

Όνομα φοιτητή: Ουρανία Χρίστου

Αριθμός φοιτητικής ταυτότητας: 2008830543

Αριθμός ταυτότητας: 976472

Επιβλέποντες: Επίκουρος Καθηγητής Δημήτρης Τσάλτας, Δρ. Ιάκωβος Παντελίδης

Τίτλος πτυχιακής μελέτης: “Μοριακή ταυτοποίηση επιφυτικών ζυμών αμπέλου και αξιολόγηση τους ως ανταγωνιστικοί παράγοντες κατά των μυκήτων του γένους *Aspergillus* Άθροισμα *Nigri*”.

### **Περίληψη:**

Στόχος αυτής της μελέτης ήταν η μοριακή ταυτοποίηση επιφυτικών ζυμών αμπέλου και στη συνέχεια η αξιολόγησή τους ως ανταγωνιστικοί παράγοντες κατά των μυκήτων του γένους *Aspergillus* άθροισμα *Nigri*. Αρχικά, απομονώθηκαν επιφυτικές ζύμες από τις ποικιλίες Μαραθεύτικο και Cabernet Sauvignon από 4 περιοχές της ορεινής Λεμεσού· Κοιλάνι, Άγιος Αμβρόσιος, Πάχνα και Άρσος. Στη συνέχεια οι απομονώσεις μελετήθηκαν με μακροσκοπικές και μικροσκοπικές μεθόδους. Ακολούθως έγινε απομόνωση του γενωμικού DNA των ζυμών, το οποίο χρησιμοποιήθηκε σε αντιδράσεις ενίσχυσης και αλληλούχισης της D2 περιοχής της μεγάλης υπομονάδας (LSU) του γονιδίου του ριβοσωμικού RNA και ανάλυση αλληλουχιών με το λογισμικό MicroSeq® ID Analysis Software όπου έγινε σύγκριση αλληλουχιών με την βιβλιοθήκη MicroSeq® Fungal Gene library και χρήση του αλγόριθμου BLAST για τη σύγκριση αλληλουχιών με την παγκόσμια βάση δεδομένων του NCBI. Αφού ταυτοποιήθηκαν οι απομονώσεις και αναγνωρίστηκαν σε ποια είδη ζυμών ανήκουν έγινε *in vitro* αξιολόγηση των ζυμών ως προς την ικανότητα τους να παρεμποδίζουν την ανάπτυξη των μαύρων ασπεργίλων. Για τον σκοπό αυτό πραγματοποιήθηκαν δύο διαφορετικά πειράματα. Στο πρώτο πείραμα έγινε διπλή καλλιέργεια ζύμης – μύκητα σε τριβλία με κατάλληλο θρεπτικό υπόστρωμα όπου παρατηρήθηκε η αλληλεπίδρασή τους (σχηματισμός ζώνης παρεμπόδισης στο μέτωπο επαφής των δύο μικροοργανισμών). Με βάση τα αποτελέσματα αυτά επιλέγηκαν ζύμες οι οποίες παρατηρήθηκε ότι εμπόδιζαν την ανάπτυξη του μύκητα με την δημιουργία ζώνης παρεμπόδισης ανάμεσα σε αυτές και τον μύκητα. Ακολούθως τα δείγματα αυτά χρησιμοποιήθηκαν σε δοκιμές παθογένειας σε ράγες σταφυλιού στο εργαστήριο. Οι ράγες εμβαπτίστηκαν στις ζύμες και ο μύκητας εμβολιάστηκε πάνω στις ράγες σε μία οπή που δημιουργήθηκε ασηπτικά με βελόνα. Κατά τη διάρκεια του πειράματος έγιναν παρατηρήσεις για την ανάπτυξη του μύκητα και καταγράφηκε η διάμετρος του παθογόνου πάνω στις ράγες. Από αυτή τη σειρά των πειραμάτων επιλέγηκαν συνολικά 2 ζύμες που παρουσίασαν το μεγαλύτερο ποσοστό παρεμπόδισης του μύκητα για να εφαρμοστούν και να αξιολογηθούν σε πειραματικούς αμπελώνες. Οι ζύμες που επιλέγηκαν ανήκαν στο είδος *Aureobasidium pullulans*. Οι ζύμες αυτές καθώς και 3 γεωργικά μυκητοκτόνα (Geoxe, Chorus, Switch) ψεκάστηκαν σε αμπελώνες που αποτελούνταν από τις οινοποιήσιμες ποικιλίες Μαραθεύτικο και Cabernet sauvignon. Τα αποτελέσματα των πειραμάτων στον αγρό έδειξαν πως οι ζύμες που εφαρμόστηκαν δεν μείωσαν την εμφάνιση των μαύρων ασπεργίλων στις ράγες των

σταφυλιών αφού η συχνότητα επιμόλυνσης με τους μύκητες δεν διέφερε σημαντικά από τα φυτά μάρτυρες.

Title: "Molecular characterization of phyllosphere grapevine yeasts and evaluation of their antagonistic activity against *Aspergillus Section Nigri*"

**Abstract:**

The aim of this study was the molecular identification of phyllosphere grapevine yeasts and their evaluation as biological agents against *Aspergillus section Nigri*. Initially, grapevine yeasts were isolated from the grape varieties Maratheftiko and Cabernet Sauvignon from 4 regions of Limassol: Koilani, Agios Ambrosios, Pachna and Arsos. The yeast isolates were studied macroscopically and microscopically. Genomic DNA was isolated from each yeast sample and used for the amplification and sequencing of the D2 region of the nuclear large-subunit (LSU) ribosomal RNA gene. The DNA sequence of the gene for each isolate was then determined through the process of capillary electrophoresis on an Applied Biosystems genetic analyzer. The sequences were compared to a MicroSeq® Fungal Gene library that contains D2 sequence entries from more than 1000 validated species, using MicroSeq® ID Analysis software. Moreover, the sequences obtained were compared to the database of NCBI using the BLAST algorithm. After the molecular identification of the yeasts the isolates were evaluated *in vitro* as biological agents against black *Aspergilli*. For this purpose, two different sets of experiments were performed. All of the yeast isolates were screened for *in vitro* antagonism against *A. tubingensis* by the dual culture technique on Petri dishes containing Yeast Malt Agar medium. The antagonistic effects were recorded by measuring the percentage inhibition of the radial growth of *A. tubingensis*, and the width of any inhibition growth. The yeasts that were able to inhibit the growth of the pathogen were selected for the following experiments. A collection of 34 yeast isolates was used for the evaluation of their antagonistic activity against *A. tubingensis* in a detached berry test. Berries from bunches of Red Globe variety were immersed in a suspension of the selected yeast isolates and 24 hours later, a calibrated wound was made with a sterile needle on each berry. The wound was spot-inoculated with a conidial suspension of *A. tubingensis*. The percentage of fungal growth inhibition was determined for each yeast isolate. The activity of the two most efficient yeast isolates in the laboratory screening experiments (*Aureobasidium pullulans*) was compared to the activity of the commercial fungicides Geoxe (fludioxonil 50%), Chorus (cyprodinil 50%) and Switch (cyprodinil 37.5% and fludioxonil 25%) under field conditions in two different wine-producing regions of Limassol (Pachna, Maratheftiko vineyard, Agios Amvrosios, Cabernet sauvignon vineyard). The results showed that the yeasts that were applied in the fields did not reduce infection of grape berries with black *Aspergilli* since the frequency of the infected berries was not significantly different compared to the control plants.