



ΠΑΝΕΠΙΣΤΗΜΙΟ
ΘΕΣΣΑΛΙΑΣ

ΣΧΟΛΗ ΓΕΩΠΟΝΙΚΩΝ ΕΠΙΣΤΗΜΩΝ
ΤΜΗΜΑ ΓΕΩΠΟΝΙΑΣ, ΦΥΤΙΚΗΣ ΠΑΡΑΓΩΓΗΣ ΚΑΙ
ΑΓΡΟΤΙΚΟΥ ΠΕΡΙΒΑΛΛΟΝΤΟΣ

ΕΡΓΑΣΤΗΡΙΟ ΓΕΝΕΤΙΚΗΣ ΒΕΛΤΙΩΣΗΣ ΦΥΤΩΝ

ΠΤΥΧΙΑΚΗ ΔΙΑΤΡΙΒΗ

«Έκφραση του γονιδίου *hpaA* σε φυτά του είδους *N. benthamiana*: αξιολόγηση
της ανθεκτικότητας έναντι βιοτικών καταπονήσεων»

ΕΛΕΝΗ ΜΙΧΑΗΛΙΔΟΥ



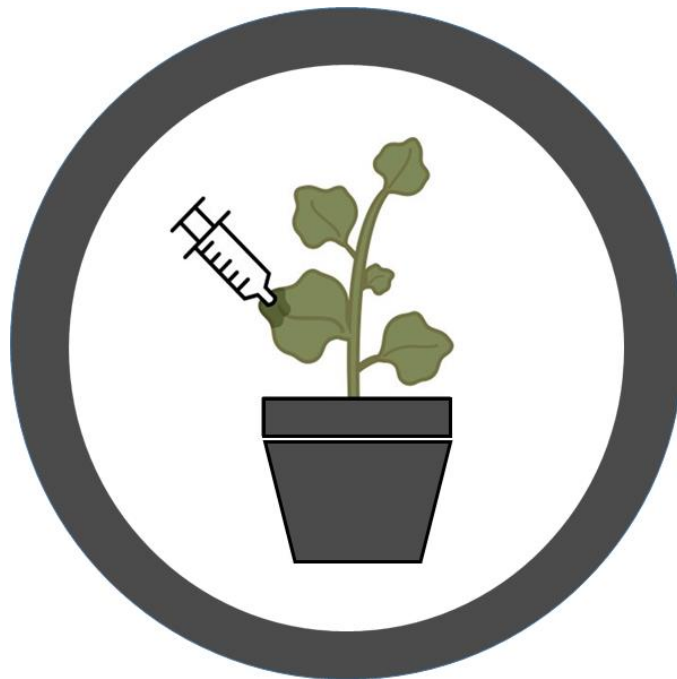
ΕΠΙΒΛΕΠΟΥΣΑ: ΟΥΡΑΝΙΑ ΠΑΥΛΗ, ΕΠΙΚ. ΚΑΘΗΓΗΤΡΙΑ Π.Θ.

ΒΟΛΟΣ 2021

«Έκφραση του γονιδίου *hpaA* σε φυτά του είδους *N. benthamiana*: αξιολόγηση της ανθεκτικότητας έναντι βιοτικών καταπονήσεων»

«Expression of *hpaA* in *N. benthamiana* plants: evaluation of resistance against biotic stresses»

Ελένη Μιχαηλίδου



Τριμελής Εξεταστική Επιτροπή:

Παυλή Ουρανία, Επικ. Καθηγήτρια, Γενετική Βελτίωση Φυτών, Τμήμα Γεωπονίας Φυτικής Παραγωγής και Αγροτικού Περιβάλλοντος, Πανεπιστήμιο Θεσσαλίας

Ιμπραχίμ-Αβραάμ Χα, Καθηγητής, Γενετική Βελτίωση Φυτών, Τμήμα Γεωπονίας Φυτικής Παραγωγής και Αγροτικού Περιβάλλοντος, Πανεπιστήμιο Θεσσαλίας

Παναγιώτης Μαδέσης, Επικ. Καθηγητής, Μοριακή Βιολογία Φυτών, Τμήμα Γεωπονίας Φυτικής Παραγωγής και Αγροτικού Περιβάλλοντος, Πανεπιστήμιο Θεσσαλίας

ΕΥΧΑΡΙΣΤΙΕΣ

Η παρούσα πτυχιακή εργασία με τίτλο «Έκφραση του γονιδίου *hpaA* σε φυτά του είδους *N. benthamiana*: αξιολόγηση της ανθεκτικότητας έναντι βιοτικών καταπονήσεων» εκπονήθηκε στο Εργαστήριο Γενετικής Βελτίωσης Φυτών του Τμήματος Γεωπονίας Φυτικής Παραγωγής και Αγροτικού Περιβάλλοντος της Σχολής Γεωπονικών Επιστημών του Πανεπιστημίου Θεσσαλίας κατά τη διάρκεια των ακαδημαϊκών ετών 2019-2020.

Η ολοκλήρωση της συγκεκριμένη διατριβής δεν θα είχε επιτευχθεί χωρίς τη συμβολή και τη συνεχή καθοδήγηση ορισμένων ανθρώπων, τους οποίους θα ήθελα να ευχαριστήσω.

Αρχικά, θα ήθελα να εκφράσω τις βαθύτατες ευχαριστίες μου στην επιβλέπουσα καθηγήτρια μου, κα. Ουρανία Παυλή, Επικ. Καθηγήτρια Γενετικής Βελτίωσης Φυτών, για την ανάθεση του θέματος, την πολύτιμη καθοδήγηση και υποστήριξη της καθώς και για το προσωπικό της ενδιαφέρον σε όλα τα στάδια της διατριβής.

Επιπλέον, θα ήθελα να ευχαριστήσω θερμά την κα. Νικολέτα Μητσοπούλου, υποψήφια διδάκτορα Γενετικής Βελτίωσης Φυτών για τη διαρκή βοήθεια κατά την εκπόνηση της διατριβής και τις πολύτιμες υποδείξεις της καθώς και την κα. Ευαγγελία Παναγιωτάκη, μέλος ΕΔΙΠ του Εργαστηρίου Γενετικής Βελτίωσης Φυτών, για το θερμό περιβάλλον κατά την διεξαγωγή των πειραμάτων στο Εργαστήριο Γενετικής Βελτίωσης Φυτών.

Τέλος, ένα τεράστιο ευχαριστώ στους φίλους μου και στην οικογένεια μου για την αγάπη και την στήριξη τους.

ΠΕΡΙΛΗΨΗ

Τα φυτά εκτίθενται σε πληθώρα αβιοτικών και βιοτικών καταπονήσεων. Κατά την εξελικτική διαδικασία, τα φυτά ανέπτυξαν μια σειρά από μηχανισμούς άμυνας προκειμένου να εξασφαλίσουν την επιβίωσή τους κάτω από δυσμενείς αγροκλιματικές συνθήκες. Ταυτόχρονα, σε αντίστοιχες διαδικασίες εξέλιξης υπόκεινται οι μικροοργανισμοί, οι οποίοι προσβλέπουν στη δυνατότητα επιβίωσης και αναπαραγωγής. Η πορεία συνεξέλιξης των φυτών και των μικροοργανισμών οδήγησε στην ανάπτυξη συστημάτων και μορίων, συμπεριλαμβανομένων των πρωτεϊνών τελεστών, που επιτρέπουν τη μεταβολή της άμυνας των φυτών-ξενιστών προς όφελος των μικροοργανισμών. Κατ' αντιστοιχία, τα φυτά με την πάροδο του χρόνου ανέπτυξαν μία πληθώρα αμυντικών μηχανισμών που δρουν σε επίπεδο αναγνώρισης των παθογόνων, σηματοδότησης και ενεργοποίησης βιοχημικών μονοπατιών που οδηγούν σε εκδήλωση ανθεκτικότητας.

Αντικείμενο της παρούσας πτυχιακής διατριβής αποτέλεσε η μελέτη της επίδρασης του γονιδίου *hpaA*, που προέρχεται από το φυτοπαθογόνο βακτήριο *Xanthomonas campestris* pv. *campestris*, ως προς την ανθεκτικότητα έναντι βιοτικών καταπονήσεων. Για την επίτευξη του ανωτέρου στόχου, μελετήθηκε η απόκριση διαγονιδιακών φυτών του είδους *N. benthamiana* σε συνθήκες καταπόνησης από το βακτήριο *Pseudomonas syringae* pv. *tabaci*, το οποίο προκαλεί την ασθένεια της βακτηριακής κηλίδωσης. Στο πλαίσιο αυτό, αναπτύχθηκαν *hpaA*-διαγονιδιακές σειρές και, έπειτα από τεχνητή μόλυνση με το βακτήριο, ακολούθησε αξιολόγηση της ανθεκτικότητας βάσει της συμπτωματολογίας, της αποίκισης του βακτηρίου και της περιεχόμενης ποσότητας χλωροφύλλης πριν και μετά τη μόλυνση με το βακτήριο. Παρά το γεγονός ότι τα συνολικά ευρήματα δεν υποστηρίζουν τη διαφορετική απόκριση των *hpaA*-διαγονιδιακών σειρών ως προς την ανθεκτικότητα έναντι του βακτηρίου *P. syringae* pv. *tabaci*, παρέχουν ενδείξεις για την εκδήλωση συμπτωμάτων της αντίδρασης υπερευαισθησίας. Με δεδομένο ότι μέχρι σήμερα, δεν έχει τύχει μελέτης η επίδραση της ενδογενούς έκφρασης του γονιδίου *hpaA* σε φυτά, τα αποτελέσματα της μελέτης συζητούνται υπό το πρίσμα της πιθανής αξιοποίησής του για την ανάπτυξη διαγονιδιακής ανθεκτικότητας έναντι καταπονήσεων.

ΠΕΡΙΕΧΟΜΕΝΑ

1.	ΕΙΣΑΓΩΓΗ.....	1
1.1	Γενικά	1
1.2	Κύριες καταπονήσεις των φυτών	2
1.2.1	Βιοτικές καταπονήσεις	2
1.2.2	Αβιοτικές καταπονήσεις.....	3
1.3	Καταπονήσεις που οφείλονται σε φυτοπαθογόνα βακτήρια	5
1.3.1	Το βακτήριο <i>Pseudomonas syringae</i> pv. <i>tabaci</i> - Ασθένεια της βακτηριακής κηλίδωσης.....	7
1.4	Μηχανισμοί άμυνας των φυτών έναντι καταπονήσεων	8
1.4.1	Παθητική αντοχή.....	10
1.4.2	Ενεργητική αντοχή	10
1.5	Γενετική Μηχανική: τεχνολογία ανάπτυξης ανθεκτικότητας έναντι καταπονήσεων	12
1.6	Προσεγγίσεις Γενετικής Μηχανικής	13
1.6.1	Pathogen derived resistance (PDR)	13
1.6.2	Εκκριτικό σύστημα τύπου III	14
1.6.3	Πρωτεΐνες - τελεστές.....	16
1.7	Γονίδια <i>hpaA</i> & <i>hpaB</i>	16
1.8	Το είδος <i>N. benthamiana</i>	18
	ΣΚΟΠΟΣ ΤΗΣ ΜΕΛΕΤΗΣ	21
2.	ΥΛΙΚΑ & ΜΕΘΟΔΟΙ	22
2.1	Φυτικό υλικό	22
2.2	Ανάπτυξη διαγονιδιακών <i>hpaA</i> -διαγονιδιακών σειρών	22
2.3	Προετοιμασία βακτηριακού μολύσματος και διαδικασία τεχνητής μόλυνσης των φυτών	23
2.4	Αξιολόγηση της ανθεκτικότητας έναντι του βακτηρίου <i>Pseudomonas syringae</i> pv. <i>tabaci</i> και μέτρηση αποικιών.....	24
2.5	Μέτρηση του ποσοστού χλωροφύλλης πριν και μετά την τεχνητή μόλυνση.....	25
3.	ΑΠΟΤΕΛΕΣΜΑΤΑ	27
3.1	Επίδραση της έκφρασης του γονιδίου <i>hpaA</i> στο φαινότυπο των διαγονιδιακών φυτών	27

3.2	Συγκριτική αξιολόγηση της συμπτωματολογίας των φυτών έπειτα από μόλυνση με το βακτήριο <i>Pseudomonas syringae</i> pv. <i>tabaci</i>	28
3.3	Συγκριτική αξιολόγηση της αποίκισης του βακτηρίου έπειτα από μόλυνση με το <i>Pseudomonas syringae</i> pv. <i>tabaci</i>	34
3.4	Συγκριτική αξιολόγηση των τιμών χλωροφύλλης πριν και μετά τη μόλυνση με το βακτήριο <i>Pseudomonas syringae</i> pv. <i>tabaci</i>	40
3.4.1	Τιμές χλωροφύλλης πριν την μόλυνση με το βακτήριο <i>Pseudomonas syringae</i> pv. <i>tabaci</i>	40
3.4.2	Τιμές χλωροφύλλης μετά την μόλυνση με το βακτήριο <i>Pseudomonas syringae</i> pv. <i>tabaci</i>	42
4.	ΣΥΖΗΤΗΣΗ.....	44
5.	ΣΥΜΠΕΡΑΣΜΑΤΑ.....	49
6.	BIBΛΙΟΓΡΑΦΙΑ.....	50
	Ξενόγλωσση	50
	Ελληνική.....	54
7.	ΠΑΡΑΡΤΗΜΑ	55

Κατάλογος Πινάκων

Πίνακας 3.1: Αποίκιση του βακτηρίου σε φυτά του είδους *N. benthamiana*, 24 ώρες μετά τη μόλυνση με το βακτήριο *Pseudomonas syringae* pv. *tabaci*.

Πίνακας 3.2: Αποίκιση του βακτηρίου σε φυτά του είδους *N. benthamiana*, 72 ώρες μετά τη μόλυνση με το βακτήριο *Pseudomonas syringae* pv. *tabaci*.

Πίνακας 3.3: Περιεχόμενη ποσότητα χλωροφύλλης στα φυτά αγρίου τύπου και στις *hpaA*-διαγονιδιακές σειρές, πριν τη μόλυνση με το βακτήριο *Pseudomonas syringae* pv. *tabaci*

Πίνακας 3.4: Περιεχόμενη ποσότητα χλωροφύλλης στα φυτά αγρίου τύπου και στις *hpaA*-διαγονιδιακές σειρές, μετά τη μόλυνση με το βακτήριο *Pseudomonas syringae* pv. *tabaci*.

Πίνακας 7.1: Τιμές χλωροφύλλης των φυτών αγρίου τύπου (WT), πριν και μετά τη μόλυνση με το βακτήριο *Pseudomonas syringae* pv. *tabaci*.

Πίνακας 7.2: Τιμές χλωροφύλλης της διαγονιδιακής σειράς *hpaA* 1-1 πριν και μετά τη μόλυνση με το βακτήριο *Pseudomonas syringae* pv. *tabaci*.

Πίνακας 7.3: Τιμές χλωροφύλλης της διαγονιδιακής σειράς *hpaA* 1-2 πριν και μετά τη μόλυνση με το βακτήριο *Pseudomonas syringae* pv. *tabaci*.

Πίνακας 7.4: Τιμές χλωροφύλλης της διαγονιδιακής σειράς *hpaA* 2-3 πριν και μετά τη μόλυνση με το βακτήριο *Pseudomonas syringae* pv. *tabaci*.

Πίνακας 7.5: Τιμές χλωροφύλλης της διαγονιδιακής σειράς *hpaA* T1-5 πριν και μετά τη μόλυνση με το βακτήριο *Pseudomonas syringae* pv. *tabaci*

Πίνακας 7.6: Μέσος όρος τιμών χλωροφύλλης των μαρτύρων και των μολυσμένων φυτών ανά κατηγορία φυτών (wt και *hpaA*-), πριν και μετά τη μόλυνση με το βακτήριο *Pseudomonas syringae* pv. *tabaci*.

Κατάλογος Γραφημάτων

Διάγραμμα 3.1: Περιεχόμενη ποσότητα χλωροφύλλης στα φυτά αγρίου τύπου και στις *hpaA*-διαγονιδιακές σειρές, πριν τη μόλυνση με το βακτήριο *Pseudomonas syringae* pv. *tabaci*.

Διάγραμμα 3.2: Περιεχόμενη ποσότητα χλωροφύλλης στα φυτά αγρίου τύπου και στις *hpaA*-διαγονιδιακές σειρές, 10 ημέρες μετά τη μόλυνση με το βακτήριο *Pseudomonas syringae* pv. *tabaci*.

Κατάλογος Εικόνων

Εικόνα 1.1 : Βιοτικοί και αβιοτικοί παράγοντες καταπόνησης (Καραμπουρνιώτης, κ.α., 2012).

Εικόνα 1.2 : Αντίδραση Υπερευαισθησίας (HR) σε φυτά καπνού. **A.** Συμπτώματα μωσαϊκού τα οποία προκλήθηκαν από τον ιό του μωσαϊκού του καπνού (TMV) σε ευαίσθητο φύλλο καπνού **B.** Ενεργοποίηση της αντίδρασης υπερευαισθησίας που εκδηλώνεται με κυτταρικό θάνατο, έπειτα από προσβολή ανθεκτικού γονοτύπου καπνού με τον ιό του μωσαϊκού του καπνού (TMV) (Πηγή: Sonhita et. al, 2017).

Εικόνα 1.3 : Άμεσες, τοπικές και διασυστηματικές αντιδράσεις επαγόμενης άμυνας φυτών (Πηγή: Καραμπουρνιώτης, κ.α., 2012).

Εικόνα 2.1 : Διαδικασία πραγματοποίησης των διαδοχικών αραιώσεων από τα εκχυλίσματα των φυτών για κάθε *hpaA*-διαγονιδιακή σειρά και τα φυτά αγρίου τύπου που χρησιμοποιήθηκαν ως μάρτυρες του είδους *N. benthamiana*, 24 h μετά την τεχνητή μόλυνση με το βακτήριο *Pseudomonas syringae* pv. *tabaci*.

Εικόνα 3.1: Συγκριτική απεικόνιση των *hpaA*-διαγονιδιακών φυτών και των φυτών αγρίου τύπου (WT). Παρατηρείται ομοιότητα ως προς τα μορφολογικά και αναπτυξιακά χαρακτηριστικά των φυτών. **A.** φυτά αγρίου τύπου **B.** φυτά της διαγονιδιακής σειράς *hpaA 2*-

Εικόνα 3.2: Συγκριτική απεικόνιση της συμπτωματολογίας φυτών του είδους *Nicotiana benthamiana*, δύο ημέρες μετά τη μόλυνση με το βακτήριο *Pseudomonas syringae* pv. *tabaci*. **A.** Φυτά αγρίου τύπου (WT), όπου είναι ορατή η ανάπτυξη χλωρωτικών κηλίδων στα μεσαία φύλλα. **B.** Φυτά της διαγονιδιακής σειράς *hpaA 1-2*, όπου είναι εμφανής η ανάπτυξη χλωρωτικών κηλίδων στα μεσαία φύλλα. **Γ.** Ανώτερο φύλλο της διαγονιδιακής σειράς *hpaA 1-1*, όπου είναι ορατή η ανάπτυξη χλωρωτικών κηλίδων. **Δ.** Φυτά της διαγονιδιακής σειράς *hpaA 2-3*, όπου είναι ορατή η εμφάνιση συμπτωμάτων ήπιου μαρασμού. **Ε.** Φυτά της διαγονιδιακής σειράς *hpaA T1-5*, όπου είναι ορατή η εμφάνιση συμπτωμάτων κύρτωσης του ελάσματος και ήπιου μαρασμού.

Εικόνα 3.3: Συγκριτική απεικόνιση της συμπτωματολογίας φυτών του είδους *Nicotiana benthamiana*, τέσσερις ημέρες μετά τη μόλυνση με το βακτήριο *Pseudomonas syringae* pv. *tabaci*. **A.** Ανώτερο φύλλο φυτού αγρίου τύπου

(WT), όπου είναι ορατή η ανάπτυξη εκτεταμένων χλωρωτικών κηλίδων. **B.** Μεσαίο φύλλο της διαγονιδιακής σειράς *hpaA 2-3*, όπου είναι ορατή η ήπια ανάπτυξη χλωρωτικών κηλίδων. **Γ.** Κορυφαίο φύλλο της διαγονιδιακής σειράς *hpaA T1-5*, όπου διακρίνονται χλωρωτικές κηλίδες. **Δ.** Φυτό της διαγονιδιακής σειράς *hpaA 1-1*, όπου είναι ορατή η ανάπτυξη χλωρωτικών κηλίδων και η ήπια κύρτωση του ελάσματος. **Ε.** Φυτά της διαγονιδιακής σειράς *hpaA 1-2*, όπου είναι εμφανής η έντονη ανάπτυξη μεσονεύριων χλωρωτικών κηλίδων στα ανώτερα φύλλα

Εικόνα 3.4: Συγκριτική απεικόνιση της συμπτωματολογίας φυτών του είδους *Nicotiana benthamiana*, επτά ημέρες μετά τη μόλυνση με το βακτήριο *Pseudomonas syringae* pv. *tabaci*. **A.** Μεσαίο φύλλο άγριου τύπου (WT), όπου είναι ορατή η ανάπτυξη έντονων χλωρωτικών κηλίδων. **B.** Φύλλο της διαγονιδιακής σειράς *hpaA 1-1*, όπου είναι εμφανής η κύρτωση του ελάσματος, η συστροφή των φύλλων και η περιφερειακή νέκρωση τους. **Γ.** Φυτό της διαγονιδιακής σειράς *hpaA 1-2*, όπου είναι εμφανής η ανάπτυξη χλωρωτικών κηλίδων και ο μαρασμός του φυτού. **Δ.** Φυτά της διαγονιδιακής σειράς *hpaA 2-3*, όπου διακρίνονται χλωρωτικές κηλίδες και ήπιος μαρασμός. **Ε.** Φυτό της διαγονιδιακής σειράς *hpaA T1-5*, όπου είναι ορατή η κύρτωση του ελάσματος, η συστροφή των φύλλων και ο ήπιος μαρασμός του φυτού.

Εικόνα 3.5: Συγκριτική απεικόνιση της συμπτωματολογίας φυτών του είδους *Nicotiana benthamiana*, δέκα ημέρες μετά τη μόλυνση με το βακτήριο *Pseudomonas syringae* pv. *tabaci*. **A.** Μεσαίο φύλλο άγριου τύπου (WT), όπου είναι εμφανής η ανάπτυξη χλωρωτικών κηλίδων. **B.** Φυτά της διαγονιδιακής σειράς *hpaA 1-1*, όπου διακρίνονται χλωρωτικές κηλίδες στα μεσαία φύλλα, κύρτωση του ελάσματος και περιφερειακή νέκρωση στα κατώτερα φύλλα. **Γ.** Φυτά της διαγονιδιακής σειράς *hpaA 1-2*, όπου είναι ορατή η κύρτωση του ελάσματος και ο μαρασμός του φυτού. **Δ.** Φυτά της διαγονιδιακής σειράς *hpaA 2-3*, όπου διακρίνεται ο ήπιος μαρασμός του φυτού. **Ε.** Φυτό της διαγονιδιακής σειράς *hpaA T1-5*, όπου διακρίνεται η συστροφή των φύλλων και ο μαρασμός του φυτού

Εικόνα 3.6: Συγκριτική απεικόνιση της συμπτωματολογίας φυτών του είδους *Nicotiana benthamiana*, δεκαέξι ημέρες μετά τη μόλυνση με το βακτήριο *Pseudomonas syringae* pv. *tabaci*. **A.** Φυτά άγριου τύπου (WT), όπου είναι

εμφανής η συστροφή των φύλλων και ο μαρασμός. **Β.** Φυτό της διαγονιδιακής σειράς *hraA 1-1*, όπου είναι εμφανής η ανάπτυξη έντονων και εκτεταμένων χλωρωτικών κηλίδων. **Γ.** Φύλλο της διαγονιδιακής σειράς *hraA 1-2*, όπου είναι ορατή η περιφερειακή νέκρωση του φύλλου. **Δ.** Φυτά της διαγονιδιακής σειράς *hraA T1-5*, όπου διακρίνεται η κύρτωση του ελάσματος και ο μαρασμός του φυτού. **Ε.** Φύλλο της διαγονιδιακής σειράς *hraA 2-3*, όπου διακρίνεται παραμόρφωση του ελάσματος και ο μαρασμός των φύλλων.

Εικόνα 3.7: Συγκριτική απεικόνιση των αποικιών που αναπτύχθηκαν σε φυτικό ιστό του είδους *Nicotiana benthamiana*, 24 ώρες έπειτα από τη μόλυνση με το βακτήριο *Pseudomonas syringae* pv. *tabaci*. **Α.** Ιστός που προέρχεται από υγιή, μη μολυσμένο φυτό (μάρτυρας) **Β.** Ιστός που προέρχεται από φυτό αγρίου τύπου (WT) **Γ.** Ιστός που προέρχεται από φυτό της σειράς *hraA 1-1* **Δ.** Ιστός που προέρχεται από φυτό της σειράς *hraA 1-2* **Ε.** Ιστός που προέρχεται από φυτό της σειράς *hraA 2-3* **ΣΤ.** Ιστός που προέρχεται από φυτό της σειράς *hraA T1-5*.

Εικόνα 3.8: Συγκριτική απεικόνιση των αποικιών που αναπτύχθηκαν σε φυτικό ιστό του είδους *Nicotiana benthamiana*, 72 ώρες έπειτα από τη μόλυνση με το βακτήριο *Pseudomonas syringae* pv. *tabaci*. **Α.** Ιστός που προέρχεται από υγιή, μη μολυσμένο φυτό (μάρτυρας) **Β.** Ιστός που προέρχεται από φυτό αγρίου τύπου (WT) **Γ.** Ιστός που προέρχεται από φυτό της σειράς *hraA 1-1* **Δ.** Ιστός που προέρχεται από φυτό της σειράς *hraA 1-2* **Ε.** Ιστός που προέρχεται από φυτό της σειράς *hraA 2-3* **ΣΤ.** Ιστός που προέρχεται από φυτό της σειράς *hraA T1-5*.

1. ΕΙΣΑΓΩΓΗ

1.1 Γενικά

Η πλειονότητα των φυτών αναπτύσσεται σε περιβάλλοντα που επικρατούν δυσμενείς συνθήκες για την αύξηση, ανάπτυξη και επιβίωσή τους. Τις τελευταίες δεκαετίες, οι επιδράσεις της κλιματικής αλλαγής και του φαινομένου του θερμοκηπίου οδηγούν σε μεταβολές τόσο στο περιβάλλον όσο και στη βιοποικιλότητα των αγροσυστημάτων. Οι αντίξοες συνθήκες που προκαλούν καταπόνηση στα φυτά περιλαμβάνουν αβιοτικούς και βιοτικούς παράγοντες. Οι δυσμενείς επιδράσεις των παραγόντων καταπόνησης τείνουν να παρεμποδίσουν την εύρυθμη λειτουργία των φυτών, δημιουργώντας συνέπειες που εκδηλώνονται σε φυσιολογικό, αναπτυξιακό, μορφολογικό και βιοχημικό επίπεδο αλλά και στο επίπεδο της παραγωγικότητάς τους (Wang *et al.*, 2003; Wania *et al.*, 2016).

Σύμφωνα με ερευνητικές μελέτες, οι αβιοτικές καταπονήσεις επηρεάζουν άμεσα την ανάπτυξη και την παραγωγικότητα των φυτών και είναι υπεύθυνες για τη σημαντική μείωση της απόδοσης και την απειλή της βιωσιμότητας της καλλιέργειας (Tardieu, 2010). Ως απόκριση στις αβιοτικές καταπονήσεις, τα φυτά έχουν αναπτύξει ένα εύρος στρατηγικών ώστε να καταστούν ικανά να προσαρμοστούν και να αντιμετωπίσουν τις αντίξοες συνθήκες που επικρατούν στο περιβάλλον ανάπτυξής τους (Boyer, 1982). Είναι ευρέως γνωστό ότι το δυναμικό απόδοσης μιας καλλιέργειας επηρεάζεται άμεσα από τις επικρατούσες περιβαλλοντικές συνθήκες, ενώ ταυτόχρονα διαμορφώνεται και από το γονότυπο και την αλληλεπίδραση γονοτύπου-περιβάλλοντος. Συνεπώς, το περιβάλλον αποτελεί έναν καθοριστικό παράγοντα αναφορικά με την εκδήλωση των μορφολογικών γνωρισμάτων των φυτών αλλά και το δυναμικό ανάπτυξης και παραγωγικότητας.

Από την άλλη πλευρά, σημαντικότερη είναι και η επίδραση των βιοτικών παραγόντων καταπόνησης. Το βιοτικό στρες στα φυτά προκαλείται από ζωντανούς οργανισμούς, συμπεριλαμβανομένων των ιών, βακτηρίων, μυκήτων αλλά και των νηματωδών και εντόμων. Οι βιοτικοί παράγοντες καταπόνησης στερούν άμεσα από τον ξενιστή τους τα απαραίτητα θρεπτικά συστατικά, προκαλώντας επιπτώσεις που συχνά οδηγούν σε αδυναμία επιβίωσής τους.

Είναι ωστόσο αξιοσημείωτο ότι το περιβάλλον ανάπτυξης των φυτών συχνά χαρακτηρίζεται από την ταυτόχρονη επικράτηση αβιοτικών και βιοτικών παραγόντων καταπόνησης, ενώ είναι σπανιότερη η παρουσία ενός μόνο παράγοντα καταπόνησης. Σύμφωνα με τους Rizhsky *et al.* (2004b), τα φυτά έχουν αναπτύξει συγκεκριμένους μηχανισμούς που τους επιτρέπουν να εντοπίζουν ακριβείς περιβαλλοντικές αλλαγές και να ανταποκρίνονται σε σύνθετες συνθήκες στρες, ελαχιστοποιώντας τις βλάβες και διατηρώντας παράλληλα πολύτιμους πόρους για την ανάπτυξη και αναπαραγωγή τους. Σημειώνεται ωστόσο ότι υπό συνθήκες ταυτόχρονης επικράτησης βιοτικών και αβιοτικών καταπονήσεων, οι οδοί σηματοδότησης έχει διαπιστωθεί ότι συχνά δρουν ανταγωνιστικά (Anderson *et al.*, 2004; Asselbergh *et al.*, 2008b).

1.2 Κύριες καταπονήσεις των φυτών

1.2.1 Βιοτικές καταπονήσεις

Οι βιοτικές καταπονήσεις στα φυτά προκαλούνται από ζωντανούς οργανισμούς, όπως μύκητες, ιοί, ιοειδή, βακτήρια, νηματώδεις, έντομα κ.λπ. Οι εν λόγω παράγοντες καταπόνησης προκαλούν διάφορους τύπους ασθενειών και βλαβών στα φυτά, επηρεάζοντας τελικά σε σημαντική υποβάθμιση, ποιοτική και ποσοτική, της αποδοτικότητας της καλλιέργειας. Οι επιδράσεις των βιοτικών καταπονήσεων γίνονται ορατές μέσω των απωλειών που προκαλούν πριν και μετά τη συγκομιδή. Παρά το γεγονός ότι τα φυτά στερούνται προσαρμοστικού ανοσοποιητικού συστήματος, καθίστανται ικανά να εξουδετερώσουν, μερικώς ή πλήρως, τις επιδράσεις του παράγοντα καταπόνησης μέσω συγκεκριμένων στρατηγικών που έχουν εξελιχθεί κατά τη συνύπαρξή τους. Οι αμυντικοί μηχανισμοί που δρουν ενάντια στις καταπονήσεις ελέγχονται γενετικά και αφορούν κυρίως στην παρουσία και έκφραση γονιδίων που ελέγχουν γνωρίσματα ανθεκτικότητας.

Οι επιδράσεις των βιοτικών καταπονήσεων παρουσιάζουν ομοιότητες αλλά και αξιοσημείωτες διαφορές συγκριτικά με αυτές που προκαλούνται από αβιοτικούς παράγοντες, όπως η αλατότητα, η ηλιακή ακτινοβολία, οι ακραίες θερμοκρασίες, οι πλημμύρες και η ξηρασία (Anderson *et al.*, 2004; Asselbergh *et al.*, 2008b). Συχνά παρατηρούμενη επίδραση των βιοτικών καταπονήσεων είναι η μεταβολή της φωτοσυνθετικής δραστηριότητας, η οποία στην περίπτωση των μασητικών εντόμων

οφείλεται στη μείωση της φυλλικής επιφάνειας, ενώ υπό συνθήκες ιολογικών ασθενειών σχετίζεται με τη μείωση του ρυθμού φωτοσύνθεσης ανά περιοχή φύλλων. Παρά τη διαφορετική απόκριση των φυτών στις διαφορετικές βιοτικές καταπονήσεις, η μείωση της απόδοσης των καλλιεργειών αποτελεί μία γενικευμένη επίδραση. Με στόχο τη μείωση των απωλειών που αποδίδονται στις βιοτικές καταπονήσεις, η βελτίωση της ανθεκτικότητας αποτελεί βασικότατο στόχο του συνόλου των βελτιωτικών προγραμμάτων ανεξάρτητα από το είδος και την κατεύθυνση της καλλιέργειας. Για την επίτευξη του στόχου της ανάπτυξης ανθεκτικών ποικιλιών, οι ερευνητικές προσπάθειες στρέφονται προς ένα εύρος στρατηγικών και μεθοδολογικών προσεγγίσεων που εκτείνονται από τις κλασικές έως και τις πλέον σύγχρονες βιοτεχνολογικές εφαρμογές, συμπεριλαμβανομένων αυτών της γενετικής μηχανικής (Anderson *et al.*, 2004; Asselbergh *et al.*, 2008b).

1.2.2 Αβιοτικές καταπονήσεις

Οι αβιοτικοί παράγοντες είναι οι σημαντικότεροι παράγοντες περιορισμού της απόδοσης των καλλιεργειών (Canter, 2018; Zörb *et al.*, 2019). Οι ακραίες θερμοκρασίες, η ξηρασία, οι πλημμύρες, η αλατότητα και το στρες από τα βαρέα μέταλλα, μεταξύ άλλων, επηρεάζουν την αύξηση, την ανάπτυξη και την απόδοση των φυτών (Waqas *et al.*, 2017; Vaughan *et al.*, 2018; Zafar *et al.*, 2018). Αξίζει να σημειωθεί ότι σύμφωνα με πρόσφατες αναφορές, περίπου το 90 % της συνολικής καλλιεργήσιμης έκτασης σε παγκόσμιο επίπεδο είναι επιρρεπής σε έναν ή περισσότερους αβιοτικούς παράγοντες καταπόνησης, επιφέροντας απώλειες απόδοσης έως και 70 % σε σημαντικές τροφικές καλλιέργειες (dos Reis *et al.*, 2012; Mantri *et al.*, 2012). Επιπλέον, οι εκτιμήσεις που βασίζονται στην ενσωμάτωση των επιπτώσεων της κλιματικής αλλαγής και σε μοντέλα απόδοσης των καλλιεργειών υπογραμμίζουν την επερχόμενη μείωση της απόδοσης σημαντικών καλλιεργειών, όπως αυτές του ρυζιού, του σίτου και του αραβοσίτου, προκαλώντας αδιαμφισβήτητα ανησυχία σχετικά με την επισιτιστική ασφάλεια (Tigchelaar *et al.*, 2018).

Οι πλέον σημαντικές αβιοτικές καταπονήσεις, βάσει των επιπτώσεων στις μορφολογικές, φυσιολογικές, βιοχημικές και μοριακές αποκρίσεις των φυτών είναι η θερμοκρασιακή και η υδατική καταπόνηση. Παράλληλα, ο συνδυασμός των ανωτέρω καταπονήσεων προκαλεί πολυεπίπεδες φυσιολογικές μεταβολές που επηρεάζουν την

ανάπτυξη, την απόδοση και την ποιότητα των παραγόμενων προϊόντων (Rizhsky *et al.*, 2002; Mittler, 2006; Prasad *et al.*, 2011; Vile *et al.*, 2012; Suzuki, 2014).

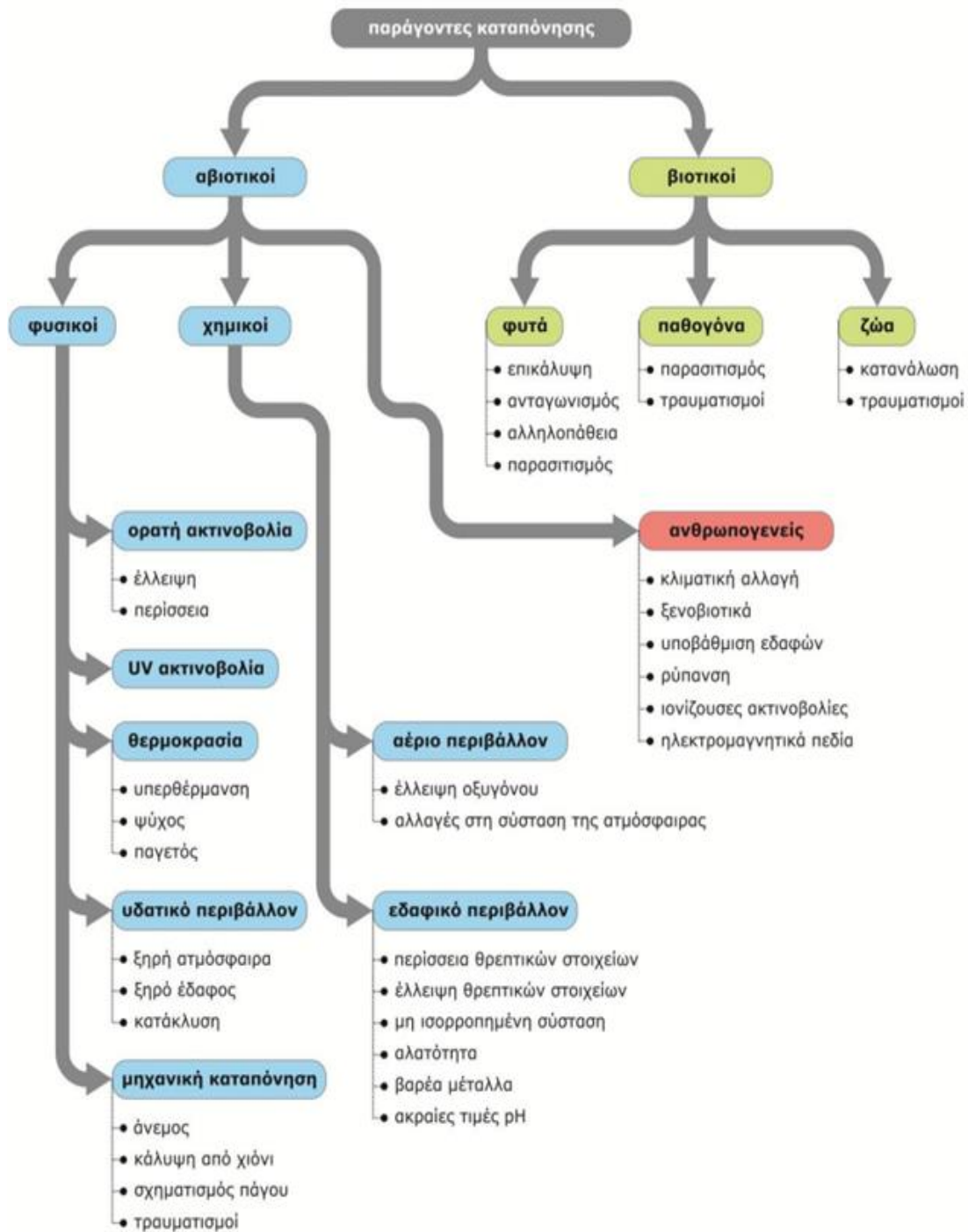
Υπό συνθήκες αγρού, οι καλλιέργειες εκτίθενται συνήθως σε διάφορους παράγοντες αβιοτικού στρες ταυτόχρονα. Πρόσφατες μελέτες αποκάλυψαν ότι η απόκριση των φυτών σε ένα συνδυασμό διαφορετικών αβιοτικών στρες είναι μοναδική και δεν μπορεί να γίνει αντιληπτή μελετώντας ξεχωριστά τις επικρατούσες επιλεκτικές πιέσεις. Η συνδυασμένη επίδραση αβιοτικών καταπονήσεων δημιουργεί συνθήκες ισχυρής επιλεκτικής πίεσης, οι οποίες οδηγούν στην προσαρμογή και ικανότητα επιβίωσης των φυτών σε δυσμενείς συνθήκες. Το θερμοκρασιακό στρες - ψυχρό ή θερμικό - κατά τη διάρκεια των κρίσιμων σταδίων ανάπτυξης των φυτών επιδρά στην ανάπτυξή τους (Zhou *et al.*, 2018), διαταράσσοντας παράλληλα τη βέλτιστη βιοχημική και φυσιολογική λειτουργία τους και προκαλώντας τροποποιήσεις σε μοριακό επίπεδο (Djanaguiraman *et al.*, 2018; Muhlemann *et al.*, 2018; Takahashi & Shinozaki, 2019). Αντίστοιχα, η υδατική καταπόνηση επηρεάζει άμεσα την βιωσιμότητα και παραγωγικότητα των φυτών λόγω της επίδρασης αφυδάτωσης ή/και ωσμωτικής καταπόνησης, προσομοιάζοντας τα συμπτώματα καταπόνησης αλατότητας. Κοινό χαρακτηριστικό των δυο όψεων της υδατικής καταπόνησης είναι η μείωση του υδατικού δυναμικού στους φυτικούς ιστούς, η οποία προκαλεί ωσμωτικό στρες και αφυδάτωση των κυττάρων (Sperry *et al.*, 2002; Tardieu *et al.*, 2017; Bartlett *et al.*, 2019).

Παρά την ευρεία επικράτηση βιοτικών και αβιοτικών καταπονήσεων στα περιβάλλοντα ανάπτυξης των καλλιεργειών, οι φυτικοί οργανισμοί χαρακτηρίζονται από την ικανότητα πρόσληψης των περιβαλλοντικών ερεθισμάτων, μεταγωγής του σήματος κινδύνου στους φυτικούς ιστούς και τροποποίησης των λειτουργιών τους με τρόπο που προάγει την προσαρμογή τους τις επικρατούσες καταπονήσεις. Οι τροποποιήσεις που λαμβάνουν χώρα υπό συνθήκες καταπόνησης μπορεί να είναι παροδικές ή μόνιμες και να κληρονομούνται στις επόμενες γενεές (Souza & Sodek 2003; Renault *et al.*, 2010).

1.3 Καταπονήσεις που οφείλονται σε φυτοπαθογόνα βακτήρια

Τα φυτά εκτίθενται συνεχώς σε ένα εύρος παθογόνων μικροοργανισμών, που περιλαμβάνει βακτήρια, ιούς, ιοειδή και μύκητες. Μεταξύ των βιοτικών παραγόντων καταπόνησης των φυτών, τα φυτοπαθογόνα βακτήρια προκαλούν σημαντικότερες απώλειες σε επίπεδο ανάπτυξης και απόδοσης, ενώ παράλληλα είναι δύσκολος ο έλεγχος τους (Εικόνα 1.1). Η πλειονότητα των φυτοπαθογόνων βακτηρίων είναι αρνητικά κατά Gram και ανήκουν στα γένη *Erwinia*, *Pseudomonas*, *Xanthomonas*, *Ralstonia* και *Agrobacterium*. Κοινό χαρακτηριστικό των εν λόγω γενών βακτηρίων είναι ότι αφορούν σε εξωκυτταρικά παθογόνα που αρχικά αναπτύσσονται επιφυτικά και έπειτα ενδοφυτικά ως βιότροφα, είτε στο χώρο μεταξύ των κυττάρων είτε στο αγγειακό σύστημα των φυτών (Agiros, 2004). Η αρχική μόλυνση ξεκινά με μικρό αριθμό παθογόνων κυττάρων, τα οποία αποικούν και πολλαπλασιάζονται συνεχώς στους ζωντανούς φυτικούς ιστούς, επιτυγχάνοντας σε σύντομο χρόνο ιδιαίτερα μεγάλους πληθυσμούς. Η ποσότητα της μεγάλης μικροβιακής βιομάζας οδηγεί σε παραγωγή βιοενεργών συστατικών, ταχεία εξάντληση των θρεπτικών στοιχείων και καθυστέρηση της ανάπτυξης του φυτού-ξενιστή. Τα μολυσμένα φυτά εμφανίζουν μακροσκοπικές αλλαγές, οι οποίες είναι κατά περίπτωση χαρακτηριστικές της αλληλεπίδρασης παθογόνου-ξενιστή. Η τελική συνέπεια από την μόλυνση με φυτοπαθογόνα βακτήρια είναι η μειωμένη ανάπτυξη και απόδοση των φυτών, η υποβάθμιση της ποιότητας, οι μετασυλλεκτικές απώλειες και σπανιότερα η αυξημένη ευαισθησία σε βιοτικές και αβιοτικές καταπονήσεις.

Η πλειονότητα των σημαντικών για την γεωργία φυτικών ειδών, είναι επιδεκτικά στην προσβολή από φυτοπαθογόνα βακτήρια. Ωστόσο, η πλειονότητα των φυτικών ειδών έχει αναπτύξει ανθεκτικότητα ή αντοχή έναντι των περισσότερων φυτοπαθογόνων βακτηρίων. Η ανθεκτικότητα των φυτών και το εύρος των ξενιστών που δύναται να προσβάλλει ένα βακτηριακό είδος ή στέλεχος βακτηρίου καθορίζεται από το είδος και το γονότυπο του ξενιστή, τις επικρατούσες περιβαλλοντικές συνθήκες καθώς και την αλληλεπίδρασή τους.



Εικόνα 1.1 : Βιοτικοί και αβιοτικοί παράγοντες καταπόνησης (Καραμπουρνιώτης, κ.α., 2012).

1.3.1 Το βακτήριο *Pseudomonas syringae* pv. *tabaci* - Ασθένεια της βακτηριακής κηλίδωσης

Το βακτήριο *P. syringae* pv. *tabaci* είναι ένα αρνητικό κατά Gram μη-καψιδιακό βακτήριο, το οποίο αποτελεί το παθογόνο αίτιο της ασθένειας της βακτηριακής κηλίδωσης. Ως προς την βιολογία του, δεν σχηματίζει σπόρια, είναι μη-οξυάντοχο, έχει ράβδους μήκους 0.5 x 2-2.5 μm και έξι διπολικά μαστίγια. Κατά την προσβολή ενός φυτού-ξενιστή το βακτήριο παράγει καπνοτοξίνη, μία πράσινη φθορίζουσα χρωστική ουσία που προκαλεί μείωση των επιπέδων συνθετάσης της γλουταμίνης και της χλωροφύλλης. Κατ' επέκταση, τα προσβεβλημένα φυτά εμφανίζουν χλώρωση του ιστού, κηλίδες που περιβάλλονται από χλωρωτική άλω και νέκρωση των ιστών στα προσβεβλημένα μέρη του φυτού (Lucas, 1975).

Η *in vitro* καλλιέργεια του βακτηρίου σχηματίζει μεγάλο αριθμό αποικιών λευκού χρώματος, οι οποίες έχουν μία ημιδιαφανή άκρη. Κατά την απομόνωση του βακτηρίου, και έπειτα από επαναλαμβανόμενη ανακαλλιέργεια, παρατηρείται σημαντική μείωση ή απώλεια της παθογόνου ικανότητάς του (Sigeo & El-Mastery, 1989). Ωστόσο, σύμφωνα με μελέτες, όταν γίνονται συχνοί εμβολιασμοί και επαναπομονώσεις σε φυτά καπνού, φαίνεται να διατηρείται η παθογένειά του. Η διατήρηση των βακτηριακών κυττάρων μπορεί να γίνει σε αποστειρωμένο απεσταγμένο νερό, ενώ έχει αποδειχθεί ότι έτσι διατηρείται η μολυσματικότητά του.

Τα συμπτώματα της βακτηριακής κηλίδωσης είναι η εμφάνιση κηλίδων, οι οποίες στην αρχή είναι υδατώδεις και αργότερα γίνονται νεκρωτικές και έχουν γωνιακά περιθώρια. Οι κηλίδες αυτές περιβάλλονται από χλωρωτική άλω, πλάτους έως 2.5 cm και οι νεκρωτικές κηλίδες έχουν διάμετρο 1 - 8 mm. Σε κάποιες περιπτώσεις, οι κηλίδες μπορεί να συνενώνονται, σχηματίζοντας πολύ μεγάλες νεκρωτικές περιοχές στην επιφάνεια των φύλλων. Τα τελικά συμπτώματα στα αναπτυσσόμενα φύλλα οδηγούν σε παραμόρφωση και συστροφή των φύλλων, ενώ οι υγιείς ιστοί των φύλλων συνεχίζουν να επεκτείνονται γύρω από την προσβεβλημένη περιοχή. Κατόπιν, τα μολυσμένα φύλλα φθείρονται και γίνονται πιο τραχιά και ο ιστός αποκολλάται από το κυρίως έλασμα και πέφτει. Η ασθένεια εξελίσσεται συχνά στις περιοχές έντονης προσβολής και σε εντοπισμένες περιοχές που γειτνιάζουν με την αρχική εστία μόλυνσης.

Στα σπορεία, τα προσβεβλημένα φύλλα αναπτύσσουν περιφερειακές υγρές σήψεις, οι οποίες επεκτείνονται και καλύπτουν ολόκληρη τη φυλλική επιφάνεια.

Μερικά φυτά ενδέχεται να νεκρωθούν στο σπορείο ή αμέσως μετά τη μεταφύτευσή τους. Στον αγρό, στα προσβεβλημένα φύλλα αναπτύσσονται αρχικά χλωρωτικές κηλίδες, οι οποίες αργότερα μετατρέπονται σε νεκρωτικές και επεκτείνονται γρήγορα οδηγώντας στην πτώση τμημάτων των φύλλων υπό συνθήκες υψηλής σχετικής υγρασίας (Lucas, 1975; Shew & Lucas, 1991).

Το βακτήριο *Pseudomonas syringae* pv. *tabaci* διαχειμάζει στο έδαφος, σε υπολείμματα των φυτών και στους σπόρους. Η μεταφορά του στα φυτικά μέρη γίνεται μέσω των σταγονιδίων της βροχής, τον άνεμο και της καλλιεργητικές εργασίες αγρού. Η υψηλή σχετική υγρασία ή ύπαρξη λεπτού στρώματος νερού συντελούν στην εμφάνιση μολύνσεων και στην επιδημιολογική εξέλιξη της ασθένειας. Η είσοδος των βακτηρίων και η μόλυνση των φυτών, μπορεί να γίνει μέσω των στομάτων και των πληγών, με συνέπεια την εκδήλωση της σχετικής συμπτωματολογίας.

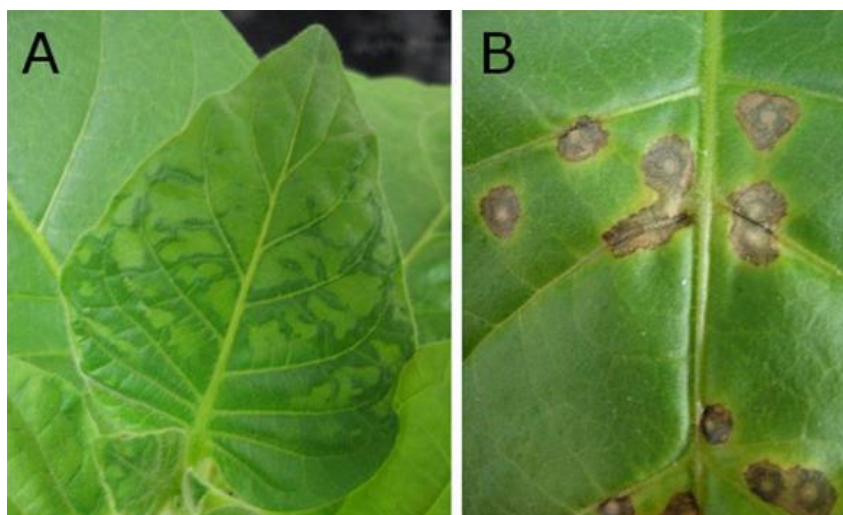
1.4 Μηχανισμοί άμυνας των φυτών έναντι καταπονήσεων

Με δεδομένη την αδυναμία κίνησης των φυτών κατά την επικράτηση παραγόντων καταπόνησης, τα φυτά έχουν αναπτύξει πληθώρα μηχανισμών άμυνας προκειμένου να εξασφαλίσουν την απρόσκοπτη ανάπτυξη και επιβίωσή τους. Οι μηχανισμοί άμυνας των φυτών διακρίνονται στους επαγόμενους και συστατικούς ή δομικούς. Η ενεργοποίηση των δομικών μηχανισμών άμυνας απαιτεί την καταβολή υψηλότερων επιπέδων ενέργειας, γι' αυτό σε περιόδους που δεν υπάρχει άμεσος κίνδυνος για τα φυτά αξιοποιούνται κυρίως οι επαγόμενοι μηχανισμοί άμυνας (Karban & Baldwin, 2007). Παράλληλα, έχει διαπιστωθεί η αλληλεπίδραση των εμπλεκόμενων βιοχημικών μονοπατιών, ενώ συχνά η ενεργοποίηση των επαγόμενων μηχανισμών άμυνας φαίνεται να επιδρά αρνητικά στη εύρυθμη λειτουργία βιοχημικών μονοπατιών που συμβάλλουν στην καταπολέμηση άλλων εχθρών (Agrawal *et al.*, 1999; Kunkel *et al.*, 2002).

Τα φυτά, όπως και όλοι οι ανώτεροι οργανισμοί, προσαρμόζονται παράλληλα με την εξελικτική πορεία των οργανισμών που δρουν ως άμεσοι εχθροί τους. Χαρακτηριστικό της εν λόγω αλληλεπίδρασης είναι το γεγονός ότι στα φυτοπαθογόνα βακτήρια συχνά παρατηρείται μεταβολή των συστημάτων έκκρισης και παράλληλα τα φυτά προσαρμόζουν ανάλογα την ανθεκτικότητά τους.

Οι κύριοι μηχανισμοί άμυνας των φυτών περιλαμβάνουν τη βιοσύνθεση φυτοαλεξινών (δευτερογενείς μεταβολίτες με αντιμικροβιακή δράση), την ενίσχυση του κυτταρικού τοιχώματος, με εναπόθεση καλλόζης, λιγνίνης και γλυκοπρωτεϊνών πλούσιων σε υδροξυπρολίνη, καθώς και την παραγωγή διαφόρων υδρολυτικών και οξειδωτικών ενζύμων, όπως λυσοζύμες, χιτινάσες, γλουκανάσες και περοξειδάσες (Brisson *et al.*, 1994; Osbourn *et al.*, 1996; Somssich & Hahlbrock, 1998; Van Loon, 1997).

Η επαγωγή μέρους ή του συνόλου των μηχανισμών άμυνας λαμβάνει χώρα στις περισσότερες αλληλεπιδράσεις των παθογόνων με ανθεκτικά φυτά, ενώ συχνά αλλά όχι πάντα, παρατηρείται η επαγωγή της αντίδρασης υπερευαισθησίας (Hypersensitive Response, HR), ως αποτέλεσμα της αλληλεπίδρασης των *avr* γονιδίων των παθογόνων με αντίστοιχα αλληλόμορφα γονιδίων ανθεκτικότητας (Resistance genes, *R*) των φυτών. Ως αντίδραση υπερευαισθησίας (HR) ορίζεται η ακραία έκφραση αντοχής των φυτών σε μυκητολογικές, βιολογικές και ιολογικές προσβολές, με κύριο χαρακτηριστικό τον ταχύτατο κυτταρικό θάνατο (Εικόνα 1.2).



Εικόνα 1.2 : Αντίδραση Υπερευαισθησίας (HR) σε φυτά καπνού. **A.** Συμπτώματα μωσαϊκού τα οποία προκλήθηκαν από τον ιό του μωσαϊκού του καπνού (TMV) σε ευαίσθητο φύλλο καπνού **B.** Ενεργοποίηση της αντίδρασης υπερευαισθησίας που εκδηλώνεται με κυτταρικό θάνατο, έπειτα από προσβολή ανθεκτικού γονοτύπου καπνού με τον ιό του μωσαϊκού του καπνού (TMV) (Πηγή: Sonhita *et. al.*, 2017).

Η HR θεωρείται ως ένας από τους κύριους μηχανισμούς άμυνας που απαντάται στο οπλοστάσιο των φυτικών οργανισμών (Τζάμος, 2007). Η ενεργοποίηση της HR συνεπάγεται ταχεία νέκρωση των κυττάρων στην περιοχή που έχει γίνει η προσβολή από τον παθογόνο παράγοντα, η οποία οδηγεί σε αποκλεισμό του παθογόνου και στον έγκαιρο περιορισμό της εξάπλωσης της μόλυνσης. Για τους ανωτέρω λόγους, η HR χαρακτηρίζεται ως ένας μηχανισμός προγραμματισμένου θανάτου προσβεβλημένων κυττάρων ο οποίος αποσκοπεί στην ανάσχεση της προσβολής από το παθογόνο.

1.4.1 Παθητική αντοχή

Ως παθητική αντοχή ορίζεται η ανθεκτικότητα που οφείλεται σε κληρονομούμενα ανατομικά και βιοχημικά χαρακτηριστικά. Η ύπαρξη των κληρονομούμενων αυτών χαρακτηριστικών, παρεμποδίζει ή καθυστερεί τη μόλυνση με το παθογόνο, ενώ η αποτελεσματικότητα έγκειται στο γεγονός ότι τα χαρακτηριστικά αυτά υφίστανται πριν από την προσβολή από το παθογόνο (Ζάχος, 1984). Η μόλυνση εμποδίζεται από τα προστατευτικά στρώματα που υπάρχουν στην επιφάνεια των φυτών και τα φυσικά ανοίγματα (κηρώδης επίστρωση, χνούδι, στομάτια), από το πάχος και τη σκληρότητα των κυτταρικών τοιχωμάτων των ιστών του φυτού, από τις αντιμικροβιακές ουσίες που εκκρίνονται από το περιβάλλον του, από την απουσία στο φυτό ουσιών που συμβάλλουν την ανάπτυξη του παθογόνου καθώς και την απουσία των υποδοχέων ευαισθησίας στις παραγόμενες τοξίνες του παθογόνου (Otani, 1998). Επίσης, παρεμποδιστικά δρουν η οσμωτική πίεση, η περιεκτικότητα σε νερό και η ενεργός οξύτητα των φυτικών κυττάρων (Agiros, 1997).

1.4.2 Ενεργητική αντοχή

Με τον όρο ενεργητική ή διασυστηματική αντοχή νοείται η ανθεκτικότητα που προέρχεται από μία σειρά αντιδράσεων που ενεργοποιούνται έπειτα από την προσβολή του φυτού από το παθογόνο και εξελίσσονται παράλληλα με αυτό. Οι αντιδράσεις αυτές, χρειάζονται τη συμμετοχή του μεταβολισμού του φυτού-ξενιστή και αντιμετωπίζουν δυναμικά τόσο τον παθογόνο οργανισμό όσο και τα μεταβολικά προϊόντα του.

Η διασυστηματική ανοχή διακρίνεται σε επίκτητη (Systemic Acquired Resistance, SAR) και επαγόμενη (Induced Systemic Resistance, ISR). Η διασυστηματική ανοχή αφορά μια βιολογική, βιοχημική ή χημική διέγερση λανθανόντων μηχανισμών ανοχής, οι οποίοι έχουν ως αποτέλεσμα τη μετατροπή ενός δεδομένου φυτού από ευπαθές σε ένα δεδομένο ανθεκτικό σύστημα ξενιστή-παθογόνου. Έχει επικρατήσει η “διασυστηματική ανοχή” να αποδίδεται χάριν συντομίας και με τον όρο “Ανοσοποίηση” (Τζάμος, 2007).

Η επίκτητη διασυστηματική ανοχή είναι η άμυνα των φυτών σε “δεύτερο χρόνο” και επάγεται κατόπιν μόλυνσεως του ξενιστή με ένα παθογόνο. Αντίστοιχα, η επαγόμενη ανθεκτικότητα επιτυγχάνεται με βιολογικούς παράγοντες οι οποίοι δεν προκαλούν τοπική νέκρωση (Εικόνα 1.3). Συγκεκριμένα, επαγόμενη ανθεκτικότητα ονομάζεται η έκφραση των γονιδίων άμυνας του φυτού ως αποτέλεσμα της επίδρασης εξωτερικών παραγόντων (Hammerschmidt, 1999). Για την αντιμετώπιση των δυνητικών προσβολών, κατά την επαγόμενη ανθεκτικότητα, το φυτό βρίσκεται σε μία κατάσταση “υψηλής αμυντικής ετοιμότητας” ή “προηγμένης άμυνας” (Van Loon, 1997).

		
άμεσες αντιδράσεις των προσβεβλημένων κυττάρων (λεπτά)	αντιδράσεις σε τοπικό επίπεδο (λεπτά-ώρες)	αντιδράσεις σε διασυστηματικό επίπεδο (ώρες)
<ol style="list-style-type: none"> 1. Παραγωγή ROS 2. Σύνθεση μορίων-σημάτων συναγερμού 3. Διαρροή ηλεκτρολυτών 4. Παρεμπόδιση ή ενεργοποίηση υπαρχόντων ενζυμικών μορίων 5. Επαναδιευθέτηση κυτταροσκελετού 6. Επαγωγή γονιδίων 	<ol style="list-style-type: none"> 1. Συνολικός επαναπρογραμματισμός της μεταγραφής γονιδίων 2. Ρυθμίσεις σε επίπεδο δευτερογενούς μεταβολισμού 3. Προγραμματισμένος κυτταρικός θάνατος-αντίδραση υπερευαισθησίας 4. Σύνθεση PRPs 5. Κλείσιμο στοματίων 6. Ισχυροποίηση κυτταρικών τοιχωμάτων 	<p>Επαγωγή γονιδίων και σύνθεση νέων PRPs σε διασυστηματικό επίπεδο</p>

Εικόνα 1.3 : Άμεσες, τοπικές και διασυστηματικές αντιδράσεις επαγόμενης άμυνας φυτών (Πηγή: Καραμπουρνιώτης, κ.α., 2012).

Τέλος, εξίσου σημαντικό ως προς την άμυνα των φυτών είναι το στάδιο ανάπτυξης του φυτού. Έχει διαπιστωθεί ότι ένα συγκεκριμένο είδος μπορεί να είναι

ανθεκτικό σε ένα στάδιο ανάπτυξης έναντι ορισμένου παθογόνου και να καταστεί ευπαθές σε διαφορετικό αναπτυξιακό στάδιο. Επιπλέον, η ανθεκτικότητα και η ευπάθεια των φυτών σε παθογόνα επηρεάζονται και από τις συνθήκες του περιβάλλοντος.

1.5 Γενετική Μηχανική: τεχνολογία ανάπτυξης ανθεκτικότητας έναντι καταπονήσεων

Η γενετική μηχανική έχει αποτελέσει τη θεμέλια βάση τόσο σε επίπεδο βασικής όσο και εφαρμοσμένης έρευνας, επιφέροντας δυνατότητες και προοπτικές που έφεραν “επανάσταση” στην επιστήμη της βιολογίας. Μετά τη δεκαετία του '80, η ανάπτυξη της τεχνολογίας του ανασυνδυασμένου DNA έκανε δυνατή την κλωνοποίηση ευκαρυωτικών γονιδίων και τη μελέτη της έκφρασής τους σε μοριακό επίπεδο. Ακολούθησε η ανάπτυξη της τεχνολογίας του γενετικού μετασχηματισμού και της μεταφοράς γονιδίων μεταξύ διαφορετικών οργανισμών, ανεξάρτητων ταξινομικών εμποδίων, προσδίδοντάς σε οργανισμούς-στόχους βελτιωμένες ιδιότητες. Η μεταφορά ολόκληρου ή τμήματος ενός γονιδίου σε έναν οργανισμό, με αποτέλεσμα τη δημιουργία γενετικά τροποποιημένων οργανισμών, είναι μια ευρύτατα εφαρμοζόμενη τεχνική, με ποικίλες εφαρμογές στις επιστήμες ζωής και δη στις γεωπονικές επιστήμες. Είναι αξιοσημείωτο ότι οι φυτικοί οργανισμοί είναι επιδεκτικοί στις τεχνικές της γενετικής τροποποίησης, γεγονός που αποδίδεται στον ολοδυναμικό χαρακτήρα των κυττάρων τους (totipotency).

Με δεδομένη την αδυναμία μετακίνησης των φυτών και τη συνεπακόλουθη έκθεσή τους σε πληθώρα αβιοτικών και βιοτικών παραγόντων καταπόνησης, η έρευνα έχει στραφεί προς την αξιοποίηση της γενετικής μηχανικής για την ανάπτυξη ανθεκτικότητας έναντι καταπονήσεων. Η προσέγγιση αυτή, πέραν της γενετικής τροποποίησης αυτής καθεαυτής περιλαμβάνει επιπλέον την αναγέννηση των γενετικά μετασχηματισμένων κυττάρων με στόχο τη δημιουργία οργανισμών που εκφράζουν δομικά το διαγονίδιο-στόχο. Κατά τις διαδικασίες αναγέννησης κυττάρων και ιστών, η επιλογή των μετασχηματισμένων κυττάρων περιλαμβάνει την αξιοποίηση ποικίλων

συστημάτων επιλογής, όπως είναι δείκτες και τα γονίδια ανθεκτικότητας σε αντιβιοτικά.

Στο πλαίσιο ανάπτυξης ανθεκτικότητας έναντι καταπονήσεων, η έρευνα έχει αξιοποιήσει γονίδια ανθεκτικότητας που προέρχονται είτε από φυτικά είδη είτε από παθογόνους οργανισμούς. Έχει διαπιστωθεί ότι είναι εφικτή η επαγωγή της ενεργητικής άμυνας του φυτού μέσω της έκφρασης γονιδίων που προέρχονται από το ίδιο το παθογόνο με στόχο την καταστολή γονιδίων που κωδικοποιούν πρωτεΐνες για βασικές λειτουργίες του παθογόνου ή γονιδίων που υπεισέρχονται σε κάποιο στάδιο στο βιοχημικό μονοπάτι άμυνας (Pathogen derived resistance - PDR).

Επίσης, τα τελευταία χρόνια, το ερευνητικό ενδιαφέρον έχει στραφεί προς την αξιοποίηση ενός διαφορετικού μηχανισμού προστασίας, ο οποίος είναι γνωστός με τον όρο γονιδιακή σίγηση (RNA silencing). Η γονιδιακή σίγηση έγκειται στην παρουσία στον ίδιο τόπο και χρόνο μορίων RNA, που παρουσιάζουν υψηλή ομολογία με το παθογόνο εισβολέα, οδηγώντας στην αναγνώριση και στη μετέπειτα αποδόμηση των ομόλογων μορίων. Τα τελευταία χρόνια έχει καταστεί δυνατή, η εισαγωγή 'ξένων' γονιδίων και πλαστιδίων στο γονιδίωμα των χλωροπλαστών. Με αυτόν τον τρόπο έχουν δημιουργηθεί διαγονιδιακά φυτά, με τη μεταφορά γονιδίων με φορέα το βακτήριο *Agrobacterium* αλλά και με απευθείας μεταφορά DNA, με τη χρήση σύγχρονων άμεσων μεθόδων μεταφοράς, που δε συνεπάγονται τη χρήση φορέα. Ενδεικτικά, ορισμένες τέτοιες μέθοδοι είναι ο βομβαρδισμός μικροσωματιδίων, η ηλεκτροπόρωση και η εφαρμογή πολυαιθυλενικής γλυκόλης. Παρά την επιτυχία ποικίλων μεθόδων γενετικού μετασχηματισμού, η αξιοποίηση βακτηριακών στελεχών που ανήκουν στο γένος *Agrobacterium* αποτελεί την πλέον αποτελεσματική οδό για τον επιτυχή μετασχηματισμό ενός μεγάλου εύρους φυτικών ειδών (Singh, 2000; Καλτσίκης, 1989).

1.6 Προσεγγίσεις Γενετικής Μηχανικής

1.6.1 Pathogen derived resistance (PDR)

Με τον όρο Pathogen derived resistance (PDR) ορίζεται η επίκτητη αντοχή που προέρχεται από παθογόνα μέσω της έκφρασης γονιδίων που απομονώθηκαν από παθογόνα στοχεύοντας σε παρεμβολή στην παθογόνο διαδικασία και εκδήλωση

ανθεκτικότητας στον ξενιστή. Η σύλληψη της ανάπτυξης ανθεκτικότητας που βασίζεται σε γονίδια των παθογόνων αποδίδεται στους Sanford και Johnston (1985). Ωστόσο, η επιτυχής εφαρμογή της προσέγγισης της PDR αποτυπώθηκε στην έρευνα των Abel *et al.* (1986), όπου απεδείχθη ότι φυτά καπνού -*Nicotiana tabacum* cv. Xanthi- που εκφράζουν ενδογενώς το γονίδιο καψιδιακής πρωτεΐνης (CP) του ιού μωσαϊκού καπνού (TMV), μέσω γενετικού μετασχηματισμού με το φορέα *Agrobacterium tumefaciens*, εμφάνιζαν ανθεκτικότητα έναντι του ιού. Μάλιστα, η ανθεκτικότητα επιβεβαιώθηκε σε ανεξάρτητα μετασχηματισμένες σειρές καπνού, οι οποίες μολύνθηκαν με μηχανικό εμβολιασμό είτε με ισωμάτια είτε με γυμνό RNA του ιού TMV (Abel *et al.*, 1986). Διαπιστώθηκε μια άμεση θετική συσχέτιση μεταξύ της ποσότητας της παραγόμενου γονιδιακού προϊόντος, της καψιδιακής πρωτεΐνης (CP), και των επιπέδων ανθεκτικότητας, ενώ παράλληλα παρατηρήθηκε και το φαινόμενο της διασταυρούμενης ανθεκτικότητας που συνεπάγεται υψηλή ανθεκτικότητα έναντι της επακόλουθης μόλυνσης από τον ιό TMV. Στο πλείστο των περιπτώσεων, δεν παρατηρήθηκε ανοσία έναντι του ιού, ανεκτικότητα, η οποία συνεπάγεται την ικανότητα αναπαραγωγής του παθογόνου απουσία συμπτωμάτων, αλλά διαπιστώθηκε καθυστερημένη εκδήλωση συμπτωμάτων ασθένειας που αποδόθηκε στον παρεμποδισμό της συστημικής κίνησης του ιού στα φυτά. Η εν λόγω ανθεκτικότητα που οφείλεται στην ενδογενή παραγωγή της καψιδιακής πρωτεΐνης (CPMR) φάνηκε να μην είναι πλέον λειτουργική όταν τα διαγονιδιακά φυτά μολύνθηκαν με πολύ υψηλή συγκέντρωση εμβολίου (1 $\mu\text{g} / \text{ml}$) του ιού.

Πλέον, η προσέγγιση της PDR αποτελεί ένα ευρέως εφαρμόσιμο εννοιολογικό εργαλείο για την ανάπτυξη υψηλής ανθεκτικότητας έναντι παθογόνων και παρασίτων, μέσω της χρήσης της γενετικής μηχανικής. Ο μετασχηματισμός φυτών με αλληλουχίες που προέρχονται από το γονιδίωμα των ιών συχνά οδηγεί στην ανάπτυξη ανθεκτικών ή ακόμη και άνοσων φυτών στον ιό από τον οποίο προήλθαν οι αλληλουχίες.

1.6.2 Εκκριτικό σύστημα τύπου III

Το εκκριτικό σύστημα τύπου III (TTSS) υπάρχει στην πλειονότητα των Hrp-αρνητικών βακτηρίων και εκτιμάται ότι πιθανόν να αποκτήθηκε μέσω μηχανισμών οριζόντιας γονιδιακής μεταφοράς (Initiative, 2000). Συνολικά το εκκριτικό σύστημα III αποτελείται από περίπου είκοσι πρωτεΐνες, στις οποίες ανήκει και μια

ενδοκυτταρική μεμβρανική ΑΤΡάση. Οι περισσότερες από τις πρωτεΐνες της εσωτερικής μεμβράνης του συστήματος είναι ομόλογες της πρωτεΐνης βιογένεσης του μαστιγίου των αρνητικών και θετικών κατά Gram βακτηρίων, ενώ η πρωτεΐνη της εξωτερικής μεμβράνης είναι ομόλογη της πρωτεΐνης PulD του εκκριτικού συστήματος II (Fouts, 2002). Σε όλα τα εκκριτικά συστήματα τύπου III των παθογόνων βακτηρίων, των ζώων αλλά και των φυτών, υπάρχει ένας κοινός αριθμός κύριων δομικών συστατικών που είναι υψηλά συντηρημένα (Initiative, 2000). Τα εν λόγω συστατικά διακρίνονται σε δύο κύριες ομάδες. Στην πρώτη ομάδα, εντάσσονται οι εξωτερικές πρωτεΐνες της μεμβράνης (peripheral membrane proteins) στις οποίες συμπεριλαμβάνεται και μια πρωτεΐνη που έχει όμοια αλληλουχία με τις μεταφορικές πρωτεΐνες και τις λιγότερο συντηρημένες λιποπρωτεΐνες. Στην δεύτερη ομάδα, περιλαμβάνονται οι πρωτεΐνες που είναι πλήρως ενσωματωμένες στη μεμβράνη (integral membrane proteins), οι οποίες μοιάζουν με τη συσκευή βιογένεσης του μαστιγίου. Η απομόνωση και απεικόνιση της υπερμοριακής δομής που συνδέεται με το εκκριτικό σύστημα τύπου III του βακτηρίου *Salmonella typhimurium* έγινε με την βοήθεια του ηλεκτρονικού μικροσκοπίου (Leister *et al.*, 1996). Η παραπάνω δομή είναι γνωστή και ως σύμπλοκο βελόνας (needle complex) και εκτείνεται στην εσωτερική και εξωτερική μεμβράνη του βακτηριακού φακέλου.

Μέσω του εκκριτικού συστήματος τύπου III γίνεται η μεταφορά των πρωτεϊνών παθογένειας στο κυτταρόπλασμα των ευκαρυωτικών κυττάρων. Στις περισσότερες περιπτώσεις, η φυσική επαφή του βακτηρίου με την επιφάνεια του κυττάρου στόχου ελέγχει την έκκριση του TTSS. Η ικανότητα αυτή, του εκκριτικού συστήματος να μεταφέρει πρωτεΐνες από το βακτηριακό κυτταρόπλασμα στο κυτταρόπλασμα του ξενιστή, μελετήθηκε αρχικά στο βακτήριο *Yersinia pseudotuberculosis* (Saraste *et al.*, 1990; Taira *et al.*, 1999). Τα φυτοπαθογόνα βακτήρια τα οποία φέρουν το εκκριτικό σύστημα τύπου III, κατηγοριοποιούνται σε δύο ομάδες, στην πρώτη ανήκουν τα γένη *P. syringae* και *Erwinia* spp και στη δεύτερη τα *R. solanacearum* και *Xanthomonas* spp. Οι δύο ομάδες διαφοροποιούνται μεταξύ τους σε αρκετά χαρακτηριστικά, συμπεριλαμβανομένης της ομολογίας των συστατικών πρωτεϊνών τους (Alfano & Collmer, 1997).

1.6.3 Πρωτεΐνες - τελεστές

Με τον όρο πρωτεΐνες – τελεστές (effector proteins) καλούνται οι πρωτεΐνες που εκκρίνονται από φυτοπαθογόνα ή/και συμβιωτικά βακτήρια και δύναται να εισέλθουν εντός των κυττάρων του ξενιστή, οδηγώντας σε μεταβολή της φυσιολογίας του ξενιστή και προωθώντας τον αποικισμό του από το βακτήριο. Στις πρωτεΐνες – τελεστές συγκαταλέγονται τα προϊόντα των γονιδίων αμολυσματικότητας *avr*. Η απομόνωση του πρώτου *avr* γονιδίου αφορούσε στο *avrA*, το οποίο προέρχεται από το παθογόνο *Pseudomonas syringae* pv. *glycinea* (Staskawicz *et al.*, 1984). Ωστόσο, στις αρχικές μελέτες δεν είχε γίνει γνωστό ότι το αντίστοιχο προϊόν κωδικοποιεί ένα εκκριτικό υπόστρωμα. Πρόσφατα, έχει αποδειχτεί η μεταφορά των πρωτεϊνών-τελεστών στα ευκαρυωτικά κύτταρα και ότι η δράση τους γίνεται μέσα στο κύτταρο του ξενιστή.

Οι πρωτεΐνες – τελεστές των παθογόνων βακτηρίων επηρεάζουν το μεταβολισμό και το αμυντικό σύστημα του φυτού-ξενιστή. Ο τρόπος δράσης τους περιλαμβάνει την καταστολή του προγραμματισμένου κυτταρικού θανάτου *HopAB2* και *AvrPto* (Abramovitch *et al.*, 2003; Kim *et al.*, 2002), οδηγώντας στην ενεργοποίηση του βιοχημικού μονοπατιού σύνθεσης του ιασμονικού οξέος (JA). Έτσι, το κυτταρικό τοίχωμα των φυτών ξενιστών ασθενεί και ενεργοποιείται η λειτουργία της μεταγραφής και η καταστολή των πρωτεϊνών R - *AvrRpt2* που συνδέονται με ανθεκτικότητα (He *et al.*, 2004; Mackey *et al.*, 2003).

Σύμφωνα με μελέτες, οι πρωτεΐνες - τελεστές εμφανίζουν διττό ρόλο κατά τις αλληλεπιδράσεις φυτών και φυτοπαθογόνων βακτηρίων. Ειδικότερα, στα φυτά-ξενιστές η δράση των τελεστών σχετίζεται με την εκδήλωση συμπτωμάτων της ασθένειας, ενώ σε φυτά-μη ξενιστές καθώς και σε ανθεκτικούς γονοτύπους φυτών-ξενιστών ο ρόλος τους σχετίζεται με την εκδήλωση ανθεκτικότητας.

1.7 Γονίδια *hpaA* & *hpaB*

Τα διαγονιδιακά φυτά στα οποία έχουν εισαχθεί γονίδια φυτικής ή βακτηριακής προέλευσης, συχνά εμφανίζουν προηγμένη αντοχή σε αβιοτικούς και βιοτικούς παράγοντες καταπόνησης, κυρίως λόγω της επαγωγής ποικίλων βιοχημικών μονοπατιών άμυνας. Με δεδομένη ωστόσο την περιορισμένη διαθεσιμότητα γονιδίων

ανθεκτικότητας φυτικής προέλευσης, το ενδιαφέρον στρέφεται ολοένα και περισσότερο προς την αξιοποίηση γονιδίων που προέρχονται από παθογόνους οργανισμούς. Στο πλαίσιο αυτό, τα τελευταία χρόνια έχει αναδειχθεί η δυνατότητα επίτευξης ανθεκτικότητας μέσω της έκφρασης γονιδίων που κωδικοποιούν πρωτεΐνες-τελεστές που προέρχονται από φυτοπαθογόνα βακτήρια.

Το γένος *Xanthomonas* περιλαμβάνει αρνητικά κατά Gram φυτοπαθογόνα βακτήρια που προκαλούν ασθένειες σε ένα ευρύ φάσμα καλλιεργούμενων φυτικών ειδών. Το σύνολο των βακτηρίων που ανήκουν στο γένος χαρακτηρίζονται από την παρουσία του συστήματος έκκρισης τύπου III, το οποίο εξυπηρετεί την έγχυση πρωτεϊνών-τελεστών στο φυτικό κύτταρο. Οι πρωτεΐνες-τελεστές τύπου III ομαδοποιούνται σε διαφορετικές οικογένειες βάσει της αλληλουχίας και της βιοχημικής τους δράσης. Σε κάθε περίπτωση, οι εν λόγω πρωτεΐνες χαρακτηρίζονται από την εμπλοκή τους είτε στην εκδήλωση συμπτωμάτων ασθένειας είτε στην εκδήλωση ανθεκτικότητας, ανάλογα με τη φύση του φυτο-παθοσυστήματος.

Παρά το γεγονός ότι τα διαφορετικά είδη και παθότυποι που ανήκουν στο γένος *Xanthomonas* χαρακτηρίζονται από την κατοχή διαφορετικών πρωτεϊνών-τελεστών, το γονίδιο *hpaA* έχει αποδειχθεί ότι εμφανίζει υψηλή συντηρησιμότητα στα διαφορετικά είδη *Xanthomonas* spp. (Lorenz *et al.*, 2008), συμπεριλαμβανομένου του *Xanthomonas campestris* pv. *campestris*. Αντίστοιχα, υψηλή συντηρησιμότητα μεταξύ των ξανθομονάδων εμφανίζει και το γονίδιο *hpaB*, το οποίο απαντάται στα είδη *X. campestris* pv. *vesicatoria*, *X. oryzae* pv. *oryzae*, *X. axonopodis* pv. *citri*, *X. axonopodis* pv. *glycines* και *X. campestris* pv. *campestris* (Büttner *et al.*, 2004).

Τα γονίδια *hpaA* και *hpaB* σχετίζονται με το εκκριτικό σύστημα τύπου III, το οποίο συμβάλλει ενεργά στη βακτηριακή μόλυνση και αποίκηση, μέσω της έγχυσης πρωτεϊνών που συμβάλλουν στην παθογένεια εντός των φυτικών κυττάρων. Σύμφωνα με μελέτες, το γονίδιο *hpaA* δρα ως ρυθμιστής του εκκριτικού συστήματος τύπου III, ενώ έχει προταθεί ο ρόλος του ως τελεστή καθώς προκαλεί παθογένεια, συμβάλλοντας στην εκδήλωση συμπτωμάτων σε ευαίσθητα φυτά, και επάγει την αντίδραση υπερευαισθησίας σε φυτά-μη ξενιστές καθώς και σε ανθεκτικούς γονοτύπους (Lorenz, *et al.*, 2008).

Η δράση των γονιδίων *hpaA* και *hpaB* στους βακτηριακούς φορείς αποκαλύφθηκε μέσω της δημιουργίας βακτηριακών στελεχών που υπέστησαν

μετάλλαξη προκειμένου να επιτευχθεί η σίγηση των εν λόγω γονιδίων. Μέσω της προσέγγισης αυτής, που είναι ευρέως γνωστή ως knock out, διαπιστώθηκε ότι το γονίδιο *hpaA* δρα ως ρυθμιστής του εκκριτικού συστήματος τύπου III (Lorenz *et al.*, 2008), ενώ το *hpaB* φαίνεται ότι δρα ως μία ρυθμιστική πρωτεΐνη εξόδου στο εκκριτικό σύστημα τύπου III (Büttner, *et al.*, 2004). Παράλληλα, διαπιστώθηκε ότι τα γονίδια *hpaA* και *hpaB* αλληλεπιδρούν μεταξύ τους, με τρόπο που η διαδικασία μόλυνση από την ξανθομονάδα ενεργοποιεί την έκκριση πρωτεϊνών στο εσωτερικό των κυττάρων ξενιστών, μέσω του γονιδίου *hpaA*, και ακολουθεί η πρόσδεση του τελευταίου στο *hpaB*, η οποία αποτελεί προϋπόθεση για την έκκριση πρωτεϊνών-μη τελεστών. Απεναντίας, η έκκριση των τελεστών απαιτεί την απελευθέρωση του γονιδίου *hpaB*.

Οι αναλύσεις GST pull-down αποκάλυψαν ότι το *hpaB* αλληλεπιδρά με δύο άσχετες πρωτεΐνες τελεστών, τις AnrBs1 και AnrBs3, αλλά όχι με την XorA. Η τοποθεσία δέσμευσης του HpaB βρίσκεται στα πρώτα 50 αμινοξέα της πρωτεΐνης AnrBs3. Αυτή η περιοχή περιέχει επίσης το σήμα στόχευσης για έκκριση που εξαρτάται από την πρωτεΐνη HpaB, το οποίο εκλείπει από τις HrpF και XorA. Είναι ενδιαφέρον ότι τα N-άκρα των HrpF και XorA στοχεύουν τον υποδοχέα AnrBs3Δ2 για μετατόπιση σε μεταλλαγμένο Δ*hpaB* αλλά όχι στο στέλεχος άγριου τύπου. Αυτό δείχνει ότι το HpaB παίζει ουσιαστικό ρόλο στον έλεγχο εξόδου του συστήματος TTS. Σύμφωνα με αναφορές, εξάγεται το συμπέρασμα ότι το HpaB προάγει την έκκριση ενός μεγάλου συνόλου τελεστικών πρωτεϊνών και αποτρέπει την απελευθέρωση μη-τελεστών στο φυτικό κύτταρο (Büttner *et al.*, 2004).

Σύμφωνα με πρόσφατες μελέτες, το γονίδιο *hpaA* φαίνεται να έχει καταλυτικό ρόλο στην παθογένεια του βακτηρίου από το οποίο προέρχεται, πιθανότατα δρώντας ως πρωτεΐνη-τελεστής, ενώ το γονίδιο *hpaB* είναι απαραίτητο για να ολοκληρωθεί η παθογένεια του βακτηρίου-φορέα (Lonjon *et al.*, 2017).

1.8 Το είδος *N. benthamiana*

Το *Nicotiana benthamiana* είναι ένα άγριο είδος καπνού, η καταγωγή του οποίου πιθανολογείται ότι είναι η Αυστραλία. Ωστόσο, το συγκεκριμένο είδος χαρακτηρίζεται από υψηλή προσαρμοστικότητα καθώς έχει αναφερθεί η ανάπτυξή του σε διάφορα

περιβάλλοντα. Λόγω της υψηλής προσαρμοστικής ικανότητας, εμφανίζει μεγάλη παραλλακτικότητα σε επίπεδο μορφολογίας, φυσιολογίας και γονιδιώματος. Από γενετική άποψη, έχει 19 ζεύγη χρωμοσωμάτων και το μέγεθος του γονιδιώματος είναι 3,136 Mbp (Knapp *et al.* 2004).

Το *Nicotiana benthamiana* είναι ένα από τα πλέον διαδεδομένα φυτά-μοντέλα σε μελέτες βιολογίας των φυτών, ενώ τυγχάνει ευρείας εφαρμογής στην ιολογία των φυτών, κυρίως λόγω του μεγάλου εύρους ιών που μπορούν να το μολύνουν με επιτυχία. Επιπλέον, το *N. benthamiana* είναι ευαίσθητο σε μεγάλη ποικιλία φυτοπαθογόνων βακτηρίων και μυκήτων. Τα χαρακτηριστικά που το καθιστούν ιδιαίτερα ελκυστικό είδος για αξιοποίηση σε έρευνες που σχετίζονται με την μελέτη της γονιδιακής έκφρασης, και δη σε μελέτες που σχετίζονται με την ανάπτυξη ανθεκτικότητας, είναι ο σύντομος βιολογικός κύκλος του, το μεγάλο εύρος ξενιστών του καθώς και η διαθεσιμότητα αποτελεσματικών πρωτοκόλλων γενετικής μηχανικής για την δημιουργία διαγονιδιακών φυτών (Li *et al.*, 2012). Προς την κατεύθυνση αυτή, αναφέρεται ότι το είδος χαρακτηρίζεται από ικανοποιητική συχνότητα γενετικού μετασχηματισμού και αναγέννησης ολόκληρων φυτών. Παραδόξως, παρά το γεγονός ότι είναι ένα πολύ χρήσιμο πειραματικό μοντέλο, υπάρχουν ελάχιστες πληροφορίες σχετικά με την προέλευσή, τη γενετική ποικιλομορφία και το γονιδίωμά του (Goodin *et al.*, 2015; Bally *et al.*, 2018).

Στη διεθνή βιβλιογραφία είναι χαρακτηριστική η ύπαρξη διαφόρων αποτελεσματικών πρωτοκόλλων για τον ευχερή μετασχηματισμό και τις διαδικασίες αναγέννησης ιστών ή/και ολόκληρων φυτών. Συνεπώς, προσφέρεται η δυνατότητα δημιουργίας διαγονιδιακών φυτών και αξιοποίησής τους σε μελέτες λειτουργικής ανάλυσης γονιδίων και σε μελέτες που αφορούν σε αλληλεπιδράσεις φυτών-παθογόνων μικροοργανισμών ή/και άλλων παραγόντων καταπόνησης. Τα προς μελέτη γονίδια είτε αφορούν στη μεταβολή της έκφρασης ενός μόνο μεταβολίτη ή επαγόμενων πρωτεϊνών υπεύθυνων για την παραγωγή ενζύμων, πρωτεϊνών μεταφοράς κ.α. (Chapman *et al.* 1992; Cruz *et al.* 1996; Escobar *et al.* 2003; Lucas 2006).

Επίσης, το είδος *N. benthamiana* έχει χρησιμοποιηθεί ευρέως σε λειτουργικές αναλύσεις γονιδιακής έκφρασης μέσω της παροδικής έκφρασης διαγονιδίων στους φυτικούς ιστούς. Η μέθοδος αυτή επιτυγχάνεται με αγροεμποτισμό («agrofiltration») των ιστών, με κύτταρα βακτηριακής ή ιικής προέλευσης, που εκφράζουν τα υπό μελέτη

γονίδια και λειτουργούν ως φορείς. Ο αγροεμποτισμός εφαρμόζεται με στόχο την ετερόλογη έκφραση πρωτεϊνών, δευτερογενών μεταβολιτών και άλλων ουσιών προσβλέποντας στη μελέτη της λειτουργίας γονιδίων ενδιαφέροντος και ρυθμιστικών στοιχείων (Goodin *et al.*, 2008).

ΣΚΟΠΟΣ ΤΗΣ ΜΕΛΕΤΗΣ

Με δεδομένο το διττό ρόλο των πρωτεϊνών-τελεστών στην παθογένεια σε φυτά-ξενιστές και στην αμολυσματικότητα σε φυτά-μη ξενιστές και σε ανθεκτικούς γονοτύπους φυτών ξενιστών, τα τελευταία χρόνια ένα πλήθος ερευνητικών μελετών εστιάζει στη λειτουργική αξιοποίησή τους για την ανάπτυξη ανθεκτικότητας έναντι καταπονήσεων. Οι πρωτεΐνες-τελεστές από φυτοπαθογόνα βακτήρια εκκρίνονται στο εσωτερικό των φυτικών κυττάρων, μέσω του εκκριτικού συστήματος τύπου III (T3SS), συμβάλλοντας στην επαγόμενη απόκριση των φυτών. Το γονίδιο *hpaA* εμφανίζει υψηλή συντήρηση στο γένος *Xanthomonas* και είναι αξιοσημείωτο ότι έχει προταθεί ο ρόλος του ως τελεστή καθώς προκαλεί παθογένεια σε ευαίσθητα φυτά και επάγει την αντίδραση υπερευαισθησίας σε φυτά-μη ξενιστές και σε ανθεκτικούς γονοτύπους. Παρά το γεγονός ότι έχει αποσαφηνισθεί ο ρόλος του γονιδίου *hpaA* στους βακτηριακούς φορείς του, η επίδραση της έκφρασής του σε φυτά δεν έχει τύχει μελέτης. Στο πλαίσιο αυτό, στόχο της παρούσας διατριβής αποτέλεσε η μελέτη της επίδρασης του γονιδίου *hpaA*, που προέρχεται από το βακτήριο *Xanthomonas campestris* pv. *campestris*, σε διαγονιδιακά φυτά του είδους *Nicotiana benthamiana* ως προς την ανθεκτικότητα έναντι βιοτικών καταπονήσεων. Για την επίτευξη του ανωτέρου στόχου, μελετήθηκε συγκριτικά η απόκριση διαγονιδιακών σειρών που εκφράζουν ενδογενώς το γονίδιο *hpaA* και φυτών αγρίου τύπου (wt) υπό συνθήκες τεχνητής μόλυνσης με το βακτήριο *Pseudomonas syringae* pv. *tabaci*. Για την αξιολόγηση της ανθεκτικότητας αξιοποιήθηκαν ως παράμετροι η συμπτωματολογία των φυτών, η αποίκηση του βακτηρίου εντός των φυτικών ιστών και η περιεχόμενη ποσότητα χλωροφύλλης πριν και μετά την μόλυνση με το βακτήριο.

2. ΥΛΙΚΑ & ΜΕΘΟΔΟΙ

2.1 Φυτικό υλικό

Στην παρούσα πτυχιακή διατριβή η πειραματική διαδικασία έλαβε χώρα στο Εργαστήριο Γενετικής Βελτίωσης Φυτών, του Τμήματος Γεωπονίας Φυτικής Παραγωγής και Αγροτικού Περιβάλλοντος του Πανεπιστημίου Θεσσαλίας. Το φυτικό υλικό που χρησιμοποιήθηκε για την διεξαγωγή του πειράματος ήταν το άγριο είδος καπνού *Nicotiana benthamiana*, το οποίο αποτελεί ένα ευρέως χρησιμοποιούμενο φυτό - μοντέλο για ερευνητικούς σκοπούς.

Ειδικότερα, ως φυτικό υλικό αξιοποιήθηκαν διαγονιδιακές σειρές *N. benthamiana*, οι οποίες εκφράζουν ενδογενώς το γονίδιο *hraA* που προέρχεται από το βακτήριο *Xanthomonas campestris* pv. *campestris*. Τα φυτά που μελετήθηκαν είναι φυτά δεύτερης γενεάς (T₂) που προέρχονταν από αυτογονιμοποίηση των αρχικών συμβάντων μετασχηματισμοί. Στο σύνολο των *hraA*-διαγονιδιακών σειρών που χρησιμοποιήθηκαν είχε προηγουμένως επιβεβαιωθεί η ομοζύγωτη φύση τους με βάση την αναλογία διάσπασης του γονιδίου *hprtIII*, που προσδίδει ανθεκτικότητα στην καναμυκίνη, υπό συνθήκες βλάστησης σε θρεπτικό υπόστρωμα επιλογής (καναμυκίνη: 150 µg/ml).

Στα πειράματα αξιολόγησης της ανθεκτικότητας έναντι του βακτηρίου *Pseudomonas syringae* pv. *tabaci* συμπεριλήφθηκαν τέσσερις διαγονιδιακές σειρές, τις *hraA* 1-1, 1-2, 2-3 και T1-5. Επίσης, στο πείραμα αξιοποιήθηκαν ως μάρτυρες φυτά αγρίου τύπου (wild type).

2.2 Ανάπτυξη διαγονιδιακών *hraA*-διαγονιδιακών σειρών

Αρχικά έγινε απολύμανση των σπόρων της T₂ γενιάς (17/10/2019), με τοποθέτηση των σπόρων σε καθαρή αιθανόλη (1 min), υπό συνεχή ανάδευση. Κατόπιν ακολούθησε η ο έλεγχος των σπόρων της T₂ γενιάς ως προς το επίπεδο ζυγωτίας, μέσω της βλάστησής τους σε θρεπτικό υπόστρωμα ½ MS medium που περιείχε το αντιβιοτικό καναμυκίνη (150 mg/L).

Στη συνέχεια, σπόροι των επιλεγμένων ομοζύγων σειρών τοποθετήθηκαν σε δοχεία τύπου jiffy pots και μεταφέρθηκαν σε θάλαμο ελεγχόμενων συνθηκών, συγκεκριμένα σε θερμοκρασία 25 °C και φωτοπερίοδο 16h φωτός και 8h σκοτάδι. Κατά το διάστημα ανάπτυξης των φυτών, εφαρμόζονταν τακτική άρδευση, χρησιμοποιώντας περίπου 200 ml dH₂O ανά 2 ημέρες.

Έπειτα από την πάροδο 3 μηνών (18/01/2020), τα ανεπτυγμένα φυτά μεταφυτεύθηκαν σε φυτοδοχεία με εμπλουτισμένο υπόστρωμα μίγματος χώματος και περλίτη (3:1). Τα φυτά παρέμειναν σε θάλαμο ανάπτυξης ελεγχόμενων συνθηκών θερμοκρασίας και φωτοπεριόδου (25 °C, 16h φως/8h σκοτάδι), για διάστημα περίπου 45 ημερών. Κατά το διάστημα αυτό, τα φυτά δέχονταν τακτικές εφαρμογές άρδευσης (400 ml / 2 ημέρες) έως ότου εισέλθουν στο κατάλληλο στάδιο ανάπτυξης ώστε να πραγματοποιηθεί η τεχνητή μόλυνση με το βακτήριο.

2.3 Προετοιμασία βακτηριακού μολύσματος και διαδικασία τεχνητής μόλυνσης των φυτών

Με σκοπό να πραγματοποιηθεί έλεγχος της ανθεκτικότητας των *hpaA*-διαγονιδιακών σειρών του είδους *N. benthamiana*, πραγματοποιήθηκε τεχνητή μόλυνση των φυτών με το βακτήριο *Pseudomonas syringae* pv. *tabaci*, και συγκεκριμένα με το στέλεχος BPIC 585.

Το βακτήριο παραλήφθηκε σε δοκιμαστικό σωλήνα στις 20/02/2020 από το Μπενάκειο Φυτοπαθολογικό Ινστιτούτο. Για την καλλιέργεια του βακτηρίου, παρασκευάστηκε υγρό θρεπτικό μέσο KB (200 ml) το οποίο περιείχε: 4 g πεπτόνη (peptone), 3 g θειικό μαγνήσιο (MgSO₄), 0,392 g δισόξινο φωσφορικό κάλιο (KH₂PO₄) και 3 g γλυκερόλη (glycerol). Στη συνέχεια, το βακτήριο καλλιεργήθηκε σε falcon των 50 ml που περιείχε 10 ml θρεπτικό μέσο KB, 20 μl τετρακυκλίνη (tetracycline 5mg/ml), 1 μl καναμυκίνη (kanamycin) και ποσότητα βακτηριακού μολύσματος το οποίο παραλήφθηκε από το δοκιμαστικό σωλήνα. Έπειτα από δύο ημέρες (22/02/2020), έγινε ανακαλλιέργεια των βακτηριακών κυττάρων με στόχο τη δημιουργία της απαιτούμενης ποσότητας για τη διαδικασία της τεχνητής μόλυνσης των φυτών.

Με το πέρας του διαστήματος επώασης, έγινε η διαδικασία για τη δημιουργία του βακτηριακού μολύσματος του *P. syringae* pv. *tabaci* BPIC 585. Αρχικά, έγινε μέτρηση της οπτικής πυκνότητας (OD₆₀₀) και λήφθηκαν 15 ml της καλλιέργειας τα οποία φυγοκεντρήθηκαν στις 3.000 rpm για 5 λεπτά. Έπειτα, έγινε απόρριψη του υπερκείμενου και επαναδιάλυση του ιζήματος σε 50 ml ddH₂O ώστε να δημιουργηθεί αιώρημα βακτηρίων με συγκέντρωση 10⁸ cfu/ml. Στη συνέχεια, σε 20ml του αραιωμένου αιωρήματος βακτηρίου προστέθηκαν 1975 ml ddH₂O και 5 ml Tween-20 (0,5 %). Τέλος, για την πραγματοποίηση της τεχνητής μόλυνσης των φυτών, έγινε ψεκασμός με το αιώρημα των βακτηρίων και τα φυτά καλύφθηκαν με πλαστικό κάλυμμα για δύο ημέρες.

2.4 Αξιολόγηση της ανθεκτικότητας έναντι του βακτηρίου *Pseudomonas syringae* pv. *tabaci* και μέτρηση αποικιών

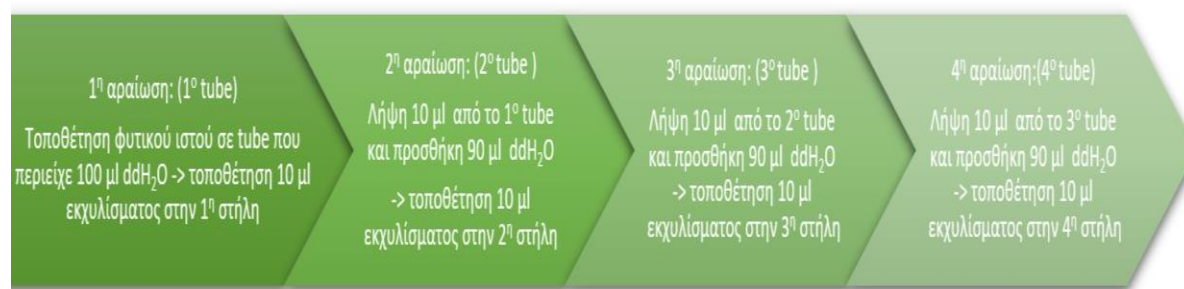
Για την αξιολόγηση της ανθεκτικότητας έναντι του βακτηρίου *Pseudomonas syringae* pv. *tabaci*, λήφθηκαν παρατηρήσεις ανά τακτά χρονικά διαστήματα. Συγκεκριμένα, η καταγραφή των συμπτωμάτων έγινε σε διάστημα δύο, τεσσάρων, επτά, δέκα και δεκαέξι ημερών, στις ακόλουθες ημερομηνίες: 04/03/2020, 06/03/2020, 09/03/2020, 12/03/2020 και 18/03/2020. Για την εξαγωγή ασφαλών συμπερασμάτων σχετικά με την ανάπτυξη συμπτωμάτων της ασθένειας της βακτηριακής κηλίδωσης, στο πείραμα συμπεριλήφθηκαν φυτά μάρτυρες, τα οποία δεν υπέστησαν τεχνητή μόλυνση.

Έπειτα, ακολούθησε η ποσοτικοποίηση του βακτηρίου στα φυτά με τον προσδιορισμό και την μέτρηση των αποικιών του. Αρχικά παρασκευάστηκε στερεό θρεπτικό μέσο KB medium (1 L) το οποίο περιείχε: 20 g πεπτόνη (peptone), 15 g θειικό μαγνήσιο (MgSO₄), 1.96 g δισόξινο φωσφορικό κάλιο (KH₂PO₄), 15 ml γλυκερόλη (glycerol) και 15 g άγαρ (agar) και το θρεπτικό διάλυμα αποστειρώθηκε στους 120 °C. Στη συνέχεια, πραγματοποιήθηκε επίστρωση του θρεπτικού μέσου στα τριβλία.

Για την ποσοτικοποίηση του βακτηρίου μέσω της μέτρησης των αποικιών, λήφθηκαν δείγματα ιστού, 24 h μετά την μόλυνση, από φυλλικούς δίσκους διαμέτρου 1 cm που προέρχονταν από νεαρά φύλλα, με τη χρήση διακορευτή, φροντίζοντας να μη ληφθεί δείγμα από τα φύλλα της κορυφής. Ειδικότερα, για κάθε *hpaA*-σειρά (*hpaA*

1-1, 1-2, 2-3 και T1-5) λήφθηκαν δείγματα από τέσσερα φυτά, όπως και από τέσσερα φυτά-μάρτυρες αγρίου τύπου (WT). Τα φύλλα τοποθετήθηκαν σε 1,5 ml Eppendorf tubes που περιείχαν 100 μl αποστειρωμένου νερού και υπέστησαν λειοτρίβηση με τη χρήση ειδικού εμβόλου. Έπειτα, πραγματοποιήθηκε η διαδικασία των διαδοχικών αραιώσεων (1/10, 1/100, 1/1000) σε δύο χρονικά διαστήματα: i) 24h μετά την μόλυνση (03/03/2020) και ii) 72 h μετά την μόλυνση (03/03/2020), όπως περιγράφεται παρακάτω (Εικόνα 2.1).

Η μέτρηση των αποικιών έγινε στις 24 h και 72 h μετά την επίστρωση των διαδοχικά αραιωμένων εκχυλισμάτων στα τρυβλία, στις ακόλουθες ημερομηνίες: 04/03/2020 και 06/03/2020 αντίστοιχα.



Εικόνα 2.1 : Διαδικασία πραγματοποίησης των διαδοχικών αραιώσεων από τα εκχυλίσματα των φυτών για κάθε *hpaA*-διαγονιδιακή σειρά και τα φυτά αγρίου τύπου που χρησιμοποιήθηκαν ως μάρτυρες του είδους *N. benthamiana*, 24 h μετά την τεχνητή μόλυνση με το βακτήριο *Pseudomonas syringae* pv. *tabaci*.

2.5 Μέτρηση του ποσοστού χλωροφύλλης πριν και μετά την τεχνητή μόλυνση

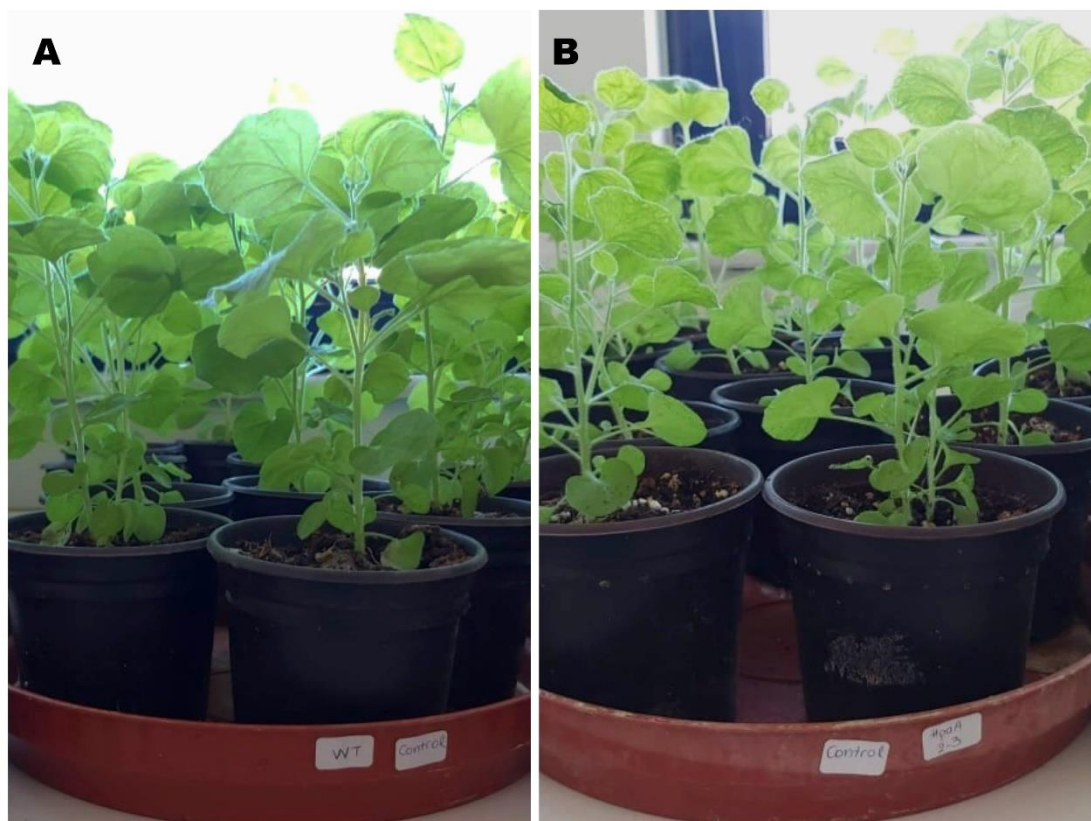
Για τη μέτρηση του περιεχόμενου ποσοστού χλωροφύλλης χρησιμοποιήθηκε το χλωροφυλλόμετρο SPAD (Chlorophyll Meter SPAD-502Plus - Konica Minolta Europe). Η μέτρηση της περιεχόμενης ποσότητας χλωροφύλλης αφορούσε σε 4 *hpaA*-διαγονιδιακές σειρές (T₂ γενιά) και φυτά αγρίου τύπου του είδους *Nicotiana benthamiana*. Για κάθε κατηγορία φυτών, έγινε μέτρηση της χλωροφύλλης σε 5-6 φυτά (βιολογικές επαναλήψεις) πριν τη μόλυνση (18/02/2020) και έπειτα από τη μόλυνση (12/03/2020) με το βακτήριο *Pseudomonas syringae* pv. *tabaci*.

Η μέτρηση πραγματοποιήθηκε σε πλήρως ανεπτυγμένα φύλλα που εντοπίζονταν στο μέσο της φυλλικής επιφάνειας των φυτών. Επίσης, προκειμένου να ενισχυθεί η αξιοπιστία των αποτελεσμάτων έγινε μέτρηση της χλωροφύλλης και σε φυτά τα οποία ήταν απαλλαγμένα μολύσματος και εξυπηρετήσαν ως μάρτυρες (5-6 βιολογικές επαναλήψεις). Κατά τη μέτρηση, έγινε καταγραφή του μέσου όρου χλωροφύλλης ανά φυτό (βιολογική επανάληψη) και ακολούθησε ο προσδιορισμός του συνολικού μέσου όρου ανά σειρά και ανά μεταχείριση (μολυσμένα φυτά και φυτά-μάρτυρες).

3. ΑΠΟΤΕΛΕΣΜΑΤΑ

3.1 Επίδραση της έκφρασης του γονιδίου *hraA* στο φαινότυπο των διαγονιδιακών φυτών

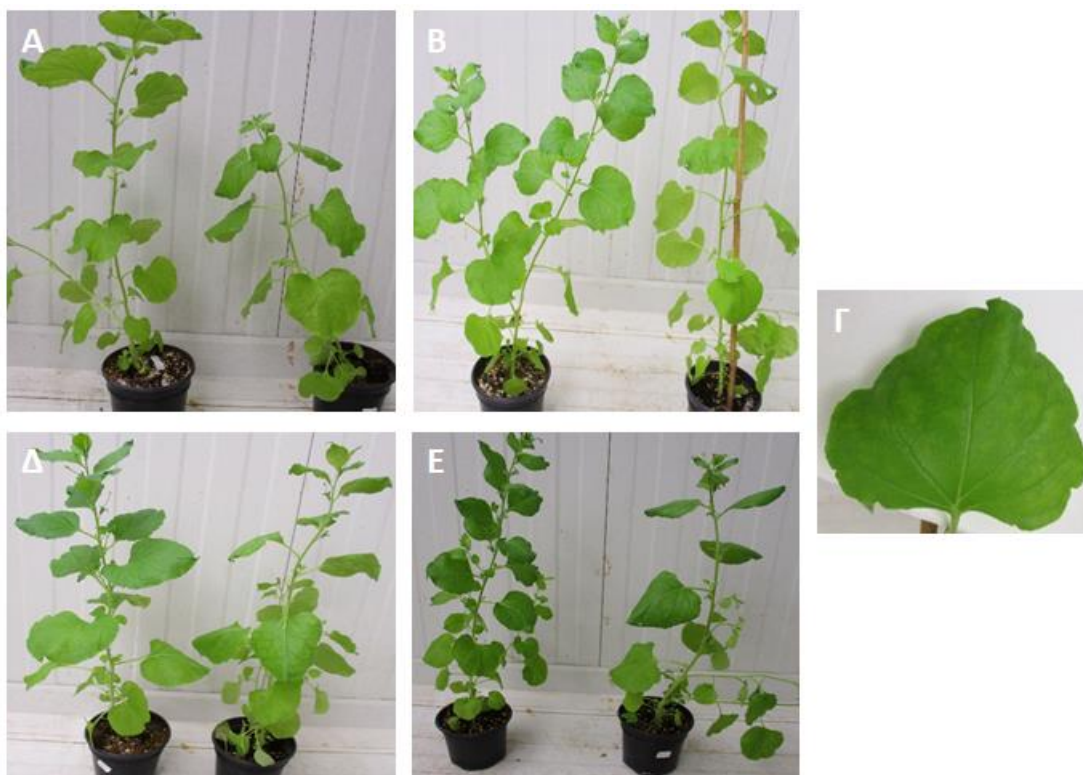
Η ενδογενής έκφραση του γονιδίου *hraA*, που προέρχεται από το φυτοπαθογόνο βακτήριο *Xanthomonas campestris* pv. *campestris*, στο είδος *Nicotiana benthamiana* δεν επηρέασε το φαινότυπο των φυτών καθώς δεν παρατηρήθηκαν συμπτώματα νέκρωσης ή άλλου τύπου παρεκκλίσεις από το φυσιολογικό φαινότυπο. Συνεπώς, τα *hraA*-διαγονιδιακά φυτά εμφάνιζαν μορφολογικά και αναπτυξιακά χαρακτηριστικά που ήταν όμοια με τα φυτά άγριου τύπου (WT) (Εικόνα 3.1).



Εικόνα 3.1: Συγκριτική απεικόνιση των *hraA*-διαγονιδιακών φυτών και των φυτών άγριου τύπου (WT). Παρατηρείται ομοιότητα ως προς τα μορφολογικά και αναπτυξιακά χαρακτηριστικά των φυτών. **A.** φυτά άγριου τύπου **B.** φυτά της διαγονιδιακής σειράς *hraA* 2-3.

3.2 Συγκριτική αξιολόγηση της συμπτωματολογίας των φυτών έπειτα από μόλυνση με το βακτήριο *Pseudomonas syringae* pv. *tabaci*

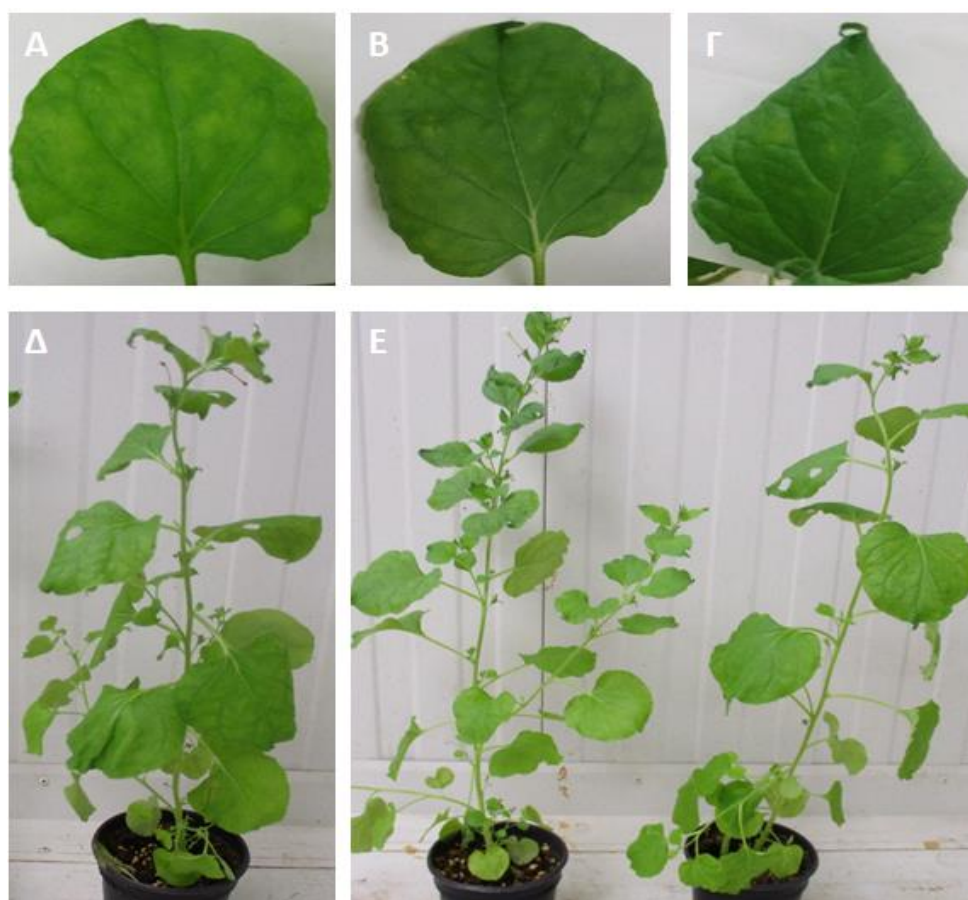
Μετά τη μόλυνση με το βακτήριο *Pseudomonas syringae* pv. *tabaci*, τα φυτά παρουσίασαν συμπτώματα χλώρωσης στα μεσαία και ανώτερα φύλλα και ήπιο μαρασμό. Αν και όλα τα φυτά εμφάνισαν συμπτώματα της ασθένειας, οι υπό μελέτη κατηγορίες φυτών διέφεραν μεταξύ τους ως προς τη συμπτωματολογία. Συγκεκριμένα, τα φυτά αγρίου τύπου και τα φυτά της σειράς *hpaA 1-2* εμφάνισαν χλωρωτικές κηλίδες στα μεσαία φύλλα, ενώ τα φυτά της σειράς *hpaA 1-1* παρουσίασαν χλωρωτικές κηλίδες στα ανώτερα φύλλα (Εικόνα 3.2). Ωστόσο, τα φυτά των σειρών *hpaA 2-3* και *hpaA T1-5* εμφάνισαν ήπιο μαρασμό, με τη δεύτερη σειρά να παρουσιάζει και κύρτωση του ελάσματος (Εικόνα 3.2). Τα ανωτέρω συμπτώματα, στο διάστημα δύο ημερών μετά τη μόλυνση, δεν οδήγησαν σε ανάσχεση της ανάπτυξης των φυτών.



Εικόνα 3.2: Συγκριτική απεικόνιση της συμπτωματολογίας φυτών του είδους *Nicotiana benthamiana*, δύο ημέρες μετά τη μόλυνση με το βακτήριο *Pseudomonas syringae* pv. *tabaci*. **A.** Φυτά αγρίου τύπου (WT), όπου είναι ορατή η ανάπτυξη χλωρωτικών κηλίδων στα μεσαία φύλλα. **B.** Φυτά

της διαγονιδιακής σειράς *hraA 1-2*, όπου είναι εμφανής η ανάπτυξη χλωρωτικών κηλίδων στα μεσαία φύλλα. Γ. Ανώτερο φύλλο της διαγονιδιακής σειράς *hraA 1-1*, όπου είναι ορατή η ανάπτυξη χλωρωτικών κηλίδων. Δ. Φυτά της διαγονιδιακής σειράς *hraA 2-3*, όπου είναι ορατή η εμφάνιση συμπτωμάτων ήπιου μαρασμού. Ε. Φυτά της διαγονιδιακής σειράς *hraA T1-5*, όπου είναι ορατή η εμφάνιση συμπτωμάτων κύρτωσης του ελάσματος και ήπιου μαρασμού.

Τέσσερις ημέρες μετά τη μόλυνση, το σύνολο των υπό μελέτη κατηγοριών φυτών ανέπτυξαν έντονες χλωρώσεις. Συγκεκριμένα, τα φυτά αγρίου τύπου αλλά και τα φυτά των διαγονιδιακών σειρών *hraA 1-2* και *hraA T1-5* εμφάνισαν έντονες και εκτεταμένες χλωρωτικές κηλίδες στα ανώτερα φύλλα (Εικόνα 3.3). Αντίθετα, τα φυτά της διαγονιδιακής σειράς *hraA 2-3* ανέπτυξαν ήπιες χλωρωτικές κηλίδες στα μεσαία φύλλα. Τέλος, στα φυτά της σειράς *hraA 1-1* παρατηρήθηκε ανάπτυξη χλωρωτικών κηλίδων καθώς ήπια κύρτωση του ελάσματος (Εικόνα 3.3).



Εικόνα 3.3: Συγκριτική απεικόνιση της συμπτωματολογίας φυτών του είδους *Nicotiana benthamiana*, τέσσερις ημέρες μετά τη μόλυνση με το βακτήριο *Pseudomonas syringae* pv. *tabaci*. **A.** Ανώτερο φύλλο φυτού αγρίου τύπου (WT), όπου είναι ορατή η ανάπτυξη εκτεταμένων χλωρωτικών κηλίδων. **B.** Μεσαίο φύλλο της διαγονιδιακής σειράς *hpaA 2-3*, όπου είναι ορατή η ήπια ανάπτυξη χλωρωτικών κηλίδων. **Γ.** Κορυφαίο φύλλο της διαγονιδιακής σειράς *hpaA T1-5*, όπου διακρίνονται χλωρωτικές κηλίδες. **Δ.** Φυτό της διαγονιδιακής σειράς *hpaA 1-1*, όπου είναι ορατή η ανάπτυξη χλωρωτικών κηλίδων και η ήπια κύρτωση του ελάσματος. **Ε.** Φυτά της διαγονιδιακής σειράς *hpaA 1-2*, όπου είναι εμφανής η έντονη ανάπτυξη μεσονεύριων χλωρωτικών κηλίδων στα ανώτερα φύλλα

Εν συνεχεία, στις επτά μέρες μετά τη μόλυνση, η συμπτωματολογία των φυτών εντάθηκε περαιτέρω, με χαρακτηριστική την ανάπτυξη εκτεταμένης χλώρωσης και την αύξηση των χλωρωτικών κηλίδων. Έτσι, ενώ η συμπτωματολογία των φυτών κατά τις προηγούμενες παρατηρήσεις υπήρξε ήπια και αφορούσε σε εντοπισμένες χλωρωτικές κηλίδες και ήπια κύρτωση του ελάσματος, στο στάδιο αυτό παρατηρήθηκε κύρτωση του ελάσματος και συστροφή των φύλλων. Τα συμπτώματα αυτά ήταν χαρακτηριστικά των διαγονιδιακών σειρών *hpaA 1-1* και *hpaA T1-5* (Εικόνα 3.4).

Επιπλέον, τα φυτά της διαγονιδιακής σειράς *hpaA 1-1* εμφάνισαν για πρώτη φορά περιφερειακή νέκρωση του φύλλου, ενώ αυτά της σειράς *hpaA T1-5* παρουσίασαν ήπιο μαρασμό (Εικόνα 3.4). Αντίθετα στο διάστημα αυτό, η συμπτωματολογία των φυτών αγρίου τύπου και αυτών της σειράς *hpaA 2-3* χαρακτηρίστηκε ως ηπιότερη συγκριτικά με τις άλλες κατηγορίες φυτών (Εικόνα 3.4).

Είναι σημαντικό να αναφερθεί ότι από την έβδομη ημέρα μετά τη μόλυνση και έπειτα, παρατηρήθηκε περιορισμός της ανάπτυξης των μολυσμένων φυτών συγκριτικά με τα φυτά μάρτυρες, χωρίς ωστόσο να σημειώνεται πλήρης αναστολή της ανάπτυξής τους.



Εικόνα 3.4: Συγκριτική απεικόνιση της συμπτωματολογίας φυτών του είδους *Nicotiana benthamiana*, επτά ημέρες μετά τη μόλυνση με το βακτήριο *Pseudomonas syringae* pv. *tabaci*. **A.** Μεσαίο φύλλο άγριου τύπου (WT), όπου είναι ορατή η ανάπτυξη έντονων χλωρωτικών κηλίδων. **B.** Φύλλο της διαγονιδιακής σειράς *hpaA 1-1*, όπου είναι εμφανής η κύρτωση του ελάσματος, η συστροφή των φύλλων και η περιφερειακή νέκρωση τους. **Γ.** Φυτό της διαγονιδιακής σειράς *hpaA 1-2*, όπου είναι εμφανής η ανάπτυξη χλωρωτικών κηλίδων και ο μαρασμός του φυτού. **Δ.** Φυτά της διαγονιδιακής σειράς *hpaA 2-3*, όπου διακρίνονται χλωρωτικές κηλίδες και ήπιος μαρασμός. **Ε.** Φυτό της διαγονιδιακής σειράς *hpaA T1-5*, όπου είναι ορατή η κύρτωση του ελάσματος, η συστροφή των φύλλων και ο ήπιος μαρασμός του φυτού.

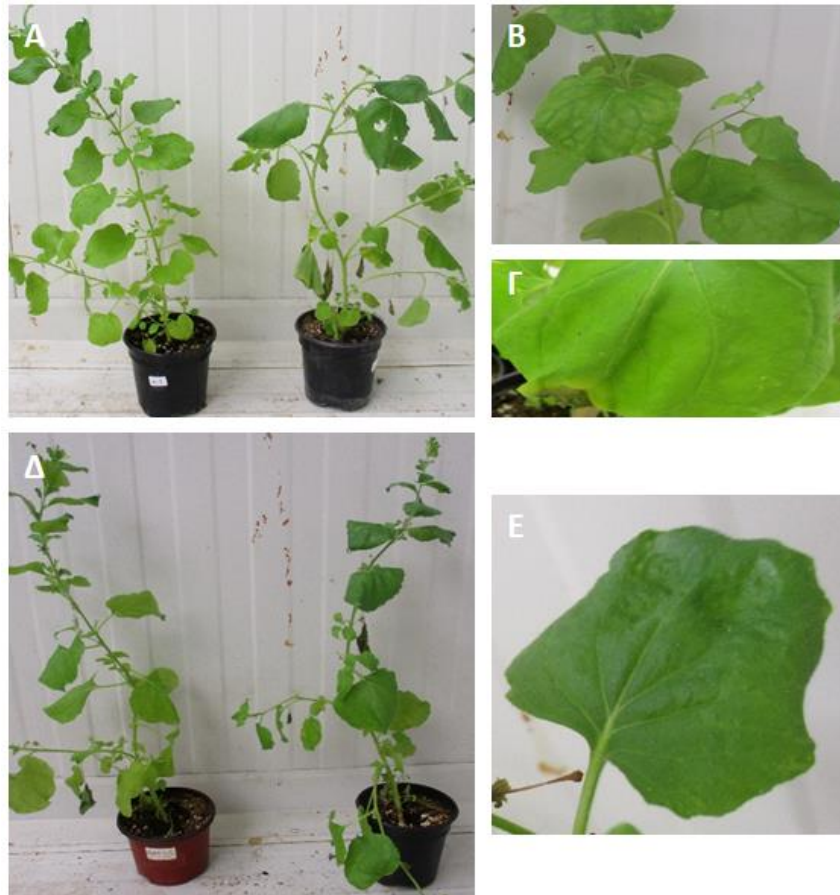
Κατ' αντιστοιχία, δέκα ημέρες μετά τη μόλυνση τα συμπτώματα των φυτών καθώς και ο γενικευμένος μαρασμός επεκτάθηκαν σημαντικά. Ωστόσο, σε ορισμένες περιπτώσεις, οι διαγονιδιακές σειρές διέφεραν ως προς τη συμπτωματολογία τόσο μεταξύ τους όσο και με τα φυτά αγρίου τύπου. Συγκεκριμένα, τα φυτά αγρίου τύπου και αυτά της διαγονιδιακής σειράς *hpaA 1-1* ανέπτυξαν χλωρωτικές κηλίδες στα μεσαία φύλλα (Εικόνα 3.5). Παράλληλα, τα φυτά των σειρών *hpaA 1-1* και *hpaA 1-2* εμφάνισαν κύρτωση του ελάσματος, ενώ τα φυτά της σειράς *hpaA 2-3* χαρακτηρίζονταν από την εκδήλωση ήπιου μαρασμού (Εικόνα 3.5). Τέλος, όπως και σε προηγούμενες παρατηρήσεις η σειρά *hpaA T1-5* εμφάνισε έντονη συστροφή των φύλλων, ενώ στα φυτά της σειράς *hpaA 1-1* παρατηρήθηκε επέκταση των συμπτωμάτων περιφερειακού καψίματος (Εικόνα 3.5).



Εικόνα 3.5: Συγκριτική απεικόνιση της συμπτωματολογίας φυτών του είδους *Nicotiana benthamiana*, δέκα ημέρες μετά τη μόλυνση με το βακτήριο *Pseudomonas syringae* pv. *tabaci*. **A.** Μεσαίο φύλλο αγρίου τύπου (WT),

όπου είναι εμφανής η ανάπτυξη χλωρωτικών κηλίδων. **Β.** Φυτά της διαγονιδιακής σειράς *hpaA 1-1*, όπου διακρίνονται χλωρωτικές κηλίδες στα μεσαία φύλλα, κύρτωση του ελάσματος και περιφερειακή νέκρωση στα κατώτερα φύλλα. **Γ.** Φυτά της διαγονιδιακής σειράς *hpaA 1-2*, όπου είναι ορατή η κύρτωση του ελάσματος και ο μαρασμός του φυτού. **Δ.** Φυτά της διαγονιδιακής σειράς *hpaA 2-3*, όπου διακρίνεται ο ήπιος μαρασμός του φυτού. **Ε.** Φυτό της διαγονιδιακής σειράς *hpaA T1-5*, όπου διακρίνεται η συστροφή των φύλλων και ο μαρασμός του φυτού.

Τέλος, στις δεκαέξι ημέρες μετά τη μόλυνση, η εκδήλωση συμπτωμάτων των φυτών ήταν σαφώς πιο έντονη συνολικά. Συγκεκριμένα, τα φυτά της σειράς *hpaA 1-1* χαρακτηρίστηκαν από την ανάπτυξη έντονων χλωρωτικών κηλίδων (Εικόνα 3.6). Επιπλέον, τα φυτά της σειράς *hpaA 2-3*, εμφάνισαν μια παραμόρφωση του ελάσματος, ενώ τα φυτά της σειράς *hpaA T1-5* εμφάνισαν κύρτωση του ελάσματος (Εικόνα 3.6). Ωστόσο, στις δεκαέξι ημέρες εμφανίστηκε περιφερειακή νέκρωση και στην σειρά *hpaA 1-2*, πέρα από την σειρά *hpaA 1-1* που παρατηρήθηκε τις προηγούμενες ημέρες. Τέλος, τα φυτά αγρίου τύπου εμφάνισαν συστροφή των φύλλων και μια συνολική εικόνα μαρασμού (Εικόνα 3.6).



Εικόνα 3.6: Συγκριτική απεικόνιση της συμπτωματολογίας φυτών του είδους *Nicotiana benthamiana*, δεκαέξι ημέρες μετά τη μόλυνση με το βακτήριο *Pseudomonas syringae* pv. *tabaci*. **Α.** Φυτά άγριου τύπου (WT), όπου είναι εμφανής η συστροφή των φύλλων και ο μαρασμός. **Β.** Φυτό της διαγονιδιακής σειράς *hraA 1-1*, όπου είναι εμφανής η ανάπτυξη έντονων και εκτεταμένων χλωρωτικών κηλίδων. **Γ.** Φύλλο της διαγονιδιακής σειράς *hraA 1-2*, όπου είναι ορατή η περιφερειακή νέκρωση του φύλλου. **Δ.** Φυτά της διαγονιδιακής σειράς *hraA T1-5*, όπου διακρίνεται η κύρτωση του ελάσματος και ο μαρασμός του φυτού. **Ε.** Φύλλο της διαγονιδιακής σειράς *hraA 2-3*, όπου διακρίνεται παραμόρφωση του ελάσματος και ο μαρασμός των φύλλων.

3.3 Συγκριτική αξιολόγηση της αποίκισης του βακτηρίου έπειτα από μόλυνση με το *Pseudomonas syringae* pv. *tabaci*

Με στόχο τη μελέτη της επίδρασης του γονιδίου *hraA* σε διαγονιδιακά φυτά του είδους *N. benthamiana*, ως προς την ανθεκτικότητα έναντι της ασθένειας της

βακτηριακής κηλίδωσης του καπνού, πραγματοποιήθηκε ποσοτικοποίηση του παθογόνου βακτηρίου σε φυτά τα οποία είχαν προηγουμένως μολυνθεί τεχνητά με το βακτήριο *Pseudomonas syringae* pv. *tabaci*. Για την διεξαγωγή της μελέτης, λήφθηκαν δείγματα φυτικού ιστού, 24 και 72 ώρες μετά τη μόλυνση, και στη συνέχεια εκτιμήθηκε η αποίκιση του βακτηρίου, μέσω προσδιορισμού του αριθμού αποικιών που αναπτύχθηκαν σε θρεπτικό μέσο KB.

Για την αξιολόγηση της αποίκισης του βακτηρίου συγκρίθηκαν τα φυτά των διαγονιδιακών *hpaA*-σειρών και των φυτών άγριου τύπου. Ειδικότερα, λήφθηκαν δείγματα φύλλων από τέσσερα φυτά για κάθε κατηγορία φυτών. Επίσης, στο πείραμα συμπεριλήφθηκαν ως μάρτυρες και δείγματα φυτικού ιστού που προέρχονταν από μη μολυσμένα φυτά. Στο πλαίσιο εκτίμησης της αποίκισης του βακτηρίου, πραγματοποιήθηκαν διαδοχικές αραιώσεις ώστε να επιλεγθεί η καταλληλότερη προς μέτρηση. Με βάση την μέτρηση του αριθμού των αποικιών που αναπτύχθηκαν σε κάθε τρυβλίο είναι εφικτή η εκτίμηση του αριθμού αποικιών (cfu) που σχηματίζονται ανά 1 ml της αντίστοιχης αραιώσης. Η μέτρηση των αποικιών πραγματοποιήθηκε μακροσκοπικά από τις φωτογραφίες που λήφθηκαν, ωστόσο για μεγαλύτερη εγκυρότητα και ευκρίνεια προτείνεται να χρησιμοποιείται η φασματοφωτομετρική ή η άμεση μικροσκοπική καταμέτρηση.

3.3.1 Αποίκιση του βακτηρίου 24h μετά την μόλυνση

Η πρώτη καταμέτρηση των αποικιών των βακτηρίων πραγματοποιήθηκε 24 ώρες μετά τη μόλυνση των φυτών με το βακτήριο *Pseudomonas syringae* pv. *tabaci*.

Σύμφωνα με τα αποτελέσματα της στατιστικής ανάλυσης, η αποίκιση του βακτηρίου στα εκχυλίσματα της 1^{ης} αραιώσης δε διέφερε μεταξύ των διαφορετικών κατηγοριών φυτών. Παρά την απουσία στατιστικά σημαντικών διαφορών, παρατηρήθηκαν διαφορές μεταξύ των κατηγοριών φυτών, με τα φυτά άγριου τύπου και τα φυτά της σειράς *hpaA T1-5* να εμφανίζουν το μεγαλύτερο και μικρότερο αριθμό αποικιών αντίστοιχα (Πίνακας 3.1).

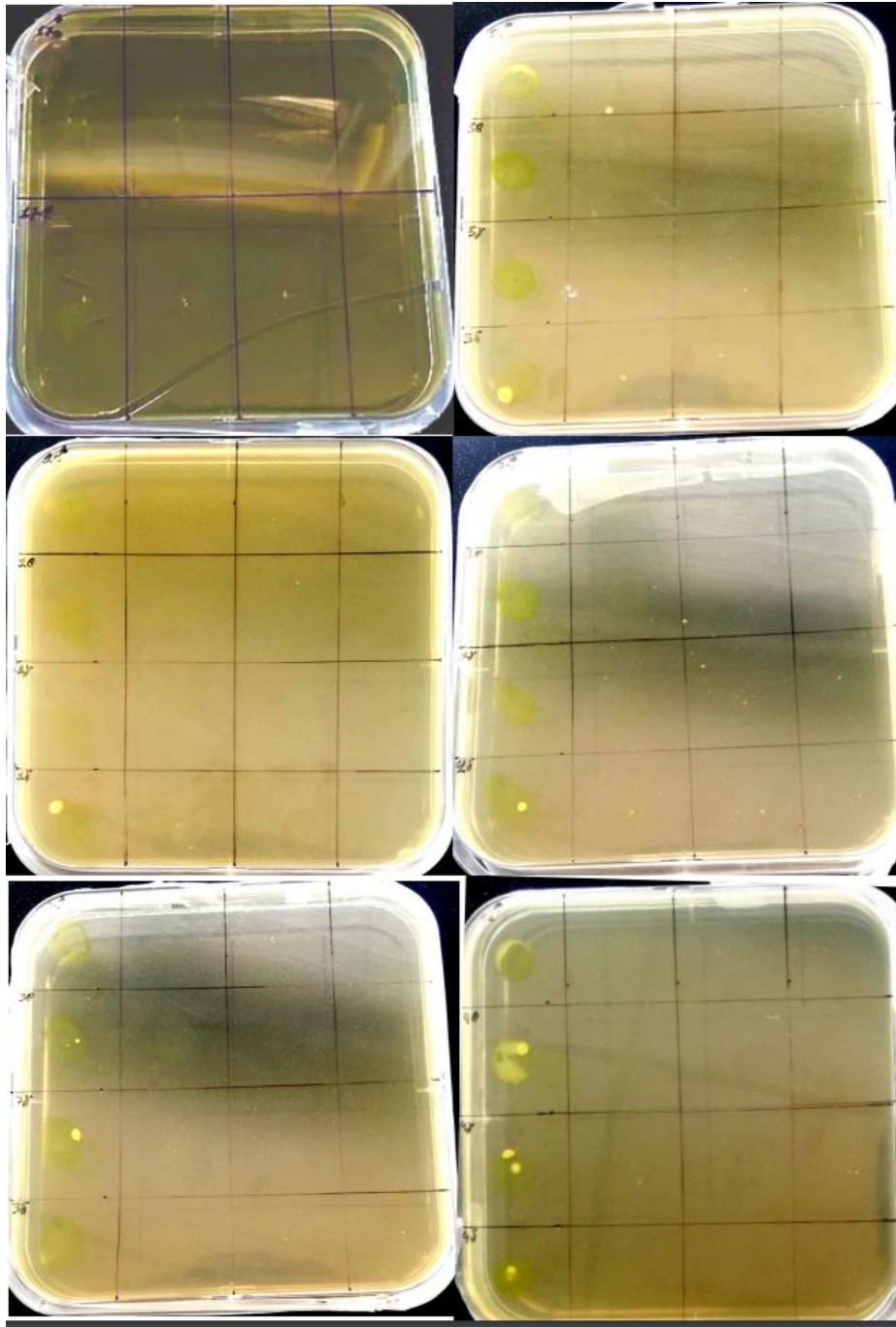
Αντίθετα, κατά τη 2^η αραιώση, η ανάλυση κατέδειξε την ύπαρξη διαφορών στα εκχυλίσματα των διαφορετικών κατηγοριών φυτών. Είναι αξιοσημείωτο ότι τα φυτά των διαγονιδιακών σειρών *hpaA 2-3* εμφάνισαν μηδενική αποίκιση, ενώ μικρό αριθμό

αποικιών εμφάνισαν τα φυτά αγρίου τύπου, ακολουθούμενα από αυτά της σειράς *hpaA 1-1*. Σημαντική διαφορά σημειώθηκε στα φυτά της σειράς *hpaA 1-2*, τα οποία χαρακτηρίζονταν από αυξημένο αριθμό αποικιών, που αντιστοιχεί σε 1,50 (Πίνακας 3.1). Στα φυτικά εκχυλίσματα της 3^{ης} και 4^{ης} αραιώσεως, δεν παρατηρήθηκε ανάπτυξη αποικιών βακτηρίων.

Στην Εικόνα 3.7 παρουσιάζεται συγκριτικά η αποίκιση του βακτηρίου σε θρεπτικό μέσο KB, όπου έχει γίνει επίστρωση των φυτικών εκχυλισμάτων που προέρχονται από τα μολυσμένα φυτά. Σημειώνεται ότι τα τρυβλία που παρατίθενται εμφανίζονται διαιρεμένα και κάθε κελί αφορά στις διαφορετικές διαδοχικές αραιώσεις (αρχικό εκχύλισμα, 1/10, 1/100, 1/1000). Οι αραιώσεις πραγματοποιήθηκαν σύμφωνα με την μέθοδο που παρουσιάζεται στην Εικόνα 2.1.

Πίνακας 3.1: Αποίκιση του βακτηρίου σε φυτά του είδους *N. benthamiana*, 24 ώρες μετά τη μόλυνση με το βακτήριο *Pseudomonas syringae* pv. *tabaci*.

Σειρά (G)	Αποίκιση βακτηρίου			
	1 ^η αραιώση		2 ^η αραιώση	
WT	5,25	a	0,25	b
<i>hpaA 1-1</i>	3,25	a	0,75	ab
<i>hpaA 1-2</i>	3,50	a	1,50	a
<i>hpaA 2-3</i>	2,50	a	0,00	b
<i>hpaA T1-5</i>	2,00	a	0,25	b



Εικόνα 3.7: Συγκριτική απεικόνιση των αποικιών που αναπτύχθηκαν σε φυτικό ιστό του είδους *Nicotiana benthamiana*, 24 ώρες έπειτα από τη μόλυνση με το βακτήριο *Pseudomonas syringae* pv. *tabaci*. **Α.** Ιστός που προέρχεται από υγιή, μη μολυσμένο φυτό (μάρτυρας) **Β.** Ιστός που προέρχεται από φυτό αγρίου τύπου (WT) **Γ.** Ιστός που προέρχεται από φυτό της σειράς *hraA 1-1* **Δ.** Ιστός που προέρχεται από φυτό της σειράς *hraA 1-2* **Ε.** Ιστός που προέρχεται από φυτό της σειράς *hraA 2-3* **ΣΤ.** Ιστός που προέρχεται από φυτό της σειράς *hraA T1-5*.

3.3.2 Αποίκιση του βακτηρίου 72h μετά την μόλυνση

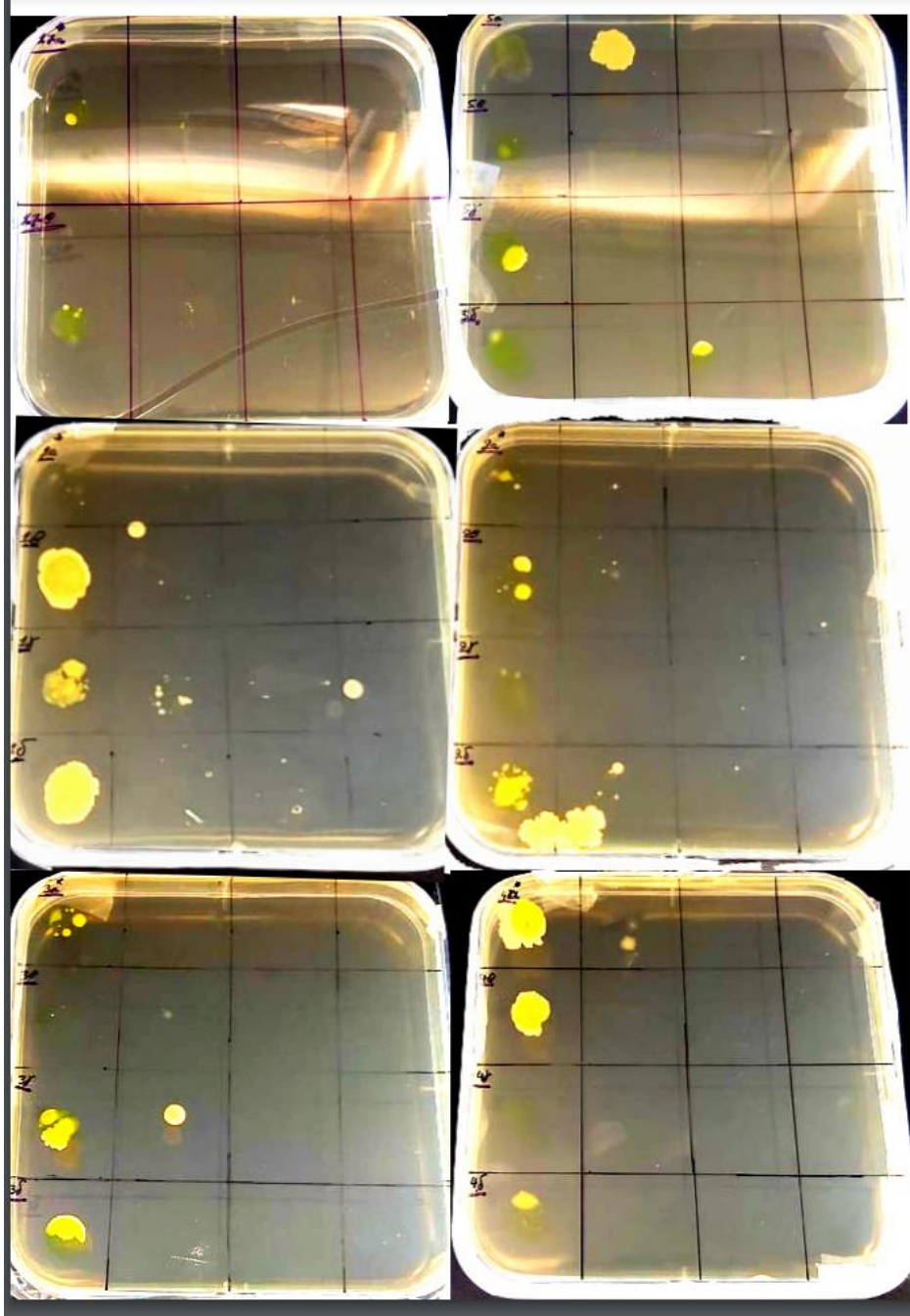
Η δεύτερη καταμέτρηση των αποικιών των βακτηρίων πραγματοποιήθηκε 72 ώρες μετά τη μόλυνση των φυτών με το βακτήριο *Pseudomonas syringae* pv. *tabaci*.

Τα αποτελέσματα της στατιστικής ανάλυσης κατέδειξαν σημαντικές διαφορές στην αποίκιση του βακτηρίου μεταξύ των εκχυλισμάτων της 1^{ης} και της 2^{ης} αραίωσης που προέρχονταν από τις διαφορετικές κατηγορίες φυτών. Συγκεκριμένα, τα φυτά της διαγονιδιακής σειράς *hraA 1-2* εμφάνισαν το μεγαλύτερο αριθμό αποικιών, ακολουθούμενα από τα φυτά της σειράς *hraA 2-3* (Πίνακας 3.2). Παράλληλα, μειωμένο αριθμό αποικιών εμφάνισαν τα φυτά αγρίου τύπου καθώς και αυτά της σειράς *hraA 1-1* (Πίνακας 3.2). Αντίθετα, τον μικρότερο αριθμό αποικιών παρουσίασαν τα φυτά της σειράς *hraA T1-5* (Πίνακας 3.2).

Όσον αφορά την 2^η αραίωση, τα αποτελέσματα της ανάλυσης κατέδειξαν ύπαρξη διαφορών στην αποίκιση του βακτηρίου στα εκχυλίσματα των φυτών αγρίου τύπου. Επιπροσθέτως, αναφορικά με τις υπόλοιπες κατηγορίες φυτών η στατιστική ανάλυση κατέδειξε την απουσία διαφορών. Ωστόσο, το μεγαλύτερο αριθμό αποικιών, συγκριτικά με τις υπόλοιπες κατηγορίες φυτών, εμφάνισε η σειρά *hraA 2-3* και τον μικρότερο τα φυτά αγρίου τύπου, ακολουθούμενα από την σειρά *hraA T1-5* (Πίνακας 3.2). Στην Εικόνα 3.8 παρουσιάζεται συγκριτικά η αποίκιση του βακτηρίου σε θρεπτικό μέσο KB, όπου έχει γίνει επίστρωση των φυτικών εκχυλισμάτων που προέρχονται από τα μολυσμένα φυτά.

Πίνακας 3.2: Αποίκιση του βακτηρίου σε φυτά του είδους *N. benthamiana*, 72 ώρες μετά τη μόλυνση με το βακτήριο *Pseudomonas syringae* pv. *tabaci*.

Σειρά (G)	Αποίκιση βακτηρίου			
	1 ^η αραίωση		2 ^η αραίωση	
WT	2,66	ab	0,00	b
<i>hraA 1-1</i>	2,33	ab	1,00	ab
<i>hraA 1-2</i>	5,33	a	1,33	ab
<i>hraA 2-3</i>	4,66	ab	1,66	a
<i>hraA T1-5</i>	1,00	b	0,33	ab



Εικόνα 3.8: Συγκριτική απεικόνιση των αποικιών που αναπτύχθηκαν σε φυτικό ιστό του είδους *Nicotiana benthamiana*, 72 ώρες έπειτα από τη μόλυνση με το βακτήριο *Pseudomonas syringae* pv. *tabaci*. **Α.** Ιστός που προέρχεται από υγιή, μη μολυσμένο φυτό (μάρτυρας) **Β.** Ιστός που προέρχεται από φυτό αγρίου τύπου (WT) **Γ.** Ιστός που προέρχεται από φυτό της σειράς *hraA 1-1* **Δ.** Ιστός που προέρχεται από φυτό της σειράς *hraA 1-2* **Ε.** Ιστός που προέρχεται από φυτό της σειράς *hraA 2-3* **ΣΤ.** Ιστός που προέρχεται από φυτό της σειράς *hraA T1-5*.

3.4 Συγκριτική αξιολόγηση των τιμών χλωροφύλλης πριν και μετά τη μόλυνση με το βακτήριο *Pseudomonas syringae* pv. *tabaci*

Με στόχο τη μελέτη της επίδρασης του γονιδίου *hpaA* σε διαγονιδιακά φυτά του είδους *N. benthamiana*, ως προς την ασθένεια της βακτηριακής κηλίδωσης του καπνού, εκτιμήθηκε η ποσότητα της περιεχόμενης χλωροφύλλης των φυτών πριν και μετά τη μόλυνση με το βακτήριο *Pseudomonas syringae* pv. *tabaci*. Για τον σκοπό αυτό, πραγματοποιήθηκε μέτρηση με το χλωροφυλλόμετρο SPAD-502Plus σε πλήρως ανεπτυγμένα φύλλα.

3.4.1 Τιμές χλωροφύλλης πριν την μόλυνση με το βακτήριο *Pseudomonas syringae* pv. *tabaci*

Οι τιμές περιεχόμενης χλωροφύλλης των στα φυτά των δύο κατηγοριών μεταχείρισης -φυτά μάρτυρες και μολυσμένα φυτά-, πριν την μόλυνση με το βακτήριο, παρουσιάζεται στον Πίνακα 3.3.

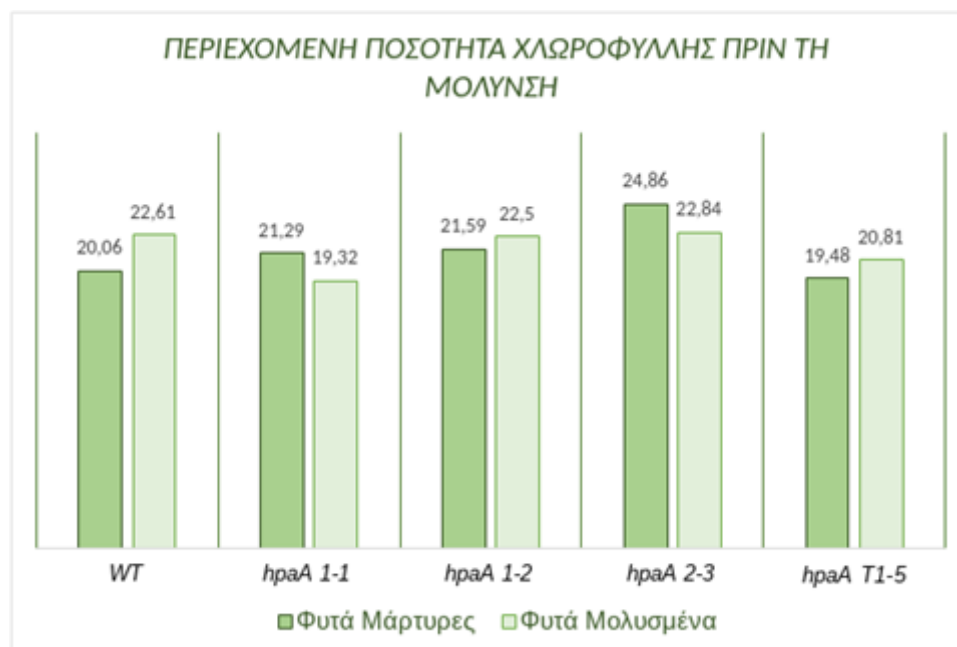
Τα αποτελέσματα της στατιστικής ανάλυσης κατέδειξαν ότι οι τιμές της χλωροφύλλης δε διέφεραν σημαντικά μεταξύ των φυτών μαρτύρων και των μολυσμένων φυτών, όπως προκύπτει από τις μέσες τιμές των μεταχειρίσεων για όλες τις κατηγορίες φυτών (μάρτυρες: 21,37 / μολυσμένα φυτά: 21,57). Επίσης, η ανάλυση κατέδειξε την απουσία διαφορών μεταξύ των φυτών μαρτύρων που προέρχονται από τις διαφορετικές κατηγορίες φυτών, με μόνη εξαίρεση τα φυτά της σειράς *hpaA* 2-3 που εμφάνισαν σημαντικά αυξημένη ποσότητα χλωροφύλλης (24,86). Αντίθετα, τη μικρότερη ποσότητα χλωροφύλλης παρουσίασαν οι μάρτυρες της διαγονιδιακής σειράς *hpaA* T1-5 (19,48) (Πίνακας 3.3).

Ωστόσο, στα φυτά που μολύνθηκαν με το βακτήριο η ανάλυση κατέδειξε την ύπαρξη στατιστικά σημαντικών διαφορών αναφορικά με την ποσότητα χλωροφύλλης. Συγκεκριμένα, τα φυτά της σειράς *hpaA* 2-3 εμφάνισαν τη μεγαλύτερη ποσότητα χλωροφύλλης (22,84), ενώ στα φυτά της σειράς *hpaA* 1-1 σημειώθηκε η μικρότερη ποσότητα χλωροφύλλης (19,32). Οι υπόλοιπες διαγονιδιακές σειρές παρουσίασαν παρόμοια μεταξύ τους και με τα φυτά αγρίου τύπου επίπεδα χλωροφύλλης.

Πίνακας 3.3: Περιεχόμενη ποσότητα χλωροφύλλης στα φυτά αγρίου τύπου και στις *hpaA*-διαγονιδιακές σειρές, πριν τη μόλυνση με το βακτήριο *Pseudomonas syringae* pv. *tabaci*

Σειρές (G)	Μεταχείριση (T)		
	Μάρτυρες	Μολυσμένα φυτά	Μ.Ο. (C)
WT	20,06 b	22,61 ab	21,19 b
<i>hpaA</i> 1-1	21,29 b	19,32 b	20,30 b
<i>hpaA</i> 1-2	21,59 b	22,50 ab	22,09 ab
<i>hpaA</i> 2-3	24,86 a	22,84 a	23,85 a
<i>hpaA</i> T1-5	19,48 ab	20,81 ab	20,09 b
Μ.Ο.(G)	21,37 a	21,57 a	

Οι τιμές της χλωροφύλλης που παρουσίασαν τα φυτά που ανήκουν στις δύο κατηγορίες μεταχειρίσεων, δηλαδή οι μάρτυρες και τα φυτά που επρόκειτο να μολυνθούν, με το βακτήριο *Pseudomonas syringae* pv. *tabaci*, πριν την μόλυνση, παρουσιάζονται συγκριτικά στο Διάγραμμα 3.1.



Διάγραμμα 3.1: Περιεχόμενη ποσότητα χλωροφύλλης στα φυτά αγρίου τύπου και στις *hpaA*-διαγονιδιακές σειρές, πριν τη μόλυνση με το βακτήριο *Pseudomonas syringae* pv. *tabaci*.

3.4.2 Τιμές χλωροφύλλης μετά την μόλυνση με το βακτήριο *Pseudomonas syringae* pv. *tabaci*

Η περιεχόμενη χλωροφύλλη στα φυτά των δύο κατηγοριών μεταχείρισης, δηλαδή στα φυτά μάρτυρες και στα μολυσμένα, μετά την μόλυνση με το βακτήριο, παρουσιάζεται στον Πίνακα 3.4.

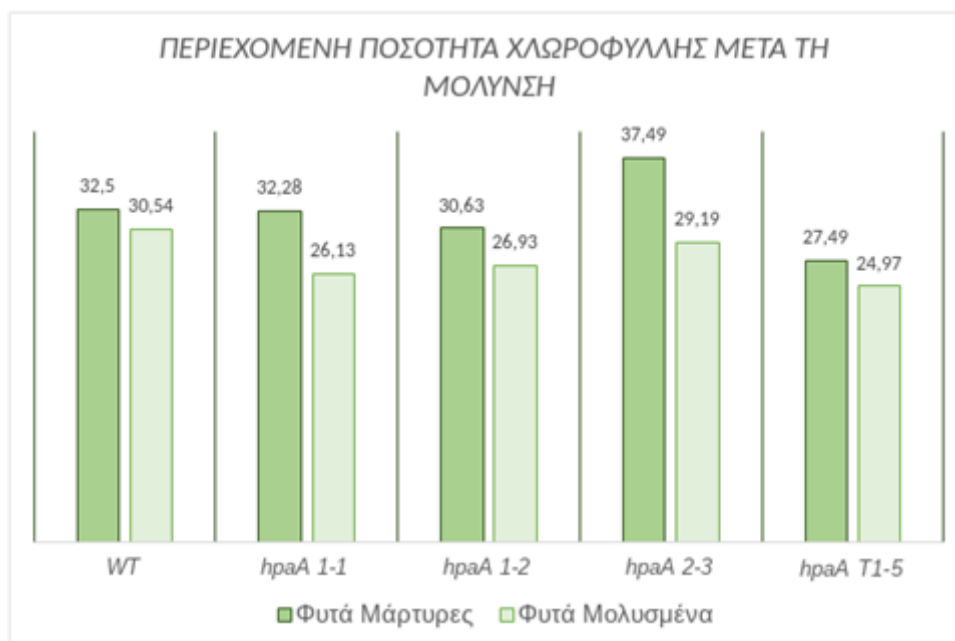
Όπως προκύπτει από τα αποτελέσματα της ανάλυσης, παρατηρήθηκαν σημαντικές διαφορές σε επίπεδο μεταχείρισης, σύμφωνα με τις μέσες τιμές των μεταχειρίσεων για όλες τις κατηγορίες φυτών (μάρτυρες: 32,06 / μολυσμένα φυτά: 27,43) (Πίνακας 3.4). Παράλληλα, τα αποτελέσματα κατέδειξαν την ύπαρξη σημαντικών διαφορών στους μάρτυρες των διαφορετικών κατηγοριών φυτών. Ειδικότερα, τη μεγαλύτερη ποσότητα χλωροφύλλης εμφάνισαν τα φυτά της σειράς *hpaA* 2-3 (37,94), ενώ στους μάρτυρες της σειράς *hpaA* T1-5 σημειώθηκε η μικρότερη ποσότητα χλωροφύλλης (27,49).

Αντίθετα, η ανάλυση κατέδειξε την απουσία διαφορών ως προς την ποσότητα χλωροφύλλης στα μολυσμένα φυτά που ανήκουν στις διαφορετικές κατηγορίες φυτών. Παρά την απουσία στατιστικά σημαντικών διαφορών, τη μεγαλύτερη ποσότητα χλωροφύλλης εμφάνισαν τα φυτά αγρίου τύπου (30,54), ενώ η μικρότερη τιμή καταγράφηκε στα φυτά της σειράς *hpaA* T1-5 (24,97), ακολουθούμενα από τα φυτά των σειρών *hpaA* 1-1 και *hpaA* 1-2 (26,13 και 26,93 αντίστοιχα).

Πίνακας 3.4: Περιεχόμενη ποσότητα χλωροφύλλης στα φυτά αγρίου τύπου και στις *hpaA*-διαγονιδιακές σειρές, μετά τη μόλυνση με το βακτήριο *Pseudomonas syringae* pv. *tabaci*.

Σειρές (G)	Μεταχείριση (T)		
	Μάρτυρες	Μολυσμένα φυτά	M.O. (C)
WT	32,5ab	30,54a	31,67ab
<i>hpaA</i> 1-1	32,28b	26,13a	29,21abc
<i>hpaA</i> 1-2	30,63b	26,93a	28,57bc
<i>hpaA</i> 2-3	37,94a	29,19a	33,57a
<i>hpaA</i> T1-5	27,49b	24,97a	26,35c
M.O.(G)	32,06a	27,43b	

Οι τιμές της χλωροφύλλης που παρουσίασαν τα φυτά που ανήκουν στις δύο κατηγορίες μεταχειρίσεων, δηλαδή στους μάρτυρες και στα φυτά που μολύνθηκαν με το βακτήριο *Pseudomonas syringae* pv. *tabaci* παρουσιάζονται συγκριτικά στο Διάγραμμα 3.2. Είναι εμφανές ότι τα φυτά μάρτυρες παρουσιάζουν μεγαλύτερη τιμή χλωροφύλλης σε σχέση με τα φυτά που μολύνθηκαν, αποτέλεσμα που αποδεικνύει την δυσμενή επίδραση της μόλυνσης με το βακτήριο.



Διάγραμμα 3.2: Περιεχόμενη ποσότητα χλωροφύλλης στα φυτά αγρίου τύπου και στις *hraA*-διαγονιδιακές σειρές, 10 ημέρες μετά τη μόλυνση με το βακτήριο *Pseudomonas syringae* pv. *tabaci*.

4. ΣΥΖΗΤΗΣΗ

Στο περιβάλλον ανάπτυξής τους, τα φυτά υπόκεινται σε ένα ευρύ φάσμα καταπονήσεων που προκαλούνται είτε από αβιοτικούς είτε από βιοτικούς παράγοντες. Στους τελευταίους, συγκαταλέγονται οι μικροοργανισμοί που αλληλεπιδρούν με τα φυτά καθ' όλη τη διάρκεια της ζωής τους, με αποτέλεσμα τη δημιουργία ευεργετικών ή παθογόνων αλληλεπιδράσεων (Thrall *et al.*, 2007; Rodriguez *et al.*, 2019). Επιπλέον, οι φυτικοί οργανισμοί, σε αντίθεση με τα θηλαστικά, στερούνται της ικανότητας κίνησης και προσαρμοστικού ανοσοποιητικού συστήματος (Jones & Dangl, 2006). Συνεπώς, η ικανότητα αντιμετώπισης των μικροοργανισμών –ευεργετικών ή παθογόνων- απαιτεί ποικίλες προσαρμογές που συμβάλλουν στη διαμόρφωση ενός έμφυτου ανοσοποιητικού συστήματος, του οποίου η φύση καθορίζεται συναρτήσει του αλληλοεπιδρώντος μικροοργανισμού (Pieterse *et al.*, 2014).

Με δεδομένες τις απώλειες απόδοσης και την υποβάθμιση των γεωργικών προϊόντων που οφείλονται σε παθογόνους μικροοργανισμούς, η έρευνα της βελτίωσης παραδοσιακά θέτει ως πρωταρχικό στόχο την αναβάθμιση της ανθεκτικότητας έναντι ασθενειών. Είναι γεγονός ότι κλασικές βελτιωτικές διαδικασίες έχουν συμβάλει στην ανάπτυξη πληθώρας ανθεκτικών ποικιλιών σε ένα μεγάλο εύρος καλλιεργούμενων φυτικών ειδών. Ωστόσο, οι δυνατότητες περαιτέρω βελτίωσης της ανθεκτικότητας, μέσω κλασικών διαδικασιών, δυσχεραίνεται σημαντικά αφενός μεν από την περιορισμένη διαθεσιμότητα φυσικών πηγών ανθεκτικότητας και αφετέρου από την πολύπλοκη γενετική βάση των γνωρισμάτων ανθεκτικότητας. Στο πλαίσιο αυτό, η έρευνα στη βελτίωση εστιάζει ολοένα και περισσότερο προς την αξιοποίηση των τεχνολογιών της Γενετικής Μηχανικής καθώς επιτρέπουν την επίτευξη ανθεκτικότητας έναντι βιοτικών καταπονήσεων, προσπερνώντας τα εμπόδια που θέτει η συμβατότητα διασταύρωσης των φυτικών ειδών. Συνεπώς, η ενσωμάτωση γονιδίων φυτικής ή μη προέλευσης έχει επιτυχώς συμβάλει στην ανάπτυξη διαγονιδιακών φυτών με γενετική ανθεκτικότητα ή ακόμη και ανοσία έναντι φυτοπαθογόνων μικροοργανισμών.

Το εξελιγμένο και έμφυτο ανοσοποιητικό σύστημα των φυτών αποτρέπει την ανάπτυξη επιβλαβών μικροοργανισμών μέσω δύο αλληλένδετων αμυντικών στρατηγικών των φυτών με βάση την αντίληψη των παθογόνων (Nishad *et al.*, 2020). Ειδικότερα, όσον αφορά τα φυτοπαθογόνα βακτήρια είναι γνωστό ότι εγχέουν

μολυσματικές πρωτεΐνες - τελεστές σε φυτικά κύτταρα μέσω του εκκριτικού συστήματος III (Coburn & Finlay, 2007). Είναι ευρέως γνωστό ότι οι πρωτεΐνες - τελεστές έχουν διπλό ρόλο ως μοριακοί συντελεστές, (Alfano & Collmer, 2004; Kamoun, 2006) οι οποίοι είτε επάγουν αμυντικούς μηχανισμούς, συχνά ενεργοποιώντας την αντίδραση υπερευαισθησίας, είτε καταστέλλουν την άμυνα του ξενιστή, συμβάλλοντας στην παθογένεια των βακτηριακών φορέων τους. Βάσει των ανωτέρω, τα τελευταία χρόνια ένα πλήθος ερευνών έχει εστιάσει στην αξιοποίηση των τελεστών για την ανάπτυξη ανθεκτικότητας έναντι καταπονήσεων.

Με δεδομένο ότι το γονίδιο *hpaA*, που εμφανίζει υψηλή συντήρηση στο γένος *Xanthomonas*, έχει προταθεί ότι πιθανώς δρα ως τελεστής, στόχο της παρούσας διατριβής αποτέλεσε η μελέτη της επίδρασης του γονιδίου *hpaA*, που προέρχεται από το βακτήριο *Xanthomonas campestris* pv. *campestris*, σε διαγονιδιακά φυτά του είδους *Nicotiana benthamiana* ως προς την ανθεκτικότητα έναντι βιοτικών καταπονήσεων. Για το σκοπό αυτό, μελετήθηκε συγκριτικά η απόκριση διαγονιδιακών σειρών που εκφράζουν ενδογενώς το γονίδιο *hpaA* και φυτών αγρίου τύπου (wt) υπό συνθήκες τεχνητής μόλυνσης με το βακτήριο *Pseudomonas syringae* pv. *tabaci*. Για την αξιολόγηση της ανθεκτικότητας αξιοποιήθηκαν ως παράμετροι η συμπτωματολογία των φυτών, η αποίκηση του βακτηρίου εντός των φυτικών ιστών και η περιεχόμενη ποσότητα χλωροφύλλης πριν και μετά την μόλυνση με το βακτήριο.

Τα ευρήματα της μελέτης ανέδειξαν ότι τα διαγονιδιακά φυτά που εκφράζουν ενδογενώς το γονίδιο *hpaA* παρουσιάζουν φυσιολογικό φαινότυπο που δεν αποκλίνει από τον αντίστοιχο των φυτών αγρίου τύπου. Συγκεκριμένα, τα φυτά που προέρχονταν από τις διαφορετικές *hpaA*-σειρές εμφάνισαν όμοιο ρυθμό ανάπτυξης και μορφολογία τόσο μεταξύ τους όσο και με τα φυτά αγρίου τύπου, οδηγώντας στο συμπέρασμα ότι η ενδογενής έκφραση του *hpaA* δεν επηρεάζει το φαινότυπο των φυτών στο είδος *N. benthamiana*.

Στο πλαίσιο μελέτης της επίδρασης του γονιδίου *hpaA* ως προς την ανθεκτικότητα έναντι της ασθένειας της βακτηριακής κηλίδωσης, αξιολογήθηκε συγκριτικά με φυτά αγρίου τύπου η συμπτωματολογία των *hpaA*-σειρών δύο, τέσσερις, επτά, δέκα και δεκαέξι ημέρες μετά τη μόλυνση με το βακτήριο *Pseudomonas syringae* pv. *tabaci*. Με την πάροδο του χρόνου, όπως αναμενόταν, η συμπτωματολογία εντείνονταν, οδηγώντας σε περισσότερα και εκτεταμένα συμπτώματα της ασθένειας.

Παρά το γεγονός ότι το σύνολο των φυτών ανέπτυξαν παρόμοια συμπτώματα, τα οποία ήταν χαρακτηριστικά της ασθένειας, οι διαφορετικές κατηγορίες φυτών διέφεραν τόσο ως προς την ένταση όσο και ως προς την έκταση και το ρυθμό εκδήλωσης των συμπτωμάτων. Έτσι, το σύνολο των υπό μελέτη κατηγοριών φυτών - αγρίου τύπου και *hpaA*-σειρές - ανέπτυξαν χλωρωτικές κηλίδες, οι οποίες κάλυπταν σημαντικό μέρος της φυλλικής επιφάνειας και γίνονταν προοδευτικά περισσότερο έντονες και εκτεταμένες. Επίσης, το σύνολο των φυτών με την πάροδο του χρόνου, μετά από δεκαέξι ημέρες, εμφάνισε συστροφή των φύλλων και ήπιο έως και γενικευμένο μαρασμό. Ωστόσο, είναι αξιοσημείωτο ότι τα φυτά της διαγονιδιακής σειράς *hpaA* 2-3 παρουσίασαν γενικότερα σαφώς πιο ήπια συμπτωματολογία, εν συγκρίσει με τις υπόλοιπες σειρές αλλά και τα φυτά αγρίου τύπου, η οποία αφορούσε κυρίως σε χλώρωση των μεσαίων φύλλων και ήπιο μαρασμό.

Αναφορικά με την αποίκιση του βακτηρίου, η αξιολόγηση έλαβε χώρα στις 24 και 72 ώρες μετά την μόλυνση των φυτών με το βακτήριο. Στις 24 ώρες μετά την μόλυνση, τα αποτελέσματα της ανάλυσης κατέδειξαν την απουσία σημαντικών διαφορών μεταξύ των εκχυλισμάτων 1^{ης} αραιώσης που προέρχονταν από τις διαφορετικές κατηγορίες φυτών. Ωστόσο, η ανάλυση των εκχυλισμάτων 2^{ης} αραιώσης ανέδειξε την ύπαρξη διαφορών μεταξύ των διαφορετικών σειρών, με τα φυτά της σειράς *hpaA* 2-3 να εμφανίζουν μηδενική αποίκιση, ενώ τα φυτά της σειράς *hpaA* 1-2 παρουσίασαν τη μεγαλύτερη αποίκιση. Ωστόσο, στις 72 ώρες μετά τη μόλυνση σημειώθηκαν σημαντικές διαφορές μεταξύ των διαφορετικών κατηγοριών φυτών. Στο διάστημα αυτό τα φυτά της σειράς *hpaA* 1-2 εμφάνισαν το μεγαλύτερο αριθμό αποικιών, ενώ σημαντικά μειωμένη αποίκιση εμφάνισαν τα φυτά της σειράς *hpaA* T1-5. Τα ευρήματα αυτά, σε συνδυασμό με τη συμπτωματολογία των διαφορετικών κατηγοριών φυτών, παρέχουν ενδείξεις σχετικά με την πιθανή υπεροχή της *hpaA* T1-5 ως προς την ανθεκτικότητα έναντι του βακτηρίου *P. syringae* pv. *tabaci*.

Σχετικά με την ποσότητα χλωροφύλλης, τα αποτελέσματα της ανάλυσης αποκάλυψαν την απουσία διαφορών μεταξύ των διαφορετικών κατηγοριών φυτών πριν τη μόλυνση. Ωστόσο, έπειτα από τη μόλυνση, παρατηρήθηκαν σημαντικές διαφορές μεταξύ των μαρτύρων και των μολυσμένων φυτών, όπως προκύπτει από τις μέσες τιμές των μεταχειρίσεων για όλες τις κατηγορίες φυτών. Τα ευρήματα αυτά καταδεικνύουν ότι η μόλυνση με το βακτήριο *P. syringae* pv. *tabaci* επιδρά δυσμενώς στην ποσότητα χλωροφύλλης και συνάδουν με προηγούμενες έρευνες που υπογραμμίζουν ότι η

χλωροφύλλη, και συνεπώς η φωτοσυνθετική δραστηριότητα, μειώνονται έπειτα από τη μόλυνση με το βακτήριο *P. syringae* (Burger *et al.*, 2007). Συγκεκριμένα, έχει αποδειχθεί ότι τα στελέχη του *P. syringae* παράγουν μια διπεπτιδική τοξίνη, την tabtoxinine που προκαλεί χλώρωση και είναι ο αιτιολογικός παράγοντας της ασθένειας της βακτηριακής κηλίδωσης σε φυτά *N. benthamiana* (Turner, 1988; Lydon & Patterson, 2001). Παράλληλα, έχει αναδειχθεί ότι η συγκεκριμένη τοξίνη συμβάλλει στην μείωση της χλωροφύλλης (Rousseau *et al.*, 2013; Iqbal *et al.*, 2012). Περαιτέρω, η μόλυνση με το βακτήριο *Pseudomonas syringae* pv. *tabaci* έχει προταθεί ως ανασταλτική του ρυθμού φωτοσύνθεσης και της καρβοξυλίωσης. Επιπλέον, η εξέλιξη της ασθένειας οδηγεί προοδευτικά σε βλάβες του φωτοσυνθετικού συστήματος PSII και μείωση της φωτοσυνθετικής δραστηριότητας του συστήματος PSI. Τέλος, έχει παρατηρηθεί ότι διάφορες πρωτεΐνες όπως η PsaA (Pneumococcal surface adhesin A) υποβαθμίζονται και σημειώνεται συσσώρευση δραστικών μορφών οξυγόνου (ROS), που δρουν ως παράγοντες οξειδωτικού στρες σε πρωτεΐνες και λιπίδια (Fan *et al.*, 2014; Cheng *et al.*, 2016).

Στο σύνολό τους, τα ευρήματα της μελέτης υποδεικνύουν ότι οι διαγονιδιακές σειρές που εκφράζουν ενδογενώς το γονίδιο *hpaA*, από το βακτήριο *X. campestris* pv. *campestris*, δεν εμφανίζουν στο σύνολο τους προηγμένη ανθεκτικότητα έναντι της ασθένειας της βακτηριακής κηλίδωσης που προκαλείται από το βακτήριο *P. syringae* pv. *tabaci*. Σημειώνεται ωστόσο ότι οι διαγονιδιακές σειρές διαφοροποιήθηκαν σημαντικά μεταξύ τους αναφορικά τόσο με τη συμπτωματολογία όσο και με την αποίκηση του βακτηρίου. Σε επίπεδο συμπτωματολογίας, την καλύτερη επίδοση εμφάνισε η σειρά *hpaA* 2-3, η οποία χαρακτηρίστηκε από ηπιότερη συμπτωματολογία που αφορούσε κυρίως σε μη εκτεταμένη χλώρωση των μεσαίων φύλλων και ήπιο μαρασμό. Παράλληλα, τα συνολικά ευρήματα παρέχουν ενδείξεις σχετικά με την υπεροχή της σειράς *hpaA* T1-5, υπεροχή η οποία τεκμαίρεται από τη μειωμένη αναπαραγωγή του βακτηρίου, όπως προκύπτει από τη μικρότερη αποίκηση συγκριτικά με τις υπόλοιπες κατηγορίες φυτών, αλλά και την ήπια συμπτωματολογία καθ' όλο το διάστημα λήψης παρατηρήσεων.

Συμπερασματικά, τα προκαταρκτικά αποτελέσματα της μελέτης παρέχουν ενδείξεις σχετικά με τη δυνατότητα πιθανούς αξιοποίησης του γονιδίου *hpaA*, από το φυτοπαθογόνο βακτήριο *X. campestris* pv. *campestris*, για την επίτευξη διαγονιδιακής ανθεκτικότητας έναντι καταπονήσεων. Παρά το γεγονός ότι η εξαγωγή ασφαλών

συμπερασμάτων απαιτεί τη διεξαγωγή επιπρόσθετων πειραμάτων, σχετικά είναι τα αποτελέσματα προηγούμενων μελετών που ανέδειξαν την προηγμένη ανεκτικότητα των *hraA*-σειρών έναντι αβιοτικών καταπονήσεων στο είδος *N. benthamiana* (Mitsopoulou *et al.*, 2016). Με δεδομένη την υψηλή ειδικευση που διέπει τις αλληλεπιδράσεις μεταξύ φυτών και βιοτικών ή αβιοτικών ερεθισμάτων, είναι προφανές ότι η απόκριση των *hraA*-διαγονιδιακών σειρών διαμορφώνεται από το σύστημα που μελετάται.

5. ΣΥΜΠΕΡΑΣΜΑΤΑ

Στην παρούσα διατριβή μελετήθηκε η επίδραση του γονιδίου *hraA*, που προέρχεται από το βακτήριο *Xanthomonas campestris* pv. *campestris*, ως προς την ανθεκτικότητα έναντι βιοτικών καταπονήσεων σε διαγονιδιακά φυτά του είδους *N. benthamiana*. Για το σκοπό αυτό, μελετήθηκε η απόκριση των *hraA*-διαγονιδιακών σειρών, σε σύγκριση με τα φυτά αγρίου τύπου, υπό συνθήκες τεχνητής μόλυνσης με το φυτοπαθογόνο βακτήριο *Pseudomonas syringae* pv. *tabaci*. Τα αποτελέσματα της μελέτης συνηγορούν στα ακόλουθα συμπεράσματα:

- Τα διαγονιδιακά φυτά που εκφράζουν ενδογενώς το γονίδιο *hraA*, εμφανίζουν όμοιο φαινότυπο με τα φυτά αγρίου τύπου αναφορικά με τη μορφολογία και το ρυθμό ανάπτυξης, υποδεικνύοντας ότι η έκφραση του γονιδίου *hraA* δεν επηρεάζει το φαινότυπο στο είδος *N. benthamiana*.
- Οι *hraA*-σειρές παρουσιάζουν διαφορετική ένταση των συμπτωμάτων έπειτα από μόλυνση με το βακτήριο *Pseudomonas syringae* pv. *tabaci*. Βάσει της συμπτωματολογίας και του χρόνου εκδήλωσης συμπτωμάτων, την καλύτερη επίδοση εμφάνισαν τα φυτά της σειράς *hraA* 2-3, ενώ η σειρά *hraA* 1-2 διακρίθηκε για τη μειωμένη αποίκηση του βακτηρίου.
- Η εμφάνιση νεκρωτικών κηλίδων στα διαγονιδιακά φυτά πιθανώς συνδέεται με εκδήλωση της αντίδρασης υπερευαισθησίας.

Τα συνολικά ευρήματα της μελέτης υποδεικνύουν ότι οι διαγονιδιακές σειρές που εκφράζουν ενδογενώς το γονίδιο *hraA*, από το βακτήριο *X. campestris* pv. *campestris*, δεν εμφανίζουν στο σύνολο τους προηγμένη ανθεκτικότητα έναντι της ασθένειας της βακτηριακής κηλίδωσης που προκαλείται από το βακτήριο *P. syringae* pv. *tabaci*. Με δεδομένο ωστόσο ότι δεν έχει αποσαφηνισθεί η επίδραση της έκφρασης του γονιδίου *hraA* σε φυτά, η εξαγωγή συμπερασμάτων σχετικά με τις προοπτικές αξιοποίησής του για την επίτευξη ανθεκτικότητας έναντι καταπονήσεων χρήζει σαφώς περαιτέρω διερεύνησης.

6. ΒΙΒΛΙΟΓΡΑΦΙΑ

Ξενογλώσση

1. Abel, P. P., Nelson, R. S., De, B., Hoffmann, N., Rogers, S. G., Fraley, R. T., & Beachy, R. N. (1986). Delay of disease development in transgenic plants that express the tobacco mosaic virus coat protein gene. *Science*, 232(4751), 738-743.
2. Agrios, G. N. (2005). How plants defend themselves against pathogens. *Plant Pathology* (5th edition), 207-248. doi: 10.1016/B978-0-08-047378-9.50012-9
3. Alfano, J. R., & Collmer, A. (2004). Type III secretion system effector proteins: double agents in bacterial disease and plant defense. *Annu. Rev. Phytopathol.*, 42, 385-414. doi: 10.1146/annurev.phyto.42.040103.110731
4. Anderson, J. P., Badruzsaufari, E., Schenk, P. M., Manners, J. M., Desmond, O. J., Ehlert, C., ... & Kazan, K. (2004). Antagonistic interaction between abscisic acid and jasmonate-ethylene signaling pathways modulates defense gene expression and disease resistance in Arabidopsis. *The Plant Cell*, 16(12), 3460-3479.
5. Asselbergh B., De Vleeschauwer, D., & Höfte, M. (2008). Global switches and fine-tuning—ABA modulates plant pathogen defense. *Molecular Plant-Microbe Interactions*, 21(6), 709-719.
6. Beachy, R. N. (1997). Mechanisms and applications of pathogen-derived resistance in transgenic plants. *Current Opinion in Biotechnology*, 8(2), 215-220.
7. Berger, S., Benediktyová, Z., Matouš, K., Bonfig, K., Mueller, M. J., Nedbal, L., & Roitsch, T. (2007). Visualization of dynamics of plant–pathogen interaction by novel combination of chlorophyll fluorescence imaging and statistical analysis: differential effects of virulent and avirulent strains of *P. syringae* and of oxylipins on *A. thaliana*. *Journal of Experimental Botany*, 58(4), 797-806.
8. Büttner, D., Gürlebeck, D., Noël, L. D., & Bonas, U. (2004). HpaB from *Xanthomonas campestris* pv. *vesicatoria* acts as an exit control protein in type III-dependent protein secretion. *Molecular microbiology*, 54(3), 755-768.
9. Canter, L. W. (2018). *Environmental Impact of Agricultural Production Activities*. CRC Press. doi: 10.1201/9781351071796.

10. Coburn, B., Sekirov, I., & Finlay, B. B. (2007). Type III secretion systems and disease. *Clinical microbiology reviews*, 20(4), 535-549. 535-549. DOI: 10.1128/CMR.00013-07
11. Dos Reis, S. P., Lima, A. M., & De Souza, C. R. B. (2012). Recent molecular advances on downstream plant responses to abiotic stress. *International Journal of Molecular Sciences*, 13(7), 8628-8647. doi: 10.3390/ijms13078628.
12. Djanaguiraman, M., Perumal, R., Jagadish, S. V. K., Ciampitti, I. A., Welti, R., Prasad, P. V. V., *et al.* (2018). Sensitivity of sorghum pollen and pistil to high-temperature stress. *Plant. Cell Environ.* 41, 1065–1082. doi: 10.1111/pce.13089.
13. Iqbal, M. J., Goodwin, P. H., Leonardos, E. D., & Grodzinski, B. (2012). Spatial and temporal changes in chlorophyll fluorescence images of *Nicotiana benthamiana* leaves following inoculation with *Pseudomonas syringae* pv. *tabaci*. *Plant Pathology*, 61(6), 1052-1062.
14. Jones, J. D. G., & Dangl, J. L. (2006). The plant immune system. *Nature*, 444(7117), 323–329. doi:10.1038/nature05286
15. Kamoun S. A catalogue of the effector secretome of plant pathogenic oomycetes. *Annu Rev Phytopathol* 44, 41–60 (2006).
<https://doi.org/10.1146/annurev.phyto.44.070505.143436>
16. Karban, R., & Baldwin, I. T. (2007). *Induced responses to herbivory*. University of Chicago Press.
17. Knapp, S., Chase, M. W., and Clarkson, J. J. (2004). Nomenclatural changes and a new sectional classification in *Nicotiana* (Solanaceae). *Taxon* 53:73-82.
18. Li, W., Xu, Y. P., Zhang, Z. X., Cao, W. Y., Li, F., Zhou, X., ... & Cai, X. Z. (2012). Identification of genes required for nonhost resistance to *Xanthomonas oryzae* pv. *oryzae* reveals novel signaling components.
19. Lonjon, F., Lohou, D., Cazalé, A. C., Büttner, D., Ribeiro, B. G., Péanne, C., ... & Vailliau, F. (2017). HpaB-dependent secretion of type III effectors in the plant pathogens *Ralstonia solanacearum* and *Xanthomonas campestris* pv. *vesicatoria*. *Scientific reports*, 7(1), 1-14. doi: 10.1038/s41598-017-04853-9.
20. Lucas, G. B. (1975). Wildfire and angular leaf spot, p. 397-409. In G. B. Lucas (ed.), *Diseases of tobacco*. Biological Consulting Associates, Raleigh, N.C.
21. Lydon, J., & Patterson, C. D. (2001). Detection of tabtoxin-producing strains of *Pseudomonas syringae* by PCR. *Letters in applied microbiology*, 32(3), 166-170

22. Mantri, N., Patade, V., Penna, S., Ford, R., Pang, E. (2012). “Abiotic stress responses in plants: present and future,” in *Abiotic stress responses in plants* (New York: Springer), 1–19. doi: 10.1007/978-1-4614-0634-1_1.
23. Mittler, R., & Blumwald, E. (2010). Genetic engineering for modern agriculture: challenges and perspectives. *Annual review of plant biology*, *61*, 443-462.
24. Mitsopoulou, N., Kelaidi, G. I., Skaracis, G. N. and Pavli, O.I. (2018). The *hpaB* gene from *Xanthomonas campestris* pv. *vesicatoria* enhances abiotic stress tolerance in transgenic *N. benthamiana* .69th Panhellenic Conference of the Hellenic Society for Biochemistry and Molecular Biology. 23-25 November 2018 Larissa Greece.
25. Muhlemann, J. K., Younts, T. L. B., Muday, G. K. (2018). Flavonols control pollen tube growth and integrity by regulating ROS homeostasis during high-temperature stress. *Proc. Natl. Acad. Sci.* *115*, E11188–E11197. doi: 10.1073/pnas.1811492115
26. Nishad, R., Ahmed, T., Rahman, V. J., & Kareem, A. (2020). Modulation of plant defense system in response to microbial interactions. *Frontiers in Microbiology*, *11*, 1298.
27. Pieterse, C. M., Zamioudis, C., Berendsen, R. L., Weller, D. M., VanWees, S. C., and Bakker, P. A. (2014). Induced systemic resistance by beneficial microbes. *Annu. Rev. Phytopathol.* *52*, 347–375. doi: 10.1146/annurev-phyto-082712-102340
28. Rodriguez, P. A., Rothballer, M., Chowdhury, S. P., Nussbaumer, T., Gutjahr, C., and Falter-Braun, P. (2019). Systems biology of plant-microbiome interactions. *Mol. Plant.* *12*, 804–821. doi: 10.1016/j.molp.2019.05.006
29. Rousseau, C., Belin, E., Bove, E., Rousseau, D., Fabre, F., Berruyer, R., ... & Boureau, T. (2013). High throughput quantitative phenotyping of plant resistance using chlorophyll fluorescence image analysis. *Plant methods*, *9*(1), 1-13.
30. Rizhsky, L., Liang, H., Shuman, J., Shulaev, V., Davletova, S., & Mittler, R. (2004). When defense pathways collide. The response of *Arabidopsis* to a combination of drought and heat stress. *Plant physiology*, *134*(4), 1683-1696.
31. Shoemaker, P. B. (1991). Wildfire and angular leaf spot. *Compendium of Tobacco Diseases; Shew, HD, Lucas, GB, Eds*, 30-32.
32. Singh B.D. (2000). Plant breeding-Principles and Methods. *Kalyani Publishers*.
33. Sigee, D. C., & El-Masry, M. H. (1989). Changes in cell size and flagellation in the phytopathogen *Pseudomonas syringae* pv. *tabaci* cultured in vitro and in planta: a

- comparative electron microscope study. *Journal of Phytopathology*, 125(3), 217-230.
34. Sonhita Chakraborty, Wolfgang Moeder, Keiko Yoshioka, Plant Immunity, Reference Module in Life Sciences, *Elsevier*, 2017
 35. Takahashi, F., Shinozaki, K. (2019). Long-distance signaling in plant stress response. *Curr. Opin. Plant Biol.* 47, 106–111. doi: 10.1016/j.pbi.2018.10.006.
 36. Thrall, P. H., Hochberg, M. E., Burdon, J. J., and Bever, J. D. (2007). Coevolution of symbiotic mutualists and parasites in a community context. *Trends Ecol. Evol.* 22, 120–126. doi: 10.1016/j.tree.2006.11.007
 37. Turner, J. G. (1988). Inhibition of photosynthesis in *Nicotiana tabacum* leaves treated with tabtoxin and its relation to pigment loss. *Physiologia plantarum*, 74(3), 549-555.
 38. Tardieu F, Tuberosa R (2010) Dissection and modelling of abiotic stress tolerance in plants. *Curr Opin Plant Biol* 13: 206-212.
 39. Tigchelaar, M., Battisti, D. S., Naylor, R. L., Ray, D. K. (2018). Future warming increases probability of globally synchronized maize production shocks. *Proc. Natl. Acad. Sci.* 115, 6644–6649. doi: 10.1073/pnas.1718031115.
 40. Vaughan, M. M., Block, A., Christensen, S. A., Allen, L. H., Schmelz, E. A. (2018). The effects of climate change associated abiotic stresses on maize phytochemical defenses. *Phytochem. Rev.* 17, 37–49. doi: 10.1007/s11101-017-9508-2.
 41. Wang, H., Zou, Z., Wang, S., Gong, M. (2013). Global analysis of transcriptome responses and gene expression profiles to cold stress of *Jatropha curcas* L. *PLoS One* 8, e82817. doi: 10.1371/journal.pone.0082817.
 42. Wang, W., Vinocur, B., and Altman, A. (2003). Plant responses to drought, salinity and extreme temperatures: towards genetic engineering for stress tolerance. *Planta* 28, 1–14. doi: 10.1007/s00425-003-1105-5.
 43. Wania, S. H., Kumar, V., Shriram, V., and Sah, S. K. (2016). Phytohormones and their metabolic engineering for abiotic stress tolerance in crop plants. *Crop J.* 4, 162–176. doi: 10.1016/j.cj.2016.01.010.
 44. Waqas, M. A., Khan, I., Akhter, M. J., Noor, M. A., Ashraf, U. (2017). Exogenous application of plant growth regulators (PGRs) induces chilling tolerance in short-duration hybrid maize. *Environ. Sci. Pollut. Res.* 24, 11459–11471. doi: 10.1007/s11356-017-8768-0.

45. Wilson T.M. (1993). Strategies to protect crop plants against viruses: Pathogen-derived resistance blossoms. *Proc. Nat. Acad. Sci.*, 90: 3134-3141.
46. Zafar, S. A., Noor, M. A., Waqas, M. A., Wang, X., Shaheen, T., Raza, M. (2018). “Temperature extremes in cotton production and mitigation strategies,” in *In Past, Present and Future Trends in Cotton Breeding* (London, UK: IntechOpen). doi: 10.5772/intechopen.74648.
47. Zhou, R., Hyldgaard, B., Yu, X., Rosenqvist, E., Ugarte, R. M., Yu, S., *et al.* (2018). Phenotyping of faba beans (*Vicia faba* L.) under cold and heat stresses using chlorophyll fluorescence. *Euphytica* 214, 68. doi: 10.1007/s10681-018-2154-y.
48. Zörb, C., Geilfus, C.-M., Dietz, K.-J. (2019). Salinity and crop yield. *Plant Biol.* 21, 31–38. doi: 10.1111/plb.12884.

Ελληνική

49. Ασημακοπούλου Γεωργία (2014). Γενετικός μετασχηματισμός στο είδος *Nicotiana benthamiana* με γονίδια φυτοπαθογόνων βακτηρίων. Μεταπτυχιακή Διατριβή Ειδίκευσης Γεωπονικό Πανεπιστήμιο Αθηνών
50. Καλτσίκης Π.Ι. (1989). Βελτίωση φυτών-Αρχές και Μέθοδοι. Εκδόσεις Σταμούλης Α.
51. Μητσοπούλου Ν. (2016). Αξιολόγηση της ανθεκτικότητας σε παθογόνους μικροοργανισμούς σε φυτά *N. benthamiana* που εκφράζουν ενδογενώς τη χαρπίνη HrpZPsph. Μεταπτυχιακή Διατριβή Ειδίκευσης. Πανεπιστήμιο Θεσσαλίας. Σχολή Γεωπονικών Επιστημών. Βόλος.
52. Τζάμος, Ε. Κ.. (2017). Φυτοπαθολογία. Αθήνα: Εκδόσεις Σταμούλη.
53. Καραμπουρνιώτης, Γ., Λιακόπουλος, Γ. & Νικολόπουλος, Δ. (2012). *Φυσιολογία Καταπονήσεων των Φυτών*. Αθήνα. Εκδόσεις Έμβρυο.

7. ΠΑΡΑΡΤΗΜΑ

Πίνακας 7.1: Τιμές χλωροφύλλης των φυτών άγριου τύπου (WT), πριν και μετά τη μόλυνση με το βακτήριο *Pseudomonas syringae* pv. *tabaci*.

Σειρά	Μεταχείριση	Επανάληψη	Πριν τη μόλυνση			Μετά τη μόλυνση		
			1	2	M.O.	1	2	M.O.
wt	Μάρτυρες C	1	20,4	23,6	22	33	33,8	33,4
		2	21,2	22,1	22,05	33,6	36	34,8
		3	16,9	15,9	16,4	31,6	33,4	32,5
		4	17,9	17,6	17,75	27,3	26,7	27
		5	23,2	21,8	22,5	34,1	36,3	35,2
	Μολυσμένα φυτά	1	18,2	17,3	17,75	30,9	34,8	32,85
		2	22	21,5	21,75	32,4	33,5	32,95
		3	23,6	26,6	25,1	22	20,2	21,1
4		26,6	25,1	25,85	34,3	36,2	35,25	

Πίνακας 7.2: Τιμές χλωροφύλλης της διαγονιδιακής σειράς *hpaA* 1-1 πριν και μετά τη μόλυνση με το βακτήριο *Pseudomonas syringae* pv. *tabaci*.

Σειρά	Μεταχείριση	Επανάληψη	Πριν τη μόλυνση			Μετά τη μόλυνση		
			1	2	M.O.	1	2	M.O.
<i>hpaA</i> 1-1	Μάρτυρες C	1	19,6	20,4	20	37,1	36,3	36,7
		2	19,9	19,5	19,7	30,6	27,1	28,85
		3	24,3	23	23,65	38	33	35,5
		4	20,1	18,2	19,15	23	22,8	22,9
		5	23,5	24,4	23,95	37,4	37,5	37,45
	Μολυσμένα φυτά	1	17,9	21,5	19,7	28,2	26,9	27,55
		2	17,3	18,4	17,85	23,6	28,5	26,05
		3	19,1	23	21,05	32,2	31,9	32,05
		4	16,7	19	17,85	22,7	23,6	23,15
		5	18	22,3	20,15	23,1	20,6	21,85

Πίνακας 7.3: Τιμές χλωροφύλλης της διαγονιδιακής σειράς *hpaA* 1-2 πριν και μετά τη μόλυνση με το βακτήριο *Pseudomonas syringae* pv. *tabaci*.

Σειρά	Μεταχείριση	Επανάληψη	Πριν τη μόλυνση			Μετά τη μόλυνση		
			1	2	M.O.	1	2	M.O.
<i>hpaA</i> 1-2	Μάρτυρες C	1	19,8	22	20,9	24,1	28,2	26,15
		2	21	20,2	20,6	25,6	26,6	26,1
		3	23,5	20,9	22,2	34,7	34,6	34,65
		4	22,7	22,6	22,65	36	35,2	35,6
	Μολυσμένα φυτά	1	18	22,8	20,4	28,8	29,8	29,3
		2	20,8	23,2	22	27	28,7	27,85
		3	20,4	20,2	20,3	20,3	19,4	19,85
		4	23,1	22,4	22,75	28,6	29	28,8
		5	26,8	27,3	27,05	29,1	28,6	28,85

Πίνακας 7.4: Τιμές χλωροφύλλης της διαγονιδιακής σειράς *hpaA* 2-3 πριν και μετά τη μόλυνση με το βακτήριο *Pseudomonas syringae* pv. *tabaci*.

Σειρά	Μεταχείριση	Επανάληψη	Πριν τη μόλυνση			Μετά τη μόλυνση		
			1	2	M.O.	1	2	M.O.
<i>hpaA</i> 2-3	Μάρτυρες C	1	19,6	21,8	20,7	39	38,8	38,9
		2	21,9	28,9	25,4	42	39,6	40,8
		3	24,3	25	24,65	37	38,3	37,65
		4	27,4	23,2	25,3	38,4	39,7	39,05
		5	31,3	25,2	28,25	33,3	33,3	33,3
	Μολυσμένα φυτά	1	21,4	23,8	22,6	33,1	36	34,55
		2	26,3	26,6	26,45	29,3	24,6	26,95
		3	23,4	18,3	20,85	28,5	31,5	30
		4	23	24,4	23,7	22	23,2	22,6
		5	19,1	22,1	20,6	32,6	31,1	31,85

Πίνακας 7.5: Τιμές χλωροφύλλης της διαγονιδιακής σειράς *hpaA* T1-5 πριν και μετά τη μόλυνση με το βακτήριο *Pseudomonas syringae* pv. *tabaci*

Σειρά	Μεταχείριση	Επανάληψη	Πριν τη μόλυνση			Μετά τη μόλυνση		
			1	2	Μ.Ο.	1	2	Μ.Ο.
<i>hpaA</i> T1-5	Μάρτυρες C	1	20,1	21,5	19,7	28,6	29,6	29,1
		2	18,8	18,1	18,45	25,7	29,7	27,5
		3	19,3	20,3	19,75	26,4	31,2	28,8
		4	19,4	19,5	19,45	26,1	22,4	24,25
		5	19,7	19,9	19,8	29,7	28,3	29
		6	18,2	19,5	18,85	24,9	27,7	26,3
	Μολυσμένα φυτά	1	21,4	23,8	22,6	19,4	21,3	20,35
		2	26,3	26,6	26,45	23	18,1	20,55
		3	23,4	18,3	20,85	20,7	24,6	22,65
		4	23	24,4	23,7	29,5	27,3	28,4
5		19,1	22,1	20,6	34	31,8	32,9	

Πίνακας 7.6: Μέσος όρος τιμών χλωροφύλλης των μαρτύρων και των μολυσμένων φυτών ανά κατηγορία φυτών (wt και *hpaA*-), πριν και μετά τη μόλυνση με το βακτήριο *Pseudomonas syringae* pv. *tabaci*.

Σειρά Μεταχείριση	Πριν τη μόλυνση		Μετά τη μόλυνση	
	Μάρτυρες C	Μολυσμένα φυτά	Μάρτυρες C	Μολυσμένα φυτά
WT	20,06	22,61	32,58	30,54
<i>hpaA</i> 1-1	21,29	19,7	32,28	26,13
<i>hpaA</i> 1-2	21,59	22,50	30,62	26,93
<i>hpaA</i> 2-3	24,86	22,84	37,94	29,19
<i>hpaA</i> T1-5	19,48	20,13	27,49	24,97