

Doctoral Dissertation

**More than a fungicide:
Unravelling the beneficial effects of
kresoxim-methyl in plants**

Chrystalla Antoniou

Limassol, May 2018

CYPRUS UNIVERSITY OF TECHNOLOGY

Faculty of Geotechnical Sciences and Environmental Management
Department of Agricultural Sciences, Biotechnology and Food Science

Doctoral Dissertation

**More than a fungicide:
Unravelling the beneficial effects of
kresoxim-methyl in plants**

Chrystalla Antoniou

Limassol, May 2018

Approval Form

Doctoral Dissertation

**More than a fungicide:
Unravelling the beneficial effects of KM in plants**

Chrystalla Antoniou

Supervisor: Dr. Vassilis Fotopoulos, Associate Professor

Member of the committee: Mark Tester, Professor

Member of the committee: Panagiotis Moschou, Associate Professor

Cyprus University of Technology

Limassol, May 2018

Copyrights

Copyright © 2018 of dissertation submission Chrystalla Antoniou

All rights reserved.

The approval of the dissertation by the Department of Agricultural Sciences, Biotechnology and Food Science does not imply necessarily the approval by the Department of the views of the writer.

ACKNOWLEDGEMENT

My PhD thesis' writing has reached to the end of a nice journey in science, full of challenges and uncertainties. In this section, I would like to express my gratitude to people that supported me towards the completion of this thesis.

First and foremost, I would like to express my appreciation and gratitude to my promoter for giving me the opportunity to accomplish my PhD studies in his group. I first met you in 2009, as a professor of the courses Botany and Plant Physiology. An intelligent and strict professor, who loves science and you should be passionate with science as well to understand his lectures. It was not taken long to realize that I would like to perform my bachelor thesis under your supervision. I am feeling so grateful that joined your group at its initial steps and still be a part of it, the last nine years. Thank you for giving me the freedom to do whatever comes in my mind and the opportunity to perform several other projects in parallel with my PhD. I couldn't have wished for a better PhD promoter. Σε ευχαριστώ για όλα όσα μου πρόσφερες και εύχομαι να είναι εφικτή η συνέχιση της συνεργασίας μας!!!

A big part of my thesis was performed at Plant System Biology department, in Ghent, Belgium. For this reason, I would like to express my gratitude to my co-promoter Prof. Dirk Inze for giving me the opportunity to join his group four times during my PhD in order to perform experiments in the field of plant growth. Thank you for your supervision and the financial support. I really appreciate the time you invested on the strobilurins project. I will never forget your enthusiasm in every meeting and your ability to motivate your team even when we struggled with several difficulties. It was a great experience.

Of course I would like to thank the entire "Systems Biology of Yield" group. The group has changed over the years and it was my pleasure to meet and work with new members during my visits. You are all so welcome and kind people and I would like to thank you all for making my stay in Belgium so pleasant! Special thanks go out to the Strobymates, Judith and Stijn. Thank you for the nice collaboration and the fruitful discussions. Judith, I love your enthusiasm and openness. Stijn, I admire your multitasking and your positivity.

ABSTRACT

The human global population is rising rapidly every year, increasing the demand for sustainable food production in modern climate change-stricken agriculture. A greater understanding of how plants regulate their growth and unraveling the factors underpinning plant growth are therefore fundamental for crop yield improvement. Subsequently, finding strategies to optimize crop production as well as plant survival in the presence of abiotic stress factors is a task of crucial importance. The existence of chemical compounds with promising features resulting in plant growth promotion and enhanced tolerance to abiotic stress is attracting increasing attention. Strobilurins comprise an important class of fungicides applied in a range of plants that exert positive effects in plant fitness and physiology, frequently defined as “greening effect”. The central aim of this thesis was to unravel the underlying mechanisms responsible for the kresoxim-methyl (KM; a representative member of strobilurins)-induced growth promotion and enhanced stress tolerance. KM emerged to be a promising priming inducer by ameliorating the deleterious effects of salinity and drought in plants via the regulation of multiple cellular, biochemical and molecular processes. These promising results, and in particular, the effects observed in treated plants grown under optimal conditions were the driving force to subsequently examine the potential effects of KM as a plant growth promoting compound in greater depth. Application of KM by root watering, in its commercial formulation Stroby[®]-WG (BASF), resulted in a profound positive effect in *Arabidopsis* rosette growth by enhancing cell proliferation. Stroby-treated plants revealed differential expression of nitrate and sugar transporter as well as iron-related genes including the subgroup Ib basic helix-loop-helix (*bHLH*) transcription factors. *bHLH039* in particular, was found to play a pivotal role in mediating Stroby-induced growth promotion. Pharmacological studies showed that nitric oxide (NO) was produced not only in the leaves but possibly in roots as well. The findings of the present thesis firmly support the notion that Stroby-mediated growth promotion is mainly a result of NO signaling function, which elicits downstream developmental processes. However, further research is needed to fully unravel the effect of Stroby in the root, focusing on the source and function of NO produced following Stroby treatment. Collectively, the findings of this thesis provide new insight in the mode of action of KM as a promising priming agent and growth promoting compound.

ΠΕΡΙΛΗΨΗ

Ο συνεχώς αυξανόμενος πληθυσμός της γης σε συνδυασμό με τις κλιματικές αλλαγές που παρατηρούνται τα τελευταία χρόνια, οδηγούν στην ανάγκη εξεύρεσης μεθόδων και διαδικασιών μεγιστοποίησης της παραγωγικότητας των φυτών. Οι στρομπιλουρίνες είναι μια κατηγορία μυκητοκτόνων τα οποία εκτός της κύριας δράσης τους στην αντιμετώπιση των φυτοπαθογόνων μυκήτων, παρουσιάζουν θετικές επιδράσεις στη φυσιολογία και ανάπτυξη των φυτών. Σε αυτές περιλαμβάνονται η βελτιστοποίηση της ανάπτυξης και παραγωγικότητας των φυτών, καθώς και η επαγωγή μηχανισμών άμυνας των φυτών σε συνθήκες αβιοτικών καταπονήσεων. Η παρούσα διδακτορική διατριβή έχει ως σκοπό τη μελέτη των μηχανισμών μέσω των οποίων η στρομπιλουρίνη kresoxim-methyl, επάγει την αύξηση των φυτών και την ανθεκτικότητά τους σε συνθήκες αβιοτικών καταπονήσεων. Η εφαρμογή του KM ως παράγοντας χημικής έναυσης μείωσε σημαντικά τα επίπεδα της κυτταρικής ζημίας αλλά και γενικότερα τις αρνητικές επιπτώσεις της ξηρασίας και της αλατότητας στα φυτά. Τα ενδιαφέροντα αποτελέσματα που προέκυψαν τόσο από την εφαρμογή του KM σε φυτά που είχαν εκτεθεί σε συνθήκες καταπόνησης, όσο και σε φυτά που μεγάλωσαν σε βέλτιστες συνθήκες, αποτέλεσαν το έναυσμα για περαιτέρω μελέτη του KM ως παράγοντα αύξησης των φυτών. Η εφαρμογή του εμπορικού σκευάσματος Strobby το οποίο περιέχει 50% β/ο KM και 50% β/ο επιφανειοδραστικές ενώσεις, αύξησε σημαντικά το μέγεθος της ροζέτας του φυτού *Arabidopsis thaliana*, προωθώντας τις διαδικασίες της κυτταρικής διαίρεσης. Η μελέτη του μεταγραφώματος έδειξε ότι η μεταχείριση με Strobby ρυθμίζει την έκφραση διαφόρων γονιδίων που κωδικοποιούν μεταφορείς νιτρικών, σακχάρων και σιδήρου, καθώς και την επαγωγή των μεταγραφικών παραγόντων *bHLH*, που ανήκουν στην υποκατηγορία Ib και εμπλέκονται στην απορρόφηση σιδήρου σε συνθήκες τροφοπενίας σιδηρού. Επιπρόσθετα, η εφαρμογή του Strobby αύξησε τα επίπεδα του μονοξειδίου του Ν (NO) και την ενεργότητα της νιτρικής αναγωγής (NR), υποδηλώνοντας την εμπλοκή του NO ως μόριο σηματοδότησης στην ενεργοποίηση διαδικασιών που οδηγούν σε αύξηση και ανάπτυξη του φυτού. Η εμπλοκή του NO στην επαγόμενη από το Strobby αύξηση της ροζέτας επιβεβαιώθηκε με την εφαρμογή τόσο του δότη του NO (SNP) όσο και του παρεμποδιστή (c-PTO). Εν κατακλείδι, η παρούσα διδακτορική διατριβή παρέχει σημαντικές πληροφορίες για την κατανόηση των μηχανισμών μέσω των οποίων το KM επάγει τόσο την αύξηση του φυτού σε βέλτιστες συνθήκες ανάπτυξης όσο και την άμυνα του φυτού σε συνθήκες αβιοτικών καταπονήσεων.