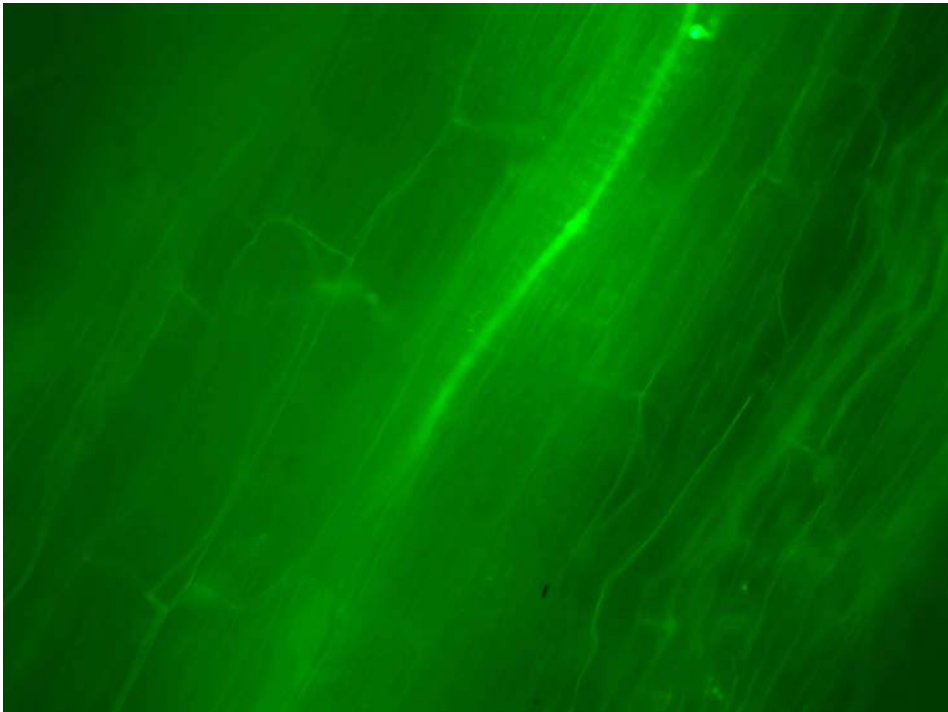




ΠΑΝΕΠΙΣΤΗΜΙΟ ΘΕΣΣΑΛΙΑΣ
ΠΡΟΓΡΑΜΜΑ ΜΕΤΑΠΤΥΧΙΑΚΩΝ ΣΠΟΥΔΩΝ
ΤΟΥ ΤΜΗΜΑΤΟΣ
ΒΙΟΧΗΜΕΙΑΣ ΚΑΙ ΒΙΟΤΕΧΝΟΛΟΓΙΑΣ



Μπεκρής Φώτιος

Γονιδιακή έκφραση κατά την αλληλεπίδραση φυτών τομάτας με
ένα μη παθογόνο στέλεχος *Fusarium solani*

Λάρισα
2009

Γονιδιακή έκφραση κατά την αλληλεπίδραση φυτών τομάτας με ένα μη παθογόνο στέλεχος *Fusarium solani*

Εικ. Εξωφύλλου. Φωτογραφία ηλεκτρονικού μικροσκοπίου φθορισμού (Leica 5500) στην οποία γίνεται απεικόνιση του αγγειακού συστήματος φυτού τομάτας. Διακρίνεται υφή του μη παθογόνου στελέχους *Fusarium solani* να διατρέχει τις ηθμαγειώδεις δεσμίδες. Το στέλεχος είχε μετασχηματιστεί γενετικά με τη φθορίζουσα πρωτεΐνη (*GFP*).

ΤΡΙΜΕΛΗΣ ΕΞΕΤΑΣΤΙΚΗ ΕΠΙΤΡΟΠΗ

1. Καλλιόπη Παπαδοπούλου, Επιβλέπουσα
Επίκουρος Καθηγήτρια Βιοτεχνολογίας Φυτών, Τμήμα Βιοχημείας και
Βιοτεχνολογίας, Πανεπιστήμιο Θεσσαλίας
2. Δημήτριος Καρπούζας, Μέλος,
Λέκτορας Βιοτεχνολογίας Αποικοδομητικών Μικροοργανισμών, Τμήμα Βιοχημείας
και Βιοτεχνολογίας, Πανεπιστήμιο Θεσσαλίας
3. Κωνσταντίνος Οιχαλιώτης, Μέλος,
Επίκουρος Καθηγητής Γονιμότητας και Βιολογίας Εδάφους, Τμήμα Αξιοποίησης
Φυσικών Πόρων και Γεωργικής Μηχανικής, Γεωπονικό Πανεπιστήμιο Αθηνών

Ευχαριστίες...

Πρωτίστως θα ήθελα να ευχαριστήσω την επιβλέπουσα καθηγήτρια μου Παπαδοπούλου Καλλιόπη, Επίκουρο Καθηγήτρια του τμήματος Βιοχημείας και Βιοτεχνολογίας για την αμέριστη βοήθεια της καθώς και για την εμπιστοσύνη που επέδειξε στο πρόσωπο μου κατά την διάρκεια της παρουσίας μου στα εργαστήρια του τμήματος για την διεξαγωγή της διπλωματικής μου εργασίας.

Επίσης θα ήθελα να ευχαριστήσω τον παλιό μου καθηγητή Δρ. Καβρουλάκη Νεκτάριο για την πολύτιμη βοήθεια και τις πολύτιμες συμβουλές του καθώς και τους Καρπούζα Δημήτριο, Λέκτορα του τμήματος Βιοχημείας και Βιοτεχνολογίας και Οιγαλιώτη Κωνσταντίνο, Επίκουρο καθηγητή του Γεωπονικού Πανεπιστημίου Αθηνών, για την συμμετοχή τους στην εξεταστική μου επιτροπή αλλά και για την βοήθεια και τις γνώσεις που μου μετέδωσαν. Ακόμα θα ήθελα να ευχαριστήσω όλους όσους με στήριξαν λιγότερο η περισσότερο στα δύο αυτά χρόνια της μεταπτυχιακής μου εκπαίδευσης. Και ιδίως την Χαρά Παπαϊωάννου και την Δήμητρα Λεβέντη για την υπομονή τους αλλά και για την πολύτιμη συμπαράστασή τους. Και τέλος τους γονείς μου για την στήριξη των επιλογών μου.

ΠΕΡΙΕΧΟΜΕΝΑ	Σελ.
Περίληψη.....	7
A. ΕΙΣΑΓΩΓΗ	
ΜΕΡΟΣ ΠΡΩΤΟ: ΓΟΝΙΔΙΑΚΗ ΑΠΟΚΡΙΣΗ ΤΩΝ ΦΥΤΙΚΩΝ ΟΡΓΑΝΙΣΜΩΝ.....	9
A.1 Γενικές έννοιες-παραδοχές.....	9
A.2 Μηχανισμοί άμυνας του φυτού έναντι των βιοτικών καταπονήσεων.....	10
A.2.1 Πρώτη γραμμή άμυνας.....	11
A.2.1.1 Άμυνα χωρίς προσβολή του ξενιστή - Non-host Resistance.....	12
A.2.1.2 Βασική Άμυνα-Basal Resistance.....	13
A.3 Δεύτερη γραμμή άμυνας	14
A.3.1 Επαγόμενοι μηχανισμοί άμυνας του φυτού-Induced Resistance.....	16
A.3.2 Διασυστηματική ανθεκτικότητα επαγόμενη από τα ριζοβακτήρια.....	16
ΜΕΡΟΣ ΔΕΥΤΕΡΟ: ΟΙ ΜΥΚΗΤΕΣ ΩΣ ΣΥΜΜΑΧΟΙ ΤΩΝ ΦΥΤΙΚΩΝ ΟΡΓΑΝΙΣΜΩΝ.....	19
A.1 Γενικά περί μυκήτων	19
A.2 Οι μύκητες ως επαγωγείς της ανάπτυξης των φυτών (Plant Growth Promoting Fungi).....	21
A.3 Επαγόμενη ανθεκτικότητα στα φυτά από τους μύκητες.....	21
A.4 <i>Piriformospora indica</i> ένας μύκητας πολλά οφέλη.....	22
ΜΕΡΟΣ ΤΡΙΤΟ: ΣΚΟΠΟΣ ΤΗΣ ΠΑΡΟΥΣΑΣ ΕΡΓΑΣΙΑΣ.....	24
A.1 Οργανισμοί μετέχοντες στην εργασία.....	24
A.1.1 Ο φυτικός οργανισμός	24
A.1.2 Το στέλεχος του μύκητα.....	24
B. ΥΛΙΚΑ ΚΑΙ ΜΕΘΟΔΟΙ	27
B.1 Πειραματικός σχεδιασμός.....	27
B.2 Μικροσκοπία Φθορισμού.....	27
B.3 Αφαιρετική βιβλιοθήκη- cDNA Subtraction library.....	29
B.3.1 Φυτικό υλικό και χειρισμοί πριν τη σπορά-προετοιμασία εδαφικού υποστρώματος.....	29

B.3.2 Εφαρμογή εμβολιασμού των φυτών με το στέλεχος του μύκητα <i>Fusarium solani</i>	29
B.3.3 Θρεπτικό υλικό ανάπτυξης των μυκήτων που χρησιμοποιήθηκαν.....	30
B.3.4 Καλλιέργεια και συνθήκες ανάπτυξης του μη παθογόνου μύκητα <i>Fusarium solani</i>	30
B.3.5 Συλλογή ριζών και απομόνωση ολικού RNA.....	30
B.3.6 Απομόνωση Poly-A RNA από ολικό RNA μέσω της χρήσης μικροσφαιριδίων με μαγνητισμό (Dynabeads Oligo dT).....	31
B.3.7 Σύνθεση αφαιρετικής βιβλιοθήκης (cDNA Subtraction Synthesis).....	33
(α) Σύνθεση μονόκλωνης αλυσίδας cDNA – First Strand Synthesis cDNA.....	34
(β) Σύνθεση δίκλωνης αλυσίδας cDNA – Second Strand Synthesis cDNA.....	35
(γ) Πέψη με την ενδονουκλεάση περιορισμού Rsa I – Rsa I Digestion.....	36
(δ) Σύνδεση των ανταπτόρων - Adaptor ligation.....	37
(ε) Πρώτος υβριδισμός	37
(ζ) Δεύτερος υβριδισμός.....	38
(η) Κλωνοποίηση των τμημάτων της διαφορικής έκφρασης της cDNA βιβλιοθήκης	
(η.1) Πρώτη αλυσιδωτή αντίδραση της πολυμεράσης	39
(η.2) Δεύτερη αλυσιδωτή αντίδραση της πολυμεράσης.....	39
B.3.8 Υποκλωνοποίηση σε φορέα ένθεσης – Subcloning in pGem T-easy Vector.....	40
B.3.9 Μετασηματισμός Δεκτικών κυττάρων – Transformation.....	41
B.3.10 Colony PCR στα δείγματα από τα 96 Well Cell Cluster plate.....	41
B.3.11 Υβριδισμός κατά Southern.....	41
B.3.12 Επιλογή κλώνων και διαδικασία αλληλούχισης	44
Γ. ΑΠΟΤΕΛΕΣΜΑΤΑ & ΣΥΖΗΤΗΣΗ	
Γ.1 Αποτελέσματα από την μικροσκοπία φθορισμού.....	46
Γ.1.2 Παρατήρηση δειγμάτων 2, 4 και 6 ημέρες μετά των εμβολιασμό.....	46
Γ.1.3 Παρατήρηση δειγμάτων 12, 18 και 23 ημέρες μετά των εμβολιασμό.....	47
Γ.1.4 Ο μύκητας Fs-K και ο εν δυνάμει ενδοφυτικός του χαρακτήρας.....	50
Γ.2 Αποτελέσματα από την αφαιρετική βιβλιοθήκη- cDNA Subtraction.....	53
Γ.2.1 Συνοψίζοντας.....	64
Παράρτημα	66
ΒΙΒΛΙΟΓΡΑΦΙΑ	68

Περίληψη

Ένα μη παθογόνο μυκητιακό στελέχος *Fusarium solani* (Fs-K), εμφάνισε την ιδιότητα να επιφέρει στα φυτά τομάτας μια ενεργοποίηση των μηχανισμών άμυνας έναντι του φυτοπαθογόνου μύκητα φυλλώματος *Septoria lycopersici* (Κανρουλάκης *et al.*, 2007). Ο μύκητας προστατεύει το φυτό επίσης τοπικά έναντι της προσβολής από το ριζομύκητα σήψης *Fusarium oxysporum radicles-lycopersici* μέσω του μηχανισμού άμυνας που εμπλέκεται το αιθυλένιο. Στα πειράματα που έγιναν στα πλαίσια αυτής της εργασίας επιχειρήθηκε να αποσαφηνιστεί η πορεία του μύκητα εντός του φυτικού σώματος καθώς και ο ενδοφυτικός του χαρακτήρας μέσω πειραμάτων μικροσκοπίας φθορισμού, ενώ το στελέχος είχε γενετικά μετασχηματιστεί με την πράσινη φθορίζουσα πρωτεΐνη (gfp). Επίσης κατασκευάστηκε μια αφαιρετική βιβλιοθήκη cDNA για τον εντοπισμό γονιδίων που εκφράζονται στο φυτό κατόπιν της επίδρασης του στελέχους. Στην παρουσία του *Fusarium solani* (Fs-K), αναγνωρίστηκαν γονίδια που κωδικοποιούν για κινάσες, υπεροξειδάσες και άλλες πρωτεΐνες που παράγονται σε συνθήκες καταπόνησης. Η παρουσία του μυκητιακού στελέχους και ο ενδοφυτικός του χαρακτήρας θέτουν το φυτό σε μια υψηλή κατάσταση ενεργοποίησης. Η ασυμπτωματική πορεία, όμως, του στελέχους έναντι του φυτού και ο μηχανισμός που κρύβεται πίσω από αυτή την αλληλεπίδραση χρίζει περαιτέρω διερεύνηση .

A. ΕΙΣΑΓΩΓΗ

ΜΕΡΟΣ ΠΡΩΤΟ

ΓΟΝΙΔΙΑΚΗ ΑΠΟΚΡΙΣΗ ΤΩΝ ΦΥΤΙΚΩΝ ΟΡΓΑΝΙΣΜΩΝ

A.1 Γενικές έννοιες-παραδοχές

Ανάμεσα στους ανώτερους πολυκύτταρους οργανισμούς αυτούς που θα μπορούσαμε να χαρακτηρίσουμε ως τους πιο αποτελεσματικά και άμεσα αλληλεπιδρώντες με το περιβάλλον τους είναι οι φυτικοί οργανισμοί. Αυτή η ιδιότητα έχει αποκτηθεί από τα φυτά κατόπιν της επίδρασης εκατομμυρίων χρόνων εξελικτικής πίεσης, ακριβώς για να μπορέσουν να επιβιώσουν και να μεταβιβάσουν τις γενετικές τους πληροφορίες. Αυτή η παραδοχή γίνεται εύκολα κατανοητή αν ληφθεί υπόψη ότι τα φυτά είναι οργανισμοί που καλούνται να αναπτυχθούν σε έναν θώκο χωρίς την δυνατότητα μετακίνησης τουλάχιστον όσον αφορά την αλλαγή θέσης και όχι την κίνηση του φυτικού σώματος (ναστικές κινήσεις). Επίσης η πρόσληψη των απαραίτητων μακροστοιχείων και μικροστοιχείων είναι άμεσα συνυφασμένη με την διάθεση αυτών στο έδαφος. Οπότε για να επιτευχθεί η επιβίωση για τους φυτικούς οργανισμούς αναγκαία κρίνεται η ταχύτατη γονιδιακή ρύθμιση, και η απόκριση τους σε οποιοδήποτε ερέθισμα βιοτικού ή μη χαρακτήρα.

Ως καταπόνηση μπορεί να χαρακτηριστεί η επίδραση ποικίλων εξωτερικών και εσωτερικών παραγόντων (παραγόντων καταπόνησης), που προκαλεί μεταβολή στην ομοιοστασία ή στην κατάσταση προσαρμογής του οργανισμού. Η αντίδραση του οργανισμού σε παράγοντες καταπόνησης, που είναι μια αντίδραση προσαρμογής του στις νέες συνθήκες, στοχεύει στην επαναφορά του οργανισμού σε μια βασική φυσιολογική κατάσταση και βασική κατάσταση συμπεριφοράς. Το καταπόνηση μπορεί να ταξινομηθεί σε τρεις κατηγορίες (Σμοκοβίτης, 2007):

- 1) Ουδέτερη καταπόνηση
- 2) Ευεργετική καταπόνηση
- 3) Επιβλαβής καταπόνηση

Για την μελέτη μεταξύ των φυτών και του οργανωμένου μοριακού μηχανισμού ανταπόκρισης τους απέναντι στην καταπόνηση υπάρχει ένας ακόμα τρόπος κατάταξης της καταπόνησης, κατά τον οποίο ως κεντρικό κριτήριο

λαμβάνουμε την προέλευση του ερεθίσματος από βιοτικούς ή αβιοτικούς παράγοντες (βιοτική-αβιοτική καταπόνηση). Τα φυτά έχουν στην διάθεση τους ένα καλά εξοπλισμένο οπλοστάσιο για να κερδίσουν την μάχη της διαίωσισης τους έναντι σε οτιδήποτε τα απειλήσει. Οι μηχανισμοί αυτοί άμυνας των φυτών είναι καλά οργανωμένοι και πολύπλοκοι, έχοντας επανδρώσει στις τάξεις τους πληθώρα χημικών μορίων και μοριακών ιδιοτήτων.

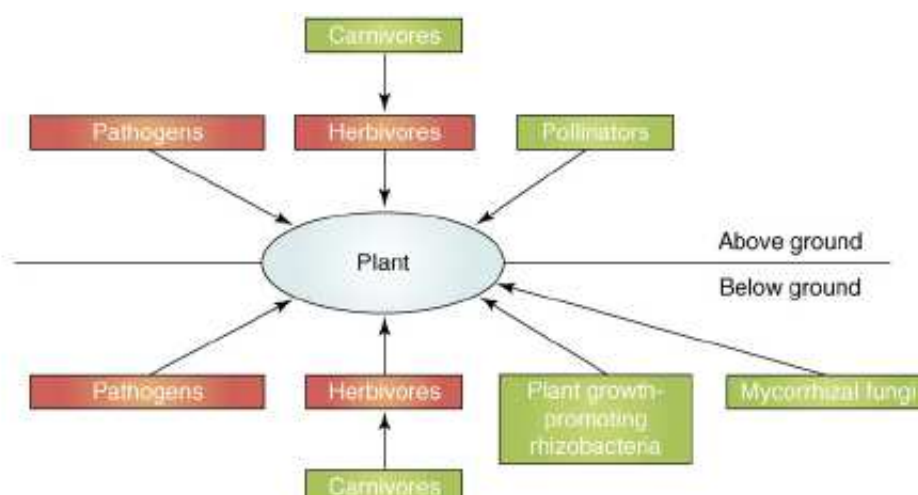
Με τον όρο **αβιοτική καταπόνηση** συνήθως καταδεικνύουμε της κλιματικές συνθήκες και γενικότερα το μικρο- και μακρο-περιβάλλον του οικολογικού θώκου του φυτικού οργανισμού. Τα φυτά βιώνουν σωρεία παραγόντων περιβαλλοντικής καταπόνησης, όπως η έλλειψη νερού (λειψυδρία), η αλατότητα των εδαφών, και οι ακραίες θερμοκρασίες. Η ανοχή και η ευπάθεια των φυτών σε αυτούς τους αβιοτικούς παράγοντες είναι ένα πολύπλοκο και παραγοντικό φαινόμενο διότι η καταπόνηση, μπορεί να εκδηλωθεί σε διάφορα στάδια ανάπτυξης του φυτού και σε διάφορους βαθμούς έντασης (Viswanathan Chinnusamy *et al.*, 2004).

Η βιοτική καταπόνηση εμπεριέχει όλες τις αλληλεπιδράσεις μεταξύ των φυτικών οργανισμών και όλων των άλλων έμβιων όντων όπως οι μύκητες, τα βακτήρια, τα έντομα οι κατώτεροι ζωικοί οργανισμοί καθώς και οι ανώτεροι. Τα φυτά έρχονται αντιμέτωπα εξίσου με ανταγωνιστικούς και ωφέλιμους οργανισμούς κατά την διάρκεια της ζωής τους. Τα φυτά προστατεύονται από τη βιοτική καταπόνηση χρησιμοποιώντας διάφορους προϋπάρχοντες και επαγόμενους μηχανισμούς άμυνας-απόκρισης-ενεργοποίησης απέναντι στο κάθε τι έμβιο.

A.2 Μηχανισμοί άμυνας του φυτού έναντι των βιοτικών καταπονήσεων

Τα φυτά δεν μπορούν να γνωρίζουν εκ των προτέρων τη φύση και τις προθέσεις του κάθε οργανισμού με τον οποίο αλληλεπιδρούν, για αυτό ένα από τα βασικά συστήματα του ανοσοποιητικού τους συστήματος είναι η αναγνώριση χημικών μορίων και διεγερτών που προέρχονται από τον εισβολέα ή ορθότερα από τον αγνώστου ταυτότητας και πρόθεσης οργανισμό. Επίσης, συχνά τα φυτά αλληλεπιδρούν όχι μόνο με εχθρικούς για αυτά οργανισμούς αλλά και με σύμμαχους, αποκομίζοντας οφέλη όπως την ενεργοποίηση αμυντικών συστημάτων. Η επαγωγή αυτών των σημαντικών ανοσοποιητικών συστημάτων για το φυτό αποτελεί μια δεύτερη γραμμή άμυνας και σίγουρα αποτελεί στρατηγική που αναπτύχθηκε κατά το πέρασ αιώνων και συνεξέλιξης με αυτούς τους ωφέλιμους μικροοργανισμούς. Αυτή η αλληλεπίδραση επιφέρει και στους ωφέλιμους μικροοργανισμούς κάποια

ανταλλάγματα (θρεπτικά στοιχεία, προστασία, και ευνοϊκές συνθήκες για ανάπτυξη). Η επαγόμενη ανθεκτικότητα έχει ένα ενεργειακό κόστος για το φυτό (Heil, 2002), (Heil and Baldwin, 2002). Για αυτό το λόγο τα φυτά διαθέτουν ρυθμιστικούς μηχανισμούς, οι οποίοι βελτιώνουν και ενεργοποιούν τον πιο κατάλληλο μηχανισμό άμυνας έναντι της προσβολής από τα παθογόνα ενώ το ενεργειακό κόστος ελαχιστοποιείται (Pieterse and Dicke, 2007).



Εικ.1 Τα φυτά ως μέλη πολυσύνδετων κοινοτήτων. Τα φυτά αλληλεπιδρούν με εχθρούς, όπως παθογόνοι μικροοργανισμοί και φυτοφάγα έντομα (κόκκινο χρώμα) καθώς και με ωφέλιμους οργανισμούς, όπως ριζοβακτήρια, μυκόρριζες, εντομοφάγα έντομα και εποικονιαστές (πράσινο χρώμα). Το δίκτυο σηματοδότησης το οποίο ενεργοποιείται από το φυτό σε βιοτικές καταπονήσεις δείχνει ότι η αντίδραση του φυτού ισορροπεί κάπου μεταξύ προστασίας έναντι κάθε επιθετικής πολιτικής καθώς και ανοχής απέναντι σε κάθε συμμαχική πολιτική. (Pieterse and Dicke, 2007).

A.2.1 Πρώτη γραμμή άμυνας

Μία απλή παρατήρηση των φυτικών οργανισμών, μάς οδηγεί στη σκέψη ότι τα φυτά μπορούν να ανθίστανται έναντι ενός μεγάλου αριθμού μικροοργανισμών και εντόμων κάτι που προϋποθέτει μια μεγάλη γκάμα από αμυντικούς μηχανισμούς. Τα αγκάθια και η μορφολογία του φυτικού σώματος πολλές φορές είναι δομημένη έτσι ώστε να αποτελεί μια πρώτη γραμμή άμυνας. Ακόμα και αν εξετάσουμε τα φυτικά κύτταρα μικροσκοπικά, η κατασκευή τους αποτελεί ένα φραγμό για ένα εύρος εισβολέων. Πληθώρα φυτών παράγουν δευτερογενείς μεταβολίτες οι οποίοι κάνουν λιγότερο ελκυστικό τον φυτικό ιστό στους εισβολείς (Osbourne, 1996), (Tierens *et al.*, 2001). Παρόλα αυτά, όμως, πολλοί μικροοργανισμοί καθώς και έντομα είναι ικανά να ξεπεράσουν αυτούς τους μηχανισμούς βασικής άμυνας. Σε αυτές τις περιπτώσεις ένας μεγάλος αριθμός από επαγόμενους μηχανισμούς ενεργοποιείται με σκοπό την

παρεμπόδιση περαιτέρω προσβολής. Αυτοί οι μηχανισμοί *απαρτίζουν* την πρωτογενή αμυντική οχύρωση των φυτών.

Οι φυτικοί οργανισμοί συνεπώς ανοσοποιούνται από τους πιο κοινούς παθογόνους μέσω της παρεμπόδισης της εισβολής αυτών στο φυτικό σώμα (non-host resistance) ή μέσω της παρεμπόδισης περαιτέρω εξάπλωσης της ασθένειας (basal resistance), δια της ταχύτατης νέκρωσης των προσβεβλημένων φυτικών κυττάρων αυτό το φαινόμενο είναι γνωστό ως αντίδραση υπερευαισθησίας (HYPERSENSITIVE RESPONSE) για την οποία αναφορά θα γίνει παρακάτω.

A.2.1.1 Άμυνα χωρίς προσβολή του ξενιστή - Non-host Resistance

Η άμυνα που επιτυγχάνεται μέσω της παρεμπόδισης της εισβολής στο φυτικό σώμα περιλαμβάνει την αναγνώριση της ταυτότητας των παθογόνων οργανισμών βάσει των χαρακτηριστικών που φέρουν στην κυτταρική τους μεμβράνη ή των έξω-κυτταρικών χημικών μορίων που κατευθύνονται προς το φυτικό κύτταρο, όπως η φλατζελίνη, η χιτίνη οι λιποσακχαρίτες και η εργοστερόλη. Όλα αυτά τα μόρια αποτελούν επαγωγείς ανθεκτικότητας (Bittel and Robatzek, 2007). Αυτοί οι **μοριακοί διεγέρτες-σχετιζόμενοι με παθογένεια (PAMPs - pathogen-associated molecular patterns)** ενεργοποιούν την σηματοδότηση που οδηγεί στην λεγόμενη **ανοσοποίηση διεγέρτη (PAMP-triggered immunity - PTI)**, που ουσιαστικά είναι μια ανοσολογική απόκριση του φυτού χάρη στο μηχανισμό αναγνώρισης των PAMPs μέσω εξειδικευμένων υποδοχέων (των **PRPs – pattern recognition receptors**). Συνήθως η PTI αποτελεί την πρώτη ενεργή αντίδραση του φυτικού οργανισμού. Ο μοριακός μηχανισμός που διέπει αυτή την άμυνα του φυτού σχετίζεται με την ενεργοποίηση των MAP κινασών, την επαγωγή εξειδικευμένων γονιδίων (Pathogen Responsive), την παραγωγή ελεύθερων ενεργών ριζών ROS (reactive oxygen species) και την εναπόθεση καλόζης στο κυτταρικό τοίχωμα του φυτικού κυττάρου για την ισχυροποίηση του έναντι της εισβολής, όλα αυτά συνηγορούν εις βάρος της ανάπτυξης του παθογόνου αιτίου (Nurnberger *et al.*, 2004).

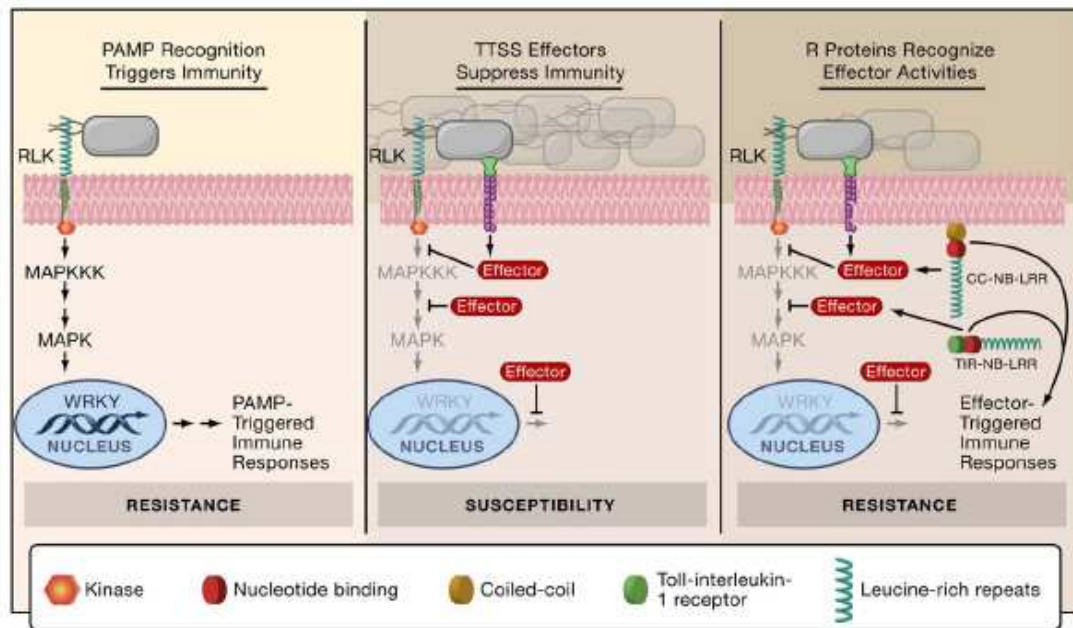
Αν και οι μοριακοί μηχανισμοί που εμπλέκονται στην PTI δεν είναι πλήρως αποσαφηνισμένοι εντούτοις, όμως, πολλά πράγματα είναι γνωστά για αυτό τον τρόπο άμυνας των φυτικών οργανισμών. Αυτή η αμυντική λειτουργία που έχουν αναπτύξει τα φυτά εκδηλώνεται μόνο στην περίπτωση που το παθογόνο δεν μπορεί να προκαλέσει κανένα σύμπτωμα στο φυτό (Agrios, 1997).

A.2.1.2 Βασική Άμυνα-Basal Resistance

Οι πιο επιτυχημένοι παθογόνοι μικροοργανισμοί έχουν αναπτύξει συστήματα παραπλάνησης και τεχνικές αποφυγής της έγκαιρης αναγνώρισής τους από το φυτό. Αυτό επιτυγχάνεται μέσω κάποιων εξειδικευμένων πρωτεϊνών που παράγουν τα παθογόνα και ονομάζονται **τελεστές (effector proteins)**. Οι τελεστές μπορούν και αλληλεπιδρούν με την PTI έτσι ώστε να μειώνουν ή ακόμα και να τερματίζουν τη δράση της ανοσοποίησης που οφείλεται στην PTI. Οι φυτικοί οργανισμοί, όμως, αντιστέκονται σε αυτή τη νέα στρατηγική των παθογόνων χτίζοντας ένα νέο σύστημα αναγνώρισης του εχθρού το οποίο είναι η αναγνώριση των τελεστών, έτσι ώστε να μην προλάβουν να σαμποτάρουν την άμυνα του φυτού. Αυτό επιτυγχάνεται δια μέσου της παραγωγής συγκεκριμένων γονιδίων ασθένειας-μολυσματικότητας, τα οποία επάγουν ένα νέο σύστημα ανοσοποίησης το ονομαζόμενο **ανοσοποίηση τελεστή (effector-triggered immunity – ETI)**. Η ETI συνήθως σχετίζεται με την αντίδραση υπερευαισθησίας (Jones and Dangl, 2006).

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

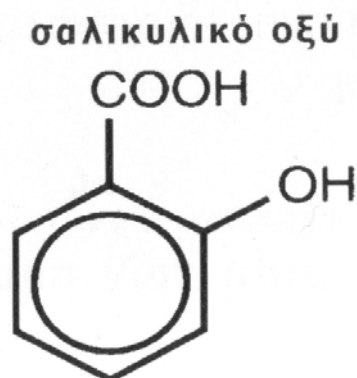
Πολύ συχνά ως συνέχεια της αντίδρασης υπερευαισθησίας ακολουθεί η ενεργοποίηση μιας αλληλουχίας μηχανισμών άμυνας του φυτού. Η έκφραση γονιδίων άμυνας του φυτού ως αποτέλεσμα της επίδρασης εξωτερικών παραγόντων ονομάζεται **επαγόμενη ανθεκτικότητα** (Hammerschmidt, 1999). Κατά την επαγόμενη ανθεκτικότητα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



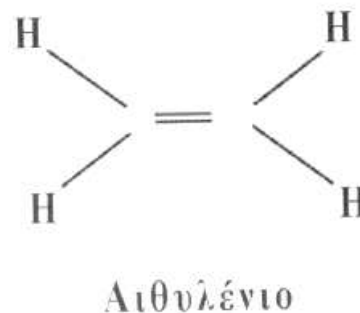
Εικ. 2 Μοντέλο εξέλιξης της ανθεκτικότητας των φυτών έναντι των βακτηρίων (Chisolm *et al.*, 2006)

A.3 Δεύτερη γραμμή άμυνας

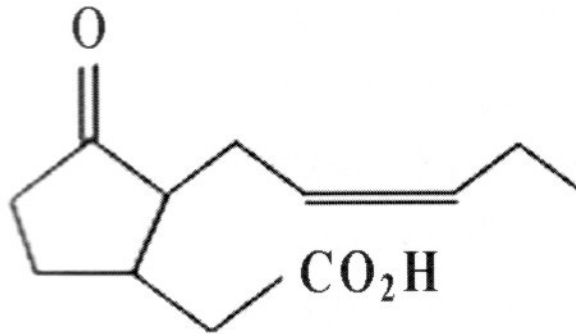
Η αμυντική ανταπόκριση του φυτού κατά την επαγομένη ανθεκτικότητα ρυθμίζεται από ένα δίκτυο αλληλεπιδρώντων μονοπατιών μεταγωγής σήματος στα οποία το σαλικυλικό οξύ, το ιασημονικό οξύ και το αιθυλένιο διαδραματίζουν κεντρικό ρόλο (Pieterse and Van Loon 1999, Thomma and Penninckx 2001, Glazebrook 2001).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



Εικ. 3 Χημικός τύπος σαλικυλικού οξέος



Εικ.4 Χημικός τύπος αιθυλενίου



Ιασμονικό οξύ

Εικ.5 Χημικός τύπος ιασμονικού οξέος

Το σαλικυλικό οξύ, το ιασμονικό οξύ και το αιθυλένιο συσσωρεύονται στα φυτά μετά από προσβολή από παθογόνα ή μετά από ζημιές από ζωικούς εχθρούς και οδηγούν στην ενεργοποίηση διακριτών ή μερικώς επικαλυπτόμενων ομάδων αμυντικών γονιδίων των φυτών (Pieterse and Van Loon, 2004). Θα πρέπει βέβαια να τονισθεί ότι οι περισσότερες πληροφορίες που διαθέτουμε αφορούν το γνωστό φυτό μοντέλο των μοριακών βιολόγων *Arabidopsis thaliana* και πολλά μένουν να διευκρινισθούν για τα μονοπάτια επαγομένης ανθεκτικότητας στα φυτά γεωργικού ενδιαφέροντος. Παρόλα αυτά έχει γίνει σαφές ότι υπάρχει εξειδίκευση των αμυντικών μονοπατιών στα διάφορα παθογόνα. Γενικά, τα υποχρεωτικά παθογόνα θεωρούνται ευαίσθητα σε αμυντικούς μηχανισμούς που εξαρτώνται από το σαλικυλικό οξύ (Ton *et al.*, 2002b). Το σαλικυλικό οξύ θεωρείται ότι συμμετέχει σε μηχανισμούς προγραμματισμένου θανάτου των κυττάρων (apoptosis), ο οποίος οδηγεί σε καταστροφή των μολυσμένων κυττάρων και κατά συνέπεια περιορισμό των υποχρεωτικών παθογόνων. Αντίθετα τα σαπροφυτικά παθογόνα, καθώς και φυτοφάγα έντομα, αντιμετωπίζονται από τα φυτά με μηχανισμούς άμυνας που εξαρτώνται από το αιθυλένιο και το ιασμονικό οξύ. Για παράδειγμα, η ενεργοποίηση της SA-εξαρτώμενης SAR (βλέπε παρακάτω) από το μη μολυσματικό στέλεχος *Pseudomonas syringae* pv. *tomato* προσφέρει επαρκή προστασία στο φυτό *Arabidopsis* έναντι του υποχρεωτικού παθογόνου *Turnip crinkle virus* (Pieterse and Van Loon, 2004).. Από την άλλη μεριά, στο ίδιο φυτό, η JA/ET εξαρτώμενη ISR που ενεργοποιείται από το μη παθογόνο ριζοβακτήριο, *Pseudomonas fluorescens* προσφέρει επαρκή προστασία έναντι του σαπροφυτικού μύκητα *Alternaria brassicicola* όπου ο μηχανισμός επαγόμενης προστασίας SAR είναι ανεπαρκής (Ton *et al.*, 2002b). Η αλληλεπίδραση

των παραπάνω μονοπατιών επιτρέπει στα φυτά να ελέγχουν τους ενδογενείς επαγόμενους μηχανισμούς άμυνας ανάλογα με το είδος των προσβολών που αντιμετωπίζει κάθε φορά.

A.3.1 Επαγόμενοι μηχανισμοί άμυνας του φυτού-Induced Resistance

Ένας από τους μηχανισμούς επαγόμενης άμυνας είναι η **τοπικά επίκτητη ανθεκτικότητα (Local Acquired Resistance - LAR)**. Η LAR είναι κατάσταση αυξημένης αμυντικής ετοιμότητας φυτικών ιστών οι οποίοι βρίσκονται σε άμεση επαφή με το σημείο προσβολής. Η LAR μπορεί να εκδηλωθεί με τη νέκρωση και ξήρανση του φυτικού ιστού όπως και η αντίδραση υπερευαισθησίας και συνήθως προστατεύει το φυτό από δευτερογενείς προσβολές του προσβεβλημένου ιστού από μια σειρά άλλων παθογόνων.

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

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

A.3.2 Διασυστηματική ανθεκτικότητα επαγόμενη από τα ριζοβακτήρια

Οι Kloepper & Schroth το 1978 ανέφεραν για πρώτη φορά ότι ορισμένα είδη βακτηρίων, τα οποία αποικίζουν το ριζικό σύστημα των φυτών, μπορούν να βοηθήσουν στην ανάπτυξη των φυτών. Τα βακτήρια αυτά που ονομάστηκαν

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

Είναι γνωστό ότι βακτήρια της ριζόσφαιρας των γενών *Pseudomonas* και *Bacillus*, μπορούν να επάγουν διασυστηματική ανθεκτικότητα (ISR) στα φυτά έναντι παθογόνων τόσο της ρίζας όσο και των φύλλων (Pieterse and van Loon, 1999). Το φαινόμενο της ISR διαφέρει από αυτό της SAR κυρίως στο ότι δεν είναι αναγκαία η ύπαρξη νεκρωτικών κηλίδων (αντίδραση υπερευαισθησίας) (Liu *et al.*, 1995), και στην απουσία της διαμεσολάβησης του σαλικυλικού οξέος (SA) κατά την ενεργοποίηση των αυξημένων επιπέδων άμυνας (Chen *et al.*, 1999). Κατά συνέπεια δεν έχουμε την επαγωγή της έκφρασης PR πρωτεϊνών η οποία όπως θα αναφερθεί παρακάτω συνδέεται με το σαλικυλικό οξύ. Στην περίπτωση της διασυστηματικής αντοχής που επάγεται από ριζοβακτήρια τα επίπεδα αντοχής των φυτών καθορίζονται από τα βιοχημικά μονοπάτια βιοσύνθεσης-αντίληψης του ιασμονικού οξέος και του αιθυλενίου (Ton *et al.*, 2002b). Τα ακριβή μονοπάτια μεταγωγής σήματος και δημιουργίας ανθεκτικών φυτών διαφέρουν ανάλογα με το φυτό και το μικροοργανισμό που αλληλεπιδρούν. Επίσης, οι περισσότερες πληροφορίες που υπάρχουν σχετικά με το φαινόμενο της ISR αφορούν το φυτό-μοντέλο *Arabidopsis* και θα πρέπει να υπάρχει μια σχετική επιφύλαξη σχετικά με την γενικευσή τους σε όλα τα φυτά. Για παράδειγμα όταν το φυτό-ξενιστής είναι σολανώδες, το σαλικυλικό οξύ φαίνεται να παίζει κάποιο ρόλο στην επαγωγή της ISR στα φύλλα τουλάχιστον σε ορισμένες περιπτώσεις βακτηριακών στελεχών (Audenaert *et al.*, 2002, Maurhofer *et al.*, 1998). Ακόμα η ISR μπορεί να συνοδεύεται από επαγωγή σύνθεσης PR πρωτεϊνών (Maurhofer *et al.*, 1994, Park and Kloepper, 2000) γεγονός που αποτελεί

εξαίρεση στον κανόνα. Αντιθέτως, η ISR στα *Arabidopsis* σχετίζεται μόνο με τα βιοχημικά μονοπάτια του ιασμονικού οξέος και του αιθυλενίου αλλά όχι με του σαλικυλικού οξέος.

Η πλειοψηφία των ερευνητών έχει επικεντρωθεί στην μελέτη της ISR μόνο στα φύλλα με αποτέλεσμα πολλές διαδικασίες που διέπουν το φαινόμενο στις ρίζες να παραμένουν αδιευκρίνιστες προς το παρόν. Η επαγωγή της ISR στη ρίζα έχει καταρχήν μελετηθεί στη βάση του βιολογικού ελέγχου των παθογόνων οργανισμών της ρίζας και όχι της διευκρίνησης των βιοχημικών μονοπατιών που εμπλέκονται με αυτήν. Στην περίπτωση της ρίζας έχουν προταθεί μηχανισμοί βιολογικού ελέγχου φυτοπαθογόνων οι οποίοι σχετίζονται με την παραγωγή ελεύθερων ριζών στο φυτό ξενιστή (Audenaert *et al.*, 2002), καθώς και με την παραγωγή του αντιμυκητιακού μεταβολίτη 2,4-diacetylphloroglucinol από τον ανταγωνιστή μικροοργανισμό (Iavicoli *et al.*, 2003). Έχει ενδιαφέρον ότι στην αγγουριά, το βακτήριο που δρα ως βιολογικός παράγοντας ελέγχου ενός φυτοπαθογόνου αλλά και ο ίδιος ο φυτοπαθογόνος οργανισμός ενεργοποιούν τα ίδια γονίδια άμυνας (Chen *et al.*, 2000). Ανάλογο φαινόμενο παρατηρείται και στην τομάτα σε συγκεκριμένα βακτηριακά στελέχη (Audenaert *et al.*, 2002). Μέχρι στιγμής οι μελέτες για την ISR έχουν περιοριστεί κυρίως στα δικότυλα και πολλά πράγματα μένουν να διευκρινιστούν κυρίως για τις διαδικασίες και τα γονίδια που σχετίζονται με την ISR στα υπόγεια τμήματα του.

ΜΕΡΟΣ ΔΕΥΤΕΡΟ

ΟΙ ΜΥΚΗΤΕΣ ΩΣ ΣΥΜΜΑΧΟΙ ΤΩΝ ΦΥΤΩΝ

A.1 Γενικά περί μυκήτων

Ανάμεσα στις τόσες απειλές που δέχονται τα φυτά μια από τις σημαντικότερες είναι και αυτή των παθογόνων μυκήτων. Τα αίτια αυτής της μάχης εκατομμυρίων χρόνων ανάμεσα στα δύο στρατόπεδα αποτελεί η ανεύρεση χώρου, θρεπτικών στοιχείων και γενικά η επιβίωση του ενός εις βάρος του άλλου. Οι μύκητες αποτελούν μια ομάδα μικροοργανισμών που η ύπαρξη τους στο πλανήτη γη χρονολογείται περίπου στα δύο εκατομμύρια χρόνια. Αποτελούν ένα είδος που συνεχίζει την ύπαρξή του δια μέσου των αιώνων μέσω της ικανότητάς τους να προσαρμόζονται στο περιβάλλον και στο να μπορούν με διάφορες λειτουργίες και μηχανισμούς να εξασφαλίζουν τη διαβίωση τους (συνήθως εις βάρος κάποιου ξενιστή) άρα και την επιβίωση-αναπαραγωγή τους. Εκτός από τους παθογόνους μύκητες υπάρχουν και πολλοί φυτοπροστατευτικοί αλλά η αναγνώριση τους και η σημασία τους για τα φυτά καθυστέρησε να γίνει αντιληπτή λόγω της έμφασης που δόθηκε από τους ερευνητές πρώτα προς τους παθογόνους. Τα τελευταία χρόνια όμως το πεδίο για τους φυτοπροστατευτικούς μύκητες γίνεται όλο και πιο ξεκάθαρο με πολλές έρευνες να βλέπουν το φως της δημοσίευσης.

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

- Είναι ευκαρυωτικοί οργανισμοί.
- Στερούνται χλωροφύλλης (είναι ετερότροφοι).
- Τα κυττάρά τους περιβάλλονται από κυτταρικό τοίχωμα, το οποίο συνίσταται από χιτίνη ή κυτταρίνη ή και από τις δύο.
- Το σώμα τους είναι νηματοειδές, διακλαδιζόμενο ή αμοιβαδοειδές.
- Αναπαράγονται κατά κανόνα με αγενή και σε ορισμένες περιπτώσεις με εγγενή σπόρια.
- Ζουν σε ποικιλία υποστρωμάτων και συνθηκών ως παράσιτα ή σαπρόφυτα (Ηλιόπουλος, 2000).

Έχουν περιγραφεί 100.000 είδη που κατατάσσονται σε 2.500 περίπου γένη. Τα περισσότερα από αυτά ζουν σαπροφυτικά στο έδαφος και αλλού, ενώ άλλα είναι παράσιτα κυρίως των φυτών και μερικά του ανθρώπου και των ζώων. Στους

μύκητες ανήκει το σημαντικότερο και πολυπληθέστερο άθροισμα φυτοπαθογόνων μικροοργανισμών. Περισσότερα από 8.000 είδη μυκήτων έχουν προσδιοριστεί ως φυτοπαθογόνα. Σχεδόν όλα τα φυτά προσβάλλονται από μερικά είδη μυκήτων. Ορισμένοι φυτοπαθογόνοι μύκητες μπορούν να προσβάλλουν πολλά είδη φυτών, ενώ άλλοι μόνο λίγα είδη. Μερικοί προσβάλλουν μόνο ένα είδος φυτού. Ως σαπρόφυτα, οι μύκητες συμβάλλουν μαζί με τα βακτήρια και άλλους μικροοργανισμούς στη χουμοποίηση και διατήρηση της γονιμότητας του εδάφους. Σχεδόν όλοι οι μύκητες έχουν την ικανότητα αποσύνθεσης πολύπλοκων οργανικών ουσιών, τις οποίες χρησιμοποιούν ως πηγές ενέργειας. Άλλοι παρασιτούν ανώτερα φυτά με την ατελή μορφή τους, π.χ *Fusicladium dendriticum* (Φουζικλάδιο μηλιάς) και ζουν σαπροφυτικά με την τέλεια μορφή τους π.χ *Venturia inaequalis* ως Ασκομύκητας.

Η επιβίωση και ανάπτυξη των μυκήτων, εξαρτάται σε πολύ μεγάλο μέρος από τις συνθήκες περιβάλλοντος, όπως την υγρασία, τη θερμοκρασία, τη διαθεσιμότητα τροφής, παράγοντες που καθορίζουν τη δυνατότητα πρόσληψης των θρεπτικών στοιχείων. Ο ρόλος των μυκήτων εκτός από επιζήμιος, μπορεί να αποδειχθεί και ευεργετικός μέχρι σημείου ενεργοποίησης επαγόμενων αμύνων. Η αναγνώριση των MAMPs (microbe-associated molecular patterns) από το φυτό όσον αφορά του φυτοπροστατευτικούς μύκητες δεν έχει αποσαφηνιστεί πλήρως. Μύκητες του γένους *Trichoderma spp.* που παράγουν κυτταρίνη (cellulose) καθώς και ξυλανάσες επάγουν άμυνες στα φυτά. (Rotblat *et al.*, 2002). Προσφάτως αποδείχτηκε ότι η hydrophobin-like elicitor Sm1 του φυτοπροστατευτικού μύκητα εδάφους *Trichoderma virens* επάφει διασυστηματική ανθεκτικότητα στο ρύζι (Djonovic *et al.*, 2007). Φυτά ρυζιού με αποσιώπηση του *Sm1* γονιδίου έδειξαν μειωμένη επαγωγή του φαινομένου πράγμα που καταδεικνύει την σημαντικότητά του στη σηματοδότηση της άμυνας του ξενιστή. Επίσης, χημικά μόρια ή διεγέρτες των μυκήτων και ιδίως των μυκορριζικών επάγουν ανθεκτικότητα παραμένουν άγνωστα (Pozo and Azcon-Aguilar, 2007). Παρόλα αυτά η προσφάτως αλληλούχιση του μυκορριζικού μύκητα *Laccaria bicolor* (Martin *et al.*, 2008) ίσως παρέχει στοιχεία για την διερεύνηση των MAMPs που εμπλέκονται στο φαινόμενο.

A.2 Οι μύκητες ως επαγωγείς της ανάπτυξης των φυτών (Plant Growth Promoting Fungi)

Πολλοί μύκητες που έχουν απομονωθεί από το έδαφος μπορούν να αναστείλουν την φυτική ανάπτυξη. Κατά κανόνα η αναστολή της ανάπτυξης του φυτού συνήθως πραγματοποιείται από τους φυτοπαθογόνους μύκητες. Ωστόσο ορισμένοι μύκητες που δεν θεωρούνται παθογόνοι, κάτω από ορισμένες συνθήκες έχουν την συμπεριφορά των παθογόνων στην φυτική ανάπτυξη (Yuen and Schroth 1986). Εν αντιθέση άλλοι εδαφικοί μύκητες όπως η *Trichoderma sp.*, (Yedidia et al., 2001, Harman 2006) και ο *Rhizoctonia solani* (Hyakumachi 1997) καθώς και άλλοι μπορούν να επάγουν τη φυτική ανάπτυξη και συνεπώς και τη φυτική μάζα. Πολλοί από αυτούς τους μύκητες επαγωγής ανάπτυξης των φυτών (Plant Growth Promoting Fungi - PGPF), είναι αρκετά ανταγωνιστικοί και καταλαμβάνουν το χώρο της ριζόσφαιρας. Τα περισσότερα γένη που έχουν βρεθεί και ταυτοποιηθεί αποτελούν γνωστά και διαδεδομένα είδη που ζούν στο έδαφος. Η τεχνική η οποία χρησιμοποιείται για να καταταχθεί ένας μύκητας ως PGPF είναι η μέτρηση του ξηρού βάρους της ρίζας ή του υπέργειου τμήματος στα φυτά που έχουν εμβολιαστεί με το μύκητα σε σύγκριση με τα φυτά που δεν έχουν εμβολιαστεί (Shivanna et al., 1994). Μύκητες όπως ο *Rhizopus nigricans* και ο *Fusarium roseum* επίσης έχουν αναφερθεί ως επαγωγείς ανάπτυξης στην τομάτα (Lindsey and Baker 1967).

Οι φυσικές ιδιότητες του εδάφους δηλαδή το pH, η υγρασιακή καταστασή, τα ανόργανα θρεπτικά στοιχεία και τα οργανικά υπολείμματα σε συνάρτηση με το μικροβιακό φορτίο του εδάφους, επιδρούν στην εισαγωγή και εγκατάσταση των φυτοπροστατευτικών οργανισμών στο έδαφος. Αρκετές υποθέσεις υπάρχουν για το που οφείλεται η επαγωγή της ανάπτυξης του φυτού από τους PGPF καθώς και για το ποιοι μηχανισμοί διέπουν αυτή τη σχέση. Μερικοί από αυτούς τους μηχανισμούς εμπλέκονται στην: (α) παραγωγή ορμονών, (β) αποδόμηση υποστρωμάτων και (γ) τον περιορισμό των παθογόνων μικροοργανισμών.

A.3 Επαγόμενη ανθεκτικότητα στα φυτά από τους μύκητες

Φαινόμενα **ISR** έχουν παρατηρηθεί στην κολοκυθιά προερχόμενα από ενδοφυτικούς μύκητες καθώς και PGPF (Hyakumachi 1997, Koike et al., 2001, Meera et al., 1994). Προσφάτως πολλά δημοσιεύματα αναφέρουν ότι μύκητες του γένους *Rhizoctonia* και *Trichoderma* μπορούν να επάγουν διασυστηματική ανθεκτικότητα καθώς και την ανάπτυξη της φυτικής μάζας του φυτού. Οι ορμόνες

παίζουν κεντρικό ρόλο και στα δύο αυτά φαινόμενα, οπότε συνήθως αρκετοί μύκητες χαρακτηρίζονται από αυτόν τον διττό φυτοπροστατευτικό ρόλο. Επίσης η εναπόθεση λιγνίνης έχει χαρακτηριστεί ως ένας από τους μηχανισμούς της ISR προερχόμενη από τους μύκητες (Hammaerschmidt and Kuc 1982). Έχει επίσης παρατηρηθεί τοπική και διασυστηματική ανθεκτικότητα έναντι του μύκητα *Phytophthora parasitica* προερχόμενη από τον μυκορριζικό μύκητα *Glomus mosseae* σε ρίζες τομάτας (Cordier et al., 1998). Η διαπίστωση αυτών των αποτελεσμάτων γίνεται με την τεχνική του διαχωρισμού των ριζών (split-root system) και κατόπιν του εμβολιασμού των διαχωρισμένων ριζών πρώτα με των φυτοπροστατευτικό και μετά με το παθογόνο.

Η μελέτη αυτής της συμπεριφοράς των φυτοπροστατευτικών μυκήτων εκτός από το επιστημονικό ενδιαφέρον τους που περικλείουν για την κατανόηση των μηχανισμών των επαγόμενων αμυνών έχουν και μεγάλο πρακτικό ενδιαφέρον. Η χρήση σκευασμάτων μυκήτων που έχουν τέτοιες ευεργετικές ιδιότητες για τα φυτά θα μπορούσαν να μειώσουν την επιβάρυνση του οικοσυστήματος από τη χρήση των αγροχημικών. Θα μπορούσαμε να πούμε ότι πρόκειται για μια πιο βιολογική και αειφόρο προσέγγιση στην γεωργία.

A.4 *Piriformospora indica* ένας μύκητας πολλά οφέλη

Ένα από παράδειγμα για το πώς μπορεί ένα μικροοργανισμός και ιδίως ένας μύκητας από μόνος του να αποτελέσει των καλύτερο σύμμαχο ενός φυτού αποτελεί η περίπτωση της *Piriformospora indica*. Ο εν λόγω μύκητας ανήκει στην οικογένεια των Βασιδιομυκήτων και η ανεύρεση του έγινε στην έρημο Thar στις Ινδίες και από τα πρώτα πειραματικά δεδομένα κιόλας διαπιστώθηκε ότι επάγει ισχυρή ανάπτυξη της φυτικής μάζας σε ένα μεγάλο εύρος φυτών κατά την συμβίωση του με αυτά (Verma et al. 1998). Ανάμεσα στα φυτικά είδη που μπορεί να αναπτύξει συμβιωτική σχέση συμπεριλαμβάνονται φυτά μεγάλης οικονομικής και διατροφικής αξίας όπως τα δημητριακά και ιδίως το ρύζι, το σιτάρι, το κριθάρι καθώς και πολλά δικοτυλήδονα συμπεριλαμβανομένου του *Arabidopsis* (Varma et al., 1999, Peskan et al., 2004). Η αλληλεπίδραση του ενδοφυτικού αυτού μύκητα με της ρίζες του φυτού *Arabidopsis* συνοδεύεται με σημαντική πρόσληψη αζώτου από το περιβάλλον (Peskan et al., 2004). Είναι σημαντικό, επίσης, το γεγονός ότι τα μοριακά εργαλεία που υπάρχουν στο φυτό μοντέλο *Arabidopsis* αποτελούν έναν πολύ καλό οδηγό στην εξερεύνηση

γονιδίων που εμπλέκονται σε αυτήν την αλληλεπίδραση, έτσι ώστε να ανοίξει ο δρόμος και για άλλους φυτο-προστατευτικούς οργανισμούς.

Με τον αποικισμό της ριζόσφαιρας των φυτών από την *Piriformospora* έχει επίσης παρατηρηθεί (Waller et al., 2005) αντοχή στην ήπια καταπόνηση από την αλατότητα (αβιοτικό stress) στο κριθάρι, και επαγόμενη τοπικά (στη ρίζα) και διασυστηματικά (στα φύλλα) ανθεκτικότητα έναντι του νεκροτροφικού μύκητα σήψης *Fusarium culmorum* και του βιοτροφικού μύκητα *Bulmeria graminis* αντιστοίχως (Bergmann et al., 2001).

Αναλογιζόμενη όλες αυτές τις ιδιότητες της *Piriformospora indica* μπορούμε να καταλάβουμε πόσο όφελος μπορεί να προσφέρει ένα στέλεχος ενός μύκητα ή γενικότερα των ωφέλιμων μικροοργανισμών για τα φυτά από άποψη ενεργειακού κόστους, κόπου και χρήματος, αλλά και από την πλευρά της περιβαλλοντικής διαχείρισης.

ΜΕΡΟΣ ΤΡΙΤΟ

ΣΚΟΠΟΣ ΤΗΣ ΠΑΡΟΥΣΑΣ ΕΡΓΑΣΙΑΣ

A.1 Οργανισμοί που έχουν χρησιμοποιηθεί στην παρούσα μελέτη

A.1.1 Ο φυτικός οργανισμός

Ο φυτικός οργανισμός που επιλέχθηκε για να μελετηθεί αυτή η εξελικτική σχέση μεταξύ ενός μη-παθογόνου μύκητα και ενός φυτού είναι η κοινή σε όλους τομάτα *Lycopersicon esculentum* της ποικιλίας ACE 55.

Η τομάτα και τα στενά συγγενικά της είδη έχουν ως κέντρο καταγωγής τους μια ορεινή περιοχή που εκτείνεται στην οροσειρά των Άνδεων μεταξύ Περού, Ισημερινού, και Χιλής. Καλλιέργεια της τομάτας εκτός του κέντρου καταγωγής της φαίνεται ότι για πρώτη φορά έλαβε χώρα στους αρχαίους πολιτισμούς του Μεξικό. Το όνομα tomato προέρχεται από τη Μεξικανική διάλεκτο Nahuatl και παραλλαγές αυτού του ονόματος έχουν συνοδεύσει την εξάπλωση καλλιέργειας της τομάτας σε όλο τον κόσμο (Tigchelaar 1991). Στην Ευρώπη έγινε γνωστή από το 16^ο αιώνα, ενώ η χρήση της στη διατροφή του ανθρώπου άρχισε από το 18^ο αιώνα. Μέχρι τότε καλλιεργούνταν μόνο ως καλλωπιστικό, επειδή θεωρούταν επιβλαβής στην ανθρώπινη υγεία. Η εισαγωγή της στην Ελλάδα έγινε το 1818 και σήμερα η καλλιέργεια της κατέχει αξιοσημείωτη θέση ανάμεσα στις κηπευτικές εκμεταλλεύσεις στην αγροτική παραγωγή-οικονομία (Δημητράκης 1998).

Η καλλιεργούμενη τομάτα (tomato) ταξινομείται στο γένος *Lycopersicon* της οικογένειας **Solanaceae**. Στην οικογένεια αυτή ανήκουν, επίσης αρκετά είδη καλλιεργούμενων φυτών με μεγάλη οικονομική σημασία, όπως η πατάτα, η μελιτζάνα, η πιπεριά και ο καπνός (Tigchelaar 1991). Η καλλιέργεια της τομάτας αποτελεί μία από τις πιο διαδεδομένες καλλιέργειες στον ελλαδικό χώρο. Οι καρποί της αποτελούν ένα υψηλό διατροφικό προϊόν που βρίσκουν εφαρμογή τόσο στην βιομηχανία τροφίμων όσο και στην απλή διακίνηση μέσω των αγορών των οπωροκηπευτικών αγαθών.

A.1.2 Το στέλεχος του μύκητα

Το στέλεχος του μύκητα που χρησιμοποιήθηκε στην εργασία είναι το μη παθογόνο στέλεχος *Fusarium solani*. Ο *Fusarium solani* (Fs-K) αποτελεί ένα

στέλεχος το οποίο απομονώθηκε απο ένα επισχετικό compost που παρασκευάστηκε απο υπολλείματα στέμφυλων και παραπροϊόντων ελαιουργίας (Kavroulakis *et al.*, 2005). Το συγκεκριμένο στέλεχος εμφάνισε την ιδιότητα να επιφέρει στα φυτά τομάτας μια ενεργοποίηση των μηχανισμών άμυνας του φυτού έναντι του φυτοπαθογόνου μύκητα φυλλώματος *Septoria lycopersici* (Kavroulakis *et al.*, 2007). Ο μύκητας προστατεύει το φυτό επίσης τοπικά έναντι της προσβολής από το ριζομύκητα σήψης *Fusarium oxysporum radices-lycopersici* μέσω του μηχανισμού άμυνας που εμπλέκεται το αιθυλένιο.

Σε αυτή την διπλωματική εργασία πραγματοποιήθηκαν πειράματα μικροσκοπίας φθορισμού με ένα γενετικά μετασχηματισμένο με την πράσινη φθορίζουσα πρωτεΐνη (gfp)στέλεχος του Fs-K, έτσι ώστε να παρακολουθηθεί (monitoring) η πορεία του μύκητα εντός του φυτικού ιστού. Επίσης επιχειρήθηκε η κατασκευή μιας αφαιρετικής βιβλιοθήκης (cDNA Subtraction Library) για την διερεύνηση της γονιδιακής έκφρασης που διέπει αυτή την αλληλεπίδραση και τον εντοπισμό γονιδίων που υπερ-εκφράζονται στο φυτό κατά τον αποικισμό του ριζικού συστήματος από το στέλεχος Fs-K..

B. ΜΕΘΟΔΟΙ ΚΑΙ ΥΛΙΚΑ

B.1 Πειραματικός σχεδιασμός

Όπως αναφέρθηκε και στην προηγούμενη ενότητα η πειραματική προσέγγιση που επιχειρήθηκε στα πλαίσια αυτής της διπλωματικής εργασίας ήταν η εξής:

(α) Πειράματα ηλεκτρονικής μικροσκοπίας φθορισμού με το μετασχηματισμένο στέλεχος *Fusarium solani* με την πράσινη φθορίζουσα πρωτεΐνη (gfp) με σκοπό τη λεπτομερή περιγραφή του προτύπου αποικισμού της ρίζας φυτών τομάτας από τον ενδοφυτικό μύκητα.

(β) Η κατασκευή μιας αφαιρετικής βιβλιοθήκης για τη μελέτη των υπερεκφραζομένων και υποεκφραζομένων γονιδίων στην ρίζα φυτών τομάτας κατόπιν της επίδρασης του μη παθογόνου ενδοφυτικού στελέχους *Fusarium solani*, με σκοπό την ανεύρεση γονιδίων που σχετίζονται με την εγκαθίδρυση του αποικισμού του φυτού από το μύκητα.

Συνοπτικά ακολουθήθηκε ο εξής πειραματικός σχεδιασμός: φύτευση φυτών τομάτας και χάραξη πειραματικών τεμαχίων, εμβολιασμός φυτών με τον *Fusarium solani*, συλλογή ιστών και απομόνωση RNA, απομόνωση mRNA από ολικό RNA (poly A+ isolation), σύνθεση αφαιρετικής βιβλιοθήκης (cDNA Subtraction Synthesis), Southern υβριδισμός, υποκλωνοποίηση και αλληλούχιση, επιλογή κλώνων.

B.2 Μικροσκοπία Φθορισμού

B.2.1 Φυτικό υλικό και χειρισμοί πριν τη σπορά-προετοιμασία εδαφικού υποστρώματος

Οι σπόροι τομάτας που χρησιμοποιήθηκαν στο πείραμα ήταν ποικιλίας ACE 55 πριν την φύτευση τους απολυμάνθηκαν για πέντε λεπτά σε υποχλωριώδες νάτριο και στη συνέχεια ξεπλύθηκαν σχολαστικά με αποστειρωμένο νερό και αφέθηκαν να στεγνώσουν για δέκα λεπτά πάνω σε διηθητικό χαρτί.

Στο πείραμα χρησιμοποιήθηκε άμμος έτσι ώστε να γίνεται εύκολα ο διαχωρισμός των ριζών από το υπόστρωμα κατά την διαδικασία της δειγματοληψίας. Η άμμος αποστειρώθηκε με υγρή αποστείρωση στους 121 °C για 30 λεπτά. Μετά την σπορά τα φυτοδοχεία τοποθετήθηκαν σε θάλαμο ανάπτυξης φυτών σε θερμοκρασία 25 °C και φωτοπερίοδο 16 ωρών. Τα φυτά ποτίζονταν με πλήρες θρεπτικό διάλυμα

μία φορά την εβδομάδα. Η σύσταση του θρεπτικού διαλύματος που χρησιμοποιήθηκε υπάρχει στο παράρτημα .

B.2.2 Εφαρμογή εμβολιασμού των φυτών με το μετασχηματισμένο στέλεχος του μύκητα *Fusarium solani*

Επτά ημέρες μετά την σπορά τα φυτά εμβολιάστηκαν με τον μετασχηματισμένο (με την πράσινη φθορίζουσα πρωτεΐνη) μη παθογόνο μύκητα *Fusarium solani*, σε συγκέντρωση κονιδίων στο υπόστρωμα της άμμου $10^5 /\text{cm}^3$.

B.2.3 Θρεπτικό υλικό ανάπτυξης του μύκητα

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

Πιν. Β.1

PDB (Potato Dextrose Broth)	Potato Dextrose Broth (Scharlau Microbiology) 24 gr/Lt,
PDA (Potato Dextrose Agar)	Potato Dextrose Broth (Scharlau Microbiology) 24 gr/Lt., Agar 1,7 % κ.β.

B.2.4 Καλλιέργεια και συνθήκες ανάπτυξης του μετασχηματισμένου στέλεχους *Fusarium solani*

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

B.2.5 Δειγματοληψίες και προετοιμασία για μικροσκοπική παρατήρηση

Οι χρόνοι που επιλέχθηκαν για τις δειγματοληψίες ήταν στις 2, 4, 6, 12, 18 και 23 ημέρες μετά τον εμβολιασμό των φυτών. Σε κάθε δειγματοληψία επιλεγόντουσαν 5-10 φυτά στα οποία αποκόπτονταν το υπέργειο τμήμα και σχολαστικά ξεπλένονταν οι ρίζες από την άμμο με όσο το δυνατόν μικρότερη απώλεια ριζικού ιστού μπορούσε να επιτευχθεί. Κατόπιν οι ρίζες τοποθετιόντουσαν σε αντικειμενοφόρες πλάκες και σκεπάζονταν με καλυπτρίδες, ακολουθούσε η παρατήρηση τους σε μικροσκόπιο φθορισμού (Leica 5500).

B.3 Αφαιρετική βιβλιοθήκη- cDNA Subtraction library

B.3.1 Φυτικό υλικό και χειρισμοί πριν τη σπορά-προετοιμασία εδαφικού υποστρώματος

Οι σπόροι τομάτας που χρησιμοποιήθηκαν στο πείραμα ήταν ποικιλίας ACE 55. Μεσοπρώιμη ποικιλία, παραγωγική, κατάλληλη για υπαίθριες καλλιέργειες φυτό μέτριας ανάπτυξης με καρπούς σχεδόν στρογγυλούς λίγο πεπλατυσμένους, μεγάλου μεγέθους 200-250 gr. (Δημητράκης 1998).

Οι σπόροι πριν την φύτευση τους απολυμάνθηκαν για πέντε λεπτά σε υποχλωριώδες νάτριο και στη συνέχεια ξεπλύθηκαν σχολαστικά με αποστειρωμένο νερό και αφέθηκαν να στεγνώσουν για δέκα λεπτά πάνω σε διηθητικό χαρτί.

Στο πείραμα χρησιμοποιήθηκε τύρφη (Peat moss, Sunu Kura, Seda joint-Stock company). Η τύρφη αποστειρώθηκε με υγρή αποστείρωση στους 121°C για 30 λεπτά. Μετά την σπορά τα φυτοδοχεία τοποθετήθηκαν σε θάλαμο ανάπτυξης φυτών σε θερμοκρασία κατάλληλη 25°C και φωτοπερίοδο 16 ωρών. Τα φυτά ποτίζονταν με πλήρες θρεπτικό διάλυμα μία φορά την εβδομάδα. Η σύσταση του θρεπτικού διαλύματος που χρησιμοποιήθηκε υπάρχει στο παράρτημα .

B.3.2 Εφαρμογή εμβολιασμού των φυτών με το στέλεχος του μύκητα *Fusarium solani*

Τα φυτοδοχεία χωρίστηκαν σε 2 ομάδες , στην πρώτη ομάδα θα γινόταν ο εμβολιασμός με το μυκητιακό στέλεχος ενώ τα φυτά της δεύτερης ομάδας θα έμεναν ανεμβολίαστα και θα είχαν τον ρόλο του μάρτυρα όσον αφορά τις οποιεσδήποτε αλλαγές επέφερε ο μύκητας στην γονιδιακή απόκριση του φυτού. Κάθε ομάδα αποτελούνταν από 15 φυτοδοχεία και κάθε φυτοδοχείο περιείχε 5 φυτά. Η πρώτη

πεντάδα φυτοδοχείων (και για τις δύο ομάδες) προοριζόταν για την συλλογή φυτικού υλικού 7 ημέρες μετά τον εμβολιασμό, η δεύτερη για την συλλογή φυτικού υλικού 14 ημέρες μετά τον εμβολιασμό ενώ η τρίτη για τις 21 ημέρες.

Τα φυτά εμβολιάστηκαν με τον μύκητα *Fusarium solani* μια εβδομάδα μετά τη σπορά σε συγκέντρωση κονιδίων στο υπόστρωμα της τύρφης: 10^5 /cm³.

B.3.3 Θρεπτικό υλικό ανάπτυξης του μύκητα

Η σύνθεση των θρεπτικών υλικών τα οποία χρησιμοποιήθηκαν είναι ίδια με την ενότητα B.2.3

B.3.4 Καλλιέργεια και συνθήκες ανάπτυξης του μη παθογόνου μύκητα *Fusarium solani*

Η καλλιέργεια και οι συνθήκες ανάπτυξης του μη παθογόνου μύκητα είναι ίδιες με αυτές της ενότητας B.2.4

B.3.5 Συλλογή ριζών και απομόνωση ολικού RNA

Επτά (7), δεκατέσσερις (14), και είκοσι-μια (21) ημέρες μετά τον εμβολιασμό με το μύκητα πραγματοποιήθηκε η συλλογή ριζών, οι οποίες μεταφέρθηκαν αμέσως σε υγρό άζωτο. Η άμεση μεταφορά σε υγρό άζωτο αποσκοπούσε αφενός στη διατήρηση του RNA αφετέρου στην παρεμπόδιση της επαγωγής της έκφρασης γονιδίων λόγω καταπόνησης. Ο φυτικός ιστός κονιορτοποιήθηκε με υγρό άζωτο σε γουδί λειοτρίβησης.

Για την απομόνωση του RNA από τις ρίζες χρησιμοποιήθηκε το RNeasy Plant Mini Kit της QIAGEN. Πιο συγκεκριμένα:

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

1. Σε Buffer RLT (παρέχεται έτοιμο για χρήση από την εταιρία) προστίθεται μερκαπτοαιθανόλη σε τελική συγκέντρωση 5% (κ.ο).
2. 450 μl του παραπάνω διαλύματος προστίθενται στο σωλήνα erpendorf που περιέχει το φυτικό ιστό. Ακολουθεί ισχυρή ανάδευση με την χρήση vortex για μερικά δευτερόλεπτα.
3. Το υλικό ομογενοποιείται με την βοήθεια κολώνας που παρέχεται από την εταιρία και τοποθετούμε το διήθημα σε νέο erpendorf.

4. Προσθέτουμε 225 μl αιθανόλης (96-100%).
5. Στην συνέχεια το ολικό RNA δεσμεύεται σε μεμβράνη με διέλευση του ομογενοποιημένου υλικού από κολώνα.
6. Η μεμβράνη με το ακινητοποιημένο RNA ξεπλένεται με 700 μl Buffer RW1 (παρέχεται από την εταιρία).
7. Επαναλαμβάνεται η παραπάνω διαδικασία με 500 μl Buffer RPE για δύο φορές.
9. Ακολουθεί έκλουση του ακινητοποιημένου RNA με 40 μl Rnase-free H₂O. Το RNA φυλάσσεται στους -80 °C με προσθήκη 1 μl (40 U/μl) παρεμποδιστή ριβονουκλεασών.

Η ποσότητα και η ποιότητα του RNA ελέγχονταν με ηλεκτροφόρησή του σε πηκτική αγαρόζης.

B.3.6 Απομόνωση Poly-A RNA από ολικό RNA μέσω της χρήσης μικροσφαιριδίων με μαγνητισμό (Dynabeads Oligo dT)

Για την κατασκευή της αρχικής cDNA βιβλιοθήκης έπρεπε να εξαλειφθούν όλα τα τμήματα του RNA που δεν μετείχαν στην μεταγραφή, αφού άλλωστε οι αλλαγές στην γονιδιακή έκφραση ήταν το αντικείμενο υπό μελέτη. Για να επιτευχθεί αυτό χρησιμοποιήθηκε το χαρακτηριστικό των μεταγραφημάτων να φέρουν βάσεις αδενίνης μετά το μάτισμα. Για την απομόνωση αυτών των τμημάτων χρησιμοποιήθηκε η τεχνική δέσμευσής τους μέσω μικροσφαιριδίων πολυστερίνης (Dynabeads Oligo dT της εταιρίας DYNAL) με μαγνητισμό που έχουν προσκολλημένα στο μόριο τους βάσεις θυμίνης, έτσι ώστε να δεσμεύουν της βάσεις αδενίνης που έχουν τα μεταγραφήματα στο 3' άκρο. Επίσης έγινε ποσοτικοποίηση και ανάμειξη των 3 δειγματοληψιών (7, 14 και 21 ημέρες μετά τον εμβολιασμό) για κάθε μία από τις 2 ομάδες χειρισμών (παρουσίας και απουσίας του μη παθογόνου στελέχους *Fusarium solani*). Το πρωτόκολλο που εφαρμόστηκε αναφέρεται παρακάτω.

Προετοιμασία των μικροσφαιριδίων-Dynabeads

1. Ανάδευση των Dynabeads με την χρήση vortex για να επαναδιαλυθούν
2. Μεταφορά 200 μl του εναιωρήματος των Dynabeads για ποσότητα όγκου 100 μl ολικού RNA σε σωλήνα eppendorf.
3. Τοποθέτηση του σωλήνα eppendorf για 1 λεπτό στον μαγνητικό συγκεντρωτήρα.

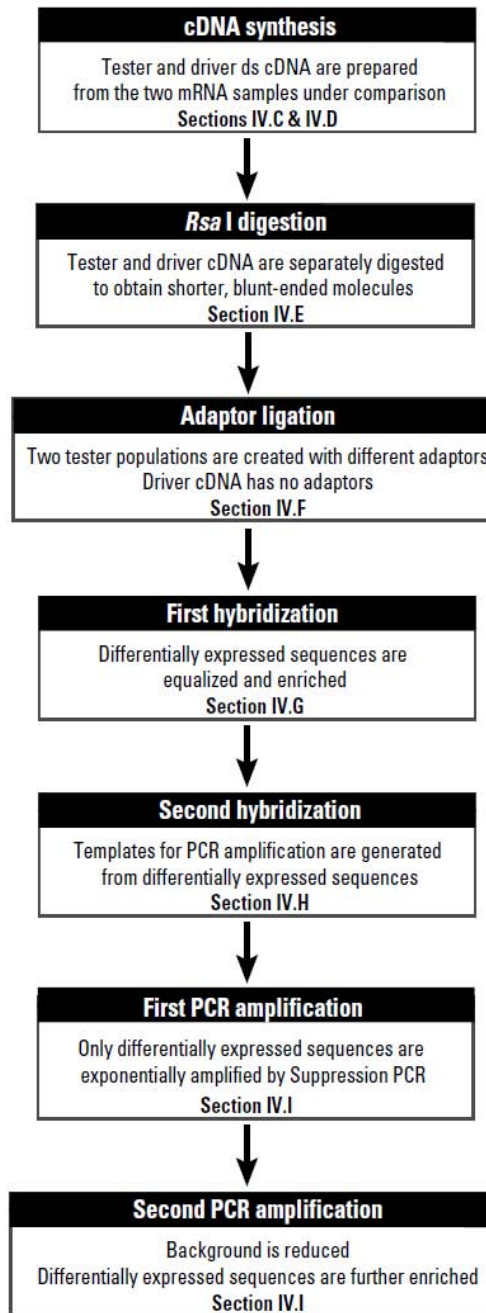
4. Αφαίρεση της ποσότητας του διαλύματος αποθήκευσης που υπήρχε χωρίς να διαταραχθεί το pellet.
5. Απομάκρυνση του μαγνητικού συγκεντρωτήρα από τον σωλήνα erpendorf και επαναδιάλυση των beads σε 200 μl Buffer δέσμησης (binding, βλέπε παράρτημα). Ανάμειξη με την χρήση πιπέτας.
6. Τοποθέτηση του σωλήνα erpendorf για 1 λεπτό στον μαγνητικό συγκεντρωτήρα και αφαίρεση του Buffer δέσμησης.
7. Απομάκρυνση του μαγνητικού συγκεντρωτήρα από τον σωλήνα erpendorf και επαναδιάλυση των beads σε 100 μl Buffer δέσμησης (binding) όσο και η ποσότητα του ολικού RNA που θα προστεθεί.

Απομόνωση poly-A RNA

1. Επώαση του ολικού RNA στους 70°C για 5 λεπτά, ύστερα προσθήκη 100 μl στο διάλυμα που περιέχει τα Dynabeads με το Buffer δέσμησης από το βήμα 7 του παραπάνω πρωτόκολλου. Ανάμειξη με την χρήση πιπέτας.
2. Επώαση σε θερμοκρασία δωματίου για 10 λεπτά έτσι ώστε να δεσμευτεί το poly-A RNA στα beads.
3. Τοποθέτηση του σωλήνα erpendorf για 2 λεπτά στον μαγνητικό συγκεντρωτήρα.
4. Αφαίρεση του διαλύματος που βρίσκεται στο σωλήνα χωρίς να διαταραχθεί το pellet.
5. Απομάκρυνση του μαγνητικού συγκεντρωτήρα από τον σωλήνα erpendorf και επαναδιάλυση των beads σε 200 μl Buffer πλυσίματος (wash, βλέπε παράρτημα). Ανάμειξη με την χρήση πιπέτας.
6. Τοποθέτηση του σωλήνα erpendorf για 1 λεπτό στον μαγνητικό συγκεντρωτήρα και αφαίρεση του Buffer πλυσίματος χωρίς να διαταραχθεί το pellet.
7. Επανάληψη των βημάτων 5 και 6.
8. Επαναδιάλυση των beads σε 20 μl Buffer έκλυσης (elution, βλέπε παράρτημα).
9. Επώαση του σωλήνα erpendorf για 2 λεπτά σε θερμοκρασία 85 °C.
10. Αμέσως τοποθέτηση του μαγνητικού συγκεντρωτήρα στον σωλήνα erpendorf και μεταφορά του διαλύματος έκλυσης σε ένα καινούργιο αποστειρωμένο σωλήνα erpendorf. Στο διάλυμα έκλυσης περιέχεται το poly-A RNA. Αποθήκευση στους -80°C.

B.3.7 Σύνθεση αφαιρετικής βιβλιοθήκης (cDNA Subtraction Syntesis)

Για την δημιουργία της αφαιρετικής βιβλιοθήκης χρειαζόμαστε δύο υπό εξέταση νουκλεοτιδικές μήτρες έτσι ώστε να γίνει η σάρωση των γονιδίων. Η μία κατέχει το ρόλο του οδηγού (driver) και η άλλη τον ρόλο του ελεγκτή (tester). Τον ρόλο του οδηγού στην εν λόγω πειραματική προσέγγιση κατέχει το m-RNA που απομονώθηκε από την ομάδα που δεν έγινε ο εμβολιασμός με τον μύκητα ενώ τον ρόλο του ελεγκτή το m-RNA της ομάδας των μεταχειρίσεων που έγινε ο εμβολιασμός με τον μύκητα *Fusarium solani*. Για να αποφευχθεί το ενδεχόμενο να ανακύψουν γονίδια που ανήκουν στο μύκητα, m-RNA είχε απομονωθεί και από τον μύκητα που είχε μεγαλώσει σε minimal θρεπτικό μέσο, αυτό το m-RNA εμπεριέχεται επίσης στον οδηγό (driver). Το πρωτόκολλο που ακολουθήθηκε αναφέρεται παρακάτω και αποτελείται από τα εξής στάδια : σύνθεση μονόκλωνης αλυσίδας cDNA, σύνθεση δίκλωνης αλυσίδας cDNA, πέψη με την ενδονουκλεάση περιορισμού Rsa I, σύνδεση των προσαρμογέων (adaptors), πρώτος υβριδισμός, δεύτερος υβριδισμός, κλωνοποίηση των τμημάτων της αφαιρετικής βιβλιοθήκης



Εικ. 1 Σύνοψη της πειραματικής διαδικασίας βάση του πρωτοκόλλου της εταιρίας (Clontech)

(α) Σύνθεση μονόκλωνης αλυσίδας cDNA – First Strand Synthesis cDNA

1. Ανάμειξη

poly-A RNA (2μg) 2-4 μl

cDNA Synthesis εκκινητής (primer) 1 μl

σε τελικό όγκο αντίδρασης 5 μl, προσθήκη αποστειρωμένου νερού αν χρειαστεί

2. Επάση για 2 λεπτά στους 70 °C σε θερμοκυκλοποιητή

3. Ψύξη σε πάγο για 2 λεπτά και ελαφρά ανάδευση

4. Προσθήκη στην αντίδραση

5X Buffer μονόκλωνης αλυσίδας	2 μl
μείγμα ολιγονουκλεοτιδίων (dNTP Mix 10mM)	1μl
αποστειρωμένο νερό	1μl
Αντίστροφη μεταγραφάση (20 units/μl)	1μl

5. Ελαφρά ανάδευση και φυγοκέντρωση

6. Επώαση των δειγμάτων για 1,5 ώρα σε θερμοκρασία 42 °C

7. Ψύξη σε πάγο για να σταματήσει η αντίδραση και άμεσα συνέχιση με την σύνθεση της δίκλωνης αλυσίδας cDNA.

(β) Σύνθεση δίκλωνης αλυσίδας cDNA – Second Strand Synthesis cDNA

1. Προσθήκη στην ήδη υπάρχουσα αντίδραση από την σύνθεση της μονόκλωνης αλυσίδας cDNA

αποστειρωμένο νερό	48,4 μl
5X Buffer δίκλωνης αλυσίδας	16 μl
μείγμα ολιγονουκλεοτιδίων (dNTP Mix 10mM)	1,6μl
20X Second strand Enzyme cocktail	4,0 μl

2. Ανάμειξη και ελαφρά ανάδευση. Ο τελικός όγκος πρέπει να ανέρχεται στα 80 μl

3. Επώαση των δειγμάτων για 2 ώρες σε θερμοκρασία 16 °C

4. Προσθήκη στην αντίδραση 2 μl T4 DNA polymerase (6unit)

5. Επώαση των δειγμάτων για 30 λεπτά σε θερμοκρασία 16 °C

6. Προσθήκη στην αντίδραση 4 μl από διάλυμα 20X EDTA/Glycogen για να τερματιστεί η αντίδραση

7. Προσθήκη στην αντίδραση 100 μl διαλύματος φαινόλης:χλωροφόρμιου: ισοαμυλικής αλκοόλης (25:24:1)

8. Ανάδευση και φυγοκέντρωση για 10 λεπτά στις 14000 rpm σε θερμοκρασία δωματίου για να γίνει ο διαχωρισμός των φάσεων

9. Μεταφορά της άνω φάσης σε νέο σωλήνα eppendorf

10. Προσθήκη στην αντίδραση 100 μl διαλύματος χλωροφόρμιου: ισοαμυλικής αλκοόλης (24:1)

11. Επανάληψη των βημάτων 8 και 9

12. Προσθήκη 40 μl NH₄OAc (4M) και 300 μl αιθανόλης (95%)

13. Ανάδευση και φυγοκέντρηση για 20 λεπτά στις 14000 rpm σε θερμοκρασία δωματίου
14. Απομάκρυνση του υπερκείμενου και ξέπλυμα του υπερκείμενου με 500 μl αιθανόλης 80%
15. Ανάδευση και φυγοκέντρηση για 10 λεπτά στις 14000 rpm σε θερμοκρασία δωματίου
16. Απομάκρυνση του υπερκείμενου και στέγνωμα των δειγμάτων σε απαγωγό εστία για 10 λεπτά, έτσι ώστε να απομακρυνθεί οποιοδήποτε κατάλοιπο αιθανόλης
17. Επαναδιάλυση του ιζήματος σε 50 μl αποστειρωμένου νερού

(γ) Πέψη με την ενδονουκλεάση περιορισμού Rsa I – Rsa I Digestion

1. Προσθήκη στην αντίδραση

ds cDNA	43,5 μl
10X Rsa I Buffer ενδονουκλεάσης	5,0 μl
Rsa I	1,5 μl

2. Ανάδευση και ελαφρά φυγοκέντρηση
3. Επώαση για 1,5 ώρα στους 37 °C
4. Προσθήκη 2,5 μl από διάλυμα 20X EDTA/Glycogen για να τερματιστεί η αντίδραση
5. Προσθήκη στην αντίδραση 50 μl διαλύματος φαινόλης:χλωροφόρμιου: ισοαμυλικής αλκοόλης (25:24:1)
6. Ανάδευση και φυγοκέντρηση για 10 λεπτά στις 14000 rpm σε θερμοκρασία δωματίου για να γίνει ο διαχωρισμός των φάσεων
7. Μεταφορά της άνω φάσης σε νέο σωλήνα eppendorf
8. Προσθήκη στην αντίδραση 50 μl διαλύματος χλωροφόρμιου: ισοαμυλικής αλκοόλης (24:1)
9. Επανάληψη των βημάτων 6 και 7
10. Προσθήκη 25 μl NH₄OAc (4M) και 187,5 μl αιθανόλης (95%)
11. Επανάληψη του βήματος 6
12. Απομάκρυνση του υπερκείμενου
13. Ξέπλυμα του ιζήματος με 200 μl αιθανόλης 80%
14. Φυγοκέντρηση για 5 λεπτά στις 14000 rpm

15. Απομάκρυνση του υπερκείμενου
16. Στέγνωμα των δειγμάτων σε απαγωγό εστία για 10 λεπτά
17. Επαναδιάλυση του ιζήματος σε 5,5 μl αποστειρωμένου νερού και αποθήκευση στους -20 °C

(δ) Σύνδεση των προσαρμογέων - Adaptor ligation

1. Επαναδιάλυση 1 μl δείγματος από τον ελεγκτή (tester) από την προηγούμενη πέψη σε 5 μl αποστειρωμένου νερού.
2. Προσθήκη στην αντίδραση

	1	2
	Tester 1-1	Tester 1-2
Επαναδιαλυμένος tester cDNA	2μl	2μl
Προσαρμογέας 1	2μl	-
Προσαρμογέας 2R	-	2μl
Master Mix*	6μl	6μl

3. Επώαση για 16 ώρες στους 16°C
4. Προσθήκη στην αντίδραση 1 μl από διάλυμα EDTA/Glycogen για να τερματιστεί η αντίδραση
5. Επώαση των δειγμάτων για 5 λεπτά στους 72°C για να απενεργοποιηθεί η δράση της λυγάσης

* Buffer λυγάσης

T4 DNA λυγάση

Αποστειρωμένο νερό

(ε) Πρώτος υβριδισμός

1. Προσθήκη στην αντίδραση

	Δείγματα Υβριδισμού	
	1	2
	Tester 1-1	Tester 1-2
cDNA οδηγού (Driver)-από την αντίδραση της πέψης	1,5 μl	1,5 μl
Tester 1-1 από την αντίδραση της (δ) ενότητας	1,5 μl	-

Tester 1-2 από αντίδραση της (δ) ενότητας	-	1,5 μl
4X Buffer Υβριδισμού	1 μl	1μl

2. Ελαφρά ανάδευση

3. Επώαση των δειγμάτων για 1,5 λεπτό σε θερμοκρασία 98 °C

4. Επώαση των δειγμάτων για 8 ώρες σε θερμοκρασία 68 °C

(ζ) Δεύτερος υβριδισμός

1. Σε ένα νέο σωλήνα eppendorf προσθήκη

cDNA οδηγού (Driver) από την αντίδραση της πέψης	1μl
4X Buffer Υβριδισμού	1μl
Αποστειρωμένο νερό	2μl

2. Τοποθέτηση 1 μl από την παραπάνω αντίδραση σε νέο σωλήνα eppendorf των 0.5 ml καθώς και προσθήκη μιας σταγόνας κεδρέλαιου

3. Επώαση για 1,5 λεπτό σε θερμοκρασία 98 °C

4. Παίρνοντας μια μικρή ποσότητα από το δείγμα και αφήνοντας κενό αέρα στο tip της πιπέτας

5. Αναμειγνύουμε έχοντας πάρει με το ίδιο tip το δείγμα υβριδισμού (2) από την προηγούμενη ενότητα παρουσία του φρέσκου cDNA οδηγού με το δείγμα υβριδισμού (1) επίσης από την προηγούμενη ενότητα. Ουσιαστικά ο δεύτερος υβριδισμός πραγματοποιείται στο tip της πιπέτας κατά την διάρκεια της ανάμειξης

6. Επώαση της αντίδρασης για 16 ώρες σε θερμοκρασία 68 °C

7. Προσθήκη 200 μl Buffer διάλυσης

8. Θέρμανση στους 68 °C για 7 λεπτά

9. Αποθήκευση στους -20°C

(η) Κλωνοποίηση των τμημάτων της διαφορικής έκφρασης της cDNA βιβλιοθήκης

Τα τμήματα του DNA που αναμένετε να ανακύψουν από αυτή την αφαιρετική cDNA βιβλιοθήκη κλωνοποιούνται μέσω δύο αλυσιδωτών αντιδράσεων της πολυμεράσης. Στην πρώτη αντίδραση (primary PCR reaction) μόνο δίκλινα κομμάτια DNA με διαφορετικές αλληλουχίες προσαρμογέων στα 3' άκρα τους κλωνοποιούνται. Ενώ

στην δεύτερη αντίδραση (secondary ή nested PCR reaction) ενισχύονται τα τμήματα της διαφορικής έκφρασης, δηλαδή τα τμήματα του DNA που δυνητικά η παρουσία του μηκυτιακού στελέχους (αφού αυτός ο μόνος παράγοντας που διαφοροποιεί την έκφραση των γονιδίων στην πειραματική διαδικασία) ώθησε στην έκφραση.

(η.1) Πρώτη αλυσιδωτή αντίδραση της πολυμεράσης

Αποστειρωμένο νερό	19,5 μl
10X Buffer πολυμεράσης	2,5 μl
Μείγμα ολιγονουκλεοτιδίων (10mM)	0,5 μl
Εκκινητής 1(10mM)	1,0 μl
50X cDNA μείγμα πολυμεράσης	0,5 μl

DNA από τον δεύτερο υβριδισμό καθώς και του αντίστοιχου τμήματος από την ενότητα της ένωσης των ανταπτόρων 1 μl

Το πρόγραμμα που ακολουθήθηκε ήταν το εξής

Κύκλος 1 ^{ος}	94°C για 25 δευτ. (αρχική αποδιάταξη)
Κύκλος 2 ^{ος} -27 ^{ος}	94°C για 30 δευτ. (αποδιάταξη) 66°C για 30 δευτ. (σύνδεση εκκινητή) 72°C για 1,5 λεπτό (επιμήκυνση)

(η.2) Δεύτερη αλυσιδωτή αντίδραση της πολυμεράσης

Επαναδιάλυση 3 μl από το προϊόν της πρώτης αντίδρασης σε 27 μl αποστειρωμένου νερού και τοποθέτηση 1 μl από αυτά στην δεύτερη αντίδραση της πολυμεράσης (secondary PCR)

Αποστειρωμένο νερό	18,5 μl
10X Buffer πολυμεράσης	2,5 μl
Μείγμα ολιγονουκλεοτιδίων (10mM)	0,5 μl
Nested Εκκινητής 1(10mM)	1,0 μl
Nested Εκκινητής 2R (10mM)	1,0 μl
50X cDNA μείγμα πολυμεράσης	0,5 μl

Το πρόγραμμα που ακολουθήθηκε ήταν το εξής

Κύκλος 1^{ος}-12^{ος} 94°C για 30 δευτ. (αποδιάταξη)
 68°C για 30 δευτ. (σύνδεση εκκινητή)
 72°C για 1,5 λεπτό (επιμήκυνση)

Αποθήκευση των δειγμάτων στους -20°C

B.3.8 Υποκλωνοποίηση σε φορέα ένθεσης – Subcloning in pGem T-easy Vector

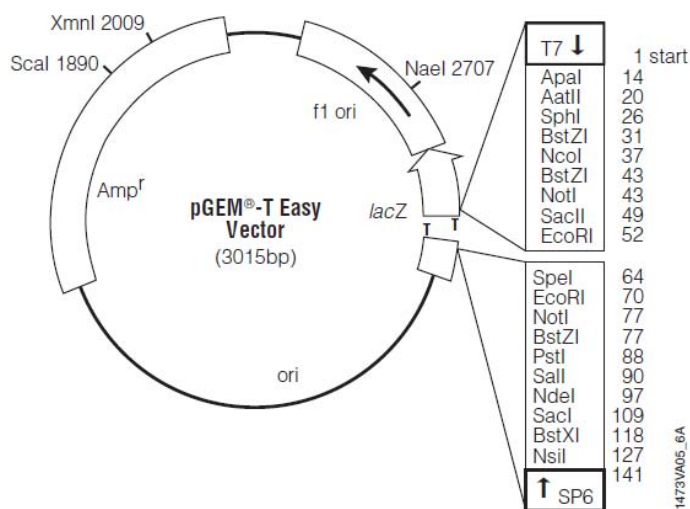
Το τμήματα του DNA που προέκυψαν από την αφαιρετική βιβλιοθήκη υποκλωνοποιήθηκαν σε φορέα ένθεσης έτσι ώστε να γίνει το screening των κλώνων και κατόπιν η αλληλούχιση τους για να ανιχνευτεί η ταυτότητα τους. Ο φορέας ένθεσης που χρησιμοποιήθηκε ήταν ο pGEM T-Easy (Promega) και το πρωτόκολλο που χρησιμοποιήθηκε αναφέρεται παρακάτω. Το σύστημα επιλογής των μετασχηματισμένων αποικιών που παρέχει ο συγκεκριμένος φορέας είναι το σύστημα της β-γαλακτοσιδάσης.

1. Προσθήκη στην αντίδραση

2X Buffer λυγάσης	5 μl
pGEM T-Easy φορέας ένθεσης	1 μl
DNA από την αφαιρετική βιβλιοθήκη	3 μl
T4 DNA λυγάση	1 μl

2. Επώαση για 16 ώρες στους 4 °C

pGEM[®]-T Easy Vector Map and Sequence Reference Points



Εικ. 2 Ο φορέας ένθεσης pGEM-T Easy

B.3.9 Μετασχηματισμός Δεκτικών κυττάρων – Transformation

1. Σε 50 µl δεκτικών κυττάρων DH5a (Invitrogen) προσθήκη 2 µl από την αντίδραση της λυγάσης στο φορέα ένθεσης
2. Ψύξη για 30 λεπτά σε πάγο
3. Θέρμανση για 40 δευτ. στους 42 °C
4. Ψύξη για 5 λεπτά σε πάγο
5. Προσθήκη 200 µl θρεπτικού διαλύματος LB και επώαση στους 37 °C για 50 λεπτά
6. Προσθήκη 50 µl X-gal και 10 µl IPTG
7. Στρώσιμο σε τριβλία LB αμπικικιλίνης
8. Επώαση στους 37 °C για 16 ώρες
9. Επιλογή των μετασχηματισμένων κλώνων (λευκών αποικιών) και πέρασμα σε 96 Well Cell Cluster plate (για να γίνει η σάρωση πολλών αποικιών ταυτόχρονα) και επώαση στους 37 °C για 16 ώρες

B.3.10 Colony PCR στα δείγματα από τα 96 Well Cell Cluster plate

Για να γίνει ο εντοπισμός και η ανίχνευση των γονιδίων που έχουν διαφορετική έκφραση έγινε επανάληψη της δεύτερης αντίδρασης της πολυμεράσης σε μορφή colony PCR και κατόπιν Υβριδισμός κατά Southern. Η αντίδραση και το πρόγραμμα που εφαρμόστηκε κατά το colony PCR είναι το ίδιο με αυτό της ενότητας (η.2).

B.3.11 Υβριδισμός κατά Southern

Η ανίχνευση των τμημάτων της cDNA βιβλιοθήκης μέσω του Υβριδισμού κατά Southern χωρίζεται σε τρία τμήματα:

- α) Ηλεκτροφόρηση των DNA τμημάτων σε πηκτή αγαρόζης
- β) Μεταφορά του DNA από την πηκτή σε nylon μεμβράνη με φαινόμενα ανοδικής τριχοειδούς μεταφοράς
- γ) Ανάλυση υβριδισμού των ακολουθιών DNA που μας ενδιαφέρουν χρησιμοποιώντας μη ραδιενεργά σημασμένο DNA ανιχνευτή

(α) Τα δείγματα του DNA υφίστανται ηλεκτροφόρηση σε πηκτή αγαρόζης (2%), ακολουθεί μετουσίωση του DNA με εμβάπτιση του πήγματος σε 500 ml διαλύματος μετουσίωσης (βλέπε παράρτημα) για 20 λεπτά, σε θερμοκρασία δωματίου και ήπια ανάδευση. Στη συνέχεια το αλκαλικό περιβάλλον εξουδετερώνεται με εμβάπτιση του πήγματος σε 500 ml διαλύματος εξουδετέρωσης (βλέπε παράρτημα) για 20 λεπτά σε

θερμοκρασία δωματίου και με ήπια ανάδευση. Ακολουθεί ξέπλυμα της πηκτής με διάλυμα 2X SSC (βλέπε παράρτημα), και η διαδικασία μεταφοράς στην nylon μεμβράνη (Hybond) η οποία περιλαμβάνει την εξής διαδικασία

(β) Τοποθέτηση της πηκτής σε δοχείο που θα γίνει η μεταφορά, πάνω σε γυάλινη πλάκα που φέρει στην επιφάνειά της 3 φύλλα διηθητικού χαρτιού Whattman 3MM σε σχήμα γέφυρας, έτσι ώστε οι δύο άκρες του χαρτιού να εφάπτονται στη βάση του δοχείου. Η μεταφορά πραγματοποιείται σε αρκετή ποσότητα διαλύματος μεταφοράς 20X SSC. Τα φύλλα του διηθητικού χαρτιού εμποτίστηκαν με το διάλυμα μεταφοράς και η πηκτή τοποθετήθηκε ανεστραμμένη πάνω στα φύλλα Whattman. Στην επιφάνεια του πηγματος τοποθετήθηκε η nylon μεμβράνη και δύο φύλλα διηθητικού χαρτιού τα οποία εμβαπτίστηκαν σε διάλυμα μεταφοράς 20X SSC. Στην επιφάνεια των διηθητικών χαρτιών τοποθετήθηκαν πολλά στρώματα απορροφητικού χαρτιού και στην κορυφή ένα αντικείμενο βάρους 0,5 kg. Η μεταφορά από το πήγμα στη μεμβράνη πραγματοποιήθηκε με φαινόμενα ανοδικής τριχοειδούς μεταφοράς και ολοκληρώθηκε μετά από 16 ώρες περίπου. Η μεμβράνη στη συνέχεια εμβαπτίζεται σε διάλυμα 2X SSC και εκπλένεται για 5 λεπτά σε θερμοκρασία δωματίου με πολύ ήπια ανάδευση. Το φίλτρο τοποθετείται σε επιφάνεια διηθητικού χαρτιού και αφήνεται να στεγνώσει πλήρως. Αποθήκευση στους -4°C .

(γ) Μη ραδιενεργός υβριδισμός DNA-DNA

Η εταιρεία Roche έχει αναπτύξει μία μέθοδο μη ραδιενεργής σύνδεσης και ανίχνευσης του DNA. Στη μέθοδο αυτή χρησιμοποιείται η διγοξυγενίνη (ένα στεροειδές απτένιο) για την ιχνηθέτηση DNA και RNA. Ο μη ραδιενεργός υβριδισμός DNA-DNA σύμφωνα με το πρωτόκολλο της εταιρείας Roche βασίζεται στη δράση του τμήματος klenow της DNA πολυμεράσης I, που έχει δράση πολυμεράσης στη κατεύθυνση $5' \rightarrow 3'$, δράση εξωνουκλεάσης στη κατεύθυνση $3' \rightarrow 5'$, αλλά δεν έχει δράση εξωνουκλεάσης στη κατεύθυνση $5' \rightarrow 3'$. Το δίκλωνο μόριο του DNA αφού μετουσιωθεί και γίνει μονόκλωνο, με τη βοήθεια του τμήματος klenow της DNA πολυμεράσης I συντίθεται συμπληρωματικό DNA με αυτό του μονόκλωνου εκμαγείου. Για την έναρξη της αντιγραφής δίνονται από την εταιρεία εξανουκλεοτίδια, τα οποία συνδέονται με συμπληρωματικές αλληλουχίες των μονόκλωνων μορίων του DNA. Το ένζυμο της πολυμεράσης αναγνωρίζει αυτές τις

δίκλωνες περιοχές ως σημεία έναρξης του πολυμερισμού και αρχίζει να συνθέτει τη νέα αλυσίδα ενσωματώνοντας και το σημασμένο digoxigenine-11-dUTP.

Αυτή η μέθοδος υβριδισμού χρησιμοποιήθηκε και στην παρούσα εργασία και περιλαμβάνει τρία στάδια:

1. Σήμανση DNA ιχνηθέτη με digoxigenine-11-dUTP (Roche DIG-High Prime)

Ως DNA ιχνηθέτης χρησιμοποιείτε τμήμα από το μη κλωνοποιημένο υλικό της cDNA βιβλιοθήκης και η αντίδραση περιλαμβάνει βράσιμο για 10 λεπτά του μορίου το DNA ιχνηθέτη μεταφορά κατευθείαν σε πάγο και προσθήκη στο αποδιαταγμένο πλέον μόριο 4 μl από το μείγμα DIG-High Prime

2. Υβριδισμός του ιχνηθετιμένου DNA με το ακινητοποιημένο DNA στη νάλον μεμβράνη

Αρχικά πραγματοποιείται προϋβριδισμός, που περιλαμβάνει επώαση της μεμβράνης με διάλυμα προϋβριδισμού (20 ml διαλύματος προϋβριδισμού για 100 cm² μεμβράνης). Το στάδιο του προϋβριδισμού ολοκληρώνεται με επώαση της μεμβράνης με το παραπάνω διάλυμα, υπό περιστροφή, στους 68°C για 3 ώρες. Μετά την ολοκλήρωση του προϋβριδισμού αφαιρείται το διάλυμα και ακολουθεί ο υβριδισμός. Το διάλυμα υβριδισμού περιέχει το σημασμένο ανιχνευτή που έχει παρασκευαστεί. Το στάδιο του υβριδισμού πραγματοποιείται όπως προηγουμένως σε κλίβανο υβριδισμού στους 68°C για 18 ώρες. Μετά το τέλος του υβριδισμού, το φίλτρο ξεπλένεται αρχικά 2 φορές για 5 λεπτά (η κάθε πλύση) με 50 ml διαλύματος πλύσης I (βλέπε παράρτημα) και εν συνέχεια 2 φορές για 15 λεπτά (η κάθε πλύση) στους 68 °C με διάλυμα πλύσης II (βλέπε παράρτημα).

3. Ανίχνευση του υβριδίου με χρωμογόνο αντίδραση

Η μεμβράνη υφίσταται εκπλύσεις σε θερμοκρασία δωματίου αρχικά με το διάλυμα I για 1 λεπτό, στη συνέχεια για 30 λεπτά με διάλυμα II (0.5% w/v αντιδραστήριο αποκλεισμού σε διάλυμα I, παρασκευάζεται στους 50 °C -70 °C). Ακολουθεί έκπλυση με διάλυμα I για 1 λεπτό. Στη συνέχεια, παρασκευάζεται το διάλυμα με το αντίσωμα (antibody-conjugated solution) με διάλυση 4 μl του αντισώματος σε 20 ml διαλύματος I. Πραγματοποιήθηκε επώαση του φίλτρου με 20 ml διαλύματος με το αντίσωμα για 30 λεπτά και κατόπιν απομακρύνθηκε το μη συνεζευγμένο αντίσωμα με

πλύσεις με διάλυμα I, δύο φορές για 15 λεπτά. Η ανίχνευση του υβριδίου γίνεται με χρωμογόνο αντίδραση. Το φίλτρο εξισορροπήθηκε με το διάλυμα III (βλέπε παράρτημα). Στη συνέχεια, το φίλτρο επωάζεται στο σκοτάδι χωρίς ανάδευση με 10 ml χρωμογόνου διαλύματος. Όταν εμφανιστούν οι επιθυμητές ζώνες το φίλτρο ξεκπλένεται με 50 ml διαλύματος TE και αφήνεται να στεγνώσει.

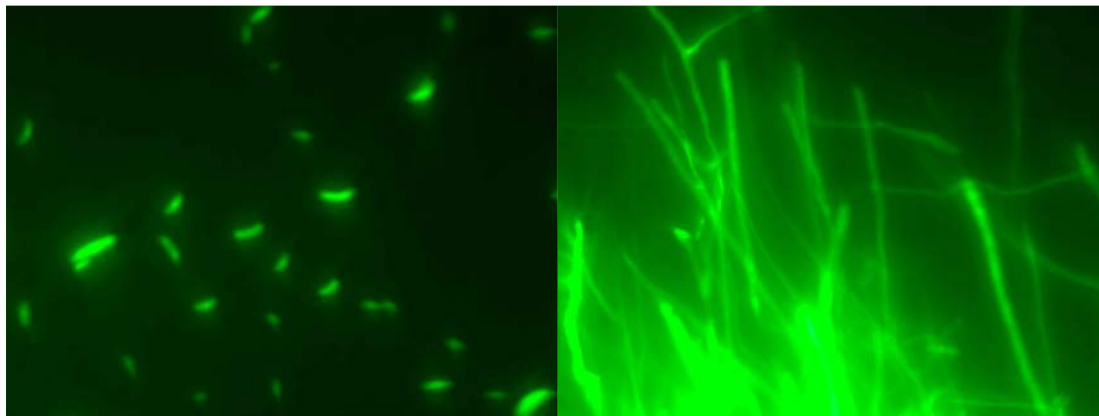
B.3.12 Επιλογή κλώνων και διαδικασία αλληλούχισης

Μετά και την ολοκλήρωση του υβριδισμού έγινε εκτίμηση των ζωνώσεων που υβριδίστηκαν στην μεμβράνη νιτρικής κυτταρίνης (με τον ιχνηθέτη για τα υπερεκφραζόμενα τμήματα από την cDNA βιβλιοθήκη) και επιλέχθηκαν οι κλώνοι οι οποίοι στάλθηκαν για να αλληλουχηθεί η ακολουθία που έφεραν στο πλασμίδιο τους, προσδοκώντας να ανακύψουν σημαντικά μόρια στην αλληλεπίδραση του μη παθογόνου στελέχους *Fusarium solani* και του φυτικού οργανισμού της τομάτας όσων αφορά την εγκαθίδρυση του μύκητα εντός του φυτικού ιστού αλλά και άλλων αποκρίσεων όπως η επαγωγή της φυτικής ανάπτυξης. Οι κλώνοι στάλθηκαν για αλληλούχιση στην εταιρία MacroGen (Κορέα). Και τα αποτελέσματα αναλύθηκαν σε βάσεις δεδομένων χρησιμοποιώντας τους αλγόριθμους (Blast /<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/>).

Γ. ΑΠΟΤΕΛΕΣΜΑΤΑ & ΣΥΖΗΤΗΣΗ

Γ.1 Αποτελέσματα από την μικροσκοπία φθορισμού

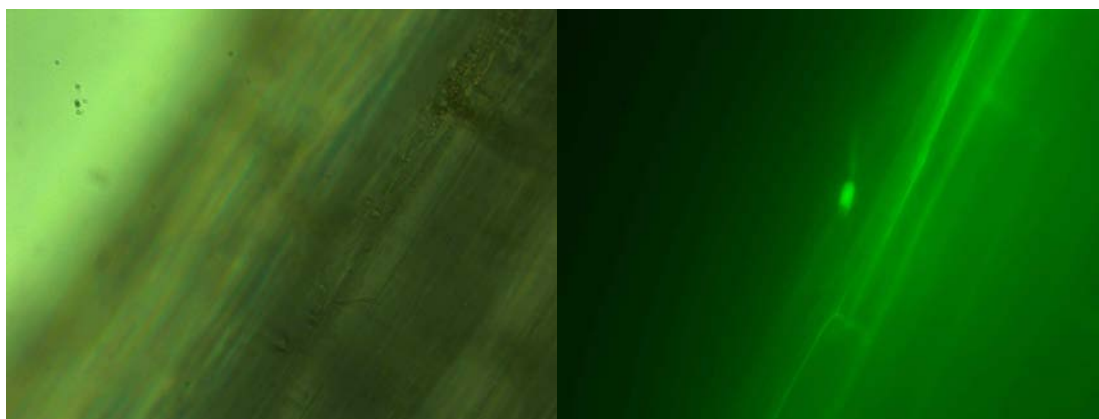
Κατά την διάρκεια των μικροσκοπικών παρατηρήσεων αποκομίσθηκαν πολλές χρήσιμες πληροφορίες για την πορεία και τον τρόπο αποικισμού του ριζικού συστήματος από τον μύκητα. Η παράθεση αυτών των συμπερασμάτων που αναλύεται παρακάτω έγινε βάση των χρονικών σημείων που έγιναν οι παρατηρήσεις.



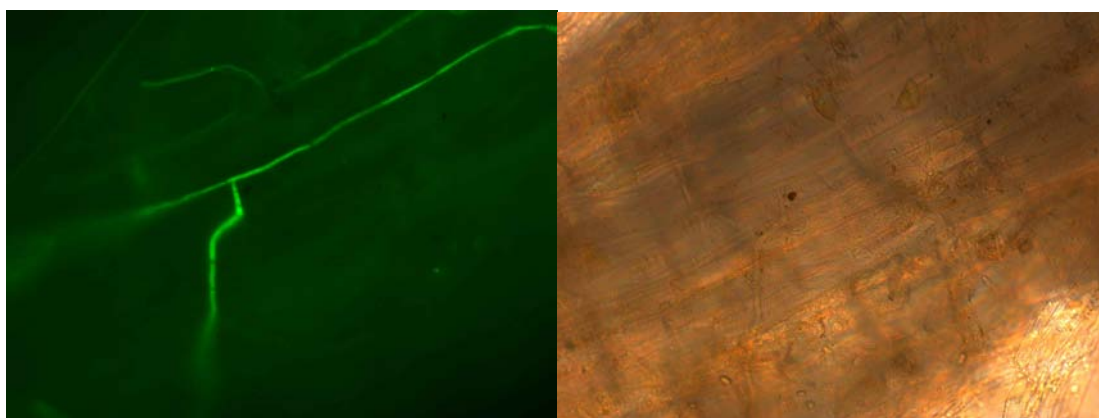
Εικ. 1. Κονίδια με τα οποία γίνεται ο εμβολιασμός των φυτών και υφές οι οποίες έχουν βλαστήσει. Η ικανότητα φθορισμού τους είναι ικανοποιητική δείγμα του επιτυχημένου μετασχηματισμού καθώς και της σταθερότητας στην έκφραση του χαρακτηριστικού στους απογόνους.

Γ.1.2 Παρατήρηση δειγμάτων 2, 4 και 6 ημέρες μετά των εμβολιασμό

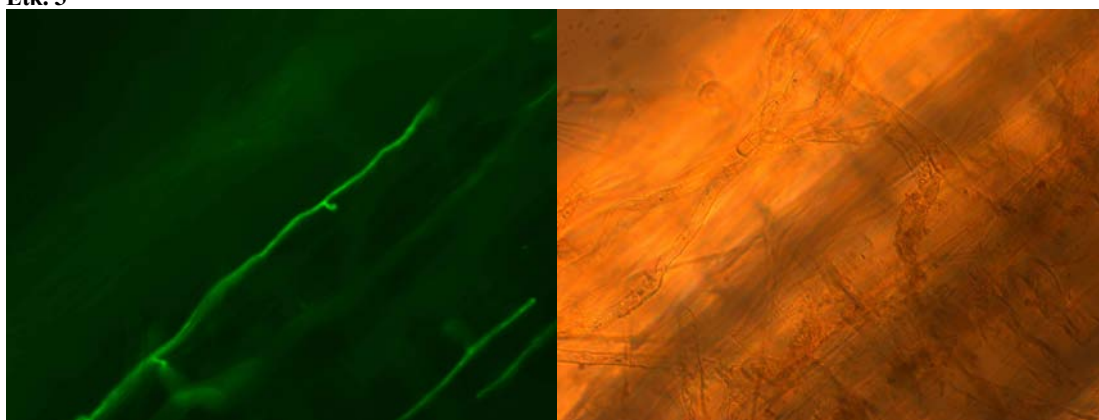
Στις μικροσκοπικές παρατηρήσεις των 2 και 4 ημερών μετά των εμβολιασμό εντοπίστηκε η προσκόλληση κονιδίων στον ιστό της ρίζας (Εικ 2) καθώς και η έναρξη βλάστησης υφών κατά μήκος των επιδερμικών κυττάρων (Εικ. 3, Εικ. 4). Θα μπορούσε να θεωρηθεί ότι αυτό το στάδιο είναι το στάδιο αναγνώρισης μεταξύ των δύο οργανισμών και προφανώς και η έναρξη σηματοδότησης και αντίδρασης του φυτού συμβαίνει σε αυτό το χρονικό σημείο. Την 6 ημέρα δειγματοληψίας και παρατήρησης διαπιστώθηκε πυκνή ανάπτυξη υφών, οι οποίες διατρέχουν την επιδερμίδα της ρίζας. Επίσης, δεν παρατηρήθηκε εντοπισμός σημείων εισόδου του μύκητα στη ρίζα σε συγκεκριμένη περιοχή της ρίζας.



Εικ. 2



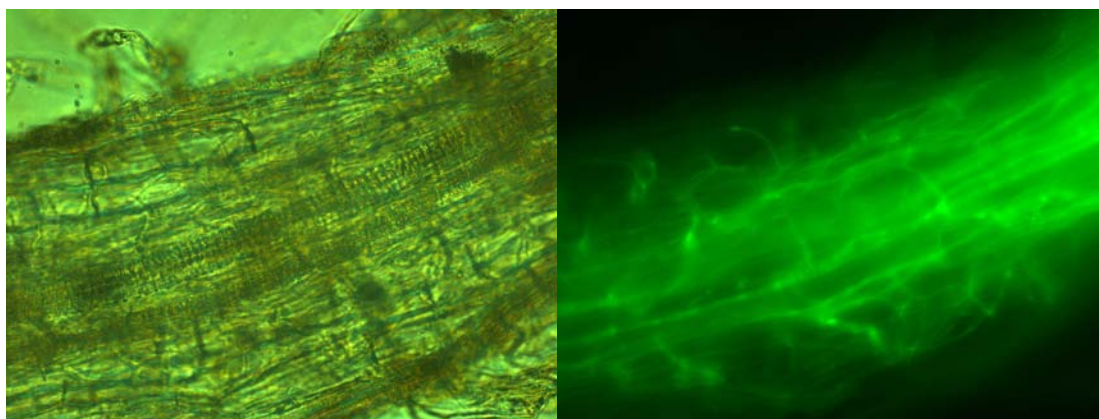
Εικ. 3



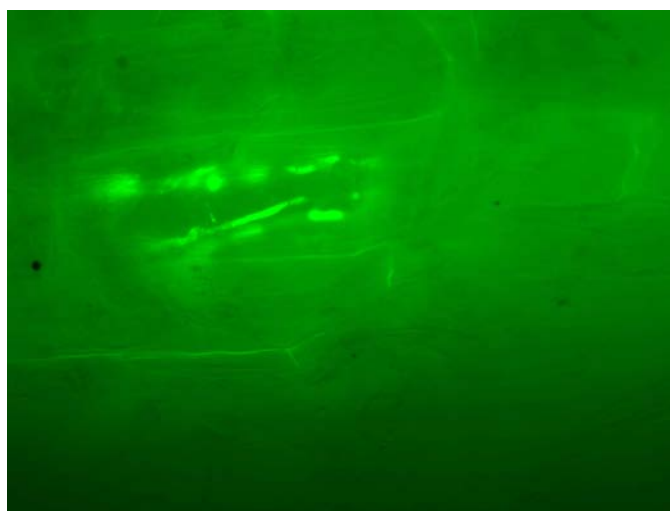
Εικ. 4

Γ.1.3 Παρατήρηση δειγμάτων 12, 18 και 23 ημέρες μετά των εμβολιασμό

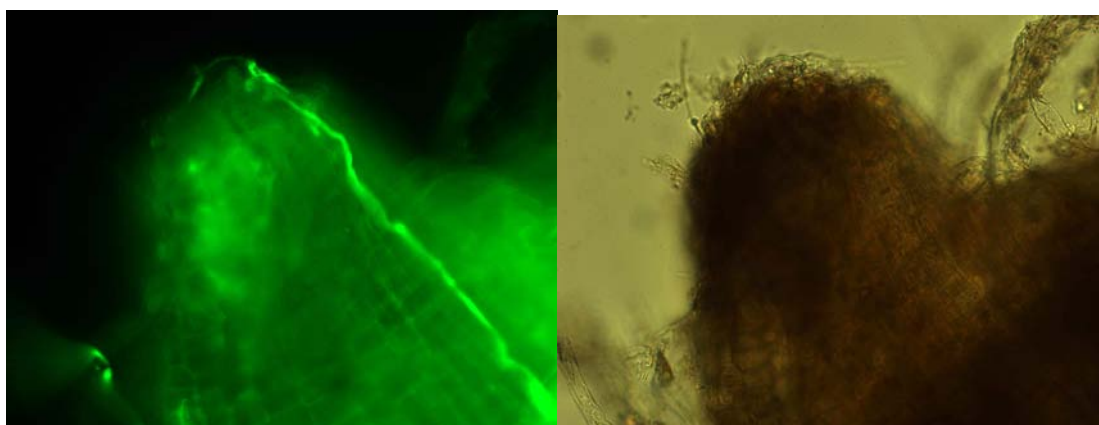
Στα δείγματα των 12, 18 και 23 ημερών η εικόνα ήταν πλέον πολύ διαφορετική και πιο ξεκάθαρη. Η εικόνα 5 δείχνει την εξάπλωση του μύκητα σε όλο το φλοιώδες παρέγχυμα και τις υφές να εξαπλώνονται κατά μήκος των περιθωρίων των κυττάρων. Οι επιπλέον εικόνες δείχνουν (Εικ. 5α) ενδοκυτταρική ανάπτυξη του μύκητα και (Εικ. 5β) εξάπλωση μέχρι το άκρο των πλαγίων ριζών (σε αντίθεση ποτέ δεν παρατηρήθηκε είσοδος ή εξάπλωση του μύκητα στο άκρο της κύριας ρίζας).



Εικ. 5



Εικ. 5α

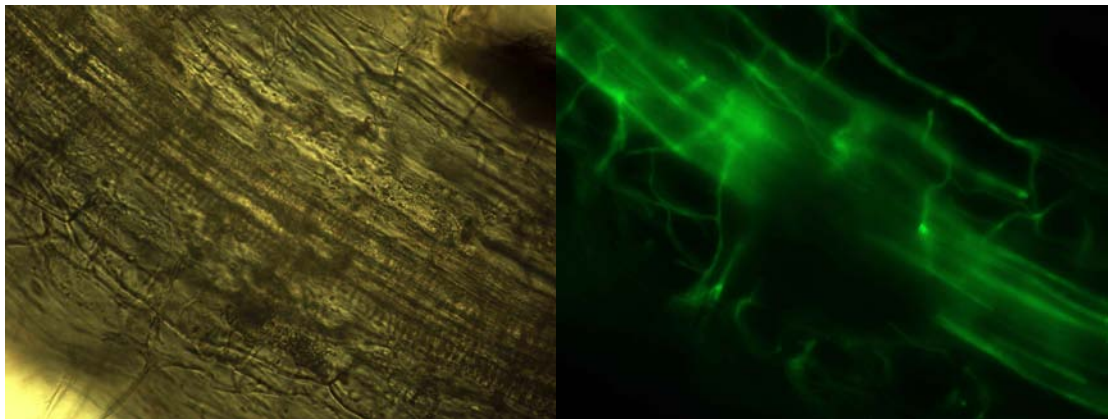


Εικ. 5β

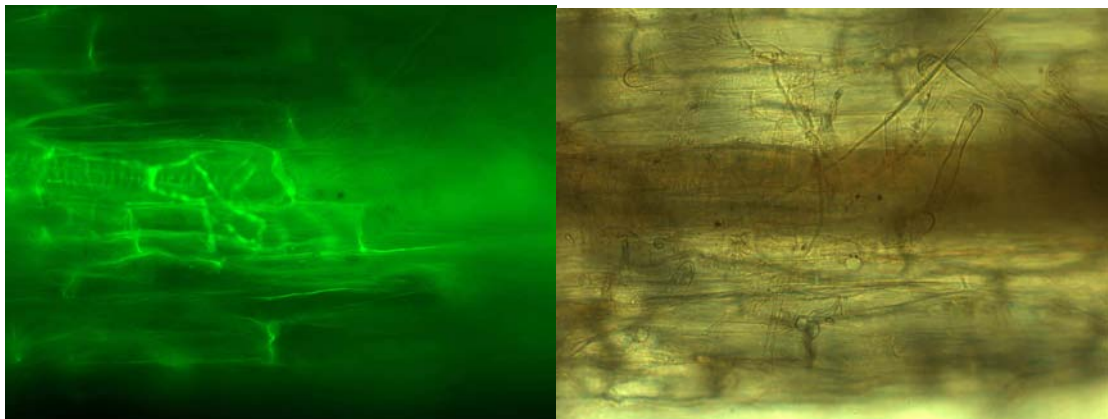
Παρατηρήθηκε διάτρηση των επιδερμικών κυττάρων (Εικ. 6, Εικ. 7), όπως και αναπαραγωγικές δομές του μύκητα (κονίδια) εντός της ρίζας (Εικ. 8).

Εντυπωσιακό ήταν επίσης το φαινόμενο της εισχώρησης των υφών εντός του αγγειακού συστήματος του φυτού (Εικ. 9), κάτι που εντοπίζεται έντονα στους παθογόνους μύκητες της ριζόσφαιρας (Δευτερομύκητες), καθώς και η πλήρη ανεκτικότητα που δείχνει το φυτό σε έναν άλλο οργανισμό που το αποικίζει τόσο ολοκληρωτικά (Εικ. 10), χωρίς μάλιστα την εμφάνιση οποιουδήποτε συμπτώματος.

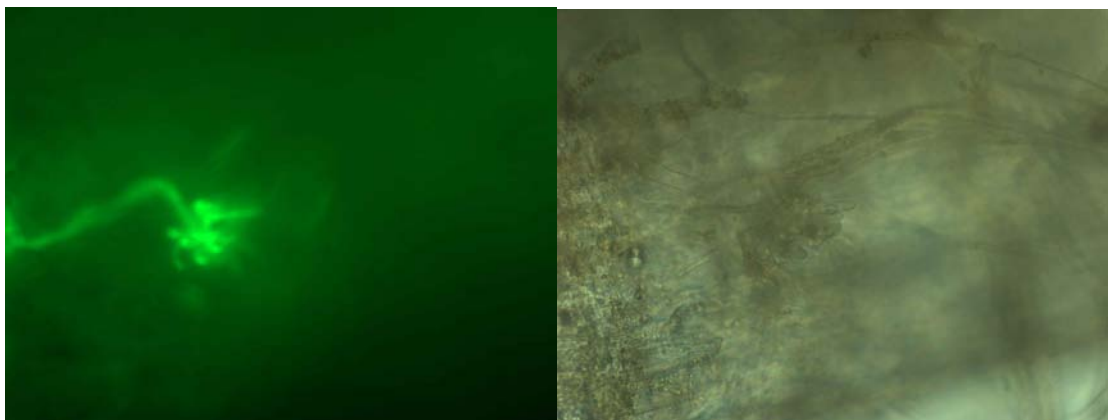
Επίσης τα σημεία εισόδου εντός της ρίζας δεν φαίνονται να σχετίζονται με την περιοχή της καλύπτρας και με τα ριζικά τριχίδια, και από ότι φαίνεται βασιζόμενοι και σε άλλα πειραματικά δεδομένα ο μύκητας εξέρχεται από της ρίζες του φυτού ίσως για ανεύρεση χώρου και επιπλέον θρεπτικών στοιχείων (Εικ. 11).



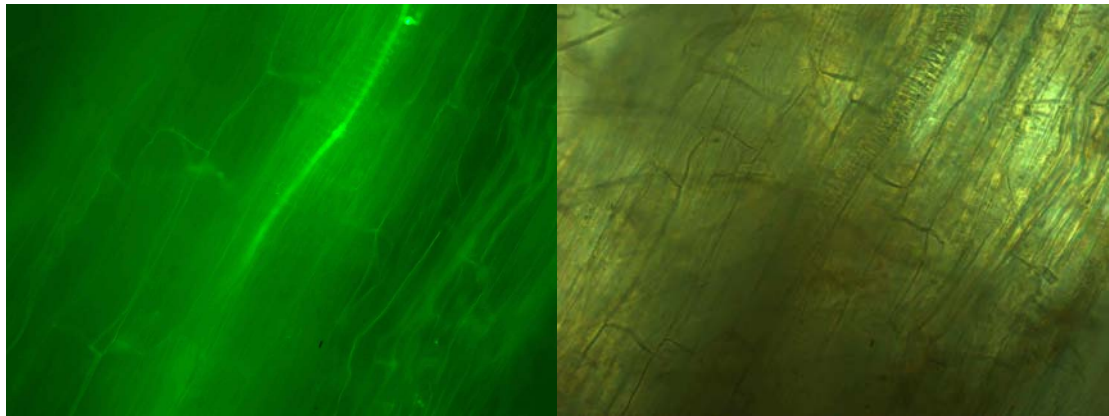
Εικ. 6



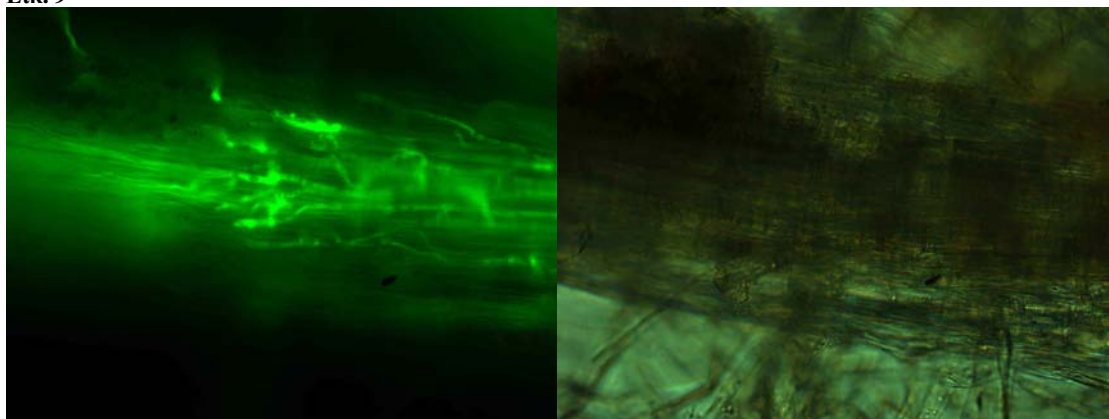
Εικ.7



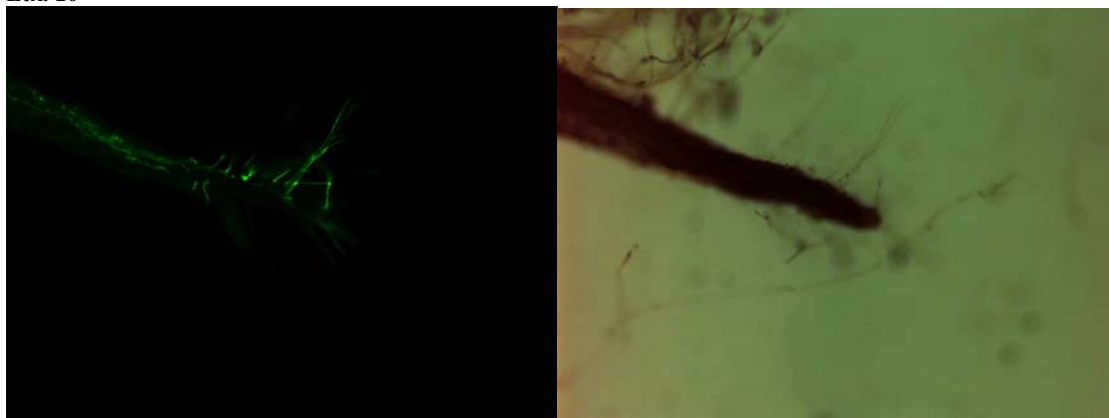
Εικ. 8



Εικ. 9



Εικ. 10



Εικ. 11

Γ.1.4 Ο μύκητας Fs-K και ο εν δυνάμει ενδοφυτικός του χαρακτήρας

Βάση των αποτελεσμάτων από τις μικροσκοπικές παρατηρήσεις και σε σύγκριση με την παρούσα βιβλιογραφία το συμπέρασμα το οποίο προκύπτει είναι ότι στο μυκητιακό στέλεχος *Fusarium solani* πλέον είναι ξεκάθαρος ο ενδοφυτικός του χαρακτήρας, κάτι που παρατηρείται έντονα στις μυκόρριζες και σε άλλους μύκητες όπως η *Piriformora*, η *Alternaria* και μύκητες του γένους *Penicillium* (Stone *et al.*, 2004; Waller *et al.*, 2005). Επίσης η πορεία του αποικισμού φαίνεται να προχωρά από την επιδερμίδα προς το αγγειακό σύστημα, γεγονός που αναδεικνύει ένα επιτυχημένο σύστημα μεταφοράς του μυκητιακού σώματος εντός των φυτικών κυττάρων χωρίς

κάποια εμφανή εξειδίκευση στον τύπο των κυττάρων. Στις περισσότερες βιβλιογραφικές αναφορές η ενδοσυμβίωση μεταξύ παρόμοιων οργανισμών με τον υπό εξέταση μύκητα χαρακτηρίζεται από αμοιβαιότητα των συμβαλλομένων (μύκητας – φυτό) ως προς τα οφέλη (Zimand *et al.*, 1996). Οι μυκόρριζες προσλαμβάνουν υδατάνθρακες από το φυτό, εξασφαλίζοντας του αυξητικές ορμόνες και ανόργανα στοιχεία (ο φώσφορος αποτελεί ένα από τα κύρια στοιχεία που αποκομίζει το φυτό). Ορισμένοι φυτικοί οργανισμοί ολοκληρώνουν πιο επιτυχημένα τον βιολογικό τους κύκλο χάρη σε αυτή την συμβίωση, όπως στην περίπτωση ενός είδους γρασιδιού (*Festuca arundinacea*) το οποίο εξαιτίας του μονίμως αποικισμένου του ιστού από το μύκητα *Neotyphodium coenophialum*, παράγει στους ιστούς του τοξικά αλκαλοειδή (Bacon *et al.*, 1977), τα οποία όμως του προσδίδουν αυξημένη αντοχή έναντι των βιοτικών και αβιοτικών καταπονήσεων (Schardl *et al.*, 2004).

Οι ενδοφυτικοί μύκητες αποικίζουν τα φυτά χωρίς σημάδια προσβολής και στη φύση δεν υπάρχουν γνωστοί φυτικοί οργανισμοί, ο οποίοι να μην αναπτύσσουν τέτοιες συμβιωτικές σχέσεις. Η παραλλακτικότητα όμως που υπάρχει ανάμεσα στους ενδοφυτικούς μύκητες όσον αφορά το είδος της συμβιωτικής σχέσης που αναπτύσσετε είναι μεγάλη (Zabalgoageazcoa, 2008). Όπως στην περίπτωση του *Pythium oligandrum* ο οποίος είναι ένας σαπροφυτικός ωομύκητας και για να τραφεί χρησιμοποιεί το περιεχόμενο των υφών στις οποίες διεισδύει, καθώς και εκκρίματα των ριζών στις οποίες προσκολλάται (Bro Ova *et al.*, 2002). Τα οφέλη για το φυτό είναι η προαγωγή της ανάπτυξης του μέσω του άμεσου ελέγχου που ασκεί στην περιοχή της ριζόσφαιρας ή και με έμμεσο τρόπο επάγοντας μηχανισμούς διασυστηματικής προστασίας των φυτών (Le Floch *et al.*, 2003). Επίσης η *Piriformospora indica* χάρη στη ενδοφυτική σχέση που αναπτύσσει με τα φυτά μπορεί να εξασφαλίζει σε αυτά αντοχή σε συνθήκες υψηλής αλατότητας καθώς και να προάγει την ανάπτυξή τους (Waller *et al.*, 2005). Ακόμα παρατηρείται το φαινόμενο μερικοί ενδοφυτικοί μύκητες να μπορούν να αποικίσουν ένα μεγάλο αριθμό ξενιστών (π.χ. μυκόρριζες), όπως επίσης και ο αποικισμός τους να περιορίζεται σε κάποια ελάχιστα είδη μόνο. Για παράδειγμα τα είδη του μύκητα *Neotyphodium* είναι οργανισμοί που συνυπάρχουν με τους ξενιστές τους από το στάδιο του σπόρου (έχουν αποικίσει τους σπόρους από το μητρικό φυτό) και η συνεξέλιξη τους με τα διάφορα είδη γρασιδιού θεωρείται πλέον κάτι δεδομένο σύμφωνα με φυλογεννητικές μελέτες. Αποτελούν, δε, τα πιο μελετημένα είδη ενδοφυτικών οργανισμών εξαιτίας του χαρακτηριστικού τους αυτού. Επίσης,

υπάρχουν είδη γρασιδιού που συσχετίζονται με παραπάνω από εκατό περιπτώσεις ενδοφυτικών αλληλεπιδράσεων με μύκητες (Sánchez Márquez *et al.*, 2007) και ίσως για άλλους φυτικούς οργανισμούς το νούμερο αυτό να είναι ακόμα μεγαλύτερο (Arnold *et al.*, 2000; Stone *et al.*, 2004).

Ως προς τον αποικισμό των επιμέρους φυτικών τμημάτων και την προτίμηση που μπορεί να δείξει ένας ενδοφυτικός μύκητας είναι γνωστό ότι υπάρχει μεγάλη ποικιλομορφία. Μερικοί ενδοφυτικοί μύκητες περιορίζονται μόνο σε ορισμένα μέρη του φυτού. Αυτό έχει παρατηρηθεί σε δείγματα που έχουν ληφθεί από το φυσικό περιβάλλον, κάτι που ίσως εν μέρει ισχύει λόγω του ανταγωνισμού των ενδοφυτικών οργανισμών για χώρο εντός του φυτικού σώματος. Για παράδειγμα, είδη του γένους *Neotyphodium* και *Epichloë* έχει αποδειχθεί ότι αποικίζουν συστηματικά τον ενδοκυτταρικό χώρο των φύλλων, τους βλαστούς που φέρουν αναπαραγωγικά όργανα αλλά και τους σπόρους των ξενιστών τους, αλλά έχουν καταγραφεί και είδη που αναβρίσκονται μόνο στις ρίζες ή στα φύλλα (Stone *et al.*, 2004).

Ακόμα ποικιλομορφία εμφανίζεται μεταξύ των ενδοφυτικών μυκήτων στον τρόπο με τον οποίο μπορούν να παρεμβάλουν τη δράση τους μεταξύ των αλληλεπιδράσεων φυτών και παθογόνων. Πολλοί μηχανισμοί έχουν αναφερθεί στον τομέα αυτό όπως η επαγωγή μηχανισμών άμυνας, παραγωγή αντιβιοτικών ουσιών (Strobel, 2002; Schulz and Boyle, 2005; Wang *et al.*, 2007), και ο ανταγωνισμός για χώρο και θρεπτικά στοιχεία. Ορισμένοι ενδοφυτικοί μύκητες μπορούν επίσης να παρασιτούν έναντι άλλων μυκήτων όπως στην περίπτωση του *Acremonium strictum* ο οποίος απομονώθηκε από ένα είδος γρασιδιού (*Dactylis glomerata*) (Sánchez Márquez *et al.*, 2007), και μπορεί να παρασιτήσει τον μύκητα *Helminthosporium solani* ο οποίος είναι ένα παθογόνο της πατάτας (Rivera Varas *et al.*, 2007). Επίσης υπάρχουν αναφορές για σαπροφυτικούς μύκητες, οι οποίοι συνήθως εντοπίζονται σε γηραιότερα μέρη του φυτού αλλά εντοπίστηκαν σε νεότερα μέρη χωρίς σημάδια ασθένειας και απομονώθηκαν ως ενδοφυτικοί (Promputtha *et al.*, 2007).

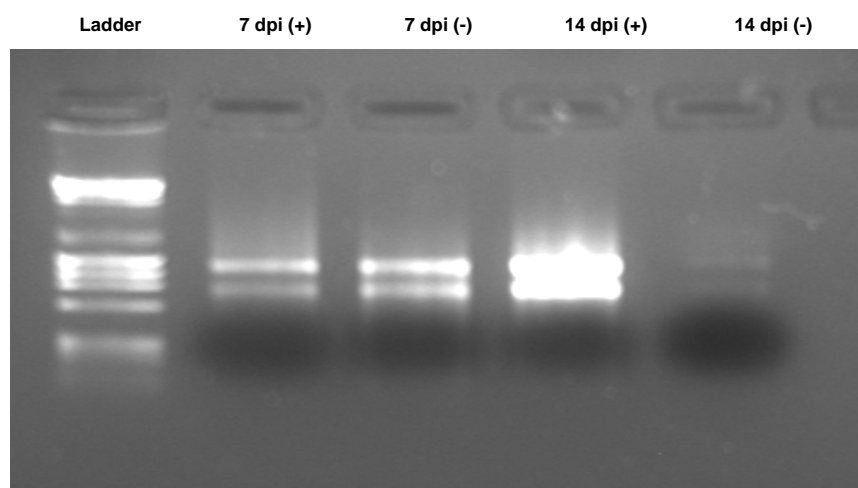
Όπως πάντως αποδεικνύεται με τα μέχρι τώρα γνωστά ευρήματα στον χώρο των ενδοφυτικών μυκήτων η εισβολή και ο αποικισμός του φυτού από αυτούς τους οργανισμούς δεν συνδέεται με την παθογένεια. Οι παράγοντες που καθορίζουν την εξέλιξη του αποικισμού ενός φυτού από έναν μύκητα σε ασθένεια ή ευημερία του φυτού ξενιστή δεν είναι πλήρως γνωστοί, σίγουρα όμως τα οφέλη από την διερεύνηση αυτών των αλληλεπιδράσεων και των μηχανισμών που τους διέπουν

μπορούν να φανούν εξαιρετικά χρήσιμα, όχι μόνο για την ακαδημαϊκή γνώση αλλά και για την εφαρμοσμένη γεωργία.

Γ.2 Αποτελέσματα από την αφαιρετική βιβλιοθήκη- cDNA Subtraction

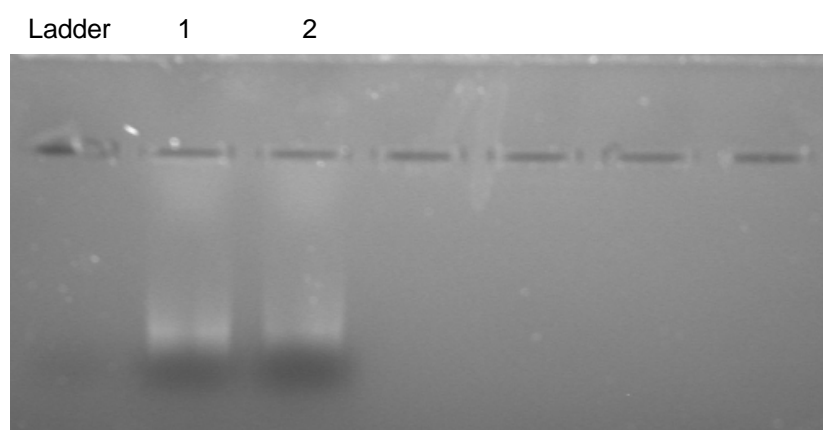
Κατά την διαδικασία κατασκευής της αφαιρετικής βιβλιοθήκης όπως έχει ήδη αναφερθεί οι μοριακές τεχνικές που ακολουθήθηκαν ήταν η απομόνωση ολικού RNA, η απομόνωση Poly-A RNA από ολικό RNA, το πρωτόκολλο σύνθεσης της αφαιρετικής βιβλιοθήκης με τα επιμέρους τμήματα, δηλαδή σύνθεση μονόκλωνης αλυσίδας cDNA, σύνθεση δίκλωνης αλυσίδας cDNA, πέψη με την ενδονουκλεάση περιορισμού Rsa I, σύνδεση των προσαρμογέων (adaptors), πρώτος υβριδισμός, δεύτερος υβριδισμός, κλωνοποίηση των τμημάτων της αφαιρετικής βιβλιοθήκης και τέλος η επιλογή των κλώνων και η αλληλούχιση τους. Στην ενότητα αυτή γίνεται αναφορά των αποτελεσμάτων αλλά και των κριτηρίων με τα οποία πιστοποιήθηκε η καλή ποιότητα της βιβλιοθήκης μας. Οι προσδοκώμενες αλληλουχίες γονιδίων που αναμενόταν να προκύψουν από την cDNA βιβλιοθήκη δυνητικά θα έπρεπε να περιλαμβάνουν γονίδια τα οποία εμπλέκονται στη σηματοδότηση του φυτού κατά τον αποικισμό του και ίσως γονίδια επαγωγής της ανάπτυξης της φυτικής μάζας ή της επαγωγής άμυνας του φυτού. Οι βάσεις δεδομένων που χρησιμοποιήθηκαν για την ανάλυση των αλληλουχιών ήταν η NCBI και η MiBase (ειδική βάση για την τομάτα). Για την εύρεση της ομολογίας των αλληλουχιών χρησιμοποιήθηκε το πρόγραμμα αλγορίθμων Basic Local Alignment Search Tool programme (BLAST; <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/BLAST>).

Το RNA από τους ιστούς της ρίζας ηλεκτροφορήθηκε σε πηκτή αγαρόζης (διαγνωστικά) για να εξακριβωθεί η ποιότητα του (ενδεικτικά Εικ. 12). Η εικόνα των δειγμάτων από την απομόνωση για τις 21 ημέρες και για τις δύο ομάδες κρίθηκε επίσης ικανοποιητική.



Εικ. 12. Απομόνωση ολικού RNA για τις δύο ομάδες χειρισμών (παρουσία +, απουσία -, του στελέχους) από τις 7 και 14 ημέρες

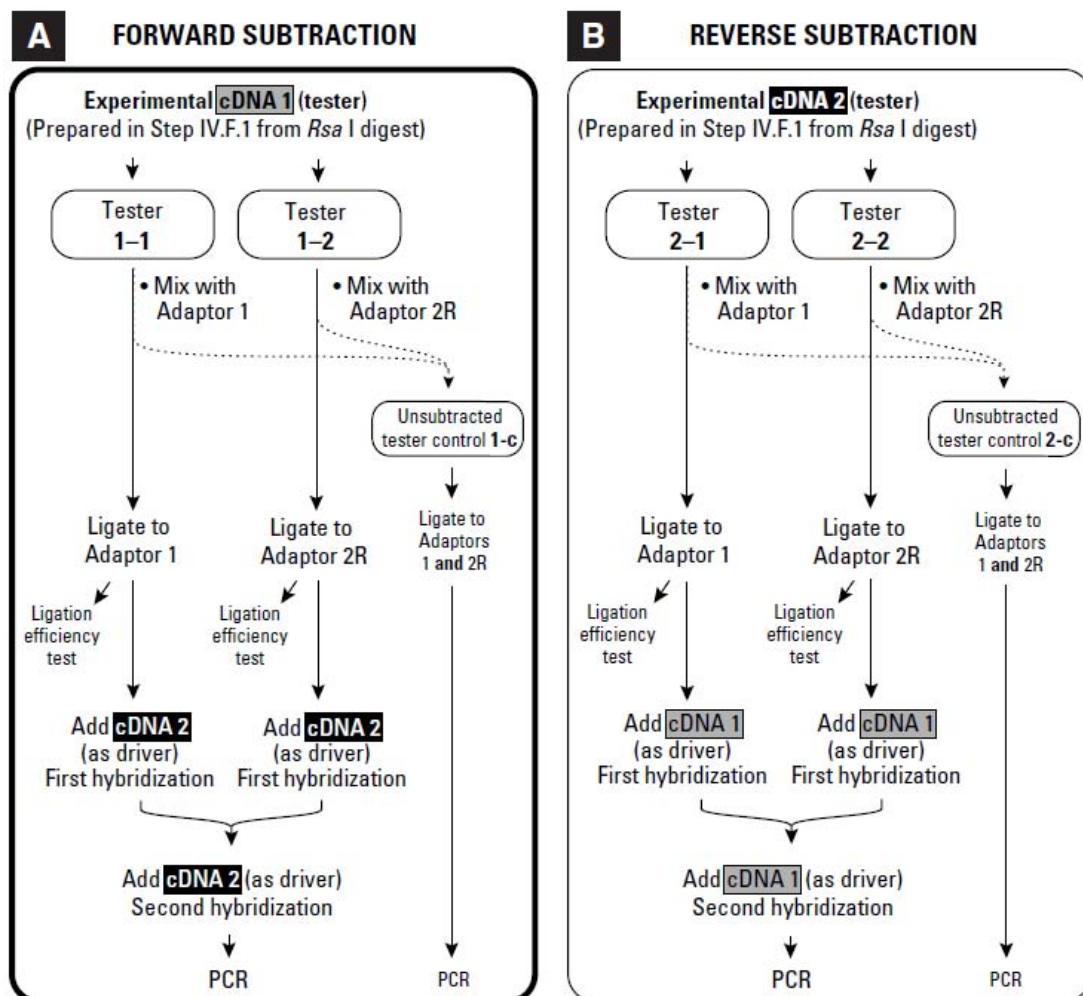
Πριν την απομόνωση του Poly-A RNA έγινε ποσοτικοποίηση και ανάμειξη των 3 δειγματοληψιών (7, 14 και 21 ημέρες μετά τον εμβολιασμό) για κάθε μία από τις 2 ομάδες χειρισμών (παρουσίας και απουσίας του μη παθογόνου στελέχους *Fusarium solani*) καθώς και η προσθήκη RNA από τον μύκητα στο δείγμα που θα αποτελούσε τον οδηγό (driver, σύμφωνα με το πρωτόκολλο της αφαιρετικής βιβλιοθήκης). Για να καθοριστεί επίσης η ποιότητα του Poly-A RNA των δειγμάτων ακολούθησε ηλεκτροφόρηση σε πηκτή αγαρόζης (Εικ. 13) και φωτομέτρηση.



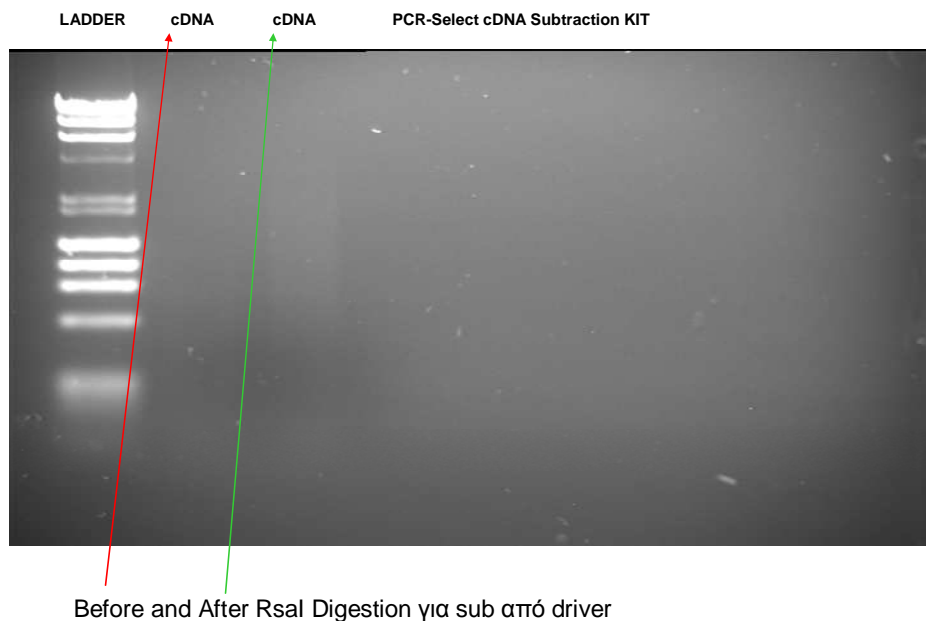
Εικ. 13. Ηλεκτροφόρηση του Poly-A RNA για τον οδηγό (driver, 1) και τον ελεγκτή (tester, 2)

Το επόμενο βήμα ήταν η κατασκευή της αφαιρετικής βιβλιοθήκης (Εικ. 14). Μέσω αυτής της τεχνικής είναι εφικτή η σύγκριση δυο πληθυσμών m-RNA και η ανάκτηση γονιδίων που εκφράζονται μόνο στον ένα πληθυσμό αλλά όχι στον άλλο. Αν και υπάρχουν διάφορες τεχνικές για την κατασκευή μια αφαιρετικής βιβλιοθήκης

η βασική θεωρία είναι ίδια για όλες. Αρχικά οι δύο υπό εξέταση νουκλεοτιδικές μήτρες (m-RNA)(tester και driver) μετατρέπονται σε cDNA και στην συνέχεια υβριδίζονται. Τα υβριδισμένα τμήματα που είναι ένδειξη της παρουσίας αυτών των γονιδίων και στους δύο πληθυσμούς αφαιρούνται έτσι ώστε να μείνουν μόνο τα τμήματα της διαφορικής έκφρασης. Πιο συγκεκριμένα μετά την κατασκευή του cDNA μορίου για τον οδηγό και τον ελεγκτή. Ακολουθεί μια πέψη με την ενδονουκλεάση περιορισμού Rsa I και στους δύο πληθυσμούς (Εικ. 15) για να δημιουργηθούν τυφλά άκρα έτσι να γίνει η σύνδεση των προσαρμογέων. Μετά το σημείο αυτό ο ελεγκτής χωρίζεται σε δύο κλάσματα στα οποία ακολουθεί σύνδεση με 2 διαφορετικούς προσαρμογείς (adaptor ligation)(η αλληλουχία των προσαρμογέων αναγράφεται στο παράρτημα) για το κάθε κλάσμα. Το ένα άκρο από τον κάθε προσαρμογέα δεν περιέχει φωσφορική ομάδα έτσι ώστε να προσδέεται μόνο η μία αλυσίδα του στο 5' άκρο του cDNA μορίου του ελεγκτή. Στον οδηγό δεν γίνεται σύνδεση με προσαρμογέα.

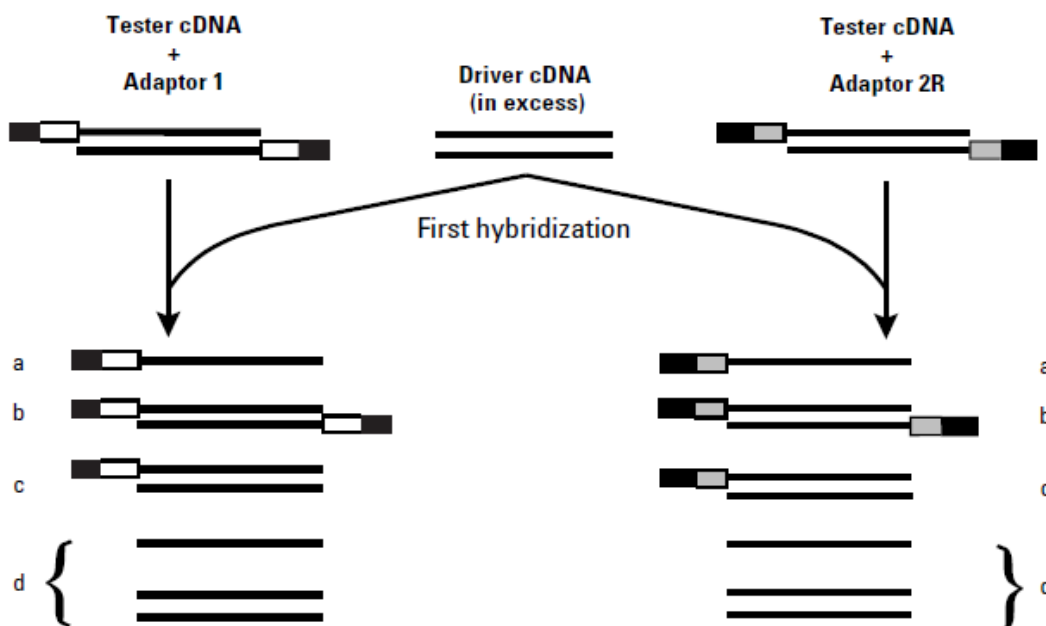


Εικ. 14. Διαδικασία κατασκευής της αφαιρετικής βιβλιοθήκης



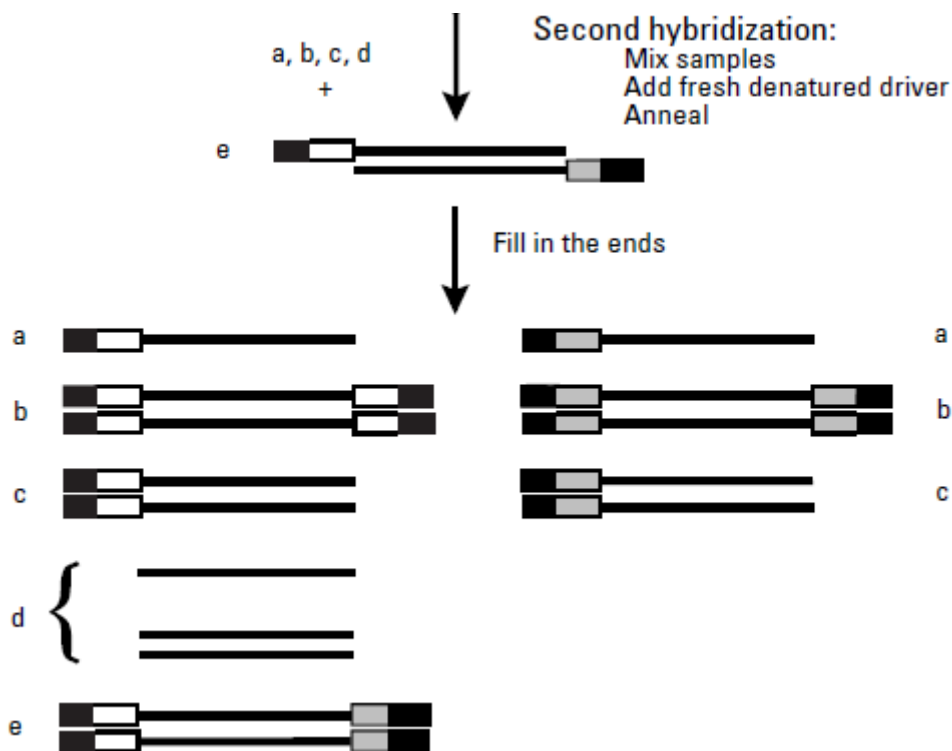
Εικ. 15. Πέψη με την ενδονουκλεάση περιορισμού Rsa I για τον οδηγό

Έπειτα ακολουθούν δυο αντιδράσεις υβριδισμού. Στον πρώτο προσθέεται περίσσεια από το cDNA του οδηγού σε κάθε κλάσμα του ελεγκτή και ύστερα τα δείγματα αποδιατάσσονται με θέρμανση και ακολουθεί η υβριδοποίηση τους. Τα μόρια που προκύπτουν ανήκουν σε 4 κατηγορίες a,b,c και d (Εικ. 16).



Εικ. 16. Τα μόρια που προκύπτουν από τον πρώτο υβριδισμό

Η πληθώρα των μικρο- και μακρο- μοριακών δομών τύπου a εξισορροπείται πιο γρήγορα κατά την διάρκεια του υβριδισμού λόγω του μεγάλου αριθμού τους σύμφωνα με δεύτερο κανόνα της κινητικής του υβριδισμού (Nucleic Acid Hybridization, ed. by James & Higgins, 1985). Επίσης τα τμήματα a είναι πλέον σαφώς ενισχυμένα όσον αφορά την διαφορική έκφραση, ενώ τα τμήματα τα οποία δεν μετέχουν στην διαφορική έκφραση σχηματίζουν μόρια του τύπου c. Κατά τον δεύτερο υβριδισμό τα δύο κλάσματα αναμειγνύονται χωρίς να αποδιαταχθούν έτσι ώστε μόνο τα εναπομείναντα διαφορικά μονόκλινα κλάσματα να μπορούν να ενωθούν δίνοντας μόρια του τύπου e (Εικ. 17) που είναι και τα επιθυμητά. Τα υβρίδια τύπου e είναι τα δίκλινα τμήματα του ελεγκτή με τα άκρα των δύο διαφορετικών προσαρμογών και τα τμήματα της διαφορικής έκφρασης σε σχέση με τον οδηγό.

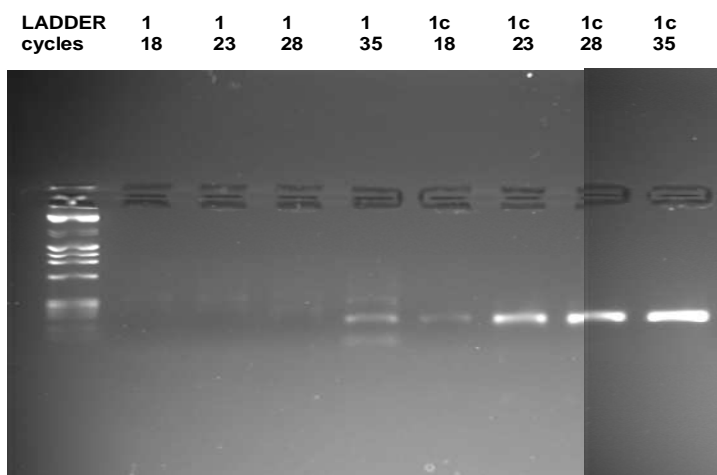


Εικ. 17. Διαδικασία δεύτερου υβριδισμού, με την δομή του επιθυμητού υβριδίου e κατά την κατασκευή της αφαιρετικής βιβλιοθήκης έχοντας ενσωματώσει στο μόριο του τους δύο προσαρμογείς

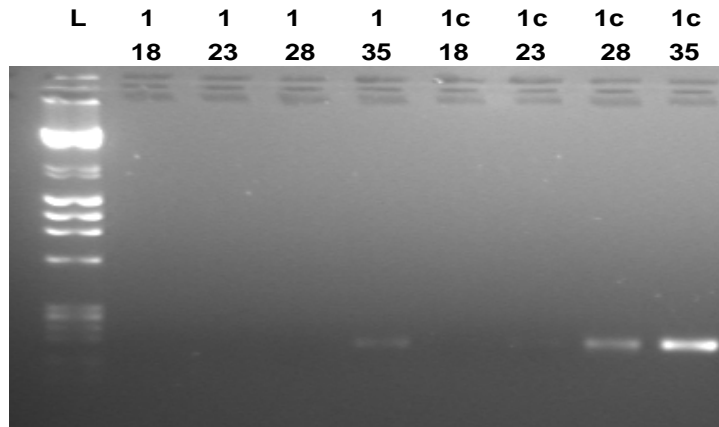
Κατόπιν όλα τα μόρια υπόκεινται σε δύο αλυσιδωτές αντιδράσεις της πολυμεράσης, στην πρώτη αντίδραση κλωνοποιούνται μόνο τα επιθυμητά υβρίδια τύπου e κλωνοποιούνται επαρκώς, ενώ τα μόρια τύπου a και d χάνουν τη θέση υβριδισμού του εκκινητή και δεν μπορούν να πολλαπλασιάσουν περαιτέρω και οι περισσότερες δομές b απλά αποδιατάσσονται και επανασυνδέονται μη μπορώντας να κλωνοποιηθούν. Τέλος οι δομές τύπου c έχουν μόνο μια θέση υβριδισμού του

εκκινητή και κλωνοποιούνται σαν δακτύλιοι. Η δεύτερη αλυσιδωτή αντίδραση της πολυμεράσης πραγματοποιείται με τους Nested εκκινητές (βλέπε παράρτημα) για να μειωθεί όσο το δυνατόν περισσότερο οποιοδήποτε κατάλοιπο μη επιθυμητών δομών και για να αυξηθούν τα τμήματα της διαφορικής έκφρασης που είναι και το ζητούμενο.

Στην πειραματική προσέγγιση της παρούσας εργασίας κατασκευάστηκαν δύο αφαιρετικές βιβλιοθήκες (Subtraction Library 1- SL1 και Subtraction Library 2-SL2), για να εξακριβωθεί η αποτελεσματικότητα τους προτείνεται ένα έλεγχος (με ένα σταθερά εκφραζόμενο και συντηρημένο γονίδιο (housekeeping). Το γονίδιο που επιλέχθηκε για τον έλεγχο αυτό ήταν η ουβικουτίνη. Βάση αυτής της διαδικασίας ελέγχεται το cDNA (του ελεγκτή) πριν και μετά από την απομάκρυνση των μη διαφορικών τμημάτων. Ειδικότερα ο μάρτυρας (control) περιελάμβανε δείγμα του DNA πριν την σύνδεση των προσαρμογέων και ο ελεγκτής δείγμα μετά την κατασκευή της βιβλιοθήκης (μετά και την δεύτερη αντίδραση της πολυμεράσης). Η εξαγωγή 5μl από την αντίδραση στους 18, 23, 28 και 35 κύκλους και η ηλεκτροφόρηση τους σε πηχτή αγαρόζης θα έδειχνε και το πρότυπο της έκφρασης. Περιμένοντας στον ελεγκτή να ανιχνεύσουμε πολύ μικρή η μηδαμινή έκφραση της ουβικουτίνης κάτι που επαληθεύτηκε και για της δύο βιβλιοθήκες (Εικ. 18, Εικ. 19).

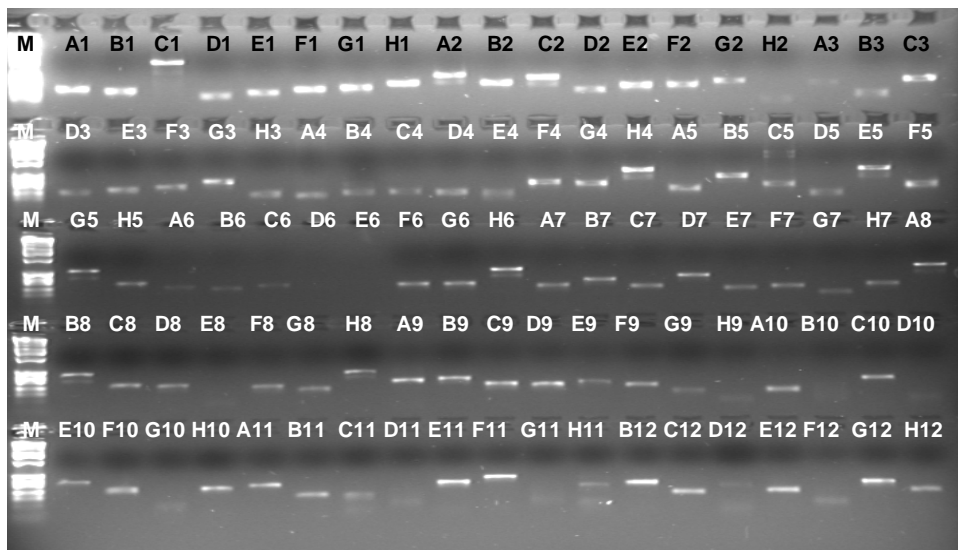


Εικ. 18. PCR Analysis of Subtraction Efficiency για την S.L 1 (1 - cDNA μόριο κατόπιν της αφαίρεσης των μη διαφορικών τμημάτων, 1c – cDNA μόριο πριν την αφαίρεση των διαφορικών τμημάτων)



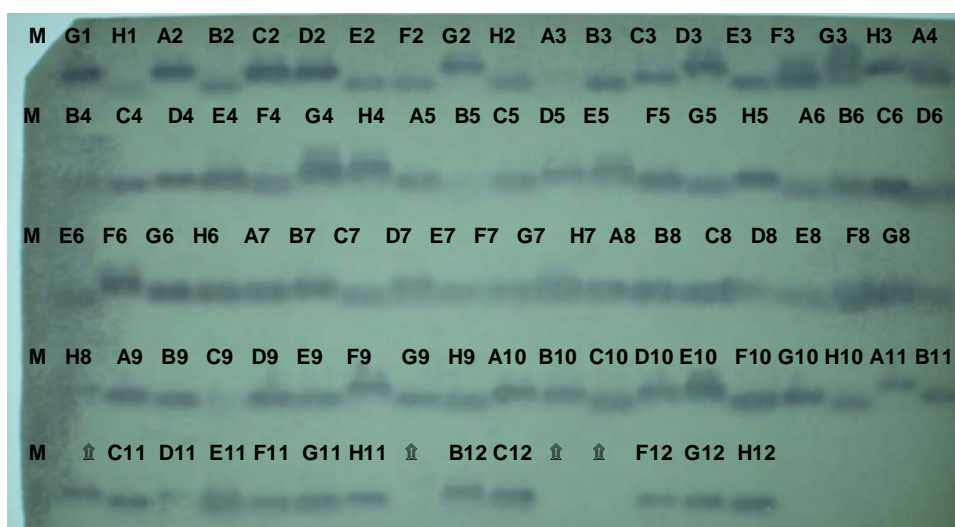
Εικ. 19. PCR Analysis of Subtraction Efficiency για την S.L 2 (1 - cDNA μόριο κατόπιν της αφαίρεσης των μη διαφορικών τμημάτων, 1c – cDNA μόριο πριν την αφαίρεση των διαφορικών τμημάτων)

Αφού όντως η εγκυρότητα των δύο cDNA αφαιρετικών βιβλιοθηκών κρίθηκε ικανοποιητική το επόμενο βήμα περιλάμβανε υποκλωνοποίηση σε φορέα ένθεσης (pGEM T-Easy Vector από την εταιρία Promega) απευθείας του cDNA μορίου μετά και τη δεύτερη αλυσιδωτή αντίδραση της πολυμεράσης. Τα πολλά μικρομοριακά τμήματα που προέκυπταν ενσωματώνονταν στους πλασμιδιακούς φορείς και ύστερα ακολουθούσε η εισαγωγή του φορέων (transformation) στα επιδεικτικά κύτταρα. Το σύστημα για την επιλογή των μετασχηματισμένων αποικιών (β-γαλακτοσιδάσης) του φορέα ένθεσης έκανε εφικτή την γρήγορη επιλογή των κλώνων. Για να γίνει η μαζική επιλογή των κλώνων οι οποίοι θα στέλνονταν για αλληλούχιση έπρεπε να διαπιστωθεί αφενός η παρουσία του ενθέματος στον πλασμιδιακό φορέα και αφετέρου να γίνει υβριδισμός (κατά Southern) για να εντοπιστούν διαφορετικά πρότυπα άρα και κατάλληλα για την περαιτέρω ανάλυση και αλληλούχιση τους. Η τεχνική που εξυπηρετούσε την επίτευξη και των δύο στόχων ήταν αυτή της αλυσιδωτής αντίδρασης της πολυμεράσης σε αποικίες (Colony PCR)(Εικ. 20) έτσι ώστε μετά την ηλεκτροφόρηση να γίνει η μεταφορά από το πήγμα στη νάυλον μεμβράνη υβριδισμού με φαινόμενα ανοδικής τριχοειδούς μεταφοράς .

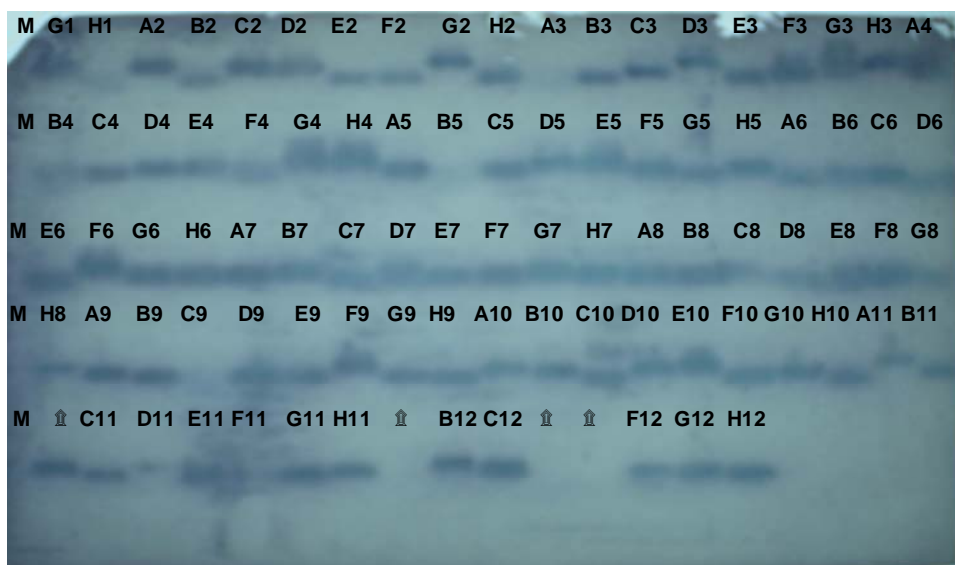


Εικ. 20. Ηλεκτροφόρηση για δείγματα από το Colony PCR. Τα μικρά τμήματα της διαφορετικής έκφρασης ποικίλουν

Εφόσον η εικόνα από το Colony PCR αποδεικνυόταν ικανοποιητική ο υβριδισμός κατά Southern ήταν το επόμενο βήμα το οποίο περιλαμβάνει τη μεταφορά και τον υβριδισμό των ακολουθιών DNA με μη ραδιενεργό σήμανση (βλέπε μέθοδοι και υλικά). Οι δύο ιχνηθέτες που χρησιμοποιούνται για τον υβριδισμό (και θεωρούνται οι ιδανικοί για να γίνει ο εντοπισμός υβριδίων των οποίων η έκφρασή αυξομειώνεται άρα και η περαιτέρω αλληλούχιση τους κρίνεται αναγκαία) είναι το cDNA του ελεγκτή και του οδηγού. Η σύγκριση των προτύπων των υβριδισμένων μεμβρανών οδήγησε και στην επιλογή των τελικών κλώνων (Εικ. 21, Εικ. 22).



Εικ. 21. Πρότυπο υβριδισμένης μεμβράνης με ιχνηθέτη από τον ελεγκτή



Εικ. 22 Πρότυπο υβριδισμένης μεμβράνης με ιχνηθέτη από τον οδηγό

Οι κλώνοι που τελικά επιλέχθηκαν να σταλούν για αλληλούχιση είναι οι παρακάτω

Όνομα κλώνου	Μέγεθος (bp)	cDNA Βιβλιοθήκη	Blast	Ομολογία	Περιγραφή
A4	109	Forw. (S.L 1)	NCBI, Mibase	-	-
B2	64	Forw. (S.L 1)	NCBI, Mibase	98%	Εξτενσίνη
B5	346	Forw. (S.L 1)	NCBI, Mibase	99%	EST
C3	243	Forw. (S.L 1)	NCBI, Mibase	83%	Κινάση
D2	236	Forw. (S.L 1)	NCBI, Mibase	-	-
D2	124	Forw. (S.L 2)	NCBI, Mibase	100%	EST
D11	369	Forw. (S.L 2)	NCBI, Mibase	100% 100%	EST ubiquitin
E4	119	Forw. (S.L 2)	NCBI, Mibase	100%	Peroxidase
B12	176	Forw. (S.L 2)	NCBI, Mibase	-	-
D4	108	Forw. (S.L 2)	NCBI, Mibase	-	-

Η ανάλυση στις βάσεις δεδομένων για τον κλώνο B2 της SL1 βιβλιοθήκης έδειξε ότι ο συγκεκριμένος κλώνος παρουσιάζει πολύ μεγάλη ομολογία με γονίδια που κωδικοποιούν για πρωτεΐνες που ονομάζονται εξτενσίνες (extensin class I protein). Οι εξτενσίνες αποτελούν μια οικογένεια (hydroxyproline-rich) γλυκοπρωτεϊνών, οι οποίες εντοπίζονται στην κυτταρική μεμβράνη των ανώτερων φυτών (Cassab *et al.*, 1998, Showalter *et al.*, 1990). Σε πολλά δικοτυλήδονα φυτά οι εξτενσίνες παράγονται ως αντίδραση στο αιθυλένιο (Showalter *et al.*, 1990). Επίσης,

η αντίχνευση τους είναι έντονη συνήθως κατόπιν προσβολής και ρήξης του κυτταρικού τοιχώματος καθώς και σε περιστατικά προσβολής φυτών από μύκητες (Corbin *et al.*, 1987). Οι εξτενσίνες αν και εντοπίζονται κυρίως στα δικότυλα φυτά παρόλα αυτά ανευρίσκονται και στα μονοκότυλα. Η δομή των πρωτεϊνών για το μόριο της εξτενσίνης στα δικότυλα φυτά συνήθως αποτελείται από λίγα αμινοξέα όπως την σερίνη, βαλινίνη, τυροσίνη, ιστιδίνη και την υδροξυπρολίνη που είναι και αυτό που απαντάται σε μεγαλύτερο βαθμό 30-40%. Ακόμα ένα χαρακτηριστικό της πρωτεΐνης είναι η συχνή επανάληψη της αμινοξικής αλληλουχίας σερίνης-υδροξυπρολίνης₄. Η εξτενσίνες έχουν την τάση να συνδέονται και θεωρούνται σαν δομικός λίθος της κυτταρικής μεμβράνης (Kahl 1982). Η σύνδεση και σταθεροποίηση τους ολοκληρώνεται με την ενσωμάτωση μορίων έτσι ώστε να σχηματιστεί ένα ρευστό μωσαϊκό. Ένας από τους κυρίους υποψηφίους αυτών των μορίων είναι η ισοδιτυροσίνη (isodityrosini, IDT). Στις εξτενσίνες έχει αποδοθεί ο ρόλος της επούλωσης πληγών και του ευεργετικού ρόλου που μπορεί να έχει στην άμυνα του φυτού λόγω της διαπίστωσης ότι το m-RNA της εντοπίζεται μετά την εμφάνιση πληγών κατόπιν και προσβολής από παθογόνα (Showalter *et al.*, 1990).

Κατά την ανάλυση της αλληλουχίας του κλώνου C3 από την SL1 βιβλιοθήκη, βρέθηκε ομολογία κατά 83% με μια εξαρτώμενη του ασβεστίου πρωτεϊνική κινάση. Η δράση και ο ρόλος των κινάσεων στην σηματοδότηση είναι γνωστά: οι κινάσες είναι ένζυμα τα οποία, χρησιμοποιώντας το μόριο του ATP ως καταλύτη, φωσφορυλιώνουν άλλες πρωτεΐνες τροποποιώντας έτσι την λειτουργία τους κάνοντας εφικτή τη μεταγωγή σημάτων. Η πρωτεϊνική κινάση ασβεστίου έχει αναφερθεί ότι διαδραματίζει σημαντικό ρόλο στην κυτταρική αύξηση το μετασχηματισμό και την διαφοροποίηση των ευκαρυωτικών κυττάρων (Dekker and Parker, 1995). Τα φυτά και τα πρώτιστα έχουν κινάσες, οι οποίες ενεργοποιούνται και ρυθμίζονται απευθείας από τα ιόντα ασβεστίου (CDPKs, calcium dependent protein kinases) (Harmon *et al.*, 1987; Zhao *et al.*, 1994), σε αντίθεση με τους μύκητες και τα ζώα, των οποίων οι κινάσες δεν είναι πλήρως λειτουργικές στα ιόντα ασβεστίου και για την πλήρη ενεργοποίησή τους έχουν ανάγκη από καλμοδουλίνη (calmodulin) και λιπίδια. Η κλωνοποίηση της πρώτης CDPK στα φυτά έγινε στην σόγια (*Glycine max*; Harper *et al.*, 1991) και ακολούθησαν και άλλα φυτικά είδη. Όλες οι κινάσες των φυτών έχουν την ίδια αρχική δομή 4 τμημάτων. Ένα N-τελικό άκρο που ποικίλει, την κύρια δομή της κινάσης η οποία ακολουθείται από μία αυτό-ρυθμιζόμενη περιοχή και ένα καρβοξυλικό-άκρο, με δομή καλμοδουλίνης. Η αυτο-ρυθμιζόμενη περιοχή περιέχει

ένα κέντρο ψευδουπόστρωματος έτσι ώστε εν απουσία του ασβεστίου, προσδένεται προς το ενεργό κέντρο καθιστώντας την κινάση ανενεργή. Η δέσμευση, όμως, του ασβεστίου με την καλμοδουλίνη λειτουργεί ως διακόπτης για την απελευθέρωση του ενεργού κέντρου και την ενεργοποίηση της κινάσης (Harmon *et al.*, 1994, 2000, Harper *et al.*, 1994, Hrabak, 2000). Το ελεύθερο ασβέστιο στο κυτόπλασμα κάτω από συνθήκες ηρεμίας διατηρείται σε πολύ χαμηλά επίπεδα (10-200 nm), εξασφαλίζοντας τη μικρή δραστηριότητα των CDPKs ενώ μια αύξηση του ελεύθερου στο κυτόπλασμα ασβεστίου συνεπάγεται και την ενεργοποίηση των κινασών. Ένας μεγάλος αριθμός καταπονήσεων βιοτικού και αβιοτικού χαρακτήρα έχει σαν αποτέλεσμα την αύξηση του ελεύθερου ασβεστίου που δρα σαν μεταγωγέας σήματος για μια πληθώρα κυτταρικών αντιδράσεων (Webb *et al.*, 1996; Sanders *et al.*, 1999). Οι CDPKs κωδικοποιούνται από μεγάλες οικογένειες γονιδίων και οι διαφορετικές ισομορφές τους εμφανίζουν διαφορετική εξειδίκευση στο ασβέστιο καθώς και διαφορετική δραστηριοποίηση όσον αφορά τη διαμερισματοποίηση τους (Harmon *et al.*, 2000). Πιθανοί μηχανισμοί δράσης και ενεργοποίησης των CDPKs περιλαμβάνουν διαλυτοποίηση ενζύμων, ενεργοποίηση μεταγραφικών παραγόντων, κανάλια και αντλίες ιόντων και πρωτεΐνες του κυτταροσκελετού αν και πολύ λίγες πρωτεΐνες έχουν χαρακτηριστεί σαν υποστρώματα κινασών (Harmon *et al.*, 2000; Hrabak, 2000).

Στην ανάλυση του κλώνου D11 της SL2 βιβλιοθήκης βρέθηκε 100% ομολογία με ένα γονίδιο που κωδικοποιεί για ουβικουιτίνη. Η ουβικουιτίνη (ubiquitin) είναι μια πρωτεΐνη η οποία είναι ευρύτατα διαδεδομένη και συντηρημένη στους ευκαρυωτικούς οργανισμούς. Η προσθήκη ενός ή λίγων μορίων ουβικουιτίνης σε μια πρωτεΐνη (μονουβικουιτίνωση ή ολιγοουβικουιτίνωση, αντίστοιχα) επηρεάζει τη δραστηριότητα της και τη θέση της μέσα στο κύτταρο. Αντίθετα, η προσθήκη πολλών μορίων ουβικουιτίνης σε μια πρωτεΐνη (πολυουβικουιτίνωση) οδηγεί στο σχηματισμό αλυσίδων ουβικουιτίνης πάνω στην πρωτεΐνη-στόχο και τη ιχνηθετεί για μεταφορά και αποικοδόμηση στο πρωτεάσωμα.

Η ανάλυση για τον κλώνο E4 της SL2 βιβλιοθήκης έδειξε ότι πρόκειται για μια υπεροξειδάση (peroxidase TPX2). Οι υπεροξειδάσες είναι μία μεγάλη οικογένεια ενζύμων, οι οποίες έχουν την ικανότητα να καταλύουν υπεροξειδία καθώς και να προστατεύουν τα κύτταρα από της ελεύθερες ρίζες (ROS). Οι υπεροξειδάσες δείχνουν ενεργότητα έναντι πολλών υποστρωμάτων. Ιδίως για τους φυτικούς οργανισμούς οι υπεροξειδάσες εμπλέκονται σε διάφορες φυσιολογικές διεργασίες

όπως στην δευτερογενή βιοσύνθεση του κυτταρικού τοιχώματος (Abeles and Biles, 1991), την επούλωση πληγών (Espelie *et al.*, 1986), την εναπόθεση πολυφαινολών μετά των τραυματισμό του φυτικού ιστού (Lagrimini, 1991), τον καταβολισμό της αυξίνης (Gaspar *et al.*, 1989) καθώς και βοηθούν στην άμυνα του φυτού ενάντια στα παθογόνα (Ye *et al.*, 1990). Η παρουσία των πολλών υπεροξειδασών στα ανώτερα φυτά καθιστά δύσκολο την διερεύνηση του ρόλου του κάθε ισοενζύμου *in vivo*. Σύμφωνα με την βιβλιογραφία ο ρόλος της TPX2 υπεροξειδάσης αν και δεν είναι πλήρως διευκρινισμένος σίγουρα δραστηριοποιείται και στοχεύει στο κυτταρικό τοίχωμα (Botella *et al.*, 1993).

Για τον κλώνο B5 και D2 της SL1 και SL2 αντιστοίχως η ανάλυση έδειξε ομολογία με ESTs (expressed sequence tags), τα οποία έχουν εντοπισθεί σε πολλές cDNA βιβλιοθήκες ιστών τομάτας αλλά δεν έχει ακόμα χαρακτηριστεί. Τα τελευταία χρόνια η ανάγκη για την ανεύρεση γονιδίων για ένα φυτό οικονομικής σημασίας όπως η τομάτα οδήγησε στην έναρξη του ερευνητικού προγράμματος SOL (Solanaceae Genome Project) (<http://www.sgn.cornell.edu/solanaceae-project/>). Από αυτό το ερευνητικό πρόγραμμα τα τελευταία χρόνια πολλές αλληλουχίες ESTs έχουν κατατεθεί σε βάσεις δεδομένων όπως το NCBI (Benson *et al.*, 2003). Κάτι που θα φανεί πολύ χρήσιμο στην περαιτέρω μελέτη των γονιδίων για τους εκπροσώπους τους είδους των Solanaceae.

Για τους κλώνους A4, D2 της SL1 και B12, D4 της SL2 βιβλιοθήκης δεν βρέθηκε ομολογία με κάποια γνωστή αλληλουχία στις βάσεις δεδομένων που εξετάστηκαν.

Γ.2.1 Συνοψίζοντας

Συνοψίζοντας τα μέχρι τώρα ευρήματα της ανάλυσης των κλώνων αυτό που προκύπτει είναι το ότι εντοπίζεται μια έντονη διέγερση μηχανισμών μεταγωγής σήματος αλλά και δραστηριοποίησης μορίων που συνήθως συμβαίνουν έναντι βιοτικών καταπονήσεων και έναντι προσβολής παθογόνων μικροοργανισμών. Η παρουσία του μυκητιακού στελέχους και ο ενδοφυτικός του χαρακτήρας θέτουν το φυτό σε μια υψηλή κατάσταση ενεργοποίησης ιδίως από την στιγμή που έχουμε εισβολή εντός του φυτικού σώματος. Η ασυμπτωματική πορεία, όμως, του στελέχους έναντι του φυτού και ο μηχανισμός που κρύβεται πίσω από αυτή την αλληλεπίδραση χρίζει περαιτέρω διερεύνηση. Η ευρωστία και η ανοσία που παρέχεται στο φυτό έναντι παθογόνων μικροοργανισμών κατά κύριο λόγο οφείλεται σε όλη αυτή την

πολύπλοκη μοριακή ενεργοποίηση καταπόνησης και ισχυροποίηση εντέλει από μέρους του φυτού.

Παράρτημα

Θρεπτικό διάλυμα φυτών

Η σύνθεση του θρεπτικού διαλύματος σε 1 lt απιονισμένου νερού ήταν η ακόλουθη

Θρεπτικό διάλυμα φυτών

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

Διάλυμα ιχνοστοιχείων

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

Διαλύματα από την απομόνωση Poly-A RNA από ολικό RNA

Buffer δέσμευσης (binding) : 50 ml διαλύματος με τελικές συγκεντρώσεις, 20 mM Tris-HCl (pH 7,5), 1M LiCl, και 2 mM EDTA.

Buffer πλυσίματος (wash) : 50 ml διαλύματος με τελικές συγκεντρώσεις, 10 mM Tris-HCl (pH 7,5), 0,15 M LiCl και 1mM EDTA.

Buffer έκλουσης (elution) : 15 ml διαλύματος με τελικές συγκεντρώσεις, 10 mM Tris-HCl (pH 7,5).

Διαλύματα από τον υβριδισμό κατά Southern

Διάλυμα μετουσίωσης : 0.5N NaOH, 1.5M NaCl

Διάλυμα εξουδετέρωσης : 1M Tris-HCl pH 8.0, 1.5M NaCl

20XSSC: 3M NaCl, 0.3M κιτρικό νάτριο

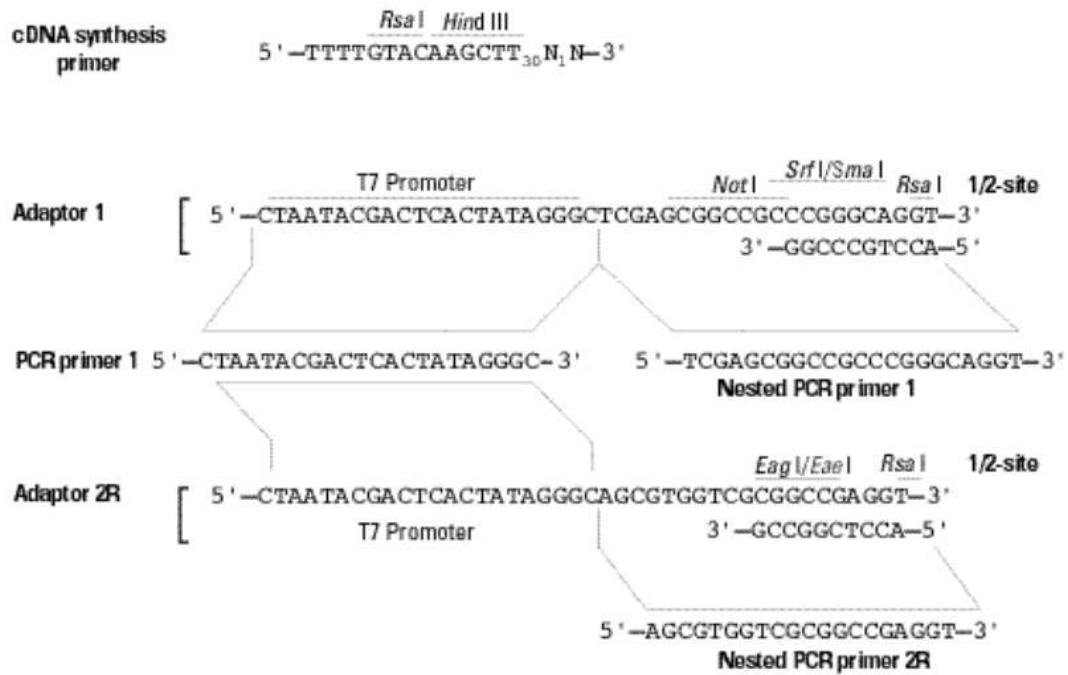
Διάλυμα I : 100mM Tris-HCl, 150mM NaCl, pH 7.5

Διάλυμα πλύσης II : 0.1xSSC, 0.1% w/v SDS

Διάλυμα III : 100mM Tris-HCl, 100mM NaCl, 50mM MgCl₂ pH 9.5

Διάλυμα TE : 10mM Tris-HCl, 1mM EDTA, pH 8.0

Οι αλληλουχίες των εκκινητών και των προσαρμογέων της αφαιρετικής c-DNA βιβλιοθήκης



ΒΙΒΛΙΟΓΡΑΦΙΑ

Agrios G.N. Plant Pathology. 1997. San Diego USA. Academic Press Inc.

Audenaert K, Pattery T, Cornelis P and Hfte M. Induction of systemic resistance to *Botrytis cinerea* in tomato by *Pseudomonas aeruginosa* TNSK2: role of salicylic acid, pyochelin, and pyocyanin. *Mol. Plant-Microbe Interact.* 2002;15:1147-1156

Bacon C.W., Porter J.K., Robins J.D., Lutrell E.J., . *Epichloë typhina* from toxic tall fescue grass. *Appl. Env. Microbiol.* 1997;34, 576-581.

Bittel P and Robatzek S. Microbe-associated molecular patterns (MAMPs) probe plant immunity. *Current Opinion in Plant Biology.* 2007; 10: 335-341.

Cassab GI, Varner JE: Cell wall proteins. *Annual Rev. Plant Physiology- Plant. Mol. Biol.* 1988; 39:321-353.

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

Corbin DR, Saner N, Lamb CJ: Differential regulation of a hydroxyproline-rich glycoprotein gene family in wounded and infected plants. *Mol. Cell. Biol.* 1987; 7: 4337-4344.

Cordier C, Pozo M.J, Barea J.M, Gianinazzi S. and Gianinazzi-Pearson V. Cell defense responses associated with localized and systemic resistance to *Phytophthora parasitica* induced in tomato by an arbuscular mycorrhizal fungus. *Molecular Plant-Microbe Interact.* 1998; 11: 1017–1028.

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

Chisholm Stephen T., Coaker Gitta, Day Brad and Staskawicz Brian J. Host-Microbe Interactions: Shaping the Evolution of the Plant Immune Response. *Cell*. 2006; 124: 803-814.

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

Dekker LV, Parker PP. The protein kinase C and protein kinase C related gene families. *Curr Opin Struct Biol*. 1995; 5:396-402.

Djonovic S, Vargas W.A, Kolomiets M.V, Horndeski M, Wiest A, Kenerley C.M. A proteinaceous elicitor Sm1 from the beneficial fungus *Trichoderma virens* is required for induced systemic resistance in maize. *Plant Physiology*. 2007; 145: 875-889.

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

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

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

Hammaerschmidt R and Kuc J. Lignification as a mechanism for induced systemic resistance in cucumber. *Physiology Plant Pathology*. 1982; 20: 61-71.

Harman GE. Overview of mechanisms and uses of *Trichoderma* spp. *Phytopathology*. 2006; 96: 190-194.

Heil M. Ecological costs of induced resistance. *Current Opinion in Plant Biology*. 2002; 5: 345-350.

Heil M, and Baldwin I.T. Fitness costs of induced resistance: emerging experimental support for a slippery concept. *Trends Plant Science*. 2002; 7: 61-67.

Hyakumachi M. Induced systemic resistance against anthracnose in cucumber due to plant growth-promoting fungi and studies on mechanisms. Proceedings of Fourth International Workshop on Plant Growth-Promoting Rhizobacteria. 1997. Japan-OECD Joint Workshop, Sapporo: pp 164-169.

Jones J.D.G and Dangl J.L. The plant immune system. *Nature*. 2006; 444: 323-329.

Kahl G: Molecular biology of wound healing: the conditioning phenomenon. In: Kahl G, Schell JS (eds) *Molecular Biology of Plant Tumors*, pp. 211-267. Academic Press, New York (1982).

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

Kavroulakis Nektarios, Ntougias Spyridon, Zervakis Georgios, Ehaliotis Constantinos, Haralampidis Kosmas and Papadopoulou Kalliope. Role of ethylene in the protection of tomato plants against soil-borne fungal pathogens conferred by an endophytic *Fusarium solani* strain. *Journal of Experimental Botany*. 2007; 58: 3853-3864.

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

Le Floch,G, Rey, P, Benizri, E, Benhamou N,Tirilly Y. Impact of auxin-compounds produced by the antagonistic fungus *Pythium oligandrum* or the minor pathogen *Pythium* group F on plant growth. *Plant Soil*. 2003; 257:459-470.

Lindsey DL and Baker R. Effect of certain fungin on dwarf tomatos growth under gnotobiotic conditions.*Phytopathology*. 1967; 57:1262-1263.

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

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

Martin F, Aerts A, Ahren D, Brun A, Danchin E.G.J, Duchaussoy F, Gibon J, Kohler A, Lindquist E, Pereda V *et al*. The genome of *Laccaria bicolor* provides insights into mycorrhizal symbiosis. *Nature*. 2008; 452:88-92.

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

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

Meera M.S, Shivanna M.B, Kageyama K. and Hyakumachi M. Plant growth promoting fungi from zoysiagrass rhizosphere as potential inducers of systemic resistance in cucumbers. *Phytopathology*. 1994; 84: 1399–1406.

Nurnberger T, Brunner F, Kemmerling B., and Piater L. Innate immunity in plants and animals striking similarities and obvious differences. *Immunol. Rev.* 2004; 198: 249-266.

Osborn Anne. Saponins and plant defence-a soap story. *Trends Plant Science*. 1996; 1: 4-9.

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

Peškan-Berghofer, T., Shahollari, B., Giong, P. H., Hehl, S., Markert, C, Blanke V., Kost, G., Varma, A. & Oelmueller, R. *Physiol. Plant.* 2004; 122: 465–477.

Pieterse C.M.J and Dicke Marcel. Plant interaction with microbes and insects: from molecular mechanisms to ecology. *Trends Plant Science.* 2007; 12: 564-569.

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

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

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

Pozo M.J, Azcon-Aguilar C. Unraveling mycorrhiza-induced resistance. *Current Opinion in Plant Biology.* 2007; 10:393-398.

Rotblat B, Enshell-Seijffers D, Gershoni J.M, Schuster S, Avni A. Identification of an essential component of the elicitation active site of the EIX protein elicitor. *Plant Journal.* 2002; 32: 1049-1055.

Scardl C.L., Leuchtman A., Spiering M.J., Symbioses of grasses with seedborne fungal endophytes. *Ann. Rev. Plant. Biol.* 2004; 55, 315-340.

Σμοκοβίτης Αθανάσιος. Φυσιολογία 2004. Θεσσαλονίκη. Εκδόσεις Κυριακίδη.

Sanchez Marquez S., Bills G.F. , Zabalgogezcoa I.. The endophytic mycobiota of the grass *Dactylis glomerata*. *Fung Divers.* 2007; 27, 171-195.

Showalter AM, Rumeau D: Molecular biology of the plant cell wall hydroxyproline-rich glycoproteins. In: Adair WS, Mecham RP (eds) *Organization and Assembly of Plant and Animal Extracellular Matrix*, pp. 247-281. Academic Press, New York (1990).

Shivanna M.B, Meera M.S, and Hyakumachi M. Sterile fungi from zoysiagrass rhizosphere as plant growth promoters in spring wheat. *Can J. Microbiology.* 1994; 40: 637-644.

Stone J.K., Polishook J.D., White J.F. Endophytic fungi. In: *Biodiversity of fungi. Inventory and monitoring methods* (Mueller G.M., Bills G.F., Foster M.S., eds). Elsevier Academic Press, San Diego, USA. 2004; 241-270.

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

Tierens K.F.M, Thomma B.P.H.J, Brouwer M, Schmidt J, Kistner K, Porzel A, Mauch-Mani B, Cammue B.P.A and Broekaert W.F. Study of the role of antimicrobial glucosinolate-derived isothiocyanates in resistance of *Arabidopsis* to microbial pathogens. *Plant Physiology.* 2001; 125: 1688-1699.

Tigchelaa E.C. Tomato: Botany and Culture. In: Jones J.B, Jones J.P, Stall R.E, Zitter T.A (eds). *Compendium of Tomato Diseases.* 1991; 105: 2-4.

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

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

Viswanathan Chinnusamy, Karen Schumaker and Jian-Kang Zhu. Molecular genetic perspectives on cross-talk and specificity in abiotic stress signalling in plants. *Journal of Experimental Botany*. 2004; 55: 225-236.

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

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

Varma, A., Verma, S., Sudha, Sahay, N., Büttenhorn, B. & Franken, P. *Appl. Environ. Microbiol*. 1999; 65: 2741–2744.

Verma, S., Varma, A., Rexer, K.-H., Hassel, A., Kost, G., Sarabhoy, A., Bisen P., Büttenhorn, B. & Franken, P. *Mycologia*.1998; 90: 896–903.

Waller Frank, Achatz Beate, Baltruschat Helmut, Fodor Jozsef, Becker Katja, Fischer Marina, Heier Tobias, Huckelhoven Ralph, Neumann Christina, Diter von Wettstein, Franken Philipp and Kogel Karl-Heinz. The endophytic fungus *Piriformospora indica* reprograms barley to salt-stress tolerance, disease resistance, and higher yield. *PNAS*. 2005; 102: 13386–13391.

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

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

Yedidia I, Shrivasta AK, Kapulnik Y, Chet I. Effect of *Trichoderma harzianum* on microelement concentration and increased growth of cucumber plants. *Plant Soil*. 2001; 235: 235-242

Yuen G.Y and Schroth M.N. Interactions of *Pseudomonas fluorescens* strain E6 with ornamental root colonizing microflora. *Phytopathology*. 1986; 76: 176-180.

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

Zimand G, Elad Y and Chet I. Effect of *Trichoderma harzianum* on *Botrytis cinerea* pathogenicity. *Phytopathology*. 1996; 86:1255–1260