

ΓΕΩΠΟΝΙΚΟ ΠΑΝΕΠΙΣΤΗΜΙΟ ΑΘΗΝΩΝ
ΣΧΟΛΗ ΑΓΡΟΤΙΚΗΣ ΠΑΡΑΓΩΓΗΣ ΥΠΟΔΟΜΩΝ & ΠΕΡΙΒΑΛΛΟΝΤΟΣ
ΤΜΗΜΑ ΕΠΙΣΤΗΜΗΣ ΦΥΤΙΚΗΣ ΠΑΡΑΓΩΓΗΣ
ΕΡΓΑΣΤΗΡΙΟ ΦΥΤΟΠΑΘΟΛΟΓΙΑΣ
Π.Μ.Σ « ΕΠΙΣΤΗΜΕΣ ΚΑΙ ΣΥΣΤΗΜΑΤΑ ΦΥΤΙΚΗΣ ΠΑΡΑΓΩΓΗΣ »

“Η επίδραση μονοσακχαριτών και δισακχαριτών στην αλληλεπίδραση του μύκητα *Verticillium dahliae* με το φυτό ξενιστή”

ΜΕΤΑΠΤΥΧΙΑΚΗ ΔΙΑΤΡΙΒΗ

ΓΙΩΡΓΟΣ Θ. ΦΑΤΟΥΡΟΣ

ΕΠΙΒΛΕΠΩΝ

ΔΡ. ΤΖΑΜΟΣ ΣΩΤΗΡΙΟΣ

ΑΘΗΝΑ 2019

“Η επίδραση μονοσακχαριτών και δισακχαριτών στην αλληλεπίδραση του μύκητα *Verticillium dahliae* με το φυτό ξενιστή”

“The effect of of monosaccharides and disaccharides in the interaction of pathogenic fungus *Verticillium dahliae* with the host plant ”

ΜΕΤΑΠΤΥΧΙΑΚΗ ΔΙΑΤΡΙΒΗ

ΓΙΩΡΓΟΣ Θ. ΦΑΤΟΥΡΟΣ

ΕΠΙΒΛΕΠΩΝ

ΔΡ. ΤΖΑΜΟΣ ΣΩΤΗΡΙΟΣ

ΕΞΕΤΑΣΤΙΚΗ ΕΠΙΤΡΟΠΗ

ΚΑΘΗΓΗΤΗΣ ΕΠΑΜΕΙΝΩΝΔΑΣ ΠΑΠΛΩΜΑΤΑΣ

ΕΠΙΚΟΥΡΟΣ ΚΑΘΗΓΗΤΗΣ ΣΩΤΗΡΗΣ ΤΖΑΜΟΣ

ΚΑΘΗΓΗΤΡΙΑ ΒΙΟΛΕΤΑ ΚΩΝΣΤΑΝΤΙΝΟΥ - ΚΟΚΟΤΟΥ

*Στην οικογένεια μου και σε όσους
μου συμπαραστάθηκαν και με υποστήριξαν*

ΠΕΡΙΛΗΨΗ

Η ασθένεια που προκαλείται από τον εδαφογενή μύκητα *Verticillium dahliae*, γνωστή ως αδρομύκωση είναι δύσκολα ελεγχόμενη και ταυτόχρονα καταστρεπτική εξαιτίας της ικανότητας του παθογόνου να προσβάλλει τους αγγειώδεις ιστούς των φυτών και να επιβιώνει για πολλά χρόνια στο έδαφος. Λόγω της μη ύπαρξης ασφαλών και αποτελεσματικών χημικών φυτοπροστατευτικών προϊόντων, η έρευνα για την αντιμετώπιση του μύκητα εστιάζει στην εύρεση βιολογικών ανταγωνιστών και φυσικών οργανικών ουσιών (βιοδιεγέρτες-βιοενεργοποιητές), που θα μπορούν μέσω ανταγωνισμού ή μέσω διέγερσης των αμυντικών μηχανισμών του φυτού να επιβραδύνουν την επέλαση του παθογόνου. Στην παρούσα μεταπτυχιακή μελέτη διερευνήθηκε ο ρόλος της προσθήκης μονοσακχαριτών και δισακχαριτών κατά την προσβολή φυτών μελιτζάνας από τον μύκητα *V. dahliae* καθώς επίσης η ανίχνευση με αναλυτικές μεθόδους ποσοτικά του σαλικυλικού και ιασμονικού οξέος, που ενεργοποιούν βιοχημικά μονοπάτια που σχετίζονται με την άμυνα των φυτών. Για το σκοπό αυτό πραγματοποιήθηκαν πειράματα παθογένειας κατά τα οποία φυτά μελιτζάνας μολύνθηκαν με το μύκητα *V. dahliae* και έπειτα έγινε εφαρμογή γλυκόζης, φρουκτόζης και μαλτόζης με ριζοπότισμα. Στη συνέχεια πραγματοποιήθηκε καταγραφή των συμπτωμάτων και αποτυπώθηκε το ποσοστό των ασθενών φύλλων, η συχνότητα εμφάνισης της ασθένειας και το σχετικό εμβαδό ασθένειας. Έπειτα πραγματοποιήθηκε με αναλυτικές μεθόδους ποσοτικοποίηση του σαλικυλικού και ιασμονικού οξέος στα φυτά όπου είχαν ριζοποτιστεί με μαλτόζη, τα οποία είχαν τα καλύτερα αποτελέσματα στην ανάσχεση των συμπτωμάτων της ασθένειας, για να ελέγξουμε εάν ενεργοποιούνται βιοχημικά μονοπάτια που σχετίζονται με την άμυνα. Τα αποτελέσματα της εργασίας έδειξαν ότι τα φυτά όπου έγινε εξωγενής εφαρμογή μαλτόζης με ριζοπότισμα είχαν μικρότερη ένταση συμπτωμάτων, μικρότερο αριθμό φυτών με συμπτώματα αλλά και μικρότερο σχετικό εμβαδό ασθένειας, εμφανίζοντας στατιστικώς σημαντική διαφορά σε σχέση με τον μάρτυρα. Επίσης παρατηρήθηκε αυξημένη συγκέντρωση ποσοτικά σαλικυλικού και ιασμονικού οξέος, γεγονός που υποδεικνύει την ενεργοποίηση της άμυνας των φυτών.

Λέξεις κλειδιά: Αδρομύκωση, *Verticillium dahliae*, μονοσακχαρίτες, δισακχαρίτες, μαλτόζη, φρουκτόζη, γλυκόζη, ριζοπότισμα, βιοχημικά μονοπάτια, σαλικυλικό οξύ, ιασμονικό οξύ, HRMS (Q-TOF)

The effect of of monosaccharides and disaccharides in the interaction of pathogenic fungus *Verticillium dahliae* with the host plant

The disease caused by the soilborne fungi *Verticillium dahliae* known as adromycosis, is difficult to control and at the same time destructive due to the pathogens ability to infect the vascular tissues of the host plant and to survive for many years in the soil. Due to the absence of safe and effective fungicides, the research focuses on the discovery of biocontrol agents and natural organic substances (bioenergizers - bioactivators), which through competition or by stimulating the defense mechanisms of the plant, can reduce the disease severity. For this purpose, in the current study, the role of monosaccharides and disaccharides during the attack of the plants by *V. dahliae*, as well as the quantitative detection of salicylic and jasmonic acid by analytical methods, which activate biochemical pathways related to plant defense, were investigated. For that reason, pathogenicity experiments were carried out in which *Solanum melongena* plants were infected with conidia of *V. dahliae* fungus and then D-glucose, D-fructose and D-maltose were applied by rootzone irrigation. Symptoms were then recorded and the percentage of diseased leaves, the incidence of the disease and the relative AUDPC were captured. Analytical methods were then performed to quantify salicylic and jasmonic acid in the plants with maltose treatment, which had the best results in preventing the symptoms of the disease, to identify if defense related biochemical pathways were triggered. The results of the study showed that the D-maltose treatment plants had less intensity of symptoms, fewer plants with symptoms but also a smaller relative area of disease (AUDPC), showing a statistically significant difference compared to the control. Furthermore, an increased concentration quantitative of salicylic and jasmonic acid was observed, indicating the activation of plant defense.

Key words: Adromycosis, *Verticillium dahliae*, monosaccharides, disaccharides, maltose, fructose, glyucose, root irrigation, biochemical pathways, salicylic acid, jasmonic acid, HRMS (Q-TOF)

Ευχαριστίες

Η μεταπτυχιακή αυτή μελέτη εκπονήθηκε στο Εργαστήριο Φυτοπαθολογίας του Γεωπονικού Πανεπιστημίου Αθηνών υπο την επίβλεψη του Επίκουρου Καθηγητή Σωτήρη Τζάμου.

Αρχικά θα ήθελα να ευχαριστήσω τον επιβλέποντα Επίκουρο Καθηγητή Φυτοπαθολογίας Σωτήρη Τζάμο τόσο για την ανάθεση της συγκεκριμένης μελέτης, όσο για την επιστημονική καθοδήγηση και την καθοριστική συμβολή καθ' όλη τη διάρκεια της εκπόνησης της. Επίσης θα ήθελα να τον ευχαριστήσω για την άψογη συνεργασία που είχαμε κατά τη διάρκεια των προπτυχιακών αλλά και μεταπτυχιακών σπουδών μου.

Ιδιαίτερες ευχαριστίες θα ήθελα να απευθύνω στον καθηγητή και διευθυντή του Εργαστηρίου Φυτοπαθολογίας ΓΠΑ Επαμεινώνδα Παπλωματά για τις γνώσεις που μου προσέφερε όλα αυτά τα χρόνια σπουδών καθώς και για το άριστο κλίμα που επικρατούσε στο Εργαστήριο.

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

Θα ήθελα ακόμα να ευχαριστήσω ιδιαίτερα την Καθηγήτρια και διευθύντρια του Εργαστηρίου Χημείας Βιολέτα Κωνσταντίνου-Κόκοτου, καθώς και το μέλος ΕΔΙΠ Χάρη Κανάκη και τη μεταπτυχιακή φοιτήτρια Ειρήνη Μεσημέρη που μας βοήθησαν στο τελευταίο μέρος του πειράματος που αφορούσε την υγρή χρωματογραφία.

Τέλος θα ήθελα να ευχαριστήσω όλο το προσωπικό του εργαστηρίου φυτοπαθολογίας για την προθυμία τους να βοηθήσουν, το ειλικρινές ενδιαφέρον τους

για την πρόοδο της εργασίας μου καθώς και για το ευχάριστο κλίμα που δημιουργούσαν.

Περιεχόμενα

ΠΕΡΙΛΗΨΗ	Σφάλμα! Δεν έχει οριστεί σελιδοδείκτης.
SUMMARY	Σφάλμα! Δεν έχει οριστεί σελιδοδείκτης.
1. Εισαγωγή	9
1.1 Ο μύκητας <i>Verticillium dahliae</i>	9
1.2 Ο βιολογικός κύκλος της ασθένειας.....	16
1.3 Επιδημιολογία της ασθένειας	19
1.4 Τρόποι αντιμετώπισης της βερτισιλλίωσης	21
1.4.1 Γενικά.....	21
1.4.2 Ανθεκτικές ποικιλίες.....	21
1.4.3 Απολύμανση εδάφους	22
1.4.4 Ηλιοαπολύμανση	22
1.4.5 Καλλιεργητικές πρακτικές	23
1.5 Βιολογική αντιμετώπιση	24
1.5.1 Γενικά.....	24
1.5.2 Βιολογική αντιμετώπιση εδαφογενών παθογόνων των φυτών	24
1.5.3 Οικονομική σημασία των εδαφογενών παθογόνων.....	26
1.6 Υδατάνθρακες - Μονοσακχαρίτες και δισακχαρίτες	27
1.7 Το αμυντικό σύστημα των φυτών.....	28
1.7.1 Γενικά.....	28
1.7.2 Μηχανισμοί άμυνας των φυτών από τα παθογόνα	29
1.7.2.1 Βασικό ανοσοποιητικό σύστημα.....	30
1.7.2.2 Ανθεκτικότητα των μη-ξενιστών	30
Βασική ανθεκτικότητα.....	31
Ανοσοποιητικό σύστημα των γονιδίων ανθεκτικότητας	32

1. Γόνου προς γόνου ανθεκτικότητα χωρίς αντίδραση υπερευαισθησίας.....	32
2. Γόνου προς γόνου ανθεκτικότητα που σχετίζεται με την αντίδραση υπερευαισθησίας	32
1.7.3 Φυτικές ορμόνες	34
1.7.4 Η σημασία του σαλικυλικού οξέος και του ιασμονικού/αιθυλενίου ως σήματα για τη διέγερση λανθανόντων μηχανισμών άμυνας των φυτών	34
Επίκτητη διασυστηματική αντοχή των φυτών και ο ρόλος του σαλικυλικού οξέος	37
Επαγόμενη διασυστηματική αντοχή.....	39
Έκφραση <i>PR</i> γονιδίων ανεξάρτητα από το σαλικυλικό οξύ.....	39
1.7.6 Ρύθμιση της έκφρασης των ντιφενσινών (defensins) και των θειονινών (thionins) από το ιασμονικό οξύ και το αιθυλένιο.....	40
1.7.7 Αλληλεπιδράσεις μεταξύ των σημάτων που σχετίζονται με την άμυνα των φυτών ..	41
1.8 Αναλυτικές μέθοδοι προσδιορισμού φυτικών ορμονών.....	42
ΣΚΟΠΟΣ ΤΗΣ ΜΕΛΕΤΗΣ	43
ΥΛΙΚΑ ΚΑΙ ΜΕΘΟΔΟΙ	45
3.1 Φυτικό υλικό	45
3.2 Βιολογικό υλικό	45
3.3 Θρεπτικά υλικά.....	45
3.4 Παρασκευή διαλύματος μονοσακχαριτών και δισακχαριτών	47
3.5 Προετοιμασία του παθογόνου μολύσματος.....	47
3.6 Πείραμα 1 : Αξιολόγηση της ανθεκτικότητας φυταρίων μελιτζάνας όπου είχε προηγηθεί ριζοπότισμα με σάκχαρα, στο μύκητα <i>Verticillium dahliae</i>	49
3.7 Πείραμα 2 : Προσδιορισμός του επιπέδου έκφρασης των φυτοορμονών	50
3.7.3 Λυοφιλίωση.....	52
3.7.4 Παρασκευή εκχυλισμάτων	52
3.7.5 Συνθήκες UHPLC – HRMS/MS	53
ΑΠΟΤΕΛΕΣΜΑΤΑ.....	54
4.1 Μελέτη της μολυσματικής ικανότητας του μύκητα <i>V. dahliae</i> σε φυτά μελιτζάνας όπου είχε προηγηθεί προσθήκη μονοσακχαριτών και δισακχαριτών	54
.....	56
4.2 Μέτρηση νωπού βάρους φυτών της κάθε επέμβασης.....	68
4.3 Μέτρηση του επιπέδου έκφρασης του σαλικυλικού οξέος και του ιασμονικού οξέος στα φυτά όπου πραγματοποιήθηκε ριζοπότισμα με μαλτόζη κατά την αλληλεπίδραση με τον παθογόνο μύκητα <i>Verticillium dahliae</i>	72
ΣΥΜΠΕΡΑΣΜΑΤΑ	79
ΒΙΒΛΙΟΓΡΑΦΙΑ	88
ΠΑΡΑΡΤΗΜΑ.....	114

1. Εισαγωγή

1.1 Ο μύκητας *Verticillium dahliae*

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

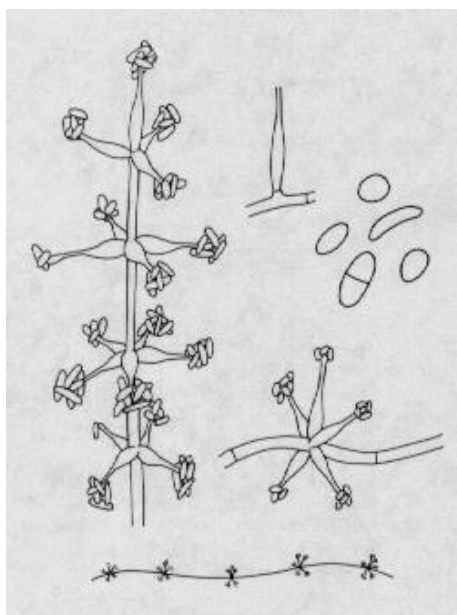
Οι μύκητες του γένους *Verticillium* ανήκουν στην κλάση Αδηλομύκητες (*Adelomycetes*), στην τάξη *Moniliales* (*Hyphomycetes*) και στην οικογένεια *Moniliaceae*. Αναφέρονται τα εξής είδη: *V. albo-atrum*, *V. dahliae*, *V. nigrescens*, *V. nubilum*, *V. tricorpus* και *V. longisporum* όπου μέχρι σήμερα δεν έχει αναφερθεί η

παρουσία της τέλειας μορφής τους σε κανένα από τα παραπάνω. Οι μύκητες αυτοί όταν καλλιεργηθούν σε θρεπτικό υλικό, σχηματίζουν λευκές βαμβακώδεις αποικίες που αναπτύσσονται αργά. Έπειτα από μια εβδομάδα εμφανίζονται υπόλευκες ενώ αργότερα γίνονται μαύρες λόγω σχηματισμού μικροσκληρωτίων (Hawksworth 1970a, 1970b, 1970c). Μεγαλύτερη φυτοπαθολογική σημασία παρουσιάζουν τα είδη *V. dahliae* (Kleb.) και *V. albo-atrum* (Reinke & Berth.) (Hawksworth & Talboys 1970a, 1970b; Pegg 1974; Schnathorst 1981; Wilhelm 1984).

Ο μύκητας *V. dahliae* έχει εκτεταμένη γεωγραφική εξάπλωση στις εύκρατες χώρες του κόσμου (Engelhard 1957; Sackston *et al.* 1957; Woolliams 1966; Pegg 1984). Κατά κανόνα, ο μύκητας *V. dahliae* βρίσκεται στις θερμότερες περιοχές των ΗΠΑ, του Καναδά, της Ευρώπης και της Ασίας. Αντίθετα με τον μύκητα *V. albo-atrum* που φαίνεται να είναι περιορισμένος σε περιοχές όπου η μέση θερμοκρασία δεν υπερβαίνει τους 21-24 °C για το μεγαλύτερο διάστημα της καλλιεργητικής περιόδου ενώ ο μύκητας *V. dahliae* μπορεί να προσβάλει τα φυτά τόσο σε ψυχρές όσο και σε θερμές περιοχές όπου η μέση θερμοκρασία υπερβαίνει τους 24 °C για το μεγαλύτερο διάστημα της καλλιεργητικής περιόδου (Schnathorst 1981). Όμως, είναι καταστροφικότερος σε θερμότερα κλίματα (Snyder & Smith 1981; Rowe 1985) ειδικά σε αρδευόμενες καλλιέργειες (Snyder & Smith 1981). Γι' αυτό, έχει αναφερθεί στο Ισραήλ, σχεδόν αποκλειστικά σε ερημικές περιοχές που αρδεύονται και σε συνθήκες υψηλής εξατμισοδιαπνοής, ο μύκητας αποβαίνει ένας από τους κύριους περιοριστικούς παράγοντες στην παραγωγή των φυτών (Krikun, 1979). Επειδή ο μύκητας *V. dahliae* ευνοείται από υψηλές μέσες θερμοκρασίες, κυριαρχεί στις θερμές περιοχές της νότιας Ευρώπης και της Μεσογείου (Παναγόπουλος 1995) και μεταξύ αυτών και στην Κρήτη (Ligoxigakis 1991; Ligoxigakis & Vakalounakis 1992, 1994).

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

διαδοχικά πολλά κονίδια, τα οποία συγκρατούνται μεταξύ τους με μια κολλώδη ουσία και έτσι σχηματίζονται συχνά μικρές κεφαλές (ομάδες) κονιδίων (Παναγόπουλος, 2007).



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

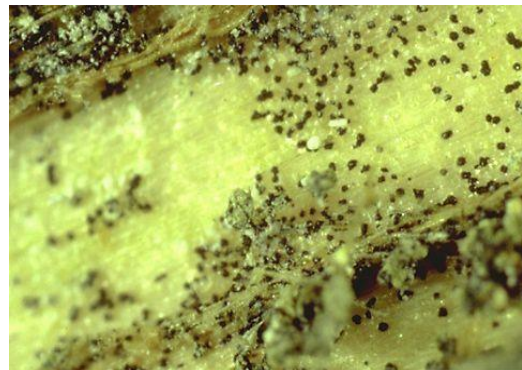
Στη διεθνή βιβλιογραφία παλιότερα γινόταν σύγχυση στην ταξινόμηση των ειδών *V. dahliae* και *V. albo-atrum*. Η σύγχυση οφειλόταν στο ερώτημα εάν ο μύκητας *V. dahliae* είναι ένα ξεχωριστό είδος ή θα πρέπει να συμπεριληφθεί στο είδος *V. albo-atrum*. Η πιο χαρακτηριστική διαφορά μεταξύ των εν λόγω ειδών,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

- Μυκήλιο: Μάζες υφών με παχιά τοιχώματα, πολυάριθμα εγκάρσια τοιχώματα και βορτυόμορφη εμφάνιση, που

θυμίζουν γλαμυδοσπόρια.

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

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



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

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

Χαρακτηριστικό σύμπτωμα της ασθένειας αποτελεί ο καστανός μεταχρωματισμός των αγγείων του ξύλου, ο οποίος εμφανίζεται σε επιμήκη ή εγκάρσια



τομή του στελέχους και των ριζών, όχι όμως σε όλους τους ξενιστές.

Ο μεταχρωματισμός αυτός μπορεί να εμφανιστεί στη μια πλευρά του στελέχους ή σ ολόκληρη την έκταση των αγγείων (Παναγόπουλος, 2007) (εικόνα 4).

Τα κύρια συμπτώματα της βερτισιλλίωσης είναι:

- Μάρανση (επιναστία)
- Χλόρωση

- Ξήρανση των κατώτερων φύλλων
- Νανισμός των προσβεβλημένων φυτών.
- Καστανός μεταχρωματισμός των αγγείων του ξύλου

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



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



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

Ο μύκητας *V. dahliae* είναι ένα από τα σπουδαιότερα παθογόνα του αγγειακού συστήματος των ανώτερων φυτών και έχει ευρύτατο φάσμα ξενιστών. Προσβάλλει περισσότερα από 400 είδη φυτών, στα οποία περιλαμβάνονται λαχανικά και ανθοκομικά φυτά με μεγάλη οικονομική σημασία, ψυχανθή και φυτά μεγάλης καλλιέργειας καθώς επίσης οπωροφόρα και καλλωπιστικά δένδρα και μεγάλο αριθμό αυτοφυών. Είδη των οικογενειών *Solanaceae*, *Cucurbitaceae*, *Malvaceae*, *Asteraceae*, *Brassicaceae* και *Fabaceae* περιλαμβάνονται μεταξύ των κυριότερων ξενιστών του μύκητα *V. dahliae* (Bhat & Subbarao, 1990). Αναφέρεται ότι ο αριθμός των ειδών που προσβάλλονται από το μύκητα συνεχώς αυξάνεται καθώς η εκδήλωση της ασθένειας καταγράφεται και σε νέους ξενιστές.

Μεταξύ των λαχανοκομικών ειδών που προσβάλλονται συνήθως από το μύκητα *V. dahliae* είναι τα εξής: τομάτα, πατάτα, μελιτζάνα, πιπεριά, μπάμια, αγγουριά, πεπονιά, καρπουζιά, κολοκυθιά, αντίδι, ραδίκι, ζαχαρότευτλα, ραπάνι, φασόλι, αγκινάρα κ.ά. Υπάρχουν όμως μερικά είδη λαχανοκομικών φυτών που προσβάλλονται σπάνια από το μύκητα, όπως: μαρούλι, γογγύλι, λάχανο, λάχανο Βρυξελλών, κουνουπίδι, μπρόκολο, σινάπι, σπανάκι, μπιζέλι, φασόλι, κρεμμύδι, σκόρδο, πράσο, σπαράγγι, μαϊντανός, σέλινο κ.ά. (Sherf & MacNab, 1986). Όσον αφορά τις δένδροκομικές καλλιέργειες ο μύκητας προσβάλλει συνήθως ελιά, βερικοκιά, αμυγδαλιά, ροδακινιά, δαμασκηνιά και φιστικιά με τη βερικοκιά και τη ελιά να υφίστανται τις σοβαρότερες απώλειες (Παναγόπουλος, 2007). Τέλος αναφέρεται ότι

μπορεί να επιβιώσει σε μερικά είδη καλλιεργούμενων και αυτοφυών φυτών. Ως ασυμπτωματικοί φορείς του μύκητα αναφέρονται είδη της οικογένειας *Poaceae* όπως π.χ. η βρώμη και η αγριοβρώμη (Thanassoulouropoulos *et al.*, 1981; Resende *et al.*, 1994).

1.2 Ο βιολογικός κύκλος της ασθένειας

Ο μύκητας *V. dahliae*, εισχωρεί στα φυτά από το ριζικό σύστημα και προκαλεί μονοκυκλική ασθένεια, δηλαδή μόνο ένας κύκλος ασθένειας και παραγωγής μολυσμάτων πραγματοποιείται σε κάθε καλλιεργητική περίοδο. Ο κύκλος ζωής του παθογόνου μπορεί να διακριθεί σε τρεις φάσεις: τη ληθαργική ή λανθάνουσα, την παρασιτική και τη σαπροφυτική. Κατά τη ληθαργική φάση, οι κατασκευές διαχείμασης του μύκητα δηλαδή τα μικροσκληρώτια παραμένουν σε λήθαργο, μέσω της λειτουργίας που ονομάζεται μυκόσταση (mycostasis). Με αυτό τον τρόπο αποτρέπει η βλάστηση των μικροσκληρωτίων, και ενεργοποιείται μόνο με την επικράτηση περιβαλλοντικών συνθηκών που ευνοούν την βλάστηση και την ανάπτυξη του μύκητα. Η περίσσεια άνθρακα και αζώτου υποδηλώνουν την παρουσία ξενιστών φυτών που απελευθερώνουν αυτές τις ουσίες στη ριζόσφαιρα (Huisman, 1982; Mol *et al.*, 1995; Olsson & Nordbrin-Hertz, 1985; Schreiber & Green, 1963). Κάθε μεμονωμένο κύτταρο ενός μικροσκληρωτίου μπορεί να βλαστήσει έστω και μία φορά δίνοντας την ευκαιρία στο μικροσκληρώτιο να βλαστάνει πολλές φορές αυξάνοντας έτσι την πιθανότητα επιτυχούς μόλυνσης. Οι υφές που εξέρχονται από το βλαστάνον μικροσκληρώτιο μπορούν να διανύσουν περιορισμένη απόσταση (έχει υπολογισθεί ότι η σφαίρα επιρροής της ρίζας στο *V.dahliae* είναι πιθανό να είναι 300 μm ή λιγότερο) πιθανώς κατευθυνόμενες από τα θρεπτικά συστατικά, μέχρι να φτάσουν στον υποψήφιο ξενιστή (Huisman, 1982). Τυπικά ο μύκητας *V. dahliae* εισέρχεται στη φάση του παρασιτισμού μολύνοντας τα ευπαθή φυτά είτε από το ακρορίζιο είτε από τα σημεία σχηματισμού των πλευρικών ριζών. Για να περάσει όμως στους ιστούς του ξύλου, ο μύκητας πρέπει πρώτα να διασχίσει την ενδοδερμίδα, που λειτουργεί σαν φυσικός φραγμός έναντι της προσβολής. Επομένως η είσοδος του μύκητα μπορεί να επιτευχθεί είτε στην περίπτωση που η ενδοδερμίδα δεν έχει αναπτυχθεί πλήρως είτε όταν είναι τραυματισμένη (π.χ. από τη δράση νηματωδών σκωλήκων) (Bowers *et al.*, 1996; Huisman, 1982; Pegg, 1974; Schnathorst, 1981). Αφού ξεπεράσει το εμπόδιο της ενδοδερμίδας, εισέρχεται

στα αγγεία του ξύλου όπου σχηματίζει κονίδια. Στα αγγεία του ξύλου μολυσμένων βλαστών και ριζών παρατηρείται το μυκήλιο και τα κονίδια τα οποία συχνά φράζουν τα αγγεία, εμποδίζοντας τη διακίνηση του ανοδικού ρεύματος χυμού. Σε πολλές περιπτώσεις έχει παρατηρηθεί τα κύτταρα του παρεγχύματος που περιβάλλουν τα αγγεία να κινητοποιούνται από το εκκριτικό σύστημα του μύκητα σε υπερβολικό πολλαπλασιασμό, οδηγώντας έτσι τα αγγεία σε κατάρρευση. Η απόφραξη των αγγείων επιδεινώνεται και με τη συσσώρευση των προϊόντων της αποδόμησης των φυτικών ιστών που προκαλείται από τα ένζυμα του μύκητα, σχηματίζοντας μάζες με υψηλό ιξώδες. Πρόκειται για πηκτινολυτικά ένζυμά όπου διασπούν τις πηκτινικές ουσίες του μεσοτοιχίου των κυττάρων (φαινόλες του παρεγχύματος), τις οποίες μετατρέπουν αρχικά σε μελανίνη, απ' όπου και ο κιτρινοπορτοκαλόχρωμος μεταχρωματισμός και στη συνέχεια δημιουργούν πήγματα (πηκτίνης), όπου προκαλούν διόγκωση και κλείσιμο των αγγείων με τελικό αποτέλεσμα την παρεμπόδιση ή το σταμάτημα της κυκλοφορίας του νερού, απ' όπου και ο μαρασμός. Ακόμα αναφέρεται ότι προβλήματα στη μετακίνηση των στοιχείων μέσω των αγγείων δημιουργούν και οι τυλώσεις, από τη συνένωση δύο αντικριστών αγγείων, στην προσπάθεια του ξενιστή να ανακόψει την πορεία του μύκητα. Θεωρείται ότι η παρουσία πολλών τυλώσεων σχετίζεται με την αντοχή των φυτών στις αδρομυκώσεις, διότι δυσχεραίνει την αποίκιση και προέλαση του παθογόνου στα αγγεία του ξύλου. Η ανάπτυξη της τύλωσης φαίνεται ότι προκαλείται από την αυξημένη παραγωγή ινδολοξικού οξέος (IAA) και όσον αφορά την φυσιολογία του φυτού, η παρουσία τυλώσεων στα αγγεία του ξύλου συντελεί επιπλέον στο μερικό περιορισμό της πορείας του νερού στα φύλλα (Fradin & Thomma, 2006). Επίσης, όσο προχωράει η ανάπτυξη του μύκητα μέσα στους ιστούς τα συμπτώματα εντείνονται περισσότερο λόγω της δράσης των τοξινών που παράγονται από το μύκητα. Αυτές οι τοξίνες νεκρώνουν το πρωτόπλασμα και καταστρέφουν την οσμωτική λειτουργία των κυττάρων, ιδίως των φύλλων. Τέλος σύμφωνα με τον Agrios (2005), υποστηρίζεται ότι οι τοξίνες που παράγονται από το μύκητα μεταφέρονται στα φύλλα, στα οποία προκαλούν μείωση της χλωροφύλλης κατά μήκος των νευρώσεων και μείωση της φωτοσυνθετικής δραστηριότητας, κατάρρευση των κυτταρικών μεμβρανών του φύλλου και συνεπώς την ικανότητα του να ρυθμίζει την υδατική του κατάσταση με αποτέλεσμα την επινασσία, τη μάρανση και τη νέκρωση.

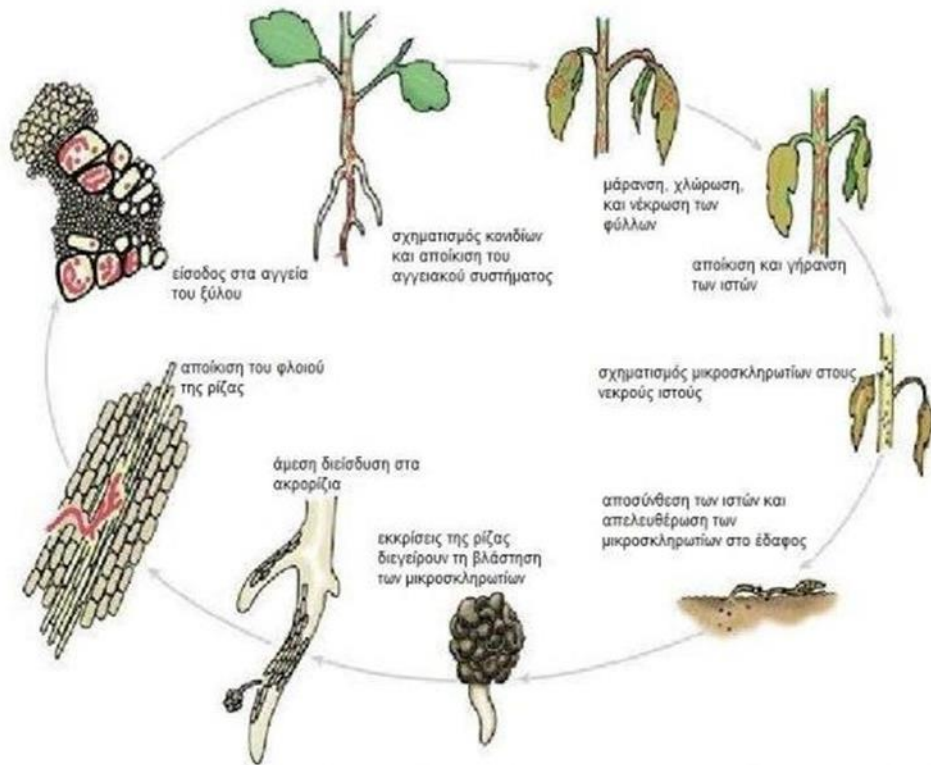
Τα υαλώδη κονίδια που σχηματίζονται από το μύκητα, μεταφέρονται σταδιακά σε νέες θέσεις με το ανοδικό ρεύμα μέσω των αγγείων όπου βλαστάνουν εκ νέου και

διατρυπούν γειτονικά όργανα ή ιστούς των αγγειωδών δεσμίδων, συνεχίζοντας έτσι τον αποικισμό. Κατά την διάρκεια νέκρωσης των ιστών ή της γήρανσης του φυτού, ο μύκητας εισέρχεται στη σαπροφυτική φάση. Εκτός από τους αγγειακούς ιστούς, οι βλαστοί και οι ρίζες του φυτού τώρα επίσης μπορούν να αποικιστούν. Σε αυτό το στάδιο ο μύκητας παράγει μεγάλες ποσότητες μικροσκληρωτίων τα οποία καταλήγουν στο έδαφος μαζί με τους νεκρούς ιστούς (Fradin & Thomma, 2006).

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

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

Drawing by Vickie Brewster, colored by Jesse Ewing



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

1.3 Επιδημιολογία της ασθένειας

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

την ενσωμάτωσή τους στο έδαφος στον εμπλουτισμό του με μολύσματα (κυρίως μικροσκληρωτία) (Παναγόπουλος, 2007).

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

Η διασπορά των μολυσμάτων πραγματοποιείται με το νερό της βροχής καθώς και του ποτίσματος, τα υπολείμματα της καλλιέργειας, τα ζιζάνια, με το έδαφος που μεταφέρεται μέσω των γεωργικών μηχανημάτων και τέλος με το μολυσμένο πολλαπλασιαστικό υλικό (μοσχεύματα, εμβόλια, κόνδυλοι πατάτας, σπόρος) όπου πραγματοποιείται μεταφορά του παθογόνου σε μεγάλες αποστάσεις (Παναγόπουλος, 2007).

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

1.4 Τρόποι αντιμετώπισης της βερτισιλλίσωσης

1.4.1 Γενικά

Η βερτισιλλίσωση είναι ευρύτατα διαδεδομένη σε όλο τον κόσμο εξαιτίας του μεγάλου εύρους ξενιστών που προσβάλλει και έχει ιδιαίτερη οικονομική σημασία στις περισσότερες χώρες εξαιτίας της αδυναμίας καταπολέμησης της με τα υπάρχοντα σήμερα διασυστηματικά μυκητοκτόνα (Παναγόπουλος, 1995) καθώς επίσης και την ικανότητα του μύκητα να επιβιώνει με την μορφή των μικροσκληρωτίων σε φυτικά υπολείμματα που βρίσκονται στην επιφάνεια του εδάφους ή σε κάποιο βάθος του κάνει ιδιαίτερα οξύ το πρόβλημα αντιμετώπισης της (Pegg, 1984). Εξαιτίας του γεγονότος ότι δεν υπάρχει χημική καταπολέμηση, η αντιμετώπιση της ασθένειας πραγματοποιείται συνήθως με τη χρήση ανθεκτικών ποικιλιών και με καλλιεργητικές πρακτικές που στοχεύουν στη μείωση του πληθυσμού του παθογόνου στο έδαφος.

1.4.2 Ανθεκτικές ποικιλίες

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

1.4.3 Απολύμανση εδάφους

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

1.4.4 Ηλιοαπολύμανση

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



Εικόνα 8: Αγρός όπου εφαρμόζεται η τεχνική της ηλιοαπολύμανσης
(<https://chrisdeper.com/2018/01/05/ilioapolymansi/>)

1.4.5 Καλλιεργητικές πρακτικές

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

- 1) Αποφυγή συγκαλλιέργειας ευπαθών ειδών με άλλα ευπαθή είδη
- 2) Αποφυγή δημιουργίας πληγών με καλλιεργητικά εργαλεία στην περιοχή του λαιμού και των ριζών, η συστηματική καταπολέμηση των ζιζανίων,
- 3) Εκρίζωση και η καταστροφή των μολυσμένων φυτών
- 4) Καταστροφή των υπολειμμάτων της προηγούμενης καλλιέργειας.

- 5) Αποφυγή άρδευσης με τη μέθοδο της κατάκλισης αλλά με συστήματα που δεν ευνοούν τη μετάδοση του μολύσματος όπως στάγδην άρδευση
- 6) Αποφυγή υπερβολικής αζωτούχου λίπανσης
- 7) Χρήση υγιούς πολλαπλασιαστικού υλικού (σπόρος, υποκείμενα)

1.5 Βιολογική αντιμετώπιση

1.5.1 Γενικά

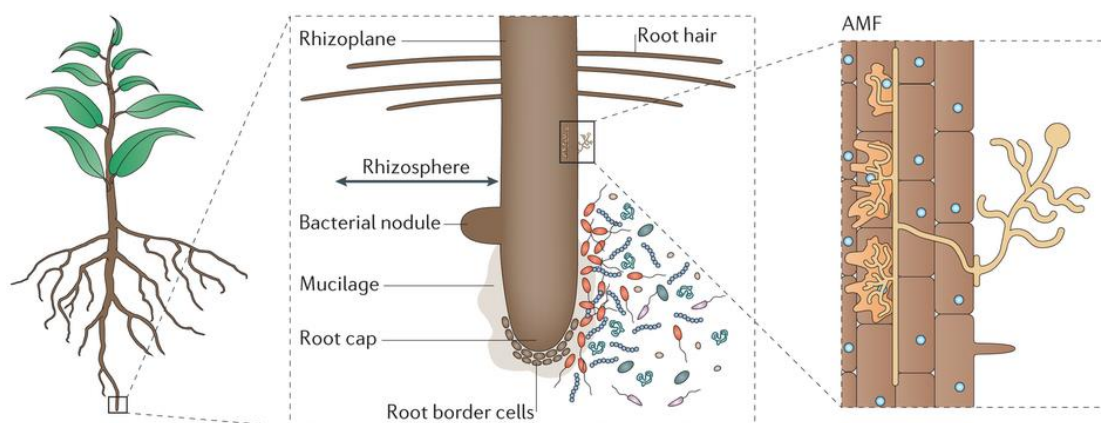
Ένας άλλος τρόπος αντιμετώπισης, πολλά υποσχόμενος με μελλοντικές ελπίδες που κατακτά όλο και περισσότερο έδαφος στον τομέα της γεωργίας, αποτελεί η χρήση βιολογικών παραγόντων έναντι φυτοπαθογόνων μυκήτων και βακτηρίων. Η βιολογική αντιμετώπιση των ασθενειών περιλαμβάνει τη χρήση μικροοργανισμών που παρεμποδίζουν τη δραστηριότητα ενός φυτοπαθογόνου αιτίου και επομένως τη μόλυνση ή περιορίζουν την εκδήλωση της ασθένειας. Αφορά στην αξιοποίηση σαπροφυτικών κυρίως μικροοργανισμών που δρουν ως καταστολείς των ασθενειών με απώτερο στόχο την εξασφάλιση της υγείας του φυτού. Η αντιμετώπιση των ασθενειών με τη χρήση παραγόντων βιολογικής αντιμετώπισης στηρίζεται στην εκδήλωση αλληλεπιδράσεων του φυτού, του παθογόνου, του βιολογικού παράγοντα, της μικροβιακής χλωρίδας πάνω και γύρω από το φυτό και του φυσικού περιβάλλοντος (Τζάμος, 2007).

1.5.2 Βιολογική αντιμετώπιση εδαφογενών παθογόνων των φυτών

Η βιολογική αντιμετώπιση των εδαφογενών παθογόνων των φυτών είναι μια ιδιαίτερος περίπλοκη διαδικασία, που εκδηλώνεται στο δυναμικό περιβάλλον αλληλεπιδράσεως της ρίζας και του εδάφους, που ονομάζεται **ριζόσφαιρα** (Τζάμος, 2007).

Η ριζόσφαιρα, η στενή ζώνη εδάφους που περικλείει και επηρεάζεται από τις ρίζες των φυτών είναι το ενδιαίτημα για ένα μεγάλο αριθμό μικροοργανισμών και ασπόνδυλων και θεωρείτε ότι είναι ένα από τα πιο δυναμικά περιβάλλοντα στη γη. Οργανισμοί που είναι παρόντες στη μικροχλωρίδα της ριζόσφαιρας μπορούν έχουν σημαντικές επιπτώσεις στην ανάπτυξη, τη θρέψη και την υγεία των φυτών στα αγροοικοσυστήματα. Η μικροχλωρίδα της ριζόσφαιρας μπορεί επίσης να επηρεάσει

άμεσα και/ή έμμεσα τη σύνθεση και τη βιομάζα των φυτικών ειδών στα φυσικά οικοσυστήματα. Πολυάριθμοι οργανισμοί συμβάλλουν σε αυτές τις διαδικασίες, οδηγώντας σε αμέτρητες αλληλεπιδράσεις μεταξύ φυτών, ανταγωνιστών και υποχρεωτικών συμβιωτών (Philippot, et al. 2013).



Nature Reviews | Microbiology

Εικόνα 9: Η ριζόσφαιρα είναι μια στενή ζώνη εδάφους πάχους 1mm από τη ρίζα και τα ακρορρίζα και επηρεάζεται από τις εκκρίσεις της και την παρουσία της μικροβιακής μικροχλωρίδας. Το σχήμα δείχνει τη ριζόσφαιρα, σαπροφυτικά και συμβιωτικά βακτήρια και μύκητες αλλά και μυκόριζες.

Πηγή: <http://www.nature.com/nrmicro/journal/v11/n11/full/nrmicro3109.html>

Οι περισσότερες σημαντικές αλληλεπιδράσεις που αναπτύσσονται στη ριζόσφαιρα μπορούν να ταξινομηθούν σε τρεις κυρίες ομάδες.

1. Αλληλεπίδραση μεταξύ φυτών η οποία προκαλείται από επικαλυπτόμενες ριζόσφαιρες, που σαν αποτέλεσμα έχει τον ανταγωνισμό για θρεπτικά συστατικά
2. Αλληλεπίδραση μεταξύ ρίζας και μικροοργανισμών όπου οι μικροοργανισμοί μπορούν να ευνοούν, να αναστέλλουν η να μην έχουν καμία δράση στην ανάπτυξη της ρίζας και στην άμυνα του φυτού που εξαρτάται βέβαια από τους μικροοργανισμούς, το είδος του φυτικού οργανισμού και τις συνθήκες του περιβάλλοντος.

3. Αλληλεπιδράσεις μεταξύ μικροοργανισμών που εμπεριέχουν συνεργιστική ή ανταγωνιστική δράση μεταξύ τους (Lynch, 1990 'Marschner, 1995' Azcon-Aguilar and Barea, 1996).

1.5.3 Οικονομική σημασία των εδαφογενών παθογόνων

Στα περισσότερα αγροοικοσυστήματα τα εδαφογενή παθογόνα μπορεί να είναι ένας σημαντικός περιοριστικός παράγοντας στις αποδόσεις εμπορεύσιμων προϊόντων των καλλιεργειών. Επίσης υπάρχει περισσότερη ανθεκτικότητα στη διαχείριση και τον έλεγχο αυτών, σε σχέση με τα παθογόνα που σχετίζονται με το υπέργειο μέρος των φυτών (Bruehl 1987). Τα εδαφογενή παθογόνα είναι προσαρμοσμένα για επιβίωση και ανάπτυξη στον κύριο όγκο του εδάφους, αλλά η ριζόσφαιρα είναι το σημείο όπου το παθογόνο συναντά το φυτό και ξεκινάει μια παρασιτική σχέση μαζί του. Αυτό είναι επίσης το σημείο όπου το σύστημα ριζόσφαιρα, μικροβιακή κοινότητα, μικροχλωρίδα και μικροπανίδα αλληλοεπιδρά με το παθογόνο και επηρεάζει το αποτέλεσμα την μικροβιακής μόλυνσης (Raaijmakers et al. 2009).

Υπάρχουν τέσσερις κυρίες ομάδες φυτοπαθογόνων (Agrios 2005), αλλά μόνο δυο από αυτές είναι οι κυριότερες στο έδαφος : μύκητες (μύκητες και ψευδομύκητες) και νηματώδεις. Μόνο μερικές ομάδες βακτηρίων θεωρούνται εδαφογενείς, πιθανόν επειδή τα βακτήρια που δεν σχηματίζουν σπόρια δεν μπορούν να επιβιώσουν για πολύ εντός του εδάφους. Τα βακτήρια χρειάζονται επίσης μια πληγή ή ένα φυσικό άνοιγμα για να μολύνουν το φυτό.

Η εκτίμηση των απωλειών των καλλιεργειών από τους παθογόνους μικροοργανισμούς είναι μια δύσκολη διαδικασία και υπάρχουν πολύ λίγες καλά τεκμηριωμένες μελέτες (Raaijmakers et al. 2009). Σε μια από αυτές τις μελέτες φαίνεται ότι από το 2001 έως το 2003 κατά μέσο όρο το 7-15% των απωλειών των καλλιεργειών παγκόσμια (σιτάρι, ρύζι, αραβόσιτος, σόγια) που προέκυψε, οφείλεται σε μύκητες και βακτήρια (Oerke 2005). Το διάστημα 1996 - 1998 αυτά τα παθογόνα προκάλεσαν μια απώλεια της τάξεως του 9,9%, αλλά η πιθανή απώλεια χωρίς έλεγχο θα ήταν 14,9% (Oerke and Dehne 2004).

1.6 Υδατάνθρακες - Μονοσακχαρίτες και δισακχαρίτες

Οι υδατάνθρακες απαντούν σε κάθε ζωντανό οργανισμό. Η ζάχαρη και το άμυλο στις τροφές, η κυτταρίνη στο ξύλο, το χαρτί και το βαμβάκι είναι σχεδόν καθαροί υδατάνθρακες. Τροποποιημένοι υδατάνθρακες συνιστούν μέρος του περιβλήματος των κυττάρων και άλλοι είναι συστατικά των νουκλεϊκών οξέων (McMurry, 2017). Οι υδατάνθρακες είναι μόρια με βάση τον άνθρακα τα οποία είναι πλούσια σε υδροξυλομάδες. Σχηματίζονται από μονοσακχαρίτες, οι οποίοι είναι μικρά μόρια που περιέχουν από τρία έως εννέα άτομα άνθρακα και ποικίλλουν στο μέγεθος και στη στερεοχημική διαμόρφωση σε ένα ή περισσότερα κέντρα άνθρακα. Αυτοί οι μονοσακχαρίτες μπορούν να συνδέονται μεταξύ τους για να σχηματίζουν δομές ολιγοσακχαριτών. Οι μονοσακχαρίτες που γνωρίζουμε καλύτερα είναι οι εξόζες, όπως η γλυκόζη και η φρουκτόζη. Η γλυκόζη είναι μια θεμελιώδης πηγή ενέργειας σε όλες σχεδόν τις μορφές ζωής. Η φρουκτόζη η οποία χρησιμοποιείται σαν γλυκαντικό, μετατρέπεται μέσα στα κύτταρα σε παράγωγα της γλυκόζης. Οι δισακχαρίτες αποτελούνται από δύο σάκχαρα ενωμένα με έναν γλυκοζιτικό δεσμό *O*. Οι τρεις πιο διαδεδομένοι δισακχαρίτες είναι η σακχαρόζη, η λακτόζη και η μαλτόζη. Στη μαλτόζη δυο μονάδες γλυκόζης ενώνονται με έναν γλυκοζιτικό δεσμό α-1, 4. Η μαλτόζη προέρχεται από την υδρόλυση μεγάλων πολυμερικών ολιγοσακχαριτών, όπως το άμυλο και το γλυκογόνο και υδρολύεται με τη σειρά της σε γλυκόζη από τη μαλτάση (Berg et al., 2015). Οι υδατάνθρακες βιοσυντίθενται από τα φυτά μέσω της φωτοσύνθεσης, μια περίπλοκης διαδικασίας κατά την οποία το ηλιακό φως προσφέρει την απαραίτητη ενέργεια για την μετατροπή του CO₂ και H₂O σε O₂. Πολλά μόρια γλυκόζης συνδέονται με χημικούς δεσμούς, σχηματίζοντας μεγαλύτερα μόρια τα οποία αποθηκεύονται στο φυτό με τη μορφή κυτταρίνης ή αμύλου. Υπολογίζεται ότι τουλάχιστον το 50% του ξηρού βάρους της βιομάζας της γης, δηλαδή το σύνολο των φυτών και των ζώων, αποτελείται από πολυμερή της γλυκόζης (McMurry, 2017).

1.7 Το αμυντικό σύστημα των φυτών

1.7.1 Γενικά

Τα φυτά για να επιβιώσουν κατά τη διάρκεια της εξέλιξης τους έχουν εκτεθεί σε δυσμενείς περιβαλλοντικές συνθήκες και καταπονήσεις από παθογόνους μικροοργανισμούς. Οι παθογόνοι αυτοί μικροοργανισμοί όπως μύκητες, βακτήρια και ιοί χρησιμοποιούν διαφορετικούς βιοχημικούς και μοριακούς μηχανισμούς προκειμένου να μολύνουν τα φυτά, τα οποία έχουν αναπτύξει την άμυνα τους ώστε να προστατευθούν από τα παθογόνα. Αποτέλεσμα αυτής της αλληλεπίδρασης είναι μια σταθερή και παράλληλη εξέλιξη στο χρόνο του αμυντικού συστήματος των φυτών και των μηχανισμών μολυσματικότητας των παθογόνων (Agris, 2005).

Η άμυνα των φυτών προς τα παθογόνα είναι αποτέλεσμα ενός πολύπλοκου συνδυασμού δομικών χαρακτηριστικών και επαγόμενων βιοχημικών αντιδράσεων. Τα δομικά χαρακτηριστικά, όπως το κυτταρικό τοίχωμα αποτελούν ένα αμυντικό σύστημα το οποίο προϋπάρχει στα φυτά και λειτουργεί ως φυσικός φραγμός στην είσοδο των παθογόνων και εν τέλει στην εξάπλωση τους μέσα στα φυτά. Επιπλέον τα φυτά αντιλαμβάνονται άμεσα ή έμμεσα την παρουσία ενός παθογόνου κάτι που έχει σαν επακόλουθο την επαγωγή των αμυντικών αντιδράσεων. Αυτές οι αντιδράσεις περιλαμβάνουν τη σύνθεση σημάτων όπως είναι το σαλικυλικό οξύ, το ιασμονικό οξύ και το αιθυλένιο τα οποία ελέγχουν την έκφραση γονιδίων και την παραγωγή μορίων που σχετίζονται με την άμυνα των φυτών. Όλες αυτές οι επαγόμενες φυσιολογικές αντιδράσεις έχουν σκοπό τον περιορισμό της εισόδου και της ανάπτυξης του παθογόνου στους ιστούς του φυτού. Το τελικό αποτέλεσμα της αλληλεπίδρασης φυτού – παθογόνου είναι η πρόκληση ασθένειας στο φυτό (συμβατότητα) ή η αντοχή του φυτού (ασύμβατη σχέση) και εξαρτάται από ένα συνδυασμό πολλών παραμέτρων. Αυτές οι παράμετροι περιλαμβάνουν τα γενετικά χαρακτηριστικά και τη φυσιολογική κατάσταση του φυτού και του παθογόνου καθώς και περιβαλλοντικές συνθήκες όπως η υγρασία, η θερμοκρασία και το φως (Παντελίδης, 2009).

1.7.2 Μηχανισμοί άμυνας των φυτών από τα παθογόνα

Τα φυτά έχουν αναπτύξει παθητικούς μηχανισμούς άμυνας (π.χ. φυσικοί παράγοντες και κατασκευές του φυτού, τοξικοί μεταβολίτες) και ένα εγγενές ενεργητικό σύστημα άμυνας που έχει διαφοροποιηθεί βιοχημικά στο α) βασικό ανοσοποιητικό σύστημα (basal immune system) που ενεργοποιείται 10-30 λεπτά μετά την επαφή του φυτού με το παθογόνο και β) στο ανοσοποιητικό σύστημα των γονιδίων ανθεκτικότητας (resistance (R) – gene-mediated innate immune system) που ενεργοποιείται 2-3 ώρες μετά την επαφή και την απελευθέρωση των διεγερτών από το παθογόνο στο φυτικό κύτταρο (Τζάμος, 2007).

Η επαφή αποτελεί το πρώτο στάδιο επικοινωνίας του παθογόνου με τον ξενιστή. Για την μετάβαση όμως στα επόμενα στάδια της διείσδυσης και εγκατάστασης του παθογόνου, μια ροή γενετικών πληροφοριών υφίσταται σε παθογόνο και ξενιστή, οι οποίες θα εξασφαλίζουν την αλληλοαναγνώριση. Η αναγνώριση αποτελεί το πρωταρχικό βήμα σε οποιαδήποτε άμεση αλληλεπίδραση μεταξύ παθογόνων ή μη παθογόνων ξενιστών των φυτών. Πρόκειται για μια βιοχημική και μοριακή διεργασία που παρέχει τη δυνατότητα στα παθογόνα να αναγνωρίζουν τους ξενιστές στο περιβάλλον τους και ειδικότερα εξειδικευμένες επιφάνειες και χαρακτηριστικά τους, για να εξασφαλίσουν τη διείσδυση και τη μόλυνση (Montesano et al., 2003).

Μια ομάδα βιοχημικών παραγόντων που καλούνται διεγέρτες (elicitors) δρουν κατά τα αρχικά στάδια της αναγνώρισης μεταξύ παθογόνου και ξενιστή με σκοπό την καταστολή ή τη διέγερση του εγγενούς ανοσοποιητικού συστήματος των φυτών. Οι διεγέρτες μεταβιβάζουν μέσω εξειδικευμένων προσδένουσων πρωτεϊνών (binding proteins) οι οποίες αποτελούν τους υποδοχείς-δέκτες στις κυτταρικές μεμβράνες ή στο κυτόπλασμα των φυτών, το μήνυμα στον ξενιστή για την επαπειλούμενη είσοδο και μόλυνση με αποτέλεσμα την πρόκληση ή την αποφυγή της ασθένειας από το συγκεκριμένο παθογόνο (Montesano et al., 2003).

Ο όρος διεγέρτης χρησιμοποιείται για όλες της χημικές ουσίες που διεγείρουν οποιοδήποτε αμυντικό μηχανισμό του φυτού. Οι διεγέρτες περιλαμβάνουν μόρια παθογόνου προέλευσης (εξωγενείς διεγέρτες) και ενώσεις που απελευθερώνονται από τα φυτά κατά την επαφή τους με τα παθογόνα (ενδογενείς διεγέρτες) (Boller, 1995´

Ebel & Cosio, 1994). Οι διεγέρτες κατατάσσονται σε 2 κατηγορίες, τους γενικούς (general) που διεγείρουν το βασικό ανοσοποιητικό σύστημα σε ξενιστές και μη-ξενιστές του παθογόνου και τους εξειδικευμένους σε φυλή του παθογόνου (race-specific) διεγέρτες που οδηγούν στην ανάπτυξη ανοχής μόνο σε φυτά ξενιστές μέσω του ανοσοποιητικού συστήματος των γονιδίων ανθεκτικότητας. Οι διεγέρτες έχουν την ικανότητα δράσης σε χαμηλές συγκεντρώσεις και δεν έχουν κοινή χημική δομή, αλλά ανήκουν σε μια ευρεία κλίμακα χημικών ενώσεων που περιλαμβάνουν ολιγοσακχαρίτες, πρωτεΐνες, πεπτίδια και λιπίδια (Montesano et al., 2003). Οι περισσότεροι διεγέρτες είναι συστατικά στοιχεία των κυτταρικών τοιχωμάτων των παθογόνων όπως η γλουκάνη, η χιτίνη, η εργοστερόλη και η φλατζελίνη (flagellin), δομικό συστατικό του βακτηριακού μαστιγίου και ονομάζονται PAMPs (Pathogen Associated Molecular Patterns) (Nurnberger και Brunner, 2002). Στους γενικούς διεγέρτες κατατάσσονται επίσης διάφοροι ολιγοσακχαρίτες όπως το επτά-β-γλυκοσίδιο, η ολιγοχιτίνη και η χιτοσάνη. Οι ολιγοσακχαρίτες σε χαμηλές συγκεντρώσεις ενεργοποιούν αμυντικούς μηχανισμούς όπως, συσσώρευση φυτοαλεξινών, παρεμποδιστές πρωτεϊνών, περοξειδασών, λιποξυγενάσης, β-1,3-γλουκανασών και λιγνίνης (Τζάμος, 2007). Μια άλλη κλάση διεγερτών που παίζουν ρόλο στη μολυσματική ικανότητα των παθογόνων είναι τα προϊόντα των γονιδίων αμολυσματικότητας (Avr), (Nurnberger, 1999' Bonas και Lehay, 2002).

1.7.2.1 Βασικό ανοσοποιητικό σύστημα

Το βασικό ανοσοποιητικό σύστημα προσφέρει στα φυτά μη-εξειδικευμένη (γενική) ανθεκτικότητα (non-specific resistance), η οποία είναι αποτελεσματική εναντίον αρκετών φυτοπαθογόνων ειδών ή στελεχών (βιότυπων, παθότυπων, φυλών) ενός παθογόνου (Παντελίδης, 2009)

1.7.2.2 Ανθεκτικότητα των μη-ξενιστών

Η πιο σημαντική και μεγαλύτερης διάρκειας ανθεκτικότητα είναι η λεγόμενη ανθεκτικότητα του μη-ξενιστή (non-host resistance), που σημαίνει ότι όλα τα είδη ενός φυτικού είδους είναι ανθεκτικά σε όλες τις φυλές ενός παθογόνου είδους (Mellersh et al., 2002' Thordal-Christensen, 2003' Mysore και Ryu, 2004). Παρόλο που αυτός είναι ο πιο κοινός τύπος ανθεκτικότητας, έχουν γίνει σχετικά λίγες έρευνες στις οποίες επιχειρήθηκε να δοθεί μια εξήγηση για αυτόν το μηχανισμό. Αυτές οι έρευνες έδειξαν ότι η ισορροπία των ενεργών ομάδων οξυγόνου (Reactive Oxygen Species-ROS) και

των αντιοξειδωτικών μπορεί να παίζουν ρόλο στην ανάσχεση της εισόδου των παθογόνων στους μη-ξενιστές. Οι Trujillo et al., (2004) έδειξαν ότι οι ROS και ιδιαίτερα το υπεροξειδίο του υδρογόνου μπορεί να είναι η αιτία της ανθεκτικότητας του κριθαριού στο μύκητα *Blumeria graminis* f. sp. tritici. Είναι πιθανό οι ROS να είναι υπεύθυνες για τον περιορισμό του παθογόνου τόσο στους μη-ξενιστές όσο και στις ασύμβατες αλληλεπιδράσεις (incompatible interactions).

Βασική ανθεκτικότητα

Αυτή η μορφή ανθεκτικότητας εμφανίζεται στα πρώτα στάδια της αλληλεπίδρασης παθογόνου – ξενιστή. Τα φυτά έχουν υποδοχείς με τους οποίους αντιλαμβάνονται τους “γενικούς διεγέρτες” (general elicitors) ή τα συντηρημένα μοριακά μοτίβα που σχετίζονται με τα παθογόνα (PAMPs), τα οποία παρατηρούνται σε πολλά παθογόνα (Abramovitch et al., 2006). Ένα τυπικό PAMP είναι ένα πεπτίδιο που προέρχεται από βακτηριακή φλατζελίνη (flagellin), μια πρωτεΐνη η οποία αποτελεί συστατικό στοιχείο των βακτηριακών μαστιγίων. Άλλα PAMPs μπορεί να είναι λιποπολυσακχαρίτες, η χιτίνη και η εργοστερόλη των μυκήτων. Η αναγνώριση της φλατζελίνης γίνεται από τον υποδοχέα FLS2. Ως αποτέλεσμα της αλληλεπίδρασης της φλατζελίνης και του FLS2 το PAMP αναγνωρίζεται από πρωτεϊνικές κινάσες (Chinchilla et al., 2006) και αρκετά γονίδια ενεργοποιούνται στο μολυσμένο φυτό. Τα περισσότερα από αυτά τα γονίδια είναι τα ίδια που ενεργοποιούνται αργότερα κατά την εκδήλωση του εγγενούς ανοσοποιητικού συστήματος των γονιδίων ανθεκτικότητας, όταν το προϊόν του γονιδίου *R* (resistance) αντιδρά με το προϊόν του γονιδίου *Avr* (avirulence) του παθογόνου (Navarro et al., 2004; Zipfel et al., 2004). Όσον αφορά το μηχανισμό που περιορίζει ή νεκρώνει το παθογόνο έχουν αναφερθεί η αύξηση της δράσης των χιτινασών και κάποιων άλλων ενζύμων που αποδομούν το κυτταρικό τοίχωμα και η συσσώρευση αντιμικροβιακών ουσιών. Η αυξημένη δραστηριότητα των χιτινασών αποδομεί τη χιτίνη στα κυτταρικά τοιχώματα των μυκήτων (Van Loon et al., 2006). Είναι ενδιαφέρον επίσης το ότι η δραστηριότητα τέτοιων ενζύμων είναι χαρακτηριστικό ειδών φυτών τα οποία είναι ανθεκτικά σε βακτηριακές ή ιικές προσβολές.

Ανοσοποιητικό σύστημα των γονιδίων ανθεκτικότητας

1. Γόνου προς γόνο ανθεκτικότητα χωρίς αντίδραση υπερευαισθησίας

Μια εξειδικευμένη μορφή ανθεκτικότητας είναι αυτή που λέγεται και ‘αντίδραση ανοσοποίησης’. Αυτός ο τύπος ανθεκτικότητας δεν σχετίζεται με την αντίδραση υπερευαισθησίας (HR), αφού δεν παρατηρούνται νεκρωτικά σημεία στο σημείο μόλυνσης του ανθεκτικού φυτού

2. Γόνου προς γόνο ανθεκτικότητα που σχετίζεται με την αντίδραση υπερευαισθησίας

Αυτός ο τύπος ανθεκτικότητας σχετίζεται με τον μηχανισμό γόνου προς γόνο και την HR των φυτών. Έχει μελετηθεί πιο πολύ από κάθε άλλη μορφή ανθεκτικότητας στα φυτά και χαρακτηρίζεται από τον σχηματισμό νεκρώσεων σε μικρά τμήματα του φυτικού ιστού στα ανθεκτικά φυτά. Το παθογόνο παραμένει και εγκλωβίζεται εντός των ορίων του νεκρού φυτικού ιστού και νεκρώνεται (Klement et al., 1964). Η εξειδίκευση είναι σημαντικό χαρακτηριστικό αυτού του τύπου ανθεκτικότητας. Αυτό σημαίνει ότι κάποιες ποικιλίες φυτών είναι ανθεκτικές μόνο σε κάποια στελέχη (φυλές) του παθογόνου. Αυτός είναι ένας κλασσικός μηχανισμός γόνου προς γόνο που εξαρτάται από την αλληλεπίδραση των προϊόντων του γονιδίου ανθεκτικότητας του φυτού (*R*) και του γονιδίου αμολυσματικότητας (*Avr*). Η ανθεκτικότητα επίσης που σχετίζεται με την HR καλείται και ‘race-specific’ λόγω του γεγονότος ότι είναι αποτελεσματική μόνο εναντίον ενός ή μερικών παθογόνων στελεχών. Αυτό το χαρακτηριστικό αποτελεί και μειονέκτημα αυτού του τύπου ανθεκτικότητας από την πλευρά της πρακτικής εφαρμογής στη βελτίωση φυτών. Η ‘race-specific’ ανθεκτικότητα δεν έχει μεγάλη διάρκεια ζωής και συνήθως δεν κρατάει πάνω από 10 χρόνια. Η σύνθεση των φυλών ενός παθογόνου αλλάζει σημαντικά μέσα σε μια δεκαετία, επομένως προκύπτουν νέες πιο προσαρμοσμένες παθογόνες φυλές, μερικές από τις οποίες θα έχουν την ικανότητα να μολύνουν την ποικιλία που προηγουμένως εμφάνιζε ‘race-specific’ ανθεκτικότητα. Η θεωρία του γόνου προς γόνο γίνεται επίσης πιο κατανοητή με το μοντέλο της πρωτεΐνης επίδρασης – υποδοχέα (effector-receptor model). Το προϊόν του γονιδίου *R* μπορεί να θεωρηθεί ως υποδοχέας πρωτεϊνών που αποτελούν προϊόντα του γονιδίου *Avr* των παθογόνων (Mudgett, 2005’ Ellis et al., 2006). Η αλληλεπίδραση του γόνου προς γόνο ξεκινάει με την αναγνώριση του παθογόνου και επακολουθεί η φάση της ενεργοποίησης των μονοπατιών μεταγωγής σημάτων (Martin et al., 2003) που σαν αποτέλεσμα έχουν να περιορίζεται ή να

νεκρώνεται το παθογόνο στα ανθεκτικά φυτά (Staskawicz et al., 1995). Αυτή η διαδικασία πιθανόν να σχετίζεται με την HR.

Τα τελευταία χρόνια έχουν απομονωθεί και προσδιορισθεί γονίδια ανθεκτικότητας από πολλά καλλιεργούμενα φυτά ή φυτά-πρότυπα (*Arabidopsis thaliana*). Τα λειτουργικά γονίδια ανθεκτικότητας που έχουν απομονωθεί, συμβάλλουν στην αντοχή στις βακτηριολογικές, μυκητολογικές και ιολογικές ασθένειες. Παρά τη μεγάλη διαφοροποίηση μεταξύ των παθογόνων σχετικά με τις ιδιότητες των πρωτεϊνών επίδρασης (effectors), οι γόνιοι ανθεκτικότητας των φυτών κωδικοποιούν πέντε κατηγορίες πρωτεϊνών-υποδοχέων που μπορεί να είναι είτε εξωκυτταρικές είτε ενδοκυτταρικές (εικόνα):

- Οι Receptor-Like Proteins (RLPs), όπως οι υποδοχείς της τομάτας Cf-2 και Cf-9 που κωδικοποιούν διαμεμβρανικές γλυκοπρωτεΐνες, αποτελούνται κατά κύριο λόγο από μια εξωκυτταρική περιοχή από επαναλαμβανόμενα πεπτιδικά μόρια πλούσια στο αμινοξύ λευκίνη (Leucine Rich Repeats - LRRs) και ένα μικρό κυτταροπλασματικό τομέα (Dangl και Jones, 2001).
- Οι Receptor-Like Kinases (RLKs), όπως ο υποδοχέας της τομάτας Xa21, ο οποίο αναγνωρίζει τον τελεστή AvrXa21 του *Xanthomonas oryzae* pv. *oryzae*. Οι RLKs είναι διαμεμβρανικές πρωτεΐνες πλούσιες σε εξωκυτταρικές περιοχές LRRs και περιέχουν μια κυτοπλασμική περιοχή κινάσης της σερίνης-θρεονίνης που μεταβιβάζει το σήμα σε άλλες κινάσες για περαιτέρω ενίσχυση του (Dangl και Jones, 2001).
- Οι TIR-NB-LRR R πρωτεΐνες όπως για παράδειγμα οι κυτοπλασματικές πρωτεΐνες που κωδικοποιούνται από τα γονίδια *N* του καπνού κατά του ιού TMV, *L* του λιναριού κατά του μύκητα που προκαλεί σκωρίαση *Melampora lini* και *RPP5* της αραβίδωσης κατά του ωμούκητα *Hyaloperonospora parasitica*.
- Η CC-NB-LRR ομάδα των κυτοπλασματικών R πρωτεϊνών έχει LRR και NB περιοχές και διαθέτει μια αμινοτελική περιοχή που μοιάζει με περιελιγμένο σπείραμα (Coiled Coil - CC) (Dangl και Jones, 2001).
- Τα γονίδια ανθεκτικότητας που κωδικοποιούν κινάσες της σερίνης-θρεονίνης όπως είναι το R γονίδιο *Pto* της τομάτας που αναγνωρίζει την πρωτεΐνη επίδρασης *AvrPto* του βακτηρίου *Pseudomonas syringae* (Dangl και Jones, 2001).

1.7.3 Φυτικές ορμόνες

Οι φυτικές ορμόνες είναι μόρια τα οποία προέρχονται από ποικίλες βασικές μεταβολικές οδούς. Είναι σημαντικοί ρυθμιστές της ανάπτυξης των φυτών και ρυθμίζουν τις αντιδράσεις τόσο στις βιοτικές όσο και στις αβιοτικές καταπονήσεις. Περιέχονται σε πολύ χαμηλές συγκεντρώσεις και ενεργούν είτε τοπικά, είτε στη θέση σύνθεσής τους ή σε μακρινούς ιστούς. Οι έρευνες των τελευταίων ετών έχουν αποκαλύψει διάφορες ενώσεις που κατατάσσονται στις φυτικές ορμόνες, εκ των οποίων οι βασικότερες είναι το αμπισικό οξύ (ABA), το ινδολο-3-οξικό οξύ (IAA ή αυξίνη), τα μπρασινοστεροειδή (BRs), οι κυτοκινίνες, οι γιββερελλίνες (GA), το ιασμονικό οξύ (JA), το αιθυλένιο και το σαλικυλικό οξύ. Συνολικά αυτές οι ενώσεις ρυθμίζουν κάθε πτυχή της ζωής του φυτού, από το σχηματισμό μοτίβου κατά τη διάρκεια της ανάπτυξης του έως και τις αντιδράσεις σε βιοτικό και αβιοτικό στρές. Τα φυτά επίσης χρησιμοποιούν αρκετές πεπτιδικές ορμόνες ώστε να ρυθμίσουν διάφορες αποκρίσεις κατά την ανάπτυξή τους. Αν και η φυσιολογική λειτουργία των περισσότερων φυτικών ορμονών έχει μελετηθεί για δεκαετίες, τα τελευταία 15 χρόνια παρατηρείται μεγάλη πρόοδος στην κατανόηση των μοριακών μηχανισμών της βιοσύνθεσης, μεταφοράς και απόκρισης των ορμονών. Τα βιοσυνθετικά μονοπάτια για τις περισσότερες ορμόνες είναι καλά χαρακτηρισμένα (όπως στη περίπτωση των ABA, BRs, και GA) ή αναδυόμενα (όπως για την αυξίνη και ιασμονικό οξύ). Γνωρίζουμε ότι τα επίπεδα των ορμονών είναι ρυθμιζόμενα και ανταποκρίνονται αναλόγως σε ένα μεταβαλλόμενο περιβάλλον (Santner *et al.*, 2009)

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

Το σαλικυλικό οξύ είναι ένα φαινολικό συστατικό το οποίο παρά την ευρεία κατανομή του στα φυτά, διαφέρει μεταξύ των ειδών με μεγάλες διαφορές να έχουν καταγραφεί (Raskin *et al.*, 1990). Παράγεται στους χλωροπλάστες των φυτών, είναι προϊόν του μεταβολισμού των φαινυλοπροπανοειδών και έχει φυσικές ιδιότητες που το καθιστούν ιδανικό για τη μεταφορά του μέσα στον ηθμό. Η σύνθεση του γίνεται μέσω

δυο μονοπατιών από το χωρισματικό οξύ, ένα προϊόν του μονοπατιού του σικιμικού οξέος. Το ένα μονοπάτι είναι μέσω της συνθάσης του ισοχωρισματικού (ICS), η οποία πιστεύεται ότι είναι υπεύθυνη για πάνω από το 90% της σύνθεσης του σαλικυλικού οξέος κατά τη διάρκεια ενεργοποίησης της απόκρισης του φυτού στο στρες (M.C. Wildermuth, J. *et al.* 2001). Το άλλο μονοπάτι χρησιμοποιεί το γονίδιο *PAL* (H.I. Lee *et al.*, 1995). Πιστεύεται ότι το σαλικυλικό οξύ έχει καίριο ρόλο στη διάχυση - μεταφορά του σήματος μετά τη μόλυνση από το παθογόνο. Τέλος θεωρείται ότι είναι διεγέρτης της συσσωρεύσεως και άλλων πρωτεϊνών σχετικών με την παθογένεση (PR πρωτεϊνών) εκτός από την PR1. (Τζάμος, 2007). Η οικογένεια πρωτεϊνών PR1 έχει μελετηθεί εκτενώς σε σχέση με τις υπόλοιπες πρωτεΐνες παθογενέσεως παρόλο που η δράση της δεν έχει ακόμα διευκρινιστεί όπως παραδείγματος χάρη οι PR2, PR3 κ.α. που έχουν χαρακτηριστεί ως χιτινάσες και β-1,3- γλουκανάσες οι οποίες έχουν την ικανότητα να υδρολύουν το κυτταρικό τοίχωμα των μυκήτων. Η συσσώρευση των PR1 πρωτεϊνών επιτυγχάνεται μέσω της σηματοδότησης του μονοπατιού του σαλικυλικού οξέος, ενώ η έκφραση τους είναι συνδεδεμένη με την ανθεκτικότητα έναντι βιοτροφικών και ημιβιοτροφικών παθογόνων (Veronese *et al.*, 2006). Την έκφραση του γονιδίου *PR1* (*Pathogenesis-related gene 1*) επάγει η παρουσία του σαλικυλικού οξέος και συνεπώς η υπερέκφραση του είναι δείκτης της ενεργοποίησης του μηχανισμού άμυνας που εξαρτάται από το σαλικυλικό οξύ (Feys *et al.*, 2000). Το σαλικυλικό οξύ έχει κρίσιμο ρόλο στην άμυνα των φυτών και γενικά εμπλέκεται στην ενεργοποίηση της άμυνας εναντίον βιοτροφικών και ημι-βιοτροφικών παθογόνων καθώς και στην ενεργοποίηση της επίκτητης διασυστηματικής αντοχής (Grant and Lamb 2006). Επιπλέον αναφέρεται ότι το μονοπάτι του σαλικυλικού οξέος λειτουργεί ανταγωνιστικά έναντι των μονοπατιών του ιασμονικού οξέος και του αιθυλενίου, τα οποία ευθύνονται για αύξηση της ανθεκτικότητας του ξενιστή έναντι προσβολών από νεκροτροφικά παθογόνα. Επομένως αύξηση των ενδογενών επιπέδων του σαλικυλικού οξέος έχει ως αποτέλεσμα την καταστολή των επιπέδων έκφρασης των πρωτεϊνών παθογενέσεως των οποίων η έκφραση τους ελέγχεται από τα μονοπάτια του ιασμονικού οξέος και του αιθυλενίου. Αντίστοιχα όμως, και τα μονοπάτια του ιασμονικού οξέος και του αιθυλενίου καταστέλλουν το αντίστοιχο μονοπάτι του σαλικυλικού οξέος, ενδογενής αύξηση των επιπέδων του ιασμονικού οξέος και του αιθυλενίου λειτουργούν κατασταλτικά ως προς την επαγωγή της έκφρασης της πρωτεΐνης PR1. Πολλά παθογόνα εκμεταλλεύονται τον ενδογενή ανταγωνισμό μεταξύ των μονοπατιών

άμυνας που σχετίζονται με τις παραπάνω φυτοορμόνες εκκρίνοντας μολυσματικούς παράγοντες οι οποίοι μιμούνται τον τρόπο δράσης μίας φυτοορμόνης για να καταστείλουν την συσσώρευση της άλλης (Laluk & Mangiste 2010).

Το ιασμονικό οξύ (jasmonic acid, JA) και ο μεθυλιωμένος εστέρας του, παράγονται κατά το μεταβολισμό των λιπαρών οξέων από το λινολενικό οξύ και έχει παρατηρηθεί ότι παρουσία ιασμονικού οξέος παράγονται πληθώρα πρωτεϊνών που χαρακτηρίζονται από αντιμυκητιακή δράση όπως π.χ. οι θειονίνες στο κριθάρι και στην αραβίδοψη, παρεμποδιστές πρωτεϊνικών στην τομάτα και ενζύμων που εμπλέκονται στη βιοσύνθεση φυτοαλεξινών (Τζάμος, 2007). Το ιασμονικό οξύ είναι ένα πολύ σημαντικό ενδιάμεσο μόριο σήματος στην άμυνα των φυτών που δρα ενάντια σε πληγές, φυτοφάγα έντομα και παθογόνα (Turner et al, 2002). Πολλές μελέτες έδειξαν ότι υπάρχουν πολύ συνθέτες σχέσεις μεταξύ αιθυλενίου, ιασμονικού και σαλικυλικού οξέος που μπορούν να λειτουργούν συνεργιστικά ή ανταγωνιστικά έτσι ώστε να τελειοποιούν την ανταπόκριση της άμυνας των φυτών (Kunkel and Brooks, 2002).

Αξίζει να αναφερθεί ότι η σύνδεση του αιθυλενίου με το ιασμονικό οξύ έγινε εμφανής στην περίπτωση των ντιφενσινών (defensin PDF 1.2) που παρατηρήθηκε ότι η παραγωγή αυτών των πρωτεϊνών είναι αποτέλεσμα συνεργασίας και των δύο μονοπατιών (Penninckx et al., 1996). Οι φυτικές ντιφενσίνες (PR-12) είναι μικρά πεπτίδια πλούσια σε κυστεΐνη ενωμένα μεταξύ τους με δισουλφιδικούς δεσμούς (Selitrennikoff, 2001). Στο φυτό *A. thaliana*, οι ντιφενσίνες κωδικοποιούνται από πολλαπλά γονίδια, από τα οποία τα δεκατρία, συμπεριλαμβανομένων και των τριών γονιδίων που σχετίζονται με την έκφραση του *PDF1.2* (*PDF1.2a*, *PDF1.2b* και *PDF1.2c*), κωδικοποιούν 11 διαφορετικές ντιφενσίνες. Ο ακριβής μηχανισμός της αντιμυκητιακής τους δράσης δεν έχει κατανοηθεί πλήρως εξαιτίας της μεγάλης παραλλακτικότητας τους ως προς το μηχανισμό δράσης σε κάθε φυτικό είδος. Παρ' όλα αυτά έχουν αναφερθεί διάφοροι μηχανισμοί δράσης συμπεριλαμβανομένου αυτού της διατάραξης της φυσιολογικής ροής ιόντων ασβεστίου που απαιτούνται για την ανάπτυξη του ακραίου τμήματος των υφών, καθώς επίσης και της επίδρασης τους στη διατάραξη της διαπερατότητας της κυτταρικής μεμβράνης ως προς την ανταλλαγή ιόντων (Selitrennikoff, 2001). Επίσης έχει αναφερθεί ότι η έκθεση σε μη παθογόνους μικροοργανισμούς μπορεί να αυξήσει την ανθεκτικότητα των φυτών σε μελλοντικές επιθέσεις παθογόνων, μέσω της ανάπτυξης της επαγόμενης διασυστηματικής ανοχής. Μη παθογόνοι μικροοργανισμοί όπως τα ριζοβακτήρια ενεργοποιούν σηματοδοτικά

μονοπάτια, στα οποία συμμετέχουν το ιασμονικό οξύ και το αιθυλένιο, που πυροδοτούν την επαγόμενη διασυστηματική αντοχή σε όλη την έκταση του φυτού. Η επαγόμενη διασυστηματική αντοχή χαρακτηρίζεται μάλλον από αυξημένα επίπεδα προετοιμασίας του φυτού έναντι επιθέσεων από παθογόνους οργανισμούς, παρά από ενεργοποίηση άμεσων αμυντικών μέτρων (Taiz & Zeiger 2010). Επίσης σύμφωνα με τους Tuzun & Bent 2005 αναφέρεται ότι κάποια ριζοβακτήρια μπορούν να ενεργοποιήσουν και τη δράση του σαλικυλικού οξέος.

Επίκτητη διασυστηματική αντοχή των φυτών και ο ρόλος του σαλικυλικού οξέος

Η επίκτητη αντοχή αναπτύσσεται στα φυτά μετά την αρχική προσβολή όταν οι περιβάλλοντες ιστοί του σημείου προσβολής καθώς και τα απομακρυσμένα τμήματα του φυτού γίνονται ανθεκτικά στην παραπέρα μόλυνση. Αυτός ο τύπος ανθεκτικότητας είναι ανάλογος με την ανοσοποίηση των ανώτερων ζώων. Ωστόσο ο μηχανισμός επίκτητης αντοχής στα φυτά είναι πολύ διαφορετικός από αυτόν στα ζώα. Η επίκτητη αντοχή στα φυτά επάγεται στους απομακρυσμένους ιστούς μετά την προσπάθεια μόλυνσης από παθογόνα που προκαλούν νεκρωτικά συμπτώματα στο σημείο προσβολής ή και από άλλους παράγοντες όπως για παράδειγμα αβιοτικές καταπονήσεις και ριζοσφαιρικά βακτήρια. Το φυτό αναπτύσσει μια μνήμη καταπόνησης ως αποτέλεσμα της αρχικής μόλυνσης εναντίον μια ενδεχόμενης επακόλουθης μόλυνσης. Η επίκτητη αντοχή των φυτών μπορεί να δράσει τοπικά σε κύτταρα που συνορεύουν με την αρχική μόλυνση ή διασυστηματικά σε απομακρυσμένους ιστούς του φυτού. Αυτή η ανθεκτικότητα είναι μη-εξειδικευμένη και είναι αποτελεσματική εναντίον διάφορων ειδών παθογόνων που προκαλούν νεκρώσεις κυττάρων και ιστών στα φυτά. Η τοπική επίκτητη αντοχή αναφέρθηκε αρχικά από τον Yarwood (1960) και τον Ross (1961) σε σχέση με τις ιικές μολύνσεις. Η εργασία του Ross (1961) απέδειξε για πρώτη φορά την ύπαρξη της επίκτητης διασυστηματικής αντοχής (Systemic acquired resistance - SAR), σε φυτά καπνού που είχαν μολυνθεί από τον ιό του μωσαϊκού του καπνού (*Tobacco mosaic virus - TMV*). Περίπου 30 χρόνια αργότερα δύο ερευνητικές ομάδες ανακάλυψαν το κεντρικό ρόλο του σαλικυλικού οξέος σε αυτή τη διαδικασία (Salicylic acid - SA). Οι εργασίες τους

έδειξαν ότι το SA συσσωρεύτηκε σε φύλλα καπνού τόσο τοπικά όσο και διασυστηματικά λίγο μετά τη μόλυνση με τον ιό *TMV* (Malamy et al., 1990, Mettraux et al., 1990). Ο σημαντικός ρόλος του SA στη SAR επιβεβαιώθηκε σε πειράματα με γενετικώς τροποποιημένα φυτά καπνού *NahG* τα οποία φέρουν το γονίδιο της βακτηριακής υδροξυλάσης του SA, το οποίο μετατρέπει το SA σε κατεχόλη και έτσι δεν μπορούν να συσσωρεύσουν SA σε μεγάλες ποσότητες. Μετά τη μόλυνση *NahG* φυτών καπνού *TMV*, δεν ενεργοποιήθηκε η SAR διασυστηματικά στα απομακρυσμένα φύλλα και παρατηρήθηκε έλλειψη συσσώρευσης SA (Gaffney et al., 1993). Επίσης σε αυτά τα φυτά τα νεκρωτικά συμπτώματα ήταν σε πολύ μεγαλύτερη έκταση, σε σχέση με τα άγριου τύπου φυτά και συνεπώς ήταν πιο ευπαθή στον *TMV*. Εκτός από το SA έχουν προταθεί και άλλα μόρια ως υπεύθυνα σήματα της SAR. Η έρευνα των Maldonado et al., (2002) έδειξε τον πιθανό ρόλο μια πρωτεΐνης μεταφοράς λιπιδίων στη μετάδοση του σήματος της SAR. Ένα άλλο μόριο που προτάθηκε ως το σήμα, ήταν μια πρωτεΐνη πρόσδεσης του SA (salicylic acid-binding protein – SABP2) σε φυτά καπνού η οποία μετατρέπει το βιολογικά μη ενεργό methyl salicylate σε ενεργό SA στους απομακρυσμένους ιστούς (Forouhar et al., 2005). Τα τελευταία χρόνια έχει αποδειχτεί ότι η επίδραση του SA στη SAR βασίζεται στην ενεργοποίηση αρκετών αντιοξειδωτικών ενζύμων, όπως η superoxide dismutase, η glutathione reductase, η glutathione-S-transferase, όπως επίσης και στα επίπεδα μη ενζυματικών αντιοξειδωτικών όπως η glutathione (Fodor et al., 1997, Kiraly et al., 2002). Η υπερέκφραση των αντιοξειδωτικών διαπιστώθηκε τόσο σε ιστούς όπου είχε συσσωρευτεί SA όσο και σε μη μολυσμένους ιστούς φύλλων στα οποία είχε εφαρμοστεί SA. Η αυξημένη δραστηριότητα των αντιοξειδωτικών μπορεί να μειώσει την κυτταρική νέκρωση μετά τη μόλυνση. Επίσης τα αντιοξειδωτικά μπορούν να εξουδετερώνουν τα επιζήμια αποτελέσματα των ενεργών ομάδων οξυγόνου (Reactive Oxygen Species- ROS). Στα *NahG* φυτά στα οποία δεν συσσωρεύεται SA και δεν αναπτύσσεται η SAR (Gaffney et al., 1993) η δραστηριότητα πολλών αντιοξειδωτικών ενζύμων επίσης καταστέλλεται (Kiraly et al., 2002). Συνεπώς ο ρόλος του SA στην επαγωγή της SAR θα μπορούσε να είναι μέσω της επίδρασης του στην αύξηση των αντιοξειδωτικών.

Επαγόμενη διασυστηματική αντοχή

Μια άλλη μορφή διασυστηματικής αντοχής είναι η επαγόμενη διασυστηματική αντοχή (induced systemic resistance - ISR) η οποία ενεργοποιείται από τα βακτήρια της ριζόσφαιρας (Van Loon et al., 1998' Tuzun και Bent, 2005). Ένας μεγάλος αριθμός μη παθογόνων βακτηρίων της ριζόσφαιρας είναι ικανός να επάγει μη-εξειδικευμένη ανθεκτικότητα στους ιστούς κάποιων φυτών. Το πιο πιθανό είναι ότι αυτή η μορφή διασυστηματικής αντοχής λειτουργεί κάτω από φυσικές συνθήκες όπως η SAR. Ωστόσο τα ριζοβακτήρια δεν προκαλούν ορατά συμπτώματα HR στα φυτά και επιπλέον είναι ικανά να προάγουν την ανάπτυξη των φυτών. Κάποια ριζοβακτήρια ενεργοποιούν το SA ενώ κάποια άλλα φυτικές ορμόνες όπως το ιασμονικό οξύ και το αιθυλένιο (Tuzun και Bent, 2005).

Έκφραση *PR* γονιδίων ανεξάρτητα από το σαλικυλικό οξύ

Οι πρωτεΐνες *PR* (pathogenesis related proteins) συσσωρεύονται στα φυτά μετά την προσβολή από παθογόνα και ανακαλύφθηκαν αρχικά σε φύλλα καπνού που παρουσίαζαν HR στον *TMV* (Van Loon et al., 1997). Κάποιες από αυτές τις πρωτεΐνες *PR* όπως η οι χιτινάσες και οι γλουκανάσες, έχουν αντιμικροβιακές ιδιότητες και θεωρείται ότι συμβάλλουν στην ανθεκτικότητα που ενεργοποιείται κατά τη μόλυνση από κάποιο νεκροτροφικό μικροοργανισμό. Η επαγωγή από τα παθογόνα των περισσότερων *PR* γονιδίων σχετίζεται με την έναρξη της SAR στους αμόλυντους ιστούς η οποία μπορεί να ενεργοποιηθεί και με εξωγενή εφαρμογή SA (Ward et al., 1991). Ωστόσο υπάρχουν αρκετά δεδομένα που δείχνουν ότι το SA δεν είναι το μόνο σήμα που εμπλέκεται στην επαγωγή των *PR* γονιδίων. Κατ' αρχήν, η ενεργοποίηση των *PR* γονιδίων δεν συμπίπτει πάντα με τα αυξημένα επίπεδα του SA (Vallelian – Bindschedler et al., 1998). Κατά δεύτερον η ομάδα των *PR* γονιδίων που ενεργοποιείται κατά τη μόλυνση δεν αντιστοιχεί πάντα με αυτή που ενεργοποιείται από το SA (Schweizer et al., 1997' Schaffrath et al., 1997). Για παράδειγμα η μόλυνση του καπνού με το παθογόνο βακτήριο *Erwinia caratovora* ή η εφαρμογή των διεγερτών του (elicitors) στα φύλλα, ενεργοποίησαν διασυστηματικά μια ομάδα *PR* γονιδίων που

είναι διαφορετικά από αυτά που επάγονται από το SA (Vidal et al., 1997, Vidal et al., 1998). Κατά τις πρώτες 12 ώρες από τη μόλυνση το βακτήριο *Erwinia caratovora* ενεργοποίησε εξειδικευμένα το γονίδιο της βασικής β -1, 3-γλουκανάσης (*PR2*) και της βασικής χιτινάσης (*PR3*) αλλά όχι του SA-επαγόμενου γονιδίου *PR1*, ενώ η εξωγενής εφαρμογή SA ενεργοποίησε τη έκφραση του γονιδίου *PR1* αλλά όχι του *PR2* και *PR3*. Ενδιαφέρον προκάλεσε το γεγονός ότι η επαγωγή των γονιδίων *PR* από το *E. caratovora* αλληλεπίδρασε ανταγωνιστικά με το SA, ενώ η έκφραση των SA-επαγόμενων γονιδίων *PR* έδειξε ανταγωνισμό με τους διεγέρτες του *E. caratovora* (Vidal et al., 1997). Η επαγωγή των γονιδίων *PR* μέσω του *E. caratovora* δεν επηρεάστηκε στα μετασχηματισμένα *NahG* φυτά καπνού. Επιπλέον οι διεγέρτες του *E. caratovora* αύξησαν τη διασυστηματική αντοχή σε άγριου τύπου και μετασχηματισμένα φυτά *NahG* καπνού (Vidal et al., 1998), υποδεικνύοντας ότι η αντοχή είναι ανεξάρτητη του μονοπατιού μεταγωγής του SA. Αρκετά δεδομένα υποστηρίζουν ότι το ιασμονικό οξύ και το αιθυλένιο παίζουν επίσης σημαντικό ρόλο. Για παράδειγμα το methyl-jasmonate, ένα φυσικό παράγωγο του ιασμονικού οξέος, αύξησε τα επίπεδα έκφρασης του SA-επαγόμενου γονιδίου *PR1* σε φυτά καπνού (Xu et al., 1994). Επίσης ο συνδυασμός του methyl-jasmonate και του αιθυλενίου λειτούργησε συνεργιστικά στην επαγωγή μελών τόσο της *PR1* όσο και της *PR5* οικογένειας γονιδίων στον καπνό. Μια άλλη έρευνα έδειξε ότι η ενεργοποίηση *PR* γονιδίων από τους διεγέρτες του *E. caratovora* απαιτεί κοινή ενεργοποίηση του ιασμονικού οξέος και του αιθυλενίου και είναι ανεξάρτητη του SA (Brederode et al., 1991).

1.7.6 Ρύθμιση της έκφρασης των ντιφενσινών (defensins) και των θειονινών (thionins) από το ιασμονικό οξύ και το αιθυλένιο.

Τα τελευταία χρόνια έχουν γίνει αρκετές μελέτες που υποστηρίζουν ότι το ιασμονικό οξύ (jasmonic acid - JA) και το αιθυλένιο (ethylene - ET) είναι πολύ σημαντικά σήματα στην επαγωγή της άμυνας των φυτών. Τόσο το JA όσο και το ET παράγονται άμεσα όταν τα φυτά μολύνονται από παθογόνα, ιδιαίτερα στην περίπτωση

των νεκροτροφικών παθογόνων, όπου τα επίπεδα του JA αυξάνονται κατά μήκος των ιστών του φυτού (Penninckx et al., 1996). Επίσης η εξωγενής εφαρμογή του JA και του ET ενεργοποίησε μια ομάδα γονιδίων άμυνας που επάγονται κατά τη μόλυνση από παθογόνα, ανάμεσα στα οποία είναι γονίδια που κωδικοποιούν ντιφενσίνες και θειονίνες που είναι μικρές, πλούσιες σε κυστεΐνη βασικές πρωτεΐνες με αντιμικροβιακή δράση (Erple et al., 1997' Terras et al., 1995). Στο φυτό *Arabidopsis thaliana*, τα γονίδια της θειονίνης *Thi2.1* και της ντιφενσίνης *PDF1.2* ενεργοποιήθηκαν τοπικά και διασυστηματικά μετά από μόλυνση με νεκροτροφικά παθογόνα ή μετά από εξωγενή εφαρμογή με methyl-jasmonate, αλλά όχι μετά την εφαρμογή με SA (Erple et al., 1995' Penninckx et al., 1996' Bignutelli et al., 1998). Μια άλλη εργασία έδειξε ότι τα μονοπάτια του JA και του ET πρέπει να ενεργοποιηθούν αργότερα για την επαγωγή του γονιδίου *PDF1.2* κατά τη μόλυνση (Penninckx et al., 1998). Η μόλυνση με νεκροτροφικό παθογόνο ενεργοποίησε ταυτόχρονα την επαγωγή SA-εξαρτώμενων *PR* γονιδίων, αλλά και των SA-ανεξάρτητων γονιδίων *PDF1.2* και *Thi2.1*. Επομένως φαίνεται ότι τα μονοπάτια που ενεργοποιούν τους μηχανισμούς άμυνας έχουν κοινά συστατικά στοιχεία.

1.7.7 Αλληλεπιδράσεις μεταξύ των σημάτων που σχετίζονται με την άμυνα των φυτών

Κατά τη μόλυνση από παθογόνο διεγείρεται ο σχηματισμός ιασμονικού οξέος και αιθυλενίου. Ωστόσο υπάρχουν αρκετά δεδομένα που υποδεικνύουν ότι τα μονοπάτια μεταγωγής τους είναι ξεχωριστά ή και ανταγωνιστικά σε ορισμένες περιπτώσεις. Για παράδειγμα στο καπνό ο τραυματισμός και η μόλυνση από παθογόνα ενεργοποίησαν διαφορετικά *PR* γονίδια (Bol et al., 1996). Ο τραυματισμός φάνηκε να ενεργοποιεί βασικά *PR* γονίδια ενώ τα παθογόνα οδήγησαν στην ενεργοποίηση όξινων *PR* γονιδίων. Μια πιθανή εξήγηση είναι ότι κατά τους τραυματισμούς μόνο το ιασμονικό οξύ και το αιθυλένιο φαίνεται να παίζουν ρόλο, ενώ κατά τη μόλυνση με παθογόνα παράγεται επίσης και σαλικυλικό οξύ. Το SA και τα λειτουργικά του ανάλογα περιόρισαν την JA-επαγόμενη γονιδιακή έκφραση (Pena-Cortes et al., 1993' Doares et al., 1995' Niki et al., 1998). Σε φυτά *A. thaliana* η έκφραση του JA- και του ET-επαγόμενου γονιδίου *PDF1.2* αυξήθηκε στα *NahG* φυτά καπνού τα οποία δεν συσσωρεύουν SA (Penninckx et al., 1996), υποδεικνύοντας ότι στα άγριου τύπου φυτά η επαγωγή του γονιδίου *PDF1.2* καταστέλλεται σε ένα βαθμό από το ενδογενές SA.

Αυτό φάνηκε από την παρατήρηση ότι η συσσώρευση mRNA του *PDF1.2* περιορίστηκε μετά από εφαρμογή του INA που είναι ανάλογο του SA (Bowling et al., 1997). Ωστόσο, έχει αναφερθεί συνεργιστική δράση του JA και του ET στις SA-εξαρτώμενες αντιδράσεις. Στον καπνό η συνδυασμένη εφαρμογή methyl jasmonate και SA οδήγησε σε ισχυρότερη επαγωγή της έκφρασης του γονιδίου *PRI* από ότι η εφαρμογή με SA μόνο (Xu et al., 1991). Επιπλέον, το αιθυλένιο ευαισθητοποίησε τα φυτά *A. thaliana* στη δράση του SA, που οδήγησε σε υψηλότερα επίπεδα συγκέντρωσης mRNA του *PRI* μετά από εφαρμογή SA (Lawton et al., 1994).

Συμπερασματικά φαίνεται ότι τα φυτά ενεργοποιούν ξεχωριστά μονοπάτια άμυνας ανάλογα με τον τύπο της επίθεσης που δέχονται. Τα μόρια του SA, του JA και του ET παίζουν πολύ σημαντικό ρόλο σηματοδότησης σε αυτό το δίκτυο βιοχημικών μονοπατιών που σχετίζονται με την άμυνα των φυτών. Η διακοπή της αντίδρασης κάποιου από αυτά τα σήματα μπορεί να οδηγήσει σε ευπάθεια των φυτών στα παθογόνα ή και στα έντομα-εχθρούς (Gaffney et al., 1994' McConn et al., 1997' Knoester et al., 1998' Staswick et al., 1998' Vijayan et al., 1998). Η ανθεκτικότητα που επάγεται μέσω του μονοπατιού του SA φαίνεται να στοχεύει σε κάποιους τύπους παθογόνων διαφορετικούς από αυτούς που στοχεύει η ανθεκτικότητα που σχετίζεται με του JA και του ET.

1.8 Αναλυτικές μέθοδοι προσδιορισμού φυτικών ορμονών

Πολλές μέθοδοι έχουν αναπτυχθεί στη βιβλιογραφία για την ποσοτικοποίηση των φυτικών ορμονών όπως του σαλικυλικού και ιασμονικού οξέος, κυρίως με τη χρήση υγρής και αέριας χρωματογραφίας σε συνδιασμό με φασματομετρία μαζών (Schneider et al., 1985).

Οι κυριότερες μέθοδοι που χρησιμοποιούνται για την ποσοτικοποίηση των φυτικών ορμονών είναι οι εξής :

- GC-MS
- HPLC
- LC-MS
- LC-MS/MS
- HRMS (Orbitrap)

- HRMS (Q-TOF)

Η ποσοτικοποίηση των ορμονών παρουσιάζει ορισμένες δυσκολίες καθώς η συγκέντρωσή τους στους φυτικούς ιστούς είναι σε επίπεδα ppb. Η χρήση της φασματομετρίας μάζας υψηλής διακριτικής ικανότητας μπορεί να βοηθήσει αρκετά σε αυτή την περίπτωση, όμως η εφαρμογή της σε αυτή την κατηγορία ενώσεων περιορίζεται μέχρι στιγμής σε μια μέθοδο με προσδιορισμό φυτοορμονών στη τομάτα με αναλυτή μαζών Orbitrap (Van Meulebroek *et al.*, 2012) και στην αραβίδοψη (*Arabidopsis thaliana*) με αναλυτή μαζών Q-TOF (Lian *et al.*, 2012).

ΣΚΟΠΟΣ ΤΗΣ ΜΕΛΕΤΗΣ

Ο μύκητας *Verticillium dahliae* είναι ένα εδαφογενές φυτοπαθογόνο που προσβάλλει πάνω από 200 ξενιστές, σε καλλιέργειες ετήσιες και πολυετείς με μεγάλη οικονομική σημασία, στην εύκρατη και υποτροπική ζώνη. Προκαλεί στα φυτά που προσβάλλει ασθένειες οι οποίες ονομάζονται αδρομυκώσεις, δηλαδή ασθένειες που προσβάλλουν τις αγγειώδεις δεσμίδες μέσω του ριζικού συστήματος προκαλώντας απόφραξη τους και συνακόλουθα προβλήματα θρέψης και συγκεκριμένα την ασθένεια η οποία είναι γνωστή σαν βερτισιλλίωση. Για την αντιμετώπιση του μύκητα *V. dahliae* δεν υπάρχουν στην αγορά φυτοπροστατευτικών προϊόντων αποτελεσματικά σκευάσματα και προτείνονται κυρίως προληπτικά και καλλιεργητικά μέτρα. Η έρευνα για την αντιμετώπιση του μύκητα *V. dahliae* εστιάζει κυρίως στη χρήση βιολογικών παραγόντων ή και κάποιων οργανικών ενώσεων οι οποίοι αποτελούν μια στρατηγική αντιμετώπισης συμβατή με τις αρχές της ολοκληρωμένης και βιολογικής γεωργίας και συνεπώς με το χαμηλότερο περιβαλλοντικό αντίκτυπο. Οι βιολογικοί παράγοντες δρούν προστατευτικά για τα φυτά είτε μέσω ανταγωνισμού για θρεπτικά στοιχεία με τον εκάστοτε παθογόνο μικροοργανισμό, είτε μέσω της παραγωγής αντιβιοτικών ή και

μέσω της διέγερσης λανθανόντων μηχανισμών άμυνας. Διάφορες οργανικές ενώσεις μπορούν επίσης να διεγείρουν αυτούς τους μηχανισμούς άμυνας. Οι λανθάνοντες μηχανισμοί άμυνας ενεργοποιούνται κυρίως από διάφορες φυτοορμόνες όπως το σαλικυλικό και ιασμονικό οξύ οι οποίες παράγονται και μετακινούνται στους φυτικούς ιστούς παίζοντας το ρόλο σήματος για να ενεργοποιηθούν αυτοί οι μηχανισμοί σαν αποτέλεσμα των αλληλεπιδράσεων μεταξύ των μικροοργανισμών, των οργανικών ενώσεων και των διαφόρων ουσιών που παράγονται στη ριζόσφαιρα. Οι φυτοορμόνες όπως το σαλικυλικό οξύ, ιασμονικό οξύ, ινδολο-3-οξικό οξύ (Αυξίνες), αλλά και το αιθυλένιο παίζουν πολύ σημαντικό ρόλο στην ενεργοποίηση του ανοσοποιητικού συστήματος των φυτών. Όλες αυτές οι φυτοορμόνες είναι ικανές να αλληλεπιδρούν ή να ανταγωνίζονται μεταξύ τους για να σηματοδοτήσουν συγκεκριμένα βιοχημικά μονοπάτια που σχετίζονται με διαφορετικής φύσεως παθογόνα.

Στην παρούσα μεταπτυχιακή μελέτη διερευνήθηκε ο ρόλος της προσθήκης μονοσακχαριτών και δισακχαριτών και συγκεκριμένα της γλυκόζης, φρουκτόζης και μαλτόζης, με ριζοπότισμα στο εδαφικό υπόστρωμα όπου αναπτύσσονταν φυτά μελιτζάνας, τα οποία θεωρούνται αρκετά ευπαθείς ξενιστές, στην παρεμπόδιση των συμπτωμάτων της ασθένειας που προκαλείται από τον φυτοπαθογόνο μύκητα *Verticillium dahliae*. Οι μονοσακχαρίτες ή οι δισακχαρίτες που είχαν προστεθεί με ριζοπότισμα στα φυτά, οι οποίοι εμφάνισαν στα πειράματα δοκιμών παθογένειας κάποιου είδους προστασία δοκιμάστηκαν εκ νέου ώστε να συλλεχθεί φυτικός ιστός και να διερευνηθεί με αναλυτικές μεθόδους ποιες φυτικές ορμόνες ενεργοποιούνται στα φυτά στα οποία έγινε προσθήκη σακχάρων κατά τη μόλυνση από τον μύκητα *V. dahliae*.

ΥΛΙΚΑ ΚΑΙ ΜΕΘΟΔΟΙ

3.1 Φυτικό υλικό

Σπόροι μελιτζάνας ποικιλίας Black Beauty

3.2 Βιολογικό υλικό

Στην παρούσα μελέτη σαν βιολογικό υλικό χρησιμοποιήθηκε ο παθογόνος μύκητας *Verticillium dahliae* από τη συλλογή του Εργαστηρίου Φυτοπαθολογίας του Γεωπονικού Πανεπιστημίου Αθηνών.

3.3 Θρεπτικά υλικά

- Εκχύλισμα πατάτας με δεξτρόζη και άγαρ (Potato dextrose Agar, PDA)
- Διάλυμα σουκρόζης και νιτρικού Νατρίου (Sucrose Sodium Nitrate, SSN)

Παρασκευή εκχυλίσματος πατάτας με δεξτρόζη και άγαρ (PDA)

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

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

Παρασκευή διαλύματος σακχαρόζης και νιτρικού νατρίου (SSN):

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

Για την παρασκευή 100 ml διαλύματος ιχνοστοιχείων απαιτούνται:

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

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

3.4 Παρασκευή διαλύματος μονοσακχαριτών και δισακχαριτών

- D - Γλυκόζη
- D - Φρουκτόζη
- D – Μαλτόζη

Παρασκευάστηκε διάλυμα των ανωτέρω σακχάρων με σκοπό να τα εφαρμόσουμε με ριζοπότισμα στο εδαφικό υπόστρωμα όπου αναπτύσσονται τα φυτά. Πιο συγκεκριμένα παρασκευάστηκε διάλυμα γλυκόζης 20g/lit, διάλυμα φρουκτόζης 20g/lit και διάλυμα μαλτόζης 38g/lit. Επίσης παρασκευάστηκε διάλυμα μαλτόζης 20g/lit.

3.5 Προετοιμασία του παθογόνου μολύσματος

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

Διαδικασία:

Μεταφορά, υπό ασηπτικές συνθήκες, 1-2 κεραμικών χαντρών, που περιείχαν το μύκητα *V. dahliae* και φυλάσσονταν στους -80 °C, σε τρυβλία με θρεπτικό υλικό από εκχύλισμα πατάτας (PDA)

Τοποθέτηση των τρυβλίων για επώαση σε θερμοκρασία δωματίου 20-25 °C

Αφού το μυκήλιο του βερτισιλλίου αναπτύχθηκε και κάλυψε μεγάλο μέρος του τρυβλίου, μεταφέρθηκε υπό ασηπτικές συνθήκες σε κωνικές φιάλες που περιείχαν θρεπτικό υλικό SSN

Οι κωνικές φιάλες τοποθετήθηκαν σε ανακινούμε ερωαστικό θάλαμο σε θερμοκρασία 25 °C με ταχύτητα ανάδευσης 100 στροφές/λεπτό

Μετά από 5 ημέρες στις κωνικές φιάλες είχε σχηματισθεί πυκνό αιώρημα κονιδίων μαζί με μυκήλιο

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

Το αιώρημα κονιδίων μεταφέρθηκε, μετά από φιλτράρισμα με τούλι, σε ποτήρι ζέσεως, το οποίο είχε τοποθετηθεί επί μαγνητικού αναδευτήρα, 'ώστε να επιτευχθεί ομοιόμορφη κατανομή των κονιδίων στο αιώρημα .

Με πιπέτα έγινε παραλαβή 1 ml από το πυκνό αιώρημα και μεταφέρθηκε σε φιαλίδιο που περιείχε 9 ml νερό και στη συνέχεια πραγματοποιήθηκε και δεύτερη δεκαδική αραίωση (10^{-2}) ώστε να εξασφαλιστεί ευκολότερη μέτρηση των κονιδίων.

Τοποθέτηση περίπου 25 μ l από τη δεύτερη δεκαδική αραίωση σε ειδική αντικειμενοφόρο πλάκα μέτρησης κονιδίων (κυτταρόμετρο) για να εκτιμηθεί η τελική πυκνότητα του αιωρήματος. Η μέτρηση των κονιδίων στα τετραγωνάκια του κυτταρόμετρου έγινε σε μικροσκόπιο Carl Zeiss.

- Ο υπολογισμός του αριθμού των κονιδίων / ml γίνεται με βάση τον τύπο: Άθροισμα κονιδίων σε z τετραγωνάκια / (αριθμός τετραγώνων (z) x 4 x 10^{-6}).
- Η τιμή που βρέθηκε από τον παραπάνω τύπο πολλαπλασιάζεται επί 10 για να υπολογισθούν τα κονίδια / ml στο αρχικό αιώρημα πριν τη δεκαδική αραίωση.
- Στη συνέχεια μέσω του τύπου της αραίωσης $C_1V_X=C_2V_2$ υπολογίζεται πόσα ml από το αρχικό αιώρημα V_X θα χρησιμοποιηθεί έτσι ώστε ο τελικός αριθμός κονιδίων/ml να είναι 10^7 σε τελικό συνολικό όγκο V_2 .
- Μέσω της αφαίρεσης (V_2-V_X) υπολογίζεται ο όγκος του νερού που πρέπει να προστεθεί έτσι ώστε να προκύψει τελικός όγκος V_2

3.6 Πείραμα 1 : Αξιολόγηση της ανθεκτικότητας φυταρίων μελιτζάνας όπου είχε προηγηθεί ριζοπότισμα με σάκχαρα, στο μύκητα *Verticillium dahliae*

Για να αξιολογηθεί η ενδεχόμενη ανθεκτικότητα φυταρίων μελιτζάνας, στα οποία έγινε προσθήκη με ριζοπότισμα μονοσακχαριτών και δισακχαριτών, στον φυτοπαθογόνο μύκητα *Verticillium dahliae* πραγματοποιήθηκαν πειράματα παθογένειας και αξιολόγηση των συμπτωμάτων της ασθένειας. Όλες οι εφαρμογές συγκρίθηκαν με έναν μολυσμένο μάρτυρα. Για την επιβεβαίωση της επαναληψιμότητας των αποτελεσμάτων το πείραμα πραγματοποιήθηκε τρεις φορές.

Αρχικά πραγματοποιήθηκε στο στάδιο των 2-3 πραγματικών φύλλων ριζοπότισμα με 10 ml αιωρήματος γλυκόζης, φρουκτόζης, μαλτόζης συγκέντρωσης 111mM και αιωρήματος μαλτόζης συγκέντρωσης 58mM. Λόγω διαφορετικής μοριακής μάζας των ενώσεων αυτών πραγματοποιήθηκε ριζοπότισμα με διαφορετική συγκέντρωση αιωρήματος. Παρακάτω παρατίθενται οι μοριακές μάζες των σακχάρων που χρησιμοποιήθηκαν κατά την πειραματική διαδικασία.

Ένωση		Μοριακή μάζα
Γλυκόζη		180,156 g/mol
Φρουκτόζη		180,16 g/mol
Μαλτόζη		342,3 g/mol

Η επέμβαση αυτή πραγματοποιήθηκε σε φυτά ηλικίας περίπου 15 ημερών. Στη συνέχεια 5 ημέρες μετά κάθε φυτό μολύνθηκε με 10ml αιωρήματος κονιδίων του μύκητα *V.dahliae* συγκέντρωσης 10^7 κονίδια/ml. . Έπειτα, επτά ημέρες μετά τη μόλυνση πραγματοποιήθηκε δεύτερη προσθήκη σακχάρων σε μερικά φυτά. Στις μετρήσεις καταγράφονταν και ο συνολικός αριθμός των φύλλων του φυτού και η ασθένεια εκφράστηκε ως ποσοστό ασθενών φύλλων προς το σύνολο των φύλλων.

Στα πειράματα παθογένειας ορίστηκαν οι εξής εφαρμογές :

1. 20 φυτά ως μάρτυρες (φυτά που έχουν μολυνθεί με τον παθογόνο μύκητα *V. dahliae* (Vd control)

2. 20 φυτά στα οποία έγινε η εφαρμογή του μύκητα *V. dahliae* μαζί με γλυκόζη (*Vd*+Glucose1 (111mM))
3. 20 φυτά στα οποία έγινε η εφαρμογή του μύκητα *V. dahliae* μαζί με φρουκτόζη (*Vd* + Fructose1 (111mM))
4. 20 φυτά στα οποία έγινε η εφαρμογή του μύκητα *V. dahliae* μαζί με μαλτόζη (*Vd* + Maltose1 (111mM))
5. 20 φυτά στα οποία έγινε η εφαρμογή του μύκητα *V. dahliae* μαζί με μειωμένη συγκέντρωση μαλτόζης (*Vd* + Maltose 58mM)
6. 15 φυτά στα οποία δεν πραγματοποιήθηκε καμία επέμβαση (Mock)
7. 10 φυτά μολυσμένα με τον μύκητα *V. dahliae* στα οποία έγινε δεύτερη προσθήκη γλυκόζης (*Vd* + Glucose2 (111mM))
8. 10 φυτά μολυσμένα με τον μύκητα *V. dahliae* στα οποία έγινε δεύτερη προσθήκη φρουκτόζης (*Vd* + Fructose2 (111mM))
9. 10 φυτά μολυσμένα με τον μύκητα *V. dahliae* στα οποία έγινε δεύτερη προσθήκη μαλτόζης (*Vd* + Maltose2 (111mM))

Μετά το τέλος της καταμέτρησης των συμπτωμάτων έγινε παραλαβή του υπέργειου μέρους (βλαστός και φύλλα) των φυτών για κάθε εφαρμογή και βρέθηκε το μέσο νωπό βάρος των φυτών για κάθε χειρισμό. Η εφαρμογή με σάκχαρα που έδειξε τη μεγαλύτερη ανθεκτικότητα στον μύκητα *V. dahliae* επαναλήφθηκε εκ νέου, ώστε να συλλεχθεί ο φυτικός ιστός και να προσδιοριστεί το επίπεδο έκφρασης των φυτοορμονών που σχετίζονται με την άμυνα των φυτών.

3.7 Πείραμα 2 : Προσδιορισμός του επιπέδου έκφρασης των φυτοορμονών

Για να διαπιστωθεί εάν η ανθεκτικότητα των φυτών στα οποία είχε προηγηθεί ριζοπότισμα με σάκχαρα, στο μύκητα *V. dahliae* οφείλεται στην ενεργοποίηση βιοχημικών μονοπατιών που σχετίζονται με την άμυνα των φυτών, πραγματοποιήθηκε ταυτοποίηση και ποσοτικοποίηση του επιπέδου έκφρασης του σαλικυλικού οξέος και του ιασμονικού οξέος. Οι πρότυπες ενώσεις που χρησιμοποιήθηκαν για την

ταυτοποίηση και ποσοτικοποίηση των φυτικών ορμονών παρουσιάζονται στον πίνακα 1. Από τις δύο ενώσεις που μελετήθηκαν το ιασμονικό και το σαλικυλικό οξύ ήταν εμπορικά διαθέσιμα από την εταιρία TCI Chemicals.

Πίνακας 1: Ενώσεις που μελετήθηκαν με φασματοφωτομετρία μαζών

Όνομασία IUPAC	Εμπειρική ονομασία	Συντομογραφία
2-Υδροξυβενζοϊκό οξύ (2-Hydroxybenzoic acid)	Σαλικυλικό οξύ	SA
{(1S, 2S)-3-οξο-2-[(2Z)-πεντ-2-εν-1-υλ]κυκλοπεντυλ}οξικό οξύ {(1S, 2S)-3-oxo-2-[(2Z)-pent-2-en-1-yl]cyclopentyl}acetic acid	Ιασμονικό οξύ	JA

Συσκευές και όργανα

- Φασματογράφος μάζας UHPLC – HRMS/MS της εταιρίας Agilent (μοντέλο Agilent 6530) εξοπλισμένος με πηγή ιοντισμού με ηλεκτροψεκασμό (ESI), αναλυτή Q-TOF, χρωματογραφικό σύστημα UHPLC Agilent 1290 Infinity και αυτόματο δειγματολήπτη
- Ηλεκτρονικός υπολογιστής, συνδεδεμένος με το φασματογράφο μάζας με το λογισμικό Agilent MassHunter Data Acquisition (version B.06.00) και Agilent MassHunter Qualitative Analysis (version B.07.00), για την λήψη και την επεξεργασία των φασμάτων, αντίστοιχα.

3.7.3 Λυοφιλίωση

Η λυοφιλίωση είναι μια διαδικασία που επιτυγχάνεται η απομάκρυνσή του νερού από ένα δείγμα μέσω εξάχνωσης και διασποράς. Στην ουσία πρόκειται για μία ξήρανση δια καταψύξεως ή αλλιώς μια ψυχρή ξήρανση. Αυτή η διαδικασία πραγματοποιείται σε συσκευή λυοφιλίωσης, η οποία αποτελείται από ένα συμπυκνωτή που παγιδεύει το νερό που απομακρύνεται από το δείγμα, ένα σύστημα ψύξης (προσεγγίζει τη θερμοκρασία των -20°C) και ένα σύστημα κενού για να μειώνει την πίεση έτσι ώστε να διευκολύνεται η διαδικασία εξάχνωσης. Η λυοφιλίωση μπορεί να οδηγήσει σε εξαιρετικά χαμηλή περιεκτικότητα σε υγρασία, της τάξης του 1-4 % προλαμβάνοντας την ανάπτυξη μικροοργανισμών αλλά και τη δράση ενζύμων από το να προκαλέσουν χημικές αντιδράσεις που μπορούν καταστρέψουν το δείγμα. Η μέθοδος της ξήρανσης με κατάψυξη είναι νέα μέθοδος όπου το νερό μεταβαίνει από τη στερεά κατάσταση (πάγος) στην αέρια (υδρατμός) χωρίς τη μεσολάβηση της υγρής φάσης. Τα δείγματα παρέμειναν στον Freeze-dryer για περίπου 3 ημέρες.

3.7.4 Παρασκευή εκχυλισμάτων

Η εκχύλιση πραγματοποιήθηκε σύμφωνα με τους Cao *et al.* ως εξής : 1 g λυοφιλωμένου λαχανικού εκχυλίστηκε στους 4°C για 24 ώρες με 20 mL MeOH 80%. Ο διαλύτης απομακρύνθηκε με διήθηση σε Buchner και το υπόλειμμα εκχυλίστηκε εκ νέου με 20 mL MeOH 80% για 30 λεπτά στους 4°C . Οι οργανικές στοιβάδες συγκεντρώθηκαν, ξηράνθηκαν με 1 g άνυδρο θειικό νάτριο και διηθήθηκαν. Το εκχύλισμα συμπυκνώνεται υπο κενό στους 35°C μέχρι ξηρού και το υπόλειμμα διαλύθηκε σε 1 mL MeOH. Για την ανάλυση στο LC-MS, 50 μL από το εκχύλισμα αραιώθηκαν με 50 μL MeOH (Revelou, 2018)

3.7.5 Συνθήκες UHPLC – HRMS/MS

Ως αέριο σύγκρουσης χρησιμοποιήθηκε άζωτο, ενώ τα πειράματα διεξήχθησαν στον αρνητικό ιοντισμό με ηλεκτροψεκασμό. Οι παράμετροι της μεθόδου ήταν οι εξής:

- Θερμοκρασία αερίου αποδιαλύτωσης, 300°C
- Ροή αερίου αποδιαλύτωσης, 12 l/min
- Δυναμικό τριχοειδούς, 4000 V
- Πίεση αερίου εκνεφωτή, 45 psi
- Δυναμικό θραυσματοποίησης, 170 V
- Δυναμικό αποκορυφωτή / διαχωριστή ιόντων, 65 V
- Ταχύτητα σάρωσης, 1 scan / sec
- Εύρος ανιχνευόμενων μαζών, 50-1500 m/z

Για τα πειράματα MS/MS αναπτύχθηκε μέθοδος auto MS/MS με τις εξής παραμέτρους:

- Δυναμικό ενέργειας σύγκρουσης, 5V
- Δυναμικό αντιστάθμισης, 2.5 V
- Προτιμώμενη κατάσταση φορτίου, 2, 1, unknown.
- Ταχύτητα σάρωσης, 1 scan/sec
- Εύρος ανιχνευόμενων μαζών, 50-1500 m/z

Κατά τη διάρκεια των αναλύσεων επιλέχθηκε η δυνατότητα συνεχούς διόρθωσης της βαθμονόμησης του συστήματος με διοχέτευση κατάλληλου διαλύματος που περιείχε γνωστές τιμές ιόντων αναφοράς. Για τη χρωματογραφική ανάλυση χρησιμοποιήθηκε στήλη χρωματογραφίας αντίστροφης φάσης της εταιρίας Agilent (Zorbax C18, 50 x 2.1 mm, 1.8 μm). Η κινητή φάση ήταν H₂O – φορμικό οξύ 0.1% (A) και MeOH – φορμικό οξύ 0.1% (B) με την ακόλουθη βαθμιδωτή σύσταση: 0 min: 5% B; 1 min 5% B; 8.5 min: 95% B; 9.5 min: 95% B; 11.5 min: 5% B; 28.5 min: 5% B. Ο όγκος του ενέσιμου εκχυλίσματος ήταν 2 Μl, η ροή ήταν 0.4 mL/min και η θερμοκρασία της στήλης ρυθμίστηκε στους 27°C. Όλες οι ενώσεις μελετήθηκαν με φασματομετρία μάζας με την τεχνική της έγχυσης συνεχούς ροής (flow injection analysis-FIA) (Revelou, 2018).

Χρόνος (min)	H ₂ O (%)	MeOH (%)	Ροή (mL/min)	Μέγιστο όριο πίεσης (bar)
0	95	5	0,4	600
1	95	5		
8,5	5	95		
9,5	5	95		
11,5	95	5		
37,00	95	5		

Πρόγραμμα ανάλυσης στο LC-HRMS για το σαλικυλικό και ιασμονικό οξύ

ΑΠΟΤΕΛΕΣΜΑΤΑ

4.1 Μελέτη της μολυσματικής ικανότητας του μύκητα *V. dahliae* σε φυτά μελιτζάνας όπου είχε προηγηθεί προσθήκη μονοσακχαριτών και δισακχαριτών

Σε αυτό το πείραμα αξιολογήθηκε η μολυσματική ικανότητα του μύκητα *V. dahliae* καθώς επίσης και η επίδραση της προσθήκης γλυκόζης φρουκτόζης και μαλτόζης με ριζοπότισμα στο εδαφικό υπόστρωμα όπου αναπτύσσονταν φυτά μελιτζάνας. Πραγματοποιήθηκαν δοκιμές παθογένειας σε φυτά που είχαν μολυνθεί με το μύκητα αλλά είχε γίνει εφαρμογή σακχάρων έχοντας ως μάρτυρες αμόλυντα φυτά, μολυσμένα φυτά αλλά και φυτά επίσης όπου είχαν εφαρμοστεί μόνο σάκχαρα. Επίσης πραγματοποιήθηκαν δοκιμές παθογένειας σε φυτά όπου έγινε και δεύτερη προσθήκη

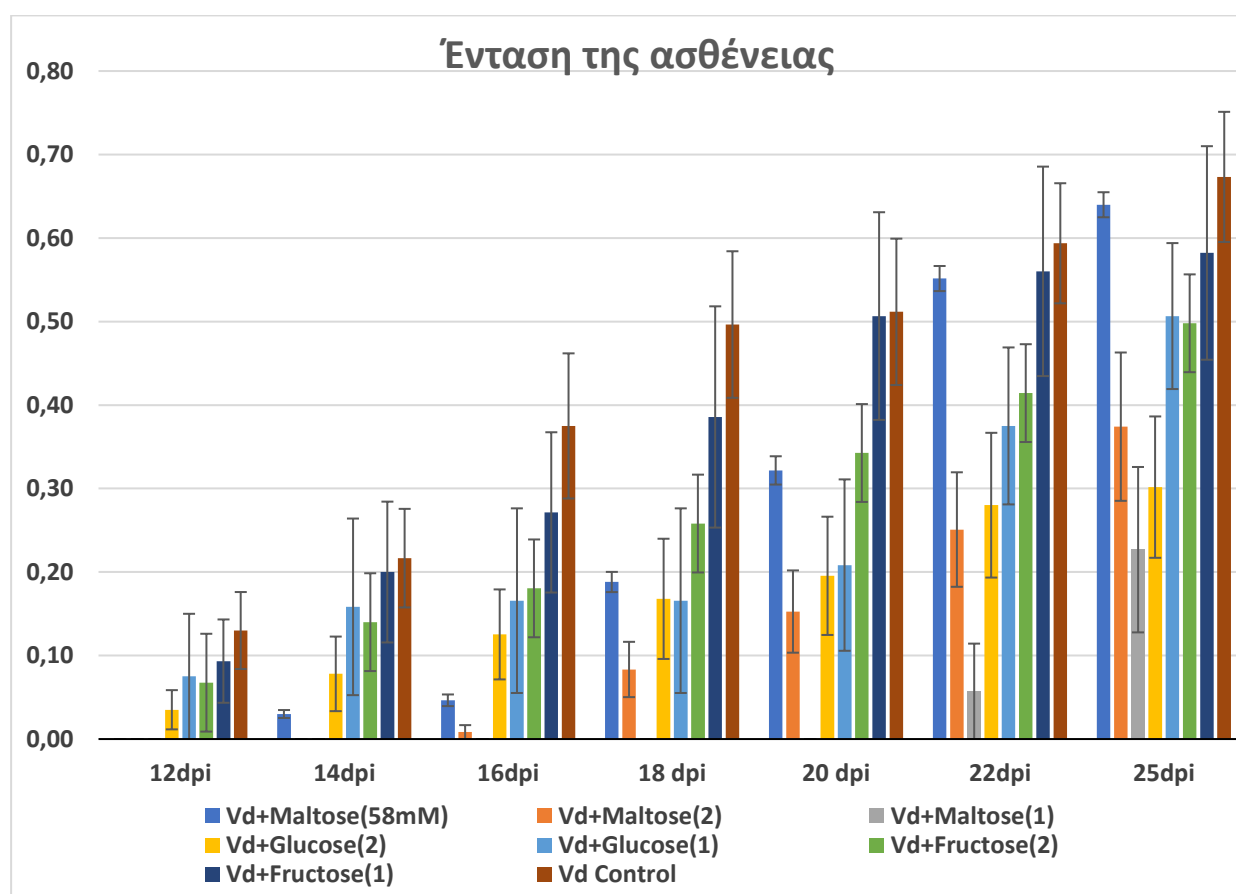
σακχάρων επτά ημέρες μετά την μόλυνση με το μύκητα *V. dahliae*, όπως περιγράφηκε στην προηγούμενη ενότητα. Η πρώτη μέτρηση πραγματοποιήθηκε 12 ημέρες μετά τη μόλυνση, ενώ τα συμπτώματα εμφανίζονταν κυρίως ως χλωρώσεις και μαράνσεις και η καταγραφή πραγματοποιούνταν ανά δύο ημέρες, έως τις 25 ημέρες μετά τη μόλυνση.

Στα φυτά που είχε γίνει προσθήκη γλυκόζης και φρουκτόζης τα συμπτώματα εμφανίστηκαν την δωδέκατη ημέρα σε αντίθεση με τα φυτά που είχε γίνει προσθήκη μαλτόζης όπου τα συμπτώματα εμφανίστηκαν την δέκατη όγδοη ημέρα, με εξαίρεση τα φυτά όπου είχε γίνει προσθήκη μαλτόζης μειωμένης συγκέντρωσης (58mM) όπου εμφανίστηκαν τα συμπτώματα την δέκατη έκτη ημέρα.

Στις μετρήσεις καταγράφονταν τα ασθενή φύλλα προς το συνολικό αριθμό των φύλλων του κάθε φυτού καθώς επίσης και το σύνολο των ασθενών φυτών ανά επέμβαση σε όλες τις υπό εξέταση εφαρμογές.

Στο γράφημα 1.A εκφράζεται η ένταση της ασθένειας στα φυτά όπου έγινε προσθήκη στο εδαφικό υπόστρωμα μονοσακχαριτών και δισακχαριτών με ριζοπότισμα σε σχέση πάντα με τον μολυσμένο μάρτυρα. Πιο συγκεκριμένα στο γράφημα 1.A παρατηρείται ότι από την δωδέκατη έως την εικοστή πέμπτη ημέρα, τα φυτά όπου έχει γίνει μία εφαρμογή φρουκτόζης ($Vd + Fructose(1)$) παρουσίασαν τα πιο έντονα συμπτώματα σε σύγκριση με τις υπόλοιπες εφαρμογές, πάντα σε σχέση με τον μάρτυρα. Έπειτα ακολουθούσαν τα φυτά όπου είχαν γίνει δύο εφαρμογές φρουκτόζης ($Vd + Fructose(2)$) με μειωμένη ένταση συμπτωμάτων σε σχέση με τα ($Vd + Fructose(1)$) και με στατιστικά σημαντική διαφορά. Παρατηρούμε επίσης στο γράφημα 1.A ότι τα φυτά όπου είχε γίνει μία εφαρμογή γλυκόζης ($Vd + Glucose(1)$) παρουσίασαν μικρότερη ένταση συμπτωμάτων σε σχέση με τις εφαρμογές με φρουκτόζη σε όλες τις ημέρες όπου πάρθηκαν οι μετρήσεις, αλλά και σε σχέση με τον μάρτυρα. Επίσης τα φυτά όπου πραγματοποιήθηκε διπλή εφαρμογή γλυκόζης ($Vd + Glucose(2)$) παρουσίασαν λιγότερα συμπτώματα σε σχέση με την εφαρμογή ($Vd + Glucose(1)$) σε όλες τις ημέρες, εκτός από την δέκατη όγδοη και εικοστή ημέρα όπου η διαφορά τους δεν ήταν στατιστικώς σημαντική. Τέλος στο γράφημα παρατηρούμε την ένταση της ασθένειας των φυτών όπου είχε πραγματοποιηθεί στο εδαφικό υπόστρωμα προσθήκη μαλτόζης μία φορά ($Vd + Maltose(1)$), δύο φορές ($Vd + Maltose(2)$) και μία εφαρμογή όπου είχε γίνει προσθήκη μαλτόζης με μειωμένη συγκέντρωση ($Vd + Maltose(58mM)$). Βλέπουμε στο γράφημα ότι τα φυτά της

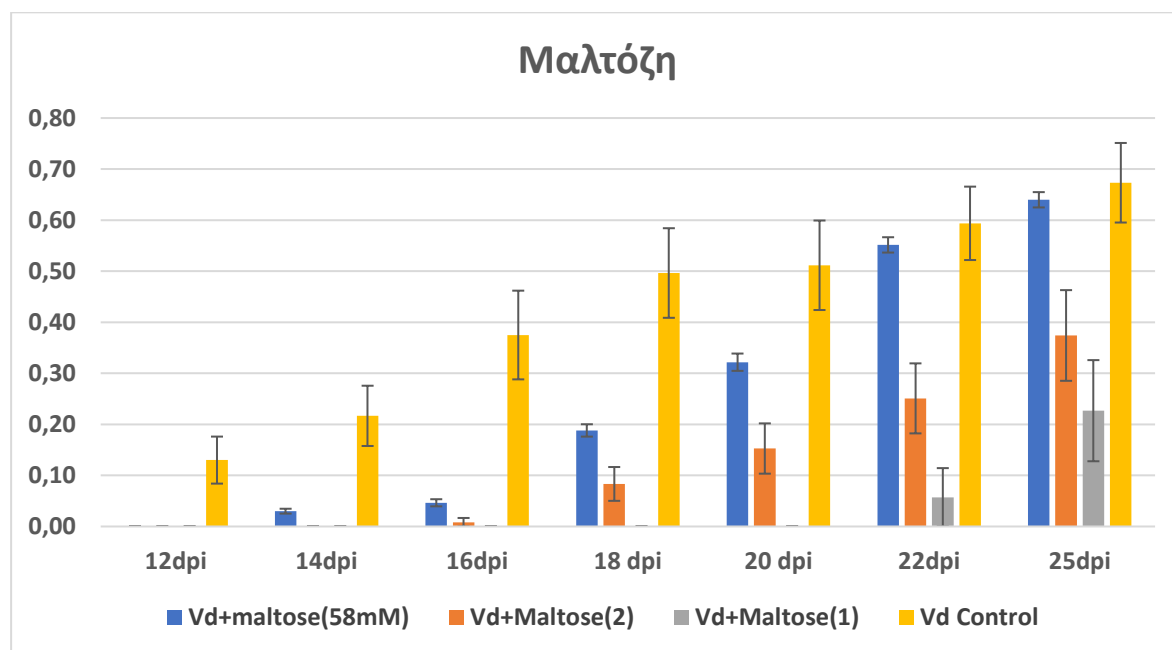
εφαρμογής (Vd +Maltose(2)) παρουσίασαν τα πρώτα συμπτώματα την δέκατη όγδοη ημέρα αλλά ήταν σημαντικά μειωμένα σε σχέση με τις παραπάνω εφαρμογές μέχρι την εικοστή τρίτη ημέρα, ενώ τα φυτά της εφαρμογής (Vd +Maltose(58mM)) παρουσίασαν τα πρώτα συμπτώματα την δέκατη τέταρτη ημέρα. Τέλος τα φυτά της εφαρμογής (Vd +Maltose(1)) παρουσίασαν τα πρώτα συμπτώματα την εικοστή δεύτερη ημέρα και είχαν την μικρότερη ένταση συνολικά σε σχέση με όλες τις εφαρμογές αλλά και σε σχέση με τον μάρτυρα.



Γράφημα 1A : Απεικονίζεται η ένταση της ασθένειας στα φυτά όπου έγινε προσθήκη στο εδαφικό υπόστρωμα μονοσακχαριτών και δισακχαριτών με ριζοπότισμα σε σχέση πάντα με τον μολυσμένο μάρτυρα.

Στο γράφημα 1.B απεικονίζεται η ένταση της ασθένειας στα φυτά όπου έγινε προσθήκη στο εδαφικό υπόστρωμα μαλτόζης σε διαφορετικές συγκεντρώσεις.

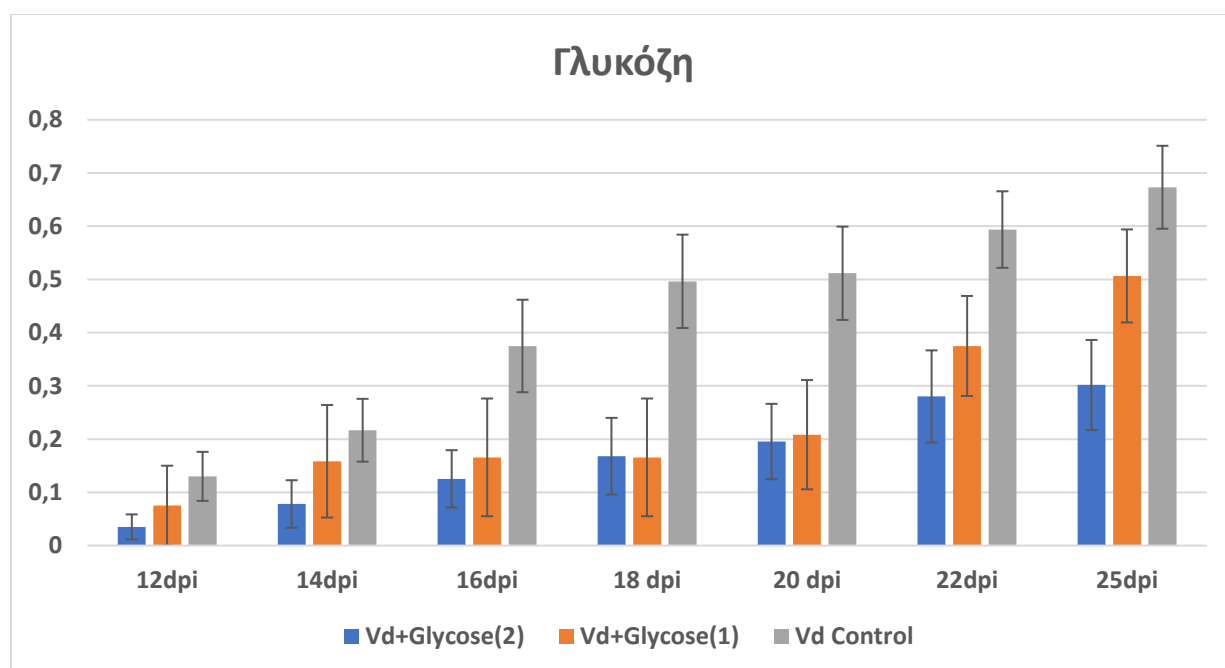
Παρατηρούμε ότι την μεγαλύτερη ένταση συμπτωμάτων σε σχέση με τον μάρτυρα την παρουσίασε η εφαρμογή *Vd+Maltose(58mM)*, όπου τα πρώτα συμπτώματα εμφανίστηκαν την δέκατη τέταρτη ημέρα και αυξάνονταν διαρκώς μέχρι την τελευταία παρατήρηση όπου δεν υπήρχε στατιστικά σημαντική διαφορά σε σχέση με το μάρτυρα. Αντίθετα η εφαρμογή *Vd+Maltose(2)*, στα φυτά της οποίας πραγματοποιήθηκε δύο φορές προσθήκη μαλτόζης με ριζοπότισμα, τα πρώτα συμπτώματα εμφανίστηκαν την δέκατη έκτη ημέρα και αυξάνονταν μέχρι την εικοστή πέμπτη ημέρα, αλλά εμφανίστηκαν σημαντικά μειωμένα σε σχέση με τα φυτά της εφαρμογής *Vd+Maltose(58mM)*, αλλά και σε σχέση με τον μάρτυρα. Τέλος, τα φυτά της εφαρμογής *Vd+Maltose(1)*, όπου είχε πραγματοποιηθεί μια φορά μόνο προσθήκη μαλτόζης εμφάνισε τα λιγότερα συμπτώματα σε σχέση με τις άλλες εφαρμογές αλλά και σε σχέση με τον μάρτυρα. Πιο συγκεκριμένα, τα συμπτώματα της εφαρμογής αυτής εμφανίστηκαν την εικοστή δεύτερη ημέρα όπου πραγματοποιήθηκε η προτελευταία παρατήρηση



Γράφημα 1.Β : Απεικονίζεται η ένταση της ασθένειας στα φυτά όπου έγινε προσθήκη μαλτόζης στο εδαφικό υπόστρωμα με ριζοπότισμα σε διαφορετικές συγκεντρώσεις, σε σχέση με το μάρτυρα

Στο γράφημα 1.Γ απεικονίζεται η ένταση της ασθένειας στα φυτά όπου έγινε προσθήκη στο εδαφικό υπόστρωμα γλυκόζης σε διαφορετικές συγκεντρώσεις. Παρατηρούμε ότι

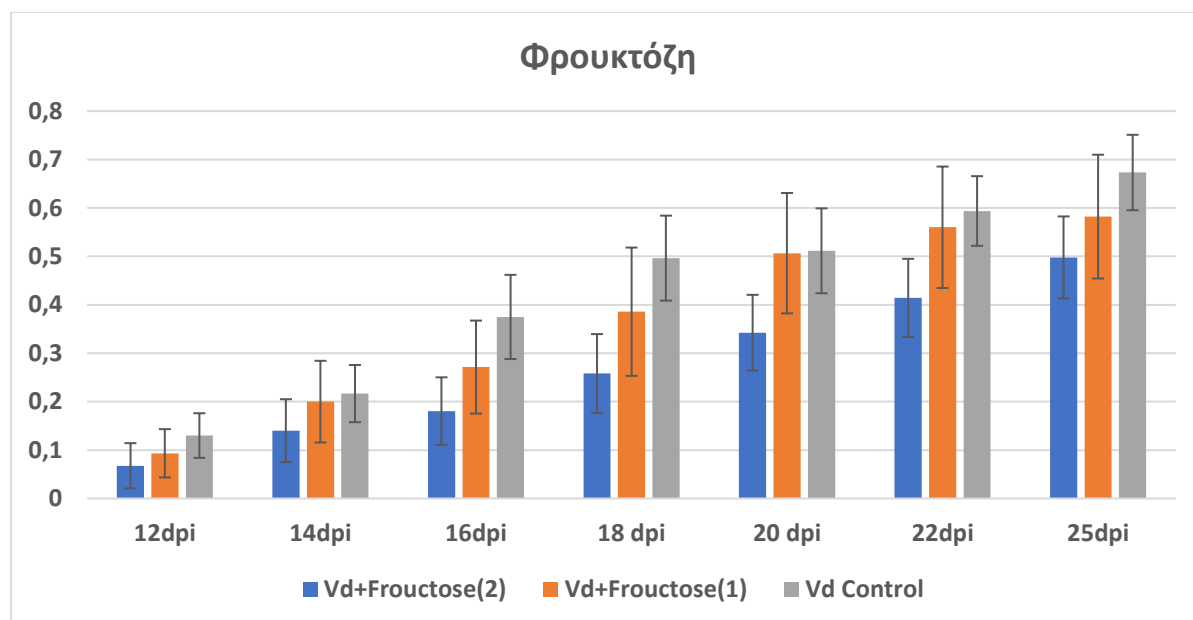
την μεγαλύτερη ένταση συμπτωμάτων σε σχέση με τον μάρτυρα την παρουσίασαν τα φυτά της εφαρμογής *Vd+Glucose(1)*, αλλά όχι με στατιστικά σημαντική διαφορά σε σχέση με τα φυτά της εφαρμογής *Vd+Glucose(2)* στις περισσότερες μετρήσεις που πάρθηκαν. Πιο συγκεκριμένα, τα συμπτώματα σε όλες τις επεμβάσεις εμφανίστηκαν τη δωδέκατη ημέρα και μέχρι την εικοστή ημέρα οι δύο επεμβάσεις με γλυκόζη δεν είχαν στατιστικά σημαντική διαφορά μεταξύ τους παρά μόνο με τον μάρτυρα. Στις δύο τελευταίες παρατηρήσεις τα συμπτώματα στα φυτά της εφαρμογής *Vd+Glucose(1)* αυξήθηκαν σε σχέση με τα φυτά της εφαρμογής *Vd+Glucose(2)*.



Γράφημα 1.Γ : Απεικονίζεται η ένταση της ασθένειας στα φυτά όπου έγινε προσθήκη γλυκόζης στο εδαφικό υπόστρωμα με ριζοπότισμα σε διαφορετικές συγκεντρώσεις, σε σχέση με το μάρτυρα

Στο γράφημα 1.Δ απεικονίζεται η ένταση της ασθένειας στα φυτά όπου έγινε προσθήκη στο εδαφικό υπόστρωμα φρουκτόζης σε διαφορετικές συγκεντρώσεις. Παρατηρούμε ότι τη μικρότερη ένταση συμπτωμάτων την εμφάνισαν τα φυτά της εφαρμογής *Vd+Fructose(2)*. Πιο συγκεκριμένα, τα συμπτώματα στις τρεις διαφορετικές επεμβάσεις εμφανίστηκαν την δωδέκατη ημέρα όπου είχαμε την πρώτη παρατήρηση. Τα συμπτώματα στην εφαρμογή *Vd+Fructose(2)* παρέμειναν σταθερά μέχρι την εικοστή ημέρα και έπειτα παρατηρήθηκε αύξηση στις δύο τελευταίες παρατηρήσεις, αλλά ήταν σαφώς μειωμένα και με στατιστικά σημαντική διαφορά σε σχέση με τα συμπτώματα του μάρτυρα από την δέκατη έκτη παρατήρηση και μετά. Τέλος η εφαρμογή *Vd+Fructose(1)* από την πρώτη παρατήρηση μέχρι την εικοστή δεν είχε

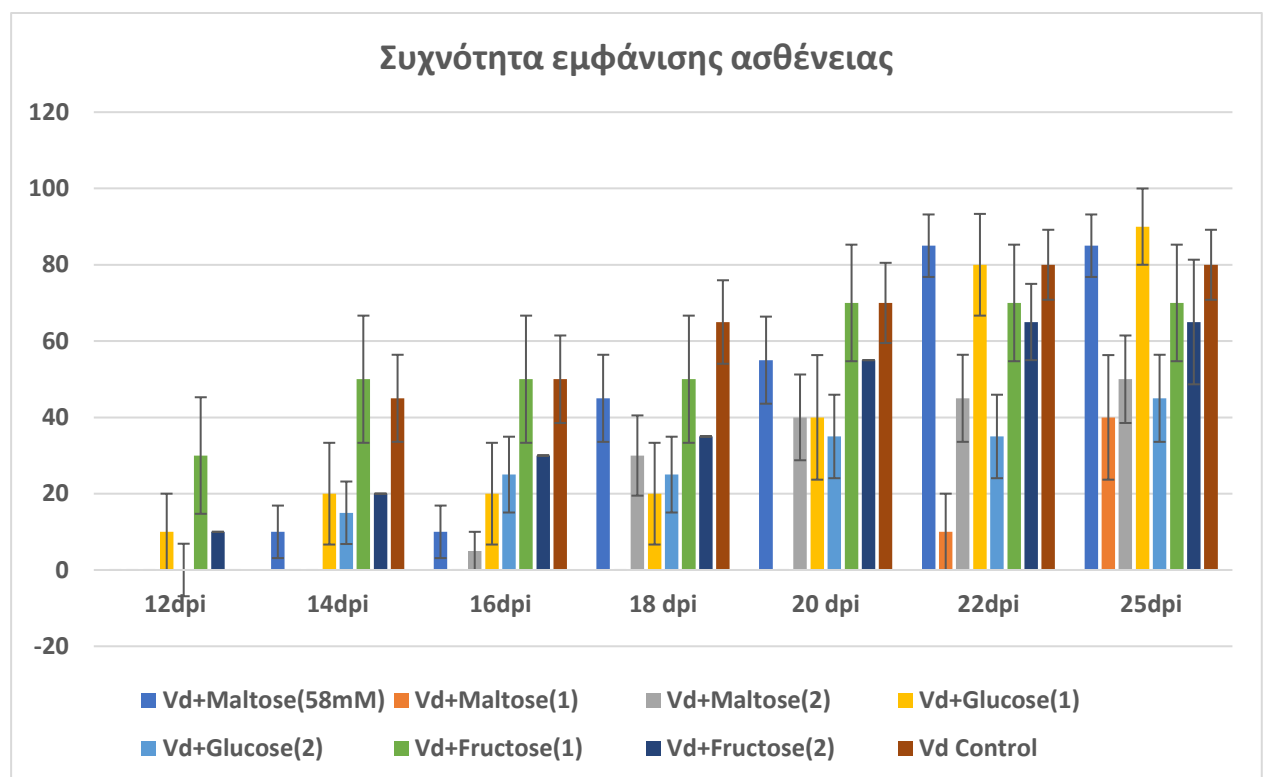
διαφορά στην ένταση των συμπτωμάτων σε σχέση με τα φυτά της εφαρμογής *Vd+Fructose(2)*.



Γράφημα 1.Δ : Απεικονίζεται η ένταση της ασθένειας στα φυτά όπου έγινε προσθήκη φρουκτόζης στο εδαφικό υπόστρωμα με ριζοπότισμα σε διαφορετικές συγκεντρώσεις, σε σχέση με το μάρτυρα

Στο γράφημα 2.Α απεικονίζεται η συχνότητα εμφάνισης της ασθένειας στις διάφορες επεμβάσεις, δηλαδή το ποσοστό των φυτών που παρουσίασαν συμπτώματα της ασθένειας σε κάθε επέμβαση. Παρατηρούμε ότι στην πρώτη μέτρηση, δηλαδή στη δωδέκατη μέρα μετά τη μόλυνση το μεγαλύτερο ποσοστό φυτών που παρουσίασαν συμπτώματα παρατηρείται στις εφαρμογές *Vd+Fructose(1)* και στην εφαρμογή *Vd+Glucose(1)* χωρίς να έχουν στατιστικά σημαντική διαφορά μεταξύ τους, ακολουθούμενη από την εφαρμογή *Vd+Fructose(2)*. Στις επόμενες δύο μετρήσεις, την δέκατη τέταρτη ημέρα και την δέκατη έκτη το μεγαλύτερο ποσοστό ασθενών φυτών το εμφανίζει η εφαρμογή *Vd+Fructose(1)* και ο μάρτυρας και έπειτα ακολουθούν οι εφαρμογές *Vd+Fructose(2)*, *Vd+Glucose(1)* και *Vd+Glucose(2)* έχοντας στατιστικά σημαντική διαφορά σε σχέση με την τις προαναφερόμενες εφαρμογές. Την δέκατη όγδοη ημέρα και την εικοστή ημέρα παρατηρείται μια εκθετική αύξηση της συχνότητας εμφάνισης της ασθένειας στις προαναφερόμενες εφαρμογές, με τη διαφορά ότι παρουσιάζεται απότομη αύξηση του αριθμού των ασθενών φυτών της εφαρμογής

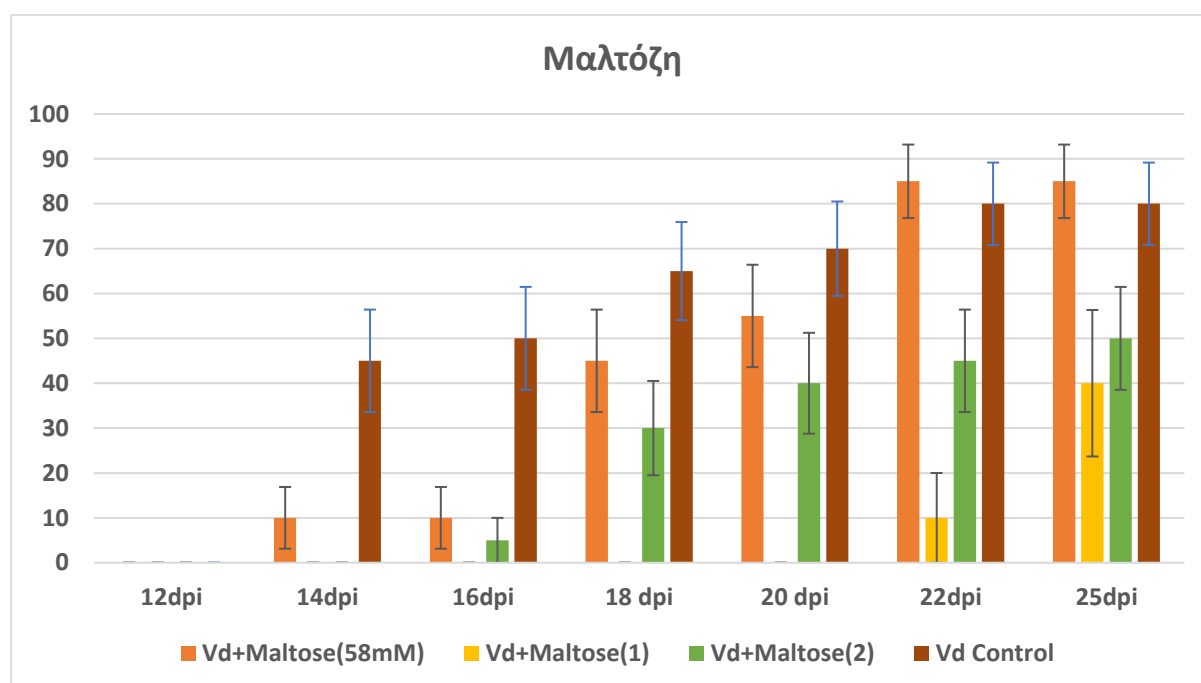
Vd+Maltose(2). Στην προτελευταία μέτρηση, την εικοστή δεύτερη ημέρα μετά τη μόλυνση εμφανίζονται τα πρώτα ασθενή φυτά στην εφαρμογή *Vd*+Maltose(1) έχοντας στατιστικά σημαντική διαφορά σε σχέση με τον μάρτυρα και φυσικά τις υπόλοιπες εφαρμογές παρουσιάζοντας πολύ μικρότερο ποσοστό ασθενών φυτών. Στην τελευταία μέτρηση, την εικοστή πέμπτη ημέρα το ποσοστό των ασθενών φυτών της εφαρμογής *Vd*+Maltose(1) αυξάνεται αλλά είναι μικρότερο σε σχέση με τον μάρτυρα και με στατιστικά σημαντική διαφορά.



Γράφημα 2.A : Απεικονίζεται η συχνότητα εμφάνισης της ασθένειας στα φυτά όπου έγινε προσθήκη στο εδαφικό υπόστρωμα μονοσακχαριτών και δισακχαριτών με ριζοπότισμα σε σχέση με τον μολυσμένο μάρτυρα.

Στο γράφημα 2.B απεικονίζεται η συχνότητα εμφάνισης της ασθένειας στα φυτά όπου έγινε προσθήκη στο εδαφικό υπόστρωμα μαλτόζης σε διαφορετικές συγκεντρώσεις. Παρατηρούμε ότι το μεγαλύτερο ποσοστό ασθενών φυτών παρουσιάστηκε στην εφαρμογή *Vd*+Maltose(58mM) χωρίς να εμφανίζει στατιστικά

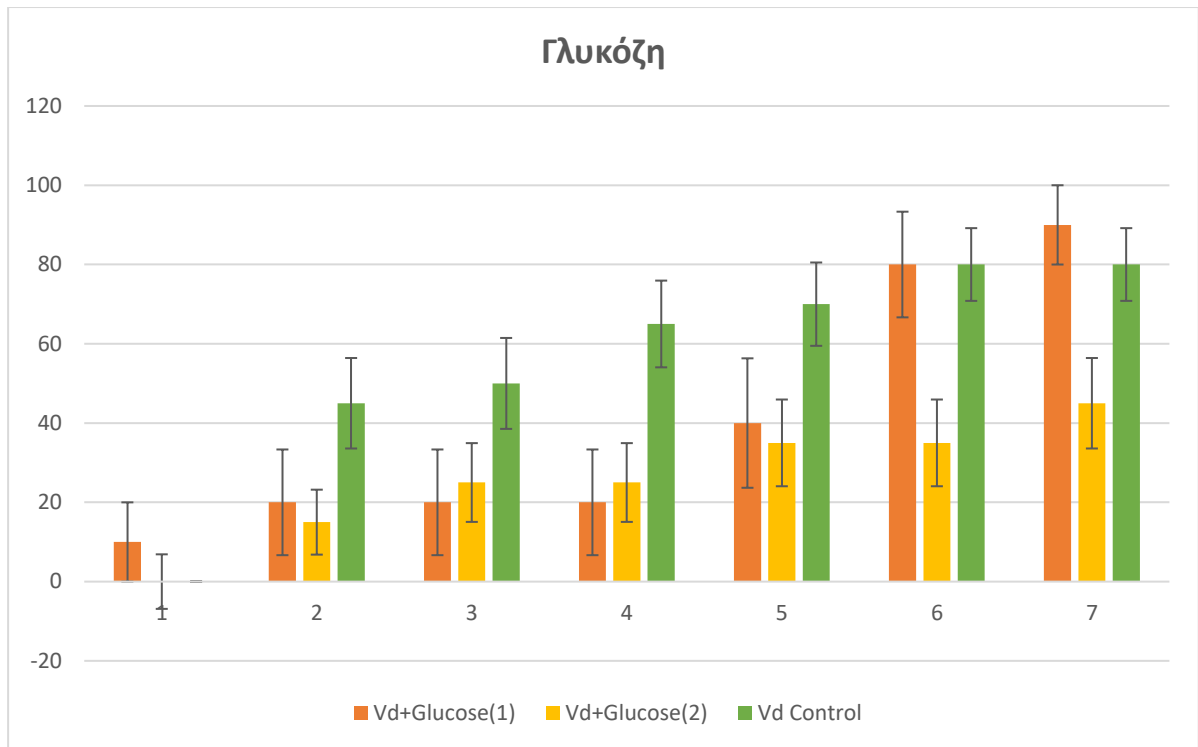
σημαντική διαφορά σε σχέση με το μάρτυρα. Μετά ακολουθεί η εφαρμογή *Vd+Maltose(2)* όπου τα πρώτα φυτά με συμπτώματα παρατηρούνται την δέκατη έκτη ημέρα και παρουσιάζουν έπειτα μια αύξηση στον αριθμό τους την δέκατη όγδοη ημέρα, όπου παραμένει σχετικά σταθερός μέχρι την τελευταία παρατήρηση και είναι σαφώς μειωμένος σε σχέση με την εφαρμογή *Vd+Maltose(58mM)* αλλά και σε σχέση με τον μάρτυρα. Τέλος παρατηρούμε ότι στην εφαρμογή *Vd+Maltose(1)* τα πρώτα ασθενή φυτά παρατηρήθηκαν την εικοστή δεύτερη μέρα και παρουσίασαν μια αύξηση στον αριθμό τους στην τελευταία παρατήρηση αλλά σαφώς μικρότερη σε σχέση με τις άλλες εφαρμογές αλλά και σε σχέση με τον μάρτυρα.



Γράφημα 2.Β : Απεικονίζεται η συχνότητα εμφάνισης της ασθένειας στα φυτά όπου έγινε προσθήκη στο εδαφικό υπόστρωμα μαλτόζης με ριζοπότισμα, σε σχέση με τον μολυσμένο μάρτυρα.

Στο γράφημα 2.Γ απεικονίζεται η συχνότητα εμφάνισης της ασθένειας στα φυτά όπου έγινε προσθήκη στο εδαφικό υπόστρωμα γλυκόζης σε διαφορετικές συγκεντρώσεις. Παρατηρούμε ότι στην πρώτη παρατήρηση, δηλαδή την δωδέκατη ημέρα μόνο τα φυτά της εφαρμογής *Vd+Glucose(1)* παρουσίασαν συμπτώματα. Στην δεύτερη παρατήρηση την δέκατη τέταρτη ημέρα οι εφαρμογές *Vd+Glucose(1)* και

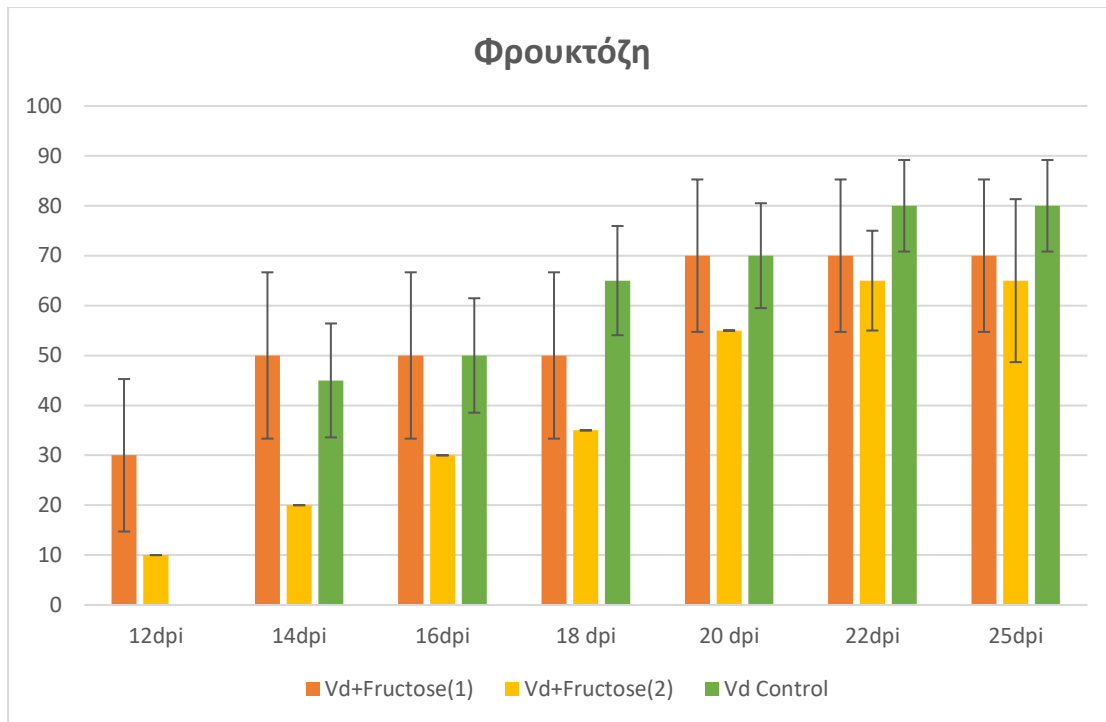
Vd+Glucose(2) δεν είχαν στατιστικά σημαντική διαφορά μεταξύ τους στο βαθμό συμπτωμάτων, αλλά παρουσίασαν και οι δύο εφαρμογές λιγότερα συμπτώματα με στατιστικά σημαντική διαφορά σε σχέση με τον μάρτυρα. Στη συνέχεια στις δύο επόμενες παρατηρήσεις που πραγματοποιήθηκαν την δέκατη έκτη και δέκατη όγδοη ημέρα παρατηρείται η ίδια εικόνα με την δέκατη τέταρτη ημέρα, δηλαδή στις δύο επεμβάσεις με γλυκόζη δεν παρατηρείται αύξηση του αριθμού των φυτών που νοσούν. Αντιθέτως παρατηρούμε μια μικρή αύξηση των ασθενών φυτών στον μολυσμένο μάρτυρα. Έπειτα στην παρατήρηση που πραγματοποιήθηκε την εικοστή ημέρα παρατηρείται αύξηση των φυτών με συμπτώματα και στις δύο εφαρμογές όπου έχει γίνει ριζοπότισμα με γλυκόζη, χωρίς να έχουν όμως στατιστικά σημαντική διαφορά μεταξύ τους, αλλά ο αριθμός αυτός είναι μικρότερος με διαφορά στατιστικώς σημαντική σε σχέση με τον μάρτυρα. Στη συνέχεια την εικοστή δεύτερη ημέρα παρατηρείται μια αλματώδης αύξηση των φυτών που παρουσιάζουν συμπτώματα στην εφαρμογή *Vd+Glucose(1)* όπου δεν παρουσιάζει στατιστικά σημαντική διαφορά πλέον σε σχέση με τον μάρτυρα. Αντιθέτως η εφαρμογή *Vd+Glucose(2)* παραμένει στα ίδια επίπεδα σε σχέση με την παρατήρηση της εικοστής ημέρας, ενώ ταυτοχρόνως παρατηρείται μια μικρή αύξηση του αριθμού φυτών που παρουσιάζουν συμπτώματα στον μάρτυρα. Τέλος στην εικοστή Πέμπτη ημέρα ο αριθμός των φυτών που παρουσιάζουν συμπτώματα αυξάνεται στην εφαρμογή *Vd+Glucose(1)* αλλά χωρίς να διαφέρει στατιστικώς σε σχέση με τον μάρτυρα. Αντίθετα η εφαρμογή *Vd+Glucose(2)* αυξήθηκε ελάχιστα σε σχέση με την προηγούμενη παρατήρηση και συνολικά εμφάνισε λιγότερα ασθενή φυτά σε σχέση με τον μάρτυρα αλλά και σε σχέση με την εφαρμογή *Vd+Glucose(1)* με διαφορά όμως στατιστικώς σημαντική.



Γράφημα 2.Γ : Απεικονίζεται η συχνότητα εμφάνισης της ασθένειας στα φυτά όπου έγινε προσθήκη στο εδαφικό υπόστρωμα γλυκόζης με ριζοπότισμα, σε σχέση με τον μολυσμένο μάρτυρα.

Στο γράφημα 2.Δ απεικονίζεται η συχνότητα εμφάνισης της ασθένειας στα φυτά όπου έγινε προσθήκη στο εδαφικό υπόστρωμα φρουκτόζης σε διαφορετικές συγκεντρώσεις. Στην πρώτη παρατήρηση που πραγματοποιήθηκε, την δωδέκατη ημέρα παρατηρήθηκαν ασθενή φυτά και στις δύο εφαρμογές με φρουκτόζη, δηλαδή στις εφαρμογές *Vd+Fructose(1)* και *Vd+Fructose(2)* με περισσότερα ασθενή φυτά στην εφαρμογή *Vd+Fructose(1)* με στατιστικά σημαντική διαφορά σε σχέση με την εφαρμογή *Vd+Fructose(2)*. Κατά την δέκατη τέταρτη ημέρα φαίνεται να υπάρχει μια αύξηση του αριθμού των φυτών που παρουσιάζουν συμπτώματα της ασθένειας στην εφαρμογή *Vd+Fructose(1)* αλλά και στον μάρτυρα χωρίς όμως να έχουν στατιστικά σημαντική διαφορά μεταξύ τους. Αντιθέτως στην εφαρμογή *Vd+Fructose(2)* το ποσοστό των ασθενών φυτών παραμένει χαμηλότερο σε σχέση με την εφαρμογή *Vd+Fructose(1)* αλλά και σε σχέση με τον μάρτυρα με στατιστικά σημαντική διαφορά,

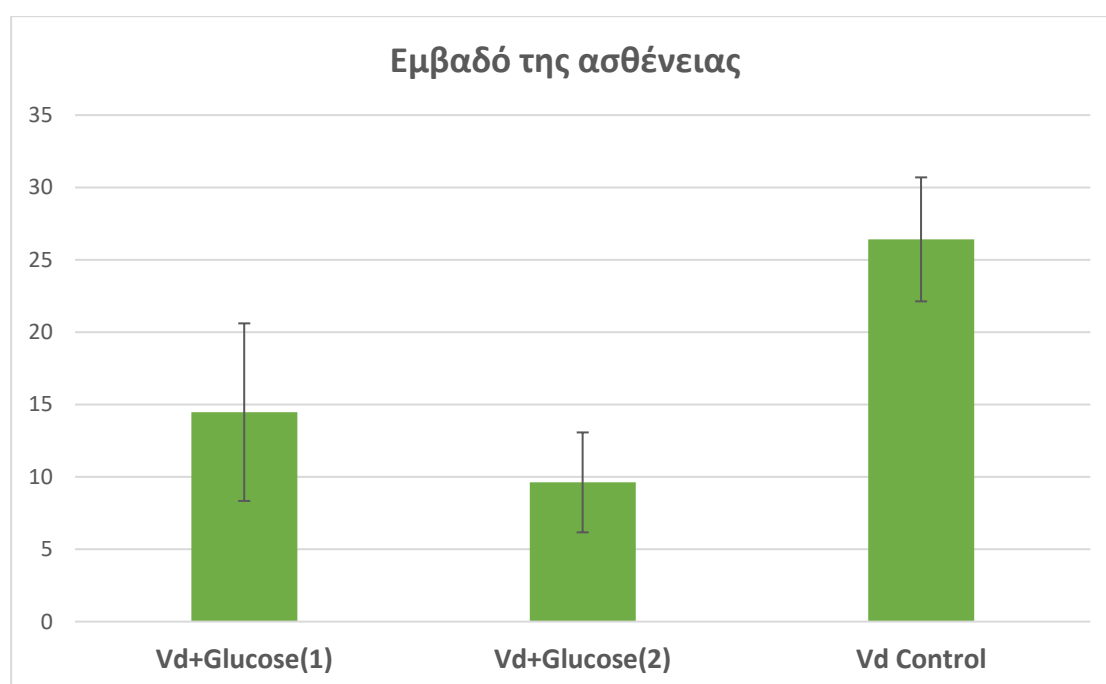
αν και εμφανίζεται αυξημένο σε σχέση με την παρατήρηση της δωδέκατης ημέρας. Στην παρατήρηση τις δέκατης έκτης ημέρας παρατηρείται μια μικρή αύξηση του ποσοστού των ασθενών φυτών στον μάρτυρα ενώ το ποσοστό αυτό παραμένει σταθερό στην εφαρμογή *Vd+Fructose(1)* σε σχέση με την προηγούμενη παρατήρηση της δέκατης τέταρτης ημέρας. Παρόλα αυτά δεν παρατηρείται στατιστικά σημαντική διαφορά μεταξύ της εφαρμογής *Vd+Fructose(1)* και του μάρτυρα. Στην εφαρμογή *Vd+Fructose(2)* το ποσοστό ασθενών φυτών παραμένει χαμηλότερο σε σχέση με τις άλλες δύο εφαρμογές με στατιστικά σημαντική διαφορά και ελάχιστα αυξημένο σε σχέση με την προηγούμενη παρατήρηση. Κατά την παρατήρηση της εικοστής ημέρας παρατηρείται μια αυξητική τάση του ποσοστού αυτού και στις 3 εφαρμογές. Πιο συγκεκριμένα η εφαρμογή *Vd+Fructose(1)* δεν διαφέρει στατιστικά σε σχέση με τον μάρτυρα ενώ στην εφαρμογή *Vd+Fructose(2)* το ποσοστό αυτό είναι χαμηλότερο με στατιστικά σημαντική διαφορά. Τέλος στην παρατήρηση της εικοστής δεύτερης ημέρας έχουμε αύξηση του ποσοστού των ασθενών φυτών στο μάρτυρα αλλά και στην εφαρμογή *Vd+Fructose(2)* ενώ το ποσοστό αυτό παραμένει σταθερό στα φυτά της εφαρμογής *Vd+Fructose(1)* σε σχέση με την προηγούμενη παρατήρηση. Και οι τρεις εφαρμογές ωστόσο δεν φαίνεται να έχουν στατιστικά σημαντική διαφορά μεταξύ τους, ενώ η ίδια εικόνα παρατηρείται και στην τελευταία μέτρηση την εικοστή πέμπτη ημέρα.



Γράφημα 2.Δ : Απεικονίζεται η συχνότητα εμφάνισης της ασθένειας στα φυτά όπου έγινε προσθήκη στο εδαφικό υπόστρωμα φρουκτόζης με ριζοπότισμα, σε σχέση με τον μολυσμένο μάρτυρα.

Στο γράφημα 3.Α, 3.Β, 3.Γ έχει υπολογιστεί η σχετική τιμή του εμβαδού ασθενείας Relative AUDPC (η τιμή του εμβαδού ασθενείας εκφρασμένη ως ποσοστό του μέγιστου δυνατού εμβαδού ασθενείας για όλη τη χρονική περίοδο των παρατηρήσεων) ώστε να δοθεί μια εικόνα του ποσού της ασθενείας στην καθεμία επέμβαση αλλά και για την επίδραση της προσθήκης σακχάρων. Στο γράφημα 3.Α απεικονίζεται το σχετικό εμβαδό της ασθενείας του ποσοστού των ασθενών φύλλων στα φυτά όπου πραγματοποιήθηκε ριζοπότισμα με γλυκόζη σε δύο χρονικές στιγμές, όπου διακρίνεται ότι η προσθήκη γλυκόζης παρείχε προστασία ως ένα βαθμό σε σχέση με τον μάρτυρα έχοντας στατιστικά σημαντική διαφορά μεταξύ τους. Αντιθέτως μεταξύ των δύο εφαρμογών όπου έγινε προσθήκη γλυκόζης δεν φαίνεται να υπάρχει διαφορά στατιστικώς σημαντική και έτσι συμπεραίνουμε ότι η προσθήκη γλυκόζης εκ νέου δεν εμπόδισε περαιτέρω την εκδήλωση των συμπτωμάτων της ασθενείας. Στο γράφημα 3.Β απεικονίζεται το σχετικό εμβαδό της ασθενείας του ποσοστού των ασθενών φύλλων στα φυτά όπου πραγματοποιήθηκε ριζοπότισμα με φρουκτόζη σε δύο χρονικές στιγμές. Παρατηρούμε ότι στα φυτά όπου πραγματοποιήθηκε μια φορά

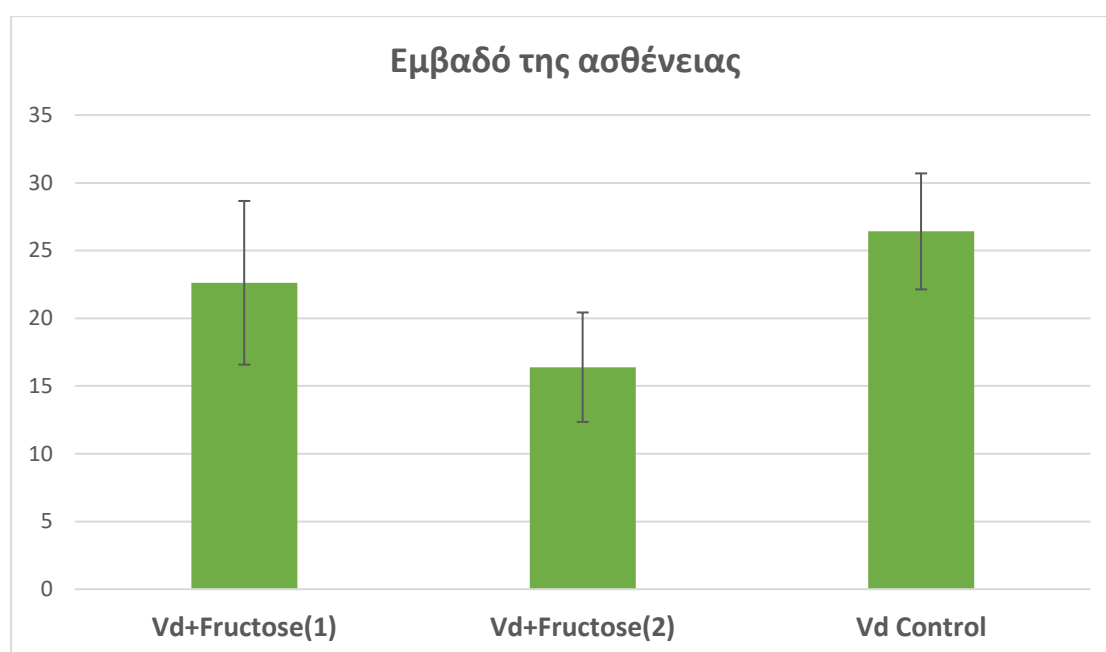
προσθήκη φρουκτόζης το σχετικό εμβαδό της ασθένειας ήταν σχετικά χαμηλότερο σε σχέση με τον μάρτυρα αλλά χωρίς να εμφανίζουν βέβαια στατιστικά σημαντική διαφορά. Ομοίως η εφαρμογή όπου πραγματοποιήθηκε ριζοπότισμα με φρουκτόζη σε δύο χρονικές στιγμές φάνηκε να εμφανίζει μικρότερη ένταση και συχνότητα συμπτωμάτων σε σχέση με την εφαρμογή *Vd+Fructose(1)* χωρίς όμως και πάλι να εμφανίζουν στατιστικά σημαντική διαφορά μεταξύ τους.



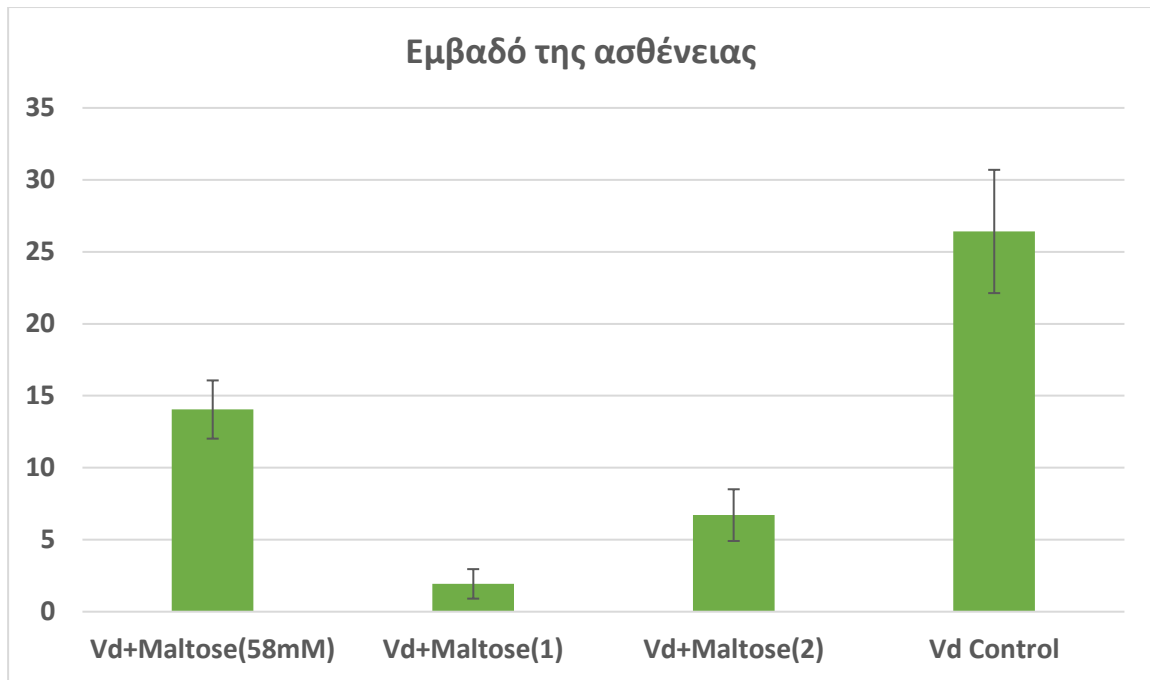
Γράφημα 3.Α : Απεικονίζεται το σχετικό εμβαδό της ασθένειας στα φυτά όπου έγινε προσθήκη στο εδαφικό υπόστρωμα γλυκόζης με ριζοπότισμα σε δύο χρονικές στιγμές, σε σχέση με τον μολυσμένο μάρτυρα.

Τέλος στο γράφημα 3.Γ βλέπουμε το σχετικό εμβαδό της ασθένειας στα φυτά όπου έγινε προσθήκη μαλτόζης με ριζοπότισμα σε δύο χρονικές στιγμές αλλά και σε φυτά όπου έγινε ριζοπότισμα με διάλυμα μαλτόζης σε χαμηλότερη συγκέντρωση και συγκεκριμένα με διάλυμα μαλτόζης 58mM. Παρατηρούμε ότι η προσθήκη μαλτόζης στο έδαφος παρεμποδίζει με κάποιο τρόπο την εκδήλωση της ασθένειας σε σχέση με τον μάρτυρα. Πιο συγκεκριμένα η εφαρμογή *Vd+Maltose(1)* εμφάνισε το μικρότερο σχετικό εμβαδό της ασθένειας σε σχέση με τις υπόλοιπες εφαρμογές με μαλτόζη αλλά

και σε σχέση με τον μάρτυρα και με στατιστικά σημαντική διαφορά. Έπειτα ακολούθησε η εφαρμογή με τα φυτά όπου η προσθήκη μαλτόζης έγινε σε δύο χρονικές στιγμές όπου το εμβαδό της ασθένειας ήταν αρκετά μικρότερο από το εμβαδό της εφαρμογής Vd+Maltose(58mM) αλλά και σχέση με το μάρτυρα με στατιστικά σημαντική διαφορά. Τέλος η εφαρμογή Vd+Maltose(58mM) αν και εμφάνιζε το υψηλότερα ποσοστό έντασης αλλά και συχνότητας των συμπτωμάτων της ασθένειας σε σχέση με τις άλλες δύο εφαρμογές με μαλτόζη, εντούτοις είχε μικρότερο ποσοστό εμβαδού της ασθένειας σε σχέση με τον μάρτυρα με διαφορά στατιστικώς σημαντική.



Γράφημα 3.Β : Απεικονίζεται το σχετικό εμβαδό της ασθένειας στα φυτά όπου έγινε προσθήκη στο εδαφικό υπόστρωμα φρουκτόζης με ριζοπότισμα σε δύο χρονικές στιγμές, σε σχέση με τον μολυσμένο μάρτυρα.

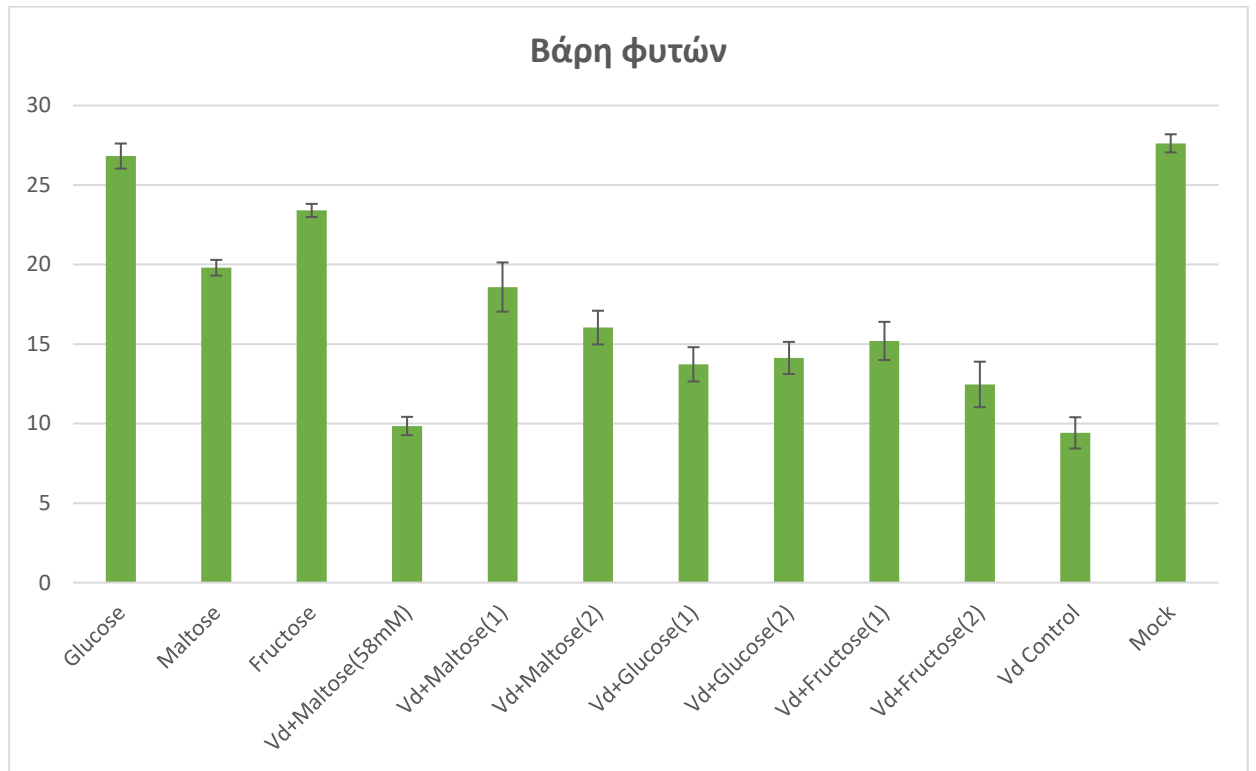


Γράφημα 3.Γ : Απεικονίζεται το σχετικό εμβαδό της ασθένειας στα φυτά όπου έγινε προσθήκη στο εδαφικό υπόστρωμα μαλτόζης με ριζοπότισμα σε δύο χρονικές στιγμές, αλλά και σε φυτά όπου πραγματοποιήθηκε προσθήκη μαλτόζης σε χαμηλότερη συγκέντρωση σε σχέση με τον μολυσμένο μάρτυρα.

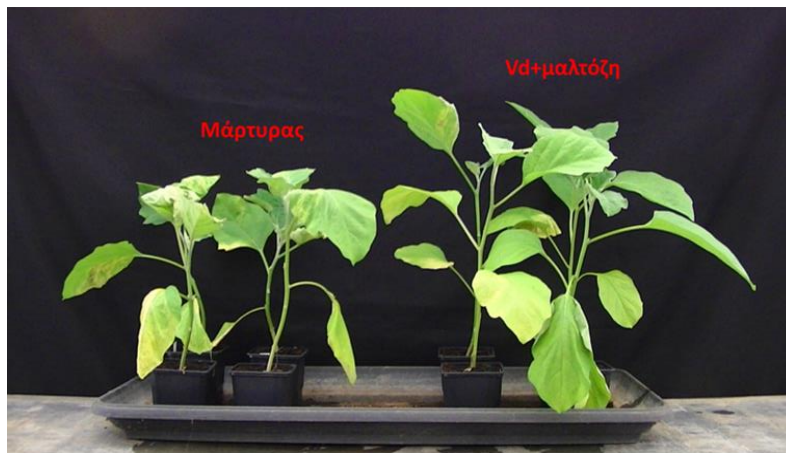
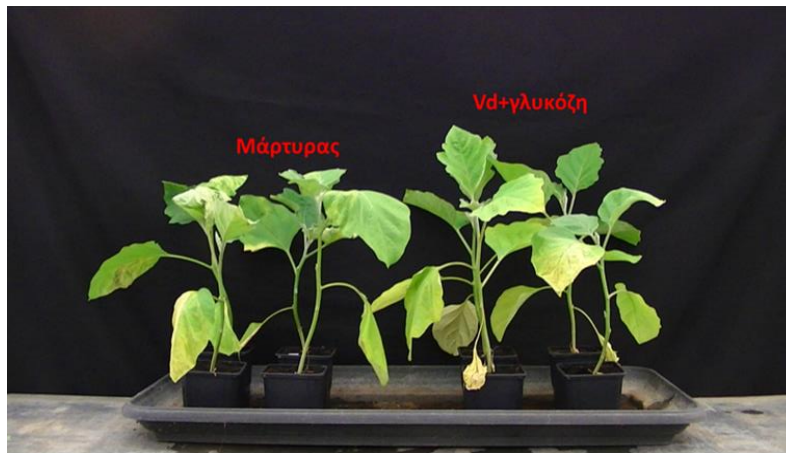
4.2 Μέτρηση νωπού βάρους φυτών της κάθε επέμβασης

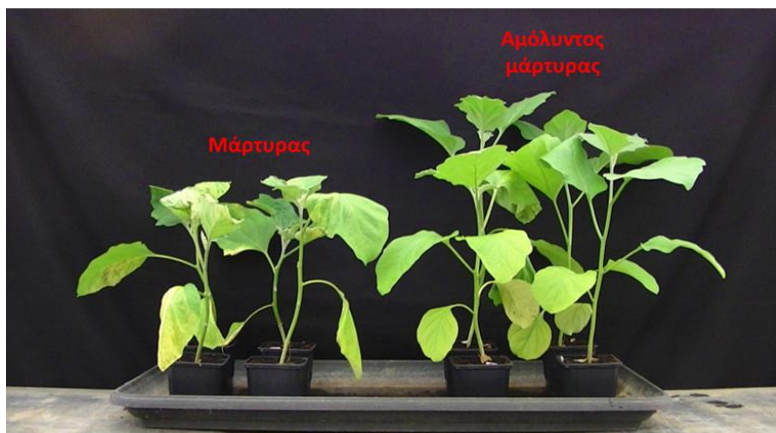
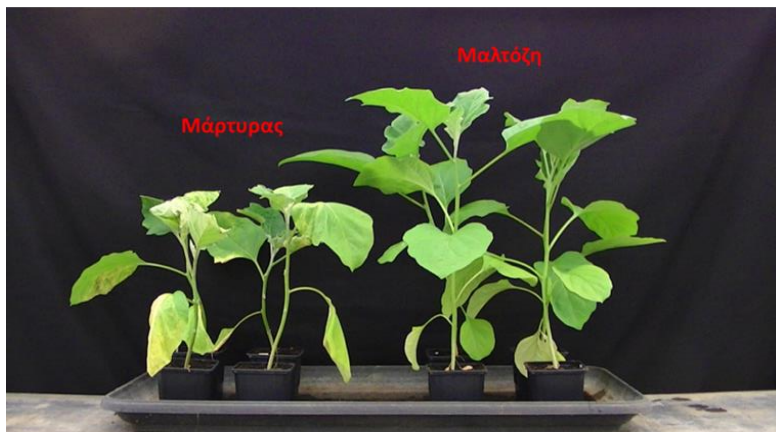
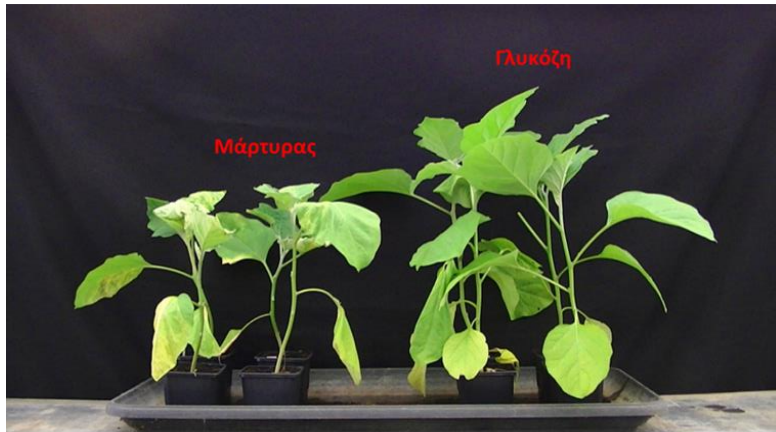
Μετά το τέλος της καταμέτρησης των συμπτωμάτων έγινε παραλαβή του υπέργειου μέρους (βλαστός και φύλλα) 30 φυτών και βρέθηκε το μέσο νωπό βάρος κάθε φυτού ανά επέμβαση. Στο γράφημα 4.Α βλέπουμε τη συγκριτική απεικόνιση του μέσου νωπού βάρους των φυτών ανά επέμβαση. Παρατηρούμε ότι το μεγαλύτερο μέσο νωπό βάρος το παρουσιάζει ο αμόλυντος μάρτυρας και ακολουθούν τα φυτά της εφαρμογής με γλυκόζη και φρουκτόζη. Έπειτα ακολουθεί η εφαρμογή με τα μολυσμένα φυτά όπου είχε γίνει μια φορά ριζοπότισμα με μαλτόζη (Vd+Maltose1) και ο μάρτυρας με μαλτόζη, όπου μεταξύ αυτών των δύο εφαρμογών δεν υπάρχει στατιστικά σημαντική διαφορά. Στη συνέχεια έχουμε τις τέσσερις εφαρμογές των μολυσμένων φυτών όπου είχε γίνει εφαρμογή γλυκόζης και φρουκτόζης και παρατηρούμε ότι δεν υπάρχει στατιστικά σημαντική διαφορά που να υποδεικνύει

διαφορά στα βάρη τους. Τέλος το μικρότερο μέσο νωπό βάρος το εμφάνισε ο μολυσμένος μάρτυρας μαζί με την εφαρμογή *Vd*+Maltose(58mM) χωρίς να έχουν στατιστικά σημαντική διαφορά μεταξύ τους.



Γράφημα 4.A : Συγκριτική απεικόνιση του μέσου νωπού βάρους ανά επέμβαση





Εικόνα: Συμπτωματολογική εικόνα των φυτών των διαφόρων επεμβάσεων σε σχέση με τον μάρτυρα.

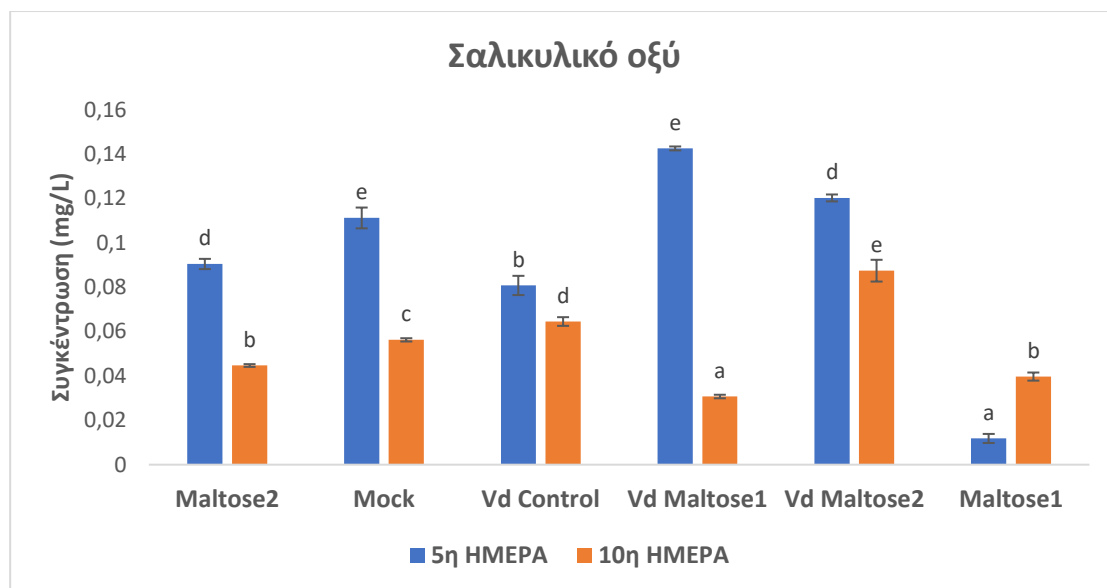
4.3 Μέτρηση του επιπέδου έκφρασης του σαλικυλικού οξέος και του ιασμονικού οξέος στα φυτά όπου πραγματοποιήθηκε ριζοπότισμα με μαλτόζη κατά την αλληλεπίδραση με τον παθογόνο μύκητα *Verticillium dahliae*

Προκειμένου να διαπιστωθεί ποια βιοχημικά μονοπάτια, που σχετίζονται με την άμυνα των φυτών, ενεργοποιούνται κατά την αλληλεπίδραση του μύκητα *V. dahliae* με τα φυτά όπου έχει γίνει ριζοπότισμα με μαλτόζη, πραγματοποιήθηκε συλλογή του υπέργειου μέρους των φυτών την πέμπτη και την δέκατη ημέρα μετά τη μόλυνση. Έπειτα ακολούθησε ψύξη των φυτικών ιστών στους -20°C , λυοφιλίωση, εκχύλιση με διαλύτη MeOH και ποσοτικοποίηση του επιπέδου έκφρασης των φυτοορμονών με χρωματογραφική ανάλυση UHPLC – HRMS/MS.

Επίσης παρασκευαστήκαν πρότυπα διαλύματα συγκέντρωσης 1000 ppm σε MeOH και αποθηκεύτηκαν στους -20°C . Από αυτά παρασκευάστηκαν με αραιώση σε MeOH τα πρότυπα διαλύματα εργασίας για την κατασκευή κατάλληλης καμπύλης αναφοράς στο LC-HRMS. Για το σαλικυλικό οξύ κατασκευάστηκε καμπύλη αναφοράς από 0,01- 0,1 ppm ενώ για την κατασκευή καμπύλης ιασμονικού οξέος από 0,01-0,5 ppm. Ο ταυτόχρονος προσδιορισμός του σαλικυλικού και του ιασμονικού οξέος στον αρνητικό ιοντισμό με την τεχνική ESI, βασίστηκε στο χρόνο έκλουσης με τη χρήση προτύπων ενόσεων, την ακριβή μάζα των ιόντων $[\text{M}+\text{H}]^{-}$ και τα φάσματα μάζας τους. Τα χαρακτηριστικά ιόντα, το σφάλμα μάζας και η ένταση της κορυφής στον αρνητικό ESI ιοντισμό απεικονίζονται στο πίνακα Α.1.

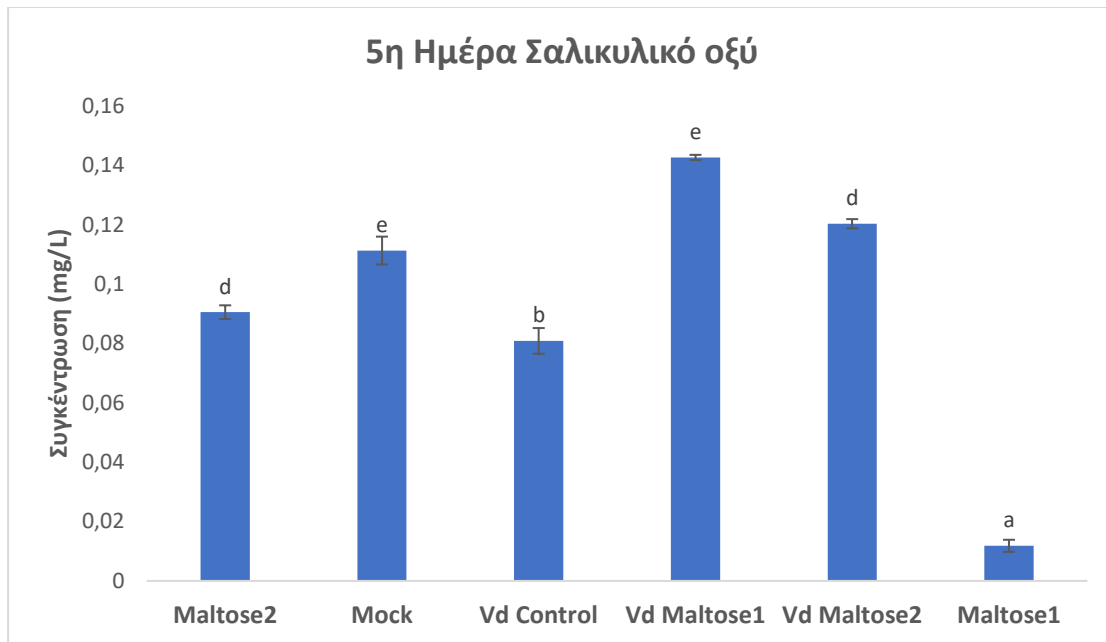
Ενώσεις	Χρόνος ανίχνευσης (retention time)	Θεωρητική μάζα (m/z) $[\text{M}+\text{H}]^{-}$	Παρατηρούμενη μάζα (m/z) $[\text{M}+\text{H}]^{-}$	Σφάλμα μάζας (ppm)	Ένταση κορυφής $[\text{M}+\text{H}]^{-}$	Κύρια θραύσματα (m/z)
Σαλικυλικό	9.91 min	137,0244	137,0245	0,7	1×10^2	93,0345
Ιασμονικό	10.49 min	209,1183	209,1185	0,9	1×10^2	59,0140

Πίνακας Α.1. Χαρακτηριστικά ιόντα, σφάλμα μάζας, ένταση κορυφής στον αρνητικό ESI ιοντισμό.



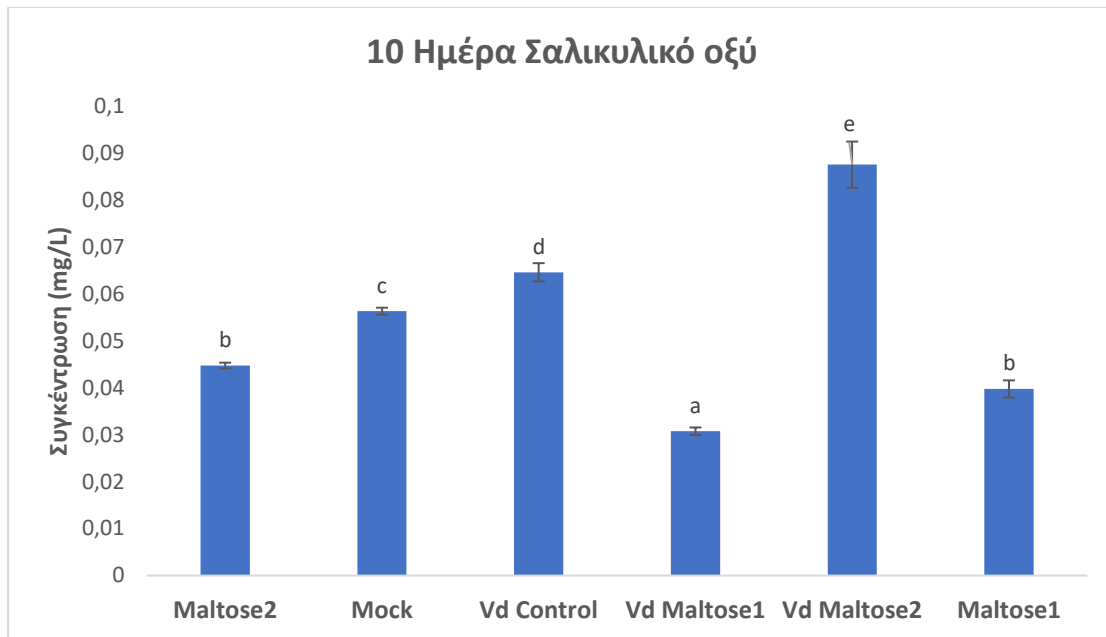
Γράφημα 4.Β : Συγκριτική απεικόνιση του σαλικυλικού οξέος ποσοτικά στις διάφορες επεμβάσεις την πέμπτη και την δέκατη ημέρα μετά τη μόλυνση.

Στο γράφημα 4.Β παρουσιάζονται τα αποτελέσματα της ποσοτικοποίησης του σαλικυλικού οξέος στις διάφορες επεμβάσεις την πέμπτη και την δέκατη ημέρα μετά τη μόλυνση, σε σχέση με τον μολυσμένο (*Vd control*) και τον αμόλυντο μάρτυρα (*Mock*). Παρατηρούμε ότι στην εφαρμογή όπου η προσθήκη μαλτόζης έγινε σε δύο χρονικές στιγμές (*Maltose2*), την πέμπτη ημέρα η ποσότητα του σαλικυλικού οξέος ήταν σημαντικά αυξημένη σε σχέση με την δέκατη ημέρα όπου εμφάνισε μείωση. Η ίδια εικόνα παρατηρείται στον αμόλυντο (*Mock*) και μολυσμένο μάρτυρα (*Vd control*), δηλαδή μεγαλύτερη συγκέντρωση ποσοτικά του σαλικυλικού οξέος την πέμπτη σε σχέση με την δέκατη ημέρα. Στα φυτά της εφαρμογής *Vd+Maltose(1)* παρατηρείται αρκετά μεγάλη συγκέντρωση σαλικυλικού οξέος την πέμπτη ημέρα σε σχέση με τις άλλες εφαρμογές, ενώ την δέκατη ημέρα η ποσότητα αυτή εμφανίζεται αρκετά μειωμένη σε σχέση με την πέμπτη ημέρα. Επίσης μεγάλη συγκέντρωση σαλικυλικού οξέος παρατηρείται στα φυτά της εφαρμογής *Vd+Maltose(2)* την πέμπτη ημέρα σε σχέση με την δέκατη ημέρα από τη μόλυνση. Τέλος αρκετά μικρή συγκέντρωση σαλικυλικού οξέος παρατηρείται στα φυτά όπου η προσθήκη μαλτόζης πραγματοποιήθηκε μία φορά (*Maltose1*) την πέμπτη ημέρα, ενώ την δέκατη ημέρα παρατηρείται μια αυξητική τάση στη συγκέντρωση του σαλικυλικού οξέος.



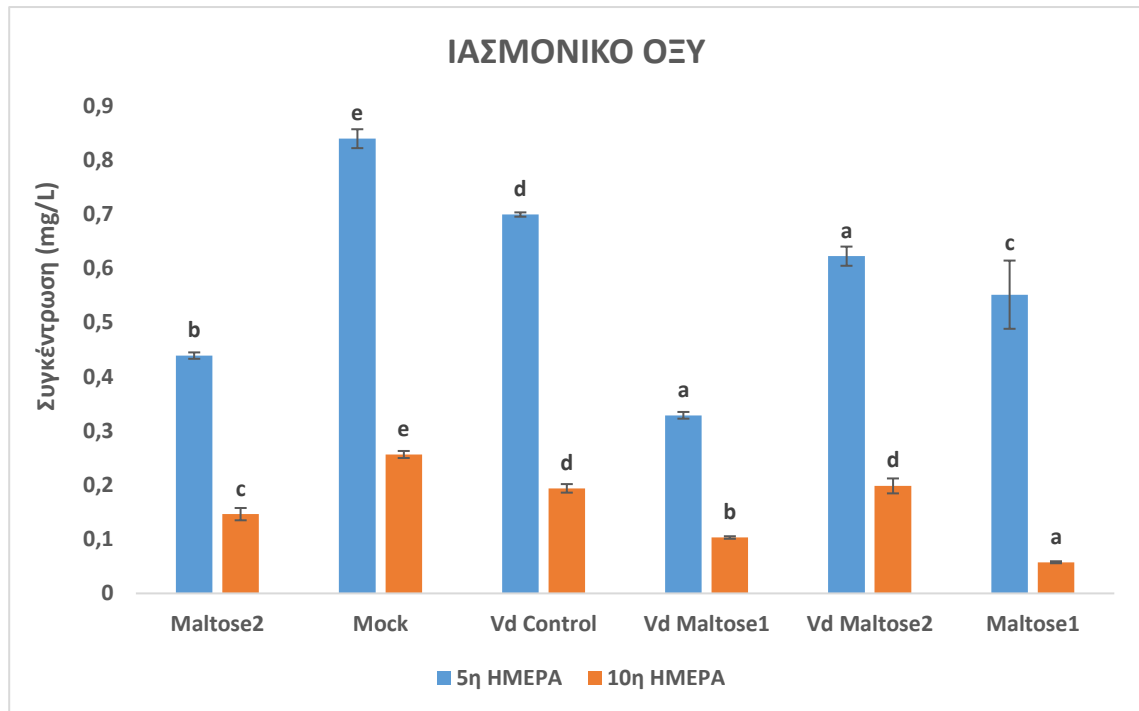
Γράφημα 4.Γ : Συγκριτική απεικόνιση του σαλικυλικού οξέος ποσοτικά στις διάφορες επεμβάσεις την πέμπτη ημέρα μετά τη μόλυνση.

Στο γράφημα 4.Γ παρουσιάζονται τα αποτελέσματα της ποσοτικοποίησης του σαλικυλικού οξέος στις διάφορες επεμβάσεις την πέμπτη ημέρα μετά τη μόλυνση, σε σχέση με τον μολυσμένο (*Vd control*) και τον αμόλυντο μάρτυρα (*Mock*). Η μεγαλύτερη συγκέντρωση ποσοτικά σαλικυλικού οξέος παρατηρείται στην εφαρμογή *Vd+Maltose(1)* με στατιστικά σημαντική διαφορά σε σχέση με τις υπόλοιπες επεμβάσεις αλλά και με τον μολυσμένο (*Vd control*) και αμόλυντο μάρτυρα (*Mock*). Έπειτα ακολουθεί η εφαρμογή *Vd+Maltose(2)* όπου η συγκέντρωση σαλικυλικού οξέος είναι μικρότερη σε σχέση με την εφαρμογή *Vd+Maltose(1)*, αλλά μεγαλύτερη σε σχέση με τους μάρτυρες εμφανίζοντας στατιστικά σημαντική διαφορά. Στην εφαρμογή όπου έγινε προσθήκη μαλτόζης σε δύο χρονικές στιγμές (*Maltose2*) η συγκέντρωση του σαλικυλικού οξέος εμφανίζεται μικρότερη ποσοτικά από τις εφαρμογές *Vd+Maltose(1)* και *Vd+Maltose(2)*, αλλά και σε σχέση με τον μολυσμένο (*Vd control*) και τον αμόλυντο μάρτυρα (*Mock*) με στατιστικά σημαντική διαφορά. Τέλος τη μικρότερη συγκέντρωση σαλικυλικού οξέος ποσοτικά εμφανίζει η εφαρμογή *Maltose(1)* παρουσιάζοντας στατιστικά σημαντική διαφορά σε σχέση με τις υπόλοιπες επεμβάσεις.



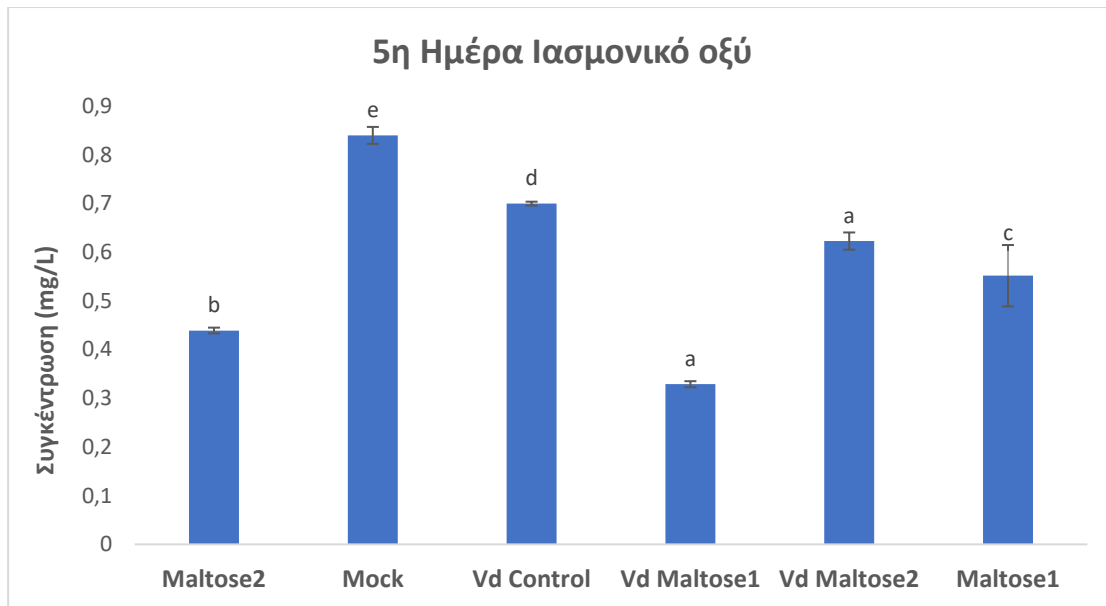
Γράφημα 4.Δ : Συγκριτική απεικόνιση του σαλικυλικού οξέος ποσοτικά στις διάφορες επεμβάσεις την δέκατη ημέρα μετά τη μόλυνση.

Στο γράφημα 4.Δ παρουσιάζονται τα αποτελέσματα της ποσοτικοποίησης του σαλικυλικού οξέος στις διάφορες επεμβάσεις την πέμπτη ημέρα μετά τη μόλυνση, σε σχέση με τον μολυσμένο (*Vd control*) και τον αμόλυντο μάρτυρα (*Mock*). Παρατηρούμαι ότι τη δέκατη ημέρα η μεγαλύτερη συγκέντρωση σαλικυλικού οξέος εμφανίζεται στην εφαρμογή *Vd+Maltose(2)* με στατιστικά σημαντική διαφορά σε σχέση με τις υπόλοιπες επεμβάσεις αλλά και τους μάρτυρες. Αξιοσημείωτο είναι ότι η μικρότερη συγκέντρωση σαλικυλικού οξέος την δέκατη ημέρα εμφανίζει η εφαρμογή *Vd+Maltose(1)*. Έπειτα μεγαλύτερη συγκέντρωση σαλικυλικού οξέος εμφανίζει ο μολυσμένος μάρτυρας (*Vd control*) και ακολουθεί ο αμόλυντος μάρτυρας (*Mock*) όπου οι διαφορές μεταξύ αυτών των εφαρμογών εμφανίζουν στατιστικά σημαντική διαφορά. Τέλος παρατηρούμε μία αύξηση στη συγκέντρωση του σαλικυλικού οξέος στην εφαρμογή *Maltose(1)* σε σχέση με την πέμπτη ημέρα ενώ μείωση σε σχέση με την πέμπτη ημέρα εμφανίζει η εφαρμογή *Maltose(2)*. Μεταξύ όμως των δύο αυτών εφαρμογών δεν παρουσιάζεται στατιστικά σημαντική διαφορά στη συγκέντρωση του σαλικυλικού οξέος την δέκατη ημέρα.



Γράφημα 4.Ε : Συγκριτική απεικόνιση του ιασμονικού οξέος ποσοτικά στις διάφορες επεμβάσεις την πέμπτη και την δέκατη ημέρα μετά τη μόλυνση.

Στο γράφημα 4.Ε παρουσιάζονται τα αποτελέσματα της ποσοτικοποίησης του ιασμονικού οξέος στις διάφορες επεμβάσεις την πέμπτη και την δέκατη ημέρα μετά τη μόλυνση, σε σχέση με τον μολυσμένο (*Vd control*) και τον αμόλυντο μάρτυρα (*Mock*). Γενικά την πέμπτη ημέρα η συγκέντρωση του ιασμονικού οξέος ποσοτικά ήταν εμφανώς μεγαλύτερη σε σχέση με την δέκατη ημέρα εμφανίζοντας και στατιστικά σημαντική διαφορά. Την πιο αυξημένη συγκέντρωση σε ιασμονικό οξύ την πέμπτη ημέρα εμφάνισε ο αμόλυντος μάρτυρας (*Mock*) και ακολουθούσε ο μολυσμένος μάρτυρας (*Vd Control*).

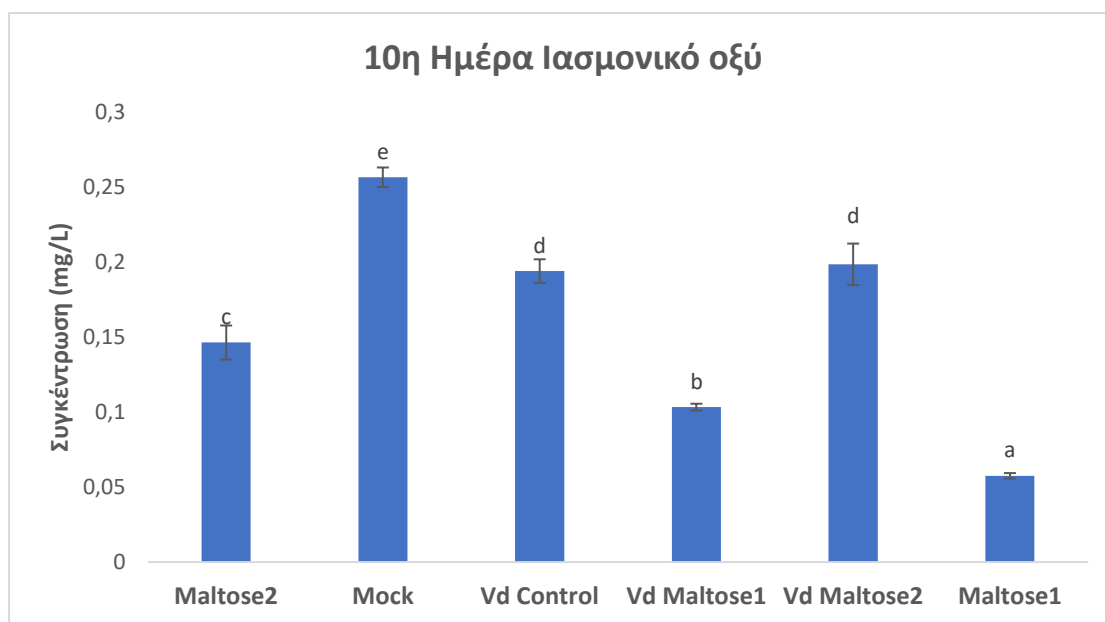


Γράφημα 4.Z : Συγκριτική απεικόνιση του ιασμονικού οξέος ποσοτικά στις διάφορες επεμβάσεις την πέμπτη ημέρα μετά τη μόλυνση.

Πιο αναλυτικά στο γράφημα 4.Z βλέπουμε τα αποτελέσματα της ποσοτικοποίησης του ιασμονικού οξέος την πέμπτη ημέρα. Όπως ειπώθηκε και παραπάνω η μεγαλύτερη συγκέντρωση ιασμονικού οξέος ποσοτικά την παρουσίασαν τα φυτά του αμόλυντου μάρτυρα (Mock) και ακολουθούσαν τα φυτά του μολυσμένου μάρτυρα (Vd control), έχοντας μεταξύ τους στατιστικά σημαντική διαφορά. Έπειτα ακολουθούσε η εφαρμογή Vd+Maltose(2) όπου μαζί με την εφαρμογή Maltose(1) δεν φάνηκε να υπάρχει στατιστικά σημαντική διαφορά που να αποδεικνύει ότι υπάρχει διαφορά στη συγκέντρωση του ιασμονικού οξέος μεταξύ τους. Η συγκέντρωση του ιασμονικού οξέος στην εφαρμογή Maltose(1) ήταν μικρότερη σε σχέση με τις παραπάνω εφαρμογές έχοντας στατιστικά σημαντική διαφορά μεταξύ τους, αλλά μεγαλύτερη σε σχέση με την εφαρμογή Vd+Maltose(1) η οποία είχε τη μικρότερη συγκέντρωση ιασμονικού οξέος σε σχέση με τις υπόλοιπες εφαρμογές.

Στο γράφημα 4.H βλέπουμε τα αποτελέσματα της συγκέντρωσης του ιασμονικού οξέος ποσοτικά την δέκατη ημέρα από τη μόλυνση. Παρατηρούμε ότι τη δέκατη ημέρα η μεγαλύτερη συγκέντρωση ιασμονικού οξέος εμφανίζεται στα φυτά του αμόλυντου μάρτυρα και ακολουθούν τα φυτά του μολυσμένου μάρτυρα (Vd control)

και τα φυτά της εφαρμογής *Vd+Maltose(2)* χωρίς όμως να παρουσιάζουν στατιστικά σημαντική διαφορά μεταξύ τους.



Γράφημα 4.Η : Συγκριτική απεικόνιση του ιασμονικού οξέος ποσοτικά στις διάφορες επεμβάσεις την δέκατη ημέρα μετά τη μόλυνση.

Στη συνέχεια παρατηρούμε ότι η συγκέντρωση ιασμονικού οξέος στα φυτά της εφαρμογής *Maltose(2)* είναι μικρότερη σε σχέση με τους μάρτυρες αλλά μεγαλύτερη σε σχέση με τη συγκέντρωση ιασμονικού που παρουσιάζουν τα φυτά των εφαρμογών *Vd+Maltose(2)* και *Maltose(1)*, έχοντας στατιστικά σημαντική διαφορά σε σχέση με αυτές τις εφαρμογές. Τέλος, παρατηρούμε ότι τα φυτά της εφαρμογής *Maltose(1)* έχουν τη μικρότερη συγκέντρωση ιασμονικού οξέος σε σχέση με τις υπόλοιπες εφαρμογές αλλά και σε σχέση με τα φυτά της εφαρμογής *Vd+Maltose(1)*.

ΣΥΜΠΕΡΑΣΜΑΤΑ

Η βερτισιλλίωση αποτελεί μια πολύ σοβαρή ασθένεια η οποία προκαλείται από τον φυτοπαθογόνο μύκητα *Verticillium dahliae* και ευθύνεται για μεγάλες απώλειες στη φυτική παραγωγή σε σημαντικές καλλιέργειες όπως η τομάτα (*Solanum lycopersicum*), η ελιά (*Olea europaea*), η μελιτζάνα (*Solanum melongena*), η αγκινάρα (*Cynara cardunculus var. scolymus*), ο ηλίανθος (*Helianthus spp.*), το βαμβάκι (*Gossypium hirsutum*) και πολλές άλλες (Tjamos, E.C. 2000, Peggand Brady, 2002; Schnathorst, 1981). Ο μύκητας *V. dahliae* επιβιώνει στο έδαφος με τη μορφή μικροσκληρωτίων, την πρωτογενή πηγή μόλυνσης για αρκετά χρόνια. Εξαιτίας της μακράς παραμονής του στο έδαφος και της έλλειψης κατάλληλων φυτοπροστατευτικών προϊόντων η αντιμετώπιση του στηριζόταν κυρίως στον υποκαπνισμό του εδάφους με χημικά μέσα (Klosterman *et al.*, 2009), όπως το βρωμιούχο μεθύλιο, το κύριο και πιο αποτελεσματικό απολυμαντικό εδάφους που απαγορεύτηκε το 2005 με το Πρωτόκολλο του Μόντρεαλ, το οποίο περιλάμβανε ουσίες που είναι υπεύθυνες για τη διάσπαση της στοιβάδας του όζοντος. Ο μύκητας *V. dahliae* σύμφωνα με την στρατηγική επίθεσης που ακολουθεί ανήκει στα ημιβιοτροφικά παθογόνα, με την διαδικασία μόλυνσης να είναι σύνθετη και να περιλαμβάνει διάφορα στάδια. Η μόλυνση ξεκινάει με μια αρχικά φαινομενική βιοτροφική φάση όπου το παθογόνο ξεκινάει τον αποικισμό του ριζικού συστήματος και στην συνέχεια διαμέσου του φλοιώδους παρεγχύματος μετακινείται στα αγγεία του ξύλου. Έτσι έχοντας εισχωρήσει πλέον στις αγγειώδεις δεσμίδες ακολουθεί μια νεκροτροφική φάση, με την εμφάνιση συμπτωμάτων μααρασμού, νεκρώσεις φύλλων, ημιπληγίες κ.α (Fradin & Thomma 2006).

Στην παρούσα μελέτη διερευνήθηκε εάν η προσθήκη στο έδαφος μονοσακχαριτών και δισακχαριτών με ριζοπότισμα και συγκεκριμένα D-γλυκόζης, D-μαλτόζης και D-φρουκτόζης, παρεμποδίζει την εκδήλωση της τυπικής συμπτωματολογίας της ασθένειας που προκαλεί ο μύκητας *Verticillium dahliae* σε φυτά μελιτζάνας, που είναι από τους πιο ευπαθείς ξενιστές. Επίσης εξετάστηκε ποια βιοχημικά μονοπάτια που σχετίζονται με την άμυνα των φυτών ενεργοποιούνται στα φυτά, όπου έχουν προστεθεί σάκχαρα και κονίδια του μύκητα, στο εδαφικό υπόστρωμα όπου αναπτύσσονται.

Τα σάκχαρα εμπλέκονται σε διάφορα μεταβολικά και σηματοδοτικά μονοπάτια στα φυτά. Τα βιοχημικά αυτά μονοπάτια μπορεί να συμβάλλουν στην άμυνα των φυτών εναντίον παθογόνων μικροοργανισμών και πιθανόν να λειτουργούν σαν πρωταρχικά μόρια που οδηγούν στην επαγόμενη αντοχή των φυτών που προέρχεται από τους ‘γενικούς διεγέρτες’ (general elicitors) ή τα συντηρημένα μοριακά μοτίβα που σχετίζονται με τα παθογόνα (PAMPs), αλλά και από τους ειδικούς διεγέρτες ή τελεστές (effectors). Ο υποθετικός αυτός ρόλος των σακχάρων βασίζεται στη αλληλεπίδραση με τις διάφορες φυτοορμόνες (Moghaddam et al., 2012). Σάκχαρα όπως η γλυκόζη, η φρουκτόζη και η σακχαρόζη αναγνωρίζονται σαν μόρια που παίζουν ρόλο σήματος στα φυτά (Rolland et al., 2006 ‘Bolouri-Moghaddam et al., 2010), επιπρόσθετα από τον γνωστό τους ρόλο ως πηγή άνθρακα και ενέργειας (Koch, 2004). Οι ιμβερτάσες παίζουν σημαντικό ρόλο στη ρύθμιση των επιπέδων της σακχαρόζης και το λόγο της σουκρόζης : εξόζης που σχετίζεται με τη σηματοδότηση που προέρχεται από τα σάκχαρα. Οι ουδέτερες αλκαλικές ιμβερτάσες αλλά και αυτές που προέρχονται από το χυμοτόπιο και το κυτταρικό τοίχωμα των κυττάρων μπορούν να ανιχνευθούν (Koch, 2004; Xiang et al., 2011). Η σηματοδότηση που προέρχεται από σάκχαρα μπορεί να παίζει σημαντικό ρόλο στην άμυνα των φυτών σε βιοτικές και αβιοτικές καταπονήσεις. Επίσης τα σάκχαρα μικροβιακής προέλευσης (Moxon and Kroll, 1990; Smith, 1990; Levitz, 2004; Zaragoza et al., 2009), αλλά και φυτικής (Herbers et al., 1996a), μπορούν να παίζουν σημαντικό ρόλο στην αλληλεπίδραση μεταξύ ξενιστή και παθογόνου (Morkunas et al., 2005). Είναι γνωστό ότι τα σάκχαρα ενεργοποιούν ποικίλα μοτίβα γονιδιακής αναγνώρισης (Herbers et al., 1996a,b; Johnson and Ryan, 1990). Μεταξύ αυτών, οι ιμβερτάσες των κυτταρικών τοιχωμάτων (CWIs), δηλαδή εξωκυτταρικά ένζυμα που διασπούν τη σακχαρόζη σε γλυκόζη και φρουκτόζη θεωρούνται ότι ανήκουν στην κατηγορία πρωτεϊνών PR (Roitsch et al., 2003). Μεταξύ των σακχάρων η σακχαρόζη αναδύεται σαν ένα υποψήφιο μόριο σήματος κατά την επαγωγή της άμυνας των φυτών (Gomez-Ariza et al., 2007; Birch et al., 2009). Είναι πιθανό να συμβαίνει μια συντονισμένη αλληλεπίδραση μεταξύ των σακχάρων και των βιοχημικών μονοπατιών που σχετίζονται με την άμυνα και να οδηγεί στην ενεργοποίηση αποτελεσματικών αμυντικών αποκρίσεων στα φυτά. Στα πειράματα δοκιμών παθογένειας που πραγματοποιήσαμε στο θερμοκήπιο παρατηρήσαμε ότι τα μολυσμένα με κονίδια του μύκητα *V. dahliae* φυτά που είχε γίνει εφαρμογή σακχάρων με ριζοπότισμα παρουσίασαν σχετικά μειωμένη ένταση της ασθένειας σε σχέση με τον μάρτυρα. Επίσης στα φυτά στα οποία είχε προστεθεί μαλτόζη μια φορά (*Vd*+Maltose1)

τα πρώτα συμπτώματα εμφανίστηκαν την εικοστή δεύτερη ημέρα μετά τη μόλυνση, δηλαδή στην προτελευταία παρατήρηση. Επιπλέον το μέσο βάρος των μολυσμένων φυτών όπου είχε πραγματοποιηθεί ριζοπότισμα με σάκχαρα ήταν μεγαλύτερο σε σχέση με το μέσο βάρος των φυτών του μάρτυρα. Μπορεί να υποθέσει κανείς ότι το φυτό αντιλαμβάνεται την αλλαγή των επιπέδων των σακχάρων αποπλαστικά και τα σήματα που παράγονται, συνδυάζονται με αυτά που προέρχονται από τα PAMPs, με αποτέλεσμα την ενεργοποίηση της άμυνας του φυτού. Αυτοί οι μηχανισμοί μπορεί να επηρεάζονται επίσης από την ένταση του φωτός και την φωτοπερίοδο (Moghaddam et al., 2012).

Ο ρόλος διάφορων μονοσακχαριτών και δισακχαριτών στην ενεργοποίηση της άμυνας στα φυτά έχει αναγνωριστεί καθώς μπορούν να διεγείρουν τη συσσώρευση ισοφλαβονοειδών ενώσεων (Morkunas et al., 2005). Μεταξύ αυτών, μικροί ολιγοσακχαρίτες όπως η 1-κεστόζη και η ραφινόζη, καθώς και ο δισακχαρίτης τρεχαλόζη και το ένζυμο συνθάση της γαλακτινόλης, βρέθηκαν να συσσωρεύονται σε κύτταρα κατά την προσβολή από νηματώδεις (Hofmann et al., 2010). Επίσης μερικοί μεταβολίτες που προέρχονται από την 1-κεστόζη και τη ραφινόζη, βρέθηκαν να συσσωρεύονται διασυστηματικά σε αμόλυντους ιστούς στα φυτά, γεγονός που δείχνει ότι οι συγκεκριμένοι ολιγοσακχαρίτες λειτουργούν σαν σήματα (Keller and Pharr, 1996). Δύο ένζυμα στο φυτό *Arabidopsis thaliana* και συγκεκριμένα οι ιμπερτάσες AtVII και AtVI2, παράγουν 1-κεστόζη, όταν έρχονται σε επαφή με μεγάλη συγκέντρωση σακχαρόζης (De Coninck et al., 2005). Τοπική αύξηση της συγκέντρωσης σακχαρόζης και μυοϊνοσιτόλης παρατηρείται συχνά κατά τη διάρκεια βιοτικού και αβιοτικού στρες στα φυτά (Valluru and Van den Ende, 2011). Τέτοιοι μηχανισμοί ενεργοποιούν την παραγωγή του ενζύμου συνθάση της γαλακτινόλης σαν πρόδρομο μόριο της παραγωγής ραφινόζης. Έχουν υπάρξει ενδείξεις ότι η γαλακτινόλη και η ραφινόζη εμπλέκονται σαν σήματα στην επαγωγή της άμυνας κατά τη διάρκεια επίθεσης από παθογόνα (Kim et al., 2008). Πράγματι, εξωτερική εφαρμογή του ενζύμου συνθάση της γαλακτινόλης είχε σαν αποτέλεσμα την ενεργοποίηση των γονιδίων *PR1a*, *PR1b*, και *NtACSI*, τα οποία είναι γνωστό ότι σχετίζονται με την άμυνα στον καπνό (Kim et al., 2008). Η τρεχαλόζη επίσης είναι ένα σάκχαρο το οποίο έχει φανεί ότι επάγει μερικώς την άμυνα, εναντίον του μύκητα *Blumeria graminis* f. sp. *tritici* που προκαλεί την ασθένεια γνωστή σαν ωίδιο των σιτηρών, μέσω της ενεργοποίησης του γονιδίου *PAL* αλλά και γονιδίων υπεροξειδασών

(Reignault et al., 2001; Muchembled et al., 2006). Είναι γνωστό επίσης ότι μερικά γονίδια που σχετίζονται με την άμυνα επάγονται από ολιγογαλακτουρονίδια (OGs) που προέρχονται από το κυτταρικό τοίχωμα κατά τη διάρκεια προσβολής από παθογόνους μύκητες. Αυτά τα συστατικά απελευθερώνονται από το φυτικό κύτταρο και δρουν σαν διεγέρτες του ανοσοποιητικού συστήματος (Ridley et al., 2001; Denoux et al., 2008). Είναι πιθανό ότι οι κινάσες WAK1 και WAK2 που σχετίζονται με το κυτταρικό τοίχωμα είναι οι κύριοι υποδοχείς αυτών των μορίων (Brutus et al., 2010), μεταφέροντας το σήμα κατά μήκος της κυτταροπλασματικής μεμβράνης. Επίσης τα γονίδια WAK υπερεκφράζονται από τραυματισμούς, βακτηριακές μολύνσεις και από το σαλικυλικό οξύ (SA) (He et al., 1998; Wagner and Kohorn, 2001). Η σύνδεση μεταξύ της έκφρασης των WAKs και μεταγραφικών ενζύμων καθορίζεται από τις πρωτεϊνικές κινάσες (MAPKs) όπως οι MPK3 και MPK6 (Kohorn et al., 2011). Είναι εντυπωσιακό ότι μεταλλαγμένα φυτά που απουσίαζε το γονίδιο *wak2* χρειάζονταν εξωτερική εφαρμογή σακχάρων για να έχουν φυσιολογική ανάπτυξη και επίσης έδειξαν μειωμένη δραστηριότητα ιμβερτασών στο χυμοτόπιο του φυτικού κυττάρου (Kohorn et al., 2006). Συμπερασματικά, το σήμα που παράγεται από τις κινάσες WAKs, ελέγχει την έκφραση πολλών γονιδίων άμυνας και μεταβάλλει τον μεταβολισμό των υδατανθράκων μέσω της ανίχνευσης των OGs.

Υπάρχουν ενδείξεις ότι μερικά σπάνια σάκχαρα όπως η ψικόζη και το DMDP (ανάλογο της φρουκτόζης), μπορούν να τονώσουν το ανοσοποιητικό σύστημα των φυτών μέσω της έκφρασης γονιδίων που σχετίζονται με την άμυνα. Έχει προταθεί ότι αυτά τα συστατικά δρουν σαν σήματα μέσω του μονοπατιού της εξοκινάσης, αλλά και μέσω άλλων μονοπατιών (Birch et al., 1993; Derridj et al., 2009; Kano et al., 2011). Ωστόσο το DMDP δρά και σαν παρεμποδιστής των ιμβερτασών καθώς προσδένεται στις ιμβερτάσες του χυμοτοπίου αλλά και των κυτταρικών τοιχωμάτων (Verhaest et al., 2007). Το DMDP μπορεί να εισχωρήσει στο κύτταρο και να αυξήσει το λόγο της σακχαρόζης:εξόζης, επηρεάζοντας με διαφορετικό τρόπο τα βιοχημικά μονοπάτια που σχετίζονται με την γλυκόζη, την φρουκτόζη και την σακχαρόζη (Moore et al., 2003; Li et al., 2011; Smeekens et al., 2010). Η μεταβολή στο λόγο της σακχαρόζης:εξόζης μπορεί να επηρεάσει την άμυνα. Στο ρύζι το σάκχαρο ψικόζη επάγει την άμυνα στην βακτηριακή κηλίδωση (Kano et al., 2011). Επιπλέον εξωγενής εφαρμογή ισομερών της σακχαρόζης όπως για παράδειγμα η τυρανόζη και η παλατινόζη, μπορούν να δράσουν σαν διεγέρτες για να ενεργοποιηθούν οι πρωτεϊνικές κινάσες MAPKs (Sinha

et al., 2002). Επομένως η εξωτερική εφαρμογή σακχάρων όπως αυτά που αναφέρθηκαν παραπάνω μπορούν να χαρακτηριστούν από το φυτό σαν παράγωγα παθογόνων και με αυτόν τον τρόπο να ενεργοποιηθούν οι βιοχημικές διαδικασίες που ενεργοποιούν τους αμυντικούς μηχανισμούς (Moghaddam et al., 2012).

Η σακχαρόζη είναι το κύριο προϊόν της φωτοσύνθεσης αλλά και ο κύριος μετακινούμενος υδατάνθρακας στα φυτά (Koch, 2004). Έχει αναγνωριστεί η συμβολή της σε διάφορες ρυθμιστικές διαδικασίες στα φυτά όπως στην ανάπτυξη, στην γονιδιακή έκφραση αλλά και στην απόκριση στο στρές (Wind et al., 2010). Παρουσιάζει ενδιαφέρον το γεγονός ότι η σακχαρόζη έχει προταθεί σαν ενδογενές σήμα για την επαγωγή της άμυνας εναντίον παθογόνων στο ρύζι. Πράγματι, εξωγενής εφαρμογή σακχαρόζης μία ημέρα πριν τη μόλυνση ενίσχυσε αποτελεσματικά την άμυνα του φυτού (Gomez-Ariza et al., 2007). Έχει επίσης τεκμηριωθεί ότι γονίδια που σχετίζονται με την άμυνα όπως το *OsPR1a*, *OsPR1b*, *PBZ1*, και *PR5* υπερεκφράστηκαν στα φύλλα ρυζιού όταν έγινε εφαρμογή σακχαρόζης με ριζοπότισμα (Gomez-Ariza et al., 2007). Επίσης εξωγενής εφαρμογή σακχαρόζης έχει φανεί ότι οδηγεί στην ενεργοποίηση της άμυνας στο λούπινο εναντίον του παθογόνου μύκητα του γένους *Fusarium* που επάγεται πιθανόν από τη συσσώρευση ισοφλαβονοειδών (Morkunas et al., 2005). Η σακχαρόζη επίσης διεγείρει τη συσσώρευση ανθοκυανινών (Solfanelli et al., 2006), οι οποίες έχουν και αντιμικροβιακές ιδιότητες, ενώ σε αντίθεση η προερχόμενη από τα παθογόνα πρωτεΐνη flg22 παρεμποδίζει επιλεκτικά αυτή τη συσσώρευση (Serrano et al., 2012). Η εξειδίκευση της σακχαρόζης σαν μόριο που λειτουργεί σαν σήμα αποδεικνύεται από το γεγονός ότι οι ισομοριακές εφαρμογές της γλυκόζης και της φρουκτόζης δεν οδήγησαν σε συσσώρευση ανθοκυανών (Solfanelli et al., 2006). Συμπερασματικά ο υψηλός λόγος σακχαρόζης : εξόζης μπορεί να διεγείρει κάποιο σήμα που σχετίζεται με την σακχαρόζη και με αυτόν τον τρόπο να ενεργοποιούνται γονίδια που χρειάζονται για τη συσσώρευση ανθοκυανών και άλλων δευτερογενών μεταβολιτών που έχουν προστατευτική δράση για το φυτό (Kwon et al., 2011). Στη μελέτη που πραγματοποιήσαμε είδαμε ότι οι ισομοριακές εφαρμογές γλυκόζης και φρουκτόζης δεν έδειξαν να εμφανίζουν κάποιο βαθμό προστασίας με στατιστικά σημαντική διαφορά σε σχέση με τον μάρτυρα εναντίον του μύκητα *V. dahliae* σε φυτά μελιτζάνας, σε αντίθεση με τη μαλτόζη η οποία εμφάνισε προστασία με διαφορά στατιστικώς σημαντική σε σύγκριση με τον μάρτυρα. Είναι γνωστό ότι ανιχνεύονται υψηλά ποσοστά σακχάρων στους φυτικούς ιστούς κατά τη διάρκεια

ιολογικών προσβολών (Watson and Watson, 1951; Shalitin and Wolf, 2000). Αυτό μας δείχνει ότι τα φυτά έχουν την ικανότητα να τροποποιήσουν τα αποθέματα σακχάρων τους έτσι ώστε να λειτουργήσουν είτε σαν πηγή άνθρακα και ενέργειας, είτε σαν σήματα και παράγοντες εκκίνησης των αμυντικών αντιδράσεων των φυτών (Gomez-Ariza et al., 2007). Ο λόγος της σακχαρόζης:εξόζης στα αποθέματα σακχάρων εντός του κυττάρου αποτελεί μια σημαντική παράμετρο που καθορίζει τις κυτταρικές λειτουργίες (Bolouri-Moghaddam et al., 2010; Xiang et al., 2011). Η ιμπερτάση, δηλαδή το ένζυμο που διασπά τη σακχαρόζη εμπλέκεται στον καταμερισμό των υδατανθράκων αλλά και στη ρύθμιση της αναλογίας σουκρόζης:εξόζης. Ως εκ τούτου ορισμένες μορφές ιμπερτάσης μπορεί να έχουν κεντρικό ρόλο (Proels and Roitsch, 2009) σαν ρυθμιστές κλειδί που σχετίζονται με τα διάφορα βιοχημικά μονοπάτια που έχουν ρόλο σήματος στα φυτά. Τα σήματα που σχετίζονται με την ιμπερτάση φαίνεται να παίζουν σημαντικό ρόλο στην ενεργοποίηση της άμυνας των φυτών (Fotopoulos et al., 2003; Kocal et al., 2008). Κατά τη διάρκεια της αλληλεπίδρασης παθογόνου και φυτού – ξενιστή, τα γονίδια των ιμπερτασών των κυτταρικών τοιχωμάτων (CWI γονίδια) ενεργοποιούνται από διεγέρτες σε διάφορα είδη φυτών (Sturm και Chrispeels, 1990; Roitsch et al., 2003; Berger et al., 2004). Οι πρωτεϊνικές κινάσες MAPKs φαίνεται να εμπλέκονται σε αυτή τη διαδικασία (Hyun et al., 2009). Ωστόσο, υπάρχουν αντιφατικές απόψεις για τον ρόλο των CWIs και των παρεμποδιστών τους κατά τη διάρκεια της μόλυνσης από παθογόνα (Bonfig et al., 2006, 2010; Essmann et al., 2008; Kocal et al., 2008). Έχει αναφερθεί ότι υψηλή δραστηριότητα των ιμπερτασών των κυτταρικών τοιχωμάτων, είναι απαραίτητη για να παραχθεί υπεροξειδίο του υδρογόνου (H_2O_2), που ανήκει στις ενεργές ομάδες οξυγόνου (ROS) το οποίο είναι επίσης ένα μόριο σήματος που συμβάλει στην ενεργοποίηση της άμυνας των φυτών (Essmann et al., 2008). Το H_2O_2 έχει αποδειχθεί ότι είναι ένα σημαντικό μόριο σήματος, ανεξάρτητο από το μονοπάτι του σαλικυλικού και ιασμονικού οξέος κατά την ενεργοποίηση της άμυνας (Miller et al., 2009). Επίσης το H_2O_2 διεγείρει την βιοσύνθεση του ενζύμου S-τρανσφεράση της γλουταθειόνης συμβάλλοντας με το μονοπάτι του σαλικυλικού οξέος (Leon et al., 1995; Dong, 2004). Όλα τα παραπάνω δείχνουν τον σημαντικό ρόλο της σακχαρόζης και άλλων σακχάρων κατά τη διαδικασία ενεργοποίησης της άμυνας των φυτών. Ωστόσο ο ακριβής μηχανισμός της ανοσοποίησης που προκαλείται από τα σάκχαρα και των σχετιζόμενων σημάτων παραμένει άγνωστος. Ο υποτιθέμενος ρόλος των ιμπερτασών και των ενεργών ομάδων

οξυγόνου ή του άζωτου χρειάζεται περαιτέρω έρευνα (Bolouri-Moghaddam et al., 2012).

Η ενεργοποίηση της άμυνας των φυτών εναντίον μια πληθώρας παθογόνων αποτελεί μια διαδικασία όπου καταναλώνεται ενέργεια. Οι αλληλεπιδράσεις μεταξύ των διαφόρων βιοχημικών μονοπατιών που σχετίζονται με την άμυνα είναι υπεύθυνες για την αποτελεσματικότερη κατανομή αυτής της ενέργειας. Τα βιοχημικά μονοπάτια που σχετίζονται με το σαλικυλικό οξύ και το αιθυλένιο – ιασμονικό οξύ λειτουργούν συνεργιστικά αλλά και ανταγωνιστικά. Έχει αναφερθεί ότι με εφαρμογή σαλικυλικού και ιασμονικού οξέος σε μικρές συγκεντρώσεις, έχουμε σαν αποτέλεσμα την συνεργιστική έκφραση των γονιδίων δεικτών *PR1* και *PDF1.2* του σαλικυλικού και ιασμονικού οξέος, αντίστοιχα. Αντιθέτως με εφαρμογή υψηλής συγκέντρωσης σαλικυλικού και ιασμονικού οξέος παρατηρείται ανταγωνιστική δράση αυτών των γονιδίων (Mur et al., 2006). Ο μοριακός μηχανισμός που ευθύνεται για την ανταγωνιστική δράση μεταξύ των βιοχημικών μονοπατιών που σχετίζονται με το σαλικυλικό οξύ και το αιθυλένιο – ιασμονικό οξύ δεν είναι ξεκάθαρος και αποτελεί αντικείμενο έρευνας. Οι Leon-Reyes et al. ανέφεραν ότι η παρεμπόδιση του μονοπατιού του ιασμονικού οξέος από το μονοπάτι του σαλικυλικού είναι ανεξάρτητο από τη βιοσύνθεση του ιασμονικού. Στο πείραμα που πραγματοποιήσαμε, κατά τον προσδιορισμό ποσοτικά του σαλικυλικού και ιασμονικού οξέος, με αναλυτικές μεθόδους και συγκεκριμένα με υγρή χρωματογραφία HRMS σε συνδιασμό με αναλυτή μαζών Q-TOF, παρατηρήσαμε να υπάρχει ανταγωνιστική δράση μεταξύ σαλικυλικού και ιασμονικού οξέος. Συγκεκριμένα, στα φυτικά δείγματα της πέμπτης ημέρας μετά τη μόλυνση, στα μολυσμένα φυτά από τον μύκητα *V. dahliae*, όπου είχε πραγματοποιηθεί ριζοπότισμα με μαλτόζη μόνο μια φορά (εφαρμογή *Vd* + Maltose1), παρατηρήθηκε μεγάλη συγκέντρωση ιασμονικού οξέος, ενώ αντίθετα παρατηρήθηκε μικρή συγκέντρωση του σαλικυλικού οξέος. Στα δείγματα όμως της δέκατης ημέρας μετά τη μόλυνση παρατηρήθηκε μεγάλη μείωση του σαλικυλικού αλλά και του ιασμονικού στην ίδια εφαρμογή.

Η αλληλεπίδραση μεταξύ των βιοχημικών μονοπατιών που σχετίζονται με τα σάκχαρα και τις φυτοορμόνες κατά την ενεργοποίηση της άμυνας στα φυτά έχει αποδειχθεί (Leon και Sheen, 2003). Όταν τα φυτά αντιμετωπίζουν εισβολή από παθογόνα μερικές φυτοορμόνες λειτουργούν σαν σήματα ώστε να διεγερθεί το αμυντικό σύστημα του φυτού (Pieterse et al., 2009). Μια καλοκουρδισμένη

αλληλεπίδραση μεταξύ της φυτοορμόνης ABA (αμπσιτικό οξύ), του SA (σαλικυλικό οξύ) αλλά και των διεγερτών PAMPs, οδηγεί στο κλείσιμο των στοματίων στα φύλλα και γενικά στην ενεργοποίηση της άμυνας μαζί με τα υπόλοιπα σήματα (Melotto et al., 2008; Ton et al., 2009; Cutler et al., 2010). Σε μεταλλαγμένα φυτά που απουσιάζουν τα γονίδια που ελέγχουν το κλείσιμο των στοματίων, έχει παρατηρηθεί μεγάλη ευαισθησία σε παθογόνα του υπέργειου τμήματος των φυτών (Melotto et al., 2006), κάτι που οδηγεί στο συμπέρασμα ότι το κλείσιμο των στοματίων αποτελεί τον πρώτο φραγμό άμυνας στα PAMPs και επίσης έχει ρυθμιστικό ρόλο στο βιοχημικό μονοπάτι του ABA (Ton et al., 2009). Το κλείσιμο των στοματίων στα φύλλα που ελέγχεται από τον μονοπάτι του ABA συσχετίζεται με αυξημένα επίπεδα H_2O_2 σαν σήμα και συνήθως προκύπτει μετά από στρές ξηρασίας, που οδηγεί σε συσσώρευση υδατανθράκων (Pattanagul, 2011). Το H_2O_2 που προκύπτει από το μονοπάτι του ABA μπορεί να ενεργοποιήσει τα MAPK και άλλα σχετιζόμενα αντιοξειδωτικά μονοπάτια (Zhang et al., 2006). Οι κυτοκινίνες είναι άλλη μια κατηγορία φυτοορμονών που ρυθμίζουν ποικίλες λειτουργίες συμπεριλαμβανόμενης της άμυνας των φυτών. Πρόσφατες έρευνες έχουν δείξει ότι οι κυτοκινίνες έχουν ευεργετική επίδραση στην άμυνα των φυτών, καθώς αυξάνουν τη δράση αντιβακτηριακών παραγόντων εναντίον του φυτοπαθογόνου βακτηρίου *Pseudomonas syringae* pv. *tabaci* και παράγουν φυτοαλεξίνες στον καπνό, ανεξάρτητα από το μονοπάτι του σαλικυλικού οξέος (Grobkinsky et al., 2011). Επίσης οι κυτοκινίνες, ενεργοποιούν την άμυνα σε ικές προσβολές (Sano et al., 1996; Rogany et al., 2004), ενεργοποιούν το μονοπάτι του σαλικυλικού οξέος μετά τη δημιουργία πληγών στους φυτικούς ιστούς (Sano et al., 1996) και καταστέλλουν την αντίδραση υπερευαισθησίας (Barna et al., 2008).

Υπάρχει μια συσχέτιση μεταξύ της σακχαρόζης και είτε του ιασμονικού οξέος είτε των κυτοκινινών και την επαγωγή των γονιδίων που σχετίζονται με τη βιοσύνθεση των ανθοκυανινών. Αυτό υποδεικνύει την ικανότητα της σακχαρόζης να διαμορφώνει κάποιους ρυθμιστικούς παράγοντες των ανθοκυανινών (Shan et al., 2009), αλλά επίσης τεκμηριώνει την ικανότητα των σακχάρων και των ορμονών να ρυθμίζουν τα μονοπάτια που οδηγούν στη συσσώρευση ανθοκυανινών (Deikman and Hammer, 1995; Weiss, 2000; Solfanelli et al., 2006). Αυτά τα ευρήματα μας δείχνουν ότι το μονοπάτι του ABA και της σακχαρόζης έχουν παρόμοια δράση στη συσσώρευση των ανθοκυανινών στα φυτά. Στον καπνό τα επίπεδα των γονιδίων *PR-Q* και *PR1* φάνηκαν να αυξάνονται σε εφαρμογές που περιείχαν σακχαρόζη, φρουκτόζη και γλυκόζη

ανεξάρτητα από το μονοπάτι του σαλικυλικού οξέος. Εφαρμογή σορβιτόλης ίδιου μοριακού βάρους ήταν ασήμαντη, υποδηλώνοντας ότι ωσμωτικές δραστηριότητες δεν είχαν εμπλακεί σε αυτή τη διαδικασία (Herbers et al., 1996b). Ωστόσο, οι Herbers et al., 1996b υπέθεσαν ότι ένα μονοπάτι που σχετίζεται με τα σάκχαρα και είναι ανεξάρτητο του σαλικυλικού οξέος μπορεί να παίζει σημαντικό ρόλο στα πρώτα στάδια της αλληλεπίδρασης φυτού – παθογόνου, πριν την έναρξη της ενεργοποίησης της άμυνας που επάγεται από το μονοπάτι του σαλικυλικού οξέος (Herbers et al., 1996b). Η άμυνα των φυτών εναντίον παθογόνων μικροοργανισμών δεν ενεργοποιείται από συγκεκριμένα μονοπάτια, αλλά προκύπτει μέσα από ένα πολύπλοκο δίκτυο μορίων που έχουν το ρόλο σήματος αλλά και ποικίλες αλληλεπιδράσεις μεταξύ αυτών. Σε αυτό το πολύπλοκο δίκτυο τα σάκχαρα μπορεί να συμβάλλουν στην ενεργοποίηση της άμυνας και να έχουν σημαντικό ρόλο σαν σήματα. Αυτός ο πιθανός ρόλος των σακχάρων εξαρτάται βέβαια και από την αλληλεπίδραση τους μαζί με τις διάφορες φυτοορμόνες (Bolouri-Moghaddam et al., 2012).

Η σύγχρονη φυτοπροστασία εξαρτάται κυρίως από την παραγωγή συνθετικών φυτοπροστατευτικών ουσιών για την αντιμετώπιση παθογόνων μυκήτων, βακτηρίων αλλά και επιβλαβών εντόμων. Η χρήση όμως συνθετικών φυτοπροστατευτικών ουσιών χωρίς περιβαλλοντικό κόστος είναι αδύνατη. Επίσης τα προγράμματα βελτίωσης φυτών, για την παραγωγή νέων ποικιλιών που να παρουσιάζουν αντοχή σε διάφορες ασθένειες ή έντομα, τα αποτελέσματα που έχουν είναι συνήθως παροδικά καθώς η αντοχή αυτή χάνεται μετά από μερικά χρόνια. Επομένως υπάρχει ανάγκη να βρεθούν βιοδιασπώμενα και φθηνά υποκατάστατα. Είναι σημαντικό να συνεχιστεί η έρευνα σχετικά με την άμυνα που σχετίζεται με τα σάκχαρα, έτσι ώστε να μελετηθεί η δυνατότητα χρήσης βιοδιασπώμενων ενώσεων σακχάρων σαν εναλλακτική λύση στη χρήση επικίνδυνων για το περιβάλλον αγροχημικών.

ΒΙΒΛΙΟΓΡΑΦΙΑ

- Παναγόπουλος, Χ. Γ. (1995).** Ασθένειες κηπευτικών καλλιεργειών. Εκδόσεις ΑΘ. Σταμούλης, Αθήνα
- Παναγόπουλος, Χ. Γ. (2007).** Ασθένειες καρποφόρων δένδρων και αμπέλων. Εκδόσεις ΑΘ. Σταμούλης, Αθήνα
- Παντελίδης, Ι. (2009).** Φυτοπαθολογική και μοριακή διερεύνηση των μηχανισμών που εμπλέκονται στην άμυνα των φυτών κατά των παθογόνων των αδρομυκώσεων.
- Ρεβέλου, Π. (2018).** Απομόνωση βιοδραστικών ενώσεων από σταυρανθή λαχανικά. Ταυτοποίηση και ποσοτικός προσδιορισμός με συνθετικές και φασματοσκοπικές τεχνικές
- Τζάμος, Ε. (2007).** Φυτοπαθολογία. Εκδόσεις ΑΘ. Σταμούλης, Αθήνα
3:285-290815–830.
- Φούσια, Σ. (2016).** “Μοριακή διερεύνηση του ρόλου των αυξινών στην βιολογική αντιμετώπιση και ανθεκτικότητα των φυτών *Arabidopsis thaliana* εναντίον του φυτοπαθογόνου μύκητα *Verticillium dahliae*”
- Ádám, A.L.; Nagy, Z.Á.; Kátay, G.; Mergenthaler, E.; Viczián, O.** Signals of Systemic Immunity in Plants: Progress and Open Questions. *Int. J. Mol. Sci.* **2018**, *19*, 1146.
- Agrios, G. N. (2005).** Plant Pathology. Elsevier, CA, Academy Press
- Antonopoulos, D. F., Tjamos, S. E., Antoniou, P. P., Rafeletos, P., and Tjamos, E.C. (2008).** Effect of *Paenibacillus alvei*, strain K165, on the germination of *Verticillium dahliae* microsclerotia in planta. *Biol Control.* *46*:166–170
- Ash, C., Priest, F. G., and Collins, M.D. (1993).** Molecular identification of rRNA group 3 bacilli (Ash, Farrow, Wallbanks and Collins) using a PCR probe test. Proposal for the creation of a new genus *Paenibacillus*. *Antonie Van Leeuwenhoek.* **64**:253-260
- Asselbergh B, De Vleeschauwer D, Hofte M. 2008.** Global switches and fine-tuning: ABA modulate plant pathogen defence. *Molecular Plant-Microbe Interaction* *21*, 709–719.

Audenaert K, De Meyer GB, Hofte MM. 2002. Abscisic acid determines basal susceptibility of tomato to *Botrytis cinerea* and

Balibrea Lara ME, Gonzalez Garcia MC, Fatima T, Ehness R,

Ban T, Ishimaru M, Kobayashi S, Shiozaki S, Goto- Yamamoto N, Horiuchi S. 2003. Abscisic acid and 2,4- dichlorophenoxyacetic acid affect the expression of anthocyanin biosynthetic pathway genes in ‘Kyoho’ grape berries. *Journal of Horticultural Science and Biotechnology* 78, 586–589.

Bari, R., and Jones, J. D. G. (2009). Role of plant hormones in plant defence responses. *Plant Mol Biol.* 69:473-488

Bari, R., and Jones, J. D. G. (2009). Role of plant hormones in plant defence responses. *Plant Mol Biol.* 69:473-488

Barna B, Smigocki AC, Baker JC. 2008. Transgenic production of cytokinin suppresses bacterially induced hypersensitive response symptoms and increases antioxidative enzyme levels in *Nicotiana* spp. *Phytopathology* 98, 1242–47.

Berkeley, G. H., Madden, G. O., and Willison, R. S. (1931). *Verticillium* wilts in Ontario. *Sci. Agr.* 11:739-759

Berkeley, G. H., Madden, G. O., and Willison, R. S. (1931). *Verticillium* wilts in Ontario. *Sci. Agr.* 11:739-759

Berg J. M., Tymoczko J. L., Gatto G. J., Stryer L., (2015). *Biochemistry*, 8th edition.

Berger S, Muhammad N, Zeier J, Sinha AK, Roitsch T. 2010. Post-translational derepression of invertase activity in source leaves via down-regulation of invertase inhibitor expression is part of the plant defence response. *Molecular Plant* 3, 1037–1048.

Berger S, Papadopoulos M, Schreiber U, Kaiser W, Roitsch T. 2004. Complex regulation of gene expression, photosynthesis and sugar levels by pathogen infection in tomato. *Physiologia Plantarum* 122, 419–428.

Bhat, R. G., and Subbarao, K. V. (1999). Host Range Specificity in *Verticillium dahliae*. *Phytopathology.* 89:1218-1225

Bhat, R. G., and Subbarao, K. V. (1999). Host Range Specificity in *Verticillium dahliae*. *Phytopathology*. **89**:1218-1225

Birch ANE, Roberson WM, Geoghegan IE, MC-Gavin WJ, Alpheyt JW, Porter EA. 1993. DMDP – a plant-derived sugar analogue with systemic activity against plant parasitic nematodes. *Nematologica* 39, 521–535.

Birch ANE, Shepherd T, Hancock R, Goszcz K. 2009. Understanding sugar sensing in induced plant defences and stress tolerance. In: Proceedings of the 25th meeting of the International Society of Chemical Ecology, 23–27 August 2009, Neuchatel, Switzerland, 230.

Bittel, P., and Robatzek, S. (2007). Microbe-associated molecular patterns (MAMPs) probe plant immunity. *Curr. Opin. Plant Biol.* 10:335–341

Bittel, P., and Robatzek, S. (2007). Microbe-associated molecular patterns (MAMPs) probe plant immunity. *Curr. Opin. Plant Biol.* **10**:335–341

Boller, T. (1995). Chemoperception of Microbial Signals in Plant Cells. *Annu. Rev. Plant Physiol. Plant Mol Biol.* 46:189-214

Boller, T. (1995). Chemoperception of Microbial Signals in Plant Cells. *Annu. Rev. Plant Physiol. Plant Mol Biol.* **46**:189-214

Boller, T., and Felix, G. A. (2009). A renaissance of elicitors: perception of microbe-associated molecular patterns and danger signals by pattern-recognition receptors. *Annu. Rev. Plant Biol.* 60:379-406

Boller, T., and Felix, G. A. (2009). A renaissance of elicitors: perception of microbe-associated molecular patterns and danger signals by pattern-recognition receptors. *Annu. Rev. Plant Biol.* **60**:379-406

Bolouri-Moghaddam MR, Le Roy K, Xiang L, Rolland F, Van den Bonfig KB, Gabler A, Simon UK, Luschin-Ebengreuth N, Hatz M, Bonfig KB, Schreiber U, Gabler A, Roitsch T, Berger S. 2006. Infection with virulent and avirulent *P. syringae* strains differentially affects photosynthesis and sink metabolism in *Arabidopsis* leaves. *Planta* 225, 1–12.

Bowers, J. H., Nameth, S. T., Riedel, R. M. and Rowe, R. C. (1996). Infection and colonization of potato roots by *Verticillium dahliae* as affected by *Pratylenchus penetrans* and *P. crenatus*. *Phytopatholog.* 86:614-621

Bowers, J. H., Nameth, S. T., Riedel, R. M. and Rowe, R. C. (1996). Infection and colonization of potato roots by *Verticillium dahliae* as affected by *Pratylenchus penetrans* and *P. crenatus*. *Phytopatholog.* 86:614-621

Brendan, N., Kidd, N., Kadoo, Y., Dombrecht, B., Tekeoğlu, D., Gardiner, L., Thatcher, F., Elizabeth, A. B., Aitken, P., Schenk, M., Manners, M., and Kemal, K. (2011). Auxin signaling and transport promote susceptibility to the root-infecting fungal pathogen *Fusarium oxysporum* in *Arabidopsis*. *Molecular Plant-Microbe Interactions* 24:733-748

Brouwer S, Schwochow M, Ko" hl K, van Dongen JT. 2011. A naturally associated rhizobacterium of *Arabidopsis thaliana* induces a starvation-like transcriptional response while promoting growth. *PLoS ONE* doi: 10.1371/journal.pone.0029382.

Brutus A, Sicilia F, Macone A, Cervone F, De Lorenzo G. 2010. A domain swap approach reveals a role of the plant wall associated kinase 1 (WAK1) as a receptor of oligogalacturonides. *Proceedings of the National Academy of Sciences, USA* 107, 9452–9457.

Chisholm ST, Coaker G, Day B, Staskawicz BJ. 2006. Host – microbe interactions: shaping the evolution of the plant immune response. *Cell* 124, 803–814. Cho YH, Yoo SD. 2011.

Conrath U. 2011. Molecular aspects of defence priming. *Trends in Plant Science* 16, 524–531.

Cook, R. J. (1991). Challenges and rewards of sustainable agriculture research and education. In: *Sustainable agriculture research and education in the field: A Proceedings*. National Research Council, National Academy Press, Washington, DC. Pp. 32–76.

Cutler SR, Rodriguez PL, Finkelstein RR, Abrams SR. 2010. Abscisic acid: emergence of a core signaling network. *Annual Review of Plant Biology* 61, 651–679.

De Coninck B, Le Roy K, Francis I, Clerens S, Vergauwen R, Halliday AM, Smith SM, Van Laere A, Van den Ende W. 2005. Arabidopsis AtcwINV3 and 6 are not invertases but are fructan exohydrolases (FEHs) with different substrate specificities. *Plant Cell and Environment* 28, 432–443.

Deikman J, Hammer PE. 1995. Induction of anthocyanin accumulation by cytokinins in *Arabidopsis thaliana*. *Plant Physiology* 108, 47–57.

Dekkers BJ, Schuurmans JA, Smeekens SC. 2008. Interaction between sugar and abscisic acid signalling during early seedling development in *Arabidopsis*. *Plant Molecular Biology* 67, 151–167.

Denoux C, Galletti R, Mammarella N, Gopalan S, Werck D, De Lorenzo G, Ferrari S, Ausubel FM, Dewdney J. 2008. Activation of defence response pathways by OGs and flg22 elicitors in *Arabidopsis* seedlings. *Molecular Plant* 1, 423–445.

Depuydt, S., and Hardtke, C. S. (2011). Hormone signaling crosstalk in plant growth regulation. *Curr. Biol.* 21: 365-373

Depuydt, S., and Hardtke, C. S. (2011). Hormone signaling crosstalk in plant growth regulation. *Curr. Biol.* 21: 365-373

Derridj S, Elad Y, Birch ANE. 2009. Sugar signaling and a new way for vegetable and fruit induced resistance against insects, pathogens and nematodes. IOBC/WPRS Working Group “Induced resistance in plants against insects and diseases”, Granada, Spain, 12–16 May 2009. <http://www.fvcee.uji.es/abstractbook.pdf>.

Ding, X., Cao, Y., Huang, L., Zhao, C., Li, X., and Wang, S. (2008). Activation of the indole- 3-acetic acid-amido synthetase GH3-8 suppresses expansin expression and promotes salicylate- and jasmonate- independent basal immunity in rice. *Plant Cell* 20:228-240

Dixon, R. A., Harrison, M. J., and Lamb, C. J. (1994). *Annu Rev Phytopathol.* 32:479-501

Dong X. 2004. NPR1, all things considered. *Current Opinion in Plant Biology* 7, 547–552.

Ehneb R, Roitsch T. 1997. Coordinated induction of extracellular invertase and glucose transporters in *Chenopodium rubrum* by cytokinins. *Plant Journal* 11, 539–548.

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

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

Ende W. 2010. Sugar signalling and antioxidant network connections in plant cells. *FEBS Journal* 277, 2022–2037.

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

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

Essmann J, Schmitz-Thom I, Schon H, Sonnewald S, Weis E, Scharte J. 2008. RNA interference-mediated repression of cell wall invertase impairs defence in source leaves of tobacco. *Plant Physiology* 147, 1288–1299.

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

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

Fotopoulos V, Gilbert MJ, Pittman JK, Marvier AC, Buchanan AJ, Sauer N, Hall JL, Williams LE. 2003. The monosaccharide transporter gene, AtSTP4, and the cell-wall invertase, Atbfruct1, are induced in *Arabidopsis* during infection with the fungal biotroph *Erysiphe cichoracearum*. *Plant Physiology* 132, 821–829.

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

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

- Fukumoto T, Kano A, Ohtani K, et al. 2011.** Rare sugar D-allose suppresses gibberellin signaling through hexokinase-dependent pathway in *Oryza sativa* L. *Planta* 234, 1083–1095.
- Gaffney, T.; Friedrich, L.; Vernooij, B.; Negrotto, D.; Nye, G.; Uknes, S.; Ward, E.; Kessmann, H.; Ryals, J.** Requirement of salicylic Acid for the induction of systemic acquired resistance. *Science* **1993**, 261, 754–756.
- Gao JJ, Shen XF, Zhang Z, Peng RH, Xiong AS, Xu J, Zhu B, Zheng JL, Yao QH. 2011.** The myb transcription factor MdMYB6 suppresses anthocyanin biosynthesis in transgenic *Arabidopsis*. *Plant Cell Tissue and Organ Culture* 106, 235–242.
- Garciarrubio A, Legaria JP, Covarrubias AA. 1997.** Abscisic acid inhibits germination of mature *Arabidopsis* seeds by limiting the availability of energy and nutrients. *Planta* 203, 182–187
- Gkizi, D., Lehmann, S., L’Haridon, F., Serrano, M., Paplomatas, E. J., Metraux, J. P., and Tjamos, S. E. (2016).** The innate immune signaling system as a regulator of disease resistance and ISR activity against *Verticillium dahliae*. *Molecular Plant-Microbe Interaction*: <http://dx.doi.org/10.1094/MPMI-11-15-0261-R>
- Gkizi, D., Lehmann, S., L’Haridon, F., Serrano, M., Paplomatas, E. J., Metraux, J. P., and Tjamos, S. E. (2016).** The innate immune signaling system as a regulator of disease resistance and ISR activity against *Verticillium dahliae*. *Molecular Plant-Microbe Interaction*: <http://dx.doi.org/10.1094/MPMI-11-15-0261-R>
- Glazebrook, J.** Contrasting mechanisms of defense against biotrophic and necrotrophic pathogens. *Annu. Rev. Phytopathol.* **2005**, 43, 205–227.
- Gomez-Ariza J, Campo S, Rufat M, Estopa` M, Messeguer J, San Segundo B, Coca M. 2007.** Sucrose-mediated priming of plant defence responses and broad-spectrum disease resistance by overexpression of the maize pathogenesis-related PR protein in rice plants. *Molecular Plant–Microbe Interactions* 20, 832–842.
- Golem S, Culver J. 2003.** Tobacco mosaic virus induced alterations in the gene expression profile of *Arabidopsis thaliana*. *Molecular Plant– Microbe Interactions* 16, 681–688.

Griebel T, Zeier J. 2008. Light regulation and daytime dependency of inducible plant defences in Arabidopsis: phytochrome signaling controls systemic acquired resistance rather than local defence. *Plant Physiology* 147, 790–801.

Großkinsky DK, Naseem M, Abdelmohsen UR, et al. 2011. Cytokinins mediate resistance against *Pseudomonas syringae* in tobacco through increased antimicrobial phytoalexin synthesis independent of salicylic acid signalling. *Plant Physiology* 157,

Harborne JB, Williams CA. 2000. Advances in flavonoid research since 1992. *Phytochemistry* 55, 481–504.

Hawksworth, D. L., and Talboys, P. W. (1970) a. *Verticillium dahliae* Klebahn. In: C.M.I. Descriptions of pathogenic fungi and bacteria. No 256, pp2. Commonwealth Mycological Institute, Kew

Hawksworth, D. L., and Talboys, P. W. (1970) b. *Verticillium albo-atrum*. Reinke and Berthold. In: C.M.I. Descriptions of pathogenic fungi and bacteria No 255, pp2. Commonwealth Mycological Institute, Kew.

Hawksworth, D. L., and Talboys, P. W. (1970)a. *Verticillium dahliae* Klebahn. In: C.M.I. Descriptions of pathogenic fungi and bacteria. No 256, pp2. Commonwealth Mycological Institute, Kew

Hawksworth, D. L., and Talboys, P. W. (1970)b. *Verticillium albo-atrum*. Reinke and Berthold. In: C.M.I. Descriptions of pathogenic fungi and bacteria No 255, pp2. Commonwealth Mycological Institute, Kew.

Hayashi, K.I. (2012). The interaction and integration of auxin signaling components. *Plant Cell Physiol.* 53:965-975

Hayes MA, Feechan A, Dry IB. 2010. Involvement of abscisic acid in the coordinated regulation of a stress-inducible hexose transporter (VvHT5) and a cell wall invertase in grapevine in response to biotrophic fungal infection. *Plant Physiology* 153, 211–221.

He ZH, He DZ, Kohorn BD. 1998. Requirement for the induced expression of a cell wall associated receptor kinase for survival during the pathogen response. *Plant Journal* 14, 55–63.

Heale, J. B., and Isaac, I. (1965). Environmental factors in the production of dark resting structures in *Verticillium albo-atrum*, *V. dahliae* and *V. tricorpus*. *Trans. Br. Mycol. Soc.* 48:39- 50

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

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

Herbers K, Meuwly P, Frommer W, Metraux JP, Sonnewald U. 1996a. Systemic acquired resistance mediated by the ectopic expression of invertase: possible hexose sensing in the secretory pathway. *Plant Cell* 8, 793–803.

Herbers K, Meuwly P, Metraux JP, Sonnewald U. 1996b. Salicylic acid independent induction of pathogenesis-related protein transcripts by sugars is dependent on leaf developmental stage. *FEBS Letter* 397, 239–244.

Hofmann J, El Ashry A, Anwar S, Erban A, Kopka J, Grundler F. 2010. Metabolic profiling reveals local and systemic responses of host plants to nematode parasitism. *The Plant Journal* 62, 1058–1071.

Homma, Y., Kato, Z., Hirayama, F., Konno, K., Shirahama, H., and Suzui, T. (1989). Production of antibiotics by *Pseudomonas cepacia* as an agent for biological control of soilborne plant pathogens. *Soil Biol. Biochem.* 21:723-728

Hothorn M, Van den Ende W, Lammens W, Rybin V, Scheffzek K. 2010. Structural insights into the pH-controlled targeting of plant cell-wall invertase by a specific inhibitor protein. *Proceedings of the National Academy of Sciences, USA* 107, 17427–17432.

Howell, C. R., and Stipanovic, R. D. (1980). Suppression of *Pythium ultimum* induced damping - off of cotton seedlings by *Pseudomonas fluorescens* and its antibiotic, pyoluteerin. *Phytopathology* 70:712-715

Huisman, O. C. (1982). Interrelations of root growth dynamics to epidemiology of root invading fungi. *Annu. Rev. Phytopathol.* 20:303-327

Hyun TK, Hoffmann A, Sinha AK, Roitsch T. 2009. Tomato mitogen activated protein kinases regulate the expression of extracellular invertase Lin6 in response to stress related stimuli. *Functional Plant Biology* 36, 1088–1097.

Islam, T. M., Hashidoko, Y., Deora, A., Ito, T., and Tahara, S. (2005). Suppression of damping-off disease in host plants by the rhizoplane bacterium *Lysobacter* sp. strain SB-K88 is linked to plant colonization and antibiosis against soilborne peronosporomycetes. *Appl. Environ. Microbiol.* 71:3786-3796

Ithal N, Reddy AR. 2004. Rice flavonoid pathway genes, OsDfr and OsAns, are induced by dehydration, high salt and ABA, and contain stress responsive promoter elements that interact with the transcription activator. OsC1-MYB. *Plant Science* 166, 1505–1513.

Jeong ST, Goto-Yamamoto N, Kobayashi S, Esaka M. 2004. Effects of plant hormones and shading on the accumulation of anthocyanins and the expression of anthocyanin biosynthetic genes in grape berry skins. *Plant Science* 167, 247–252.

Ji X, Dong B, Shiran B, Talbot MJ, Edlington JE, Hughes T, White RG, Gubler F, Dolferus R. 2011. Control of abscisic acid catabolism and abscisic acid homeostasis is important for reproductive stage stress tolerance in cereals. *Plant Physiology* 156, 647–662.

Johnson R, Ryan CA. 1990. Wound-inducible potato inhibitor II genes: enhancement of expression by sucrose. *Plant Molecular Biology* 14, 527–536.

Jones JD, Dangl JL. 2006. The plant immune system. *Nature* 444, 323–329.

Jones, E. E., Mead, A., and Whipps, J. M. (2004). Effect of inoculums type and timing of application of *Coniothyrium minitans* on *Sclerotinia sclerotiorum*: control of sclerotinia disease in glasshouse lettuce. *Plant Pathology* 53:611-620

Kano A, Hosotani K, Gomi K, et al. 2011. D- Psicose induces upregulation of defence-related genes and resistance in rice against bacterial blight. *Journal of Plant Physiology* 168, 1852–1857.

Karpinski S, Gabrys H, Mateo A, Karpinska B, Mullineaux PM. 2003. Light perception in plant disease defence signalling. *Current Opinion in Plant Biology* 6, 390–396.

Keller F, Pharr DM. 1996. Metabolism of carbohydrates in sinks and sources: galactosyl-sucrose oligosaccharides. In: Zamski E, Schaffer AA, eds. *Photoassimilate distribution in plants and crops: source–sink relationships*. New York: Marcel Dekker, 157–183.

Kerr, A. (1980). Biological control of crown gall through production of agrocin 84. *Plant Dis.* 64:25-30

Kim JY, Mahe´ A, Brangeon J, Prioul JL. 2000. A maize vacuolar invertase, IVR2, is induced by water stress, organ/tissue specificity and diurnal modulation of expression. *Plant Physiology* 124, 71–84.

Kim MS, Cho SM, Kang EY, Im YJ, Hwangbo H, Kim YC, Ryu CM, Yang KY, Chung GC, Cho BH. 2008. Galactinol is a signaling component of the induced systemic resistance caused by *Pseudomonas chlororaphis* O6 root colonization. *Molecular Plant- Microbe Interactions* 21, 1643–1653.

Kloepper, J. W., and Schroth, M. N. (1981). Relationship of in vitro antibiosis of plant growth promoting rhizobacteria to plant growth and the displacement of root microflora. *Phytopathology* 71:1020-1024

Kloepper, J. W., Ryu, C. M., and Zhang, S. (2004). Induce systemic resistance and promotion of plant growth by *Bacillus* spp. *Phytopathology* 94:1259-1266

Kocal N, Sonnewald U, Sonnewald S. 2008. Cell wall-bound invertase limits sucrose export and is involved in symptom development and inhibition of photosynthesis during compatible interaction between tomato and *Xanthomonas campestris* pv. *vesicatoria*. *Plant Physiology* 148, 1523–1536.

Koch K. 2004. Sucrose metabolism: regulatory mechanisms and pivotal roles in sugar sensing and plant development. *Current Opinion in Plant Biology* 7, 235–246.

Koh EJ, Lee SJ, Hong SW, Lee HS, Lee H. 2008. The ABA effect on the accumulation of an invertase inhibitor transcript that is driven by the CAMV35S promoter in *Arabidopsis*. *Molecules and Cells* 26, 236–242.

Kohorn BD, Kobayashi M, Johansen S, Riese J, Huang LF, Koch K, Fu S, Dotson A, Byers N. 2006. An Arabidopsis cell wall-associated kinase required for invertase activity and cell growth. *The Plant Journal* 46, 307–316.

Kohorn BD, Kohorn SL, Todorova T, Baptiste G, Stansky K, McCullough M. 2011. A dominant allele of Arabidopsis pectin-binding wall-associated kinase induces a stress response suppressed by MPK6 but not MPK3 mutations. *Molecular Plant* doi: 10.1093/mp/ ssr096 (Epub ahead of print).

Koumoutsis, A., Chen, X. H., Henne, A., Liesegang, H., Gabriele, H., Franke, P., Vater, J., and Borris, R. (2004). Structural and functional characterization of gene clusters directing nonribosomal synthesis of bioactive lipopeptides in *Bacillus amyloliquefaciens* strain FZB42. *J. Bact.* 186:1084-1096

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

Krikun, J., and Orion, D. (1979). *Verticillium* wilt of potato: Importance and control.

Kwon YR, Oh JE, Noh HN, Hong SW, Bhoo SH, Lee HJ. 2011. The ethylene signaling pathway has a negative impact on sucrose induced anthocyanin accumulation in Arabidopsis. *Journal of Plant Research* 124, 193–200.

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

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

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

Lecourieux F, Lecourieux D, Vignault C, Delrot S. 2010. A sugar inducible protein kinase, VvSK1, regulates hexose transport and sugar accumulation in grapevine cells. *Plant Physiology* 152, 1096–1106. Leng NGS. 2008. Physiological effects of BA and ABA on Caixin seedlings. Master's thesis, National University of Singapore, Singapore.

Lee TK, Proels R, Tanner W, Roitsch T. 2004. Extracellular invertase is an essential component of cytokinin-mediated delay of senescence. *Plant Cell* 16, 1276–1287.

Leon J, Lawton MA, Raskin L. 1995. Hydrogen peroxide stimulates salicylic acid biosynthesis in tobacco. *Plant Physiology* 108, 1673–1678.

Leon P, Sheen J. 2003. Sugar and hormone connections. *Trends in Plant Science* 8, 110–111.

Levitz SM. 2004. Interactions of Toll-like receptors with fungi. *Microbes and Infection* 6, 1351–1355.

Li P, Wind JJ, Shi X, Zhang H, Hanson J, Smeekens SC, Teng S. 2011. Fructose sensitivity is suppressed in Arabidopsis by the transcription factor NAC089 lacking the membrane-bound domain. *Proceedings of the National Academy of Sciences, USA* 108, 3436–3441.

Li Y, Smith C, Corke F, Zheng L, Merali Z, Ryden P, Derbyshire P, Waldron K, Bevan MW. 2007. Signaling from an altered cell wall to the nucleus mediates sugar-responsive growth and development in Arabidopsis thaliana. *Plant Cell* 19, 2500–2515.

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

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

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

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

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

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

Lincoln, T., and Eduardo, Z. (2010). *Plant Physiology*, Fifth Edition Sinauer Associates Inc., Publishers Sunderland, Massachusetts U.S.A.

Liscum, E., and Briggs, W. R. (1996). Mutations of *Arabidopsis* in potential transduction and response components of the phototropic signaling pathway. *Plant Physiol.* **112**:291-296

Lopez-Escudero, F. J., and Blanco-Lopez, M. A. (2001). Effect of a Single or Double Soil Solarization to Control *Verticillium* Wilt in Established Olive Orchards in Spain. *Plant Disease* **85**:489-496

Lopez-Escudero, F. J., and Blanco-Lopez, M. A. (2001). Effect of a Single or Double Soil Solarization to Control *Verticillium* Wilt in Established Olive Orchards in Spain. *Plant Disease* **85**:489-496

Loreti E, Povero G, Novi G, Solfanelli C, Alpi A, Perat P. 2008. Gibberellins, jasmonate and abscisic acid modulate the sucrose induced expression of anthocyanin biosynthetic genes in *Arabidopsis*. *New Phytologist* **179**, 1004–1016.

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

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

McMurry J. (2016). Organic chemistry, 9th edition

Meinke, D. W., Cherry, J. M., Dean, C., Rounsley, S. D., and Koornneef, M. (1998). *Arabidopsis thaliana*: A Model Plant for Genome Analysis. *Science* **282**:662-682

Melotto M, Underwood W, He SY. 2008. Role of stomata in plant innate immunity and foliar bacterial diseases. *Annual Review of Phytopathology* **46**, 101–122.

Melotto M, Underwood W, Koczan J, Nomura K, He SY. 2006. Plant stomata function in innate immunity against bacterial invasion. *Cell* **126**, 969–980.

Miller G, Schlauch K, Tam R, Cortes D, Torres MA, Shulaev V, Dangl JL, Mittler R. 2009. The plant NADPH oxidase RBOHD mediates rapid systemic signaling in response to diverse stimuli. *Science Signal* **2**, ra45.

Mol, L., Scholte, K., and Vos, J. (1995). Effects of crop rotation and removal of crop debris on the soil population of two isolates of *Verticillium dahliae*. *Plant Pathol* **44**: 1070-1074

Mol, L., Scholte, K., and Vos, J. (1995). Effects of crop rotation and removal of crop debris on the soil population of two isolates of *Verticillium dahliae*. *Plant Pathol* **44**: 1070-1074

Moore B, Zhou L, Rolland F, Hall Q, Cheng WH, Liu YX, Hwang I, Jones T, Sheen J. 2003. Role of the Arabidopsis glucose sensor HXK1 in nutrient, light, and hormonal signaling. *Science* 300, 332–336.

Morker KH, Roberts MR. 2011. Light exerts multiple levels of influence on the Arabidopsis wound response. *Plant, Cell and Environment* 34, 717–728.

Morkunas I, Marczak Q, Stachowiak J, Stobiecki M. 2005. Sucrose-stimulated accumulation of isoflavonoids as a defence response of lupine to *Fusarium oxysporum*. *Plant Physiology and Biochemistry* 43, 363–73.

Moxon ER, Kroll JS. 1990. The role of bacterial polysaccharide capsules as virulence factors. *Current Topics in Microbiology and Immunology* 150, 65–85.

Moyne, A. L., Shelby, R., Cleveland, T. E., and Tuzun, S. (2001). *Bacillomycin D*: an iturin with antifungal activity against *Aspergillus flavus*. *J. Appl. Microbiol.* **90**:622-629

Moyne, A. L., Shelby, R., Cleveland, T. E., and Tuzun, S. (2001). *Bacillomycin D*: an iturin with antifungal activity against *Aspergillus flavus*. *J. Appl. Microbiol.* **90**:622-629

Muchembled J, Loune's-Hadj Sahraoui A, Grandmougin- Ferjani A, Sancholle M. 2006. Changes in lipid composition of *Blumeria graminis* f. sp. *tritici* conidia produced on wheat leaves treated with heptanoyl salicylic acid. *Phytochemistry* 67, 1104–1109.

Muller J, Aeschbacher R, Sprenger N, Boller T, Wiemken A. 2000. Disaccharide-mediated regulation of sucrose: fructan-6- fructosyltransferase (6-SFT), a key enzyme of fructan synthesis in barley leaves. *Plant Physiology* 123, 265–273.

Nagpal, P., Ellis, C. M., Weber, H., Ploense, S. E., Barkawi, L. S., Guilfoyle, L. S., Hagen, G., Alonso, J. M., Cohen, J. D., Farmer, E. E., Ecker, J. R., and Reed, J. W. (2005). Auxin response factors ARF6 and ARF8 promote jasmonic acid production and flower maturation. *Development* **132**:4107-4718

Nagpal, P., Ellis, C. M., Weber, H., Ploense, S. E., Barkawi, L. S., Guilfoyle, L. S., Hagen, G., Alonso, J. M., Cohen, J. D., Farmer, E. E., Ecker, J. R., and Reed, J. W. (2005). Auxin response factors ARF6 and ARF8 promote jasmonic acid production and flower maturation. *Development* **132**:4107-4718

Naseem, M., and Dandekar, T. (2012). The role of auxin-cytokinin antagonism in plant- pathogen interactions. *PLoS Pathog* **8**:100-3026

Nunez-Pastrana R, Arcos-Ortega GF, Souza-Perera RA, Sanchez-Borges CA, Nakazawa-Ueji YE, Garcia-Villalobos FJ, Guzman-Antonio AA, Zuniga-Aguilar JJ. 2011. Ethylene, but not salicylic acid or methyl jasmonate, induces a resistance response against *Phytophthora capsici* in Habanero pepper. *European Journal of Plant Pathology* **131**, 699–683.

Nürnberg, T., and Scheel, D. (2001). Signal transmission in the plant immune response.

Nürnberg, T., and Scheel, D. (2001). Signal transmission in the plant immune response. *Trends Plant Sci* **6**:372-379

Olsson, S., and Nordbring-Hertz, B. (1985). Microsclerotial germination of *Verticillium dahliae* as affected by rape rhizosphere. *FEMS Microbiol. Ecol.* **31**:293-299

Oñate-Sánchez, L., and Vicente-Carbajosa, J. (2008). DNA-free RNA isolation

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

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

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

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

Pattanagul W. 2011. Exogenous abscisic acid enhances sugar accumulation in rice (*Oryza sativa* L.) under drought stress. *Asian Journal of Plant Sciences* 10, 212–219.

Penninckx, I. A. M., Eggermont, K., Terras, F. R. G., Thomma, B. P. H. J., De Samblanx, G. W., Buchala, A., Métraux, J. b., Manners, J. M., and Broekaer, W. F. (1996). Pathogen Induced Systemic Activation of a Plant Defensin Gene in *Arabidopsis* Follows a Salicylic Acid- Independent Pathway. *Plant Cell* 8:2309-2323
Phytoparasitica **7**:107-116 *Phytopath. medit.* 23:220

Pieterse CMJ, Leon-Reyes A, Van der Ent S, Van Wees SCM. 2009. Networking by small-molecule hormones in plant immunity. *Nature Chemical Biology* 5, 308–316.

Pieterse, C.M.J.; Leon-Reyes, A.; Van der Ent, S.; Van Wees, S.C.M. Networking by small-molecule hormones in plant immunity. *Nat. Chem. Biol.* **2009**, 5, 308–316.

Piskurewicz U, Tureckova V, Lacombe E, Lopez-Molina L. 2009. Far-red light inhibits germination through DELLA-dependent stimulation of ABA synthesis and ABI3 activity. *EMBO Journal* 28, 2259–2271.

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

Pogany M, Koehl J, Heiser I, Elstner E, Barna B. 2004. Juvenility of tobacco induced by cytokinin gene introduction decreases susceptibility to Tobacco necrosis virus and confers tolerance to oxidative stress. *Physiology and Molecular Plant Pathology* 65, 39–47.

Proels RK, Roitsch T. 2009. Extracellular invertase LIN6 of tomato: a pivotal enzyme for integration of metabolic, hormonal, and stress signals is regulated by a diurnal rhythm. *Journal of Experimental Botany* 60, 1555–1567.

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

Qi T, Song S, Ren Q, Wu D, Huang H, Chen Y, Fan M, Peng W,

Quiroga AM, Berli FJ, Moreno D, Cavagnaro JB, Bottini R. 2009. Abscisic acid sprays significantly increase yield per plant in vineyard grown wine grape (*Vitis vinifera* L.) cv. Cabernet Sauvignon through increased berry set with no negative effects on anthocyanin content and total polyphenol index of both juice and wine. *Journal of Plant Growth Regulation* 28, 28–35.

R. A., Hirt, H., and Mengiste, T. (2006). Distinct roles of the membrane anchored Botrytis Induced Kinase 1 in *Arabidopsis* resistance to necrotrophic and biotrophic pathogens. *The Plant Cell* 188:257-273

Rahnamaeian M. 2011. Antimicrobial peptides: modes of mechanism, modulation of defence responses. *Plant Signaling and Behavior* 6, 1325–1332.

Rasul S, Dubreuil-Maurizi C, Lamotte O, Koen E, Poinssot B, Alcaraz G, Wendehenne D, Jeandroz S. 2012. Nitric oxide production mediates oligogalacturonides-triggered immunity and resistance to *Botrytis cinerea* in *Arabidopsis thaliana*. *Plant, Cell and Environment* doi: 10.1111/j.1365-3040.2012.02505.x (Epub ahead of print).

Reignault P, Cojan A, Muchembled J, Sahouri AL, Durand R, Sancholle M. 2001. Trehalose induces resistance to powdery mildew in wheat. *New Phytologist* 149, 519–529.

Ren C, Xie D. 2011. The jasmonate-ZIM-domain proteins interact with the WD-repeat/bHLH/MYB complexes to regulate jasmonate mediated anthocyanin accumulation and trichome initiation in *Arabidopsis thaliana*. *The Plant Cell* 23, 1795–1814.

Ridley BL, O'Neill MA, Mohnen D. 2001. Pectins: Structure, biosynthesis, and oligogalacturonide-related signaling. *Phytochemistry* 57, 929–967.

Roberts MR, Paul ND. 2006. Seduced by the dark side: integrating molecular and ecological perspectives on the influence of light on plant defence against pests and pathogens. *New Phytologist* 170, 677–699.

Robert-Seilaniantz A, Navarro L, Bari R, Jones JDG. 2007. Pathological hormone imbalances. *Current Opinion in Plant Biology* 10, 372–379.

Robson F, Okamoto H, Patrick E, Harris SR, Wasternack C, Brearley C, Turner JG. 2010. Jasmonate and phytochrome A signaling in Arabidopsis wound and shade responses are integrated through JAZ1 stability. *The Plant Cell* 22, 1143–1160.

Roitsch T, Balibrea ME, Hofmann M, Proels R, Sinha AK. 2003. Extracellular invertase: key metabolic enzyme and PR protein. *Journal of Experimental Botany* 54, 513–524.

Rolland F, Baena-Gonzalez E, Sheen J. 2006. Sugar sensing and signaling in plants: conserved and novel mechanisms. *Annual Review of Plant Biology* 57, 675–709.

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

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

Sano H, Seo S, Koizumi N, Niki T, Iwamura H, Ohashi Y. 1996. Regulation by cytokinins of endogenous levels of jasmonic and salicylic acids in mechanically wounded tobacco plants. *Plant and Cell Physiology* 37, 762–769.

Schaarschmidt S, Roitsch T, Hause B. 2006. Arbuscular mycorrhiza induces gene expression of the apoplastic invertase LIN6 in tomato (*Lycopersicon esculentum*) roots. *Journal of Experimental Botany* 57, 4015–4023.

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

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

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

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

Schwachtje J, Karojet S, Thormaehlen I, Bernholz C, Kunz S,

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

Serrano M, Kanehara K, Torres M, Yamada K, Tintor N, Kombrink E, Schulze-Lefert P, Saijo Y. 2012. Repression of sucrose/ultraviolet B light-induced flavonoid accumulation in microbe-associated molecular pattern-triggered immunity in *Arabidopsis*. *Plant Physiology* 158, 408–422.

Shalitin D, Wolf S. 2000. Cucumber mosaic virus infection affects sugar transport in melon plants. *Plant Physiology* 123, 597–604.

Shan X, Zhang Y, Peng W, Wang Z, Xie D. 2009. Molecular mechanism for jasmonate-induction of anthocyanin accumulation in *Arabidopsis*. *Journal of Experimental Botany* 60, 3849–3860.

Shanahan, P., O'Sullivan, D. J., Simpson, P., Glennon, J. D., and O'Gara, F. (1992). Isolation of 2,4-Diacetylphloroglucinol from a fluorescent pseudomonad and investigation of physiological parameters influencing its production. *Appl. Environ. Microbiol* 58:353-358

Sherf, A. F., and MacNab, A. A. (1986). *Vegetable Diseases and their Control.* (2nd ed.). John Wiley & sons, eds. New York, USA, pp728

Sherf, A. F., and MacNab, A. A. (1986). *Vegetable Diseases and their Control.* (2nd ed.). John Wiley & sons, eds. New York, USA, pp728

Shirasu K. 2009. The HSP90–SGT1 chaperone complex for NLR immune sensors. *Annual Review of Plant Biology* 60, 139–164.

Silo-Suh, L. A., Lethbridge, B. J., Raffel, S. J., He, H., Clardy, J., and Handelsman, J. (1994). Biological activities of two fungistatic antibiotics produced by *Bacillus cereus* UW85. *Appl. Environ. Microbiol* **60**: 2023-2030

Singh V, Louis J, Ayre BG, Reese JC, Shah J. 2011. TREHALOSE PHOSPHATE SYNTHASE11-dependent trehalose metabolism promotes *Arabidopsis thaliana* defence against the phloem feeding insect *Myzus persicae*. *The Plant Journal* **67**, 94–104.

Sinha AK, Hofmann MG, Romer U, Kockenberger W, Elling L, Roitsch T. 2002. Metabolizable and non-metabolizable sugars activate different signal transduction pathways in tomato. *Plant Physiology* **128**, 1480–1489.

Smeekens S, Ma J, Hanson J, Rolland F. 2010. Sugar signals and molecular networks controlling plant growth. *Current Opinion in Plant Biology* **13**, 274–279.

Smith H. 1990. Pathogenicity and the microbe in vivo. The 1989 Fred Griffith Review Lecture. *Journal of General Microbiology* **136**, 377–393.

Smith, K. P., Havey, M. J., and Handelsman, J. (1993). Suppression of cottony leak of cucumber with *Bacillus cereus* strain UW85. *Plant Dis* **77**:139-142

Snyder, W. C., and Smith, S. N. (1981). Current Status. In: *Fungal Wilt Diseases of Plants*. M.E. Mace, A.A. Bell and C.H. Beckman, eds. Academic Press, Inc. 111 Fifth Ave., New York 10003, pp640

Snyder, W. C., and Smith, S. N. (1981). Current Status. In: *Fungal Wilt Diseases of Plants*. M.E. Mace, A.A. Bell and C.H. Beckman, eds. Academic Press, Inc. 111 Fifth Ave., New York 10003, pp640

Solfanelli C, Poggi A, Loreti E, Alpi A, Perata P. 2006. Sucrosespecific induction of the anthocyanin biosynthetic pathway in *Arabidopsis*. *Plant Physiology* **140**, 637–646.

Spoel, S.H.; Johnson, J.S.; Dong, X. Regulation of tradeoffs between plant defenses against pathogens with different lifestyles. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **2007**, *104*, 18842–18847.

Staskawicz, B. J., Ausubel, F. M., Baker, B. J., Ellis, J. G., and Jones, J. D. G. (1995). Molecular genetics of plant disease resistance. *Science* **268**:661-667

- Sturm A, Chrispeels MJ. 1990.** cDNA cloning of carrot extracellular b-fructosidase and its expression in response to wounding and bacterial infection. *Plant Cell* 2, 1107–1119.
- Subbarao, K. V., Kabir, Z., Martin, F. N., and Koike, S. T. (2007).** Management of soilborne diseases in strawberry using vegetable rotations. *Plant Dis* 91:964-972
- Teng S, Keurentjes J, Bentsink L, Koornneef M, Smeekens S. 2005.** Sucrose-specific induction of anthocyanin biosynthesis in *Arabidopsis* requires the MYB75/PAP1 gene. *Plant Physiology* 139, 1840–1852.
- Thanassoulopoulos, 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
- Thibaud MC, Gineste S, Nussaume L, Robaglia C. 2004.** Sucrose increases pathogenesis-related PR-2 gene expression in *Arabidopsis thaliana* through a SA-dependent but NPR1-independent signaling pathway. *Plant Physiology and Biochemistry* 42, 81–88.
- Thomashow, L. S., Bonsall, R. F., and Weller, D. M. (2002).** Antibiotic production by soil and rhizosphere microbes in situ. Pages 638-647 in: *Manual of Environmental Microbiology* (2nd ed.), ASM Press, Washington DC.
- Thomma, B.P.; Eggermont, K.; Penninckx, I.A.; Mauch-Mani, B.; Vogelsang, R.; Cammue, B.P.; Broekaert, W.F.** Separate jasmonate-dependent and salicylate-dependent defense-response pathways in *Arabidopsis* are essential for resistance to distinct microbial pathogens. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **1998**, 95, 15107–15111.
- Thomma, B.P.; Eggermont, K.; Tierens, K.F.; Broekaert, W.F.** Requirement of functional ethylene-insensitive 2 gene for efficient resistance of *Arabidopsis* to infection by *Botrytis cinerea*. *Plant Physiol.* **1999**, 121, 1093–1102.
- Ting JP, Willingham SB, Bergstralh DT. 2008.** NLRs at the intersection of cell death and immunity. *Nature Reviews Immunology* 8, 372–379.
- Tjamos, E. C., Biris, D. A, and Paplomatas, E. J. (1991).** Recovery of olive trees with *Verticillium* wilt after individual application of soil solarization in established olive orchards. *Plant Disease* 75:557-562

Tjamos, E. C., Biris, D. A, and Paplomatas, E. J. (1991). Recovery of olive trees with *Verticillium* wilt after individual application of soil solarization in established olive orchards. *Plant Disease* **75**:557-562

Tjamos, S. E., Flemetakis, E., Paplomatas, E. J., and Katinakis, P. (2005). Induction of resistance to *Verticillium dahliae* in *Arabidopsis thaliana* by the biocontrol agent K165 and pathogenesis-related proteins gene expression; *Mol. Plant Microbe In.* **18**: 555-561

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 K165 and pathogenesis-related proteins gene expression; *Mol. Plant Microbe In.* **18**: 555-561

Ton J, Flors V, Mauch-Mani B. 2009. The multifaceted role of ABA in disease resistance. *Trends in Plant Science* **14**, 310–317.

Trends Plant Sci **6**:372-379

Trouverie J, Chateau-Joubert S, Thevenot C, Jacquemot MP, Prioul JL. 2004. Regulation of vacuolar invertase by abscisic acid or glucose in leaves and roots from maize plantlets. *Planta* **219**, 894–905.

Tuzun, S., and Bent, E. (2005). Multigenic and Induced Systemic Resistance in Plants. *Appl. Environ. Microbiol.* **56**:908-912

Tuzun, S., and Bent, E. (2005). Multigenic and Induced Systemic Resistance in Plants. *Appl. Environ. Microbiol.* **56**:908-912

Valluru R, Van den Ende W. 2011. Myo-inositol and beyond – emerging networks under stress. *Plant Science* **181**, 387–400.

Van den Ende W, Lammens W, Van Laere A, Schroeven L, Le Roy K. 2009. Donor and acceptor substrate selectivity among plant glycoside hydrolase family 32 enzymes. *FEBS Journal* **276**, 5788–5798.

Van-Loon, L. C., (2007). Plant responses to plant growth-promoting rhizobacteria. *Plant Pathol* **119**:243-254

Van-Loon, L. C., (2007). Plant responses to plant growth-promoting rhizobacteria. *Plant Pathol* **119**:243-254

Van-Loon, L. C., and Van-Strien E. A. (1999). The families of pathogenesis-related proteins, their activities, and comparative analysis of PR-1 type proteins. *Physiological and Molecular Plant Pathology* **55**:85-97

Van-Loon, L. C., 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

Verhaest M, Lammens W, Le Roy K, De Ranter CJ, Van Laere A, Rabijns A, Van den Ende W. 2007. Insights into the fine architecture of the active site of chicory fructan 1-exohydrolase: 1-kestose as substrate vs sucrose as inhibitor. *New Phytologist* **174**, 90–100.

Veronese, P., Nakagami, H., Bluhm, B., AbuQamar, S., Chen, X., Salmeron, J., Dietrich, Wagner TA, Kohorn BD. 2001. Wall-associated kinases are expressed throughout plant development and are required for cell expansion. *Plant Cell* **13**, 303–318.

Wahl R, Wippel K, Goos S, Kamper J, Sauer N. 2010. A novel high-affinity sucrose transporter is required for virulence of the plant pathogen *Ustilago maydis*. *PLoS Biology* **8**, e1000303.

Wang N, Nobel PS. 1998. Phloem transport of fructans in the crassulacean acid metabolism species *Agave deserti*. *Plant Physiology* **116**, 709–714.

Wang, D., Pajerowska-Mukhtar, K., Culler, A. H., and Dong, X. (2007). Salicylic acid inhibits pathogen growth in plants through repression of the auxin signaling pathway. *Curr Biol* **17**:1784-1790

Wang, D., Pajerowska-Mukhtar, K., Culler, A. H., and Dong, X. (2007). Salicylic acid inhibits pathogen growth in plants through repression of the auxin signaling pathway. *Curr Biol* **17**:1784-1790

Warnasooriya SN, Porter KJ, Montgomery BL. 2011. Tissue- and isoform-specific phytochrome regulation of light-dependent anthocyanin accumulation in *Arabidopsis thaliana*. *Plant Signaling and Behavior* **6**, 624–631.

Watson MA, Watson DJ. 1951. The effect of infection with beet mosaic viruses on the carbohydrate content of sugar-beet leaves, and on translocation. *Annals of Applied Biology* 38, 276–289.

Weiss D. 2000. Regulation of flower pigmentation and growth: multiple signalling pathways control anthocyanin synthesis in expanding petals. *Physiologia Plantarum* 110, 152–157.

Wildermuth, M.C.; Dewdney, J.; Wu, G.; Ausubel, F.M. Isochorismate synthase is required to synthesize salicylic acid for plant defence. *Nature* 2001, 414, 562–565.

Wilhelm, S. (1984). Sources and genetics of *Verticillium* wilt resistance in major crops.

Wilhelm, S. (1984). Sources and genetics of *Verticillium* wilt resistance in major crops.

Wind J, Smeekens S, Hanson J. 2010. Sucrose: metabolite and signaling molecule. *Phytochemistry* 71, 1610–1614.

Wingler A, Delatte TL, O’Hara LE, Primavesi LF, Jhurrea D, Paul MJ, Schlupepmann H. 2012. Trehalose 6-phosphate is required for the onset of leaf senescence associated with high carbon availability. *Plant Physiology* 158, 1241–1251.

Winkel-Shirley B. 2001. Flavonoid biosynthesis: a colorful model for genetics, biochemistry, cell biology, and biotechnology. *Plant Physiology* 126, 485–493.

Woo, S. L., Scala, f., Ruocco, M., and Lorito, M. (2006). The molecular biology of the interaction between *Trichoderma* spp. Phytopathogenic fungi and plants. *Phytopathol* 96:181- 185

Woolliams, G. E. (1966). Host range and syptomatology of *Verticillium dahliae* in economic, weed and native plants in interior British Columbia. *Can. J. Plant Sci.* 46: 661-669

Woolliams, G. E. (1966). Host range and syptomatology of *Verticillium dahliae* in economic, weed and native plants in interior British Columbia. *Can. J. Plant Sci.* 46: 661-669

Xiang L, Le Roy K, Bolouri-Moghaddam MR, Vanhaecke M, Lammens W, Rolland F, Van den Ende W. 2011. Exploring the neutral invertase-oxidative stress

defence connection in *Arabidopsis thaliana*. *Journal of Experimental Botany* 62, 3849–3862.

Xie Y, Ling T, Han Y, et al. 2008. Carbon monoxide enhances salt tolerance by nitric oxide mediated maintenance of ion homeostasis and up-regulation of antioxidant defence in wheat seedling roots. *Plant, Cell and Environment* 31, 1864–1881.

Yang, L., Jue, D., Li, W., Zhang, R., Chen, M., and Yang, Q. (2013). Identification of miRNA from eggplant (*Solanum melongena* L.) by small RNA deep sequencing and their response to *Verticillium dahliae* infection. *PLoS ONE* 8, e72840

Young, N. D. (2000). The genetic architecture of resistance. *Curr. Opin. Plant Biol.*

Young, N. D. (2000). The genetic architecture of resistance. *Curr. Opin. Plant Biol.* 3:285-290

Zaragoza O, Rodrigues ML, De Jesus M, Frases S, Dadachova E, Casadevall A. 2009. The capsule of the fungal pathogen *Cryptococcus neoformans*. *Advances in Applied Microbiology* 68, 133–216.

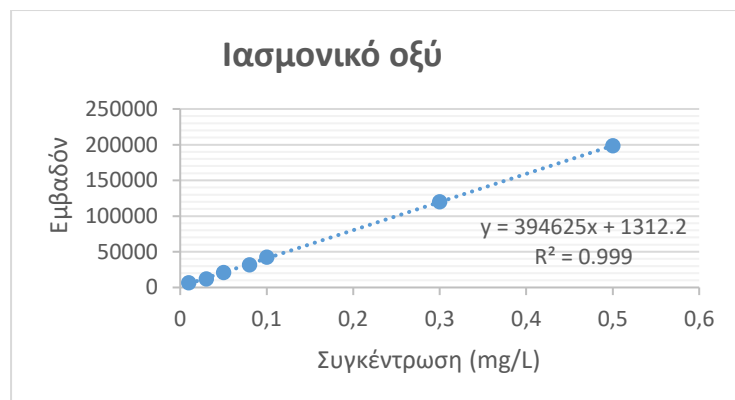
Zhang AY, Jiang MY, Zhang JH, Tan MP, Hu ZL. 2006. Mitogen activated protein kinase is involved in abscisic acid-induced antioxidant defence and acts downstream of reactive oxygen species production in leaves of maize plants. *Plant Physiology* 141, 475–487.

Zhang Y, Liu Z, Wang L, Zheng S, Xie J, Bi Y. 2010. Sucrose induced hypocotyl elongation of *Arabidopsis* seedlings in darkness depends on the presence of gibberellins. *Journal of Plant Physiology* 167, 1130–1136.

Zuther E, Kwart M, Willmitzer L, Heyer AG. 2004. Expression of a yeast-derived invertase in companion cells results in long-distance transport of a trisaccharide in an apoplastic loader and influences sucrose transport. *Planta* 218, 759–766

ΠΑΡΑΡΤΗΜΑ

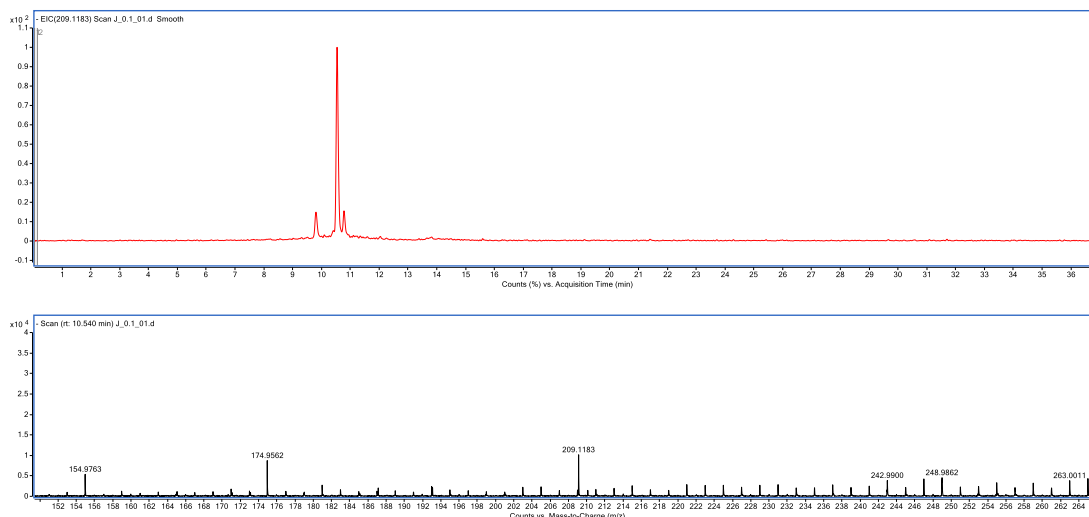
ΚΑΜΠΥΛΕΣ ΑΝΑΦΟΡΑΣ



LOD	0.01
LOQ	0.04

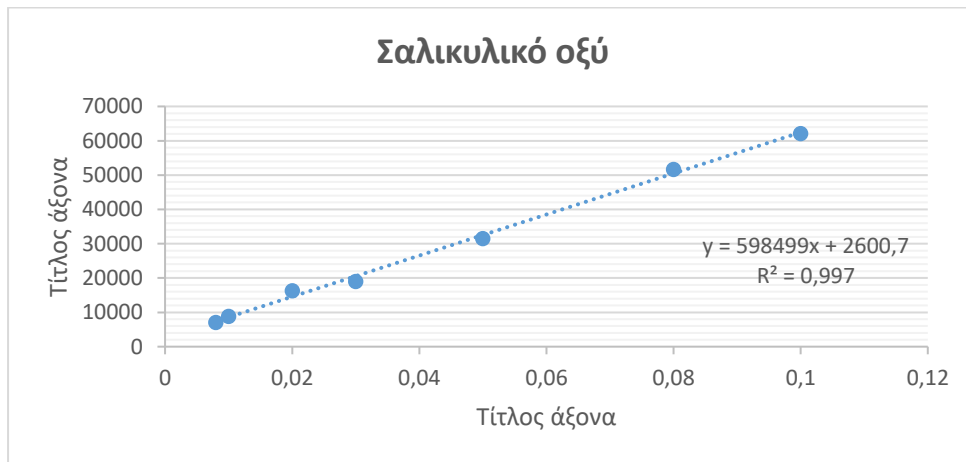
Εμφανίζει καλή γραμμικότητα με $R^2=0.999$ και $LOD = 0.01$ και $LOQ = 0.04$

Ενδεικτικά αναφέρω παρακάτω το χρωματογράφημα και το φασμα μαζας της προτυπής ένωσης του ιασμονικού οξέως σε συγκέντρωση 0,1 mg/L.



Στο χρωματογράφημα παρατηρώ ότι η ένωση εμφανίζεται στα 10.5 min.

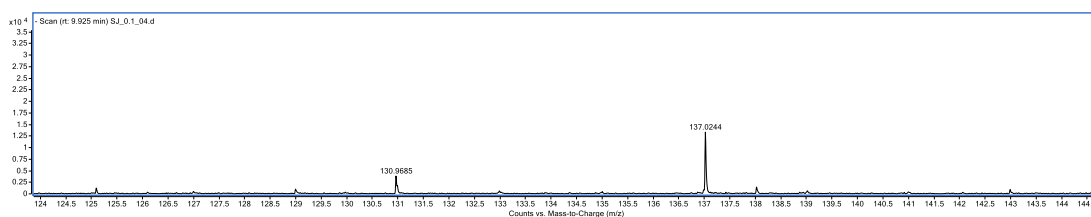
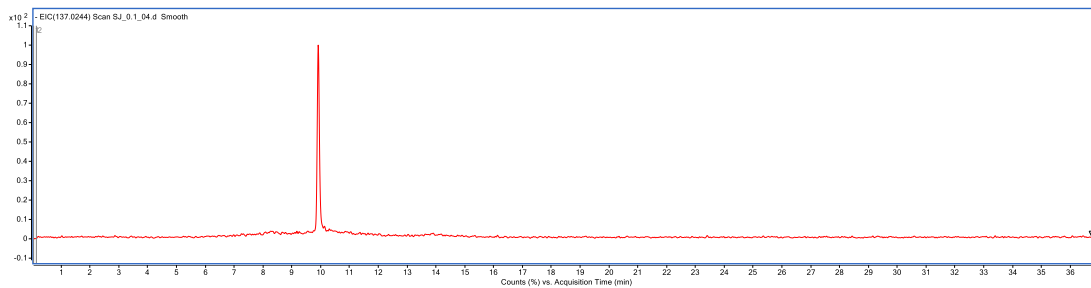
Στο φασμα μαζας παρατηρώ στον θετικό ιοντισμό το ιόν προσθήκης (adduct) $[M+H]^+ = 209.1183$.



LOD	0.01
LOQ	0.03

Εμφανίζει καλή γραμμικότητα με $R^2=0.997$ και $LOD = 0.01$ και $LOQ = 0.03$

Ενδεικτικά αναφέρω παρακάτω το χρωματογράφημα και το φασμα μαζας της προτυπής ενωσης του ιασμονικου οξεως σε συγκεντρωση 0,1mg/L.



Στο χρωματογράφημα παρατηρω οτι η ενωση εμφανίζεται στα 9.9 min.

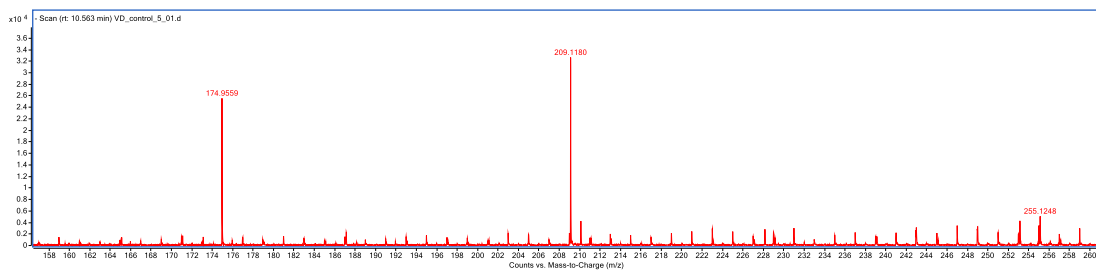
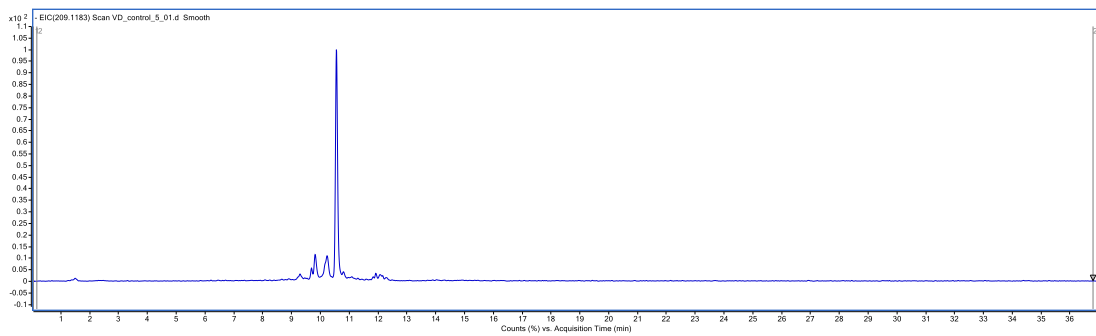
Στο φασμα μαζας παρατηρω στον θετικο ιοντισμο το ιον προσθηκης (adduct) $[M+H]^+ = 137.0244$.

ΔΕΙΓΜΑΤΑ

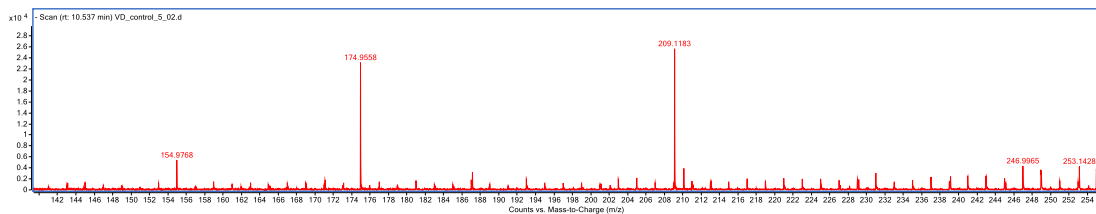
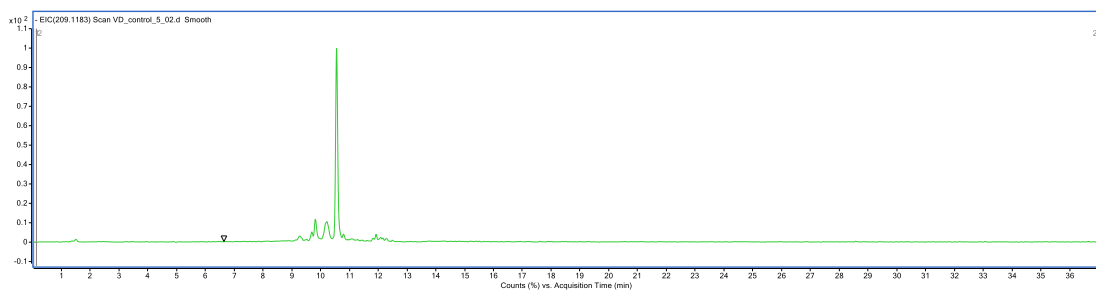
ΙΑΣΜΟΝΙΚΟ ΟΞΥ

Vd Control_5^η ημέρα

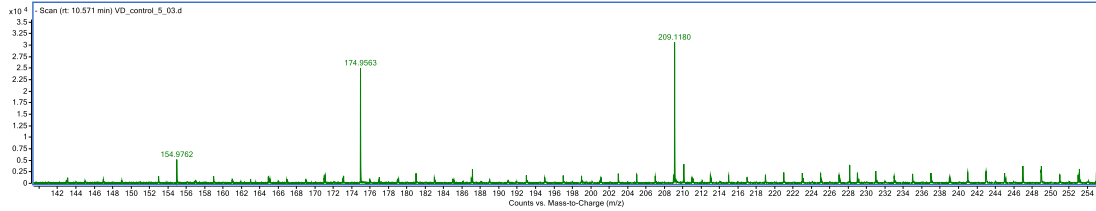
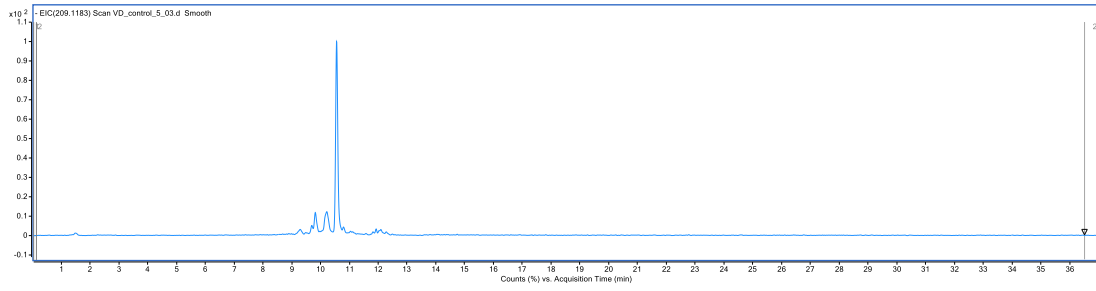
1^η Επανάληψη



2^η Επανάληψη

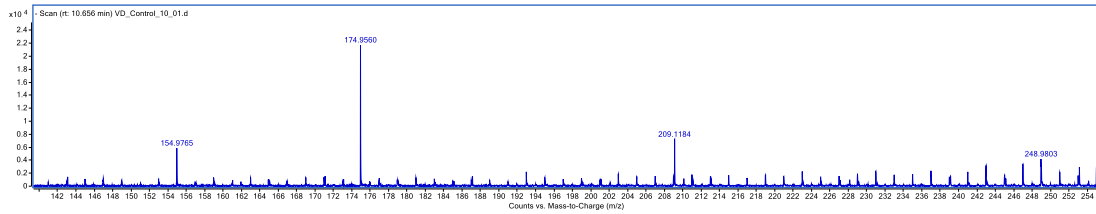
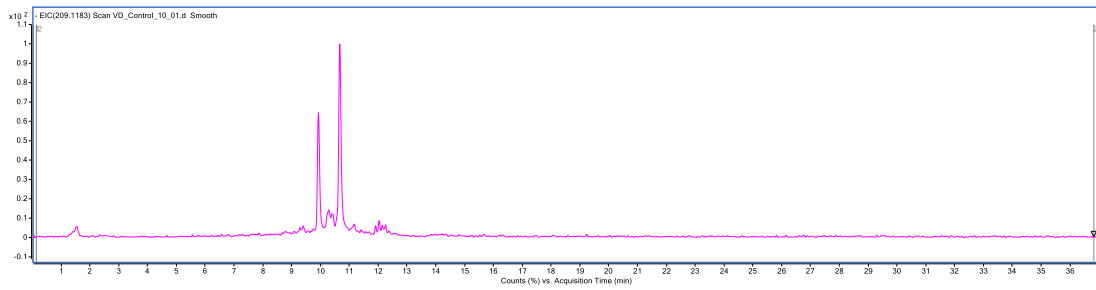


3^η Επανάληψη

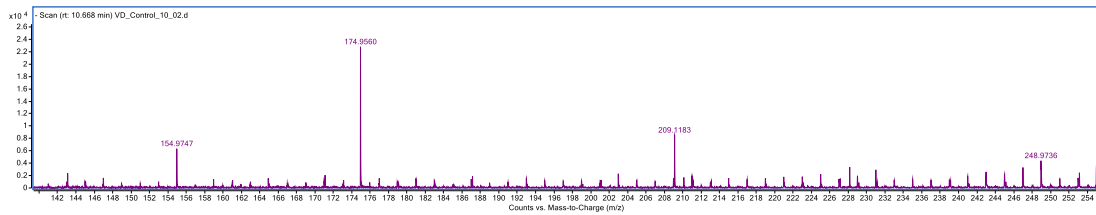
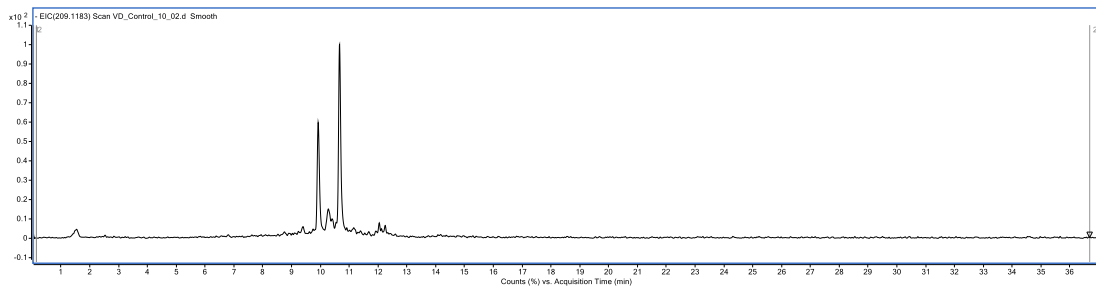


Vd Control_10ⁿ ημέρα

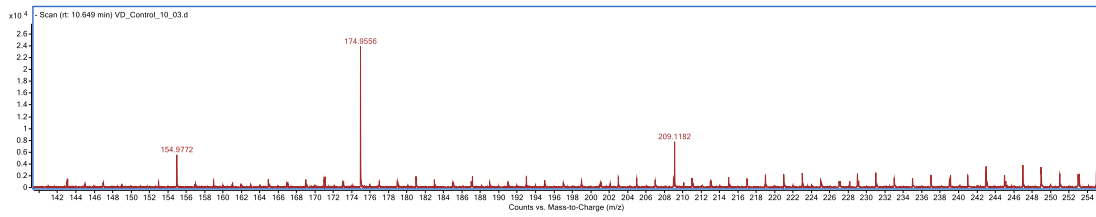
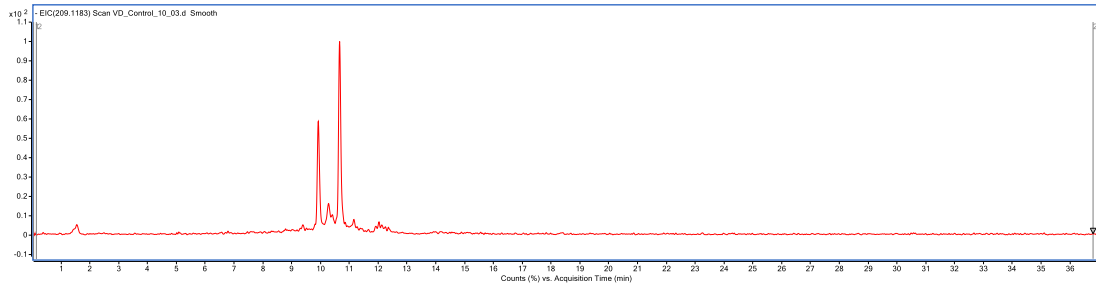
1



2

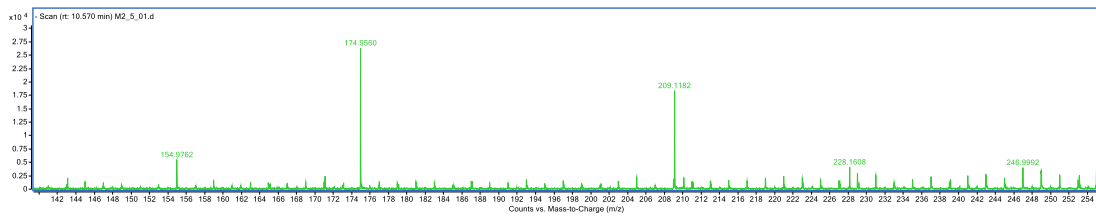
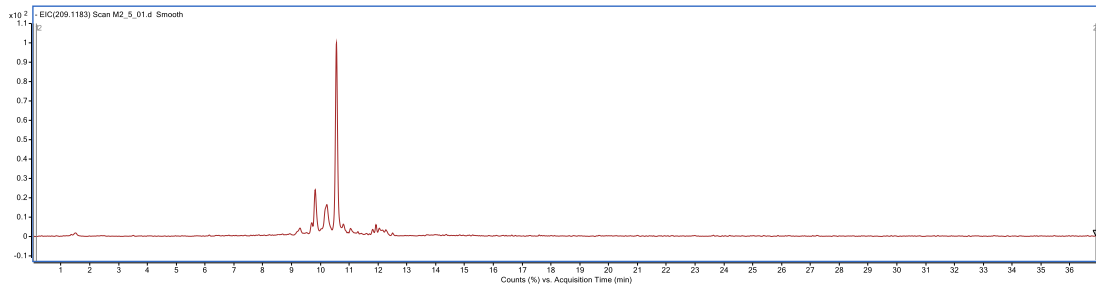


3

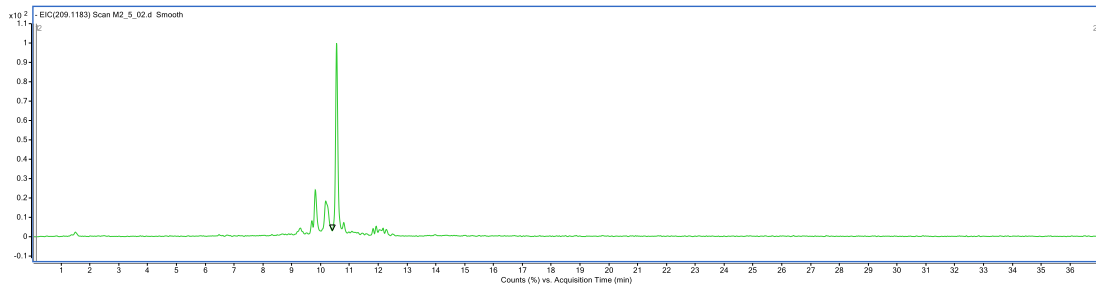


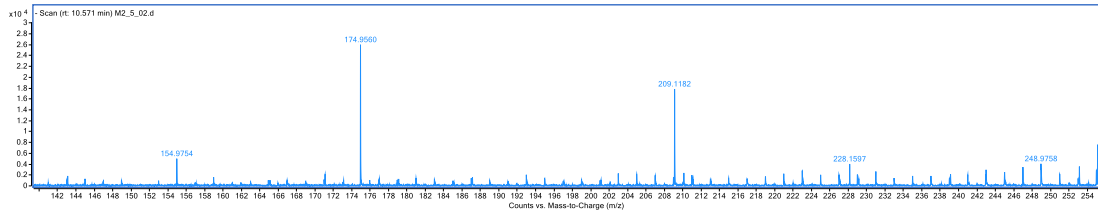
Maltose2_5^η ημέρα

1

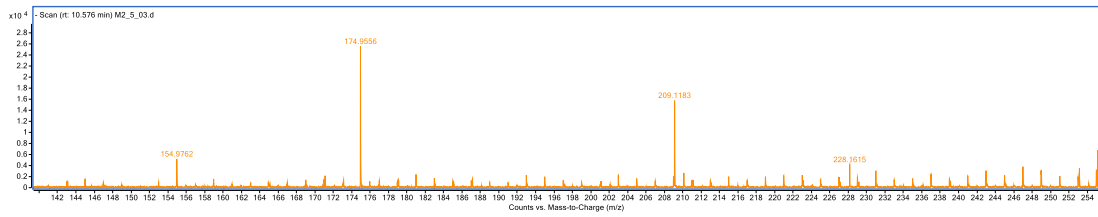
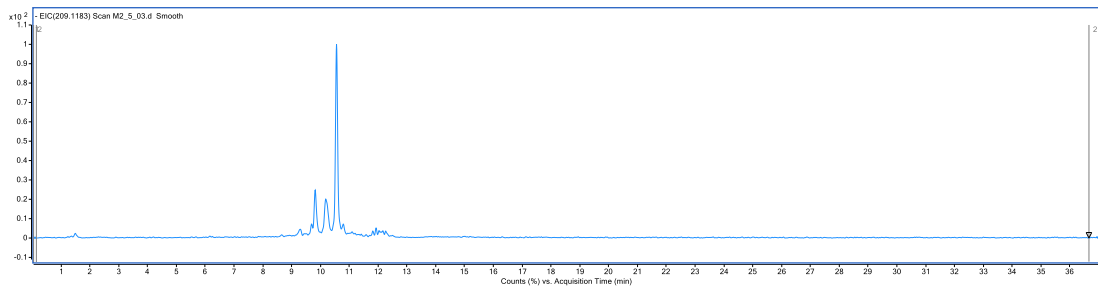


2





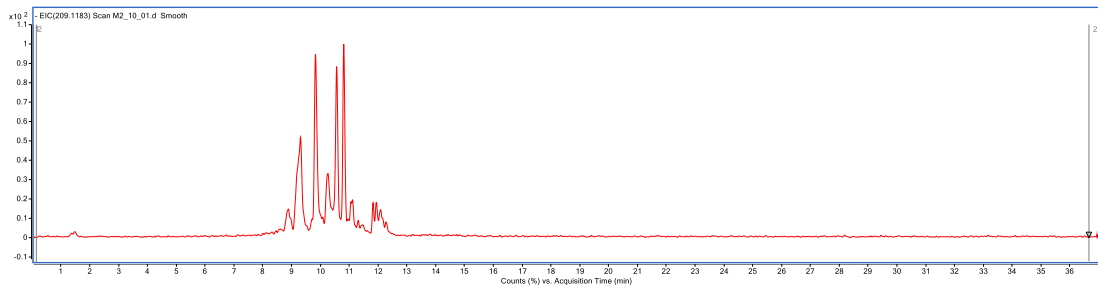
3

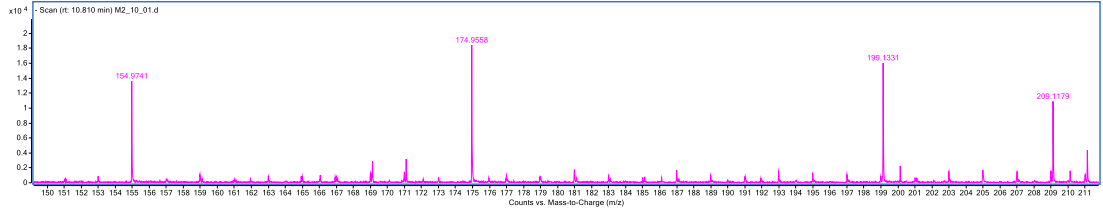
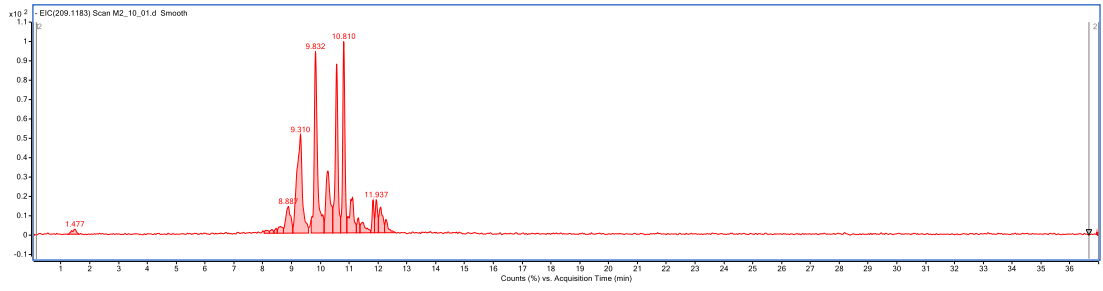


Maltose2_10^η ημέρα

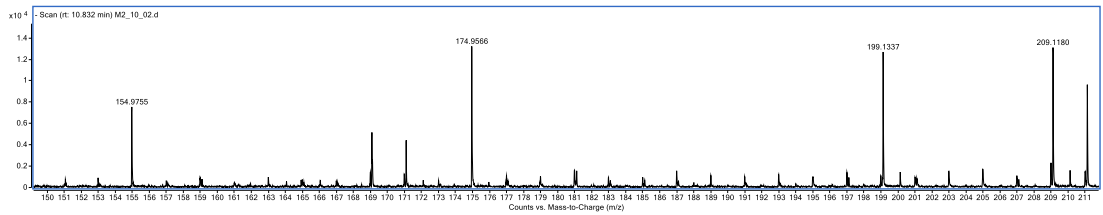
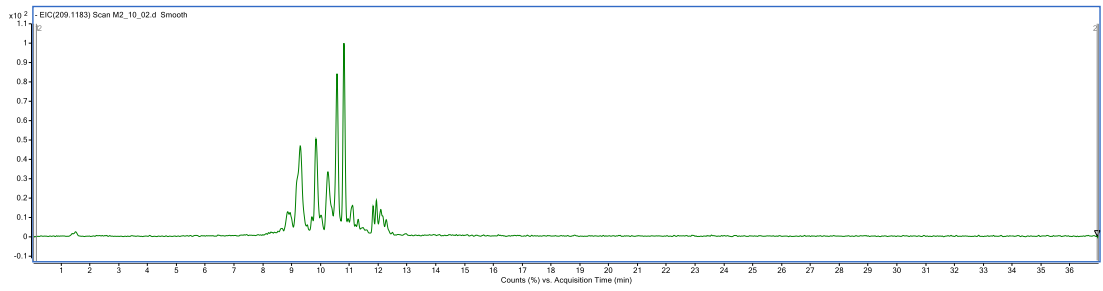
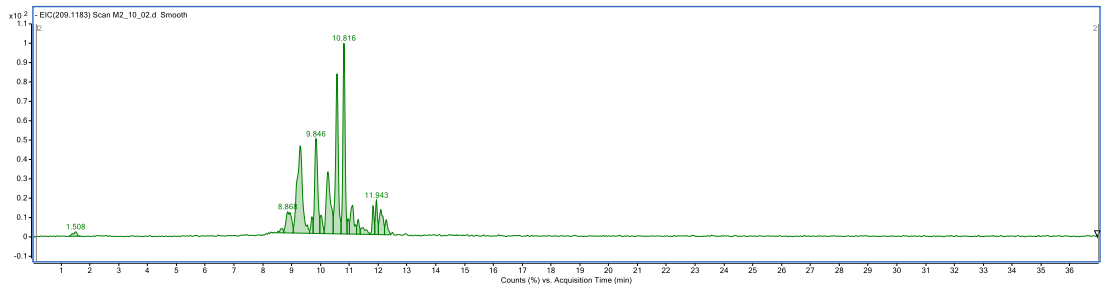
1

Η ένωση εμφανίζεται στα 10.810 λεπτά

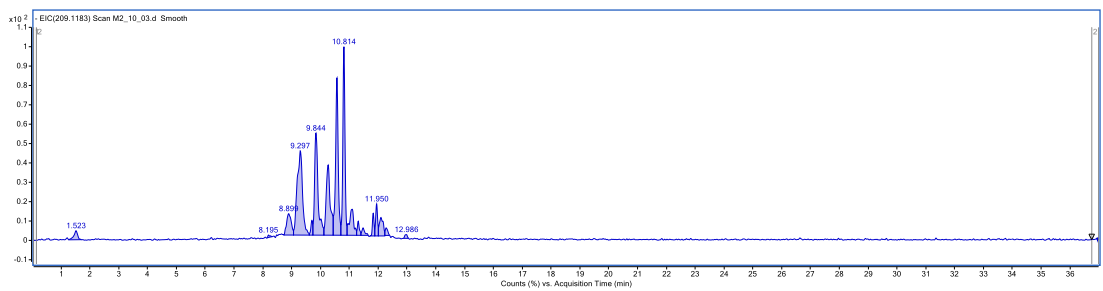


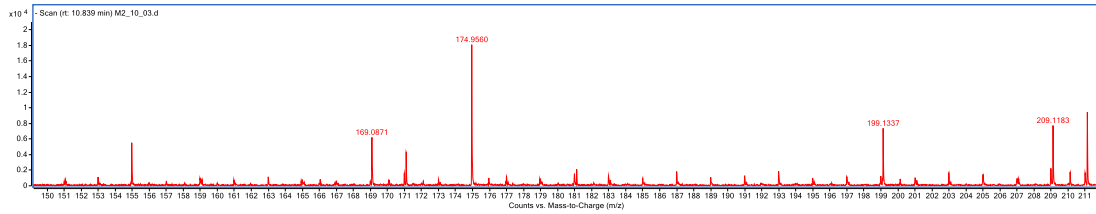
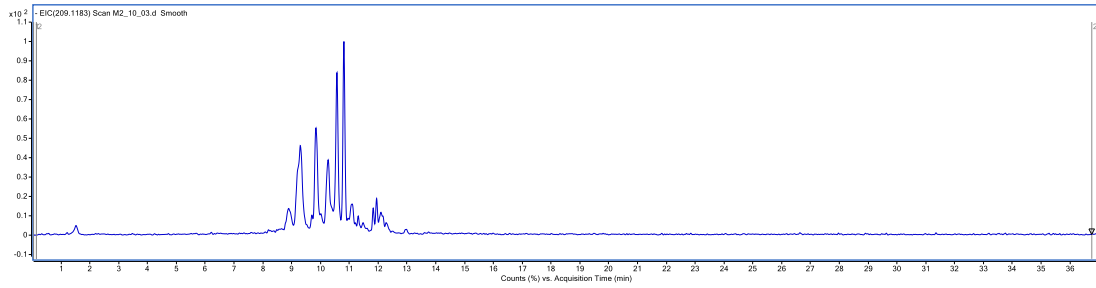


2



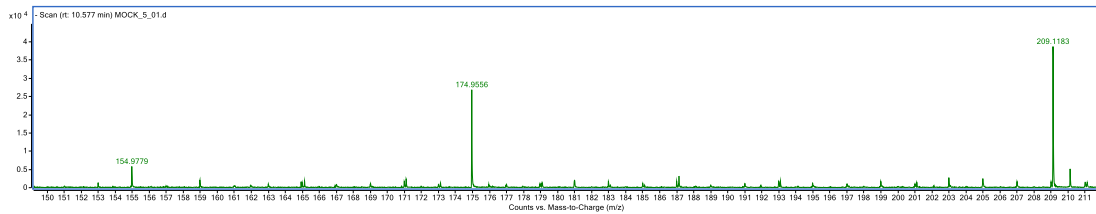
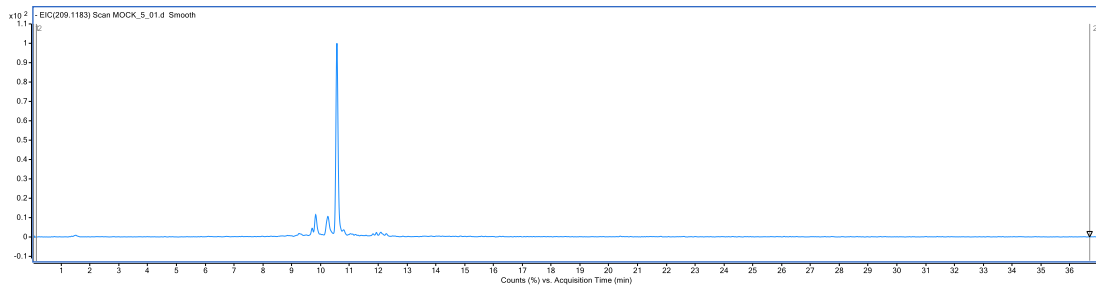
3



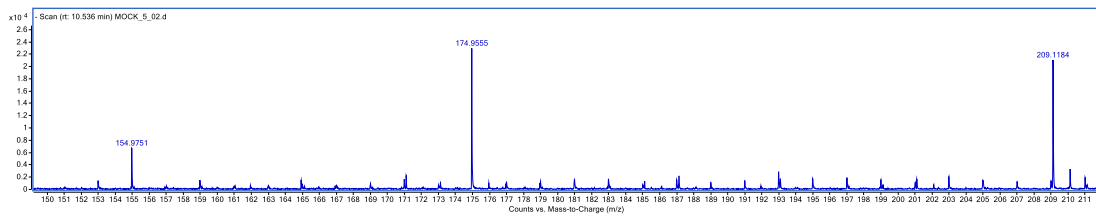
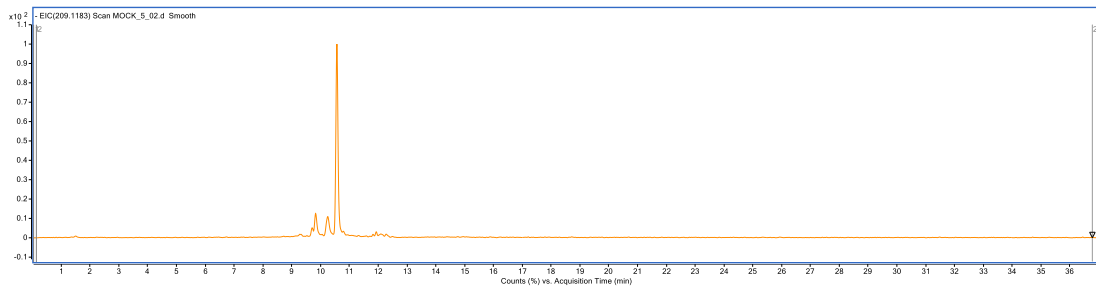


Mock_5^η ημέρα

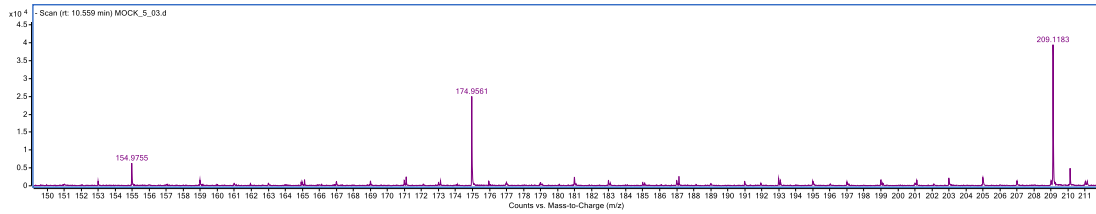
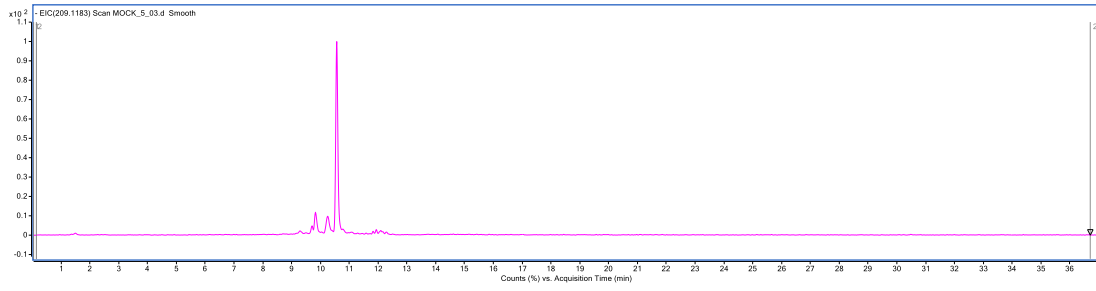
1



2

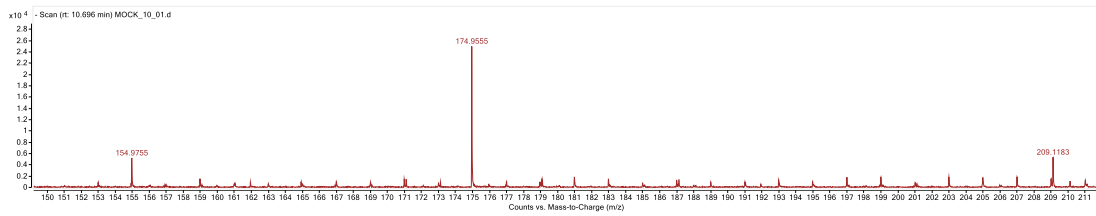
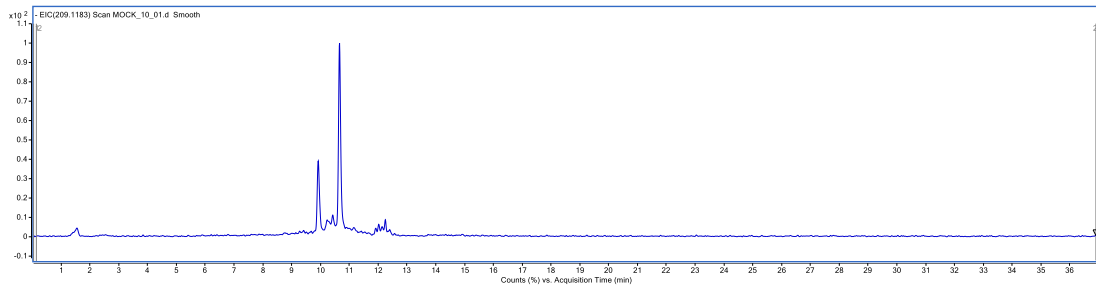


3

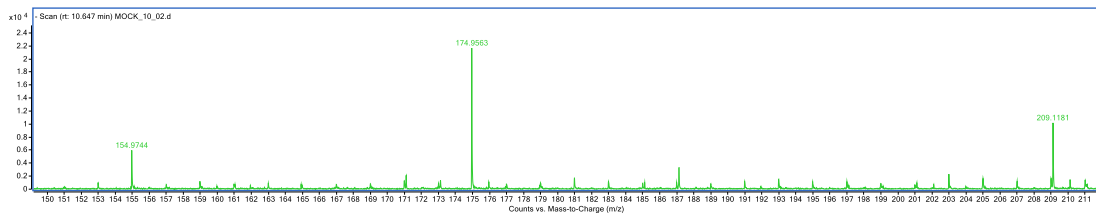
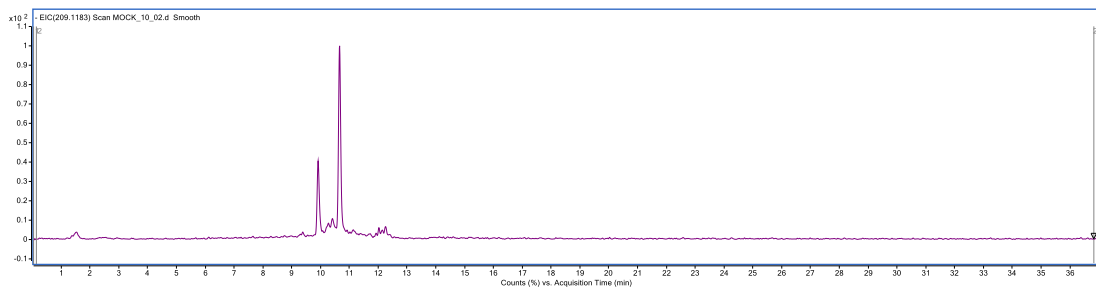


Mock_10ⁿ ημέρα

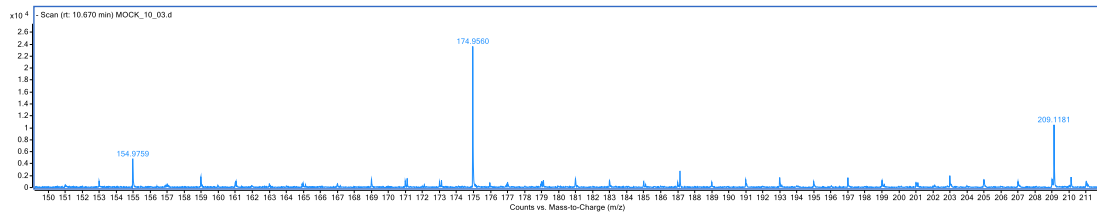
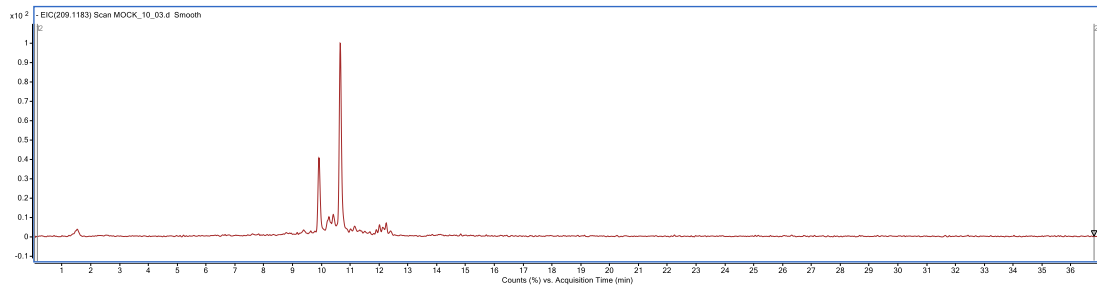
1



2

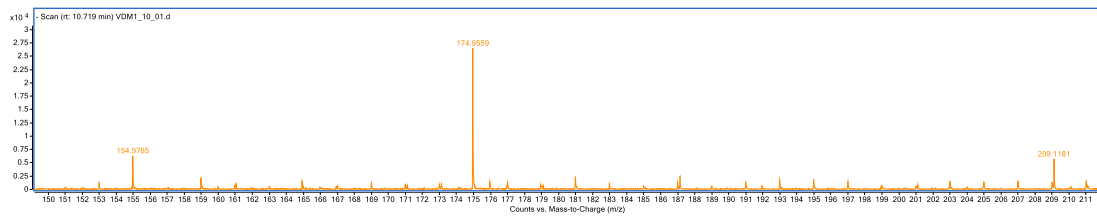
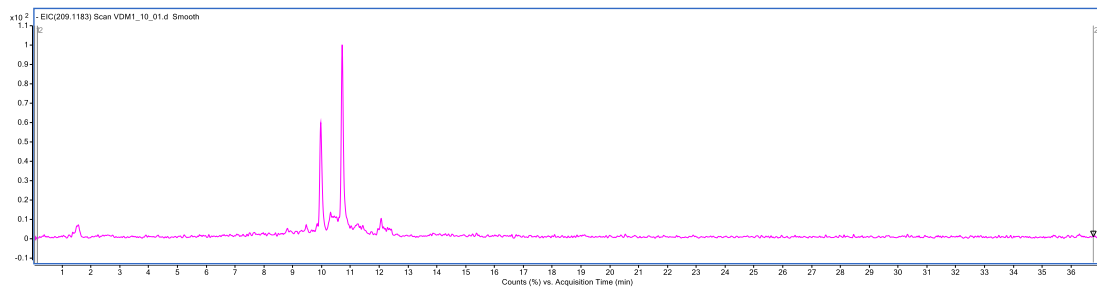


3

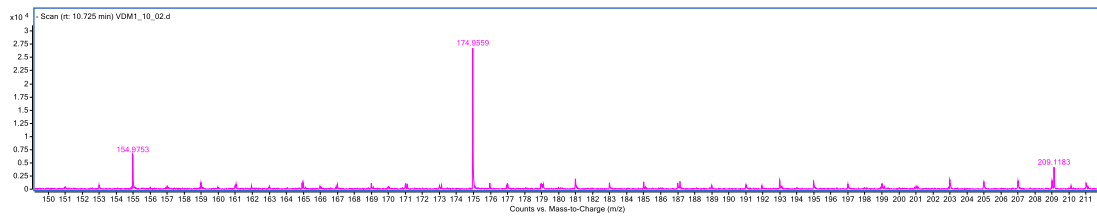
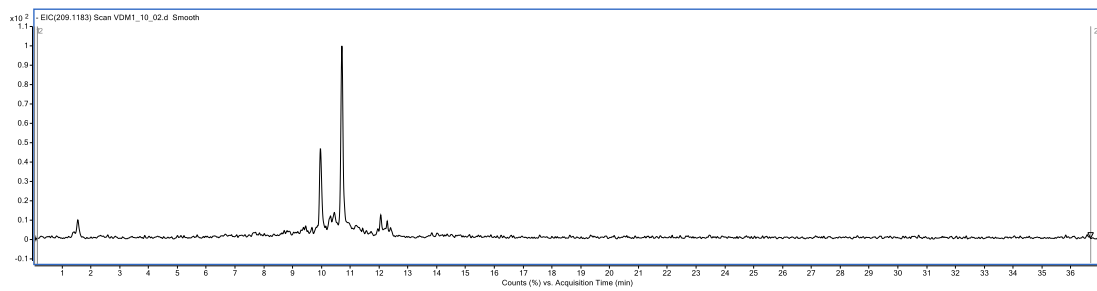


Vd+Maltose1_5th ημέρα

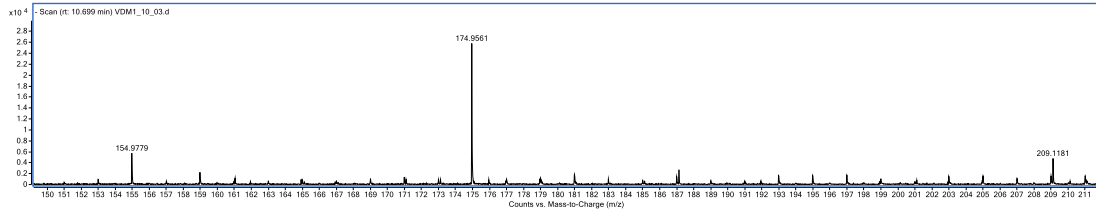
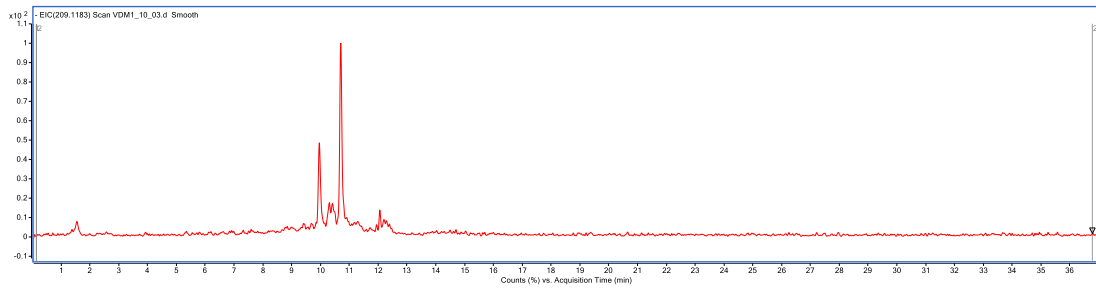
1



2

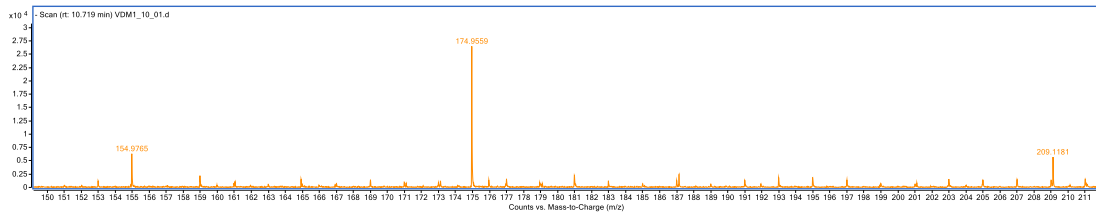
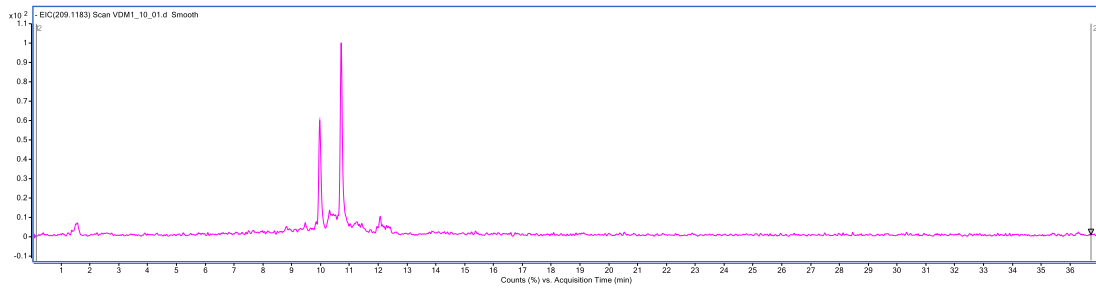


3

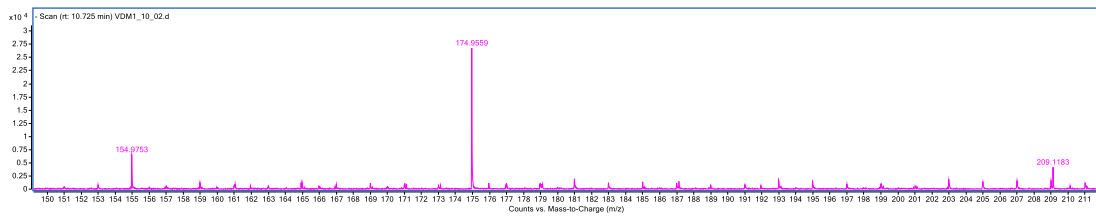
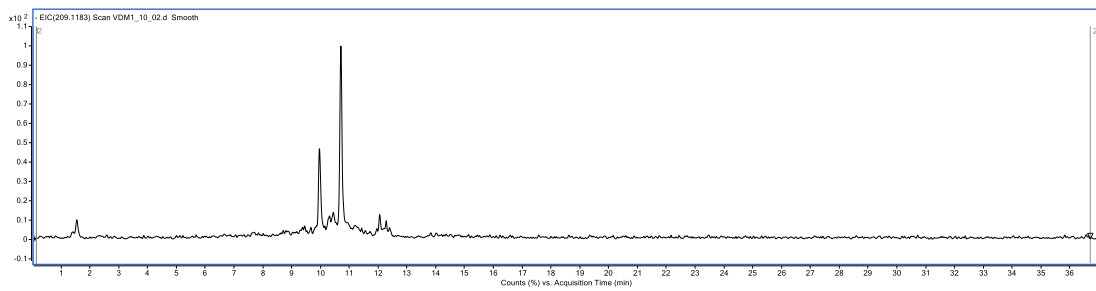


Vd+Maltose1_10th ημέρα

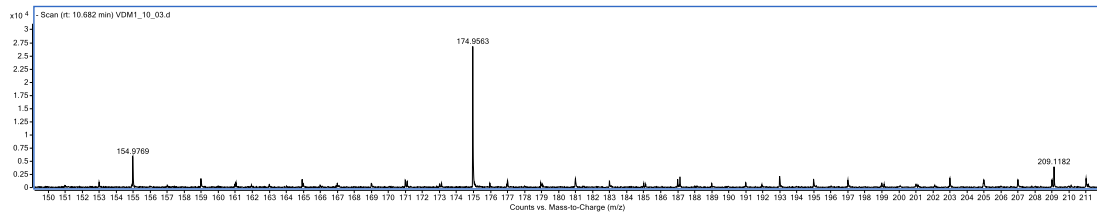
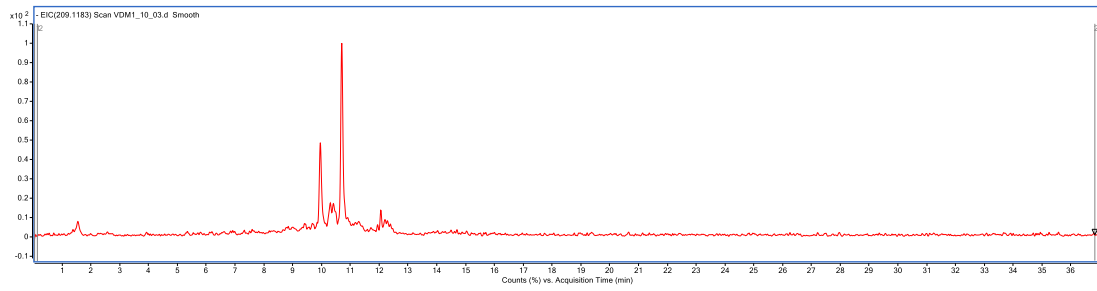
1



2

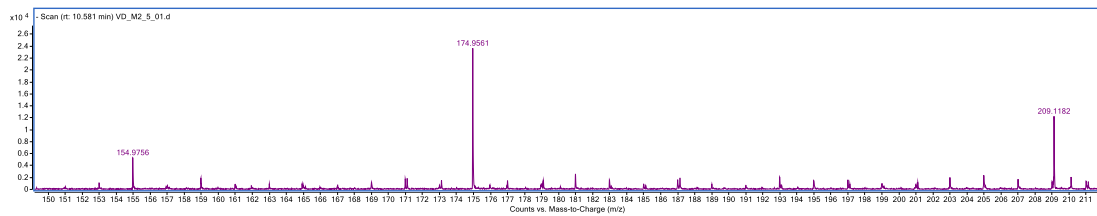
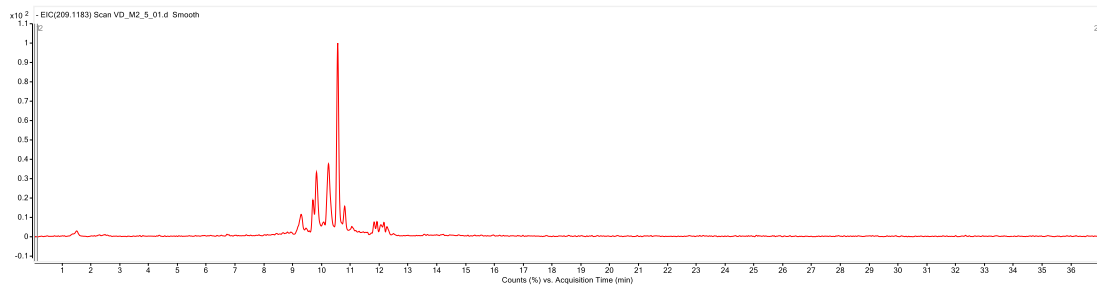


3

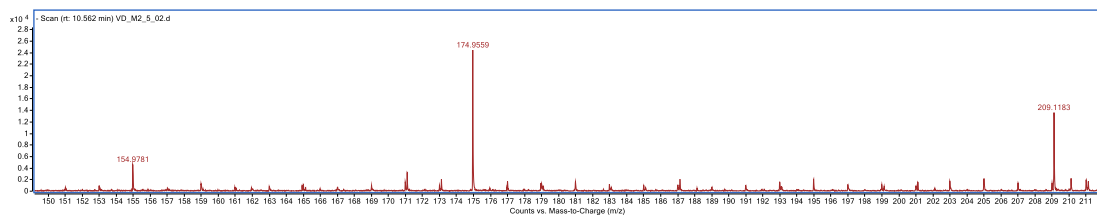
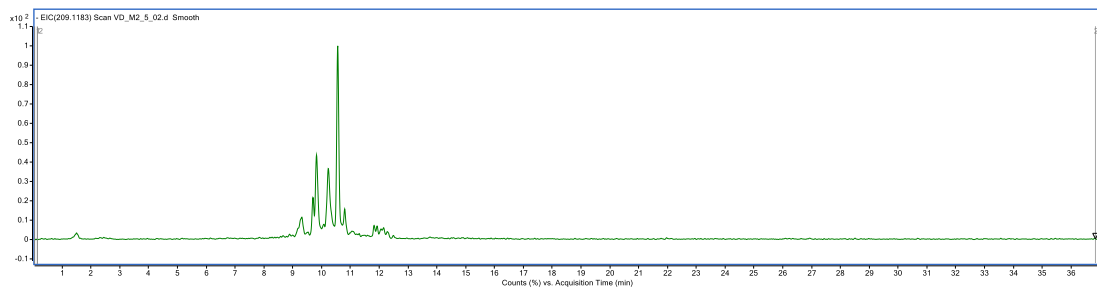


Vd+Maltose2_5ⁿ ημέρα

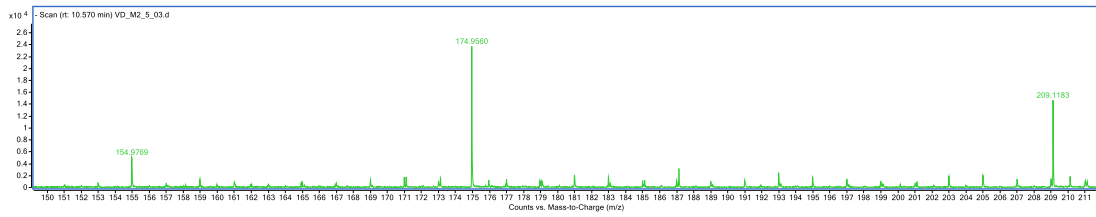
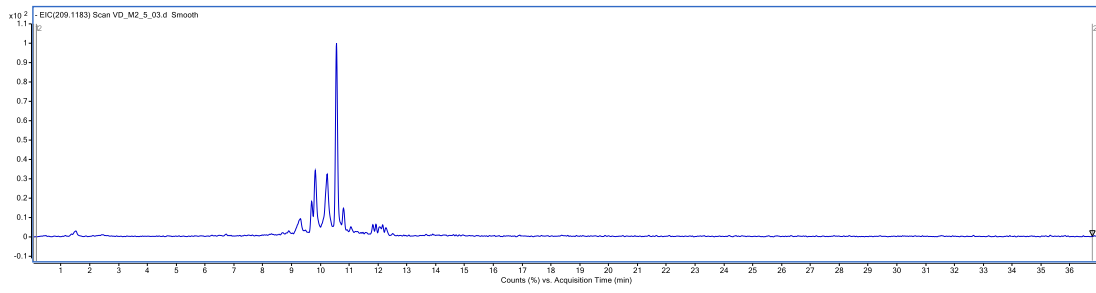
1



2

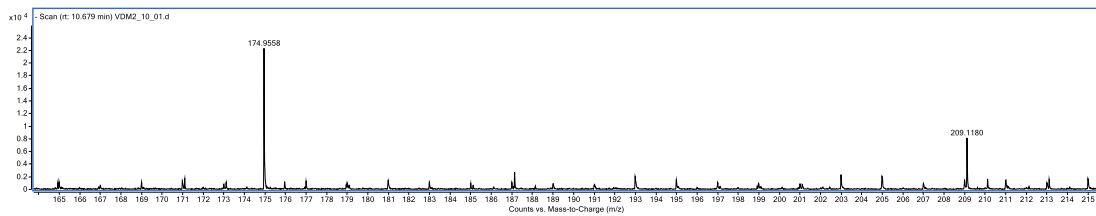
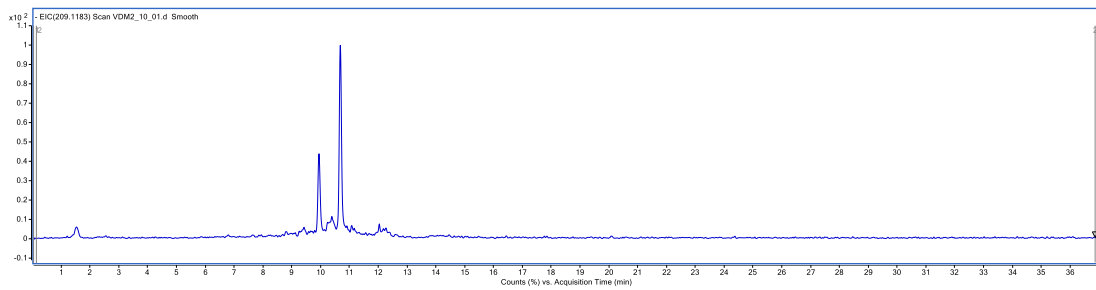


3

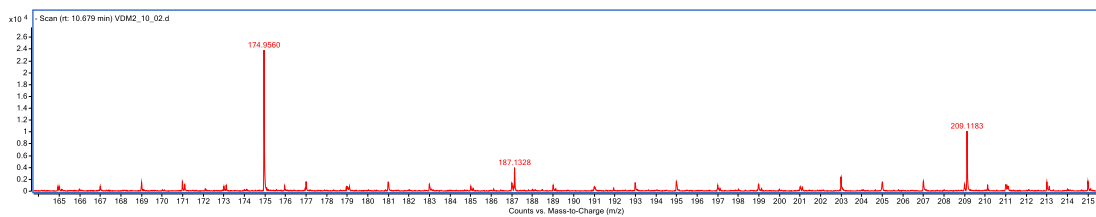
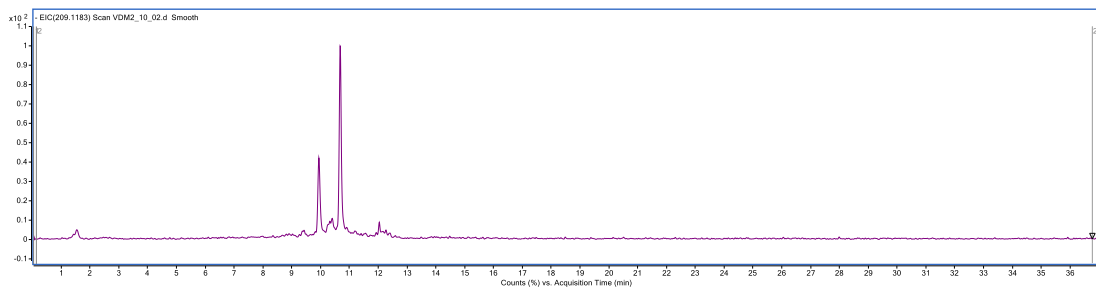


Vd+Maltose 2_10ⁿ ημέρα

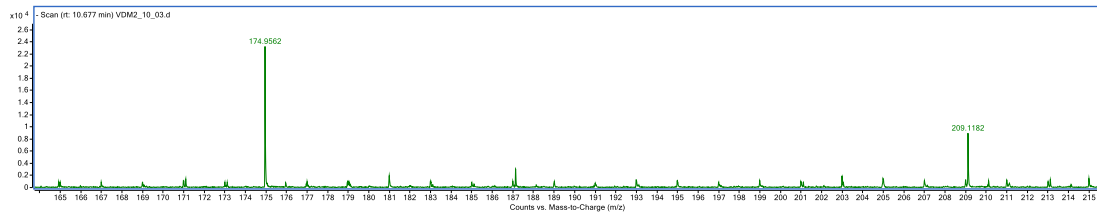
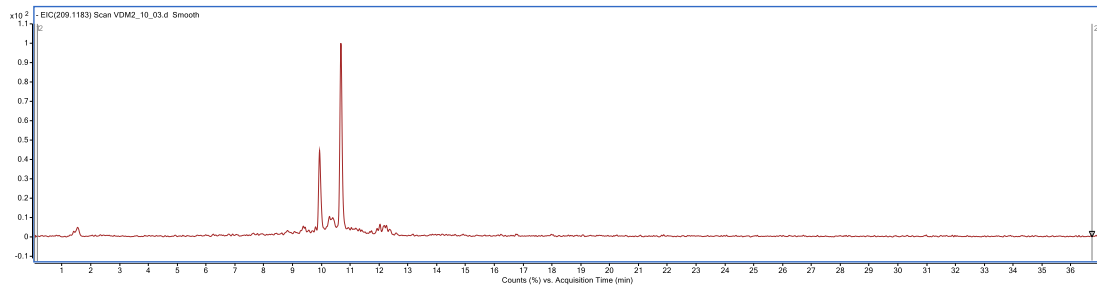
1



2



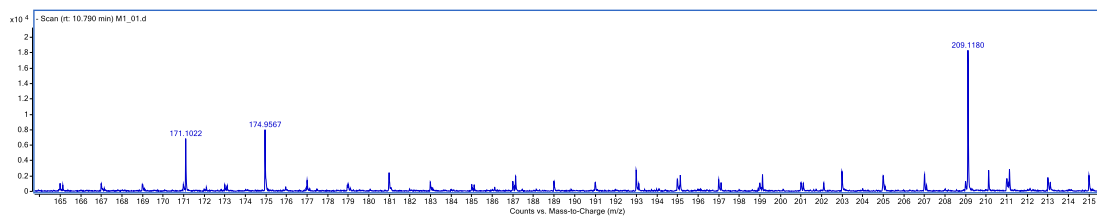
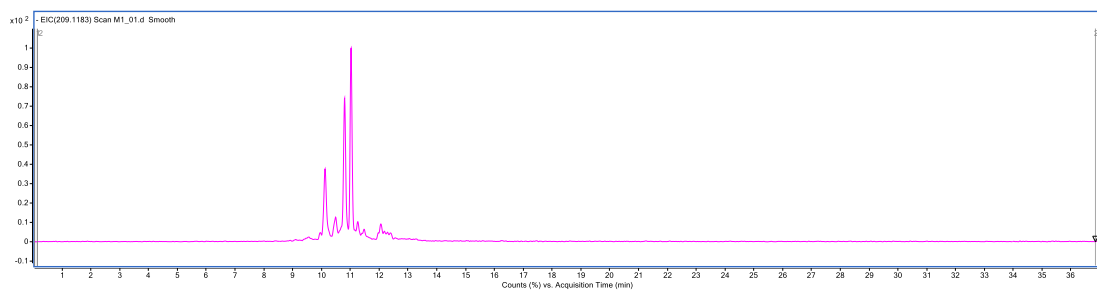
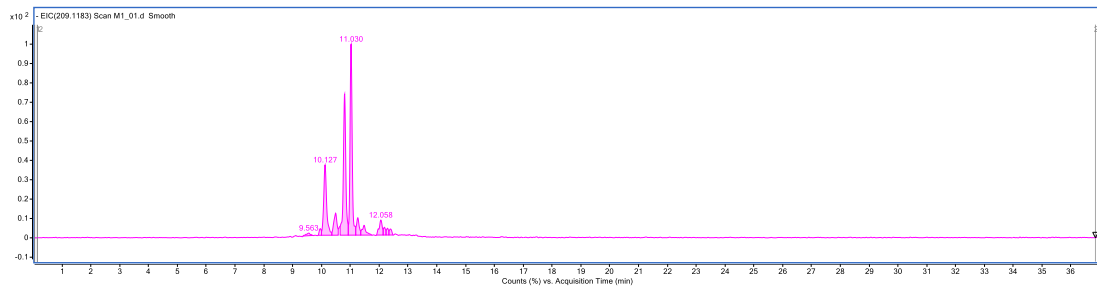
3



Maltose1_5ⁿ ημέρα

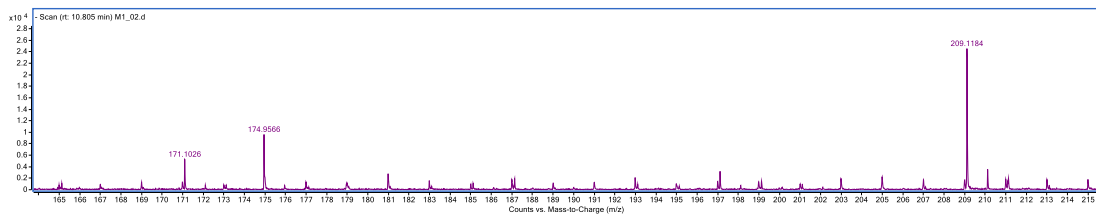
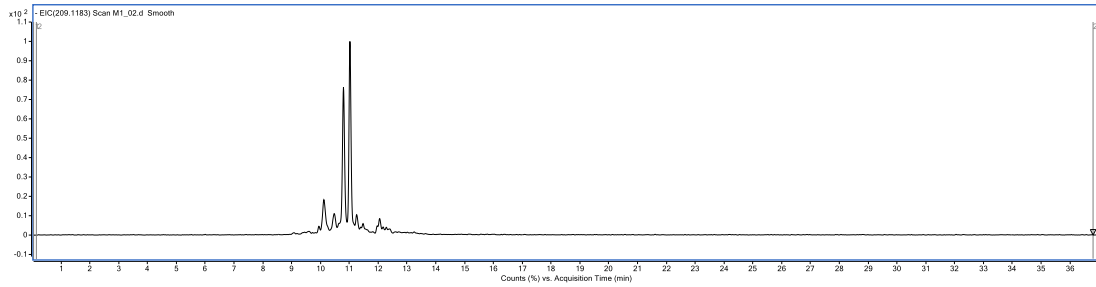
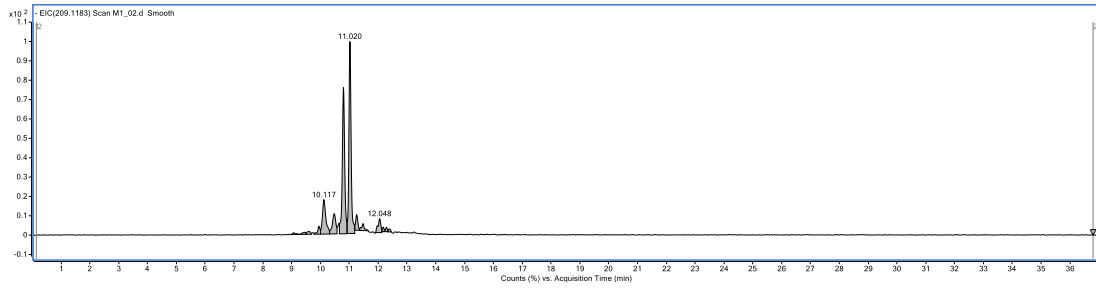
1

Η ένωση εμφανίζεται στα 10.806 λεπτά



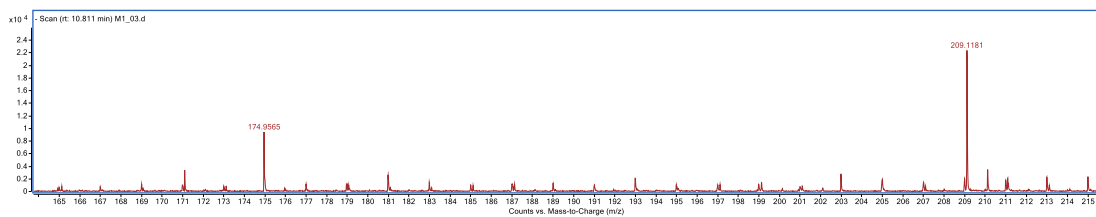
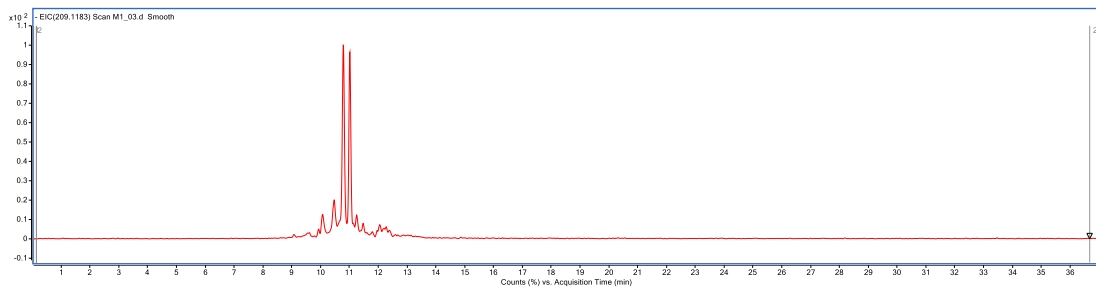
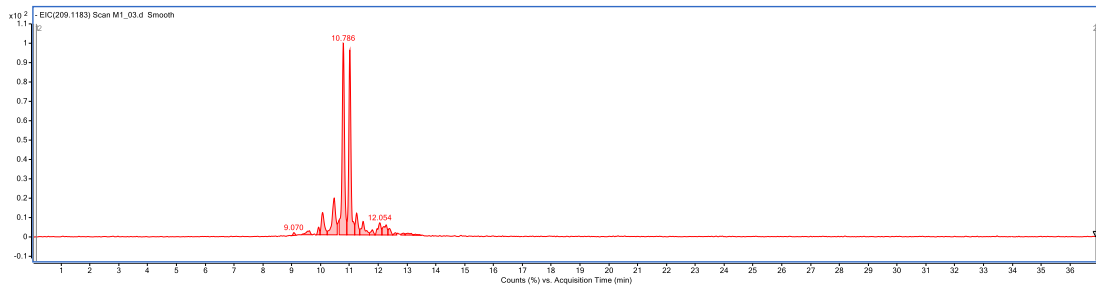
2

Η ένωση εμφανίζεται στα 10.788 λεπτά



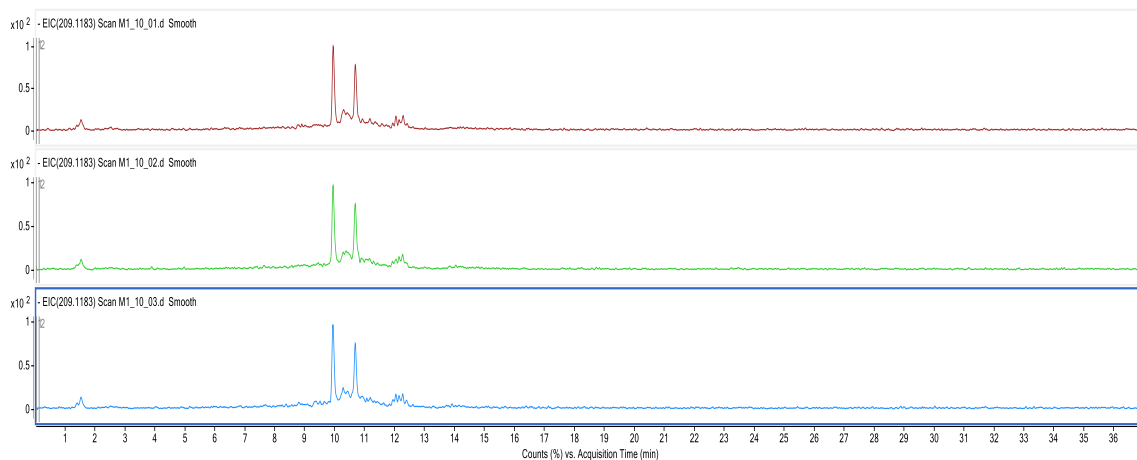
3

Η ένωση εμφανίζεται στα 10.786 λεπτά



Maltose1_10^η ημέρα

Το φάσμα μάζας δεν μπορεί να απεικονισθεί διότι το εμβαδό που έχει η ένωση μας είναι πολύ χαμηλό. Οι χρόνοι κατακράτησης είναι : 10.6 λεπτά και στις τρεις επαναλήψεις.

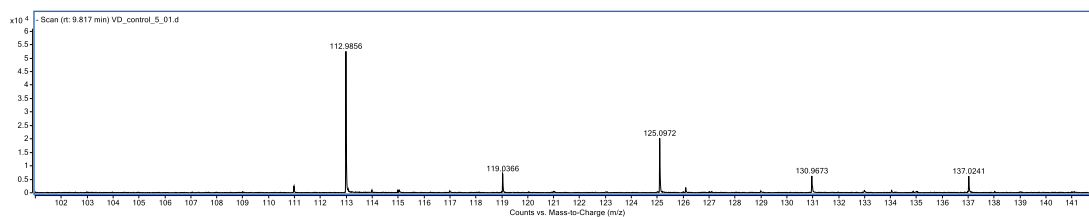
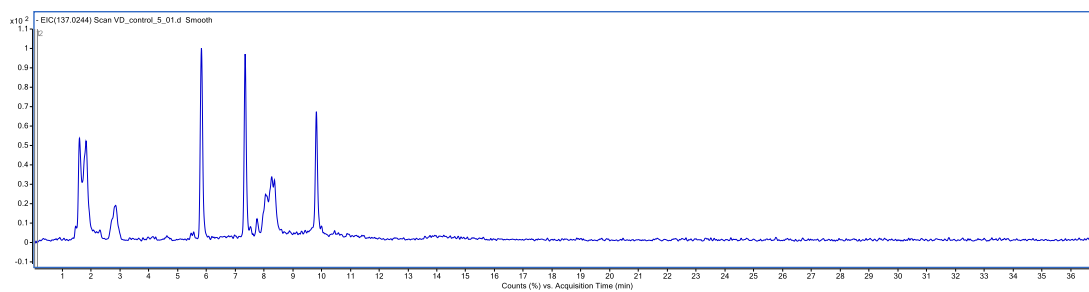


ΣΑΛΙΚΥΛΙΚΟ ΟΞΥ

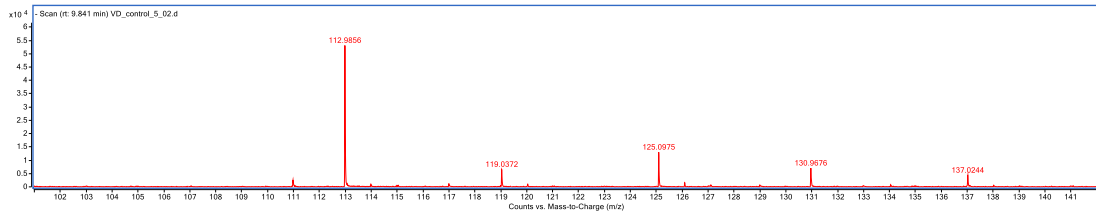
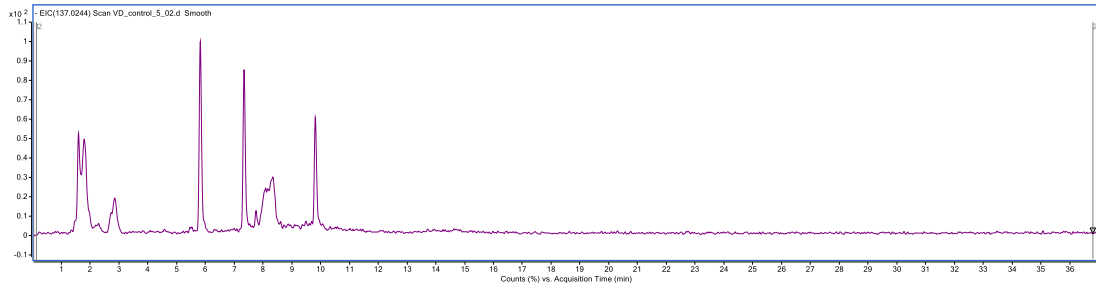
Vd Control_5ⁿ ημέρα

1

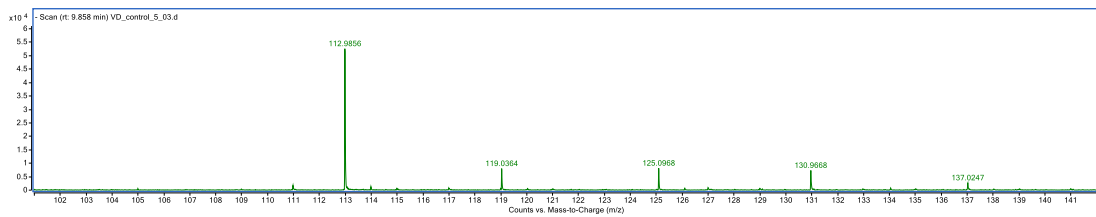
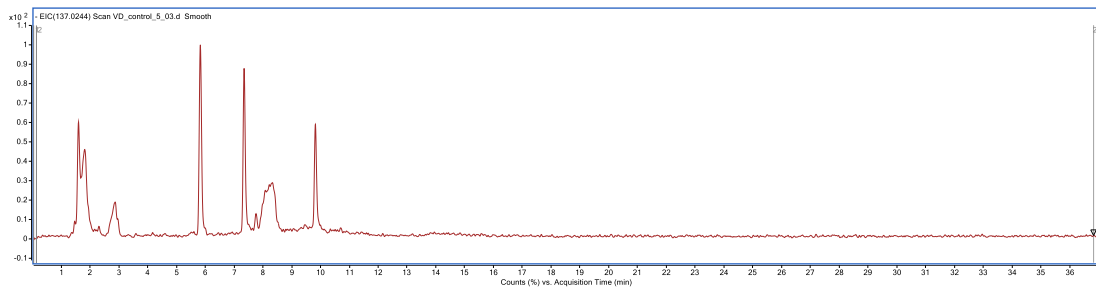
Η ένωση εμφανίζεται στα 9,816 λεπτά



2



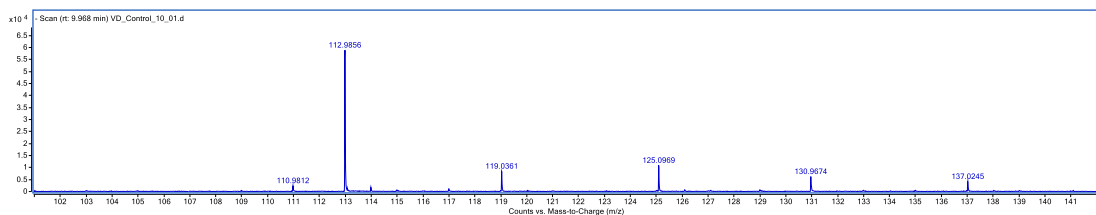
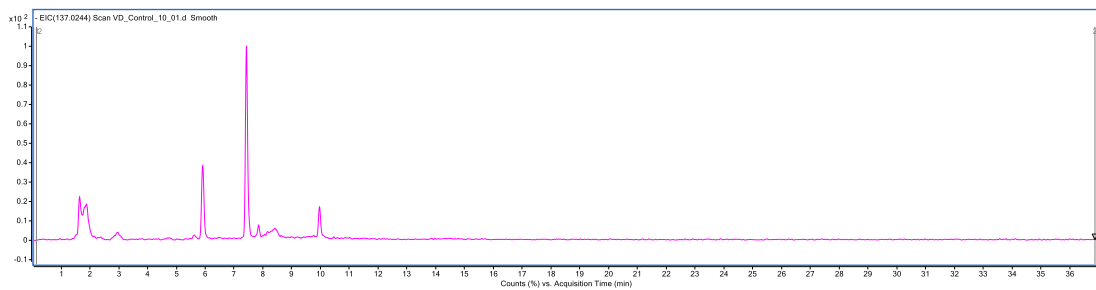
3



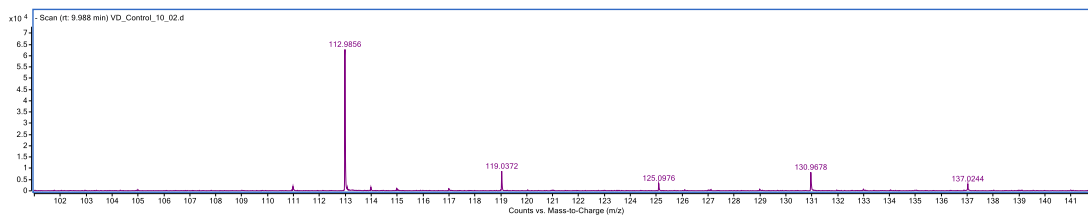
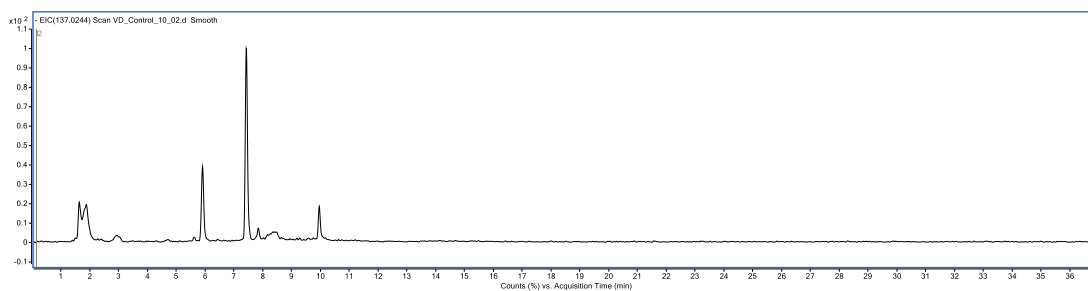
Vd Control_10ⁿ ημέρα

Η ένωση εμφανίζεται στα 9,968 λεπτά

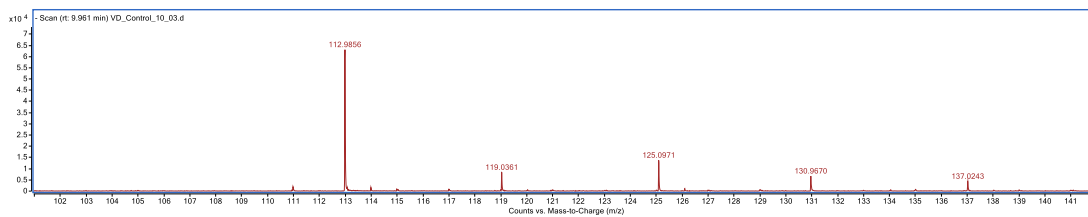
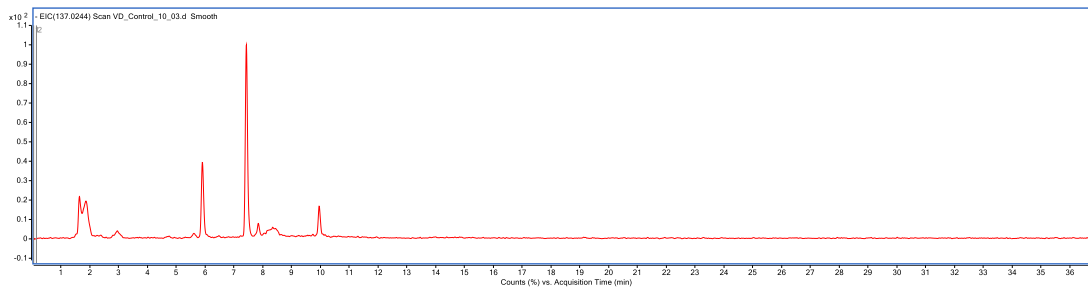
1



2



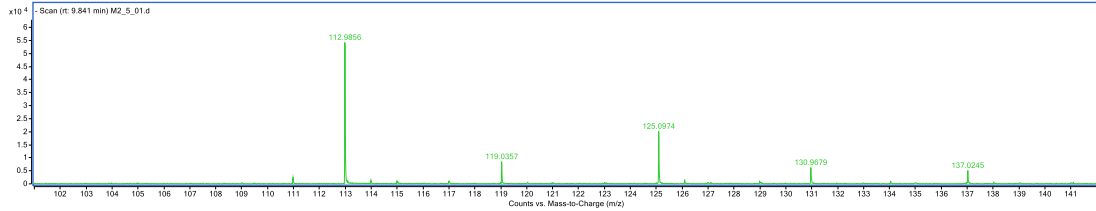
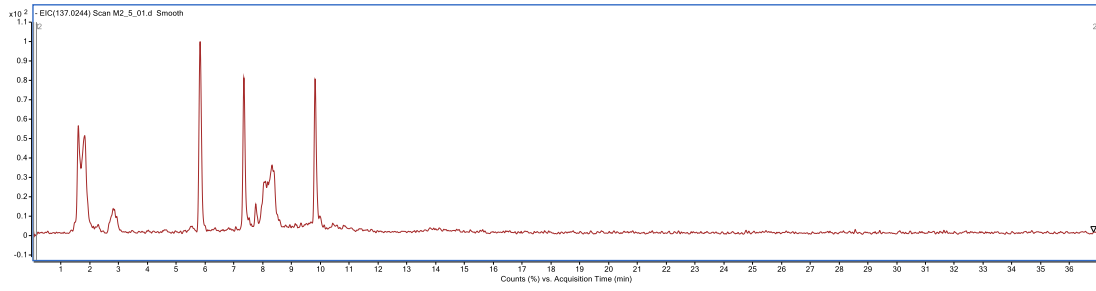
3



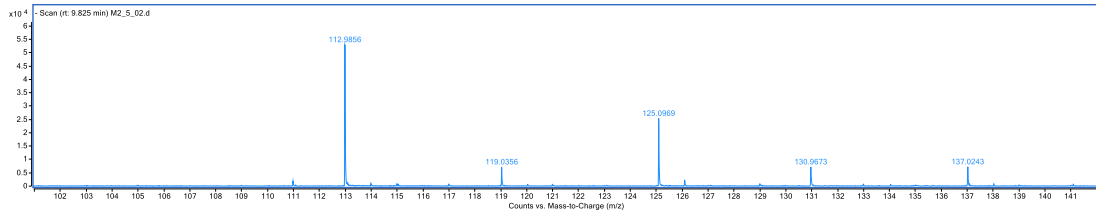
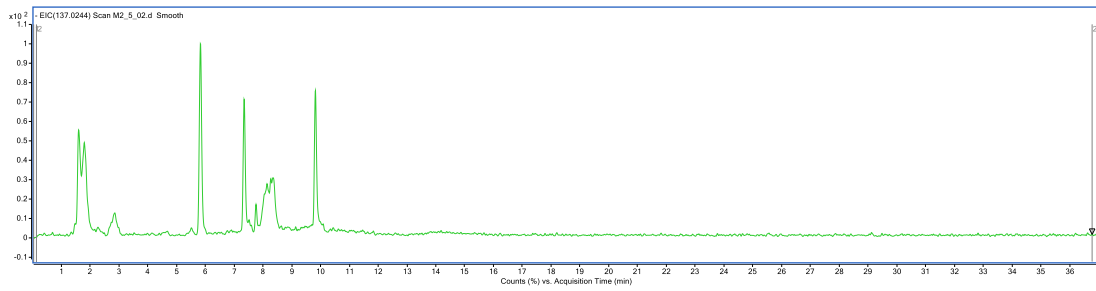
Maltose2_5^η ημέρα

9,816 λεπτά

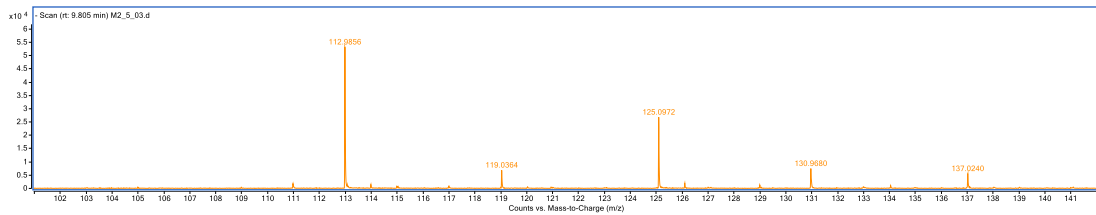
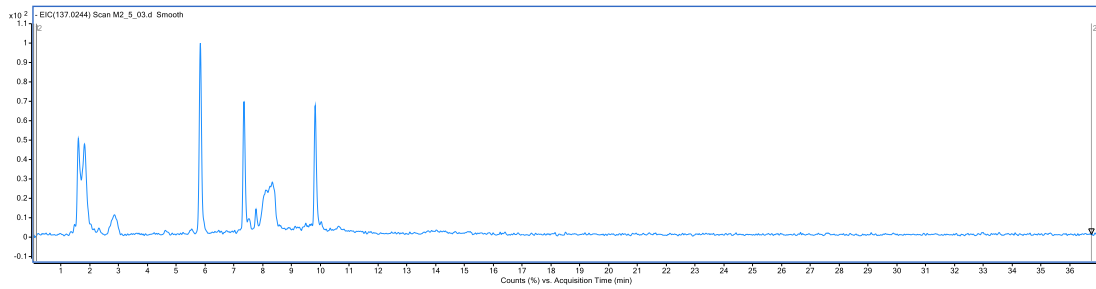
1



2



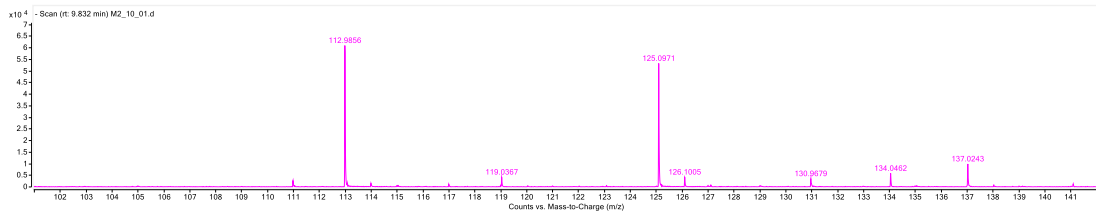
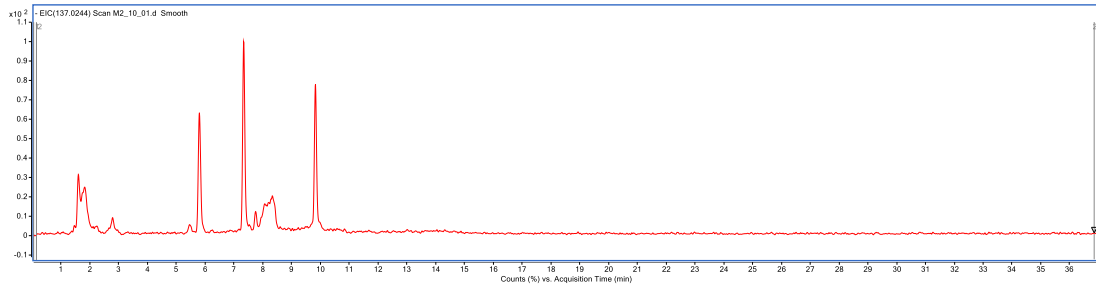
3



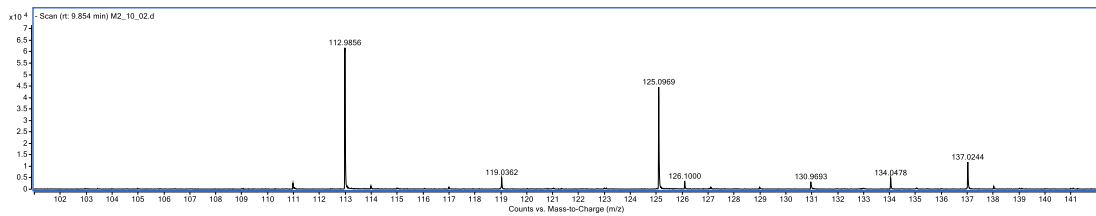
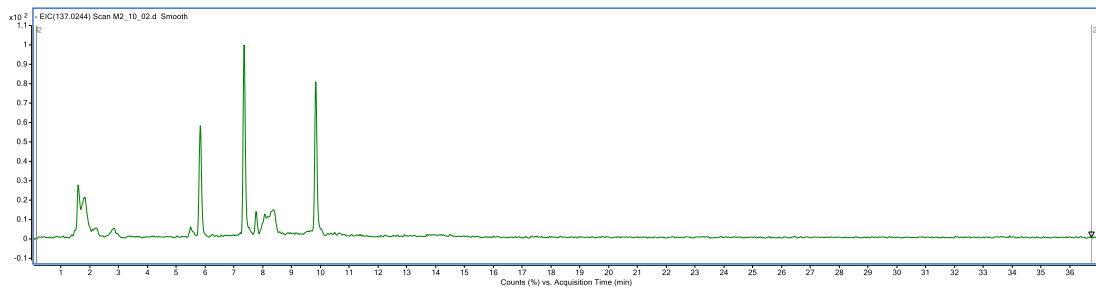
Maltose2_10ⁿ ημέρα

9.947 λεπτά

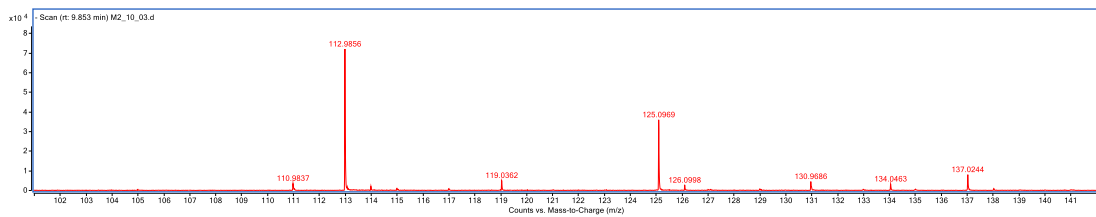
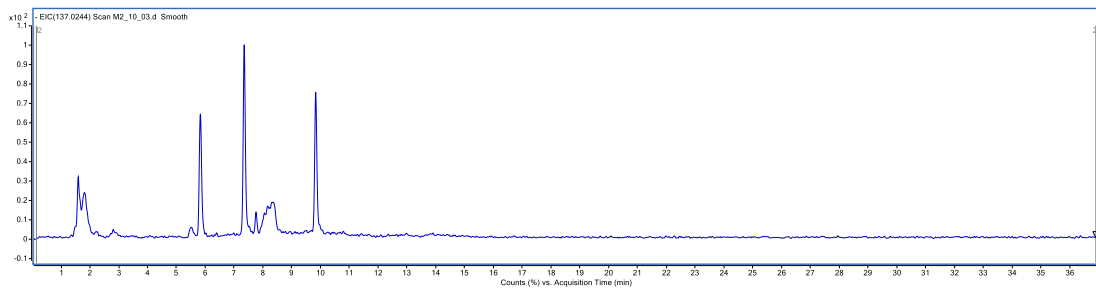
1



2



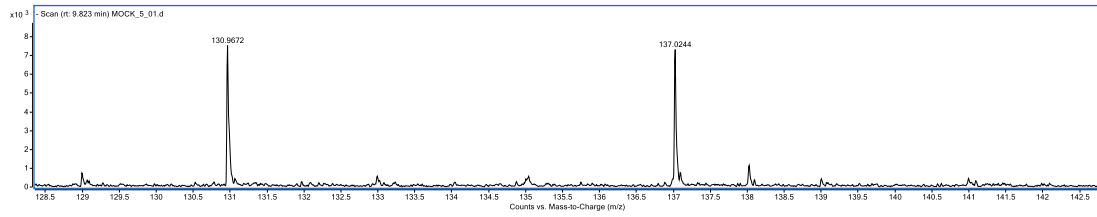
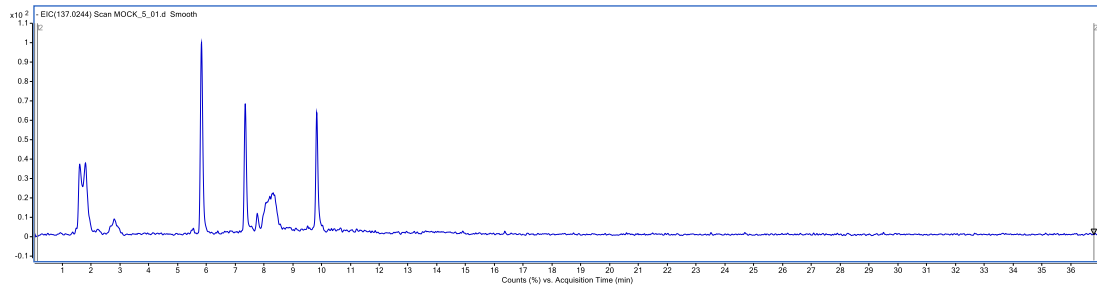
3



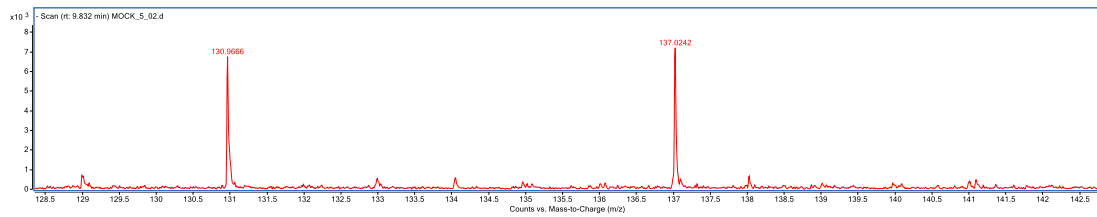
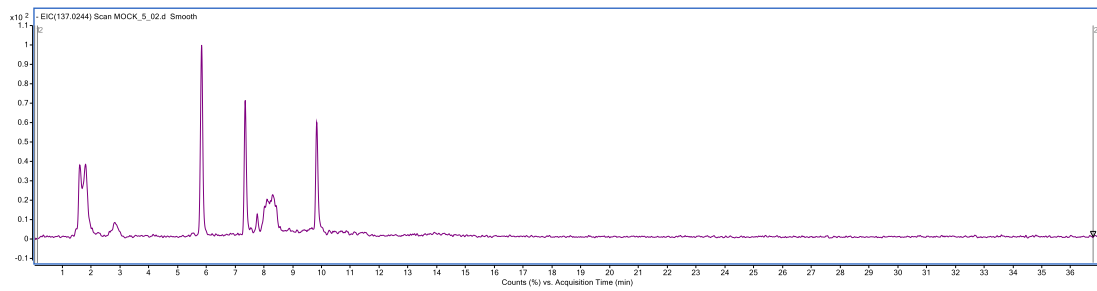
Mock_5^η ημέρα

9,831 λεπτά

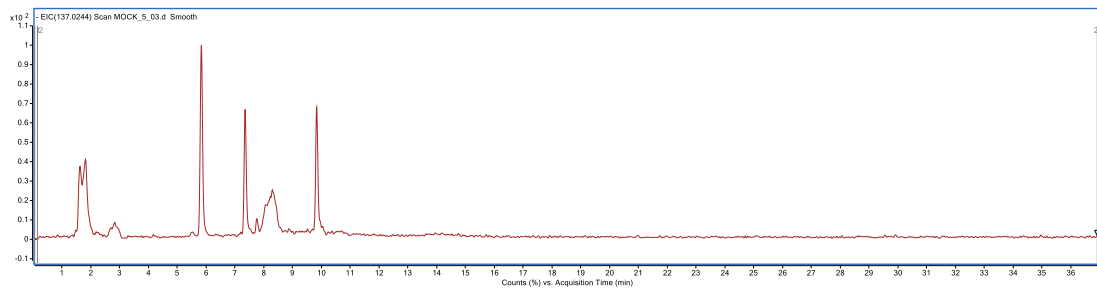
1

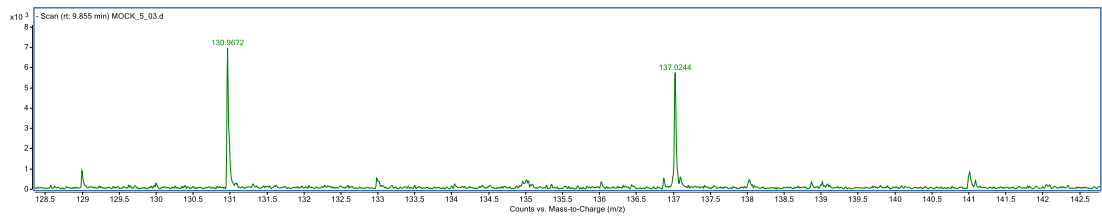


2



3

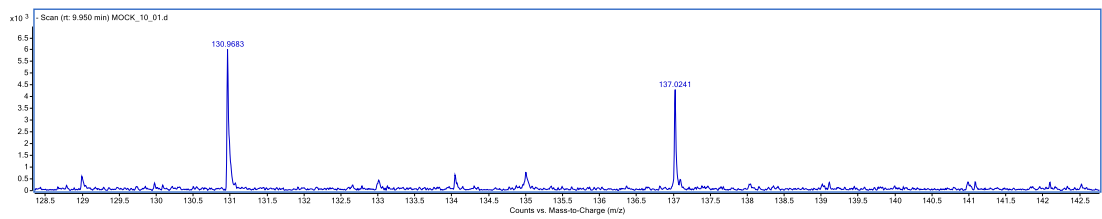
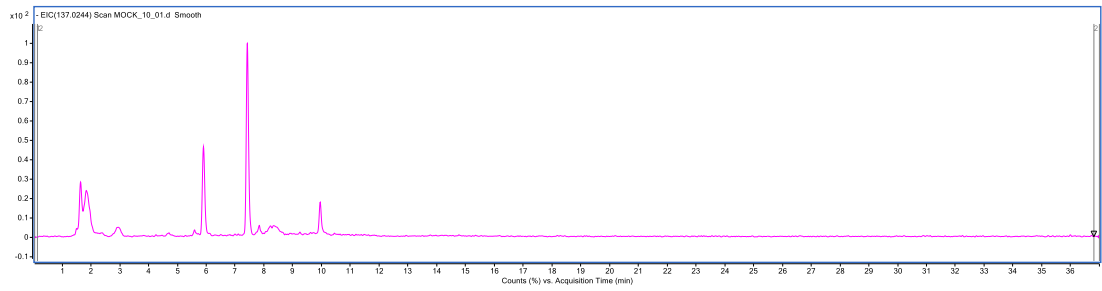




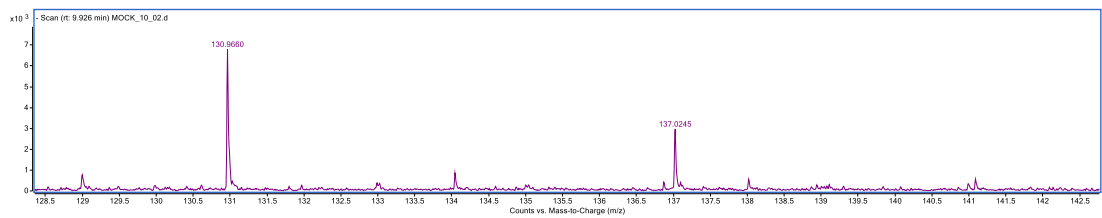
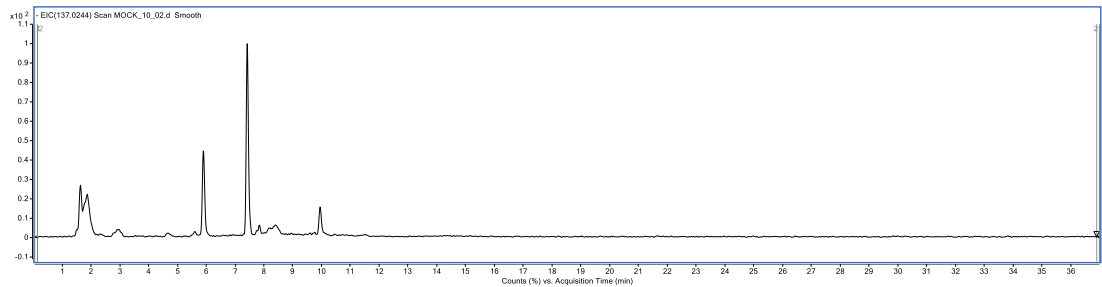
Mock_10ⁿ ημέρα

9,958 λεπτά

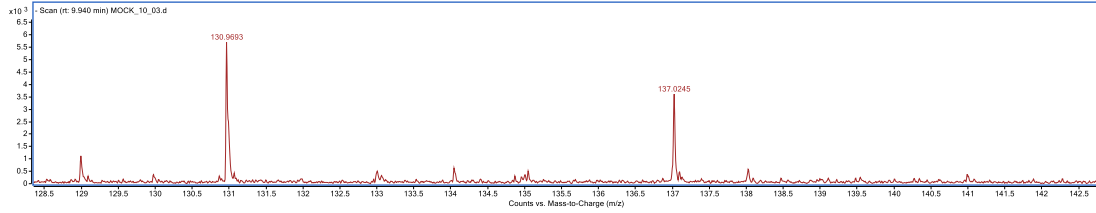
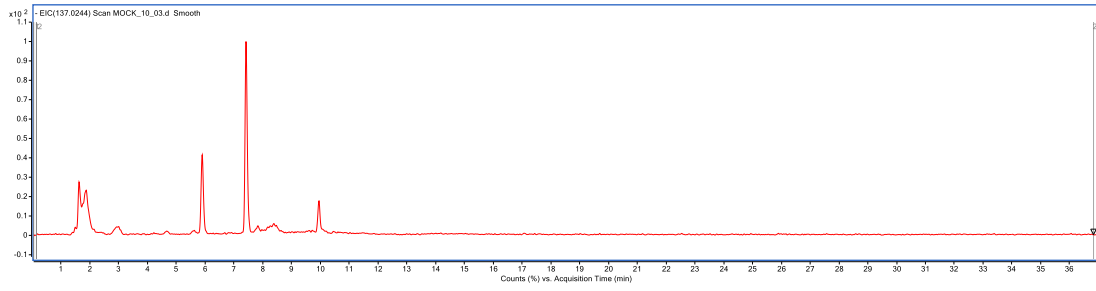
1



2



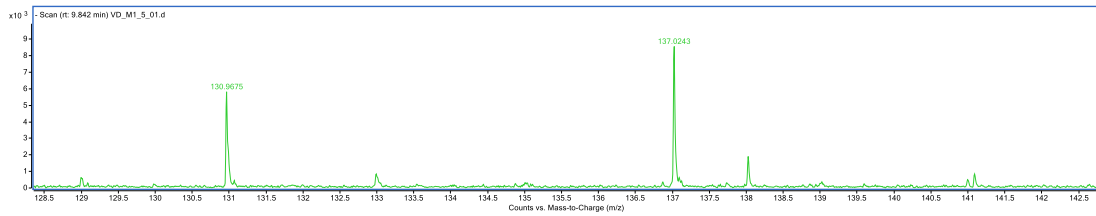
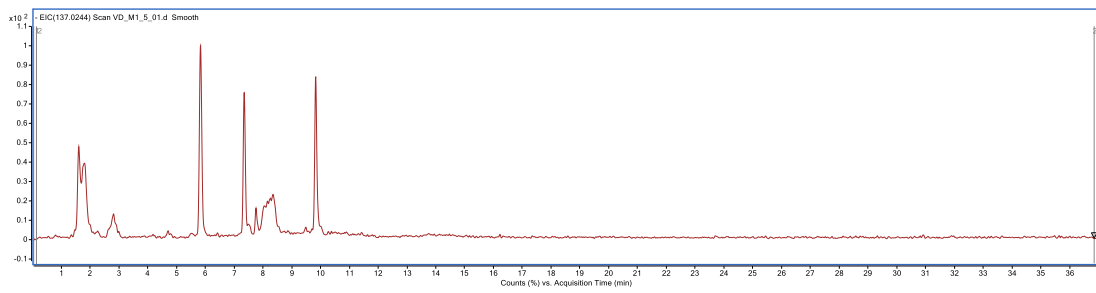
3



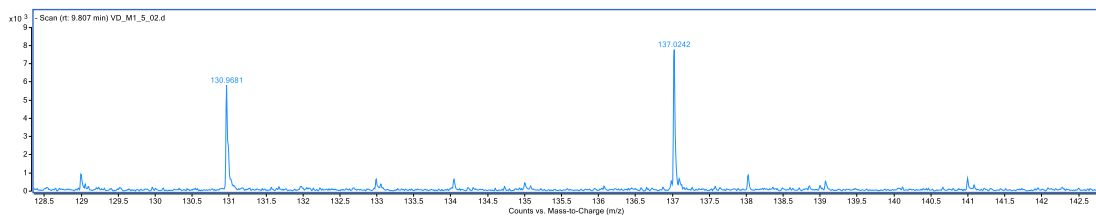
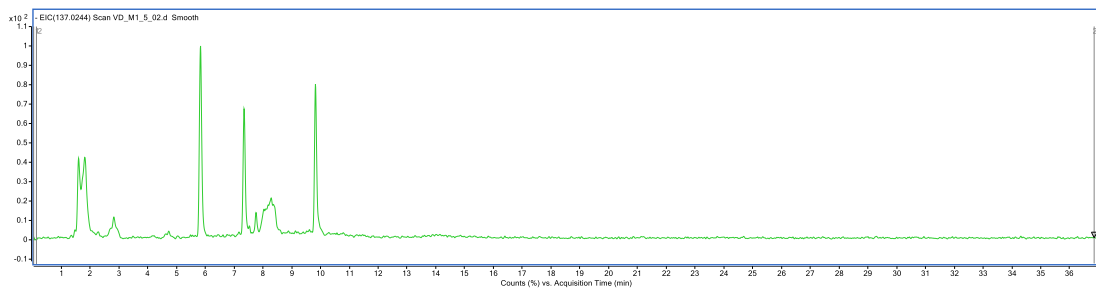
Vd_Maltose1_5th ημέρα

9,833 λεπτά

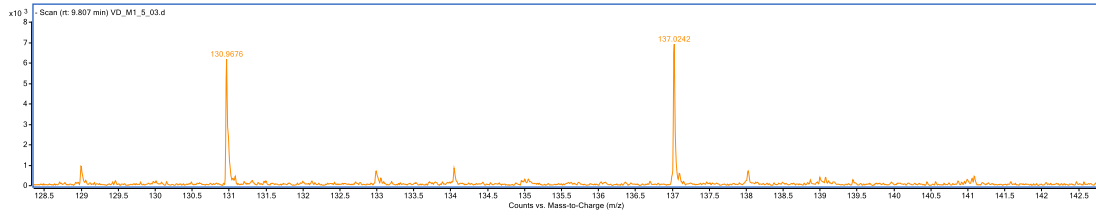
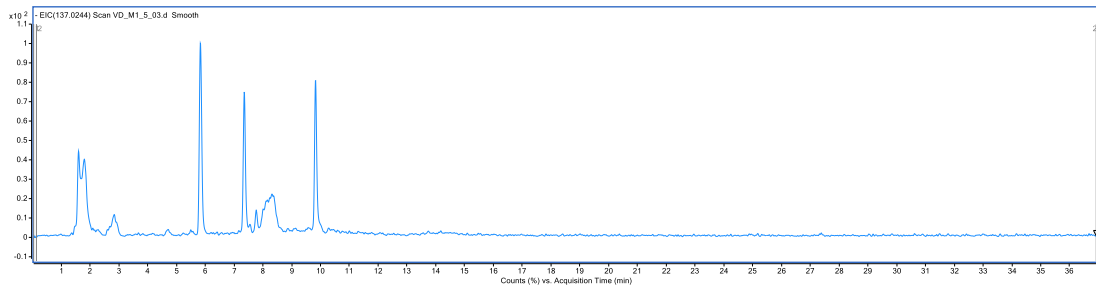
1



2



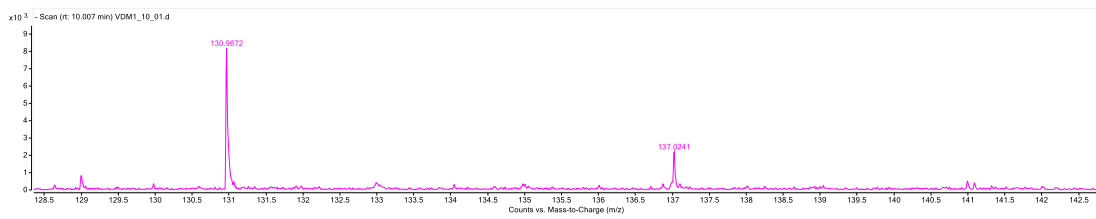
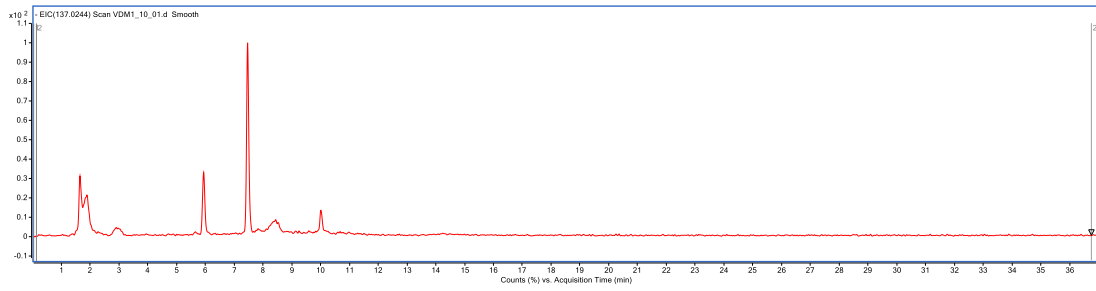
3



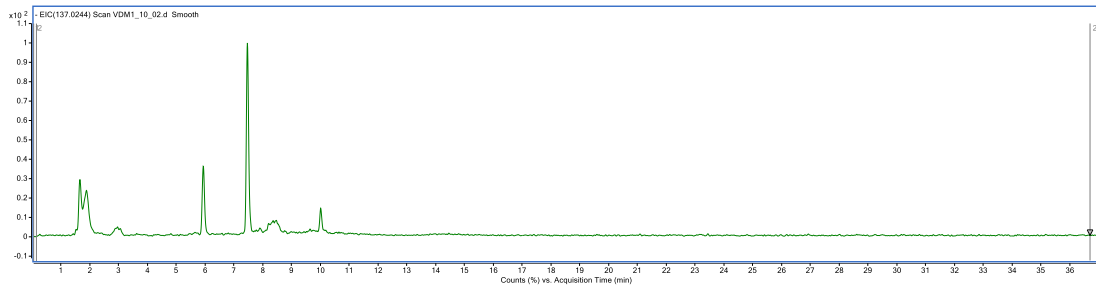
Vd_Maltose1_10ⁿ ημέρα

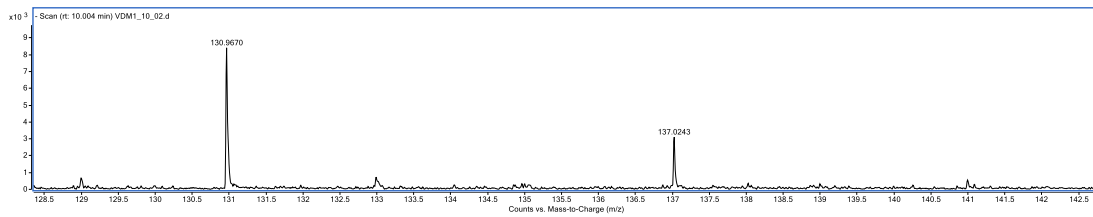
10,015 λεπτά

1

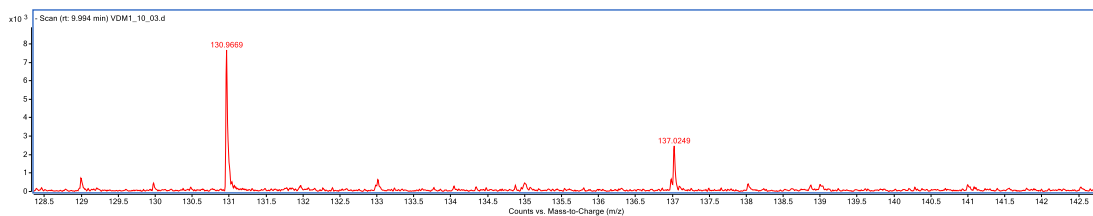
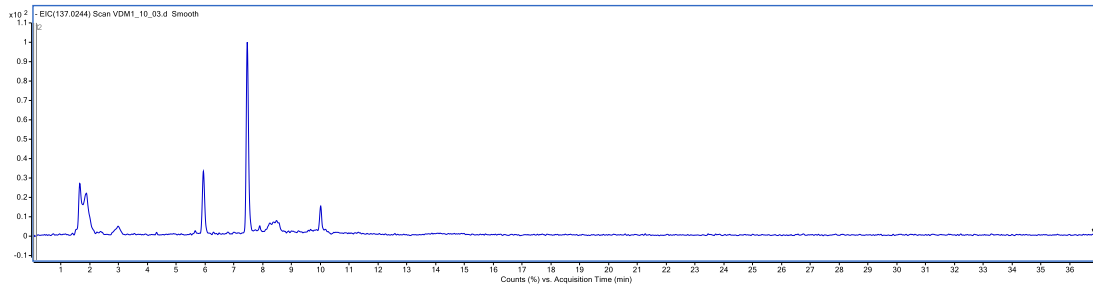


2





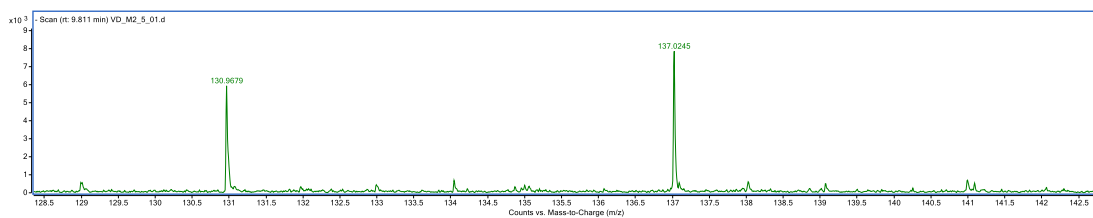
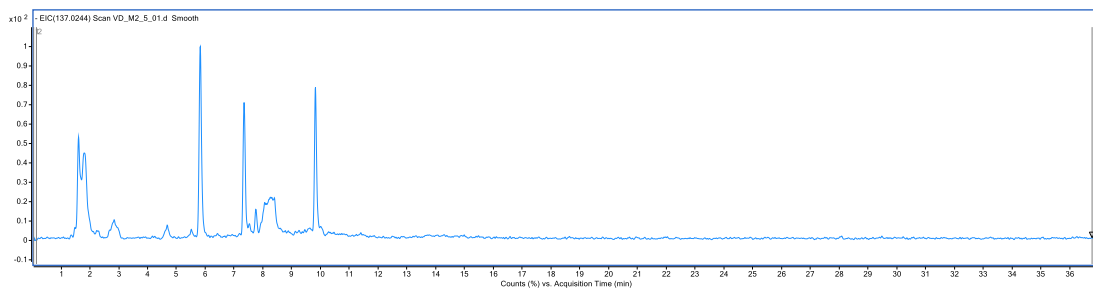
3



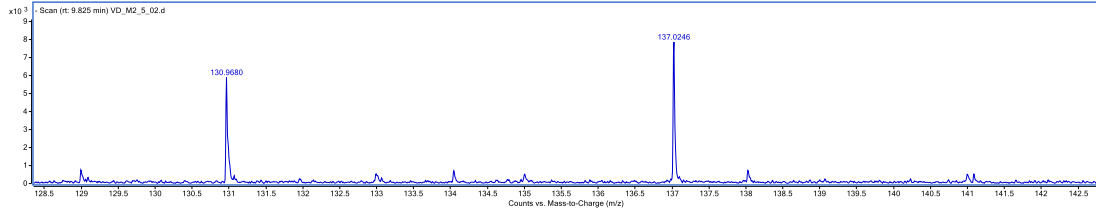
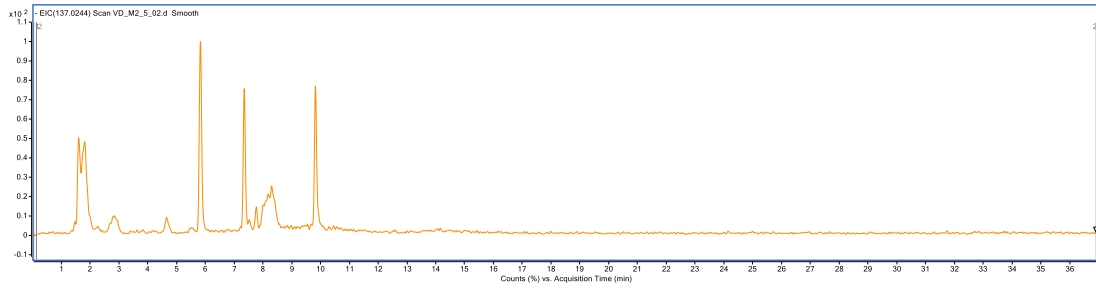
Vd_Maltose2_5^η ημέρα

9,827 λεπτά

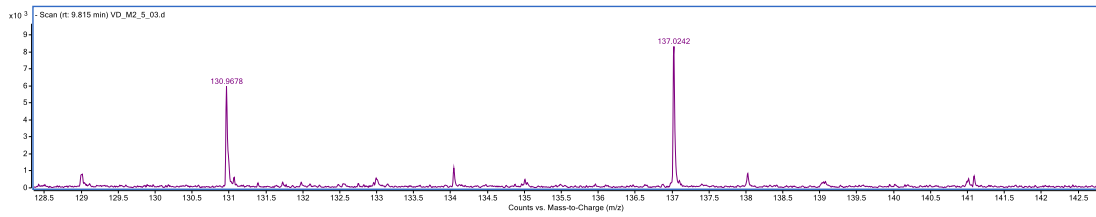
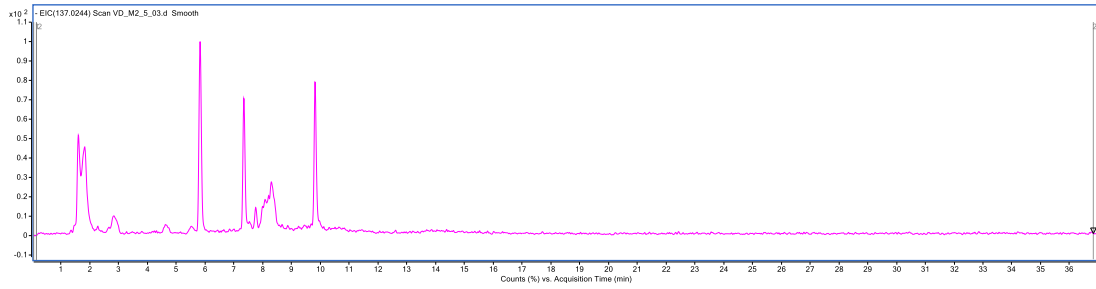
1



2



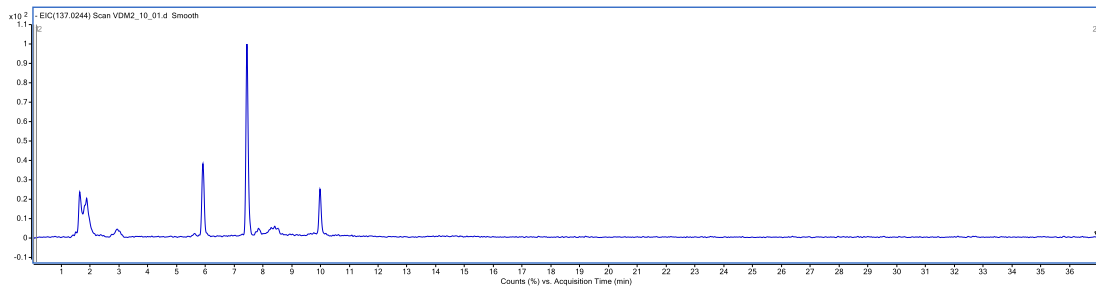
3

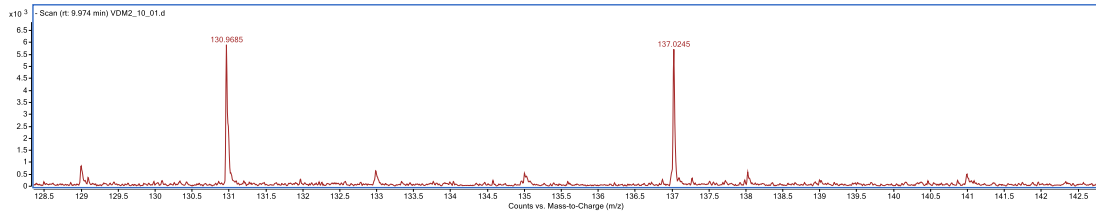


Vd_Maltose2_10th ημέρα

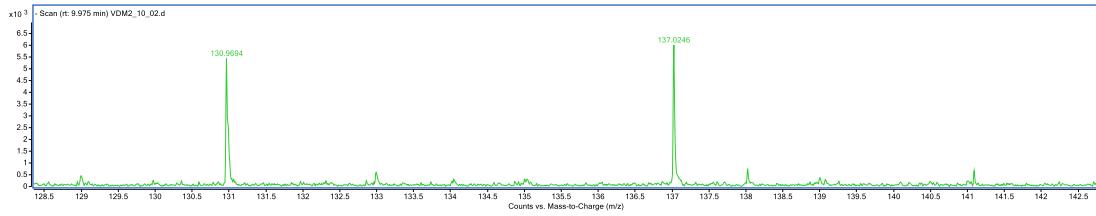
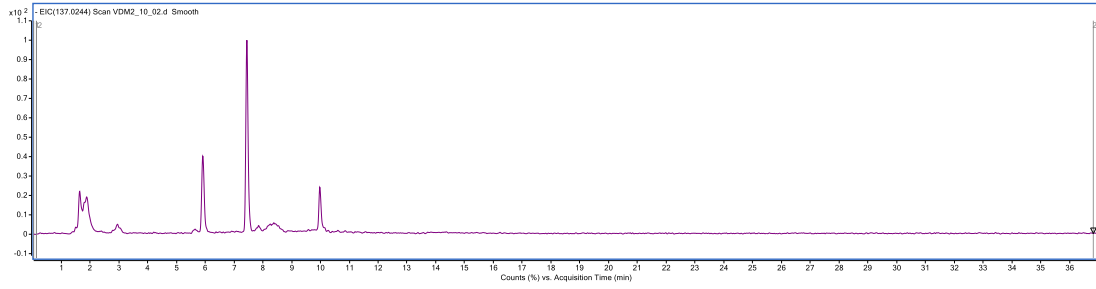
9,983 ΛΕΠΤΑ

1

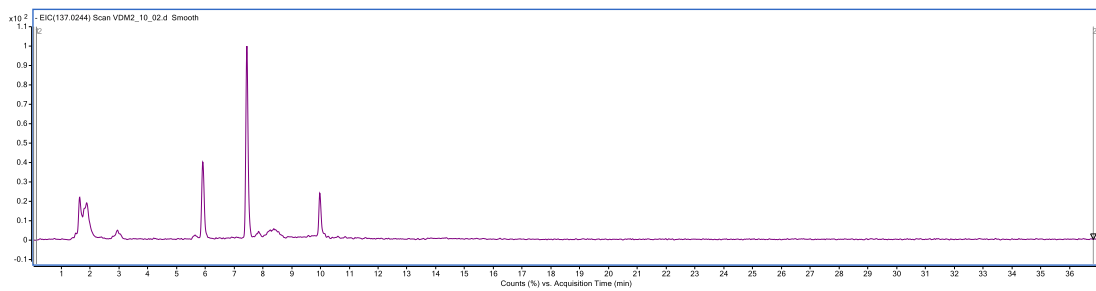
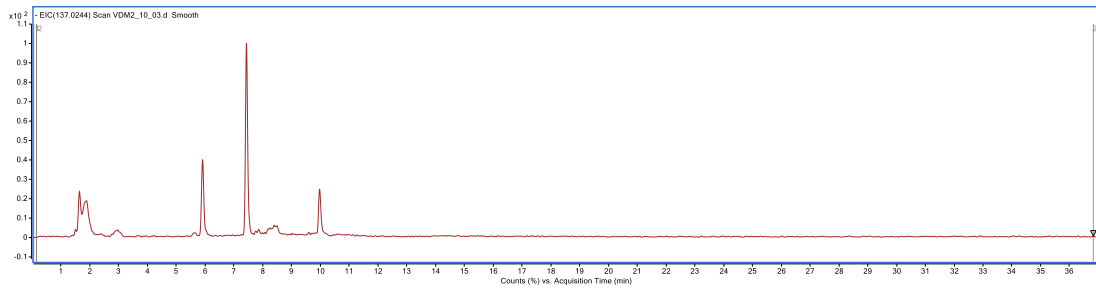




2



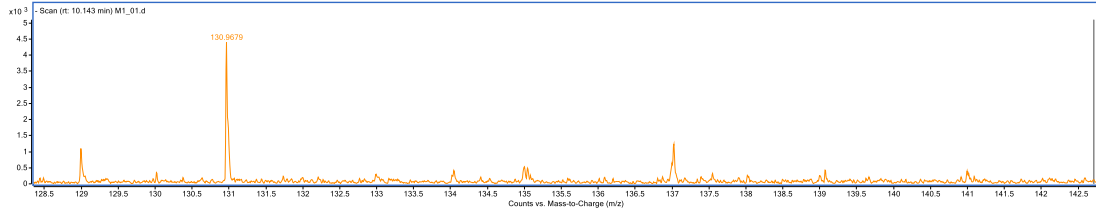
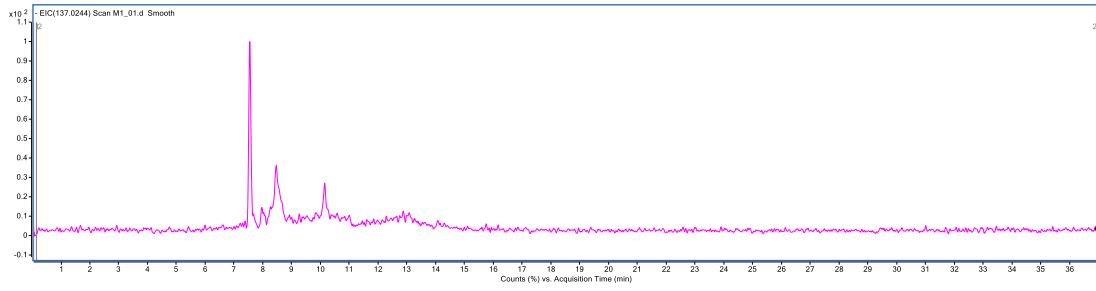
3



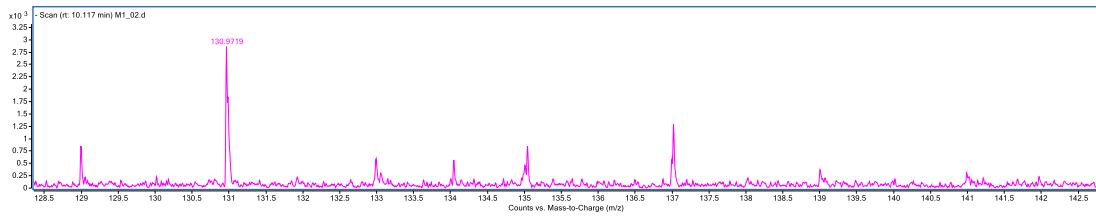
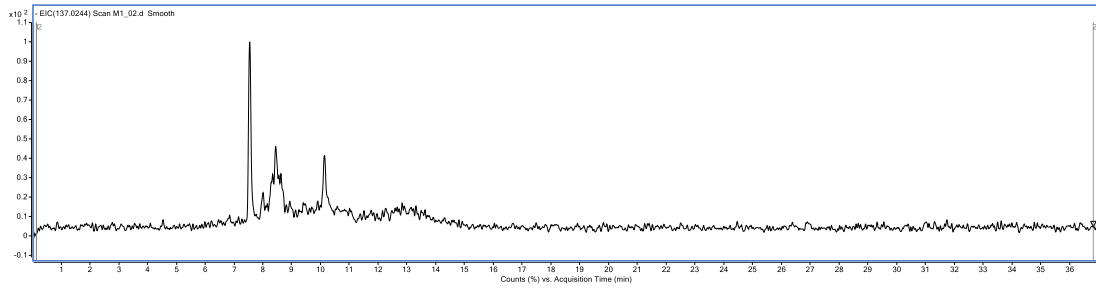
Maltose1_5^η ημέρα

10,152 λεπτά

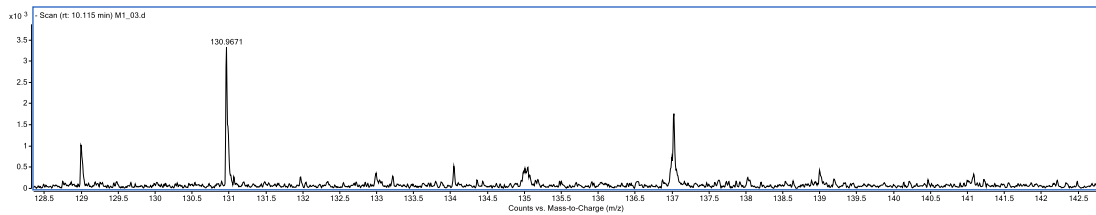
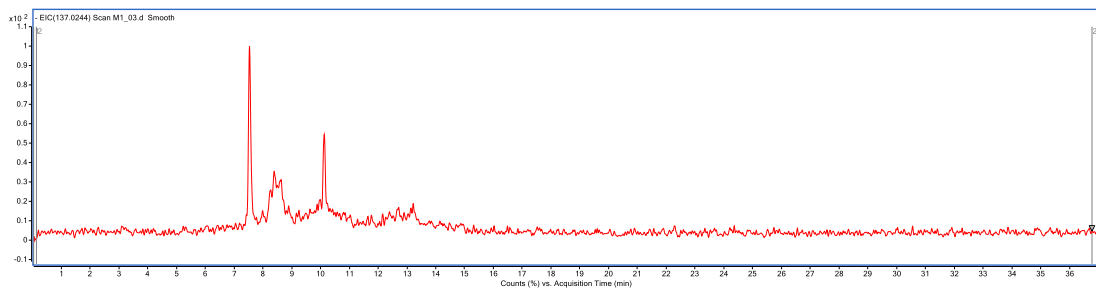
1



2



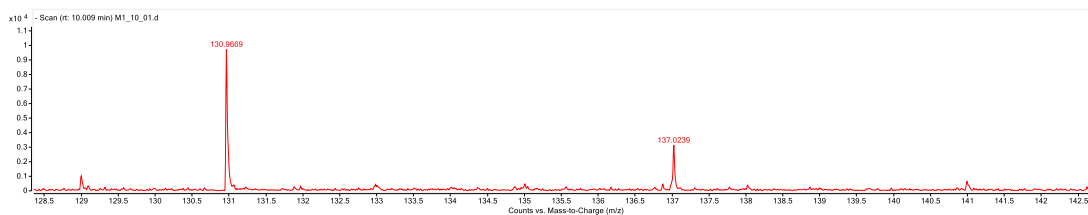
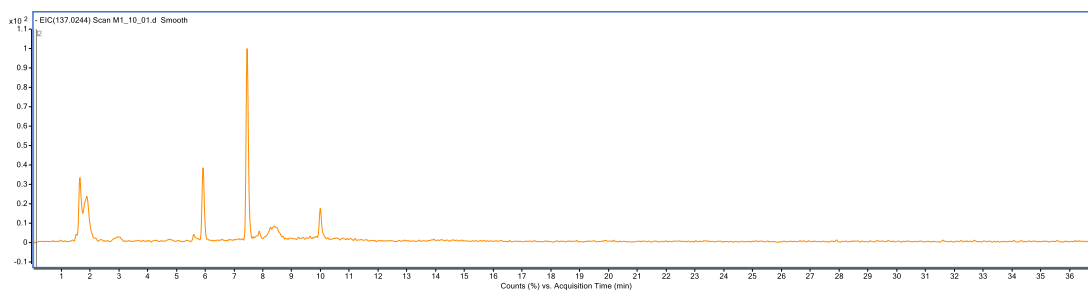
3



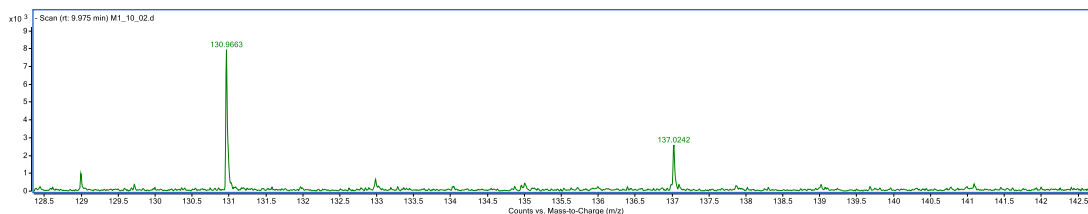
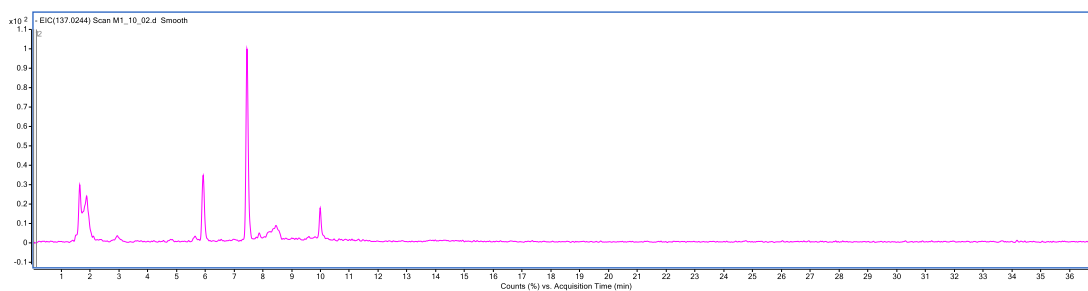
Maltose1_10ⁿ ημέρα

9,992 λεπτά

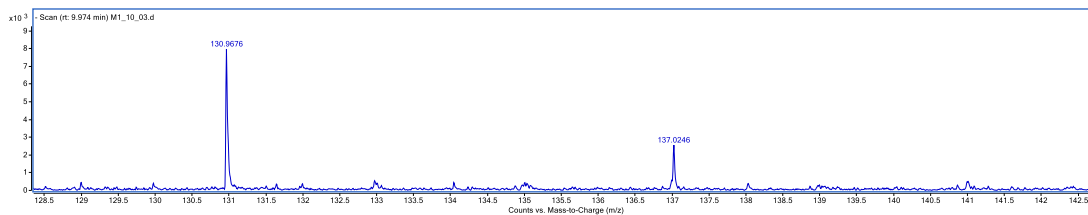
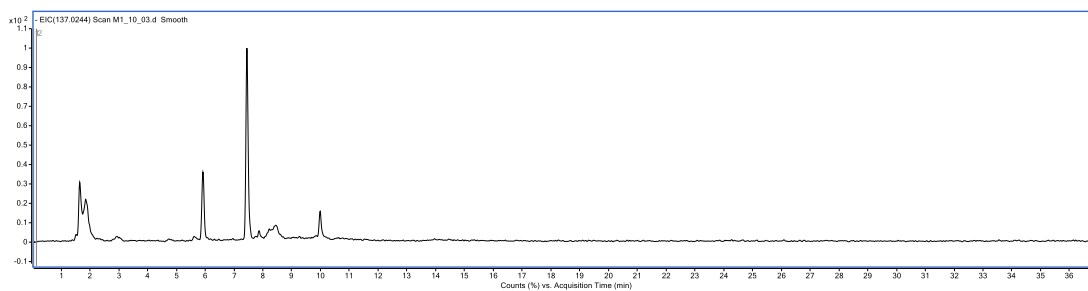
1

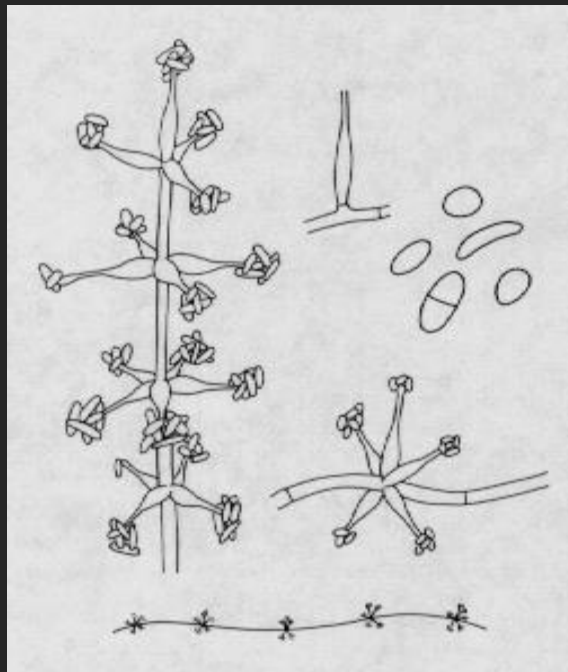


2



3





H_2O

