

Abstract

The maintenance of high agricultural productivity as response to an increasing global demand for food and the exploitation of natural resources have become major challenges in both developed and developing countries. In addition, it is a persistent issue worldwide that a large number of plant pathogens may cause important plant diseases that are responsible for major crop losses. Subsequently, the need to understand the molecular mechanisms underlying fungal pathogenicity is of crucial importance. It has been suggested that some microorganisms, including plant growth promoting rhizobacteria (PGPR), manipulate the level of ethylene in plants by cleaving 1-aminocyclopropane-1-carboxylic acid (ACC), an ethylene precursor, into α -ketobutyrate and ammonia using ACC deaminase. In this thesis, it was investigated whether ACC deaminase of *Verticillium dahliae*, a soil-borne fungal pathogen of many important crops, is involved in pathogenicity of this pathogen. Overexpression of the *V. dahliae* gene encoding this enzyme, labeled as *ACCd*, significantly increased virulence in both tomato and eggplant, while deletion of *ACCd* reduced virulence. Both types of mutant produced more ethylene than the wild type (70V-WT) strain although they significantly differed in ACC content, with overexpressing strains exhibiting lower levels and deletion strains showing higher levels of ACC as compared to the wild type strain. Overexpressing strains were proven to significantly lower the ACC levels in the roots of infected plants while the amount of ACC in the roots of plants infected with deletion mutants increased compared to the wild type strain. ACC holds a key position in many plant physiological processes with its main role as direct precursor of ethylene. Recent studies have shown that ACC may act as a potential signaling molecule independent from ethylene. To test the hypothesis that ACC acts as a signal for controlling defense, roots of WT and *Never Ripe (Nr)* tomato plants and Col-0 and *etr1-1 Arabidopsis* plants were treated with ACC prior to *V. dahliae* inoculation. Plants pre-treated with ACC displayed less severe symptoms than untreated controls. ACC application on the roots of Col-0 and *etr1-1* plants *in vitro* was also found to trigger root hair formation and induce hormone-dependent defense responses. Collectively, our results suggest a novel role of ACC as a regulator of both plant defense and pathogen virulence.

Περίληψη

Η διατήρηση της υψηλής γεωργικής παραγωγικότητας ως απάντηση στην αυξανόμενη παγκόσμια ζήτηση για τροφή και την εκμετάλλευση των φυσικών πόρων, αποτελούν σημαντικές προκλήσεις τόσο στις ανεπτυγμένες όσο και στις αναπτυσσόμενες χώρες. Επιπλέον, είναι ζήτημα παγκόσμιας σημασίας ότι μεγάλος αριθμός παθογόνων μπορεί να προκαλέσει σοβαρές ασθένειες των φυτών, που ευθύνονται για σημαντικές απώλειες των καλλιεργειών και των παραγόμενων προϊόντων. Συνεπώς η κατανόηση των μοριακών μηχανισμών που διέπουν την παθογένεια των φυτοπαθογόνων μικροοργανισμών είναι πολύ σημαντική, ώστε να αναπτυχθούν νέες στρατηγικές αντιμετώπισης τους. Ορισμένοι μικροοργανισμοί έχουν την ικανότητα να μειώνουν τα επίπεδα αιθυλενίου των φυτών, διασπώντας το ACC σε αμμωνία και κετοβουτυρικό οξύ μέσω του ενζύμου ACC απαμινάση. Το ένζυμο ACC απαμινάση αποτελεί έναν από τους κυριότερους μηχανισμούς που διαθέτουν αρκετά ριζοβακτήρια που προάγουν την ανάπτυξη των φυτών καθώς με τη μείωση του παραγόμενου αιθυλενίου τα φυτά σχηματίζουν πλουσιότερο ριζικό σύστημα και μπορούν να ανταπεξέλθουν σε έναν μεγάλο αριθμό αβιοτικών και βιοτικών καταπονήσεων. Η ACC απαμινάση έχει μελετηθεί ευρέως στους ωφέλιμους μικροοργανισμούς, ωστόσο ο ρόλος της στα φυτοπαθγόνα παραμένει άγνωστος. Στην παρούσα διδακτορική διατριβή μελετήθηκε ο ρόλος του γονιδίου ACC απαμινάση (*ACCd*) στην παθογένεια και παραγωγή αιθυλενίου του μύκητα *Verticillium dahliae*, ενός σημαντικού εδαφογενούς παθογόνου που προκαλεί μεγάλες απώλειες παραγωγής σε πολλές καλλιέργειες παγκοσμίως. Η υπερέκφραση του γονιδίου *ACCd* στο μύκητα *V. dahliae* οδήγησε σε αύξηση της σοβαρότητας της ασθένειας σε φυτά τομάτας και μελιτζάνας ενώ η απενεργοποίηση του γονιδίου οδήγησε σε σημαντική μείωση της ασθένειας. Και οι δύο τύποι μετασχηματισμένων στελεχών παρήγαγαν περισσότερο αιθυλένιο από το άγριο στέλεχος (70V-WT) παρόλο που διέφεραν σημαντικά ως προς τα επίπεδα ACC, με τα στελέχη υπερέκφρασης να παρουσιάζουν χαμηλότερα επίπεδα ACC και τα απενεργοποιημένα στελέχη υψηλότερα επίπεδα ACC σε σύγκριση με το άγριο στέλεχος. Επιπλέον τα στελέχη υπερέκφρασης του γονιδίου *ACCd* μείωσαν σημαντικά τα επίπεδα ACC στις ρίζες των μολυσμένων φυτών ενώ η ποσότητα του ACC στις ρίζες των φυτών που μολύνθηκαν με τα στελέχη στα οποία είχε διαγραφεί το γονίδιο, ήταν περισσότερη σε σχέση με τα φυτά που είχαν μολυνθεί με το άγριο στέλεχος. Το ACC είναι ένα μόριο «κλειδί» στη φυσιολογία των φυτών αποτελώντας την πρόδρομη ουσία βιοσύνθεσης του αιθυλενίου. Πρόσφατες μελέτες έχουν δείξει ότι το ACC μπορεί να δρα

ως πιθανό μόριο-σηματοδότης ανεξάρτητα από το αιθυλένιο, ρυθμίζοντας την ανάπτυξη των φυτών. Για να διερευνηθεί η υπόθεση ότι το ACC δρα ως μόριο σηματοδότης ενεργοποιώντας τους αμυντικούς μηχανισμούς των φυτών, ρίζες φυτών τομάτας αγρίου τύπου (WT) και *Never Ripe* (*Nr*) και φυτών *Arabidopsis* Col-0 και *etr1-1* μεταχειρίστηκαν με ACC πριν από μόλυνση με το μύκητα *V. dahliae* και η προμεταχείριση τους με ACC, οδήγησε σε σημαντική μείωση των συμπτωμάτων της ασθένειας. Η εφαρμογή ACC στις ρίζες των φυτών Col-0 και *etr1-1*, *in vitro*, βρέθηκε επίσης ότι προκαλεί αύξηση του μήκους των ριζικών τριχιδίων και επαγωγή μηχανισμών άμυνας μέσω υπερέκφρασης γονιδίων δεικτών. Συλλογικά, τα αποτελέσματα αυτής της διατριβής, υποδεικνύουν ένα δυνητικό ρόλο του ACC, ανεξάρτητο του αιθυλενίου, ως ρυθμιστή τόσο της παθογένειας του μύκητα *V. dahliae* όσο και της επαγωγής μηχανισμών άμυνας των φυτών.