



Τεχνολογικό
Πανεπιστήμιο
Κύπρου

Σχολή Γεωτεχνικών

Επιστημών και

Διαχείρισης

Περιβάλλοντος

Μεταπτυχιακή διατριβή

**Αξιολόγηση ανθεκτικότητας μεταλλαγμένων φυτών
Arabidopsis στην παραγωγή/έκκριση κουμαρινών έναντι του
μύκητα *Verticillium dahliae***

Ηλιάνα Χαραλάμπους

Λεμεσός, Μαΐος 2024

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

Μεταπτυχιακή διατριβή

Αξιολόγηση ανθεκτικότητας μεταλλαγμένων φυτών *Arabidopsis*
στην παραγωγή/έκκριση κουμαρινών έναντι του μύκητα
Verticillium dahliae

της

Ηλιάνας Χαραλάμπους

Επιβλέπων Καθηγητής
Δρ. Ιάκωβος Παντελίδης

Λεμεσός, Μάιος 2024

Έντυπο έγκρισης

Μεταπτυχιακή διατριβή

Αξιολόγηση ανθεκτικότητας μεταλλαγμένων φυτών *Arabidopsis*
στην παραγωγή/έκκριση κουμαρινών έναντι του μύκητα
Verticillium dahliae

Παρουσιάστηκε από

Ηλιάνα Χαραλάμπους

Επιβλέπων καθηγητής: Ιάκωβος Παντελίδης, Επίκουρος Καθηγητής

Υπογραφή _____

Μέλος επιτροπής: Όνομα και ιδιότητα

Υπογραφή _____

Μέλος επιτροπής: Όνομα και ιδιότητα

Υπογραφή _____

Τεχνολογικό Πανεπιστήμιο Κύπρου

Λεμεσός, Μάιος 2024

Πνευματικά δικαιώματα

Copyright © Ηλιάνα Χαραλάμπους, 2024

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/της συγγραφέα εκ μέρους του Τμήματος.

Με την ολοκλήρωση της μεταπτυχιακής μου διατριβής αισθάνομαι την ανάγκη να ευχαριστήσω όλους όσους συνέβαλαν με κάθε τρόπο στην εκπόνηση της.

Αρχικά, θα ήθελα να απονείμω εγκάρδιες ευχαριστίες στον επιβλέποντα καθηγητή μου, Δρ. Ιάκωβο Παντελίδη για την πολύτιμη υποστήριξη του καθ' όλη την διάρκεια της εκπόνησης της διπλωματικής αυτής εργασίας, τις υποδείξεις, τις συμβουλές και την επιστημονική καθοδήγηση που μου προσέφερε όπου χωρίς αυτήν η πραγματοποίηση αυτής της εργασίας θα ήταν αδύνατη.

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

Θερμά ευχαριστώ επίσης την μεταπτυχιακή συμφοιτήτρια μου Άντρια Τσαλακού, που με την άπογη συνεργασία και την πολύτιμη βοήθεια που μου προσέφερε βοήθησε στην ολοκλήρωση της παρούσας έρευνας.

Τέλος, θέλω να εκφράσω την ευγνωμοσύνη μου στην οικογένεια μου και στον σύντροφο μου, για την συμπαράσταση και το κουράγιο που μου έδωσαν καθ' όλη τη διάρκεια της ακαδημαϊκής μου πορείας.

ΠΕΡΙΛΗΨΗ

Ο μύκητας *Verticillium dahliae* είναι ένα εδαφογενές παθογόνο που προσβάλλει ένα ευρύ φάσμα ξενιστών προκαλώντας αδρομύκωση. Στους ξενιστές του περιλαμβάνονται καλλιέργειες σημαντικού οικονομικού ενδιαφέροντος όπως είναι η ντομάτα, το μαρούλι, οι φράουλες, το βαμβάκι, το πιπέρι, η μελιτζάνα και η ελιά. Τα φυτά που προσβάλλονται από το συγκεκριμένο μύκητα παρουσιάζουν μια σειρά από συμπτώματα που μπορεί να περιλαμβάνουν χλωρώσεις και μαράνσεις στα φύλλα, καστανό μεταχρωματισμό των αγγείων του ξύλου, νανισμό και νέκρωση που έχουν ως αποτέλεσμα τη μείωση της απόδοσης της παραγωγής. Η αντιμετώπιση του παθογόνου είναι ιδιαίτερα δύσκολη αφού μπορεί να επιβιώνει για δεκαετίες στο έδαφος απουσία ευπαθούς ξενιστή και τα διαθέσιμα μέτρα για την αντιμετώπιση του δεν είναι αποτελεσματικά ιδιαίτερα μετά τη μόλυνση των φυτών. Η διαχείριση του παθογόνου στηρίζεται κυρίως σε προληπτικά μέτρα, όπως είναι η απολύμανση του εδάφους και η χρήση ανθεκτικών ποικιλιών. Επομένως, η εξεύρεση εναλλακτικών μεθόδων για την αντιμετώπιση του αποτελεί επιτακτική ανάγκη. Τα φυτά έχουν εξελίξει διάφορους μηχανισμούς για να ανταπεξέρχονται σε ποικίλες αβιοτικές και βιοτικές καταπονήσεις. Αυτοί οι μηχανισμοί περιλαμβάνουν την παραγωγή διαφόρων δευτερογενών μεταβολιτών που τους επιτρέπουν να προσαρμόζονται στις μεταβαλλόμενες περιβαλλοντικές συνθήκες και να επιβιώνουν σε αντίξοες καταστάσεις. Οι κουμαρίνες είναι δευτερογενείς μεταβολίτες με ποικίλους ρόλους στα φυτά. Εκκρίνονται από τις ρίζες σε εδάφη με χαμηλή περιεκτικότητα σε σίδηρο, βοηθώντας στην απορρόφηση και κινητοποίηση του σιδήρου, και αποτελούν μέρος των αμυντικών μηχανισμών των φυτών απέναντι σε παθογόνους μικροοργανισμούς. Πολλές μελέτες σε διαγονιδιακά φυτά *Arabidopsis thaliana* έχουν αναδείξει τη σημασία των κουμαρινών στην ανθεκτικότητα των φυτών έναντι διαφόρων φυτοπαθογόνων μικροοργανισμών. Ο σκοπός αυτής της διατριβής ήταν να αξιολογηθεί η ανθεκτικότητα των μεταλλαγμένων γονοτύπων *fb'hl*, *myb72* και *bglu42* των φυτών *A. thaliana* έναντι του *V.dahliae*. Μετά τα πειράματα παθογένειας πραγματοποιήθηκε ποσοτικοποίηση του παθογόνου στα φυτά, για να διαπιστωθεί αν η διαφορετική σοβαρότητα της ασθένειας που παρατηρήθηκε στους γονότυπους, σχετίζεται με την ποσότητα του παθογόνου εντός του αγγειακού συστήματος των φυτών. Επίσης, αξιολογήθηκε η αντιμικροβιακή δράση των εκκρίσεων των ριζών αυτών των γονοτύπων έναντι του *V.dahliae*. Τέλος, μελετήθηκε η έκφραση γονιδίων που αποτελούν δείκτες επαγωγής αμυντικών μηχανισμών των φυτών.

Λέξεις κλειδιά: *Arabidopsis thaliana*, *Verticillium dahliae*, κουμαρίνες, αμυντικοί μηχανισμοί

ABSTRACT

The fungus *Verticillium dahliae* is a soil-borne pathogen that infects a broad spectrum of hosts, causing vascular wilt. Its host range includes economically important crops such as tomatoes, lettuce, strawberries, cotton, peppers, eggplants, and olives. Infected plants exhibit a variety of symptoms, including chlorosis and wilting of leaves, browning of vascular tissues, stunting, and necrosis, leading to significant yield losses. Control of this pathogen is particularly challenging due to its ability to survive in the soil for decades in the absence of a susceptible host, and the current control measures are largely ineffective once infection has occurred. Management strategies predominantly rely on preventive measures, such as soil disinfection and the use of resistant cultivars. Consequently, the identification and development of alternative control methods are urgently needed. Plants have developed a variety of mechanisms to cope with abiotic and biotic stresses. These mechanisms include the production of secondary metabolites, which enable them to adapt to fluctuating environmental conditions and survive in adverse situations. Coumarins are secondary metabolites that play multiple roles in plants. They are secreted by roots in iron-deficient soils to aid in iron uptake and mobilization, and they are also involved in plant defense against pathogenic microorganisms. Numerous studies on transgenic *Arabidopsis thaliana* plants have demonstrated the importance of coumarins in plant resistance to various phytopathogens. The aim of this thesis was to evaluate the resistance of the *f6'h1*, *myb72*, and *bglu42* mutant genotypes of *A. thaliana* to *V.dahliae*. Pathogenicity assays were conducted, followed by quantification of the pathogen within the plants to ascertain if the variation in disease severity among the genotypes correlated with the pathogen quantity in the vascular system. Additionally, the antimicrobial activity of root exudates from these genotypes against *V.dahliae* was assessed. Finally, the expression of genes involved in the activation of plant defense responses was examined.

Keywords: *Arabidopsis thaliana*, *Verticillium dahliae*, coumarins, defense mechanisms

ΠΙΝΑΚΑΣ ΠΕΡΙΕΧΟΜΕΝΩΝ

Contents

ΠΕΡΙΛΗΨΗ.....	vi
ΠΙΝΑΚΑΣ ΠΕΡΙΕΧΟΜΕΝΩΝ.....	vii
ΚΑΤΑΛΟΓΟΣ ΔΙΑΓΡΑΜΜΑΤΩΝ.....	xii
ΣΥΝΤΟΜΟΓΡΑΦΙΕΣ	xiii
1 ΕΙΣΑΓΩΓΗ.....	1
1.1 Ο μύκητας <i>Verticillium dahliae</i>	1
1.2 Ο Βιολογικός κύκλος του <i>V.dahliae</i>	3
1.3 Μηχανισμοί δράσης του μύκητα κατά την μόλυνση φυτών	4
1.4 Πρατικές για την αντιμετώπιση του μύκητα	5
1.4.1 Απολύμανση εδάφους.....	5
1.4.2 Ανθεκτικές ποικιλίες.....	6
1.4.3 Καλλιεργητικές πρακτικές	6
1.4.4 Βιολογική αντιμετώπιση.....	7
1.4.5 Αγροτεχνικές μέθοδοι- Εφαρμογή οργανικής λίπανσης.....	8
1.4.6 Βιοκαπνισμός εδάφους με φυτικά υλικά	9
1.5 Αμυντικοί μηχανισμοί των φυτών έναντι σε παθογόνα	10
1.6 Ο ρόλος των κουμαρινών στους μηχανισμούς άμυνας των φυτών και στην ανεπάρκεια σιδήρου στο έδαφος.....	13
1.6.1 Ρόλος των κουμαρινών στην ανεπάρκεια σιδήρου στο έδαφος	13
1.6.2 Ρόλος των κουμαρινών ως μηχανισμοί άμυνας των φυτών έναντι παθογόνων.....	14
1.6.3 Κουμαρίνες και η αλληλεπίδραση τους με ωφέλιμα μικρόβια του εδάφους... ..	15

1.6.4	Συσσωρευση κουμαρινών ως απόκριση από επίθεση παθογόνου και αντιμικροβιακές ιδιότητες.....	15
1.6.5	Ο ρόλος των κουμαρινών στην αλληλεπίδραση φυτών- μικροβίων	15
1.6.6	Οι κουμαρίνες και η σύνθεση μικροβιώματος στην ρίζα	16
1.6.7	Η αλληλεπίδραση των κουμαρινών με εδαφογενή παθογόνα	16
1.6.8	Σκοπός διατριβής	18
2	Μεθοδολογία έρευνας.....	19
2.1	Φυτικό Υλικό και συνθήκες ανάπτυξης.....	19
2.2	Στέλεχος φυτοπαθογόνου μύκητα και προετοιμασία μολύσματος	20
2.3	Δοκιμές παθογένειας	20
2.4	Ποσοτικοποίηση του μύκητα <i>V.Dahliae</i> από το φυτικό υλικό	21
2.4.1	Απομόνωση DNA φυτικού ιστού <i>A.thaliana</i>	21
2.4.2	Απομόνωση DNA του μύκητα <i>V.dahliae</i>	22
2.4.3	Αλυσιδωτή αντίδρασης της πολυμεράσης (Polymerase Chain Reaction) 23	
2.4.4	Ποσοτική PCR σε πραγματικό χρόνο (Real-Time qPCR) για ποσοτικοποίηση του μύκητα <i>V.dahliae</i>	24
2.5	Πειράματα ανάλυσης γονιδιακής έκφρασης	26
2.5.1	<i>In vitro</i> δοκιμασίες ανάπτυξης και μόλυνσης με το παθογόνο <i>V.dahliae</i> σε φυτά <i>A.thaliana</i>	26
2.5.2	Απομόνωση RNA φυτικού ιστού <i>A.thaliana</i>	27
2.5.3	Ηλεκτροφόρηση τμημάτων RNA σε πηκτή αγαρόζης	28
2.5.4	Αντίδραση αντίστροφης μεταγραφής	28
2.5.5	Εφαρμογή ποσοτικής PCR πραγματικού χρόνου (Real-Time qPCR).....	29
2.6	Μελέτη αντιμικροβιακής δράσης των ριζικών εκκρίσεων των φυτών <i>A.thaliana</i>	30
2.7	Στατιστική ανάλυση	31

3	Αποτελέσματα.....	32
3.1	Επίδραση του <i>V.dahliae</i> ως προς τα φυσιολογικά χαρακτηριστικά των σειρών <i>A.thaliana</i>	32
3.1.1	Νωπό Βάρος.....	32
3.1.2	Φυλλική επιφάνεια	33
3.2	Πειράματα παθογένειας του <i>V.dahliae</i> με τις μεταλλαγμένες σειρές <i>A.thaliana</i>	34
3.3	Αντιμικροβιακή δράση των ριζικών εκκρίσεων των φυτών <i>A.thaliana</i>	37
3.4	Ποσοτικοποίηση του μύκητα σε φυτά <i>A. thaliana</i> με ποσοτική PCR σε πραγματικό χρόνο Real time qPCR	38
3.5	Έκφραση γονιδίων που σχετίζονται με την άμυνα των φυτών	40
4	Συζήτηση.....	43
5	Βιβλιογραφία.....	50