέντρο της QIAquick Spin στήλης. Παραμονή του Buffer στη στήλη για 1 λεπτό και φυγοκέντρηση για 1 λεπτό.

(B) Mini Preps Solutions

1. Μεταφορά 1,5 ml καλλιέργειας σε 1 σωληνάκι eppendorf και φυγοκέντρηση για 1 λεπτό, στις 13.000 rpm.
2. Προσθήκη 100 μl Solution I (50 mM glucose, 25 mM Tris-HCl, pH 8, 10 mM EDTA, pH 8, H₂O) ανακίνηση για 2 λεπτά και επώαση δειγμάτων για 5 λεπτά σε θερμοκρασία δωματίου.
3. Προσθήκη 200 μl Solution II (0.2 N NaOH, 1% SDS, H₂O) καλή ανάμιξη και τοποθέτηση των δειγμάτων στον πάγο για 5 λεπτά.
4. Προσθήκη 150 μl Solution III (5 M KAc, Glacial Acetic Acid, H₂O) καλή ανάμιξη και τοποθέτηση των δειγμάτων στον πάγο για 5 λεπτά.
5. Φυγοκέντρηση για 5 λεπτά, μεταφορά 400 μl από το υπερκείμενο σε νέο σωληνάκι eppendorf.
6. Προσθήκη 400 μl phenol:chloroform, ανακίνηση για 2 λεπτά, φυγοκέντρηση για 3 λεπτά και μεταφορά του υπερκειμένου σε νέο σωληνάκι eppendorf.
7. Προσθήκη 700 μl 100% EtOH, καλή ανάμιξη, παραμονή των δειγμάτων για 2 λεπτά σε θερμοκρασία δωματίου, φυγοκέντρηση για 5 λεπτά και απομάκρυνση του υπερκειμένου.
8. Προσθήκη 1 ml 70% EtOH, φυγοκέντρηση για 2 λεπτά και απομάκρυνση του υπερκειμένου.
9. Επιπλέον φυγοκέντρηση για 1 λεπτό.
10. Στέγνωμα του pellet για 15 λεπτά σε θάλαμο νηματικής ροής.

- Μετά το τέλος του πρωτοκόλλου των Mini preps ακολούθησε ηλεκτροφόρηση για τον έλεγχο των προϊόντων και την ύπαρξη πιθανού κλώνου. Πραγματοποιήθηκαν μονές και διπλές πέψεις στους 37°C για 16 ώρες ώστε να διαπιστωθεί η πιθανή τοποθέτηση του γονιδίου *VdLaeA* στον φορέα SK1226 και έγινε ηλεκτροφόρηση των πέψεων. Τοποθετήθηκαν σε υγρή καλλιέργεια LB με αντιβιοτικό οι αποικίες που ελέγχθηκαν στο gel και ακολούθησε το πρωτόκολλο Plasmid DNA purification. Τα δείγματα αυτά στάλθηκαν για αλληλούχιση του κλωνοποιημένου τμήματος και σύγκριση του γονιδίου αυτού με αλληλουχίες ομόλογων γονιδίων στο διαδίκτυο για να επιβεβαιωθεί η κλωνοποίηση του *VdLaeA*. Σκοπός ήταν η κλωνοποίηση της κασέτας υπερέκφρασης στο δυαδικό φορέα SK879 Εικόνα 22 με τη χρήση των περιοριστικών ενζύμων *EcoRI* και *HindIII*, εν συνεχεία *HindIII* διότι το γονίδιο κοβόταν σε δύο μέρη. Για την τελική επιλογή αυτών των ενζύμων έγιναν προσπάθειες και με το περιοριστικό ένζυμο το *SpHI* αλλά ο φορέας SK879 κοβόταν σε τρία κομμάτια πράγμα το οποίο δεν ήταν επιθυμητό. Ο SK879 είναι δυαδικός φορέας που προήλθε από τον *Pcambia1300* κι έχει ανθεκτικότητα στην καναμικίνη. Απώτερος στόχος ήταν η εισαγωγή του τελικού φορέα στο βακτήριο *A.tumefaciens* και τελικός μετασχηματισμός του μύκητα *V. dahliae*.



1. Έγινε χρήση των μετασχηματισμένων *E. coli* κυττάρων.
2. Χρήση 4 σειρών τρυβλίων (π.χ 5 τρυβλία transformation: $5 \times 4 = 20$ τρυβλία). Σε καθένα τοποθετήθηκαν τρία διηθητικά χαρτιά.

3. Μεμβράνη υβριδισμού με διάμετρο ίση του τρυβλίου τοποθετήθηκε πάνω στο τρυβλίο με τα μετασχηματισμένα κύτταρα. Σημειώθηκε ο προσανατολισμός και ο αριθμός του τρυβλίου για κάθε μεμβράνη. Έγινε αφαίρεση της μεμβράνης αυτής και τοποθέτησή της σε άλλο τρυβλίο με LB και αντιβιοτικό ώστε να μείνει το αποτύπομα των αποικιών σ' αυτό. Κατόπιν τα τρυβλία αυτά τοποθετήθηκαν στους 37°C για μία νύχτα, ώστε να αναπτυχθούν πάλι οι αποικίες αυτές.
4. Διαβροχή με 0,5 N NaOH της μεμβράνης υβριδισμού στα διηθητικά χαρτιά πολύ προσεκτικά. Οι μεμβράνες τοποθετήθηκαν έχοντας τις αποικίες προς την πάνω πλευρά για χρονικό διάστημα 5 min.
5. Διαβροχή των μεμβρανών υβριδισμού με 1M Tris, pH=7.4, για χρονικό διάστημα 5 min.
6. Διαβροχή των μεμβρανών υβριδισμού με 2x SSC για χρονικό διάστημα 5 min.
7. Διαβροχή των μεμβρανών με 95% EtOH, αφέθηκαν για 5 λεπτά.
8. Τοποθέτηση μεμβρανών για 10 min ώστε να στεγνώσουν.
9. Τοποθέτηση των μεμβρανών σε επωαστικό θάλαμο στους 65°C για 30 min με 125 ml 20xSSC, 50 ml 20% SDS και H₂O μέχρι τα 500 ml.
10. Τοποθέτηση των μεμβρανών στους σωλήνες υβριδισμού με 20 ml hybridization buffer, μεταφορά τους σε ειδικό επωαστικό θάλαμο και περιστροφή τους για 40 min στους 42°C. Προσοχή μετά την τοποθέτηση του hybridization buffer, η περιστροφή τους πραγματοποιείται σιγά ώστε να διαβραχούν οι μεμβράνες καλά.
11. Προετοιμασία σωληναρίου eppendorf που περιείχε 4 μl insert και 9 μl hybridization buffer. Το νερό όταν ήταν στο σημείο βρασμού τοποθετήθηκε μέσα το σωληνάριο eppendorf για 5min, και στη συνέχεια μεταφέρθηκε στον πάγο. Μεταφορά του μείγματος (probe) αυτού από το eppendorf σωληναρίου στους σωλήνες υβριδισμού (κύλινδροι).
12. Τοποθέτηση των κυλίνδρων σε επωαστικό για 16 ώρες, στους 42°C να περιστραφούν σε χαμηλή ταχύτητα.

Πλήσεις και εμφάνιση του φιλμ των αποικιών

1. Άνοιγμα του υδατόλουτρου και του επωαστικού θαλάμου στους 65°C.
2. Κατασκευή των Wash Solution I και Wash Solution II σε όγκο 1000 ml, όγκος που απαιτείται για 10 μεμβράνες και το Buffer III.
3. Θέρμανση του Wash Solution II στο υδατόλουτρο στους 68° C.

4. Έκπλυση των μεμβρανών σε πλαστικό δοχείο 2 φορές για 5 min σε θερμοκρασία δωματίου με το Wash Solution I.
5. Έκπλυση μεμβρανών 2 φορές για 15 min στους 68° C.
6. Παραμονή μεμβράνης 1 min στο Buffer 1 (Maleic Acid, pH:7.5).
7. Επώαση για 30 min με 100 ml Buffer 2, 500 ml Maleic Acid και 5% Regilait 1%).
8. Διάλυση του antidig conjugate, τοποθέτηση της μεμβράνης σε σακούλα μαζί το αντίσωμα.
9. Επώαση μεμβράνης για 30 min σε 20 ml antibody conjugate solution.
10. Απομάκρυνση antibody με 100 ml Buffer 1 (Maleic Acid, pH=7.5), 2 φορές επί 15 min αφού τοποθετήθηκαν στον επωαστικό θάλαμο όπου και περιστράφηκαν.
11. Εξισορρόπηση σε 20 ml σε Buffer 3 για 2 λεπτά.
12. Τοποθέτηση μεμβράνης side up στον φάκελο εμφάνισης.
13. Τοποθέτηση film πάνω από τη μεμβράνη.
14. Χαραγή της μιάς άκρης του φιλμ ώστε να είναι γνωστός ο προσανατολισμός .
15. Έκθεση αυτών για 30 min, 1 h, 3 h.
16. Εμφάνιση των φιλμ σε φωτογραφικά υγρά.
17. Τοποθέτηση των φιλμ για 1-2min στο developer, έπειτα 2-3 min τοποθέτηση των φιλμ στο fixing solution για τη στερέωση του αποτυπώματος στο φιλμ. Τέλος ξέπλυμα με νερό της βρύσης.

3.6 ΦΑΙΝΟΤΥΠΙΚΟΣ ΧΑΡΑΚΤΗΡΙΣΜΟΣ ΤΩΝ ΜΕΤΑΛΛΑΓΜΕΝΩΝ *ΔVdLaeA* ΣΤΕΛΕΧΩΝ ΚΑΙ ΤΟΥ *V. DAHLIAE*

Στελέχη *ΔVdLaeA* με απενεργοποιημένο το γονίδιο αξιολογήθηκαν ως προς διάφορα μορφολογικά χαρακτηριστικά σε σχέση με το άγριο στελέχος του μύκητα *V. dahliae* από το οποίο προέκυψαν τα μεταλλαγμένα. Για την αξιολόγηση της μυκηλιακής αύξησης αγρίων και μεταλλαγμένων στελεχών πραγματοποιήθηκε το πείραμα ως εξής:

- Με τη χρήση αποστειρωμένης οδοντογλυφίδας τοποθετήθηκε στο κέντρο του τρυβλίου μικρή ποσότητα του *V. dahliae* και των δύο μεταλλαγμένων ΤΔΑΓΙ.Α.3 και ΤΔΑΓΙ.Α18 αντίστοιχα σε κάθε τρυβλίο.
- Χρησιμοποιήθηκαν διαφορετικά θρεπτικά υλικά για την ανάπτυξη και τη παρατήρηση της μορφολογικής ανάπτυξης των μυκήτων αυτών όπως PDA, SSN-

agar, Czapek, Rose Bengal σε ποσότητα 25 ml θρεπτικού υλικού ως υπόστρωμα για κάθε τρυβλίο.

- ο Η διάμετρος των αποικιών μετρήθηκε κάθε 7 ημέρες για συνολικό χρονικό διάστημα 45 ημερών.

3.7 ΠΕΙΡΑΜΑΤΑ ΠΑΘΟΓΕΝΕΙΑΣ ΣΕ ΕΠΙΛΕΓΜΕΝΟΥΣ ΞΕΝΙΣΤΕΣ

Για τη διερεύνηση του ρόλου του γονιδίου *VdLaeA* στην παθογένεια του μύκητα *V.dahliae*, τα μεταλλαγμένα στελέχη εξετάστηκαν ως προς την ικανότητά τους να προκαλούν ασθένεια σε φυτά *A. thaliana*, σε φυτά μελιτζάνας *Solanum melongena* cv. *Black Beauty* και σε φυτά τομάτας *Solanum lycopersicum* cv. *Aisla Craig*.

- Στα φυτά *Arabidopsis thaliana* εξετάστηκε η παθογένεια του άγριου στελέχους *V.dahliae* και των μεταλλαγμένων στελεχών ΤΔΑΓΙ.Α.3 και ΤΔΑΓΙ.Α18, (20 φυτά ανά επέμβαση). Μολύνθηκαν στο στάδιο του τρίτου φύλλου, (καθώς τα φύλλα αναπτύσσονται σε μορφή ροζέτας), με αιώρημα κονιδίων 10^7 κον/ml.
- Σε φυτά μελιτζάνας *Solanum melongena* cv. *Black Beauty* εξετάστηκε η παθογένεια του άγριου στελέχους *V.dahliae* και των μεταλλαγμένων στελεχών ΤΔΑΓΙ.Α.3 και ΤΔΑΓΙ.Α18, (15 φυτά ανά επέμβαση). Τα φυτά μελιτζάνας μολύνθηκαν στο στάδιο του 4^{ου} πραγματικού φύλλου με 10ml, αιωρήματος κονιδίων 10^7 κον/ml.
- Τα φυτά της τομάτας *Solanum lycopersicum* μολύνθηκαν στο στάδιο του 4^{ου} πραγματικού φύλλου με το άγριο *V.dahliae* και τα μεταλλαγμένα ΤΔΑΓΙ.Α.3 και ΤΔΑΓΙ.Α18, (24 φυτά ανά επέμβαση), με αιώρημα κονιδίων 10^7 κον/ml .

3.7.1 ΠΡΟΕΤΟΙΜΑΣΙΑ ΦΥΤΙΚΟΥ ΥΛΙΚΟΥ

Arabidopsis thaliana

Προετοιμασία σπορείου

Σπόροι αραβίδωσης *Arabidopsis thaliana*, γονότυπου Columbia-0 (Col-0) τοποθετήθηκαν σε πλαστικό γλαστράκι εμβαδού 6x6 που περιείχε υγρή τύρφη, σκεπάστηκαν με διαφανές πλαστικό (σπορείο) και τοποθετήθηκαν σε θάλαμο σταθερής θερμοκρασίας 4°C για 3 μέρες προκειμένου να επιτευχθεί διακοπή του ληθάργου.

Μεταφορά στα θερμοκήπια -Μεταφύτευση

Μετά την πάροδο 3 ημερών, το σπορείο οδηγήθηκε στο θερμοκήπιο σε ειδικό θάλαμο ελεγχόμενης φωτοπεριόδου και θερμοκρασίας (16 ώρες φώς και 8 ώρες σκοτάδι, στους 24°C). Το διαφανές πλαστικό αφαιρέθηκε όταν το μεγαλύτερο ποσοστό των

βλαστημένων σπόρων ακούμπησαν το πλαστικό Εικόνα 23, διαδικασία που διαρκεί 5-6 ημέρες.



Εικόνα 23: Σπόροι Col-0, *Arabidopsis thaliana* σε πλαστικό γλαστράκι εμβαδού 6x6.

Ακολούθησε η ανάμειξη του εδαφικού υποστρώματος το οποίο αποτελείτο από μείγμα τύρφης:άμμου 4:1 και μικρής ποσότητας 5ml/θέση εντομοκτόνου (Diazinon 1ml/L ή Actara 0.2gr/L). Η μεταφύτευση πραγματοποιήθηκε μία ημέρα μετά την προετοιμασία του εδαφικού υποστρώματος. Έγινε μεταφύτευση των φυταρίων σε πλαστικές παλέτες των 20 θέσεων Εικόνα 24, ένα φυτάριο/θέση. Οι παλέτες τοποθετήθηκαν σε δίσκο για τη διευκόλυνση του ποτίσματος.



Εικόνα 24: Μεταφύτευση των φυταρίων *Arabidopsis thaliana* σε πλαστικές παλέτες των 20 θέσεων ένα φυτάριο/θέση.

Αναφέρεται ότι στα φυτά πραγματοποιήθηκαν ψεκασμοί φυλλώματος εναλλάξ με τα εντομοκτόνα Diazinon 1ml/L, Actara 0.2gr/L κάθε 15 μέρες και ποτίζονταν ανάλογα με το πόσο στεγνό ήταν το υπόστρωμα κάθε 4-5 ημέρες περίπου.

***Solanum melongena* - Μελιτζάνα και *Solanum lycopersicum* - Τομάτα**

Προβλάστηση σπόρων

Για την επίτευξη ομοιόμορφης βλαστικότητας των σπόρων μελιτζάνας της ποικιλίας *Black Beauty* και της τομάτας ακολουθήθηκε η εξής διαδικασία:

- ❖ Σε καλά πλυμένο δίσκο τοποθετήθηκε αποστειρωμένο διηθητικό χαρτί. Ακολούθησε εμποτίση του διηθητικού χαρτιού με αποστειρωμένο νερό και τοποθέτηση ικανού

αριθμού σπόρων μελιτζάνας (απολυμασμένων με το μυκητοκτόνο THIRAM, για να αποφευχθεί η προφυτρωτική μόλυνση από άλλα παθογόνα) σε κατάλληλες αποστάσεις ώστε να καλύπτεται η επιφάνεια του διηθητικού χαρτιού.

- ❖ Ο δίσκος καλύφθηκε με μεμβράνη, για την αποφυγή της εξάτμισης του νερού. Τοποθέτηση του δίσκου μέσα σε μία μαύρη πλαστική σακούλα ώστε να βρίσκονται οι σπόροι σε συνθήκες σκότους και τοποθέτησή τους σε θερμοκρασία δωματίου 25°C για 7 ημέρες μέχρι να βλαστήσει το μεγαλύτερο ποσοστό των σπόρων.
- ❖ Αντίστοιχη διαδικασία ακολουθήθηκε για την προβλάστηση των σπόρων της τομάτας.

Μεταφύτευση

- ❖ Πραγματοποιήθηκε προετοιμασία πλαστικών γλαστρών εμβαδού 9x9, τοποθέτηση τύρφης μέσα σ'αυτά και ακολούθησε καλό πότισμα. Τα γλαστράκια τοποθετήθηκαν σε πλαστικούς δίσκους.
- ❖ Μεταφύτευση των βλαστημένων σπόρων πάνω στην τύρφη, (ένας βλαστημένος σπόρος ανά γλαστράκι). Έγινε επίστρωση του βλαστημένου σπόρου με μικρή ποσότητα τύρφης και μικρή πίεση για την κάλυψή του.

Εντός του θερμοκηπίου που αναπτύσσονταν τα φυτά υπήρχε σταθερή θερμοκρασία 25°C, ενώ οι συνθήκες φωτός/σκότους ήταν για 16/8 ώρες αντίστοιχα. Τα φυτά ποτίζονταν ανάλογα με την εικόνα του υποστρώματος Εικόνα 25, κάθε 2-3 ημέρες περίπου.



Εικόνα 25: Ανάπτυξη φυτών μελιτζάνας και τομάτας σε γλαστράκια στο θερμοκήπιο

3.7.2 ΚΑΤΑΓΡΑΦΗ ΣΥΜΠΤΩΜΑΤΩΝ

Ο προσδιορισμός του βαθμού προσβολής των φυτών από το μύκητα έγινε με τη μέτρηση του ποσοστού των ασθενών φύλλων, προς το συνολικό αριθμό φύλλων για κάθε φυτό. Οι μετρήσεις γίνονταν ανά τακτά χρονικά διαστήματα (2-8 ημερών) και σταματούσαν όταν ο μάρτυρας εμφάνιζε ποσοστό ασθενών φύλλων 70-100%.

Προετοιμασία Μολύσματος

Για τα πειράματα παθογένειας σε φυτά *S. melongena*, *S. lycopersicum* και *A. thaliana* πραγματοποιήθηκε μόλυνση με 10 ml/φυτό αιωρήματος κονιδίων του άγριου στελέχους *V.dahliae* και των μεταλλαγμένων στελεχών ΤΔΑΓΙΑ.3, ΤΔΑΓΙΑ18 συγκέντρωσης 10^7 κον/ml και ακολούθησε η εξής διαδικασία προετοιμασίας:

- ✓ Ενεργοποίηση των στελεχών σε θρεπτικό υλικό PDA.
- ✓ Το πυκνό αιώρημα κονιδίων που είχε αναπτυχθεί σε θρεπτικό υλικό SSN διηθήθηκε σε αποστειρωμένη φιάλη των 250 ml.
- ✓ Ακολούθησε ζωηρή ανάδευση του διηθήματος (vortex) και παραλαβή μικρής ποσότητας, 100 μl διηθήματος και 900 μl διπλά αποσταγμένου και αποστειρωμένου νερού σε erpendorf σωληνάκι του 1,5 ml (αραίωση 1/10).
- ✓ Έγινε ζωηρή ανάδευση του erpendorf σωληνίσκου. Ακολούθησε παραλαβή και τοποθέτηση από 10 μl σε κάθε μία από τις 2 πλευρές της ειδικής αντικειμενοφόρου πλάκας με την καλυπτρίδα του αιματοκυτταρομέτρου.
- ✓ Στη συνέχεια το αιματοκυτταρόμετρο οδηγήθηκε σε οπτικό μικροσκόπιο σε μεγέθυνση 10X για την εύρεση του grip (πλέγμα που αποτελείται στο κέντρο του από 25 τετράγωνα κάθε ένα από τα οποία αποτελείται από 16 μικρότερα τετραγωνάκια) και παρατήρηση των κονιδίων που υπάρχουν στα κεντρικά 25 τετράγωνα σε μεγέθυνση 40X, Εικόνα 26.



Εικόνα 26: Καταμέτρηση κονιδίων στο αιματοκυτταρόμετρο.

- ✓ Ακολούθησε υπολογισμός του αριθμού των κονιδίων ανά ml σύμφωνα με τον τύπο $(Z1+Z2)/2 \times (50.000 \text{ ή } 10.000) \times 10$ όπου :

Z1:Ο αριθμός των κονιδίων που μετρήθηκαν στην πάνω πλευρά του αιματοκυτταρομέτρου

Z2:Ο αριθμός των κονιδίων που μετρήθηκαν στην κάτω πλευρά του αιματοκυτταρομέτρου

50.000 ή 10.000: στην περίπτωση που μετρήθηκαν μόνο τα 5 τετράγωνα στο κέντρο του grip ή τα 25 τετράγωνα του grip αντίστοιχα.

10 :λόγω της αραίωσης 1/10.

- ✓ Στη συνέχεια υπολογίστηκε η ποσότητα που χρειάστηκε από το αρχικό μόλυσμα και έγινε η κατάλληλη αραίωση έτσι ώστε να έχουμε συγκέντρωση 10^7 κον/ml
- ✓ Το μόλυσμα τοποθετήθηκε σε υάλινο δοχείο και οδηγήθηκε υπό συνεχή ανάδευση στο θερμοκήπιο για την διενέργεια της μόλυνσης.
- ✓ Με τη χρήση σύριγγας έγινε έγχυση του μολύσματος 10ml /φυτό, Εικόνα 27.



Εικόνα 27: Έγχυση του μολύσματος 10 ml/φυτό

3.7.3 ΕΚΤΙΜΗΣΗ ΠΑΘΟΓΟΝΟΥ ΙΚΑΝΟΤΗΤΑΣ ΚΑΙ ΔΕΙΚΤΗ ΑΣΘΕΝΕΙΑΣ

Για την εκτίμηση της παθογόνου ικανότητας των άγριων και μεταλλαγμένων στελεχών καταγράφηκε η πρόοδος της ασθένειας κάθε στελέχους σε συγκεκριμένα χρονικά διαστήματα ανάλογα του είδους του και υπολογίστηκε ο δείκτης AUDPC (Area Under The Disease Progress Curve). Το ποσοστό της ασθένειας σε κάθε μέτρηση υπολογίστηκε από τον αριθμό των φύλλων που παρουσίασαν συμπτώματα, σε σχέση με το συνολικό αριθμό φύλλων κάθε φυτού. Ακολούθησε γραφική παράσταση 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 Campbell & Madden (1990). Προκειμένου να συσχετιστεί ο δείκτης AUDPC με την ένταση της ασθένειας, ο δείκτης αυτός εκφράστηκε ως ποσοστό της μέγιστης τιμής AUDPC για όλη τη διάρκεια του πειράματος, όπου αντιστοιχεί σε 100% προσβολή και αναφέρεται ως ποσοστό ασθένειας βάσει AUDPC.

3.8 ΔΟΚΙΜΕΣ ΚΥΤΤΑΡΙΚΟΥ ΘΑΝΑΤΟΥ

Οι δοκιμές κυτταρικού θανάτου πραγματοποιήθηκαν σε φυτά καπνού της ποικιλίας *Petite Gerard* και *Petite Havana*. Πιο συγκεκριμένα, για τη μελέτη της ικανότητας των

ΔVdLaeA στελεχών να προκαλούν κυτταρικό θάνατο ακολουθήθηκε η παρακάτω διαδικασία:

- Έγινε ανάπτυξη των φυτών σε σπορείο για διάστημα 30 ημερών.
- Τα φυτά μεταφυτεύτηκαν σε γλαστράκια διαστάσεων 9x9x9 (1 φυτάριο /γλαστράκι)
- Πραγματοποιήθηκε η μόλυνση μετά από 20 ημέρες στο στάδιο του 4^{ου} πραγματικού φύλλου.

Η παρασκευή του αιωρήματος έγινε ως εξής:

- Ενεργοποίηση του άγριου και των μεταλλαγμένων στελεχών σε τρυβλία με θρεπτικό υλικό για 10 μέρες.
- Μεταφορά κομματιών από κάθε τρυβλίο σε κωνική φιάλη των 250 ml που περιείχε 100 ml θρεπτικού διαλύματος SSN.
- Τοποθέτηση των κωνικών φιαλών σε επωαστικό θάλαμο σταθερής θερμοκρασίας (26°C), με συνεχόμενη ανακίνηση για διάστημα 15 ημερών.
- Διήθηση του αιωρήματος κονιδίων με την χρήση αποστειρωμένων κομματιών από πυκνό τούλι και εν συνεχεία το αιώρημα αυτό διηθήθηκε από Miracloth (εταιρίας Chembiotin).
- Ακολούθησε ζωηρή ανάδευση και αραίωση τους, 100 μl του πυκνού και 900 μl διπλά αποστειρωμένο, απεσταγμένο νερό (αραίωση 1/10) σε eppendorf tube (1.5 ml).
- Μέτρηση σε οπτικό μικροσκόπιο με τη βοήθεια του αιματοκυτταρομέτρου.
- Υπολογισμός της ποσότητας του μολύσματος από το άγριο στέλεχος και τα μεταλλαγμένα TΔAGI.A.3, TΔAGI.A18 που απαιτείται για να έχουμε τελική συγκέντρωση 10⁷ κον/ml.
- Η μισή ποσότητα αιωρήματος περάστηκε από φίλτρα 20 μM ώστε να αποκτηθεί διάλυμα του εκχυλίσματος των διαφόρων καλλιεργειών χωρίς την παρουσία των κονιδίων.
- Έγχυση των διαφόρων αιωρημάτων (3ml ανά επέμβαση), στα φύλλα καπνού *Petite Gerard* και *Petite Havana* δείκτες, κάτω από την εφυμενίδα με τη χρήση αποστειρωμένης σύριγγας.

3.9 ΔΟΚΙΜΕΣ ΠΑΘΟΓΕΝΕΙΑΣ ΜΕ ΜΙΚΡΟΣΚΛΗΡΩΤΙΑ ΣΤΟ ΧΩΜΑ ΣΕ ΦΥΤΑ ΜΕΛΙΤΖΑΝΑΣ

Για την πραγματοποίηση των δοκιμών παθογένειας με σκληρώτια σε φυτά μελιτζάνας ακολουθήθηκαν τα παρακάτω βήματα:

- Καλλιέργεια των στελεχών ΤΔΑΓΙ.Α.3, ΤΔΑΓΙ.Α18 και του άγριου στελέχους του μύκητα *V. dahliae* σε θρεπτικό υλικό ανάπτυξης SSN-Agar.
- Μεταφορά των τρυβλίων στον επωαστικό θάλαμο στους 24°C για χρονικό διάστημα περίπου 40 ημερών μέχρι το σχηματισμό μικροσκληρωτίων στο τρυβλίο.
- Με τη βοήθεια νυστεριού έγινε χαραγή και απομάκρυνση από το τρυβλίο του θρεπτικού υλικού με τα μικροσκληρώτια. Τοποθέτηση αυτών σε μεταλλικό δοχείο για το διαχωρισμό τους με τη χρήση του OMNI-MIXER, Εικόνα 28.



Εικόνα 28: OMNI-MIXER

- Τα μεταλλικά δοχεία που χρησιμοποιήθηκαν για τα τρία διαφορετικά στελέχη απολυμαίνονταν πριν από κάθε χρήση ως εξής:
 - α) χρήση χλωρίνης 10% για χρονικό διάστημα 10 min καθ' όλη τη διάρκεια γινόταν συνεχής ανακίνηση
 - β) ξέπλυμα με αποστειρωμένο νερό, δύο φορές, για να μην υπάρχουν υπολείμματα χλωρίνης
 - γ) χρήση αιθανόλης 70% για χρονικό διάστημα 5 min
 - δ) ακολούθως έγινε δύο φορές πλύση με αποστειρωμένο νερό πολύ προσεκτικά διότι αν υπάρχουν υπολείμματα αιθανόλης μπορεί να καταστραφούν τα σκληρώτια.
 - ε) αφέθηκαν τα μεταλλικά δοχεία για χρονικό διάστημα 10 λεπτών να στεγνώσουν πριν επαναχρησιμοποιηθούν.

- Το προϊόν της πολτοποίησης, που είχε παχύρευστη υφή απλώθηκε σε αποστειρωμένο τρυβλίο.
- Τα τρυβλία μεταφέρθηκαν στον επωαστικό θάλαμο όπου επικρατούσαν θερμοκρασίες 28°C, χωρίς τη χρήση του πάνω μέρους του τρυβλίου για να μπορέσει να αφυδατωθεί και να μείνουν μόνο τα μικροσκληρώτια στο τρυβλίο, για χρονικό διάστημα 15 ημερών.

Για τη χρήση των μικροσκληρωτίων στο χώμα είναι απαραίτητη η αφυδάτωση των τρυβλίων που περιέχουν τα μικροσκληρώτια και η επανααιωρηματοποίησή τους ώστε να γίνει η μέτρηση στο αιματοκυτταρόμετρο για τον υπολογισμό της συγκέντρωσης της μόλυνσης. Για τον υπολογισμό και την παρασκευή του μολύσματος ακολουθήθηκαν τα εξής βήματα:

1. Έγινε χρήση των τρυβλίων που είχε αφυδατωθεί το αιώρημα και είχαν μείνει τα μικροσκληρώτια.
2. Με τη χρήση νυστεριού αφαιρέθηκε η αφυδατωμένη μεμβράνη από το τρυβλίο και τοποθετήθηκε στα μεταλλικά δοχεία του Omni-Mixer ώστε να ομογενοποιηθούν με τη χρήση 20 ml H₂O.
3. Έγινε η απολύμανση των δοχείων κάθε φορά που άλλαζε το στέλεχος.
4. Το αιώρημα που προέκυψε μετρήθηκε σε αιματοκυτταρόμετρο.
5. Η συγκέντρωση που χρησιμοποιήθηκε για τη μόλυνση στο χώμα υπολογίστηκε σε 40 μικροσκληρώτια/g εδάφους.
6. Πριν την τοποθέτηση του μολύσματος στο χώμα έγινε ο συνολικός υπολογισμός του χώματος για όλα τα γλαστράκια σε ζυγό ακριβείας.
7. Μετά την εφαρμογή των μικροσκληρωτίων έγινε πολύ καλή αναμόχλευση του χώματος ώστε να γίνει ομοιόμορφα η κατανομή τους στο χώμα.

Για την πραγματοποίηση της μόλυνσης με τα μικροσκληρώτια τα φυτά είχαν βλαστήσει και να είχαν τουλάχιστον δύο πραγματικά φύλλα Εικόνα 29.



Εικόνα 29: Ανάπτυξη φυτών μελιτζάνας πριν την μόλυνση με τα μικροσκληρώτια

3.10 ΠΑΡΕΜΠΟΔΙΣΤΙΚΗ ΔΡΑΣΗ ΤΟΥ K-165

Έχει βρεθεί ότι το στέλεχος K165 επάγει τους αμυντικούς μηχανισμούς του φυτού *Arabidopsis thaliana* εναντίον του βερτισιλλίου. Ακόμη έχει παρατηρηθεί ότι το στέλεχος K165 μειώνει τη βλαστική ικανότητα των μικροσκληρωτίων του μύκητα *V. dahliae* (Antonopoulos *et al.*, 2007). Η μελέτη της παρεμποδιστικής δράσης του K165 εφαρμόστηκε σε αυτή τη μελέτη στα μεταλλαγμένα $\Delta VdLaeA$ στελέχη.

Έγινε χρήση του στελέχους K165 ως εξής:

- Έγινε χρήση του στελέχους K165 από erppendorf σωληνάριο που υπήρχε stock στους -80°C .
- Ενεργοποίηση του στελέχους K165 σε θρεπτικό υλικό NAG στο θάλαμο σταθερής νηματικής ροής (laminar).
- Τοποθέτηση τρυβλίων σε συνθήκες σταθερής θερμοκρασίας 28°C , μέσα στον επωαστικό θάλαμο, για μία μέρα.
- Με τη χρήση αποστειρωμένης οδοντογλυφίδας έγινε μεταφορά μίας αποικίας βακτηρίου του K165 σε τρυβλίο με θρεπτικό υλικό PDA το οποίο αρχικά είχε χωριστεί εξωτερικά σε δύο μέρη για να παρατηρηθεί η παρεμπόδιση του προκαλεί στην ανάπτυξη του *V. dahliae* που υπήρχε ήδη προς ανάπτυξη μέσα στο τρυβλίο με το θρεπτικό υλικό.
- Η παρατήρηση των τρυβλίων για τα μεταλλαγμένα και το άγριο στέλεχος ως προς την παρεμπόδιση γινόταν κάθε 4-5 μέρες για διάστημα 30 ημερών.

3.11 ΘΡΕΠΤΙΚΑ ΥΛΙΚΑ-ΠΥΘΜΙΣΤΙΚΑ ΔΙΑΛΥΜΑΤΑ

1) PDA (Potato Dextrose Agar):

Για 1 λίτρο PDA:

Σε μία κωνική φιάλη τοποθετήθηκε απιονισμένο νερό και προστέθηκαν 200 gr πατάτας, κομμένα σε κυβάκια 1cm x1cm και τοποθετήθηκε η φιάλη σε δοχείο με βραστό νερό για 45 λεπτά. Ακολούθησε φιλτράρισμα του εκχυλίσματος σε τουλπάνι και προσθήκη 20 gr άγαρ και 20 gr δεξτρόζη. Ογκομέτρηση του τελικού προϊόντος και προσθήκη απιονισμένου νερού έως τον όγκο 1 λίτρου. Αποστείρωση στους 120°C , για 20 λεπτά.

2) SSN (Sucrose-Sodium-Nitrate)

Για 1 λίτρο SSN:

- Sucrose 15 gr
- KH_2PO_4 1 gr
- $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ 0.5 gr
- NaNO_3 2 gr
- KCl 0.5 gr
- διάλυμα ιχνοστοιχείων
- απιονισμένο νερό έως τον όγκο 1 λίτρου

Το **διάλυμα των ιχνοστοιχείων** παρασκευάστηκε με την προσθήκη των παρακάτω υλικών και προσθήκη απιονισμένου νερού μέχρι τον όγκο των 100 ml:

- $\text{FeSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ 249 mg
- $\text{CuSO}_4 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$ 40 mg
- $\text{ZnSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ 44 mg
- $\text{MnSO}_4 \cdot 4\text{H}_2\text{O}$ 41 mg
- $\text{Na}_2\text{MoO}_4 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$ 51 mg

Στη συνέχεια ακολούθησε αποστείρωση στον κλίβανο στους 120°C για 20 λεπτά. Στην περίπτωση του SSN-agar έγινε προσθήκη ποσότητας 20 gr άγαρ πριν το στάδιο της αποστείρωσης.

3) Παρασκευή NAG

Για 1 λίτρο NAG:

- Nutrient Broth 8 g
- Glycerol 20 g
- Άγαρ 20 g

Σε μια κωνική φιάλη προστέθηκε απιονισμένο νερό και στη συνέχεια τα συστατικά αναδεύθηκαν μέχρι πλήρους διάλυσης, ακολούθησε το πωμάτισμα της κωνικής φιάλης με το θρεπτικό υπόστρωμα. Αποστείρωση της κωνικής φιάλης με το θρεπτικό υπόστρωμα σε κλίβανο στους 120°C για 15 min.

4) Dichloran rose Bengal chloramphenicol agar (DRBC)

Για την παρασκευή 1 λίτρο DRBC:

- Γλυκόζη 10 gr
- Πεπτόνη 5 gr
- K_2HPO_4 1 gr
- $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ 0.5 gr
- Agar Oxoid No3 15 gr
- Απεσταγμένο νερό μέχρι τα 1000 ml

- Rose Bengal (αποστείρωση και αυτό) 25 mgr
- Dichloran (2,6 dichloro-4-nitroaniline) 2 mgr
- Chloramphenicol 100 mgr

Αποστείρωση της κωνικής φιάλης με το θρεπτικό υπόστρωμα σε κλίβανο, στους 120°C, για 15 min.

5) LB (Luria Betrani)

Για την παρασκευή 1 λίτρου LB ακολουθήθηκαν τα παρακάτω βήματα :

1. Διάλυση των ακόλουθων υλικών σε 800 ml διπλά αποσταγμένο νερό:
 - Difco Bacto Tryptone 10 g
 - Yeast Extract 5 g
 - NaCl 10 g
2. Ρύθμιση του pH=7, με τη βοήθεια NaOH
3. Συμπλήρωση με διπλά αποσταγμένο νερό μέχρι το 1 L και αποστείρωση στον κλίβανο στους 120° C για 20 min.

Στην περίπτωση του LB-agar :

- Προσθήκη 15 g agar σε 1000 ml θρεπτικού υλικού

6) Czapek (Dox) agar

Για την παρασκευή 1L Czapek (Dox) agar έγινε χρήση:

- Sodium nitrate NaNO_3 2 gr
- Potassium phosphate K_2HPO_4 1 gr
- Potassium chloride KCl 0.5 gr
- Magnesium sulphate $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ 0.5 gr
- Ferrous sulphate FeSO_4 0.01 gr
- Sucrose 30 gr
- Agar 15 gr
- Απεσταγμένο νερό μέχρι τα 1000 ml

Αποστείρωση της κωνικής φιάλης με το θρεπτικό υπόστρωμα σε κλίβανο στους 120°C, για 15 min.

4. ΑΠΟΤΕΛΕΣΜΑΤΑ

4.1 ΚΛΩΝΟΠΟΙΗΣΗ ΤΜΗΜΑΤΩΝ DNA ΣΕ ΠΛΑΣΜΙΔΙΑΚΟ ΦΟΡΕΑ

Για τη δημιουργία υπερέκφρασης του υπό μελέτη γονιδίου ήταν απαραίτητη η κλωνοποίηση τμημάτων DNA σε συγκεκριμένο πλασμιδιακό φορέα. Η διαδικασία που ακολουθήθηκε περιγράφεται στην παράγραφο 3.1. Με τη διαδικασία αυτή πραγματοποιήθηκε κλωνοποίηση στο φορέα SK1226 του προϊόντος PCR 1955 βάσεων. Ενδεικτικά αναφέρεται ότι χρησιμοποιήθηκαν τα ένζυμα BamHI-SpHI και η επώασή τους στους 37°C. Ακολούθησε η ενσωμάτωση του κλώνου στο φορέα SK879.

4.1.1 ΕΝΙΣΧΥΣΗ ΜΕ PCR ΚΑΙ ΚΛΩΝΟΠΟΙΗΣΗ ΤΗΣ ΠΕΡΙΟΧΗΣ F1R1

Το προς μελέτη τμήμα των 1955 βάσεων του γονιδίου *VdLaeA* ενισχύθηκε με PCR χρησιμοποιώντας γενωματικό DNA του μύκητα *V. dahliae*. Χρησιμοποιήθηκαν οι εκκινητές VD_OE_LaeA-F1-BamHI και οι VD_OE_LaeA-R1-SphI που σχεδιάστηκαν όπως περιγράφεται στην παράγραφο 3.1.1 εφαρμόζοντας θερμοκρασία υβριδισμού 55°C. Η αντίδραση πραγματοποιήθηκε όπως αναφέρεται στον Πίνακα 1:

Buffer	5μl
dNTPs	2μl
VD_OE_LaeA-F1-BamHI	2μl
VD_OE_LaeA-R1-SphI	2μl
MgCl ₂	1,5μl
Taq polymerase	0,2μl
H ₂ O	36,3μl
DNA	1μl
Τελικός όγκος	50μl

Πίνακας 1: Αντίδραση PCR

Μετά το τέλος της PCR ακολούθησε ηλεκτροφόρηση όπως φαίνεται στην Εικόνα 30 με στόχο την επιβεβαίωση της επιτυχίας της αντίδρασης και την εκτίμηση του προϊόντος. Χρησιμοποιήθηκε Gene Ruler 1kb DNA ladder.



Εικόνα 30: Ενίσχυση του τμήματος 1955 βάσεων εφαρμόζοντας PCR με τους εκκινητές VD_OE_LaeA-F1-BamHI και VD_OE_LaeA-R1-SphI σε γενοματικό DNA του μύκητα *V.dahliae*.

Το προϊόν της ηλεκτροφόρησης εμφανίστηκε κοντά στις 2000 βάσεις, με το προς μελέτη γονίδιο να είναι στις 1955 βάσεις (bp).

4.1.2 ΠΕΨΗ ΝΟΥΚΛΕΪΚΩΝ ΟΞΕΩΝ

Στη συνέχεια ακολούθησε καθαρισμός του προϊόντος PCR με τη διαδικασία που περιγράφεται στην παράγραφο 3.5. Μετά τον καθαρισμό ακολούθησε αντίδραση πέψης με τα ένζυμα BamHI-SpHI. Τόσο το προϊόν της PCR όσο και ο φορέας τοποθετήθηκαν για επώαση στους 37°C για 16 ώρες. Η αντίδραση πέψης πραγματοποιήθηκε ως εξής Πίνακας 2:

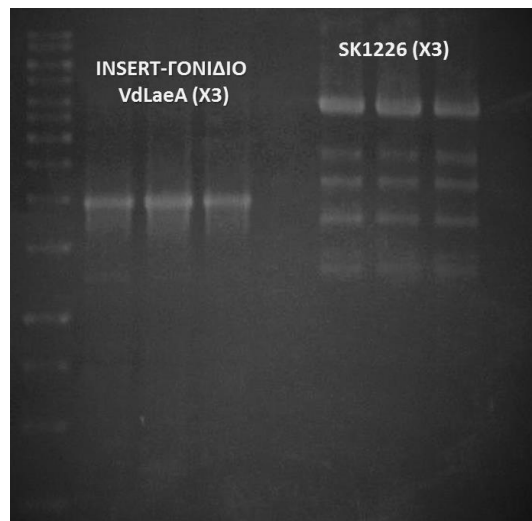
	insert-γονίδιο <i>VdlaeA</i>	Φορέας - SK1226
DNA	9 μl	1 μl
Buffer K	2 μl	2 μl
BamHI	1 μl	1 μl
SpHI	1 μl	1 μl
H₂O	7 μl	15 μl
Τελικός όγκος	20 μl	20 μl

Πίνακας 2: Η αντίδραση τη πέψης (digestion) νουκλεϊκών οξέων

4.1.3 ΗΛΕΚΤΡΟΦΟΡΗΣΗ ΤΩΝ ΠΕΨΕΩΝ, ΚΑΘΑΡΙΣΜΟΣ ΚΑΙ ΑΠΟΜΟΝΩΣΗ DNA ΑΠΟ ΤΟ ΠΗΓΜΑ ΑΓΑΡΟΖΗΣ

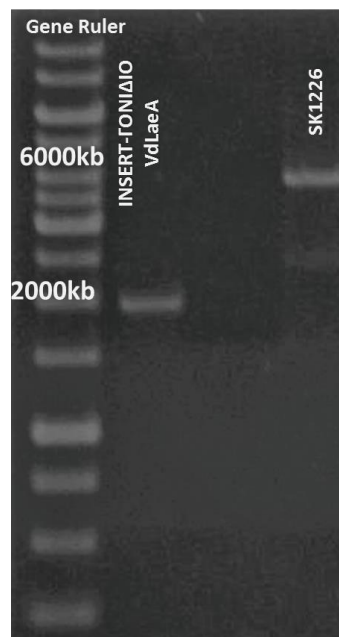
Πραγματοποιήθηκε ηλεκτροφόρηση των πέψεων σε πηκτή αгарόζης συγκέντρωσης 0,8% και εξαγωγή από πηκτή (gel extraction) των επιθυμητών κομματιών DNA του προϊόντος και του φορέα για το καθένα έγιναν τρεις επαναλήψεις (X3), σύμφωνα με το

πρωτόκολλο που περιγράφεται αναλυτικά στην παράγραφο 3.5.3. Το προϊόν της ηλεκτροφόρησης φαίνεται στην Εικόνα 31.



Εικόνα 31: Gel ηλεκτροφόρησης των πένσεων.

Μετά την ηλεκτροφόρηση ακολούθησε το πρωτόκολλο καθαρισμού και απομόνωσης του DNA από την πηκτή. Εν συνεχεία πραγματοποιήθηκε ηλεκτροφόρηση των προϊόντων καθαρισμού όπως φαίνεται στην Εικόνα 32, για την ποσοτικοποίηση τους και την εκτέλεση της αντίδρασης συνένωσης (ligation).



Εικόνα 32: Gel ηλεκτροφόρησης μετά το gel-extraction.

4.1.4 ΑΝΤΙΔΡΑΣΗ ΣΥΝΕΝΩΣΗΣ (LIGATION)

Μετά την ολοκλήρωση του πρωτόκολλου καθαρισμού και την ηλεκτροφόρηση των προϊόντων, έγινε πραγματοποίηση αντίδραση συνένωσης (ligation), Πίνακα 3. Η συγκέντρωση του insert-*VdLaeA* ήταν 15 ng/μl και του φορέα-SK1226 ήταν 30 ng/μl.

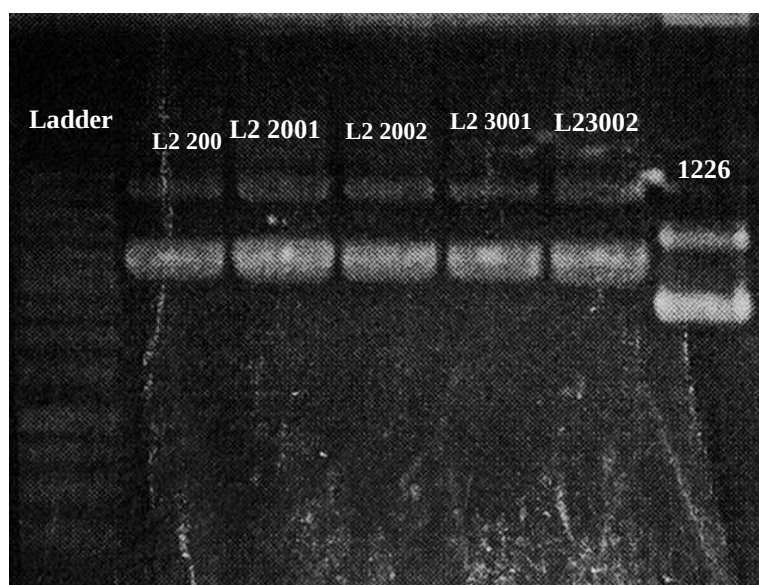
SK1226			
L1 (control)		L2 (1:3)	
Φορέας SK 1226	1,6 μl	Φορέας SK1226	1,6 μl
Insert- <i>VdLaeA</i>	-	Insert- <i>VdLaeA</i>	10 μl
Buffer T4	1 μl	Buffer T4	2 μl
Ligase	0,5 μl	Ligase	1 μl
H ₂ O	6,9 μl	H ₂ O	5,4 μl
Τελικός όγκος	10 μl	Τελικός όγκος	20 μl

Πίνακας 3: Αντίδραση συνένωσης (ligation)

Μετά την αντίδραση συνένωσης τα δείγματα επώαστηκαν στους 16°C για 16 ώρες.

4.1.5 ΜΕΤΑΣΧΗΜΑΤΙΣΜΟΣ ΣΕ ΕΠΙΔΕΚΤΙΚΑ ΚΥΤΤΑΡΑ (DH5A) ΤΟΥ ΒΑΚΤΗΡΙΟΥ *E.COLI*, ΑΠΟΜΟΝΩΣΗ ΚΑΙ ΚΑΘΑΡΙΣΜΟΣ ΠΛΑΣΜΙΔΙΑΚΩΝ ΦΟΡΕΩΝ

Μετά την επώαση της αντίδρασης συνένωσης ακολούθησε ο μετασχηματισμός (transformation), με εισαγωγή του ανασυνδιασμένου πλασμιδίου (από την αντίδραση συνένωσης) σε επιδεκτικά κύτταρα (competent cells) DH5a του βακτηρίου *E.coli* (CaCl₂ Competent Cells) όπως περιγράφεται στην παράγραφο 3.5. Μετά την επώαση των τρυβλίων για ένα ολόκληρο βράδυ σε επωαστικό θάλαμο στους 37°C, ακολούθησε η επιλογή των επιθυμητών αποικιών που είχαν αναπτυχθεί στο επιλεκτικό θρεπτικό υλικό. Ακολούθησε η απομόνωση και ο καθαρισμός των πλασμιδιακών φορέων όπως περιγράφεται στο πρωτόκολλο στην παράγραφο 3.5.6. Μετά το τέλος του πρωτοκόλλου ακολούθησε ηλεκτροφόρηση για τον έλεγχο των προϊόντων και την ύπαρξη πιθανού κλώνου όπως φαίνεται στην Εικόνα 33 .



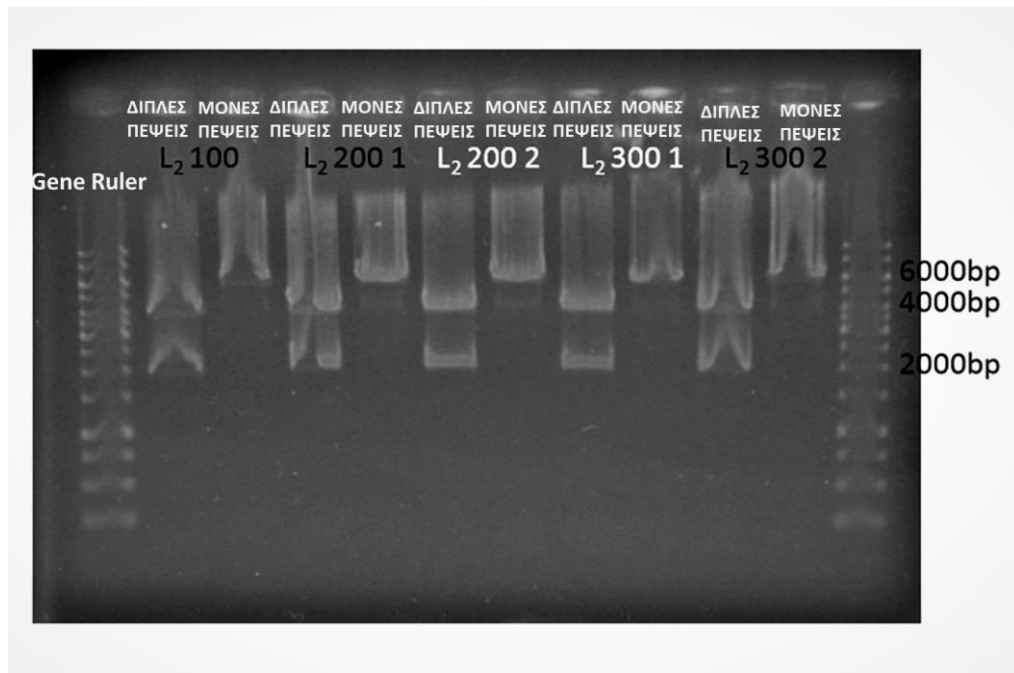
Εικόνα 33: Η φωτογραφία του gel του πρωτοκόλλου των mini preps δείχνει την πιθανή ενσωμάτωση του γονιδίου *VdLaeA* μέσα στο φορέα SK1226.

Επόμενο βήμα μετά την ηλεκτροφόρηση ήταν η πραγματοποίηση πέψης με τα ένζυμα BamHI-SpHI για τη διαπίστωση της επιτυχούς εισόδου του γονιδίου στο φορέα. Οι αντίδραση πέψης πραγματοποιήθηκε όπως φαίνεται στον Πίνακα 4.

ΠΕΨΕΙΣ		
	ΜΟΝΕΣ	ΔΙΠΛΕΣ
DNA	5 μl	5 μl
BamHI	0,5 μl	1 μl
SpHI	-	1 μl
BufferK	2 μl	2 μl
H₂O	12,5 μl	11 μl
Τελικός όγκος	20 μl	20 μl

Πίνακας 4: Αντίδραση πέψης

Έπειτα οι πέψεις τοποθετήθηκαν στον επωαστικό θάλαμο στους 37°C για 16 ώρες και ακολούθησε ηλεκτροφόρηση των πέψεων όπως φαίνεται στην Εικόνα 34. Το γονίδιο απελευθερώθηκε στο επιθυμητό μέγεθος στις διπλές πέψεις ενώ στις μονές μόνο μια ζώνη ήταν διακριτή που περιελάμβανε το φορέα και το γονίδιο *VdLaeA*. Τα αποτελέσματα αυτά επιβεβαίωσαν την εισαγωγή του *VdLaeA* στο φορέα SK1226.

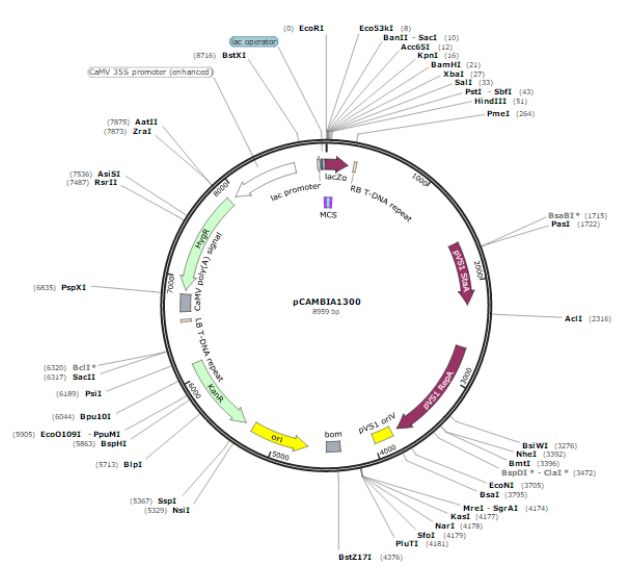


Εικόνα 34: Φωτογραφία του gel-ηλεκτροφόρησης από τις μονές και διπλές πέψεις

Ακολούθησε η υγρή καλλιέργεια των κλώνων αυτών, η εφαρμογή του πρωτοκόλλου Plasmid DNA purification και τα δείγματα στάλθηκαν για αλληλούχιση του insert.

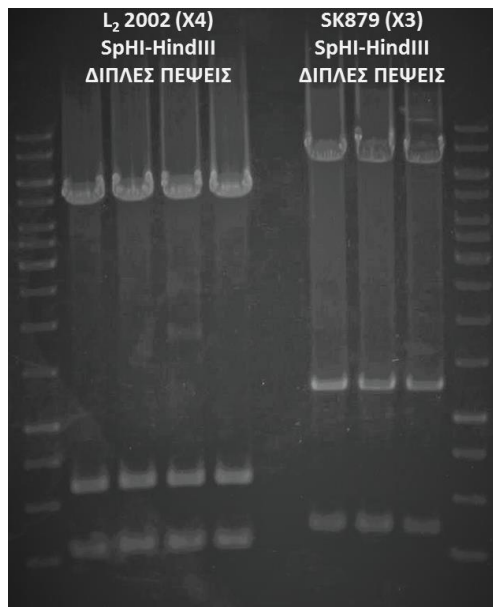
4.1.6 ΕΝΣΩΜΑΤΩΣΗ ΤΟΥ ΚΛΩΝΟΠΟΙΗΜΕΝΟΥ ΤΜΗΜΑΤΟΣ *VdLaeA* ΣΤΟ ΔΥΑΔΙΚΟ ΦΟΡΕΑ SK879

Ο SK879 είναι δυαδικός φορέας 8000 βάσεων Εικόνα 35 που προήλθε από τον pCambia 1300 και έχει ανθεκτικότητα στην канаμικίνη. Τελικός στόχος ήταν η κλωνοποίηση της κασέτας υπερέκφρασης στο δυαδικό φορέα SK879 με τη χρήση αρχικά



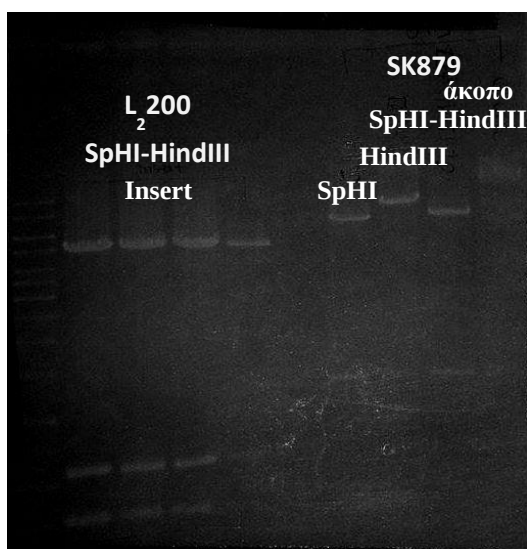
Εικόνα 35: Σχηματική παράσταση του φορέα SK879 με τις θέσεις των περιοριστικών ενζύμων.

των περιοριστικών ενζύμων EcoRI-HindIII και ακολούθως HindIII. Το γονίδιο κοβόταν σε δύο μέρη με τη χρήση του περιοριστικού ενζύμου HindIII οπότε δύο διαδικασίες της κλωνοποίησης πραγματοποιήθηκαν με στόχο την ενσωμάτωση του γονιδίου στο δυαδικό φορέα SK879. Για την επιλογή των κατάλληλων ενζύμων πραγματοποιήθηκαν δοκιμές με το ένζυμο SpHI και το HindIII στο δυαδικό φορέα SK879 για την τελική επιλογή όπως φαίνεται στις Εικόνες 36,37 του gel ηλεκτροφόρησης. Πέψη με τα ένζυμα SpHI και HindIII έδειξε ότι ο φορέας SK879 κόβεται σε δύο σημεία και δίνει 3 ζώνες.



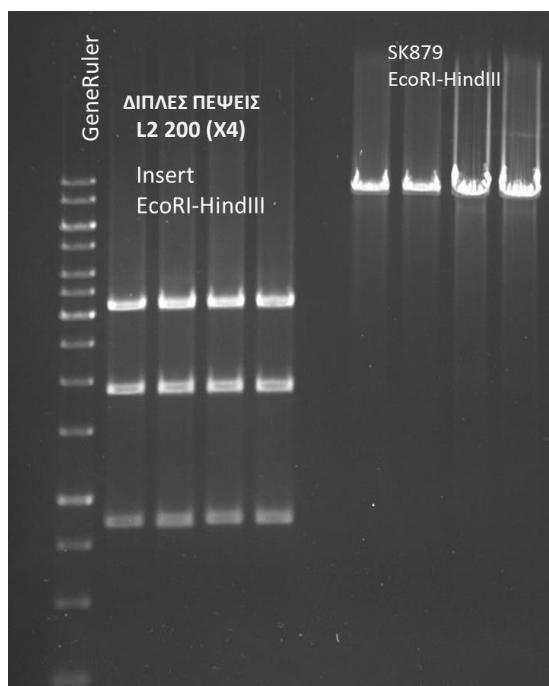
Εικόνα 36: Φωτογραφία ηλεκτροφόρησης των διπλών πέψεων SpHI-HindIII του κλώνου L2 200 και του SK879.

Για την επιβεβαίωση του προβλήματος πραγματοποιήθηκαν μονές πέψεις στο φορέα SK879 και ηλεκτροφόρησή τους, Εικόνα 37.



Εικόνα 37: Φωτογραφία ηλεκτροφόρησης διπλών πέψεων στο L2 200 με τη SpHI-HindIII, μονών και διπλών πέψεων με τη χρήση των περιοριστικών ενζύμων SpHI-HindIII στο φορέα SK879.

Οι προσπάθειες ενσωμάτωσης της κασέτας υπερέκφρασης στο δυαδικό φορέα πραγματοποιήθηκαν αρχικά με τη χρήση των περιοριστικών ενζύμων EcoRI-HindIII. Τα βήματα που ακολουθήθηκαν είναι αυτά που περιγράφονται στην παράγραφο 3.5. Μετά την εκτέλεση όλων των βημάτων που αναφέρθηκαν ανωτέρω έγινε η ηλεκτροφόρηση των δειγμάτων με τα περιοριστικά ένζυμα EcoRI-HindIII και λήφθηκε η κάτωθι Εικόνα 38.



Εικόνα 38: Ηλεκτροφόρηση των διπλών πέψεων L₂ 200 και του φορέα SK879 με τα περιοριστικά ένζυμα EcoRI-HindIII

Ακολουθώς έγιναν οι διαδικασίες καθαρισμού και απομόνωσης του DNA από το πηγάδι αγαρόζης όπως περιγράφεται στην παράγραφο 3.5.3, πραγματοποίηση αντίδρασης συνένωσης και μετασχηματισμός σε επιδεκτικά κύτταρα DH5a του βακτηρίου *E. coli* όπως περιγράφονται στην παράγραφο 3.5.4, 3.5.5. Κατόπιν έγινε απομόνωση, καθαρισμός των πλασμιδιακών φορέων όπως περιγράφεται στην παράγραφο 3.5.6. Για τον έλεγχο μεγάλου αριθμού αποικιών της ύπαρξης πιθανού κλώνου εφαρμόστηκε αρχικά colony PCR και στη συνέχεια Colony Blotting. Η colony PCR πραγματοποιήθηκε με τη χρήση συγκεκριμένων εκκινητών, R1RT και T7. Η αντίδραση της PCR έγινε ως εξής:

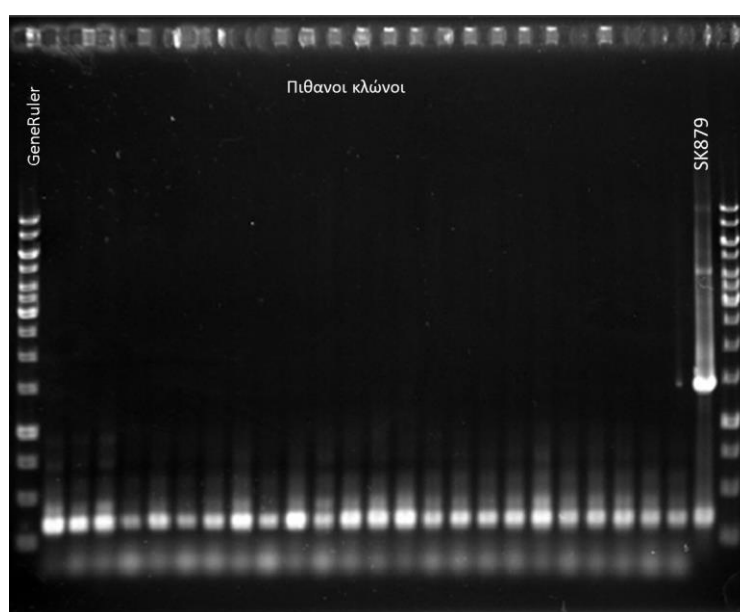
- Αποδιάταξη στους 94°C για 2 min
- 40 κύκλους με αποδιάταξη 30 sec στους 94°C
- Υβριδισμό για 30 sec στους 55°C
- Επέκταση για 2 min στους 72°C
- Επέκταση στους 72°C για 10 min

Η αντίδραση της colony PCR φαίνεται στον Πίνακα 5 ως εξής:

Buffer	5 μ l
dNTPs	2 μ l
R1RT	2 μ l
T7	0.8 μ l
MgCl₂	1.5 μ l
Taq polymerase	0.3 μ l
H₂O	36.4 μ l
plasmid DNA	2 μ l
Τελικός όγκος	50 μ l

Πίνακας 5: Αντίδραση Colony PCR

Αφού ολοκληρώθηκε η Colony PCR έγινε η ηλεκτροφόρηση των προϊόντων για τον έλεγχο ύπαρξης πιθανών κλώνων Εικόνα 39.



Εικόνα 39: Gel ηλεκτροφόρησης της colony PCR των πιθανών κλώνων

Το αποτέλεσμα της ηλεκτροφόρησης δεν έδειξε την ύπαρξη πιθανών κλώνων διότι δεν εμφανίζονται οι φωτεινές ζώνες στο επιθυμητό ύψος.

4.1.7 ΠΡΑΓΜΑΤΟΠΟΙΗΣΗ COLONY BLOTTING ΓΙΑ ΤΗΝ ΕΠΙΒΕΒΑΙΩΣΗ ΤΟΥ ΜΕΤΑΣΧΗΜΑΤΙΣΜΟΥ ΚΑΙ ΕΜΦΑΝΙΣΗ ΤΟΥ ΦΙΑΜ

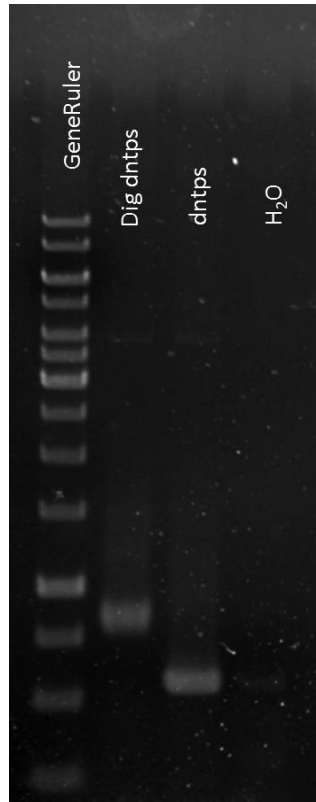
Η διαδικασία του Colony blotting πραγματοποιήθηκε όπως περιγράφεται στην παράγραφο 3.5.7. Για την ολοκλήρωση του πρωτόκολλου του Colony blotting και συγκεκριμένα του υβριδισμού πραγματοποιήθηκε PCR με τη χρήση των εκκινητών LaeAF2 και LaeAR1RT και έδωσαν ένα προϊόν 532 βάσεων για τη δημιουργία του ανιχνευτή (probe).

Η αντίδραση της PCR περιελάμβανε αρχική αποδιάταξη στους 94°C για 2 min, 40 κύκλους με αποδιάταξη 30 sec στους 94°C, υβριδισμό για 30 sec στους 55°C και επέκταση για 2 min στους 72°C και ένα τελικό βήμα επέκτασης 72°C για 10 min. Πραγματοποιήθηκαν τρεις αντιδράσεις με τα dNTPs-DNA(L₂200), dNTPs dig-DNA(L₂200), dNTPs χωρίς το DNA ως μάρτυρα, για να ελέγξουμε τα προϊόντα της αντίδρασης. Η αντίδραση της PCR Πίνακας 6 πραγματοποιήθηκε ως εξής:

dNTPs- DNA		dNTPs dig- DNA		dNTPs	
Buffer	5 μl	Buffer	5 μl	Buffer	5 μl
dNTPs	2.5 μl	dNTPs dig	2.5 μl	dNTPs	2.5 μl
MgCl ₂	2 μl	MgCl ₂	2 μl	MgCl ₂	2 μl
LaeAF2	2 μl	LaeAF2	2 μl	LaeAF2	2 μl
LaeAR1RT	2 μl	LaeAR1RT	2 μl	LaeAR1RT	2 μl
H ₂ O	35 μl	H ₂ O	35 μl	H ₂ O	36 μl
Taq	0.5 μl	Taq	0.5 μl	Taq	0.5 μl
DNA L ₂ 200	1 μl	DNA L ₂ 200	1 μl	DNA L ₂ 200	-
Τελικός όγκος	50 μl	Τελικός όγκος	50 μl	Τελικός όγκος	50 μl

Πίνακας 6: Αντίδραση της PCR

Μετά το τέλος της PCR ακολούθησε η ηλεκτροφόρηση των προϊόντων της όπως φαίνεται στην Εικόνα 40 που ακολουθεί:



Εικόνα 40: Ηλεκτροφόρηση των προϊόντων μετά την αντίδραση της PCR

Το DIG-dNTPs εμφάνισε φωτεινή ζώνη υψηλότερα σε σχέση με τα μη-σημασμένα dNTPs διότι το μέγεθός τους είναι μεγαλύτερο. Το DIG είναι μία μη ραδιενεργός σήμανση. Η χρωστική DIG συνδέεται χημικά σε ένα dNTP και ενσωματώνεται στο τμήμα που ενισχύεται από τυχαίες 6 μερείς αλληλουχίες DNA. Γίνεται περαιτέρω χρήση αντισώματος για να ανιχνευτεί η DIG. Πλεονεκτήματα της είναι ο μικρός χρόνος ανίχνευσης, συνήθως δευτερόλεπτα έως λεπτά και η σταθερότητά της. Ο ιχνηθέτης μπορεί να χρησιμοποιηθεί για μήνες και είναι οικονομικός. Μειονεκτεί διότι η ανίχνευση απαιτεί πολλά βήματα. Αφού πραγματοποιήθηκε το πρωτόκολλο της διαδικασίας του colony blotting και των πλήσεων έγινε η εμφάνιση του φίλμ όπως περιγράφεται στο κεφάλαιο 3.5.7.

4.2 ΦΥΣΙΟΛΟΓΙΚΟΣ ΚΑΙ ΜΟΡΦΟΛΟΓΙΚΟΣ ΧΑΡΑΚΤΗΡΙΣΜΟΣ ΤΩΝ ΜΕΤΑΛΛΑΓΜΕΝΩΝ Δ*VdLaeA* ΣΤΕΛΕΧΩΝ

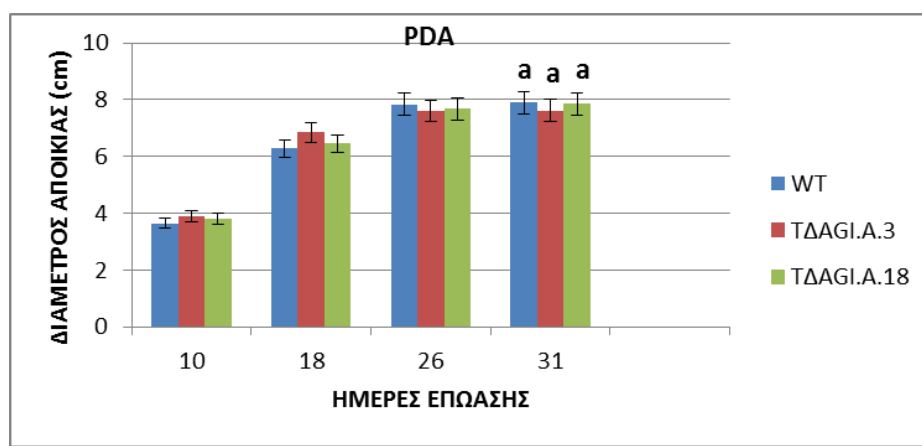
Τα μεταλλαγμένα Δ*VdLaeA* στελέχη ΤΔΑΓΙ.Α.3, ΤΔΑΓΙ.Α18 αξιολογήθηκαν ως προς τη μυκηλιακή αύξηση σε σχέση με το άγριο στέλεχος του μύκητα *V. dahliae* από το οποίο προέκυψαν.

4.2.1 ΜΕΤΡΗΣΕΙΣ ΔΙΑΜΕΤΡΟΥ ΜΥΚΗΛΙΑΚΗΣ ΑΥΞΗΣΗΣ ΚΑΙ ΑΝΑΠΤΥΞΗΣ

Όπως αναφέρεται στην παράγραφο 3.6, για το φαινοτυπικό χαρακτηρισμό των μεταλλαγμένων *ΔVdLaeA* στελεχών και του άγριου στελέχους του μύκητα *V. dahliae*, αξιολογήθηκε η μυκηλιακή αύξηση σε θρεπτικό υπόστρωμα PDA, SSN-agar, Rose Bengal και Czapek.

Μυκηλιακή αύξηση σε θρεπτικό υλικό PDA

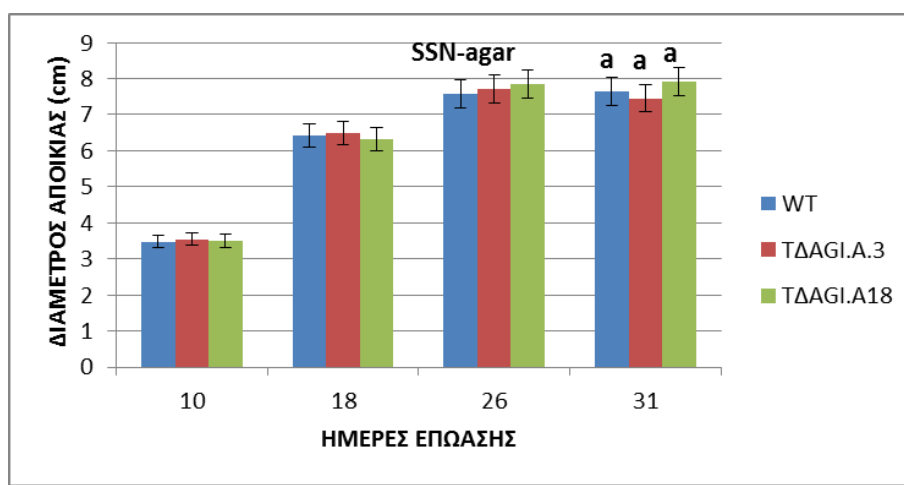
Στην αξιολόγηση της μυκηλιακής αύξησης συγκρίθηκε η ανάπτυξη του μυκηλίου άγριου στελέχους *V. dahliae* όσο και των μεταλλαγμένων στελεχών ΤΔΑΓΙ.Α.3, ΤΔΑΓΙ.Α.18 σε τρυβλία που περιείχαν στερεό θρεπτικό υπόστρωμα PDA. Στο Σχεδιάγραμμα 1 παρουσιάζεται η αύξηση της διαμέτρου των μεταλλαγμένων στελεχών ΤΔΑΓΙ.Α.3, ΤΔΑΓΙ.Α.18 και του άγριου στελέχους *V. dahliae*. Όπως φαίνεται στο διάγραμμα αυτά τα στελέχη μέχρι τις 10 ημέρες παρουσίαζαν παρόμοιο ρυθμό αύξησης της διαμέτρου τους στο τρυβλίο, η οποία έφτασε μέχρι τα 3,8 εκατοστά ανάπτυξης. Στη συνέχεια το μεταλλαγμένο στέλεχος ΤΔΑΓΙ.Α.3 άρχισε να διαφοροποιείται ως προς το ρυθμό ανάπτυξής του. Πιο συγκεκριμένα στις 18 ημέρες μετά την έναρξη του πειράματος το ΤΔΑΓΙ.Α.3 αυξήθηκε με μεγαλύτερους ρυθμούς ενώ στο τέλος των μετρήσεων η μυκηλιακή ανάπτυξη διατηρήθηκε σταθερή στα 7,6 εκατοστά. Το άγριο στέλεχος του μύκητα *V. dahliae* όπως φαίνεται στο διάγραμμα στις 10 ημέρες μετά την επώαση παρουσιάζει μια σταθερότητα στην ανάπτυξή του. Με την πάροδο των ημερών στις 18, 26, 31 ημέρες μετά την επώαση παρατηρείται αύξηση του άγριου στελέχους όπου στο τέλος των μετρήσεων έφτασε τα 7,9 εκατοστά διάμετρο μεγαλύτερη από τα μεταλλαγμένα.



Σχεδιάγραμμα 1: Ρυθμός ανάπτυξης του άγριου στελέχους του μύκητα *V. dahliae* και των μεταλλαγμένων στελεχών ΤΔΑΓΙ.Α.3, ΤΔΑΓΙ.Α.18, σε σχέση με το χρόνο. Στον οριζόντιο άξονα απεικονίζονται οι ημέρες, μετά την έναρξη της επώασης. Στον κάθετο άξονα απεικονίζονται οι μετρήσεις της διαμέτρου σε εκατοστά. Οι στήλες διαφορετικών χρωμάτων αντιπροσωπεύουν διαφορετικά στελέχη, ενώ σε κάθε στήλη παρουσιάζεται το τυπικό σφάλμα (standard error). Το τυπικό σφάλμα υπολογίστηκε με βάση τη τυπική απόκλιση από το μέσο όρο για τρεις επαναλήψεις.

Μυκηλιακή αύξηση σε θρεπτικό υλικό SSN-agar

Στην αξιολόγηση της μυκηλιακής αύξησης συγκρίθηκε η ανάπτυξη του μυκηλίου του άγριου στελέχους *V. dahliae* και των μεταλλαγμένων στελεχών ΤΔΑΓΙ.Α.3, ΤΔΑΓΙ.Α.18 σε τρυβλία που περιείχαν στερεό θρεπτικό υπόστρωμα SSN-agar. Στο Σχεδιάγραμμα 2 παρουσιάζεται η αύξηση της διαμέτρου των μεταλλαγμένων στελεχών ΤΔΑΓΙ.Α.3, ΤΔΑΓΙ.Α.18 και του άγριου στελέχους *V. dahliae*. Όπως φαίνεται στο διάγραμμα τα στελέχη μέχρι τις 10 ημέρες παρουσίαζαν παρόμοιο ρυθμό αύξησης της διαμέτρου τους στο τρυβλίο, η οποία έφτασε τα 3,5 εκατοστά ανάπτυξης. Στη συνέχεια τα μεταλλαγμένα στελέχη ΤΔΑΓΙ.Α.3, ΤΔΑΓΙ.Α.18 άρχισαν να διαφοροποιούνται ως προς το ρυθμό ανάπτυξής τους. Πιο συγκεκριμένα στις 18, 26 ημέρες μετά την έναρξη του πειράματος το ΤΔΑΓΙ.Α.18 και το ΤΔΑΓΙ.Α.3 αυξήθηκαν με μεγαλύτερο ρυθμό έναντι του άγριου στελέχους *V. dahliae*. Στο τέλος των μετρήσεων το ΤΔΑΓΙ.Α.18 είχε τη μεγαλύτερη ανάπτυξη έναντι των άλλων στελεχών φτάνοντας στη διάμετρο ανάπτυξης του μύκητα των 7,9 εκατοστών. Το άγριο στέλεχος του μύκητα *V.dahliae* στις 10 ημέρες μετά την επώαση παρουσίασε μια σταθερότητα στην ανάπτυξή του. Με την πάροδο των ημερών στις 18, 26, 31 ημέρες μετά την επώαση παρατηρήθηκε αύξηση του άγριου στελέχους του μύκητα *V. dahliae* σε μικρότερο ρυθμό σε σχέση με τα μεταλλαγμένα στελέχη ΤΔΑΓΙ.Α.3, ΤΔΑΓΙ.Α.18. Στο τέλος των μετρήσεων έφτασε τα 7,6 εκατοστά το άγριο στέλεχος *V. dahliae*.

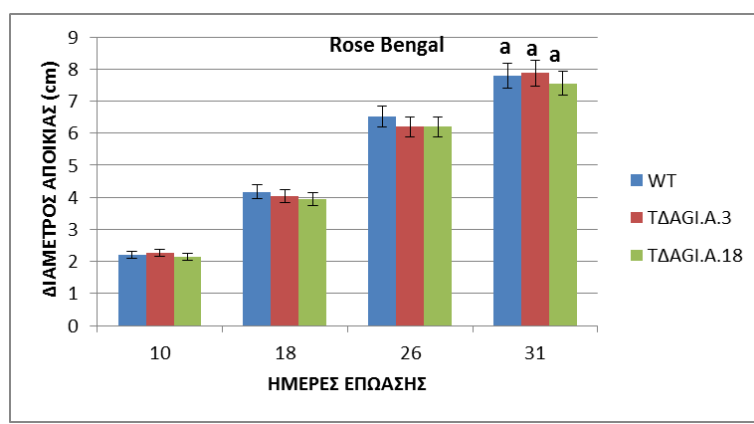


Σχεδιάγραμμα 2: Ρυθμός ανάπτυξης του άγριου στελέχους του μύκητα *V.dahliae* και των μεταλλαγμένων στελεχών ΤΔΑΓΙ.Α.3, ΤΔΑΓΙ.Α.18, σε σχέση με το χρόνο. Στον οριζόντιο άξονα αποικονίζονται οι ημέρες, μετά την έναρξη της επώασης. Στον κάθετο άξονα απεικονίζονται οι μετρήσεις της διαμέτρου σε εκατοστά. Οι στήλες διαφορετικών χρωμάτων αντιπροσωπεύουν διαφορετικά στελέχη, ενώ σε κάθε στήλη παρουσιάζεται το τυπικό σφάλμα (standard error). Το τυπικό σφάλμα υπολογίστηκε με βάση την τυπική απόκλιση από το μέσο όρο για τις τρεις επαναλήψεις.

Μυκηλιακή αύξηση σε θρεπτικό υλικό Rose Bengal

Στην αξιολόγηση της μυκηλιακής αύξησης συγκρίθηκε η ανάπτυξη του μυκηλίου του άγριου στελέχους *V. dahliae* και των μεταλλαγμένων στελεχών ΤΔΑΓΙ.Α.3, ΤΔΑΓΙ.Α.18 σε τρυβλία που περιείχαν στερεό θρεπτικό υλικό Rose Bengal. Στο

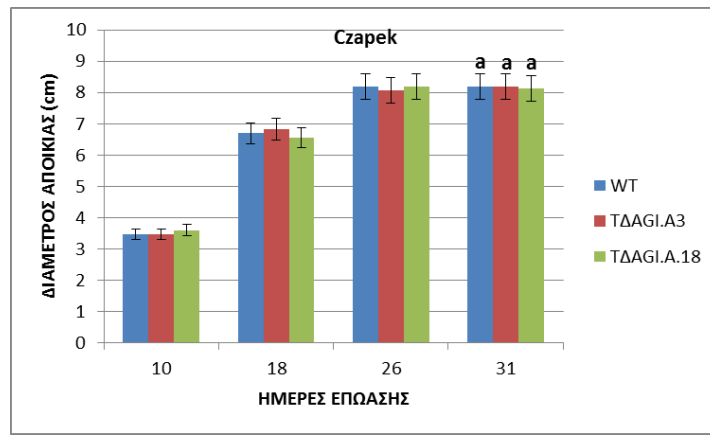
Σχεδιάγραμμα 3 παρουσιάζεται η αύξηση της διαμέτρου των μεταλλαγμένων στελεχών ΤΔΑΓΙ.Α.3, ΤΔΑΓΙ.Α.18 και του άγριου στελέχους *V. dahliae*. Όπως φαίνεται στο διάγραμμα τα στελέχη μέχρι τις 10 ημέρες παρουσίαζαν σταθερότητα και μικρό ρυθμό αύξησης της διαμέτρου τους στο τρυβλίο, η οποία έφτασε τα 2,2 εκατοστά ανάπτυξης. Στη συνέχεια το άγριο στέλεχος *V. dahliae* άρχισε να διαφοροποιείται ως προς το ρυθμό ανάπτυξής του. Πιο συγκεκριμένα στις 18 και 26 ημέρες μετά την έναρξη του πειράματος το άγριο στέλεχος *V. dahliae* αυξήθηκε με μεγαλύτερους ρυθμούς ενώ στο τέλος των μετρήσεων στις 31 ημέρες η μυκηλιακή του ανάπτυξη έφτασε τα 7,8 εκατοστά. Το μεταλλαγμένο στέλεχος ΤΔΑΓΙ.Α.3 αυξήθηκε με μεγαλύτερους ρυθμούς στις 18 και 26 ημέρες σε σχέση με τα άλλα δύο στελέχη. Στο τέλος των μετρήσεων το ΤΔΑΓΙ.Α.3 είχε ταχεία αύξηση του μύκητα όπου απέκτησε διάμετρο 7,87 και διαφοροποιήθηκε και από το άγριο στέλεχος *V. dahliae*.



Σχεδιάγραμμα 3: Ρυθμός ανάπτυξης του άγριου στελέχους του μύκητα *V. dahliae* και των μεταλλαγμένων στελεχών ΤΔΑΓΙ.Α.3, ΤΔΑΓΙ.Α.18, σε σχέση με το χρόνο. Στον οριζόντιο άξονα απεικονίζονται οι ημέρες, μετά την έναρξη της επώασης. Στον κάθετο άξονα απεικονίζονται οι μετρήσεις της διαμέτρου σε εκατοστά. Οι στήλες διαφορετικών χρωμάτων αντιπροσωπεύουν διαφορετικά στελέχη, ενώ σε κάθε στήλη παρουσιάζεται το τυπικό σφάλμα (standard error). Το τυπικό σφάλμα υπολογίστηκε με βάση την τυπική απόκλιση από το μέσο όρο για τρεις επαναλήψεις.

Μυκηλιακή αύξηση σε θρεπτικό υλικό Czapek

Στην αξιολόγηση της μυκηλιακής αύξησης συγκρίθηκε η ανάπτυξη του μυκηλίου του άγριου στελέχους *V. dahliae* όσο και των μεταλλαγμένων στελεχών ΤΔΑΓΙ.Α.3, ΤΔΑΓΙ.Α.18 σε τρυβλία που περιείχαν στερεό θρεπτικό υλικό Czapek. Στο Σχεδιάγραμμα 4 παρουσιάζεται η αύξηση της διαμέτρου των μεταλλαγμένων στελεχών ΤΔΑΓΙ.Α.3, ΤΔΑΓΙ.Α.18 και του άγριου στελέχους *V. dahliae*. Όπως φαίνεται στο διάγραμμα τα στελέχη μέχρι τις 10 ημέρες παρουσίαζαν σταθερότητα στο ρυθμό αύξησης της διαμέτρου τους στο τρυβλίο, η οποία έφτασε τα 3,4 εκατοστά ανάπτυξης. Στην συνέχεια τόσο το άγριο στέλεχος *V. dahliae* όσο και το ΤΔΑΓΙ.Α.3, ΤΔΑΓΙ.Α.18 παρουσίασαν παρόμοιο ρυθμό ανάπτυξης. Πιο συγκεκριμένα το άγριο στέλεχος *V. dahliae* παρουσίασε μεγαλύτερη ανάπτυξη της διαμέτρου του μύκητα 8,2 εκατοστά στις 26 ημέρες μετά την έναρξη της επώασης. Ενώ στις 31 ημέρες επώασης και τα τρία στελέχη είχαν την ίδια ανάπτυξη.



Σχεδιάγραμμα 4: Ρυθμός ανάπτυξης του άγριου στελέχους του μύκητα *V. dahliae* και των μεταλλαγμένων στελεχών TΔAGI.A.3, TΔAGI.A18, σε σχέση με το χρόνο. Στον οριζόντιο άξονα απεικονίζονται οι ημέρες, μετά την έναρξη της επώασης. Στον κάθετο άξονα απεικονίζονται οι μετρήσεις της διαμέτρου σε εκατοστά. Οι στήλες διαφορετικών χρωμάτων αντιπροσωπεύουν διαφορετικά στελέχη, ενώ σε κάθε στήλη παρουσιάζεται το τυπικό σφάλμα (standard error). Το τυπικό σφάλμα υπολογίστηκε με βάση την τυπική απόκλιση από το μέσο όρο για τρεις επαναλήψεις.

4.2.2 ΟΠΤΙΚΗ ΠΑΡΑΤΗΡΗΣΗ ΑΝΑΠΤΥΞΗΣ ΚΑΙ ΣΧΗΜΑΤΙΣΜΟΥ ΜΙΚΡΟΣΚΛΗΡΩΤΙΩΝ ΣΕ ΔΙΑΦΟΡΕΤΙΚΑ ΘΡΕΠΤΙΚΑ ΥΠΟΣΤΡΩΜΑΤΑ PDA, SSN-AGAR, ROSE BENGAL ΚΑΙ CZAPEK

Η ενεργοποίηση των στελεχών πραγματοποιήθηκε το ίδιο χρονικό διάστημα σε όλα τα τρυβλία.

Μυκηλιακή αύξηση σε θρεπτικό υλικό PDA

Όσον αφορά την παραγωγή μικροσκληρωτίων πραγματοποιήθηκε οπτική παρατήρηση των τρυβλίων κάθε 6 ημέρες. Στις αρχικές μετρήσεις δεν παρατηρήθηκε διαφοροποίηση ως προς το σχηματισμό των μικροσκληρωτίων, όμως στο τέλος των παρατηρήσεων στις 31 ημέρες παρατηρήθηκε πλήρης κάλυψη των τρυβλίων του άγριου *V. dahliae* με μικροσκληρώτια ενώ στα μεταλλαγμένα παρατηρήθηκε μικρός σχηματισμός σκληρωτίων, όπως φαίνεται στις Εικόνες: 41-46 και 48.

Μυκηλιακή αύξηση σε θρεπτικό υλικό SSN-agar

Στις 10 ημέρες μετά την επώαση παρατηρήθηκε διαφοροποίηση ως προς τον σχηματισμό μικροσκληρωτίων στο άγριο στέλεχος του μύκητα *V. dahliae* ενώ στα μεταλλαγμένα στελέχη TΔAGI.A.3, TΔAGI.A18 δεν παρατηρήθηκε κάποια διαφοροποίηση. Στις 23 ημέρες μετά την επώαση παρατηρήθηκε διαφοροποίηση ως προς το σχηματισμό μικροσκληρωτίων στο TΔAGI.A18 ενώ στο TΔAGI.A.3 δεν παρατηρήθηκε κάποια μεταβολή. Στις 26 και 31 ημέρες μετά την επώαση παρατηρήθηκε στο άγριο στέλεχος *V. dahliae* πλήρης κάλυψη του τρυβλίου από το μύκητα και καθολικό σχηματισμό μικροσκληρωτίων, στο TΔAGI.A18 παρατηρήθηκε μεγαλύτερος σχηματισμός

μικροσκληρωτίων ενώ σχηματίστηκαν τελικά μικροσκληρώτια και στο ΤΔΑΓΙ.Α.3, όπως φαίνεται στις Εικόνες από 44 έως 47.

Μυκηλιακή αύξηση σε θρεπτικό υλικό Rose Bengal

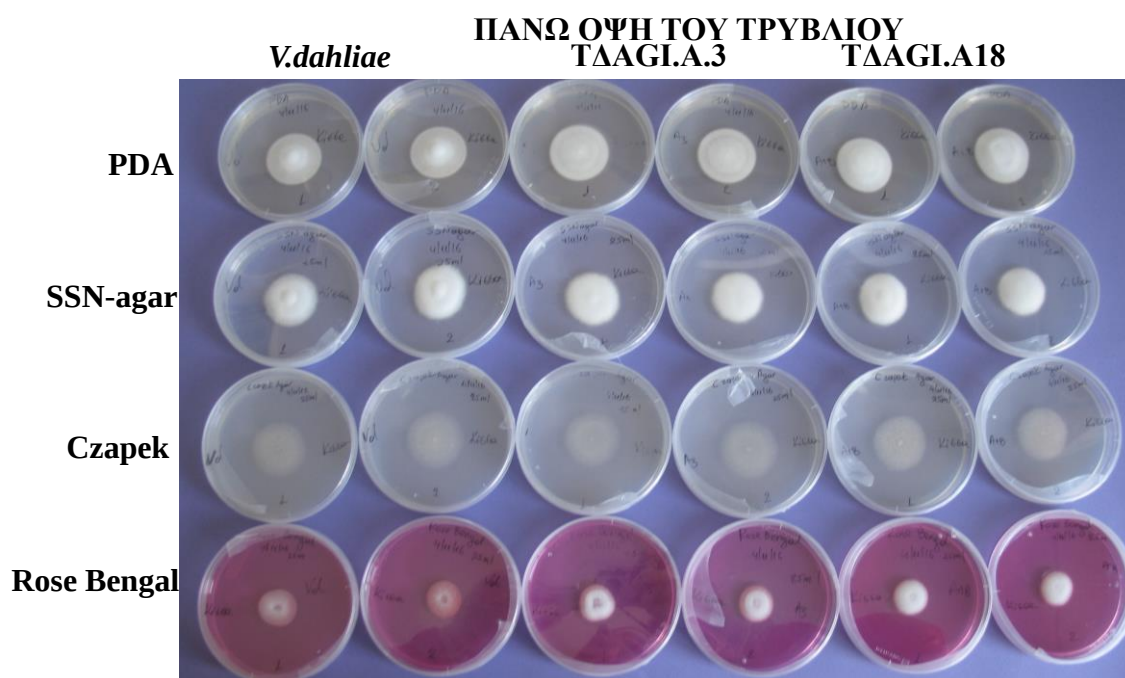
Σχετικά με την παραγωγή μικροσκληρωτίων πραγματοποιήθηκε οπτική παρατήρηση των τρυβλίων κάθε 6 ημέρες. Στις αρχικές μετρήσεις δεν παρατηρήθηκε διαφοροποίηση ως προς τον σχηματισμό μικροσκληρωτίων. Στις 26 ημέρες μετά την έναρξης της επώασης παρατηρήθηκε στο άγριο στέλεχος *V. dahliae* σχηματισμός μικροσκληρωτίων. Στις 31 ημέρες μετά την έναρξη της επώασης παρατηρήθηκε σε μεγαλύτερο βαθμό σχηματισμός μικροσκληρωτίων στο άγριο *V. dahliae* ενώ παρατηρήθηκε διαφοροποίηση και σχηματισμό μικροσκληρωτίων στο κέντρο του τρυβλίου στο μεταλλαγμένο στελέχος ΤΔΑΓΙ.Α18, όπως φαίνεται στις Εικόνες 46, 50.

Μυκηλιακή αύξηση σε θρεπτικό υλικό Czapek

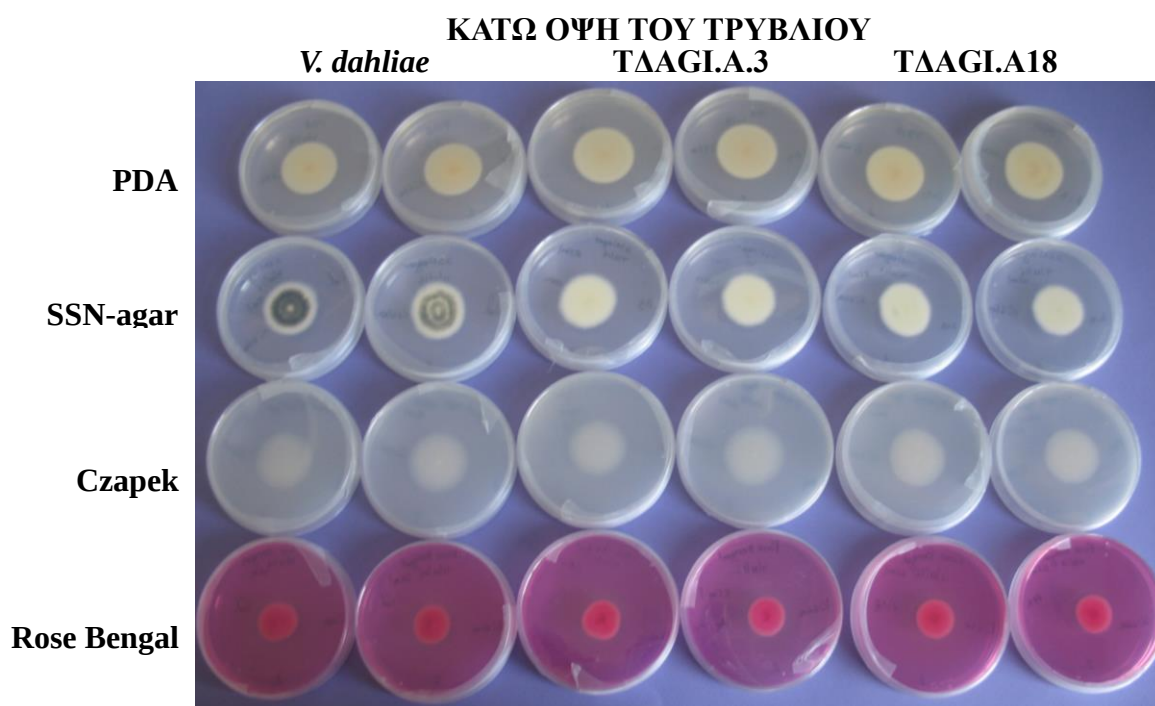
Πραγματοποιήθηκε οπτική παρατήρηση κάθε 6 ημέρες για την παραγωγή μικροσκληρωτίων στα τρυβλία. Σε όλη την διάρκεια της παρατήρησης των τρυβλίων στο θρεπτικό υλικό Czapek δεν παρατηρήθηκε σχηματισμός μικροσκληρωτίων στα ΤΔΑΓΙ.Α.3, ΤΔΑΓΙ.Α.18 ούτε και στο άγριο στέλεχος *V. dahliae*, όπως φαίνεται στις Εικόνες 44, 47 και 49.

Συμπερασματικά, στο θρεπτικό υπόστρωμα SSN-agar παρατηρήθηκε πιο γρήγορη ανάπτυξη των στελεχών αλλά και σχηματισμό των μικροσκληρωτίων σε σύγκριση με τα υπόλοιπα θρεπτικά υποστρώματα. Στο Rose Bengal παρατηρήθηκε για όλα τα στελέχη μια καθυστέρηση στη συνολική ανάπτυξη σε σχέση με τα άλλα θρεπτικά υποστρώματα. Ενώ στο Czapek δεν παρατηρήθηκε σχηματισμός μικροσκληρωτίων, όπως φαίνεται και στην Εικόνα 49. Τέλος παρατηρήθηκε ο σχηματισμός σκληρωτίων μόνο στο άγριο στέλεχος *V.dahliae* Εικόνα 51 και όχι στα μεταλλαγμένα στελέχη ΤΔΑΓΙ.Α.3, ΤΔΑΓΙ.Α18 της υγρής καλλιέργειας SSN.

10 ημέρες μετά την έναρξη της επώασης



Εικόνα 41: Απεικόνιση της πάνω όψης των τρυβλίων όπου αναπτύσσονται το άγριο στέλεχος του μύκητα *V.dahliae* και των μεταλλαγμένων στελεχών ΤΔΑΓΙ.Α.3, ΤΔΑΓΙ.Α18 στα διαφορετικά θρεπτικά υποστρώματα, μετά από 10 ημέρες επώασης.

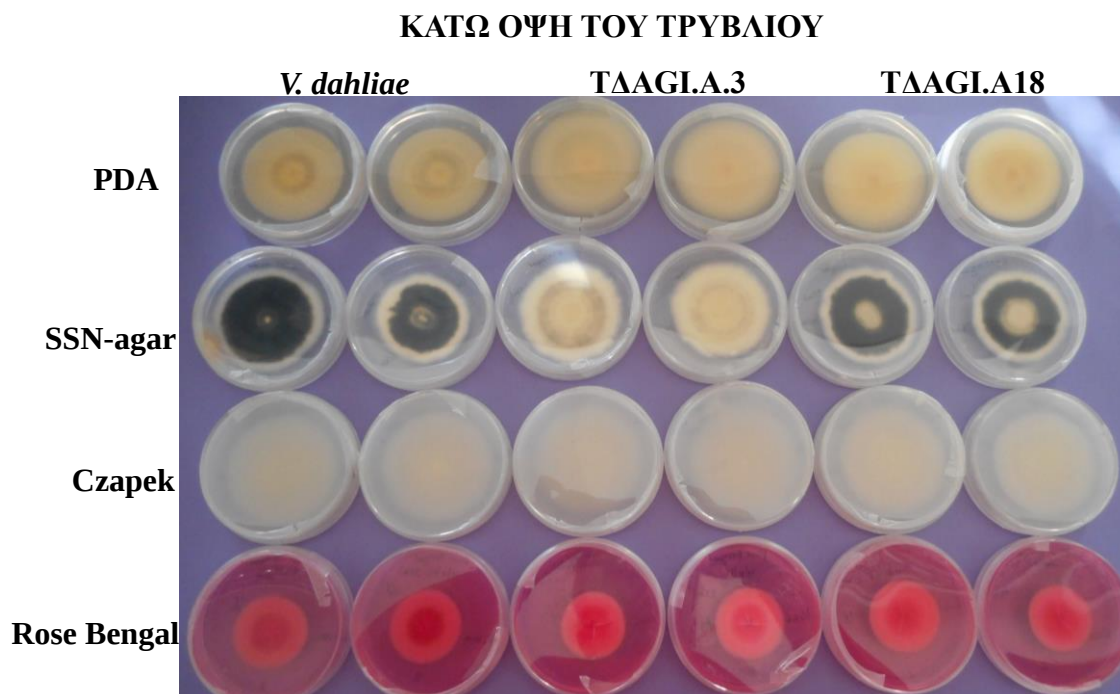


Εικόνα 42: Απεικόνιση της κάτω όψης των τρυβλίων όπου αναπτύσσονται το άγριο στέλεχος του μύκητα *V.dahliae* και των μεταλλαγμένων στελεχών ΤΔΑΓΙ.Α.3, ΤΔΑΓΙ.Α18 στα διαφορετικά θρεπτικά υποστρώματα, μετά από 10 ημέρες επώασης.

18 ημέρες μετά την έναρξη της επώασης



Εικόνα 43: Απεικόνιση της πάνω όψης των τρυβλίων όπου αναπτύσσονται το άγριο στέλεχος του μύκητα *V.dahliae* και των μεταλλαγμένων στελεχών ΤΔΑΓΙ.Α.3, ΤΔΑΓΙ.Α18 στα διαφορετικά θρεπτικά υποστρώματα, μετά από 18 ημέρες επώασης.

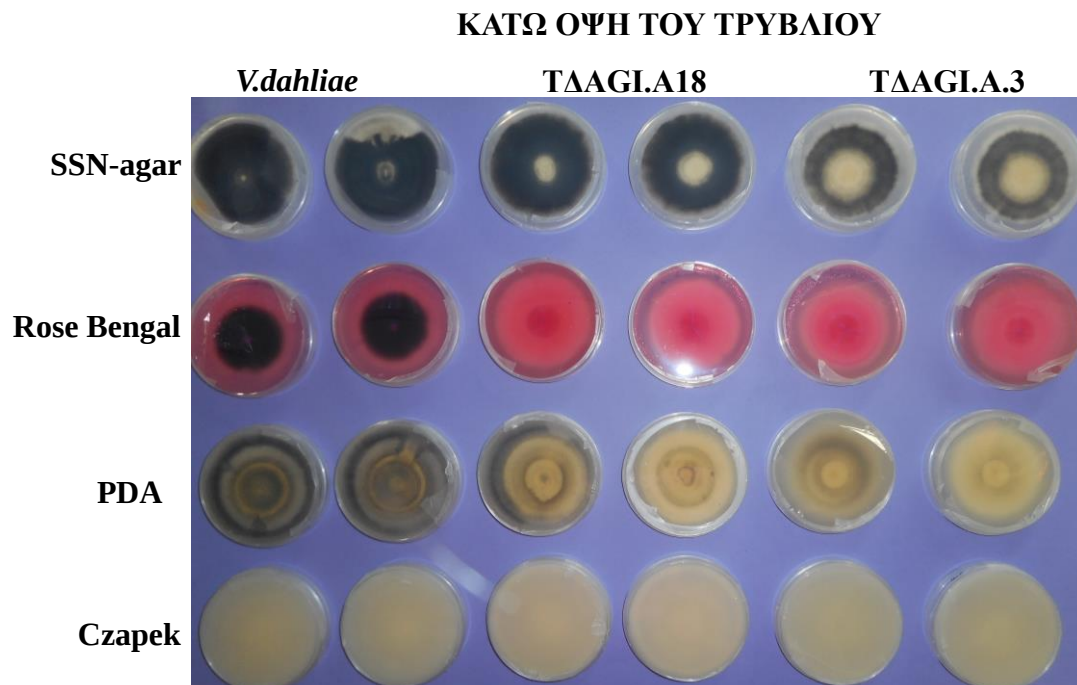


Εικόνα 44: Απεικόνιση της κάτω όψης των τρυβλίων όπου αναπτύσσονται το άγριο στέλεχος του μύκητα *V.dahliae* και των μεταλλαγμένων στελεχών ΤΔΑΓΙ.Α.3, ΤΔΑΓΙ.Α18 στα διαφορετικά θρεπτικά υποστρώματα, μετά από 18 ημέρες επώασης.

31 ημέρες μετά την έναρξη της επώασης



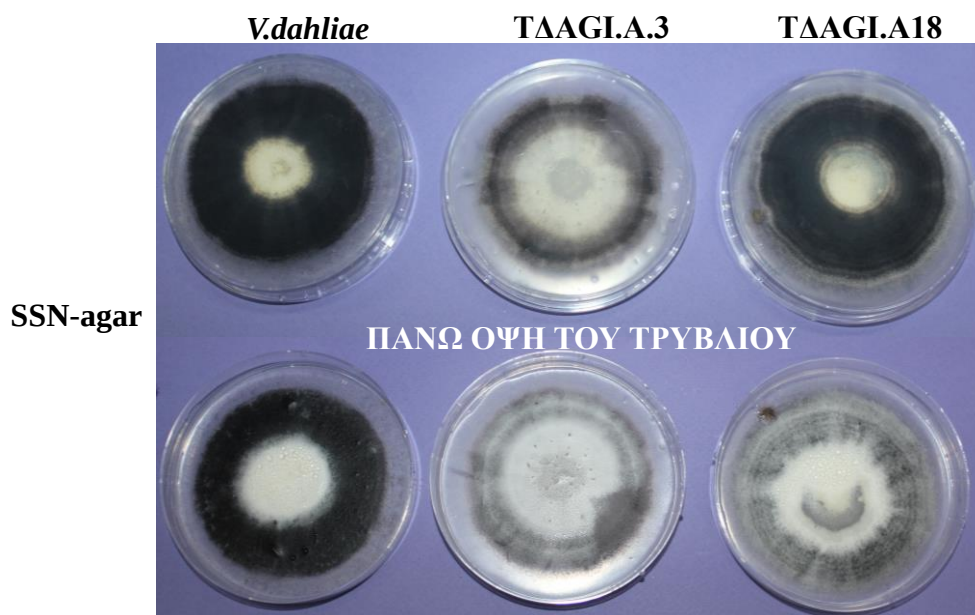
Εικόνα 45: Απεικόνιση της πάνω όψης των τρυβλίων όπου αναπτύσσονται το άγριο στέλεχος του μύκητα *V.dahliae* και των μεταλλαγμένων στελεχών ΤΔΑΓΛΑ.3, ΤΔΑΓΛΑ18 στα διαφορετικά θρεπτικά υποστρώματα, μετά από 31 ημέρες επώασης.



Εικόνα 46: Απεικόνιση της κάτω όψης των τρυβλίων όπου αναπτύσσονται το άγριο στέλεχος του μύκητα *V.dahliae* και των μεταλλαγμένων στελεχών ΤΔΑΓΛΑ.3, ΤΔΑΓΛΑ18 στα διαφορετικά θρεπτικά υποστρώματα, μετά από 31 ημέρες επώασης.

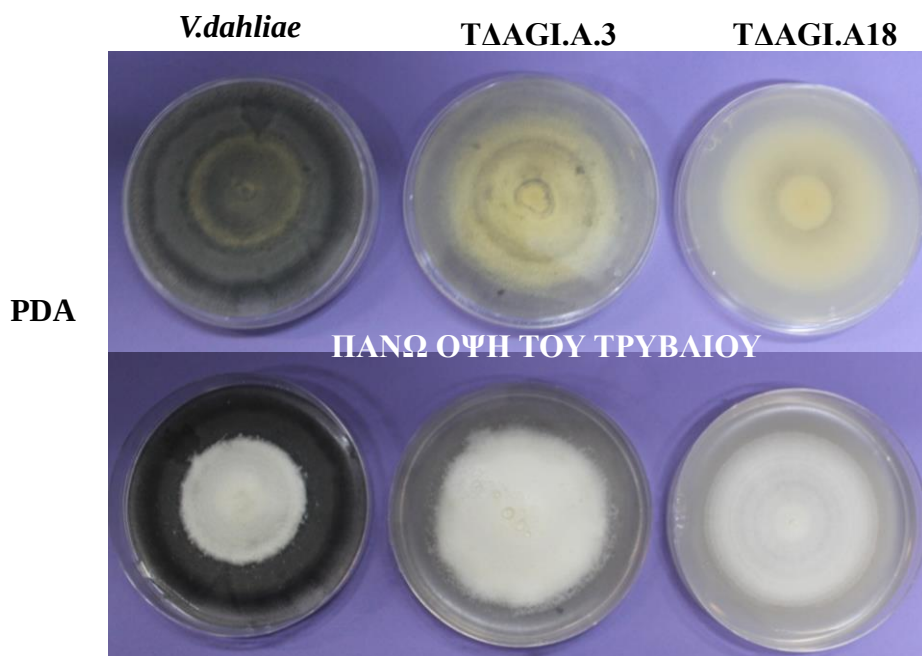
79 ημέρες μετά την έναρξη της επώασης

ΚΑΤΩ ΟΨΗ ΤΟΥ ΤΡΥΒΑΙΟΥ



Εικόνα 47 : Απεικόνιση της πάνω και της κάτω όψης των τρυβλίων όπου αναπτύσσονται το άγριο στέλεχος του μύκητα *V.dahliae* και των μεταλλαγμένων στελεχών ΤΔΑΓΙ.Α.3, ΤΔΑΓΙ.Α18 στο θρεπτικό υλικό SSN-agar, μετά από 79 ημέρες επώασης.

ΚΑΤΩ ΟΨΗ ΤΟΥ ΤΡΥΒΑΙΟΥ



Εικόνα 48: Απεικόνιση της πάνω και της κάτω όψης των τρυβλίων όπου αναπτύσσονται το άγριο στέλεχος του μύκητα *V.dahliae* και των μεταλλαγμένων στελεχών ΤΔΑΓΙ.Α.3, ΤΔΑΓΙ.Α18 στο θρεπτικό υλικό PDA, μετά από 79 ημέρες επώασης.

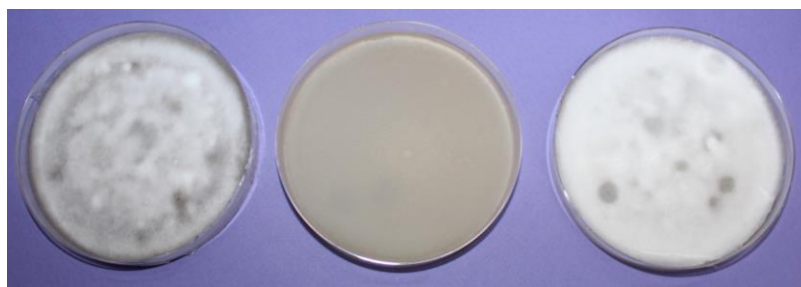
ΠΑΝΩ ΟΨΗ ΤΟΥ ΤΡΥΒΛΙΟΥ

V.dahliae

ΤΔΑΓΙ.Α.3

ΤΔΑΓΙ.Α18

Czapek



Εικόνα 49: Απεικόνιση της πάνω όψης των τρυβλίων όπου αναπτύσσονται το άγριο στέλεχος του μύκητα *V.dahliae* και των μεταλλαγμένων στελεχών ΤΔΑΓΙ.Α.3, ΤΔΑΓΙ.Α18 στο θρεπτικό υλικό Czapek, μετά από 79 ημέρες επώασης.

ΚΑΤΩ ΟΨΗ ΤΟΥ ΤΡΥΒΛΙΟΥ

V. dahliae

ΤΔΑΓΙ.Α.3

ΤΔΑΓΙ.Α18

Rose Bengal



ΠΑΝΩ ΟΨΗ ΤΟΥ ΤΡΥΒΛΙΟΥ

Εικόνα 50: Απεικόνιση της κάτω και της πάνω όψης των τρυβλίων όπου αναπτύσσονται το άγριο στέλεχος του μύκητα *V.dahliae* και των μεταλλαγμένων στελεχών ΤΔΑΓΙ.Α.3, ΤΔΑΓΙ.Α18 στο θρεπτικό υλικό Rose Bengal, μετά από 79 ημέρες επώασης.

V.dahliae

ΤΔΑΓΙ.Α.3

ΤΔΑΓΙ.Α18

SSN



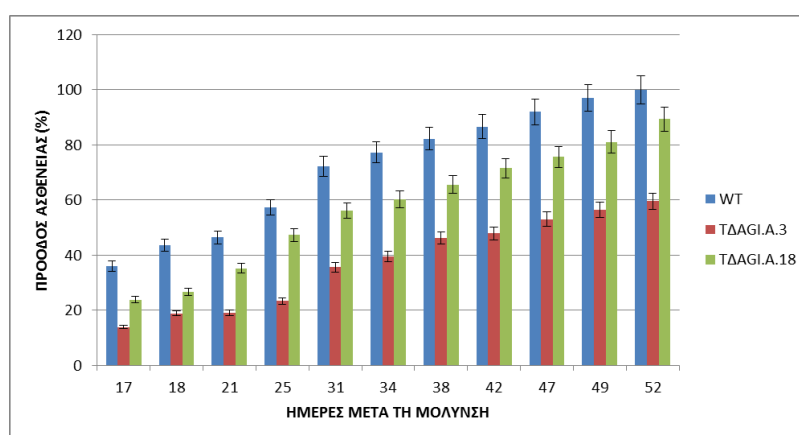
Εικόνα 51: Απεικόνιση των κωνικών φιαλών της υγρής καλλιέργειας SSN και παρουσία σχηματισμού μικροσκληρωτίων.

4.3 ΠΕΙΡΑΜΑΤΑ ΠΑΘΟΓΕΝΕΙΑΣ

Όπως αναφέρεται στην παράγραφο 3.7, πραγματοποιήθηκαν πειράματα παθογένειας σε φυτά αραβίδοψης (*A. thaliana*), σε φυτά μελιτζάνας (*S. melongena* cv. *Black Beauty*) και σε φυτά τομάτας (*S. lycopersicum*). Συνολικά πραγματοποιήθηκαν 4 πειράματα παθογένειας, με τρόπο που περιγράφεται αναλυτικά στην παράγραφο 3.7.

4.3.1 ΑΞΙΟΛΟΓΗΣΗ ΤΩΝ ΔVdLaeA ΣΤΕΛΕΧΩΝ ΣΕ ΦΥΤΑ ΑΡΑΒΙΔΟΨΗΣ

Στο Σχεδιάγραμμα 5 παρουσιάζεται η πρόοδος της ασθένειας σε φυτά αραβίδοψης για χρονικό διάστημα 52 ημερών μετά τη μόλυνση τους με το άγριο στέλεχος *V. dahliae* και τα μεταλλαγμένα στελέχη ΤΔΑΓΙ.Α.3, ΤΔΑΓΙ.Α18. Παρατηρείται το ΤΔΑΓΙ.Α.3 στην αρχή της μόλυνσης από τις 17 έως τις 25 ημέρες μετά τη μόλυνση να παρουσιάζει χαμηλό και σταθερό επίπεδο προσβολής της τάξης 23%. Από τις 31 μέχρι τις 49 ημέρες αυξήθηκε το επίπεδο προσβολής στο 56%. Ενώ στις 52 ημέρες μετά τη μόλυνση είχε τελικό επίπεδο προσβολής 59,5%. Το ΤΔΑΓΙ.Α.3 παρουσίασε το χαμηλότερο ποσοστό προσβολής σε σχέση με το ΤΔΑΓΙ.Α18 και το άγριο στέλεχος *V. dahliae*. Το ΤΔΑΓΙ.Α18 εμφάνισε μεγαλύτερο ποσοστό προσβολής έναντι του ΤΔΑΓΙ.Α.3. Πιο συγκεκριμένα μέχρι τις 18 ημέρες μετά τη μόλυνση το ποσοστό προσβολής ήταν μικρό της τάξης 26,7% ενώ στη συνέχεια το ΤΔΑΓΙ.Α18 εμφάνισε σταδιακή αύξηση της προσβολής από τις 21 μέχρι τις 49 ημέρες μετά τη μόλυνση, με αρχικό ποσοστό προσβολής 35% και τελικό 81%. Ενώ στις 52 ημέρες μετά τη μόλυνση το ποσοστό προσβολής έφτασε στο 89%. Το άγριο στέλεχος *V. dahliae* εμφάνισε το μεγαλύτερο βαθμό μολυσματικότητας έναντι των στελεχών ΤΔΑΓΙ.Α.3, ΤΔΑΓΙ.Α18. Στις πρώτες μέρες μετά τη μόλυνση εμφάνισε μεγάλο ποσοστό προσβολής της τάξης 46% από τις 17 έως τις 21 ημέρες μετά τη μόλυνση. Από τις 25 έως τις 47 ημέρες μετά τη μόλυνση το ποσοστό προσβολής έφτασε στο 92% ποσοστό προσβολής. Στο τέλος των μετρήσεων στις 49 έως τις 52 ημέρες μετά τη μόλυνση το ποσοστό προσβολής αυξήθηκε και ξεπέρασε τα ποσοστά προσβολής των μεταλλαγμένων στο 99%.

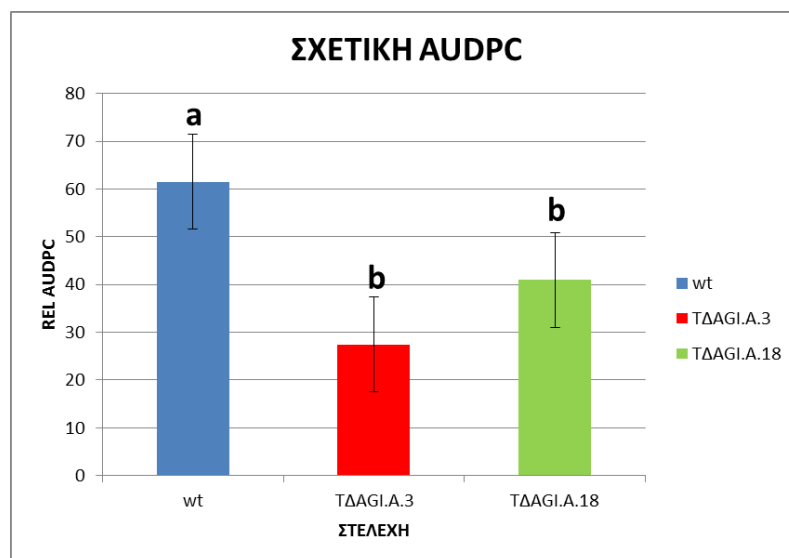


Σχεδιάγραμμα 5: Εξέλιξη της ασθένειας σε φυτά αραβίδοψης μετά από μόλυνση με το άγριο στέλεχος *V. dahliae* και τα μεταλλαγμένα στελέχη ΤΔΑΓΙ.Α.3, ΤΔΑΓΙ.Α18 για χρονικό διάστημα 52 ημερών. Στον οριζόντιο άξονα απεικονίζονται οι ημέρες μετά τη μόλυνση στις οποίες πραγματοποιήθηκε μέτρηση και στον κάθετο άξονα απεικονίζεται η πρόοδος της ασθένειας (%). Οι στήλες διαφορετικών χρωμάτων αντιπροσωπεύουν τα διαφορετικά στελέχη, ενώ σε κάθε στήλη παρουσιάζεται το τυπικό σφάλμα. Το τυπικό σφάλμα υπολογίστηκε με βάση την τυπική απόκλιση από το μέσο όρο για 20 φυτά.

Στο παραπάνω πείραμα η εξέλιξη της ασθένειας που προκλήθηκε από τα υπό μελέτη στελέχη εκφράστηκε ως ποσοστό ασθένειας βάσει AUDPC (ο υπολογισμός του οποίου περιγράφεται στην παράγραφο 3.7). Στον Πίνακα 7 παρουσιάζεται ο υπολογισμός του μέσου όρου της σχετικής AUDPC. Από τον πίνακα αυτό προκύπτει το Σχεδιάγραμμα 6 στο οποίο η στατιστική ανάλυση έδειξε στατιστικά σημαντική διαφορά της σοβαρότητας της ασθένειας μεταξύ του άγριου στελέχους *V. dahliae* και των μεταλλαγμένων ΤΔΑΓΙ.Α.3, ΤΔΑΓΙ.Α18 στελεχών. Ενώ δεν υπάρχει στατιστικά σημαντική διαφορά της σοβαρότητας της ασθένειας μεταξύ του ΤΔΑΓΙ.Α.3 και του μεταλλαγμένου στελέχους ΤΔΑΓΙ.Α18.

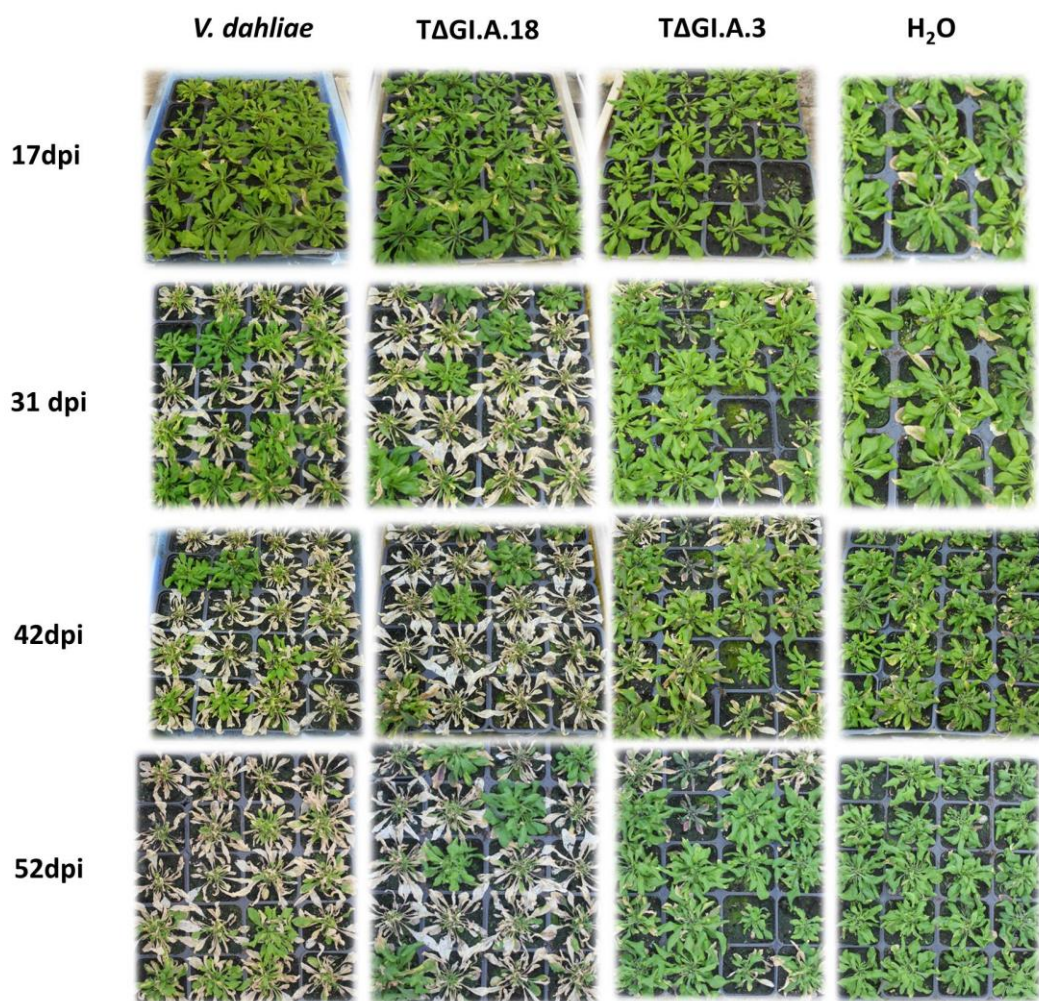
ΣΤΕΛΕΧΟΣ	Μ.Ο.Σχετικής AUDPC	ΤΥΠΙΚΟ ΛΑΘΟΣ	ΦΥΤΑ
WT	a	61,48	20
ΤΔΑΓΙ.Α.3	b	27,39	20
ΤΔΑΓΙ.Α.18	b	40,93	20

Πίνακας 7: Οι τιμές του μέσου όρου της σχετικής AUDPC καθώς και το τυπικό λάθος της σχετικής AUDPC για τα μεταλλαγμένα στελέχη και το άγριο στέλεχος σε 20 φυτά αραβίδωσης.



Σχεδιάγραμμα 6: Σχετική AUDPC του άγριου στελέχους *V.dahliae* και των μεταλλαγμένων στελεχών ΤΔΑΓΙ.Α.3, ΤΔΑΓΙ.Α18 για χρονικό διάστημα 52 ημερών. Στον οριζόντιο άξονα απεικονίζονται τα ονόματα των στελεχών και στον κάθετο άξονα απεικονίζεται η σχετική AUDPC επί της %. Οι στήλες διαφορετικών χρωμάτων αντιπροσωπεύουν τα διαφορετικά στελέχη, ενώ σε κάθε στήλη παρουσιάζεται το τυπικό σφάλμα. Το τυπικό σφάλμα υπολογίστηκε με βάση την τυπική απόκλιση της σχετικής AUDPC για 20 φυτά. Τα διαφορετικά γράμματα επάνω από τις στήλες υποδηλώνουν στατιστικά σημαντική διαφορά, με επίπεδο σημαντικότητας ($p \leq 0.05$).

Παρακάτω παρατίθενται η Εικόνα 52 από τα φυτά αραβίδωσης *A. thaliana* σε διάφορα στάδια της μόλυνσης. Φαίνεται χαρακτηριστικά ο βαθμός προσβολής για κάθε στέλεχος.

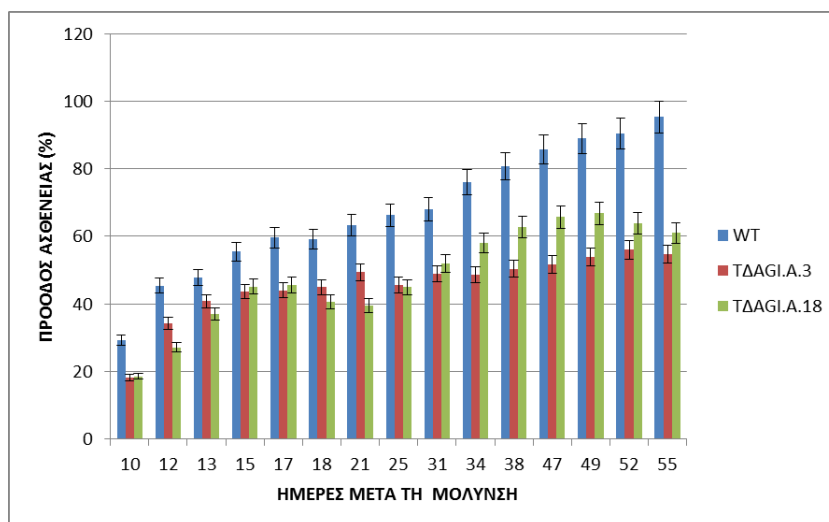


Εικόνα 52: Φυτά *A. thaliana* μολυσμένα με το άγριο και τα μεταλλαγμένα στελέχη TΔAGI.A.3, TΔAGI.A.18, στις 17, 31, 42 και 52 ημέρες μετά τη μόλυνση με αιώρημα κονιδίων 10^7 κον/ml.

4.3.2 ΑΞΙΟΛΟΓΗΣΗ ΤΩΝ Δ*VdLaeA* ΣΤΕΛΕΧΩΝ ΣΕ ΦΥΤΑ ΜΕΛΙΤΖΑΝΑΣ

Στο Σχεδιάγραμμα 7 παρουσιάζεται η πρόοδος της ασθένειας σε φυτά μελιτζάνας για χρονικό διάστημα 55 ημερών μετά τη μόλυνση τους με το άγριο στέλεχος *V. dahliae* και τα μεταλλαγμένα στελέχη TΔAGI.A.3, TΔAGI.A.18. Παρατηρείται ότι το στέλεχος TΔAGI.A.3 εμφάνισε το χαμηλότερο ποσοστό προσβολής σε σχέση με το TΔAGI.A.18 και το *V. dahliae*. Πιο συγκεκριμένα το TΔAGI.A.3 στις 10 ημέρες μετά τη μόλυνση εμφάνισε ποσοστό προσβολής 18%. Από τις 13 μέχρι 31 ημέρες μετά τη μόλυνση εμφάνισε μια σταθερότητα στο ποσοστό προσβολής της τάξης του 45%. Ενώ από τις 34 μέχρι τις 55 ημέρες μετά τη μόλυνση το ποσοστό προσβολής αυξήθηκε ελάχιστα μέχρι το 56% όπου και παρέμεινε σταθερό μέχρι το τέλος των μετρήσεων. Παρατηρώντας το σχεδιάγραμμα φαίνεται ότι το στέλεχος TΔAGI.A.18 στις 12 ημέρες μετά τη μόλυνση παρουσίασε ποσοστό προσβολής 27%. Από τις 13 έως τις 31 ημέρες μετά τη μόλυνση το ποσοστό προσβολής του στέλεχους

ΤΔΑΓΙ.Α.18 αυξανόταν σε όμοιο βαθμό προσβολής με το ΤΔΑΓΙ.Α.3, φτάνοντας στις 31 ημέρες μετά τη μόλυνση το στέλεχος ΤΔΑΓΙ.Α.18 να εμφανίζει ποσοστό προσβολής 51%. Από τις 34 έως τις 55 ημέρες μετά τη μόλυνση ο βαθμός προσβολής του ΤΔΑΓΙ.Α.18 αυξήθηκε με μεγάλους ρυθμούς και διαφοροποιήθηκε από το ΤΔΑΓΙ.Α.3 με τελικό ποσοστό προσβολής στις 55 ημέρες μετά τη μόλυνση 61%. Το *V. dahliae* εμφάνισε το μεγαλύτερο βαθμό προσβολής έναντι των μεταλλαγμένων όπως φαίνεται και στο σχεδιάγραμμα. Στις 10 ημέρες μετά τη μόλυνση εμφάνισε ποσοστό προσβολής 29%. Από τις 12 μέχρι τις 25 ημέρες το ποσοστό προσβολής αυξήθηκε πολύ γρήγορα φτάνοντας στο 66%. Ακόμη από τις 31 έως τις 55 ημέρες μετά τη μόλυνση το ποσοστό προσβολής των φυτών από το *V. dahliae* αυξήθηκε φτάνοντας στη τελική μέτρηση των 55 ημερών μετά την μόλυνση σε ποσοστό προσβολής 95%.

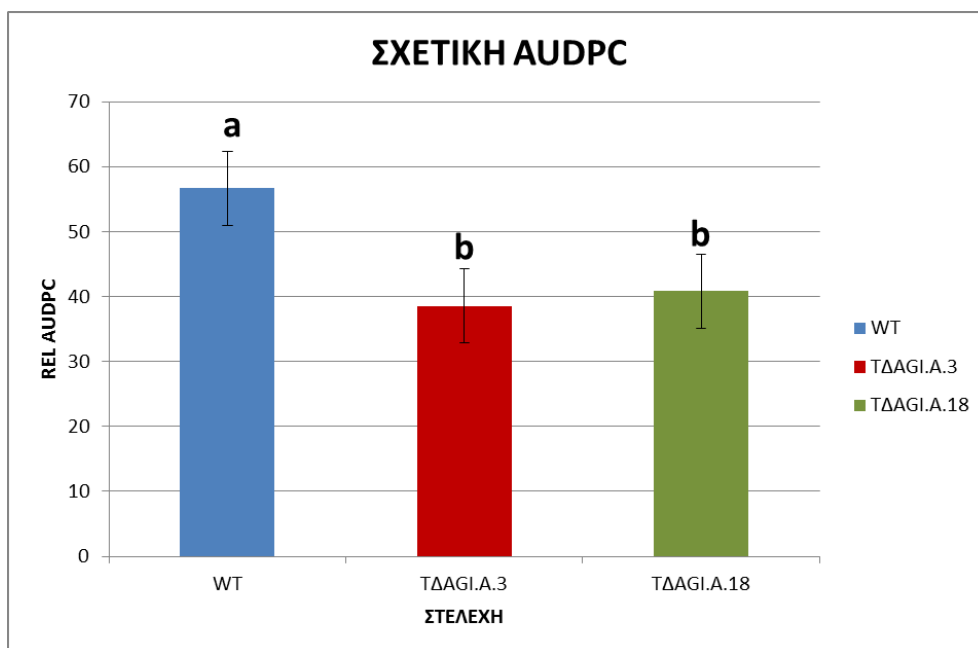


Σχεδιάγραμμα 7: Εξέλιξη της ασθένειας σε φυτά μελιτζάνας μετά από μόλυνση με το άγριο στέλεχος *V. dahliae* και τα μεταλλαγμένα στελέχη ΤΔΑΓΙ.Α.3, ΤΔΑΓΙ.Α.18 για χρονικό διάστημα 55 ημερών. Στον οριζόντιο άξονα απεικονίζονται οι ημέρες μετά τη μόλυνση στις οποίες πραγματοποιήθηκε μέτρηση και στον κάθετο άξονα απεικονίζεται η πρόοδος της ασθένειας επί (%). Οι στήλες διαφορετικών χρωμάτων αντιπροσωπεύουν τα διαφορετικά στελέχη, ενώ σε κάθε στήλη παρουσιάζεται το τυπικό σφάλμα. Το τυπικό σφάλμα υπολογίστηκε με βάση την τυπική απόκλιση από το μέσο όρο για 14 φυτά.

Στο παραπάνω πείραμα η εξέλιξη της ασθένειας που προκλήθηκε από τα υπό μελέτη στελέχη εκφράστηκε ως ποσοστό ασθένειας βάσει AUDPC (ο υπολογισμός του οποίου περιγράφεται στην παράγραφο 3.7). Στον πίνακα που ακολουθεί Πίνακας 8 παρουσιάζεται ο υπολογισμός του μέσου όρου της σχετικής AUDPC καθώς και του τυπικού λάθους της σχετικής AUDPC για τα 14 φυτά που μολύνθηκαν από το άγριο στέλεχος *V. dahliae* και τα μεταλλαγμένα στελέχη ΤΔΑΓΙ.Α.3, ΤΔΑΓΙ.Α.18. Από τον πίνακα αυτό προκύπτει το Σχεδιάγραμμα 8 στο οποίο η στατιστική ανάλυση έδειξε ότι δεν υπάρχει στατιστικά σημαντική διαφορά της σοβαρότητας της ασθένειας μεταξύ των μεταλλαγμένων στελεχών ΤΔΑΓΙ.Α.3, ΤΔΑΓΙ.Α.18, ενώ το *V. dahliae* παρουσιάζει στατιστικά σημαντική διαφορά έναντι των μεταλλαγμένων στελεχών.

ΣΤΕΛΕΧΟΣ	Μ.Ο Σχετικής AUDPC	ΤΥΠΙΚΟ ΛΑΘΟΣ	ΦΥΤΑ
WT	a 55,29	1,84	14
ΤΔΑΓΙ.Α.3	b 46,78	4,47	14
ΤΔΑΓΙ.Α.18	b 46,00	4,44	14

Πίνακας 8: Οι τιμές του μέσου όρου της σχετικής AUDPC καθώς και το τυπικό λάθος της σχετικής AUDPC για τα μεταλλαγμένα στελέχη και το άγριο στέλεχος σε 14 φυτά μελιτζάνας

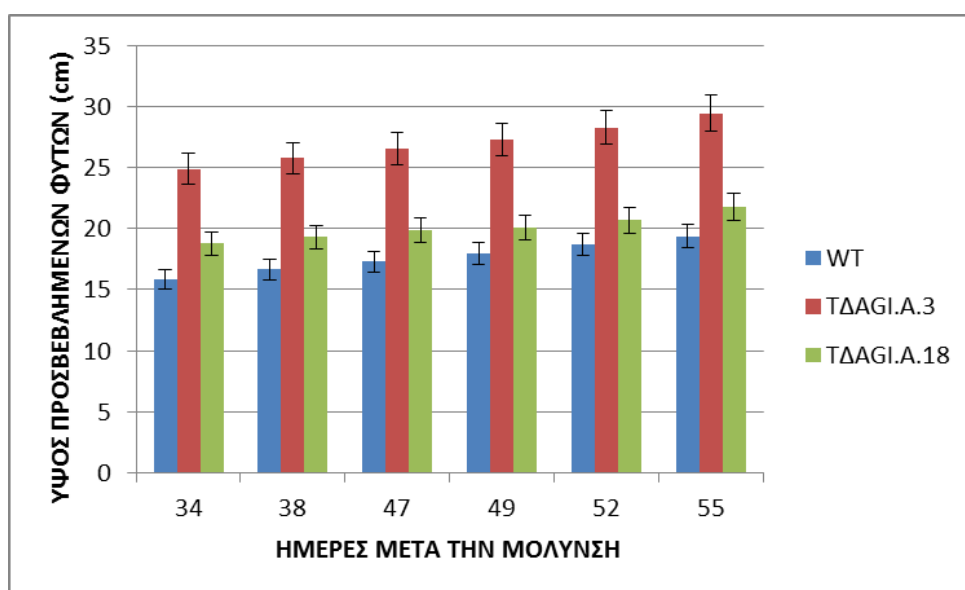


Σχεδιάγραμμα 8: Σχετική AUDPC του άγριου στελέχους *V. dahliae* και των μεταλλαγμένων στελεχών ΤΔΑΓΙ.Α.3, ΤΔΑΓΙ.Α.18 για χρονικό διάστημα 55 ημερών. Στον οριζόντιο άξονα απεικονίζονται τα ονόματα των στελεχών και στον κάθετο άξονα απεικονίζεται η σχετική AUDPC επί (%). Οι στήλες διαφορετικών χρωμάτων αντιπροσωπεύουν τα διαφορετικά στελέχη, ενώ σε κάθε στήλη παρουσιάζεται το τυπικό σφάλμα. Το τυπικό σφάλμα υπολογίστηκε με βάση την τυπική απόκλιση της σχετικής AUDPC για 14 φυτά. Τα διαφορετικά γράμματα επάνω από τις στήλες υποδηλώνουν στατιστικά σημαντική διαφορά, με επίπεδο σημαντικότητας ($p \leq 0.05$).

Μέτρηση ύψους των προσβεβλημένων φυτών μελιτζάνας

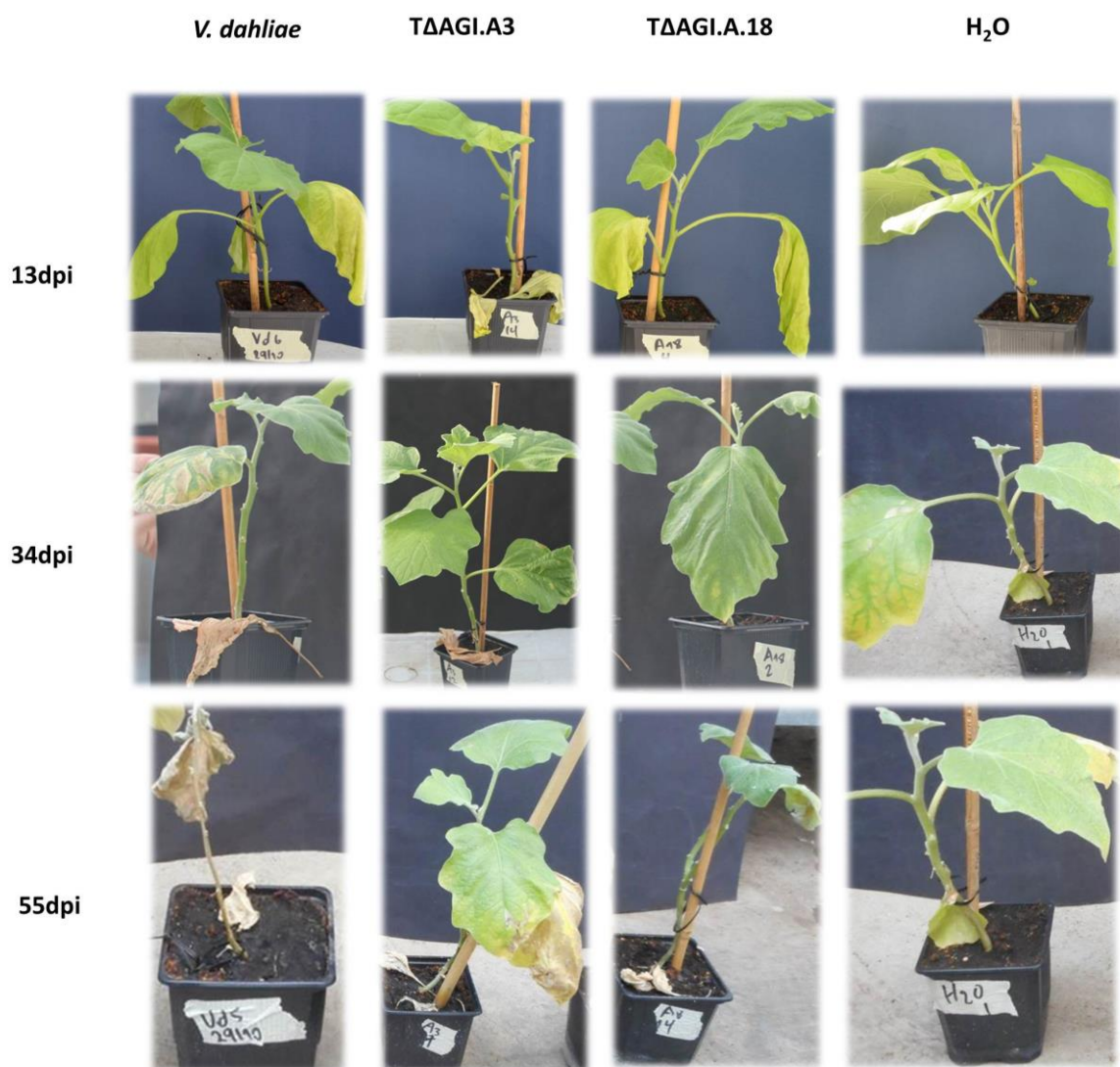
Στο Σχεδιάγραμμα 9 παρουσιάζεται η πρόοδος του ύψους σε φυτά μελιτζάνας για χρονικό διάστημα 55 ημερών μετά τη μόλυνση τους με το άγριο στέλεχος *V. dahliae* και τα μεταλλαγμένα στελέχη ΤΔΑΓΙ.Α.3, ΤΔΑΓΙ.Α.18. Παρατηρείται ότι το άγριο στέλεχος *V. dahliae* είχε τη μικρότερη ανάπτυξη στις ημέρες των μετρήσεων μετά τη μόλυνση μέχρι το τέλος του πειράματος σε σχέση με τα μεταλλαγμένα που παρουσίασαν μεγαλύτερη ανάπτυξη. Πιο συγκεκριμένα το *V. dahliae* από τις 34 μέχρι τις 38 ημέρες μετά τη μόλυνση είχε ύψος 16,6 εκατοστά. Ενώ από τις 47 έως τις 55 ημέρες μετά τη μόλυνση έφτασε στο ύψος των 19,3 εκατοστών. Στο ΤΔΑΓΙ.Α.18 μεταλλαγμένο στέλεχος από τις 34 έως 38 ημέρες μετά τη μόλυνση είχε ύψος 19,3 εκατοστά. Από τις 47 μέχρι τις 55 ημέρες το ΤΔΑΓΙ.Α.18 διαφοροποιήθηκε από το άγριο στέλεχος *V. dahliae* σε μικρή ένταση, έφτασε

στο ύψος 22 εκατοστών στην τελευταία μέτρηση που πραγματοποιήθηκε. Το ΤΔΑΓΙ.Α.3 είχε τη μεγαλύτερη διαφοροποίηση στην ανάπτυξη, εμφάνισε το μεγαλύτερο βαθμό ανάπτυξης των φυτών. Πιο συγκεκριμένα στις 34 ημέρες μετά τη μόλυνση εμφάνισε ύψος 24,8 εκατοστά. Στις 38 έως τις 47 ημέρες είχαν ύψος τα φυτά 26,5 εκατοστά. Στις 49 έως 52 ημέρες απέκτησαν ύψος 28,2 εκατοστά. Ενώ στο τέλος των μετρήσεων στις 55 ημέρες μετά την μόλυνση έφτασαν στο ύψος των 29,4 εκατοστών. Το στέλεχος ΤΔΑΓΙ.Α.3 δεν επηρέασε με τη μόλυνση στο ρυθμό και στο βαθμό την ανάπτυξη των φυτών. Τη μεγαλύτερη προσβολή και τη μείωση στην ανάπτυξη την εμφάνισε το άγριο στέλεχος *V.dahliae*.



Σχεδιάγραμμα 9: Εξέλιξη του ύψους των φυτών μελιτζάνας μετά από μόλυνση με το άγριο στέλεχος *V.dahliae* και τα μεταλλαγμένα στελέχη ΤΔΑΓΙ.Α.3, ΤΔΑΓΙ.Α.18 για χρονικό διάστημα 55 ημερών. Στον οριζόντιο άξονα απεικονίζονται οι ημέρες μετά τη μόλυνση στις οποίες πραγματοποιήθηκε μέτρηση και στον κάθετο άξονα απεικονίζεται η πρόοδος του ύψους σε φυτά μελιτζάνας. Οι στήλες διαφορετικών χρωμάτων αντιπροσωπεύουν τα διαφορετικά στελέχη, ενώ σε κάθε στήλη παρουσιάζεται το τυπικό σφάλμα. Το τυπικό σφάλμα υπολογίστηκε με βάση την τυπική απόκλιση από το μέσο όρο για 14 φυτά.

Παρακάτω παρατίθεται η Εικόνα 53, από φυτά μελιτζάνας σε διάφορα στάδια μετά τη μόλυνσης κατά τη διάρκεια των μετρήσεων. Φαίνεται χαρακτηριστικά ο βαθμός προσβολής για κάθε στέλεχος.

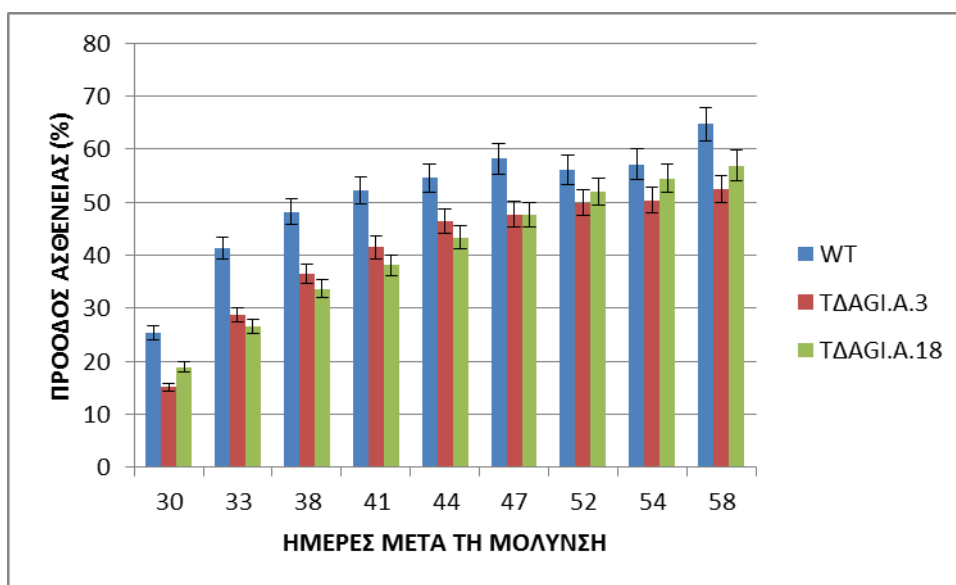


Εικόνα 53: Φυτά μελιτζάνας μολυσμένα με το άγριο στέλεχος *V.dahliae* και τα μεταλλαγμένα στελέχη ΤΔΑΓΙ.Α.3, ΤΔΑΓΙ.Α18 στις 13, 34 και 55 ημέρες μετά τη μόλυνση με αιώρημα κονιδίων 10^7 κον/ml.

4.3.3 ΑΞΙΟΛΟΓΗΣΗ ΤΩΝ Δ*VdLaeA* ΣΤΕΛΕΧΩΝ ΣΕ ΦΥΤΑ ΤΟΜΑΤΑΣ

Στο Σχεδιάγραμμα 10 παρουσιάζεται η πρόοδος της ασθένειας σε φυτά τομάτας για χρονικό διάστημα 58 ημερών μετά τη μόλυνση τους με το άγριο στέλεχος *V. dahliae* και τα μεταλλαγμένα στελέχη ΤΔΑΓΙ.Α.3, ΤΔΑΓΙ.Α18. Στο πείραμα αυτό καθυστέρησε η εμφάνιση των συμπτωμάτων. Τα συμπτώματα αυτά εμφανίστηκαν 30 ημέρες μετά τη μόλυνση. Το μεγαλύτερο ποσοστό προσβολής εμφάνισε το *V. dahliae*. Τα μεταλλαγμένα στελέχη εμφάνισαν παρόμοιο ποσοστό προσβολής κατά τη διάρκεια των μετρήσεων. Πιο συγκεκριμένα το *V. dahliae* στις 30 ημέρες μετά τη μόλυνση εμφάνισε ποσοστό προσβολής 25%. Κατά την διάρκεια των υπολοίπων μετρήσεων το ποσοστό προσβολής αυξήθηκε. Από τις 33 μέχρι τις 47 ημέρες μετά τη μόλυνση το επίπεδο προσβολής έφτασε το 57%. Στη συνέχεια από τις 47 μέχρι τις 54 ημέρες μετά τη μόλυνση υπήρξε μια σταθερότητα στο ποσοστό της προσβολής στη τιμή του 58%. Στο τέλος των μετρήσεων το ποσοστό

προσβολής έφτασε το 65%. Το ΤΔΑΓΙ.Α.3 και το ΤΔΑΓΙ.Α.18 στις πρώτες μετρήσεις εμφάνισαν χαμηλό ποσοστό προσβολής στα 17%. Στη συνέχεια το ΤΔΑΓΙ.Α.3 εμφάνισε μεγαλύτερο βαθμό προσβολής από το ΤΔΑΓΙ.Α.18 για ένα διάστημα μετρήσεων από τις 33 μέχρι 47 ημέρες μετά τη μόλυνση, εμφάνισε ποσοστό προσβολής στα 47%. Στο τέλος των μετρήσεων στις 58 ημέρες το ΤΔΑΓΙ.Α.3 εμφάνισε 53% ποσοστό προσβολής. Το ΤΔΑΓΙ.Α.18 στις 30 ημέρες μετά τη μόλυνση εμφάνισε 19% ποσοστό προσβολής. Από τις 33 μέχρι τις 47 ημέρες το ποσοστό προσβολής αυξήθηκε σταδιακά από το 26% στο 47,4%. Ενώ στη τελευταία μέτρηση είχε 57% ποσοστό προσβολής.

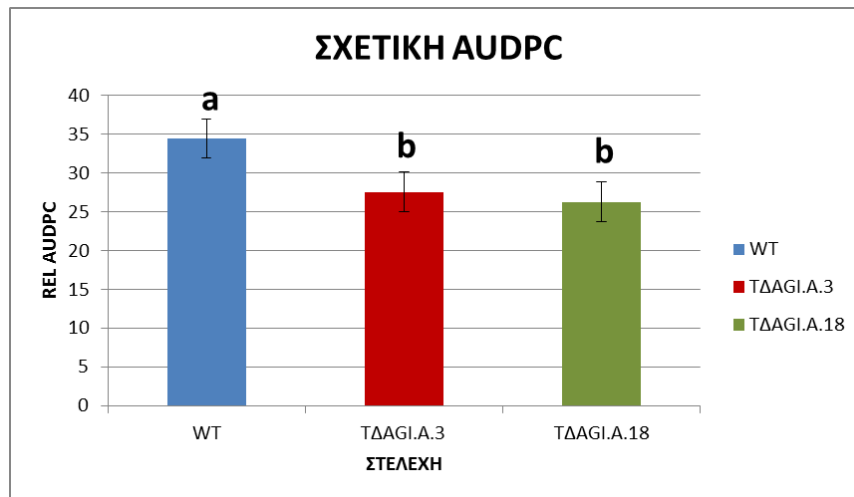


Σχεδιάγραμμα 10: Εξέλιξη της ασθένειας σε φυτά τομάτας μετά από μόλυνση με το άγριο στέλεχος *V.dahliae* και τα μεταλλαγμένα στελέχη ΤΔΑΓΙ.Α.3, ΤΔΑΓΙ.Α.18 για χρονικό διάστημα 58 ημερών. Στον οριζόντιο άξονα απεικονίζονται οι ημέρες μετά τη μόλυνση στις οποίες πραγματοποιήθηκε μέτρηση και στον κάθετο άξονα απεικονίζεται η πρόοδος της ασθένειας (%). Οι στήλες διαφορετικών χρωμάτων αντιπροσωπεύουν τα διαφορετικά στελέχη, ενώ σε κάθε στήλη παρουσιάζεται το τυπικό σφάλμα. Το τυπικό σφάλμα υπολογίστηκε με βάση την τυπική απόκλιση από το μέσο όρο για 24 φυτά.

Στο παραπάνω πείραμα η εξέλιξη της ασθένειας που προκλήθηκε από τα υπό μελέτη στελέχη εκφράστηκε ως ποσοστό ασθένειας βάσει AUDPC (ο υπολογισμός του οποίου περιγράφεται στην παράγραφο 3.7). Στον Πίνακα 9 παρουσιάζεται ο υπολογισμός του μέσου όρου της σχετικής AUDPC καθώς και του τυπικού λάθους της σχετικής AUDPC για τα 24 φυτά που μολύνθηκαν με το άγριο και τα μεταλλαγμένα στελέχη. Από τον πίνακα αυτό προκύπτει το Σχεδιάγραμμα 11 στο οποίο η στατιστική ανάλυση έδειξε στατιστικά σημαντική διαφορά της σοβαρότητας της ασθένειας μεταξύ του άγριου και των μεταλλαγμένων στελεχών ΤΔΑΓΙ.Α.3, ΤΔΑΓΙ.Α.18.

ΣΤΕΛΕΧΟΣ	Μ.Ο ΣΧΕΤΙΚΗ AUDPC	ΤΥΠΙΚΟ ΛΑΘΟΣ	ΦΥΤΑ
WT	a 29,23	3,02	24
ΤΔΑΓΙ.Α.3	b 30,18	1,52	24
ΤΔΑΓΙ.Α.18	b 26,67	1,49	24

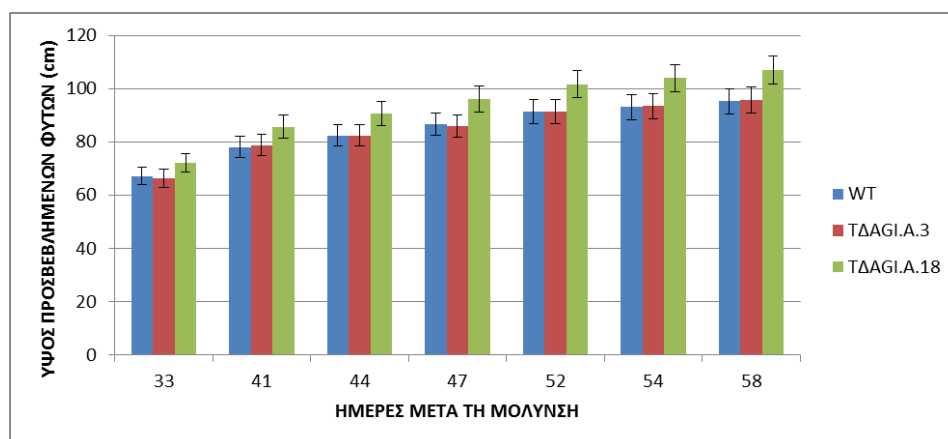
Πίνακας 9: Οι τιμές του μέσου όρου της σχετικής AUDPC καθώς και του τυπικού λάθους της σχετικής AUDPC για τα μεταλλαγμένα στελέχη και το άγριο στέλεχος σε 24 φυτά τομάτας.



Σχεδιάγραμμα 11: Σχετική AUDPC του άγριου στελέχους *V.dahliae* και των μεταλλαγμένων στελεχών ΤΔAGI.A.3, ΤΔAGI.A18 για χρονικό διάστημα 58 ημερών. Στον οριζόντιο άξονα απεικονίζονται τα ονόματα των στελεχών και στον κάθετο άξονα απεικονίζεται η σχετική AUDPC επί της %. Οι στήλες διαφορετικών χρωμάτων αντιπροσωπεύουν τα διαφορετικά στελέχη, ενώ σε κάθε στήλη παρουσιάζεται το τυπικό σφάλμα. Το τυπικό σφάλμα υπολογίστηκε με βάση την τυπική απόκλιση της σχετικής AUDPC για 24 φυτά. Τα διαφορετικά γράμματα επάνω από τις στήλες υποδηλώνουν τη μη ύπαρξη στατιστικής σημαντικής διαφοράς, με επίπεδο σημαντικότητας (p) ≤ 0.05 .

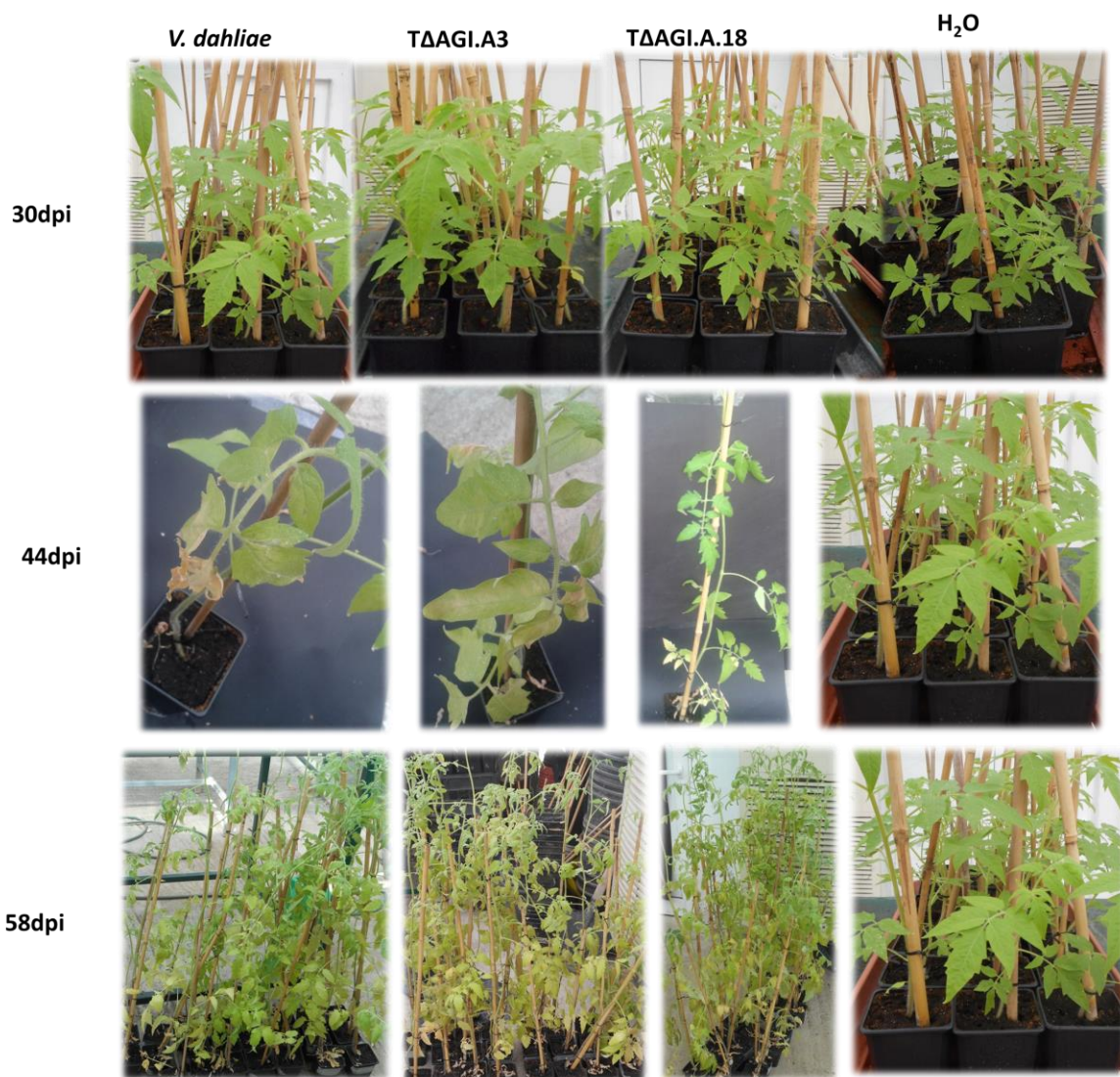
Μέτρηση ύψους των προσβεβλημένων φυτών τομάτας

Στο Σχεδιάγραμμα 12 παρουσιάζεται η πρόοδος του ύψους σε φυτά τομάτας για χρονικό διάστημα 58 ημερών μετά τη μόλυνση τους με το άγριο στέλεχος *V.dahliae* και τα μεταλλαγμένα στελέχη ΤΔAGI.A.3, ΤΔAGI.A18. Το ΤΔAGI.A18 εμφάνισε φυτά με το μεγαλύτερο ύψος. Τα φυτά τομάτας εμφάνισαν παρόμοιο βαθμό προσβολής σε όλα τα στελέχη. Το στέλεχος ΤΔAGI.A18 στην τελευταία μέτρηση στις 58 ημέρες μετά τη μόλυνση εμφάνισε μέγιστο ύψος 107,4 εκατοστά. Το άγριο στέλεχος *V.dahliae* και το ΤΔAGI.A.3 στα μολυσμένα φυτά έφτασαν τα 95,2 εκατοστά. Η μόλυνση στα φυτά της τομάτας με το στέλεχος ΤΔAGI.A18 δεν επηρέασε σε μεγάλο βαθμό την ανάπτυξη των φυτών όπως φαίνεται και στο σχεδιάγραμμα που ακολουθεί.



Σχεδιάγραμμα 12: Εξέλιξη του ύψους των φυτών τομάτας μετά από μόλυνση με το άγριο στέλεχος *V. dahliae* και τα μεταλλαγμένα στελέχη ΤΔAGI.A.3, ΤΔAGI.A18 για χρονικό διάστημα 58 ημερών. Στον οριζόντιο άξονα απεικονίζονται οι ημέρες μετά τη μόλυνση στις οποίες πραγματοποιήθηκε μέτρηση και στον κάθετο άξονα απεικονίζεται η πρόοδος του ύψους σε φυτά τομάτας. Οι στήλες διαφορετικών χρωμάτων αντιπροσωπεύουν τα διαφορετικά στελέχη, ενώ σε κάθε στήλη παρουσιάζεται το τυπικό σφάλμα. Το τυπικό σφάλμα υπολογίστηκε με βάση την τυπική απόκλιση από το μέσο όρο για 24 φυτά.

Παρακάτω παρατίθενται η Εικόνα 54 από φυτά τομάτας σε διάφορα στάδια μετά από 30, 44 και 58 ημέρες μετά τη μόλυνση κατά τη διάρκεια των μετρήσεων. Φαίνεται ο βαθμός προσβολής για κάθε στελέχος.

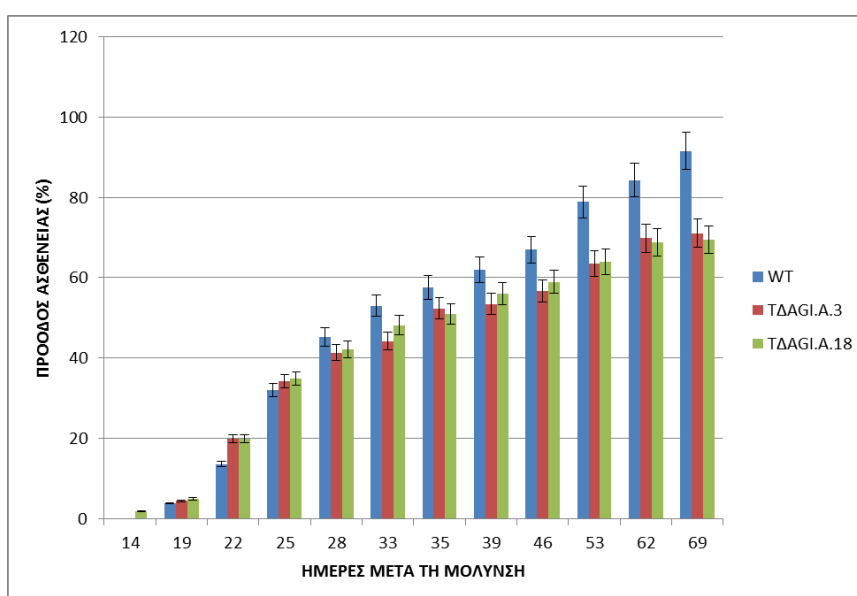


Εικόνα 54: Φυτά τομάτας, μολυσμένα με το άγριο και τα μεταλλαγμένα στελέχη TΔAGI.A.3, TΔAGI.A.18, στις 30, 44 και 58 ημέρες μετά τη μόλυνση με αιώρημα κονιδίων 10^7 κον/ml.

4.3.4 ΑΞΙΟΛΟΓΗΣΗ ΤΩΝ Δ*VdLaeA* ΣΤΕΛΕΧΩΝ ΣΕ ΦΥΤΑ ΜΕΛΙΤΖΑΝΑΣ ΜΕ ΜΟΛΥΝΣΗ ΜΕ ΜΙΚΡΟΣΚΛΗΡΩΤΙΑ

Στο Σχεδιάγραμμα 13 παρουσιάζεται η πρόοδος της ασθένειας σε φυτά μελιτζάνας για χρονικό διάστημα 69 ημερών μετά τη μόλυνση τους με μικροσκληρώτια του άγριου στελέχους *V. dahliae* και των μεταλλαγμένα στελέχη TΔAGI.A.3, TΔAGI.A.18. Παρατηρείται ότι στο πείραμα με τα μικροσκληρώτια, το άγριο στέλεχος *V. dahliae*

εμφάνισε το μεγαλύτερο ποσοστό προσβολής σε σχέση με τα υπόλοιπα στελέχη. Πιο συγκεκριμένα το *V.dahliae*. Από τις 28 μέχρι τις 35 ημέρες μετά τη μόλυνση το ποσοστό της προσβολής αυξήθηκε με γρήγορους ρυθμούς και έφθασε 57,5%. Από τις 39 μέχρι τις 46 ημέρες το ποσοστό προσβολής έφτασε στο 66,9%. Από τις 53 μέχρι τις 62 ημέρες το ποσοστό προσβολής έφθασε 84,2%. Ενώ στη τελευταία μέτρηση στις 69 ημέρες μετά τη μόλυνση το ποσοστό έφθασε το 91,5%. Το ΤΔΑΓΙ.Α.3, ΤΔΑΓΙ.Α18 κατά τη διάρκεια της μόλυνσης εμφάνισαν παρόμοιο ρυθμό προσβολής. Συγκεκριμένα από την έναρξη της μόλυνσης μέχρι τις 19 ημέρες τα φυτά εμφάνισαν χαμηλό ποσοστό προσβολής της τάξης του 5%. Από τις 22 μέχρι τις 35 ημέρες μετά τη μόλυνση με τα μικροσκληρώτια τα φυτά εμφάνισαν σταδιακή αύξηση του ποσοστού προσβολής φτάνοντας το 52%. Από τις 39 μέχρι 60 ημέρες παρατηρήθηκε ένα μικρό ποσοστό αύξησης σε σχέση με το άγριο στέλεχος *V. dahliae* φτάνοντας το 69%.

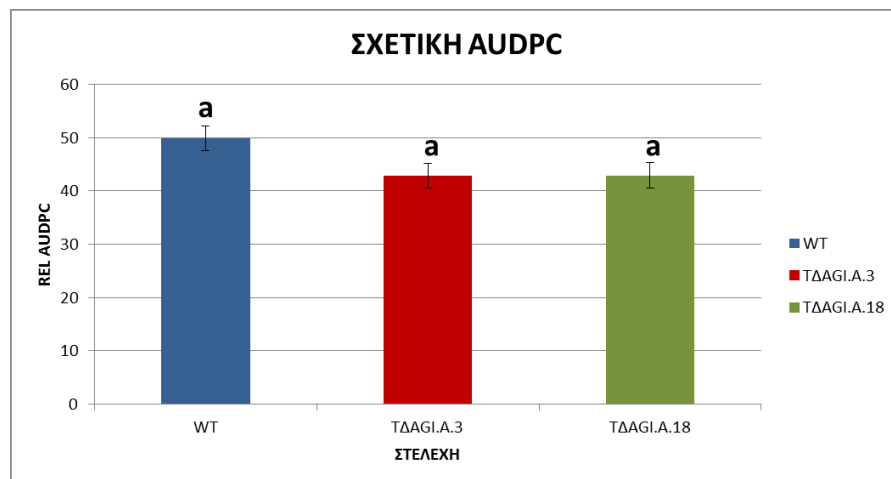


Σχεδιάγραμμα 13: Εξέλιξη της ασθένειας σε φυτά μελιτζάνας μετά από μόλυνση με μικροσκληρώτια στο χώμα του άγριου στέλεχος *V. dahliae* και των μεταλλαγμένων στελεχών ΤΔΑΓΙ.Α.3, ΤΔΑΓΙ.Α18 για χρονικό διάστημα 69 ημερών. Στον οριζόντιο άξονα απεικονίζονται οι ημέρες μετά τη μόλυνση στις οποίες πραγματοποιήθηκε μέτρηση και στον κάθετο άξονα απεικονίζεται η πρόοδος της ασθένειας σε φυτά μελιτζάνας. Οι στήλες διαφορετικών χρωμάτων αντιπροσωπεύουν τα διαφορετικά στελέχη, ενώ σε κάθε στήλη παρουσιάζεται το τυπικό σφάλμα. Το τυπικό σφάλμα υπολογίστηκε με βάση την τυπική απόκλιση από το μέσο όρο για 30 φυτά.

Στο παραπάνω πείραμα η εξέλιξη της ασθένειας που προκλήθηκε από τα υπό μελέτη στελέχη εκφράστηκε ως ποσοστό ασθένειας βάσει AUDPC (ο υπολογισμός του οποίου περιγράφεται στην παράγραφο 3.7). Στον Πίνακα 10 παρουσιάζεται ο υπολογισμός του μέσου όρου της σχετικής AUDPC καθώς και του τυπικού λάθους της σχετικής AUDPC για τα 30 φυτά. Από τον πίνακα αυτό προκύπτει το Σχεδιάγραμμα 14 στο οποίο η στατιστική ανάλυση δεν έδειξε στατιστικά σημαντική διαφορά της σοβαρότητας της ασθένειας μεταξύ του άγριου και των μεταλλαγμένων στελεχών.

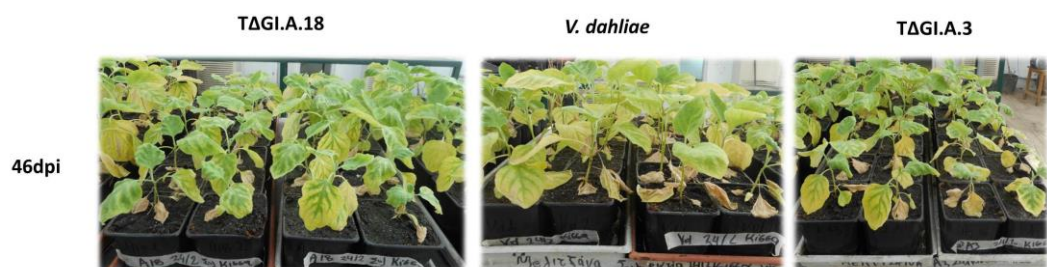
ΣΤΕΛΕΧΟΣ		Μ.Ο ΣΧΕΤΙΚΗ Α ΤΥΠΙΚΟ Λ/ΦΥΤΑ		
WT	a	49,90	0,77	30
ΤΔΑΓΙ.Α.3	a	42,82	0,74	30
ΤΔΑΓΙ.Α.18	a	42,94	1,04	30

Πίνακας 10: Οι τιμές του μέσου όρου της σχετικής AUDPC καθώς και το τυπικό λάθος της σχετικής AUDPC για τα μεταλλαγμένα στελέχη και το άγριο στέλεχος σε 24 φυτά τομάτας



Σχεδιάγραμμα 14: Σχετική AUDPC του άγριου στελέχους *V.dahliae* και των μεταλλαγμένων στελεχών ΤΔΑΓΙ.Α.3, ΤΔΑΓΙ.Α.18 για χρονικό διάστημα 69 ημερών. Στον οριζόντιο άξονα απεικονίζονται τα ονόματα των στελεχών και στον κάθετο άξονα απεικονίζεται η σχετική AUDPC επί της %. Οι στήλες διαφορετικών χρωμάτων αντιπροσωπεύουν τα διαφορετικά στελέχη, ενώ σε κάθε στήλη παρουσιάζεται το τυπικό σφάλμα. Το τυπικό σφάλμα υπολογίστηκε με βάση την τυπική απόκλιση της σχετικής AUDPC για 30 φυτά. Τα διαφορετικά γράμματα επάνω από τις στήλες υποδηλώνουν την ύπαρξη στατιστικής σημαντικής διαφοράς, με επίπεδο σημαντικότητας (P) ≤ 0.05 .

Παρακάτω παρατίθεται η Εικόνα 55 από φυτά τομάτας σε διάφορα στάδια μετά τη μόλυνσης κατά τη διάρκεια των μετρήσεων. Φαίνεται χαρακτηριστικά ο βαθμός προσβολής για κάθε στέλεχος.



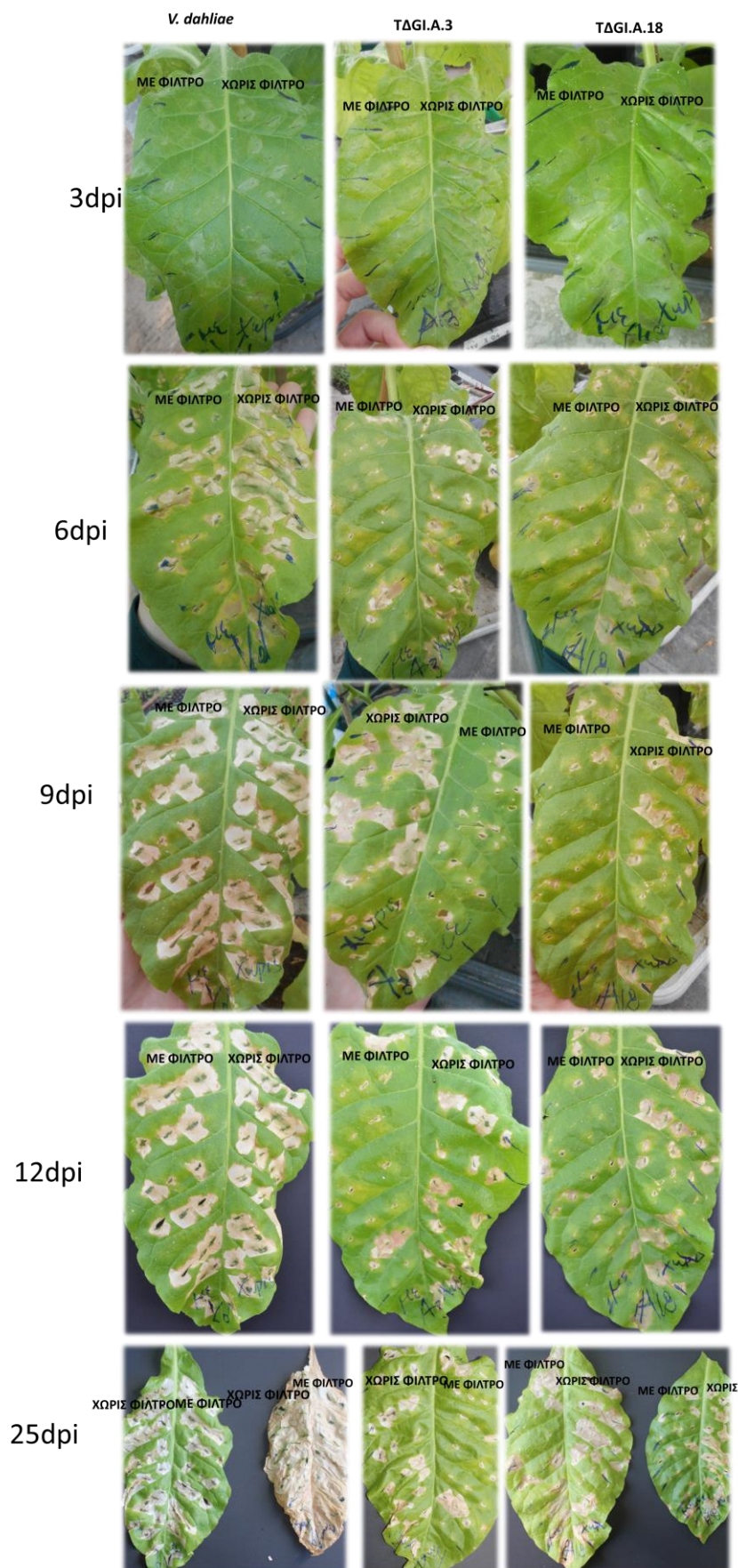
Εικόνα 55: Φυτά μελιτζάνας μολυσμένα με σκληρόττια στο χώμα με το άγριο και τα μεταλλαγμένα στελέχη ΤΔΑΓΙ.Α.3, ΤΔΑΓΙ.Α.18 στις 46 ημέρες μετά τη μόλυνση.



Εικόνα 56: Προσβεβλημένοι βλαστοί μελιτζάνας με το άγριο στέλεχος του μύκητα *V.dahliae*, όπου παρουσιάζουν καστανό μεταχρωματισμό στα αγγεία του, στις 69 ημέρες μετά τη μόλυνση.

4.4 ΚΥΤΤΑΡΙΚΟΣ ΘΑΝΑΤΟΣ ΣΕ ΦΥΛΛΑ ΚΑΠΝΟΥ

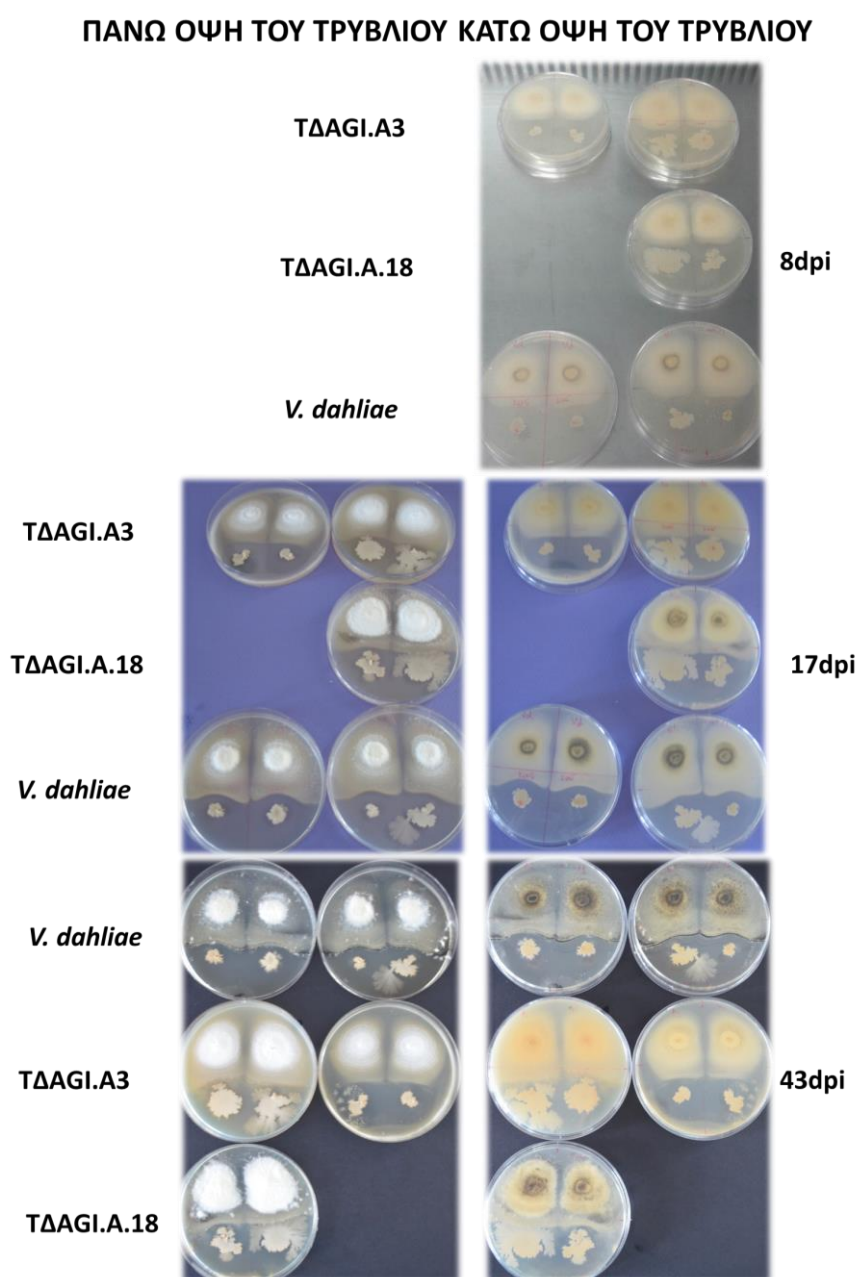
Για τη διερεύνηση της ικανότητας του άγριου στελέχους του μύκητα *V. dahliae* και των μεταλλαγμένων στελεχών ΤΔΑΓΙ.Α.3, ΤΔΑΓΙ.Α18 να προκαλούν κυτταρικό θάνατο έγινε έγχυση αιωρήματος κονιδίων σε φύλλα καπνού τόσο με τη χρήση φίλτρου όσο και χωρίς. Το ένα αιώρημα είχε κονίδια, το άλλο δεν είχε κονίδια ήταν φιλτραρισμένο και παρασκευάστηκε όπως περιγράφεται στην παράγραφο 3.8. Παρακάτω παρατίθεται η Εικόνα 57 από τα φύλλα καπνού στις 3, 6, 9, 12 και 25 ημέρες μετά τη μόλυνση κατά τη διάρκεια των παρατηρήσεων. Φαίνεται χαρακτηριστικά η νέκρωση για κάθε βαθμό κυτταρικού θανάτου στα φύλλα καπνού εμφάνισε το άγριο στέλεχος τόσο με τη χρήση φίλτρου όσο και χωρίς. Από τα μεταλλαγμένα μεγαλύτερη νέκρωση στα φύλλα καπνού εμφάνισε ΤΔΑΓΙ.Α18 χωρίς τη χρήση του φίλτρου. Ενώ το στέλεχος ΤΔΑΓΙ.Α.3 εμφάνισε νέκρωση στα φύλλα καπνού αλλά σε μικρότερο βαθμό όπως φαίνεται και στην εικόνα.



Εικόνα 57: Φύλλα καπνού στις 3, 6, 9, 12 και 25 ημέρες μετά τη μόλυνση από τα *V. dahliae* και τα μεταλλαγμένα στελέχη ΤΔΑΓΙ.Α.3, ΤΔΑΓΙ.Α.18.

4.5 ΦΑΙΝΟΤΥΠΙΚΗ ΑΞΙΟΛΟΓΗΣΗ ΤΗΣ ΠΑΡΕΜΠΟΔΙΣΗΣ ΤΩΝ Δ*VdLaeA* ΣΤΕΛΕΧΩΝ ΑΠΟ ΤΟ ΑΝΤΑΓΩΝΙΣΤΙΚΟ ΒΑΚΤΗΡΙΟ K-165

Για τη διερεύνηση της παρεμποδιστικής ικανότητας του K165 ενάντια στην ανάπτυξη του άγριου στελέχους του μύκητα *V. dahliae* και των μεταλλαγμένων στελεχών ΤΔΑΓΙ.Α.3, ΤΔΑΓΙ.Α.18 πραγματοποιήθηκε πείραμα *in vitro* όπως περιγράφεται στην παράγραφο 3.10. Το K165 προκαλεί έντονη παρεμπόδιση τόσο στη μυκηλιακή ανάπτυξη όσο και στην ανάπτυξη των σκληρωτίων του άγριου αλλά και των μεταλλαγμένων στελεχών. Αυτό υποδηλώνει ότι στο γονίδιο *VdLaeA* δεν υπεισέρχεται στην αλληλεπίδραση του K-165 με το *V. dahliae* και στην παρεμπόδιση που δημιουργεί στο μύκητα (Εικόνα 58).



Εικόνα 58: Απεικόνιση της πάνω και κάτω όψης των τρυβλίων στις 8,17 και43 ημέρες επώασης του *V. dahliae* και των μεταλλαγμένων στελεχών ΤΔΑΓΙ.Α.3, ΤΔΑΓΙ.Α.18 παράλληλα με το K-165.

5. ΣΥΖΗΤΗΣΗ–ΣΥΜΠΕΡΑΣΜΑΤΑ

Οι ασθένειες που προκαλούνται από τους μύκητες του γένους *Verticillium spp.* είναι δύσκολο να ελεγχθούν και η δυσκολία αυτή βασίζεται σε ένα σύμπλοκο παραγόντων όπως η αδυναμία ελέγχου της ασθένειας με τα μυκητοκτόνα από τη στιγμή που ο μύκητας εισέλθει και αποικίσει τα αγγεία του ξύλου, το μεγάλο χρονικό διάστημα ζωής των οργάνων επιβίωσης του παθογόνου (μικροσκληρώτια στο έδαφος) και το μεγάλο εύρος ξενιστών που προσβάλλει.

Η ανάγκη εύρεσης νέων εναλλακτικών μεθόδων αντιμετώπισης της ασθένειας οδήγησε στη διενέργεια πολλών ερευνητικών εργασιών για τον καθορισμό παραγόντων που επιδρούν στην παθογένεια ή τη μολυσματικότητα. Μύκητες του γένους *Verticillium spp.* αλλά και πολλά άλλα παθογόνα υπεύθυνα αδρομυκώσεων, έχουν αποτελέσει αντικείμενο έρευνας πολλών εργασιών μέσω σύγκρισης άγριων στελεχών με μεταλλαγμένα στελέχη που είχαν προκύψει από χημική UV μεταλλαξογένεση και είχαν οδηγήσει σε απώλεια μέρους ή όλης της παθογόνου ικανότητας (Cooper & Durrands, 1989 Howell, 1976 Idnurm & Howlett, 2001). Τεχνολογίες βελτιωμένες σχετικές με μεταλλαξογένεση, ανάλυση μεταλλαγών, αλληλούχιση και ανάλυση γονιδιωμάτων μυκήτων έχουν διευκολύνει τη ταυτοποίηση γονιδίων που σχετίζονται με τη μολυσματική ικανότητα φυτοπαθογόνων μυκήτων (Idnurm & Howlett, 2001). Ωστόσο, ενώ οι προηγούμενες μοριακές τεχνικές έχουν εφαρμοστεί για τη διερεύνηση του ρόλου των γονιδίων παθογένειας σε ένα μεγάλο αριθμό μυκήτων, δεν έχει δοθεί ιδιαίτερη βαρύτητα για τη διευκρίνιση της μοριακής βάσης της παθογένειας του μύκητα *V. dahliae*.

Στην παρούσα εργασία γίνεται μελέτη του δευτερογενούς μεταβολισμού του μύκητα *V. dahliae* για την εύρεση πιθανής αλληλεπίδρασης μεταξύ δευτερογενούς μεταβολισμού και παθογένειας του μύκητα. Πιο συγκεκριμένα μελετήθηκε ένας πιθανός γενικός ρυθμιστής του δευτερογενούς μεταβολισμού, το γονίδιο *VdLaeA*. Συγκεκριμένα το γονίδιο αυτό θεωρείται ένας γενικός ρυθμιστής του δευτερογενούς μεταβολισμού στο μύκητα *Aspergillus spp.*, καθώς είναι απαραίτητος για τη βιοσύνθεση μιας μυκοτοξίνης, καλούμενης στεριγματοκυστίνη αλλά και για τη βιοσύνθεση της πενικιλίνης. Για τον *A. nidulans* εκτός από αυτά που αναφέρθηκαν παραπάνω είναι υπεύθυνο το γονίδιο για την παραγωγή μυκηλιακών χρωστικών. Επίσης το γονίδιο αυτό είναι υπεύθυνο για την παραγωγή πρωτεΐνης απαραίτητης για την παραγωγή αφλατοξινών και την έκφραση του μεταγραφικού παράγοντα *afIR*, γενικού ρυθμιστή της δέσμης γονιδίων της αφλατοξίνης. Η έλλειψη του γονιδίου *laeA* φαίνεται να έχει μηδενική επίδραση στη μορφολογική ανάπτυξη σε αντίθεση με άλλα γονίδια που ρυθμίζουν το μεταβολισμό. Το γονίδιο αυτό έχει μελετηθεί εκτενώς στους μύκητες του γένους *Aspergillus spp.*

Η διερεύνηση της ύπαρξης αλληλεπίδρασης μεταξύ δευτερογενούς μεταβολισμού και της παθογένειας του μύκητα *V. dahliae*, αποτέλεσαν βασικό στόχο αυτής της μελέτης. Πιο συγκεκριμένα έγινε προσπάθεια υπερέκφρασης του γονιδίου *VdLaeA* στο μύκητα *V. dahliae*. Η πραγματοποίηση της υπερέκφρασης του γονιδίου *VdLaeA* δεν επετεύχθει. Πιο συγκεκριμένα το γονίδιο κατάφερε με επιτυχία να ενσωματωθεί στο φορέα SK1226 αλλά η ενσωμάτωση του κλώνου αυτού στο δυαδικό φορέα υπερέκφρασης SK879 δεν ήταν

επιτυχής, έτσι η υπερέκφραση και η μελέτη του γονιδίου δεν κατέσται δυνατή. Ένας από τους λόγους που δεν κατέσται επιτυχής η υπερέκφραση ήταν η δυσκολία της μεταφοράς ολόκληρου του γονιδίου μέσα στο φορέα SK879, και η μεταφορά του ανά τμήματα με τη χρήση διαφορετικών ενζύμων.

Ένας ακόμη στόχος αυτής της εργασίας ήταν η μελέτη των μεταλλαγμένων *ΔVdLaeA* στελεχών και εξετάστηκε περαιτέρω ο ρόλος του γονιδίου στη μορφολογία του μύκητα μέσω πειραμάτων μυκηλιακής ανάπτυξης των μεταλλαγμένων στελεχών σε διάφορα θρεπτικά υλικά. Πειράματα που έγιναν στα μεταλλαγμένα στέλεχη TΔAGI.A.3, TΔAGI.A18 και το *V. dahliae* ως προς την ανάπτυξη τους σε θρεπτικά υλικά όπως Rose Bengal, Czapek, PDA, SSN-agar έδειξαν ότι το άγριο στέλεχος *V. dahliae* σχημάτισε πιο γρήγορα μικροσκληρώτια σε σχέση με τα μεταλλαγμένα στελέχη και παρουσίαζε μεγαλύτερη ανάπτυξη μυκηλίου. Ενώ από τα μεταλλαγμένα στελέχη πιο εύκολα σχημάτισε μικροσκληρώτια το στέλεχος TΔAGI.A18.

Απενεργοποίηση το γονιδίου *laeA* στους μύκητες *A. nidulans* και *A. fumigatus* είχε σαν αποτελέσματα και στους δύο μύκητες τα στελέχη *ΔlaeA* να είναι οπτικά ανιχνεύσιμα από την έλλειψη μυκηλιακών χρωστικών στο πίσω μέρος των αποικιών στα τρυβλία. Επιπλέον στο μύκητα *A. nidulans* η παραγωγή αρκετών μεταβολιτών, περιλαμβανομένης και της ST ήταν μειωμένη. Η παραγωγή της ανοσοτοξίνης γλιοτοξίνης στο μύκητα *A. fumigatus* εμφάνισε μείωση σε όλα τα *ΔlaeA* στελέχη και σε όλες τις περιπτώσεις παρατηρήθηκε μείωση ή εξάλειψη της μεταγραφής των υπεύθυνων για την παραγωγή γλιοτοξίνης γονιδίων στα *ΔlaeA* στελέχη στο μύκητα αυτό (Bok and Keller, 2003). Επιπλέον στο μύκητα *A. fumigatus*, τα στελέχη με απενεργοποιημένο γονίδιο (*ΔlaeA* στελέχη) βρέθηκε να έχουν χάσει την ικανότητα παραγωγής αρκετών τοξινών, περιλαμβανομένης της γλιοτοξίνης, που έχει αποδειχθεί να είναι ανοσοκατασταλτικός παράγοντας *in vitro* και παρουσιάζουν επίσης μειωμένη μολυσματική ικανότητα σε ξενιστές ποντικού. Τα *ΔlaeA* στελέχη στον ίδιο μύκητα, ήταν ανίκανα παραγωγής δευτερογενών μεταβολιτών, έδειξαν μειωμένη δραστηριότητα λιπάσης και ήταν λιγότερο ικανά να αποικίσουν σπόρους φυστικιού και αραβοσίτου (Kale *et al.*, 2008).

Στην περίπτωση του μύκητα *F. fujikuroi*, διαγραφή του γονιδίου *FfLae1* οδήγησε σε σημαντική μείωση της έκφραση των γονιδίων γιββερελλινικού οξέος (GA) και βικαβερίνης (bikaverin) καθώς και των αντίστοιχων προϊόντων τους ενώ αντίστοιχη ήταν και η επίδραση στην παραγωγή πενικιλίνης που παρατηρήθηκε στα στελέχη του μύκητα *P. chrysogenum* όπου είχε απενεργοποιηθεί το γονίδιο *laeA*. Φυτά ρυζιού που είχαν μολυνθεί με τα μεταλλαγμένα *ΔFlae1* στελέχη του μύκητα *F.fujikuroi*, παρουσίασαν φυσιολογικό ύψος με σκούρους πράσινους βλαστούς και φύλλα σε αντίθεση με φυτά που υπέστησαν μόλυνση με το άγριο στέλεχος και εμφάνισαν τυπικά συμπτώματα εκχλοίωσης με χλωρωτικούς βλαστούς και φύλλα. Τα αποτελέσματα αυτά αποδεικνύουν ξεκάθαρα ότι το γονίδιο *Flae1* είναι μολυσματικός παράγοντας του μύκητα *F.fujikuroi* κατά τη μόλυνση, κυρίως λόγω του ενδιαφέροντος ρόλου του ως ενεργοποιητής της βιοσύνθεσης γιββερελλινικού οξέος (GA) (Wiemann *et al.*, 2010).

Τα αποτελέσματα της παρούσας μελέτης έδειξαν ότι η απενεργοποίηση του γονιδίου *VdLaeA* στο μύκητα *V. dahliae* είχε σαφή επίδραση στην παθογένειά του. Συγκεκριμένα σε φυτά αραβίδου (A. thaliana) που μολύνθηκαν με τα μεταλλαγμένα στελέχη ΤΔΑΓΙ.Α.3, ΤΔΑΓΙ.Α18 εμφάνισαν την ασθένεια σε σημαντικά μειωμένο ποσοστό σε σύγκριση με το άγριο στέλεχος. Η ασθένεια σε φυτά που είχαν μολυνθεί με το άγριο στέλεχος *V.dahliae* 21 ημέρες μετά τη μόλυνση εμφάνισαν ποσοστό προσβολής 46,4%, ποσοστό μεγαλύτερης προσβολής σε σύγκριση με το ΤΔΑΓΙ.Α.3 στέλεχος που προκάλεσε το ίδιο χρονικό διάστημα ποσοστό προσβολής πολύ μικρότερο του επιπέδου 19%. Στις 52 ημέρες μετά από τη μόλυνση τα φυτά που είχαν μολυνθεί με το άγριο στέλεχος *V. dahliae* έφτασαν σε ποσοστό προσβολής 99,9% ενώ το μεταλλαγμένο στέλεχος ΤΔΑΓΙ.Α.3 σε ποσοστό προσβολής 59,5% . Η στατιστική ανάλυση έδειξε στατιστικά σημαντική διαφορά μεταξύ του άγριου στελέχους *V. dahliae* και των μεταλλαγμένων στελεχών ΤΔΑΓΙ.Α18 και ΤΔΑΓΙ.Α.3.

Παρόμοια με τα αποτελέσματα των πειραμάτων στα φυτά της αραβίδου, φυτά μελιτζάνας (*S. melongena*) που μολύνθηκαν με τα μεταλλαγμένα στελέχη ΤΔΑΓΙ.Α.3, ΤΔΑΓΙ.Α18 εμφάνισαν την ασθένεια σε σημαντικά μειωμένο ποσοστό σε σύγκριση με το άγριο στέλεχος *V. dahliae*. Πιο συγκεκριμένα το άγριο στέλεχος *V. dahliae* εμφάνισε το μεγαλύτερο ποσοστό προσβολής συνολικά σε σύγκριση με τα μεταλλαγμένα στελέχη. Ειδικότερα το άγριο στέλεχος *V. dahliae* στις 55 ημέρες μετά τη μόλυνση εμφάνισε 95,2% ποσοστό προσβολής ενώ το ΤΔΑΓΙ.Α.3 στο ίδιο χρονικό διάστημα εμφάνισε μικρότερο ποσοστό προσβολής της τάξης του 54,6%. Η στατιστική ανάλυση που εφαρμόστηκε στη μόλυνση των φυτών μελιτζάνας ως προς τη διαφοροποίηση του βαθμού προσβολής των μολυσμένων φυτών έδειξε ότι υπάρχει στατιστικά σημαντική διαφορά μεταξύ των μεταλλαγμένων *ΔVdLaeA* και του άγριου στελέχους (WT).

Όμοια με τα αποτελέσματα των πειραμάτων στα φυτά της μελιτζάνας, σε φυτά τομάτας (*S. lycopersicum*) που υπέστησαν μόλυνση με τα μεταλλαγμένα στελέχη ΤΔΑΓΙ.Α.3, ΤΔΑΓΙ.Α18 εμφάνισαν την ασθένεια σε μειωμένο ποσοστό σε σύγκριση με το άγριο στέλεχος *V. dahliae*. Ειδικότερα το άγριο στέλεχος *V. dahliae* εμφάνισε το μεγαλύτερο ποσοστό προσβολής συνολικά σε σύγκριση με τα μεταλλαγμένα στελέχη. Το *V. dahliae* εμφάνισε ποσοστό προσβολής 64,6% ενώ τα μεταλλαγμένα στελέχη 52%. Η στατιστική ανάλυση που εφαρμόστηκε έδειξε ότι υπάρχει στατιστικά σημαντική διαφορά μεταξύ του *V. dahliae* και των μεταλλαγμένων στελεχών ΤΔΑΓΙ.Α18 και ΤΔΑΓΙ.Α.3.

Τα πειράματα που έγιναν *in vitro* για την αξιολόγηση της παρεμπόδισης του K165 στην ανάπτυξη των μυκήτων έδειξαν ότι το βακτήριο επιβραδύνει την ανάπτυξη μικροσκληρωτίων καθώς και το ρυθμό ανάπτυξης τόσο του άγριου στελέχους όσο και των μεταλλαγμένων. Στη συνέχεια παρατηρήθηκε σχηματισμός μικροσκληρωτίων μόνο στο άγριο στέλεχος *V. dahliae* όταν αναπτύχθηκε στο ίδιο τρυβλίο με το K165, τα μεταλλαγμένα στελέχη δεν σχημάτισαν μικροσκληρώτια. Τα αποτελέσματα αυτά δείχνουν ότι το *VdLaeA* δεν επηρεάζει την ανταγωνιστική ικανότητα του K-165.

Στο πείραμα της εκδήλωσης της νέκρωσης των φυτικών κυττάρων που πραγματοποιήθηκε σε φύλλα καπνού έδειξε ότι το άγριο στέλεχος *V. dahliae* προκάλεσε μεγαλύτερης έκτασης νέκρωση στα φύλλα τόσο με τη χρήση φίλτρου όσο και χωρίς τη χρήση του σε σύντομο χρονικό διάστημα από την έναρξη της μόλυνσης. Μεταξύ των μεταλλαγμένων στελεχών το TΔAGI.A18 προκάλεσε μεγαλύτερης έκτασης νέκρωση συγκριτικά με το TΔAGI.A.3 στα φύλλα, συγκεκριμένα κυτταρικό θάνατο από το αιώρημα των κονιδίων που εφαρμόστηκε όπως παρατηρήθηκε κατά τη διάρκεια της μολύνσεως.

Τα αποτελέσματα αυτά αποτελούν μία πρώτη ένδειξη του πιθανού ρόλου της πρωτεΐνης *VdLaeA* στον δευτερογενή μεταβολισμό του φυτοπαθογόνου μύκητα *V. dahliae*. Η αποσαφήνιση και η εξακρίβωση του ρόλου της απαιτεί την πραγματοποίηση περαιτέρω πειραμάτων. Κρίνεται απαραίτητη πραγματοποίηση της υπερέκφρασης του γονιδίου *VdLaeA* του μύκητα *V. dahliae*, ώστε να ελεγχθεί η μορφολογική και η μολυσματική του ικανότητα σε σύγκριση με το άγριο στέλεχος. Ακόμη για τον έλεγχο του γονιδίου *VdLaeA* στο δευτερογενή μεταβολισμό απαιτείται μεταβολομική ανάλυση των μεταλλαγμένων στελεχών συγκριτικά με το άγριο. Επιπλέον κρίνεται άξιας μελέτης η πραγματοποίηση πειραμάτων επανατοποθέτησης (complementation) του γονιδίου *VdLaeA* στα μεταλλαγμένα στελέχη $\Delta VdLaeA$ προκειμένου να ελεγχθεί η επαναφορά του άγριου φαινοτύπου ως προς τη μορφολογία και τη μολυσματικότητα του μύκητα *V. dahliae*. Σημαντική θα ήταν η συμβολή της πρωτεομικής ανάλυσης των μεταλλαγμένων στελεχών ώστε να διαπιστωθεί ποιες πρωτεΐνες ρυθμίζονται από το γονίδιο *VdLaeA* σε σχέση με το άγριο.

6. ΒΙΒΛΙΟΓΡΑΦΙΑ

Ξενόγλωσση Βιβλιογραφία

1. Agrios, G.N. (2004). Plant Pathology (Amsterdam etc., Elsevier Academic Press).
2. Barbara, D.J., Clewes, E. (2003). Plant pathogenic *Verticillium species*: how many of them are there? Molecular Plant Pathology 4, 297-305.
3. Bayram, O., Krappmann,S., Ni, M., Bok, J.W, Helmstaedt, K.,Valerius, O., Braus-Stromeyer, S.,Kwon, N.-J., Keller , N.P.,Yu , J.-H., et al.(2008). *VelB/VeA/LaeA* Complex Coordinates Light Signal with Fungal Development and Secondary Metabolism. Science 320, 1504-1506.
4. B.Buchanan, W.G., R. Jones (2000). Responses to Plant Pathogens.Biochemistry and Molecular Biology of Plants, 1102-1156.
5. Beckman, C.H. (1987). The nature of wilt diseases of plants.
6. Bishop, C.D., and Cooper, R.M.(1983). An ultrastructural study of vascular colonization in three vascular wilt diseases I.Colonization of susceptible cultivars. Physiological Plant Pathology 23, 323-343.
7. Bok, J.W., and Keller, N.P.(2004). *LaeA*, a regulator of secondary metabolism in *Aspergillus spp.* Eukaryotic Cell 3, 527-535.
8. Buchner V., Burstein,Y. and Nachmias, A.(1989). Comparison of *Verticillium dahliae*-produced phytotoxic peptides purified from culture fluids and infected potato stems. Physiological and Molecular Plant Pathology 35, 253-269.
9. Buchner V., Nachmias, 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.
10. Calvo, A.M. (2008). The *VeA* regulatory system and its role in morphological and chemical development in fungi. Fungal Genetics and Biology 45, 1053-1061.
11. Cooper, R.M. (2000). *Verticillium*-host interactions: Past achievements and future molecular prospects.Tjamos, E C Rowe RC Heale JB Fravel DR Advances in *Verticillium*: Research and Disease Management 144-150.
12. Cooper, R.M., Resende, M.L.V., Flood,J., Rowan, M.G., Beale, M.H., and Potter, U. (1996). Detection and cellular localization of elemental Sulphur in disease-resistant genotypes of *Theobroma cacao*. Nature 379, 159-162.
13. Davis D.A., Low P.S., and Heinsteint P.(1998). Purification of a glycoprotein elicitor of phytoalexin formation from *Verticillium dahliae*. Physiological and Molecular Plant Pathology 52, 259-273.
14. Davis, N.D., Diener, U.L., Sansing, G.A., and Ellenbur. T. (1972). Medium-Scale production and purification of ochratoxin a, a metabolite of *aspergillus-ochraceus*. Applied Microbiology 23, 433.

15. Dellaporta, S., Wood, J., and Hicks, J.(1983). A plant DNA miniprep: Version II. *Plant Molecular Biology Reporter* 1, 19-21.
16. 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.
17. Durrands, P.K., and Cooper R.M (1988). Selection and characterization of pectinase-deficient mutants of the vascular wilt pathogen *verticillium-albo-atrum*. *Physiological and Molecular Plant Pathology* 32, 343-362.
18. Fradin, E.F., and Thomma, B.P.H.J. (2006). Physiology and molecular aspects of *Verticillium* wilt diseases caused by *V.dahliae* and *V.albo-atrum*. *Molecular Plant Pathology* 7, 71-86.
19. G.F.,P. (1989). Pathogenesis in vascular diseases of plants. Tjamos, EC, and Beckman, CH (Eds), *Vascular wilt diseases of plants* Springer-Verlag, Berlin, 51-94.
20. Gao, S.J., and Nuss, D.L. (1996). Distinct roles for two G protein alpha subunits in fungal virulence, morphology, and reproduction revealed by targeted gene disruption. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 93, 14122-14127.
21. Glover, D.M.H.B.D. (1995). *DNA cloning core techniques*.
22. 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.
23. 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.
24. Hanahan, D.(1983). Studies on transformation of *Escherichia coli* with plasmids. *Journal of molecular biology* 166,557-580.
25. Hanahan, D. (1985). Techniques for transformation of *E.coli*. *DNA cloning: A Practical Approach* (ed DM Glover), 109-135.
26. 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 Pathology* 45,106-114.
27. Inoue, H., Nojima, H., and Okayama, H. (1990). High efficiency transformation of *Escherichia coli* with plasmids. *Gene* 96, 23-28.
28. Kale, S.P., Milde, L., Trapp, M.K., Frisvad, J.C., Keller, N.P., and Bok, J.W. (2008). Requirement of *LaeA* for secondary metabolism and sclerotial production in *Aspergillus flavus*. *Fungal Genetics and Biology* 45, 1422-1429.

29. Khang, C.H., Park, S.-Y., Lee, Y.-H., and Kang, S. (2005). A dual selection based, targeted gene replacement tool for *Magnaporthe grisea* and *Fusarium oxysporum*. *Fungal Genetics and Biology* 42, 483-492.
30. Klose, S., Ajwa, H.A., Fennimore, S.A., Martin, F.N., Browne, G.T., and Subbarao, K.V. (2007). Dose response of weed seeds and soilborne pathogens to 1,3-D and chloropicrin. *Crop Protection* 26, 535-542.
31. Lee S.B., T.J.W. (1990). Genetics and Evolution: Isolation of DNA from fungal mycelia and single spores. PCR protocols: a guide to methods and applications, ed by Innis MA, Gelfand DH, Sninsky J, and White TJ Academic Press, 282-287.
32. Malandraki, I., Tjamos, S.E., Pantelides, I.S., and Paplomatas, E.J. (2008). Thermal inactivation of compost suppressiveness implicates possible biological factors in disease management. *Biological Control* 44, 180-187.
33. Mansoori, B., and Smith, C.J. (2005). Elicitation of Ethylene by *Verticillium albo-atrum* Phytotoxins in Potato. *Journal of Phytopathology* 153, 143-149.
34. Markoglou, A.N., Doukas, E.G., and Ziogas, B.N. (2008). Phenylpyrrole-resistance and aflatoxin production in *Aspergillus parasiticus* Speare. *International Journal of Food Microbiology* 127, 268-275.
35. Meyer, R., Slater, V, and Dubery, I.A. (1994). A phytotoxic protein-lipopolysaccharide complex produced by *Verticillium dahliae*. *Phytochemistry* 35, 1449-1453.
36. Paplomatas, E.J., Lampropoulos, C.J. (2000). Molecular characterization of *Verticillium* spp. by random amplified polymorphic DNA analysis. Tjamos, EC Rowe RC Heale JB Fravel DR *Advances in Verticillium: Research and Disease Management*, 48-52.
37. Paplomatas, E.J., Tjamos, S.E., Malandrakis, A.A., Kafka, A.L. and Zouvelou, S.V (2005). Evaluation of compost amendments for suppressiveness against *Verticillium* wilt of eggplant and study of mode of action using a novel *Arabidopsis* pathosystem. *European Journal of Plant Pathology* 112, 183-189.
38. Pegg, G.F., and Cronshaw, D.K. (1976). Ethylene production in tomato plants infected with *Verticillium albo-atrum*. *Physiological Plant Pathology* 8, 279-295.
39. 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, 353-359.
40. Perry, J.W., and Evert, R.F. (1984). Structure of microsclerotia of *Verticillium-dahliae* in roots of russet Burbank potatoes. *Canadian Journal of Botany-Revue Canadienne De Botanique* 62, 396-401.
41. Pieterse C.M.J., Leon-Reyes A., Van der Ent S. and Van Wees S.C.M. (2009). Networking by small-molecule hormones in plant immunity *Nature Chemical Biology* 5, 308 - 316
42. Puhalla, J.E., and Mayfield, J.E. (1974). Mechanism of heterokaryotic growth in *Verticillium-dahliae*. *Genetics* 76, 411-422.

43. Robb, J., Lee, B., and Nazar, R.(2007). Gene suppression in a tolerant tomato-vascular pathogen interaction. *Planta* 226, 299-309.
44. Schreiber L.R., G.R.J. (1963). Effect of root exudates on germination of conidia and microsclerotia of *Verticillium albo atrum* inhibited by the soil fungistatic principle. *Phytopathology*, 288.
45. Shwab, E.K., and Keller, N.P.(2008). Regulation of secondary metabolite production in filamentous ascomycetes. *Mycological Research* 112, 225-230.
46. Tjamos, E.C. (1993). Prospects and strategies in controlling verticillium wilt of olive1. *EPPO Bulletin* 23, 505-512.
47. Tjamos E.C.(1989). Problems and prospeccts in controlling Verticillium wilt. Tjamos, EC, Beckman, C (Eds), *Vascular Wilt Diseases of Plants* Springer, Berlin, 51-94
48. 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.
49. Tjamos, E.C.B.C.H. (1989). *Vascular wilt diseases of plants. Basic studies and control.*
50. Tjamos, E.C.T.H. *Proceedings of 5th International Verticillium Symposium, 25th -30th June 1990, Leningrad, USSR,p.20(1990). Formation of *Verticillium dahliae* microsclerotia in partially disintegrated leaves of *Verticillium* affected olive trees. Paper presented at: 5th International Verticillium Symposium (Leningrad, USSR).*
51. Tsitsigiannis, D.I. and Keller N.P.(2006). Oxylipins act as determinants of natural product biosynthesis and seed colonization in *Aspergillus nidulans*. *Molecular Microbiology* 59, 882-892.
52. 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.
53. Wiemann, P.,Brown, D.W., Kleigrew, K.,Bok, J.W., Keller,N.P., Humpf, H.-U., and Tudzynski,B. (2010). FfVel1 and FfLae1, components of a velvet-like complex in *Fusarium fujikuroi*, affect differentiation, secondary metabolism and virulence. *Molecular Microbiology* 77, 972-994.
54. Williams, J.S.,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 Physiology* 128, 150-159.

Ελληνική Βιβλιογραφία

1. Παναγόπουλος,Υ.Γ. (2007). Αδρομυκώσεις, Ασθένειες Καρποφόρων Δένδρων και αμπέλου (Αθήνα, εκδ.Σταμούλη).

2. Παντελίδης, Ι. (2009). Φυτοπαθολογική και Μοριακή Διερεύνηση των μηχανισμών που εμπλέκονται στην άμυνα των φυτών κατά των παθογόνων των αδρομυκώσεων. Εργαστήριο Φυτοπαθολογίας (Αθήνα, Γεωπονικό Πανεπιστήμιο Αθηνών).
3. Τζίμα, Α. (2009). Φυτοπαθολογική και Μοριακή Διερεύνηση της Αλληλεπίδρασης του Μύκητα *Verticillium dahliae* με το φυτό Ξενιστή. (Αθήνα, Γεωπονικό Πανεπιστήμιο Αθηνών).
4. Τσιτσιγιάννης Δ.Ι. (1996). Βιολογική καταπολέμηση του μύκητα *Verticillium dahliae* με ανταγωνιστικά βακτήρια ριζόσφαιρας. (Αθήνα, Γεωπονικό Πανεπιστήμιο Αθηνών).
5. Γιαννακοπούλου Α. (2011). Μελέτη του ρόλου του γονιδίου *VdLaeA* στην παθογένεια και βιολογία του φυτοπαθογόνου μύκητα *Verticillium dahliae* (Αθήνα, Γεωπονικό Πανεπιστήμιο Αθηνών).
6. Γκατζούνη Α. (2014). Διερεύνηση του ρόλου του γονιδίου *VdLaeA* στη μορφολογία και παθογένεια του φυτοπαθογόνου μύκητα *Verticillium dahliae* (Αθήνα, Γεωπονικό Πανεπιστήμιο Αθηνών).
7. Λεκάνης Ν.(2014). Επίδραση της πυκνότητας του βακτηρίου *Paenibacillus alvei* στέλεχος K165 στη βιολογική του δράση εναντίον του μύκητα *Verticillium dahliae*. (Αθήνα, Γεωπονικό Πανεπιστήμιο Αθηνών).