

**Αξιολόγηση επιφανειοδραστικών ουσιών για την  
αντιμετώπιση του βακτηριακού έλκους της τομάτας**

**ΗΛΙΑΣ ΜΩΡΑΪΤΗΣ**

**ΜΕΤΑΠΤΥΧΙΑΚΗ ΜΕΛΕΤΗ**

**που υποβλήθηκε στο**

**Γεωπονικό Πανεπιστήμιο Αθηνών**

Τριμελής εξεταστική επιτροπή

Αντωνίου Πολύμνια	Επίκουρη Καθηγήτρια	Επιβλέπουσα
Τζάμος Ελευθέριος	Καθηγητής	Μέλος
Τσιτσιγιάννης Δημήτριος	Λέκτορας	Μέλος

**ΑΘΗΝΑ 2011**

## ΠΡΟΛΟΓΟΣ

Η εκπόνηση της παρούσας μεταπτυχιακής μελέτης πραγματοποιήθηκε στο Εργαστήριο Φυτοπαθολογίας του Γεωπονικού Πανεπιστημίου Αθηνών και αποτελεί το τελευταίο μέρος για την ολοκλήρωση του Α' κύκλου του Μεταπτυχιακού Προγράμματος Ειδίκευσης. Η εργασία αυτή έχει ως αντικείμενο την αξιολόγηση επιφανειοδραστικών ουσιών για την αντιμετώπιση του βακτηριακού έλκους της τομάτας. Σχετικά με τις ουσίες αυτές, δεν έχει γίνει μέχρι σήμερα αναφορά για την εφαρμογή τους στη φυτοπαθολογία και γι' αυτό το λόγο θεώρησα την ανάληψη μιας τέτοιας μελέτης άκρως ενδιαφέρουσα και συναρπαστική.

Σε αυτό το σημείο, θεωρώ χρέος μου να εκφράσω την ευγνωμοσύνη μου στην Επίκουρη Καθηγήτρια ΓΠΑ κ. Πολύμνια Αντωνίου, για την τελική ανάθεση του θέματος καθώς και την επίβλεψη και πολύτιμη καθοδήγησή της κατά την πραγματοποίηση της μελέτης.

Ευχαριστώ θερμά τον ομότιμο καθηγητή ΓΠΑ κ. Ελευθέριο Τζάμο, για την καθοριστική του συμβολή στην ανάθεση του θέματος της μελέτης. Η εμπιστοσύνη που μου επέδειξε, ήταν ιδιαίτερη τιμή για εμένα και υπήρξε κίνητρο συνεχούς μελέτης καθ' όλη τη διάρκεια παραμονής μου στο Εργαστήριο φυτοπαθολογίας.

Θα ήθελα επίσης να ευχαριστήσω τον Λέκτορα ΓΠΑ κ. Δημήτριο Τσιτσιγιάννη, για την προθυμία του να συζητήσουμε οποιαδήποτε απορία μου αλλά και για τη συμμετοχή του στην αξιολόγηση της μελέτης.

Σημαντική ήταν επίσης η βοήθεια από τον Λέκτορα ΓΠΑ κ. Σωτήριο Τζάμο κατά το διάστημα πραγματοποίησης των πειραμάτων μοριακής διερεύνησης.

Επιπλέον, δεν μπορώ να παραλείψω την αμέριστη συμπαράσταση και συνεργασία που παρείχαν οι μεταπτυχιακοί συμφοιτητές μου, αλλά και το άριστο κλίμα το οποίο είχε δημιουργηθεί καθ' όλο το διάστημα του προγράμματος μεταπτυχιακών σπουδών.

Τέλος, ευχαριστώ τον Δρ. Joseph Kuc, Emeritus Professor, για την ευγενική παραχώρηση των επιφανειοδραστικών ουσιών.

## ΠΕΡΙΕΧΟΜΕΝΑ

<b>ΠΕΡΙΛΗΨΗ</b> .....	5
<b>ABSTRACT</b> .....	7
<b>1. ΕΙΣΑΓΩΓΗ</b> .....	9
1.1 Το παθογόνο <i>Clavibacter michiganensis</i> subsp. <i>michiganensis</i> .....	9
1.1.1 Συμπτώματα.....	11
1.1.2 Συνθήκες ανάπτυξης και επιδημιολογία .....	14
1.1.3 Διάγνωση.....	17
1.1.4 Αντιμετώπιση.....	19
1.1.5 Στοιχεία μοριακής μελέτης.....	22
1.2 Το αμυντικό σύστημα των φυτών .....	25
1.2.1 Μηχανισμοί αντίδρασης φυτών στη μόλυνση από τα παθογόνα .....	25
1.2.1.1 Παθητικό αμυντικό σύστημα.....	26
1.2.1.2 Εγγενής ενεργητικός μηχανισμός άμυνας .....	27
1.2.1.2.1 Βασικό ανοσοποιητικό σύστημα.....	28
1.2.1.2.2 Ανοσοποιητικό σύστημα των γονιδίων ανθεκτικότητας .....	29
1.2.1.2.2.1 Η θεωρία γόνου προς γόνο .....	30
1.2.1.2.2.2 Η υπόθεση του φρουρού .....	33
1.2.1.2.2.3 Η αντίδραση υπερευαισθησίας.....	34
1.2.2 Επαγόμενη και επίκτητη διασυστηματική αντοχή.....	35
1.2.2.1 Οι πρωτεΐνες παθογένεσης.....	37
1.2.2.2 Ο ρόλος του σήματος .....	39
1.2.2.3 Παράγοντες διέγερσης της ανοσοποίησης.....	42
1.2.2.3.1 Η χρήση του παθογόνου και άλλων βιολογικών παραγόντων .	43
1.2.2.3.2 Η χρήση ριζοσφαιρικών βακτηρίων .....	45
1.2.2.3.3 Συνθετικές χημικές ενώσεις .....	48
1.2.2.3.3.1 Εφαρμογή χημικών διεγερτών της SAR για την αντιμετώπιση του <i>Clavibacter michiganensis</i> subsp. <i>michiganensis</i> .....	52
1.3 Επιφανειοδραστικοί παράγοντες .....	57
1.4 Φάσμα αμυντικών μηχανισμών των φυτών .....	58
1.5 Σκοπός της παρούσας μελέτης .....	60
<b>2. ΥΛΙΚΑ ΚΑΙ ΜΕΘΟΔΟΙ</b> .....	62

2.1 Δοκιμές παθογένειας.....	62
2.1.1 Περιγραφή του πειράματος .....	62
2.1.2 Παραγωγή φυτικού υλικού.....	62
2.1.3 Εφαρμογή επιφανειοδραστικών παραγόντων.....	63
2.1.4 Μόλυνση με το παθογόνο βακτήριο <i>Clavibacter michiganensis</i> subsp. <i>michiganensis</i> .....	64
2.1.5 Καταγραφή μετρήσεων .....	66
2.1.6 Πειραματικός σχεδιασμός .....	67
2.1.7 Στατιστική ανάλυση .....	68
2.2 Μοριακή διερεύνηση .....	68
2.2.1 Σχεδιασμός του πειράματος.....	68
2.2.2 Απομόνωση RNA από φυτά τομάτας .....	69
2.2.3 Μέτρηση νουκλεϊκών οξέων .....	70
2.2.4 Αντίδραση αντίστροφης μεταγραφής .....	70
2.2.5 Εφαρμογή PCR πραγματικού χρόνου .....	72
<b>3. ΑΠΟΤΕΛΕΣΜΑΤΑ.....</b>	<b>74</b>
3.1 Αξιολόγηση δοκιμών παθογένειας .....	74
3.1.1 Παράγοντας A.....	74
3.1.2 Παράγοντας B.....	81
3.1.3 Παράγοντας C.....	88
3.1.4 Παράγοντας D.....	92
3.2 Μοριακή διερεύνηση .....	96
<b>4. ΣΥΖΗΤΗΣΗ-ΣΥΜΠΕΡΑΣΜΑΤΑ.....</b>	<b>100</b>
<b>5. ΒΙΒΛΙΟΓΡΑΦΙΑ.....</b>	<b>106</b>

## Π Ε Ρ Ι Λ Η Ψ Η

Το βακτηριακό έλκος της τομάτας, που προκαλείται από το βακτήριο *Clavibacter michiganensis* subsp. *michiganensis* (*Cmm*), αποτελεί μία από τις σοβαρότερες αδροβακτηριώσεις σε όλες σχεδόν τις περιοχές που καλλιεργείται η τομάτα. Οι τρόποι αντιμετώπισης της ασθένειας βασίζονται στην πρόληψη, κυρίως με μείωση και καταστροφή του παθογόνου στο σπόρο, την αμειψισπορά και την εφαρμογή της ηλιοαπολύμανσης του εδάφους.

Η επίκτητη διασυστηματική αντοχή ή ανοσοποίηση (Systemic Acquired Resistance, SAR) θα μπορούσε να αποτελέσει έναν ακόμη τρόπο αντιμετώπισης του παθογόνου βακτηρίου, δεδομένου ότι υπάρχουν ερευνητικά δεδομένα επιτυχούς αντιμετώπισης ασθενειών των φυτών. Το εύρος επιτυχούς εφαρμογής της επίκτητης διασυστηματικής αντοχής περιλαμβάνει φυτοπαθογόνους μύκητες, βακτήρια και ιούς. Η εκδήλωση της SAR μπορεί να λάβει χώρα και με τη χρήση χημικών ουσιών. Με βάση αυτά τα δεδομένα έγινε προσπάθεια αξιολόγησης τεσσάρων κατιονικών επιφανειοδραστικών παραγόντων του βρωμιούχου αμμωνίου (A, B, C και D) για την ικανότητά τους να επάγουν τον αμυντικό μηχανισμό των φυτών τομάτας εναντίον του *Clavibacter michiganensis* subsp. *michiganensis* και οι οποίοι δεν έχουν μελετηθεί μέχρι σήμερα για την ικανότητά τους να επάγουν την επίκτητη διασυστηματική αντοχή στα φυτά. Η αξιολόγηση των επιφανειοδραστικών παραγόντων πραγματοποιήθηκε με πειράματα παθογένειας στο σύστημα αλληλεπίδρασης ξενιστή-παθογόνου τομάτα-*Cmm*. Η εφαρμογή των 4 επιφανειοδραστικών ουσιών έγινε σε διαφορετικές συγκεντρώσεις, προκειμένου να διαπιστωθεί ποια συγκέντρωση για κάθε παράγοντα υπερτερεί έναντι των άλλων στον περιορισμό των συμπτωμάτων της ασθένειας. Διαπιστώθηκε ότι η επέμβαση με τον παράγοντα A έδωσε τα καλύτερα αποτελέσματα σε σχέση με τους άλλους 3 παράγοντες, ενώ η συγκέντρωση των 10 mM, ήταν πιο αποτελεσματική σε σύγκριση με τις συγκεντρώσεις των 50mM και 1mM καθώς και με τα φυτά μάρτυρες, περιορίζοντας στατιστικά σημαντικά τα επίπεδα της ασθένειας κατά 22,5%. Η επέμβαση με τον παράγοντα B στη συγκέντρωση 10mM, ήταν πιο αποτελεσματική σε σύγκριση με τις συγκεντρώσεις των 50mM και 1mM καθώς και με τα φυτά μάρτυρες στην αντιμετώπιση της ασθένειας σε ποσοστό 11,7%. Επιπλέον η εφαρμογή του παράγοντα C στα φυτά μείωσε τα συμπτώματα της ασθένειας κατά 11,8% στη συγκέντρωση των 50 mM η οποία δεν διέφερε όμως στατιστικά σημαντικά από τη C10 επέμβαση. Αντιστοίχως, η επέμβαση με τον παράγοντα D στη συγκέντρωση 10mM, ήταν πιο αποτελεσματική σε σύγκριση με τις συγκεντρώσεις των 50mM και 1mM καθώς και με τους μάρτυρες μειώνοντας τα επίπεδα της ασθένειας σε ποσοστό 21,4%.

Επιπλέον, για τους παράγοντες A και B έγινε προσπάθεια αξιολόγησής τους σε μοριακό επίπεδο μέσω ανίχνευσης γονιδίων άμυνας (χιτινάσες, PR-1 και PR-2 γονίδια). Η εφαρμογή τους έγινε σε φυτά τομάτας στη συγκέντρωση των 10 mM για

καθέναν από τους δύο παράγοντες, όπου από τα πειράματα παθογένειας που προηγήθηκαν, διαπιστώθηκε ότι ήταν οι πιο αποτελεσματικές για την αντιμετώπιση της ασθένειας. Η έκφραση των χιτινασών ανιχνεύτηκε στα φυτά που είχαν δεχθεί τον παράγοντα A. Για το PR-2 γονίδιο παρατηρείται μια μεταγραφή του γονιδίου στις 12 ώρες μετά την εφαρμογή των παραγόντων, ενώ η έκφραση αυτή εντοπίζεται και στις 36 ώρες. Για το PR-1 γονίδιο παρατηρείται η πιο σαφής έκφραση στις 36 ώρες από την εφαρμογή των ουσιών στα φυτά. Η επαγωγή του γονιδίου αυτού συνδέεται με τη σύνθεση της αντίστοιχης πρωτεΐνης, ώστε η έκφρασή του είναι πιθανή ένδειξη επαγωγής των λανθανόντων μηχανισμών ανοχής στα φυτά.

**Λέξεις κλειδιά:** Βακτηριακό έλκος της τομάτας, Επίκτητη διασυστηματική ανοχή, κατιονικοί επιφανειοδραστικοί παράγοντες, χιτινάσες, PR-1γονίδια, PR-2 γονίδια.

## A B S T R A C T

The bacterial canker of tomato, caused by the bacterium *Clavibacter michiganensis* subsp. *michiganensis* (*Cmm*), is one of the major bacterial wilt in almost all areas where tomato is cultivated. The control of the disease is based on prevention, particularly by reducing and destroying the pathogen in seed, crop rotation and the application of soil solarization.

The Systemic Acquired Resistance (SAR), could be another way to deal with the pathogenic bacterium *Clavibacter michiganensis* subsp. *michiganensis*, since there are research data of successful treatment against other diseases. The range of successful application of acquired systemic resistance includes plant pathogenic fungi, bacteria and viruses. The triggering of SAR can take place with the use of chemicals substances. Based on these data, was attempted the evaluation of four cationic surfactants of ammonium bromide (factor A, B, C and D), for their ability to induce the defense mechanisms of tomato plants against *Clavibacter michiganensis* subsp. *michiganensis* and which have not been studied so far for their ability to induce systemic acquired resistance in plants. The cationic surfactants were evaluated through pathogenicity experiments in the system host-pathogen interaction tomato-*Cmm*. The application of 4 surfactant substances took place at different concentrations in order to determine what concentration of each factor outweighs the others in reducing the symptoms of the disease. It was found that the application with factor A gave better results than the other 3 factors, while the concentration of 10 mM, was more effective than the concentrations of 50mM and 1mM, and the control plants significantly reducing levels disease in 22.5%. The application of the factor B at concentration 10mM, was more effective than the concentrations of 50mM and 1mM and control of plants in the treatment of the disease at a rate of 11.7%. Moreover, the application of C factor in plants reduced the symptoms up to 11.8% in the concentration of 50 mM, which did not differ significantly with the C10 application. Similarly, the application of the D factor in concentration 10mM, was more effective than the concentrations of 50mM and 1mM, as well as at control plants by reducing the levels of disease at a rate of 21.4%.

Furthermore, for the factors A and B was attempted molecular evaluation, by detection of defense genes (chitinases, PR-1 and PR-2 genes). The application was made on tomato plants in the concentration of 10 mM for each of the two factors, since the pathogenicity tests seemed to take the best results. The expression of chitinases genes detected in plants treated with factor A. For PR-2 gene, is observed transcription in 12 hours after application of factors and this expression is detected in 36 hours as well. For the PR-1 gene, there is expression at 36 hours after application of substances in plants. The up-regulation of this gene is associated with the composition of the corresponding protein, so that is a possible indication of induction of plant-defense mechanisms.

**Keywords:** Bacterial cancer, *Clavibacter michiganensis* subsp. *michiganensis*, Systemic Acquired Resistance, Cationic surfactants, chitinases, PR-1 gene, PR-2 gene.



## 1. ΕΙΣΑΓΩΓΗ

### 1.1 Το παθογόνο *Clavibacter michiganensis* subsp. *michiganensis*

Το βακτήριο *Clavibacter michiganensis* subsp. *michiganensis* (Cmm) προκαλεί το βακτηριακό έλκος ή κορυνοβακτηρίωση της τομάτας, ενώ ξενιστές αποτελούν και τα είδη *Solanum douglasii*, *S. nigrum* και *S. triflorum*. Πρόκειται για μια σοβαρή αδροβακτηρίωση που από πλευράς γεωγραφικής εξαπλώσεως, απαντά σχεδόν σε όλες τις περιοχές του κόσμου που καλλιεργείται η τομάτα. Οι ζημιές από την ασθένεια μπορεί να φτάσουν το 70-80% της παραγωγής (Παναγόπουλος, 1992).

Το *Clavibacter michiganensis* subsp. *michiganensis* (Smith) έχει ως προγενέστερες συνώνυμες ονομασίες: *Corynebacterium michiganense* pv. *michiganense* (Smith) Jensen και *Corynebacterium michiganense* pv. *michiganense* (Smith). Ταξονομικά, ανήκει στην οικογένεια *Microbacteriaceae* (Σχήμα 1.1) (Stackebrandt et al., 1997). Σε επίπεδο γένους η ταξινόμηση βασίζεται στην παρουσία του 2,4-διαμινοβουτυρικού οξέος στις πεπτιδογλυκάνες του κυτταρικού τοιχώματος. Το γένος *Clavibacter* περιλαμβάνει ένα είδος με 5 υποείδη των οποίων ο διαχωρισμός βασίζεται στη διαφοροποίησή τους ως προς τα φαινοτυπικά χαρακτηριστικά, η πρωτεϊνική τους κατατομή, τις ορολογικές αντιδράσεις και το φάσμα των ξενιστών (Louws et al., 1998). Τα 5 υποείδη προσβάλλουν τους παρακάτω ξενιστές: *C. michiganensis* subsp. *sependonicus* με ξενιστή την πατάτα, *C. michiganensis* subsp. *nebraskensis* με ξενιστή τον αραβόσιτο, *C. michiganensis* subsp. *tesselarius* με ξενιστή το σιτάρι και *C. michiganensis* subsp. *insidiosus* με ξενιστή τη μηδική (Gartemann et al., 2003, Compendium of tomato diseases).

Περιγράφηκε για πρώτη φορά στις ΗΠΑ το 1909 στην Πολιτεία Michigan από την οποία πήρε το όνομά του το παθογόνο βακτήριο, ενώ φαίνεται πως η ασθένεια ήταν γνωστή στη Νέα Υόρκη από το 1892 με διάφορα ονόματα (Grand Rapids disease, stem rot, bacterial tomato wilt, bird's eye spot). Το κοινό όνομα της ασθένειας σήμερα στην αγγλική γλώσσα είναι Bacterial cancer, στη γαλλική Chancre bactérien, στη γερμανική Bacterienwelke, ενώ στην Ισπανική Cancro batterico (Data sheets on quarantine pests).

Όσον αφορά στην Ελλάδα, διαπιστώθηκε για πρώτη φορά το 1958 στην περιοχή της Πρέβεζας. Σήμερα έχει εξαπλωθεί σ' όλη τη χώρα και αποτελεί ένα σοβαρό πρόβλημα τόσο στις υπαίθριες όσο και στις υπό κάλυψη καλλιέργειες τομάτας (Παναγόπουλος, 1992).

Το βακτήριο μορφολογικά όταν βρίσκεται στα κύτταρα του ξενιστή, έχει κατά κανόνα σχήμα κορόνης (προηγούμενη ονομασία *Corynebacterium*). Δε φέρει

μαστίγια και επομένως στερείται αυτονόμου κινήσεως. Είναι θετικό κατά Gram, οι αποικίες είναι σχετικά βραδείας ανάπτυξης, ανοικτού κίτρινου λαμπερού χρώματος (Εικόνα 1.1) στα συνηθισμένα υποστρώματα ανάπτυξης όπως το NAG (Nutrient Agar Glucose) και Yeast Peptone Glucose Agar. Τα κύτταρα στην καλλιέργεια διατάσσονται σε χαρακτηριστικά σχήματα V και Y. Τα λιπαρά οξέα του βακτηριακού κυττάρου είναι κατά κύριο λόγο κορεσμένα με 12-17 άτομα άνθρακα. Όμως το χαρακτηριστικό λιπαρό οξύ για το υποείδος *Cmm* είναι ένα ακόρεστο λιπαρό οξύ, το δεκαπεντενοϊκό (Pentadecenoic acid, C15:1) (Lelliot and Stead, 1987, Compendium of tomato diseases).

Σχήμα 1.1: Συστηματική ταξινόμηση του παθογόνου *Clavibacter michiganensis* subsp. *michiganensis* (Smith) ( [www.ncbi.nlm.nih.gov](http://www.ncbi.nlm.nih.gov), [www.uniprot.org](http://www.uniprot.org)).

Kingdom: Monera  
Division: Actinobacteria  
Class: High GC Gram +  
Subclass: Actinobacteridae  
Order: Actinomycetales  
Suborder: Micrococcineae  
Family: *Microbacteriaceae*  
Genus: *Clavibacter*  
Species: *Clavibacter michiganensis*  
Subspecies: *Clavibacter michiganensis* subsp. *michiganensis*



Εικόνα 1.1: Αποικίες του *Clavibacter michiganensis* subsp. *michiganensis* (www.eppo.org)

### 1.1.1 Συμπτώματα

Το παθογόνο προκαλεί ποικίλα συμπτώματα στους ξενιστές του. Η εμφάνιση και η πολυπλοκότητα των συμπτωμάτων καθορίζεται από μια σειρά παραγόντων όπως η ηλικία του ξενιστή, η θέση της μόλυνσης, η ευαισθησία της ποικιλίας και οι περιβαλλοντικές συνθήκες.

Αν λάβουμε υπ' όψη τη θέση της μόλυνσης, παρατηρούμε ότι σε περίπτωση τοπικής μόλυνσης, τα πρώτα τοπικά συμπτώματα είναι η περιφερειακή νέκρωση και κηλίδωση των φυλλαρίων, ενώ στη διασυστηματική μόλυνση το πρώτο σύμπτωμα είναι η μάρανση. Πιο αναλυτικά, για τη διασυστηματική μόλυνση, τα φυτάρια του σπορείου συνήθως φτάνουν σε μαρασμό και ξηραίνονται. Αν όμως επιζήσουν παρουσιάζουν έντονο νανισμό ενώ πολλές φορές τα συμπτώματα μπορούν να εμφανιστούν αργότερα, μετά τη μεταφύτευση. Στα μεγαλύτερα φυτά παρατηρείται το σύνδρομο του βραδέως μαρασμού. Αρχικώς, στα κατώτερα φύλλα, παρατηρείται επιναστία και μαραίνονται αργότερα βαθμιαία, ενώ τα ανώτερα φύλλα διατηρούν τη σπαργή τους. Ο μαρασμός μπορεί να είναι μονόπλευρος (ημιπληγία, Εικόνα 1.2) με την περιφέρεια των φύλλων να συστρέφεται προς τα επάνω. Στην περίπτωση που η μόλυνση αρχίζει από πληγή κλαδέματος, τότε τα συμπτώματα εμφανίζονται πρώτα επάνω και προχωρούν ταχύτατα προς τα κάτω, θανατώνοντας το φυτό (Παναγόπουλος, 1992, Θανασουλόπουλος, 1996).

Χαρακτηριστικό σύμπτωμα της ασθένειας είναι ένας κίτρινος ως καστανός μεταχρωματισμός των ηθμαγγειωδών σωλήνων σε ολόκληρο το μήκος των προσβεβλημένων βλαστών και μίσχων των φύλλων (Εικόνα 1.3). Οι

μεταχρωματισμοί αυτοί είναι πιο εμφανείς στα γόνατα των φυτών. Σε εγκάρσια τομή στη βάση του μίσχου του φύλλου, παρατηρείται καστανός μεταχρωματισμός των αγγείων ημισεληνοειδούς μορφής ή πετάλου ίππου. Οι μεταχρωματισμένοι ιστοί εμφανίζουν μαλακή σήψη. Λόγω καταστροφής της αγγειακής μοίρας από τη δράση του παθογόνου, παρατηρείται αποκόλληση του κεντρικού κυλίνδρου από την εντεριώνη. Στα προχωρημένα στάδια της προβολής καταστρέφεται ο φλοιός των βλαστών και σχίζεται η επιδερμίδα με αποτέλεσμα να σχηματίζονται επιμήκη ανοικτά έλκη στην επιφάνεια του στελέχους. Η παρουσία τέτοιων ελκών εξηγεί την ονομασία της ασθένειας και επιπλέον αποτελεί χαρακτηριστικό σύμπτωμα (Παναγόπουλος 1992).

Η μόλυνση των καρπών μπορεί να γίνει από την επιφάνειά τους από βακτήρια που μεταφέρονται μέσω βροχής ή υψηλής ατμοσφαιρικής υγρασίας μπαίνοντας από τα στομάτια, φακίδια, τρίχες, προκαλώντας τοπικές μολύνσεις. Κύριο σύμπτωμα είναι οι κυκλικές κηλίδες, χρώματος αρχικά υπόλευκου και αργότερα καστανού που περιβάλλονται από μια υπόλευκη άλω (υπόλευκος δακτύλιος). Οι κηλίδες έχουν διάμετρο 1-3mm, συχνά σχίζονται στο κέντρο και μοιάζουν με «μάτι πτηνού» (bird's eye) όπως φαίνεται και στην εικόνα 1.4. Ο άλλος τρόπος μόλυνσης των καρπών είναι εσωτερικά δια των αγγείων μετά από διασυστηματική κίνηση του παθογόνου από τους βλαστούς. Η εσωτερική προσβολή παρουσιάζει κίτρινες αγγειώδεις δεσμίδες που φθάνουν στα σπέρματα, καθώς και κίτρινο μεταχρωματισμό στην περιοχή του κάλυκα. Οι ώριμοι καρποί φαίνονται εξωτερικά υγιείς ενώ οι άωροι παραμένουν μικροί και παραμορφώνονται (Θανασουλόπουλος, 1996, Παναγόπουλος 1992, Data sheets on Quarantine Pests).

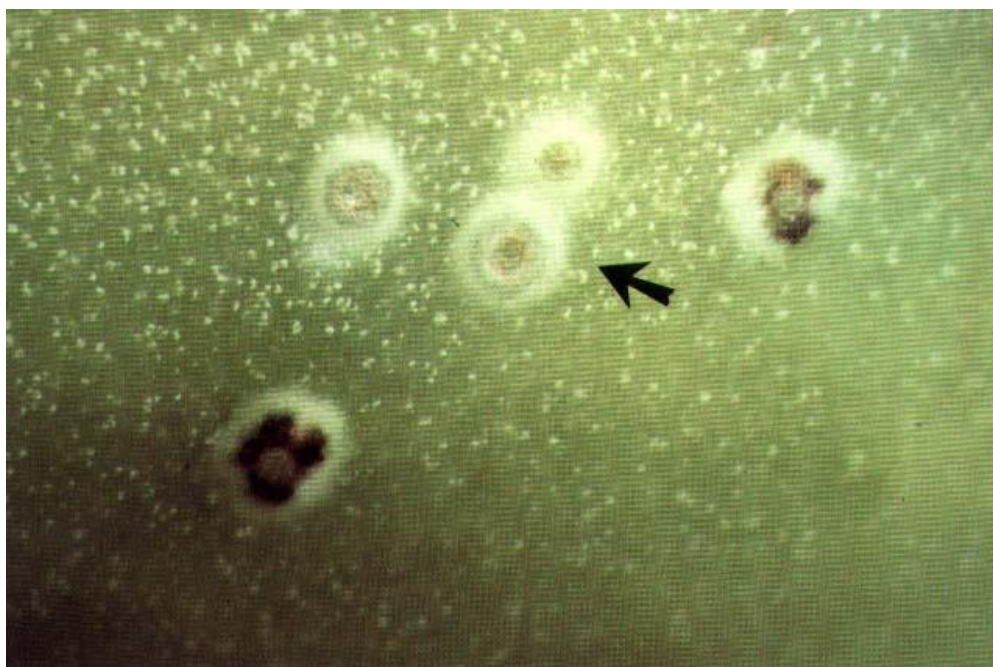


Εικόνα 1.2: Φυτό τομάτας με εμφανές το σύμπτωμα της ημιπληγίας ([www.eppo.org](http://www.eppo.org))





Εικόνα 1.3: Καστανός μεταχρωματισμός των αγγείων σε επιμήκη τομή προσβεβλημένου βλαστού ([www.forestryimages.org](http://www.forestryimages.org) )



Εικόνα 1.4: Χαρακτηριστικό σύμπτωμα «μάτι πτηνού» (bird's eye) σε καρπό τομάτας που προκαλείται από την ασθένεια ([www.bitkisagligi.net](http://www.bitkisagligi.net)).

### **1.1.2 Συνθήκες ανάπτυξης και επιδημιολογία**

Το βακτήριο μπορεί να χαρακτηριστεί ως εδαφογενές παθογόνο, αλλά μπορεί να μεταδίδεται και με το σπόρο. Στο φυτό μπαίνει από τις πληγές των ριζών και του λαιμού που προκαλούνται από έντομα, νηματώδεις, κατά τη μεταφύτευση, με τα καλλιεργητικά εργαλεία (Εικόνα 1.5, 1.6). Εγκαθίσταται στο ξύλο και εν συνεχεία στο φλοιό και την εντεριώνη προκαλώντας διασυστηματική προσβολή με πληθυσμό άνω του  $10^9$  βακτηριακών κυττάρων/γραμμάριο φυτικού ιστού. Η είσοδος του παθογόνου μπορεί να γίνει και από φυσικά ανοίγματα του ξενιστή όπως στομάτια, υδατώδη, τρίχες ή ακόμη και από άλλες εναέριες πληγές ή λύσεις της συνέχειας της επιδερμίδας. Στην περίπτωση των εναέριων πληγών, οι μολύνσεις έχουν κατά κανόνα τοπικό χαρακτήρα (Gartemann et al., 2003, Παναγόπουλος, 1992, Tsiantos, 1987).

Η μετάδοση του παθογόνου στον αγρό και το θερμοκήπιο γίνεται με τα μολυσμένα φυτάρια καθώς και με ορισμένες καλλιεργητικές επεμβάσεις και εργαλεία όπως μαχαιρίδια και ψαλίδια κλαδέματος μέσω των τομών που δημιουργούνται. Ο βροχερός καιρός σε συνδυασμό με άνεμο καθώς και πότισμα με τεχνητή βροχή όσον αφορά στον αγρό, αλλά και επικράτηση συνθηκών υψηλής ατμοσφαιρικής υγρασίας και συνωστισμού των φυτών όσον αφορά στα θερμοκήπια, αποτελούν ευνοϊκές συνθήκες διάδοσης του παθογόνου.

Επιπλέον, όπως έχει ήδη αναφερθεί, το παθογόνο μπορεί να επιβιώσει στον σπόρο και να μεταδοθεί μέσω αυτού σε περιοχές μη μολυσμένες. Μετά την εγκατάσταση του παθογόνου σε μια αμόλυντη περιοχή, μεγάλη σημασία έχει για την επιβίωσή του η διαχείριση των υπολειμμάτων της καλλιέργειας. Σε εδάφη που έχουν υπολείμματα προσβεβλημένων φυτικών ιστών, το παθογόνο μπορεί να επιβιώσει 2 έτη (Gleason et al., 1991). Το παθογόνο μπορεί να επιβιώσει και σε ορισμένα ζιζάνια, ιδιαίτερα τα πολυετή σολανώδη (Παναγόπουλος, 1992).

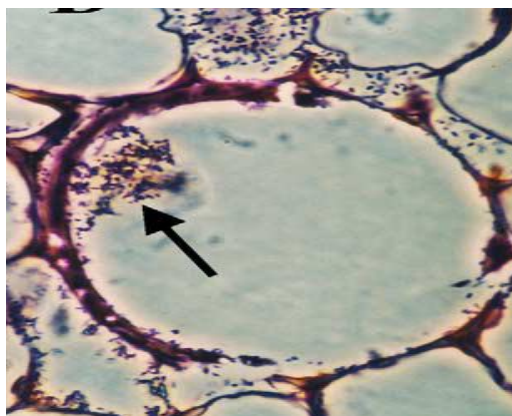
Η ασθένεια ευνοείται σε θερμοκρασίες 24-32°C και είναι σοβαρότερη στα ελαφρότερα αμμώδη εδάφη, όταν τα φυτά καλλιεργούνται σε περιβάλλον που ευνοείται η ανάπτυξη σαρκώδους βλαστήσεως και υπό συνθήκες ελλιπούς φωτισμού. Η υψηλή σχετική υγρασία ή βροχές αποτελούν επίσης ευνοϊκούς παράγοντες για την εξέλιξη της ασθένειας (Παναγόπουλος, 1992).

Γενικά, το παθογόνο μολύνει τους ξενιστές του με τρεις κύριους μηχανισμούς. Πρώτον, μέσω μηχανικής απόφραξης των αγγείων του ξύλου, δεύτερον μέσω τοξικής δράσης των εξωκυτταρικών πολυσακχαριτών (exopolysaccharides, EPS) και τρίτον μέσω της καταλυτικής δράσης εξωκυτταρικών ενζύμων κατά των φυτικών ιστών.

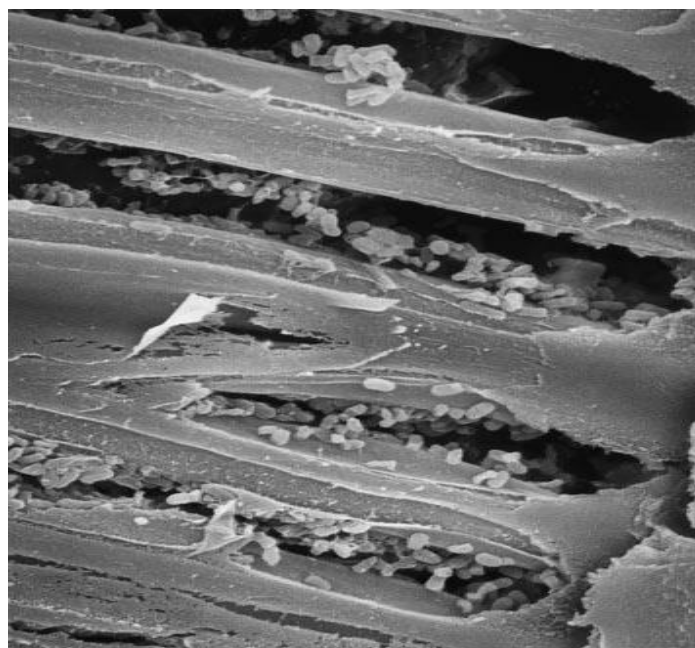
Προκειμένου να εξηγηθεί ο μηχανισμός πρόκλησης μάρανσης του ξενιστή από το παθογόνο, έχει διατυπωθεί μία υπόθεση κατά την οποία καθώς τα βακτηριακά κύτταρα εγκαθίστανται στα αγγεία του ξύλου του ξενιστή, μία φυσιολογική δυσλειτουργία στη μεταφορά νερού προκαλεί έντονη υδατική καταπόνηση με αποτέλεσμα τη μάρανση των ιστών του ξενιστή. Η σύνθεση εξωκυτταρικών πολυσακχαριτών αποτελεί ένα σημαντικό παράγοντα της απόφραξης των αγγείων του

ξύλου. Όπως στα περισσότερα φυτοπαθογόνα βακτήρια, το *Cmm* παράγει μεγάλου μοριακού βάρους όξινους εξωκυτταρικούς πολυσακχαρίτες, οι οποίοι συντελούν πολλαπλό βιολογικό ρόλο και συγκεκριμένα δημιουργούν ένα κορεσμένο υδατικά περιβάλλον γύρω από τα βακτήρια ως προστασία κατά της αφυδάτωσης, ελέγχοντας ταυτόχρονα την επιλεκτική πρόσληψη ιόντων καθώς συγκεντρώνουν γύρω τους ποσότητες θρεπτικών για τα βακτήρια ουσιών (Leigh and Coplin, 1992). Επίσης έχει φανεί ότι προστατεύουν τα βακτήρια από τη δέσμευση τοξικών για αυτά ουσιών. Ιδίως στο πλαίσιο των αλληλεπιδράσεων μεταξύ των βακτηρίων και των φυτών, οι EPS μπορεί να εμποδίσουν την αναγνώριση των βακτηρίων από το αμυντικό σύστημα των φυτών. Επιπλέον οι εξωκυτταρικοί πολυσακχαρίτες μπορεί να προστατεύσουν τα βακτήρια κατά συστατικών του αμυντικού συστήματος των φυτών μέσω παρεμπόδισης των συγκολλητινών ή λεκτινών, αποτοξικοποίηση των φυτοαλεξινών ή δραστικών ομάδων οξυγόνου. Επίσης, οι EPS μπορούν να μεσολαβήσουν στην πρόσφυση του βακτηριακού κυττάρου με αβιοτικές και βιοτικές στερεές επιφάνειες και ως εκ τούτου στην προώθηση της μόλυνσης του φυτού ξενιστή, με αποτέλεσμα την ουσιαστική ανάπτυξη της ασθένειας. Ο προσδιορισμός των εξωκυτταρικών πολυσακχαριτών του *Cmm* έχει δείξει ότι είναι ταυτόσημοι με τους EPS του *C. michiganensis* subsp. *insidiosus* έχοντας μοριακό βάρος της τάξεως 1-10 MDa αποτελούμενων από φουκόζη, γαλακτόζη και γλυκόζη σε αναλογία 2:1:1.

Όσον αφορά στα εξωκυτταρικά ένζυμα, έχει ανιχνευθεί η δράση ενδοκυτταρινασών, πολυγαλακτορουνασών, πηκτινομεθυλεστερασών και ξυλανασών. Τα ένζυμα αυτά μπορούν να αποδομήσουν τα συστατικά κυτταρικών τοιχωμάτων του ξενιστή με αποτέλεσμα το βακτήριο να προσεγγίσει τα παρεγχυματικά κύτταρα και αγγεία του ξύλου του ξενιστή συμβάλλοντας στην ανάπτυξη της ασθένειας. Είναι σαφές πλέον ότι τα εξωκυτταρικά ένζυμα αποδομώντας τα βιολογικά μακρομόρια, παίζουν σημαντικό ρόλο στην εκμετάλλευση όλων των ενεργειακών πηγών του ξενιστή. Παρά ταύτα, ο κρίσιμος ρόλος των εξωκυτταρικών ενζύμων δεν έχει ακόμα εξακριβωθεί πλήρως (Gartemann et al., 2003).



Εικόνα 1.5: Μικροσκοπική απεικόνιση εισόδου του *Clavibacter michiganensis* subsp. *michiganensis* σε τομή κυττάρου ξύλου από προσβεβλημένο ιστό φυτού τομάτας (Jahr et al., 2000).



Εικόνα 1.6: Επιμήκης τομή αγγείων ξύλου τομάτας προσβεβλημένων από *Clavibacter michiganensis* subsp. *michiganensis*. Εικόνα από ηλεκτρονικό μικροσκόπιο σάρωσης (Jahr et al., 1999).



### 1.1.3 Διάγνωση

Για τη διάγνωση του *Cmm* εφαρμόζεται μία σειρά κατάλληλων διαδικασιών. Η κλινική διάγνωση αποτελεί την πρώτη διαγνωστική προσέγγιση και συνίσταται στην προσπάθεια ανίχνευσης χαρακτηριστικών για την ασθένεια συμπτωμάτων όπως αυτά περιγράφηκαν παραπάνω. Ωστόσο η κλινική διάγνωση δεν είναι πάντοτε εμπεριστατωμένη και ακριβής καθώς απαιτεί ιδιαίτερη εμπειρία (Τζάμος, 2004).

Η εργαστηριακή διάγνωση ξεκινά με τη μελέτη της συμπτωματολογικής εικόνας του ασθενούς φυτού και ακολουθεί η μικροσκοπική παρατήρηση όπου στο μικροσκόπιο παρατηρούμε έξοδο βακτηριακών κυττάρων από τον εξεταζόμενο ιστό. Στη συνέχεια της διαδικασίας γίνεται η απομόνωση του παθογόνου υπό ασηπτικές συνθήκες και η γραμμική διασπορά σε κατάλληλο θρεπτικό υπόστρωμα. Εφόσον αναπτυχθούν οι αποικίες στο υπόστρωμα, λαμβάνεται βακτηριακό αιώρημα από μεμονωμένη αποικία και εφαρμόζεται η δοκιμή αντίδρασης υπερευαισθησίας σε φυτά δειλινού (*Mirabilis jalapa*) και σπορόφυτα καπνού (*Nicotiana tabacum*) (Alarcón et al., 1998, Hibberd et al., 1996).

Εκτός από τη δοκιμή υπερευαισθησίας, η εργαστηριακή διάγνωση περιλαμβάνει και την χρώση Gram. Η χρώση GRAM διαφοροποιεί τα βακτήρια σε δύο κατηγορίες : τα Gram(+) και τα Gram(-). Τα Gram (+) βακτήρια διατηρούν τον συνδυασμό της χρωστικής του κρυσταλλικού ιώδους με το ιώδιο, γιατί δημιουργείται σύμπλοκο με συγκεκριμένα συστατικά του κυτταρικού τοιχώματος και του κυττοπλάσματός τους, αποκτώντας ιώδες χρώμα . Τα Gram (-) βακτήρια δεν αποκτούν αυτή τη σχέση συμπλόκου των δομικών συστατικών τους με το συνδυασμό της χρωστικής-ιωδίου η οποία αποπλένεται με την αιθανόλη, καθιστώντας τα βακτήρια σχεδόν «αόρατα», ή πορφυρά, εάν έχει προστεθεί στην όλη διαδικασία και η δεύτερη χρωστική σαφρανίνη. Επισημαίνεται ότι τα θετικά κατά Gram βακτήρια τείνουν να γίνουν αρνητικά με την πάροδο της ηλικίας τους. Ως εκ τούτου είναι απαραίτητη η χρήση νεαρών καλλιεργειών για χρώση Gram (Τζάμος, 2004).

Για τη διάγνωση του παθογόνου μπορεί να εφαρμοστούν επίσης μορφολογικές, φυσιολογικές και βιοχημικές δοκιμές. Διάφορα θρεπτικά προφίλ εμπορικών σκευασμάτων (kits) έχουν αναπτυχθεί τα οποία στηρίζονται στο μεταβολισμό, από τα βακτήρια, θρεπτικών υποστρωμάτων σε συγκεκριμένα οργανικά οξέα. Η ανίχνευση των λιπαρών οξέων των βακτηρίων μέσω της αέριας χρωματογραφίας καθώς και των πρωτεϊνών με τη χρησιμοποίηση ηλεκτροφόρησης σε πήγμα πολυακρυλαμίδης έχουν αναφερθεί ως διαγνωστικές μέθοδοι, χωρίς όμως ευρεία χρήση καθώς η σημασία τους είναι κυρίως ταξινομική για το είδος παρά διαγνωστική. Αναφέρεται ότι η ανίχνευση του δεκαπεντενοϊκού οξέος (C15:1) μέσω αέριας χρωματογραφίας σε αναλογία 2,56% και άνω επί του συνόλου των λιπιδίων έχει αποτελέσει διαγνωστικό χαρακτήρα για την παρουσία του *Cmm* με επίπεδο εμπιστοσύνης P=0.10 (Gitaitis and Beaver, 1990, Κυριακοπούλου και Παπλωματάς, 2004).

Οι ορολογικές μέθοδοι χρησιμοποιούνται στην ανίχνευση των βακτηρίων μέσα στους ιστούς των φυτών, σε δείγματα σπόρων και στο έδαφος στα υπολείμματα καλλιέργειας. Στηρίζονται στην εξειδικευμένη προσκόλληση αντιγόνων-αντισωμάτων και ενδεικτικά αναφέρονται η δοκιμή ανοσοφθορισμού (Immunofluorescence), η ανοσοδιάχυση (Immunodiffusion) και η ενζυμική ανοσοπροσροφητική μέθοδος (Enzyme Linked-ImmunoSorbent Assay, ELISA) (Κυριακοπούλου και Παπλωματάς, 2004).

Η χρήση μοριακών τεχνικών έχει αυξήσει κατά πολύ την ικανότητά μας στην ανίχνευση φυτοπαθογόνων βακτηρίων προσφέροντας ταχύτητα, ευαισθησία και ακρίβεια στη διάγνωση. Από αυτές, η μέθοδος του μοριακού υβριδισμού (nucleic acid hybridization) στηρίζεται στην αρχή συμπληρωματικότητας των πουρινικών και πυριμιδινικών βάσεων. Γνωρίζοντας την αλληλουχία των νουκλεοτιδίων του προς ανίχνευση παθογόνου, κατασκευάζεται ένα συμπληρωματικό τμήμα του, σημασμένο με κατάλληλες ουσίες. Το τμήμα αυτό χρησιμοποιείται ως ανιχνευτής του ομολόγου τμήματος του νουκλεοξέος του υπό ανίχνευση παθογόνου. Το υπό ανίχνευση νουκλεϊκό οξύ μετουσιώνεται ώστε η διπλή αλυσίδα του μορίου να μετατραπεί σε δύο μονόκλωνες. Ο σημασμένος ανιχνευτής προσεγγίζει το συμπληρωματικό του τμήμα και υβριδίζει. Κατόπιν, ανάλογα με τον τρόπο σήμανσεως του ανιχνευτή γίνεται εντοπισμός και οπτικοποιείται το αποτέλεσμα (Τζάμος, 2004, Κυριακοπούλου και Παπλωματάς, 2004).

Παρά τη μεγάλη σημασία ορισμένων από τις παραπάνω τεχνικές, η μεγάλη πρόοδος στην ανίχνευση και διάγνωση όχι μόνο των βακτηρίων αλλά του συνόλου των παθογόνων, έχει επέλθει με την ανάπτυξη της τεχνικής της αλυσιδωτής αντίδρασης πολυμεράσης (Polymerase Chain Reaction, PCR). Η μέθοδος βασίζεται στην *in vitro* εκθετική ενίσχυση συγκεκριμένου τμήματος DNA με αποτέλεσμα τη σύνθεση ικανής ποσότητας για ανίχνευση και προσδιορισμό του οργανισμού από τον οποίο προέρχεται. Για την εφαρμογή της μεθόδου απαιτείται να είναι γνωστή η αλληλουχία των δύο άκρων του προς ενίσχυση τμήματος (DNA στόχος). Έτσι, συντίθενται oligομερή τμήματα DNA, το καθένα συμπληρωματικό του αντίστοιχου άκρου, οι DNA εκκινητές. Η αντίδραση λαμβάνει χώρα με την εφαρμογή αρκετών διαδοχικών κύκλων θερμάνσεως και ψύξεως, ενώ το ένζυμο που χρησιμοποιείται για τον πολυμερισμό του DNA στόχου είναι μια θερμοάντοχη DNA πολυμεράση. Γενικά το εξαιρετικό πλεονέκτημα της μεθόδου είναι η εγγενής της δυνατότητα για αύξηση της ευαισθησίας της μέχρι του σημείου ανιχνεύσεως έστω και ενός μόνο μορίου νουκλεϊκού οξέος του εξεταζόμενου δείγματος.

### 1.1.4 Αντιμετώπιση

Το βακτήριο αποτελεί φυτοπαθογόνο καραντίνας στην Ευρωπαϊκή Ένωση καθώς και πολλές άλλες χώρες παραγωγής τομάτας. Θα πρέπει εδώ να σημειωθεί ότι δεν υπάρχει κάποιο χημικό σκεύασμα φυτοπροστατευτικού προϊόντος το οποίο να είναι εγκεκριμένο για χρήση εναντίον του βακτηριακού έλκους της τομάτας, όπως επίσης και η χρήση αντιβιοτικών στα φυτά η οποία υπόκειται σε καθεστώς απαγόρευσης. Η ανάγκη όμως για αποτελεσματικότερη αντιμετώπιση του παθογόνου οδήγησε την έρευνα στην ανάπτυξη εναλλακτικών μεθόδων. Αξιολογώντας όσα έχουν αναφερθεί ανωτέρω που αφορούν στη βιολογία του παθογόνου που προκαλεί το βακτηριακό έλκος της τομάτας, μπορούμε με την εφαρμογή μιας σειράς μέτρων να αντιμετωπίσουμε το παθογόνο. Πιο συγκεκριμένα:

- Η χρησιμοποίηση υγιούς πολλαπλασιαστικού υλικού, έχει ιδιαίτερη σημασία για την αντιμετώπιση της ασθένειας. Η χρήση υγιών σπόρων που προέρχονται από αμόλυντες καλλιέργειες είναι, όπως για κάθε ασθένεια, ο σημαντικότερος παράγοντας για την πρόληψη της διάδοσης και εκδήλωσης της ασθένειας. Επιπλέον είναι αναγκαία η απολύμανση του εδάφους του σπορείου αλλά και οποιοδήποτε άλλου εδαφικού υποστρώματος.
- Ο ύποπτος μολύνσεως σπόρος απολυμαίνεται με εμβάπτιση σε νερό θερμοκρασίας 50-55°C επί 25-30 λεπτά.
- Εφ' όσον ο αριθμός των προσβεβλημένων φυτών δεν είναι μεγάλος, συνιστάται η εκρίζωσή τους μαζί με το ριζικό σύστημα αλλά και μέρος εδάφους και κατόπιν καταστροφή σε απομακρυσμένο από τη φυτεία μέρος.
- Καταστροφή των υπολειμμάτων μετά το τέλος της καλλιεργητικής περιόδου.
- Το κλάδεμα να γίνεται με το χέρι ή τα εργαλεία κλαδέματος να απολυμαίνονται συνεχώς.
- Το νερό της άρδευσης να μη διέρχεται από προσβεβλημένες φυτείες.
- Καταπολέμηση των σολανωδών ζιζανίων.
- Εφαρμογή προγράμματος αμειψισποράς. Σε περιπτώσεις εντατικών καλλιεργειών, όπως οι θερμοκηπιακές, η εφαρμογή αμειψισποράς καθίσταται πρακτικά αδύνατη.
- Χρήση ανθεκτικών ποικιλιών. Ανθεκτικές ποικιλίες θεωρούνται οι Bulgaria 12, Utah 737, Utah 20, H 2990, Heinz 2274, BOG AT69 (Παναγόπουλος, 1992). Επιπλέον, σε μελέτη των Kabelka et al. (2002), έγινε χρήση μοριακών δεικτών (quantitative trait loci, QTL) που συμβάλλουν στην ικανότητα ανθεκτικότητας του ξενιστή εναντίον του βακτηριακού έλκους της τομάτας. Η ανάλυση των αποτελεσμάτων έδειξε ότι τουλάχιστον δύο γονίδια από το *Lycopersicon hirsutum*, και συγκεκριμένα το γονίδιο Rcm 2.0 στο

χρωμόσωμα 2 και Rem 5.1 στο χρωμόσωμα 5, συμβάλουν στην ανθεκτικότητα.

- Η εφαρμογή της μεθόδου της ηλιοαπολύμανσης του εδάφους έχειδειχθεί ότι αντιμετωπίζει με επιτυχία την ασθένεια. Συγκεκριμένα, σε πειράματα θερμοκηπίου που διεξήχθησαν στη Δυτική Ελλάδα έγινε κάλυψη του εδάφους με διαφανή φύλλα πολυαιθυλενίου για χρονική διάρκεια 6-8 εβδομάδες. Η μέθοδος αυτή μείωσε σημαντικά τα συμπτώματα που προκαλούνται από το παθογόνο. Η θερμική επίδραση κατά του παθογόνου αλλά και η παρουσία βακτηρίων του γένους *Pseudomonas*, *Bacillus*, *Streptomyces* ως παραγόντων βιολογικής καταπολέμησης, συμβάλλουν στην αποτελεσματικότητα της μεθόδου. (Antonίου et al., 1995).

Σε έρευνα που έχει γίνει για την επίδραση φυτικών ουσιών στο *Clavibacter michiganensis* subsp. *michiganensis*, έχειδειχθεί ότι τα αιθέρια έλαια της ρίγανης του θυμαριού και του δίκταμου παρουσιάζουν παρεμπόδιση σε *in vitro* καλλιέργεια του παθογόνου, σε συγκεντρώσεις 100, 85 και 100 μg αιθέριου ελαίου/ml θρεπτικού υποστρώματος ΝΑ (Nutrient Agar) αντιστοίχως για κάθε φυτό (Πίνακας 1.1). Τα αιθέρια έλαια ως αντιμικροβιακές ουσίες πλεονεκτούν ως προς τη φυσική τους προέλευση με την έννοια ότι είναι ασφαλή για τον άνθρωπο και το περιβάλλον αλλά και εκτιμώνται ως χαμηλού κινδύνου για ανάπτυξη ανθεκτικότητας από το παθογόνο εξαιτίας του πολυάριθμου μίγματος ουσιών των αιθερίων ελαίων τα οποία προφανώς και διέπονται από διαφορετικούς μηχανισμούς δράσης (Daferera et al., 2003).

Πίνακας 1.1: Επίδραση (αποτελεσματική συγκέντρωση) αιθερίων ελαίων φυτών για την καταπολέμηση *in vitro* του *Clavibacter michiganensis* subsp. *michiganensis* (Daferera et al., 2003).

ΦΥΤΙΚΟ ΕΙΔΟΣ	ΚΥΡΙΑΡΧΟ ΑΙΘ. ΕΛΑΙΟ	ED50*
<i>Origanum vulgare</i>	Θυμόλη	67
<i>Thymus capitatus</i>	Καρβακρόλη	39
<i>Origanum dictamnus</i>	Καρβακρόλη	88
<i>Origanum majorana</i>	Καρβακρόλη	119
<i>Lavandula angustifolia</i>	Λιναλόλη	252
<i>Salvia fruticosa</i>	Ευκαλυπτόλη	211

\*ED<sub>50</sub> (Effective dose 50): Η συγκέντρωση του αιθέριου ελαίου (mg/ml), που προκαλεί μείωση κατά 50% στην ικανότητα σχηματισμού αποικιών του *Cmm*.

Σε μελέτη των Utkhede και Koch (2004), αξιολογήθηκε μια σειρά βιολογικών σκευασμάτων στην ικανότητα αντιμετώπισης του βακτηριακού έλκους της τομάτας. Μελετήθηκε η επίδραση στην ανάπτυξη του παθογόνου *in vitro* και σε φυτά τομάτας σε συνθήκες θερμοκηπίου των σκευασμάτων *Bacillus subtilis* (Quadra 136, Quadra 137), *Rhodosporidium diobovatum* (S33), *Trichoderma harzianum* (RootShield®), vermicompostea, και του ενζύμου λυσοζύμη. Σε φυτά τομάτας που εφαρμόστηκε λυσοζύμη συγκέντρωσης 10g/L και 100 g/L, το ύψος των φυτών ήταν σημαντικά μεγαλύτερο σε σχέση με το μολυσμένο θετικό μάρτυρα, ενώ δεν διέφερε σε σχέση με τους αρνητικούς μάρτυρες. Ο ψεκασμός των Quadra 136 (0,3g/L), Quadra 137 (0.5g/L), S33 (10<sup>9</sup> CFU/ml), RootShield® (0.6 g/L), και ενσωμάτωση στο υπόστρωμα vermicompostea, έδειξε αποτελεσματικότητα στην αντιμετώπιση της ασθένειας όπως φαίνεται στον Πίνακα 1.2 (Hodge, 2000).

Πίνακας 1.2: Επίδραση των βιολογικών ουσιών στην αντιμετώπιση του βακτηριακού έλκους της τομάτας (Utkhede and Koch, 2004).

ΕΦΑΡΜΟΓΗ	ΣΥΓΚΕΝΤΡΩΣΗ	ΜΟΛΥΝΣΗ (%)	ΚΑΤΑΣΤΟΛΗ ΑΣΘΕΝΕΙΑΣ (%)
Μάρτυρας (+)		71,6	
Quadra 136	0.3 g/l	18.4	74
RootShield®	0.6 g/l	26.6	63
Lysozyme	10.0 g/l	26,6	63
Vermicompostea		26,6	63
S33	1*10 <sup>9</sup> CFU/ml	33,2	54
Quadra 137	0.5 g/l	33,2	54
Μάρτυρας (-)		0.0	

Μια άλλη κατεύθυνση όπου έχει στραφεί η έρευνα για την αντιμετώπιση του παθογόνου, είναι η μελέτη της επαγωγής λανθανόντων μηχανισμών ανοχής των φυτών. Σε παρακάτω κεφάλαιο γίνεται αναφορά της υφιστάμενης έρευνας η οποία έχει εκπονηθεί για την κατανόηση της λειτουργίας των μηχανισμών αυτών.

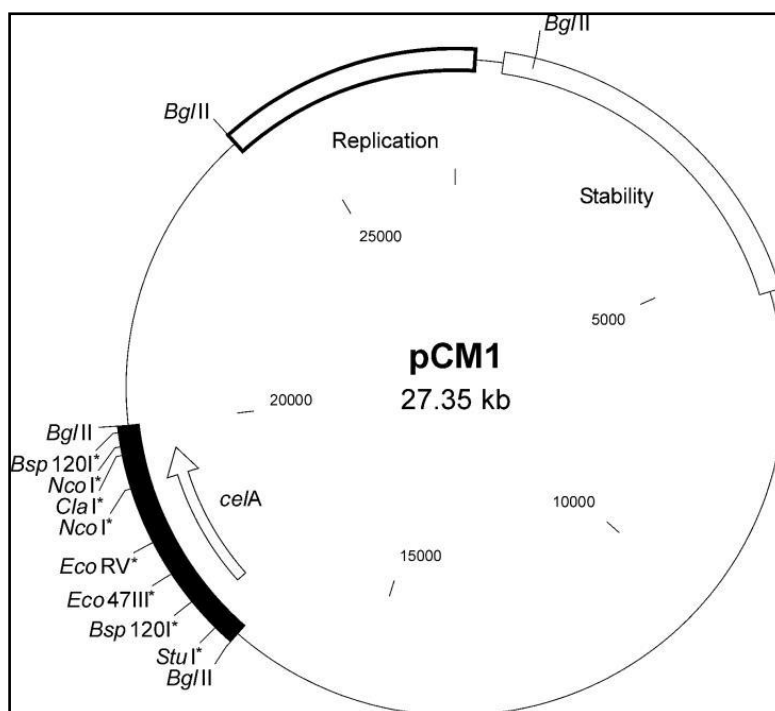
### 1.1.5 Στοιχεία μοριακής μελέτης

Η ανάπτυξη της μοριακής βιολογίας και η εφαρμογή των αρχών της στη φυτοπαθολογία έχει δώσει ώθηση στη μελέτη του γονιδιώματος και τον χαρακτηρισμό του *Clavibacter michiganensis* subsp. *michiganensis*. Η μελέτη των μοριακών μηχανισμών με τους οποίους το *Cmm* προσβάλλει τα φυτά τομάτας, προϋποθέτει τον προσδιορισμό των γονιδίων που εμπλέκονται στην παθογένεια και το χαρακτηρισμό της λειτουργίας και του ρόλου των προϊόντων των γονιδίων αυτών. Ωστόσο, η γενετική ανάλυση της παθογένειας των Gram-θετικών βακτηρίων εμφανίζει αρκετούς περιορισμούς λόγω έλλειψης γενετικών εργαλείων και μεθόδων δεδομένου ότι εκείνα έχουν αναπτυχθεί και εφαρμοστεί σε Gram-αρνητικά βακτήρια.

Η έρευνα του *Cmm* για την παρουσία πλασμιδίων έδειξε ότι πολλά στελέχη περιέχουν δύο πλασμίδια. Ενδεικτικά, το βακτηριακό στέλεχος *Clavibacter michiganensis* subsp. *michiganensis* NCPPB382, φέρει δύο πλασμίδια, το pCM1 (27,35 kb) και το pCM2 (72 kb), από τα οποία εκφράζονται γονίδια σχετιζόμενα με την μολυσματικότητα του βακτηρίου. Στο πλασμίδιο pCM2 υπάρχει κωδικοποιημένο το γονίδιο *pat-1* το οποίο εκφράζει μια πρωτεάση (serine protease). Το πλασμίδιο pCM-1 φέρει το γονίδιο *cel-1* μιας ενδογλουκανάσης και συγκεκριμένα της ενδο-β-1,3-γλουκανάσης. Το *cel-1* γονίδιο κωδικοποιεί την CelA πρωτεΐνη (78 kDa, 746 αμινοξέα) που ανήκει στην κατηγορία των A<sub>1</sub> κυτταρινασών (Metzelus et al., 1993, Jahr et al., 2000).

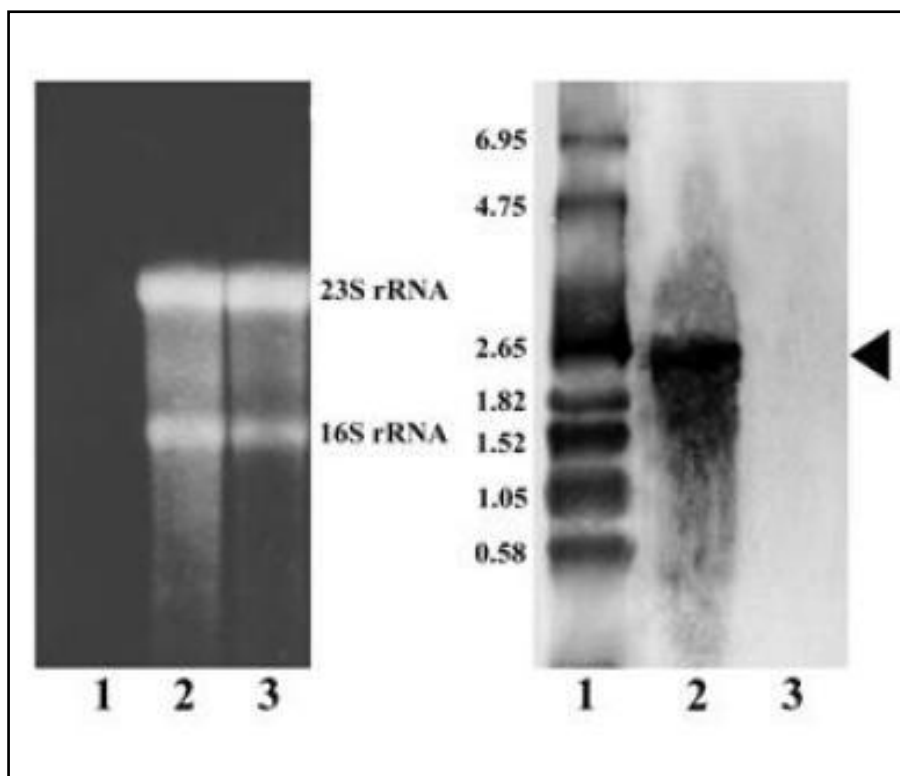
Από τη μελέτη της CelA πρωτεΐνης, φαίνεται ότι αυτή διαδραματίζει μείζονα ρόλο στη μολυσματικότητα του παθογόνου. Για να αποδειχθεί αυτό έχει αναπτυχθεί μια διαδικασία κατά την οποία αφού το πλασμίδιο κλωνοποιηθεί, γίνεται διαγραφή του *cel-1* γονιδίου και κατόπιν συμπληρωματικότητα και έλεγχος της έκφρασης (complementation). Μετά από αυτή τη διαδικασία ακολουθεί η φαινοτυπική ανάλυση (Jahr et al., 2000).

Στο *Cmm* NCPPB382, η απώλεια των πλασμιδίων pCM-1 και pCM-2 οδηγεί σε ένα μη μολυσματικό βακτηριακό στέλεχος ονομαζόμενο CMM100. Στο βακτηριακό στέλεχος που φέρει μόνο το pCM-1 πλασμίδιο (CMM101), παρατηρείται η παραγωγή της ενδο-β-1,3-γλουκανάσης, που παρουσιάζει όμως μειωμένη μολυσματικότητα η οποία προκαλεί καθυστέρηση στην εμφάνιση των τυπικών συμπτωμάτων της ασθένειας κατά 6 ημέρες σε σύγκριση με το στέλεχος NCPPB382. Έχει επίσηςδειχθεί ότι το 3,2 kb *Bgl*III τμήμα περιορισμού B<sub>1</sub> του πλασμιδίου pCM-1 φέρει το *cel-1* γονίδιο (Εικόνα 1.7). Μετασχηματισμός του CMM100 στελέχους με το πλασμίδιο pDM302:B1 επανέφερε την δράση της ενδογλουκανάσης *in vitro* (δοκιμή τρυβλίων με καρβοξυμεθυλοκυτταρίνη) αλλά και στους φυτικούς ιστούς (Jahr et al., 2000).



Εικόνα 1.7: Απεικόνιση του πλασμιδίου pCM1. Το τμήμα *BglII*-1 αποτελεί τη σκιασμένη περιοχή, ενώ με το βέλος φαίνεται η περιοχή του γονιδίου της ενδο-β-1,3-γλουκανάσης (*CelA*).

Για τη μελέτη της μεταγραφής του *cel1* γονιδίου και της έκφρασης της αντίστοιχης *CelA* πρωτεΐνης, έχει γίνει αποτύπωμα του RNA κατά Northern και κατόπιν ανάλυση με υβριδισμό. Συγκεκριμένα, έγινε εξαγωγή αρχικά του RNA από το CMM100 (plasmid free) και το CMM101(pCM1) και ελήφθη το αποτύπωμα κατά Northern. Ακολούθως με τη βοήθεια κατάλληλου RNA ανιχνευτή συμπληρωματικού προς το *cel1* mRNA, γίνεται υβριδισμός και λαμβάνεται το αποτέλεσμα (Εικόνα 1.8). Από αυτό προκύπτει μια μεταγραφή του RNA περίπου 2400 νουκλεοτιδίων στο στέλεχος CMM101(pCM1), ενώ για το στέλεχος CMM100 δεν προκύπτει τέτοια μεταγραφή (Jahr et al., 2000).



Εικόνα 1.8: Ανάλυση του *celI* RNA. Αριστερά, απεικόνιση σε πήγμα αγαρόζης του εξαγόμενου RNA από το CMM101(γραμμή 1) και CMM100 (γραμμή 2) με τις 23S και 16S ως εξέχουσες ζώνες. Δεξιά, σημασμένος με διγοξigenίνη RNA δείκτης (γραμμή 1, μέγεθος σε kilonucleotides, knt). Υβριδισμός με τον *celA* ανιχνευτή ταυτοποιεί μια μεταγραφή 2,4 knt που υποδεικνύεται με το βέλος (γραμμή 1). Στο CMM100 (plasmid free) δεν ανιχνεύεται αντίστοιχη μεταγραφή (γραμμή 3).



## **1.2 Το αμυντικό σύστημα των φυτών**

Τα φυτά εξελίσσονται στη φύση παράλληλα με τα παθογόνα εδώ και εκατομμύρια χρόνια. Όμως, τα φυτά είναι ανθεκτικά στην πλειονότητα των παθογόνων, στα οποία δεν επιτρέπουν να τα προσβάλλουν και να τους προκαλούν ασθένειες. Η ικανότητα αυτή των φυτών να ανθίστανται στις επιθέσεις των παθογόνων αποτελεί βασική προϋπόθεση για τη διατήρηση κάθε φυτικού είδους. Ένας οργανισμός για να προκαλέσει ασθένεια σε ένα συγκεκριμένο ξενιστή πρέπει, μεταξύ άλλων, να είναι ικανός να υπερνικήσει τους αμυντικούς μηχανισμούς του, να καταστείλει βασικές κυτταρικές λειτουργίες του καθώς και να διαταράξει τις φυσιολογικές, βιοχημικές και μοριακές διεργασίες του φυτού.

Η εξελικτική πορεία των φυτικών ειδών προϋποθέτει μία διαδικασία προσαρμογής τους στις συνθήκες του περιβάλλοντος με αποτέλεσμα την ανάπτυξη των αμυντικών μηχανισμών, οι οποίοι τα προφυλάσσουν από τις προσβολές των περισσοτέρων παθογόνων. Η παράλληλη όμως εξέλιξη ξενιστή-παθογόνου εξασφαλίζει τη δυνατότητα επιβίωσης και του παθογόνου. Έτσι, όταν το φυτό αποκτήσει, μέσω της εξέλιξής του, ένα νέο μηχανισμό άμυνας, τότε το παθογόνο προσπαθεί να αποκτήσει ένα εναλλακτικό μηχανισμό για να επανακτήσει την παθογόνο του ικανότητα. Αυτοί οι δυναμικοί μηχανισμοί αναγνώρισης μεταξύ παθογόνου και φυτού έχουν συντελέσει στη δημιουργία εξειδικευμένων μηχανισμών αλληλεπίδρασης ανάμεσα στο σύστημα ξενιστή-παθογόνου (Agrios, 2005).

### ***1.2.1 Μηχανισμοί αντίδρασης φυτών στη μόλυνση από τα παθογόνα***

Τα διάφορα φυτικά είδη προσβάλλονται από έναν μεγάλο αριθμό παθογόνων μυκήτων, βακτηρίων, ιών, λοιπών προκαρυωτικών μικροοργανισμών. Συχνά τα φυτά μολύνονται από περισσότερα του ενός παθογόνα και παρόλο που μερικά καταλήγουν να υπόκεινται σε μικρότερου ή μεγαλύτερου βαθμού καταστροφές, αρκετά επιβιώνουν από αυτές τις μολύνσεις και καταφέρνουν να αναπτυχθούν και να δώσουν ικανοποιητική παραγωγή (Agrios, 2005).

Η άμυνα των φυτών εναντίον των παθογόνων είναι αποτέλεσμα ενός συνδυασμού: (α) δομικών χαρακτηριστικών τα οποία λειτουργούν ως φυσικό εμπόδιο που αποτρέπει την είσοδο και εξάπλωση των παθογόνων σε όλο το φυτό, και (β) επαγόμενων βιοχημικών αντιδράσεων που λαμβάνουν χώρα στα φυτικά κύτταρα και αφορούν στην έκφραση γονιδίων και την παραγωγή ουσιών οι οποίες είτε είναι τοξικές στα παθογόνα, είτε δημιουργούν συνθήκες για την παρεμπόδιση ανάπτυξης των εντός των φυτικών ιστών. Ο ανωτέρω συνδυασμός παρουσιάζει εξαιρετική πολυπλοκότητα και ποικίλει ως προς την ενεργοποίησή του στα διάφορα συστήματα ξενιστή-παθογόνου. Επιπλέον, ακόμα και όταν αναφερόμαστε στο ίδιο σύστημα

ξενιστή-παθογόνου, ο συνδυασμός μεταβάλλεται ανάλογα με την ηλικία του φυτού, το είδος του φυτικού οργάνου και ιστού που δέχεται την προσβολή, τη θρεπτική κατάσταση του φυτού, και τις επικρατούσες περιβαλλοντικές συνθήκες (Agrios, 2005).

Όσον αφορά στους μηχανισμούς άμυνας, τα φυτά έχουν αναπτύξει (I) ένα παθητικό αμυντικό σύστημα και (II) έναν εγγενή ενεργητικό μηχανισμό άμυνας που έχει διαφοροποιηθεί βιοχημικά στο:

- (α) βασικό ανοσοποιητικό σύστημα (basal innate immune system) που ενεργοποιείται 10-30 min μετά την επαφή του φυτού με το παθογόνο και
- (β) στο ανοσοποιητικό σύστημα των γονιδίων ανθεκτικότητας (resistance (R) - gene-mediated innate immune system) που ενεργοποιείται 2-3 h μετά την επαφή και την απελευθέρωση των διεγερτών από το παθογόνο στο φυτικό κύτταρο.

### ***1.2.1.1 Παθητικό αμυντικό σύστημα***

Το παθητικό αμυντικό σύστημα αναφέρεται στην αντοχή η οποία περιλαμβάνει προϋπάρχοντες στο φυτό, πριν τη μόλυνση, ανατομικούς-φυσικούς και βιοχημικούς μηχανισμούς άμυνας, οι οποίοι παρεμποδίζουν ή καθυστερούν την είσοδο ή εγκατάσταση του παθογόνου.

Η επιφάνεια του φυτού διαθέτει ορισμένα ανατομικά χαρακτηριστικά που το προστατεύουν από το παθογόνο και περιλαμβάνει (α) τα προστατευτικά στρώματα της φυτικής επιφάνειας, (β) τη δομή και λειτουργία των φυσικών ανοιγμάτων του φυτού και (γ) τα κυτταρικά τοιχώματα και ιστούς του φυτού. Πιο συγκεκριμένα, το κηρώδες επίχρισμα που σχηματίζεται στην επιφάνεια των φύλλων και καρπών και τα επιδερμικά τριχίδια, παρεμποδίζουν τη δημιουργία σταγονιδίων και άρα τη βλάστηση σπορίων καθώς επίσης και τους βλαστικούς σωλήνες των μυκήτων να προσεγγίσουν την επιφάνεια των φυτών. Η παχιά εφυμενίδα μπορεί να αυξήσει την αντοχή των φυτών σε παθογόνα που μολύνουν από άμεση διείσδυση με άσκηση μηχανικής πίεσης, αν και το πάχος της εφυμενίδας δε σχετίζεται πάντα με την αντοχή του ξενιστή. Επιπροσθέτως, ο αριθμός, η θέση, το μέγεθος και λειτουργία των φυσικών ανοιγμάτων (στομάτια, φακίδια, υδατώδη, ουλές) επηρεάζουν την είσοδο παθογόνων (Agrios, 2005, Τζάμος, 2004).

Αν και τα ανατομικά χαρακτηριστικά δίδουν στα φυτά ένα βαθμό αντοχής έναντι των παθογόνων, ωστόσο η αντοχή τους εξαρτάται περισσότερο από τις ουσίες που παράγονται στα κύτταρά τους. Η παθητική βιοχημική άμυνα των φυτών σχετίζεται άμεσα με τη σύνθεση και έκκριση αντιμικροβιακών ουσιών (τοξικών μεταβολιτών) από πλευράς φυτού. Οι αντιμικροβιακές αυτές ουσίες, γνωστές ως φυτοαντισιπίνες, παράγονται στα φυτά ως προϊόντα δευτερογενούς μεταβολισμού πριν από τη

μόλυνσή τους από τα παθογόνα και παίζουν σημαντικό ρόλο στην αντοχή των φυτών σε ορισμένες ασθένειες. Οι φυτοαντισιπίνες περιλαμβάνουν φαινολικές ενώσεις (κατεχόλες, ταννίνες), κυανογόνους γλυκοζίτες και σαπωνίνες (αβενασίνη) οι οποίες αποτελούνται από γλυκοζυλιωμένα στεροειδή και τερπενοειδή. Επίσης τα φυτά διαθέτουν για την άμυνά τους εναντίον των παθογόνων αντιμικροβιακές πρωτεΐνες και πεπτίδια οι οποίες: (α) δρουν ως αναστολείς των πρωτεϊνών ή των υδρολυτικών ενζύμων των παθογόνων, (β) αδρανοποιούν τα ξένα ριβοσώματα, (γ) αυξάνουν τη διαπερατότητα των ημιπερατών μεμβρανών των παθογόνων. Αναφέρεται επίσης ότι η απουσία ορισμένων θρεπτικών στοιχείων στο φυτό (υδατάνθρακες, πρωτεΐνες, βιταμίνες) που είναι απαραίτητα για την ανάπτυξη του παθογόνου αποτελεί έναν επίσης βιοχημικό μηχανισμό παθητικής αντοχής (Agris, 2005).

### *1.2.1.2 Εγγενής ενεργητικός μηχανισμός άμυνας*

Το πρώτο βήμα για την επιτυχή μόλυνση του παθογόνου σε έναν ξενιστή είναι η επαφή. Για την επίτευξη όμως της διεισδύσεως και εγκαταστάσεως του παθογόνου, είναι απαραίτητη η ροή γενετικών πληροφοριών σε παθογόνο και ξενιστή, οι οποίες θα εξασφαλίσουν την αλληλοαναγνώριση. Η αναγνώριση είναι πρωταρχικής σημασίας για την αλληλεπίδραση μεταξύ παθογόνων ή μη παθογόνων και ξενιστών φυτών καθώς είναι η βιοχημική και μοριακή διαδικασία που δίδει τη δυνατότητα στα παθογόνα να αναγνωρίζουν τους ξενιστές στο περιβάλλον τους μέσω εξειδικευμένων χαρακτηριστικών επιφανειών τους, ώστε να εξασφαλίσουν τη διείσδυση και κατόπιν τη μόλυνση. Καθοριστικό ρόλο για την αναγνώριση μεταξύ παθογόνου και ξενιστή παίζουν μία ομάδα μορίων που παράγονται από τα παθογόνα και καλούνται διεγέρτες (elicitors). Οι **διεγέρτες** έχουν ως σκοπό τη διέγερση ή την καταστολή του εγγενούς φυτικού ανοσοποιητικού συστήματος και τη μεταβίβαση μέσω των εξειδικευμένων προσδενοσών πρωτεϊνών (binding proteins) του μηνύματος στον ξενιστή για την είσοδο και μόλυνση με αποτέλεσμα την πρόκληση ή την αποτροπή εκδήλωσης ασθένειας από το παθογόνο αυτό. Οι προσδενοσες πρωτεΐνες αποτελούν τους υποδοχείς-δέκτες και εδράζονται στις κυτταρικές μεμβράνες ή στο κυτταρόπλασμα των φυτών (Montesano et al., 2003).

Ο ευρύτερος ορισμός των διεγερτών περιλαμβάνει τόσο τα μόρια παθογόνου προέλευσης (εξωγενείς διεγέρτες), όσο και τις ενώσεις που απελευθερώνονται από τα φυτά κατά την επαφή τους με τα παθογόνα (ενδογενείς διεγέρτες) ώστε το μήνυμα της απειλής μόλυνσης να ενισχυθεί. Οι διεγέρτες κατατάσσονται περαιτέρω σε 2 κατηγορίες, (α) τους γενικούς (general elicitors) που έχουν την ικανότητα διεγέρσεως του βασικού ανοσοποιητικού συστήματος σε ξενιστές και μη-ξενιστές του παθογόνου και (β) τους εξειδικευμένους σε φυλή παθογόνου (race-specific elicitors) διεγέρτες που οδηγούν στην ανάπτυξη αντοχής μόνο σε φυτά ξενιστές μέσω του

ανοσοποιητικού συστήματος των γονιδίων ανθεκτικότητας. Οι περισσότεροι διεγέρτες είναι συστατικά των κυτταρικών τοιχωμάτων των παθογόνων. Οι διεγέρτες παρουσιάζουν ετερογένεια ως προς τη χημική τους δομή, καθώς ανήκουν σε ένα ευρύ σύνολο χημικών ενώσεων που συμπεριλαμβάνουν ολιγοσακχαρίτες (επτα-β-γλυκοσίδιο, ολιγοχιτίνη, χιτοζάνη), γλυκοπεπτίδια, πρωτεΐνες (φλατζελίνη), λιπίδια (Montesano et al., 2003, Nürnberger, 1999).

#### **1.2.1.2.1 Βασικό ανοσοποιητικό σύστημα**

Το βασικό ανοσοποιητικό σύστημα ενεργοποιείται άμεσα ύστερα από την επαφή παθογόνου-ξενιστή (10-30 min μετά την επαφή) και πρόκειται για μια αλληλοαναγνώριση γενικής φύσεως καθώς συμβαίνει σε κάθε περίπτωση κατά την οποία ένα δυνητικό παθογόνο έρθει σε επαφή με έναν πιθανό ξενιστή. Το βασικό ανοσοποιητικό σύστημα των φυτών είναι υπεύθυνο για τη μη-εξειδικευμένη (γενική) ανθεκτικότητα (non-specific resistance) στα φυτά, η οποία είναι αποτελεσματική εναντίον αρκετών φυτοπαθογόνων μικροοργανισμών καθώς στη φύση η εκδήλωση της ασθένειας αποτελεί εξαίρεση και όχι τον κανόνα (Thordal-Christensen, 2003, Agrios, 2005).

Η ενεργοποίηση του βασικού ανοσοποιητικού συστήματος προκαλεί την βασική ανθεκτικότητα (basal resistance) η οποία όπως έχει φανεί αποτελεί την πρώτη ενεργητική αντίδραση του φυτού μετά την επαφή του με τα διάφορα παθογόνα. Η πιο σημαντική από απόψεως διάρκειας μορφή ανθεκτικότητας είναι η λεγόμενη ανθεκτικότητα του μη-ξενιστή (non-host resistance), που σημαίνει ότι ένα φυτό είναι ανθεκτικό σε όλες τις φυλές ενός παθογόνου. Οι διεγέρτες γενικής φύσεως που λαμβάνουν μέρος στην αναγνώριση αυτή καλούνται PAMPs (Pathogen Associated Molecular Patterns) και μπορεί να είναι όσον αφορά στους ωομύκητες γλυκάνες, τρανσγλουταμινάσες, διάφορες πρωτεάσες, για τους μύκητες η εργοστερόλη, χιτίνη, ξυλανάση, για τα βακτήρια πρωτεΐνες του μαστιγίου (φλατζελίνη), λιποπολυσακχαρίτες, πρωτεΐνες καταπόνησης ψύχους (cold-shock), πεπτιδογλυκάνες, ενώ για τους ιούς δεν έχουν βρεθεί PAMPs. Τα PAMPs (α) είναι μόρια καλά συντηρημένα, (β) εντοπίζονται στους φυτικούς και ζωικούς οργανισμούς και (γ) συνήθως παίζουν κυρίαρχο ρόλο στην επιβίωση των μικροοργανισμών. Η διέγερση που προκαλείται στα φυτά, γνωστή και ως PAMP-triggered immunity (PTI), ενεργοποιείται μετά από την αναγνώριση από τους αντίστοιχους πρωτεϊνικούς υποδοχείς αναγνώρισης ή PRR (Pattern recognition Receptors) των PAMPs στις κυτταρικές μεμβράνες των φυτών που λαμβάνουν και μεταγάζουν το βιολογικό σήμα, ώστε να ενεργοποιηθούν οι ενεργητικοί μηχανισμοί άμυνας. Η μεταγωγή του σήματος της αμυντικής αντίδρασης επιτελείται μέσω ορισμένων καλά συντηρημένων βιοχημικών ατραπών. Η επαγωγή αυτής της ενεργοποίησης σχετίζεται με την παραγωγή ενεργών ριζών οξυγόνου (reactive oxygen species, ROS), μεταβολή του

επιπέδου ιόντων  $Ca^{2+}$  στο κυτταρόπλασμα, μετα-μεταγραφική δραστηριοποίηση των MAP κινασών (Mitogen Activated Protein Kinases), εναπόθεση καλλόζης για την ενίσχυση των κυτταρικών τοιχωμάτων στα σημεία επαφής (Nürnberger and Lipka, 2005, Nürnberger and Kemmerling, 2009, Schwessinger and Zipfel, 2008)

Ένα μελετημένο και καλά χαρακτηρισμένο παράδειγμα είναι η περίπτωση αναγνώρισης της βακτηριακής φλατζελίνης από το φυτό *Arabidopsis thaliana*. Στην αραβίδωση υπάρχει ένα εξειδικευμένο σύστημα αναγνώρισης του μορίου-διεγέρτη flg22 (το οποίο αποτελείται από μια καλά συντηρημένη περιοχή αποτελούμενη από 22 αμινοξέα) της βακτηριακής φλατζελίνης. Το εγγενές ανοσοποιητικό σύστημα της αραβίδωσης περιλαμβάνει ένα πρωτεϊνικό σύμπλεγμα που λειτουργεί ως υποδοχέας της flg22. Η προσδένουσα αυτή πρωτεΐνη είναι μία κινάση-υποδοχέας που περιλαμβάνει επαναλαμβανόμενα πεπτιδικά μόρια πλούσια σε λευκίνη (Leucine Rich Repeat, LRR) και ονομάζεται FLS2. Η αναγνώριση flg22-FLS2 οδηγεί στην παραγωγή δραστικών ομάδων οξυγόνου, αλκαλοποίηση του θρεπτικού υποστρώματος καλλιέργειας, δραστηριοποίηση των MAP κινασών, και επαγωγή γονιδίων σχετικά με την άμυνα του φυτού εναντίον παθογόνων (Gomez-Gomez and Boller, 2000, Navarro et al., 2004).

Παρόλη όμως τη μελέτη αρκετών συστημάτων διεγερτών-υποδοχέων, η γνώση του μοριακού υπόβαθρου της ανθεκτικότητας μη ξενιστή ακόμη υστερεί. Ωστόσο οι πρόσφατες εξελίξεις στον βιοχημικό χαρακτηρισμό της PAMP-επαγόμενης μεταγωγής του βιολογικού σήματος και η μοριακή μελέτη της ανθεκτικότητας μη-ξενιστή στο φυτό μοντέλο *Arabidopsis thaliana* έχει συμβάλει στην καλύτερη κατανόηση των μηχανισμών της βασικής ανθεκτικότητας (Nürnberger and Lipka, 2005).

#### **1.2.1.2.2 Ανοσοποιητικό σύστημα των γονιδίων ανθεκτικότητας**

Όπως έχει ήδη αναφερθεί, τα φυτά εξελίσσονται στη φύση και στο χρόνο παράλληλα με τα παθογόνα. Οι αλλαγές στην ικανότητα μόλυνσης των παθογόνων φαίνεται να βρίσκονται συνεχώς σε ισορροπία με αντίστοιχες μεταβολές στους ξενιστές και αντίστροφα. Αναφέρθηκε επίσης ότι τα PAMPs παράγονται από όλα τα παθογόνα και ενεργοποιούν την άμυνα των φυτών. Παρόλα αυτά η ικανότητα πρόκλησης ασθένειας από τα παθογόνα οφείλεται στους ειδικούς διεγέρτες ή τελεστές (effectors) ή μολυσματικούς παράγοντες (virulence factors). Τα μόρια αυτά παρεμποδίζουν τον μηχανισμό της βασικής ανθεκτικότητας και προκαλούν την ασθένεια στους ξενιστές. Ενώ όμως τα παθογόνα παράγουν τους ειδικούς διεγέρτες-τελεστές που καταστέλλουν την ανοχή των φυτών, τα φυτά μέσω της εξέλιξής τους έχουν αναπτύξει το ανοσοποιητικό σύστημα των γονιδίων ανθεκτικότητας (Resistance

genes) που αναγνωρίζουν τους ειδικούς διεγέρτες και τους παρεμποδίζουν (Hammond-Kosack and Jones, 2000, Agrios, 2005).

#### **1.2.1.2.2.1 Η θεωρία γόνου προς γόνο**

Η σταδιακή και παράλληλη εξέλιξη της ικανότητας πρόκλησης ασθένειας και ανθεκτικότητας, μπορεί να εξηγηθεί με τη γόνου προς γόνο θεωρία (gene-for-gene hypothesis) η οποία διατυπώθηκε το 1971. Σύμφωνα με αυτήν, μία πρωτεΐνη που κωδικοποιείται από γονίδια αμολυσματικότητας (Avirulence gene, *Avr* gene) αναγνωρίζεται εξειδικευμένα από μία συμπληρωματική πρωτεΐνη του φυτού που κωδικοποιείται από ένα κυρίαρχο γονίδιο ανθεκτικότητας (Resistance gene, *R* gene). Τα γονίδια αμολυσματικότητας έχουν ονομαστεί έτσι διότι καθιστούν μία συγκεκριμένη φυλή του παθογόνου μη μολυσματική σε έναν συγκεκριμένο ξενιστή που φέρει το αντίστοιχο *R* γονίδιο. Όταν δεν εκφράζεται, είτε ένα γονίδιο αμολυσματικότητας είτε το αντίστοιχο γονίδιο ανθεκτικότητας, τότε δεν παρατηρείται αλληλοαναγνώριση και έχουμε την εκδήλωση ασθένειας. Αντίθετα στην περίπτωση που τα *Avr* γονίδια εκφράζονται, αλλά και οι αντίστοιχες *R* πρωτεΐνες είναι παρούσες, παρατηρείται αναγνώριση του μοριακού συμπλόκου *Avr-R* στο φυτικό κύτταρο και δίνεται το έναυσμα-σήμα δραστηριοποίησης των ενεργητικών μηχανισμών ανοχής συνήθως μέσω της αντίδρασης υπερευαισθησίας. Η μεταγωγή πραγματοποιείται μέσω διαδοχικών μεταβιβάσεων του σήματος με κατεύθυνση τον πυρήνα του κύτταρου ώστε να γίνει η μεταγραφή των κατάλληλων γονιδίων (Hammond-Kosack and Jones, 2000, Agrios, 2005).

Οι βασικότερες ιδιότητες των ειδικών διεγερτών είναι να: (α) διεγείρουν τη σύνθεση φυτοαλεξινών, (β) αποτελούν το έναυσμα της αντίδρασης υπερευαισθησίας, μηχανισμός στον οποίο γίνεται αναφορά παρακάτω, (γ) επάγουν την παραγωγή γλυκοζυλο-υδρολασών, ικανών να αντιδράσουν με πολυμερή των επιφανειών των παθογόνων, (δ) επάγουν τη σύνθεση πρωτεϊνών που παρεμποδίζουν ένζυμα των παθογόνων με ικανότητα αποσυνθέσεως των φυτικών ιστών, (ε) επάγουν την παραγωγή δραστικών ομάδων οξυγόνου, (στ) επάγουν την τροποποίηση των κυτταρικών τοιχωμάτων με εναπόθεση καλλόζης, λιγνίνης ή και γλυκοπρωτεϊνών πλούσιων σε υδροξυπρολίνη (Hammond-Kosack and Jones, 2000).

Συνήθως, στους ξενιστές, τα γονίδια της ανθεκτικότητας είναι κυρίαρχα (*R*), ενώ τα γονίδια της μη-ανθεκτικότητας είναι υπολειπόμενα (*r*). Από πλευράς παθογόνου όμως, τα γονίδια της αμολυσματικότητας είναι συνήθως κυρίαρχα (*A*) ενώ τα γονίδια της μολυσματικότητας είναι υπολειπόμενα (*a*) (Σχήμα 1.2) (Hammond-Kosack and Jones, 1997).

Interactions involved in <i>R</i> gene - <i>Avr</i> gene incompatibility			
		Host plant genotype	
		<i>R1 r2</i>	<i>r1 R2</i>
Pathogen genotype	<i>Avr1, avr2</i>	I	C
	<i>avr1, Avr2</i>	C	I

Σχήμα 1.2: Σχηματικό μοντέλο της γόνου-προς-γόνου ανθεκτικότητας. Το γράμμα I συμβολίζει την ασύμβατη σχέση (incompatible) όπου ο ξενιστής είναι ανθεκτικός στο παθογόνο και δεν εκδηλώνεται η ασθένεια, ενώ με το γράμμα C συμβολίζεται η συμβατή (compatible) αλληλεπίδραση ξενιστή-παθογόνου όπου εκδηλώνεται η ασθένεια. Τα *R1* και *R2* είναι δύο κυρίαρχα γονίδια ανθεκτικότητας των φυτών, όπου *r1* και *r2* είναι τα αντίστοιχα υπολειπόμενα (nonfunctional) αλληλόμορφα. Τα *R1* και *R2* κυρίαρχα γονίδια προσδίδουν ανθεκτικότητα στον ξενιστή μέσω της αναγνώρισης των *Avr1* και *Avr2* γονιδίων αμολυσματικότητας του παθογόνου, αλλά όχι στην περίπτωση των *avr1* και *avr2* υπολειπόμενων αλληλομόρφων καθώς η δεν γίνεται η αναγνώριση. Η ασθένεια προκαλείται μόνο στις περιπτώσεις όπου είτε το *R* γονίδιο δεν υπάρχει ή είναι μη λειτουργικό είτε το αντίστοιχο *avr* γονίδιο απουσιάζει ή έχει μεταλλαχθεί. Οι σχέσεις που καταδεικνύονται σε αυτό το σχήμα, επισημαίνουν την παρουσία δύο ανεξαρτήτως δρώντων *R-Avr* αλληλεπιδράσεων (Προσαρμογή από Hammond-Kosack and Jones, 1997).

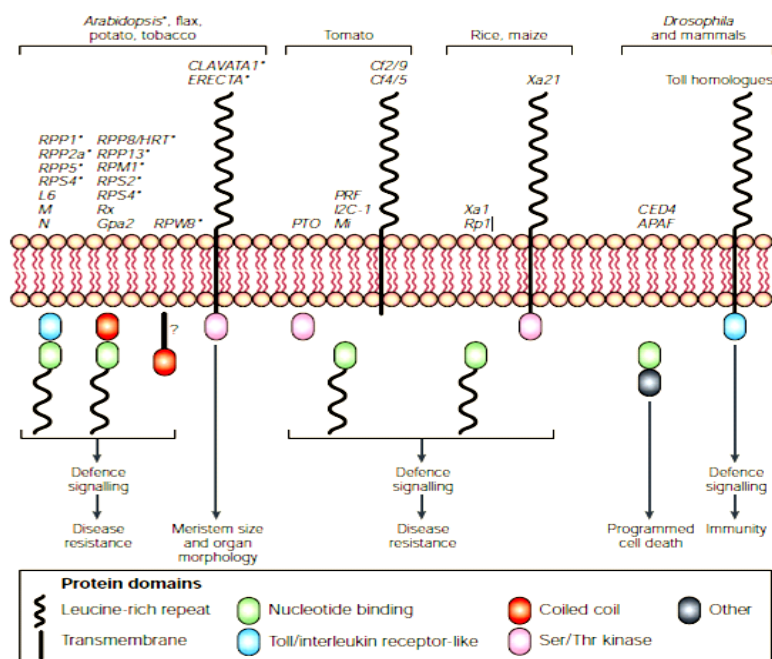
Τα παθογόνα μεταφέρουν τους ειδικούς διεγέρτες στα κύτταρα των ξενιστών μέσω συγκεκριμένων εκκριτικών βιοχημικών ατραπών. Τα βακτήρια μεταφέρουν τους τελεστές μέσω του γενικού μονοπατιού εκκρίσεως, αλλά και άλλων τεσσάρων εξειδικευμένων εκκριτικών μονοπατιών τα οποία εν συντομία είναι (Alfano and Collmer, 2004):

- Εκκριτικό μονοπάτι τύπου I, λειτουργεί ως διαμεμβρανικός διάυλος μέσω του οποίου διέρχεται το εκκρινόμενο μόριο (π.χ. πρωτεάσες του *Erwinia chrysanthemi*)
- Εκκριτικό μονοπάτι τύπου II, είναι επέκταση του γενικού εκκριτικού μονοπατιού το οποίο σε δύο διαφορετικά στάδια εκκρίνει πρωτεϊνικές τοξίνες και ένζυμα
- Εκκριτικό μονοπάτι τύπου III, εκκρίνει πρωτεΐνες παθογένειας φυτοπαθογόνων βακτηρίων και μεταφέρει στο κύτταρο του ξενιστή τους τελεστές. Τα βακτήρια διαθέτουν στο γενετικό τους υλικό νησίδες παθογένειας (pathogenicity islands) που είναι υπεύθυνες για τη συγκρότηση του μονοπατιού τύπου III
- Εκκριτικό μονοπάτι τύπου IV, εκκρίνει πρωτεΐνες και DNA.

Όλο και περισσότερες ερευνητικές δραστηριότητες τελευταία καταφέρνουν να απομονώσουν και να προσδιορίσουν γονίδια ανθεκτικότητας από πολλά φυτά ή και άλλους οργανισμούς (Εικόνα 1.9). Παρά τη μεγάλη ετερογένεια μεταξύ των παθογόνων όσον αφορά στις τελεστικές πρωτεΐνες, τα γονίδια ανθεκτικότητας των φυτών κωδικοποιούν ανεξάρτητα από φύση του παθογόνου πρωτεΐνες-υποδοχείς (εξωκυτταρικές και ενδοκυτταρικές) και οι οποίες δύνανται να κατηγοριοποιηθούν ως εξής (Dangl and Jones, 2001):

- Οι Receptor-Like Proteins (RLPs), όπως οι υποδοχείς της τομάτας Cf-2 και Cf-9, κωδικοποιούν διαμεμβρανικές γλυκοπρωτεΐνες, με μια εξωκυτταρική περιοχή από επαναλαμβανόμενα πεπτιδικά μόρια πλούσια στο αμινοξύ λευκίνη (Leucine Rich Repeats - LRRs) και ένα μικρό κυτταροπλασματικό τομέα. Οι RLPs μπορούν να λειτουργήσουν ως εξωκυτταρικοί ή ενδοκυτταρικοί υποδοχείς *Avr* πρωτεϊνών
- Οι Receptor-like Kinases (RLKs), είναι διαμεμβρανικές πρωτεΐνες πλούσιες σε εξωκυτταρικές περιοχές LRRs και περιέχουν μια κυτοπλασματική περιοχή κινάσης της σερίνης-θρεονίνης που μεταβιβάζει το σήμα σε άλλες κινάσες για περαιτέρω ενίσχυσή του
- Οι TIR-NB-LRR R πρωτεΐνες, κωδικοποιούν κυττοπλασματικές πρωτεΐνες. Επιπλέον της περιοχής LRR, οι υποδοχείς αυτοί διαθέτουν και την περιοχή προσδέσεως νουκλεοτιδίων (Nucleotide Binding, NB) καθώς και την περιοχή TIR που είναι ομόλογη της ενδοκυτταρικής περιοχής του Toll-υποδοχέα ιντερλευκίνης (Toll/Interleukin 1) των υποδοχέων των θηλαστικών, περιοχές που εμπλέκονται στην αντίληψη και μεταγωγή των σημάτων της αντοχής του φυτού.
  - Οι περιοχές NB-LRR λειτουργούν ως θέσεις αντιδράσεων μεταξύ πρωτεϊνών-πρωτεϊνών, πρωτεϊνών-προσδεμάτων (ligands) και πρωτεϊνών-υδατανθράκων και προσδίδουν την εκλεκτικότητα στην αναγνώριση των διαφόρων παθογόνων από τα φυτά.
- Η CC-NB-LRR ομάδα των κυτοπλασματικών R πρωτεϊνών έχει LRR και NB περιοχές και διαθέτει μια αμινοτελική περιοχή που μοιάζει με περιελγμένο σπείραμα (Coiled Coil,CC)
- Τα γονίδια ανθεκτικότητας που κωδικοποιούν κινάσες της σερίνης-θρεονίνης όπως είναι το *R* γονίδιο *Pto* της τομάτας που αναγνωρίζει τον *AvrPto* τελεστή του βακτηρίου *Pseudomonas syringae*.

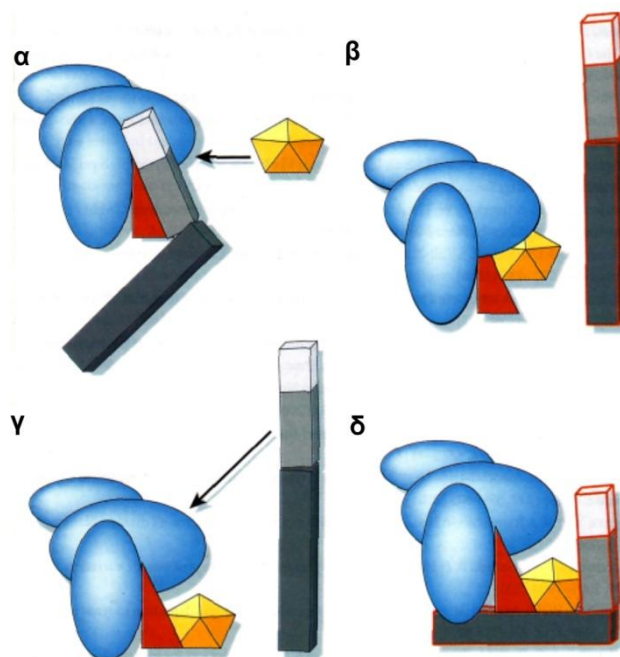




Εικόνα 1.9: Γονίδια ανθεκτικότητας που κωδικοποιούν R πρωτεΐνες τα οποία έχουν κλωνοποιηθεί στα είδη κατά σειρά από αριστερά: αραβίδωση, λινάρι, πατάτα, καπνός, τομάτα, ρύζι, αραβόσιτος, δροσόφυλλα και θηλαστικά (Holub, 2001).

### 1.2.1.2.2 Η υπόθεση του φρουρού

Σύγχρονες μελέτες υποδηλώνουν ότι οι R πρωτεΐνες λειτουργούν είτε με απευθείας αναγνώριση και πρόσδεσή τους στον τελεστή (γόνου προς γόνο θεωρία), είτε αναγνωρίζοντας μία άλλη πρωτεΐνη του φυτού η οποία είναι ο στόχος του παθογόνου τελεστικού μορίου (υπόθεση του φρουρού, Guard Hypothesis). Η υπόθεση του φρουρού πρόκειται για μία ενδιαφέρουσα πρόσφατη θεωρία για την κατανόηση της δράσης των τελεστών με τις πρωτεΐνες ανθεκτικότητας. Η υπόθεση έχει διατυπωθεί για την ερμηνεία του φαινομένου ότι η πρωτεϊνική κινάση Pto χρειάζεται την NB-LRR πρωτεΐνη Prf για να δραστηριοποιήσει την άμυνα κατά την αναγνώριση του AnrPto. Κατά το πρότυπο αυτό, η Pto είναι ένα γενικό στοιχείο της άμυνας του ξενιστή, πιθανώς σε ένα μεταβολικό μονοπάτι για την αντίδραση εναντίον γενικών διεγερτών φυτοπαθογόνων βακτηρίων. Ο λειτουργικός ρόλος του AnrPto για το *Pseudomonas syringae* είναι να σημαίνει το Pto και να καταστέλλει αυτή τη μη εξειδικευμένη αντίδραση. Κατά το πρότυπο αυτό, οι R πρωτεΐνες αποτελούν τους ρυθμιστές ενός συμπλόκου δύο ή περισσότερων πρωτεϊνών που ενεργοποιείται από τις πρωτεΐνες των παθογόνων. Όταν απουσιάζει μια R πρωτεΐνη ή ο ενδιάμεσος στόχος του ξενιστή, ο τελεστής του παθογόνου δεν αναγνωρίζεται και άρα έχουμε πρόκληση της ασθένειας (Εικόνα 1.10) (Dangl and Jones, 2001).



Εικόνα 1.10: **α.** Ένα σύμπλοκο πρωτεϊνών (μπλε) που περιλαμβάνει το μόριο του «φυλασσόμενου/προστατευόμενου» (κόκκινο) μορίου και μια πρωτεΐνη ανθεκτικότητας (γκρίζα σκιαζόμενη από το αμινοτελικό άκρο μέσω των δομικών περιοχών NB και LRR) είναι το σύμπλοκο-στόχος για έναν τελεστή ενός παθογόνου (πορτοκαλί). **β.** Η συνένωση του τελεστή (πορτοκαλί) στο σύμπλοκο καταλήγει στην αποσύνδεση και δραστηριοποίηση της R πρωτεΐνης και στην έκφραση αντοχής. **γ.** Εναλλακτικά η πρωτεΐνη NB-LRR μπορεί να μην αποτελεί μέρος του συμπλόκου στόχου μέχρι να συνδεθεί ο τελεστής. **δ.** Επανάωση του τελεστή στο σύμπλοκο με τον στόχο ενεργοποιεί την NB-LRR πρωτεΐνη (Προσαρμογή από Dangl and Jones, 2001).

### 1.2.1.2.2.3 Η αντίδραση υπερευαισθησίας

Η αντίδραση υπερευαισθησίας AY (Hypersensitive Response, HR), αποτελεί έναν από τους πιο σημαντικούς αμυντικούς μηχανισμούς των φυτών. Διατυπώθηκε για πρώτη φορά πριν από περίπου έναν αιώνα, κατά τη μελέτη της σκωρίασης των σιτηρών. Σήμερα πλέον γνωρίζουμε ότι η αντίδραση υπερευαισθησίας είναι το αποτέλεσμα αμυντικής ενεργητικής αντίδρασης· παρουσιάζεται στα φυτικά κύτταρα που έχουν έρθει σε επαφή με το παθογόνο, με αποτέλεσμα τον άμεσο κυτταρικό θάνατο περιορισμένης έκτασης ιστού. Η AY αναφέρεται χαρακτηριστικά ως ένας προγραμματισμένος κυτταρικός θάνατος (Programmed Cell Death, PCD), ενώ η πιο μελετημένη περίπτωση του PCD είναι η απόπτωση στα θηλαστικά, που μαζί με τη μίτωση διατηρούν σε ισορροπία τον αριθμό των κυττάρων. Αποτελεί ακραία έκφραση αντοχής των φυτών σε μυκητολογικές (κυρίως υποχρεωτικά παράσιτα), βακτηριολογικές και ιολογικές προσβολές. Σκοπός της AY, μέσω του ταχύτατου θανάτου των κυττάρων του ξενιστή, είναι η απομόνωση του παθογόνου στις θέσεις

διεισδύσεως και η παρεμπόδιση πολλαπλασιασμού και μετακινήσεως του παθογόνου με αποτέλεσμα την αποφυγή ανάπτυξης της ασθένειας (Agris, 2005, Heath, 1998).

Οι πρωτογενείς αντιδράσεις των φυτικών κυττάρων, οφείλονται στην αναγνώριση των διεγερτών των παθογόνων, ή των προϊόντων μεταβολισμού τους από τους αντίστοιχους πρωτεϊνικούς υποδοχείς των ξενιστών. Η ΑΥ αφορά ετερόλογες (ασύμβατες) σχέσεις μεταξύ παθογόνου-ξενιστή, στις οποίες το παθογόνο αποτυγχάνει να μολύνει τον ξενιστή. Το γεγονός αυτό αποδίδεται στην παρουσία στο φυτό ενός γονιδίου αντοχής  $R$  το οποίο επάγεται για δράση από το διεγέρτη, ο οποίος αποτελεί προϊόν ενός γονιδίου αμολυσματικότητας  $avr$  και απελευθερώνεται από το παθογόνο. Στα μυκητολογικά υποχρεωτικά παράσιτα, η σχέση των  $R$  και  $avr$  γονιδίων είναι σύμφωνη με την γόνου προς γόνο υπόθεση. Στα βακτήρια όμως, τα γονίδια  $avr$  και  $R$  φαίνεται να έχουν μια πιο πολύπλοκη μεταξύ τους σχέση, καθώς ένα γονίδιο  $R$  αντιστοιχεί σε περισσότερα του ενός  $avr$  γονίδια (Agris, 2005, Heath, 1998, Heath, 2000).

Οι περισσότερες βιοχημικές αντιδράσεις που επιτελούνται κατά την εκδήλωση της ΑΥ, έχουν κατά κανόνα κοινό βιοχημικό υπόβαθρο και δεν σχετίζονται με τη φύση του παθογόνου. Η βιοχημική επαγωγή της ΑΥ περιλαμβάνει την (α) σύνθεση και απελευθέρωση των διεγερτών της ΑΥ, (β) δραστηριοποίηση του συστήματος των υπεροξειδασών των κυτταρικών τοιχωμάτων,  $H_2O_2$  και του συστήματος  $NADH/NADPH$  που ανάγει το  $O_2$  σε  $H_2O_2$  και  $O_2^-$  ή  $OH^-$  (φαινόμενο οξειδωτικής εκρήξεως, oxidative burst), (γ) οξείδωση των λιπιδίων των μεμβρανών του ξενιστή μέσω των λιποξυγενασών, (δ) εισροή ιόντων  $Ca^{2+}$  τα οποία δρουν ως μεταγωγικό στοιχείο για την έναρξη της ΑΥ, (ε) φωσφορυλίωση μέσω των πρωτεϊνικών κινασών, (στ) βλάβη της ημιπερατότητας των μεμβρανών της  $H^+$ -ΑΤΡάσης, (ζ) απώλεια μέσω εκροής ηλεκτρολυτών, (η) καταστροφή της πολικότητας της κυτταρικής μεμβράνης, συσσώρευση φυτοαλεξινών στα κύτταρα του ξενιστή, (θ) νέκρωση των φυτικών κυττάρων (Hammond-Kosack and Jones, 2000).

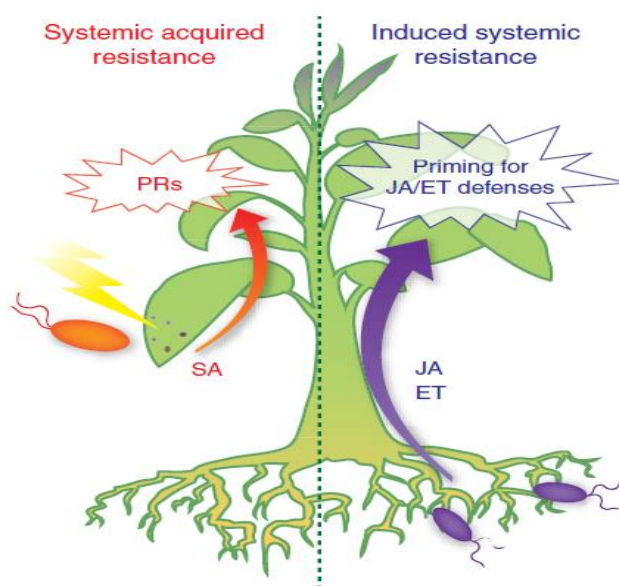
### **1.2.2 Επαγόμενη και επίκτητη διασυστηματική αντοχή**

Στα ανώτερα ζώα, όταν ένα άτομο έρθει σε επαφή με ένα νοσογόνο παράγοντα μπορεί να τον αναγνωρίσει ως αντιγόνο και να παράγει αντισώματα. Τα αντισώματα εξασφαλίζουν ανοσία στο άτομο, που δεν μπορεί να προσβληθεί ξανά από την ίδια ασθένεια. Αυτό μάλιστα συμβαίνει πολλές φορές για όλη τη διάρκεια της ζωής του. Αντισώματα δεν είναι γνωστά στα φυτά και μέχρι πριν από λίγα χρόνια η γενική πεποίθηση ήταν, ότι όσες φορές και αν προσβληθεί ένα φυτό από μια ασθένεια ποτέ δε γίνεται λιγότερο ευαίσθητο στην ασθένεια αυτή. Χάρη όμως στις εργασίες των τελευταίων δεκαετιών, έχει αποδειχθεί πλέον η προστασία φυτών μέσω του φαινομένου της ανοσοποίησης. Η ανοσοποίηση των φυτών δεν περιλαμβάνει την

παραγωγή αντισωμάτων, αλλά έχει επικρατήσει να χρησιμοποιείται ως όρος ο οποίος εν συντομία περιγράφει την ενεργοποίηση των λανθανόντων μηχανισμών ανοχής του ξενιστή (Γεωργόπουλος και Ζιώγας, 1992).

Το φαινόμενο της ανάπτυξης ανθεκτικότητας ως αντίδραση στη μόλυνση από τα παθογόνα παρατηρήθηκε πρώτη φορά το 1901 από τους Ray και Beauverie για τον μύκητα *Botrytis cinerea*. Χρησιμοποιήθηκαν εξασθενημένα στελέχη για να διεγερθεί η ανθεκτικότητα φυτεύοντας φυτά βεγόνιας σε μολυσμένο έδαφος ή κάνοντας έγχυση του μολύσματος στα φυτά. Το 1933 ο Chester ύστερα από ανασκόπηση δημοσιεύσεων περιέγραψε ένα φαινόμενο το οποίο όρισε ως φυσιολογική επίκτητη ανοσία. Τελικά, τρεις διαφορετικές διαδικασίες ονομάστηκαν τότε ως επίκτητη ανοσία: 1) ική διασταυρωτή προστασία, 2) ανταγωνισμός και 3) αυτό που σήμερα ορίζεται ως επίκτητη διασυστηματική ανοχή. Το 1961 ο Ross διαπίστωσε ότι η πρόκληση τοπικών μολύνσεων στα φύλλα καπνού με τον ιό του μωσαϊκού του καπνού (Tobacco Mosaic Virus, TMV), συνέβαλε στο να μειωθεί η μόλυνση των ανώτερων φύλλων σε επακόλουθες μολύνσεις με τον ίδιο ιό. Όμως στις αρχές της δεκαετίας του 1970, δημοσιεύτηκαν οι πρώτες εργασίες του καθηγητή Joseph Kuc και των συνεργατών του, οι οποίες αναφέρονταν στη διασυστηματική διέγερση μηχανισμών ανοχής σε μυκητολογικές, βακτηριολογικές, και ιολογικές ασθένειες των κολοκυνθοειδών. Πρόκειται ουσιαστικά για μια μορφή «ανοσοποίησης», η οποία προκαλείται από βιολογικούς παράγοντες (μύκητες, βακτήρια, ιούς) εναντίον των ιδίων ή διαφορετικών παθογόνων σε σύγκριση με εκείνα που προκάλεσαν τη διέγερση (Ryals et al., 1996, Τζάμος, 2004).

Τα φυτά έχουν τη δυνατότητα να αμύνονται κατά των παθογόνων με μια πλειάδα μηχανισμών ανοχής. Οι μηχανισμοί αυτοί λειτουργούν στα ανθεκτικά, κατά περίπτωση, φυτά ή παραμένουν σε λανθάνουσα κατάσταση και διεγείρονται από βιοτικούς ή αβιοτικούς παράγοντες. Η διέγερση λανθανόντων μηχανισμών ανοχής αποτελεί το αντικείμενο της επίκτητης ή επαγόμενης διασυστηματικής ανοχής. Η ανοσοποίηση μπορεί να διαχωριστεί σε (α) επίκτητη διασυστηματική ανοχή (Systemic Acquired Resistance, SAR), όταν ενεργοποιείται κατόπιν μόλυνσης του ξενιστή με ένα παθογόνο και σε (β) επαγόμενη διασυστηματική ανοχή (Induced Systemic Resistance, ISR), όταν επιτυγχάνεται με βιολογικούς παράγοντες που δεν προκαλούν τοπική νέκρωση π.χ. ριζοβακτήρια (Εικόνα 1.11). Ακόμη, η ανοσοποίηση θα λέγαμε ότι εμφανίζεται με δύο μορφές, μια τοπικού και μια διασυστηματικού χαρακτήρα. Η τοπικά επαγόμενη ανοχή εκφράζεται μόνο στο σημείο εισβολής του παθογόνου στο φυτό με νέκρωση και ξήρανση των ιστών και σχετίζεται με την αντίδραση υπερευαισθησίας. Κατά τη διασυστηματικά επαγόμενη ανοχή, οι αμυντικοί μηχανισμοί του φυτού εκφράζονται και πέραν του σημείου διεγέρσεως. Η έκφραση της επίκτητης και της επαγόμενης διασυστηματικής ανοχής, έχει λάβει χώρα σε δικότυλα και μονοκότυλα φυτά. Η ενεργοποίηση των λανθανόντων μηχανισμών ανοχής επάγεται κατόπιν διεγέρσεως, οπότε και τα δύο φαινόμενα είναι μια μορφή ανοσοποίησης με διαφορετικούς παράγοντες διεγέρσεως και με ίδιους ή διαφορετικούς μηχανισμούς ανοχής (Ryals et al., 1994, Τζάμος, 2004).



Εικόνα 1.11: Σχηματική αναπαράσταση της ανοσοποίησης. Η SAR (Systemic Acquired Resistance) ενεργοποιείται σε υγιείς ιστούς μακριά από το σημείο της μόλυνσης-διέγερσης. Μετά τη διέγερση, μετακινείται ένα σήμα μέσω των αγγείων για να ενεργοποιηθεί η άμυνα στους απομακρυσμένους ιστούς. Το σαλικυλικό οξύ (SA) είναι απαραίτητο μόριο για την ενεργοποίηση των PR πρωτεϊνών (PRs). Η ISR (Induced Systemic Resistance), επιτυγχάνεται ύστερα από αποικισμό της ριζόσφαιρας από ωφέλιμους μικροοργανισμούς (π.χ. ριζοβακτήρια). Το ιασμονικό οξύ (JA) και το αιθυλένιο (ET) έχουν το ρόλο σήματος που συνδέεται με την άμεση ενεργοποίηση των PR γονιδίων (Pieterse et al., 2009).

### 1.2.2.1 Οι πρωτεΐνες παθογένεσης

Σε κυτταρικό επίπεδο, οι μηχανισμοί άμυνας του φυτού που διεγείρονται κατά την ανοσοποίηση σχετίζονται με την έκφραση γονιδίων που συμβάλλουν στην άμυνα του φυτού μέσω των πρωτεϊνών παθογένεσης. Οι πρωτεΐνες παθογένεσης (Pathogen-Related, PR-proteins) είναι μικρού μοριακού βάρους πρωτεΐνες, ανθεκτικές σε δυσμενές περιβάλλον, που παράγονται σε συμβατές και ασύμβατες αλληλεπιδράσεις μεταξύ ξενιστή-παθογόνου και επάγονται ως αντίδραση στη μόλυνση, συμβάλλοντας στην άμυνα των ενεργοποιημένων φυτικών ιστών.

Στις αρχές της δεκαετίας του '70 παρατηρήθηκε από τον van Loon η διασυστηματική συγκέντρωση καινοφανών πρωτεϊνών σε φυτά καπνού που είχαν μολυνθεί με τον TMV. Οι πρωτεΐνες αυτές δεν είχαν ανιχνευθεί σε αμόλυντους ιστούς ούτε επρόκειτο για υπεροξειδάσες ή αλλά ένζυμα τα οποία τότε σχετίζονταν με τη μόλυνση από τον TMV, οπότε προτάθηκε ότι πρόκειται για πρωτεΐνες που εμπλέκονται στη SAR. Μεταγενέστερες εργασίες έδειξαν ότι το σαλικυλικό οξύ (Salicylic Acid, SA) και το

ακετυλοσαλικυλικό οξύ (Acetylsalicylic Acid, ASA) προκαλούσε ανθεκτικότητα στον καπνό, ενώ οι van Loon και Antoniwi (1982) έδειξαν ότι το SA ήταν ικανό να επάγει τις PR-πρωτεΐνες (Hammerschmidt, 2009).

Οι πρωτεΐνες παθογένεσης κωδικοποιούνται από το φυτό ξενιστή, όπου η σύνθεσή τους ενεργοποιείται ύστερα από μόλυνση παθογόνου ή μέσω άλλων συνθηκών που θα αναφερθούν παρακάτω. Έχουν τόσο τοπικό χαρακτήρα, καθώς συσσωρεύονται στη θέση μόλυνσης, όσο και διασυστηματικό, αφού ανιχνεύονται σε μικρότερες συγκεντρώσεις και σε υγιείς ιστούς. Η σύνθεση PR-πρωτεϊνών είναι μη εξειδικευμένο φαινόμενο αφού έχουν εντοπιστεί σε αρκετά ως τώρα φυτικά είδη. Οι PR-πρωτεΐνες αναφέρονται και ως SAR-πρωτεΐνες και τα γονίδια που συνδέονται με αυτές SAR-γονίδια. Οι πρωτεΐνες παθογένεσης είναι ταξινομημένες σε ομάδες με βάση τη βιολογική τους δράση και το βαθμό ομολογίας τους (Πίνακας 1.3). Αρκετές από αυτές τις πρωτεΐνες έχουν χαρακτηριστεί ως χιτινάσες και γλουκανάσες οι οποίες διασπών συστατικά των κυτταρικών τοιχωμάτων των μυκήτων. Αν αναλογισθούμε ότι το κυτταρικό τοίχωμα των φυτών δεν περιέχει χιτίνη, τότε υποθέτουμε ότι το φυτό συνθέτει τις χιτινάσες για να αντιμετωπίσει παθογόνα που έχουν χιτίνη στο κυτταρικό τους τοίχωμα (van Loon and van Strien, 1999, Τζάμος, 2004).

Πίνακας 1.3: Οι ομάδες των πρωτεϊνών παθογένεσης (van Loon and van Strien, 1999)

Ομάδα	Τύπος	Ιδιότητα	Γονίδιο
PR-1	Tobacco PR-1a	Άγνωστη	<i>Ypr1</i>
PR-2	PR-2 Tobacco PR-2	β-1,3-γλουκανάση	<i>Ypr2</i> , [ <i>Gns2</i> (' <i>Glb'</i> )]
PR-3	PR-3 Tobacco P, Q	Χιτινάση τύπου I, II, IV, V, VI, VII	<i>Ypr3</i> , <i>Chia</i>
PR-4	Tobacco 'R'	Χιτινάση τύπου I, II	<i>Ypr4</i> , <i>Chid</i>
PR-5	Tobacco S	Σαν θαυματίνη	<i>Ypr5</i>
PR-6	Tomato Inhibitor I	Παρεμποδιστής πρωτεΐνάσης	<i>Ypr6</i> , <i>Pis</i> (' <i>Pin'</i> )
PR-7	Tomato P <sub>69</sub>	Ενδοπρωτεΐνάση	<i>Ypr7</i>
PR-8	Cucumber chitinase	Χιτινάση τύπου III	<i>Ypr8</i> , <i>Chib</i>
PR-9	Tobacco lignin-forming peroxidase	Υπεροξειδάση	<i>Ypr9</i> , <i>Prx</i>
PR-10	Parsley PR1	Σαν ριβονουκλεάση	<i>Ypr10</i>
PR-11	Tobacco class V chitinase	Χιτινάση τύπου I	<i>Ypr11</i> , <i>Chic</i>
PR-12	Radish Rs-AFP3	Ντιφενσίνη	<i>Ypr12</i>
PR-13	Arabidopsis THI2.1	Θειονίνη	<i>Ypr13</i> , <i>Thi</i>
PR-14	Barley LTP4	Πρωτεΐνη μεταφοράς λιπιδίων	<i>Ypr14</i> , <i>Ltp</i>

### 1.2.2.2 Ο ρόλος του σήματος

Η επαγωγή της ανοσοποίησης επιτυγχάνεται μετά από την αναγνώριση των διεγερτών από τους αντίστοιχους υποδοχείς των φυτών. Μετά την αναγνώριση ακολουθεί η ενεργοποίηση των διαφόρων μεταβολικών μονοπατιών και η μεταφορά ενός ενδογενούς σήματος μέσω των αγγείων του φυτού στα διάφορα όργανα του φυτού που βρίσκονται πέραν του σημείου διέγερσης. Το σήμα θα ενεργοποιήσει γονίδια για την παραγωγή PR-πρωτεϊνών. Η φύση του σήματος πιστεύεται ότι δεν είναι συγκεκριμένη για το κάθε φυτικό είδος ενώ και η περαιτέρω διερεύνησή του έχει αποτελέσει αντικείμενο ιδιαίτερης μελέτης (Durrant and Dong, 2004).

Αναφορικά με τη μεταφορά του σήματος στους φυτικούς ιστούς, έχει δειχθεί από πειράματα ότι το σήμα μεταφέρεται από τα διεγερμένα φύλλα στους απομακρυσμένους ιστούς μέσω του ανιόντος ρεύματος. Σε περίπτωση που συμβαίνει

αυτό η μεταφορά του σήματος συμπίπτει με τη μεταφορά υδατανθράκων και άλλων οργανικών ουσιών. Σε πειράματα με φυτά αραβίδωσης, παρατηρήθηκε ότι η κίνηση ραδιοσημασμένης σακχαρόζης δεν συνέπιπτε ακριβώς με την επαγωγή SAR, τη συσσώρευση SA ή έκφραση PR-1 πρωτεϊνών. Η επαγωγή της SAR παρατηρήθηκε εκτός της κανονικής μεταφοράς χυμών. Αυτό ίσως υποδηλώνει ότι η μικρή ποσότητα του σήματος στον ανιόντα χυμό είναι ικανή να προκαλέσει επαγωγή της SAR. Φαίνεται πως το ανιόν ρεύμα αποτελεί τον κύριο αγωγό μεταφοράς του σήματος, αλλά ένα μέρος αυτού μπορεί επίσης να είναι σε θέση να κινηθεί από μια διαφορετική διαδρομή (Durrant and Dong, 2004).

Η ανίχνευση του σαλικυλικού οξέος σε φύλλα και ιστούς διεγερμένων φυτών έχει οδηγήσει πολλούς ερευνητές να πιστεύουν ότι το SA θα μπορούσε να είναι το σήμα της SAR. Σύγχρονες μελέτες αναφέρουν ότι το σήμα μπορεί να προκύπτει από τη μετατροπή του SA στο πτητικό σαλικυλικό μεθύλιο, που είναι ικανό να επάγει λανθάνοντες μηχανισμούς ανοχής όχι μόνο στα διεγερμένα φυτά αλλά και στα γειτονικά αυτών. Αντιθέτως, ένας αριθμός εργασιών υποστηρίζει ότι το SA δεν μπορεί να είναι το σήμα για τη SAR. Χαρακτηριστικά αναφέρεται ότι η αφαίρεση μολυσμένων φύλλων αγγουριάς από το βακτήριο *Pseudomonas syringae* αμέσως μετά τη διέγερση της SAR, και ενώ τα επίπεδα του SA ήταν ακόμα χαμηλά, δεν ήταν ικανή να παρεμποδίσει την επαγωγή της SAR. Φαίνεται ότι ο ρόλος του SA για το αν αποτελεί σήμα δεν έχει εξακριβωθεί. Παρόλα αυτά όμως, ακόμα και αν το SA δεν είναι το σήμα, φαίνεται ότι εμπλέκεται άμεσα στην εκδήλωση της SAR. Συγκεκριμένα οι Gaffney et al. (1993), χρησιμοποίησαν το *nahG*, ένα βακτηριακό γονίδιο, που εκφράζει το ένζυμο σαλικυλική υδροξυλάση (salicylate hydroxylase) το οποίο διασπά το SA μέσω μετατροπής του σε κατεχόλη. Διαγονιδιακά φυτά καπνού και αραβίδωσης τα οποία εκφράζουν το γονίδιο *nahG* συσσωρεύουν μικρή ποσότητα SA ύστερα από την προσβολή παθογόνου, ενώ ταυτόχρονα δεν έχουν την ικανότητα επαγωγής PR-γονιδίων και εκδήλωσης της SAR (Shulaev et al., 1995, Durrant and Dong, 2004).

Στα περισσότερα φυτά η συσσώρευση SA προηγείται της εκδήλωσης SAR. Όμως μερικά φυτά όπως η πατάτα και το ρύζι, έχουν ήδη υψηλά επίπεδα ενδογενούς SA υπό φυσιολογικές συνθήκες. Πράγματι, εφαρμογή εξωγενούς SA στην πατάτα δεν επάγει ανθεκτικότητα εναντίον του *Phytophthora infestans*. Η έκφραση του *nahG* γονιδίου στην πατάτα που έχει διεγερθεί με αραχιδονικό οξύ, μειώνει την ανθεκτικότητα στον *P. infestans*. Αυτό δείχνει ότι με την εφαρμογή αραχιδονικού οξέος, εκτός από τα αυξημένα επίπεδα SA, τα φυτά πατάτας γίνονται πιο ευαίσθητα στην αντίληψη του SA. Φαίνεται λοιπόν από αυτά, ότι το SA μοιάζει να αποτελεί σήμα για την επαγωγή SAR σε ένα εύρος φυτών, ωστόσο ο μηχανισμός με τον οποίο το SA επιδρά στην SAR μπορεί να διαφέρει (Durrant and Dong, 2004).

Τα τελευταία χρόνια, γενετικές αναλύσεις στην αραβίδωση έχουν δώσει επιπλέον στοιχεία για τον μηχανισμό της SAR. Φυτά τα οποία ανιχνεύθηκαν να μην αντιδρούν στο μηχανισμό της SAR, βρέθηκε ότι έχουν υποστεί μεταλλαγή στο γονίδιο *npr1/nim1* (*non-expresser of pr genes1/ non inducible immunity 1*). Συγκεκριμένα, για

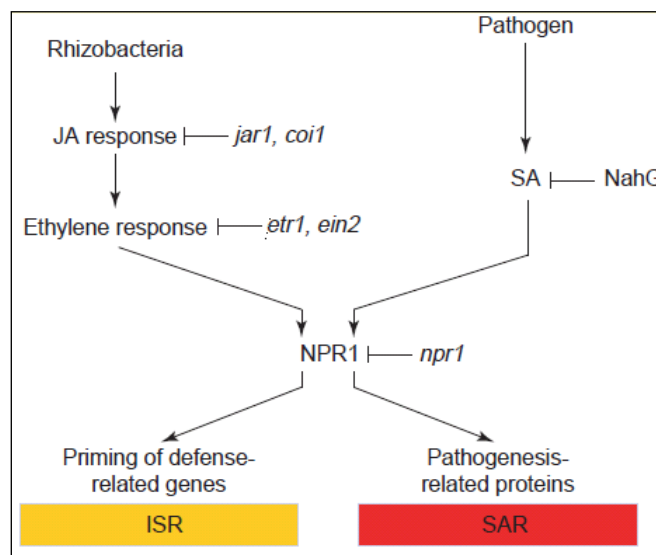


τον προσδιορισμό των παραγόντων που συμμετέχουν στη μεταγωγή του σήματος μέσω του SA, μελετήθηκε ένας αριθμός μεταλλαγμένων φυτών. Κατά τη μελέτη αυτή, εντοπίστηκαν πολλαπλοί αλληλόμορφοι ενός γονιδίου, του *NPR1/NIM1*. Περαιτέρω χαρακτηρισμός έδειξε ότι ο ρόλος του *NPR1* γονιδίου δεν περιορίζεται στη SAR. Τα *npr1* μεταλλαγμένα παρουσιάζουν αυξημένα συμπτώματα ασθένειας σε μόλυνση από παθογόνα, και σε ορισμένα εμφανίζεται μειωμένη η γόνου προς γόνου ανθεκτικότητα, γεγονός που υποδηλώνει ότι η έκφραση του *NPR1* γονιδίου είναι σημαντική για τον περιορισμό ανάπτυξης των παθογόνων στο σημείο της μόλυνσης. Επίσης το *NPR1* είναι απαραίτητο για την επαγωγή της ISR καθώς και στη συμβολή των βιοχημικών μονοπατιών του SA, JA και ET για ανάπτυξη ανθεκτικότητας εναντίον ορισμένων νεκροτροφικών παθογόνων. Όπως αναφέρθηκε ανωτέρω, τα *npr1* φυτά έχουν μειωμένη αντοχή στην τοξικότητα του SA και συγκεντρώνουν ενδογενώς SA σε υψηλές συγκεντρώσεις, άρα το *NPR1* πιθανόν παίζει ρόλο στην αποτροπή συγκέντρωσης SA στους ιστούς σε ποσότητα ικανή να προκαλέσει τοξικότητα, αλλά και στον έλεγχο βιοσύνθεσης του SA. Ένα άλλο στοιχείο μας δείχνει την υψηλή συσχέτιση του *NPR1* γονιδίου με την επαγωγή της SAR είναι ότι η υπερέκφραση του *NPR1* δίνει αυξημένη αντοχή στο φυτό (Durrant and Dong, 2004).

Επιπλέον του SA, οι φυτικές ορμόνες ιασμονικό οξύ (jasmonic acid, JA) και αιθυλένιο (ethylene, ET) έχουν αναφερθεί ως σήματα για την επαγωγή διασυστηματικής αντοχής στα φυτά (Σχήμα 1.3). Το JA παράγεται από το λινολενικό οξύ, ενώ μικρές ποσότητές του επάγουν πρωτεϊνικούς παρεμποδιστές όπως θειονίνη, οσσωτίνη, προλίνη των κυτταρικών τοιχωμάτων, ένα δισουλφιδριλικό παρεμποδιστή πρωτεϊνών και διάφορα ένζυμα που εμπλέκονται στους μηχανισμούς άμυνας του φυτού όπως οξειδάση πολυφαινολών, αμινοπεπτιδάση και λιποξυγενάση. Το JA φαίνεται ότι λειτουργεί ως δευτερογενής επαγωγέας της ανοσοποίησης. Το ET επάγει τη σύνθεση μερικών πρωτεϊνών παθογένεσης όπως η β-1,3 γλουκανάση, χιτινάση και β-γλουκανάση. Η παρουσία του αιθυλενίου προκαλεί δομικές αλλαγές που αυξάνουν την αντοχή του κυτταρικού τοιχώματος, όπως εναπόθεση λιγνίνης και συσσώρευση υδροξυπρολινοπρωτεϊνών. Το JA και το ET παράγονται στην περίπτωση της επαγόμενης διασυστηματικής αντοχής ύστερα από διέγερση με εφαρμογή ριζοσφαιρικών βακτηρίων. Ακόμη, η εξωγενής εφαρμογή JA και ET ενεργοποιεί γονίδια άμυνας τα οποία επάγονται σε περιπτώσεις μόλυνσης από παθογόνα (Penninckx et al., 1996, Penninckx et al., 1998, Hammond-Kosack and Jones, 2000).

Παρόλα αυτά, πρόσφατες εργασίες προτείνουν ότι το διασυστηματικό σήμα πρόκειται για ένα μόριο λιπιδιακής φύσεως. Οι Madonado et al. (2002) έδειξαν ότι τα *dir1* (defective in induced resistance 1) μεταλλαγμένα φυτά τα οποία δεν συνθέτουν την DIR1 πρωτεΐνη, εμφάνισαν τοπική ανθεκτικότητα εναντίον των παθογόνων, δεν ήταν όμως ικανά να επάγουν τη SAR και να εκφράσουν PR-γονίδια στα απομακρυσμένα από το σημείο μόλυνσης φύλλα. Στα αγρίου τύπου DIR1, συντίθεται η DIR1 πρωτεΐνη η οποία παρουσιάζει ομοιότητα στην αλληλουχία με τις πρωτεΐνες μεταφοράς λιπιδίων (Lipid Transfer Proteins, LTPs) που ίσως λειτουργικά συμβάλλει στην παραγωγή ή μετάδοση του σήματος. Πράγματι, σε πειράματα που μελετήθηκε ο

ανιόντας χυμός *dir1* φυτών φάνηκε να μην ανιχνεύεται το σήμα το οποίο να μπορεί να εκδηλώσει τη SAR. Όμως, τα *dir1* φυτά διατηρούσαν την ικανότητα αντίληψης του σήματος το οποίο μεταφέρθηκε σε αυτά από DIR1 φυτά, αποκλείοντας έτσι κάποιο ειδικό ρόλο των DIR1 φυτών στην αντίληψη του σήματος (Durrant and Dong, 2004).



Σχήμα 1.3: Μονοπάτια μεταγωγής του σήματος κατά την ενεργοποίηση της SAR και ISR. Η εκδήλωση της SAR σχετίζεται με τη σύνθεση σαλικυλικού οξέος από πλευράς ξενιστή με αποτέλεσμα τη σύνθεση PR πρωτεϊνών. Η ISR δεν απαιτεί τη συγκέντρωση SA, αλλά εξαρτάται από την ανταπόκριση των φυτών στο ιασμονικό οξύ και το αιθυλένιο. Αυτός ο τύπος επαγωγής ανθεκτικότητας δεν συνδέεται με σύνθεση PR πρωτεϊνών, παρόλο που η ISR αλλά και η SAR απαιτούν την παρουσία της λειτουργικής NPR1 πρωτεΐνης για την εκδήλωσή τους (van Loon et al., 2006).

### 1.2.2.3 Παράγοντες διέγερσης της ανοσοποίησης

Η ανοσοποίηση μπορεί να χωριστεί σε μια φάση έναρξης και μια φάση διατήρησης. Η φάση έναρξης περιλαμβάνει όλα τα βιοχημικά μονοπάτια και τα στάδια τα οποία η ανοσοποίηση εγκαθίσταται στο φυτό. Το πρώτο βήμα της φάσης αυτής είναι η αναγνώριση του παθογόνου από το φυτό. Το φυτό αναγνωρίζοντας το παθογόνο αντιδρά απελευθερώνοντας το σήμα που μετακινείται διασυστηματικά και προετοιμάζει τους φυτικούς ιστούς, ώστε να αμυνθούν σε επακόλουθη μόλυνση (Ryals et al., 1994).

Από τα μέχρι τώρα ερευνητικά δεδομένα, η διέγερση των λανθανόντων μηχανισμών ανοχής μπορεί να προκληθεί κατά μη εξειδικευμένο τρόπο από μια σειρά βιολογικών, βιοχημικών και χημικών παραγόντων όπως: (Τζάμος, 2004)

- Τα ίδια τα παθογόνα
- Μη συμβατές φυλές παθογόνων μικροοργανισμών
- Μη παθογόνα στελέχη παθογόνων μικροοργανισμών
- Μη παθογόνοι μικροοργανισμοί (σαπρόφυτα) πχ. Ριζοσφαιρικά βακτήρια
- Παράγοντες αβιοτικής καταπόνησης ( πχ ξηρασία, έλλειψη θρεπτικών στοιχείων)
- Χημικές ενώσεις

#### **1.2.2.3.1 Η χρήση του παθογόνου και άλλων βιολογικών παραγόντων**

Κατά την εφαρμογή ενός παθογόνου που είναι ικανό να επάγει τη SAR μέχρι την εκδήλωση της ανοσοποίησης απαιτείται ένα χρονικό διάστημα το οποίο σχετίζεται με τη δημιουργία περιορισμένων νεκρωτικών περιοχών στα σημεία της διέγερσης. Οι τοπικού χαρακτήρα νεκρωτικές περιοχές, χαρακτηριστικές της αντίδρασης υπερευαισθησίας, είναι αποτελεσματικές στην επαγωγή ανθεκτικότητας στα φυτά. Οι Cameron et al. (1994), έδειξαν την ικανότητα επαγωγής SAR στην αραβίδοψη μολύνοντας ένα φύλλο με *Ps. syringae* pv. *tomato* που φέρει το γονίδιο αμολυσματικότητας *avrRpt*. Η αλληλεπίδραση αυτή κατέληξε σε εκδήλωση ΑΥ και ανθεκτικότητας, σε διάστημα 48 ωρών, καθώς τα φυτά κετεστήθησαν ανθεκτικά σε επόμενη μόλυνση με *Ps. syringae* pv. *tomato* που δεν έφερε το γονίδιο αμολυσματικότητας *avrRpt* καθώς και με το *Ps. syringae* pv. *maculicola*. Αντίστοιχα, διέγερση με παθογόνο *Ps. syringae* pv. *lachrymans* σε αγγούρι έδωσε ανθεκτικότητα σε επόμενη μόλυνση με το ίδιο παθογόνο με μεγαλύτερο όμως διάστημα το οποίο απαιτείται για την ενεργοποίηση της SAR. Αυτό ίσως να αποδίδεται στην καθυστέρηση εμφάνισης των τοπικών νεκρωτικών περιοχών (Hammerschmidt, 2009).

Ένα ερώτημα που τέθηκε είναι εάν είναι απαραίτητη η παρουσία νεκρωτικών ιστών για την επαγωγή της ανοσοποίησης. Οι Jenns και Kuc (1980), αναφέρουν ότι η μη νεκρωτική διέγερση στις κοτυληδόνες αγγουριού με τον TMV, δεν έδειξε επαγωγή της SAR. Η δημιουργία όμως τοπικών νεκρωτικών περιοχών με χρήση ξηρού πάγου ήταν αναποτελεσματική για την επαγωγή SAR σε φυτά αγγουριάς (Hammerschmidt et al., 1982). Για περαιτέρω διερεύνηση έχει γίνει μελέτη του χρόνου παραμονής του φύλλου διέγερσης που απαιτείται για την ανάπτυξη ανοσοποίησης. Στο πρώτο πραγματικό φύλλο αγγουριάς έγινε εφαρμογή του παθογόνου *Colletotrichum orbiculare* και 6 ημέρες μετά το φύλλο αφαιρέθηκε. Στο δεύτερο φύλλο έγινε εφαρμογή του ίδιου παθογόνου 7 ημέρες μετά τη διέγερση του πρώτου. Τα αποτελέσματα έδειξαν ότι το πρώτο φύλλο έπρεπε να παραμείνει στο φυτό για 72

τουλάχιστον ώρες ώστε να εκφραστεί η SAR ως ένα βαθμό στο δεύτερο φύλλο. Το διάστημα αυτό συμπίπτει με το χρόνο εμφάνισης των πρώτων νεκρωτικών κηλίδων από το *C. orbiculare*. Όσο περισσότερο χρόνο το φύλλο διέγερσης παρέμεινε στο φυτό, τόσο μεγαλύτερη ανθεκτικότητα μέσω εκδήλωσης της SAR παρατηρήθηκε στα επόμενα φύλλα (Hammerschmidt, 2009).

Τα πειράματα που περιγράφονται ως τώρα δείχνουν πιθανή συσχέτιση, αλλά δεν δίδουν αποδείξεις για το ρόλο των νεκρωτικών περιοχών στην εκδήλωση της SAR. Συγκεκριμένα, από τους Smith et al. (1991), αναφέρεται ότι πιθανώς το σύνολο των διεργασιών που οδηγούν στη νέκρωση (μέρος της αρχικής φάσης αναγνώρισης ξενιστή-παθογόνου) είναι αυτές που πυροδοτούν τη SAR και ότι ο θάνατος των κυττάρων του ξενιστή δεν είναι αναγκαίος. Μεταγενέστερα, οι Mishina and Zeier (2007), συμπέραναν ότι τα *Ps. syringae* pv. *glycinea* και *Ps. syringae* pv. *phaseolicola* δεν προκαλούν την ΑΥ στην αραβίδοψη αλλά επάγουν τη SAR. Ένα άλλο στοιχείο που ενισχύει την άποψη ότι η νέκρωση των κυττάρων δεν είναι απαραίτητη για την επαγωγή της SAR, δίνεται από την επαγωγή ανθεκτικότητας μέσω διέγερσης παθογόνων ιικής φύσεως. Φυτά πατάτας που μολύνθηκαν με τον ιό Y της πατάτας (Potato Virus Y, PVY) και τον ιό X της πατάτας (Potato Virus X, PVX) εμφάνισαν συμπτώματα μωσαϊκού (και όχι νεκρωτικές περιοχές), και παρατηρήθηκε επαγωγή ανθεκτικότητας σε επόμενη μόλυνση των φυτών από τον *Phytophthora infestans*. Μπορούμε να συμπεράνουμε λοιπόν ότι πιθανώς τελικά τα στάδια που οδηγούν στη νέκρωση κυττάρων να αποτελούν το καθοριστικό σημείο για την επαγωγή της SAR. Έχει επίσης προταθεί ότι σε κάθε σύστημα ξενιστή-παθογόνου είναι δυνατόν να επιτελούνται διαφορετικές διεργασίες ώστε να παρατηρείται διαφορά μεταξύ τους (Hammerschmidt, 2009).

Διάφορα βιομόρια προερχόμενα από τα παθογόνα μπορούν επίσης να επάγουν την επίκτητη διασυστηματική ανοχή. Οι λιποπολυσακχαρίτες, όπως έχει αποδειχθεί, είναι ικανοί να επάγουν μια τέτοια ανοχή (Newman et al., 2001). Άλλοι γνωστοί διεγέρτες είναι τα ακόρεστα λιπαρά οξέα του *P. infestans* όπως το αραχιδονικό και εικοσιπενταενοϊκό οξύ (Eicosapentaenoic Acid, EPA) όπου επάγουν τη SAR σε φυτά πατάτας και τα οποία έχουν ανιχνευθεί ως διεγέρτες σεσκιτερπενοειδών φυτοαλεξινών σε κονδύλους πατάτας (Bostock et al., 1981). Άλλες ουσίες-διεγέρτες που σχετίζονται με ωμούκητες και πραγματικούς μύκητες και αποτελούν τμήματα των μεμβρανών τους είναι η χιτοζάνη, η χιτίνη και η β-1,3 γλουκάνη. Μετά την επαφή των παθογόνων στην επιφάνεια του ξενιστή, απελευθερώνονται αυτοί οι διεγέρτες ύστερα από τη δράση ενζύμων των ξενιστών (όπως οι χιτινάσες και γλουκανάσες) τα οποία και ενεργοποιούν την διασυστηματική ανθεκτικότητα (Reglinski et al., 2007).

Στην περίπτωση των ιών, οι πρωτεΐνες του καψιδίου είναι οι πλέον πιθανοί διεγέρτες της ανοσοποίησης. Στο παράδειγμα του ιού του μωσαϊκού του καπνού, η RNA πολυμεράση του ιού δρα ως διεγέρτης αμολυσματικότητας σε φυτά καπνού που φέρουν το αντίστοιχο γονίδιο ανοχής το οποίο προέρχεται από το είδος *Nicotiana glutinosa*. Η αλληλεπίδραση αυτή επάγει τη SAR (Padgett and Beachy, 1993).

Ομοίως, στα βακτήρια οι μηχανισμοί άμυνας συνδέονται με τις βακτηριακές πρωτεΐνες ( όπως π.χ. οι γλυκοπρωτεΐνες του βακτηρίου *Ralstonia solanacearum*) ή με τις βακτηριακές πρωτεΐνες *Anr*, όπου σε αυτή την περίπτωση σχετίζεται με το φαινόμενο της αντίδρασης υπερευαισθησίας. Η διασυστηματική ανθεκτικότητα, μπορεί να επιτευχθεί με εφαρμογή στα φυτά τμημάτων των μεμβρανών (βιομόρια-διεγέρτες) μη παθογόνων μυκήτων και βακτηρίων, ή ακόμη και μέσω εφαρμογής ουσιών πρωτεϊνικής φύσεως από άλλα φυτά (Agrios, 2005).

Αξίζει να σημειωθεί ότι οι Griesbach et al. (2000), μόλυναν φυτά τομάτας με το μη παθογόνο στέλεχος NCPPB 3123 του *Clavibacter michiganensis* subsp. *michiganensis* και παρατήρησαν ευρείας κλίμακας προστασία σε επόμενη μόλυνση των φυτών με παθογόνα στελέχη του *Cmm* όπου τα τυπικά συμπτώματα της ασθένειας ήταν σημαντικά μειωμένα. Η επαγωγή της ανθεκτικότητας είχε άμεση σχέση με τη συγκέντρωση των παθογόνων και μη παθογόνων στελεχών στους φυτικούς ιστούς και το μεσοδιάστημα μεταξύ των δύο μολύνσεων. Το μη παθογόνο στέλεχος παρουσίασε διασυστηματική κίνηση, όπως και τα παθογόνα, ωστόσο ο πληθυσμός τους βρέθηκε σημαντικά χαμηλότερος στους σπόρους σε σχέση με τα παθογόνα στελέχη. Η ανθεκτικότητα διατηρήθηκε ως το τέλος του βιολογικού κύκλου των φυτών.

#### **1.2.2.3.2 Η χρήση ριζοσφαιρικών βακτηρίων**

Η χρήση μη παθογόνων μικροοργανισμών (σαπρόφυτα), όπως τα ριζοσφαιρικά βακτήρια, μπορεί να προκαλεί την επαγόμενη διασυστηματική ανοχή (ISR) όπως έχει ήδη αναφερθεί παραπάνω. Τα βακτήρια αυτά βρίσκονται σε μεγάλους αριθμούς στη ριζόσφαιρα των φυτών. Μερικά στελέχη των ριζοβακτηρίων μπορεί να προωθούν την ανάπτυξη των φυτών και αναφέρονται ως ριζοβακτήρια που προάγουν το ρυθμό ανάπτυξης των φυτών (Plant Growth – Promoting Rhizobacteria, PGPR) διότι η εφαρμογή τους μπορεί να διεγείρει την ανάπτυξη των φυτών και να τα καταστήσει πιο ανθεκτικά υπό συνθήκες καταπόνησης. Αναφέρεται ότι για τις θετικές επιδράσεις της ISR στα φυτά εμπλέκονται και άλλοι μηχανισμοί των ριζοβακτηρίων όπως, τροφικός ανταγωνισμός, παρασιτισμός, ανταγωνισμός για θέση, αντιβίωση, παραγωγή σιδηροφόρων.

Όταν αναφερόμαστε σε παθογόνα του εναερίου μέρους των φυτών, τα παθογόνα και τα PGPR δεν είναι δυνατό να έλθουν σε επαφή, με αποτέλεσμα να γίνεται μόνο επαγωγή της ISR και όχι πιθανή συνεργιστική δράση των παραπάνω αναφερθέντων μηχανισμών ώστε να μπορεί να αποδειχθεί το φαινόμενο της επίκτητης διασυστηματικής ανοχής. Όταν όμως αναφερόμαστε σε εδαφογενή παθογόνα, το παθογόνο και τα βακτήρια βρίσκονται στη ριζόσφαιρα. Σε αυτή την περίπτωση, για να αποδείξουμε το μηχανισμό της ανοσοποίησης, χωρίζουμε το ριζικό σύστημα του

φυτού σε δύο ίσα μέρη εφαρμόζοντας στο ένα μέρος το βακτήριο και στο άλλο το παθογόνο. Οι δύο αυτές ομάδες μικροοργανισμών, θα πρέπει να παραμένουν διαχωρισμένες σε όλη τη διάρκεια της ανοσοποίησης, καθώς είναι απαραίτητη η απουσία του διεγέρτη από την πλευρά που βρίσκεται το παθογόνο (van Loon et al., 1998).

Για το χαρακτηρισμό ενός ριζοσφαιρικού βακτηρίου ως διεγέρτη του φαινομένου της ανοσοποίησης έχει καθοριστεί μια σειρά κριτηρίων που θα πρέπει να ικανοποιεί. Αυτά είναι (van Loon et al., 1998):

α) Η απουσία τοξικών επιδράσεων του βακτηρίου στον παθογόνο παράγοντα. Το βακτήριο θα πρέπει να παρεμποδίζει την ανάπτυξη του παθογόνου *in vitro*, παρόλα αυτά, η παρεμποδιστική δράση του βακτηρίου έναντι του παθογόνου είναι δύσκολο να ελεγχθεί απόλυτα στο περιβάλλον της ριζόσφαιρας, καθώς αποτελεί ένα δυναμικό περιβάλλον με μεγάλο αριθμό αλληλεπιδράσεων μεταξύ των μικροοργανισμών.

β) Καταστολή της ανοσοποίησης από προηγούμενη εφαρμογή εξειδικευμένων παρεμποδιστών, όπως η ακτινομυκίνη D (AMD), που επηρεάζουν την έκφραση ορισμένων γονιδίων στα φυτά. Αυτό το κριτήριο είναι δύσκολο να εξεταστεί στην ανοσοποίηση μέσω ριζοβακτηρίων, καθώς οι παρεμποδιστές επηρεάζουν περισσότερες από μια λειτουργίες στα φυτά.

γ) Ανάγκη παρέλευσης χρονικού διαστήματος μεταξύ εφαρμογής του διεγέρτη και της έναρξης εκδήλωσης της ανοσοποίησης από το φυτό. Ο χρόνος που χρειάζεται από τα φυτά ώστε να φτάσουν στο στάδιο της διέγερσης είναι, από μερικές ημέρες ως μια εβδομάδα.

δ) Απουσία τυπικής σχέσης συγκέντρωσης του διεγέρτη για την εκδήλωση του αποτελέσματος όπως αυτό συνδέεται με τις τοξικές ουσίες. Η ανοσοποίηση επάγεται όταν στα φυτά γίνεται εφαρμογή πληθυσμού ριζοσφαιρικών βακτηρίων, τέτοιου ώστε να ικανοποιεί ένα κατώτατο όριο. Όμως, η περαιτέρω αύξηση στον πληθυσμό του βακτηρίου, δεν συνοδεύεται από ανάλογη αύξηση του φαινομένου της ανοσοποίησης. Εφόσον εκδηλωθεί η ανοσοποίηση, διατηρείται για μεγάλο χρονικό διάστημα ακόμα για ολόκληρο το βιολογικό κύκλο του φυτού, αν και το επίπεδο αντοχής υποβαθμίζεται με την ανάπτυξη του φυτού. Μια χρονική περίοδος (η οποία μπορεί να είναι μικρή) που ο παράγοντας διέγερσης βρίσκεται σε ικανοποιητικό επίπεδο πληθυσμού, είναι ικανή για την επαγωγή της ανοσοποίησης. Αυτό έρχεται σε αντίθεση με άλλους ανταγωνιστικούς παράγοντες που επιστρατεύονται για την αντιμετώπιση των παθογόνων στα φυτά, καθώς η παρουσία μεγάλου πληθυσμού από τους παράγοντες αυτούς είναι απαραίτητη σε όλο το χρονικό διάστημα κατά το οποίο το παθογόνο αποτελεί απειλή για τα φυτά.

ε) Μη εξειδικευμένη φύση της ανοσοποίησης. Η επίκτητη διασυστηματική αντοχή δίνει στα φυτά προστασία εναντίον ευρέως φάσματος παθογόνων κατά μη εξειδικευμένο τρόπο, όπως μύκητες, βακτήρια, ιοί, ακόμα και έντομα και νηματώδεις.

στ) Τοπική και διασυστηματική προστασία. Κατά την επαγωγή της ανοσοποίησης, παράγεται ένα σήμα το οποίο μεταφέρεται από την περιοχή διέγερσης σε όλα τα υπόγεια και υπέργεια όργανα του φυτού ώστε να προκληθεί η ανοσοποίησή του.

ζ) Εξάρτηση από το γονότυπο του φυτού. Οι διαφορετικές ποικιλίες ενός φυτού ποικίλουν στην ικανότητα διέγερσης από έναν διεγέρτη. Αυτό έχει αποδειχθεί από διάφορα πειραματικά δεδομένα.

Πίνακας 1.4: Παραδείγματα εφαρμοζόμενων ριζοσφαιρικών βακτηρίων για την πρόκληση επαγόμενης διασυστηματικής αντοχής στα διάφορα παθογόνα (van Loon et al., 1998).

ΦΥΤΟ	ΒΑΚΤΗΡΙΑΚΟ ΣΤΕΛΕΧΟΣ	ΠΑΘΟΓΟΝΟ
Αραβίδοψη	<i>Pseudomonas fluorescens</i> WCS 417	<i>Fusarium oxysporum</i> f.sp. <i>raphani</i> <i>Peronospora parasitica</i> <i>Pseudomonas syringae</i> pv. <i>tomato</i>
Αραβίδοψη	<i>Pseudomonas putida</i> WCS 358	<i>Fusarium oxysporum</i> f.sp. <i>raphani</i> <i>Pseudomonas syringae</i> pv. <i>tomato</i>
Αγγούρι	<i>Pseudomonas aureofaciens</i>	<i>Colletotrichum orbiculare</i>
Αγγούρι	<i>Pseudomonas putida</i> 89-B27	Cucumber mosaic virus <i>Fusarium oxysporum</i> f.sp. <i>lachrymans</i> <i>Fusarium oxysporum</i> f.sp. <i>cucumerinum</i> <i>Colletotrichum orbiculare</i>
Καπνός	<i>Serratia marcescens</i> 90-166	<i>Pseudomonas syringae</i> pv. <i>tabaci</i>
Καπνός	<i>Pseudomonas aeruginosa</i> 7NSK2	Tobacco mosaic virus
Καπνός	<i>Pseudomonas fluorescens</i> CHAO	<i>Thielaviopsis basicola</i> Tobacco necrosis virus
Τομάτα	<i>Pseudomonas fluorescens</i> WCS 417	<i>Fusarium oxysporum</i> f.sp. <i>lycopersici</i>
Τομάτα	<i>Pseudomonas fluorescens</i> 89-B27	Cucumber mosaic virus
Τομάτα	<i>Serratia marcescens</i> 90-166	Cucumber mosaic virus

Διάφορες βακτηριακές ουσίες έχουν μελετηθεί ως διεγέρτες του φαινομένου της επίκτητης διασυστηματικής αντοχής. Οι λιποπολυσακχαρίτες (LPS) έχει βρεθεί ότι προκαλούν την ISR στα φυτά. Οι βακτηριακοί λιποπολυσακχαρίτες συμβάλουν στην επιβίωση και ανάπτυξη του βακτηρίου στη ριζόσφαιρα, βοηθώντας στον καλύτερο αποικισμό τους, δημιουργώντας ένα ευνοϊκό μικρο-περιβάλλον και λειτουργώντας ως ένα προστατευτικό σύνορο για το βακτήριο απέναντι σε τοξικές ουσίες που υπάρχουν στη ριζόσφαιρα και παράγονται από το φυτό ή άλλους ανταγωνιστικούς μικροοργανισμούς. Επίσης άλλη μια ομάδα βακτηριακών ουσιών που έχει βρεθεί ότι επάγουν την ανοσοποίηση είναι οι σιδηροφόροι. Πρόκειται για χηλικές ενώσεις παραγόμενες από τους μικροοργανισμούς, που έχουν ως σκοπό τη δέσμευση του σιδήρου, από το περιβάλλον του μικροοργανισμού σε συνθήκες έλλειψης του στοιχείου αυτού. Οι φθορίζουσες ψευδομονάδες (*Pseudomonas fluorescens*) παράγουν τέτοιες ουσίες, που ονομάζονται ψευδομπακτίνες. Πολλά ριζοβακτήρια που λειτουργούν ως διεγέρτες της ISR παράγουν σαλικυλικό οξύ ως σιδηροφόρο. Έχει πράγματι παρατηρηθεί η ικανότητα ορισμένων στελεχών φθορίζουσών ψευδομονάδων να παράγουν σαλικυλικό σε συνθήκες έλλειψης σιδήρου, όπου ταυτόχρονα παρατηρήθηκε και η ικανότητα επαγωγής διασυστηματικής αντοχής στα φυτά (van Loon et al., 1998).

#### 1.2.2.3 Συνθετικές χημικές ενώσεις

Η χρησιμοποίηση συνθετικών ουσιών ως διεγέρτες του μηχανισμού της ανοσοποίησης των φυτών έναντι ασθενειών των οποίων η αντιμετώπιση με άλλα μέσα είναι πολύ δύσκολη (πχ. ιώσεις για την αντιμετώπιση των οποίων δεν υπάρχουν ανθεκτικές ποικιλίες), συνιστά μια σημαντική εναλλακτική λύση. Μια συνθετική χημική ουσία μπορεί να χαρακτηριστεί ως διεγέρτης ή επαγωγέας της ανοσοποίησης εάν ικανοποιεί τα παρακάτω κριτήρια (Kessmann et al., 1994):

- Να επάγει μηχανισμούς αντοχής στο ίδιο φάσμα παθογόνων και να διεγείρει την έκφραση των ίδιων βιοχημικών δεικτών που διεγείρει και το βιολογικό πρότυπο της ανοσοποίησης.
- Να μην έχει άμεση αντιμικροβιακή δράση *in vitro* ή *in vivo*. Σε περίπτωση αντιμικροβιακής δράσης, η διέγερση μπορεί να επιτευχθεί αν οι απομονώσεις του παθογόνου εμφανίζουν ανθεκτικότητα ύστερα από εφαρμογή του συγκεκριμένου χημικού παράγοντα διέγερσης.
- Να τροποποιεί την αλληλεπίδραση παθογόνου-ξενιστή, ώστε φαινοτυπικά να μην έχουμε μόλυνση και να επάγει τους μηχανισμούς άμυνας του φυτού πριν από ή μετά την μόλυνση.

Πριν μελετηθεί ο ρόλος του σαλικυλικού οξέος στη μεταφορά του σήματος ανοσοποίησης, είχε ήδη διαπιστωθεί η εμπλοκή του ως διεγέρτη. Η εφαρμογή σαλικυλικού οξέος (hydroxybenzoic acid) ή της ακετυλομένης του μορφής (Acetyl



Salicylic Acid, ASA), επάγει ανθεκτικότητα στον καπνό κατά του TMV. Λίγο αργότερα διαπιστώθηκε ότι το SA επάγει τη σύνθεση PR πρωτεϊνών (van Loon and Antoniw, 1982).

Το 2,6 διχλωροϊσονικωτικό οξύ (2,6-dichloroisonicotinic acid, DCINA ή INA) αποτελεί μία από τις πρώτες συνθετικές ουσίες που χρησιμοποιήθηκαν για την επαγωγή της ανοσοποίησης. Στις αρχικές δοκιμές έγινε εφαρμογή σε φυτά πιπεριάς και ρυζιού ενώ αργότερα αναφέρθηκε ότι η εφαρμογή του DCINA στον καπνό πέτυχε επαγωγή PR-πρωτεϊνών ίδιων με αυτές που παρατηρήθηκαν όταν στο φυτό έγινε εφαρμογή με SA. Επίσης εφαρμογή του DCINA σε αραβίδωση, κατέδειξε επαγωγή ανθεκτικότητας στα *Ps. syringae* pv. *maculicola* και *Hyaloperonospora arabidopsidis*. Με βάση τις παρατηρήσεις αυτές, φαίνεται πως το DCINA επάγει τη SAR κατά τρόπο παρόμοιο με αυτόν του SA (Ward et al., 1991, Uknes et al., 1992). Μερικά ακόμη παραδείγματα εφαρμογής του DCINA αναφέρουν ότι διεγείρει φυτάρια φασολιού (*Phaseolus vulgaris*) έναντι των *Colletotrichum lindemuthianum* (ανθράκωση του φασολιού), *Uromyces appendiculatus* (σκωρίαση του φασολιού) και *Pseudomonas syringae* pv. *phaseolicola*. Η ανίχνευση της δράσης χιτινασών και β-1,3 γλουκανασών στα ανώτερα φύλλα του φυτού αποδεικνύει την ικανότητα επαγωγής SAR του DCINA (Dann and Deverall, 1996).

Το βένζο(1,2,3) θειαδιαζολ-7-καρβοθειικό οξύ (benzothiadiazole-7-carbothioic acid, BTH) και ο μεθυλεστέρας του (S-methyl benzo [1,2,3]thiadiazole-7-carbothioate, ASM) είναι άλλη μια ομάδα συνθετικών ενώσεων που επάγουν τη SAR. Εμπορικά έχει κυκλοφορήσει ως διεγέρτης των φυτών περιλαμβάνοντας τα σκευάσματα Bion<sup>®</sup>, Actigard<sup>®</sup>, και Boost<sup>®</sup>. Το ASM λειτουργικά εμφανίζει υψηλή συσχέτιση με το σαλικυλικό οξύ, επάγοντας την ανθεκτικότητα σε εύρος παθογόνων ως αποτέλεσμα της έκφρασης PR-γονιδίων (Oostendorp et al., 2001). Στην αραβίδωση έχει αναφερθεί η ικανότητα επαγωγής ανοσοποίησης εναντίον των παθογόνων *Pseudomonas syringae* pv. *tomato* και *Peronospora parasitica*. (Lawton et al., 1996; Τζάμος 2004). Επιπλέον αναφορές υπάρχουν και στον καπνό, όπου το BTH προωθεί την ανοσοποίηση φυτών καπνού εναντίον των παθογόνων *Cercospora nicotianae*, *Erwinia carotovora*, *Phytophthora parasitica*, *Pseudomonas syringae* pv. *tabaci* και του ιού TMV, ενώ για το *Alternaria alternata* και *Botrytis cinerea*, δεν παρατηρήθηκε επαγωγή ανοτοχής. Σημειώνεται ότι σε *in vitro* πειράματα, το BTH έδειξε μη αντιμικροβιακή δράση ενώ εκτός από την ικανότητα έκφρασης PR-γονιδίων παρατηρήθηκε η μεταγραφή γονιδίων που εκφράζουν υπεροξειδάσες και άλλα ενζυμα σχετικά με την άμυνα των φυτών (Friedrich et al., 1996). Επαγωγή όμως των λανθανόντων μηχανισμών ανοτοχής από το BTH, έχουμε και σε περιπτώσεις μονοκότυλων φυτών. Έχει επισημανθεί συγκεκριμένα ανοτοχή στο σιτάρι έναντι του *Erysiphe graminis* μετά από επαγωγή με BTH (Gorlach et al., 1996). Η ικανότητα του ASM να επάγει την άμυνα δεν περιορίζεται μόνο στα ποώδη φυτά. Η εφαρμογή του ASM σε δενδρόνες με μηλιές έδειξε μείωση των συμπτωμάτων του βακτηριακού καψίματος που προκαλείται από το *Erwinia amylovora*. Για τη διέγερση βέβαια, απαιτούνται περισσότερες από μία εφαρμογές, αλλά η μειωμένη εμφάνιση

συμπτωμάτων συγκρίνεται με αυτήν που παρατηρείται ύστερα από εφαρμογή στρεπτομυκίνης. Η τοπικού χαρακτήρα, αλλά και διασυστηματική αργότερα συσσώρευση υπεροξειδασών, β-1,3 γλουκανασών και η έκφραση των PR-1, PR-2 και PR-8 γονιδίων συνδέεται με την επαγωγή διασυστηματικής ανθεκτικότητας (Brisset et al., 2000, Maxson-Stein et al., 2002).

Η εφαρμογή του β-αμινοβουτυρικού οξέος (β-aminobutyric acid, BABA) έχει δείξει ότι επάγει τη SAR σε φυτά πιπεριάς, τα οποία παρουσιάζουν ανθεκτικότητα στο μύκητα *Phytophthora capsici*. (Hwang et al., 1997). Σε πειράματα με το φυτό *Arabidopsis thaliana*, το BABA επάγει μηχανισμούς ανοσοποίησης έναντι των παθογόνων *Alternaria brassicicola* και *Plectoshaerella cucumerina*. Φαίνεται όμως ότι η δράση του BABA εντοπίζεται, εκτός των άλλων, και στην ενεργοποίηση σε περιπτώσεις καταπόνησης των φυτών καθώς σε φυτά που γίνεται εφαρμογή του, αυξάνεται η ανθεκτικότητα έναντι του ψύχους, της ξηρασίας, της υψηλής θερμοκρασίας και των υψηλών συγκεντρώσεων αλάτων στο έδαφος (Ton and Mauch-Mani, 2004, Ζιώγας και Μαρκόγλου, 2007).

Έχει διαπιστωθεί ότι διάφορα άλατα όπως φωσφορικά, πυριτικά, καλιούχα, επάγουν την αντοχή των φυτών στις ασθένειες. Συγκεκριμένα, σε πειράματα με φυτά μαρουλιού έγινε εφαρμογή β-αμινοβουτυρικού οξέος (BABA), και όξινου φωσφορικού καλίου ( $K_2HPO_3$ ) σε διάφορες συγκεντρώσεις. Τα αποτελέσματα έδειξαν ότι σε συγκεντρώσεις 10 mM για το BABA και 40,6 για το  $K_2HPO_3$ , επετεύχθη επαγωγή μηχανισμών αντοχής των φυτών έναντι του περονοσπόρου (*Bremia lactucae*). Το  $K_2HPO_3$  εμπόδισε τη βλάστηση των σπορίων του παθογόνου και η αντοχή των φυτών διήρκησε για τουλάχιστον 15 ημέρες (Pajot et al., 2001).

Ο Reuveni et al. (2000) διαπίστωσαν την επαγωγή ISR εναντίον του μύκητα *Sphaerotheca fuliginea* σε φυτά αγγουριάς. Η ουσία που επάγει την ISR είναι το μονοφωσφορικό κάλιο (mono-potassium phosphate, MKP), που χρησιμοποιείται ως λιπαντικό στοιχείο σε υδροπονικές καλλιέργειες. Η μείωση της προσβολής από τα κονίδια του παθογόνου έφτασε το 91% σε αντίστοιχη συγκέντρωση φωσφόρου 20 ppm στο θρεπτικό διάλυμα, όμως εφαρμογή στο φύλλωμα 1% του διαλύματος MKP έδειξε προστασία εναντίον του παθογόνου ανεξάρτητα από τη συγκέντρωση του φωσφόρου στο θρεπτικό διάλυμα το οποίο πιθανώς να συνδέεται και με την ενεργοποίηση της SAR ως ξεχωριστός μηχανισμός. Η εφαρμογή του MKP έχει δείξει επίσης μείωση προσβολής άνω του 50% σε δέντρα νεκταρινιάς, μέσω ενεργοποίησης της SAR έναντι του παθογόνου *Sphaerotheca pannosa* (Reuveni and Reuveni, 1998).

Ένα άλλο επίσης φωσφορικό άλας έχει αποδειχθεί ως επαγωγέας της SAR. Το όξινο φωσφορικό κάλιο ( $K_2HPO_4$ ) προκάλεσε αντοχή στην ανθράκωση της αγγουριάς προκαλούμενη από το *Colletotrichum lagenarium*. Με την εφαρμογή του  $K_2HPO_4$  ακολούθησε εμφάνιση νεκρωτικών κηλίδων στα φύλλα όπου και παρατηρήθηκε αύξηση της συγκέντρωσης σαλικυλικού οξέος (Orober et al., 2002).

Η ουσία 2,2 διχλωρο-3,3-διμεθυλκυκλοπροπανο-καρβοξυλικό οξύ (2,2 dichloro-3,3-dimethylcyclopropane carboxylic acid, DCP), περιγράφηκε για πρώτη φορά ως διεγέρτης του αμυντικού μηχανισμού του ρυζιού. Το DCP έχει ασθενή μυκητοκτόνο δράση *in vitro*, επάγει την παραγωγή υπεροξειδασών και για αυτό αργότερα θεωρήθηκε ότι συνδέεται περισσότερο με την παραγωγή φυτοαλεξινών στο ρύζι (Kessmann et al., 1994).

Η χημική ένωση Tiadinil [N-(3-chloro-4-methylphenyl)-4-methyl-1,2,3-thiadiazole-5-carboxamide, TDL], αποτελεί έναν πρόσφατο σχετικά διεγέρτη της άμυνας των φυτών που χρησιμοποιήθηκε πρώτη φορά για την αντιμετώπιση της πυρικούλαριώσεως στο ρύζι. Το TDL επάγει επίσης την άμυνα στον καπνό κατά του *Ps. syringae* pv. *tabaci* και του TMV. Το TDL μεταβολίζεται στα φυτά ρυζιού σε 4-μεθυλ-1,2,3-θειοδιαζολ-5-καρβοξυλικό οξύ το οποίο επάγει τη μεταγραφή PR-γονιδίων. Ο μεταβολίτης αυτός έχει την ικανότητα να ενεργοποιεί τη SAR σε καπνό που φέρει το *NahG* γονίδιο, γεγονός που υποδηλώνει ότι η ένωση αυτή (ομοίως και το INA και ASM) ενεργοποιεί τα ίδια βιοχημικά μονοπάτια με αυτά που διεγείρει το σαλικυλικό οξύ για την έναρξη της διασυστηματικής άμυνας στα φυτά (Yasuda et al., 2004).

Από την κατηγορία των αγροχημικών, η ένωση Fosetyl-Al (aluminium tris-O-ethylphosphonate) διαπιστώθηκε ότι επάγει τους μηχανισμούς άμυνας των φυτών εναντίον ωομυκήτων. Η δραστική αυτή ουσία ενεργοποιείται πρωτίστως εναντίον των παθογόνων μέσω φωσφορικού οξέος ( $H_3PO_3$ ) που αποτελεί προϊόν του μεταβολισμού της από αυτά. Το φωσφορικό οξύ καθυστερεί την ανάπτυξη του παρασίτου δίνοντας τον απαιτούμενο κρίσιμο χρόνο στον ξενιστή προκειμένου να αναπτύξει μηχανισμούς άμυνας. Ακόμη, το μυκητοκτόνο Metalaxyl-M (methyl N-methoxyacetyl-N-2,6-xyllyl-D-alaninate) διαπιστώθηκε ότι δρα ως ενεργοποιητής αμυντικών μηχανισμών των φυτών έναντι ωομυκήτων. Αποτελεί όμως και εδώ, μια δραστική ουσία η οποία έχει μια διασυστηματική προληπτική και θεραπευτική μυκητοκτόνο δράση (Agrios, 2005).

Η δραστική ουσία probenazole και τα προϊόντα μεταβολισμού του (1,2-benzisothiazole-1,1-dioxide), έχει δειχθεί ότι προκαλούν τη SAR λόγω της ικανότητάς τους να εκφράζουν PR-γονίδια. Όμως σε αντίθεση με το ASM και το INA, η εφαρμογή probenazole σε *NahG* φυτά καπνού δεν καταλήγει σε επαγωγή της SAR, δείχνοντας έτσι την ανάγκη για συσσώρευση SA ως μέρος του τρόπου δράσης των ενώσεων αυτών (Leadbeater and Staub, 2007).

Η δραστική ουσία της ομάδας των στρομπιλουρινών pyraclostrobin, έχει μελετηθεί για την ικανότητα επαγωγής ανοσοποίησης. Έγχυση του pyraclostrobin σε φύλλα καπνού επάγει ανθεκτικότητα κατά του TMV και του *Ps. syringae* pv. *tabaci*. Παρόλο που το pyraclostrobin δεν επάγει από μόνο του τη σύνθεση της PR-1 πρωτεΐνης, ωστόσο επιταχύνει την έκφραση PR-γονιδίων και τη συσσώρευση PR-πρωτεϊνών στους ιστούς των φύλλων που μολύνονται με τον TMV. Αυτό υποδηλώνει

ότι το pyraclostrobin δεν επάγει τη SAR κατά την αυστηρή έννοια (Herms et al., 2002).

Η εφαρμογή σε συγκομισμένους καρπούς, ακτινοβολίας UV (254 nm) σε χαμηλές δόσεις, προκαλεί σχεδόν άμεση έκφραση γονιδίων όπως, χιτινάσες, β-1,2,-γλουκανάσες καθώς και άλλα ενζυμικά συστήματα, τα οποία σχετίζονται με την επαγωγή της SAR (Agris, 2005).

Θα πρέπει σε αυτό το σημείο να αναφερθεί ότι για μερικές από τις παραπάνω αναφερθείσες χημικές συνθετικές ενώσεις, καθώς και άλλες ενώσεις (ανόργανα άλατα, νουκλεϊκά οξέα, ακόρεστα λιπαρά οξέα) που έχουν εξεταστεί για την ενεργοποίηση της SAR στα φυτά δεν ικανοποιούν στο ακέραιο τα κριτήρια όπως αυτά αναφέρθηκαν στην αρχή του κεφαλαίου. Σε μερικές περιπτώσεις, οι ουσίες αυτές προκαλούν τοπική νέκρωση στο σημείο εφαρμογής, το οποίο πυροδοτεί ένα μονοπάτι όπου η παρουσία του σαλικυλικού οξέος είναι έντονη και καθοριστική, με αποτέλεσμα οι βιοχημικές διεργασίες του μονοπατιού αυτού να συσχετίζονται με την επαγωγή της αντοχής όπως αυτή συμβαίνει ύστερα από προσβολή ενός αριθμού παθογόνων.

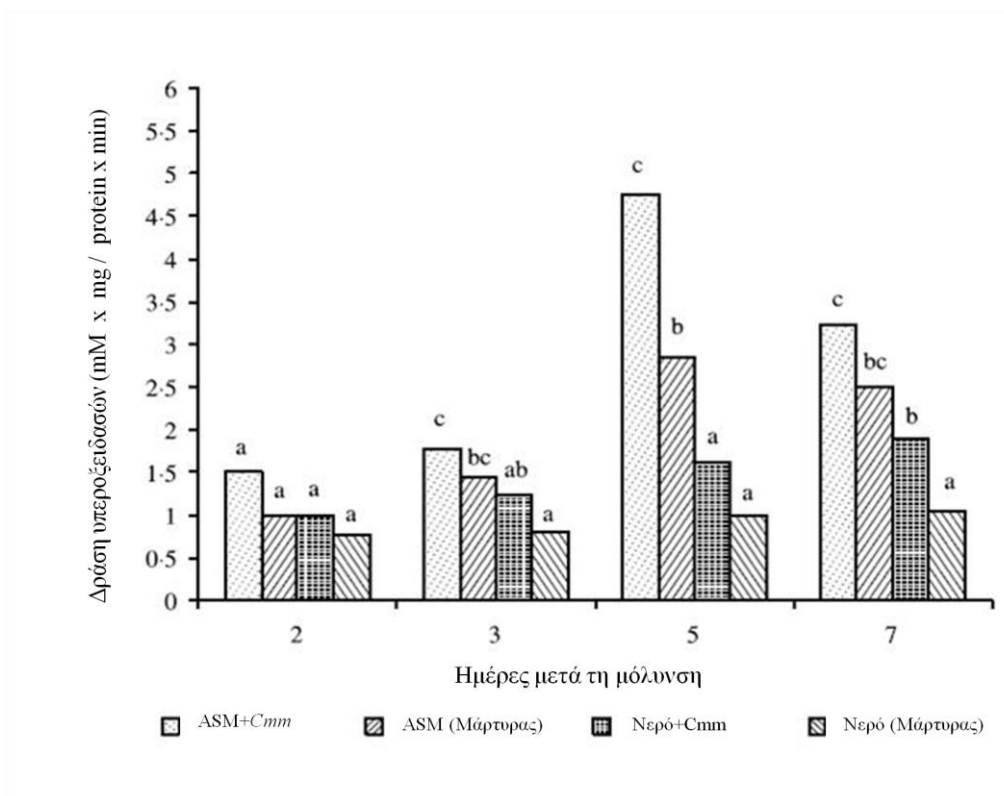
#### 1.2.3.3.1 Εφαρμογή χημικών διεγερτών της SAR για την αντιμετώπιση του *Clavibacter michiganensis* subsp. *michiganensis*.

Η χημική ουσία BTH, όπως έχει αναφερθεί, χρησιμοποιείται ως επαγωγέας της SAR για διάφορα παθογόνα. Ο μεθυλεστέρας του BTH (acibenzolar-S methyl, ASM) χρησιμοποιήθηκε για επαγωγή της ανοσοποίησης σε φυτά τομάτας. Σε εργασία του Baysal et al. (2003) έγινε εφαρμογή με ASM σε διαφορετικές συγκεντρώσεις στα σπορόφυτα, και μετά ακολούθησε η μόλυνση με το παθογόνο σε χρονικό διάστημα 24, 48, 72 και 96 ώρες από τη διέγερση. Τα αποτελέσματα φαίνονται στον Πίνακα 1.5.

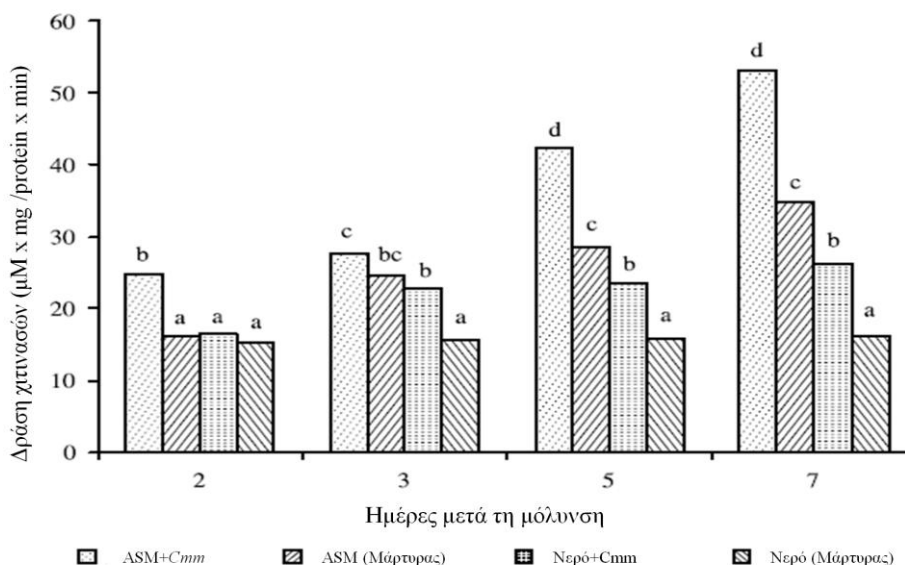
Πίνακας 1.5: Επίδραση της εφαρμογής ASM στην εκδήλωση ασθένειας από το παθογόνο *Clavibacter michiganensis* subsp. *michiganensis* σε φυτά τομάτας.

Ημέρες από τη μόλυνση με <i>Cmm</i>	Διάστημα μεταξύ διέγερσης και μόλυνσης (ώρες)	Ποσοστό προσβολής από την ασθένεια (%)	Ποσοστό προστασίας έναντι του παθογόνου
4	Μάρτυρας	11	0
	24	8	25
	48	5,3	50
	72	3,3	68,8
	96	4,7	56,3
7	Μάρτυρας	33	0
	24	18	46
	48	16	52
	72	8,7	74
	96	12	64
11	Μάρτυρας	62	0
	24	29	53,8
	48	23	62,4
	72	15	76,3
	96	19	68,8
14	Μάρτυρας	81	0
	24	51,3	49,2
	48	29	63,9
	72	19	74,1
	96	25	68,9

Η επαγωγή της SAR συνδέθηκε με αυξημένες ενζυμικές δραστηριότητες. Μετά τη διέγερση και τη μόλυνση, η δράση των υπεροξειδασών (Peroxydases, POX) ήταν ιδιαίτερα υψηλή (Σχήμα 1.4), καθώς και η συγκέντρωση των χιτινασών σε σχέση με το μάρτυρα (Σχήμα 1.5). Η ενζυμική αυτή δράση συνδέεται με την ενεργοποίηση των PR-πρωτεϊνών των ανοσοποιημένων φυτικών ιστών.



Σχήμα 1.4: Επίδραση της εφαρμογής ASM στην επαγωγή υπεροξειδασών σε φύλλα τομάτας. Φύλλα που χειρίστηκαν με ASM ή νερό μολύνθηκαν με *Cmm* 3 ημέρες μετά τη διέγερση. Στους μάρτυρες δεν έγινε μόλυνση με το παθογόνο. Η μέγιστη δράση υπεροξειδασών, περίπου πενταπλάσια σε σχέση με το μάρτυρα, παρατηρήθηκε στις 5 ημέρες μετά τη μόλυνση με το *Cmm*. Οι τιμές των στηλών που ακολουθούνται από το ίδιο γράμμα, δε διαφέρουν στατιστικά σημαντικά μεταξύ τους σε επίπεδο σημαντικότητας 5% (προσαρμογή από Baysal et al., 2003).



Σχήμα 1.5: Επίδραση της εφαρμογής ASM στην επαγωγή χιτινασών σε φύλλα τομάτας. Φύλλα που χειρίστηκαν με ASM ή νερό μολύνθηκαν με *Cmm*, 3 ημέρες μετά τη διέγερση. Στους μάρτυρες δεν έγινε μόλυνση με το παθογόνο. Η μέγιστη δράση των χιτινασών, περίπου τετραπλάσια σε σχέση με το μάρτυρα, παρατηρήθηκε στις 7 ημέρες από τη διέγερση με ASM. Οι τιμές των στηλών που ακολουθούνται από το ίδιο γράμμα, δε διαφέρουν στατιστικά σημαντικά μεταξύ τους σε επίπεδο σημαντικότητας 5% (προσαρμογή από Baysal et al., 2003).

Επιπλέον ερευνητικά δεδομένα έχουν προκύψει σχετικά πρόσφατα αναφορικά με την αντιμετώπιση του βακτηρίου με μια άλλη συνθετική ουσία το β-αμινοβουτυρικό οξύ (BABA). Στη μελέτη αυτή το φυτικό υλικό ήταν σπορόφυτα τομάτας ηλικίας 3 εβδομάδων, το BABA εφαρμόστηκε σε 4 διαφορετικές συγκεντρώσεις (μάρτυρας, 250, 500, 750, 1000 μg/ml) ενώ η μόλυνση με το παθογόνο βακτήριο έγινε σε διάστημα 24 ωρών από τη διέγερση (Baysal et al., 2005).

Τα αποτελέσματα έδειξαν ότι η εφαρμογή του BABA στις διάφορες συγκεντρώσεις μείωσε τα συμπτώματα που προκαλούνται από το βακτήριο ( Πίνακας 1.6).

Πίνακας 1.6. Η επίδραση της εφαρμογής BABA στην εκδήλωση του βακτηριακού έλκους της τομάτας (Baysal et al., 2005).

Εφαρμογή	Δόση (μg/ml)	Αποτελεσματικότητα (%)
Μάρτυρας	0	
BABA	250	17
	500	54
	750	54
	1000	56

Τα σπορόφυτα μολύνθηκαν με το *Cmm* 24 h μετά την εφαρμογή του BABA ή του νερού (για το μάρτυρα). Τα συμπτώματα μετρήθηκαν 14 ημέρες μετά τη μόλυνση. Η αποτελεσματικότητα υπολογίζεται ως η ποσοστιαία μείωση των συμπτωμάτων σε σχέση με το μάρτυρα.

Η ενζυμική δραστηριότητα στους φυτικούς ιστούς που εφαρμόστηκε η διέγερση βρέθηκε να είναι επίσης σημαντικά αυξημένη σε σχέση με το μάρτυρα, γεγονός το οποίο συνδέεται με την ενεργοποίηση των PR-πρωτεϊνών. Πιο συγκεκριμένα η δράση του ενζύμου αμμωνιακή λυάση της φαινυλαλανίνης (Phenylalanine ammonia-lyase, PAL) αυξήθηκε από την τρίτη ημέρα ύστερα από τη διέγερση. Αναφέρεται ότι η PAL αποτελεί βιοχημικό δείκτη της ανοσοποίησης καθώς καταλύει τη μετατροπή της L-φαινυλαλανίνης σε trans-κινναμικό οξύ, όπου ρυθμίζει την παραγωγή πρόδρομων ουσιών βιοσύνθεσης λιγνίνης και άλλων φαινολικών ουσιών οι οποίες προστατεύουν το φυτικό κύτταρο.

Ακόμη η εφαρμογή του BABA προήγαγε την ενεργοποίηση των υπεροξειδασών (POX), 1 ημέρα μετά και έφτασε στο μέγιστο στις 3 ημέρες μετά την εφαρμογή, ενώ κατά αντιστοιχία αυξήθηκε και η συγκέντρωση  $H_2O_2$  στα υγιή φύλλα των διεγερθέντων φυτών. Υπάρχουν σαφείς ενδείξεις που καταδεικνύουν ότι οι δραστικές ομάδες οξυγόνου (active oxygen species, AOS) και ιδιαίτερα το  $H_2O_2$ , μετέχουν σε σημαντικές λειτουργίες στη άμυνα των φυτών έναντι παθογόνων, περιλαμβάνοντας αντιμικροβιακή δράση, σχηματισμό λιγνίνης και πυροδοτώντας τη SAR. Οι υπεροξειδάσες εμπλέκονται στο μηχανισμό της αντίδρασης υπερευαισθησίας και τον πολυμερισμό των λιγνολών προς σχηματισμό λιγνίνης (Baysal et al., 2005).

Όπως περιγράφηκε και παραπάνω, έχει δείχθει ότι τα ακόρεστα λιπαρά οξέα είναι ικανά να διεγείρουν τη διασυστηματική άμυνα στα φυτά (Bostock et al., 1981, Durrant and Dong, 2004). Για την αντιμετώπιση του *Cmm* μέσω διέγερσης των



λανθανόντων μηχανισμών ανθεκτικότητας, οι Baysal et al. (2005) μελέτησαν το λίπος θαλάσσιας χελώνας (*Caretta caretta*) ως προς την ικανότητα διέγερσης των μηχανισμών αυτών. Από την ανάλυση του λίπους με αέρια χρωματογραφία ανιχνεύθηκαν σε μεγαλύτερο ποσοστό το παλμιτικό, μυριστικό, ελαϊκό καθώς και τα πολυακόρεστα λιπαρά οξέα το εικοσιπενταενοϊκό (EPA), και εικοσιδιεξενοϊκό (Docosahexaenoic acid, DHA). Η αναλογία κορεσμένων/ακόρεστων λιπαρών οξέων ή οι μεταβολές στην κατανομή τους στο κύτταρο του ξενιστή μπορεί να ρυθμίζουν την παραγωγή του σήματος. Η επίδραση του λίπους χελώνας ίσως να συνδέεται με την ενεργοποίηση των μονοπατιών μεταγωγής του σήματος.

Ο υπό μελέτη διεγέρτης εφαρμόστηκε σε νεαρά φυτά τομάτας 24 ώρες πριν τη μόλυνση με το *Cmm*. Τα αποτελέσματα έδειξαν ότι ο πληθυσμός του *Cmm* εμφανιζόταν μειωμένος στο διάστημα 4-7 ημέρες μετά τη μόλυνση στα διεγερθέντα φυτά και ως εκ τούτου η εμφάνιση συμπτωμάτων ήταν μειωμένη μέχρι και 50,4% σε σχέση με το μάρτυρα. Επιπλέον, παρατηρήθηκε παρεμπόδιση πολλαπλασιασμού των βακτηρίων *in planta*. Σημειώνεται ότι το λίπος δεν παρουσίασε βακτηριοκτόνο δράση *in vitro*. Η μειωμένη εκδήλωση συμπτωμάτων συσχετίστηκε με την αυξημένη δράση υπεροξειδασών στα διεγερθέντα φυτά, ένζυμα-κλειδιά για την παραγωγή ενεργών ομάδων οξυγόνου και την επαγωγή ανθεκτικότητας. Η αυξημένη δράση POX συνδέεται επίσης συχνά με την ενσωμάτωση φαινολικών ουσιών στα κυτταρικά τοιχώματα κατά τη μη συμβατή αναγνώριση ξενιστή-παθογόνου. Στην τομάτα οι υπεροξειδάσες είναι από τα ένζυμα που πιστεύεται ότι καταλύουν το τελευταίο βήμα της λιγνινοποίησης κατά την οποία τα κύτταρα του ξενιστή καθίστανται ανθεκτικά στα κυτταρολυτικά ένζυμα και τις τοξίνες που παράγονται από τα παθογόνα. Επιπλέον παρατηρήθηκε αύξηση της δράσης των λιποξυγενασών (Lipoxygenases, LPOX). Οι LPOX μπορεί να συσχετιστούν με αύξηση της ανθεκτικότητας στην τομάτα, καθώς η οξειδωση του λινολενικού οξέος από τις LPOX αποτελεί το πρώτο βήμα του βιοσυνθετικού μονοπατιού του ιασημονικού οξέος. Συνεκτιμώντας όλα τα παραπάνω, το λίπος αυτό φαίνεται ότι πιθανώς αποτελεί έναν διεγέρτη της διασυστηματικής ανθεκτικότητας της τομάτας εναντίον του *Cmm* (Baysal et al., 2005).

### **1.3 Επιφανειοδραστικοί παράγοντες**

Οι κατιονικοί επιφανειοδραστικοί παράγοντες του βρωμιούχου αμμωνίου (cationic surfactants of ammonium bromide) αποτελούν τεταρτοταγείς ενώσεων αμμωνίου με κυριότερη ένωση το hexadecyl-trimethyl-ammonium bromide  $[(C_{16}H_{33})N(CH_3)_3Br]$ . Οι ενώσεις αυτές είναι κρυσταλλικές λευκές ουσίες και ως επιφανειοδραστικές ουσίες σχηματίζουν μικέλλες σε υδατική φάση (βαθμός συσσωμάτωσης 75-110). Έχουν χρησιμοποιηθεί ως τοπικά αντισηπτικά, ενώ αποτελούν συστατικά σε είδη οικιακής

χρήσης όπως καλλυντικά, σαμπουάν, οδοντόκρεμες. Στην βιομηχανία βρίσκουν χρήση ως γαλακτωματοποιητές, ως αποστειρωτικά σε εκτροφές μεταξοσκωλήκων, καθώς και ως αντιστατικοί παράγοντες στη βιομηχανία ινών. Στο εργαστήριο αποτελούν συστατικά ρυθμιστικών διαλυμάτων για την εξαγωγή DNA. Επίσης στην ηλεκτροφόρηση γλυκοπρωτεϊνών μπορεί να αντικαταστήσουν το SDS με σκοπό την παραλαβή πιο συγκεκριμένων και σαφών ζωνών των πηγμάτων ([www.chemicaland21.com](http://www.chemicaland21.com), Buxbaum, 2003).

Οι κατιονικοί επιφανειοδραστικοί παράγοντες του βρωμιούχου αμμωνίου φαίνεται ότι μετέχουν στην εκδήλωση ανοσοποίησης σε άλλους οργανισμούς. Οι παράγοντες αυτοί, λόγω της χημικής τους δομής, βρίσκουν εφαρμογή στην ανοσολογία, ως ανοσοενισχυτικά έκδοχα, αυξάνοντας την άμυνα των οργανισμών στα αντιγόνα. Η χορήγηση σε αρουραίους DDAB (Dimethyl Dioctadecyl Ammonium Bromide) σε συνδυασμό με thehalose 6,6 dibehenate (TDB), έχει ως αποτέλεσμα τη δημιουργία μιας ανοσοενισχυτικής υπομονάδας κατά του *Mycobacterium tuberculosis*, που είναι υπεύθυνο για την πρόκληση φυματίωσης στον ανθρώπινο οργανισμό (Holten-Andersen et al., 2004).

#### **1.4 Φάσμα αμυντικών μηχανισμών των φυτών**

Από την καταγραφή της μελέτης της διεθνούς βιβλιογραφίας που αφορά την ανοσοποίηση των φυτών βλέπουμε ότι οι διάφοροι μηχανισμοί επαγωγής της αντοχής εντάσσονται σε ένα ευρύ φάσμα αμυντικών μηχανισμών οι οποίοι μπορεί να συμβαίνουν ταυτόχρονα και να συνθέτουν ένα σύμπλοκο φαινόμενο. Από τους μηχανισμούς αυτούς άλλοι διεγείρονται τοπικά στη θέση προσβολής και άλλοι διασυστηματικά με αμυντικές αντιδράσεις σε επακόλουθες προσβολές μολυσματικών παθογόνων και διεγερτών. Εκτός επομένως από τους μηχανισμούς της SAR και ISR που αναλύθηκαν παραπάνω, σημαντικό ρόλο διαδραματίζουν και άλλοι αμυντικοί μηχανισμοί όπως (Τζάμος, 2004):

- Αντίδραση υπερευαισθησίας
- Παραγωγή ενώσεων μέσω οξειδωτικής μεταβολικής εκρήξεως
- Παραγωγή αναστολέων πρωτεϊνών
- Λιγνινοποίηση και άλλοι δομικοί φραγμοί
- Σύνθεση και συσσώρευση των φυτοαλεξινών

Συμπερασματικά, κάνοντας μια ανασκόπηση των όσων έχουν αναφερθεί, καταλαβαίνουμε ότι από την εποχή που ξεκίνησε να μελετάται ο μηχανισμός της ανοσοποίησης των φυτών μέχρι και τις μέρες μας, έχει παραχθεί μεγάλη γνώση ύστερα από την επιστάμενη μελέτη της παγκόσμιας επιστημονικής κοινότητας. Τα ερευνητικά δεδομένα καταδεικνύουν ότι η εφαρμογή των μηχανισμών ανοσοποίησης, ως ένα επιπλέον μέτρο για την αντιμετώπιση των ασθενειών των φυτών, δίδει ενθαρρυντικές και ελπιδοφόρες προοπτικές προς αυτήν την κατεύθυνση. Αυτό αποκτά μεγαλύτερη σημασία αν αναλογισθούμε την ανάγκη της εποχής μας για ανάπτυξη τρόπων αντιμετώπισης των παθογόνων εναρμονισμένων με αρχές της ήπιας διαχείρισης των αγροοικοσυστημάτων. Τα πλεονεκτήματα επομένως που προκύπτουν μπορεί να είναι πολλαπλά και συνοψίζονται στα ακόλουθα (Γεωργόπουλος και Ζιώγας, 1992):

- Η ανοσοποίηση είναι αποτελεσματική εναντίον ιώσεων, βακτηριώσεων και μυκητολογικών ασθενειών των φυτών.
- Η ανοσοποίηση βασίζεται στην ενεργοποίηση περισσότερων του ενός κάθε φορά μηχανισμών ανθεκτικότητας του ξενιστή και συνεπώς, είναι εξαιρετικά μειωμένη η πιθανότητα ανάπτυξης μηχανισμών ανθεκτικότητας από τα παθογόνα.
- Η ανοσοποίηση είναι διασυστηματική σε αντίθεση με τα μυκητοκτόνα μη εξειδικευμένης δράσης, που είναι κατά κανόνα προστατευτικά.
- Όταν επιτευχθεί η ανοσοποίηση, κρατάει για αρκετό διάστημα, συνήθως για όλη τη διάρκεια ζωής των ετησίων φυτών.
- Επειδή κατά την ανοσοποίηση χρησιμοποιούνται μηχανισμοί, που υπάρχουν στα φυτά, μπορεί να υποστηριχθεί ότι δεν δημιουργούνται πρόσθετοι κίνδυνοι για τον άνθρωπο και το περιβάλλον.
- Αν γίνει εμβολιασμός, τουλάχιστον στον καπνό και τα κολοκυνθοειδή, η ανοσοποίηση μεταδίδεται από το υποκείμενο στο εμβόλιο και αυτό μπορεί να έχει ιδιαίτερη σημασία για ορισμένες καλλιέργειες.
- Η ανοσοποίηση είναι μια διασυστηματική ευαισθητοποίηση των φυτών ώστε να αντιδράσουν, αλλά η αντίδραση δεν εκδηλώνεται παρά μόνο, όταν χρειασθεί.
- Η ικανότητα ανοσοποίησης ευαίσθητων φυτών σημαίνει ότι η δυνατότητα ανθεκτικότητας υπάρχει σε όλα τα φυτά.

Βέβαια πέραν όλων των πλεονεκτημάτων που αναφέρθηκαν, θα πρέπει να εξετασθεί κατά πόσον η ανοσοποίηση είναι ανταγωνιστική σε σχέση με τη χημική καταπολέμηση ως προς την ταχύτητα της αποτελεσματικότητας στα φυτά καθώς και την οικονομική βιωσιμότητα της μεθόδου.

### **1.5 Σκοπός της παρούσας μελέτης**

Το βακτηριακό έλκος ή κορυνοβακτηρίωση της τομάτας προκαλείται από το παθογόνο βακτήριο *Clavibacter michiganensis* subsp. *michiganensis* και αποτελεί μία σοβαρή αδροβακτηρίωση η οποία έχει εξαπλωθεί σε όλες σχεδόν τις χώρες του κόσμου που καλλιεργείται η τομάτα. Στην Ελλάδα διαπιστώθηκε για πρώτη φορά το 1958 στην περιοχή της Πρέβεζας. Σήμερα έχει εξαπλωθεί σε όλη τη χώρα και αποτελεί σοβαρό πρόβλημα τόσο στις υπαίθριες όσο και στις υπό κάλυψη τοματοκαλλιέργειες.

Η επαγωγή λανθανόντων μηχανισμών αντοχής πραγματοποιείται κατά την αναγνώριση των μορίων διέγερσης από τους αντίστοιχους υποδοχείς στα φυτά. Η αναγνώριση αυτή ενεργοποιεί μεταβολικά μονοπάτια σχηματισμού και κατόπιν μεταγωγής ενός ενδογενούς σήματος. Το σήμα με τη σειρά του, ενεργοποιεί γονίδια από τα οποία συντίθενται πρωτεΐνες που σχετίζονται με την άμυνα των φυτών. Η επίκτητη διασυστηματική αντοχή SAR, μπορεί να ενεργοποιηθεί, εκτός από τα παθογόνα, από διάφορες χημικές ουσίες. Αρκετές φυσικές ή συνθετικές ουσίες έχουν χαρακτηριστεί επαγωγείς της SAR.

Σκοπός της παρούσας μελέτης είναι η αξιολόγηση, τεσσάρων κατιονικών επιφανειοδραστικών παραγόντων του βρωμιούχου αμμωνίου (cationic surfactants of ammonium bromide), ως προς την ικανότητά τους να επάγουν τον αμυντικό μηχανισμό των φυτών τομάτας. Η μελέτη αφορά την καταγραφή της εξέλιξης των συμπτωμάτων στο σύστημα αλληλεπίδρασης τομάτα-*Cmm*, στο οποίο θα εφαρμοστεί ξεχωριστά ο καθένας επιφανειοδραστικός παράγοντας, σε διαφορετικές συγκεντρώσεις. Τα πειράματα παθογένειας έχουν ως σκοπό (α) να διαπιστωθεί αν κάποιος από τους παράγοντες προκαλεί μείωση των συμπτωμάτων της ασθένειας στον ξενιστή σε σχέση με τα φυτά που δεν έχουν δεχθεί τη σχετική επέμβαση, (β) σε ποια συγκέντρωση του κάθε παράγοντα παρατηρείται μεγαλύτερος περιορισμός των συμπτωμάτων της ασθένειας.

Επιπλέον, σε δύο από τους επιφανειοδραστικούς παράγοντες γίνεται μοριακή διερεύνηση. Η αξιολόγηση αυτή σε μοριακό επίπεδο έχει ως σκοπό (α) τη μελέτη της ικανότητας των επιφανειοδραστικών παραγόντων να ενεργοποιούν στα φυτά γονίδια που σχετίζονται με την επαγόμενη διασυστηματική αντοχή όπως χιτινάσες, PR-1, PR-

2 γονίδια, (β) την ανίχνευση παρέλευσης του χρονικού διαστήματος που απαιτείται από την εφαρμογή του επιφανειοδραστικού παράγοντα μέχρι τη επαγωγή των παραπάνω μελετούμενων γονιδίων. Η πιθανή ανίχνευση ενεργοποίησης των χιτινασών, PR-1 και PR-2 γονιδίων δίδει σαφείς ενδείξεις για επαγωγή του φαινομένου της SAR καθώς τα γονίδια αυτά αποτελούν δείκτες της ανοσοποίησης.

## 2. ΥΛΙΚΑ ΚΑΙ ΜΕΘΟΔΟΙ

### 2.1 Δοκιμές παθογένειας

#### **2.1.1 Περιγραφή του πειράματος**

Για τη διεξαγωγή των πειραμάτων παθογένειας αναπτύχθηκαν φυτά τομάτας. Τα φυτά αναπτύχθηκαν και όταν έφτασαν στο κατάλληλο βλαστικό στάδιο, έγινε εφαρμογή των επιφανειοδραστικών παραγόντων. Στις 5 ημέρες μετά τη διέγερση, ακολούθησε η μόλυνση των φυτών με το *Clavibacter michiganensis* subsp. *michiganensis*. Τα συμπτώματα της ασθένειας που παρατηρήθηκαν στα φυτά καταγράφηκαν και ακολούθησε η στατιστική επεξεργασία των δεδομένων αυτών.

#### **2.1.2 Παραγωγή φυτικού υλικού**

Κατά την πειραματική διαδικασία χρησιμοποιήθηκαν φυτά τομάτας (*Lycopersicon esculentum*, Οικ. Solanaceae) ποικιλίας Ailsa Graig τα οποία αποκτήθηκαν από την εταιρία Thompson & Morgan (UK) Ltd.

Οι σπόροι της τομάτας παρέμειναν αποθηκευμένοι στους 4°C. Η διαδικασία παραγωγής σποροφύτων ξεκίνησε με την προβλάστηση των σπόρων. Κατά το επόμενο βήμα ακολούθησε η φύτευση των σπόρων στο θερμοκήπιο του εργαστηρίου φυτοπαθολογίας. Σε ατομικά φυτοδοχεία πολυπροπυλενίου διαστάσεων 9x9x10 cm της εταιρίας Desch Plantpak™ προσθέτονταν περίπου 500 cm<sup>3</sup> τύρφης (Potgrond P, Klasmann Deilmann GmbH) και με τη βοήθεια λαβίδας τοποθετούνταν ένας βλαστημένος σπόρος ο οποίος καλυπτόταν με 8-10 mm τύρφης. Μετά τη φύτευση των σπόρων, τα φυτοδοχεία τοποθετήθηκαν σε πλαστικό πιάτο και το πότισμα γινόταν με προσθήκη νερού στο πιάτο. Το ύψος του νερού στο πιάτο κυμαινόταν στα 5-10 mm με την υγρασία να διατηρείται συνεχώς σταθερή στο υπόστρωμα ανάπτυξης. Οι συνθήκες θερμοκρασίας του θερμοκηπίου διατηρούνταν σταθερές με τη βοήθεια δύο κλιματιστικών με μέση θερμοκρασία νύχτας τους 19-21°C και μέση θερμοκρασία ημέρας τους 24-26°C.

### 2.1.3 Εφαρμογή επιφανειοδραστικών παραγόντων

Το πείραμα περιλαμβάνει την αξιολόγηση 4 κατιονικών επιφανειοδραστικών ενώσεων του βρωμιούχου αμμωνίου στην ικανότητα επαγωγής λανθανόντων μηχανισμών άμυνας (παραγόντας Α, Β, C και D). Για τον καθένα από τους 4 αυτούς παράγοντες έγινε εφαρμογή σε τρεις διαφορετικές συγκεντρώσεις: 1) 1mM, 2) 10 mM και 3) 50 mM. Η ποσότητα που χρησιμοποιήθηκε από τον κάθε παράγοντα για τη δημιουργία διαλυμάτων των τριών αυτών συγκεντρώσεων υπολογίστηκε με βάση το μοριακό τους βάρος και παρουσιάζεται στον πίνακα 2.1. Οι ουσίες μετρήθηκαν με ζυγό ακριβείας (Santorius BA 61) και διαλύθηκαν σε δις απιονισμένο και αποστειρωμένο νερό μέχρι του τελικού όγκου που ορίστηκε στα 10 ml. Τα διαλύματα τοποθετήθηκαν σε σωληνάκια των 25 ml και μεταφέρονταν με αυτά στο χώρο του θερμοκηπίου.

Πίνακας 2.1: Ποσότητα επιφανειοδραστικών παραγόντων που χρησιμοποιήθηκε για την παρασκευή υδατικού διαλύματος συγκεντρώσεων 1 mM, 10 mM, 50 mM.

ΕΠΙΦΑΝΕΙΟΔΡΑΣΤΙΚΟΣ ΠΑΡΑΓΟΝΤΑΣ	ΜΟΡΙΑΚΟ ΒΑΡΟΣ	ΣΥΓΚΕΝΤΡΩΣΗ (g/10 ml διαλύματος)		
		1 mM	10 mM	50 mM
A	322,38	0,0032238	0,0322380	0,1611900
B	308,3	0,0030830	0,0308300	0,1541500
C	384,4	0,0038440	0,0384400	0,1922000
D	368	0,0036800	0,0368000	0,1840000

Η εφαρμογή των επιφανειοδραστικών παραγόντων στα φυτά τομάτας διενεργήθηκε μόλις τα φυτάρια είχαν φτάσει στο βλαστικό στάδιο των 2 πραγματικών φύλλων, 22-24 ημέρες περίπου μετά τη φύτευσή τους. Η εφαρμογή γινόταν ως εξής: ποσότητα 20 μl από το διάλυμα των σωληνίσκων των παραγόντων διαφορετικής συγκέντρωσης λαμβάνονταν με τη βοήθεια πιπέτας (20-200 μl) και τοποθετούνταν στα φυλλάκια του κάθε ενός από τα δύο φύλλα που είχαν τα φυτάρια. Η συνολική ποσότητα (2x20 μl= 40 μl) διαλύματος παράγοντα σε κάθε φυτό τοποθετούνταν σε μικρά σταγονίδια στη φυλλική επιφάνεια όπως φαίνεται στην εικόνα 2.1.B.

Σημειώνεται ότι πριν την εφαρμογή των επιφανειοδραστικών παραγόντων τα φυτά δέχονταν υποστύλωση με λεπτό καλάμι μπαμπού μήκους 30 cm και γινόταν χαλαρό δέσιμο με πλαστικό σπάγγο (Εικόνα 2.1.A). Τα καλάμια προηγουμένως είχαν απολυμανθεί με εμβάπτιση σε διάλυμα 20 % υποχλωριώδους νατρίου. Η εργασία

αυτή διευκόλυνε την εφαρμογή των επιφανειοδραστικών παραγόντων (και την διαδικασία μόλυνσης που θα περιγραφεί παρακάτω), καθώς τα φυτά συγκρατούνταν σε κάθετη διάταξη με αποτέλεσμα να αποφεύγεται η απορροή των παραγόντων από τις φυλλικές επιφάνειες. Όταν το ύψος των φυτών υπερέβαινε τα 40 cm, αφαιρούνταν τα καλάμια αυτά και τοποθετούνταν νέα μεγαλύτερα μήκους 60 cm.

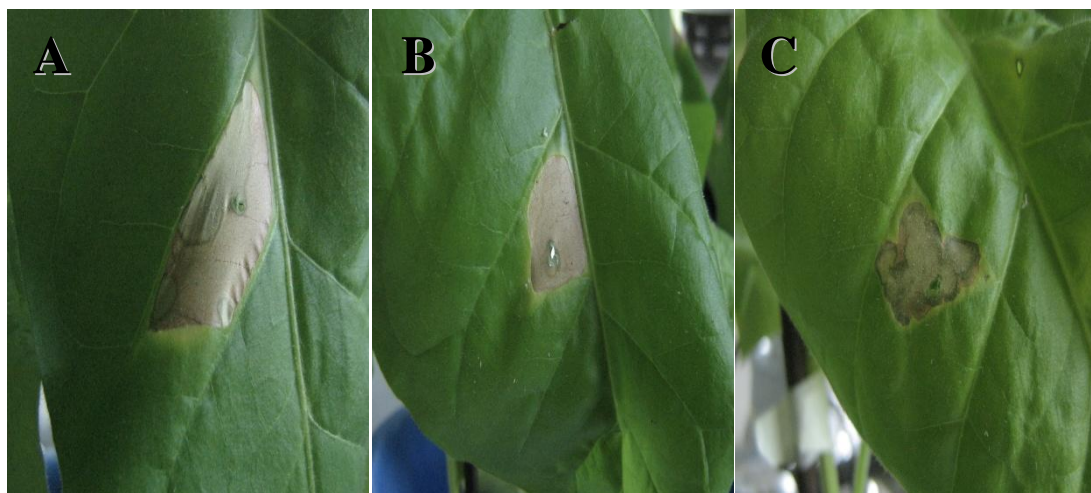


Εικόνα 2.1: Α: Υποστήλωση φυταρίων τομάτας. Β: Εφαρμογή 20 μl επιφανειοδραστικού παράγοντα στο 1<sup>ο</sup> φύλλο φυτού τομάτας 22 ημερών. Στην εικόνα φαίνεται ο διαμερισμός της ποσότητας 7 σταγονιδίων στα φυλλάρια.

#### **2.1.4 Μόλυνση με το παθογόνο βακτήριο *Clavibacter michiganensis* subsp. *michiganensis***

Η διαδικασία ξεκινά με την προετοιμασία παρασκευής του μολύσματος. Τα στελέχη του *Cmm* ήταν αποθηκευμένα στους  $-80^{\circ}\text{C}$  ως αιώρημα βακτηριακών κυττάρων σε 25% υδατική γλυκερόλη. Το σύνολο των στελεχών του *Cmm* που ήταν διαθέσιμα καλλιεργήθηκαν σε θρεπτικό υλικό NA (Nutrient Agar: Nutrient Broth 0.5%, Agar 2%, DD H<sub>2</sub>O 97.5%) και αξιολογήθηκαν με βάση την ικανότητά τους στην επαγωγή αντίδρασης υπερευαισθησίας σε φύλλα καπνού, ποικιλίας Petite Gerard. Τα στελέχη που επιλέχθηκαν να χρησιμοποιηθούν για τις μολύνσεις είναι τα 4045, 4065, 4068 τα οποία έχουν απομονωθεί από φυτά τομάτας θερμοκηπίου (Εικόνα 2.2). Για κάθε ένα από αυτά τα στελέχη παρασκευάστηκε 10 ml υδατικό αιώρημα βακτηριακών κυττάρων συγκέντρωσης  $10^7$  cfu/ml και στη συνέχεια τα τρία αιωρήματα τοποθετήθηκαν σε φιαλίδιο ώστε τελικά να έχει δημιουργηθεί μίγμα αιωρήματος βακτηρίων σταθερής συγκέντρωσης και συνολικού όγκου 30 ml.





Εικόνα 2.2: Απεικόνιση εκδήλωσης ΑΥ σε φύλλα καπνού των στελεχών του *Cmm*: (A) 4045, (B) 4065, (C) 4068.

Στη συνέχεια το βακτηριακό αιώρημα μεταφέρθηκε στις θερμοκηπιακές εγκαταστάσεις του εργαστηρίου ώστε να γίνουν οι μολύνσεις στα φυτά. Το χρονικό σημείο των μολύνσεων είχε καθοριστεί καθ'όλη τη διάρκεια των πειραμάτων στις 5 ημέρες μετά την εφαρμογή των επιφανειοδραστικών παραγόντων. Η τεχνητή μόλυνση κάθε φυτού γινόταν ως εξής: βακτηριακό αιώρημα όγκου 20 μl λαμβάνονταν με τη βοήθεια πιπέτας (20-200 μl) και στη συνέχεια το tip αποχωριζόταν από την πιπέτα και τοποθετούνταν στο στέλεχος του φυτού σε διάταξη τέτοια ώστε η προσρόφηση του μολύσματος να πραγματοποιείται εντός 6-8 ωρών (Εικόνα 2.3). Σημειώνεται ότι μετά τη μόλυνση των φυτών ακολουθούσε η κάλυψή τους με λεπτό φύλλο πλαστικού για διάστημα 30 ωρών, ψεκασμένο με νερό στην εσωτερική του επιφάνεια, με σκοπό να δημιουργηθούν συνθήκες υψηλής ατμοσφαιρικής υγρασίας ώστε να εξασφαλιστεί η επιτυχία των μολύνσεων (Εικόνα 2.4). Για τον ίδιο σκοπό, από το διάστημα των εφαρμογής του μολύσματος και για τις επόμενες 5 ημέρες, η θερμοκρασία του θερμοκηπίου διατηρείτο στους 25°C.



Εικόνα 2.3: Τεχνητή μόλυνση με τοποθέτηση ακροφυσίου πιπέτας με ποσότητα αιωρήματος του βακτηρίου στο στέλεχος φυτού τομάτας.



Εικόνα 2.4: Κάλυψη φυτών τομάτας μετά από τεχνητή μόλυνση για δημιουργία συνθηκών υψηλής υγρασίας. Δεξιά φαίνονται τα μη καλυμμένα φυτά μάρτυρες.

### **2.1.5 Καταγραφή μετρήσεων**

Με την έναρξη εκδήλωσης των πρώτων συμπτωμάτων της ασθένειας ξεκίνησε και η καταγραφή τους ανά 3 ημέρες.

Κατά την καταγραφή σε κάθε φυτό, αρχικά γινόταν καταμέτρηση του συνόλου των φύλλων του φυτού και κατόπιν των προσβεβλημένων φύλλων αυτού. Στα φύλλα που εμφανίζονταν τα συμπτώματα της ασθένειας, μετρούνταν τα προσβεβλημένα φυλλάρια και τα υγιή, με σκοπό να σχηματισθεί ένα κλάσμα αριθμητής του οποίου ήταν ο αριθμός των προσβεβλημένων φυλλαρίων, ενώ ο παρονομαστής ήταν ο συνολικός αριθμός των φυλλαρίων από τα ασθενή φύλλα. Για τον υπολογισμό του ποσοστού ασθένειας ανά φυτό προσθέτονταν τα επιμέρους ποσοστά των προσβεβλημένων φύλλων και διαιρούνταν με τον συνολικό αριθμό των φύλλων.

Η καταγραφή των συμπτωμάτων γινόταν με τον τρόπο που περιγράφηκε παραπάνω καθ'όλη τη διάρκεια εξέλιξης της ασθένειας ως το σημείο που τα φυτά μάρτυρες έφταναν σε ποσοστό ασθένειας 100%. Κατά το πέρας των μετρήσεων γινόταν λήψη δύο φυτών από κάθε επέμβαση για περαιτέρω επεξεργασία. Οι χειρισμοί αυτοί περιελάμβαναν:

(α) την απομόνωση του βακτηρίου που προκαλεί την ασθένεια και την καλλιέργειά του σε υπόστρωμα NA

(β) τη λήψη βακτηριακού αιωρήματος για δοκιμή αντίδρασης υπερευαισθησίας σε φύλλα καπνού

(γ) τη χρώση Gram ώστε να διαπιστωθεί ότι πρόκειται για Gram + βακτήριο.

### 2.1.6 Πειραματικός σχεδιασμός

Στα πλαίσια της παρούσας μελέτης περιλαμβάνεται η αξιολόγηση 4 επιφανειοδραστικών παραγόντων (A, B, C, D). Ο σχεδιασμός του πειράματος έχει ως εξής: Για τον παράγοντα A διεξήχθησαν 2 ανεξάρτητες χρονικά πειραματικές διαδικασίες. Ομοίως και για τον B παράγοντα έγιναν 2 ανεξάρτητα χρονικά πειράματα. Οι παράγοντες C και D μελετήθηκαν από μία φορά ώστε να έχουν διεξαχθεί συνολικά ( $2xA+2xB+1xC+1xD$ ) 6 πειράματα. Όσον αφορά στους μάρτυρες του πειράματος, ο θετικός μάρτυρας περιελάμβανε μόλυνση με το *Cmm* χωρίς καμία άλλη επέμβαση πριν ή μετά, ο αρνητικός μάρτυρας αναφέρεται στην εφαρμογή δις αποιονισμένου αποστειρωμένου  $H_2O$ , ενώ υπήρχαν και μάρτυρες-φυτά που δέχθηκαν μόνο την εφαρμογή παράγοντα στις 3 διαφορετικές συγκεντρώσεις ώστε να διερευνηθεί πιθανή άλλη επίδραση των παραγόντων στα φυτά. Για κάθε ένα από τα πειράματα αυτά έγινε σχεδιασμός που αποδίδεται με τον παρακάτω σχηματισμό:

Παράγοντας  $1\text{ mM}^1 + Cmm$ ..... 15 φυτά x 3 επαναλήψεις = 45 φυτά

Παράγοντας  $10\text{ mM}^2 + Cmm$ ..... 15 φυτά x 3 επαναλήψεις = 45 φυτά

Παράγοντας  $50\text{ mM}^3 + Cmm$ ..... 15 φυτά x 3 επαναλήψεις = 45 φυτά

$Cmm^4$ ..... 15 φυτά

$H_2O^5$ ..... 15 φυτά

Παράγοντας  $1\text{ mM}$ ..... 15 φυτά

Παράγοντας  $10\text{ mM}$ ..... 15 φυτά

Παράγοντας  $50\text{ mM}$ ..... 15 φυτά

<sup>1</sup> Εφαρμογή παράγοντα συγκέντρωσης 1mM,

<sup>2</sup> Εφαρμογή παράγοντα συγκέντρωσης 10mM

<sup>3</sup> Εφαρμογή παράγοντα συγκέντρωσης 50mM

<sup>4</sup> (+) Μάρτυρας

<sup>5</sup> (-) Μάρτυρας

Σημειώνεται ότι μόνη εξαίρεση του παραπάνω προτύπου υπήρξε στην πρώτη από τις 2 μελέτες του Α παράγοντα, όπου έγιναν 2 επαναλήψεις από 20 φυτά η καθεμία.

### **2.1.7 Στατιστική ανάλυση**

Χρησιμοποιώντας τις μετρήσεις καταγραφής συμπτωμάτων σχηματίστηκε η αντίστοιχη γραφική παράσταση σε συνάρτηση με το χρόνο. Σύμφωνα με τη γραφική αυτή παράσταση, υπολογίστηκε ο δείκτης AUDPC (Area Under the Disease Progress Curve, εμβαδόν κάτω από την καμπύλη προόδου της ασθένειας) ο οποίος εκφράζει το συνολικό ποσό της ασθένειας. Ο δείκτης αυτός εκφράστηκε ως ποσοστό της μέγιστης τιμής AUDPC για όλη την διάρκεια του πειράματος, που αντιστοιχεί στο 100 % της προσβολής, και αναφέρθηκε ως σχετική AUDPC (REL. AUDPC) (Korolev et al., 2001). Οι τιμές που προέκυψαν με βάση αυτό το ποσοστό για κάθε διαφορετική επέμβαση του πειράματος, υποβλήθηκαν με τη χρήση του στατιστικού προγράμματος Statgraphics plus 2.1 σε στατιστική ανάλυση με τη μέθοδο ANOVA (Analysis Of Variance) και οι μέσοι όροι διαχωρίστηκαν με πολλαπλή δοκιμή κατά LSD (Least Significant Difference).

## **2.2 Μοριακή διερεύνηση**

Σε αυτό το τμήμα της μελέτης διερευνάται σε μοριακό επίπεδο εάν η εφαρμογή των επιφανειοδραστικών παραγόντων σε φύλλα τομάτας έχει την ικανότητα επαγωγής γονιδίων που σχετίζονται με την άμυνα των φυτών.

### **2.2.1 Σχεδιασμός του πειράματος**

Κατά τη μοριακή διερεύνηση αξιολογήθηκαν οι επιφανειοδραστικοί παράγοντες Α και Β, οι οποίοι είχαν μελετηθεί 2 φορές σε ανεξάρτητα πειράματα παθογένειας. Για το σκοπό αυτό φυτεύθηκαν φυτά τομάτας και ακολούθησε η εφαρμογή του Α και Β παράγοντα όπως αυτά περιγράφηκαν στην προηγούμενη ενότητα. Επιλέχθηκε η συγκέντρωση των 10 mM για την εφαρμογή των παραγόντων Α και Β καθώς σε αυτήν εκδηλώθηκαν μειωμένης έντασης συμπτώματα της ασθένειας στα πειράματα παθογένειας. Ως μάρτυρες, χρησιμοποιήθηκαν φυτά στα οποία έγινε εφαρμογή H<sub>2</sub>O στα φύλλα. Κάθε επέμβαση περιελάμβανε 5 φυτά-επαναλήψεις. Στις 3 επεμβάσεις

(παράγοντας A, παράγοντας B, μάρτυρας), έγινε λήψη των φυτικών στελεχών σε προκαθορισμένα χρονικά διαστήματα μετά την εφαρμογή των παραγόντων τα οποία είναι 6, 12, 24, 36 ώρες. Για τη λήψη του φυτικού υλικού αφαιρούνταν τα φύλλα και λαμβανόταν το στέλεχος σε απόσταση 10 cm πάνω από το σημείο διέγερσης. Το σύνολο του υλικού όλων των επαναλήψεων κάθε επέμβασης τοποθετούνταν άμεσα σε υγρό άζωτο, για να ψυχθούν οι ιστοί πριν αρχίσει η δράση ενζύμων που πιθανά θα υποβάθμιζαν το φυτικό υλικό. Στη συνέχεια τα δείγματα συλλέγονταν και τοποθετούνταν σε υπερκατάψυξη στους  $-80^{\circ}\text{C}$ .

### **2.2.2 Απομόνωση RNA από φυτά τομάτας**

Με την ολοκλήρωση συλλογής των δειγμάτων, ακολουθεί η εξαγωγή RNA για την ανίχνευση παρουσίας γονιδίων που σχετίζονται με την άμυνα του φυτού. Αναφέρεται ότι για κάθε επέμβαση πραγματοποιήθηκαν 2 επαναλήψεις εξαγωγής RNA.

Η απομόνωση ολικού RNA από τα φυτά τομάτας πραγματοποιήθηκε με τη χρήση TRI Reagent<sup>®</sup> (Molecular Research Center, Inc) σύμφωνα με τις οδηγίες του κατασκευαστή. Για τη διαδικασία αυτή, το φυτικό υλικό που είχε συλλεχθεί, ξεπλύθηκε με δις απιονισμένο αποστειρωμένο νερό και κονιορτοποιήθηκε με χρήση υγρού αζώτου σε αποστειρωμένα ιγδία. Ποσότητα περίπου 100 mg κονιορτοποιημένου φυτικού ιστού τοποθετήθηκε σε πλαστικό σωλήνα 1.5 ml και αναμείχθηκε με 1 ml TRI Reagent<sup>®</sup>. Τα δείγματα παρέμειναν σε θερμοκρασία δωματίου για 5 min, ακολούθησε ανάμειξη με 200 μl χλωροφόρμιο και μετά έγινε έντονη ανακίνηση για 15 sec. Τα δείγματα παρέμειναν για 10 min σε θερμοκρασία δωματίου και έγινε φυγοκέντρηση (Heraceus Biofuge fresco) στις 11.000 rpm στους  $4^{\circ}\text{C}$  για 15 min. Η υπερκείμενη φάση μεταφέρθηκε σε νέο σωλήνα 1.5 ml και ακολούθησε εκχύλιση με ίσο όγκο φαινόλη: χλωροφόρμιο (1:1, v:v). Μετά, ακολούθησε η κατακρήμνιση των νουκλεϊκών οξέων με προσθήκη 500μl ισοπροπανόλης, γίνεται ανάμειξη και το δείγμα παραμένει για 10 min σε θερμοκρασία δωματίου. Στη συνέχεια γίνεται φυγοκέντρηση επί 8 min στις 11.000 rpm και  $4^{\circ}\text{C}$  και αφαιρείται το υπερκείμενο. Ακολουθεί η απομάκρυνση των αλάτων με έκπλυση 1 ml διαλύματος αιθανόλης 75% στο δείγμα το οποίο αργότερα υπόκειται σε φυγοκέντρηση στους  $4^{\circ}\text{C}$ . Η διαδικασία της φυγοκέντρησης επαναλαμβάνεται ώστε να επιτύχουμε την απομάκρυνση όσο το δυνατό περισσότερης αιθανόλης από το δείγμα. Ακολουθεί αφύγρανση του ιζήματος RNA για 5 min σε θερμοκρασία δωματίου αφήνοντας στον πλαστικό σωλήνα 1,5 ml ανοικτό το πώμα, ενώ μετά γίνεται επαναιώρησή του σε 30 μl υπερκάθαρο νερό, απαλλαγμένο από ριβοζονουκλεάσες (RNase free water). Το RNA διατηρήθηκε σε βαθιά κατάψυξη ( $-80^{\circ}\text{C}$ ) για περαιτέρω χειρισμό.

### 2.2.3 Μέτρηση νουκλεϊκών οξέων

Η συγκέντρωση του RNA υπολογίστηκε σε όργανο Nanodrop ND-1000 Spectrophotometer το οποίο ήταν συνδεδεμένο με ηλεκτρονικό υπολογιστή για τη λειτουργία του λογισμικού του οργάνου.

Η διαδικασία της μέτρησης του RNA των δειγμάτων ξεκίνησε με την τοποθέτηση ποσότητας 1 μl υπερκάθαρου νερού απαλλαγμένου από ριβοζονουκλεάσες, με σκοπό να γίνει μηδενισμός του οργάνου. Στη συνέχεια γινόταν η μέτρηση των δειγμάτων με τοποθέτηση ποσότητας 1 μl από το κάθε δείγμα.

Ο υπολογισμός της συγκέντρωσης του RNA πραγματοποιήθηκε με τη μέτρηση της οπτικής πυκνότητας των δειγμάτων στα 260 nm. Η οπτική απορρόφηση στα 260 nm ισούται με τη μονάδα ( $O.D_{260} = 1,0$ ) και αντιστοιχεί σε συγκέντρωση σε RNA ίση με 40 μg/ml. Συνεπώς ο προσδιορισμός της συγκέντρωσης RNA υπολογίζεται με βάση την εξίσωση:

Συγκέντρωση = 40 μg/ml (RNA) x  $O.D_{260}$  του δείγματος X συντελεστής αραίωσης

Από το όργανο Nanodrop καταγράφηκαν οι συγκεντρώσεις RNA σε ng/μl ανά δείγμα για να ακολουθήσει αργότερα ο υπολογισμός της προσθήκης RNase free H<sub>2</sub>O ώστε όλα τα δείγματα να έχουν συγκέντρωση 1μg/μl. Επίσης για την αξιολόγηση της καθαρότητας των δειγμάτων καταγράφηκε ο λόγος  $O.D_{260}/O.D_{280}$ .

### 2.2.4 Αντίδραση αντίστροφης μεταγραφής

Η αντίδραση αντίστροφης μεταγραφής εφαρμόστηκε για την *in vitro* παραγωγή DNA (complementary DNA, cDNA) συμπληρωματικού προς το μόριο RNA το οποίο έχει εξαχθεί από τα δείγματα.

Αρχικά, για να παρεμποδιστεί η επιμόλυνση του RNA με DNA, πραγματοποιήθηκε χειρισμός του RNA με 1μl ένζυμο δεσοξυριβοζονουκλεάσης (DNase I Amp Grade, Invitrogen) και τα δείγματα παρέμειναν σε συνθήκες δωματίου για 15 min. Στη συνέχεια προστέθηκε 1μl (25mM) EDTA προκειμένου να διακοπεί η δράση της DNase και τα δείγματα τοποθετήθηκαν στους 65 °C για 10 min ώστε να σταματήσει η αντίδραση.

Για την αντίδραση αντίστροφης μεταγραφής, χρησιμοποιήθηκε το ένζυμο της Superscript™ II RT της εταιρείας Invitrogen. Η σύνθεση cDNA πραγματοποιήθηκε σε δύο στάδια. Κατά το πρώτο στάδιο, σε σωληνάκι 0,5 ml τοποθετήθηκαν 8μg ολικού RNA και κατόπιν έγινε προσθήκη εκκινητή oligo-dT, (ο οποίος λειτουργεί ως

εκκινητής που ενώνεται με το poly-A άκρο του mRNA καθώς από το ολικό RNA χρειαζόμαστε μόνο το mRNA ώστε να λειτουργήσει ως μόριο-εκμαγείο για τη σύνθεση cDNA) και dNTPs (δεοξυριβονουκλεοτίδια) σε τελικό όγκο 10μl. Ακολούθησε ήπια ανάδευση, σύντομη φυγοκέντρηση και οι σωληνίσκοι τοποθετήθηκαν στους 65 °C για 5 min για την αποδιάταξη του RNA. Τα συστατικά και οι συγκεντρώσεις του πρώτου σταδίου είναι τα εξής:

Συστατικά Αντίδρασης	Όγκος
Ολικό RNA	8 μl (1μg/μl)
Εκκινητής oligo (dT) <sub>12-18</sub>	1 μl (500 μg/μl)
dNTP Mix	1 μl (10mM)
H <sub>2</sub> O	2 μl
Τελικός όγκος αντίδρασης 12 μl	

Κατά το δεύτερο στάδιο, οι σωληνίσκοι τοποθετήθηκαν στον πάγο, έγινε σύντομη φυγοκέντρηση και προστέθηκε σε αυτά Master Mix το οποίο περιείχε τα αντιδραστήρια: ρυθμιστικό διάλυμα αντίδρασης RT, μείγμα νουκλεοτιδίων, παρεμποδιστής ριβοζονουκλεασών, ένζυμο Superscript™ II RT σε συγκεντρώσεις:

Συστατικά Αντίδρασης	Όγκος
Ρυθμιστικό διάλυμα αντίστροφης μεταγραφάσης (5X First-Stand Buffer)	4μl
DTT	2μl (0.1M)
RNaseOUT™ Recombinant Ribonuclease Inhibitor (Invitrogen)	1μl (40 units/ml)
Αντίστροφη Μεταγραφάση Superscript™ II RT (Invitrogen)	1μl
Τελικός όγκος αντίδρασης 20 μl	

Η αντίδραση πραγματοποιήθηκε σε τελικό όγκο 20 μl και επώαστηκε στο μηχάνημα της PCR για 50 min στους 42 °C. Ακολούθησε απενεργοποίηση του ενζύμου στους 70 °C για 15 min. Ως αποτέλεσμα αυτής της διαδικασίας είναι η δημιουργία cDNA το οποίο θα χρησιμοποιηθεί ως μόριο-εκμαγείο για την ενίσχυσή του με τη μέθοδο της αλυσιδωτής αντίδρασης πολυμεράσης πραγματικού χρόνου η οποία περιγράφεται αμέσως παρακάτω.

### 2.2.5 Εφαρμογή PCR πραγματικού χρόνου

Η μέθοδος της PCR πραγματικού χρόνου (Real-time PCR), εφαρμόστηκε για τον ποσοτικό προσδιορισμό γονιδίων που σχετίζονται με την άμυνα των φυτών μέσω του *in vitro* πολλαπλασιασμού των γονιδίων αυτών. Για να πραγματοποιηθεί αυτό, χρησιμοποιούνται οι εκκινητές του DNA στόχου (δύο μονόκλωνα ολιγομερή τμήματα DNA με αλληλουχία βάσεων συμπληρωματική με αυτές των 3' άκρων του στόχου). Για να γίνει ο πολυμερισμός του DNA χρησιμοποιείται μία θερμοάαντοχη DNA πολυμεράση, δεοξυριβονουκλεοτίδια ως δομικοί λίθοι των νέων μορίων ενώ οι διεργασίες αυτές πραγματοποιούνται σε περιβάλλον ρυθμιστικού διαλύματος.

Η μελέτη περιελάμβανε τη διερεύνηση επαγωγής τριών γονιδίων τα οποία φαίνεται να υπερεκφράζονται σε συνθήκες επαγωγής μηχανισμών άμυνας στην τομάτα (Balaji et al., 2008) και πρόκειται για τα γονίδια που σχετίζονται με την έκφραση (α) χιτινασών, (β) PR-1 πρωτεϊνών και (γ) PR-2 πρωτεϊνών. Ως γονίδιο αναφοράς χρησιμοποιήθηκε το γονίδιο της αφυδρογονάσης της 3-φωσφορικής γλυκεριναλδεϋδης (glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase, GAPDH). Οι εκκινητές των γονιδίων αυτών είναι:

Γονίδιο	Gen Bank accession	Ζεύγη εκκινητών
Χιτινάση	BG629612	5'-GCTACCAGCAGAGTATTGACATGG-3' 5'-GTGCACTCTCTACTGGCCTATTC-3'
PR-1	M69247	5'-TATACTCAAGTAGTCTGGCGCAAC-3' 5'-CCTACAGGATCGTAGTTGCAAGA-3'
PR-2	BT013355	5'-TTTACTGCGCTACCTGGGAT-3' 5'-ATCTACCGCATGAAGCTTGG-3'
GAPDH	U97257	5'-ATGCTCCCATGTTTGTGTGGGTG-3' 5'-TTAGCCAAAGGTGCAAGGCAGTTC-3'

Οι εκκινητές παραλήφθηκαν από την εταιρία Invitrogen σε λυοφιλιωμένη μορφή και η αιωρηματοποίησή τους έγινε με προσθήκη υπερκάθαρου H<sub>2</sub>O ώστε να έχουν συγκέντρωση 100 mM. Στη συνέχεια έγινε ανάμιξη σε σωληνάκι 1,5 ml των καθοδικών και ανοδικών εκκινητών για το κάθε γονίδιο (Mix Primers Working Solution) και ακολούθησε η προσθήκη H<sub>2</sub>O με σκοπό η συγκέντρωση φτάσει στα 25mM.

Οι αντιδράσεις Real-time PCR πραγματοποιήθηκαν στο θερμοκυκλοποιητή MxPro-Mx3005P™ (Stratagene) χρησιμοποιώντας τα αντιδραστήρια του KAPA™ SYBR® FAST qPCR Kit. Σε κάθε σωλήνα αντίδρασης τοποθετήθηκε 1μl cDNA. Ακολούθως, έγινε προσθήκη των εκκινητών και της χρωστικής KAPA™ SYBR® FAST. Οι



αντιδράσεις εκτελέστηκαν με τα αντιδραστήρια και τις αναλογίες που εμφανίζονται παρακάτω:

Συστατικά αντίδρασης	Όγκος
RNase free H <sub>2</sub> O	3 μl
Mixed Primers (25 mM)	1 μl
KAPA™ SYBR® FAST qPCR Master Mix (2X) Universal	5 μl
cDNA	1
Τελικός όγκος αντίδρασης	10 μl

Το πρόγραμμα θερμοκρασιών που χρησιμοποιήθηκε στις αντιδράσεις Real-time PCR περιελάμβανε τα εξής στάδια: 1) Αρχικό βήμα ενεργοποίησης του ενζύμου DNA πολυμεράσης για 3 λεπτά στους 95°C, 2) 40 κύκλοι που στον κάθε ένα πραγματοποιούνταν αποδιάταξη του cDNA για 3 δευτερόλεπτα και ακολούθως συνδυασμένος υβριδισμός και επέκταση για 20 δευτερόλεπτα στους 60 °C, 3) Στον τελευταίο κύκλο της αντίδρασης μετά από 1 λεπτό στους 95 °C και 30 δευτερόλεπτα στους 60 °C πραγματοποιούνταν σταδιακή αύξηση της θερμοκρασίας κατά 0.5 °C κάθε 30 δευτερόλεπτα μέχρι τους 95 °C προκειμένου να διαχωριστούν τα πιθανά διμερή που σχηματίζουν οι εκκινητές ή άλλα μη εξειδικευμένα προϊόντα.

Για την ανάλυση των αποτελεσμάτων υπολογίστηκε η τιμή του μέσου όρου του οριακού κύκλου (threshold cycle, Ct) για κάθε υπό εξέταση γονίδιο με βάση δύο ανεξάρτητα βιολογικά δείγματα. Η μέση τιμή Ct των υπό εξέταση γονιδίων (χιτινάση, PR-1 γονίδιο, PR-2 γονίδιο) αφαιρέθηκε από τη μέση τιμή Ct του γονιδίου αναφοράς (GAPDH) και στη συνέχεια εφαρμόστηκε ο μαθηματικός τύπος:  $x = 2^{-\Delta Ct}$ , όπου  $\Delta Ct = Ct$  (χιτινάση, PR-1 γονίδιο, PR-2 γονίδιο) – Ct (GAPDH).

### 3. ΑΠΟΤΕΛΕΣΜΑΤΑ

#### 3.1 Αξιολόγηση δοκιμών παθογένειας

##### *3.1.1 Παράγοντας A*

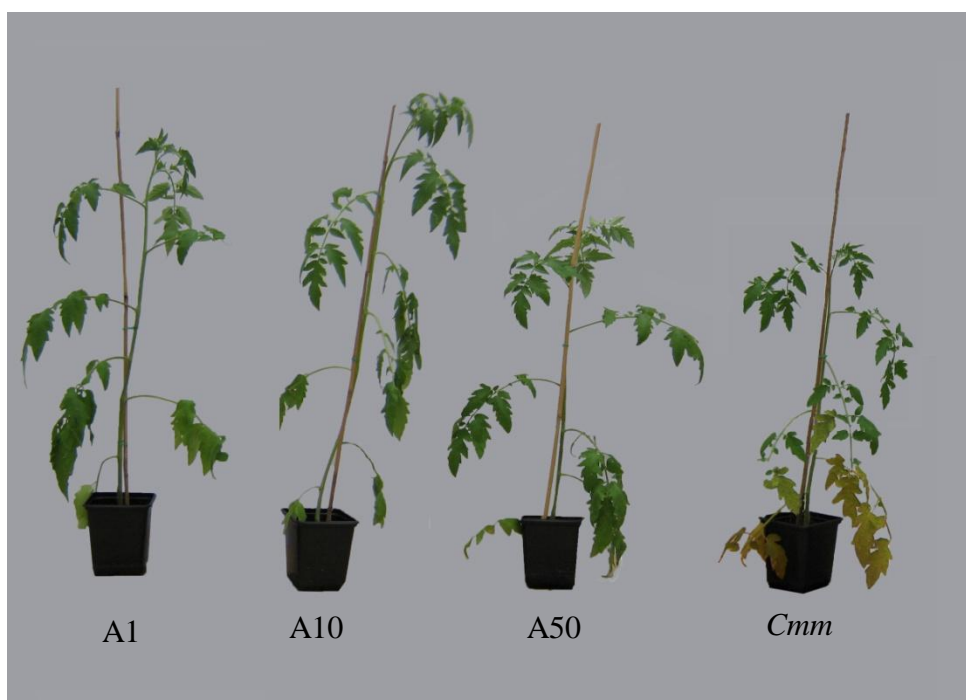
Κατά την αξιολόγηση του επιφανειοδραστικού παράγοντα A ως προς την ικανότητά του να επάγει μηχανισμούς ανθεκτικότητας κατά του βακτηριακού έλκους της τομάτας, έγιναν πειράματα παθογένειας με το παθογόνο *Clavibacter michiganensis* subsp. *michiganensis* σε φυτά τομάτας. Για το σκοπό αυτό έγινε διέγερση των φυτών με τον παράγοντα A και ακολούθησε η μόλυνση με το *Cmm* όπως αυτά περιγράφονται στο κεφάλαιο 2.1. Η μελέτη των δοκιμών παθογένειας περιλαμβάνει δύο ανεξάρτητα περάματα, στα οποία το πρώτο περιλαμβάνει δύο επαναλήψεις για κάθε επέμβαση, ενώ το δεύτερο τρεις επαναλήψεις. Παρακάτω παρουσιάζονται τα αποτελέσματα των δύο ανεξάρτητων πειραματικών διαδικασιών.

Κατά την πρώτη σειρά πειραμάτων, τα πρώτα συμπτώματα της ασθένειας εμφανίζονται στους μάρτυρες με τη μορφή της μαρανσης και χλώρωσης στα κατώτερα φύλλα, 15 ημέρες (Days Post Inoculation, DPI) μετά από τη μόλυνση των φυτών με το *Cmm* (Εικόνα 3.1). Η εξέλιξη των συμπτωμάτων έχει καταγραφεί μέχρι τις 45 ημέρες μετά την εφαρμογή του βακτηρίου, οπότε και σταμάτησε καθώς ο μάρτυρας είχε φτάσει σε ποσοστό μόλυνσης 100%.

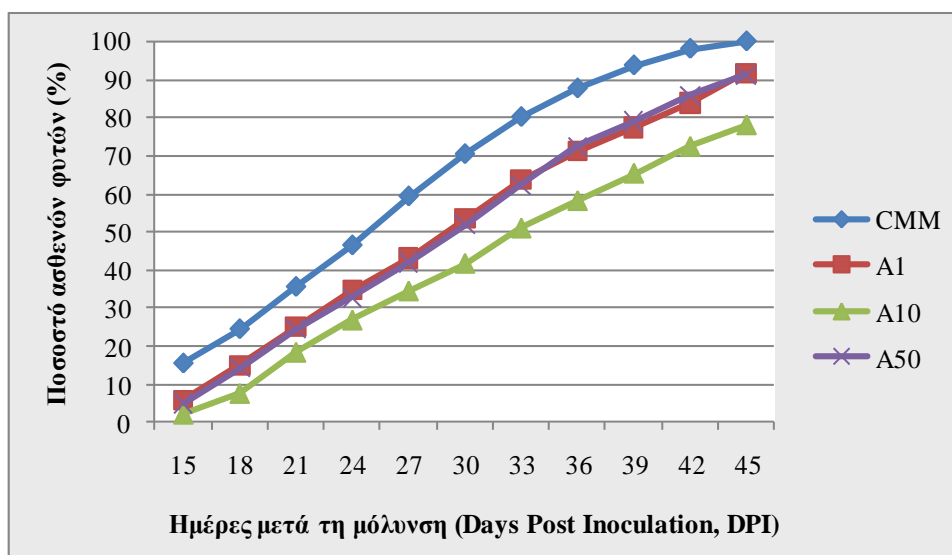
Τα συμπτώματα της ασθένειας εξελίχθηκαν σε όλες τις επεμβάσεις. Οπτικά παρατηρήθηκε διαφοροποίηση στις επεμβάσεις που είχαν χειριστεί με τον παράγοντα A πριν τη μόλυνση, καθώς σε αυτές τα φυτά εκδήλωσαν ηπιότερα συμπτώματα και πιο αργή εξέλιξη της ασθένειας. Συγκεκριμένα, στις 45 ημέρες μετά τη μόλυνση με το παθογόνο, ενώ το ποσοστό της ασθένειας για το μάρτυρα (ποσοστό ασθενών φυλλαρίων σε σχέση με το συνολικό αριθμό των φύλλων) είναι 100%, στην επέμβαση A1 είναι 91,9%, στην επέμβαση A10 είναι 78,1% και στην επέμβαση A50 είναι 91,35% (Διάγραμμα 3.1). Κατά το τέλος λοιπόν των μετρήσεων, η επέμβαση A10 εμφανίζει τη μεγαλύτερη μείωση που φτάνει το 21,9% σε σχέση με το μάρτυρα, ενώ αν λάβουμε υπ' όψη όλη την πορεία της ασθένειας, τότε η μεγαλύτερη μείωση της ασθένειας παρατηρείται στις 36 DPI με ποσοστό 29,45% σε σχέση με το μάρτυρα (Διάγραμμα 3.2).

Χρησιμοποιώντας τις μετρήσεις καταγραφής συμπτωμάτων, η πρόοδος της ασθένειας εκφράστηκε με βάση τη συνολική της εξέλιξη σε όλο το χρονικό διάστημα της καταγραφής της, η οποία αποδίδεται με το δείκτη AUDPC. Ο δείκτης της σχετικής AUDPC, ο οποίος εκφράζεται ως ποσοστό της μέγιστης τιμής AUDPC για

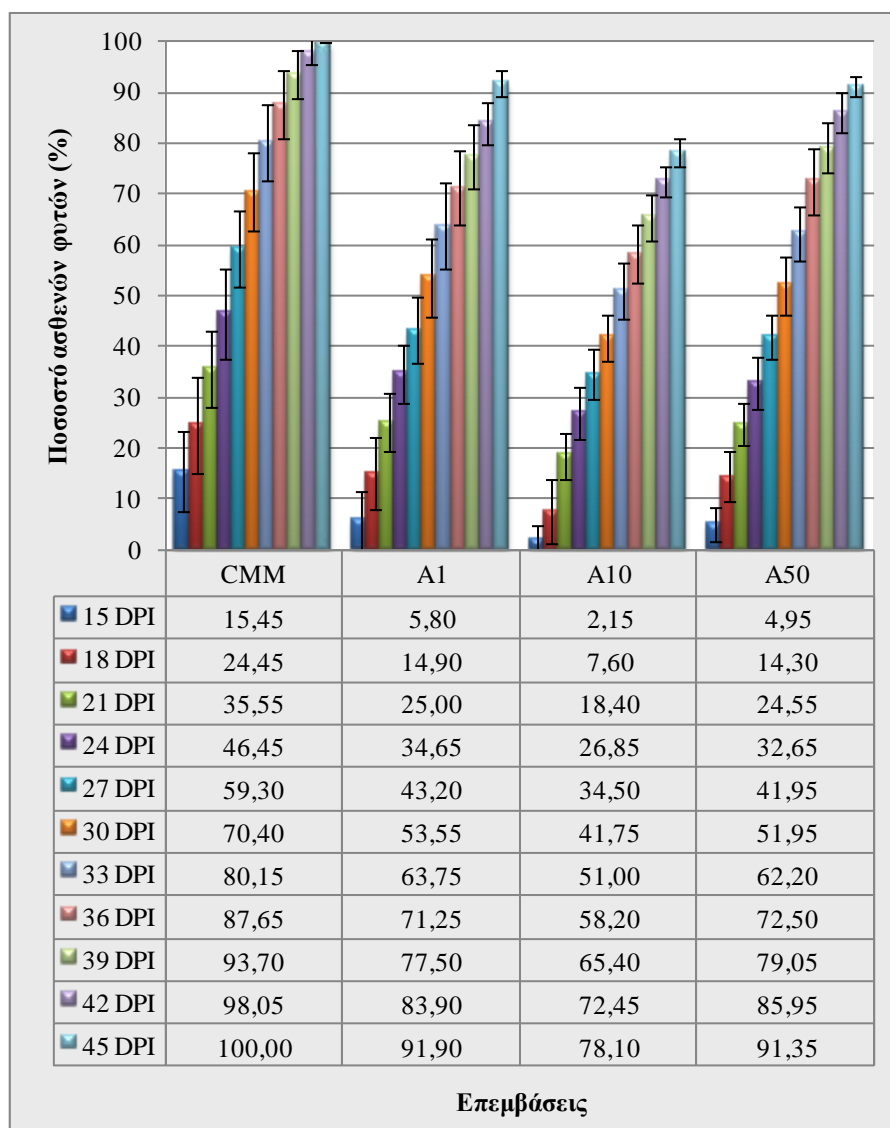
όλη την διάρκεια του πειράματος, που αντιστοιχεί στο 100 % της προσβολής δίδεται στο διάγραμμα 3.3. Από τη στατιστική ανάλυση της σχετικής AUDPC βλέπουμε ότι όλες οι επεμβάσεις διαφέρουν στατιστικά σημαντικά (σε επίπεδο σημαντικότητας 95%) σε σχέση με το μάρτυρα. Η ανάλυση μεταξύ των επεμβάσεων μας δείχνει ότι οι επεμβάσεις A1 και A50 δεν διαφέρουν σημαντικά, αλλά η επέμβαση A10 διαφέρει στατιστικά σημαντικά από τις άλλες δύο, ενώ σε σχέση με το μάρτυρα εμφανίζεται μειωμένη κατά 39%.



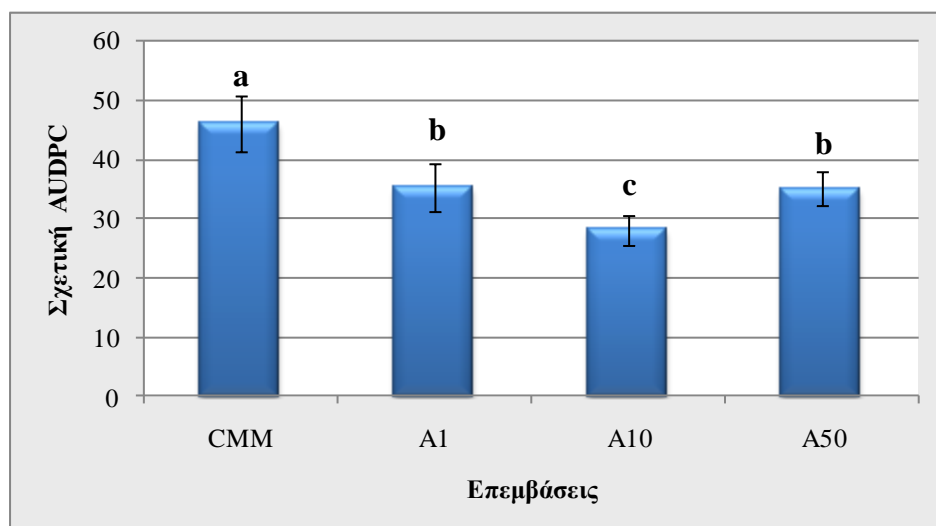
Εικόνα 3.1: Επίδραση του παράγοντα A στην εκδήλωση συμπτωμάτων από το παθογόνο *Clavibacter michiganensis* subsp. *michiganensis* σε φυτά τομάτας. A1: εφαρμογή παράγοντα A συγκέντρωσης 1mM πριν τη μόλυνση, A10: εφαρμογή παράγοντα A συγκέντρωσης 10 mM πριν τη μόλυνση, A50: εφαρμογή παράγοντα A συγκέντρωσης 50 mM πριν τη μόλυνση Cmm: Μάρτυρας (μόλυνση με Cmm).



Διάγραμμα 3.1: Επίδραση του παράγοντα A στο ποσοστό ασθενών φυτών τομάτας μετά τη μόλυνση με το βακτήριο *Clavibacter michiganensis* subsp. *michiganensis* κατά την πρώτη σειρά πειραμάτων. Η ένταση της ασθένειας υπολογίστηκε για κάθε χρονική στιγμή καταγραφής των συμπτωμάτων ως το ποσοστό (%) του αριθμού των ασθενών φύλλων σε σχέση με τον συνολικό αριθμό των φύλλων για κάθε φυτό. Για την κάθε επέμβαση χρησιμοποιήθηκαν 20 φυτά και τα πειράματα περιελάμβαναν δύο επαναλήψεις. Στο ιστόγραμμα αντιπροσωπεύονται οι μέσοι όροι 40 φυτών συναρτήσει του χρόνου καταγραφής συμπτωμάτων. CMM: Μάρτυρας (μόλυνση με *Cmm*), A1: εφαρμογή παράγοντα A συγκέντρωσης 1mM πριν τη μόλυνση, A10: εφαρμογή παράγοντα A συγκέντρωσης 10 mM πριν τη μόλυνση, A50: εφαρμογή παράγοντα A συγκέντρωσης 50 mM πριν τη μόλυνση.



Διάγραμμα 3.2: Επίδραση του παράγοντα A στο ποσοστό ασθενών φυτών τομάτας μετά τη μόλυνση με το βακτήριο *Clavibacter michiganensis* subsp. *michiganensis* κατά την πρώτη σειρά πειραμάτων. Η ένταση της ασθένειας υπολογίστηκε για κάθε χρονική στιγμή καταγραφής των συμπτωμάτων ως το ποσοστό (%) του αριθμού των ασθενών φύλλων σε σχέση με τον συνολικό αριθμό των φύλλων για κάθε φυτό. Για την κάθε επέμβαση χρησιμοποιήθηκαν 20 φυτά και τα πειράματα περιελάμβαναν δύο επαναλήψεις. Στο ραβδόγραμμα οι στήλες αντιπροσωπεύουν τους μέσους όρους 40 φυτών συναρτήσει των επεμβάσεων του πειράματος και οι κάθετες ράβδοι αντιπροσωπεύουν την απόκλιση από το μέσο όρο με βάση το τυπικό σφάλμα. CMM: Μάρτυρας (μόλυνση με *Cmm*), A1: εφαρμογή παράγοντα A συγκέντρωσης 1mM πριν τη μόλυνση, A10: εφαρμογή παράγοντα A συγκέντρωσης 10 mM πριν τη μόλυνση, A50: εφαρμογή παράγοντα A συγκέντρωσης 50 mM πριν τη μόλυνση, DPI: ημέρες μετά τη μόλυνση.



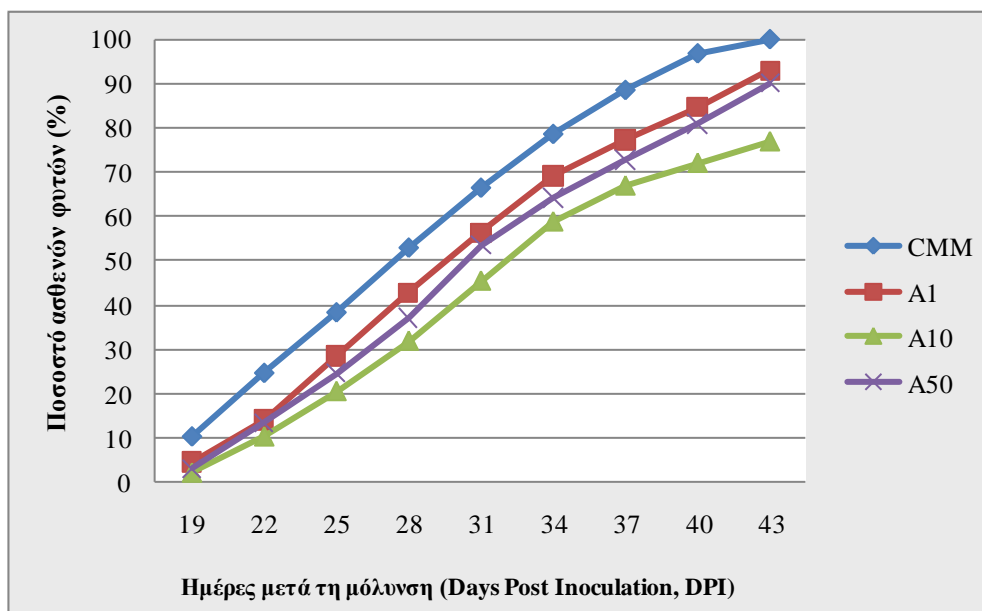
Διάγραμμα 3.3: Ραβδόγραμμα απεικόνισης σχετικής AUDPC ως ποσοστό του μέγιστου εμβαδού κάτω από τη καμπύλη εξέλιξης της ασθένειας (AUDPC) για όλη τη διάρκεια της πρώτης σειράς πειραμάτων μελέτης του παράγοντα A. Ο υπολογισμός της σχετικής AUDPC προέκυψε με τη μέθοδο της τραπεζοειδούς ολοκλήρωσης της καμπύλης εξέλιξης της ασθένειας σε σχέση με το χρόνο. Στο ραβδόγραμμα οι στήλες αντιπροσωπεύουν τους μέσους όρους 40 φυτών και οι κάθετες ράβδοι αντιπροσωπεύουν την απόκλιση από το μέσο όρο με βάση το τυπικό σφάλμα. Οι στήλες που συνοδεύονται από διαφορετικά γράμματα διαφέρουν στατιστικά σημαντικά σε επίπεδο σημαντικότητας ( $P \leq 0,05$ ). Οι μέσοι όροι διαχωρίστηκαν σύμφωνα με τη μέθοδο πολλαπλών δοκιμών LSD. CMM: Μάρτυρας (μόλυνση με *Cmm*), A1: εφαρμογή παράγοντα A συγκέντρωσης 1mM πριν τη μόλυνση, A10: εφαρμογή παράγοντα A συγκέντρωσης 10 mM πριν τη μόλυνση, A50: εφαρμογή παράγοντα A συγκέντρωσης 50 mM πριν τη μόλυνση.

Κατά τη δεύτερη σειρά πειραμάτων, τα συμπτώματα της ασθένειας εμφανίζονται πρώτα στους μάρτυρες με τη μορφή της μαρανσης στα κατώτερα φύλλα, 19 ημέρες μετά τη μόλυνση των φυτών με το *Cmm*. Η εξέλιξη των συμπτωμάτων έχει καταγραφεί μέχρι τις 43 ημέρες μετά τη μόλυνση με το βακτήριο, χρονικό σημείο κατά το οποίο ο μάρτυρας είχε φτάσει σε ποσοστό μόλυνσης 100%.

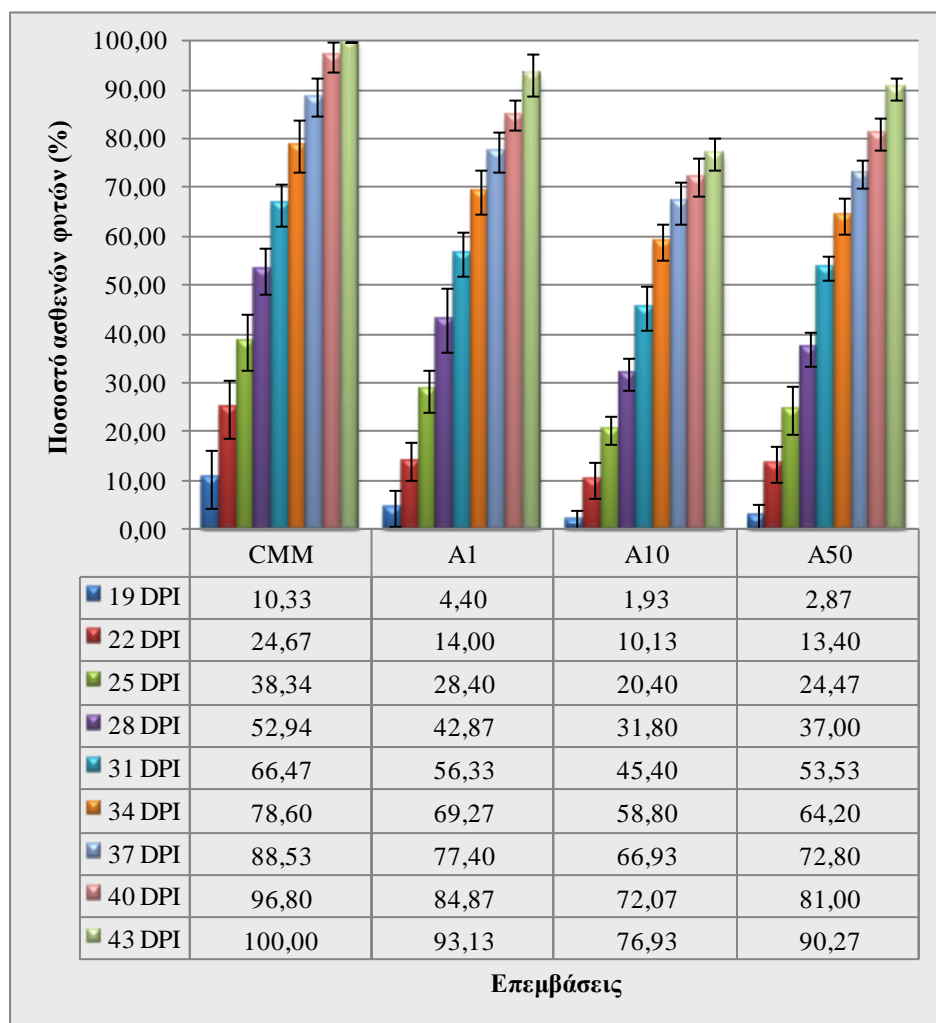
Τα συμπτώματα της ασθένειας εξελίχθηκαν σε όλες τις επεμβάσεις, ενώ σε αυτές που είχε εφαρμοστεί ο παράγοντας A πριν τη μόλυνση, εκδήλωσαν πιο αργή εξέλιξη της ασθένειας. Στις 43 ημέρες μετά την εφαρμογή του παθογόνου, το ποσοστό της ασθένειας για το μάρτυρα είναι 100%, ενώ στην επέμβαση A1 είναι 93,13%, στην επέμβαση A10 είναι 76,93% και στην επέμβαση A50 είναι 90,67% (Διάγραμμα 3.4). Αναφέρεται ότι ενώ στο πρώτο πείραμα η ασθένεια έφτασε στο 100% του μάρτυρα στις 45 ημέρες από τη μόλυνση, εδώ φτάνει στις 43 DPI (Διάγραμμα 3.5).

Από τη στατιστική ανάλυση της σχετικής AUDPC (Σχήμα 3.6) καταδεικνύεται ότι όλες οι επεμβάσεις διαφέρουν στατιστικά σημαντικά (σε επίπεδο σημαντικότητας 95%) σε σχέση με το μάρτυρα. Η ανάλυση μεταξύ των επεμβάσεων δείχνει ότι οι επεμβάσεις A1 και A50 δεν διαφέρουν μεταξύ τους, όμως η επέμβαση A10 διαφέρει

στατιστικά σημαντικά από τις άλλες δύο, καθώς επίσης και σε σχέση με το μάρτυρα όπου εμφανίζεται μειωμένη κατά 34%.

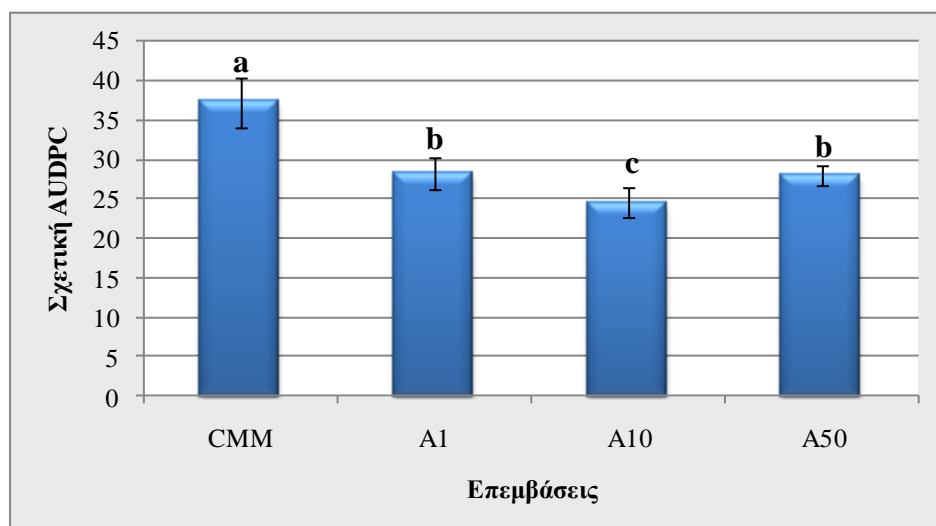


Διάγραμμα 3.4: Επίδραση του παράγοντα A στο ποσοστό ασθενών φυτών τομάτας μετά τη μόλυνση με το βακτήριο *Clavibacter michiganensis* subsp. *michiganensis* κατά τη δεύτερη σειρά πειραμάτων. Η ένταση της ασθένειας υπολογίστηκε για κάθε χρονική στιγμή καταγραφής των συμπτωμάτων ως το ποσοστό (%) του αριθμού των ασθενών φύλλων σε σχέση με τον συνολικό αριθμό των φύλλων για κάθε φυτό. Για την κάθε επέμβαση χρησιμοποιήθηκαν 15 φυτά και τα πειράματα περιελάμβαναν τρεις επαναλήψεις. Στο ιστόγραμμα αντιπροσωπεύονται οι μέσοι όροι 45 φυτών συναρτήσει του χρόνου καταγραφής συμπτωμάτων. CMM: Μάρτυρας (μόλυνση με *Cmm*), A1: εφαρμογή παράγοντα A συγκέντρωσης 1mM πριν τη μόλυνση, A10: εφαρμογή παράγοντα A συγκέντρωσης 10 mM πριν τη μόλυνση, A50: εφαρμογή παράγοντα A συγκέντρωσης 50 mM πριν τη μόλυνση.



Διάγραμμα 3.5: Επίδραση του παράγοντα A στο ποσοστό ασθενών φυτών τομάτας μετά τη μόλυνση με το βακτήριο *Clavibacter michiganensis* subsp. *michiganensis* κατά τη δεύτερη σειρά πειραμάτων. Η ένταση της ασθένειας υπολογίστηκε για κάθε χρονική στιγμή καταγραφής των συμπτωμάτων ως το ποσοστό (%) του αριθμού των ασθενών φύλλων σε σχέση με τον συνολικό αριθμό των φύλλων για κάθε φυτό. Για την κάθε επέμβαση χρησιμοποιήθηκαν 15 φυτά και τα πειράματα περιελάμβαναν τρεις επαναλήψεις. Στο ραβδόγραμμα οι στήλες αντιπροσωπεύουν τους μέσους όρους 45 φυτών συναρτήσει των επεμβάσεων του πειράματος και οι κάθετες ράβδοι αντιπροσωπεύουν την απόκλιση από το μέσο όρο με βάση το τυπικό σφάλμα. CMM: Μάρτυρας (μόλυνση με *Cmm*), A1: εφαρμογή παράγοντα A συγκέντρωσης 1mM πριν τη μόλυνση, A10: εφαρμογή παράγοντα A συγκέντρωσης 10 mM πριν τη μόλυνση, A50: εφαρμογή παράγοντα A συγκέντρωσης 50 mM πριν τη μόλυνση, DPI: ημέρες μετά τη μόλυνση.





Διάγραμμα 3.6: Ραβδόγραμμα απεικόνισης σχετικής AUDPC ως ποσοστό του μέγιστου εμβαδού κάτω από τη καμπύλη εξέλιξης της ασθένειας (AUDPC) για όλη τη διάρκεια της δεύτερης σειράς πειραμάτων μελέτης του παράγοντα A. Ο υπολογισμός της σχετικής AUDPC προέκυψε με τη μέθοδο της τραπεζοειδούς ολοκλήρωσης της καμπύλης εξέλιξης της ασθένειας σε σχέση με το χρόνο. Στο ραβδόγραμμα οι στήλες αντιπροσωπεύουν τους μέσους όρους 45 φυτών και οι κάθετες ράβδοι αντιπροσωπεύουν την απόκλιση από το μέσο όρο με βάση το τυπικό σφάλμα. Οι στήλες που συνοδεύονται από διαφορετικά γράμματα διαφέρουν στατιστικά σημαντικά σε επίπεδο σημαντικότητας ( $P \leq 0,05$ ). Οι μέσοι όροι διαχωρίστηκαν σύμφωνα με τη μέθοδο πολλαπλών δοκιμών LSD. CMM: Μάρτυρας (μόλυνση με *Cmm*), A1: εφαρμογή παράγοντα A συγκέντρωσης 1mM πριν τη μόλυνση, A10: εφαρμογή παράγοντα A συγκέντρωσης 10 mM πριν τη μόλυνση, A50: εφαρμογή παράγοντα A συγκέντρωσης 50 mM πριν τη μόλυνση.

### 3.1.2 Παράγοντας B

Με σκοπό να αξιολογηθεί ο επιφανειοδραστικός παράγοντας B ως προς την ικανότητά του να επάγει μηχανισμούς ανθεκτικότητας κατά του βακτηριακού έλκους της τομάτας, έγιναν πειράματα παθογένειας με το παθογόνο *Clavibacter michiganensis* subsp. *michiganensis* σε φυτά τομάτας. Κατά την αξιολόγηση έγινε διέγερση των φυτών με τον παράγοντα B και ακολούθησε η μόλυνση με το *Cmm* όπως αυτά περιγράφονται στο κεφάλαιο 2.1. Η μελέτη των δοκιμών παθογένειας περιλαμβάνει δύο ανεξάρτητα περάματα, σε καθένα από τα οποία γίνονται τρεις επαναλήψεις για κάθε επέμβαση. Παρακάτω παρουσιάζονται τα αποτελέσματα των δύο ανεξάρτητων πειραματικών διαδικασιών.

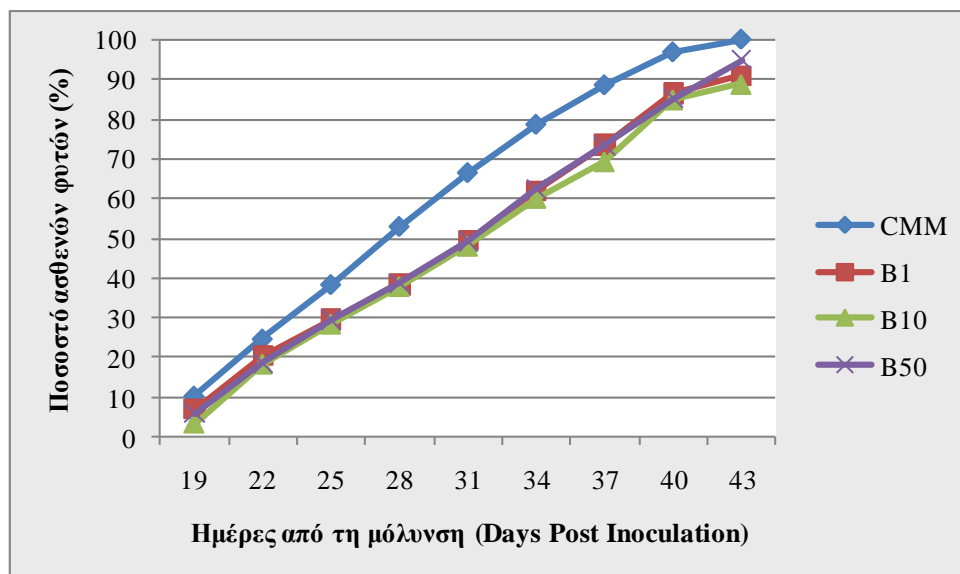
Κατά την πρώτη σειρά πειραμάτων, οι μάρτυρες εμφανίζουν τα πρώτα συμπτώματα της ασθένειας υπό τη μορφή μαράνσεων στα κατώτερα φύλλα, 19 ημέρες μετά τη μόλυνση των φυτών με το *Cmm* (Εικόνα 3.2). Η εξέλιξη των συμπτωμάτων έχει καταγραφεί μέχρι τις 43 ημέρες μετά τη μόλυνση με το βακτήριο, χρονικό σημείο κατά το οποίο ο μάρτυρας είχε φτάσει σε ποσοστό μόλυνσης 100%.

Τα συμπτώματα της ασθένειας εξελίχθηκαν σε όλες τις επεμβάσεις, ενώ οι επεμβάσεις με τον παράγοντα B πριν τη μόλυνση παρουσίασαν πιο όψιμη εκδήλωση συμπτωμάτων της ασθένειας. Στις 43 ημέρες μετά την εφαρμογή του παθογόνου, ενώ το ποσοστό της ασθένειας για το μάρτυρα είναι 100%, στην επέμβαση B1 είναι 91,9%, στην επέμβαση B10 είναι 89,07% και στην επέμβαση B50 είναι 95,07% (Διάγραμμα 3.7 και 3.8). Επομένως, η επέμβαση που εμφανίζει τη μεγαλύτερη μείωση είναι η B10 με τιμή μείωσης 10.93% σε σύγκριση με το μάρτυρα.

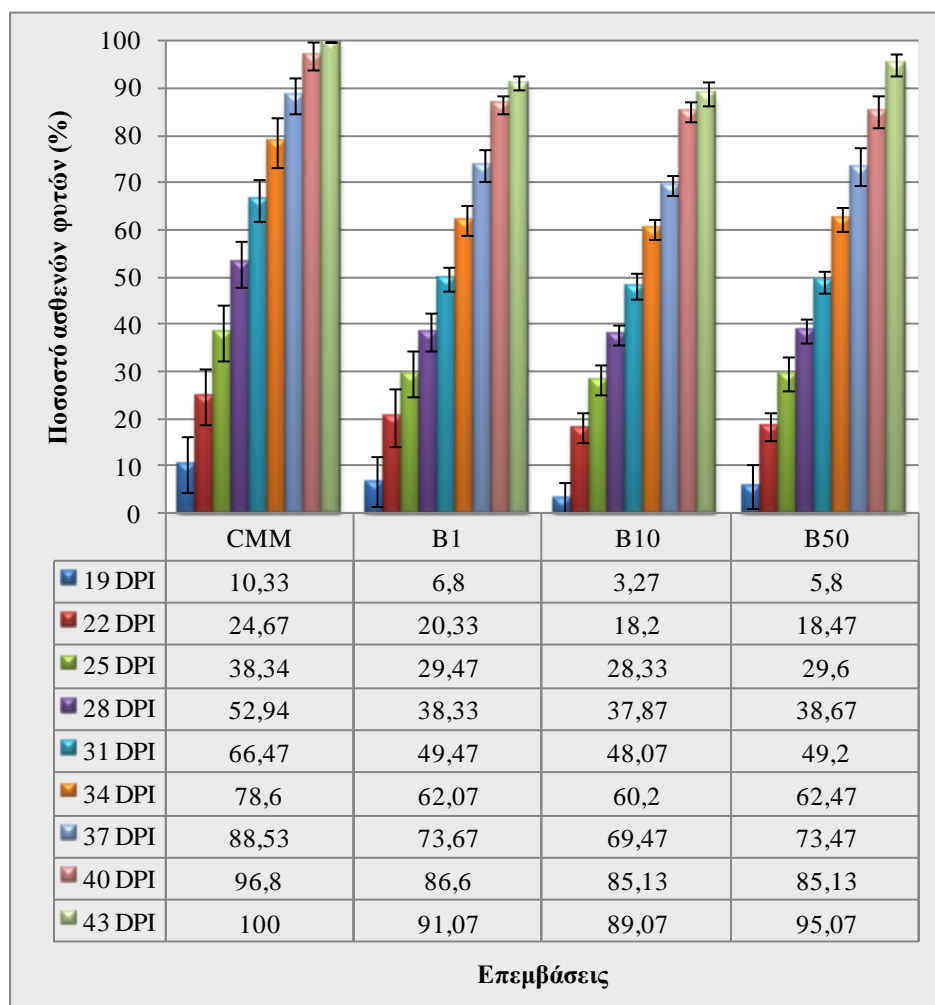
Υπολογίζοντας το δείκτη AUDPC και της σχετικής AUDPC ο οποίος εκφράζεται ως ποσοστό της μέγιστης τιμής AUDPC για όλη την διάρκεια του πειράματος, που αντιστοιχεί στο 100 % της προσβολής λαμβάνεται το διάγραμμα 3.9. Από τη στατιστική ανάλυση της σχετικής AUDPC βλέπουμε ότι όλες οι επεμβάσεις διαφέρουν στατιστικά σημαντικά (σε επίπεδο σημαντικότητας 95%) σε σχέση με το μάρτυρα. Η ανάλυση μεταξύ των επεμβάσεων μας δείχνει ότι η επέμβαση B1 δε διαφέρει από τη B50 αλλά διαφέρει από τη B10. Επιπλέον, η επέμβαση B10 δε διαφέρει από τη B50, υπερέρχει όμως από τις δύο στην ικανότητα μείωσης των συμπτωμάτων κατά 24,4% σε σχέση με το μάρτυρα.



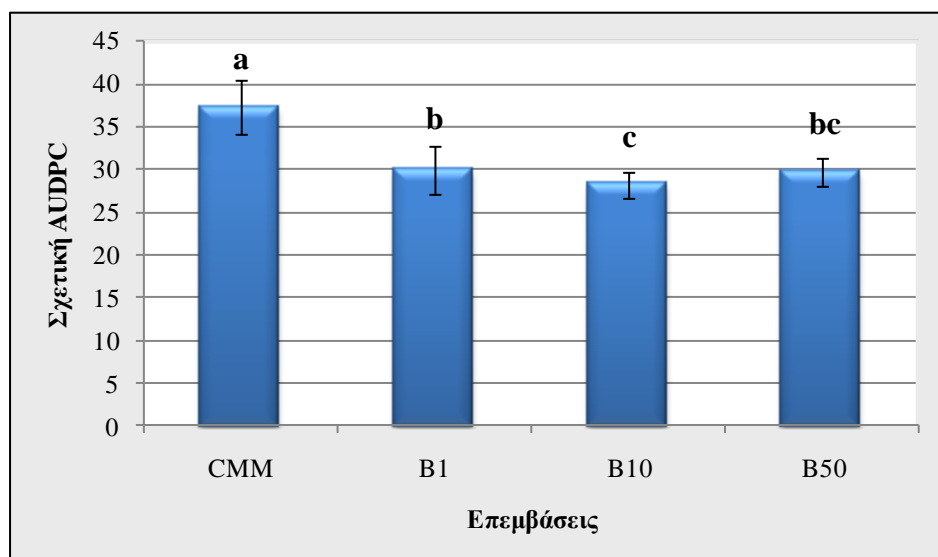
Εικόνα 3.2: Επίδραση του παράγοντα B στην εκδήλωση συμπτωμάτων από το παθογόνο *Clavibacter michiganensis* subsp. *michiganensis* σε φυτά τομάτας. B1: εφαρμογή παράγοντα B συγκέντρωσης 1mM πριν τη μόλυνση, B10: εφαρμογή παράγοντα B συγκέντρωσης 10 mM πριν τη μόλυνση, B50: εφαρμογή παράγοντα B συγκέντρωσης 50 mM πριν τη μόλυνση Cmm: Μάρτυρας (μόλυνση με Cmm).



Διάγραμμα 3.7: Επίδραση του παράγοντα Β στο ποσοστό ασθενών φυτών τομάτας μετά τη μόλυνση με το βακτήριο *Clavibacter michiganensis* subsp. *michiganensis* κατά την πρώτη σειρά πειραμάτων. Η ένταση της ασθένειας υπολογίστηκε για κάθε χρονική στιγμή καταγραφής των συμπτωμάτων ως το ποσοστό (%) του αριθμού των ασθενών φύλλων σε σχέση με τον συνολικό αριθμό των φύλλων για κάθε φυτό. Για την κάθε επέμβαση χρησιμοποιήθηκαν 15 φυτά και τα πειράματα περιελάμβαναν τρεις επαναλήψεις. Στο ιστόγραμμα αντιπροσωπεύονται οι μέσοι όροι 45 φυτών συναρτήσει του χρόνου καταγραφής συμπτωμάτων. CMM: Μάρτυρας (μόλυνση με *Cmm*), B1: εφαρμογή παράγοντα Β συγκέντρωσης 1mM πριν τη μόλυνση, B10: εφαρμογή παράγοντα Β συγκέντρωσης 10 mM πριν τη μόλυνση, B50: εφαρμογή παράγοντα Β συγκέντρωσης 50 mM πριν τη μόλυνση.



Διάγραμμα 3.8: Επίδραση του παράγοντα Β στο ποσοστό ασθενών φυτών τομάτας μετά τη μόλυνση με το βακτήριο *Clavibacter michiganensis* subsp. *michiganensis* κατά την πρώτη σειρά πειραμάτων. Η ένταση της ασθένειας υπολογίστηκε για κάθε χρονική στιγμή καταγραφής των συμπτωμάτων ως το ποσοστό (%) του αριθμού των ασθενών φύλλων σε σχέση με τον συνολικό αριθμό των φύλλων για κάθε φυτό. Για την κάθε επέμβαση χρησιμοποιήθηκαν 15 φυτά και τα πειράματα περιελάμβαναν τρεις επαναλήψεις. Στο ραβδόγραμμα οι στήλες αντιπροσωπεύουν τους μέσους όρους 45 φυτών συναρτήσει των επεμβάσεων του πειράματος και οι κάθετες ράβδοι αντιπροσωπεύουν την απόκλιση από το μέσο όρο με βάση το τυπικό σφάλμα. CMM: Μάρτυρας (μόλυνση με *Cmm*), B1: εφαρμογή παράγοντα Β συγκέντρωσης 1mM πριν τη μόλυνση, B10: εφαρμογή παράγοντα Β συγκέντρωσης 10 mM πριν τη μόλυνση, B50: εφαρμογή παράγοντα Β συγκέντρωσης 50 mM πριν τη μόλυνση, DPI: ημέρες μετά τη μόλυνση.



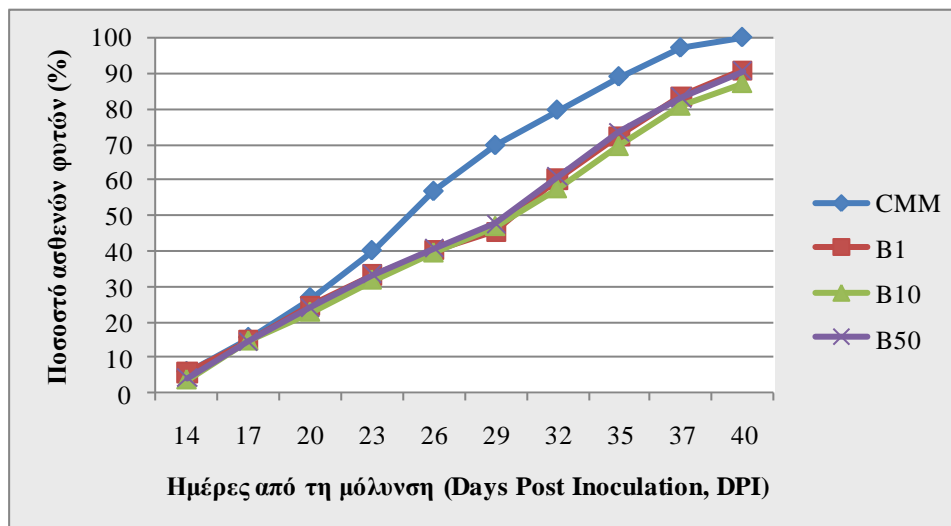
Διάγραμμα 3.9: Ραβδόγραμμα απεικόνισης σχετικής AUDPC ως ποσοστό του μέγιστου εμβαδού κάτω από τη καμπύλη εξέλιξης της ασθένειας (AUDPC) για όλη τη διάρκεια της πρώτης σειράς πειραμάτων μελέτης του παράγοντα B. Ο υπολογισμός της σχετικής AUDPC προέκυψε με τη μέθοδο της τραπεζοειδούς ολοκλήρωσης της καμπύλης εξέλιξης της ασθένειας σε σχέση με το χρόνο. Στο ραβδόγραμμα οι στήλες αντιπροσωπεύουν τους μέσους όρους 45 φυτών και οι κάθετες ράβδοι αντιπροσωπεύουν την απόκλιση από το μέσο όρο με βάση το τυπικό σφάλμα. Οι στήλες που συνοδεύονται από διαφορετικά γράμματα διαφέρουν στατιστικά σημαντικά σε επίπεδο σημαντικότητας ( $P \leq 0,05$ ). Οι μέσοι όροι διαχωρίστηκαν σύμφωνα με τη μέθοδο πολλαπλών δοκιμών LSD. CMM: Μάρτυρας (μόλυνση με *Cmm*), B1: εφαρμογή παράγοντα B συγκέντρωσης 1mM πριν τη μόλυνση, B10: εφαρμογή παράγοντα B συγκέντρωσης 10 mM πριν τη μόλυνση, B50: εφαρμογή παράγοντα B συγκέντρωσης 50 mM πριν τη μόλυνση.

Κατά τη δεύτερη σειρά πειραμάτων για τον B παράγοντα, τα συμπτώματα της ασθένειας εμφανίζονται πρώτα στους μάρτυρες, 14 ημέρες μετά την εφαρμογή του *Cmm* στα φυτά. Η εξέλιξη των συμπτωμάτων έχει καταγραφεί μέχρι τις 40 ημέρες μετά τη μόλυνση με το βακτήριο, χρονικό σημείο κατά το οποίο ο μάρτυρας είχε φτάσει σε ποσοστό μόλυνσης 100%.

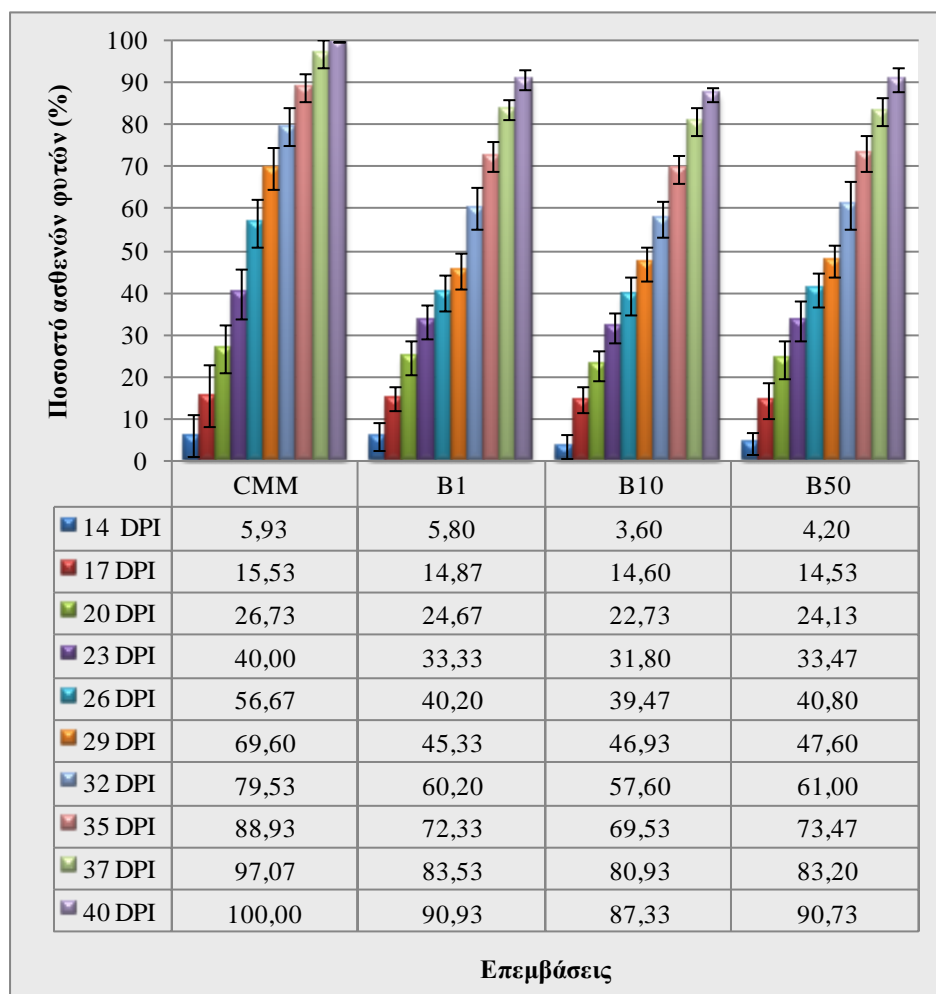
Τα συμπτώματα της ασθένειας εξελίχθηκαν σε όλες τις επεμβάσεις. Στις 40 ημέρες μετά τη μόλυνση με το παθογόνο, το ποσοστό της ασθένειας για το μάρτυρα είναι 100%, ενώ στην επέμβαση B1 είναι 90,93%, στην επέμβαση B10 είναι 87,33% και στην επέμβαση B50 είναι 90,73% (Διάγραμμα 3.10). Εκτιμώντας την εξέλιξη της ασθένειας σε όλο το χρόνο καταγραφής των συμπτωμάτων, βλέπουμε ότι η μείωση των συμπτωμάτων της ασθένειας έφτασε σε ποσοστό 22.67% στις 29 DPI (Διάγραμμα 3.11).

Από τη στατιστική ανάλυση της σχετικής AUDPC (Διάγραμμα 3.12) φαίνεται ότι όλες οι επεμβάσεις διαφέρουν στατιστικά σημαντικά (σε επίπεδο σημαντικότητας

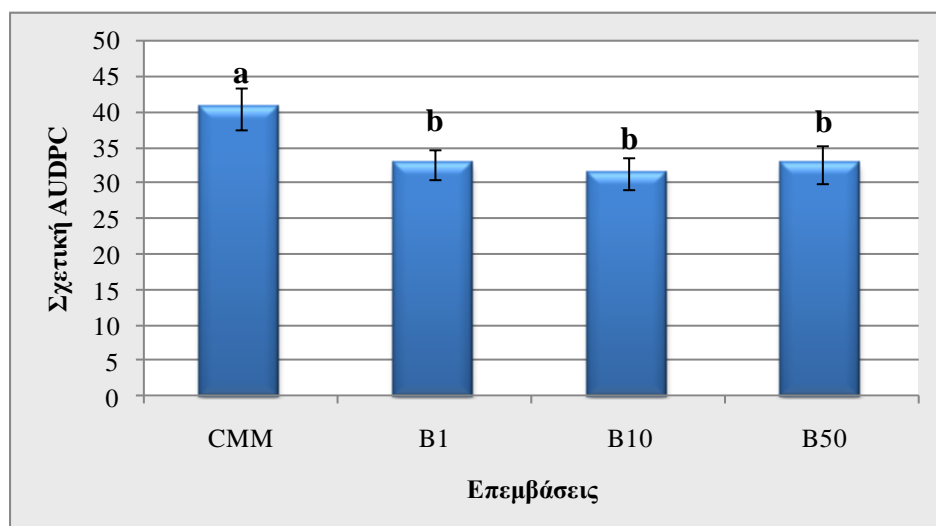
95%) σε σύγκριση με το μάρτυρα. Μεταξύ όμως των επεμβάσεων B1, B10 και B50 δεν υπάρχει στατιστικά σημαντική διαφορά.



Διάγραμμα 3.10: Επίδραση του παράγοντα B στο ποσοστό ασθενών φυτών τομάτας μετά τη μόλυνση με το βακτήριο *Clavibacter michiganensis* subsp. *michiganensis* κατά τη δεύτερη σειρά πειραμάτων. Η ένταση της ασθένειας υπολογίστηκε για κάθε χρονική στιγμή καταγραφής των συμπτωμάτων ως το ποσοστό (%) του αριθμού των ασθενών φύλλων σε σχέση με τον συνολικό αριθμό των φύλλων για κάθε φυτό. Για την κάθε επέμβαση χρησιμοποιήθηκαν 15 φυτά και τα πειράματα περιελάμβαναν τρεις επαναλήψεις. Στο ιστόγραμμα αντιπροσωπεύονται οι μέσοι όροι 45 φυτών συναρτήσει του χρόνου καταγραφής συμπτωμάτων. CMM: Μάρτυρας (μόλυνση με *Cmm*), B1: εφαρμογή παράγοντα B συγκέντρωσης 1mM πριν τη μόλυνση, B10: εφαρμογή παράγοντα B συγκέντρωσης 10 mM πριν τη μόλυνση, B50: εφαρμογή παράγοντα B συγκέντρωσης 50 mM πριν τη μόλυνση.



Διάγραμμα 3.11: Επίδραση του παράγοντα Β στο ποσοστό ασθενών φυτών τομάτας μετά τη μόλυνση με το βακτήριο *Clavibacter michiganensis* subsp. *michiganensis* κατά τη δεύτερη σειρά πειραμάτων. Η ένταση της ασθένειας υπολογίστηκε για κάθε χρονική στιγμή καταγραφής των συμπτωμάτων ως το ποσοστό (%) του αριθμού των ασθενών φύλλων σε σχέση με τον συνολικό αριθμό των φύλλων για κάθε φυτό. Για την κάθε επέμβαση χρησιμοποιήθηκαν 15 φυτά και τα πειράματα περιελάμβαναν τρεις επαναλήψεις. Στο ραβδόγραμμα οι στήλες αντιπροσωπεύουν τους μέσους όρους 45 φυτών συναρτήσει των επεμβάσεων του πειράματος και οι κάθετες ράβδοι αντιπροσωπεύουν την απόκλιση από το μέσο όρο με βάση το τυπικό σφάλμα. CMM: Μάρτυρας (μόλυνση με *Cmm*), B1: εφαρμογή παράγοντα Β συγκέντρωσης 1mM πριν τη μόλυνση, B10: εφαρμογή παράγοντα Β συγκέντρωσης 10 mM πριν τη μόλυνση, B50: εφαρμογή παράγοντα Β συγκέντρωσης 50 mM πριν τη μόλυνση, DPI: ημέρες μετά τη μόλυνση.



Διάγραμμα 3.12: Ραβδόγραμμα απεικόνισης σχετικής AUDPC ως ποσοστό του μέγιστου εμβαδού κάτω από τη καμπύλη εξέλιξης της ασθένειας (AUDPC) για όλη τη διάρκεια της δεύτερης σειράς πειραμάτων μελέτης του παράγοντα Β. Ο υπολογισμός της σχετικής AUDPC προέκυψε με τη μέθοδο της τραπεζοειδούς ολοκλήρωσης της καμπύλης εξέλιξης της ασθένειας σε σχέση με το χρόνο. Στο ραβδόγραμμα οι στήλες αντιπροσωπεύουν τους μέσους όρους 45 φυτών και οι κάθετες ράβδοι αντιπροσωπεύουν την απόκλιση από το μέσο όρο με βάση το τυπικό σφάλμα. Οι στήλες που συνοδεύονται από διαφορετικά γράμματα διαφέρουν στατιστικά σημαντικά σε επίπεδο σημαντικότητας ( $P \leq 0,05$ ). Οι μέσοι όροι διαχωρίστηκαν σύμφωνα με τη μέθοδο πολλαπλών δοκιμών LSD. CMM: Μάρτυρας (μόλυνση με *Cmm*), B1: εφαρμογή παράγοντα Β συγκέντρωσης 1mM πριν τη μόλυνση, B10: εφαρμογή παράγοντα Β συγκέντρωσης 10 mM πριν τη μόλυνση, B50: εφαρμογή παράγοντα Β συγκέντρωσης 50 mM πριν τη μόλυνση.

### 3.1.3 Παράγοντας C

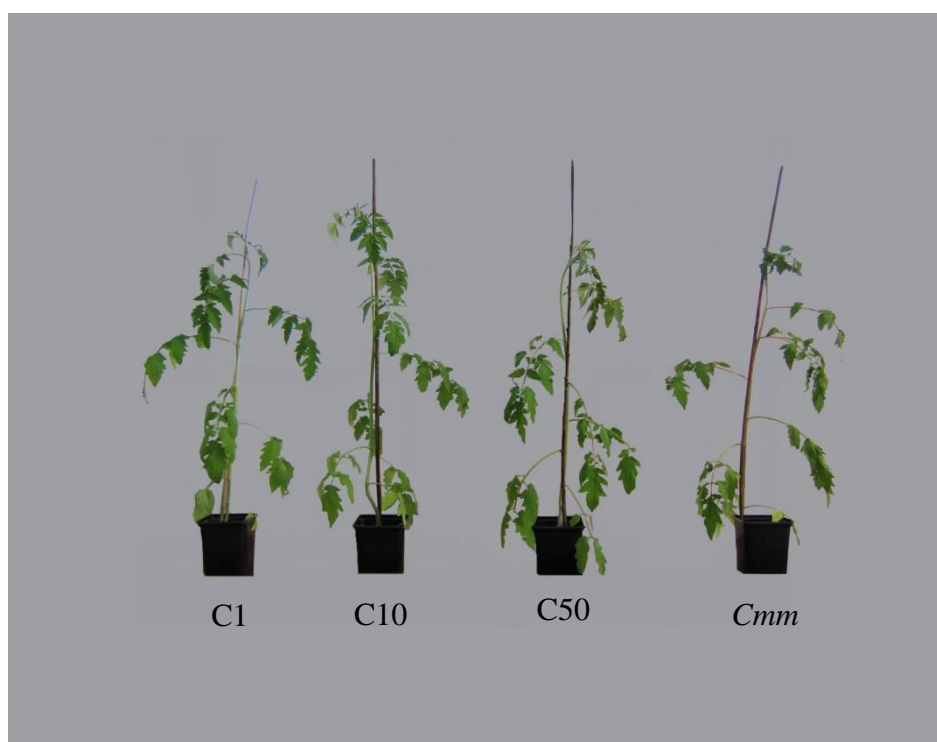
Κατά την αξιολόγηση του επιφανειοδραστικού παράγοντα C ως προς την ικανότητά του να επάγει μηχανισμούς ανθεκτικότητας κατά του βακτηριακού έλκους της τομάτας, έγιναν πειράματα παθογένειας με το παθογόνο *Clavibacter michiganensis* subsp. *michiganensis* σε φυτά τομάτας. Για το σκοπό αυτό έγινε διέγερση των φυτών με τον παράγοντα C και ακολούθησε η μόλυνση με το *Cmm* όπως αυτά περιγράφονται στο κεφάλαιο 2.1. Κατά τη διενέργεια των πειραμάτων παθογένειας, κάθε επέμβαση περιλαμβάνει τρεις επαναλήψεις από 15 φυτά η καθεμία.

Στις 18 ημέρες μετά την εφαρμογή του *Cmm* στα φυτά, εμφανίστηκαν στους μάρτυρες τα πρώτα συμπτώματα της ασθένειας με τη μορφή της μαρανσης στα κατώτερα φύλλα. Η εξέλιξη των συμπτωμάτων έχει καταγραφεί μέχρι τις 48 ημέρες μετά την εφαρμογή του βακτηρίου, οπότε και σταμάτησε καθώς ο μάρτυρας είχε φτάσει σε ποσοστό μόλυνσης 100% (Εικόνα 3.3). Κατά το χρονικό αυτό σημείο, ενώ το ποσοστό της ασθένειας για το μάρτυρα (ποσοστό ασθενών φύλλων σε σχέση με το συνολικό αριθμό των φύλλων) είναι 100%, στην επέμβαση C1 είναι 95.73%, στην

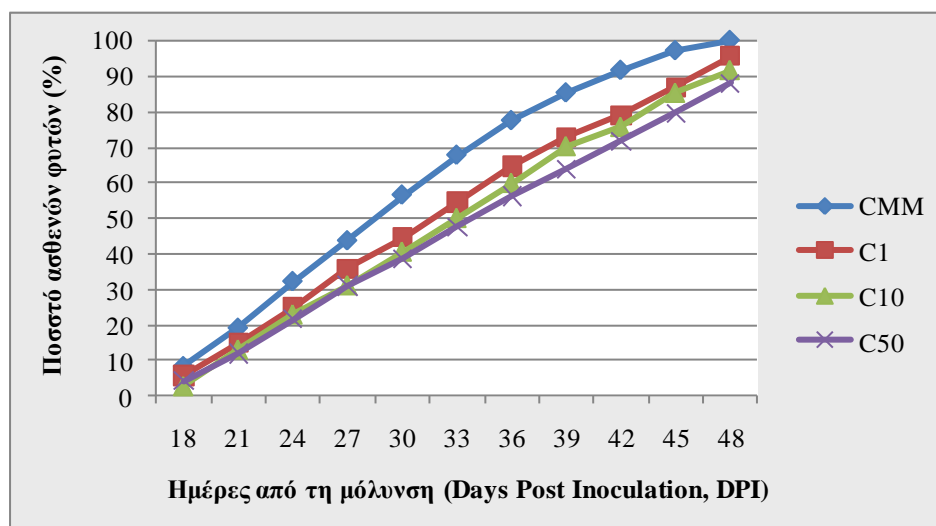


επέμβαση C10 είναι 91.67% και στην επέμβαση C50 είναι 88.2% (Διάγραμμα 3.13). Κατά το τέλος επομένως των μετρήσεων, η επέμβαση C50 παρουσιάζει τη μεγαλύτερη μείωση που φτάνει το 11,8% σε σχέση με το μάρτυρα, ενώ στο σύνολο της εξέλιξης της ασθένειας, η μεγαλύτερη μείωση των συμπτωμάτων παρατηρείται στις 39 DPI κατά 21,4% σε σχέση με το μάρτυρα, ποσοστό σχεδόν διπλάσιο από αυτό που καταγράφεται κατά το πέρας των μετρήσεων (Διάγραμμα 3.14).

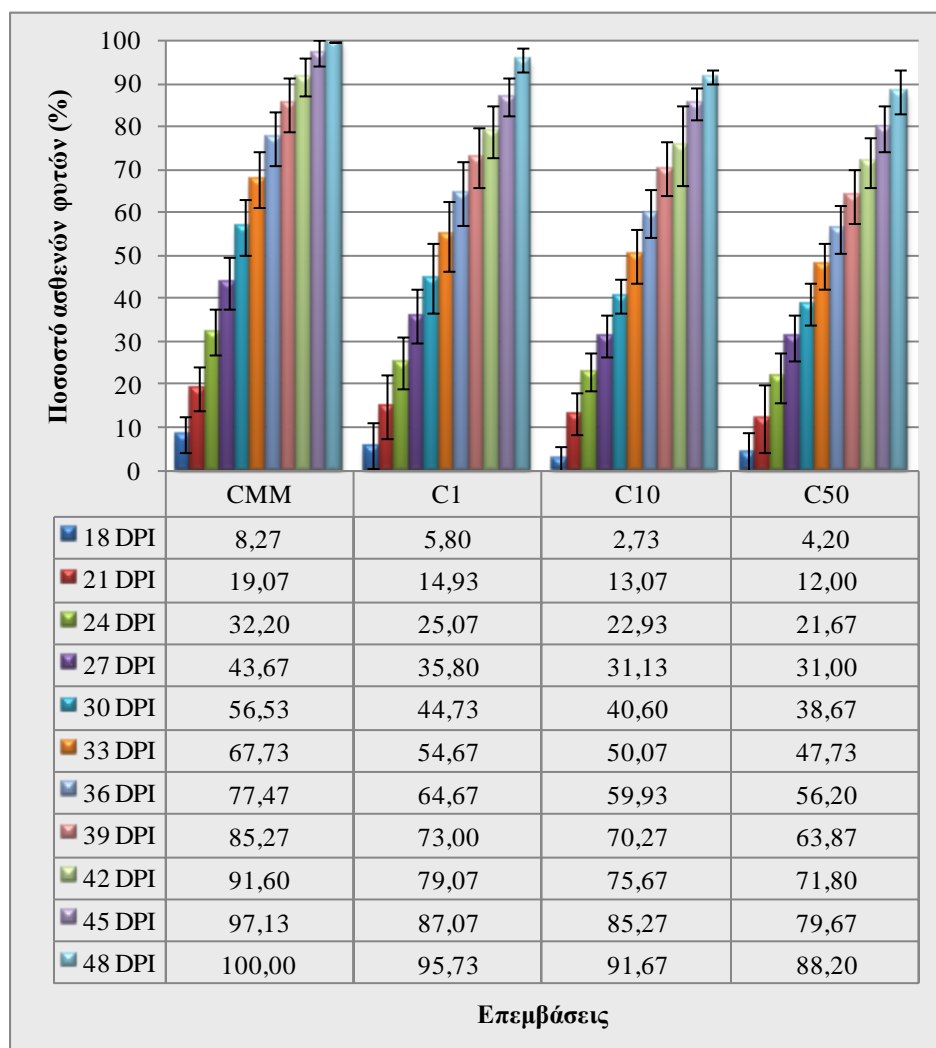
Από τη στατιστική ανάλυση της σχετικής AUDPC (Διάγραμμα 3.15) συμπεραίνεται ότι όλες οι επεμβάσεις διαφέρουν στατιστικά σημαντικά (σε επίπεδο σημαντικότητας 95%) σε σχέση με το μάρτυρα. Η επέμβαση C1, εκτός από το μάρτυρα, διαφέρει στατιστικά σημαντικά από τις επεμβάσεις C10 και C50. Επιπλέον οι C10 και C50 επεμβάσεις δεν εμφανίζουν στατιστικά σημαντική διαφορά μεταξύ τους. Στην επέμβαση C50 καταγράφεται η χαμηλότερη σχετική AUDPC, η οποία παρουσιάζεται μειωμένη κατά 25,9% σε σχέση με το μάρτυρα.



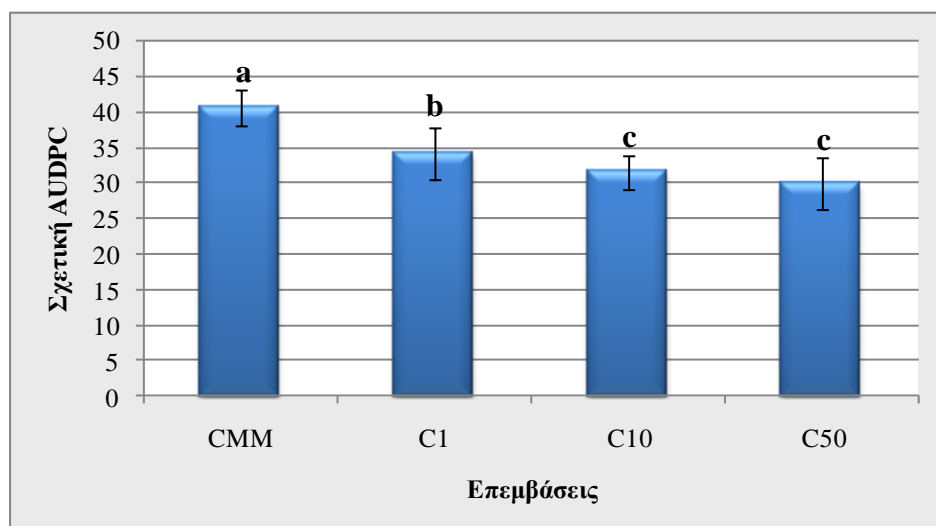
Εικόνα 3.3: Επίδραση του παράγοντα C στην εκδήλωση συμπτωμάτων από το παθογόνο *Clavibacter michiganensis* subsp. *michiganensis* σε φυτά τομάτας. C1: εφαρμογή παράγοντα C συγκέντρωσης 1mM πριν τη μόλυνση, C10: εφαρμογή παράγοντα C συγκέντρωσης 10 mM πριν τη μόλυνση, C50: εφαρμογή παράγοντα C συγκέντρωσης 50 mM πριν τη μόλυνση Cmm: Μάρτυρας (μόλυνση με Cmm).



Διάγραμμα 3.13: Επίδραση του παράγοντα C στο ποσοστό ασθενών φυτών τομάτας μετά τη μόλυνση με το βακτήριο *Clavibacter michiganensis* subsp. *michiganensis*. Η ένταση της ασθένειας υπολογίστηκε για κάθε χρονική στιγμή καταγραφής των συμπτωμάτων ως το ποσοστό (%) του αριθμού των ασθενών φύλλων σε σχέση με τον συνολικό αριθμό των φύλλων για κάθε φυτό. Για την κάθε επέμβαση χρησιμοποιήθηκαν 15 φυτά και τα πειράματα περιελάμβαναν τρεις επαναλήψεις. Στο ιστόγραμμα αντιπροσωπεύονται οι μέσοι όροι 45 φυτών συναρτήσει του χρόνου καταγραφής συμπτωμάτων. CMM: Μάρτυρας (μόλυνση με *Cmm*), C1: εφαρμογή παράγοντα C συγκέντρωσης 1mM πριν τη μόλυνση, C10: εφαρμογή παράγοντα C συγκέντρωσης 10 mM πριν τη μόλυνση, C50: εφαρμογή παράγοντα C συγκέντρωσης 50 mM πριν τη μόλυνση.



Διάγραμμα 3.14: Επίδραση του παράγοντα C στο ποσοστό ασθενών φυτών τομάτας μετά τη μόλυνση με το βακτήριο *Clavibacter michiganensis* subsp. *michiganensis*. Η ένταση της ασθένειας υπολογίστηκε για κάθε χρονική στιγμή καταγραφής των συμπτωμάτων ως το ποσοστό (%) του αριθμού των ασθενών φύλλων σε σχέση με τον συνολικό αριθμό των φύλλων για κάθε φυτό. Για την κάθε επέμβαση χρησιμοποιήθηκαν 15 φυτά και τα πειράματα περιελάμβαναν τρεις επαναλήψεις. Στο ραβδόγραμμα οι στήλες αντιπροσωπεύουν τους μέσους όρους 45 φυτών συναρτήσει των επεμβάσεων του πειράματος και οι κάθετες ράβδοι αντιπροσωπεύουν την απόκλιση από το μέσο όρο με βάση το τυπικό σφάλμα. CMM: Μάρτυρας (μόλυνση με *Cmm*), C1: εφαρμογή παράγοντα C συγκέντρωσης 1mM πριν τη μόλυνση, C10: εφαρμογή παράγοντα C συγκέντρωσης 10 mM πριν τη μόλυνση, C50: εφαρμογή παράγοντα C συγκέντρωσης 50 mM πριν τη μόλυνση, DPI: ημέρες μετά τη μόλυνση.



Διάγραμμα 3.15: Ραβδόγραμμα απεικόνισης σχετικής AUDPC ως ποσοστό του μέγιστου εμβαδού κάτω από τη καμπύλη εξέλιξης της ασθένειας (AUDPC) για όλη τη διάρκεια της μελέτης του παράγοντα C. Ο υπολογισμός της σχετικής AUDPC προέκυψε με τη μέθοδο της τραπεζοειδούς ολοκλήρωσης της καμπύλης εξέλιξης της ασθένειας σε σχέση με το χρόνο. Στο ραβδόγραμμα οι στήλες αντιπροσωπεύουν τους μέσους όρους 45 φυτών και οι κάθετες ράβδοι αντιπροσωπεύουν την απόκλιση από το μέσο όρο με βάση το τυπικό σφάλμα. Οι στήλες που συνοδεύονται από διαφορετικά γράμματα διαφέρουν στατιστικά σημαντικά σε επίπεδο σημαντικότητας ( $P \leq 0,05$ ). Οι μέσοι όροι διαχωρίστηκαν σύμφωνα με τη μέθοδο πολλαπλών δοκιμών LSD. CMM: Μάρτυρας (μόλυνση με *Cmm*), C1: εφαρμογή παράγοντα C συγκέντρωσης 1mM πριν τη μόλυνση, C10: εφαρμογή παράγοντα C συγκέντρωσης 10 mM πριν τη μόλυνση, C50: εφαρμογή παράγοντα C συγκέντρωσης 50 mM πριν τη μόλυνση.

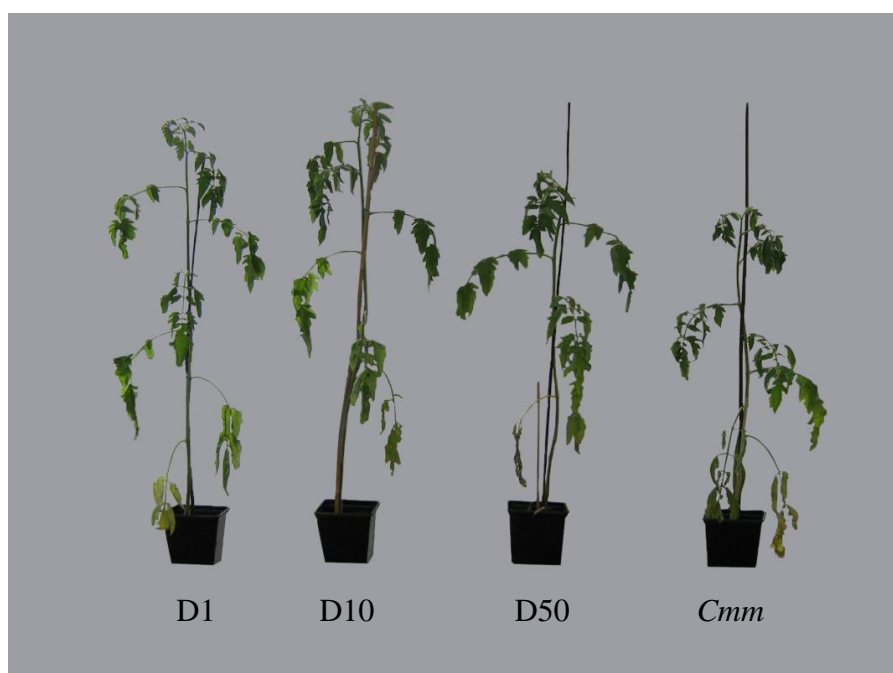
### 3.1.4 Παράγοντας D

Προκειμένου να γίνει αξιολόγηση του επιφανειοδραστικού παράγοντα D για την ικανότητα επαγωγής μηχανισμών ανθεκτικότητας κατά του βακτηριακού έλκου της τομάτας, έγιναν πειράματα παθογένειας με το παθογόνο *Clavibacter michiganensis* subsp. *michiganensis* σε φυτά τομάτας. Κατά την αξιολόγηση έγινε διέγερση των φυτών με τον παράγοντα D και ακολούθησε η μόλυνση με το παθογόνο *Cmm* κατά τις διαδικασίες που περιγράφονται στο κεφάλαιο 2.1. Ο σχεδιασμός των πειραμάτων παθογένειας για τον παράγοντα D περιλαμβάνει τρεις επαναλήψεις για κάθε επέμβαση με 15 φυτά η καθεμία.

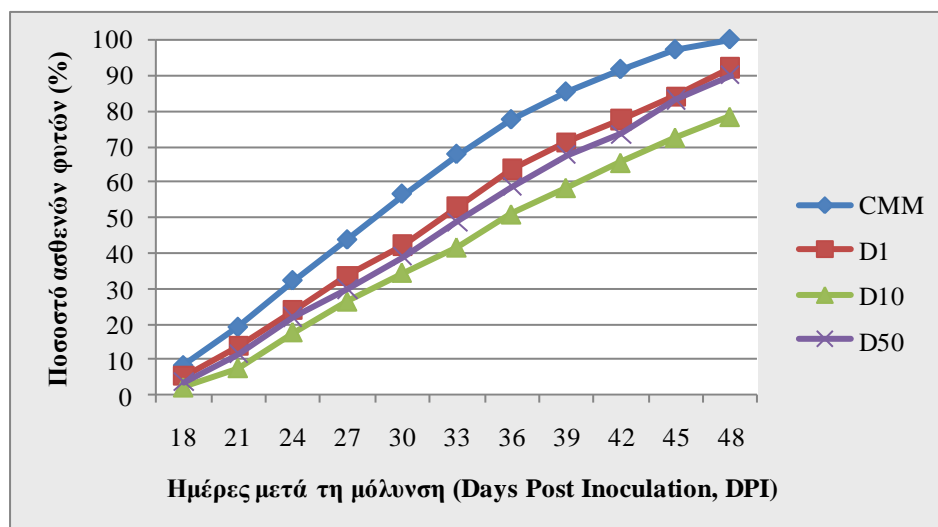
Τα πρώτα τυπικά συμπτώματα της ασθένειας εμφανίζονται στους μάρτυρες με τη μορφή της μαρανσης και συστροφής της άνω επιφάνειας των κατώτερων φύλλων, 18 ημέρες μετά τη μόλυνση των φυτών με το *Cmm* (Εικόνα 3.4). Η εξέλιξη των συμπτωμάτων καταγράφηκε μέχρις ότου ο μάρτυρας έφτασε σε ποσοστό μόλυνσης 100%, το οποίο παρατηρήθηκε στις 48 ημέρες μετά τη μόλυνση με το βακτήριο.

Τα συμπτώματα της ασθένειας εξελίχθηκαν σε όλες τις επεμβάσεις, με τα φυτά μάρτυρες να εμφανίζουν πιο επιβαρυσμένη συμπτωματολογική εικόνα. Οι επεμβάσεις με τον παράγοντα D πριν τη μόλυνση, εκδήλωσαν πιο ήπια συμπτώματα. Κατά την τελευταία μέτρηση (48 DPI), το ποσοστό της ασθένειας για το μάρτυρα εμφανίζεται 100%, στην επέμβαση D1 είναι 92.27%, το αντίστοιχο στην επέμβαση D10 είναι 78,6% και στην επέμβαση D50 είναι 90.2% (Διάγραμμα 3.16). Σύμφωνα με αυτά, η επέμβαση D10 εμφανίζει τη μεγαλύτερη μείωση συμπτωμάτων που φτάνει το 21,4% σε σχέση με το μάρτυρα, ενώ επί της συνολικής πορείας της ασθένειας, η μεγαλύτερη μείωση στα συμπτώματα παρατηρείται στις 39 DPI με ποσοστό 26,73% σε σχέση με το μάρτυρα (Διάγραμμα 3.17).

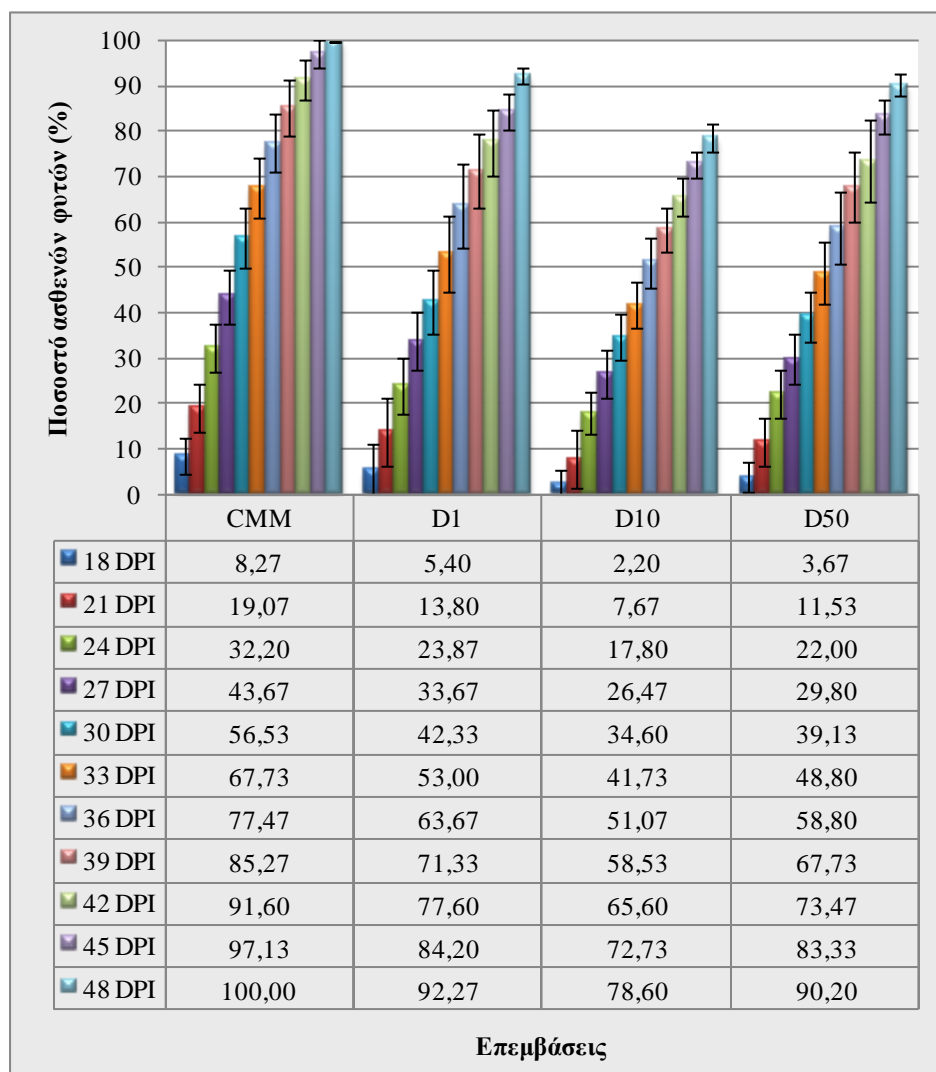
Από τη στατιστική ανάλυση της σχετικής AUDPC (Διάγραμμα 3.18) διαφαίνεται ότι όλες οι επεμβάσεις διαφέρουν στατιστικά σημαντικά (σε επίπεδο σημαντικότητας 95%) σε σχέση με το μάρτυρα. Η επέμβαση D1, διαφέρει από την D10, δεν παρουσιάζει όμως στατιστικά σημαντική διαφορά από τη D50 επέμβαση. Η επέμβαση D10 διαφέρει από τη D1 αλλά και τη D50 καθώς έχει τη χαμηλότερη τιμή σχετικής AUDPC με ποσοστό μείωσης κατά 34,85% συγκρινόμενη με το μάρτυρα-*Cmm*.



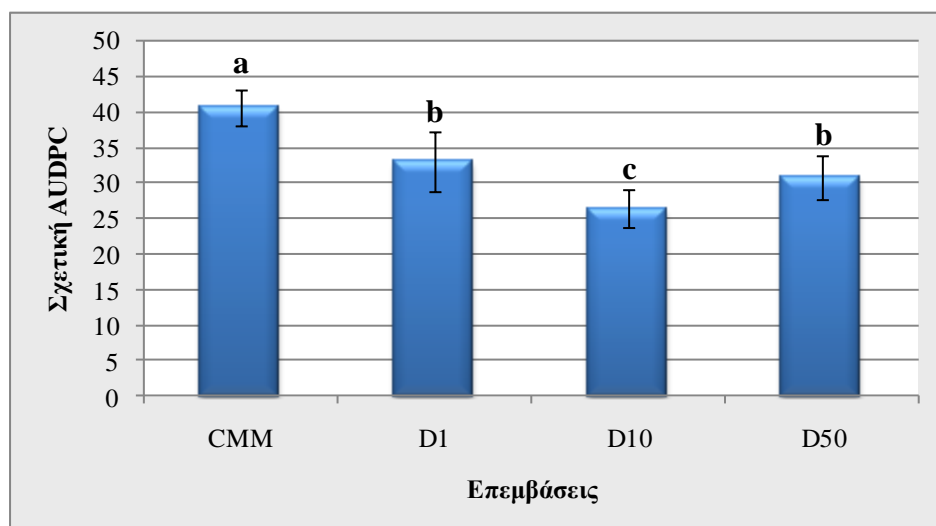
Εικόνα 3.4: Επίδραση του παράγοντα D στην εκδήλωση συμπτωμάτων από το παθογόνο *Clavibacter michiganensis* subsp. *michiganensis* σε φυτά τομάτας. D1: εφαρμογή παράγοντα D συγκέντρωσης 1mM πριν τη μόλυνση, D10: εφαρμογή παράγοντα D συγκέντρωσης 10 mM πριν τη μόλυνση, D50: εφαρμογή παράγοντα D συγκέντρωσης 50 mM πριν τη μόλυνση, *Cmm*: Μάρτυρας (μόλυνση με *Cmm*).



Διάγραμμα 3.16: Επίδραση του παράγοντα D στο ποσοστό ασθενών φυτών τομάτας μετά τη μόλυνση με το βακτήριο *Clavibacter michiganensis* subsp. *michiganensis*. Η ένταση της ασθένειας υπολογίστηκε για κάθε χρονική στιγμή καταγραφής των συμπτωμάτων ως το ποσοστό (%) του αριθμού των ασθενών φύλλων σε σχέση με τον συνολικό αριθμό των φύλλων για κάθε φυτό. Για την κάθε επέμβαση χρησιμοποιήθηκαν 15 φυτά και τα πειράματα περιελάμβαναν τρεις επαναλήψεις. Στο ιστόγραμμα αντιπροσωπεύονται οι μέσοι όροι 45 φυτών συναρτήσει του χρόνου καταγραφής συμπτωμάτων. CMM: Μάρτυρας (μόλυνση με *Cmm*), D1: εφαρμογή παράγοντα D συγκέντρωσης 1mM πριν τη μόλυνση, D10: εφαρμογή παράγοντα D συγκέντρωσης 10 mM πριν τη μόλυνση, D50: εφαρμογή παράγοντα D συγκέντρωσης 50 mM πριν τη μόλυνση.



Διάγραμμα 3.17: Επίδραση του παράγοντα D στο ποσοστό ασθενών φυτών τομάτας μετά τη μόλυνση με το βακτήριο *Clavibacter michiganensis* subsp. *michiganensis*. Η ένταση της ασθένειας υπολογίστηκε για κάθε χρονική στιγμή καταγραφής των συμπτωμάτων ως το ποσοστό (%) του αριθμού των ασθενών φύλλων σε σχέση με τον συνολικό αριθμό των φύλλων για κάθε φυτό. Για την κάθε επέμβαση χρησιμοποιήθηκαν 15 φυτά και τα πειράματα περιελάμβαναν τρεις επαναλήψεις. Στο ραβδόγραμμα οι στήλες αντιπροσωπεύουν τους μέσους όρους 45 φυτών συναρτήσει των επεμβάσεων του πειράματος και οι κάθετες ράβδοι αντιπροσωπεύουν την απόκλιση από το μέσο όρο με βάση το τυπικό σφάλμα. CMM: Μάρτυρας (μόλυνση με *Cmm*), D1: εφαρμογή παράγοντα D συγκέντρωσης 1mM πριν τη μόλυνση, D10: εφαρμογή παράγοντα D συγκέντρωσης 10 mM πριν τη μόλυνση, D50: εφαρμογή παράγοντα D συγκέντρωσης 50 mM πριν τη μόλυνση, DPI: ημέρες μετά τη μόλυνση.



Διάγραμμα 3.18: Ραβδόγραμμα απεικόνισης σχετικής AUDPC ως ποσοστό του μέγιστου εμβαδού κάτω από τη καμπύλη εξέλιξης της ασθένειας (AUDPC) για όλη τη διάρκεια της μελέτης του παράγοντα D. Ο υπολογισμός της σχετικής AUDPC προέκυψε με τη μέθοδο της τραπεζοειδούς ολοκλήρωσης της καμπύλης εξέλιξης της ασθένειας σε σχέση με το χρόνο. Στο ραβδόγραμμα οι στήλες αντιπροσωπεύουν τους μέσους όρους 45 φυτών και οι κάθετες ράβδοι αντιπροσωπεύουν την απόκλιση από το μέσο όρο με βάση το τυπικό σφάλμα. Οι στήλες που συνοδεύονται από διαφορετικά γράμματα διαφέρουν στατιστικά σημαντικά σε επίπεδο σημαντικότητας ( $P \leq 0,05$ ). Οι μέσοι όροι διαχωρίστηκαν σύμφωνα με τη μέθοδο πολλαπλών δοκιμών LSD. CMM: Μάρτυρας (μόλυνση με *Cmm*), D1: εφαρμογή παράγοντα D συγκέντρωσης 1mM πριν τη μόλυνση, D10: εφαρμογή παράγοντα D συγκέντρωσης 10 mM πριν τη μόλυνση, D50: εφαρμογή παράγοντα D συγκέντρωσης 50 mM πριν τη μόλυνση.

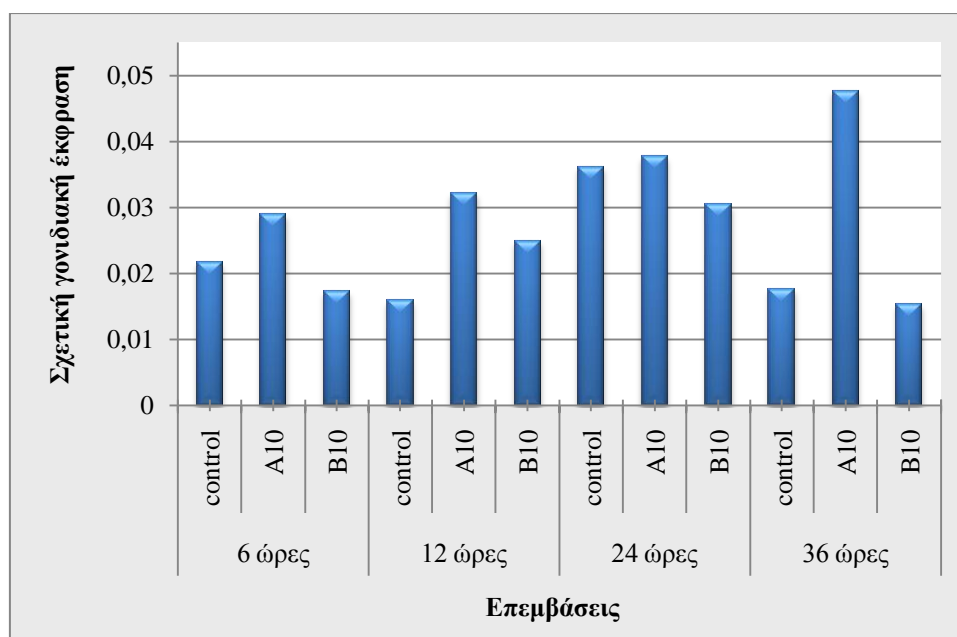
### 3.2 Μοριακή διερεύνηση

Η μοριακή διερεύνηση πραγματοποιείται προκειμένου να μελετηθεί η ικανότητα των επιφανειοδραστικών ουσιών να επάγουν τον αμυντικό μηχανισμό των φυτών. Στα πλαίσια αυτής της αξιολόγησης, οι επιφανειοδραστικοί παράγοντες A και B εφαρμόστηκαν σε συγκέντρωση 10 mM και ακολούθησε η διαδικασία ανίχνευσης PR γονιδίων στο RNA φυτών τομάτας μέσω της Real-time PCR όπως αυτή περιγράφεται στην ενότητα 2.2. Η συγκέντρωση των 10 mM επιλέχθηκε καθώς από τα πειράματα παθογένειας είχε δείχθει ότι αποτελεί την επέμβαση με τα καλύτερα αποτελέσματα, ενώ η επιλογή των γονιδίων βασίστηκε στη βιβλιογραφική αναζήτηση που αναφέρεται σε επαγωγή μηχανισμών άμυνας των φυτών εναντίον του *Cmm*. Τα αποτελέσματα της μοριακής ανίχνευσης των υπό μελέτη γονιδίων απεικονίζονται στα διαγράμματα 3.19 - 3.21.

Όσον αφορά στο γονίδιο της χιτίνωσης (Διάγραμμα 3.19), στις 6 ώρες από τη διέγερση δεν παρατηρείται διαφοροποίηση η οποία να σημαίνει έκφραση του γονιδίου, ενώ στις 12 ώρες παρατηρείται διπλάσια έκφραση του γονιδίου στην

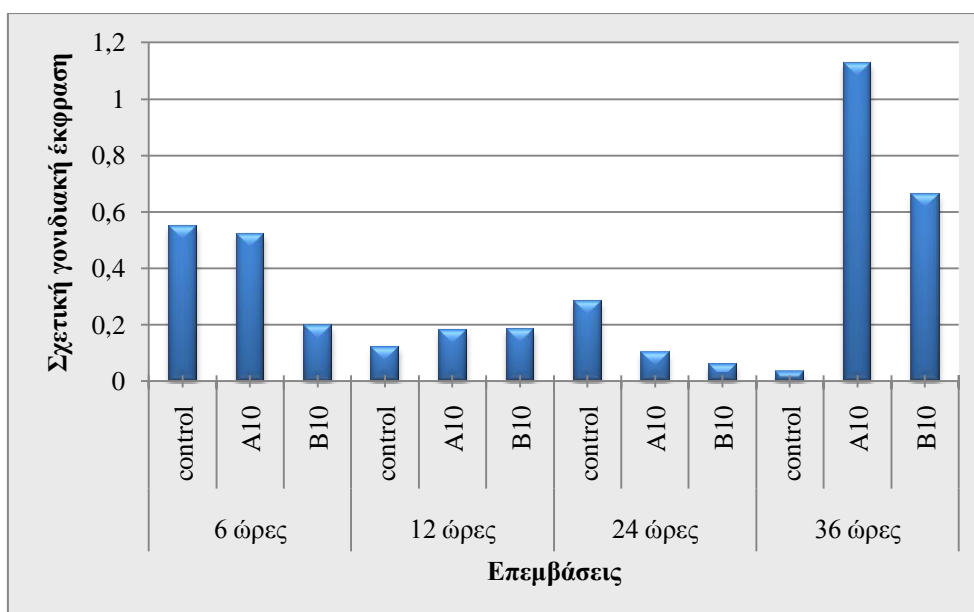


επέμβαση A10 σε σχέση με το μάρτυρα, τιμή η οποία θεωρείται το κατώτατο όριο ώστε να αναφερθεί ότι το γονίδιο εκφράζεται. Στις 24 ώρες από την εφαρμογή δεν παρατηρείται διάφορα στις επεμβάσεις, στο διάστημα των 36 ωρών όμως, για την επέμβαση A10 καταγράφεται έκφραση των γονιδίων των χιτινασών.



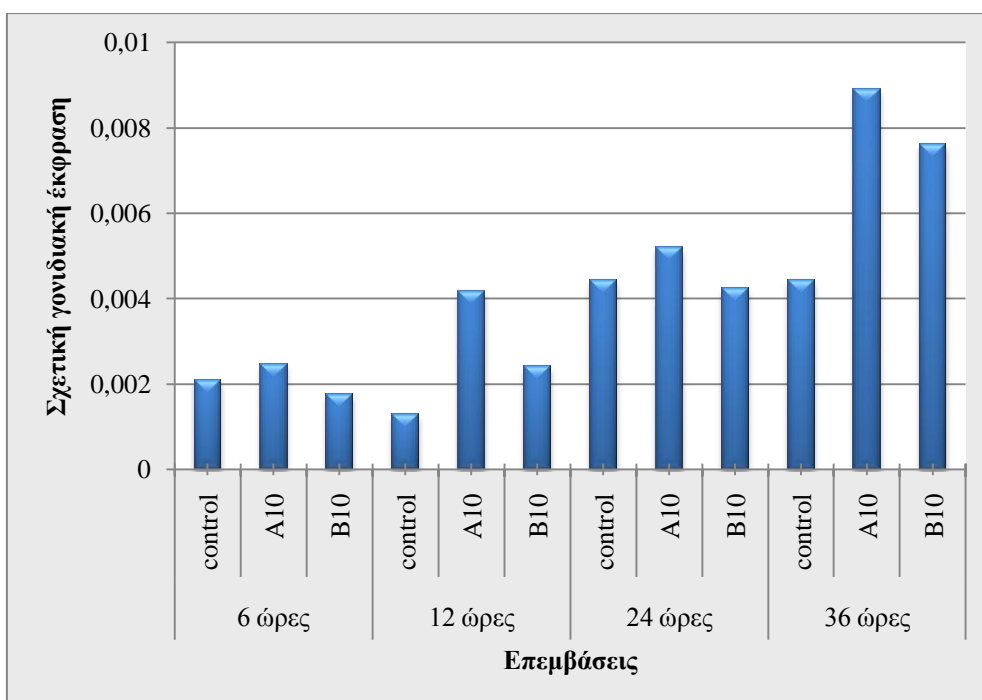
Διάγραμμα 3.19: Επίπεδα έκφρασης για το γονίδιο της χιτινάσης σε φυτά τομάτας μετά από την εφαρμογή των παραγόντων A και B. Το RNA απομονώθηκε από το υπέργειο μέρος 5 φυτών για κάθε επέμβαση στις 6, 12, 24 και 36 ώρες μετά την εφαρμογή των παραγόντων A και B. Έγινε αντίστροφη μεταγραφή του poly(A)<sup>+</sup>-RNA σε cDNA, που χρησιμοποιήθηκε σε αντιδράσεις Real-time PCR. Τα επίπεδα της γονιδιακής μεταγραφής στα διαφορετικά δείγματα κανονικοποιήθηκαν με βάση το γονίδιο αναφοράς GAPDH. Control: μάρτυρας (εφαρμογή H<sub>2</sub>O), A10: εφαρμογή παράγοντα A συγκέντρωσης 10mM, B10: εφαρμογή παράγοντα B συγκέντρωσης 10 mM.

Λαμβάνοντας υπ' όψη τα αποτελέσματα της ανίχνευσης του PR-1 γονιδίου (Διάγραμμα 3.20), φαίνεται πως δεν παρατηρείται επαγωγή του γονιδίου κατά τις 24 πρώτες ώρες από την εφαρμογή οποιουδήποτε από τους παράγοντες. Στο διάστημα όμως των 36 ωρών, καταγράφεται υπερέκφραση του PR-1 γονιδίου από την εφαρμογή του παράγοντα A κατά 33 φορές περισσότερο σε σχέση με το μάρτυρα ενώ και για την επέμβαση B10 το γονίδιο υπερεκφράζεται 19 φορές περισσότερο από το μάρτυρα.



Διάγραμμα 3.20: Επίπεδα έκφρασης του PR-1 γονιδίου σε φυτά τομάτας μετά από την εφαρμογή των παραγόντων A και B. Το RNA απομονώθηκε από το υπέργειο μέρος 5 φυτών για κάθε επέμβαση στις 6, 12, 24 και 36 ώρες μετά την εφαρμογή των παραγόντων A και B. Έγινε αντίστροφη μεταγραφή του poly(A)<sup>+</sup>-RNA σε cDNA, που χρησιμοποιήθηκε σε αντιδράσεις Real-time PCR. Τα επίπεδα της γονιδιακής μεταγραφής στα διαφορετικά δείγματα κανονικοποιήθηκαν με βάση το γονίδιο αναφοράς GAPDH. Control: μάρτυρας (εφαρμογή H<sub>2</sub>O), A10: εφαρμογή παράγοντα A συγκέντρωσης 10mM, B10: εφαρμογή παράγοντα B συγκέντρωσης 10 mM.

Για το PR-2 γονίδιο (Διάγραμμα 3.21), στις 6 ώρες από την εφαρμογή των παραγόντων δεν φαίνεται να κάποια μεταγραφή του γονιδίου, ενώ στις 12 ώρες υπάρχει περίπου διπλάσια επαγωγή του γονιδίου στην επέμβαση B10 και τριπλάσια περίπου στην A10 επέμβαση σε σχέση με το μάρτυρα. Στο διάστημα των 24 ωρών ο μάρτυρας δε διαφοροποιείται από τις επεμβάσεις. Στις 36 ώρες από την εφαρμογή παραγόντων, το PR-2 γονίδιο φαίνεται να επάγεται τόσο στην επέμβαση A10 όσο και στη B10.



Διάγραμμα 3.21: Επίπεδα έκφρασης του PR-2 γονιδίου σε φυτά τομάτας μετά από την εφαρμογή των παραγόντων A και B. Το RNA απομονώθηκε από το υπέργειο μέρος 5 φυτών για κάθε επέμβαση στις 6, 12, 24 και 36 ώρες μετά την εφαρμογή των παραγόντων A και B. Έγινε αντίστροφη μεταγραφή του poly(A)<sup>+</sup>-RNA σε cDNA, που χρησιμοποιήθηκε σε αντιδράσεις Real-time PCR. Τα επίπεδα της γονιδιακής μεταγραφής στα διαφορετικά δείγματα κανονικοποιήθηκαν με βάση το γονίδιο αναφοράς GAPDH. Control: μάρτυρας (εφαρμογή H<sub>2</sub>O), A10: εφαρμογή παράγοντα A συγκέντρωσης 10mM, B10: εφαρμογή παράγοντα B συγκέντρωσης 10 mM.

#### 4. ΣΥΖΗΤΗΣΗ - ΣΥΜΠΕΡΑΣΜΑΤΑ

Το βακτήριο *Clavibacter michiganensis* subsp. *michiganensis* (*Cmm*) το οποίο είναι υπεύθυνο για την πρόκληση του βακτηριακού έλκους της τομάτας, είναι ένα εδαφογενές παθογόνο με παγκόσμια εξάπλωση, που προκαλεί αδροβακτηριώσεις και οδηγεί σε σημαντικές απώλειες της παραγωγής με μεγάλη οικονομική σημασία. Οι αδροβακτηριώσεις αυτές αποτελούν σοβαρές απειλές για τους ξενιστές τους αφού δεν υπάρχουν φυτοπροστατευτικά προϊόντα που η εφαρμογή τους θα ήταν ικανή να ελέγξει επιτυχώς το παθογόνο. Για αυτόν το λόγο, οι στρατηγικές διαχείρισης της ασθένειας βασίζονται κυρίως σε προληπτικά μέτρα, ανάμεσα στα οποία είναι και η χρήση ανθεκτικών ποικιλιών, η μείωση και καταστροφή του παθογόνου στο σπόρο, οι πρακτικές βιολογικής καταπολέμησης (Utkhede and Koch, 2004), η αμειψισπορά και η εφαρμογή της ηλιοαπολύμανσης του εδάφους (Παναγόπουλος, 1992, Antoniou et al., 1995).

Μια άλλη κατεύθυνση όπου έχει στραφεί η έρευνα για την αντιμετώπιση των παθογόνων, είναι η μελέτη της επαγωγής αμυντικών μηχανισμών των φυτών. Σημαντικό ρόλο σε αυτό έχει συμβάλλει η ανάπτυξη και εφαρμογή των αρχών της μοριακής βιολογίας στη φυτοπαθολογία μέσω της μελέτης των μηχανισμών που ενεργοποιούνται κατά τις αλληλεπιδράσεις των ξενιστών με τα παθογόνα και της κατανόησης του γενετικού υπόβαθρου των αμυντικών μηχανισμών των φυτών. Παρόλα αυτά θα πρέπει να αναφερθεί ότι, αν και έχει εκτεταμένα ερευνηθεί η αλληλεπίδραση των παθογόνων-ξενιστών, οι μοριακοί μηχανισμοί που σχετίζονται με την ανθεκτικότητα των φυτών κατά των παθογόνων δεν έχουν ακόμη εξακριβωθεί.

Το φάσμα των μηχανισμών άμυνας των φυτών συνθέτει ένα σύμπλοκο φαινόμενο, μέρος του οποίου είναι και η επίκτητη διασυστηματική αντοχή ή ανοσοποίηση (Systemic Acquired Resistance, SAR). Σύμφωνα με ερευνητικά δεδομένα, έχει δειχθεί η επιτυχής επαγωγή της SAR εναντίον ενός εύρους παθογόνων που περιλαμβάνει μύκητες, βακτήρια και ιούς. Επιπλέον, αναφορές υπάρχουν για αντιμετώπιση του *Cmm* μέσω επαγωγής της διασυστηματικής αντοχής με χρήση χημικών ουσιών όπως π.χ. το ASM (acibenzolar-S methyl) το οποίο ήταν αποτελεσματικό εναντίον του παθογόνου, ενώ παράλληλα παρατηρήθηκε ενζυμική δράση που συνδέεται με την ενεργοποίηση των PR-πρωτεϊνών των ανοσοποιημένων φυτικών ιστών (Baysal et al., 2003). Ενεργοποίηση των PR-πρωτεϊνών σε φυτά τομάτας για την καταπολέμηση επίσης του *Cmm*, έχει επιτευχθεί με την εφαρμογή BABA (β-αμινοβουτυρικό οξύ) στους φυτικούς ιστούς από τους Baysal et al. (2005).

Συνεκτιμώντας τα παραπάνω ερευνητικά δεδομένα, μέσα από την παρούσα μελέτη έγινε προσπάθεια αξιολόγησης τεσσάρων κατιονικών επιφανειοδραστικών παραγόντων του βρωμιούχου αμμωνίου (A, B, C, D) για την ικανότητά τους να

επάγουν τον αμυντικό μηχανισμό φυτών τομάτας εναντίον του *Clavibacter michiganensis* subsp. *michiganensis*. Σχετικά με τους παράγοντες αυτούς, δεν έχει γίνει μέχρι σήμερα αναφορά για την ικανότητα τους να επάγουν την επίκτητη διασυστηματική αντοχή στα φυτά, εναντίον φυτοπαθογόνων αιτίων.

Η αξιολόγηση των επιφανειοδραστικών παραγόντων πραγματοποιήθηκε με πειράματα παθογένειας στο σύστημα αλληλεπίδρασης τομάτα-*Cmm*. Η εφαρμογή των παραγόντων έγινε σε διαφορετικές συγκεντρώσεις, προκειμένου να διαπιστωθεί ποια συγκέντρωση από κάθε παράγοντα υπερτερεί έναντι των άλλων στον περιορισμό των συμπτωμάτων της ασθένειας.

Από τις δύο ανεξάρτητες δοκιμές παθογένειας για τον παράγοντα A, διαπιστώθηκε ότι τα αποτελέσματα ήταν κοινά και στα δύο πειράματα. Η επέμβαση σε συγκέντρωση παράγοντα 10 mM, ήταν πιο αποτελεσματική σε σύγκριση με τις συγκεντρώσεις των 50mM και 1mM καθώς και με τα φυτά μάρτυρες περιορίζοντας στατιστικά σημαντικά τα επίπεδα της ασθένειας κατά 23%.

Τα πειράματα παθογένειας κατά την αξιολόγηση του B παράγοντα έδειξαν από κοινού ότι όλες οι επεμβάσεις διαφέρουν σε σχέση με το μάρτυρα. Εντός των επεμβάσεων παρατηρείται διαφοροποίηση στα δύο πειράματα, με το πρώτο πείραμα να δείχνει διαφορά μεταξύ των επεμβάσεων B1-B10 και το δεύτερο να μην καταδεικνύει στατιστικά σημαντική διαφορά ανάμεσα στις τρεις επεμβάσεις. Η επέμβαση με τον παράγοντα B στη συγκέντρωση 10mM, ήταν πιο αποτελεσματική, με ποσοστό 11,8% σε σύγκριση με τις συγκεντρώσεις των 50mM και 1mM καθώς και με τα φυτά μάρτυρες στην αντιμετώπιση της ασθένειας αλλά σε χαμηλότερο ποσοστό σε σύγκριση με τον παράγοντα A.

Από την ανάλυση των πειραμάτων αξιολόγησης του επιφανειοδραστικού παράγοντα C, παρατηρήθηκε επίσης σημαντική διαφορά μεταξύ επεμβάσεων και του μάρτυρα. Σε αντίθεση όμως με τον πειραματισμό των άλλων παραγόντων, ο παράγοντας C έδειξε τη μέγιστη μείωση συμπτωμάτων ασθένειας στη συγκέντρωση των 50 mM, αν και αυτή δε διέφερε στατιστικά σημαντικά από τη C10 επέμβαση.

Παρατηρώντας τα πειραματικά αποτελέσματα για τον D παράγοντα σε σχέση με τα άλλα πειράματα, συμπεραίνουμε ότι οι D και A παράγοντες εμφανίζουν πανομοιότυπα αποτελέσματα καθώς όλες οι επεμβάσεις διαφέρουν από το μάρτυρα ενώ η επέμβαση συγκέντρωσης ουσίας 10 mM φαίνεται να είναι η πλέον αποτελεσματική.

Συνοψίζοντας τις παρατηρήσεις από τα πειράματα παθογένειας, συμπεραίνουμε ότι η συγκέντρωση των 10 mM υδατικού διαλύματος επιφανειοδραστικών παραγόντων ήταν αυτή η οποία έδωσε τα καλύτερα αποτελέσματα, εκτός από την περίπτωση εφαρμογής του C παράγοντα. Φαίνεται πως η συγκέντρωση του 1 mM δεν είναι αρκετή ώστε να ενεργοποιηθεί ο αμυντικός μηχανισμός του φυτών στο βαθμό που απαιτείται. Ακόμα όμως και σε αυτή τη συγκέντρωση ενδέχεται να διεγείρονται ως ένα βαθμό οι μηχανισμοί άμυνας των φυτών καθώς καταγράφεται ελαφρά ηπιότερη

εμφάνιση συμπτωμάτων της ασθένειας. Για τη συγκέντρωση των 50 mM, τα αποτελέσματα έδειξαν μειωμένη ικανότητα περιορισμού των συμπτωμάτων της ασθένειας. Η αυξημένη συγκέντρωση εφαρμογής των παραγόντων στα φυτά, δε συνοδεύτηκε από περαιτέρω μείωση στην καταγραφή συμπτωμάτων σε σχέση με τη βέλτιστη συγκέντρωση (των 10 mM) που δέχθηκαν τα φυτά. Αυτό πιθανώς να οφείλεται στο γεγονός ότι η συγκέντρωση αυτή είναι τοξική για τα φυτά και μέσω αυτής να ενεργοποιούνται μηχανισμοί πέραν των αμυντικών ή να καταστέλλονται άλλοι που ίσως να σχετίζονται με την άμυνα των φυτών. Επισημαίνεται ότι, η παρατήρηση νεκρώσεων στους ιστούς των φυτών που εφαρμόστηκαν οι (τουλάχιστον Β και D) παράγοντες σε αυτή τη συγκέντρωση, πιθανόν να σχετίζεται με την τοξική δράση των παραγόντων αυτών. Η εκτέλεση μελλοντικά μιας σειράς περαμάτων που θα εφαρμόζονταν οι επιφανειοδραστικές ουσίες σε συγκεντρώσεις 10-50 mM, πιθανώς να διευκρίνιζε το όριο τοξικότητας των ουσιών αυτών.

Επιπλέον, στα πλαίσια της γενικότερης κατανόησης της επίδρασης που ασκούν οι επιφανειοδραστικοί παράγοντες στα φυτά, χρήζει περαιτέρω μελέτης η πιθανή επίδραση των ουσιών αυτών στην ανάπτυξη των φυτών. Η υπόθεση αυτή έχει σχέση με την παρατήρηση η οποία έγινε όταν κατά τις δοκιμές παθογένειας υπήρχαν φυτά μάρτυρες που δέχθηκαν μόνο εφαρμογή των παραγόντων. Στα φυτά αυτά, μετά την εφαρμογή παραγόντων, παρατηρήθηκε αναστολή της ανάπτυξής τους σε σύγκριση με άλλα φυτά που δεν είχαν δεχθεί καμία επέμβαση. Αναφέρεται ότι οι Navarro et al. (2004), μελετώντας την αντίδραση φυτών αραβίδοψης ύστερα από την εφαρμογή ενός γενικού διεγέρτη (flg22), παρατήρησαν την υποέκφραση αρκετών γονιδίων που επάγουν τη σύνθεση αυξινών στα φυτά. Η καταστολή της βιοσύνθεσης αυξινών οδηγεί πιθανά στη μείωση της βλαστικής ανάπτυξης των φυτών αυτών. Αξιοποιώντας την αναφορά αυτή, η εκπόνηση ενός πειράματος που θα ανίχνευε την έκφραση αυτών των γονιδίων σε φυτά που προηγουμένως θα είχαν διεγερθεί με τους επιφανειοδραστικούς παράγοντες, ίσως να μπορούσε να δώσει περισσότερες ενδείξεις στη διατύπωση της παραπάνω υπόθεσης.

Η μοριακή διερεύνηση που ακολούθησε των πειραμάτων παθογένειας, στόχευε στην ανίχνευση γονιδίων που εμπλέκονται στην επαγωγή διασυστηματικής αντοχής στα φυτά. Τα γονίδια που μελετήθηκαν (χιτινάσες, PR-1 και PR-2 πρωτεΐνες), επάγονται διασυστηματικά από τα φυτά προκειμένου να εκφραστούν πρωτεΐνες σε περιπτώσεις προσβολής από παθογόνα και συνδέονται με την εκδήλωση του φαινομένου της SAR (van Loon and van Strien, 1999). Οι χιτινάσες συμβάλλουν στην άμυνα εναντίον διαφόρων παθογόνων με αντιμυκητιακές ιδιότητες (Ponstein et al., 1994). Στην παρούσα μελέτη, η έκφραση χιτινασών ανιχνεύτηκε σε φυτά που είχαν δεχθεί τον παράγοντα Α. Η επαγωγή του γονιδίου φαίνεται να γίνεται στις 36 ώρες μετά τη διέγερση, ενώ μάλλον δεν παρατηρείται άμεση επαγωγή του γονιδίου. Αντίστοιχα, σε φυτά διεγερμένα με τον Β παράγοντα η επαγωγή του γονιδίου δεν ανιχνεύθηκε.

Η PR-1 πρωτεΐνη, έχοντας σημαντικό ρόλο στην ανθεκτικότητα των φυτών, επάγεται από παθογόνα (αλλά και το SA) και χρησιμοποιείται ως δείκτης διέγερσης της διασυστηματικής αντοχής των φυτών. Οι van Loon και van Strien (1999), συνδέουν

το ρόλο των PR-1 πρωτεϊνών με την ανθεκτικότητα των φυτών στις μυκητολογικές προσβολές αλλά ο τρόπος λειτουργίας τους ή η σχέση τους με άλλες πρωτεΐνες παραμένει άγνωστος. Τα αποτελέσματα της πειραματικής διαδικασίας, δείχνουν ξεκάθαρη υπερέκφραση του PR-1 γονιδίου στις 36 ώρες μετά την εφαρμογή των επιφανειοδραστικών ουσιών. Τα επίπεδα έκφρασης του PR-1 γονιδίου στην περίπτωση του A παράγοντα είναι σχεδόν διπλάσια από την αντίστοιχη του B. Ωστόσο πριν από το διάστημα αυτό δεν ανιχνεύεται κάποια μεταγραφή.

Οι PR-2 πρωτεΐνες αποτελούν β-1,3 γλυκανάσες οι οποίες αποδομούν τις β-1,3 γλυκάνες του κυτταρικού τοιχώματος των μυκήτων. Όμως, και τα προϊόντα της ενζυμικής τους δράσης μπορούν να λειτουργήσουν ως διεγέρτες των μηχανισμών άμυνας των φυτών. Αν και η ανθεκτικότητα που προκύπτει από τη δράση των χιτινασών έχει χαρακτηριστεί μικρής κλίμακας, ωστόσο αρκετά παθογόνα είναι ευπαθή στη συνεργιστική δράση των χιτινασών και των γλυκανασών (Menu-Bouaouiche et al., 2003, Mauch et al., 1988). Στην παρούσα εργασία, από τα πειράματα παρατηρείται για τον A παράγοντα, μια έκφραση του γονιδίου στις 12 ώρες μετά την εφαρμογή του στα φυτά, ενώ η έκφραση αυτή εντοπίζεται και στις 36 ώρες. Σύμφωνα με αυτά, αναμενόμενη θα ήταν και η έκφραση του γονιδίου στις 24 ώρες, αλλά κάτι τέτοιο δεν παρατηρήθηκε. Παρόμοια κατατομή έκφρασης λήφθηκε και στην εφαρμογή του B παράγοντα, αλλά σε μικρότερο βαθμό σε σχέση με τον παράγοντα A.

Λαμβάνοντας υπ' όψη τα στοιχεία της μοριακής διερεύνησης, τα πιο ξεκάθαρα αποτελέσματα λήφθηκαν στην ανίχνευση του PR-1 γονιδίου. Στα υπόλοιπα δύο γονίδια, τα αποτελέσματα παρουσιάζουν ασάφεια. Αυτό κυρίως αποδίδεται στην έκφραση που παρατηρείται στους μάρτυρες και η οποία είναι μη αναμενόμενη. Η γονιδιακή επαγωγή που προκύπτει στους μάρτυρες (φυτά που είχαν δεχθεί H<sub>2</sub>O στα φύλλα) μπορεί πιθανώς να αποδοθεί σε διάφορες παραμέτρους που αφορούν στη διαχείριση του φυτικού υλικού στο θερμοκήπιο. Αυτές μπορεί να είναι: (α) η εντομολογική προσβολή των φυτών από αφίδες. Παρά τον έλεγχο των αφίδων με χημικά σκευάσματα, υπήρχε παρουσία τους στο χώρο του θερμοκηπίου κατά την ανάπτυξη των φυτών. Υπάρχουν αναφορές υποστηρίζουν ότι η προσβολή από αφίδες επάγει τα PR-1 γονίδια και αυτά των γλυκανασών (Moran and Thompson, 2001). (β) οι θερμοκρασιακές συνθήκες κατά την ανάπτυξη των φυτών τομάτας ελέγχθηκαν με τη χρήση κλιματιστικών, ωστόσο η μεταβολή των θερμοκρασιακών συνθηκών καθώς και άλλων παραγόντων αβιοτικής καταπόνησης (ξηρασία, έλλειψη θρεπτικών στοιχείων, αλατότητα εδάφους, υπερϊώδης ακτινοβολία) είναι δυνατόν να διεγείρουν τους λανθάνοντες μηχανισμούς αντοχής (Τζάμος, 2004, Agrios, 2005). Επομένως για τους παραπάνω λόγους, σε μία μελλοντική πειραματική διερεύνηση κρίνεται απαραίτητο, το φυτικό υλικό να διατηρηθεί αδιατάρακτο από τις παραμέτρους οι οποίες πιθανώς σε αυτό το πείραμα να επηρέασαν την επαγωγή γονιδίων άμυνας στα φυτά.

Στη συνέχεια, αξιολογώντας τα αποτελέσματα ως προς τους δύο επιφανειοδραστικούς παράγοντες, συμπεραίνουμε ότι ο A παράγοντας δίδει

μεγαλύτερα επίπεδα έκφρασης και για τα τρία υπό μελέτη γονίδια σε σύγκριση με τον παράγοντα Β. Αυτό έρχεται και σε συμφωνία με τα αποτελέσματα των δοκιμών παθογένειας όπου ο Α παράγοντας εμφανίζει ηπιότερα συμπτώματα της ασθένειας. Επιπλέον θα μπορούσε να μελετηθεί στο μέλλον η ικανότητα επαγωγής γονιδίων των επιφανειοδραστικών παραγόντων σε διαφορετικές συγκεντρώσεις ώστε να διαπιστωθεί μια πιθανή συσχέτιση των δοκιμών παθογένειας με τη μοριακή διερεύνηση. Αν τώρα εκτιμήσουμε τα αποτελέσματα του μοριακού πειράματος σε σχέση με το χρόνο, συμπεραίνουμε ότι και για τα τρία γονίδια η έκφραση γίνεται σαφής στις 36 ώρες μετά την εφαρμογή παραγόντων. Όπως σχεδιάστηκε το πείραμα αυτό, στόχος ήταν να ανιχνευθεί η άμεση επαγωγή γονιδίων και ως εκ τούτου δεν δόθηκε η δυνατότητα για διερεύνηση μεταγραφής των γονιδίων σε μεγαλύτερο βάθος χρόνου. Εξάλλου, οι Baysal et al. (2005), σε μελέτη επαγωγής της SAR με τη χρήση ΒΑΒΑ, ανίχνευσαν ότι η δραστηριότητα του ενζύμου PAL μεγιστοποιήθηκε στις 5 ημέρες μετά την εφαρμογή του διεγέρτη, ενώ η μέγιστη συγκέντρωση H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> εντοπίστηκε αντίστοιχα στις 3 ημέρες. Για αυτό το λόγο προτείνεται σε μελλοντικό πείραμα, η ανίχνευση των γονιδίων που εμπλέκονται στην άμυνα των φυτών, σε μεγαλύτερο χρονικό διάστημα. Επιπροσθέτως, προτείνεται η επέκταση του πειράματος με ανίχνευση των γονιδίων μετά από μόλυνση με το παθογόνο σε φυτά στα οποία έχουν ήδη εφαρμοστεί οι παράγοντες.

Ως προς τις άλλες παραμέτρους του πειράματος αναφέρεται ότι ο χρόνος που μεσολαβεί από την εφαρμογή των επιφανειοδραστικών ουσιών μέχρι τη μόλυνση με το παθογόνο, είναι 5 ημέρες. Το χρονικό αυτό διάστημα επιλέχθηκε αφού έχει θεωρηθεί ικανό για την επαγωγή μηχανισμών άμυνας (Agiros, 2005), ωστόσο η ανίχνευση γονιδίων που σχετίζονται με την άμυνα των φυτών σε εκείνο το διάστημα, είναι πιθανό να δώσει παραπάνω στοιχεία για το εάν τα επίπεδα μεταγραφής των γονιδίων βρίσκονται σε υψηλά επίπεδα ή έχουν μειωθεί ως αποτέλεσμα του συμπλόκου των μεταβολικών διεργασιών που επιτελούνται στους φυτικούς ιστούς. Το μεσοδιάστημα αυτό είναι μικρότερο σε αντίστοιχα πειράματα επαγωγής SAR στο παθοσύστημα τομάτα-*Cmm*, καθώς κατά την αξιολόγηση του ASM, καλύτερα αποτελέσματα λαμβάνονται στις 72 ώρες μετά την εφαρμογή του διεγέρτη (Baysal et al., 2003).

Συμπερασματικά, στην παρούσα μελέτη, έγινε αξιολόγηση 4 επιφανειοδραστικών ουσιών για την ικανότητά τους να επάγουν τους λανθάνοντες μηχανισμούς άμυνας σε φυτά τομάτας τα οποία μολύνθηκαν με το παθογόνο *Clavibacter michiganensis* subsp. *michiganensis*. Οι 4 αυτές ουσίες, μελετώμενες σε διαφορετικές συγκεντρώσεις, μείωσαν την εμφάνιση των τυπικών συμπτωμάτων της ασθένειας. Εξίσου σημαντική ήταν η καθυστέρηση που προκάλεσαν οι επιφανειοδραστικές ουσίες στην εκδήλωση των συμπτωμάτων και οι οποίες πιθανώς θα είχαν τη δυνατότητα να ενταχθούν σε ένα πρόγραμμα βιολογικής αντιμετώπισης του παθογόνου εφόσον δεν υφίσταται εγκεκριμένη χημική καταπολέμηση για το βακτηριακό έλκος της τομάτας. Επιπλέον, για δύο από τις ουσίες αυτές έγινε προσπάθεια αξιολόγησής τους σε μοριακό επίπεδο μέσω ανίχνευσης γονιδίων άμυνας



(χιτινάσες, PR-1 και PR-2 γονίδια) μετά από εφαρμογή τους σε φυτά τομάτας. Από αυτά, για το PR-1 γονίδιο υπήρξε η πιο σαφής έκφραση στις 36 ώρες από την εφαρμογή των ουσιών στα φυτά. Η επαγωγή του γονιδίου αυτού συνδέεται με τη σύνθεση της αντίστοιχης πρωτεΐνης, ώστε η έκφρασή του είναι πιθανή ένδειξη επαγωγής των λανθανόντων μηχανισμών αντοχής των φυτών.

## 5. ΒΙΒΛΙΟΓΡΑΦΙΑ

- Agrios, G.N.** 2005. Plant Pathology. Fifth edition. *Elsevier Academic Press*. USA, pp 237-242, 315-316.
- Alarcón, C. Castro, J. . Muñoz, F. Arce-Johnson, P Delgado, J.** 1998. Protein(s) from the Gram-Positive Bacterium *Clavibacter michiganensis* subsp. *michiganensis* Induces a Hypersensitive Response in Plants. *Phytopathology*, **88(4)**: 306-310.
- Antoniou, P., Tjamos, E., Andreou, M., Panagopoulos, C.** 1995. Effectiveness, modes of action and commercial application of soil solarization for control of *Clavibacter michiganensis* subsp. *michiganensis* of tomatoes. *Acta Horticulturae*, **382**: 119-128.
- Balaji, V., Mayrose, M., Sherf, O., Jacob-Hirsch, J., Eichenlaub, R., Iraki, N., Manulis-Sasson, S., Rechavi, G., Barash, I., Sessa, G.** 2008. Tomato Transcriptional Changes in Response to *Clavibacter michiganensis* subsp. *michiganensis* Reveal a Role for Ethylene in Disease Development. *Plant Physiology*, **146**: 1797–1809.
- Baysal, Ö., Soylu, E., Soylu, S.** 2003. Induction of defence-related enzymes and resistance by the plant activator acibenzolar-S-methyl in tomato seedlings against bacterial cancer caused by *Clavibacter michiganensis* subsp. *michiganensis*. *Plant Pathology*. **52**:747-753.
- Baysal, Ö., Gürsoy, Y.Z., Örnek, H., Duru, A.** 2005. Enhanced tomato resistance to bacterial canker by application of turtle oil. *Journal of General Plant Pathology*, **71**:204–210.
- Baysal, Ö., Gürsoy, Y.Z., Örnek, H., Duru, A.** 2005. Induction of oxidants in tomato leaves treated with DL-*b*-Amino butyric acid (BABA) and infected with *Clavibacter michiganensis* ssp. *michiganensis*. *European Journal of Plant Pathology*, **112**: 361–369.

- Bostock, R., Kuc, J. Laine, R.** 1981. Eicosapentaenoic and arachidonic acids from *Phytophthora infestans* elicit fungitoxic sesquiterpenes in the potato. *Science*, **212**: 67–69.
- Brisset, M.-N., Cesbron, S., Thomson, S., Paulin, J.-P.** 2000. Acibenzolar-Smethyl induces the accumulation of defense-related enzymes in apple and protects from fire blight. *European Journal of Plant Pathology*, **106**: 529–536.
- Buxbaum, E.** 2003. Cationic electrophoresis and electrotransfer of membrane glycoproteins. *Analytical Biochemistry*, **314**: 70–76.
- Cameron, K., Dixon, A., Lamb, J.** 1994. Biologically induced systemic acquired resistance in *Arabidopsis thaliana*. *The Plant Journal*, **5**: 715–725.
- Compendium of Tomato Diseases.** 1991. *APS Press*. Third Printing. USA. 25-26 p.p.
- Daferera, D., Ziogas, B., Polissiou, M.** 2003. The effectiveness of plant essential oils on the growth of *Botrytis cinerea*, *Fusarium* sp. and *Clavibacter michiganensis* subsp. *michiganensis*. *Crop Protection*, **22**: 39-44.
- Dangl, J., Jones J.** 2001. Plant pathogens and integrated defence responses to infection. *Nature*, **411**: 826-833.
- Dann, E., Deverall, B.** 1996. 2,6-dichloro-isonicotinic acid (INA) induces resistance in green beans to the rust pathogen, *Uromyces appendiculatus*, under field conditions. *Australasian Plant Pathology*, **25**: 199–204.
- Data Sheets on Quarantine Pests, *Clavibacter michiganensis* subsp. *michiganensis*.** EPPO quarantine pest, Prepared by CABI and EPPO for the EU under contract 90/399003.
- Durrant, W., Dong, X.** 2004. SYSTEMIC ACQUIRED RESISTANCE. *Annual Review of Phytopathology*, **42**:185–209.
- Friedrich, L., Lawton, K., Ruess, W., Masner, P., Specker, N., Gut Rella, M., Meier, B., Dincher, S., Staub, T., Uknes, S., Métraux, J., Kessmann, H., Ryals, J.** 1996. A benzothiazole derivative induces systemic acquired resistance in tobacco. *The Plant Journal*, **10(1)**: 61-70.

- Gaffney, T., Friedrich, L., Vernooij, B., Negrotto, D., Nye, G., Uknes, S., Ward, E., Kessmann, H., Ryals, J.** 1993. Requirement of salicylic acid for the induction of systemic acquired resistance. *Science*, **261**:754–756.
- Gartemann, K., Kirchener, O., Engemann, J., Gräfen, I., Eichenlaub, R., Burger, A.** 2003. *Clavibacter michiganensis* subsp. *michiganensis*: first steps in the understanding of virulence of a Gram-positive phytopathogenic bacterium. *Journal of Biotechnology*, **106**: 179-191.
- Gitaitis, R., Beaver, R.** 1990. Characterization of Fatty Acid Methyl Ester Content of *Clavibacter michiganensis* subsp. *michiganensis*. *Phytopathology*, **80**: 318-321.
- Gleason, M., Braun, E., Carlton, W., Peterson, R.** 1991. Survival and Dissemination of *Clavibacter michiganensis* subsp. *michiganensis* in Tomatoes. *Phytopathology*, **81(12)**: 1519-1523.
- Gomez-Gomez, L., Boller, T.** 2000. FLS2: An LRR Receptor-like Kinase Involved in the Perception of the Bacterial Elicitor Flagellin in *Arabidopsis*. *Molecular Cell*, **5**: 1003–1011.
- Gorlach, J., Volrath, S., Knauf-Beiter, G., Hengy, G., Beckhove, U., Kogel, K., Oostendorp, M., Staub, D., Ward, E., Kessmann, H., Ryals, J.** 1996. Benzothiazole, a Novel Class of Inducers of Systemic Acquired Resistance, Activates Gene Expression and Disease Resistance in Wheat. *The Plant Cell*, **8(4)**: 629-643.
- Griesbach, E., Eisbein, K., Krämer, I., Müller, J., Völksch, B.** 2000. Induction of resistance to bacterial pathogens in the pathosystem tomato/*Clavibacter michiganensis* subsp. *michiganensis*. I. Characterization of the resistance induction. *Journal of Plant Protection*, **107**: 449-463.
- Hammerschmidt, R.** 2009. Systemic Acquired Resistance. *Advances in Botanical Research*, **51**: 173-222.
- Hammerschmidt, R., Nuckles, M. and Kuc, J.** 1982. Association of enhanced peroxidase activity with induced systemic resistance of cucumber to *Colletotrichum lagenarium*. *Physiological Plant Pathology*, **20**: 73–82.

- Hammond-Kosack, K., Jones, J.** 1997. Plant disease resistance genes. *Annual Review of Plant Physiology and Plant Molecular Biology*, **48**: 575–607.
- Hammond-Kosack, K., Jones, J.** 2000. Responses to Plant Pathogens in “Biochemistry & Molecular Biology of Plants” by B. Buchanan, W. Gruissem, R. Jones. *American Society of Plant Physiologists*, 1102-1156 pp.
- Heath, M.** 1998. Apoptosis, programmed cell death and the hypersensitive response. *European Journal of Plant Pathology*, **104**: 117-124.
- Heath, M.** Hypersensitive response-related death. *Plant Molecular Biology*, **44**: 321-334.
- Herms, S., Seehaus, K., Koehle, H., Conrath, U.** 2002. A strobilurin fungicide enhances the resistance of tobacco against tobacco mosaic virus and *Pseudomonas syringae* pv *tabaci*. *Plant Physiology*, **130**: 120–127.
- Hibberd, A.M., Piperidis, G., Godwin, I.D.** 1996. The hypersensitive reaction to bacterial canker in *Mirabilis jalapa* is simply inherited. *Australasian Plant Pathology*, **25**(1): 64-67.
- Hodge, A.** 2000. Microbial ecology of the arbuscular mycorrhiza. *FEMS Microbiology Ecology*, **32**: 91-96.
- Holten-Andersen, L., Doherty, T., Korsholm, K., Andersen, P.** 2004. Combination of the Cationic Surfactant Dimethyl Dioctadecyl Ammonium Bromide and Synthetic Mycobacterial Cord Factor as an Efficient Adjuvant for Tuberculosis Subunit Vaccines. *Infection and Immunity*, **72**(3): 1608-1617.
- Holub, E.** 2001. The arms race is ancient history in *Arabidopsis*, the wildflower. *Nature Reviews Genetics*, **2**: 516-527.
- Hwang, B., Sunwoo, J., Kim, Y., Kim, B.** 1997. Accumulation of  $\beta$ -1,3-glucanase and chitinase isoforms, and salicylic acid in the DL- $\beta$ -amino-n-butyric acid-induced resistance response of pepper stems to *Phytophthora capsici*. *Physiological and Molecular Plant Pathology*, **51**(5): 305-322.

- Jahr, H., Bahro, R., Burger, A., Ahlemeyer, J., Eichenlaub, R.** 1999. Interactions between *Clavibacter michiganensis* and its host plants. *Environmental Microbiology*, **1(2)**: 113–118.
- Jahr, H., Dreier, J., Meletzus, D., Bahro, R., Eichenlaub, R.** 2000. The Endo-b-1,4-glucanase CelA of *Clavibacter michiganensis* subsp. *michiganensis* Is a Pathogenicity Determinant Required for Induction of Bacterial Wilt of Tomato. *Molecular Plant-Microbe Interactions*, **13(7)**: 703-714.
- Jenns, E., Kuc, J.** 1980. Characteristics of anthracnose resistance induced by localized infection of cucumber with tobacco necrosis virus. *Physiological Plant Pathology*, **17**: 81–91.
- Kabelka, E., Franchino, B., Francis, D.** 2002. Two Loci from *Lycopersicon hirsutum* LA407 Confer Resistance to Strains of *Clavibacter michiganensis* subsp. *michiganensis*. *Phytopathology*, **92(5)**: 504-510.
- Kessmann, H., Staub, T., Hofmann, C., Maetzke, T., Herzog, J., Ward, E., Ukness, S., Ryals, J.** 1994. Induction of systemic acquired resistance in plants by chemicals. *Annual Review of Phytopathology*, **32**: 439-459.
- Korolev, N., Pérez-Artés, E., Bejarano-Alcázar, J., Rodríguez-Jurado, D., Katan, J., Katan, T., Jiménez-Díaz, M.** 2001. Comparative study of genetic diversity and pathogenicity among populations of *Verticillium dahliae* from cotton in Spain and Israel. *European Journal of Plant Pathology*, **107**: 443-456.
- Lawton, K., Friedrich, L., Hunt, M., Weymann, K., Delaney, T., Kessmann, H., Staub, T., Ryals, J.** 1996. Benzothiazole induces disease resistance in *Arabidopsis* by activation of the systemic acquired resistance signal transduction pathway. *The Plant Journal*, **10(1)**: 71-82.
- Leadbeater, A., Staub, T.** 2007. Exploitation of induced resistance: a commercial perspective. In: D. Walters, A. Newton and G. Lyons, (eds.). Induced Resistance for Plant Defence, A Sustainable Approach to Crop Protection. *Blackwell Publishing*, Oxford, UK. 229 pp.
- Leigh, J.A., Coplin, D.L.** 1992. Exopolysaccharides in plant-bacterial interactions. *Annual Review of Microbiology*, **46**: 307–346.

- Lelliot, R.A., Stead, D.E.** 1987. Methods of the diagnosis of bacterial diseases of plants. *Blackwell Scientific Publications*. Oxford. UK.
- Louws, F., Bell, J., Medina-Mora, C., Smart, C., Opgenorth, D., Ishimaru, C., Hausbeck, M., de Bruijn, F., Fulbright, D.** 1998. rep-PCR-mediated genomic fingerprinting: A rapid and effective method to identify *Clavibacter michiganensis*. *Phytopathology*, **88**: 862-868.
- Maldonado A.M, Doerner P, Dixon R.A, Lamb C.J, Cameron R.K.** 2002. A putative lipid transfer protein involved in systemic resistance signalling in *Arabidopsis*. *Nature*, **419**: 399–403
- Mauch, F., Mauch-Mani, B., Boller, T.** 1988. Antifungal hydrolases in pea tissue. II. Inhibition of fungal growth by combinations of chitinase and  $\beta$ -1,3-glucanase. *Plant Physiology*, **88**: 936-942.
- Maxson-Stein, K., He, S.-Y., Hammerschmidt, R., Jones, A.** 2002. Effect of treating apple trees with acibenzolar-S-methyl on fire blight and expression of pathogenesis-related protein genes. *Plant Disease*, **86**: 785–790.
- Meletzus, D., BERPohl, A., Dreier, J., Eichenlaub, R.** 1993. Evidence for plasmid encoded virulence factors in the phytopathogenic bacterium *Clavibacter michiganense* ssp. *michiganense* NCPPB382. *The Journal of Bacteriology*, **175**: 2131-2136.
- Menu-Bouaouiche, L., Vriet, C., Peumans, W., Barre, A., Van Damme, E., Rouge, P.** 2003. A molecular basis for the endo- $\beta$ 1,3-glucanase activity of the thaumatin-like proteins from edible fruits. *Biochimie*, **85**: 123-131.
- Mishina, E., Zeier, J.** 2007. Pathogen-associated molecular pattern recognition rather than development of tissue necrosis contributes to bacterial induction of systemic acquired resistance in *Arabidopsis*. *The Plant Journal*, **50**: 500–513.
- Moran, P., Thompson, G.** 2001. Molecular Responses to Aphid Feeding in *Arabidopsis* in Relation to Plant Defense Pathways. *Plant Physiology*, **125**: 1074-1085.

- Montesano, M., Brader, G., Palva, E.T.** 2003. Pathogen derived elicitors: searching for receptors in plants. *Molecular Plant Pathology*, **4(1)**: 73-79.
- Navarro, L., Zipfel, C., Rowland, O., Keller, I., Robatzek, S., Boller, T., Jones, J.** 2004. The Transcriptional Innate Immune Response to flg22. Interplay and Overlap with Avr Gene-Dependent Defense Responses and Bacterial Pathogenesis. *Plant Physiology*, **135**: 1113-1128.
- Newman, A., Dow, M. Daniels, J.** 2001. Bacterial lipopolysaccharides and plant-pathogen interactions. *European Journal of Plant Pathology*, **107**, 95–102.
- Nürnberg, T.** 1999. Signal perception in plant pathogen defense. *Cellular and Molecular Life Sciences*, **55**: 167–182.
- Nürnberg, T., Kemmerling, B.** 2009. PAMP-Triggered Basal Immunity in Plants. *Advances in Botanical Research*, **51**:1-38.
- Nürnberg, T., Lipka, V.** 2005. Non-host resistance in plants: new insights into an old phenomenon. *Molecular Plant Pathology*, **6(3)**: 335-345.
- Orober, M., Siegrist, J., Buchenauer, H.** 2002. Mechanisms of Phosphate-Induced Disease Resistance in Cucumber. *European Journal of Plant Pathology*, **108(4)**: 345-353.
- Padgett, H., Beachy, R.** 1993. Analysis of a tobacco mosaic virus strain capable of overcoming N-gene-mediated resistance. *The Plant Cell*, **5**: 577-586.
- Pajot, E., Le Corre, D., Silué, D.** 2001. Phytogard<sup>®</sup> and DL-β-amino Butyric acid (BABA) Induce Resistance to Downy Mildew (*Bremia lactucae*) in Lettuce (*Lactuca sativa* L.). *European Journal of Plant Pathology*, **107(9)**: 861-869.
- Penninckx, I., Eggermont, K., Terras, F., Thomma, B., De Samblanx, G., Buchala, A., Metraux, J., Manners, J., Broekaert, W.** 1996. Pathogen-induced systemic activation of a plant defensin gene in Arabidopsis follows a salicylic acid-independent pathway. *Plant Cell*, **8**: 2309–2323.
- Penninckx, I., Thomma, B., Buchala, A., Metraux, J., Broekaert, W.** 1998. Concomitant activation of jasmonate and ethylene response pathways is required for induction of a plant defensin gene in Arabidopsis. *Plant Cell*, **10**: 2103–2113.



- Pieterse, C., Leon-Reyes, A., van der Ent, S., van Wees, S.** 2009. Networking by small-molecule hormones in plant immunity. *Nature Chemical Biology*, **5**: 308-316.
- Ponstein, A., Bles-Vloemans, S., Sela-Buurlage, M., van den Elzen, P., Melchers, L., Cornelissen, B.** 1994. A novel pathogen- and wound-inducible tobacco protein with antifungal activity. *Plant Physiology*, **104**: 109-118.
- Reglinski, T., Dann, E. Deverall, B.** 2007. Integration of induced resistance in crop production. *In*: D. Walters, A. Newton and G. Lyons, (eds.). Induced Resistance for Plant Defence, A Sustainable Approach to Crop Protection. *Blackwell Publishing*, Oxford, UK. 201 pp.
- Reuveni, M., Reuveni R.** 1998. Foliar applications of mono-potassium phosphate fertilizer inhibit powdery mildew development in nectarine trees. *Canadian Journal of Plant Pathology*, **20**: 253-258.
- Reuveni, R., Dor, G., Raviv, M., Reuveni, M., Tuzun, S.** 2000. Systemic resistance against *Shaerotheca fuliginea* in cucumber plants exposed to phosphate in hydroponics system, and its control by foliar spray mono-potassium phosphate. *Crop Protection*, **19**: 355-361.
- Ryals, J., Neuenschwander, U., Willits, M., Molina, A., Steiner, H., Hunt, M.** 1996. Systemic Acquired Resistance. *The Plant Cell*, **8**: 1809-1819.
- Ryals, J., Ukness, S., Ward, E.** 1994. Systemic Acquired Resistance. *Plant Pathology*, **104**: 1109-1112.
- Schwessinger, C., Zipfel, C.** 2008. News from the frontline: recent insights into PAMP-triggered immunity in plants. *Current Opinion in Plant Biology*. **11**: 389–395.
- Shulaev, V., León, J., Raskin, I.** 1995. Is Salicylic Acid a Translocated Signal of Acquired Systemic Resistance in Tobacco?. *The Plant Cell*, **7**: 1691-1701.
- Smith, A., Hammerschmidt, R., Fulbright, W.** 1991. Rapid induction of systemic resistance in cucumber by *Pseudomonas syringae* pv. *syringae*. *Physiological and Molecular Plant Pathology*, **38**: 223–235.

- Stackebrandt, E., Rainey, F., Ward-Rainey, N.** 1997. Proposal for a New Hierarchic Classification System, *Actinobacteria* classis nov. *International Journal of Systemic Bacteriology*, **47(2)**: 479-491.
- Thordal-Christensen, H.** 2003. Fresh insights into processes of nonhost resistance. *Current Opinion in Plant Biology*, **6**: 351–357.
- Ton, J., Mauch-Mani, B.** 2004. B-amino-butyric acid induced resistance against necrotrophic pathogens is based on ABA-dependent priming for callose. *The Plant Journal*, **38**: 119-130.
- Tsiantos, I.** 1987. Transmission of bacterium *Corynebacterium michiganense* pv. *michiganense* by seeds. *Journal of Phytopathology*, **119**: 142-146.
- Uknes, S., Mauch-Mani, B., Moyer, M., Potter, S., Williams, S., Dincher, S., Chandler, D., Slusarenko, A., Ward, E. Ryals, J.** 1992. *Acquired Resistance in Arabidopsis*. *The Plant Cell*, **4**: 645–656.
- Utkhede, R., Koch, C.** 2004. Biological treatments to control bacterial canker of greenhouse tomatoes. *BioControl*, **49**: 305–313.
- van Loon, L., Antoniw, J.** 1982. Comparison of the effects of salicylic acid and ethephon with virus induced hypersensitivity and acquired resistance in tobacco. *Netherlands Journal of Plant Pathology*, **88**: 237–256.
- van Loon, L., Bakker, P., Pieterse, C.** 1998. Systemic Resistance Induced by Rhizosphere bacteria. *Annual Review of Phytopathology*, **36**: 453-483.
- van Loon, L., Geraats, B., Linthorst, H.** 2006. Ethylene as a modulator of disease resistance in plants. *Trends in Plant Science*, **11(4)**: 184-191.
- van Loon, L., van Strien, E.** 1999. The families of pathogenesis-related proteins, their activities, and comparative analysis of PR-1 type proteins. *Physiological and Molecular Plant Pathology*, **55**: 85-97.
- Ward, E., Uknes, S., Williams, S., Dincher, S., Wiederhold, D., Alexander, D., Ahl Goy, P., Metraux, J.-P., Ryals, J.** 1991. Coordinate gene activity in response to agents that induce systemic acquired resistance. *The Plant Cell*, **3**: 1085–1094.

- Yasuda, M., Nakashita, H., Yoshida, S.** 2004. Tiadinil, a novel class of activator of systemic acquired resistance, induces defense gene expression and disease resistance in tobacco. *Journal of Pesticide Science*, **29**: 46–49.
- Γεωργόπουλος, Σ.Γ., Ζιώγας Β.Ν.** 1992. Αρχές και μέθοδοι καταπολέμησης των ασθενειών των φυτών. *Αθήνα*. σελ 221-234.
- Ζιώγας, Β., Μαρκόγλου, Α.** 2007. Γεωργική Φαρμακολογία. Βιοχημεία, Φυσιολογία, Μηχανισμοί Δράσης και Χρήσεις των Φυτοπροστατευτικών Προϊόντων. *Αθήνα*. σελ 229-232.
- Θαναουλόπουλος, Κ.** 1996. Ασθένειες φυτών προκαρυωτικής αιτιολογίας. Πανεπιστημιακές Παραδόσεις. *Εκδόσεις Ζήτη*. Θεσσαλονίκη. σελ. 48-50.
- Κυριακοπούλου, Π. Η., Παπλωματάς, Ε. Ι.** 2004. Σημειώσεις διαγνωστικής των φυτικών ασθενειών. Γεωπονικό Πανεπιστήμιο Αθηνών. Εργαστήριο Φυτοπαθολογίας. *Αθήνα*. σελ. 21-40.
- Παναγόπουλος, Γ.Χ.** 1992. Ασθένειες της τομάτας. *Αθήνα*. σελ. 38-41.
- Τζάμος, Ε.Κ.** 2004. Φυτοπαθολογία. *Εκδόσεις Σταμούλη*. Αθήνα. σελ. 399-421.
- <[http://www.bitkisagligi.net/Domates/Clavibacter\\_michiganensis\\_michiganensis.jpg](http://www.bitkisagligi.net/Domates/Clavibacter_michiganensis_michiganensis.jpg)>  
( 16 December 2010).
- < <http://www.forestryimages.org/images/768x512/5368890.jpg> > ( 13 March 2010).
- < <http://www.uniprot.org/taxonomy/85023> > ( 13 March 2010).
- < <http://www.chemicalland21.com/arokorhi/lifescience/phar/CETRIMIDE.htm>> (12 February 2011).
- <[http://photos.eppo.org/albums/pests/Bacteria/Clavibacter\\_m\\_michiganensis/\\_CORB MI\\_09.jpg](http://photos.eppo.org/albums/pests/Bacteria/Clavibacter_m_michiganensis/_CORB_MI_09.jpg) > (13 March 2010).
- <[http://www.eppo.org/QUARANTINE/bacteria/Clavibacter\\_m\\_michiganensis/CORB MI\\_02.jpg](http://www.eppo.org/QUARANTINE/bacteria/Clavibacter_m_michiganensis/CORB_MI_02.jpg) > (12 March 2010).
- <[http://www.ncbi.nlm.nih.gov/Taxonomy/Browser/wwwtax.cgi?lin=s&p=has\\_linkout &id=443906](http://www.ncbi.nlm.nih.gov/Taxonomy/Browser/wwwtax.cgi?lin=s&p=has_linkout&id=443906) > (15 January 2011).