



**ΓΕΩΠΟΝΙΚΟ ΠΑΝΕΠΙΣΤΗΜΙΟ ΑΘΗΝΩΝ  
ΤΜΗΜΑ ΕΠΙΣΤΗΜΗΣ ΦΥΤΙΚΗΣ ΠΑΡΑΓΩΓΗΣ  
ΕΡΓΑΣΤΗΡΙΟ ΦΥΤΟΠΑΘΟΛΟΓΙΑΣ**

**ΠΡΟΓΡΑΜΜΑ ΜΕΤΑΠΤΥΧΙΑΚΩΝ ΣΠΟΥΔΩΝ  
ΟΛΟΚΛΗΡΩΜΕΝΑ ΣΥΣΤΗΜΑΤΑ ΦΥΤΟΠΡΟΣΤΑΣΙΑΣ  
& ΔΙΑΧΕΙΡΙΣΗΣ ΤΟΥ ΠΕΡΙΒΑΛΛΟΝΤΟΣ**

**Μεταπτυχιακή Διπλωματική Εργασία**

Επαγωγή της άμυνας των φυτών εναντίον του μύκητα *Verticillium dahliae* με τη χρήση απενεργοποιημένων κυττάρων του

**Μαρία Φραντζέσκα Μ. Τριβιζά**

Επιβλέπων καθηγητής:

Σωτήρης Τζάμος, Αναπληρωτής Καθηγητής ΓΠΑ

**ΑΘΗΝΑ  
2024**

**ΓΕΩΠΟΝΙΚΟ ΠΑΝΕΠΙΣΤΗΜΙΟ ΑΘΗΝΩΝ  
ΤΜΗΜΑ ΕΠΙΣΤΗΜΗΣ ΦΥΤΙΚΗΣ ΠΑΡΑΓΩΓΗΣ  
ΕΡΓΑΣΤΗΡΙΟ ΦΥΤΟΠΑΘΟΛΟΓΙΑΣ**

**Μεταπτυχιακή Διπλωματική Εργασία**

Επαγωγή της άμυνας των φυτών εναντίον του μύκητα *Verticillium dahliae* με τη χρήση απενεργοποιημένων κυττάρων του

“Enhancement of plant immunity against *Verticillium dahliae*  
by necrotized spores of the pathogen”

**Μαρία Φραντζέσκα Μ. Τριβιζά**

Εξεταστική Επιτροπή:

Σωτήρης Τζάμος, Αναπληρωτής Καθηγητής ΓΠΑ (επιβλέπων)

Επαμεινώνδας Παπλωματάς, Καθηγητής ΓΠΑ

Δημήτριος Τσιτσιγιάννης, Καθηγητής ΓΠΑ

**Επαγωγή της άμυνας των φυτών εναντίον του μύκητα *Verticillium dahliae*, με τη χρήση απενεργοποιημένων κυττάρων του**

ΠΜΣ Ολοκληρωμένα Συστήματα Φυτοπροστασίας & Διαχείρισης του Περιβάλλοντος  
Τμήμα Επιστήμης Φυτικής Παραγωγής  
Εργαστήριο Φυτοπαθολογίας

## **Π Ε Ρ Ι Λ Η Ψ Η**

Ο εδαφογενής μύκητας *Verticillium dahliae* προκαλεί σημαντικές απώλειες στο φυτικό κεφάλαιο παγκοσμίως. Η έλλειψη χημικών μέσων για την αντιμετώπιση του καθιστά σημαντική την ανάγκη για εξεύρεση εναλλακτικών μέσων αντιμετώπισης του παθογόνου.

Στη παρούσα εργασία αξιολογήθηκε η δυνατότητα ενεργοποίησης της άμυνας των φυτών εναντίον του μύκητα *V. dahliae* με τη χρήση νεκρών σπορίων του παθογόνου μύκητα. Διαπιστώθηκε ότι η εφαρμογή νεκρών σπορίων του μύκητα *V. dahliae* σε φυτά μελιτζάνας και *Arabidopsis thaliana* μειώνει την ένταση της ασθένειας καθώς και την ενδοφυτική εξάπλωση του μύκητα, το οποίο επαληθεύτηκε με την εξαγωγή DNA από τα φυτά των πειραματικών εφαρμογών και τη χρήση Real Time PCR.

Επίσης, διαπιστώθηκε η υπερέκφραση των γονιδίων άμυνας *PR1* και *PDF1.2* στα φυτά όπου είχε πραγματοποιηθεί η εφαρμογή των νεκρών σπορίων του μύκητα. Τέλος, η χρήση μεταλλαγμένων φυτών *A. thaliana*, ως προς τον υποδοχέα *CERK1*, που ανιχνεύει στα φυτά τη παρουσία χιτίνης, έδειξαν ότι η φυτοπροστατευτική δράση των νεκρών σπορίων του μύκητα εξαρτάται άμεσα από τον εν λόγω υποδοχέα *CERK1*.

**Επιστημονική περιοχή:** Φυτοπαθολογία

**Λέξεις κλειδιά:** *CERK1*, χιτίνη, άμυνα των φυτών, PAMP, νεκρά σπόρια, *Verticillium dahliae*

## Enhancement of plant immunity against *Verticillium dahliae* by necrotized spores of the pathogen

MSc Integrated Plant Protection & Environmental Management Systems  
Faculty of Crop Science  
Laboratory of Phytopathology

### ABSTRACT

The soil-borne fungus *Verticillium dahliae*, known for colonizing plant vascular systems, has gained notoriety as a destructive pathogen, affecting over 200 species of dicotyledonous plants. In this study, we delve into an innovative plant protection approach employing autoclaved spores of the fungus as a form of plant vaccination against its pathogenic effects.

To achieve this, we conducted experiments involving eggplants and *Arabidopsis thaliana*. Autoclaved spores of *V. dahliae* were applied through root drenching or stem/leaf inoculation. Three days later, the plants were artificially inoculated with the pathogen. Strikingly, both application methods of autoclaved spores exhibited a remarkable reduction in disease symptoms and the colonization of the plant's vascular system by the pathogen, as compared to the control group.

Moreover, our investigation revealed an upregulation of the plant defense-related genes *PR1* and *PDF1.2* in plants treated with autoclaved spores. This increased gene expression suggests an activated defense response. Notably, when subjecting the *Arabidopsis* mutant *cerk1*—impaired in chitin perception—to pathogenicity experiments, we underscored the pivotal role of the CERK1 receptor in facilitating the observed protective activity of autoclaved necrotized *V. dahliae* propagules.

In summary, our study introduces a promising method for safeguarding plants against *V. dahliae* through the application of autoclaved spores, shedding light on underlying genetic mechanisms and the crucial role of specific receptors in this newfound protective phenomenon.

**Scientific area:** Phytopathology

**Keywords:** CERK1, chitin, innate immune system, PAMP, autoclaved spores, *Verticillium dahliae*

## *Ευχαριστίες*

Με την ολοκλήρωση της παρούσας εργασίας θα ήθελα να ευχαριστήσω τον επιβλέποντα καθηγητή μου κ. Σωτήρη Τζάμο, για την πολύτιμη και συνεχή καθοδήγηση και υποστήριξή του καθ' όλη τη διάρκεια των πειραματικών εργασιών καθώς και για την καθοδήγηση κατά τη διαδικασία συγγραφής και παρουσίασης της εργασίας.

Επιπλέον, θα ήθελα να ευχαριστήσω τους καθηγητές του Εργαστηρίου Φυτοπαθολογίας και μέλη της εξεταστικής επιτροπής κ. Επαμεινώνδα Παπλωματά, Καθηγητή και κ. Δημήτριο Τσιτσιγιάννη, Καθηγητή, για τις γνώσεις και την εμπειρία που μας μετέδωσαν ως διδάσκοντες στα μαθήματα του μεταπτυχιακού προγράμματος και για τον χρόνο που διέθεσαν για την παρουσίαση αυτής της πτυχιακής μελέτης.

Επιπλέον, ιδιαίτερες ευχαριστίες αρμόζουν στην κα. Ειρήνη Πουλάκη, Γεωπόνο, η οποία με πλήρη αφοσίωση και συνεχή διαθεσιμότητα αφιέρωσε και θυσίασε επαγγελματικό και προσωπικό χρόνο ώστε να επιτευχθεί η ολοκλήρωση των πειραματικών διαδικασιών.

Ακόμη, θα ήθελα να ευχαριστήσω όλους τους καθηγητές και το εκπαιδευτικό προσωπικό του Εργαστηρίου Φυτοπαθολογίας αλλά και τους υποψήφιους διδάκτορες για τις γνώσεις και την βοήθεια που μου προσέφεραν καθ' όλη τη διάρκεια της φοίτησής μου στο Μεταπτυχιακό Πρόγραμμα.

Τέλος, ευχαριστώ το οικογενειακό και φιλικό μου περιβάλλον για την αμέριστη υποστήριξή τους.

Με την άδειά μου, η παρούσα εργασία ελέγχθηκε από την Εξεταστική Επιτροπή μέσα από λογισμικό ανίχνευσης λογοκλοπής που διαθέτει το ΓΠΑ και διασταυρώθηκε η εγκυρότητα και η πρωτοτυπία της.

## Περιεχόμενα

ΕΙΣΑΓΩΓΗ .....	8
1. Το παθογόνο <i>V. dahliae</i> .....	9
1.1 Βερτισιλλίωση - Η ασθένεια που προκαλείται από τους μύκητες του γένους <i>Verticillium</i> spp. ....	9
1.2 Ταξινόμηση .....	10
1.3 Μορφολογία .....	10
1.5.2 Μορφολογικά χαρακτηριστικά των μυκήτων του γένους <i>Verticillium</i> sp. ....	14
1.5 Αναλυτική περιγραφή των μικροσκληρωτίων .....	16
1.4 Φυσιολογία .....	19
1.5 Ο Βιολογικός κύκλος του μύκητα .....	20
1.5.1 Στάδια του βιολογικού κύκλου .....	20
1.6 Παρουσίαση ξενιστών .....	24
1.7 Συμπτωματολογία.....	25
1.7.1 Ο ρόλος της προσβολής από Νηματώδεις στην εκδήλωση συμπτωμάτων της ασθένειας.....	27
1.7.2 Συμπτωματολογία και ξενιστές.....	28
1.7.2.1 Καλλιέργειες δενδρωδών φυτών και συμπτώματα .....	28
1.7.2.2 Κηπευτικά φυτά και συμπτώματα.....	31
2. Μηχανισμοί άμυνας των φυτών κατά τη προσβολή από τον μύκητα <i>Verticillium dahliae</i> .....	33
2.1 Μόρια και σήματα άμυνας φυτών .....	34
2.1.1 Μονοπάτια ενεργοποίησης μηχανισμών άμυνας των φυτών.....	34
2.2 Μηχανισμοί παθογένειας των μυκήτων του γένους <i>Verticillium</i> .....	37
2.2.1 Ρόλος των υδρολυτικών ενζύμων.....	37
2.2.2 Ρόλος των τοξινών και των επαγωγέων .....	38
2.2.3 Ανάλυση των μηχανισμών άμυνας των φυτών ενάντια στη μόλυνση από τους μύκητες του γένους <i>Verticillium</i> .....	39
3. Αντιμετώπιση του μύκητα <i>Verticillium dahliae</i> .....	41
4. Χρήση νεκρών σπορίων στην αντιμετώπιση του μύκητα <i>Verticillium dahliae</i> .....	44
4.1 Σκοπός του πειράματος.....	44

4.2 Προετοιμασία και τρόποι εφαρμογής των νεκρών σπορίων του μύκητα <i>Verticillium dahliae</i> .....	45
Υλικά και μέθοδοι .....	46
4.4 Πειράματα παθογένειας και ξενιστές .....	46
4.4.1 Προετοιμασία φυτικού υλικού για τα 3 φυτά ξενιστές .....	47
4.4.1.1 Προετοιμασία μολύσματος .....	48
4.4.1.3 Εφαρμογή μολύσματος και νεκρών σπορίων του μύκητα .....	48
4.5 qPCR και περιγραφή μοριακών μεθόδων .....	48
4.5.1 Καθορισμός των επιπέδων μεταγραφής <i>PR1</i> , <i>PDF1.2</i> και <i>CERK1</i> .....	49
4.5.2 Στατιστική ανάλυση .....	49
5. Αποτελέσματα .....	50
Τα νεκρά σπόρια του μύκητα <i>V. dahliae</i> ενεργοποιούν τους μηχανισμούς άμυνας εναντίον του μύκητα <i>V. dahliae</i> .....	53
5.2 Η φυτοπροστατευτική δράση των νεκρών σπορίων του μύκητα <i>V. dahliae</i> εξαρτάται από το <i>CERK1</i> .....	54
6. Συζήτηση και συμπεράσματα .....	57
Βιβλιογραφία - Works Cited .....	61

## ΕΙΣΑΓΩΓΗ

Ο φυτοπαθογόνος εδαφογενής μύκητας *Verticillium dahliae* είναι το αίτιο μίας ευρέως διαδεδομένης και σοβαρής ασθένειας που επηρεάζει το αγγειακό σύστημα των φυτών και προσβάλλει περισσότερα από 200 φυτικά είδη (δικοτυλήδονα). Ο μύκητας *V. dahliae* προσβάλλει τα φυτά διαμέσου της ρίζας, προχωρά σε αποικισμό του ξυλώδους, αγγειακού συστήματος και τέλος προκαλούνται νεκρώσεις στους εναέριους ιστούς (Bhat and Sabbarao, 1999).

Οι υφές των μυκήτων του γένους *Verticillium*, είναι απλές ή διακλαδισμένες, έχουν σέπτα, είναι πολυπύρηνες και υαλόμορφες. Το κάθε κονίδιο έχει σχήμα ωοειδές, παράγεται εκ επιμηκών φιαλιδίων τα οποία εντοπίζονται σπονδυλωτά, περιφερειακά της κονιδιοφόρου (Εικόνα 1,3), ενώ οι διακλαδώσεις με τους κονιδιοφόρους εμφανίζονται σπονδυλωτά και σε πολλαπλά επίπεδα. Ορμώμενοι από αυτή τη διάταξη της διακλάδωσης που παρουσιάζουν οι κονιδιοφόροι και τα φιαλίδια, δηλαδή σπονδυλωτά, έχει προκύψει και η ονομασία *Verticillium* εκ του verticillate. Τα δύο είδη του μύκητα *V. dahliae* και *V. albo-atrum*, είναι ικανά να προκαλέσουν την ασθένεια της βερτισιλλίωσης σε υπό-τροπικό ή θερμό κλίμα και περιορισμένα σε τροπικό. Μεταξύ των δύο ειδών, διαπιστώνεται διαφορά στη βέλτιστη θερμοκρασία εκδήλωσης συμπτωμάτων, με τον μύκητα *V. albo-atrum* να προτιμά χαμηλότερο εύρος θερμοκρασιών σε σύγκριση με τον μύκητα *V. dahliae*, εν προκειμένω το είδος *V. albo-atrum* περιορίζεται σε περιοχές όπου η θερμοκρασία δεν υπερβαίνει τους 21-24°C. Αυτό αντικατοπτρίζεται και γεωγραφικά, παρατηρώντας χωρικά την εξάπλωσή τους (Schnathorst, 1981). Σε καλλιέργειες βάμβακος, ηλίανθου και κουνουπιδιών, έχει παρατηρηθεί η ύπαρξη μεγάλων εστιών προσβολής και ολοκληρωτική απώλεια στις καλλιέργειες (Church, 1995; Friebertshauser, 1982; Koike, 1994). Όπως είναι γνωστό, ένα μεγάλο πρόβλημα στην αντιμετώπιση της ασθένειας της βερτισιλλίωσης αποτελεί η έλλειψη μυκητοκτόνων σκευασμάτων. Παρά τις μεγάλες οικονομικές και γεωργικές ζημιές που προκαλεί η ασθένεια, ακόμη είναι πολύ περιορισμένα τα στοιχεία που υπάρχουν διαθέσιμα για τους μοριακούς μηχανισμούς που την προκαλούν.



## 1. Το παθογόνο *V. dahliae*

### 1.1 Βερτισιλλίωση - Η ασθένεια που προκαλείται από τους μύκητες του γένους *Verticillium* spp.

Οι ασθένειες που χαρακτηρίζονται ως αδρομυκώσεις, είναι καταστρεπτικές για ξυλώδη και ποώδη φυτά και προκαλούνται από προσβολή των φυτών από φυτοπαθογόνους εδαφογενείς μύκητες. Ως πιο καταστρεπτικοί χαρακτηρίζονται οι μύκητες που ανήκουν στα γένη *Verticillium* και *Fusarium* ενώ χαρακτηριστικό τους είναι ότι η προσβολή εντοπίζεται στο αγγειακό σύστημα του φυτού (Παναγόπουλος, 2007). Η ασθένεια που προκαλείται από τους μύκητες του γένους *Verticillium* spp. πέραν από αδρομύκωση, αναφέρεται χαρακτηριστικά και ως βερτισιλλίωση. Αυτές οι ασθένειες έχουν παγκόσμιο εύρος με πολύ μεγάλη σημασία για την εύκρατη ζώνη. Όπως έχει προαναφερθεί, οι μύκητες του γένους *Verticillium* spp. προσβάλλουν πάνω από 200 φυτικά είδη όπως ετήσια, δενδρώδεις καλλιέργειες και πολλά ακόμη (Agrios, 2005). Οι καλλιέργειες που παρουσιάζουν ευπάθεια ποικίλουν, με χαρακτηριστικές περιπτώσεις από δενδρώδεις καλλιέργειες τις φυσιτικές, τις ελιές και τα πυρηνόκαρπα, από ετήσια φυτά και συγκεκριμένα από κηπευτικές καλλιέργειες τις φράουλες, τις πατάτες, τις τομάτες, τις μελιτζάνες και τα κολοκυνθοειδή, από βιομηχανικές καλλιέργειες, τα ψυχανθή, τα βαμβάκια και τη μηδική, ενώ υπάρχουν και πολλά καλλωπιστικά φυτά που προσβάλλονται όπως είναι οι τριανταφυλλίες (Παναγόπουλος, 2007).

Σε ορισμένα φυτικά είδη, η ασθένεια της βερτισιλλίωσης εντοπίζεται σε σπορόφυτα, με νέκρωση αυτών έπειτα από σύντομο χρονικό διάστημα από τις μολύνσεις. Συνηθέστερα, έχουμε εκδήλωση συμπτωμάτων όπου χαρακτηρίζονται από φυλλόπτωση των κατώτερων φύλλων, όπως χλωρώσεις και νεκρώσεις φύλλων. Κατά τη μόλυνση των φυτών με μύκητες του γένους *Verticillium* spp., παρατηρείται νανισμός και καστανός μεταχρωματισμός των ιστών του αγγειακού συστήματος. Κατά την εμφάνιση της ασθένειας στον αγρό, εντοπίζεται κυρίως διάσπαρτα στον αγρό. (Agrios, 2005).

Στα περισσότερα φυτά, η ασθένεια προκαλείται από τα είδη *Verticillium albo-atrum* και *Verticillium dahliae*. Χαρακτηριστικό των ειδών αυτών αποτελεί η παραγωγή κονιδίων μικρής διάρκειας ζωής, ωστόσο, ο μύκητας *V. dahliae* χαρακτηρίζεται και από την παραγωγή μικροσκληρωτίων ενώ ο μύκητας *V. albo-atrum* δεν τα παράγει, παράγει μυκήλια με παχιά και σκούρα τοιχώματα (Agrios, 2005). Όσον αφορά στις περιπτώσεις πολυετών και δενδρώδων καλλιεργειών στην Ελλάδα, το αίτιο της βερτισιλλίωσης αποτελεί η προσβολή από τον μύκητα *V. dahliae* (Παναγόπουλος, 2007).

## 1.2 Ταξινόμηση

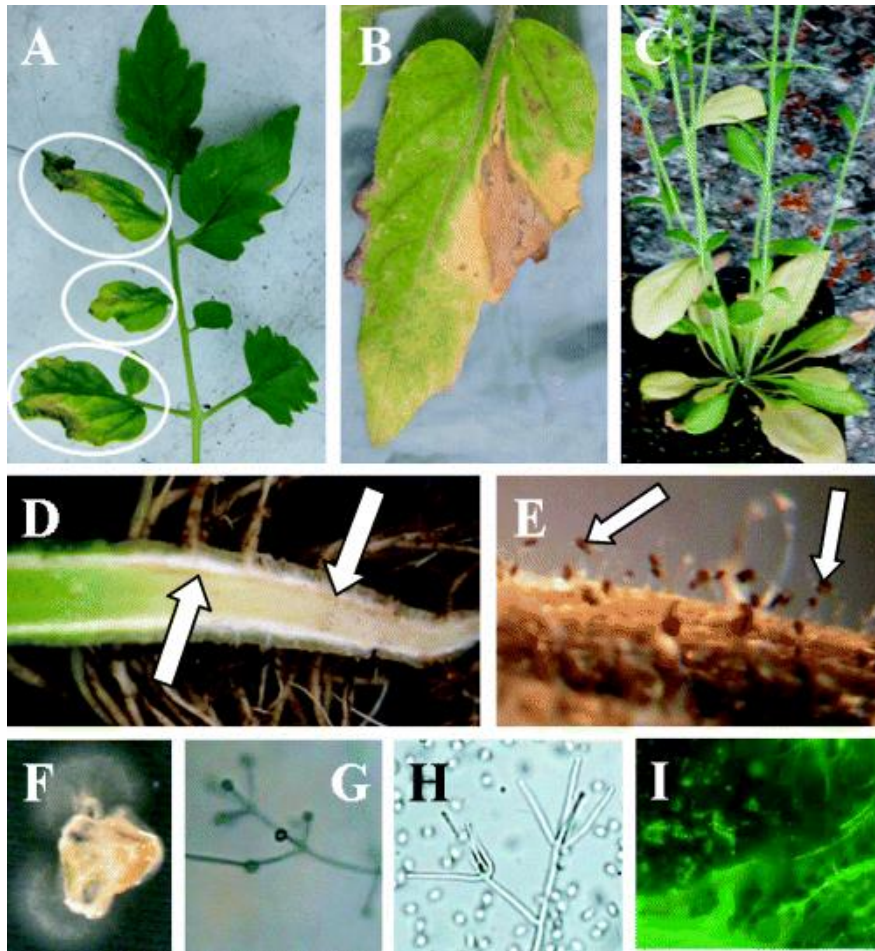
Το γένος *Verticillium* κατατάσσεται στους Hyphomycetes. Επί δεκαετίες, το αίτιο της ασθένειας που ονομάζεται βερτισιλλίωση θεωρούνταν ο μύκητας *Verticillium albo-atrum*. Αυτό συνέβαινε λόγω της ταξινόμησης των μυκήτων του γένους *Verticillium* που ήταν αρχικά σε ισχύ, όπου ο μύκητας *Verticillium albo-atrum* θεωρούνταν το παθογόνο-αίτιο της ασθένειας, ενώ ο μύκητας *Verticillium dahliae* ταξινομικά υπαγόταν σε αυτόν και δεν ήταν διαχωρισμένο είδος. Περί το 1970 επιβεβαιώθηκε ότι τα δύο αυτά είδη του μύκητα *Verticillium* είναι ξεχωριστά και συγκεκριμένα ότι το είδος *Verticillium dahliae* είναι αυτό που ευθύνεται για την ασθένεια της βερτισιλλίωσης. Μία χαρακτηριστική περίπτωση αποτελεί η καλλιέργεια βάμβακος, όπου σε συνθήκες αγρού, ο μύκητας *Verticillium albo-atrum* προκαλεί συμπτώματα μόνο κατά τη διάρκεια εκδήλωσης θερμοκρασιών κάτω των 25°C, εν αντιθέσει, με το *Verticillium dahliae* όπου μπορεί να προκαλέσει εκδήλωση συμπτωμάτων σε θερμοκρασίες έως και 30°C (Hillocks, 1992).

## 1.3 Μορφολογία

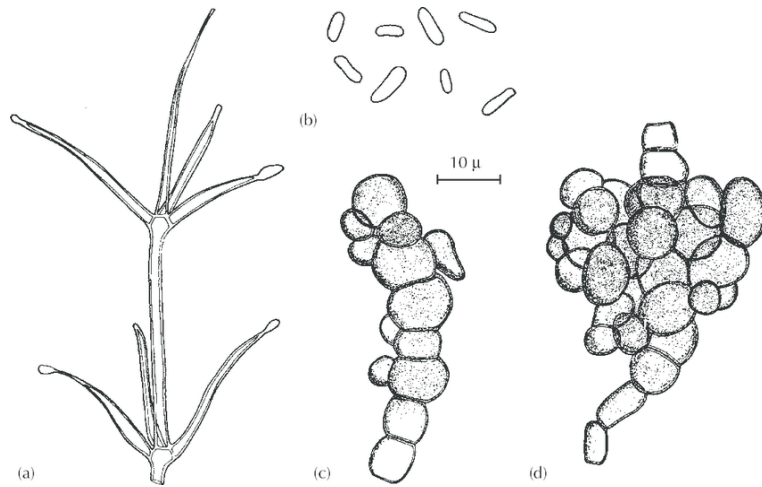
Κατάλληλα θρεπτικά μέσα ανάπτυξης για τον φυτοπαθογόνο μύκητα *V. dahliae*, αποτελούν το Potato Dextrose Agar (PDA) αλλά και το Corn Meal Agar (ή Maize Agar-MA), ενώ η βέλτιστη θερμοκρασία ανάπτυξης είναι περί τους 20-25°C. Ο ρυθμός ανάπτυξης κυμαίνεται από 2 έως 5 mm ανά ημέρα. Κατά τα αρχικά στάδια ανάπτυξης της καλλιέργειας οι αποικίες έχουν λευκό ή φαιό χρωματισμό και βελούδινη υφή. Τα μυκήλια που σχηματίζονται είναι πολυκύτταρα με διάμετρο από 2 έως 4,5 μm. Κατά τα αρχικά στάδια είναι υαλώδη ενώ στη πορεία αποκτούν καστανή απόχρωση. Στο θρεπτικό μέσο PDA το μυκήλιο εμφανίζεται πυκνότερο συγκριτικά με το θρεπτικό μέσο MA. Και στις δύο περιπτώσεις, από την πάροδο 1 εβδομάδας και μετά, το μυκήλιο αποκτά μαύρη απόχρωση λόγω του σχηματισμού μικροσκληρωτίων (Hawksworth, 1970a) (Εικόνα 5).

Αναλυτικότερα, αρχικά, πραγματοποιείται σχηματισμός υαλώδων, πολυκύτταρων, ελεύθερων και ανορθωμένων κονιδιοφόρων (Εικόνα 1,3) με χαρακτηριστικές σπονδυλωτές διακλαδώσεις (verticillate) (Παναγόπουλος, 2007). Σε αυτό οφείλεται και η ονομασία του συγκεκριμένου μύκητα γένους *Verticillium* (Tolmsoff, 1983). Στη συνέχεια, υπάρχει σχηματισμός 2 έως 4 πλευρικών, μονοκύτταρων, κοντών φιαλιδίων (στηριγμάτων) ανά σπόνδυλο, στο εγκάρσιο χώρισμα των κονιδιοφόρων και στα κορυφαία σημεία αυτών πραγματοποιείται σχηματισμός φιαλιδιοσπορίων (κονιδίων). Η συγκράτηση αυτών των κονιδίων πραγματοποιείται μέσω κολλώδους ουσίας και έτσι σχηματίζονται μικρές κεφαλές με κονίδια, ενώ ελευθερώνονται μέσω του νερού

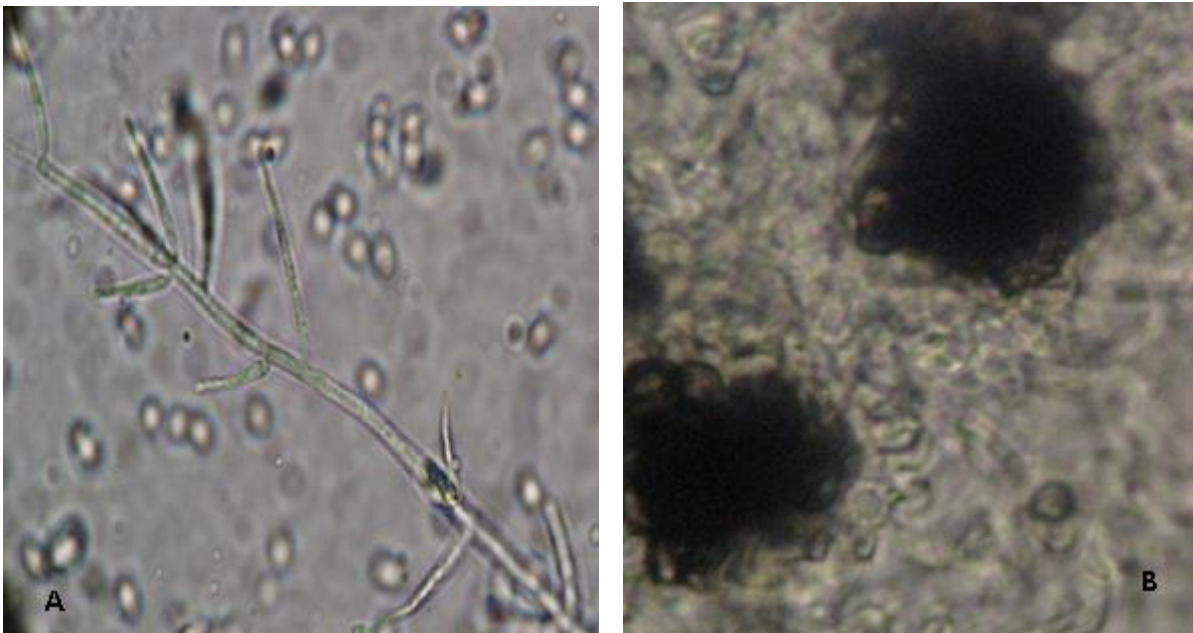
(Παναγόπουλος, 2007). Τα μεγέθη των φιαλιδίων κυμαίνονται σε 16-35 x 1-2.5 μm. Τα κονίδια ή σπόρια του μύκητα *V. dahliae*, έχουν σχήμα ελλειψοειδές έως ωοειδές, είναι υαλώδη, μονοκύτταρα και σπανίως δικύτταρα. Οι διαστάσεις των κονιδίων κυμαίνονται περίπου στα 2,5-8 x 1,4-3,2 μm. Κατόπιν, πραγματοποιείται σχηματισμός των μικροσκληρωτίων, όπου αποτελούν διαχειμάζοντα κατασκευές και εντοπίζονται στο κέντρο των καλλιεργειών, σε εύρος σχημάτων και μεγεθών, με διάμετρο από 15 έως 100 μm (Wilhelm, 1981) και τα οποία, καθώς αναπτύσσονται, αποκτούν μαύρο χρώμα. Προέρχονται από μεμονωμένες υφές, μέσω επαναλαμβανόμενων εκβλαστήσεων, έχουν σχήμα βαρελοειδές ή βοτρυοειδές και είναι εμφανής η παρουσία εξογκωμάτων (Εικόνα 2). Τα μικροσκληρώτια είναι και ο τρόπος διάκρισης των δύο ειδών του παθογόνου *V. albo-atrum* και *V. dahliae*. Ανάμεσα στις διάφορες απομονώσεις υπάρχει μεγάλη παραλλακτικότητα, με την περίοδο σχηματισμού τους να κυμαίνεται έως και αρκετές εβδομάδες μετά την έναρξη ανάπτυξης της καλλιέργειας (Λιγοξυγκάκης, 1998). Στον μύκητα *V. dahliae*, το χρώμα τους είναι μαύρο ενώ η ανάπτυξή τους επέρχεται στους 30°C, σε αντίθεση με τον μύκητα *V. albo-atrum*, όπου όπως έχει αναφερθεί, δεν αναπτύσσονται μικροσκληρώτια, παρά σύνολο διαχειμαζόντων υφών χρώματος καστανού (Παναγόπουλος, 2007).



Εικόνα 1 Συμπτώματα και χαρακτηριστικά του μύκητα *Verticillium* spp. (A) Φύλλο φυτού τομάτας προσβεβλημένο από τον μύκητα *V. dahliae* με εκδήλωση συμπτωμάτων της μόλυνσης. Χαρακτηριστικές χλωρώσεις, μαρασμός και συμπτώματα νέκρωσης είναι ορατά μόνο κατά το ήμισυ στο προσβεβλημένο φύλλο (όπως φαίνεται στο εσωτερικό των κύκλων). (B) Φύλλο φυτού τομάτας προσβεβλημένο από τον μύκητα *V. albo-atrum* όπου (C) Φυτά *Arabidopsis thaliana* 23 ημέρες μετά την μόλυνση με τον μύκητα *V. dahliae* εμφανίζει χλώρωση της ροζέτας των φύλλων και συμπτώματα μάρανσης. (D) Διαμήκης τμήμα της βάσης του μίσχου φυτού τομάτας, το οποίο έχει προσβληθεί από τον μύκητα *V. albo-atrum* επιδεικνύοντας ελαφρώς καστανούς μεταχρωματισμούς στα αγγεία (βέλη). (E) Μικροσκοληρώτια (βέλη) που παράγονται από τον μύκητα *V. dahliae* σε ιστό μίσχου φυτού τομάτας, που έχει νεκρωθεί. (F) *In vitro* απεικόνιση διακλάδωσης μίσχου φυτού τομάτας, προσβεβλημένο από τον μύκητα *V. dahliae* απεικονίζοντας την ανάπτυξη του μύκητα από τις ηθμαγγειώδεις δεσμίδες. (G) Μικροσκοπική παρατήρηση του μυκηλίου του μύκητα *V. dahliae* όπου είναι ευδιάκριτη η σπονδυλωτή ('verticillate') διάταξη των κονιδιοφόρων. (H) Μικροσκοπική παρατήρηση του μυκηλίου του μύκητα *V. dahliae* όπου είναι ευδιάκριτη η σπονδυλωτή ('verticillate') διάταξη των κονιδιοφόρων με ελεύθερα κονίδια. (I) *In vitro* ανεπτυγμένος διαγονιδιακός μύκητας *V. dahliae* εκφράζοντας πράσινη φθορίζουσα πρωτεΐνη (green fluorescent protein-GFP) παρατηρούμενο μέσω μικροσκοπίας φθορισμού. Οι υφές και τα κονίδια φαίνονται με έντονο φθορισμό. ( <https://doi.org/10.1111/j.1364-3703.2006.00323.x> )



Εικόνα 2 [https://www.researchgate.net/publication/285941788\\_Foliar\\_floral\\_and\\_soilborne\\_diseases](https://www.researchgate.net/publication/285941788_Foliar_floral_and_soilborne_diseases)  
 Σχηματική παράσταση των μορφολογικών χαρακτηριστικών του μύκητα *Verticillium dahliae* (από C.M.I. description no. 256) Α: Κονιδιοφόροι Β: Κονίδια/φιαλοσπόρια Γ: Μικροσκληρώτια Δ : Όριμα μικροσκληρώτια



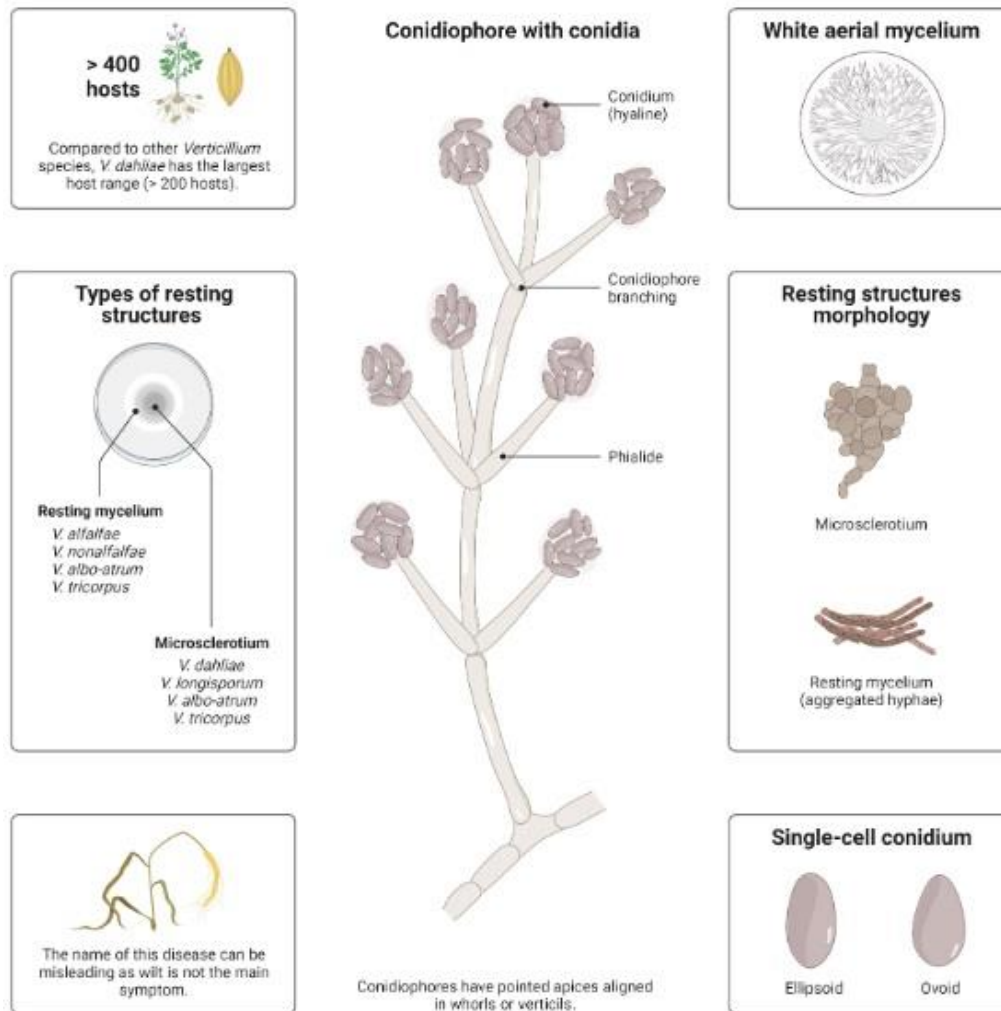
Εικόνα 3: Ο κονιδιοφόρος του μύκητα *V. dahliae*, σε μικροσκοπική παρατήρηση, όπου διακρίνεται η χαρακτηριστική του διακλάδωση στην οποία οφείλεται το όνομα του παθογόνου (Α) Μικροσκοπική παρατήρηση μικροσκληρωτίων του μύκητα (Β) (Παναγόπουλος, Χ.Γ.,2007, Ιωάννης Α. Στριγγλής, 2012)

## 1.5.2 Μορφολογικά χαρακτηριστικά των μυκήτων του γένους *Verticillium* sp.

# Verticillium Wilt

Genus: *Verticillium*

Verticillium wilt is a soil-borne disease represented by several fungal species.  
The type species of the genus is *V. dahliae*.



Εικόνα 4. Μορφολογικά χαρακτηριστικά του μύκητα *Verticillium dahliae*

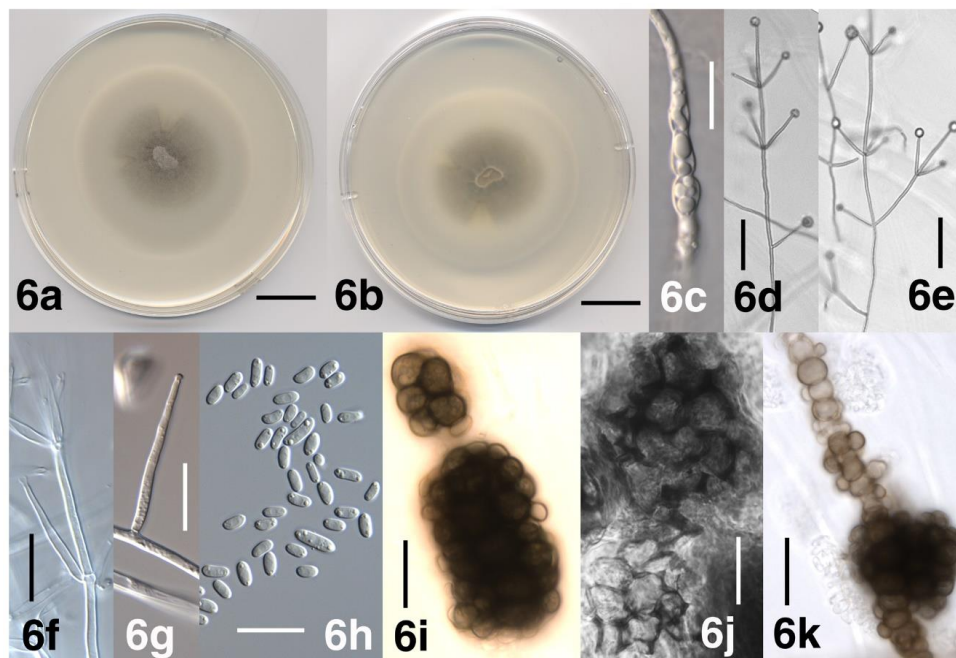
Barnes, E. H., & Barnes, E. H. (1979). *Verticillium wilt*. Atlas and Manual of Plant Pathology, 244-249.

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(12), e28341.

CABI compendium. <https://www.cabidigitallibrary.org/doi/full/10.1079/cabicompendium.56275>



Εικόνα 5. Καλλιέργεια του μύκητα *Verticillium theobromae*. Διακρίνονται διαφορετικές ζώνες απόχρωσης στο μυκήλιο, ανεπτυγμένο σε PDA θρεπτικό μέσο, 2007, ([https://commons.wikimedia.org/wiki/File:Verticillium theobromae culture.jpg](https://commons.wikimedia.org/wiki/File:Verticillium_theobromae_culture.jpg))



Εικόνα 6. 6a. Αποικία 14 ημερών σε PDA, μπροστινή όψη. 6b. Αποικία 14 ημερών σε PDA, κάτοψη. 6c. Διογκωμένα κύτταρα παρόντα στο μυκήλιο 28 ημέρες μετά, σε PDA. 6d. Κονιδιοφόροι μετά από 15 ημέρες, σε WA-p. 6e. Διακλαδώσεις κονιδιοφόρων 12 ημέρες μετά, σε WA-p. 6f. Σπονδυλωτά φιαλίδια 25 ημέρες μετά, σε WA-p. 6g. Μεμονωμένα φιαλίδια 14 ημέρες μετά, σε PDA. 6h. Κονίδια 9 ημέρες μετά, σε PDA. 6i. Μικροσκληρώτια 12 ημέρες μετά, σε WA-p. 6j. Μικροσκληρώτια του μύκητα *V. dahliae* από μίσχο φυτού *Dahlia* sp. 6k. Βραχεία υφή καφέ πύργματος που αποτελείται από κυλινδρικά κύτταρα προσκολλημένα στα μικροσκληρώτια 49 ημέρες, σε PDA.

Scale bar: 6a, 6b=2 cm; 6c, 6f-6k=20 μm; 6d, 6e=50 μm. Imaging method: 6a, 6b=DS; 6c, 6f-6h=DIC; 6d, 6e, 6i, 6k=BF; 6j=PC. (<https://doi.org/10.1371/journal.pone.0028341.g006>)

## 1.5 Αναλυτική περιγραφή των μικροσκληρωτίων

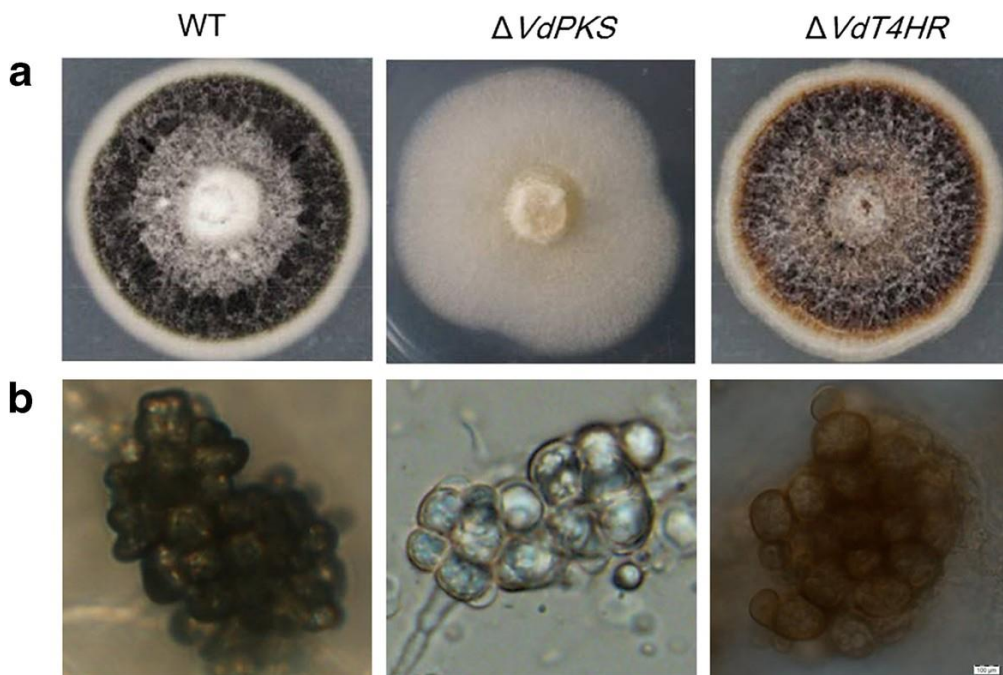
Πολλαπλά είδη μυκήτων, με πιθανώς το πιο διαδεδομένο να είναι ο μύκητας *Sclerotinia sclerotiorum* (Bolton *et al.*, 2006), είναι γνωστά για την παραγωγή σκληρωτίων ως ανθεκτικές βλασάνουσες και διαχειμάζουσες κατασκευές. Όπως αναφέρθηκε, τα μικροσκληρώτια που παράγονται από τον μύκητα *V. dahliae* αποτελούνται από μικροσκοπικά, συμπαγή συσσωματώματα υφών με παχιά τοιχώματα και σκούρου πηγματος (Εικόνα 7). Αυτά τα συσσωματώματα υφών περιέχουν σκούρο (μελανό) εξωτερικό φλοιό πολλαπλών κυτταρικών στρωμάτων ώστε να θωρακιστεί το εσωτερικό τμήμα (σπογγώδες παρέγχυμα). Αναπτύσσονται μέσω διόγκωσης των υφών και του σχηματισμού χωρισμάτων (σέπτων) στο διογκωμένο παρέγχυμα. Ταυτοχρόνως, μελανίνη εναποθέτεται στα κυτταρικά τοιχώματα και στον ενδοκυτταρικό χώρο (Gordee and Porter, 1961; Perry and Evert, 1982). Οι περισσότερες μελανίνες που παράγονται από μύκητες, προκύπτουν από τη πρόδρομη ένωση 1,8-dihydroxynaphthalene (DHN) η οποία παράγεται στο κυτταρόπλασμα και ταυτοχρόνως συγκεντρώνεται στο κυτταρικό τοίχωμα (Bell and Wheeler, 1986; Butler and Day, 1998). Η βιοσύνθεση της μελανίνης που προέρχεται από την 1,8-dihydroxynaphthalene (DHN), χαρακτηρίστηκε αρχικά στον μύκητα *V. dahliae* με μεταλλάξεις απουσία μελανίνης (Bell *et al.*, 1976; Stipanovic and Bell, 1976). Γενικότερα, η μελανίνη θεωρείται ότι προσφέρει προστασία στα περιβαλλοντικά στρες διάφορων ειδών (Butler and Day, 1998; Henson *et al.*, 1999). Για τον μύκητα *V. dahliae*, η μελανίνη παρουσιάζεται να συμμετέχει στην μακρόβια επιβίωση των διαχειμαζόντων μορφών του μύκητα, καθώς τα μικροσκληρώτια απουσία μελανίνης, χάνουν ταχέως την δυνατότητα μακράς διατήρησής τους (Hawke and Lazarovits, 1995). Επιπροσθέτως, ο ρόλος της μελανίνης στη μολυσματικότητα του μύκητα έχει αποδειχθεί για πληθώρα μυκήτων (Howard and Valent, 1996). Παρά ταύτα, όπως και για πολλούς άλλους μύκητες, ο ρόλος της μελανίνης στη παθογένεια των μυκήτων του γένους *Verticillium* έχει περιθώρια για περαιτέρω μελέτες (Bolton *et al.*, 2006; Fitzgerald *et al.*, 2004; Thomma, 2003).

Παρότι η βιοσύνθεση της μελανίνης έχει μελετηθεί εις βάθος, υπάρχουν πολύ περιορισμένες πληροφορίες για τον μοριακό έλεγχο της ανάπτυξης των μικροσκληρωτίων. Μία εκφρασμένη βιβλιοθήκη ακολουθιών EST (expressed sequence tag) 1000 κλώνων του μύκητα *V. dahliae*, παρήχθησαν από μυκήλιο που αναπτύχθηκε σε συνθήκες εργαστηρίου κατά τη διάρκεια ανάπτυξης μικροσκληρωτίων (Neumann and Dobinson, 2003). Περίπου μισά από τα γονίδια προορίζονταν για την ενέργεια, τον μεταβολισμό ή τη σύνθεση πρωτεϊνών και περίπου 30 κλώνοι εκπροσωπούσαν τα τρία γονίδια βιοσύνθεσης DHN-μελανίνης (Neumann and Dobinson, 2003). Αυτή η βιβλιοθήκη μπορεί να χρησιμοποιηθεί για την ταυτοποίηση παραγόντων του σχηματισμού μικροσκληρωτίων. Ένα απαραίτητο γονίδιο για την ανάπτυξη



μικροσκληρωτίων του μύκητα *V. dahliae* είναι το *VDH1*, όπου η έκφρασή του οδηγεί στην επαγωγή της παραγωγής τους, ενώ από μελέτες έχει αποδειχθεί ότι το συγκεκριμένο γονίδιο εμπλέκεται και στην ζωτικότητα των σπορίων του μύκητα *V. dahliae* (Klimes and Dobinson, 2003). Επί προσθέτως, μία πρωτεϊνική κινάση MAPK των μυκήτων του γένους *Verticillium* (*VMK1*) χαρακτηρίστηκε προσφάτως ότι επίσης εμφανίζεται να παίζει έναν ρόλο στην ανάπτυξη μικροσκληρωτίων. Ο αριθμός των μικροσκληρωτίων που παράγονται από τα διαγονιδιακά στελέχη *vmk1* ήταν σημαντικά χαμηλότερη από τα στελέχη του αγρίου τύπου (Rauyaree *et al.*, 2005). Παρά ταύτα, λόγω του ότι τα διαγονιδιακά στελέχη έδειξαν μειωμένο σχηματισμό κονιδίων στο εργαστήριο, όπως και μειωμένη παθογένεια σε διάφορα φυτά ξενιστές, μπορεί να θεωρηθεί ότι αυτή η MAP κινάση εμπλέκεται σε πολλαπλές διαδικασίες (Rauyaree *et al.*, 2005).

Εν κατακλείδι, τα μικροσκληρώτια μπορούν να χρησιμοποιηθούν για τον διαχωρισμό του μύκητα *V. dahliae* από τον μύκητα *V. albo-atrum* (Berlanger and Powelson, 2000).



Εικόνα 7. Εμφάνιση αποικίας (a) του μύκητα *Verticillium dahliae* αγρίου τύπου (WT), του στελέχους JY και τα δύο διαγονιδιακά στελέχη ελλείπει μελανίνης (DHN melanin) σε θρεπτικό υλικό Czapek Dox agar και κατόπιν επώασης 2 εβδομάδων στους 25°C, και τα μικροσκληρώτιά τους (b) έπειτα από επώαση για 4 εβδομάδες σε τρυβλία BMM. Bar = 30 μm (Rong Fan, Xue Gong, Liqiang Gao, Wenjing Shang, Xiaoping Hu, Xiangming Xu, 2020) <https://doi.org/10.1007/s10658-020-02014-9>



Εικόνα 8. Μικροσκληρώτια του μύκητα *Verticillium dahliae* σε καλλιέργεια (Thomas Gulya, 2006)  
[https://www.researchgate.net/publication/43268615 Sources of Resistance to a New Strain of Verticillium dahliae on Sunflower in North America-2006](https://www.researchgate.net/publication/43268615_Sources_of_Resistance_to_a_New_Strain_of_Verticillium_dahliae_on_Sunflower_in_North_America-2006)

#### 1.4 Φυσιολογία

Ο μύκητας *V. dahliae* πραγματοποιεί την ανάπτυξή του κανονικά σε απλά σάκχαρα και αμινοξέα που απαντώνται στις φυτικές εκκρίσεις και στο χυμό του ξύλου. Επιπλέον, ο μύκητας *V. dahliae* παράγει υδρολυτικά ένζυμα σε μεγάλο αριθμό, τα οποία επιτρέπουν την πέψη υδατανθράκων, πρωτεϊνών και νουκλεϊκών οξέων των φυτικών ιστών. Η ανάπτυξη του μύκητα *V. dahliae* δεν επηρεάζεται από τη συγκέντρωση του οξυγόνου και τη διαθεσιμότητα του νερού. Το μέγιστο της ανάπτυξης του μύκητα έχει διαπιστωθεί ότι επιτυγχάνεται σε συγκεντρώσεις οξυγόνου οι οποίες κυμαίνονται μεταξύ 1,9-2,7% και σε υδατικό δυναμικό που κυμαίνεται μεταξύ -10 και -30 bars. Οι ιδανικές θερμοκρασίες ανάπτυξης έχουν παρατηρηθεί ότι βρίσκονται μεταξύ 22 και 27°C ενώ σε ορισμένες περιπτώσεις οι απομονώσεις συνεχίζουν την ανάπτυξή τους έως και στους 32°C. Υπάρχουν φυλές του μύκητα που χαρακτηρίζονται αποφυλλωτικές και μη αποφυλλωτικές. Οι αποφυλλωτικές φυλές αναπτύσσονται βέλτιστα στους 28°C συγκριτικά με τις μη αποφυλλωτικές φυλές. Ο παράγοντας της θερμοκρασίας είναι ο πιο καθοριστικός. Η θερμοκρασία είναι συνήθως ο μεγαλύτερος περιοριστικός παράγοντας για την ανάπτυξη του μύκητα στις καλλιέργειες κατά τις καλλιεργητικές περιόδους. Η ανεκτικότητα του μύκητα έχει άμεση σχέση με το υδατικό δυναμικό. Με τη μείωση του υδατικού δυναμικού αυξάνεται και η ανεκτικότητα του μύκητα στις υψηλές θερμοκρασίες. Η ανάπτυξη του μύκητα πραγματοποιείται έως και τους 35°C, αρκεί το υδατικό δυναμικό να κυμαίνεται μεταξύ των -35 και -40 bars. Παρά ταύτα, σε θερμοκρασία 33°C δεν μπορεί να συμβεί εάν το νερό είναι άμεσα διαθέσιμο. Είναι γνωστό ότι ο μύκητας *V. dahliae* δεν προκαλεί εκδήλωση συμπτωμάτων σε θερμοκρασίες άνω των 30-35°C. Η επίδραση στην έκθεση του φωτός και του αρνητικού υδατικού δυναμικού επηρεάζει την σποροποίηση και το σχηματισμό μικροσκληρωτίων, με την έννοια ότι η έκθεση στο φως και το αρνητικό υδατικό δυναμικό διεγείρει τη σποροποίηση και παρεμποδίζει το σχηματισμό μικροσκληρωτίων (Bell and Wheeler, 1986).

## 1.5 Ο Βιολογικός κύκλος του μύκητα

Ο βιολογικός κύκλος του μύκητα *V. dahliae* περιλαμβάνει τον σχηματισμό μικροσκληρωτίων με τα οποία το παθογόνο επιβιώνει σε διαχείμαση. Αυτά διαβιούν στο έδαφος, σε φυτικά υπολείμματα επιβιώνοντας για πολλά χρόνια σε βάθη έως και 40cm. Τα μικροσκληρώτια βλαστάνουν λόγω της έκθεσής τους στις εκκρίσεις του ριζικού συστήματος και δημιουργούνται αποικίες του μύκητα στην επιφάνεια των ριζών του φυτού, συνήθως 3-10mm από το επάκριο τμήμα της ρίζας. Οι υφές των αποικιών εισχωρούν στο φλοιό της ρίζας και εν τέλει εισέρχονται και στα αγγεία του ξύλου. Η ύπαρξη πληγών λειτουργεί πιθανώς βοηθητικά στην είσοδο του παθογόνου μύκητα και ενισχύει την ένταση των συμπτωμάτων. Το παθογόνο πολλαπλασιάζεται μέσα στα αγγεία του ξύλου σχηματίζοντας κονίδια τα οποία και μεταφέρονται με το ανοδικό ρεύμα έως ότου φτάσουν στα τοιχώματα των αγγείων όπου τότε βλαστάνουν, διατρυπούν και εισέρχονται στο επόμενο τμήμα του αγγείου. Με τον τρόπο αυτό ο μύκητας *V. dahliae* σταδιακά καταλαμβάνει ολόκληρο το αγγειακό σύστημα του φυτού. Τα συμπτώματα της προσβολής δεν είναι εμφανή παρά μόνο όταν αποφραχθούν τα αγγεία. Οι υφές του παθογόνου μύκητα διατρυπούν τα αγγεία του ξύλου και εισέρχονται στο παρέγχυμα όπου εκεί μετά τη πάροδο αρκετών εβδομάδων ή/και μηνών σχηματίζονται τα μικροσκληρώτια στο φυτικό ιστό ο οποίος πλέον έχει νεκρωθεί (Εικόνα 9). Τα μικροσκληρώτια διατηρούνται πολλά χρόνια στο έδαφος και με την αποσύνθεση των φυτικών υπολειμμάτων και τις καλλιεργητικές εργασίες διασκορπίζονται (Hillocks, 1992). Η θερμοκρασία όπου οι μύκητες που ανήκουν στο είδος *V. dahliae* ευνοούνται, είναι από 21 έως 27 °C και αυτή είναι η αιτία της επικράτησής τους ως πολύ σοβαρά παθογόνα στις Μεσογειακές χώρες. Οι μύκητες αυτοί έχουν ευρύ φάσμα από ξενιστές και δεν εξειδικεύονται (Παναγόπουλος, 2007; Schnathorst 1981; Fradin και Thomma, 2006).

### 1.5.1 Στάδια του βιολογικού κύκλου

Ο μύκητας *V. dahliae* έχει βιολογικό κύκλο τριών σταδίων: το ληθαργικό ή διαχείμασης, το παρασιτικό και το σαπροφυτικό. Κατά το πρώτο στάδιο, οι ληθαργικές μυκηλιακές κατασκευές ή αλλιώς τα μικροσκληρώτια, δεν βλαστάνουν εξαιτίας την μυκόστασης ή της μικροβιόστασης, κάτι το οποίο μπορεί να ξεπεραστεί παρουσία περίσσειας των στοιχείων άνθρακα και αζώτου στις εκκρίσεις των ριζών των ξενιστών. Η βλάστηση του κάθε κυττάρου των μικροσκληρωτίων πραγματοποιείται μόνο μία φορά, κατ' επέκταση

τα μικροσκληρώτια που απαρτίζονται από τα κύτταρα, βλαστώνουν πολλαπλά και έτσι αυξάνονται οι πιθανότητες μόλυνσεων. Η κάθε υφή που προκύπτει από το μικροσκληρώτιο, μπορεί να διανύσει περιορισμένες αποστάσεις και καθοδηγείται προς τα θρεπτικά στοιχεία που παράγονται από τα φυτά-ξενιστές. Κατόπιν μελετών φαίνεται ότι η ριζόσφαιρα έχει σφαίρα επιρροής στο παθογόνο περί τα 300 μm ή και λιγότερο (Fradin και Thomma, 2006). Σε πολλαπλές μελέτες, έχει οριστεί ότι χρειάζεται διάστημα μεταξύ 2 και 4 ημερών προτού ο μύκητας εισχωρήσει στο ξυλώδες αγγειακό σύστημα των ριζών και μία ημέρα επιπλέον για να εξαπλωθεί στα γειτνιάζοντα ξυλώδη όργανα και στο να σποροποιήσει (Chen *et al.*, 2004; Gold and Robb, 1995; Heinz *et al.*, 1998).

Σε επίπεδο είδους, η ασθένεια που προκαλείται από τον μύκητα *V. dahliae* χαρακτηρίζεται μονοκυκλική, δηλαδή μόνο ένας κύκλος της ασθένειας ενώ και η παραγωγή μολύσματος προκαλείται κατά τη διάρκεια μίας περιόδου ανάπτυξης. Σε αντίθεση με τον μύκητα *V. dahliae*, ο μύκητας *V. albo-atrum* μπορεί να παράγει κονίδια (σπόρια) σε προσβεβλημένους φυτικούς ιστούς όπου μετατρέπονται σε αερομεταδιδόμενους και συμβάλουν στην εξάπλωση της ασθένειας (Jiménez-Díaz and Millar, 1988). Κατ' επέκταση, η ασθένεια που προκαλείται από τον μύκητα *V. albo-atrum* ενδέχεται σε μερικές περιπτώσεις να είναι πολυκυκλική.

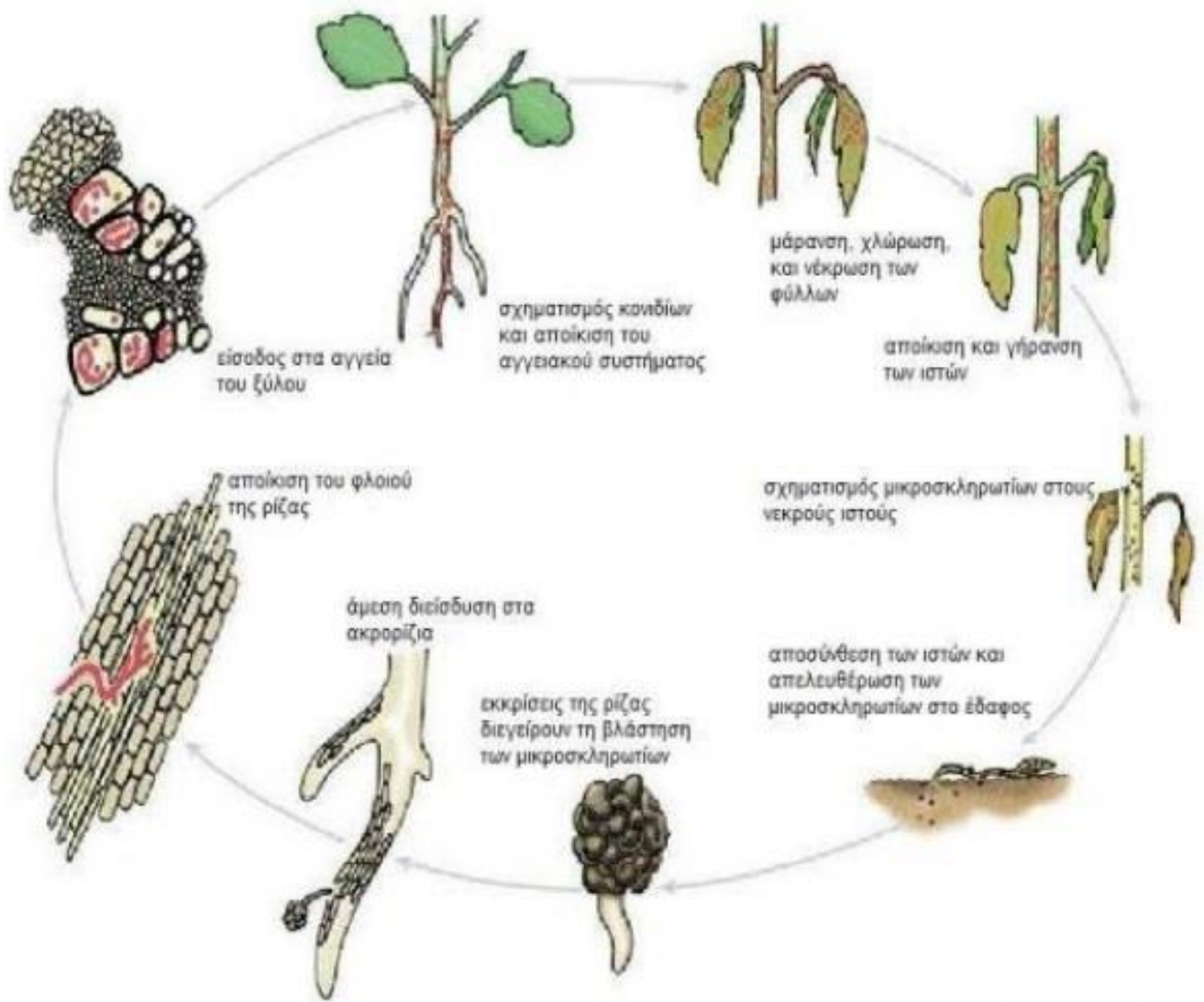
Ο βιολογικός κύκλος και στα δύο είδη του μύκητα είναι σχεδόν ταυτόσημος και όπως αναφέρθηκε μπορεί να διαχωριστεί σε φάση διαχείμασης ή ληθαργική, παρασιτική και σαπροφυτική. Αναλυτικότερα, κατά τη φάση της διαχείμασης, η βλάστηση των μυκηλιακών κατασκευών που αποτελούν όργανα διαχείμασης και βρίσκονται στο έδαφος και διατηρούνται μέσω της μικροβιόστασης ή της μυκόστασης, κάτι το οποίο παρεμποδίζεται από την διαθεσιμότητα περίσσιας άνθρακα και αζώτου που εκκρίνονται από τις ρίζες και απελευθερώνονται στη ριζόσφαιρα του ξενιστή και των μη-ξενιστών φυτών (Huisman, 1982; Mol *et al.*, 1995; Olsson and Nordbring-Hertz, 1985; Schreiber and Green, 1963).

Ακολούθως της διαχείμασης, επέρχεται η φάση παρασιτισμού όπου έχουμε μόλυνση φυτών που παρουσιάζουν ευπάθεια στους εδαφογενείς μύκητες που προκαλούν αδρομυκώσεις, διαμέσου των ακρορριζίων ή στα σημεία που διαμορφώνονται οι πλευρικές ρίζες. Η είσοδος των μυκήτων στο εσωτερικό των ιστών του αγγειακού συστήματος (ενεργού ξύλου), πραγματοποιείται αφού διαρρήξουν την ενδοδερμίδα, η οποία δρα ως φυσικό εμπόδιο κατά των μόλυνσεων. Η επίτευξη της προσπέλασης επιτυγχάνεται όταν η ενδοδερμίδα δεν παρουσιάζει πλήρη ανάπτυξη, δηλαδή προς το ακρορρίζιο, είτε εάν έχει υποστεί καταστροφή από εχθρούς όπως είναι οι περιπτώσεις προσβολής από νηματώδεις ή από έντομα. Αφού εισέλθουν εντός των ριζών, οι μύκητες συνεχίζουν και πραγματοποιείται εγκατάστασή τους επί των αγγείων του ξύλου. Εντός των αγγειώδων δεσμίδων παρατηρούνται τα μυκήλια αλλά και τα κονίδια του μύκητα. Κατά την άνοδο του χυμού, μέσω του ανοδικού ρεύματος,

πραγματοποιείται και η μεταφορά κονιδίων. Κατά την άνοδο αυτή, ακολουθεί παγίδευσή τους στις κοιλότητες στα βοθρία και εκεί ακολουθεί βλάστηση και διάτρηση ιστών και οργάνων που βρίσκονται πλησίον των αγγειακών δεσμίδων. Με αυτή τη διαδικασία επιτυγχάνεται ο αποικισμός (Fradin και Thomma, 2006).

Τέλος, η σαπροφυτική φάση αφορά στη γήρανση των φυτών και στις νεκρώσεις των φυτικών ιστών. Πέραν των αγγειακών ιστών, σε αυτό το στάδιο ο μύκητας εγκαθίσταται στους βλαστούς και στις ρίζες του φυτού. Σε αυτό το στάδιο ο μύκητας *V. albo-atrum* μπορεί να παράγει κονίδια σε μολυσμένους φυτικούς ιστούς και μπορεί να διαδίδεται με ρεύματα αέρος και να ξεκινήσει νέος κύκλος της ασθένειας (Jiménez-Díaz and Millar, 1988). Στη περίπτωση της μόλυνσης από τον μύκητα *V. dahliae*, μεγάλες ποσότητες μικροσκληρωτίων παράγονται και αυτά απελευθερώνονται στο έδαφος με την αποσύνθεση των φυτικών ιστών όπου μπορεί να επιβιώσουν με αυτή τη μορφή έως και 10-15 έτη (Wilhelm, 1955). Η πιθανότητα επιβίωσης των μελανών, σκούρων διαχειμάζωντων μυκηλίων που παράγονται από τον μύκητα *V. albo-atrum* είναι περισσότερο περιορισμένη. Επί προσθέτως, και τα δύο είδη του μύκητα μπορούν να διαχειμάσουν ως μυκήλιο εσωτερικά των πολυετών φυτών ξενιστών ή στα αναπαραγωγικά όργανα των φυτών όπως είναι οι κόνδυλοι, οι βολβοί και οι σπόροι (Fradin και Thomma, 2006).

Κάποιοι παράγοντες από τους οποίους εξαρτάται η ένταση αλλά και η ανάπτυξη της ασθένειας, αποτελούν το μόλυσμα, η πυκνότητά του, οι φυλές του παθογόνου, οι ποικιλίες των φυτών, τα εδάφη, οι θερμοκρασίες εδάφους και αέρα, η ύπαρξη ζιζανίων, η πιθανότητα βροχοπτώσεων, η άρδευση και οι καλλιεργητικές επεμβάσεις (Παναγόπουλος, 2007).



Εικόνα 9. Στάδια του βιολογικού κύκλου του μύκητα *V. dahliae* (<https://www.APSnet.org>)

## 1.6 Παρουσίαση ξενιστών

Το φάσμα των ξενιστών είναι ευρύ, με τον παθογόνο μύκητα *V. dahliae* να προσβάλλει πάνω από 200 φυτικά είδη. Σε αυτά ανήκουν κηπευτικά (αγκινάρα, μελιτζάνα, πιπεριά, πατάτα, αγγούρι, καρπούζι και τομάτα), καλλωπιστικά (χρυσάνθεμο), καλλιέργειες παραγωγής φρούτων, ελαιόλαδου και οινοποίησης (φράουλα, ελιά και αμπέλι), φυτά μεγάλων καλλιεργειών, αυτοφυή, καλλιέργειες σπορέλαιου (ηλίανθος), καλλιέργειες υφαντουργίας (βαμβάκι, λινάρι) και πολυετή ξυλώδη (Pegg and Brady, 2002; Schnathorst, 1981). Κάποιες από τις Οικογένειες που προσβάλλονται από τον παθογόνο μύκητα *V. dahliae* αποτελούν οι Gramineae, Fabaceae, Labiatae, Malvaceae, Solanaceae, Compositae, Convolvulaceae και Chenopodiaceae, οι οποίες χαρακτηρίζονται ως μεγάλης οικονομικής και γεωργικής σημασίας. Για κάποιες καλλιέργειες κηπευτικών (μελιτζάνες, τομάτες και πατάτες) έχουν αναπτυχθεί ανθεκτικές ποικιλίες (Douglas, 2008). Επιπλέον, έχει διαπιστωθεί ότι προσβάλλει και καλλιέργειες όπως το σπανάκι, το μπρόκολο, τα κρεμμύδια, τα σκόρδα, τα μαρούλια κ.α. (Sherf & MacNab, 1986). Δενδρώδεις καλλιέργειες που προσβάλλονται από το παθογόνο αποτελούν οι ελιές, οι δαμασκηνιές, οι ροδακινιές κ.α. (Thanassoulorouλος and Kitsos, 1972). Ο παράγοντας των ασυμπτωματικών φυτών είτε είναι αυτοφυή είτε καλλιεργούμενα, είναι πολύ σημαντικός αφού μέσω αυτών, προσβάλλονται και νέα φυτά. Σε αυτή τη κατηγορία υπάγονται φυτά της Οικογένειας Gramineae (Martinson and Horner, 1962; Martinson and Horner, 1964), ενώ ενδιαφέρον έχει ότι κατά το παρελθόν, τα είδη αυτής της Οικογένειας εκλαμβάνονταν ως ανθεκτικά λόγω της μη εκδήλωσης συμπτωμάτων της ασθένειας που προκαλεί το παθογόνο (Engelhard, 1957). Ο μύκητας *V. albo-atrum* θεωρείται ότι έχει πιο περιορισμένο εύρος ξενιστών και αναφέρεται ως παθογόνο κυρίως σε καλλιέργειες φασολιών, λυκίσκου, σόγιας, τομάτας και πατάτας. Επιπλέον, πέραν των προαναφερθέντων φυτών καλλιέργειας, πολλά άλλα φυτά (ζιζάνια) αποτελούν ασυμπτωματικούς ή συμπτωματικούς ξενιστές των μυκήτων του γένους *Verticillium* (Ligoixigakis *et al.*, 2002; Vallad *et al.*, 2005). Τα περισσότερα μονοκοτυλήδονα φυτά, θεωρείται ότι δεν αποτελούν ξενιστές των μυκήτων του γένους *Verticillium*. Πολλά μεμονωμένα στελέχη των μυκήτων του γένους *Verticillium* είναι ικανά να προκαλούν ένα ευρύ φάσμα συμπτωμάτων ως προς την έντασή τους, στους διάφορους ξενιστές (Bhat and Subbarao, 1999; Subbarao *et al.*, 1995). Παρά ταύτα, μερικά στελέχη είναι περισσότερο εξειδικευμένα και έτσι έχουν πιο περιορισμένο εύρος ξενιστών (Bhat and Subbarao, 1999). Αυτά περιλαμβάνουν στελέχη του μύκητα *V. dahliae* από φυτά μέντας και κακαόδεντρου και στελέχη του μύκητα *V. albo-atrum* από καλλιέργειες φασολιού και λυκίσκου (Correll *et al.*, 1988; Horner, 1954; Isaac and Keyworth, 1958; Resende *et al.*, 1994).



## 1.7 Συμπτωματολογία

Οι μύκητες που ανήκουν στο είδος *V. dahliae* θεωρούνται από τους πιο ζημιογόνους παθογόνους μύκητες και ευθύνονται για τη προσβολή του αγγειακού συστήματος πολλαπλών ξενιστών προκαλώντας την ασθένεια που χαρακτηρίζεται ως αδρομύκωση. Ο μύκητας *V. dahliae* προκαλεί σε ένα ευρύ φάσμα ξενιστών ξήρανση ενώ πολλά άλλα φυτά αποτελούν ασυμπτωματικούς ή συμπτωματικούς ξενιστές των μυκήτων του γένους *Verticillium* (Ligoixigakis *et al.*, 2002; Vallad *et al.*, 2005).

Λόγω του ότι υπάρχει διαφοροποίηση στα συμπτώματα που προκαλεί η προσβολή από τους μύκητες του γένους *Verticillium* μεταξύ των ξενιστών, δεν υπάρχουν παθογνωμονικά συμπτώματα τα οποία εκδηλώνονται σε όλα τα είδη φυτών που προσβάλλονται από τον συγκεκριμένο μύκητα. Παρά την ονομασία ξήρανση βερτισιλλίωσης, το σύμπτωμα της ξήρανσης δεν εκδηλώνεται σε όλες τις περιπτώσεις σαν αποτέλεσμα της προσβολής από τους μύκητες του γένους *Verticillium*.

Η τυπική ξήρανση ξεκινά να εκδηλώνεται σαν σύμπτωμα της ασθένειας μόνο κατά το ήμισυ του προσβεβλημένου φύλλου, συνήθως στους παλαιότερους βλαστούς, λόγω του ότι η προσβολή είναι ακροπέταλη (από τη βάση προς την κορυφή). Χαρακτηριστικές περιπτώσεις αποτελούν τα φυτά τομάτας, όπου όταν προσβάλλονται και υπάρχει εκδήλωση συμπτωμάτων, τα κατώτερα φύλλα αποκτούν κίτρινο μεταχρωματισμό ενώ παρουσιάζεται νέκρωση του επάκριου τμήματος του φύλλου καθώς και περιφερειακά αυτού, προκαλώντας τις τυπικές περιοχές σχήματος *V*. Τελικώς, ολόκληρο το φύλλο μαραίνεται, ξηραίνεται και σε μερικές περιπτώσεις ενδέχεται να παρατηρηθεί φυλλόπτωση. Εναλλακτικά, τα φύλλα αναπτύσσουν κίτρινες κηλίδες οι οποίες εξελίσσονται σε νεκρωτικές και καστανές, και τα νεύρα του φύλλου δύναται να εμφανιστούν καστανά ή ιώδη. Για πληθώρα είδη φυτών, ο μαρασμός των νεαρών βλαστών μπορεί να προκληθεί κατά τις θερμότερες περιόδους της ημέρας με ανάκαμψη κατά τις νυχτερινές ώρες. Η ξηρασία και άλλες συνθήκες όπου μειώνουν την ευρωστία του φυτού, μπορεί να προκαλέσουν την εξέλιξη της ασθένειας και την έκφραση συμπτωμάτων (Παναγόπουλος, 1995).

Τα ετήσια φυτά συνήθως επιβιώνουν κατά τη καλλιεργητική περίοδο, αλλά μπορεί να είναι χλωρωτικά, καχεκτικά, πρόωρα γερασμένα (Εικόνα 10) και να έχουν μικρότερη παραγωγή. Γενικότερα, οι ασθένειες που χαρακτηρίζονται ως βερτισιλλιώσεις είναι δύσκολο να διαγνωστούν βάσει της έκφρασης συμπτωμάτων, ειδικότερα λόγω του ότι πολλαπλά είδη των μυκήτων του γένους *Fusarium* προκαλούν παρόμοια συμπτώματα (αδρομυκώσεις).

Τα συμπτώματα της ασθένειας μπορούν να γίνουν διακριτά σε όλη την έκταση του φυτού. Τα φύλλα ενδέχεται να έχουν ανομοιόμορφο μεταχρωματισμό, νεκρωτικές περιοχές, μαρασμό, και/ή και πλήρης πτώση του φυτού. Σε τμήματα του στελέχους

διακρίνεται καστανός μεταχρωματισμός των ιστών των αγγείων (Εικόνα 11), όπου ο νεκρωτικός ιστός, ο οποίος είναι επιμήκης και σκουρόχρωμος είναι και η αιτία του μεταχρωματισμού. Επιπλέον, παρατηρείται βραχυγονάτωση, που προκαλείται από μειωμένη ανάπτυξη και έχει ως αποτέλεσμα την εμφάνιση ροζέτας (Soumyojit, 2017) και/ή καχεξία. Πρόωρη γήρανση και ξήρανση μπορεί επίσης να παρατηρηθούν (Subbarao, 2020).

Τα συμπτώματα του κιτρινίσματος, της μάρανσης ή της νέκρωσης του φύλλου, των κλαδίσκων αλλά και εξ' ολοκλήρου του φυτού, συνοδεύουν τον εσωτερικό μεταχρωματισμό. Επιπλέον, εικόνα ξήρανσης, χλώρωσης και παραμόρφωσης φύλλων, νανισμού καθώς και νέκρωσης κλάδων, αποτελούν συμπτωματολογία η οποία χαρακτηρίζεται ως χρόνια (Pataky, 1997). Επιπροσθέτως, η συμπτωματολογία χαρακτηρίζεται από συμπτώματα ημιπληγίας στα εξωτερικά ή στα κατώτερα μέρη των φυτών ή σε κάποιους κλαδίσκους του φυτού (Agrios, 2005).



Εικόνα 10: Χλώρωση, ξήρανση και νανισμός φυτών βαμβακιού που έχουν μολυνθεί από το μύκητα *V. dahliae* (δεξιά) σε σχέση με αμόλυντα φυτά (αριστερά) (<http://www.cottoncrc.org.au>)



Εικόνα 11: Κίτρινος έως καστανωπός μεταχρωματισμός των ξυλωδών αγγείων στο εσωτερικό στελέχους φυτού βάμβακος (ΑΣΘΕΝΕΙΕΣ ΒΙΟΜΗΧΑΝΙΚΩΝ ΦΥΤΩΝ

<https://eclass.teiwm.gr/modules/document/file.php/TEG140/%CE%91%CE%A3%CE%98%CE%95%CE%9D%CE%95%CE%99%CE%95%CE%A3%20%CE%92%CE%99%CE%9F%CE%9C%CE%97%CE%A7%CE%91%CE%9D%CE%99%CE%9A%CE%A9%CE%9D%20%CE%A6%CE%A5%CE%A4%CE%A9%CE%9D.pptx>)

### 1.7.1 Ο ρόλος της προσβολής από Νηματώδεις στην εκδήλωση συμπτωμάτων της ασθένειας

Η προσβολή των ριζών των φυτών από παρασιτικούς νηματώδεις μπορεί να ευνοήσει την έκφραση και την ένταση των συμπτωμάτων που προκαλούνται από εδαφογενείς μύκητες όπως οι *V. dahliae* και *V. albo-atrum* (Back *et al.*, 2002; Harrison, 1971; Johnson and Santo, 2001; Miller, 1975). Σε πατάτες, το σύμπλοκο της ασθένειας που προκαλείται από τους μύκητες *V. dahliae* ή *V. albo-atrum*, σε συνδυασμό με κομβονηματούδεις ή τον νηματώδη *Pratylenchus penetrans*, παρουσιάζει μεγάλη έκταση ζημιών ενώ η ασθένεια έχει ονομασθεί πρόωρος θάνατος της πατάτας (potato early dying) και είναι ενδημική σε πολλές περιοχές παραγωγής πατάτας (Rowe and Powelson, 2002). Συνεπώς, οι νηματώδεις παρουσιάζεται να έχουν επίδραση στην ένταση της ασθένειας, κάτι το οποίο μπορεί να αποδοθεί σε πολλαπλές αιτίες (Back *et al.*, 2002). Αρχικά, οι νηματώδεις προκαλούν τη δημιουργία πληγών στο ριζικό σύστημα όπου αυτές αποτελούν με αυξημένες πιθανότητες σημείο εισόδου του μύκητα (Polychronopoulos *et al.*, 1969; Storey and Evans, 1987). Δευτερευόντως, οι προαναφερθείσες πληγές μπορεί να λειτουργήσουν ως σημεία αυξημένης απορροής ριζικών προϊόντων στο περιβάλλον έδαφος, κάτι το οποίο προσελκύει τους μύκητες (Grayston *et al.*, 1997) και μπορεί να προκαλέσει τη βλάστηση των διαχειμαζόντων μορφών των μυκήτων του γένους *Verticillium*. Τέλος, η προσβολή από νηματώδεις μπορεί να οδηγήσει σε αλλαγές στη σύσταση του χυμού του ξυλώματος, κάτι που προκαλεί βλάστηση κονιδίων, και κατ' επέκταση την εξέλιξη της ασθένειας και του

μαρασμού ή της ξήρανσης που προκαλείται από τους μύκητες του γένους *Verticillium* (Katsantonis *et al.*, 2005).

### 1.7.2 Συμπτωματολογία και ξενιστές

Ενδιαφέρον παρουσιάζει η έκφραση συμπτωμάτων της ασθένειας της βερτισιλλίωσης, που προκαλείται από τους φυτοπαθογόνους μύκητες του γένους *Verticillium* και πως αυτά εκδηλώνονται στα εκάστοτε φυτικά είδη. Έχουν καταγραφεί πλήθος συμπτωμάτων σε πολλαπλούς ξενιστές με χαρακτηριστικές ομοιότητες ή διαφοροποιήσεις.

#### 1.7.2.1 Καλλιέργειες δενδρωδών φυτών και συμπτώματα

Όπως είναι γνωστό, δεν υπάρχει παθογνωμονικό σύμπτωμα για την συγκεκριμένη ασθένεια, δηλαδή, κανένα σύμπτωμα δεν καθίσταται αρκετό για την διάγνωση της ασθένειας, εντούτοις, κάποια από τα χαρακτηριστικά συμπτώματα που παρουσιάζονται αποτελούν το χλωρωτικό φύλλωμα, η απότομη νέκρωση φύλλων ή κλαδίσκων, η μειωμένη ανάπτυξη και οι νεκρώσεις κλάδων. Σε κάποια είδη δένδρων εμφανίζεται περιοχή νεκρωτική και επιμήκης στους φλοιούς. Αιτία αυτού, είναι η νέκρωση στο εσωτερικό των φλοιών, ενώ κάτω από τον φλοιό σχηματίζονται περιοχές υδαρούς σύστασης (Pataky, 1997).

Η ημιπληγία αποτελεί το πλέον χαρακτηριστικό σύμπτωμα της εκδήλωσης της ασθένειας σε δενδρώδεις καλλιέργειες. Αυτό το σύμπτωμα εμφανίζεται ως μονόπλευρη προσβολή των δένδρων και αφορά στην εμφάνιση συμπτωμάτων στη πλευρά που υπάρχουν τα προσβεβλημένα όργανα και αγγεία, εν αντιθέσει με το υπόλοιπο φυτό που απουσιάζει συμπτωμάτων. Κατά την πάροδο του χρόνου και τη πρόοδο της ασθένειας, τα συμπτώματα επεκτείνονται σε όλες τις πλευρές του φυτού (Εικόνα 12) (Παναγόπουλος, 2007).

Ένα από τα συμπτώματα που εκδηλώνονται κατά την ασθένεια, είναι και ο εσωτερικός μεταχρωματισμός καστανού χρώματος στο ξυλώδες παρέγχυμα. Αυτό το σύμπτωμα εκδηλώνεται κατά το προχωρημένο στάδιο της προσβολής και αποτελεί επίσης ένα από τα πιο χαρακτηριστικά συμπτώματα στους δενδρώδεις ξενιστές. Το μοτίβο εμφάνισης του μεταχρωματισμού μπορεί να είναι ραβδωτό, κατά κηλίδες ή ως τόξο (Παναγόπουλος, 2007).

Η εκδήλωση των συμπτωμάτων της ασθένειας δεν είναι περιορισμένη μόνο για μία καλλιεργητική περίοδο. Αναφορικά, φυτά θάμνων ή δένδρων κατά τον επόμενο χρόνο δύναται να εμφανίζουν εκτεταμένο το σύμπτωμα της μάρανσης αλλά και της

νέκρωσης. Έχει παρατηρηθεί σε δένδρα και συγκεκριμένα αυτά των πυρηνοκάρπων, να επανεμφανίζεται η ασθένεια μετά την πάροδο αρκετών ετών. Λόγω αυτού, η ασθένεια θεωρείται απρόβλεπτη στην εκδήλωσή της χρονικά (Pataky, 1997).

Επιπλέον, σε δένδρα πυρηνοκάρπων, κατά τα αρχικά στάδια της προσβολής παρατηρείται νέκρωση κλαδίσκων που εκτείνεται έως και στους βραχίονες, ενώ τα φύλλα εμφανίζονται χλωρωτικά. Ακολούθως εμφανίζονται τα συμπτώματα του καρουλιάσματος, της φυλλόπτωσης και της πλήρους ξήρανσης των κλαδίσκων και των κλάδων (Παναγόπουλος, 2007).

Όπως είναι γνωστό τα δένδρα ελιάς προσβάλλονται έντονα από την ασθένεια και η εμφάνισή της πραγματοποιείται με δύο σύνδρομα. Το αποφυλλωτικό αποτελεί το πρώτο και εκδηλώνεται από πρώιμη φυλλόπτωση, σε πράσινα φύλλα ενώ οι κλάδοι τελικώς παραμένουν χωρίς φύλλα και επέρχεται η νέκρωσή τους. Αυτή η συμπτωματολογία έχει παρατηρηθεί να εκδηλώνεται κατά τις τελευταίες φθινοπωρινές ημέρες ως και τις τελευταίες ανοιξιότικες ημέρες τμηματικά ή ολοκληρωτικά στην καλλιέργεια. Τα συμπτώματα του δεύτερου συνδρόμου αφορούν δύο τύπους ή στάδια και εκδηλώνονται είτε με αποπληξία, συνώνυμο του συνδρόμου απότομου μαρασμού (Εικόνα 13), είτε με ημιπληγία, συνώνυμο του συνδρόμου βραδείας αποξηράνσεως. Στη πρώτη περίπτωση, η εκδήλωση του συμπτώματος της αποπληξίας, λαβαίνει χώρα κατά τις τελευταίες χειμωνιάτικες έως και τις πρώτες ανοιξιότικες ημέρες. Υπάρχει αλλαγή στην υγρή εικόνα των φυταρίων, των νεαρών δένδρων και των φύλλων, τα οποία εμφανίζουν καρούλιασμα, μεταχρωματίζονται σε τεφρά ή καστανά, επηρεάζεται η στιλπνότητά τους και τέλος επέρχεται η πλήρης ξήρανσή τους, ενώ διατηρούνται επί των κλάδων. Στον δεύτερο τύπο του δεύτερου συνδρόμου, το χαρακτηριστικό σύμπτωμα της ημιπληγίας παρατηρείται κατά τις ανοιξιότικες ημέρες και κατά την άνθηση, ενώ τις καλοκαιρινές ημέρες παρατηρείται επιβράδυνση του ρυθμού εξέλιξης των συμπτωμάτων. Κατά το δεύτερο αυτό στάδιο, εμφανίζονται συμπτώματα σε κλαδιά, παρατηρείται χλώρωση των φύλλων και τέλος επέρχεται η πλήρης ξήρανση και πτώση τους. Επιπλέον, εκδηλώνεται πλήρης ξήρανση στους κλάδους που έχουν προσβληθεί. Τέλος, στα δένδρα ελιάς, είναι σύνηθες να μην εκδηλώνεται το σύμπτωμα του μεταχρωματισμού στο ενεργό ξύλο στα προσβεβλημένα όργανα (Παναγόπουλος, 2007; Jiménez-Díaz *et al.*, 2012).

Στα φυτά αμπέλου, τα συμπτώματα εκδηλώνονται κατά την καλοκαιρινή περίοδο με το σύνδρομο του απότομου μαρασμού και της αποξηράνσης των φύλλων επί όλων ή επί μερικών κλιματίδων.

Στα δένδρα φιστικιάς, η ασθένεια εκδηλώνεται ομοίως με τα πυρηνόκαρπα, ενώ και σε αυτή τη περίπτωση το σύμπτωμα του μεταχρωματισμού στο ξύλο δεν εκδηλώνεται (Παναγόπουλος, 2007).



Εικόνα 12: Ημιπληγία σε δένδρομεγαλύτερης ηλικίας ως αποτέλεσμα της βερτισιλλίωσης (ΓΚΑΤΖΙΛΑΚΗΣ, ΓΟΥΤΟΣ, ΕΡΓΑΣΤΗΡΙΟ ΦΥΤΟΠΑΘΟΛΟΓΙΑΣ – ΒΑΚΤΗΡΙΟΛΟΓΙΑΣ ΑΣΘΕΝΕΙΕΣ ΕΛΙΑΣ <https://eclass.hmu.gr/modules/document/file.php/GF136/%CE%A0%CE%95%CE%A1%CE%99%CE%95%CE%A7%CE%9F%CE%9C%CE%95%CE%9D%CE%9F/%CE%A3%CE%97%CE%9C%CE%95%CE%99%CE%A9%CE%A3%CE%95%CE%99%CE%A3/K.4-/ASThENEIES%20ELIAS.pdf>)

### 1.7.2.2 Κηπευτικά φυτά και συμπτώματα

Η συμπτωματολογία που εκδηλώνεται στα φυτά-ξενιστές κηπευτικών καλλιεργειών κατά τη προσβολή τους από τους μύκητες του γένους *Verticillium*, ομοιάζουν μεταξύ τους (Threlfall, 1959), ενώ τα συμπτώματα συνήθως εκδηλώνονται διάσπαρτα στον αγρό.

Αναφορικά, τα συμπτώματα εκδήλωσης της ασθένειας είναι τα εξής: ξήρανση, νεκρωτικές καστανοκίτρινες κηλίδες που ακολουθούνται από νέκρωση και φυλλόπτωση, επιναστία φυλλώματος, δηλαδή η περίπτωση άμβλυνσης στη γωνία μίσχων-στελέχους (Wellman, 1941), νανισμός και καστανόμαυρος μεταχρωματισμός στα αγγεία των ξύλων (Robb, Smith and Busch, 1982), ενώ όπως περιγράφει και η ονομασία της συγκεκριμένης ασθένειας, η συμπτωματολογία του μαρασμού είναι κυρίαρχη (*Verticillium wilt*) (Threlfall, 1959).

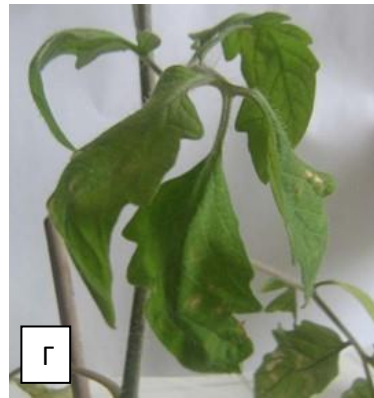
Αναλυτικότερα, κατά τα πρώτα στάδια της προσβολής, ένα από τα πρώτα συμπτώματα, εκδηλώνεται μέσω παροδικού μαρασμού του φυλλώματος. Αυτό το χαρακτηριστικό σύμπτωμα εκφράζεται μέσω της μεσημεριανής μάρανσης και της ανάρρωσης τους κατά τις βραδινές ώρες (Pataky, 1997). Ακολούθως, αναπτύσσονται χλωρωτικές, καστανοκίτρινες μεσονεύριες κηλίδες του κατώτερου φυλλώματος. Οι κηλίδες εξελίσσονται σε καστανές και νεκρωτικές και μετέπειτα επέρχεται μάρανση, ξήρανση και αποκοπή των φύλλων. Εν συνεχεία της εμφάνισης συμπτωμάτων στο κατώτερο φύλλωμα, το ανώτερο φύλλωμα μετατρέπεται σε πράσινο-ωχρό και εκδηλώνεται κατσάρωμα του ελάσματος (Εικόνα 13B) (Pataky, 1997).

Με τη πάροδο του χρόνου, σε προχωρημένες προσβολές, εκδηλώνονται συμπτώματα νανισμού, χλώρωσης φυλλώματος και νέκρωσής τους, ενώ μέρος του φυλλώματος διατηρείται επί των φυτών. Όπως και στις δενδρώδεις καλλιέργειες, έτσι και εδώ, συμπτώματα αποφύλλωσης και μονόπλευρης ξήρανσης του φυτού, δηλαδή συμπτώματα ημιπληγίας, εκδηλώνονται κατά τις προχωρημένες φάσεις της προσβολής καθώς και σπανιότερα εμφάνιση μεταχρωματισμού στα αγγεία των ξύλων. Η συμπτωματολογία μεταχρωματισμού στα αγγεία, αποτελεί κατευθυντήρια πληροφορία για μία πρώτη διάγνωση του συγκεκριμένου φυτοπαθογόνου μύκητα (Sherf and MacNab, 1986). Το σύμπτωμα αυτό εντοπίζεται από το σημείο του λαιμού έως και στο ένα μέτρο ή ακόμη πιο ψηλά. Η έντονη πτώση των φύλλων που προκαλείται από αυτή την ασθένεια αποτελεί παράγοντα επιβάρυνσης ζημιών στους καρπούς μέσω ηλιοκαυμάτων και κατ' επέκταση υποβαθμισμένης ποιότητας και μειωμένης παραγωγής (Denby and Woolliams, 1962). Σε περιπτώσεις μολύνσεων νεαρών φυτών, η ασθένεια εκδηλώνεται με πρόωμη νέκρωσή τους. Στη πράξη, στα λαχανοκομικά φυτά, η εκδήλωση συμπτωμάτων πραγματοποιείται σε όλα τα στάδια ανάπτυξης αλλά, η

χαρακτηριστική συμπτωματολογία εκδηλώνεται μετά τη καρπόδεση (Thanassoulouros and Kitsos, 1972).

Στα φυτά τομάτας, το μεσοδιάστημα για τα πρώτα συμπτώματα έως και τις νεκρώσεις, κυμαίνεται μεταξύ 3 έως και 4 εβδομάδων και πάντα συναρτήσει των καιρικών συνθηκών (Fletcher, 1984). Στα φυτά μελιτζάνας, μετά το πέρας 6 έως 8 εβδομάδων από τη φύτευση ξεκινά η εκδήλωση των πρώτων συμπτωμάτων (Sherf and MacNab, 1986). Έχει παρατηρηθεί ότι η εκδήλωση των συμπτωμάτων εξωτερικώς του φυτού, μπορεί να επέλθει είτε κατόπιν μεγάλου βαθμού ασθένειας είτε στη περίπτωση υδατικής καταπονήσεως.

Η συμπτωματολογία των αδρομυκώσεων που προκαλούν οι προσβολές από τους φυτόπαθογόνους μύκητες του γένους *Verticillium* και του γένους *Fusarium* ομοιάζουν. Επιπλέον, τα συμπτώματα παρουσιάζουν ομοιότητα με το βακτηριακό έλκος και τη βακτηριακή μάρανση, καθώς και όπως έχει αναφερθεί, οι μύκητες του γένους *Verticillium* λειτουργούν συνεργιστικά με νηματώδεις σε φυτά τομάτας, πατάτας, πιπεριάς και μελιτζάνας. Λόγω αυτών, ο μόνος τρόπος με τον οποίο μπορεί να προκύψει ασφαλές συμπέρασμα για το παθογόνο αίτιο της ασθένειας είναι μέσω εργαστηριακής εξέτασης (Pataky, 1997).



Εικόνα 13: Συμπτώματα βερτισιλλίωσης (Α) Καστανός μεταχρωματισμός των αγγείων του ξύλου όπως φαίνεται σε εγκάρσια τομή σε υγιή στελέχη και σε στελέχη με ενεργή προσβολή (Β) Συμπτώματα χλώρωσης, ξήρανσης και συστροφής φύλλου (<https://www.sunflowersna.com/growers/Diseases/Verticillium-Wilt/>) (Γ) Χαρακτηριστική εικόνα μάρανσης (φύλλο σημαίας) (Τσαγγούρης, 2011)



## 2. Μηχανισμοί άμυνας των φυτών κατά τη προσβολή από τον μύκητα *Verticillium dahliae*

Οι ασθένειες που προκαλούνται από παθογόνα αίτια (μύκητες, βακτήρια και ιοί), έχουν ως αποτέλεσμα σημαντική μείωση, σε ποσοτικό και ποιοτικό επίπεδο, των γεωργικών καλλιεργειών ανά τον κόσμο. Παρά ταύτα, ενώ τα φυτά αντιμετωπίζουν συνεχώς προσβολές από παθογόνους μικροοργανισμούς, η ανάπτυξη ασθενειών είναι σχετικά σπάνιο φαινόμενο. Συνεπώς, είναι εμφανές ότι τα φυτά διαθέτουν αποτελεσματικούς μηχανισμούς άμυνας (Brown *et al.*, 2003).

Η επαγωγή των μηχανισμών άμυνας απαιτεί, αρχικά, την προσέγγιση και αναγνώριση του παθογόνου από το φυτό-ξενιστή. Ακολουθείται από ένα δίκτυο διαδικασιών μεταγωγής σημάτων, με αποτέλεσμα την ταχεία ενεργοποίηση της έκφρασης των γονιδίων άμυνας, δηλαδή, την ενεργοποίηση μηχανισμών επαγόμενης άμυνας. Κάποια δευτερογενή μόρια μεταγωγής σήματος όπως το σαλικυλικό οξύ (SA), το ιασμονικό οξύ (JA), ο μεθυλιωμένος εστέρας του, methyl jasmonate (MeJA) και το αιθυλένιο (ET), δρουν ώστε να ενισχύσουν και να ρυθμίσουν την έκφραση της άμυνας ακολούθως της αρχικής ενεργοποίησής της (Dong, 1998; Reymond and Farmer, 1998; Schenk *et al.*, 2000).

## 2.1 Μόρια και σήματα άμυνας φυτών

### 2.1.1 Μονοπάτια ενεργοποίησης μηχανισμών άμυνας των φυτών

Το σαλικυλικό οξύ, το αιθυλένιο και το ιασμονικό οξύ, αποτελούν φυτικές ορμόνες που δρουν σαν μεμονωμένο μοριακό σήμα στον μηχανισμό άμυνας των φυτών (Thomma *et al.*, 2001).

#### Σαλικυλικό οξύ (SA)

Η σύνθεση, η απελευθέρωση και η συσσώρευση των φαινολικών και ειδικότερα του σαλικυλικού οξέος (SA), διαδραματίζουν κεντρικό ρόλο στη σηματοδότηση για την ενεργοποίηση της άμυνας των φυτών έναντι των προσβολών από μικροοργανισμούς (Boller and He, 2009). Τα φαινολικά συντίθενται όταν οι υποδοχείς που είναι υπεύθυνοι για την αναγνώριση, αναγνωρίζουν πιθανά παθογόνα (Newman *et al.*, 2007), μέσω συντηρημένων μοριακών μοτίβων όπου σχετίζονται με τα παθογόνα (PAMPs), οδηγώντας σε άμυνα που ενεργοποιείται μέσω των PAMPs (Zipfel, 2008). Ως αποτέλεσμα αυτού, η εξέλιξη της μόλυνσης περιορίζεται πριν το παθογόνο καταστεί απόλυτα καταστρεπτικό για το φυτό (Nicaise *et al.*, 2009). Το σαλικυλικό οξύ (SA), είναι απαραίτητο για την αναγνώριση των στοιχείων που προέρχονται από το παθογόνο, καθώς και για τη ταυτόχρονη δράση της άμυνας τοπικά, στη περιοχή της προσβολής, αλλά και διασυστηματικά, στην άμυνα σε επίπεδο ολόκληρου του φυτού (Plant, 2009).

#### Αιθυλένιο (ET)

Κατά τη μόλυνση από φυτοπαθογόνους μύκητες που ανήκουν στο γένος *Verticillium*, υπάρχει ταχεία αύξηση της παραγωγής αιθυλενίου (Pegg and Cronshaw, 1976). Ο ακριβής ρόλος που κατέχει το αιθυλένιο για την ανθεκτικότητα στα φυτά ενάντια σε παθογόνα, δεν έχει προσδιοριστεί, κυριαρχεί η θεώρηση ότι το ET σχετίζεται με την ανθεκτικότητα των φυτών αλλά σε περιορισμένα παθογόνα (Hoffman *et al.* 1999, Thomma *et al.*, 1999). Ένας επιπλέον ρόλος του αιθυλενίου αφορά στον έλεγχο της εκδήλωσης συμπτωμάτων κατά την αλληλεπίδραση παθογόνων και φυτών- ξενιστών (Hoffman *et al.* 1999, Lund *et al.* 1998, Thomma *et al.* 1999). Σε διαγονιδιακά φυτά, ελλείψει του γονιδίου *ETR1* (γονίδιο υποδοχής αιθυλενίου-ET receptor), παρουσιάστηκε ενίσχυση της ανθεκτικότητας έναντι του φυτοπαθογόνου μύκητα *Verticillium dahliae*, εν αντιθέσει με διαγονιδιακά φυτά ελλείψει των γονιδίων που αφορούσαν το ιασμονικό ή το σαλικυλικό οξύ (Pantelides *et al.*, 2010). Σύμφωνα με τα αποτελέσματα, αποδεικνύεται η σημασία του *ETR1* γονιδίου για την ενεργοποίηση της άμυνας των φυτών-ξενιστών για τη καταπολέμηση του φυτοπαθογόνου μύκητα *Verticillium dahliae*. Ακολούθως, σε πειράματα που αφορούσαν τη ποσοτικοποίηση,

παρατηρήθηκε μειωμένη ένταση των συμπτωμάτων στα διαγονιδιακά φυτά και μειωμένη ανάπτυξη του φυτοπαθογόνου μύκητα στα αγγεία των ξενιστών, κάτι το οποίο παραπέμπει στο ότι η μείωση πρόσληψης ET στα συγκεκριμένα διαγονιδιακά φυτά προσφέρει αύξηση στην αντοχή ενάντια στη μόλυνση από τον φυτοπαθογόνο μύκητα *Verticillium dahliae* και κατ' επέκταση στην ασθένεια που προκαλείται από αυτόν.

### Ιασμονικό οξύ (JA)

Η φυτική ορμόνη του ιασμονικού οξέως (JA), jasmonoyl isoleucine (JA-Ile), αποτελεί σημαντικό ρυθμιστή της ανάπτυξης των φυτών (Gomi, 2020) και της κυτταρικής άμυνας που προκαλείται ως αποτέλεσμα διάφορων σημάτων βιοτικού και αβιοτικού στρες.

Η σηματοδότηση που προκαλείται μέσω των ορμονών του ιασμονικού οξέος (JA) παίζει κεντρικό ρόλο στην άμυνα του φυτού εναντίον νεκροφυτικών παθογόνων και φυτοφάγων εντόμων, όπου επηρεάζουν ταυτόχρονα ρίζες και βλαστούς. Αυτό το μονοπάτι ενεργοποιείται επίσης από την αλληλεπίδραση με ωφέλιμα μικρόβια που μπορεί να οδηγούν στην επαγωγή της διασυστηματικής άμυνας. Τα ιασμονικά οξέα (JAs) είναι μία κλάση φυτικών ορμονών που παίζουν σημαντικό ρόλο στην αντίδραση της φθοράς των ιστών. Δρουν στην έκφραση γονιδίων για να καθυστερήσουν την ανάπτυξη και για να ανακατευθύνουν τον μεταβολισμό προς τη παραγωγή μορίων άμυνας και προς την αποκατάσταση ζημιών (Ruan *et al.*, 2019).

Σε αντίθεση με το ET (ethylene), το οποίο σχετίζεται με την εκδήλωση της συμπτωματολογίας της ασθένειας, κατά την αλληλεπίδραση ξενιστών και του φυτοπαθογόνου μύκητα *Verticillium*, το ιασμονικό οξύ (JA) εμπλέκεται στην αντοχή εναντίον των φυτοπαθογόνων μυκήτων. Θεωρείται ότι φυτά τομάτας και *Arabidopsis* ελλείπει ιασμονικού οξέος παρουσιάζουν ευαισθησία έναντι των μολύνσεων από μύκητες του γένους *Verticillium* (Thaler *et al.* 2004, Tjamos *et al.* 2005).

Συμπερασματικά, το ιασμονικό οξύ (JA) όπως και το σαλικυλικό οξύ (SA), παίζουν σημαντικό ρόλο στα συστήματα άμυνας των φυτών. Τα μονοπάτια σηματοδότησης του ιασμονικού οξέος (JA) και του σαλικυλικού οξέος (SA) δρουν ανταγωνιστικά μεταξύ τους σε δικοτυλήδονα φυτά, ενώ ο τρόπος παρεμπόδισης μεταξύ των σηματοδοτήσεών τους είναι άγνωστος στα μονοκότυλα (Tamaoki *et al.*, 2013).

### 2.1.2.1 PDF1.2

Το γονίδιο *PDF1.2* που κωδικοποιεί τον μηχανισμό άμυνας του φυτού *Arabidopsis*, συχνά χρησιμοποιείται σαν γονίδιο-δείκτης για χαρακτηρισμό της άμυνας που εξαρτάται από το ιασμονικό οξύ (JA) (Brown, 2003). Το ιασμονικό οξύ και το αιθυλένιο (ET) εμπλέκονται ταυτόχρονα στην επαγωγή του γονιδίου άμυνας *PDF1.2* (Iris, 2003).

### 2.1.2.2 PR1

Το φαινόμενο της επίκτητης διασυστηματικής αντοχής (SAR), αποτελεί σημείο έρευνας για πάρα πολλά χρόνια. Τα φυτά μπορούν να αναπτύξουν μηχανισμούς άμυνας όχι μόνο μετά από έκθεση σε κάποιον βιολογικό παράγοντα αλλά και μετά από έκθεση σε κάποιον χημικό παράγοντα.

Η SAR αποτελεί έναν μηχανισμό επαγόμενης άμυνας όπου προσδίδει προστασία μακράς διάρκειας ενάντια σε ένα ευρύ φάσμα μικροοργανισμών. Προϋποθέτει το μόριο-σηματοδότη του σαλικυλικού οξέος (SA) και εμπλέκεται με τη συσσώρευση των πρωτεϊνών που σχετίζονται με το παθογόνο (Rana and Hussain, 2018).

### 2.1.2.3 CERK1 - Chitin elicitor receptor kinase 1

Τα μόρια της χιτίνης αποτελούν κύριο στοιχείο των κυτταρικών τοιχωμάτων των κυττάρων των μυκήτων και δρουν ως συντηρημένα μοριακά δομικά στοιχεία των μικροοργανισμών (MAMPs) για τον εντοπισμό πολλαπλών δυνητικών παθογόνων στο ενδογενές ανοσοποιητικό σύστημα των φυτών και των ζώων. (Akira *et al.*, 2006). Στο συγκεκριμένο πείραμα εμπλέκεται το CERK1 που δρα ως υποδοχέας και είναι απαραίτητος για την ενεργοποίηση σημάτων που συμμετέχουν στην επαγωγή της άμυνας των φυτών μέσω της χιτίνης, και συγκεκριμένα στα φυτά *Arabidopsis*.

## 2.2 Μηχανισμοί παθογένειας των μυκήτων του γένους *Verticillium*

Έπειτα από μελέτες, έχει διαπιστωθεί ότι οι μύκητες του γένους *Verticillium* sp. έχουν τη δυνατότητα καταστολής των φυτικών αμυντικών μηχανισμών για διάστημα αρκετών ωρών που εντοπίζονται πλησίον των σημείων προσβολής, με αποτέλεσμα ο μύκητας να εκμεταλλεύεται το διάστημα του χρόνου που μεσολαβεί και έτσι διαφεύγει πλευρικά των παρακείμενων αγγείων (Gold και Robb, 1995; Lee *et al.*, 1992; Robb *et al.*, 1989). Δεν υπάρχει μεγάλη διαθεσιμότητα πληροφοριών για τους μοριακούς μηχανισμούς και τους παράγοντες της παθογένειας για τα είδη του *Verticillium* sp. Η σημασία που παρουσιάζουν τα υδρολυτικά ένζυμα και οι τοξίνες ή οι ουσίες που λειτουργούν ως επαγωγείς αποτελούν θέματα πολλαπλών μελετών.

### 2.2.1 Ρόλος των υδρολυτικών ενζύμων

Οι μύκητες του γένους *Verticillium* sp. είναι γνωστοί για την παραγωγή ενζύμων όπου καταστρέφουν τα κυτταρικά τοιχώματα (Bidochka *et al.*, 1999; Cooper and Wood, 1973; Dobinson *et al.*, 1997, 2004). Τα περισσότερο μελετημένα εκ των ενζύμων αποτελούν τα πηκτινολυτικά, ενώ υπάρχει η θεώρηση ότι έχουν κυρίαρχο ρόλο στις διαδικασίες που αφορούν την παθογένεια. Αυτό αποδίδεται στην προϋπόθεση της προσπέλασης των μεμβρανών ώστε να υπάρξει εξάπλωση από τους μύκητες του γένους *Verticillium* sp. Τα περιεχόμενα των μεμβρανών περιλαμβάνουν πηκτίνες ενώ εντοπίζονται στα συστατικά στα αγγεία των φυτών (Bishop and Cooper, Pegg *et al.* 1976). Επιπρόσθετα, κάποια παράγωγα που εναποτίθενται από τον ξενιστή και είναι υψηλής σημασίας για τις αγγειακές αποφράξεις, περιλαμβάνουν πηκτίνες και τα παθογόνα καλούνται να τις διαπεράσουν ώστε να αποικίσουν διασυστηματικά τον ξενιστή (Ludwig, 1952). Η πολυγαλακτορουνάση, η πηκτινестεράση και η πηκτινική λυάση αποτελούν χαρακτηρισμένα πηκτινολυτικά ένζυμα (Huang and Mahoney, 1999; Mussel and Strause, 1972; Wang and Keen, 1970). Ο ρόλος αυτών των ενζύμων διαφορετικών στελεχών του μύκητα *Verticillium* sp., είναι αποδεδειγμένα πολύ σημαντικός, αφού υπάρχει συσχέτιση αυτών με τα επίπεδα μολυσματικότητας (Carder *et al.*, 1987).

## 2.2.2 Ρόλος των τοξινών και των επαγωγέων

Οι μύκητες των ειδών *V. dahliae* και *V. albo-atrum*, είναι γνωστοί για την παραγωγή φυτοτοξινών και άλλων μορίων ώστε να υπάρξει επαγωγή της νέκρωσης των ξενιστών (Pegg, 1965). Ο ίδιος ο μύκητας *Verticillium* sp. ή παράγωγά του στα οποία εντοπίζονται ομάδες συμπλοκών από τοξίνες, χρησιμοποιούνται για την επαγωγή του μηχανισμού της άμυνας των φυτών και γενικότερα για την εξέταση που παρουσιάζει η φυσιολογία της άμυνας του φυτού. Παρά ταύτα, τα συστατικά που απαρτίζουν τα σύμπλοκα δεν είναι ξεκάθαρα. Σε αυτά τα παράγωγα του μύκητα, εμπεριέχονται σύμπλοκα πρωτεΐνης-λιποπολυσακχαρίτη (PLP) που χαρακτηρίζονται από μεγάλο μοριακό βάρος, λυτικά ένζυμα του κυτταρικού τοιχώματος και γλυκοπρωτεΐνες. Σε πείραμα όπου πατάτες είχαν μολυνθεί από το είδος *V. dahliae*, περιείχαν γλυκοπεπτιδικές τοξίνες οι οποίες συνδέονται με την εκδήλωση συμπτωματολογίας στον εκάστοτε ευπαθή ξενιστή (Buchner *et al.*, 1982). Τοξική δράση στο εκάστοτε φυτό εμφάνισαν πολυπεπτιδικά κλάσματα του PLP, κάτι που οφείλεται στην εξειδικευμένη σχέση που παρουσιάζουν οι ξενιστές με το παθογόνο. Αυτά τα τοξικά σύμπλοκα δεν παρουσίασαν αντίδραση που μπορεί να χαρακτηριστεί ως ευαισθησία στα φυτά, που χαρακτηρίζονται από ανθεκτικότητα ή ανεκτικότητα (Buchner *et al.*, 1989). Οι τοξίνες παρουσιάστηκαν συσσωρευμένες στο κυτταρικό τοίχωμα του αγγειακού ιστού των στελεχών και των κονδύλων σε φυτά που χαρακτηρίζονταν ως ευπαθή, κατόπιν πειραμάτων ανοσοεντοπισμού (Nachmias *et al.*, 1985). Συνεπώς, τα τοξικά σύμπλοκα είναι αναγκαία ώστε να προκληθεί η εκδήλωση της παθογένειας (Buchner *et al.*, 1982). Επιπρόσθετα, κατά τη μόλυνση κονδύλων από τον μύκητα *Verticillium* sp. οι τοξίνες θεωρούνται υπαίτιες για την μείωση του μεγέθους της ρίζας (Buchner *et al.*, 1989; Kotson and Rouse, 1984). Με την παρατηρούμενη μειωμένη φωτοσύνθεση που λαβαίνει χώρα όταν τα στόματα κλείνουν κατά την υδατική καταπόνηση, εξηγείται και η εκδήλωση του συμπτώματος του νανισμού (Flexas and Medrano, 2002). Όπως προαναφέρθηκε, για τα φυτά με την ιδιότητα της ανθεκτικότητας ή της ανεκτικότητας, δεν επηρεάζονται από την τοξίνη που παράγεται από τους μύκητες *Verticillium* sp. και έτσι υπήρξε το συμπέρασμα ότι ακριβώς αυτή η απουσία ευαισθησίας στις τοξίνες αποτελεί τις βάσεις της ανεκτικότητας ή της ανθεκτικότητας (Buchner *et al.* 1989, Gour and Dube 1985).

Σε γένη βακτηρίων, μυκήτων και ωομυκήτων, αλλά και συγκεκριμένα στον μύκητα *V. dahliae* υπάρχει αναγνώριση πρωτεϊνών οι οποίες είναι επαγωγείς και ονομάζονται Nep1-like proteins (NLPs) (Pemberton και Salmond, 2004). Η πρωτεΐνη που αφορά στον μύκητα *V. dahliae* έχει ονομαστεί *VdNep* (Wang *et al.*, 2004a), ενώ άλλες πρωτεΐνες

επάγουν τον κυτταρικό θάνατο, κάτι που τις χαρακτηρίζει ως επαγωγείς και λιγότερο ως τοξίνες (Pemberton and Salmond, 2004; Wang et al., 2004a).

### 2.2.3 Ανάλυση των μηχανισμών άμυνας των φυτών ενάντια στη μόλυνση από τους μύκητες του γένους *Verticillium*

Όπως είναι γνωστό, οι φυτοπαθογόνοι μύκητες του γένους *Verticillium* αποτελούν μια πολύ σημαντική ασθένεια των φυτών, καθώς δεν υπάρχουν αποτελεσματικά ανθεκτικοί ξενιστές στη προσβολή από τα παθογόνα του συγκεκριμένου γένους μυκήτων. Ο διαχωρισμός ανθεκτικών φυτών και ευπαθών φυτών μπορεί να περιγραφεί στα ευπαθή φυτά από εκδήλωση συμπτωμάτων με μεγάλη ένταση και αποικισμό του μύκητα που κατακλύζει τα φυτά ξενιστές του και εν αντιθέσει, η ανθεκτικότητα στα φυτά εκδηλώνεται με πολύ μικρότερο βαθμό αποικισμού και επιπλέον η ασθένεια δεν εκφράζεται σε έντονο βαθμό. Μία τρίτη κατηγορία μπορεί να θεωρηθεί η ανεκτικότητα των φυτών, όπου σε αυτή τη περίπτωση στα φυτά, ο βαθμός αποικισμού θεωρείται υψηλός, αλλά η εκδήλωση συμπτωμάτων δεν είναι έντονη. Κατ' επέκταση, ορίζεται με τον όρο ανοχή, η κατάσταση στην οποία βρίσκεται ένα μολυσμένο φυτό όπου δεν εκδηλώνονται με ένταση τα συμπτώματα της προσβολής από παθογόνα, δηλαδή έχει χαμηλή εκδήλωση παθογένειας και φυσιολογικές λειτουργίες που ομοιάζουν με φυτά χωρίς μολύνσεις (Agrios, 2005). Φυσικά, σε κάθε περίπτωση οι πιθανότητες να υπάρξει μείωση των αποδόσεων ανά στρέμμα παρουσία των παθογόνων και το αντίθετο, είναι αυξημένες και για αυτό το λόγο η καλύτερη ορολογία θα ήταν μερική αντοχή (Schafer, 1971). Εν κατακλείδι, με την ορολογία της ανθεκτικότητας ή της αντοχής έχουμε μειωμένα επίπεδα απόδοσης, ενώ με τον όρο ανοχή έχουμε μειωμένες απώλειες της απόδοσης των φυτών-ξενιστών, απουσίας επίδρασης στο ρυθμό και βαθμό ανάπτυξης του φυτοπαθογόνου μύκητα. Παρά ταύτα, ο όρος της ανοχής δεν είναι εύκολο να ορισθεί διότι προϋποθέτει καθορισμό της ποσοτικοποίησης του βαθμού και ρυθμού ανάπτυξης του φυτοπαθογόνου και πάντα συναρτηθεί με τη συμπτωματολογία, την απόδοση της καλλιέργειας και τα ποιοτικά χαρακτηριστικά. Επιπλέον, υπάρχει η θεώρηση ότι η ανοχή προκύπτει μέσω της μειωμένης ευαισθησίας του φυτού-ξενιστή έναντι των τοξινών των φυτοπαθογόνων μυκήτων του γένους *Verticillium* (Buchner et al., 1982, 1989; Nachmias et al., 1985).

Έχουν μελετηθεί εκτενώς οι τρόποι λειτουργίας των μηχανισμών άμυνας των φυτών έναντι των φυτοπαθογόνων μυκήτων του γένους *Verticillium*, σε φυτά *Humulus lupulus*, *Solanum lycopersicum* και *Gossypium* sp. Τα αποτελέσματα δείχνουν πολλαπλές διεργασίες που προσφέρουν προστασία μέσω αντοχής, κατά τη φάση προ και κατά τη διάρκεια της μόλυνσης στα αγγεία. Οι μελέτες παραπέμπουν στο ότι σε αρκετές

περιπτώσεις των μολύνσεων, αυτές διατηρούνται στη θέση προ των αγγείων, ενώ υπάρχει παραμονή του μύκητα στις ρίζες και συγκεκριμένα στους φλοιούς, και εκεί εντοπίζεται μεσοκυττάρια, καθώς και ενδοκυττάρια ανάπτυξη, με περιορισμό της μόλυνσης των φυτών (Huisman, 1988; Talboys, 1972).

Στα φυτά που παρουσιάζουν ανθεκτικότητα, οι μύκητες εντοπίζονται στις ρίζες και τον λαιμό (βάσεις των βλαστών), κάτι που οφείλεται στους ταχείς μηχανισμούς άμυνας, σε αντίθεση με φυτά που παρουσιάζουν ευπάθεια, στα οποία οι μύκητες αποφεύγουν την άμυνα και πραγματοποιούν αποικισμό σε ολόκληρα τα φυτά. Λόγω της ταχείας απόθεσης σουμπερινών και λοιπών συστατικών τα οποία σχετίζονται με την επίστρωση των κυτταρικών τοιχωμάτων των αγγείων, λειτουργούν ως φραγμός για την εισχώρηση του φυτοπαθογόνου μύκητα με αποτέλεσμα να αποφεύγεται η πιθανότητα εξάπλωσής του (Robb *et al.*, 1989).

Πέραν των προαναφερθέντων, οι τυλώσεις που δημιουργούνται, οι κυτταρικές μεμβράνες που διογκώνονται στα κύτταρα του παρεγχύματος στις αγγειώδεις δεσμίδες, αλλά και η ανάπτυξη που παρατηρείται σε θύλακες από λιγνίνη, θεωρούνται μηχανισμοί ανθεκτικότητας και εντοπίζονται σε προσβολές μυκήτων οι οποίοι είναι υπαίτιοι για την πρόκληση αδρομυκώσεων. Έτσι, παρατηρείται στη περίπτωση των ευαίσθητων ποικιλιών στα φυτά, η καθυστέρηση της δημιουργίας των τυλώσεων ή η δημιουργία τους περιορισμένα (Τζάμος, 2007).

Συστατικά με αντιμικροβιακή δράση συσσωρεύονται σε φυτά που έχουν μολυνθεί, εν μέσω των ιστών στη ρίζα και των βλαστών. Αυτά αφορούν κατηγορίες πρωτεϊνών που συσχετίζονται με εκδήλωση παθογενειών, κάποιες από αυτές είναι η γλουκανάση, η χιτινάση, φυτοαλεξίνες και τα φαινολικά στοιχεία. Το χαρακτηριστικό για την κατανόηση της προσφοράς αυτών των ουσιών είναι ότι ενώ υπάρχει παραγωγή τους σε φυτά τα οποία παρουσιάζουν ανθεκτικότητα αλλά και σε φυτά που παρουσιάζουν ευπάθεια, η ειδοποιός διαφορά στις δύο περιπτώσεις αποτελούν οι ρυθμοί και τα επίπεδα που παράγονται, όπου παρατηρείται ότι είναι αυξημένα στα φυτά που παρουσιάζουν ανθεκτικότητα (Bell, 1969; Cooper *et al.*, 1996; Daayf *et al.*, 1997; Gold and Robb, 1995; Talboys, 1972; Williams *et al.*, 2002).

Η ανθεκτικότητα η οποία εξαρτάται από πολλαπλά γονίδια και αφορά τους μύκητες του γένους *Verticillium*, διαπιστώθηκε για πολλαπλά είδη φυτών, όπως τα *Medicago sativa*, *Gossypium* sp., *Solanum tuberosum*, *Fragaria* sp. (Bolek *et al.*, 2005; Simko *et al.*, 2004b). Επιπλέον, πολλαπλά γονίδια που χαρακτηρίζονται ως κυρίαρχα και ελέγχουν την ανθεκτικότητα έχουν εντοπιστεί σε διάφορα είδη φυτών όπως, *Gossypium* sp., *Solanum tuberosum*, *Solanum lycopersicum* και *Helianthus annuus* (Jansky *et al.*, 2004; Lynch *et al.*, 1997; Schaible *et al.*, 1951). Στα φυτά τομάτας, η ανθεκτικότητα που αφορά στις αδρομυκώσεις λόγω της προσβολής από τους φυτοπαθογόνους μύκητες του γένους *Verticillium*, οφείλεται στο γονιδιακό τόπο *Ve* (Schaible *et al.*, 1951), κάτι το



οποίο χρησιμοποιείται στη βελτίωση φυτών και έχει ενσωματωθεί στο μεγαλύτερο ποσοστό των καλλιεργούμενων ποικιλιών. Η αναγνώριση που προσφέρεται μέσω της πρωτεΐνης Ve, που προσφέρει ανθεκτικότητα μέσω των απομονώσεων των μυκήτων *V. dahliae* και *V. albo-atrum*, κατατάσσονται στη φυλή 1, ενώ στη φυλή 2 κατατάσσονται οι εναπομένουσες (Pegg, 1974).

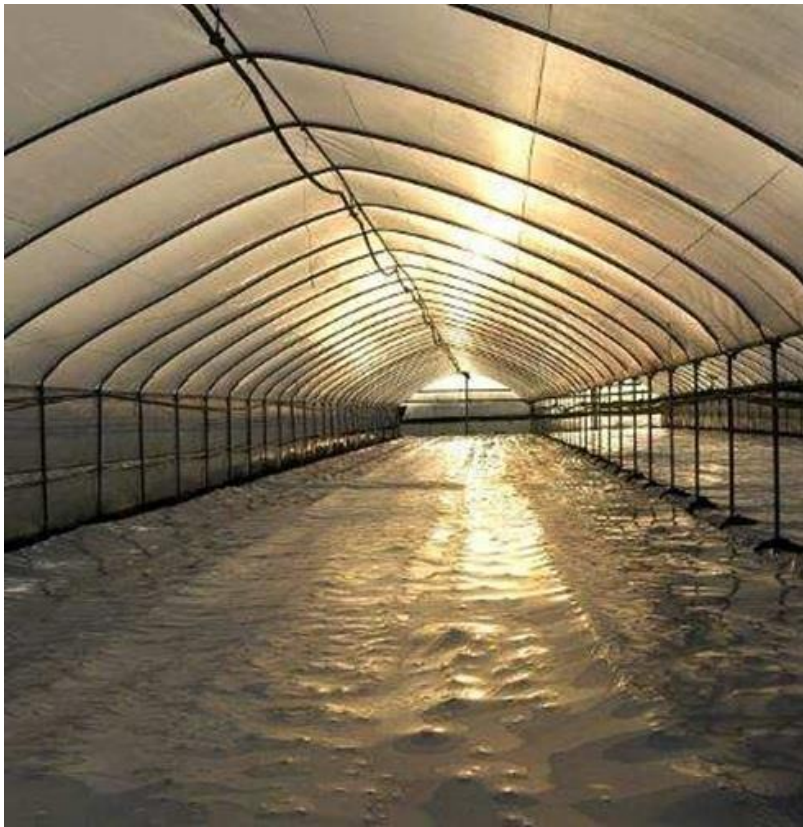
### 3. Αντιμετώπιση του μύκητα *Verticillium dahliae*

Είναι γνωστή η δυσκολία αντιμετώπισης της ασθένειας που προκαλούν οι μύκητες του γένους *Verticillium* sp. Κάποιοι παράγοντες που έχουν ως αποτέλεσμα αυτή τη δυσκολία είναι η δημιουργία μικροσκληρωτίων του μύκητα και η ικανότητά τους να διατηρούνται στο έδαφος για μεγάλο χρονικό διάστημα ακόμη και απουσία των φυτών-ξενιστών, οι ξενιστές του παθογόνου στους οποίους ανήκουν εκατοντάδες είδη φυτών και ότι κατά τις αδρομυκώσεις, τα αγγεία στο ξύλο αποικούνται, έτσι η καταπολέμηση του παθογόνου καθίσταται δυσχερής. Άλλοι, πολύ σημαντικοί παράγοντες μηχανικής μετάδοσης, αποτελούν η χρήση κλαδευτικών εργαλείων μολυσμένα από το παθογόνο, μέσω εδαφικού υλικού και τα συστήματα άρδευσης με τη μεταφορά του μολύσματος μέσω του νερού ποτίσματος. Επιπλέον, οι προσβεβλημένοι σπόροι και η χρήση κονδύλων, ριζωμάτων ή βολβών με το μόλυσμα αποτελούν τρόπους μετάδοσης και διασποράς (Pataky, 1997; Fradin and Thomma, 2006). Για να αντιμετωπιστεί η ασθένεια προϋποθέτει να έχει διαγνωσθεί ορθώς το παθογόνο, αφού έχει καλλιεργηθεί ο προσβεβλημένος φυτικός ιστός εργαστηριακά και έχει απομονωθεί το παθογόνο, διότι οι αδρομυκώσεις μπορεί να προκληθούν και από άλλους μύκητες ή γενικότερα από άλλες αιτιολογίες. Όταν αναγνωρισθεί ο μύκητας του γένους *Verticillium*, οι συστάσεις αφορούν στην εφαρμογή μέτρων πρόληψης ώστε να μειωθεί η ένταση της ασθένειας και να περιοριστεί στον αγρό (Pataky, 1997).

Δεν έχει βρεθεί χημικός τρόπος καταπολέμησης για την ασθένεια που προκαλεί το παθογόνο του γένους *Verticillium*, συνεπώς τα προληπτικά μέτρα αποτελούν και τον μόνο τρόπο αποφυγής προσβολής από την ασθένεια. Κάποια από αυτά τα προληπτικά μέτρα αφορούν στις ανθεκτικές ποικιλίες και στην ορθή εφαρμογή των γεωργικών πρακτικών, ώστε να περιοριστεί το εδαφικό μόλυσμα. Καθοριστικό παράγοντα στο να περιοριστεί η ασθένεια, αποτελεί το να απομακρύνονται τα διαγνωσμένα φυτά που έχουν διαπιστωμένα προσβληθεί από τους μύκητες του γένους *Verticillium*. Λόγω του ότι μέσω των μικροσκληρωτίων πραγματοποιείται η αρχική μόλυνση, είναι μέγιστης σημασίας η στόχευση αυτών (Fradin and Thomma, 2006). Μέσω της μεθόδου της ηλιοαπολύμανσης, των εναλλαγών στις καλλιέργειες και της εφαρμογής

συγκεκριμένων χημικών σκευασμάτων στο έδαφος, μπορεί να μειωθεί το μόλυσμα με καλά αποτελέσματα (Tjamos *et al.*, 1991).

Με τη μέθοδο της ηλιοαπολύμανσης του εδάφους (Εικόνα 14,15), έχει αποδειχθεί ότι δύναται να καταπολεμηθεί η ασθένεια σε περιπτώσεις καλλιεργειών θερμοκηπίου ή και υπαίθρου. Αυτή η μέθοδος, μέσω της χρήσης ηλιακής ακτινοβολίας, απολυμαίνει το έδαφος, με την αύξηση των θερμοκρασιών (καλύπτοντας το έδαφος με 'φύλλα' από πολυαιθυλένιο) και είναι μία μέθοδος με θεραπευτική δράση για δενδρώνες που είναι ήδη εγκατεστημένοι (Tjamos *et al.*, 1991).



Εικόνα 14. Εφαρμογή της ηλιοαπολύμανσης σε θερμοκήπιο (Η βερτισιλλίωση των κηπευτικών, Τσιαντούλα Ειρήνη, 2007)



Εικόνα 15. Εφαρμογή της ηλιοαπολύμανσης σε αγρό (Βερτισιλλίωση: Η σοβαρότερη μυκητολογική ασθένεια της Ελιάς, Κατερίνης Στέλιος, 2018  
<https://blog.farmacon.gr/katigories/teχνiki-arthrografia/fytoprostaasia/item/1875-vertisilliosi-i-sovaroteri-mykitologiki-astheneia-tis-elias> )

Σημειώνεται ότι λόγω της επιβλαβούς φύσης του βρωμιούχου μεθυλίου, απέναντι στους ανθρώπους και γενικότερα στο περιβάλλον, που χρησιμοποιούνταν για την απολύμανση εδαφών ως χημικό μέσο, η χρήση του για αυτό το σκοπό έχει μειωθεί (Fradin and Thomma, 2006), παράλληλα το συγκεκριμένο χημικό μέσο, είναι απαγορευμένο σε Ευρωπαϊκή Ένωση και σε διάφορες άλλες χώρες ανά το κόσμο (Termorshuizen *et al.*, 2006).

Η μέθοδος της αμειψισποράς (ή των εναλλαγών καλλιέργειας), δεν αποτελεί την πλέον αποτελεσματική μέθοδο, διότι υπάρχει διατήρηση των μικροσκοκληρωτίων του μύκητα στο έδαφος και μάλιστα για μεγάλα χρονικά διαστήματα απαιτώντας εναλλαγές στις καλλιέργειες, μακράς διάρκειας, μονοκοτυλήδων φυτών, ώστε τα μικροσκοκληρώτια να μειωθούν σε πληθυσμό σε επίπεδα όπου δεν θα προκαλούν την μόλυνση και την εκδήλωση συμπτωμάτων (Fradin and Thomma, 2006).

Επιπλέον, πολύ σημαντικά είναι εξής: να αποφεύγεται η συγκαλλιέργεια ξενιστών της ασθένειας (πχ. ελιές με κηπευτικά), τα αρδευτικά συστήματα να ακολουθούν πορεία η οποία δεν μεταφέρει τα μολύσματα, τα ζιζάνια πρέπει να καταστρέφονται, λόγω του ότι δύναται να είναι ξενιστές του παθογόνου και επίσης να καταστρέφονται τα υπολείμματα των καλλιεργειών.

Τέλος, για μία καλλιέργεια απαλλαγμένη από την ασθένεια προ της εγκατάστασής της, είναι η χρήση υγιούς πολλαπλασιαστικού υλικού, η εγκατάσταση σε αμόλυντους αγρούς, οι ανθεκτικές ποικιλίες ή υποκείμενα και η αποφυγή της εγκατάστασης δενδροκομείου στις εκτάσεις που έχει καλλιεργηθεί ευπαθής ξενιστής για μεγάλα χρονικά διαστήματα (Παναγόπουλος, 2007; Τζάμος, 2007).

Μεγάλο βήμα έχει αποκτήσει η εφαρμογή μεθόδων βιολογικής αντιμετώπισης ενάντια των αδρομυκώσεων, δηλαδή βιολογική αντιμετώπιση χρησιμοποιώντας στελέχη από εδαφογενή βακτήρια και μη παθογόνα στελέχη των μυκήτων του είδους *Fusarium oxysporum* (Tjamos *et al.*, 2005; Pantelides *et al.*, 2008; Gizi *et al.*, 2011).

## **4. Χρήση νεκρών σπορίων στην αντιμετώπιση του μύκητα *Verticillium dahliae***

### 4.1 Σκοπός του πειράματος

Έχουν πραγματοποιηθεί πολλές μελέτες παθοσυστημάτων φυτών-παθογόνων για να γίνουν κατανοητοί οι μοριακοί μηχανισμοί, όπου είναι υπεύθυνοι για την ανθεκτικότητα έναντι των παθογόνων του γένους *Verticillium*. Ο στόχος της παρούσας μελέτης είναι η εξέταση των μηχανισμών άμυνας των φυτών, έπειτα από την εφαρμογή νεκρών σπορίων του μύκητα *V. dahliae*. Μεγάλο ενδιαφέρον παρουσίασαν τα αποτελέσματα της εφαρμογής των νεκρών σπορίων του παθογόνου σε φυτά μελιτζάνας και *Arabidopsis*, όπου είχε ως αποτέλεσμα την επαγωγή της άμυνας ενάντια στη ζώσα μορφή του μύκητα *V. dahliae*. Αυτό εκφράστηκε με την ένταση της ασθένειας και τον αποικισμό του παθογόνου τα οποία εντοπίστηκαν σε χαμηλότερα επίπεδα στα φυτά όπου είχαν εφαρμοστεί να νεκρά σπόρια σε σύγκριση με τα φυτά μάρτυρες όπου δεν είχε πραγματοποιηθεί εφαρμογή τους.

## 4.2 Προετοιμασία και τρόποι εφαρμογής των νεκρών σπορίων του μύκητα *Verticillium dahliae*

Το παρόν πείραμα καταγράφει τα αποτελέσματα της εφαρμογής νεκρών σπορίων του φυτοπαθογόνου μύκητα *Verticillium dahliae* ως μέσο ενεργοποίησης των μηχανισμών άμυνας φυτών μελιτζάνας και *Arabidopsis*. Ο τρόπος παρασκευής και εφαρμογής του εναιωρήματος αποστειρωμένων (νεκρών) σπορίων του μύκητα *V. dahliae* ήταν ο ακόλουθος:

Από καλλιέργεια του μύκητα *Verticillium dahliae* του Εργαστηρίου Φυτοπαθολογίας του Γεωπονικού Πανεπιστημίου Αθηνών, παρασκευάστηκε εναιώρημα σε κωνική φιάλη 2000mL, το οποίο παρέμεινε για 5 ημέρες σε κατάλληλο περιβάλλον με συνεχή ανάδευση (orbital shaker). Εν συνεχεία, τοποθετήθηκε σε κλίβανο αποστείρωσης ώστε να επιτευχθεί η νέκρωση των σπορίων του μύκητα. Το εναιώρημα αυτό κατόπιν εφαρμόστηκε με ριζοπότισμα και με ενέσιμη εφαρμογή στα φύλλα των φυτών.

## Υλικά και μέθοδοι

### Καλλιέργεια *Verticillium dahliae*

Χρησιμοποιήθηκαν απομονώσεις του μύκητα *Verticillium dahliae*, που προήλθαν από προσβεβλημένα φυτά *Raphanus sativus* L. ή *Solanum melongena* L., και χρησιμοποιήθηκαν στα πειράματα με φυτά *A. thaliana* και μελιτζάνας, αντίστοιχα (Tjamos, et al. 2005), (Tjamos, et al. 2004). Εναιώρημα  $10^7$  κονιδίων/mL του μύκητα *V. dahliae*, παρασκευάστηκε από καλλιέργεια που αναπτύχθηκε για 5 ημέρες σε 24 °C σε υγρό θρεπτικό μέσον SSN (sucrose sodium nitrate) (Sinha and Wood, 1968).

### Προέλευση Σπόρων και Συνθήκες Ανάπτυξης Φυτών

Για τα πειράματα, φυτά *A. thaliana* και μελιτζάνες αναπτύχθηκαν ξεχωριστά σε φυτοδοχεία (9 9 10 cm) τα οποία περιείχαν εδαφικό υπόστρωμα. Οι συνθήκες ανάπτυξης των φυτών ήταν 25 °C, 16 h φωτοπεριόδου, και 60–70% σχετική υγρασία.

## 4.4 Πειράματα παθογένειας και ξενιστές

Πραγματοποιήθηκαν 3 πειράματα παθογένειας, με φυτά μελιτζάνας, *Arabidopsis wt* και *Arabidopsis cerk1*. Παρατηρήθηκαν και καταγράφηκαν τα συμπτώματα της προσβολής από την ασθένεια που προκαλεί ο μύκητας *Verticillium dahliae* στα προαναφερθέντα φυτά-ξενιστές κατόπιν ή μη της εφαρμογής με νεκρά σπόρια του ίδιου μύκητα. Για αυτό το πείραμα, πραγματοποιήθηκαν πέντε (5) επεμβάσεις.

20 φυτά: νεκρά σπόρια *V. dahliae* (ριζοπότισμα) + *V. dahliae*

Σε 20 φυτοδοχεία με φυτά μελιτζάνας πραγματοποιήθηκε εφαρμογή νεκρών σπορίων του μύκητα *V. dahliae*, υπό την μορφή διαλύματος, με ριζοπότισμα. Η ποσότητα που εφαρμόστηκε στο κάθε φυτοδοχείο ήταν 10mL. Μετά από διάστημα 2 ημερών πραγματοποιήθηκε εφαρμογή του μολύσματος, ομοίως σε μορφή διαλύματος με ριζοπότισμα, 10mL ανά φυτοδοχείο.

20 φυτά: νεκρά σπόρια *V. dahliae* (εμβολιασμός σε φύλλα) + *V. dahliae*

Σε 20 φυτοδοχεία με φυτά μελιτζάνας πραγματοποιήθηκε εφαρμογή νεκρών σπορίων του μύκητα *V. dahliae*, υπό την μορφή διαλύματος. Στη συγκεκριμένη περίπτωση η εφαρμογή πραγματοποιήθηκε μέσω εμβολιασμού στα φύλλα του φυτού. Χρησιμοποιήθηκαν αποστειρωμένες βελόνες σύριγγας. Η ποσότητα που εφαρμόστηκε στο κάθε φύλλο ήταν 20μL. Μετά από διάστημα 2 ημερών πραγματοποιήθηκε

εφαρμογή του μολύσματος, σε μορφή διαλύματος με ριζοπότισμα, 10mL ανά φυτοδοχείο.

#### Αναλυτικά τα πειράματα παθογένειας

Φυτά *A. thaliana* αγρίου τύπου Col-0 είκοσι ημερών, ριζοποτίστηκαν με 10mL ή εμβολιάστηκαν τα φύλλα τους με 20μL με  $10^7$  νεκρά ( $121\text{ }^\circ\text{C}$ , 1.2 atm, 15 min) κονίδια *V. dahliae* mL<sup>-1</sup> σε απεσταγμένο, αποστειρωμένο νερό, ανά φυτό ή μόνο με απεσταγμένο, αποστειρωμένο νερό (mock treatments). Τρεις ημέρες μετά, τα φυτά ριζοποτίστηκαν με 10 mL  $10^7$  *V. dahliae* κονίδια mL<sup>-1</sup> σε απεσταγμένο, αποστειρωμένο νερό ανά φυτό ή μόνο με απεσταγμένο, αποστειρωμένο νερό (mocks, negative control) (Gkizi, et al. 2016). Το πείραμα επαναλήφθηκε τρεις φορές με 10 φυτά ανά εφαρμογή (συνολικά 30 φυτά ανά εφαρμογή). Η ένταση της ασθένειας υπολογίστηκε ως ποσοστό των φύλλων που παρουσίαζαν συμπτώματα της ασθένειας επί του συνολικού αριθμού των φύλλων ανά φυτό. Ταυτοχρόνως, το ποσοστό του εμβαδού της ασθένειας (AUDPC) επί της μέγιστης πιθανής τιμής AUDPC για το διάστημα των πειραμάτων, υπολογίστηκε για κάθε φυτό (Campbell, C.L.; Madden, L.V. 1990). Εκτός των φυτών της μελιτζάνας, ίδια μεθοδολογία ακολουθήθηκε για τα πειράματα παθογένειας των φυτών *A. thaliana*, Col-0 και *cerk1-2*. Η αξιολόγηση της προστατευτικής δράσης που παρουσιάζεται στα φυτά από τα νεκρά σπόρια του μύκητα *V. dahliae* ενάντια στον μύκητα *V. dahliae* σε φυτά μελιτζάνας πραγματοποιήθηκε με ριζοπότισμα των φυτών με 10mL ή εμβολιασμό του μίσχου των φυτών με 20μL εναιωρήματος  $10^7$  νεκρών σπορίων ( $121\text{ }^\circ\text{C}$ , 1.2 atm, 15 min) του μύκητα *V. dahliae* mL<sup>-1</sup> σε απεσταγμένο, αποστειρωμένο νερό ανά φυτό και ακολουθώντας την ίδια μεθοδολογία όπως περιεγράφηκε παραπάνω.

#### **4.4.1 Προετοιμασία φυτικού υλικού για τα 3 φυτά ξενιστές**

Πριν τη πραγματοποίηση της εκάστοτε σποράς, εφαρμόστηκε στο εδαφικό υπόστρωμα εντομοκτόνο σκεύασμα ώστε να εξασφαλιστεί η άρτια ανάπτυξη των φυτών, χωρίς απώλειες λόγω πιθανής παρουσίας εχθρών. Μετά το πέρας 3 ημερών, το εδαφικό υπόστρωμα τοποθετήθηκε σε πλαστικά, μαύρα φυτοδοχεία αποσπόμενα από δίσκους σποράς. Πραγματοποιήθηκε σπορά φυτών μελιτζάνας, *Arabidopsis* και *Arabidopsis cerk1*, αντίστοιχα. Συγκεκριμένα, χρησιμοποιήθηκαν 90 φυτοδοχεία με εδαφικό υλικό για το εκάστοτε πείραμα παθογένειας. Τοποθετήθηκαν 8-10 σπόροι σε κάθε φυτοδοχείο ώστε να εξασφαλιστεί η επιτυχία ανάπτυξης. Μετά από διάστημα 2 εβδομάδων, όπου είχαν φτάσει στο κατάλληλο στάδιο ανάπτυξης τα φυτάρια, πραγματοποιήθηκε η εφαρμογή των νεκρών σπορίων (στις επεμβάσεις που

απαιτούνταν η εφαρμογή τους) και κατόπιν 2 ημερών πραγματοποιήθηκε η εφαρμογή του μολύσματος (στις επεμβάσεις που απαιτούνταν η εφαρμογή τους).

#### **4.4.1.1 Προετοιμασία μολύσματος**

Για τα πειράματα, η παραγωγή κονιδίων πραγματοποιήθηκε με μεταφορά κομματιών καλλιέργειας του μύκητα *Verticillium dahliae*, όπου είχε αναπτυχθεί σε θρεπτικό υλικό PDA, σε SSN (sucrose sodium nitrate) (Sinha and Wood, 1968) σε κωνικές φυάλες 2L, τοποθετήθηκαν για επώαση σε κατάλληλους αναδευτήρες συνεχούς ανάδευσης (orbital shaker) για 5 ημέρες, σε 150 rpm, στους 22°C και σε συνθήκες σκότους. Ακολούθως, με χρήση αιματοκυτταρόμετρου, υπολογίστηκε η συγκέντρωση του μολύσματος σε κονίδια και πραγματοποιήθηκαν οι εκάστοτε εφαρμογές στα φυτά. Ομοίως, πραγματοποιήθηκε και η προετοιμασία των κονιδίων για την παραγωγή νεκρών σπορίων. Προ της εφαρμογής στα φυτά μεσολάβησε το στάδιο αποστείρωσης με τοποθέτηση της κωνικής φυάλης με το μόλυσμα σε κλίβανο αποστείρωσης.

#### **4.4.1.3 Εφαρμογή μολύσματος και νεκρών σπορίων του μύκητα**

Η εφαρμογή του μολύσματος του μύκητα *V. dahliae* πραγματοποιήθηκε με ριζοπότισμα. Η εφαρμογή των νεκρών σπορίων προηγήθηκε της εφαρμογής του μολύσματος και εφαρμόστηκε με τη μέθοδο του ριζοποτίσματος και της εισαγωγής του διαλύματος στα φύλλα σε ενέσιμη μορφή.

### **4.5 qPCR και περιγραφή μοριακών μεθόδων**

#### Εξαγωγή DNA και qPCR ποσοτικοποίηση του μύκητα *V. dahliae*

Στα πειράματα με τα φυτά *A. thaliana* (αγρίου τύπου και *cerk1-2*), η σχετική ποσότητα DNA του *V. dahliae* για τις διαφορετικές εφαρμογές, ποσοτικοποιήθηκε στις 25 ημέρες μετά τη μόλυνση (25dpi). Το DNA που εξάχθηκε, απομονώθηκε από τα εναέρια φυτικά μέρη 10 φυτών ανά εφαρμογή, ομογενοποιημένα σε ένα δείγμα και λειοτριβήθηκαν ώστε να έχουν μορφή λεπτής σκόνης, χρησιμοποιώντας υγρό άζωτο. Η εξαγωγή DNA πραγματοποιήθηκε σύμφωνα με τη μεθοδολογία των Dellaporta *et al.* 1983. Οι μέθοδοι qPCR πραγματοποιήθηκαν σε θερμικό κυκλοποιητή Applied Biosystems StepOnePlus και για τις αντιδράσεις πολλαπλασιασμού χρησιμοποιήθηκε KAPA SYBR® FAST (Merck SA). Οι εκκινητές που χρησιμοποιήθηκαν στην real-time PCR, ήταν οι TS1-F 5-AAAGTTTAAATGGTTCGCTAAGA-3 και ST-VE1-R 5-CTTGGTCATTTAGAGGAAGTAA-3 για



τις περιοχές ITS1 και ITS2 του 5.8S ριβοσωμικού RNA γονιδίου (Z29511) του μύκητα *V. dahliae* (Gkizi et al. 2016) και 5-GAGCTGAAGTGGCTTCCATGAC-3 και 5-GGTCCGACATACCCATGATCC-3 για το γονίδιο αναφοράς των φυτών *Arabidopsis At4g26410* (Czechowski, et al. 2005). Για την κάθε εφαρμογή, πραγματοποιήθηκαν τρεις βιολογικές επαναλήψεις και τρεις τεχνικές επαναλήψεις ανά βιολογική επανάληψη. Η σχετική ποσότητα DNA του μύκητα *V. dahliae*, υπολογίσθηκε χρησιμοποιώντας τον τύπο  $2^{-\Delta Ct}$ , εκφράστηκε ως ποσοστό σε σύγκριση με τον άγριο τύπο, ενώ η τιμή ( $2^{-\Delta Ct}$ ) του αγρίου τύπου ορίστηκε στο 100% (Gkizi et al. 2016).

#### 4.5.1 Καθορισμός των επιπέδων μεταγραφής *PR1*, *PDF1.2* και *CERK1*

Για την εξαγωγή RNA, τα εναέρια μέρη πέντε φυτών αγρίου τύπου *A. thaliana* από κάθε εφαρμογή και πειραματική επανάληψη (συνολικά 3 επαναλήψεις) συλλέχθηκαν και ομογενοποιήθηκαν σε ένα δείγμα στις 3 και 7 ημέρες μετά τη μόλυνση (3 και 7 dpi). Οι ομογενοποιημένοι ιστοί λειοτριβήθηκαν με υγρό άζωτο και πραγματοποιήθηκε εξαγωγή RNA χρησιμοποιώντας TRIzol® Reagent (Invitrogen, Paisley, Renfrewshire, UK), σύμφωνα με τις οδηγίες του κατασκευαστή. Στα δείγματα RNA προστέθηκε DNase I (Macherey-Nagel) ώστε να μην υπάρχουν ίχνη από γενωμικό DNA. Μονόκλωνο cDNA συντέθηκε χρησιμοποιώντας PrimeScript One Step RT-PCR Kit (Takara) και ακολουθώντας τις οδηγίες του κατασκευαστή. Πραγματοποιήθηκαν qPCRs σε θερμικό κυκλοποιητή Applied Biosystems StepOnePlus και για τις αντιδράσεις ενίσχυσης χρησιμοποιήθηκε KAPA SYBR® FAST (Merck SA). Οι εκκινητές που χρησιμοποιήθηκαν στην real-time PCR ήταν *CERK1* (AT3G21630, 5-CAAATCAAGAGATGGTGTGGTGC-3 και 5-CACCACCAAACCTCCACT-3), *PR1* (AT2G14610, 5-GTGCCAAAGTGAGGTGTAACAA-3 και 5-CGTGTGTATGCATGATCAC-ATC-3) and *PDF1.2* (AT5G44420, 5-TTTGCTGCTTTCGACGCAC-3 και 5-CGCAAACCCCT-GACCATG-3). Για κάθε εφαρμογή, πραγματοποιήθηκαν 3 βιολογικές επαναλήψεις και 3 τεχνικές επαναλήψεις/βιολογική επανάληψη, την κάθε χρονική στιγμή δειγματοληψίας (3 και 7 dpi). Τα σχετικά επίπεδα έκφρασης γονιδίων *PR1*, *PDF1.2* και *CERK1* στα φυτά όπου πραγματοποιήθηκαν εφαρμογές, εκφράστηκε σε σχέση με τα επίπεδα έκφρασης γονιδίων *PR1*, *PDF1.2* και *CERK1* στα φυτά που δεν είχε πραγματοποιηθεί εφαρμογή (mocks).

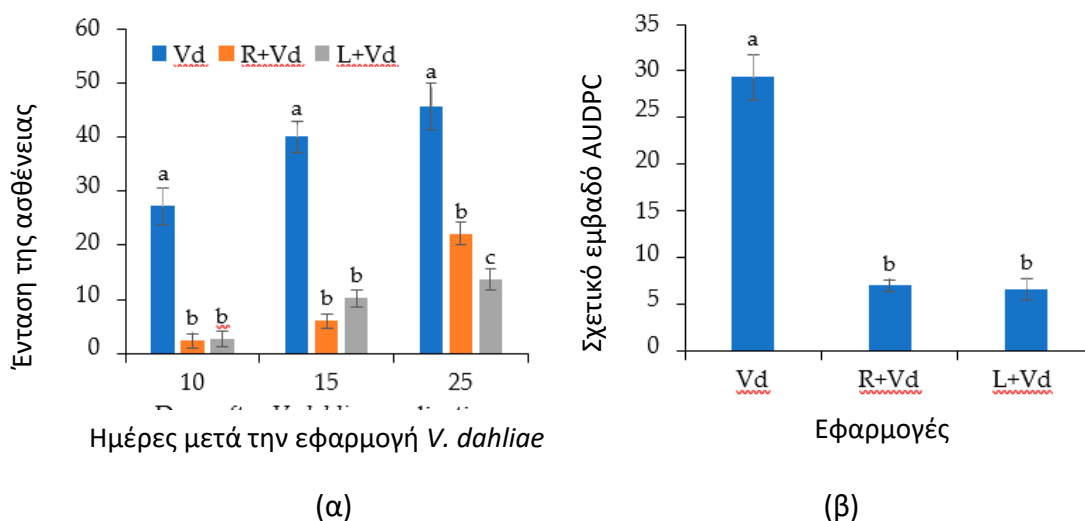
#### 4.5.2 Στατιστική ανάλυση

Η στατιστική ανάλυση των αποτελεσμάτων για την ένταση της ασθένειας, το σχετικό εμβαδό της ασθένειας (AUDPC), τα επίπεδα σχετικής ποσότητας DNA *V. dahliae*, και της έκφρασης γονιδίων πραγματοποιήθηκε με ANOVA. Στις περιπτώσεις που παρατηρήθηκαν σημαντικά F-test ( $p < 0.05$ ), τα αποτελέσματα αναλύθηκαν περαιτέρω με LSD multiple range test ( $p < 0.05$ ).

## 5. Αποτελέσματα

**Τα νεκρά (αποστειρωμένα) σπόρια του μύκητα *V. dahliae* προστατεύουν φυτά *A. thaliana* και μελιτζάνες ενάντια του μύκητα *V. dahliae***

Η προσθήκη των νεκρών спорίων του μύκητα μείωσε την εκδήλωση συμπτωμάτων μάρανσης της ασθένειας στα φυτά *A. thaliana* Col-0. Τα συμπτώματα που προκαλεί το βερτισιλλίο εμφανίζονται κυρίως με την μορφή της μάρανσης. Η ένταση της ασθένειας καταγράφηκε από τις 10 ημέρες μετά τη μόλυνση (10dpi) έως και τις 25 ημέρες μετά την μόλυνση (25dpi) (Διάγραμμα 1).

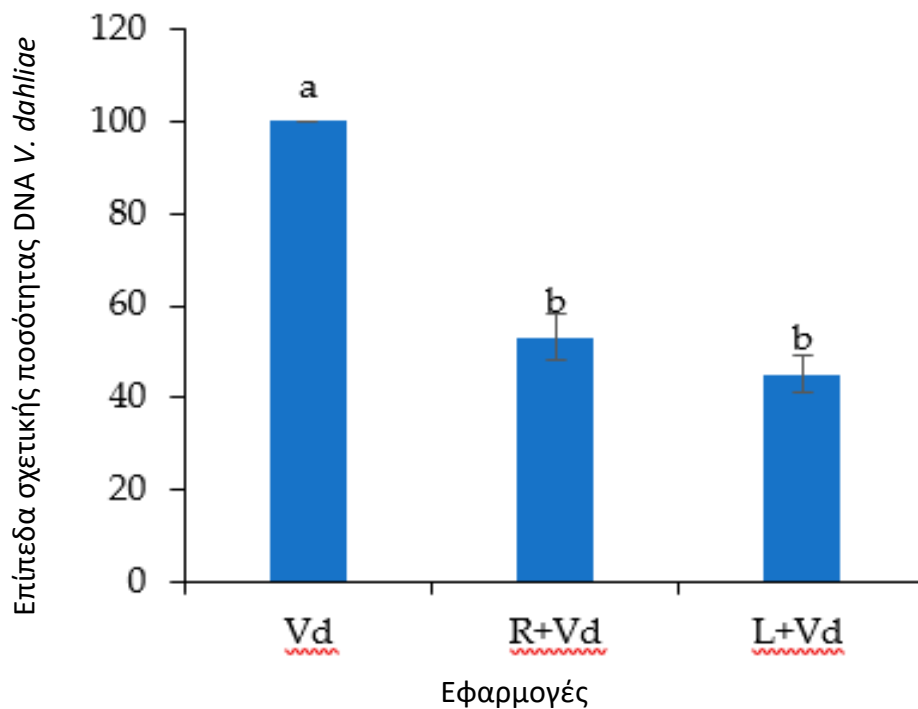


Διάγραμμα 1. Ένταση της ασθένειας (α) και σχετικό εμβαδό AUDPC (β) που προκαλείται από εφαρμογή του μύκητα *V. dahliae* (Vd), σε φυτά *Arabidopsis thaliana*, με εμβολιασμό στα φύλλα (L + Vd) ή εφαρμογή στη ρίζα - ριζοπότισμα (R + Vd) με νεκρά σπόρια του μύκητα *V. dahliae* ή με εφαρμογή μόνο του μολύσματος (Vd). Οι στήλες αντιπροσωπεύουν τρεις επαναλήψεις ανά εφαρμογή ( $n = 30$  plants,  $\pm$  SE). Διαφορετικά γράμματα αντιπροσωπεύουν σημαντικές στατιστικές διαφορές μεταξύ των εφαρμογών ( $p < 0.05$ ) σύμφωνα με το LSD τεστ.

Τα φυτά *A. thaliana* στα οποία εφαρμόστηκαν τα νεκρά σπόρια του μύκητα *V. dahliae*, έδειξαν σημαντικά χαμηλότερη ένταση των συμπτωμάτων κατά τη διάρκεια του πειράματος παθογένειας. Κατά τη τελευταία καταγραφή συμπτωμάτων (25 dpi), το ποσοστό των ασθενών φύλλων ήταν 14% και 22% στα φυτά όπου η εφαρμογή νεκρών спорίων του μύκητα *V. dahliae* είχε πραγματοποιηθεί με εμβολιασμό στα φύλλα και στα φυτά όπου τα νεκρά σπόρια εφαρμόστηκαν στη ρίζα (ριζοπότισμα), αντίστοιχα, ενώ στα φυτά όπου εφαρμόστηκε μόνο το μολύσμα (controls), το ποσοστό των ασθενών φύλλων ανήλθε στο 46%. Η ανάλυση του σχετικού εμβαδού της ασθένειας

(AUDPC) επιβεβαίωσε ότι συνολικά, η ένταση της ασθένειας στα φυτά όπου εφαρμόστηκαν νεκρά σπόρια του παθογόνου ήταν χαμηλότερη συγκριτικά με τα φυτά στα οποία είχε εφαρμοστεί μόνο το μόλυσμα (controls).

Τα αποτελέσματα της έντασης της ασθένειας επιβεβαιώθηκαν και με αναλύσεις qPCR των επιπέδων του ενδοφυτικού DNA του παθογόνου στις διαφορετικές εφαρμογές. Αποδείχθηκε ότι τα φυτά *A. thaliana*, στα οποία είχαν εφαρμοστεί νεκρά σπόρια του μύκητα *V. dahliae*, έδειξαν σημαντικά χαμηλότερα σχετικά επίπεδα DNA από ότι οι μάρτυρες (controls) (Διάγραμμα 2). Επιπλέον, δεν καταγράφηκε σημαντική στατιστική διαφορά μεταξύ των διαφορετικών φυτοπροστατευτικών εφαρμογών. Συνεπώς, η εφαρμογή νεκρών σπορίων του παθογόνου έχει ως αποτέλεσμα τη προστασία των φυτών.



Διάγραμμα 2. Σχετική ποσοτικοποίηση των επιπέδων DNA του μύκητα *V. dahliae* σε φυτά *A. thaliana* αγρίου τύπου με εμβολιασμό στα φύλλα (L+ Vd) ή εφαρμογή στη ρίζα - ριζοπότισμα (R + Vd) με νεκρά σπόρια του μύκητα *V. dahliae* και εφαρμογή του μολύσματος μετά από 3 ημέρες με *V. dahliae* ή μόνο με εφαρμογή του μολύσματος (Vd). Τα επίπεδα σχετικής ποσότητας DNA *V. dahliae* υπολογίσθηκαν μέσω qPCR χρησιμοποιώντας DNA το οποίο απομονώθηκε από τα εναέρια μέρη των φυτών στις 25 ημέρες μετά την μόλυνση (25dpi). Οι στήλες αντιπροσωπεύουν ομάδες των τριών βιολογικών και τεχνικών επαναλήψεων ανά εφαρμογή ( $n = 9, \pm SE$ ) στις 25 dpi (τέλος του πειράματος παθογένειας). Διαφορετικά γράμματα συμβολίζουν τις σημαντικές στατιστικές διαφορές μεταξύ των εφαρμογών ( $p < 0.05$ ) σύμφωνα με την LSD στατιστική δοκιμή.

Η προστατευτική δράση που προσφέρουν στα φυτά τα νεκρά σπόρια του *V. dahliae* εξετάστηκε και σε φυτά μελιτζάνας. Ομοίως όπως και στα φυτά *A. thaliana*, τα αρχικά συμπτώματα της ασθένειας εμφανίστηκαν με τη μορφή μαρασμού (Εικόνα 16). Η καταγραφή των συμπτωμάτων ξεκίνησε στις 15 ημέρες μετά την εφαρμογή του μολύσματος (15dri) και διήρκησε έως και τις 35 ημέρες (35dri) (Διάγραμμα 3). Τα φυτά μελιτζάνας όπου είχαν εφαρμοστεί τα νεκρά σπόρια του μύκητα *V. dahliae* παρουσίασαν λιγότερο ποσοστό συμπτωμάτων μάρανσης της ασθένειας, σε σύγκριση με τα φυτά μάρτυρες (controls) κατά τη διάρκεια του πειράματος. Κατά τη τελευταία καταγραφή (35dri), το ποσοστό των ασθενών φύλλων έφτανε 33% και 40% σε φυτά όπου είχε πραγματοποιηθεί εμβολιασμός στα φύλλα και σε φυτά όπου είχε εφαρμοστεί ριζοπότισμα με τα νεκρά σπόρια του μύκητα *V. dahliae* αντίστοιχα, ενώ το ποσοστό των ασθενών φύλλων στα φυτά-μάρτυρες ήταν 63%. Η ανάλυση του σχετικού εμβαδού της ασθένειας επιβεβαίωσε ότι τα συνολικά επίπεδα της έντασης της ασθένειας σε φυτά όπου είχαν εφαρμοστεί τα νεκρά σπόρια του παθογόνου ήταν χαμηλότερα σε σύγκριση με τα φυτά-μάρτυρες (controls).

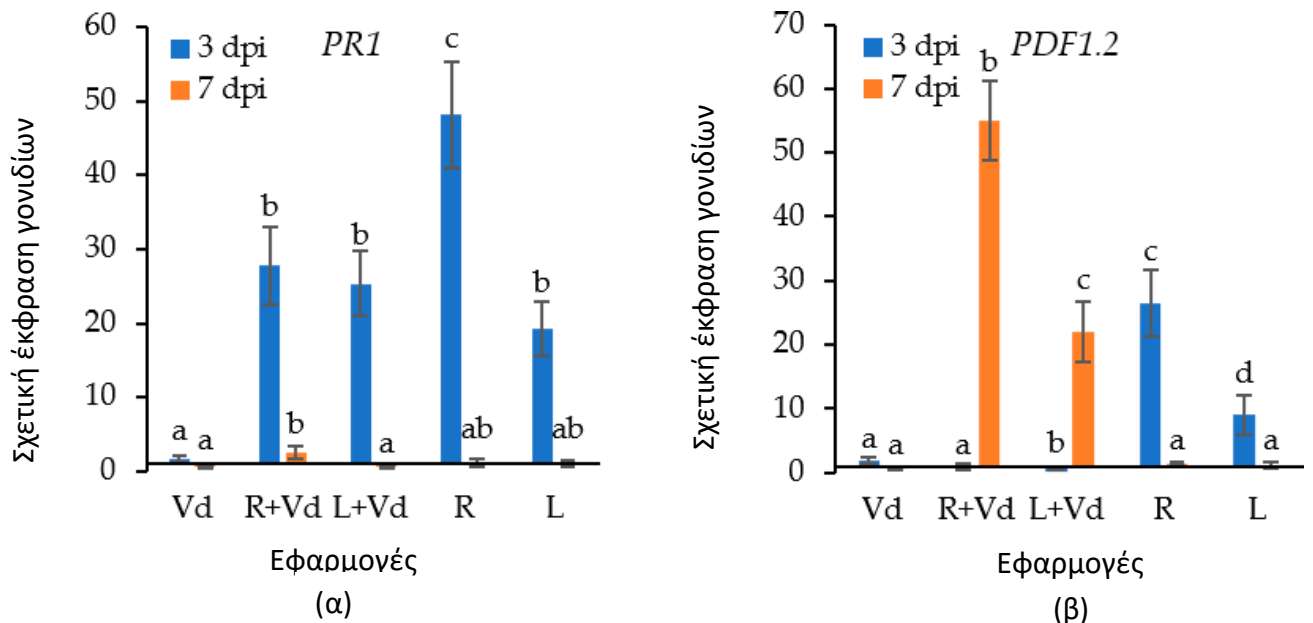


Εικόνα 16. Συμπτώματα μάρανσης που προκαλούνται από προσβολή του μύκητα *Verticillium dahliae* σε φυτά μελιτζάνας όπου έχουν εμβολιαστεί οι μίσχοι (a) ή έχουν ριζοποτιστεί (b) με νεκρά σπόρια του μύκητα *V. dahliae*, μάρτυρες (μολυσμένα με *V. dahliae*) (c) και φυτά χωρίς εφαρμογές (mock) (d). Οι φωτογραφίες τραβήχτηκαν στις 25 ημέρες μετά τη μόλυνση (25 dri).

## **Τα νεκρά σπόρια του μύκητα *V. dahliae* ενεργοποιούν τους μηχανισμούς άμυνας εναντίον του μύκητα *V. dahliae***

Τα πειράματα παθογένειας αποκάλυψαν ότι η εφαρμογή νεκρών σπορίων του μύκητα *V. dahliae* σε φυτά μελιτζάνας οδηγεί σε σημαντική μείωση της έντασης της ασθένειας συγκριτικά με τους μάρτυρες (controls). Επομένως, στόχος ήταν να ερευνησουμε εάν υπήρχε υπέρ-έκφραση συγκεκριμένων γονιδίων εμπλεκόμενα με την άμυνα των φυτών, σε αυτές τις φυτοπροστατευτικές εφαρμογές. Για αυτό το σκοπό, εξετάσαμε τα επίπεδα έκφρασης των γονιδίων άμυνας *PR1* και *PDF1.2*, γονίδια δείκτες της άμυνας που εξαρτάται από το SA και ET/JA, στις 3 και 7 ημέρες μετά την εφαρμογή του μολύσματος (3 και 7dpi).

Η εφαρμογή των νεκρών σπορίων του μύκητα *V. dahliae* προκάλεσε υπέρ-έκφραση των γονιδίων δεικτών *PR1* και *PDF1.2* στις 3 ημέρες μετά την εφαρμογή, παρά ταύτα αυτό ήταν ένα προσωρινό φαινόμενο, διότι η έκφραση και των δύο γονιδίων εξελίχθηκε παρόμοια με τις εφαρμογές όπου δεν είχε πραγματοποιηθεί εφαρμογή (Διάγραμμα 3). Κατόπιν της εφαρμογής του μολύσματος, η έκφραση των γονιδίων *PR1* και *PDF1.2* ακολούθησε αντίθετα μοτίβα, εφόσον η έκφραση του *PR1* ήταν υψηλότερη στις 3dpi συγκριτικά με τις 7dpi, ενώ η έκφραση του γονιδίου *PDF1.2* ήταν υψηλότερη στις 7dpi συγκριτικά με τις 3dpi στα φυτά όπου εφαρμόστηκαν τα νεκρά σπόρια του μύκητα *V. dahliae*, ανεξάρτητα από την μέθοδο εφαρμογής τους. Η έκφραση του γονιδίου *PR1* παρουσίασε υπέρ-έκφραση, 22 φορές αυξημένη σε φυτά όπου είχαν εφαρμοστεί νεκρά σπόρια του μύκητα *V. dahliae* συγκριτικά με τα φυτά όπου δεν είχε πραγματοποιηθεί κάποια εφαρμογή, στις 3dpi, ενώ το γονίδιο *PDF1.2* παρουσίασε υπέρ-έκφραση 22- και 55- φορές αυξημένη στην εφαρμογή των νεκρών σπορίων του μύκητα *V. dahliae* στις 7dpi, με εμβολιασμό στα φύλλα και με ριζοπότισμα, αντίστοιχα. Στα φυτά όπου εφαρμόστηκε μόνο το μόλυσμα (controls – Vd), η έκφραση των γονιδίων *PR1* και *PDF1.2* παρουσίασε υπέρ-έκφραση στις 3dpi 1.7- και 2- φορές αυξημένη σχετικά με τα φυτά όπου δεν είχε πραγματοποιηθεί εφαρμογή του μολύσματος (mock-inoculated plants), αντίστοιχα, ενώ υπήρχε μειωμένη έκφραση των γονιδίων στις 7dpi.

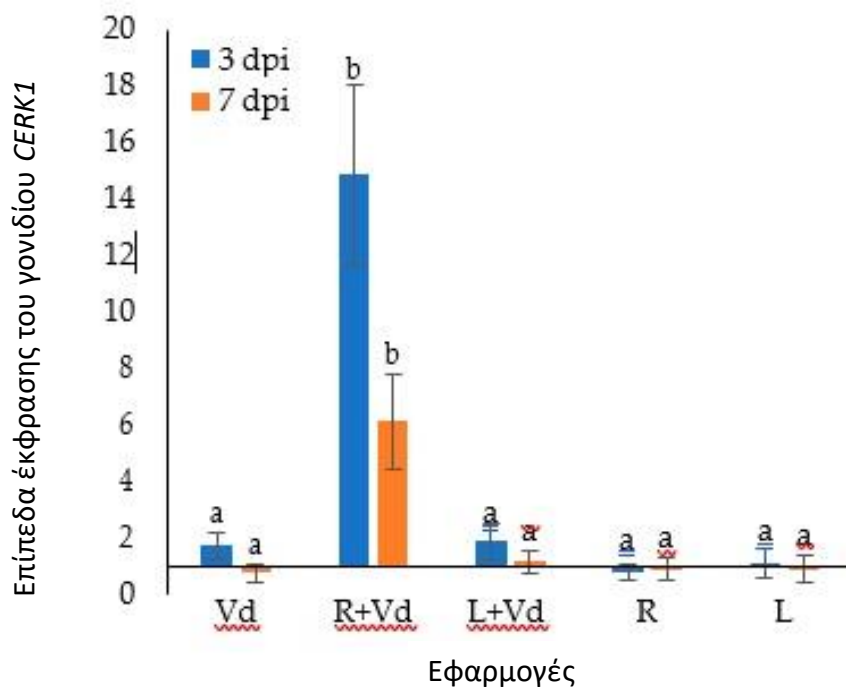


Διάγραμμα 3. Σχετική έκφραση των γονιδίων *PR1* (α) και *PDF1.2* (β) στα εναέρια μέρη των φυτών *A. thaliana* με εμβολιασμό στα φύλλα (L + Vd) ή με ριζοπότισμα (R + Vd) με νεκρά σπόρια του μύκητα *V. dahliae* ή με εφαρμογή μόνο του μολύσματος (mock inoculated-positive control, Vd) στις 3 και 7 ημέρες μετά την εφαρμογή του μύκητα *V. dahliae* (3dpi και 7dpi). Τα δείγματα για απομονώσεις RNA συλλέχθηκαν στις 3 και 7 ημέρες μετά την εφαρμογή (dpi) του μολύσματος. Τα επίπεδα έκφρασης των γονιδίων *PR1* και *PDF1.2* ποσοτικοποιήθηκαν σχετικά με την έκφραση του γονιδίου αναφοράς *At4g26410* η οποία μετρήθηκε στα ίδια δείγματα και παρουσιάζονται σε σύγκριση με το επίπεδο έκφρασης του εκάστοτε γονιδίου στα φυτά όπου εφαρμόστηκε μόνο το μόλυσμα (mock treatment). Οι στήλες αντιπροσωπεύουν ομάδες των τριών βιολογικών και τεχνικών επαναλήψεων ανά εφαρμογή ( $n = 9$ ,  $\pm$  SE). Για την κάθε ημέρα, διαφορετικά γράμματα υποδηλώνουν τις στατιστικά σημαντικές διαφορές ανάμεσα στις εφαρμογές ( $p < 0.05$ ) σύμφωνα με το LSD test.

## 5.2 Η φυτοπροστατευτική δράση των νεκρών σπορίων του μύκητα *V. dahliae* εξαρτάται από το CERK1

Παρατηρώντας την φυτοπροστατευτική δράση των νεκρών σπορίων του μύκητα *V. dahliae* και την υπέρ-έκφραση των γονιδίων που εμπλέκονται στην άμυνα σε αυτές τις εφαρμογές κατόπιν της εφαρμογής μολύσματος (*V. dahliae*), ερευνήθηκε εάν ο υποδοχέας χιτίνης CERK1 εμπλέκεται στην ανοσία, η οποία θεωρείται προκαλούμενη από τα PAMPs εναντίον του μύκητα *V. dahliae*. Για αυτό το σκοπό, ερευνήσαμε τα επίπεδα *CERK1* σε φυτά *A. thaliana* αγρίου τύπου στα οποία είχαν εφαρμοστεί νεκρά σπόρια του μύκητα *V. dahliae* και κατόπιν εφαρμογής του μολύσματος *V. dahliae* στις 3 και 7 ημέρες μετά την εφαρμογή του μύκητα *V. dahliae* (3 και 7dpi) και την φυτοπροστατευτική δράση των νεκρών σπορίων του μύκητα *V. dahliae* σε

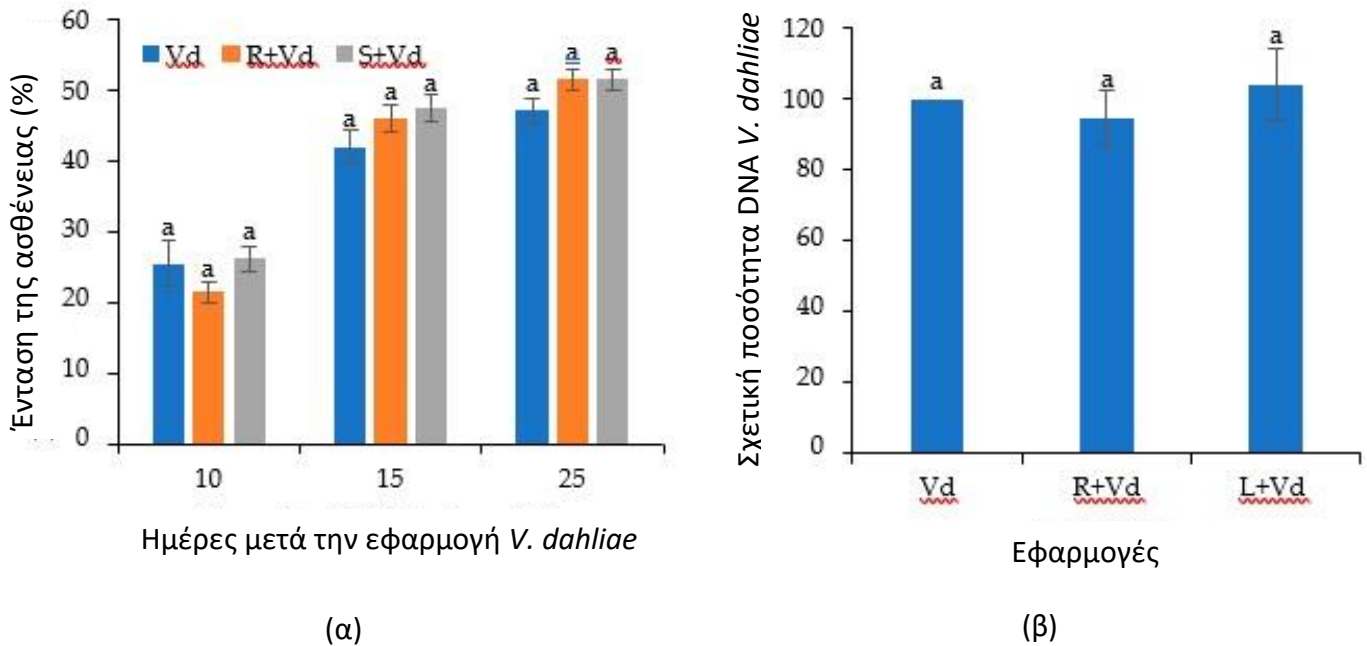
μεταλλαγμένα φυτά *A. thaliana cerk1*. Πράγματι, στην περίπτωση του ριζοποτίσματος με νεκρά σπόρια του μύκητα *V. dahliae*, παρουσιάστηκε υπέρ-έκφραση του γονιδίου *CERK1* 15- και 6- φορές αυξημένη συγκριτικά με τα φυτά όπου δεν εφαρμόστηκαν (mock treatments) στις 3 και 7dpi, αντίστοιχα (Διάγραμμα 4).



Διάγραμμα 4. Σχετική έκφραση του γονιδίου *CERK1* στα εναέρια μέρη φυτών *A. thaliana* στα οποία εφαρμόστηκαν νεκρά σπόρια του μύκητα *V. dahliae* με εμβολιασμό στα φύλλα (L + Vd) ή με ριζοπότισμα (R + Vd) ή φυτών στα οποία εφαρμόστηκε μόνο το μόλυσμα (Vd) ως αντίδραση στη μόλυνση από τον μύκητα *V. dahliae*. Τα δείγματα για την απομόνωση RNA συλλέχθηκαν στις 3 και 7 ημέρες μετά την εφαρμογή (3 και 7dpi) με το παθογόνο. Τα επίπεδα έκφρασης του γονιδίου *CERK1* ποσοτικοποιήθηκαν με την έκφραση του γονιδίου αναφοράς *At4g26410* το οποίο μετρήθηκε στα ίδια δείγματα και παρουσιάζονται σε σύγκριση με το επίπεδο έκφρασης του γονιδίου στα φυτά όπου εφαρμόστηκε μόνο το μόλυσμα (mock treatment). Οι στήλες αντιπροσωπεύουν ομάδες των τριών βιολογικών και τεχνικών επαναλήψεων ανά εφαρμογή ( $n = 9, \pm SE$ ). Την κάθε ημέρα, διαφορετικά γράμματα υποδηλώνουν τις στατιστικά σημαντικές διαφορές ανάμεσα στις εφαρμογές ( $p < 0.05$ ) σύμφωνα με το LSD test.

Η εφαρμογή των νεκρών σπορίων του μύκητα *V. dahliae* στα φύλλα είχε ως αποτέλεσμα την οριακή υπέρ-έκφραση του γονιδίου *CERK1* μετά τη μόλυνση με το μύκητα *V. dahliae*, όμοια με την εφαρμογή μόνο του μολύσματος (control treatment) στις 3dpi. Σε αντίθεση, τα επίπεδα έκφρασης του γονιδίου *CERK1* δεν παρουσίασαν υπέρ-έκφραση απουσίας της μόλυνσης. Η σημασία του *CERK1* στη φυτοπροστατευτική δράση των νεκρών σπορίων του μύκητα *V. dahliae* εξετάστηκε στα φυτά *cerk1*. Όπως και στα προαναφερθέντα πειράματα παθογένειας, τα αρχικά συμπτώματα της

ασθένειας της βερτισιλώσεως στα φυτά *cerk1* ήταν ο μαρασμός, ακολουθούμενος από κιτρίνισμα φύλλων και νέκρωση. Η καταγραφή συμπτωμάτων ξεκίνησε στις 10dpi και διήρκεσε έως και τις 25dpi (Διάγραμμα 5). Σε αντίθεση με τα φυτά *A. thaliana* αγρίου τύπου, η εφαρμογή των νεκρών σπορίων του μύκητα *V. dahliae* στα φυτά *cerk1* δεν είχε ως αποτέλεσμα τη μείωση της έντασης της ασθένειας συγκριτικά με τα φυτά μάρτυρες (control). Σε συμφωνία με τα πειράματα παθογένειας, η ανάλυση με qPCR αποκάλυψε ότι η σχετική ποσότητα DNA του μύκητα *V. dahliae* ήταν όμοια στις διάφορες εφαρμογές (Διάγραμμα 5).



Διάγραμμα 5. Ένταση της ασθένειας και σχετική ποσότητα DNA του μύκητα *V. dahliae* σε φυτά *A. thaliana*, *cerk1*, εμβολιασμένα στα φύλλα (L + Vd) ή εφαρμόζοντας ριζοπότισμα (R + Vd) με νεκρά σπόρια του μύκητα *V. dahliae* ή σε φυτά με εφαρμογή μόνο του μολύσματος (mock inoculated-positive control, Vd) και με εφαρμογή του μολύσματος μετά από 3 ημέρες. Τα επίπεδα DNA του μύκητα υπολογίστηκαν στις 25 ημέρες μετά την εφαρμογή (25dpi). Στο διάγραμμα (a), οι στήλες αντιπροσωπεύουν ομάδες των 3 επαναλήψεων για κάθε εφαρμογή ( $n = 30$  plants,  $\pm$  SE) και στο διάγραμμα (b) αντιπροσωπεύουν ομάδες των 3 βιολογικών και τεχνικών επαναλήψεων ανά εφαρμογή ( $n = 9$ ,  $\pm$  SE) στις 25 ημέρες μετά την εφαρμογή (25dpi) (τέλος του πειράματος παθογένειας). Στο διάγραμμα (b), οι μάρτυρες (control treatment-Vd) έχουν οριστεί ως το 100%. Διαφορετικά γράμματα υποδηλώνουν τις στατιστικά σημαντικές διαφορές ανάμεσα στις εφαρμογές ( $p < 0.05$ ) σύμφωνα με το LSD test.



## 6. Συζήτηση και συμπεράσματα

Η ασθένεια που προκαλείται λόγω προσβολής από τους μύκητες του γένους *Verticillium*, κυρίως από τον μύκητα *V. dahliae*, είναι μία καταστρεπτική ασθένεια η οποία επηρεάζει όλο το πλανήτη και προκαλεί σημαντικές απώλειες σε φυτική μάζα κάθε χρόνο. Η έλλειψη χημικής αντιμετώπισης και η ανεπάρκεια των γονιδίων της άμυνας των φυτών έχει οδηγήσει σε ερευνητικές προσπάθειες ώστε να αναγνωριστούν νέες στρατηγικές περιορισμού της ασθένειας (Klosterman *et al.*, 2009). Τα αποτελέσματά μας δείχνουν ότι η εφαρμογή νεκρών σπορίων του μύκητα *V. dahliae* σε φυτά *A. thaliana* και μελιτζάνας είχαν ως αποτέλεσμα τη μείωση των συμπτωμάτων της ασθένειας σε σύγκριση με τα φυτά όπου δεν εφαρμόστηκαν τα νεκρά σπόρια (controls). Σύμφωνα με τις τρέχουσες πληροφορίες, αυτή είναι η πρώτη αναφορά όπου φαίνεται η προστατευτική δράση νεκρών σπορίων ενός παθογόνου ενάντια στη ζώσα μορφή του. Η προσέγγιση της αντιμετώπισης της ασθένειας αντιπροσωπεύει την επίδραση των εμβολίων στα θηλαστικά, όπου ανενεργές μορφές ενός παθογόνου χρησιμοποιούνται ώστε να προκληθεί ανοσία.

Η καινοτόμος μέθοδος που παραλληλίζει τον εμβολιασμό της ανθρώπινης ιατρικής με τον εμβολιασμό των φυτών, τις τελευταίες δεκαετίες, έχει αναπτύξει μεγάλο ενδιαφέρον κυρίως χρησιμοποιώντας φυσικά ή συνθετικά μόρια που ενεργοποιούν την ανοσία των φυτών (Bektas *et al.*, 2015). Αυτά τα μόρια αναγνωρίζονται από τα φυτά είτε μόρια που παράγονται λόγω τραυματισμού ή θανάτου των φυτικών κυττάρων (DAMPs) ή ως μοριακά μοτίβα των παθογόνων (ή εξελικτικά σταθερές δομές των μικροοργανισμών) (PAMPs) (Sherwood Lauralee, 2015; Quintana-Rodriguez *et al.*, 2018).

Στη περίπτωση του συγκεκριμένου πειράματος, τα μόρια των νεκρών σπορίων του μύκητα *V. dahliae* υπάγονται στη δεύτερη κατηγορία, PAMPs, με το πιο γνωστό και μελετημένο μόρια να είναι η χιτίνη. Τα αποτελέσματα του πειράματος παρουσιάζουν ότι τα φυτά μελιτζάνας και *A. thaliana* εκλαμβάνουν τα νεκρά σπόρια του μύκητα *V. dahliae* ως PAMPs και προκαλούν την ενεργοποίηση της άμυνας ως επίκτητη αντοχή. Τα φυτά όπου ενεργοποιήθηκε η αντοχή παρουσιάζουν διαρκή και ενισχυμένη ενεργοποίηση της άμυνας μετά από βιοτικό ή αβιοτικό στρες (Conrath *et al.*, 2016). Πράγματι, η εφαρμογή σε φυτά *A. thaliana* με νεκρά σπόρια του μύκητα *V. dahliae* είχε ως αποτέλεσμα την υπέρ-έκφραση των εξεταζόμενων γονιδίων άμυνας *PR1* και *PDF1.2* μετά τη μόλυνση από το παθογόνο. Ο μηχανισμός άμυνας του φυτού αποτελείται από δύο κύρια μονοπάτια, που εξαρτώνται από το SA (σαλικυλικό οξύ) και ET/JA (Αιθυλένιο/Ιασμονικό οξύ). Ο μηχανισμός άμυνας που εξαρτάται από το σαλικυλικό οξύ (SA) ενεργοποιείται ενάντια σε βιοτροφικά παθογόνα, ενώ ο μηχανισμός άμυνας που εξαρτάται από το αιθυλένιο/ιασμονικό οξύ ενεργοποιείται ενάντια σε

νεκροτροφικά παθογόνα (Glazebrook, 2005). Ο μύκητας *V. dahliae* θεωρείται ημιβιοτροφικός παθογόνος μύκητας, δρώντας ως βιοτροφικό κατά τα πρώτα στάδια μόλυνσης έως την εγκαθίδρυσή του στο ξυλώδες αγγειακό σύστημα, κατόπιν, μετατρέπεται σε νεκροτροφικό, παράγει πολλαπλά τοξικά προς το φυτό μόρια, καταλήγοντας στον θάνατο του φυτού (Thaler *et al.*, 2004; Veronese *et al.*, 2003). Αυτός ο διττός τρόπος ήταν εμφανής στην έκφραση των γονιδίων άμυνας *PR1* και *PDF1.2* στα φυτά *A. thaliana* στα οποία είχε εφαρμοστεί το μόλυσμα καθώς και τα νεκρά σπόρια του μύκητα *V. dahliae*, εφόσον η έκφραση του γονιδίου *PR1* ήταν υψηλότερη στις 3 ημέρες από την εφαρμογή του μολύσματος σε σύγκριση με τις 7 ημέρες μετά την εφαρμογή του μολύσματος (3dpi και 7dpi), ενώ η έκφραση του γονιδίου *PDF1.2* ήταν υψηλότερη στις 7 ημέρες από την εφαρμογή του μολύσματος σε σύγκριση με τις 3 ημέρες μετά την εφαρμογή του μολύσματος (7dpi και 3dpi). Το αντίθετο μοτίβο έκφρασης μεταξύ των γονιδίων άμυνας *PR1* και *PDF1.2* επιβεβαιώνει επίσης τον υπάρχων ανταγωνισμό μεταξύ των μηχανισμών άμυνας σαλικυλικού οξέος SA και αιθυλενίου/ιασμονικού οξέος ET/JA (Glazebrook, 2005). Αυτός ο ανταγωνισμός μεταξύ των μονοπατιών, προστατεύει τα φυτά από τυχόν αρνητική επίδραση στην ανάπτυξή τους το οποίο προκαλείται από την μετατόπιση παροχής των μεταβολικών αποθεμάτων προς την άμυνα, που σε άλλη περίπτωση θα παρεχόταν προς την ανάπτυξη και την αναπαραγωγή των φυτών (Glazebrook, 2005). Επομένως, η πρώιμη υπέρ-έκφραση του γονιδίου *PR1* ενδέχεται να έχει πολύ σημαντικό ρόλο στην άμυνα του φυτού ενάντια της βιοτροφικής φάσης του παθογόνου, ενώ σε μεταγενέστερο χρόνο η υπέρ-έκφραση του γονιδίου *PDF1.2* ενδέχεται να στοχεύει στην νεκροτροφική φάση του παθογόνου. Κατά το παρελθόν, οι Thaler *et al.*, 2004, αναφέρθηκαν στο σημαντικό ρόλο των αμυνών που εξαρτώνται από το Ιασμονικό οξύ (JA) ενάντια στην ασθένεια που προκαλεί ο μύκητας *V. dahliae*, όπου διαγονιδιακά φυτά τομάτας *def1*, ελλείψει του Ιασμονικού οξέος (JA), παρουσίαζαν μεγαλύτερη ευαισθησία σε προσβολή από τον μύκητα *V. dahliae* σε σύγκριση με τα φυτά τομάτας αγρίου τύπου. Επιπλέον, εξωγενής εφαρμογή σαλικυλικού οξέος (SA) και ενεργοποίηση του μονοπατιού του Ιασμονικού οξέος (JA) προκάλεσε αυξημένη ανθεκτικότητα στα φυτά *A. thaliana* εναντίον του ημι-βιοτροφικού παθογόνου που προκαλεί αδρομύκωση, *Fusarium oxysporum*, το οποίο έχει παρόμοιο τρόπο προσβολής με το παθογόνο που εξίσου προκαλεί αδρομύκωση, *V. dahliae* (Edgar *et al.*, 2006). Ένα κύριο στοιχείο της κυτταρικής μεμβράνης των μυκήτων αποτελεί η χιτίνη. Τα φυτά, έχοντας εξελιχθεί έτσι ώστε να προσαρμόζονται στην παρουσία της χιτίνης στον πιθανό εχθρό-μύκητα, είναι εξοπλισμένα με τον υποδοχέα CERK1 στην πλασματική τους μεμβράνη, όπου προσδένει τη χιτίνη σε συνέργεια με την κινάση LYK5, όπου αποτελεί έναν κύριο υποδοχέα της χιτίνης στα φυτά *A. thaliana* (Petutschnig *et al.*, 2012). Στα πειράματα που πραγματοποιήθηκαν, η προστατευτική δράση των νεκρών σπορίων του μύκητα *V. dahliae* ήταν απύσχα στα

διαγονιδιακά φυτά *cerk1*, δείχνοντας την σημαντικότητα του υποδοχέα CERK1 στην αλληλεπίδραση των φυτών με τα νεκρά σπόρια του μύκητα *V. dahliae* και του μολύσματος που προκάλεσε την ενεργοποίηση των άμυνων. Σε άλλες μελέτες, η εφαρμογή σε φυτά ή σε καλλιέργειες των κυττάρων τους με ολιγομερή χιτίνης προκαλεί πολλαπλές αντιδράσεις της άμυνας, όπως η σύνθεση των PRs και των φυτοαλεξινών (Shibuya *et al.*, 1997). Ενδιαφέρον έχει ότι το CERK1 αφού ταυτοποιήθηκε ως υποδοχέας της χιτίνης, αναγνωρίστηκε και ως υποδοχέας για γλυκάνες απλής αλυσίδας (1,3-b-D-glucans), ένα κύριο στοιχείο του κυτταρικού τοιχώματος των μυκήτων και των οωμυκήτων. Το CERK1 ταυτοποιήθηκε επίσης ως έχοντας ρόλο στην πρόσληψη των βακτηριακών πεπτιδογλυκάνων στα φυτά *Arabidopsis* (*A. thaliana*). Η πεπτιδογλυκάνη ή μουρεΐνη είναι δομικό στοιχείο στο κυτταρικό τοίχωμα των περισσότερων βακτηρίων. Εφόσον η χιτίνη αντιπροσωπεύει μικρότερο μέρος από το κυτταρικό τοίχωμα στους μύκητες σε σύγκριση με τις γλυκάνες, οι γλυκάνες ενδέχεται να έχουν σημαντικότερο ρόλο από ότι η χιτίνη στην παρατηρούμενη προστασία του φυτού ενάντια στον μύκητα *V. dahliae* (Willmann *et al.*, 2011). Κατά κύριο λόγο, τα πιθανά PAMPs που εντοπίζονται από τα φυτά μελιτζάνας και *A. thaliana*, είναι η χιτίνη και οι γλυκάνες. Ένας αξιόλογος διαχωρισμός παρατηρήθηκε μεταξύ των δύο μεθόδων εφαρμογής των νεκρών σπορίων του μύκητα *V. dahliae* στα φυτά. Παρατηρήθηκε υπέρ-έκφραση του *CERK1* στα φυτά στα οποία είχε πραγματοποιηθεί εφαρμογή των νεκρών σπορίων του μύκητα *V. dahliae* με ριζοπότισμα, αφού εφαρμόστηκε το μόλυσμα, ενώ στην περίπτωση της εφαρμογής των νεκρών σπορίων του μύκητα *V. dahliae* με εμβολιασμό στα φύλλα, δεν παρουσιάστηκε υπέρ-έκφραση του *CERK1*. Μία πιθανή αιτιολόγηση για αυτή τη παρατήρηση είναι η αυξημένη διαθεσιμότητα μολύσματος στη περίπτωση της εφαρμογής των νεκρών του μύκητα *V. dahliae* σπορίων με ριζοπότισμα σε σύγκριση με την περίπτωση της εφαρμογής των νεκρών σπορίων του μύκητα *V. dahliae* με εμβολιασμό στα φύλλα. Στη περίπτωση του ριζοποτίσματος εφαρμόστηκαν 10 milliliters από τα νεκρά σπόρια του μύκητα *V. dahliae* ανά φυτό, ενώ στη περίπτωση του εμβολιασμού των φύλλων, εφαρμόστηκαν 20 microliters από τα νεκρά σπόρια του μύκητα *V. dahliae* ανά φυτό. Παρά ταύτα, τα επίπεδα προστασίας των φυτών ήταν στατιστικά όμοια μεταξύ των δύο τρόπων εφαρμογής. Επομένως, τα επίπεδα έκφρασης του *CERK1* δεν επηρέασαν την παρατηρούμενη προστασία των φυτών, κάτι που αποδεικνύει την ανάγκη για λειτουργικό *CERK1* ανεξαρτήτως της έκφρασής του για την ενεργοποίηση της άμυνας εναντίον του μύκητα *V. dahliae*. Συμπερασματικά, τα αποτελέσματα του συγκεκριμένου πειράματος, δείχνουν την δυναμική των νεκρών σπορίων ενός παθογόνου στη προστασία των φυτών ενάντια στην ενεργή μορφή του. Μπορεί να θεωρηθεί ότι η χρήση των πολλαπλασιαστικών κατασκευών του μύκητα *V. dahliae*, μπορούν να προσφέρουν ένα εύρος PAMPs που θα

ενεργοποιήσουν τους μηχανισμούς άμυνας σε περισσότερα είδη φυτών σε σύγκριση με κάποιο μεμονωμένο PAMP. Εφόσον είναι γνωστό ότι μερικά PAMPs εκλαμβάνονται από περιορισμένο αριθμό φυτικών ειδών, ενώ άλλα ενεργοποιούν μηχανισμούς άμυνας σε ευρύτερο φάσμα ειδών, η χρήση των νεκρών σπορίων μπορεί να προσφέρει προστασία σε μεγαλύτερο φάσμα φυτικών ειδών (Zipfel, et al. 2006). Τα αποτελέσματα αποφαίνονται την εμπλοκή του υποδοχέα CERK1 και την ταυτόχρονη ενεργοποίηση των γονιδίων άμυνας των φυτών *PR1* και *PDF1.2*, με τρόπο που αντικατοπτρίζει το βιοτροφικό και νεκροτροφικό τρόπο δράσης του μύκητα *V. dahliae*.

## Βιβλιογραφία - Works Cited

- A., Sherf A. F. and Macnab A. 1986. «Vegetable Diseases and their Control.» 728.
- A., Sherf A. F. and Macnab. 1986. «Vegetable Diseases and their Control.» 728.
- Agrios, G.N. 1997. «Plant Pathology.» 4th edn. San Diego: Academic Press.
- Agrios, G.N. 2005. «Plant Pathology.» 5th edition. San Diego: Academic Press.
- Akira, S., Uematsu, S., Takeuchi, O., 2006. Pathogen recognition and innate immunity. *Cell* 124, 783-801.
- Back, M.A., Haydock, P.P.J. and Jenkinson, P. 2002. «Disease complexes involving plant parasitic nematodes and soilborne pathogens.» *Plant Pathology* 51, 683–697.
- Barbara, D.J. and Clewes, E. 2003. «Plant pathogenic *Verticillium* species: how many of them are there?» *Molecular Plant Pathology* 4 297–305.
- Barnes, E. H., & Barnes, E. H. (1979). *Verticillium wilt*. Atlas and Manual of Plant Pathology, 244-249.
- Bart PHJ Thomma, Iris AMA Penninckx, Bruno PA Cammue, Willem F Broekaert. 2001. «The complexity of disease signaling in Arabidopsis.»
- Bektas, Y., και T. Eulgem. 2015. «Synthetic plant defense elicitors.» *Frontiers in Plant Science* 5, 804.
- Bell, A.A. and Wheeler, M.H. 1986. «Biosynthesis and functions of fungals melanins.» *Annual Review of Phytopathology* 24, 411-451.
- Bell, A.A. 1969. «Phytoalexin production and *Verticillium* wilt resistance in cotton.» *Phytopathology*. 59 1119–1127.
- Bell, A.A., Puhalla, J.E., Tolmsoff, W.J. and Stipanovic, R.D. 1976. «Use of mutants to establish (+)-scytalone as an intermediate in melanin biosynthesis by *Verticillium dahliae*.» *Canadian Journal of Microbiology* 22, 787– 799.
- Benhamou, N. 1995. «Ultrastructural and cytochemical aspects of the response of eggplant parenchyma cells in direct contact with *Verticillium*-infected xylem vessels .» *Physiological and Molecular Plant Pathology*. 46 321–338.
- Berlanger, I. and Powelson M.L. 2000. «*Verticillium* wilt. The Plant Health Instructor.» *American Phytopathological Society*. doi:10.1094/phi-i-2000-0801-01.
- Bhat, R.G. and Subbarao, K.V. 1999. «Host range specificity in *Verticillium dahliae*.» *Phytopathology* 89, 1218–1225.
- Bidochka, M.J., Burke, S. and Ng, L. 1999. «Extracellular hydrolytic enzymes in the fungal genus *Verticillium*: adaptations for pathogenesis.» *Canadian Journal of Microbiology*. 45 856–864.
- Bishop, C.D. and Cooper, R.M. 1983a. «An ultrastructural study of root invasion in three vascular wilt diseases.» *Physiological Plant Pathology* 22, 15–27.
- Bishop, C.D. and Cooper, R.M. 1983b. «An ultrastructural study of root invasion in three vascular wilt diseases I. Colonization of susceptible cultivars.» *Physiological Plant Pathology* 23, 323–343.

- Bolek, Y., El-Zik, K.M., Pepper, A.E., Bell, A.A., Magill, C.W., Thaxton, P.M. and Reddy, O.U.K. 2005. «Mapping of Verticillium wilt resistance genes in cotton.» *Plant Science* 168, 1581–1590.
- Boller, T. and He, S.Y. 2009. «Innate immunity in plants: an arms race between pattern recognition receptors in plants and effectors in microbial pathogens.» *Science* 324, 742–744.
- Bolton, M.D., Thomma, B.P.H.J. and Nelson, B.D. 2006. «Sclerotinia sclerotiorum (Lib.) de Bary: biology and molecular traits of a cosmopolitan pathogen.» *Molecular Plant Pathology* 7, 1–16.
- Bowers, J.H., Nameth, S.T., Riedel, R.M. and Rowe, R.C. 1996. «Infection and colonization of potato roots by Verticillium dahliae as affected by Pratylenchus penetrans and P. crenatus.» *Phytopathology* 86, 614–621.
- Bowers, J.H., Nameth, S.T., Riedel, R.M. and Rowe, R.C. 1996. «Infection and colonization of potato roots by Verticillium dahliae as affected by Pratylenchus penetrans and P. crenatus.» *Phytopathology* 86, 614–621.
- Brinkerhoff, L. A. 1973. «Effects of environment on the pathogen and the disease. In: Verticillium Wilt of cotton.» *Proceedings Work Conference, Aug. 30 – Sept. 1, 1971 National Cotton Pathol. Research Lab., College Stn, Texas* 78-79.
- Buchner, V., Burstein, Y. and Nachmias, A. 1989. «Comparison of Verticillium dahliae -produced phytotoxic peptides purified from culture fluids and infected potato stems.» *Physiological and Molecular Plant Pathology*. 35 253– 269.
- Buchner, V., Nachmias, A. and Burstein, Y. 1982. « Isolation and partial characterization of a phytotoxic glycopeptide from a protein lipopolysaccharide complex produced by a potato isolate of Verticillium dahliae.» *Federation of European Biochemical Societies Letters* 138 261-264.
- Butler, M.J. and Day, A.W. 1998. «Canadian Journal of Microbiology.» *Fungal melanins: a review* 44, 1115–1136.
- Campbell, C.L., και L.V. Madden. 1990. «Introduction to Plant Disease Epidemiology.» *Wiley: New York, NY, USA, 1990*.
- Carder, J.H., Hignett, R.C. and Swinburne, T.R. 1987. «Relationship between the virulence of hop isolates of Verticillium albo-atrum and their in vitro secretion of cell-wall degrading enzymes.» *Physiological and Molecular Plant Pathology*. 31 441–452.
- Chen, P., Lee, B. and Robb, J. 2004. «Tolerance to a non-host isolate of Verticillium dahliae in tomato.» *Physiological and Molecular Plant Pathology* 64, 283–291.
- Church, V.J. and McCartney, H.A. 1995. «Occurrence of Verticillium dahliae on sunflower (Helianthus annuus) in the UK.» *Annals of Applied Biology* 127 49–56.
- Conrath, U., G.J. Beckers, C.J. Langenbach, και M.R. Jaskiewicz. 2015. «Priming for enhanced defense.» *Annual Review of Phytopathology* 2015 53, 97–119.
- Conrath, U., G.J.M. Beckers, V. Flors, P. García-Agustín, G. Jakab, F. Mauch, M.-A. Newman, και ουυ. 2016. «Priming: Getting ready for battle.» *Molecular Plant-Microbe Interactions* 19, 1062–1071.

- Cooper, R.M. and Wood, R.K.S. 1973. «Induction of synthesis of extracellular cell- wall degrading enzymes in vascular wilt fungi.» *Nature*. 246 309–311.
- Cooper, R.M., Resende, M.L.V., Flood, J., Rowan, M.G., Beale, M.H. and Potter, U. 1996. «Detection and cellular localization of elemental sulphur in disease resistant genotypes of *Theobroma cacao*.» *Nature*. 379 159–162.
- Correll, J.C., Gordon, T.R. and McCain, A.H. 1988. «Vegetative compatibility and pathogenicity of *Verticillium albo-atrum*.» *Phytopathology* 78, 1017–1021.
- Czechowski, T., M. Stitt, T. Altmann, M.K. Udvardi, και W.R. Scheible. 2005. «Genome wide identification and testing of superior reference genes for transcript normalization in *Arabidopsis*.» *Plant Physiology* 139 5–17.
- D., Soumyojit. 2017. «Morphological Symptoms of Plant Diseases.» *Botany*.
- Daayf, F., Nicole, M., Boher, B., Pando, A. and Geiger, J.P. 1997. «Early vascular defense reactions of cotton roots infected with defoliating mutant strain of *Verticillium dahliae*.» *European Journal of Plant Pathology*. 103 125–136.
- Daisuke Tamaoki, Shigemi Seo, Shoko Yamada, Akihito Kano, Ayumi Miyamoto, Hodaka Shishido, Seika Miyoshi, Shiduku Taniguchi, Kazuya Akimitsu, and Kenji Gomi. 2013. «Jasmonic acid and salicylic acid activate a common defense system in rice.»
- Dellaporta, S.L., J. Wood, και J.B. Hicks. 1983. «A plant DNA miniprep, version II.» *Plant Molecular Biology Reporter* 1 19–21.
- Denby, L.G. and Woolliams G.E. 1962. «The development of *Verticillium* resistant strains of established tomato varieties.» *Canadian Journal of Plant Science*, 42 681-685.
- Dobinson, K.F., Grant, S.J. and Kang, S. 2004. «Cloning and targeted disruption, via *Agrobacterium tumefaciens*-mediated transformation, of a trypsin protease gene from the vascular wilt fungus *Verticillium dahliae*.» *Current Genetics*. 45 104–110.
- Dobinson, K.F., Lecomte, N. and Lazarovits, G. 1997. «Production of an extracellular trypsin-like protease by the fungal plant pathogen *Verticillium dahliae*.» *Canadian Journal of Microbiology*. 43 227–233.
- Dong, X. 1998. «SA, JA, ethylene, and disease resistance in plants.» *Current Opinion in Plant Biology* 1 316–323.
- Douglas, S. 2008. «*Verticillium* Wilt of Vegetables and Herbaceous Ornamentals.» [www.ct.gov](http://www.ct.gov).
- Edgar, C.I., K.C. McGrath, B. Dombrecht, J.M. Manners, D.C. Maclean, P.M. Schenk, και K. Kazan. 2006. «Salicylic acid mediates resistance to the vascular wilt pathogen *Fusarium oxysporum* in the model host *Arabidopsis thaliana*.» *Australasian Plant Pathology* 35 581-591.
- Engelhard, A.W. 1957. «Host index of *Verticillium albo-atrum* Reinke and Berth. (including *Verticillium dahliae* Kleb.).» *Plant Disease Reporter Suppl.*, 244 23-49.
- Fitzgerald, A., van Kan, J.A.L. and Plummer, K.M. 2004. «Simultaneous silencing of multiple genes in the apple scab fungus, *Venturia inaequalis*, by expression of RNA with chimeric inverted repeats.» *Fungal Genetics and Biology* 41 963–971.
- Fletcher, J.T. 1984. «Diseases of Greenhouse Plants. Longman.» *Ed. London & New York* 351.
- Flexas, J. and Medrano, H. 2002. «Drought-inhibition of photosynthesis in C3 plants: stomatal and non-stomatal limitations revisited.» *Annals of Botany*. 89 183– 189.

- Fradin, E. F., Thomma, B. P. H. J. 2006. «Physiology and molecular aspects of Verticillium wilt diseases caused by *V. dahliae* and *V. albo-atrum*.» *Molecular Plant Pathology*, 7 (2) 71–86.
- Fradin, E.F., El-Haliem, A.A., Masini, L., van den Berg, G.C.M., Joosten, M.H.A.J., and Thomma, B.P.H.J. 2011. «Interfamily transfer of Tomato Ve1 Mediates Verticillium Resistance in Arabidopsis.» *Plant Physiology*. 156(4) 2255- 2265.
- Friebertshausen, G.E. and de Vay, J.E. 1982. «Differential-effects of the defoliating and non-defoliating pathotypes of *Verticillium dahliae* upon the growth and development of *Gossypium hirsutum*.» *Phytopathology*, 72 872– 877.
- G.T., Thanassoulopoulos C.C. and Kitsos. 1972. «Verticillium wilt in Greece.» *Plant Disease Reporter*, 56 264-267.
- Gizi, D., Stringlis, I.A., Tjamos, S.E., Paplomatas, E.J. 2011. «Seedling vaccination by stem injecting a conidial suspension of F2, a non-pathogenic *Fusarium oxysporum* strain, suppresses Verticillium wilt of eggplant.» *Biological Control*. 58 387-392.
- Gkizi, D., S. Lehmann, F. L'Haridon, M. Serrano, E.J. Paplomatas, J.P. Métraux, και S.E. Tjamos. 2016. «The innate immune signaling system as a regulator of disease resistance and ISR activity against *Verticillium dahliae*.» *Molecular Plant-Microbe Interactions* 29 313-323.
- Glazebrook, J. 2005. «Contrasting mechanisms of defense against biotrophic and necrotrophic pathogens.» *Annual Review of Phytopathology* 43 205–227.
- Gold, J. and Robb, J. 1995. «The role of the coating response in *Craigella* tomatoes infected with *Verticillium dahliae*, races 1 and 2.» *Physiological and Molecular Plant Pathology* 47 141–157.
- Gomi, Kenji. 2020. «Jasmonic Acid: An Essential Plant Hormone.»
- Gordee, R.S. and Porter, C.L. 1961. «Structure, germination, and physiology of microsclerotia of *Verticillium albo-atrum*.» *Mycologia*, 53 171–182.
- Gour, H.N. and Dube, H.C. 1985. «Effects of ouabain and phytotoxic metabolites from *Verticillium dahliae* on the cell-membranes of cotton plants.» *Physiological Plant Pathology*. 27 109–118.
- Grayston, S.J., Vaughan, D. and Jones, D. 1997. «Rhizosphere carbon flow in trees, in comparison with annual plants: the importance of root exudation and its impact on microbial activity and nutrient availability.» *Applied Soil Ecology* 5 29–56.
- Gulya, Thomas. 2006. «Sources of Resistance to a New Strain of *Verticillium dahliae* on Sunflower in North America.»
- Harrison, J.A.C. 1971. «Association between the potato-cyst nematode *Heterodera rostochiensis* Woll. and *Verticillium dahliae* Kleb. in the early-dying disease of potatoes.» *Annals of Applied Biology* 67 185–193.
- Hawke, M.A. and Lazarovits, G. 1995. «The role of melanin in the survival of microsclerotia of *Verticillium dahliae*.» *Phytoparasitica* 23, 54.
- Hawksworth, D.L., and Talboys P.W. 1970a. «*Verticillium dahliae* Klebahn. In: C.M.I. Descriptions of pathogenic fungi and bacteria.» *Commonwealth Mycological Institute. Kew No 256*, 2.



- Heale, J.B. and Isaac I. 1965. «Environmental factors in the production of dark resting structures in *Verticillium albo-atrum*, *V. dahliae* and *V. tricorpus*.» *Transactions of the British Mycological Society*, 48 39-50.
- Heinz, R., Lee, S.W., Saparno, A., Nazar, R.N. and Robb, J. 1998. «Cyclical systemic colonization in *Verticillium*-infected tomato.» *Physiological and Molecular Plant Pathology* 52 385– 396.
- Henson, J.M., Butler, M.J. and Day, A.W. 1999. «The dark side of mycelium: melanins of phytopathogenic fungi.» *Annual Review of Phytopathology* 37 447–471.
- Hilker, M., J. Schwachtje, M. Baier, S. Balazadeh, I. Bäurle, S. Geiselhardt, D.K. Hincha, και συν. 2016. «Priming and memory of stress responses in organisms lacking a nervous system.» *Biological Reviews* 91 1118-1133.
- Hillocks, R. J. 1992. «Cotton diseases.» *CABI Publishing* 432.
- Hoffman, T., Schmidt, J.S., Zheng, X.Y. and Bent, A.F. 1999. «Isolation of ethylene-insensitive soybean mutants that are altered in pathogen susceptibility and gene-for-gene disease resistance.» *Plant Physiology*. 119 935–949.
- Horner, C.E. 1954. «Pathogenicity of *Verticillium* isolates to peppermint.» *Phytopathology*, 44 239–242.
- Howard, R.J. and Valent, B. 1996. «Breaking and entering: host penetration by the fungal rice blast pathogen *Magnaporthe grisea*.» *Annu. Rev. Microbiol.* 50 491–512.
- Huang, L.K. and Mahoney, R.R. 1999. «Purification and characterization of an endopolygalacturonase from *Verticillium albo-atrum*.» *Journal of Applied Microbiology*. 86 145–156.
- Huisman, O.C. 1982. «Interrelations of root growth dynamics to epidemiology of root-invading fungi.» *Annual Review of Phytopathology* 20 303–327.
- Huisman, O.C. 1988. «Seasonal colonization of roots of field-grown cotton by *Verticillium dahliae* and *V. tricorpus*.» *Phytopathology*, 78 708–716.
- 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(12), e28341.
- Iris A. M. A. Penninckx, Kristel Eggermont, Peer M. Schenk, Guido Van den Ackerveken, Bruno P. A. Cammue, Bart P. H. J. Thomma. 2003. «The *Arabidopsis* mutant *iop1* exhibits induced over-expression of the plant defensin gene PDF1.2 and enhanced pathogen resistance.»
- Isaac, I. and Keyworth, W.G. 1958. «*Verticillium* wilt of the hop (*Humulus lupulus*). III. A study of the pathogenicity of isolates from fluctuating and from progressive outbreaks.» *Annals of Applied Biology* 35 243–249.
- Isaac, I. 1967. «Speciation in *Verticillium*.» *Annual Review of Phytopathology* 5 201–222.
- Jansky, S., Rouse, D.I. and Kauth, P.J. 2004. «Inheritance of resistance to *Verticillium dahliae* in diploid interspecific potato hybrids.» *Plant Disease*. 88 1075–1078.
- Jiménez-Díaz, R. M., Cirulli, M., Bubici, G., Jiménez-Gasco, M. M., Antoniou, P. P., Tjamos, E. C. 2012. «*Verticillium* Wilt, a major threat to olive production: current status and future prospects for its management.» *Plant Disease*, 96 (3) 304-329.

- Jiménez-Díaz, R.M. and Millar, R.L. 1988. «Sporulation on infected tissues, and presence of airborne *Verticillium albo-atrum* in alfalfa fields in New York.» *Plant Pathology* 37 64–70.
- Jingjun Ruan, Yuexia Zhou, Meiliang Zhou, Jun Yan, Muhammad Khurshid, Wenfeng Weng, Jianping Cheng and Kaixuan Zhang. 2019. «Jasmonic Acid Signaling Pathway in Plants.»
- Johnson, D.A. and Santo, G.S. 2001. «Development of wilt in mint in response to infection by two pathotypes of *Verticillium dahliae* and co-infection by *Pratylenchus penetrans*.» *Plant Disease* 85 1189–1192.
- K., Subbarao. 2020. «*Verticillium dahliae* (verticillium wilt).»
- Katsantonis, D., Hillocks, R.J. and Gowen, S. 2005. «Enhancement of germination of spores of *Verticillium dahlia* and *Fusarium oxysporum* f.sp. *vasinfectum* in vascular fluid from cotton plants infected with the root-knot nematode.» *Phytoparasitica*, 33 215-224.
- Klimes, A. and Dobinson, K.F. 2003. «Functional characterization of a *Verticillium dahliae* hydrophobin gene homologue.» *Canadian Journal of Plant Pathology* 25 321.
- Klosterman, S.J., Z.K. Atallah, G.E. Vallad, και K.V. Subbarao. 2009. «Diversity, pathogenicity, and management of *Verticillium* species.» *Annual Review of Phytopathology* 47 39–62.
- Koike, S.T., Subbarao, K.V., Davis, R.M., Gordon, T.R. and Hubbard, J.C. 1994. «*Verticillium* wilts of cauliflower in California.» *Plant Disease* 78 116–1121.
- Kotcon, J.B. and 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*.» *American Pot Journal*. 61 557–568.
- Lauralee, Sherwood. 2015. «Human Physiology: From Cells to Systems .» 8th Edition 526-538.
- Lee, S.W., Mazar, R.N., Powell, D.A. and Robb, J. 1992. «Reduced PAL gene expression in *Verticillium*-infected resistant tomatoes.» *Plant Molecular Biology*. 18 345–352.
- Ligoxigakis, E.K., Vakalounakis, D.J. and Thanassoulopoulos, C.C. 2002. «Weed hosts of *Verticillium dahliae* in Crete: susceptibility, symptomatology and significance.» *Phytoparasitica*, 30 511–518.
- Liu, T., Z. Liu, C. Song, Y. Hu, Z. Han, J. She, F. Fan, και ουν. 2012. «Chitin-induced dimerization activates a plant immune receptor.» *Science* 336 1160–1164.
- Lu, Hua. 2009. «Dissection of salicylic acid-mediated defense signaling networks.» *Plant Signal Behav.* 2009 Aug; 4(8) 713–717.
- Ludwig, R.A. 1952. «Studies on the physiology of hadromycotic wilting in the tomato plant.» *Macdonald College Technology Bulletin*. 20 1–40.
- Lynch, D.R., Kawchuck, L.M. and Hachey, J. 1997. «Identification of a gene conferring high levels of resistance to *Verticillium* wilt in *Solanum chacoense*.» *Plant Disease*. 81 1001–1014.
- Martinez-Medina, A., V. Flors, M. Heil, B. Mauch-Mani, C.M.J. Pieterse, M.J. Pozo, J. Ton, N.M. van Dam, και U. Conrath. 2016. «Recognizing plant defense priming.» *Trends Plant Science* 21 818–822.
- Martinson, C.A. and Horner C.E. 1962. «Importance of nonhosts in maintaining the inoculum potential of *Verticillium*.» *Phytopathology*, 52 742.
- Martinson, C.A. and Horner E. 1964. «Colonization of plant debris in soil by *Verticillium dahliae*.» *Phytopathology*, 54 900.

- Mauch-Mani, B. and Slusarenko, A.J. 1996. «Production of salicylic acid precursors is a major function of phenylalanine ammonia lyase in the resistance of Arabidopsis to *Peronospora parasitica*.» *Plant Cell*. 8 203–212.
- Miller, P.M. 1975. «Effect of the tobacco cyst nematode, *Heterodera tabacum*, on severity of *Verticillium* and *Fusarium* wilts of tomato.» *Phytopathology*, 65 81–82.
- Miya, A., P. Albert, T. Shinya, Y. Desaki, K. Ichimura, K. Shirasu, Y. Narusaka, N. Kawakami, H. Kaku, και N. Shibuya. 2007. «CERK1, a LysM receptor kinase, is essential for chitin elicitor signaling in Arabidopsis.» *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 104 19613-19618.
- Mussel, H.W. and Strause, B. 1972. «Characterization of two polygalacturonases produced by *Verticillium albo-atrum*.» *Canadian Journal of Biochemistry*. 50 625–632.
- Nachmias, A., Buchner, V. and 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.» *Physiological Plant Pathology* 26 43-55.
- Neumann, M.J. and Dobinson, K.F. 2003. «Sequence tag analysis of gene expression during pathogenic growth and microsclerotia development in the vascular wilt pathogen *Verticillium dahliae*.» *Fungal Genetics and Biology* 38 54–62.
- Newman, M.A., Dow, J.M., Molinaro, A. and Parrilli, M. 2007. «Priming, induction and modulation of plant defense responses by bacteria lipopolysaccharides.» *J. Endotoxin Res.* 13, 69–84.
- Nicaise, V., Roux, M. and Zipfel, C. 2009. «Recent advances in PAMP-triggered immunity against bacteria: pattern recognition receptors watch over and raise the alarm.» *Plant Physiol.* 150, 1638–1647.
- Olsson, S. and Nordbring-Hertz, B. 1985. «Microsclerotial germination of *Verticillium dahliae* as affected by rape rhizosphere.» *FEMS Microbial Ecology* 31 293–299.
- Pantelides, I. S., Tjamos, S. E., Paplomatas, E. J. 2010. «Ethylene perception via ETR1 is required in Arabidopsis infection by *Verticillium dahliae*.» *Molecular Plant Pathology*. 11(2) 191–202.
- 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.» *Biological Control* 50 30-36.
- Pataky, 1997. «*Verticillium* Wilt Disease report on Plant Disease.» *Director of the Plant Disease Clinic, University Of Illinois*.
- Patrik Inderbitzin, Richard M. Bostock, R. Michael Davis, Toshiyuki Usami, Harold W. Platt, Krishna V. Subbarao. 2011. «Phylogenetics and Taxonomy of the Fungal Vascular Wilt Pathogen *Verticillium*, with the Descriptions of Five New Species.» doi:<https://doi.org/10.1371/journal.pone.0028341.g006>.
- Pegg, G.F. and Brady, B.L. 2002. «*Verticillium* Wilts.» *Wallingford, UK: CABI Publishing*.
- Pegg, G.F. and Cronshaw, D.K. 1976. «Relationship of in vitro to in vivo ethylene production in *Pseudomonas solanacearum* infection of tomato.» *Physiological Plant Pathology*. 9 145–154.

- Pegg, G.F. 1965. «Phytotoxin production by *Verticillium albo-atrum* Reinke and Berthold.» *Nature*. 208 1228–1229.
- Pegg, G.F. 1965. «Phytotoxin production by *Verticillium albo-atrum* Reinke and Berthold.» *Nature*. 208 1228–1229.
- Pegg, G.F. 1974. «*Verticillium* diseases.» *Review of Plant Pathology*. 53 157–182.
- Pegg, G.F., Gull, K. and Newsam, R.J. 1976. «Transmission electron microscopy of *Verticillium albo-atrum* hyphae in xylem vessels of tomato plants.» *Physiological Plant Pathology*. 8 221–224.
- Pemberton, C.L. and Salmond, G.P.C. 2004. «The Nep1-like proteins-a growing family of microbial elicitors of plant necrosis.» *Molecular Plant Pathology*. 5 353–359.
- Perry, J.W. and Evert, R.F. 1982. «Structure of microsclerotia of *Verticillium dahliae* in roots of 'Russett Burbank' potatoes.» *Canadian Journal of Botany* 62 396–401.
- Petutschnig, E.K., A.M. Jones, L. Serazetdinova, U. Lipka, και V. Lipka. 2010. «The lysin motif receptor-like kinase (LysM-RLK) CERK1 is a major chitin-binding protein in *Arabidopsis thaliana* and subject to chitin-induced phosphorylation.» *Journal of Biological Chemistry* 285 28902-28911.
- Polychronopoulos, A.G., Houston, B.R. and Lownsbery, B.F. 1969. «Penetration and development of *Rhizoctonia solani* in sugar beet seedlings infected with *Heterodera schachtii*.» *Phytopathology*, 59 482–485.
- Quintana-Rodriguez, E., D. Duran-Flores, M. Heil, και X. Camacho-Coronel. 2018. «Damage-associated molecular patterns (DAMPs) as future plant vaccines that protect crops from pests.» *Scientia Horticulturae* 237 207–220.
- R.J., Threlfall. 1959. «Physiological studies on the *Verticillium* wilt disease of tomato.» *Annals of Applied Biology* 47 57-77.
- Ramakers, C., J.M. Ruijter, R.H. Deprez, και A.F. Moorman. 2003. «Assumption free analysis of quantitative real-time polymerase chain reaction (PCR) data.» *Neuroscience Letters* 339 62–66.
- Rana, M. F. Hussain. 2018. «*Arabidopsis* WRKY50 and TGA Transcription Factors Synergistically Activate Expression of PR1.»
- Rauyaree, P., Ospina-Giraldo, M.D., Kang, S., Bhat, R.G., Subbarao, K.V., Grant, S.J. and Dobinson, K.F. 2005. «Mutations in VMK1, a mitogen-activated protein kinase gene, affect microsclerotia formation and pathogenicity in *Verticillium dahliae*.» *Current Genetics* 48 109-116.
- Rebecca L. Brown, Kemal Kazan, Ken C. McGrath, Don J. Maclean, John M. Manners. 2003. «A Role for the GCC-Box in Jasmonate-Mediated Activation of the PDF1.2 Gene of *Arabidopsis*.» *Plant Physiology*, Volume 132, Issue 2, June 2003 1020–1032.
- Resende, M.L.V., Flood, J. and Cooper, R.M. 1994. «Host specialization of *Verticillium dahliae*, with emphasis on isolates from cocoa (*Theobroma cacao*).» *Plant Pathology* 43 104–111.
- Reymond, P. and Farmer, E. 1998. «Jasmonate and Salicylate as Global Signals for Defense Gene Expression.» *Current Opinion in Plant Biology*, 1 404-411.

- Robb, E.J., Powell, D.A. and Street, P.F.S. 1989. «Vascular coating: a barrier to colonization by the pathogen in Verticillium wilt of tomato.» *Canadian Journal of Botany*. 67 600–607.
- Robb, J., A. Smith, and L. Busch. 1982. «Wilts caused by Verticillium species. A cytological survey of vascular alterations in leaves.» *Canadian Journal of Botany* 60 825-837.
- Rong Fan, Xue Gong, Liqiang Gao, Wenjing Shang, Xiaoping Hu, Xiangming Xu. 2020. «Temporal dynamics of the survival of Verticillium dahliae microsclerotia with or without melanin in soils amended with biocontrol agents.» doi:https://doi.org/10.1007/s10658-020-02014-9.
- Rowe, R.C. and Powelson, M.L. 2002. «Potato early dying: management challenges in a changing production environment.» *Plant Disease* 86 1184–1193.
- Schafer, J.F. 1971. «Tolerance to plant disease.» *Annual Review of Phytopathology*. 9 235–252.
- Schaible, L., Cannon, O.S. and Waddoups, V. 1951. «Inheritance of resistance to Verticillium wilt in a tomato cross.» *Phytopathology*. 41 986–990.
- Schenk, P. M., Kazan, K., Wilson, I., Anderson, J. P., Richmond, T., Somerville, S. C., et al. 2000. «Coordinated plant defense responses in Arabidopsis revealed by microarray analysis.» *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 97 11655–11660.
- Schnathorst, W.C. 1973. «Nomenclature and physiology of Verticillium species, with emphasis on the V. albo-atrum versus V. dahliae controversy. In: Verticillium Wilt of cotton.» *Proc. Work Conf., Aug. 30 – Sept. 1, 1971, National Cotton Pathol. Research Lab., College Stn, Texas* 1-19.
- Schnathorst, W.C. 1965. *Phytopathology*, 53. «Theoretical relationships between inoculum potential and disease severity based on a study of the variation in virulence among isolates of V. albo-atrum.» 1963 888.
- Schnathorst, W.C., Mace, M.E., Bell, A.A. and Beckman C.H. 1981. «Life cycle and epidemiology of Verticillium. In Fungal Wilt Diseases of Plants.» *New York: Academic Press* 81–111.
- Schreiber, L.R. and Green, R.J. Jr. 1963. «Effect of root exudates on germination of conidia and microsclerotia of Verticillium albo-atrum inhibited by the soil fungistatic principle.» *Phytopathology*, 53 260–264.
- Shibuya, N., και E. Minami. 2001. «Oligosaccharide signaling for defense responses in plant.» *Physiological and Molecular Plant Pathology* 59 223–233.
- Simko, I., Haynes, K.G., Ewing, E.E., Costanzo, S., Christ, B.J. and Jones, R.W. 2004. «Mapping genes for resistance to Verticillium albo-atrum in tetraploid and diploid populations using haplotype association tests and genetic linkage analysis.» *Molecular Genomics and Genetics* 271 522-531.
- Sinha, A.K., και R.K.S. Wood. 1968. «Studies on the nature of resistance in tomato plants to Verticillium albo-atrum.» *Annals of Applied Biology* 62 319–327.
- Stacey, G., και N. Shibuya. 1997. «Chitin recognition in rice and legumes.» *Plant Soil* 194 161–169.
- Stipanovic, R.D. and Bell, A.A. 1976. «Pentaketide metabolites of Verticillium dahliae. 3. Identification of (–)-3,4-dihydro-3,8-dihydroxy-1 (2H)-naphthalenone [(–)-vermelone] as a precursor to melanin.» *The Journal of Organic Chemistry* 41 2468–2469.

- Storey, G.W. and Evans, K. 1987. «Interaction between *Globodera pallida* juvenile, *Verticillium dahliae* and three potato cultivars with description of associated histopathologies.» *Plant Pathology* 36 192–200.
- Subbarao, K.V., Chassot, A., Gordon, R.R., Hubbard, J.C., Bonello, P., Mullin, R., Okamoto, D., Davis, R.M. and Koike, S.T. 1995. «Genetic relationships and cross pathogenicities of *Verticillium dahliae* isolates from cauliflower and other crops.» *Phytopathology* 85 1105-1112.
- Talboys, P.W. 1972. «A discussion on disease resistance in plants.» *Proceedings of the Royal Society*, 181 319–332.
- Termorshuizen, A.J, van Rijn, E., van der Gaag, D.J., Alabouvette, C., Chen, Y., Lagerlof, J., Malandrakis, A.A., Paplomatas, E.J., Ramert, B., Ryckeboer, J., Steinberg, C., Zmorana-Nahum, S. 2006. «Suppressiveness of 18 composts against 7 pathosystems variability in pathogen response.» *Soil Biology & Biochemistry* 38 2461-2477.
- Thaler, J.S., Owen, B. and Higgins, V.J. 2004. «The role of the jasmonate response in plant susceptibility to diverse pathogens with a range of lifestyles.» *Plant Physiology*. 135 530–538.
- Thomma, B.P.H.J. 2003. «*Alternaria* spp. from general saprophyte to specific parasite.» *Molecular Plant Pathology* 4 225–236.
- Thomma, B.P.H.J., Eggermont, K., Tierens, K.F.M.J. and Broekaert, W.F. 1999. «Requirement of functional Ethylene-Insensitive 2 gene for efficient resistance of *Arabidopsis* to infection by *Botrytis cinerea*.» *Plant Physiology*. 121 1093–1101.
- Thomma, B.P.H.J., Penninckx, I.A.M.A., Broekaert, W.F. and Cammue, B.P.A. 2001. «The complexity of disease signaling in *Arabidopsis*.» *Current Opinion in Immunology*. 13 63–68.
- Thurrow, C., Krischke, M., Mueller, M. J., and Gatz, C. 2020. «Induction of Jasmonoyl-Isoleucine (JA-Ile)-Dependent JASMONATE ZIM-DOMAIN (JAZ) Genes in NaCl-Treated *Arabidopsis thaliana* Roots Can Occur at Very Low JA-Ile Levels and in the Absence of the JA/JA-Ile Transporter JAT1/AtABCG16.» *Plants* 9(12), 1635.
- Tjamos, E. C., Biris, D. A., and Paplomatas, E. J. 1991. «Recovery of olive trees from *Verticillium* wilt after individual application of soil solarization in established olive orchards.» *Plant Disease*. 75 557-562.
- Tjamos, E.C., D.I. Tsitsigiannis, S.E. Tjamos, P.P. Antoniou, και P. Katinakis. 2004. «Selection and screening of endorhizosphere bacteria from solarised soils as biocontrol agents against *Verticillium dahliae* of solanaceous hosts.» *European Journal of Plant Pathology* 110 35-44.
- Tjamos, S.E., Flietakis, E., Paplomatas, E.J. and Katinakis, P. 2005. «Induction of resistance to *Verticillium dahliae* in *Arabidopsis thaliana* by biocontrol agent K- 165 and pathogenesis-related proteins gene expression.» *Molecular Plant–Microbe Interactions* 18 555-561.
- Tolmsoff, W.J. 1983. «Heteroploidy as a mechanism of variability among fungi.» *Annual Review of Phytopathology* 21 317-400.

- Tolmsoff, W.J. 1973. «Life cycles of Verticillium species. In: Verticillium Wilt of cotton.» *Proceedings Work Conference Aug. 30 – Sept. 1, 1971, National Cotton Pathol. Research Lab., College Stn, Texas.*
- Tzima, A., Paplomatas, E. J., Rauyaree, P., Kang, S. 2010. «Roles of the catalytic subunit of cAMP-dependent protein kinase A in virulence and development of the soilborne plant pathogen Verticillium dahliae.» *Fungal Genetics and Biology.* 47(5) 406–415.
- Tzima, A.K., Paplomatas, E.J., Rauyaree, P., Ospina-Giraldo, M.D., and Kang S. 2011. «VdSNF1, the Sucrose Nonfermenting Protein Kinase Gene of Verticillium dahliae, Is Required for Virulence and Expression of Genes Involved in Cell-Wall Degradation.» *Molecular Plant Microbe Interactions* 24 (1) 129-142.
- Vallad, G.E., Bhat, R.G., Koike, S.T., Ryder, E.J. and Subbarao, K.V. 2005. «Weedborne reservoirs and seed transmission of Verticillium dahliae in lettuce.» *Plant Disease* 89 317–324.
- Veronese, P., M.L. Narasimhan, R.A. Stevenson, J.K. Zhu, και S.C. Weller. 2003. «Identification of a locus controlling Verticillium disease symptom response in Arabidopsis thaliana.» *Plant Journal* 35 574–587.
- Wang, J.-Y., Cai, Y., Gou, J.-Y., Mao, Y.-B., Xu, Y.-H., Jiang, W.-H. and Chen, X.-Y. 2004a. «VdNEP, an elicitor from Verticillium dahliae, induces cotton plant wilting.» *Applied and Environmental Microbiology.* 70 4989–4995.
- Wang, M.C. and Keen, N.T. 1970. «Purification and characterization of endopolygalacturonase from Verticillium albo-atrum.» *Archives of Biochemistry and Biophysics.* 141 749–757.
- Wang, X.K., C.Y. Wang, C.J. Xie, και X.Y. Yang. 2014. «Advances in molecular mechanisms of Verticillium pathogenicity and plant resistance to Verticillium wilt.» *Journal of Henan Agricultural Sciences* 43 1-6.
- Wellman, F.L. 1941. «Epinasty of tomato, one of the earliest symptoms of Fusarium wilt.» *Phytopathology*, 31 281-283.
- Wilhelm, S. 1955. «Longevity of the Verticillium wilt fungus in the laboratory and in the field.» *Phytopathology*, 45 180–181.
- Wilhelm, S., Mace, M.E., Bell, A.A. and Beckman, C.H. 1981. «Sources and genetics of host resistance in field and fruit crops.» *Fungal Wilt Diseases of Plants. Academic Press New York* 299-376.
- Williams, J., Hall, S.A., Hawkesford, M.J., Beale, M.H. and Cooper, R.M. 2002. «Elemental sulfur and thiol accumulation in tomato and defense against a fungal vascular pathogen.» *Plant Physiology.* 128 150–159.
- Willmann, R., H.M. Lajunen, G. Erbs, M.A. Newman, D. Kolb, K. Tsuda, F. Katagiri, και συν. 2011. «Arabidopsis lysin-motif proteins LYM1 LYM3 CERK1 mediate bacterial peptidoglycan sensing and immunity to bacterial peptidoglycan sensing and immunity to bacterial infection.» *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 125 19824-19829.
- Zipfel, C., G. Kunze, D. Chinchilla, A. Caniard, J.D.G. Jones, T. Boller, και G. Felix. 2006. «Perception of the Bacterial PAMP EF-Tu by the receptor EFR restricts Agrobacterium-mediated transformation.» *Cell*, 125 749–760.

- Zipfel, C. 2008. «Pattern-recognition receptors in plant innate immunity.» *Curr. Opin. Immunol.* 20, 10–16.
- Λιγοξυγκάκης, Ε.Κ. 1998. «Μελέτη των Βερτισιλιώσεων των φυτών στη νήσο Κρήτη. Διδακτορική Διατριβή ΑΠΘ»
- Παναγόπουλος, Χ.Γ. 2007. «Αδρομυκώσεις, Ασθένειες Καρποφόρων Δένδρων και Αμπέλου.» *Εκδόσεις Α. Σταμούλης, Αθήνα-Πειραιάς* 206-217.
- Τζάμος, Ε. 2007. «Γενική Φυτοπαθολογία.» *Εκδόσεις Α. Σταμούλης, Αθήνα – Πειραιάς.*