



ΕΛΛΗΝΙΚΗ ΔΗΜΟΚΡΑΤΙΑ

Εθνικό και Καποδιστριακό Πανεπιστήμιο Αθηνών

ΣΧΟΛΗ ΘΕΤΙΚΩΝ ΕΠΙΣΤΗΜΩΝ

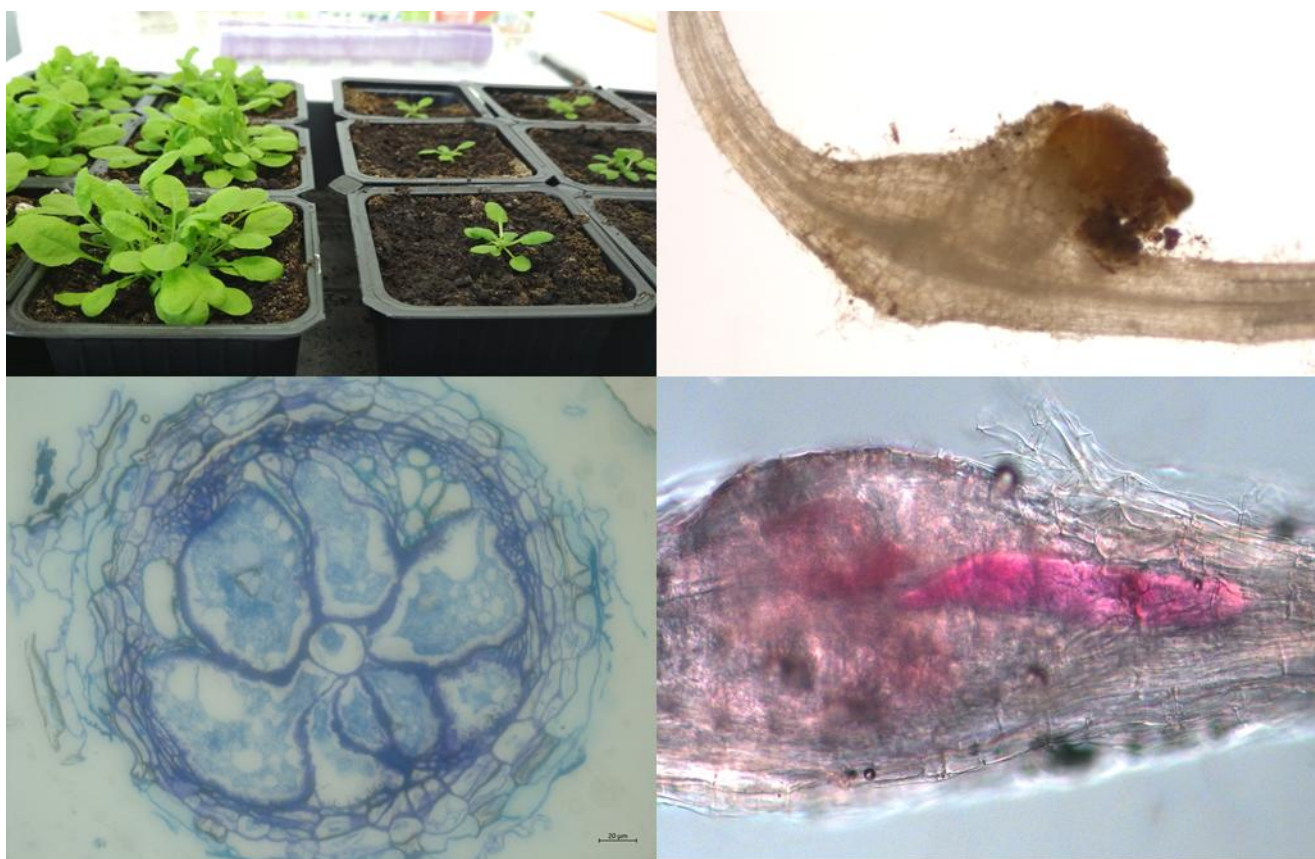
ΤΜΗΜΑ ΒΙΟΛΟΓΙΑΣ - ΤΟΜΕΑΣ ΒΟΤΑΝΙΚΗΣ

Μεταπτυχιακό Πρόγραμμα Σπουδών

ΜΙΚΡΟΒΙΑΚΗ ΒΙΟΤΕΧΝΟΛΟΓΙΑ

Δ Ι Π Λ Ω Μ Α Τ Ι Κ Η Ε Ρ Γ Α Σ Ι Α

Κυτταρικές διαφοροποιήσεις ξενιστών από κομβονηματώδεις και Βιοέλεγχος



ΜΕΪΝΤΑΝΗ ΧΡΙΣΤΙΝΑ-ANNA

ΕΠΙΒΛΕΠΩΝ: Ιωάννης Δημοσθένης-Σ.Αδαμάκης, Επ. Καθηγητής

ΑΘΗΝΑ 2019



ΕΛΛΗΝΙΚΗ ΔΗΜΟΚΡΑΤΙΑ

Εθνικό και Καποδιστριακό Πανεπιστήμιο Αθηνών

ΣΧΟΛΗ ΘΕΤΙΚΩΝ ΕΠΙΣΤΗΜΩΝ

ΤΜΗΜΑ ΒΙΟΛΟΓΙΑΣ

ΤΟΜΕΑΣ ΒΟΤΑΝΙΚΗΣ

Μεταπτυχιακό Πρόγραμμα Σπουδών

ΜΙΚΡΟΒΙΑΚΗ ΒΙΟΤΕΧΝΟΛΟΓΙΑ

Δ Ι Π Λ Ω Μ Α Τ Ι Κ Η Ε Ρ Γ Α Σ Ι Α

**Κυτταρικές διαφοροποιήσεις ξενιστών από κομβονηματοδείς και
Βιοέλεγχος**

ΜΕΪΝΤΑΝΗ ΧΡΙΣΤΙΝΑ-ANNA

ΕΠΙΒΛΕΠΩΝ

Ιωάννης Δημοσθένης-Σ.Αδαμάκης, Επ. Καθηγητής

ΑΘΗΝΑ 2019

Εξώφυλλο: Φυτά-ξενιστές *A.thaliana* L. Col-0 & *fra2* (πάνω αριστερά). Κόμβος με νηματώδη *M.incognita* και ωόσακκο με αυγά (πάνω δεξιά). Τομή κόμβου με χρώση τολουιδίνης (κάτω αριστερά). Κόμβος με νηματώδεις με χρώση οξικής φουξίνης (κάτω δεξιά).

Πρόλογος

Η παρούσα διπλωματική εργασία πραγματοποιήθηκε το ακαδημαϊκό έτος 2019-2020 στα πλαίσια της συνεργασίας του Εθνικού Καποδιστριακού Πανεπιστημίου Αθηνών και του Μπενάκειου Φυτοπαθολογικού Ινστιτούτου, στα εργαστήρια του Τομέα Βοτανικής και του Εργαστηρίου Βιολογικού Ελέγχου Γεωργικών Φαρμάκων αντίστοιχα. Θα ήθελα να ευχαριστήσω θερμά τους υπεύθυνους καθηγητές και ερευνητές Δρ. Ιωάννη Δ.Σ.Αδαμάκη και Δρα Ελένη Γιαννούτσου (από το ΕΚΠΑ) καθώς και τη Δρα Νικολέττα Ντάλλη (από το ΜΦΙ) για την καθοδήγηση και την αμέριστη βοήθεια που μου παρείχαν καθόλη τη διάρκεια της διπλωματικής εργασίας. Ο θαυμάσιος χαρακτήρας και η υπέρμετρη υπομονή αυτών των ανθρώπων έκαναν την πειραματική πορεία της διπλωματικής εργασίας μια άκρως ενδιαφέρουσα και ευχάριστη διαδικασία. Η αμέριστη βοήθεια και η ηθική υποστήριξη που μου προσέφεραν όποτε χρειαζοταν, με εφοδίασαν με χρήσιμες γνώσεις και μου άφησαν υπέροχες αναμνήσεις για τον τρόπο με τον οποίο πρέπει να λειτουργεί ένα πρότυπο εργαστήριο και να συνεργάζονται τα μέλη που το στελεχώνουν.

Επίσης, θα ήθελα να ευχαριστήσω τους καθηγητές του ΜΠΣ «Μικροβιακή Βιοτεχνολογία», Δρα Αμαλία Κ.Καραγκούνη, Δρ. Δημήτρη Χατζηνικολάου και Δρ. Γ.Διαλλινά που με δέχτηκαν ως μεταπτυχιακή φοιτήτρια κι μου έδωσαν την ευκαιρία να παρακολουθήσω αυτό το άκρως ενδιαφέρον και πολύπλευρο ΜΠΣ. Ιδιαίτερα θα ήθελα να σταθώ στην ομότιμη καθηγήτρια Δρα Αμαλία Κ.Καραγκούνη και τους επιστημονικούς συνεργάτες της και μέλη ΕΔΙΠ του ΕΚΠΑ, Δρ. Στάθη Κατσίφα και Δρ. Αλέξανδρο Σαββίδη, που μου πρότειναν το παρόν θέμα ως διπλωματική εργασία. Στα εργαστηριακά πειράματα είχα την χαρά και τιμή να συνεργαστώ με τις ερευνήτριες Δρα Μαρία Σαμαρά (από το ΜΦΙ) και την Δρα Πηνελόπη Σωτηρίου (μέλος ΕΔΙΠ του ΕΚΠΑ) που με βοήθησαν να κατανοήσω τις πειραματικές διαδικασίες, να εξοικειωθώ με τους εργαστηριακούς χώρους και να χειριστώ τον εξοπλισμό τους. Σημαντική συμβολή στο πειραματικό μέρος που σχετίζεται με τον Βιοέλεγχο είχε η προπτυχιακή φοιτήτρια Εύα Λαμπροπούλου, η οποία διατηρούσε βακτηριακές καλλιέργειες στρεπτομυκήτων στο πλαίσιο της δικής της πτυχιακής εργασίας και ευγενικά με προμήθευε όποτε χρειαζόμουν με στελέχη στρεπτομυκήτων για τα δικά μου πειράματα. Οι κομβονηματώδεις που χρησιμοποιήθηκαν ήταν ευγενική χορηγία του Εργαστηρίου Βιολογικού Ελέγχου Γεωργικών Φαρμάκων του ΜΦΙ, με υπεύθυνη την Δρα Νικολέττα Ντάλλη.

Τέλος θα ήθελα να ευχαριστήσω όλους τους προπτυχιακούς και μεταπτυχιακούς συμφοιτητές από το ΜΠΣ αλλά και το Εργαστήριο Βοτανικής για τη συνεργασία και την ευχάριστη ατμόσφαιρα. Ειδικά ευχαριστώ τους δεύτερους για το υπέροχο κλίμα που επικρατούσε στους χώρους του εργαστηρίου αλλά και στα δύο επιστημονικά συνέδρια που συμμετείχαμε και είχαμε την ευκαιρία να γνωριστούμε καλύτερα και να διασκεδάσουμε παρέα. Φυσικά τίποτα απ' όλα αυτά δεν θα ήταν εφικτό χωρίς την βοήθεια και την κατανόηση και τη στήριξη της οικογένειάς μου. Τους αγαπώ και τους ευχαριστώ από τα βάθη της καρδιάς μου.

Περιεχόμενα

	Σελίδες
1 Εισαγωγή	7
1.1 Το φυτό <i>Arabidopsis</i> και η συμβολή του σε μελέτες σύστασης του κυτταρικού τοιχώματος	7
1.1.1 <i>Arabidopsisthaliana</i> L. πρότυπο φυτικό υλικό	7
1.1.2 Κατανίνη: πρωτεΐνη που ελέγχει τον κυτταροσκελετό και το κυτταρικό τοίχωμα	10
1.1.3 Περιγραφή του μεταλλαγμένου στελέχους <i>fra2</i> του <i>Arabidopsis thaliana</i> L.	13
1.1.4 Δευτερεύοντα στοιχεία του κυτταρικού τοιχώματος	16
1.1.4.1 Ημικυτταρίνες	17
1.1.4.2 Πηκτίνες	18
1.1.4.3 Γλυκοπρωτεΐνες	19
1.2 Ο ρόλος των κομβονηματωδών στην μείωση της παραγωγής πολλών καλλιεργούμενων φυτών	21
1.2.1 Ταξινόμηση κομβονηματωδών σκωλήκων	21
1.2.2 Περιγραφή και κύκλος ζωής των κομβονηματωδών σκωλήκων	22
1.2.3 Σχηματισμός μεγακυττάρων στις θέσεις θρέψης του κομβονηματώδους	26
1.3 Οι στρεπτομύκητες ως παράγοντες βιοελέγχου	28
1.3.1 Οι στρεπτομύκητες και ο ρόλος τους στην προώθηση της ανάπτυξης των φυτών	30
1.3.2 Οι στρεπτομύκητες και ο ρόλος τους στην αποφυγή της μόλυνσης από φυτοπαθογόνους οργανισμούς	30
2 Σκοπός της Διπλωματικής Εργασίας	32
3 Υλικά και Μέθοδοι	33
3.1 Εκτροφή κομβονηματωδών <i>Meloidogyneincognita</i> σε φυτά <i>Solanum lycopersicum</i> L.και μόλυνση φυτών <i>Arabidopsisthaliana</i> L.	33
3.1.1 Καλλιέργεια φυτών <i>Solanumlycopersicum</i> L.και <i>Arabidopsis thaliana</i> L.	34
3.1.2 Εκτροφή του κομβονηματώδους <i>Meloidogyneincognita</i>	35
3.1.2.1 Συντήρηση πληθυσμού του νηματώδους <i>Meloidogyne incognita</i> σε φυτά <i>Solanumlycopersicum</i> L.	35
3.1.2.2 Συλλογή μολυσματικού σταδίου J2 του είδους <i>Meloidogyne incognita</i> και μόλυνση φυτών <i>Arabidopsisthaliana</i> L.	35

3.2	Τεχνικές προσδιορισμού σύστασης του κυτταρικού τοιχώματος μεγακυττάρων στο φυτό <i>Arabidopsisthaliana</i> L.	37
3.2.1	Συλλογή κόμβων από τις ρίζες μολυσμένων φυτών <i>Arabidopsis thaliana</i> L.	37
3.2.2	Στερέωση των κόμβων μολυσμένων φυτών <i>Arabidopsisthaliana</i> L.	38
3.2.3	Σταδιακή αφυδάτωση κόμβων του φυτού <i>Arabidopsisthaliana</i> L.	38
3.2.4	Εμποτισμός κόμβων του φυτού <i>Arabidopsisthaliana</i> L. σε ρητίνη LRW	38
3.2.5	Εγκάρσια τμήση κόμβων του φυτού <i>Arabidopsisthaliana</i> L. σε μικροτόμο	39
3.2.6	Ανοσοσήμανση τοιχωματικών επιτόπων μεγακυττάρων στο φυτό <i>Arabidopsisthaliana</i> L.	40
3.2.6.1	Χρώση τολουιδίνης, κυανό της ανιλίνης και CalcofluorWhite τομών κόμβων του φυτού <i>Arabidopsisthaliana</i> L.	40
3.2.6.2	Ανοσοσήμανση τομών κόμβων του φυτού <i>Arabidopsisthaliana</i> L. με αντισώματα που ανιχνεύουν επιτόπους του κυτταρικού τοιχώματος	40
3.2.7	Παρατήρηση τομών κόμβων του φυτού <i>Arabidopsisthaliana</i> L. σε μικροσκόπιο φθορισμού	43
3.2.8	Επεξεργασία εικόνας τομών κόμβων του φυτού <i>Arabidopsisthaliana</i> L.	43
3.3	Πειραματική διαδικασία για την εκτίμηση της επίδρασης στελεχών στρεπτομυκήτων στην ανάπτυξη φυτών <i>Arabidopsisthaliana</i> L. και του βαθμού μόλυνσης αυτών από κομβονηματώδεις <i>Meloidogyneincognita</i>	43
3.3.1	Εμβολιασμός στελεχών <i>Arabidopsisthaliana</i> L. Col-0 και <i>fra2</i> με εναιώρημα σπορίων <i>Streptomycescolombiensis</i> ATHUBA 438 και <i>Streptomycesmonomycini</i> ATHUBA220	44
3.3.2	Εκτίμηση παραμέτρων ανάπτυξης των φυτών <i>Arabidopsisthaliana</i> L. Col-0 και <i>fra2</i>	46
3.3.3	Εκτίμηση βαθμού μόλυνσης των φυτών <i>Arabidopsisthaliana</i> L. Col-0 και <i>fra2</i> από κομβονηματώδεις <i>M.incognita</i>	47
3.3.3.1	Χρώση κομβονηματωδών <i>Meloidogyne incognita</i> με οξική φουξίνη στις ρίζες μολυσμένων φυτών <i>Arabidopsis thaliana</i> L. Col-0 και <i>fra2</i>	47
3.3.3.2	Στερεοσκοπική καταμέτρηση κομβονηματωδών στις ρίζες μολυσμένων φυτών <i>Arabidopsisthaliana</i> L. Col-0 και <i>fra2</i> από <i>Meloidogyneincognita</i>	48
3.3.4	Στατιστική επεξεργασία αποτελεσμάτων	48
4	Αποτελέσματα	50

4.1	Συγκριτική μελέτη της σύστασης του κυτταρικού τοιχώματος σε τομές φυτών <i>Arabidopsis thaliana</i> L. Col-0 και <i>fra2</i>	50
4.1.1	Ημικυτταρίνες	56
4.1.2	Πηκτίνες	57
4.1.3	Γλυκοπρωτεΐνες	58
4.2	Έλεγχος μολυσματικότητας κομβονηματωδών <i>Meloidogyne incognita</i> σε φυτά <i>Arabidopsis thaliana</i> L. Col-0 και <i>fra2</i>	69
4.2.1	Εκτίμηση ευαισθησίας του μεταλλαγμένου στελέχους <i>Arabidopsis thaliana</i> L. <i>fra2</i>	69
4.2.2	Μελέτη της επίδρασης των στελεχών <i>Streptomyces colombiensis</i> ATHUBA 438 και <i>Streptomyces monomycini</i> ATHUBA 220 στα φυτά <i>Arabidopsis thaliana</i> L. Col-0 και <i>fra2</i>	70
4.2.2.1	Μελέτη της επίδρασης των στελεχών <i>Streptomyces colombiensis</i> ATHUBA 438 και <i>Streptomyces monomycini</i> ATHUBA 220 στην ανάπτυξη του βλαστού φυτών <i>Arabidopsis thaliana</i> L. Col-0 και <i>fra2</i>	70
4.2.2.2	Μελέτη της επίδρασης των στελεχών <i>Streptomyces colombiensis</i> ATHUBA 438 και <i>Streptomyces monomycini</i> ATHUBA 220 στο βαθμό μόλυνσης φυτών <i>Arabidopsis thaliana</i> L. Col-0 και <i>fra2</i>	80
5	Συζήτηση και Συμπεράσματα	82
5.1	Η σύσταση του κυτταρικού τοιχώματος διαφέρει στις ρίζες μολυσμένων από κομβονηματώδεις <i>Meloidogyne incognita</i> και μη μολυσμένων φυτών <i>Arabidopsis thaliana</i> L. Col-0 και <i>fra2</i>	83
5.2	Το <i>Arabidopsis thaliana</i> L. <i>fra2</i> παρουσιάζει αυξημένη ευαισθησία στη μόλυνση από <i>Meloidogyne incognita</i>	85
5.3	Τα στελέχη <i>Streptomyces colombiensis</i> ATHUBA 438 και <i>Streptomyces monomycini</i> ATHUBA 220 προωθούν την ανάπτυξη του φυτού <i>Arabidopsis thaliana</i> L. και μειώνουν το βαθμό προσβολής από κομβονηματώδεις <i>Meloidogyne incognita</i>	86
6	Γενικά Συμπεράσματα	89
	Παράρτημα	90
	Περίληψη	91
	Abstract	92
7	Βιβλιογραφία	93

1 Εισαγωγή

1.1 Το φυτό *Arabidopsis* και η συμβολή του σε μελέτες σύστασης του κυτταρικού τοιχώματος

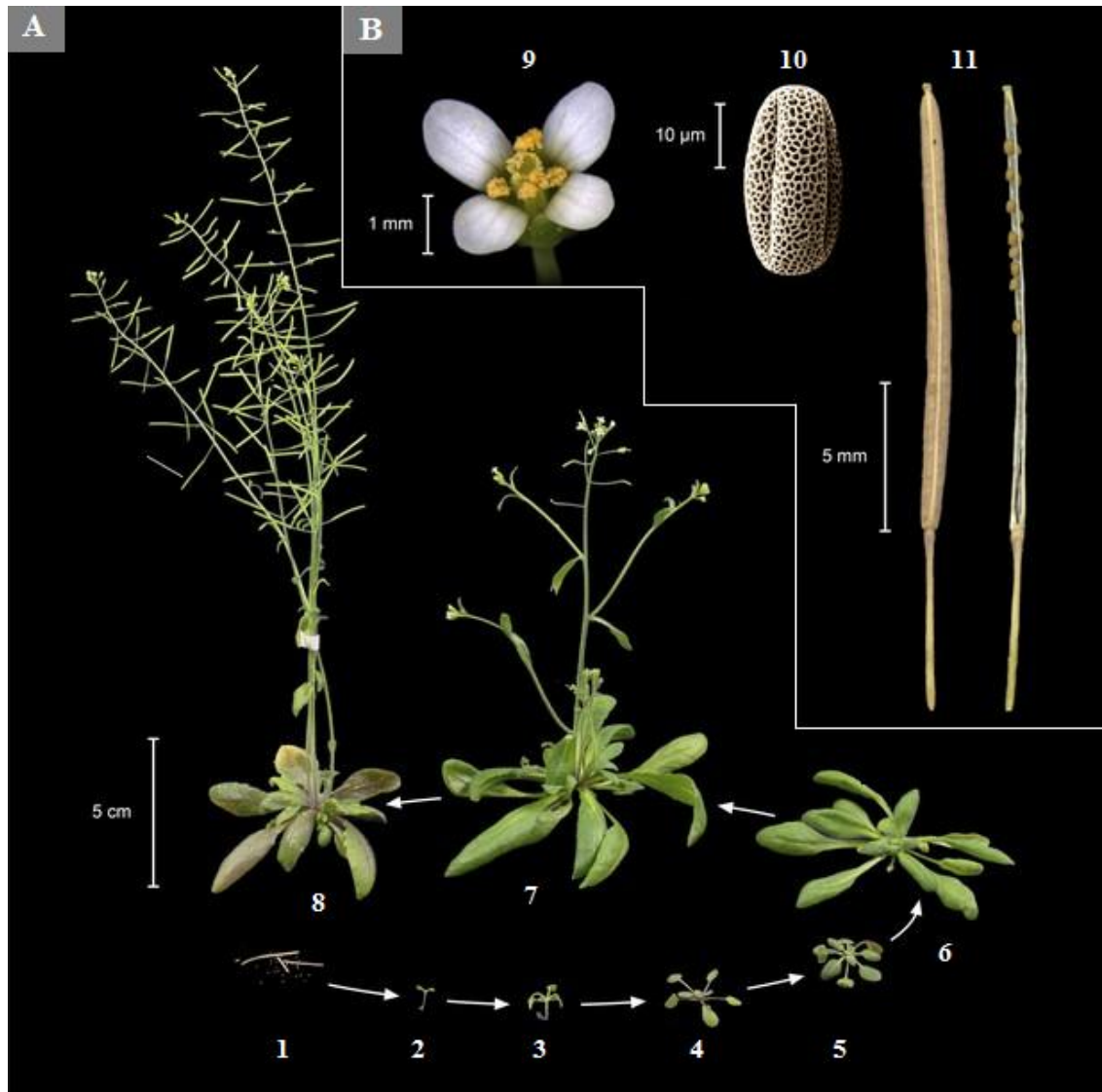
1.1.1 *Arabidopsisthaliana*L. πρότυπο φυτικό υλικό

Το φυτό *Arabidopsisthaliana*L. είναι ένα μικρού μεγέθους δικοτυλήδονο φυτό (ξιζάνιο) που ανήκει στην οικογένεια Brassicaceae των Αγγειοσπέρμων. Παρά την έλλειψη οικονομικού ενδιαφέροντος, το *Arabidopsisthaliana*L. παρουσιάζει πολλά πλεονεκτήματα που το καθιστούν τον ευρύτερα χρησιμοποιούμενο φυτικό οργανισμό-μοντέλο στα χέρια της επιστημονικής κοινότητας. Η μελέτη του βοηθά στην κατανόηση των μηχανισμών που διέπουν την ανάπτυξη και εξέλιξη των φυτών, αλλά και εκείνων που καθορίζουν τις αλληλεπιδράσεις τους με βιοτικούς και αβιοτικούς παράγοντες του περιβάλλοντος. Με αυτό τον τρόπο συνεισφέρει στην βελτίωση της αγροτικής ανάπτυξης και την διατήρηση των φυσικών οικοσυστημάτων.

Το *Arabidopsisthaliana*L. είναι ο πρώτος φυτικός οργανισμός του οποίου το γονιδίωμα αλληλουχήθηκε (*Arabidopsis*GenomeInitiative2000) και σε συνδυασμό με τις σύγχρονες μεθόδους μεταλλαξιγένεσης και μετασχηματισμού οδήγησε στη δημιουργία ποικίλων βάσεων δεδομένων και τραπεζών γενετικού υλικού που προσφέρουν τη δυνατότητα μελέτης πολλών γονιδίων του. Μεταξύ των πιο συνηθισμένων οικοτύπων που χρησιμοποιούνται ως μάρτυρες (άγριος τύπος) σε τέτοιες μελέτες είναι το *Columbia-0* (Col-0).

Ο κύκλος ζωής του *Arabidopsisthaliana*L. (Col-0) διαρκεί 8-10 εβδομάδες (Εικόνα 1.1.A). Κατά τη διάρκεια των πέντε πρώτων εβδομάδων εκπύσσονται τα φύλλα σε διάταξη ροζέτας (βλαστητική φάση) (Εικόνα 1.1.A(1-6)). Ακολουθεί κατακόρυφη αύξηση του βλαστού (αναπαραγωγική φάση), το ύψος του οποίου δεν ξεπερνά συνήθως τα 40cm (Εικόνα 1.1.A(7-8)). Το ακραίο μερίστωμα του βλαστού μετατρέπεται σταδιακά σε μερίστωμα ταξιανθίας. Παράλληλα με την επιμήκυνση του βλαστού, από το μερίστωμα ταξιανθίας εμφανίζονται καταβολές ανθικών μεριστωμάτων που σχηματίζουν απευθείας άνθη (πρωτογενής ταξιανθία). Επιπλέον σχηματίζονται καταβολές φύλλων, το μασχαλιαίο μερίστωμα των οποίων μετατρέπεται είτε σε ανθικό μερίστωμα ή δευτερογενές μερίστωμα ταξιανθίας που οδηγεί στο σχηματισμό πλάγιων ανθοφόρων κλάδων (δευτερογενής ταξιανθία) (Εικόνα 1.1.A(7)). Το άνθος αποτελείται από τέσσερα σπονδυλώματα ανθικών οργάνων με ακτινωτή συμμετρία (Εικόνα 1.1.B). Διαθέτει στήμονες και καρπόφυλλα κι έτσι δίνει τη δυνατότητα τεχνητής γονιμοποίησης και αυτογονιμοποίησης. Ο καρπός ανήκει στην κατηγορία των διαρρηκτών καρπών και ονομάζεται κέρας (*siliqua*). Κάθε κέρας φέρει 20-30 σπέρματα προσαρτημένα σε μεμβρανώδες διάφραγμα, ενώ από ένα φυτό μπορούν να συλλεχθούν έως και 10.000 σπέρματα

(Εικόνα 1.1.B). Τα σπέρματα διατηρούνται σε χαμηλή θερμοκρασία για μεγάλο χρονικό διάστημα μετά τη συγκομιδή τους.



Εικόνα 1.1.Κύκλος ζωής και μορφολογία του *Arabidopsis thaliana* L (Col-0).

A) Απεικόνιση των αναπτυξιακών σταδίων του φυτού *Arabidopsis thaliana* L (Col-0) σε διάστημα οκτώ εβδομάδων, **(1-6)** 39 ημέρες, **(6-8)** 14 ημέρες, **(1)** φύτευση σπερμάτων, **(2-6)** βλαστητική φάση, σχηματισμός ροζέτας, **(7)** αναπαραγωγική φάση, σχηματισμός πρωτογενούς και δευτερογενών ταξιανθιών, οι πλάγιοι κλάδοι σχηματίζονται από μεριστώματα στις μασχάλες των φύλλων, **(8)** ώριμο φυτό με καρπούς. **B)** Αναπαραγωγικά στοιχεία του φυτού: **(9)** άνθος, **(10)** γυρεόκοκκος σε μεγάλη μεγέθυνση, **(11)** ώριμος κλειστός καρπός (κέρα), διαρρηγμένο κέρα με σπέρματα προσαρτημένα σε μεβρανώδες διάφραγμα. Τροποποιημένη εικόνα από: Krämeretal., 2015

Το ριζικό σύστημα του *Arabidopsis thaliana* L., όπως και πολλών άλλων δικοτυλήδων φυτών, αποτελείται από μία κύρια ρίζα που αναπτύσσεται κατακόρυφα προς τα κάτω (πρωτογενής ρίζα). Από την πρωτογενή ρίζα εκτείνονται

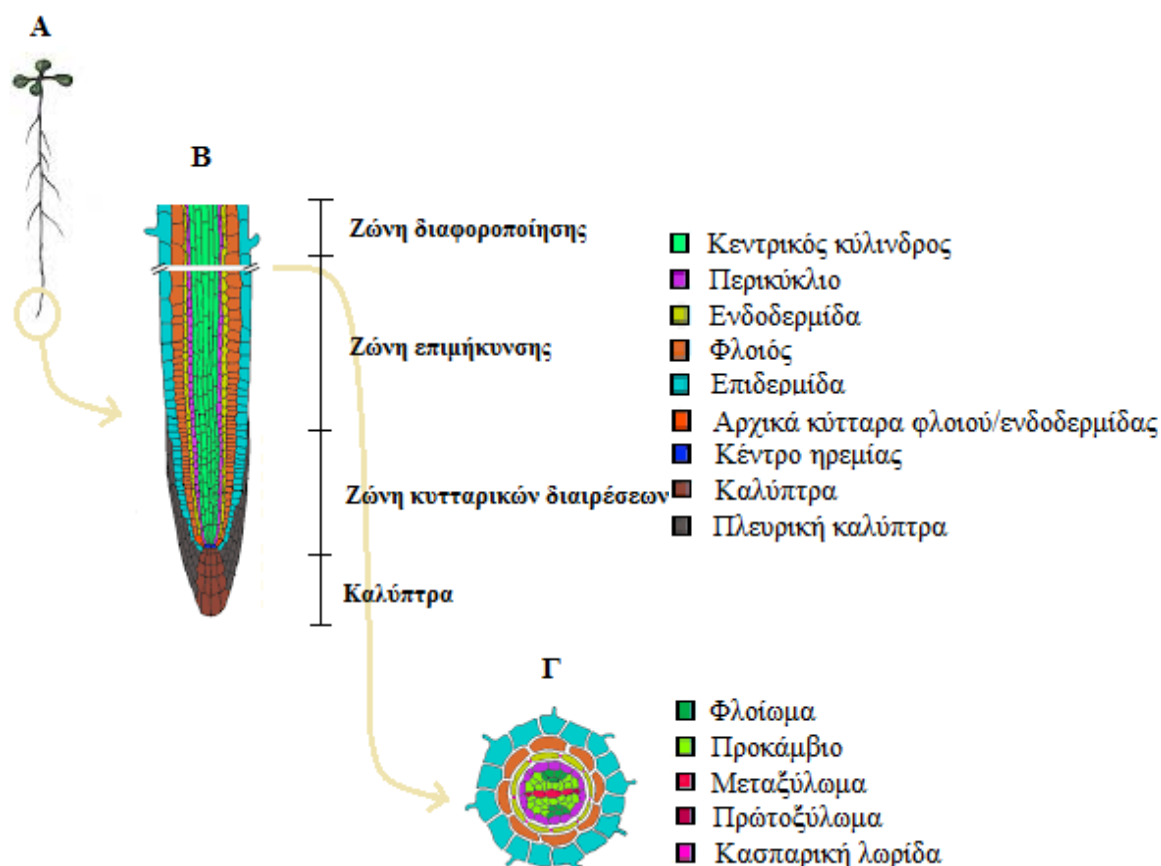
πολυάριθμες πλάγιες ρίζες (δευτερογενείς ρίζες) δημιουργώντας τελικά ένα εκτεταμένο ριζικό σύστημα πασσαλώδους τύπου (Εικόνα 1.2.A).

Πρωτογενής ρίζα: Η βαρυτροπική αύξηση της ρίζας πραγματοποιείται από τη δραστηριότητα ενός ακραίου μεριστώματος που προστατεύεται από την καλύπτρα (Εικόνα 1.2.B). Πάνω από την μεριστωματική ζώνη εκτείνεται η ζώνη επιμήκυνσης όπου τα κύτταρα αυξάνουν παράλληλα προς τον επιμήκη άξονα της ρίζας και διαφοροποιούνται διαμορφώνοντας τον κεντρικό κύλινδρο (προκάμβιο), την ενδοδερμίδα, το περικύκλιο, το φλοιό και την επιδερμίδα. Στον κεντρικό κύλινδρο σχηματίζεται αρχικά το πρωτοφλοιώμα και στη συνέχεια το πρωτοξύλωμα από δεσμίδες που προέρχονται από το προκαμβιο. Η στήλη του κεντρικού κυλίνδρου στο *Arabidopsisthaliana*L. είναι διαρκική (δύο πόλοι πρωτοξυλώματος και δύο πόλοι πρωτοφλοιώματος). Στην πορεία σχηματίζονται άλλα τρία αγγεία πρωτοξυλώματος ανάμεσα στους δύο πόλους διαμορφώνοντας μια ευθεία σειρά πέντε στοιχείων ξυλώματος που διαιρεί τη στήλη σε δύο ημικυκλικές περιοχές (Εικόνα 1.2.Γ). Αργότερα παρατηρούνται και μεγαλύτερης διαμέτρου στοιχεία του ξυλώματος στις πιο κεντρικές θέσεις της στήλης που εφάπτονται μεταξύ τους και συνιστούν το μεταξύλωμα. Ομοίως σχηματίζεται και το μεταφλοιώμα που περιλαμβάνει τα αγγεία των ηθμοσωλήνων, συνοδά και άλλα παρεγχυματικά κύτταρα. Ακολουθεί η ζώνη διαφοροποίησης των ριζικών τριχιδίων, ενώ σε ανώτερο επίπεδο ξεκινά ο σχηματισμός των πλάγιων ριζών από τη δραστηριότητα των κυττάρων του περικυκλίου.

Δευτερογενής ρίζα: Κατά τη δευτερογενή αύξηση της ρίζας η επιδερμίδα, ο φλοιός και η ενδοδερμίδα καταστρέφονται λόγω της αυξανόμενης πίεσης από την διεύρυνση του κεντρικού κυλίνδρου, ενώ από το περικύκλιο δημιουργείται το φελλογόνιο, που αποτελεί πλέον το προστατευτικό κάλυμμα της ρίζας. Το δευτερογενές ξύλωμα και φλοιώμα που σχηματίζονται από το αγγειώδες κάμβιο, είναι παρόμοια με τα αντίστοιχα στοιχεία του αγωγού ιστού του βλαστού και υποστηρίζουν τη μεταφορά νερού προς το υπέργειο τμήμα του φυτού (ξύλωμα) και τη διακίνηση θρεπτικών για την υποστήριξη της ανάπτυξης της ρίζας (φλοιώμα). Δευτερογενής αύξηση παρουσιάζεται και σε ορισμένους πλάγιους κλάδους της ρίζας.

Η προώθηση της ρίζας σε βαθύτερα στρώματα του εδάφους πραγματοποιείται με διαδοχικές κυτταρικές διαιρέσεις στο ακραίο μερίστωμα της ρίζας για την παραγωγή νέων κυττάρων, αλλά και την συντονισμένη αύξηση του μήκους των κυττάρων στη ζώνη επιμήκυνσης του ακρόρριζου. Η επιμήκυνση των κυττάρων επιτυγχάνεται χάρη στην ανισότροπη διεύθυνση των ινιδίων κυτταρίνης που αποτελούν το βασικό συστατικό των κυτταρικών τοιχωμάτων και καθορίζεται από το δίκτυο περιφερειακών μικροσωληνίσκων που βρίσκεται κάτω από την πλασματική μεμβράνη. Η ρύθμιση του κυτταροσκελετού επηρεάζει μεταξύ άλλων τη μορφολογία των κυττάρων και κατ' επέκταση την αύξηση της ρίζας. Η μικρή διάμετρος της ρίζας (περίπου 80 μm) του *Arabidopsisthaliana*L. επιτρέπει την παρατήρηση των επιμέρους ιστών και σε συνδυασμό με το σταθερό πρότυπο ανάπτυξης και την σχετικά απλή

ιστολογική της οργάνωση, διευκολύνει την αναγνώριση τροποποιημένων περιοχών ή ξένων σωμάτων στο εσωτερικό ή στην επιφάνεια της.



Εικόνα 1.2.Μορφολογία και ανατομία της ρίζας του *Arabidopsisthaliana*L (Col-0).

A)Απεικόνιση *Arabidopsis thaliana* L (Col-0) 13 ημερών με ριζικό σύστημα πασσαλώδους τύπου. **Β)** Ακραίο τμήμα της πρωτογενούς ρίζας όπου διακρίνεται η καλύπτρα, η ζώνη των κυτταρικών διαιρέσεων, η ζώνη επιμήκυνσης και η ζώνη διαφοροποίησης ριζικών τριχιδίων. **Γ)** Η εγκάρσια τομή στη ζώνη διαφοροποίησης περιλαμβάνει, από έξω προς τα μέσα, την επιδερμίδα, το φλοιό, την ενδοδερμίδα, το περικύκλιο, τους δύο πόλους του φλοιώματος, το προκαμβίο και τα στοιχεία του ξυλώματος σε ευθεία διευθέτηση (τα ακριανά στοιχεία αντιστοιχούν στο πρωτοξύλωμα) Τροποποιημένη εικόνα από: DeSmetetal., 2015

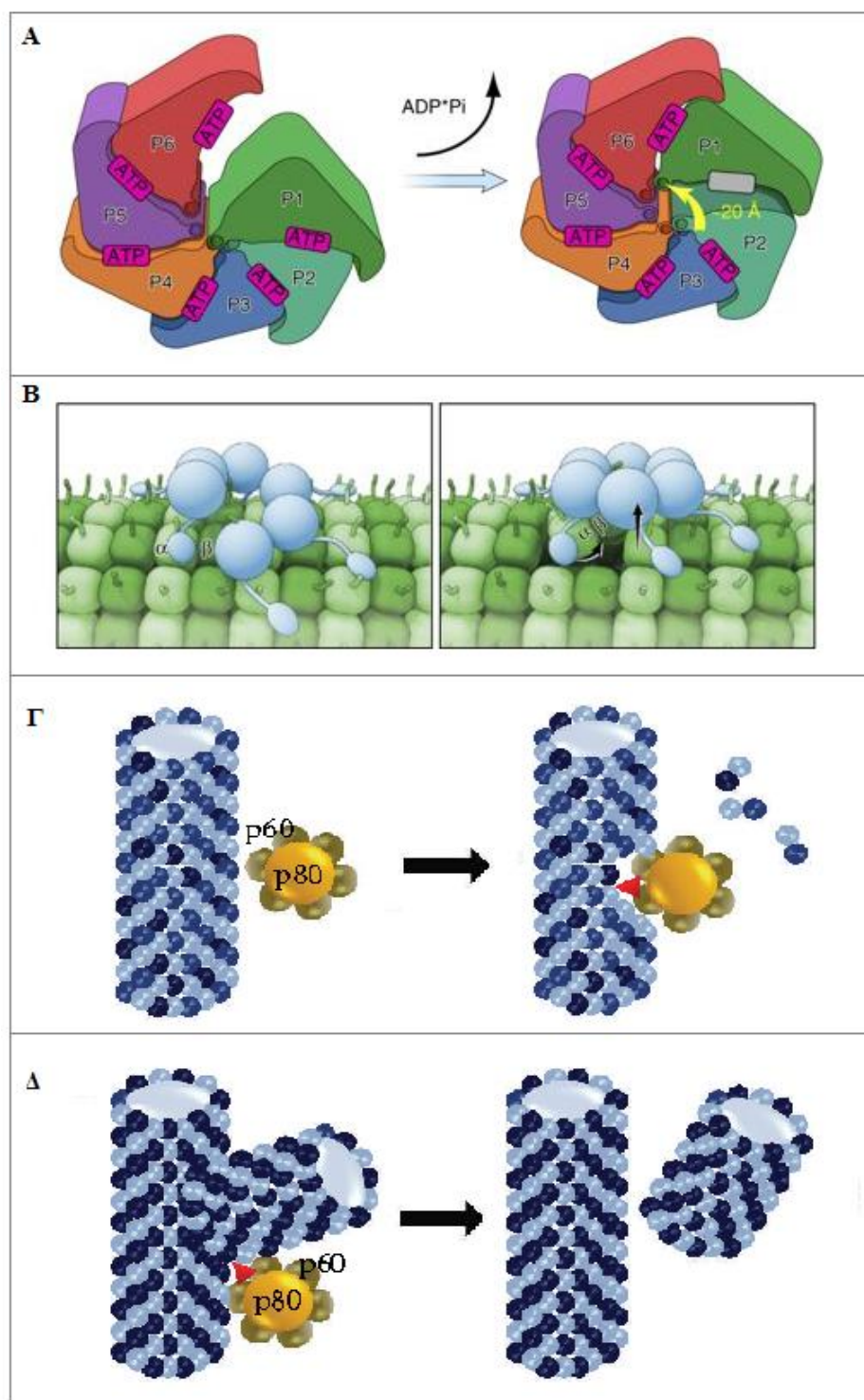
1.1.2 Κατανίνη: πρωτεΐνη που ελέγχει τον κυτταροσκελετό και το κυτταρικό τοίχωμα

Ο έλεγχος του κυτταροσκελετού επιτελείται από ένα σύνολο πρωτεϊνικών μορίων συνδεδεμένων με τους μικροσωληνίσκους, γνωστών ως MAPs (MicrotubuleAssociatedProteins), οι οποίες έχουν ως ρόλο να διαμορφώνουν το δίκτυο των μικροσωληνίσκων ανάλογα με τις ανάγκες του κυττάρου. Οι MAPs συνεισφέρουν στο φαινόμενο δυναμικής αστάθειας που χαρακτηρίζει τους

μικροσωληνίσκους συμμετέχοντας σε διαδικασίες σταθεροποίησης, αποσταθεροποίησης, συνεχούς ανακύκλωσης υπομονάδων (treadmilling), μεταφοράς ή/και σταυροσύνδεσης (cross-linking) αυτών. Επιπλέον διαμεσολαβούν στις αλληλεπιδράσεις των μικροσωληνίσκων με άλλες πρωτεΐνες. Μία από τις πιο σημαντικές είναι η Κατανίνη (katanin) η οποία τέμνει τους μικροσωληνίσκους σε συγκεκριμένα σημεία βοηθώντας τις MAPs στη ρύθμιση του κυτταροσκελετού. Η τοπική διαφοροποίηση του κυτταρικού τοιχώματος είναι άμεσα συνδεδεμένη με το δίκτυο περιφερειακών μικροσωληνίσκων που καθοδηγούν την εναπόθεση των ινιδίων κυτταρίνης. Η Κατανίνη έμμεσα συμβάλλει στη βιοσύνθεση και τροποποίηση των κυτταρικών τοιχωμάτων, καθώς και την κυτταρική επέκταση.

Η Κατανίνη ανήκει στην AAA οικογένεια ATPασών. Είναι ένα ετεροδιμερές μόριο με μία μικρή καταλυτική υπομονάδα p60 (60kDa) και μία μεγαλύτερη ρυθμιστική p80 (80kDa). Η υπομονάδα p60 εμφανίζει ενεργότητα ATPάσης και καταλύει την τμήση των μικροσωληνίσκων, ενώ η p80 ευθύνεται για την στόχευση του ετεροδιμερούς σε αυτούς (Εικόνα 1.3.A). Πάνω στον μικροσωληνίσκο η Κατανίνη εξαμερίζεται δεσμεύοντας ATP στις p60 υπομονάδες των ετεροδιμερών. Σε αυτή την κατάσταση το σύμπλοκο έχει τη μορφή ανοικτής σπείρας (Εικόνα 1.3.B). Με την υδρόλυση του ATP και την απελευθέρωση ADP από την περιοχή πρόσδεσης νουκλετιδίου (NSB, NucleotideBindingSite) της p60 υπομονάδας, το σύμπλοκο μεταπίπτει σε μορφή κλειστού δακτυλίου απομακρύνοντας ταυτόχρονα ετεροδιμερή σωληνίνης (Εικόνα 1.3.B-Δ).

Η Κατανίνη ανακαλύφθηκε και μελετήθηκε αρχικά σε ζωικούς οργανισμούς (McNally&Thomas1998, McNallyetal., 2011, Zehretal., 2017). Στογονιδίωμα του *Arabidopsis thaliana* L. έχει βρεθεί ένα μόνο ομόλογο γονίδιο της p60 υπομονάδας (*AtKTN1*) και τέσσερα για την p80 (Bouquinetal., 2003, Keechetetal., 2010) τα οποία περιλαμβάνουν στο σύνολο τους WD40 αυτοτελείς δομικές περιοχές (domains) για την υποκυτταρική στόχευση της Κατανίνης (Lupton&iaetal., 2017). Η μελέτη πλήθους μεταλλαγμένων στελεχών έχει αποκαλύψει το σημαντικό ρόλο της Κατανίνης στην οργάνωση των μικροσωληνίσκων της μιτωτικής ατράκτου, αλλά και του δικτύου περιφερειακών μικροσωληνίσκων κατά την κυτοκίνηση (Panteris&Adamakis, 2012; Komisetal., 2017). Επιπλέον η Κατανίνη συμμετέχει στην ρύθμιση του κυτταροσκελετού ως απόκριση σε ερεθίσματα του εξωτερικού περιβάλλοντος (Nakamura, 2015) και φαίνεται να εμπλέκεται στα μονοπάτια του μεταβολισμού και της σύνθεσης αρκετών ορμονών, όπως η αυξίνη, το αποκοπτικό οξύ, το αιθυλένιο και οι γιββερελίνες (Komorisonoetal., 2005; Takáčetal., 2017) που ρυθμίζουν ποικίλες αναπτυξιακές διεργασίες.



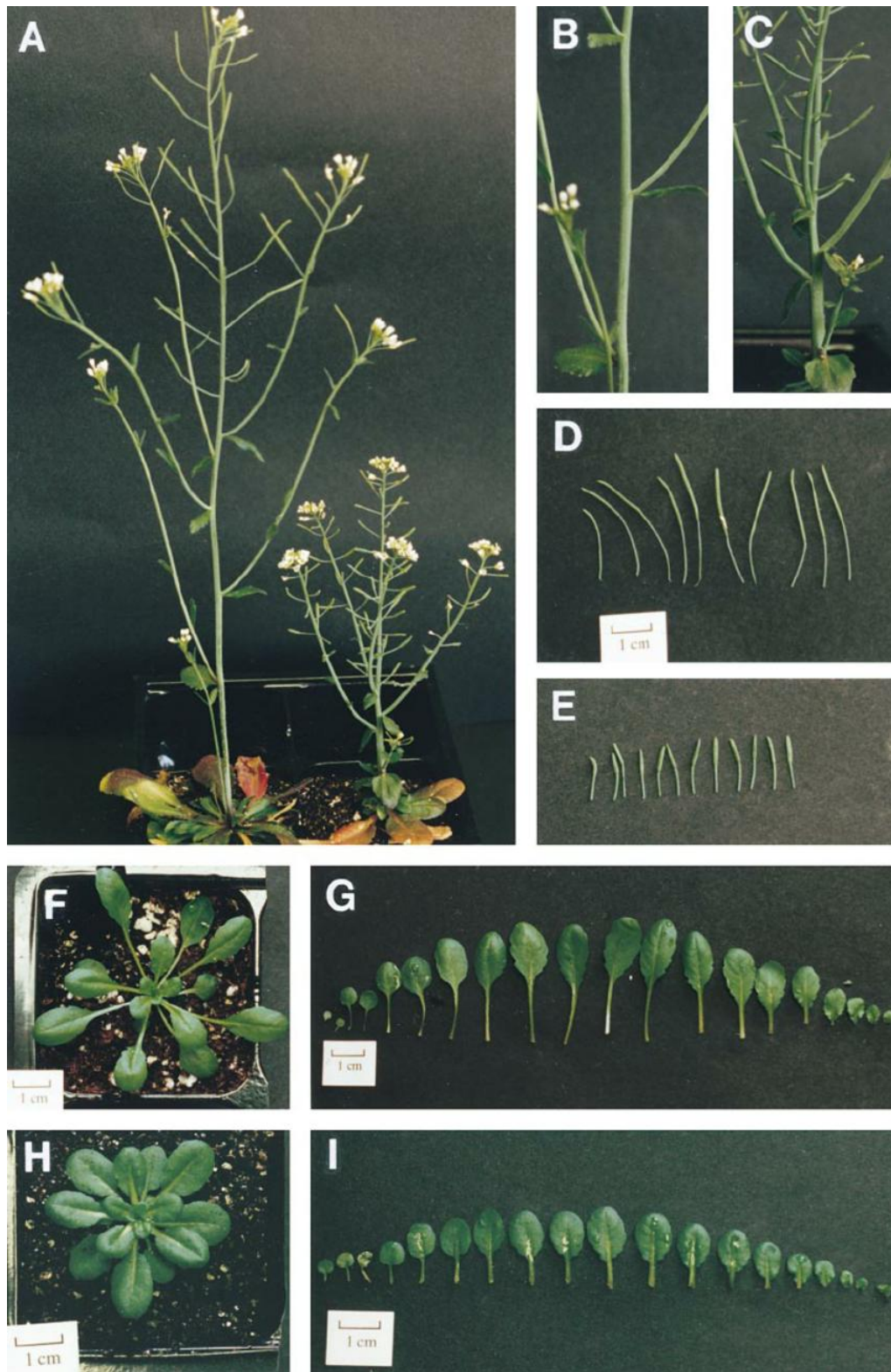
Εικόνα 1.3. Δομή και λειτουργία της Κατανίνης. Η Κατανίνη αποτελείται από μία καταλυτική υπομονάδα p60 και μία ρυθμιστική υπομονάδα p80. **(Α)** Όταν η Κατανίνη εξαμεριστεί πάνω στο μικροσωληνίσκο οι p60 υπομονάδες υδρολύουν το δεσμευμένο ATP και το σύμπλοκο μεταπίπτει από **(Β)** ανοικτή σπείρα σε κλειστό δακτύλιο απομακρύνοντας ταυτόχρονα ετεροδιμερή (α-β)-σωληνίνης. Έτσι μπορεί **(Γ)** να τέμνει εγκάρσια τους μικροσωληνίους ή **(Δ)** να αποκόπτει πλευρικές διακλαδώσεις. Τροποποιημένες εικόνες από: Zehretal., 2017; Ghoshetal., 2012

1.1.3 Περιγραφή του μεταλλαγμένου στελέχους *fra2* του *Arabidopsisthaliana* L.

Σύμφωνα με τους Burketal., 2001, το μετάλλαγμα *fragilefiber 2 (fra2)* έχει προκύψει από EMS μεταλλαξιγένεση που προκάλεσε έλλειψη μιας βάσης (A2329 del) στην αλληλουχία του εβδόμου εξωνίου του γονιδίου της Κατανίνης (*AtKTN1*). Η έλλειψη αυτή είχε ως αποτέλεσμα τη δημιουργία πρόωρου κωδικονίου λήξης (TGA) και την απώλεια 78 αμινοξέων από το καρβοξυτελικό άκρο της πολυπεπτιδικής αλυσίδας της p60 υπομονάδας (523 αμινοξέα, 57kDa). Η θέση πρόσδεσης του ATP στην p60 υπομονάδα περιλαμβάνει τα αμινοξικά κατάλοιπα 236-454. Το πρόωρο κωδικόνιο λήξης στο *fra2* αφαιρεί από αυτή τα τρία τελευταία αμινοξέα (452-454) επηρεάζοντας έτσι τη δραστηριότητα της. Το γονίδιο *AtKTN1* εκφράζεται σε βλαστό, φύλλα, άνθη και ρίζες με αποτέλεσμα το μετάλλαγμα *fra2* να παρουσιάζει μορφολογικές διαφορές στο φαινότυπο όλων των φυτικών οργάνων σε σχέση με το Col-0.

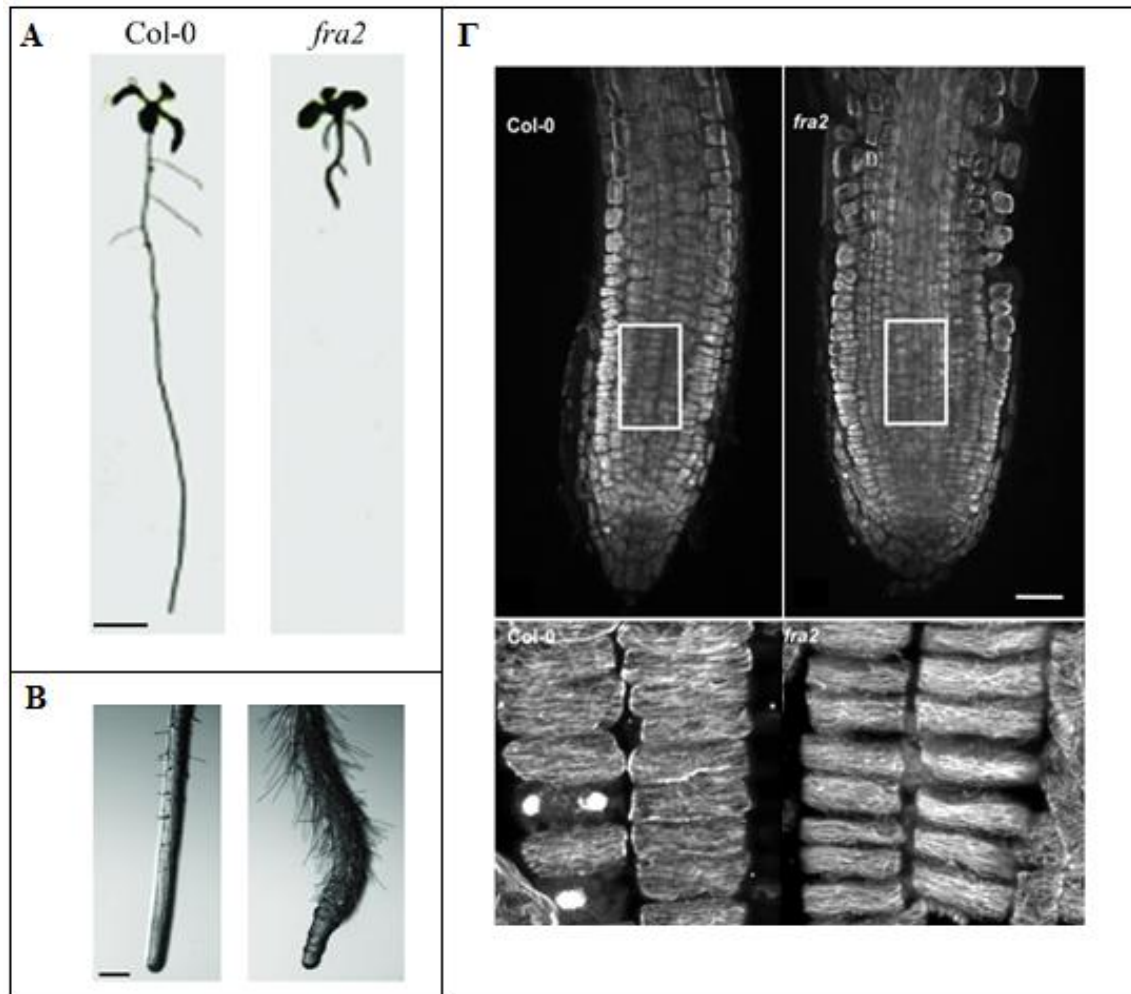
Φαινότυπος *fra2*: Το μήκος του συνόλου των φυτικών οργάνων στο *fra2* είναι μειωμένο σε σχέση με του αγρίου τύπου (Εικόνα 1.4.), σε αντίθεση με το πλάτος το οποίο συχνά είναι παρόμοιου μεγέθους ή/και μεγαλύτερο. Στο βλαστό, το μήκος των μεσογονάτιων διαστημάτων μειώνεται σημαντικά, αλλά όχι και ο αριθμός τους, με αποτέλεσμα το τελικό ύψος του να μην ξεπερνά συχνά το 50% του ύψους του αγρίου τύπου (Εικόνα 1.4.B-C). Σε εγκάρσιες τομές του βλαστού, τα κύτταρα έχουν μεγαλύτερη διατομή με αποτέλεσμα η διάμετρός του να αυξάνεται. Τα φύλλα του *fra2* είναι μικρότερα σε μήκος, αλλά ίσου πλάτους με το Col-0, με αποτέλεσμα το σχήμα του φύλλου είναι πιο στρογγυλό και το κράσπεδο μικρότερο σε εμβαδόν (Εικόνα 1.4.I). Έτσι η ροζέττα στη βάση του φυτού φαίνεται να έχει πιο πυκνά διατεταγμένα φύλλα (Εικόνα 1.4.F-H). Τα σπονδυλώματα του άνθους και οι καρποί χαρακτηρίζονται επίσης από χαμηλότερο λόγο μήκους/πλάτους (Εικόνα 1.4.E). Νεαρά φυτά μιας εβδομάδας εμφανίζουν κοντύτερη ρίζα από το Col-0, με πυκνή διάταξη ριζικών τριχιδίων (Εικόνα 1.5.A-B), λόγω του μικρού μήκους των επιδερμικών κυττάρων στη ζώνη διαφοροποίησης (Burketal., 2001). Ομοίως, περιορισμένη είναι και η μεριστωματική περιοχή της ρίζας, ενώ, όπως και στο βλαστό, η διάμετρος του ακρόριζου είναι αυξημένη (Panterisetal., 2011) (Εικόνα 1.5.Γ).

Η διαφορά στις διαστάσεις των φυτικών οργάνων του μεταλλάγματος *fra2* οφείλεται στο διάχυτο πρότυπο κυτταρικής αύξησης, σύμφωνα με το οποίο, ο προσανατολισμός των ινιδίων κυτταρίνης στο κυτταρικό τοίχωμα είναι ισότροπος, με αποτέλεσμα το κύτταρο να αυξάνεται εξίσου προς όλες τις κατευθύνσεις, τείνοντας να λάβει σφαιρικό σχήμα (Burketal., 2007). Το πρότυπο εναπόθεσης ινιδίων κυτταρίνης εξαρτάται από τη διεύθυνση των υποκείμενων περιφερειακών μικροσωληνίσκων (Baskinetal., 2004; Lloyd&Chan, 2008), οι οποίοι στην περίπτωση του μεταλλάγματος Κατανίνης *fra2* αδυνατούν να προσανατολιστούν παράλληλα μεταξύ τους και κάθετα προς τον κύριο άξονα του κυττάρου, εμποδίζοντας την κατά μήκος αύξησή του (Burketal., 2001) (Εικόνα 1.5.Γ λεπτομέρεια πλαισίου).



Εικόνα 1.4. Μορφολογία υπέργειου τμήματος φυτών *Arabidopsis thaliana* L. αγρίου τύπου (Col-0) και μεταλλάγματος κατανίνης (*fra2*). Α) Φυτά ηλικίας οκτώ εβδομάδων (Col-0 αριστερά, *fra2* δεξιά). (B-C) Το *fra2* (C) έχει βραχύτερα μεσογονάτια διαστήματα. (D-E) Το *fra2* (E) έχει μικρότερου μήκους καρπούς. (F-H) Το *fra2* (H) έχει φαινομενικά πιο πυκνή διάταξη ροζέτας, λόγω του μικρότερου μήκους και αποστρογγυλεμένου κράσπεδου των φύλλων (I) σε σχέση με το Col-0 (G). Εικόνα από: Burketal., 2001

Η δράση της Κατανίνης, εκτός της κυτταρικής επέκτασης, επηρεάζει και άλλες διεργασίες που σχετίζονται με τον κυτταροσκελετό. Η μη ορθή λειτουργία της επηρεάζει το επίπεδο των κυτταρικών διαιρέσεων, δίνοντας σειρές κυττάρων που δεν ακολουθούν το καλώςστοιχισμένο πρότυπο διάταξης που χαρακτηρίζει τη ρίζα του Col-0 (Panterisetal., 2011). Επιπλέον, με τη βοήθεια της ηλεκτρονικής μικροσκοπίας διέλευσης, έχειδειχθεί ότι τόσο τα πρωτογενή όσο και τα δευτερογενή κυτταρικά τοιχώματα στο *fra2* παρουσιάζουν μειωμένη ποσότητα τοιχωματικών υλικών συγκριτικά με τον άγριο τύπο (Burk&Ye, 2002).



Εικόνα 1.5. Μορφολογία ρίζας φυτών *Arabidopsis thaliana* L. αγρίου τύπου (Col-0) και μεταλλάγματος κατανίνης (*fra2*). Α) Το μήκος της ρίζας φυτών *fra2* ηλικίας μιας εβδομάδας είναι πολύ μικρότερο του Col-0. Κλίμακα: 5mm. **Β)** Η ακραία περιοχή της ρίζας του *fra2* έχει μεγαλύτερη διάμετρο, η ζώνη διαφοροποίησης βρίσκεται πιο κοντά στο άκρο και χαρακτηρίζεται από μεγαλύτερη πυκνότητα ριζικών τριχιδίων. Κλίμακα: 250μm **Γ)** Διάταξη μικροσωληνίσκων σε κύτταρα του φλοιού της μεριστωματικής περιοχής του ακρόρριζου. Πλαίσιο: Στο Col-0 οι μικροσωληνίσκοι διευθετούνται κάθετα προς τον επιμήκη άξονα της ρίζας, ενώ στο *fra2* δεν τηρούν ομοιόμορφο προσανατολισμό. Κλίμακα: 50μm, (πλαίσιο 10μm). Εικόνες από: Luptončiaketal., 2017; Panterisetal., 2018

Τελικά φαίνεται ότι η αδυναμία της Κατανίνης να δράσει φυσιολογικά στο μετάλλαγμα *fra2* έχει αντίκτυπο στη μορφογένεση των φυτικών κυττάρων και οργάνων, στην κυτταρική διαίρεση και επέκταση, αλλά και στη σύσταση των κυτταρικών τοιχωμάτων.

1.1.4 Δευτερεύοντα στοιχεία του κυτταρικού τοιχώματος

Το κυτταρικό τοίχωμα είναι μια μηχανικά ισχυρή κυτταρική δομή που εναποτίθεται εξωτερικά της πλασματικής μεμβράνης των φυτικών κυττάρων και συμβάλλει μεταξύ άλλων στη κυτταρική αύξηση και τη προστασία των φυτικών ιστών από παθογόνους οργανισμούς (McNeiletal., 1984; Caffall&Monhen, 2009). Αποτελείται από μικροϊνίδια κυτταρίνης εγκλεισμένα σε άμορφο πολυσακχαριτικό στρώμα ημικυτταρινών, πηκτινών, δομικών πρωτεϊνών, ενζύμων και λιγνίνης (Herediaetal., 1995) (Εικόνα 1.6.). Ανάλογα με το αναπτυξιακό στάδιο του κυττάρου, τα κυτταρικά τοιχώματα διακρίνονται σε πρωτογενή (πριν ολοκληρωθεί η κυτταρική αύξηση) και δευτερογενή (αφού ολοκληρωθεί η κυτταρική αύξηση) και διαφέρουν ως προς τη χημική τους σύσταση (Albersheimetal., 2011).

Η κυτταρίνη αποτελεί το κύριο δομικό συστατικό, πρωτογενών και δευτερογενών τοιχωμάτων (Taylor, 2008), και η περιεκτικότητα των τοιχωμάτων σε κυτταρίνη εξαρτάται από το φυτικό είδος και τον τύπο του κυττάρου. Στο *Arabidopsisthaliana* L. απαντά σε ποσοστό 15% στο φύλλο και έως 33% στο βλαστό (Caffall&Monhen, 2009). Η κρυσταλλική κυτταρίνη συντίθεται από διαμεμβρανικά ένζυμα με ενεργότητα συνθάσης της κυτταρίνης CesaA (CellulosesynthaseA) τα οποία εκκρίνονται στην πλασματική μεμβράνη και συγκροτούν εξαγωνικά πρωτεϊνικά σύμπλοκα σε σχηματισμό ροζέττας (McFarlaneetal., 2014; Cosgrove, 2005; Mutwiletal., 2008). Οι ροζέττες κινούμενες κατά μήκος των υποκείμενων περιφερειακών μικροσωληνίσκων συνθέτουν τα μικροϊνίδια κυτταρίνης εξωτερικά της πλασματικής μεμβράνης (Gutierrezetal., 2009).

Το στρώμα αποτελεί την ενυδατωμένη φάση του κυτταρικού τοιχώματος. Αποτελείται από πολυμερή πολυσακχαριτών που συντίθεται στα δικτυοσωμάτια (συσκευή Golgi) από μεμβρανικές γλυκοζυλοτρανσφεράσες (Lerouxetal., 2011) και δομικές πρωτεΐνες και ένζυμα που συντίθενται στο ενδοπλασματικό δίκτυο (ΕΔ) και στη συνέχεια γλυκοζυλιώνονται στα δικτυοσωμάτια (Showalter&Basu, 2016). Η μεταφορά των πολυμερών του στρώματος στο κυτταρικό τοίχωμα επιτυγχάνεται μέσω μικρών κυστιδίων (Cosgrove, 2005) που κατευθύνονται από τα δικτυοσωμάτια στην πλασματική μεμβράνη με τη συμβολή του κυτταροσκελετού. Με το έλεγχο της εναπόθεσης και σύνθεσης των τοιχωματικών υλικών, ο κυτταροσκελετός ελέγχει την οργάνωση του κυτταρικού τοιχώματος (Szymanski&Cosgrove, 2009).

Τα πολυσακχαριτικά συστατικά του στρώματος συνίστανται από ημικυτταρίνες και πηκτινικές ενώσεις, ενώ οι δομικές πρωτεΐνες γλυκοζυλιώνονται σε μικρό ή μεγάλο βαθμό και αναφέρονται ως γλυκοπρωτεΐνες.

1.1.4.1 Ημικυτταρίνες

Οι ημικυτταρίνες είναι περίπλοκα ετεροπολυμερή γραμμικά μόρια που συντίθενται από κατάλοιπα γλυκόζης, μαννόζης ή ξυλόζης, συνδεδεμένων με β -(1 $\rightarrow$ 4) γλυκοζιτικό δεσμό και φέρουν βραχείες πλευρικές αλυσίδες κι άλλων σακχαριτικών καταλοίπων, όπως η φουκόζη (Scheller&Ulvskov, 2010; Lerouxetal., 2011). Ενώνονται με τα μικροϊνίδια κυτταρίνης με δεσμούς υδρογόνου (Lerouxetal., 2011) δημιουργώντας ένα συνεκτικό ελαστικό δίκτυο κυτταρίνης-ημικυτταρίνης, ενώ ταυτόχρονα εμποδίζουν τα μικροϊνίδια να κολλούν μεταξύ τους (στρώση ολίσθησης). Στις ημικυτταρίνες συγκαταλέγονται οι ξυλάνες, ξυλογλυκάνες, μαννάνες, γλυκομαννάνες και β -(1 $\rightarrow$ 3,1 $\rightarrow$ 4) γλυκάνες. Η καλλόζη αποτελείται από κατάλοιπα γλυκόζης ενωμένων αποκλειστικά με β -(1 $\rightarrow$ 3) γλυκοζιτικό δεσμό και γι' αυτό από πολλούς αμφισβητείται ότι ανήκει στην ομάδα των ημικυτταρινών (Scheller&Ulvskov, 2010). Ωστόσο σε αρκετές ερευνητικές εργασίες μελετάται στα πλαίσια των ημικυτταρινών (Spiridon & Popa, 2005; Srivastavaetal., 2001). Η ίδια τακτική ακολουθήθηκε στην παρούσα εργασία.

Ξυλογλυκάνη: Η ξυλογλυκάνη είναι η ημικυτταρίνη με την μεγαλύτερη αφθονία στα πρωτογενή κυτταρικά τοιχώματα των σπερματοφύτων (Scheller&Ulvskov, 2010). Συμμετέχει σε ποσοστό 20-25% του ξηρού βάρους των τοιχωμάτων στα δικοτυλήδονα φυτά (Varner&Lin, 1989). Αποτελείται από ένα γραμμικό σκελετό καταλοίπων γλυκόζης συνδεδεμένων με β (1 $\rightarrow$ 4) γλυκοζιτικό δεσμό τα οποία μπορεί να φέρουν βραχείες πλευρικές αλυσίδες α -D-ξυλόζης με α (1 $\rightarrow$ 6) γλυκοζιτικό δεσμό ή/και κατάλοιπα γαλακτόζης και φουκόζης (Εικόνα 1.6). Το είδος και το πρότυπο υποκατάστασης των καταλοίπων γλυκόζης του σκελετού παρουσιάζει μεγάλη ποικιλία και εξαρτάται από το είδος του φυτού και τον κυτταρικό τύπο (Pauly&Keegstra, 2016). Η ξυλογλυκάνη προσδένεται στα μικροϊνίδια κυτταρίνης με δεσμούς υδρογόνου που αναπτύσσονται μεταξύ των μη υποκαταστημένων καταλοίπων γλυκόζης του πολυσακχαριτικού σκελετού τους (Srivastavaetal., 2001; Cosgrove, 2005). Με αυτό τον τρόπο δημιουργείται ένα δίκτυο κυτταρίνης-ημικυτταρίνης που συμβάλλει στην δομή και την στιβαρότητα των κυτταρικών τοιχωμάτων (Pauly&Keegstra, 2016; Scheller&Ulvskov, 2010). Η συγκέντρωση της ξυλογλυκάνης και το είδος των υποκαταστατών επηρεάζει τη συνεκτικότητα του δικτύου κυτταρίνης-ημικυτταρίνης (Lopezetal., 2010). Τοιχώματα υψηλής περιεκτικότητας ξυλογλυκάνης παρουσιάζουν μειωμένη εκτατότητα (Chanliaudetal., 2004). Έτσι, η ξυλογλυκάνη σχετίζεται με τις μηχανικές ιδιότητες του τοιχώματος που καθορίζουν την επιμήκυνση των κυτταρικών τοιχωμάτων και εν τέλει την κυτταρική αύξηση (Paulyetal., 2013).

Καλλόζη: Η καλλόζη δεν αποτελεί σταθερό συστατικό των κυτταρικών τοιχωμάτων. Η σύνθεσή της συνδέεται με συγκεκριμένες κυτταρικές διεργασίες ή αποτελεί απόκριση σε τραυματισμό, προσβολή από παθογόνους οργανισμούς και μηχανικές ή αβιοτικές καταπονήσεις (υψηλές θερμοκρασίες)(Stassetal., 2009). Συμμετέχει στο σχηματισμό της κυτταρικής πλάκας κατά την κυτοκίνηση (Thieleetal., 2009) καθώς

και στη γαμετογένεση (Huangetal., 2009). Η απόθεση καλλόζης στους πόρους των πλασμοδεσμών, μεταξύ πλασματικής μεμβράνης και κυτταρικού τοιχώματος, ελαττώνει τη διάμετρό των πόρων και με αυτό τον τρόπο περιορίζει τη συμπλαστική μεταφορά του κυτταρικού περιεχομένου (Knoxetal., 2014). Έντομα και νηματώδεις που διατρέφονται απομιζώντας φυτικά κύτταρα διαθέτουν γονίδια υδρολυτικών ενζύμων της καλλόζης για την διεύρυνση των πόρων και την ανεμπόδιστη διακίνηση κυτταρικών συστατικών που αποτελούν την τροφή τους (Hofmannetal., 2010; Haoetal., 2008).

1.1.4.2 Πηκτίνες

Οι πηκτίνες συνιστούν κι αυτές μια ετερογενή ομάδα πολυσακχαριτών του στρώματος των κυτταρικών τοιχωμάτων που στα δικοτυλήδονα φυτά ισοδυναμεί με το 30% του ολικού πολυσακχαριτικού περιεχομένου τους (Caffall&Mohnen, 2009). Στα πρωτογενή κυτταρικά τοιχώματα εξυπηρετούν πολλές λειτουργίες που σχετίζονται με την κυτταρική αύξηση και γενικότερα την φυτική ανάπτυξη (Ridleyetal., 2001). Οι πηκτίνες, όπως και οι ημικυτταρίνες, συνδέονται με τα μικροϊνίδια κυτταρίνης αλλά και με άλλα συστατικά των κυτταρικών τοιχωμάτων (Wei et al., 2009). Επίσης, συνδέονται μεταξύ τους με ομοιοπολικούς δεσμούς σχηματίζοντας πηκτώματα που ενισχύουν την πλαστικότητα και στιβαρότητα των τοιχωμάτων (Caffall&Mohnen, 2009). Η συγκέντρωση των πηκτινών αυξάνεται στην εξωτερική περιοχή των πρωτογενών τοιχωμάτων κοντά στη μέση πλάκα, ενισχύοντας τη συνάφεια μεταξύ γειτονικών κυττάρων, αλλά και στους μεσοκυττάριους χώρους που σχηματίζονται από τρία ή περισσότερα κύτταρα (Caffall&Mohnen, 2009; Patova et al., 2014; Giannoutsou et al., 2016; Sotiriou et al., 2016). Πολλοί φυτοπαθογόνοι οργανισμοί αποικοδομούν τις πηκτινικές ενώσεις των κυτταρικών τοιχωμάτων προκειμένου να μειώσουν τη συνοχή της μέσης πλάκας και να εισβάλλουν στους φυτικούς ιστούς (Ridley et al., 2001). Οι πηκτίνες με τη μεγαλύτερη αφθονία αποτελούνται από ένα γραμμικό σκελετό καταλοίπων γαλακτουρονικού οξέος ή/και ραμνόζης στον οποίο διακρίνονται τρεις αναγνωρίσιμες πολυσακχαριτικές περιοχές: η ομογαλακτουρονάνη (HG), η ραμνογαλακτουρονάνη I (RGI) και η ραμνογαλακτουρονάνη II (RGII) (Harholt et al., 2010) (Εικόνα 1.6.).

Ομογαλακτουρονάνη (HG): Η HG χαρακτηρίζεται από μια γραμμική αλυσίδα καταλοίπων γαλακτουρονικού οξέος συνδεδεμένων με $\beta(1\rightarrow4)$ γλυκοζιτικό δεσμό στα οποία μπορεί να συνδέονται και μονομερή κατάλοιπα ξυλόζης (ξυλογαλακτουρονάνη). Συντίθεται στο σύμπλεγμα Golgi, μεταφέρεται με κυστίδια στην πλασματική μεμβράνη και εξάγεται στο κυτταρικό τοίχωμα (Geshi et al., 2004). Σε όλη αυτή την πορεία οι καρβοξυλομάδες του γαλακτουρονικού οξέος είναι έντονα μεθυλεστεροποιημένες (MPHG) προκειμένου να καλύπτονται τα φορτία του γαλακτουρονικού οξέος. Όταν φτάσουν στο σημείο εναπόθεσης τους στο κυτταρικό τοίχωμα, ειδικά ένζυμα αναλαμβάνουν την απομεθυλεστεροποίηση της HG (DeSPHG) προκειμένου να σχηματιστούν ομοιοπολικοί δεσμοί με ιόντα ασβεστίου και να συνδεθούν έτιςμε άλλες πηκτινικές αλυσίδες (γέφυρες Ca^{2+}) για το

σχηματισμό συνεκτικών πηκτωμάτων (Wolfetal., 2009; Wolf&Greiner, 2012). Το πρότυπο μεθυλεστεροποίησης της HG επηρεάζει τις μηχανικές ιδιότητες των κυτταρικών τοιχωμάτων και κατ' επέκταση την ανάπτυξη του φυτού αλλά και την αλληλεπίδραση του με βιοτικούς και αβιοτικούς παράγοντες του περιβάλλοντος (Levesque-Tremblayetal., 2015).

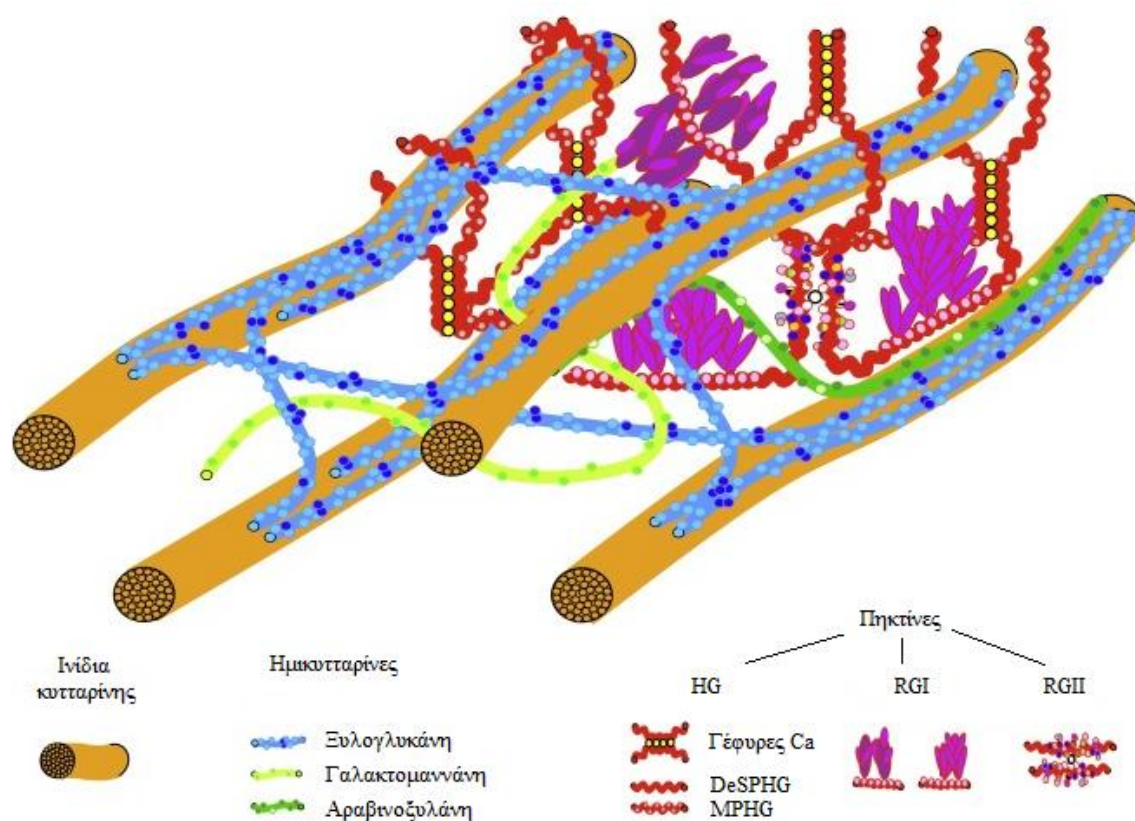
Ραμνογαλακτουρονάνη I (RGI):Η RGI αποτελείται από γραμμικό σκελετό εναλλασόμενων καταλοίπων γαλακτουρονικού οξέος-ραμνόζης με πλευρικές διακλαδώσεις καταλοίπων γαλακτόζης, αραβινόζης και σπανιότερα φουκόζης προσδεμένες στα κατάλοιπα ραμνόζης του σκελετού (Harholtetal., 2010). Θεωρείται ότι η ύπαρξη αυτών των εκτεταμένων πλευρικών αλυσίδων μειώνει την εγγύτητα των αλυσίδων HG αποτρέποντας τη δημιουργία γεφυρών Ca^{2+} μεταξύ τους, γεγονός που μειώνει με τη σειρά του την ικανότητα σχηματισμού πηκτωμάτων (Harholtetal., 2010). Η τροποποίηση των πλευρικών αλυσίδων μπορεί να αλλάξει τις μηχανικές ιδιότητες του κυτταρικού τοιχώματος (Bidhendi&Geitmann, 2015).

Ραμνογαλακτουρονάνη II (RGII): Η RGIIαποτελεί την πιο περίπλοκη περιοχή των πηκτινικών αλυσίδων (Perezetal., 2003) η οποία περιλαμβάνει έως και 15 β(1→4)-συνδεδεμένα κατάλοιπα γαλακτουρονικού οξέος με τέσσερα εξαιρετικά συντηρημένα είδη πλευρικών διακλαδώσεων (Pabstetal., 2013; Glushkaetal., 2003;Vidaletal., 2000). Οι πλευρικές αλυσίδες της RGIIγειτονικών πηκτινικών αλυσίδων συνδέονται μεταξύ τους με βορικούς διεστέρες επιτρέποντας τη δημιουργία πηκτινικών πηκτωμάτων για την αύξηση της συνοχής των κυτταρικών τοιχωμάτων (O'Neilletal., 2004; Perezetal., 2003).

1.1.4.3 Γλυκοπρωτεΐνες

Στο κυτταρικό τοίχωμα, εκτός από τους πολυσακχαρίτες, απαντούν ένζυμα και αρκετές δομικές πρωτεΐνες που διαχωρίζονται με βάση την αμινοξική τους σύσταση (Showalter, 1993).Οι βασικές κατηγορίες δομικών πρωτεϊνών είναι οι HRGPs (γλυκοπρωτεΐνες πλούσιες σε υδροξυπρολίνη), οι GRPs (πρωτεΐνες πλούσιες σε γλυκίνη) και οι PRPs (πρωτεΐνες πλούσιες σε προλίνη) (Kieliszewskietal., 1995; Nobre&Evans, 1998). Στα φυτικά κυτταρικά τοιχώματα όλες οι δομικές πρωτεΐνες περιέχουν υδροξυπρολίνη και γλυκοζυλιώνονται (Cassab, 1998). Ο βιολογικός τους ρόλος μεταξύ άλλων σχετίζεται με τη μηχανική ενίσχυση, την τροποποίηση και την ικανότητα έκτασης των κυτταρικών τοιχωμάτων, τη σηματοδότηση αλλά και τις μεταβολικές διεργασίες που λαμβάνουν χώρα σε αυτά (Jametetal., 2006; Albersheimetal., 2011).Οι υδροξυπρολίνες (HRGPs) εμπλέκονται στην ενίσχυση των κυτταρικών τοιχωμάτων και την άμυνα έναντι παθογόνων οργανισμών (Deepaketal., 2010). Περιλαμβάνουν μεταξύ άλλων τις πρωτεΐνες αραβινογαλακτάνης (AGPs) και τις εξτενσίνες (Jacksonetal., 2012). Οι πρώτες είναι βαριά γλυκοζυλιωμένες, ενώ οι δεύτερες γλυκοζυλιώνονται σε χαμηλό βαθμό (Showalteretal., 2010), αμφότερες εντοπίζονται στους ιστούς των περισσότερων φυτών (Herediaetal., 1995; Jose-Estanyol&Puigdomenech, 2000).

Πρωτεΐνες αραβινογαλακτάνης (AGPs): Οι AGPs ανήκουν στις πρωτεογλυκάνες του κυτταρικού τοιχώματος, είναι συχνά αγκυροβολημένες στην πλασματική μεμβράνη μέσω αγκυρας γλυκοζυλοφωσφατιδυλοϊνositόλης (GPI) και περιέχουν επαναλαμβανόμενα μοτίβα διπεπτιδίων (Ala-Pro, Ser-Pro, Thr-Pro, Val-Pro) (Kieliszewski, 2001). Τα κατάλοιπα προλίνης υδροξυλιώνονται και γλυκοζυλιώνονται από υδροξυλάσες και γλυκοζυλοτρανσφεράσες αντίστοιχα (Knochetal., 2014). Κατά τη γλυκοζυλίωση σχηματίζονται μακριές διακλαδιζόμενες αλυσίδες σακχαριτικών καταλοίπων, κυρίως γλυκόζης και αραβινόζης, που αποτελούν έως και το 90% της ολικής μάζας των AGPs (Kitazawaetal., 2013). Επιπλέον, γλυκοσυλ-υδρολάσες του τοιχώματος μπορούν να τροποποιούν το πρότυπο διακλάδωσης ή τη σακχαριτική σύσταση των πλευρικών αλυσίδων των AGPs εξυπηρετώντας των πολλαπλό τους ρόλο στα κυτταρικά τοιχώματα (Herman&Lamb, 1992). Οι AGPs ελέγχουν την κυτταρική ανάπτυξη και διαφοροποίηση, καθώς και τις αλληλεπιδράσεις μεταξύ γειτονικών κυττάρων (Jose-Estanyol&Puigdomenech, 2000).



Εικόνα 1.6. Σύνδεση πολυσακχαριτών του κυτταρικού τοιχώματος. Το κυτταρικό τοίχωμα αποτελείται από ένα σκελετό ινιδίων κυτταρίνης εγκλεισμένο σε άμορφο στρώμα ημικυτταρινών και πηκτινών (HG:ομογαλακτουρονάνη, RGIραμνογαλακτουρονάνη I, RGII: ραμνογαλακτουρονάνη II). Η ξυλογλυκάνη συνδέεται κατά μήκος με τα ινίδια κυτταρίνης ή τα συνδέει μεταξύ τους. Μη μεθυλεστεροποιημένα κατάλοιπα γλυκουρονικού οξέος της HG σχηματίζουν γέφυρες ασβεστίου, συνδέοντας τις πηκτινικές αλυσίδες, η RGII ενισχύει τη σύνδεση γειτονικών αλυσίδων μέσω διεστέρων βορίου, ενώ αντίθετα οι ογκώδεις διακλαδώσεις της RGIτις απομακρύνουν. Τροποποιημένη εικόνα από: Loqueetal., 2015

1.2 Ο ρόλος των κομβοηματοδών στην μείωση της παραγωγής πολλών καλλιεργούμενων φυτών

1.2.1 Ταξινόμηση κομβοηματοδών σκωλήκων

Οι νηματώδεις σκώληκες ανήκουν στο φύλο Nematodaton Εκδυσοζών που αποτελεί ένα από τα μεγαλύτερα φύλα των Μεταζών, περιλαμβάνοντας πάνω από 25.000 χαρακτηρισμένα είδη (Zhang, 2013). Τα περισσότερα είδη είναι μικροσκοπικοί οργανισμοί που εποικούν χερσαία και υδάτινα οικοσυστήματα, με παγκόσμια εξάπλωση, από τις τροπικές περιοχές μέχρι τους πόλους (Nicholas, 1984). Κατηγοριοποιούνται με βάση τις διατροφικές τους συνήθειες σε ελεύθερους και παρασιτικούς (Decraemer&Hunt, 2006). Οι παρασιτικοί προσβάλλουν ζώα και φυτά προκαλώντας σοβαρές ασθένειες στα πρώτα (Hirst&Stapley, 2000) καθώς και εκτεταμένες ζημιές σε καλλιεργούμενα ή μη φυτά, με οικονομικές απώλειες που αγγίζουν τα \$157δισ ετησίως (Perry&Moens, 2013).

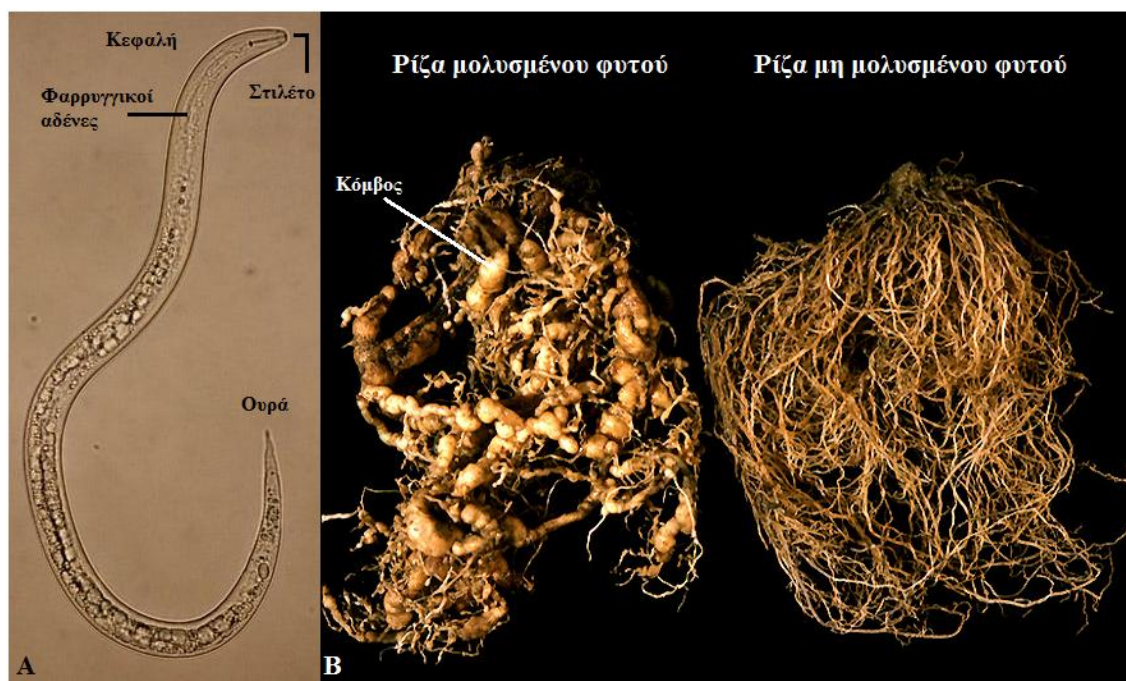
Οι φυτοπαρασιτικοί νηματώδεις διακρίνονται σε δύο μεγάλες κατηγορίες, τους εκτοπαρασιτικούς και τους ενδοπαρασιτικούς, ανάλογα με τη στρατηγική προσβολής των ξενιστών τους (Perry&Moens, 2013). Οι εκτοπαρασιτικοί παραμένουν εξωτερικά του ξενιστή και διατρέφονται κυρίως από τα επιδερμικά κύτταρα των ριζών και τα ριζικά τριχίδια (Decraemer&Geraert, 2006). Τα στάδια ανάπτυξης των ενδοπαρασιτικών χωρίζονται σε δύο ομάδες, μεταναστευτικά (migratory) και μη μεταναστευτικά (sedentary). Οι κινούμενοι νηματώδεις προσβάλλουν, ανάλογα με το είδος τους, σχεδόν όλα τα φυτικά όργανα, προκαλώντας τοπική νέκρωση των ιστών από τους οποίους τρέφονται ή διαρρηγνύουν κατά τη διέλευση τους (Duncan&Moens, 2006).

Οι στατικοί ενδοπαρασιτικοί νηματώδεις προσβάλλουν τις ρίζες των φυτών και εγκαθίστανται σε μια συγκεκριμένη περιοχή, τη θέση θρέψης (feedingsite), έως ότου ολοκληρώσουν τον κύκλο ζωής τους (Perry&Moens, 2013). Στη θέση θρέψης επάγουν την τροποποίηση των φυτικών κυττάρων σε ειδικούς τροφικούς σχηματισμούς υπό τη μορφή κόμβου (gall). Ανάλογα με το είδος των σχηματισμών που δημιουργούν, οι στατικοί νηματώδεις χωρίζονται σε δύο κατηγορίες, τους κυστονηματοδείς (CN; CystNematodes) και τους κομβοηματοδείς (RKNRootKnotNematodes) (Perry&Moens, 2013; Wyss&Grundler, 1992).

Κυστονηματοδείς (CN): Οι CN έχουν ευρεία εξάπλωση σε εύκρατες, υποτροπικές και τροπικές περιοχές και περιλαμβάνουν ορισμένα από τα πιο καταστροφικά για τις καλλιέργειες γένη, μεταξύ των οποίων τα *Heterodera* και *Globodera* (Turner&Rowe, 2006; Jones et al., 2013). Οι νεαροί μολυσματικοί CN διαπερνούν ενδοκυτταρικά τους ιστούς της ρίζας έως ότου εντοπίσουν ένα κατάλληλο για τη διατροφή τους κύτταρο εντός του κεντρικού κυλίνδρου. Διατρύπουν το κύτταρο με το στίλετο, ένα κοίλο στοματικό εξάρτημα (Εικόνα 1.7.A), και με τη βοήθεια εκκρίσεων προκαλούν μορφολογικές αλλαγές στο φυτικό κύτταρο (EvesvandenAkker et al., 2014). Το

κύτταρο σταδιακά ενώνεται με γειτονικά, μέσω τοπικής αποικοδόμησης των τοιχωμάτων, δημιουργώντας τελικά μια περιοχή ενωμένων κυττάρων που ονομάζεται συγκύτιο (Grundleretal., 1998).

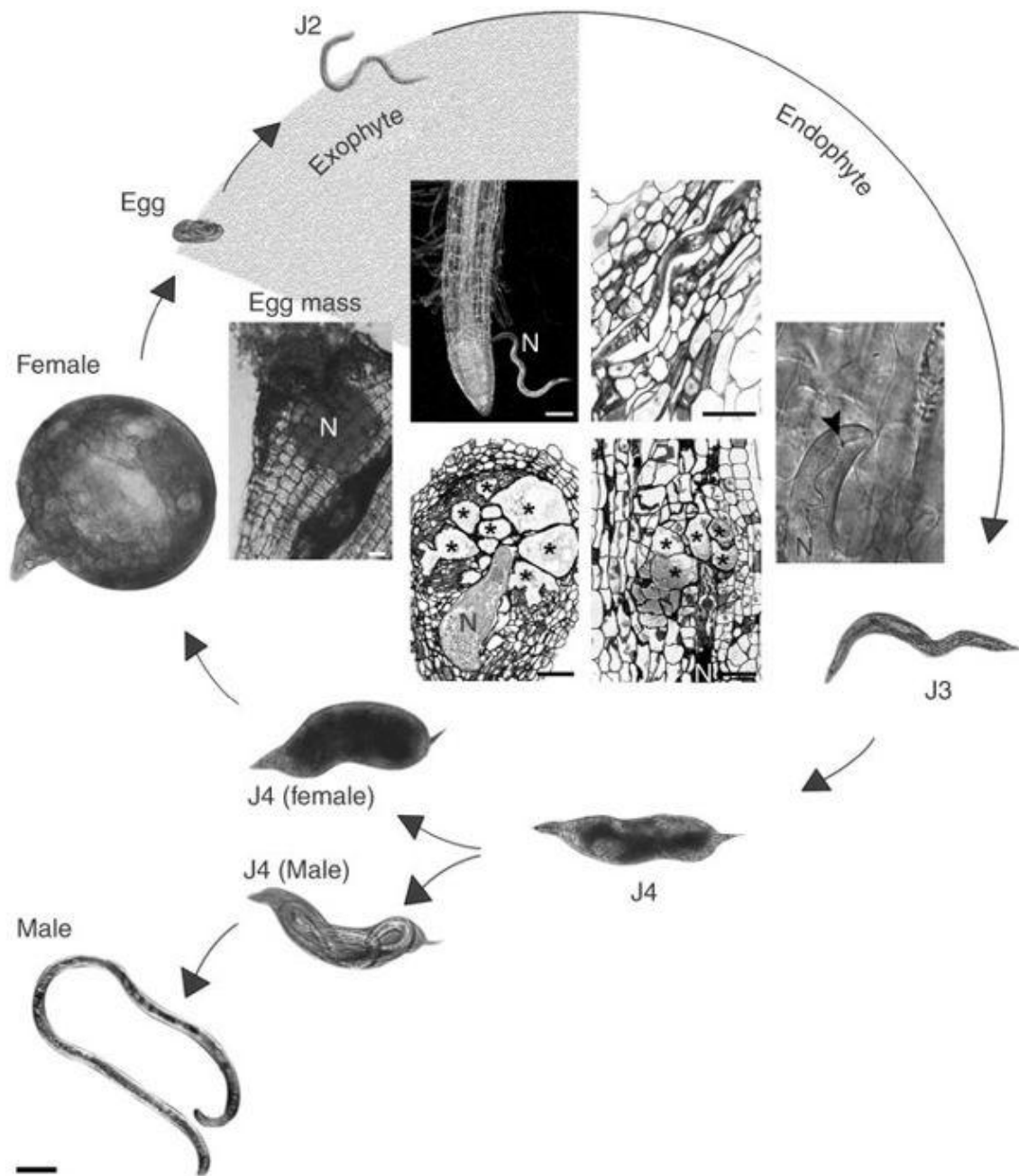
Κομβονηματώδεις (RKN): Σε αντίθεση με τους CN, οι κόμβονηματώδεις δημιουργούν τροφικούς σχηματισμούς, που ονομάζονται κόμβοι (knots) και δεν αποτελούνται από την ένωση γειτονικών κυττάρων αλλά από ξεχωριστά υπερτροφικά παρεγχυματικά κύτταρα, τα μεγακύτταρα (GC; giant cells) (Εικόνα 1.7.B).



Εικόνα 1.7. Μορφολογία κομβονηματώδους και κόμβων μολυσμένων ριζών.
A) Το μικρό μέγεθος των κομβονηματωδών (μήκος<1mm, πλάτος=15-20mm) και το λεπτό διάφανο σώμα του νηματώδους επιτρέπει την παρατήρηση των εσωτερικών του οργάνων. Στο σώμα διακρίνεται η περιοχή της κεφαλής, με το χαρακτηριστικό στοματικό εξάρτημα (στιλέτο) για την προσρρόφηση θρεπτικών συστατικών και τη διάτρηση των φυτικών ιστών, το κυρίως σώμα, όπου διακρίνονται οι φαρυγγικοί αδένες, το πεπτικό και το αναπαραγωγικό σύστημα και τέλος η οξύληκτη ουρά κοντά στην οποία βρίσκεται ο αναπαραγωγικός πόρος.**B)** Φαινότυπος μολυσμένων και μη μολυσμένων ριζών ντομάτας, όπου στα πρώτα ξεχωρίζουν οι κόμβοι που δημιουργούν οι κομβονηματώδεις μετά την εγκατάστασή τους (θέσεις θρέψης). Τροποποιημένες εικόνες από: www.daera-ni.gov.uk, www.researchgate.net

1.2.2 Περιγραφή και κύκλος ζωής των κομβονηματωδών σκωλήκων

Οι κομβονηματώδεις περιλαμβάνουν περισσότερα από 100 είδη, τα πιο κοινά εκ των οποίων ανήκουν στο γένος *Meloidogyne* (*M.incognita*, *M.hapla*, *M.javanica*, *M.chitwoodi* και *M.arenaria*; Moensetal., 2010; Elling, 2013). Το είδος *M.incognita* προσβάλλει σχεδόν όλες τις οικογένειες φυτών στις τροπικές και υποτροπικές ζώνες συμπεριλαμβανομένων και πολλών εμπορικών φυτών (λαχανικά, δημητριακά, όσπρια, λαχανικά, δένδρα και ινώδη φυτά) (Trudgill&Blok, 2001).



Εικόνα 1.8. Κύκλος ζωής κομβοηματοδών. Οι κομβοηματοδείς (N) είναι υποχρεωτικά παράσιτα που προσβάλουν το ριζικό σύστημα των φυτών. Διαθέτουν τέσσερα στάδια ανάπτυξης (juvenile stage 1-4, **J1-J4**), η πρώτη έκδυση πραγματοποιείται μέσα στο αυγό, το J2 μολυσματικό στάδιο εισέρχεται στη ρίζα από τη ζώνη επιμήκυνσης του ακρόρριζου. Τα J3-J4 στάδια είναι μη μεταναστευτικά και αυξάνουν σε μέγεθος καθώς διατρέφονται από τα τροποποιημένα παρεγχυματικά κύτταρα του ξενιστή στα οποία έχουν εγκατασταθεί, τα Μεγακύτταρα (αστερίσκοι). Μετά την τελευταία έκδυση, προκύπτει είτε ενήλικο αρσενικό που εγκαταλείπει τη ρίζα είτε σε ενήλικο θηλυκό που γεννά εκατοντάδες αυγά εντός ζελατινώδους σάκου (ωόσακος) στην επιφάνεια του κόμβου. Τα στάδια στη ζωή των κομβοηματοδών από την εκκόλαψη των αυγών έως την εγκατάσταση στο σημείο θρέψης της ρίζας (γκρι περιοχή) ζουν εκτός του ξενιστή ενώ τα υπόλοιπα εντός. Εικόνα από: www.iivr.org

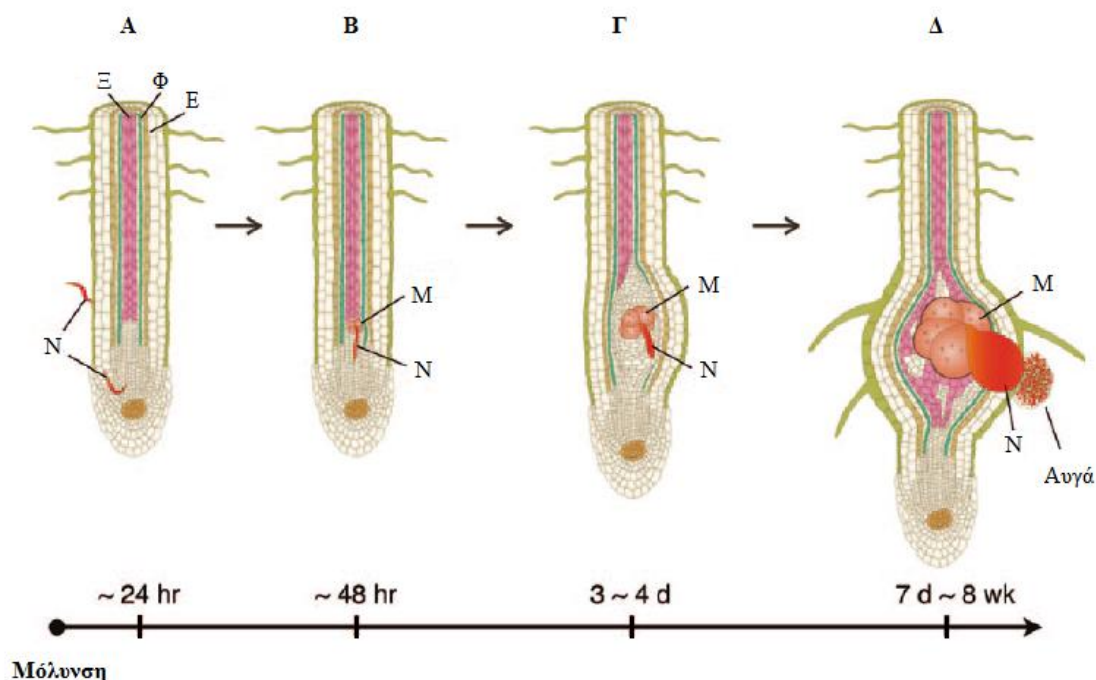
Η αναπαραγωγή των κομβονηματωδών *M.incognita* μπορεί να γίνει φυλετικά ή αφυλετικά. Ο καθορισμός του φύλου και η τελική αναλογία θηλυκών/αρσενικών ατόμων εξαρτάται από περιβαλλοντικούς παράγοντες. Συνήθως, το ποσοστό των αρσενικών ατόμων είναι πολύ μικρό συγκριτικά με των θηλυκών και αυξάνει μόνο σε δυσμενείς συνθήκες (Snyderetal., 2006; Triantaphyllou, 1973). Τα περισσότερα άτομα προκύπτουν από μιτωτική παρθενογένεση δημιουργώντας ισογενείς πληθυσμούς.

Τα νεαρά άτομα *M.incognita* παρουσιάζουν τέσσερα εκδυτικά στάδια (juveniles; J1-J4) (Εικόνα 1.8.). Η εμβρυογένεση και η πρώτη έκδυση λαμβάνει χώρα εντός του αυγού (Jones&Goto, 2011). Τα νεαρά δευτέρου αναπτυξιακού σταδίου J2 (μολυσματικό στάδιο) εκκολάπτονται από το αυγό, υπό ευνοϊκές συνθήκες θερμοκρασίας και υγρασίας (Karssenetal., 2013) και κατευθύνονται χημειοτακτικά προς το άκρο γειτονικών ριζών (Perry&Wesemael, 2008; Reynoldsetal., 2010). Οι J2 κομβονηματώδεις εισβάλλουν στο ακρόρριζο από τη ζώνη επιμήκυνσης και κινούμενοι διακυτταρικά, προσπερνούν το φραγμό της ενδοδερμίδας και κατευθύνονται ακροβασιπεταλικά κατά μήκος του κεντρικού κυλίνδρου (Williamson&Gleason, 2003) (Εικόνα 1.9 A-B.). Η κλίση συγκέντρωσης της αυξίνης που δεσμεύεται στα αισθητήρια όργανα του νηματώδους (αμφίδια), φαίνεται να είναι υπεύθυνη για την κατευθυνόμενη πορεία του νηματώδους εντός της ρίζας (Rasmanntetal., 2012). Η κίνηση των J2 μεταξύ των φυτικών κυττάρων διευκολύνεται με τη βοήθεια του στιλέτου (Εικόνα 1.7.A) το οποίο ασκεί μηχανική πίεση στη περιοχή της μέσης πλάκας ενώ ταυτόχρονα απελευθερώνει ένζυμα αποικοδόμησης των κυτταρικών τοιχωμάτων, όπως κυτταρινάσες, πηκτινάσες και μουτάσες (ενζυμική αποικοδόμηση), που εκκρίνονται από τους φαρυγγικούς αδένες του νηματώδους (Davisetal., 2004). Τα γονίδια των αποικοδομητικών ενζύμων φαίνεται να έχουν προέλθει από βακτήρια μέσω οριζόντιας μεταφοράς σε προγονικά είδη ελεύθερων νηματωδών, γεγονός το οποίο προώθησε την εκδήλωση του παρασιτισμού.

Όταν οι J2 εντοπίσουν κατάλληλο σημείο του αγγειακού συστήματος (3-4dpi, ημέρες μετά τη μόλυνση), ακινητοποιούνται και τρυπούν με το στιλέτο τους το κυτταρικό τοίχωμα 2 έως 12 παρεγχυματικών κυττάρων (VonMende, 1997) (Εικόνα 1.8., 1.9.B). Εκκρίσεις από τους ραχιαίους αδένες των J2 επάγουν τη μετατροπή των παρεγχυματικών κυττάρων σε μεγακύτταρα (Davisetal., 2004).

Στο διάστημα των επόμενων 3-4 ημερών, δύο ακόμα εκδύσεις πραγματοποιούνται στις θέσεις θρέψης (Εικόνα 1.8.), ενώ παράλληλα τα νεαρά άτομα (J3 και J4) αυξάνουν σε μέγεθος. Μετά την τελευταία έκδυση τα αρσενικά άτομα εγκαταλείπουν τη ρίζα (Abadetal., 2003), ενώ τα νεαρά θηλυκά παραμένουν στο σημείο θρέψης έως ότου ολοκληρώσουν τον κύκλο ζωής τους, ποικίλει ανάλογα με τις συνθήκες του περιβάλλοντος. Η διάρκεια του βιολογικού κύκλου εξαρτάται από τη θερμοκρασία (Ploeg&Maris, 1999). Τα ώριμα θηλυκά γεννούν αρκετές εκατοντάδες αυγά

εγκλεισμένα σε ζελατινώδη γλυκοπρωτεϊνική μήτρα, τον ωόσακκο (eggmass), στην επιφάνεια του κόμβου (Curtis et al., 2010) (Εικόνα 1.8., 1.9.Δ).



Εικόνα 1.9. Χρονική πορεία της μόλυνσης της ρίζας από κομβοηματώδη. Α) Ο κομβοηματώδης εντός 24-48 ωρών από τη στιγμή της εκκολλησης προσβάλλει τη ρίζα από τη ζώνη επιμήκυνσης, κινείται διακυτταρικά προς το άκρο και αφού περάσει το φραγμό της ενδοδερμίδας εισέρχεται στο κεντρικό κύλινδρο (σε διάστημα μιας μέρας). **Β)** Μόλις εντοπίσει τα κατάλληλα για τη διατροφή του συνοδά κύτταρα των ηθμοσωλήνων, τρυπά το κυτταρικό τους τοίχωμα και με εκκρίσεις επάγει την διαφοροποίησή τους σε μεγακύτταρα (2-4 μέρες). **Γ)** Καθώς τα μεγακύτταρα αυξάνουν σε μέγεθος και οι παρακείμενοι ιστοί ακολουθούν την διόγκωση του σημείου θρέψης με κυτταρικές διαιρέσεις, σχηματίζεται σταδιακά ο κόμβος (διάρκεια 3-5 εβδομάδων). Ταυτόχρονα ο κομβοηματώδης αυξάνει σε μέγεθος. **Δ)** 6-8 εβδομάδες μετά τη μόλυνση τα ώριμα θηλυκά έχουν σχηματίσει ωόσακκους γεμάτους εκατοντάδες αυγά στην επιφάνεια του κόμβου. Τροποποιημένη εικόνα από: Bartle et al., 2013

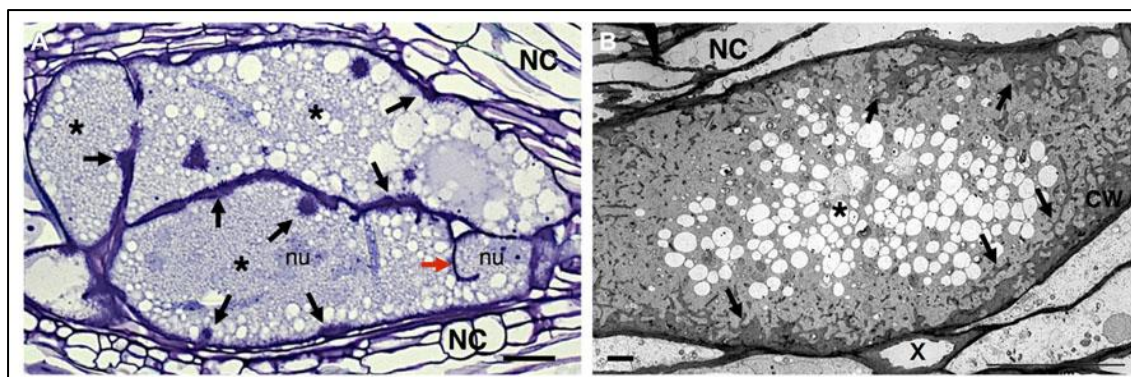
Τα μολυσμένα από *M. incognita* φυτά χαρακτηρίζονται από χαμηλή βιομάζα, λεπτότερα και μικρότερα φύλλα και μικρότερα μεσογονάτια διαστήματα συγκριτικά με μη μολυσμένα φυτά (Fortnum et al., 1991). Επιπλέον, έχει φανεί ότι μολυσμένα ζαχαρότευτλα παρουσιάζουν χαμηλότερη περιεκτικότητα σε χλωροφύλλη και καροτενοειδή μετά την μόλυνση από *M. incognita* (Koray et al., 2012). Ο σχηματισμός των κόμβων και η ανορθόδοξη ανάπτυξη της ρίζας, παράλληλα με την μείωση της συγκέντρωσης χλωροφύλλης θεωρείται ότι σχετίζονται με τις διατροφικές απαιτήσεις των κομβοηματωδών (Koenning et al., 2004). Ορισμένα είδη κομβοηματωδών μεταξύ των οποίων και το *M. incognita* αυξάνουν την ευαισθησία

του ξενιστή τους και σε άλλα παθογόνα όπως μύκητες (Koeningetal., 2004; Karssenetal., 2013).

1.2.3 Σχηματισμός μεγακυττάρων στις θέσεις θρέψης του κομβονηματώδους

Από τη στιγμή που οι J2κομβονηματώδεις εγκαθίστανται στη θέση θρέψης, επαναπρογραμματίζουν τη διαφοροποίηση των συνοδών κυττάρων των ηθμοσωλήνων που διατρύχουν με το στίλετο τους (Bird&Kaloshian, 2003). Η πρώτη ένδειξη σχηματισμού των μεγακυττάρων (GC) είναι η πρόκληση κυτταρικής διαίρεσης, η οποία δεν ακολουθείται από φυσιολογική κυτοκίνηση (Jones, 1981). Τα κυστίδια που κανονικά δημιουργούν μετά τη σύντηξη τους την κυτταρική πλάκα μεταξύ των θυγατρικών κυττάρων, κατευθύνονται στο σωστό σημείο, αλλά αποτυγχάνουν να συντηχθούν και στη συνέχεια διασπείρονται στο κυτταρόπλασμα. Αρχικά τα διπύρρηνα κύτταρα δε διαφέρουν σε μέγεθος από τα γειτονικά τους. Οι πυρηνικές διαιρέσεις συνεχίζονται δίνοντας 32 ή και περισσότερους πυρήνες στα αναπτυσσόμενα μεγακύτταρα (Wiggersetal., 1990). Εκτός από την αρχική διαίρεση στην οποία η πυρηνική άτρακτος είναι κανονικά προσανατολισμένη, οι υπόλοιπες γίνονται σε τυχαίες θέσεις, ενώ υπάρχουν και περιπτώσεις που δημιουργούνται πολυπλοειδείς πυρήνες καθώς ο διπλασιασμός του γενετικού υλικού δεν ακολουθείται από μίτωση (Εικόνα 1.10.A). Αρκετές φορές παρατηρούνται προεκβολές στο κυτταρικό τοίχωμα, όταν η πυρηνική διαίρεση γίνεται κοντά στο πλασμαλήμμα, από τη σύντηξη ορισμένων κυστιδίων που προορίζονταν για το σχηματισμό της κυτταρικής πλάκας (Εικόνα 1.10.A). Τα μεγακύτταρα αναπτύσσονται τάχιστα σε διάστημα 3 εβδομάδων (Molleretal., 1998; Jones, 1981). Παράλληλα με τις πυρηνικές διαιρέσεις, τα μεγακύτταρα διογκώνονται και υφίστανται μια σειρά μορφολογικών και φυσιολογικών αλλαγών που τα κάνει να ξεχωρίζουν από τα γειτονικά παρεγχυματικά κύτταρα. Τα μεγακύτταρα είναι πλασμοβριθή, με αυξημένο αριθμό ριβοσωμάτων και πολυάριθμα μικρά χυμοτόπια (Εικόνα 1.10.B). Οι πυρήνες και οι πυρηνίσκοι μεγεθύνονται, με έντονη παρουσία ετεροχρωματικών περιοχών, αλλά και τα οργανίδια με τη σειρά τους υφίστανται ποικίλλες μορφολογικές αλλαγές (Endo&Wergin, 1973). Η αύξηση του μεγέθους των μεγακυττάρων διαταράσσει την διευθέτηση των αγγείων του αγωγού ιστού στον κεντρικό κύλινδρο στη θέση θρέψης (Molleretal., 1998; Jones, 1981) (Εικόνα 1.9.Δ). Τα γειτονικά κύτταρα δεν συνθλίβονται από τη συνεχιζόμενη αύξηση του όγκου των μεγακυττάρων αλλά διαιρούνται κι αυτά συνοδεύοντας την επιμήκυνση των δεύτερων, συμμετέχοντας έτσι στην τοπική διόγκωση της ρίζας και το χαρακτηριστικό σχηματισμό του κόμβου (Bird&Koltai, 2000). Το τελικό μέγεθος του κόμβου εξαρτάται από το είδος του ξενιστή και του κομβονηματώδους (Kyndtetal., 2013). Τα μεγακύτταρα που βρίσκονται πλησίον των ηθμοσωλήνων του φλοιώματος, όπου επιτελείται η διακίνηση των θρεπτικών στο φυτικό σώμα, παίρνουν τη μορφή μεταγωγών κυττάρων με εκτεταμένες ενδοκυτταρικές προεκβολές από εναπόθεση μη λιγνινοποιημένου δευτερογενούς τοιχώματος (Εικόνα 1.10.A). Με αυτό τον τρόπο αυξάνει 15-20 φορές η επιφάνεια του πλασμαλλήματος, ενώ ταυτόχρονα σχηματίζονται δευτερογενή βοηθητικά πεδία πλασμοδεσμών μεταξύ εφαιπτόμενων

μεγακυττάρων, που διευκολύνουν την ταχύτερη μεταφορά μεγαλύτερης ποσότητας νερού και θρεπτικών από τα στοιχεία του αγωγού ιστού προς το σύνολο των μεγακυττάρων (Crawford&Zambryski, 2000; Hofmannetal., 2010; Jones, 1981).



Εικόνα 1.10. Ανατομία μεγακυττάρων προσβεβλημένων φυτών *Arabidopsisthaliana*L. από *Meloidogyneincognita*. A) Εγκάρσια τομή μεγακυττάρου (αστερίσκος) με χρώση τολουιδίνης. Διακρίνονται οι ενδοκυτταρικές προεκβολές του τοιχώματος (μαύρα βέλη) και κατάλοιπο σχηματισμού κυτταρικής πλάκας από την αδυναμία ολοκλήρωσης της κυτοκίνησης μετά τη μιτωτική διαίρεση πυρήνα (κόκκινο βέλος). Οι σκουρόχρωμες περιοχές εντός του κυτοπλάσματος υποδεικνύουν τη θέση των πυρήνων. B) Σε απρόμαυρο φόντο διακρίνονται με ευκολία πολυάριθμα μικρά χυμοτόπια του μεγακυττάρου. NC: γειτονικά κύτταρα, X: αγγεία ξυλώματος, nu: πυρήνας, CW: κυτταρικό τοίχωμα. Κλίμακα: A) 25μm B) 5 μm. Εικόνα από: Rodiucetal., 2014

Κεντρικό ρόλο στην ανάπτυξη των μεγακυττάρων κατέχει το κυτταρικό τοίχωμα. Τροποποιήσεις στη σύσταση του τοιχώματος το καθιστούν ικανό να ανθίσταται στην έντονη πίεση σπαργής, λόγω της αύξησης του κυτοπλάσματος, ενώ παράλληλα να διατηρείται εκτάσιμο και ελαστικό, ώστε να αποφευχθεί η κατάρρευση του κατά τη διόγκωση του μεγακυττάρου. Παλαιότερα, είχε δείχθει ότι η ξυλογλυκάνη και οι πηκτίνες στα τοιχώματα των GC παρουσιάζουν ομοιόμορφη κατανομή (Bergetal., 2009), ενώ πρόσφατα προτάθηκε ότι αλλαγές στη σύστασή τους εξαρτώνται από το είδος του ξενιστή (Bozbugaetal., 2018). Στην τελευταία μελέτη φάνηκε ότι οι τροποποιήσεις των πολυσακχαριτών του τοιχώματος των GC στο *Arabidopsisthaliana*L. είναι πολύ περιορισμένες συγκριτικά με των μη μολυσμένων φυτών αλλά και σε σχέση με άλλα φυτικά είδη, όπως τα *Zeamays* και *Vignaangularis*. Μεταλλάγματα ημικυτταρινών του *Arabidopsisthaliana*L. οδήγησαν στο σχηματισμό μικρότερων κόμβων, ενώ οι νηματώδεις που μετρήθηκαν είχαν μικρότερο μέγεθος αλλά και μικρότερο αριθμό απογόνων (Bozbugaetal., 2018). Μεταλλάγματα πηκτινών και γλυκοπρωτεϊνών του τοιχώματος χαρακτηρίζονταν από αυξημένη ευαισθησία έναντι της μόλυνσης από *M.incognita* (Bozbugaetal., 2018). Συμπερασματικά, η σύσταση του τοιχώματος μπορεί να επηρεάσει την ανάπτυξη του κομβονηματώδους ή την ευαισθησία του φυτού στη μόλυνση.

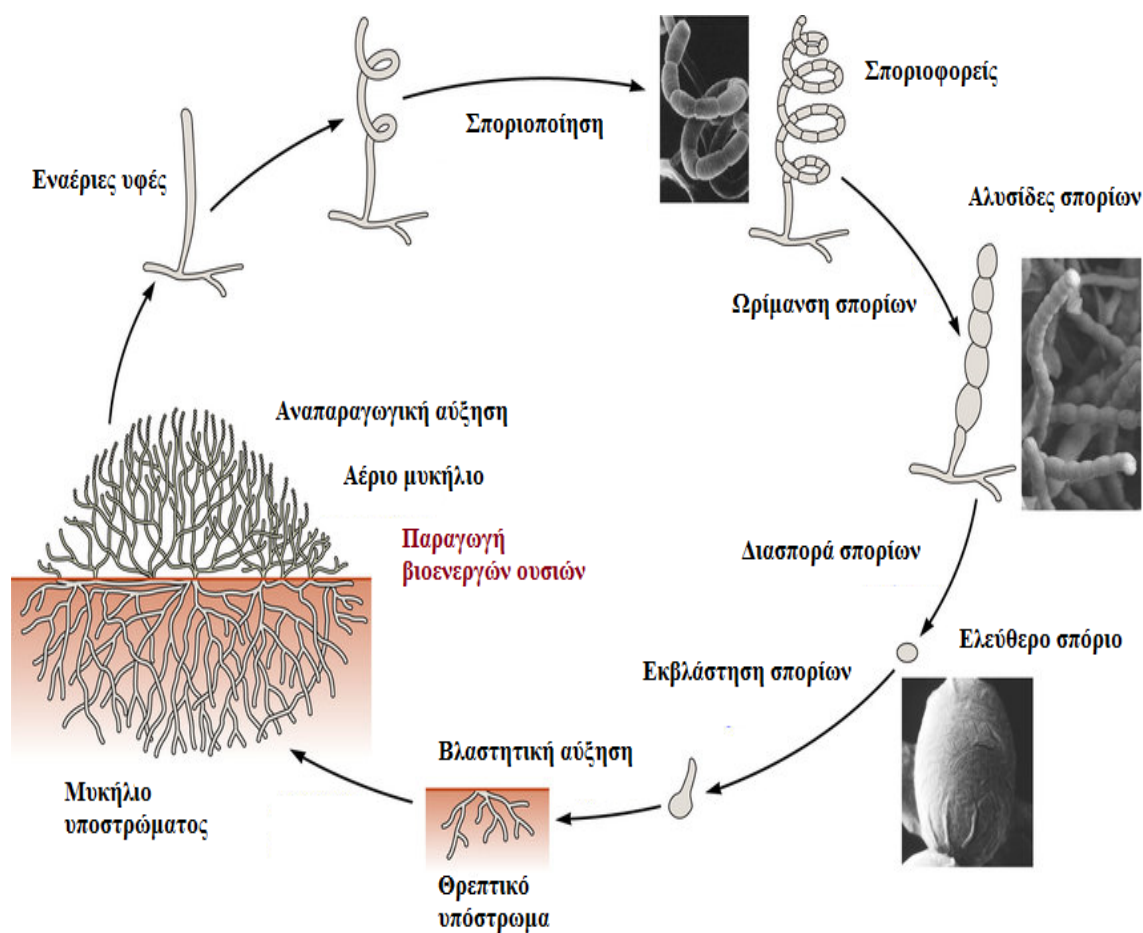
Εκτός από τους ενδογενείς μηχανισμούς άμυνας των φυτών έναντι της μόλυνσης από νηματώδεις, σημαντικό ρόλο παίζουν οι αλληλεπιδράσεις φυτού και νηματώδους με άλλους βιοτικούς παράγοντες της ριζόσφαιρας.

1.3 Οι στρεπτομύκητες ως παράγοντες βιοελέγχου

Τις τελευταίες δεκαετίες, η αυξημένη ανάγκη για τροφή που μπορεί να υποστηρίξει την κατακόρυφη αύξηση του ανθρώπινου πληθυσμού, σε συνδυασμό με την ρύπανση του περιβάλλοντος και τις επιπτώσεις που επιφέρει στα φυσικά οικοσυστήματα και την υγεία του ανθρώπου, δημιούργησαν την ανάγκη ενός ολοκληρωμένου σχεδίου αειφόρου ανάπτυξης (Godfrayetal., 2010). Στον τομέα της αγροτικής ανάπτυξης δύο είναι οι βασικοί στόχοι, η ενίσχυση της φυτικής παραγωγής και η μείωση των απωλειών από φυτοπαθογόνους οργανισμούςκαι ασθένειες των καλλιεργούμενων φυτών (Oerke, 2006). Στα πλαίσια ενός τέτοιου εγχειρήματος περιλαμβάνεται, μεταξύ άλλων, η αντικατάσταση των χημικών παρασιτοκτόνων που χρησιμοποιούνται ευρέως στη γεωργία με βιοτικούςπαράγοντες φιλικούς προς το περιβάλλον (Lawetal., 2017). Η έκθεση σε χημικά συντιθέμενα φυτοπροστατευτικά προϊόντα, όπως το DBCP (1,2 διβρωμο-3 χλωροπροπάνιο), αποδεδειγμένα βλάπτει την ανθρώπινη υγεία, μολύνει το περιβάλλον και αφήνει ανεπιθύμητα υπολείμματα για αρκετά χρόνια μετά την χρήση. Επιπλέον, το υψηλό κόστος παραγωγής και η ανάγκη για επαναλαμβανόμενες εφαρμογές στις καλλιέργειες, λόγω απωλειών με έκπλυση και απομάκρυνση μέσω των κατακρυσμνήσεων και επιφανειακών απορροών, συντελούν στην ανάγκη εξεύρεσης μιας οικολογικής εναλλακτικής προσέγγισης του προβλήματος (Thomasonetal., 1987). Η αξιοποίηση εδαφικών μικροοργανισμών που δρουν ως παράγοντες βιοελέγχου για την αντιμετώπιση των φυτοπαθογόνων αποτελεί την πιο ελκυστική λύση και παρουσιάζει πολλαπλά ωφέλη για το περιβάλλον και τον άνθρωπο (Viaeneetal., 2016).

Στους πιο πολλά υποσχόμενους εδαφικούς μικροοργανισμούς για το σκοπό αυτό συγκαταλέγονται οι στρεπτομύκητες (Viaeneetal., 2016) που ανήκουν στο φύλο των Ακτινοβακτηρίων και περιλαμβάνουν πάνω από 776 χαρακτηρισμένα είδη. Πρόκειται για θετικά κατά Gram, χημειοοργανότροφα βακτήρια που συχνά εντοπίζονταιστη ριζόσφαιρα των φυτών (διεπιφάνεια πάχους 1-2mm γύρω από τη ρίζα) (Philippotetal., 2013). Πολλά είδη ακτινοβακτηρίων αναπτύσσουν συμβιωτικές σχέσεις με τα φυτά, ενώ ελάχιστα είναι παθογόνα (Fyansetal., 2016; Locey&Lenon, 2016). Οι εκκρίσεις των ριζών, αποτελούν το 20-40% του φωτοσυνθετικά καθηλωμένου άνθρακα και εμπλουτίζουν τη ριζόσφαιρα με οργανικές ενώσεις προμηθεύοντας με θρεπτικά τους εδαφικούς μικροοργανισμούς (Chaparroetal., 2013). Οι στρεπτομύκητες αλληλεπιδρούν με άλλους οργανισμούς του εδάφους (μύκητες, μικρά έντομα, σκώληκες) που συγκεντρώνονται κοντά στις ρίζες των φυτών διαμορφώνοντας ένα ιδιαίτερο οικοσύστημα. Η σύνθεση των βιοκοινοτήτων της ριζόσφαιρας εξαρτάται από το φυτικό είδος, το είδος των φυτικών εκκρίσεωνκαθώς και την αρχιτεκτονική διαμόρφωση του ριζικού συστήματος (Bergetal., 2009). Οι στρεπτομύκητες αναπτύσσουν ενδοειδικές και διαειδικές ανταγωνιστικές σχέσεις παράγοντας μεγάλη

ποικιλία βιοδραστικών ενώσεων (Εικόνα 1.11). Παράγουν βιοενεργές ουσίες με αντιβιοτική δράση (Chateretal., 2006; Chater, 2016) με εφαρμογές στην Ιατρική, τη Βιοτεχνολογία, τη Γεωργία, τη Κτηνοτροφία και την Οικολογία (Horwood, 2007). Πλήθος βιοενεργών ουσιών των στρεπτομυκήτων, προϊόντα του δευτερογενούς μεταβολισμού, έχουν απομονωθεί και μελετηθεί με σκοπό την αντιμετώπιση φυτοπαθογόνων οργανισμών (Ruanpanunetal., 2011b). Η εμπορική εκμετάλλευση εδαφικών στελεχών στρεπτομυκήτων έχει ήδη ξεκινήσει σε καλλιέργειες καλαμποκιού, βάμβακος και ψυχανθών με την ανάπτυξη εμπορικά διαθέσιμων φυτοπροστατευτικών προϊόντων όπως το AVICTA (Cabreraetal., 2013). Η εγκατάσταση στρεπτομυκήτων στη ριζόσφαιρα των καλλιεργούμενων φυτών έχει διττό ρόλο. Οι στρεπτομυκήτες ανταγωνίζονται τους φυτοπαθογόνους οργανισμούς ενώ παράλληλα προωθούν τη φυτική ανάπτυξη.



Εικόνα 1.11. Κύκλος ζωής στρεπτομυκήτων. Από την εκβλάστηση ελεύθερων σπορίων υπό ευνοϊκές συνθήκες, σχηματίζεται το βλαστητικό μυκήλιο πάνω σε θρεπτικό υπόστρωμα. Ακολουθεί η ανάπτυξη του αέριου μυκηλίου και η δημιουργία σπορίων (σποριοποίηση) από εναέριες υφές, ενώ συγχρόνως παράγονται βιοενεργές ουσίες. Στο άκρο των εναέριων υφών (σποριοφορείς) σχηματίζονται τα σπόρια σε αλυσίδες σπορίων χαρακτηριστικής διαμόρφωσης έπειτα από κυτταρική διαίρεση και χρωμοσωμικό διαχωρισμό. Τα σπόρια ωριμάζουν και διασπείρονται για τον σχηματισμό νέων αποικιών στρεπτομυκήτων. Τροποποιημένη εικόνα από: Barkaetal., 2016.

1.3.1 Οι στρεπτομύκητες και ο ρόλος τους στην προώθηση της ανάπτυξης των φυτών

Βακτήρια του γένους *Streptomyces* απαντούν στη ριζόσφαιρα πολλών φυτών σε μεγάλες συγκεντρώσεις και αναπτύσσουν με αυτά συμβιωτικές σχέσεις καθώς διευκολύνουν την πρόσληψη θρεπτικών στοιχείων από τη ρίζα (Amaresanetal., 2018). Τα τελευταία χρόνια η ανάδειξη αυτού του γένους ως προς την ικανότητά του να προωθεί τη φυτική ανάπτυξη έχει κεντρίσει το ενδιαφέρον των επιστημόνων αλλά και γενικότερα της βιομηχανίας τροφίμων παγκοσμίως (Diasetal., 2017). Οι στρεπτομύκητες εκτός από τη ριζόσφαιρα συχνά εποικίζουν τους εσωτερικούς ιστούς των ριζών (Vurukondaetal., 2018). Ο ενδοφυτικός τρόπος διαβίωσης παρέχει στα βακτήρια ένα προστατευμένο ενδιαίτημα και άμεση πρόσβαση στα αναγκαία για αυτά θρεπτικά στοιχεία, ενώ ταυτόχρονα το φυτό επωφελείται από τα βακτήρια που φιλοξενεί ποικιλοτρόπως (Vurukondaetal., 2018). Παράγουν μεγάλη ποικιλία λυτικών ενζύμων που διασπούν δυσδιάλυτα οργανικά πολυμερή, όπως η κυτταρίνη και η χιτίνη, συμβάλλοντας στην ανακύκλωση οργανικών και ανόργανων ενώσεων και ιόντων (Seipkeetal., 2012). Ορισμένοι παράγουν σιδηροφόρα για την πρόσληψη ιόντων σιδήρου (Fe^{3+}) από το έδαφος, συμμετέχουν στη διαλυτοποίηση του ανόργανου φωσφόρου και συνδέονται με την ενεργοποίηση φυτικών βιοσυνθετικών μονοπατιών που σχετίζονται με την παραγωγή χηλικών παραγόντων και φυτικών ορμονών αλλά και την απόκριση των φυτών σε βιοτικές και αβιοτικές καταπονήσεις (deJesusSousa&Olivares, 2016).

1.3.2 Οι στρεπτομύκητες και ο ρόλος τους στην αποφυγή της μόλυνσης από φυτοπαθογόνους οργανισμούς

Οι στρεπτομύκητες ανταγωνίζονται άμεσα άλλους μικροοργανισμούς του εδάφους, όπως μύκητες, βακτήρια και μικρά έντομα, παράγοντας ένα ευρύ φάσμα βιοδραστικών ενώσεων ή έμμεσα, ενεργοποιώντας αμυντικούς μηχανισμούς του φυτού, όπως τα μονοπάτια του ιασμονικού οξέος, του σαλικυλικού οξέος και του αιθυλενίου (Baisetal., 2006; Connetal., 2008). Στελέχη στρεπτομυκήτων έχουν χρησιμοποιηθεί μεταξύ άλλων και σε μελέτες βιοελέγχου φυτοπαρασιτικών νηματωδών σκωλήκων. Η νηματωδοκτόνος δράση των στρεπτομυκήτων συνίσταται κυρίως στην παρεμπόδιση της εκκόλαψης των αυγών και την αύξηση της θνησιμότητας του J2 μολυσματικού σταδίου, όπως στην περίπτωση του στελέχους

Streptomyces roseovirens παράγει τη βιοενεργό ουσία fervernulin (Ruanpanun et al., 2011b) και του στελέχους *Streptomyces albogriseolus* συνθέτει fungichromin B (Zenget al., 2013). Πλήθος άλλων στελεχών στρεπτομυκήτων, όπως το *Streptomyces hydropneumatis* strain DH16, συμβάλλουν με παρόμοιο τρόπο στην αντιμετώπιση της μόλυνσης από κομβομηματώδεις *M. incognita* (Kaure et al., 2016).

Παρά την εντατική έρευνα για την αντιμετώπιση των φυτοπαρασιτικών οργανισμών, κάθε χρόνο νέα στελέχη στρεπτομυκήτων απομονώνονται, χαρακτηρίζονται και δοκιμάζονται ως παράγοντες βιοελέγχου. Οι στρεπτομυκήτες απομονώνονται από χερσαία αλλά και υδάτινα οικοσυστήματα (Rashad et al., 2015). Έχει φανεί ωστόσο ότι μη ενδογενή στελέχη στρεπτομυκήτων που δεν είναι προσαρμοσμένα στο κλίμα των καλλιεργούμενων περιοχών όπου χρησιμοποιούνται δεν έχουν την αναμενόμενη απόδοση στην αντιμετώπιση των φυτοπαθογόνων ενώ συχνά η ταυτόχρονη εφαρμογή περισσότερων του ενός είδους μικροβιακών παραγόντων βιοελέγχου είναι αποτελεσματικότερη (Ghosh et al., 2015). Στην Ελλάδα, το Μεσογειακό κλίμα που χαρακτηρίζεται από διαρκείς μεταβολές στις κλιματικές συνθήκες κατά τη διάρκεια του έτους αλλά και η μεγάλη ποικιλία ενδιαιτημάτων και φυτικών ειδών δίνει τη δυνατότητα εύρεσης πλήθους ενδημικών στελεχών στρεπτομυκήτων προσαρμοσμένων στο βιοτικό και αβιοτικό περιβάλλον του ελλαδικού χώρου που θα μπορούσαν δυνητικά να αξιοποιηθούν σε εφαρμογές βιοελέγχου.

Είναι φανερό ότι μικροοργανισμοί όπως οι στρεπτομυκήτες μπορούν να συμβάλουν στη φυτοπροστασία και τη γονιμότητα των καλλιεργούμενων εδαφών εναλλακτικά των χημικά συντιθέμενων φυτοπροστατευτικών προϊόντων και λιπασμάτων ως μια πιο φιλική προς το περιβάλλον και τον άνθρωπο προσέγγιση.

2 Σκοπός της Διπλωματικής Εργασίας

Ο σκοπός της παρούσας διπλωματικής εργασίας είναι η ανάδειξη του βιοελέγχου μέσω του εμπλουτισμού καλλιεργούμενων εδαφών, με ενδογενή στελέχη στρεπτομυκήτων για την αντιμετώπιση φυτοπαρασιτικών κομβονηματωδών σκωλήκων *M.incognita*. Προκειμένου να εξακριβωθεί η ικανότητα μείωσης του βαθμού μόλυνσης από *M.incognita*, πραγματοποιήθηκαν πειράματα βιοελέγχου με τα στελέχη *Streptomycescolombiensis*ATHUBA 438 και *Streptomycesmonomycini*ATHUBA 220, στο φυτό *Arabidopsisthaliana*L. αγρίου τύπου Col-0 και του μεταλλάγματος κατανίνης *fra2*, στο οποίο η μη ορθή λειτουργία του κυτταροσκελετού επιφέρει σειρά τροποποιήσεων στη σύσταση των κυτταρικών τοιχωμάτων και την οργάνωση της ρίζας. Με αυτό τον τρόπο αυξάνεται η ευαισθησία του φυτού στη μόλυνση από *M.incognita* και αναδεικνύεται η έμμεση συμβολή του κυτταροσκελετού στην ενδογενή άμυνα των φυτών εναντίον των κομβονηματωδών. Παράλληλα, διερευνήθηκε η συνεισφορά των δύο στελεχών στρεπτομυκήτων στην αναστροφή του φαινότυπου της μόλυνσης δηλαδή την επαναφορά τριων αναπτυξιακών παραμέτρων (μήκος, νωπό και ξηρό βάρος βλαστού) που επηρεάζονται από τη μόλυνση με *M.incognita*.

3 Υλικά και Μέθοδοι

3.1

Εκτροφή κομβονηματωδών *Meloidogyne incognita* σε φυτά *Solanum lycopersicum* L. και μόλυνση φυτών *Arabidopsis thaliana* L.

Οικοκομβονηματώδεις σκώληκες *Meloidogyne incognita* χορηγήθηκαν ευγενικά από το Εργαστήριο Βιολογικού Ελέγχου Γεωργικών Φαρμάκων του Τμήματος Ελέγχου Γεωργικών Φαρμάκων και Φυτοφαρμακευτικής του Μπενακείου Φυτοπαθολογικού Ινστιτούτου (ΜΦΙ, Π.Δέλτα 8, Κηφισιά Αττικής, 14561, www.bpi.gr), με υπεύθυνη την Δρα Νικολέττα Ντάλλη.

Τα σπέρματα του φυτού *Solanum lycopersicum* L. προέρχονται από εμπορικό προϊόν της εταιρίας NORMATIVACE (ποικιλία Pomodoro S. Marzano Nano), αγοράστηκαν από κατάστημα λιανικής πώλησης ανθοκομικών και γεωργικών προϊόντων τον Οκτώβριο του 2018 και χρησιμοποιήθηκαν αποκλειστικά για τη συντήρηση του πληθυσμού των κομβονηματωδών.

Φυτά *Arabidopsis thaliana* L. αγρίου τύπου, οικότυπου Columbia-0 (Col-0), καθώς και το μεταλλαγμένο στέλεχος *fragile fiber 2 (fra2)* (Burketal., 2001, Luptončiak et al., 2017), χρησιμοποιήθηκαν για τη διεξαγωγή του πειραματικού μέρους της παρούσας εργασίας. Τα σπέρματα αγοράστηκαν από την εταιρία «The European Arabidopsis Stock Centre» (NASC), με κωδικούς NASCID:N1092 και NASCID:N57954 αντίστοιχα, και διατηρούνται σε τράπεζα σπερμάτων του Εργαστηρίου Βοτανικής, Τομέα Βοτανικής, Τμήματος Βιολογίας του Εθνικού Καποδιστριακού Πανεπιστημίου Αθηνών.



Εικόνα 3.1: *Solanum lycopersicum* L.

3.1.1 Καλλιέργεια φυτών *Solanum lycopersicum* L. και *Arabidopsis thaliana* L.

Καλλιέργεια φυτών *Solanum lycopersicum* L.: Σπέρματα τομάτας *Solanum lycopersicum* L. φυτεύθηκαν σε γλαστράκια όγκου 200 cm³ με διαβρεγμένο χώμα Potgrond P και αναπτύχθηκαν σε θάλαμο καλλιέργειών ελεγχόμενων συνθηκών του Εργαστηρίου Βιολογικού Ελέγχου Γεωργικών Φαρμάκων του ΜΦΙ (Εικόνα 3.1). Ο θάλαμος διατηρεί σταθερή θερμοκρασία 28°C, 60% υγρασία και εναλλασσόμενο φωτισμό (16h φως, 8h σκοτάδι) με λάμπες φθορισμού SYLVANIA GRO-LUX (F36W/GRO), έντασης φωτός 120 μmol·m⁻²·s⁻¹. Τα φυτά ποτίζονταν ανά τρεις μέρες.

Καλλιέργεια φυτών *Arabidopsis thaliana* L.: Η ανάπτυξη των φυτών *Arabidopsis thaliana* L. Col-0 και *fra2* πραγματοποιήθηκε στο Εργαστήριο Βοτανικής του ΕΚΠΑ. Για τον συγχρονισμό της φύτευσης των σπερμάτων αυτού του φυτικού είδους, απαιτείται ψυχρή στρωμάτωση (φύλαξη σε Eppendorf με αποστειρωμένο νερό και διατήρησή τους στους 4°C) διάρκειας δύο ημερών (Zhong et al., 1998). Τα σπέρματα έπειτα φυτεύθηκαν σε γλαστράκια όγκου 64 cm³ με 25g διαβρεγμένου χώματος Potgrond P και διατηρήθηκαν σε θάλαμο καλλιέργειών ελεγχόμενων συνθηκών θερμοκρασίας 17°C, 60% υγρασίας και εναλλασσόμενο φωτισμό (16h φως, 8h σκοτάδι) με λάμπες φθορισμού SYLVANIA LUXLINE PLUS (F18W/840), έντασης φωτός 120 μmol·m⁻²·s⁻¹. Τα φυτά ποτίζονταν ανά δύο μέρες με 5ml νερό βρύσης. Φυτά που προορίζονταν για τη συγκομιδή των σπερμάτων, προκειμένου να διατηρηθεί ο πληθυσμός τους στην τράπεζα σπερμάτων του Εργαστηρίου Βοτανικής, αφήνονταν να ολοκληρώσουν τον κύκλο ζωής τους που διαρκεί περίπου δύο μήνες για το Col-0 και μισό μήνα παραπάνω για το *fra2*, λόγω της καθυστερημένης ανάπτυξής του (Burk et al., 2001) (Εικόνα 3.2). Τα φυτά που χρησιμοποιήθηκαν ως πειραματικό φυτικό υλικό για τη μελέτη της σύστασης του κυτταρικού τοιχώματος μολυσμένων και μη φυτών,

αναπτύχθηκαν στο θάλαμο καλλιέργειών για σαρανταοκτώ μέρες, ενώ εκείνα που χρησιμοποιήθηκαν στο πείραμα βιοελέγχου εβδομηντατέσσερις μέρες συνολικά.



Εικόνα 3.2: Καλλιέργεια φυτών *Arabidopsis thaliana* L. Col-0 (δεξιά) και *fra2* (αριστερά), ηλικίας 40 ημερών

3.1.2 Εκτροφή του κομβονηματώδους *Meloidogyne incognita*

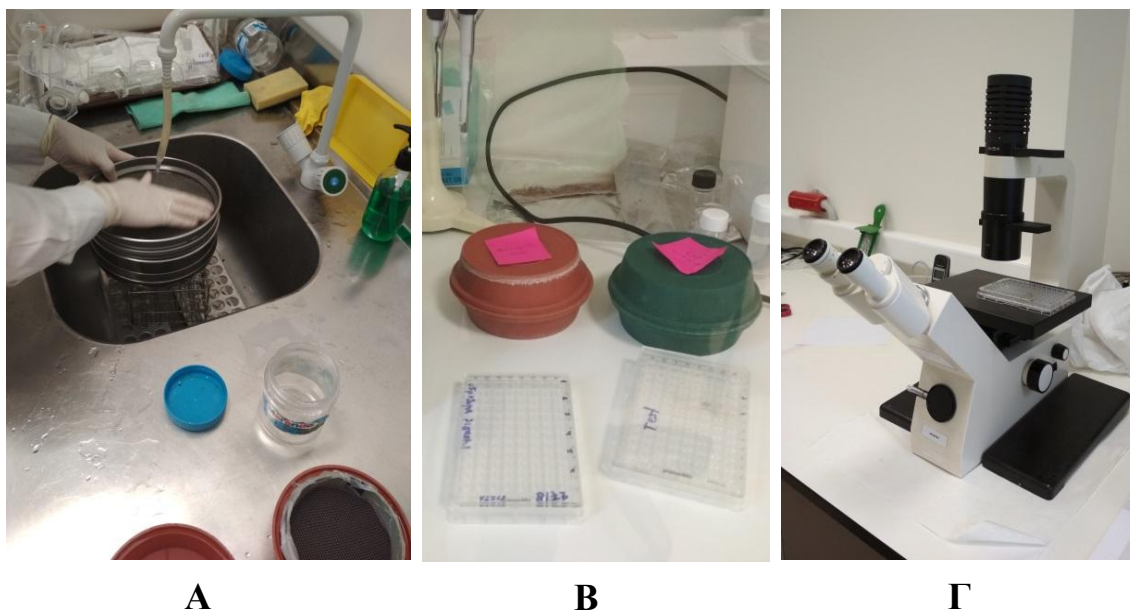
3.1.2.1 Συντήρηση πληθυσμού του νηματώδους *Meloidogyne incognita* σε φυτά *Solanum lycopersicum* L.

Φυτά τομάτας *Solanum lycopersicum* L. ηλικίας δύο μηνών μολύνθηκαν με J2 κομβονηματώδεις *Meloidogyne incognita*. Για τη μόλυνση κάθε φυτού τομάτας ανοίχθηκαν συμμετρικά τρεις τρύπες στο έδαφος γύρω από το βλαστό, με κατεύθυνση προς τον κατακόρυφο άξονα ανάπτυξης της ρίζας, σε βάθος ίσο με τα δύο τρίτα περίπου του ύψους της γλάστρας. Στις τρύπες εγχύθηκε εναιώρημα νηματωδών όγκου 10ml συγκέντρωσης 100 νηματωδείς/ml. Οι μολυσμένες τομάτες διατηρήθηκαν στο θάλαμο καλλιέργειών ελεγχόμενων συνθηκών του Εργαστηρίου Βιολογικού Ελέγχου Γεωργικών Φαρμάκων του ΜΦΙ. Τα φυτά ποτίζονταν με 10ml νερό βρύσης ανά τρεις μέρες. Εξηνταπέντε μέρες μετά τη μόλυνση αφαιρέθηκε ο βλαστός με ψαλίδι. Οι ρίζες, διαβρέχτηκαν για δύο ώρες σε λεκάνη με νερό βρύσης, καθαρίστηκαν προσεκτικά από το χώμα, ώστε να μην απομακρυνθούν οι ωόσακκοι των κομβονηματωδών. Στη συνέχεια, οι ρίζες κόπηκαν με ψαλίδι σε τμήματα μήκους 5cm περίπου και τοποθετήθηκαν σε κλειστό δοχείο με 200ml διαλύματος υποχλωριώδους νατρίου (NaOCl) 20%v/v. Ακολούθησε ισχυρή ανακίνηση του δοχείου για 4min. Το περιεχόμενο του δοχείου αδειάστηκε σε διπλό κόσκινο με διάμετρο πόρων 425μm (άνω κόσκινο, χοντρό) και 250μm (κάτω κόσκινο, λεπτό). Οι ρίζες ξεπλύθηκαν με άφθονο τρεχούμενο νερό βρύσης για άλλα 4min ενώ παράλληλα τρίβονταν στο άνω κόσκινο με το χέρι, ώστε να απομακρυνθούν οι ωόσακκοι και να περάσουν από τις οπές στο λεπτό κόσκινο (Εικόνα 3.3). Στη συνέχεια οι νηματωδείς τοποθετήθηκαν σε τροποποιημένη συσκευή Baermann (VanBezooijen, 2006).

Συσκευή Baermann: Η συσκευή Baermann αποτελείται από δύο πλαστικά πιάτα τοποθετημένα το ένα πάνω στο άλλο (Εικόνα 3.3B) ώστε να δημιουργείται εσωτερικός σκοτεινός χώρος στον οποίο προστίθενται 100ml νερό καθώς και ένα μικρό κόσκινο, προσεκτικά καλυμμένο με διαβρεγμένο διηθητικό χαρτί (Cottonwool nematode filter). Πάνω στο διηθητικό χαρτί τοποθετούνται οι νηματώδεις (αυγά και J2) ώστε να βρίσκονται σε συνεχή επαφή με το νερό. Οι εκκολαπτόμενοι J2 νηματώδεις, διέρχονται από το διηθητικό χαρτί, κινούμενοι προς το νερό, απ' όπου παραλαμβάνονται ανά δύο μέρες για να μολυνθούν εκ νέου φυτά. Κάθε φορά που απομακρύνεται το εναιώρημα νηματωδών, αναπληρώνεται το νερό στη συσκευή Baermann (Hussey & Barker, 1973, Ntallietal., 2010).

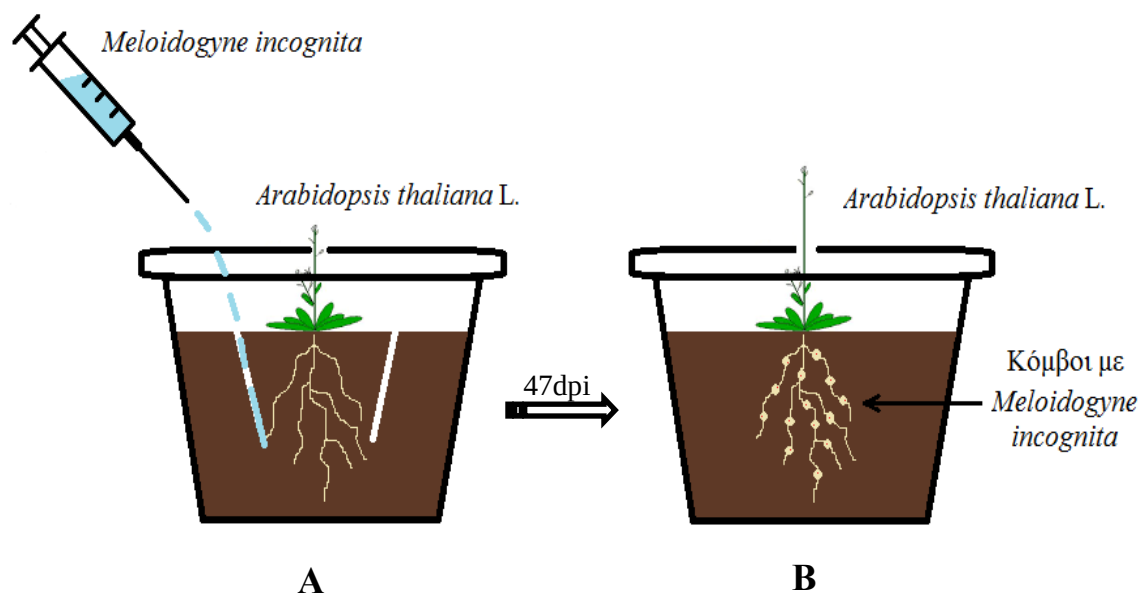
3.1.2.2 Συλλογή μολυσματικού σταδίου J2 του είδους *Meloidogyne incognita* και μόλυνση φυτών *Arabidopsis thaliana* L.

Η συλλογή του μολυσματικού σταδίου J2 των κομβονηματωδών αρχίζει δύο μέρες μετά την εξαγωγή τους από τους ώριμους ωόσακκους στη συσκευή Baermann και επαναλαμβάνεται ανά δύο μέρες για δύο εβδομάδες περίπου. Οι κομβονηματώδεις μεταφέρθηκαν με falcon των 50ml στο Εργαστήριο Βοτανικής του ΕΚΠΑ. Ο προσδιορισμός της συγκέντρωσης των J2 *Meloidogyne incognita* στο εναιώρημα που παραλήφθηκε από τη συσκευή Baermann έγινε με καταμέτρηση των J2 σε ανάστροφο μικροσκόπιο AXIOVERT100, ZEISS (Εικόνα 3.3) και ακόλουθη συμπίκνωση, ώστε η τελική συγκέντρωση να ανέρχεται στους 100 νηματώδεις/ml (20 κομβονηματώδεις/g εδάφους).



Εικόνα 3.3:Εξαγωγή κομβονηματοδών με τη μέθοδο Baermann.**A)**Κομμένες ρίζες μολυσμένων φυτών (65dpi) ξεπλένονται με υποχλωριώδες νάτριο 5% και τοποθετούνται σε διπλό κόσκινο (425 και 250 μm). Τρίβοντας τις ρίζες οι νηματώδεις περνούν από το πάνω, στο κάτω κόσκινο και στη συνέχεια τοποθετούνται στη συσκευή Baermann. **B)**Οι J2 *Meloidogyne incognita* εκκολάπτονται και κατευθύνονται προς το νερό. Κάθε δύο μέρες παραλαμβάνεται το εναιώρημα κομβονηματοδών και με τη βοήθεια πιάτου ELISA γίνεται συμπύκνωση, ώστε η τελική συγκέντρωση να ανέρχεται σε 100νηματώδεις/ml. **Γ)**Η καταμέτρηση των νηματωδών γίνεται σε ανάστροφο μικροσκόπιο.

Στα φυτά *Arabidopsis thaliana* L. η μόλυνση πραγματοποιήθηκε εικοσιεπτά μέρες μετά τη φύτευση, όπως περιγράφηκε στην ενότητα 3.1.2.1, με τη διαφορά ότι σε κάθε γλαστράκι προστέθηκαν 5ml εναιωρήματος J2 νηματωδών, ώστε να μην υπάρξει διαρροή από τις οπές στη βάση της γλάστρας. Την πρώτη εβδομάδα μετά τη μόλυνση το πότισμα των φυτών απαιτεί ιδιαίτερη προσοχή, προκειμένου να μην απομακρυνθούν οι νηματώδεις πριν προλάβουν να εισέλθουν στις ρίζες. Στη συνέχεια τα φυτά ποτίζονταν κανονικά με 5ml νερό βρύσης ανά δύο μέρες. Εικοσιμία μέρες μετά τη μόλυνση (21dpi) σχηματίζονται κόμβοι με μεγακύντα, ενώ σαρανταεπτά μέρες μετά τη μόλυνση (47dpi) παρατηρούνται μακροσκοπικά ακόμα και οι ώριμοι ωόσακκοι ως ερυθρά στίγματα πάνω στους κόμβους των ριζών (Εικόνα 3.4).



Εικόνα 3.4: Μόλυνση φυτών *Arabidopsis thaliana* L. από κομβοηματώδεις *Meloidogyne incognita*. **A)** Εναιώρημα περίπου 500 J2 κομβοηματωδών *Meloidogyne incognita* (20 κομβοηματώδεις/g εδάφους) εισάγεται σε τρύπεζγύρω από το ριζικό σύστημα φυτών *Arabidopsis thaliana* L. Col-0 και *fra2*. **B)** Σαρανταεπτά μέρες μετά τη μόλυνση (47dpi) έχουν αναπτυχθεί πλήρως οι ώριμοι ωσάκκοι πάνω στους μακροσκοπικά εμφανείς κόμβους των ριζών (ερυθρά στίγματα στους κόμβους) που φέρουν μεγάλο αριθμό αυγών καθώς και το μολυσματικό στάδιο J2 των κομβοηματωδών *Meloidogyne incognita*.

3.2 Τεχνικές προσδιορισμού σύστασης του κυτταρικού τοιχώματος μεγακυττάρων στο φυτό *Arabidopsis thaliana* L.

Για τον προσδιορισμό της σύστασης του κυτταρικού τοιχώματος των μεγακυττάρων, χρησιμοποιήθηκαν φυτά *Arabidopsis thaliana* L. Col-0 και *fra2* που αναπτύχθηκαν σε θαλάμους καλλιεργειών, όπως περιγράφηκε στην ενότητα 3.1.1. Εικοσιεπτά μέρες μετά τη φύτευση (27dpi), κάθε φυτό μολύνθηκε με εναιώρημα νηματωδών που περιείχε περίπου 500 J2 *Meloidogyne incognita* (20 κομβοηματώδεις/g εδάφους). Η παρασκευή των διαλυμάτων που ακολουθούν αναλύεται στο Παράρτημα Ι.

3.2.1 Συλλογή κόμβων από τις ρίζες μολυσμένων φυτών *Arabidopsis thaliana* L.

Εικοσιμία μέρες μετά τη μόλυνση (21dpi) τα φυτά απομακρύνθηκαν από τα γλαστράκια τους και οι ρίζες καθαρίστηκαν ενδελεχώς από το χώμα με άφθονο νερό. Η ρίζα τοποθετήθηκε σε γυάλινο τρυβλίο με νερό βρύσης και παρατηρήθηκε σε στερεοσκόπιο Stemi 2000-C, ZEISS για να εντοπιστούν οι κόμβοι. Με λαβίδα και νυστέρι αποκόπηκαν τα τμήματα της ρίζας με κόμβους σε απόσταση 1cm εκατέρωθεν αυτών και φυλάχθηκαν σε Eppendorf με αποστειρωμένο νερό.

3.2.2 Στερέωση των κόμβων μολυσμένων φυτών *Arabidopsis thaliana* L.

Τα δείγματα μεταφέρθηκαν σε διάλυμα στερέωσης παραφορμαλδεϋδης-γλουταρικής αλδεϋδης (2% PFA - 0,5% GA) για 2h σε θερμοκρασία δωματίου (παραλλαγή της μεθόδου των Adamakis et al., 2014). Ακολούθησαν δύο διαδοχικές εκπλύσεις με ρυθμιστικό διάλυμα PEM (50mM PIPES - 5mM EGTA - 5mM MgSO₄) διάρκειας 10min η καθεμία.

3.2.3 Σταδιακή αφυδάτωση κόμβων του φυτού *Arabidopsis thaliana* L.

Τα Eppendorf με τα δείγματα σε ρυθμιστικό διάλυμα PEM, μεταφέρθηκαν στον πάγο ώστε να γίνει σταδιακή αφυδάτωση με παγωμένη αιθανόλη αυξανόμενης συγκέντρωσης (Panteris et al., 2010). Οι συγκεντρώσεις αιθανόλης και τα χρονικά διαστήματα παραμονής των δειγμάτων σε αυτή παρουσιάζονται στον Πίνακα 3.1. Στο τέλος αυτής της διαδικασίας, τα δείγματα φυλάσσονται στο ψυγείο (4°C).

Πίνακας 3.1: Στάδια διαδοχικής αφυδάτωσης κόμβων σε κλίση συγκεντρώσεων παγωμένης αιθανόλης

Στάδιο	Συγκέντρωση αιθανόλης %v/v	Χρονικό διάστημα
1	30	10min
2	30	30min
3*	30	30min
4	50	1h
5	70	1h
6	90	1h
7	100	1h
8	100	2h
9**	100	1μέρα

* το διάλυμα 30% αιθανόλης αυτού του σταδίου περιέχει επιπλέον 0,5% OsO₄.

** το διάλυμα 100% αιθανόλης προέρχεται από δοχείο το οποίο περιέχει στερεό στον πάτο CuSO₄, για να μεγιστοποιηθεί αφυδάτωση.

3.2.4 Εμποτισμός κόμβων του φυτού *Arabidopsis thaliana* L. σε ρητίνη LRW

Το διάλυμα αφυδάτωσης των δειγμάτων αναρροφήθηκε με γυάλινη πιπέτα και αντικαταστάθηκε από 500μl αιθανόλη 100%, υπέρκορο με CuSO₄. Ακολούθησε διαδοχική προσθήκη 125μl ρητίνης LRW (London Resin White) τέσσερις φορές σε διάστημα δύο ημερών, ώστε να αυξηθεί η συγκέντρωση της ρητίνης σε 50% με πολύ

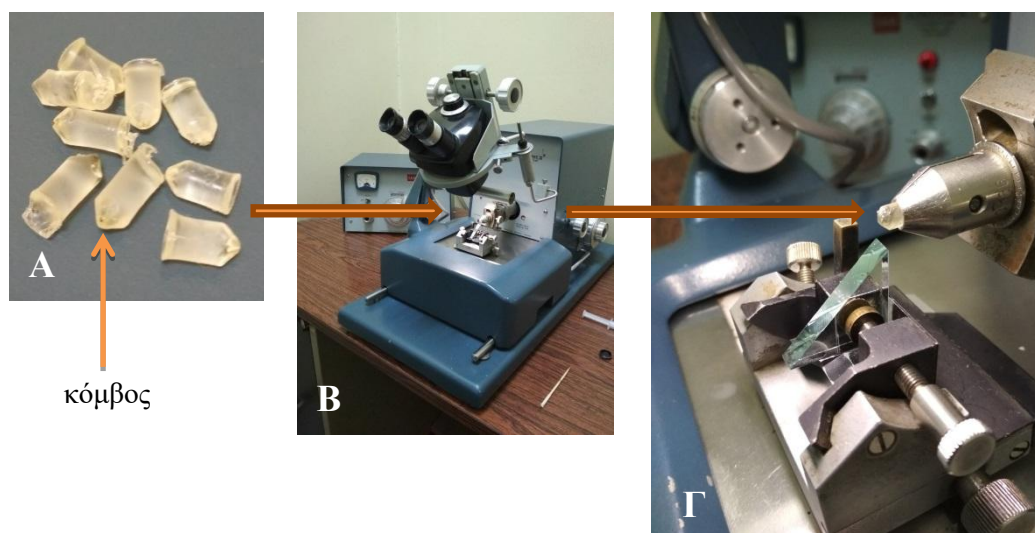
αργούς ρυθμούς προκειμένου να εμποτιστούν οι φυτικοί ιστοί ομοιόμορφα. Στη συνέχεια αφαιρούνταν το διάλυμα ρητίνης και αντικαθίστατο από διάλυμα μεγαλύτερης συγκέντρωσης έως ότου η τελική συγκέντρωση της ρητίνης να γίνει 100%. Η αναλογία ρητίνη LRW προς 100% αιθανόλη-CuSO₄ και τα αντίστοιχα χρονικά διαστήματα παραμονής των δειγμάτων σε αυτή παρουσιάζονται στον Πίνακα 3.2. Όλες οι αναφερόμενες διαδικασίες έγιναν στον πάγο, σε απαγωγό αερίων, ενώ η ρητίνη αφού χρησιμοποιούνταν κάθε φορά επέστρεφε στο ψυγείο, σε προστατευμένο από το φως δοχείο, καθώς είναι ιδιαίτερα ευαίσθητη στο φως και σε υψηλότερες θερμοκρασίες. Την έβδομη ημέρα τα δείγματα μεταφέρθηκαν σε υπεχειλισμένες με ρητίνη LRW θήκες εμπότισης οι οποίες, αφού έκλεισαν ερμητικά, τοποθετήθηκαν σε κλίβανο 60°C για μία μέρα. Τέλος, τα δείγματα με τους εγκλεισμένους στη ρητίνη πλέον κόμβους, απομακρύνθηκαν από τις θήκες εμπότισης, καθαρίστηκαν με 30% αιθανόλη και αφέθηκαν για άλλη μία μέρα στους 60°C.

Πίνακας 3.2: Στάδια εμποτισμού κόμβων με ρητίνη LRW αυξανόμενης συγκέντρωσης

Στάδιο	Αναλογία (Ρητίνη LRW) : (100%αιθανόλη-CuSO ₄)	Χρονικό διάστημα
1	1:4	1h
2	1:2	1μέρα
3	3:4	1h
4	1:1	1μέρα
5	2:1	1μέρα
6	3:1	1μέρα
7	1:0	1μέρα
8	1:0	1μέρα

3.2.5 Εγκάρσια τμήση κόμβων του φυτού *Arabidopsisthaliana* L. σε μικροτόμο

Τα δείγματα τοποθετήθηκαν σε υπερμικροτόμο ULTROTOME III TYPE 8801A, έτσι ώστε να ληφθούν εγκάρσιες τομές, πάχους 10-12μm, στο επίπεδο των κόμβων όπου εντοπίζονται τα μεγακύτταρα (Εικόνα 3.5). Οι τομές αποτέθηκαν σε σταγόνες αποσταγμένου νερού πάνω σε αντικειμενοφόρους πλάκες και θερμάνθηκαν σε εστία VELPSCIENTIFICA μέχρι να εξατμιστεί πλήρως το νερό. Ακολούθησε μικροσκοπική παρατήρηση των επιστρωμένων τομών για να εντοπιστούν οι καταλληλότερες.



Εικόνα 3.5: Εγκάρσια τμήση ρητίνης με κόμβους ριζών. Α) Εγκλεισμένοι κόμβοι σε ρητίνη LRWB) Μικροτόμος Γ) Εγκάρσια τμήση δειγμάτων κόμβων σε ρητίνη με αιχμηρό γυάλινο μαχαίρι.

3.2.6 Ανοσοσθήμανση τοιχωματικών επιτόπων μεγακυττάρων στο φυτό *Arabidopsisthaliana*L.

3.2.6.1 Χρώση τολουιδίνης, κυανό της ανιλίνης και CalcofluorWhite τομών κόμβων του φυτού *Arabidopsisthaliana*L.

Ο εντοπισμός των φυτικών ιστών και της θέσης του κομβοηματοδούς στις εγκάρσιες τομές έγινε με τη συνδυαστική χρήση χρωστικών ουσιών. Αρχικά πραγματοποιείται χρώση με τολουιδίνη (1% toluidine σε 1% v/v H_3BO_3) που αποκαλύπτει τόσο τους φυτικούς όσο και τους ζωικούς ιστούς. Η χρώση με CalcofluorWhite (0.001% CalcofluorWhite σε PBS) και με κυανό της ανιλίνης (0.05% aniline blue σε 0,07M K_2HPO_4) που επικαθονται στην κυτταρίνη και σε εναποθέσεις καλλόξης αντίστοιχα, επιβεβαίωσαν σε κάθε περίπτωση το είδος των κυττάρων που παρατηρούνταν στις τομές (Herburger et al., 2016). Η θέση του ζώου προσδιορίστηκε σχετικά εύκολα λόγω του έντονου χρωματισμού και του αυτοφθορισμού του πεπτικού συστήματος. Για την κάθε χρώση προστέθηκε από μία σταγόνα της αντίστοιχης χρωστικής πάνω στις τομές σε αντικειμενοφόρους πλάκες. Στην περίπτωση της χρώσης με τολουιδίνη, η αντικειμενοφόρος τοποθετήθηκε σε θερμαντική εστία έως ότου η άλως της σταγόνας γίνει ελαφρώς πιο αμυδρή και έπειτα ξεπλύθηκε με άφθονο απιονισμένο νερό με τη βοήθεια υδροβολέα. Οι τομές με τη χρώση τολουιδίνης παρατηρήθηκαν σε οπτικό μικροσκόπιο. Οι τομές με τη χρώση κυανό της ανιλίνης και Calcofluor White, καλύφθηκαν με καλυπτρίδα και παρατηρήθηκαν σε μικροσκόπιο φθορισμού Zeiss Axioplan.

3.2.6.2 Ανοσοσθήμανση τομών κόμβων του φυτού *Arabidopsisthaliana*L. με αντισώματα που ανιχνεύουν επιτόπους του κυτταρικού τοιχώματος

Πίνακας 3.3: Τα αντισώματα και οι επίτοποι του κυτταρικού τοιχώματος που ανιχνεύουν

Αντίσωμα	Επίτοπος	Συνομογραφία επιτόπου	Κατηγορία επιτόπου	Αναφορά
anti-β- 1,3- glucan	Καλλόζη	Cal	Ημικυτταρίνες	Kondori etal.,(2008)
LM25	Ξυλογλυκάνη	Xyl	Ημικυτταρίνες	Pedersen et al., (2012)
LM6	Αραβινάνη	Ara	Πηκτίνες	Willats et al., (1998)
LM20	Πλήρως Μεθυλεστεροποιημένη Ομογαλακτουρονάνη	MeHG	Πηκτίνες	Verhertbruggen et al., (2009a)
JIM5	ΑπομεθυλεστεροποιημένηΟμογαλακτουρονάνη	DeSPHG	Πηκτίνες	Casero et al., (1995)
LM2	Αραβιανογλυκοπρωτεΐνες	AGPs	Γλυκοπρωτεΐνες	Smallwood et al., (1996)

Για τον προσδιορισμό της σύστασης των κυτταρικών τοιχωμάτων των μεγακυττάρων, εγκάρσιες τομές των κόμβων επωάστηκαν με αντισώματα που αναγνωρίζουν και προσδένονται ειδικά σε επιτόπους τοιχωματικών υλικών (Pattathil et al., 2010, Willatset al., 2010). Τα αντισώματα που χρησιμοποιήθηκαν στα πλαίσια αυτής της εργασίας εντοπίζουν δευτερεύοντα στοιχεία του κυτταρικού τοιχώματος, όπως ημικυτταρίνες, πηκτινικές ενώσεις, γλυκοπρωτεΐνες και ένζυμα του τοιχώματος. Στον Πίνακα 3.3, παρουσιάζονται τα αντισώματα που χρησιμοποιήθηκαν, οι επίτοποι στους οποίους δεσμεύονται και η ευρύτερη κατηγορία δευτερογενών στοιχείων του τοιχώματος στην οποία ανήκουν οι επίτοποι αυτοί. Τα αντισώματα LM2, LM6, LM20, LM25 και JIM5 αγοράστηκαν από την Plant-Probes, το anti-β-1,3-glucan από την AUSTRALIA BIOSUPPLIES, ενώ τα anti-rat και anti-mouse δευτέρα αντισώματα από την Sigma-Aldrich.

Ανοσοσήμανση τομών με αντισώματα LM25, LM6, LM20 και JIM5: Ακολουθήθηκε η μέθοδος που περιγράφεται από τους Giannoutsou et al., 2016 με παραλλαγές όπως περιγράφεται παρακάτω. Σε κάθε τομή προστέθηκε σταγόνα 2% BSA (2g BSA σε 100ml PEM) για 2h σε θερμοκρασία δωματίου, ώστε να καλυφθούν μη επιθυμητοί επίτοποι αποδιατεταγμένων πρωτεϊνών (blocking) που θα δώσουν ψευδώς θετικό σήμα εντοπισμού δεσμεύοντας μη ειδικά τα αντισώματα που χρησιμοποιούνται. Στη συνέχεια, οι τομές ξεπλένονται δύο φορές με ρυθμιστικό διάλυμα PEM για 5min. Έπειτα οι τομές επωάζονται σε σταγόνες που περιέχουν το πρώτο αντίσωμα LM25, LM6, LM20 ή JIM5 αραιωμένο με PEM σε αναλογία 1:20. Τα παραπάνω αντισώματα προσδένονται αντίστοιχα σε ενώσεις ξυλογλυκάνης, αραβινάνης, πλήρως

μεθυλεστεροποιημένης ομογαλακτουρονάνης και απομεθυλεστεροποιημένης ομογαλακτουρονάνης του κυτταρικού τοιχώματος (Pedersen et al., 2012, Willatset al., 1998, Verherthbruggen et al., 2009a, Casero et al., 1995). Οι αντικειμενοφόροι πλάκες με τις σταγόνες επί των τομών φυλάσσονται για μία μέρα σε σκοτεινό μέρος, σε σφραγισμένα με Parafilm πλαστικά τρυβλία. Ακολουθούν δύο διαδοχικά πεντάλεπτα ξεπλύματα του πρώτου αντισώματος με ρυθμιστικό διάλυμα PEM. Οι τομές επωάζονται με δεύτερο αντίσωμα anti-rat, για 1h σε κλίβανο θερμοκρασίας 37°C στα σφραγισμένα με Parafilm πλαστικά τρυβλία. Οι τομές ξεπλένονται από το δεύτερο αντίσωμα εις διπλούν με ρυθμιστικό διάλυμα PEM. Τέλος, πάνω σε κάθε τομή αποτίθεται σταγόνα διαλύματος κάλυψης (250μl PEM, 1-2 νιφάδες PDA υπό ανάδευση, 500μl γλυκερόλη) και καλυπτρίδα για να παρατηρηθούν σε μικροσκόπιο φθορισμού.

Ανοσοσημανση τομών με αντίσωμα anti-β-1,3-glucan: Στις τομές προστέθηκε σταγόνα 5%BSA (2gBSA σε 100mlPBS) για 5h σε θερμοκρασία δωματίου (blocking) σε σφραγισμένο με Parafilm πλαστικό τρυβλίο. Έπειτα, οι τομές ξεπλένονται δύο φορές με ρυθμιστικό διάλυμα PBS για 5min. Στη συνέχεια οι τομές επωάζονται με σταγόνες που περιέχουν το πρώτο αντίσωμα anti-β-1,3-glucan αραιωμένο με PBS σε αναλογία 1;20. Το αντίσωμα αυτό προσδένεται σε καλλόζη (Kondori et al., 2008). Οι αντικειμενοφόροι φυλάσσονται για μία μέρα σε σκοτεινό μέρος, σε σφραγισμένο με Parafilm πλαστικό τρυβλίο. Ακολουθούν δύο διαδοχικά πεντάλεπτα ξεπλύματα του πρώτου αντισώματος με ρυθμιστικό διάλυμα PBS. Η διαδικασία της κάλυψης (blocking) επαναλαμβάνεται για 3h με 2%BSA και ακολουθούν δύο ξεπλύματα με PBS. Οι τομές επωάζονται στο δεύτερο αντίσωμα anti-mouse, για 1,5h σε κλίβανο θερμοκρασίας 37°C σε σφραγισμένο πλαστικό τρυβλίο. Τέλος, αφού ξεπλυθούν και από το δεύτερο αντίσωμα, προστίθεται στην κάθε τομή σταγόνα διαλύματος κάλυψης και καλυπτρίδα για να παρατηρηθούν σε μικροσκόπιο φθορισμού.

Ανοσοσημανση τομών με αντίσωμα LM2: Κατάλοιπα αλδεϋδης καλύπτονται στις εγκάρσιες τομές των κόμβων με τη χρήση διαλύματος 0,05M γλυκίνης (0,375g γλυκίνη σε 100mlPBS) για 1h. Έπειτα, αφού αφαιρεθεί η σταγόνα γλυκίνης, προστίθεται όπως και στην προηγούμενη περίπτωση 5%BSA για 5h σε θερμοκρασία δωματίου (blocking). Οι τομές ξεπλένονται δύο φορές με ρυθμιστικό διάλυμα PBS για 5min και επωάζονται στο πρώτο αντίσωμα LM2, αραιωμένο με PBS σε αναλογία 1;20. Το αντίσωμα αυτό προσδένεται σε γλυκοπρωτεΐνες πλούσιες σε κατάλοιπα αραβινάνης, AGPs (Smallwood et al., 1996). Οι αντικειμενοφόροι φυλάσσονται για μία μέρα σε σκοτεινό μέρος, σε σφραγισμένο με Parafilm πλαστικό τρυβλίο. Ακολουθούν δύο διαδοχικά πεντάλεπτα ξεπλύματα του πρώτου αντισώματος με ρυθμιστικό διάλυμα PBS. Οι τομές επωάζονται στο δεύτερο αντίσωμα anti-rat, για 3h σε κλίβανο θερμοκρασίας 37°C σε σφραγισμένο πλαστικό τρυβλίο. Τέλος, αφού ξεπλυθούν και από το δεύτερο αντίσωμα, προστίθεται πάνω στις τομές σταγόνα διαλύματος κάλυψης και καλυπτρίδα για να παρατηρηθούν σε μικροσκόπιο φθορισμού.

3.2.7 Παρατήρηση τομών κόμβων του φυτού *Arabidopsisthaliana* L. σε μικροσκόπιο φθορισμού

Οι τομές παρατηρήθηκαν σε μικροσκόπιο φθορισμού AxioPlan, με προσαρμοσμένη κάμερα AxioCamMRs5. Αρχικά, καταγράφηκε ο αυτοφθορισμός φυτικών και ζωικών ιστών σε πράσινη και μπλέ μονοχρωματική ακτινοβολία με σκοπό να εκτιμηθεί η συμβολή του στο οπτικό αποτέλεσμα των τομών που έχουν υποστεί μεταχείριση με χρώσεις ή ανοσοσήμανση. Οι τομές με χρώση τολουιδίνης παρατηρούνται και φωτογραφίζονται σε λευκό φως, ενώ εκείνες με CalcofluorWhite και κυανό της ανιλίνης υπό την επίδραση μπλε μονοχρωματικής ακτινοβολίας. Για όλες τις ανοσοσημασμένες τομές χρησιμοποιήθηκε η πράσινη μονοχρωματική δέσμη φωτός του μικροσκοπίου. Φωτογραφίες λαμβάνονταν σε μεγεθύνσεις 20×, 40× και 100× με χρήση ειδικού λαδιού (immersionoiltype-F, Olympus).

3.2.8 Επεξεργασία εικόνας τομών κόμβων του φυτού *Arabidopsisthaliana* L.

Οι φωτογραφίες λαμβάνονται σε H/Y με το πρόγραμμα Axiovision σύμφωνα με τις οδηγίες του κατασκευαστή. Η επεξεργασία της αντίθεσης και φωτεινότητας των εικόνων πραγματοποιήθηκε με το πρόγραμμα PhotoshopCS2.

3.3 Πειραματική διαδικασία για την εκτίμηση της επίδρασης στελεχών στρεπτομυκήτων στην ανάπτυξη φυτών *Arabidopsisthaliana* L. και του βαθμού μόλυνσης αυτών από κομβονηματώδεις *Meloidogyneincognita*

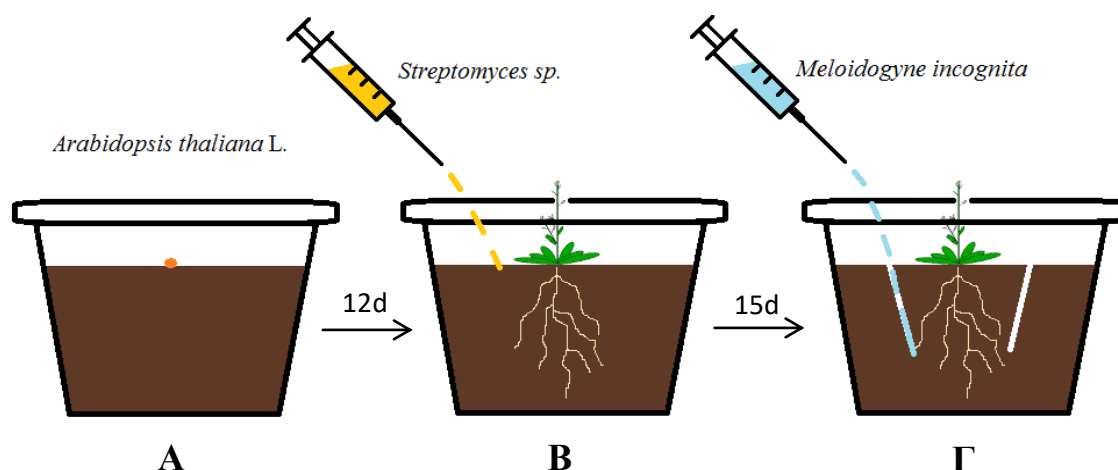
Για τα πειράματα βιοελέγχου χρησιμοποιήθηκαν τα στελέχη στρεπτομυκήτων *Streptomycescolombiensis*ATHUBA 438 και *Streptomycesmonomycini*ATHUBA 220, της τράπεζας ATHUBA «TheAthensUniversityBacterial&ArchaeaCultureCollection» του ΕΚΠΑ, με κωδικούς εργαστηρίου CR83 και AMO19 αντίστοιχα (Katsifas et al., 1999). Τα στελέχη χορηγήθηκαν ευγενικά από την προπτυχιακή φοιτήτρια του τμήματος Βιολογίας του ΕΚΠΑ, Εύα Λαμπροπούλου, η οποία τα καλλιέργησε και τα χρησιμοποίησε στα πλαίσια της διπλωματικής της εργασίας. Η επιλογή των στελεχών έγινε με βάση την νηματωδοκτόνο δράση που εμφάνισαν σε *invitro* πειράματα. Το πείραμα πραγματοποιήθηκε εις διπλούν την άνοιξη του 2019.

Πίνακας 3.4: Στελέχη στρεπτομυκήτων της τράπεζας ATHUBA

Είδος Στρεπτομύκητα	Κωδικός ATHUBA	Κωδικός Εργαστηρίου	Αναφορά
<i>Streptomycescolombiensis</i>	438	CR83	Katsifas et al. (1999)

Ταστελέχη *Streptomyces colombiensis* ATHUBA 438 και *Streptomyces monomycini* ATHUBA απομονώθηκαν από ριζόσφαιρα κωνοφόρων δένδρων της Κρήτης και αείφυλλων θάμνων της Σάμου αντίστοιχα. Στη διπλωματική εργασία της φοιτήτριας του Βιολογικού Τμήματος Αθηνών, Σαγιά Αγγελική (2017), με τίτλο «Διερεύνηση της δυνατότητας παραγωγής βιοενεργών ουσιών στα στελέχη του γένους *Streptomyces* της Συλλογής Μικροοργανισμών του Εργαστηρίου Μικροβιολογίας του ΕΚΠΑ» βρέθηκε ότι αμφότερα τα στελέχη αναστέλουν 12 μικροβιακούς δείκτες, μεταξύ των οποίων θετικά και αρνητικά κατά Gram βακτήρια, νηματοειδείς μύκητες και ζυμομύκητες. Ο έλεγχος βιοενεργότητας εκχυλισμάτων από στερεές και υγρές καλλιέργειες έδειξε ότι τα δύο στελέχη παράγουν μικρού μοριακού βάρους βιοενεργές ουσίες.

3.3.1 Εμβολιασμός στελεχών *Arabidopsis thaliana* L. Col-0 και *fra2* με εναιώρημα σπορίων *Streptomyces colombiensis* ATHUBA 438 και *Streptomyces monomycini* ATHUBA 220



Εικόνα 3.8: Α) Φύτευση σπερμάτων φυτών *Arabidopsis thaliana* L. Col-0 και *fra2*, Β) Εμβολιασμός φυτών ηλικίας 12 ημερών με στελέχη στρεπτομυκήτων *Streptomyces colombiensis* ATHUBA 438 και *Streptomyces monomycini* ATHUBA 220, Γ) Μόλυνση φυτών ηλικίας 27 ημερών από κομβονηματώδεις *Meloidogyne incognita*.

Εναιώρημα σπορίων όγκου 10 ml *Streptomyces colombiensis* ATHUBA 438 και *Streptomyces monomycini* ATHUBA 220, συγκέντρωσης $2,57 \cdot 10^7$ κύτταρα/ml (περίπου 10^7 κύτταρα/g εδάφους) και $2,48 \cdot 10^7$ κύτταρα/ml (περίπου 10^7 κύτταρα/g εδάφους) αντίστοιχα, εμβολιάστηκαν σε φυτά *Arabidopsis thaliana* L. Col-0 και *fra2* ηλικίας 12 ημερών. Τα φυτά αναπτύχθηκαν σε θάλαμο ελεγχόμενων συνθηκών, 17°C, 60% υγρασία, 16h φως και 8h σκοτάδι (Εικόνα 3.8). Δεκαπέντε μέρες μετά τον εμβολιασμό με τους στρεπτομύκητες, ένα μέρος των φυτών μολύνθηκε από κομβονηματώδεις J2 *Meloidogyne incognita*, όπως περιγράφηκε στην ενότητα

3.1.2.2, ενώ ίσος αριθμός φυτών χωρίς προσθήκη κομβονηματοδών αναπτύχθηκαν ως μάρτυρες, όπως παρουσιάζεται στον Πίνακα 3.5. Σαρανταεπτά μέρες μετά τη μόλυνση (47dpi), τα φυτά αφαιρέθηκαν από το έδαφος. Οι ρίζες ξεπλύθηκαν προσεκτικά από το χώμα σε τρεχούμενο νερό βρύσης. Με νυστέρι απομακρύνθηκε ο βλαστός κάθε φυτού στο ύψος της μεταβατικής ζώνης (βάση του φυτού) και τοποθετήθηκε σε διηθητικό χαρτί. Οι ρίζες των μολυσμένων φυτών παρέμειναν σε σωληνάρια falcon με νερό όγκου 10ml για περεταίρω επεξεργασία.

Πίνακας 3.5: Είδος και συμβολισμός μαρτύρων και μολυσμένων φυτών

Φυτικό Στέλεχος	Μεταχείριση	Είδος Μεταχείρισης	Συμβολισμός
Arabidopsis thaliana L. Col-0	-	Μάρτυρας φυτού	Col-0
	<i>Streptomyces colombiensis</i> ATHUBA 438	Μάρτυρας επίδρασης <i>S.colombiensis</i> ATHUBA 438	Col-0+ <i>S.colombiensis</i> ATHUBA 438
	<i>Streptomyces monomycini</i> ATHUBA 220	Μάρτυρας επίδρασης <i>S.monomycini</i> ATHUBA 220	Col-0+ <i>S.monomycini</i> ATHUBA 220
	<i>Meloidogyne incognita</i>	Μάρτυρας επίδρασης κομβονηματοδούς	Col-0+ <i>M.incognita</i>
	<i>Meloidogyne incognita</i> και <i>Streptomyces colombiensis</i> ATHUBA 438	Δείγμα Βιοελέγχου με επίδραση <i>S.colombiensis</i> ATHUBA 438	Col-0+ <i>S.colombiensis</i> ATHUBA 438+ <i>M.incognita</i>

<i>Arabidopsis thaliana</i> L. <i>fra2</i>	<i>Meloidogyne incognita</i> και <i>Streptomyces monomycini</i> ATHUBA 220	Δείγμα Βιοελέγχου με επίδραση <i>S.monomycini</i> ATHUBA 220	Col-0+ <i>S.monomycini</i> ATHUBA 220+ <i>M.incognita</i>
	-	Μάρτυρας φυτού	<i>fra2</i>
	<i>Streptomyces colombiensis</i> ATHUBA 438	Μάρτυρας επίδρασης <i>S.colombiensis</i> ATHUBA 438	<i>fra2+S.colombiensis</i> ATHUBA 438
	<i>Streptomyces monomycini</i> ATHUBA 220	Μάρτυρας επίδρασης <i>S.monomycini</i> ATHUBA 220	<i>fra2+S.monomycini</i> ATHUBA 220
	<i>Meloidogyne incognita</i>	Μάρτυρας επίδρασης κομβονηματώδους	<i>fra2+M.incognita</i>
	<i>Meloidogyne incognita</i> και <i>Streptomyces colombiensis</i> ATHUBA 438	Δείγμα Βιοελέγχου με επίδραση <i>S.colombiensis</i> ATHUBA 438	<i>fra2+</i> <i>S.colombiensis</i> ATHUBA 438+ <i>M.incognita</i>
	<i>Meloidogyne incognita</i> και <i>Streptomyces monomycini</i> ATHUBA 220	Δείγμα Βιοελέγχου με επίδραση <i>S.monomycini</i> ATHUBA 220	<i>fra2+</i> <i>S.monomycini</i> ATHUBA 220+ <i>M.incognita</i>

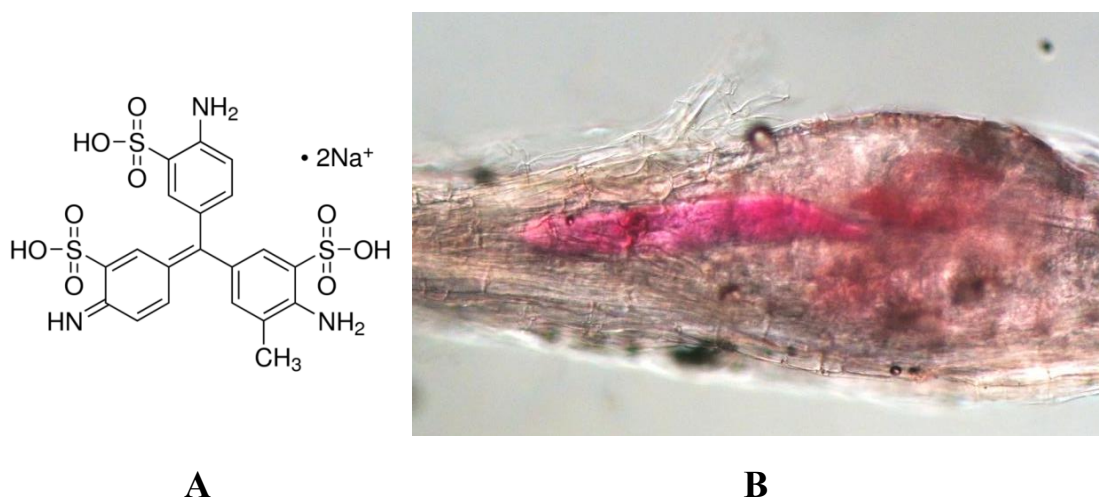
3.3.2 Εκτίμηση παραμέτρων ανάπτυξης των φυτών *Arabidopsis thaliana* L. Col-0 και *fra2*

Μία μέρα μετά την απομάκρυνση των φυτών από τα γλαστράκια, μετρήθηκε με χάρακα το μήκος του βλαστού (SL) σε *cm* και το νωπό του βάρος σε *mg* σε ζυγό ακριβείας KERN AEJ. Τα δείγματα φυλάχθηκαν σε διηθητικό χαρτί σε κλίβανο 60°C για μία εβδομάδα. Τέλος, εκτιμήθηκε το ξηρό βάρος του βλαστού (SDM) σε *mg* σε ζυγό ακριβείας.

3.3.3 Εκτίμηση βαθμού μόλυνσης των φυτών *Arabidopsis thaliana* L. Col-0 και *fra2* από κομβονηματώδεις *M. incognita*

3.3.3.1 Χρώση κομβονηματωδών *Meloidogyne incognita* με οξική φουξίνη στις ρίζες μολυσμένων φυτών *Arabidopsis thaliana* L. Col-0 και *fra2*

Για τον εντοπισμό των κομβονηματωδών στις ρίζες απαιτείται η χρώση των νηματωδών με οξική φουξίνη (Byrd et al., 1983), καθώς το σώμα τους είναι διαφανές και συνεπώς δύσκολο να εντοπιστεί, ειδικά στην περίπτωση που βρίσκεται εξ' ολοκλήρου εντός της ρίζας. Η οξική φουξίνη $C_{20}H_{17}N_3Na_2O_9S_3$ βάφει αποκλειστικά τους ζωικούς ιστούς καθιστώντας εύκολη την καταμέτρηση των ζώων, ακόμα και στην περίπτωση που υπάρχουν παραπάνω από ένα άτομα σε έναν κόμβο.



Εικόνα 3.9: Χρώση οξικής φουξίνης. **A)** Συντακτικός τύπος οξικής φουξίνης (acid fuchsin, www.sigmaaldrich.com), **B)** Χρώση κομβονηματωδών *Meloidogyne incognita* στους κόμβους ριζών μολυσμένων φυτών *Arabidopsis thaliana* L. Col-0. Στο εσωτερικό του κόμβου (διογκωμένο δεξί τμήμα της ρίζας) διακρίνονται με ευκολία δύο κομβονηματώδεις οι κεφαλές των οποίων βρίσκονται στην μέση περίπου του κόμβου όπου εντοπίζονται τα μεγακύτταρα (θέση θρέψης του κομβονηματώδους).

Οι ρίζες των μολυσμένων φυτών ξεπλύθηκαν σε ποτήρι ζέσεως των 100ml με 5% διάλυμα υποχλωριώδους νατρίου (30% NaOCl) για 4min και στη συνέχεια με τρεχούμενο νερό για 1min. Τα δείγματα τοποθετήθηκαν σε σωληνάρια falcon με 10ml νερό βρύσης για 15min. Σε κάθε σωληνάριο προστέθηκαν δύο σταγόνες διαλύματος οξικής φουξίνης και ακολούθησε βρασμός για 5min. Κατόπιν τα δείγματα, αφού επανήλθαν σε θερμοκρασία δωματίου, ξεπλύθηκαν με νερό βρύσης

για 1min και τοποθετήθηκαν σε γυάλινα τρυβλία με ελάχιστο νερό, προκειμένου να καταμετρηθούν οι κομβονηματώδεις σε κάθε ρίζα, όπως περιγράφεται στην επόμενη παράγραφο. Το τελευταίο στάδιο της μεθόδου, δηλαδή η προσθήκη σταγόνων οξινομένης γλυκερίνης (acidified glycerine), παραλήφθηκε σκόπιμα ώστε να μην επιδράσει στις μετρήσεις που ακολουθούν. Αφού ολοκληρώθηκε η καταμέτρηση, οι ρίζες μεταφέρθηκαν σε διηθητικό χαρτί και αφέθηκαν για μία εβδομάδα σε κλίβανο 60°C, για να προσδιοριστεί το ξηρό βάρος τους (RDM) σε mg με ζυγό ακριβείας.

3.3.3.2 Στερεοσκοπική καταμέτρηση κομβονηματωδών στις ρίζες μολυσμένων φυτών *Arabidopsis thaliana* L. Col-0 και *fra2* από *Meloidogyne incognita*

Η καταμέτρηση κομβονηματωδών *Meloidogyne incognita* στις ρίζες μολυσμένων φυτών *Arabidopsis thaliana* L. Col-0 και *fra2* έγινε σε στερεοσκόπιο Stemi 2000-C, ZEISS. Η λήψη και επεξεργασία των φωτογραφιών έγινε με την ενσωματωμένη στο στερεοσκόπιο κάμερα ProgRes C3, JENOPTIK και το αντίστοιχο λογισμικό ProgRes.

3.3.4 Στατιστική επεξεργασία αποτελεσμάτων

Για τις παραμέτρους ανάπτυξης των φυτών μήκος (SL), νωπό (SWM) και ξηρό (SDM) βάρος βλαστού, αλλά και για το βαθμό μόλυνσης (αριθμός κομβονηματωδών/ξηρό βάρος ρίζας) εκτιμήθηκε η μέση τιμή και το τυπικό σφάλμα SE και τα αποτελέσματα απεικονίστηκαν σε κοινά γραφήματα για τα φυτά *Arabidopsis thaliana* L. Col-0 και *fra2*. Επιπλέον εκτιμήθηκε η ευαισθησία των δύο φυτικών στελεχών στη μόλυνση από *Meloidogyne incognita*, με τη βοήθεια του δείκτη σχετικής ανθεκτικότητας RTI (Relative Tolerance Index) για την κάθε αναπτυξιακή παράμετρο ξεχωριστά (Dixon et al., 1990). Για τον προσδιορισμό του RTI υπολογίστηκε ο λόγος της μέσης τιμής της εκάστοτε παραμέτρου των μολυσμένων φυτών *Arabidopsis thaliana* L. Col-0 και *fra2* από *Meloidogyne incognita*, παρουσία και απουσία στελεχών στρεπτομυκήτων, προς τη μέση τιμή της αντίστοιχης παραμέτρου των φυτών-μαρτύρων, σε ποσοστό επί τοις εκατό (τύποι I, II και III).

Η δοκιμασία ANOVA δεν φανέρωσε στατιστικά σημαντική διαφορά ως προς το χρόνο διεξαγωγής των δύο επαναλήψεων των πειραμάτων βιοελέγχου κι έτσι ακολούθησε δοκιμασία Tukey's (t-test) ξεχωριστά για τα φυτά *Arabidopsis thaliana* L. Col-0 και *fra2*, με τη βοήθεια του διαδικτυακού προγράμματος GraphPad (www.graphpad.com), για τη σύγκριση των μέσων τιμών κάθε παραμέτρου φυτικής ανάπτυξης αλλά και για το βαθμό μόλυνσης. Ομοίως, πραγματοποιήθηκε δοκιμασία Tukey's (t-test) και μεταξύ των δύο φυτικών στελεχών ως προς το βαθμό μόλυνσης και τις παραμέτρους φυτικής ανάπτυξης από *Meloidogyne incognita* υπό την παρουσία των στελεχών στρεπτομυκήτων *Streptomyces colombiensis* ATHUBA 438 και *Streptomyces monomycini* ATHUBA 220.

Υπολογισμός του δείκτη RTI:

Δείκτης σχετικής ανθεκτικότητας ως προς το μήκος του βλαστού SLRTI:

$$SLRTI = \frac{\overline{SL}_{treatment}}{\overline{SL}_{control}} \times 100\% \quad (I)$$

Δείκτης σχετικής ανθεκτικότητας ως προς το νωπό βάρος του βλαστού SWMRTI:

$$SWMRTI = \frac{\overline{SWM}_{treatment}}{\overline{SWM}_{control}} \times 100\% \quad (II)$$

Δείκτης σχετικής ανθεκτικότητας ως προς το ξηρό βάρος του βλαστού SDMRTI:

$$SDMRTI = \frac{\overline{SDM}_{treatment}}{\overline{SDM}_{control}} \times 100\% \quad (III)$$

Υπολογισμός του τυπικού σφάλματος RTI:

Ο υπολογισμός του τυπικού σφάλματος έγινε με τη θεώρηση της συνάρτησης δύο μεταβλητών:

$$f(x, y) = \frac{x}{y}$$

όπου,

χημέση τιμή της εκάστοτε παραμέτρου μολυσμένων φυτών από *Meloidogyne incognita* με ή χωρίς *Streptomyces colombiensis* ATHUBA 438 και *Streptomyces monomycini* ATHUBA 220 και χημέση τιμή της αντίστοιχης παραμέτρου των φυτών-μαρτύρων χωρίς μεταχείριση με νηματοδεις ή στρεπτομύκητες.

Τυπικό σφάλμα σ του RTI:

$$\sigma = \sqrt{\left[\frac{\partial f}{\partial x}\right]^2 \sigma_x^2 + \left[\frac{\partial f}{\partial y}\right]^2 \sigma_y^2}$$

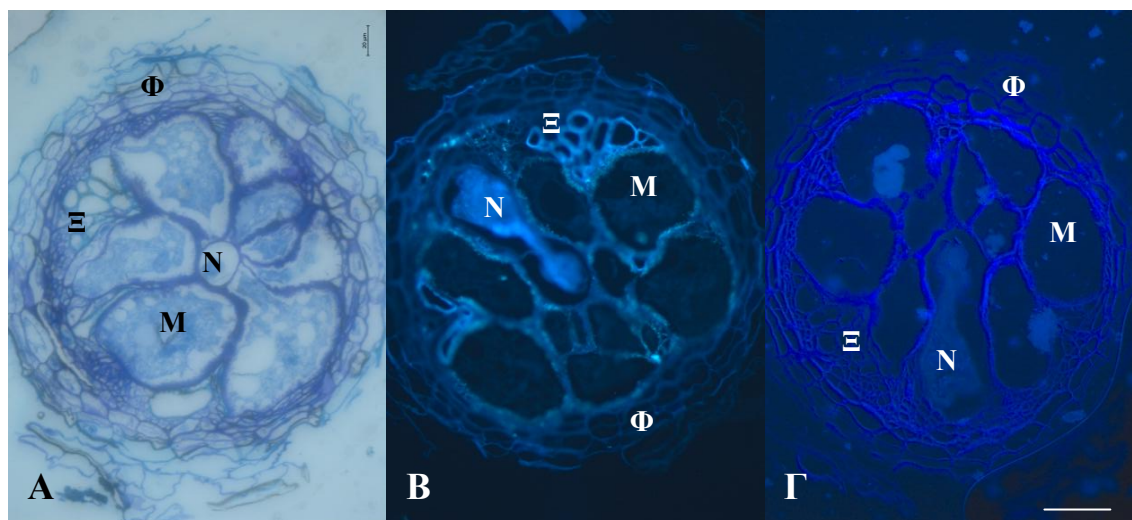
$$\Rightarrow \sigma = \sqrt{\frac{\sigma_x^2}{y^2} + \frac{x^2 \cdot \sigma_y^2}{y^4}} \quad (IV)$$

όπου σ_x και σ_y η τυπική απόκλιση των παραμέτρων ανάπτυξης (SL, SWM και SDM) των φυτών με μεταχείριση «νηματοδεις» ή «νηματοδεις και στρεπτομύκητες» και των φυτών-μαρτύρων αντίστοιχα.

4 Αποτελέσματα

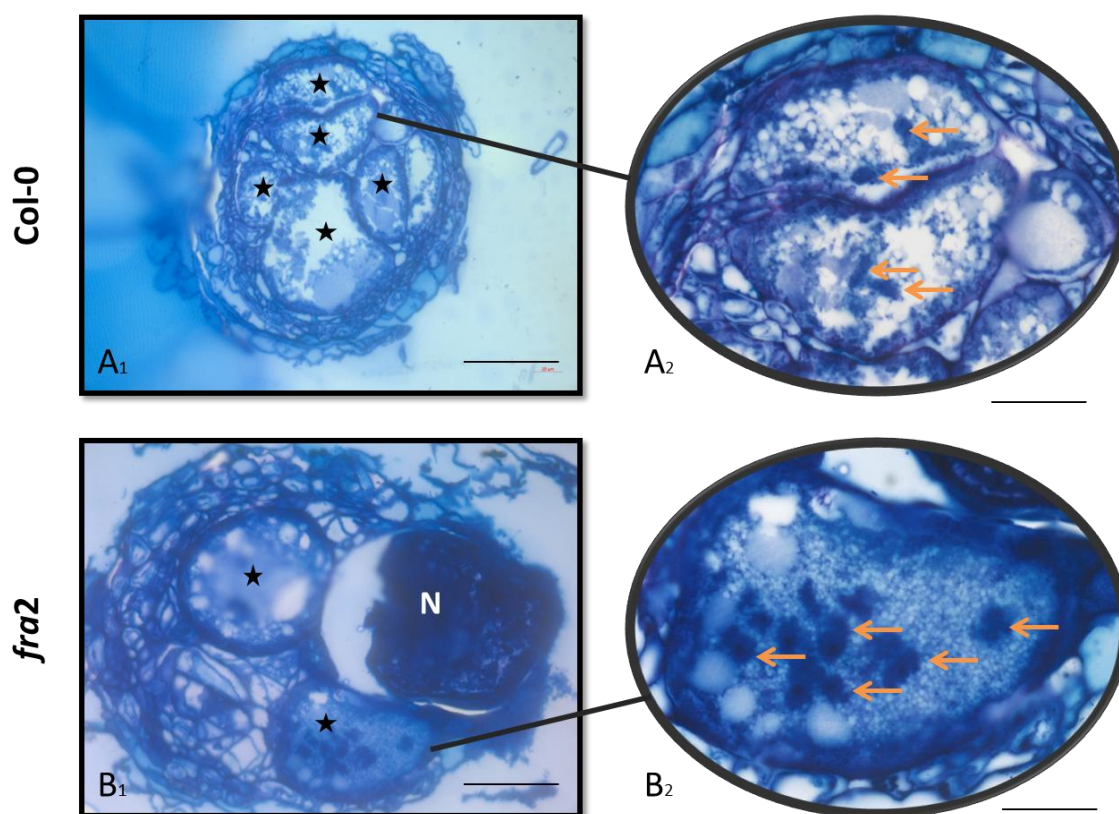
4.1 Συγκριτική μελέτη της σύστασης του κυτταρικού τοιχώματος σε τομές φυτών *Arabidopsis thaliana* L. Col-0 και *fra2*

Οι εγκάρσιες τομές των μολυσμένων φυτών *Arabidopsis thaliana* L. Col-0 και *fra2* παρουσιάζουν ποικίλες ανατομικές διαφορές συγκριτικά με μη μολυσμένα φυτά. Στα μη μολυσμένα φυτά, η θέση των ιστών της ρίζας είναι ως ένα βαθμό αναμενόμενη (Dolan et al. 1993). Στις μολυσμένες από κομβονηματώδεις ρίζες, τα κύτταρα του κεντρικού κυλίνδρου εκτοπίζονται λόγω της υπέρμετρης διόγκωσης των μεγακυττάρων. Επιπλέον σε πολλές περιπτώσεις στις εγκάρσιες τομές εμφανίζεται και ζωικός ιστός που ανήκει στον νηματώδη (Εικόνα 4.1). Η εξακρίβωση της θέσης φυτικών και ζωικών ιστών στις τομές γίνεται με τη συνδυαστική χρήση χρώσεων.



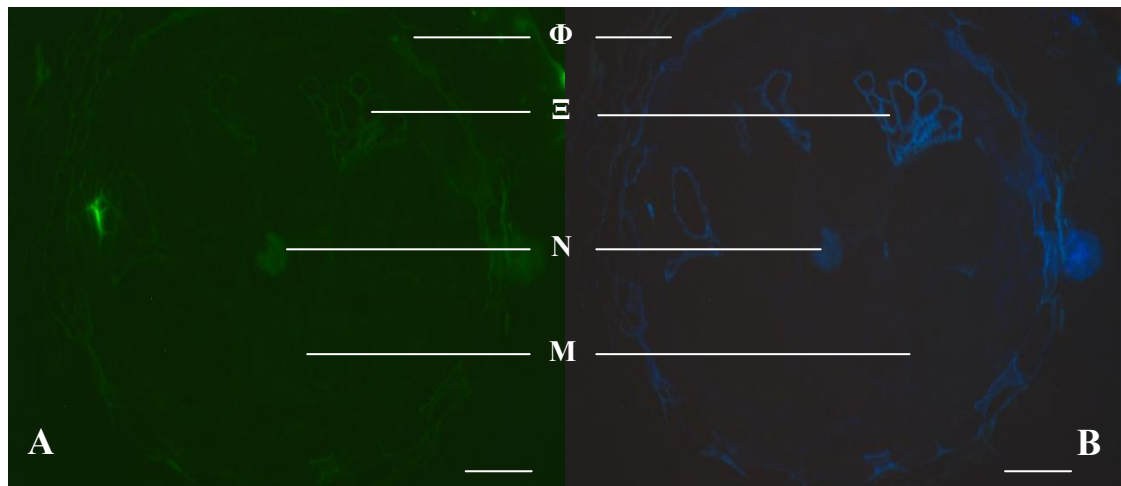
Εικόνα 4.1: Χρώση με τολουιδίνη, κυανό της ανιλίνης και Calcofluor White, εγκάρσιων τομών κόμβων μολυσμένων φυτών *Arabidopsis thaliana* L. Col-0 από κομβονηματώδεις *Meloidogyne incognita* για τον προσδιορισμό φυτικών και ζωικών ιστών. **Α)** Χρώση με τολουιδίνη, **Β)** Χρώση με κυανό της ανιλίνης, **Γ)** Χρώση με Calcofluor White, **Ν:** νηματώδης, **Μ:** μεγακύτταρο, **Ξ:** ξύλωμα, **Φ:** Φλοιός ρίζας. Ο νηματώδης εντοπίζεται πλησίον των μεγακυττάρων από τα οποία τρέφεται, δεν διαθέτει κυτταρικό τοίχωμα και το επιδερμίδιο του παρουσιάζεται ως μια λεία κυκλική γραμμή (Α), ενώ ο αυτοφθορισμός του πεπτικού του συστήματος (Β, Γ) βοηθά στον εντοπισμό του. Το ξύλωμα (Ξ) αποτελείται από κοίλα αγγεία με παχιά κυτταρικά τοιχώματα, ενώ τα κύτταρα του φλοιού (Φ) εντοπίζονται εκτός κεντρικού κυλίνδρου. Τα μεγακύτταρα (Μ) διακρίνονται με ευκολία λόγω της μεγάλης διατομής τους. Κλίμακα 100 μm.

Τα μεγακύτταρα περιβάλλονται από ένα εξαιρετικά παχύ κυτταρικό τοίχωμα. Στο εσωτερικό διακρίνεται ο έντονα χυμοτοπιασμένος πρωτοπλάστης. Επιπλέον, ορατοί καθίστανται οι πολλαπλοί πυρήνες που σχηματίζονται από διαδοχικές μιτώσεις οι οποίες δεν ακολουθούνται από κυτοκίνηση (Rodríguez et al., 2014). Στους περισσότερους πυρήνες διακρίνεται με ευκολία και ο πυρηνίσκος ως ένα μαύρο στίγμα εντός της πυρηνικής περιοχής.



Εικόνα 4.2: Λεπτομερής παρατήρηση μεγακυττάρων σε τομές μολυσμένων φυτών *Arabidopsis thaliana* L. Col-0 και *fra2* από κομβοηλιατώδεις *Meloidogyne incognita* που επωάζονται σε τουλουιδίνη. Οι αστερίσκοι (a₁, b₁) υποδεικνύουν τη θέση των μεγακυττάρων, ενώ ο νηματώδης (N) είναι εμφανής μόνο στην τομή του μεταλλάγματος *fra2* (b₁). Σε μεγαλύτερη μεγέθυνση (a₂, b₂) διακρίνεται ο έντονα χυμοτοπιασμένος πρωτοπλάστης των μεγακυττάρων (οι λευκές κηλίδες είναι πολυάριθμα μικρά χυμοτόπια). Οι σκουρόχρωμες περιοχές εντός των μεγακυττάρων (πορτοκαλί βέλη) είναι οι πυρήνες που προκύπτουν από διαδοχικές μιτώσεις οι οποίες δεν ακολουθούνται από κυτοκίνηση. Στο εσωτερικό των σκουρόχρωμων περιοχών παρατηρείται ακόμα και ο πυρηνίσκος (μαύρο στίγμα). Κλίμακα: A₁: 50μm, A₂: 20μm, B₁: 50μm, B₂: 20μm.

Αυτοφθορισμός: Ο αυτοφθορισμός φυτικών και ζωικών ιστών υπό την επίδραση μονοχρωματικής δέσμης φωτός μπορεί να οδηγήσει στην εσφαλμένη εντύπωση για την ύπαρξη θετικού σήματος του υπό μελέτη επιτόπου σε μια ανοσοσημασμένη τομή. Για το λόγο αυτό, πριν την επώαση με ειδικά αντισώματα, εκτιμάται η συνεισφορά του αυτοφθορισμού των ιστών σε κάθε τομή.



Εικόνα 4.3: Αυτοφθορισμός ιστών σε εγκάρσιες τομές κόμβων μολυσμένων φυτών *Arabidopsisthaliana* L. Col-0 από κομβονηματοδείς *Meloidogyneincognita*. **A)** Αυτοφθορισμός φυτικών και ζωικών ιστών σε πράσινη μονοχρωματική δέσμη φωτός, **B)** Αυτοφθορισμός φυτικών και ζωικών ιστών σε μπλε μονοχρωματική δέσμη φωτός, **Ν:** νηματώδης, **Μ:** μεγακύτταρο, **Ξ:** ξύλωμα, **Φ:** Φλοιός. Το πεπτικό σύστημα του νηματώδους (Ν) και τα αγγεία του ξυλώματος (Ξ) αυτοφθορίζουν, ενώ τα μεγακύτταρα και το παρέγχυμα του κεντρικού κυλίνδρου δεν είναι ευδιάκριτα. Τα κύτταρα του φλοιού (Φ) με το ελάχιστο φως που εκπέμπουν βοηθούν στην οριοθέτηση του κεντρικού κυλίνδρου και διευκολύνουν την παρατήρηση των τομών. Κλίμακα 100μm.

Τα δεδομένα του αυτοφθορισμού, όπως και εκείνα των χρώσεων, λαμβάνονται υπόψη σε κάθε περίπτωση, πριν την επώαση των τομών με αντισώματα, ακόμα και αν δεν παρουσιάζονται στα αποτελέσματα της ανοσοσήμανσης. Στην Εικόνα 4.3 η θέση του ξυλώματος (Ξ) και του κομβονηματοδούς (Ν) προσδιορίζονται εύκολα λόγω του αυτοφθορισμού τους στην πράσινη (Α) και μπλε (Β) μονοχρωματική ακτινοβολία. Αντιθέτως, πιο αμυδρά διακρίνονται τα κύτταρα του φλοιού (Φ) που περιβάλλουν τον κεντρικό κύλινδρο, ενώ τα μεγακύτταρα και τα υπόλοιπα παρεγχυματικά κύτταρα του αγωγού ιστού έχουν ελάχιστο αυτοφθορισμό.

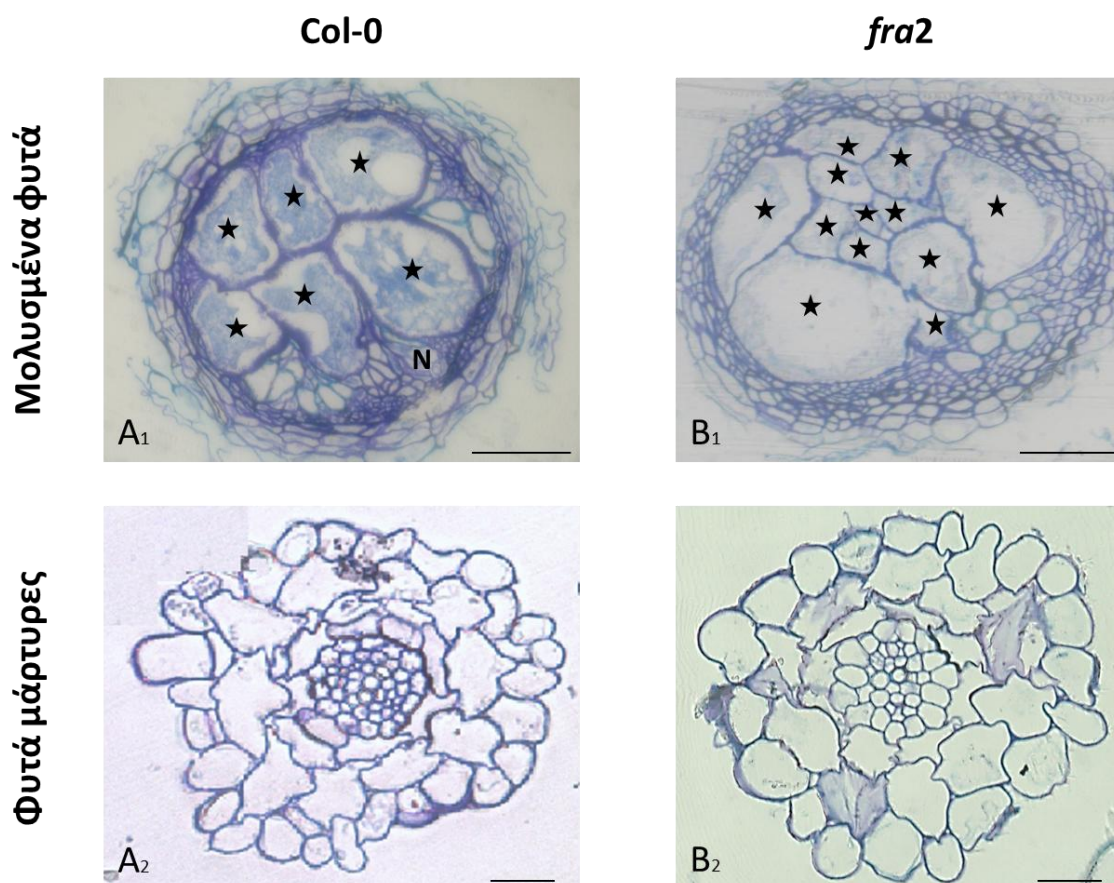
Η λήψη της εικόνας του αυτοφθορισμού των εγκάρσιων τομών, πριν την ανοσοσήμανση, είναι σημαντική διότι εξυπηρετεί εκτός των άλλων και στον εντοπισμό προσμίξεων που δίνουν ψευδώς θετικό σήμα στις τομές που επωάζονται με αντισώματα. Στην Εικόνα 4.3.Α διακρίνεται μια έντονα φωτισμένη περιοχή στο αριστερό τμήμα της τομής η οποία λαμβάνεται υπόψη στις τομές που επωάζονται με αντισώματα που εκπέμπουν στο πράσινο φως.

Συγκριτική μελέτη της ανατομίας μολυσμένων ριζών: Σε εγκάρσιες τομές ρίζας μολυσμένων από κομβονηματοδείς φυτών και μη μολυσμένων φυτών-μαρτύρων *Arabidopsis thaliana* L. Col-0 και *fra2*, έγινε χρώση με τολουιδίνη και CalcofluorWhite.

Χρώση με τολουιδίνη: Η χρώση με τολουιδίνη αποκαλύπτει τη μορφή, τη θέση και το είδος των περισσοτέρων κυττάρων στην εγκάρσια τομή μιας ρίζας. Στα σημεία όπου λαμβάνει χώρα η δευτερογενής αύξηση της ρίζας των φυτών-μαρτύρων, ο αγωγός ιστός εντοπίζεται κεντρικά και περιβάλλεται από το περικύκλιο και την ενδοδερμίδα (Εικόνα 4.4 A₂, B₂). Στο εσωτερικό του κεντρικού κυλίνδρου ξεχωρίζουν τα αγγεία του ξυλώματος μεταξύ των παρεγχυματικών κυττάρων και ηθμοσωλήνων του αγωγού ιστού. Αντίθετα, στους κόμβους των μολυσμένων φυτών κεντρική θέση καταλαμβάνουν τα διευρυμένα μεγακύτταρα (Εικόνα 4.4 A₁, B₁), που διαθέτουν παχιά κυτταρικά τοιχώματα με εσωτερικές προεκβολές. Τα μεγακύτταρα είναι πολυπύρρηνα, πλασματοβριθή και έντονα χυμοτοπιασμένα. Τα κοίλα αγγεία του ξυλώματος, με τα παχιά δευτερογενή κυτταρικά τοιχώματα, εκτοπίζονται στην περιφέρεια του κεντρικού κυλίνδρου λόγω της διόγκωσης των μεγακυττάρων και στο Col-0 αλλά και στο *fra2*. Συνήθως στο μετάλλαγμα *fra2* παρουσιάζονται λιγότερα και μεγαλύτερης διαμέτρου μεγακύτταρα συγκριτικά με τον άγριο τύπο (Col-0). Επιπλέον, καθώς το σώμα των θηλυκών κομβονηματωδών γεμίζει με αυγά και αυξάνει σε μέγεθος, μπορεί να προκαλέσει διάρρηξη των φυτικών ιστών και να εξέλθει της ρίζας (Εικόνα 4.10 B₂).

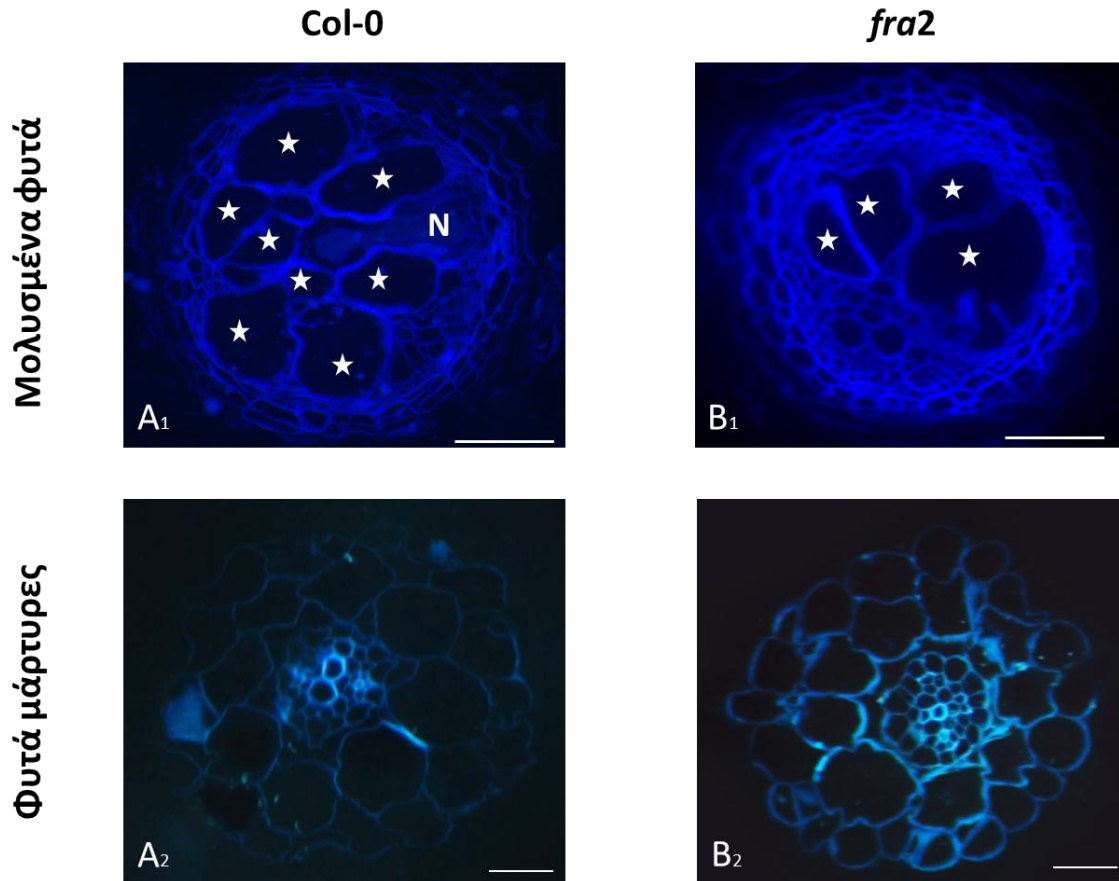
Χρώση Calcofluor White: Η κυτταρίνη των φυτικών κυττάρων χρωματίζεται με τη χρωστική Calcofluor White. Κύτταρα με τοιχώματα μεγάλου πάχους, όπως τα αγγεία του ξυλώματος με τις δευτερογενείς παχύνσεις και τα μεγακύτταρα με τις εσωτερικές προεκβολές διακρίνονται με ευκολία από τους υπόλοιπους φυτικούς ιστούς. Στην Εικόνα 4.5 A₂ και B₂, χαρακτηριστική είναι η έντονη χρώση των στοιχείων του αγωγού ιστού και των κυττάρων της ενδοδερμίδας (Εικόνα 4.5 B₂) έναντι των υπολοίπων ιστών της ρίζας των μη μολυσμένων φυτών. Στα μολυσμένα φυτά Col-0 και *fra2* (Εικόνα 4.5 A₁ και B₁) κυριαρχεί ο έντονος χρωματισμός των τοιχωμάτων των μεγακυττάρων.

Τολουϊδίνη



Εικόνα 4.4: Χρώση με τουλουϊδίνη σε τομές ρίζας μολυσμένων φυτών από κομβονηματώδεις *Meloidogyne incognita* (21dpi) και μη μολυσμένων φυτών-μαρτύρων *Arabidopsis thaliana* L. αγρίου τύπου Col-0 και μεταλλάγματος κατανίνης *fra2*. Στις εγκάρσιες τομές της ρίζας των φυτών-μαρτύρων διακρίνονται από την περιφέρεια προς το κέντρο η ριζοδερμίδα, τα κύτταρα του φλοιού, η ενδοδερμίδα, το περικύκλιο και ο κεντρικός κύλινδρος που περιλαμβάνει αγγεία του ξυλώματος, ηθμοσωλήνες του φλοιώματος και παρεγχυματικά κύτταρα του αγωγού ιστού (A₂, B₂). Στις τομές των κόμβων των μολυσμένων φυτών τα κύτταρα του αγωγού ιστού έχουν εκτοπιστεί στην περιφέρεια του κεντρικού κυλίνδρου από τα διευρυμένα μεγακύτταρα (αστερίσκοι) (A₁, B₁). Η διατομή του σώματος του κομβονηματώδους (N) συχνά φαίνεται στις τομές (a₁) πλησίον των μεγακυττάρων από τα οποία διατρέφεται. Λόγω του μεγέθους των μεγακυττάρων, διακρίνονται τα χυμοτόπια και οι πολυάριθμοι πυρήνες με τους πυρηνίσκους τους, ακόμα και σε μικρή μεγέθυνση σε οπτικό μικροσκόπιο. Κλίμακα: A₁: 50μm, A₂: 20μm, B₁: 50μm, B₂: 20μm.

Calcofluor White



Εικόνα 4.5:Χρώση με Calcofluor White σε τομές ρίζας μολυσμένων φυτών από κομβονηματώδεις *Meloidogyne incognita*(21dpi) και μη μολυσμένων φυτών-μαρτύρων *Arabidopsis thaliana* L. αγρίου τύπου Col-0 και μεταλλάγματος κατανίνης *fra2*. Στις τομές των ριζών των φυτών-μαρτύρων διακρίνονται τα στοιχεία του αγωγού ιστού (ξύλωμα και φλοίωμα), λόγω του μεγαλύτερου πάχους των κυτταρικών τοιχωμάτων τους, από τα υπόλοιπα παρεγχυματικά κύτταρα του κεντρικού κυλίνδρου. Στο μετάλλαγμα κατανίνης (*fra2*) έντονα χρωματίζονται και τα εξωτερικά περικλινή κυτταρικά τοιχώματα των κυττάρων της ενδοδερμίδας (A₂, B₂). Στις τομές των κόμβων των μολυσμένων φυτών, τα μεγάκύτταρα (αστερίσκοι) διαθέτουν έντονα χρωματισμένα κυτταρικά τοιχώματα και καταλαμβάνουν το μεγαλύτερο μέρος της διατομής του κόμβου (A₁, B₁). Το μετάλλαγμα *fra2* χαρακτηρίζεται από τοιχώματα μεγαλύτερου πάχους συγκριτικά με τον άγριο τύπο (Col-0), γεγονός το οποίο αποτυπώνεται στις εικόνες των τομών τόσο των μολυσμένων όσο και των μη μολυσμένων φυτών (A₁ - B₁, A₂ - B₂). Κλίμακα: A₁: 50μm, A₂: 20μm, B₁: 50μm, B₂: 20μm.

4.1.1 Ημικυτταρίνες

Οι ημικυτταρίνες που ανιχνεύτηκαν με ανοσοεντοπισμό στην παρούσα εργασία περιλαμβάνουν ενώσεις ξυλογλυκάνης και καλλόζης. Η ανίχνευση τους έγινε με χρήση των μονοκλωνικών αντισωμάτων LM25 (Pedersen et al., 2012) και anti-β-1,3-glucan (Majewska-Sawka et al., 2002) αντίστοιχα.

Εντοπισμός ξυλογλυκάνης (Xyl): Το LM25 αναγνωρίζει τα ολιγοσακχαριτικά μοτίβα XXXG, τρία κατάλοιπα ξυλόζης ακολουθούμενα από μια γλυκόζη, XXLG, ξυλόζη-ξυλόζη-γαλακτόζη-γλυκόζη, και XLLG, ξυλόζη-γαλακτόζη-γαλακτόζη-γλυκόζη, που εντοπίζονται κατά μήκος των πολυμερών ημικυτταρίνης (Pedersen et al., 2012). Η ξυλογλυκάνη απαντά σε ποσοστό περίπου 35% στα κυτταρικά τοιχώματα πολλών δικοτυλήδων φυτών (Albersheim et al., 2011) και όπως είναι αναμενόμενο τα κύτταρα της ρίζας του *Arabidopsis thaliana* L. παρουσιάζουν υψηλή περιεκτικότητα σε ξυλογλυκάνη (Εικόνα 4.6). Τόσο στα μολυσμένα φυτά όσο και στα μη μολυσμένα φυτά η κατανομή του σήματος καλύπτει το σύνολο των φυτικών ιστών στις εγκάρσιες τομές της ρίζας. Τα μεγακύτταρα εμφανίζουν έντονη εναπόθεση ξυλογλυκάνης τόσο στο Col-0 όσο και στο *fra2* (Εικόνα 4.6 A₁, B₁). Διαφορά παρατηρείται ωστόσο στη κατανομή της ξυλογλυκάνης εντός του κεντρικού κυλίνδρου. Στα μη μολυσμένα φυτά αγρίου τύπου (Col-0) εντονότερη είναι η απόθεση ξυλογλυκάνης στο παρέγχυμα του αγωγού ιστού (Εικόνα 4.6 A₂), ενώ στο μετάλλαγμα κατανίνης *fra2* δε φαίνεται να ισχύει κάτι τέτοιο (Εικόνα 4.6 B₂), η κατανομή του σήματος είναι ομοιόμορφη. Παρόμοιο πρότυπο κατανομής εντός του κεντρικού κυλίνδρου διατηρούν και οι μολυσμένες ρίζες (Εικόνα 4.6).

Εντοπισμός καλλόζης (Cal): Το μονοκλωνικό αντίσωμα anti-β-1,3-glucan προσδένεται ειδικά σε γραμμικές αλυσίδες καταλοίπων γλυκόζης ενωμένων με β-1,3 γλυκοζιτικό δεσμό (Majewska-Sawka et al., 2002) και για αυτό το λόγο θεωρείται κατάλληλο για την ανίχνευση της καλλόζης. Σε μη μολυσμένα φυτά το σήμα ανοσοφθορισμού της καλλόζης του ξυλώματος διατηρείται και μετά τη μόλυνση (Εικόνα 4.7), ενώ στον υπόλοιπο κεντρικό κύλινδρο η εικόνα είναι διαφορετική. Τα παρεγχυματικά κύτταρα του αγωγού ιστού, στα μη μολυσμένα φυτά, δεν χαρακτηρίζονται από την παρουσία καλλόζης. Αντίθετα, στα μολυσμένα φυτά, τα τοιχώματα των παρεγχυματικών κυττάρων του κεντρικού κυλίνδρου παρουσιάζουν αφθονία καλλόζης (Εικόνα 4.7 A₁, B₁). Ισχυρή εναπόθεση καλλόζης παρουσιάζουν τα τοιχώματα των μεγακυττάρων στον άγριο τύπο Col-0 (Εικόνα 4.7 A₁), σε αντιδιαστολή με το *fra2* στο οποίο τα μεγακύτταρα στερούνται καλλόζης (Εικόνα 4.7 B₁). Τα συμπληρωματικά δεδομένα, από τη χρώση με το κυανό της ανιλίνης, επαληθεύουν την ύπαρξη καλλόζης αποκλειστικά στα μεγακύτταρα του αγρίου τύπου (Εικόνα 4.8), αλλά και την επαγωγή της εναπόθεσης καλλόζης στα κύτταρα του κεντρικού κυλίνδρου μετά τη μόλυνση.

4.1.2 Πηκτίνες

Η κύρια κατηγορία πηκτινικών ενώσεων είναι οι γραμμικές αλυσίδες ομογαλακτουρονάνης (HG) που συνεισφέρουν στις διασυνδέσεις των δομικών στοιχείων του κυτταρικού τοιχώματος και συγκεκριμένα στο δίκτυο κυτταρίνης-ημικυτταρίνης (Caffalletal., 2009). Οι καρβοξυλομάδες του γαλακτουρονικού οξέος που αποτελεί το μονομερές της ομογαλακτουρονάνης (Ενότητα 1.1.4.1), μπορεί να είναι μεθυλεστεροποιημένες (MPHG) ή απομεθυλεστεροποιημένες (DeSPHG). Κατά τύπους οι γραμμικές αλυσίδες ομογαλακτουρονάνης σχετίζονται και με άλλους πηκτινικούς πολυσακχαρίτες όπως η ραμνογαλακτουρονάνη I και η ραμνογαλακτουρονάνη II (Leeetal., 2011) που φέρουν πλευρικές βραχείες αλυσίδες κατάλοιπων αραβινόζης (Ara) (Albersheimetal., 2011).

Εντοπισμός μη μεθυλεστεροποιημένης ομογαλακτουρονάνης (DeSPHG): Το μονοκλωνικό αντίσωμα JIM5 αναγνωρίζει και προσδένεται σε μερικώς απομεθυλεστεροποιημένα κατάλοιπα γαλακτουρονικού οξέος της ομογαλακτουρονάνης (Caseroetal., 1995). Τα κύτταρα του κεντρικού κυλίνδρου, συμπεριλαμβανομένων των μεγακυττάρων, στα μολυσμένα Col-0 και *fra2* εμφανίζουν εντονότερο σήμα ανοσοεντόπισης από τα αντίστοιχα κύτταρα των φυτών-μαρτύρων (Εικόνα 4.9). Στο μη μολυσμένο άγριο τύπο (Col-0) υψηλότερης περιεκτικότητας τοιχώματα σε DeSPHG φαίνεται να έχουν τα στοιχεία του ξυλώματος (Εικόνα 4.9 A₂) και του φλοιώματος σε σχέση με το *fra2* που δεν εμφανίζει διαφορές στη συγκέντρωση DeSPHG μεταξύ των κυττάρων του κεντρικού κυλίνδρου (Εικόνα 4.9 B₂).

Εντοπισμός πλήρως μεθυλεστεροποιημένης ομογαλακτουρονάνης (MPHG): Το μονοκλωνικό αντίσωμα LM20 ανιχνεύει αποκλειστικά μεθυλεστεροποιημένα κατάλοιπα γαλακτουρονικού οξέος της ομογαλακτουρονάνης (Verhertbruggenetal., 2009a). Τα κύτταρα του κεντρικού κυλίνδρου των μη μολυσμένων φυτών του *fra2* αποδίδουν σήμα ισοδύναμης έντασης με εκείνα των μολυσμένων φυτών (Εικόνα 4.10 B₁, B₂), με εντονότερο εντοπισμό στα γειτονικά κύτταρα των αγγείων του ξυλώματος. Ωστόσο η συσσώρευση μεθυλεστεροποιημένης ομογαλακτουρονάνης παρουσιάζει διαφορά ως προς την τοπική εναπόθεσή της μεταξύ των μεγακυττάρων των μολυσμένων φυτών και των κυττάρων του κεντρικού κυλίνδρου στα μη μολυσμένα *fra2* φυτά. Σε μη μολυσμένα *fra2* η MHPG συσσωρεύεται στους μεσοκυττάρους χώρους, όπως είναι αναμενόμενο σύμφωνα με τους Verhertbruggenetal., 2009a, ενώ στα μεγακύτταρα εντοπίζεται και κατά μήκος των εφαπτόμενων τοιχωμάτων τους. Παρόμοια εικόνα εμφανίζουν και τα φυτά αγρίου τύπου (Col-0) με τη διαφορά ότι το σήμα στα τοιχώματα των μεγακυττάρων τους είναι μικρότερης έντασης συγκριτικά με αυτό του *fra2* (Εικόνα 4.10 A₁, B₁).

Εντοπισμός αραβινάνης (Ara): Οι πλευρικές διακλαδώσεις αραβινάνης στους πηκτινικούς πολυσακχαρίτες είναι άφθονες στα πρωτογενή κυτταρικά τοιχώματα (Guilleminetal., 2005), όπως γίνεται εύκολα αντιληπτό από τις ανοσοσημασμένες τομές των μη μολυσμένων φυτών Col-0 και *fra2* της Εικόνας 4.11. Στο Col-

Ο ισχυρότερο σήμα εκπέμπουν τα αγγεία του ξυλώματος, ενώ στο *fra2* ο κεντρικός κύλινδρος στο σύνολο του αλλά και η ενδοδερμίδα παρουσιάζουν ομοιόμορφα κατανομημένο σήμα εντοπισμού αραβινάνης (Εικόνα 4.11 A₂, B₂). Το ίδιο πρότυπο κατανομής διατηρούν οι τομές των μολυσμένων ριζών του *fra2*. Τα μεγακύτταρα στο *fra2* εμφανίζουν μεγάλη συγκέντρωση πηκτινικών ενώσεων με αραβινάνη. Απεναντίας, στο Col-0, ο φθορισμός των αντισωμάτων που εντοπίζουν αλυσίδες αραβινάνης είναι ιδιαίτερα αμυδρός σε όλους τους φυτικούς ιστούς συμπεριλαμβανομένων των μεγακυττάρων (Εικόνα 4.11 A₁, B₁).

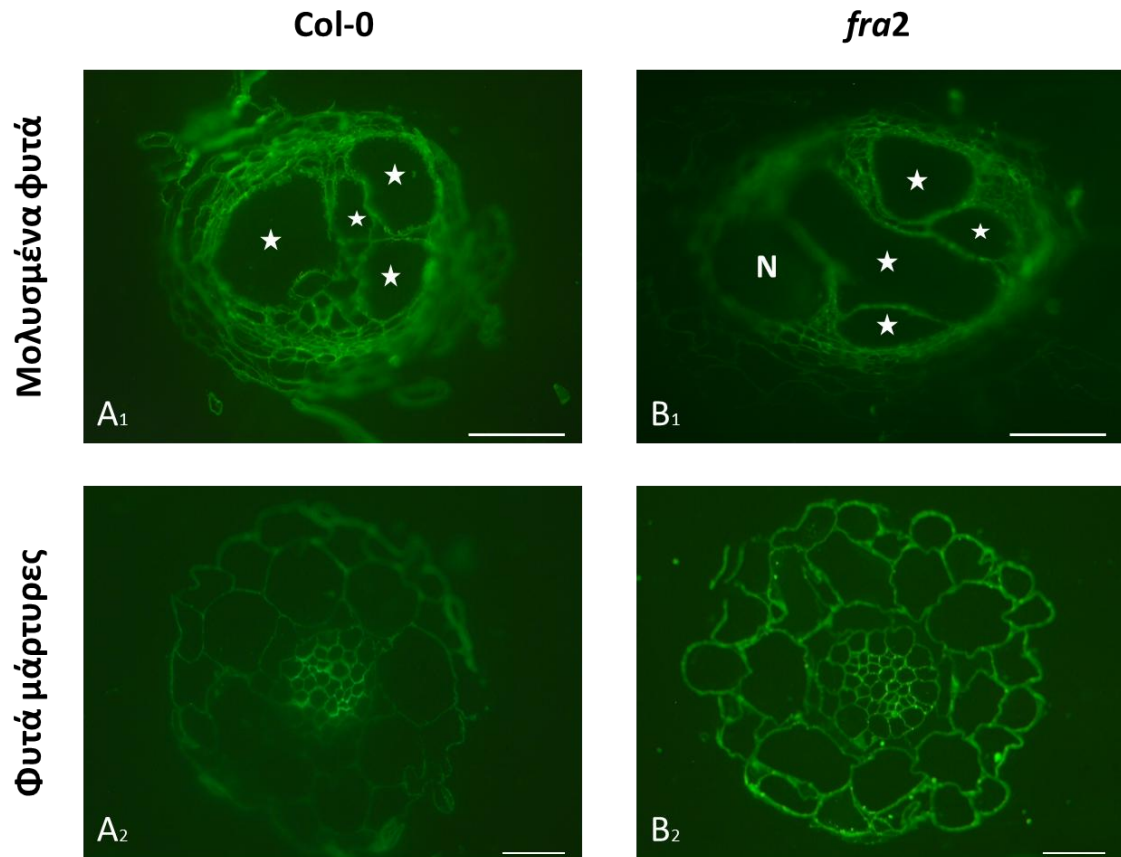
4.1.3 Γλυκοπρωτεΐνες

Η παρουσία γλυκοπρωτεϊνών με αλυσίδες αραβινογαλακτάνης (AGPs) σε χαμηλές συγκεντρώσεις είναι συνηθισμένη στα κυτταρικά τοιχώματα των κυττάρων του κεντρικού κυλίνδρου της ρίζας πολλών δικοτυλήδων φυτών όπως το *A.thaliana* (José-Estanyol et al., 2000).

Εντοπισμός γλυκοπρωτεϊνών αραβινογαλακτάνης (AGPs): Το μονοκλωνικό αντίσωμα LM2 δεσμεύεται σε AGPs του κυτταρικού τοιχώματος (Smallwood et al., 1996). Τα μη μολυσμένα φυτά Col-0 και *fra2* της Εικόνας 4.12 εμφανίζουν αποθέσεις γλυκοπρωτεϊνών AGPs σε όλο το εύρος της τομής εν αντιθέσει με τα μεγακύτταρα των μολυσμένων ριζών στα οποία σημειώνεται σχεδόν παντελής έλλειψη αυτών των επιτόπων (Εικόνα 4.12 A₁, B₁). Πιο συγκεκριμένα, στα μη μολυσμένα φυτά Col-0 ισχυρότερη παρουσία AGPs σημειώνεται στο ξύλωμα του αγωγού ιστού παρά στα παρεγχυματικά κύτταρα του κεντρικού κυλίνδρου (Εικόνα 4.12 A₂). Στο *fra2* το ξύλωμα δεν παρουσιάζει ανάλογης έντασης σήμα με του αγρίου τύπου, ενώ τα γειτονικά παρεγχυματικά κύτταρα φαίνεται να περιέχουν παρόμοιας συγκέντρωσης γλυκοπρωτεΐνες AGPs (Εικόνα 4.12 B₂). Το ίδιο πρότυπο κατανομής των γλυκοπρωτεϊνών AGPs χαρακτηρίζει τα μολυσμένα φυτά Col-0 και *fra2*, (Εικόνα 4.12 A₁, B₁).

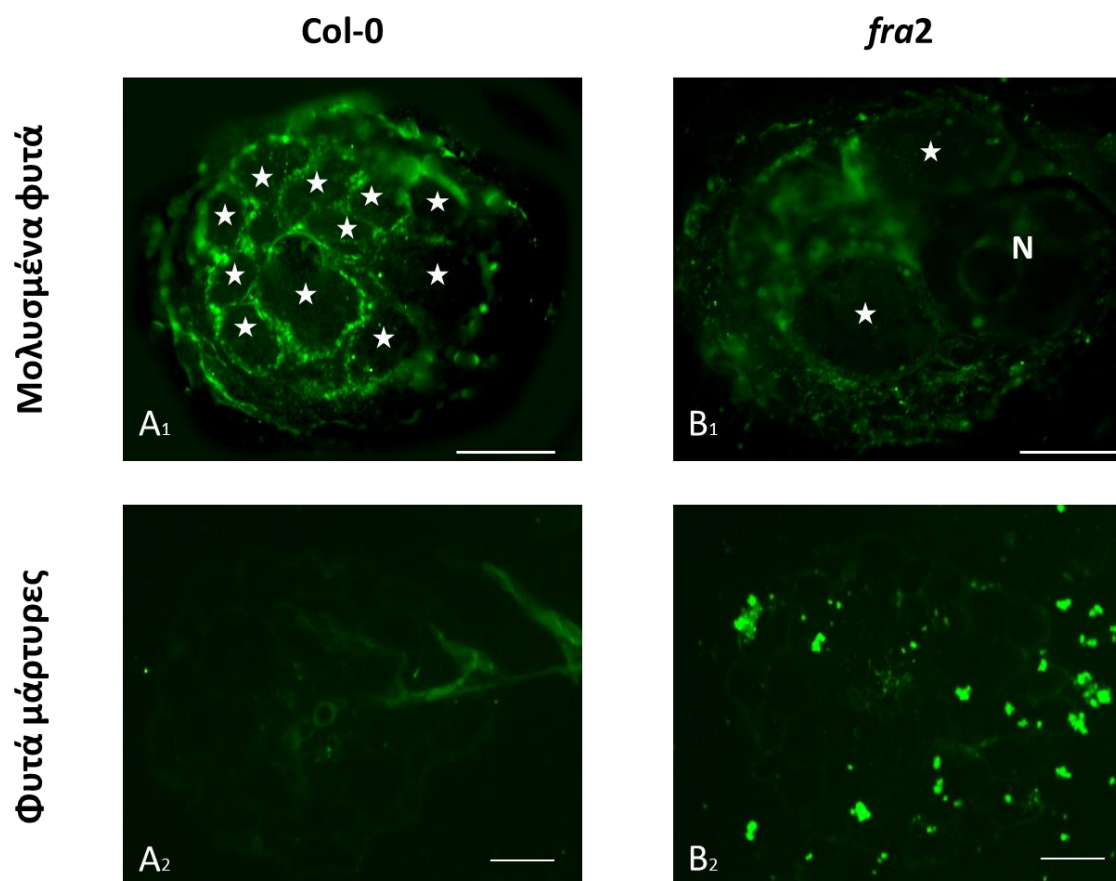
Στον συγκεντρωτικό Πίνακα 4.1 αποτυπώνεται συμβολικά η παρουσία και η αφθονία του συνόλου των επιτόπων που μελετήθηκαν σε αυτή την εργασία. Στα γραφήματα που ακολουθούν επιχειρείται η οπτική απεικόνιση της σύστασης του κυτταρικού τοιχώματος μολυσμένων και μη μολυσμένων φυτών Col-0 και *fra2* με σκοπό την διευκόλυνση της σύγκρισης των τοιχωματικών υλικών των μεγακυττάρων και των υπόλοιπων παρεγχυματικών κυττάρων του κεντρικού κυλίνδρου.

Ξυλογλυκάνη (LM25)



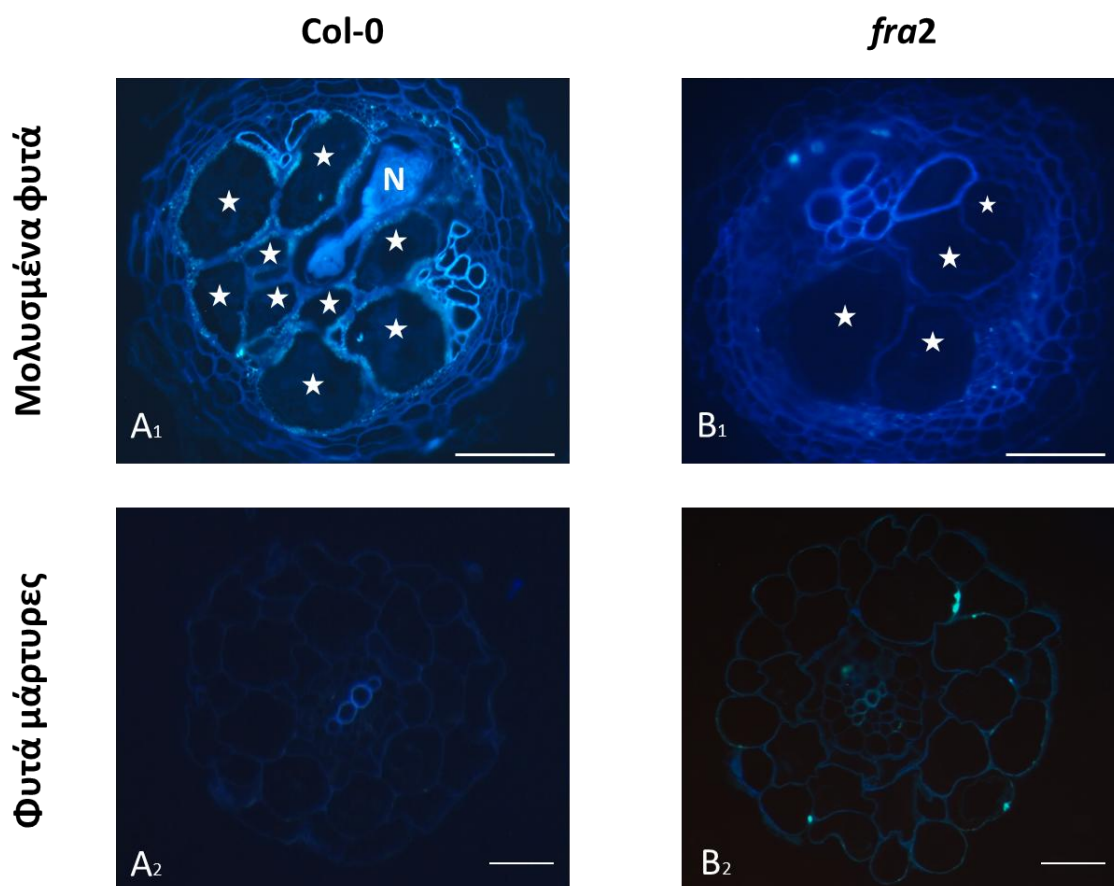
Εικόνα 4.6: Ανοσοσθήμανση ξυλογλυκάνης (LM25) σε εγκάρσιες τομές ρίζας μολυσμένων φυτών από κομβονηματώδεις *Meloidogyne incognita* (21dpi) και μη μολυσμένων φυτών-μαρτύρων *Arabidopsis thaliana* L. αγρίου τύπου (Col-0) και μεταλλάγματος κατανίνης (*fra2*). Το μονοκλωνικό αντίσωμα LM25 εντοπίζει εναποθέσεις ξυλογλυκάνης σε τομές μολυσμένων (A₁, B₁) και μη μολυσμένων φυτών (A₂, B₂). Οι αστερίσκοι υποδεικνύουν τη θέση των μεγακυττάρων, ενώ η ένδειξη (N) τη θέση του νηματώδους. Στα μη μολυσμένα φυτά-μάρτυρες αγρίου τύπου Col-0 (A₂), τα τοιχώματα των παρεγχυματικών κυττάρων του αγωγού ιστού παρουσιάζουν υψηλότερη συγκέντρωση ξυλογλυκάνης συγκριτικά με τα αγγεία του ξυλώματος. Στο *fra2* (B₂) η κατανομή της ξυλογλυκάνης στον κεντρικό κύλινδρο είναι ομοιόμορφη. Η μόλυνση από κομβονηματώδεις (A₁, B₁) δε φαίνεται να μεταβάλλει το πρότυπο κατανομής της ξυλογλυκάνης σε κανέναν από τους δύο οικότυπους. Η περιεκτικότητα ξυλογλυκάνης στα κυτταρικά τοιχώματα των μεγακυττάρων είναι παρόμοια στον άγριο τύπο Col-0 και στο *fra2* (A₁, B₁). Κλίμακα: A₁: 50μm, A₂: 20μm, B₁: 50μm, B₂: 20μm.

Καλλόζη (anti- β -1,3-glucan)



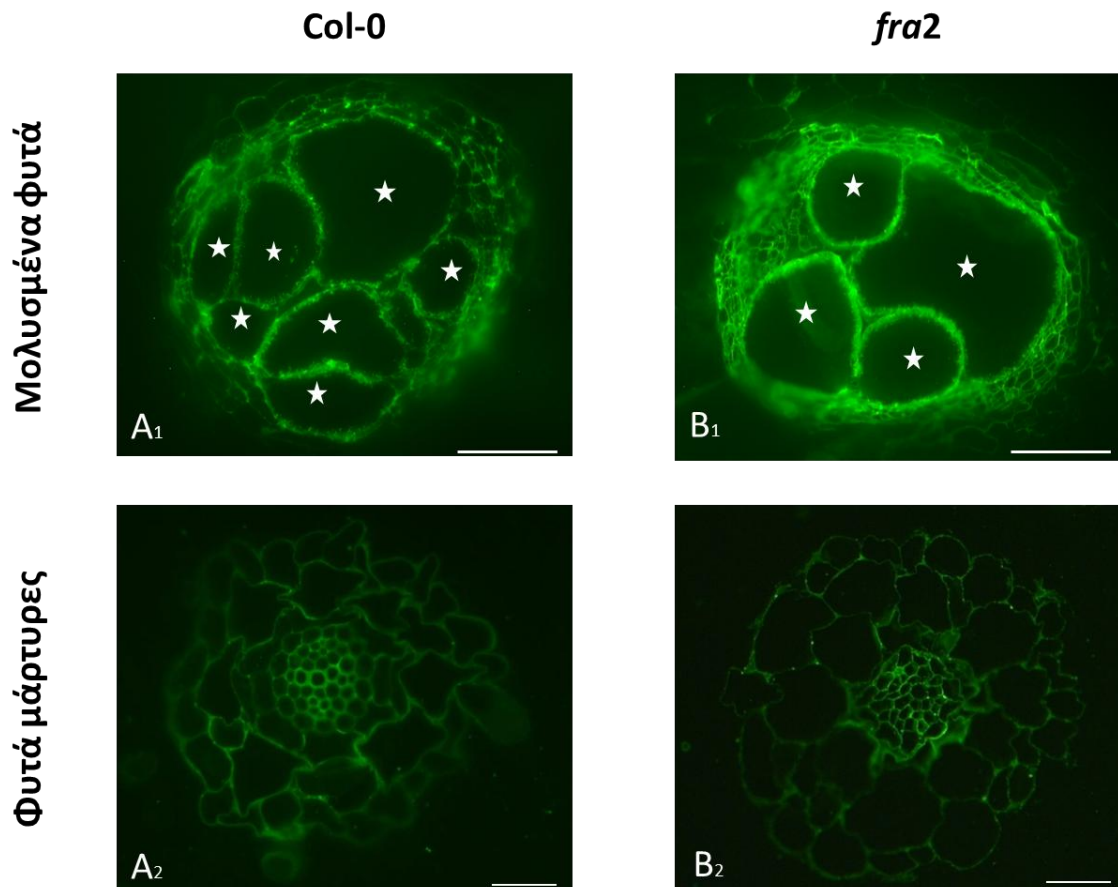
Εικόνα 4.7:Ανοσοσθήμανση καλλόζης (anti- β -1,3-glucan) σε εγκάρσιες τομές ρίζας μολυσμένων φυτών από κομβονηματώδεις *Meloidogyne incognita* (21dpi) και μη μολυσμένων φυτών-μαρτύρων *Arabidopsis thaliana* L. αγρίου τύπου (Col-0) και μεταλλάγματος κατανίνης (*fra2*). Το μονοκλωνικό αντίσωμα anti- β -1,3-glucan εντοπίζει εναποθέσεις καλλόζης σε τομές μολυσμένων (A_1, B_1) και μη μολυσμένων φυτών (A_2, B_2). Οι αστερίσκοι υποδεικνύουν τη θέση των μεγακυττάρων, ενώ η ένδειξη (N) τη θέση του νηματώδους. Στα μη μολυσμένα φυτά-μάρτυρες μικρής περιεκτικότητας καλλόζη εντοπίζεται στα τοιχώματα του ξυλώματος (A_2, B_2). Στα μεγακύτταρα του αγρίου τύπου Col-0 (A_1) η παρουσία της καλλόζης είναι έντονη, ενώ στο *fra2* τα τοιχώματα των μεγακυττάρων φαίνεται να έχουν μικρή ποσότητα καλλόζης (B_1). Στα υπόλοιπα κύτταρα του κεντρικού κυλίνδρου ο εντοπισμός της καλλόζης είναι εμφανής (A_1, B_1). Κλίμακα: A_1 : 50 μ m, A_2 : 20 μ m, B_1 : 50 μ m, B_2 : 20 μ m.

Καλλόζη (Aniline blue)



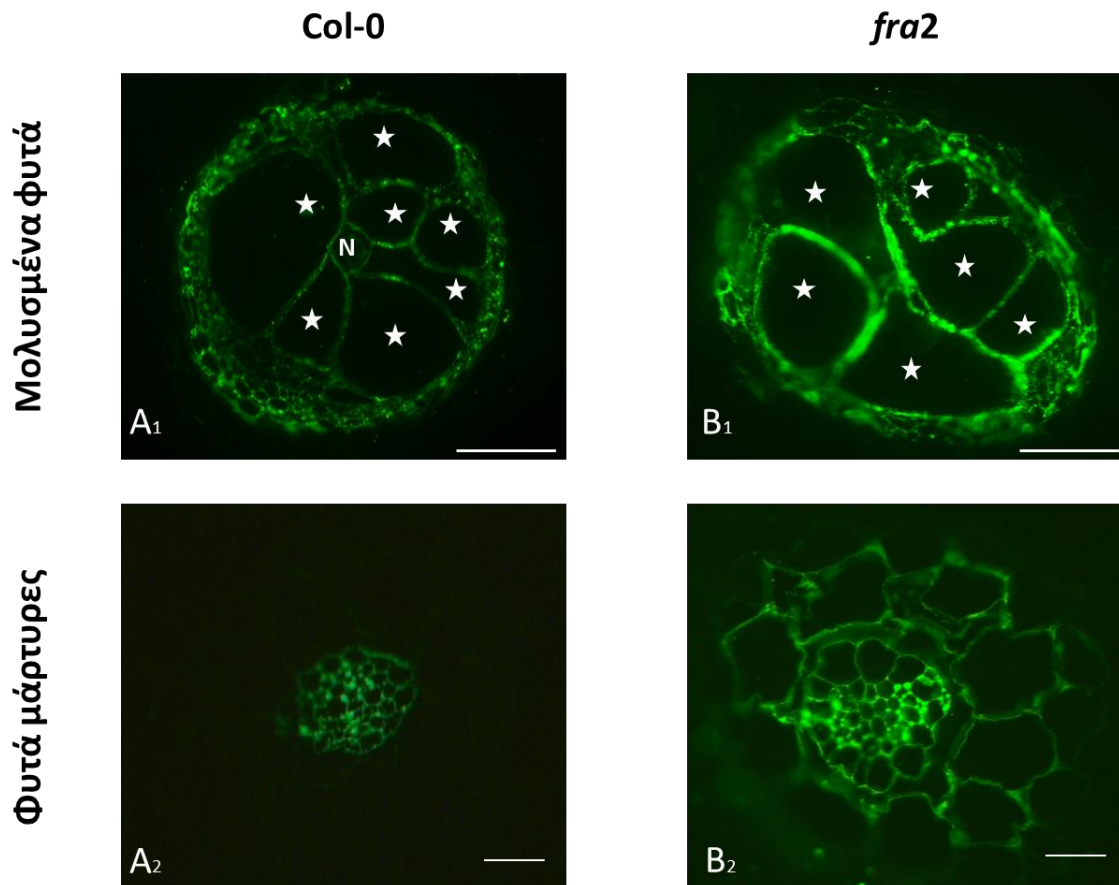
Εικόνα 4.8: Χρώση καλλόζης με το κυανό της ανιλίνης σε εγκάρσιες τομές ρίζας μολυσμένων φυτών από κομβοηματώδεις *Meloidogyne incognita* (21dpi) και μη μολυσμένων φυτών-μαρτύρων *Arabidopsis thaliana* L. αγρίου τύπου (Col-0) και μεταλλάγματος κατανίνης (*fra2*). Το κυανό της ανιλίνης εντοπίζει εναποθέσεις καλλόζης σε τομές μολυσμένων (A_1, B_1) και μη μολυσμένων φυτών (A_2, B_2). Οι αστερίσκοι υποδεικνύουν τη θέση των μεγακυττάρων, ενώ η ένδειξη (N) τη θέση του νηματώδους. Στα μη μολυσμένα φυτά-μάρτυρες μικρής περιεκτικότητας καλλόζη εντοπίζεται στα τοιχώματα του ξυλώματος (A_2, B_2). Στα μεγακύτταρα του αγρίου τύπου Col-0 (A_1) η παρουσία της καλλόζης είναι έντονη, ενώ στο *fra2* τα τοιχώματα των μεγακυττάρων φαίνεται να έχουν μικρή ποσότητα καλλόζης (B_1). Στα υπόλοιπα κύτταρα του κεντρικού κυλίνδρου ο εντοπισμός της καλλόζης είναι εμφανής (A_1, B_1). Κλίμακα: A_1 : 50μm, A_2 : 20μm, B_1 : 50μm, B_2 : 20μm.

Απομεθυλεστεροποιημένη Ομογαλακτουρονάνη (JIM5)



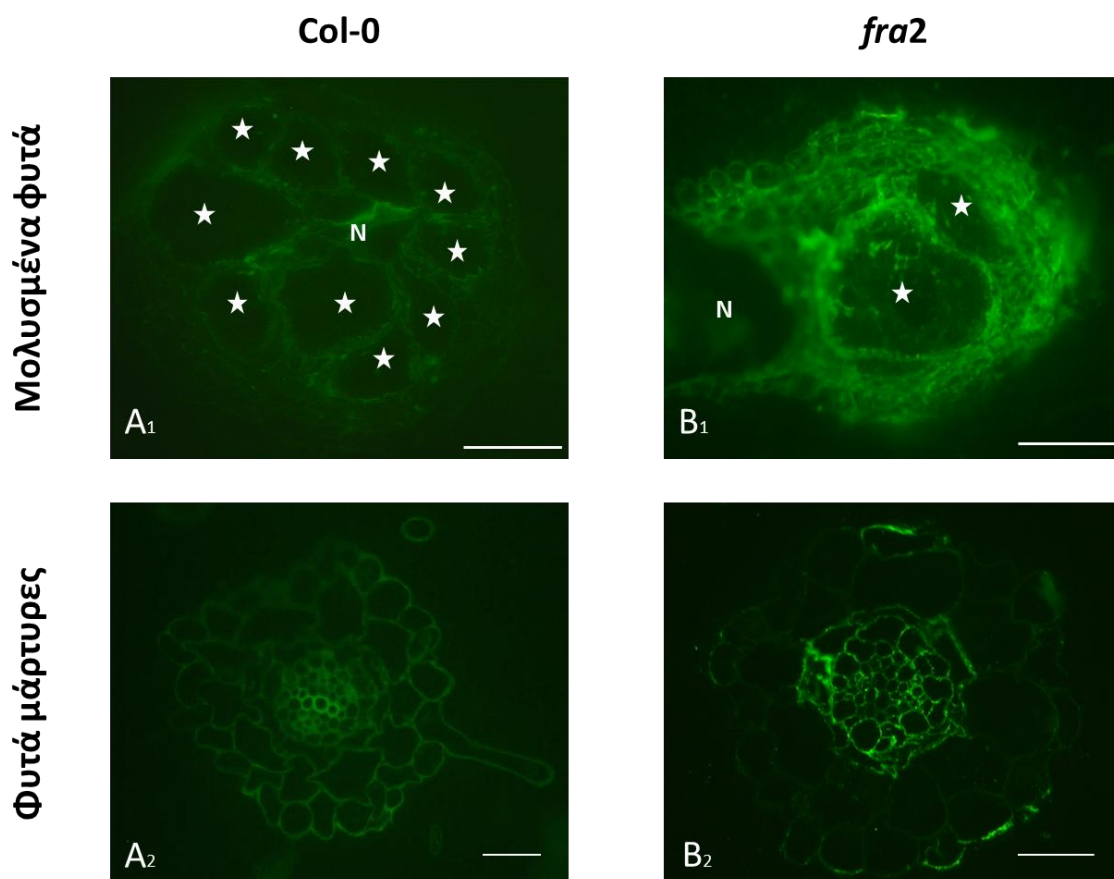
Εικόνα 4.9:Ανοσοσήμανση απομεθυλεστεροποιημένης ομογαλακτουρονάνης (JIM5) σε εγκάρσιες τομές ρίζας μολυσμένων φυτών από κομβονηματοδείς *Meloidogyne incognita* (21dpi) και μη μολυσμένων φυτών-μαρτύρων *Arabidopsis thaliana* L. αγρίου τύπου (Col-0) και μεταλλάγματος κατανίνης (*fra2*). Το μονοκλωνικό αντίσωμα JIM5 εντοπίζει εναποθέσεις μερικώς απομεθυλεστεροποιημένης ομογαλακτουρονάνης (DeSPHG) σε τομές μολυσμένων (A₁,B₁) και μη μολυσμένων φυτών (A₂,B₂). Οι αστερίσκοι υποδεικνύουν τη θέση των μεγακυττάρων. Στα μη μολυσμένα φυτά-μάρτυρες αγρίου τύπου Col-0 (A₂) DeSPHG φαίνεται να συγκεντρώνεται περισσότερο στα στοιχεία του ξυλώματος του αγωγού ιστού, ενώ στο *fra2* ο εντοπισμός είναι διάχυτος σε όλο το εύρος του κεντρικού κυλίνδρου(B₂). Στα μολυσμένα φυτά (Col-0 και *fra2*) τα τοιχώματα των μεγακυττάρων παρουσιάζουν αφθονία DeSPHG (A₁,B₁). Στα υπόλοιπα κύτταρα του κεντρικού κυλίνδρου η συγκέντρωση DeSPHG (A₁,B₁) είναι επίσης υψηλή. Κλίμακα: A₁: 50μm, A₂: 20μm, B₁: 50μm, B₂: 20μm.

Μεθυλεστεροποιημένη Ομογαλακτουρονάνη (LM20)



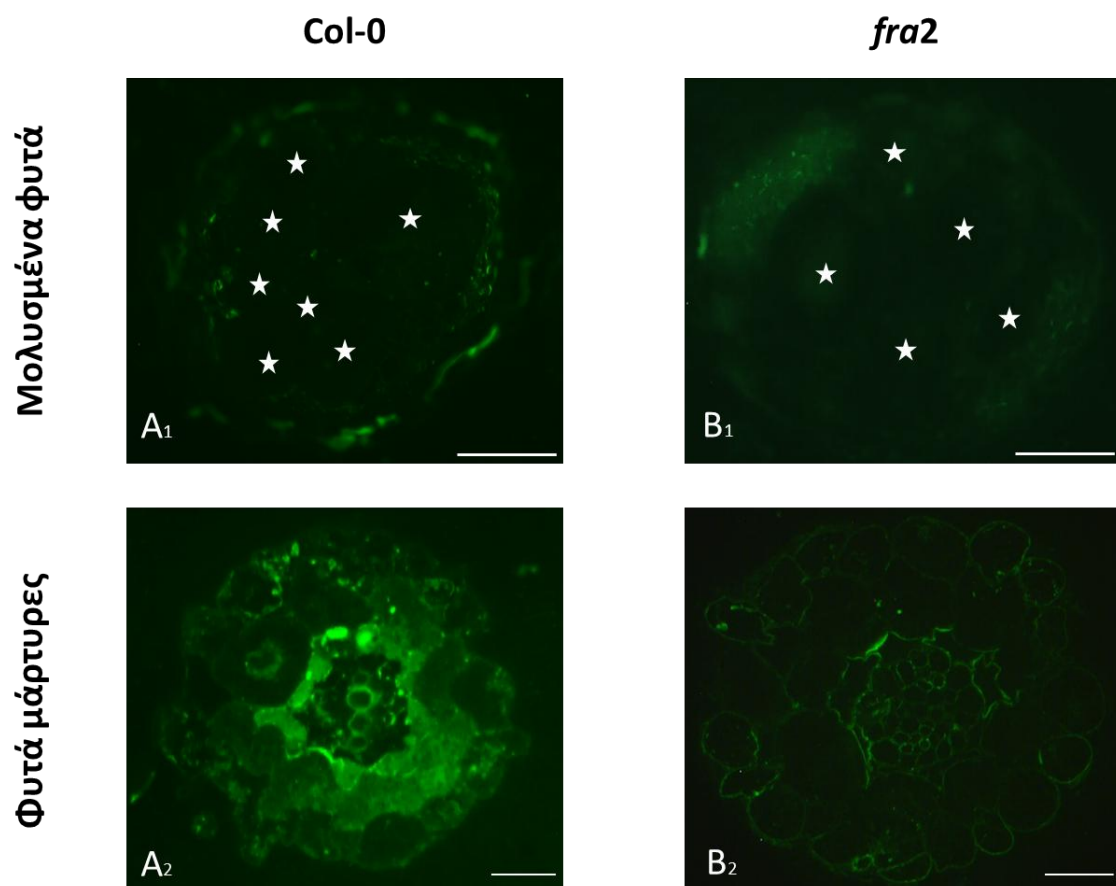
Εικόνα 4.10: Ανοσοσθήμανση πλήρως μεθυλεστεροποιημένης ομογαλακτουρονάνης (LM20) σε εγκάρσιες τομές ρίζας μολυσμένων φυτών από κομβονηματοώδεις *Meloidogyne incognita* (21dpi) και μη μολυσμένων φυτών-μαρτύρων *Arabidopsis thaliana* L. αγρίου τύπου (Col-0) και μεταλλάγματος κατανίνης (*fra2*). Το μονοκλωνικό αντίσωμα LM20 εντοπίζει εναποθέσεις πλήρως μεθυλεστεροποιημένης ομογαλακτουρονάνης (MPHG) σε τομές μολυσμένων (A_1, B_1) και μη μολυσμένων φυτών (A_2, B_2). Οι αστερίσκοι υποδεικνύουν τη θέση των μεγακυττάρων, ενώ η ένδειξη (N) τη θέση του νηματώδους. Στα μη μολυσμένα φυτά-μάρτυρες (A_2, B_2) MPHG παρουσιάζεται σε υψηλές συγκεντρώσεις στα παρεγχυματικά κύτταρα του αγωγού ιστού στις περιοχές του κυτταρικού τοιχώματος που πλαισιώνουν μεσοκυττάρους χώρους. Στα μολυσμένα φυτά (Col-0 και *fra2*) τα τοιχώματα των μεγακυττάρων παρουσιάζουν αφθονία MPHG (A_1, B_1) με τη διαφορά ότι η παρουσία της είναι έντονη και κατά μήκος των εφαιπτόμενων τοιχωμάτων τους. Το *fra2* διακρίνεται από υψηλότερη εναπόθεση MPHG (B_1). Στα υπόλοιπα κύτταρα του κεντρικού κυλίνδρου η συγκέντρωση MPHG (A_1, B_1) είναι επίσης υψηλή και η τοπική κατανομή της όπως εκείνη των μη μολυσμένων φυτών. Κλίμακα: A_1 : 50 μm , A_2 : 20 μm , B_1 : 50 μm , B_2 : 20 μm .

Αραβινάνη (LM6)



Εικόνα 4.11:Ανοσοσήμανση αραβινάνης (LM6) σε εγκάρσιες τομές ρίζας μολυσμένων φυτών από κομβονηματώδεις *Meloidogyne incognita* (21dpi) και μη μολυσμένων φυτών-μαρτύρων *Arabidopsis thaliana* L. αγρίου τύπου (Col-0) και μεταλλάγματος κατανίνης (*fra2*). Το μονοκλωνικό αντίσωμα LM6 εντοπίζει εναποθέσεις αραβινάνης(Ara) σε τομές μολυσμένων (A₁,B₁) και μη μολυσμένων φυτών (A₂,B₂). Οι αστερίσκοι υποδεικνύουν τη θέση των μεγακυττάρων, ενώ η ένδειξη (N) τη θέση του νηματώδους. Στα μη μολυσμένα φυτά-μάρτυρες του *fra2*Ara εμφανίζεται σε υψηλές συγκεντρώσεις στα παρεγχυματικά κύτταρα του αγωγού ιστού (B₂). Αντιθέτως ο κεντρικός κύλινδρος του αγρίου τύπου δεν χαρακτηρίζεται από την έντονη παρουσίαAra (A₂). Στα μολυσμένα φυτά *fra2*τα τοιχώματα των μεγακυττάρων παρουσιάζουν αφθονία Ara (B₁), ενώ στον άγριο τύπο (Col-0) παρατηρείται μικρή συγκέντρωση ενώσεων αραβινάνης (A₁). Στα υπόλοιπα κύτταρα του κεντρικού κυλίνδρου του *fra2* η ένταση του σήματος για την Ara είναι ανάλογη εκείνης των παρεγχυματικών κυττάρων του κεντρικού κυλίνδρου των μη μολυσμένων φυτών (B₁ - B₂). Κλίμακα: A₁: 50μm, A₂: 20μm, B₁: 50μm, B₂: 20μm.

Γλυκοπρωτεΐνες AGPs (LM2)

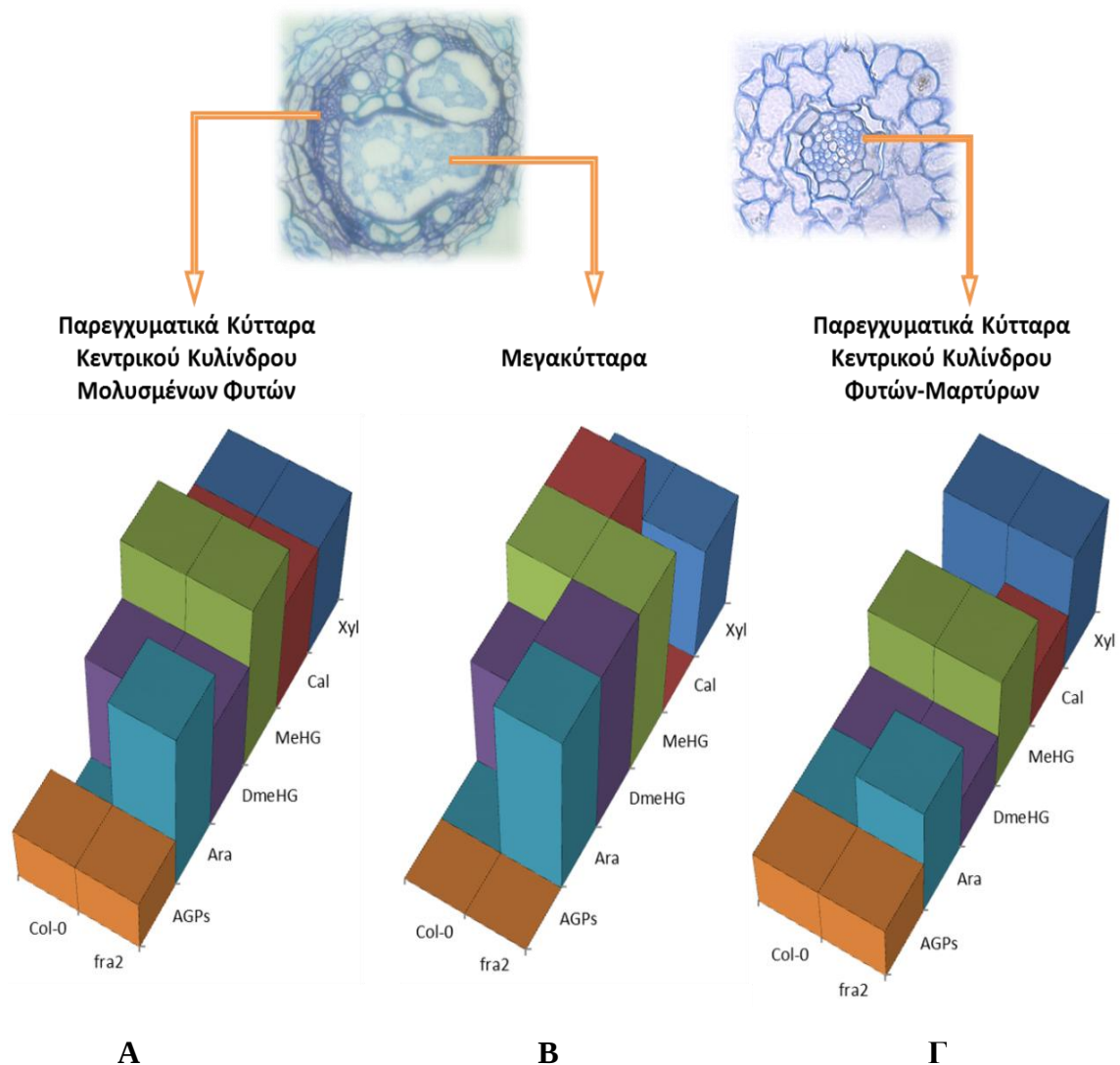


Εικόνα 4.12:Ανοσοσήμανση γλυκοπρωτεϊνών AGPs (LM2)σε εγκάρσιες τομές ρίζας μολυσμένων φυτών από κομβοηματώδεις *Meloidogyne incognita* (21dpi) και μη μολυσμένων φυτών-μαρτύρων *Arabidopsis thaliana* L. αγρίου τύπου (Col-0) και μεταλλάγματος κατανίνης (*fra2*). Το μονοκλωνικό αντίσωμα LM2 εντοπίζει εναποθέσεις γλυκοπρωτεϊνών(AGPs) σε τομές μολυσμένων (A₁,B₁) και μη μολυσμένων φυτών (A₂,B₂). Οι αστερίσκοι υποδεικνύουν τη θέση των μεγακυττάρων, ενώ η ένδειξη (N) τη θέση του νηματώδους. Στα μη μολυσμένα φυτά-μάρτυρες Col-0 και *fra2* οι AGPs εμφανίζονται με μικρή αφθονία στα παρεγχυματικά κύτταρα του αγωγού ιστού (A₂,B₂). Στα μολυσμένα φυτά Col-0 και *fra2* στα τοιχώματα των μεγακυττάρων παρατηρείται έλλειψη γλυκοπρωτεϊνών(AGPs) (A₁,B₁). Στα υπόλοιπα παρεγχυματικά κύτταρα του κεντρικού κυλίνδρου του *fra2* η ένταση του σήματος για AGPs είναι ανάλογη των παρεγχυματικών κυττάρων του κεντρικού κυλίνδρου των μη μολυσμένων φυτών (A₂,B₂). Κλίμακα: A₁: 50μm, A₂: 20μm, B₁: 50μm, B₂: 20μm..

Πίνακας 4.1*: Συγκεντρωτικός πίνακας ανοσοσήμανσης τομών ριζών μολυσμένων από *Meloidogyne incognita* και μη μολυσμένων φυτών *Arabidopsis thaliana* L. Col-0 και *fra2*

		Arabidopsis thaliana L.						
Συστατικά Κυτταρικού Τοιχώματος	Πρώτο Αντίσωμα/ Χρώση	Col-0			fra2			
		ΠΚΚΚ	Μ	ΠΚΦΜ	ΠΚΚΚ	Μ	ΠΚΦΜ	
Ημικυτταρίνες	Xyl	LM25	+	+	+	+	+	+
	Cal	anti β-1-3 glucan	+	++	-	+	-	+/-
	Cal	Aniline blue	+	++	-	+	-	+/-
Πηκτίνες	MPHG	LM20	++	++	+	++	++	+
	DeSPHG	JIM5	+	+	+/-	+	++	+/-
	Ara	LM6	-	-	+/-	++	++	+
Γλυκοπρωτεΐνες	AGPs	LM2	+/-	-	+/-	+/-	-	+/-
	Αυτοφθορισμός		-	-	-	-	-	-

*Ο Πίνακας 4.1 αποτυπώνει συμβολικά τα αποτελέσματα των εικόνων 4.3 έως 4.12. Η εκτίμηση της αφθονίας των τοιχωματικών συστατικών γίνεται ανάλογα με την ένταση του σήματος ανοσοφθορισμού, χρώσης ή αυτοφθορισμού στις τομές: **(-)** απουσία σήματος, **(+/-)** αμυδρή παρουσία σήματος (μικρή αφθονία), **(+)** διακριτή παρουσία σήματος (ενδιάμεση αφθονία), **(+/+)** έντονη παρουσία σήματος (μεγάλη αφθονία). **ΠΚΚΚ:** Παρεγχυματικά κύτταρα κεντρικού κυλίνδρου μολυσμένων φυτών από κομβοθηματώδεις, **Μ:** Μεγακύτταρα μολυσμένων φυτών από κομβοθηματώδεις, **ΠΚΦΜ:** Παρεγχυματικά κύτταρα κεντρικού κυλίνδρου φυτών-μαρτύρων, **Xyl:** ξυλογλυκάνη, **Cal:** καλλόζη, **MPHG:** μεθυλεστεροποιημένη ομογαλακτουρονάνη, **DeSPHG:** πλήρως απομεθυλεστεροποιημένη ομογαλακτουρονάνη, **Ara:** αραβινάνη, **AGPs:** γλυκοπρωτεΐνες αραβινογαλακτάνης, **Col-0:** άγριος τύπος *Arabidopsis thaliana* L., **fra2:** μετάλλαγμα κατανίνης του *Arabidopsis thaliana* L.



Εικόνα 4.1: Γραφική απεικόνιση των αποτελεσμάτων του Πίνακα 4.1. Στα γραφήματα (Α), (Β) και (Γ) παρουσιάζονται στήλες τεσσάρων διαφορετικών υψών που αντιστοιχούν στα σύμβολα -, +/-, + και ++ του Πίνακα 4.1 κατά σειρά αυξανόμενου μεγέθους. Με Col-0 και *fra2* παριστάνεται ο άγριος τύπος και το μετάλλαγμα κατανίνης αντίστοιχα. Τα συστατικά του κυτταρικού τοιχώματος που συγκρίνονται είναι οι ημικυτταρίνες Xyl: ξυλογλυκάνη και Cal: καλλόζη, οι πηκτινικές ενώσεις MPHG: μεθυλεστεροποιημένη ομογαλακτουρονάνη, DeSPHG: πλήρως απομεθυλεστεροποιημένη ομογαλακτουρονάνη, Ara: αραβινάνη και AGPs: γλυκοπρωτεΐνες αραβινογαλακτάνης. Τα διαγράμματα (Α) και (Β) αφορούν σε μολυσμένα από κομβοηματοδείς φυτά, ενώ το (Γ) σε μη μολυσμένα φυτά. **Τα μη μολυσμένα φυτά (Γ)** Col-0 και *fra2* παρουσιάζουν παρόμοια αφθονία στα επιμέρους συστατικά των κυτταρικών τοιχωμάτων των παρεγχυματικών κυττάρων του κεντρικού κυλίνδρου τους εκτός από την καλλόζη και την αραβινάνη, που είναι εξαρχής αφθονότερες στο *fra2*. **Τα αντίστοιχα παρεγχυματικά κύτταρα των μολυσμένων φυτών (Α)** διατηρούν περίπου το ίδιο πρότυπο κατανομής των επιμέρους συστατικών με τα μη μολυσμένα, με παράλληλη αύξηση των MPHG και DeSPHG αλλά και της Cal που έρχεται στα ίδια επίπεδα (Α) σε μετάλλαγμα (*fra2*) και άγριο τύπο (Col-0). Αξιοσημείωτη είναι η διαφορά στην κατανομή της αραβινάνης που αυξάνεται ακόμα περισσότερο στο μετάλλαγμα ενώ

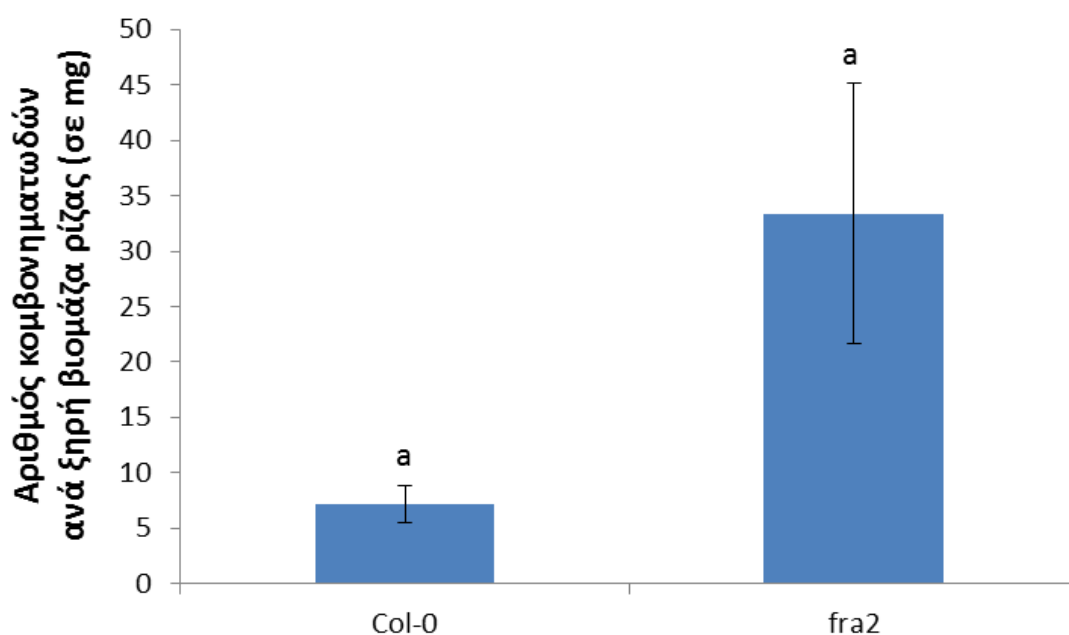
παρουσιάζεται αισθητά μειωμένη στον άγριο τύπο (Α). Τα **μεγακύτταρα (Β)** από την άλλη παρουσιάζουν ένα αρκετά διαφορετικό πρότυπο κατανομής των τοιχωματικών υλικών. Στον άγριο τύπο (Col-0) διατηρούνται μόνο τα επίπεδα ξυλογλυκάνης, ενώ AGPs δεν ανιχνεύονται καθόλου (Β). Οι εναποθέσεις MPHG και DeSPHG παρουσιάζονται αυξημένες, ενώ η Cal, που στα μη μολυσμένα φυτά ήταν ελάχιστη (Γ), βρίσκεται σε υψηλότερη αφθονία ακόμα και από τα υπόλοιπα κύτταρα του παρεγχύματος των μολυσμένων φυτών (Α). Παρομοίως, στο μετάλλαγμα (*fra2*), η ξυλογλυκάνη φαίνεται να μην επηρεάζεται από τη μόλυνση παραμένοντας στα ίδια επίπεδα με των μη μολυσμένων φυτών (Β-Γ), ενώ ελαφρώς ενισχυμένα φαίνονται τα τοιχώματα των μεγακυττάρων σε MPHG και Aga, όπως συμβαίνει και με τα υπόλοιπα κύτταρα του κεντρικού κυλίνδρου (Α-Β-Γ). Εμφανώς μεγαλύτερη συγκέντρωση παρουσιάζει η DeSPHG, ενώ συγχρόνως εξαφανίζονται οι επίτοποι των AGPs (Γ). Η καλλόζη, παρότι ενισχυμένη στα παρεγχυματικά κύτταρα των μολυσμένων ριζών (Α), δεν απαντά στα τοιχώματα των μεγακυττάρων (Β).

4.2

Έλεγχος μολυσματικότητας κομβονηματωδών *Meloidogyne incognita* σε φυτά *Arabidopsis thaliana* L. Col-0 και *fra2*

4.2.1 Εκτίμηση ευαισθησίας στη μόλυνση με νηματώδεις του μεταλλαγμένου στελέχους *Arabidopsis thaliana* L. *fra2*

Το *fra2* είναι πιο ευαίσθητο στη μόλυνση από κομβονηματώδεις *Meloidogyne incognita* καθώς παρουσιάζει σημαντική διαφορά στο βαθμό μόλυνσης σε σχέση με το Col-0 (Εικόνα 4.2). Τα *fra2* φυτά εμφανίζουν περίπου επτά φορές υψηλότερες τιμές αριθμού κομβονηματωδών ανά μονάδα ξηρής μάζας της ρίζας απ' ότι τα φυτά Col-0. Η αναγωγή του πλήθους των κομβονηματωδών που μολύνουν τις ρίζες ανά μονάδα ξηρής βιομάζας της ρίζας είναι αναγκαία καθώς το Col-0 και το *fra2* παρουσιάζουν διαφορά ως προς την ανάπτυξη του ριζικού τους συστήματος. Το Col-0 σχηματίζει νωρίς κατά την ανάπτυξη του, πιο εκτεταμένο και πυκνό ριζικό σύστημα από το *fra2*, με αποτέλεσμα ο αριθμός των κομβονηματωδών που εισέρχονται στις ρίζες του την στιγμή της μόλυνσης να είναι μεγαλύτερος συγκριτικά με το *fra2*.



Εικόνα 4.2: Σύγκριση του βαθμού μόλυνσης (αριθμός κομβονηματωδών/mg ξηρής βιομάζας ρίζας) από κομβονηματώδεις *Meloidogyne incognita* (21dpi) φυτών *Arabidopsis thaliana* L. Col-0 και *fra2*. Το μεταλλαγμένο στέλεχος *Arabidopsis thaliana* L. *fra2* είναι πιο ευάλωτο στη μόλυνση από κομβονηματώδεις *Meloidogyne incognita* από τον άγριο τύπο (Col-0). Η προσβολή του ριζικού του συστήματος παρουσιάζει συχνότητα επτά φορές μεγαλύτερη από του άγριου τύπου (Col-0). a: $p < 0,01$.

4.2.2 Μελέτη της επίδρασης των στελεχών *Streptomycescolombiensis*ATHUBA 438 και *Streptomycesmonomycini*ATHUBA 220 στα φυτά *Arabidopsisthaliana*L. Col-0 και *fra2*

Παράγοντες βιοελέγχου, όπως οι εδαφικοί στρεπτομύκητες, έχουν δυνητικά ευεγερτική δράση, όχι μόνο ως προς την αντιμετώπιση της προσβολής από φυτοπαθογόνους οργανισμούς (Sousaetal., 2008), όπως οι κομβονηματώδεις, αλλά και στην ανάπτυξη των υπό μελέτη φυτών (Vermaetal., 2011). Στην παρούσα εργασία μετρήθηκαν παράμετροι φυτικής αύξησης που αφορούν σε χαρακτηριστικά του βλαστού μεταξύ των οποίων το μήκος του βλαστού, το νωπό και το ξηρό βάρος.

4.2.2.1 Μελέτη της επίδρασης των στελεχών *Streptomycescolombiensis*ATHUBA 438 και *Streptomycesmonomycini*ATHUBA 220 στην ανάπτυξη του βλαστού φυτών *Arabidopsisthaliana*L. Col-0 και *fra2*

Μελετώντας την επίδραση των δύο στελεχών στρεπτομυκήτων σε μολυσμένα από κομβονηματώδεις Col-0 και *fra2* φυτά προέκυψε μια σειρά αποτελεσμάτων που υποδεικνύουν ότι, παρά τις μεταξύ τους διαφορές, και οι δύο τύποι φυτών επωφελούνται από την παρουσία στρεπτομυκήτων στη ριζόσφαιρα. Ενδιαφέρον παρουσιάζει το γεγονός ότι κάτι τέτοιο δεν ισχύει ελλείψει κομβονηματωδών, δηλαδή τα στελέχη στρεπτομυκήτων δεν φαίνεται να προωθούν στον ίδιο βαθμό από μόνα τους την φυτική αύξηση. Το στέλεχος *Streptomycesmonomycini*ATHUBA220 παρουσιάζει μεγαλύτερη δυναμική επαναφοράς των αναπτυξιακών παραμέτρων στα επίπεδα των μη μολυσμένων φυτών-μαρτύρων. Το στέλεχος *Streptomyces colombiensis* ATHUBA 438 δρα καλύτερα προς όφελος του *fra2* παρά του Col-0.

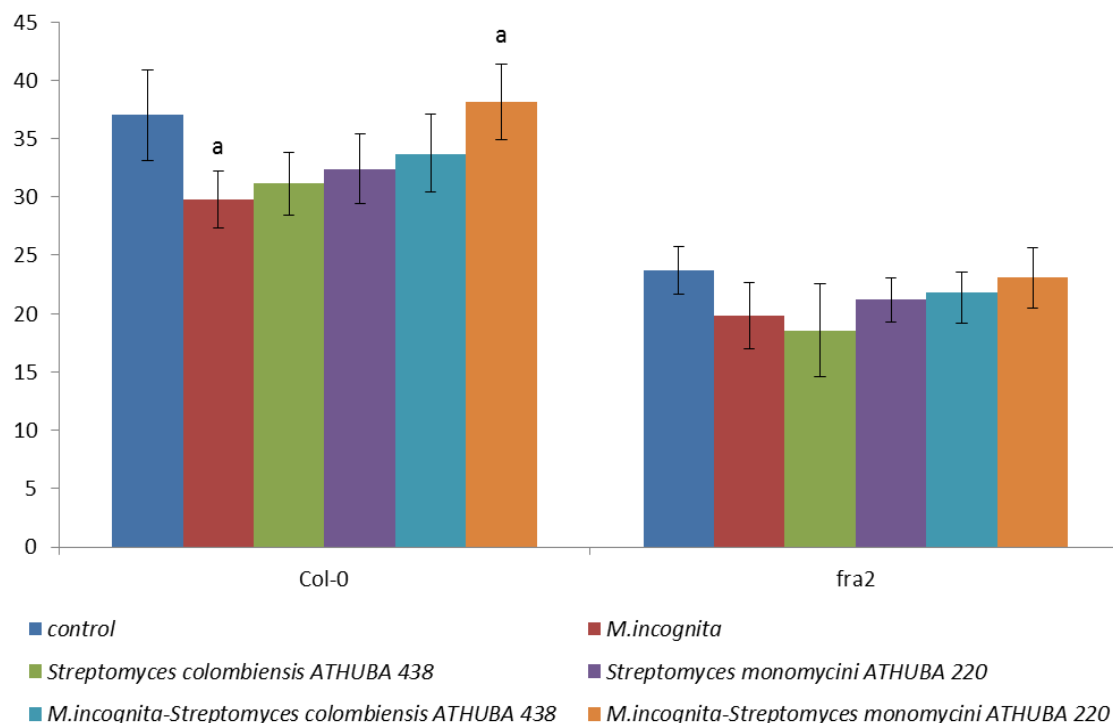
Μήκος βλαστού (cm): Με βάσει τα αποτελέσματα που απεικονίζονται στην Εικόνα 4.3 παρατηρείται γενικά διαφορά στο ύψος του βλαστού μεταξύ φυτών αγρίου τύπου και μεταλλαγμάτων κατανίνης. Το *fra2* σχηματίζει βλαστούς κατά 36% περίπου κοντύτερους συγκριτικά με το Col-0 στα φυτά-μάρτυρες. Ομοίως, ο μέσος όρος μήκους βλαστών σε φυτά με στρεπτομύκητες ή/και κομβονηματώδεις είναι μικρότερος στο *fra2* σε σχέση με το Col-0. Για το λόγο αυτό ο έλεγχος στατιστικά σημαντικής διαφοράς μεταξύ των μέσων όρων μήκους βλαστού πραγματοποιήθηκε για κάθε φυτό ξεχωριστά. Έτσι, στο Col-0 η μόλυνση με κομβονηματώδεις προκαλεί μείωση του μήκους του βλαστού. Ωστόσο, το στέλεχος *Streptomycesmonomycini*ATHUBA220 επαναφέρει το μήκος του βλαστού στα επίπεδα των μη μολυσμένων φυτών-μαρτύρων, ενώ το *Streptomyces colombiensis* ATHUBA 438 αποτυγχάνει να επιφέρει ανάλογο αποτέλεσμα. Στο *fra2* ακολουθείται ένα πιο ομοιόμορφο πρότυπο ανάπτυξης του βλαστού χωρίς στατιστικά σημαντικές διαφορές, αλλά με παρόμοια τάση με τον άγριο τύπο στις αντίστοιχες μεταχειρήσεις. Η μόλυνση ελαττώνει την αύξηση του βλαστού ενώ το στέλεχος *Streptomycesmonomycini*ATHUBA220 τείνει να επαναφέρει το μήκος του βλαστού στα άνευ μόλυνσης επίπεδα. Το *Streptomyces colombiensis* ATHUBA 438 πλησιάζει περισσότερο την αποδοτικότητα του άλλου στελέχους στρεπτομύκητα στο *fra2* απ' ό,τι στο Col-0. Ταυτόχρονα, και στα δύο φυτικά στελέχη είναι έκδηλη η αδυναμία

προώθησης της αύξησης του βλαστού από τη αποκλειστική παρουσία των στελεχών στρεπτομυκήτων.

Νωπό βάρος βλαστού (mg): Με βάση τα αποτελέσματα που απεικονίζονται στην Εικόνα 4.4 παρατηρείται διαφορά στο νωπό βάρος του βλαστού μεταξύ φυτών Col-0 και *fra2* και ως εκ τούτου η εκτίμηση των αποτελεσμάτων γίνεται ξεχωριστά. Στο Col-0 χαμηλότερο κατά μέσο όρο βάρος σε σχέση με τα φυτά-μάρτυρες έχουν οι βλαστοί των φυτών με οποιαδήποτε άλλη μεταχείριση εκτός εκείνης του συνδυασμού *Streptomycesmonomycini*ATHUBA220 και *Meloidogyneincognita*. Για άλλη μια φορά, το στέλεχος *Streptomycesmonomycini*ATHUBA220 φαίνεται να προωθεί την αύξηση του βλαστού παρουσία κομβονηματοδώνσε στατιστικά σημαντικό βαθμό. Με την μέτρηση του νωπού βάρους γίνεται ακόμα πιο εμφανής η σημασία της παρουσίας του κομβονηματοδούς προκειμένου να δράσει ο στρεπτομύκητας ενισχυτικά στην αύξηση του βλαστού. Όπως και στις προηγούμενες Εικόνες, το στέλεχος *Streptomyces colombiensis* ATHUBA 438 δεν έχει θετική επίδραση ως προς το νωπό βάρος του Col-0, ανεξάρτητα από την παρουσία των κομβονηματοδών. Στο *fra2* η εικόνα είναι διαφορετική σε σχέση με το Col-0. Το νωπό βάρος να παρουσιάζεται αυξημένο σε σχέση με των μη μολυσμένων φυτών-μαρτύρων, με βέλτιστη εικόνα να εμφανίζουν τα μολυσμένα φυτά με *Streptomycesmonomycini*ATHUBA220 και *Meloidogyneincognita*, παρότι τα αποτελέσματα δεν χαρακτηρίζονται και πάλι από στατιστική σημαντικότητα.

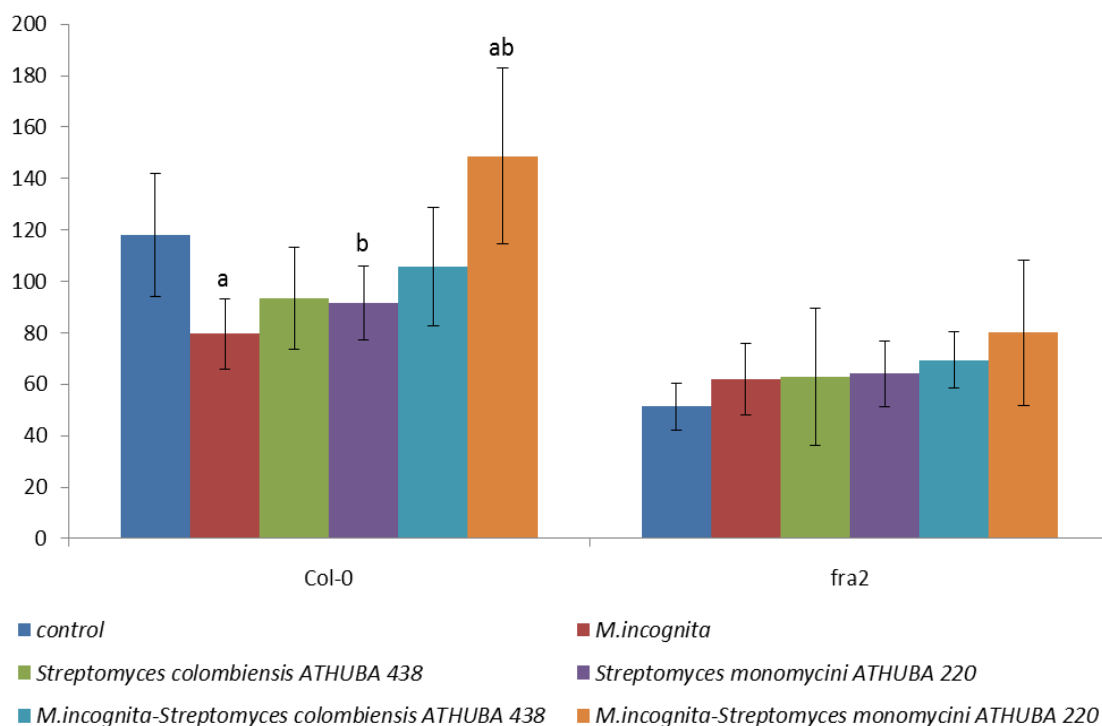
Ξηρό βάρος βλαστού (mg): Στα ίδια πρότυπα κινείται και η απόδοση της κάθε μεταχείρισης ως προς το ξηρό βάρος του βλαστού σε Col-0και *fra2*. Ωστόσο στην Εικόνα 4.5 αποδίδεται στατιστική σημαντικότητα $P < 0,05$ μεταξύ μη μολυσμένων και μολυσμένων φυτών σε Col-0 και *fra2*. Στο Col-0η συμβολή του *Streptomycesmonomycini*ATHUBA220 στην αύξηση του ξηρού βάρους του βλαστού είναι μεγαλύτερη συγκρινόμενη με εκείνη των μολυσμένων φυτών από κομβονηματοδείς αλλά και εκείνων που αναπτύσσονται σε εμβολιασμένο έδαφος με στρεπτομύκητες του ίδιου είδους. Στο *fra2*το στέλεχος *Streptomycesmonomycini*ATHUBA220 φαίνεται να έχει ανάλογο αποτέλεσμα χωρίς να επιβεβαιώνεται όμως στατιστικά. Η μεταχείριση φυτών με το στέλεχος *Streptomyces colombiensis* ATHUBA 438 παρουσιάζει ελαφρώς υψηλότερες τιμές ξηρού βάρους βλαστού από εκείνες των μολυσμένων φυτών από *Meloidogyneincognita* κι έτσι δεν μπορεί να αξιολογηθεί ως σημαντική στην προώθηση της φυτικής ανάπτυξης για κανένα από τα δύο φυτά.

Μήκος βλαστού (cm)



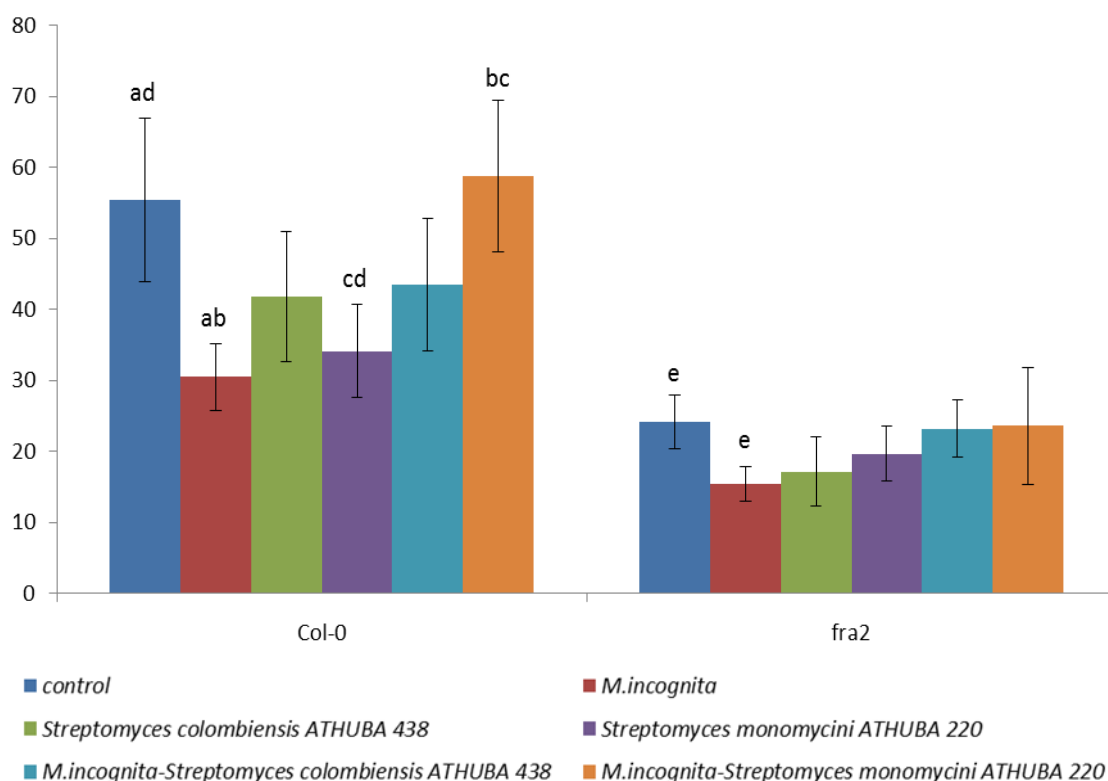
Εικόνα 4.3: Σύγκριση της μέσης τιμής του μήκους βλαστού (cm) σε φυτά-μάρτυρες *Arabidopsis thaliana* L. Col-0 και *fra2* και σε μολυσμένα φυτά από κομβονηματώδεις *Meloidogyne incognita*, που αναπτύσσονται παρουσία *Streptomyces colombiensis* ATHUBA 438 ή *Streptomyces monomycini* ATHUBA 220. Η μόλυνση από κομβονηματώδεις και στα δύο φυτικά στελέχη μειώνει το μήκος του βλαστού, ενώ μολυσμένα φυτά των οποίων η ριζόσφαιρα έχει εμπλουτιστεί με το στέλεχος *Streptomyces monomycini* ATHUBA 220 διατηρούν τους βλαστούς τους στα επίπεδα των μη μολυσμένων φυτών. Το στέλεχος *Streptomyces colombiensis* ATHUBA 438 δεν είναι εξίσου αποδοτικό σε κανένα από τους δύο οικότυπους. Φυτά τα οποία εμβολιάστηκαν μόνο με στρεπτομυκήτες σχηματίζουν κοντύτερους βλαστούς από τα φυτά-μάρτυρες. Η ταυτόχρονη παρουσία νηματωδών και στρεπτομυκήτων δείχνει να ενισχύει την ανάπτυξη του βλαστού. Το *fra2* σχηματίζει βραχύτερους βλαστούς από τον άγριο τύπο. Η δοκιμασία t-test πραγματοποιήθηκε για κάθε οικότυπο ξεχωριστά, $a: p < 0,05$

Νωπό βάρος βλαστού (mg)



Εικόνα 4.4: Σύγκριση της μέσης τιμής του νωπού βάρους του βλαστού (mg) σε φυτά-μάρτυρες *Arabidopsis thaliana* L. Col-0 και *fra2* και σε μολυσμένα φυτά από κομβονηματώδεις *Meloidogyne incognita*, που αναπτύσσονται παρουσία *Streptomyces colombiensis* ATHUBA 438 ή *Streptomyces monomycini* ATHUBA 220. Η μόλυνση από κομβονηματώδεις και στα δύο φυτικά στελέχη μειώνει το νωπό βάρος του βλαστού. Μολυσμένα φυτά και των δύο οικότυπων που αναπτύσσονται παρουσία του στελέχους *Streptomyces monomycini* ATHUBA 220, σχηματίζουν βλαστούς μεγαλύτερου νωπού βάρους συγκριτικά με φυτά-μάρτυρες, αλλά και με μη μολυσμένα φυτά που μεγαλώνουν σε έδαφος εμβολιασμένο με τον ίδιο στρεπτομύκητα. Αντιθέτως, το στέλεχος *Streptomyces colombiensis* ATHUBA 438 δεν αυξάνει το νωπό βάρος των φυτών ούτε από μόνο του ούτε σε συνδυασμό με το νηματώδη. Το μεταλλαγμένο στέλεχος *Arabidopsis thaliana* L. *fra2* σχηματίζει κατά κανόνα ελαφρύτερους βλαστούς από τον άγριο τύπο. Η δοκιμασία t-test πραγματοποιήθηκε για κάθε οικότυπο ξεχωριστά, a: $p < 0,05$, b: $p < 0,10$.

Ξηρό βάρος βλαστού (mg)



Εικόνα 4.5: Σύγκριση της μέσης τιμής του ξηρού βάρους του βλαστού (mg) σε φυτά-μάρτυρες *Arabidopsis thaliana* L. Col-0 και *fra2* και σε μολυσμένα φυτά από κομβονηματώδεις *Meloidogyne incognita*, που αναπτύσσονται παρουσία *Streptomyces colombiensis* ATHUBA 438 ή *Streptomyces monomycini* ATHUBA 220. Η μόλυνση από κομβονηματώδεις και στα δύο φυτικά στελέχη μειώνει το ξηρό βάρος του βλαστού και στους δύο στέλεχους σε στατιστικά σημαντικό επίπεδο. Φυτά αγρίου τύπου που αναπτύσσονται παρουσία *Streptomyces monomycini* ATHUBA 220 στο έδαφος και μολύνονται από κομβονηματώδεις, διατηρούν τους βλαστούς τους στα επίπεδα των μη μολυσμένων φυτών. Παρόμοια εικόνα δίνουν και φυτά *fra2* χωρίς ωστόσο να χαρακτηρίζονται τα αποτελέσματα από στατιστική σημαντικότητα. Το στέλεχος *Streptomyces colombiensis* ATHUBA 438 δεν είναι εξίσου αποδοτικό με το *Streptomyces monomycini* ATHUBA 220 στο Col-0 ενώ δείχνει να ενισχύει περισσότερο την αύξηση του ξηρού βάρους του βλαστού στο *fra2*. Το *fra2* σχηματίζει κατά κανόνα ελαφρύτερους βλαστούς από τον άγριο τύπο. Η δοκιμασία t-test πραγματοποιήθηκε για κάθε στέλεχος ξεχωριστά, a, b, e: $p < 0,05$, c, d: $p < 0,01$.

Η άμεση σύγκριση των αναπτυξιακών χαρακτηριστικών των φυτών Col-0 και *fra2* είναι δύσκολη εξαιτίας εγγενών διαφορών που παρουσιάζουν στην ανάπτυξή τους. Για το λόγο αυτό υπολογίστηκε ο δείκτης ανθεκτικότητας RTI(RelativeToleranceIndex) (Dixonetal., 1990) για κάθε αναπτυξιακό χαρακτηριστικό, μήκος (ShootLengthRTI, **SLRTI**), νωπό (ShootWetMassRTI, **SWMRTI**) και ξηρό (ShootDryMassRTI, **SDMRTI**) βάρος βλαστού ξεχωριστά (Ενότητα 3.3.4). Μέσω του RTIμπορούν να συγκριθούν τα στελέχη στρεπτομυκήτων ως προς την δυνατότητα αναστροφής του φαινότυπου της μόλυνσης από κομβονηματώδεις *Meloidogyneincognita*σε Col-0 και *fra2* φυτά. Ο λόγος των μολυσμένων φυτών (Col-0 και *fra2*), με ή χωρίς μεταχείριση στρεπτομυκήτων, προς τα αντίστοιχα μη μολυσμένα φυτά ανάγεται σε ποσοστό επί τοις εκατό, όπως φαίνεται στον παρακάτω Πίνακα 4.2.

Πίνακας 4.2: Δείκτης RTI για το μήκος, νωπό και ξηρό βάρος βλαστού σε μολυσμένα φυτά *Arabidopsisthaliana* L. Col-0 και *fra2*

Μεταχείριση	SLRTI		SWMRTI		SDMRTI	
	Col-0	<i>fra2</i>	Col-0	<i>fra2</i>	Col-0	<i>fra2</i>
<i>Meloidogyneincognita</i>	80%	83%	67%	120%	55%	64%
<i>Meloidogyneincognita</i> + <i>S.colombiensis</i> ATHUBA 438	91%	91%	89%	135%	78%	95%
<i>Meloidogyneincognita</i> + <i>S.monomycini</i> ATHUBA 220	103%	97%	126%	155%	105%	97%

Τα παραπάνω αποτελέσματα παρουσιάζονται ανά παράμετρο αύξησης και στις Εικόνες 4.6-4.8. Η διακεκομμένη γραμμή (100%) δείχνει το επίπεδο ανάπτυξης των φυτών-μαρτύρων (Col-0 και *fra2*), διευκολύνοντας την σύγκριση μεταξύ των διαφορετικών μεταχειρίσεων, αλλά και του *fra2* σε σχέση με το Col-0. Γενικά, τα μολυσμένα από κομβονηματώδεις φυτά εμφανίζουν το χαμηλότερο ποσοστό ανάπτυξης. Ακολουθούν τα μολυσμένα φυτά που έχουν αναπτυχθεί σε εμβολιασμένο έδαφος με το στέλεχος *Streptomyces colombiensis* ATHUBA 438, ενώ τη βέλτιστη ικανότητα ανάπτυξης δίνει η μεταχείριση με το στέλεχος

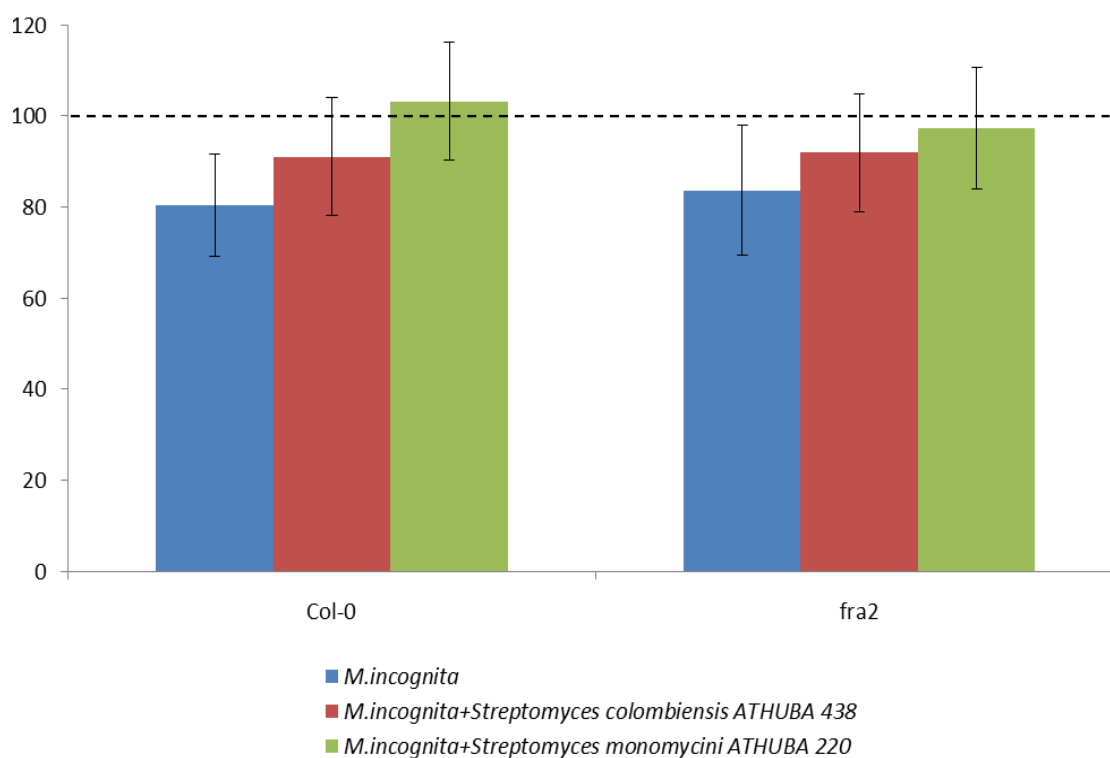
*Streptomycesmonomycini*ATHUBA220, η οποία στις περισσότερες περιπτώσεις ξεπερνά ακόμα και τα επίπεδα ανάπτυξης των μη μολυσμένων φυτών.

Μήκος βλαστού (cm):Ο εμπλουτισμός της ριζόσφαιρας με στελέχη στρεπτομυκήτων *Streptomycescolombiensis*ATHUBA 438 και *Streptomycesmonomycini*ATHUBA 220 προωθεί την ανάπτυξη του βλαστού των μολυσμένων φυτών τόσο στο Col-0 όσο και στο *fra2*. Πιο συγκεκριμένα, η μεταχείριση με το στέλεχος *Streptomycesmonomycini*ATHUBA 220 δίνει *fra2* φυτά κατά 14% ψηλότερα που πλησιάζουν τα επίπεδα των μη μολυσμένων φυτών-μαρτύρων (97%).Στο Col-0 το μήκος του βλαστού ξεπερνά τα επίπεδα των μη μολυσμένων φυτών (105%), σημειώνοντας ποσοστό αύξησης 23% έναντι των μολυσμένων φυτών χωρίς προσθήκη στρεπτομυκήτων. Το στέλεχος *Streptomycescolombiensis*ATHUBA 438 δεν παρουσιάζει την ίδια δυναμική επαναφοράς του μήκους του βλαστού στο Col-0 και στο *fra2*, επιφέροντας αύξηση μόνο κατά 11% και 8% αντίστοιχα.

Νωπό βάρος βλαστού (mg):Οι στρεπτομύκητες βοηθούν τα φυτά να επιτύχουν υψηλότερες τιμές νωπού βάρους σε σύγκριση με φυτά-μάρτυρες Col-0 και *fra2*. Στο Col-0, το στέλεχος *Streptomycescolombiensis*ATHUBA 438 συνεισφέρει στην αύξηση του νωπού βάρους του βλαστού κατά 22% χωρίς όμως να ξεπερνά τα φυσιολογικά επίπεδα των φυτών-μαρτύρων (89%). Αντίθετα, φυτά Col-0 με το στέλεχος *Streptomycesmonomycini*ATHUBA 220 ξεπερνούν κατά πολύ τα επίπεδα νωπού βάρους των μη μολυσμένων φυτών, αγγίζοντας το ποσοστό 126%, δηλαδή 59% μεγαλύτερο από των μολυσμένων φυτών και 37% ενισχυμένο σε σχέση με την μεταχείριση με το στέλεχος *Streptomycescolombiensis*ATHUBA 438. Στο *fra2* η μόλυνση από κομβονηματώδεις φαίνεται να επηρεάζει ανοδικά (ποσοστό αύξησης 20%) το νωπό βάρος των φυτών ακόμα και χωρίς την προσθήκη στρεπτομυκήτων. Παρόλα αυτά, η μεταχείριση με το στέλεχος *Streptomycescolombiensis*ATHUBA 438 ενισχύει την αύξηση του μήκους του βλαστού κατά 15%, ενώ η μεταχείριση με το στέλεχος *Streptomycesmonomycini*ATHUBA 220 κατά 35%, σχηματίζοντας βλαστούς 135% και 155% βαρύτερους σε σχέση με των μη μολυσμένων φυτών.

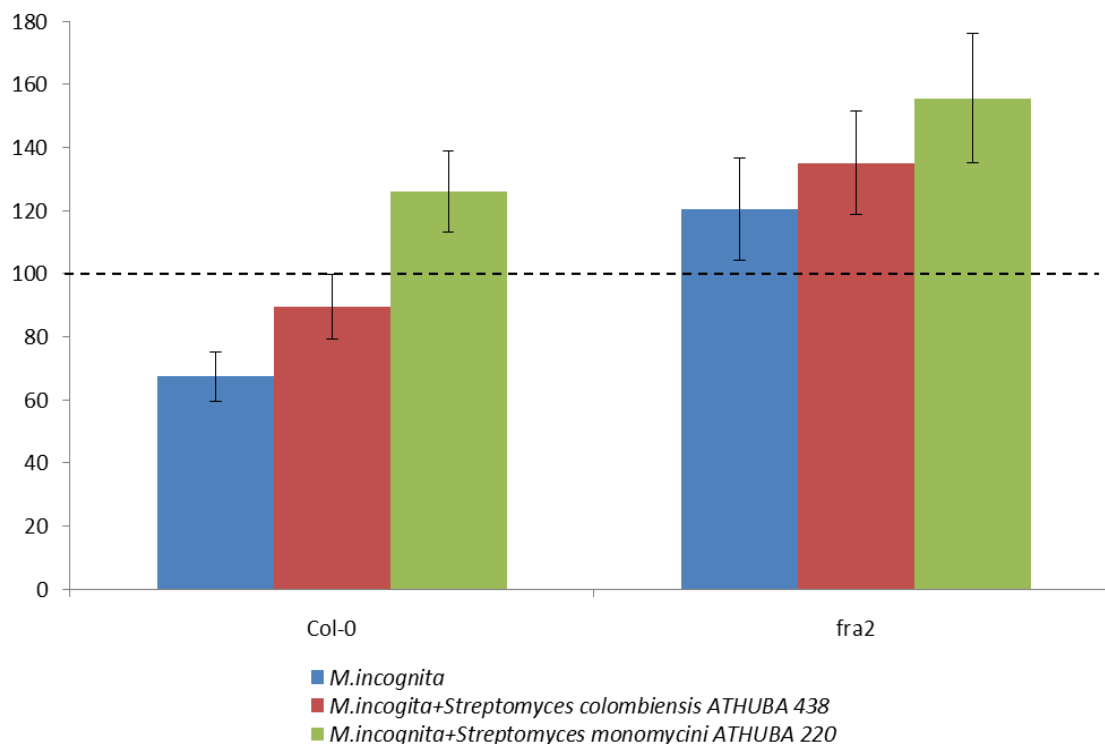
Ξηρό βάρος βλαστού (mg):Η συνεισφορά των στρεπτομυκήτων *Streptomycescolombiensis*ATHUBA 438 και *Streptomycesmonomycini*ATHUBA 220 στην ανάκτηση του φυσιολογικού ξηρού βάρους των μολυσμένων φυτών *fra2* είναι ισοδύναμη με ποσοστά αύξησης 31% και 33% αντίστοιχα. Τα φυτά αυτά πλησιάζουν το φυσιολογικό ξηρό βάρος (σε ποσοστό 95% και 97% αντίστοιχα) χωρίς όμως να το ξεπερνούν. Στο Col-0 το στέλεχος *Streptomycescolombiensis*ATHUBA 438 συμβάλλει στην αύξηση του ξηρού βάρους του βλαστού κατά 23%, αλλά σε πολύ μικρότερο βαθμό συγκριτικά με το στέλεχος *Streptomycesmonomycini*ATHUBA 220 που προωθεί τα επίπεδα ξηρού βάρους κατά 50%, σε τιμές ανώτερες αυτών των μη μολυσμένων φυτών (105%).

RTI μήκους βλαστού (SLRTI)



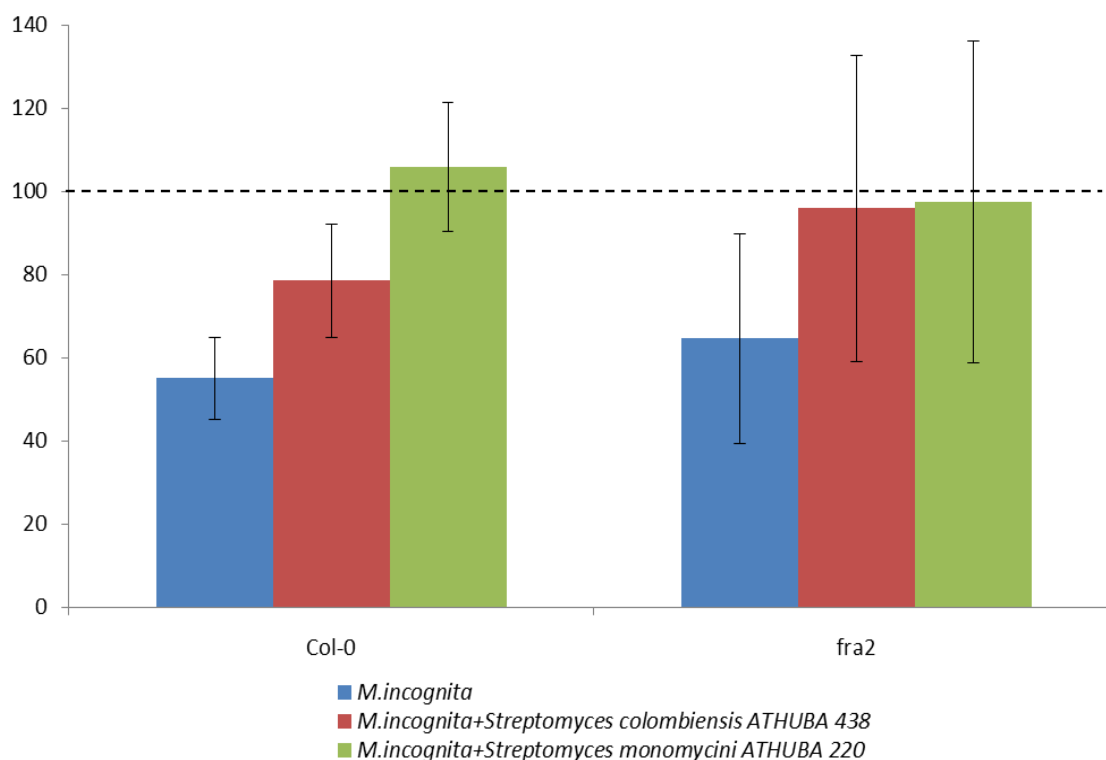
Εικόνα 4.6: Δείκτης RTI για το μήκος του βλαστού των μολυσμένων φυτών *Arabidopsis thaliana* L. Col-0 και *fra2* από κομβονηματώδεις *Meloidogyne incognita*, που αναπτύσσονται χωρίς ή με τα εδαφικά στελέχη στρεπτομυκήτων *Streptomyces colombiensis* ATHUBA 438 ή *Streptomyces monomycini* ATHUBA 220. Οι στρεπτομύκητες βοηθούν τα φυτά να επανέλθουν στα επίπεδα ανάπτυξης των μη μολυσμένων φυτών. Το στέλεχος *Streptomyces monomycini* ATHUBA 220 πλησιάζει πολύ (στο *fra2*) ή ακόμα και ξεπερνά (στο Col-0) το μήκος του βλαστού των μη μολυσμένων φυτών. Το στέλεχος *Streptomyces colombiensis* ATHUBA 438 δεν παρουσιάζει την ίδια δυναμική επαναφοράς, παρόλο που ενισχύει κι αυτό την ανάπτυξη του βλαστού ως προς το μήκος. Η διακεκομμένη γραμμή παριστάνει το επίπεδο ανάπτυξης μη μολυσμένων φυτών (100%).

RTI νωπού βάρους βλαστού (SWMRTI)



Εικόνα 4.7: Δείκτης RTI για το νωπό βάρος του βλαστού των μολυσμένων φυτών *Arabidopsis thaliana* L. Col-0 και *fra2* από κομβοηματώδεις *Meloidogyne incognita*, που αναπτύσσονται χωρίς ή με τα εδαφικά στελέχη στρεπτομυκήτων *Streptomyces colombiensis* ATHUBA 438 ή *Streptomyces monomycini* ATHUBA 220. Οι στρεπτομύκητες βοηθούν τα φυτά να επιτύχουν υψηλότερα επίπεδα ανάπτυξης από εκείνα των μη μολυσμένων φυτών. Το στέλεχος *Streptomyces colombiensis* ATHUBA 438 συνεισφέρει στην αύξηση του νωπού βάρους του βλαστού χωρίς να ξεπερνά τα επίπεδα των μη μολυσμένων φυτών Col-0. Στο *fra2* μόλυνση από κομβοηματώδεις φαίνεται να επηρεάζει ανοδικά το νωπό βάρος των φυτών, ενώ η μεταχείριση με το στέλεχος *Streptomyces colombiensis* ATHUBA 438 την ενισχύει ακόμα περισσότερο. Το στέλεχος *Streptomyces monomycini* ATHUBA 220 ξεπερνά σε μεγάλο βαθμό τα επίπεδα νωπού βάρους των μη μολυσμένων φυτών και στα δύο φυτικά στελέχη (Col-0 και *fra2*). Η διακεκομμένη γραμμή παριστάνει το επίπεδο ανάπτυξης μη μολυσμένων φυτών (100%).

RTIξηρού βάρους βλαστού (SDMRTI)



Εικόνα 4.8: Δείκτης RTI για το ξηρό βάρος του βλαστού των μολυσμένων φυτών *Arabidopsis thaliana* L. Col-0 και *fra2* από κομβονηματώδεις *Meloidogyne incognita*, που αναπτύσσονται χωρίς ή με τα εδαφικά στελέχη στρεπτομυκήτων *Streptomyces colombiensis* ATHUBA 438 ή *Streptomyces monomycini* ATHUBA 220. Οι στρεπτομύκητες *Streptomyces colombiensis* ATHUBA 438 και *Streptomyces monomycini* ATHUBA 220 συνεισφέρουν σημαντικά στην ανάκτηση του ξηρού βάρους σε μολυσμένα φυτά *fra2*, χωρίς ωστόσο να το ξεπερνούν. Στο Col-0 το στέλεχος *Streptomyces colombiensis* ATHUBA 438 συμβάλλει στην αύξηση του ξηρού βάρους του βλαστού σε πολύ μικρότερο βαθμό από ότι το στέλεχος *Streptomyces monomycini* ATHUBA 220 που ξεπερνά τα επίπεδα ξηρού βάρους των μη μολυσμένων φυτών. Η διακεκομμένη γραμμή παριστάνει το επίπεδο ανάπτυξης μη μολυσμένων φυτών (100%).

4.2.2.2 Μελέτη της επίδρασης των στελεχών *Streptomycescolombiensis*ATHUBA 438 και *Streptomycesmonomycini*ATHUBA 220 στο βαθμό μόλυνσης φυτών *Arabidopsisthaliana*L. Col-0 και *fra2*

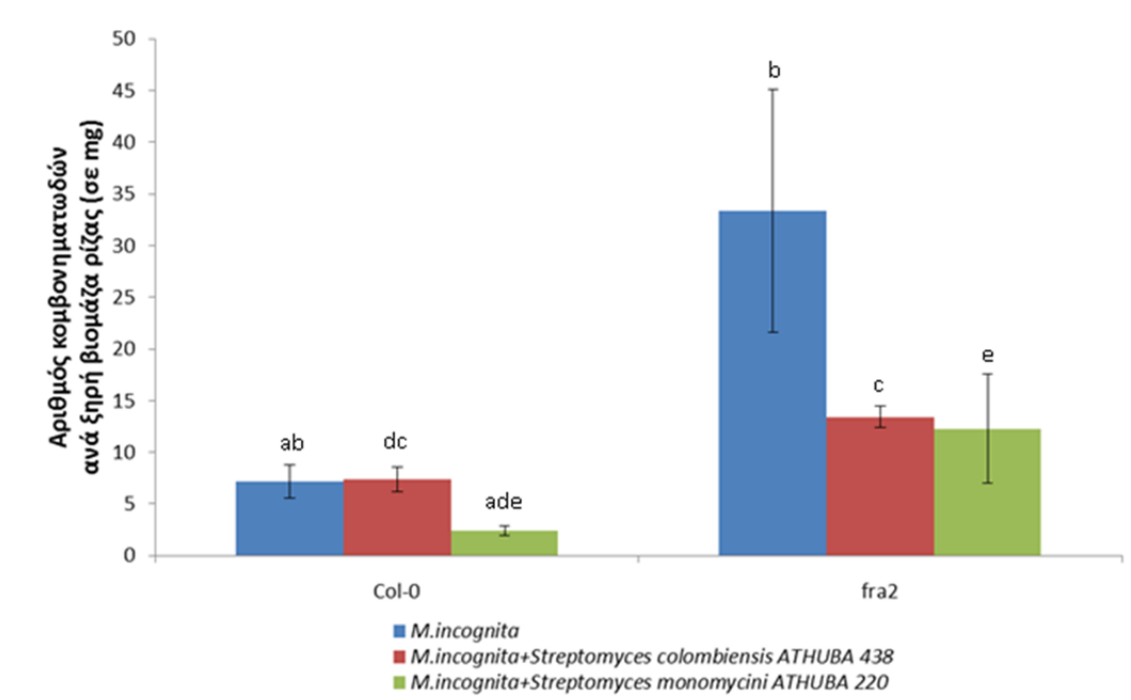
Το *fra2* παρουσιάζει αυξημένη ευαισθησία στη μόλυνση από κομβονηματώδεις *Meloidogyneincognita* σε σχέση με το Col-0, όπως φάνηκε από τα αποτελέσματα της ενότητας 4.2.1. Γενικά, τα *fra2* φυτά που μολύνονται μόνο από κομβονηματώδεις *Meloidogyneincognita* και εκείνα που αναπτύσσονται αρχικά σε έδαφος με τα εδαφικά στελέχη στρεπτομυκήτων *Streptomycescolombiensis*ATHUBA 438 και *Streptomycesmonomycini*ATHUBA 220 εμφανίζουν υψηλότερες τιμές αριθμού κομβονηματωδών ανά μονάδα ξηρής βιομάζας της ρίζας απ' ό,τι τα φυτά Col-0 με την αντίστοιχη μεταχείριση, σε στατιστική σημαντικότητα $P < 0,05$ (Εικόνα 4.9).

Μεταχείριση με *Streptomycescolombiensis*ATHUBA 438: Το στέλεχος *Streptomycescolombiensis*ATHUBA 438 φαίνεται να επιδρά πιο αποτελεσματικά στο *fra2* παρά στο Col-0, σε στατιστικά σημαντικό επίπεδο $P < 0,01$. Στον άγριο τύπο δεν παρατηρείται μείωση του βαθμού μόλυνσης συγκριτικά με τα φυτά που αναπτύσσονται απουσία στρεπτομυκήτων. Αντιθέτως, στο *fra2* η διαφορά στην ευαισθησία είναι αισθητή.

Μεταχείριση με *Streptomycesmonomycini*ATHUBA 220: Το στέλεχος *Streptomycesmonomycini*ATHUBA 220 έχει εμφανώς πιο ευεργετική δράση για τον ξενιστή ενάντια στη μόλυνση από κομβονηματώδεις και στα δύο φυτικά στελέχη. Πιο συγκεκριμένα, στο Col-0 ο βαθμός μόλυνσης παρουσία *Streptomycesmonomycini*ATHUBA 220 περιορίζεται περίπου κατά 51% σε στατιστικά σημαντικό βαθμό $P < 0,05$ συγκριτικά με τις άλλες δύο μεταχειρίσεις, αλλά και στο *fra2* το στέλεχος αυτό δείχνει να συνεισφέρει περισσότερο στην αντιμετώπιση της μόλυνσης.

Το γεγονός ότι δεν επιτεύχθηκε στατιστική σημαντικότητα μεταξύ των τιμών του βαθμού μόλυνσης των φυτών *fra2* παρουσία και απουσία στρεπτομυκήτων οφείλεται ίσως στον μικρότερο αριθμό δειγμάτων. Τα μεταλλάγματα *fra2* παρουσιάζουν γενικά χαμηλότερο ποσοστό φύτευσης από τον άγριο τύπο με αποτέλεσμα ο αριθμός των δειγμάτων να περιορίζεται σημαντικά.

Βαθμός μόλυνσης



Εικόνα 4.9: Σύγκριση του βαθμού μόλυνσης (αριθμός κομβονηματωδών/mg ξηρής βιομάζας ρίζας) σε φυτά *Arabidopsis thaliana* L. Col-0 και *fra2* που αναπτύσσονται παρουσία *Streptomycescolombiensis*ATHUBA 438 ή *Streptomycesmonomycini*ATHUBA 220 με φυτά χωρίς προσθήκη εδαφικού στελέχους στρεπτομυκήτων. Στο Col-0 το στέλεχος *Streptomycescolombiensis*ATHUBA 438 δεν περιορίζει το βαθμό μόλυνσης, ενώ το *Streptomycesmonomycini*ATHUBA 220 παρουσιάζει στατιστικά σημαντική μείωση της μόλυνσης από κομβονηματώδεις.Στο *fra2* και τα δύο στελέχη στρεπτομυκήτων φαίνεται να επιδρούν ανασταλτικά στη μόλυνση με πιο αποτελεσματικό το *Streptomycesmonomycini*ATHUBA 220. Συνολικά, το *fra2* είναι σε στατιστικά σημαντικό βαθμό πιο ευαίσθητο στη μόλυνση από *Meloidogyneincognita* σε σχέση με τον άγριο τύπο. a,d:p<0,05,b: p<0,01, c, e: p<0,001.

5 Συζήτηση

Μέχρι σήμερα έχουν μελετηθεί μεταλλάγματα δευτερογενών στοιχείων του κυτταρικού τοιχώματος (ημικυτταρινών, πηκτινών και γλυκοπρωτεϊνών) του *Arabidopsis thaliana* L. τα οποία παρουσιάζουν διαφορές ως προς τη σύσταση των τοιχωμάτων, χωρίς ωστόσο να διαφέρει σημαντικός βαθμός μόλυνσης από κομβονηματώδεις *M. incognita* (Bozbuga et al., 2018). Αντιθέτως, μεταλλάγματα κυτταροσκελετού, όπως το μετάλλαγμα κατανίνης *fra2*, που επηρεάζουν τόσο τη μορφολογία της ρίζας και την κυτταρική επέκταση όσο και τη σύσταση των τοιχωμάτων θα μπορούσαν να παρουσιάσουν διαφορετική ευαισθησία στη μόλυνση συγκριτικά με φυτά αγρίου τύπου (Lupton et al., 2017; Panteris et al., 2018). Για το λόγο αυτό το μετάλλαγμα *fra2* επιλέχθηκε στην παρούσα εργασία για τη μελέτη της προσβολής φυτών από κομβονηματώδεις *M. incognita*.

Παλαιότερες μελέτες δείχνουν ότι το μετάλλαγμα *fragile fiber 2 (fra2)* παρουσιάζει αυξημένη ευθραυστότητα στους ιστούς του υπέργειου τμήματος αλλά και του ριζικού του συστήματος (Burk et al., 2001). Η μειωμένη περιεκτικότητα των κυτταρικών τοιχωμάτων του *fra2* σε κυτταρίνη και το διαφορετικό πρότυπο εναπόθεσης λιγνίνης, οδηγούν σε φυτά με μειωμένη αντοχή σε εφελκυσμό (Burk et al., 2001). Ο φαινότυπος των φυτών *fra2* χαρακτηρίζεται από μικρότερο λόγο μήκους/πλάτους φυτικών οργάνων που οφείλεται στο διάχυτο πρότυπο κυτταρικής αύξησης (Baskin et al., 2004; Burk et al., 2001). Διαταραχές του κυτταροσκελετού κατά τη κυτταρική διαίρεση στα φυτά *fra2* επηρεάζουν το επίπεδο των κυτταρικών διαιρέσεων και κατ' επέκταση την ανάπτυξη της ρίζας (Lupton et al., 2017; Panteris et al., 2018). Η μεριστωματική ζώνη είναι περιορισμένη και οι φυτικοί ιστοί του ακρόρριζου δεν ακολουθούν το καλά στοιχισμένο πρότυπο διάταξης των κυττάρων της ρίζας που απαντούν στο Col-0 (Panteris et al., 2011). Μέχρι σήμερα δεν έχει πραγματοποιηθεί μελέτη της σύστασης των κυτταρικών τοιχωμάτων στο *fra2*.

Στην παρούσα εργασία μελετήθηκε αρχικά η σύσταση των κυτταρικών τοιχωμάτων φυτών *fra2* συγκριτικά με τον άγριο τύπο (Col-0), ως προς την παρουσία και την κατανομή πολυσακχαριτικών δευτερογενών στοιχείων του κυτταρικού τοιχώματος, με τεχνικές ανοσοφθορισμού. Ακολούθησε εντοπισμός των ιδίων τοιχωματικών επιτόπων σε κόμβους μολυσμένων φυτών, για να διαπιστωθούν οι διακριτές τροποποιήσεις του τοιχώματος των μεγακυττάρων στο μετάλλαγμα κατανίνης και τον άγριο τύπο. Στη συνέχεια, καλλιέργειες φυτών σε έδαφος, ανέδειξαν την αυξημένη ευαισθησία του *fra2* στη μόλυνση από κομβονηματώδεις *M. incognita*, ενώ η μεταχείριση φυτών *fra2* και Col-0 με ενδημικά στελέχη εδαφικών στρεπτομυκήτων οδήγησε στη μείωση έως και 51% του βαθμού μόλυνσης, όπως συνήθως παρατηρείται σε πειράματα βιοελέγχου και με στελέχη στρεπτομυκήτων (Kaure et al., 2016), και τόνισε τη σημασία των βιοτικών αλληλεπιδράσεων στο μικροπεριβάλλον της ριζόσφαιρας.

5.1 Η σύσταση του κυτταρικού τοιχώματος διαφέρει στις ρίζες μολυσμένων από κομβονηματοδείς *Meloidogyne incognita* και μη μολυσμένων φυτών *Arabidopsis thaliana* L. Col-0 και *fra2*

Σύσταση κυτταρικού τοιχώματος μη μολυσμένων φυτών Col-0 και *fra2*: Κατά τη ριζική ανάπτυξη τα τοιχώματα των κυττάρων της ρίζας πρέπει να είναι αρκετά ισχυρά ώστε να μην καταρρεύσουν από την εφαρμογή πολλαπλών εσωτερικών και εξωτερικών πιέσεων και τάσεων. Η πίεση σπαργής του πρωτοπλάστη (εσωτερικά) και οι διατμητικές τάσεις κατά την διείσδυση της ρίζας σε βαθύτερα στρώματα του εδάφους (εξωτερικά) προϋποθέτουν το σχηματισμό ενισχυμένων κυτταρικών τοιχωμάτων, πλούσιων σε ημικυτταρίνες και πηκτινικές ενώσεις (DeSPHG, απομεθυλεστεροποιημένης ομογαλακτουρονάνης και ραμνογαλακτουρονάνης II), ενώ συχνά στην ενίσχυση των τοιχωμάτων και την κυτταρική διασύνδεση συμμετέχουν και γλυκοπρωτεΐνες του τοιχώματος. Παράλληλα όμως τα κύτταρα στη ζώνη των κυτταρικών διαιρέσεων και τη ζώνη επιμήκυνσης πρέπει να διατηρούν την εκτατότητα των τοιχωμάτων τους (Dolan&Davies, 2004). Αυτό επιτυγχάνεται με την χαλάρωση των διασυνδέσεων μεταξύ πηκτινών ενώσεων του τοιχώματος (MPHG, μεθυλεστεροποιημένη ομογαλακτουρονάνη και ραμνογαλακτουρονάνη I) (McCartneyetal., 2003;Dolanetal., 1997). Στη ζώνη διαφοροποίησης, στην οποία εστιάζεται η παρούσα εργασία και διακρίνεται από την παρουσία στοιχείων πρωτοξυλώματος (Dolanetal, 1993), τα κύτταρα έχουν λάβει την τελική τους διαμόρφωση. Οι υποκαταστάτες (μεθυλομάδες) της MPHG σταδιακά απομακρύνονται προς σχηματισμό συνεκτικών πηκτωμάτων DeSPHG ενώ παράλληλα αυξάνει η συγκέντρωση ημικυτταρινών (Somssichetal., 2016).

Πράγματι, στις τομές των ριζών του Col-0 η παρουσία πηκτινικών επιτόπων MPHG (LM20)περιορίζεται μόνο στα κύτταρα του κεντρικού κυλίνδρου, μιας και τα κύτταρα του φλοιού, της ενδοδερμίδας και της ριζοδερμίδας σε αυτή την περιοχή της ρίζας αναμένεται να έχουν λάβει το τελικό τους μέγεθος (Εικόνα 4.10.A₂). Σε αυτή τη διαπίστωση συνηγορεί η εκτεταμένη κατανομή του αντισώματος JIM5 που ανιχνεύει DeSPHG (Εικόνα 4.9.A₂). Τα στοιχεία του κεντρικού κυλίνδρου φαίνεται να βρίσκονται σε μια ενδιάμεση κατάσταση όπου περιοχές MPHG και DeSPHG συνυπάρχουν στα κυτταρικά τοιχώματα, με πιο έντονη παρουσία στα στοιχεία του αγωγού ιστού. Επιπλέον, ομοιόμορφη κατανομή ενώσεων αραβινάνης (LM6), που συνεισφέρουν στη διατήρηση της ελαστικότητας των τοιχωμάτων (McCartneyetal., 2000), παρατηρείται σε όλο το εύρος της ζώνης διαφοροποίησης τομών του Col-0 (Εικόνα 4.11.A₂). Αντιθέτως, οι τομές ριζών *fra2* χαρακτηρίζονται από εκτεταμένη εναπόθεση MPHG σε όλους τους ιστούς της ρίζας, και ιδιαίτερα στα παρεγγυματικά κύτταρα του κεντρικού κυλίνδρου, ενώ εντονότερη εναπόθεση ενώσεων αραβινάνης περιορίζεται στον κεντρικό κύλινδρο. Ο εντοπισμός DeSPHG στο *fra2* είναι παρόμοιος του Col-0. Η τροποποίηση των πηκτινικών ενώσεων στη ζώνη διαφοροποίησης στον άγριο τύπο, επιφέρει αλλαγές στις μηχανικές ιδιότητες των κυτταρικών τοιχωμάτων που οδηγούν προοδευτικά στη καθιέρωση ισχυρότερων και ταυτόχρονα ελαστικών τοιχωμάτων. Οι τροποποιήσεις αυτές στη σύσταση των

τοιχωμάτων του *fra2* φαίνεται να καθυστερούν να πραγματοποιηθούν στη ζώνη διαφοροποίησης.

Η περιεκτικότητα των κυτταρικών τοιχωμάτων σε ημικυτταρίνες στο σύνολο των ιστών της ρίζας στο *fra2* είναι υψηλότερη σε σχέση με του Col-0, γεγονός που πιθανότατα οφείλεται στην μη φυσιολογική κυτταρική αύξηση. Η ξυλογλυκάνη (LM25) κατανέμεται ομοιόμορφα στην τομή της ρίζας του *fra2*, ενώ στο Col-0 περιορίζεται κυρίως στον κεντρικό κύλινδρο και ειδικότερα στα στοιχεία του αγωγού ιστού (Εικόνα 4.6.A₂,B₂). Στον άγριο τύπο αυτό το πρότυπο κατανομής είναι αναμενόμενο αφού η αφθονία των τοιχωμάτων σε ξυλογλυκάνη επηρεάζει τη συνεκτικότητα του δικτύου κυτταρίνης-ημικυτταρίνης (Lopezetal., 2010), συμβάλλοντας στην αύξηση της στιβαρότητας των κυτταρικών τοιχωμάτων και μειώνοντας παράλληλα την εκτατότητά τους (Pauly&Keegstra, 2016; Scheller&Ulvskov, 2010; Chanliaudet al., 2004). Στο *fra2* η γενικευμένη εναπόθεση ξυλογλυκάνης πιθανότητα εντείνεται για να αντισταθμίσει τη μειωμένη σύνθεση ινιδίων κυτταρίνης (Burket al., 2001; Zhaoetal., 2019). Η καλλόζη ακολουθεί το ίδιο πρότυπο με τη ξυλογλυκάνη σε άγριο τύπο και μετάλλαγμα, ενισχύοντας την παραπάνω υπόθεση (Εικόνα 4.8.A₂,B₂). Γλυκοπρωτεΐνες AGPs που επηρεάζουν επίσης τις μηχανικές ιδιότητες των τοιχωμάτων και ελέγχουν την κυτταρική ανάπτυξη και διαφοροποίηση, καθώς και τις αλληλεπιδράσεις μεταξύ γειτονικών κυτταρών, ανιχνεύονται σε χαμηλές συγκεντρώσεις στο σύνολο των φυτικών ιστών της ρίζας και των δύο φυτικών στελεχών (Jose-Estanyol&Puigdomenech, 2000; Bozbugaetal., 2018) (Εικόνα 4.12.A₂,B₂).

Σύσταση κυτταρικού τοιχώματος μεγακυττάρων φυτών Col-0 και *fra2*: Τα τοιχώματα των μεγακυττάρων πρέπει να είναι πρωτίστως ισχυρά, για να αποφευχθεί η κατάρρευση λόγω της υψηλής πίεσης σπαργής από τη διόγκωση του πρωτοπλάστη (Εικόνα 4.2 και 4.4.A₁,B₁), και αρκούντως εκτάσιμα, ώστε να εξυπηρετούν τις περιοδικές διατροφικές απαιτήσεις του νηματώδους (Kyndtet al., 2013). Για το λόγο αυτό τα μεγακύτταρα υπόκεινται σε σειρά τροποποιήσεων της σύστασης των τοιχωμάτων τους. Σε παλαιότερες μελέτες σύστασης κυτταρικών τοιχωμάτων συγκυτίων κυστονηματωδών, διαπιστώθηκε αυξημένη περιεκτικότητα MPHG και ξυλογλυκάνης (Bohlmann&Sobczak, 2014; Zhanget al., 2016). Παρόμοια αποτελέσματα πρόεκυψαν από μελέτη μεταξύ διαφορετικών ξενιστών που μολύνθηκαν με κομβονηματώδεις *M.incognita*, τα οποία έδειξαν επιπλέον μειωμένη έως μηδαμινή παρουσία ενώσεων αραβινάνης και γλυκοπρωτεϊνών (AGPs) στα τοιχώματα των μεγακυττάρων (Bozbugaetal., 2018). Οι τροποποιήσεις αυτές προσδίδουν στο τοίχωμα των μεγακυττάρων την απαραίτητη πλαστικότητα που συνοδεύει την κατ' όγκο αύξηση ενώ ταυτόχρονα αντιστέκεται στη διάρρηξή τους. Στην παρούσα εργασία επιβεβαιώθηκε η κατανομή των ανωτέρω πολυσακχαριτών και γλυκοπρωτεϊνών στα τοιχώματα των μεγακυττάρων του Col-0. Ωστόσο στο *fra2* διαπιστώθηκαν αποκλίσεις στην περιεκτικότητα των τοιχωμάτων ορισμένων δευτερογενών στοιχείων του κυτταρικού τοιχώματος. Στα μεγακύτταρα του μεταλλάγματος κατανίνης ο εντοπισμός MPHG είναι εντονότερος, γεγονός που

ενισχύει την πλαστικότητα και εκτατότητα των τοιχωμάτων. Ταυτόχρονα, η εναπόθεση ενώσεων αραβινάνης εκτείνεται σε όλη τη διατομή της ρίζας εκπέμποντας πολύ ισχυρό σήμα, ενδεικτικό της έντονης παρουσίας τους στο σύνολο των φυτικών ιστών. Η αύξηση εναποθέσεων αραβινάνης, που ενισχύει την ελαστικότητα των κυτταρικών τοιχωμάτων, θα μπορούσε να θεωρηθεί ως απόκριση στην αυξημένη ευθραυστότητα που παρουσιάζουν οι ιστοί του *fra2*. Ενδιαφέρον θα ήταν να φανεί αν η απόκριση αυτή οφείλεται σε μηχανισμούς άμυνας του ξενιστή ή επάγεται μέσω εκκρίσεων του κομβονηματώδους ώστε να προστατεύσει από διάρρηξη το ενδιαίτημά του. Διαφορές από τον άγριο τύπο παρουσιάζονται επίσης στην κατανομή της καλλόξης. Είναι κοινώς αποδεκτό ότι η καλλόξη συντίθεται στα άκρα των πλασμοδεσμών και ελέγχει τη συμπλαστική διέλευση ουσιών μεταξύ γειτονικών κυττάρων (Knox et al., 2014). Επιπλέον, συντίθεται υπό συνθήκες βιοτικής και αβιοτικής καταπόνησης (DeStorpe & Geelen, 2014; Eleftheriou et al., 2012; Voigt, 2014). Σε μελέτες συγκυτίων κυστονηματώδων σκωλήκων έχει παρατηρηθεί ο σχηματισμός πώματος καλλόξης (feeding plug) που εμποδίζει την κυτοπλασματική διακίνηση συστατικών προς το άνοιγμα του στιλέτου του νηματώδους (Golinowski et al., 1999), όμως κάτι τέτοιο δεν έχει παρατηρηθεί σε μεγακύτταρα κομβονηματώδων. Μέχρι και σήμερα η έρευνα γύρω από την εναπόθεση καλλόξης στα μεγακύτταρα είναι πολύ περιορισμένη. Στην παρούσα φαίνεται ότι η μόλυνση από παρασιτικούς νηματώδεις επάγει τη σύνθεση καλλόξης (Εικόνα 4.8.A₁, A₂). Ειδικότερα, στα μεγακύτταρα του Col-0 παρατηρείται έντονη εναπόθεση καλλόξης (Εικόνα 4.8.A₁). Η ενίσχυση των τοιχωμάτων με καλλόξη υποστηρίζει το κυτταρικό τοίχωμα των μεγακυττάρων, ενώ δεν μπορεί να αποκλειστεί και η πιθανότητα να αποτελεί μηχανικό φραγμό έναντι της μόλυνσης από κομβονηματώδεις, όπως έχει διαπιστωθεί για άλλα είδη νηματωδών (Holbein et al., 2016). Η ελάττωση του ανοίγματος των πόρων περιορίζει τη συμπλαστική μεταφορά θρεπτικών μεταξύ γειτονικών μεγακυττάρων, αλλά και μεταξύ των μεγακυττάρων και του αγωγού ιστού, παρεμποδίζοντας με αυτό τον τρόπο τη θρέψη του νηματώδους. Πράγματι, στην Εικόνα 4.8.A₁ παρατηρείται αυξημένη εναπόθεση καλλόξης τόσο μεταξύ εφαπτόμενων μεγακυττάρων όσο και στην περιοχή μεταξύ των μεγακυττάρων και των αγγείων του ξυλώματος. Στα τοιχώματα των μεγακυττάρων του *fra2* η σύνθεση καλλόξης είναι εμφανώς μειωμένη (Εικόνα 4.8.B₁). Με αυτό τον τρόπο καταστρατηγείται η πρώτη γραμμή άμυνας του ξενιστή που λειτουργεί ως μηχανικός φραγμός έναντι της υπέρμετρης αύξησης του μεγακυττάρου, ενώ παράλληλα διευκολύνεται η συμπλαστική διακίνηση κυτταροπλάσματος που αποτελεί τη διατροφή του νηματώδους. Ο συνδυασμός των ανωτέρω παρατηρήσεων θα μπορούσε εν μέρει να εξηγήσει την ευαισθησία του μεταλλάγματος *fra2* στη μόλυνση από κομβονηματώδεις.

5.2 Το *Arabidopsis thaliana* L. *fra2* παρουσιάζει αυξημένη ευαισθησία στη μόλυνση από *Meloidogyne incognita*

Πειράματα ευαισθησίας σε Col-0 και *fra2* έδειξαν αυξημένη ευαισθησία του μεταλλάγματος στη μόλυνση από *M. incognita*. Η συχνότητα εμφάνισης

κομβονηματωδών στις ρίζες του *fra2* βρέθηκε επτά φορές περίπου υψηλότερη από του Col-0 (Εικόνα 4.2), γεγονός που υποδεικνύει ότι η μειωμένη δραστηριότητα της κατανίνης οδηγεί στην αύξηση της ευαισθησίας του φυτού.

Η μειωμένη σύνθεση κυτταρίνης στα τοιχώματα του *fra2* τα καθιστά εξαιρετικά εύθραυστα. Με αυτό τον τρόπο διευκολύνεται η διακυτταρική διέλευση του μολυσματικού J2 σταδίου του κομβονηματώδους αλλά και η διάτρηση συνοδών κυττάρων για την εγκατάστασή του στη θέση θρέψης. Επιπλέον, η φανερά μειωμένη περιεκτικότητα των τοιχωμάτων του *fra2* σε καλλόζη, που συντίθεται σε συνθήκες μηχανικής καταπόνησης και συνεισφέρει στην ελαστικότητα των τοιχωμάτων ενώ παράλληλα προστατεύει το πλασμαλήμμα από την έντονη πίεση σπαργής των μεγακυττάρων, συμβάλλει στην ευαισθησία του φυτού *fra2* στη μόλυνση. Ως αντιστάθμισμα της έλλειψης επαρκούς ποσότητας καλλόζης στα μεγακύτταρα του *fra2*, παρατηρείται έντονη παρουσία επιτόπων αραβινάνης και MPHG προκειμένου να διατηρηθεί η συνοχή των κυτταρικών τοιχωμάτων των μεγακυττάρων. Η αξιοσημείωτη αύξηση της εναπόθεσης αραβινάνης σε ολόκληρη τη διατομή του κόμβου συμβάλλει περαιτέρω στη σταθεροποίηση των ιστών της ρίζας, που λόγω αυξημένης ευθραυστότητας θα μπορούσε να καταρρεύσει υπό την έντονη πίεση των διογκωμένων μεγακυττάρων εντός του κεντρικού κυλίνδρου. Με αυτά τα δεδομένα γίνεται σαφές ότι η κατανίνη που ελέγχει την ορθή λειτουργία του κυτταροσκελετού και πιο συγκεκριμένα του δικτύου μικροσωληνίσκων, συμμετέχει έμμεσα στην άμυνα του ξενιστή ενάντια στη μόλυνση από κομβονηματώδεις.

Είναι γνωστό ότι οι φυτοπαρασιτικοί νηματώδεις επάγουν κυτταρικές τροποποιήσεις παρεμβαίνοντας μέσω εκκρίσεων στη γονιδιακή ρύθμιση των ξενιστών τους. Δεν αποκλείεται μέρος αυτών των τροποποιήσεων που παρατηρήθηκαν στο *fra2* να προέρχεται από τον έλεγχο της γονιδιακής έκφρασης του φυτού από μέρους του νηματώδους και όχι από την άμεση απόκριση του φυτού στη μηχανική καταπόνηση. Οι νηματώδεις φαίνεται να είναι σε θέση να αναγνωρίζουν τις ιδιαιτερότητες του κάθε ξενιστή και να χειρίζονται το γονιδιακό του υπόβαθρο προς όφελος τους (Bozbugaetal., 2018). Δεν αποτελεί έκπληξη λοιπόν ότι οι φυτοπαρασιτικοί νηματώδεις διαθέτουν ένα τόσο ευρύ φάσμα ξενιστών, καθώς είναι γνωστό ότι είναι σε θέση να μολύνουν τα περισσότερα είδη αγγειοσπέρμων (Leelarasameeetal., 2018). Η προσαρμοστικότητα των παρασιτικών νηματωδών στο γονιδιακό δυναμικό του εκάστοτε ξενιστή είναι που κάνει εξαιρετικά δύσκολη αντιμετώπισή τους.

5.3 Τα στελέχη *Streptomycescolombiensis*ATHUBA 438 και *Streptomycesmonomycini*ATHUBA 220 προωθούν την ανάπτυξη του φυτού *Arabidopsisthaliana* L. και μειώνουν το βαθμό προσβολής από κομβονηματώδεις *Meloidogyneincognita*

Για την αντιμετώπιση των κομβονηματωδών αρχικά χρησιμοποιήθηκαν χημικά νηματωδοκτόνα. Η εφαρμογή συνθετικών παρασιτοκτόνων επί σειρά δεκαετιών, μεταξύ των οποίων το DBCP (1,2 διβρωμο-3 χλωροπροπάνιο) που εφαρμόζεται σε

νεαρά αρτίβλαστα χωρίς να εκδηλώνει φυτοτοξικότητα (Gowen, 1997), αποδείχθηκε ότι έχει ωστόσο αρνητικές επιπτώσεις στην υγεία του ανθρώπου και στο περιβάλλον και η χρήση τους έχει πλέον απαγορευθεί σε πολλές χώρες παγκοσμίως. Τα τελευταία χρόνια το ενδιαφέρον στρέφεται ολοένα και περισσότερο στην αξιοποίηση εδαφικών μικροοργανισμών που αποτελούν φυσικούς εποικιστές του ριζικού συστήματος και ως εκ τούτου φιλικούς προς το περιβάλλον παράγοντες αντιμετώπισης των φυτοπαρασιτικών νηματωδών (Radwanetal., 2012). Επιπλέον, οι μικροβιακοί παράγοντες βιοελέγχου δεν αποτελούν κίνδυνο για την υγεία, ενώ παράλληλα ορισμένοι εξ' αυτών συνεισφέρουν στην ευρωστία των φυτών και τη βελτίωση εδαφών και καλλιεργειών (Tamreihaoetal., 2016). Οι μικροοργανισμοί εγκαθίστανται στο μικροπεριβάλλον της ριζόσφαιρας, σχηματίζουν βιοκοινότητες αλληλεπιδρώντας με άλλους εγγενείς εδαφικούς οργανισμούς και δεν εκπλένονται με το πότισμα ή τις κατακρυσνήσεις όπως συμβαίνει με τα συνθετικά παρασιτοκτόνα. Οι μικροβιακοί παράγοντες βιοελέγχου αποδίδουν πολλαπλά οφέλη στη Γεωργία και αποτελούν πλέον πεδίο εντατικής επιστημονικής έρευνας.

Στην παρούσα εργασία μελετήθηκε η επίδραση ενδογενών στελεχών στρεπτομυκήτων της τράπεζας ATHUBA «TheAthensUniversityBacterial&ArchaeaCultureCollection» του ΕΚΠΑ (Katsifasetal., 1999), σε μολυσμένα από κομβονηματώδεις *M.incognita* φυτά Col-0 και *fra2*. Πραγματοποιήθηκαν μετρήσεις παραμέτρων φυτικής ανάπτυξης και εκτιμήθηκε ο βαθμός μόλυνσης των δύο φυτικών στελεχών παρουσία των ειδών *S.monomycini*ATHUBA 220 και *S.colombiensis*ATHUBA438. Οι μετρήσεις του μήκους του βλαστού, του νωπού και του ξηρού βάρους των φυτών αγρίου τύπου έδειξαν ότι στατιστικά σημαντική διαφορά σημειώνεται μεταξύ των μολυσμένων από *M.incognita* φυτών Col-0 και μολυσμένων φυτών στα οποία όμως προηγήθηκε μεταχείριση με το στέλεχος *S.monomycini*ATHUBA 220 (Εικόνες 4.3.-4.5). Επιπλέον, το ξηρό και το νωπό βάρος παρουσιάζουν στατιστικά σημαντική διαφορά και μεταξύ μη μολυσμένων και μολυσμένων φυτών Col-0, παρουσία του *S.monomycini*ATHUBA 220 (Εικόνες 4.4.-4.5). Στο Col-0 οι μικρότερες τιμές των παραμέτρων σημειώνονται στα μολυσμένα με *M.incognita* φυτά, ακολουθούν οι τιμές των παραμέτρων φυτών που υποβλήθηκαν σε μεταχείριση με στρεπτομύκητες και τέλος εκείνες από την συμμόλυνση με νηματώδεις και στρεπτομύκητες. Στις τελευταίες σημειώθηκαν τιμές που υπερβαίνουν ακόμα και εκείνες των μη μολυσμένων φυτών για τη μεταχείριση με *S.monomycini*ATHUBA 220 σε ποσοστό έως και 126%(Εικόνες 4.3.-4.5). Ανάλογα πειράματα βιοελέγχου με στελέχη στρεπτομυκήτων, όπως το *S.hydrogenans*DH16, αύξησαν τις αναπτυξιακές παραμέτρους μολυσμένων από *M.incognita* φυτών σε ποσοστό 200-400%, ενώ σε μη μολυσμένα φυτά μόλις 50-100% (Kauretal., 2016). Το γεγονός αυτό αναδεικνύει τη σημασία των βιοτικών αλληλεπιδράσεων της ριζόσφαιρας στην προώθηση της φυτικής ανάπτυξης.

Παρόμοιο πρότυπο σχετικά με τις αναπτυξιακές παραμέτρους φαίνεται να ακολουθείται και στο *fra2* παρότι τα αποτελέσματα δεν χαρακτηρίζονται από

στατιστική σημαντικότητα, συνεπώς δεν μπορούν να εξαχθούν ασφαλή συμπεράσματα. Η ελαττωματική διαμόρφωση του κυτταροσκελετού στο *fra2* φαίνεται πως είναι κρίσιμη για την ανάπτυξη των ιστών του υπέργειου τμήματος και δεν μπορεί να αντισταθμιστεί από την ενισχυτική συμβολή των στρεπτομυκήτων στην φυτική ανάπτυξη.

Για να εκτιμηθεί η συνεισφορά των στελεχών στρεπτομυκήτων στην αναστροφή του φαινότυπου της μόλυνσης στο υπέργειο τμήμα των φυτών, υπολογίστηκε ο δείκτης RTI (Πίνακας 4.2.), με τον οποίο συγκρίνονται οι τιμές των μεταχειρίσεων με νηματώδεις και στρεπτομυκήτες απευθείας με τα μη μολυσμένα φυτά Col-0 και *fra2*. Και με αυτή την προσέγγιση το στέλεχος *S.monomycini*ATHUBA 220 αποδείχθηκε ικανό να επαναφέρει τις τιμές των αναπτυξιακών παραμέτρων στα φυσιολογικά επίπεδα ή ακόμα και να τις υπερβεί. Το στέλεχος *S.colombiensis*ATHUBA438 δρα ευεγρετικά μόνο στην περίπτωση του *fra2*, χωρίς ωστόσο να αναστρέφει το φαινότυπο της μόλυνσης. Επίσης, το *fra2* διακρίνεται από αυξημένες τιμές του δείκτη RTI ως προς το νωπό βάρος, αλλά όχι και το ξηρό. Πιθανότητα αυτό να οφείλεται σε συσσώρευση νερού στα χυμοτόπια των κυττάρων του βλαστού εξαιτίας της μόλυνσης από κομβονηματώδεις. Τα πειραματικά αποτελέσματα σχετικά με την συνεισφορά των δύο στελεχών στρεπτομυκήτων στην αντιμετώπιση της προσβολής του ριζικού συστήματος από κομβονηματώδεις *M.incognita*, έδειξαν ότι μόνο το *S.monomycini*ATHUBA 220 μειώνει το βαθμό μόλυνσης στο Col-0 κατά 51%. Ανάλογα αποτελέσματα δίνουν και άλλα στελέχη στρεπτομυκήτων, με ποσοστό μείωσης της προσβολής 50-60% (Kauretal., 2016). Στο *fra2* και τα δύο στελέχη στρεπτομυκήτων φαίνεται να δρουν ικανοποιητικά αν και τα αποτελέσματα δε χαρακτηρίζονται από στατιστική σημαντικότητα (Εικόνα 4.9.).

Συμπερασματικά, φαίνεται ότι στελέχη στρεπτομυκήτων, όπως το *S.monomycini*ATHUBA 220, είναι ικανά να δρουν ως παράγοντες βιοελέγχου για την αντιμετώπιση φυτοпараσιτικών κομβονηματωδών. Ακόμα και αν δεν καταφέρνουν να αποτρέψουν πλήρως την προσβολή της ρίζας από κομβονηματώδεις είναι σε θέση να αναστρέφουν το φαινότυπο της μόλυνσης του υπέργειου τμήματος. Θα μπορούσαν με αυτό τον τρόπο να αξιοποιηθούν σε καλλιέργειες φυτών των οποίων μόνο το υπέργειο τμήμα είναι εμπορικά εκμεταλλεύσιμο, όπως η ντομάτα ή τα καλλωπιστικά φυτά. Αντιθέτως για καλλιεργούμενα φυτά, όπως το καρότο και η πατάτα, στα οποία η μόλυνση επηρεάζει το εδώδιμο μέρος τους, απαιτείται πλήρης αντιμετώπιση των παρασιτικών νηματωδών.

6 Γενικά Συμπεράσματα

- Στο μετάλλαγμα *fra2* παρατηρείται καθυστερημένη κυτταρική αύξηση μέχρι και τη ζώνη διαφοροποίησης. Τα τοιχώματα διατηρούν την εκτατότητα τους παρουσιάζοντας αυξημένες εναποθέσεις πηκτινικών ενώσεων αραβινάνης και MPHG. Σε αντίθεση με τα κυτταρικά τοιχώματα του Col-0 που έχουν λάβει το τελικό τους μέγεθος στη ζώνη διαφοροποίησης.
- Η περιεκτικότητα των τοιχωμάτων των μεγακυττάρων του *fra2* σε καλλόζη είναι αισθητά μειωμένη, γεγονός που διευκολύνει την κυτταρική επέκταση. Στα τοιχώματα των μεγακυττάρων του *fra2* η εντονότερη παρουσία ενώσεων αραβινάνης και MPHG τα καθιστά ικανά να εκτείνονται ακόμα περισσότερο χωρίς να καταρρέουν υπό την έντονη πίεση σπαργής του πρωτοπλάστη. Στο Col-0 τα τοιχώματα των μεγακυττάρων ενισχύονται με καλλόζη. Με αυτό τον τρόπο μειώνεται η ικανότητα επέκτασης τους ενώ ταυτόχρονα περιορίζεται η συμπλαστική διακίνηση κυτταροπλασματικών ουσιών για τη θρέψη του νηματώδους. Τα εύθραυστα κυτταρικά τοιχώματα του *fra2* ενισχύονται με ημικυτταρίνες ως αντίμετρο στην ανεπαρκή σύνθεση κυτταρίνης.
- Το μετάλλαγμα *fra2* είναι πιο ευαίσθητο στην προσβολή από *M.incognita*. Η ομαλή λειτουργία του κυτταροσκελετού συμβάλλει στην άμυνα του φυτού έναντίον κομβονηματωδών σκωλήκων.
- Μεταχείριση φυτών Col-0 και *fra2* με ενδογενή στελέχη στρεπτομυκήτων πριν την μόλυνση με κομβονηματώδεις *M.incognita* έδειξε ότι ορισμένα στελέχη στρεπτομυκήτων μπορούν να δράσουν ως παράγοντες βιοελέγχου.
- Το στέλεχος *S.monomycini* ATHUBA 220 μειώνει το βαθμό μόλυνσης σε φυτά Col-0 ενώ συγχρόνως βελτιώνει τις παραμέτρους φυτικής ανάπτυξης του υπέργειου τμήματος του φυτού (μήκος, νωπό και ξηρό βάρος βλαστού).
- Το στέλεχος *S.colombiensis* ATHUBA 438 δρα ευεγερτικά μόνο στο *fra2* μειώνοντας το βαθμό μόλυνσης χωρίς ωστόσο να είναι ικανό να αναστρέψει το φαινότυπο των μολυσμένων φυτών.

Παράρτημα

Παρασκευή διαλυμάτων

Παρασκευή ρυθμιστικού διαλύματος PEM pH6,8 (buffer)

Γυάλινο ποτήρι ζέσεως όγκου ενός λίτρου με 500ml dH₂O και μαγνητική ράβδο, τοποθετείται σε μαγνητική εστία VossofMaldon. Καθώς το νερό αναδεύεται προστίθενται διαδοχικά 7,56g PIPES, 0,95g EGTA και 0,614g MgSO₄. Για την πλήρη διάλυση των επιμέρους συστατικών εισάγεται μικρή ποσότητα στερεού KOH. Στο τέλος, το pH ρυθμίζεται με προσθήκη σταγόνων 37% HCl και ελέγχεται με πεχαμετρικό χαρτί (Macherey-Nagel) έως ότου λάβει τιμή pH6,8. Το ρυθμιστικό διάλυμα PEM μεταφέρεται σε κλειστή φιάλη και φυλάσσεται στο ψυγείο (4°C).

Παρασκευή διαλύματος στερέωσης (fixative)

Σε γυάλινο ποτήρι ζέσεως των 40ml εισάγονται 20ml PEM και 0,4g PFA. Το ποτήρι ζέσεως μεταφέρεται σε θερμαντική μαγνητική εστία όπου το περιεχόμενο αφήνεται να διαλυθεί υπό ανάδευση, με τη βοήθεια μικρής μαγνητικής ράβδου, σε θερμοκρασία 60°C. Παράλληλα προστίθενται σταδιακά KOH ώστε να αυξηθεί η τιμή του pH για να διαλυθεί πλήρως το PFA. Όσο πιο διαυγές είναι το διάλυμα τόσο πιο επιτυχημένη θα είναι η στερέωση. Κατόπιν προστίθενται 0,4ml GA και το διάλυμα αναδεύεται για άλλα 10min. Το pH του διαλύματος ρυθμίζεται με προσθήκη σταγόνων 37% HCl και ελέγχεται με πεχαμετρικό χαρτί έως ότου λάβει τιμή pH6,8. Το διάλυμα στερέωσης μοιράζεται σε Eppendorf του 1ml και φυλάσσεται στην κατάψυξη (-18°C). Κάθε φορά που πρόκειται να χρησιμοποιηθεί αυτό το διάλυμα, πρέπει να αφήνεται σε θερμοκρασία δωματίου για να ξεπαγώσει.

Παρασκευή διαλύματος 30% αιθανόλης, 0,5% OsO₄

250ml διαλύματος 2% OsO₄, από απόθεμα που φυλάσσεται στην κατάψυξη (-18°C) και αφήνεται να ξεπαγώσει σε απαγωγό, αραιώνεται με 300ml αιθανόλη 100% και 450ml dH₂O.

Παρασκευή ρυθμιστικού διαλύματος PBS pH7,0 (buffer)

Σε 500ml dH₂O προστίθενται σταδιακά υπό ανάδευση 7,742mg Na₂HPO₄·7H₂O και 2,914mg NaH₂PO₄·H₂O. Το pH του διαλύματος ρυθμίζεται με σταγόνες 37% HCl και μεταφέρεται σε κλειστή φιάλη στο ψυγείο (4°C).

Παρασκευή διαλύματος οξικής φουξίνης

Σε 150ml dH₂O προστίθενται υπό ανάδευση 50ml CH₃COOH και 0,7g οξική φουξίνη.

Κυτταρικές διαφοροποιήσεις ξενιστών από κομβονηματώδεις και Βιοέλεγχος

Μεϊντάνη Χ.¹, Γιαννούτσου Ε.¹, Ντάλλη Ν.², Καραγκούνη Α.¹, Αδαμάκης Σ.Ι.Δ.¹

¹Τομέας βοτανικής, Τμήμα Βιολογίας, ΕΚΠΑ, 15784Αθήνα, sbi1200150@gmail.com

²Μπενάκειο Φυτοπαθολογικό Ινστιτούτο, 14561Αθήνα

Οι κομβονηματώδεις του είδους *Meloidogyne incognita* είναι υποχρεωτικά παρασιτικοί οργανισμοί που προσβάλλουν τις ρίζες πολλών καλλιεργούμενων φυτών. Επάγουν τη διαφοροποίηση των συνοδών παρεγχυματικών κυττάρων του κεντρικού κυλίνδρου σε μεγακύτταρα από τα οποία τρέφονται μέχρι να ολοκληρώσουν τον κύκλο ζωής τους. Στο μετάλλαγμα *fra2*, η κατανίνη που συμβάλλει στην ορθή διευθέτηση των μικροσωληνίσκων και με αυτό τον τρόπο ρυθμίζει έμμεσα τη διαμόρφωση του κυτταρικού τοιχώματος, δεν είναι λειτουργική. Προκειμένου να διαλευκανθεί η συνεισφορά της ορθής λειτουργίας του κυτταροσκελετού στη μόλυνση από τον κομβονηματώδη, φυτά *fra2* ηλικίας 30 ημερών μολύνθηκαν με 100 κομβονηματώδεις/ml. Παράλληλα μολυσμένα φυτά αγρίου τύπου, Col-0, χρησιμοποιήθηκαν ως μάρτυρες. Τμήματα της ρίζας μήκους 0,5cm εκατέρωθεν των κόμβων αποκόπηκαν από φυτά 21 ημέρες μετά την μόλυνση και έπειτα από διαδοχικές αφυδατώσεις με αιθανόλη εμποτίστηκαν με ρητίνη LRW. Οι εγκάρσιες τομές στο επίπεδο των μεγακυττάρων επώαστηκαν με τα αντισώματα JIM5, LM20, LM6, LM25, anti-(1→3)-β-D-glucan, LM2 που προσδένονται ειδικά σε απομεθυλεστεροποιημένη ομογαλακτουρονάνη (DeSPHG), πλήρως μεθυλεστεροποιημένη ομογαλακτουρονάνη (MPHG), αραβινάνη (Ara), ξυλογλυκάνη (Xlg), καλλόζη (Cal) και γλυκοπρωτεΐνες (AGPs) αντίστοιχα. Τα δείγματα παρατηρήθηκαν σε μικροσκόπιο φθορισμού. Τα επίπεδα DeSPHG και AGPs είναι παρόμοια στον άγριο τύπο και στο μετάλλαγμα, ενώ οι MPHG και Ara παρουσιάζονται αυξημένες στο *fra2*. Αντίθετα οι Xlg και Cal διατηρούνται σε υψηλότερα επίπεδα στο Col-0. Σύμφωνα με αυτά τα δεδομένα παρατηρείται αυξημένη εναπόθεση πηκτινικών ενώσεων στο *fra2* έναντι του Col-0 και ταυτόχρονα χαμηλότερα επίπεδα ημικυτταρίνων που συμβάλλουν στην δημιουργία πιο χαλαρών και εύθραυστων κυτταρικών τοιχωμάτων στο μετάλλαγμα *fra2*. Οι τροποποιήσεις του κυτταρικού τοιχώματος, προάγουν την ευαισθησία του μεταλλάγματος στη μόλυνση από *M. incognita*.

Ο βιοέλεγχος αποτελεί τη σύγχρονη προσέγγιση αντιμετώπισης φυτοπαθογόνων οργανισμών, όπως οι κομβονηματώδεις *M. incognita*. Πραγματοποιήθηκε η μελέτη της επίδρασης 2 ενδογενών εδαφικών στελεχών στρεπτομυκήτων *Streptomyces monomycini* ATHUBA 220 και *Streptomyces colombiensis* ATHUBA 438 στην μόλυνση από *M. incognita* φυτών *Arabidopsis thaliana* L. αγρίου τύπου (Col-0) και του μεταλλάγματος κατανίνης *fra2*. Στο έδαφος φυτών ηλικίας 12 ημερών προστέθηκε εναιώρημα σπορίων στρεπτομυκήτων, συγκέντρωσης 10⁷ κύτταρα/γεδάφους, και ακολούθησε μόλυνση των φυτών με εναιώρημα *M. incognita*, συγκέντρωσης 20 κομβονηματώδεις/γεδάφους 15 ημέρες αργότερα. Μετά από 21 ημέρες μετρήθηκε το μήκος, το νωπό και το ξηρό βάρος βλαστού και ο αριθμός κομβονηματωδών ανά mg ξηρής μάζας της ρίζας και υπολογίστηκε ο δείκτης σχετικής ανθεκτικότητας (RTI). Το στέλεχος *S. monomycini* ATHUBA 220 μειώνει την ευαισθησία των φυτών και αναστρέφει το φαινότυπο της μόλυνσης. Το στέλεχος *S. colombiensis* ATHUBA 438 δρα εξίσου αποτελεσματικά μόνο στο *fra2*.

Cell wall modifications induced by rootknot nematodes and Biocontrol

Meidani C.¹, Giannoutsou H.¹, Ntalli N.², Karagouni-Kirtsou A.¹, Adamakis S. I-D.¹

¹ Department of Botany, Faculty of Biology, University of Athens, 15784 Athens,
sbi1200150@gmail.com

² Laboratory of Biological Control of Pesticides, Benaki Phytopathological Institute, 14561 Athens

Rootknot nematodes of the species *Meloidogyne incognita* are obligatorily parasitic organisms that infect the roots of many cultivated plants. They induce the differentiation of the parenchymatic cells of the central cylinder to giant-cells from which they feed until they complete their life cycle. Nematode entry in the root of the plant causes a line of responses, which include also the change in the composition of the cell walls, via the expression of various genes. In the *fra2* mutant, katanin, that contributes in the proper microtubule organization and consequently regulates indirectly the configuration of the cell wall, is not functional. So in order to study the contribution of microtubules in the rootknot infection, 30-day-old *fra2* plants were treated with 100 nematodes/ml. Similarly treated wild type plants, Col-0, were used as controls. Root knots of a length of 0,5 cm were cut off from plants, 21 days after the infection and subjected to successive dehydration with ethanol finally embedded to LRW resin. Transverse sections through the giant cells were incubated with JIM5, LM20, LM6, LM25, anti-(1→3)-b-D-glucan, and LM2 primary antibodies which bind specifically to de-methyl-esterified homogalacturonan (DeSPHG), methyl-esterified homogalacturonan (MPHG), arabinan (Ara), xyloglucan (Xlg), callose (Cal) and glycoproteins (AGPs) respectively. These sections were observed in an epifluorescence microscope. Levels of DeSPHG and AGPs were similar in the wild type and the mutant plants, while MPHG and Ara appeared increased in *fra2*. On the contrary Xlg and Cal were maintained in higher levels in Col-0. These data suggest an increased deposition of pectins and simultaneously lower levels of hemicelluloses in *fra2* that contribute in the creation of more loose and fragile cell walls in the mutant. The cell wall modifications promote the sensitivity of the mutant against rootknot nematode infection.

Biocontrol is a modern approach to handle plant-parasitic organisms such as the rootknot nematode *M. incognita*. The impact of two Greek indigenous *Streptomyces* strains, *Streptomyces monomycini* ATHUBA 220 and *Streptomyces colombiensis* ATHUBA 438, on *M. incognita* infestation of wild type *Arabidopsis thaliana* L. plants (Col-0) and *fra2* katanin mutants, was studied. A *Streptomyces* spore suspension having a concentration of 10^7 cells/g_{soil}, was added to the soil of 12 day old plants and 15 days later plants were treated with *M. incognita* suspension of 20 nematodes/g_{soil}. Shoot length, wet and dry shoot mass and the number of nematodes per mg of root dry mass as well as the Relative Tolerance Index (RTI) were estimated 21 days post infection. *S. monomycini* ATHUBA 220 reduced plant sensitivity and reversed infection phenotype. *S. colombiensis* ATHUBA 438 proved to be equally effective only for *fra2* plants.

7 Βιβλιογραφία

1. Abad, P., Favery, B., Rosso, M. N., & Castagnone-Sereno, P. (2003). Root-knot nematode parasitism and host response: molecular basis of a sophisticated interaction. *Molecular plant pathology*, 4(4), 217-224.
2. Albersheim, P., Darvill, A., Roberts, K., Sederoff, R., & Staehelin, A. (2011). *Plant Cell Walls*, Garland Science.
3. Amaresan, N., Kumar, K., Naik, J. H., Bapatla, K. G., & Mishra, R. K. (2018). Streptomyces in Plant Growth Promotion: Mechanisms and Role. In *New and Future Developments in Microbial Biotechnology and Bioengineering* (pp. 125-135). Elsevier.
4. Arabidopsis Genome Initiative. (2000). Analysis of the genome sequence of the flowering plant *Arabidopsis thaliana*. *Nature*, 408(6814), 796.
5. Bais, H.P.; Weir, T.L.; Perry, L.G.; Gilroy, S.; Vivanco, J.M. The role of root exudates in rhizosphere interactions with plants and other organisms. *Ann. Rev. Plant Biol.* **2006**, 57, 233–266.
6. Barka, E. A., Vatsa, P., Sanchez, L., Gaveau-Vaillant, N., Jacquard, C., Klenk, H. P., & van Wezel, G. P. (2016). Taxonomy, physiology, and natural products of Actinobacteria. *Microbiol. Mol. Biol. Rev.*, 80(1), 1-43.
7. Bartlem, D. G., Jones, M. G., & Hammes, U. Z. (2013). Vascularization and nutrient delivery at root-knot nematode feeding sites in host roots. *Journal of Experimental Botany*, 65(7), 1789-1798.
8. Baskin, J. M., & Baskin, C. C. (2004). A classification system for seed dormancy. *Seed science research*, 14(1), 1-16.
9. Berg, G., & Smalla, K. (2009). Plant species and soil type cooperatively shape the structure and function of microbial communities in the rhizosphere. *FEMS microbiology ecology*, 68(1), 1-13.
10. Berg, R. H., Fester, T., & Taylor, C. G. (2009). Development of the root-knot nematode feeding cell. In *Cell biology of plant nematode parasitism* (pp. 115-152). Springer, Berlin, Heidelberg.
11. Bidhendi, A. J., & Geitmann, A. (2015). Relating the mechanics of the primary plant cell wall to morphogenesis. *Journal of experimental botany*, 67(2), 449-461.
12. Bird, D. M., & Koltai, H. (2000). Plant parasitic nematodes: habitats, hormones, and horizontally-acquired genes. *Journal of plant growth regulation*, 19(2), 183-194.
13. Bird, D. M., & Kaloshian, I. (2003). Are roots special? Nematodes have their say. *Physiological and Molecular Plant Pathology*, 62(2), 115-123.
14. Bohlmann, H., & Sobczak, M. (2014). The plant cell wall in the feeding sites of cyst nematodes. *Frontiers in plant science*, 5, 89.
15. Bouquin, T., Mattsson, O., Næsted, H., Foster, R., & Mundy, J. (2003). The *Arabidopsis* lue1 mutant defines a katanin p60 ortholog involved in hormonal control of microtubule orientation during cell growth. *Journal of Cell Science*, 116(5), 791-801.
16. Bozbuga, R., Lilley, C. J., Knox, J. P., & Urwin, P. E. (2018). Host-specific signatures of the cell wall changes induced by the plant parasitic nematode, *Meloidogyne incognita*. *Scientific reports*, 8(1), 17302.

17. Burk, D. H., & Ye, Z. H. (2002). Alteration of oriented deposition of cellulose microfibrils by mutation of a katanin-like microtubule-severing protein. *The Plant Cell*, 14(9), 2145-2160.
18. Burk, D. H., Liu, B., Zhong, R., Morrison, W. H., & Ye, Z. H. (2001). A Katanin-like protein regulates normal cell wall gBiosynthesis and cell elongation. *The Plant Cell*, 13(4), 807-827.
19. Burk, D. H., Zhong, R., & Ye, Z. H. (2007). The katanin microtubule severing protein in plants. *Journal of Integrative Plant Biology*, 49(8), 1174-1182.
20. Bybd Jr, D. W., Kirkpatrick, T., & Barker, K. (1983). An improved technique for clearing and staining plant tissues for detection of nematodes. *Journal of nematology*, 15(1), 142.
21. Cabrera, J. A., Menjivar, R. D., Dababat, A. E. F. A., & Sikora, R. A. (2013). Properties and nematicide performance of avermectins. *Journal of Phytopathology*, 161(2), 65-69.
22. Caffall, K. H., & Mohnen, D. (2009). The structure, function, and biosynthesis of plant cell wall pectic polysaccharides. *Carbohydrate research*, 344(14), 1879-1900.
23. Casero, P. J., Casimiro, I., & Knox, J. P. (1998). Occurrence of cell surface arabinogalactan-protein and extensin epitopes in relation to pericycle and vascular tissue development in the root apex of four species. *Planta*, 204(2), 252-259.
24. Casero, P. J., & Knox, J. P. (1995). The monoclonal antibody JIM5 indicates patterns of pectin deposition in relation to pit fields at the plasma-membrane-face of tomato pericarp cell walls. *Protoplasma*, 188(1-2), 133-137.
25. Cassab, G. I. (1998). Plant cell wall proteins. *Annual review of plant biology*, 49(1), 281-309.
26. Chanliaud, E., De Silva, J., Strongitharm, B., Jeronimidis, G., & Gidley, M. J. (2004). Mechanical effects of plant cell wall enzymes on cellulose/xyloglucan composites. *The Plant Journal*, 38(1), 27-37.
27. Chaparro, J. M., Badri, D. V., Bakker, M. G., Sugiyama, A., Manter, D. K., & Vivanco, J. M. (2013). Root exudation of phytochemicals in Arabidopsis follows specific patterns that are developmentally programmed and correlate with soil microbial functions. *PloS one*, 8(2), e55731.
28. Chater, K. F. (2006). Streptomyces inside-out: a new perspective on the bacteria that provide us with antibiotics. *Philosophical Transactions of the Royal Society B: Biological Sciences*, 361(1469), 761-768.
29. Chater, K. F. (2016). Recent advances in understanding Streptomyces. *F1000Res* 5: 2795.
30. Conn, V.M.; Walker, A.R.; Franco, C.M. Endophytic actinobacteria induce defense pathways in Arabidopsis thaliana. *Mol. Plant Microbe Interact.***2008**, 21, 208–218
31. Cosgrove, D. J. (2005). Growth of the plant cell wall. *Nature reviews molecular cell biology*, 6(11), 850.
32. Crawford, K. M., & Zambryski, P. C. (2000). Subcellular localization determines the availability of non-targeted proteins to plasmodesmatal transport. *Current Biology*, 10(17), 1032-1040.
33. Curtis, R. H. C. (1996). Identification and in situ and in vitro characterization of secreted proteins produced by plant-parasitic nematodes. *Parasitology*, 113(6), 589-597.

34. Davis, E. L., Hussey, R. S., & Baum, T. J. (2004). Getting to the roots of parasitism by nematodes. *Trends in parasitology*, 20(3), 134-141.
35. De Jesus Sousa, J. A., & Olivares, F. L. (2016). Plant growth promotion by streptomycetes: ecophysiology, mechanisms and applications. *Chemical and Biological Technologies in Agriculture*, 3(1), 24.
36. De Smet, S., Cuypers, A., Vangronsveld, J., & Remans, T. (2015). Gene networks involved in hormonal control of root development in *Arabidopsis thaliana*: a framework for studying its disturbance by metal stress. *International journal of molecular sciences*, 16(8), 19195-19224.
37. Decraemer, W., & Geraert, E. (2006). Ectoparasitic nematodes. In *Plant nematology* (pp. 153-184). CABI.
38. Decraemer, W., & Hunt, D. J. (2006). Structure and Classification in Plant nematology. *Perry, RN, and Moens, M.(Eds.)*.
39. Deepak, S., Shailasree, S., Kini, R. K., Muck, A., Mithöfer, A., & Shetty, S. H. (2010). Hydroxyproline-rich glycoproteins and plant defence. *Journal of Phytopathology*, 158(9), 585-593.
40. Dias, M. P., Bastos, M. S., Xavier, V. B., Cassel, E., Astarita, L. V., & Santarém, E. R. (2017). Plant growth and resistance promoted by *Streptomyces* spp. in tomato. *Plant physiology and biochemistry*, 118, 479-493.
41. Dixon, A. F. G., & Kindlmann, P. (1990). Role of plant abundance in determining the abundance of herbivorous insects. *Oecologia*, 83(2), 281-283.
42. Dolan, L., & Davies, J. (2004). Cell expansion in roots. *Current opinion in plant biology*, 7(1), 33-39.
43. Dolan, L., Janmaat, K., Willemsen, V., Linstead, P., Poethig, S., Roberts, K., & Scheres, B. (1993). Cellular organisation of the *Arabidopsis thaliana* root. *Development*, 119(1), 71-84.
44. Dolan, L., Linstead, P., & Roberts, K. (1997). Developmental regulation of pectic polysaccharides in the root meristem of *Arabidopsis*. *Journal of experimental botany*, 48(3), 713-720.
45. Duncan, L. W., & Moens, M. (2006). Plant Nematology.
46. Elling, A. A. (2013). Major emerging problems with minor Meloidogyne species. *Phytopathology*, 103(11), 1092-1102.
47. Evans, K., & Nobre, M. G. (1998). Plant and nematode surfaces: their structure and importance in host-parasite interactions. *Nematologica*, 44(2), 103-124.
48. Eves-van den Akker, S., Lilley, C. J., Ault, J. R., Ashcroft, A. E., Jones, J. T., & Urwin, P. E. (2014). The feeding tube of cyst nematodes: characterisation of protein exclusion. *PloS one*, 9(1), e87289.
49. Fortnum, B. A., Kasperbauer, M. J., Hunt, P. G., & Bridges, W. C. (1991). Biomass partitioning in tomato plants infected with *Meloidogyne incognita*. *Journal of nematology*, 23(3), 291.
50. Fyans, J. K., Bown, L., & Bignell, D. R. (2016). Isolation and characterization of plant-pathogenic *Streptomyces* species associated with common scab-infected potato tubers in Newfoundland. *Phytopathology*, 106(2), 123-131.
51. Geshi, N., Jørgensen, B., & Ulvskov, P. (2004). Subcellular localization and topology of β (1 $\rightarrow$ 4) galactosyltransferase that elongates β (1 $\rightarrow$ 4) galactan side chains in rhamnogalacturonan I in potato. *Planta*, 218(5), 862-868.
52. Ghosh, P. P., Dutta, S., & Chattopadhyay, A. (2015). Integration of organic and inorganic amendments with native bioagents for bio-intensive

- management of vascular bacterial wilt on eggplant (*Solanum melongena*). *Ind Phytopathol*, 68(1), 32-38.
53. Ghosh, D. K., Dasgupta, D., & Guha, A. (2012). Models, regulations, and functions of microtubule severing by katanin. *ISRN molecular biology*, 2012.
 54. Giannoutsou, E., Apostolakis, P., & Galatis, B. (2016). Spatio-temporal diversification of the cell wall matrix materials in the developing stomatal complexes of *Zea mays*. *Planta*, 244(5), 1125-1143.
 55. Glushka, J. N., Terrell, M., York, W. S., O'Neill, M. A., Gucwa, A., Darvill, A. G. & Prestegard, J. H. (2003). Primary structure of the 2-O-methyl- α -L-fucose-containing side chain of the pectic polysaccharide, rhamnogalacturonan II. *Carbohydrate research*, 338(4), 341-352.
 56. Godfray, H. C. J., Beddington, J. R., Crute, I. R., Haddad, L., Lawrence, D., Muir, J. F. & Toulmin, C. (2010). Food security: the challenge of feeding 9 billion people. *Science*, 327(5967), 812-818.
 57. Golinowski, W., Grundler, F., & Sobczak, M. (1999). Ultrastructure of feeding plugs and feeding tubes formed by *Heterodera schachtii*. *Nematology*, 1(4), 363-374.
 58. Gowen, S. R. (1997). Chemical control of nematodes: efficiency and side-effects. *FAO Plant Production and Protection Paper (FAO)*.
 59. Grundler, F. M., Sobczak, M., & Golinowski, W. (1998). Formation of wall openings in root cells of *Arabidopsis thaliana* following infection by the plant-parasitic nematode *Heterodera schachtii*. *European Journal of Plant Pathology*, 104(6), 545-551.
 60. Guillemin, F., Guillon, F., Bonnin, E., Devaux, M. F., Chevalier, T., Knox, J. P. & Thibault, J. F. (2005). Distribution of pectic epitopes in cell walls of the sugar beet root. *Planta*, 222(2), 355-371.
 61. Gutierrez, R., Lindeboom, J. J., Paredez, A. R., Emons, A. M. C., & Ehrhardt, D. W. (2009). *Arabidopsis* cortical microtubules position cellulose synthase delivery to the plasma membrane and interact with cellulose synthase trafficking compartments. *Nature cell biology*, 11(7), 797.
 62. Hao, P., Liu, C., Wang, Y., Chen, R., Tang, M., Du, B. & He, G. (2008). Herbivore-induced callose deposition on the sieve plates of rice: an important mechanism for host resistance. *Plant physiology*, 146(4), 1810-1820.
 63. Harholt, J., Suttangkakul, A., & Scheller, H. V. (2010). Biosynthesis of pectin. *Plant physiology*, 153(2), 384-395.
 64. Herburger, K., & Holzinger, A. (2015). Localization and quantification of callose in the streptophyte green algae *Zygnema* and *Klebsormidium*: correlation with desiccation tolerance. *Plant and Cell Physiology*, 56(11), 2259-2270.
 65. Heredia, A., Jiménez, A., & Guillén, R. (1995). Composition of plant cell walls. *Zeitschrift für Lebensmittel-Untersuchung und Forschung*, 200(1), 24-31.
 66. Herman, E. M., & Lamb, C. J. (1992). Arabinogalactan-rich glycoproteins are localized on the cell surface and in intravacuolar multivesicular bodies. *Plant Physiology*, 98(1), 264-272.
 67. Hirst, S. I., & Stapley, L. A. (2000). Parasitology: the dawn of a new millennium. *Parasitology Today*, 16(1), 1-3.
 68. Hofmann, J., Youssef-Banora, M., de Almeida-Engler, J., & Grundler, F. M. (2010). The role of callose deposition along plasmodesmata in nematode feeding sites. *Molecular Plant-Microbe Interactions*, 23(5), 549-557.

69. Holbein, J., Grundler, F. M., & Siddique, S. (2016). Plant basal resistance to nematodes: an update. *Journal of experimental botany*, 67(7), 2049-2061.
70. Hopwood, D. A. (2007). *Streptomyces in nature and medicine: the antibiotic makers*. Oxford University Press.
71. Huang, L., Chen, X. Y., Rim, Y., Han, X., Cho, W. K., Kim, S. W., & Kim, J. Y. (2009). Arabidopsis glucan synthase-like 10 functions in male gametogenesis. *Journal of plant physiology*, 166(4), 344-352.
72. Hussey, R. S., & Barker, K. R. (1973). A comparison of methods.
73. Jackson, O., Taylor, O., Adams, D. G., & Knox, J. P. (2012). Arabinogalactan proteins occur in the free-living cyanobacterium genus *Nostoc* and in plant–*Nostoc* symbioses. *Molecular Plant-Microbe Interactions*, 25(10), 1338-1349.
74. Jamet, E., Canut, H., Boudart, G., & Pont-Lezica, R. F. (2006). Cell wall proteins: a new insight through proteomics. *Trends in plant science*, 11(1), 33-39.
75. Jones, M. G. K. (1981). Host cell responses to endoparasitic nematode attack: structure and function of giant cells and syncytia. *Annals of applied Biology*, 97(3), 353-372.
76. Jones, M. G., & Goto, D. B. (2011). Root-knot nematodes and giant cells. In *Genomics and molecular genetics of plant-nematode interactions* (pp. 83-100). Springer, Dordrecht.
77. Josè-Estanyol, M., & Puigdomènech, P. (2000). Plant cell wall glycoproteins and their genes. *Plant Physiology and Biochemistry*, 38(1-2), 97-108.
78. Karssen, G., Wesemael, W., & Moens, M. (2013). Root-knot nematodes. *Plant nematology*, (Ed. 2), 73-108.
79. Katsifas, E. A., Giannoutsou, E. P., & Karagouni, A. D. (1999). Diversity of streptomycetes among specific Greek terrestrial ecosystems. *Letters in applied microbiology*, 29(1), 48-51.
80. Kaur, T., & Manhas, R. K. (2014). Antifungal, insecticidal, and plant growth promoting potential of *Streptomyces hydrogenans* DH16. *Journal of basic microbiology*, 54(11), 1175-1185.
81. Keech, O., Pesquet, E., Gutierrez, L., Ahad, A., Bellini, C., Smith, S. M., & Gardeström, P. (2010). Leaf senescence is accompanied by an early disruption of the microtubule network in *Arabidopsis*. *Plant Physiology*, 154(4), 1710-1720.
82. Kieliszewski, M. J., O'Neill, M., Leykam, J., & Orlando, R. (1995). Tandem mass spectrometry and structural elucidation of glycopeptides from a hydroxyproline-rich plant cell wall glycoprotein indicate that contiguous hydroxyproline residues are the major sites of hydroxyproline O-arabinosylation. *Journal of Biological Chemistry*, 270(6), 2541-2549.
83. Kieliszewski, M. J. (2001). The latest hype on Hyp-O-glycosylation codes. *Phytochemistry*, 57(3), 319-323.
84. Kitazawa, K., Tryfona, T., Yoshimi, Y., Hayashi, Y., Kawauchi, S., Antonov, L. & Tsumuraya, Y. (2013). β -Galactosyl Yariv reagent binds to the β -1, 3-galactan of arabinogalactan proteins. *Plant Physiology*, 161(3), 1117-1126.
85. Knoch, E., Dilokpimol, A., & Geshi, N. (2014). Arabinogalactan proteins: focus on carbohydrate active enzymes. *Frontiers in plant science*, 5, 198.
86. Knox, J. P., & Benitez-Alfonso, Y. (2014). Roles and regulation of plant cell walls surrounding plasmodesmata. *Current opinion in plant biology*, 22, 93-100.

87. Koenning, S. R., Wrather, J. A., Kirkpatrick, T. L., Walker, N. R., Starr, J. L., & Mueller, J. D. (2004). Plant-parasitic nematodes attacking cotton in the United States: Old and emerging production challenges. *Plant disease*, 88(2), 100-113.
88. Komis, G., Luptovčiak, I., Ovečka, M., Samakovli, D., Šamajová, O., & Šamaj, J. (2017). Katanin effects on dynamics of cortical microtubules and mitotic arrays in *Arabidopsis thaliana* revealed by advanced live-cell imaging. *Frontiers in plant science*, 8, 866.
89. Komorisono, M., Ueguchi-Tanaka, M., Aichi, I., Hasegawa, Y., Ashikari, M., Kitano, H., Sazuka, T. (2005). Analysis of the rice mutant dwarf and gladius leaf 1. Aberrant katanin-mediated microtubule organization causes up-regulation of gibberellin biosynthetic genes independently of gibberellin signaling. *Plant physiology*, 138(4), 1982-1993.
90. Kondori, N., Edebo, L., & Mattsby-Baltzer, I. (2008). A novel monoclonal antibody recognizing β (1–3) glucans in intact cells of *Candida* and *Cryptococcus*. *Apmis*, 116(10), 867-876.
91. Korayem, A. M., El-Bassiouny, H. M. S., El-Monem, A. A. A., & Mohamed, M. M. M. (2012). Physiological and biochemical changes in different sugar beet genotypes infected with root-knot nematode. *Acta Physiologiae Plantarum*, 34(5), 1847-1861.
92. Krämer, U. (2015). The natural history of model organisms: Planting molecular functions in an ecological context with *Arabidopsis thaliana*. *Elife*, 4, e06100.
93. Kyndt, T., Vieira, P., Gheysen, G., & de Almeida-Engler, J. (2013). Nematode feeding sites: unique organs in plant roots. *Planta*, 238(5), 807-818.
94. Law, J. W. F., Ser, H. L., Khan, T. M., Chuah, L. H., Pusparajah, P., Chan, K. G. & Lee, L. H. (2017). The potential of *Streptomyces* as biocontrol agents against the rice blast fungus, *Magnaporthe oryzae* (*Pyricularia oryzae*). *Frontiers in microbiology*, 8, 3.
95. Lee, K. J., Marcus, S. E., & Knox, J. P. (2011). Cell wall biology: perspectives from cell wall imaging. *Molecular plant*, 4(2), 212-219.
96. Leelarasamee, N., Zhang, L., & Gleason, C. (2018). The root-knot nematode effector MiPFN3 disrupts plant actin filaments and promotes parasitism. *PLoS pathogens*, 14(3), e1006947.
97. Leroux, O., Leroux, F., Bagniewska-Zadworna, A., Knox, J. P., Claeys, M., Bals, S., & Viane, R. L. L. (2011). Ultrastructure and composition of cell wall appositions in the roots of *Asplenium* (Polypodiales). *Micron*, 42(8), 863-870.
98. Levesque-Tremblay, G., Pelloux, J., Braybrook, S. A., & Müller, K. (2015). Tuning of pectin methylesterification: consequences for cell wall biomechanics and development. *Planta*, 242(4), 791-811.
99. Lloyd, C., & Chan, J. (2008). The parallel lives of microtubules and cellulose microfibrils. *Current opinion in plant biology*, 11(6), 641-646.
100. Locey, K. J., & Lennon, J. T. (2016). Scaling laws predict global microbial diversity. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 113(21), 5970-5975.
101. Lopez, M., Bizot, H., Chambat, G., Marais, M. F., Zykwincka, A., Ralet, M. C. & Buléon, A. (2010). Enthalpic studies of xyloglucan cellulose interactions. *Biomacromolecules*, 11(6), 1417-1428.

102. Loque, D., Scheller, H. V., & Pauly, M. (2015). Engineering of plant cell walls for enhanced biofuel production. *Current opinion in plant biology*, 25, 151-161.
103. Luptovčiak, I., Komis, G., Takáč, T., Ovečka, M., & Šamaj, J. (2017). Katanin: a sword cutting microtubules for cellular, developmental, and physiological purposes. *Frontiers in plant science*, 8, 1982.
104. Majewska-Sawka, A., Münster, A., & Rodríguez-García, M. I. (2002). Guard cell wall: immunocytochemical detection of polysaccharide components. *Journal of Experimental Botany*, 53(371), 1067-1079.
105. McCartney, L., Ormerod, A. P., Gidley, M. J., & Knox, J. P. (2000). Temporal and spatial regulation of pectic (1→4)-β-d-galactan in cell walls of developing pea cotyledons: implications for mechanical properties. *The Plant Journal*, 22(2), 105-113.
106. McCartney, H. A., Foster, S. J., Fraaije, B. A., & Ward, E. (2003). Molecular diagnostics for fungal plant pathogens. *Pest Management Science: formerly Pesticide Science*, 59(2), 129-142.
107. McFarlane, H. E., Döring, A., & Persson, S. (2014). The cell biology of cellulose synthesis. *Annual review of plant biology*, 65, 69-94.
108. McNally, F. J., & Thomas, S. (1998). Katanin is responsible for the M-phase microtubule-severing activity in *Xenopus* eggs. *Molecular biology of the cell*, 9(7), 1847-1861.
109. McNally, K. P., & McNally, F. J. (2011). The spindle assembly function of *Caenorhabditis elegans* katanin does not require microtubule-severing activity. *Molecular biology of the cell*, 22(9), 1550-1560.
110. McNeil, M., Darvill, A. G., Fry, S. C., & Albersheim, P. (1984). Structure and function of the primary cell walls of plants. *Annual review of biochemistry*, 53(1), 625-663.
111. Moens, T., Braeckman, U., Derycke, S., Fonseca, G., Gallucci, F., Gingold, R. & Van Colen, C. (2013). Ecology of free-living marine nematodes. *Handbook of Zoology. De Gruyter, Berlin*.
112. Moens, M., & Wesemael, W. (2008). Quality damage on carrots (*Daucus carota* L.) caused by the root-knot nematode *Meloidogyne chitwoodi*. *Nematology*, 10(2), 261-270.
113. Møller, S. G., Urwin, P. E., Atkinson, H. J., & McPherson, M. J. (1998). Nematode-induced expression of *atao1*, a gene encoding an extracellular diamine oxidase associated with developing vascular tissue. *Physiological and molecular plant pathology*, 53(2), 73-79.
114. Mutwil, M., Debolt, S., & Persson, S. (2008). Cellulose synthesis: a complex complex. *Current opinion in plant biology*, 11(3), 252-257.
115. Nakamura, M. (2015). Microtubule nucleating and severing enzymes for modifying microtubule array organization and cell morphogenesis in response to environmental cues. *New Phytologist*, 205(3), 1022-1027.
116. Newitt, J. T., Prudence, S. M., Hutchings, M. I., & Worsley, S. F. (2019). Biocontrol of cereal crop diseases using streptomycetes. *Pathogens*, 8(2), 78.
117. Nicholas, W. L., & Stewart, A. I. M. O. R. N. (1984). *Criconemella avicenniae* n. sp. (Nematoda: Criconematidae) and *Enchodelus coomansi* n. sp. (Nematoda: Nordiidae) associated with the roots of the mangrove *Avicennia marina* (Forsk.) Vierh. *Nematologica*, 30(4), 429-436.

118. Ntalli, N. G., Menkissoglu-Spiroudi, U., & Giannakou, I. (2010). Nematicidal activity of powder and extracts of *Melia azedarach* fruits against *Meloidogyne incognita*. *Annals of Applied Biology*, 156(2), 309-317.
119. Oerke, E. C. (2006). Crop losses to pests. *The Journal of Agricultural Science*, 144(1), 31-43.
120. O'Neill, M. A., Ishii, T., Albersheim, P., & Darvill, A. G. (2004). Rhamnogalacturonan II: structure and function of a borate cross-linked cell wall pectic polysaccharide. *Annu. Rev. Plant Biol.*, 55, 109-139.
121. Pabst, M., Fischl, R. M., Brecker, L., Morelle, W., Fauland, A., Köfeler, H. & Léonard, R. (2013). Rhamnogalacturonan II structure shows variation in the side chains monosaccharide composition and methylation status within and across different plant species. *The Plant Journal*, 76(1), 61-72.
122. Pangesti, N., Pineda, A., Pieterse, C. M., Dicke, M., & Van Loon, J. J. (2013). Two-way plant mediated interactions between root-associated microbes and insects: from ecology to mechanisms. *Frontiers in plant science*, 4, 414.
123. Panteris, E., Komis, G., Adamakis, I. D. S., Šamaj, J., & Bosabalidis, A. M. (2010). MAP65 in tubulin/colchicine paracrystals of *Vigna sinensis* root cells: possible role in the assembly and stabilization of atypical tubulin polymers. *Cytoskeleton*, 67(3), 152-160.
124. Panteris, E., Adamakis, I. D. S., Voulgari, G., & Papadopoulou, G. (2011). A role for katanin in plant cell division: microtubule organization in dividing root cells of *fra2* and *lue1* *Arabidopsis thaliana* mutants. *Cytoskeleton*, 68(7), 401-413.
125. Panteris, E., & Adamakis, I. D. S. (2012). Aberrant microtubule organization in dividing root cells of *p60*-katanin mutants. *Plant signaling & behavior*, 7(1), 16-18.
126. Panteris, E., Adamakis, I. D. S., Daras, G., Hatzopoulos, P., & Rigas, S. (2013). Differential responsiveness of cortical microtubule orientation to suppression of cell expansion among the developmental zones of *Arabidopsis thaliana* root apex. *PLoS One*, 8(12), e82442.
127. Panteris, E., Diannelidis, B. E., & Adamakis, I. D. S. (2018). Cortical microtubule orientation in *Arabidopsis thaliana* root meristematic zone depends on cell division and requires severing by katanin. *Journal of Biological Research-Thessaloniki*, 25(1), 12.
128. Patova, O. A., Golovchenko, V. V., & Ovodov, Y. S. (2014). Pectic polysaccharides: Structure and properties. *Russian Chemical Bulletin*, 63(9), 1901-1924.
129. Pattathil, S., Avci, U., Baldwin, D., Swennes, A. G., McGill, J. A., Popper, Z. & Dong, R. (2010). A comprehensive toolkit of plant cell wall glycan-directed monoclonal antibodies. *Plant physiology*, 153(2), 514-525.
130. Pauly, M., & Keegstra, K. (2016). Biosynthesis of the plant cell wall matrix polysaccharide xyloglucan. *Annual review of plant biology*, 67, 235-259.
131. Pedersen, H. L., Fangel, J. U., McCleary, B., Ruzanski, C., Rydahl, M. G., Ralet, M. C., & Field, R. (2012). Versatile high resolution oligosaccharide microarrays for plant glycobiology and cell wall research. *Journal of Biological Chemistry*, 287(47), 39429-39438.
132. Pérez, S., Rodríguez-Carvajal, M. A., & Doco, T. (2003). A complex plant cell wall polysaccharide: rhamnogalacturonan II. A structure in quest of a function. *Biochimie*, 85(1-2), 109-121.

133. Perry, R. N., & Moens, M. (Eds.). (2013). *Plant nematology*. Cabi.
134. Perry, R., & Wesemael, W. (2008). Host plant effects on hatching of root-knot nematodes. *Russian Journal of Nematology*, 16(1), 1-5.
135. Philippot, L., Raaijmakers, J. M., Lemanceau, P., & Van Der Putten, W. H. (2013). Going back to the roots: the microbial ecology of the rhizosphere. *Nature Reviews Microbiology*, 11(11), 789.
136. Ploeg, A. T., & Maris, P. C. (1999). Effect of temperature on suppression of *Meloidogyne incognita* by *Tagetes* cultivars. *Journal of nematology*, 31(4S), 709.
137. Radwan, M. A., Farrag, S. A. A., Abu-Elamayem, M. M., & Ahmed, N. S. (2012). Biological control of the root-knot nematode, *Meloidogyne incognita* on tomato using bioproducts of microbial origin. *Applied Soil Ecology*, 56, 58-62.
138. Rashad, F. M., Fathy, H. M., El-Zayat, A. S., & Elghonaimy, A. M. (2015). Isolation and characterization of multifunctional *Streptomyces* species with antimicrobial, nematocidal and phytohormone activities from marine environments in Egypt. *Microbiological research*, 175, 34-47.
139. Rasmann, S., De Vos, M., Casteel, C. L., Tian, D., Halitschke, R., Sun, J. Y. & Jander, G. (2012). Herbivory in the previous generation primes plants for enhanced insect resistance. *Plant physiology*, 158(2), 854-863.
140. Reynolds, A. M., Dutta, T. K., Curtis, R. H., Powers, S. J., Gaur, H. S., & Kerry, B. R. (2010). Chemotaxis can take plant-parasitic nematodes to the source of a chemo-attractant via the shortest possible routes. *Journal of the Royal Society Interface*, 8(57), 568-577.
141. Ridley, B. L., O'Neill, M. A., & Mohnen, D. (2001). Pectins: structure, biosynthesis, and oligogalacturonide-related signaling. *Phytochemistry*, 57(6), 929-967.
142. Rodiuc, N., Vieira, P., Banora, M. Y., & de Almeida Engler, J. (2014). On the track of transfer cell formation by specialized plant-parasitic nematodes. *Frontiers in plant science*, 5, 160.
143. Ruanpanun, P., Laatsch, H., Tangchitsomkid, N., & Lumyong, S. (2011). Nematicidal activity of fervenulin isolated from a nematicidal actinomycete, *Streptomyces* sp. CMU-MH021, on *Meloidogyne incognita*. *World Journal of Microbiology and Biotechnology*, 27(6), 1373-1380.
144. Scheller, H. V., & Ulvskov, P. (2010). Hemicelluloses. *Annual review of plant biology*, 61.
145. Seipke, R.F.; Kaltenpoth, M.; Hutchings, M.I. *Streptomyces* as symbionts: An emerging and widespread theme? *FEMS Microbiol. Rev.* 2012, 36, 862–876.
146. Showalter, A. M. (1993). Structure and function of plant cell wall proteins. *The Plant Cell*, 5(1), 9.
147. Showalter, A. M., Keppler, B., Lichtenberg, J., Gu, D., & Welch, L. R. (2010). A bioinformatics approach to the identification, classification, and analysis of hydroxyproline-rich glycoproteins. *Plant physiology*, 153(2), 485-513.
148. Showalter, A. M., & Basu, D. (2016). Extensin and arabinogalactan-protein biosynthesis: glycosyltransferases, research challenges, and biosensors. *Frontiers in plant science*, 7, 814.

149. Sinetova, M., & Ivanov, R. (2015). Aniline blue and Calcofluor white staining of callose and cellulose in the streptophyte green algae *Zygnema* and *Klebsormidium*. *Plant & Cell Physiology*.
150. Smallwood, M., Yates, E. A., Willats, W. G., Martin, H., & Knox, J. P. (1996). Immunochemical comparison of membrane-associated and secreted arabinogalactan-proteins in rice and carrot. *Planta*, 198(3), 452-459.
151. Snyder, D. W., Opperman, C. H., & Bird, D. M. (2006). A method for generating *Meloidogyne incognita* males. *Journal of nematology*, 38(2), 192.
152. Somerville, C. (2006). Cellulose synthesis in higher plants. *Annu. Rev. Cell Dev. Biol.*, 22, 53-78.
153. Somssich, M., Je, B. I., Simon, R., & Jackson, D. (2016). CLAVATA-WUSCHEL signaling in the shoot meristem. *Development*, 143(18), 3238-3248.
154. Sotiriou, P., Giannoutsou, E., Panteris, E., Apostolakis, P., & Galatis, B. (2016). Cell wall matrix polysaccharide distribution and cortical microtubule organization: two factors controlling mesophyll cell morphogenesis in land plants. *Annals of botany*, 117(3), 401-419.
155. Sousa, C. D. S., Soares, A. C. F., & Garrido, M. D. S. (2008). Characterization of streptomycetes with potential to promote plant growth and biocontrol. *Scientia Agricola*, 65(1), 50-55.
156. Spiridon, I., & Popa, V. I. (2005). Hemicelluloses: structure and properties. *Polysaccharides: structural diversity and functional versatility*, 2.
157. Srivastava, V., McKee, L. S., & Bulone, V. (2001). Plant Cell Walls. *eLS*, 1-17.
158. Stanly, T. A., Fritzsche, M., Banerji, S., García, E., de la Serna, J. B., Jackson, D. G., & Eggeling, C. (2016). Critical importance of appropriate fixation conditions for faithful imaging of receptor microclusters. *Biology open*, 5(9), 1343-1350.
159. Stass, A., & Horst, W. J. (2009). Callose in abiotic stress. In *Chemistry, biochemistry, and biology of 1-3 beta glucans and related polysaccharides* (pp. 499-524). Academic Press.
160. Szymanski, D. B., & Cosgrove, D. J. (2009). Dynamic coordination of cytoskeletal and cell wall systems during plant cell morphogenesis. *Current Biology*, 19(17), R800-R811.
161. Takáč, T., Šamajová, O., Pechan, T., Luptovčiak, I., & Šamaj, J. (2017). Feedback microtubule control and microtubule-actin cross-talk in Arabidopsis revealed by integrative proteomic and cell biology analysis of KATANIN 1 mutants. *Molecular & Cellular Proteomics*, 16(9), 1591-1609.
162. Tamreihao, K., Ningthoujam, D. S., Nimaichand, S., Singh, E. S., Reena, P., Singh, S. H., & Nongthomba, U. (2016). Biocontrol and plant growth promoting activities of a *Streptomyces corchorusii* strain UCR3-16 and preparation of powder formulation for application as biofertilizer agents for rice plant. *Microbiological research*, 192, 260-270.
163. Taylor, N. G. (2008). Cellulose biosynthesis and deposition in higher plants. *New phytologist*, 178(2), 239-252.
164. Thiele, K., Wanner, G., Kindzierski, V., Jürgens, G., Mayer, U., Pachel, F., & Assaad, F. F. (2009). The timely deposition of callose is essential for cytokinesis in Arabidopsis. *The Plant Journal*, 58(1), 13-26.
165. Thomason, I. J. (1987). Challenges facing nematology: environmental risks with nematicides and the need for new approaches.

166. Triantaphyllou, A. C., & Hussey, R. S. (1973). Modern approaches in the study of relationships in the genus *Meloidogyne*. *EPPO Bulletin*, 2(9), 61-66.
167. Trudgill, D. L., & Blok, V. C. (2001). Apomictic, polyphagous root-knot nematodes: exceptionally successful and damaging biotrophic root pathogens. *Annual review of phytopathology*, 39(1), 53-77.
168. Van Bezooijen, J. (2006). *Methods and techniques for nematology* (p. 20). Wageningen, The Netherlands: Wageningen University.
169. Varner, J. E., & Lin, L. S. (1989). Plant cell wall architecture. *Cell*, 56(2), 231-239.
170. Verherbruggen, Y., Marcus, S. E., Haeger, A., Ordaz-Ortiz, J. J., & Knox, J. P. (2009). An extended set of monoclonal antibodies to pectic homogalacturonan. *Carbohydrate Research*, 344(14), 1858-1862.
171. Verma, V. C., Singh, S. K., & Prakash, S. (2011). Bio-control and plant growth promotion potential of siderophore producing endophytic *Streptomyces* from *Azadirachta indica* A. Juss. *Journal of basic microbiology*, 51(5), 550-556.
172. Viaene, T., Langendries, S., Beirinckx, S., Maes, M., & Goormachtig, S. (2016). *Streptomyces* as a plant's best friend?. *FEMS microbiology ecology*, 92(8).
173. Vidal, S., Doco, T., Williams, P., Pellerin, P., York, W. S., O'Neill, M. A. & Albersheim, P. (2000). Structural characterization of the pectic polysaccharide rhamnogalacturonan II: evidence for the backbone location of the aceric acid-containing oligoglycosyl side chain. *Carbohydrate research*, 326(4), 277-294.
174. von Mende, N. (1997). Invasion and migration behaviour of sedentary nematodes. In *Cellular and molecular aspects of plant-nematode interactions* (pp. 51-64). Springer, Dordrecht.
175. Vurukonda, S. S. K. P., Giovanardi, D., & Stefani, E. (2018). Plant growth promoting and biocontrol activity of *Streptomyces* spp. as endophytes. *International journal of molecular sciences*, 19(4), 952.
176. Wei, H., Xu, Q., Taylor II, L. E., Baker, J. O., Tucker, M. P., & Ding, S. Y. (2009). Natural paradigms of plant cell wall degradation. *Current Opinion in Biotechnology*, 20(3), 330-338.
177. Wiggers, R. J., Thornton, N. T., & Starr, J. L. (2002). The effects of colchicine on number of giant cell nuclei and nematode development in *Pisum sativum* infected by *Meloidogyne incognita*. *Nematology*, 4(1), 107-109.
178. Williamson, V. M., & Gleason, C. A. (2003). Plant–nematode interactions. *Current opinion in plant biology*, 6(4), 327-333.
179. Willats, W. G., Marcus, S. E., & Knox, J. P. (1998). Generation of a monoclonal antibody specific to (1→ 5)- α -L-arabinan. *Carbohydrate Research*, 308(1-2), 149-152.
180. Willats, W. G., Limberg, G., Buchholt, H. C., van Alebeek, G. J., Benen, J., Christensen, T. M., ... & Knox, J. P. (2000). Analysis of pectic epitopes recognised by hybridoma and phage display monoclonal antibodies using defined oligosaccharides, polysaccharides, and enzymatic degradation. *Carbohydrate Research*, 327(3), 309-320.
181. Wolf, S., Mouille, G., & Pelloux, J. (2009). Homogalacturonan methyl-esterification and plant development. *Molecular plant*, 2(5), 851-860.

182. Wolf, S., & Greiner, S. (2012). Growth control by cell wall pectins. *Protoplasma*, 249(2), 169-175.
183. Wyss, U., & Grundler, F. M. W. (1992). Feeding behavior of sedentary plant parasitic nematodes. *Netherlands Journal of Plant Pathology*, 98(2), 165-173.
184. Zhang, Y., Qiao, M., Xu, J., Cao, Y., Zhang, K. Q., & Yu, Z. F. (2013). Genetic diversity and recombination in natural populations of the nematode-trapping fungus *A. rthrobotrys oligospora* from China. *Ecology and evolution*, 3(2), 312-325.
185. Zhang, T., Zheng, Y., & Cosgrove, D. J. (2016). Spatial organization of cellulose microfibrils and matrix polysaccharides in primary plant cell walls as imaged by multichannel atomic force microscopy. *The Plant Journal*, 85(2), 179-192.
186. Zhao, F., Chen, W. Q., Sechet, J., Martin, M., Bovio, S., Lionnet, C. & Traas, J. (2019). Xyloglucans and microtubules synergistically maintain meristem geometry and phyllotaxis. *Plant physiology*, pp-00608.
187. Zehr, E., Szyk, A., Piszczek, G., Szczesna, E., Zuo, X., & Roll-Mecak, A. (2017). Katanin spiral and ring structures shed light on power stroke for microtubule severing. *Nature structural & molecular biology*, 24(9), 717.
188. Zeng, Q., Huang, H., Zhu, J., Fang, Z., Sun, Q., & Bao, S. (2013). A new nematicidal compound produced by *Streptomyces albogriseolus* HA10002. *Antonie Van Leeuwenhoek*, 103(5), 1107-1111.
189. Zhong, H. H., Painter, J. E., Salomé, P. A., Straume, M., & McClung, C. R. (1998). Imbibition, but not release from stratification, sets the circadian clock in *Arabidopsis* seedlings. *The Plant Cell*, 10(12), 2005-2017.