

**Η επίδραση της σύγχισης των γονιδίων του
μεταβολισμού του αμύλου στην ανθεκτικότητα των
φυτών *A. thaliana* στους μύκητες
Verticillium dahliae και *Fusarium oxysporum***

Μεταπτυχιακή μελέτη

Έντα Γ. Νάσκα

Επιβλέπων: Επ. Καθ. Σωτήρης Τζάμος

**Μ.Π.Σ.: Επιστήμες και Συστήματα Φυτικής Παραγωγής
Επιστήμη Φυτικής Παραγωγής, Εργαστήριο Φυτοπαθολογίας
Γεωπονικό Πανεπιστήμιο Αθηνών, 2017**

**Η επίδραση της σύγχισης των γονιδίων του
μεταβολισμού του αμύλου στην ανθεκτικότητα των
φυτών *A. thaliana* στους μύκητες
Verticillium dahliae και *Fusarium oxysporum***

Μεταπτυχιακή μελέτη

Έντα Γ. Νάσκα

Επιβλέπων: Επ. Καθ. Σωτήρης Τζάμος

**Μ.Π.Σ.: Επιστήμες και Συστήματα Φυτικής Παραγωγής
Επιστήμη Φυτικής Παραγωγής, Εργαστήριο Φυτοπαθολογίας**

Γεωπονικό Πανεπιστήμιο Αθηνών, 2017

**Η επίδραση της σίγησης των γονιδίων του
μεταβολισμού του αμύλου στην ανθεκτικότητα των
φυτών *A. thaliana* στους μύκητες
Verticillium dahliae και *Fusarium oxysporum***

Μεταπτυχιακή μελέτη

Έντα Γ. Νάσκα

Επιβλέπων: Επ. Καθ. Σωτήρης Τζάμος

Τριμελής επιτροπή:

- Καθηγητής Επαμεινώνδας Παπλωματάς
 - Λέκτορας Κωνσταντίνος Αλιφέρης
 - Επ. Καθηγητής Σωτήρης Τζάμος

Ευχαριστίες

Για την ολοκλήρωση της μεταπτυχιακής μου μελέτης ευχαριστώ τον Επίκουρο Καθηγητή Σ. Τζάμο για την επίβλεψη καθ' όλη την διάρκεια των πειραμάτων και τον Διευθυντή του Εργαστηρίου της Φυτοπαθολογίας Καθηγητή Ε. Παπλωματά. Ευχαριστώ για την βοήθεια που μας προσέφερε για την πραγματοποίηση των πειραμάτων μεταβολομικής τον Λέκτορα του Εργαστηρίου της Γεωργικής Φαρμακολογίας Κ. Αλιφέρη. Τέλος, ευχαριστώ όλους τους εξάιρετους καθηγητές και μέλη του Εργαστηρίου Φυτοπαθολογίας για κάθε βοήθεια που μου προσέφεραν όλα αυτά τα χρόνια.

Περίληψη

Οι μύκητες *Verticillium dahliae* και *Fusarium oxysporum* είναι εδαφογενή παθογόνα τα οποία προκαλούν κάθε χρόνο μεγάλες οικονομικές ζημιές παγκοσμίως. Η έλλειψη αποτελεσματικών χημικών μέσων αντιμετώπισής τους έχει οδηγήσει τις τελευταίες δεκαετίες στην προσπάθεια ανάπτυξης νέων αποτελεσματικών μεθόδων με βάση την κατανόηση της αλληλεπίδρασης των φυτών με τα παθογόνα. Μέχρι σήμερα δεν είναι ξεκάθαρη η σχέση του πρωτογενούς μεταβολισμού των φυτών με τους μηχανισμούς της άμυνάς τους. Σε προηγούμενη μελέτη έχει αποδειχθεί η ανθεκτικότητα φυτών *A. thaliana* τα οποία είναι μεταλλαγμένα ως προς γονίδια τα οποία βρίσκονται σε διάφορα στάδια του καταβολισμού του αμύλου μετά την μόλυνση με τους παθογόνους μύκητες *V. dahliae* και *F. oxysporum*. Στην παρούσα μελέτη διερευνήθηκε εάν η ανθεκτικότητα που παρουσίασαν τα μεταλλαγμένα φυτά *pwd*, *gwd2*, *dpe2* και *isa1* σχετίζεται με τους μηχανισμούς άμυνας των φυτών που ενεργοποιούνται από το σαλικυλικό οξύ και το ιασμονικό οξύ/αιθυλενίου. Για τον σκοπό αυτό εξετάστηκε, στο υπέργειο και υπόγειο τμήμα των μολυσμένων και μη φυτών, η έκφραση των γονιδίων *PR1* και *PDF1.2* τα οποία αποτελούν δείκτες ενεργοποίησης των μονοπατιών του σαλικυλικού οξέως και του ιασμονικού οξέως/αιθυλενίου αντίστοιχα, με την χρήση της μεθόδου qPCR. Επιπλέον, μελετήθηκε η έκφραση των γονιδίων *PWD*, *GWD1*, *GWD2*, *DPE2* και *ISA1* στα αγρίου τύπου φυτά Col-0 μετά την μόλυνση με τον μύκητα *V. dahliae*, επίσης με την χρήση της qPCR. Στις περισσότερες μεταλλαγμένες σειρές υπήρχε υψηλότερη έκφραση των πρωτεϊνών παθογένειας *PR1* σε σχέση με την έκφραση των πρωτεϊνών παθογένειας *PDF1.2* γεγονός που οδηγεί στο συμπέρασμα της συσχέτισης της ανθεκτικότητας των

μεταλλαγμένων σειρών κυρίως με το μονοπάτι βιοσύνθεσης του σαλικυλικού οξέως. Η υπόθεση αυτή έρχεται να επιβεβαιωθεί και σε μεταβολικό επίπεδο, όπου οι μεταβολίτες που συμμετέχουν στην βιοσύνθεση του σαλικυλικού οξέως(κιναμικό οξύ) βρίσκονται σε υψηλή συγκέντρωση σε αντίθεση με εκείνους του ιασμονικού (α-λινολεϊκό οξύ). Η έκφραση των πρωτεϊνών παθογένειας *PR1* και *PDF1.2* στις μεταλλαγμένες σειρές σε συνδυασμό με την υψηλή έκφραση των γονιδίων *PWD*, *GWD1*, *GWD2(290)*, *DPE2* και *ISA1* στα αγρίου τύπου φυτά Col-0 οδηγούν στο συμπέρασμα ότι η έκφραση των γονιδίων του μεταβολισμού του αμύλου έχει ενεργό ρόλο στην αλληλεπίδραση των φυτών *A. thaliana* με τον μύκητα *V. dahliae*.

Abstract

Verticillium dahliae and *Fusarium oxysporum* are soilborne fungal plant pathogens with a worldwide distribution, which cause vascular disease in a wide range of economically important plant species. During the last few years, the lack of effective plant protection products PPPs to control the disease has led in an effort to develop novel disease control strategies by investigating the various plant responses upon *V. dahliae* and *F. oxysporum* infections. To date, little is known on the role of plant primary metabolism in defence against pathogens. In a previous study, the resistance of *Arabidopsis thaliana* plants impaired in genes that participate in starch degradation after *V. dahliae* and *F. oxysporum* infection has been proven. In the present study, a possible correlation between the resistance of the *pwd*, *gwd1*, *gwd2*, *dpe2* and *isa1* plants with the salicylate/jasmonate depended defence mechanisms was investigated. Analysis by real-time quantitative PCR (qPCR) was conducted for the determination of *PR1* and *PDF1.2* expression in the *pwd*, *gwd2*, *dpe2* and *isa1* plants upon infection by *V. dahliae* and *F. oxysporum* and the estimation of the expression of *PWD*, *GWD1*, *GWD2*, *DPE2* and *ISA1* genes in wild type plants Col-0 upon infection with *V. dahliae*. Analyses with qPCR revealed up-regulation of *PR1* in most mutated plants in comparison to *PDF1.2*, a fact that indicates correlation of the mutants' resistance with the plants' salicylate associated mechanisms. This assumption was confirmed by metabolomics analysis which revealed increased biosynthesis of metabolites of salicylate biosynthetic pathway (cinamate) in contrast to the metabolites of jasmonate biosynthetic pathway (α-linolate) whose biosynthesis was decreased. *PR1* and *PDF1.2* expression in the mutated plants along with the high expression of *PWD*, *GWD1*, *GWD2*, *DPE2* and *ISA1* genes in wild type plants Col-0 lead to the conclusion that the genes participating in the process of starch degradation play a key role during the *A. thaliana*-*V. dahliae* interaction.

Περιεχόμενα

1. Εισαγωγή

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

2. Υλικά και μέθοδοι

- 2.1 Γενετικά τροποποιημένα φυτά *Arabidopsis thaliana*
- 2.2 Ο μύκητας *Fusarium oxysporum* και η προετοιμασία του μολύσματος
- 2.3 Ο μύκητας *Verticillium dahliae* και η προετοιμασία του μολύσματος
- 2.4 Θρεπτικά υλικά και διαλύματα για την εξαγωγή RNA
- 2.5 Πείραμα 1 : Μελέτη της έκφρασης των γονιδίων *PR1* και *PDF1.2*
- 2.6 Πείραμα 2: Μελέτη της έκφρασης των γονιδίων *PWD*, *GWD1*, *GWD2*, *ISA1*, *DPE2* σε φυτά *Arabidopsis thaliana* Col-0 μετά από μόλυνση με τους μύκητες *Verticillium dahliae* και *Fusarium oxysporum*

- 2.7 Πειράματα μεταβολομικής
 - 2.7.1 Χημικά και αντιδραστήρια
 - 2.7.2 Βιολογικό υλικό/ Βιοδοκιμές
 - 2.7.3 Δειγματοληψία και προετοιμασία δειγμάτων για μεταβολομική ανάλυση
 - 2.7.4 Χημική ανάλυση
 - 2.7.5 Βιοπληροφορική-Κατασκευή μεταβολικών δικτύων της *A. thaliana*

3. Αποτελέσματα

- 3.1 Έκφραση των γονιδίων *PR1* και *PDF1.2*
 - 3.1.1 Μόλυνση με τον μύκητα *Verticillium dahliae*
 - 3.1.2 Μόλυνση με τον μύκητα *Fusarium oxysporum*
- 3.2 Έκφραση των γονιδίων *GWD-1*, *GWD-2*, *PWD*, *DPE2*, *ISA1*
- 3.3 Μεταβολομική ανάλυση

4. Συζήτηση

5. Βιβλιογραφία

1. Εισαγωγή

1.1 Ο μύκητας *Fusarium oxysporum*

Το γένος *Fusarium* περιλαμβάνει εδαφογενή παθογόνα. Τα περισσότερα είδη δρουν ως σαπρόφυτα, δηλαδή είναι νεκροτροφικοί οργανισμοί. Κάποια άλλα είδη παρασιτούν φυτά ή ακόμα και ζωικούς οργανισμούς. Στα φυτά προκαλούν σήψεις φλοιού, ριζών, καρπών, σήψεις της βάσεως του στελέχους και των ανθέων (σιτηρά), τήξεις σπορίων, κηλιδώσεις φύλλων και αδρομυκώσεις (Agrios, 2005). Το είδος *Fusarium oxysporum* προκαλεί κύρια αδρομυκώσεις σε πολλές καλλιέργειες, ενώ πολλά άλλα είδη, όπως το *Fusarium solani*, προκαλούν σήψεις ριζών, βλαστών και σπόρων. Οι σήψεις των σπόρων που προκαλούνται από τα είδη *Fusarium* έχουν ιδιαίτερη σημασία γιατί συχνά συνοδεύονται από παραγωγή επικίνδυνων μυκοτοξινών (Τριχοθηκίνες από *Fusarium graminearum* και Φουμονισίνες από *Fusarium verticillioides*, *F. moniliforme*, *F. proliferatum*) για τον άνθρωπο και τα ζώα. Μερικά είδη μπορεί ακόμα να προκαλέσουν ευκαιριακές μολύνσεις στον άνθρωπο (ονυχομύκωση, προβλήματα στα μάτια κ.α.) (Agrios, 2005).

Οι μύκητες του γένους *Fusarium oxysporum* προκαλούν τις αδροφουζαριώσεις (=φουζαριώσεις), δηλαδή τις αδρομυκώσεις που προκαλούνται από μύκητες του γένους *Fusarium*. Οι μύκητες του είδους αυτού είναι παθογόνοι σε ποώδεις ξενιστές κυρίως. Είναι πολύ σημαντικά παθογόνα και προκαλούν κάθε χρόνο αξιοσημείωτες ζημιές. Εντός αυτού του είδους υπάρχουν πάνω από 120 ειδικές μορφές (*formae speciales*) που προσβάλουν αποκλειστικά κάποιους ξενιστές ενώ δεν είναι παθογόνα άλλων ξενιστών συγγενικών με τους πρώτους (Agrios, 2005). Είναι κοσμοπολίτικα

παθογόνα που ανάλογα με την ειδική μορφή τους έχουν και άλλη εξάπλωση. Επίσης έχουν αναφερθεί πολλές φυσιολογικές φυλές που διακρίνονται με βάση την παθογένεια μίας απομόνωσης σε συγκεκριμένη ποικιλία ξενιστή (Agrios, 2005). Κατάλογοι των φυλών αυτών έχουν δοθεί από τους Armstrong(1968) και Booth (1971).

Αξίζει να αναφερθούν μερικές ειδικές μορφές καθώς και ο ξενιστής τους:

Πίνακας 1: Ειδικές μορφές του μύκητα *Fusarium oxysporum* και οι ξενιστές τους

Φυτό-ξενιστής	Ειδική μορφή του <i>Fusarium oxysporum</i>
Τομάτα	<i>F. oxysporum f.sp. lycopersici</i>
Αγγούρι, κολοκυθιά	<i>F. oxysporum f.sp.conglutinans</i>
Μπανάνα	<i>F. oxysporum f.sp. cubense</i>
Βαμβάκι	<i>F. oxysporum f.sp. vasinfectum</i>
Γαρύφαλλο	<i>F. oxysporum f.sp. dianthi</i>
Καρπούζι	<i>F. oxysporum f.sp. niveum</i>
Πεπόνι	<i>F. oxysporum f.sp. melonis</i>
Σπαράγγι	<i>F. oxysporum f.sp. asparagi</i>
Γλυκοπατάτα	<i>F. oxysporum f.sp. batatas</i>

Ζαχαρότευτλο	<i>F. oxysporum f.sp. betae</i>
Φασόλι	<i>F. oxysporum f.sp. phaseoli</i>
Σταυρανθή	<i>F. oxysporum f.sp. raphani</i>
Φοίνικας	<i>F. oxysporum f.sp. albedinis</i>
Μπιζέλι	<i>F. oxysporum f.sp. pisi</i>
Νάρκισσος	<i>F. oxysporum f.sp. narcissi</i>
Λινάρι	<i>F. oxysporum f.sp. lini</i>
Φακή	<i>F. oxysporum f.sp. lentis</i>
Κύμινο	<i>F. oxysporum f.sp. cumini</i>
Χρυσάνθεμο	<i>F. oxysporum f.sp. chrysanthemi</i>
Τομάτα	<i>F. oxysporum f.sp. radicis-lycopersici</i>
Αγγούρι	<i>F. oxysporum f.sp. radicis-cucumerinum</i>

Τα συμπτώματα που προκαλούνται από τις αδροφουζαριώσεις είναι παρόμοια για όλους τους ξενιστές. Τα φυτά που έχουν προσβληθεί εμφανίζουν το σύνδρομο του βραδέως ή του αιφνίδιου μαρασμού (Παναγόπουλος, 1995). Τα πιο χαρακτηριστικά συμπτώματα των αδροφουζαριώσεων είναι αυτά που προκαλούνται στην τομάτα από το *F.*

oxysporum f.sp. lycopersici. Στα αρχικά στάδια η ασθένεια εκδηλώνεται με μαρασμό μεμονωμένων φυλλιδίων ή και φύλλων. Στο έλασμα των κατώτερων φύλλων εμφανίζεται αρχικά μεσονεύρια χλώρωση που συνοδεύεται από απώλεια της σπαργής και εν συνεχεία νέκρωση των χλωρωτικών ιστών. Ακολουθεί μαρασμός και πτώση των φύλλων. Τα συμπτώματα αυτά εκδηλώνονται αργότερα και στα ανώτερα φύλλα και μπορεί να εμφανίζονται σε μορφή ημιπληγίας. Τα προσβεβλημένα φυτά γίνονται καχεκτικά και τελικά μπορεί να ξηρανθούν. Ακόμη τα ασθενή φυτά μπορεί να εμφανίσουν επιναστία ή έντονο μαρασμό. Εάν η μόλυνση των φυτών γίνει σε αρχικό στάδιο ανάπτυξης τότε έχουμε γρήγορη θανάτωση του φυτού. Τα ασθενή φυτά στον αγρό εμφανίζονται μεμονωμένα ή σε ομάδες (Agrios, 2005).

1.2 Ο μύκητας *Verticillium dahliae*

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

Χαρακτηριστικό σύμπτωμα της ασθένειας αποτελεί ο καστανός μεταχρωματισμός των αγγείων του ξύλου, ο οποίος εμφανίζεται σε επιμήκη ή εγκάρσια τομή του στελέχους και των ριζών, όχι όμως σε όλους τους ξενιστές. Ο μεταχρωματισμός αυτός μπορεί να εμφανίζεται σε όλη την έκταση των αγγείων ή μόνο στη μία πλευρά του στελέχους (Παναγόπουλος, 2007). Τα κυριότερα συμπτώματα είναι: χλώρωση, μάρανση (επιναστία) και ξήρανση

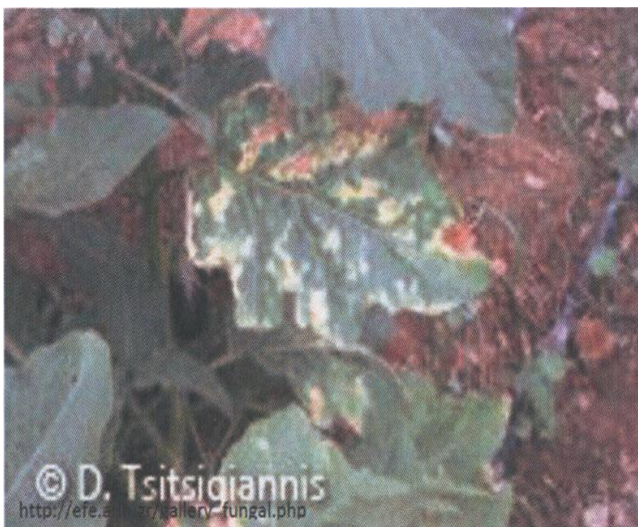
των κατώτερων φύλλων, νανισμός των προσβεβλημένων φυτών, καθώς και καστανός μεταχρωματισμός των αγγείων του ξύλου. Τα συμπτώματα και η εξέλιξή τους διαφέρουν ανάλογα με τον ξενιστή όπου συνήθως στα ετήσια φυτά παρατηρείται το σύνδρομο του βραδέος μαρασμού ενώ στις δενδρώδεις καλλιέργειες παρατηρείται το σύνδρομο της ημιπληγίας (Τζάμος, 2007).

Τα συμπτώματα των αδρομυκώσεων οφείλονται στην εγκατάσταση και δράση των παθογόνων μέσα στα αγγεία του ξύλου, εμποδίζοντας τη διακίνηση του ανοδικού ρεύματος χυμού. Όσο προχωράει η ανάπτυξη του μύκητα μέσα στους ιστούς του ξενιστή, τα συμπτώματα εντείνονται λόγω αδυναμίας του φυτού να απορροφήσει νερό και θρεπτικά στοιχεία στο έδαφος. Έτσι προκαλείται μάρανση και χλώρωση του φυτού λόγω έλλειψης νερού και ελλιπούς θρέψης αλλά και ως επακόλουθο της δράσης ενζύμων που διασπούν το κυτταρικό τοίχωμα των φυτών και φυτοτοξινών, που παράγονται από τον μύκητα (Fradin and Thomma, 2006) καθώς και λόγω έκλυσης αιθυλενίου (Robison *et al.* 2001). Έχει επίσης βρεθεί ότι ο διεγέρτης VdNEP προκαλεί μάρανση σε διάφορα φυτικά είδη, όταν εγχυθεί στα φύλλα τους (Wang *et al.* 2004; Yao *et al.* 2011). Στο τελευταίο στάδιο τα παθογόνα αποκλείουν και καταστρέφουν εντελώς το αγγειακό σύστημα του φυτού νεκρώνοντάς το (Fradin and Thomma, 2006). Σε μικροσκοπική παρατήρηση εγκάρσιων τομών του στελέχους προσβεβλημένων φυτών, παρατηρούνται άφθονες μυκηλιακές υφές μέσα στα αγγεία του ξύλου καθώς και τα σπόρια του μύκητα (Παναγόπουλος, 2007). Για την φραγή των αγγείων ευθύνεται κυρίως η ανάπτυξη του μυκηλίου μέσα σε αυτά αλλά και ουσίες που παράγονται από τον μύκητα καθώς και ουσίες που παράγονται από τον ξενιστή ως αντίδραση στην παρουσία του παθογόνου (Fradin and Thomma, 2006).



Εικόνες 1,2,3: Χαρακτηριστικός μεταχρωματισμός των αγγείων που προκαλείται από τον μύκητα *Verticillium dahliae*

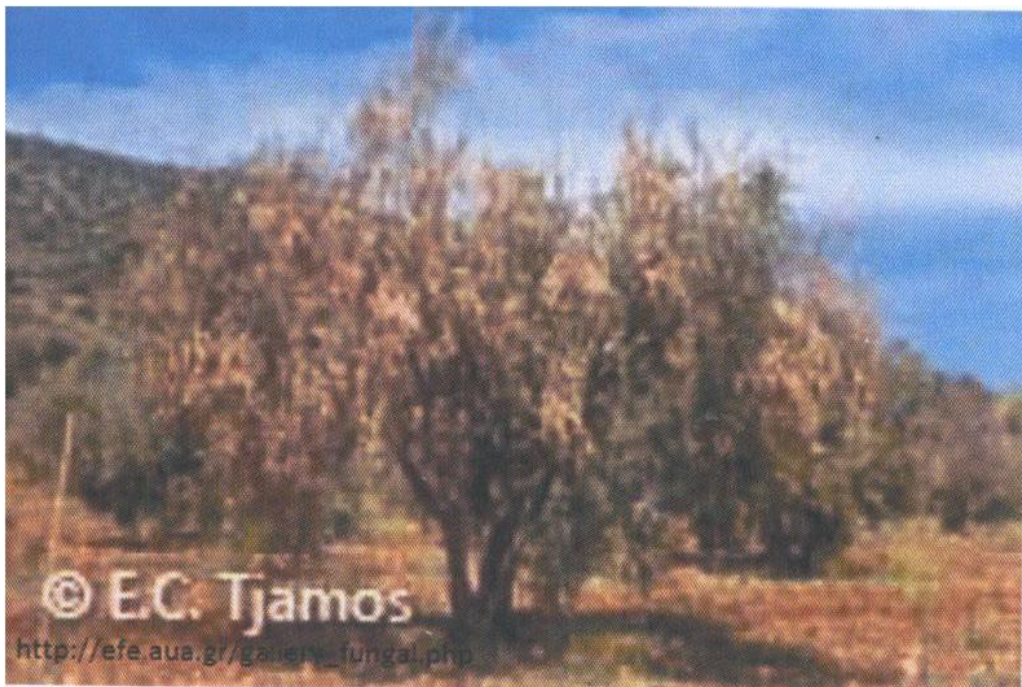




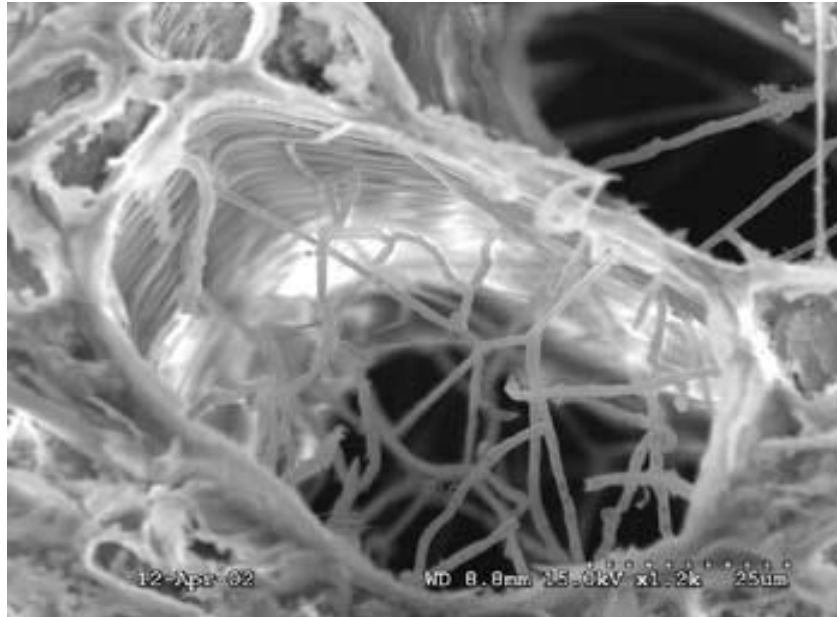
Εικόνες 4, 5, 6: Χλωρώσεις και νεκρώσεις που προκάλεσε ο μύκητας *V. dahliae* σε φυτά μελιτζάνας



Εικόνα 7: Χαρακτηριστική μάρανση που προκλήθηκε σε φυτά αγγουριάς από τον μύκητα *V. dahliae*



Εικόνα 8: Χαρακτηριστικά συμπτώματα που προκαλεί ο μύκητας *V. dahliae* σε ελαιόδεντρα



Εικόνα 9: Φωτογραφία από ηλεκτρονικό μικροσκόπιο σάρωσης όπου φαίνεται ο αποικισμός των αγγείων της ρίζας σε φυτά πατάτας. Το βέλος δείχνει τις υφές του μύκητα *V. dahliae*

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

Ο μύκητας *V.dahliae* ανήκει στο γένος *Verticillium* που παλαιότερα περιελάμβανε μυκητοπαθογόνους, εντομοπαθογόνους, φυτοπαθογόνους και σαπροφυτικούς μύκητες. Ωστόσο πρόσφατα το γένος υπέστη αναθεώρηση και πλέον οι περισσότερες εντομοπαθογόνες και μυκητοπαθογόνες απομονώσεις εμπίπτουν στο γένος *Lecanicillium*. Οι μύκητες του γένους *Verticillium*, ανήκουν στην κλάση *Adelomycetes*, στην τάξη *Moniliales (Hyphomycetes)* και στην οικογένεια *Moniliaceae*. Τα είδη που αναφέρονται είναι τα εξής: *V.albo-*

atrum, *V. dahliae*, *V. nigrescens*, *V. nubilum*, *V. tricorpus* και *V. longisporum* και μέχρι σήμερα δεν έχει αναφερθεί η παρουσία τέλειας μορφής σε κανένα από τα παραπάνω. Τα είδη *V.albo-atrum* και *V. dahliae* προκαλούν σοβαρές απώλειες στα καλλιεργούμενα φυτά (Τζάμος, 2007).

Οι μύκητες του γένους *Verticillium* έχουν λευκό βαμβακώδες πολυκύτταρο μυκήλιο (με εγκάρσια χωρίσματα) και σχηματίζουν κονίδια (φιαλιδιοσπόρια) μέσα σε φιαλίδια, πάνω σε ελεύθερους, ανορθωμένους, υαλώδεις, πολυκύτταρους κονιδιοφόρους, που διακλαδίζονται χαρακτηριστικά κατά σπονδύλους. Τα κονίδια είναι μονοκύτταρα, υαλώδη, ωοειδή μέχρι ελλειψοειδή και έχουν διαστάσεις 2,5-8x1,4-3,2μm. Στην κορυφή κάθε φιαλιδίου παράγονται διαδοχικά πολλά κονίδια, τα οποία συγκρατούνται μεταξύ τους με μία κολλώδη ουσία. Με αυτόν τον τρόπο σχηματίζονται συχνά μικρές κεφαλές (ομάδες) κονιδίων.



Εικόνα 10: Κονιδιοφόρος του μύκητα *V. dahliae* που φέρει φιαλίδια με κονίδια

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

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

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

(Ligoxigakis et al., 2002). Επίσης, ο μύκητας είναι ικανός να επιβιώσει σε μερικά είδη καλλιεργούμενων και αυτοφυών φυτών που είναι ασυμπτωματικά, δηλαδή παρόλο που φιλοξενούν το παθογόνο δεν παρουσιάζουν συμπτώματα της ασθένειας. Είδη της οικογένειας *Rosaceae* έχουν αναφερθεί ως ασυμπτωματικοί φορείς του μύκητα, ενώ παλαιότερα θεωρούνταν ότι ανήκουν στα ανθεκτικά είδη, όπως για παράδειγμα η βρώμη και η αγριοβρώμη (Thanassouloroulos et al., 1981).

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

Η ένταση των συμπτωμάτων εξαρτάται από το βαθμό μολυσματικότητας του στελέχους το οποίο έχει προκαλέσει τη μόλυνση, την ποσότητα του μολύσματος στο έδαφος, το βαθμό αντοχής ή ανοχής του φυτού, τη

θερμοκρασία εδάφους και αέρα που επικρατεί κατά την διάρκεια της καλλιέργειας, την παρουσία νερού από βροχοπτώσεις και αρδεύσεις, τα ζιζάνια που λειτουργούν σαν φυτά εθελοντές, την συγκαλλιέργεια με άλλες ευπαθείς καλλιέργειες και τις καλλιεργητικές επεμβάσεις (Παναγόπουλος, 2007). Το ύψος των απωλειών εξαρτάται και από την πρωιμότητα ή οψιμότητα της προσβολής. Σε πειράματα που πραγματοποιήθηκαν σε φυτά βαμβακιού όσο πιο πρώιμη ήταν η προσβολή τόσο μεγαλύτερες ήταν οι απώλειες (Bejarano Alcazar, 1997).

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

Οι εκκρίσεις των ριζών του ξενιστή προκαλούν την δραστηριοποίηση των οργάνων του μύκητα που βλαστάνοντας δίνουν μολυσματική υφή, όταν οι συνθήκες είναι ευνοϊκές. Μικροσκληρώτια και υφές με μελανίνη είναι συνήθως τα όργανα εκείνα που προκαλούν την μόλυνση (Fradin and Thomma, 2006). Η βλαστική υφή διατρύπεί απ' ευθείας τους ιστούς της ρίζας και διαμέσου του φλοιώδους παρεγχύματος της ρίζας φθάνει στα αγγεία. Η είσοδος του παθογόνου διευκολύνεται από πληγές στις ρίζες οι οποίες είναι συχνά

αποτέλεσμα προσβολών από έντομα και νηματώδεις (Fradin and Thomma, 2006). Το μυκήλιο που φθάνει στις αγγειώδεις δεσμίδες συνεχίζει τον αποικισμό μέσα στα αγγεία και παράγει κονίδια τα οποία με το ανοδικό ρεύμα χυμού φθάνουν ταχύτατα στα ανώτερα μέρη του φυτού. Μετά την ανάπτυξη των συμπτωμάτων και το θάνατο των ιστών του ξενιστή ο μύκητας σχηματίζει πάνω τους μικροσκληρώτια τα οποία καταλήγουν στο έδαφος μαζί με τους νεκρούς ιστούς (Fradin and Thomma, 2006).

1.4 *Arabidopsis thaliana*

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

Μορφολογικά, είναι μικρό φυτό που φθάνει σε μέγεθος μέχρι 20-25 cm. Τα φύλλα φύονται σε μορφή ροζέτας στην βάση του φυτού, με μερικά φύλλα επίσης πάνω στον ανθοφόρο βλαστό. Τα φύλλα του έχουν μήκος 1,5-5 cm και πλάτος 2- 10 mm, με λεία ή ελαφρώς κυματιστή περιφέρεια και καλύπτονται από μικρές μονοκύτταρες τρίχες. Τα άνθη του έχουν διάμετρο 3 mm, και οι ταξιανθίες του έχουν μορφή κορύμβου. Εμφανισιακά είναι ένας τυπικός εκπρόσωπος της οικογένειας *Brassicaceae*. Ο καρπός είναι κέρας μήκους 5-20 mm και περιέχει 20-30 σπόρους. Το ανθικό στέλεχος αναπτύσσεται σε περίπου 3 εβδομάδες και τα άνθη αυτογονιμοποιούνται (Blamey and Grey-Wilson, 1989).

Έχει γίνει σημαντική προσπάθεια για να χαρακτηρισθούν τα 25.498 γονίδια του φυτού που κωδικοποιούν πρωτεΐνες από 11.000 οικογένειες (The Arabidopsis Genome Initiative, 2000). Είναι ιδανικά για πειράματα με χρήση συνεστιακού μικροσκοπίου (confocal) και μικροσκοπίου φθορισμού καθώς τα νεαρά φυτά και ειδικά οι ρίζες τους είναι αρκετά διαφανή ώστε να τα διαπερνά το φως. (Moreno et al., 2006).

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

1.5 Η άμυνα των φυτών

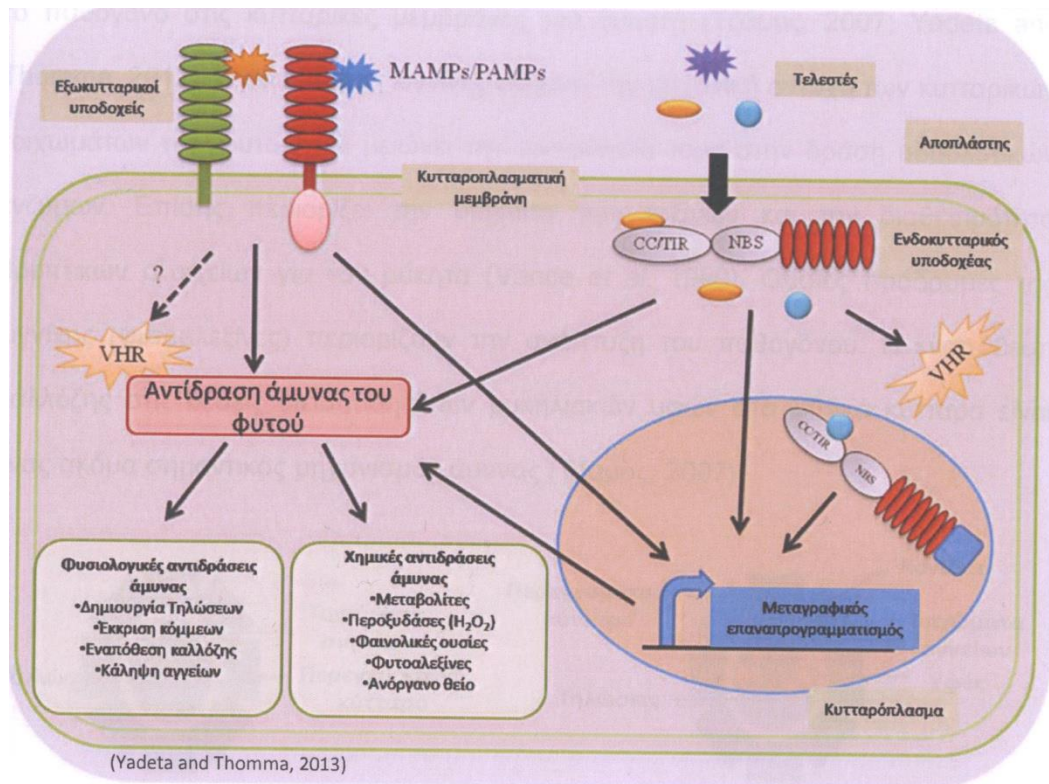
Στην φύση η ικανότητα ενός παθογόνου να μολύνει ένα φυτό και να προκαλεί την εμφάνιση συμπτωμάτων είναι εξαίρεση και όχι κανόνας. Αυτό συμβαίνει επειδή τα φυτά έχουν την ικανότητα να αναγνωρίζουν τα παθογόνα που τα απειλούν και να ενεργοποιούν την άμυνά τους ώστε να αποκρούσουν την απειλή (Staskawicz, 2001). Τα παθογόνα που καταφέρνουν να μην αναγνωρισθούν από το φυτό ή να παρακάμψουν την άμυνα του φυτού είναι αυτά τα οποία έχουν την ικανότητα να το μολύνουν. Σύμφωνα με την θεωρία "γονίδιο-προς-γονίδιο" τα ανθεκτικά φυτά διαθέτουν γονίδια ανθεκτικότητας (R genes) τα οποία χρησιμεύουν στο να αναγνωρίσει το φυτό παθογόνα τα οποία διαθέτουν το αντίστοιχο Avr γονίδιο (Staskawicz, 2001; Dangl *et al.*, 2013). Σήμερα γνωρίζουμε ότι τα φυτά αναγνωρίζουν μόρια των παθογόνων μικροοργανισμών (microbe-associated molecular patterns-MAMPs/pathogen-associated molecular patterns/PAMPs) και μόρια-τελεστές (effectors) που εκκρίνονται από το παθογόνο ή είναι μόρια φυτικής προέλευσης που απελευθερώνονται από το φυτό ως αποτέλεσμα της ζημιάς την οποία υπέστη (Dangl *et al.*, 2013; Yadeta and Thomma, 2013). Η αναγνώριση γίνεται είτε μέσω εξωκυτταρικών είτε μέσω ενδοκυτταρικών υποδοχέων. Τέτοιοι υποδοχείς έχουν βρεθεί και χαρακτηρισθεί σε διάφορα φυτά, μεταξύ αυτών η τομάτα και *Arabidopsis thaliana* (Yadeta and Thomma, 2013). Η αναγνώριση του παθογόνου έχει σαν επακόλουθο αλυσιδωτές μεταβολές στην έκφραση διαφόρων γονιδίων που οδηγούν σε ενεργοποίηση των μηχανισμών άμυνας του, εξαρτωμένων από το μόριο το οποίο προκάλεσε την ενεργοποίησή τους (PAMP, Effector-triggered immunity). Τέτοιοι μηχανισμοί είναι η δημιουργία τηλώσεων και η εναπόθεση λιγνίνης και καλλόζης καθώς και η παραγωγή χημικών ενώσεων από το φυτό που νεκρώνουν το παθογόνο ή περιορίζουν

την εξάπλωσή του (Yadeta and Thomma, 2013). Φυτά τα οποία δεν αναγνωρίζουν το παθογόνο, δεν είναι σε θέση να ενεργοποιήσουν τους μηχανισμούς άμυνάς τους με αποτέλεσμα να προσβάλλονται ευκολότερα από αυτό (Staskawicz, 2001; Yadeta and Thomma, 2013). Οι πρωτεΐνες Ve1 της τομάτας και Xa21 του ρυζιού έχει αποδειχθεί ότι αποτελούν εξωκυτταρικούς υποδοχείς που αναγνωρίζουν τις πρωτεΐνες Ave1 του μύκητα *V. dahliae* Xa21 *Xanthomonas oryzae* pv. *oryzae*, αντίστοιχα (Yadeta and Thomma, 2013). Η πρωτεΐνη I-2 της τομάτας και η RRSI-R του φυτού *A. thaliana* είναι παραδείγματα ενδοκυτταρικών NB-LRR υποδοχέων που αναγνωρίζουν τον τελεστή Avr2 του μύκητα *F. oxysporum* f.sp. *lycopersici* και τον PopP2 του βακτηρίου *Ralstonia solanacearum* (Yadeta and Thomma, 2013).

Η δημιουργία τηλώσεων δεν συνεπάγεται απαραίτητα ανθεκτικότητα, καθώς τυλώσεις δεν δημιουργούνται μόνο σε ανθεκτικά φυτά. Ο χρόνος δημιουργίας τους καθώς και η έκτασή τους διαφέρουν από φυτό σε φυτό συνεπώς ο βαθμός ανθεκτικότητας διαφέρει μεταξύ των διαφόρων φυτών. Φυτά τα οποία δεν σχηματίζουν τυλώσεις ή σχηματίζουν αλλά με βραδύ ρυθμό θεωρούνται ευπαθή στις αδρομυκώσεις (Yadeta and Thomma, 2013). Οι τηλώσεις είναι διογκώσεις της κυτταρικής μεμβράνης των παρεγχυματικών κυττάρων των αγγειωδών δεσμίδων στα σημεία των πλάγιων βοθρίων προς το εσωτερικό των αγγείων, που δυσχεραίνουν την προέλαση του παθογόνου στα αγγεία και την αποίκισή τους. Προκαλούνται από επίδραση ουσιών προερχομένων από το φυτό ή το παθογόνο στις κυτταρικές μεμβράνες του ξενιστή (Τζάμος, 2007; Yadeta and Thomma, 2013). Η εναπόθεση λιγνίνης αυξάνει την μηχανική αντοχή των κυτταρικών τοιχωμάτων των φυτών και μειώνει την ευαισθησία τους στην δράση υδρολυτικών ενζύμων. Επίσης περιορίζει την διάχυση των τοξινών και την διαθεσιμότητα θρεπτικών στοιχείων για τον μύκητα (Vance *et al.*, 1980). Η εναπόθεση καλλόζης στις

θέσεις διεϊσδυσης των μυκηλιακών υφών στα φυτικά κύτταρα είναι ένας ακόμα σημαντικός μηχανισμός άμυνας (Τζάμος, 2007).

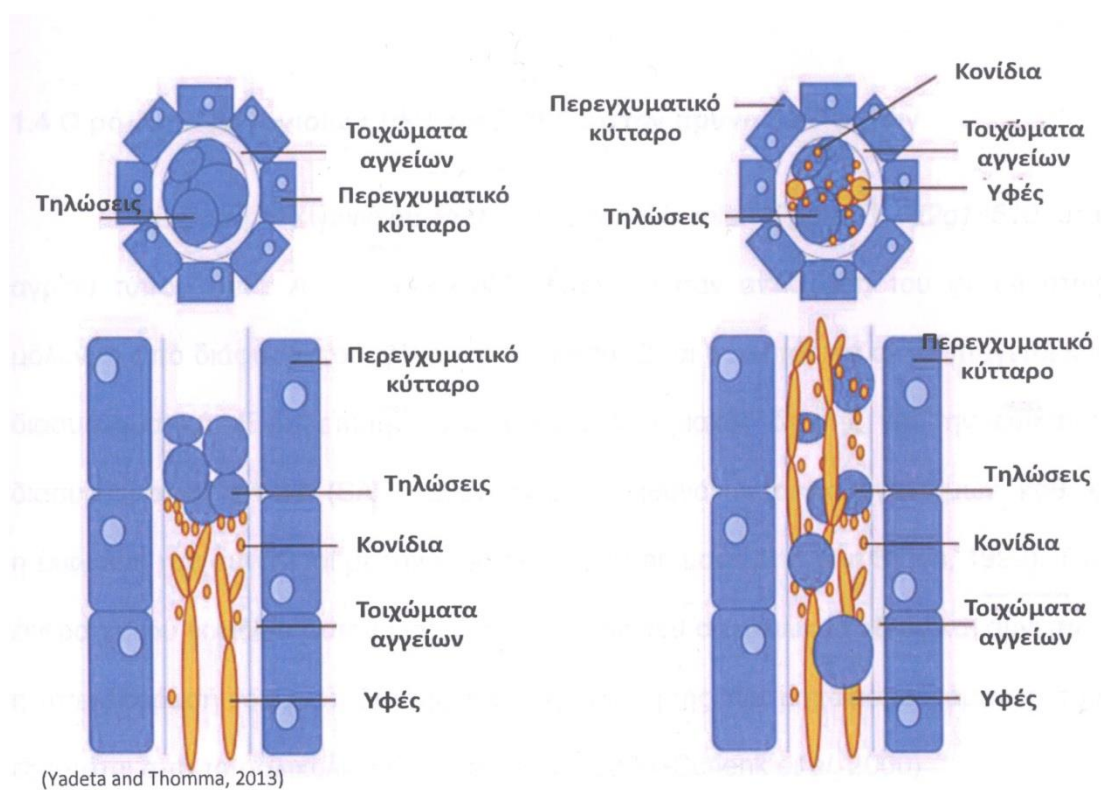
Η προσβολή των αγγείων έχει σαν επακόλουθο μεταβολικές αλλαγές στα παρεγχυματικά κύτταρα των γειτονικών μη προσβεβλημένων αγγείων οι οποίες οδηγούν σε συσσώρευση πρωτεϊνών και δευτερογενών μεταβολιτών,



Εικόνα 11: Γραφική απεικόνιση του μηχανισμού αναγνώρισης των παθογόνων που προσβάλλουν τα αγγεία των φυτών και ενεργοποίηση των μηχανισμών άμυνας του φυτού. Το φυτό αναγνωρίζει μόρια PAMPs/MAMPs στην επιφάνεια των παθογόνων και τους τελεστές που εκκρίνουν τα παθογόνα μέσω ενδοκυτταρικών και εξωκυτταρικών υποδοχέων και ενεργοποιούνται οι μηχανισμοί άμυνας του φυτού (Yadeta and Thomma, 2013)

στον χυμό των φυτών, που συνεισφέρουν άμεσα ή έμμεσα στην άμυνα των φυτών και παρεμποδίζουν ή περιορίζουν την ανάπτυξη του παθογόνου. Τέτοιες πρωτεΐνες και μεταβολικές ουσίες είναι οι *PR1*, *PR2*, *PR3*, *PR4* και *PR5*

(pathogenesis related proteins) και διάφορες περοξυδάσες, πρωτεάσες, φαινόλες, φυτοαλεξίνες κ.α. (Yadeta and Thomma, 2013).



Εικόνα 12: Σχηματική απεικόνιση εγκάρσιας τομής (πάνω) και επιμήκουσ τομής(κάτω) αγγείων ανθεκτικού(αριστερά) και ευαίσθητου(δεξιά) φυτού κατά την προσβολή από παθογόνο μύκητα. Στο ανθεκτικό φυτό, η δημιουργία τηλώσεων στο εσωτερικό των αγγείων, περιορίζει την ανάπτυξη του μύκητα και την περαιτέρω εξάπλωσή του. Εφόσον ο αριθμός των αγγείων που έχουν φραχθεί είναι περιορισμένος, το φυτό δεν υποφέρει από υδατική καταπόνηση. Στα ευαίσθητα φυτά, οι τηλώσεις που δημιουργούνται δεν επιτυγχάνουν να περιορίσουν την ανάπτυξη του παθογόνου (Yadeta and Thomma, 2013)

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

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

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

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

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

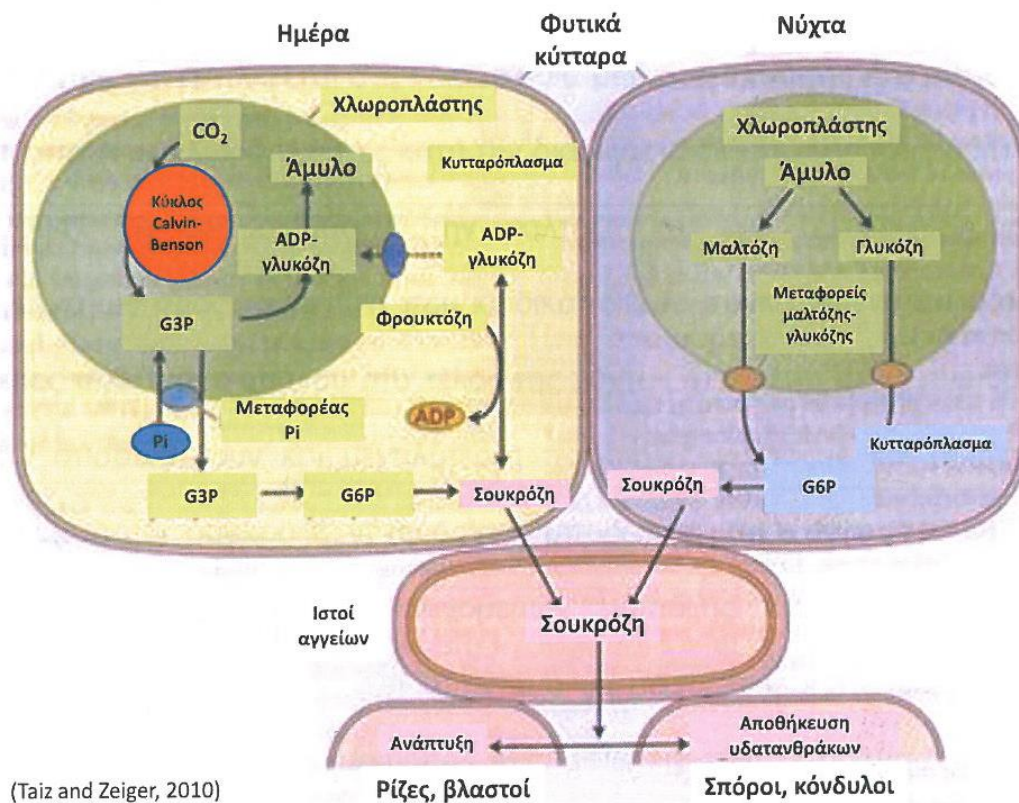
Δεν έχει αποσαφηνιστεί ακόμα ο ρόλος των ενζύμων που εμπλέκονται στον μεταβολισμό του αμύλου σε άλλα φυτικά είδη είναι όμως πολύ πιθανόν το μονοπάτι μεταβολισμού του αμύλου να μην είναι το ίδιο για όλα τα είδη φυτών (Lloyd *et al.*, 2005). Έχει αποδειχθεί επίσης ότι η δραστηριότητα των ενζύμων που εμπλέκονται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

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

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

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

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



Εικόνα 13: Η διαδικασία σύνθεσης του αμύλου κατά την διάρκεια της ημέρας και η διαδικασία διάσπασης του αμύλου κατά την διάρκεια της νύχτας. Οι δύο διαδικασίες λαμβάνουν χώρα στο στρώμα του χλωροπλάστη

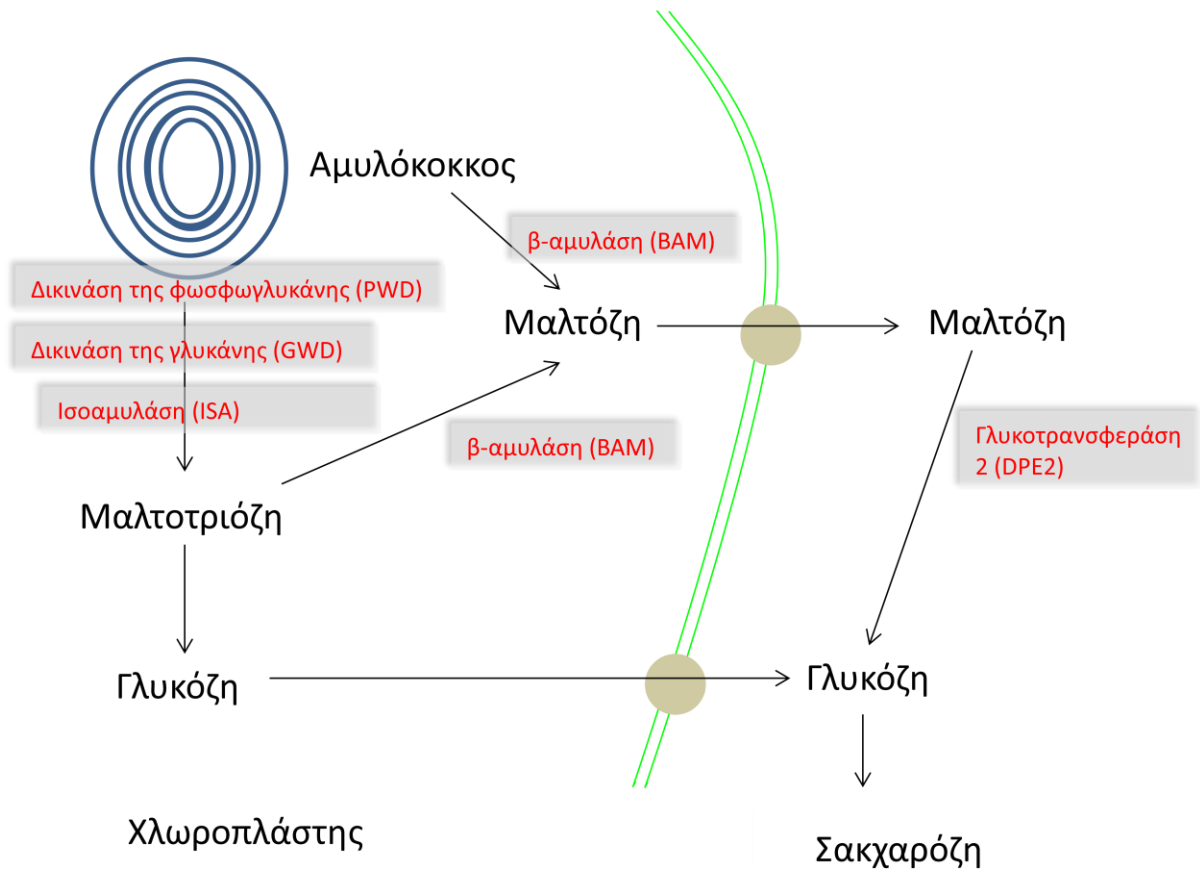
Μεταλλαγμένα φυτά στους χλωροπλάστες των οποίων δεν παράγονται ισοαμυλάσες τείνουν να συσσωρεύουν μεγάλες ποσότητες αμύλου αλλά και φυτογλυκογόνου, το οποίο είναι ένα έντονα διακλαδιζόμενο πολυμερές αποτελούμενο από μονομερή D-γλυκόζης και έχει δομή παρόμοια με αυτή του ζωικού γλυκογόνου (Zeeman *et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

Μετά την δράση των ενζύμων (debranching enzymes) που διασπούν το άμυλο σε μικρότερες αλυσίδες ολιγομερών μαλτόζης (malto-oligosaccharides-MOSs) οι οποίες συσσωρεύονται στο στρώμα του χλωροπλάστη, πιθανόν να αναλαμβάνουν δράση οι β-αμυλάσες οι οποίες διασπούν τα ολιγομερή αυτά

σε μικρότερα τμήματα αλλά και οι α-(1,4) γλυκοτρανσφεράσες (*DPE*) (Lloyd *et al.*, 2005). Το ένζυμο *DPE1* μεταφέρει α-1,4 δεσμούς από ένα ολιγομερές μαλτόζης σε ένα άλλο υποκαταστάτη ο οποίος μπορεί να είναι μια φωσφογλυκάνη, είτε ένα μόριο μαλτόζης ή γλυκόζης (Lloyd *et al.*, 2005). Το ένζυμο *DPE2* συσσωρεύεται στο κυτταρόπλασμα και εμπλέκεται στην διαδικασία μεταβολισμού της μαλτόζης η οποία εξέρχεται από τους χλωροπλάστες κατά την διαδικασία διάσπασης του αμύλου (Chia *et al.*, 2004). Το *DPE2* διασπά την μαλτόζη και έχει αποδειχθεί ότι φυτά μεταλλαγμένα ως προς το γονίδιο που κωδικοποιεί το συγκεκριμένο ένζυμο, έχουν μεγαλύτερες ποσότητες αμύλου στο τέλος της νύχτας σε σχέση με τα αγρίου τύπου φυτά, ενώ συσσωρεύουν και μεγαλύτερες ποσότητες μαλτόζης και μαλτοτριόζης αλλά είναι ελλιπή σε σουκρόζη, γεγονός που υποδεικνύει ότι ο ρόλος του *DPE2* είναι σημαντικός για την διάσπαση ολιγομερών μαλτόζης και συνεπώς για τον καταβολισμό του αμύλου (Chia *et al.*, 2004). Ωστόσο πειράματα που έγιναν σε μεταλλαγμένα στελέχη *Chlamydomonas reinhardtii* και που αφορούσαν την δράση ενός γονιδίου ομολόγου του *DPE1* του φυτού *A. thaliana* έδειξαν ότι το συγκεκριμένο ένζυμο (D-enzyme) εμπλέκεται και στην σύνθεση του αμύλου (Wattebled *et al.*, 2003). Επομένως είναι πολύ πιθανό το ένζυμο *DPE1* του φυτού *A. thaliana* να εμπλέκεται όχι μόνο στην διαδικασία διάσπασης του αμύλου αλλά και σε αυτήν της βιοσύνθεσής του (Lloyd *et al.*, 2005).

Η μαλτόζη και η γλυκόζη είναι τα βασικά προϊόντα του μεταβολισμού του αμύλου. Η μαλτόζη παράγεται μέσω της δράσης των β-αμυλασών και η γλυκόζη μέσω της περαιτέρω διάσπασης των ολιγομερών μαλτόζης από τις γλυκοτρανσφεράσες (*DPE*) ή της μαλτοτριόζης από τις β-αμυλάσες (Lloyd *et al.*, 2005). Μεταλλαγμένα φυτά *A. thaliana* στα γονίδια που είναι υπεύθυνα για την σύνθεση των 4 β-αμυλασών που εντοπίζονται στους χλωροπλάστες

καθώς και σε όλους τους πιθανούς συνδυασμούς αυτών των γονιδίων, συσσωρεύουν σημαντικές ποσότητες αμύλου στους ιστούς τους, το οποίο κατά την διάρκεια της νύχτας αδυνατεί να διασπασθεί σε μαλτόζη (Fulton *et al.*, 2008)



Εικόνα 14: Το μονοπάτι της διάσπασης του αμύλου και ο ρόλος των ενζύμων στα οποία γίνεται αναφορά στην παρούσα μελέτη.

1.8 Μεταβολομική

Η μεταβολομική αποσκοπεί στην ενδεδειγμένη ανάλυση όλων των μεταβολιτών ενός βιολογικού συστήματος. Αποτελεί μια από τις γρηγορότερα αναπτυσσόμενες βιοαναλυτικές τεχνολογίες, η οποία παρέχει πληροφορίες σχετικά με το μεταβολισμό βιολογικών συστημάτων και την διασύνδεση μεταξύ των διαφορετικών επιπέδων μεταβολισμού των οργανισμών (genome, transcriptome, proteome, metabolome). Οι μεταβολίτες είναι τα τελικά προϊόντα του μεταβολισμού και η μεταβολική σύσταση ενός οργανισμού μπορεί να θεωρηθεί ως η καλύτερη παράμετρος για την επεξήγηση του φαινοτύπου του.

Η ανάλυση του συνόλου των μεταβολιτών των φυτών (metabolome) είναι ένα υπερβολικά απαιτητικό έργο: πολλά φυτικά είδη παράγουν μοναδικούς δευτερογενείς μεταβολίτες, οι περισσότεροι από τους οποίους παραμένουν άγνωστοι. Επιπροσθέτως, οι φυσικοχημικές τους ιδιότητες (πολικότητα, διαλυτότητα κ.τ.λ.), οι δομές και οι συγκεντρώσεις τους εντός των φυτών μπορεί να ποικίλουν σε μεγάλο βαθμό τα οποία αποτελούν προκλήσεις για την χημική τους ανάλυση.

Στο πλαίσιο αυτό, η μεταβολομική έρχεται να αντιμετωπίσει τις νέες αυτές αναλυτικές προκλήσεις μέσω του ταυτόχρονου ελέγχου και της ταυτοποίησης μεγάλου αριθμού φυτικών μεταβολιτών πρωτογενών και δευτερογενών καθώς και την βιολογική ερμηνεία και βιοπληροφορική ανάλυση του τεράστιου όγκου των παραγόμενων δεδομένων.

Μέχρι σήμερα η μεταβολομική έχει χρησιμοποιηθεί με μεγάλη επιτυχία στην μελέτη και εις βάθος κατανόηση των αλληλεπιδράσεων σε συστήματα ξενιστή-παθογόνου, όπως για την κατανόηση της αλληλεπίδρασης του φυτού *Glycine max* L. με τον παθογόνο εδαφογενή μύκητα *Rhizoctonia*

solani (Aliferis *et al.*, 2014) και των φυτών *Solanum lycopersicum* και *Arabidopsis thaliana* με τον μύκητα *V. dahliae* (Buhtz *et al.*, 2015).

Με βάση τα παραπάνω, σκοπός της παρούσας μελέτης ήταν η κατανόηση των αλλαγών στον μεταβολισμό των φυτών *Arabidopsis thaliana* τα οποία ήταν μεταλλαγμένα ως προς το γονίδιο *PWD* και των αγρίου τύπου Col-0 μετά την μόλυνσή τους με τους μύκητες *V. dahliae* και *F. oxysporum*. Οι μεταβολομικές αναλύσεις πραγματοποιήθηκαν με την χρησιμοποίηση αέριου χρωματογράφου-φασματομέτρου μάζας (**gas chromatography–mass spectrometry GC-MS**). Οι αναλύσεις μεταβολομικής με GC-MS σε συνδυασμό με αναλύσεις βιοπληροφορικής αποτελούν από τις πιο διαδεδομένες και ευρέως χρησιμοποιούμενες μεθόδους στην μεταβολομική φυτών.

1.9 Σκοπός της εργασίας

Σκοπός της παρούσας μελέτης ήταν η διερεύνηση:

- του ρόλου των γονιδίων *PWD*, *GWD1*, *GWD2*, *ISA1* και *DPE-2* στα αγρίου τύπου φυτά Col-0 μετά την μόλυνση με τον παθογόνο μύκητα *V. dahliae*
- κατά πόσον η ανθεκτικότητα που είχε παρατηρηθεί στα μεταλλαγμένα φυτά που είχαν μολυνθεί με τους μύκητες *V. dahliae* και *F. oxysporum* οφείλεται σε επαγωγή των μηχανισμών άμυνας των φυτών που εξαρτώνται από το σαλικυλικό οξύ και το αιθυλένιο/ιασμονικό οξύ
- της επίδρασης των μυκήτων *V. dahliae* και *F. oxysporum* στον μεταβολισμό του φυτού-ξενιστή (*A. thaliana*)

2. Υλικά και μέθοδοι

2.1 Γενετικά τροποποιημένα φυτά *Arabidopsis thaliana*

Στην παρούσα μελέτη χρησιμοποιήθηκαν φυτά *Arabidopsis thaliana* τα οποία έχουν υποστεί γενετική τροποποίηση με την χρήση Τι πλασμιδίου σε μια σειρά γονιδίων που εμπλέκονται στον μεταβολισμό του αμύλου. Οι σειρές SALK προέρχονται από το Salk Institute Genomic Analysis Laboratory και μαζί με τις σειρές GABI-Kat, που προέρχονταν αρχικά από το Max-Planck-Institute of Plant Breeding Research και πλέον από το Bielefeld University, διακινούνται από το Nottingham Arabidopsis Stock Centre(NASC) (Alonso *et al.*, 2003; Kleinboelting *et al.*, 2012). Όλοι οι σπόροι διατηρήθηκαν πριν την διεξαγωγή των πειραμάτων στους 4^ο C.

Οι μεταλλαγμένες σειρές φυτών *Arabidopsis thaliana* που χρησιμοποιήθηκαν ήταν οι εξής:

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

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

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

- *gwd* μεταλλαγμένα ως προς τα γονίδια At1g10760 (NASK stock ID: N658720-SALK) και Atg24450 (NASK stock ID: N668540-SALK)

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

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

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

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

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

Για την διεξαγωγή των πειραμάτων παθογένειας χρησιμοποιήθηκε μια απομόνωση του μύκητα *V. dahliae* με επιβεβαιωμένη παθογένεια σε φυτά *A. thaliana* (Tjamos *et al.*, 2005). Ο μύκητας είχε διατηρηθεί ως αιώρημα κονιδίων σε υδατικό διάλυμα γλυκερόλης 25% στους -80°C (Maniatis *et al.*, 1982). Πριν τη χρήση του στα πειράματα παθογένειας είχε μεταφερθεί σε θρεπτικό υλικό από εκχύλισμα πατάτας (Potato Dextrose Agar, PDA) και αναπτύχθηκε στους 25°C για 5 ημέρες. Για τα πειράματα παθογένειας χρησιμοποιήθηκε αιώρημα κονιδίων του μύκητα, συγκέντρωσης 10⁷ κονίδια mL⁻¹ από υγρή καλλιέργεια του μύκητα στο θρεπτικό υλικό των Sinha and Wood 1968, Sucrose Sodium Nitrate (SSN).

2.3 Ο μύκητας *F. oxysporum* και η προετοιμασία του μολύσματος

Για την διεξαγωγή των πειραμάτων παθογένειας χρησιμοποιήθηκε μια απομόνωση του μύκητα *F. oxysporum* με επιβεβαιωμένη παθογένεια σε φυτά *A. thaliana* (Tjamos *et al.*, 2005). Ο μύκητας είχε διατηρηθεί ως αιώρημα κονιδίων σε υδατικό διάλυμα γλυκερόλης 25% στους -80°C (Maniatis *et al.*, 1982). Πριν τη χρήση του στα πειράματα παθογένειας είχε μεταφερθεί σε

θρεπτικό υλικό από εκχύλισμα πατάτας (Potato Dextrose Agar, PDA) και αναπτύχθηκε στους 28°C για 3 ημέρες. Για τα πειράματα παθογένειας χρησιμοποιήθηκε αιώρημα κονιδίων του μύκητα, συγκέντρωσης 10⁷ κονίδια/ml από υγρή καλλιέργεια του μύκητα στο θρεπτικό υλικό των Sinha and Wood 1968, Sucrose Sodium Nitrate (SSN).

2.4 Θρεπτικά υλικά και διαλύματα για την εξαγωγή RNA

Για την καλλιέργεια των μυκήτων χρησιμοποιήθηκαν τα εξής θρεπτικά υλικά:

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

PDA:

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

SSN:

- Σακχαρόζη15g
- K₂HPO₄ (όξινο φωσφορικό κάλιο) 1g
- MgSO₄·7H₂O (Θειικό μαγνήσιο) 0,5g
- NaNO₃ (νιτρικό νάτριο) 2g
- KCl (χλωριούχο κάλιο)0,5g
- Διάλυμα ιχνοστοιχείων 1ml
- Απιονισμένο νερό μέχρι τελικό όγκο 1lt

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

Για την Παρασκευή 100 ml διαλύματος ιχνοστοιχείων απαιτούνται:

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

Για την εξαγωγή RNA από τους φυτικούς ιστούς χρησιμοποιήθηκαν τα εξής διαλύματα:

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

Διάλυμα λύσης κυττάρων (Cell Lysis Solution 10 mL):

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

Το pH του διαλύματος πρέπει να ρυθμιστεί στο 4 - 4.5. Το χαμηλό pH είναι σημαντικό για την απενεργοποίηση των ενζύμων που καταστρέφουν το RNA.

Διάλυμα καθίζησης πρωτεϊνών και DNA (Protein-DNA precipitation solution):

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

Πυκνά διαλύματα:

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

2.5 Πείραμα 1 : Μελέτη της έκφρασης των γονιδίων *PR1* και *PDF1.2*

Σε πειράματα παθογένειας που έχουν πραγματοποιηθεί, έχει διαπιστωθεί ανθεκτικότητα των φυτών *A. thaliana*, τα οποία είναι μεταλλαγμένα ως προς τα γονίδια που βρίσκονται σε διάφορα στάδια του καταβολισμού του αμύλου όπως το *PWD*, *GWD2*, *ISA1*, *DPE2*, ως προς τους μύκητες *V. dahliae* και *F. oxysporum*. Για να διαπιστωθεί κατά πόσον η ανθεκτικότητα που παρατηρήθηκε στα μεταλλαγμένα φυτά ως προς τα γονίδια *PWD*, *GWD2*, *ISA1*, *DPE2* οφειλόταν σε επαγωγή της άμυνας των φυτών που εξαρτάται από το σαλικυλικό οξύ και το ιασμονικό οξύ/αιθυλένιο πραγματοποιήθηκε μελέτη της έκφρασης των γονιδίων *PR1* και *PDF1.2* στα φυτά αυτά. Τα δείγματα που

χρησιμοποιήθηκαν συλλέχθηκαν από μολυσμένα και μη μολυσμένα φυτά στις 3, 7 και 14 ημέρες μετά την μόλυνση. Η έκφραση των γονιδίων *PR1* και *PDF1.2*, στα φύλλα και στις ρίζες μολυσμένων φυτών *rwd*, *gwd2*, *dpe2*, *isa1*, και Col-0 συγκρίθηκε με αυτήν στα φυτά μάρτυρες των ίδιων γονοτύπων. Για κάθε γονότυπο και κάθε χρονική στιγμή συλλέχθηκε δείγμα φύλλων και δείγμα ρίζας από μολυσμένα φυτά καθώς και δείγμα φύλλων και δείγμα ρίζας από μη μολυσμένα φυτά, και πραγματοποιήθηκαν 3 τεχνικές επαναλήψεις. Κάθε δείγμα αποτελούταν από 10 φυτά.

Η απομόνωση του ολικού RNA από τους φυτικούς ιστούς έγινε ως εξής:

(τροποποίηση του πρωτοκόλλου των Onate-Sanchez and Vicente-Carbajosa, 2008):

- Κονιορτοποίηση του φυτικού ιστού σε πορσελάνινο γουδί με υγρό άζωτο και τοποθέτηση 80-100mg (300-400 μ l) κονιορτοποιημένου φυτικού ιστού σε σωληνάριο τύπου erpendorf χωρητικότητας 1.5ml
- Προσθήκη 300 μ l διαλύματος λύσης κυττάρων
- Έντονη ανάμιξη (vortex) για 20sec και ανάμειξη με αναστροφή των σωληναρίων τύπου erpendorf
- Επώαση για 5 min σε θερμοκρασία δωματίου σε συνεχή αναστροφή για καλύτερη ανάμειξη
- Προσθήκη 100 μ l διαλύματος καθίζησης πρωτεϊνών και DNA, το οποίο έχει προ-ψυχθεί σε πάγο
- Ελαφριά ανάμειξη, χτυπώντας και αναστρέφοντας τα σωληνάκια τύπου erpendorf
- Επώαση για 10 min σε θερμοκρασία 4°C
- Φυγοκέντρηση για 15 min στην πλήρη ταχύτητα της φυγόκεντρο (14.000 rpm) σε θερμοκρασία 4°C

- Μεταφορά υπερκείμενου (περίπου 300μl) σε καινούριο σωληνάριο τύπου errendorf αποφεύγοντας την ενδιάμεση φάση. Αν υπάρχουν υπολείμματα ιστών στο υπερκείμενο μετά την μεταφορά του, ακολουθεί δεύτερη φυγοκέντρηση για 5min σε θερμοκρασία 4°C στην πλήρη ταχύτητα της φυγόκεντρου και μεταφορά του υπερκείμενου σε νέο σωληνάριο τύπου errendorf
- Προσθήκη ίσου όγκου ισοπροπανόλης για την κατακρήμνιση του RNA (περίπου 300μl) και ελαφριά ανάδευση με αναστροφή
- Επώαση για 10 min σε θερμοκρασία 4°C
- Φυγοκέντρηση για 5min στην πλήρη ταχύτητα της φυγόκεντρου και σε θερμοκρασία 4°C
- Απομάκρυνση υπερκειμένου
- Προσθήκη 300μl αιθανόλης 70% για καθαρισμό του ιζήματος
- Φυγοκέντρηση για 5min στην πλήρη ταχύτητα της φυγόκεντρου και σε θερμοκρασία 4°C
- Απομάκρυνση υπερκειμένου
- Στέγνωμα ιζήματος
- Επαναιωρηματοποίηση του ιζήματος σε 25μl αποστειρωμένο δισαπεσταγμένο νερό και ανάμειξη μέχρι να διαλυθεί το ίζημα
- Φυγοκέντρηση για ελάχιστα δευτερόλεπτα

Προσδιορισμός της συγκέντρωσης του RNA

Μετά την απομόνωση του ολικού RNA από τα φυτά πραγματοποιήθηκε καθαρισμός των δειγμάτων από DNA με την χρήση DNase I (HT BIOTECHNOLOGY LTD). Ο καθαρισμός των δειγμάτων από DNA έγινε ως εξής:

- Σε κάθε δείγμα προστέθηκε 1μl DNase I (1 unit/μl) και 3μl buffer
- Τα δείγματα τοποθετήθηκαν για επώαση στο υδατόλουτρο σε θερμοκρασία 37 °C για 10 min
- Μετά το πέρας των 10 λεπτών, σε κάθε δείγμα προστέθηκε 1 μl EDTA (το EDTA δεσμεύει όλα τα ιόντα τα οποία λειτουργούν ως συμπαραγοντες του ενζύμου DNaseI)
- Τα δείγματα τοποθετήθηκαν για επώαση σε drybath στους 75 °C για 10min ώστε να απενεργοποιηθεί η DNase I

Στη συνέχεια πραγματοποιήθηκε μέτρηση της συγκέντρωσης του κάθε δείγματος με την χρήση φασματοφωτόμετρου Nanodrop, η λειτουργία του οποίου βασίζεται στην μέτρηση της απορρόφησης του δείγματος ώστε να προσδιοριστεί η συγκέντρωσή του και η καθαρότητά του. Η απορρόφηση στα 260 nm δίνει τη συγκέντρωση των νουκλεϊκών οξέων(RNA) και η απορρόφηση στα 280 nm μετράει τις δευτερεύουσες ουσίες που απομονώθηκαν μαζί με το RNA (π.χ. πρωτεΐνες). Ο λόγος 260/280 δίνει μια εκτίμηση της καθαρότητας του δείγματος RNA, όσο περισσότερο προσεγγίζει το 2 τόσο υψηλότερη είναι η καθαρότητά του. Η συγκέντρωση κάθε δείγματος RNA προκύπτει από τη σχέση:

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

Αφού προσδιορίστηκε η συγκέντρωση του RNA (C(ng/μL)) για κάθε δείγμα, τα δείγματα RNA αραιώθηκαν με δισαπεσταγμένο και αποστειρωμένο νερό

έτσι ώστε η τελική συγκέντρωση του RNA μετά την προσθήκη των αντιδραστηρίων για την αντίδραση της αντίστροφης μεταγραφάσης να είναι σε όλα τα δείγματα 500ng (τελικός όγκος 7μl, συνολική ποσότητα RNA 500ng) και έγινε μετατροπή του mRNA σε cDNA με την χρήση του Prime Script RT reagent kit (TAKARA BIO INC) σύμφωνα με τις οδηγίες του κατασκευαστή, ως εξής:

Σε κάθε δείγμα προστέθηκαν

- 2μl ρυθμιστικό διάλυμα (5x prime script buffer)
- 0,5μl αντίστροφη μεταγραφάση (prime script RT enzyme)
- 0,5μl μείγμα εκκινητών θυμίνης (oligo dT primer)
- 7 μl δείγματος RNA (template)

Η αντίδραση πραγματοποιήθηκε στις εξής συνθήκες:

Πίνακας 2: Συνθήκες αντίστροφης μεταγραφής

	Χρόνος	Θερμοκρασία (°C)	Αποτέλεσμα
Στάδιο 1	15 min	37	Υβριδισμός νουκλεοτιδίων θυμίνης με την ουρά πολύ-αδενίνης του mRNA και επιμήκυνση της cDNA αλυσίδας
Στάδιο 2	5 sec	85	Τερματισμός της αντίδρασης - Απενεργοποίηση της αντίστροφης μεταγραφάσης
Στάδιο 3	∞	10	

Ακολούθησε η εφαρμογή για την ποσοτικοποίηση των μεταγραφημάτων των γονιδίων *PR1*, *PDF1.2* και του γονιδίου αναφοράς *tubulin 4*(At4g26410) με την χρήση των παρακάτω ζευγών εκκινητών:

Πίνακας 3: Τα ζεύγη εκκινητών που χρησιμοποιήθηκαν για την μελέτη έκφρασης των γονιδίων *PR1* και *PDF1.2* με τη μέθοδο της Real Time PCR

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

Η RT-PCR έγινε σε θερμοκυκλοποιητή της Stratagene Mx3005PTM και για τις αντιδράσεις ενίσχυσης χρησιμοποιήθηκαν τα αντιδραστήρια (master mix KAPA SYBR Fast Universal qPCR kit) της εταιρίας KAPABiosystems, ενώ τα αποτελέσματα αναλύθηκαν με το λογισμικό MxProQPCR. Τα αντιδραστήρια που χρησιμοποιήθηκαν στις αντιδράσεις της RT-PCR, σύμφωνα με τις οδηγίες της εταιρίας της οποίας το master mix χρησιμοποιήθηκε δίνονται στον παρακάτω πίνακα:

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

Αντιδραστήρια	Ποσότητα/Αντίδραση
KAPA SYBR Fast Universal qPCR Master Mix	5μl
Rox low	0,2μl
Εκκινητής F	0,5μl
Εκκινητής R	0,5μl
Δείγμα cDNA (template)	1μl
H ₂ O χωρίς RNAασες	2,8μl
Τελικός όγκος	10μl

Οι συνθήκες της αντίδρασης της RT-PCR δίνονται από τον ακόλουθο πίνακα:

Πίνακας 5: Οι θερμοκρασίες και οι αντίστοιχοι χρόνοι για κάθε βήμα της RT-PCR σύμφωνα με τις οδηγίες του κατασκευαστή του master mix KAPA SYBR Fast Universal qPCR της KAPABiosystems

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

*Το βήμα 2 επαναλήφθηκε για 40 κύκλους

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

2.6 Πείραμα 2 : Μελέτη της έκφρασης των γονιδίων *PWD*, *GWD1*, *GWD2*, *ISA1*, *DPE2* σε φυτά *Arabidopsis thaliana* Col-0 μετά από μόλυνση με τους μύκητες *Verticillium dahliae* και *Fusarium oxysporum*

Τα δείγματα που χρησιμοποιήθηκαν συλλέχθηκαν από μολυσμένα και μη φυτά Col-0 στις 3 και 7 ημέρες μετά την μόλυνση. Η έκφραση των γονιδίων *PWD*, *GWD1*, *GWD2*, *ISA1*, *DPE2* στα φύλλα και στις ρίζες μολυσμένων φυτών Col-0 συγκρίθηκε με αυτήν στα φυτά μάρτυρες. Για κάθε χρονική στιγμή συλλέχθηκε ένα δείγμα φύλλων και ένα δείγμα ρίζας από μολυσμένα φυτά καθώς και δείγμα φύλλων και δείγμα ρίζας από μη μολυσμένα φυτά, και πραγματοποιήθηκαν 3 τεχνικές επαναλήψεις. Κάθε δείγμα αποτελούνταν από 10 φυτά.

Για την απομόνωση του ολικού RNA από τους φυτικούς ιστούς για το συγκεκριμένο πείραμα ακολουθήθηκε η ίδια διαδικασία με το πείραμα 1. Ακολούθησε καθαρισμός με DNase I, μέτρηση της συγκέντρωσης RNA του κάθε δείγματος σε φασματοφωτόμετρο nanodrop και αραίωση των δειγμάτων όπως στο πείραμα 1.

Πίνακας 6: Τα ζεύγη εκκινητών που χρησιμοποιήθηκαν για την μελέτη έκφρασης των γονιδίων *PWD*, *GWD1*, *GWD2*, *ISA1* και *DPE2* σε φυτά Col-0 με την μέθοδο της Real time PCR

Γονίδιο στόχος	Ζεύγος εκκινητών	Αναφορά
<i>TUBULIN 4</i> (At4g26410)	5'- GAGCTGAAGTGGCTTCCATGAC-3'	Czechowski <i>et al.</i> , 2005
	5'- GGTCCGACATACCCATGATCC-3'	
<i>PWD</i> (At5g26570)	5'-GCCTCCTTTACTCTTCCAAGGAT-3'	NCBI primer design tool
	5'TGATAAGTCCGGCGAAAGCA-3'	

<i>GWD-1</i> (At1g10760)	5'- ACTGACAAGATCCAGCGCAA- 3'	NCBI primer design tool
	5'- GGCAAAGAGTTTGGTGGCAG – 3'	
<i>GWD-2</i> (At4g24450)	5' – TGAGTGCTCCAATGGCTCTG -3'	NCBI primer design tool
	5' – GCTCCAACCAAGGTCTCTCC – 3'	
<i>ISA-1</i> (At2g39930)	5'-GGTTTCCCAAGGTGTCCCAA-3'	NCBI primer design tool
	5'-CAGTCGTAAGGGCTCGGTTT-3'	
<i>DPE-2</i> (At2g40840)	5'-ATATGCTGGCATGTGGGGAG-3'	NCBI primer design tool
	5'-AAGCGGGAAAATAGCCACAA-3'	

2.7 Πειράματα μεταβολομικής

2.7.1 Χημικά και αντιδραστήρια

Για την ανάλυση των δειγμάτων σε GC/MS πραγματοποιήθηκε η προετοιμασία τους με την χρήση των αντιδραστηρίων πυριδίνη (99,8%), υδροχλωρική μεθοξυλαμίνη (98%), N-methyl-N-(trimethyl-silyl) trifluoroacetamide (MSTFA) και ριβιτόλη. Τα αντιδραστήρια και τα αναλυτικά πρότυπα προμηθεύτηκαν από την εταιρεία Sigma-Aldrich Ltd (Steinheim, Germany). Ο οξικός αιθυλεστέρας και η μεθανόλη (GC/MS grade, 99,9%) προμηθεύτηκαν από την εταιρεία Carlo Erba Reagents (val de Reuil, France)

2.7.2 Βιολογικό υλικό και μόλυνση φυτών *A. thaliana*

Σπόροι φυτών *A. thaliana* μεταλλαγμένων ως προς το γονίδιο *PWD* και σπόροι των αγρίου τύπου φυτών Col-0 φυτεύτηκαν σε πλαστικά γλαστράκια (9 x 9 x 10 εκ.) με αποστειρωμένο χώμα και διατηρήθηκαν στους 25°C με

φωτοπερίοδο 12 ωρών. Μετά από 10 ημέρες έγινε μεταφύτευση των φυτών σε ξεχωριστά πλαστικά γλαστράκια τα οποία περιείχαν περίπου 80 cm³ αποστειρωμένου χώματος και περλίτη. Το πότισμα γινόταν στάγδην, ανά δύο ημέρες, περιμετρικά των φυτών. Τα φυτά ηλικίας 20 ημερών μολύνθηκαν με τους μύκητες *V. dahliae* και *F. oxysporum* μέσω διαβροχής των ριζών με 10mL εναιωρήματος συγκέντρωσης 10⁷ κονιδίων mL⁻¹ αποστειρωμένου απιονισμένου νερού για τον κάθε μύκητα. Το μόλυσμα τοποθετήθηκε με σύριγγα στο χώμα σε 3 σημεία γύρω από την ρίζα του φυτού. Στα φυτά μάρτυρες πραγματοποιήθηκε διαβροχή των ριζών με 10 mL αποστειρωμένου απιονισμένου νερού. Η συγκομιδή του φυτικού ιστού πραγματοποιήθηκε στις 72 και 96 ώρες μετά την μόλυνση του εδάφους των φυτών και ακολούθησε η προετοιμασία για την εκχύλιση των μεταβολιτών. Οι χρονικές στιγμές επιλέχθηκαν έτσι ώστε να γίνει ανάλυση του μεταβολισμού των φυτών κατά την έναρξη της μόλυνσης από τα παθογόνα. Κάθε εφαρμογή αποτελούνταν από 5 βιολογικές επαναλήψεις των 4 φυτών.

2.7.3 Δειγματοληψία και προετοιμασία δειγμάτων για μεταβολομική ανάλυση

Στις 72 και 96 ώρες μετά την μόλυνση του εδάφους συγκομίστηκαν 3-5 φύλλα ανά φυτό από μολυσμένα και μη μολυσμένα φυτά. Για να σταματήσει άμεσα ο μεταβολισμός των φυτών αμέσως μετά την συγκομιδή τα φύλλα τοποθετήθηκαν σε υγρό άζωτο και στην συνέχεια διατηρήθηκαν στους -80°C. Ακολούθησε κονιορτοποίηση του φυτικού ιστού σε πορσελάνινο γουδί με γουδοχέρι με υγρό άζωτο και τοποθέτηση 30mg κονιορτοποιημένου φυτικού ιστού σε σωληνάριο τύπου erpendorf χωρητικότητας 1.5 mL. Η εκχύλιση πραγματοποιήθηκε με την προσθήκη 0,5 mL μείγματος οξικού αιθυλεστέρα-

μεθανόλης (50:50 v/v). Ως εσωτερικό πρότυπο στα εκχυλίσματα προστέθηκε διάλυμα ριβιτόλης σε μεθανόλη (20 mg mL^{-1}). Στη συνέχεια για την εκχύλιση, τα δείγματα τοποθετήθηκαν σε λουτρό υπερήχων (ultrasonic bath) για 20 λεπτά και μεταφέρθηκαν σε περιστροφικό αναδευτήρα υπό συνεχή ανακίνηση (150 rpm) για δύο ώρες στους 24°C . Ακολούθησε φιλτράρισμα των εκχυλισμάτων για τον καθαρισμό τους με την χρήση συρίγγων και ειδικών σε αυτά προσαρτημένων φίλτρων ($0,2\mu\text{m}$). Τελικά, με την χρήση συμπυκνωτή τα εκχυλίσματα αποξηραίνονταν (οι οργανικοί διαλύτες απομακρύνονταν).

2.7.4 Χημική ανάλυση

Για την παραγωγοποίηση των δειγμάτων (derivatization) για ανάλυση σε GC/MS πραγματοποιήθηκε μεθοξυποίηση προσθέτοντας στα αποξηραμένα δείγματα 80 μL υδροχλωρικής μεθοξυλαμίνης (20 mg/mL σε πυριδίνη) και επώαση σε υδατόλουτρο (Daihan Labtech, Gyeonggi-do, Korea) στους 30°C για 120 min. Ως δεύτερο στάδιο, πραγματοποιήθηκε σιλυλίωση με την προσθήκη 80 μL MSTFA σε κάθε σωληνάριο τύπου erpendorf και τα δείγματα παρέμειναν σε υδατόλουτρο για 90 min στους 37°C .

Τα παραγωγοποιημένα δείγματα τοποθετήθηκαν στην συνέχεια σε μικροεπεξεργαστές (150 μL , Fischer Scientific Company), οι οποίοι με την σειρά τους τοποθετήθηκαν σε αυτόματους δειγματολήπτες (2mL). Για τις αναλύσεις των μεταβολιτών χρησιμοποιήθηκε πλατφόρμα Agilent 7890A GC (Agilent Technologies Inc.) με ανιχνευτή μάζας 5973 (inertmass selective detector, MSD) και αυτόματο δειγματολήπτη 7683 (autosampler). Σε στήλη GC (HP-5MS, μήκους 30 m, διαμέτρου 0.25 mm, πάχος υμενίου $0.25 \mu\text{m}$ – Agilent Technologies Inc) με συχνότητα έκχυσης 10:1 και θερμοκρασία έκχυσης στους 230°C εγχύθηκε 1 μL των δειγμάτων. Ως

φέρων αέριο χρησιμοποιήθηκε ήλιο με ρυθμό ροής 1 mL min^{-1} . Η θερμοκρασία του κλιβάνου ήταν αρχικά σταθερή στους 70°C για 5 min, ακολουθούμενη από μια αύξηση των 5°C min^{-1} μέχρι τους 295°C και τελικά σταθεροποιήθηκε για 1 min. Ο τρόπος ιονισμού ήταν θετικός ιονισμός ηλεκτρονίων στα 70eV . Φάσματα μαζών πλήρους σάρωσης αποκτήθηκαν στο εύρος μαζών 50-800 Da με συχνότητα 2 σαρώσεις ανά 4 δείγματα και με 10min καθυστέρηση διαλύτη. Η θερμοκρασία για την πηγή MS ήταν 230°C και για το τετράπολο 150°C .

2.7.5 Βιοπληροφορική - Κατασκευή μεταβολικών δικτύων της *A. thaliana*

Ακολούθησε προεπεξεργασία των φασμάτων με το λογισμικό MS DIAL και πολυπαραγοντική ανάλυση των μεταβολικών προφίλ για τον έλεγχο των τάσεων και τον προσδιορισμό των βιοδεικτών (biomarkers). Το λογισμικό που χρησιμοποιήθηκε για την πολυπαραγοντική ανάλυση ήταν το SIMCA-P + v.12.0 (Umetrics, MKS Instruments Inc. Umea, Sweeden). Η ανίχνευση των βιοδεικτών έγινε με την βοήθεια της ανάλυσης ορθογώνιων μερικών ελαχίστων τετραγώνων (orthogonal partial least squares - discriminant analysis, OPLS-DA) ($P < 0.05$). Πρότυπα σφάλματα υπολογίστηκαν με τη μέθοδο Jackknifing με 95% διάστημα εμπιστοσύνης.

Για τον καλύτερο έλεγχο της επίδρασης των επεμβάσεων στον μεταβολισμό του φυτού κατασκευάστηκαν σχηματικά τα μεταβολικά δίκτυα του φυτού και φαίνεται πως επηρεάζεται ο κάθε μεταβολίτης ξεχωριστά σε κάθε επέμβαση. Ο κόκκινος χρωματισμός υποδηλώνει την υπεραύξηση της παραγωγής του μεταβολίτη μετά από κάποια επέμβαση, ο πράσινος χρωματισμός υποδηλώνει την μειωμένη παραγωγή του μεταβολίτη, ενώ με

μαύρο χρωματισμό είναι οι μεταβολίτες που δεν μεταβλήθηκε η συγκέντρωσή τους κατά τις επεμβάσεις.

3. Αποτελέσματα

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

Για να ελεγχθεί εάν η ανθεκτικότητα που εμφάνισαν τα μεταλλαγμένα φυτά ως προς τα γονίδια *PWD*, *GWD2*, *DPE2* και *ISA1* οφείλεται σε ενεργοποίηση της άμυνας των φυτών εξετάστηκε η έκφραση των γονιδίων *PR1* και *PDF1.2* τα οποία αποτελούν δείκτες της ενεργοποίησης των μονοπατιών του σαλικυλικού οξέος και του ιασμονικού/αιθυλενίου, αντίστοιχα (Feys *et al.* 2000; Schenk *et al.* 2000).

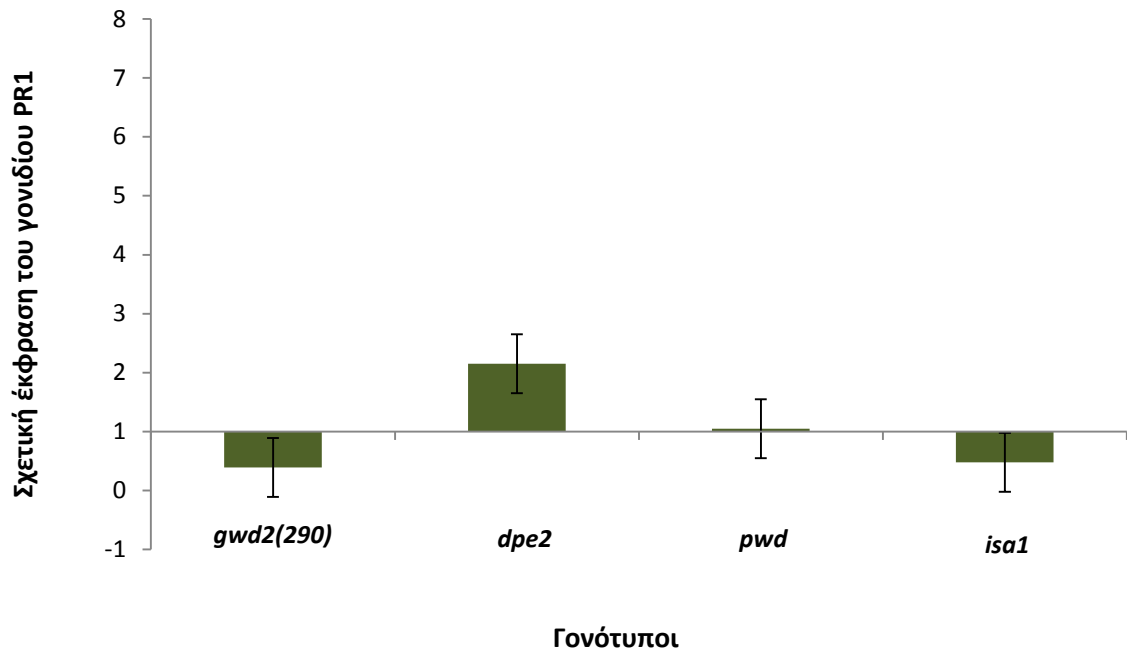
Η καταγραφή της έκφρασης των γονιδίων *PR1* και *PDF1.2* στο υπέργειο μέρος και στις ρίζες των μεταλλαγμένων σειρών *pwd*, *gwd2*, *dpe2* και *isa1* σε σύγκριση με αυτήν στα αγρίου τύπου φυτά Col-0 πραγματοποιήθηκε σε δείγματα που συλλέχθηκαν στις 3, 7 και 14 ημέρες μετά την μόλυνση με τους μύκητες *Verticillium dahliae* και *Fusarium oxysporum*. Το ολικό RNA απομονώθηκε από το υπέργειο μέρος και από τις ρίζες των φυτών και μετατράπηκε σε cDNA ώστε να χρησιμοποιηθεί για την μελέτη της έκφρασης των γονιδίων με την χρήση Real-time quantitative PCR (qPCR). Τα επίπεδα έκφρασης του κάθε γονιδίου κανονικοποιήθηκαν σε σχέση με την έκφραση του γονιδίου τουμπουλίνη 4 (*tubulin 4*, *At4g26410*) στα ίδια δείγματα, και εκφράστηκαν σε σχέση με τα κανονικοποιημένα επίπεδα μεταγραφής των ίδιων γονιδίων στα μολυσμένα Col-0 φυτά.

3.1.1 Μόλυνση με τον μύκητα *Verticillium dahliae*

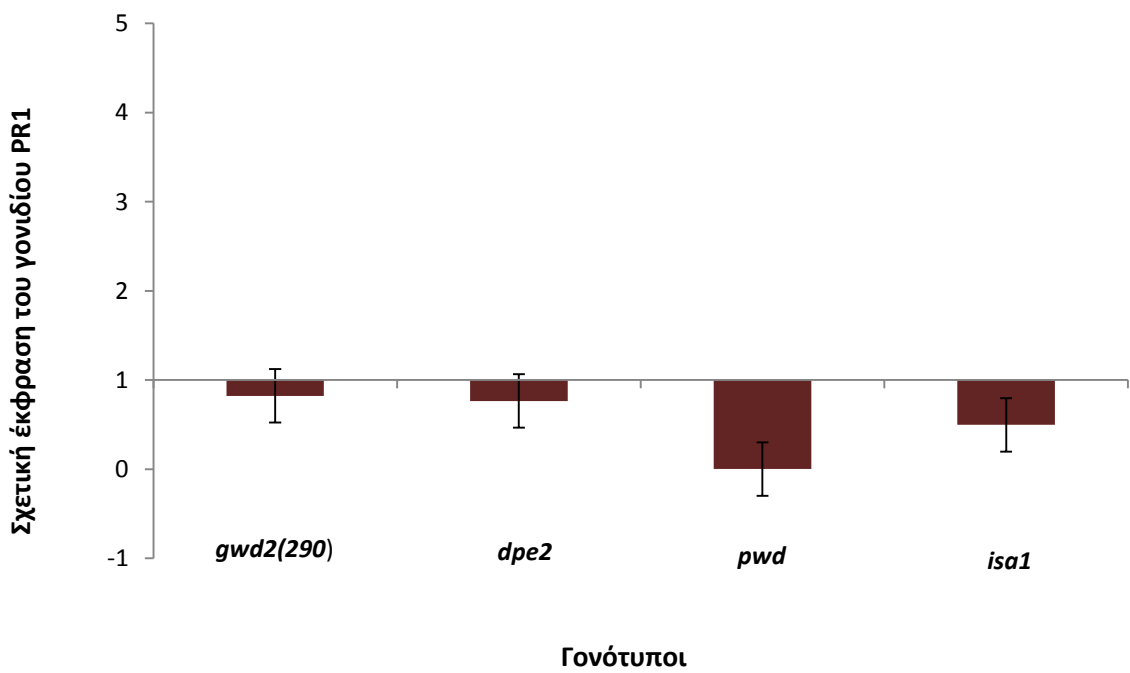
Στο υπέργειο μέρος των φυτών η έκφραση του γονιδίου *PR1* για τις 3 ημέρες μετά την μόλυνση με τον μύκητα *V. dahliae* εμφανίζεται αυξημένη στις μεταλλαγμένες σειρές *dpe2* και *rwd* και μειωμένη στις σειρές *gwd2(290)* και *isa1* σε σχέση με την έκφραση του γονιδίου στα αγρίου τύπου φυτά Col-0 (Γράφημα 1A). Στις 7 ημέρες μετά την μόλυνση παρουσιάζεται σημαντική υπερέκφραση του γονιδίου σε όλες τις σειρές και κυρίως στην σειρά *isa1* (Γράφημα 2A) ενώ στις 14 ημέρες μετά την μόλυνση παρατηρείται υπερέκφραση του γονιδίου στις σειρές *gwd2(290)* και *dpe2* ενώ στις σειρές *rwd* και *isa1* υπάρχει υποέκφραση του γονιδίου σε σχέση με τα αγρίου τύπου φυτά (Γράφημα 3A). Σε αντίθεση με το υπέργειο μέρος, στις ρίζες παρουσιάζεται μια πιο σταθερή εικόνα έκφρασης του γονιδίου *PR1*. Συγκεκριμένα, στις 3 ημέρες μετά την μόλυνση έχουμε μειωμένη έκφραση του γονιδίου σε όλες τις μεταλλαγμένες σειρές σε σχέση με τα αγρίου τύπου φυτά, με την σειρά *rwd* να παρουσιάζει την μεγαλύτερη υποέκφραση (Γράφημα 1B), ενώ στις 7 και 14 ημέρες μετά την μόλυνση το γονίδιο υπερεκφράζεται σε όλες τις μεταλλαγμένες σειρές με την σειρά *isa1* να παρουσιάζει την σημαντικότερη υπερέκφραση και στις δύο χρονικές στιγμές (Γράφημα 2B και 3B).

Όσον αφορά την έκφραση του γονιδίου *PDF1.2* στο υπέργειο μέρος των μεταλλαγμένων φυτών, για τις 3 ημέρες μετά την μόλυνση με τον μύκητα *V. dahliae*, παρατηρείται υπερέκφραση σε όλες τις μεταλλαγμένες σειρές με την μεγαλύτερη να παρουσιάζεται στην σειρά *isa1* (Γράφημα 4A). Στις 7 ημέρες μετά την μόλυνση υπάρχει αυξημένη έκφραση του γονιδίου στις μεταλλαγμένες σειρές *dpe2* και *rwd* (Γράφημα 5A) ενώ στις 14 ημέρες μετά την μόλυνση σημαντική αύξηση της έκφρασης έχουμε στην σειρά *isa1* σε

σχέση με τα αγρίου τύπου φυτά Col-0 (Γράφημα 6A). Στις ρίζες, η έκφραση του γονιδίου είναι αυξημένη στην σειρά *dpe2* για τις 7 ημέρες μετά την μόλυνση (Γράφημα 5B) και στις σειρές *gwd2(290)* και *isa1* για τις 14 ημέρες μετά την μόλυνση (Γράφημα 6B) . Η έκφραση του γονιδίου στις υπόλοιπες σειρές είναι είτε μειωμένη είτε οριακά αυξημένη σε σχέση με την έκφραση στα μη μεταλλαγμένα φυτά Col-0.

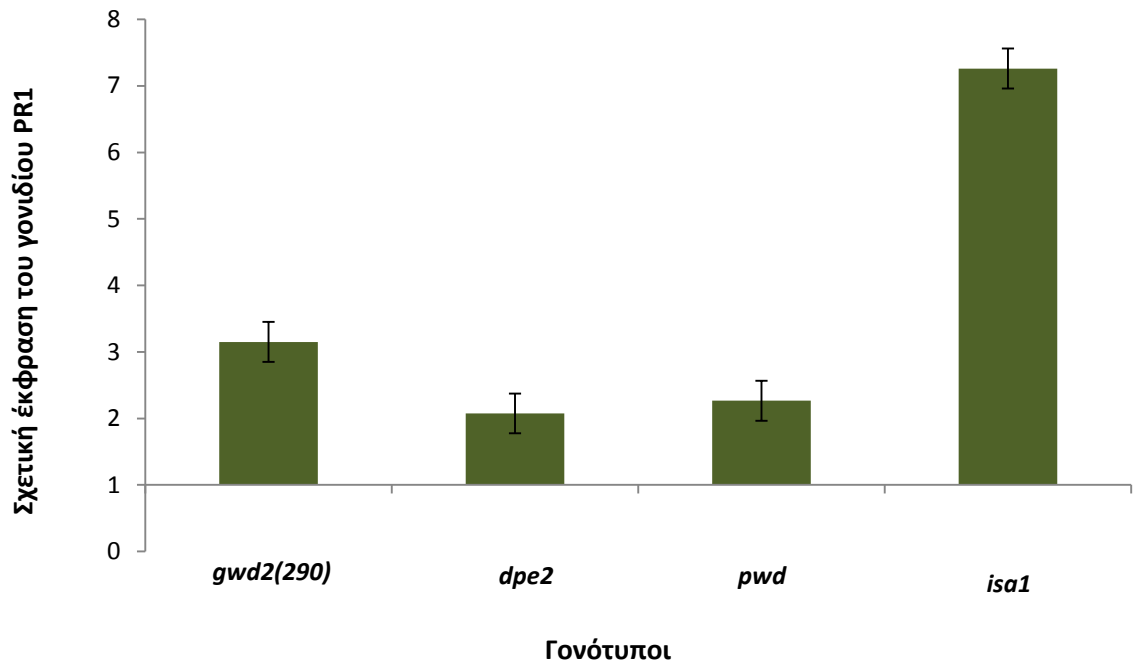


(A)

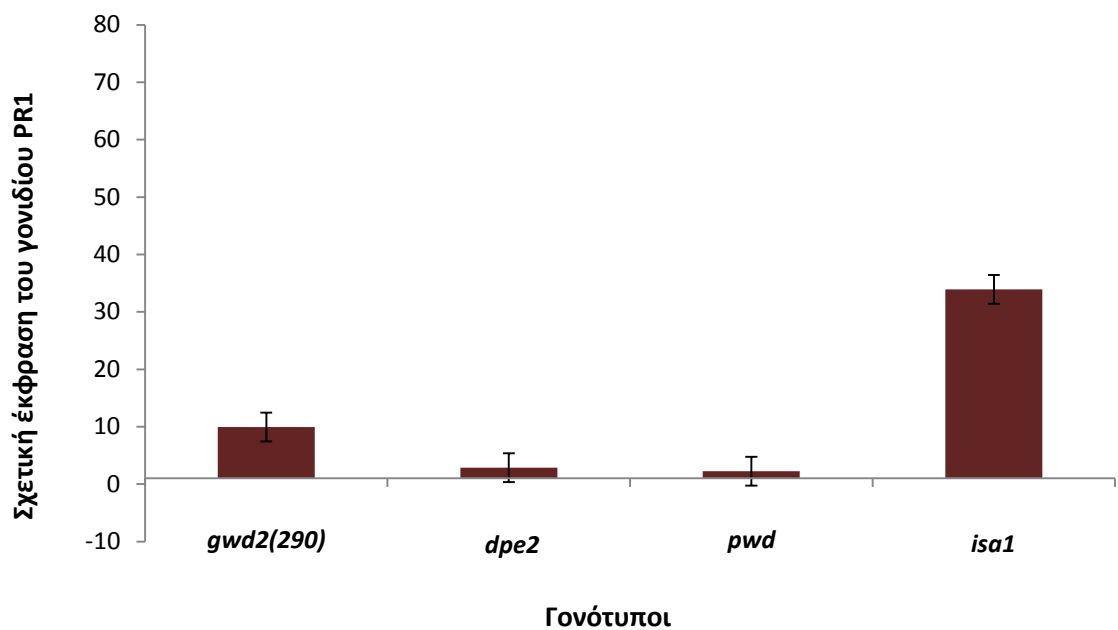


(B)

Γράφημα 1: Σχετική έκφραση του γονιδίου *PR1* στο υπέργειο μέρος **(A)** και στις ρίζες **(B)** των μεταλλαγμένων σειρών *gwd2(290)*, *dpe2*, *pwd* και *isa1* σε σύγκριση με την έκφραση του γονιδίου στα αγρίου τύπου φυτά Col-0 3 ημέρες μετά την μόλυνση με τον μύκητα *V. dahliae*. Κάθε στήλη αντιπροσωπεύει την μέση έκφραση του γονιδίου *PR1* σε διαφορετική μεταλλαγμένη σειρά και οι κάθετες γραμμές αντιπροσωπεύουν το τυπικό σφάλμα για 3 επαναλήψεις.

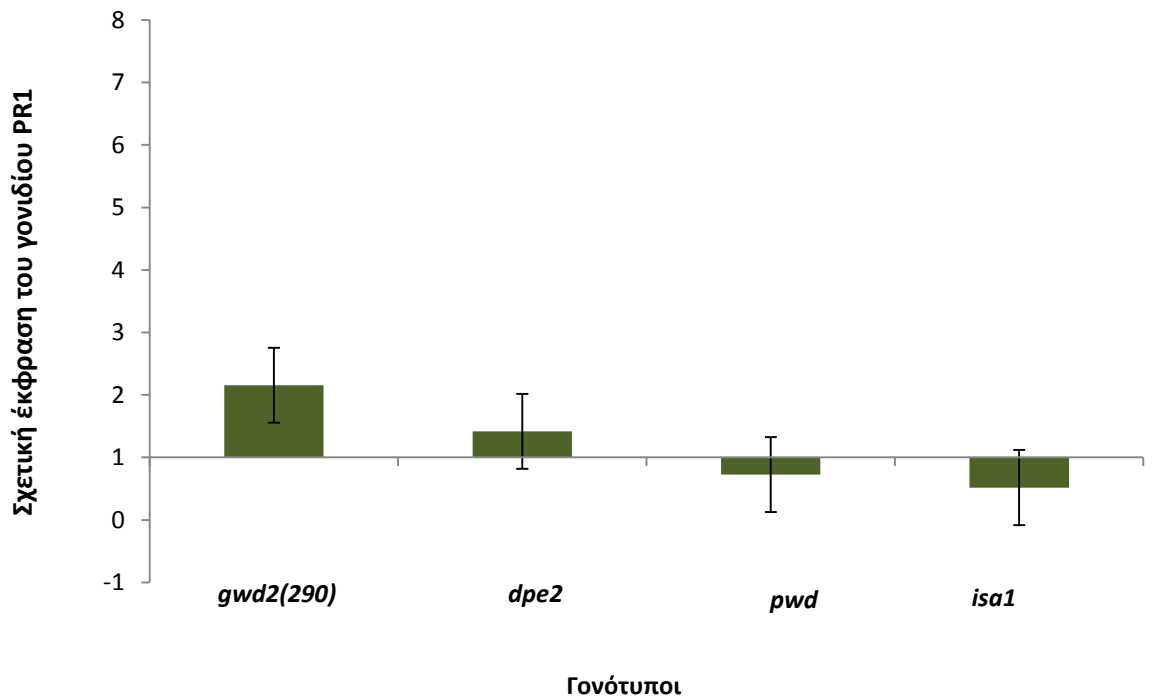


(A)

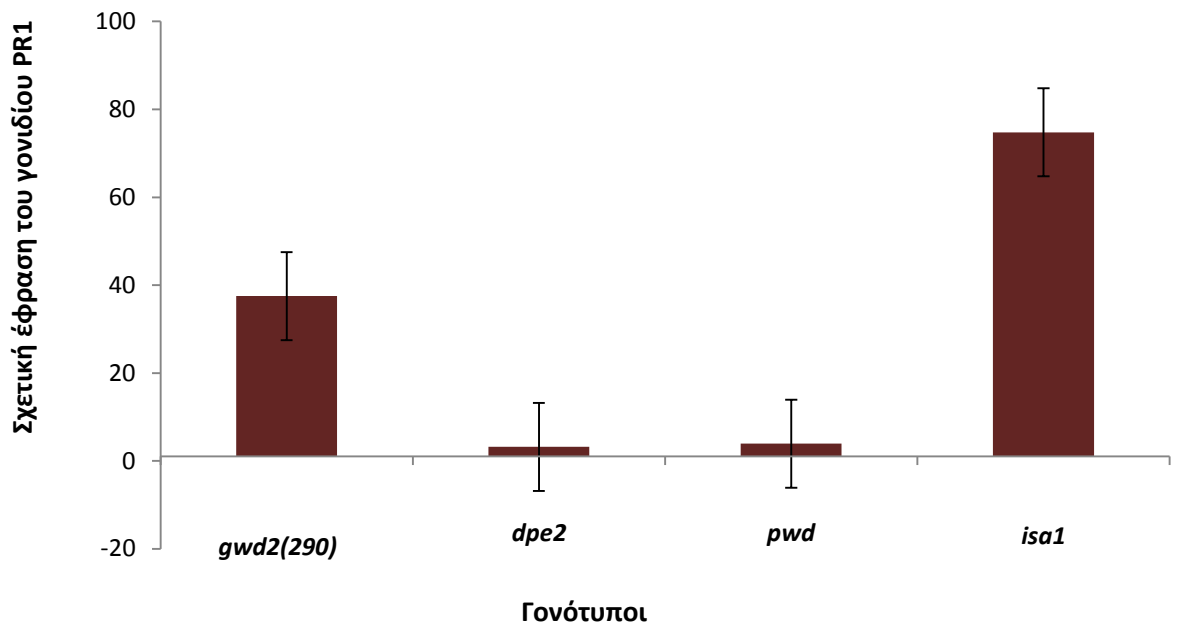


(B)

Γράφημα 2: Σχετική έκφραση του γονιδίου *PR1* στο υπέργειο μέρος (A) και στις ρίζες (B) των μεταλλαγμένων σειρών *gwd2(290)*, *dpe2*, *pwd* και *isa1* σε σύγκριση με την έκφραση του γονιδίου στα αγρίου τύπου φυτά Col-0 7 ημέρες μετά την μόλυνση με τον μύκητα *V. dahliae*. Κάθε στήλη αντιπροσωπεύει την μέση έκφραση του γονιδίου *PR1* σε διαφορετική μεταλλαγμένη σειρά και οι κάθετες γραμμές αντιπροσωπεύουν το τυπικό σφάλμα για 3 επαναλήψεις.

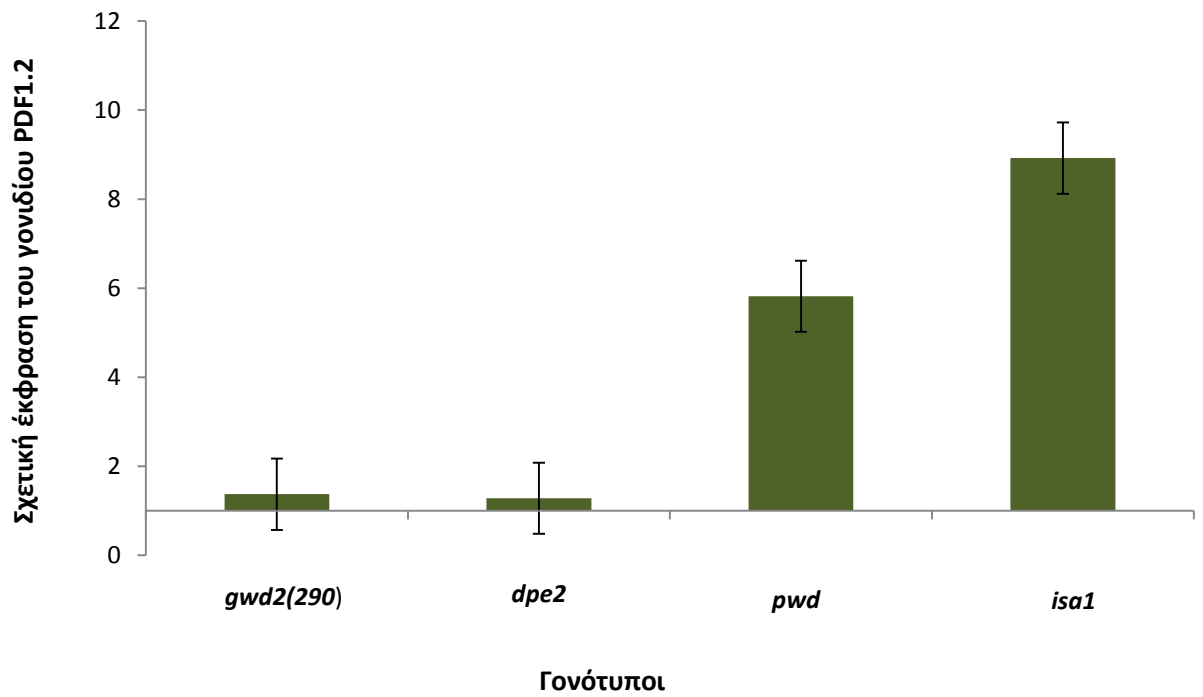


(A)

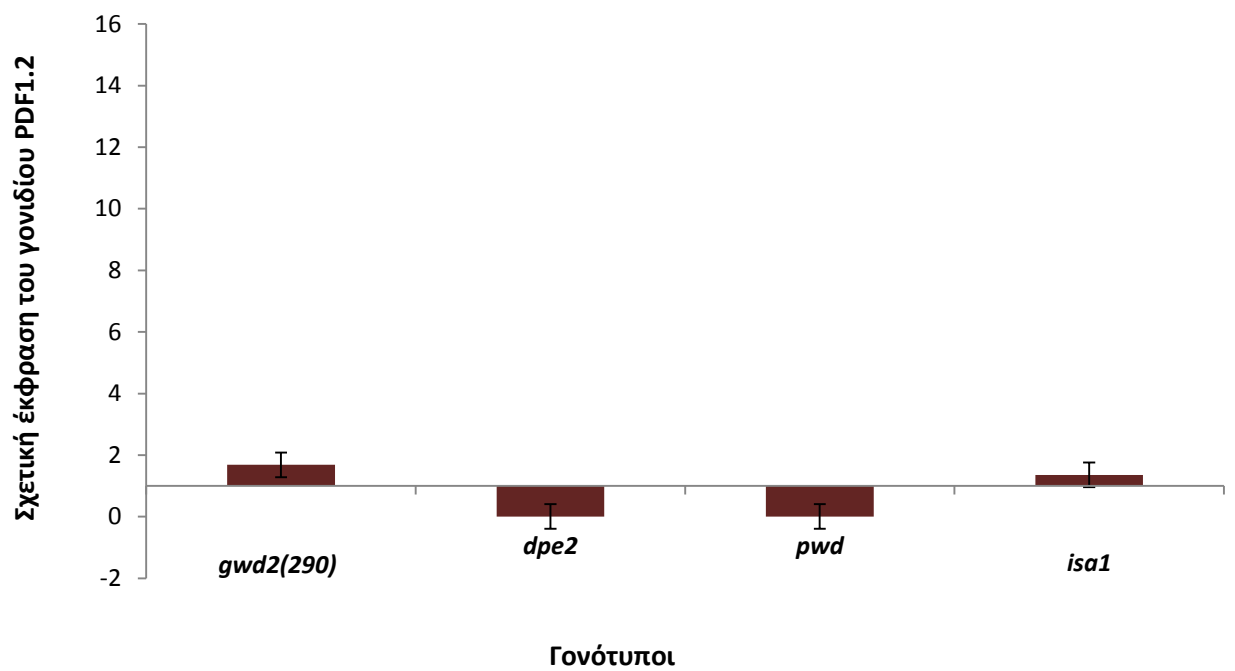


(B)

Γράφημα 3: Σχετική έκφραση του γονιδίου *PR1* στο υπέργειο μέρος (A) και στις ρίζες (B) των μεταλλαγμένων σειρών *gwd2(290)*, *dpe2*, *pwd* και *isa1* σε σύγκριση με την έκφραση του γονιδίου στα αγρίου τύπου φυτά Col-0 14 ημέρες μετά την μόλυνση με τον μύκητα *V. dahliae*. Κάθε στήλη αντιπροσωπεύει την μέση έκφραση του γονιδίου *PR1* σε διαφορετική μεταλλαγμένη σειρά και οι κάθετες γραμμές αντιπροσωπεύουν το τυπικό σφάλμα για 3 επαναλήψεις

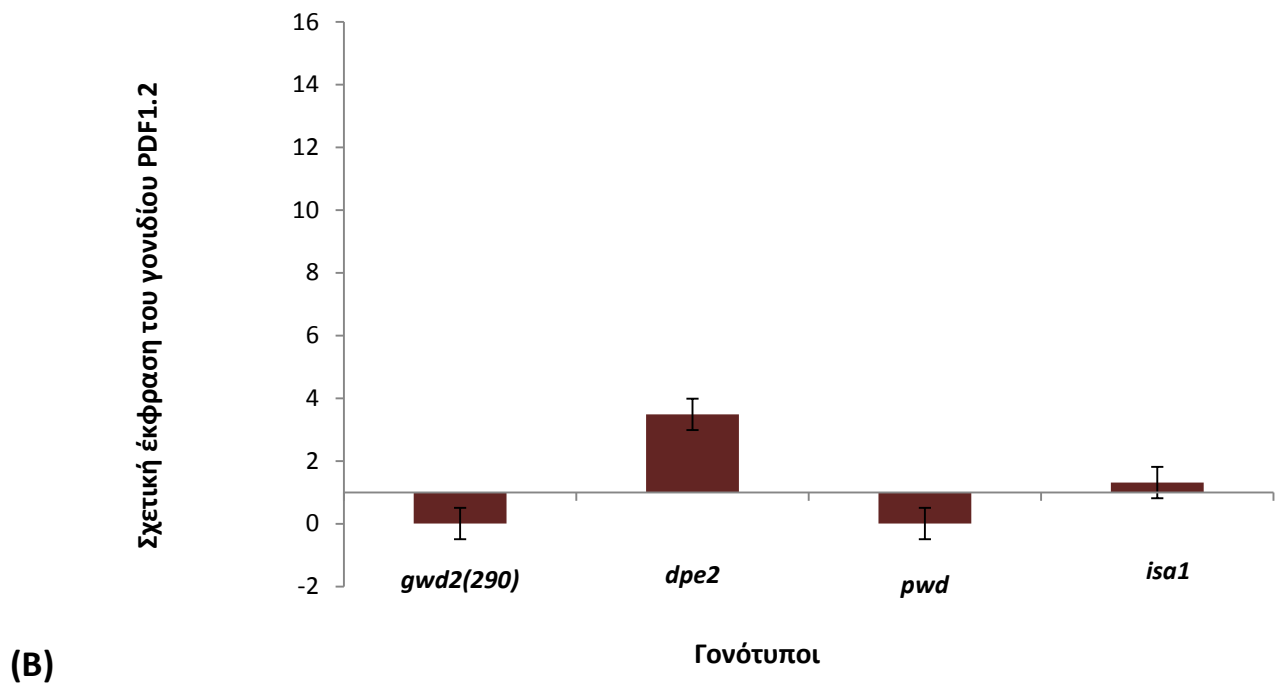
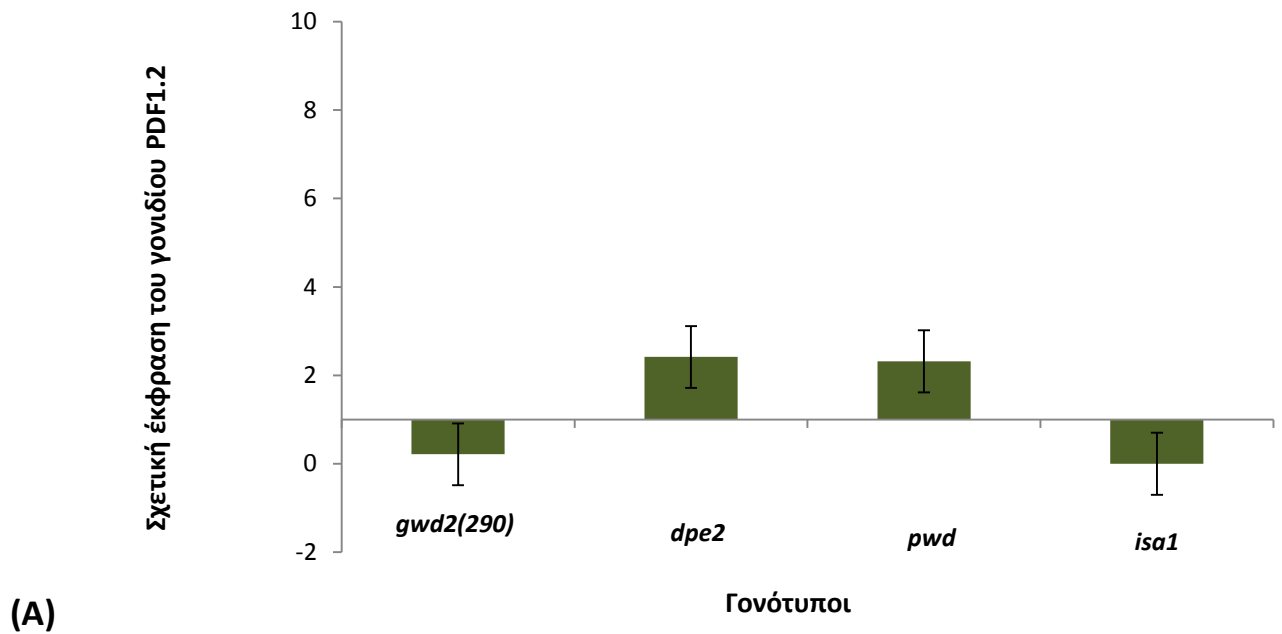


(A)

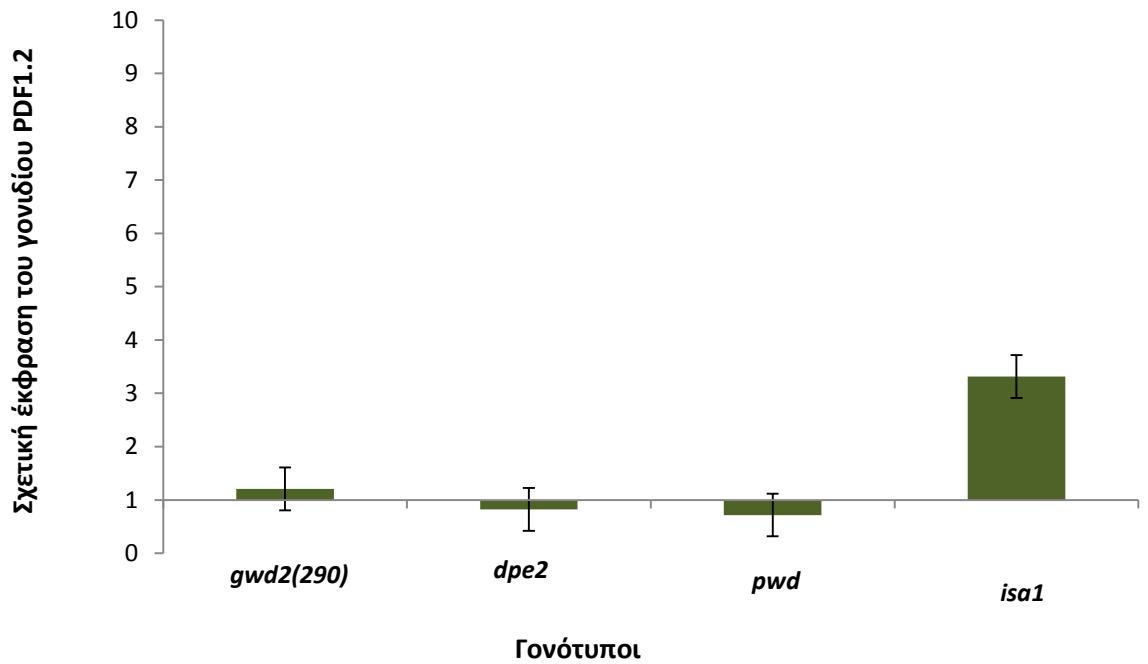


(B)

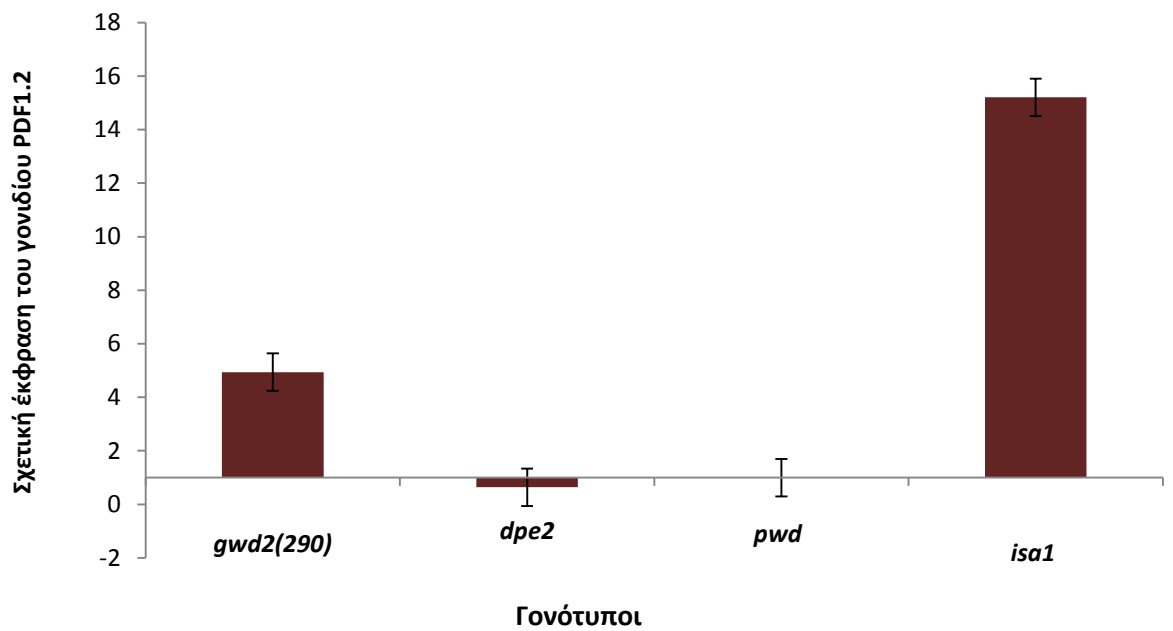
Γράφημα 4: Σχετική έκφραση του γονιδίου *PDF1.2* στο υπέργειο μέρος (A) και στις ρίζες (B) των μεταλλαγμένων σειρών *gwd2(290)*, *dpe2*, *pwd* και *isa1* σε σύγκριση με την έκφραση του γονιδίου στα αγρίου τύπου φυτά Col-0 3 ημέρες μετά την μόλυνση με τον μύκητα *V. dahliae*. Κάθε στήλη αντιπροσωπεύει την μέση έκφραση του γονιδίου *PDF1.2* σε διαφορετική μεταλλαγμένη σειρά και οι κάθετες γραμμές αντιπροσωπεύουν το τυπικό σφάλμα για 3 επαναλήψεις



Γράφημα 5: Σχετική έκφραση του γονιδίου *PDF1.2* στο υπέργειο μέρος **(A)** και στις ρίζες **(B)** των μεταλλαγμένων σειρών *gwd2(290)*, *dpe2*, *pwd* και *isa1* σε σύγκριση με έκφραση του γονιδίου στα αγρίου τύπου φυτά Col-0 7 ημέρες μετά την μόλυνση με τον μύκητα *V. dahliae*. Κάθε στήλη αντιπροσωπεύει την μέση έκφραση του γονιδίου *PDF1.2* σε διαφορετική μεταλλαγμένη σειρά και οι κάθετες γραμμές αντιπροσωπεύουν το τυπικό σφάλμα για 3 επαναλήψεις



(A)



(B)

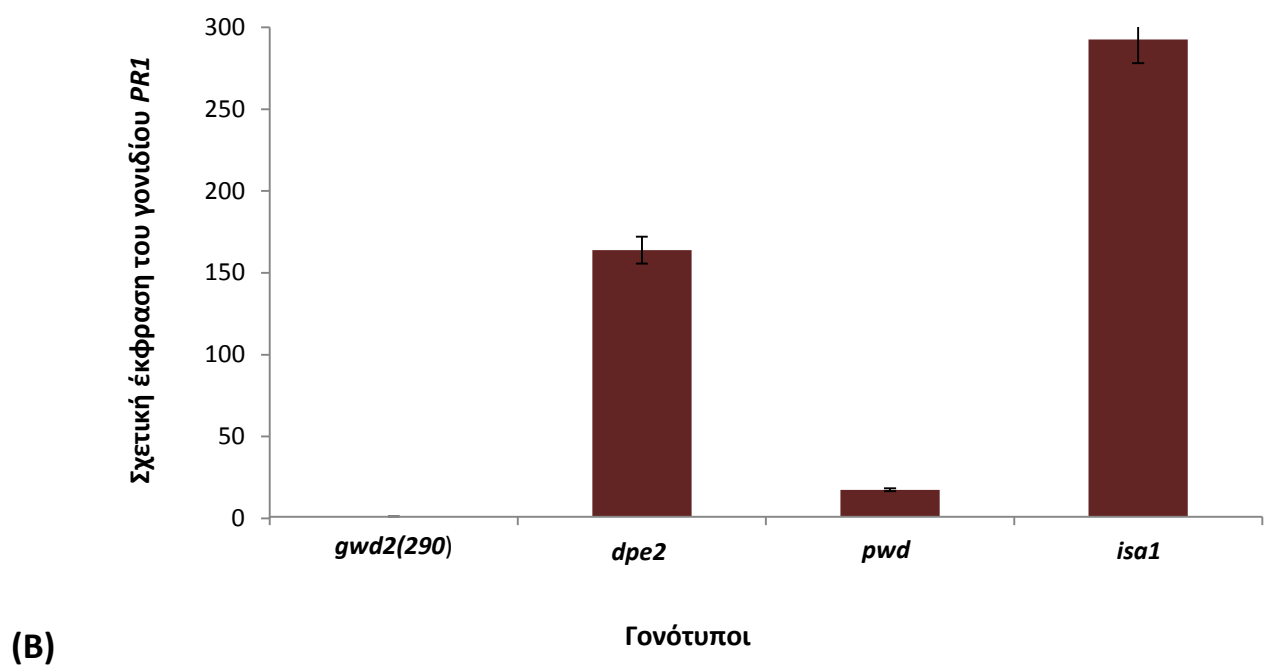
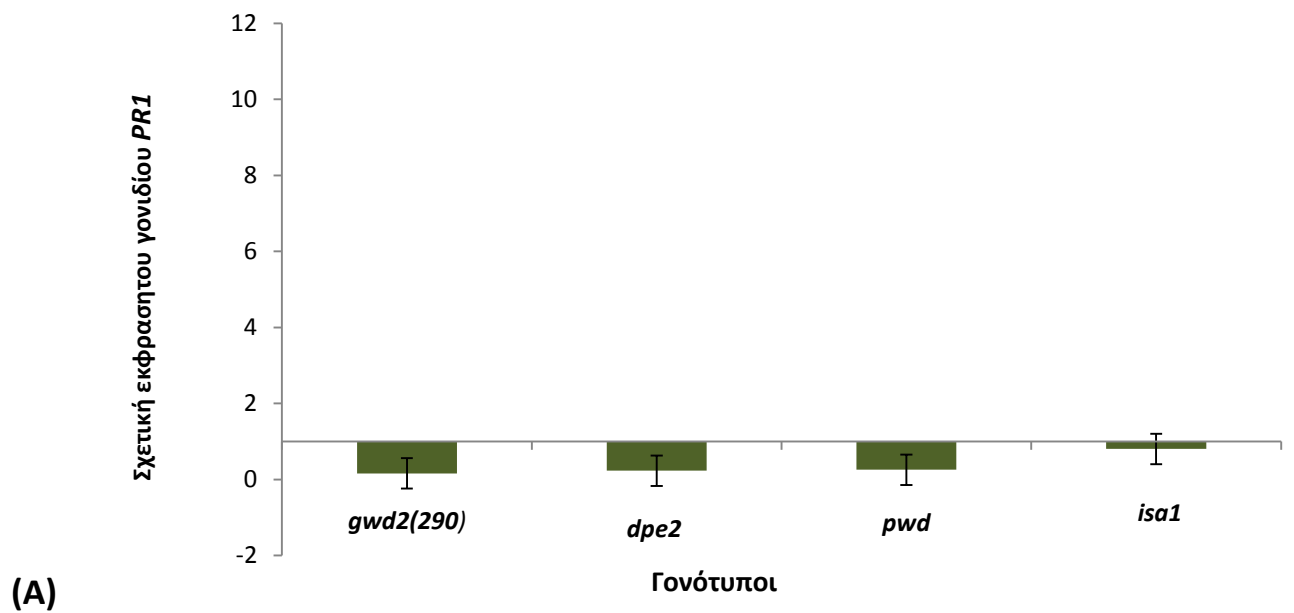
Γράφημα 6: Σχετική έκφραση του γονιδίου *PDF1.2* στο υπέργειο μέρος (A) και στις ρίζες (B) των μεταλλαγμένων σειρών *gwd2(290)*, *dpe2*, *pwd* και *isa1* σε σύγκριση με την έκφραση του γονιδίου στα αγρίου τύπου φυτά Col-0 14 ημέρες μετά την μόλυνση με τον μύκητα *V. dahliae*. Κάθε στήλη αντιπροσωπεύει την μέση έκφραση του γονιδίου *PDF1.2* σε διαφορετική μεταλλαγμένη σειρά και οι κάθετες γραμμές αντιπροσωπεύουν το τυπικό σφάλμα για 3 επαναλήψεις

3.1.2 Μόλυνση με τον μύκητα *Fusarium oxysporum*

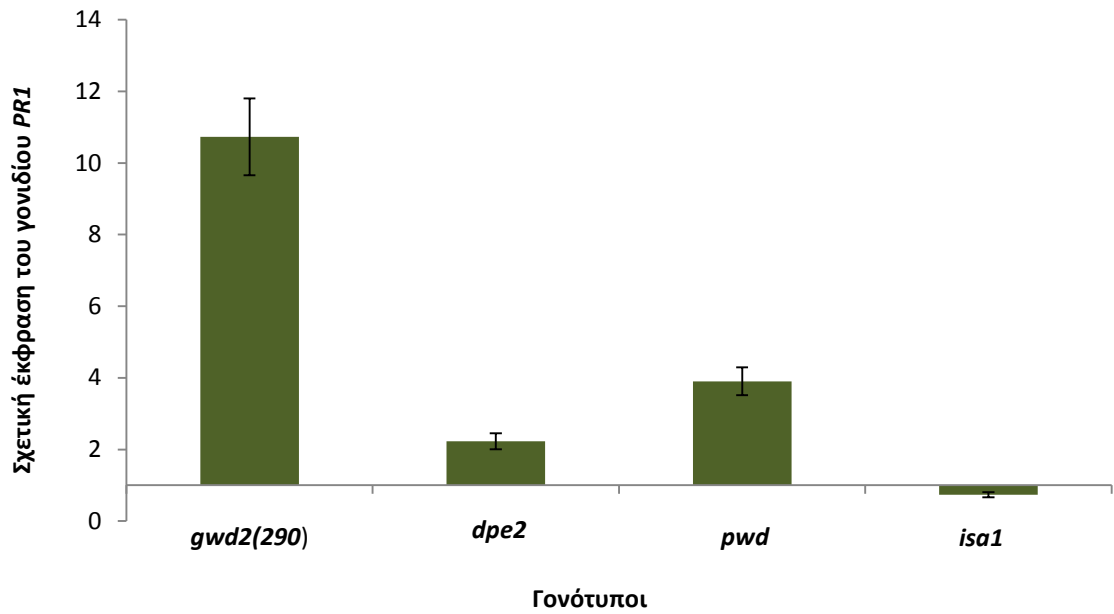
Η έκφραση του γονιδίου *PR1* στο υπέργειο μέρος των μεταλλαγμένων σειρών που είχαν μολυνθεί με τον μύκητα *F. oxysporum* ήταν μειωμένη συγκριτικά με την έκφραση του γονιδίου στα αγρίου τύπου φυτά 3 ημέρες μετά την μόλυνση, με την μεγαλύτερη υποέκφραση να παρουσιάζεται στην σειρά *gwd2(290)* (Γράφημα 7A). Αντιθέτως, 7 ημέρες μετά την μόλυνση το γονίδιο υπερεκφράζεται στην μεταλλαγμένη σειρά *gwd2(290)* καθώς και στις μεταλλαγμένες σειρές *dpe2* και *rwd* ενώ στην σειρά *isa1* υποεκφράζεται σε σχέση με τα μη μεταλλαγμένα φυτά Col-0 (Γράφημα 8A). Το γονίδιο *PR1* εξακολουθεί να υπερεκφράζεται στις μεταλλαγμένες σειρές *dpe2* και *rwd* 14 ημέρες μετά την μόλυνση, στην σειρά *gwd2(290)* υποεκφράζεται ενώ στην σειρά *isa1* δεν υπάρχει σημαντική διαφοροποίηση σε σχέση με τα Col-0 (Γράφημα 9A). Στις ρίζες των μεταλλαγμένων φυτών, 3 ημέρες μετά την μόλυνση, παρουσιάζεται ακριβώς η αντίθετη εικόνα από εκείνη που παρατηρήθηκε στο υπέργειο μέρος των αντίστοιχων μεταλλαγμένων σειρών καθώς η έκφραση του γονιδίου ήταν αυξημένη σε όλες τις σειρές σε σχέση με τα Col-0. Το γονίδιο συνεχίζει να υπερεκφράζεται σε όλες τις μεταλλαγμένες σειρές εκτός από την *isa1*, όπου υποεκφράζεται, 7 ημέρες μετά την μόλυνση (Γράφημα 8B). Τελικά, 14 ημέρες μετά την μόλυνση, υπήρξε υπερέκφραση του γονιδίου στις μεταλλαγμένες σειρές *dpe2* και *isa1* και υποέκφρασή του στις *gwd2(290)* και *rwd* συγκριτικά με τα μη μεταλλαγμένα φυτά (Γράφημα 9B).

Η έκφραση του γονιδίου *PDF1.2* 3 ημέρες μετά την μόλυνση στα φύλλα των μεταλλαγμένων σειρών δεν είχε σημαντική διαφοροποίηση σε σχέση με τα Col-0 εκτός από την υπερέκφραση του γονιδίου στην σειρά *gwd2(290)* (Γράφημα 10A). Στη συνέχεια, 7 ημέρες μετά την μόλυνση, το γονίδιο υποεκφράζεται στην σειρά *rwd* ενώ στις υπόλοιπες υπερεκφράζεται

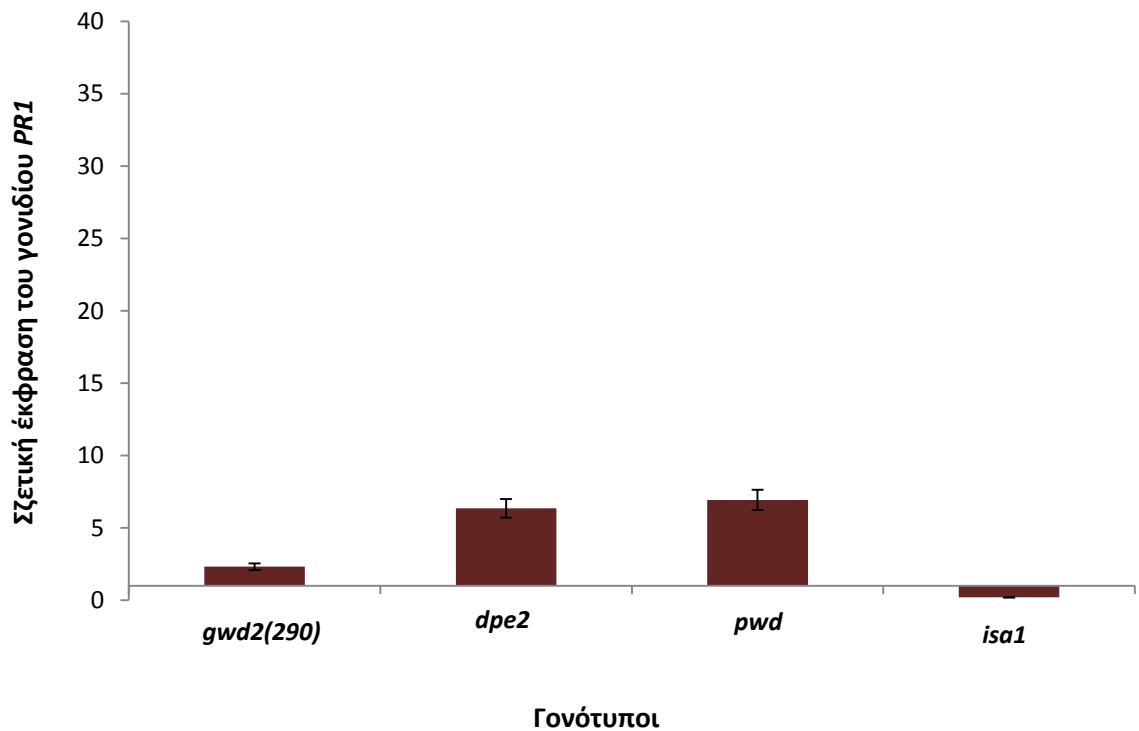
(Γράφημα 11A). Στις 14 ημέρες μετά την μόλυνση παρουσιάζεται μικρή αύξηση της έκφρασης στην σειρά *dpe2* και πολύ μεγάλη αύξηση στην σειρά *isa1* συγκριτικά με τα Col-0, ενώ στις υπόλοιπες σειρές το γονίδιο υποεκφράζεται (Γράφημα 12A). Όσον αφορά τις ρίζες, το γονίδιο υπερεκφράστηκε σε μεγάλο βαθμό σε όλες σχεδόν τις μεταλλαγμένες σειρές 3 ημέρες μετά την μόλυνση με τον μύκητα *F. oxysporum* (Γράφημα 10B) σε αντίθεση με τις υπόλοιπες χρονικές στιγμές όπου υπάρχει υψηλή έκφραση του γονιδίου σε σχέση με την έκφραση του ίδιου γονιδίου στα αγρίου τύπου φυτά Col-0 μόνο στην μεταλλαγμένη σειρά *isa1* (Γράφημα 11B, 12B).



Γράφημα 7: Σχετική έκφραση του γονιδίου *PR1* στο υπέργειο μέρος **(A)** και στις ρίζες **(B)** των μεταλλαγμένων σειρών *gwd2(290)*, *dpe2*, *pwd* και *isa1* σε σύγκριση με την έκφραση του γονιδίου στα αγρίου τύπου φυτά Col-0 3 ημέρες μετά την μόλυνση με τον μύκητα *F. oxysporum*. Κάθε στήλη αντιπροσωπεύει την μέση έκφραση του γονιδίου *PR1* σε διαφορετική μεταλλαγμένη σειρά και οι κάθετες γραμμές αντιπροσωπεύουν το τυπικό σφάλμα για 3 επαναλήψεις.

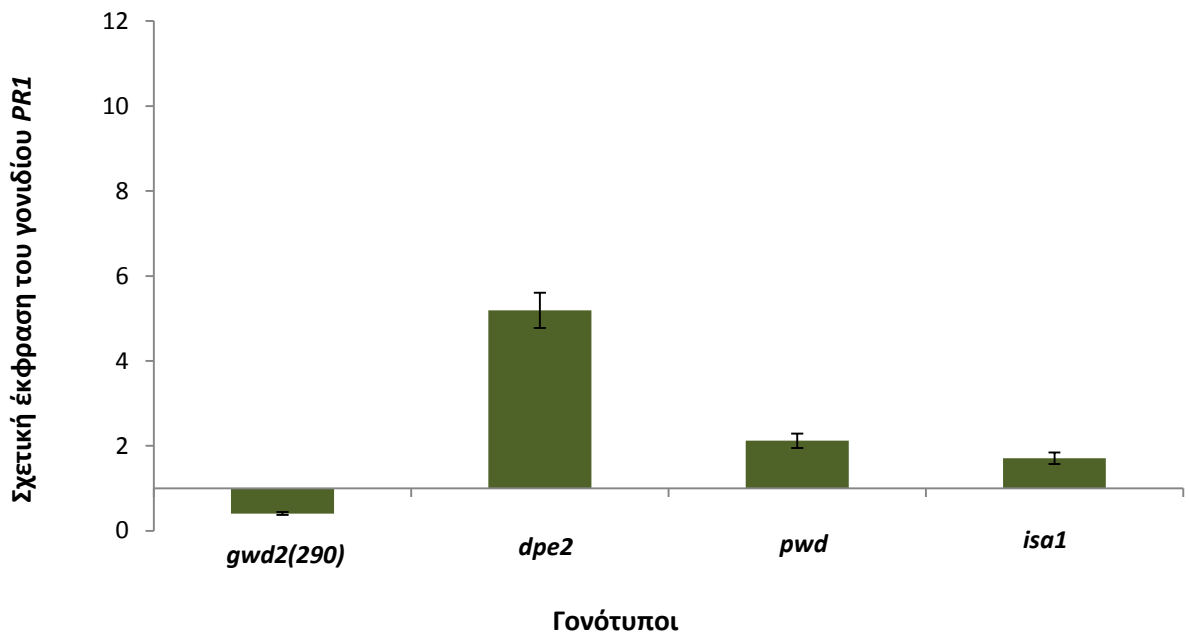


(A)

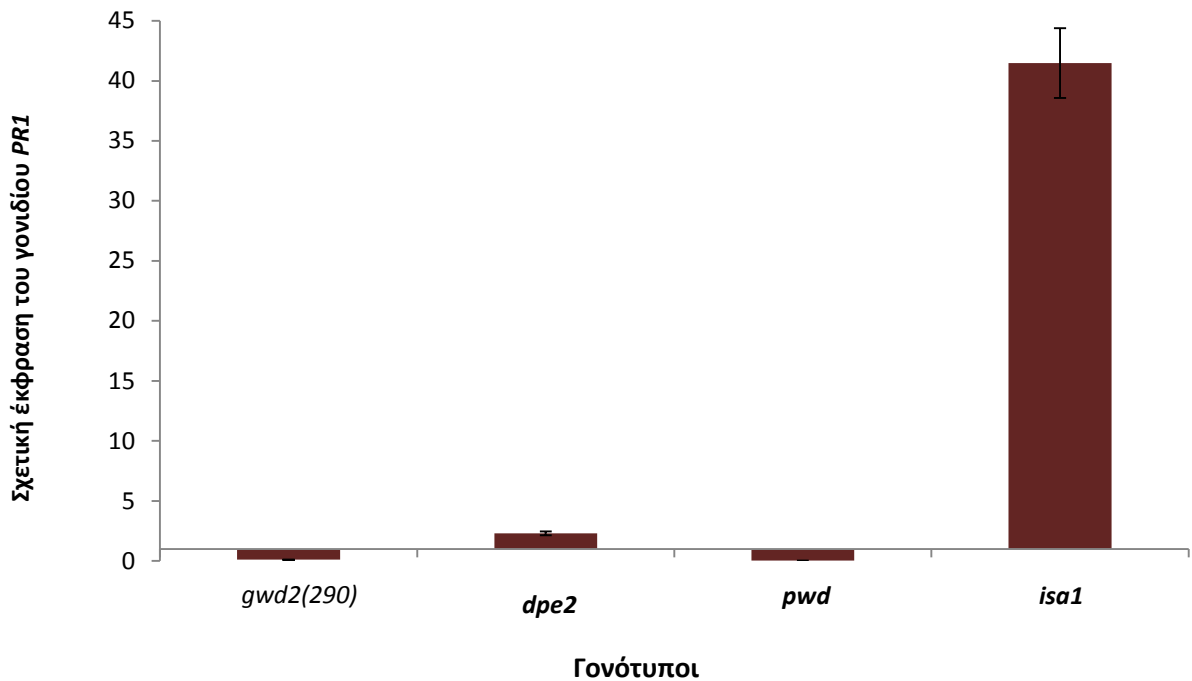


(B)

Γράφημα 8: Σχετική έκφραση του γονιδίου *PR1* στο υπέργειο μέρος **(A)** και στις ρίζες **(B)** των μεταλλαγμένων σειρών *gwd2(290)*, *dpe2*, *pwd* και *isa1* σε σύγκριση με την έκφραση του γονιδίου στα αγρίου τύπου φυτά Col-0 7 ημέρες μετά την μόλυνση με τον μύκητα *F. oxysporum*. Κάθε στήλη αντιπροσωπεύει την μέση έκφραση του γονιδίου *PR1* σε διαφορετική μεταλλαγμένη σειρά και οι κάθετες γραμμές αντιπροσωπεύουν το τυπικό σφάλμα για 3 επαναλήψεις.

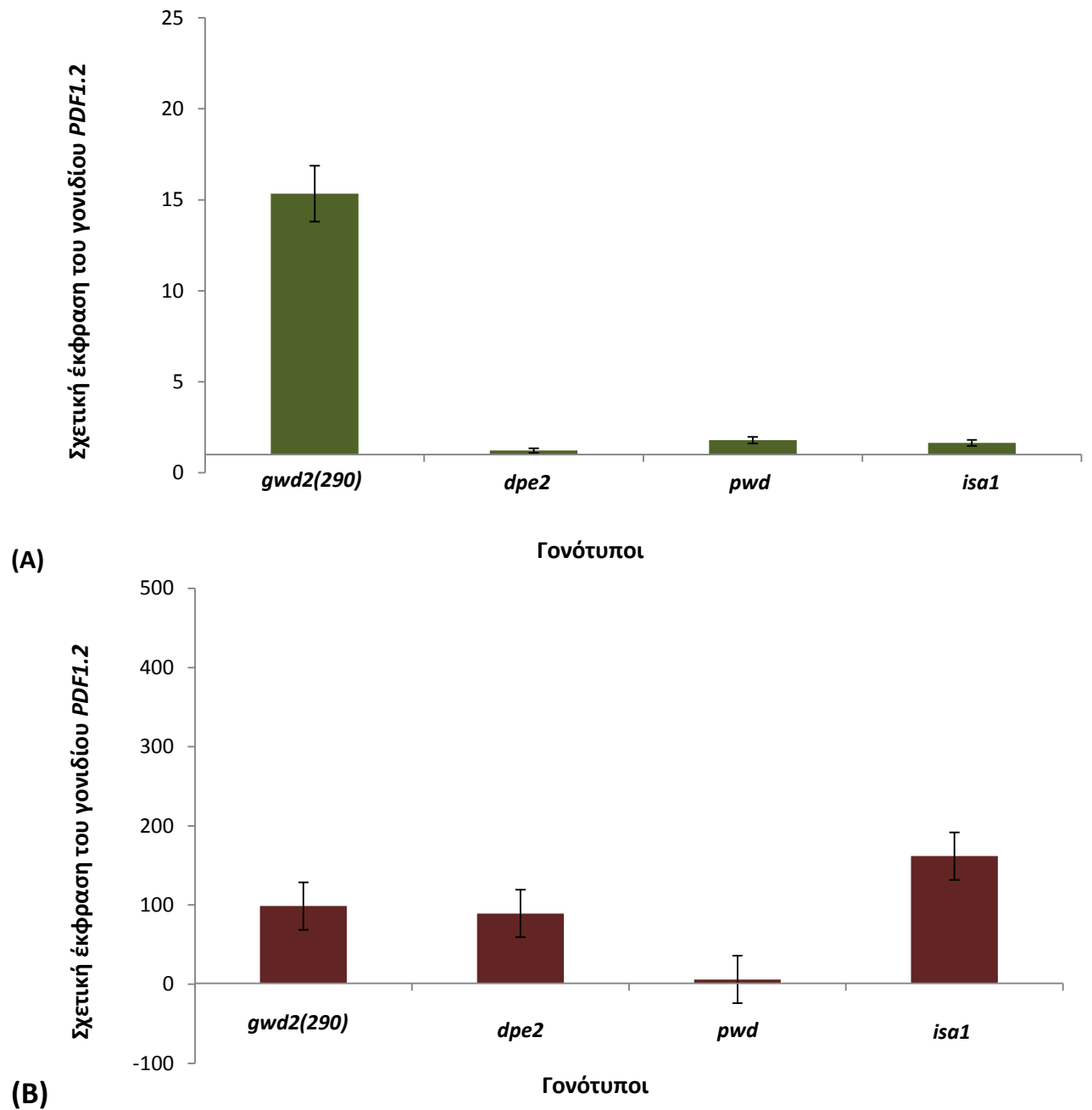


(A)

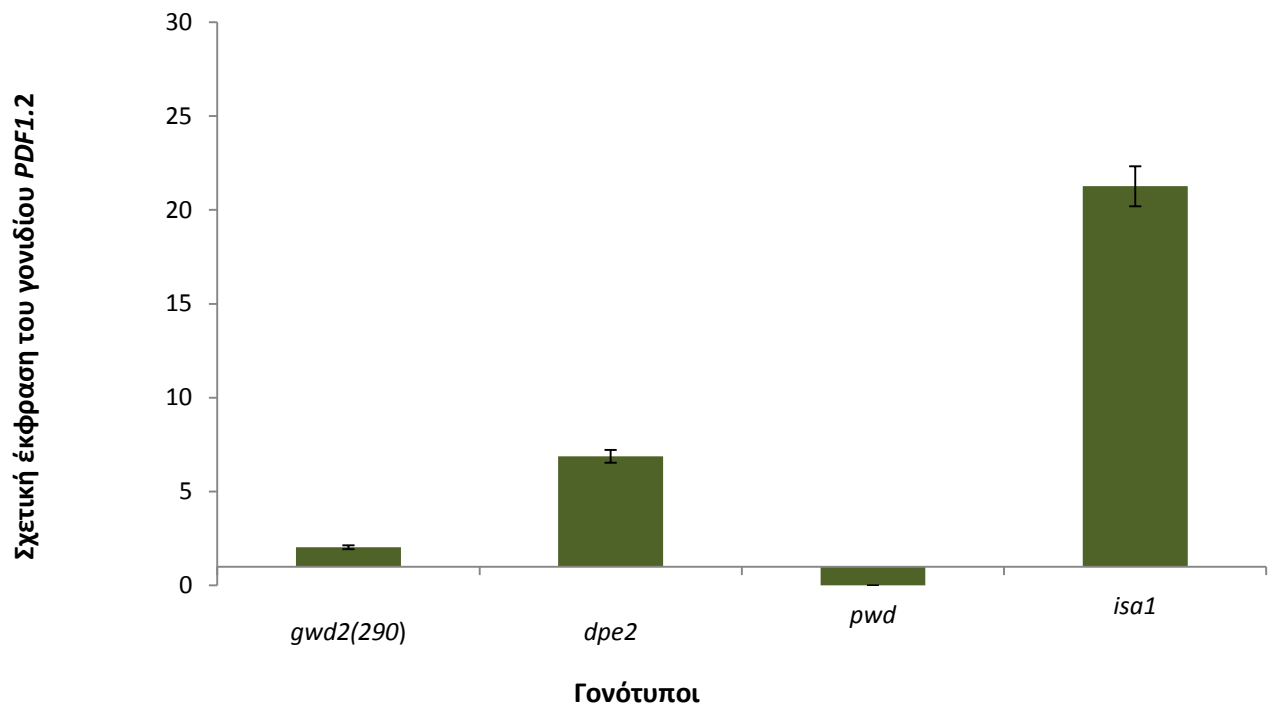


(B)

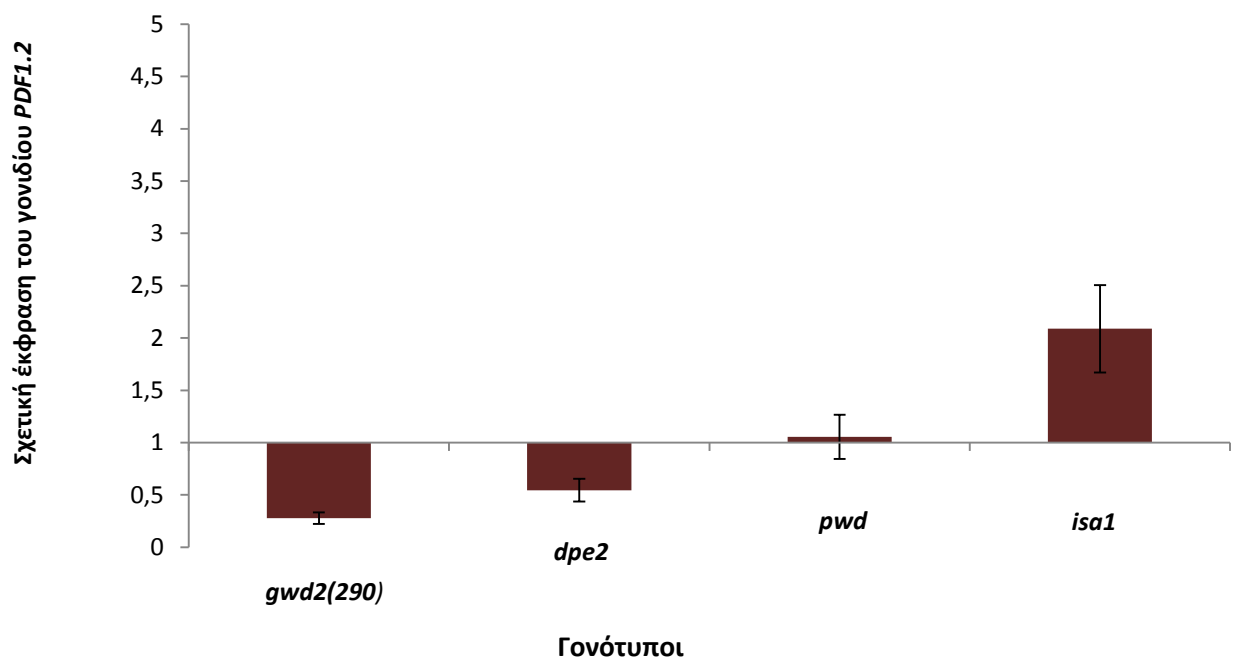
Γράφημα 9: Σχετική έκφραση του γονιδίου *PR1* στο υπέργειο μέρος **(A)** και στις ρίζες **(B)** των μεταλλαγμένων σειρών *gwd2(290)*, *dpe2*, *pwd* και *isa1* σε σύγκριση με την έκφραση του γονιδίου στα αγρίου τύπου φυτά Col-0 14 ημέρες μετά την μόλυνση με τον μύκητα *F. oxysporum*. Κάθε στήλη αντιπροσωπεύει την μέση έκφραση του γονιδίου *PR1* σε διαφορετική μεταλλαγμένη σειρά και οι κάθετες γραμμές αντιπροσωπεύουν το τυπικό σφάλμα για 3 επαναλήψεις.



Γράφημα 10: Σχετική έκφραση του γονιδίου *PDF1.2* στο υπέργειο μέρος **(A)** και στις ρίζες **(B)** των μεταλλαγμένων σειρών *gwd2(290)*, *dpe2*, *pwd* και *isa1* σε σύγκριση με την έκφραση του γονιδίου στα αγρίου τύπου φυτά Col-0 3 ημέρες μετά την μόλυνση με τον μύκητα *F. oxysporum*. Κάθε στήλη αντιπροσωπεύει την μέση έκφραση του γονιδίου *PR1* σε διαφορετική μεταλλαγμένη σειρά και οι κάθετες γραμμές αντιπροσωπεύουν το τυπικό σφάλμα για 3 επαναλήψεις.

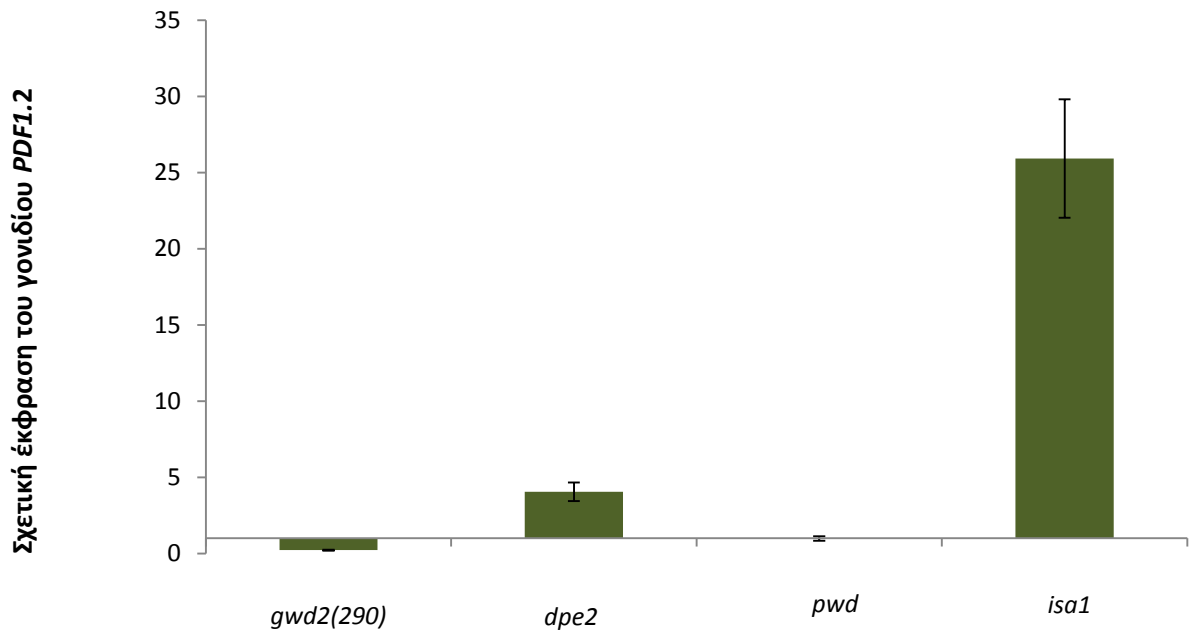


(A)

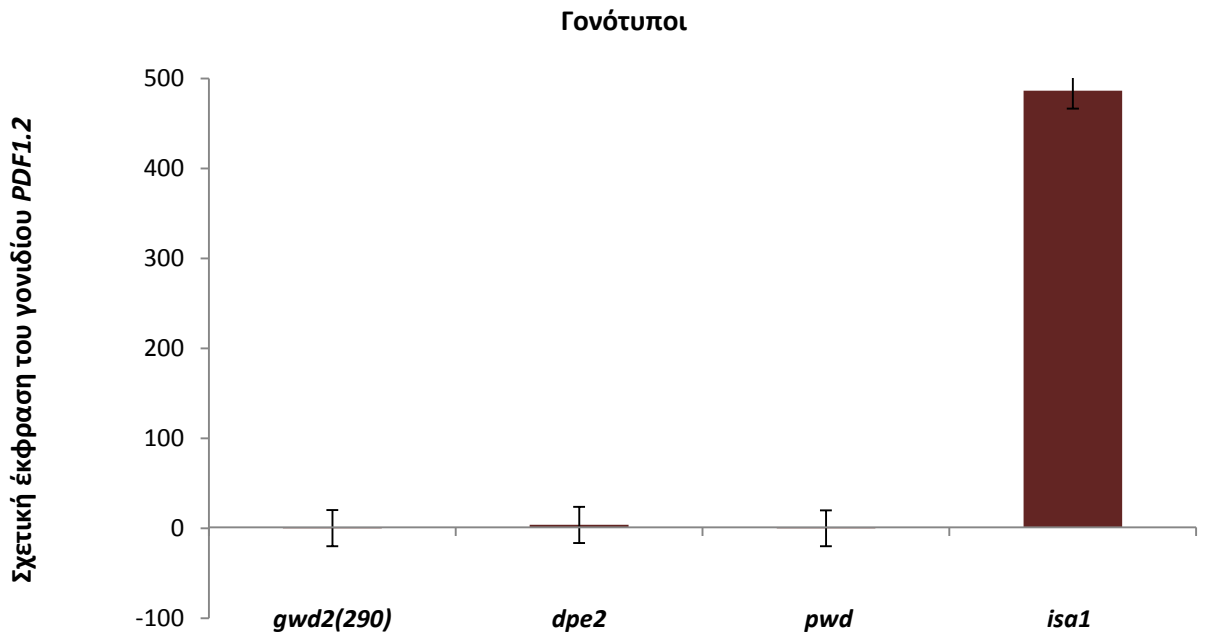


(B)

Γράφημα 11: Σχετική έκφραση του γονιδίου *PDF1.2* στο υπέργειο μέρος (A) και στις ρίζες (B) των μεταλλαγμένων σειρών *gwd2(290)*, *dre2*, *pwd* και *isa1* σε σύγκριση με την έκφραση του γονιδίου στα αγρίου τύπου φυτά Col-0 7 ημέρες μετά την μόλυνση με τον μύκητα *F. oxysporum*. Κάθε στήλη αντιπροσωπεύει την μέση έκφραση του γονιδίου *PR1* σε διαφορετική μεταλλαγμένη σειρά και οι κάθετες γραμμές αντιπροσωπεύουν το τυπικό σφάλμα για 3 επαναλήψεις.



(A)



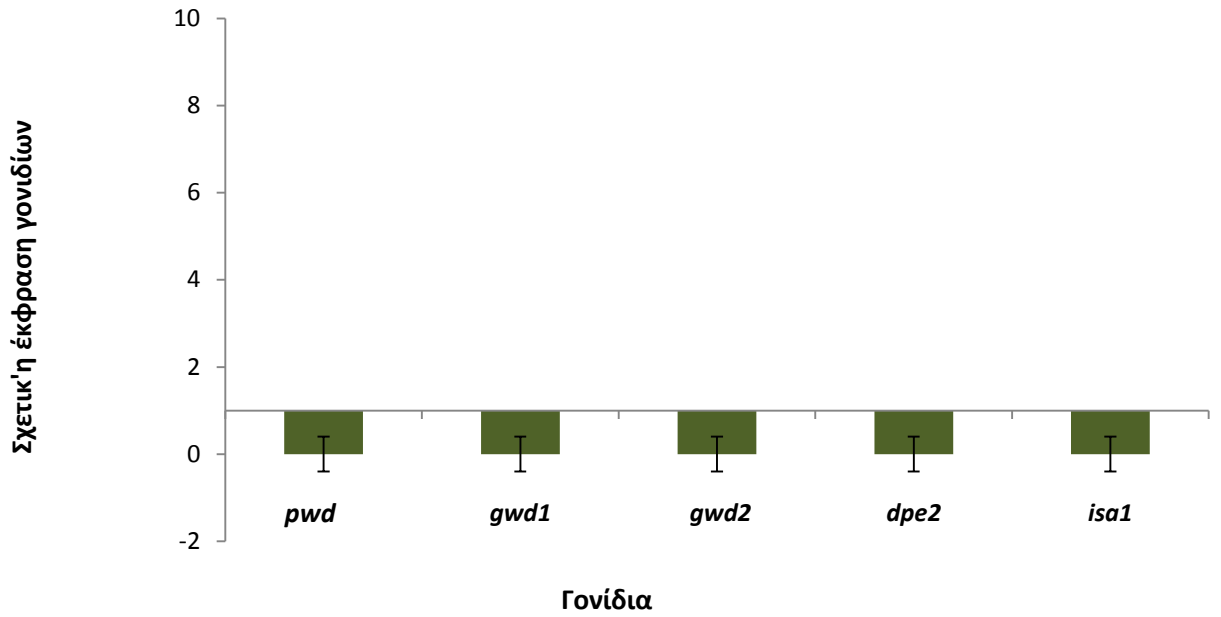
(B)

Γράφημα 12: Σχετική έκφραση του γονιδίου *PDF1.2* στο υπέργειο μέρος (A) και στις ρίζες (B) των μεταλλαγμένων σειρών *gwd2(290)*, *dpe2*, *pwd* και *isa1* σε σύγκριση με την έκφραση του γονιδίου στα αγρίου τύπου φυτά Col-0 14 ημέρες μετά την μόλυνση με τον μύκητα *F. oxysporum*. Κάθε στήλη αντιπροσωπεύει την μέση έκφραση του γονιδίου *PR1* σε διαφορετική μεταλλαγμένη σειρά και οι κάθετες γραμμές αντιπροσωπεύουν το τυπικό σφάλμα για 3 επαναλήψεις.

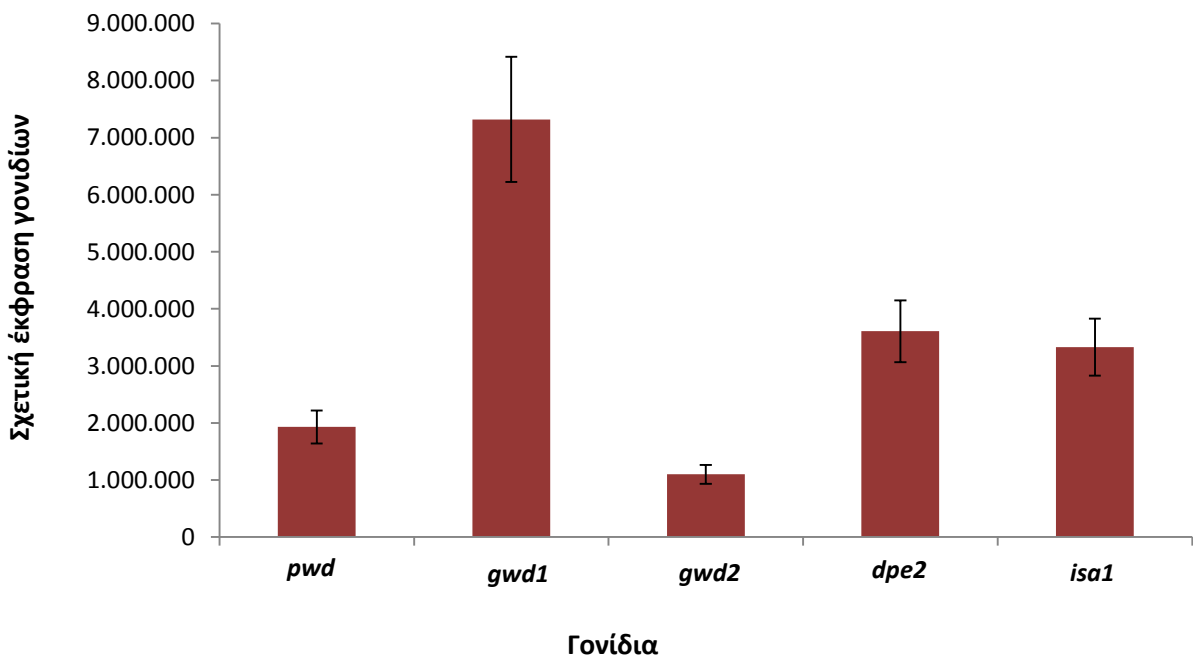
3.2 Έκφραση των γονιδίων *GWD1*, *GWD2*, *PWD*, *DPE2*, *ISA1*

Η έκφραση των γονιδίων *GWD1*, *GWD2*, *PWD*, *DPE2*, *ISA1* σε φυτά Col-0 μολυσμένα με τον μύκητα *V. dahliae* συγκρίθηκε με εκείνη στα μη μολυσμένα φυτά Col-0. Το ολικό RNA των φυτών απομονώθηκε στις 3 και 7 ημέρες μετά την μόλυνση και μετατράπηκε σε cDNA για να χρησιμοποιηθεί για την μελέτη της έκφρασης των προαναφερθέντων γονιδίων με την χρήση της Real time-quantitative PCR (qPCR). Τα επίπεδα έκφρασης των γονιδίων στα μολυσμένα φυτά κανονικοποιήθηκαν σε σχέση με την έκφραση του γονιδίου τουμπουλίνη 4 (tubulin 4, At4g26410) στα ίδια δείγματα, και εκφράστηκαν σε σχέση με τα κανονικοποιημένα επίπεδα μεταγραφής των ίδιων γονιδίων στα μη μολυσμένα φυτά. Το γονίδιο At4g26410 επιλέχτηκε ως γονίδιο αναφοράς λόγω της σταθερής έκφρασης του στα φυτά *A. thaliana* (Wang *et al.*, 2014).

Στο υπέργειο μέρος των φυτών Col-0 3 ημέρες μετά την μόλυνση με τον μύκητα *V. dahliae* υπήρχε υποέκφραση όλων των εξεταζόμενων γονιδίων ενώ στις ρίζες των ίδιων φυτών όλα τα γονίδια υπερεκφράστηκαν (Γράφημα 13A, 13B). Στις 7 ημέρες μετά την μόλυνση όλα τα γονίδια υπερεκφράστηκαν τόσο στο υπέργειο μέρος όσο και στις ρίζες των φυτών με εξαίρεση τα γονίδια *gwd1* και *dpe2* στις ρίζες των μολυσμένων φυτών τα οποία δεν παρουσίασαν κάποια διαφορά με την έκφραση των ίδιων γονιδίων στις ρίζες των μη μολυσμένων φυτών (Γράφημα 14A, 14B).

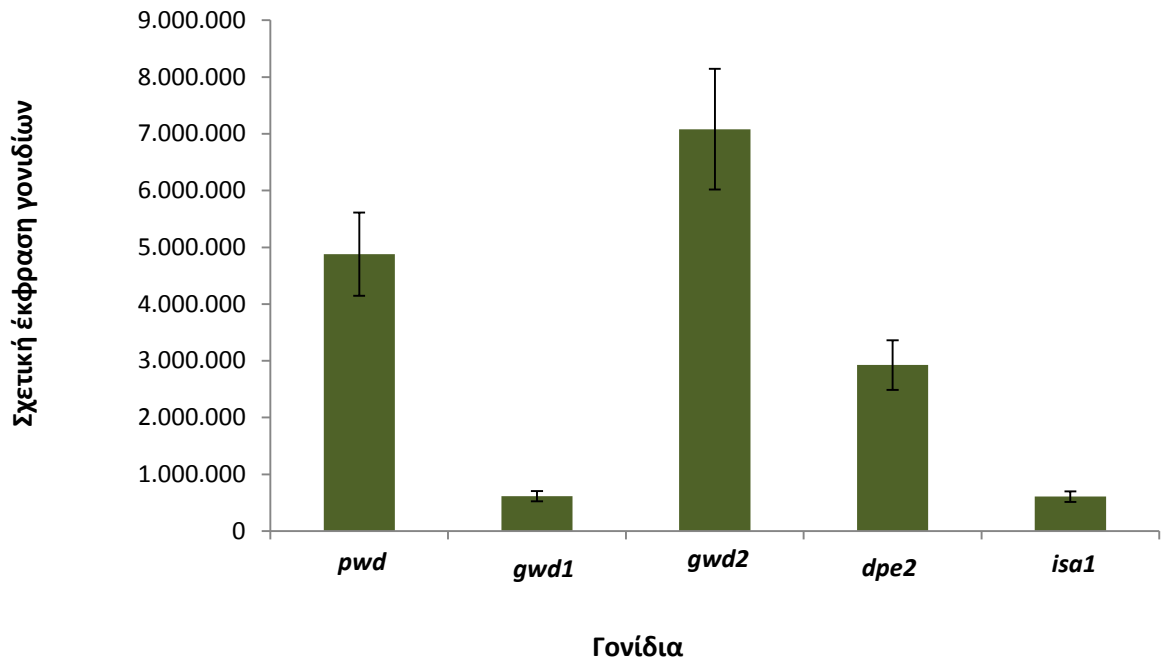


(A)

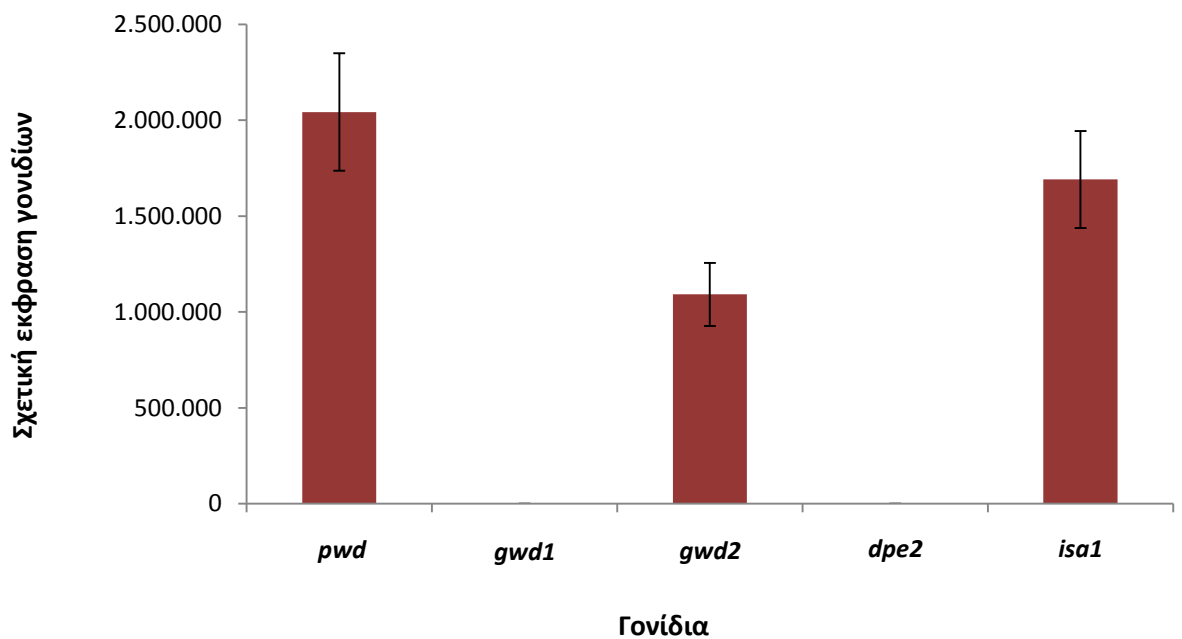


(B)

Γράφημα 13: Σχετική έκφραση των γονιδίων *gwd1*, *gwd2*, *pwd*, *dpe2*, *isa1* στο υπέργειο **(A)** τμήμα και στις ρίζες **(B)** των μολυσμένων με το μύκητα *V. dahliae* αγρίου τύπου φυτών Col-0 σε σύγκριση με την έκφραση των ίδιων γονιδίων σε αμόλυντα Col-0 3 ημέρες μετά την μόλυνση. Κάθε στήλη αντιπροσωπεύει την μέση έκφραση του αντίστοιχου γονιδίου και οι κάθετες γραμμές αντιπροσωπεύουν το τυπικό σφάλμα για 3 τεχνικές επαναλήψεις.



(A)



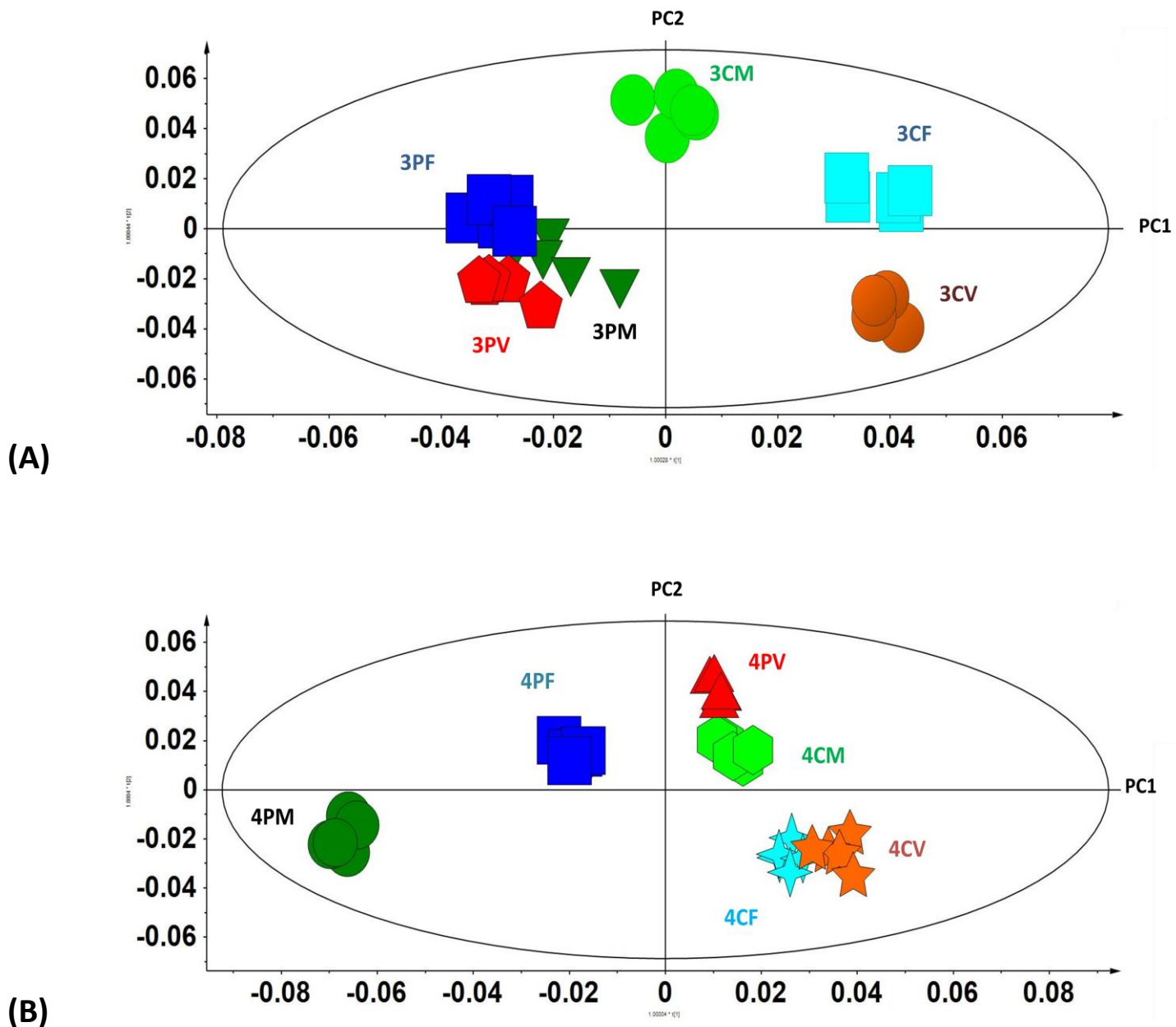
(B)

Γράφημα 14: Σχετική έκφραση των γονιδίων *gwd-1*, *gwd-2*, *pwd*, *dpe2*, *isa1* στο υπέργειο **(A)** τμήμα και στις ρίζες **(B)** των μολυσμένων με το μύκητα *V. dahliae* αγρίου τύπου φυτών Col-0 σε σύγκριση με την έκφραση των ίδιων γονιδίων σε αμόλυντα Col-0 7 ημέρες μετά την μόλυνση. Κάθε στήλη αντιπροσωπεύει την μέση έκφραση του αντίστοιχου γονιδίου και οι κάθετες γραμμές αντιπροσωπεύουν το τυπικό σφάλμα για 3 τεχνικές επαναλήψεις.

3.3 Επίδραση της προσβολής των μυκήτων *V. dahliae* και *F. oxysporum* στην μεταβολική σύσταση των *pwd* φυτών

Το τελικό στάδιο της μεταβολομικής είναι η πολυπαραγοντική ανάλυση ώστε να γίνει κατανοητή η επίδραση των παθογόνων, των μυκήτων *V. dahliae* και *F. oxysporum*, στον μεταβολισμό των φυτών. Στα διαγράμματα που ακολουθούν απεικονίζεται η επίδραση που έχουν οι επεμβάσεις στις 3 και στις 4 ημέρες μετά την μόλυνση στα αγρίου τύπου φυτά Col-0 και στα φυτά τα οποία είναι μεταλλαγμένα ως προς το γονίδιο *PWD*. Ο οριζόντιος άξονας(PC1) διαχωρίζει τα αποτελέσματα της ανάλυσης ως προς τον γονότυπο ενώ ο κάθετος άξονας(PC2) διαχωρίζει τα αποτελέσματα της ανάλυσης ως προς τις επεμβάσεις. Έτσι, παρατηρούμε, ότι ο μεγαλύτερος βαθμός διαχωρισμού οφείλεται πρωτίστως στον γονότυπο και δευτερευόντως στις επεμβάσεις (Γράφημα 15A, 15B). Ο πολύ καλός διαχωρισμός που υπάρχει μεταξύ των επεμβάσεων σημαίνει ότι κάθε επέμβαση προκάλεσε διακριτές αλλαγές στον μεταβολισμό των φυτών. Το πρώτο γράφημα (Γράφημα 15A) δείχνει τον διαχωρισμό στις 3 ημέρες μετά την μόλυνση. Ο μάρτυρας τόσο στα αγρίου τύπου φυτά όσο και στα μεταλλαγμένα ως προς το γονίδιο *PWD* φυτά διαφοροποιείται συγκριτικά με τις άλλες επεμβάσεις γεγονός που δείχνει ότι οι υπόλοιπες επεμβάσεις προκάλεσαν αλλαγές στον μεταβολισμό των φυτών. Τα μεταλλαγμένα απεικονίζονται πιο κοντά συγκριτικά με τα Col-0 τα οποία παρουσιάζουν πολύ καλό διαχωρισμό μεταξύ τους. Το δεύτερο γράφημα (Γράφημα 15B) δείχνει τον διαχωρισμό στις 4 ημέρες μετά την μόλυνση. Τα μεταλλαγμένα απεικονίζονται πιο κοντά με τον μάρτυρα στα Col-0 γεγονός που δικαιολογείται από την ομοιότητα στον μεταβολισμό τους λόγω της ανθεκτικότητας που παρουσιάζουν. Οι επεμβάσεις στα αγρίου τύπου φυτά με τους μύκητες *V. dahliae* και *F. oxysporum* απεικονίζονται επίσης πολύ κοντά

μεταξύ τους διότι και τα δύο παθογόνα προκαλούν αδρωμυκώσεις και κατά τα φαινόμενα και τις ίδιες μεταβολές στον μεταβολισμό των φυτών.



Γράφημα 15: Ανάλυση κύριων συνιστωσών. Απεικόνιση του μεταβολισμού των *pwd* φυτών *Arabidopsis thaliana* και των αγρίου τύπου Col-0 **3(A)** και **4(B)** ημέρες μετά την εφαρμογή των παθογόνων μηκύτων *V. dahliae* και *F. oxysporum*. **3,4:** ημέρες μετά την μόλυνση, **P:** *pwd*, **C:** Col-0, **V:** *V. dahliae*, **F:** *F. oxysporum*.

Λαμβάνοντας υπ' όψη το γεγονός ότι ένας μεταβολίτης μπορεί να συμμετέχει σε περισσότερα του ενός μονοπάτια και να επηρεάσει πολλαπλές βιολογικές διεργασίες, η παρακολούθηση των μεταβολικών δικτύων ενός φυτού καθίσταται μια πρόκληση. Προκειμένου να ξεπεραστεί αυτή η δυσκολία και να απλοποιηθεί η διαδικασία, πραγματοποιήθηκε κατηγοριοποίηση των μεταβολιτών στις αντίστοιχες βιοσυνθετικές οδούς με βάση τους κωδικούς που χρησιμοποιεί η βάση δεδομένων KEGG (Aliferis *et al.*, 2014). Μια γενική διατάραξη του μεταβολισμού των φυτών παρατηρήθηκε ως απόκριση στην μόλυνση, με τον μεγαλύτερο αριθμό των ταυτοποιημένων μεταβολιτών να ανήκουν στα μεταβολικά μονοπάτια των υδατανθράκων και των λιπιδίων (Εικόνα 20).

Τα παθογόνα προκάλεσαν μεταβολές στον μεταβολισμό των φυτών όπως φαίνεται από την διακύμανση των υδατανθράκων και των λιπιδίων. Ο μύκητας *V. dahliae* μετέβαλε τον μεταβολισμό των υδατανθράκων τόσο στα αγρίου τύπου φυτά Col-0 όσο και στα *rwd*, προκαλώντας συσσώρευση των εξοζών σακχάρων όπως της γλυκόζης στα Col-0 στις 3 ημέρες μετά την μόλυνση και στα *rwd* στις 3 και 4 ημέρες μετά την μόλυνση. Επίσης, παρατηρήθηκε αύξηση της μαλτόζης για τα *rwd* στις 3 ημέρες μετά την μόλυνση και της φρουκτόζης για τα Col-0 στις 3 ημέρες μετά την μόλυνση καθώς και για τα *rwd* στις 4 ημέρες μετά την μόλυνση (Εικόνα 15, starch and sucrose metabolism).

Στο μονοπάτι βιοσύνθεσης του σαλικυλικού οξέος το κιναμικό οξύ παρουσιάστηκε αυξημένο στα Col-0 και τις δύο χρονικές στιγμές ενώ στα *rwd* μόνο την χρονική στιγμή 3dpi. Το βενζοϊκό οξύ ήταν αυξημένο μόνο στα Col-0 στις 4 ημέρες μετά την εφαρμογή του παθογόνου. Η πρόδρομη ένωση του ιασμονικού οξέος το, α-λινολεϊκό οξύ, δεν παρουσίασε αύξηση στα Col-0 ή

στα *pwd* μετά την μόλυνση των εν λόγω φυτών με τον μύκητα *V. dahliae* (Εικόνα 15, phenylpropanoid biosynthesis, unsaturated fatty acids).

Επιπλέον, η συγκέντρωση των παραπάνω μεταβολιτών του μεταβολισμού του αμύλου και των μεταβολιτών της βιοσύνθεσης του σαλικυλικού και ιασμονικού οξέος μελετήθηκε στα *pwd* φυτά που είχαν μολυνθεί με τον μύκητα *V. dahliae* συγκριτικά με τα αγρίου τύπου Col-0 τα οποία είχαν μολυνθεί με τον ίδιο μύκητα (Εικόνα 17). Τα σάκχαρα γλυκόζη, μαλτόζη και φρουκτόζη είχαν αυξημένη συγκέντρωση στις 4 ημέρες μετά την μόλυνση με τον μύκητα *V. dahliae*. Στο μονοπάτι του σαλικυλικού οξέως το κιναμικό οξύ ήταν αυξημένο και στις δύο χρονικές στιγμές μετά την μόλυνση ενώ το βενζοϊκό οξύ δεν παρουσίασε αύξηση στα *pwd* σε σχέση με τα Col-0. Το α-λινολεϊκό, στο μονοπάτι του ιασμονικού οξέως, δεν παρουσίασε κάποια μεταβολή στα *pwd* σε σχέση με τα Col-0 (Εικόνα 17).

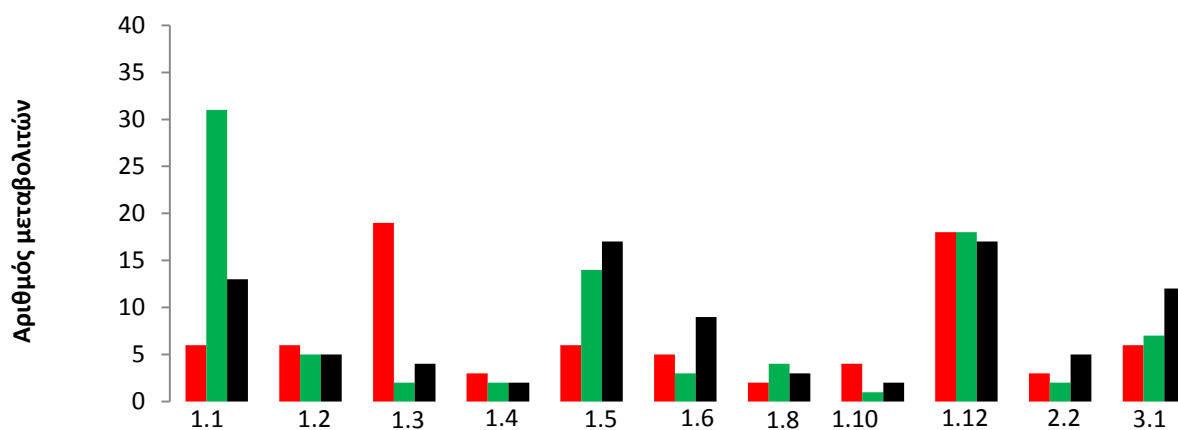
Η μόλυνση με τον μύκητα *F. oxysporum* είχε ως αποτέλεσμα την αύξηση της γλυκόζης για τα μεταλλαγμένα *pwd* στις 4 ημέρες μετά την μόλυνση και αύξηση της μαλτόζης στις 3 ημέρες μετά την μόλυνση για τα *pwd* και στις 4 ημέρες μετά την μόλυνση για τα Col-0 και τα *pwd*. Όσο αφορά την βιοσύνθεση του σαλικυλικού οξέως, το κιναμικό οξύ ήταν αυξημένο στα Col-0 και τις δύο χρονικές στιγμές και στα *pwd* στις 3 ημέρες μετά την μόλυνση. Το βενζοϊκό οξύ παρουσίασε αύξηση στα Col-0 στις 4 ημέρες μετά την μόλυνση. Στο μονοπάτι βιοσύνθεσης του ιασμονικού το α-λινολεϊκό ήταν αυξημένο για τα *pwd* και για τα Col-0 στις 3 ημέρες μετά την μόλυνση (Εικόνα 16).

Στην σύγκριση των μεταβολιτών των *pwd* φυτών με τους αντίστοιχους μεταβολίτες των αγρίου τύπου φυτών Col-0 που είχαν μολυνθεί με τον μύκητα *F. oxysporum* παρατηρήθηκε αύξηση της γλυκόζης και στις δύο χρονικές στιγμές μετά την μόλυνση. Αύξηση παρουσίασε επίσης το κιναμικό

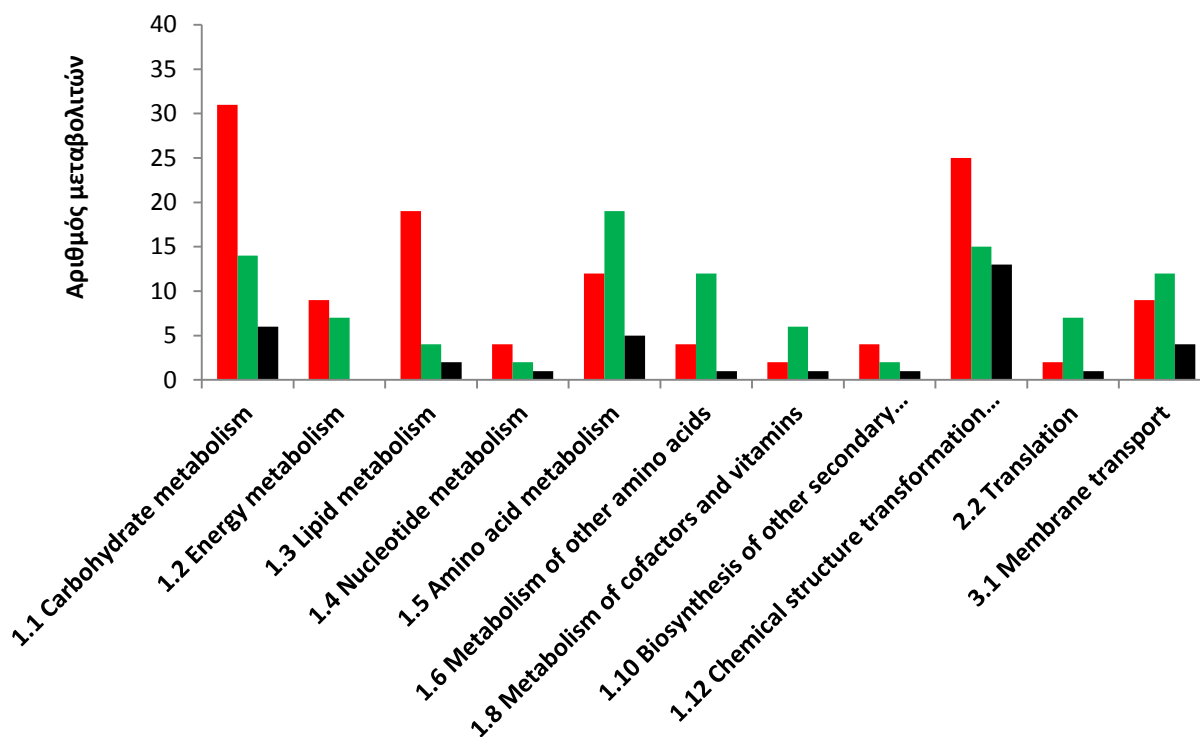
οξύ στις 3dpi και το α- λινολεϊκό οξύ στις 4 ημέρες μετά την μόλυνση (Εικόνα 18).

Η τελευταία σύγκριση που πραγματοποιήθηκε σε επίπεδο μεταβολικής ανάλυσης ήταν μεταξύ των φυτών-μάρτυρες της σειράς *pwd* και των αμόλυντων φυτών Col-0. Στο μονοπάτι μεταβολισμού του αμύλου υπερέκφραση παρουσίασε η γλυκόζη στις 3 ημέρες μετά την μόλυνση. Το κιναμικό οξύ ήταν αυξημένο και στις δύο χρονικές στιγμές ενώ το βενζοϊκό οξύ αυξήθηκε στις 4 ημέρες μετά την μόλυνση. Στο μονοπάτι του ιασμονικού οξέως το α-λινολεϊκό ήταν αυξημένο στις 4 ημέρες μετά την μόλυνση (Εικόνα 19).

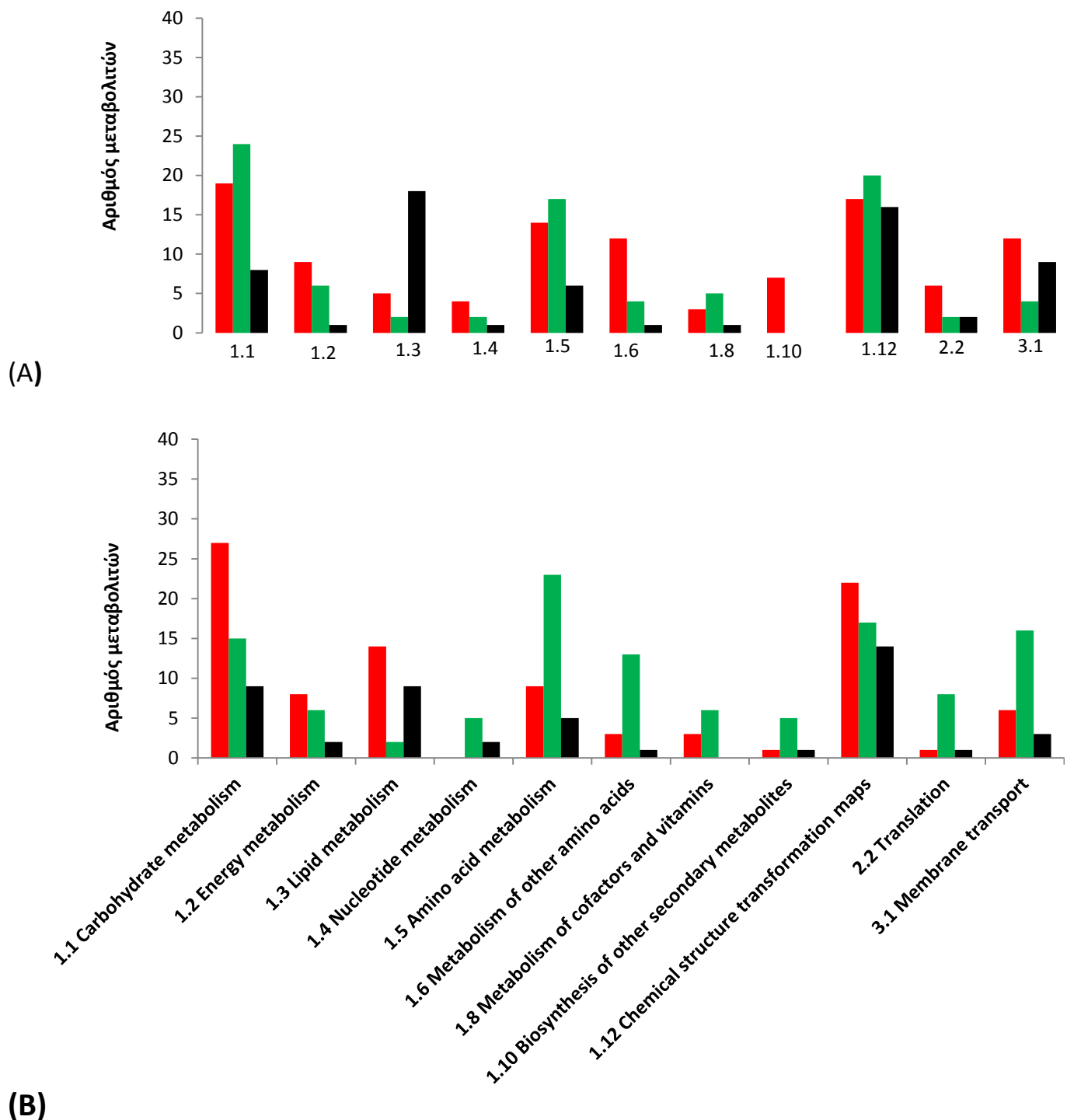
(A)



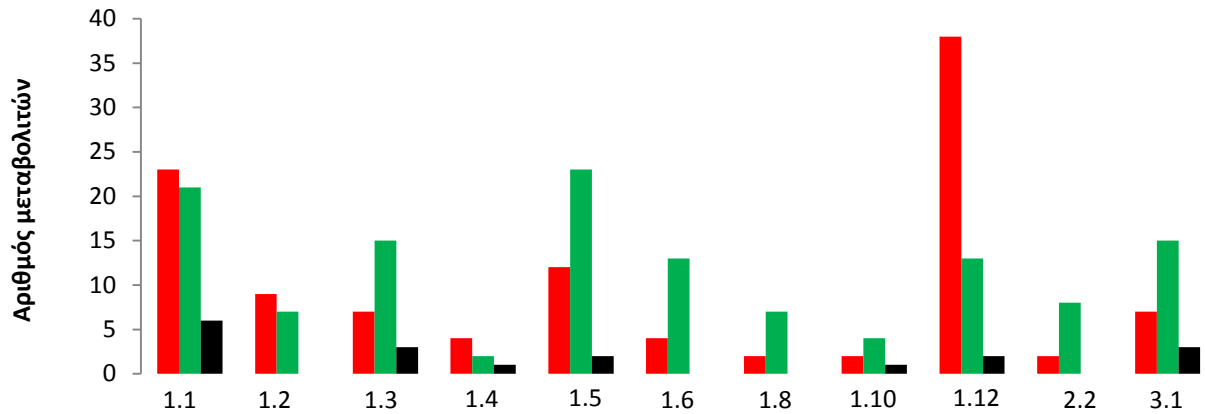
(B)



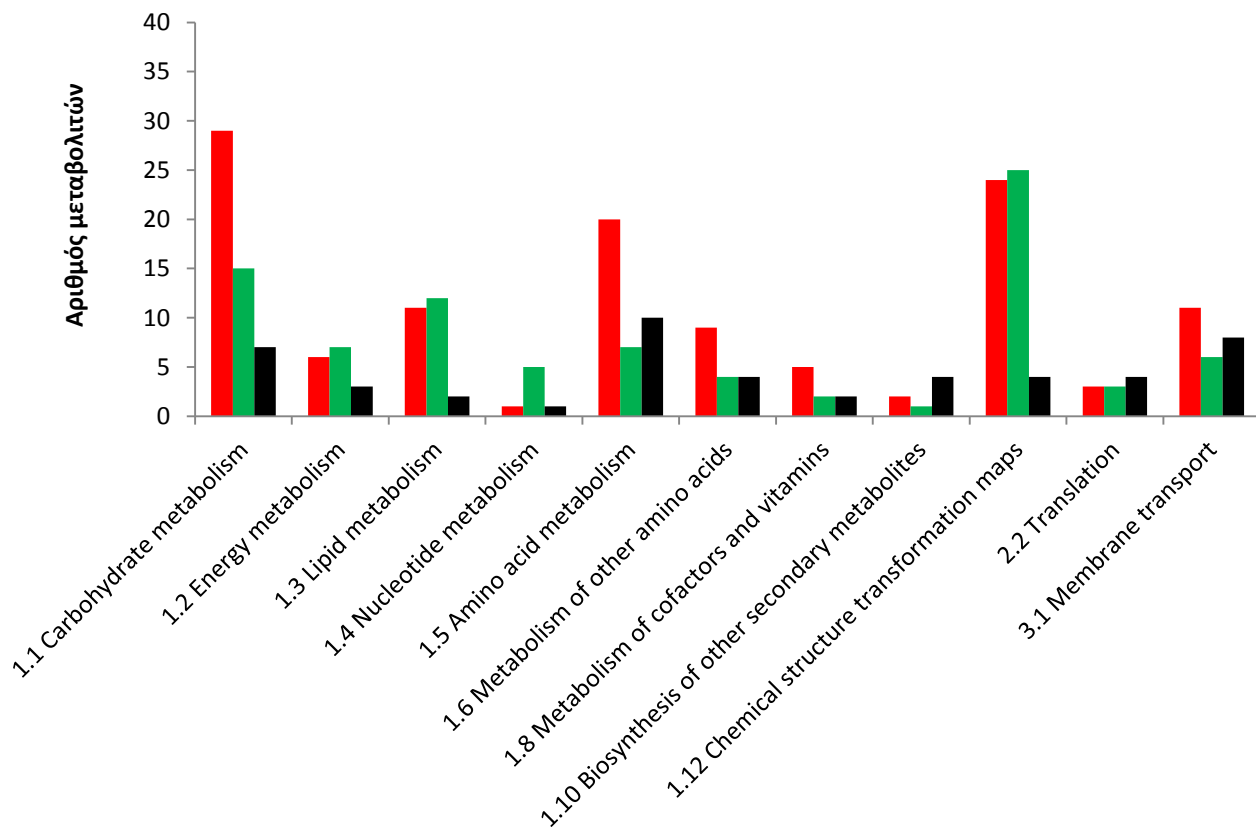
Γράφημα 16: Σύνοψη της επίδρασης του μύκητα *F.oxysporum* στον μεταβολισμό των αγρίου τύπου φυτών Col-0 **3(A)** και **4(B)** ημέρες μετά την μόλυνση. Οι στήλες αντιπροσωπεύουν τον αριθμό μεταβολιτών που αυξήθηκαν(κόκκινο), μειώθηκαν(πράσινο), δεν μεταβλήθηκαν(μαύρο) σε σύγκριση με τα φυτά μάρτυρες. Η κατηγοριοποίηση των μεταβολιτών στις αντίστοιχες βιοσυνθετικές οδούς πραγματοποιήθηκε με βάση τους κωδικούς που χρησιμοποιεί η βάση δεδομένων KEGG.



Γράφημα 17: Σύνοψη της επίδρασης του μύκητα *V. dahliae* στον μεταβολισμό των αγρίου τύπου φυτών Col-0 3(A) και 4(B) ημέρες μετά την μόλυνση. Οι στήλες αντιπροσωπεύουν τον αριθμό μεταβολιτών που αυξήθηκαν(κόκκινο), μειώθηκαν(πράσινο), δεν μεταβλήθηκαν(μαύρο) σε σύγκριση με τα φυτά μάρτυρες. Η κατηγοριοποίηση των μεταβολιτών στις αντίστοιχες βιοσυνθετικές οδούς πραγματοποιήθηκε με βάση τους κωδικούς που χρησιμοποιεί η βάση δεδομένων KEGG.

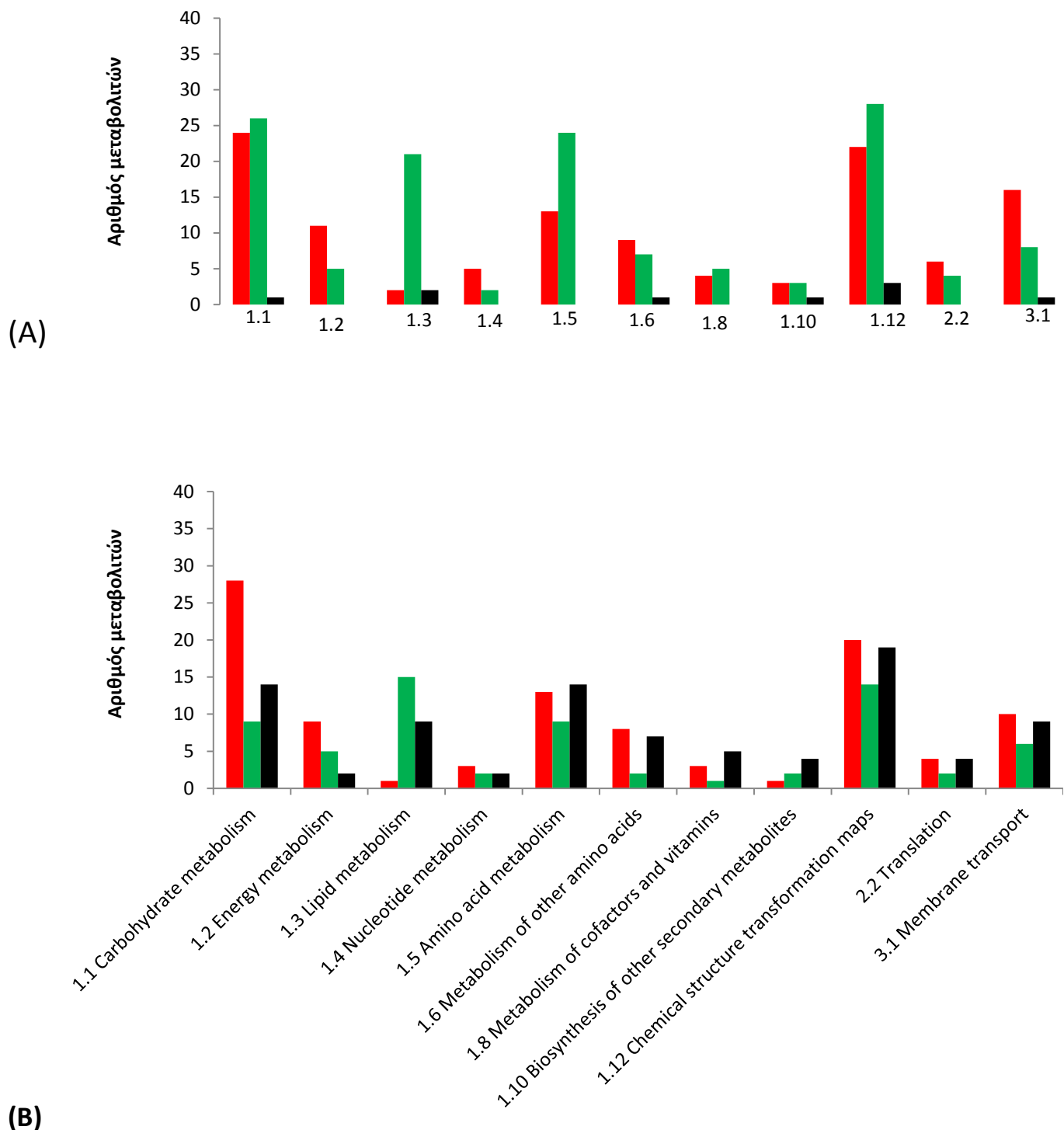


(A)



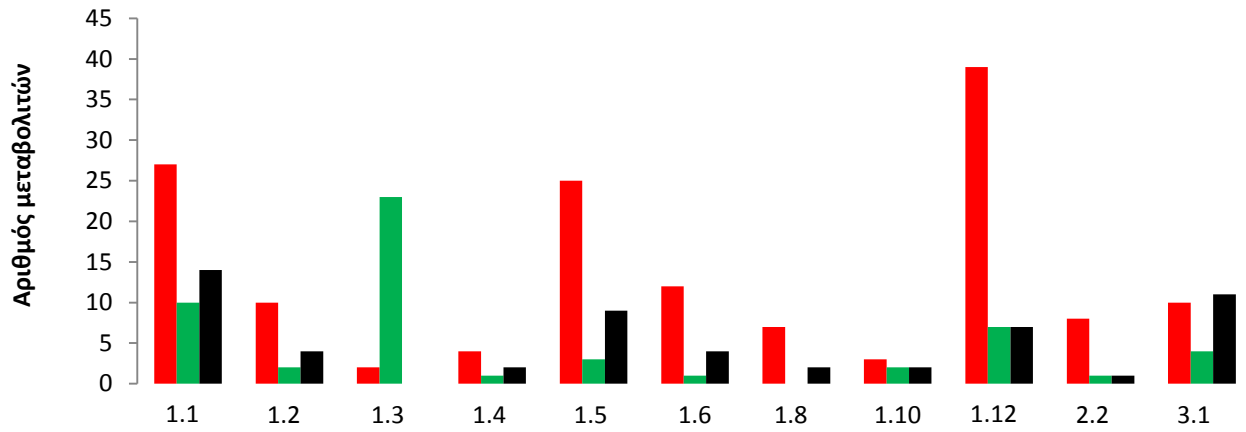
(B)

Γράφημα 18: Σύνοψη της επίδρασης του μύκητα *F.oxysporum* στον μεταβολισμό των *pwd* φυτών 3(A) και 4(B) ημέρες μετά την μόλυνση. Οι στήλες αντιπροσωπεύουν τον αριθμό μεταβολιτών που αυξήθηκαν(κόκκινο), μειώθηκαν(πράσινο), δεν μεταβλήθηκαν(μαύρο) σε σύγκριση με τα φυτά μάρτυρες. Η κατηγοριοποίηση των μεταβολιτών στις αντίστοιχες βιοσυνθετικές οδούς πραγματοποιήθηκε με βάση τους κωδικούς που χρησιμοποιεί η βάση δεδομένων KEGG.

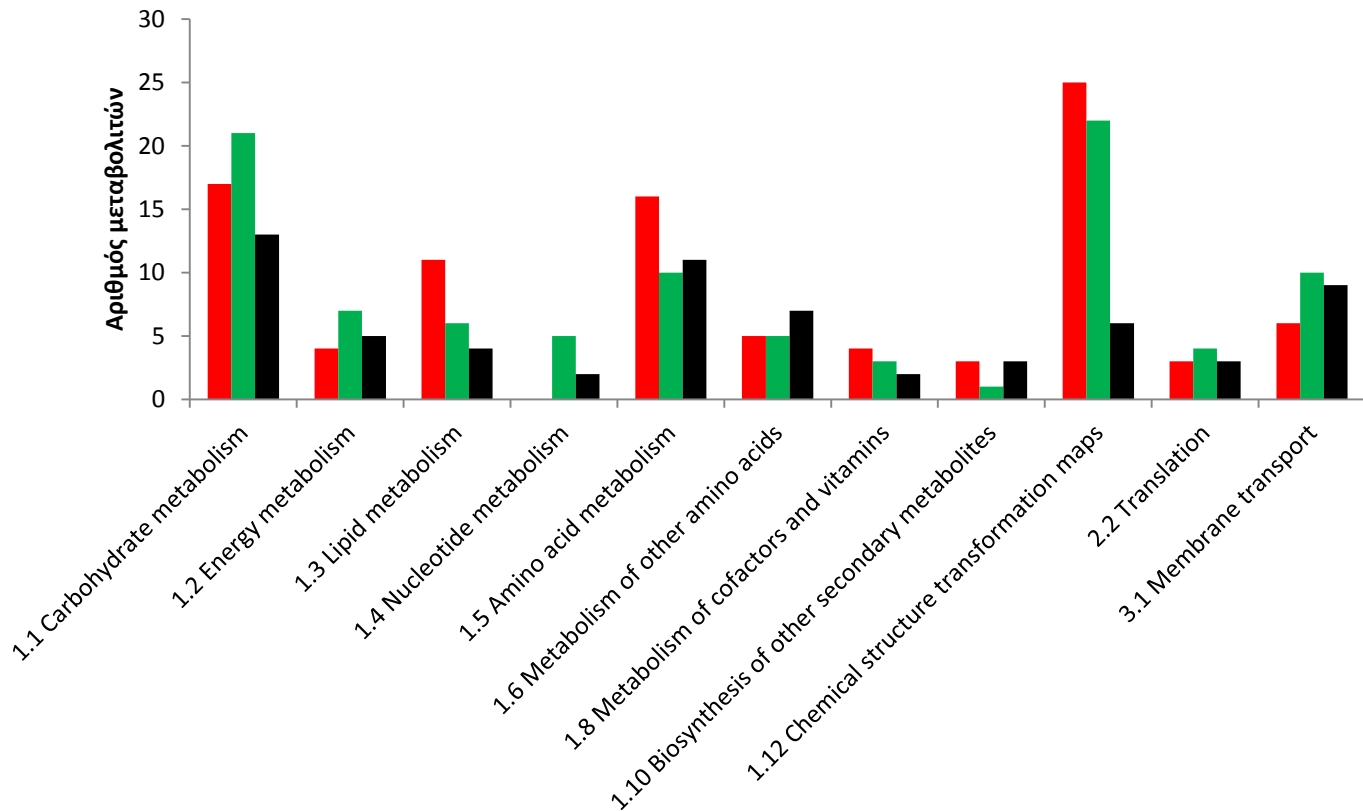


Γράφημα 19: Σύνοψη της επίδρασης του μύκητα *V.dahliae* στον μεταβολισμό των *pwd* φυτών 3(A) και 4(B) ημέρες μετά την μόλυνση. Οι στήλες αντιπροσωπεύουν τον αριθμό μεταβολιτών που αυξήθηκαν(κόκκινο), μειώθηκαν(πράσινο), δεν μεταβλήθηκαν(μαύρο) σε σύγκριση με τα φυτά μάρτυρες. Η κατηγοριοποίηση των μεταβολιτών στις αντίστοιχες βιοσυνθετικές οδούς πραγματοποιήθηκε με βάση τους κωδικούς που χρησιμοποιεί η βάση δεδομένων KEGG.

(A)

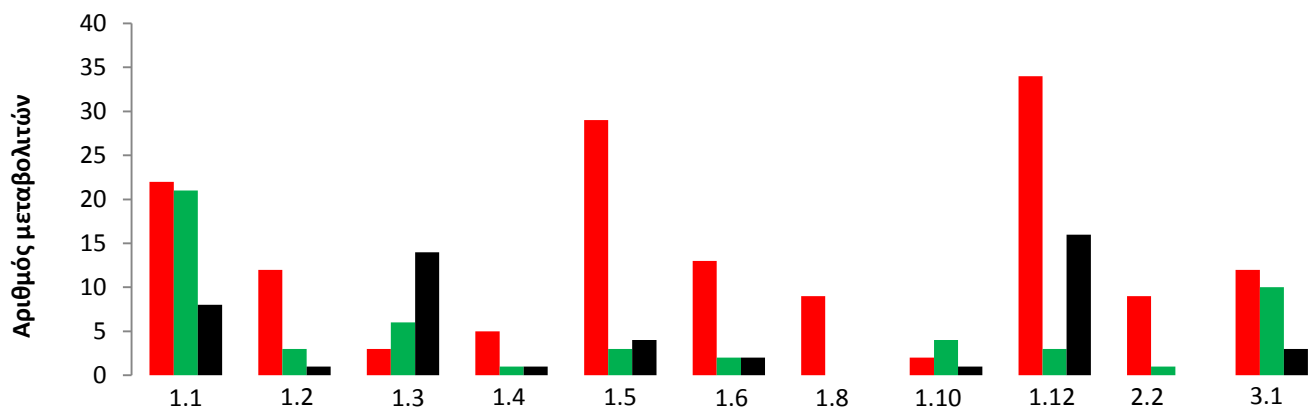


(B)

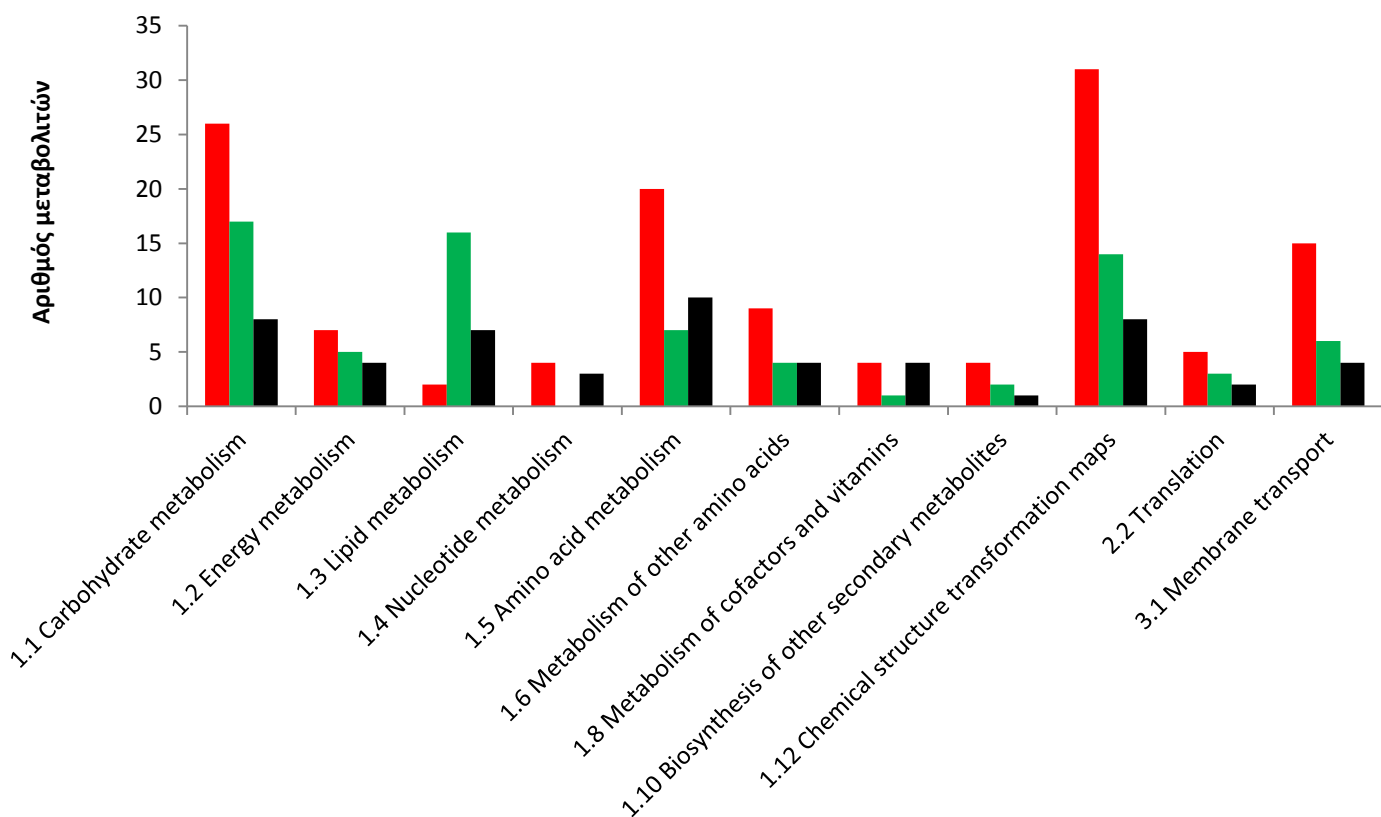


Γράφημα 20: Σύνοψη της επίδρασης του μύκητα *F.oxysporum* στον μεταβολισμό των *pwd* φυτών 3(A) και 4(B) ημέρες μετά την μόλυνση. Οι στήλες αντιπροσωπεύουν τον αριθμό μεταβολιτών που αυξήθηκαν(κόκκινο), μειώθηκαν(πράσινο), δεν μεταβλήθηκαν(μαύρο) σε σύγκριση με τα αγρίου τύπου φυτά Col-0. Η κατηγοριοποίηση των μεταβολιτών στις αντίστοιχες βιοσυνθετικές οδούς πραγματοποιήθηκε με βάση τους κωδικούς που χρησιμοποιεί η βάση δεδομένων KEGG.

(A)

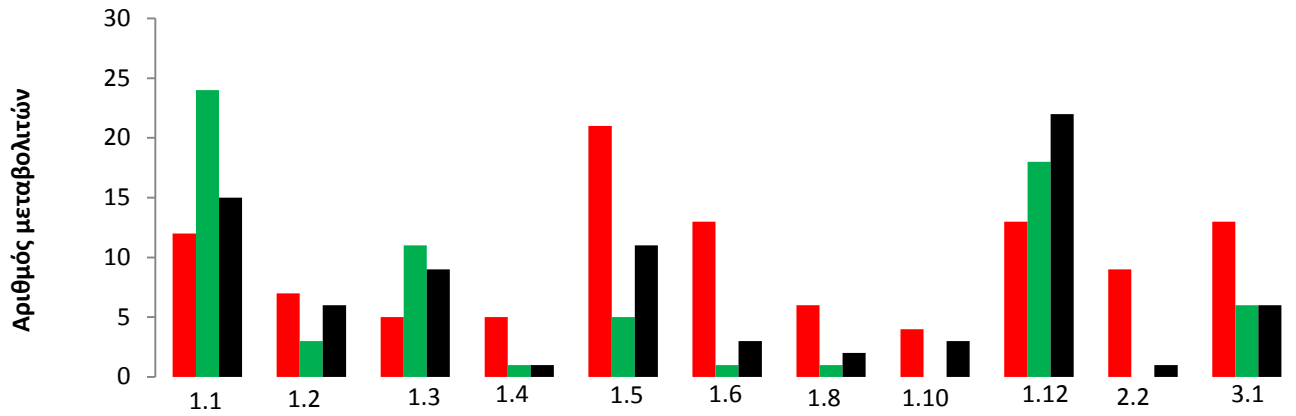


(B)

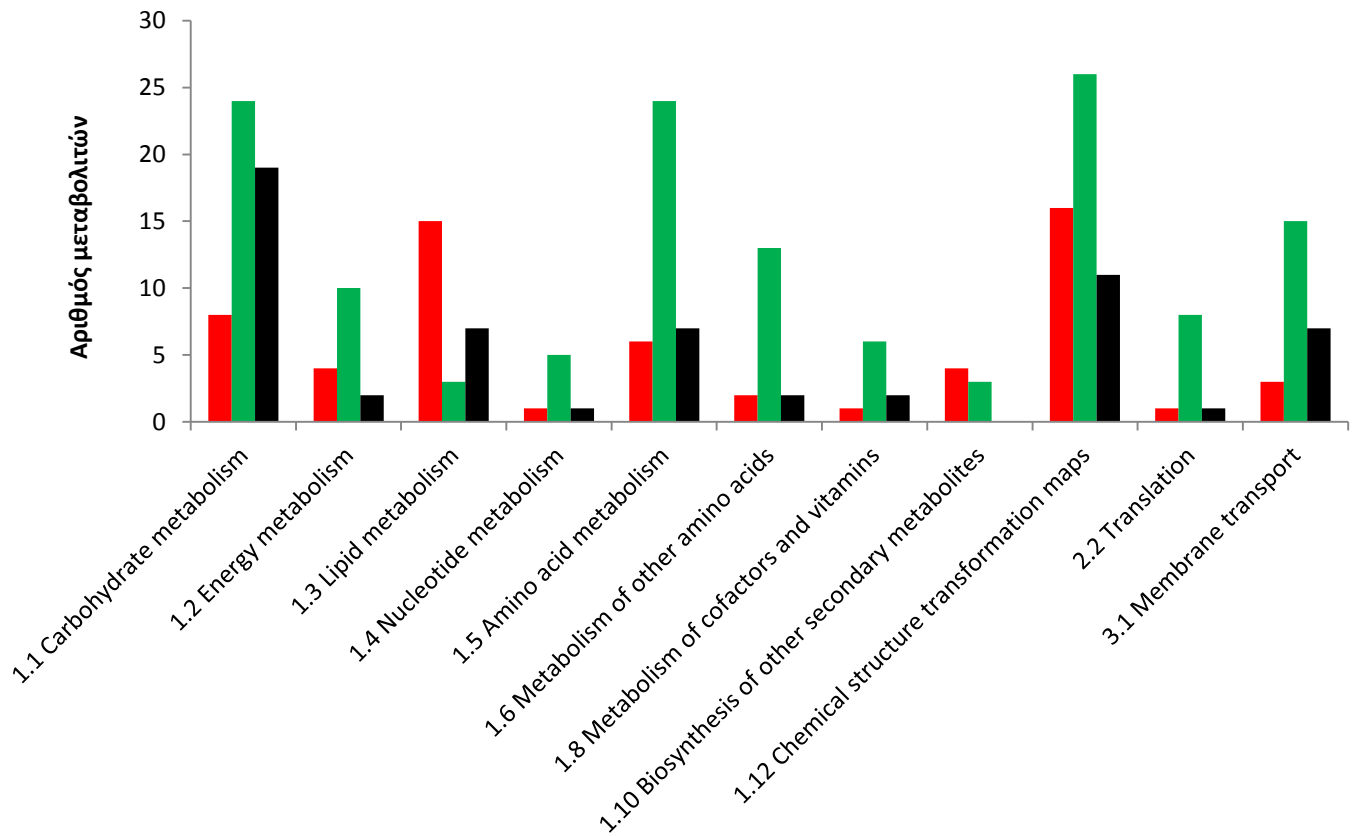


Γράφημα 21: Σύνοψη της επίδρασης του μύκητα *V.dahliae* στον μεταβολισμό των *pwd* φυτών 3(A) και 4(B) ημέρες μετά την μόλυνση. Οι στήλες αντιπροσωπεύουν τον αριθμό μεταβολιτών που αυξήθηκαν(κόκκινο), μειώθηκαν(πράσινο), δεν μεταβλήθηκαν(μαύρο) σε σύγκριση με τα αγρίου τύπου φυτά Col-0. Η κατηγοριοποίηση των μεταβολιτών στις αντίστοιχες βιοσυνθετικές οδούς πραγματοποιήθηκε με βάση τους κωδικούς που χρησιμοποιεί η βάση δεδομένων KEGG.

(A)

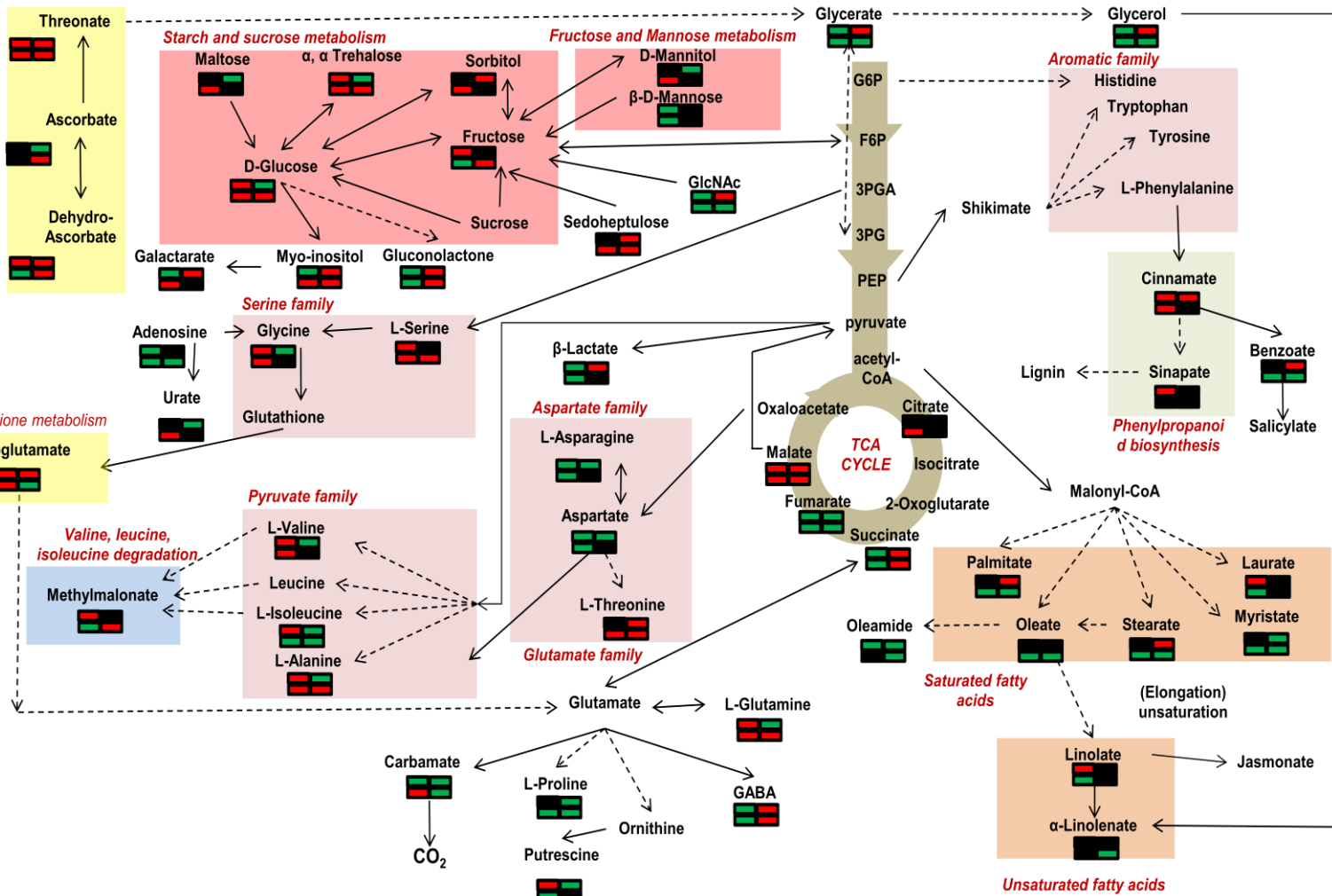


(B)



Γράφημα 22: Σύνοψη του μεταβολισμού των αμόλυντων *pwd* φυτών 3(A) και 4(B) ημέρες μετά την μόλυνση των αντίστοιχων εφαρμογών. Οι στήλες αντιπροσωπεύουν τον αριθμό μεταβολιτών που αυξήθηκαν(κόκκινο), μειώθηκαν(πράσινο), δεν μεταβλήθηκαν(μαύρο) σε σύγκριση με τα αγρίου τύπου φυτά Col-0. Η κατηγοριοποίηση των μεταβολιτών στις αντίστοιχες βιοσυνθετικές οδούς πραγματοποιήθηκε με βάση τους κωδικούς που χρησιμοποιεί η βάση δεδομένων KEGG.

Ascorbate and aldarate metabolism

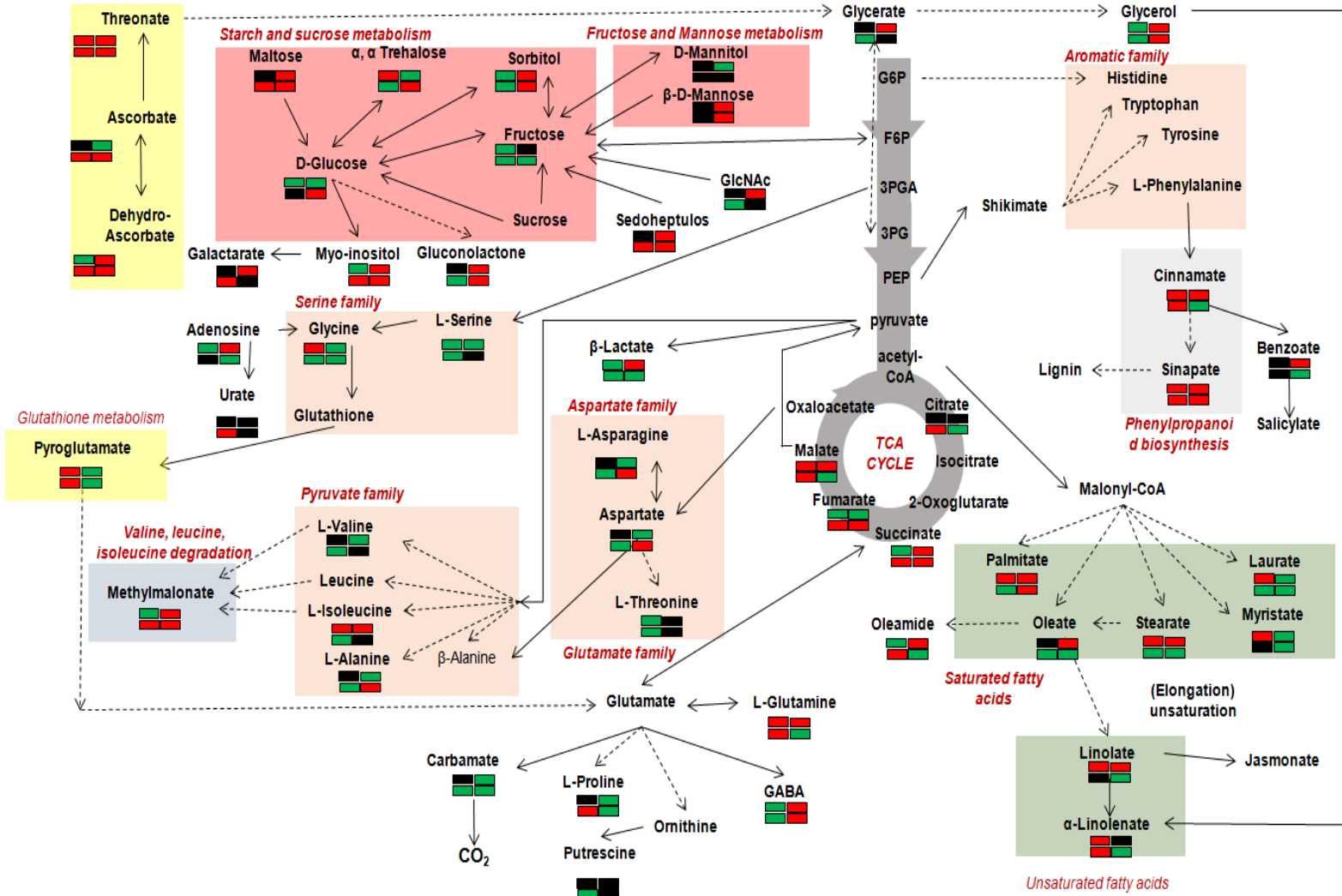


3 4

Col
pwd

Εικόνα 15: Μεταβολικό δίκτυο του φυτού *Arabidopsis thaliana* όπου φαίνεται η επίδραση της προσβολής από τον μύκητα *V. dahliae* στον μεταβολισμό των αγρίου τύπου φυτών Col-0 ως προς τα αμόλυντα Col-0 και τον μεταβολισμό των *pwd* φυτών ως προς τα αμόλυντα *pwd*, 3 και 4 μέρες μετά την μόλυνση. Σε κάθε μεταβολίτη τα 2 επάνω τετράγωνα αντιστοιχούν στα Col-0 και τα 2 κάτω στα *pwd*, τα 2 αριστερά τετράγωνα (πάνω και κάτω) αντιστοιχούν στις 3 ημέρες μετά την μόλυνση ενώ τα δύο δεξιά τετράγωνα (πάνω και κάτω) αντιστοιχούν στις 4 ημέρες μετά την μόλυνση. Με κόκκινο χρώμα απεικονίζεται η αυξημένη συγκέντρωση των μεταβολιτών, με πράσινο η μειωμένη και με μαύρο η συγκέντρωση των μεταβολιτών η οποία δεν έχει διαφοροποιηθεί σε σχέση με εκείνη των αντίστοιχων φυτών-μάρτυρες.

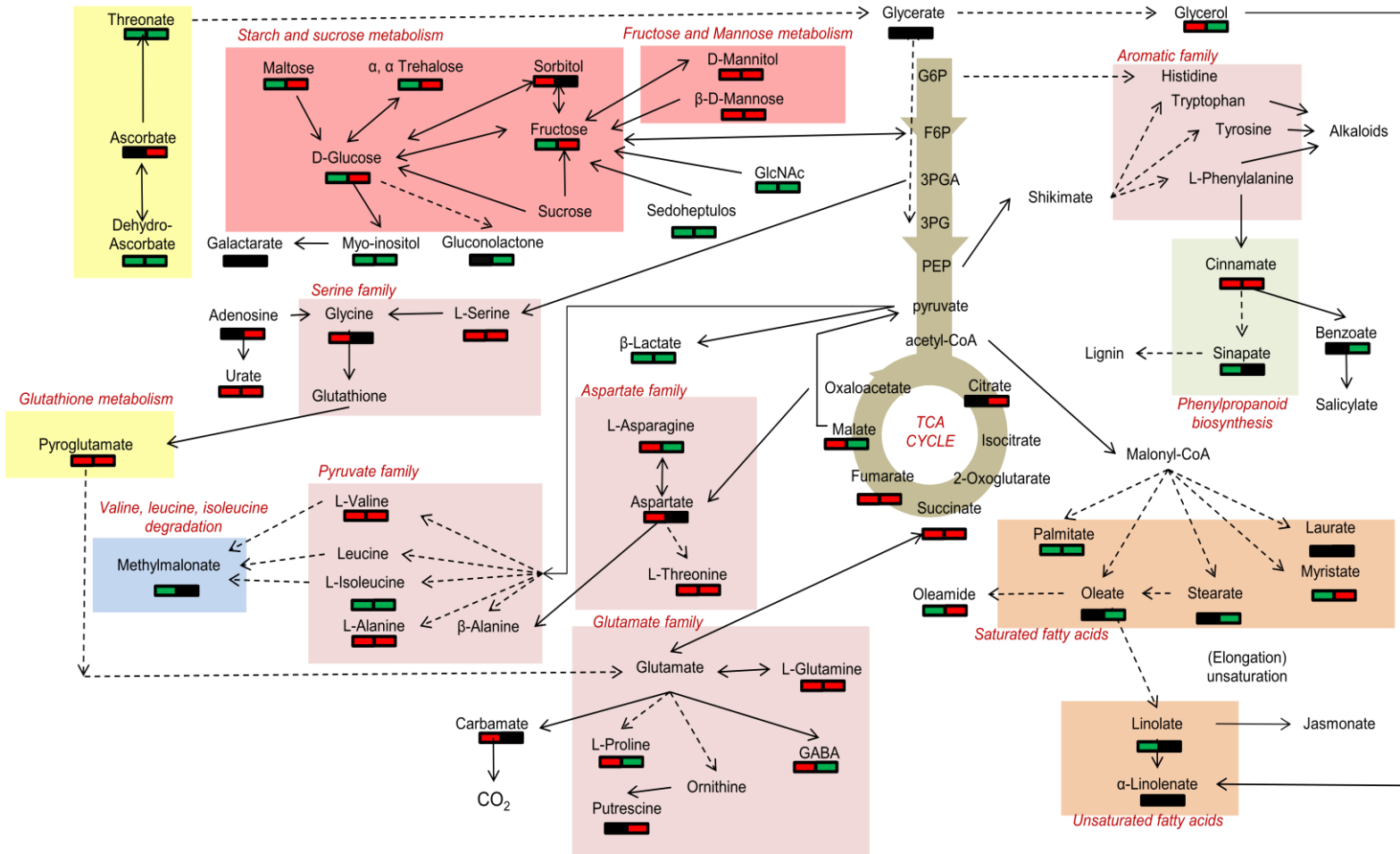
Ascorbate and aldarate metabolism



3 4
Col
pwd

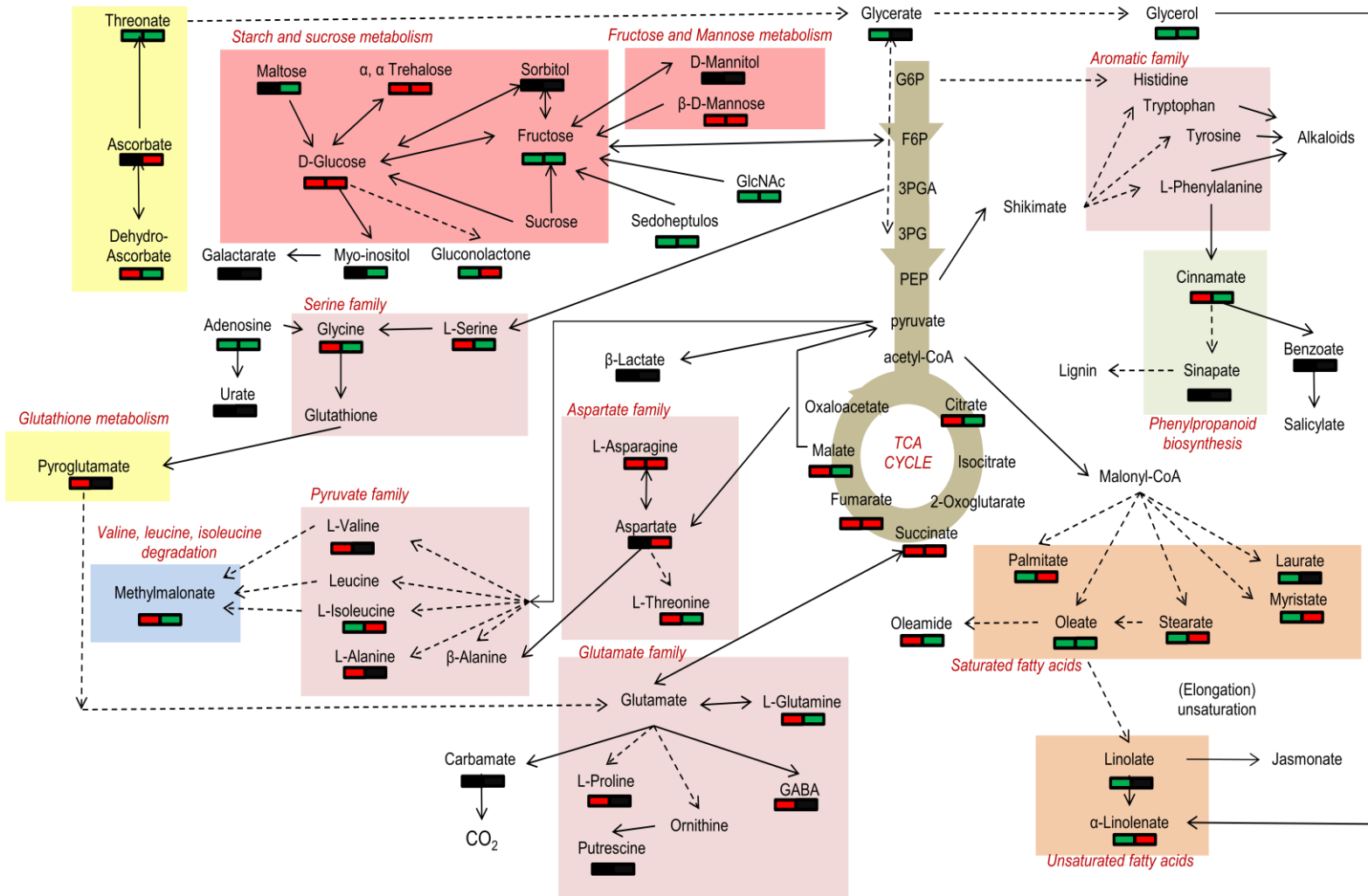
Εικόνα 16: Μεταβολικό δίκτυο του φυτού *Arabidopsis thaliana* όπου φαίνεται η επίδραση της προσβολής από τον μύκητα *F.oxysporum* στον μεταβολισμό των αγρίου τύπου Col-0 ως προς τα αμόλυντα Col-0 και τον μεταβολισμό των *pwd* φυτών ως προς τα αμόλυντα *pwd*, 3 και 4 μέρες μετά την μόλυνση. Σε κάθε μεταβολίτη τα 2 επάνω τετράγωνα αντιστοιχούν στα Col-0 και τα 2 κάτω στα *pwd*, τα 2 αριστερά τετράγωνα (πάνω και κάτω) αντιστοιχούν στις 3 ημέρες μετά την μόλυνση ενώ τα δύο δεξιά τετράγωνα (πάνω και κάτω) αντιστοιχούν στις 4 ημέρες μετά την μόλυνση. Με κόκκινο χρώμα απεικονίζεται η αυξημένη συγκέντρωση των μεταβολιτών, με πράσινο η μειωμένη και με μαύρο η συγκέντρωση των μεταβολιτών η οποία δεν έχει διαφοροποιηθεί σε σχέση με εκείνη των αντίστοιχων φυτών-μάρτυρες.

Ascorbate and aldarate metabolism



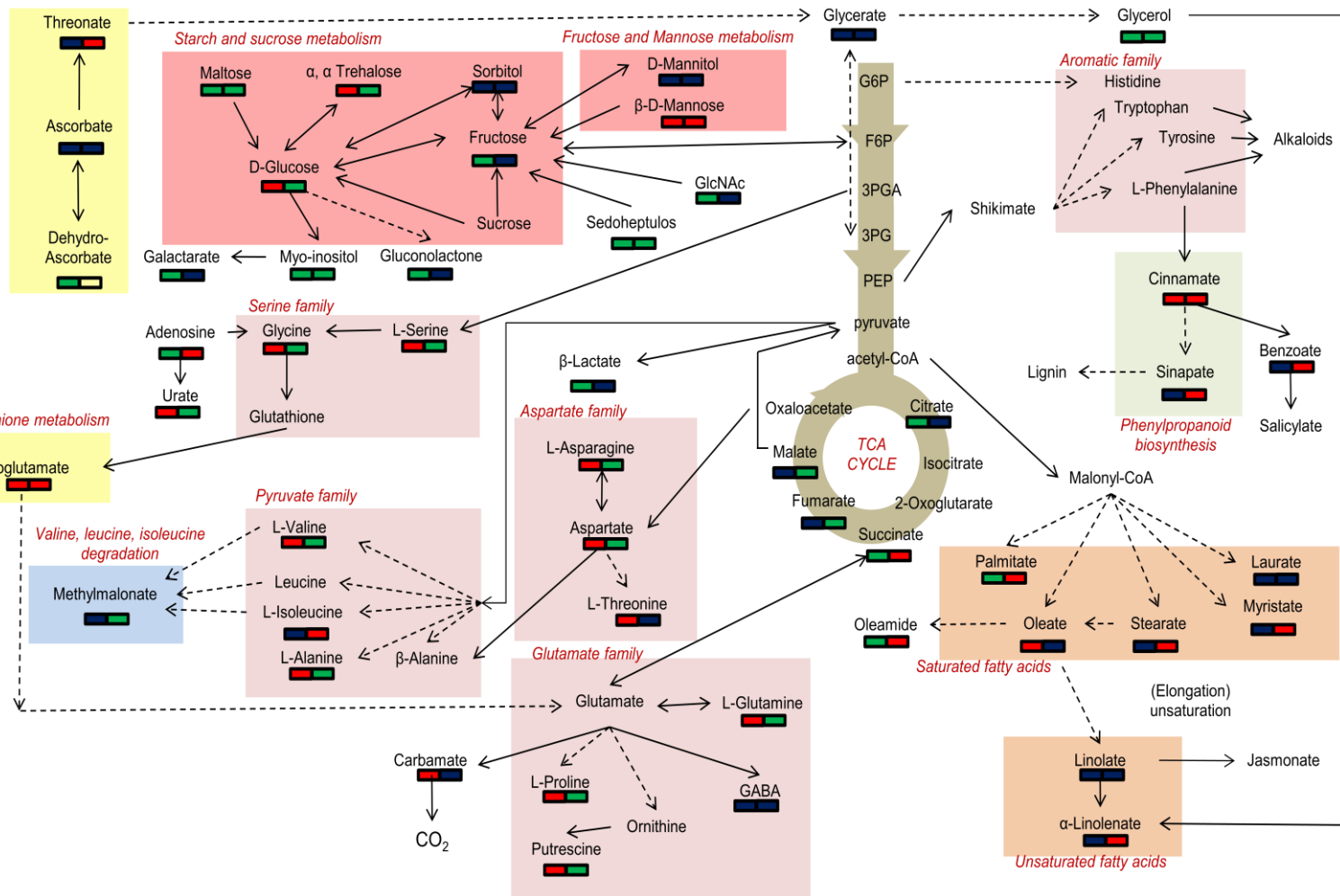
Εικόνα 17: Μεταβολικό δίκτυο του φυτού *Arabidopsis thaliana* όπου φαίνεται η επίδραση της προσβολής από τον μύκητα *V. dahliae* στον μεταβολισμό των *rwd* φυτών συγκριτικά με την επίδραση που έχει ο μύκητας στον μεταβολισμό των αγρίου τύπου Col-0 3(αριστερά) και 4(δεξιά) ημέρες μετά την μόλυνση. Με κόκκινο χρώμα απεικονίζεται η αυξημένη συγκέντρωση των μεταβολιτών, με πράσινο η μειωμένη και με μαύρο η συγκέντρωση των μεταβολιτών η οποία δεν έχει διαφοροποιηθεί σε σχέση με εκείνη των αγρίου τύπου φυτών.

Ascorbate and aldarate metabolism

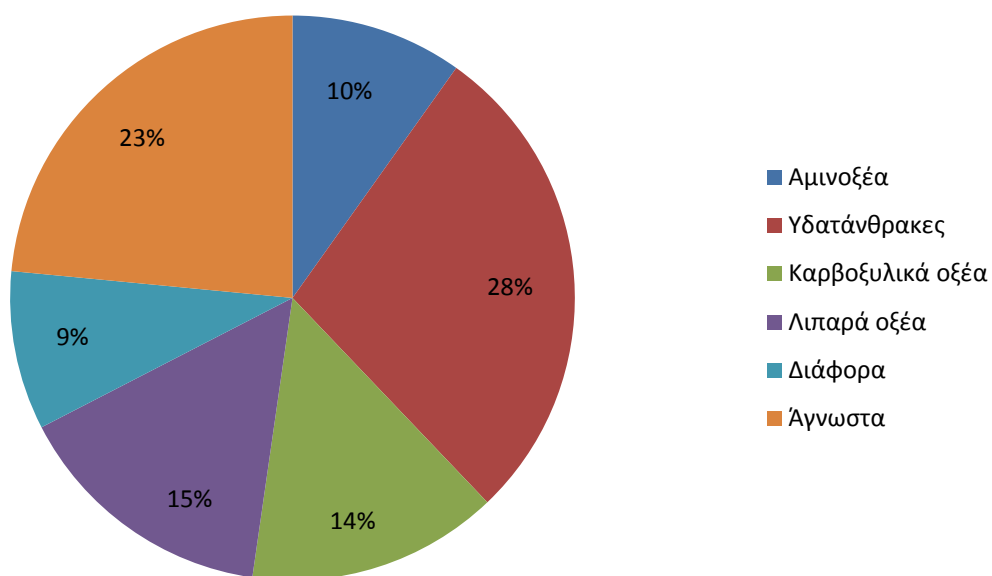


Εικόνα 18: Μεταβολικό δίκτυο του φυτού *Arabidopsis thaliana* όπου φαίνεται η επίδραση της προσβολής από τον μύκητα *F. oxysporum* στον μεταβολισμό των *rwd* φυτών συγκριτικά με την επίδραση που έχει ο μύκητας στον μεταβολισμό των αγρίου τύπου Col-0 3(αριστερά) και 4(δεξιά) ημέρες μετά την μόλυνση. Με κόκκινο χρώμα απεικονίζεται η αυξημένη συγκέντρωση των μεταβολιτών, με πράσινο η μειωμένη και με μαύρο η συγκέντρωση των μεταβολιτών η οποία δεν έχει διαφοροποιηθεί σε σχέση με εκείνη των αγρίου τύπου φυτών.

Ascorbate and aldarate metabolism



Εικόνα 19: Απεικόνιση του μεταβολικού δικτύου των αμόλυντων *pwd* φυτών *A. thaliana* σε σύγκριση με τα αμόλυντα αγρίου τύπου Col-0 3(αριστερά) και 4(δεξιά) ημέρες μετά την μόλυνση των αντίστοιχων εφαρμογών. Με κόκκινο χρώμα απεικονίζεται η αυξημένη συγκέντρωση των μεταβολιτών, με πράσινο η μειωμένη και με μαύρο η συγκέντρωση των μεταβολιτών η οποία δεν έχει διαφοροποιηθεί σε σχέση με εκείνη των αγρίου τύπου φυτών.



Εικόνα 20: Στα δείγματα που αναλύθηκαν ανιχνεύθηκαν 132 μεταβολικά χαρακτηριστικά από τα οποία το μεγαλύτερο ποσοστό αποτελούσαν οι υδατάνθρακες ακολουθούμενοι από τα λιπαρά και τα καρβοξυλικά οξέα

4. Συζήτηση

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

Η βασικότερη πηγή άνθρακα που υπάρχει σε κάθε φυτό είναι το άμυλο, το οποίο τα φυτά παράγουν κατά την διάρκεια της ημέρας και διασπούν κατά την διάρκεια της νύχτας με σκοπό την παραγωγή ενέργειας για την δική τους ανάπτυξη. Όπως προαναφέρθηκε τα ένζυμα δικινάση της φωσφογλυκάνης (PWD), δικινάση της γλυκάνης (GWD), γλυκοτρανσφεράση 2 (DPE2) και ισοαμυλάση 1 (ISA1) είναι μερικά από τα σημαντικότερα ένζυμα που εμπλέκονται στο μονοπάτι μεταβολισμού του αμύλου. Μέχρι σήμερα η διεθνής βιβλιογραφία που αφορά τον πρωτογενή μεταβολισμό των φυτών και την σχέση με την άμυνά τους είναι αρκετά περιορισμένη. Στην παρούσα μελέτη διερευνήθηκε ο ρόλος της δικινάσης της γλυκάνης (GWD), της δικινάσης της φωσφογλυκάνης (PWD), της γλυκοτρανσφεράσης 2 (DPE2) και της ισοαμυλάσης 1 (ISA1) στην αλληλεπίδραση του φυτού ξενιστή με τα παθογόνα.

Σε πειράματα παθογένειας που έχουν πραγματοποιηθεί, έχει διαπιστωθεί ανθεκτικότητα των φυτών *A. thaliana*, τα οποία είναι μεταλλαγμένα ως προς τα γονίδια που βρίσκονται σε διάφορα στάδια του καταβολισμού του αμύλου όπως το *GWD*, *PWD*, *ISA1*, *DPE2*, ως προς τους μύκητες *V. dahliae* και *F. oxysporum*. Για να ελεγχθεί εάν η ανθεκτικότητα που εμφάνισαν τα μεταλλαγμένα φυτά ως προς τα γονίδια *PWD*, *GWD2(290)*, *DPE2* και *ISA1* οφείλεται σε ενεργοποίηση της άμυνας των φυτών εξετάστηκε η έκφραση των γονιδίων *PR1* και *PDF1.2* τα οποία συνδέονται με την ενεργοποίηση των μηχανισμών άμυνας του φυτού και συγκεκριμένα των μονοπατιών του σαλικυλικού οξέος και του ιασμονικού/αιθυλενίου, αντίστοιχα (Feys *et al.* 2000; Schenk *et al.* 2000). Για το πείραμα αυτό συγκρίθηκε η έκφραση των προαναφερθέντων γονιδίων στις μεταλλαγμένες σειρές *pwd*, *gwd2(290)*, *dpe2* και *isa1* με την έκφρασή τους στα αγρίου τύπου φυτά Col-0 στις 3, 7 και 14 ημέρες μετά την μόλυνσή τους με τους μύκητες *V. dahliae* και *F. oxysporum*.

Για την μόλυνση των φυτών με τον μύκητα *V. dahliae* τα αποτελέσματα της qPCR έδειξαν υπερέκφραση του γονιδίου *PR1* στο ριζικό σύστημα όλων των μεταλλαγμένων σειρών, απ' όπου εισέρχεται το παθογόνο, σε σχέση με τα αγρίου τύπου φυτά Col-0 στις 7 και ακόμα πιο έντονα στις 14 ημέρες μετά την μόλυνση (Γράφημα 2A, 2B, 3A, 3B). Στις 3 ημέρες μετά την μόλυνση υπήρχε υποέκφραση του γονιδίου στο ριζικό σύστημα των μεταλλαγμένων σειρών συγκριτικά με τα Col-0, γεγονός που οδηγεί στο συμπέρασμα ότι χρειάζεται ένα χρονικό διάστημα μεγαλύτερο των 3 ημερών μετά την είσοδο του παθογόνου στο ριζικό σύστημα του φυτού προκειμένου να ενεργοποιηθεί το μονοπάτι του σαλικυλικού οξέως και να έχουμε την έκφραση των πρωτεϊνών παθογένειας *PR1* (Γράφημα 1A, 1B). Η αύξηση της έκφρασης του *PR1* στο ριζικό σύστημα των μεταλλαγμένων φυτών με την πάροδο των ημερών μετά την μόλυνση έχει αναφερθεί από τους Gkizi *et al.*, 2015 στις μεταλλαγμένες σειρές της *A. thaliana bam3*, *bam14* και *bam 1234* οι οποίες είχαν επίσης μολυνθεί με τον μύκητα *V. dahliae*. Η υπερέκφραση του *PR1* δείχνει την σημασία των μηχανισμών άμυνας που ενεργοποιούνται από το σαλικυλικό οξύ στην αλληλεπίδραση του φυτού ξενιστή με τον μύκητα *V. dahliae*, όπως έχει προταθεί σε προηγούμενες μελέτες όπου φυτά ανθεκτικά στον παραπάνω μύκητα χαρακτηρίζονται από ταχεία αύξηση της δραστηριότητας των PAL και υπερέκφραση των *PR1*, *PR2* και *PR5* (Pantelides *et al.*, 2010; Derksen *et al.*, 2013). Η έκφραση του γονιδίου *PDF1.2* στο ριζικό σύστημα των μολυσμένων-μεταλλαγμένων σειρών είναι ασήμαντη συγκριτικά με εκείνη του *PR1* στα ίδια φυτά γεγονός που υποδεικνύει αρνητική αλληλεπίδραση μεταξύ της ενεργοποίησης του σαλικυλικού και ιασμονικού/αιθυλενίου, όπως έχει αναφερθεί και για την έκφραση πολλών άλλων γονιδίων (Berrocal- Lobo & Molina, 2008).

Μια αντίθετη εικόνα παρουσιάζεται στα αποτελέσματα της qPCR στις μεταλλαγμένες σειρές που είχαν μολυνθεί με τον μύκητα *F. oxysporum* όπου υπάρχει ταχύτερη ενεργοποίηση του μονοπατιού του σαλικυλικού οξέως καθώς το *PR1* υπερεκφράζεται στο ριζικό σύστημα των μεταλλαγμένων σειρών από τις 3 ημέρες μετά την μόλυνση. ενώ στις 7 και 14 ημέρες μετά την μόλυνση υπάρχει μικρότερη έκφραση ή και υποέκφραση του *PR1*. Εξαίρεση αποτελεί η έκφραση του *PR1* στην *isa1* στις 14 ημέρες μετά την μόλυνση, η οποία είναι σημαντικά ανεβασμένη. Το ίδιο παρατηρείται και για την έκφραση του *PDF1.2* στο υπόγειο τμήμα των φυτών η οποία είναι σημαντικά αυξημένη στις μεταλλαγμένες σειρές σε σχέση με τα Col-0 στις 3 ημέρες μετά την μόλυνση, ενώ στις υπόλοιπες χρονικές στιγμές είναι μειωμένη. Εξαίρεση αποτελεί ξανά η σειρά *isa1* στις 14 ημέρες μετά την μόλυνση στην οποία η έκφραση του *PDF1.2* είναι πολύ μεγάλη.

Από τα παραπάνω, μπορούμε να πούμε ότι ο μύκητας *F. oxysporum* προκαλεί ταχύτερη ενεργοποίηση των μηχανισμών άμυνας του φυτού που σχετίζονται με το μονοπάτι του σαλικυλικού οξέως και του ιασμονικού/αιθυλενίου σε σχέση με τον μύκητα *V. dahliae* καθώς και ότι η ανθεκτικότητα των μεταλλαγμένων φυτών *A. thaliana* συνδέεται κυρίως με τον μηχανισμό άμυνας που εξαρτάται από το σαλικυλικό οξύ.

Η μελέτη της έκφρασης των γονιδίων *GWD1*, *GWD2(290)*, *PWD*, *DPE2* και *ISA1* που συμμετέχουν στο μονοπάτι μεταβολισμού του αμύλου, στο υπόγειο και υπέργειο τμήμα των αγρίου τύπου φυτών Col-0 που είχαν μολυνθεί με τον μύκητα *V. dahliae* σε σχέση με την έκφραση στα αμόλυντα Col-0 έδειξε ότι ο μύκητας επηρεάζει την έκφρασή τους. Τα αποτελέσματα της qPCR έδειξαν ότι η παρουσία του μύκητα οδήγησε σε υπερέκφραση των παραπάνω γονιδίων στο ριζικό σύστημα των φυτών στις 3 ημέρες μετά την μόλυνση, γεγονός που

υποδεικνύει ότι ο μύκητας πιθανόν να προωθεί την παθογένειά του επηρεάζοντας την έκφραση των συγκεκριμένων γονιδίων. Αντιθέτως, στο υπέργειο τμήμα των φυτών τα γονίδια ήταν υποεκφρασμένα σε σχέση με τα αμόλυντα Col-0, ενώ στις 7 ημέρες μετά την μόλυνση υπήρχε μεγάλη υπερέκφραση των γονιδίων τόσο στο υπέργειο όσο και υπόγειο τμήμα των φυτών. Συνεπώς, μπορούμε να πούμε ότι το παθογόνο επηρεάζει θετικά την έκφραση των γονιδίων που συμμετέχουν στον μεταβολισμό του αμύλου αρχικά στις ρίζες, εφόσον εισέρχεται από το ριζικό σύστημα των φυτών, και στην συνέχεια στα φύλλα για να προωθήσει την παθογένειά του επωφελούμενος από την αποδόμηση του αμύλου σε γλυκόζη και μαλτόζη.

Στην παρούσα μελέτη πραγματοποιήθηκε ανάλυση του συνόλου των μεταβολιτών των φυτών *A. thaliana*, της μεταλλαγμένης σειράς *pwd* και των αγρίου τύπου Col-0. Η σειρά *pwd* επιλέχθηκε διότι το ένζυμο *PWD* βρίσκεται σε αρχικό στάδιο του καταβολισμού του αμύλου και η έλλειψη του αποτρέπει την αποδόμηση του αμύλου σε μαλτοτριόζη και στην συνέχεια σε γλυκόζη (Εικόνα 14). Από την μεταβολική ανάλυση στο μονοπάτι μεταβολισμού του αμύλου φαίνεται η υψηλή συγκέντρωση της γλυκόζης στα *pwd* φυτά που έχουν μολυνθεί με τους μύκητες *V. dahliae* και *F. oxysporum* (Εικόνες 15, 16). Τα παθογόνα προκειμένου να προωθήσουν την παθογένειά τους πιθανόν να επηρεάζουν την έκφραση ισοενζύμων του *PWD* με αποτέλεσμα τον καταβολισμό του αμύλου και την υψηλή συγκέντρωση της γλυκόζης.

Η γενική διατάραξη του μεταβολισμού της *A. thaliana* είναι επίσης εμφανής από την διακύμανση των μεταβολιτών στο μονοπάτι βιοσύνθεσης των φαινυλοπροπανοειδών (Εικόνα 15), το οποίο έχει σημαντικό ρόλο στην φυσιολογία του φυτού, συμπεριλαμβάνοντας τις αποκρίσεις άμυνας. Υπερέκφραση του συγκεκριμένου μονοπατιού έχει ως αποτέλεσμα την

βιοσύνθεση του σαλικυλικού οξέως. Το σαλικυλικό οξύ είναι ένα σημαντικό μόριο στα φυτά και θεωρείται ότι υπάρχουν δύο τρόποι βιοσύνθεσης του σαλικυλικού οξέος σε αυτά. Βιοχημικές μελέτες έχουν δείξει ότι ο ένας τρόπος, ο οποίος εξετάζεται στην παρούσα μελέτη, είναι η σύνθεση του σαλικυλικού οξέος από το κιναμικό οξύ το οποίο παράγεται από την δραστηριότητα της αμμωνιακής λυάσης της φαινυλαλανίνης (PAL). Η σίγηση των PAL γονιδίων στον καπνό ή η χημική σίγηση στην *A. thaliana*, την αγγουριά και την πατάτα μειώνει την επαγόμενη από τα παθογόνα συσσώρευση του σαλικυλικού οξέος (Chen et al., 2009). Στην μεταβολική ανάλυση διαπιστώθηκε υψηλότερη συγκέντρωση του κιναμικού οξέως στα *pwd* φυτά σε σχέση με την συγκέντρωση στα Col-0 στις 3 και 4 ημέρες μετά την μόλυνση με τον μύκητα *V. dahliae* (Εικόνα 17), γεγονός που επιβεβαιώνει την προηγούμενη υπόθεση της συσχέτισης της ανθεκτικότητας των μεταλλαγμένων φυτών με την βιοσύνθεση του σαλικυλικού οξέως και ενεργοποίηση των μηχανισμών άμυνας που εξαρτώνται από το σαλικυλικό οξύ. Η ίδια διαπίστωση γίνεται και για την μόλυνση με τον μύκητα *F. oxysporum* όπου και πάλι φαίνεται να σχετίζεται η ανθεκτικότητα των *pwd* φυτών με την βιοσύνθεση του σαλικυλικού οξέως (Εικόνα 18).

Το ιασμονικό οξύ είναι μια οξυλιπίνη η οποία λειτουργεί ως σήμα ενεργοποίησης των μηχανισμών άμυνας κατά την απόκριση του φυτού σε βιοτικές και αβιοτικές καταπονήσεις. Η βιοσύνθεση του ιασμονικού οξέος και τα μονοπάτια μετάδοσης του σήματος έχουν μελετηθεί εκτενώς σε δικοτυλήδονα φυτά όπως το φυτό *A. thaliana*, ο καπνός και η τομάτα. Μελετήθηκε η πρόδρομη ένωση της βιοσύνθεσης του ιασμονικού οξέως, το α-λινολεϊκό οξύ, το οποίο αποτελεί σημαντικό συστατικό για την ενεργοποίηση της άμυνας του φυτού. Η ενεργοποίηση της βιοσύνθεσης του ιασμονικού οξέως απαιτεί υψηλά επίπεδα α-λινολεϊκού, τα οποία πιθανόν

απελευθερώνονται από το σύμπλοκο των μεμβρανικών λιπιδίων. Όπως φαίνεται και στην μεταβολική ανάλυση (Εικόνα 17), η συγκέντρωση του α-λινολεϊκού στα *pwd* φυτά που έχουν μολυνθεί με τον μύκητα *V. dahliae* βρίσκεται στα ίδια επίπεδα με εκείνη στα Col-0 στις 3 και 4 ημέρες μετά την μόλυνση, γεγονός που συμφωνεί με την υπόθεση ότι η άμυνα των μεταλλαγμένων φυτών, στην συγκεκριμένη των *pwd*, σχετίζεται λιγότερο με τους μηχανισμούς άμυνας που ενεργοποιούνται από το ιασμονικό οξύ. Επίσης, διαφοροποίηση παρουσιάζεται στην μόλυνση με τον μύκητα *F. oxysporum* (Εικόνα 18), όπου η συγκέντρωση του α-λινολεϊκού στις 3 ημέρες μετά την μόλυνση είναι χαμηλότερη στα *pwd* συγκριτικά με την συγκέντρωση στα Col-0 ενώ στις 4 είναι υψηλότερη.

Αξιοσημείωτο από την μεταβολική ανάλυση των φυτών *A. thaliana*, αποτελεί η υψηλή συγκέντρωση του γ-αμινοβουτυρικού οξέως (GABA) και του θρεονικού οξέως τα οποία έχουν αντιοξειδωτική δράση ως προς τις ενεργές μορφές οξυγόνου (reactive oxygen species, ROS). Η αναγνώριση του παθογόνου από τα φυτά προωθεί την παραγωγή των ενεργών μορφών οξυγόνου, το οποίο διαδραματίζει σημαντικό ρόλο στην μολυσματικότητα και ανάπτυξη των παθογόνων. Η υψηλή συγκέντρωση του γ-αμινοβουτυρικού οξέως στις 4 ημέρες μετά την μόλυνση των *pwd* και Col-0 και του θρεονικού οξέως στις 3 και 4 ημέρες μετά την μόλυνση των *pwd* και Col-0 και με τα δύο παθογόνα υποδεικνύει την κατάσταση της οξειδωτικής καταπόνησης στην οποία βρίσκονταν τα φυτά λόγω της αλληλεπίδρασής τους με τους μύκητες *V. dahliae* και *F. oxysporum* (Εικόνες 15, 16).

Εν κατακλείδι, από την παρούσα μελέτη προκύπτει ότι η ανθεκτικότητα που παρουσίασαν τα μεταλλαγμένα φυτά σχετίζεται κυρίως με τους μηχανισμούς άμυνας των φυτών που ενεργοποιούνται από το σαλικυλικό οξύ

παρά από το ιασημονικό οξύ/αιθυλένιο, γεγονός που απεδείχθη και σε μεταβολικό επίπεδο. Επιπλέον, η έκφραση των πρωτεϊνών παθογένειας *PR1* και *PDF1.2* στις μεταλλαγμένες σειρές σε συνδυασμό με την υψηλή έκφραση των γονιδίων του καταβολισμού του αμύλου στα αγρίου τύπου φυτά Col-0 που είχαν μολυνθεί με τον παθογόνο μύκητα *V. dahliae* οδηγούν στο συμπέρασμα ότι η έκφραση των γονιδίων του μεταβολισμού του αμύλου έχει ενεργό ρόλο στην αλληλεπίδραση των φυτών *A. thaliana* με τον μύκητα *V. dahliae*.

5. Βιβλιογραφία

- Agrios, 2005.** Plant Pathology, 5th edition. New York, USA: Elsevier.
- Allen R.M.1951.** Cotton seeds are capable of carrying *Verticillium*. Plant Disease Reporter 35:11-12.
- Aliferis, K.A., Faubert, D., Jabaji, S., 2014.** A metabolic Profiling strategy for the dissection of Plant Defence against Fungal Pathogens.
- Alonso, J.M., Stepanova, A.n., Leisse, T.J., Kim, C.j., Chen, H.M., Shinn, P.,Stevenson, D.K., Zimmerman, J., Barajas, P., Cheuk, R., Gadrinab, C., Heller, C., Jeske, A., Koesema, E., Meyers, C.C., Parker, H., Predmis, L.,Ansari, Y., Choy, N., Deen, H., Geral, M.,Hazari, N., Hom, E., Karnes, M.,Mulholland, C., Ndubaku, R., Schmidt, I., Guzman, P., Aguilar-Henonin, L., Schimd, M., Weigel, D., Carter, D.E., Machand, T., Risseeuw, E., Brogden, D., Zeko, A., Crosby, W.L., Berry, C.C., and Echer, J.R. 2003.** Genome wide Insertional mutagenesis of *Arabidopsis thaliana*. Science 301:653-657.
- BejaranoAlcazar, J., BlancoLopez, M.A., MeleroVara, J.M., and JimenezDiaz, R.M.1997.** The influence of verticillium wilt epidemic on cotton yield in southern Spain. Plant Pathology 46:168-178
- Bhat R.G. nad Subbarao K.V., 1999.** Host Range Specificity in *Verticillium dahliae*. Phytopathology 89:1218-1225
- Blamey, M. and Grey-Wilson, C. 1989.** Flora of Britain and Northern Europe.
- Bolouri Moghaddam, M.R., and Van den Ende, W. 2012.** Sugars and plant innate immunity. Journal of Experimental Botany 63:3989-3998

- Booth C, (1971).** The genus *Fusarium*. KEW, UK Common wealth. Mycological Institute
- Buhtz, A., Witzel, K., Strehmel, N., Ziegler, J., Abel, S., Grosch, .,R., 2015.** Perturbations in the Primary Metabolism of Tomato and *Arabidopsis thaliana* Plants Infected with the Soil- Borne Fungus *Verticillium dahliae*.
- Campbell, C.L., and Madden, L.V. 1990.** Introduction to Plant Disease Epidemiology. New York: Wiley.
- Chia T., Thorneycroft, D., Chapple, A., Messerli, G., Chen, J., Zeeman, S.C., Smith, S.M., and Smith, A.M. 2004.** Acytosolic glucosyltransferase is required for conversion of starch to sucrose in *Arabidopsis* leaves at night. *Plant Journal* 37:853-863.
- Clough, S.J., and Bent, A.F., 1998.** Floral dip: a simplified method for *Agrobacterium*-mediated transformation of *Arabidopsis thaliana*. *Plant Journal* 16:735-743.
- Dangl, J.L., 2013.** Pivoting the plant immune system from dissection to deployment. *Science* 341:1175-1175
- Feys, B.J., and Parker, J.E. 2000.** Interplay of signaling pathways in plant disease resistance. *Trends in Genetics*
- Fradin, E.F., and Thomma, B. 2006.** Physiology and molecular aspects of *Verticillium* wilt diseases caused by *V. dahliae* and *V. albo-atrum*. *Molecular Plant Pathology* 7:71-86.
- Fulton, D.C., Stettler, M., Mettler, T., Vaughan, C.K.,Li, J., Francisco, P., Gil, D., Reinold, H., Eicke, S., Messerli, G., Dorken, G., Halliday, K., Smith, A.M., Smith, S.M., and Zeeman, S.C.2008.** beta-AMYLASE4, a noncatalytic

protein required for starch breakdown, acts upstream of three active beta-amylases in *Arabidopsis* chloroplasts. Plant Cell 20:1040-1058.

Goicoechea, N., Aguirreolea, J., Cenoz, S., and Garcia-Mina, J.M.2000.

Verticillium dahliae modifies the concentrations of proline, soluble sugars, starch, soluble protein and abscisic acid in pepper plants. Eur. J. Plant Pathol. 106:19-25.

Hansjakob, A., Bischof, S., Bringmann, G., Riederer, M., and Hildebrandt, U.

2010. Very-long-chain aldehydes promote *in vitro* prepenetration processes of *Blumeria graminis* in a dose- and chain length-dependent manner. New Phytol. 188: 1039-1054.

Hansjakob, A. Riederer, M., and Hildebrandt, U. 2011.

Wax matters: absence of very-long-chain aldehydes from the leaf cuticular wax of the glossy11 mutant of maize compromises the prepenetration processes of *Blumeria graminis*. Plant Pathol. 60: 1151-1161.

Kleinboelting, N., Huel, G., Kloetgen, A., Viehoveer, P., and Weisshaar, B.2012.

GABI-Kat SimpleSearch: new features of the *Arabidopsis thaliana* T-DNA mutant database. Nucleic Acids Research 40:D1211-D1215.

Kötting, O., Pusch, K., Tiessen, A., Geigenberger, P., Steup, M., and Ritte, G.,

2005. Identification of a novel enzyme required for starch metabolism in *Arabidopsis* leaves. The phosphoglucan water dikinase. Plant Physiology 137:242-252.

Lapin, D., and Van den Ackerveken, G. 2013.

Susceptibility to plant disease: more than a failure of host immunity. Trends in Plant Sci. 18: 546-554.

- Ligoxigakis, E.K., Vakalounakis, D.J., and Thanassoulopoulos, C.C. 2002a.** Host range of *Verticillium dahliae* in cultivated species in Crete. *Phytoparasitica* 30:141-146.
- Lloyd, J.R., Koosmann, J., and Ritte, G. 2005.** Leaf starch degradation comes out of the shadows. *Trends in Plant Science* 10:130-137.
- Maniatis, T., Fritsch, E.F., and Sambrook, J., 1982.** *Molecular Cloning, A Laboratory Manual.* Cold Spring Harbor, NY: Cold Spring Harbor Laboratory Press.
- Meinke, D.W., Cherry, J.M., Dean, C., Rounsley, S.D., and Koornneef, M. 1998.** *Arabidopsis thaliana: A model plant for genome analysis.* *Science* 282:662.
- Moreno, N., Bougourd, S., Haseloff, J. and Fiejo, J.A., 2006.** Chapter 44: Imaging Cells, In: Pawley JB (Editor). *Handbook of Biological Confocal Microscopy – 3rd edition.* SpringerScience+Business Media, New York. p. 769-787.
- Robison, M.M., Griffith, M., Pauls, K.P., and Glick, B.R. 2001.** Dual role for ethylene in susceptibility of tomato to *Verticillium* wilt. *Journal of Phytopathology- Phytopathologische Zeitschrift* 149:385-388.
- Schenk, P.M., Kazan, K., Wilson, I., Anderson, J.P., Richmond, T., Somerville, S.C., and Manners, J.M., 2000.** Coordinated plant defence responses in *Arabidopsis* revealed by microarray analysis. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 97:11655-11660.
- Sherf, A.F. and MacNab, a.a., 1986.** *Vegetable Diseases and their Control.* (2nd ed.). John Wiley & sons, eds. New York, USA, pp. 728.

- Sinha, A.K., and Wood, R.K.S. 1968.** Studies on the nature of resistance in tomato plants to *Verticillium albo-atrum*. Ann. Appl. Biol. 62: 319-327.
- Staskawicz, B.J. 2001.** Genetics of plant-pathogen interactions specifying plant disease resistance. Plant Physiology 125:73-76.
- Streb S. and Zeeman S.C. 2012.** Strach Metabolism in Arabidopsis. The Arabidopsis Book 10: e0160.DOL: 10.1199/tab.0160.
- Struck, C., Ernst, M., Hahn, M. 2002** Characterization of a developmentally regulated amino acid transporter (AAT1p) of the rust fungus *Uromyces fabae*. Mol Plant Pathol 3:23-30.
- Thanassouloupoulos C.C., Biris, D.A. and Tjamos, E.C. 1981.** Weed hosts as inoculum source of *Verticillium* in olive orchards. Phytopath. Medit. 20:164-168.
- Tjamos, S.E., Flemetakis, E., Paplomatas, E.J., and Katinakis, P. 2005.** Induction of resistance to *Verticillium dahliae* in *Arabidopsis thaliana* by the biocontrol agent K-165 and pathogenesis-related proteins gene expression. Molecular Plant-Microbe Interactions 18:555-561.
- Uppalapatia, S.R., Ishigaa, Y., Doraiswamy, V., Bedaira, M., Mittala, S., Chena, J., Nakashimaa, J., Tanga, Y., Tadegea, M., Ratetb, P., Chena, R., Schultheissc, H., Mysorea, K. 2012.** Loss of abaxial leaf epicuticular wax in *Medicago truncatula* *irg1/palm1* mutants results in reduced spore differentiation of anthracnose and nonhost rust pathogens. Plant Cell 24: 353-370.

- Van Loon, L.C., and Van Strien, E.A. 1999.** The families of pathogenesis-related proteins, their activities, and comparative analysis of PR-1 type proteins. *Physiological and Molecular Plant Pathology* 55:85-97.
- Vance, C.C., Kirk, T.K., and Sherwood, R.T. 1980.** Lignification as a mechanism of disease resistance. *Annual Review of Phytopathology* 18:259-288.
- Voegelé, R.T., Struck, C., Hahn, M., Mendgen, K. (2001).** The role of haustoria in sugar supply during infection of broad bean by the rust fungus *Uromyces fabae*. *Proc Natl Acad Sci USA* 98:8133-8138.
- 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.
- Wang, H., Wang, J., Jiang, J., Chen, S., Guan, Z., Liao, Y. and Chen, F. 2014.** Reference genes for normalizing transcription in diploid and tetraploid *Arabidopsis*. *Scientific Reports* 4.
- Wattebled, F., Ral, J.P., Dauvillee, D., Myers, A.M., James, M.G., Schlichting, R., Giersch, C., Ball, S.G., and D’Hulst, C. 2003.** STA11, a *Chlamydomonas reinhardtii* locus required for normal starch granule biogenesis, encodes Disproportionating enzyme. Further evidence for a function of alpha-1,4 glucanotransferases during starch granule biosynthesis in green algae. *Plant Physiology* 132:137-145.
- Wheeler, M.H. 1982.** Melanin biosynthesis in *Verticillium dahliae*: dehydration and reduction reactions in cell-free homogenates. *Experimental Mycology* 6:171-179.

Yadeta, K., and Thomma, B.P.H.J. 2013. The xylem as battleground for plant hosts and vascular wilt pathogens. *Frontiers in Plant Science* 4.

Yao, Z., Rashid, K.Y., Adam, L.R., and Daayf, F.2011. *Verticillium dahliae's* VdNEP acts both as a plant defence elicitor and a pathogenicity factor in the interaction with *Helianthus annuus*. *Canadian Journal of Plant Pathology-Revue Canadienne De Phytopathologie* 33:375-388.

Zeeman, S.C., Umemoto, T., Lue, W.L., Au-Yeung, P., Martin, C., Smith, A.M., and Chen, J. 1998. A mutant of *Arabidopsis* lacking a chloroplastic isoamylase accumulates both starch and phytoglucogen. *Plant Cell* 10:1699.

Θανασουλόπουλος Κ. 1995. Μυκητολογικές ασθένειες φυτών μεγάλης καλλιέργειας. Θεσσαλονίκη: εκδόσεις Ζήτη..

Μαυρογιαννόπουλος Γ. 2005. Θερμοκήπια. Αθήνα: εκδόσεις Σταμούλης.

Παναγόπουλος Χ.Γ. 1995. Ασθένειες κηπευτικών καλλιεργειών. Αθήνα: εκδόσεις Σταμούλης.

Παναγόπουλος Χ.Γ. 2007. Ασθένειες κηπευτικών καλλιεργειών. Αθήνα: εκδόσεις Σταμούλης.

Τζάμος, Ε.Κ. 2007. Φυτοπαθολογία Εκδ. Σταμούλη.