



Τεχνολογικό  
Πανεπιστήμιο  
Κύπρου

Σχολή Γεωτεχνικών  
Επιστημών και  
Διαχείρισης  
Περιβάλλοντος

**Μεταπτυχιακή διατριβή**

**«Αξιολόγηση της εφαρμογής του ACC στην απόκριση φυτών  
*Arabidopsis* έναντι του μύκητα *Verticillium dahliae*»**

**Κρυσταλλία Κομνηνάκη**

**Λεμεσός, Μάιος 2023**



ΤΕΧΝΟΛΟΓΙΚΟ ΠΑΝΕΠΙΣΤΗΜΙΟ ΚΥΠΡΟΥ  
ΣΧΟΛΗ ΓΕΩΤΕΧΝΙΚΩΝ ΕΠΙΣΤΗΜΩΝ ΚΑΙ ΔΙΑΧΕΙΡΙΣΗΣ  
ΠΕΡΙΒΑΛΛΟΝΤΟΣ  
ΤΜΗΜΑ ΓΕΩΠΟΝΙΚΩΝ ΕΠΙΣΤΗΜΩΝ, ΒΙΟΤΕΧΝΟΛΟΓΙΑΣ ΚΑΙ  
ΕΠΙΣΤΗΜΗΣ ΤΡΟΦΙΜΩΝ

Μεταπτυχιακή διατριβή  
«Αξιολόγηση της εφαρμογής του ACC στην απόκριση φυτών  
*Arabidopsis* έναντι του μύκητα *Verticillium dahliae*»  
της  
Κρυσταλλίας Κομνηνάκη

Λεμεσός, Μάιος 2023

## Έντυπο έγκρισης

Μεταπτυχιακή διατριβή

### «Αξιολόγηση της εφαρμογής του ACC στην απόκριση φυτών *Arabidopsis* έναντι του μύκητα *Verticillium dahliae*»

Παρουσιάστηκε από

Κρυσταλλία Κομνηνάκη

Επιβλέπων καθηγητής: Ιάκωβος Παντελίδης, Επίκουρος Καθηγητής

Υπογραφή \_\_\_\_\_

Μέλος επιτροπής: Ιωάννης Στριγγλής, Επίκουρος Καθηγητής

Υπογραφή \_\_\_\_\_

Μέλος επιτροπής: Λουκάς Κανέτης, Επίκουρος Καθηγητής

Υπογραφή \_\_\_\_\_

Τεχνολογικό Πανεπιστήμιο Κύπρου

Λεμεσός, Μάιος 2023

## **Πνευματικά δικαιώματα**

Copyright © Κρυσταλλία Κομνηνάκη, 2023

Με επιφύλαξη παντός δικαιώματος. All rights reserved.

Η έγκριση της μεταπτυχιακής διατριβής από το Τμήμα Γεωπονικών Επιστημών, Βιοτεχνολογίας και Επιστήμης Τροφίμων του Τεχνολογικού Πανεπιστημίου Κύπρου δεν υποδηλώνει απαραίτητως και αποδοχή των απόψεων του συγγραφέα εκ μέρους του Τμήματος.

*Με την ολοκλήρωση της μεταπτυχιακής μου διατριβής αισθάνομαι την ανάγκη να αναφερθώ και να ευχαριστήσω όλους όσους συνέβαλαν στην εκπόνηση της.*

*Το ΤΕΠΑΚ για τους νέους ορίζοντες γνώσης που ανοίγει μέσω του Προγράμματος Μεταπτυχιακού επιπέδου, προσεγγίζοντας διεπιστημονικά το αντικείμενο της Γεωπονικής Βιοτεχνολογίας, παρέχοντας υψηλής ποιότητας σύγχρονη κατάρτιση τόσο σε θεωρητικό όσο και σε εργαστηριακό/ τεχνικό επίπεδο.*

*Ευχαριστώ θερμά τον επιβλέπων Καθηγητή μου Κο Ιάκωβο Παντελίδη, για την εμπιστοσύνη που μου έδειξε εξ' αρχής, αναθέτοντας μου το συγκεκριμένο θέμα, την επιστημονική του καθοδήγηση, τις υποδείξεις και τις συμβουλές, την πολύτιμη βοήθεια του από αρχής μέχρι τέλους και ιδιαίτερα τους τελευταίους μήνες της πυρετώδους προσπάθειας μου.*

*Επίσης ευχαριστώ θερμά τη Δρ. Μαρία Δήμητρα Τσολακίδου, για την πολύτιμη στήριξη που μου παρείχε, την επιστημονική της καθοδήγηση και τις εύστοχες επισημάνσεις κατά την διεξαγωγή του πειράματος αλλά και καθ' όλη τη διάρκεια της φοίτησής μου.*

*Θέλω ιδιαίτερα να ευχαριστήσω τον Κοσμήτορα και Καθηγητή Κο Ανδρέα Κατσιώτη για τις γνώσεις που απέκτησα στη Στατιστική, στο μάθημά του «Πειραματικός Σχεδιασμός και Βιοστατιστική» για την ορθή, επιστημονική ανάλυση και αξιολόγηση των δεδομένων των πειραμάτων της μελέτης.*

*Θερμές ευχαριστίες οφείλω στον Καθηγητή Κο Βασίλη Φωτόπουλο για την γνώση που μου προσέφερε στις αρχές της Βιοτεχνολογίας και την κατανόηση της με τρόπο εύληπτο ιδιαίτερα επεξηγηματικό.*

*Επιπλέον, θα ήθελα να εκφράσω τις ευχαριστίες μου στον Καθηγητή Κο Μενέλαο Σταυρινίδη όπου μέσα από το μάθημα του «Μοριακή και Εφαρμοσμένη Οικολογία» έμαθα και γνώρισα την αξία της σωστής διαχείρισης και διατήρησης ενός ισορροπημένου και υγιούς περιβάλλοντος.*

*Τέλος, θέλω να εκφράσω την ευγνωμοσύνη μου στην οικογένειά μου, για την αμέριστη στήριξη και συμπαράστασή τους καθ' όλη τη διάρκεια των σπουδών μου.*

## ΠΕΡΙΛΗΨΗ

Ο μύκητας *Verticillium dahliae* είναι ένα εδαφογενές παθογόνο που προκαλεί αδρομύκωση σε μεγάλο αριθμό φυτικών ειδών. Το εύρος των ξενιστών του ξεπερνάει τα 200 είδη παγκοσμίως και σε αυτό συγκαταλέγονται καλλιέργειες υψηλού οικονομικού ενδιαφέροντος όπως τομάτα, πιπεριά, αγκινάρα, μελιτζάνα, ελιά, φράουλα, ηλίανθος, βαμβάκι και ξυλώδη πολυετή φυτά. Τα φυτά που προσβάλλονται από το παθογόνο παρουσιάζουν χαρακτηριστικά συμπτώματα που περιλαμβάνουν μαράνσεις, χλωρώσεις στα φύλλα, μεταχρωματισμό του ξυλώματος, πρόωμη γήρανση, μειωμένη απόδοση παραγωγής και νέκρωση. Το παθογόνο σχηματίζει εξειδικευμένες κατασκευές, τα μικροσκληρώτια, που του επιτρέπουν να επιβιώνει στο έδαφος για μεγάλα χρονικά διαστήματα απουσία ευπαθούς ξενιστή. Οι στρατηγικές για την αντιμετώπιση του βασίζονται κυρίως σε προληπτικά μέτρα και δεν υπάρχουν αποτελεσματικά φυτοπροστατευτικά σκευάσματα για την αντιμετώπιση του μετά την προσβολή και την εγκατάσταση του στους αγγειακούς ιστούς των φυτών. Ως εκ τούτου η εξεύρεση εναλλακτικών μεθόδων για την αντιμετώπιση του έχει ιδιαίτερη σημασία. Μέσα σε αυτό το πλαίσιο, η μελέτη των αμυντικών μηχανισμών των φυτών και η κατανόηση τους, μπορεί να προσφέρει πολύτιμες πληροφορίες για την αξιοποίησή τους για την ανάπτυξη μεθόδων αντιμετώπισης των φυτοπαθογόνων που να είναι πιο φιλικές προς το περιβάλλον και τον άνθρωπο. Το σαλικυλικό οξύ (SA), το ιασμονικό οξύ (JA) και το αιθυλένιο (ET) είναι τρεις σημαντικές φυτοορμόνες που διαδραματίζουν κεντρικό ρόλο στην άμυνα των φυτών για την αντιμετώπιση παθογόνων μικροοργανισμών. Πρόσφατες εργασίες έδειξαν ότι το ACC (1-aminocyclopropane-1-carboxylic acid), που αποτελεί την πρόδρομη ένωση του αιθυλενίου στα φυτά, αποτελεί ένα μόριο που εμπλέκεται στους αμυντικούς μηχανισμούς των φυτών ενάντια στο μύκητα *V. dahliae*. Στην παρούσα διατριβή μελετήθηκε ο ρόλος του ACC στην άμυνα φυτών *Arabidopsis thaliana* αγρίου τύπου και μεταλλαγμένων γονοτύπων εναντίον του *V. dahliae*, με σκοπό τη διερεύνηση της εμπλοκής του στους αμυντικούς μηχανισμούς που ελέγχονται μέσω των σηματοδοτικών μονοπατιών των ορμονών του αιθυλενίου (ET), του σαλικυλικού οξέος (SA), του ιασμονικού οξέος (JA) και του αμπισισικού οξέος (ABA). Τα αποτελέσματα της εργασίας έδειξαν ότι το ACC, στις συγκεντρώσεις που χρησιμοποιήθηκε, δεν επηρέασε την ανάπτυξη του μύκητα *in vitro* ωστόσο παρατηρήθηκε μείωση της πρωτογενούς ρίζας και αύξηση της πυκνότητας των

τριχιδίων στην υψηλότερη συγκέντρωση. Ακολούθως, η προμεταχείριση φυτών *Arabidopsis* αγρίου τύπου με ACC (συγκέντρωση 500  $\mu$ M) και η μετέπειτα επιμόλυνσή τους με το μύκητα, οδήγησε σε σημαντική μείωση των συμπτωμάτων της ασθένειας. Στη συνέχεια πραγματοποιήθηκαν πειράματα παθογένειας σε φυτά *Arabidopsis* αγρίου τύπου (Col-0) και σε μεταλλαγμένες σειρές φυτών για τα ορμονικά μονοπάτια αιθυλενίου (*etr1-1*), σαλικυλικού οξέος (*npr1-1*), ιασμονικού οξέος (*jar1-1*) και αμπισισικού οξέος (*abi5*). Η εφαρμογή του ACC (συγκέντρωση 500  $\mu$ M) οδήγησε σε μειωμένη σοβαρότητα της ασθένειας στα φυτά Col-0, *npr1-1* και *abi1-1* σε σχέση με τα φυτά μάρτυρες αλλά όχι στα φυτά *etr1-1* και *jar1-1*, υποδεικνύοντας την εμπλοκή του ACC μέσω των ορμονικών μονοπατιών του αιθυλενίου και του ιασμονικού οξέος. Τα πειράματα ποσοτικοποίησης του παθογόνου στους αγγειακούς ιστούς των φυτών έδειξαν ότι το παθογόνο ήταν σημαντικά λιγότερο σε όλους τους γονοτύπους που είχαν προμεταχειριστεί με ACC (*jar1-1*, *npr1-1*, *abi5*) εκτός από το *etr1-1* σε σχέση με τα φυτά του μάρτυρα. Σε μια προσπάθεια να διερευνηθεί ο μηχανισμός που αναπτύσσεται στα φυτά και περιορίζει το παθογόνο, πραγματοποιήθηκαν πειράματα γονιδιακής έκφρασης σε φυτά Col-0 σε γονίδια που αποτελούν δείκτες επαγωγής αμυντικών μηχανισμών μέσω των μονοπατιών αντίληψης του αιθυλενίου, του σαλικυλικού, του ιασμονικού και του αμπισισικού οξέος. Από τα πειράματα αυτά διαπιστώθηκε ότι η εφαρμογή του ACC οδήγησε στην υπερέκφραση γονιδίων που υποδεικνύουν ότι η αμυντική αντίδραση των φυτών κατά του παθογόνου ελέγχεται μέσω περισσότερων του ενός σηματοδοτικών μονοπατιών των ορμονών. Μελλοντικές μελέτες πρέπει να επικεντρωθούν στη περαιτέρω διερεύνηση των μηχανισμών που ενεργοποιούνται από το ACC που θα συμβάλουν στην καλύτερη κατανόηση του ρόλου του στην άμυνα των φυτών.

**Λέξεις κλειδιά:** *Arabidopsis thaliana*, *Verticillium dahliae*, εδαφογενής μύκητας, ACC (1-aminocyclopropane-1-carboxylic acid), αιθυλένιο, σαλικυλικό οξύ, ιασμονικό οξύ, αμπισισικό οξύ



## ABSTRACT

*Verticillium dahliae* is a soil-borne pathogen that causes vascular wilt in a wide range of plant species. Its host range exceeds 200 species worldwide, including economically important crops such as tomato, pepper, artichoke, eggplant, olive, strawberry, sunflower, cotton, and woody perennial plants. Plants affected by the pathogen exhibit characteristic symptoms, including wilting, leaf chlorosis, discoloration of the wood, premature aging, reduced yield, and necrosis. The pathogen forms specialized structures called microsclerotia, which allow it to survive in the soil for extended periods without a susceptible host. The management of *Verticillium dahliae* primarily relies on preventive strategies due to the lack of effective pesticides for controlling the pathogen once the plants are infected and the pathogen is established in the plant's vascular tissues. As a result, there is a pressing need to identify alternative methods for effectively managing this pathogen. Within this framework, the study of plant defense mechanisms and their understanding can provide valuable insights for harnessing them in the development of environmentally and human-friendly methods to combat plant pathogens. Salicylic acid (SA), jasmonic acid (JA), and ethylene (ET) are three important plant hormones that play a central role in plant defense against pathogenic microorganisms. Recent research has shown that ACC (1-aminocyclopropane-1-carboxylic acid), which is a precursor of ethylene in plants, is involved in the defense mechanisms of plants against *V. dahliae*. In this dissertation, the role of ACC in the defense of *Arabidopsis thaliana* wild-type and mutant genotypes against *V. dahliae* was investigated to explore its involvement in the defense mechanisms controlled by the signaling pathways of ethylene (ET), salicylic acid (SA), jasmonic acid (JA), and abscisic acid (ABA) hormones. The results of this study showed that ACC, at the concentrations used, did not affect the *in vitro* growth of the fungus. However, a reduction in primary root growth and an increase in trichome density were observed at higher concentrations. Subsequently, pre-treatment of *Arabidopsis* wild-type plants with ACC (500  $\mu$ M) followed by inoculation with the fungus resulted in a significant reduction in disease symptoms. Following the initial experiment, pathogenicity experiments were conducted on *Arabidopsis thaliana* wild-type plants (Col-0) and mutant lines deficient in the hormonal pathways of ethylene (*etr1-1*), salicylic acid (*npr1-1*), jasmonic acid (*jar1-1*), and abscisic acid (*abi5*). The application of ACC (at a concentration

of 500  $\mu\text{M}$ ) resulted in a reduced disease severity in Col-0, *npr1-1*, and *abi1-1* plants compared to control plants, while no such effect was observed in *etr1-1* and *jar1-1* plants, indicating the involvement of ACC through the ethylene and jasmonic acid hormonal pathways. Quantification experiments of the pathogen within the vascular tissues of plants demonstrated a significant reduction in pathogen levels in all ACC-pretreated genotypes (*jar1-1*, *npr1-1*, *abi5*) except *etr1-1*, in comparison to control plants. To gain insights into the underlying mechanism that confers plant resistance and limits pathogen proliferation, gene expression profiling was performed in Col-0 plants using marker genes associated with the activation of defense mechanisms mediated by ethylene, salicylic acid, jasmonic acid, and abscisic acid pathways. The results of these experiments revealed that ACC application induced the upregulation of specific genes, indicating that the plant defense response against the pathogen is regulated through multiple hormone signaling pathways. Further investigations should be undertaken to elucidate the precise mechanisms triggered by ACC, which would contribute to a comprehensive understanding of its role in plant defense.

**Keywords:** *Arabidopsis thaliana*, *Verticillium dahliae*, soil-born fungus, ACC (1-aminocyclopropane-1-carboxylic acid), ethylene, salicylic acid, jasmonic acid, abscisic acid.