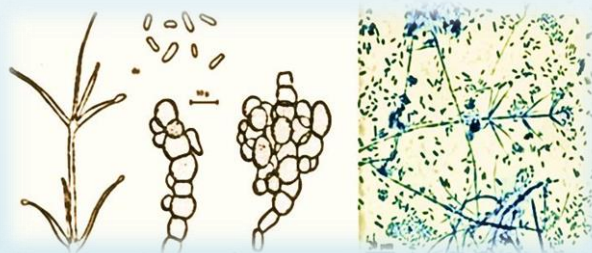


ΓΕΩΠΟΝΙΚΟ ΠΑΝΕΠΙΣΤΗΜΙΟ ΑΘΗΝΩΝ
ΣΧΟΛΗ ΑΓΡΟΤΙΚΗΣ ΠΑΡΑΓΩΓΗΣ ΤΡΟΦΙΜΩΝ & ΠΕΡΙΒΑΛΛΟΝΤΟΣ
ΤΜΗΜΑ ΕΠΙΣΤΗΜΗΣ ΦΥΤΙΚΗΣ ΠΑΡΑΓΩΓΗΣ
ΕΡΓΑΣΤΗΡΙΟ ΦΥΤΟΠΑΘΟΛΟΓΙΑΣ

**Μελέτη της επίδρασης της κυτταρίνης και του
αμύλου στην αλληλεπίδραση του μύκητα
Verticillium dahliae με το φυτό ξενιστή**

ΜΕΤΑΠΤΥΧΙΑΚΗ ΜΕΛΕΤΗ



ΝΕΟΦΥΤΟΥ ΠΑΝΑΓΙΩΤΗΣ

ΑΘΗΝΑ 2020

ΓΕΩΠΟΝΙΚΟ ΠΑΝΕΠΙΣΤΗΜΙΟ ΑΘΗΝΩΝ
ΣΧΟΛΗ ΑΓΡΟΤΙΚΗΣ ΠΑΡΑΓΩΓΗΣ ΤΡΟΦΙΜΩΝ & ΠΕΡΙΒΑΛΛΟΝΤΟΣ
ΤΜΗΜΑ ΕΠΙΣΤΗΜΗΣ ΦΥΤΙΚΗΣ ΠΑΡΑΓΩΓΗΣ
ΕΡΓΑΣΤΗΡΙΟ ΦΥΤΟΠΑΘΟΛΟΓΙΑΣ



ΜΕΤΑΠΤΥΧΙΑΚΗ ΜΕΛΕΤΗ

Θέμα : Μελέτη της επίδρασης της κυτταρίνης και του αμύλου στην αλληλεπίδραση του μύκητα *Verticillium dahliae* με το φυτό ξενιστή

Master thesis topic : Study of the effect of cellulose and starch on the interaction between *Verticillium dahliae* and a host plant

Μεταπτυχιακός Φοιτητής : Παναγιώτης Νεοφύτου

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

Τριμελής εξεταστική επιτροπή

Αν. Καθηγητής : Σωτήρης Τζάμος

Αν. Καθηγητής : Δημήτριος Τσιτσιγιάννης

Καθηγητής : Επαμεινώνδας Παπλωματάς

Αθήνα 2020

Ευχαριστίες

Η παρούσα διπλωματική εργασία εκπονήθηκε στα πλαίσια του μεταπτυχιακού προγράμματος «Ολοκληρωμένα Συστήματα Φυτοπροστασίας και Διαχείρισης του Περιβάλλοντος» του Γεωπονικού Πανεπιστημίου Αθηνών την περίοδο 2018-2019. Ως την ελάχιστη δυνατή μνεία, με την παρούσα παράγραφο οφείλω να ευχαριστήσω όλους όσους συνέβαλαν στην εκπόνησή της.

Αρχικά, θα ήθελα να ευχαριστήσω θερμά τον επιβλέποντα Επίκουρο Καθηγητή Φυτοπαθολογίας Σωτήρη Τζάμο, για την εμπιστοσύνη που μου έδειξε στην εκπόνηση της παρούσας διπλωματικής εργασίας. Η συνεργασία μου με τον κ. Τζάμο ήταν εξαιρετική και τον ευχαριστώ ιδιαίτερα για την δυνατότητα που μου έδωσε να πραγματοποιήσω την μεταπτυχιακή μου μελέτη στο Εργαστήριο Φυτοπαθολογίας του Γεωπονικού Πανεπιστημίου Αθηνών. Με την επιστημονική του καθοδήγηση, τις υποδείξεις του, την επιμονή του και το πραγματικό του ενδιαφέρον από την αρχή μέχρι το τέλος, ολοκληρώθηκε με επιτυχία το παρόν πόνημα.

Επίσης, τις ιδιαίτερες ευχαριστίες μου, θα ήθελα να απευθύνω την διδάκτορα Δανάη Γκίζη, για την πολύτιμη βοήθεια της και την ενεργό συμμετοχή της στα πειράματα της παρούσας μεταπτυχιακής μελέτης.

Τέλος, θερμές ευχαριστίες σε όλο το προσωπικό του Εργαστηρίου Φυτοπαθολογίας, για το ευχάριστο και λειτουργικό περιβάλλον εργασίας που δημιούργησαν κατά την εκπόνηση της παρούσας διπλωματικής εργασίας.

Περίληψη

Μια από τις πιο ευρέως διαδεδομένες και συνάμα καταστροφικές ασθένειες των καλλιεργούμενων φυτών παγκοσμίως, είναι η βερτισιλλίωση που προκαλείται από τον εδαφοπαθογόνο μύκητα *Verticillium dahliae*. Ο μύκητας *V. dahliae* έχει μεγάλο εύρος ξενιστών, επηρεάζοντας πάνω από 200 διαφορετικά είδη φυτών. Δυστυχώς, μέχρι στιγμής δεν έχουν εξευρεθεί διασυστηματικά μυκητοκτόνα που να ελέγχουν αποτελεσματικά την ασθένεια, για αυτό η αντιμετώπιση του μύκητα βασίζεται κυρίως με προληπτικά μέτρα (π.χ. αμειψισπορά, ανθεκτικές ποικιλίες). Η βιολογική αντιμετώπιση της ασθένειας με την χρησιμοποίηση ανταγωνιστικών στο έδαφος μικροοργανισμών, κερδίζει όλο και περισσότερο ερευνητικό ενδιαφέρον τις τελευταίες δεκαετίες. Παράλληλα όμως με τους ωφέλιμους μικροοργανισμούς, εξετάζεται και η χρησιμοποίηση ορισμένων φυσικών οργανικών ουσιών, οι οποίες δύναται να διεγείρουν αποτελεσματικά τους λανθάνοντες μηχανισμούς αντοχής των φυτών. Στο πλαίσιο της παρούσας διπλωματικής εργασίας, διερευνήθηκε η επίδραση του άμυλου και της κυτταρίνης στην παθογένεια του μύκητα *V. dahliae* σε φυτά μελιτζάνας, της ποικιλίας 'Black Beauty'. Συγκεκριμένα, διενεργήθηκαν δοκιμές παθογένειας όπου εξετάστηκε η άμεση και έμμεση επίδραση, με διαχωρισμό του ριζικού συστήματος για τη μελέτη της επαγόμενης διασυστηματικής άμυνας, του αμύλου και της κυτταρίνης στην προστασία των φυτών από το μύκητα *V. dahliae*. Στις μεταχειρίσεις του μη αποστειρωμένου εδάφους, τα φυτά της μελιτζάνας παρουσίασαν προστασία στις εφαρμογές *Verticillium*/άμυλο και *Verticillium*/κυτταρίνη. Η προστασία αυτή αποδίδεται στην επαγωγή της άμυνας των φυτών, αλλά δεν είναι σαφές εάν επάγεται άμεσα από τα σάκχαρα ή έμμεσα από τους μικροοργανισμούς του εδάφους. Ωστόσο, οι μοριακές αναλύσεις κατέδειξαν την ενεργή συμμετοχή της κυτταρίνης στις υπερακφράσεις των γονιδίων *PR-1* και *PR-4*, που παρουσιάστηκαν στα φυτά των εφαρμογών του μη αποστειρωμένου εδάφους. Επιπλέον, στο αποστειρωμένο έδαφος, η σχετική προστασία ενάντια στον μύκητα *V. dahliae* παρουσιάστηκε μόνο στην μεταχείριση με την άμεση επίδραση των σακχάρων στο μύκητα. Σε αυτή τη μεταχείριση τα επίπεδα της έκφρασης των γονιδίων *PR-1* και *PR-4*, ήταν ιδιαίτερα υψηλά στις εφαρμογές *Verticillium*/άμυλο και *Verticillium*/κυτταρίνη, σε σχέση με τον μολυσμένο μάρτυρα. Αυτό αποδεικνύει ότι τα δύο σάκχαρα διεγείραν αποτελεσματικά την άμυνα των φυτών ενάντια στον μύκητα *V. dahliae*.

Επιστημονική περιοχή διατριβής: Φυτοπαθολογία

Λέξεις-Κλειδιά: βιολογική αντιμετώπιση, σάκχαρα, άμυλο, κυτταρίνη, βερτισιλλίωση, φυτική άμυνα

Study of the effect of cellulose and starch on the interaction between *Verticillium dahliae* and a host plant

Abstract

One of the most widespread and destructive diseases of cultivated plants, is Verticillium wilt caused by *Verticillium dahliae*. The fungus has a wide host range and infects over 200 different host plants. Unfortunately, until now there are no effective systemic fungicides to control this disease, whereas only preventive (e.g. crop rotation, resistance cultivars) measures can take place. The biological control of the disease with the use of soil competing microorganisms, is gaining increasing research interest in recent decades. Along with the beneficial microorganisms, is also considered the use of natural organic compounds, in order to stimulate the plant resistance mechanisms. In the present thesis, we investigated the effects of starch and cellulose on the pathogenicity of *V. dahliae* in eggplants (*Solanum melongena*). In "whole root" and "split root" treatments of non-sterile soil, eggplant seedlings have shown protection in the Vd + Starch and Vd + Cellulose applications. This protection is attributed to induction of plant defense mechanisms, but it is not clear if it is directly caused by sugars or indirectly by soil microorganisms. However, transcriptomic analysis has shown the active involvement of cellulose on higher expressions levels of *PR-1* and *PR-4* in non-sterile soil applications. On the other hand, in sterile soil, a relative protection was only shown in the "whole root" treatment plants. In this treatment, the expression levels of the *PR-1* and *PR-4* genes were particularly higher in the Vd + Starch and Vd + Cellulose applications compared to the infected control. This indicates that both sugars induce the ISR against *V. dahliae* in sterile soil experiment. In addition to that, we observed that the plants who treated only with starch or cellulose, had greater development than all other plants of the sterile soil experiment. This suggests that starch and cellulose inhibit the growth of eggplant seedlings at the expense of defense in the split root sterile soil experiment.

Scientific area of interest: phytopathology

Keywords: biological control, carbohydrates, starch, cellulose, verticillium, plant defense

Περιεχόμενα

Περίληψη.....	4
Abstract	6
Περιεχόμενα	7
1. Εισαγωγή	10
1.1 Το γένος <i>Verticillium</i>	10
1.1.1 Ο μύκητας <i>V. dahliae</i>	11
1.1.1.1 Μορφολογικά χαρακτηριστικά του μύκητα <i>V. dahliae</i>	12
1.1.1.2 Βιολογικός κύκλος του μύκητα <i>V. dahliae</i>	13
1.1.1.3 Μηχανισμοί παθογένεσης του μύκητα.....	16
1.1.1.4 Μηχανισμοί αμύνης των φυτών ενάντια στον μύκητα <i>V. dahliae</i>	18
1.1.1.5 Συμπτώματα σε δένδρα.....	20
1.1.1.6 Συμπτώματα σε ποώδεις ξενιστές.....	21
1.1.1.7 Αντιμετώπιση.....	22
1.2 Η άμυνα των φυτών.....	25
1.2.1 Επαγόμενη από συντηρημένες δομές παθογόνων διασυστηματική άμυνα (PAMPs triggered immunity-PTI)	26
1.2.2 Επαγόμενη από τελεστές άμυνα (effector-triggered immunity-ETI).....	27
1.2.3 Επίκτητη διασυστηματική αντοχή (systemic acquired resistance–SAR).....	28
1.2.4 Επαγόμενη διασυστηματική αντοχή (induced systemic resistance-ISR).....	28
1.2.5 Αντίδραση υπερευαισθησίας (hypersensitivity response-HR).....	29
1.2.6 Πρωτεΐνες που σχετίζονται με την παθογένεση (pathogenesis-related proteins)	30
1.2.7 Οι υποδοχείς NLRs (nucleotide-binding oligomerization domain-like receptors) ..	32
1.2.8 Φυτοαλεξίνες (phytoalexins)	33
1.2.9 Ο ρόλος των φυτορμονών στην άμυνα των φυτών	34
1.2.9.1 Ιασμονικό οξύ (JA)	34
1.2.9.2 Σαλικυλικό οξύ (SA).....	35
1.2.9.3 Αιθυλένιο (ET).....	36
1.2.9.4 Συστημίνη	37
1.2.10 Ο ρόλος της σηματοδότησης στην άμυνα των φυτών	38
1.3 Βιολογική αντιμετώπιση των φυτοπαθογόνων μικροοργανισμών	41
1.3.1 Υπερπαρασιτισμός	41
1.3.2 Αντιβίωση	41

1.3.3	Ανταγωνισμός.....	43
1.3.4	Παραγωγή λυτικών ενζύμων και άλλων βιολογικών προϊόντων.....	44
1.3.5	Επαγωγή άμυνας.....	45
1.4	Ο ρόλος των σακχάρων στην άμυνα των φυτών.....	47
1.4.1	Η ανίχνευση των σακχάρων και η σηματοδότηση στα φυτά.....	47
1.4.2	Η διείσδυση των σακχάρων διαμέσου της φυλλικής επιδερμίδας.....	51
1.4.3	Οι αλλαγές στα επίπεδα των σακχάρων στο σημείο της προσβολής.....	53
1.4.4	Η σχέση της δομής των σακχάρων με την άμυνα του φυτού.....	56
1.4.5	Διάφοροι τύποι σακχάρων που επάγουν την άμυνα των φυτών.....	57
1.4.6	Αλληλεπιδράσεις σακχάρων με φυτορμόνες.....	59
1.5	Άμυλο ένας αποθηκευτικός πολυσακχαρίτης.....	61
1.6	Κυτταρίνη ένας δομικός πολυσακχαρίτης.....	62
1.7	Μελιτζάνα (<i>Solanum Melongena</i> L.).....	63
1.8	Σκοπός της παρούσας διπλωματικής εργασίας.....	66
2.	Πειραματικό μέρος.....	67
2.1	Πρώτο πείραμα : Αξιολόγηση της επίδρασης του αμύλου και της κυτταρίνης στην παθογένεια του μύκητα <i>V. dahliae</i>.....	67
2.1.1	Σκοπός του πρώτου πειράματος.....	67
2.1.2	Μεταχειρίσεις πρώτου πειράματος.....	67
2.1.3	Οι εφαρμογές της μεταχείρισης “whole root”.....	68
2.1.4	Οι εφαρμογές της μεταχείρισης “split root”.....	68
2.2	Δεύτερο πείραμα : Αξιολόγηση της επίδρασης του αμύλου και της κυτταρίνης στην παθογένεια του μύκητα <i>V. dahliae</i> σε αποστειρωμένο έδαφος.....	69
2.2.1	Σκοπός του δεύτερου πειράματος.....	69
2.2.2	Μεταχειρίσεις δεύτερου πειράματος.....	69
2.2.3	Οι εφαρμογές της μεταχείρισης “whole root”.....	69
2.2.4	Οι εφαρμογές της μεταχείρισης “split root”.....	70
2.3	Υλικά και Μέθοδοι.....	71
2.3.1	Φυτικό υλικό.....	71
2.3.2	Θρεπτικά υποστρώματα ανάπτυξης.....	71
2.3.3	Παρασκευή υδατικού αιωρήματος αμύλου και κυτταρίνης.....	72
2.3.4	Καλλιέργεια και προετοιμασία του παθογόνου μολύσματος.....	73
2.3.5	Υπολογισμός της συγκέντρωσης του μολύσματος (κονίδια/ml).....	73
2.3.6	Μόλυνση φυτών με τον μύκητα <i>V. dahliae</i>	74
2.3.7	Καταμέτρηση των συμπτωμάτων της ασθένειας.....	74

2.3.8	Υπολογισμός του σχετικού εμβαδού ασθενείας (relative AUDPC)	74
2.3.9	Προσδιορισμός των επιπέδων έκφρασης των γονιδίων <i>PR-1</i> και <i>PR-4</i>	75
3.	Αποτελέσματα	79
3.1	Αποτελέσματα πρώτου πειράματος	79
3.1.1	Αξιολόγηση της επίδραση του αμύλου και της κυτταρίνης στην παθογένεια του μύκητα <i>V. dahliae</i>	79
3.1.2	Σχετική έκφραση του γονιδίου <i>PR-1</i>	88
3.1.3	Σχετική έκφραση του γονιδίου <i>PR-4</i>	89
3.2	Αποτελέσματα δεύτερου πειράματος	91
3.2.1	Αξιολόγηση της επίδραση του αμύλου και της κυτταρίνης στην παθογένεια του μύκητα <i>V. dahliae</i> σε αποστειρωμένο έδαφος	91
3.2.2	Μέσο ναπό βάρος των φυτών της μεταχείρισης όπου δεν πραγματοποιήθηκε διαχωρισμός του ριζικού συστήματος σε δύο μέρη	101
3.2.3	Μέσο ύψος των φυτών της μεταχείρισης όπου δεν πραγματοποιήθηκε διαχωρισμός του ριζικού συστήματος σε δύο μέρη	102
3.2.4	Σχετική έκφραση του γονιδίου <i>PR-1</i>	104
3.2.5	Σχετική έκφραση του γονιδίου <i>PR-4</i>	105
4.	Συμπεράσματα	108
5.	Συζήτηση	112
6.	Βιβλιογραφία	117

1. Εισαγωγή

1.1 Το γένος *Verticillium*

Το γένος *Verticillium*, είναι ένα μικρό γένος των ασκομυκήτων το οποίο καθιερώθηκε από τον Nees von Esenbeck το 1816 (Isaac, 1966). Περιλαμβάνει σημαντικούς φυτοπαθογόνους μύκητες με καταστροφικές επιπτώσεις σε πάρα πολλές καλλιέργειες παγκοσμίως. Έξι μόνο είδη μυκήτων που υπάγονται σε αυτό το γένος, προκαλούν πολύ σοβαρές ασθένειες στις φυτικές καλλιέργειες και συγκεκριμένα πρόκειται για τους μύκητες *V. dahliae*, *V. albo-atrum*, *V. nigrescens*, *V. nubilum*, *V. tricorpus* και *V. theobromae*. Από αυτά, τα πιο ζημιογόνα είδη θεωρούνται οι μύκητες *V. dahliae* και *V. albo-atrum* (Bhat and Subbarao, 1999), οι οποίοι δραστηριοποιούνται κυρίως στις εύκρατες και υποτροπικές περιοχές του πλανήτη, άλλα λιγότερο στις τροπικές. Είναι παρά πολύ δύσκολο και δαπανηρό να ελεγχθούν οι ασθένειες που προκαλούνται από τους μύκητες του γένους *Verticillium*, καθώς δεν υπάρχουν διαθέσιμα μυκητοκτόνα για την θεραπεία των ασθενών φυτών. Επίσης, τα συμπτώματα που προκαλούν οι μύκητες του γένους *Verticillium* spp., διαφέρουν μεταξύ των φυτών ξενιστών και σε αρκετές περιπτώσεις είναι παρόμοια με αυτά που προκαλούνται από τους μύκητες του γένους *Fusarium* spp. (Fradin and Thomma, 2006). Γενικά, οι μύκητες του γένους *Verticillium* εγκαθίστανται στα αγγεία του ξύλου και προκαλούν αδρομυκώσεις. Το χαρακτηριστικότερο σύμπτωμα των αδρομυκώσεων, είναι ο καστανός μεταχρωματισμός των αγγείων του ξύλου, ο οποίος τείνει να είναι εμφανής και στις ρίζες του φυτού (Παναγόπουλος, 1995). Τα είδη του γένους *Verticillium* αναπαράγονται αγενώς (Usami et al., 2009). Ένα χαρακτηριστικό που παίζει σημαντικό ρόλο στην βιολογία των μυκήτων του γένους *Verticillium*, είναι οι δομές επιβίωσης που σχηματίζουν αυτοί οι μύκητες όταν διαχειμάζουν, οι οποίες έπαιξαν και καθοριστικό ρόλο για την ταξινόμηση τους. Σύμφωνα με τους Inderbitzin et al. (2011), οι δομές αυτές παρατηρήθηκαν για πρώτη φορά στον μύκητα *V. albo-atrum* ως καφέ χρωματισμένες υφές, και ονομάστηκαν «Dauermycelien» από τους Reinke & Berthold το 1879. Ο όρος «Dauermycelien» μεταφράστηκε αργότερα το 1949 από τον Ivor Isaac σε «διαχειμάζον μυκήλιο» (resting mycelium). Άλλες μελανές κατασκευές επιβίωσης στο γένος *Verticillium*, είναι τα χλαμυδοσπόρια και τα μικροσκληρώτια. Τα χλαμυδοσπόρια αποτελούνται από βραχείες αλυσίδες καφέ στρογγυλεμένων κυττάρων, ενώ τα μικροσκληρώτια είναι στρογγυλεμένα καφέ κύτταρα που εμφανίζονται σε συστάδες. Ενδεικτικά, ο μύκητας *V. albo-atrum*

προσδιορίζεται με βάση την παρουσία του διαχειμάζοντος μυκηλίου, ενώ ο μύκητας *V. nubilum* από τα γλαυδοσπόρια που σχηματίζει. Οι μύκητες *V. dahliae* και *V. longisporum*, σχηματίζουν μικροσκληρώτια, ενώ ο μύκητας *V. tricorpus* σχηματίζει ταυτόχρονα διαχειμάζον μυκήλιο, γλαυδοσπόρια και μικροσκληρώτια (Isaac, 1949, 1945; Karapara et al., 1997). Στο γένος *Verticillium* υπάγονται πολλά διαφορετικά είδη μυκήτων, τα οποία παρασιτούν ποικίλους οργανισμούς, όπως φυτά, έντομα, νηματώδεις, αράχνες, και μύκητες (Bidochka et al. 1999). Σύμφωνα με τους Fradin and Thomma (2006), το γένος *Verticillium*, ταξινομείται σε :

Βασίλειο: Fungi

Φύλο: Ascomycota

Υπόφυλο: Pezizomycotina

Ομοταξία: Sordariomycetes

Τάξη: Phyllachorales

Γένος: *Verticillium*

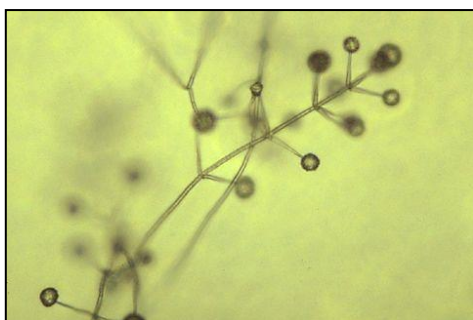
1.1.1 Ο μύκητας *V. dahliae*

Ο μύκητας *V. dahliae*, είναι ένας εδαφογενής φυτοπαθογόνος μύκητας με παγκόσμια εξάπλωση. Έχει μεγάλη γενετική πλαστικότητα και είναι σε θέση να μολύνει πέραν των 200 φυτικών ειδών, προκαλώντας ζημιές δισεκατομμυρίων δολαρίων στις καλλιεργούμενες εκτάσεις παγκοσμίως (Agrios, 1997). Στις σημαντικότερες κατηγορίες φυτών που έχει ανιχνευτεί ο μύκητας *V. dahliae*, περιλαμβάνονται τα λαχανικά (αγκινάρα, μελιτζάνα, πιπεριά, πατάτα και ντομάτα), τα φρούτα (αμπέλι, ελιά και φράουλα), τα καλλωπιστικά (Χρυσάνθεμο), τα ελαιούχα σπέρματα (ηλίανθος), οι φυτικές ίνες (βαμβάκι, λινάρι), τα ξυλώδη πολυετή φυτά και τα όσπρια (Bhat and Subbarao, 1999; Fradin and Thomma, 2006). Αξιοσημείωτο είναι το γεγονός ότι φυτά που στο παρελθόν θεωρούνταν μη ξενιστές του μύκητα *V. dahliae*, πλέον παρασιτούνται από αυτόν, με αποτέλεσμα ο κατάλογος των ξενιστών του μύκητα να αυξάνεται συνεχώς (Bhat & Subbarao, 1999; Lindsey et al., 2002). Χαρακτηριστικό παράδειγμα της πιο πάνω περίπτωσης, είναι το μαρούλι που καλλιεργείτο στις παράκτιες περιοχές της Καλιφόρνιας και θεωρείτο ανθεκτικό στην βερτισιλλίωση μέχρι το 1995. Από τότε, τεράστιες εκτάσεις έχουν αποδεκατιστεί,

χωρίς όμως να έχουν διευκρινιστεί οι πραγματικές αιτίες της ξαφνικής ευαισθησίας του μαρουλιού στον μύκητα *V. dahliae* (Atallah et al., 2010).

1.1.1.1 Μορφολογικά χαρακτηριστικά του μύκητα *V. dahliae*

Ο Heinrich Klebahn, ήταν ο πρώτος που περιέγραψε μορφολογικά τον μύκητα *V. dahliae*, σε ασθενή φυτά ντάλιας (*Dahlia rosae*) το 1913 (Barbara & Clewes, 2003; Klosterman et al., 2009; Smith, 1965). Το ενδοφυτικό μυκήλιο του μύκητα είναι υαλώδεις, φέρει σέπτα και είναι πολυκύτταρο με λεπτό τοίχωμα διαμέτρου 2-4 μm. Οι κονιδιοφόροι του μύκητα είναι συνήθως μικροί (80-160 μm μήκος), διακλαδιζόμενοι και υαλώδεις. Κάθε κονιδιοφόρος φέρει από 1-3 σπόνδυλους (Whorls), από τους οποίους εκφύονται συνήθως 3-4 φιαλίδια (phialides), τα οποία σχηματίζουν στις κορυφές τους φιαλιδοκονίδια (phialoconidia). Τα κονίδια του μύκητα είναι ωοειδή ή ελλειψοειδή και συνήθως μονοκύτταρα. Τα πρωτοσχηματιζόμενα κονίδια είναι διαστάσεων 3-5,5 × 1,5-2 μm περίπου και συχνά συγκεντρώνονται όλα μαζί σχηματίζοντας μικρές κεφαλές. Το διαχειμάζον μυκήλιο είναι συνήθως σκούρου καφέ χρώματος και με αποβλάστηση (budding) σχηματίζει μαύρα μικροσκληρώτια διαμέτρου 30-60 μm (Fradin & Thomma, 2006; Smith, 1965). Επιπρόσθετα, η διακλάδωση των κονιδιοφόρων εμφανίζεται σε σπειράματα διαφορετικών επιπέδων. Από αυτό το λεγόμενο «verticillate», δηλαδή από την διάταξη των κλάδων και των φιαλιδίων στους κονιδιοφόρους, προέρχεται και το όνομα του γένους *Verticillium* (εικόνα 1). Τα μικροσκληρώτια που παράγονται από τον μύκητα *V. dahliae* είναι μικροσκοπικά, πυκνά, μελανού χρώματος συσσωματώματα κυτταρικών υφών και παχέου τοιχώματος. Το μελανό χρώμα των μικροσκληρωτίων οφείλεται στην μελανίνη. Οι μελανίνες είναι σκούρες χρωστικές που σχηματίζονται από τον οξειδωτικό πολυμερισμό των φαινολικών ή ινδολικών ενώσεων και εναποτίθενται στα κυτταρικά τοιχώματα και στους μεσοκυττάριους χώρους των μυκήτων. Στον μύκητα *V. dahliae*, η μελανίνη βοηθά στην μακροχρόνια επιβίωση των μικροσκληρωτίων του στο έδαφος, καθώς τα μη μελανοποιημένα μικροσκληρώτια, χάνουν αυτήν την ικανότητα πολύ πιο γρήγορα (Fradin and Thomma, 2006).



Εικόνα 1 : Κονίδια του μύκητα *V. dahliae* που εκφύονται από τα φιαλίδια, τα οποία με την σειρά τους δημιουργούν ένα σπειροειδές γύρω από το άξονα του κάθε κονιδιοφόρου (apsnet.org).



Εικόνα 2 : Μικροσκληρώτια του μύκητα *V. dahliae* (apsnet.org).

1.1.1.2 Βιολογικός κύκλος του μύκητα *V. dahliae*

Η ασθένεια που προκαλεί ο μύκητας *V. dahliae* είναι μονοκυκλική. Ο βιολογικός κύκλος της ασθένειας χωρίζεται σε τρεις φάσεις : την παρασιτική, την σαπροφυτική και την περίοδο της διάπαυσης (Fradin and Thomma, 2006).

1.1.1.2.1 Φάση διάπαυσης (dormant phase)

Ο μύκητας *V. dahliae* επιβιώνει στο έδαφος υπό την μορφή των μικροσκληρωτίων, τα οποία διασκορπίστηκαν από το μολυσμένο φυτικό υλικό, έδαφος, νερό και γεωργικό εξοπλισμό (Klosterman et al., 2009). Κατά την διάρκεια της διάπαυσης, οι διαχειμάζουσες δομές του μύκητα, δηλαδή τα μικροσκληρώτια, παραμένουν αδρανοποιημένα και δεν βλαστάνουν. Αυτό οφείλεται χάρη σε κάποιες αυτορυθμιζόμενες διαδικασίες, τις οποίες διαθέτουν οι παθογόνοι μικροοργανισμοί για να εξασφαλίζουν την επιβίωσή τους σε αντίξοες συνθήκες. Τα μικροσκληρώτια μπορούν και επιβιώνουν στο έδαφος από 10 έως και 15 έτη (Wilhelm, 1955). Η αναστολή της βλάστησης των μικροσκληρωτίων, εξαρτάται ανάλογα με τις διαθέσιμες συγκεντρώσεις του άνθρακα και του αζώτου στην ριζόσφαιρα (Huisman, 1982; Mol, 1995; Olsson and Nordbring-Hertz, 1985). Ένα μικροσκληρώτιο, διαθέτει την ικανότητα να βλαστάνει περισσότερες από μία φορές, πράγμα το οποίο αυξάνει σημαντικά την πιθανότητα να υπάρξει μια επιτυχημένη μόλυνση (Fradin and Thomma, 2006). Η συνεχής βλάστηση των μικροσκληρωτίων χωρίς την μόλυνση κάποιου ξενιστή, μπορεί να δώσει μυκήλια και κονίδια, τα οποία όμως δεν θα συμβάλουν στην μακροχρόνια επιβίωση του παθογόνου στο έδαφος, καθώς μειώνεται

η αντοχή τους στην ξηρασία (Jiménez-Díaz et al., 2012). Οι βλαστώνουσες υφές του μύκητα κατευθύνονται προς τη περιοχή της ριζόσφαιρας του φυτού ξενιστή, οδηγούμενες από τις συγκεντρώσεις των θρεπτικών στοιχείων που απελευθερώνονται από το ριζικό σύστημα κατά διαστήματα. Η κίνηση αυτή των παθογόνων προς τα θρεπτικά στοιχεία, ονομάζεται χημειοτροπισμός. Προκειμένου να πραγματοποιηθεί η μόλυνση, πρέπει η απόσταση της ρίζας από την υφή της μόλυνσης να είναι πάρα πολύ μικρή, διότι τα είδη του γένους *Verticillium* θεωρούνται φτωχά είδη σαπρόφυτων στο έδαφος (Schnathorst, 1981). Υπολογίστηκε ότι αυτή η απόσταση πρέπει να είναι 300 μm (Huisman, 1982). Δεν υπάρχουν αποδεδειγμένα εξειδικευμένες αλληλεπιδράσεις μεταξύ του παθογόνου και του φυτού ξενιστή, οι οποίες θα συμβάλουν στην μείωση της αρχικής μόλυνσης (Klosterman et al., 2009). Βρέθηκε ότι η βλάστηση των μικροσκληρωτίων του μύκητα *V. dahliae*, αυξάνεται όταν έρχονται σε επαφή με ρίζες ή με ριζικά εκκρίματα σίτου (μη ξενιστής) ή τομάτας (ξενιστής), εντούτοις η βλάστηση των μικροσκληρωτίων είναι εντονότερη στα ριζικά εκκρίματα της τομάτας (Schnathorst, 1981).

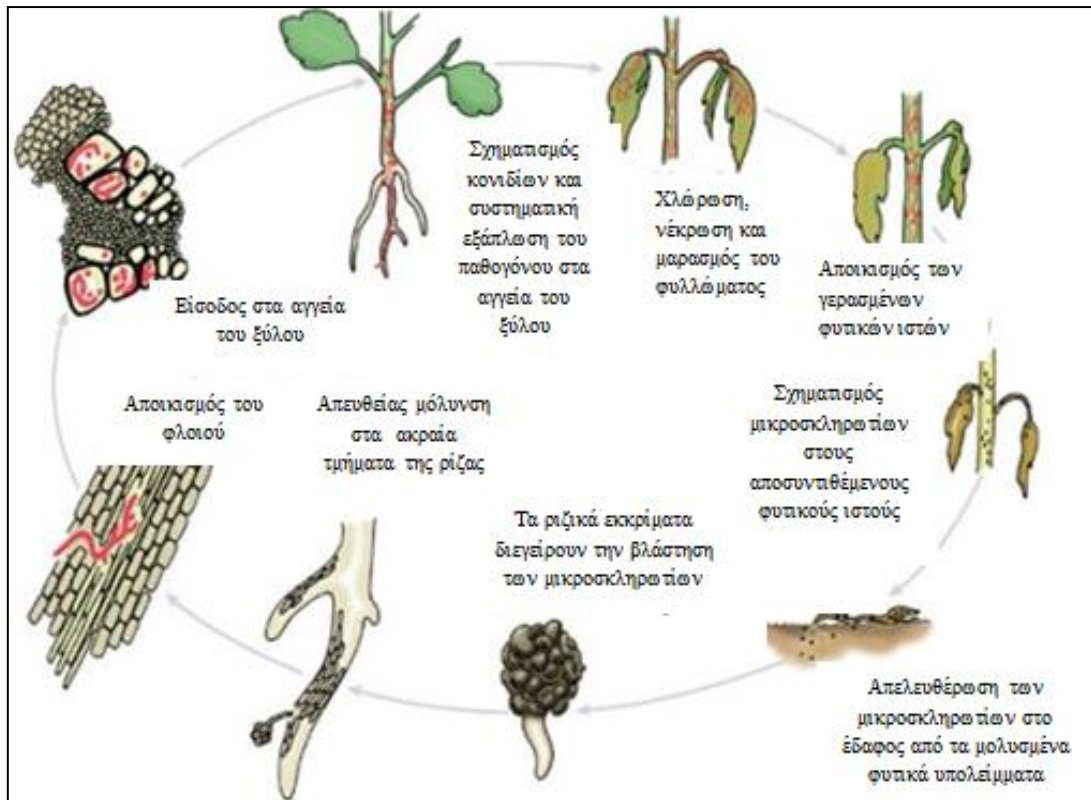
1.1.1.2.2 Παρασιτική φάση (parasitic phase)

Τυπικά, τα είδη του γένους *Verticillium* εισέρχονται στο παρασιτικό τους στάδιο όταν μολύνουν τα ευαίσθητα φυτά από το άκρο της ρίζας ή από τις θέσεις σχηματισμού των πλευρικών ριζών (Cooper & Bishop, 1983). Επίσης, οι μύκητες μπορούν να εισέλθουν απευθείας και από τα επιδερμικά κύτταρα της ζώνης επιμήκυνσης. Μόλις ο μύκητας *V. dahliae* εισέλθει στην ρίζα, έχει την ικανότητα να αναπτύσσεται και να προχωρά ταχέως τόσο στα μεσοκυττάρια, όσο και στα ενδοκυττάρια φλοιώδη κύτταρα της ρίζας. Η εναπόθεση καλλόζης και η αύξηση της σουμπερίνης στα κυτταρικά τοιχώματα της ενδοδερμίδας, θεωρείται ως ένας από τους σημαντικότερους μηχανισμούς που διαθέτουν τα φυτά για να εμποδίσουν την περεταίρω προέλαση του παθογόνου στα αγγεία του ξύλου. Η παρεμπόδιση αυτή ξεπερνιέται αν το μέγεθος του μολύσματος είναι αρκετά μεγάλο και η εναπόθεση της καλλόζης δεν είναι σε τέτοια ποσότητα που να αποτρέπει την ανάπτυξη του παθογόνου. Όταν ο μύκητας διαπεράσει την ενδοδερμίδα της ρίζας, εισέρχεται πλέον μέσα στα αγγεία του ξύλου. Σε αυτό το υγρό περιβάλλον ο μύκητας *V. dahliae* αναπτύσσεται σε δύο μορφές, την ανάπτυξη μέσω των υφών και την ανάπτυξη τύπου ζύμης (“yeast-like” growth). Δηλαδή, δημιουργεί κονίδια τα οποία βλαστάνουν

απευθείας από τις υφές ή κονίδια τα οποία εκφύονται απευθείας από τα κονίδια των φιαλιδίων (Buckley et al., 1969). Τα κονίδια με το ρεύμα των υγρών κινούνται ακροπέταλα και παγιδεύονται στις κοιλότητες των βοθρίων ή στα τελικά τοιχώματα των αγγείων του ξύλου (trapping sites). Εκεί θα βλαστήσουν και θα εισέλθουν στα γειτονικά αγγεία του ξύλου, προκειμένου να συνεχιστεί ο αποικισμός (Perry and Evert, 1983; Schnathorst, 1981) και να ξεκινήσει ένας νέος κύκλος μόλυνσης εντός του φυτού ξενιστή (Cooper & Bishop, 1983). Από μελέτες διαπιστώθηκε ότι ο μύκητας *V. dahliae* χρειάζεται γύρω στις 2-4 ημέρες προκειμένου να εισέλθει στα αγγεία του ξύλου της ρίζας. Ακολούθως, χρειάζεται και άλλη μια μέρα για να εξαπλωθεί και να απελευθερώσει τα κονίδια του στα γειτονικά αγγεία του ξύλου (Chen et al., 2004; Gold & Robb, 1995; Heinz et al., 1998).

1.1.1.2.3 Σαπροφυτική φάση (saprophytic phase)

Κατά τη διάρκεια της νέκρωσης των ιστών και της γήρανσης του φυτού, ο μύκητας *V. dahliae* εισέρχεται στο σαπροφυτικό του στάδιο. Στο στάδιο αυτό, ο μύκητας εξαπλώνεται σε όλο το φυτό, αποικίζοντας βλαστούς και ρίζες. Επίσης, στις περιοχές της επιτυχούς συστηματικής μόλυνσης, σχηματίζει κονιδιοφόρους και κονίδια, τα οποία συνεχίζουν να αναπτύσσονται και μετά την πλήρη νέκρωση του φυτού (Vallad et al., 2006). Τα κονίδια δεν μπορούν να επιβιώσουν στο έδαφος για αρκετούς μήνες. Παρ' όλ' αυτά, μπορεί να προκαλέσουν δευτερογενείς μολύνσεις σε άλλες καλλιέργειες (Klosterman et al., 2009). Στα μολυσμένα φυτά, οι βλαστοί και οι ρίζες των φυτών φέρουν μεγάλο αριθμό μικροσκληρωτίων, τα οποία θα απελευθερωθούν στο έδαφος κατά την αποδόμηση τους (Fradin and Thomma, 2006). Πιστεύεται ότι πάνω από 90.000 μικροσκληρώτια μπορούν να εισαχθούν στο έδαφος από ένα και μόνο μολυσμένο στέλεχος φυτού, και στη συνέχεια να εξαπλωθούν σε ολόκληρο τον αγρό (Johnson and Dung, 2010).



Σχήμα 1 : Ο κύκλος ζωής του μύκητα *V. dahliae* (Berlanger and Powelson, 2000)

1.1.1.3 Μηχανισμοί παθογένεσης του μύκητα

1.1.3.1.1 Ένζυμα

Έχει αναφερθεί ότι κατά τον αποικισμό των αγγείων του ξύλου, ο μύκητας παράγει θρεπτικά μέσω της αποικοδόμησης των συστατικών του κυτταρικού τοιχώματος των φυτικών κυττάρων και των βοθρίων (Pegg, 1989). Οι περισσότεροι μύκητες που προκαλούν αδρομυκώσεις, εκκρίνουν πολυγαλακτουρονάσες (Polygalacturonases-PG) και λυάσες της πηκτίνης (Pectin Lyases-PL) (Durrands and Cooper, 1988). Ο μύκητας *V. dahliae* παράγει μια ποικιλία ενζύμων που αποικοδομούν τα φυτικά κυτταρικά τοιχώματα (Cell Wall Degrading Enzymes - CWDE). Σε αυτά τα ένζυμα, περιλαμβάνονται πηκτινάσες, πολυσακχαριδάσες και πρωτεϊνάσες (Bidochka et al., 1999; Dobinson et al., 1997; Howell et al., 1976; Lambert and Pujarniscle, 1984; Talboys and Busch, 1970; Wood, 1961). Η δραστηριότητα των ενζύμων CWDE, μπορεί συμβάλει άμεσα στην επαγωγή των συμπτωμάτων της νόσου (δυσλειτουργία των αγγείων), καθώς και στην αποδυνάμωση του φυτού ξενιστή, έτσι ώστε να μην είναι σε θέση να προβάλλει

κάποια αξιόλογη αντίσταση (Pegg, 1989). Για να αναπτυχθεί ο μύκητας εντός του φυτού ξενιστή, πρέπει να παραβιάσει τις μεμβράνες που περιέχουν πηκτίνη μεταξύ των γειτονικών αγγείων του ξύλου άλλα και μεταξύ των ακραίων τμημάτων του ξύλου (Bishop and Cooper, 1983; Pegg et al., 1976). Γενικά, τα πηκτινολυτικά ένζυμα έχουν μελετηθεί εκτενώς και πιστεύεται ότι παίζουν κρίσιμο ρόλο στην παθογένεια των μυκήτων του γένους *Verticillium* (Fradin & Thomma, 2006). Στα σημαντικότερα εξ' αυτών, περιλαμβάνονται η πολυγαλακτουρουνάση, η λύση της πηκτίνης και η πηκτινεστεράση (Huang & Mahoney, 1999; Mussell & Strouse, 1972; M. C. Wang & Keen, 1970). Οι πηκτινάσες μπορεί να θεωρηθούν ως παράγοντες μολυσματικότητας για τον μύκητα *V. dahliae*, αλλά δεν θεωρούνται καθοριστικοί για την παθογένεια του μύκητα (Alfen, 1989). Τέλος, η συνεργιστική δράση που προκύπτει από το συνδυασμό όλων των πιο πάνω προαναφερθεισών ενζύμων, πιστεύεται ότι είναι το κύριο όπλο που χρησιμοποιούν οι μύκητες του γένους *Verticillium* για να αποικήσουν και να μολύνουν τα φυτά ξενιστές (Durrands and Cooper, 1988).

1.1.3.1.2 Τοξίνες

Οι φυτοτοξίνες είναι μικροβιακοί μεταβολίτες οι οποίοι θεωρούνται επιβλαβείς για τα φυτά ακόμη και σε χαμηλές συγκεντρώσεις (Rudolph, 1976). Σε αρκετές μελέτες έχουν χρησιμοποιηθεί διάφορες τοξίνες από τα εκχυλίσματα των μυκήτων του γένους *Verticillium*, με σκοπό την επαγωγή της φυτικής άμυνας και την μελέτη των φυτικών αποκρίσεων. Γενικά, σε αυτά τα ακατέργαστα εκχυλίσματα, εντοπίστηκαν υψηλού μοριακού βάρους σύμπλοκα πρωτεΐνης-λιποπολυσακχαρίτη (PLP), γλυκοπρωτεϊνών, αλλά και ενζύμων αποικοδόμησης του κυτταρικού τοιχώματος (Fradin and Thomma, 2006). Σε φυτά πατάτας, το υψηλού μοριακού βάρους σύμπλεγμα PLP του μύκητα *V. dahliae*, περιέχει μια γλυκοπεπτιδική τοξίνη που βρέθηκε να είχε άμεση σχέση με την εκδήλωση των συμπτωμάτων της ασθένειας στους ευπαθείς ξενιστές (Buchner et al., 1982). Αυτό το κλάσμα πολυπεπτιδίου παρουσιάζει διαφορετική τοξική δράση, ανάλογα με τον ξενιστή από τον οποίο απομονώθηκε. Τα ανθεκτικά φυτά φαίνεται παρουσιάζουν μια ανεκτικότητα σε αυτό το σύμπλοκο τοξίνης (Buchner et al., 1989). Επίσης, η τοξίνη αυτή συσσωρεύεται στα κυτταρικά τοιχώματα των αγγείων του ξύλου, στα στελέχη και στους κονδύλους των ευπαθών ξενιστών (Nachmias et al., 1985). Η δράση της θεωρείται απαραίτητη για την παθογένεια του μύκητα *V. dahliae*, καθώς δεν έχει ανιχνευτεί ακόμη στα μη

παθογόνα στελέχη του μύκητα (Buchner et al., 1982). Επιπρόσθετα, σε καλλιέργειες κυτταρικών αιωρημάτων βαμβακιού, βρέθηκε ότι ο διεγέρτης του μύκητα *V. dahliae* ήταν μια γλυκοπρωτεΐνη 65 kDa. Μόνο ένα πρωτεϊνικό συστατικό από αυτήν την πρωτεΐνη (απογλυκοζυλιωμένη πρωτεΐνη 53-kDa), ήταν υπεύθυνο για την δραστηριότητα του διεγέρτη, ο οποίος φαίνεται να επάγει την βιοσύνθεση φυτοαλεξινών (Davis et al., 1998). Πιστεύεται ότι τα συμπτώματα που προκαλεί η ασθένεια της βερτισιλλίωσης, οφείλονται κυρίως στις τοξίνες που παράγει ο παθογόνος μύκητας παρά στο φράξιμο των αγγείων του ξύλου (Keen et al., 1972). Για παράδειγμα, σε πειράματα που πραγματοποιήθηκαν σε φυτά πατάτας με χωρισμένο ριζικό σύστημα (split-root), παρατηρήθηκε μια μείωση στην ανάπτυξη του ριζικού συστήματος, και αυτή αποδόθηκε στην δραστηριότητα των τοξινών που παράγει ο μύκητας *V. dahliae* (Buchner et al., 1989; Kotcon and Rouse, 1984). Επίσης, μερικώς καθαρισμένες τοξίνες από ορισμένους μύκητες του γένους *Verticillium*, αποδείχθηκαν ότι προκαλούν χλωρίωση και νέκρωση στα φύλλα ευαίσθητων (στην βερτισιλλίωση) ποικιλιών τομάτας και πατάτας (Mansoori and Smith, 2005).

Ορισμένα μέλη της οικογένειας των πρωτεϊνών NLPs που συναντώνται σε βακτήρια, μύκητες και ωομύκητες, είναι σε θέση να προκαλέσουν την αντίδραση υπερευαισθησίας, υποδεικνύοντας ότι λειτουργούν σαν διεγέρτες παρά ως τοξίνες (Pemberton & Salmond, 2004; Wang et al., 2004). Ένα μέλος των πρωτεϊνών NLP το οποίο απομονώθηκε από τον μύκητα *V. dahliae* και ονομάζεται VdNep, βρέθηκε να προκαλεί μαρασμό σε φύλλα βαμβακιού (Wang et al., 2004). Λίγα είναι όμως γνωστά για την έκφραση των πρωτεϊνών της οικογένειας NLP κατά τη διάρκεια της μόλυνσης, καθώς δεν έχει ανιχνευτεί οποιασδήποτε πρωτεΐνη της ομάδας NLP να εμπλέκεται στην παθογένεια του μύκητα *V. dahliae*.

1.1.1.4 Μηχανισμοί αμύνης των φυτών ενάντια στον μύκητα *V. dahliae*

Τα φυτά τα οποία έχουν μολυνθεί από τον μύκητα *V. dahliae*, παράγουν και συγκεντρώνουν στους ιστούς των βλαστών και της ρίζας ορισμένα αντιμικροβιακά συστατικά, όπως πρωτεΐνες που σχετίζονται με την παθογένεση (π.χ. γλουκανάσες και χιτινάσες), φυτοαλεξίνες και φαινολικές ενώσεις (Huisman, 1988). Κατά τη διάρκεια της κανονικής ανάπτυξης των ριζών, εναποτίθεται σουμπερίνη στα κύτταρα της ενδοδερμίδας, η οποία λειτουργεί ως ένα φυσικό φράγμα κατά της προέλασης του

μύκητα (Talboys, 1964). Επιπλέον, με την είσοδο του μύκητα στο φυτό ξενιστή, η λιγνίνη κατατίθεται πολύ γρήγορα στα επιδερμικά και στα φλοιώδη κυτταρικά τοιχώματα των φυτών, αλλά και γύρω από τις υφές διείσδυσης του μύκητα, σχηματίζοντας τους λεγόμενους κονδύλους λιγνίνης (Griffiths, 1971). Με την ταχεία εναπόθεση της σουμπερίνης και των άλλων υλικών επικάλυψης στα κυτταρικά τοιχώματα των αγγείων του ξύλου, συμπεριλαμβανομένων και των θέσεων παγίδευσης (trapping sites), σχηματίζεται ένα φράγμα κατά των μυκητιακών υφών διείσδυσης του μύκητα (Robb et al., 1989). Επίσης, προκαλείτε και μια απόφραξη στα αγγεία του ξύλου, με κόμματα, πήγματα και άλλα συστατικά που εκκρίνονται από τα γειτονικά παρεγχύματικά κύτταρα (Benhamou, 1995). Σε αυτήν την απόφραξη σχηματίζονται και οι τυλώσεις. Πρόκειται για φυσαλιδώδεις εξελίξεις των παρεγχυματικών κυττάρων, οι οποίες συσσωρεύουν μια ποικιλία ρητινών και δύναται να επεκταθούν και στα γειτονικά αγγεία του ξύλου (Robb et al., 1979). Όλα αυτά τα φυσικά εμπόδια δεν επιτρέπουν την μεταφορά των υγρών στα αγγεία του ξύλου, μπλοκάροντας παράλληλα και την προέλαση του μύκητα. Στην περίπτωση που τα πιο πάνω γεγονότα λάβουν χώρα προτού γίνει η μόλυνση από τον μύκητα, η προτού απελευθερωθούν τα κονίδια στο ρεύμα των υγρών, τότε το παθογόνο μπορεί να περιοριστεί και να έχουμε ανθεκτικότητα. Εντούτοις, αν έχουμε ταυτόχρονη προσβολή πολλών αγγείων του ξύλου από το παθογόνο και δεν υπάρξει αντικατάσταση τους με νέα, τότε το φυτό θα οδηγηθεί σε κατάρρευση (Talboys, 1972). Η ανατομία των αγγείων του ξύλου ενδεχομένως να επηρεάζει την κατά μήκος των αγγείων ανάπτυξη και εξάπλωση του παθογόνου (Alfen, 1989).

Η πιο εντυπωσιακή φυτοαλεξίνη που εμπλέκεται ενεργά στην αντίσταση κατά των μυκήτων του γένους *Verticillium*, είναι το στοιχειακό θείο, το οποίο χρησιμοποιείται ως μυκητοκτόνο στην γεωργία. Σε ανθεκτικές ποικιλίες βαμβακιού και τομάτας, το θείο εντοπίστηκε σε πολύ υψηλές συγκεντρώσεις στα παρεγχυματικά κύτταρα του ξύλου, στα τοιχώματα των αγγείων του ξύλου και στα πήγματα που αποφράζουν τα αγγεία του ξύλου (Talboys, 1972). Επίσης, σε φυτά βαμβακιού, ο μύκητας *V. dahliae* οδήγησε σε μια αυξημένη συσσώρευση τερπενοειδών φυτοαλεξίνων, οι οποίες φαίνεται να προήλθαν κυρίως από τα παρεγχυματικά κύτταρα του ξύλου (Mace et al., 1976). Η αντοχή της τομάτας στα διάφορα παθογόνα, συσχετίστηκε με την φυτοαλεξίνη ρισχιδίνη (rishitin) και τις χιτινάσες, οι οποίες πιστεύεται ότι αποικοδομούν τα κυτταρικά τοιχώματα του μύκητα *V. dahliae* (Williams et al., 2002).

Τέλος, λόγω του ότι το παθογόνο παράγει ένζυμα τα οποία αποικοδομούν το κυτταρικό τοίχωμα των φυτών, τα φυτά με την σειρά τους εκφράζουν μερικές γλυκοπρωτεΐνες (PGIPs-polygalacturonase inhibiting proteins) οι οποίες έχουν ως σκοπό να αναστέλλουν τις ενδοπολυγαλακτουρονάσες του μύκητα (Lorenzo et al., 2001). Τέτοιες είδους πρωτεΐνες κατά των ενδοπολυγαλακτουρονάσων του μύκητα *V. dahliae*, έχουν απομονωθεί μέχρι στιγμής από το βαμβάκι (James and Dubery, 2001) και από την μηλιά (Gazendam et al., 2004).

1.1.1.5 Συμπτώματα σε δένδρα

Στα πυρηνόκαρπα τα συμπτώματα εμφανίζονται συνήθως αρχές του καλοκαιριού, και περιλαμβάνουν την μαρανση των κλάδων ή των βραχιόνων και χλωρωτικό φύλλωμα. Επίσης, παρατηρείται καρούλιασμα των φύλλων, φυλλόπτωση και αποξήρανση των προσβεβλημένων κλάδων. Στα αγγεία του ξύλου των προσβεβλημένων κλάδων ή βραχιόνων, παρατηρείται έντονος καστανός ή καστανοερυθρός μεταχρωματισμός. Σε εγκάρσια τομή, ο μεταχρωματισμός έχει την μορφή ραβδώσεων. Ο μαρασμός και η χλώρωση παρουσιάζονται μονόπλευρα, δηλαδή μόνο στην μία πλευρά των προσβεβλημένων δένδρων (φύλλων ή κλάδων), ενώ στην άλλη πλευρά απουσιάζουν τα συμπτώματα (ημιπληγία). Εντούτοις, με την πάροδο του χρόνου η προβολή επεκτείνεται αργότερα σε όλη την κόμη του δέντρου. Η χλώρωση παρατηρείται πρώτα στα κατώτερα φύλλα των κλάδων και στην συνέχεια επεκτείνεται και στα ανώτερα φύλλα των κλάδων. Τα νεαρά δένδρα σε συνθήκες έντονης προσβολής διατρέχουν τον κίνδυνο να ξεραθούν σε σχέση με τα ηλικιωμένα (Παναγόπουλος, 2007).

Στην ελιά, οι επιπτώσεις της βερτισιλλίωσης είναι πολύ σημαντικές και πρόκειται για την σοβαρότερη ασθένεια της ελιάς παγκοσμίως. Οι απώλειες περιλαμβάνουν κυρίως τον θάνατο των δέντρων και σημαντικές μειώσεις στις αποδόσεις των ελαιούχων σπόρων. Ο θάνατος των δένδρων συμβαίνει κυρίως στους νέους ελαιώνες, αλλά μπορεί επίσης να συμβεί και στα ενήλικα δένδρα. Η βερτισιλλίωση στην ελιά εκδηλώνεται σε δύο μορφές. Η πρώτη περιλαμβάνει το σύνδρομο του απότομου μαρασμού ή της αποπληξίας και η δεύτερη το σύνδρομο της βραδείας αποξήρανσης. Η αποπληξία στην ελιά αναπτύσσεται κυρίως στα τέλη του χειμώνα και νωρίς την άνοιξη. Χαρακτηρίζεται από μια γρήγορη ξήρανση των κλάδων και των βραχιόνων του προσβεβλημένου δέντρου, ενώ τα φύλλα αποκτούν χρώμα ανοιχτού καφέ και

γυρίζουν προς τα πίσω, προς την οξεία πλευρά και αποξηραίνονται. Τα νεκρά φύλλα παραμένουν προσκολλημένα στους συμπτωματικούς βλαστούς, αν και μπορεί να εμφανιστεί και μερική φυλλόπτωση (κυρίως στα νεαρά δέντρα). Συνήθως, ο φλοιός των επηρεασμένων κλάδων και βραχιόνων, παρουσιάζει έναν πορφυρό αποχρωματισμό. Τα συμπτώματα του απότομου μαρασμού εμφανίζονται κατά την διάρκεια της ανθοφορίας και προχωρούν αργά μέχρι τις αρχές του καλοκαιριού. Περιλαμβάνουν κυρίως την μουμιοποίηση των λουλουδιών και την νέκρωση των ταξιανθιών, συνοδευόμενες από την χλώρωση και από την νέκρωση των φύλλων που αναπτύσσονται σε μεμονωμένους κλάδους. Τα φύλλα συχνά αποκόπτονται και πέφτουν, εκτός από εκείνα που βρίσκονται στο άκρο των κλάδων. Οι καρποί συρρικνώνονται, αποξηραίνονται και μουμιοποιούνται. Σε ορισμένες ποικιλίες μπορεί να απουσιάζει ο καστανός μεταχρωματισμός των αγγείων του ξύλου. Στο σύνδρομο της βραδείας αποξήρανσης, τα φύλλα γίνονται χλωρωτικά, μαραίνονται και πέφτουν νωρίς, ενώ οι προσβεβλημένοι κλάδοι αποξηραίνονται. Αυτά τα συμπτώματα μπορούν να παρατηρηθούν από το φθινόπωρο έως τα τέλη της άνοιξης. Συνήθως, εκδηλώνονται αρχικά μόνο στην μια πλευρά της κόμης του δέντρου και στην συνέχεια να επεκτείνονται σε ολόκληρη την κόμη του δέντρου (Παναγόπουλος, 2007; Jiménez-Díaz et al., 2012).

Στο αμπέλι, η ασθένεια εμφανίζεται κυρίως το καλοκαίρι με μια απότομη μάρανση του φυλλώματος. Στην συνέχεια η μάρανση ακολουθείται από την αποξήρανση του φυλλώματος και των κληματίδων του πρέμνου. Επίσης, παρατηρείται καστανός μεταχρωματισμός των αγγείων του ξύλου των κληματίδων ή του κορμού κατά θέσεις. Ο μεταχρωματισμός μπορεί να είναι συνεχής με την μορφή στιγμάτων (σε εγκάρσια τομή), ή με την μορφή συνεχών και διακεκομμένων ραβδώσεων (σε κατά μήκος τομή) (Παναγόπουλος, 2007).

1.1.1.6 Συμπτώματα σε ποώδεις ξενιστές

Επειδή τα συμπτώματα της βερτισιλλίωσης διαφέρουν μεταξύ των ξενιστών, δεν υπάρχουν μοναδικά συμπτώματα τα οποία να αντιπροσωπεύουν όλα τα φυτά που προσβάλλει ο μύκητας *V. dahliae*. Για παράδειγμα, στην τομάτα τα κατώτερα φύλλα γίνονται χλωρωτικά και οι άκριες των φύλλων νεκρώνονται σε σχήμα V. Τα φύλλα συχνά μαραίνονται και πέφτουν. Επίσης, τα φύλλα μπορεί να αναπτύξουν κίτρινες κηλίδες που αργότερα γίνονται νεκρωτικές, ενώ οι νευρώσεις να αποκτούν καφέ ή

μώβ χρώμα. Σε πολλά φυτικά είδη, η μάρανση των νεαρών βλαστών παρατηρείται κατά τη διάρκεια των υψηλών θερμοκρασιών της ημέρας. Ξηρασία ή άλλες συνθήκες που μειώνουν την ζωτικότητα του φυτού, μπορεί να αναδείξουν την ανάπτυξη και την εκδήλωση των συμπτωμάτων της ασθένειας. Τα ετήσια φυτά συχνά επιβιώνουν, αλλά μπορεί να είναι χλωρωτικά, υπανάπτυκτα, πρώιμα γερασμένα και να έχουν μικρότερη απόδοση. Χαρακτηριστικό σύμπτωμα της ασθένειας, είναι ο καστανός μεταχρωματισμός των αγγείων του ξύλου, ο οποίος είναι εμφανής και στις ρίζες. Ο μεταχρωματισμός μπορεί να επεκταθεί σε όλο το μήκος των στελεχών, ακόμη και μέχρι τα αγγεία των καρπών της τομάτας και των κονδύλων της πατάτας (Παναγόπουλος, 1995).

1.1.1.7 Αντιμετώπιση

Η ασθένεια της βερτισιλλίωσης είναι πολύ δύσκολο να ελεγχθεί, εξαιτίας της ικανότητας του παθογόνου να επιβιώνει στο έδαφος για αρκετά χρόνια υπό τη μορφή των μικροσκληρωτίων. Επίσης, η δυσκολία έγκειται και στο ευρύ φάσμα ξενιστών που μολύνει ο μύκητας, αλλά και από την ανικανότητα πολλών διασυστηματικών μυκητοκτόνων να επηρεάσουν το παθογόνο μόλις εισέλθει στο ξύλο. Γενικότερα, στα μονοκυκλικά παθογόνα και ειδικά για τα παθογόνα που προκαλούν αδρομυκώσεις, ο κυριότερος στόχος είναι η διαχείριση και η μείωση του αρχικού μολύσματος (Klosterman et al., 2009). Η πιο επιθυμητή προσέγγιση για την αντιμετώπιση της βερτισιλλίωσης, είναι η αποφυγή του παθογόνου μύκητα, πράγμα το οποίο είναι πάρα πολύ δύσκολο να επιτευχθεί, καθώς τα είδη του γένους *Verticillium* είναι κοσμοπολίτικα είδη. Αυτό μπορεί να επιτευχθεί σε κάποιο βαθμό με περιορισμούς καραντίνας, με σκοπό την αποτροπή της μετακίνησης των μολυσμένων φυτών ή σπόρων. Η αφαίρεση των ασθενών φυτών από τον αγρό μόλις διαγνωστούν με την ασθένεια της βερτισιλλίωσης, θεωρείται η πιο ορθή γεωργική πρακτική για την μείωση του αρχικού μολύσματος (Fradin and Thomma, 2006).

Στο παρελθόν, η χημική απολύμανση του εδάφους με την εφαρμογή απολυμαντικών ευρέου φάσματος, όπως το βρωμιούχο μεθύλιο (βρωμιούχο μεθύλιο 98% και χλωροπικρίνη 2%), θεωρείτο η πιο αποτελεσματική μέθοδος για την αντιμετώπιση της βερτισιλλίωσης (Easton, 1970; Easton et al., 1972; Powelson and Carter, 1973). Εντούτοις, εξαιτίας των αρνητικών επιπτώσεων που είχαν τα χημικά

απολυμαντικά του εδάφους στο περιβάλλον και στον άνθρωπο, η χρήση τους έχει πλέον απαγορευτεί.

Η αμειψισπορά που είναι αποτελεσματική για τη διαχείριση πολλών φυτοπαθολογικών ασθενειών, είναι σε μεγάλο βαθμό αναποτελεσματική για την βερτισιλλίωση. Αυτό οφείλεται κυρίως λόγω του μεγάλου εύρους ξενιστών που μολύνουν τα είδη του γένους *Verticillium*. Γενικότερα, σε αμειψισπορές πατάτας με σιτηρά, η μικρότερη περίοδος που απαιτείται για να μειωθεί σημαντικά το μόλυσμα σε μέτρια έως βαριά προσβεβλημένα εδάφη, είναι περίπου 5-10 χρόνια (Davis, 1981).

Η εφαρμογή της ηλιοαπολύμανσης (ως προληπτικό μέτρο), θεωρείται σήμερα η πιο αποτελεσματική μέθοδος για τον περιορισμό της ασθένειας. Στην Ελλάδα, σε καλλιέργειες τομάτας και αγκινάρας, η εφαρμογή της ηλιοαπολύμανσης είχε δώσει πολύ ενθαρρυντικά αποτελέσματα στην μείωση του αρχικού μολύσματος της ασθένειας (Tjamos & Paplomatas, 1988). Επίσης, εξαιρετικά αποτελέσματα είχαν δώσει στο παρελθόν, ο συνδυασμός της ηλιοαπολύμανσης με μειωμένες δόσεις απολυμαντικού εδάφους (βρωμιούχο μεθύλιο, νατριούχος μετάμη κ.ά.) (Frank et al., 1986; Tjamos & Paplomatas, 1987). Ακόμη, με την μέθοδο της ηλιοαπολύμανσης, βρέθηκε να ευνοείται η ανάπτυξη ορισμένων ανταγωνιστικών για την ασθένεια μικροοργανισμών (π.χ. *Talaromyces flavus*) (Tjamos, 1989). Η ηλιοαπολύμανση για να είναι αποτελεσματική πρέπει να εφαρμόζεται μόνο σε περιοχές που επικρατούν οι κατάλληλες περιβαλλοντικές συνθήκες (Fradin and Thomma, 2006). Περιοχές εύκρατης ζώνης, με υψηλές θερμοκρασίες κατά τους καλοκαιρινούς μήνες και υψηλή ηλιοφάνεια, θεωρούνται οι καταλληλότερες συνθήκες για την αποτελεσματική εφαρμογή της ηλιοαπολύμανσης.

Υπάρχει αυξημένη ανάγκη για εναλλακτικές πρακτικές οι οποίες θα συμβάλλουν άμεσα στην αντιμετώπιση της ασθένειας. Για να είναι όμως αποτελεσματικές, θα πρέπει συμβαδίζουν με τις μέχρι πρότεινες διαδικασίες που χρησιμοποιούντο για την αντιμετώπιση της βερτισιλλίωσης. Παρά το γεγονός ότι έχουν βρεθεί διάφορες γεωργικές πρακτικές για την αντιμετώπιση του παθογόνου, όπως η ηλιοαπολύμανση του εδάφους και η αμειψισπορά, δεν προέκυψε κάποια εναλλακτική λύση που να είναι σταθερά αποτελεσματική και να ενσωματώνεται εύκολα στις διαδικασίες της γεωργικής παραγωγής. Η ανάπτυξη ανθεκτικών ποικιλιών παραμένει μέχρι και σήμερα η προτιμώμενη στρατηγική για τον έλεγχο της βερτισιλλίωσης. Ο χαρακτηρισμός της ανθεκτικότητας σε γενετικό και φυσιολογικό επίπεδο,

περιγράφηκε καλύτερα μέχρι στιγμής στην τομάτα, πατάτα και στο βαμβάκι (Klosterman et al., 2009).

1.1.1.7.1 Βιολογική αντιμετώπιση του μύκητα *V. dahliae* με την χρήση μικροοργανισμών

Η βιολογική αντιμετώπιση του μύκητα, γίνεται κυρίως με την χρήση βιολογικών παραγόντων, μυκήτων και βακτηρίων, οπού μέσω διαφορετικών μηχανισμών δράσης ή συνδυασμό αυτών, επιτυγχάνεται η παρεμπόδιση της ασθένειας. Οι βιολογικοί παράγοντες που δρουν εναντίον του μύκητα *V. dahliae*, για να είναι σε θέση να αναπτυχθούν και να έχουν επιτυχή εφαρμογή στον αγρό, πρέπει να τηρούν τα παρακάτω κριτήρια σύμφωνα με τους Klosterman et al., (2009) : (α) να μειώνουν τα μικροσκληρώτια που υπάρχουν έδαφος, (β) να μειώνουν σημαντικά τα συμπτώματα της βερτισιλλίωσης στην καλλιέργεια, και (γ) να βελτιώνουν τις αποδόσεις των προσβεβλημένων φυτών, σε τέτοια επίπεδα τα οποία θα είναι συγκρίσιμα με τα υγιή φυτά ή με τα φυτά που αναπτύχθηκαν σε εδάφη που υπέστησαν υποκαπνισμό.

Ορισμένοι εδαφογενείς μύκητες συμπεριλαμβανομένων των *Gliocladium virens*, *Gliocladium roseum*, *Aspergillus alutaceus*, *Talaromyces flavus*, *Paecilomyces lilacinus* και *Trichoderma viride*, είναι ικανοί να μειώσουν την συχνότητα εμφάνισης της ασθένειας που προκαλείται από τον μύκητα *V. dahliae* (Keinath, 1991; Naraghi et al., 2011; Picman et al., 1990). Ο μύκητας *T. flavus*, έχει την ικανότητα να παρασιτεί και τα μικροσκληρώτια του μύκητα *V. dahliae*, καθώς ο παρασιτισμός τους από άλλους μικροοργανισμούς εμποδίζεται από το πολύ μικρό μέγεθος που διαθέτουν (Fahima et al., 1992).

Η παρουσία του μη παθογόνου μύκητα *V. nigrescens* στις ρίζες ευπαθών ξενιστών, καθυστέρησε την εμφάνιση των συμπτωμάτων του μύκητα *V. dahliae* μέχρι και 4 εβδομάδες. Ο μύκητας *V. nigrescens* πιστεύεται ότι προκάλεσε αλλαγές στον μεταβολισμό των φυτών, οι οποίες μέσω της υπερέκφρασης συγκεκριμένων παρεμποδιστικών παραγόντων απέτρεψαν αποτελεσματικά την μόλυνση από τον μύκητα *V. dahliae* (Schnathorst, 1981). Επίσης, από τις αλληλεπιδράσεις μεταξύ του μύκητα *V. dahliae* με τον μύκητα *T. basicola*, βρέθηκε ότι μύκητας *T. basicola* εμποδίζει την μόλυνση από τον μύκητα *V. dahliae*, καταλαμβάνοντας τις πιθανές θέσεις της μόλυνσης και νεκρώνοντας τις ρίζες του ευπαθούς ξενιστή (Schnathorst, 1981).

Το βακτηριακό στέλεχος *Paenobacillus alvei* (K165), είναι ένα ριζοβακτήριο που προωθεί την ανάπτυξη των φυτών και λειτουργεί και ως βιολογικός παράγοντας για την αντιμετώπιση του μύκητα *V. dahliae*, τόσο στο θερμοκήπιο όσο και στον αγρό. Το K165 σε μεταλλαγμένα φυτά αραβίδοψης, βρέθηκε να επάγει μέσω του σαλκυλικού οξέος (SA) την επαγόμενη διασυστηματική ανθεκτικότητα (ISR) και την έκφραση των γονιδίων παθογένεσης *PR-1*, *PR-2* και *PR-5* (Tjamos et al., 2005). Τέλος, το *Fusarium oxysporum* F2, είναι ένα μη παθογόνο στέλεχος του γένους *Fusarium*, το οποίο έχει δώσει μέχρι στιγμής πολύ ενθαρρυντικά αποτελέσματα για την αντιμετώπιση του μύκητα *V. dahliae* τόσο σε μελιτζάνες θερμοκηπίου όσο και σε αγρού (Malandraki et al., 2008). Από μελέτες διαπιστώθηκε ότι ο μηχανισμός της βιολογικής δράσης του F2, οφείλεται κυρίως στο ανταγωνισμό του για θέση και για θρεπτικά στοιχεία στην επιφάνεια του ριζικού συστήματος των ευπαθών ξενιστών (Pantelides et al., 2009).

1.2 Η άμυνα των φυτών

Τα φυτά αναπτύσσονται και αναπαράγονται κάτω από την συνεχή πίεση των παθογόνων μικροοργανισμών, τα οποία μπορεί να είναι βακτήρια, ιοί, μύκητες ή ωομύκητες. Στους απλούστερους αμυντικούς μηχανισμούς των φυτών, περιλαμβάνονται η ακεραιότητα του κυτταρικού τοιχώματος και της ενδοδερμίδας των φύλλων, καθώς και η παραγωγή δευτερογενών μεταβολιτών με αντιμικροβιακές ιδιότητες (Hématy et al., 2009; Martin, 1964; Paiva et al., 2010). Επίσης, τα ανοικτά στομάτια των φύλλων αποτελούν ένα από τα πιο ευπαθή σημεία του φυτού για την είσοδο των παθογόνων μικροοργανισμών. Για αυτό το λόγο, τα φυτά ανέπτυξαν μηχανισμούς που κλείνουν τα στομάτια τους όταν αντιλαμβάνονται την παρουσία των φυτοπαθογόνων (Sawinski et al., 2013). Τα φυσικά εμπόδια της άμυνας των φυτών δεν είναι πάντοτε απροσπέλαστα για τα παθογόνα, εντούτοις, τα φυτικά κύτταρα έχουν την ικανότητα να αναγνωρίζουν το παθογόνο ή τις περιοχές στόχους του παθογόνου. Γενικά, το αμυντικό σύστημα των φυτών είναι πολυστρωματικό και η άμυνα των φυτών χωρίζεται κυρίως σε δύο μέρη : α) το PAMPs, την επαγόμενη από τις συντηρημένες δομές των παθογόνων άμυνα (pathogen-associated molecular patterns-PAMPs), και β) ETI, την επαγόμενη από τελεστές άμυνα (effector-triggered immunity-ETI).

1.2.1 Επαγόμενη από συντηρημένες δομές παθογόνων διασυστηματική άμυνα (PAMPs triggered immunity-PTI)

Στα φυτά η άμυνα PTI ενεργοποιείται ως απάντηση στα διάφορα συντηρημένα μόρια που προέρχονται από τα παθογόνα. Αυτές οι συντηρημένες μοριακές δομές των παθογόνων ονομάζονται PAMPs, και είναι χαρακτηριστικές για την κάθε κατηγορία μικροοργανισμών από την οποία προέρχονται (Medzhitov and Janeway, 2002). Τα PAMPs αναγνωρίζονται και δεσμεύονται από συγκεκριμένους υποδοχείς (plant pattern recognition receptors- PRRs) που εντοπίζονται κυρίως στην κυτταροπλασματική μεμβράνη των φυτών. Οι υποδοχείς αυτοί έχουν ως κύριο ρόλο την ενεργοποίηση μιας σηματοδοτικής αλληλουχίας εντός του φυτού, η οποία επάγει την πρώτη άμυνα του φυτού, δηλαδή το PTI (Chisholm et al., 2006; Zipfel and Robatzek, 2010). Η ενεργοποίηση του PTI στα φυτά ενέχει την συμμετοχή μιας πληθώρας βιολογικών και χημικών αποκρίσεων, οι οποίες περιλαμβάνουν ροές ιόντων, σχηματισμό ενεργών μορφών οξυγόνου (ROS), ενίσχυση των κυτταρικών τοιχωμάτων με καλλόζη, ενεργοποίηση των MAP κινασών (mitogen-activated protein kinase-MAPK) και ταχεία έκφραση γονιδίων άμυνας (Bigeard et al., 2015a; Zhang and Klessig, 2001; Zipfel, 2014).

Οι περισσότεροι υποδοχείς των φυτών είναι είτε διαμεμβρανικοί τύπου κινάσης, (receptor-like kinases-RLKs) είτε πρωτεΐνης (receptor-like proteins-RLPs) (Monaghan and Zipfel, 2012). Επίσης, τα DAMPs (damage-associated molecular patterns) αποτελούν την δεύτερη κλάση των ενδογενών συντηρημένων μορίων, τα οποία δύναται να επάγουν αποτελεσματικά την άμυνα του φυτού. Αυτοί οι συντηρημένοι τύποι μορίων (DAMPs), πιστεύεται ότι προκύπτουν από το ίδιο το φυτό όταν δέχεται την επίθεση από τα παθογόνα και φαίνεται να προκαλούν μαζί με τα PAMPs, ίδιες ή παρόμοιες αμυντικές αποκρίσεις (Lotze et al., 2007). Τα DAMPs αναγνωρίζονται κυρίως από τους υποδοχείς RLKs ή WAKs (wall-associated kinases).

Οι φυτικοί υποδοχείς PRRs (Pattern recognition receptors), αναγνωρίζουν αρκετές από τις συντηρημένες δομές (PAMPs) των βακτηρίων, όπως την φλατζελίνη (Flagellin)(Felix et al., 1999), τον παράγοντα επιμήκυνσης Tu (ef-Tu) (Kunze et al., 2004), την πεπτιδογλυκάνη (Gust, 2015), τους λιποσακχαρίτες (Newman et al., 2007) και τις κυτταροπλασματικές πρωτεΐνες ψυχρού σοκ (cold shock proteins) (Felix and Boller, 2003). Το καλύτερα μελετημένο μοτίβο μέχρι στιγμής, είναι αυτό της φλατζελίνης (ή μαστιγίνης, flagellin). Πρόκειται για ένα δομικό στοιχείο των βακτηριακών μαστιγίων, το οποίο βρίσκεται σχεδόν στα περισσότερα είδη των

βακτηρίων (Felix et al., 1999). Το πεπτίδιο της φλατζελίνης περιέχει μια περιοχή στο αμινοτελικό της άκρο που αποτελείται από 22 κατάλοιπα αμινοξέων (flg22), τα οποία αναγνωρίζονται από τον υποδοχέα των φυτών FLS2 (flagellin sensing 2) (Chinchilla et al., 2006). Επιπρόσθετα, ένα χαρακτηριστικό παράδειγμα συντηρημένης μοριακής δομής στους μύκητες, είναι η χιτίνη, η οποία αναγνωρίζεται στο ρύζι και στην αραβιδόψη μέσω του υποδοχέα CEBiP (chitin elicitor-binding protein) (Kaku et al., 2006). Τέλος, οι επαγόμενες από το αιθυλένιο ξυλανάσες (EIX-ethylene inducing xylanases), αναγνωρίζονται στην τομάτα από τους υποδοχείς LeEXI 1 και LeEXI 2 (Ron and Avni, 2004).

1.2.2 Επαγόμενη από τελεστές άμυνα (effector-triggered immunity-ETI)

Οι τελεστές (effectors) είναι πρωτεϊνικά μόρια που μετακινήθηκαν από ένα φυτοπαθογόνο στα κύτταρα του φυτού ξενιστή ή στον εξωκυττάριο του χώρου, προκειμένου να αναστείλουν την πρώτη άμυνα του φυτού (PTI) και συνεπώς να αυξήσουν την ικανότητα του να το παρασιτήσει. Τα φυτά αναγνωρίζουν τους τελεστές του παθογόνου μέσω της έκφρασης των πρωτεϊνών ανθεκτικότητας R (Resistant), με αποτέλεσμα την ενεργοποίηση του ETI. Η ενεργοποίηση του ETI μπορεί να πραγματοποιηθεί και μέσω των διακυτταρικών υποδοχέων του φυτού. Οι πρωτεΐνες ανθεκτικότητας προκύπτουν από την έκφραση των γονιδίων R (resistance genes) στα φυτά, ενώ οι τελεστές αποτελούν τα προϊόντα της έκφρασης των γονιδίων Arg (avilurent) στα παθογόνα. Η πιο πάνω αλληλεπίδραση μεταξύ του παθογόνου και του φυτού ξενιστή, περιγράφηκε πρώτα από τον Flor το 1955 στο λινάρι και ονομάστηκε gene-for-gene relationship. Δηλαδή, η σχέση που προκύπτει από την άμεση αλληλεπίδραση των προϊόντων του γονιδίου R του φυτού ξενιστή, με τα προϊόντα του γονιδίου arg του παθογόνου. Τα παθογόνα σε βάθος χρόνου ανέπτυξαν και δημιούργησαν νέους τελεστές για να είναι σε θέση να μολύνουν πολύ πιο εύκολα τα φυτά ξενιστές. Το ίδιο έπραξαν και τα φυτά ξενιστές, αναπτύσσοντας τις αντίστοιχες πρωτεΐνες R προκειμένου ενεργοποιούν το ETI. Αυτή η αμοιβαία πίεση που ασκεί ο ένας οργανισμός στην εξέλιξη του άλλου προκειμένου να παραχθούν νέα αμυντικά ή επιθετικά «όπλα», αναφέρεται συχνά ως «co-evolutionary arms race» (Jones and Dangl, 2006). Όταν στα φυτά ενεργοποιηθεί το ETI, παρατηρείται συνήθως μια ορατή αντίδραση με σκοπό την καταστολή του παθογόνου. Αυτό πραγματοποιείται μέσω της διαδικασίας του προγραμματισμένου κυτταρικού θανάτου

(program cell death-PCD), σχηματίζοντας μια νεκρωτική ζώνη στο σημείο της προσβολής. Αυτή η αντίδραση υπερευαισθησίας (HR) δεν παρατηρείται στο PTI (Jones and Dangl, 2006).

1.2.3 Επίκτητη διασυστηματική αντοχή (systemic acquired resistance–SAR)

Η επιβίωση ενός φυτικού οργανισμού μετά από την εισβολή ενός παθογόνου μικροοργανισμού, οδηγεί στην ανάπτυξη μιας ανθεκτικότητας η οποία θα το συνοδεύει και θα το προστατεύει από τυχόν μελλοντικές προσβολές του ίδιου ή διαφορετικού φυτοπαθογόνου. Αυτή η ανθεκτικότητα ονομάζεται επίκτητη διασυστηματική ανθεκτικότητα (systemic acquired resistance–SAR), εκδηλώνεται σε όλα τα φυτικά μέρη και ενέχει την προστασία έναντι ενός μεγάλου εύρους φυτοπαθογόνων. Σε αυτήν την διεργασία της SAR, παρατηρείται αύξηση του σαλικιλικού οξέος (SA) και του μεθυλεστέρα του (MeSA), τα οποία επάγουν την έκφραση των πρωτεϊνών που σχετίζονται με την παθογένεση (pathogenesis-related proteins). Για παράδειγμα, διαπιστώθηκε ότι η μόλυνση του καπνού με τον μύκητα *B. cinerea*, μπορεί να επάγει την SAR όχι μόνο εναντίον του μύκητα *B. cinerea*, αλλά και εναντίον του βακτηρίου *P. syringae*. Η ανθεκτικότητα του καπνού σε αυτά τα δύο παθογόνα συσχετίστηκε με την έκφραση των αντίστοιχων γονιδίων παθογένεσης, των *PR-1a* και *PR-5* (Frías et al., 2013).

1.2.4 Επαγόμενη διασυστηματική αντοχή (induced systemic resistance-ISR)

Η επαγόμενη διασυστηματική αντοχή (induced systemic resistance-ISR), αφορά την ανθεκτικότητα που επάγεται στα φυτά από μη παθογόνους μικροοργανισμούς. Τέτοιου είδους μικροοργανισμοί μπορεί είναι τα ριζοβακτήρια, τα οποία διεγείρουν στα φυτά την έναρξη μιας μοριακής σηματοδότησης στην οποία εμπλέκεται κυρίως το ιασμονικό και το αιθυλένιο. Το αποτέλεσμα αυτής της μοριακής σηματοδότησης, είναι η επαγωγή διαφόρων αμυντικών αποκρίσεων και μηχανισμών, οι οποίοι θα είναι σε θέση να προστατεύουν αποτελεσματικά το φυτό από τυχόν μελλοντικές προσβολές (Taiz and Zeiger, 2013). Η ανοσοποίηση που προκαλείται στα φυτά λόγω των ριζοβακτηρίων, εκδηλώνεται φαινοτυπικά κυρίως με την καθυστερημένη εμφάνιση των συμπτωμάτων της ασθένειας, καθώς και με μια μείωση στην ένταση και στο

βαθμό της εξέλιξης της. Τα πιο πάνω συνδυάζονται με την επαγωγή όλων αυτών των μηχανισμών που θα συμβάλουν στην διασυστηματική τους προστασία. Στα γένη των *Pseudomonas* και *Bacillus*, ανήκουν τα πλείστα είδη των ριζοβακτηρίων που βρέθηκαν να επάγουν αποτελεσματικά την διασυστηματική αντοχή των φυτών. Για παράδειγμα, σε φυτά αγγουριάς, το βακτηριακό στέλεχος K-165 του ενδοφυτικού μύκητα *Paenibacillus alvei*, βρέθηκε να επάγει την διασυστηματική αντοχή των φυτών εναντίον του μύκητα *V. dahliae* (Τζάμος, 2007).

1.2.5 Αντίδραση υπερευαισθησίας (hypersensitivity response-HR)

Η αντίδραση υπερευαισθησίας (hypersensitivity response-HR) θεωρείται ως μια ακραία έκφραση της αντοχής των φυτών. Το φυτό προκειμένου να περιορίσει και να παρεμποδίζει τον πολλαπλασιασμό και την προέλαση του παθογόνου, προκαλεί μια ταχεία νέκρωση των κύτταρων στις θέσεις διεισδύσεως του παθογόνου (Τζάμος, 2007). Η αντίδραση υπερευαισθησίας θεωρείται ότι προκαλείται από την αναγνώριση ενός μη τοξικού γονιδιακού προϊόντος, το οποίο συνήθως προέρχεται από το παθογόνο (avirulence gene product). Εξαιτίας αυτών των παραγόντων αμολυσματικότητας, διεγείρεται ένας μηχανισμός αμυντικών γονιδίων που σχετίζονται με την παθογένεση, οδηγώντας έτσι στην αντίδραση υπερευαισθησίας (Morel and Dangl, 1997). Πριν την εκδήλωση της αντίδρασης υπερευαισθησίας, πραγματοποιούνται χημικές αλλαγές στην περιοχή της μόλυνσης. Συγκεκριμένα, παρατηρείται μια ταχεία συσσώρευση ιόντων, δραστικών μορφών οξυγόνου (ROS) και μονοξειδίων του αζώτου (NO) (Morel and Dangl, 1997; Taiz and Zeiger, 2013). Η εισροή ιόντων ασβεστίου και η ταχεία εκροή ιόντων χλωρίου και καλίου, αυξάνει το pH του κυτοπλάσματος, το οποίο σε συνδυασμό με την αυξημένη συσσώρευση των ROS, οδηγούν στην νέκρωση των κυττάρων στο σημείο της προσβολής (Morel and Dangl, 1997). Για την ενεργοποίηση της αντίδρασης υπερευαισθησίας, είναι απαραίτητο η ταυτόχρονη αύξηση των ROS και των NO, καθώς η αύξηση μόνο του ενός εκ των δύο θα έχει μικρή επίδραση στις διαδικασίες της επαγωγής του κυτταρικού θανάτου (Taiz and Zeiger, 2013).

1.2.6 Πρωτεΐνες που σχετίζονται με την παθογένεση (pathogenesis-related proteins)

Τα γονίδια που σχετίζονται με την παθογένεση (pathogen related genes-PR), εκφράζονται στα φυτά μετά από μια μυκητιακή, βακτηριακή ή ιική μόλυνση, αλλά και από τις προσβολές των φυτοφάγων εντόμων (Van Loon et al., 2006). Τα γονίδια αυτά έχουν ένα ευρύ φάσμα λειτουργιών και περιλαμβάνουν υδρολυτικά ένζυμα, αναστολείς πρωτεϊνών, υπεροξειδάσες, ριβονουκλεάσες, ντεφεσίνες, πρωτεΐνες μεταφοράς λιπιδίων και πολλές άλλες συναφείς με την άμυνα του φυτού λειτουργίες. Αυτές οι πρωτεΐνες αυξάνουν την αντοχή των φυτών στα βακτήρια και στους μύκητες, αναστέλλοντας έτσι την δράση των αμολυσματικών παραγόντων. Οι πρωτεΐνες PR (pathogen related proteins) συσσωρεύονται τοπικά για να επάγουν την υπερευαίσθητη απόκριση και ακολούθως εκφράζονται σε όλο το φυτό ενεργοποιώντας έτσι την SAR. Οι πρωτεΐνες PR-2, PR-3, PR-4, PR-8 και PR-11, αποτελούν πέντε από τις σημαντικότερες κατηγορίες πρωτεϊνών που επάγονται στα φυτά μετά από την εισβολή των φυτοπαθογόνων μυκήτων. Λειτουργούν κυρίως ως χιτινάσες και ως β-1,3-γλυκανάσες, με απώτερο σκοπό την αποικοδόμηση του κυτταρικού τοιχώματος των φυτοπαθογόνων μυκήτων (van Loon & Van Strien, 1999). Η έκφραση του γονιδίου PR-1a σε διαγονιδιακό καπνό, αύξησε την ανθεκτικότητα του καπνού ενάντια στους ωμύκητες *Peronospora tabacina* και *Phytophthora parasitica* var. *Nicotianae*. Επίσης, η υπερέκφραση του γονιδίου PR-5 που κωδικοποιεί την ωσμωτίνη του καπνού σε φυτά πατάτας, μείωσε σημαντικά την ανάπτυξη των συμπτωμάτων της ασθένειας που προκαλούνται από τον μύκητα *Phytophthora infestans* (Χατζόπουλος, 2001). Ο ρόλος των πρωτεϊνών PR-12, PR-13 και PR-14, είναι κυρίως η διάσπαση των βακτηριακών και μυκητιακών μεμβρανών. Η πρωτεΐνη PR-9 συμβάλει στην ενδυνάμωση των φυτικών κυττάρων, ενώ η πρωτεΐνη PR-7 αποδιοργανώνει τις πρωτεΐνες του κυτταρικού τοιχώματος και υδρολύει τις χιτίνες και τις γλουκάνες των μυκήτων (Τζάμος, 2007).

Πίνακας 1 : Οι κυριότερες οικογένειες των πρωτεϊνών PR και οι αντίστοιχες λειτουργίες των μελών τους (Ebrahim et al., 2011)

Οικογένειες πρωτεϊνών PR	Πρωτεΐνες	Ιδιότητες πρωτεϊνών
PR-1	Tobacco PR-1a	Αντιμυκητιακή
PR-2	Tobacco PR-2	β-1,3-γλουκανάση
PR-3	Tobacco P, Q	Χιτινάση τύπου I,II, IV,V,VI,VII
PR-4	Tobacco 'R'	Χιτινάση τύπου I,II
PR-5	Tobacco S	Πρωτεΐνες τύπου θαυματίνης
PR-6	Tomato Inhibitor I	Αναστολέας πρωτεϊνασών
PR-7	Tomato P69	Ενδοπρωτεϊνάση
PR-8	Cucumber chitinase	Χιτινάση τύπου III
PR-9	Tobacco 'lignin-forming peroxidase'	Περοξειδάση
PR-10	Parsley 'PR1'	Ριβονουκλεάση
PR-11	Tobacco class V chitinase	Χιτινάση τύπου I
PR-12	Radish Rs-AFP3	Ντεφεσίνη
PR-13	Arabidopsis THI2.1	Θειονίνη
PR-14	Barley LTP4	Πρωτεΐνη μεταφοράς λιπιδίων
PR-15	Barley OxOa (germin)	Οξαλοξική οξειδάση
PR-16	Barley OxOLP	Πρωτεΐνη τύπου οξαλοξικής οξειδάσης
PR-17	PRp27	Άγνωστη λειτουργία

1.2.7 Οι υποδοχείς NLRs (nucleotide-binding oligomerization domain-like receptors)

Τα φυτά έχουν αναπτύξει ορισμένους εξειδικευμένους υποδοχείς αμύνης κατά των φυτοπαθογόνων μικροοργανισμών. Αυτοί οι υποδοχείς είναι γνωστοί ως «ανοσολογικοί υποδοχείς NLRs» και έχουν ως κύριο ρόλο την αναγνώριση των φυτοπαθογόνων και την ενεργοποίηση της φυτικής άμυνας. Τα γονίδια NLRs ανήκουν στην κατηγορία των πιο ταχέως εξελισσόμενων γονιδίων και είναι επίσης γνωστά και ως γονίδια ανθεκτικότητας (R genes). Οι υποδοχείς NLRs εντοπίζονται κυρίως στο κυτόπλασμα αλλά μπορούν να εντοπιστούν και σε συγκεκριμένες περιοχές του κυττάρου, όπως τα ενδοσώματα ή τον πυρήνα (Andersen et al., 2018). Στα φυτά οι κυτοπλασματικοί υποδοχείς NLRs (nucleotide-binding oligomerization domain-like receptors), χαρακτηρίζονται κυρίως από τρεις περιοχές: (α) ένα αμινοτελικό άκρο που φέρει είτε την μορφή ελικοειδούς έλικας (coiled-coil), είτε τον υποδοχέα Toll/interleukin-1 (TIR), (β) την κεντρική περιοχή δέσμησης νουκλεοτιδίων (NB) και (γ) ένα καρβοξυλικό άκρο πλουσιο σε λευκίνη (LRR) (Marathe and Dinesh-Kumar, 2003). Όπως και στους PRRs (pattern recognition receptors), η ποικιλομορφία των υποδοχέων NLRs, παρέχει στα φυτά την ικανότητα να αναγνωρίζουν τις διάφορες δομές των τελεστών που παράγονται από τα παθογόνα. Οι υποδοχείς NLRs ενεργοποιούνται στα φυτά: (α) από την άμεση αλληλεπίδραση τους με τους τελεστές του παθογόνου, (β) με την ανίχνευση μιας τροποποιημένης πρωτεΐνης που αποτελεί τον στόχο του παθογόνου τελεστή, (γ) με την ανίχνευση μιας τροποποιημένης πρωτεΐνης που μιμείται τον στόχο του τελεστή ή (δ) από την τροποποίηση του ίδιου υποδοχέα NLR (Andersen et al., 2018). Μια από τις πιο καλά μελετημένες αλληλεπιδράσεις μεταξύ των υποδοχέων NLRs και των τελεστών ενός παθογόνου, είναι αυτή μεταξύ των υποδοχέων RPM1 και RPS2, οι οποίοι αντιλαμβάνονται την στόχευση ενός αρνητικού ρυθμιστή ανθεκτικότητας (RIN4) από τους τελεστές AvrRpt2 και AvrRpm1 του βακτηρίου *P. syringae* (Marathe and Dinesh-Kumar, 2003). Επιπρόσθετα, τα «decoy domains», είναι περιοχές που αντιγράφηκαν από τις φυτικές πρωτεΐνες και συγχωνεύτηκαν με τους υποδοχείς NLRs, προκειμένου να δρουν ως δόλωμα για τους τελεστές του παθογόνου. Οι υποδοχείς αυτής της κατηγορίας ονομάζονται NLR-ID (integrated domain). Όταν οι τελεστές δεσμεύονται σε αυτές τις δολωματικές αλληλουχίες αντί του πραγματικού τους στόχου, τότε το φυτό ενημερώνεται για την εισβολή από τον φυτοπαθογόνο μικροοργανισμό (Tena, 2016).

1.2.8 Φυτοαλεξίνες (phytoalexins)

Οι φυτοαλεξίνες είναι δευτερογενείς φυτικοί μεταβολίτες με ισχυρή αντιμικροβιακή δράση, οι οποίοι συσσωρεύονται συνήθως γύρω από το σημείο της προσβολής των φυτοπαθογόνων. Οι φυτοαλεξίνες περιγράφηκαν για πρώτη φορά από τους Muller και Borger το 1940, στις αλληλεπιδράσεις μεταξύ του ωομύκητα *Phytophthora infestans* με την πατάτα. Προέρχονται από διαφορετικές κατηγορίες μοριακών ενώσεων, όπως φαινόλες, τανίνες, φλαβονοειδή, τερπενοειδή ή κυανογόνα γλυκοσίδια (Egea et al., 1996). Έχουν ανιχνευτεί πάνω από 350 φυτοαλεξίνες από 30 περίπου οικογένειες φυτών, εκ των οποίων οι 30 προέρχονται από τα φυτά της οικογένειας Fabaceae. Οι φυτοαλεξίνες βιοσυντίθενται *de novo* στα φυτά μετά από την έκθεση τους σε βιοτικούς διεγέρτες (π.χ. μικροοργανισμούς) ή αβιοτικούς διεγέρτες, όπως είναι τα βαρέα μέταλλα, τα άλατα, η υπερϊώδης ακτινοβολία, οι τραυματισμοί και ο παγετός (Pedras and Ahiahonu, 2005). Η επαφή του φυτού με αυτό τον τεράστιο αριθμό παθογόνων και χημικών παραγόντων, οδηγεί σε μια μεταβολική διαταραχή εντός του φυτού και μέσω μιας διαδοχής σημάτων συναγερμού, επάγεται η σύνθεση και η εντοπισμένη συσσώρευση των φυτοαλεξίνων (Τζάμος, 2007). Η ουσιαστική διαφορά μεταξύ των ευαίσθητων και των ανθεκτικών φυτών στα παθογόνα, ωφείλεται κυρίως στο υψος και στην ταχύτητα με την οποία συσσωρεύονται οι φυτοαλεξίνες. Οι φυτοαλεξίνες βιοσυντίθενται σε όλα τα όργανα του φυτού, όμως δεν παράγονται οι ίδιες σε όλους τους ιστούς των φυτών. Η δημιουργία διαγονιδιακών φυτών που θα εκφράζουν νέες φυτοαλεξίνες, αποτελεί μια ελπιδοφόρα προοπτική για την αύξηση της ανθεκτικότητας των φυτών στα διάφορα παθογόνα (Χατζόπουλος, 2001). Για παράδειγμα, η εκφραση του γονιδίου συνθάση του στίλβενιού από το αμπέλι σε διαγονιδιακά φυτά καπνού, οδήγησε στην παραγωγή νέων φυτοαλεξινών (ρεζβερατρόλη) και αύξησε την ανθεκτικότητα του καπνού έναντι στον μύκητα *B. cinerea* (Hain et al., 1993). Αντίθετα, σε άλλα πειράματα όταν εισήχθη το γόνιδιο της απομεθυλάσης της πिसατίνης (PDA - pisatin demethylase) στον παθογόνο μύκητα *Cochliobolus heterostrophus* που προσβάλλει τον αραβόσιτο, επέτρεψε στον μύκητα να παρασιτηήσει και το μπιζέλι. Αυτό οφείλεται στο γεγονός ότι η πισατίνη του μπιζελιού αδρανοποιείτο από το γονίδιο της PDA, με αποτέλεσμα το φυτό να αδυνατεί να αποτρέψει την εισβολή του παθογόνου μύκητα (Oeser and Yoder, 1993).

1.2.9 Ο ρόλος των φυτορμονών στην άμυνα των φυτών

Το ιασμονικό οξύ (JA), το σαλικυλικό οξύ (SA) και το αιθυλένιο (ET), αποτελούν τις βασικότερες φυτικές ορμόνες για την έκφραση της αντίδρασης υπερευαισθησίας (HR) και της επίκτητης διασυστηματικής ανθεκτικότητας (SAR) στα φυτά (Loake and Grant, 2007). Το SA είναι ένα βασικό μόριο σηματοδότησης στα φυτά, απαραίτητο για την έναρξη της SAR και για την ενεργοποίηση ενός μεγάλου αριθμού γονιδίων που κωδικοποιούν πρωτεΐνες σχετιζόμενες με την παθογένεση. Τυπικά, ή επαγόμενη διασυστηματική ανθεκτικότητα (ISR) δεν σχετίζεται με την άμεση ενεργοποίηση των γονιδίων που σχετίζονται με την παθογένεση. Συνήθως, η ISR ρυθμίζεται στα φυτά από το JA και από τα εξαρτώμενα από το ET μονοπάτια σηματοδότησης. Το ET και το JA εμπλέκονται κυρίως στην άμυνα έναντι των νεκροτροφικών μικροοργανισμών, ενώ το SA έναντι των ημιβιοτροφικών μικροοργανισμών (Pieterse et al., 2009).

1.2.9.1 Ιασμονικό οξύ (JA)

Τα ιασμονικά οξέα είναι φυτικές οξυλιπίνες και τα σημαντικότερα μέλη της οικογένειάς τους περιλαμβάνουν το ιασμονικό οξύ (JA), τον ιασμονικό μεθυλεστέρα (Me-JA) και την ιασμονική ισολευκίνη (JA-Ile). Το JA συντίθεται από την οξυγόνωση του λινολενικού λιπαρού οξέος, αντίδραση που καταλύεται από το ένζυμο της λιποξυγενάσης (LOX) (Hamberg and Gardner, 1992). Το JA και τα παράγωγά του (ιασμονικά οξέα, JAs), ρυθμίζουν από κοινού την αύξηση και την ανάπτυξη των φυτών, καθώς και τις αποκρίσεις στα διάφορα βιοτικά και αβιοτικά ερεθίσματα. Στα σημαντικότερα αναπτυξιακά στάδια των φυτών που εμπλέκονται ενεργά τα ιασμονικά οξέα, ανήκει κυρίως η βλάστηση των σπόρων (Nojavan-Asghari and Ishizawa, 1998), η ανάπτυξη του ριζικού συστήματος (Staswick et al., 1992) και η γήρανση (Yuehui et al., 2002). Γενικά, τα επίπεδα του JA και των μεταβολιτών του, αυξάνονται στα φυτά όταν υφίστανται τις προσβολές των εντόμων και των φυτοπαθογόνων (Reymond and Farmer, 1998). Για παράδειγμα, σε τραυματισμένα στελέχη σόγιας, παρατηρήθηκε μια αυξημένη συσσώρευση του Me-JA, η οποία συνέβαλε στην ρύθμιση της γονιδιακής έκφρασης στο σημείο της τραυματισθέντας περιοχής (Creelman et al., 1992).

Για την ενεργοποίηση της άμυνας κατά των φυτοφάγων εντόμων, απαιτείται η δέσμευση της ιασμονικής ισολευκίνης (JA-Ile) στον πρωτεϊνικό υποδοχέα COI1 (coronatine insensitive 1) (Yan et al., 2009). Η κορονατίνη (coronatine) είναι ένας τελεστής, ο οποίος παράγεται από ορισμένα στελέχη του βακτηρίου *P. syringae*. Αυτή η ενώση ομοιάζει πολύ με την JA-ille, με την διαφορά ότι προσδίνεται ισχυρότερα στον υποδοχέα COI1 (Taiz and Zeiger, 2013). Στην αραβιδόψη, μια μεταλλαγή στον πρωτεϊνικό υποδοχέα COI1, αύξησε την ευαισθησία των φυτών στο αιγυπτιακό σκουλήκι του βαμβακιού (*Spodoptera littoralis*) (Stotz et al., 2002). Επίσης, παρόμοιες μεταλλαγές στο ίδιο υποδοχέα, βρέθηκαν να αυξάνουν την ευαισθησία της αραβίδωσης στους φυτοπαθογόνους μύκητες *A. brassicicola* και *B. cinerea* (Thomma et al., 1998).

Η ξηρασία και η υψηλή αλατότητα αυξάνουν τα επίπεδα του JA στους ιστούς των ευπαθών ξενιστών (Creelman and Mullet, 1995; Pedranzani et al., 2003). Αυτή η αυξημένη παραγωγή JA εξαιτίας των καταπονήσεων που υφίσταται ένα φυτό, οδηγεί στην αυξημένη έκφραση των γονιδίων της φυτικής αμύνης (Lorenzo & Solano, 2005). Εντούτοις, η αυξημένη συγκέντρωση του JA είτε από κάποια καταπόνηση είτε από την εξωγενή χορήγηση του, δύναται να αναστείλει την ανάπτυξη των φυτών (Kim et al., 2009).

Σε φυτά σόγιας στα οποία χορηγήθηκε το JA και ο Me-JA, παρατηρήθηκε μια αυξημένη έκφραση στα γονίδια που σχετίζονται με την παθογένεση, πράγμα το οποίο συσχετίστηκε με την αντοχή που παρουσίασε η σόγια κατά του ωμοκύκητα *Phytophthora sojae* (Graham et al., 2003). Επίσης, η εξωγενής χορήγηση ιασμονικών οξέων αύξησε την έκφραση της πρωτεΐνης *OsJAZ8* στο ρύζι. Η πρωτεΐνη αυτή είναι υπεύθυνη για την αντίσταση κατά της βακτηριακής νέκρωσης του ρυζιού, ασθένεια που προκαλείται από τον βακτήριο *Xanthomonas oryzae* pv. *oryzae* (Yamada et al., 2012). Τέλος, ορισμένα ιασμονικά οξέα βρέθηκαν να παρέχουν προστασία στην τομάτα εναντίον των φυτοπαθογόνων *P. syringae*, *X. campestris*, *F. oxysporum* και *B. cinerea* (Thaler et al., 2004).

1.2.9.2 Σαλικυλικό οξύ (SA)

Το σαλικυλικό οξύ (SA) συντίθεται από τον μεταβολισμό των φαινυλοπροπανοειδών του κινναμωνικού οξέος και του βενζοϊκού οξέος (Chen et al., 1993), τα οποία προκύπτουν από την έκφραση του γονιδίου *PAL* (Phenylalanine

ammonia-lyase), του οποίου το ένζυμο καταλύει το πρώτο στάδιο της βιοσύνθεσης του SA (Meier et al., 1993). Το SA είναι μια ενδογενής φυτική ένωση, η οποία εμπλέκεται ενεργά στα σηματοδοτικά μονοπάτια της φυτικής άμυνας. Συγκεκριμένα, το SA εμπλέκεται στην ρύθμιση της έκφρασης του PTI, του ETI, και της SAR (Vlot et al., 2009). Ο πρώτος που υπαινίχθηκε το ρόλο του SA στην άμυνα του καπνού, ήταν ο White το 1979. Συγκεκριμένα, η εξωγενής εφαρμογή SA, ενίσχυσε την αντοχή του καπνού στον ιό TMV, μέσω της έκφρασης συγκεκριμένων πρωτεϊνών PR (White, 1979).

Μια από τις σημαντικότερες οικογένειες πρωτεϊνών που έχει μελετηθεί στην ανοσοαπόκριση των φυτών, είναι η πρωτεΐνη NPR1 (Nonexpressor of *PR-1*). Η σηματοδότηση του SA ρυθμίζεται σε μεγάλο βαθμό από τον μεταγραφικό ρυθμιστή NPR1, ο οποίος είναι απαραίτητος για την έκφραση πολλών αμυντικών γονιδίων που εξαρτώνται από το SA. Για παράδειγμα, μια μεταλλαγή στον γενετικό τόπο NPR1 της αραβίδωσης, μπλόκαρε την σηματοδότηση του SA, με αποτέλεσμα το φυτό να είναι πιο ευαίσθητο στον βιοτροφικό ωομύκητα *H. arabidopsidis* και στο ημιβιοτροφικό βακτήριο *P. syringae* (Cao et al., 1994; Delaney et al., 1995). Επίσης, το SA υδροξυλιώνεται εντός των φυτών σε 2,3-2,5 διδυδροξυβενζοϊκό οξύ (dihydroxybenzoic acid-DBHA). Πρόκειται για δυο ανενεργές μορφές σαλικυλικού οξέος, οι οποίες συζευγνύονται κατά την διάρκεια της προσβολής από ένα παθογόνο ή κατά την γήρανση των φυτών (Bartsch et al., 2010).

1.2.9.3 Αιθυλένιο (ET)

Το αιθυλένιο (ET) είναι μια αέρια φυτορμόνη η οποία ρυθμίζει την αύξηση και την ανάπτυξη των φυτών, καθώς και τις αποκρίσεις τους στα διάφορα βιοτικά και αβιοτικά ερεθίσματα. Στους αναπτυξιακούς ρόλους του ET περιλαμβάνεται ο λήθαργος των σπόρων, η βλάστηση των σπόρων, η αρχιτεκτονική των ριζών, η ανθοφορία, η ωρίμανση των καρπών και η γήρανση (Helliwell et al., 2016).

Στην αραβίδωση, έχουν βρεθεί συνολικά 5 υποδοχείς ET και πρόκειται για τους *ETR1*, *ETR2*, *ERS1*, *ERS2*, και *EIN4* (Ju et al., 2012). Οι υποδοχείς του ET έχει αποδειχθεί ότι ρυθμίζουν από κοινού μαζί με το JA, την άμυνα κατά των φυτοφάγων εντόμων, μέσω της παραγωγής τοξικών μεταβολιτών. Επίσης, τα μοριακά μονοπάτια σηματοδότησης μεταξύ του JA και του ET, αλληλοσυνδέονται μέσω του παράγοντα ERF1 (ethylene responsive factor1) κατά την διάρκεια των φυτοπαθολογιών

προσβολών. Ο παράγοντας ERF1 κωδικοποιεί ένα μεταγραφικό ρυθμιστή ο οποίος ρυθμίζει την έκφραση των γονιδίων που σχετίζονται με την παθογένεση, προλαμβάνοντας έτσι την εξέλιξη της ασθένειας. Η έκφραση του ERF1 μπορεί να ενεργοποιηθεί από το ET, το JA ή από την συνεργιστική δράση των δύο ορμονών (Lorenzo et al., 2003).

Οι πληγές που δημιουργούνται στα φύλλα είτε από τον μηχανικό τραυματισμό των φυτών, είτε από τις επιθέσεις των εντόμων, διεγείρουν την τοπική και συστηματική συσσώρευση ορισμένων αντιπεπτιδικών πρωτεϊνών που ονομάζονται αναστολείς πρωτεϊνών (proteinase inhibitor proteins). Οι αναστολείς πρωτεϊνών εμποδίζουν την δράση των πρωτεολυτικών ενζύμων (πρωτεασών) που δραστηριοποιούνται στο πεπτικό σύστημα των φυτοφάγων εντόμων. Τα γονίδια που κωδικοποιούν αυτές τις ανασταλτικές πρωτεΐνες, ονομάζονται γονίδια *pin* (proteinase inhibitor genes) και βρέθηκε ότι στην τομάτα ρυθμίζονται από την συνεργιστική δράση μεταξύ του ET και του JA (O'Donnell et al., 1996).

Το ET μπορεί να λειτουργεί είτε σαν θετικός, είτε σαν αρνητικός διαμεσολαβητής της άμυνας των φυτών, ενώ απεδείχθη απαραίτητο συστατικό στις διαδικασίες του προγραμματισμένου κυτταρικού θανάτου και της υπερευαίσθητης αντίδρασης (Bent et al., 1992; Lund et al., 1998). Η εξωγενής χορήγηση ET στο ρύζι, προκάλεσε την υπερέκφραση ορισμένων γονιδίων που σχετίζονται με την παθογένεση, ενίσχυσε το κυτταρικό τοίχωμα των φυτών, και αύξησε την συγκέντρωση των φαινυλοπροπανοειδών (Agrawal et al., 2001). Επίσης, στο ρύζι το μονοπάτι της βιοσύνθεσης του ET, βρέθηκε να είναι αναγκαίο για την ενεργοποίηση της άμυνας εναντίον στον ημιοβιοτροφικό μύκητα *Magnaporthe oryzae* (Iwai et al., 2006). Αντίθετα, στην τομάτα και στην πατάτα, το ET βρέθηκε να είναι απαραίτητο για την ανάπτυξη των συμπτωμάτων που προκαλούνται από ορισμένα βακτήρια που ανήκουν στα γένη των *Xanthomonas* και *Pseudomonas* (Bent et al., 1992; Lund et al., 1998).

1.2.9.4 Συστημίνη

Η συστημίνη είναι μια πολυπεπτιδική ορμόνη που αποτελείται από 18 αμινοξέα και συντίθεται στα τραυματισμένα φύλλα της τομάτας. Η συστημίνη συμβάλλει κυρίως στην σύνθεση των αναστολέων των πρωτεϊνών για την αντιμετώπιση των φυτοφάγων εντόμων (Taiz and Zeiger, 2013). Η συστημίνη πιστεύεται ότι αποτελεί

μαζί με το SA τα σήματα της SAR (Τζάμος, 2007). Η πρόδρομη ένωση για την παράγωγή της συστημίνης είναι η προσυστημίνη, η οποία συντίθεται στα παρεγχυματικά κύτταρα του φλοιώματος. Η συστημίνη απελευθερώνεται από τα κύτταρα του φλοιώματος που έχουν τραυματισθεί (π.χ. από φυτοφάγα έντομα) και προσδένεται στους κυτταρικούς υποδοχείς των γειτονικών κυττάρων. Η πρόσδεση της συστημίνης στα γειτονικά κύτταρα του φλοιώματος, εκκινεί μια διαδοχή σιγνάλων που έχουν ως αποτέλεσμα την παραγωγή του JA. Σε αυτή την ενδοκυτταρική σηματοδότηση εμπλέκονται κυρίως η φωσφολιπάση A_2 (PL A_2) και οι πρωτεϊνικές κινάσες που ενεργοποιούνται από μιτογόνα (MAPK). Το JA που συντίθεται μέσω της συστημίνης, μετακινείται μέσω του φλοιώματος και σε άλλα μέρη του φυτού, τα οποία ενδεχόμενος θα αποτελέσουν τους πιθανούς στόχους για τις προσβολές των εντόμων. Όταν το JA φθάσει ιστούς στόχους, επάγει την έκφραση των γονιδίων που κωδικοποιούν τους αναστολείς των πρωτεϊνών κατά των φυτοφάγων εντόμων (Taiz and Zeiger, 2013).

1.2.10 Ο ρόλος της σηματοδότησης στην άμυνα των φυτών

Τα φυτά προκειμένου να αντεπεξέρχονται αποτελεσματικά στα διάφορα στρες που υφίστανται, είναι απαραίτητο να ενεργοποιείται μια μεταγωγή σήματος που θα επάγει και θα ρυθμίζει τις αμυντικές τους αποκρίσεις. Μία από τις πρώιμες αποκρίσεις (0,5-2 λεπτά) που παρατηρείται στα φυτά μετά την αναγνώριση του παθογόνου, είναι η αποπόλωση των φυτικών μεμβρανών. Αυτή προκαλείται κυρίως από την ταχεία εισροή των ιόντων H^+ και Ca^{2+} στα φυτικά κύτταρα, με την συνακόλουθη εκροή των ιόντων K^+ και NO_3^- . Η απότομη αύξηση του κυτταροπλασματικού ασβεστίου διαδραματίζει καθοριστικό ρόλο στα σηματοδοτικά μονοπάτια των φυτών, καθώς εμπλέκεται ως δευτερογενής αγγελιοφόρος σε μια πληθώρα φυτικών αποκρίσεων, τόσο σε περιβαλλοντικά όσο και σε ορμονικά σήματα. Το ασβέστιο μπορεί να δεσμεύεται από την καλμοδουλίνη (Calmodulin-CaM) που εντοπίζεται κυρίως στο κυτταρόπλασμα των φυτικών κυττάρων (Taiz and Zeiger, 2013). Η καλμοδουλίνη και οι πρωτεΐνες που ομοιάζουν με την καλμοδουλίνη, όπως πρωτεΐνες τύπου β -καλσινευρίνης (CBL) και οι εξαρτώμενες από το ασβέστιο πρωτεϊνικές κινάσες (CDPKs), αποτελούν τους κυριότερους αισθητήρες της αύξησης του κυτοπλασματικού ασβεστίου (Savatin et al., 2014). Πάρα πολλοί μεταγραφικοί

ρυθμιστές ενεργοποιούνται διαμέσου της σηματοδότης του ασβεστίου και των συμπλόκων της καλμοδουλίνης-ασβεστίου (Reddy et al., 2011).

Οι κινάσεις υποδοχείς (PRKs-plant receptor kinases), αντιπροσωπεύουν τους κύριους υποδοχείς (PRRs-plant receptor proteins) του φυτού και εντοπίζονται κυρίως στην μεμβράνη του κυτταροπλάσματος. Οι υποδοχείς RPKs αντιλαμβάνονται τους MAPKs, τα δευτερεύοντα φυτικά πεπτίδια και τα σήματα κινδύνου. Με την πρόσδεση των πιο πάνω μορίων στους υποδοχείς RPKs, τίθεται σε λειτουργία ένα δίκτυο μοριακής σηματοδότησης που ελέγχεται από τις ενεργοποιημένες με ασβέστιο πρωτεϊνικές κινάσες (PKs) και από τους ενεργοποιημένους με μιτογόνο καταρράκτες κινασών (τις MAPK). Αυτά τα δίκτυα σηματοδότησης που ενεργοποιούνται κυρίως μέσω των πρωτεϊνικών κινασών, εμπλέκονται στον έλεγχο της σύνθεσης και της δραστηριότητας μιας πληθώρας μεταγραφικών παραγόντων (TFs), ενζύμων, ορμονών, πεπτιδίων και αντιμικροβιακών χημικών ουσιών. Με αυτό τον τρόπο επάγεται και η ανοχή σε βακτήρια, ωομύκητες και μύκητες.

Στην αραβίδοψη, η μόλυνση με τον μύκητα *B. cinerea*, οδήγησε στην φωσφοριλίωση του μεταγραφικού παράγοντα WRKY33 από τις κινάσες μιτογόνων MPK3/MPK6. Αυτό προκάλεσε ένα επαναπρογραμματισμό στα γονίδια που σχετίζονται με την βιοσύνθεση της καμαλεξίνης (Mao et al., 2011). Επίσης, η φωσφοριλίωση του παράγοντα ERF6 (Ethylene Response Factor 6) από τις κινάσες μιτογόνων MPK3/MPK6, ενεργοποίησε στην αραβίδοψη τα γονίδια *PDF1.1* και *PDF1.2*, προσδίδοντας έτσι ανθεκτικότητα εναντίον του μύκητα *B. cinerea* (Meng et al., 2013).

Τα ιοντα Ca^{2+} μέσω της CaM, επάγουν την σύνθεση των ROS και των μονοξειδίων του αζώτου (NO) που απαιτούνται για την αντίδραση υπερευεσθησίας. Το νιτρικό οξύ (NO) και τα παράγωγά του, αναφερόμενα και ως δραστικές μορφές αζώτου (RNS), εμπλέκονται ενεργά στα μονοπάτια της σηματοδότησης του φυτού. Κλασικό παράδειγμα αποτελεί η S-νιτροζυλίωση (S-NO) της κυστεΐνης, η οποία πραγματοποιείται μέσω της ρύθμισης του γονιδίου *NPR1*, το οποίο αποτελεί και τον κύριο ρυθμιστή για την έκφραση των γονιδίων της φυτικής αμύνης (Bigeard et al., 2015b).

Οι κύριες μορφές των ROS είναι το υπεροξείδιο του υδρογόνου (H_2O_2), οι ρίζες υδροξυλίου ($HO\cdot$) και το ανιόν σουπεροξειδίου ($O_2^{\cdot-}$). Κατά την διάρκεια μιας βιοτικής καταπόνησης, η πρώτη οξειδωτική εκρηξη για την παραγωγή των ROS,

προκαλείται από τις οξειδάσες NADPH, γνωστές και ως RBOHs (respiratory burst oxidase homologues). Αυτές οι οξειδάσες εντοπίζονται στην πλασματική μεμβράνη των φυτών και έχουν ως κύριο ρολό την ενίσχυση των μηχανισμών της φυτικής άμυνας (Baxter et al., 2014).

1.3 Βιολογική αντιμετώπιση των φυτοπαθογόνων μικροοργανισμών

Σύμφωνα με τους Ζιώγας και Μαρκόγλου (2010), ως βιολογική αντιμετώπιση ορίζεται η σκόπιμη χρήση εισαγόμενων ή διαβιούντων στο περιβάλλον του φυτού μικροοργανισμών, με απώτερο σκοπό την καταστολή των δραστηριοτήτων ενός ή περισσοτέρων παθογόνων μικροοργανισμών. Οι μικροοργανισμοί που χρησιμοποιούνται ως βιολογικοί παράγοντες (biological control agents), ασκούν αντιμικροβιακή δράση στο παθογόνο μέσω διαφόρων μηχανισμών. Στους μηχανισμούς αυτούς περιλαμβάνονται : (α) ο ανταγωνισμός με το παθογόνο για θρεπτικά στοιχεία και για θέση, (β) η παραγωγή ενζύμων ή αντιμικροβιακών ενώσεων, (γ) ο υπερπαρασιτισμός του παθογόνου, και δ) η επαγωγή της ανθεκτικότητας στο φυτό ξενιστή.

1.3.1 Υπερπαρασιτισμός

Στον υπερπαρασιτισμό, το παθογόνο δέχεται μια άμεση επίθεση από ένα άλλο μικροοργανισμό, ο οποίος είτε θα τον σκοτώσει, είτε θα αναπτυχθεί εις βάρος του. Υπάρχουν υπερπαρασίτα που επιτίθενται μόνο στα σκληρώτια των μυκήτων (π.χ. *Coniothyrium minitans*), ενώ ορισμένα άλλα προτιμούν κυρίως τις μυκηλιακές υφές (π.χ. *Pythium oligandrum*) (Pal and Gardener, 2006). Επίσης, ένα παθογόνο μπορεί να δεχτεί επίθεση από πολλά και διαφορετικά είδη υπερπαρασίτων. Για παράδειγμα, οι μύκητες *Acremonium alternatum*, *Acrodontium crateriforme*, *Ampelomyces quisqualis*, *Cladosporium oxysporum* και *Gliocladium virens*, παρασιτούν κυρίως τα ωΐδια (Kiss, 2003). Ένα κλασικό παράδειγμα μυκητοϊού, είναι ο ιός *Cryphonectria hyrovirus*, ο οποίος χρησιμοποιείται για την βιολογική καταπολέμηση του μύκητα *Cryphonectria parasitica* που προκαλεί έλκη στην καστανιά. Οι ικές προσβολές των μυκήτων, οδηγούν κυρίως σε υπομολυσματικότητα, στην μείωση της παθογόνου ικανότητας του μύκητα και στην εξασθένηση των συμπτωμάτων της ασθένειας (Milgroom and Cortesi, 2004).

1.3.2 Αντιβίωση

Τα αντιβιοτικά είναι μικροβιακές τοξίνες οι οποίες σε χαμηλές συγκεντρώσεις μπορούν να νεκρώσουν άλλους μικροοργανισμούς. Οι περισσότεροι μικροοργανισμοί παράγουν και εκκρίνουν μία ή περισσότερες ενώσεις με ισχυρή αντιβιοτική δράση. Τα αντιβιοτικά έχουν αποδεχθεί σε αρκετές περιπτώσεις ιδιαίτερα αποτελεσματικά για την καταστολή των φυτοπαθογόνων και των ασθενειών που προκαλούν. Για να

είναι αποτελεσματική εφαρμογή τους στα προγράμματα της βιολογικής καταπολέμησης, πρέπει να παράγονται από τους μικροοργανισμούς σε επαρκείς ποσότητες (Pal and Gardener, 2006).

Πίνακας 3 : Παραδείγματα αντιβιοτικών που παράγονται από βιολογικούς παράγοντες αντιπετώπισης ασθενειών (Pal and Gardener, 2006).				
Αντιβιοτικά	Βιολογικός Παράγοντας	Παθογόνο Στόχος	Ασθένεια	Δημοσίευση
2, 4-diacetyl-phloroglucinol	<i>Pseudomonas fluorescens</i> F113	<i>Pythium</i> spp.	Τήξη φυταρίων	(Shanahan et al., 1992)
Agrocin 84	<i>Agrobacterium radiobacter</i>	<i>Agrobacterium tumefaciens</i>	Καρκίνος του λαιμού	(Kerr, 1980)
Bacillomycin D	<i>Bacillus subtilis</i> AU195	<i>Aspergillus flavus</i>	Μόλυνση με αφαλατοξίνες	(Moyné et al., 2001)
Bacillomycin, fengycin	<i>Bacillus amyloliquefaciens</i> FZB42	<i>Fusarium oxysporum</i>	Αδρομύκωση	(Koumoutsis et al., 2004)
Xanthobaccin A	<i>Lysobacter</i> sp. strain SB-K88	<i>Aphanomyces cochlioides</i>	Τήξη φυταρίων	(Islam et al., 2005)
Gliotoxin	<i>Trichoderma virens</i>	<i>Rhizoctonia solani</i>	Σήψη ριζών	(Wilhite et al.)
Herbicolin	<i>Pantoea agglomerans</i> C9-1	<i>Erwinia amylovora</i>	Βακτηριακό κάψιμο	(Sandra et al., 2001)
Iturin A	<i>B. subtilis</i> QST713	<i>Botrytis cinerea</i> και <i>R. solani</i>	Τήξη φυταρίων	(Paulitz and Bélanger, 2001) (Klopper et al. 2004)
Mycosubtilin	<i>B. subtilis</i> BBG100	<i>Pythium aphanidermatum</i>	Τήξη φυταρίων	(Leclère et al., 2005)
Phenazines	<i>P. fluorescens</i> 2-79 and 30-84	<i>Gaeumannomyces graminis</i> var. <i>tritici</i>	Πλάγιασμα αγρωστοδών	(Thomashow et al., 1990)
Pyoluteorin, pyrrolnitrin	<i>P. fluorescens</i> Pf-5	<i>Pythium ultimum</i> και <i>R. solani</i>	Τήξη φυταρίων	(Howell et al., 1976)
Pyrrolnitrin, pseudane	<i>Burkholderia cepacia</i>	<i>R. solani</i> και <i>Pyricularia oryzae</i>	Τήξη φυταρίων και πυρικούλαριωση ριζιού	(Homma et al., 1989)
Zwittermicin A	<i>Bacillus cereus</i> UW85	<i>Phytophthora medicaginis</i> και <i>P. aphanidermatum</i>	Τήξη φυταρίων	(Smith et al., 1993)

1.3.3 Ανταγωνισμός

Τα εδαφογενή φυτοπαθογόνα που μολύνουν τα φυτά μέσω μυκηλιακής επαφής (hyphodium), όπως είναι τα είδη του γένους *Fusarium* και *Pythium*, θεωρούνται πολύ πιο ευαίσθητα στον μικροβιακό ανταγωνισμό, σε σχέση με τα παθογόνα που σχηματίζουν πλάκες προσκολλησεως (appressorium) και υφές διάτρησης (infection hyphae) (Pal and Gardener, 2006). Η παρουσία άφθονων μη παθογόνων μικροοργανισμών στο έδαφος, συμβάλει στην άμεση και έμμεση προστασία των φυτών, από ένα ευρύ φάσμα φυτοπαθογόνων. Αυτό οφείλεται στο γεγονός ότι οι ωφέλιμοι μικροοργανισμοί αναπτύσσονται πολύ πιο γρήγορα, εξαντλώντας έτσι τα ελάχιστα διαθέσιμα θρεπτικά υποστρώματα για την ανάπτυξη των παθογόνων (Pal and Gardener, 2006). Για παράδειγμα, ο καταβολισμός των θρεπτικών στοιχείων από το βακτήριο *Enterobacter cloacea* στο μικροπεριβάλλον του σπόρου (spERMosphere), αναγνωριστικό στα λαχανικά ως ο κύριος μηχανισμός που συνέβαλε στην καταστολή του παθογόνου ωομύκητα *Pythium ultimum* (van Dijk et al., 2000; Kageyama & Nelson, 2003). Επιπρόσθετα, οι ωφέλιμοι μικροοργανισμοί παράγουν ορισμένους μεταβολίτες οι οποίοι καταστέλλουν τις δραστηριότητες των παθογόνων. Αυτό τους βοηθά στο να αναπτύσσονται και να εκμεταλλεύονται με μεγαλύτερη ευκολία τις διαθέσιμες πηγές νερού και άνθρακα που υπάρχουν στο έδαφος. Τέτοιες πηγές θρεπτικών στοιχείων αποτελούν τα σημεία εξόδου των δευτερογενών ριζών, τα κατεστραμμένα επιδερμικά κύτταρα και οι βλενωδείς εκκρίσεις της ρίζας (mucilage) (Pal and Gardener, 2006). Σχεδόν όλοι οι μικροοργανισμοί παράγουν σιδηροφόρους είτε τύπου κατεχόλης, είτε τύπου υδροξαμικού. Οι σιδηροφόροι συνεισφέρουν στην αυξημένη πρόσληψη σιδήρου από το έδαφος, πράγμα το οποίο ευνοεί την ταχεία εγκατάσταση των ωφέλιμων μικροοργανισμών σε μεγάλους πληθυσμούς στην περιοχή της ριζόσφαιρας. Με αυτό τον τρόπο εκτοπίζονται και οι επιβλαβείς μικροοργανισμοί από τις πιθανές θέσεις της μόλυνσης του φυτού (Pal and Gardener, 2006). Για παράδειγμα, η παραγωγή σιδηροφόρων από τα στελέχη A1, BK1, T13B1 και B10 του ριζοβακτηρίου *Pseudomonas fluorescens*, βρέθηκε να συμβάλλει στον βιολογικό έλεγχο του βακτηρίου *Erwinia carotovora* (Kloepper et al., 1980). Επίσης, *in vitro*, διαπιστώθηκε η άμεση συσχέτιση της σύνθεσης των σιδηροφόρων από τα ριζοβακτήρια *P. fluorescens*, με την ικανότητά τους να παρεμποδίζουν τη βλάστηση των χλαμυδόσποριών του μύκητα *F. oxysporum* (Elad and Baker, 1985; Sneh et al., 1984).

1.3.4 Παραγωγή λυτικών ενζύμων και άλλων βιολογικών προϊόντων

Πολλοί μικροοργανισμοί παράγουν και απελευθερώνουν λυτικά ένζυμα τα οποία υδρολύουν ένα ευρύ φάσμα πολυμερών ενώσεων, συμπεριλαμβανομένου της χιτίνης, των πρωτεϊνών, της κυτταρίνης, της ημικυτταρίνης και του DNA. Η έκφραση και η απέκκριση αυτών των ενζύμων, έχει οδηγήσει σε αρκετές περιπτώσεις στη βιολογική αντιμετώπιση των φυτοπαθογόνων (Pal and Gardener, 2006). Για παράδειγμα, η απελευθέρωση χιτινάσων από το βακτήριο *Serratia marcescens*, κατέστειλε την δραστηριότητα του εδαφοπαθογόνου μύκητα *Sclerotium rolfsii* (Ordentlich et al., 1988). Επίσης, οι β-1,3-γλυκανάσες από τα στελέχη C3 των βακτηρίων *Lysobacter enzymogenes*, βρέθηκαν να συμβάλλουν σημαντικά στη βιολογική αντιμετώπιση ορισμένων ασθενειών που προκαλούνται από τους μύκητες και ωομύκητες του γένους *Bipolaris* και *Pythium* (Palumbo et al., 2005). Τα γένη *Lysobacter* και *Myxobacteria*, παράγουν άφθονες ποσότητες λυτικών ενζύμων και ορισμένα από τα στελέχη τους θεωρούνται ιδιαίτερα αποτελεσματικά για την καταστολή της δράσης των φυτοπαθογόνων μυκήτων (Pal and Gardener, 2006). Επιπλέον, ορισμένα παραπροϊόντα που προκύπτουν από την δραστηριότητα των λυτικών ενζύμων, μπορεί να συνεισφέρουν έμμεσα στην καταστολή των φυτικών ασθενειών. Για παράδειγμα, εξαιτίας της λυτικής δραστηριότητας αυτών των ενζύμων, απελευθερώνονται ορισμένοι ολιγοσακχαρίτες από τα κυτταρικά τοιχώματα των μυκήτων, οι οποίοι δρουν κυρίως ως επαγωγείς της φυτικής άμυνας. Επιπλέον, στην καταστολή των φυτοπαθογόνων μπορούν να συμβάλλουν έμμεσα και τα απόβλητα των μικροοργανισμών (Pal and Gardener, 2006). Η παραγωγή υδροκυανίου (HCN) από ορισμένες φθορίζουσες ψευδομονάδες, πιστεύεται ότι εμπλέκεται ενεργά στην καταστολή των παθογόνων που προσβάλουν το ριζικό σύστημα των φυτών. Η ψευδομονάδα *P. fluorescens* CHA0, απελευθερώνει στο έδαφος HCN, αντιβιοτικά και σιδηροφόρα. Εντούτοις, για την καταστολή της μαύρης σήψης του καπνού που προκαλείται από τον μύκητα *Thielaviopsis basicola*, καθαριστικό ρόλο φαίνεται έπαιξε η απελευθέρωση του HCN σύμφωνα με την έρευνα των Voisard et al., (1989). Επίσης, οι Howell et al., (1988), βρήκαν ότι η αμμωνία που απελευθερώνεται από το βακτήριο *Enterobacter cloacae*, συμβάλει στην καταστολή του ωομύκητα *Pythium ultimum* που προκαλεί την τήξη των φυταρίων στο βαμβάκι.

1.3.5 Επαγωγή άμυνας

Τα φυτά έρχονται αντιμέτωπα με μια ποικιλία χημικών ερεθισμάτων τα οποία απελευθερώνονται από τους εδαφόβιους μικροοργανισμούς κατά διαστήματα. Ορισμένα είδη μικροοργανισμών από τα γένη των *Pseudomonas* και *Trichoderma*, χρησιμοποιούνται ως βιολογικοί παράγοντες αντιμετώπισης ασθενειών, καθώς είναι γνωστό ότι διεγείρουν ισχυρά την άμυνα των φυτών (Haas and Défago, 2005; Harman et al., 2004). Σε αρκετές περιπτώσεις οι εμβολιασμοί με ριζοβακτήρια τα οποία προάγουν την ανάπτυξη των φυτών (plant-growth-promoting rhizobacteria-PGPR), οδήγησαν στον αποτελεσματικό έλεγχο αρκετών φυτικών ασθενειών, συμπεριλαμβανομένου της ανθράκωσης (*Colletotrichum lagenarium*), της γωνιακής κηλίδωσης των φύλλων (*Pseudomonas syringae* pv. Lachrymans) και της αδροβακτηρίωσης (*Erwinia tracheiphila*) (Pal and Gardener, 2006). Ένας μεγάλος αριθμός διεγερτών της SAR και της ISR, μπορεί να προκύψει από την εφαρμογή στα φυτά φυτοπροστατευτικών μικροοργανισμών. Τέτοιοι διεγέρτες μπορεί να είναι το SA, οι σιδηροφόροι, οι λιποπολυσακχαρίτες και οι πτητικές ενώσεις όπως για παράδειγμα η 2,3-βουτανодиόλη (Ongena et al., 2004; Ryu et al., 2004; van Loon et al., 1998). Εξαιρουμένων των συστατικών που σχετίζονται άμεσα με την παθογένεση, στους επαγωγείς της φυτικής άμυνας μπορεί να περιλαμβάνονται : α) λιποπολυσακχαρίτες και μαστιγίνη από Gram αρνητικά βακτήρια, β) τρανσγλουταμινάσες, δ) ελισιτίνες και β-γλυκάνες από ωομύκητες, ε) ιμβερτάσες ζυμομυκήτων, ζ) χιτίνη-εργοστερόλη από μύκητες και η) οι ξυλανάσες του γένους *Trichoderma* (Nürnberg et al., 2004).

Πίνακας 4 : Βακτηριακοί διεγέρτες και ο τύπος της ανοσοποίησης που επάγουν στα φυτά ξενιστές

Στέλεχος βακτηρίου	Φυτό	Βακτηριακοί διεγέρτες	Ανοσοποίηση	Δημοσίευση
<i>Bacillus mycoides</i> strain Bac J	Ζαχαρότευτλο	Περοξειδάση, χιτινάση και β-1,3-γλουκανάση	ISR	(Bargabus et al., 2002)
<i>Bacillus subtilis</i> GB03 και IN937a	Αραβίδοψη	2,3-βουτανοδιόλη	ISR	(Ryu et al., 2004)
CHA0	Καπνός	Σιδηροφόροι	SAR	(Maurhofer et al., 1994)
	Αραβίδοψη	Αντιβιοτικά (2,4-διακετυλοφλορο-γλυκινόλη)	ISR	(Iavicoli et al., 2003)
WCS374	Ρεπάνι	Λιποπολυσακχαρίτες	ISR	(Leeman et al., 1995)
		Σιδηροφόροι		(Leeman et al., 1995)
		Πρωτεΐνες ρύθμισης σιδήρου		Leeman et al., 1995)
WCS417	Γαρυφαλλιά	Λιποπολυσακχαρίτες	ISR	(Van Peer and Schippers, 1992)
	Ρεπάνι	Λιποπολυσακχαρίτες	ISR	(Leeman et al., 1995)
		Πρωτεΐνες ρύθμισης σιδήρου		(Leeman et al., 1995)
	Αραβίδοψη	Λιποπολυσακχαρίτες	ISR	(Van Wees et al., 1997)
	Τομάτα	Λιποπολυσακχαρίτες	ISR	(Duijff et al., 1997)
<i>Pseudomonas putida</i> strains	Αραβίδοψη	Λιποπολυσακχαρίτες	ISR	(Meziane et al., 2005)
WCS 358	Αραβίδοψη	Λιποπολυσακχαρίτες	ISR	(Meziane et al., 2005)
		Σιδηροφόροι	ISR	(Meziane et al., 2005)
BTP1	Φασόλι	Z,3-hexenal	ISR	(Ongena et al., 2004)
<i>Serratia marcescens</i> 90-166	Αγγουριά	Σιδηροφόροι	ISR	(Press et al., 2001)

1.4 Ο ρόλος των σακχάρων στην άμυνα των φυτών

Στα φυτά τα σάκχαρα αποτελούν τις βασικές ομάδες βιομορίων που παρέχουν ενέργεια και συμβάλουν στην δόμηση του φυτού (Morkunas and Ratajczak, 2014). Ακόμη, αποτελούν τους κύριους ρυθμιστές ενός συνόλου μεταβολικών διεργασιών που σχετίζονται με την αύξηση και την ανάπτυξη των φυτών, καθώς και την απόκριση τους στα διάφορα βιοτικά και αβιοτικά ερεθίσματα (Rolland et al., 2006, 2002). Τα σάκχαρα ρυθμίζουν τις κυτταρικές λειτουργίες σε πολλαπλά επίπεδα, από την μεταγραφή στην μετάφραση, μέχρι και την δραστικότητα ορισμένων πρωτεϊνών (Rolland et al., 2006). Ορισμένα σάκχαρα δρουν ως διεγέρτες της φυτικής άμυνας, ενώ κάποια άλλα δρουν σαν μόρια σηματοδότησης στα μονοπάτια των φυτικών ορμονών που ρυθμίζουν τις αμυντικές τους αποκρίσεις (Trouvelot et al., 2014). Επίσης, στις αλληλεπιδράσεις μεταξύ φυτών και παθογόνων, τα σάκχαρα αποτελούν τις σημαντικές πηγές ενέργειας που απαιτούνται για την άμυνα και για την ρύθμιση της έκφρασης των γονιδίων της άμυνας (Bolton, 2009; Ehness et al., 1997; Roitsch et al., 2003). Υπάρχει ισχυρή θετική συσχέτιση μεταξύ των συγκεντρώσεων των σακχάρων και της αντίστασης τους στα διάφορα ερεθίσματα (Morkunas and Ratajczak, 2014).

1.4.1 Η ανίχνευση των σακχάρων και η σηματοδότηση στα φυτά

Η εξοκινάση 1 (HXK1), αποτελεί τον πιο καλά μελετημένο ενδοκυτταρικό υποδοχέα της γλυκόζης. Πέραν του ρόλου της σαν υποδοχέας, καταλύει σαν ένζυμο το πρώτο βήμα της γλυκόλυσης (μετατροπή της γλυκόζης σε 6-P γλυκόζη) (Smeekens et al., 2010). Τα ισομερή της εξοκινάσης έχουν εντοπιστεί στο κυτοδιάλυμα, στο χλωροπλάστη, στα μιτοχόνδρια και στον πυρήνα των φυτικών κυττάρων (Hanson and Smeekens, 2009). Με την παρουσία της στα διάφορα κυτταρικά οργανίδια, αντανακλά τον σημαντικό ρόλο που διαδραματίζει στις διάφορες κυτταρικές λειτουργίες του φυτού. Για παράδειγμα, η μιτοχονδριακή εξοκινάση σχετίζεται κυρίως με τον έλεγχο του προγραμματισμένου κυτταρικού θανάτου (Programmed cell death -PCD) (Morkunas and Ratajczak, 2014). Οι Kim *et al.* (2006), απέδειξαν ότι ο εξαρτώμενος από την εξοκινάση PCD, προάγει την έκφραση αρκετών γονιδίων PR κατά την διάρκεια της αντίδρασης υπερευαισθησίας. Στην αραβίδωση, η εξοκινάση του πυρήνα εμπλέκεται στα σηματοδοτικά γεγονότα

της θρέψης και των φυτικών ορμονών, τα οποία σχετίζονται με την ρύθμιση της γονιδιακής έκφρασης, της ανάπτυξης και της φυσιολογίας των φυτών (Bolouri-Moghaddam et al., 2010).

Οι υποδοχείς συζευγμένοι με την πρωτεΐνη G (G protein-coupled receptors: GPCRs), θεωρούνται και αυτοί ανιχνευτές μορίων γλυκόζης στα φυτά (Grigston et al., 2008; Huang et al., 2006). Τέτοιου είδους υποδοχείς εντοπίζονται στην κυτταροπλασματική μεμβράνη, και ως εκ τούτου είναι σημαντικοί για την μεταφορά του εξωκυτταρικού σήματος της γλυκόζης (Baena-González, 2010). Στο ρύζι, ορισμένες μεταλλάξεις στις πρωτεϊνικές υπομονάδες του υποδοχέα G, βρέθηκαν να αναστέλλουν τις αποκρίσεις των κύτταρων στους φυτικούς διεγέρτες της άμυνας και στα παθογόνα. Για παράδειγμα, στην μελέτη των Perfus *et al.* (2004), ο μύκητας *Magnaporthe grisea*, ανέδειξε το σημαντικό ρόλο του υποδοχέα RGS1 στην άμυνα του ρυζιού, καθώς βρέθηκε να προωθεί την παραγωγή των ROS.

Οι εξωκυτταρικές ιμβερτάσες, είναι ένζυμα τα οποία διασπούν την σακχαρόζη σε γλυκόζη και φρουκτόζη, και θεωρούνται απαραίτητες για την ρύθμιση του περιεχομένου των σακχάρων στον αποπλαστικό χώρο (Roitsch et al., 2003; Thomas Roitsch & González, 2004). Επίσης, συμβάλουν στην μεταφορά των υδατοδιαλυτών σακχάρων και στην ρύθμιση των κέντρων παραγωγής και κατανάλωσης των σακχάρων του φυτού (Ehness et al., 1997). Στις αλληλεπιδράσεις μεταξύ φυτών και παθογόνων, οι ιμβερτάσες του κυτταρικού τοιχώματος φαίνεται ότι επάγονται σημαντικά από τους διεγέρτες των παθογόνων (Susanne Berger et al., 2004; Roitsch et al., 2003; Sturm & Chrispeels, 1990). Επιπλέον, η αυξημένη δραστηριότητα των ιμβερτασών στον αποπλαστικό χώρο του κυττάρου, έχει συσχετιστεί με τις αποκρίσεις των φυτών στην σακχαρόζη, γλυκόζη, αναλόγων σακχαρόζης (Roitsch et al., 2003) και πολυγαλακτουρονικού οξέος (Godt and Roitsch, 1997). Ορισμένες ιμβερτάσες κατέχουν ρόλο ρυθμιστή στα διάφορα μονοπάτια της σηματοδότησης των σακχάρων και θεωρούνται απαραίτητες για την επαγωγή πολλών αμυντικών φυτικών αποκρίσεων (Proels and Roitsch, 2009). Επίσης, έχει αναφερθεί ότι οι ιμβερτάσες του κυτταρικού τοιχώματος συμβάλλουν στην παραγωγή του H₂O₂, δραστική μορφή οξυγόνου και σημαντικό μόριο σηματοδότησης για την άμυνα του φυτού (Proels and Roitsch, 2009). Σε διαγονιδιακά φυτά καπνού, η υπερέκφραση μιας ζυμομυκητιακής ιμβερτάσης στον αποπλαστικό χώρο, οδήγησε στην αυξημένη έκφραση ορισμένων πρωτεϊνών PR και αύξησε την αντίσταση ενάντια στον ιό Y της πατάτας (Potato Virus Y-PVY^N) (Herbers et al., 2000).

Κατά την διάρκεια της προσβολής από τους φυτοπαθογόνους μύκητες, απελευθερώνονται από το κυτταρικό τοίχωμα των φυτών ολιγομερή γαλακτουρονιδίων (oligogalacturonides). Τα μόρια αυτά δρουν κυρίως ως διεγέρτες της φυτικής άμυνας (Bolouri Moghaddam and Van den Ende, 2012) και υποδοχείς τους πιστεύεται ότι είναι ορισμένες πρωτεϊνικές κινάσες που απαντώνται στο κυτταρικό τοίχωμα των φυτών. Τέτοιοι υποδοχείς, είναι οι WAK1 (wall-associated kinase 1) και οι WAK2 (wall-associated kinase 2), στους οποίους δεσμεύονται τα κατακερματισμένα τμήματα της πηκτίνης (ολιγογαλακτουρονικό οξύ) που προκύπτουν από την διάσπαση του κυτταρικού τοιχώματος (Brutus et al., 2010). Οι υποδοχείς αυτοί με την σειρά τους, θα εκκινήσουν μια μεταγωγή σήματος με απώτερο σκοπό την ρύθμιση της έκφρασης των γονιδίων που έχουν να κάνουν με την άμυνα του φυτού. Οι πρωτεϊνικές κινάσες που ενεργοποιούνται από τα μιτογόνα (MAPK-Mitogen Activated Protein Kinases), όπως η MPK6 και MPK3, θεωρούνται οι συνδετικοί κρίκοι των υποδοχέων WAKs με τους μηχανισμούς ρύθμισης των γονιδίων της φυτικής άμυνας (Kohorn et al., 2012). Οι κυριότερες αιτίες για την υπερέκφραση των γονιδίων που κωδικοποιούν αυτούς τους πρωτεϊνικούς υποδοχείς, είναι το SA, οι τραυματισμοί των φυτών και οι βακτηριακές προσβολές (He et al., 1998; Wagner and Kohorn, 2001). Σε μεταλλαγμένα φυτά αραβίδωσης τα οποία απώλεσαν το γονίδιο *wak2*, χρειάστηκε η εξωγενής χορήγηση σακχάρων για να επιτευχθεί η φυσιολογική ανάπτυξη του φυτού. Επίσης, παρουσιάστηκε χαμηλή έκφραση στα γονίδια της χυμοτοπιακής ιμπερτάσης, της οποίας η ενζυμική δραστηριότητα παίζει σημαντικό ρόλο στην ανάπτυξη και στην σπαργή των φυτικών κυττάρων (Kohorn et al., 2006).

Τα επίπεδα των σακχάρων και ο ενεργειακός μεταβολισμός των φυτικών κυττάρων, ρυθμίζονται σε μεγάλο βαθμό από την πρωτεϊνική κινάση μη καταβολισμού της σακχαρόζης, την SnRK1 (sucrose non-fermenting-related-1-kinase). Στα φυτά θεωρείται σημαντικό ένζυμο για τον έλεγχο και για την αντιμετώπιση μιας πληθώρας βιοτικών και αβιοτικών καταπονήσεων (Baena-González and Sheen, 2008; Hey et al., 2010), ενώ αποτελεί και τον συνδετικό κρίκο του μεταβολισμού με τα σηματοδοτικά δίκτυα της άμυνας των φυτικών κυττάρων (Halford and Hey, 2009). Επίσης, σε διαγονιδιακά φυτά που απώλεσαν την λειτουργία της SnRK1, απεδείχθη ο σπουδαίος ρόλος που διαδραματίζει αυτό το ένζυμο για την έκφραση των γονιδίων της αλκοολικής διυδρογενάσης και της καρβοξυλάσης του πυροσταφυλικού, τα οποία εκφράζονται υπο την καταπόνηση της

υπερβολικής εδαφικής υγρασίας (Cho et al., 2012). Επιπρόσθετα, η έλλειψη σε σάκχαρα επάγει ισχυρά την έκφραση SnRK1, καθώς βρέθηκε ότι η εξωγενής χορήγηση σακχαρόζης (90 mM) απενεργοποίησε την δραστηριότητα της SnRK1, αναστολή η οποία μπορεί να συμβεί και με άλλα σάκχαρα, όπως για παράδειγμα με την 6-P γλυκόζη και την 6-P φωσφορική τρεχαλόζη (Nunes et al., 2013; Wingler et al., 2012; Zhang et al., 2009). Περαιτέρω, η κινάση SnRK1 ρυθμίζει την γονιδιακή έκφραση μέσω των μεταγραφικών παραγόντων bZIP (basic leucine zipper), οι οποίοι φέρουν την χαρακτηριστική δομή φερμουάρ λευκίνης. Ιδιαίτερα σημαντική για την ρύθμιση του μεταβολισμού των σακχάρων, θεωρείται η ομάδα S των μεταγραφικών παραγόντων bZIP. Η ομάδα αυτή αποτελείται από μικρού μοριακού βάρους πρωτεΐνες οι οποίες εμπλέκονται κυρίως στα μονοπάτια της σηματοδότησης των σακχάρων και των ερεθισμάτων καταπόνησης (Morkunas and Ratajczak, 2014). Στην αραβίδοψη, έχουν αναγνωριστεί οι υποομάδες S1, bZIP1, bZIP2, bZIP11, bZIP44 και bZIP53, όπου η σύνθεση τους αναστέλλεται σε μεταγραφικό επίπεδο από την σακχαρόζη (Baena-González et al., 2007; Hanson et al., 2007; Kang et al., 2010). Ορισμένοι μεταγραφικοί ρυθμιστές αυτής της κατηγορίας, μπορεί είτε να επάγονται, είτε να αναστέλλονται από τα σάκχαρα.

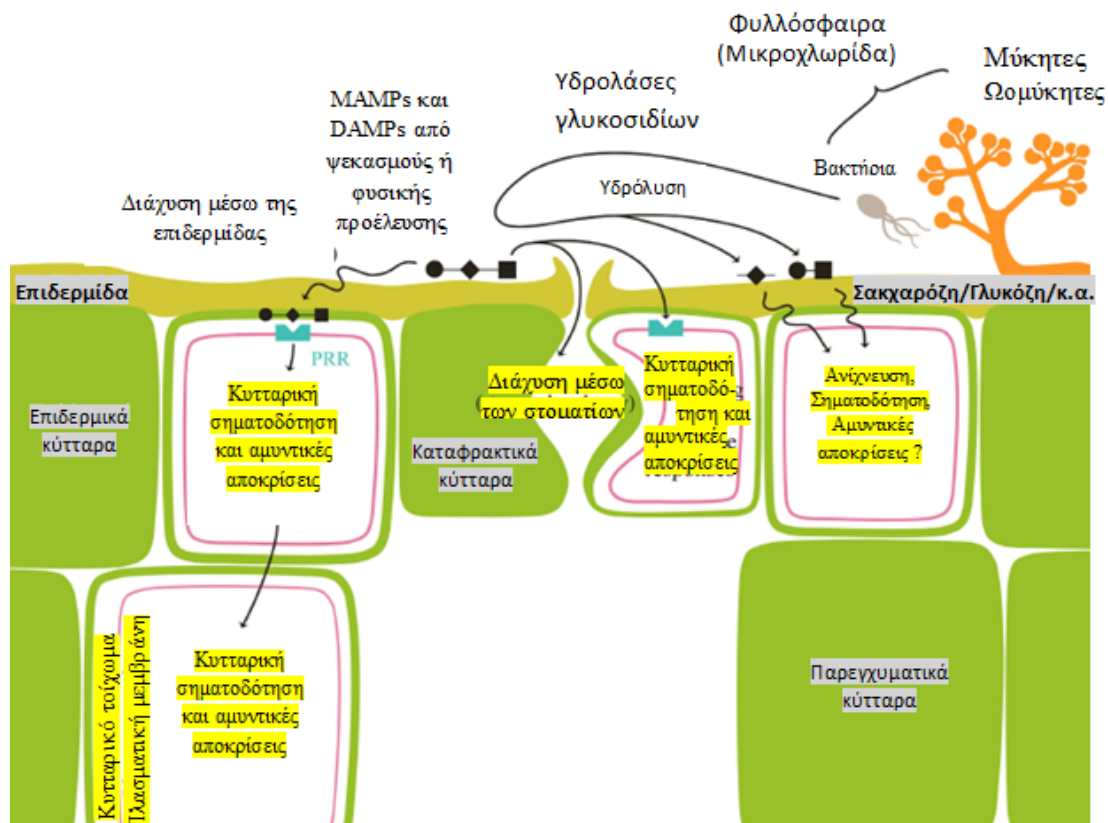
Η μοριακή σηματοδότηση με την ενεργή συμμετοχή των σακχάρων, φαίνεται να είναι ιδιαίτερα σημαντική για την ενεργοποίηση των αμυντικών αποκρίσεων στα φυτά. Ωστόσο, υπάρχουν ορισμένα παθογόνα που αποφεύγουν αυτό το σύστημα σηματοδότησης (Morkunas and Ratajczak, 2014). Ο Srt1 είναι ένας εξειδικευμένος μεμβρανικός μεταφορέας σακχαρόζης, που έχει χαρακτηριστεί από τους Wahl *et al.*, (2010) στον βιοτροφικό μύκητα του αραβοσίτου *Ustilago maydis*. Ο μεταφορέας αυτός λειτουργεί ως μολυσματικός παράγοντας, καθώς η σακχαρόζη λαμβάνεται από τον αποπλαστικό χώρο των κυττάρων χωρίς να έχει προηγηθεί η υδρόλυση της, πράγμα το οποίο εάν συνέβαινε, θα οδηγούσε στην απελευθέρωση μονοσακχαριτών οι οποίοι θα λειτουργούσαν ως επαγωγείς της φυτικής αμύνης.

Οι ολιγοσακχαρίτες μπορεί να γίνουν αντιληπτοί από τα καταφρακτικά κύτταρα των στοματίων και να επάγουν κυτταρικές σηματοδοτήσεις, αμυντικές αποκρίσεις και αλλαγές στις κινήσεις των στοματίων (κυρίως κλείσιμο). Στην τομάτα και στην κομμελίνη, παρατηρήθηκε από τους Lee *et al.*, (1999) ένα εξαρτώμενο από το H₂O₂ κλείσιμο των στοματίων, μέσω των ολιγογαλακτουρονιδίων και της χιτοζάνης. Παρομοίως, το ίδιο φαινόμενο παρατηρήθηκε και στο αμπέλι με τις β-γλυκάνες και τα ολιγογαλακτουρονίδια (Allègre et al., 2009), άλλα και στον καπνό και πάλι με την

παρουσία των β-γλυκάνων (Fu et al., 2011). Από πειράματα στο αμπέλι, βρέθηκε ότι τα καταφρακτικά κύτταρα των φύλλων ανταποκρίνονται στους ολογοσακχαρίτες σε μεγαλύτερο βαθμό από ότι τα επιδερμικά κύτταρα των φύλλων (Allègre et al., 2009; Trouvelot et al., 2008).

1.4.2 Η διείσδυση των σακχάρων διαμέσου της φυλλικής επιδερμίδας

Η επιδερμίδα των φύλλων εξαιτίας της χημικής και δομικής της σύστασης, είναι διαπερατή κυρίως στις λιπόφιλες ενώσεις. Αυτό έχει ως αποτέλεσμα να παρουσιάζεται ένα φράγμα κατά της διάχυσης των πολικών μορίων (Schreiber, 2006). Τα πολικά μόρια όπως είναι για παράδειγμα οι υδατάνθρακες, μπορούν και διαπερνούν με σχετική ευκολία την επιδερμίδα των φύλλων, κυρίως διαμέσου των υδροφιλικών της πόρων (Schonherr, 2006; Schreiber, 2006) και δευτερευόντως διαμέσου των στοματίων (Eichert and Goldbach, 2008). Μικρού μοριακού βάρους μόρια γύρω στα 2 nm, όπως είναι για παράδειγμα η σακχαρόζη, δύναται μέσω της διάχυσης να ξεπεράσουν το φράγμα της φυλλικής επιδερμίδας. Από τα στομάτια των φύλλων μπορεί να διαπεράσουν μόρια πέραν των 43 nm (Eichert et al., 2008). Εντούτοις, μόνο ένας περιορισμένος αριθμός (<10 %) φυτικών στοματίων μπορεί να επιτρέψει την διάχυση μορίων τέτοιας τάξης μεγέθους (Eichert and Burkhardt, 2001). Ο βαθμός με τον οποίο διαχέονται τα μόρια της σακχαρόζης διαμέσου της φυλλικής επιδερμίδας, βρέθηκε να κυμαίνεται γύρω στο 1% για τις επιδερμίδες των φύλλων χωρίς στομάτια και γύρω στο 4% για τις επιδερμίδες με στομάτια (Eichert and Goldbach, 2008). Σε φυτικά είδη που είναι υποστοματικά (στομάτια κυρίως στην κάτω επιφάνεια του φύλλου), βρέθηκε ότι η πρόσληψη της σακχαρόζης ήταν μέχρι και δύο φορές περισσότερή στα στομάτια της κάτω επιφάνειας των φύλλων σε σχέση με τα στομάτια της άνω επιφάνειας των φύλλων. Επιπλέον, οι ολιγοσακχαρίτες που ξεπερνούν σε μέγεθος το μόριο της σακχαρόζης, πιθανόν να απορροφούνται από την φυλλική επιδερμίδα σε πολύ πιο μικρότερο βαθμό από ότι η σακχαρόζη. Εν ολίγοις, τέτοιου είδους πληροφορίες μπορεί να αξιοποιηθούν για να εξευρεθούν οι τρόποι αύξησης της βιοδιαθεσιμότητας των ολιγοσακχαριτών που εφαρμόζονται με φυλλικούς ψεκασμούς (Trouvelot et al., 2014).



Σχήμα 3 : Η είσοδος των υδατανθράκων διαμέσου της φυλλικής επιδερμίδας (Trouvelot et al., 2014)

Οι υδατάνθρακες θα πρέπει να διαπεράσουν την υδρόφιλη επιδερμίδα των φύλλων έτσι ώστε να φτάσουν στα επιδερμικά ή στα καταφρακτικά κύτταρα και να γίνουν αντιληπτοί από τους υποδοχείς PRRs. Οι υποδοχείς αυτοί με την σειρά τους θα πυροδοτήσουν σηματοδοτικά γεγονότα και αμυντικές αποκρίσεις στο φυτό. Οι υδατάνθρακες μπορούν να εισέλθουν απευθείας και από τα στομάτια των φύλλων. Επίσης, οι μικροοργανισμοί που εδράζονται στην φυλλόσφαιρα, εκκρίνουν ένζυμα τα οποία υδρολύουν τους ολιγοσακχαρίτες του κυτταρικού τοιχώματος. Ανάλογα με την δομή των υδρολυμένων σακχάρων, δύναται να πυροδοτήσουν κυτταρικές σηματοδοτήσεις οι οποίες με την σειρά τους θα οδηγήσουν στην ενεργοποίηση των αμυντικών αποκρίσεων.

Η φυλλική επιφάνεια σε όλα τα ανώτερα φυτά σχηματίζει μια φυλλόσφαιρα στην οποία φιλοξενούνται επιφυτικοί μικροοργανισμοί, όπως βακτήρια, ζύμες, μύκητες και ωομύκητες (Vorholt, 2012). Οι μικροοργανισμοί αυτοί αξιοποιούν προς όφελος τους τις πηγές υδατανθράκων, αμινοξέων και οργανικών οξέων που απελευθερώνονται από την επιδερμίδα των φύλλων κατά διαστήματα (Derridj, 1996; Leveau and Lindow, 2001; Van der Wal and Leveau, 2011). Τα βακτήρια και οι επιφυτικοί μύκητες της φυλλόσφαιρας, παράγουν και εκκρίνουν μεγάλες ποσότητες ενζύμων (κυρίως υδρολάσες γλυκοσιδίων) τα οποία διασπούν τους πολυσακχαρίτες του φυτικού κυτταρικού τοιχώματος (Culleton et al., 2013). Στα ένζυμα που απελευθερώνουν αυτοί οι μικροοργανισμοί περιλαμβάνονται κυρίως πεκτινάσες (polygalacturonases, PG), λυάσες (pectin lyase και pectate lyase) και εστεράσες

της πηκτίνης (pectin esterases), οι οποίες δρουν στα μοτίβα της ομογαλακτουράνης με τον ίδιο τρόπο που δρουν και οι ραμνογαλακτουρονάσες (Abbott & Boraston, 2008; Alghisi & Favaron, 1995; Chen et al., 1997; Urquhart & Punja, 2002). Υπάρχουν και επίσης ορισμένοι μικροοργανισμοί που μπορεί να εκκρίνουν χιτινάσες, γλουκανάσες ή λυάσες από άλγη και φύκη (Da Costa et al., 2001; Dahiya et al., 2006; Lahaye et al., 1997; Urquhart and Punja, 2002). Από την δράση αυτών των ενζύμων απελευθερώνονται συντηρημένες δομές/μοτίβα (MAMPs και DAMPs), τα οποία αναγνωρίζονται από τους υποδοχείς PRRs του φυτού και διεγείρουν το αμυντικό σύστημα PTI. Ακόμη, τα βακτήρια της φυλλόσφαιρας δύναται να εκκρίνουν και ορισμένες βιο-επιφανιοδραστικές ουσίες (Cooper & Zajic, 1980; Neu, 1996), οι οποίες θα αυξήσουν την διαβρεξιμότητα των φυλλικών ιστών και θα αλλάξουν τις διαπεραστικές της ιδιότητες (Schreiber et al., 2005). Με αυτό τον τρόπο θα συμβάλουν στην αύξηση του βαθμού της διάχυσης και άλλων ξενοβιοτικών ουσιών, οι οποίες δύναται και αυτές με την σειρά τους να διεγείρουν το PTI (Eichert and Goldbach, 2008). Τέλος, για την τύχη και για τον βαθμό της δράσης των ολιγοσακχαριτών που εφαρμόζονται με φυλλικούς ψεκασμούς, έχουν προταθεί τα εξής υποθετικά σενάρια σύμφωνα με τους Trouvelot *et al.*, (2014) :

1. Οι ολιγοσακχαρίτες ενδεχόμενος να μην επηρεάζονται από την μικροχλωρίδα της φυλλόσφαιρας.
2. Οι συγκεντρώσεις των ολιγοσακχαριτών μεταβάλλονται μερικώς, καθώς υδρολύονται από την μικροχλωρίδα της φυλλόσφαιρας. Αυτό έχει ως αποτέλεσμα να μειώνεται η διαθέσιμη και ενεργή ποσότητα των ολιγοσακχαριτών που χρειάζονται για να ενεργοποιηθεί η άμυνα του φυτού.
3. Τα μικρού μεγέθους θραύσματα των ολιγοσακχαριτών δύναται να είναι ισχυροί ή ασθενείς διεγέρτες της φυτικής άμυνας.
4. Τα μικρού μεγέθους θραύσματα των ολιγοσακχαριτών δρουν κυρίως ως μόρια σηματοδότησης (κυρίως στην περίπτωση της β-γλουκάνης).

1.4.3 Οι αλλαγές στα επίπεδα των σακχάρων στο σημείο της προσβολής

Κατά την διάρκεια των προσβολών από τους φυτοπαθογόνους μύκητες, τα επίπεδα και οι ιδιότητες των υδατοδιαλυτών σακχάρων εντός του φυτού, δύναται να τροποποιηθούν ποικιλοτρόπως, τόσο από τους ρυθμιστικούς μηχανισμούς του φυτού,

άλλα και όσο από τους μηχανισμούς του παθογόνου μύκητα. Γενικά, στο σημείο της προσβολής παρατηρούνται ποσοτικές και ποιοτικές αλλαγές στα επίπεδα των σακχάρων, οι οποίες μπορεί να αποδοθούν σε διάφορα αίτια και γενικά διαφέρουν ανάλογα με το σύστημα ξενιστή-παθογόνου. Για παράδειγμα, μειώσεις στα επίπεδα των σακχάρων μπορεί να προκληθούν είτε λόγω της αυξημένης ενέργειας που χρειάζεται το φυτό για την άμυνα, είτε για την δόμηση. Ακόμη, οι μειώσεις στα επίπεδα των σακχάρων μπορεί να οφείλονται εξαιτίας της αυξημένης πρόσληψης τους από τα παθογόνα ή εξαιτίας της αναστολής των φωτοσυνθετικών διεργασιών στους αυτοτροφικούς ιστούς του φυτού ξενιστή (Morkunas and Ratajczak, 2014).

Ανάλογα με τις αλληλεπιδράσεις ξενιστή-παθογόνου, στους προσβεβλημένους ιστούς μπορεί να παρατηρηθεί μείωση ή αύξηση στα επίπεδα των σακχάρων (Berger et al., 2007). Οι αλλαγές αυτές οφείλονται στην ενεργοποίηση των μεταφορών εξόζης, σακχαρόζης και ιμπερτάσης του κυτταρικού τοιχώματος (Essmann et al., 2008; Kühn and Grof, 2010; Sutton et al., 2007). Στις πλείστες περιπτώσεις, το σημείο της προσβολής καταλήγει σε κέντρο κατανάλωσης σακχάρων. Οι ιμπερτάσες εντοπίζονται κυρίως στα κέντρα και στους ιστούς όπου πραγματοποιείται η κατανάλωση των σακχάρων και σπανιότερα στα φύλλα που αποτελούν τα κέντρα της βιοσύνθεσης των σακχάρων (Essmann et al., 2008).

Σε φύλλα αραβίδοψης, η προσβολή από τον βιοτροφικό μύκητα *Eryshipe cichoracearum*, βρέθηκε να επάγει αμυντικές αποκρίσεις και την έκφραση του μεταφορέα μονοσαχαριτών STP4 (STP4-sugar transporter protein 4) σε πολύ υψηλά επίπεδα (Fotopoulos et al., 2003). Παρομοίως, ο μύκητας *Colletotrichum graminicola*, φαίνεται να επάγει την έκφραση του μεταφορέα SUT1 της σακχαρόζης στον αραβόσιτο (Vargas et al., 2012), ενώ στο αμπέλι οι προσβολές από το μύκητα *Eryshipe necator* και τον ωομύκητα *Plasmopara viticola*, βρέθηκαν να επάγουν την έκφραση αρκετών μεταφορέων εξόζης και ιδιαίτερα του μεταφορέα VvHT5 (Hayes et al., 2010). Επιπλέον, οι μεταφορείς SWEETs, αποτελούν μια ιδιαίτερη κατηγορία πρωτεϊνικών μεταφορέων, η οποία ανακαλύφθηκε πρόσφατα και φαίνεται ότι εκφράζονται σε διαφορετικό βαθμό κατά την διάρκεια των προσβολών από τους φυτοπαθογόνους μύκητες (Chen et al., 2010). Για παράδειγμα, στην αραβίδοψη η προσβολή από τον μύκητα *Golovinomyces cichoracearum*, επάγει την έκφραση του μεταφορέα AtSWEET12, ενώ η προσβολή από τον μύκητα *B. cinerea*, επάγει τους μεταφορείς AtSWEETs : 4, 15 και 17. Αυτή η διαφορετική γονιδιακή ρύθμιση, υποδηλώνει ότι τα παθογόνα διαθέτουν ορισμένους εξειδικευμένους μηχανισμούς για

να αποκτούν πιο εύκολα πρόσβαση στους υδατάνθρακες των φυτών ξενιστών (Slewinski, 2011). Επίσης, οι φυτοπαθογόνοι μύκητες ενεργοποιούν και τους δικούς τους μεταφορείς σακχάρων κατά την διάρκεια της εισβολής τους στους ιστούς του φυτού ξενιστή. Για παράδειγμα, υπάρχουν μεταφορείς εξοκινάσης (HXT) που εκφράζονται εξειδικευμένα στους μυζητήρες των μυκήτων (Voegelé et al., 2001), δηλαδή μυκηλιακές κατασκευές που αναπτύσσονται στο εσωτερικό χώρο των φυτικών κυττάρων και χρησιμοποιούνται για την πρόσληψη θρεπτικών στοιχείων.

Η δημιουργία ενός κέντρου κατανάλωσης σακχάρων στην περιοχή της προσβολής, δεν καλύπτει πάντοτε τις ανάγκες για σάκχαρα. Στα σημεία της προσβολής, τα σάκχαρα λαμβάνονται σε μεγάλες ποσότητες από τους μύκητες, ενώ οι προσβεβλημένοι ιστοί διαθέτουν αρκετά υποστρώματα για την άμεση πυροδότηση των αμυντικών τους αποκρίσεων (Morkunas and Ratajczak, 2014). Στις αποκρίσεις αυτές, μπορεί να περιλαμβάνεται η σύνθεση πρωτεϊνών PR, φαινυλοπροπανοειδών ή η εναπόθεση τοιχωματικού υλικού και ο σχηματισμός της χαρακτηριστικής θηλής (papilla) κάτω από το τραύμα της προσβολής του μύκητα (Bolton, 2009; Morkunas et al., 2007, 2005; Strömberg and Brishammar, 1993).

Η ενεργοποίηση της φυτικής άμυνας σε μια φυτοπαθόγωνα προσβολή, θεωρείται ιδιαίτερα κοστοβόρα από πλευράς σακχάρων για τα φυτά ξενιστές. Στα προσβεβλημένα φυτικά κύτταρα, ο εντατικός μεταβολισμός των σακχάρων μπορεί να προκαλέσει αλλαγές στην ποιοτική και ποσοτική σύνθεση των σακχάρων (Kawakami and Yoshida, 2012; Morkunas et al., 2010). Για παράδειγμα, η προσβολή των κοτυληδόνων του ηλίανθου από τον νεκροτροφικό μύκητα *Sclerotinia sclerotiorum*, μείωσε τα αρχικά επίπεδα της σακχαρόζης κατά 100%, της φρουκτόζης κατά 85% και της γλυκόζης κατά 20 % (Jobic et al., 2007). Παρομοίως, ελλείψεις σε συγκεκριμένα σάκχαρα παρουσιάστηκαν και στην τομάτα, έπειτα από την μόλυνση της με τον μύκητα *B. cinerea* (Berger et al., 2004; Bonfig et al., 2006). Οι ελλείψεις σε σάκχαρα ενδέχεται να επιφέρουν αλλαγές στον μεταβολισμό και στην γονιδιακή έκφραση των κυττάρων (Morkunas et al., 2003). Το έλλειμμα των σακχάρων μπορεί να ενεργοποιήσει τον καταρράκτη σηματοδότησης SnRK1, προκαλώντας έτσι τον επαναπρογραμματισμό του μεταβολισμού των κυττάρων με απώτερο σκοπό την παραγωγή ενέργειας (Baena-González, 2010).

1.4.4 Η σχέση της δομής των σακχάρων με την άμυνα του φυτού

Η βιολογική δράση των ολιγοσακχαριτών εξαρτάται ως επί το πλείστον από τον βαθμό του πολυμερισμού τους και από τα δομικά τους μοτίβα (Trouvelot et al., 2014). Σε φυτικά κύτταρα καπνού, οι Fu *et al.*, (2011) παρατήρησαν ότι οι β-1,3 γλύκανες με χαμηλό βαθμό πολυμερισμού (2-10), επάγουν πολύ πιο γρήγορα τις αμυντικές τους αποκρίσεις σε σχέση με τα μόρια της λαμιρανίνης που φέρουν υψηλό βαθμό πολυμερισμού (25-40). Εντούτοις, η επαγωγή της ανθεκτικότητας ενάντια στον ιό TMV, ήταν πολύ πιο αποτελεσματική στις β-1,3 γλύκανες με τον υψηλό βαθμό πολυμερισμού, σε σχέση με αυτές με τον χαμηλό βαθμό πολυμερισμού. Παρόμοια, τα οκταμερή και τα επταμερή της χιτίνης, παρουσιάζουν ως διεγέρτες (της φυτικής αμύνης) υψηλότερη δραστηριότητα, σε σχέση με τα ολιγομερή της χιτίνης (Hamel and Beaudoin, 2010; Vander et al., 1998), ενώ για τα ολιγομερή της χιτοζάνης, πιο δραστικά θεωρούνται συνήθως αυτά με βαθμό πολυμερισμού 7-10 (Hadwiger, 2013). Ο βέλτιστος βαθμός πολυμερισμού των ολιγογαλακτουρονιδίων για την επαγωγή των φυτικών αμυντικών αποκρίσεων, θεωρείται αυτός των 10-16, ενώ για αυτά που φέρουν βαθμό πολυμερισμού 2-6, η βιολογική τους δράση εξαρτάται σε μεγάλο βαθμό από τα παθοσυστήματα (Galletti et al., 2008; Navazio et al., 2002; Vorhölter et al., 2012).

Τα φυτά έχουν αναπτύξει την ικανότητα να ανταποκρίνονται ανάλογα με την δομή β-γλυκάνων. Τα φασόλια και το ρύζι αναγνωρίζουν μόνο τις διακλαδισμένες β-γλυκάνες, ενώ ο καπνός αντιδρά μόνο στα γραμμικά μόρια των β-1,3 γλυκάνων (Cheong and Hahn, 1991; Yamaguchi et al., 2000). Για παράδειγμα, τα β-1,6-β-1,3-επταγλυκοσίδια, διεγείρουν την συσσώρευση φυτοαλεξίνων στα φασόλια, ενώ στον καπνό παραμένουν ανενεργά και δεν διεγείρουν οποιοσδήποτε αμυντικές αποκρίσεις (Klarzynski et al., 2003).

Η ακετυλίωση και η μεθυλίωση επηρεάζει σημαντικά την δραστηριότητα των ολιγοσακχαριτών. Για παράδειγμα, η ακετυλίωση της χιτίνης θεωρείται αναγκαία για την επιτυχή δέσμευση της στον υποδοχέα AtCERK1, καθώς τα πλήρως αποκετυλιωμένα ολιγομερή της χιτίνης δεν παρουσιάζουν οποιαδήποτε συγγένεια με τον υποδοχέα. Το ίδιο παρατηρείται και στη μη ακετυλιωμένη χιτοζάνη, η οποία δεσμεύεται ατελώς με τον υποδοχέα AtCERK1. Στο ρύζι απαιτούνται ισχυρά ακετυλιωμένοι υποκαταστάτες (ligands) για την ενεργοποίηση της άμυνας, καθώς τα

επταμερή και τα οκταμερή της χιτοζάνης δεν βρέθηκαν να προωθούν την συσσώρευση των ROS (Kaku et al., 1997; Kishimoto et al., 2010).

Ο βαθμός της μεθυλικής εστεροποίησης των ολιγογαλακτουρονιδίων από την μεθυλεστεράση της πηκτίνης (pectin methylesterase-PME), επηρεάζει σημαντικά την βιολογική τους δράση (Pelloux et al., 2007). Για παράδειγμα, βρέθηκε ότι η υπερέκφραση ενός αναστολέα της PME (PMEIs) αυξάνει τα συμπτώματα του μύκητα *B. cinerea* στην αραβίδοψη (Lionetti et al., 2007). Αντίθετα, η υπερέκφραση της PME στην φράουλα, μείωσε τον βαθμό της μεθυλικής εστεροποίησης στα ολιγογαλακτουρονίδια, πράγμα το οποίο οδήγησε στην αυξημένη αντίσταση κατά του νεκροτροφικού μύκητα *B. cinerea* (Osorio et al., 2007).

Στις διάφορες φυσιολογικές λειτουργίες του φυτού, εμπλέκονται αρκετά μόρια που φέρουν σουλφυδρυλομάδες. Η παρουσία των σουλφυδρυλοομάδων και ο βαθμός της σουλφιδίωσης, δύναται να επηρεάσει σημαντικά τις βιολογικές δραστηριότητες των ολιγοσακχαριτών (Trounelot et al., 2014). Σε μια μελέτη των Ménard *et al.* (2004), βρέθηκε ότι υπάρχει θετική συσχέτιση μεταξύ του βαθμού σουλφιδίωσης της λαμιρανίνης και της ενεργοποίησης των πρωτεϊνών PR στον καπνό. Συγκεκριμένα, απαιτείτο βαθμός σουλφιδίωσης πέραν του 0,4 για να πυροδοτηθεί η έκφραση των πρωτεϊνών PR, ενώ η δραστηριότητα της λαμιρανίνης ως διεγέρτης αυξανόταν με την αύξηση του βαθμού της σουλφιδιλίωσης της. Η μέγιστη δραστηριότητα της λαμιρανίνης ως διεγέρτης, παρατηρήθηκε με βαθμό σουλφιδίωσης πέραν του 1,5 και φαίνεται να είναι ανεξάρτητη του μήκους της υδατανθρακικής αλυσίδας.

1.4.5 Διάφοροι τύποι σακχάρων που επάγουν την άμυνα των φυτών

Συνήθως, μικρού μοριακού βάρους σάκχαρα, όπως μονοσακχαρίτες, δισακχαρίτες και μικροί ολιγοσακχαρίτες, θεωρούνται ικανοί για να ενεργοποιήσουν τις αμυντικές αποκρίσεις των φυτών και να αυξήσουν την ανθεκτικότητα τους στα διάφορα παθογόνα.

Σε φυτά αραβίδοψης που είχαν μολυνθεί με τον ιό TMV, παρουσιάστηκε μια αύξηση στην έκφραση του γονιδίου *TPSII* (trehalose 6-phosphate synthase phosphatase), το οποίο κωδικοποιεί το σύμπλοκο συνθάση/φωσφατάση της 6 φωσφορικής τρεχαλόζης (Golem and Culver, 2003). Το γονίδιο *TPSII* είναι υπεύθυνο για την άμυνα κατά της πράσινης αφίδας της ροδακινιάς (*Myzus persicae*). Η σίγαση του γονιδίου *TPSII* σε γενετικά τροποποιημένα φυτά αραβίδοψης, μείωσε την

αντίσταση κατά της πράσινης αφίδας, πράγμα το οποίο συσχετίστηκε με την μειωμένη συσσώρευση τρεχαλόζης στα φύλλα των μεταλλαγμένων φυτών. Εντούτοις, μετά την εξωγενή χορήγηση τρεχαλόζης στα γενετικά τροποποιημένα φυτά της αραβίδουψης, ανακτήθηκε πλήρως η αντίσταση κατά της πράσινης αφίδας, πράγμα που υποδεικνύει ότι η τρεχαλόζη αποτελεί ένα σημαντικό σηματοδοτικό μόριο για την άμυνα των φυτών. Επίσης, το γονίδιο *TPS11*, βρέθηκε να προωθεί την ανακατανομή του άνθρακα σε άμυλο εις βάρος της σακχαρόζης, αποκαλύπτοντας έτσι τον ρόλο που μπορεί να διαδραματίσει το άμυλο για τον έλεγχο των αφίδων, καθώς αποτελεί την πρωτογενή πηγή ενέργειας και άνθρακα για τα έντομα (Singh et al., 2011). Ακόμη, η τρεχαλόζη βρέθηκε να επάγει την άμυνα του σίτου κατά των ωιδίων που προκαλούνται από τον μύκητα *Blumeria graminis* f. sp. *tritici*. Η επαγωγή της άμυνας του σίτου, συνδυάστηκε με την αυξημένη έκφραση των γονιδίων που κωδικοποιούν τα ένζυμα φαινυλανίνη αμμώνια-λυάση (Phenylalanine ammonia lyase) και περοξειδάση (Peroxidase) (Reignault et al., 2001).

Διαταραχές στα κέντρα παραγωγής και κατανάλωσης των σακχάρων και τοπικές αυξήσεις στις συγκεντρώσεις της σακχαρόζης και μυο-ινοσιτόλης, παρατηρούνται συνήθως στις αβιοτικές και βιοτικές καταπονήσεις των φυτών. Τέτοιοι μηχανισμοί, οδηγούν και στην παραγωγή γαλακτινόλης, η οποία αποτελεί την πρόδρομη ένωση για την σύνθεση της ραφινόζης (Valluru and Van den Ende, 2011). Η γαλακτινόλη και η ραφινόζη, εμπλέκονται κυρίως στα δίκτυα της σηματοδότησης των φυτών που έχουν να κάνουν με τις αμυντικές τους αποκρίσεις. Στον καπνό, η εξωγενής χορήγηση γαλακτινόλης, αύξησε τα επίπεδα της έκφρασης των γονιδίων *PR-1a*, *PR-1b* και *NtACSL*, τα οποία σχετίζονται με την άμυνα του καπνού ενάντια στις προσβολές των φυτοπαθογόνων μικροοργανισμών (Kim et al., 2008).

Ορισμένα σπάνια σάκχαρα όπως η ψικόζη (psicose), η D-αλόζη (D- allose) και η 2,5 διδεοξυ-2,5 ιμινο-D-μανιτολη (2,5-dideoxy-imino-D-mannitol/DMDP), δύναται να τονώσουν την άμυνα των φυτών, μέσω της αυξημένης έκφραση των αντίστοιχων γονιδίων της φυτικής αμύνης. Τα παραπάνω σάκχαρα έχουν προταθεί ως μοριακά σήματα στα εξαρτώμενα και στα ανεξάρτητα από την εξοκινάση δίκτυα σηματοδότησης (Birch et al., 1999; Derridj et al., 2012; Kano et al., 2011a). Η DMDP δύναται να αυξήσει τον λόγο σακχαρόζης/εξόζης εντός των φυτικών κυττάρων, πράγμα το οποίο επηρεάζει σημαντικά τα εξειδικευμένα σηματοδοτικά μονοπάτια της γλυκόζης, φρουκτόζης και σακχαρόζης. Τέτοιες αλλαγές στον λόγο σακχαρόζης/εξόζης ενδεχόμενος να επηρεάζουν σημαντικά τις φυτικές αμυντικές

αποκρίσεις (Bolouri Moghaddam and Van den Ende, 2012). Στο ρύζι, η D-αλόζη αναστέλλει τις αμυντικές αποκρίσεις που εξαρτώνται από την γιβερελλίνη (GA) και αυτό συντελείται κυρίως μέσω μιας σηματοδοτικής οδού που ελέγχεται από την εξοκινάση (Fukumoto et al., 2011). Από την άλλη, η ψικόζη βρέθηκε να αυξάνει την αντίσταση κατά της βακτηριακής κηλίδωσης του ρυζιού, μέσω της υπερέκφρασης συγκεκριμένων γονιδίων παθογένεσης (Kano et al., 2011).

Η σακχαρόζη αποτελεί το κύριο προϊόν της φωτοσύνθεσης και έχει αποδειχθεί η καθοριστική συμβολή της στις διάφορες ρυθμιστικές λειτουργίες του φυτού, όπως για παράδειγμα η ανάπτυξη, η γονιδιακή έκφραση και οι αποκρίσεις στα διάφορα ερεθίσματα καταπόνησης (Wind et al., 2010). Το ριζοπότισμα του ρυζιού με σακχαρόζη, οδήγησε στην υπερέκφραση των γονιδίων παθογένεσης *OsPR1a*, *OsPR1b*, *PBZ1* και *PBZ5* (Gómez-Ariza et al., 2007). Επίσης, στο λούπινο, η σακχαρόζη βρέθηκε να επάγει την συσσώρευση ισοφλαβονοειδών, ενώ στην αραβίδοψη βρέθηκε να επάγει την συσσώρευση ανθοκυανινών (Morikunas et al., 2005). Σε αντίθεση με την σακχαρόζη, οι ισομοριακές εφαρμογές με γλυκόζη και φρουκτόζη, δεν οδήγησαν σε οποιαδήποτε συσσώρευση ανθοκυανινών στην αραβίδοψη. Αυτό αντανακλά τον εξειδικευμένο ρόλο που κατέχει ως μόριο η σακχαρόζη στην σηματοδότηση των αμυντικών αποκρίσεων (Solfanelli et al., 2006). Τέλος, ο υψηλός λόγος σακχαρόζης/εξόζης σε φυτά αραβίδοψης, δύναται να πυροδοτήσει την μεταγωγή ενός σήματος σακχαρόζης, αναγκαίο για την παραγωγή μιας συστοιχίας προστατευτικών παραγόντων που μπορεί να περιλαμβάνουν ανθοκυανίνες και άλλους δευτερογενούς μεταβολίτες (Kwon et al., 2011).

1.4.6 Αλληλεπιδράσεις σακχάρων με φυτορμόνες

Κατά την διάρκεια των φυτικών αμυντικών αποκρίσεων, τα σηματοδοτικά μονοπάτια των σακχάρων επικοινωνούν και διασταυρώνονται με τα σηματοδοτικά δίκτυα των φυτικών ορμονών (León and Sheen, 2003). Για παράδειγμα, το εξαρτώμενο από το αψισικό οξύ (ABA) κλείσιμο των στοματίων, εξαρτάται από τις αυξημένες συγκεντρώσεις του H_2O_2 , το οποίο διεγείρει με την σειρά του την αυξημένη συσσώρευση υδατανθράκων. Τέτοιες διαδικασίες λαμβάνουν δράση σε συνθήκες ξηρασίας, προκειμένου να επέλθει το κλείσιμο των στοματίων και να ενεργοποιηθεί ο πρώτος φραγμός της άμυνας εναντίων των PAMPs (Pattanagul, 2011; Ton et al., 2009). Επιπλέον, το ABA πιθανότατα να ρυθμίζει την οσμωρύθμιση

των φυτικών κυττάρων και να συμβάλλει στην τροφοδοσία τους με σάκχαρα κατά την διάρκεια των διαφόρων βιοτικών και αβιοτικών ερεθισμάτων. Αυτό στηρίζεται στο γεγονός ότι σε συνθήκες ξηρασίας, το ABA αυξάνει την έκφραση και την δραστηριότητα ορισμένων ιμβερτασών που απαντώνται στο χυμοτόπιο και στο κυτταρικό τοίχωμα των φυτών (Hayes et al., 2010; Trouverie et al., 2004).

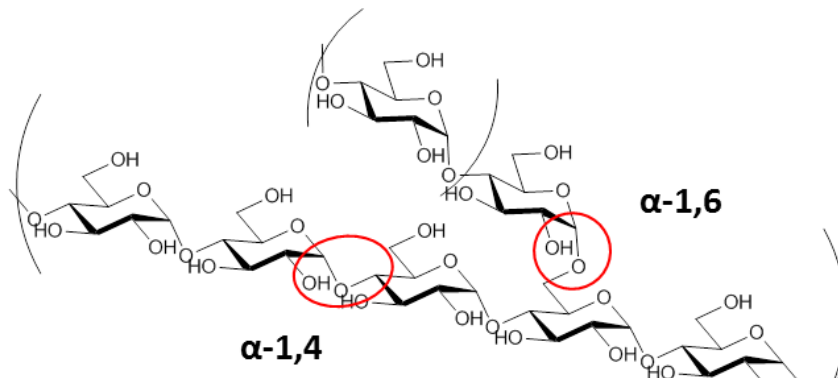
Από μελέτες διαπιστώθηκε ότι οι αλληλεπιδράσεις μεταξύ των μορίων της σακχαρόζης, του ιασμονικού και της κυτοκινίνης, σχετίζονται ισχυρά με την επαγωγή των γονιδίων που συμβάλουν στην βιοσύνθεση των ανθοκυανίνων. Αυτό υποδεικνύει ότι η σακχαρόζη συμβάλλει σημαντικά στην ρύθμιση της δραστηριότητας των παραγόντων που σχετίζονται με την βιοσύνθεση των ανθοκυανίνων (Shan et al., 2009), αλλά κυρίως αντανakλά την σπουδαία συνεργασία μεταξύ των σακχάρων και των φυτικών ορμονών για την αυξημένη συσσώρευση χρωστικών ανθοκυανίνων (Deikman and Hammer, 1995; Solfanelli et al., 2006; Weiss, 2000). Επιπρόσθετα, στην αραβίδωση βρέθηκε να υπάρχει ένα σηματοδοτικό δίκτυο επικοινωνίας μεταξύ ABA, JA, GA και σακχαρόζης, το οποίο συμβάλλει στην αυξημένη συσσώρευση των χρωστικών ανθοκυανίνων. Συνεπώς, η σακχαρόζη φαίνεται να αποτελεί το πρωτογενές και το αναγκαίο συστατικό για την λειτουργία αυτού του πολύπλοκου μεν αλλά και συνάμα σπουδαίου δικτύου μοριακής σηματοδότησης (Loreti et al., 2008).

Μεταλλαγές στην αραβίδωση οι οποίες οδήγησαν στην απώλεια της ευαισθησίας του φυτού στο αιθυλένιο, κατέδειξαν τον αρνητικό ρόλο που διαδραματίζει το ίδιο το αιθυλένιο στα σηματοδοτικά μονοπάτια της σακχαρόζης και της φρουκτόζης. Αυτό διαπιστώθηκε στα μεταλλαγμένα φυτά έπειτα από την εξωγενή χορήγηση σακχαρόζης, η οποία προκάλεσε μια αυξημένη συσσώρευση χρωστικών ανθοκυανίνων (Kwon et al., 2011).

Στον καπνό έχει βρεθεί ότι οι εφαρμογές με μόρια σακχαρόζης, φρουκτόζης και γλυκόζης, επάγουν μέσω μιας μοριακής σηματοδότησης την έκφραση των γονιδίων παθογένεσης *PR-Q* και *PR-I*, ανεξάρτητα όμως της δράσης του SA. Οι ερευνητές υποστήριξαν ότι αυτό το ανεξάρτητο από το SA μονοπάτι μοριακής σηματοδότησης, ενδεχόμενος να παίζει σημαντικό ρόλο κυρίως στις πρώιμες αλληλεπιδράσεις μεταξύ των φυτών και παθογόνων, προτού ακόμη τεθεί σε δράση το SA μέσω της SAR (Herbers et al., 1996).

1.5 Άμυλο ένας αποθηκευτικός πολυσακχαρίτης

Ο κυριότερος αποταμιευτικός πολυσακχαρίτης των φυτών είναι το άμυλο, το οποίο ανευρίσκεται στα περισσότερα τμήματα των φυτών, όπως βλαστοί, ρίζες, καρποί και σπέρματα (Αϊβαλάκης et al., 2005). Το άμυλο αποτελείται από κόκκους διαφόρων μεγεθών (2-170 nm) με χαρακτηριστικό συνήθως σχήμα. Ο κόκκος του αμύλου σε μικροσκοπική εξέταση, εμφανίζουν ευδιάκριτους ομοκεντρικούς αύλακες



Σχήμα 3 : Χημική δομή του αμύλου

γύρω από μια μελανή κηλίδα, το *hilum* (Samuelsson, 2015). Η σύνθεση του αμύλου πραγματοποιείται στο στρώμα του χλωροπλάστη και στους αμυλοπλάστες. Στο στρώμα του χλωροπλάστη, οι πρώτες ύλες για την σύνθεση του αμύλου είναι οι φωσφορικές τριόζες ενώ στους αμυλοπλάστες η σακχαρόζη (Αϊβαλάκης et al., 2005).

Το άμυλο αποτελεί μίγμα δύο πολυμερών γλυκόζης, της αμυλοπηκτίνης και της αμυλόζης. Λόγω του ότι το άμυλο υδρολύεται από διάφορες αμυλάσες σε μονάδες μαλτόζης (δισακχαρίτης γλυκόζης), θεωρείται η μαλτόζη ως η κύρια δομική μονάδα του αμύλου. Η αμυλόζη αποτελείται από μια ευθεία αλυσίδα 250-300 μονάδων D-γλυκόζης, οι οποίες είναι συνδεδεμένες μέσω α-1,4 (γλυκοζιτικών) δεσμών (Samuelsson, 2015). Η πολυσακχαριτική αλυσίδα της αμυλόζης διατάσσεται ελικοειδώς στον χώρο, φέροντας 6 μονάδες γλυκόζης σε κάθε βήμα της έλικας (Διαμαντίδης, 2010). Τα μόρια της αμυλοπηκτίνης περιέχουν πέραν των 1000 μονάδων γλυκόζης, συνδεδεμένων κυρίως μέσω α-1,4 δεσμών. Στην αμυλοπηκτίνη, σε κάθε 25-30 μόρια γλυκόζης, παρουσιάζονται διακλαδώσεις γλυκόζης συνδεδεμένες με α-1,6 δεσμούς. Οι δεσμοί 1,6 των μονάδων γλυκόζης της αμυλοπηκτίνης, ανέρχονται σε ποσοστό 4%. Στα διάφορα άμυλα ποικίλουν οι αναλογίες της αμυλόζης και της αμυλοπηκτίνης, συνήθως όμως η αμυλόζη ανέρχεται

σε ποσοστό 25 %, ενώ το υπόλοιπο είναι αμυλοπηκτική (Διαμαντίδης, 2010; Samuelsson, 2015).

Το άμυλο υδρολύεται ενζυμικά από τις αμυλάσες. Η β-αμυλάση απαντάται στα φυτά και απομονώνεται από σιτάρι, κριθάρι και γλυκοπατάτες. Το ένζυμο της β-αμυλάσης διασπά τους α-1,4 δεσμούς του αμύλου, απελευθερώνοντας μόρια μαλτόζης. Επιπρόσθετα, οι βακτηριακές και οι μυκητιακές α-αμυλάσες, υδρολύουν και αυτές τους εσωτερικούς δεσμούς α-1,4 του αμύλου, απελευθερώνοντας κυρίως μαλτοτριόζες και διακλαδισμένες μαλτοδεξτρίνες. Οι α-1,6 γλυκοζιτικοί δεσμοί του αμύλου, μπορούν να διασπαστούν με την ισοαμυλάση που απομονώνεται από τις ζύμες.

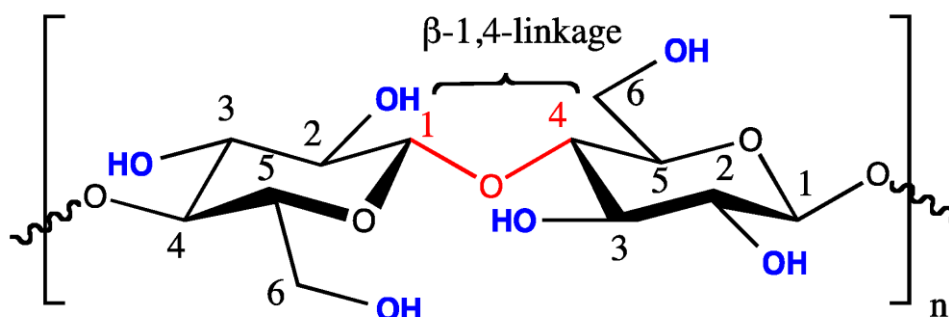
Το άμυλο είναι συνήθως αδιάλυτο στο κρύο νερό. Εάν το μίγμα αμύλου-νερού θερμανθεί στους 50-80 °C, σχηματίζεται μια πάστα η οποία με ψύξη μετατρέπεται σε πήκτη. Το διαλυτό άμυλο είναι προϊόν λαμβανόμενο κατά την ήπια υδρόλυση του αμύλου. Η μορφή αυτή με την προσθήκη ψυχρού νερού σχηματίζει ένα αδιαφανές διάλυμα (Samuelsson, 2015).

1.6 Κυτταρίνη ένας δομικός πολυσακχαρίτης

Η κυτταρίνη είναι ινώδους μορφής, δύσκαμπτο και αδιάλυτο στο νερό μακρομόριο. Απαντάται στα κυτταρικά τοιχώματα των φυτών και αποτελεί την κύρια μάζα σε κάθε ξυλώδες τμήμα του φυτού, καταλαμβάνοντας περίπου το 50 % της φυτικής μάζας (Διαμαντίδης, 2010). Τα μόρια της κυτταρίνης αποτελούνται από γραμμικές αλυσίδες μονάδων γλυκόζης (γλυκάνες) συνδεδεμένων με β-1,4 γλυκοζιτικούς δεσμούς.

Στα φυτικά κυτταρικά τοιχώματα, τα ινίδια της κυτταρίνης διατάσσονται σε πυκνή παραλληλία, συγκρατούμενα μεταξύ τους με δυνάμεις Van der Waals. Εκεί τα ινίδια της κυτταρίνης σχηματίζουν ένα σύνολο, ένα μυκήλιο διαμέτρου 6 nm και μήκους 75 nm. Τα μυκήλια σχηματίζουν με την σειρά τους μικροινίδια διαμέτρου 20-30 nm, τα οποία φέρουν κενά μεταξύ των ανεξάρτητων μυκηλιακών υφών. Όταν τα μικροινίδια συνδυάζονται σε δέσμες, καλούνται μακροινίδια. Μεταξύ των μακροινιδίων, υπάρχουν πλατιές δίοδοι 500-30 μm, οι οποίες είναι σημαντικές για την μεταφορά ουσιών χαμηλού μοριακού βάρους από το ένα κύτταρο στο άλλο (Samuelsson, 2015). Η διάταξη μικροινιδίων είναι τέτοια που καθιστά την κυτταρίνη αδιάλυτη, ισχυρή, σταθερή και πολύ ανθεκτική στην ενζυμική αποδόμηση. Η μεγάλη

αυστηρότητα με την οποία με την οποία διευθετούνται οι γλυκάνες στα μικροϊνίδια και η εκτεταμένη σύνδεση των γειτονικών γλυκάνων με μη ομοιοπολικούς δεσμούς, προσδίδει στην δομή αυτή την αντοχή σε εφελκυσμό (tensile strength), ισοδύναμη με εκείνη του χάλυβα (Taiz and Zeiger, 2013).



Σχήμα 4 : Χημική δομή κυτταρίνης

Υπεύθυνο ένζυμο για την σύνθεση της κυτταρίνης, είναι η συνθάση της κυτταρίνης, η οποία απαντάται ως διαμεμβρανιακή πρωτεΐνη στην κυτταροπλασματική μεμβράνη των φυτικών κυττάρων. Το ένζυμο αυτό συνδέει τις δομικές μονάδες της β-D γλυκόζης με β-1,4 γλυκοζιτικούς δεσμούς (Αϊβαλάκης et al., 2005).

1.7 Μελιτζάνα (*Solanum Melongena* L.)

Η μελιτζάνα ανήκει στην οικογένεια των σολανωδών (Solanaceae). Η αγγλική ονομασία της (eggplant) οφείλεται στους λευκούς καρπούς που σχημάτιζαν οι πρώτες ποικιλίες που καλλιεργηθήκαν στην Ευρώπη και οι οποίοι έμοιαζαν με αυγό κότας. Είναι δικοτυλήδονο φυτό με διπλοειδής $2n=24$ και πολυπλοειδείς ποικιλίες $3n=36$, $4n=48$ χρωμοσώματα (Ιμπραχίμ-Αβραάμ Χα and Πετρόπουλος, 2014). Καλλιεργείται για τους εδώδιμους καρπούς της οι οποίοι έχουν πικρή γεύση εξαιτίας των γλυκοαλκολοειδών (glycoalkaloids). Στο φυτό αποδίδονται ναρκωτικές, υπνωτικές και αντιρρευματικές ιδιότητες, ενώ τα φύλλα μπορεί να χρησιμοποιηθούν και ως υποκατάστατο του καπνού (Ιμπραχίμ-Αβραάμ Χα and Πετρόπουλος, 2014; Ολύμπιος, 2015).

Η μελιτζάνα θεωρείται ότι έχει δύο κέντρα καταγωγής τα οποία βρίσκονται και τα δύο στην Ασία, πρόκειται για την Κίνα και την Ινδία. Καλλιεργείται σε μεγάλες εκτάσεις στις χώρες της Μεσογείου αλλά και σε χώρες όπως η Ιαπωνία, Φιλιππίνες,

Ινδία, Κίνα, Αίγυπτος και Ιράν. Στην Ελλάδα εισήχθη περίπου τον 16^ο αιώνα. Το 2009 η παγκόσμια παραγωγή μελιτζάνας ανήρθε στους 43.103.633 τόνους, με την καλλιεργούμενη έκταση να αγγίζει τα 16.763.130 στρέμματα (Ιμπραχίμ-Αβραάμ Χα and Πετρόπουλος, 2014).

Η μελιτζάνα είναι φυτό θερμής εποχής και απαιτεί υψηλές θερμοκρασίες και άφθονο φωτισμό. Στην Ελλάδα καλλιεργείται ως υπαίθριο κηπευτικό την περίοδο άνοιξη-καλοκαίρι-φθινόπωρο, ενώ στα θερμοκήπια φθινόπωρο-χειμώνα-άνοιξη (Ολύμπιος, 2015). Θερμοκρασίες άνω των 40 °C και κάτω των 20 °C, μειώνουν τις αποδόσεις, καθώς εμποδίζεται ο σχηματισμός των καρπών. Η ανάπτυξη του φυτού σταματάει σε θερμοκρασίες κάτω των 10-12 °C (Ιμπραχίμ-Αβραάμ Χα and Πετρόπουλος, 2014). Για την επίτευξη υψηλών αποδόσεων, συνίστανται μέσης σύστασης εδάφη, καλά αποστραγγισμένα, με πλούσια οργανική ύλη και γόνιμα. Ιδανικό pH εδάφους 5,5-7,2, απαλλαγμένο από υψηλά άλατα (Ιμπραχίμ-Αβραάμ Χα and Πετρόπουλος, 2014). Τέλος, για την αποτελεσματική αντιμετώπιση των παθογόνων του εδάφους, απαιτείται η ένταξη της καλλιέργειας σε πρόγραμμα αμειψισποράς 3-4 χρόνων (Ολύμπιος, 2015).

Ποικιλίες και υβρίδια μελιτζάνας (Ολύμπιος, 2015)

1. Κοινές ποικιλίες μελιτζάνας : **Black Beauty, Long Purple, Black Magic κ.α.**
2. Ντόπιες ποικιλίες : **Άργους, Σύρου, Τσακώνικη, Λαγκαδά, Ακανθούς (Κύπρος), λευκή ωσειδής της Σαντορίνης κ.α.**
3. Υβρίδια τύπου φλάσκα : **Murena F₁, Crystal F₁, Moncharcha, Marlona F₁, Galine F₁, Ecavi F₁, Giza F₁, Boica F₁, Delica F₁, Taska F₁, Vernal F₁ κ.α.**
4. Υβρίδια τύπου μακριές : **Nilo F₁, Black slender F₁, Scarlatti, F₁, Angela F₁, Lydia F₁ κ.α.**
5. Άλλες ποικιλίες (Ελλάδα) : **Goliath F₁, Caprice F₁, Anchora F₁, Vernica, Lato Bicolore κ.α.**

Κυριότεροι εχθροί και ασθένειες της μελιτζάνας (Ολύμπιος, 2015)

A. Μυκητολογικές ασθένειες :

- Βερτισιλλίωση : *Verticillium dahliae*, *V.albo-atrum*
- Ριζοκτόνια : *Rhizoctonia solani*
- Σκληρωτινίαση : *Sclerotinia sclerotiorum*
- Βοτρύτης : *Botrytis cinerea*
- Φυτόφθορα : *Phytophthora parasitica*
- Ωίδιο : *Eryshipe polyphaga*
- Ανθράκωση : *Colletotrichum melongenae* και *C.coccodes*
- Κερκόσπορα : *Cercospora melongenae*
- Φουζαρίωση : *Fusarium oxysporum f.sp.melongenae*
- Αλτερναρίωση : *Alternaria melongenae*, *A. solani*
- Φόμοψις : *Phomopsis vegans*

B. Ιολογικές ασθένειες :

- Μωσαϊκό της τομάτας **TMV**
- Μωσαϊκό του αγγουριού **CMV**
- Ίωση της μελιτζάνας **MBV**

Γ. Προσβολές από έντομα :

- Τετράνυχος : *Tetranychus urticae*
- Αλευρώδεις : *Bemesia tabaci* ή *Trialeurodes vaporariorum*
- Αφίδες (μελίγκρες) : *Aphis gossypii*, *Myzus persicae*
- Φυλλορύκτες : *Liriomyza trifoliae*, *L. bryoniae*
- Θρίπες : *Thrips tabaci*, *Frankliniella occidentalis*
- Φυλλοφάγα έντομα : *Spotoptera littoralis*, *S. exigua*, *Heliothis armigera*
- Νηματώδεις : *Meloidogyne spp.*, *Platylenchys spp.*

☞ **Εικόνα 3** : Συμπτώματα βερτισιλλίωσης στο φύλλωμα φυτού μελιτζάνας. Η μελιτζάνα είναι ιδιαίτερα ευπαθής στο μύκητα *Verticillium*.



1.8 Σκοπός της παρούσας διπλωματικής εργασίας

Ο μύκητας *Verticillium dahliae*, κατατάσσεται στους σημαντικότερους φυτοπαθογόνους μύκητες που προκαλούν αδρομυκώσεις. Παρασιτεί μεγάλο αριθμό ξενιστών (>200), και επιβιώνει για μεγάλο χρονικό διάστημα στο έδαφος, ακόμη και στην απουσία κάποιου φυτού ξενιστή. Η παγκόσμια εξάπλωση του μύκητα *V. dahliae*, σε συνδυασμό με την αναποτελεσματική δράση των χημικών μέσων που έχουν εφαρμοστεί μέχρι στιγμής, τον καθιστούν ως ένα από τα πιο καταστροφικά φυτοπαθογόνα παγκοσμίως. Η αμειψισπορά, η ηλιοαπολύμανση και η χρήση ανθεκτικών ποικιλιών, είναι τα κυριότερα καλλιεργητικά μέτρα που εφαρμόζονται για την αντιμετώπιση του μύκητα *V. dahliae*. Τις τελευταίες όμως δεκαετίες, η έρευνα γύρω από την ασθένεια εστιάζει και στην βιολογική αντιμετώπιση του φυτοπαθογόνου. Συγκεκριμένα, έχουν γίνει αρκετές προσπάθειες για την εξεύρεση νέων ωφέλιμων ανταγωνιστικών για τον μύκητα μικροοργανισμών, αλλά και φυσικών μορίων-διεγερτών της φυτικής αμύνης. Οι ωφέλιμοι μικροοργανισμοί δύναται να καταστέλλουν το παθογόνο, είτε άμεσα μέσω του ανταγωνισμού τους για θέση και θρέψη στην περιοχή της ριζόσφαιρας, είτε έμμεσα προάγοντας την ανάπτυξη και διεγείροντας τους λανθάνοντες μηχανισμούς αντοχής των φυτών. Στους σημαντικότερους διεγέρτες της φυτικής αμύνης, συμπεριλαμβάνονται τα συντηρημένα μοτίβα μορίων μικροβιακής και φυτικής προελεύσεως, καθώς και απλούστερες οργανικές ή ανόργανες ενώσεις. Τα τελευταία χρόνια έχει αυξηθεί το ερευνητικό ενδιαφέρον γύρω από τους υδατάνθρακες, και πιο συγκεκριμένα για την αποσαφήνιση του ρόλου που διαδραματίζουν στην άμυνα των φυτών, αλλά και του τρόπου αξιοποίησής τους με σκοπό τον βιολογική αντιμετώπιση των φυτοπαθογόνων.

Σε αυτό το πλαίσιο, δηλαδή της εξεύρεσης νέων βιολογικών παραγόντων με σκοπό την αντιμετώπιση του μύκητα *V. dahliae*, κινείται και η παρούσα διπλωματική εργασία, καθώς διερευνήθηκε ο ρόλος που μπορεί να διαδραματίσει το άμυλο και η κυτταρίνη στην βιολογική αντιμετώπιση του μύκητα *V. dahliae*. Για να μελετηθεί αυτό, πραγματοποιήθηκαν δοκιμές παθογένειας σε φυτάρια μελιτζάνας, στα οποία χορηγήθηκε το άμυλο και η κυτταρίνη προτού της μόλυνσης με τον εδαφοπαθογόνο μύκητα *V. dahliae*. Μέσω συγκεκριμένων πειραματικών μεταχειρίσεων, εξετάστηκε τόσο η άμεση όσο και η έμμεση επίδραση των δύο σακχάρων στην παθογένεια του μύκητα *V. dahliae*, ενώ μελετήθηκε και το βιοχημικό-μοριακό υπόβαθρο της

αλληλεπίδρασης, μέσω του προσδιορισμό των επιπέδων έκφρασης των γονιδίων *PR-1* και *PR-4*.

2. Πειραματικό μέρος

2.1 Πρώτο πείραμα : Αξιολόγηση της επίδρασης του άμυλου και της κυτταρίνης στην παθογένεια του μύκητα *V. dahliae*

2.1.1 Σκοπός του πρώτου πειράματος

Ο σκοπός του πρώτου πειράματος ήταν να εξεταστεί σε φυτάρια μελιτζάνας η επίδραση του άμυλου και της κυτταρίνης στην παθογένεια του μύκητα *V. dahliae* και το βιοχημικό-μοριακό υπόβαθρο της αλληλεπίδρασης.

2.1.2 Μεταχειρίσεις πρώτου πειράματος

Στο πρώτο πείραμα εφαρμόστηκαν δύο πειραματικές μεταχειρίσεις. Στην πρώτη μεταχείριση, χορηγήθηκε άμυλο ή κυτταρίνη σε ολόκληρο το ριζικό (whole root) σύστημα των φυταρίων της μελιτζάνας, και ακολούθησε η μόλυνση τους με τον μύκητα *V. dahliae*. Αντίθετα, στην δεύτερη μεταχείριση, διαχωρίστηκε το ριζικό σύστημα (split root) των φυταρίων της μελιτζάνας σε δύο ξεχωριστά φυτοδοχεία, όπου στο ένα χορηγήθηκε το άμυλο ή η κυτταρίνη και στο άλλο ο μύκητας *V. dahliae*.

Η λογική της μεταχείρισης “split root” του πρώτου πειράματος, ήταν να εξεταστούν τα πιο κάτω υποθετικά σενάρια:

- α) Αν τα φυτά της μεταχείρισης “whole root” παρουσιάζουν ανθεκτικότητα στον μύκητα *V. dahliae*, και η ανθεκτικότητα εμφανίζεται και στα φυτά της μεταχείρισης “split root”, τότε το άμυλο και η κυτταρίνη λειτουργούν ως επαγωγείς της φυτικής άμυνας ή προσελκύουν μικροοργανισμούς στο ριζικό σύστημα των φυταρίων της μελιτζάνας που λειτουργούν ως επαγωγείς της φυτικής άμυνας..
- β) Αν τα φυτά της μεταχείρισης “whole root” παρουσιάζουν ανθεκτικότητα στον μύκητα *V. dahliae* και η ανθεκτικότητα δεν εμφανίζεται στα φυτά της μεταχείρισης “split root”, τότε το άμυλο και η κυτταρίνη έχουν άμεση επίδραση στο μύκητα *V.*

dahliae ή προσελκύουν μικροοργανισμούς στο ριζικό σύστημα των φυταρίων της μελιτζάνας, με αποτέλεσμα να παρεμποδίζεται η μόλυνση από τον μύκητα *V. dahliae*.

2.1.3 Οι εφαρμογές της μεταχείρισης “whole root”

Σε νεαρά φυτά μελιτζάνας που έφεραν 2-4 πραγματικά φύλλα, χορηγήθηκαν με ριζοπότισμα 10 ml υδατικού διαλύματος άμυλου ή κυτταρίνης, συγκέντρωσης 100 mM. Έπειτα, μετά από την παρέλευση 5 ημερών, ακολούθησε η μόλυνση τους με 10 ml αιωρήματος κονιδίων του εδαφοπαθογόνου μύκητα *V. dahliae*, σε συγκέντρωση 10^7 κονιδίων/ml.

Πίνακας 1α : Οι εφαρμογές της μεταχείρισης “whole root”	
Ομάδα φυτών	Εφαρμογή
1. <i>V. dahliae</i>	Φυτά τα οποία μολύνθηκαν με τον μύκητα <i>V. dahliae</i>
2. <i>V. dahliae</i> + Starch	Φυτά στα οποία χορηγήθηκε άμυλο 5 ημέρες πριν από την μόλυνση με τον μύκητα <i>V. dahliae</i>
3. <i>V. dahliae</i> + Cellulose	Φυτά στα οποία χορηγήθηκε κυτταρίνη 5 ημέρες πριν από την μόλυνση με τον μύκητα <i>V. dahliae</i>
4. Starch	Φυτά στα οποία χορηγήθηκε μόνο άμυλο
5. Cellulose	Φυτά στα οποία χορηγήθηκε μόνο κυτταρίνη
6. Φυτά μάρτυρες (Mock)	Φυτά χωρίς καμία επέμβαση

2.1.4 Οι εφαρμογές της μεταχείρισης “split root”

Σε νεαρά φυτά μελιτζάνας που έφεραν 2-4 πραγματικά φύλλα, πραγματοποιήθηκε ο διαχωρισμός του ριζικού συστήματος τους σε δύο ξεχωριστά φυτοδοχεία. Μετά από την παρέλευση 5 ημερών, στο ένα απτά δύο φυτοδοχεία του κάθε φυτού ξεχωριστά, χορηγήθηκαν με ριζοπότισμα 10 ml υδατικού διαλύματος άμυλου ή κυτταρίνης, συγκέντρωσης 100 mM. Στα υπόλοιπα φυτοδοχεία 5 ημέρες μετά από την εφαρμογή των σακχάρων, προστέθηκαν 10 ml αιωρήματος κονιδίων του μύκητα *V. dahliae*, σε συγκέντρωση 10^7 κονιδίων/ml.

Πίνακας 1β : Οι εφαρμογές της μεταχείρισης “split root”	
Ομάδα φυτών	Εφαρμογή
1. <i>V. dahliae</i>	Στο ένα μέρος του ριζικού συστήματος χορηγήθηκε ο μύκητας <i>V. dahliae</i>
2. <i>V. dahliae</i> + Starch	Στο ένα μέρος του ριζικού συστήματος χορηγήθηκε το άμυλο, ενώ στο άλλο ο μύκητας <i>V. dahliae</i>
3. <i>V. dahliae</i> + Cellulose	Στο ένα μέρος του ριζικού συστήματος χορηγήθηκε η κυτταρίνη, ενώ στο άλλο ο μύκητας <i>V. dahliae</i>
4. Φυτά μάρτυρες (Mock)	Φυτά χωρίς καμία επέμβαση

2.1.5 Μοριακές αναλύσεις

Για να μελετηθεί το βιοχημικό-μοριακό υπόβαθρο της αλληλεπίδρασης, πραγματοποιήθηκε ο προσδιορισμός των επιπέδων της έκφρασης των γονιδίων *PR-1* και *PR-4* της μελιτζάνας, στις 5 και 10 ημέρες μετά από την μόλυνση με τον μύκητα *V. dahliae*.

2.2 Δεύτερο πείραμα : Αξιολόγηση της επίδρασης του αμύλου και της κυτταρίνης στην παθογένεια του μύκητα *V. dahliae* σε αποστειρωμένο έδαφος.

2.2.1 Σκοπός του δεύτερου πειράματος

Ο σκοπός του δεύτερου πειράματος ήταν να διακριβωθεί κατά πόσον η παρουσία του αμύλου και της κυτταρίνης στο έδαφος, ευνοεί την ανάπτυξη μικροοργανισμών, οι οποίοι με την σειρά τους επάγουν τους μηχανισμούς ανοσοποίησης στα φυτάρια της μελιτζάνας.

2.2.2 Μεταχειρίσεις δεύτερου πειράματος

Στο δεύτερο πείραμα εφαρμόστηκαν ακριβώς οι ίδιες πειραματικές μεταχειρίσεις με το πρώτο πείραμα, με την μόνη διαφορά να έγκειται στο γεγονός ότι η ανάπτυξη των φυταρίων της μελιτζάνας έγινε σε αποστειρωμένο έδαφος. Για αυτό τον λόγο, προτού τη σπορά, πραγματοποιήθηκε η αποστείρωση του εδάφους σε κλίβανο στους 120 °C, πίεσης 1 atm για 30 λεπτά, για δύο φορές σε διάστημα 24 ωρών.

2.2.3 Οι εφαρμογές της μεταχείρισης “whole root”

Σε νεαρά φυτά μελιτζάνας που έφεραν 2-4 πραγματικά φύλλα, χορηγήθηκαν με ριζοπότισμα 10 ml υδατικού διαλύματος αμύλου ή κυτταρίνης, συγκέντρωσης 100 mM. Έπειτα, μετά από την παρέλευση 5 ημερών, ακολούθησε η μόλυνση τους με 10 ml αιωρήματος κονιδίων του εδαφοπαθογόνου μύκητα *V. dahliae*, σε συγκέντρωση 10^7 κονιδίων/ml.

Πίνακας 2α : Οι εφαρμογές της μεταχείρισης “whole root”	
Ομάδα φυτών	Εφαρμογή
1. <i>V. dahliae</i>	Φυτά τα οποία μολύνθηκαν με τον μύκητα <i>V. dahliae</i>
2. <i>V. dahliae</i> + Starch	Φυτά στα οποία χορηγήθηκε άμυλο 5 ημέρες πριν από την μόλυνση με τον μύκητα <i>V. dahliae</i>
3. <i>V. dahliae</i> + Cellulose	Φυτά στα οποία χορηγήθηκε κυτταρίνη 5 ημέρες πριν από την μόλυνση με τον μύκητα <i>V. dahliae</i>
4. Starch	Φυτά στα οποία χορηγήθηκε μόνο άμυλο
5. Cellulose	Φυτά στα οποία χορηγήθηκε μόνο κυτταρίνη
6. Φυτά μάρτυρες (Mock)	Φυτά χωρίς καμία επέμβαση

2.2.4 Οι εφαρμογές της μεταχείρισης “split root”

Σε νεαρά φυτά μελιτζάνας που έφεραν 2-4 πραγματικά φύλλα, πραγματοποιήθηκε ο διαχωρισμός του ριζικού τους συστήματος σε δύο ξεχωριστά φυτοδοχεία. Μετά από την παρέλευση 5 ημερών, στο ένα απτά δύο φυτοδοχεία του κάθε φυτού ξεχωριστά, χορηγήθηκαν με ριζοπότισμα 10 ml άμυλου ή κυτταρίνης σε συγκεντρώσεις 100 mM. Στα υπόλοιπα φυτοδοχεία 5 ημέρες μετά από την χορήγηση των δύο σακχάρων, προστέθηκαν 10 ml αιωρήματος κονιδίων του εδαφοπαθογόνου μύκητα *V. dahliae*, σε συγκέντρωση 10^7 κονιδίων/ml.

Πίνακας 2β : Οι εφαρμογές της μεταχείρισης “split root”	
Ομάδα φυτών	Εφαρμογή
1. <i>V. dahliae</i>	Στο ένα μέρος του ριζικού συστήματος χορηγήθηκε ο μύκητας <i>V. dahliae</i>
2. <i>V. dahliae</i> + Starch	Στο ένα μέρος του ριζικού συστήματος χορηγήθηκε το άμυλο, ενώ στο άλλο ο μύκητας <i>V. dahliae</i>
3. <i>V. dahliae</i> + Cellulose	Στο ένα μέρος του ριζικού χορηγήθηκε η κυτταρίνη, ενώ στο άλλο ο μύκητας <i>V. dahliae</i>
4. Φυτά μάρτυρες (Mock)	Φυτά χωρίς καμία επέμβαση

2.2.5 Μοριακές αναλύσεις

Για να μελετηθεί το βιοχημικό-μοριακό υπόβαθρο της αλληλεπίδρασης, πραγματοποιήθηκε ο προσδιορισμός των επιπέδων της έκφρασης των γονιδίων *PR-1* και *PR-4* της μελιτζάνας, στις 5 και 10 ημέρες μετά την μόλυνση με τον μύκητα *V. dahliae*.

2.3 Υλικά και Μέθοδοι

2.3.1 Φυτικό υλικό

Στην παρούσα διπλωματική εργασία χρησιμοποιήθηκαν φυτάρια μελιτζάνας, ποικιλίας “Black Beauty”. Για την ανάπτυξη τους χρησιμοποιήθηκαν τα πιο κάτω υλικά :

- 1- Φυτοδοχεία : γλαστράκια σποράς 7x7x6
- 2- Σπόροι : μελιτζάνας ποικιλία “Black Beauty”
- 3- Φυτόχωμα : pH 5,5-6,5

2.3.2 Θρεπτικά υποστρώματα ανάπτυξης

2.3.2.1 Εκχύλισμα πατάτας με δεξτρόζη και άγαρ (Patato Dextrose Agar-PDA)

Για την παρασκευή 1 L θρεπτικού PDA απαιτούνται :		
	Υλικά	Ποσότητα
1.	Εκχύλισμα πατάτας	200 g
2.	Δεξτρόζη	20 g
3.	Άγαρ	20 g
4.	H ₂ O	1 L

Σε μία κωνική φιάλη που περιέχει 500 ml απιονισμένο νερό, προστίθενται κύβοι πατάτας διαμέτρου 0,5 cm και ζεματίζονται σε μπέν μαρί για 45 λεπτά. Παράλληλα, 20 g άγαρ προστίθενται σε κωνική φιάλη με 500 ml απιονισμένο νερό και βράζουν σε μπεν μαρί μέχρι να λιώσει καλά το άγαρ. Το εκχύλισμα της πατάτας φιλτράρεται σε τουλπάνι και προστίθεται το λιωμένο άγαρ και 20 g γλυκόζης. Το διάλυμα ογκομετρείται και προστίθεται απιονισμένο νερό μέχρι τον τελικό όγκο του 1 L. Έπειτα πραγματοποιείται ομογενοποίηση του διαλύματος με την χρήση μαγνητικού αναδευτήρα και αποστειρώνεται σε κλίβανο στους 120 C, πίεσης 1 atm για 20 λεπτά.

2.3.2.2 Διάλυμα σουκρόζης και νιτρικού νατρίου (Sucrose Sodium Nitrate-SSN)

Για την παρασκευή 1 L θρεπτικού διαλύματος SSN απαιτούνται :		
	Υλικά	Ποσότητα
1.	Σουκρόζη	15 g
2.	NaNO ₃	2 g
3.	KH ₂ PO ₄	1 g
4.	MgSO ₄ 7H ₂ O	0.5 g
5.	KCl	0.5 g
6.	Διάλυμα ιχνοστοιχείων	1 ml
7.	H ₂ O	1 L
**		

Για την παρασκευή 100 ml διαλύματος ιχνοστοιχείων (trace elements) απαιτούνται :		
	Υλικά	Ποσότητα
1.	FeSO ₄ 7H ₂ O	249 mg
2.	CuSO ₄ 5H ₂ O	40 mg
3.	ZnSO ₄ 7H ₂ O	44 mg
4.	MnSO ₄ 4H ₂ O	41mg
5.	Na ₂ Mo 2H ₂ O	51 mg
6.	H ₂ O	100 ml

**Μετά την ανάμειξη των υλικών ακολουθεί αποστείρωση στον κλίβανο στους 120 °C, πίεσης 1 atm για 20 λεπτά.

2.3.3 Παρασκευή υδατικού αιωρήματος αμύλου και κυτταρίνης

Στα φυτάρια μελιτζάνας χορηγήθηκαν με ριζοπότισμα 10 ml αμύλου ή κυτταρίνης συγκέντρωσης 100 mM. Το άμυλο και η κυτταρίνη έχουν περίπου το ίδιο μοριακό βάρος (162.1406 g/mol). Προκειμένου όμως να χορηγηθεί στα φυτά μια ισόποση συγκέντρωση (100 mM) και από τα δύο σάκχαρα, διαλυτοποιήθηκαν 8,105g σκόνης αμύλου ή κυτταρίνης σε 500 ml νερού. Κατά την χορήγηση των σακχάρων τα αιωρήματα αμύλου και κυτταρίνης αναδεύονταν συνεχώς, προκειμένου να είναι όσο το δυνατόν πιο ομοιογενή λόγω της κακής διαλυτότητας τους στο νερό.

2.3.4 Καλλιέργεια και προετοιμασία του παθογόνου μολύσματος

- 1- Σε τρυβλία με θρεπτικό υπόστρωμα PDA, πραγματοποιείται υπό ασηπτικές συνθήκες η μεταφορά ενός ή δύο κεραμικών χαντρών που περιείχαν το μύκητα *V. dahliae* και φυλάσσονταν στους -80 °C.
- 2- Τα τρυβλία επωάστηκαν σε θερμοκρασία δωματίου 20-25 °C.
- 3- Όταν η επιφάνεια του τρυβλίου καλύφθηκε σε μεγάλο βαθμό από το βερτισίλλιο, τότε μικρά κομμάτια του μυκηλίου μεταφέρονται υπό ασηπτικές συνθήκες στις κωνικές φιάλες που περιείχαν το θρεπτικό υγρό SSN.
- 4- Οι κωνικές φιάλες τοποθετήθηκαν σε ανακινούμενο επωαστικό θάλαμο (orbital shaker), θερμοκρασίας 25 °C και με ταχύτητα ανάδευσης 100 στροφές/λεπτό.
- 5- Μετά από 5 ημέρες, οι κωνικές φιάλες με τον μύκητα *V. dahliae* σχημάτισαν αιώρημα κονιδίων μαζί με μυκήλιο.

2.3.5 Υπολογισμός της συγκέντρωσης του μολύσματος (κονίδια/ml)

- 1- Το αιώρημα των κονιδίων μεταφέρθηκε μετά από φιλτράρισμα σε ποτήρι ζέσεως, το οποίο είχε τοποθετηθεί επί μαγνητικού αναδευτήρα έτσι ώστε να επιτευχθεί ομοιόμορφη κατανομή των κονιδίων στο αιώρημα.
- 2- Από το αιώρημα έγινε παραλαβή 1 ml και ακολούθως μεταφέρθηκε σε σωλήνα Falcon που περιείχε 9 ml νερό για να γίνει η πρώτη δεκαδική αραιώση. Ακολούθησε ανάδευση, και στην συνέχεια πραγματοποιήθηκε η δεύτερη δεκαδική αραιώση του αιωρήματος σε νέο σωλήνα Falcon.
- 3- Τοποθέτηση μιας σταγόνας 25 μl από την δεύτερη δεκαδική αραιώση σε ειδική αντικειμενοφόρο πλάκα μέτρησης των κονιδίων (κυτταρόμετρο). Η μέτρηση των κονιδίων στα τετραγώνια του κυτταρόμετρου έγινε με μικροσκόπιο Carl Zeiss.
- 4- Ο υπολογισμός των κονιδίων / ml του μύκητα *V. dahliae*, πραγματοποιήθηκε χρησιμοποιώντας τον εξής τύπο :
$$\frac{\text{Αριθμός κονιδίων σε } \chi \text{ τετράγωνα}}{\text{Αριθμός τετραγώνων } (\chi)} \times 4 \cdot 10^6$$
- 5- Η τιμή που βρέθηκε από τον παραπάνω τύπο πολλαπλασιάζεται επί 10^2 για να υπολογιστούν τα κονίδια / ml στο αιώρημα πριν τις δύο δεκαδικές αραιώσεις.
- 6- Μέσω του τύπου της αραιώσης $C_1 \cdot V_x = C_2 \cdot V_2$, υπολογίστηκαν τα ml του αρχικού διαλύματος (V_x) που πρέπει να προστεθούν έτσι ώστε στο τελικό όγκο V_2 η συγκέντρωση των κονιδίων / ml να είναι 10^7 . Ο τελικός όγκος V_2 θα χρησιμοποιηθεί για την μόλυνση των φυτών.

- 7- Ο όγκος του νερού που πρέπει να προστεθεί έτσι ώστε να έχω το τελικό όγκο (V_2) βρέθηκε με την αφαίρεση του αρχικού όγκου (V_x).

2.3.6 Μόλυνση φυτών με τον μύκητα *V. dahliae*

Η μόλυνση πραγματοποιήθηκε όταν τα φυτάρια μελιτζάνας έφεραν 2-4 πραγματικά φύλλα. Με τη χρήση σύριγγας, χορηγήθηκε εξωγενώς σε κάθε φυτό ξεχωριστά, 10 ml από το αραιωμένο υγρό μόλυσμα του μύκητα *V. dahliae*.

2.3.7 Καταμέτρηση των συμπτωμάτων της ασθένειας

Η καταγραφή των συμπτωμάτων της ασθένειας για το πρώτο πείραμα, διήρκησε από την 14^η έως την 22^η ημέρα από την μόλυνση με τον μύκητα *V. dahliae*. Αντίθετα, για το δεύτερο πείραμα, οι μετρήσεις των συμπτωμάτων της ασθένειας διενεργήθηκαν από την 13^η έως την 35^η ημέρα της μόλυνσης. Κατά την καταγραφή των συμπτωμάτων της ασθένειας, σημειωνόταν για κάθε φυτό ξεχωριστά, ο αριθμός των ασθενών φύλλων προς στο σύνολο των πραγματικών φύλλων.

2.3.8 Υπολογισμός του σχετικού εμβαδού ασθενείας (relative AUDPC)

Στο πρώτο και στο δεύτερο πείραμα, το εμβαδόν ασθενείας (Area Under Disease Progress Curve, AUDPC), υπολογίστηκε με βάση το άθροισμα των εμβαδών των τραπεζιών που σχηματίζονται κάτω από την καμπύλη εξέλιξης των συμπτωμάτων της ασθένειας. Προκειμένου να εκφραστεί το εμβαδόν ασθενείας σε ποσοστό επί της εκατό της μέγιστης τιμής AUDPC, διαιρέθηκε με το μέγιστο εμβαδόν ασθενείας στο σύνολο των ημερών που διήρκησε η καταγραφή των συμπτωμάτων της ασθένειας. Στην προκειμένη περίπτωση, ήταν 2200 και 3500 για το πρώτο και δεύτερο πείραμα αντίστοιχα. Ακολούθως, οι τιμές αυτές πολλαπλασιάστηκαν επί της εκατό, υπολογίζοντας έτσι το σχετικό ποσοστό ασθενείας (relative AUDPC). Στις τιμές του σχετικού εμβαδού ασθενείας εφαρμόστηκε ανάλυση διασποράς (ANOVA). Στην παρούσα μελέτη εφαρμόστηκε ο έλεγχος ελάχιστης σημαντικής διαφοράς του Fisher ($p \leq 0.05$).

2.3.9 Προσδιορισμός των επιπέδων έκφρασης των γονιδίων *PR-1* και *PR-4*

2.3.9.1 Συλλογή φυτικών δειγμάτων

Τα δείγματα που χρησιμοποιήθηκαν για τον προσδιορισμό της έκφρασης των γονιδίων *PR-1* και *PR-4*, συλλέχθηκαν την 5^η και την 10^η ημέρα μετά από την μόλυνση με τον μύκητα *V. dahliae*. Από 5-6 φυτά της κάθε εφαρμογής, αφαιρέθηκαν με την βοήθεια του ψαλιδιού τμήματα του ελάσματος των φύλλων. Τα δείγματα μετά την συλλογή τους τοποθετήθηκαν σε υγρό άζωτο, προκειμένου να παραμείνει αναλλοίωτο το περιεχόμενο των φυτικών κύτταρων κατά την διαδικασία της συλλογής και της μεταφοράς τους από το θερμοκήπιο στο εργαστήριο.

2.3.9.2 Απομόνωση RNA

Για την απομόνωση του RNA των δειγμάτων εφαρμόστηκε το πρωτόκολλο PMI (Zipfel Lab), το οποίο μετά από κατάλληλες τροποποιήσεις ήταν το εξής :

- 1- Κονιορτοποίηση των δειγμάτων σε πορσελάνινο γουδί με υγρό άζωτο μέχρι να μετατραπεί σε πούδρα και μεταφορά 100mg σε σωληνάρια τύπου eppendorf.
- 2- Προσθήκη 300μl του Cell lysis solution και ανάμειξη (vortex) τουλάχιστον 20 δευτερόλεπτα και επώαση σε θερμοκρασία δωματίου για 5 λεπτά.
- 3- Προσθήκη 100 μl προψυγμένου στον πάγο διαλύματος protein-DNA precipitation και τοποθέτηση στον πάγο (4°C) για 10 λεπτά.
- 4- Φυγοκέντρηση στις 13.000 rpm για 15 λεπτά στους 4°C.
- 5- Μεταφορά υπερκείμενου (300μl) σε καινούργιο eppendorf. Σε περίπτωση που το υπερκείμενο δεν είναι τόσο καθαρό, τότε πραγματοποιείται εκ νέου φυγοκέντρηση στις 13.000 rpm για 5 λεπτά και μεταφορά του σε καινούργιο eppendorf.
- 6- Προσθήκη 300 μl (ίσης με το υπερκείμενο) ισοπροπανόλης και ομογενοποίηση ανακινώντας ελαφρά το eppendorf.
- 7- Φυγοκέντρηση στις 13.000 rpm για 15 λεπτά στους 4°C.
- 8- Απομάκρυνση υπερκείμενου και πλύσιμο ιζήματος με 300 μl αιθανόλης 70%.
- 9- Φυγοκέντρηση στις 13.000 rpm για 1 λεπτό στους 4°C.
- 10- Απομάκρυνση του υπερκείμενου.
- 11- Ενωρηματοποίηση του ιζήματος σε 25 μl απιονισμένου νερού απαλλαγμένου από RNA-ασες.

2.3.9.3 Προσδιορισμός της συγκέντρωσης του RNA

Μετά την απομόνωση του RNA, μετρήθηκε η συγκέντρωση και η καθαρότητα του RNA των δειγμάτων σε NanoDrop φασματοφωτόμετρο. Αφότου προσδιορίστηκαν οι συγκεντρώσεις ($C_{ng/\mu l}$) του RNA για κάθε δείγμα ξεχωριστά, τα δείγματα αραιώθηκαν έτσι ώστε η τελική συγκέντρωση του RNA να είναι $500_{ng/\mu l}$. Σύμφωνα με τον τύπο της αραιώσης $C_1 \cdot V_1 = C_2 \cdot V_2$, ο όγκος του RNA που πρέπει να αραιωθεί υπολογίστηκε από την διαίρεση $500 / C_{ng/\mu l}$. Ακολούθως, έγινε προσθήκη νερού απαλλαγμένου από RNA-ασες μέχρι τον τελικό όγκο (V_2) των 7 μl .

2.3.9.4 Εφαρμογή DNAase

Προκειμένου να καταστραφούν τα εναπομείναντα μόρια DNA στα δείγματα ακολουθήθηκαν τα εξής βήματα :

- 1- Προσθήκη 1 μl DNase I.
- 2- Προσθήκη 3 μl DNase buffer.
- 3- Προσθήκη 0,5 μl EDTA.
- 4- Υδατόλουτρο στους 75 °C για 10 λεπτά (απενεργοποίηση DNase).

2.3.9.5 Εφαρμογή αντίστροφης μεταγραφάσης

Για την μετατροπή του RNA σε cDNA χρησιμοποιήθηκε το Prime Script™ RT reagent kit της εταιρείας TakaRa. Σε κάθε δείγμα RNA (7 μl), τοποθετήθηκαν τα εξής αντιδραστήρια :

- 1- 2 μl ρυθμιστικού διαλύματος (5x prime script buffer).
- 2- 0.5 μl αντίστροφης μεταγραφάσης (prime script RT enzyme).
- 3- 0.5 μl ολιγονουκλεοτιδίων θυμίνης (oligo dT).

Για την μετατροπή του mRNA σε cDNA σε μηχανήμα PCR ακολουθήθηκαν τα εξής βήματα :

- 1- Επώαση των δειγμάτων σε υδατόλουτρο στους 37 °C για 15 λεπτά. Στο στάδιο αυτό τα ολιγονουκλεοτίδια της θυμίνης υβριδίζουν με την ουρά πολυαδενίνης (poly-A) του mRNA, και αρχίζει η επιμήκυνση της αλυσίδας.
- 2- Τοποθέτηση των δειγμάτων στους 85 °C για 5 δευτερόλεπτα προκειμένου να τερματιστεί η αντίδραση (απενεργοποίηση RT).

2.3.9.6 Εφαρμογή της Real-time PCR

Ζεύγη εκκινητών	
Γονίδιο στόχος	Ζεύγος εκκινητών
PR1	F: GCCGTGAAGATGTGGGTCGA R: GCACATCCAAGTACGTACCGAGTT
PR4	F: GGACCGCTTTCTGTGGCCCCG R: ATAAGGTGGCCTTGCTGGTAGCC
Actin	F: TCCGTTGCCAGAGGTCCT R: TTCCGTTGCCAGAGGTCCT

Αντιδραστήρια RT-PCR		
Αντιδραστήρια	Όγκος	Τελική συγκέντρωση
KARA SYBR Fast Universal qPCR Master Mix	5 μ l	
Forward primer	0.16 μ l	
Reverse primer	0.16 μ l	
cDNA (template)	1 μ l	50 ng/ml
RNase free HO ₂	3.68 μ l	
Τελικός όγκος	10 μ l	

Πρόγραμμα θερμοκρασιών RT-PCR			
Στάδιο	Θερμοκρασία	Χρόνος	Αποτέλεσμα
Holding Stage	95 °C	2 min	Ενεργοποίηση της HotStarTaq DNA πολυμεράσης
Cycling stage (40 cycles)	95 °C	5 sec	Αποδιάταξη DNA
	60 °C	30 sec	Υβριδισμός εκκινητών/επιμήκυνση αλυσίδας
Melt Curve Stage	95 °C	15 sec	Δημιουργία καμπύλης διαχωρισμού των προϊόντων της RT-PCR
	60 °C	1 min	
	95 °C	15 sec	

Για την ανάλυση των αποτελεσμάτων υπολογίστηκε η τιμή του μέσου όρου του κύκλου αναφορά (Ct) για το υπό εξέταση γονίδιο με βάση τρία ανεξάρτητα βιολογικά δείγματα.

2.3.9.7 Διαλύματα εξαγωγής RNA

Διάλυμα Cell lysis solution (10 ml)			
	Υλικά	Όγκος	Τελική συγκέντρωση
1.	10% SDS	2 ml	2%
2.	0.5 M sodium citrate	1.36 ml	68 mM
3.	1 M citrid acid	1.32 ml	132mM
4.	0.5 M EDTA	20 μ l	1 mM

Το pH του διαλύματος θα πρέπει να είναι 4-4,5 για να απενεργοποιείται η δράση των RNA-ασων. Μετά την ανάμιξη όλων των συστατικών του διαλύματος, ακολούθησε η αποστείρωση στους 120 °C για 15 λεπτά.

Διάλυμα Protein-DNA precipitation solution (10 ml)			
	Υλικά	Όγκος	Τελική συγκέντρωση
1.	5 M NaCl	8 ml	4 M
2.	0.5 M sodium citrate	320 μ l	16 mM
3.	1 M citrid acid	320 μ l	32 mM
4.	0.5 M EDTA	20 μ l	1mM

Μετά την ανάμιξη όλων των συστατικών, το τελικό διάλυμα αποστειρώθηκε σε κλίβανο στους 120 °C για 15 λεπτά, πίεσης 1 atm.

3. Αποτελέσματα

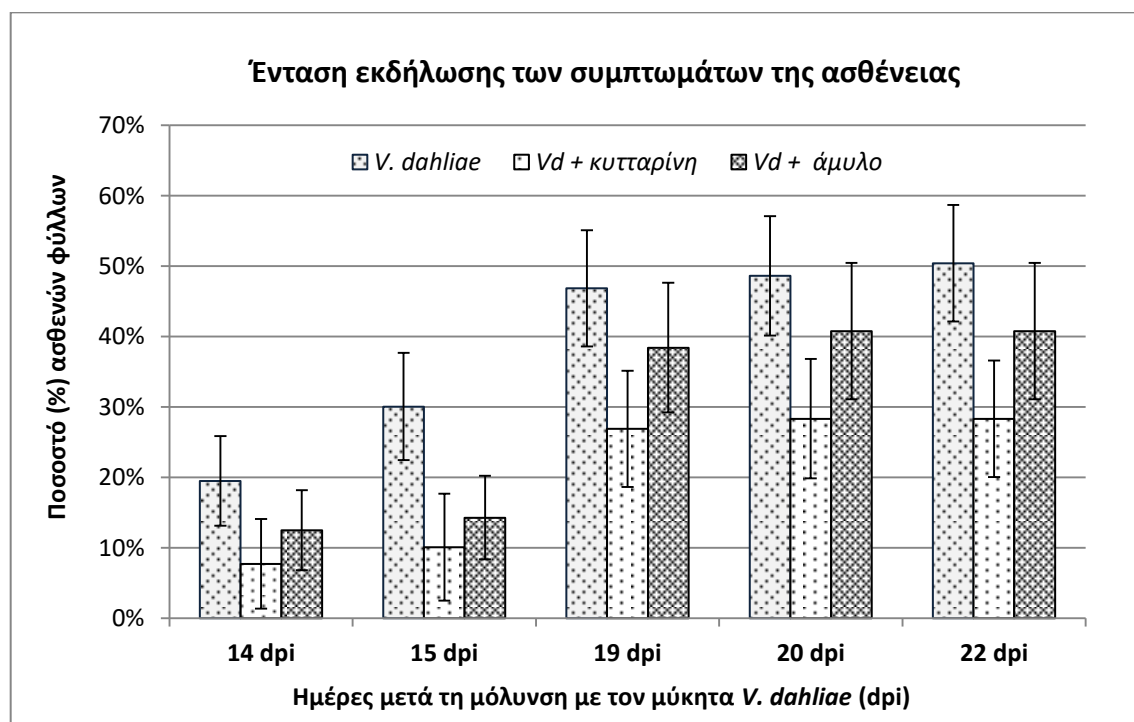
3.1 Αποτελέσματα πρώτου πειράματος

3.1.1 Αξιολόγηση της επίδραση του αμύλου και της κυτταρίνης στην παθογένεια του μύκητα *V. dahliae*

Για να διερευνηθεί η ικανότητα επιρροής του αμύλου και της κυτταρίνης στην μολυσματικότητα του μύκητα *V. dahliae*, πραγματοποιήθηκε αναλυτική καταγραφή των συμπτωμάτων της ασθένειας στα φυτάρια της μελιτζάνας, από την 14^η έως την 22^η ημέρα της μόλυνσης με τον μύκητα *V. dahliae*.

3.1.1.1 Ένταση εκδήλωσης των συμπτωμάτων της ασθένειας

Το γράφημα 3.1.1.1, απεικονίζει την εξέλιξη των συμπτωμάτων της ασθένειας στην μεταχείριση όπου δεν πραγματοποιήθηκε διαχωρισμός του ριζικού συστήματος σε δύο μέρη από την 14^η έως την 22^η ημέρα της μόλυνσης με τον μύκητα *V. dahliae*.

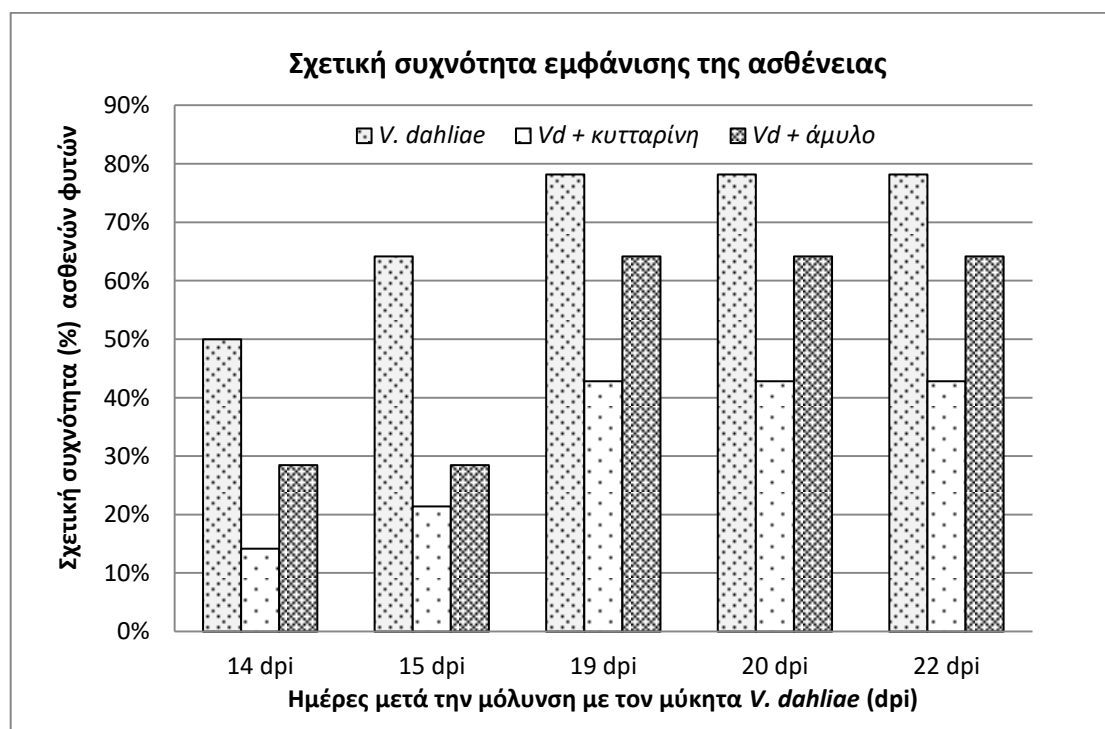


Γράφημα 3.1.1.1 : Η εξέλιξη των συμπτωμάτων της ασθένειας στα μολυσμένα φυτάρια της μελιτζάνας στην μεταχείριση όπου δεν πραγματοποιήθηκε διαχωρισμός του ριζικού συστήματος σε δύο μέρη, στα οποία έχει εφαρμοστεί το άμυλο και η κυτταρίνη σε συγκέντρωση 100 mM, και η σύγκριση τους με τον μολυσμένο μάρτυρα. Οι κατακόρυφες γραμμές απεικονίζουν το τυπικό σφάλμα.

Σύμφωνα με το γράφημα 3.1.1.1, η ένταση εκδήλωσης των συμπτωμάτων της ασθένειας ήταν ιδιαίτερα υψηλή στο μολυσμένο μάρτυρα σε σχέση με τις εφαρμογές Vd + κυτταρίνη και Vd + άμυλο, σε όλες τις μετρήσεις που ελήφθησαν κατά την διάρκεια της καταγραφής των συμπτωμάτων της ασθένειας. Επίσης, η εφαρμογή Vd + κυτταρίνη παρουσίασε ελαφρώς χαμηλότερο ποσοστό ασθενών φύλλων σε σχέση με την εφαρμογή Vd + άμυλο.

3.1.1.2 Συχνότητα εμφάνισης της ασθένειας

Το γράφημα 3.1.1.2, απεικονίζει την σχετική συχνότητα εμφάνισης της ασθένειας στην μεταχείριση όπου δεν πραγματοποιήθηκε διαχωρισμός του ριζικού συστήματος σε δύο μέρη, από την 14^η έως την 22^η ημέρα της μόλυνσης με τον μύκητα *V. dahliae*.



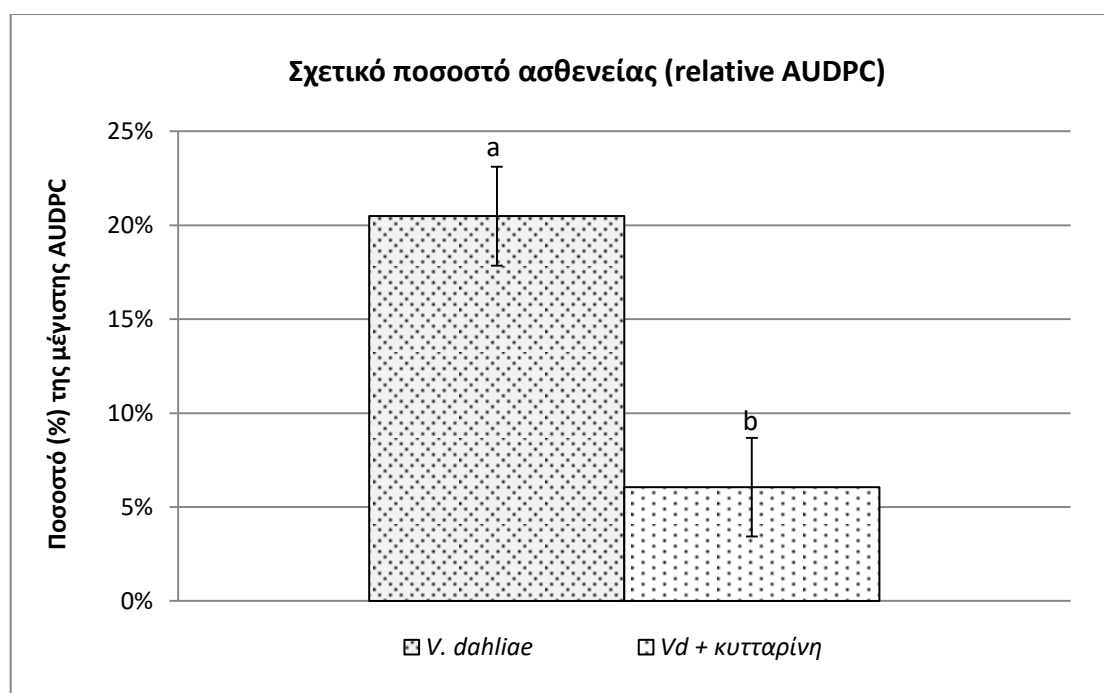
Γράφημα 3.1.1.2 : Η συχνότητα εμφάνισης της ασθένειας στα μολυσμένα φυτάρια της μελιτζάνας στην μεταχείριση όπου δεν πραγματοποιήθηκε διαχωρισμός του ριζικού συστήματος σε δύο μέρη, στα οποία έχει εφαρμοστεί το άμυλο και η κυτταρίνη σε συγκέντρωση 100 mM, και η σύγκριση τους με τον μολυσμένο μάρτυρα.

Σύμφωνα με το γράφημα 3.1.1.2, από την 14^η έως την 22^η ημέρα της μόλυνσης, το μεγαλύτερο ποσοστό των ασθενών φυτών παρουσίασε ο μολυσμένος μάρτυρας σε σχέση με τις εφαρμογές Vd + άμυλο και Vd + κυτταρίνη. Είναι αξιοσημείωτο γεγονός ότι το ποσοστό των ασθενών φυτών της εφαρμογής Vd + κυτταρίνη, δεν

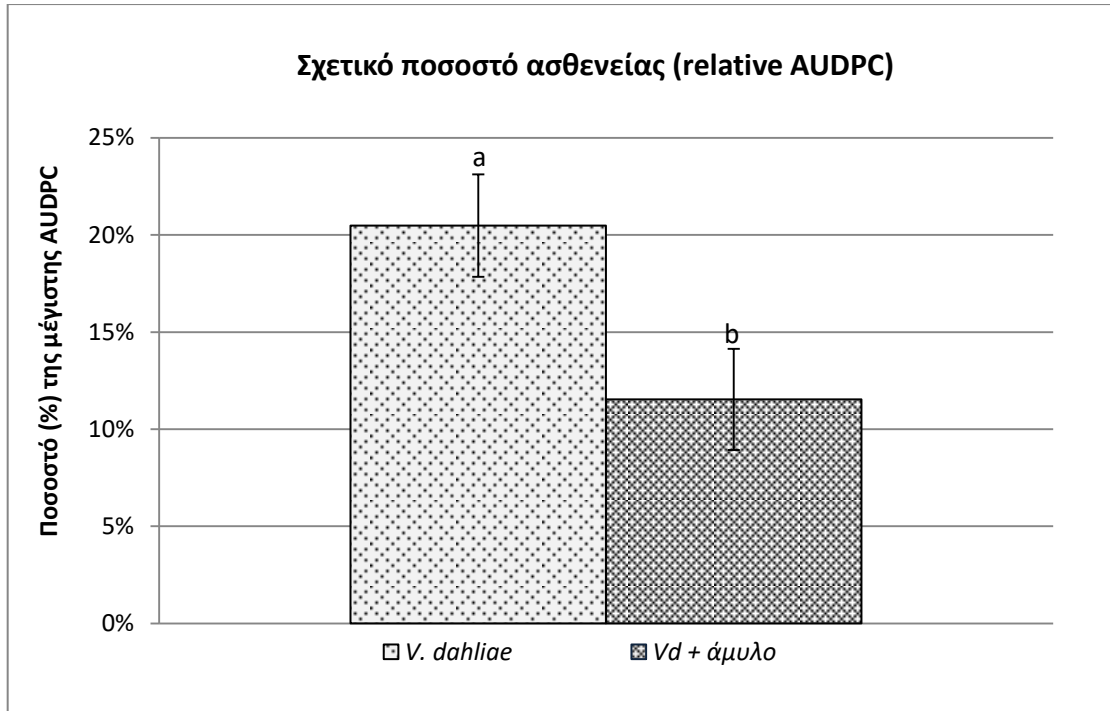
ξεπέρασε το 50 % καθ' όλη την διάρκεια της καταγραφής των συμπτωμάτων της ασθένειας. Επίσης, στο σύνολο των μετρήσεων ο αριθμός των ασθενών φυτών στην εφαρμογή Vd + άμυλο, ήταν μεγαλύτερος σε σχέση με την εφαρμογή Vd + κυτταρίνη. Τέλος, τα χαμηλότερα ποσοστά των ασθενών φυτών για τις εφαρμογές Vd + άμυλο και Vd + κυτταρίνη, παρατηρήθηκαν μόνο κατά την διάρκεια των δύο πρώτων μετρήσεων.

3.1.1.3 Σχετικό εμβαδόν ασθένειας

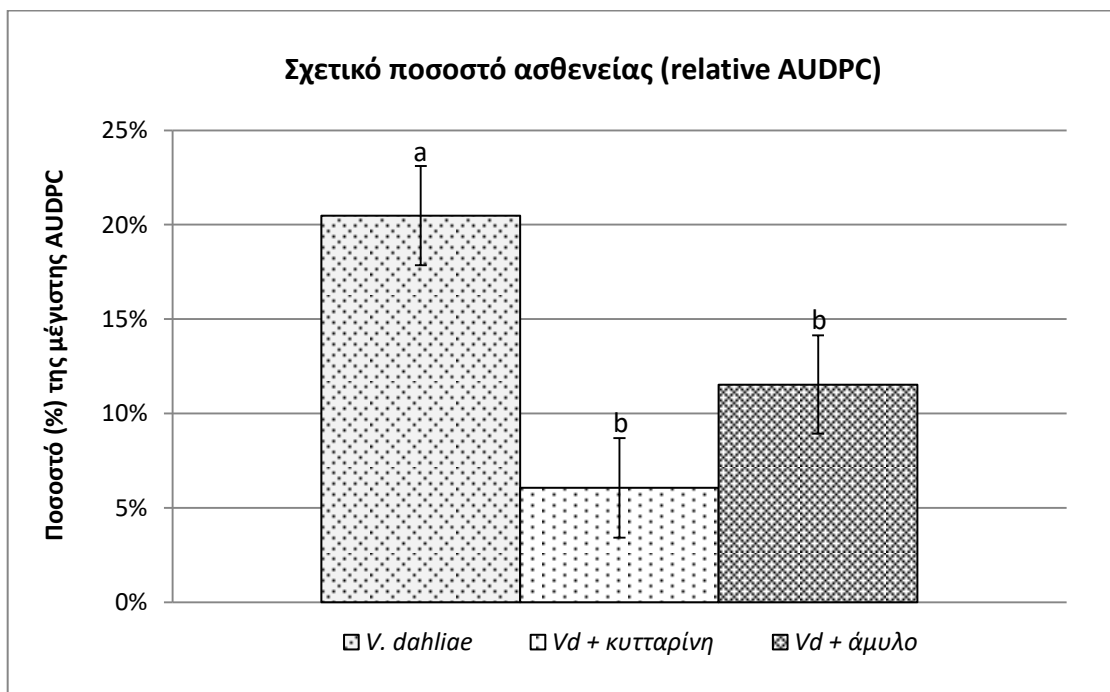
Στα γραφήματα 3.1.1.3α, β και γ, παρουσιάζονται οι σχετικές τιμές του εμβαδού ασθένειας (Relative AUDPC) για τις εφαρμογές Vd + κυτταρίνη και Vd + άμυλο της μεταχείρισης όπου δεν πραγματοποιήθηκε διαχωρισμός του ριζικού συστήματος σε δύο μέρη, σε σύγκριση με τον μολυσμένο μάρτυρα.



Γράφημα 3.1.1.3α : Το σχετικό ποσοστό ασθένειας της εφαρμογής Vd + κυτταρίνη σε σύγκριση με τον μολυσμένο μάρτυρα στην μεταχείριση όπου δεν πραγματοποιήθηκε διαχωρισμός του ριζικού συστήματος σε δύο μέρη. Οι εφαρμογές που διαφέρουν μεταξύ τους στατιστικά σημαντικά σε επίπεδο σημαντικότητας 5% ($\alpha=0.05$), φέρουν διαφορετικό γράμμα σύμφωνα με τον έλεγχο της ελάχιστης σημαντικής διαφοράς του Fisher. Οι κατακόρυφες γραμμές απεικονίζουν το τυπικό σφάλμα.



Γράφημα 3.1.1.3β : Το σχετικό ποσοστό ασθένειας της εφαρμογής Vd + άμυλο, σε σύγκριση με τον μολυσμένο μάρτυρα στην μεταχείριση όπου δεν πραγματοποιήθηκε διαχωρισμός του ριζικού συστήματος σε δύο μέρη. Οι εφαρμογές που διαφέρουν μεταξύ τους στατιστικά σημαντικά σε επίπεδο σημαντικότητας 5% ($\alpha=0.05$), φέρουν διαφορετικό γράμμα σύμφωνα με τον έλεγχο της ελάχιστης σημαντικής διαφοράς του Fisher. Οι κατακόρυφες γραμμές απεικονίζουν το τυπικό σφάλμα.

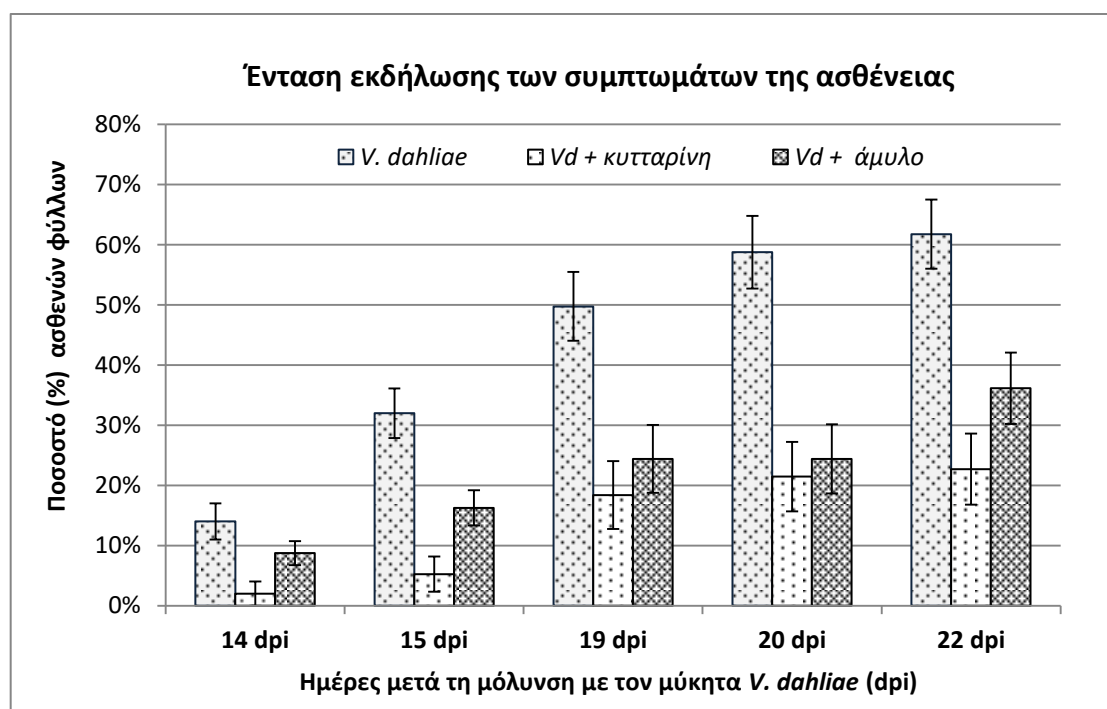


Γράφημα 3.1.1.3γ : Το σχετικό ποσοστό ασθένειας για τις εφαρμογές Vd + άμυλο και Vd + κутταρίνη στην μεταχείριση όπου δεν πραγματοποιήθηκε διαχωρισμός του ριζικού συστήματος σε δύο μέρη, σε σύγκριση με τον μολυσμένο μάρτυρα. Οι εφαρμογές που διαφέρουν μεταξύ τους στατιστικά σημαντικά σε επίπεδο σημαντικότητας 5% ($\alpha=0.05$), φέρουν διαφορετικό γράμμα σύμφωνα με τον έλεγχο της ελάχιστης σημαντικής διαφοράς του Fisher. Οι κατακόρυφες γραμμές απεικονίζουν το τυπικό σφάλμα.

Σύμφωνα με τα γραφήματα 3.1.1.3α, β και γ, το σχετικό ποσοστό ασθένειας για τις εφαρμογές Vd + κυτταρίνη και Vd + άμυλο, ήταν στατιστικά σημαντικά χαμηλότερο σε σχέση με τον μολυσμένο μάρτυρα. Αξιοσημείωτο είναι το γεγονός ότι το σχετικό εμβαδόν ασθένειας στην εφαρμογή Vd + κυτταρίνη ήταν περίπου 2,5 φορές πιο κάτω σε σχέση με τον μολυσμένο μάρτυρα, με την διαφορά αυτή να θεωρείται στατιστικά σημαντική. Τέλος, μεταξύ των εφαρμογών Vd + κυτταρίνη και Vd + άμυλο, δεν υπήρξε οποιαδήποτε στατιστική διαφορά στο σχετικό ποσοστό της ασθένειας.

3.1.1.4 Ένταση εκδήλωσης των συμπτωμάτων της ασθένειας στα φυτά όπου πραγματοποιήθηκε διαχωρισμός του ριζικού συστήματος

Το γράφημα 3.1.1.4, απεικονίζει την εξέλιξη των συμπτωμάτων της ασθένειας στα φυτά όπου πραγματοποιήθηκε διαχωρισμός του ριζικού συστήματος, από την 14^η έως την 22^η ημέρα της μόλυνσης με τον μύκητα *V. dahliae*.



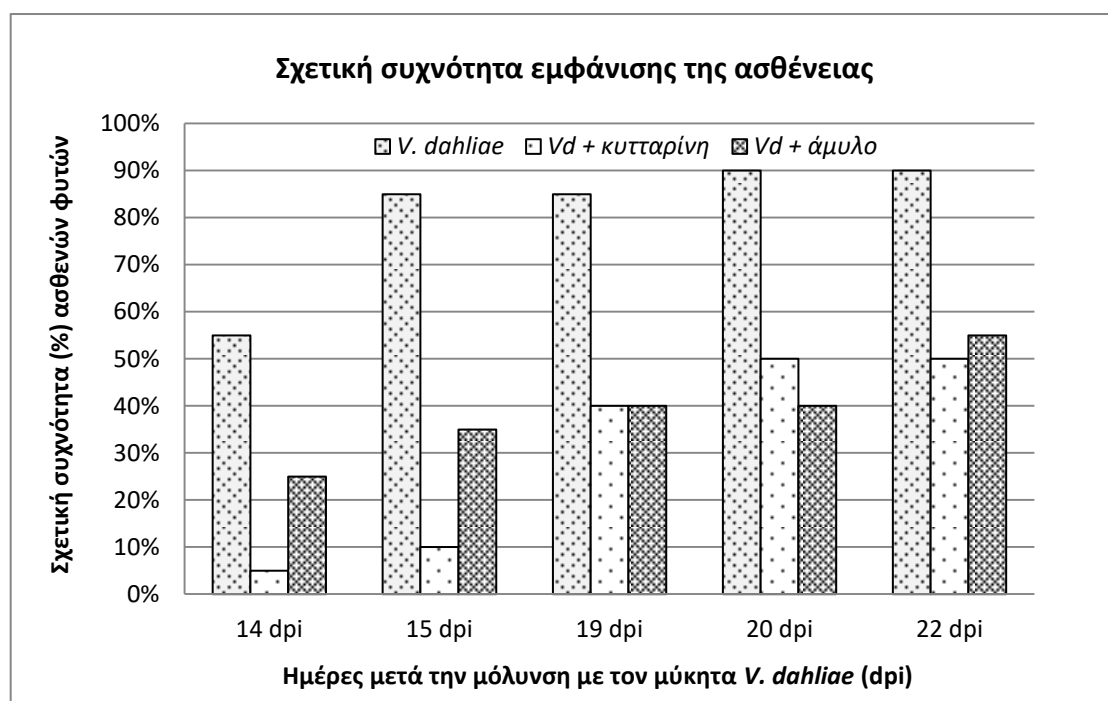
Γράφημα 3.1.1.4 : Η εξέλιξη των συμπτωμάτων της ασθένειας στα μολυσμένα φυτάρια της μελιτζάνας στα φυτά όπου πραγματοποιήθηκε διαχωρισμός του ριζικού συστήματος, στα οποία έχει εφαρμοστεί το άμυλο και η κυτταρίνη σε συγκέντρωση 100 mM, και η σύγκρισή τους με τον μολυσμένο μάρτυρα. Οι κατακόρυφες γραμμές απεικονίζουν το τυπικό σφάλμα.

Από το γράφημα 3.1.1.4, προκύπτει ότι ο βαθμός εκδήλωσης των συμπτωμάτων της ασθένειας είναι ιδιαίτερα υψηλός στο μολυσμένο μάρτυρα σε σύγκριση με τις εφαρμογές Vd + άμυλο και Vd + κυτταρίνη, καθ' όλη την διάρκεια της καταγραφής

των συμπτωμάτων της ασθένειας. Επίσης, τα φυτά στην εφαρμογή Vd + κυτταρίνη φαίνεται να παρουσιάζουν ελαφρώς χαμηλότερα ποσοστά ασθενών φύλλων σε σχέση με τα φυτά της εφαρμογής Vd + άμυλο.

3.1.1.5 Συχνότητα εμφάνισης της ασθένειας στα φυτά όπου πραγματοποιήθηκε διαχωρισμός του ριζικού συστήματος

Το γράφημα 3.1.1.5, απεικονίζει την σχετική συχνότητα εμφάνισης της ασθένειας στα φυτά όπου πραγματοποιήθηκε διαχωρισμός του ριζικού συστήματος, από την 14^η έως την 22^η ημέρα της μόλυνσης με τον μύκητα *V. dahliae*.



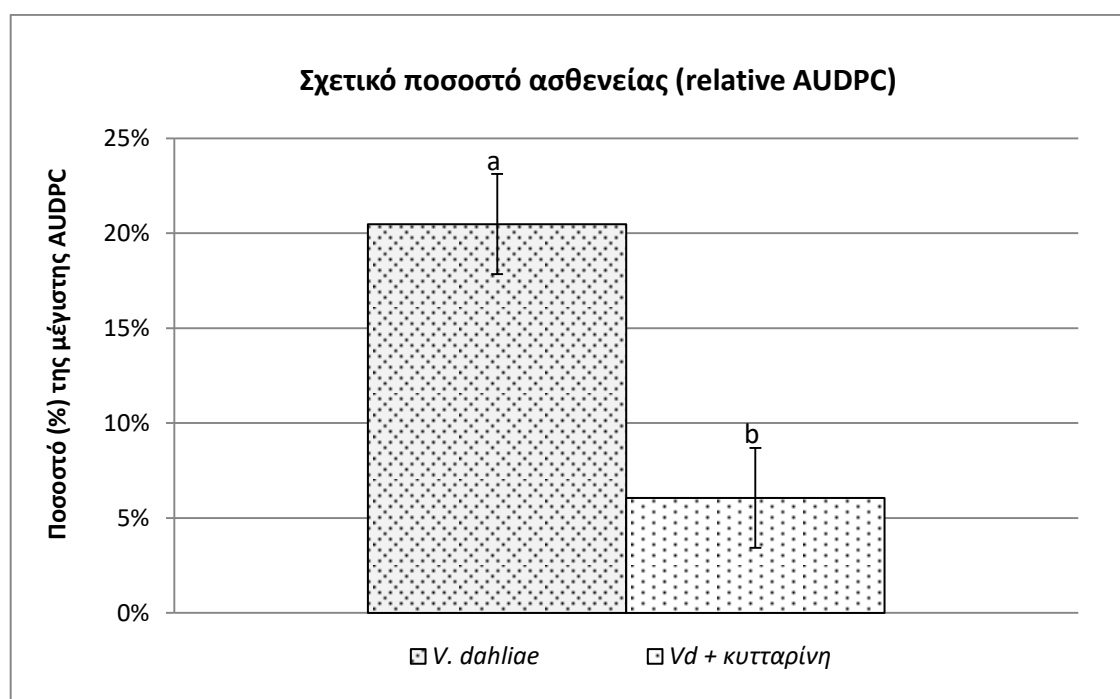
Γράφημα 3.1.1.5 : Η συχνότητα εμφάνισης της ασθένειας στα φυτά όπου πραγματοποιήθηκε διαχωρισμός του ριζικού συστήματος, στα οποία έχει εφαρμοστεί το άμυλο και η κυτταρίνη σε συγκέντρωση 100 mM, και η σύγκρισή τους σε σχέση με τον μολυσμένο μάρτυρα.

Σύμφωνα με το γράφημα 3.1.1.5, από την 14^η έως την 22^η ημέρα της μόλυνσης, το μεγαλύτερο ποσοστό των ασθενών φυτών, παρουσίασε ο μολυσμένος μάρτυρας σε σχέση με τις εφαρμογές Vd + άμυλο και Vd + κυτταρίνη. Είναι αξιοσημείωτο γεγονός ότι το ποσοστό των ασθενών φυτών στην εφαρμογή Vd + κυτταρίνη, δεν ξεπέρασε το 50 % καθ' όλη την διάρκεια της καταγραφής των συμπτωμάτων της ασθένειας. Αντίθετα, στην περίπτωση της εφαρμογής Vd + άμυλο, το ποσοστό των ασθενών φυτών ξεπέρασε το 50 %, μόνο κατά την τελευταία ημέρα της μέτρησης των συμπτωμάτων της ασθένειας, καταγράφοντας μια πολύ μικρή ποσοστιαία αύξηση

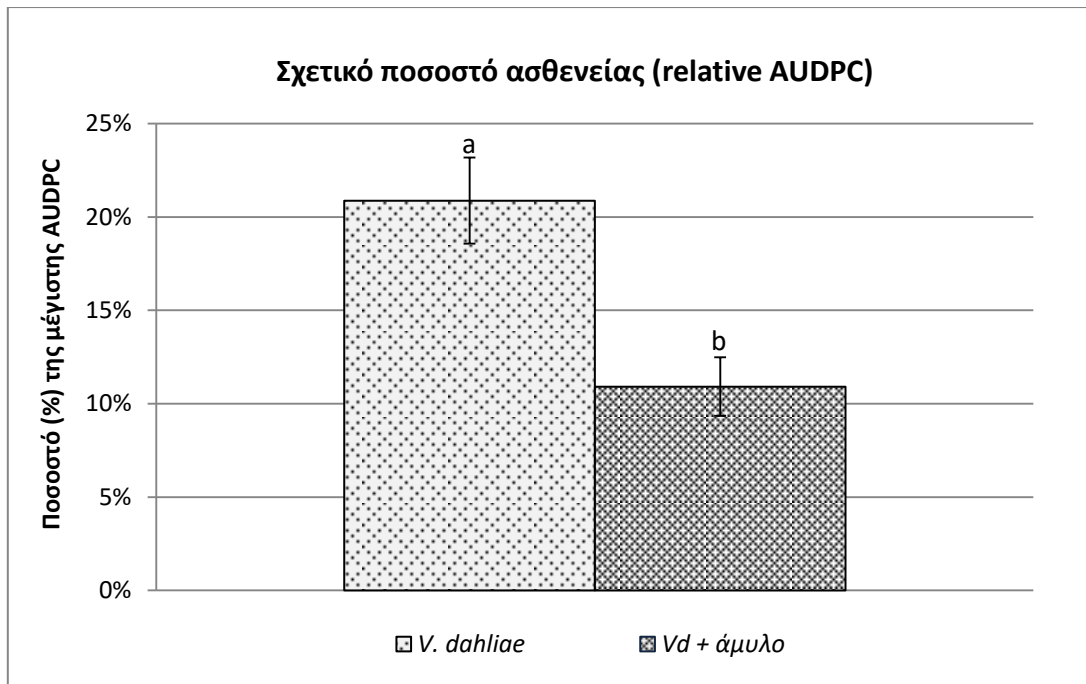
(5%). Μέχρι την 20^η ημέρα της μόλυνσης, ο αριθμός των ασθενών φυτών στην εφαρμογή Vd + άμυλο ήταν περίπου 2 φορές μικρότερος σε σχέση με τον μολυσμένο μάρτυρα. Αντίθετα, στην περίπτωση της εφαρμογής Vd + κυτταρίνη, τα ποσοστά των ασθενών φυτών ήταν 10, 8 και 2 φορές λιγότερα σε σχέση με τον μολυσμένο μάρτυρα, για τις 14, 15 και 19 ημέρες από την μόλυνση με τον μύκητα *V. dahliae* αντίστοιχα.

3.1.1.6 Σχετικό εμβαδόν ασθενείας στα φυτά όπου πραγματοποιήθηκε διαχωρισμός του ριζικού συστήματος

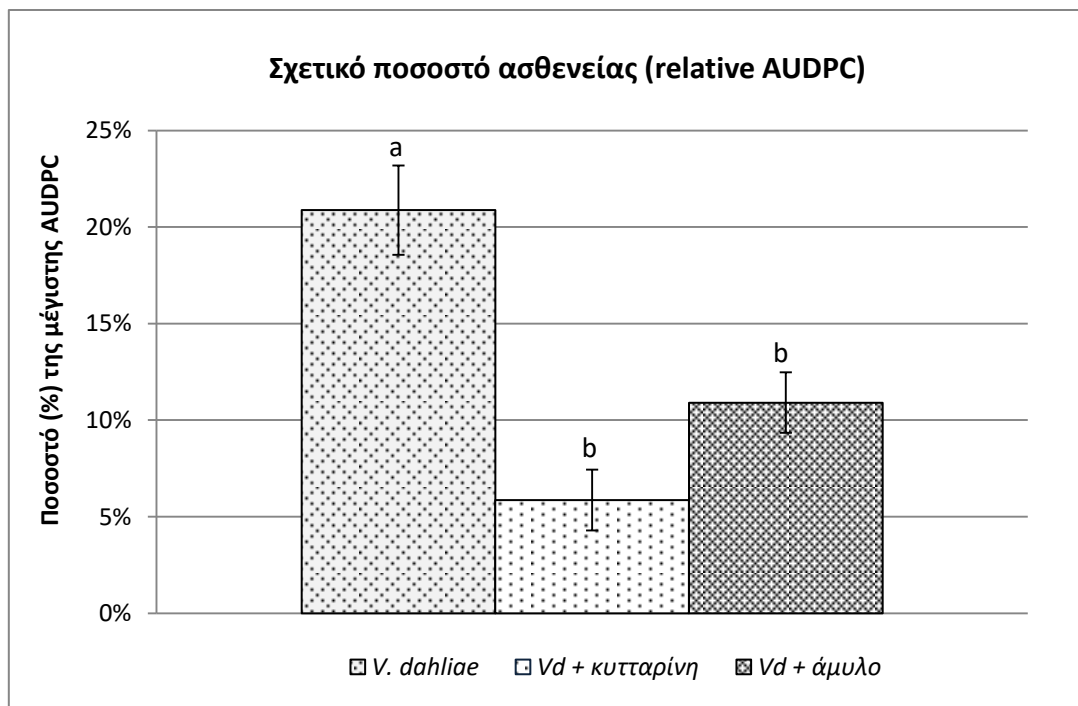
Στα γραφήματα 3.1.1.6α, β και γ, παρουσιάζονται οι σχετικές τιμές του εμβαδού ασθενείας (Relative AUDPC) για τις εφαρμογές Vd + κυτταρίνη και Vd + άμυλο της μεταχείρισης όπου πραγματοποιήθηκε διαχωρισμός του ριζικού συστήματος, σε σύγκριση με τον μολυσμένο μάρτυρα.



Γράφημα 3.1.1.6α : Το σχετικό ποσοστό ασθενείας της εφαρμογής Vd + κυτταρίνη σε σύγκριση με τον μολυσμένο μάρτυρα στα φυτά όπου πραγματοποιήθηκε διαχωρισμός του ριζικού συστήματος. Οι εφαρμογές που διαφέρουν μεταξύ τους στατιστικά σημαντικά σε επίπεδο σημαντικότητας 5% ($\alpha=0.05$), φέρουν διαφορετικό γράμμα σύμφωνα με τον έλεγχο της ελάχιστης σημαντικής διαφοράς του Fisher. Οι κατακόρυφες γραμμές απεικονίζουν το τυπικό σφάλμα.



Γράφημα 3.1.1.6β : Το σχετικό ποσοστό ασθένειας της εφαρμογής Vd + άμυλο σε σύγκριση με τον μολυσμένο μάρτυρα στα φυτά όπου πραγματοποιήθηκε διαχωρισμός του ριζικού συστήματος. Οι εφαρμογές που διαφέρουν μεταξύ τους στατιστικά σημαντικά σε επίπεδο σημαντικότητας 5% ($\alpha=0.05$), φέρουν διαφορετικό γράμμα σύμφωνα με τον έλεγχο της ελάχιστης σημαντικής διαφοράς του Fisher. Οι κατακόρυφες γραμμές απεικονίζουν το τυπικό σφάλμα.



Γράφημα 3.1.1.6γ : Το σχετικό ποσοστό ασθένειας για τις εφαρμογές Vd + άμυλο και Vd + κутταρίνη σε σύγκριση με τον μολυσμένο μάρτυρα στα φυτά όπου πραγματοποιήθηκε διαχωρισμός του ριζικού συστήματος. Οι εφαρμογές που διαφέρουν μεταξύ τους στατιστικά σημαντικά σε επίπεδο σημαντικότητας 5% ($\alpha=0.05$), φέρουν διαφορετικό γράμμα σύμφωνα με τον έλεγχο της ελάχιστης σημαντικής διαφοράς του Fisher. Οι κατακόρυφες γραμμές απεικονίζουν το τυπικό σφάλμα.

Σύμφωνα με τα γραφήματα 3.1.1.6 α, β και γ, το σχετικό ποσοστό ασθeneίας για τις εφαρμογές Vd + άμυλο και Vd + κυτταρίνη, ήταν στατιστικά σημαντικά χαμηλότερο σε σχέση με τον μολυσμένο μάρτυρα. Στην περίπτωση της εφαρμογής της Vd + κυτταρίνη, το σχετικό ποσοστό της ασθeneίας ήταν περίπου 3,5 φορές λιγότερο σε σχέση με τον μολυσμένο μάρτυρα, με την διαφορά αυτή να είναι στατιστικά σημαντική. Μεταξύ των εφαρμογών Vd + κυτταρίνη και Vd + άμυλο, δεν υπήρξε οποιαδήποτε σημαντική διαφοροποίηση όσον αφορά το σχετικό ποσοστό της ασθeneίας.

3.1.1.7 Οπτική παρατήρηση των συμπτωμάτων της ασθeneίας στην μεταχείριση όπου διαχωρίστηκε το ριζικό σύστημα σε δύο μέρη



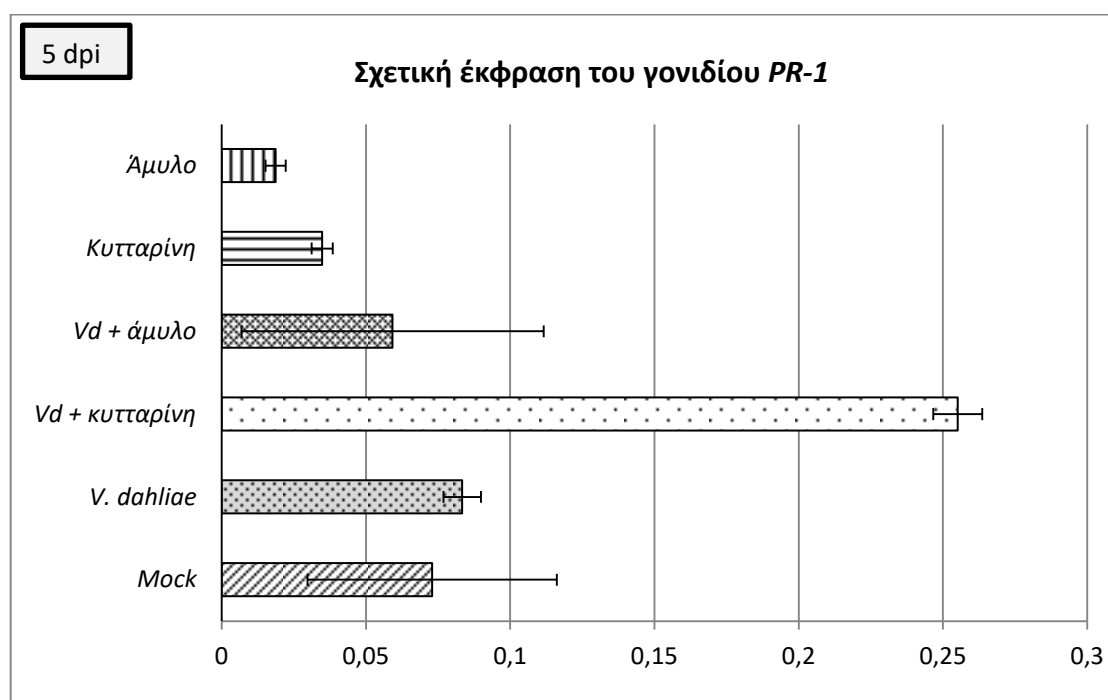
Εικόνα 6 : Φυτά μελιτζάνας της μεταχείρισης όπου το ριζικό σύστημα διαχωρίστηκε σε δύο μέρη και φωτογραφήθηκαν κατά την 22^η ημέρα της μόλυνσης με τον μύκητα *V. dahliae*.

Στην εικόνα 6, παρουσιάζεται η γενική εικόνα της εκδήλωσης των συμπτωμάτων της ασθeneίας σε φυτάρια μελιτζάνας της μεταχείρισης όπου διαχωρίστηκε το ριζικό σύστημα σε δύο μέρη και φωτογραφήθηκαν την 22^η ημέρα της μόλυνσης. Από την

εικόνα παρατηρούμε ότι η ένταση της ασθένειας ήταν υψηλότερη (χαρακτηριστικότερο σύμπτωμα η έντονη αποφύλλωση) στον μολυσμένο μάρτυρα σε σχέση με τις εφαρμογές Vd + κυτταρίνη και Vd + άμυλο.

3.1.2 Σχετική έκφραση του γονιδίου *PR-1*

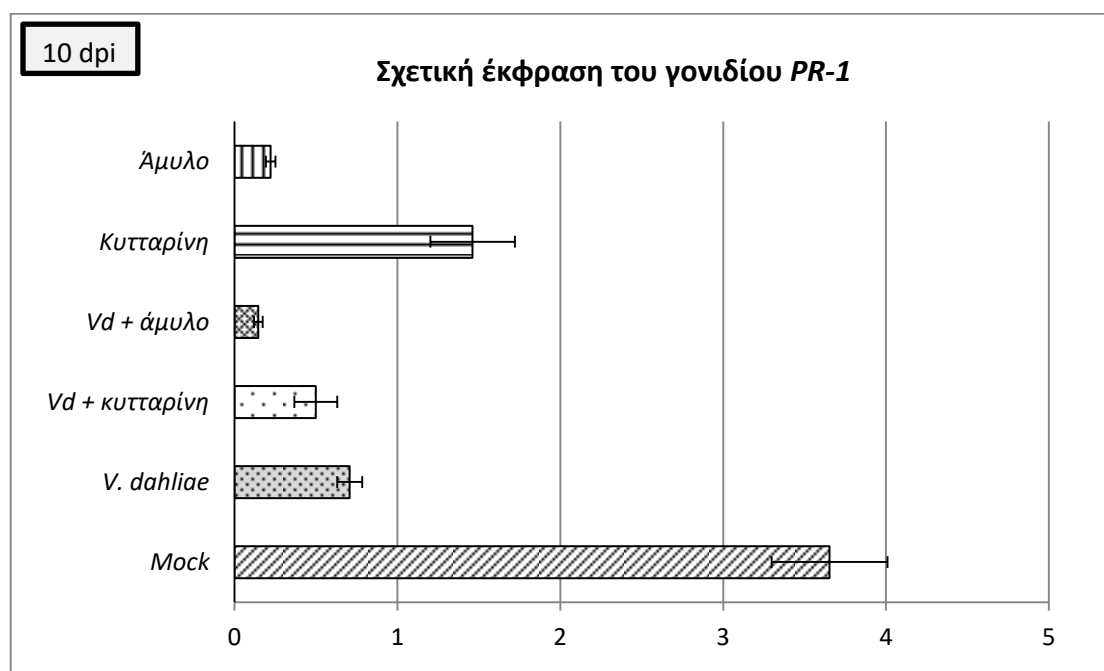
Στα γραφήματα 3.1.2α και β, απεικονίζεται η σχετική έκφραση του γονιδίου *PR-1* στα φύλλα των φυτών της μεταχείρισης όπου δεν διαχωρίστηκε το ριζικό σύστημα σε δύο μέρη, έπειτα από δειγματοληψίες που πραγματοποιήθηκαν κατά την 5^η και 10^η ημέρα της μόλυνσης με τον μύκητα *V. dahliae*.



Γράφημα 3.1.2α : Απεικόνιση της σχετικής έκφρασης του γονιδίου *PR-1* κατά την 5^η ημέρα της μόλυνσης με τον μύκητα *V. dahliae*. Οι οριζόντιοι ράβδοι συμβολίζουν την απόκλιση από τον μέσο όρο με βάση το τυπικό σφάλμα.

Από το γράφημα 3.1.2α, παρατηρούμε ότι τα υψηλότερα επίπεδα στην έκφραση του γονιδίου *PR-1* εμφανίζονται στην εφαρμογή Vd + κυτταρίνη, ενώ τα χαμηλότερα στην εφαρμογή του αμύλου. Τα επίπεδα στην έκφραση του γονιδίου *PR-1* στην εφαρμογή Vd + κυτταρίνη, υπερέχουν τόσο του μολυσμένου όσο και του αμόλυντου μάρτυρα (Mock), εν αντιθέσει με τα χαμηλότερα επίπεδα στην εφαρμογή Vd + άμυλο. Επίσης, παρατηρούμε ότι η εφαρμογή της κυτταρίνης παρουσίασε υψηλότερα

επίπεδα στην έκφραση του γονιδίου *PR-1* σε σχέση με την εφαρμογή του αμύλου, εντούτοις καμία από τις δύο εφαρμογές δεν υπερείχε του αμόλυντου μάρτυρα.



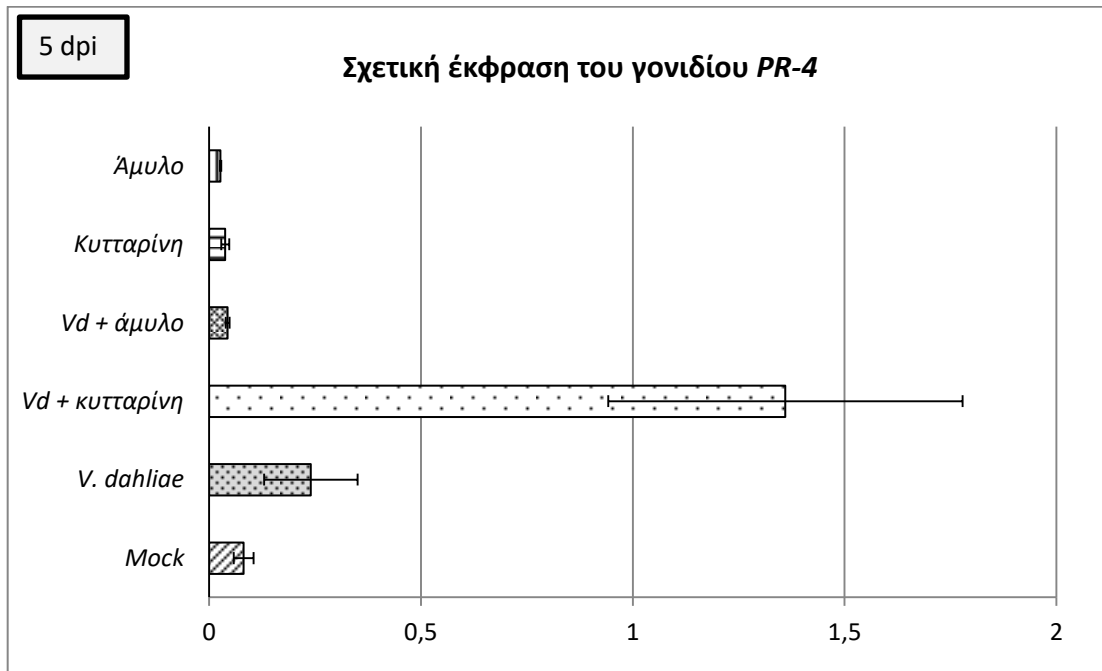
Γράφημα 3.1.2β : Απεικόνιση της σχετικής έκφρασης του γονιδίου *PR-1* κατά την 10^η ημέρα της μόλυνσης με τον μύκητα *V. dahliae*. Οι οριζόντιοι ράβδοι συμβολίζουν την απόκλιση από τον μέσο όρο με βάση το τυπικό σφάλμα.

Από το γράφημα 3.1.2.β, παρατηρούμε ότι κατά την 10^η ημέρα της μόλυνσης, τα φυτά των εφαρμογών της κυτταρίνης (Vd + κυτταρίνη και κυτταρίνη) παρουσιάζουν σχετικώς υψηλότερα επίπεδα έκφρασης στο γονίδιο *PR-1* σε σχέση με τα αντίστοιχα φυτά των εφαρμογών του αμύλου (Vd + άμυλο και άμυλο), εντούτοις τα επίπεδα αυτά ήταν χαμηλότερα από τον αμόλυντο μάρτυρα (Mock).

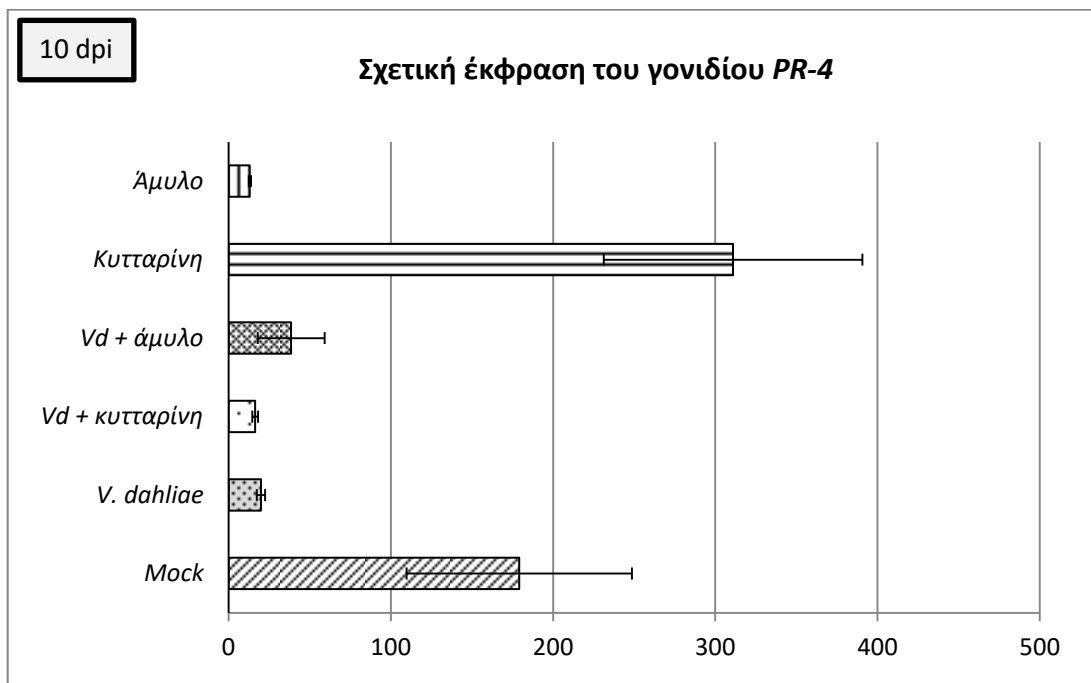
3.1.3 Σχετική έκφραση του γονιδίου *PR-4*

Στο γράφημα 3.1.3α και β, απεικονίζεται η σχετική έκφραση του γονιδίου *PR-4* στα φύλλα των φυτών της μεταχείρισης όπου δεν διαχωρίστηκε το ριζικό σύστημα σε δύο μέρη, έπειτα από δειγματοληψίες που πραγματοποιήθηκαν κατά την 5^η και 10^η ημέρα της μόλυνσης με τον μύκητα *V. dahliae*. Από το γράφημα 3.1.3α, παρατηρούμε ότι ο μολυσμένος μάρτυρας και η εφαρμογή Vd + κυτταρίνη, παρουσίασαν τα υψηλότερα επίπεδα στην έκφραση του γονιδίου *PR-4* κατά την 5^η ημέρα της μόλυνσης. Η έκφραση του γονιδίου *PR-4* στα φυτά της εφαρμογής Vd + κυτταρίνη, υπερείχε τόσο του μολυσμένου όσο και του αμόλυντου μάρτυρα (Mock). Στις

υπόλοιπες εφαρμογές δεν παρατηρήθηκε οποιαδήποτε αξιόλογη διαφοροποίηση στα επίπεδα της έκφρασης του γονιδίου *PR-4* κατά την 5^η ημέρα της μόλυνσης.



Γράφημα 3.1.3α : Απεικόνιση της σχετικής έκφρασης του γονιδίου *PR-4* κατά την 5^η ημέρα της μόλυνσης με τον μύκητα *V. dahliae*. Οι οριζόντιοι ράβδοι συμβολίζουν την απόκλιση από τον μέσο όρο με βάση το τυπικό σφάλμα.



Γράφημα 3.1.3β : Απεικόνιση της σχετικής έκφρασης του γονιδίου *PR-4* κατά την 10^η ημέρα της μόλυνσης με τον μύκητα *V. dahliae*. Οι οριζόντιοι ράβδοι συμβολίζουν την απόκλιση από τον μέσο όρο με βάση το τυπικό σφάλμα.

Σύμφωνα με το *γράφημα 3.1.3β*, κατά την 10^η ημέρα της μόλυνσης με τον μύκητα *V. dahliae*, φαίνεται να υπάρχει μια αύξηση στα επίπεδα της έκφρασης του γονιδίου *PR-4* στην εφαρμογή της κυτταρίνης. Για τις υπόλοιπες εφαρμογές τα επίπεδα της έκφρασης του γονιδίου *PR-4* κυμάνθηκαν σε χαμηλότερα επίπεδα από αυτά της εφαρμογής της κυτταρίνης. Επίσης, τα φυτά στην εφαρμογή Vd + άμυλο, παρουσίασαν ελαφρώς υψηλότερα επίπεδα στην έκφραση του γονιδίου *PR-4* σε σχέση με τον μολυσμένο μάρτυρα και την εφαρμογή Vd + κυτταρίνη, εντούτοις δεν ξεπέρασαν τον αμόλυντο μάρτυρα (Mock).

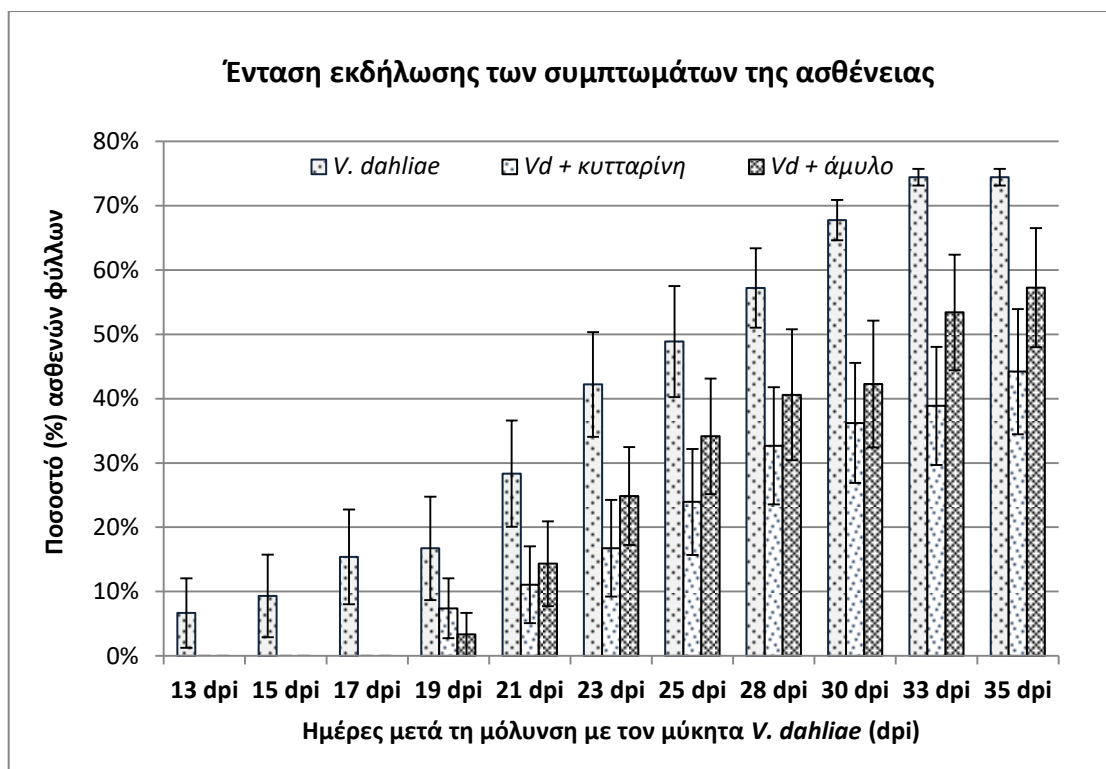
3.2 Αποτελέσματα δεύτερου πειράματος

3.2.1 Αξιολόγηση της επίδραση του αμύλου και της κυτταρίνης στην παθογένεια του μύκητα *V. dahliae* σε αποστειρωμένο έδαφος.

Για να διερευνηθεί στο αποστειρωμένο έδαφος, η επίδραση του αμύλου και της κυτταρίνης στην μολυσματικότητα του μύκητα *V. dahliae*, πραγματοποιήθηκε αναλυτική καταγραφή των συμπτωμάτων της ασθένειας στα φυτά της μελιτζάνας, από την 13^η έως την 35^η ημέρα της μόλυνσης.

3.2.1.1 Ένταση εκδήλωσης των συμπτωμάτων της ασθένειας

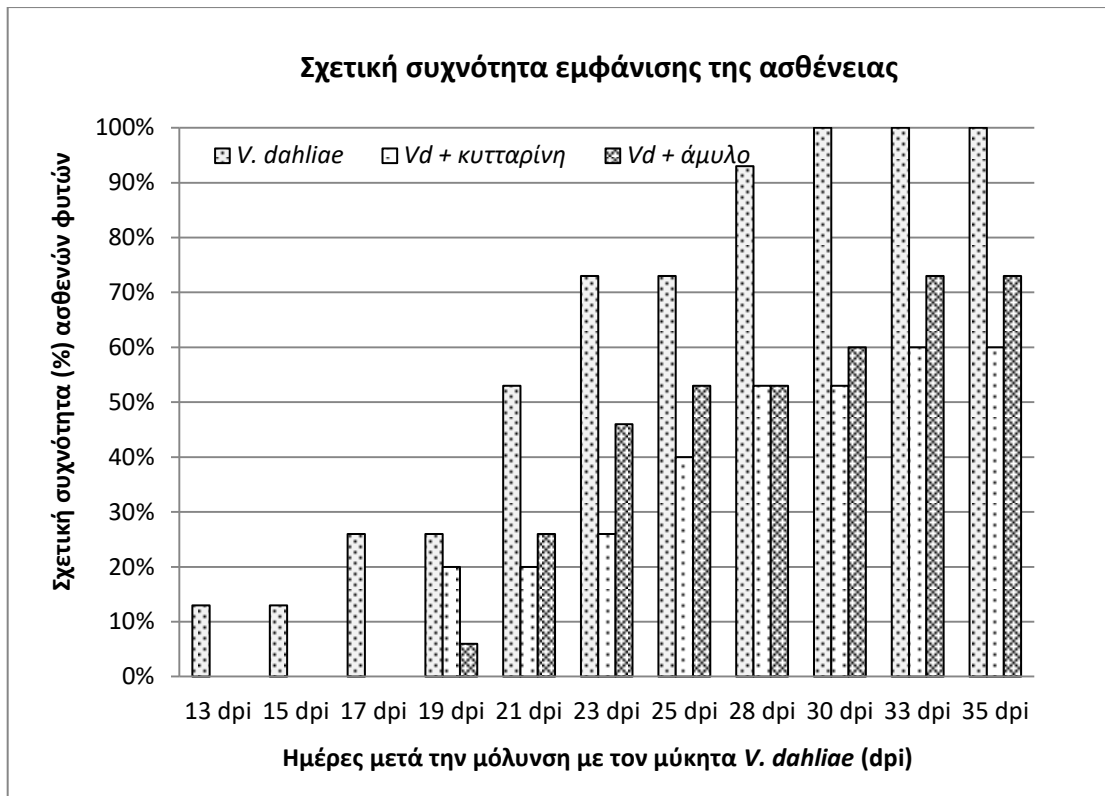
Το *γράφημα 3.2.1.1*, απεικονίζει την εξέλιξη των συμπτωμάτων της ασθένειας, από την 13^η έως την 35^η ημέρα της μόλυνσης με τον μύκητα *V. dahliae*. Από το *γράφημα 3.2.1.1*, διακρίνουμε ότι τα υψηλότερα ποσοστά των ασθενών φύλλων παρουσίασε ο μολυσμένος μάρτυρας, σε σχέση με τις εφαρμογές Vd + κυτταρίνη και Vd + άμυλο, καθ' όλη την διάρκεια των μετρήσεων των συμπτωμάτων της ασθένειας. Αξιοσημείωτο είναι το γεγονός ότι παρατηρήθηκε μια καθυστέρηση στην εκδήλωση των συμπτωμάτων της ασθένειας στις εφαρμογές Vd + κυτταρίνη και Vd + άμυλο, η οποία διήρκησε μέχρι την 19^η ημέρα της μόλυνσης. Επίσης, το ποσοστό των ασθενών φύλλων στο σύνολο των φυτών της εφαρμογής Vd + κυτταρίνη, δεν ξεπέρασε το 50 %, σε καμία από τις μετρήσεις που ελήφθησαν κατά την διάρκεια του πειράματος. Αντίθετα, στην εφαρμογή Vd + άμυλο, το ποσοστό των ασθενών φύλλων ξεπέρασε το 50 % μόνο στις τελευταίες δύο μετρήσεις του πειράματος (33 dpi και 35 dpi).



Γράφημα 3.2.1.1 : Η συχνότητα εμφάνισης της ασθένειας στα μολυσμένα φυτάρια της μελιτζάνας στα οποία έχει εφαρμοστεί το άμυλο και η κутταρίνη σε συγκέντρωση 100 mM, και η σύγκριση τους με τον μολυσμένο μάρτυρα.

3.2.1.2 Συχνότητα εμφάνισης της ασθένειας

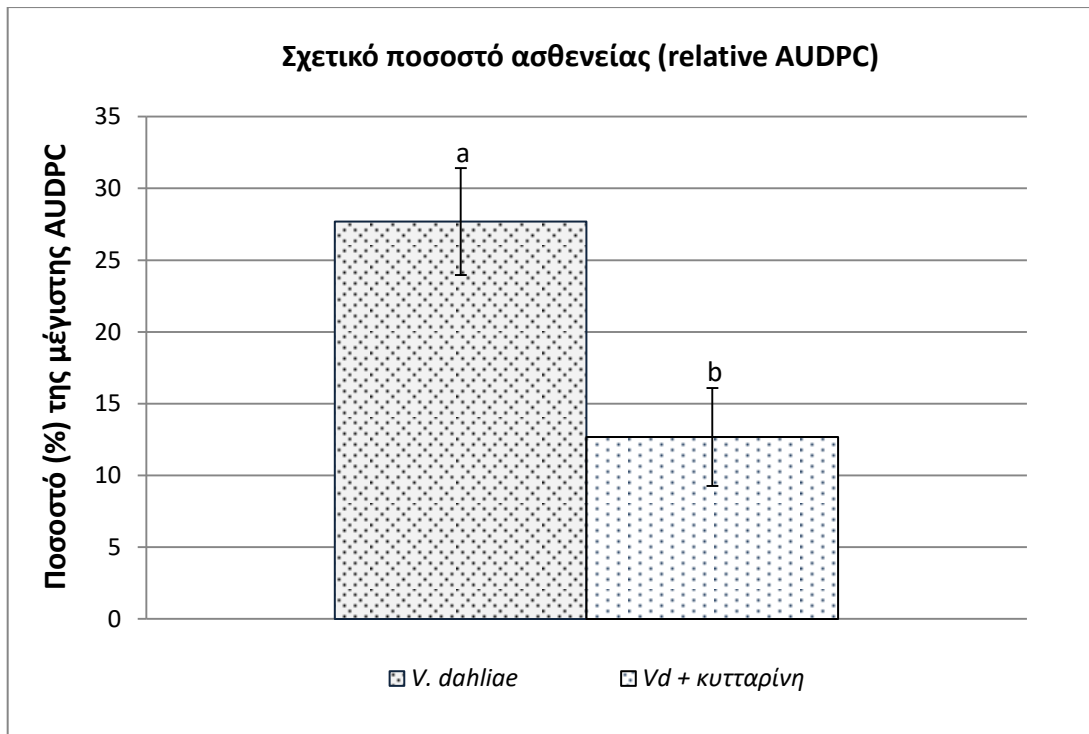
Το γράφημα 3.2.1.2, απεικονίζει την σχετική συχνότητα εμφάνισης της ασθένειας από την 13^η έως την 35^η ημέρα της μόλυνσης με τον μύκητα *V. dahliae*. Σύμφωνα με το γράφημα 3.2.1.2, το ποσοστό των ασθενών φυτών ήταν μεγαλύτερο στον μολυσμένο μάρτυρα σε σύγκριση με τις εφαρμογές *Vd + άμυλο* και *Vd + κутταρίνη*, καθ' όλη την διάρκεια των μετρήσεων που ελήφθησαν. Επίσης, τα πρώτα ασθενή φυτά στις εφαρμογές *Vd + άμυλο* και *Vd + κутταρίνη*, εμφανίστηκαν την 19η ημέρα της μόλυνσης. Απεναντίας, στα φυτά του μολυσμένου μάρτυρα, τα πρώτα συμπτώματα της ασθένειας έκαναν την εμφάνιση τους από την 13η ημέρα της μόλυνσης. Στις τελευταίες 3 μετρήσεις (30-33 dpi), η ασθένεια εκδηλώθηκε σε όλα τα φυτά του μολυσμένου μάρτυρα, εν αντιθέσει με τις εφαρμογές *Vd + κутταρίνη* και *Vd + άμυλο*, όπου το ποσοστό των ασθενών φυτών δεν ξεπέρασε το 60 και το 75 % αντίστοιχα.



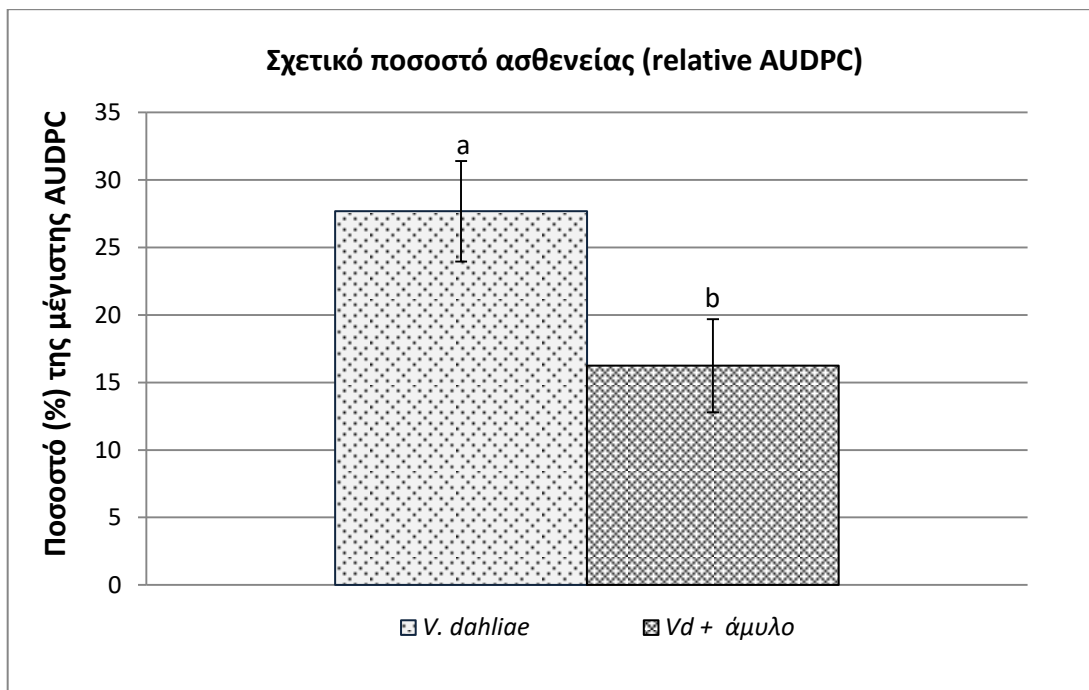
Γράφημα 3.2.1.2 : Η συχνότητα εμφάνισης της ασθένειας στα μολυσμένα φυτάρια της μελιτζάνας στα οποία έχει εφαρμοστεί το άμυλο και η κυτταρίνη σε συγκέντρωση 100 mM, και η σύγκριση τους με τον μολυσμένο μάρτυρα.

3.2.1.3 Σχετικό εμβαδόν ασθένειας

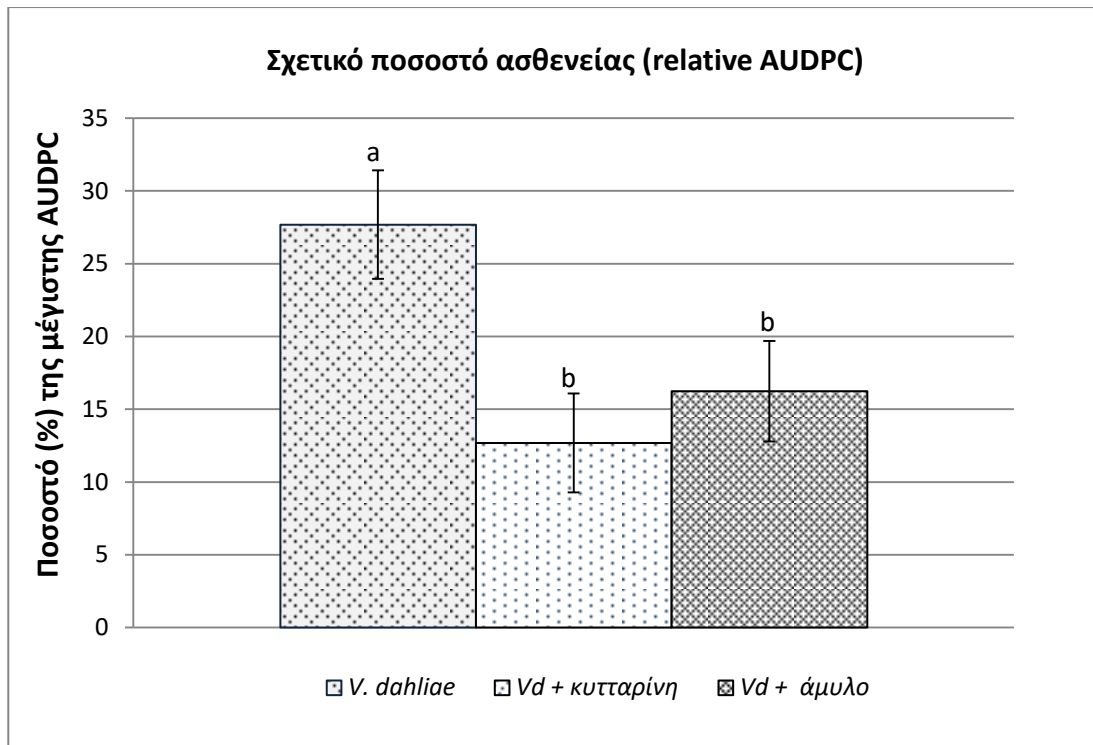
Στα γραφήματα 3.2.1.3α, β και γ, παρουσιάζονται οι σχετικές τιμές του εμβαδού ασθένειας (Relative AUDPC) για τις εφαρμογές Vd + κυτταρίνη και Vd + άμυλο, σε σύγκριση με τον μολυσμένο μάρτυρα. Σύμφωνα με τα γραφήματα 3.2.1.3α, β και γ, το σχετικό ποσοστό ασθένειας στις εφαρμογές Vd + άμυλο και Vd + κυτταρίνη, ήταν στατιστικά χαμηλότερο σε σχέση με τον μολυσμένο μάρτυρα. Στην περίπτωση της εφαρμογής Vd + κυτταρίνη, το ποσοστό της ασθένειας ήταν 2 φορές λιγότερο σε σχέση με τον μολυσμένο μάρτυρα, με την διαφορά αυτή να είναι στατιστικά σημαντική. Μεταξύ των εφαρμογών Vd + κυτταρίνη και Vd + άμυλο, δεν υπήρξε οποιαδήποτε σημαντική διαφοροποίηση όσον αφορά το σχετικό ποσοστό της ασθένειας στα φυτάρια της μελιτζάνας.



Γράφημα 3.2.1.3α : Το σχετικό ποσοστό ασθένειας της εφαρμογής Vd + κутταρίνη σε σύγκριση με τον μολυσμένο μάρτυρα. Οι εφαρμογές που διαφέρουν μεταξύ τους στατιστικά σημαντικά σε επίπεδο σημαντικότητας 5% ($\alpha=0.05$), φέρουν διαφορετικό γράμμα σύμφωνα με τον έλεγχο της ελάχιστης σημαντικής διαφοράς του Fisher. Οι κατακόρυφες γραμμές απεικονίζουν το τυπικό σφάλμα.



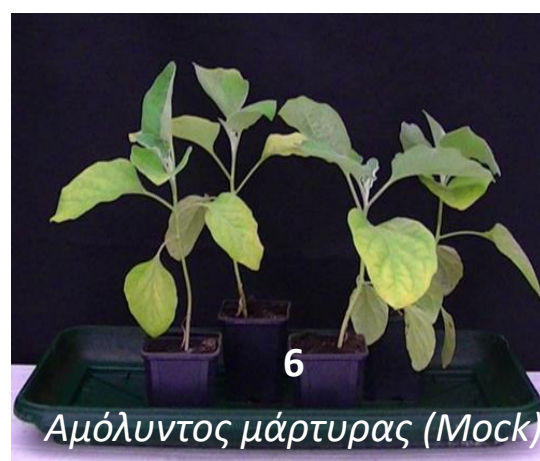
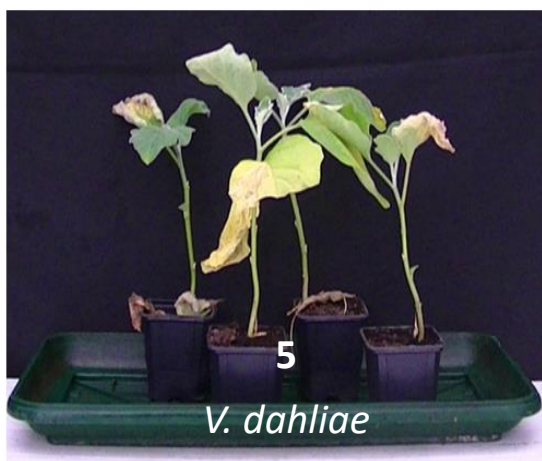
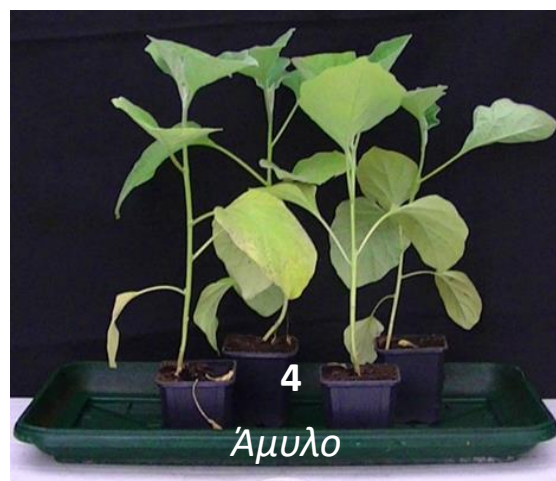
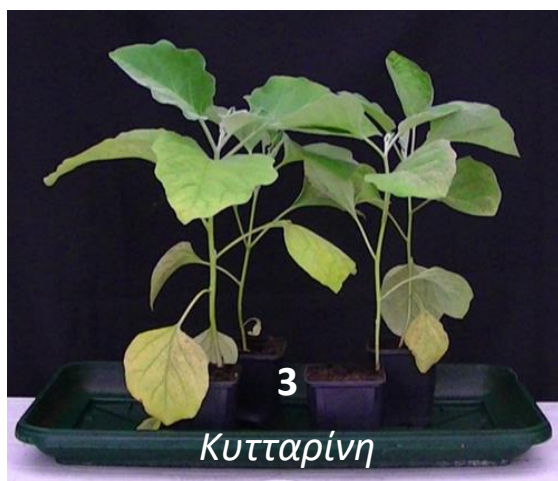
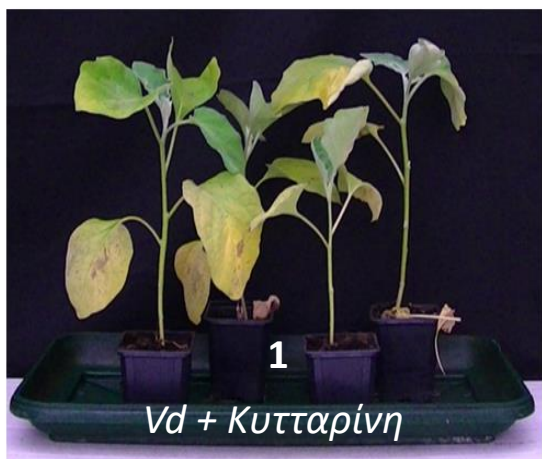
Γράφημα 3.2.1.3β : Το σχετικό ποσοστό ασθένειας της εφαρμογής Vd + άμυλο σε σύγκριση με τον μολυσμένο μάρτυρα. Οι εφαρμογές που διαφέρουν μεταξύ τους στατιστικά σημαντικά σε επίπεδο σημαντικότητας 5% ($\alpha=0.05$), φέρουν διαφορετικό γράμμα σύμφωνα με τον έλεγχο της ελάχιστης σημαντικής διαφοράς του Fisher. Οι κατακόρυφες γραμμές απεικονίζουν το τυπικό σφάλμα.



Γράφημα 3.2.1.3γ : Το σχετικό ποσοστό ασθένειας για τις εφαρμογές Vd + άμυλο και Vd + κυτταρίνη, σε σύγκριση με τον μολυσμένο μάρτυρα. Οι εφαρμογές που διαφέρουν μεταξύ τους στατιστικά σημαντικά σε επίπεδο σημαντικότητας 5% ($\alpha=0.05$), φέρουν διαφορετικό γράμμα σύμφωνα με τον έλεγχο της ελάχιστης σημαντικής διαφοράς του Fisher. Οι κατακόρυφες γραμμές απεικονίζουν το τυπικό σφάλμα.

3.2.1.4 Οπτική παρατήρηση των συμπτωμάτων της ασθένειας

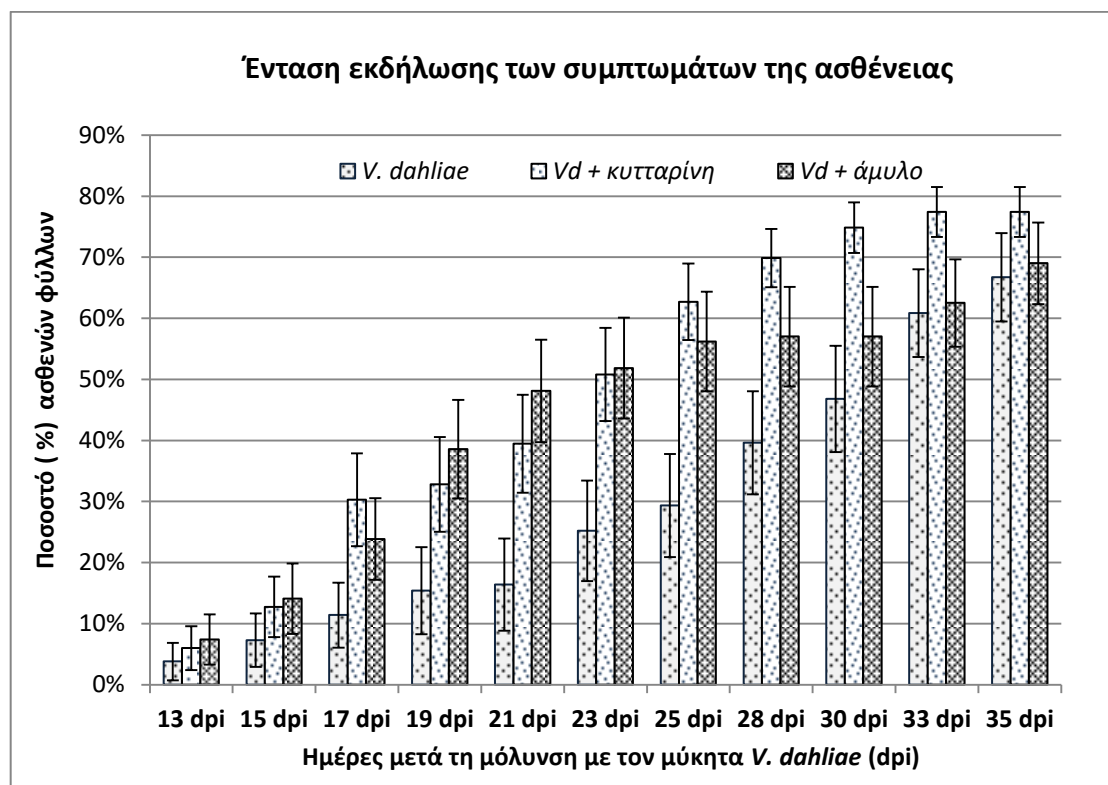
Στην εικόνα 4, παρουσιάζεται η γενική εικόνα της εκδήλωσης των συμπτωμάτων της ασθένειας στα φυτά της μελιτζάνας που αναπτύχθηκαν σε αποστειρωμένο έδαφος και φωτογραφήθηκαν την 36^η ημέρα της μόλυνσης. Από την εικόνα 4, μπορούμε να διακρίνουμε τις σημαντικές διαφορές που έχουν να κάνουν με την συμπτωματολογική εμφάνιση της ασθένειας στις εφαρμογές που είχε εφαρμοστεί ο μύκητας *V. dahliae* (*V. dahliae*, *V. dahliae* + άμυλο και *V. dahliae* + κυτταρίνη). Πιο συγκεκριμένα, παρατηρούμε ότι η ένταση της ασθένειας ήταν υψηλότερη (χαρακτηριστικότερο σύμπτωμα η έντονη αποφύλλωση) στον μολυσμένο μάρτυρα σε σχέση με τις εφαρμογές Vd + κυτταρίνη και Vd + άμυλο. Επίσης, σημαντικές διαφορές διακρίνονται και στα φυτά που χορηγήθηκε μόνο άμυλο ή κυτταρίνη, σε σχέση με τα φυτά που δεν δέχθηκαν καμία επέμβαση. Χαρακτηριστική διαφορά στην τελευταία περίπτωση, είναι η μεγαλύτερη ευρωστία και η ανάπτυξη (πυκνότερο φύλλωμα και ύψος) που παρουσιάζουν τα φυτά των εφαρμογών της κυτταρίνης και αμύλου, σε σχέση με τον αμόλυντο μάρτυρα.



Εικόνα 4 : Φυτά μελιτζάνας των εφαρμογών όπου δεν πραγματοποιήθηκε διαχωρισμός του ριζικού συστήματος σε δύο μέρη, τα οποία φωτογραφήθηκαν κατά την 36^η ημέρα της μόλυνσης με τον μύκητα *V. dahliae*.

3.2.1.5 Ένταση εκδήλωσης των συμπτωμάτων της ασθένειας στα φυτά όπου πραγματοποιήθηκε διαχωρισμός του ριζικού συστήματος

Το γράφημα 3.2.1.8, απεικονίζει την εξέλιξη των συμπτωμάτων της ασθένειας στα φυτά όπου πραγματοποιήθηκε διαχωρισμός του ριζικού συστήματος, από την 13^η έως την 35^η ημέρα της μόλυνσης με τον μύκητα *V. dahliae*.

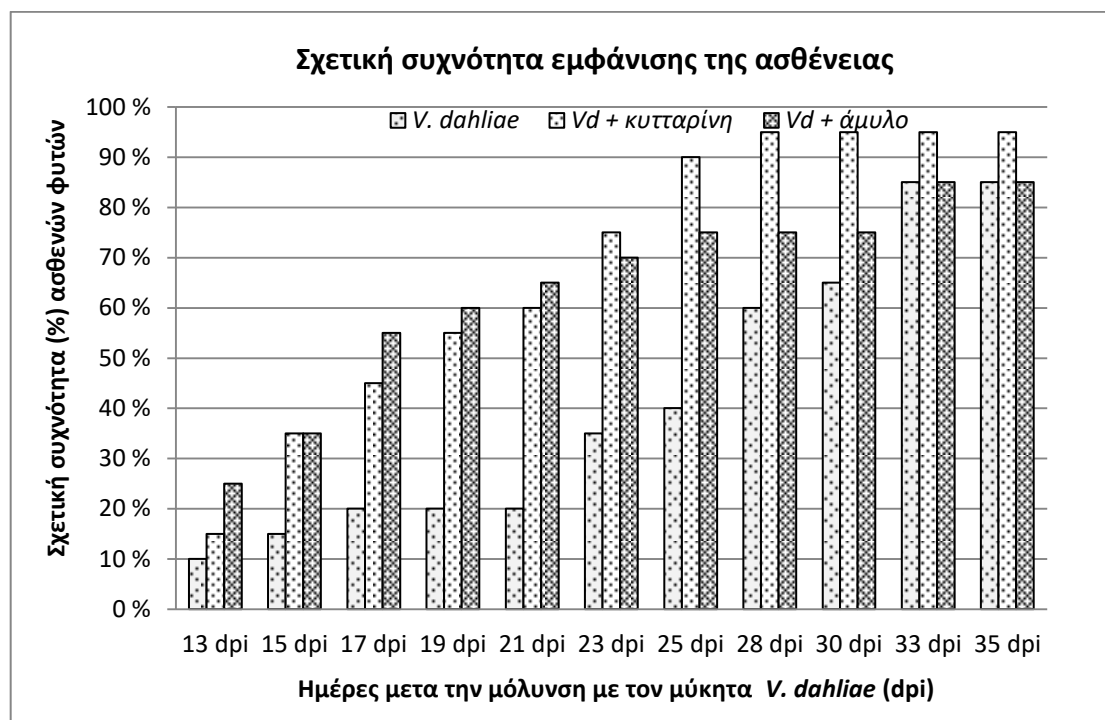


Γράφημα 3.2.1.8 : Η εξέλιξη των συμπτωμάτων της ασθένειας στα φυτά όπου πραγματοποιήθηκε διαχωρισμός του ριζικού συστήματος, στα οποία έχει εφαρμοστεί το άμυλο και η κυτταρίνη σε συγκέντρωση 100 mM, και η σύγκριση τους με τον μολυσμένο μάρτυρα. Οι κατακόρυφες γραμμές απεικονίζουν το τυπικό σφάλμα.

Από το γράφημα 3.2.1.8, παρατηρούμε ότι ο βαθμός εκδήλωσης των συμπτωμάτων της ασθένειας, ήταν χαμηλότερος στον μολυσμένο μάρτυρα σε σχέση με τις εφαρμογές *Vd + κυτταρίνη* και *Vd + άμυλο*, καθ' όλη την διάρκεια των μετρήσεων των συμπτωμάτων της ασθένειας. Επίσης, παρατηρούμε ότι τα μεγαλύτερα ποσοστά των ασθενών φύλλων παρουσίασε η εφαρμογή *Vd + άμυλο*, ιδιαίτερα προς το τέλος του πειράματος (25-35 dpi).

3.2.1.6 Συχνότητα εμφάνισης της ασθένειας στα φυτά όπου πραγματοποιήθηκε διαχωρισμός του ριζικού συστήματος

Το γράφημα 3.2.1.9, απεικονίζει η σχετική συχνότητα εμφάνισης της ασθένειας στα φυτά όπου πραγματοποιήθηκε διαχωρισμός του ριζικού συστήματος, από την 13^η έως την 35^η ημέρα της μόλυνσης με τον μύκητα *V. dahliae*.

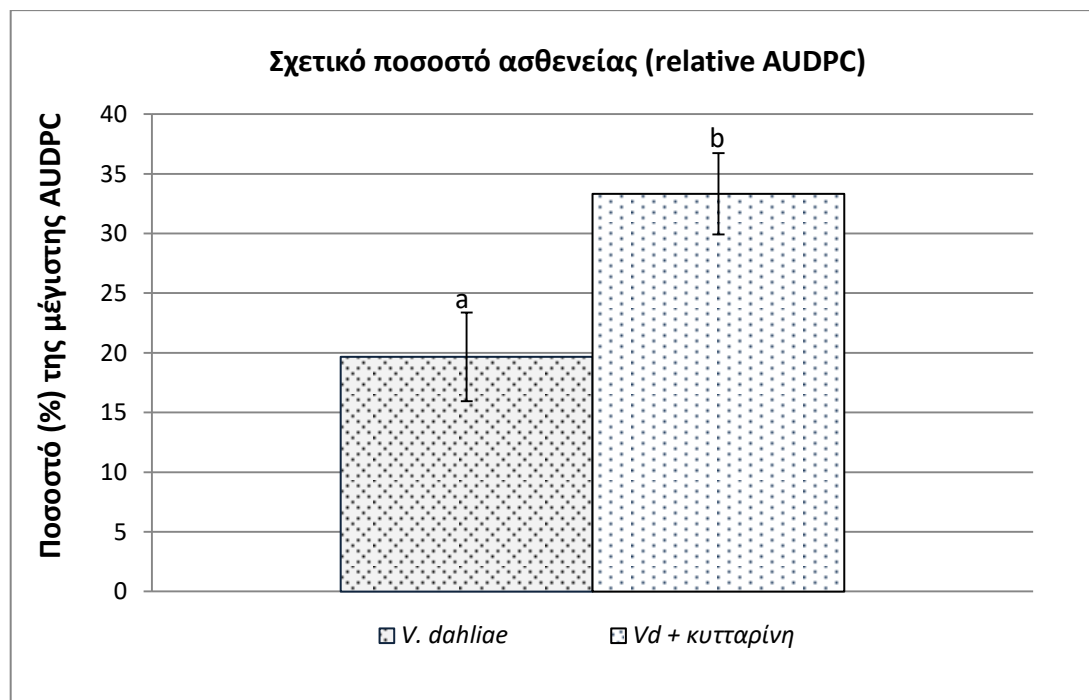


Γράφημα 3.2.1.9 : Η συχνότητα εμφάνισης της ασθένειας στα φυτά όπου πραγματοποιήθηκε διαχωρισμός του ριζικού συστήματος, στα οποία έχει εφαρμοστεί το άμυλο και η κυτταρίνη σε συγκέντρωση 100 mM, και η σύγκρισή τους σε σχέση με τον μολυσμένο μάρτυρα.

Σύμφωνα με το γράφημα 3.2.1.9, το μεγαλύτερο ποσοστό ασθενών φυτών παρουσίασε η εφαρμογή Vd + κυτταρίνη, ενώ το χαμηλότερο ο μολυσμένος μάρτυρας. Φαίνεται να υπάρχει μια καθυστέρηση στην εκδήλωση των συμπτωμάτων της ασθένειας και πιο συγκεκριμένα στα φυτά του μολυσμένου μάρτυρα, του οποίου τα ασθενή φυτά ξεπέρασαν σε ποσοστό το 50 % μόνο κατά την 28^η ημέρα της μόλυνσης. Στις τελευταίες δύο μετρήσεις, το ποσοστό των ασθενών φυτών στο μολυσμένο μάρτυρα έφτασε στα ίδια επίπεδα με το ποσοστό των ασθενών φυτών της εφαρμογής Vd + άμυλο. Επίσης, μέχρι την 21^η ημέρα της μόλυνσης, το ποσοστό των ασθενών φυτών στην μεταχείριση Vd + άμυλο, υπερείχε ελαφρώς έναντι της εφαρμογής Vd + κυτταρίνη. Αντίθετα, για τις υπόλοιπες μετρήσεις που ακολούθησαν (23-35dpi), παρουσιάστηκε άνοδος στα ποσοστά των ασθενών φυτών της εφαρμογής Vd + κυτταρίνη, με αποτέλεσμα να ξεπεράσουν τα φυτά της εφαρμογής Vd + άμυλο.

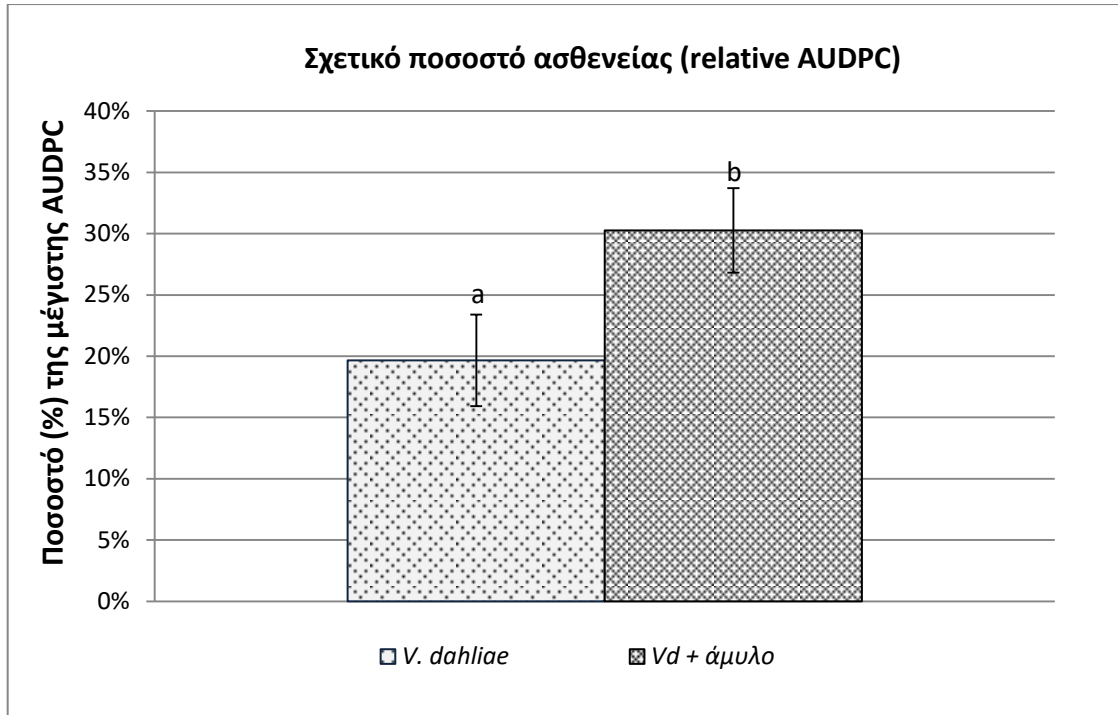
3.2.1.7 Σχετικό εμβαδόν ασθeneίας στα φυτά όπου πραγματοποιήθηκε διαχωρισμός του ριζικού συστήματος

Στα γραφήματα 3.2.1.10α, β και γ, παρουσιάζονται οι σχετικές τιμές του εμβαδού ασθeneίας (Relative AUDPC) για τις εφαρμογές Vd + κυτταρίνη και Vd + άμυλο σε σύγκριση με τον μολυσμένο μάρτυρα.

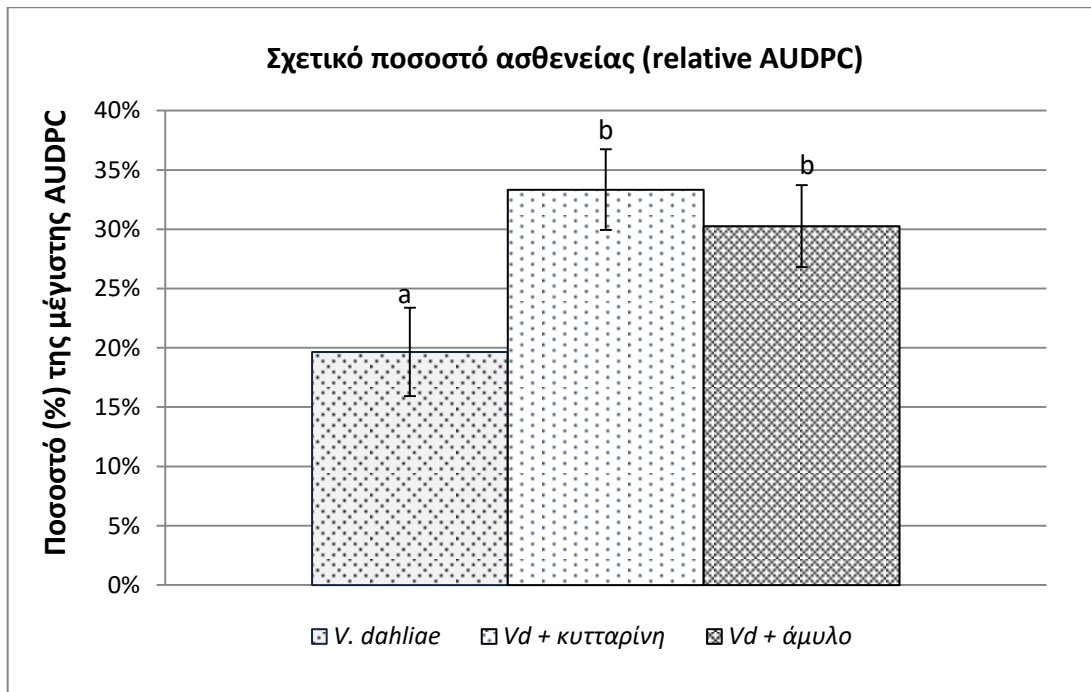


Γράφημα 3.2.1.10α : Το σχετικό ποσοστό ασθeneίας της εφαρμογής Vd + κυτταρίνη στα φυτά όπου πραγματοποιήθηκε διαχωρισμός του ριζικού συστήματος. Οι εφαρμογές που διαφέρουν μεταξύ τους στατιστικά σημαντικά σε επίπεδο σημαντικότητας 5% ($\alpha=0.05$), φέρουν διαφορετικό γράμμα σύμφωνα με τον έλεγχο της ελάχιστης σημαντικής διαφοράς του Fisher. Οι κατακόρυφες γραμμές απεικονίζουν το τυπικό σφάλμα.

Σύμφωνα με τα γραφήματα 3.1.2.10α, β και γ, το σχετικό ποσοστό ασθeneίας για τις εφαρμογές Vd + άμυλο και Vd + κυτταρίνη, ήταν στατιστικά σημαντικά υψηλότερο σε σχέση με τον μολυσμένο μάρτυρα. Μεταξύ των εφαρμογών Vd + κυτταρίνη και Vd + άμυλο, δεν υπήρξε οποιαδήποτε στατιστικά σημαντική διαφοροποίηση όσον αφορά το σχετικό ποσοστό ασθeneίας.



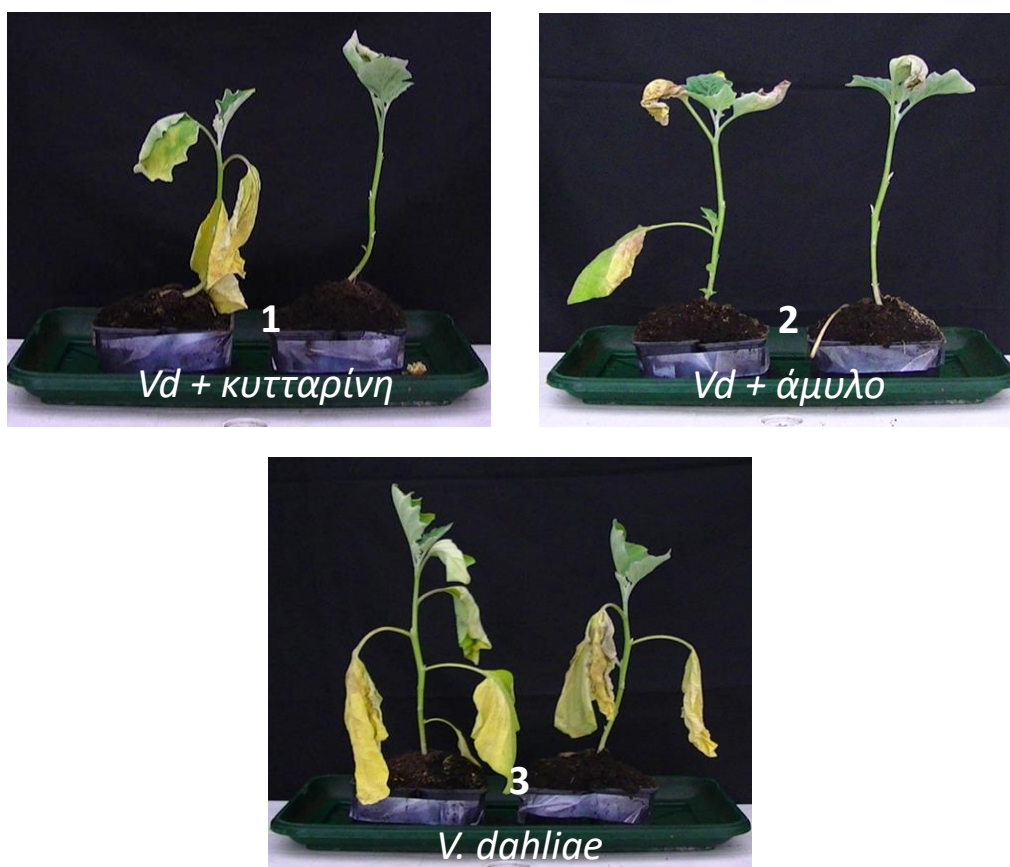
Γράφημα 3.2.1.10β : Το σχετικό ποσοστό ασθένειας της εφαρμογής Vd + άμυλο στα φυτά όπου πραγματοποιήθηκε διαχωρισμός του ριζικού συστήματος. Οι εφαρμογές που διαφέρουν μεταξύ τους στατιστικά σημαντικά σε επίπεδο σημαντικότητας 5% ($\alpha=0.05$), φέρουν διαφορετικό γράμμα σύμφωνα με τον έλεγχο της ελάχιστης σημαντικής διαφοράς του Fisher. Οι κατακόρυφες γραμμές απεικονίζουν το τυπικό σφάλμα.



Γράφημα 3.2.1.10γ : Το σχετικό ποσοστό ασθένειας στα φυτά όπου πραγματοποιήθηκε διαχωρισμός του ριζικού συστήματος για τις εφαρμογές Vd + άμυλο και Vd + κυτταρίνη, σε σύγκριση με τον μολυσμένο μάρτυρα. Οι εφαρμογές που διαφέρουν μεταξύ τους στατιστικά σημαντικά σε επίπεδο σημαντικότητας 5% ($\alpha=0.05$), φέρουν διαφορετικό γράμμα σύμφωνα με τον έλεγχο της ελάχιστης σημαντικής διαφοράς του Fisher. Οι κατακόρυφες γραμμές απεικονίζουν το τυπικό σφάλμα.

3.2.1.8 Οπτική παρατήρηση των συμπτωμάτων της ασθένειας στην μεταχείριση όπου διαχωρίστηκε το ριζικό σύστημα σε δύο μέρη

Στην εικόνα 5, παρουσιάζεται η γενική εικόνα της εκδήλωσης των συμπτωμάτων της ασθένειας, σε φυτάρια μελιτζάνας της μεταχείρισης όπου διαχωρίστηκε το ριζικό σύστημα, τα οποία αναπτύχθηκαν σε αποστειρωμένο έδαφος και φωτογραφήθηκαν την 36^η ημέρα της μόλυνσης. Από την εικόνα 5, παρατηρούμε ότι η ένταση της ασθένειας ήταν υψηλότερη (χαρακτηριστικότερο σύμπτωμα η έντονη αποφύλλωση) στις εφαρμογές Vd + κυτταρίνη και Vd + άμυλο σε σχέση με τον μολυσμένο μάρτυρα.

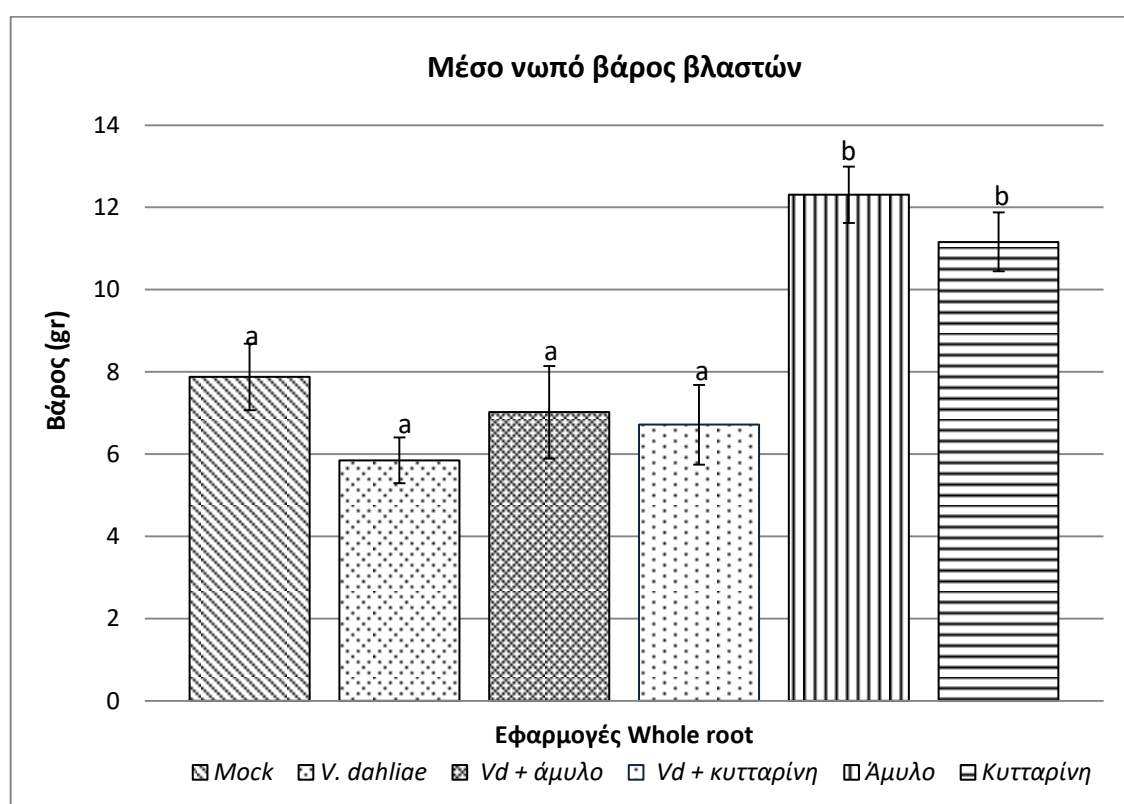


Εικόνα 5 : Φυτά μελιτζάνας της μεταχείρισης όπου το ριζικό σύστημα διαχωρίστηκε σε δύο μέρη και φωτογραφήθηκαν κατά την 36^η ημέρα της μόλυνσης με τον μύκητα *V. dahliae*.

3.2.2 Μέσο νωπό βάρος των φυτών της μεταχείρισης όπου δεν πραγματοποιήθηκε διαχωρισμός του ριζικού συστήματος σε δύο μέρη

Μετά το πέρας της καταμέτρησης των συμπτωμάτων της ασθένειας (35 dpi), χρησιμοποιώντας ζυγό ακριβείας, διενεργήθηκαν μετρήσεις για τον υπολογισμό της μέσης νωπής μάζας του υπέργειου τμήματος των φυτών (βλαστός και φύλλα). Από το γράφημα 3.2.2, παρατηρούμε ότι το χαμηλότερο μέσο νωπό βάρος παρουσίασε ο

μολυσμένος μάρτυρας, ενώ το υψηλότερο η εφαρμογή του αμύλου. Η μέση νωπή μάζα στην εφαρμογή του αμύλου δεν διέφερε σημαντικά από την εφαρμογή της κυτταρίνης. Επίσης, οι τιμές της μέσης νωπής μάζας που παρουσίασαν τα φυτά των εφαρμογών κυτταρίνης και αμύλου, ήταν πολύ υψηλότερες σε σχέση με τις υπόλοιπες εφαρμογές, με τις διαφορές αυτές να είναι στατιστικά σημαντικές. Αξιοσημείωτο είναι το γεγονός ότι τα χαμηλότερα βάρη παρουσιάστηκαν στις εφαρμογές που χορηγήθηκε ο μύκητας *V. dahliae*. Ωστόσο, αν και τα βάρη αυτά ήταν χαμηλότερα, δεν διέφεραν στατιστικά σημαντικά από την μέση νωπή μάζα του αμόλυντου μάρτυρα (Mock).

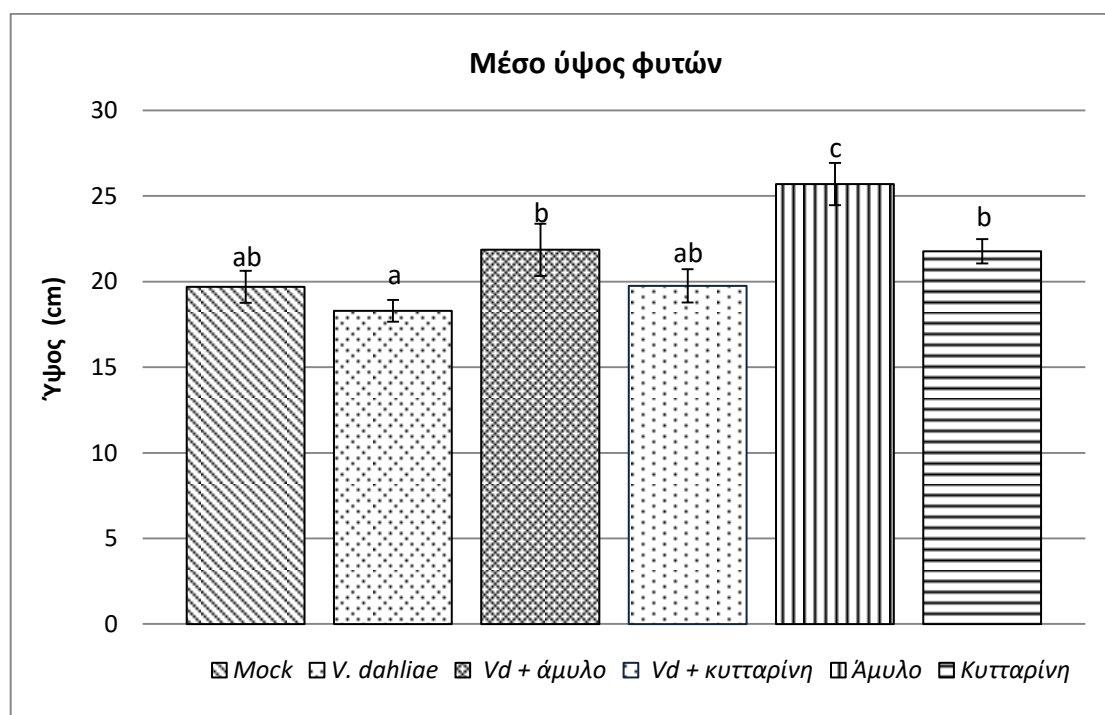


Γράφημα 3.2.2 : Συγκριτική απεικόνιση του μέσου νωπού βάρους των φυτών της μεταχείρισης όπου δεν πραγματοποιήθηκε διαχωρισμός του ριζικού συστήματος σε δύο μέρη. Οι εφαρμογές που διαφέρουν μεταξύ τους στατιστικά σημαντικά σε επίπεδο σημαντικότητας 5% ($\alpha=0.05$), φέρουν διαφορετικό γράμμα σύμφωνα με τον έλεγχο της ελάχιστης σημαντικής διαφοράς του Fisher. Οι κατακόρυφες γραμμές απεικονίζουν το τυπικό σφάλμα.

3.2.3 Μέσο ύψος των φυτών της μεταχείρισης όπου δεν πραγματοποιήθηκε διαχωρισμός του ριζικού συστήματος σε δύο μέρη

Μετά το πέρας της καταμέτρησης των συμπτωμάτων της ασθένειας (35 dpi), χρησιμοποιώντας μετροταινία, διενεργήθηκαν μετρήσεις για το υπολογισμό του

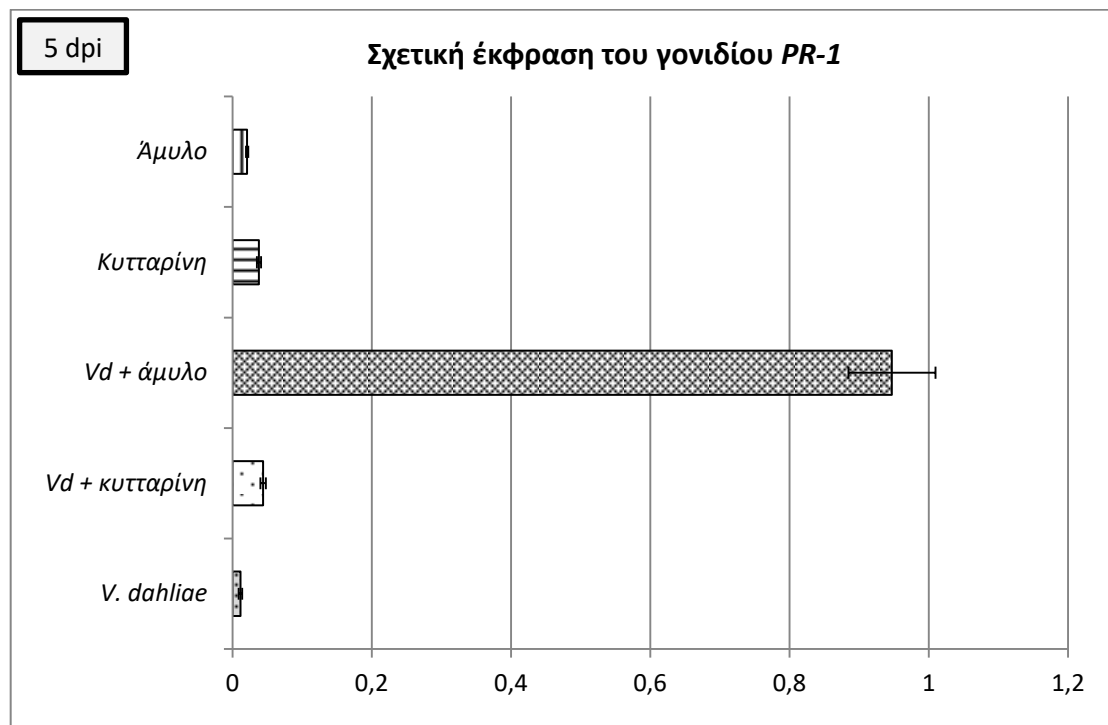
μέσου ύψους του υπέργειου τμήματος των φυτών. Στο *γράφημα 3.2.3*, παρουσιάζεται το μέσο ύψος για τα φυτά των εφαρμογών όπου δεν πραγματοποιήθηκε διαχωρισμός του ριζικού συστήματος σε δύο μέρη. Σύμφωνα με το *γράφημα 3.2.3*, παρατηρούμε ότι το μέσο ύψος των φυτών της εφαρμογής του αμύλου ήταν το μεγαλύτερο, ενώ του μολυσμένου μάρτυρα το χαμηλότερο. Επίσης, το μέσο ύψος των φυτών της εφαρμογής του αμύλου, ήταν στατιστικά υψηλότερο από όλα τα υπόλοιπα μέση ύψη των διαφορετικών εφαρμογών, με τις διαφορές αυτές να είναι στατιστικά σημαντικές. Τα φυτά των εφαρμογών Vd + άμυλο και κυτταρίνη, παρουσίασαν στατιστικά μεγαλύτερο ύψος από τον μολυσμένο μάρτυρα, αλλά δεν διέφεραν σημαντικά από τον αμόλυντο μάρτυρα. Ακόμη, τα φυτά της εφαρμογής Vd + κυτταρίνη δεν παρουσίασαν καμία στατιστικά σημαντική διαφοροποίηση, ως προς το μέσο ύψος τους σε σύγκριση με τον μολυσμένο και τον αμόλυντο μάρτυρα. Τέλος, μεταξύ των εφαρμογών Vd + κυτταρίνη και Vd + άμυλο, δεν υπήρξαν στατικά σημαντικές διαφορές ως προς το μέσο ύψος των φυτών.



Γράφημα 3.2.3: Συγκριτική απεικόνιση του μέσου ύψους των φυτών όπου δεν πραγματοποιήθηκε διαχωρισμός του ριζικού συστήματος σε δύο μέρη. Οι εφαρμογές που διαφέρουν μεταξύ τους στατιστικά σημαντικά σε επίπεδο σημαντικότητας 5% ($\alpha=0.05$), φέρουν διαφορετικό γράμμα σύμφωνα με τον έλεγχο της ελάχιστης σημαντικής διαφοράς του Fisher. Οι κατακόρυφες γραμμές απεικονίζουν το τυπικό σφάλμα.

3.2.4 Σχετική έκφραση του γονιδίου *PR-1*

Στο γράφημα 3.2.4α και β, απεικονίζεται η σχετική έκφραση του γονιδίου *PR-1* στα φύλλα των φυτών όπου δεν πραγματοποιήθηκε διαχωρισμός του ριζικού συστήματος σε δύο μέρη, έπειτα από δειγματοληψίες που πραγματοποιήθηκαν κατά την 5^η και 10^η ημέρα της μόλυνσης με τον μύκητα *V. dahliae*.

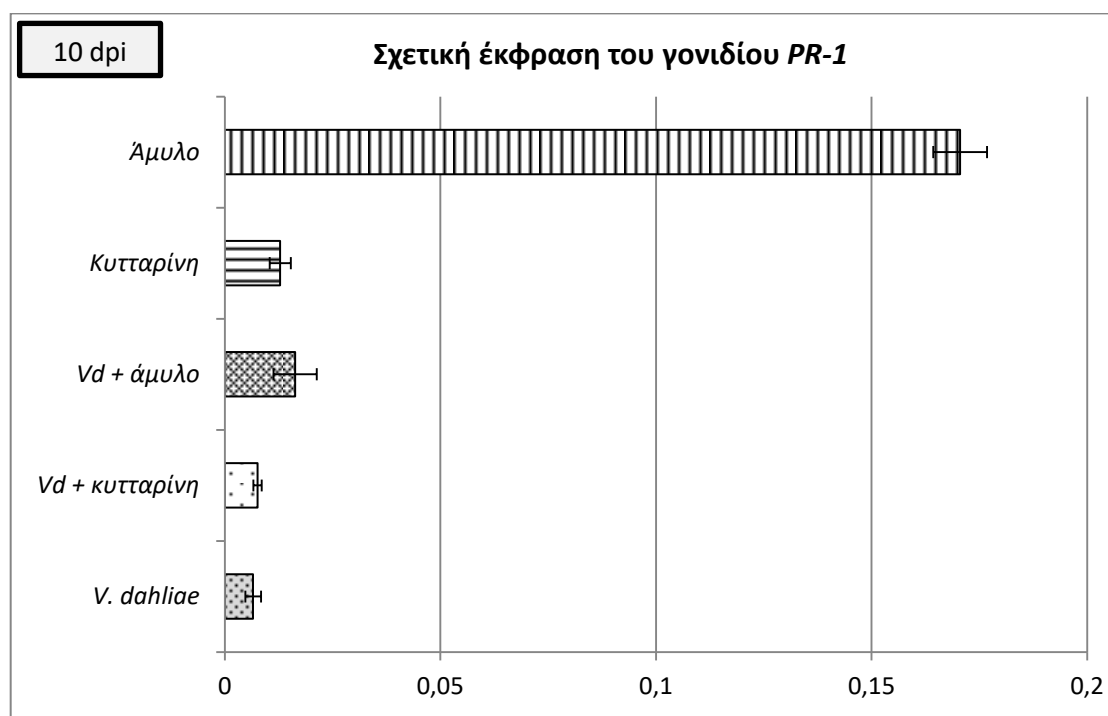


Γράφημα 3.2.4α : Απεικόνιση της σχετικής έκφρασης του γονιδίου *PR-1* των φυτών όπου δεν πραγματοποιήθηκε διαχωρισμός του ριζικού συστήματος σε δύο μέρη κατά την 5^η ημέρα της μόλυνσης με τον μύκητα *V. dahliae*. Οι οριζόντιοι ράβδοι συμβολίζουν την απόκλιση από τον μέσο όρο με βάση το τυπικό σφάλμα.

Σύμφωνα με το γράφημα 3.2.4α, τα υψηλότερα επίπεδα στην έκφραση του γονιδίου *PR-1* κατά την 5^η ημέρα της μόλυνσης, παρουσίασαν οι εφαρμογές Vd + άμυλο και Vd + κυτταρίνη, ενώ τα χαμηλότερα ο μολυσμένος μάρτυρας. Ωστόσο, στην εφαρμογή Vd + κυτταρίνη, τα επίπεδα της έκφρασης του γονιδίου *PR-1* ήταν ιδιαίτερα χαμηλά σε σύγκριση με την εφαρμογή Vd + άμυλο.

Από το γράφημα 3.2.4β, παρατηρούμε ότι τα υψηλότερα επίπεδα στην έκφραση του γονιδίου *PR-1* κατά την 10^η ημέρα της μόλυνσης, παρουσίασε η εφαρμογή του αμύλου, ενώ τα χαμηλότερα ο μολυσμένος μάρτυρας. Οι εφαρμογές Vd + κυτταρίνη και Vd + άμυλο, παρουσίασαν ελαφρώς υψηλότερα επίπεδα στην έκφραση του γονιδίου *PR-1* σε σχέση με τον μολυσμένο μάρτυρα. Τέλος, τα επίπεδα της έκφρασης του γονιδίου *PR-1* στις εφαρμογές που χορηγήθηκε το άμυλο, ήταν υψηλότερα από

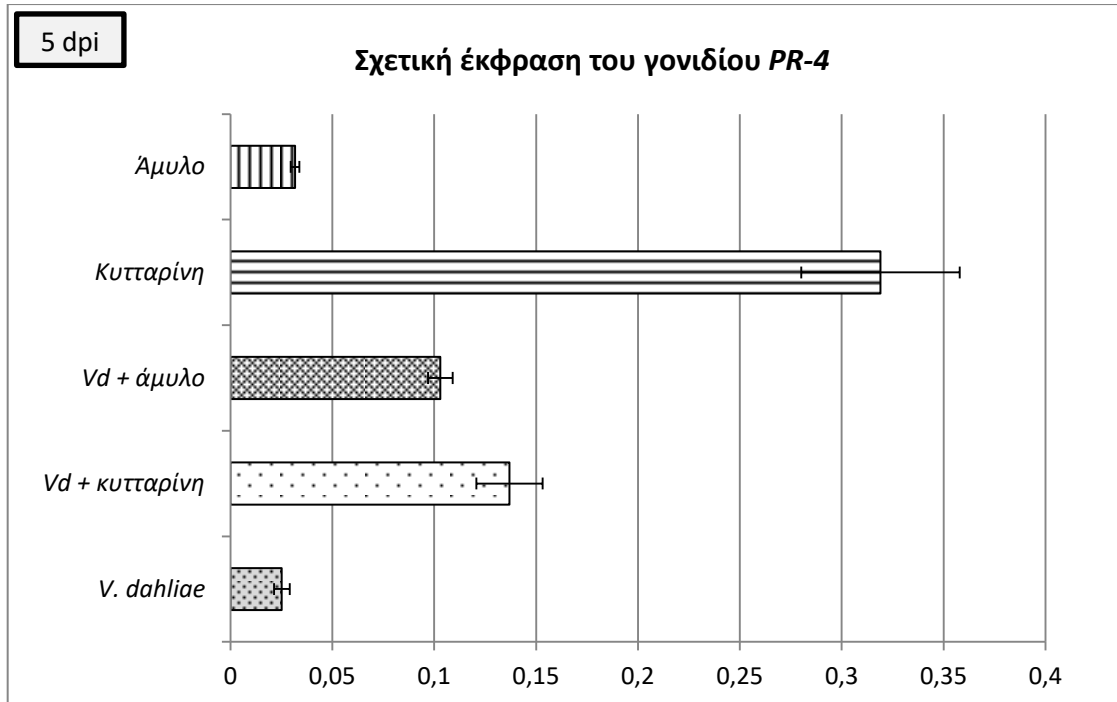
τα αντίστοιχα των εφαρμογών της κυτταρίνης, ανεξαρτήτως της παρουσίας ή όχι του μύκητα *V. dahliae* στο έδαφος.



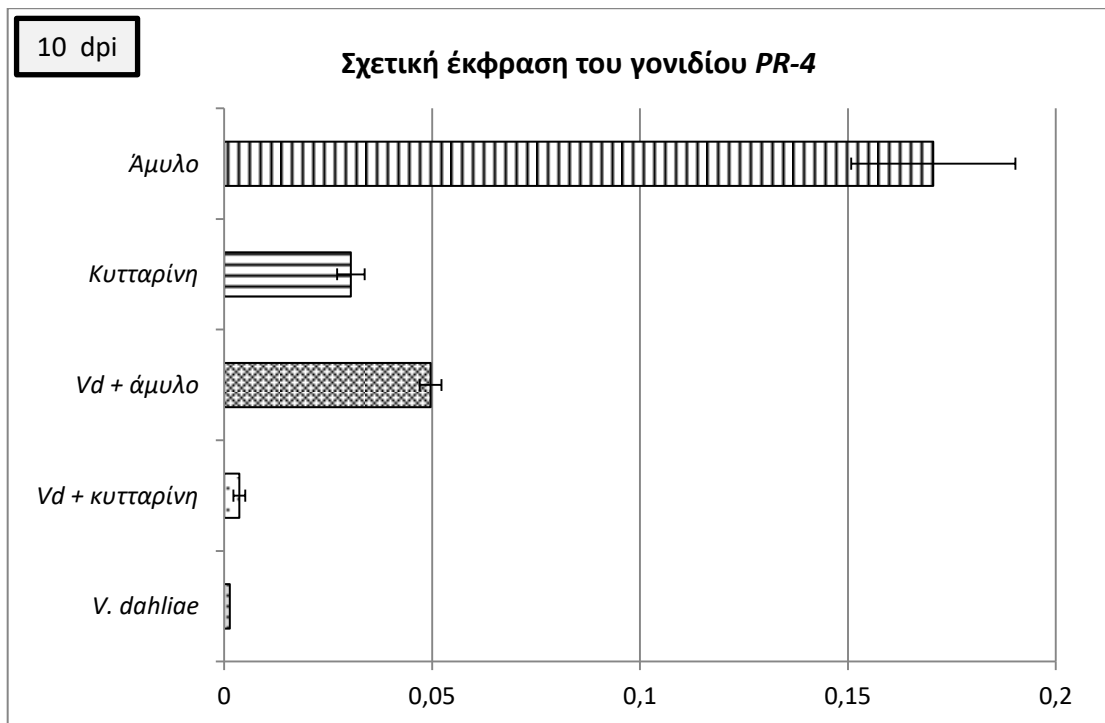
Γράφημα 3.2.1.6β : Απεικόνιση της σχετικής έκφρασης του γονιδίου *PR-1* των εφαρμογών όπου δεν πραγματοποιήθηκε διαχωρισμός του ριζικού συστήματος σε δύο μέρη κατά την 10^η ημέρα της μόλυνσης με τον μύκητα *V. dahliae*. Οι οριζόντιοι ράβδοι συμβολίζουν την απόκλιση από τον μέσο όρο με βάση το τυπικό σφάλμα.

3.2.5 Σχετική έκφραση του γονιδίου *PR-4*

Στα γραφήματα 3.2.5α και β, απεικονίζεται η σχετική έκφραση του γονιδίου *PR-4* στα φύλλα των φυτών όπου δεν πραγματοποιήθηκε διαχωρισμός του ριζικού συστήματος σε δύο μέρη, έπειτα από δειγματοληψίες που πραγματοποιήθηκαν την 5^η και 10^η ημέρα της μόλυνσης με τον μύκητα *V. dahliae*. Στο γράφημα 3.2.5α., παρατηρούμε ότι κατά την 5^η ημέρα της μόλυνσης, τα υψηλότερα επίπεδα στην έκφραση του γονιδίου *PR-4* παρουσιάστηκαν στην εφαρμογή της κυτταρίνης, ενώ τα χαμηλότερα στο μολυσμένο μάρτυρα. Επίσης, στις εφαρμογές Vd + κυτταρίνη και Vd + άμυλο, τα επίπεδα της έκφρασης του γονιδίου *PR-4* ήταν υψηλότερα σε σχέση με τον μολυσμένο μάρτυρα. Γενικά, τα επίπεδα της έκφρασης του γονιδίου *PR-4* στα φυτά που εφαρμόστηκε η κυτταρίνη ήταν υψηλότερα από τα αντίστοιχα των εφαρμογών του αμύλου ανεξαρτήτως της παρουσίας ή όχι του μύκητα *V. dahliae* στο έδαφος.



Γράφημα 3.2.5α : Απεικόνιση της σχετικής έκφρασης του γονιδίου *PR-4* των εφαρμογών όπου δεν πραγματοποιήθηκε διαχωρισμός του ριζικού συστήματος σε δύο μέρη κατά την 5^η ημέρα της μόλυνσης με τον μύκητα *V. dahliae*. Οι οριζόντιοι ράβδοι συμβολίζουν την απόκλιση από τον μέσο όρο με βάση το τυπικό σφάλμα.



Γράφημα 3.2.5β : Απεικόνιση της σχετικής έκφρασης του γονιδίου *PR-4* των εφαρμογών όπου δεν πραγματοποιήθηκε διαχωρισμός του ριζικού συστήματος σε δύο μέρη κατά την 10^η ημέρα της μόλυνσης με τον μύκητα *V. dahliae*. Οι οριζόντιοι ράβδοι συμβολίζουν την απόκλιση από τον μέσο όρο με βάση το τυπικό σφάλμα.

Από το γράφημα 3.2.5β, παρατηρούμε κατά την 10η ημέρα της μόλυνσης, τα υψηλότερα επίπεδα στην έκφραση του γονιδίου PR-4 να παρουσιάζονται στην εφαρμογή του αμύλου, ενώ τα χαμηλότερα στο μολυσμένο μάρτυρα. Επίσης, στις εφαρμογές Vd + κυτταρίνη και Vd + άμυλο, τα επίπεδα της έκφρασης του γονιδίου PR-1 ήταν υψηλότερα σε σχέση με τον μολυσμένο μάρτυρα. Γενικά, τα επίπεδα της έκφρασης του γονιδίου PR-4 στα φυτά που εφαρμόστηκε το άμυλο ήταν υψηλότερα από τα αντίστοιχα των εφαρμογών της κυτταρίνης, ανεξαρτήτως της παρουσίας ή όχι του μύκητα *V. dahliae* στο έδαφος.

4. Συμπεράσματα

Στην παρούσα διπλωματική εργασία, μελετήθηκε η επίδραση του αμύλου και της κυτταρίνης στην παθογένεια του μύκητα *V. dahliae* σε φυτάρια μελιτζάνας, ποικιλία 'Black Beauty'. Συγκεκριμένα, διενεργήθηκαν δοκιμές παθογένειας με δύο πειραματικές μεταχειρίσεις, φυτά στα οποία δεν διαχωρίστηκε το ριζικό σύστημα και φυτά όπου διαχωρίστηκε το ριζικό σύστημα, σε αποστειρωμένο και μη αποστειρωμένο έδαφος.

Στο πρώτο πείραμα (φυτά στα οποία δεν διαχωρίστηκε το ριζικό σύστημα) παρατηρήσαμε ότι κατά την 22^η ημέρα της μόλυνσης, οι εφαρμογές Vd + άμυλο και Vd + κυτταρίνη παρουσιάζουν σε σχέση με τον μολυσμένο μάρτυρα, χαμηλότερα ποσοστά ασθενείας κατά 9,6 % και κατά 22,1 % αντίστοιχα. Παρομοίως, κατά την ίδια χρονική περίοδο στην μεταχείριση όπου διαχωρίστηκε το ριζικό σύστημα τα φυτά των εφαρμογών Vd + άμυλο και Vd + κυτταρίνη, παρουσίασαν και αυτά χαμηλότερα ποσοστά ασθενείας σε σχέση με τον μολυσμένο μάρτυρα, κατά 25,6 % και κατά 39,1 % αντίστοιχα. Από την στατιστική ανάλυση που έγινε για το υπολογισμό του σχετικού εμβαδού ασθενείας, επιβεβαιώθηκε η σημαντικότητα των πιο πάνω διαφορών στις εφαρμογές των μεταχειρίσεων του πρώτου πειράματος. Και στις δύο μεταχειρίσεις του πρώτου πειράματος, τα ποσοστά ασθενείας ήταν χαμηλότερα στην εφαρμογή Vd + κυτταρίνη σε σχέση με την εφαρμογή Vd + άμυλο, όμως από την στατιστική ανάλυση δεν προέκυψαν στατιστικά σημαντικές διαφορές μεταξύ των δύο εφαρμογών. Πέραν της έντασης των συμπτωμάτων της ασθένειας, και η συχνότητα εμφάνισης της ασθένειας ήταν μειωμένη στις εφαρμογές Vd + άμυλο και Vd + κυτταρίνη, σε σχέση με το μολυσμένο μάρτυρα, πράγμα το οποίο παρατηρήθηκε και στις δύο μεταχειρίσεις του πρώτου πειράματος.

Συμπερασματικά, από τις δοκιμές παθογένειας των μεταχειρίσεων του πρώτου πειράματος, διαπιστώθηκε ότι η παρουσία του αμύλου και της κυτταρίνης στο έδαφος, μείωσαν σημαντικά τόσο τα συμπτώματα, όσο και την συχνότητα εμφάνισης της ασθένειας στα φυτάρια της μελιτζάνας. Αυτό υποδεικνύει την σημαντική επίδραση που άσκησε το άμυλο και η κυτταρίνη στην μολυσματικότητα του μύκητα *V. dahliae*. Επιπλέον, τα αποτελέσματα του πρώτου πειράματος, ήγειραν το εύλογο ερώτημα κατά πόσον η σχετική προστασία που παρατηρήσαμε στα φυτάρια της μελιτζάνας, οφείλεται στην άμεση ή στην έμμεση επίδραση των δύο σακχάρων στο έδαφος. Στην άμεση επίδραση, υποθέτουμε ότι τα δύο σάκχαρα επάγουν αμυντικές

αποκρίσεις στα φυτά της μελιτζάνας, ενώ στην έμμεση επίδραση, υποθέτουμε ότι τα δύο σάκχαρα ευνοούν την ανάπτυξη των ήδη προϋπαρχόντων μικροοργανισμών του εδάφους, οι οποίοι δύναται να επηρεάσουν με δύο διαφορετικούς τρόπους την εξέλιξη των συμπτωμάτων της ασθένειας. Στην πρώτη περίπτωση, οι πληθυσμοί των μικροοργανισμών του εδάφους διεγείρουν την επαγόμενη διασυστηματική αντοχή των φυτών (ISR), ενώ στην δεύτερη περίπτωση ανταγωνίζονται το μύκητα *V. dahliae* στην περιοχή της ριζόσφαιρας. Παρ' όλ' αυτά, ο ανταγωνισμός του μύκητα *V. dahliae* στην περιοχή της ριζόσφαιρας, θεωρείται απομακρυσμένο σενάριο στο πρώτο πείραμα, καθώς τα φυτά των εφαρμογών όπου διαχωρίστηκε το ριζικό σύστημα παρουσίασαν σχετική προστασία ενάντια στον μύκητα *V. dahliae*.

Προκειμένου να διακριβώσουμε εάν έχουμε επαγωγή της φυτικής αμύνης στα φυτά της μελιτζάνας, προσδιορίσαμε τα επίπεδα της έκφρασης των γονιδίων PR-1 και PR-4, κατά την 5^η και 10^η ημέρα της μόλυνσης με τον μύκητα *V. dahliae*. Το γονίδιο PR-1 εκφράζεται ως απάντηση στις προσβολές μιας πληθώρας παθογόνων μικροοργανισμών και αποτελεί τον δείκτη για την ενεργοποίηση της SAR στα φυτά (Dzhavakhiya et al., 2007). Αντίθετα, το γονίδιο PR-4 επάγεται από την δραστηριότητα του SA, JA και του ET, και κωδικοποιεί μια ενδοχιτινάση με αντιμυκητιακή δράση. Σύμφωνα με τις μοριακές αναλύσεις του πρώτου πειράματος, τα γονίδια PR-1 και PR-4, υπερεκφράζονται στην εφαρμογή Vd + κυτταρίνη κατά την 5^η ημέρα της μόλυνσης με τον μύκητα *V. dahliae*. Η έκφραση των πιο πάνω γονιδίων παρέμεινε υψηλή και κατά την 10^η ημέρα της μόλυνσης, άλλα αυτή την φορά για τα φυτά της εφαρμογής της κυτταρίνης. Πιο συγκεκριμένα, στην εφαρμογή της κυτταρίνης το γονίδιο PR-4 φαίνεται να υπερεκφράζεται, ενώ τα επίπεδα του γονιδίου PR-1 παραμείναν αυξημένα μεν, αλλά όχι υψηλότερα από τον αμόλυντο μάρτυρα. Με βάση αυτά, μπορούμε να υποθέσουμε εκ πρώτης όψεως, ότι η κυτταρίνη έπαιξε καθοριστικό ρόλο για την αυξημένη έκφραση των πιο πάνω γονιδίων που παρουσιάστηκε στα φυτά της μελιτζάνας του πρώτου πειράματος.

Το δεύτερο πείραμα της παρούσας διπλωματικής εργασίας, πραγματοποιήθηκε με σκοπό να διαπιστωθεί κατά πόσο η σχετική προστασία που παρατηρήσαμε στα φυτά του πρώτου πειράματος, είναι απόρροια των μικροοργανισμών του εδάφους, τους πληθυσμούς των οποίων ευνόησαν οι αυξημένες συγκεντρώσεις των δύο σακχάρων

στο έδαφος. Για να διερευνηθεί αυτό, το εδαφικό υπόστρωμα αποστειρώθηκε δύο φορές με σκοπό την πλήρη απομάκρυνση των προϋπαρχόντων μικροοργανισμών.

Στην μεταχείριση όπου δεν πραγματοποιήθηκε διαχωρισμός του ριζικού συστήματος των φυτών που αναπτύχθηκαν σε αποστειρωμένο έδαφος, παρατηρήσαμε ότι κατά την 35^η ημέρα της μόλυνσης, το ποσοστό της ασθενείας στον μολυσμένο μάρτυρα φτάνει στο 74,4 %, εν αντιθέσει με τις εφαρμογές Vd + άμυλο και Vd + κυτταρίνη που δεν ξεπέρασαν το 57,2 % και το 44,2 % αντίστοιχα. Η στατιστική ανάλυση του σχετικού εμβαδού ασθενείας στην μεταχείριση όπου δεν πραγματοποιήθηκε διαχωρισμός του ριζικού συστήματος, επιβεβαίωσε το χαμηλότερο ποσοστό ασθενείας στις εφαρμογές Vd + άμυλο και Vd + κυτταρίνη, σε σχέση με τον μολυσμένο μάρτυρα. Παρόλο ότι οι μικροοργανισμοί απουσίαζαν από το έδαφος, θα αναμέναμε να έχουμε την ίδια εικόνα στην εκδήλωση των συμπτωμάτων της ασθένειας και στην μεταχείριση όπου διαχωρίστηκε το ριζικό σύστημα. Τουναντίον, στην μεταχείριση όπου διαχωρίστηκε το ριζικό σύστημα των φυτών που αναπτύχθηκαν σε αποστειρωμένο έδαφος, τα ποσοστά της ασθενείας για τον μολυσμένο μάρτυρα ήταν στατιστικά χαμηλότερα σε σχέση με τις εφαρμογές Vd + άμυλο και Vd + κυτταρίνη. Από τα αποτελέσματα του πειράματος στα φυτά των οποίων διαχωρίστηκε το ριζικό σύστημα και αναπτύχθηκαν σε αποστειρωμένο έδαφος, δημιουργήθηκε η υπόνοια ότι απαιτείται η σχέση που προκύπτει από την άμεση επαφή του μύκητα *V. dahliae* με τα δύο σάκχαρα, εν προκειμένου να έχουμε την σχετική προστασία που παρουσίασαν τα φυτά στην μεταχείριση όπου δεν διαχωρίστηκε το ριζικό σύστημα. Η άποψη αυτή στηρίζεται στο γεγονός ότι στην μεταχείριση όπου δεν διαχωρίστηκε το ριζικό σύστημα υπήρξε μία καθυστέρηση στην εκδήλωση των συμπτωμάτων της ασθένειας μέχρι την 19^η ημέρα της μόλυνσης, για τις μεταχειρίσεις Vd + άμυλο και Vd + κυτταρίνη. Αυτό μας προϊδεάζει ότι στην αρχή του πειράματος, ο μύκητας *V. dahliae* προτίμησε να αξιοποιήσει τις εύκολα διαθέσιμες συγκεντρώσεις της κυτταρίνης και του αμύλου που υπήρχαν στο έδαφος προς όφελος της ανάπτυξης του. Όταν όμως οι συγκεντρώσεις των δύο σακχάρων στο έδαφος άρχισαν να μειώνονται, τότε ο μύκητας επέκτεινε τον παρασιτισμό του προς τα φυτά της μελιτζάνας.

Στις μοριακές αναλύσεις του δεύτερου πειράματος, προκύπτει ότι το άμυλο είχε ενεργότερη συμμετοχή στην έκφραση των γονιδίων PR-1 και PR-4 σε σχέση με την κυτταρίνη. Συγκεκριμένα, παρατηρήθηκε αυξημένη έκφραση στο γονίδιο PR-1 στις εφαρμογές Vd + άμυλο και «άμυλο» κατά την 5^η και 10^η ημέρα της μόλυνσης, ενώ

για το γονίδιο PR-4 στις εφαρμογές κυτταρίνη και άμυλο, αντίστοιχα. Αξιοσημείωτο είναι το γεγονός ότι στις εφαρμογές Vd + άμυλο και Vd + κυτταρίνη, τα επίπεδα της έκφραση των γονιδίων PR-1 και PR-4 ήταν ιδιαίτερα υψηλά σε σχέση με τον μολυσμένο μάρτυρα, τόσο κατά την 5^η, όσο και κατά την 10^η ημέρα της μόλυνσης με τον μύκητα *V. dahliae*. Οι πιο πάνω διαφοροποιήσεις στα επίπεδα της έκφρασης των γονιδίων παθογένεσης PR-1 και PR-4 της μελιτζάνας, αποτελούν σημαντικές ενδείξεις ότι το άμυλο και η κυτταρίνη διήγειρε αποτελεσματικά την ISR στα φυτάρια της μελιτζάνας.

Εφόσον στο αποστειρωμένο έδαφος τα δύο σάκχαρα επάγουν την άμυνα των φυτών στα φυτάρια της μεταχείρισης όπου δεν διαχωρίστηκε το ριζικό σύστημα, θα αναμέναμε όπως κάτι αντίστοιχο, τουλάχιστον σε επίπεδο συμπτωμάτων, να συμβαίνει και στα φυτάρια της μεταχείρισης όπου διαχωρίστηκε το ριζικό σύστημα. Από την βιβλιογραφία γνωρίζουμε ότι ο μύκητας *V. dahliae* έχει την ικανότητα να παράγει ορισμένα υδρολυτικά ένζυμα (CDWE) τα οποία διασπών το κυτταρικό τοίχωμα των φυτών. Μέχρι στιγμής γνωρίζουμε ότι ο μύκητας παράγει ένζυμα από 5 διαφορετικές οικογένειες κυτταρινασών (GH6, GH7, GH5, GH12 και GH45), 2 οικογένειες β-γλυκοσιδασών (GH1, GH3) και από μια οικογένεια πολυσακχαριδάσης μονοξυγενάσης (GH61) (Kubicek, Starr & Glass, 2014). Αυτά τα ένζυμα δύναται να διασπάσουν αποτελεσματικά τους δεσμούς β-1,4 της κυτταρίνης. Ωστόσο για το άμυλο, δεν έχει αναφερθεί ακόμη οποιοδήποτε ένζυμο που να παράγεται από την πλευρά του μύκητα και να είναι σε θέση διασπά αποτελεσματικά τους α-1,4 γλυκοζιτικούς δεσμούς του αμύλου. Συνοψίζοντας, υπάρχει η πιθανότητα αυτή η ανοσοποίηση που παρατηρήθηκε στα φυτάρια της μελιτζάνας, να οφείλεται στην υδρολυτική δράση των ενζύμων που παράγει ο μύκητας. Πιο συγκεκριμένα, με την βοήθεια των υδρολυτικών ενζύμων ο μύκητας διάσπασε τους πολυσακχαρίτες του αμύλου και της κυτταρίνης που υπήρχαν στο έδαφος, σε μικρότερου μεγέθους μόρια ολιγοσακχαριτών, τα οποία με την σειρά τους διέγειραν αποτελεσματικά την ISR στα φυτάρια της μελιτζάνας.

Στο δεύτερο πείραμα, τα φυτάρια της μελιτζάνας που έλαβαν μόνο άμυλο ή κυτταρίνη, παρουσίασαν μεγαλύτερη ευρωστία και ανάπτυξη σε σχέση με τα φυτά που δεν έγινε καμία επέμβαση (Mock). Η πιο πάνω παρατήρηση επιβεβαιώθηκε από την στατιστική ανάλυση στις τιμές της μέσης νωπής μάζας του υπέργειου τμήματος των φυτών. Συγκριμένα, τα φυτά των εφαρμογών άμυλο και κυτταρίνη, υπερείχαν σημαντικά σε νωπό βάρος έναντι των υπολοίπων εφαρμογών. Επιπλέον, υπήρξε και η

στατιστικά σημαντική υπέροχή, του μέσου ύψους των φυτών της εφαρμογής του άμυλου, σε σύγκριση με τις υπόλοιπες εφαρμογές των φυτών όπου δεν διαχωρίστηκε το ριζικό σύστημα, καθώς και της εφαρμογής Vd + άμυλο σε σχέση με τον μολυσμένο μάρτυρα. Εν ολίγοις, οι πιο πάνω διαφορές μας οδήγησαν στο συμπέρασμα ότι οι συγκεντρώσεις των δύο σακχάρων στο έδαφος ευνόησαν σημαντικά την ανάπτυξη των φυταρίων της μελιτζάνας. Αυτό ενδεχόμενος να δικαιολογεί και τα εντονότερα συμπτώματα της ασθένειας στις εφαρμογές Vd + άμυλο και Vd + κυτταρίνη, σε σχέση με τον μολυσμένο μάρτυρα, στα φυτά όπου διαχωρίστηκε το ριζικό σύστημα. Διότι από ότι διαφαίνεται, το άμυλο και η κυτταρίνη προώθησαν την ανάπτυξη των φυταρίων της μελιτζάνας εις βάρος της άμυνας. Το γεγονός ότι αυτό δεν παρατηρήθηκε στα φυτά του πρώτου πειράματος της μεταχείρισης όπου διαχωρίστηκε το ριζικό σύστημα, ενισχύει το σενάριο ότι η σχετική προστασία σε αυτή την εφαρμογή, οφείλεται στην επαγωγή της άμυνας από τους μικροοργανισμούς του εδάφους.

5. Συζήτηση

Ο μύκητας *V. dahliae*, είναι ένας εδαφογενής φυτοπαθογόνος μύκητας, ο οποίος έχει προκαλέσει ζημιές δισεκατομμυρίων δολαρίων στις καλλιεργούμενες εκτάσεις παγκοσμίως (Agris, 1997). Η αντιμετώπιση της ασθένειας που προκαλεί ο μύκητας κρίνεται εξαιρετικά δύσκολη, εξαιτίας του μεγάλου εύρους ξενιστών που μολύνει ο μύκητας, αλλά και κυρίως λόγω της ικανότητας του να επιβιώνει στο έδαφος για αρκετά χρόνια υπό την μορφή των μικροσκληρωτίων (Klosterman et al., 2009). Μέχρι στιγμής, δεν έχουν εξευρεθεί αποτελεσματικά χημικά μέσα για την αντιμετώπιση του μύκητα. Ο υποκαπνισμός του εδάφους με βρωμιούχο μεθύλιο, αποτελούσε μια από τις πιο αποτελεσματικές μεθόδους που χρησιμοποιήθηκε στο παρελθόν για την αντιμετώπιση της ασθένειας (Easton, 1970; Easton et al., 1972; Powelson and Carter, 1973). Εξαιτίας όμως των δυσμενών επιπτώσεων του βρωμιούχου μεθυλίου στο περιβάλλον, η χρήση του απαγορεύτηκε το 2005 στην συνθήκη του Μόντρεαλ. Στις μέρες μας, υπάρχει ανάγκη για την εφαρμογή εναλλακτικών μεθόδων φυτοπροστασίας, καθώς και για την χρησιμοποίηση των φυτοπροστατευτικών προϊόντων με τις λιγότερες δυσμενείς επιπτώσεις για τον άνθρωπο και για το περιβάλλον. Η αξιοποίηση των ωφέλιμων μικροοργανισμών του

εδάφους, αλλά και η χρησιμοποίηση νέων χημικών διεγερτών που δύναται να επάγουν αποτελεσματικά την διασυστηματική αντοχή των φυτών, ανήκουν στις νέες τάσεις που εξετάζονται στην βιολογική αντιμετώπιση της ασθένειας. Σε αυτούς τους χημικούς διεγέρτες, ανήκουν και τα σάκχαρα, για τα οποία παρουσιάζεται ένα αυξημένο ερευνητικό ενδιαφέρον τα τελευταία χρόνια. Η μελέτη γύρω από τα σάκχαρα έχει ως απώτερο σκοπό την αποσαφήνιση του ρόλου τους στην άμυνα των φυτών, καθώς και του τρόπου αξιοποίησής τους για την αντιμετώπιση των φυτοπαθογόνων.

Σε αυτή την μελέτη, παρατηρήθηκε αύξηση στην έκφραση των γονιδίων PR-1 και PR-4 στα φυτάρια της μελιτζάνας, έπειτα από ριζοπότισμα που έγινε με υδατικό διάλυμα κυτταρίνης και αμύλου, συγκέντρωσης 100 mM. Παρόμοιες υπερεκφράσεις σε συγκεκριμένα γονίδια που σχετίζονται με την άμυνα των φυτών, παρατηρήθηκαν και σε άλλες μελέτες στις οποίες η εφαρμογή των σακχάρων πραγματοποιήθηκε με ριζοπότισμα. Για παράδειγμα, η χορήγηση 0.5 mM γαλακτινόλης στο ριζικό σύστημα φυταρίων καπνού, οδήγησε στην υπερέκφραση των γονιδίων PR-1a, PR-1b και NtACS, ενώ αύξησε παράλληλα και την αντίσταση κατά του βακτηρίου *Erwinia carotino* και του μύκητα *Botrytis cinerea* (Kim et al., 2008). Επιπρόσθετα, βρέθηκε ότι το ριζοπότισμα φυταρίων ρυζιού με διάλυμα σακχαρόζης 0.3 M, προστατεύει αποτελεσματικά το ρύζι από τον μύκητα *Magnaporthe oryzae*, μέσω της υπερέκφρασης των γονιδίων OsPR1a, OsPR1b, PBZ1 και PR-5 (Gómez-Ariza et al., 2007). Οι υψηλές συγκεντρώσεις των σακχάρων στο έδαφος δεν ενισχύουν πάντοτε το αμυντικό σύστημα των φυτών, καθώς δύναται να ωφελήσουν σημαντικά και τους πληθυσμούς των φυτοπαθογόνων. Εντούτοις, στα περισσότερα φυτικά είδη και κυρίως στα καλλιεργούμενα, τα σάκχαρα μέχρι στιγμής φαίνεται ότι συμβάλλουν στην ενίσχυση των αμυντικών τους αποκρίσεων (Morkunas and Ratajczak, 2014).

Από μελέτες διαπιστώθηκε ότι τα σάκχαρα εμπλέκονται ενεργά στα σηματοδοτικά μονοπάτια των φυτικών ορμονών και φαίνεται να ελέγχουν αποτελεσματικά την έκφραση ενός συνόλου γονιδίων που σχετίζονται με την παθογένεση. Για παράδειγμα, στον καπνό η λαμιναρίνη με βαθμό σουλφιδίωσης 2.4, επάγει μέσω της σηματοδότησης του SA, την έκφραση των PR-1, PR-2, PR-3 και PR-5, εναντίον του ιού TMV (Ménard et al., 2004). Εντούτοις, η έκφραση του PR-1 δεν εξαρτάται πάντοτε από το SA, καθώς η γλυκόζη, η φρουκτόζη και η σακχαρόζη, βρέθηκαν να επάγουν την έκφραση των PR-1 και PR-Q στον καπνό, ανεξάρτητα από το μονοπάτι

της σηματοδότησης του SA (Herbers et al., 1996). Πέραν όμως του SA, στην έκφραση του PR-1 δύναται να συμμετέχουν και άλλες φυτικές ορμόνες, όπως για παράδειγμα το JA, το οποίο βρέθηκε μαζί με το SA να επάγουν την έκφραση του PR-1 ενάντια στον μύκητα *Magnaporthe grisea* (Bolouri Moghaddam and Van den Ende, 2012). Ακόμη, πιθανολογείται ότι δευτερεύοντα σήματα που δρουν παράλληλα με το SA ή βιοχημικοί οδοί που καταλήγουν στην ρύθμιση της σηματοδότησης του SA, οδηγούν σε αυτή την υπερέκφραση των γονιδίων που σχετίζονται με την παθογένεση. Για παράδειγμα, σε φυτά αραβίδωσης τα οποία είχαν αναπτυχθεί σε θρεπτικό διάλυμα σακχαρόζης 2%, παρατηρήθηκε αυξημένη έκφραση στα γονίδια PR-2 και PR-5. Αυτή η υπερέκφραση πιστεύεται ότι έγινε μέσω μιας σηματοδοτικής οδού η οποία πιστεύεται ότι είναι ανεξάρτητη από το μοριακό μονοπάτι της έκφρασης του γονιδίου PR-1 (Thibaud et al., 2004).

Η σχετική προστασία που παρουσίασαν τα φυτά της μελιτζάνας του πρώτου πειράματος, ενδέχεται να οφείλεται σε μεγάλο βαθμό και από τους μικροοργανισμούς του εδάφους. Υπάρχουν αρκετές έρευνες στις οποίες γίνεται μνεία για την σπουδαιότητα ορισμένων μικροοργανισμών να ελέγχουν αποτελεσματικά την ασθένεια της βερτισιλλίωσης. Με βάση τα είδη των μικροοργανισμών που έχουν απομονωθεί μέχρι στιγμής, στα επικρατέστερα γένη μικροοργανισμών που βρέθηκαν παρουσιάζουν ισχυρή βιολογική δράση κατά των μυκήτων της βερτισιλλίωσης, ανήκουν αυτά των *Pseudomonas*, *Bacillus*, *Fusarium*, και *Verticillium* (Deketelaere et al., 2017). Η αποτελεσματικότητα του βιολογικού ελέγχου των φυτοπαθογόνων στο έδαφος, εξαρτάται κυρίως από τον ανταγωνισμό των ωφέλιμων μικροοργανισμών για θέση, ανάπτυξη και για θρέψη στο περιβάλλον της ριζόσφαιρας, αλλά και στην ικανότητα τους να αποικίζουν τους υπόγειους φυτικούς ιστούς (ρίζες), εμποδίζοντας έτσι την μόλυνση από τα παθογόνα (Jabnoun-Khiareddine et al., 2009). Για παράδειγμα, βρέθηκε ότι ο μύκητας *Talaromyces flavus*, καταλαμβάνει τις θέσεις γύρω από την ριζόσφαιρα των φυτών της μελιτζάνας, πατάτας και βαμβακιού, εμποδίζοντας έτσι την βλάστηση των μικροσκληρωτίων του μύκητα *V. dahliae* (Marois et al., 1984). Επιπρόσθετα, οι Tjamos & Fravel (1997), βρήκαν ότι οι πληθυσμοί του μύκητα *T. flavus* ήταν σε μεγαλύτερο ποσοστό στις ρίζες και στα ακρορίζια της μελιτζάνας ‘Black Beauty’, σε σχέση με την ριζόσφαιρα. Ο μύκητας αυτός διαπιστώθηκε ότι στην μελιτζάνα μειώνει σημαντικά την συχνότητα εμφάνισης της βερτισιλλίωσης, αυξάνει τις αποδόσεις (Marois et al., 1982) και μειώνει τα

συμπτώματα της ασθένειας μέχρι και 77 % (Fahima and Henis, 1997). Σε μελιτζάνες θερμοκηπίου που είχαν μολυνθεί από τον μύκητα *V. dahliae*, το βακτηριακό στέλεχος *B. amyloliquefaciens* 5-127, βρέθηκε να μειώνει το ποσοστό των ασθενών φύλλων κατά 40-70%. Αυτό το βακτηριακό στέλεχος, δύναται να μειώσει σε ποσοστό πέραν του 50% την συχνότητα εμφάνισης της βερτισιλλώσεως στις υπαίθριες καλλιέργειες πατάτας (Tjamos et al., 2004).

Οι μικροοργανισμοί του εδάφους που δρουν ως βιολογικοί παράγοντες αντιμετώπισης των ασθενειών, συχνά προάγουν την ανάπτυξη του φυτού και του ριζικού συστήματος. Τα ριζοβακτήρια *Bacillus cereus* AR156, *B. subtilis* SM21 και *Serratia* sp. XY21, βελτιώνουν σημαντικά τις ιδιότητες του εδάφους, καθώς βρέθηκαν να αυξάνουν την οργανική ύλη και την διαθεσιμότητα των θρεπτικών NPK σε φυτά βαμβακιού. Η δραστηριότητα αυτών των ριζοβακτηρίων στο έδαφος, συνέβαλε σημαντικά στην βιολογική αντιμετώπιση του μύκητα *V. dahliae* στο βαμβάκι (Yang et al., 2014). Επίσης, σε προσβεβλημένα από τον μύκητα *V. dahliae*, φυτά τομάτας και μελιτζάνας, βρέθηκε ότι ο αποικισμός του ριζικού τους συστήματος από την μυκόρριζα *Funneliformes mosseae* συμβάλλει σημαντικά στην αυξημένη πρόσληψη φώσφορου και αζώτου από το έδαφος (Karagiannidis et al., 2002).

Ορισμένοι μικροοργανισμοί δύναται να επάγουν στα φυτά αμυντικές αποκρίσεις και την ανοσοποίηση σε μελλοντικές προσβολές των φυτοπαθογόνων (SAR). Το ριζοβακτήριο *P. alvei* K-165 και ο μύκητας *F. oxysporum* F2, βρέθηκαν να επάγουν στην μελιτζάνα την έκφραση των γονιδίων PR-1 και PR-4 ενάντια στην προσβολή του μύκητα *V. dahliae*. Η έκφραση των παραπάνω γονιδίων στην μελιτζάνα, παρουσίασε μια άμεση θετική συσχέτιση με τους πληθυσμούς των δυο μικροοργανισμών στην περιοχή της ριζόσφαιρας (Angelopoulou et al., 2014). Στην αραβίδοψη, η ανθεκτικότητα που επάγεται από το βακτηριακό στέλεχος *P. alvei* K-165 εναντίον του μύκητα *V. dahliae*, είναι εξαρτώμενη από τα μονοπάτι σηματοδότησης του SA (Tjamos et al., 2005).

Η σπουδαιότητα και ο πρωταγωνιστικός ρόλος ορισμένων σακχάρων στην άμυνα των φυτών, οδήγησε πρόσφατα στις έννοιες της «γλυκιάς ανοσοποίησης» (sweet immunity) και της «ενισχυμένης από σάκχαρα άμυνας» (sugar enhanced defense) (Bolouri Moghaddam and Van den Ende, 2012). Ωστόσο, η επαγόμενη εκ των σακχάρων φυτική ανοσοποίηση, σε ελάχιστες περιπτώσεις οδήγησε στην αποτελεσματική αντιμετώπιση των φυτοπαθογόνων (Trouvelot et al., 2014).

Χαρακτηριστικά παραδείγματα, αποτελούν η λαμιναρίνη ενάντια των *Plasmopara viticola* και *Botrytis cinerea* στο αμπέλι (Aziz et al., 2003), η χιτίνη εναντίον του *Magnaporthe oryzae* στο ρύζι (Tanabe et al., 2006) και τα ολιγογαλακτουρονίδια εναντίον του *B. cinerea* στην αραβίδοψη (Aziz et al., 2004; Ferrari et al., 2007). Παρόλο που τα σάκχαρα κατέχουν σημαντικό ρόλο στις βασικές λειτουργίες της άμυνας των φυτών, ο ακριβής τους ρόλος στις αλληλεπιδράσεις φυτών–παθογόνων παραμένει σε μεγάλο βαθμό ασαφής, καθώς οι μηχανισμοί της άμυνας του φυτού είναι ιδιαίτερα περίπλοκοι (Trouvelot et al., 2014). Τα μέχρι πρότινος αποτελέσματα από την χρήση των σακχάρων στην βιολογική αντιμετώπιση των φυτοπαθογόνων, δίνουν ιδιαίτερα ελπιδοφόρα μηνύματα για το μέλλον. Εάν τα σάκχαρα θα μπορέσουν στο άμεσο μέλλον να ενσωματωθούν και να εφαρμοστούν αποτελεσματικά στις διαδικασίες της ολοκληρωμένης αντιμετώπισης των φυτικών ασθενειών, είναι κάτι το οποίο χρήζει μεγαλύτερης και πιο εμπειριστατωμένης έρευνας, τόσο σε επίπεδο θερμοκηπίου, όσο και στο επίπεδο του αγρού για να απαντηθεί. Η εξεύρεση της κατάλληλης μορφής για τυποποίηση και η αποδόμηση τους από τους μικροοργανισμούς, αποτελούν τα κυριότερα προβλήματα που πρέπει να ξεπεραστούν ώστε η εφαρμογή τους να είναι αποτελεσματική στα προγράμματα της καταπολέμησης των φυτικών ασθενειών. Επιπρόσθετα, σε σχέση με τα φυτοπροστατευτικά προϊόντα που δρουν απευθείας στο παθογόνο, η χρήση των σακχάρων απαιτεί την παρουσία ενός συστήματος αντίληψης των «σακχάρων-διεγερτών» από την πλευρά του φυτού. Το οποίο να μεν υπάρχει, αλλά φαίνεται να επηρεάζεται από πάρα πολλούς παράγοντες (Trouvelot et al., 2014). Ενδεχόμενος, μια ερευνητική πρόοδος όσον αφορά τους υποδοχείς των φυτών (PPRs), να αποτελέσει τον μελλοντικό οδηγό για την επιλογή των κατάλληλων σακχάρων-διεγερτών για το κάθε φυτικό είδος ξεχωριστά. Επιπρόσθετα, το στάδιο ανάπτυξης του φυτού, οι γενότυποι των παθογόνων και οι διάφορες αβιοτικές καταπονήσεις, συμπεριλαμβανομένου και της έλλειψης θρεπτικών στοιχείων, αποτελούν μερικούς από τους παράγοντες που δύναται να επηρεάσουν τις αποκρίσεις των φυτών (Trouvelot et al., 2014). Επομένως, η έρευνα για την αποσαφήνιση του ρόλου των σακχάρων στις διάφορες βιοχημικές και φυσιολογικές λειτουργίες του φυτού, θα αποτελέσει σε συνδυασμό με άλλες στρατηγικές, σημαντικό μέρος της ολοκληρωμένης αντιμετώπισης των ασθενειών των φυτών.

6. Βιβλιογραφία

- Αϊβαλάκης, Γ., Καραμπουρνιώτης, Γ. και Φασσέας, Κ., 2005.** Γενική Βοτανική. Εκδόσεις Έμβρυο, σελ. 496.
- Διαμαντίδης, Γ., 2010.** Εισαγωγή στην βιοχημεία. Θεσσαλονίκη: University Studio Press, σελ. 417.
- Ζιώγας, Β. και Μαρκόγλου, Α., 2010.** Γεωργική φαρμακολογία. Εκδόσεις Έμβρυο, σελ. 846.
- Ιμπραχίμ-Αβραάμ Χα και Πετρόπουλος, Σ., 2014.** Γενική Λαχανοκομία & Υπαίθρια Καλλιέργεια Λαχανικών. Πανεπιστημιακές Εκδόσεις Θεσσαλίας, σελ. 712
- Ολύμπιος, Χ. Μ., 2015.** Η τεχνική της καλλιέργειας των υπαίθριων κηπευτικών. Αθήνα: Αθ. Σταμούλης, σελ. 886.
- Παναγόπουλος, Χ.Γ., 1995.** Ασθένειες Κηπευτικών Καλλιεργειών. Εκδόσεις Β. Αθήνα-Πειραιάς: Αθ.Σταμούλης. σελ. 480.
- Παναγόπουλος, Χ. Γ., 2007.** Ασθένειες Καρποφόρων Δένδρων και αμπέλου. Εκδόσεις Α. Αθήνα-Πειραιάς: Αθ.Σταμούλης, σελ. 206-217.
- Τζάμος, Ε. Κ., 2007.** Φυτοπαθολογία. Εκδόσεις Β. Αθήνα: Σταμούλη Α.Ε, σελ. 557.
- Χατζόπουλος, Π., 2001.** Βιοτεχνολογία Φυτών. Εκδόσεις Έμβρυο, σελ. 510.
- Abbott, D.W., Boraston, A.B., 2008.** Structural biology of pectin degradation by Enterobacteriaceae. *Microbiol. Mol. Biol. Rev.* 72, 301–16, table of contents.
- Agrawal, G.K., Rakwal, R., Jwa, N.-S., 2001.** Differential induction of three pathogenesis-related genes, PR10, PR1b and PR5 by the ethylene generator ethephon under light and dark in rice (*Oryza sativa* L.) seedlings. *J. Plant Physiol.* 158, 133–137.
- Agrios, G., 1997.** *Plant Pathology.* Academic Press., San Diego.
- Alfen, N.K. Van, 1989.** Molecular bases for virulence and avirulence of fungal wilt pathogens. In: Tjamos, E.C., Beckman, C.H. (Eds.), *Vascular Wilt Diseases of Plants.* Springer, Berlin, p. 284.
- Alghisi, P., Favaron, F., 1995.** Pectin-degrading enzymes and plant-parasite interactions. *Eur. J. Plant Pathol.* 101, 365–375.
- Allègre, M., Héloir, M.-C., Trouvelot, S., Daire, X., Pugin, A., Wendehenne, D., Adrian, M., 2009.** Are Grapevine Stomata Involved in the Elicitor-Induced Protection Against Downy Mildew? *Mol. Plant-Microbe Interact.* 22, 977–986.
- Anand, A., Uppalapati, S.R., Ryu, C.-M., Allen, S.N., Kang, L., Tang, Y., Mysore, K.S., 2007.** Salicylic Acid and Systemic Acquired Resistance Play a Role in Attenuating Crown Gall Disease Caused by *Agrobacterium tumefaciens*. *PLANT Physiol.* 146, 703–715.
- Andersen, E.J., Ali, S., Byamukama, E., Yen, Y., Nepal, M.P., 2018.** Disease resistance mechanisms in plants. *Genes (Basel)*. 9.
- Angelopoulou, D.J., Naska, E.J., Paplomatas, E.J., Tjamos, S.E., 2014.** Biological control agents (BCAs) of verticillium wilt: Influence of application rates and delivery method on plant protection, triggering of host defence mechanisms and rhizosphere populations of BCAs. *Plant Pathol.* 63, 1062–1069.

- Asselbergh, B., Curvers, K., Franca, S.C., Audenaert, K., Vuylsteke, M., Van Breusegem, F., Hofte, M., 2007.** Resistance to *Botrytis cinerea* in sitiens, an Abscisic Acid-Deficient Tomato Mutant, Involves Timely Production of Hydrogen Peroxide and Cell Wall Modifications in the Epidermis. *PLANT Physiol.* 144, 1863–1877.
- Atallah, Z.K., Maruthachalam, K., Koike, S.T., Davis, R.M., Klosterman, S.J., Hayes, R.J., Subbarao, K. V., 2010.** Population analyses of the vascular plant pathogen *Verticillium dahliae* detect recombination and transcontinental gene flow. *Fungal Genet. Biol.* 47, 416–422.
- Aziz, A., Heyraud, A., Lambert, B., 2004.** Oligogalacturonide signal transduction, induction of defense-related responses and protection of grapevine against *Botrytis cinerea*. *Planta* 218, 767–774.
- Aziz, A., Poinssot, B., Daire, X., Adrian, M., Bézier, A., Lambert, B., Joubert, J.-M., Pugin, A., 2003.** Laminarin Elicits Defense Responses in Grapevine and Induces Protection Against *Botrytis cinerea* and *Plasmopara viticola*, *Molecular Plant-Microbe Interactions MPMI*.
- Baena-González, E., 2010.** Energy Signaling in the Regulation of Gene Expression during Stress. *Mol. Plant* 3, 300–313.
- Baena-González, E., Rolland, F., Thevelein, J.M., Sheen, J., 2007.** A central integrator of transcription networks in plant stress and energy signalling. *Nature* 448, 938–942.
- Baena-González, E., Sheen, J., 2008.** Convergent energy and stress signaling. *Trends Plant Sci.* 13, 474–482.
- Barbara, D., Clewes, E., 2003.** Plant pathogenic *Verticillium* species : how many of them are there ? *Mol. Plant Pathol.* 4, 297–305.
- Bargabus, R.L., Zidack, N.K., Sherwood, J.E., Jacobsen, B.J., 2002.** Characterisation of systemic resistance in sugar beet elicited by a non-pathogenic, phyllosphere-colonizing *Bacillus mycoides*, biological control agent. *Physiol. Mol. Plant Pathol.* 61, 289–298.
- Bartsch, M., Bednarek, P., Vivancos, P.D., Schneider, B., von Roepenack-Lahaye, E., Foyer, C.H., Kombrink, E., Scheel, D., Parker, J.E., 2010.** Accumulation of Isochorismate-derived 2,3-Dihydroxybenzoic 3- *O* - β -d-Xyloside in *Arabidopsis* Resistance to Pathogens and Ageing of Leaves. *J. Biol. Chem.* 285, 25654–25665.
- Baxter, A., Mittler, R., Suzuki, N., 2014.** ROS as key players in plant stress signalling. *J. Exp. Bot.* 65, 1229–1240.
- Benhamou, N., 1995.** Ultrastructural and cytochemical aspects of the response of eggplant parenchyma cells in direct contact with *Verticillium*-infected xylem vessels. *Physiol. Mol. Plant Pathol.* 46, 321–338.
- Benhamou, N., Chet, I., 1997.** Cellular and Molecular Mechanisms Involved in the Interaction between *Trichoderma harzianum* and *Pythium ultimum*. *Appl. Environ. Microbiol.* 63, 2095–9.
- Bent, A.F., Innes, R.W., Ecker, J.R., Staskawicz, B.J., 1992.** Disease development in ethylene-insensitive *Arabidopsis thaliana* infected with virulent and avirulent *Pseudomonas* and *Xanthomonas* pathogens. *Mol. Plant-Microbe Interact.* 5, 372–378.
- 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. *Physiol. Plant.* 122, 419–428.
- Berger, S., Sinha, A.K., Roitsch, T., 2007.** Plant physiology meets phytopathology: plant primary metabolism and plant pathogen interactions. *J. Exp. Bot.* 58, 4019–4026.

- Berlanger, I., Powelson, M.L., 2000.** Verticillium wilt. Plant Heal. Instr.
- Bhat, R.G., Subbarao, K. V, 1999.** Host Range Specificity in *Verticillium dahliae*.
- Bidochka, M.J., Burke, S., Ng, L., 1999.** Extracellular hydrolytic enzymes in the fungal genus *Verticillium* : adaptations for pathogenesis. *Can. J. Microbiol.* 45, 856–864.
- Bigeard, J., Colcombet, J., Hirt, H., 2015a.** Signaling Mechanisms in Pattern-Triggered Immunity (PTI). *Mol. Plant* 8, 521–539.
- Bigeard, J., Colcombet, J., Hirt, H., 2015b.** Signaling Mechanisms in Pattern-Triggered Immunity (PTI). *Mol. Plant* 8, 521–539.
- Birch, A.N.E., Robertson, W.M., Geoghegan, I.E., McGavin, W.J., Alphey, T.J.W., Phillips, M.S., Fellows, L.E., Watson, A.A., Simmonds, M.S.J., Porter, E.A., 1999.** Nematology : international journal of fundamental and applied nematological research., *Nematologica*. Brill.
- Bishop, C.D., Cooper, R.M., 1983.** An ultrastructural study of root invasion in three vascular wilt diseases. *Physiol. Plant Pathol.* 22, 15–IN13.
- Bolouri-Moghaddam, M.R., Le Roy, K., Xiang, L., Rolland, F., Van den Ende, W., 2010.** Sugar signalling and antioxidant network connections in plant cells. *FEBS J.* 277, 2022–2037.
- Bolouri Moghaddam, M.R., Van den Ende, W., 2012.** Sugars and plant innate immunity. *J. Exp. Bot.* 63, 3989–3998.
- Bolton, M.D., 2009.** Primary Metabolism and Plant Defense—Fuel for the Fire. *Mol. Plant-Microbe Interact.* 22, 487–497.
- Bonfig, K.B., 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.
- 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. *Proc. Natl. Acad. Sci.* 107, 9452–9457.
- Buchner, V., Burstein, Y., Nachmias, A., 1989.** Comparison of *Verticillium dahliae*-produced phytotoxic peptides purified from culture fluids and infected potato stems. *Physiol. Mol. Plant Pathol.* 35, 253–269.
- Buchner, V., Nachmias, A., Burstein, Y., 1982.** Isolation and partial characterization of a phytotoxic glycopeptide from a protein-lipopolysaccharide complex produced by a potato isolate of *Verticillium dahliae*. *FEBS Lett.* 138, 261–264.
- Buckley, P.M., Wyllie, T.D., Devay, J.E., 1969.** Fine structure of conidia and conidium formation in *Verticillium albo-atrum* and *V. nigrescens*. 61, 240–250.
- Cao, H., Bowling, S.A., Gordon, A.S., Dong, X., 1994.** Characterization of an *Arabidopsis* Mutant That Is Nonresponsive to Inducers of Systemic Acquired Resistance. *PLANT CELL ONLINE* 6, 1583–1592.
- Chen, H.-J., Smith, D., Starrett, D., Zhou, D., Tucker, M., Solomos, T., Gross, K., 1997.** Cloning and characterization of a rhamnogalacturonan hydrolase gene from *Botrytis cinerea*. *IUBMB Life* 43, 823–838.
- Chen, L.-Q., Hou, B.-H., Lalonde, S., Takanaga, H., Hartung, M.L., Qu, X.-Q., Guo, W.-J., Kim, J.-G., Underwood, W., Chaudhuri, B., Chermak, D., Antony, G., White, F.F.,**

- Somerville, S.C., Mudgett, M.B., Frommer, W.B., 2010.** Sugar transporters for intercellular exchange and nutrition of pathogens. *Nature* 468, 527–532.
- Chen, P., Lee, B., Robb, J., 2004.** Tolerance to a non-host isolate of *Verticillium dahliae* in tomato 64, 283–291.
- Chen, Z., Silva, H., Klessig, D.F., 1993.** Active oxygen species in the induction of plant systemic acquired resistance by salicylic acid. *Science* 262, 1883–6.
- Cheng, C., Gao, X., Feng, B., Sheen, J., Shan, L., He, P., 2013.** Plant immune response to pathogens differs with changing temperatures. *Nat. Commun.* 4, 2530.
- Cheong, J.-J., Hahn, M.G., 1991.** A Specific, High-Affinity Binding Site for the Hepta- α -glucoside Elicitor Exists in Soybean Membranes, *The Plant Cell*. American Society of Plant Physiologists.
- Chinchilla, D., Bauer, Z., Regenass, M., Boller, T., Felix, G., 2006.** The Arabidopsis Receptor Kinase FLS2 Binds flg22 and Determines the Specificity of Flagellin Perception W. *Plant Cell* 18, 465–476.
- Chisholm, S.T., Coaker, G., Day, B., Staskawicz, B.J., 2006.** Host-Microbe Interactions: Shaping the Evolution of the Plant Immune Response. *Cell* 124, 803–814.
- Cho, Y.-H., Hong, J.-W., Kim, E.-C., Yoo, S.-D., 2012.** Regulatory functions of SnRK1 in stress-responsive gene expression and in plant growth and development. *Plant Physiol.* 158, 1955–64.
- Cooper, D.G., Zajic, J.E., 1980.** Surface-Active Compounds from Microorganisms. *Adv. Appl. Microbiol.* 26, 229–253.
- Cooper, R.M., Bishop, C.D., 1983.** An ultrastructural study of vascular colonization three vascular wilt diseases I. Colonization of susceptible cultivars. *Physiol. Plant Pathol.* 23, 323–343.
- Cooper, W.R., Jia, L., Goggin, L., 2005.** Effects of Jasmonate-Induced Defenses on Root-Knot Nematode Infection of Resistant and Susceptible Tomato Cultivars. *J. Chem. Ecol.* 31, 1953–1967.
- Creelman, R.A., Mullet, J.E., 1995.** Jasmonic acid distribution and action in plants: regulation during development and response to biotic and abiotic stress. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 92, 4114–9.
- Creelman, R.A., Tierney, M.L., Mullet, J.E., 1992.** Jasmonic acid/methyl jasmonate accumulate in wounded soybean hypocotyls and modulate wound gene expression. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 89, 4938–41.
- Culleton, H., McKie, V., de Vries, R.P., 2013.** Physiological and molecular aspects of degradation of plant polysaccharides by fungi: What have we learned from *Aspergillus*? *Biotechnol. J.* 8, 884–894.
- Da Costa, A., Michaud, P., Petit, E., Heyraud, A., Colin-Morel, P., Courtois, B., Courtois, J., 2001.** Purification and properties of a glucuronan lyase from *Sinorhizobium meliloti* M5N1CS (NCIMB 40472). *Appl. Environ. Microbiol.* 67, 5197–203.
- Dahiya, N., Tewari, R., Hoondal, G.S., 2006.** Biotechnological aspects of chitinolytic enzymes: a review. *Appl. Microbiol. Biotechnol.* 71, 773–782.
- Davis, D.A., Low, P.S., Heinstejn, P., 1998.** Purification of a glycoprotein elicitor of phytoalexin formation from *Verticillium dahliae*. *Physiol. Mol. Plant Pathol.* 52, 259–273.

- De Lorenzo, G., D'Ovidio, R., Cervone, F., 2001.** The role of polygalacturonase -inhibiting proteins (pgips) in defense against pathogenic fungi. *Annu. Rev. Phytopathol.* 39, 313–335.
- Deikman, J., Hammer, P.E., 1995.** Induction of Anthocyanin Accumulation by Cytokinins A *rabidopsis thaliana*’, *Plant Physiol.*
- Deketelaere, S., Tyvaert, L., França, S.C., Hofte, M., 2017.** Desirable traits of a good biocontrol agent against *Verticillium* wilt. *Front. Microbiol.* 8, 1–23.
- Delaney, T.P., Friedrich, L., Ryals, J.A., 1995.** Arabidopsis signal transduction mutant defective in chemically and biologically induced disease resistance. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 92, 6602–6.
- Derridj, S., 1996.** Nutrients on the Leaf Surface. In: *Aerial Plant Surface Microbiology*. Springer US, Boston, MA, pp. 25–42.
- Derridj, S., Elad, Y., Birch, A.N.E., 2012.** Sugar signaling as a new way for vegetable and fruit induced resistance against insects , pathogens and nematodes 83, 2012.
- Dobinson, K.F., Lecomte, N., Lazarovits, G., 1997.** Production of an extracellular trypsin-like protease by the fungal plant pathogen *Verticillium dahliae*. *Can. J. Microbiol.* 43, 227–233.
- Du, L., Ali, G.S., Simons, K.A., Hou, J., Yang, T., Reddy, A.S.N., Poovaiah, B.W., 2009.** Ca²⁺/calmodulin regulates salicylic-acid-mediated plant immunity. *Nature* 457, 1154–1158.
- Duijff, B., Phytologist, V.G.-P.-T.N., 1997, U., 1997.** Involvement of the outer membrane lipopolysaccharides in the endophytic colonization of tomato roots by biocontrol *Pseudomonas fluorescens* strain. *New Phytol.* 325–334.
- Durrands, P.K., Cooper, R.M., 1988.** Selection and characterization of pectinase-deficient mutants of the vascular wilt pathogen *Verticillium albo-atrum*. *Physiol. Mol. Plant Pathol.* 32, 343–362.
- Durrant, W.E., Dong, X., 2004.** Systemic acquired resistance. *Annu. Rev. Phytopathol.* 42, 185–209.
- Dzhavakhiya, V.G., Ozeretskovskaya, O.L., Zinovyeva, S.V., 2007.** Immune response. In: *Comprehensive and Molecular Phytopathology*. Elsevier, pp. 265–314.
- Easton, G.D., 1970.** Systemic insecticides, soil fumigation, and nitrogen fertilization for verticillium wilt control. *Am. Potato J.* 47, 419–426.
- Easton, G.D., Nagle, M.E., Bailey, D.L., 1972.** Effect of annual soil fumigation and preharvest vine burning on *Verticillium* wilt of potato. *Phytopathology*.
- Ebrahim, S., Usha, K., Singh, B., 2011.** Pathogenesis Related (PR) Proteins in Plant Defense Mechanism Pathogenesis-Related (PR) Proteins. *Div. Fruist Hortic. Technol. Memories*, 1043–1054.
- Egea, C., García Pérez, M.D., Candela, M.E., 1996.** Capsidiol accumulation in *Capsicum annum* stems during the hypersensitive reaction to *Phytophthora capsici*. *J. Plant Physiol.* 149, 762–764.
- Ehness, R., Ecker, M., Godt, D.E., Roitsch, T., 1997.** Glucose and Stress Independently Regulate Source and Sink Metabolism and Defense Mechanisms via Signal Transduction Pathways Involving Protein Phosphorylation. *Plant Cell* 9, 1825–1841.
- Eichert, T., Burkhardt, J., 2001.** Quantification of stomatal uptake of ionic solutes using a new model system. *J. Exp. Bot.* 52, 771–781.

- Eichert, T., Goldbach, H.E., 2008.** Equivalent pore radii of hydrophilic foliar uptake routes in stomatous and astomatous leaf surfaces – further evidence for a stomatal pathway. *Physiol. Plant.* 132, 491–502.
- Eichert, T., Kurtz, A., Steiner, U., Goldbach, H.E., 2008.** Size exclusion limits and lateral heterogeneity of the stomatal foliar uptake pathway for aqueous solutes and water-suspended nanoparticles. *Physiol. Plant.* 134, 151–160.
- Elad, Y., Baker, R., 1985.** Influence of trace amounts of cations and siderophore-producing pseudomonads on chlamyospore germination of *Fusarium oxysporum*. *Ecol. Epidemiol* 1047–1052.
- Essmann, J., Schmitz-Thom, I., Schön, H., Sonnewald, S., Weis, E., Scharte, J., 2008.** RNA interference-mediated repression of cell wall invertase impairs defense in source leaves of tobacco. *Plant Physiol.* 147, 1288–99.
- Fahima, T., Henis, Y., 1997.** Biological Control of Soil-Borne Plant Pathogens Hornby” (A. Alavi, A. Ahoonmanesh, eds.). In: Increasing of *Trichoderma Hamatum* and *Talaromyces Flavus* on the Root of Safe and Useful Hosts. pp. 296–322.
- Fahima, T., Madi, L., Henis, Y., 1992.** Ultrastructure and germinability of *Verticillium dahliae* microsclerotia parasitized by *Talaromyces flavus* on agar medium and in treated soil. *Biocontrol Sci. Technol.* 2, 69–78.
- Felix, G., Boller, T., 2003.** Molecular sensing of bacteria in plants. The highly conserved RNA-binding motif RNP-1 of bacterial cold shock proteins is recognized as an elicitor signal in tobacco. *J. Biol. Chem.* 278, 6201–8.
- Felix, G., Duran, J.D., Volko, S., Boller, T., 1999.** Plants have a sensitive perception system for the most conserved domain of bacterial flagellin. *Plant J.* 18, 265–276.
- Ferrari, S., Galletti, R., Denoux, C., De Lorenzo, G., Ausubel, F.M., Dewdney, J., 2007.** Resistance to *Botrytis cinerea* Induced in *Arabidopsis* by Elicitors Is Independent of Salicylic Acid, Ethylene, or Jasmonate Signaling But Requires Phytoalexin Deficient 3 1[W].
- Flor, H.H., 1955.** Host-parasite interaction in flax rust-its genetics and other implications. *Phytopathology* 45, 680–685.
- Fotopoulos, V., Gilbert, M.J., Pittman, J.K., Marvier, A.C., Buchanan, A.J., Sauer, N., Hall, J.L., Williams, L.E., 2003.** The Monosaccharide Transporter Gene, AtSTP4, and the Cell-Wall Invertase, Atfruct1, Are Induced in *Arabidopsis* during Infection with the Fungal Biotroph *Erysiphe cichoracearum* 1.
- Fradin, E., Thomma, B., 2006.** Physiology and molecular aspects of *Verticillium* wilt diseases caused by *V. dahliae* and *V. albo-atrum* 7, 71–86.
- Frank, Z.R., Ben-Yephet, Y., Katan, J., 1986.** Synergistic effect of metham and solarization in controlling delimited shell spots of peanut pods. *Crop Prot.* 5, 199–202.
- Frías, M., Brito, N., González, C., 2013.** The *Botrytis cinerea* cerato-platanin BcSpl1 is a potent inducer of systemic acquired resistance (SAR) in tobacco and generates a wave of salicylic acid expanding from the site of application. *Mol. Plant Pathol.* 14, 191–196.
- Fu, Y., Yin, H., Wang, W., Wang, M., Zhang, H., Zhao, X., Du, Y., 2011.** β -1,3-Glucan with different degree of polymerization induced different defense responses in tobacco. *Carbohydr. Polym.* 86, 774–782.
- Fukumoto, T., Kano, A., Ohtani, K., Yamasaki-Kokudo, Y., Kim, B.-G., Hosotani, K., Saito, M., Shirakawa, C., Tajima, S., Izumori, K., Ohara, T., Shigematsu, Y., Tanaka, K.,**

- Ishida, Y., Nishizawa, Y., Tada, Y., Ichimura, K., Gomi, K., Akimitsu, K., 2011.** Rare sugar d-allose suppresses gibberellin signaling through hexokinase-dependent pathway in *Oryza sativa* L. *Planta* 234, 1083–1095.
- Galletti, R., Denoux, C., Gambetta, S., Dewdney, J., Ausubel, F.M., De Lorenzo, G., Ferrari, S., 2008.** The AtrbohD-Mediated Oxidative Burst Elicited by Oligogalacturonides in *Arabidopsis* Is Dispensable for the Activation of Defense Responses Effective against *Botrytis cinerea* 1[W][OA].
- Gazendam, I., Oelofse, D., Berger, D.K., 2004.** High-level expression of apple PGIP1 is not sufficient to protect transgenic potato against *Verticillium dahliae*. *Physiol. Mol. Plant Pathol.* 65, 145–155.
- Godt, D.E., Roitsch, T., 1997.** Regulation and Tissue-Specific Distribution of mRNAs for Three Extracellular Invertase Isoenzymes of Tomato Suggests an Important Function in Establishing and Maintaining Sink Metabolism. *Plant Physiol.* 115, 273–282.
- Gold, J., Robb, J., 1995.** the role of the coating response in Craigella tomatoes infected with *Verticillium dahliae*, races 1 and 2. *Physiol. Mol. Plant Pathol.* 47, 141–157.
- Golem, S., Culver, J.N., 2003.** *Tobacco mosaic virus* Induced Alterations in the Gene Expression Profile of *Arabidopsis thaliana*. *Mol. Plant-Microbe Interact.* 16, 681–688.
- Gómez-Ariza, J., Campo, S., Rufat, M., Estopà, M., Messeguer, J., Segundo, B.S., Coca, M., 2007.** Sucrose-Mediated Priming of Plant Defense Responses and Broad-Spectrum Disease Resistance by Overexpression of the Maize Pathogenesis-Related PRms Protein in Rice Plants. *Mol. Plant-Microbe Interact.* 20, 832–842.
- Goud, J.C., Termorshuizen, A.J., 2003.** Quality of methods to quantify microsclerotia of *Verticillium dahliae* in soil. *Eur. J. Plant Pathol.* 109, 523–534.
- Graham, M.Y., Weidner, J., Wheeler, K., Pelow, M.J., Graham, T.L., 2003.** Induced expression of pathogenesis-related protein genes in soybean by wounding and the *Phytophthora sojae* cell wall glucan elicitor. *Physiol. Mol. Plant Pathol.* 63, 141–149.
- Greenberg, J.T., Yao, N., 2004.** The role and regulation of programmed cell death in plant-pathogen interactions. *Cell. Microbiol.* 6, 201–11.
- Griffiths, D.A., 1971.** The development of lignitubers in roots after infection by *Verticillium dahliae* Kleb. *Can. J. Microbiol.* 17, 441–444.
- Grigston, J.C., Osuna, D., Scheible, W.-R., Liu, C., Stitt, M., Jones, A.M., 2008.** d-Glucose sensing by a plasma membrane regulator of G signaling protein, AtRGS1. *FEBS Lett.* 582, 3577–3584.
- Gust, A.A., 2015.** Peptidoglycan Perception in Plants. *PLOS Pathog.* 11, e1005275.
- Haas, D., Défago, G., 2005.** Biological control of soil-borne pathogens by fluorescent pseudomonads. *Nat. Rev. Microbiol.* 3, 307–319.
- Hadwiger, L.A., 2013.** Multiple effects of chitosan on plant systems: Solid science or hype. *Plant Sci.* 208, 42–49.
- Hain, R., Reif, H.-J., Krause, E., Langebartels, R., Kindl, H., Vornam, B., Wiese, W., Schmelzer, E., Schreier, P.H., Stöcker, R.H., Stenzel, K., 1993.** Disease resistance results from foreign phytoalexin expression in a novel plant. *Nature* 361, 153–156.
- Halford, N.G., Hey, S.J., 2009.** Snf1-related protein kinases (SnRKs) act within an intricate network that links metabolic and stress signalling in plants. *Biochem. J.* 419, 247–59.

- Hamberg, M., Gardner, H.W., 1992.** Oxylin pathway to jasmonates: biochemistry and biological significance. *Biochim. Biophys. Acta* 1165, 1–18.
- Hamel, L.-P., Beudoin, N., 2010.** Chitoooligosaccharide sensing and downstream signaling: contrasted outcomes in pathogenic and beneficial plant–microbe interactions. *Planta* 232, 787–806.
- Hanson, J., Hanssen, M., Wiese, A., Hendriks, M.M.W.B., Smeekens, S., 2007.** The sucrose regulated transcription factor bZIP11 affects amino acid metabolism by regulating the expression of asparagine synthetase1 and proline dehydrogenase2. *plant j.* 53, 935–949.
- Hanson, J., Smeekens, S., 2009.** Sugar perception and signaling—an update. *Curr. Opin. Plant Biol.* 12, 562–567.
- Harman, G.E., Howell, C.R., Viterbo, A., Chet, I., Lorito, M., 2004.** Trichoderma species — opportunistic, avirulent plant symbionts. *Nat. Rev. Microbiol.* 2, 43–56.
- Hayes, M.A., Feechan, A., Dry, I.B., 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 [W].
- He, Z., He, D., Kohorn, B.D., 1998.** Requirement for the induced expression of a cell wall associated receptor kinase for survival during the pathogen response. *Plant J.* 14, 55–63.
- Heinz, R., Lee, S.W., Saparno, A., Nazar, R.N., Robb, J., 1998.** Cyclical systemic colonization in Verticillium -infected tomato. *Physiol. Mol. Plant Pathol.* 385–396.
- Helliwell, E.E., Wang, Q., Yang, Y., 2016.** Ethylene Biosynthesis and Signaling Is Required for Rice Immune Response and Basal Resistance Against *Magnaporthe oryzae* Infection. *Mol. Plant-Microbe Interact.* 29, 831–843.
- Hématy, K., Cherk, C., Somerville, S., 2009.** Host–pathogen warfare at the plant cell wall. *Curr. Opin. Plant Biol.* 12, 406–413.
- Herbers, K., Meuwly, P., Métraux, J.-P., Sonnewald, U., 1996.** Salicylic acid-independent induction of pathogenesis-related protein transcripts by sugars is dependent on leaf developmental stage. *FEBS Lett.* 397, 239–244.
- Herbers, K., Takahata, Y., Melzer, M., Mock, H.-P., Hajirezaei, M., Sonnewald, U., 2000.** Regulation of carbohydrate partitioning during the interaction of potato virus Y with tobacco. *Mol. Plant Pathol.* 1, 51–59.
- Hey, S.J., Byrne, E., Halford, N.G., 2010.** The interface between metabolic and stress signalling. *Ann. Bot.* 105, 197–203.
- Hofmann, J., El Ashry, A.E.N., Anwar, S., Erban, A., Kopka, J., Grundler, F., 2010.** Metabolic profiling reveals local and systemic responses of host plants to nematode parasitism. *Plant J.* 62, no-no.
- Homma, Y., Zenji, S., Fukushi, H., Katsuhiko, K., Haruhisa, S., Takahito, S., 1989.** Production of antibiotics by *Pseudomonas cepacia* as an agent for biological control of soilborne plant pathogens. *Soil Biol. Biochem.* 21, 723–728.
- Howell, C., Beier, R., Phytopathology, R.S., 1988, undefined, 1988.** Production of ammonia by *Enterobacter cloacae* and its possible role in the biological control of *Pythium* preemergence damping-off by the bacterium. *Phytopathology* 1075–1078.
- Howell, C.R., Bell, A.A., Stipanovic, R.D., 1976.** Effect of aging on flavonoid content and resistance of cotton leaves to verticillium wilt. *Physiol. Plant Pathol.* 8, 181–188.

- Huang, J., Taylor, J.P., Chen, J.-G., Uhrig, J.F., Schnell, D.J., Nakagawa, T., Korth, K.L., Jones, A.M., 2006.** The plastid protein thylakoid formation1 and the plasma membrane G protein GPA1 interact in a novel sugar-signaling mechanism in *Arabidopsis*. *Plant Cell* 18, 1226–1238.
- Huang, L.-K., Mahoney, R.R., 1999.** Purification and characterization of an endo-polygalacturonase from *Verticillium albo-atrum*. *J. Appl. Microbiol.* 86, 145–156.
- Huisman, O.C., 1982.** Interrelations of root growth dynamics to epidemiology of root-invading fungi. *Annu. Rev. Phytopathol* 20, 303–327.
- Huisman, O.C., 1988.** Seasonal Colonization of Roots of Field-Grown Cotton by *Verticillium dahliae* and *V. tricorpus*. *Phytopathology* 78, 708.
- Iavicoli, A., Boutet, E., Buchala, A., Métraux, J.-P., 2003.** Induced Systemic Resistance in *Arabidopsis thaliana* in Response to Root Inoculation with *Pseudomonas fluorescens* CHA0. *Mol. Plant-Microbe Interact.* 16, 851–858.
- Inderbitzin, P., Bostock, R.M., Davis, R.M., Usami, T., Platt, H.W., Subbarao, K. V., 2011.** Phylogenetics and Taxonomy of the Fungal Vascular Wilt Pathogen *Verticillium*, with the Descriptions of Five New Species. *PLoS One* 6, e28341.
- Isaac, I., 1945.** A further comparative study of pathogenic isolates of *Verticillium*: *V. nubilum* Pethybr. and *V. tricorpus* sp. nov Pathogenic isolates of *Verticillium*. *Ivor Isaac. Trans. Br. Mycol. Soc.* 36, 180–195, IN2.
- Isaac, I., 1949.** A comparative study of pathogenic isolates of *Verticillium*. *Trans. Br. Mycol. Soc.* 32, 132–137.
- Isaac, I., 1966.** Speciation in *Verticillium*. *Annu. Rev. Phytopathol* 5, 201–202.
- Islam, M.T., Hashidoko, Y., Deora, A., Ito, T., 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, 3786–96.
- Iwai, T., Miyasaka, A., Seo, S., Ohashi, Y., 2006.** Contribution of ethylene biosynthesis for resistance to blast fungus infection in young rice plants. *Plant Physiol.* 142, 1202–15.
- Jabnoun-Khiareddine, H., Mejda Daami-Remadi, B., Fakher Ayed, B., Mohamed El Mahjoub, B., 2009.** Biological Control of Tomato *Verticillium* Wilt by Using Indigenous *Trichoderma* spp. *African J. Plant Sci. Biotechnol.* 3, 26–36.
- James, J.T., Dubery, I.A., 2001.** Inhibition of polygalacturonase from *Verticillium dahliae* by a polygalacturonase inhibiting protein from cotton. *Phytochemistry* 57, 149–156.
- Jiménez-Díaz, R.M., Cirulli, M., Bubici, G., Jiménez-Gasco, M. del M., Antoniou, P.P., Tjamos, E.C., 2012.** Olive : An Ancient Crop Under a Major Health Threat *Verticillium* Wilt on Olive : Importance and Distribution. *Plant Dis.* 96, 304–329.
- Jobic, C., Boisson, A.-M., Gout, E., Rascle, C., Fèvre, M., Cotton, P., Bligny, R., 2007.** Metabolic processes and carbon nutrient exchanges between host and pathogen sustain the disease development during sunflower infection by *Sclerotinia sclerotiorum*. *Planta* 226, 251–265.
- Johnson, D.A., Dung, J.K.S., 2010.** *Verticillium* wilt of potato – the pathogen, disease and management †. *Can. J. Plant Pathol.* 32, 58–67.
- Jones, J.D.G., Dangl, J.L., 2006.** The plant immune system. *Nature* 444, 323–329.

- Ju, C., Yoon, G.M., Shemansky, J.M., Lin, D.Y., Ying, Z.I., Chang, J., Garrett, W.M., Kessenbrock, M., Groth, G., Tucker, M.L., Cooper, B., Kieber, J.J., Chang, C., 2012.** CTR1 phosphorylates the central regulator EIN2 to control ethylene hormone signaling from the ER membrane to the nucleus in Arabidopsis. *Proc. Natl. Acad. Sci.* 109, 19486–19491.
- Kageyama, K., Nelson, E.B., 2003.** Differential inactivation of seed exudate stimulation of *Pythium ultimum* sporangium germination by *Enterobacter cloacae* influences biological control efficacy on different plant species. *Appl. Environ. Microbiol.* 69, 1114–20.
- Kaku, H., Nishizawa, Y., Ishii-Minami, N., Akimoto-Tomiyama, C., Dohmae, N., Takio, K., Minami, E., Shibuya, N., Clarence Ryan, by A., 2006.** Plant cells recognize chitin fragments for defense signaling through a plasma membrane receptor. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 103, 1086–11091.
- Kaku, H., Shibuya, N., Xu, P., Aryan, A.P., Fincher, G.B., 1997.** N-acetylchitooligosaccharides elicit expression of a single (13)-beta-glucanase gene in suspension-cultured cells from barley (*Hordeum vulgare*). *Physiol. Plant.* 100, 111–118.
- Kang, S.G., Price, J., Lin, P.-C., Hong, J.C., Jang, J.-C., 2010.** The Arabidopsis bZIP1 Transcription Factor Is Involved in Sugar Signaling, Protein Networking, and DNA Binding. *Mol. Plant* 3, 361–373.
- Kano, A., Hosotani, K., Gomi, K., Yamasaki-Kokudo, Y., Shirakawa, C., Fukumoto, T., Ohtani, K., Tajima, S., Izumori, K., Tanaka, K., Ishida, Y., Nishizawa, Y., Ichimura, K., Tada, Y., Akimitsu, K., 2011a.** d- Psicose induces upregulation of defense-related genes and resistance in rice against bacterial blight. *J. Plant Physiol.* 168, 1852–1857.
- Kano, A., Hosotani, K., Gomi, K., Yamasaki-Kokudo, Y., Shirakawa, C., Fukumoto, T., Ohtani, K., Tajima, S., Izumori, K., Tanaka, K., Ishida, Y., Nishizawa, Y., Ichimura, K., Tada, Y., Akimitsu, K., 2011b.** d- Psicose induces upregulation of defense-related genes and resistance in rice against bacterial blight. *J. Plant Physiol.* 168, 1852–1857.
- Karagiannidis, N., Bletsos, F., Stavropoulos, N., 2002.** Effect of *Verticillium wilt* (*Verticillium dahliae* Kleb.) and mycorrhiza (*Glomus mosseae*) on root colonization, growth and nutrient uptake in tomato and eggplant seedlings 94.
- Karapapa, V., Bainbridge, B., Heale, J., 1997.** Morphological and molecular characterization of *Verticillium longisporum* comb. nov., pathogenic to oilseed rape. *Mycol. Res.* 101, 1281–1294.
- Kawakami, A., Yoshida, M., 2012.** Graminan breakdown by fructan exohydrolase induced in winter wheat inoculated with snow mold. *J. Plant Physiol.* 169, 294–302.
- Keen, N.T., Long, M., Erwin, D.C., 1972.** Possible involvement of a pathogen-produced protein-lipopolysaccharide complex in *Verticillium wilt* of cotton. *Physiol. Plant Pathol.* 2, 317–331.
- Keinath, A.P., 1991.** Potential of *Gliocladium roseum* for Biocontrol of *Verticillium dahliae*. *Phytopathology* 81, 644.
- Kerr, A., 1980.** Biological control of crown gall through production of agrocin 84. *Plant Dis.* 25–30.
- Khalil, A.-M.I., 2008.** Salicylic Acid Induces Resistance in Potatoes Against *Rhizoctonia solani*, the Cause of Black Scurf and Stem Canker. *Int. J. Biol. Chem.* 2, 14–25.
- Kim, E.H., Kim, Y.S., Park, S.-H., Koo, Y.J., Choi, Y.D., Chung, Y.-Y., Lee, I.-J., Kim, J.-K., 2009.** Methyl Jasmonate Reduces Grain Yield by Mediating Stress Signals to Alter Spikelet Development in Rice. *PLANT Physiol.* 149, 1751–1760.
- Kim, M., Lim, J.-H., Ahn, C.S., Park, K., Kim, G.T., Kim, W.T., Pai, H.-S., 2006.**

Mitochondria-Associated Hexokinases Play a Role in the Control of Programmed Cell Death in *Nicotiana benthamiana*. *Plant Cell* 18, 2341–2355.

- Kim, M.S., Cho, S.M., Kang, E.Y., Im, Y.J., Hwangbo, H., Kim, Y.C., Ryu, C.-M., Yang, K.Y., Chung, G.C., Cho, B.H., 2008.** Galactinol Is a Signaling Component of the Induced Systemic Resistance Caused by *Pseudomonas chlororaphis* O6 Root Colonization 21, 1643–1653.
- Kishimoto, K., Kouzai, Y., Kaku, H., Shibuya, N., Minami, E., Nishizawa, Y., 2010.** Perception of the chitin oligosaccharides contributes to disease resistance to blast fungus *Magnaporthe oryzae* in rice. *Plant J.* 64, 343–354.
- Kiss, L., 2003.** A review of fungal antagonists of powdery mildews and their potential as biocontrol agents. *Pest Manag. Sci.* 59, 475–483.
- Klarzynski, O., Descamps, V., Plesse, B., Yvin, J.-C., Kloareg, B., Fritig, B., 2003.** Sulfated Fucan Oligosaccharides Elicit Defense Responses in Tobacco and Local and Systemic Resistance Against Tobacco Mosaic Virus. *Mol. Plant-Microbe Interact.* 16, 115–122.
- Kloepper, J.W., Leong, J., Teintze, M., Schroth, M.N., 1980.** *Pseudomonas* siderophores: A mechanism explaining disease-suppressive soils. *Curr. Microbiol.* 4, 317–320.
- Kloepper, J.W., Ryu, C.-M., Zhang, S., 2004.** Induced Systemic Resistance and Promotion of Plant Growth by *Bacillus* spp. *Phytopathology* 94, 1259–1266.
- Klosterman, S.J., Atallah, Z.K., Vallad, G.E., Subbarao, K. V., 2009.** Diversity, Pathogenicity, and Management of *Verticillium* Species. *Annu. Rev. Phytopathol* 47, 39–62.
- Kohorn, B.D., Kobayashi, M., Johansen, S., Riese, J., Huang, L.-F., Koch, K., Fu, S., Dotson, A., Byers, N., 2006.** An *Arabidopsis* cell wall-associated kinase required for invertase activity and cell growth. *Plant J.* 46, 307–316.
- Kohorn, B.D., Kohorn, S.L., Todorova, T., Baptiste, G., Stansky, K., McCullough, M., 2012.** A Dominant Allele of *Arabidopsis* Pectin-Binding Wall-Associated Kinase Induces a Stress Response Suppressed by MPK6 but Not MPK3 Mutations. *Mol. Plant* 5, 841–851.
- Kotcon, J.B., Rouse, D.I., 1984.** Root deterioration in the potato early dying syndrome: Causes and effects of root biomass reductions associated with colonization by *Verticillium dahliae*. *Am. Potato J.* 61, 557–568.
- Koumoutsi, A., Chen, X.-H., Henne, A., Liesegang, H., Hitzeroth, G., Franke, P., Vater, J., Borriss, R., 2004.** Structural and functional characterization of gene clusters directing nonribosomal synthesis of bioactive cyclic lipopeptides in *Bacillus amyloliquefaciens* strain FZB42. *J. Bacteriol.* 186, 1084–96.
- Kubicek CP, Starr TL, Glass NL. 2014.** Plant cell wall-degrading enzymes and their secretion in plant-pathogenic fungi. *Annu. Rev. Phytopathol* 52, 427–451
- Kühn, C., Grof, C.P., 2010.** Sucrose transporters of higher plants. *Curr. Opin. Plant Biol.* 13, 287–297.
- Kunze, G., Zipfel, C., Robatzek, S., Niehaus, K., Boller, T., Felix, G., 2004.** The N Terminus of Bacterial Elongation Factor Tu Elicits Innate Immunity in *Arabidopsis* Plants. *Plant Cell* 16, 3496–3507.
- Kwon, Y., Oh, J.E., Noh, H., Hong, S.-W., Bhoo, S.H., Lee, H., 2011.** The ethylene signaling pathway has a negative impact on sucrose-induced anthocyanin accumulation in *Arabidopsis*. *J. Plant Res.* 124, 193–200.
- Lahaye, M., Brunel, M., Bonnin, E., 1997.** Fine chemical structure analysis of oligosaccharides

produced by an ulvan-lyase degradation of the water-soluble cell-wall polysaccharides from *Ulva* sp. (Ulvales, Chlorophyta). *Carbohydr. Res.* 304, 325–33.

- Lambert, F., Pujarniscle, S., 1984.** Purification and properties of the proteinase produced *in vitro* by *Verticillium dahliae*. *Can. J. Microbiol.* 30, 1488–1493.
- Leclère, V., Béchet, M., Adam, A., Guez, J.-S., Wathelet, B., Ongena, M., Thonart, P., Gancel, F., Chollet-Imbert, M., Jacques, P., 2005.** Mycosubtilin overproduction by *Bacillus subtilis* BBG100 enhances the organism's antagonistic and biocontrol activities. *Appl. Environ. Microbiol.* 71, 4577–84.
- Lee, S., Choi, H., Suh, S., Doo, I.-S., Oh, K.-Y., Choi, E.J., Taylor, A.T.S., Low, P.S., Lee, Y., 1999.** Oligogalacturonic Acid and Chitosan Reduce Stomatal Aperture by Inducing the Evolution of Reactive Oxygen Species from Guard Cells of Tomato and *Commelina communis* L.
- Leeman, M., van Pelt, J.A., den Ouden, F.M., Heinsbroek, M., Bakker, P.A.H.M., Schippers, B., 1995a.** Induction of systemic resistance by *Pseudomonas fluorescens* in radish cultivars differing in susceptibility to fusarium wilt, using a novel bioassay. *Eur. J. Plant Pathol.* 101, 655–664.
- Leeman, M., Van Pelt, J.A., Hendrickx, M.J., Scheffer, R.J., Bakker, P.A.H.M., 1995b.** Biocontrol of Fusarium wilt of radish in commercial greenhouse trials by seed treatment with *Pseudomonas fluorescens* WCS374. *Phytopathol.* 1301–1305.
- León, P., Sheen, J., 2003.** Sugar and hormone connections. *Trends Plant Sci.* 8, 110–116.
- Leveau, J.H., Lindow, S.E., 2001.** Appetite of an epiphyte: quantitative monitoring of bacterial sugar consumption in the phyllosphere. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 98, 3446–53.
- Lindsey, T., Mike, D., Hernandez-Perez, P., 2002.** Verticillium Wilt in Spinach Seed Production. *Plant Dis.* 89, 4–11.
- Lionetti, V., Raiola, A., Camardella, L., Giovane, A., Obel, N., Pauly, M., Favaron, F., Cervone, F., Bellincampi, D., 2007.** Overexpression of pectin methyltransferase inhibitors in *Arabidopsis* restricts fungal infection by *Botrytis cinerea*. *Plant Physiol.* 143, 1871–80.
- Loake, G., Grant, M., 2007.** Salicylic acid in plant defence—the players and protagonists. *Curr. Opin. Plant Biol.* 10, 466–472.
- Lorenzo, O., Piqueras, R., Sánchez-Serrano, J.J., Solano, R., 2003.** ETHYLENE RESPONSE FACTOR1 integrates signals from ethylene and jasmonate pathways in plant defense. *Plant Cell* 15, 165–78.
- Lorenzo, O., Solano, R., 2005.** Molecular players regulating the jasmonate signalling network. *Curr. Opin. Plant Biol.* 8, 532–540.
- Loreti, E., Povero, G., Novi, G., Solfanelli, C., Alpi, A., Perata, P., 2008.** Gibberellins, jasmonate and abscisic acid modulate the sucrose-induced expression of anthocyanin biosynthetic genes in *Arabidopsis*. *New Phytol.* 179, 1004–1016.
- Lotze, M.T., Zeh, H.J., Rubartelli, A., Sparvero, L.J., Amoscato, A.A., Washburn, N.R., DeVera, M.E., Liang, X., Tör, M., Billiar, T., 2007.** The grateful dead: damage-associated molecular pattern molecules and reduction/oxidation regulate immunity. *Immunol. Rev.* 220, 60–81.
- Lund, S.T., Stall, R.E., Klee, H.J., 1998.** Ethylene Regulates the Susceptible Response to Pathogen Infection in Tomato, *The Plant Cell*.
- Mace, M.E., Bell, A.A., Beckman, C.H., 1976.** Histochemistry and identification of disease-

- induced terpenoid aldehydes in *Verticillium* -wilt-resistant and -susceptible cottons. *Can. J. Bot.* 54, 2095–2099.
- Malandraki, I., Tjamos, S.E., Pantelides, I.S., Paplomatas, E.J., 2008.** Thermal inactivation of compost suppressiveness implicates possible biological factors in disease management. *Biol. Control* 44, 180–187.
- Mansoori, B., Smith, C.J., 2005.** Elicitation of Ethylene by *Verticillium albo-atrum* Phytoalexins in Potato. *J. Phytopathol.* 153, 143–149.
- Mao, G., Meng, X., Liu, Y., Zheng, Z., Chen, Z., Zhang, S., 2011.** Phosphorylation of a WRKY Transcription Factor by Two Pathogen-Responsive MAPKs Drives Phytoalexin Biosynthesis in *Arabidopsis*. *Plant Cell* 23, 1639–1653.
- Marathe, R., Dinesh-Kumar, S., 2003.** S. Plant defense: One post, multiple guards?!, *Mol. Cell. Biol.*
- Marois, J.J., Fravel, D.R., Papavizas, G.C., 1984.** Ability of *Talaromyces flavus* to occupy the rhizosphere and its interaction with *Verticillium dahliae*. *Soil Biol. Biochem.* 16, 387–390.
- Marois, J.J., Jahson, S.A., Dunn, M.T., Papavizas, G.C., 1982.** Biological control of *Verticillium* wilt of eggplant in the field. *Plant Dis.* 6, 1166–1168.
- Martin, J.T., 1964.** Role of Cuticle in the Defense against Plant Disease. *Annu. Rev. Phytopathol.* 2, 81–100.
- Maurhofer, M., Hase, C., Meuwly P., Métraux, J.P., Defago, G., 1994.** Induction of systemic resistance to tobacco necrosis virus by the root-colonizing *Pseudomonas fluorescens* strain CHA0: influence of the *gacA* gene and of pyoverdine production. *Phytopathology* 139–146.
- Medzhitov, R., Janeway, C.A., 2002.** Decoding the Patterns of Self and Nonself by the Innate Immune System. *Science* (80-.). 296, 298–300.
- Meier, B.M., Shaw, N., Slusarenko, A.J., 1993.** Spatial and temporal accumulation of defense gene transcripts in bean (*Phaseolus vulgaris*) leaves in relation to bacteria-induced hypersensitive cell death. *Mol. Plant. Microbe. Interact.* 6, 453–66.
- Ménard, R., Alban, S., De Ruffray, P., Jamois, F., Franz, G., Fritig, B., Yvin, J.-C., Kauffmann, S., 2004.** b-1,3 Glucan Sulfate, but Not b-1,3 Glucan, Induces the Salicylic Acid Signaling Pathway in Tobacco and *Arabidopsis* 16, 3020–3032.
- Meng, X., Xu, J., He, Y., Yang, K.-Y., Mordorski, B., Liu, Y., Zhang, S., 2013.** Phosphorylation of an ERF Transcription Factor by *Arabidopsis* MPK3/MPK6 Regulates Plant Defense Gene Induction and Fungal Resistance. *Plant Cell* 25, 1126–1142.
- Meziane, H., Van der Sluis, I., Van Loon, L.C., Hofte, M., Bakker, P.A.H.M., 2005.** Determinants of *Pseudomonas putida* WCS358 involved in inducing systemic resistance in plants. *Mol. Plant Pathol.* 6, 177–185.
- Milgroom, M.G., Cortesi, P., 2004.** Biological control of chestnut blight with hypovirulence: a critical analysis. *Annu. Rev. Phytopathol.* 42, 311–338.
- Mol, L., 1995.** Effect of plant roots on the germination of microsclerotia of *Verticillium dahliae* H . Quantitative analysis of the luring effect of crops. *Eur. J. Plant Pathol.* 679–685.
- Monaghan, J., Zipfel, C., 2012.** Plant pattern recognition receptor complexes at the plasma membrane. *Curr. Opin. Plant Biol.* 15, 349–357.
- Morel, J.-B., Dangl, J.L., 1997.** The hypersensitive response and the induction of cell death in plants. *Cell Death Differ.* 4, 671–683.

- Morkunas, I., Garnczarska, M., Bednarski, W., Ratajczak, W., Waplak, S., 2003.** Metabolic and ultrastructural responses of lupine embryo axes to sugar starvation. *J. Plant Physiol.* 160, 311–319.
- Morkunas, I., Kozłowska, M., Ratajczak, L., Marczak, L., 2007.** Role of sucrose in the development of Fusarium wilt in lupine embryo axes. *Physiol. Mol. Plant Pathol.* 70, 25–37.
- Morkunas, I., Marczak, L., Stachowiak, J., Stobiecki, M., 2005.** Sucrose-induced lupine defense against Fusarium oxysporum. *Plant Physiol. Biochem.* 43, 363–373.
- Morkunas, I., Ratajczak, L., 2014.** The role of sugar signaling in plant defense responses against fungal pathogens. *Acta Physiol. Plant.* 36, 1607–1619.
- Morkunas, I., Stobiecki, M., Marczak, L., Stachowiak, J., Narożna, D., Remlein-Starosta, D., 2010.** Changes in carbohydrate and isoflavonoid metabolism in yellow lupine in response to infection by Fusarium oxysporum during the stages of seed germination and early seedling growth. *Physiol. Mol. Plant Pathol.* 75, 46–55.
- Moyne, A.-L., Shelby, R., Cleveland, T.E., Tuzun, S., 2001.** Bacillomycin D: an iturin with antifungal activity against *Aspergillus flavus*. *J. Appl. Microbiol.* 90, 622–629.
- Mussell, H.W., Strouse, B., 1972.** Characterization of Two Polygalacturonases Produced by *Verticillium albo-atrum*. *Can. J. Biochem.* 50, 625–632.
- Nachmias, A., Buchner, V., Burstein, Y., 1985.** Biological and immunochemical characterization of a low molecular weight phytotoxin isolated from a protein—lipopolysaccharide complex produced by a potato isolate of *Verticillium dahliae* Kleb. *Physiol. Plant Pathol.* 26, 43–55.
- Naraghi, L., Heydari, A., Rezaee, S., Razavi, M., Afshari-Azad, H., 2011.** Biological control of *Verticillium* wilt of greenhouse cucumber by *Talaromyces flavus*. *Phytopathol. Mediterr.* 49, 321–329.
- Navazio, L., Moscatiello, R., Bellincampi, D., Baldan, B., Meggio, F., Brini, M., Bowler, C., Mariani, P., 2002.** The role of calcium in oligogalacturonide-activated signalling in soybean cells. *Planta* 215, 596–605.
- Neu, T.R., 1996.** Significance of bacterial surface-active compounds in interaction of bacteria with interfaces. *Microbiol. Rev.* 60, 151–66.
- Newman, M.-A., Dow, J.M., Molinaro, A., Parrilli, M., 2007.** Invited review: Priming, induction and modulation of plant defence responses by bacterial lipopolysaccharides. *J. Endotoxin Res.* 13, 69–84.
- Nojavan-Asghari, M., Ishizawa, K., 1998.** Inhibitory Effects of Methyl Jasmonate on the Germination and Ethylene Production in Cocklebur Seeds. *J. Plant Growth Regul.* 17, 13–18.
- Nunes, C., Primavesi, L.F., Patel, M.K., Martinez-Barajas, E., Powers, S.J., Sagar, R., Fevereiro, P.S., Davis, B.G., Paul, M.J., 2013.** Inhibition of SnRK1 by metabolites: Tissue-dependent effects and cooperative inhibition by glucose 1-phosphate in combination with trehalose 6-phosphate. *Plant Physiol. Biochem.* 63, 89–98.
- Nürnbergger, T., Brunner, F., Kemmerling, B., Piater, L., 2004.** Innate immunity in plants and animals: striking similarities and obvious differences. *Immunol. Rev.* 198, 249–66.
- O'Donnell, Calvert, Atzorn, Wasternack, Leyser, Bowles, 1996.** Ethylene as a Signal Mediating the Wound Response of Tomato Plants. *Science* 274, 1914–7.
- Oeser, B., Yoder, 0 C, 1993.** Pathogenesis by *Cochliobolus heterostrophus* transformants

- expressing a cutinase-encoding gene from *Nectria haematococca*. *Mol. Plant-Microbe Interact.* 7, 282–288.
- Olsson, S., Nordbring-Hertz, B., 1985.** Microsclerotial germination of *Verticillium dahliae* as affected by rape rhizosphere 31, 293–299.
- Ongena, M., Duby, F., Rossignol, F., Fauconnier, M.-L., Dommes, J., Thonart, P., 2004.** Stimulation of the Lipoxygenase Pathway Is Associated with Systemic Resistance Induced in Bean by a Nonpathogenic *Pseudomonas* Strain. *Mol. Plant-Microbe Interact.* 17, 1009–1018.
- Ordentlich, A., Elad, Y., Phytopathology, I.C.-, 1988, undefined, 1988.** The role of chitinase of *Serratia marcescens* in biocontrol of *Sclerotium rolfsii*. *Phytopathology* 84–88.
- Osorio, S., Castillejo, C., Quesada, M.A., Medina-Escobar, N., Brownsey, G.J., Suau, R., Heredia, A., Botella, M.A., Valpuesta, V., 2007.** Partial demethylation of oligogalacturonides by pectin methyl esterase 1 is required for eliciting defence responses in wild strawberry (*Fragaria vesca*). *Plant J.* 54, 43–55.
- Paiva, P.M.G., Gomes, F.S., Napoleão, T.H., Sa, R.A., Correia, M.T.S., Coelho, L.C.B.B., 2010.** Antimicrobial activity of secondary metabolites and lectins from plants. *Curr. Res. Technol. Educ. Top. Appl. Microbiol. Microb. Biotechnol.* 396–406.
- Pal, K.K., Gardener, B.M., 2006.** Biological Control of Plant Pathogens. The Plant Health Instructor. Biol. Control.
- Palumbo, J.D., Yuen, G.Y., Jochum, C.C., Tatum, K., Kobayashi, D.Y., 2005.** Mutagenesis of β -1,3-Glucanase Genes in *Lysobacter enzymogenes* Strain C3 Results in Reduced Biological Control Activity Toward Bipolaris Leaf Spot of Tall Fescue and Pythium Damping-Off of Sugar Beet. *Phytopathology* 95, 701–707.
- Pantelides, I.S., Tjamos, S.E., Striglis, I.A., Chatzipavlidis, I., 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. *Biol. Control* 50, 30–36.
- Pattanagul, W., 2011.** Asian journal of plant sciences., Asian Journal of Plant Sciences. ANSInet.
- Paulitz, T.C., Bélanger, R.R., 2001.** Biological Control In Greenhouse Systems. *Annu. Rev. Phytopathol.* 39, 103–133.
- Pedranzani, H., Racagni, G., Alemano, S., Miersch, O., Ramírez, I., Peña-Cortés, H., Taleisnik, E., Machado-Domenech, E., Abdala, G., 2003.** Salt tolerant tomato plants show increased levels of jasmonic acid. *Plant Growth Regul.* 41, 149–158.
- Pedras, M.S.C., Ahiahonu, P.W.K., 2005.** Metabolism and detoxification of phytoalexins and analogs by phytopathogenic fungi. *Phytochemistry* 66, 391–411.
- Pegg, G.F., 1989.** Pathogenesis in vascular diseases of plants. In: Tjamos, E., Beckman, C. (Eds.), *Vascular Wilt Diseases of Plants*. Springer, Berlin, pp. 51–94.
- Pegg, G.F., Gull, K., Newsam, R.J., 1976.** Transmission electron microscopy of *Verticillium albo-atrum* hyphae in xylem vessels of tomato plants. *Physiol. Plant Pathol.* 8, 221–224.
- Pelloux, J., Rustérucchi, C., Mellerowicz, E.J., 2007.** New insights into pectin methylesterase structure and function. *Trends Plant Sci.* 12, 267–277.
- Pemberton, C.L., Salmond, G.P.C., 2004.** The Nep1-like proteins-a growing family of microbial elicitors of plant necrosis. *Mol. Plant Pathol.* 5, 353–359.

- Perfus-Barbeoch, L., Jones, A.M., Assmann, S.M., 2004.** Plant heterotrimeric G protein function: insights from Arabidopsis and rice mutants. *Curr. Opin. Plant Biol.* 7, 719–731.
- Perry, J.W., Evert, R.F., 1983.** The effect of colonization by *Verticillium dahliae* on the root tips of Russet Burbank potatoes. *Can. J. Bot.* 61, 3422–3429.
- Picman, A.K., Schneider, E.F., Gershenzon, J., 1990.** Antifungal activities of sunflower terpenoids. *Biochem. Syst. Ecol.* 18, 325–328.
- Pieterse, C.M.J., Leon-Reyes, A., Van der Ent, S., Van Wees, S.C.M., 2009.** Networking by small-molecule hormones in plant immunity. *Nat. Chem. Biol.* 5, 308–316.
- Powelson, R.-L., Carter, G.-E., 1973.** Efficacy of soil fumigants for control of Verticillium wilt of potatoes. *Am. Potato J.* 50, 162–167.
- Press, C.M., Loper, J.E., Kloepper, J.W., 2001.** Role of Iron in Rhizobacteria-Mediated Induced Systemic Resistance of Cucumber.
- Proels, R.K., 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. *J. Exp. Bot.* 60, 1555–1567.
- Raskin, I., 1992.** Role of Salicylic Acid in Plants. *Annu. Rev. Plant Physiol. Plant Mol. Biol.* 43, 439–463.
- Reddy, A.S.N., Ali, G.S., Celesnik, H., Day, I.S., 2011.** Coping with Stresses: Roles of Calcium- and Calcium/Calmodulin-Regulated Gene Expression. *Plant Cell* 23, 2010–2032.
- Reignault, P., Cogan, A., Muchembled, J., Lounes-Hadj Sahraoui, A., Durand, R., Sancholle, M., 2001.** Trehalose induces resistance to powdery mildew in wheat. *New Phytol.* 149, 519–529.
- Reymond, P., Farmer, E.E., 1998.** Jasmonate and salicylate as global signals for defense gene expression. *Curr. Opin. Plant Biol.* 1, 404–411.
- Robb, J., Brisson, J.D., Busch, L., Lu, B.C., 1979.** Ultrastructure of wilt syndrome caused by *Verticillium dahliae*. VII. Correlated light and transmission electron microscope identification of vessel coatings and tyloses. *Can. J. Bot.* 57, 822–834.
- Robb, J., Powell, D.A., Street, P.F.S., 1989.** Vascular coating: a barrier to colonization by the pathogen in *Verticillium* wilt of tomato. *Can. J. Bot.* 67, 600–607.
- Roitsch, T., Balibrea, M.E., Hofmann, M., Proels, R., Sinha, A.K., 2003.** Extracellular invertase: key metabolic enzyme and PR protein. *J. Exp. Bot.* 54, 513–524.
- Roitsch, T., González, M.-C., 2004.** Function and regulation of plant invertases: sweet sensations. *Trends Plant Sci.* 9, 606–613.
- Rolland, F., Baena-Gonzalez, E., Sheen, J., 2006.** Sugar sensing and signaling in plants: conserved and novel mechanisms. *Annu. Rev. Plant Biol.* 57, 675–709.
- Rolland, F., Moore, B., Sheen, J., 2002.** Sugar sensing and signaling in plants. *Plant Cell* 14 Suppl, S185-205.
- Ron, M., Avni, A., 2004.** The receptor for the fungal elicitor ethylene-inducing xylanase is a member of a resistance-like gene family in tomato. *Plant Cell* 16, 1604–15.
- Rudolph, K., 1976.** Non-specific Toxins. In: *Physiological Plant Pathology*. Springer Berlin Heidelberg, Berlin, Heidelberg, pp. 270–315.
- Ryu, C.-M., Farag, M.A., Hu, C.-H., Reddy, M.S., Kloepper, J.W., Paré, P.W., 2004.**

Bacterial Volatiles Induce Systemic Resistance in Arabidopsis 1.

- Samuelsson, G., 2015.** Φαρμακευτικά προϊόντα φυσικής προέλευσεως, 2015th ed. Πανεπιστημιακές Εκδόσεις Κρήτης, Ηράκλειο.
- Sandra, A.I.W., Zumoff, C.H., Schneider, L., Steven, V.B., 2001.** Pantoea agglomerans strain EH318 produces two antibiotics that inhibit Erwinia amylovora in vitro. Appl. Environ. Microbiol. 67, 284–92.
- Savatin, D. V., Gramegna, G., Modesti, V., Cervone, F., 2014.** Wounding in the plant tissue: the defense of a dangerous passage. Front. Plant Sci. 5, 470.
- Sawinski, K., Mersmann, S., Robatzek, S., Böhmer, M., 2013.** Guarding the Green: Pathways to Stomatal Immunity. Mol. Plant-Microbe Interact. 26, 626–632.
- Schnathorst, W.C., 1981.** Life Cycle and Epidemiology of Verticillium, Fungal Wilt Diseases of Plants. ACADEMIC PRESS, INC.
- Schönherr, J., 2006.** Characterization of aqueous pores in plant cuticles and permeation of ionic solutes. J. Exp. Bot. 57, 2471–2491.
- Schreiber, L., 2006.** Review of sorption and diffusion of lipophilic molecules in cuticular waxes and the effects of accelerators on solute mobilities. J. Exp. Bot. 57, 2515–2523.
- Schreiber, L., Krimm, U., Knoll, D., Sayed, M., Auling, G., Kroppenstedt, R.M., 2005.** Plant-microbe interactions: identification of epiphytic bacteria and their ability to alter leaf surface permeability. New Phytol. 166, 589–594.
- Shan, X., Zhang, Y., Peng, W., Wang, Z., Xie, D., 2009.** Molecular mechanism for jasmonate-induction of anthocyanin accumulation in Arabidopsis. J. Exp. Bot. 60, 3849–3860.
- Shanahan, P., O’sullivan, D.J., Simpson, P., Glennon, J.D., 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, 353–8.
- Singh, V., Louis, J., Ayre, B.G., Reese, J.C., Shah, J., 2011.** Trehalose phosphate synthase 11-dependent trehalose metabolism promotes Arabidopsis thaliana defense against the phloem-feeding insect Myzus persicae. Plant J. 67, 94–104.
- Slewinski, T.L., 2011.** Diverse Functional Roles of Monosaccharide Transporters and their Homologs in Vascular Plants: A Physiological Perspective. Mol. Plant 4, 641–662.
- Smeekens, S., Ma, J., Hanson, J., Rolland, F., 2010.** Sugar signals and molecular networks controlling plant growth. Curr. Opin. Plant Biol. 13, 273–278.
- Smith, H.C., 1965.** The morphology of Verticillium albo-atrum, V. dahliae, and V. tricorpus 8233.
- Smith, K., Havey, M., Disease, J.H.-P., 1993.** Suppression of cottony leak of cucumber with Bacillus cereus strain UW85. cabdirect.org.
- Smith, P., Havey, M., Handelsman, J., 1993.** Suppression of cottony leak of cucumber with Bacillus cereus strain UW85 | Titel. Plant Dis. 139–142.
- Sneh, B., Dupler, M., Elad, Y., Phytopathology, R.B.-, 1984.** Chlamydo-spore germination of Fusarium oxysporum f. sp. cucumerinum as affected by fluorescent and lytic bacteria from a Fusarium-suppressive soil. Phytopathology 1115–1124.
- Solfanelli, C., Poggi, A., Loreti, E., Alpi, A., Perata, P., 2006.** Sucrose-specific induction of the anthocyanin biosynthetic pathway in Arabidopsis. Plant Physiol. 140, 637–46.

- Staswick, P.E., Su, W., Howell, S.H., 1992.** Methyl jasmonate inhibition of root growth and induction of a leaf protein are decreased in an *Arabidopsis thaliana* mutant. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 89, 6837–40.
- Stotz, H.U., Koch, T., Biedermann, A., Weniger, K., Boland, W., Mitchell-Olds, T., 2002.** Evidence for regulation of resistance in *Arabidopsis* to Egyptian cotton worm by salicylic and jasmonic acid signaling pathways. *Planta* 214, 648–52.
- Strömberg, A., Brishammar, S., 1993.** A Histological Evaluation of Induced Resistance to *Phytophthora infestans* (Mont.) de Bary in Potato Leaves. *J. Phytopathol.* 137, 15–25.
- Sturm, A., Chrispeels, M.J., 1990.** cDNA cloning of carrot extracellular beta-fructosidase and its expression in response to wounding and bacterial infection. *Plant Cell* 2, 1107–19.
- Sutton, P.N., Gilbert, M.J., Williams, L.E., Hall, J.L., 2007.** Powdery mildew infection of wheat leaves changes host solute transport and invertase activity. *Physiol. Plant.* 129, 787–795.
- Taiz, L., Zeiger, E., 2013.** *Φυσιολογία Φυτών*, 5th ed. Utopia.1088.
- Talboys, P.W., 1964.** A Concept of the Host–Parasite Relationship in *Verticillium* Wilt Diseases. *Nature* 202, 361–364.
- Talboys, P.W., 1972.** A Discussion on Disease Resistance in Plants. *Proc. R. Soc. London. Ser. B, Biol. Sci.* 181, 319–332.
- Talboys, P.W., Busch, L.V., 1970.** Pectic enzymes produced by *Verticillium* species. *Trans. Br. Mycol. Soc.* 55, 367–381.
- Tanabe, S., Okada, M., Jikumaru, Y., Yamane, H., Kaku, H., Shibuya, N., Minami, E., 2006.** Induction of resistance against rice blast fungus in rice plants treated with a potent elicitor, N-acetylchitoooligosaccharide. *Biosci. Biotechnol. Biochem.* 70, 1599–605.
- Tena, G., 2016.** Immunity: Decoys everywhere. *Nat. Plants* 2, 16052.
- Thaler, J.S., Owen, B., Higgins, V.J., 2004.** The role of the jasmonate response in plant susceptibility to diverse pathogens with a range of lifestyles. *Plant Physiol.* 135, 530–8.
- Thibaud, M.-C., Gineste, S., Nussaume, L., Robaglia, C., 2004.** Sucrose increases pathogenesis-related PR-2 gene expression in *Arabidopsis thaliana* through an SA-dependent but NPR1-independent signaling pathway. *Plant Physiol. Biochem.* 42, 81–88.
- Thomashow, L.S., Weller, D.M., Bonsall, R.F., Pierson, L.S., 1990.** Production of the antibiotic phenazine-1-carboxylic Acid by fluorescent pseudomonas species in the rhizosphere of wheat. *Appl. Environ. Microbiol.* 56, 908–12.
- Thomma, B.P., Eggermont, K., Penninckx, I.A., Mauch-Mani, B., Vogelsang, R., Cammue, B.P., Broekaert, W.F., 1998.** Separate jasmonate-dependent and salicylate-dependent defense-response pathways in *Arabidopsis* are essential for resistance to distinct microbial pathogens. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 95, 15107–11.
- Tjamos, E.C., 1989.** Problems and Prospects in Controlling *Verticillium* Wilt. In: *Vascular Wilt Diseases of Plants*. Springer Berlin Heidelberg, Berlin, Heidelberg, pp. 441–456.
- Tjamos, E.C., Fravel, D.R., 1997.** Distribution and establishment of the biocontrol fungus *Talaromyces flavus* in soil and on roots of solanaceous crops. *Crop Prot.* 16, 135–139.
- Tjamos, E.C., Paplomatas, E.J., 1987.** Effect of soil solarization on the survival of fungal antagonists of *Verticillium dahliae*. *EPPO Bull.* 17, 645–653.

- Tjamos, E.C., Paplomatas, E.J., 1988.** Long-term effect of soil solarization in controlling verticillium wilt of globe artichokes in Greece. *Plant Pathol.* 37, 507–515.
- Tjamos, E.C., Tsitsigiannis, D.I., Tjamos, S.E., Antoniou, P.P., Katinakis, P., 2004.** Selection and Screening of Endorhizosphere Bacteria from Solarized Soils as Biocontrol Agents Against *Verticillium dahliae* of Solanaceous Hosts. *Eur. J. Plant Pathol.* 110, 35–44.
- Tjamos, S.E., Flemetakis, E., Paplomatas, E.J., Katinakis, P., 2005.** Induction of Resistance to *Verticillium dahliae* in *Arabidopsis thaliana* by the Biocontrol Agent K-165 and Pathogenesis-Related Proteins Gene Expression. *Mol. Plant-Microbe Interact.* 18, 555–561.
- Tjamos, S.E., Flemetakis, E., Paplomatas, E.J., Katinakis, P., 2005.** Induction of Resistance to *Verticillium dahliae* in *Arabidopsis thaliana* by the Biocontrol Agent K-165 and Pathogenesis-Related Proteins Gene Expression. / 555 *MPMI* 18, 555–561.
- Ton, J., Flors, V., Mauch-Mani, B., 2009.** The multifaceted role of ABA in disease resistance. *Trends Plant Sci.* 14, 310–317.
- Trouvelot, S., Héloir, M.-C., Poinssot, B., Gauthier, A., Paris, F., Guillier, C., Combier, M., Trdá, L., Daire, X., Adrian, M., 2014.** Carbohydrates in plant immunity and plant protection: roles and potential application as foliar sprays. *Front. Plant Sci.* 5, 592.
- Trouvelot, S., Varnier, A.-L., Allègre, M., Mercier, L., Baillieul, F., Arnould, C., Gianinazzi-Pearson, V., Klarzynski, O., Joubert, J.-M., Pugin, A., Daire, X., 2008.** A β -1,3 Glucan Sulfate Induces Resistance in Grapevine against *Plasmopara viticola* Through Priming of Defense Responses, Including HR-like Cell Death. *Mol. Plant-Microbe Interact.* 21, 232–243.
- Trouverie, J., Chateau-Joubert, S., Thevenot, C., Jacquemot, M.-P., Prioul, J.-L., 2004.** Regulation of vacuolar invertase by abscisic acid or glucose in leaves and roots from maize plantlets. *Planta* 219, 894–905.
- Urquhart, E.J., Punja, Z.K., 2002.** Hydrolytic enzymes and antifungal compounds produced by *Tilletiopsis* species, phyllosphere yeasts that are antagonists of powdery mildew fungi. *Can. J. Microbiol.* 48, 219–29.
- Usami, T., Itoh, A.M., Amemiya, A.Y., 2009.** Asexual fungus *Verticillium dahliae* is potentially heterothallic. *Plant Pathol.* 75, 422–427.
- Vallad, G.E., Qin, Q.-M., Grube, R., Hayes, R.J., Subbarao, K. V., 2006.** Characterization of Race-Specific Interactions Among Isolates of *Verticillium dahliae* Pathogenic on Lettuce. *Phytopathology* 96, 1380–1387.
- Valluru, R., Van den Ende, W., 2011.** Myo-inositol and beyond – Emerging networks under stress. *Plant Sci.* 181, 387–400.
- Van der Wal, A., Leveau, J.H.J., 2011.** Modelling sugar diffusion across plant leaf cuticles: the effect of free water on substrate availability to phyllosphere bacteria. *Environ. Microbiol.* 13, 792–797.
- van Dijk, K., Nelson, E.B., Carnegie, S.R., Vanavichit, A., Schippers, B., 2000.** Fatty acid competition as a mechanism by which *Enterobacter cloacae* suppresses *Pythium ultimum* sporangium germination and damping-off. *Appl. Environ. Microbiol.* 66, 5340–7.
- van Loon, L.C., Bakker, P.A.H.M., Pieterse, C.M.J., 1998.** Systemic Resistance Induced By Rhizosphere Bacteria. *Annu. Rev. Phytopathol.* 36, 453–483.
- Van Loon, L.C., Rep, M., Pieterse, C.M.J., 2006.** Significance of Inducible Defense-related Proteins in Infected Plants. *Annu. Rev. Phytopathol.* 44, 135–162.

- Van Peer, R., Schippers, B., 1992.** Lipopolysaccharides of plant-growth promoting *Pseudomonas* sp. strain WCS417r induce resistance in carnation to *Fusarium* wilt. *Netherlands J. Plant Pathol.* 98, 129–139.
- Van Wees, S.C.M., Pieterse, C.M.J., Trijssenaar, A., Van 't Westende, Y.A.M., Hartog, F., Van Loon, L.C., 1997.** Differential Induction of Systemic Resistance in *Arabidopsis* by Biocontrol Bacteria. *Mol. Plant-Microbe Interact.* 10, 716–724.
- Vander, P., Vårum, K.M., Domard, A., Gueddari, N.E. El, Moerschbacher, B.M., 1998.** Comparison of the Ability of Partially N-Acetylated Chitosans and Chitoooligosaccharides to Elicit Resistance Reactions in Wheat Leaves 1.
- Vargas, W.A., Sanz Martín, J.M., Rech, G.E., Rivera, L.P., Benito, E.P., Díaz-Mínguez, J.M., Thon, M.R., Sukno, S.A., 2012.** Plant Defense Mechanisms Are Activated during Biotrophic and Necrotrophic Development of *Colletotricum graminicola* in Maize 1[W][OA].
- Vlot, A.C., Dempsey, D.A., Klessig, D.F., 2009.** Salicylic Acid, a Multifaceted Hormone to Combat Disease. *Annu. Rev. Phytopathol.* 47, 177–206.
- Voegelé, R.T., Struck, C., Hahn, M., Mendgen, K., 2001.** The role of haustoria in sugar supply during infection of broad bean by the rust fungus *Uromyces fabae*. *Proc. Natl. Acad. Sci.* 98, 8133–8138.
- Voisard, C., Keel, C., Haas, D., Defago, G., 1989.** Cyanide production by *Pseudomonas fluorescens* helps suppress black root rot of tobacco under gnotobiotic conditions; Cyanide production by *Pseudomonas fluorescens* helps suppress black root rot of tobacco under gnotobiotic conditions, *The EMBO Journal*.
- Vorholt, J.A., 2012.** Microbial life in the phyllosphere. *Nat. Rev. Microbiol.* 10, 828–840.
- Vorhölter, F.-J., Wiggerich, H.-G., Scheidle, H., Sidhu, V.K., Mrozek, K., Küster, H., Pühler, A., Niehaus, K., 2012.** Involvement of bacterial TonB-dependent signaling in the generation of an oligogalacturonide damage-associated molecular pattern from plant cell walls exposed to *Xanthomonas campestris* pv. *campestris* pectate lyases. *BMC Microbiol.* 12, 239.
- Wagner, T.A., Kohorn, B.D., 2001.** Wall-Associated Kinases Are Expressed throughout Plant Development and Are Required for Cell Expansion, *The Plant Cell*.
- Wahl, R., Wippel, K., Goos, S., Kämper, J., Sauer, N., 2010.** A Novel High-Affinity Sucrose Transporter Is Required for Virulence of the Plant Pathogen *Ustilago maydis*. *PLoS Biol.* 8, e1000303.
- Wang, J.-Y., Cai, Y., Gou, J.-Y., Mao, Y.-B., Xu, Y.-H., Jiang, W.-H., Chen, X.-Y., 2004.** VdNEP, an elicitor from *Verticillium dahliae*, induces cotton plant wilting. *Am Soc Microbiol* 70, 4989–4995.
- Wang, M.C., Keen, N.T., 1970.** Purification and characterization of endopolygalacturonase from *Verticillium albo-atrum*. *Arch. Biochem. Biophys.* 141, 749–757.
- Ward, E.R., Uknes, S.J., Williams, S.C., Dincher, S.S., Wiederhold, D.L., Alexander, D.C., Ahl-Goy, P., Mettraux, J.P., Ryals, J.A., 1991.** Coordinate Gene Activity in Response to Agents That Induce Systemic Acquired Resistance. *Plant Cell* 3, 1085–1094.
- Weiss, D., 2000.** Regulation of flower pigmentation and growth: Multiple signaling pathways control anthocyanin synthesis in expanding petals. *Physiol. Plant.* 110, 152–157.
- White, R.F., 1979.** Acetylsalicylic acid (aspirin) induces resistance to tobacco mosaic virus in tobacco. *Virology* 99, 410–2.

- Wilhelm, S., 1955.** Longevity of the Verticillium wilt fungus in the laboratory and field. *Phytopath* 45, 180–181.
- Wilhite, S.E., Lumsden, R.D., Straney, D.C., 2001.** Peptide synthetase gene in *Trichoderma virens*. *Appl. Environ. Microbiol.* 67, 5055–62.
- Williams, J.S., Hall, S.A., Hawkesford, M.J., Beale, M.H., Cooper, R.M., 2002.** Elemental sulfur and thiol accumulation in tomato and defense against a fungal vascular pathogen. *Plant Physiol.* 128, 150–9.
- Wind, J., Smeekens, S., Hanson, J., 2010.** Sucrose: Metabolite and signaling molecule. *Phytochemistry* 71, 1610–1614.
- Wingler, A., Delatte, T.L., O’Hara, L.E., Primavesi, L.F., Jhurrea, D., Paul, M.J., Schluepmann, H., 2012.** Trehalose 6-phosphate is required for the onset of leaf senescence associated with high carbon availability. *Plant Physiol.* 158, 1241–51.
- Wood, R.K.S., 1961.** Verticillium wilt of tomatoes—the role of pectic and cellulolytic enzymes. *Ann. Appl. Biol.* 49, 120–139.
- Yamada, S., Kano, A., Tamaoki, D., Miyamoto, A., Shishido, H., Miyoshi, S., Taniguchi, S., Akimitsu, K., Gomi, K., 2012.** Involvement of OsJAZ8 in Jasmonate-Induced Resistance to Bacterial Blight in Rice. *Plant Cell Physiol.* 53, 2060–2072.
- Yamaguchi, T., Yamada, A., Hong, N., Ogawa, T., Ishii, T., Shibuya, N., 2000.** Differences in the Recognition of Glucan Elicitor Signals between Rice and Soybean:-Glucan Fragments from the Rice Blast Disease Fungus *Pyricularia oryzae* That Elicit Phytoalexin Biosynthesis in Suspension-Cultured Rice Cells, *The Plant Cell*.
- Yan, J., Zhang, C., Gu, M., Bai, Z., Zhang, W., Qi, T., Cheng, Z., Peng, W., Luo, H., Nan, F., Wang, Z., Xie, D., 2009.** The Arabidopsis CORONATINE INSENSITIVE1 Protein Is a Jasmonate Receptor. *Plant Cell Online* 21, 2220–2236.
- Yang, W., Zheng, L., Liu, H.-X., Wang, K.-B., Yu, Y.-Y., Luo, Y.-M., Guo, J.-H., 2014.** Evaluation of the effectiveness of a consortium of three plant-growth promoting rhizobacteria for biocontrol of cotton Verticillium wilt. *Biocontrol Sci. Technol.* 24, 489–502.
- Yuehui, H., Fukushige, H., Hildebrand, D.F., Gan, S., 2002.** Evidence supporting a role of jasmonic acid in Arabidopsis leaf senescence. *Plant Physiol.* 128, 876–84.
- Zhang, S., Klessig, D.F., 2001.** MAPK cascades in plant defense signaling. *Trends Plant Sci.* 6, 520–7.
- Zhang, Y., Primavesi, L.F., Jhurrea, D., Andralojc, P.J., Mitchell, R.A.C., Powers, S.J., Schluepmann, H., Delatte, T., Wingler, A., Paul, M.J., 2009.** Inhibition of SNF1-Related Protein Kinase1 Activity and Regulation of Metabolic Pathways by Trehalose-6-Phosphate. *Plant Physiol.* 149, 1860–1871.
- Zipfel, C., 2014.** Plant pattern-recognition receptors. *Trends Immunol.* 35, 345–351.
- Zipfel, C., Robatzek, S., 2010.** Pathogen-associated molecular pattern-triggered immunity: veni, vidi...? *Plant Physiol.* 154, 551–4.

