



Τεχνολογικό
Πανεπιστήμιο
Κύπρου

Σχολή Γεωτεχνικών
Επιστημών και
Διαχείριση
Περιβάλλοντος

Μεταπτυχιακή διατριβή

**Αξιολόγηση μεταλλαγμένων φυτών *Arabidopsis* στην
παραγωγή/έκκριση κουμαρινών ως προς την ανθεκτικότητα
τους κατά του μύκητα *Fusarium oxysporum***

Άντρια Τσαλακού

Λεμεσός, Μάιος 2024

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

Μεταπτυχιακή διατριβή

Αξιολόγηση μεταλλαγμένων φυτών *Arabidopsis* στην
παραγωγή/έκκριση κουμαρινών ως προς την ανθεκτικότητα τους
κατά του μύκητα *Fusarium oxysporum*

της

Άντριας Τσαλακού

Επιβλέπων Καθηγητής
Δρ. Ιάκωβος Παντελίδης

Λεμεσός, Μάιος 2024

Έντυπο έγκρισης

Μεταπτυχιακή διατριβή

Αξιολόγηση μεταλλαγμένων φυτών *Arabidopsis* στην παραγωγή/έκκριση κουμαρινών ως προς την ανθεκτικότητα τους κατά του μύκητα *Fusarium oxysporum*

Παρουσιάστηκε από

Άντρια Τσαλακού

Επιβλέπων καθηγητής: Δρ Ιάκωβος Παντελίδης, Επίκουρος Καθηγητής

Μέλος επιτροπής: Δρ Νικόλαος Νικολουδάκης, Επίκουρος Καθηγητής

Μέλος επιτροπής: Δρ Ιωάννης Στριγγλής, Επίκουρος Καθηγητής

Τεχνολογικό Πανεπιστήμιο Κύπρου

Λεμεσός, Μάιος 2024

Πνευματικά δικαιώματα

Copyright © Άντρια Τσαλακού, 2024

Με επιφύλαξη παντός δικαιώματος. All rights reserved.

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

Η παρούσα μεταπτυχιακή διατριβή εκπονήθηκε στα εργαστήρια Φυτικής Παραγωγής του τμήματος Γεωπονικών Επιστημών, Βιοτεχνολογίας και Επιστήμης Τροφίμων του Τεχνολογικού Πανεπιστημίου Κύπρου. Ολοκληρώνοντας τη συγγραφή της μεταπτυχιακής μου διατριβής, επιθυμώ να εκφράσω τις ευχαριστίες μου προς όλους εκείνους που συνέβαλλαν με κάθε τρόπο στην πραγματοποίησή της.

Αρχικά, θα ήθελα να ευχαριστήσω τον επιβλέπων καθηγητή μου Δρ. Ιάκωβο Παντελίδη για την βοήθεια και την στήριξη από την αρχή μέχρι και την ολοκλήρωση της μεταπτυχιακής μου εργασίας, αλλά και για την εμπιστοσύνη που μου έδειξε για την ανάθεση ενός τόσο ενδιαφέροντος και αξιόλογου θέματος.

Θέλω να ευχαριστήσω θερμά την Δρ. Μαρία Δήμητρα Τσολακίδου για τις χρήσιμες υποδείξεις και συμβουλές της κατά τη διάρκεια του πειραματικού μέρους.

Επιπλέον, θα ήθελα να ευχαριστήσω τους συμφοιτητές μου και τα υπόλοιπα παιδιά στο εργαστήριο, που με την συνεργασία τους και τον πολύτιμο χρόνο που διέθεσαν, βοήθησαν στην ολοκλήρωση της παρούσας έρευνας.

Ιδιαίτερες ευχαριστίες στην καλή μου φίλη και συμφοιτήτρια Ηλιάνα, για την συνεχή συμπαράσταση και την όμορφη επικοινωνία που είχαμε όλο αυτό το διάστημα.

Τέλος, θα ήθελα να ευχαριστήσω την οικογένεια μου και ιδιαίτερα τον σύντροφο μου Ρένο, για τη στήριξη και την αμέριστη συμπαράσταση τους σε όλο το διάστημα της φοίτησής μου. Τους ευχαριστώ γιατί πίστεψαν στις δυνάμεις μου και με εμπύχωναν σε κάθε μου προσπάθεια.

ΠΕΡΙΛΗΨΗ

Η περιβαλλοντικά ορθή και βιώσιμη γεωργική παραγωγή αποτελεί μια από τις σημαντικότερες προκλήσεις του 21^{ου} αιώνα, με τη σύγχρονη γεωργία να εξαρτάται σε μεγάλο βαθμό από χημικά φυτοπροστατευτικά σκευάσματα που επιβαρύνουν το περιβάλλον και την υγεία. Ο μύκητας *Fusarium oxysporum* είναι ένας σημαντικός εδαφογενής φυτοπαθογόνος μύκητας, που προκαλεί τεράστιες απώλειες παγκοσμίως και η αντιμετώπιση του είναι ιδιαίτερα δύσκολη λόγω της ικανότητας του να επιβιώνει για πολλά έτη στο έδαφος απουσία ευπαθούς ξενιστή. Συνεπώς, η ανάπτυξη νέων στρατηγικών διαχείρισης του παθογόνου αποτελεί επιτακτική ανάγκη. Τα φυτά έχουν αναπτύξει διάφορες στρατηγικές για να αντιμετωπίζουν τις συνέπειες της έκθεσης τους σε πλήθος αβιοτικών και βιοτικών καταπονήσεων. Αυτοί οι μηχανισμοί περιλαμβάνουν την παραγωγή διαφόρων δευτερογενών μεταβολιτών που βοηθά τα φυτά να προσαρμόζονται στο μεταβαλλόμενο περιβάλλον τους και να επιβιώνουν σε μη ιδανικές συνθήκες. Οι κουμαρίνες είναι δευτερογενείς μεταβολίτες που διαδραματίζουν πολύπλευρο ρόλο στα φυτά. Εκκρίνονται από τις ρίζες των φυτών σε εδάφη με ανεπάρκεια σιδήρου και υποβοηθούν στην πρόσληψη και κινητοποίηση σιδήρου και αποτελούν μέρος του μηχανισμού άμυνας των φυτών κατά παθογόνων μικροοργανισμών. Αρκετές μελέτες σε διαγονιδιακά φυτά *Arabidopsis thaliana* δείχνουν τη σημασία των κουμαρινών στην ανθεκτικότητα έναντι διαφόρων φυτοπαθογόνων μικροοργανισμών, τονίζοντας την ανάγκη κατανόησης της λειτουργίας τους και των αλληλεπιδράσεών τους με το περιβάλλον των φυτών για την ανάπτυξη βιώσιμων γεωργικών πρακτικών. Σκοπός της παρούσας διατριβής ήταν η αξιολόγηση της ανθεκτικότητας των μεταλλαγμένων γονοτύπων *fb'h1*, *myb72* και *bglu42* των φυτών *A. thaliana* έναντι του μύκητα *F. oxysporum*. Επιπλέον, αξιολογήθηκε η αντιμικροβιακή δράση των εκκρίσεων των ριζών αυτών των γονοτύπων έναντι του *F. oxysporum* και διερευνήθηκε η συσχέτιση των συμπτωμάτων με την ποσότητα του παθογόνου εντός των φυτικών ιστών. Τέλος, μελετήθηκε η έκφραση γονιδίων δεικτών που εμπλέκονται στην άμυνα των φυτών.

Λέξεις κλειδιά: *Fusarium oxysporum*, *Arabidopsis thaliana*, κουμαρίνες, αμυντικοί μηχανισμοί

ABSTRACT

The environmentally friendly and sustainable agriculture production is one of the most significant challenges of the 21st century, with modern agriculture heavily relying on chemical crop protection products that burden the environment and human health. The fungus *Fusarium oxysporum* is a major soil-borne phytopathogen, causing enormous losses worldwide. Its particularly difficult to control the soil-born fungus due to its ability to survive in the soil for many years in the absence of a susceptible host. Therefore, the development of new pathogen management strategies is imperative. Plants have developed various strategies to cope with the consequences of exposure to numerous abiotic and biotic stresses. These mechanisms include the production of various secondary metabolites that help plants adapt to changing environments and survive under non-ideal conditions. Coumarins are secondary metabolites that facilitate various roles in the plants. They are secreted by plant roots in iron-deficient soils to assist in iron uptake and mobilization and are part of the plant's defense mechanism against pathogenic microorganisms. Several studies on transgenic *Arabidopsis thaliana* plants have highlighted the importance of coumarins in resistance to various phytopathogenic microorganisms, emphasizing the need to understand their function and interactions with the plant environment for the development of sustainable agricultural practices. The aim of this thesis was to evaluate the resistance of the mutant genotypes *f6'h1*, *myb72*, and *bglu42* of *A. thaliana* against the soil-borne pathogen *Fusarium oxysporum*. Additionally, the antimicrobial activity of root exudates from these genotypes against *Fusarium oxysporum* was assessed, and the correlation between symptoms and the pathogen load within plant tissues was investigated. Finally, the expression of marker genes involved in plant defense was studied.

Keywords: *Fusarium oxysporum*, *Arabidopsis thaliana*, coumarins, defense mechanisms

ΠΙΝΑΚΑΣ ΠΕΡΙΕΧΟΜΕΝΩΝ

ΠΕΡΙΛΗΨΗ.....	vii
ΚΑΤΑΛΟΓΟΣ ΔΙΑΓΡΑΜΜΑΤΩΝ	xii
ΚΑΤΑΛΟΓΟΣ ΠΙΝΑΚΩΝ	xiii
ΣΥΝΤΟΜΟΓΡΑΦΙΕΣ.....	xiv
1 Εισαγωγή.....	1
1.1 Ο μύκητας <i>Fusarium oxysporum</i>	1
1.1.1 Μορφολογικά χαρακτηριστικά και βιολογικός κύκλος του <i>F. oxysporum</i>	2
1.1.2 Μηχανισμοί δράσης του <i>F. oxysporum</i> κατά την μόλυνση φυτών	4
1.1.3 Συμπτώματα του μύκητα <i>F.oxysporum</i>	5
1.1.4 Επιδημιολογία του <i>F.oxysporum</i>	7
1.1.5 Καταπολέμηση φουζαρίωσης.....	7
1.2 Αμυντικοί μηχανισμοί των φυτών έναντι σε παθογόνα	11
1.2.1 Θεμελιώδης προϋπάρχουσα άμυνα	11
1.2.2 Επαγόμενη άμυνα.....	12
1.2.3 Ιστολογικοί μηχανισμοί αντοχής.....	16
Στους ιστολογικούς μηχανισμούς αντοχής περιλαμβάνονται:	16
1.3 Κουμαρίνες	17
1.3.1 Βιοσύνθεση κουμαρινών.....	18
1.3.2 Κουμαρίνες και σίδηρος.....	19
1.3.3 Ο ρόλος των κουμαρινών ως μηχανισμοί άμυνας των φυτών, έναντι παθογόνων	20
1.3.4 Αντιμικροβιακές ιδιότητες των κουμαρινών έναντι φυτοπαθογόνων.....	21
1.3.5 Η αλληλεπίδραση των κουμαρινών με εδαφογενή παθογόνα.....	22

1.3.6	Οι κουμαρίνες και η σύνθεση μικροβιώματος στην ρίζα των φυτών	23
1.4	Σκοπός διατριβής	24
2	Μεθοδολογία Έρευνας	25
2.1	Φυτικό Υλικό και συνθήκες ανάπτυξης	25
2.2	Στέλεχος φυτοπαθογόνου μύκητα και προετοιμασία μολύσματος.....	25
2.3	Δοκιμές παθογένειας.....	26
2.4	Ποσοτικοποίηση του μύκητα <i>F.oxysporum</i> από το φυτικό υλικό.....	27
2.4.1	Απομόνωση DNA φυτικού ιστού <i>A.thaliana</i>	27
2.4.2	Απομόνωση DNA του μύκητα <i>F.oxysporum</i>	28
2.4.3	Αλυσιδωτή αντίδρασης της πολυμεράσης (PCR-Polymerase Chain Reaction).....	28
2.4.4	Ποσοτική PCR σε πραγματικό χρόνο (Real-Time qPCR) για ποσοτικοποίηση του μύκητα <i>F.oxysporum</i>	30
2.5	Πειράματα ανάλυσης γονιδιακής έκφρασης.....	32
2.5.1	<i>In vitro</i> δοκιμασίες ανάπτυξης και μόλυνσης με το παθογόνο <i>F.oxysporum</i> σε φυτά <i>A. thaliana</i>	32
2.5.2	Απομόνωση RNA φυτικού ιστού <i>Arabidopsis thaliana</i>	33
2.5.3	Ηλεκτροφόρηση τμημάτων RNA σε πηκτή αγαρόζης.....	34
2.5.4	Αντίδραση αντίστροφης μεταγραφής.....	34
2.5.5	Εφαρμογή ποσοτικής PCR πραγματικού χρόνου (Real-Time qPCR)	35
2.6	Μελέτη αντιμικροβιακής δράσης των ριζικών εκκρίσεων στο φυτό <i>A.thaliana</i>	36
2.7	Στατιστική ανάλυση.....	37
3	Αποτελέσματα	38
3.1	Επίδραση του <i>F. oxysporum</i> f. sp. <i>raphani</i> ως προς τα φυσιολογικά χαρακτηριστικά των σειρών <i>A.thaliana</i>	38
3.1.1	Νωπό Βάρος	38

3.1.2	Φυλλική επιφάνεια	39
3.2	Πειράματα παθογένειας του <i>F. oxysporum</i> f. sp. <i>raphani</i> με τις μεταλλαγμένες σειρές <i>f6h1</i> , <i>myb72</i> και <i>bglu42</i>	40
	42
3.3	Ποσοτικοποίηση του μύκητα <i>Fusarium oxysporum</i> f.sp. <i>raphani</i> σε φυτά <i>Arabidopsis thaliana</i> με ποσοτική PCR σε πραγματικό χρόνο (Real time qPCR)	43
3.4	Μελέτη αντιμικροβιακής δράσης των ριζικών εκκρίσεων στο φυτό <i>A.thaliana</i>	45
3.5	Έκφραση γονιδίων που σχετίζονται με την άμυνα των φυτών.....	46
4	Συμπεράσματα.....	49
5	Βιβλιογραφία.....	56