



Τμήμα: Φυτικής Παραγωγής

**Επίδραση ενός μη παθογόνου στελέχους *Fusarium solani* στην έκφραση γονιδίων παθογένειας (PR) στην τομάτα**

---

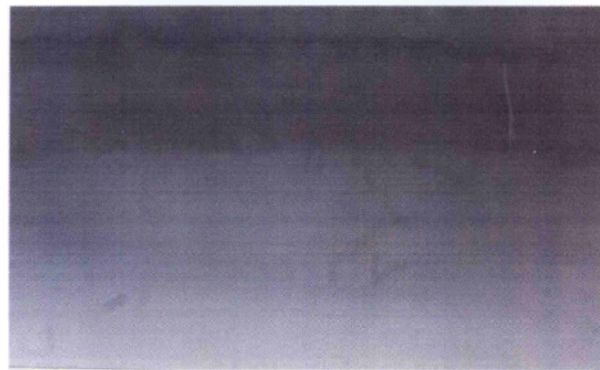
Μπεκρής Φώτιος  
Πτυχιακή Εργασία

---



Τμήμα: Φυτικής Παραγωγής

**Επίδραση ενός μη παθογόνου στελέχους *Fusarium solani* στην έκφραση γονιδίων παθογένειας (PR) στην τομάτα**



Μπεκρής Φώτιος  
Πτυχιακή Εργασία

Εισηγητής: Καβρουλάκης Νεκτάριος



## Ευχαριστίες

Στους Δρ Καβρουλάκη Νεκτάριο & Δρ Παπαδοπούλου Καλλιόπη, για τις πολύτιμες γνώσεις που μοιράστηκαν μαζί μου καθώς και για την βοήθεια και εμπιστοσύνη που επέδειξαν στο πρόσωπο μου κατά την διάρκεια της πτυχιακής μου εργασίας.

| <b>ΠΕΡΙΕΧΟΜΕΝΑ</b>  | <b>Σελ.</b> |
|---|-------------|
| <b>A. ΕΙΣΑΓΩΓΗ</b> .....  | 3           |
| ΜΕΡΟΣ ΠΡΩΤΟ: ΜΗΧΑΝΙΣΜΟΙ ΕΝΔΟΓΕΝΟΥΣ ΑΜΥΝΑΣ ΤΩΝ ΦΥΤΩΝ.....  | 4           |
| A.1 Γενικά.....   | 4           |
| A.2 Εξειδίκευση μηχανισμών άμυνας των φυτών.....  | 5           |
| A.3 Η ΕΠΑΓΟΜΕΝΗ ΑΝΘΕΚΤΙΚΟΤΗΤΑ ΣΤΑ ΦΥΤΑ ΚΑΙ Ο ΡΟΛΟΣ ΤΩΝ ΜΙΚΡΟΟΡΓΑΝΙΣΜΩΝ ΤΗΣ ΡΙΖΟΣΦΑΙΡΑΣ.....   | 7           |
| A.3.1 Παθογόνοι μικροοργανισμοί της ριζόσφαιρας μπορούν να επάγουν αμυντικές αντιδράσεις στις ρίζες.....                                | 7           |
| A.3.2 Διασυστηματική ανθεκτικότητα επαγόμενη από τα ριζοβακτήρια.....   | 8           |
| A.3.3 Επαγόμενη διασυστηματική ανοχή από ριζομύκητες.....   | 10          |
| A.4 Επαγόμενη ανθεκτικότητα στα φυτά και ο ρόλος των <i>compost</i> .....   | 10          |
| A.5 PR Πρωτεΐνες.....   | 11          |
| A.6 PR και ISR.....   | 14          |
| A.6.1 PR-1.....   | 15          |
| A.6.2 PR-5.....   | 15          |
| A.6.3 PR-7 (PR-P69).....  | 16          |
| ΜΕΡΟΣ ΔΕΥΤΕΡΟ.....  | 17          |
| A.1 Οι μύκητες ως φυτοπαθογόνα.....   | 17          |
| A.2 Εδαφικοί φυτοπαθογόνοι μύκητες.....   | 18          |
| A.3 Βιολογική καταπολέμηση των φυτοπαθογόνων μικροοργανισμών.....   | 19          |
| ΜΕΡΟΣ ΤΡΙΤΟ: RT-PCR (Reverse Transcriptase-Polymerase Chain Reaction).....  | 23          |
| A.1 Γενικά.....   | 23          |
| A.2 Πως λειτουργεί;.....  | 23          |
| <b>B. ΥΛΙΚΑ ΚΑΙ ΜΕΘΟΔΟΙ</b> .....   | 25          |
| B.1 Θρεπτικό υλικό ανάπτυξης των μυκήτων που χρησιμοποιήθηκαν.....  | 26          |
| B.2.1 Καλλιέργεια και συνθήκες ανάπτυξης του μη παθογόνου μύκητα ( <i>Fusarium solani</i> ).....  | 26          |
| B.2.2 Καλλιέργεια και συνθήκες ανάπτυξης του παθογόνου μύκητα FORI. ( <i>Fusarium oxysporum</i> f.sp. <i>radicis lycopersici</i> )..... | 26          |
| B.3 Φυτικό υλικό και χειρισμοί πριν τη σπορά-προετοιμασία εδαφικού υποστρώματος.....  | 27          |

|  |           |
|--|-----------|
| B.4 Θρεπτικό διάλυμα φυτών.....  | 28        |
| B.5 Εφαρμογή μόλυνσης-εμβολιασμού των φυτών με τα στελέχη των μυκήτων FORL και FO..... | 28        |
| B.6 Συλλογή φυτικών ιστών δειγμάτων και απομόνωση RNA από τους φυτικούς ιστούς.....    | 29        |
| B.7 Ηλεκτροφόρηση RNA/DNA σε πηκτή αγαρόζης.....                                       | 30        |
| B.8 Υδρόλυση του γονιδιωματικού DNA με την χρήση του ενζύμου DNase.....                | 31        |
| B.9.1 Καθαρισμός των RNA δειγμάτων με την χρήση φαινόλης/χλωροφόρμιου.....             | 31        |
| B.9.2 Κατακρήμνιση νουκλεϊνικών οξέων.....   | 32        |
| B.9.3 Σύνθεση μονόκλωνης συμπληρωματικής αλυσίδας DNA (First Strand Synthesis).....    | 33        |
| B.10 Αλυσιδωτή αντίδραση της πολυμεράσης PCR.....                                      | 33        |
| <b>Γ. ΑΠΟΤΕΛΕΣΜΑΤΑ &amp; ΣΥΖΗΤΗΣΗ.....</b>   | <b>35</b> |
| Γ.1 Ανάπτυξη φυτών -συλλογή υλικού.....  | 36        |
| Γ.2 Έκφραση των γονιδίων που κωδικοποιούν <i>PR</i> πρωτεΐνες στα φύλλα.....           | 37        |
| Γ.3 Έκφραση των γονιδίων που κωδικοποιούν <i>PR</i> πρωτεΐνες στις ρίζες.....          | 39        |
| Γ.4 Συζήτηση.....  | 41        |
| <b>ΒΙΒΛΙΟΓΡΑΦΙΑ.....</b>   | <b>46</b> |

## **Α. ΕΙΣΑΓΩΓΗ**



## ΜΕΡΟΣ ΠΡΩΤΟ

### ΜΗΧΑΝΙΣΜΟΙ ΕΝΔΟΓΕΝΟΥΣ ΑΜΥΝΑΣ ΤΩΝ ΦΥΤΩΝ

#### A.1 Γενικά

Τα φυτά προστατεύονται από μικροβιακές προσβολές χρησιμοποιώντας διάφορους προϋπάρχοντες και επακτούς μηχανισμούς άμυνας..

Η αντίδραση υπερευαισθησίας **HR (HYPERSENSITIVE RESPONSE)** είναι ένας από τους βασικούς μηχανισμούς άμυνας που διαθέτει το φυτό. Στην περίπτωση αυτή λαμβάνει χώρα ταχεία νέκρωση των κυττάρων στην περιοχή που έχει γίνει η προσβολή από τον παθογόνο παράγοντα έτσι ώστε να σταματά έγκαιρα η εξάπλωση της μόλυνσης. Ενεργοποιείται, με άλλα λόγια, ένας μηχανισμός προγραμματισμένου θανάτου προσβεβλημένων κυττάρων ο οποίος αποσκοπεί στην ανακοπή της προσβολής από το παθογόνο. Ολόκληρος ο μηχανισμός βασίζεται στην αλληλεπίδραση του προϊόντος ενός σταθερά εκφραζόμενου φυτικού γονιδίου ανθεκτικότητας (*R*) και του αντίστοιχου, ενός ατοξικού (*Avr*) γονιδίου του παθογόνου.

Πολύ συχνά ως συνέχεια της αντίδρασης υπερευαισθησίας ακολουθεί η ενεργοποίηση μιας αλληλουχίας μηχανισμών άμυνας του φυτού. Η έκφραση γονιδίων άμυνας του φυτού ως αποτέλεσμα της επίδρασης εξωτερικών παραγόντων ονομάζεται επαγόμενη ανθεκτικότητα (Hammerschmidt, 1999). Κατά την επαγόμενη ανθεκτικότητα το φυτό βρίσκεται σε μια κατάσταση υψηλής “αμυντικής ετοιμότητας” για να αντιμετωπίσει δυνητικές προσβολές από παθογόνα (Van Loon, 1997).

Ένας από τους μηχανισμούς αυτούς είναι η τοπικά επίκτητη ανθεκτικότητα **LAR (LOCAL ACQUIRED RESISTANCE)**. Η LAR είναι κατάσταση αυξημένης αμυντικής ετοιμότητας φυτικών ιστών οι οποίοι βρίσκονται σε άμεση επαφή με το σημείο προσβολής. Η LAR μπορεί να εκδηλωθεί με την νέκρωση και ξήρανση του φυτικού ιστού όπως και η αντίδραση υπερευαισθησίας και συνήθως προστατεύει το

φυτό από δευτερογενείς προσβολές του προσβεβλημένου ιστού από μια σειρά άλλων παθογόνων.

Ένας άλλος μηχανισμός προστασίας του φυτού που εκδηλώνεται ως αντίδραση σε κάποια αρχική προσβολή είναι η επίκτητη διασυστηματική ανθεκτικότητα **SAR (SYSTEMIC ACQUIRED RESISTANCE)**. Η SAR εκδηλώνεται, σε αντίθεση με την LAR και σε μέρη του φυτού που βρίσκονται μακριά από την θέση της προσβολής. Κατά συνέπεια αυτή η κατηγορία επαγόμενων μηχανισμών πρέπει να είναι αποτέλεσμα μοριακών σημάτων. Οι μηχανισμοί SAR και LAR είναι φαινομενικά ίδιοι, ωστόσο το σήμα το οποίο παράγεται και μεταφέρεται σε όλο το φυτό κατά τη SAR, δεν υφίσταται στη LAR.

Επαγόμενη ανθεκτικότητα φυτών παρατηρείται και ως αποτέλεσμα της αλληλεπίδρασής τους με μη παθογόνους μικροοργανισμούς. Ο μηχανισμός αντοχής των φυτών ενάντια σε ασθένειες, ο οποίος αναπτύσσεται διασυστηματικά ως αντίδραση σε μη παθογόνα αίτια όπως ριζοβακτήρια ονομάζεται επαγόμενη διασυστηματική ανθεκτικότητα **ISR (INDUCED SYSTEMIC RESISTANCE)**. Όπως και η SAR, η ISR αφορά ακόμα και όργανα του φυτού χωρίς άμεση επαφή με τον επαγωγέα παράγοντα. Μια βασική διαφορά των δύο αυτών τύπων επαγομένης ανθεκτικότητας σχετίζεται με την φύση των μοριακών μονοπατιών σηματοδότησης τα οποία έχουν να κάνουν με ενεργοποίηση των μηχανισμών αυτών.

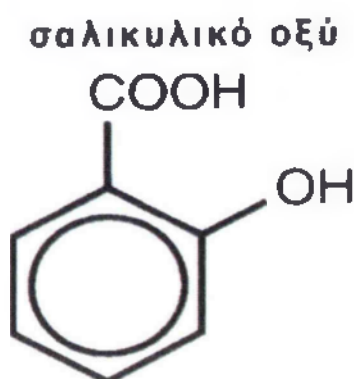
## **A.2 Εξειδίκευση μηχανισμών άμυνας των φυτών**

Η αμυντική ανταπόκριση του φυτού κατά την επαγομένη ανθεκτικότητα ρυθμίζεται από ένα δίκτυο αλληλεπιδρώντων μονοπατιών μεταγωγής σήματος στα οποία το σαλικυλικό οξύ, το ιασμονικό οξύ και το αιθυλένιο διαδραματίζουν κεντρικό ρόλο (Pieterse and Van Loon 1999, Thomma and Penninckx 2001, Glazebrook 2001). Στα μονοπάτια αυτά επίσης πιθανολογείται ότι εμπλέκονται και άλλες φυτορμόνες όπως το αψιζινικό οξύ και οι αυξίνες.

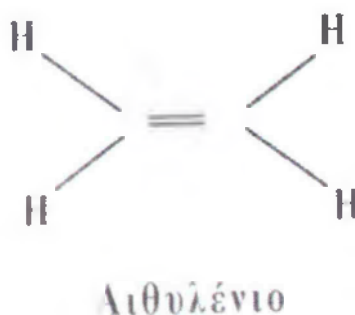
Το σαλικυλικό οξύ, το ιασμονικό οξύ και το αιθυλένιο συσσωρεύονται στα φυτά μετά από προσβολή από παθογόνα ή μετά από ζημιές από ζωικούς εχθρούς και οδηγούν στην ενεργοποίηση διακριτών ή μερικώς επικαλυπτόμενων ομάδων αμυντικών γονιδίων των φυτών (Pieterse and Van Loon, 2004). Θα πρέπει βέβαια να τονισθεί ότι οι περισσότερες πληροφορίες που διαθέτουμε αφορούν το γνωστό φυτό μοντέλο των μοριακών βιολόγων, *Arabidopsis thaliana* και πολλά μένουν να

διευκρινισθούν για τα μονοπάτια επαγομένης ανθεκτικότητας στα φυτά γεωργικού ενδιαφέροντος.

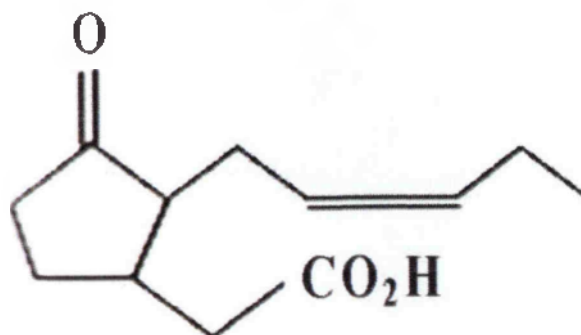
Παρόλα αυτά έχει γίνει σαφές ότι υπάρχει εξειδίκευση των αμυντικών μονοπατιών στα διάφορα παθογόνα. Γενικά, τα υποχρεωτικά παθογόνα θεωρούνται ευαίσθητα σε αμυντικούς μηχανισμούς που εξαρτώνται από το σαλικυλικό οξύ (Ton *et al.*, 2002b). Το σαλικυλικό οξύ θεωρείται ότι συμμετέχει σε μηχανισμούς προγραμματισμένου θανάτου των κυττάρων (apoptosis) ο οποίος οδηγεί σε καταστροφή των μολυσμένων κυττάρων και κατά συνέπεια περιορισμό των υποχρεωτικών παθογόνων. Αντίθετα τα σαπροφυτικά παθογόνα, καθώς και φυταράγα έντομα, αντιμετωπίζονται από τα φυτά με μηχανισμούς άμυνας που εξαρτώνται από το αιθυλένιο και το ιασμονικό οξύ. Για παράδειγμα, η ενεργοποίηση της SA-εξαρτώμενης SAR από το μη μολυσματικό στέλεχος *Pseudomonas syringae* pv. *tomato* προσφέρει επαρκή προστασία στο φυτό *Arabidopsis* έναντι του υποχρεωτικού παθογόνου *Turnip crinkle virus* (Pieterse and Van Loon, 2004).. Από την άλλη μεριά, στο ίδιο φυτό, η JA/ET εξαρτώμενη ISR που ενεργοποιείται από το μη παθογόνο ριζοβακτήριο, *Pseudomonas fluorescences* προσφέρει επαρκή προστασία έναντι του σαπροφυτικού μύκητα *Alternaria brassicicola* όπου ο μηχανισμός επαγόμενης προστασίας SAR είναι ανεπαρκής (Ton *et al.*, 2002b). Η αλληλεπίδραση των παραπάνω μονοπατιών επιτρέπει στα φυτά να ελέγχουν τους ενδογενείς επακτούς μηχανισμούς ανάλογα με το είδος των προσβολών που αντιμετωπίζει κάθε φορά.



Εικ. Α.1 Χημικός τύπος σαλικυλικού οξέος



Εικ. Α.2 Χημικός τύπος αιθυλενίου



## Ιασμονικό οξύ

Εικ. Α.3 Χημικός τύπος ιασμονικού οξέος

### Α.3 Η ΕΠΑΓΟΜΕΝΗ ΑΝΘΕΚΤΙΚΟΤΗΤΑ ΣΤΑ ΦΥΤΑ ΚΑΙ Ο ΡΟΛΟΣ ΤΩΝ ΜΙΚΡΟΟΡΓΑΝΙΣΜΩΝ ΤΗΣ ΡΙΖΟΣΦΑΙΡΑΣ

#### Α.3.1 Παθογόνοι μικροοργανισμοί της ριζόσφαιρας μπορούν να επάγουν αμυντικές αντιδράσεις στις ρίζες

Η άμυνα του φυτού ενάντια στους παθογόνους σχετίζεται με πολλούς μηχανισμούς οι οποίοι μπορούν να έχουν σαν στόχο συγκεκριμένους ή μη παθογόνους οργανισμούς. Αυτοί οι μηχανισμοί περιλαμβάνουν την παραγωγή αντιμικροβιακών μεταβολιτών, την απενεργοποίηση τοξινών και λυτικών ενζύμων που παράγονται από τα παθογόνα, και την επαγωγή αμυντικών αντιδράσεων του ξενιστή οφειλόμενη είτε στο παθογόνο είτε στο ίδιο το φυτό. Διαδικασίες οι οποίες χρησιμεύουν στον ταχύ περιορισμό της ανάπτυξης του παθογόνου στο σημείο της μόλυνσης είναι καταλυτικές για την ανθεκτικότητα έναντι της ασθένειας και περιλαμβάνουν την δημιουργία ελεύθερων ριζών (ROS) οι οποίες προκαλούν τοπική ρήξη και νέκρωση του ιστού. Εξίσου σημαντική είναι η διασυστηματική ανθεκτικότητα που επάγεται από το σαλικυλικό οξύ που παράγεται από τον ξενιστή και παρέχει προστασία στα μη προσβεβλημένα τμήματα του φυτού. Η επαγωγή των μηχανισμών ανθεκτικότητας του ιασμονικού οξέος και του αιθυλενίου επίσης συμβάλουν στην αντοχή έναντι των ασθενειών.

Μόνο ένας μικρός αριθμός βιοχημικών μονοπατιών άμυνας και μηχανισμών ανθεκτικότητας που έχουν περιγραφεί για αλληλεπιδράσεις μεταξύ παθογόνων και φυλλώματος έχουν αναφερθεί μέχρι στιγμής στις ρίζες. Ως αντίδραση στους

σαπροφυτικούς παθογόνους μύκητες, οι ρίζες ενεργοποιούν αμυντικούς μηχανισμούς οι οποίοι εξαρτώνται από το ιασμονικό οξύ και το αιθυλένιο (Devoto and Turner 2003, Turner *et al.*, 2002, Wang *et al.*, 2002), αλλά όχι μηχανισμούς ανθεκτικότητας που να σχετίζονται με το γονότυπο ή την –εξαρτώμενη από το σαλικυλικό οξύ– αντίδραση άμυνας. Η απουσία ισχυρών αντιστάσεων είναι πιθανό να οφείλεται στο ότι οι ρίζες στερούνται επαγωγέων του μονοπατιού του σαλικυλικού οξέος, κατά την προσβολή τους από σαπροφυτικούς μικροοργανισμούς, ωστόσο το γεγονός αυτό μπορεί να αντικατοπτρίζει και τον περιορισμένο αριθμό αλληλεπιδράσεων μεταξύ ρίζας και παθογόνου και τη δυσκολία στην αναγνώριση αλληλεπιδράσεων που σχετίζονται με το γονότυπο στα υπόγεια παθοσυστήματα.

Η αλληλεπίδραση με τους ωομύκητες-παθογόνους της ρίζας έχει διερευνηθεί εκτενέστερα με έμφαση στις αμυντικές αντιδράσεις που επάγονται. Πολλοί από αυτούς τους παθογόνους παράγουν φυτοτοξίνες που παρεμποδίζουν τις πρωτεΐνες παθογένειας (Van West *et al.*, 2003).

### **A.3.2 Διασυστηματική ανθεκτικότητα επαγόμενη από τα ριζοβακτήρια**

Οι Kloepper & Schroth το 1978 ανέφεραν για πρώτη φορά ότι ορισμένα είδη βακτηρίων, τα οποία αποικίζουν το ριζικό σύστημα των φυτών, μπορούν να βοηθήσουν στην ανάπτυξη των φυτών. Τα βακτήρια αυτά που ονομάστηκαν ριζοβακτήρια και προάγουν την αύξηση των φυτών (plant growth-promoting rhizobacteria, PGPR), συντελούν στην καλύτερη ανάπτυξη και λειτουργία του ριζικού συστήματος και κατ' επέκταση και ολόκληρων των φυτών είτε άμεσα με την παραγωγή φυτορμονών είτε έμμεσα με την παρεμπόδιση της ανάπτυξης παθογόνων μέσω ανταγωνισμού για θρεπτικές ουσίες ή μέσω της παραγωγής διαφόρων ενώσεων, όπως αντιβιοτικών, κυανιδίων (ενώσεις τοξικές για τους οργανισμούς), η σιδηροφόρων (ενώσεις με τις οποίες μεταφέρεται ο σίδηρος στα κύτταρα) (Weller 1988, Wei *et al.*, 1996, Van Loon *et al.*, 1998, Zehnder *et al.*, 2000, Pieterse *et al.*, 2001b). Για πολλά από αυτά τα βακτήρια της ριζόσφαιρας έχει προταθεί ότι είναι δυνατόν να ενεργοποιήσουν ενδογενείς μηχανισμούς άμυνας του φυτού. Το φαινόμενο αυτό είναι γνωστό στην διεθνή βιβλιογραφία ως διασυστηματική αντοχή επαγόμενη από ριζοβακτήρια (rhizobacteria-mediated induced systemic resistance) (Lynch & Whipps 1991, Ton *et al.*, 2001).

Είναι γνωστό ότι βακτήρια της ριζόσφαιρας των γενών *Pseudomonas* και *Bacillus*, μπορούν να επάγουν διασυστηματική ανθεκτικότητα (ISR) στα φυτά έναντι

παθογόνων τόσο της ρίζας όσο και των φύλλων (Pieterse and van Loon, 1999). Το φαινόμενο της ISR διαφέρει από αυτό της SAR κυρίως στο ότι δεν είναι αναγκαία η ύπαρξη νεκρωτικών κηλίδων (αντίδραση υπερευαισθησίας) (Liu *et al.*, 1995), συνέπεια της παρουσίας παθογόνου και στην απουσία της διαμεσολάβησης του σαλικυλικού οξέος (SA) κατά την ενεργοποίηση των αυξημένων επιπέδων άμυνας (Chen *et al.*, 1999). Κατά συνέπεια δεν έχουμε την επαγωγή της έκφρασης PR πρωτεϊνών ή οποία όπως θα αναφερθεί παρακάτω συνδέεται με το σαλικυλικό οξύ. Στην περίπτωση της διασυστηματικής αντοχής που επάγεται από ριζοβακτήρια τα επίπεδα αντοχής των φυτών καθορίζονται από τα βιοχημικά μονοπάτια βιοσύνθεσης αντίληψης του ιασμονικού οξέος και του αιθυλενίου (Ton *et al.*, 2002b). Βέβαια πρέπει εξαρχής να τονισθεί ότι τα ακριβή μονοπάτια μεταγωγής σήματος και δημιουργίας ανθεκτικών φυτών διαφέρουν ανάλογα με το φυτό και τον μικροοργανισμό που αλληλεπιδρούν. Επίσης θα πρέπει να τονισθεί ότι οι περισσότερες πληροφορίες που υπάρχουν σχετικά με το φαινόμενο της ISR αφορούν το φυτό-μοντέλο *Arabidopsis* και θα πρέπει να υπάρχει μια σχετική επιφύλαξη σχετικά με την γενικευσή τους σε όλα τα φυτά.

Για παράδειγμα όταν το φυτό-ξενιστής είναι σολανώδες, το σαλικυλικό οξύ φαίνεται να παίζει κάποιο ρόλο στην επαγωγή της ISR στα φύλλα σε ορισμένες τουλάχιστον περιπτώσεις βακτηριακών στελεχών (Audenaert *et al.*, 2002, Maurhofer *et al.*, 1998). Ακόμα η ISR μπορεί να συνοδεύεται από επαγωγή σύνθεσης PR πρωτεϊνών (Maurhofer *et al.*, 1994, Park and Kloepper, 2000) γεγονός που αποτελεί εξαίρεση στον κανόνα. Αντιθέτως, η ISR στα *Arabidopsis* σχετίζεται μόνο με τα βιοχημικά μονοπάτια του ιασμονικού οξέος και του αιθυλενίου αλλά όχι με του σαλικυλικού οξέος.

Η πλειοψηφία των ερευνητών έχει επικεντρωθεί στην μελέτη της ISR μόνο στα φύλλα με αποτέλεσμα πολλές διαδικασίες που διέπουν το φαινόμενο στις ρίζες να παραμένουν αδιευκρίνιστες προς το παρόν. Η επαγωγή της ISR στη ρίζα έχει καταρχήν μελετηθεί στη βάση του βιολογικού ελέγχου των παθογόνων οργανισμών της ρίζας και όχι της διευκρίνησης των βιοχημικών μονοπατιών που εμπλέκονται με αυτήν. Βέβαια στην περίπτωση της ρίζας έχουν προταθεί μηχανισμοί βιολογικού ελέγχου φυτοπαθογόνων οι οποίοι σχετίζονται με την παραγωγή ελεύθερων ριζών στο φυτό ξενιστή (Audenaert *et al.*, 2002), καθώς και με την παραγωγή του αντιμυκητιακού μεταβολίτη 2,4-diacetylphloroglucinol από των ανταγωνιστή οργανισμό (Iavicoli *et al.*, 2003). Έχει ενδιαφέρον ότι στην αγγουριά και το βακτήριο

που δρα ως βιολογικός παράγοντας ελέγχου ενός φυτοπαθογόνου αλλά και ο ίδιος ο φυτοπαθογόνος οργανισμός ενεργοποιούν τα ίδια γονίδια άμυνας (Chen *et al.*, 2000). Ανάλογο φαινόμενο παρατηρείται και στην τομάτα μόνο που αυτή την φορά αφορά μόνο συγκεκριμένα βακτηριακά στελέχη και όχι το σύνολο αυτών που μπορούν να δράσουν φυτοπροστατευτικά (Audenaert *et al.*, 2002).

Μέχρι στιγμής οι μελέτες για την ISR έχουν περιοριστεί κυρίως στα δικότυλα και πολλά πράγματα μένουν να διευκρινιστούν κυρίως για τις διαδικασίες και τα γονίδια που σχετίζονται με την ISR στα υπόγεια τμηματά του.

### **A.3.3 Επαγόμενη διασυστηματική αντοχή από ριζομύκητες**

Ορισμένοι σαπροφυτικοί μύκητες της ριζόσφαιρας του φυτού *Zoysia tenuifolia* βρέθηκε ότι προάγουν την αύξηση του ριζικού συστήματος διαφόρων φυτών και για το λόγο αυτό ονομάστηκαν μύκητες που προάγουν την αύξηση των φυτών (plant growth-promoting fungi, PGPF) (Hyakumachi *et al.*, 1992, Meera *et al.*, 1995, Koike *et al.*, 2001). Στελέχη από τους μύκητες αυτούς δρουν ως παράγοντες βιολογικής αντιμετώπισης διαφόρων εδαφογενών παθογόνων. Η αντοχή των φυτών που επάγεται από τα στελέχη αυτά ονομάστηκε διασυστηματική αντοχή επαγόμενη από μύκητες που προάγουν την αύξηση των φυτών (plant growth-promoting fungi-mediated induced systemic resistance) (Hyakumachi *et al.*, 1992, Meera *et al.*, 1995). Η έρευνα πάνω στους μηχανισμούς που επάγουν την αντοχή αυτή βρίσκεται ακόμα στα αρχικά στάδια.

### **A.4 Επαγόμενη ανθεκτικότητα στα φυτά και ο ρόλος των compost.**

Σχετικά λίγες μελέτες έχουν δημοσιευθεί για την επίδραση των compost σε παθογόνα φυλλώματος και στις οποίες να αναφέρεται μείωση των συμπτωμάτων που ακολουθούν. Έχει, για παράδειγμα, υποστηριχθεί ότι compost τα οποία έχουν προέλθει από παραπροϊόντα βιομηχανίας χαρτιού προστατεύουν φυτά *Arabidopsis thaliana* έναντι του φυτοπαθογόνου βακτηρίου *Pseudomonas syringae* pv *tomato* (Vallad and Goodman, 2004). Επίσης έχει αναφερθεί ότι φυτά τομάτας που αναπτύσσονται σε υποστρώματα εμπλουτισμένα με προϊόντα αερόβιας χώνευσης υπολειμμάτων γεωργικών δραστηριοτήτων εμφανίζουν ανθεκτικότητα έναντι του παθογόνου μύκητα των φύλλων *Septoria lycopersici* (Kavroulakis *et al.*, 2005). Το γεγονός ότι και στις δύο περιπτώσεις το φυτοπαθογόνο δεν έρχεται σε άμεση επαφή με τα compost δείχνει ότι η φυτοπροστατευτική δράση των τελευταίων προϋποθέτει

εμπλοκή του ίδιου του φυτού. Επιπλέον οι Kavrulakis *et al.*, (2005) υποστηρίζουν ότι το ίδιο compost προστατεύει τα φυτά έναντι του παθογόνου εδάφους *Fusarium oxysporum* f.sp. *radicis lycopersici* ενεργοποιώντας ενδογενείς μηχανισμούς άμυνας του φυτού. Πιθανολογείται δηλαδή ότι τα compost ή τουλάχιστον κάποια από αυτά μπορεί να πυροδοτούν ενδογενείς μηχανισμούς άμυνας του φυτού με τρόπο ανάλογο με αυτούς που έχουν περιγραφεί για την επίκτητη διασυστηματική ανθεκτικότητα. Η μεσολάβηση του compost στην πρόκληση ανθεκτικότητας φαίνεται να σχετίζεται με την ενεργοποίηση γονιδίων ανθεκτικότητας των φυτών και με τη συσσώρευση κάποιων ενζύμων, όπως υπεροξειδάσες και β-1,3-γλουκανάσες (Zhang *et al.*, 1998) αν και σε άλλες περιπτώσεις δεν παρατηρείται σημαντική διαφοροποίηση του προτύπου έκφρασης των αντίστοιχων γονιδίων (Kavrulakis *et al.*, 2005). Οι Vallad *et al.*, (2003) προτείνουν επίσης ότι η επαγωγή ανθεκτικότητας στα φυτά μπορεί να σχετίζεται με τη παραγωγή χημικών παραγόντων, όπως σαλικυλικού οξέως και σιδηροφόρων από συγκεκριμένες μικροβιακές ομάδες της μικροχλωρίδας των compost.

Σε κάποιες από τις μελέτες στις οποίες συσχετίζονται τα compost με την διασυστηματική προστασία των φυτών έχει επίσης αναφερθεί η επιδρασή τους στο πρότυπο έκφρασης κάποιων PR γονιδίων. Οι Vallad *et al.*, (2003) αναφέρουν ότι τα compost τα οποία προέρχονται από την αξιοποίηση παραπροϊόντων βιομηχανίας χαρτιού, έχουν την ικανότητα να διαφοροποιούν το πρότυπο έκφρασης της PR1, μιας β-1,3-γλουκανάσης καθώς και της defensin 1.2 στα φύλλα του φυτού *Arabidopsis thaliana*. Στη τομάτα επίσης έχει αναφερθεί ότι ένα compost το οποίο έχει προέλθει από πυρηνόξυλο και στέμφυλλα επηρεάζει το πρότυπο έκφρασης της PR1, PR5 και PR-P69 στη ρίζα της τομάτας (Kavrulakis *et al.*, 2006). Αντίθετα το ίδιο compost δεν φαίνεται να επιδρά στο πρότυπο έκφρασης των PR γονιδίων στα φύλλα της (Kavrulakis *et al.*, 2005).

#### **A.5 PR Πρωτεΐνες**

Το φαινόμενο της SAR έχει συσχετισθεί με πρόωμη αύξηση του ενδογενώς συντιθέμενου από τα φυτά σαλικυλικού οξέος (Sticher *et al.*, 1997) και με μια επακόλουθη ενεργοποίηση της έκφρασης μιας πληθώρας γονιδίων που κωδικοποιούν πρωτεΐνες οι οποίες σχετίζονται με την άμυνα του φυτού. Οι πρωτεΐνες αυτές καλούνται πρωτεΐνες παθογένειας **PR (Pathogenesis Related)** (Van Loon 1997).



Οι PR καθορίζονται σαν πρωτεΐνες που κωδικοποιούνται από το φυτό ξενιστή αλλά επάγονται συγκεκριμένα σε παθολογικές ή σχετιζόμενες καταστάσεις. Η επαγωγή των PR έχει βρεθεί σε πολλά φυτικά είδη που ανήκουν σε πολλές οικογένειες υπαινισόμενες έναν κεντρικό ρόλο για αυτές σε προσαρμογή με βιοτικές καταστάσεις έντασης. Η SAR ομοίως είναι ένα φαινόμενο, η οποία παράγει αύξηση της αμυντικής χωρητικότητας των φυτών και είναι υπεύθυνη για της νεκρωτικές προσβολές. Από τότε που μερικές PR του καπνού αναγνωρίστηκαν ως χιτινάσες και β-1,3-γλουκανάσες με πιθανή αντιμυκητολογική δραστηριότητα, πολύ συχνά είχε προταθεί ότι το σύνολο των PR ίσως είχε επίδραση στο περιορισμό της ανάπτυξης του παθογόνου, στον πολλαπλασιασμό του ή στην διαδοσή του. Το 1994 μια ενοποιημένη ονοματολογία για τις PR προτάθηκε βασιζόμενη στην ομαδοποίησή τους σε οικογένειες οι οποίες μοιράζονται συχνότητες αμινοξέων σειριακά σχετιζόμενες, και /ή ενζυματικές ή βιολογικές δραστηριότητες. Τα κριτήρια που χρησιμοποιήθηκαν για την ένταξη των νέων οικογενειών των PR ήταν τα εξής (1) η πρωτεΐνες πρέπει να επάγονται από ένα παθογόνο στους ιστούς που κάτω από κανονικές συνθήκες δεν επάγουν και (2) η εκφρασή τους θα πρέπει να έχει ανιχνευτεί, δηλαδή να λαμβάνει χώρα σε 2 τουλάχιστον διαφορετικούς συνδυασμούς φυτού-παθογόνου, ή να εκφραστεί σε ένα μοναδικό συνδυασμό φυτού-παθογόνου αλλά θα πρέπει να έχει επιβεβαιωθεί ανεξάρτητα από διαφορετικά εργαστήρια.

**Πιν. Α.1** Οι οικογένειες των PR γονιδίων-πρωτεϊνών

| ΟΙΚΟΓΕΝΕΙΕΣ PR | ΙΔΙΟΤΗΤΕΣ                            |
|----------------|--------------------------------------|
| PR-1           | Άγνωστες                             |
| PR-2           | β-1,3-γλουκανάσες                    |
| PR-3           | Χιτινάση τύπου I, II, IV, V, VI, VII |
| PR-4           | Χιτινάση τύπου I, II                 |
| PR-5           | Πρωτεΐνη που μοιάζει με θαυματίνη*   |
| PR-6           | Παρεμποδιστής πρωτεΐνάσης            |
| PR-7 (PR-P69)  | Ενδοπρωτεΐνάση                       |
| PR-8           | Χιτινάση τύπου III                   |
| PR-9           | Περοξειδάση                          |
| PR-10          | Ριβονουκλεάση                        |
| PR-11          | Χιτινάση τύπου I                     |
| PR-12          | Ντιφενσίνη                           |
| PR-13          | Θειονίονη                            |
| PR-14          | Πρωτεΐνη μεταφοράς λιπιδίων          |

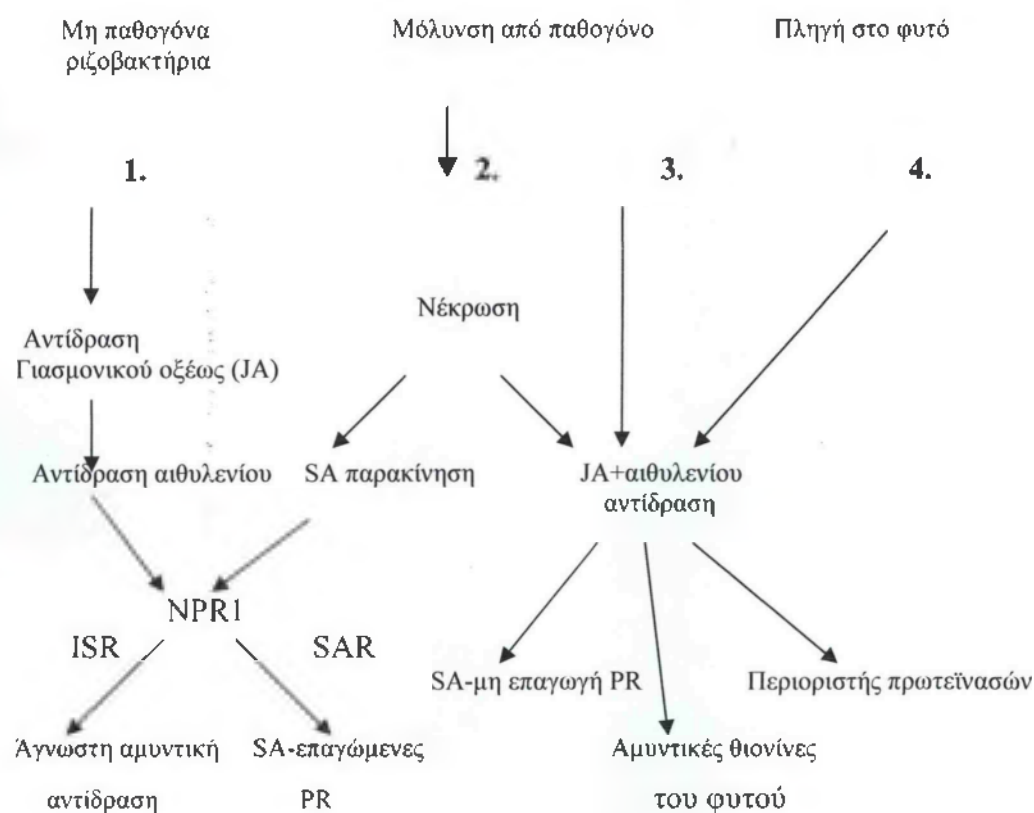
(Van Loon et al., 1999)

\*Δεν είναι πλήρως αποδεδειγμένη ιδιότητα

Εκτός από τις πρωτεΐνες, προσφάτως έχουν προσδιοριστεί ορισμένα mRNA's (cDNAs) ως πρόσθετα μέλη των υπαρχουσών οικογενειών τα οποία επάγονται από παθογόνα ή ειδικούς διεγέρτες. Ομόλογες πρωτεΐνες / mRNA σε υγιείς ιστούς, οι οποίες δεν συντίθενται κατά την προσβολή του φυτικού ιστού από το παθογόνο, ονομάζονται «πρωτεΐνες παρόμοιες με τις πρωτεΐνες παθογένειας» (PR- like proteins, PRLs). Αυτές έχουν εξειδικευμένη έκφραση κατά όργανο και παίζουν ρόλο σε φυσικές αναπτυξιακές διεργασίες (Van Loon and Van Strien 1999). Εκτός από την στενή σχέση των PRs και της SAR, έχουν αναφερθεί παραδείγματα συσσώρευσης PR κατά την έκφραση της ISR. Η επαγωγή των PR σε διαφορετικούς φυτικούς ιστούς αποτελεί ένα από τα μεγαλύτερα βιοχημικά και μοριακά φαινόμενα όταν τα φυτά προσβάλλονται από παθογόνους παράγοντες (Van Loon, 1997).

Η επαγωγή των PR επιτυγχάνεται χάριν, και δια μέσου των πολλών μοριακών σιναλών των στοιχείων των βιοχημικών μονοπατιών άμυνας του φυτού, όπως είναι το σαλικυλικό οξύ (SA), το ιασμονικό οξύ (JA) και το αιθυλένιο, των οποίων η

συνεισφορά στην δημιουργία της ISR και της SAR είναι κάτι παραπάνω από αναγκαία. Άρα και οι PR κατέχουν μια σημαντική θέση στο φαινόμενο αυτό. Επίσης κυτταρολογικές παρατηρήσεις έχουν δείξει ότι η έκφραση και η διανομή των διαφόρων PR γονιδίων-πρωτεϊνών διαφέρει ανάμεσα στους τύπους των κυττάρων που εξετάστηκαν. Άρα είναι αυτονόητο ότι κάθε μια PR διέπεται από διαφορετικούς προαγωγούς και καταστάσεις προσβολής (όχι αναγκαία παθογένειας). Επίσης και ότι η σύνθεση και το είδος των μοριακών σιναλών που υφίσταται σε μια δεδομένη στιγμή το φυτό καθορίζει την ανεκτικότητα του έναντι συγκεκριμένων φυτοπαθογόνων καθώς και την ικανότητά του να παρεμποδίζει περαιτέρω προσβολή του φυτού (Van Wees *et al.*, 1998).



**Εικ. Α.1: Μοντέλο βιοχημικών μονοπατιών άμυνας του φυτού σε περιπτώσεις προσβολής παθογόνου ή μη αιτίου**

## A.6 PR και ISR

Αρχικά η έκφραση των PR γονιδίων είχε συσχετιστεί μόνο με το φαινόμενο της SAR. Σε ορισμένες όμως περιπτώσεις η σύνθεση των PR πρωτεϊνών έχει

σχετισθεί με το φαινόμενο ISR στις οποίες δεν έχουμε απαραίτητα παθογένεση ενώ έχουμε επαγωγή PR πρωτεϊνών. Μια τυπική περίπτωση του συγκεκριμένου φαινομένου αποτελεί η διαφοροποίηση του πρότυπου έκφρασης συγκεκριμένων PR γονιδίων η οποία προκαλείται από συγκεκριμένα είδη φθοριζόντων ειδών του γένους *Pseudomonas* (Pieterse *et al.*, 1996). Βέβαια τελευταία έχει υποστηριχθεί ότι τα βακτήρια αυτά δεν έχουν την ικανότητα διαφοροποίησης του πρότυπου έκφρασης των γονιδίων των φυτών που τα προστατεύουν τουλάχιστον πριν από την προσβολή του παθογόνου (Verhagen *et al.*, 2004). Η εμπλοκή του φαινομένου της ISR έγκειται στο ότι δίνει το έναυσμα για υψηλότερα επίπεδα έκφρασης των συγκεκριμένων γονιδίων σε σύγκριση με τα κανονικά, ως αποτέλεσμα όμως μιας επακόλουθης προσβολής από κάποιο παθογόνο. Το φαινόμενο αυτό είναι γνωστό ως priming και έχει μελετηθεί περισσότερο στα φύλλα (Heil and Bostcock., 2002).

#### **A.6.1 PR-1**

Η PR-1 είναι μία απ' τις χαρακτηριστικές οικογένειες των PR γονιδίων η έκφραση κάποιων μελών της οποίας φαίνεται να σχετίζεται με το φαινόμενο της SAR, επάγεται από παθογόνους ή την SA. Στην τομάτα και τον καπνό οι PR1 πρωτεΐνες ανήκουν σε μικρές πολυγονιδιακές οικογένειες και χωρίζονται σε όξινες και βασικές (VanLoon and Van Strien, 1999). Παρόλο που η έκφραση της PR1 χρησιμοποιείται ως δείκτης για το φαινόμενο της SAR, η ακριβής δράση της δεν έχει ακόμα αποδιασαφηνισθεί. Έχει για παράδειγμα προταθεί ότι στην πατάτα ένας βασικός ισότυπος της PR1 εμφανίζει άμεση παρεμποδιστική δράση τόσο *in vitro* όσο και *in vivo* (Niderman *et al.*, 1995).

#### **A.6.2 PR-5**

Τα γονίδια που κωδικοποιούν την PR5 χωρίζονται σε αυτά που κωδικοποιούν εξωκυτταρικές όξινες και ενδοκυτταρικές βασικές πρωτεΐνες. Οι πρωτεΐνες αυτές θεωρείται ότι προστατεύουν τα φυτά έναντι ωσμωτικών καταπονήσεων, παγετό και προστασία μυκήτων και ωομηκύτων (Campos *et al.*, 2002, Piggott *et al.*, 2004, Rep *et al.*, 2002).

Στα μέλη της οικογένειας PR5 πρωτεϊνών έχουν αποδοθεί διάφορες δράσεις όπως οσμωτινών και παρεμποδιστών της alpha-αμυλάσης. Αν και ο καθορισμένος ρόλος των PR5 στα φυτά παραμένει εν πολλοίς αδιευκρίνιστος, σίγουρα έχουν κάποια σημαντική εμπλοκή στη επίκτητη διασυστηματική ανθεκτικότητα (SAR). Γενικά

θεωρείται ότι παράγονται σαν αποτέλεσμα βιοτικών καταπονήσεων. Πιο συγκεκριμένα θεωρείται ότι προκαλούν ανασχεση της ανάπτυξης των υφών και της βλάστησης των σπορίων, πιθανόν λόγω της διάρρηξης των κυτταρικών μεμβρανών (Campos *et al.*, 2002).

### **A.6.3 PR-7 (PR-P69)**

Η PR-7 (PR-P69) είναι μια πρωτεΐνη με όχι πλήρως αποσαφηνισμένο ρόλο. Έχουν απομονωθεί έξι διαφορετικές ακολουθίες DNA οι οποίες κωδικοποιούν διαφορετικούς ισότυπους της PR-P69 στη τομάτα (Meichtry *et al.*, 1999). Από μελέτες της αμινοξικής ακολουθίας τους προκύπτει ότι μοιάζουν με subtilisins των θηλαστικών οι οποίες έχουν ποικίλες ενζυμικές δράσεις (Tomero *et al.*, 1996). Έχει προταθεί ότι τα μέλη αυτής της οικογένειας γονιδίων κωδικοποιούν πρωτεάσες στις οποίες έχουν αποδοθεί διάφοροι πιθανοί ρόλοι. Πολλοί ερευνητές υποστηρίζουν ότι οι πρωτεΐνες αυτές έχουν άμεση φυτοπροστατευτική δράση αποδομώντας εκκρινόμενες πρωτεΐνες του παθογόνου και συμβάλλουν στην μετάδοση αμυντικών σιναλών με την τροποποίηση ενδογενών πρωτεϊνών του φυτού ή πρωτεϊνών των παθογόνων και συνακόλουθη παραγωγή βιοενεργών πεπτιδίων. Τα μέλη αυτής της οικογένειας εκφράζονται και σταθερά και επακτά. Συγκεκριμένα η έκφραση των γονιδίων που κωδικοποιούν τους ισότυπους P69B ΚΑΙ P69C στην τομάτα, ενεργοποιείται από την παρουσία παθογόνου. Έχει βρεθεί ότι το γονίδιο της P69B και το Epi 1 γονίδιο του μύκητα *P. infestans* συν-ρυθμίζονται και παρουσιάζουν αύξηση των επιπέδων έκφρασής τους κατά την προσβολή της τομάτας από τον φυτοπαθογόνο μύκητα (Tian *et al.*, 2004). Το Epi1 κωδικοποιεί έναν εξωκυττάριο παρεμποδιστή πρωτεασών ο οποίος επιδρά με την πρωτεΐνη παθογένεσης P69B στο χυμοτόπιο του φυτικού κυττάρου (Tian *et al.*, 2004).

## ΜΕΡΟΣ ΔΕΥΤΕΡΟ

### A.1 Οι μύκητες ως φυτοπαθογόνα

Οι μύκητες αποτελούν μια ομάδα μικροοργανισμών που η ύπαρξή τους στο πλανήτη γη χρονολογείται περίπου στα δύο εκατομμύρια χρόνια. Αποτελούν ένα είδος που συνεχίζει την ύπαρξή του δια μέσου των αιώνων μέσω της ικανότητάς τους να προσαρμόζονται στο περιβάλλον και στο να μπορούν με διάφορες λειτουργίες και μηχανισμούς να εξασφαλίζουν τη διαβίωσή τους (συνήθως εις βάρος κάποιου ξενιστή) άρα και την επιβίωση-αναπαραγωγή τους.

Σύμφωνα με τα βασικά μορφολογικά και φυσιολογικά χαρακτηριστικά τους οι μύκητες:

- Είναι ευκαρυωτικοί οργανισμοί.
- Στερούνται χλωροφύλλης (είναι ετερότροφοι).
- Τα κυττάρά τους περιβάλλονται από κυτταρικό τοίχωμα, το οποίο συνίσταται από χιτίνη ή κυτταρίνη ή και από τις δύο.
- Το σώμα τους είναι νηματοειδές, διακλαδιζόμενο ή αμοιβαδοειδές.
- Αναπαράγονται κατά κανόνα με αγενή και σε ορισμένες περιπτώσεις με εγγενή σπόρια.

Ζουν σε ποικιλία υποστρωμάτων και συνθηκών ως παράσιτα ή σαπρόφυτα (Ηλιόπουλος, 2000).

Στους μύκητες ανήκει το σημαντικότερο και πολυπληθέστερο άθροισμα φυτοπαθογόνων μικροοργανισμών. Έχουν περιγραφεί 100.000 είδη που κατατάσσονται σε 2.500 περίπου γένη. Τα περισσότερα από αυτά ζουν σαπροφυτικά στο έδαφος και αλλού, ενώ άλλα είναι παράσιτα κυρίως των φυτών και μερικά του ανθρώπου και των ζώων. Περισσότερα από 8.000 είδη μυκήτων έχουν προσδιοριστεί ως φυτοπαθογόνα. Σχεδόν όλα τα φυτά προσβάλλονται από μερικά είδη μυκήτων. Ορισμένοι φυτοπαθογόνοι μύκητες μπορούν να προσβάλλουν πολλά είδη φυτών, ενώ άλλοι μόνο λίγα είδη. Μερικοί προσβάλλουν μόνο ένα είδος φυτού. Ως σαπρόφυτα, οι μύκητες συμβάλλουν μαζί με τα βακτήρια και άλλους μικροοργανισμούς στη χουμοποίηση και διατήρηση της γονιμότητας του εδάφους. Σχεδόν όλοι οι μύκητες έχουν την ικανότητα αποσύνθεσης

πολύπλοκων οργανικών ουσιών, τις οποίες χρησιμοποιούν ως πηγές ενέργειας. Ενώ άλλοι παρασιτούν ανώτερα φυτά με την ατελή μορφή τους, π.χ *Fusicladium dendriticum* (Φουζικλάδιο μηλιάς) και ζουν σαπροφυτικά με την τέλεια μορφή τους π.χ *Venturia inaequalis* ως Ασκομύκητας.

Μερικά είδη φυτοπαθογόνων μυκήτων παράγουν τοξικές για τα ζώα και τον άνθρωπο ουσίες, καλούμενες μυκοτοξίνες, όπως και στη περίπτωση των αποθηκευμένων σπόρων που κάτω από συνθήκες αυξημένης υγρασίας, μπορεί να προσβληθούν από το μύκητα *Aspergillus flavidus*, ο οποίος παράγει την τοξική ουσία αφλατοξίνη.

## **A.2 Εδαφικοί φυτοπαθογόνοι μύκητες**

Μερικά φυτοπαθογόνα είδη μυκήτων ζουν και αναπαράγονται εντός του εδάφους, προσβάλλοντας κυρίως υπόγεια τμήματα φυτών. οι μύκητες αυτοί ονομάζονται γενικά ως <<μύκητες εδάφους>> και επιβιώνουν υπό μορφή σπορίων, μυκηλίου ή μυκηλιακών κατασκευών στο έδαφος ή σε υπολείμματα φυτών.

Η επιβίωση και ανάπτυξη των παθογόνων, εξαρτάται σε πολύ μεγάλο μέρος από τις συνθήκες περιβάλλοντος, όπως την υγρασία, τη θερμοκρασία, τη διαθεσιμότητα τροφής, παράγοντες που καθορίζουν τη δυνατότητα πρόσληψης της τροφής.

**Πιν. Α.2** Αντιπροσωπευτικά είδη ασθενειών, που οφείλονται σε μύκητες εδάφους (Ηλιόπουλος, 2000).

| Ασθένεια                     | Παθογόνοι μύκητες   | Είδη Φυτών Ξενιστών  |
|------------------------------|---|--|
| Τήξη φυταρίων                | <i>Pythium spp</i><br><i>Rhizoctonia solani</i> .   | Λαχανοκομικά, καπνός, ανθοκομικά, φυτώρια, βαμβάκι κ.α     |
| Σηψιριζίες,<br>Σήψεις λαιμού | <i>Sclerotium rolsfii</i><br><i>Rhizoctonia solani</i><br><i>Fusarium spp.</i><br><i>Phytophthora spp.</i><br><i>Sclerotinia spp.</i> | Λαχανοκομικά, καπνός, ανθοκομικά, φυτώρια, βαμβάκι, σιτηρά |
| Αδρομυκώσεις                 | <i>Fusarium spp</i><br><i>Verticillium dahliae</i><br><i>V. albo-atrum</i>  | Λαχανοκομικά, ανθοκομικά, βαμβάκι, οπωροφόρα               |

### **Α.3 Βιολογική καταπολέμηση των φυτοπαθογόνων μικροοργανισμών**

Η βιολογική αντιμετώπιση ασθενειών πρέπει να θεωρείται ως μια επιστήμη που στηρίζεται στις αρχές της φυτοπαθολογίας, οικολογίας, ταξινόμησης, μικροβιολογίας εδάφους, μορφολογίας-κυτταρολογίας-φυσιολογίας φυτών, γενετικής μικροοργανισμών, μοριακής βιολογίας και βιοχημείας. Λαμβάνει χώρα πάνω στο φυτό, μέσα ή ακόμα και μακριά από αυτό. Αποτελεί επιστημονικό πεδίο έρευνας σπουδαίο και χρήσιμο για την ανεύρεση μακροπρόθεσμων λύσεων κατά τη στρατηγική αντιμετώπισης διαφόρων ασθενειών των φυτών (Cook, 1985).

Η βιολογική αντιμετώπιση των ασθενειών αφορά στη χρήση κάθε οργανισμού που θα καταστείλει το παθογόνο. Στο βιολογικό αυτό φαινόμενο συμπεριλαμβάνεται και η ανθεκτικότητα του ξενιστή-φυτού, αποτελώντας ένα από τα πιο δραστικά εργαλεία βιολογικής αντιμετώπισης ασθενειών (Cook, 1985).



Η καταστολή των ασθενειών με τη χρήση παραγόντων βιολογικής αντιμετώπισης είναι η εκδήλωση αλληλεπιδράσεων μεταξύ του φυτού και του φυσιικού περιβάλλοντος (Handelsman *et al.*, 1996).

Κατά τον Cook (1985): οι προσεγγίσεις της βιολογικής αντιμετώπισης μπορούν να διαχωριστούν στις εξής φάσεις:

- Βιολογική αντιμετώπιση του παθογόνου μολύσματος με τις κατάλληλες καλλιεργητικές τεχνικές όπως π.χ αμειψισπορά, άροση
- Βιολογική αντιμετώπιση με ενίσχυση και ενδυνάμωση της φυτικής επιφάνειας ενάντια στα παθογόνα με την εγκατάσταση σε αυτήν κατάλληλων ανταγωνιστών
- Επαγωγή αντοχής στις ασθένειες των φυτών

Για την επίτευξη της δραστικότερης αποτελεσματικότητας των ανταγωνιστών πρέπει να προωθείται: πρώτον, η αύξηση των ήδη υπάρχοντων ανταγωνιστών, που επιζούν στο έδαφος ή καταστέλλουν με το πληθυσμό τους το παθογόνο ή έστω η μη διαταραχή αυτών, και δεύτερον, ο εντοπισμός ή η ανάπτυξη ανώτερων ανταγωνιστών ώστε να εγκατασταθούν στο έδαφος ή να εμβολιασθούν στο φυτό (Cook, 1985).

Προσπάθειες για τη χρησιμοποίηση βακτηρίων ως βιολογικοί ανταγωνιστές έχουν ξεκινήσει από τις αρχές του αιώνα. Το ενδιαφέρον στο πεδίο αυτό αυξήθηκε ιδιαίτερα στα μέσα της δεκαετίας του '60, όπου και ξεκίνησαν πλήθος πειραματικών εφαρμογών σε συνθήκες αγρού. Τα βακτήρια της ριζόσφαιρας με ικανότητα να παρέχουν βιολογική αντιμετώπιση ασθενειών είναι λιγότερο από 10% από το συνολικό πληθυσμό των ριζοβακτηρίων.

Μια βασική αρχή για την επιλογή του κατάλληλου ανταγωνιστικού βακτηρίου είναι ότι τα επιλεγόμενα βακτηριακά στελέχη πρέπει να χρησιμοποιούνται σε εδάφη με παρόμοιες εδαφοκλιματικές συνθήκες με αυτές που επικρατούν στα εδάφη από τα οποία απομονώθηκαν.

Απομονώνοντας στελέχη από επισχετικά εδάφη έχουμε αυξημένες πιθανότητες στην εύρεση δυνητικά ανταγωνιστικών βακτηρίων. Σημειώνεται ότι, δεν υπάρχει συσχέτιση μεταξύ της ικανότητας ενός βακτηρίου στο να αναπτύσσει ζώνη

παρεμπόδισης στο παθογόνο *in vitro* και της καταστολής της ασθένειας από το ίδιο παθογόνο στον αγρό. Στελέχη που δημιουργούν τη μεγαλύτερη ζώνη παρεμπόδισης στο τρυβλίο δεν είναι πάντα και οι καλύτεροι βιολογικοί ανταγωνιστές. Εξυπακούεται ότι κάθε στέλεχος πρέπει να δοκιμάζεται και σε πειράματα θερμοκηπίου. Βασικοί παράμετροι σε αυτή την περίπτωση είναι οι συνθήκες του περιβάλλοντος, το ποσό μολύσματος του παθογόνου και η δόση του ανταγωνιστικού βακτηρίου (Weller, 1988). Σημαντική προϋπόθεση των βιολογικών ανταγωνιστών σε παθογόνα εδάφους είναι να αποτελούν δυνητικούς αποικιστές της ριζόσφαιρας ή της σπερμόσφαιρας- και να υπάρχει αμοιβαία προστασία μεταξύ ξενιστή παθογόνου (Fravel, 1991).

Όσον αφορά στα ενδοφυτικά βακτήρια, μάλλον σχετίζονται στενά με τα φυτά-ξενιστές μέσω των διαδικασιών της εξέλιξης επηρεάζοντας τη φυσιολογία του φυτού. Η μοναδική τους ικανότητα να επιζούν μέσα στο φυτό αποφεύγοντας το μικροβιακό ανταγωνισμό τα καθιστά αξιόλογους βιολογικούς παράγοντες (Misaghi, 1990).

Η βιολογική δράση των ανταγωνιστικών βακτηρίων εξαρτάται από την εγκατάσταση και διατήρηση του βακτηριακού πληθυσμού σε ένα επίπεδο στη ριζόσφαιρα, όπου θα προσφέρει τη δυνατότητα της αντιμετώπισης του παθογόνου. Πάρα πολλοί εδαφικοί παράγοντες επηρεάζουν την επιβίωση και εγκατάσταση των βακτηρίων και τις αλληλεπιδράσεις τους με το παθογόνο. Ο τρόπος με τον οποίο τα βακτήρια καλλιεργούνται και στη συνέχεια εφαρμόζονται *in vivo* μπορεί να επηρεάζει τη βιωσιμότητά τους και την αντοχή τους στις αντίξοες συνθήκες που επικρατούν κατά την εφαρμογή τους στο έδαφος. Μικρότερο κίνδυνο έχουν οι βάκιλλοι λόγω της αντοχής που τους προσδίδει η παραγωγή ενδοσπορίων (Weller, 1988).

Σύμφωνα με τη Fravel (1991), ο αποτελεσματικός συνδυασμός μεταξύ του συγκεκριμένου βιολογικού ανταγωνιστή και του παθογόνου εδάφους εξαρτάται από δύο παράγοντες: Πρώτον, ο μηχανισμός δράσης του ανταγωνιστή να υιοθετηθεί και να επενεργήσει στο συγκεκριμένο σύστημα, και δεύτερον, η συγκεκριμένη χρονική στιγμή και οι περιβαλλοντολογικές συνθήκες που θα επιλεγθούν για να εφαρμοστεί ο ανταγωνιστής, να συμπίσει με τη σωστή στιγμή στη διάρκεια του βιολογικού κύκλου της ασθένειας.

Έχει αποδειχθεί ότι μεγάλο πλήθος βιολογικών δραστηριοτήτων παίρνουν μέρος για τη βιολογική καταστολή της ασθένειας. Σε αυτές συμπεριλαμβάνονται η ικανότητα αποίκησης του κατάλληλου ξενιστή και η παραγωγή ανταγωνιστικών

ενώσεων, όπως αντιβιοτικά, τοξινών, σιδηροφόρων, αμμωνία, κυανιδίνη, υδρολυτικά ένζυμα και παρασιτισμός. Επίσης τα ανταγωνιστικά βακτήρια μπορούν να προστατεύσουν το φυτό μέσω της επαγωγής των μηχανισμών αντοχής του φυτού, απαλοιφή των σημάτων που προωθούν την ανάπτυξη του παθογόνου ή να ανταγωνιστούν σε θρεπτικά στοιχεία (Baker, 1968, Lam *et al.*, 1993, Thomashow *et al.*, 1996).

## **ΜΕΡΟΣ ΤΡΙΤΟ**

### **RT-PCR**

#### **(Reverse Transcriptase-Polymerase Chain Reaction)**

##### **A.1 Γενικά**

Το RT-PCR είναι μια τεχνική της μοριακής βιολογίας η οποία επιτρέπει την ανίχνευση συγκεκριμένων RNA καθώς και την εκτίμηση της σχετικής ποσότητας. Κατά συνέπεια, εάν το RNA που μας ενδιαφέρει είναι mRNA η μέθοδος του RT-PCR μας επιτρέπει να εξετάσουμε εάν το αντίστοιχο γονίδιο έχει κωδικοποιηθεί σε ένα υπ' εξέταση βιολογικό δείγμα. Η μέθοδος χρησιμοποιείται εκτεταμένα στην βασική βιολογική έρευνα αλλά έχει και ορισμένες πρακτικές εφαρμογές. Μια κλασική εφαρμογή της μεθόδου είναι η ανίχνευση των RNA ιών σε φυτικούς και ζωικούς ιστούς. Το RT-PCR χρησιμοποιείται και στο πεδίο των γενετικά τροποποιημένων οργανισμών, διότι δίνει στους ερευνητές έναν τρόπο να ελέγξουν εάν ένα γονίδιο είναι εκφραζόμενο σε ένα διαγονιδιακό οργανισμό. Επεκτείνοντας την παραπάνω εφαρμογή είναι δυνατόν με το RT-PCR να ελεγχθεί κατά πόσο ένας οργανισμός είναι γενετικά μετασχηματισμένος ή όχι.

##### **A.2 Πως λειτουργεί;**

Το RT-PCR επιτρέπει, όπως αναφέρθηκε παραπάνω, την ανίχνευση και την εύρεση της ποσότητας του RNA σε ένα δείγμα.

Το πρώτο βήμα της μεθόδου είναι η ανάστροφη μεταγραφή (reverse transcription) του RNA σε μια συμπληρωματική μονόκλωνη αλυσίδα DNA. Η αντίδραση αυτή καταλύεται από ένα ένζυμο γνωστό ως ανάστροφη μεταγραφάση (reverse transcriptase). Το ένζυμο αυτό χρησιμοποιείται από τους ρετροϊούς σε στάδιο του βιολογικού τους κύκλου που αποτελεί μια εξαίρεση στο βασικό δόγμα της βιολογίας. Η ανάστροφη μεταγραφάση χρειάζεται προκειμένου να δράση ένα 3' άκρο (ελεύθερο υδροξύλιο) το οποίο εξασφαλίζεται με το υβριδισμό ενός μονόκλωνου ολιγονουκλεοτιδίου πάνω στην μονόκλωνη αλυσίδα RNA. Το ολιγονουκλεοτίδιο αυτό μπορεί να είναι τυχαίο εξαμερές μπορεί όμως και να έχει σχεδιαστεί έτσι ώστε να υβριδίζει εξιδικευμένα στον επιθυμητό RNA στόχο. Το polyT ολιγονουκλεοτίδιο που χρησιμοποιείται σε ορισμένες εφαρμογές ανάστροφης μεταγραφής εξασφαλίζει

ότι μόνο τα mRNA θα μεταγραφούν και χρησιμοποιούνται κυρίως σε περιπτώσεις όπου μελετάται η έκφραση γονιδίων σε ευκαρυωτικούς οργανισμούς. Τέλος μπορούν να χρησιμοποιηθούν και εκκινητές σχεδιασμένοι ειδικά για συγκεκριμένα γονίδια τα οποία είναι υπό μελέτη.

Το προϊόν της αντίδρασης αναλύεται σε πηκτή αγαρόζης και στην συνέχεια η ένταση της ζώνωσης σχετίζεται με τα επίπεδα έκφρασης του γονιδίου.

## **B. ΥΛΙΚΑ ΚΑΙ ΜΕΘΟΔΟΙ**

## **B.1 Θρεπτικό υλικό ανάπτυξης των μυκήτων που χρησιμοποιήθηκαν**

Η σύνθεση των θρεπτικών υλικών τα οποία χρησιμοποιήθηκαν στην παρούσα εργασία, ήταν η ακόλουθη (Πίνακας Β.1).

### **Πιν. Β.1**

|                             |  |
|-----------------------------|--|
| PDB (Potato Dextrose Broth) | Potato Dextrose Broth<br>(Scharlau Microbiology) 24 gr/lit,                  |
| PDA (Potato Dextrose Agar)  | Potato Dextrose Broth (Scharlau<br>Microbiology) 24 gr/lit., Agar 1,7 % κ.β. |

Το θρεπτικό διάλυμα αποστειρώθηκε σε υγρή αποστείρωση στους 121°C για 20 λεπτά και υπό πίεση 1,1 Atm.

### **B.2.1 Καλλιέργεια και συνθήκες ανάπτυξης του μη παθογόνου μύκητα *Fusarium solani***

Το μη παθογόνο στέλεχος του μύκητα *Fusarium solani* που χρησιμοποιήθηκε στην παρούσα εργασία διατηρείται στους 4°C σε τριβλία με θρεπτικό υλικό PDA (Potato Dextrose Agar). Για την παραγωγή κονιδίων χρησιμοποιήθηκαν υγρές καλλιέργειες του μύκητα σε θρεπτικό υλικό PDB (Potato Dextrose Broth). Οι φιάλες με τον μη παθογόνο μύκητα επωάζονταν στους 25 °C για τέσσερις ημέρες με ανάδευση (150 στρ/min). Η απομόνωση των κονιδίων του μύκητα γίνεται μετά από διήθηση της καλλιέργειας μέσα από τουλουπάνι και φυγοκέντρηση στις 3000 στρ/λεπτό. Τα κονίδια επαναεωρούνται σε φυσιολογικό ορό (0,85% NaCl) προκειμένου να μην έχουμε φαινόμενα σπαργής. Η συγκέντρωση των κονιδίων προσδιορίστηκε με την χρήση του αιματοκυτόμετρου.

### **B.2.2 Καλλιέργεια και συνθήκες ανάπτυξης του παθογόνου μύκητα FORL (*Fusarium oxysporum* f.sp. *radicis lycopersici*)**

Επίσης χρησιμοποιήθηκε το στέλεχος του παθογόνου μύκητα *Fusarium oxysporum* f.sp. *radicis lycopersici*. CBS 101587 (Central Bureau voor Schimmelcultures, Baam The Netherlands). Ο μύκητας διατηρείτο σε στερεό τεχνικό υλικό PDA (Potato Dextrose Agar) στους 4°C. Για την παραγωγή κονιδίων χρησιμοποιήθηκαν υγρές καλλιέργειες του μύκητα σε θρεπτικό υλικό PDB (Potato Dextrose Broth) ο μύκητας καλλιεργήθηκε για 4 ημέρες στο θάλαμο ανάπτυξης υπό

συνεχή ανάδευση στις 150 στροφές/λεπτό και σε θερμοκρασία 25°C. Η μέτρηση της συγκέντρωσης των κονιδίων γινόταν και εδώ όπως και στην καλλιέργεια του *Fusarium solani*. Γίνεται δηλαδή διήθηση της καλλιέργειας μέσα από τουλουπάνι και φυγοκέντρηση στις 3000 στρ/λεπτό. Τα κονίδια επαναεωρούνται σε φυσιολογικό ορό (0,85% NaCl) και η συγκέντρωσή τους προσδιορίστηκε με την χρήση του αιματοκυτόμετρου.

### **B.3 Φυτικό υλικό και χειρισμοί πριν τη σπορά-προετοιμασία εδαφικού υποστρώματος**

Οι σπόροι τομάτας που χρησιμοποιήθηκαν στο πείραμα ήταν ποικιλίας ACE55. Μεσοπρώιμη ποικιλία, παραγωγική, κατάλληλη για υπαίθριες καλλιέργειες. Φυτό ζωηρό, μέτριας ανάπτυξης με καρπούς σχεδόν στρογγυλούς λίγο πεπλατυσμένους, μεγάλου μεγέθους 200-250 gr. (Δημητράκης 1998).

Οι σπόροι πριν την φυτευσή τους απολυμάνθηκαν για πέντε λεπτά σε υποχλωριώδες νάτριο (χλωρίνη εμπορίου) 5% και στη συνέχεια ξεπλύθηκαν σχολαστικά με αποστειρωμένο νερό και αφέθηκαν να στεγνώσουν για δέκα λεπτά πάνω σε διηθητικό χαρτί.

Στο πείραμα χρησιμοποιήθηκε τύρφη (Peat moss, Sunu Kura, Seda joint-Stock company) στην οποία γίνονταν ρύθμιση του pH με προσθήκη CaCO<sub>3</sub> (2% κ.β.). Η τύρφη ενυδατώθηκε και εμπλουτίστηκε με θρεπτικά στοιχεία, με την προσθήκη υδατοδιαλυτού λιπάσματος (20-20-20) σε ποσότητα 0,32 gr ανά φυτοδοχείο (όγκου 300 cm<sup>3</sup>). Μετά την σπορά τα φυτοδοχεία τοποθετήθηκαν σε θάλαμο ανάπτυξης φυτών σε θερμοκρασία κατάλληλη (25 ή 17 °C) και φωτοπερίοδο 16 ωρών. Τα φυτά ποτίζονταν με πλήρες θρεπτικό διάλυμα μία φορά την εβδομάδα. Η σύσταση του θρεπτικού διαλύματος που χρησιμοποιήθηκε φαίνεται στον πίνακα B.2.



#### **B.4 Θρεπτικό διάλυμα φυτών**

Η σύνθεση του θρεπτικού διαλύματος σε 1 lt απιονισμένου νερού ήταν η ακόλουθη (Πίνακας B.2).

#### **Πιν. B.2**

##### Θρεπτικό διάλυμα φυτών

|  |               |
|--|---------------|
| MgSO <sub>4</sub> .7M <sub>2</sub> O                 | 0,2 gr / lt   |
| KM <sub>2</sub> PO <sub>4</sub>                      | 0,27 gr / lt  |
| KNO <sub>3</sub>                                     | 0,2 gr / lt   |
| K <sub>2</sub> SO <sub>4</sub>                       | 0,1 gr / lt   |
| Ca(NO <sub>3</sub> ) <sub>2</sub> .4M <sub>2</sub> O | 0,7 gr / lt   |
| Fe EDTA  | 0,025 gr / lt |
| Διαλύματα ιχνοστοιχείων                              | 0,015% κ.ο    |

##### Διάλυμα ιχνοστοιχείων

|                                      |              |
|--------------------------------------|--------------|
| M <sub>3</sub> BO <sub>3</sub>       | 7,5 gr / lt  |
| MnCl <sub>2</sub> .4H <sub>2</sub> O | 6,7 gr / lt  |
| CuCl <sub>2</sub> .2H <sub>2</sub> O | 0,37 gr / lt |
| MoO <sub>3</sub>                     | 0,15 gr / lt |
| ZnSO <sub>4</sub> .4H <sub>2</sub> O | 1,18 gr / lt |

Τα φυτοδοχεία με τα φυτά ντομάτας ποτίζονταν με το θρεπτικό διάλυμα φυτών μια (1) φορά την εβδομάδα.

#### **B.5 Εφαρμογή μόλυνσης-εμβολιασμού των φυτών με τα στελέχη των μυκήτων FORL και FO.**

Τα φυτοδοχεία χωρίστηκαν σε 8 ομάδες (των τριών επαναλήψεων) οι τέσσερις προορίζονταν για συλλογή φυτικού υλικού 7 ημέρες μετά την μόλυνση με το παθογόνο και οι άλλες τέσσερις για συλλογή 14 ημέρες μετά την μόλυνση. Σε κάθε μια από αυτές τις τετράδες γίνονταν τέσσερις διαφορετικοί χειρισμοί.

Οι χειρισμοί αυτοί ήταν:

Τα φυτά της Α ομάδας εμβολιάστηκαν μόνο με τον ανταγωνιστή μύκητα *Fusarium solani* μια εβδομάδα μετά τη σπορά (συγκέντρωση κονιδίων στο υπόστρωμα της τύρφης:  $10^5$  /cm<sup>3</sup>).

Τα φυτά της Β ομάδας δεν εμβολιάστηκαν με κανένα μύκητα και αποτέλεσαν τον μάρτυρα.

Τα φυτά της Γ ομάδας εμβολιάστηκαν με τον ανταγωνιστή μύκητα *Fusarium solani* μια εβδομάδα μετά τη σπορά (συγκέντρωση κονιδίων:  $10^5$  /cm<sup>3</sup> υποστρώματος). Επτά ημέρες μετά, όπου περίπου εμφανίζεται το πρώτο πραγματικό φύλλο, πραγματοποιήθηκε η μόλυνση με τον παθογόνο μύκητα *Fusarium oxysporum* f.sp. *radicis lycopersici* (FORL) έτσι ώστε η τελική συγκέντρωση κονιδίων στο υπόστρωμα να είναι  $10^7$  /cm<sup>3</sup> τύρφης.

Τα φυτά της Δ ομάδας μολύνθηκαν μόνο με τον παθογόνο μύκητα FORL όταν βρίσκονταν στο στάδιο του πρώτου πραγματικού φύλλου (δηλ 14 ημέρες μετά την σπορά). Η συγκέντρωση των κονιδίων του FORL ήταν και αυτή την περίπτωση  $10^7$  /cm<sup>3</sup> τύρφης..

Τα φυτά αναπτύχθηκαν στους 25 °C μέχρι την μόλυνση με το παθογόνο ενώ μετά από αυτήν στους 17 °C.

## **B.6 Συλλογή φυτικών ιστών δειγμάτων και απομόνωση RNA από τους φυτικούς ιστούς**

Επτά (7) και δεκατέσσερις (14) ημέρες μετά τη μόλυνση με το παθογόνο πραγματοποιήθηκε συλλογή φύλλων και ριζών, τα οποία μεταφέρονταν αμέσως σε υγρό άζωτο. Η άμεση μεταφορά σε υγρό άζωτο αποσκοπούσε αφενός στη διατήρηση του RNA αφετέρου στην παρεμπόδιση της επαγωγής της έκφρασης γονιδίων λόγω καταπόνησης. Ο φυτικός ιστός κονιορτοποιήθηκε με υγρό άζωτο σε γουδι λειοτρίβησης.

Για την απομόνωση του RNA από τους φυτικούς ιστούς χρησιμοποιήθηκε το RNeasy Plant Mini Kit της QIAGEN. Ποιο συγκεκριμένα:

Χρησιμοποιήθηκε 0,1 gr φυτικού ιστού για κάθε δείγμα, το οποίο είχε τοποθετηθεί σε σωλήνα eppendorf.

1. Σε Buffer RLT (παρέχεται έτοιμο για χρήση από την εταιρία) προστίθεται μερκαπτοαιθανόλη σε τελική συγκέντρωση 5% (κ.ο).

2. 450 μl του παραπάνω διαλύματος προστίθενται στο σωλήνα erpendorf που περιέχει το φυτικό ιστό. Ακολουθεί ισχυρή ανάδευση με την χρήση vortex για μερικά δευτερόλεπτα.
3. Το υλικό ομογενοποιείται με την βοήθεια κολώνας που παρέχεται από την εταιρία και τοποθετούμε το διήθημα σε νέο erpendorf.
4. Προσθέτουμε 225 μl αιθανόλης (96-100%).
5. Στην συνέχεια το ολικό RNA δεσμεύεται σε μεμβράνη με διέλευση του ομογενοποιημένου υλικού από κολώνα.
6. Η μεμβράνη με το ακινητοποιημένο RNA ξεπλένεται με 700 μl Buffer RW1 (παρέχεται από την εταιρία).
7. Επαναλαμβάνεται η παραπάνω διαδικασία με 500 μl Buffer RPE για δύο φορές.
9. Ακολουθεί έκλουση του ακινητοποιημένου RNA με 40 μl Rnase-free H<sub>2</sub>O. Το RNA φυλάσσεται στους -80 °C με προσθήκη 1 μl (40 U/μl) παρεμποδιστή ριβονουκλεασών.

Η ποσότητα και η ποιότητα του RNA ελέγχονταν με ηλεκτροφόρηση του σε πηκτή αгарόζης.

### **B.7 Ηλεκτροφόρηση RNA/DNA σε πηκτή αгарόζης**

1. Σε ορισμένο όγκο διαλύματος ηλεκτροφόρησης TAE<sup>1</sup> προστίθεται η απαραίτητη ποσότητα αгарόζης, ώστε να εξασφαλισθεί η επιθυμητή τελική συγκέντρωση πηκτής αгарόζης, βάση του εύρους διαχωρισμού που χρειάζεται για κάθε περίπτωση και ανάλογα με το μέγεθος των μορίων που πρόκειται να ηλεκτροφορηθούν. Για παράδειγμα, για την προετοιμασία 1% πηκτής αгарόζης προστίθεται 1,0 gr αгарόζης σε 100 ml 1X TAE διαλύματος (Sugden *et al.*, 1975).
2. Το υλικό θερμαίνεται σε φούρνο μικροκυμάτων μέχρις ότου η αгарόζη διαλυθεί εντελώς.
3. Το διάλυμα κρυώνει μέχρι τους 60°C περίπου και γίνεται προσθήκη 10 mg/ml διαλύματος βρωμιούχου αιθιδίου σε τελική συγκέντρωση 0,5 μg/ml. Αναμιγνύεται καλά.

---

<sup>1</sup>διαλύματος ηλεκτροφόρησης TAE: 24,2% (w/v) Tris (BDH), 57,1 ml/lit CH<sub>3</sub>COOH (BDH), 100 ml/lit 0,5 EDTA (Serva)

4. Το διάλυμα τοποθετείται σε οριζόντια συσκευή ηλεκτροφόρησης στην οποία έχει τοποθετηθεί χτένα και η πηκτή αφήνεται να πολυμεριστεί για περίπου μια ώρα σε θερμοκρασία δωματίου.
5. Η χτένα απομακρύνεται προσεκτικά. Η πηκτή βυθίζεται σε διάλυμα 1X TAE, έτσι ώστε η επιφανειά της να καλύπτεται από αυτό κατά περίπου 1-2mm.
6. Στα δείγματα του RNA/DNA γίνεται προσθήκη **ρυθμιστικού διαλύματος φόρτωσης**<sup>2</sup> και στη συνέχεια εναποθέτονται στις εγκοπές της πηκτής.
7. Εφαρμόζεται συνεχής τάση 50-110V ανάλογα με την επιθυμητή ταχύτητα διαχωρισμού και το μέγεθος της πηκτής.

### **B.8 Υδρόλυση του γονιδιωματικού DNA με την χρήση του ενζύμου DNase**

Επειδή υπήρχε πιθανότητα στα δείγματα του RNA να υπάρχουν ίχνη γονιδιωματικού DNA γεγονός το οποίο θα μας έδινε λανθασμένα αποτελέσματα στο PCR έγινε προσπάθεια να καθαριστούν με την χρήση Dnase. Πρακτικά, 25 μl διαλύματος RNA (από αυτό που έχουμε απομονώσει), 3 μl (One for All) Buffer, και 2 μl **DNASE**<sup>3</sup> τοποθετούνται σε ένα σωλήνα eppendorf. Ύστερα αφήνουμε τα tube στους 37°C για μια ώρα.

### **B.9.1 Καθαρισμός των RNA δειγμάτων με την χρήση φαινόλης/χλωροφορμίου**

Ο καθαρισμός των νουκλεϊκών οξέων (DNA ή RNA) με φαινόλη είναι η πιο ευρύτερα χρησιμοποιούμενη μέθοδος στις τεχνικές της μοριακής βιολογίας. Με τη μέθοδο αυτή επιτυγχάνεται η απομάκρυνση των πρωτεϊνών ενός υδατικού διαλύματος νουκλεϊκών οξέων. Η φαινόλη (Phenol 25%, Chloroform 24%, Isoamyl alcohol 1%) ευνοεί την αποδιάταξη των πρωτεϊνών και τον διαχωρισμό τους από τα νουκλεϊκά οξέα. Η παράλληλη χρήση χλωροφορμίου (chloroform CHCl<sub>3</sub>) ενισχύει την αποδιάταξη των πρωτεϊνών, ενώ συμβάλει ουσιαστικά στην απομάκρυνση των λιπιδίων. Η φυγοκέντρηση του διαλύματος φαινόλης/χλωροφορμίου, νουκλεϊκών οξέων έχει σαν αποτέλεσμα τη δημιουργία δύο ορατών υγρών φάσεων, της οργανικής που περιέχει τις πρωτεΐνες (υποκείμενη) και της υδατικής που περιέχει τα νουκλεϊκά οξέα (υπερκείμενη). Στη ζώνη διαχωρισμού των δύο υγρών φάσεων συγκεντρώνεται το μεγαλύτερο μέρος της πρωτεΐνης.

---

<sup>2</sup> **ρυθμιστικού διαλύματος φόρτωσης:** 0,24 % μπλε της βρωμοφαινόλης (USB), 0,25% κυανό του ξυλενίου (USB), 40% (w/v) γλυκερόλη (BDH).

<sup>3</sup> **DNASE:** δεσοξυριβονουκλεάση

Η μεθοδολογία είναι η εξής:

1. Στο υδατικό διάλυμα του RNA (στην προκειμένη περίπτωση) προστίθεται ίσος όγκος φαινόλης (Phenol 25%, Chloroform 24%, Isoamyl alcohol 1%) PH:8,0 και ακολουθεί ανάμειξη.
2. Το διάλυμα φυγοκεντρείται για 5 λεπτά στις 13.000 στρ./λεπτό. Η υπερκείμενη φάση μεταφέρεται σε νέο σωλήνα erpendorf.
3. Στο νέο erpendorf προστίθεται ίσος όγκος χλωροφορμίου (chloroform  $\text{CHCl}_3$ ). Ακολουθεί καλή ανάμειξη και επαναλαμβάνουμε φυγοκέντρηση στους ίδιους χρόνους και στροφές. Και μεταφέρουμε την υπερκείμενη φάση σε νέο erpendorf.
4. Το καθαρό νουκλεϊνικό οξύ που βρίσκεται στην υδατική φάση κατακρημνίζεται όπως περιγράφεται παρακάτω.

### **B.9.2 Κατακρήμιση νουκλεϊνικών οξέων**

Η καθίζηση των νουκλεϊνικών οξέων γίνεται παρουσία μονοκατιόντων, με προσθήκη είτε αιθανόλης είτε ισοπροπανόλης. Η κατακρήμιση λαμβάνει χώρα στους  $-20^\circ\text{C}$  (για 2-18 ώρες) ή στους  $-70^\circ\text{C}$  (για περίπου 30 λεπτά). Η αιθανόλη χρησιμοποιείται για την κατακρήμιση μικρών, σε μήκος, νουκλεϊνικών οξέων. Ο όγκος της αιθανόλης που προστίθεται είναι 3 φορές ο όγκος του υδατικού διαλύματος των νουκλεϊνικών οξέων. Όσον αφορά την ισοπροπανόλη ο παραπάνω όγκος είναι 0,7 φορές όγκος του υδατικού διαλύματος των νουκλεϊνικών οξέων.

Η παρουσία μονοκατιόντων επιτυγχάνεται με την προσθήκη διαλύματος οξικού νατρίου (NaAc) 3 M, PH:5,2. Εναλλακτικά και ανάλογα με το είδος και το μέγεθος του νουκλεϊνικού οξέος χρησιμοποιείται διάλυμα 4 M LiCl (τελική συγκέντρωση 0,01 M) ή διάλυμα 10 M οξικού αμμωνίου (τελική συγκέντρωση 2,5 M). Μετά την επώαση των διαλυμάτων σε χαμηλές θερμοκρασίες, ακολουθεί η φυγοκέντρηση τους για 10-20 λεπτά στις 13.000 στρ./λεπτό και στους  $-4^\circ\text{C}$ . Το ίζημα ξεπλένεται με 70% αιθανόλη και φυγοκεντρείται, όπως προηγουμένως αλλά για 5 λεπτά. Μετά την φυγοκέντρηση το ίζημα των νουκλεϊνικών οξέων επαναδιαλύεται στον επιθυμητό όγκο ρυθμιστικού διαλύματος TE ή σε νερό. Στην προκειμένη περίπτωση έγινε σε νερό 12  $\mu\text{l}$ .

### **B.9.3 Σύνθεση μονόκλωνης συμπληρωματικής αλυσίδας DNA (First Strand Synthesis)**

Για να γίνει η σύνθεση της μονόκλωνης συμπληρωματικής αλυσίδας DNA ακολουθείται η εξής μεθοδολογία: Σε ένα σωλήνα erpendorf κατάλληλου μεγέθους για PCR προστίθενται:

5 μl RNA (περίπου 1 μg ολικό RNA)

8,5 μl υπερκάθαρου νερού (SDW)

8 μl Superscript Buffer (5x, Roche)

2 μl dNTP (τελική συγκέντρωση 10 mM)

10 μl εξανουκλεοτίδια (τελική συγκέντρωση 10 μM).

33,5 μl τελικός όγκος διαλύματος

και τοποθετούμε το σωλήνα στους 65°C για 10 min. Μετά τα 10 min τον μεταφέρουμε αμέσως στον πάγο και προσθέτουμε ακόμα:

2 μl DTT (10 mM τελική συγκέντρωση)

1 μl (40 U/μl) RNase inhibitor

1 μl Αντίστροφη μεταγραφάση (Superscript, Roche)

2,5 μl υπερκάθαρου νερού

οπότε έχουμε 40 μl τελικό όγκο διαλύματος, και αφήνουμε το σωλήνα για 1 ώρα στους 37°C.

### **B.10 Αλυσιδωτή αντίδραση της πολυμεράσης PCR**

Το μονόκλωνο DNA στην συνέχεια πολλαπλασιάζεται χρησιμοποιώντας μια κλασική αντίδραση PCR. Ποιο συγκεκριμένα σε σωλήνα erpendorf αναμιγνύουμε:

2 μl DNA (το προϊόν της ανάστροφης μεταγραφής)

5 μl Buffer,(10X)

1 μl εκκινητών F

1 μl εκκινητών R

1 μl μίγμα dNTPs (25 mM για κάθε νουκλεοτίδιο) dNTPS

39 μl υπερκάθαρου νερού

1 unit πολυμεράση (Finenzyme, Mons).

οπότε έχουμε 51 μl τελικό όγκο. Τοποθετούμε σωλήνα erpendorf στο PCR, εφαρμόζουμε το πρωτόκολλο για την αλυσιδωτή αντίδραση της πολυμεράσης (κύκλοι) , το οποίο στην προκειμένη περίπτωση είναι το εξής:

|  |                                       |
|--|---------------------------------------|
| Κύκλος 1 <sup>ος</sup>                   | 94°C για 3 λεπτά (αρχική αποδιάταξη)  |
| Κύκλος 2 <sup>ος</sup> -35 <sup>ος</sup> | 94°C για 45 δευτ. (αποδιάταξη)        |
|  | 48°C για 45 δευτ. (σύνδεση εκκινήτων) |
|  | 72°C για 1 λεπτό (επιμήκυνση)         |
| Κύκλος 6 <sup>ος</sup>                   | 72°C για 5 λεπτά (τελική επιμήκυνση)  |

**Γ. ΑΠΟΤΕΛΕΣΜΑΤΑ  
&  
ΣΥΖΗΤΗΣΗ**



### Γ.1 Ανάπτυξη φυτών -συλλογή υλικού

Στην μελέτη αυτή επιχειρήθηκε να μελετηθεί η επίδραση ενός μη παθογόνου στελέχους *Fusarium solani* στην έκφραση μιας συγκεκριμένης ομάδας γονιδίων παθογένειας.

Στο παρόν πείραμα αναπτύχθηκαν φυτά τομάτας στα οποία πραγματοποιήθηκαν τέσσερις επεμβάσεις οι οποίες περιγράφονται στον πίνακα Γ.1. Η πρώτη επέμβαση (Α) αφορούσε φυτά τα οποία εμβολιάστηκαν με τον μύκητα *Fusarium solani*. Στη δεύτερη επέμβαση (Β) τα φυτά δεν εμβολιάστηκαν με κανένα μύκητα. Η τρίτη επέμβαση (Γ) αφορούσε φυτά που εμβολιάστηκαν και με τους δύο μύκητες, τον *Fusarium solani* και με τον παθογόνο *Fusarium oxysporum* f. sp. *radicis lycopersici*. Η τέταρτη κατηγορία φυτών μολύνθηκε μόνο με τον *Fusarium oxysporum* f. sp. *radicis lycopersici* (Δ επέμβαση).

**Πιν. Γ.1** Επεμβάσεις και χειρισμοί

| Κατηγορίες επεμβάσεων | <i>Fusarium solani</i> | <i>Fusarium oxysporum</i> f.sp. <i>radicis lycopersici</i> |
|-----------------------|------------------------|--|
| Α                     | +                      | -  |
| Β                     | -                      | -  |
| Γ                     | +                      | +  |
| Δ                     | -                      | +  |

Ο εμβολιασμός με το στέλεχος *Fusarium solani* και με το φυτοπαθογόνο έγινε όπως περιγράφεται στο κεφάλαιο «ΥΛΙΚΑ ΚΑΙ ΜΕΘΟΔΟΙ».

Η συλλογή του φυτικού υλικού πραγματοποιήθηκε επτά (7) και δεκατέσσερις (14) ημέρες μετά τη μόλυνση με το παθογόνο. Κατά την συλλογή του βιολογικού υλικού δεν παρατηρήθηκαν διαφορές στην ανάπτυξη των φυτών μεταξύ των διαφόρων επεμβάσεων. Επίσης δεν υπήρξε εκδήλωση συμπτωμάτων, εμφανής τουλάχιστον, ως αποτέλεσμα της μόλυνσης με το παθογόνο *Fusarium oxysporum* f.sp. *radicis lycopersici*.

### Γ.2 Έκφραση των γονιδίων που κωδικοποιούν PR πρωτεΐνες στα φύλλα

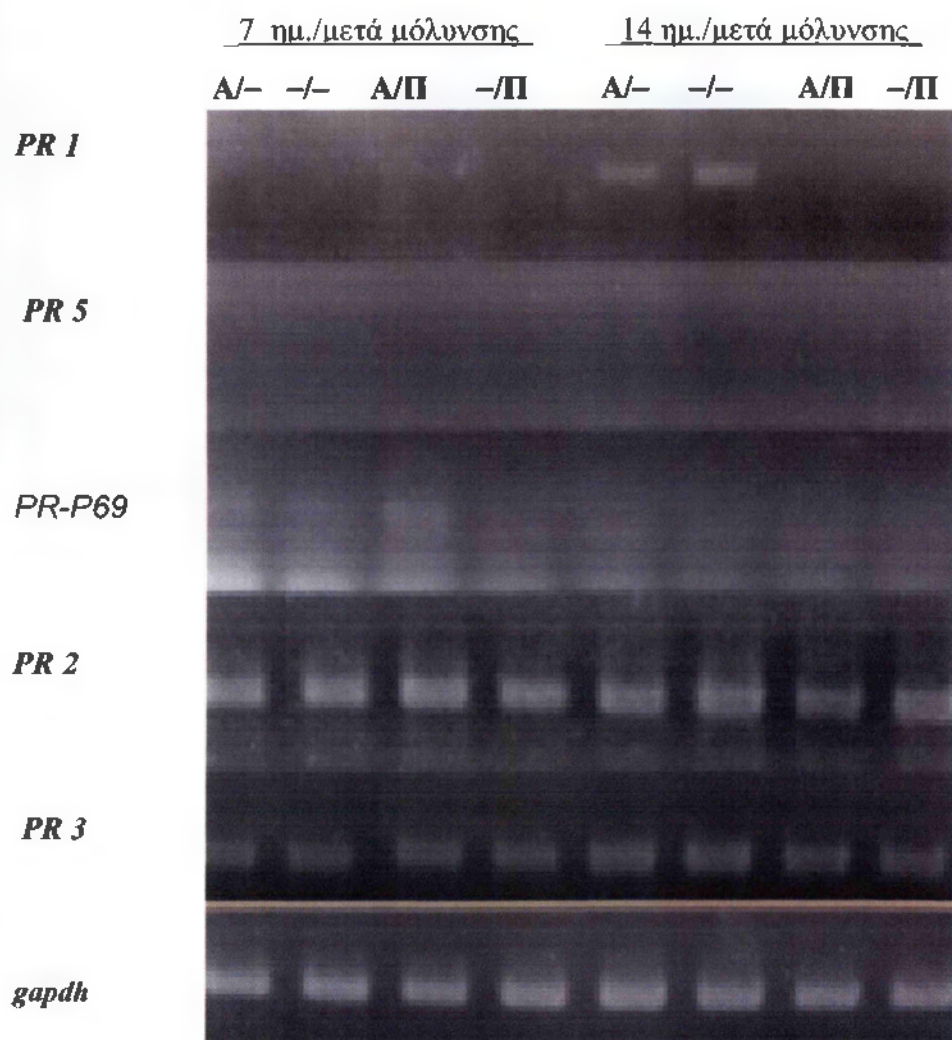
Κατά την συλλογή των φύλλων λαμβανόταν μέριμνα ώστε αυτά να βρίσκονται στο ίδιο αναπτυξιακό στάδιο. Στη συνέχεια τα δείγματα των ιστών

κονιορτοποιήθηκαν με υγρό άζωτο και έγινε απομόνωση ολικού φυτικού RNA χρησιμοποιώντας το RNeasy Plant Mini Kit (QIAGEN). Τα δείγματα RNA καθαρίστηκαν από τα τυχόν ίχνη γονιδιωματικού DNA με υδρόλυση δεσοξυριβονουκλεάσης (Dnase) και ακολούθησε καθαρισμός με την χρήση φαινόλης/χλωροφόρμιου. Ακολούθησε η ανάστροφη μεταγραφή και η σύνθεση της 1<sup>ης</sup> αλυσίδας DNA (First Strand Synthesis). Στην συνέχεια πραγματοποιήθηκαν αντιδράσεις PCR χρησιμοποιώντας για κάθε γονίδιο διαφορετικό ζεύγος εκκινητών οι οποίοι είχαν σχεδιασθεί πάνω σε ήδη δημοσιευμένες cDNA ακολουθίες των παραπάνω γονιδίων. Οι εκκινητές αυτοί παρουσιάζονται στον πίνακα Γ.2.

**Πιν. Γ.2** (Πίνακας εκκινητών πάνω στους οποίους βασίστηκε το RT-PCR)

| Οικογένεια γονιδίων | Πρωτεΐνη   | Accession No    | 5' primer  | 3' primer   | References                   |
|---------------------|--|-----------------|--|---|------------------------------|
| PR1                 | PR1b, βασική PR1                                   | <u>AJ011520</u> | 5'-<br>CCAAGACTATCTTGC GGTT<br>C-3'<br>Tm: 57.3 °C             | 5'-<br>GAACCTAAGCCACGATACCA<br>-3'<br>Tm: 57.3 °C           | VanKan <i>et al.</i> , 1992  |
| PR2                 | PR2b, βασική γλουκανάση                            | <u>M80608</u>   | 5'-<br>CAACTTGCCATCACA TTCT<br>G-3'<br>Tm: 55.3 °C             | 5'-<br>CCAAAATGCTTCTCAAGCTC-<br>3'<br>Tm: 55.3 °C           | VanKan <i>et al.</i> , 1992  |
| PR3                 | Χυτινάση 3, όξινη                                  | <u>Z15141</u>   | 5'-<br>CAATTCGTTTCCAGGTTTTG<br>-3'<br>Tm: 53.2 °C              | 5'-<br>ACTTCCCGCTGCAGTATTTG-<br>3'<br>Tm: 55.3 °C           | Danhash <i>et al.</i> , 1993 |
| PR5                 | Osmotin-like PR5                                   | <u>AY093593</u> | 5'-<br>AATTGCAATTTTAAATGGTG<br>C-3'<br>Tm: 49.1 °C             | 5'-<br>TAGCAGACCGTTAAGATGC<br>-3'<br>Tm: 55.3 °C            | Rep <i>et al.</i> , 2002     |
| PR7                 | P69A, subtilisin-like                              | <u>Y17275</u>   | 5'-<br>AACTGCAGAACAAGTGAA<br>GG-3'<br>Tm: 55.3 °C              | 5'-AAC<br>GTGATTGTAGC AACAGG-3'<br>Tm: 55.3 °C              | Tornero <i>et al.</i> , 1996 |
| gapdh               | glyceraldehyde s-3-<br>φωσφορικής-<br>αφύδρογόνωση | <u>M64114</u>   | 5'-<br>GAAATGCATCTTGC ACTAC<br>CAACTGTCCTTGC-3'<br>Tm: 67.6 °C | 5' CTGTGAGTAACCCCA TTCA<br>TTATCATACCAAGC-3'<br>Tm: 64.1 °C | Shih <i>et al.</i> , 1992    |

Τα προϊόντα των αντιδράσεων PCR αναλύθηκαν σε πηκτή αγαρόζης 1% στην οποία έγινε χρώση με βρωμιούχο αιθίδιο.



(Εικ. Γ.1)

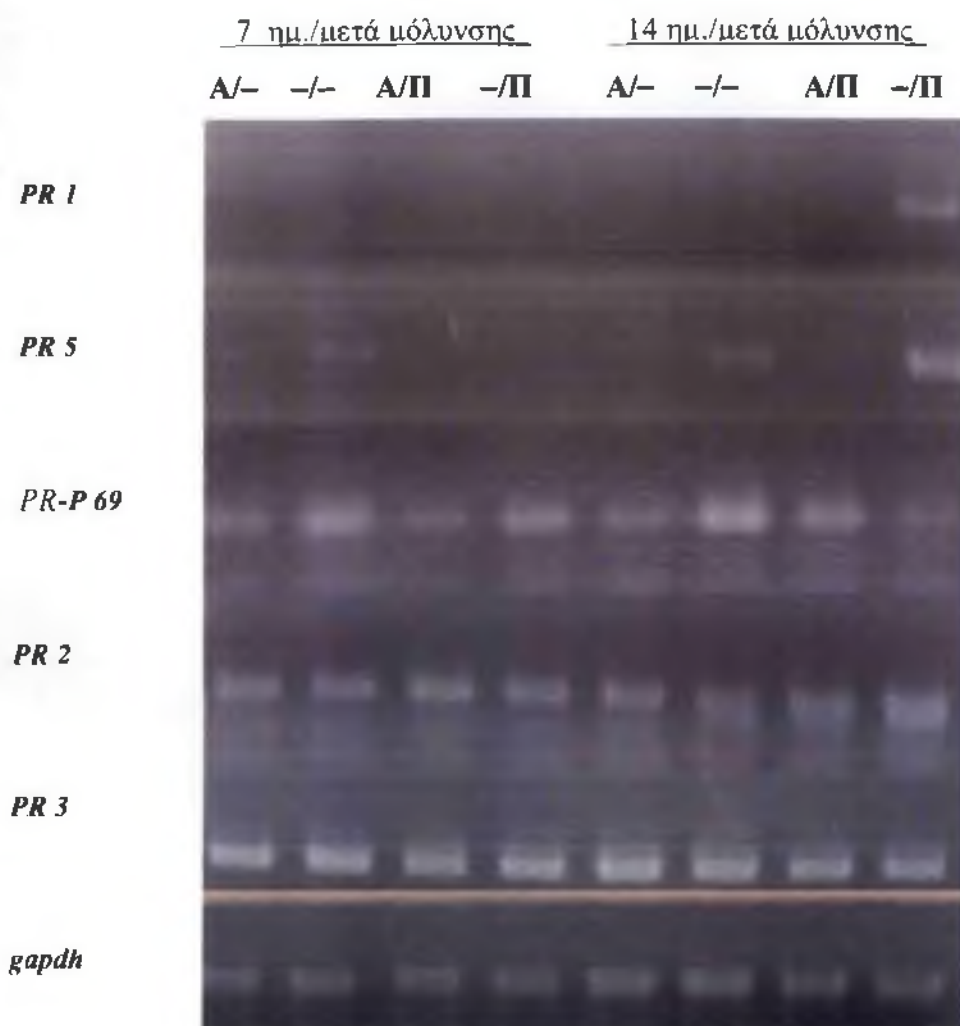
*Εικόνα Γ.1 RT-PCR ανάλυση της έκφρασης PR γονιδίων σε φύλλα φυτών ντομάτας τα οποία δέχθηκαν τους εξής χειρισμούς: Εμβολιασμός μόνο με τον ανταγωνιστή (A/-), απουσία ανταγωνιστή και παθογόνου (-/-), εμβολιασμός με τον ανταγωνιστή και το παθογόνο (A/Π), εμβολιασμός μόνο με το παθογόνο (-/Π). Η συλλογή του φυτικού υλικού έγινε 7 και 14 ημέρες μετά την μόλυνση με το παθογόνο. Ως μάρτυρας χρησιμοποιήθηκε το γονίδιο της 3-φωσφορικής- αφυδρογονάσης (gapdh).*

Όπως φαίνεται στην εικόνα Γ.1 η έκφραση των γονιδίων *PR1*, *PR2*, *PR5* και *PR-P69* δεν φαίνεται να επηρεάζεται από την παρουσία του στελέχους του *Fusarium solani* αλλά και του παθογόνου *Fusarium oxysporum* f.sp. *radicis lycopersici*.

Αντίθετα ανιχνεύτηκαν διαφοροποιήσεις στην έκφραση του γονιδίου *PR1*. Ποιο συγκεκριμένα το συγκεκριμένο γονίδιο φαίνεται να καταστέλλεται από το παθογόνο στα φύλλα φυτών ντομάτας που συλλέχθηκαν στις 14 ημέρες. Στις ίδιες ημέρες ο ανταγωνιστής μύκητας (το στέλεχος *Fusarium solani*) φαίνεται να έχει την ίδια επίδραση στην έκφραση του γονιδίου *PR1* αν και σε μικρότερο βαθμό σε σχέση με το παθογόνο.

### **Γ.3 Έκφραση των γονιδίων που κωδικοποιούν PR πρωτεΐνες στις ρίζες**

Ρίζες ντομάτας συλλέχθηκαν από φυτά στα οποία είχαν πραγματοποιηθεί οι επεμβάσεις που περιγράφονται στην παράγραφο Γ.1. Η εξαγωγή, ο χειρισμός του RNA καθώς και η ανάστροφη μεταγραφή έγινε όπως στην περίπτωση των φύλλων. Στις αντιδράσεις PCR χρησιμοποιήθηκαν ξανά τα ζεύγη εκκινητών που φαίνονται στον πίνακα Γ.2. Τα προϊόντα των αντιδράσεων PCR αναλύθηκαν σε πηκτή αγαρόζης 1%, και τα αποτελέσματα παρουσιάζονται στην εικόνα Γ.2.



(Εικ. Γ.2)

*Εικόνα Γ.2 RT-PCR ανάλυση της έκφρασης PR γονιδίων σε ρίζες φυτών ντομάτας τα οποία δέχθηκαν τους εξής χειρισμούς. Εμβολιασμός μόνο με τον ανταγωνιστή (A/-), απουσία ανταγωνιστή και παθογόνου (-/-), εμβολιασμός με τον ανταγωνιστή και το παθογόνο (A/Π), εμβολιασμός μόνο με το παθογόνο (-/Π). Η συλλογή του φυτικού υλικού έγινε 7 και 14 ημέρες μετά την μόλυνση με το παθογόνο. Ως μάρτυρας χρησιμοποιήθηκε το γονίδιο της 3-φωσφορικής- αφυδρογονάσης (gapdh).*

Όπως φαίνεται στην εικόνα Γ.2 η έκφραση των γονιδίων *PR2* και *PR3* δεν επηρεάζεται από την παρουσία του ανταγωνιστή μύκητα και του παθογόνου. Τα επίπεδα έκφρασης των παραπάνω γονιδίων παραμένουν σταθερά ανεξάρτητα από τις διάφορες επεμβάσεις που πραγματοποιήθηκαν.

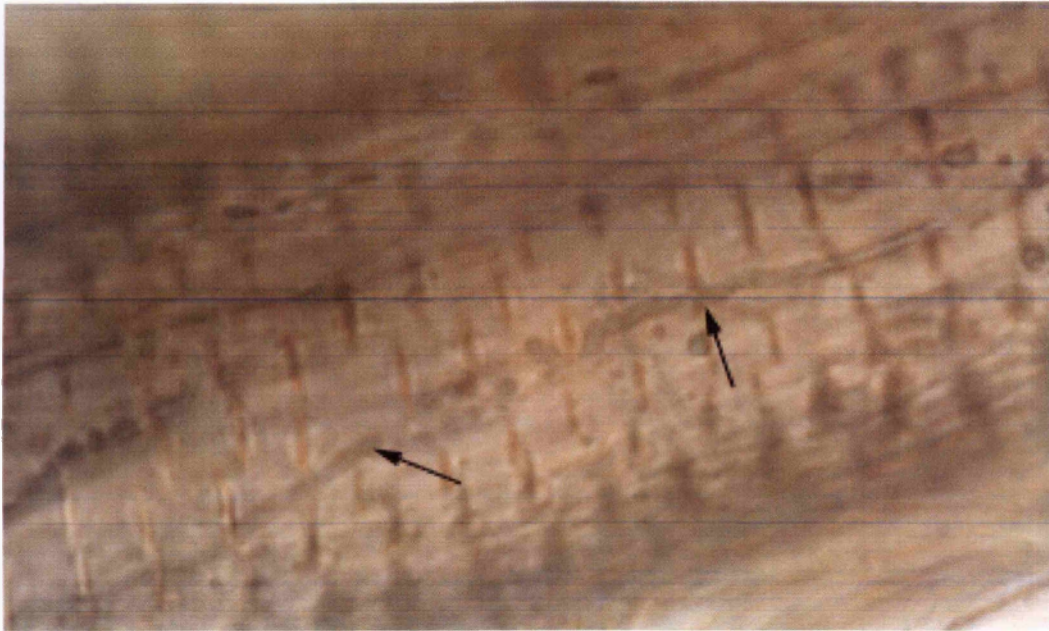
Επαγωγή της έκφραση του γονιδίου *PR1* ανιχνεύτηκε στις ρίζες φυτών ντομάτας που έγινε επέμβαση με παθογόνο 14 ημέρες μετά από τον εμβολισμό. Η έκφραση του γονιδίου *PR-P69* φαίνεται να καταστέλλεται από το ανταγωνιστικό στέλεχος *Fusarium solani* τόσο παρουσία όσο και απουσία παθογόνου.

Θα πρέπει όμως να σημειωθεί ότι παρουσία του παθογόνου η μείωση των επιπέδων έκφρασης του γονιδίου *PR-P69* είναι μικρότερη. Καταστολή της έκφρασης του γονιδίου *PR-P69* παρατηρείται και στις ρίζες φυτών ντομάτας που μολύνθηκαν μόνο με το παθογόνο 14 ημέρες μετά από την μόλυνση με αυτό.

Στα δείγματα ριζών που συλλέχθηκαν 7 ημέρες μετά την μόλυνση με το παθογόνο χαμηλά επίπεδα έκφρασης του γονιδίου *PR5* ανιχνεύτηκαν μόνο στα φυτά που δεν έγινε επέμβαση ούτε το στέλεχος του ανταγωνιστή μύκητα ούτε με το παθογόνο. Στην ίδια επέμβαση 14 ημέρες μετά την μόλυνση με το παθογόνο ανιχνεύονται αυξημένα επίπεδα έκφρασης του γονιδίου *PR5*. Στα φυτά ίδιας ηλικίας η παρουσία του ανταγωνιστή μύκητα έχει ως συνέπεια την μείωση των επιπέδων έκφρασης του γονιδίου *PR5* στην ρίζα. Αντίθετα υψηλά επίπεδα έκφρασης του γονιδίου *PR5* ανιχνεύονται στις ρίζες φυτών ντομάτας που μολύνθηκαν μόνο με το παθογόνο.

#### **Γ.4 Συζήτηση**

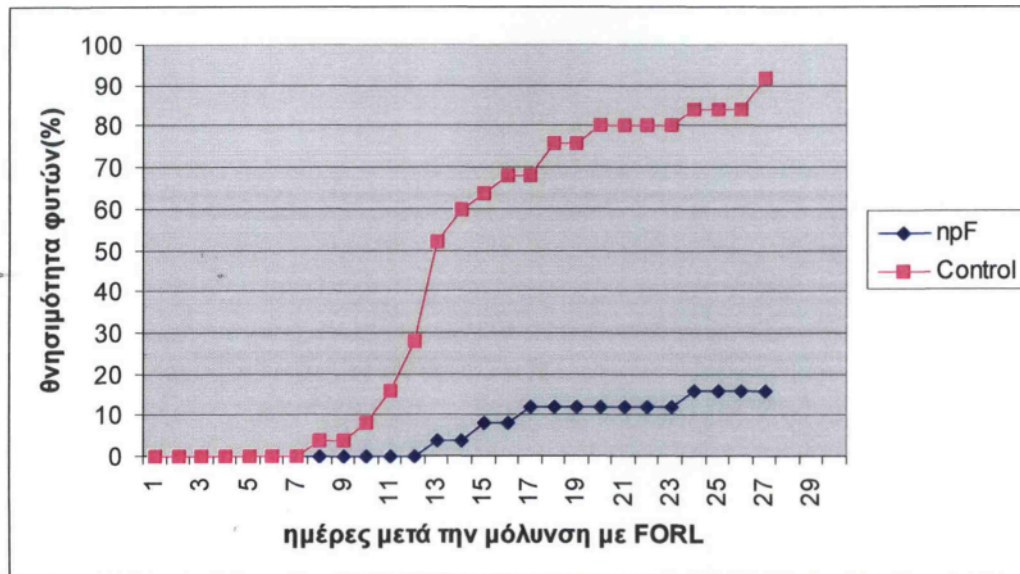
Στην μελέτη αυτή, όπως έχει ήδη αναφερθεί, επιχειρήθηκε να διερευνηθεί η επίδραση ενός μη παθογόνου στελέχους *Fusarium solani* στην έκφραση μιας συγκεκριμένης ομάδας γονιδίων παθογένειας. Το στέλεχος αυτό του μύκητα απομονώθηκε από ένα compost το οποίο φαίνεται να έχει επισχετικές ιδιότητες έναντι φυτοπαθογόνων μυκήτων (Kavroulakis *et al.*, 2005). Κατά την διερεύνηση των μηχανισμών δράσης του συγκεκριμένου compost διαπιστώθηκε ότι οι ρίζες φυτών ντομάτας που αναπτύσσονται σε αυτό αποικίζονται από κάποιο μύκητα (Kavroulakis *et al.*, 2006). Ο μύκητας αυτός, ο οποίος εντοπίζεται κυρίως στο ηθμαγγειώδες σύστημα, απομονώθηκε και χαρακτηρίστηκε με αλληλούχιση της 18S και IGS περιοχής του. Με τον τρόπο αυτό ταυτοποιήθηκε ως ένα μη παθογόνο στέλεχος *Fusarium solani*.



(Εικ. Γ.3)

**Εικόνα Γ.3. Ρίζα από φυτό ντομάτας η οποία έχει αποικιστεί από το ανταγωνιστικό στέλεχος *Fusarium solani* (βέλη). Η χρώση έγινε με chlorazol black (Kavroulakis, unpublished results).**

Το στέλεχος αυτό, όπως φάνηκε από *in vitro* πειράματα, δρα παρεμποδιστικά στην ανάπτυξη παθογόνων. Επίσης έχει την δυνατότητα να προστατεύει φυτά ντομάτας από το παθογόνο της ρίζας *Fusarium oxysporum* f.sp. *radicis lycopersici* (Εικόνα Γ.3, Kavroulakis, unpublished results). Επιπλέον το στέλεχος αυτό βρέθηκε ότι όταν αποικίζει ρίζες φυτών ντομάτας μπορεί να προστατεύει τα φύλλα τους από το παθογόνο *Septoria lycopersici*. Το γεγονός αυτό αποτέλεσε μια ισχυρή ένδειξη ότι το συγκεκριμένο στέλεχος μύκητα είναι ικανό να επάγει διασυστηματική ανθεκτικότητα σε φυτά ντομάτας.



(Εικ Γ.4)

**Εικόνα Γ.4** Θνησιμότητα φυτών ντομάτας που μολύνθηκαν με το παθογόνο *Fusarium oxysporum f.sp. radicis lycopersici* (FORL) και τα οποία είχαν προηγουμένως εμβολιασθεί με το μη παθογόνο στέλεχος *Fusarium solani*. Ως μάρτυρας (control) χρησιμοποιήθηκαν φυτά ντομάτας τα οποία δεν είχαν εμβολιασθεί με ανταγωνιστικό στέλεχος μύκητα (Κανρουλάκης, unpublished results).

Στην παρούσα μελέτη επιχειρήθηκε να διερευνηθεί περαιτέρω το φαινόμενο αυτό. Συγκεκριμένα εξετάστηκε κατά πόσο το στέλεχος αυτό είναι ικανό να επηρεάσει την έκφραση μιας ομάδας γονιδίων των οποίων η δράση έχει κατά καιρούς συνδεθεί με μηχανισμούς επαγομένης ανθεκτικότητας. Η επαγωγή της έκφρασης των γονιδίων αυτών έχει συσχετισθεί με τα επίπεδα του ενδογενούς σαλικυλικού οξέως και συνήθως αποτελεί αντίδραση σε προσβολές από παθογόνα. Η έκφραση τους μπορεί να συμβαίνει τοπικά στην περιοχή της μόλυνσης μπορεί όμως να λαμβάνει χώρα και μακριά από αυτήν. Η δεύτερη αυτή περίπτωση σχετίζεται με το φαινόμενο της SAR. Διασυστηματική έκφραση PR γονιδίων όμως έχει αναφερθεί και κατά την ISR όπου το αρχικό αίτιο δεν είναι κάποια προσβολή από παθογόνο αλλά οφείλεται στην παρουσία κάποιου μη παθογόνου μικροοργανισμού.

Όπως αναφέρθηκε στα ΑΠΟΤΕΛΕΣΜΑΤΑ το πρότυπο έκφρασης των PR γονιδίων, που εξετάστηκαν, στα φύλλα τομάτας δεν φαίνεται να επηρεάζεται από την παρουσία του στελέχους *Fusarium solani* στις ρίζες. Κατά συνέπεια η διασυστηματική προστασία των φύλλων τομάτας έναντι του μύκητα *Septoria lycopersici* από το *Fusarium solani*, δεν σχετίζεται με προηγούμενη σύνθεση



πρωτεϊνών που κωδικοποιούνται από τα υπό εξέταση γονίδια . Δεν παρατηρήθηκε ούτε το φαινόμενο " priming" κατά το οποίο προέκθεση του φυτού σε κάποιο παράγοντα (π.χ. μικροοργανισμός) οδηγεί σε αυξημένα επίπεδα έκφρασης των PR γονιδίων όταν το φυτό δεχθεί προσβολή από κάποιο παθογόνο. Πράγματι όπως δείχνει η εικόνα (Γ.1, Γ.2) φυτά ντομάτας τα οποία δέχθηκαν χειρισμό το *Fusarium solani* και στην συνέχεια μολύνθηκαν με το *Fusarium oxysporum* f.sp. *radicis lycopersici* παρουσιάζουν τα ίδια επίπεδα έκφρασης των PR γονιδίων σε σχέση με φυτά που μολύνθηκαν μόνο με το παθογόνο.

Οι παραπάνω παρατηρήσεις έρχονται σε συμφωνία με τα αποτελέσματα τα οποία δημοσιεύτηκαν από τους Verhagen *et al* ., (2004) οι οποίοι μελέτησαν, χρησιμοποιώντας RNA microarrays, την επίδραση του ανταγωνιστικού ριζοβακτηρίου *Pseudomonas flurence* στους μηχανισμούς επαγομένης διασυστηματικής προστασίας του φυτού *Arabidopsis thaliana*. Είναι πολύ πιθανό άλλα γονίδια των οποίων η επαγωγή της έκφρασης δεν συνδέεται με το σαλικυλικό οξύ να εμπλέκονται στην προστασία που προσφέρει το στέλεχος του μύκητα που εξετάζουμε. Τέτοια γονίδια μπορεί να είναι κάποια των οποίων ο έκφραση ελέγχεται από το αιθυλένιο και το ιασμονικό οξύ, δύο άλλα μόρια τα οποία σηματοδοτούν μηχανισμούς επαγομένης άμυνας των φυτών.

Η ικανότητα του στελέχους *Fusarium solani* να επάγει ανθεκτικότητα στα φυτά θα μπορούσε να οφείλεται σε κάποια πιθανά ήπια φυτοπαθογόνα χαρακτηριστικά του. Σε μια τέτοια περίπτωση η τοπική προσβολή των ριζών θα έπρεπε να ενεργοποιούσε μια αλληλουχία γεγονότων ανάλογων με αυτά της SAR. Δηλαδή αύξηση του ενδογενούς συντιθεμένου σαλικυλικού οξέως και επακόλουθη επαγωγή της έκφρασης PR γονιδίων. Στην περίπτωση που εξετάζουμε, δεν παρατηρείται αύξηση των επιπέδων έκφρασης των PR γονιδίων ως αποτέλεσμα της παρουσίας του *Fusarium solani* (Εικόνα Γ.1, Γ.2).

Έχει ιδιαίτερο ενδιαφέρον το ότι για ορισμένα από τα γονίδια που εξετάζονται στην παρούσα μελέτη, όπως *PR1* και *PR-P69*, παρατηρείται μείωση των επιπέδων έκφρασης τους στα φυτά που δέχθηκαν χειρισμό με *Fusarium solani* σε σχέση με το μάρτυρα (φυτά χωρίς χειρισμό) . Το γεγονός αυτό πιθανά να οφείλεται σε ανάγκη καταστολής μηχανισμών άμυνας του φυτού προκειμένου να καταστεί δυνατός ο αποικισμός του ριζικού συστήματος του φυτού από το στέλεχος *Fusarium solani*. Αφού στη συνέχεια το στέλεχος αποικίσει τις ρίζες του φυτού θα πρέπει να ενεργοποιεί άλλα μονοπάτια ενδογενούς άμυνας του φυτού τα οποία δεν συνδέονται

με τις PR πρωτεΐνες και το σαλικυλικό οξύ. Πράγματι όπως έδειξαν μετέπειτα πειράματα με μεταλλάγματα (mutants) ντομάτας η κατασταλτική δράση του στελέχους *Fusarium solani* συνδέεται με την φυτοορμόνη αιθυλένιο και συγκεκριμένα με μηχανισμούς αντίληψης του (perception) από το φυτό (Kavroulakis *et al.*, unpublished results).

Αντίθετα, όπως άλλωστε αναμενόταν, στην περίπτωση όπου φυτά ντομάτας μολύνθηκαν με τον παθογόνο μύκητα *Fusarium oxysporum* f.sp. *radicis lycopersici* παρατηρήθηκε αύξηση των επιπέδων έκφρασης των γονιδίων *PR1* και *PR5*. Στην περίπτωση αυτή έχουμε μια τυπική περίπτωση επαγομένης ανθεκτικότητας τύπου SAR.

## ΒΙΒΛΙΟΓΡΑΦΙΑ

Audenaert K, Pattery T, Cornelis P and Hfte M. Induction of systemic resistance to *Botrytis cinerea* in tomato by *Pseudomonas aeruginosa* 7NSK2: role of salicylic acid, pyochelin, and pyocyanin. *Mol. Plant-Microbe Interact* 2002;15:1147-1156

Baker R. Mechanisms of biological control of soil-borne pathogens. *Annual Review of Phytopathology* 1968; 6:263-294.

Δημητράκης Κ.Γ. Λαχανοκομία 1998. Αθηνά. Εκδόσεις Αγρότυπος

Campos MA, Ribeiro SG, Rigden DJ, Monte DC, Crossi de Sa MF. Putative pathogenesis-related genes within *Solanum nigrum* L. var. *americanum* genome: isolation of two genes coding for PR5-like proteins, phylogenetic and sequence analysis. *Physiological and Molecular Plant Pathology* 2002;61:205-216.

Chen C, Be' langer R R, Benhamou N and Paulitz T C. Role of salicylic acid in systemic resistance induced by *Pseudomonas* spp. against *Pythium aphanidermatum* in cucumber roots. *Eur. J. Plant Pathol.* 1999; 105: 477–486.

Chen C, Be' langer RR, Benhamou N and Paulitz TC. Defense enzymes induced in cucumber roots by treatment with plant growth-promoting rhizobacteria (PGPR) and *Pythium aphanidermatum*. *Physiol. Mol. Plant Pathol.* 2000;56:13–23.

Cook J.R. Biological control of plant pathogens: Theory to application. *Phytopathology* 1985; 75:25-29.

Devoto A and Turner JG. Regulation of jasmonate-mediated plant responses in *Arabidopsis*. *Ann. Bot.* 2003;92, 329–337.

Fravel D.R. Efficient delivery of biocontrol agents to soil. In: Biological control of plant diseases. Progress and challenges for the future. Eds: Tjamos E.C, Papavizas G.C, Cook R.J. NATO ASI Series A. *Life Sciences, Plenum Press* 1991.

Glazebrook J: Genes controlling expression of defence responses in *Arabidopsis*. *Curr Opin Plant Biol* 2001;4:301-308.

Ηλιόπουλος Α.Γ. Οι ασθένειες των φυτών 2000. Καλαμάτα

Hammerschmidt R. Induced disease resistance: how do induced plants stop pathogen? *Physiological and Molecular Plant Pathology* 1999; 55:77-84.

Handelsman J, Stabb E.V. Biocontrol of soilborne plant pathogens. *Plant cell* 1996; 8:1855-1869.

Hyakumachi M, Ichikawa M, Kageyama K. Plant growth promoting fungi isolated from rhizosphere of *Zoysia japonica*. *Annals of Phytopathological Society of Japan* 1992; 59:72 (Abstr.).

Heil M, Bostcock. RM. Induced systemic resistance (ISR) against pathogens in the context of induced plant defences. *Ann Bot-London* 2002;89 (5):503-512.

Iavicoli A, Boutet E, Buchala A, and Metraux JP. Induced systemic resistance in *Arabidopsis thaliana* in response to root inoculation with *Pseudomonas fluorescens* CHA0. *Mol. Plant-Microbe Interact* 2003;16:851-858.

Kavroulakis N, Ehaliotis C, Ntougias S, Zervakis GI, Papadopoulou KK. Local and systemic resistance against fungal pathogens of tomato plant elicited by a compost deriving from agricultural residues. *Physiology and Molecular Plant Pathology* 2005;66:163-174.

Kavroulakis N, Papadopoulou KK, Ntougias S, Zervakis GI, and Ehaliotis C. Cytological and other aspects of pathogenesis-related gene expression in tomato plants grown on a suppressive compost. *Annals of Botany* 2006;98:555-564.

Koike N, Hyakumachi M, Kageyama K, Tsuyumu S, Doke N. Induction of systemic resistance in cucumber against several diseases by plant growth-promoting fungi: lignification and superoxide generation. *European Journal of Plant Pathology* 2001; 107:523-533.

Lam S.T, Gaffney T.D. Biological activities of bacteria used in plant pathogen control. In: *Biotechnology in plant disease control*. Ed: Chet I. Wiley-Liss, Inc.1993; 291.

Liu L, Kloepper JW and Tuzun S. Induction of systemic resistance in cucumber against bacterial angular leaf spot by plant growth-promoting rhizobacteria. *Phytopathology* 1995;85:843-847.

Lynch JM, Whipps JM. Substrate flow in the rhizosphere. In : Keister D.L., Cregan P.B. (eds). *The rhizosphere and plant growth*, pp. 15-24. Kluwer, Dordrecht. 1991.

Maurhofer M, Hase C, Meuwly P, Me´traux J-P and De´fago G. Induction of systemic resistance of tobacco to tobacco necrosis virus by the root-colonizing *Pseudomonas fluorescens* strain CHA0: influence of the *gacA* gene and pyoverdine production. *Phytopathology* 1994; 84:139–146.

Maurhofer M, Reimann C, Schmidli-Sacherer P, Heeb S, Haas D and De´fago G. Salicylic acid biosynthetic genes expressed in *Pseudomonas fluorescens* strain P3 improve the induction of systemic resistance in tobacco against tobacco necrosis virus. *Phytopathology* 1998; 88:678–684.

Meera M,S. Shivanna M,B. Kageyama K, Hyakumachi M. Persistence of induced systemic resistance in cucumber in relation to root colonization by plant growth promoting fungal isolates. *Crop Protection* 1995; 14:123-130.

Meichtry J, Amrhein N, Shaller A. Characterization of the subtilase gene family in tomato (*Lycopersicon esculentum* Mill.). *Plant Molecular Biology* 1999;39:749-760.

Misaghi I.J, Donndelinger C.R. Endophytic bacteria in symptom-free cotton plants. *Phytopathology* 1990; 80:808-811.

Niderman T, Genetet I, Bruyere T, Gees R, Stintzi A, Legrand M, *et al.* Pathogenesis-related PR-1 proteins are antifungal-isolation and characterization of 3 14-kilodalton proteins of tomato and of a basic PR-1 of tobacco with inhibitory activity against *Phytophthora-infestans*. *Plant Physiology* 1995;108:17-27.

Park K S and Kloepper J W. Activation of PR-1a promoter by rhizobacteria that induce systemic resistance into tobacco against *Pseudomonas syringae* pv. *tabaci*. *Biol. Cont.* 2000; 18: 2–9.

Pieterse CMJ and Van Loon LC. Salicylic acid-independent plant defence pathways. *Trends Plant Sci.* 1999;4:52-58.

Pieterse CMJ and VanLoon LC. NPR1: the spider in the web of induced resistance signaling pathways. *Plant Biology* 2004;7:456-464.

Pieterse CMJ, Van Wees SCM, Hoffland E, Van Pelt JA, Van Loon LC. Systemic resistance in *Arabidopsis* induced by biocontrol bacteria is independent of salicylic acid accumulation and pathogenesis-related gene expression. *The Plant Cell* 1996;8:1225-1237.

Pieterse CMJ, Van Pelt JA, Van Wees SCM, Ton J, Leon-Kloosterziel KM, Keurentjes JJB, Verhagen BWM, Knoester M, Van Der Sluis I, Bakker PAHM, Van Loon LC. Rhizobacteria-mediated induced systemic resistance: triggering, signaling and expression. *European Journal Of Plant Pathology* 2001b; 107:51-61.

Piggott N, Ekramoddoullah AKM, Liu JJ, Xu XS. Gene cloning of a thaumatin-like (PR5) protein of western pine (*Pinus monticola* D.Don) and expression studies of the PR-5 group. *Physiological and Molecular Plant Pathology* 2004;64:1-8.

Rep M, Dekker HC, Vossen JH, de Doer AD, Honterman PM, Speijer D, *et al.* Mass spectrometric identification of isoforms of PR proteins in xylem sap of fungus infected tomato. *Plant Physiology* 2002;130:904-917.

Sticher L., Mauch-Mani B. and Mettraux J-P. Systemic acquired resistance. *Annual Review of Phytopathology* 1997; 35:235-270.

Sugden B, Detroy B, Roberts RJ. Agarose slab-gel electrophoresis equipment *Anal Biochem* 1975;68 (1): 36-46.

Thomma BPHJ, Penninckx IAMA, Cammue BPA, Broekaert WF. The complexity of disease signaling in *Arabidopsis*. *Curr Opin Immunol* 2001;13:63-68.

Thomashow L.S. Weller D.M. Current concepts in the use of introduced bacteria for biological disease control: Mechanisms and antifungal metabolites. In: Plant-microbe interactions Vol 1. Eds: Stacy G, Keen N.T 1996.

Tian M., Huitereima E., da Cunha L., Torno-Alalibo T., and Kamoun, S. A. Kazal-like extracellular serine protease inhibitor from *Phytophthora infestans* targets the tomato pathogenesis-related protease P69B. *J. Biol Chem.* 2004;279:26370-263.

Ton J, Davison S, Van Loon LC, Pieterse CMJ. Heritability of rhizobacteria-mediated induced systemic resistance and basal resistance in *Arabidopsis*. *European Journal Of Plant Pathology* 2001; 107:63-68.

Ton J, Van Pelt JA, Van Loon LC and Pieterse CMJ. Differential effectiveness of salicylate-dependent and jasmonate/ethylene-dependent induced resistance in *Arabidopsis*. *Mol. Plant-Microbe Interact* 2002b;15:27-34

Tornero P, Conejero V, and Vera P. Primary structure and expression of a pathogen-induced protease (PR-69) in tomato plants: Similarity of functional domains to subtilisin-like endoproteases. *Plant Biology* 1996;93:6333-6337.

Turner JG, Ellis C and Devoto A. The jasmonate signal pathway. *Plant Cell* 2002 ;14: S153–S164.

Vallad GE, Cooperband, Goodman RM. Plant foliar disease suppression mediated by composted forms of paper mill residuals exhibits molecular features of induced resistance. *Physiology and Molecular Plant Pathology* 2003;63:65-77.

Vallad GE, Goodman RM. Systemic acquired resistance and induced systemic resistance in conventional agriculture. *Crop Sci.* 2004; 44 (6): 1920-1934.

Van Loon LC. Induced resistance and the role of the pathogenesis related proteins. *Eur. J.Plant Pathol.* 1997; 103:753-65.

Van Loon LC, Bakker P.A.H.M., Pieterse CMJ. Systemic resistance induced by rhizosphere bacteria. *Annual Review Of Phytopathology.* 1998;36:453-483.

Van Loon LC and Van Strien EA. The families of pathogenesis-related proteins, their activities, and comparative analysis of *PR-1* type proteins. *Physiological and Molecular Plant Pathology.* 1999; 55:85-97.

Van Wees SCM, Pieterse CMJ, Van Pelt JA, Van Loon LC. Additive effects of rhizobacterium and pathogen-induced systemic resistance in *Arabidopsis*. Offered paper Abstracts –Vol. 2, 7<sup>th</sup> International Congress of Plant Pathology 1998; nr 1.4.35.

Van West P, Appiah AA and Gow NAR. Advances in research on oomycete root pathogens. *Physiol. Mol. Plant Pathol.* 2003;62:99–113.

Verhagen BWM, Glazebrook J, Zhu T, Chang HS, Van Loon LC, Pieterse CMJ. The transcriptome of the rhizobacteria-induced systemic resistance in *Arabidopsis*. *Molecular Plant-Microbe Interactions* 2004;17:895-908.



Vijayan P, Shockey J, Levesque C A, Cook R J and Browse J. A role for jasmonate in pathogen defense of Arabidopsis. *Proc. Natl. Acad. Sci.* 1998; 95: 7209–7214.

Wang KLC, Li H and Ecker JR. Ethylene biosynthesis and signaling networks. *Plant Cell* 2002;14: S131–S151.

Wei G, Kloepper JW, Tuzun S. Induced systemic resistance to cucumber diseases and increased plant growth by plant growth promoting rhizobacteria under field conditions. *Phytopathology* 1996;86:221-224.

Weller DM. Biological control of soil-borne plant pathogens in the rhizosphere with bacteria. *Annual Review Of Phytopathology.* 1988; 26:379-407.

Zehnder G.W, Changbin Y, Wie G, Kloepper JW. Influence of methyl bromide fumigation on microbe-induced resistance in cucumber. *Biocontrol Science and Technology* 2000;10:687-693.

Zhang W, Han DY, Dick WA, Davis KR, Hoitink HAJ. Compost and compost extract-induced systemic acquired resistance in cucumber and *Arabidopsis*. *Phytopathology* 1998;88:450-455.

## Περίληψη

Τα φυτά προστατεύονται από τους παθογόνους μικροοργανισμούς με μια σειρά επακτών και προϋπαρχόντων μηχανισμών. Οι επακτοί μηχανισμοί σε ορισμένες περιπτώσεις ενεργοποιούνται από μη παθογόνους μικροοργανισμούς της ριζόσφαιρας. Η ακριβής φύση αυτής της συνεργασίας μεταξύ των φυτών και αυτών των μικροοργανισμών δεν έχει ακόμα διευκρινισθεί σε ικανοποιητικό βαθμό. Η παρούσα εργασία είχε σαν σκοπό να διερευνήσει την επίδραση ενός ενδοφυτικού ανταγωνιστικού στελέχους *Fusarium solani* στην έκφραση κάποιων πρωτεϊνών παθογένειας (PR) στην ντομάτα. Το στέλεχος αυτό θεωρείται ικανό να επάγει μηχανισμούς διασυστηματικής ανθεκτικότητας (ISR) και να προστατεύει αποτελεσματικά φυτά τομάτας έναντι παθογόνων των φύλλων και της ρίζας.

Χρησιμοποιώντας την τεχνική του RT-PCR βρέθηκε ότι το στέλεχος *Fusarium solani* δεν επηρεάζει την έκφραση των γονιδίων παθογένειας στα φύλλα της ντομάτας. Αντίθετα η έκφραση κάποιων από τα PR γονίδια στις ρίζες φαίνεται να καταστέλλεται από τη παρουσία του ανταγωνιστή μύκητα. Το γεγονός αυτό πιθανά οφείλεται στην αναγκαιότητα καταστολής αμυντικών μηχανισμών του φυτού προκειμένου αυτό να αποικισθεί από το *Fusarium solani*. Κατά συνέπεια τα αυξημένα επίπεδα ανθεκτικότητας των φυτών τομάτας, έναντι παθογόνων, λόγω της παρουσίας του *Fusarium solani* πιθανά οφείλονται σε δευτερογενή ενεργοποίηση άλλων μηχανισμών άμυνας οι οποίοι δεν έχουν να κάνουν με πρωτεΐνες παθογένειας.