



**ΓΕΩΠΟΝΙΚΟ ΠΑΝΕΠΙΣΤΗΜΙΟ ΑΘΗΝΩΝ
ΤΜΗΜΑ ΕΠΙΣΤΗΜΗΣ ΦΥΤΙΚΗΣ ΠΑΡΑΓΩΓΗΣ
ΕΡΓΑΣΤΗΡΙΟ ΦΥΤΟΠΑΘΟΛΟΓΙΑΣ**

**ΠΡΟΓΡΑΜΜΑ ΜΕΤΑΠΤΥΧΙΑΚΩΝ ΣΠΟΥΔΩΝ
ΟΛΟΚΛΗΡΩΜΕΝΑ ΣΥΣΤΗΜΑΤΑ ΦΥΤΟΠΡΟΣΤΑΣΙΑΣ
& ΔΙΑΧΕΙΡΙΣΗΣ ΤΟΥ ΠΕΡΙΒΑΛΛΟΝΤΟΣ**

Μεταπτυχιακή Διπλωματική Εργασία

Μελέτη της επίδρασης πτητικών ενώσεων στην αντιμετώπιση του μύκητα *Botrytis cinerea* σε φυτά τομάτας και *Arabidopsis thaliana*



Αικατερίνη Ε. Κοκμοτού

Επιβλέπων καθηγητής :

Σωτήρης Τζάμος, Αναπληρωτής Καθηγητής ΓΠΑ

ΑΘΗΝΑ 2023

ΓΕΩΠΟΝΙΚΟ ΠΑΝΕΠΙΣΤΗΜΙΟ ΑΘΗΝΩΝ
ΤΜΗΜΑ ΕΠΙΣΤΗΜΗΣ ΦΥΤΙΚΗΣ ΠΑΡΑΓΩΓΗΣ
ΕΡΓΑΣΤΗΡΙΟ ΦΥΤΟΠΑΘΟΛΟΓΙΑΣ

Μεταπτυχιακή Διπλωματική Εργασία

Μελέτη της επίδρασης πτητικών ενώσεων στην αντιμετώπιση του μύκητα *Botrytis cinerea* σε φυτά τομάτας και *Arabidopsis thaliana*

“Study of the effect of volatile compounds on the control of *Botrytis cinerea* on tomato and *Arabidopsis thaliana* plants”

Αικατερίνη Ε. Κοκμοτού

Εξεταστική Επιτροπή:

Σωτήρης Τζάμος, Αναπληρωτής Καθηγητής ΓΠΑ (επιβλέπων)

Αλίκη Τζίμα, Επίκουρη Καθηγήτρια ΓΠΑ

Στριγγλής Ιωάννης, Επίκουρος Καθηγητής ΓΠΑ

Μελέτη της επίδρασης πτητικών ενώσεων στην αντιμετώπιση του μύκητα *Botrytis cinerea* σε φυτά τομάτας και *Arabidopsis thaliana*

ΠΜΣ Ολοκληρωμένα Συστήματα Φυτοπροστασίας & Διαχείρισης του Περιβάλλοντος

Τμήμα Επιστήμης Φυτικής Παραγωγής

Εργαστήριο Φυτοπαθολογίας

Περίληψη

Ο μύκητας *Botrytis cinerea* αποτελεί έναν από τους σημαντικότερους παθογόνους μικροοργανισμούς των φυτών παγκοσμίως και παρουσιάζει ένα τεράστιο φάσμα ξενιστών. Στην παρούσα μεταπτυχιακή διατριβή, μελετήθηκε η επίδραση πτητικών ενώσεων εναντίον του φυτοπαθογόνου μύκητα *B. cinerea* σε φυτά τομάτας και *Arabidopsis thaliana*. Συγκεκριμένα μελετήθηκε η επίδραση των πτητικών ενώσεων του βακτηρίου *Bacillus velezensis* K165, της ακετοΐνης - οργανικής ένωσης που χρησιμοποιείται ευρέως στα τρόφιμα, στην γεωπονία, στη χημική βιομηχανία – καθώς και του ίδιου του μύκητα *B. cinerea*, σε σπόρους τομάτας και *Arabidopsis thaliana*. Παρατηρήθηκε ότι τα φυτά που προέρχονταν από σπόρους που εκτέθηκαν στις προαναφερθείσες πτητικές οργανικές ενώσεις και ιδίως αυτά που εκτέθηκαν στην ακετοΐνη, εμφάνισαν μειωμένη ένταση και συχνότητα ασθένειας ύστερα από τη μόλυνση με τον μύκητα *B. cinerea* και στις δύο περιπτώσεις φυτών ενώ στην περίπτωση της τομάτας η ακετοΐνη επίσης, προώθησε την ανάπτυξη των φυτών. Επιπλέον, διερευνήθηκε η έκφραση τεσσάρων σημαντικών για την άμυνα των φυτών γονιδίων, του γονιδίου *PR1* (pathogenesis-related gene 1), *PDF1.2* (plant defensin 1.2) *PIN2* (proteinase inhibitor 2) καθώς και του *VSP2* (vegetative storage protein 2). Η μεταγραφομική ανάλυση έδειξε ότι οι υπό εξέταση πτητικές οργανικές ενώσεις ενεργοποιούν την επαγόμενη διασυστηματική ανοχή κατόπιν μόλυνσης με τον μύκητα *B. cinerea* και στα δύο φυτά που μελετήθηκαν. Τέλος, διερευνήθηκε η *in vitro* επίδραση αυτών των πτητικών ενώσεων στην ανάπτυξη του μύκητα *B. cinerea*. Τα αποτελέσματα, υποδεικνύουν ότι δεν υπάρχει σημαντική επίδραση, προτείνοντας ότι οι ενώσεις αυτές επάγουν την φυτική άμυνα.

Επιστημονική περιοχή: Φυτοπαθολογία

Λέξεις κλειδιά: *Botrytis cinerea*, *Bacillus velezensis* K165, ακετοΐνη, πτητικές ενώσεις, βιολογική αντιμετώπιση

Study of the effect of volatile compounds on the control of *Botrytis cinerea* on tomato and *Arabidopsis thaliana* plants

MSc: Integrated Plant Protection & Environmental Management Systems
Department of Crop Science
Laboratory of Plant Pathology

Abstract

Botrytis cinerea is one of the most important pathogens all over the world with a wide range of host plants. In the present study, we evaluated the effect of volatile organic compounds (VOCs) against *B. cinerea* in tomato and *Arabidopsis thaliana* plants. In particular, it was investigated the effect of VOCs produced by biocontrol agent *Bacillus velezensis* K165, acetoin- an organic compound which is widely used in food, agriculture and chemical industry- and *B. cinerea* itself, on tomato and *A. thaliana* seeds. It was observed that plants originated from seeds exposed to the above-mentioned VOCs-and especially those exposed to acetoin - reduced *B. cinerea* disease severity and incidence compared to controls, in both plants, whereas in the case of tomato, acetoin also promoted plant growth. Moreover, we studied the expression of four important defense related genes, the *PR1* (pathogenesis-related gene 1), the *PDF1.2* (plant defensin 1.2), the *PIN2* (proteinase inhibitor 2) and the *VSP2* (vegetative storage protein 2). The transcriptional analysis showed that the examined VOCs triggered the induced systemic resistance upon infection in both plants. Finally yet importantly, we examined the effects of these VOCs on *B. cinerea* growth *in vitro*. The results demonstrate that there is no significant effect, suggesting that VOCs induce plant defense.

Scientific area: Plant Pathology

Keywords: *Botrytis cinerea*, *Bacillus velezensis* K165, acetoin, volatile organic compounds, biological control

Ευχαριστίες

Η παρούσα μεταπτυχιακή μελέτη εκπονήθηκε στο εργαστήριο Φυτοπαθολογίας του Γεωπονικού Πανεπιστημίου Αθηνών υπό την επίβλεψη του Αναπληρωτή Καθηγητή Φυτοπαθολογίας Δρ. Τζάμου Σωτήρη. Θα ήθελα να τον ευχαριστήσω θερμά τόσο για την ανάθεση του θέματος όσο και για την εμπιστοσύνη, το ενδιαφέρον του και τις πολύτιμες συμβουλές που μου παρείχε στα πλαίσια της μεταπτυχιακής καθώς και της πτυχιακής μου μελέτης.

Επιπρόσθετα, θα ήθελα να ευχαριστήσω την υποψήφια διδάκτορα Ειρήνη Πουλάκη που με καθοδήγησε καθ' όλη τη διάρκεια της μεταπτυχιακής μου μελέτης. Την ευχαριστώ επίσης για την άψογη συνεργασία μας, την αμέριστη βοήθεια καθώς και για τον πολύτιμο χρόνο τον οποίο μου αφιέρωσε για την πραγματοποίηση αυτής.

Θα ήθελα ακόμη να ευχαριστήσω την Επίκουρη Καθηγήτρια του εργαστηρίου Φυτοπαθολογίας κα Τζίμα Αλίκη καθώς και τον επίκουρο καθηγητή κ. Ιωάννη Στριγγλή που δέχτηκαν να εξετάσουν και να βαθμολογήσουν την μεταπτυχιακή μου διατριβή ως μέλη της τριμελούς επιτροπής.

Τέλος έχω την ανάγκη να ευχαριστήσω την οικογένεια μου και του φίλους μου για την συμπαράσταση και την ενθάρρυνση τους καθ' όλη τη διάρκεια των σπουδών μου.

Με την άδειά μου, η παρούσα εργασία ελέγχθηκε από την Εξεταστική Επιτροπή μέσα από λογισμικό ανίχνευσης λογοκλοπής που διαθέτει το ΓΠΑ και διασταυρώθηκε η εγκυρότητα και η πρωτοτυπία της.

Περιεχόμενα

1. ΕΙΣΑΓΩΓΗ	6
1.1 Η ΚΑΛΛΙΕΡΓΕΙΑ ΤΗΣ ΤΟΜΑΤΑΣ (<i>Solanum lycopersicum/ Lycopersicum esculentum</i>)	6
1.1.1 Βοτανική ταξινόμηση	6
1.1.2 Καταγωγή – Ιστορικό του φυτού.....	6
1.1.3 Εξάπλωση της καλλιέργειας στις μέρες μας	6
1.1.4 Βοτανικοί χαρακτήρες.....	7
1.2 ΤΟ ΦΥΤΟ <i>ARABIDOPSIS THALIANA</i>	8
1.3 Ο ΜΥΚΗΤΑΣ <i>BOTRYTIS CINEREA</i>	8
1.3.1 Επιστημονική ταξινόμηση της τέλειαις και της ατελούς μορφής.....	8
1.3.2 Συμπτώματα και ξενιστές.....	8
1.3.3 Συνθήκες ανάπτυξης και στοιχεία επιδημιολογίας	9
1.3.4 Είσοδος παθογόνου και Βιολογικός κύκλος	11
1.3.5 Αντιμετώπιση του μύκητα.....	12
1.4 ΒΙΟΛΟΓΙΚΟΙ ΠΑΡΑΓΟΝΤΕΣ ΚΑΙ ΤΟ ΣΤΕΛΕΧΟΣ <i>BACILLUS VELEZENSIS</i> K165	14
1.4.1 Μηχανισμοί δράσης των βιολογικών παραγόντων	14
1.4.2 Τα Ριζοβακτήρια	15
1.4.3 Μηχανισμοί δράσης ριζοβακτηρίων.....	15
1.4.4 Ο βιολογικός παράγοντας <i>Bacillus velezensis</i> K165 (<i>Paenibacillus alvei</i> K165)	17
1.5 ΕΠΙΔΡΑΣΗ ΤΩΝ ΜΙΚΡΟΒΙΑΚΩΝ ΠΤΗΤΙΚΩΝ ΕΝΩΣΕΣΩΝ ΣΤΑ ΦΥΤΑ.....	18
1.5.1 Οι πτητικές ενώσεις του <i>Bacillus velezensis</i> K165	19
1.5.2 Η πτητική ένωση ακετοΐνη	20
1.5.3 Πτητικές ενώσεις μυκήτων.....	21
1.6 Η ΑΜΥΝΑ ΤΩΝ ΦΥΤΩΝ	21
1.6.1 Επαγόμενη & Επίκτητη διασυστηματική αντοχή (ανοσοποίηση)	23
1.7 ΤΑ ΓΟΝΙΔΙΑ <i>PR1</i> , <i>PIN2</i> , <i>PDF1.2</i> ΚΑΙ <i>VSP2</i>	26
1.8 ΣΚΟΠΟΣ ΤΗΣ ΕΡΓΑΣΙΑΣ	27
2. ΥΛΙΚΑ ΚΑΙ ΜΕΘΟΔΟΙ.....	28
2.1 ΦΥΤΙΚΟ ΥΛΙΚΟ.....	28
2.2 ΜΙΚΡΟΒΙΟΛΟΓΙΚΟ ΥΛΙΚΟ	28
2.3 ΘΡΕΠΤΙΚΑ ΥΛΙΚΑ	28
2.4 ΠΡΟΕΤΟΙΜΑΣΙΑ ΤΟΥ ΒΙΟΛΟΓΙΚΟΥ ΠΑΡΑΓΟΝΤΑ <i>B. VELEZENSIS</i> K165	29
2.5 ΠΡΟΕΤΟΙΜΑΣΙΑ ΑΚΕΤΟΪΝΗΣ	29
2.7 ΚΑΛΛΙΕΡΓΕΙΑ ΚΑΙ ΑΝΑΠΤΥΞΗ ΤΟΥ ΜΥΚΗΤΑ <i>B. CINEREA</i>	30

2.8 ΠΕΙΡΑΜΑ ΠΑΘΟΓΕΝΕΙΑΣ	30
2.8.1 Έκθεση σπόρων στις πτητικές ενώσεις	30
.....	30
2.8.2 Σπορά και ανάπτυξη φυτών	31
2.8.3 Μόλυνση φυτών με τον μύκητα <i>B. cinerea</i>	31
2.8.4 Παρατήρηση συμπτωμάτων και δειγματοληψία	32
2.9 ΜΕΛΕΤΗ ΕΚΦΡΑΣΗΣ ΓΟΝΙΔΙΩΝ	32
2.9.1 Απομόνωση RNA φυτών.....	32
2.9.2 Μέτρηση νουκλεϊκών οξέων	34
2.9.3 Καταστροφή υπολειμμάτων DNA	34
2.9.4 Σύνθεση cDNA	34
2.9.5 Μελέτη έκφρασης γονιδίων με Real time PCR	35
2.10 ΜΕΛΕΤΗ ΕΠΙΔΡΑΣΗΣ ΤΩΝ ΕΦΑΡΜΟΓΩΝ ΣΤΟ ΒΑΡΟΣ ΦΥΤΩΝ ΤΟΜΑΤΑΣ	36
2.11 <i>IN VITRO</i> ΜΕΛΕΤΗ ΤΗΣ ΕΠΙΔΡΑΣΗΣ ΤΩΝ ΠΤΗΤΙΚΩΝ ΕΝΩΣΕΩΝ ΣΤΟ ΜΥΚΗΤΑ <i>B. CINEREA</i>	36
2.11.1 <i>In vitro</i> μελέτη της επίδρασης της πτητικής ένωσης ακετοΐνης	37
2.11.2 <i>In vitro</i> μελέτη της επίδρασης των πτητικών ενώσεων του <i>B. velezensis</i> K165 ..	37
3. ΑΠΟΤΕΛΕΣΜΑΤΑ.....	38
3.1 ΑΠΟΤΕΛΕΣΜΑΤΑ ΠΕΙΡΑΜΑΤΟΣ ΠΑΘΟΓΕΝΕΙΑΣ.....	38
3.1.1 Αξιολόγηση πτητικών ενώσεων εναντίον του μύκητα <i>B. cinerea</i> σε φυτά τομάτας	38
3.1.2 Αξιολόγηση πτητικών ενώσεων εναντίον του μύκητα <i>B. cinerea</i> σε φυτά <i>A. thaliana</i>	39
3.2 ΑΠΟΤΕΛΕΣΜΑΤΑ ΕΚΦΡΑΣΗΣ ΓΟΝΙΔΙΩΝ	41
3.2.1 Αποτελέσματα έκφρασης γονιδίων στην τομάτα	41
3.2.2 Αποτελέσματα έκφρασης γονιδίων στο φυτό <i>A. thaliana</i>	45
3.3 ΑΠΟΤΕΛΕΣΜΑΤΑ ΕΠΙΔΡΑΣΗΣ ΤΩΝ ΠΤΗΤΙΚΩΝ ΕΝΩΣΕΩΝ ΣΤΟ ΒΑΡΟΣ ΦΥΤΩΝ ΤΟΜΑΤΑΣ	51
3.4 ΑΠΟΤΕΛΕΣΜΑΤΑ ΕΠΙΔΡΑΣΗΣ ΠΤΗΤΙΚΩΝ ΕΝΩΣΕΩΝ ΣΤΟ ΜΥΚΗΤΑ <i>B. CINEREA IN VITRO</i>	52
4. ΣΥΜΠΕΡΑΣΜΑΤΑ-ΣΥΖΗΤΗΣΗ	55
5. ΒΙΒΛΙΟΓΡΑΦΙΑ	61

1.ΕΙΣΑΓΩΓΗ

1.1 Η ΚΑΛΛΙΕΡΓΕΙΑ ΤΗΣ ΤΟΜΑΤΑΣ (*Solanum lycopersicum*/*Lycopersicon esculentum*)

1.1.1 Βοτανική ταξινόμηση

Βασίλειο: Φυτά
Συνομοταξία: Αγγειόσπερμα
Ομοταξία: Δικοτυλήδονα
Τάξη: Solanales
Οικογένεια: Solanaceae
Γένος: Solanum
Είδος: <i>S. lycopersicum</i>

1.1.2 Καταγωγή – Ιστορικό του φυτού

Η τομάτα είναι κατά κανόνα ετήσιο κηπευτικό, αρκετά διαδεδομένο και πολύ δημοφιλές. Ο τόπος καταγωγής της τομάτας είναι η Νότια Αμερική, στην περιοχή από το Εκουαδόρ μέχρι τη βόρεια Χιλή και με 2 ενδημικά είδη στα νησιά Γκαλαπάγκος (Darwin et al., 2003; Peralta and Spooner, 2005) αν και ο ακριβής χώρος καταγωγής της τομάτας δεν έχει ακόμη, πλήρως, διασαφηνιστεί (Peralta et al., 2008). Στην Ευρώπη η τομάτα μεταφέρθηκε από τον Κολόμβο μετά το δεύτερο ταξίδι του στην Αμερική το 1498. Όμως, σαν βρώσιμο λαχανικό άρχισε να αποκτά αξία από τα μέσα του 18ου αιώνα και μετά, αφού μέχρι τότε επικρατούσε η αντίληψη ότι, ως φυτό της οικογένειας των σολανωδών, η τομάτα περιέχει δηλητηριώδεις ουσίες στους καρπούς της, όπως και η πατάτα.

1.1.3 Εξάπλωση της καλλιέργειας στις μέρες μας

Η τομάτα είναι ένα αρκετά διαδεδομένο και πολύ δημοφιλές, δυνητικά πολυετές λαχανικό, που σχεδόν παγκοσμίως καλλιεργείται ως μονοετές (Tigchelaar 1986, Rick 1974). Σε διεθνή κλίμακα, η καλλιέργεια της τομάτας καταλαμβάνει την τρίτη σε έκταση θέση, μετά την πατάτα και τη γλυκοπατάτα. Ειδικότερα, στην Ελλάδα, καταλαμβάνει τη δεύτερη σε έκταση θέση, μετά την πατάτα (Ολύμπιος, 2001). Η δημοτικότητα της τομάτα ποικίλλει στις διάφορες χώρες, αλλά είναι πολύ λίγες οι περιοχές της γης όπου η τομάτα δεν καλλιεργείται με κάποια από τις μορφές καλλιέργειας της. Οι χώρες με την μεγαλύτερη παραγωγή τομάτας στον κόσμο είναι η Αμερική, η Ιταλία, η Κίνα, η Τουρκία, η Ισπανία, η Ελλάδα, η Αίγυπτος, κ.λπ. Παρότι το μεγαλύτερο μέρος της παραγωγής προέρχεται από υπαίθριες καλλιέργειες, ένα σημαντικό μέρος της συνολικής παγκόσμιας παραγωγής προέρχεται από θερμοκηπιακές ("Η καλλιέργεια της τομάτας", 2017, p.1).

1.1.4 Βοτανικοί χαρακτήρες

Η τομάτα ανήκει στην οικογένεια *Solanaceae*. Έχει $2n = 24$ χρωματοσώματα όπως όλα τα είδη του γένους *Lycopersicon*.

Σύμφωνα με τον Ολύμπιο (2001), οι βοτανικοί χαρακτήρες του φυτού περιγράφονται ως εξής :

Ρίζα: Το φυτό της τομάτας αναπτύσσει κεντρική ρίζα η οποία μπορεί να φθάσει έως 3 μέτρα σε βάθος, αλλά κατά κύριο λόγο αναπτύσσεται στο έδαφος στα πρώτα 60 εκατοστά. Σχηματίζει πασσαλώδη ρίζα όταν γίνεται απευθείας σπορά, ωστόσο όταν το φυτό μεταφυτεύεται η πρωτογενής πασσαλώδης ρίζα τραυματίζεται και κατά συνέπεια τα φυτά αποκτά μία μάλλον θυσσανώδη μορφή.

Βλαστός: Κατά το φύτεμα και μετά την οριζοντιοποίηση των κοτυληδονόφυλλων από το αρχέφυτο που βρίσκεται μεταξύ τους παράγεται ο κεντρικός βλαστός. Ο κεντρικός βλαστός φέρει τα πραγματικά φύλλα, στις μασχάλες των οποίων υπάρχουν οφθαλμοί που δίνουν πλευρικούς βλαστούς.

Φύλλα: Τα πραγματικά φύλλα της τομάτας επί του βλαστού, σχηματίζονται σε διάταξη έλικας ενώ είναι σύνθετα με περιττό αριθμό φυλλαρίων. Κάθε φύλλο αποτελείται από ζεύγη φυλλαρίων και παράφυλλων με ένα μόνο φυλλάριο στην άκρη. Επιπρόσθετα, τα φύλλα καθώς και οι βλαστοί φέρουν επιφανειακά αδενώδεις τρίχες οι οποίες ύστερα από τραυματισμό αναδίδουν την χαρακτηριστική μυρωδιά της τομάτας.

Άνθη-Ταξιανθία: Σχηματίζει κυματοειδής ταξιανθίες με άξονα που μπορεί να είναι απλός, ή να διχάζεται μία ή περισσότερες φορές. Τα άνθη φέρονται σε διακλαδώσεις του άξονα, ανά ένα στην κορυφή κάθε διακλάδωση. Σε κάθε ταξιανθία φέρονται συνήθως 3 έως 20 άνθη στις κανονικές και έως 50 στις κερασόμορφες (cherry) ποικιλίες. Τα άνθη είναι ακτινόμορφα με πενταμερή κάλυκα, πενταμερή κίτρινη στεφάνη, 5 στήμονες ενωμένους έτσι ώστε να σχηματίζουν έναν κοίλο κώνο που περιβάλλει τον στύλο και έναν ύπερο.

Καρπός: Ο καρπός της τομάτας είναι πολύχωρος ράγα, με ποικίλα σχήματα η οποία προκύπτει από την συνένωση των καρποφύλλων της ωθήκης. Ανάλογα με τον αριθμό των καρποφύλλων που αποτελούσαν το άνθος ο καρπός φέρει δύο ή περισσότερους χώρους. Στους χώρους αυτούς αναπτύσσονται κατά ομάδες οι σπόροι της τομάτας, οι οποίοι περιβάλλονται από μια γλοιώδη ουσία.

Σπόρος: Ο σπόρος όταν είναι μέσα στον καρπό περιβάλλεται από ζελατινώδη παρεγχυματικά κύτταρα τα οποία γεμίζουν τα χωρίσματα του καρπού. Έχουν χρώμα κίτρινο-χρυσάφι και είναι πεπλατυσμένοι με σχήμα στρογγυλό έως ωοειδές έως νεφροειδές.

1.2 ΤΟ ΦΥΤΟ *ARABIDOPSIS THALIANA*

Το φυτό *Arabidopsis thaliana* ανήκει στην οικογένεια *Brassicaceae*. Είναι φυτό που αναπτύσσεται ιδιαίτερα γρήγορα και ολοκληρώνει τον βιολογικό του κύκλο σε διάστημα περίπου έξι εβδομάδων παράγοντας χιλιάδες μικρά σπέρματα. Είναι ιδιαίτερα μικρό, παράγει άνθη με μήκος 2mm τα οποία αποτελούνται από 4 σέπαλα, 4 πέταλα και 6 στήμονες. Οι καρποί του φυτού έχουν μήκος 0,5mm ενώ ένα ώριμο φυτό μπορεί να παράγει εκατοντάδες καρποταξίες με περισσότερους από 5000 σπόρους.

Αποτελεί έναν από τους κυριότερους πειραματικούς ευκαρυωτικούς οργανισμούς-μοντέλα. Αυτό συμβαίνει επειδή η καλλιέργειά του είναι σχετικά εύκολη, οικονομική ενώ λόγω μεγέθους, καταλαμβάνει λίγο χώρο επιτρέποντας την ταυτόχρονη έρευνα πολλών φυτών. Άλλο σημαντικό πλεονέκτημα αποτελεί το μικρό γονιδίωμα του φυτού (περίπου 1.3x10⁸ bp) καθώς επίσης και το γεγονός ότι είναι διπλοειδές και όχι ιδιαίτερα πολύπλοκο (π.χ. λίγες επαναλήψεις μη κωδικού DNA). Αξίζει να σημειωθεί ότι, είναι το πρώτο φυτό του οποίο αποκωδικοποιήθηκε πλήρως η γονιδιωματική του ακολουθία το Δεκέμβριο του 2000 ως αποτέλεσμα της συλλογικής συνεργασίας μεταξύ ερευνητικών ομάδων Arabidopsis Genome Initiative (AGI 2000).

1.3 Ο ΜΥΚΗΤΑΣ *BOTRYTIS CINEREA*

1.3.1 Επιστημονική ταξινόμηση της τέλειαις και της ατελούς μορφής

Βασίλειο: Μύκητες	Βασίλειο: Μύκητες
Φύλο: Deuteromycota	Φύλο: Ascomycota
Κλάση: Hyphomycetes	Κλάση: Discomycetes
Τάξη: Moniliales	Τάξη: Leotiomycetes
Οικογένεια: Moniliaceae	Οικογένεια: Sclerotiniaceae
Γένος: Botrytis	Γένος: Botryotinia
Είδος: <i>B. cinerea</i>	Είδος: <i>B. fyckeliana</i>

1.3.2 Συμπτώματα και ξενιστές

Ο μύκητας *B. cinerea* είναι το αίτιο της ασθένειας που είναι κυρίως γνωστή σαν τεφρά σήψη (grey mould). Αποτελεί μια από τις πιο διαδεδομένες ασθένειες των φυτών, με παγκόσμια εξάπλωση ιδιαίτερα σε περιοχές με συνθήκες υψηλής σχετικής υγρασίας. Οι προσβολές εκδηλώνονται κυρίως στα υπέργεια όργανα των

φυτών όπως φύλλα, άνθη, καρπούς, στελέχη και οφθαλμούς με την μορφή σήψης. Επιπρόσθετα, προσβολές του μύκητα έχουν αναφερθεί και σε βολβούς, σπόρους καθώς και σε άλλα είδη πολλαπλασιαστικού υλικού όπου επίσης μπορεί να προκαλεί σημαντικές απώλειες (Elad et al., 2004). Πέρα από τις ποσοτικές απώλειες υποβαθμίζει τα προϊόντα και ποιοτικά, ενώ ταυτόχρονα μπορεί να ζημιώνει την παραγωγή και μετασυλλεκτικά κατά την αποθήκευση ή την μεταφορά.

Όσον αφορά τους ξενιστές, ο μύκητας *B. cinerea* όπως και άλλα είδη του ίδιου γένους, αποτελεί σημαντικό παθογόνο σπορείων, καλλωπιστικών, λαχανοκομικών και βιομηχανικών φυτών καθώς και καρπών οπωροφόρων δέντρων κατά τη φάση της αποθήκευσης, της συντήρησης και της μεταφοράς τους (Elad et al., 2004). Ιδιαίτερα στα κηπευτικά προκαλούνται μεγάλες ζημιές ιδίως μετά από βροχή, δροσιά και πυκνή ομίχλη. Επίσης, σε συνθήκες θερμοκηπίου δημιουργούνται ευνοϊκές συνθήκες υγρασίας για την ανάπτυξη του παθογόνου. Στο αμπέλι προκαλεί πολύ σοβαρές ζημιές που επιφέρουν σοβαρή μείωση της παραγωγής και υποβάθμιση της ποιότητας των επιτραπέζιων σταφυλιών και του παραγόμενου γλεύκους. Έντονες προσβολές παρατηρούνται και στα ψυχανθή ενώ συχνά καθιστά τα ανθοκομικά φυτά ακατάλληλα για εμπορία. Τέλος, ο μύκητας μπορεί να προσβάλλει μετασυλλεκτικά καρπούς και άνθη και προκαλεί σημαντικές οικονομικές απώλειες σε παγκόσμιο επίπεδο (Poveda et al., 2020).



Εικόνα 1: Συμπτώματα του μύκητα *Botrytis cinerea* σε διάφορα φυτικά είδη

Πηγές: <https://www.canna-uk.com/botrytis-cinerea-pests-diseases>,
<https://www.evinyardapp.com/blog/2015/11/27/gray-mold-of-grape-botrytis-cinerea-pers/><https://strawberryscout.ca.uky.edu/botrytisgraymold>,
<https://www.missouriherbarium.org/gardens-gardening/your-garden/help-for-the-home-gardener/advice-tips-resources/pests-and-problems/diseases/fungal-spots/botrytis-blight>

1.3.3 Συνθήκες ανάπτυξης και στοιχεία επιδημιολογίας

Είδη του γένους *Botrytis* παρουσιάζονται οπουδήποτε αναπτύσσονται οι ξενιστές τους, από τροπικές και υποτροπικές περιοχές μέχρι πολικές (Elad et al., 2004). Η βέλτιστη θερμοκρασία για βλάστηση κονιδίων είναι 15–25 °C, αλλά το παθογόνο μπορεί να μολύνει ακόμη και σε θερμοκρασία 2 °C καθώς και σε θερμοκρασίες άνω των 25 °C (Jarvis, 1980; Marois et al., 1988; Salinas et al., 1989). Τα είδη *Botrytis* spp. θεωρούνται παθογόνα υψηλής υγρασίας και έτσι τα κονίδια τους βλαστάνουν σε υψηλές συνθήκες υγρασίας (Snow, 1949). Επίσης, η ασθένεια ευνοείται από αμμώδη εδάφη, από τη παρουσία πληγών και εξασθενημένων φυτικών ιστών.

Ο μύκητας *B. cinerea* είναι νεκροτροφικό παθογόνο. Μετά από προσβολή και νέκρωση του ξενιστή μπορεί να αναπτυχθεί ως σαπρόφυτο στους νεκρούς ιστούς ή να σχηματίσει μυκηλιακές κατασκευές.

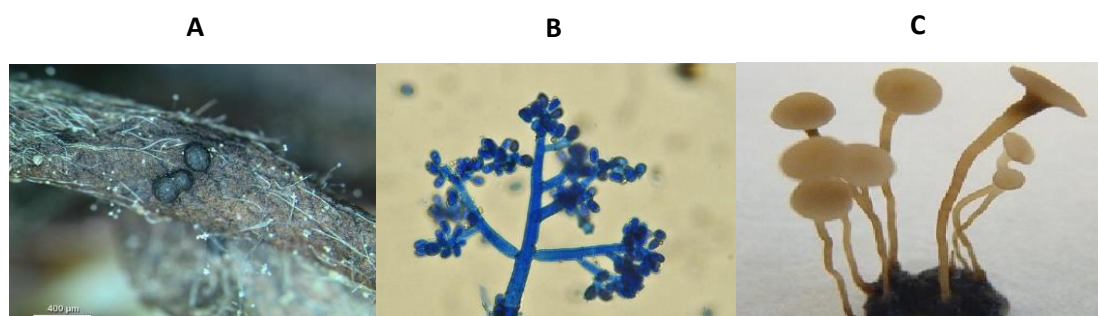
Σε αντίξοες συνθήκες το παθογόνο μπορεί να παράγει μακράς διάρκειας όργανα επιβίωσης, τα σκληρώτια, τα οποία μπορεί να σχηματίζονται σε εξασθενημένους φυτικούς ιστούς ή σε υπολείμματα καλλιεργειών στο έδαφος (Holz et al., 2007). Τα σκληρώτια είναι σκληρές μυκηλιακές κατασκευές μαύρου ή σκούρου καστανού χρώματος εξαιτίας της εναποθέσεως μελανίνης στα εξωτερικά τους τοιχώματα. Το εσωτερικό τους είναι ανοιχτότερου χρώματος και αποτελείται από πυκνή μάζα υφών του μύκητα. Το εξωτερικό περίβλημα (ψευδοπαρέγχυμα) που περιέχει τις μελανές χρωστικές προστατεύει από τη ξήρανση, την ακτινοβολία UV και από τις μικροβιακές προσβολές (Backhouse & Willetts, 1984, Williamson et al., 2007). Γενικά τα σκληρώτια θεωρούνται οι πιο σημαντικές μυκηλιακές κατασκευές για την επιβίωση και την διαίωση του μύκητα. Μπορούν να επιβιώσουν υπό δυσμενείς περιβαλλοντικές συνθήκες και στην συνέχεια να βλαστήσουν προς μυκήλιο, προς κονιδιοφόρους με κονίδια, ή κάτω από κατάλληλες συνθήκες και γονιμοποίηση προς αποθήκια (Beever & Weeds, 2004; Coley-Smith, 1980).

Μια άλλη κατασκευή επιβίωσης του μύκητα είναι τα χλαμυδοσπόρια τα οποία αποτελούν δομές βραχυπρόθεσμης επιβίωσης για σύντομο διάστημα μη ευνοϊκών συνθηκών. Συνήθως σχηματίζονται σε γηρασμένες καλλιέργειες του μύκητα και σε καλλιέργειες με επιμολύνσεις με άλλους οργανισμούς (Jarvis, 1980a). Ανάλογα με τις συνθήκες περιβάλλοντος και θρέψης τα χλαμυδοσπόρια βλαστάνουν δίνοντας υφή διάτρησης, μικροκονίδια και μακροκονίδια (Holz et al., 2004).

Το μυκήλιο του μύκητα με σέπτα απλό ή διακλαδιζόμενο, όταν είναι νεαρό είναι υαλόχρομο ενώ το παλιό είναι γκριζο και διογκωμένο κοντά στα septa. Σε συνθήκες καλλιέργειας έχει τεφρώδη χρώμα. Ο μύκητας σχηματίζει όρθιους κονιδιοφόρους, που αποτελούνται από ένα ποδίσκο καστανού χρώματος, αρχικά απλούς που στη συνέχεια διακλαδίζονται ακανόνιστα με διχοτόμηση και φέρουν στην κορυφή τους πάνω σε μικρές διακλαδώσεις κονίδια κατά κεφαλές, σε μορφή βότρυος (Παναγόπουλος, 1997). Έτσι, το γένος *Botrytis* οφείλει το όνομα του στην ελληνική λέξη βότρυς, που υποδηλώνει ότι η καρποφορία του έχει τη διάταξη της ταξιανθίας του σταφυλιού.

Τα κονίδια έχουν σχήμα ωοειδές ή σφαιρικό, χρώμα τεφρό ή υαλώδες κι είναι μονοκύτταρα με διαστάσεις 9,7-11,1 x 7,3-8μm (Stall, 1997). Παράγονται στις διάφορες πηγές μόλυσματος (υπολείμματα καλλιέργειας, προσβεβλημένα όργανα) και αποτελούν τις πιο σημαντικές μονάδες του παθογόνου, που συνήθως διασπείρονται με τα ρεύματα του αέρα σε μεγάλες αποστάσεις (ξηροσπόρια). Επίσης, έχει αναφερθεί ότι τα σπόρια μπορούν να μεταφερθούν με τη βροχή και τα έντομα αλλά αυτοί οι μηχανισμοί διασποράς είναι μικρότερης σημασίας (Jarvis, 1962b, Holz et al., 2007).

Τέλος, η τέλεια μορφή *Botryotinia fuckeliana* είναι ετερόθαλλος Ασκομύκητας και παράγει γραμμικούς ασκούς με 8 ασκοσπόρια στα αποθήκια. Τα αποθήκια προκύπτουν από τη εκβλάστηση σκληρωτίων.



Εικόνα 2: Τα σκληρώτια του μύκητα σε στέλεχος φράουλας (A) , οι κονιδιοφόροι (B) και τα αποθήκια (C)
Πηγή: <https://content.ces.ncsu.edu/botrytis-cinerea-botrytis-fruit-rot-and-blight-on-strawberry> (A), <https://forum.mikroscopia.com/topic/12475-botrytis-et-sclerotes> (B), [https://www.semanticscholar.org/paper/Studying-the-mating-system-in-Botrytis-cinerea-Soliman/00a16ee31b8b7a9d7e8f0213a385838cfae93b7a/figure/2_\(C\)](https://www.semanticscholar.org/paper/Studying-the-mating-system-in-Botrytis-cinerea-Soliman/00a16ee31b8b7a9d7e8f0213a385838cfae93b7a/figure/2_(C))

1.3.4 Είσοδος παθογόνου και Βιολογικός κύκλος

Η είσοδος του παθογόνου ξεκινά με την μεταφορά και την προσκόλληση ενός κονιδίου στην επιφάνεια της εφυμενίδας του ξενιστή. Μετά την προσκόλληση, το κονίδιο βλαστάνει στην επιφάνεια ιστών του ξενιστή, παρουσία επαρκούς υγρασίας και σχηματίζει βλαστικό σωλήνα, ο οποίος λίγο πριν την είσοδό του στον ιστό διαφοροποιείται σε πλάκα συγκρατήσεως (appressorium) και εισέρχεται στον ιστό του ξενιστή. Στην φάση αυτή, ο μύκητας παράγει ένζυμα που λύουν τη συνέχεια των φυτικών κυττάρων και διευκολύνουν έτσι τη διείσδυσή του. Τα γειτονικά κύτταρα του ιστού του ξενιστή προς το appressorium, νεκρώνονται και εμφανίζεται μια αρχική κηλίδα, η οποία είναι νεκρωτική και στην οποία συμβαίνουν οι αντιδράσεις άμυνας του ξενιστή. Σε πολλές περιπτώσεις αυτό αποτελεί την έναρξη της λανθάνουσας περιόδου (period of quiescence), η χρονική διάρκεια της οποίας είναι απροσδιόριστη και κατά την οποία συνήθως δεν συμβαίνει έξαρση εξάπλωσης του μύκητα (Prusky, 1996).

Ο μύκητας συνεπώς μπορεί να εισέρχεται στο εσωτερικό των φυτών με απευθείας διάτρηση της εφυμενίδας των φύλλων (Williamson et al., 1995, Παναγόπουλος, 2000), κατευθείαν από τα στομάτια και από άλλα φυσικά ανοίγματα με σχηματισμό πλάκας συγκρατήσεως (Garcia-Arenal & Sagasta, 1980, van den Heuvel & Waterreus, 1983) και δευτερογενώς μέσα από πληγές (πχ. από έντομα ή από φυσικές ζημιές).

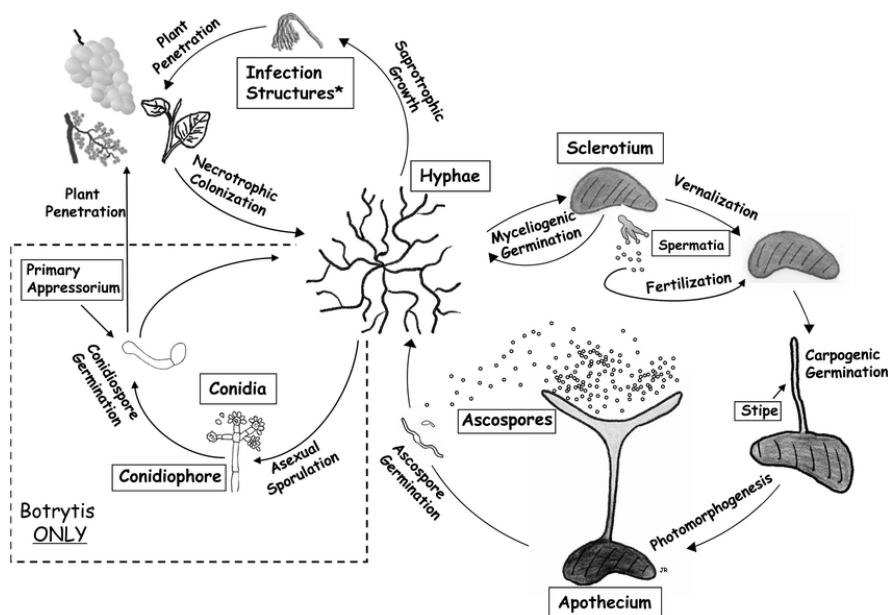
Ο μύκητας μπορεί να διαχειμάσει ως μυκήλιο σε νεκρό ή ζωντανό φυτικό υλικό ή ως σκληρώτια σε φυτικά υπολείμματα στην επιφάνεια του εδάφους ή θαμμένα στο έδαφος (Strameng et al. 2009). Από αυτές τις μορφές διαχείμασης θα προκύψουν αργά το χειμώνα και νωρίς την άνοιξη κονιδιοφόροι με κονίδια τα οποία θα αποτελέσουν το αρχικό μόλυσμα στον αγρό. Προσβεβλημένοι νεκροί ιστοί, υπολείμματα καλλιεργειών, μουμιοποιημένοι καρποί μπορούν να αποτελέσουν

εστία μόλυσματος. Τα κονίδια μεταφέρονται εύκολα με τη βοήθεια του ανέμου ή του νερού, προκαλώντας νέες μολύνσεις σε ιστούς ευπαθών ξενιστών (Williamson et al., 2007).

Λιγότερο σημαντική αλλά όχι αμελητέα είναι και η συνεισφορά άλλων τμημάτων του θαλλού του μύκητα στη διασπορά του όπως είναι για παράδειγμα τα ασκοσπόρια, τα χλαμυδοσπόρια αλλά και τμήματα προσβεβλημένων φυτικών ιστών. Τέτοιοι ιστοί εκτός από μονάδες διασποράς του παθογόνου μπορεί να αποτελέσουν και θέσεις για παραγωγή επιπλέον κονιδίων (Holz et al., 2004).

Η αρχική μόλυνση των φυτών γίνεται από τις βλαστικές υφές των κονιδίων τα οποία διαχειμάσαν είτε σαπροφυτικά σε νεκρά φυτικά υπολείμματα είτε αναπτύχθηκαν πάνω σε σκληρώτια. Από τις προσβολές αυτές αναπτύσσεται νέο μυκήλιο το οποίο είτε θα δώσει νέους κονιδιοφόρους είτε σκληρώτια.

Η τέλεια μορφή του παρασίτου *Botryotinia fuckeliana* (de Bary) Whetzel σχηματίζεται πολύ σπάνια στη φύση από τα σκληρώτια του μύκητα τα οποία όταν βλαστάνουν κάτω από ειδικές συνθήκες μπορούν να δώσουν αποθήκια (Τζάμος, 2007).



Εικόνα 3: Ο βιολογικός κύκλος του μύκητα *B. cinerea*

Πηγή: https://www.researchgate.net/figure/Lifecycle-of-S-sclerotiorum-and-B-cinerea-with-different-stages-of-sexual-and-asexual_fig11_51604599

1.3.5 Αντιμετώπιση του μύκητα

Τα μέτρα καταπολέμησης της τεφράς σήψης χωρίζονται στα καλλιεργητικά, χημικά και βιολογικά. Από αυτά τα δύο πρώτα είναι κυρίως προληπτικά, τα χημικά είναι είτε προληπτικά είτε καταπολέμησης ενώ τα βιολογικά είναι κυρίως προληπτικά.

- Καλλιεργητικά

Σημαντικό καλλιεργητικό μέτρο αποτελεί η μείωση της υγρασίας με καλό αερισμό χώρου, αραιή σπορά, αποφυγή υπερβολικής άρδευσης, άρδευση κατά τις πρωινές ώρες, κατάλληλα κλαδέματα και αποφυγή μεγάλων διακυμάνσεων της θερμοκρασίας στα θερμοκήπια η οποία προκαλεί συμπύκνωση των υδρατμών. Μεγάλη σημασία έχει και η χρήση υγιούς πολλαπλασιαστικού υλικού δηλαδή η φύτευση απολύτως υγιών φυταρίων καθώς και η τήρηση καλής υγιεινής με αφαίρεση και καταστροφή προσβεβλημένων φυτών και στελεχών, εξολόθρευση των ζιζανίων που αναπτύσσονται εντός και περιμετρικά της καλλιέργειας και αποστείρωση εργαλείων. Επιπρόσθετα, η χρήση κατάλληλων φίλτρων UV στα θερμοκήπια απορροφά μέρος της υπεριώδους ακτινοβολίας υψηλών μμηκών κύματος και συντελεί σε σημαντική μείωση της παραγωγής σπορίων από το μύκητα. Επίσης, συνιστάται ισορροπημένη λίπανση και επαρκείς ποσότητες ασβεστούχου λίπανσης καθώς αυτή συνδέεται με αύξηση της συνεκτικότητας των κυτταρικών τοιχωμάτων και ως εκ τούτου μείωση της ενζυμικής αποδιοργάνωσης από τον *B. cinerea* (Παππάς, 1992, Παναγόπουλος, 2000, Dik & Wubben, 2007). Τέλος, αρκετές προσπάθειες έχουν γίνει προκειμένου να αναπτυχθούν καλλιεργούμενες ποικιλίες φυτών με αντοχή στο βοτρυτή αλλά πολλές φορές φαίνεται ότι υπάρχουν δυσκολίες και το αποτέλεσμα δεν είναι το επιθυμητό (Williamson et al., 2007).

- Χημικά

Η χημική καταπολέμηση αποτελεί τον αποτελεσματικότερο τρόπο αντιμετώπισης της ασθένειας και στηρίζεται σε επαναλαμβανόμενους προληπτικούς ψεκασμούς με μυκητοκτόνα κατά τη διάρκεια της καλλιεργητικής περιόδου (Βελούκα, 2013). Ειδικά όταν επικρατούν συνθήκες ευνοϊκές για την ανάπτυξη επιδημίας η εφαρμογή μυκητοκτόνων φαίνεται να είναι η μόνη αποτελεσματική μέθοδος για την καταπολέμηση της ασθένειας. Ωστόσο, η εντατικοποίηση των καλλιεργειών με κύριο στόχο την αύξηση της παραγωγής, οδήγησε τον άνθρωπο στη συνεχή και αλόγιστη χρήση φυτοφαρμάκων. Έτσι, η υπολειμματικότητα, η τοξικότητα σε οργανισμούς μη στόχους, οι αρνητικές επιπτώσεις στο περιβάλλον (ρύπανση υδάτων, ατμόσφαιρας, εδάφους), η διατάραξη της οικολογικής ισορροπίας και η ανάπτυξη ανθεκτικών μυκήτων αποτελούν μερικά από τα σοβαρά προβλήματα της χημικής καταπολέμησης. Είναι άλλωστε γνωστό ότι ο μύκητας *Botrytis cinerea* αναπτύσσει γρήγορα ανθεκτικά στελέχη στα μυκητοκτόνα που εφαρμόζονται για την καταπολέμηση του.

- Βιολογικά

Η βιολογική αντιμετώπιση είναι η πιο ακίνδυνη, για τον άνθρωπο και για το περιβάλλον γενικότερα, μέθοδος αντιμετώπισης των ασθενειών η οποία δεν προκαλεί προβλήματα ανθεκτικότητας. Η έρευνα της δράσης βιολογικών παραγόντων κατά του *B. cinerea* οδήγησε στην ανάπτυξη βιολογικών σκευασμάτων ως μεθόδου καταπολέμησης του παθογόνου (Χατζηδημόπουλος, 2014). Το 1993 πήρε έγκριση στην Ελλάδα το πρώτο βιολογικό μυκητοκτόνο που συνιστάται για τη

βιολογική καταπολέμηση του *Botrytis cinerea*. Είναι το Trichodex 20 WP που περιέχει το μύκητα *Trichoderma harzianum* ο οποίος δρα ως τροφικός ανταγωνιστής εναντίον του παθογόνου. Βιολογικοί παράγοντες με δράση κατά του βοτρυτή μπορεί να είναι μύκητες (*Trichoderma harzianum*, *Ulocladium oudemansii*, *Gliocladium roseum*), ζύμες (*Candida oleophila*), ή βακτήρια του γένους *Bacillus* και *Pseudomonas* (Williamson et al., 2007).

1.4 ΒΙΟΛΟΓΙΚΟΙ ΠΑΡΑΓΟΝΤΕΣ ΚΑΙ ΤΟ ΣΤΕΛΕΧΟΣ *BACILLUS VELEZENSIS* K165

1.4.1 Μηχανισμοί δράσης των βιολογικών παραγόντων

- Ανταγωνισμός για θέση και θρεπτικά συστατικά

Ο ανταγωνισμός μεταξύ βιολογικών παραγόντων και παθογόνων είναι γνωστός εδώ και πολλά χρόνια ως μηχανισμός ελέγχου βιολογικής αντιμετώπισης των ασθενειών. Οι βιολογικοί παράγοντες στο έδαφος ανταγωνίζονται τα παθογόνα για διάφορα θρεπτικά στοιχεία και χώρο. Αυτή η αλληλεπίδραση μπορεί τελικά να οδηγήσει σε μείωση της δραστηριότητας του παθογόνου. Το πλέον χαρακτηριστικό παράδειγμα ανταγωνισμού μεταξύ βιολογικών παραγόντων και παθογόνων αποτελεί ο ανταγωνισμός για σίδηρο (Τζάμος, 2007).

- Αντιβίωση

Ο βιολογικός παράγοντας παράγει αντιβιοτικά δηλαδή οργανικές ενώσεις που είναι τοξικές σε άλλους μικροοργανισμούς. Έτσι, μπορούν να μειώνουν ή να αναστέλλουν την ανάπτυξη αυτών. Η παραγωγή των αντιβιοτικών είναι ιδιαίτερα σημαντική για την βιολογική αντιμετώπιση εδαφογενών φυτοπαθογόνων μυκήτων.

- Υπερπαρασιτισμός

Ορισμένοι βιολογικοί παράγοντες έχουν την ικανότητα να εμποδίζουν την εξάπλωση μιας ασθένειας παρασιτώντας τον φυτοπαθογόνο μικροοργανισμό. Έχουν αναφερθεί διάφοροι υπερπαρασιτικοί μύκητες οι οποίοι προσβάλλουν φυτοπαθογόνους μύκητες, όπως για παράδειγμα μύκητες του γένους *Trichoderma* οι οποίοι παρασιτούν διάφορους εδαφογενείς μύκητες (Rey et al., 2001 ; Sivan et al., 1987). Το παράσιτο αναπτύσσεται με διακλαδώσεις των υφών του προς τον ξενιστή μύκητα, περιελίσσεται και προσκολλάται σε αυτόν με κατασκευές, όπως οι πλάκες συγκρατήσεως, οι οποίες και διατρύπουν το μυκήλιο του παθογόνου (Chet et al., 1981 ; Goldman et al., 1994). Η πέψη των κυτταρικών τοιχωμάτων του μύκητα πραγματοποιείται από μια συστοιχία εκκρινόμενων ενζύμων (Τζάμος, 2007).

- Επαγωγή άμυνας

Οι βιολογικοί παράγοντες που χρησιμοποιούνται για την αντιμετώπιση φυτοπαθογόνων μικροοργανισμών διεγείρουν την Επαγόμενη διασυστηματική άμυνα (ISR) των φυτών.

- Συνδυασμός όλων των παραπάνω παραγόντων

1.4.2 Τα Ριζοβακτήρια

Τα ριζοβακτήρια είναι βακτήρια που αποικίζουν την ριζόσφαιρα δηλαδή την περιοχή του εδάφους η οποία επηρεάζεται από το ριζικό σύστημα των φυτών. Περίπου 2-5% των ριζοβακτηρίων, επηρεάζουν θετικά την ανάπτυξη των φυτών και ονομάζονται Ριζοβακτήρια που προάγουν την φυτική ανάπτυξη (Plant Growth Promoting Rhizobacteria, PGPR).

Τα PGPR χρησιμοποιούν μηχανισμούς που είτε έχουν άμεση επίδραση στην ανάπτυξη των φυτών, είτε την προάγουν έμμεσα προστατεύοντας τα φυτά από παθογόνους μικροοργανισμούς, οπότε λειτουργούν ως βιολογικοί παράγοντες (Sraepren et al., 2009). Μερικοί από τους έμμεσους μηχανισμούς που προάγουν την ανάπτυξη των φυτών είναι η παραγωγή αντιβιοτικών, η επαγόμενη διασυστηματική αντοχή και ο ανταγωνισμός με φυτοπαθογόνα για θρεπτικά στοιχεία και θέσεις αποικισμού (Kloerper et al., 2004).

Στελέχη ριζοβακτηρίων που βοηθούν στην ανάπτυξη των φυτών (plant growth promoting rhizobacteria, PGPR), ανήκουν σε πολλά και διαφορετικά γένη βακτηρίων όπως *Azotobacter*, *Bacillus*, *Enterobacter*, *Pseudomonas*, και *Paenibacillus*, εκ των οποίων τα γένη *Bacillus* και *Pseudomonas* αποτελούν τα σημαντικότερα.

Η επαγόμενη διασυστηματική αντοχή προκαλείται από τα ριζοβακτήρια τα οποία αποικίζουν τις ρίζες του φυτού. Ειδικότερα, το φαινόμενο της επαγόμενης διασυστηματικής αντοχής διεγείρεται από βιολογικούς παράγοντες που δραστηριοποιούν λανθάνοντες μηχανισμούς αντοχής, με αποτέλεσμα σημαντικές βιοχημικές αλλαγές μέσα στο φυτό, ώστε να αυξάνουν την αντοχή του και να το προετοιμάζουν σε ενδεχόμενη μόλυνση από ένα δυνητικό παθογόνο (Τζάμος, 2007). Κατά την ISR έχει βρεθεί ότι ενεργοποιούνται στο φυτό μηχανισμοί που έχουν να κάνουν με την ενίσχυση κυτταρικών τοιχωμάτων, την παραγωγή φυτοαλεξινών και τη σύνθεση PR πρωτεϊνών (Hammond-Kosack & Jones, 1996).

1.4.3 Μηχανισμοί δράσης ριζοβακτηρίων

Τα PGPR επιτυγχάνουν φυτική ανάπτυξη χρησιμοποιώντας έναν ή περισσότερους μηχανισμούς δράσης. Οι μηχανισμοί αυτοί έχουν είτε άμεση επίδραση στην ανάπτυξη των φυτών, είτε την προάγουν έμμεσα προστατεύοντας τα φυτά από παθογόνους μικροοργανισμούς.

Συγκεκριμένα διακρίνονται σε:

A. Άμεσοι μηχανισμοί

- Έκκριση φυτοορμονών

Το 80% των PGPR παράγουν ινδολοξικό οξύ IAA (Patten & Glick, 1996 ; Khalid et al. , 2004), το οποίο διεγείρει τον πολλαπλασιασμό των κυττάρων, την εκβλάστηση σπόρων κ.α..Τα PGPR που παράγουν IAA αυξάνουν την συνολική επιφάνεια των ριζών και κατά συνέπεια αυξάνουν την πρόσληψη θρεπτικών στοιχείων. Ορισμένα γένη PGPR παράγουν και άλλες φυτικές ορμόνες όπως κυτοκινίνες (Timmusk et al, 1999) και γιββερελλίνες (Bottini et al., 2004).

- Δέσμευση και παροχή ελεύθερου N₂

Το ατμοσφαιρικό N₂ μετατρέπεται σε μορφή άμεσα αξιοποιήσιμη από τα φυτά μέσω της σταθεροποίησης (biological N₂ fixation-BNF). Το άζωτο μετατρέπεται σε αμμωνία από μικροοργανισμούς που έχουν ένα περίπλοκο ενζυμικό σύμπλοκο γνωστό ως νιτρογενάση (Kim&Rees, 1994). Τα βακτήρια αυτά διακρίνονται σε συμβιωτικά και μη συμβιωτικά.

- Διαλυτοποίηση αδιάλυτων μορφών P στο έδαφος

Παρότι ο P βρίσκεται σε αφθονία στο έδαφος σε αδιάλυτες ανόργανες ή οργανικές μορφές, η διαθεσιμότητα του περιορίζεται καθώς αυτές οι μορφές είναι μη διαθέσιμες για τα φυτά (Sharma, 2013). Τα PGPR μπορούν να μετατρέπουν αυτές τις μη διαθέσιμες μορφές ανόργανου P, καθώς και τις μη διαθέσιμες μορφές οργανικού P, σε διαθέσιμες (Reyes-Castillo, 2019).

- Παραγωγή του ενζύμου ACC απαμινάση (Απαμινάση του 1- αμινοκυκλοπροπανο – 1 – καρβοξυλικού οξέος)

Το ένζυμο είναι υπεύθυνο για την διάσπαση του ACC που αποτελεί την πρόδρομη ουσία για την παραγωγή αιθυλενίου. Έτσι, τα φυτά δεν συσσωρεύουν αιθυλένιο στις ρίζες τους οι οποίες με αυτό τον τρόπο παραμένουν υγιείς (Glick, 2005).

B. Έμμεσοι μηχανισμοί

- Αυξημένη απορρόφηση Fe λόγω παραγωγής σιδηροφόρων

- Επαγωγή ISR

- Παραγωγή αντιβιοτικών

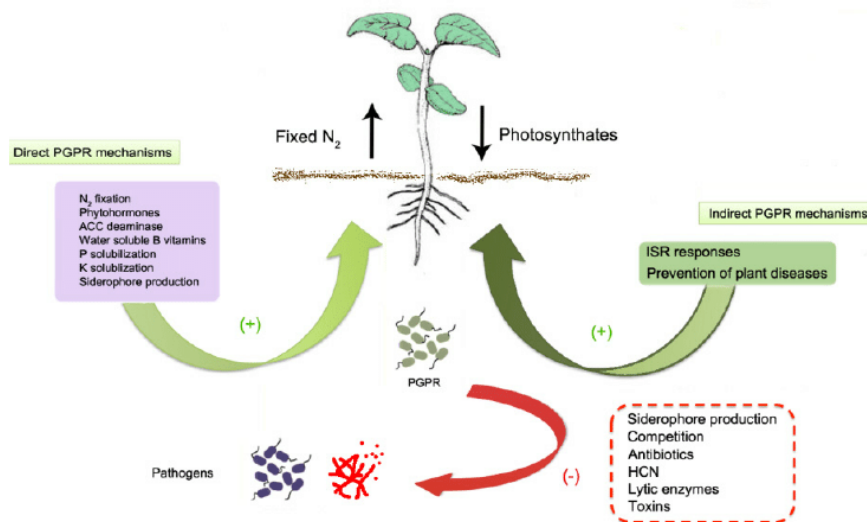
Σε συνθήκες εργαστηρίου πολλά και διαφορετικά είδη αντιβιοτικών που παράγονται από PGPR έχουν δείξει ότι είναι αποτελεσματικά εναντίον φυτοπαθογόνων παραγόντων (Bowen&Rovira, 1999).

- Ανταγωνισμός για χώρο και θρεπτικά

Οι πιο άφθονοι μικροοργανισμοί που προάγουν την ανάπτυξη των φυτών αποικίζουν γρήγορα τις φυτικές επιφάνειες και χρησιμοποιούν τα περισσότερα από τα διαθέσιμα θρεπτικά, κάνοντας δύσκολη την ανάπτυξη των παθογόνων (Robin et al., 2008 ;Friesen et al., 2010 ;Hardoim et al., 2015 ;Hu et al., 2017)

- Παραγωγή λυτικών ενζύμων

Το ένζυμο χιτινάση αποδομεί τη χιτίνη, ένα από τα κύρια συστατικά του κυτταρικού τοιχώματος μυκήτων και εντόμων. Ακόμη, τα ένζυμα β-1,3-γλουκανάση, πρωτεάση και λιπάση μπορούν να οδηγήσουν στη λύση ενός κυττάρου (Glick et al., 2015).



Εικόνα 4: Άμεσοι και έμμεσοι μηχανισμοί δράσης των PGPR

Πηγή: <https://thebiologynotes.com/plant-growth-promoting-rhizobacteria-pgpr/>

1.4.4 Ο βιολογικός παράγοντας *Bacillus velezensis* K165 (*Paenibacillus alvei* K165)

Το γένος *Paenibacillus* το οποίο περιεγράφηκε πρώτα από τους Ash et al. το 1993, είναι φυλογενετικά συγγενές με το γένος *Bacillus*. Υπάρχουν λίγα μόνο φαινοτυπικά χαρακτηριστικά του *Paenibacillus* που τα διαχωρίζουν από το *Bacillus* (Ash et al., 1993).

Το γένος *Bacillus* περιλαμβάνει βακτήρια που χαρακτηρίζονται ως Gram-θετικά, είναι υποχρεωτικά ή προαιρετικά αναερόβια και το σχήμα τους είναι ροπαλοειδές. Επίσης, το γένος παρουσιάζει ταξινομικά και μεταβολικά μια μεγάλη ποικιλομορφία. Η μεγαλύτερη δεξαμενή προέλευσης των ειδών του είναι το έδαφος, απομονώνονται όμως και από υδάτινα οικοσυστήματα, φυτά, έντομα, τρόφιμα.

Το στέλεχος K165 ανήκει στα βακτήρια που προωθούν την ανάπτυξη των φυτών (plant-growth –promoting rhizobacterium PGPR). Συγκεκριμένα, το στέλεχος K165 απομονώθηκε από τους Tjamos et al το 2004 και διαπιστώθηκε ότι είναι ικανό να προστατεύει φυτά μελιτζάνας και πατάτας από το μύκητα *Verticillium dahliae*. Σε άλλη μελέτη επίσης των Tjamos et al. το 2005, αποδείχτηκε ότι το βακτήριο είναι ικανό να επάγει τους μηχανισμούς ISR του φυτού-μοντέλου *Arabidopsis thaliana* εναντίον του ίδιου φυτοπαθογόνου μύκητα μέσω του μονοπατιού του σαλικυλικού οξέος.

1.5 ΕΠΙΔΡΑΣΗ ΤΩΝ ΜΙΚΡΟΒΙΑΚΩΝ ΠΤΗΤΙΚΩΝ ΕΝΩΣΕΣΩΝ ΣΤΑ ΦΥΤΑ

Οι μικροβιακές πτητικές οργανικές ενώσεις (microbial volatile organic compounds - mVOCs) αποτελούν ένα είδος πτητικών οργανικών ενώσεων (VOCs) που παράγονται από όλους τους μικροοργανισμούς ως μέρος του φυσιολογικού τους μεταβολισμού (Kanchiswamy et al., 2015). Ουσιαστικά, αποτελούν ποικίλες ενώσεις που σχηματίζονται από το μεταβολισμό μυκήτων και βακτηρίων (Korpi et al., 2009). Τα mVOCs που παράγονται από βακτήρια και μύκητες είναι υπεύθυνα για το άρωμα τροφίμων όπως των τυριών, κρασιών και γιαουρτιών κ.α. όπως επίσης για τη δυσάρεστη μυρωδιά των τροφίμων σε αποσύνθεση (Veselova et al., 2019).

Οι περισσότερες μικροβιακές πτητικές ενώσεις θεωρούνται προϊόντα του πρωτογενούς και του δευτερογενούς μεταβολισμού που σχηματίζονται κυρίως από την οξείδωση της γλυκόζης (Morath et al., 2012; Schmidt et al., 2015).

Τα mVOCs ανήκουν σε διαφορετικές χημικές κατηγορίες όπως αλκένια, αλκοόλες, κετόνες, βενζινοειδή, πυραζίνες και τερπένια (Schulz and Dickschat, 2007; Lemfack et al., 2014, 2017; Kanchiswamy et al., 2015; Schmidt et al., 2015). Τα προφίλ των πτητικών ενώσεων μελετώνται χρησιμοποιώντας Αέρια χρωματογραφία-Φασματομετρία μάζας (gas chromatography–mass spectrometry/GS-MS), μια μέθοδο που παρέχει επαρκή διαχωρισμό των συστατικών πολύπλοκων μειγμάτων, την ταυτοποίηση και την αξιολόγηση του σχετικού περιεχομένου των συστατικών τους. Το σύνολο των πτητικών ενώσεων που συντίθενται από έναν οργανισμό ή οικοσύστημα ορίζεται στα αγγλικά ως volatilome (Veselova et al., 2019).

Τα τελευταία χρόνια, τα στοιχεία που υποστηρίζουν την άποψη ότι τα φυτά ανταποκρίνονται στα mVOCs έχουν αυξηθεί. Το μεγαλύτερο μέρος της έρευνας που έχει διεξαχθεί μέχρι τώρα, ερευνά την επίδραση των mVOCs στο φυτό-μοντέλο *Arabidopsis thaliana* (Schulz-Bohm et al., 2017).

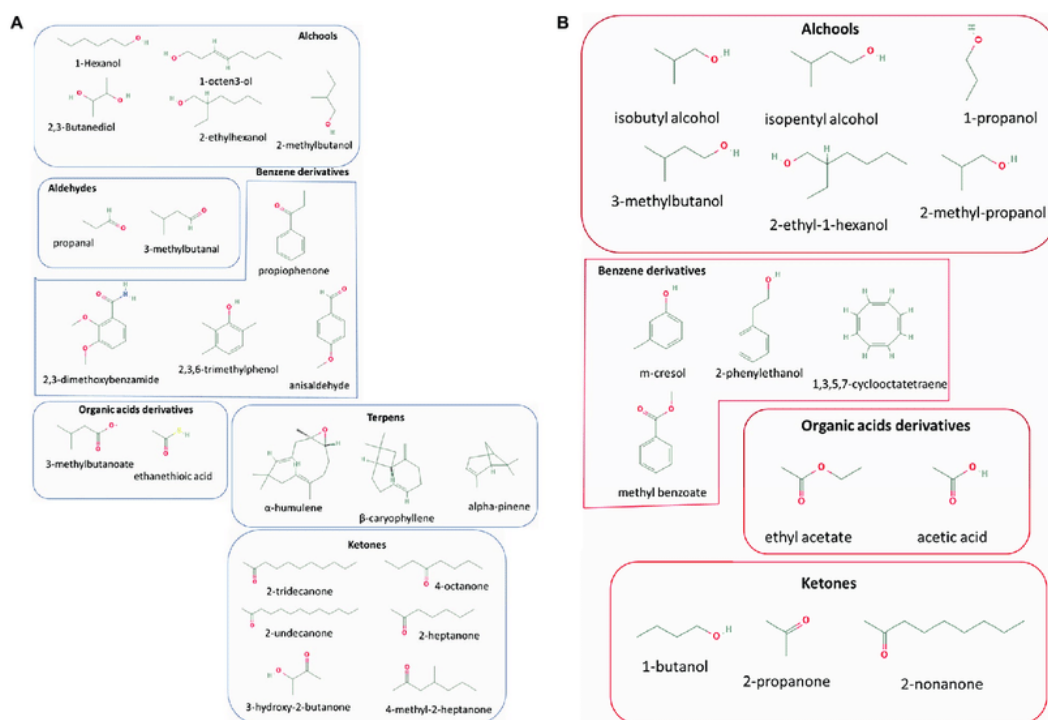
Έχει αποκαλυφθεί ότι χωρίς φυσική επαφή οι μικροοργανισμοί είναι ικανοί να αλλάζουν δραστικά την ανάπτυξη του συστήματος της ρίζας του φυτού, τη φυσιολογία του φυτού, τα ορμονικά μονοπάτια και την παραγωγή βιομάζας (Ryu et al., 2004; Blom et al., 2011; Wenke et al., 2012; Bailly et al., 2014; Bitas et al., 2015; Ditengou et al., 2015; Li et al., 2016; Piechulla et al., 2017). Επίσης, τα mVOCs μπορούν να λειτουργήσουν ως απευθείας πηγές θρεπτικών στοιχείων για τα φυτά (Meldau et al., 2013), να προάγουν την αντοχή σε φυτοπαθογόνα (D'Alessandro et al., 2014; Kottb et al., 2015; Song et al., 2015b; Wintermans et al., 2016), να επηρεάσουν την παραγωγή δευτερογενών μεταβολιτών του φυτού (Santoro et al., 2011), να περιορίζουν άμεσα τα φυτοπαθογόνα (Kai et al., 2009; Garbeva et al., 2014b; De Vrieze et al., 2015; Kottb et al., 2015) και να επηρεάσουν την εδαφική μικροβιοσύνθεση και κατασταλτικότητα (Garbeva et al., 2011; Van Agtmaal et al., 2015).

1.5.1 Οι πτητικές ενώσεις του *Bacillus velezensis* K165

Το βακτηριακό γένος *Bacillus* έχει μελετηθεί για την μεγάλη ικανότητα του να παράγει μεταβολίτες και αντιβιοτικά και αναφέρεται ως ο κύριος τρόπος δράσης εναντίον των παθογόνων (Alvarez et al., 2012; Chen et al., 2009; Romero et al., 2007). Αυτοί οι αέριοι μεταβολίτες συνήθως αναφέρονται ως οργανικές πτητικές ενώσεις (VOCs) και μπορούν να δράσουν άμεσα εναντίον του παθογόνου καταστρέφοντας το κυτταρικό τοίχωμα ή έμμεσα επάγοντας την Επαγόμενη διασυστηματική αντοχή του φυτού (Chen et al., 2008; Zheng et al., 2013).

Σε προηγούμενη μελέτη (Κοκμοτού, 2021), διερευνήθηκε η αποτελεσματικότητα των πτητικών ενώσεων που παράγει ο βιολογικός παράγοντας *Bacillus velezensis* K165 ενάντια του φυτοπαθογόνου μύκητα *B. cinerea* σε φυτά *A. thaliana*.

Τα αποτελέσματα της έδειξαν ότι η εφαρμογή του βιολογικού παράγοντα *B. velezensis* K165, συνέβαλλε στην προστασία του φυτού καθώς μείωσε τα συμπτώματα της ασθένειας σε σχέση με το θετικό μάρτυρα. Επιπρόσθετα, από τη μοριακή ανάλυση που πραγματοποιήθηκε στην ίδια μελέτη, ύστερα από την μόλυνση των φυτών με τον *B. cinerea* οι πτητικές ενώσεις του K165 ενεργοποίησαν την ISR αφού τα γονίδια *PR1*, *PDF1.2* και *VSP2* υπερεκφράστηκαν στην εφαρμογή με το K165 σε σχέση με τον μάρτυρα.



Εικόνα 5: Σημαντικότεροι πτητικοί μεταβολίτες με αντιμικροβιακές ιδιότητες που παράγονται από βακτήρια (A) και από μύκητες (B)

Πηγή:

https://www.researchgate.net/publication/339102374_Scent_of_a_Killer_Microbial_Volatilome_and_Its_Role_in_the_Biological_Control_of_Plant_Pathogens/figures?lo=1

1.5.2 Η πτητική ένωση ακετοΐνη

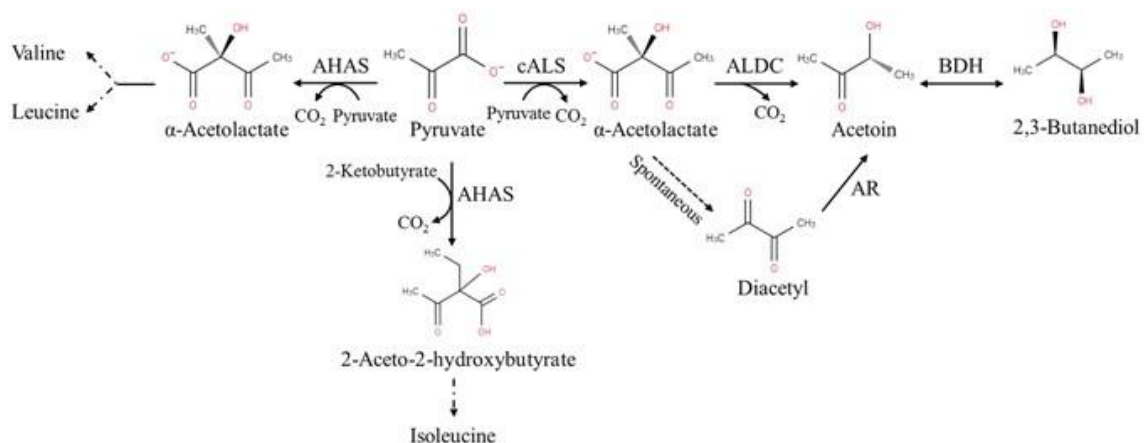
Η ακετοΐνη γνωστή και ως 3-υδρόξυ-,2-βουτανόνη, έχει διάφορες χρήσεις στη βιομηχανία όπως για χημική σύνθεση ετεροκυκλικών ενώσεων, σαν συστατικό ηλεκτρονικών τσιγάρων, στη γεωπονία σαν παράγοντας που προωθεί την ανάπτυξη φυτών και ως επαγωγέας της διασυστηματικής αντοχής καθώς και στη βιομηχανία γαλακτοκομικών σαν πτητική ένωση που προσδίδει άρωμα (Cesselin et al., 2021).

Μπορεί να παραχθεί χημικά ή με μεταβολική μηχανική. Στα βακτήρια, στη σύνθεση της ακετοΐνης εμπλέκεται η οξικογαλακτική συνθάση (ALS) που μετατρέπει το πυρουβικό σε οξικογαλακτικό και μια οξικογαλακτική δεκαρβοξυλάση (Ald) που μετατρέπει το οξυγαλακτικό σε ακετοΐνη (Cesselin et al., 2021).

Η ακετοΐνη μπορεί να μετατραπεί σε 2,3-βουτανεδιόλη με την δεϋδρογονάση της 2,3-βουτανεδιόλης (Bdh) χρησιμοποιώντας NADH σαν συμπράγοντα. Κατά συνέπεια, για συσσώρευση ακετοΐνης παρεμποδίζεται η παραγωγή 2,3-βουτανεδιόλης σε διάφορα βακτήρια μέσω δύο στρατηγικών: διακοπή του ενζύμου δεϋδρογονάσης της 2,3-βουτανεδιόλης (Bdh) και υπερέκφραση της οξειδάσης του NADH (Bae et al., 2016).

Πολλοί μικροοργανισμοί όπως *Bacillus subtilis*, *Bacillus amyloliquefaciens*, *Enterobacter cloacae*, *Serratia marcescens*, και *Paenibacillus polymyxa*, μπορούν να παράξουν ακετοΐνη μέσω αυτών των δύο ενζυμικών βημάτων που προαναφέρθηκαν (Bae et al., 2016). Ειδικότερα ενώ στο βακτήριο *B. subtilis* η ακετοΐνη μειώνεται σε 2,3-BD με το ένζυμο BDH σε άλλα βακτήρια όπως στο *B. licheniformis* το ένζυμο BudC (meso-2,3-BD dehydrogenase) καταλύει τη μετατροπή της ακετοΐνης σε meso-2,3-BD και το GDH (glycerol dehydrogenase) τη μετατροπή της σε D-2,3-BD.

Αρκετές πτητικές ενώσεις που παράγονται από ριζοβακτήρια έχουν αντιβακτηριακές ή αντιμυκητιακές δραστηριότητες (Kai et al., 2009). Συγκεκριμένα, οι πτητικές ενώσεις 2,3-βουτανεδιόλη και ακετοΐνη (3-υδρόξυ-,2-βουτανόνη), που παράγονται από *Bacillus subtilis* και *Bacillus amyloliquefaciens* έχουν αναγνωριστεί ως σημαντικοί παράγοντες στην επαγωγή της Επαγόμενης διασυστηματικής αντοχής και στην προώθηση της αύξησης του φυτού (Ryu et al., 2004).



Εικόνα 6: Σχήμα των αναβολικών και καταβολικών μονοπατιών ξεκινώντας με το πυρουβικό
Πηγή: <https://www.nature.com/articles/s41598-017-04684-8>

1.5.3 Πτητικές ενώσεις μυκήτων

Πρόσφατες μελέτες έχουν αποκαλύψει ότι οργανικές πτητικές ενώσεις που παράγονται από στελέχη μυκήτων της ριζόσφαιρας PGPF (plant growth-promoting fungi) μπορούν αποτελεσματικά να προωθούν την ανάπτυξη των φυτών και να βελτιώνουν την ανθεκτικότητα σε ασθένειες (Naznin et al., 2013) ενώ για την επαγωγή της ISR από PGPF διαμεσολαβούν σήματα SA/JA-ET (Hossain et al., 2007).

Για παράδειγμα, οι πτητικές ενώσεις μεθακρυλικό οξύ (methacrylic acid), οξικό ισοβουτύλιο (isobutyl acetate), 3-Οκτανόνη (3-octanone), m-Κρεσόλη (*m*-cresol) και φαιναιθυλική αλκοόλη (phenyl ethyl alcohol), βρέθηκαν να μειώνουν τη σοβαρότητα της ασθένειας που προκαλεί το βακτήριο *P. syringae* pv. tomato (Pst) DC3000 (Naznin et al., 2014).

Πιο συγκεκριμένα, σύμφωνα με τον Matsumori (1989), ο *B. cinerea* παράγει πτητικές ενώσεις όπως 3-octanol και 1-octen-3-ol. Η 1-Octen-3-ol αποτελεί κυρίαρχη πτητική ένωση που παράγεται από μύκητες που προκαλούν σήψεις (Kishimoto et al., 2007) και σύμφωνα με μελέτη των ίδιων, η 1-Octen-3-ol ενεργοποιεί αμυντικά γονίδια που εξαρτώνται από το μονοπάτι JA/ET και από πληγές και αυξάνει την ανθεκτικότητα εναντίον του *B. cinerea*.

Σύμφωνα με μελέτη των Kamaruzzaman et al. (2019), ταυτοποιήθηκε υπομολυσματικό στέλεχος QT5-19 του μύκητα *Botrytis cinerea* και βρέθηκε ότι μπορεί να παράγει οργανικές πτητικές ενώσεις (VOCs) με υψηλή δραστηριότητα κατά των μυκήτων και υψηλή αποτελεσματικότητα αντιμετώπισης του ίδιου του *B. cinerea*. Συνεπώς, αυτά τα αποτελέσματα προτείνουν ότι το QT5-19 αποτελεί έναν υποσχόμενο βιολογικό παράγοντα κατά του *B. cinerea*.

Επιπρόσθετα, στην πιο πρόσφατη μελέτη των Kamaruzzaman et al. (2021), αποδείχτηκε ότι οι πτητικές ενώσεις του QT5-19 προώθησαν την ανάπτυξη σποροφύτων τομάτας βελτιώνοντας τη φωτοσύνθεση και της τροποποιώντας τη βιοσύνθεση σχετικών φυτοορμόνων σε φυτά τομάτας.

Όσον αφορά τις πτητικές ενώσεις που παράγει το μολυσματικό στέλεχος *B. cinerea* το οποίο και μελετήθηκε στην παρούσα εργασία, δεν φαίνεται να υπάρχουν βιβλιογραφικά στοιχεία σχετικά με το τι είδους πτητικές ενώσεις παράγει ο μύκητας.

1.6 Η ΑΜΥΝΑ ΤΩΝ ΦΥΤΩΝ

Τα φυτά μέσω της μακροχρόνιας συνύπαρξης τους με τους παθογόνους μικροοργανισμούς, έχουν αναπτύξει ένα σχετικά πολύπλοκο ανοσοποιητικό σύστημα το οποίο δομείται σε δύο βασικά επίπεδα (Pieterse et al., 2009).

Πριν την είσοδο ενός παθογόνου στο φυτό προϋπάρχουν ορισμένα φυσικά εμπόδια τα οποία αναφέρονται σαν παθητικοί ή προ-υπάρχοντες μηχανισμοί άμυνας. Ο

παθητικός μηχανισμός άμυνας περιλαμβάνει την ύπαρξη δομών και κατασκευών που λειτουργούν ως φραγμοί καθώς και την παραγωγή χημικών παραγόντων που εμποδίζουν την εξάπλωση των παθογόνων. Η παθητική αυτή άμυνα, παρά τη μεγάλη ποικιλομορφία των αμυντικών μηχανισμών πολλές φορές δε μπορεί να αποτρέψει την είσοδο και εγκατάσταση των παθογόνων (Pieterse et al., 2009).

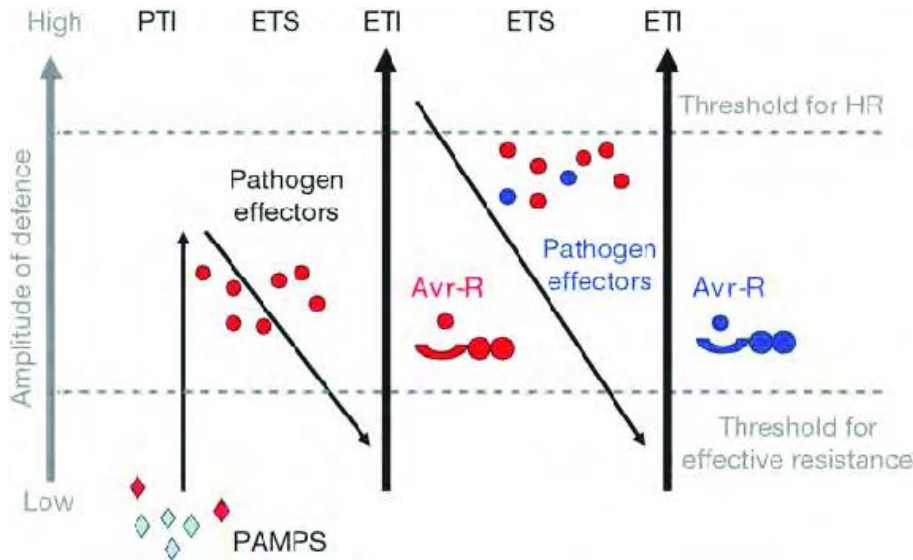
Παράλληλα τα φυτά έχουν τη δυνατότητα να αντιλαμβάνονται τα αρχικά στάδια της προσβολής άμεσα ή έμμεσα και να αντιδρούν με την επαγωγή αμυντικών βιοχημικών αντιδράσεων που αποτελεί τον ενεργητικό μηχανισμό άμυνας.

Ο ενεργητικός μηχανισμός άμυνας ενεργοποιείται μετά την επαφή του παθογόνου και διακρίνεται σε:

- I. Βασικό ανοσοποιητικό (basal innate immune system) το οποίο ενεργοποιείται 10-30min μετά την επαφή του φυτού με το παθογόνο
- II. Ανοσοποιητικό των γονιδίων ανθεκτικότητας (resistance (R) – gene mediated innate immune system) που ενεργοποιείται 2-3h μετά την επαφή και την απελευθέρωση διεγερτών του παθογόνου στο φυτικό κύτταρο (Pieterse et al., 2009)
- III. Επίκτητη και Επαγόμενη διασυστηματική αντοχή δηλαδή στη βιολογική, βιοχημική ή χημική διέγερση λανθανόντων μηχανισμών αντοχής, ώστε ένα φυτό ευπαθές σε ένα συγκεκριμένο σύστημα ξενιστή-παθογόνου να καθίσταται ανθεκτικό στο ίδιο σύστημα (Τζάμος, 2007)

Κατά την πρώτη διέγερση (10-30 λεπτά) ενεργοποιείται η βασική ανθεκτικότητα η οποία είναι γνωστή ως PAMP-triggered immunity (PTI), που αποτελεί την πρώτη ενεργή αντίδραση του φυτού ενάντια στη μικροβιακή προσβολή από τα παθογόνα. Προϋπόθεση αποτελεί η αναγνώριση γενικών διεγερτών ή μοριακών μοτίβων που σχετίζονται με το παθογόνο (PAMPs-pathogen-associated molecular patterns) απο τις διακυτταρικές πρωτεΐνες υποδοχής αναγνώρισης (PRRs-pattern recognition receptors). Οι διεγέρτες διακρίνονται σε γενικούς, οι οποίοι διεγείρουν το βασικό ανοσοποιητικό σύστημα σε ξενιστές ή μη ξενιστές, και σε εξειδικευμένους, οι οποίοι οδηγούν σε ανάπτυξη αντοχής αποκλειστικά και μόνο σε φυτά ξενιστές μέσω του ανοσοποιητικού συστήματος γονιδίων ανθεκτικότητας (Pieterse et al., 2009).

Στην συνέχεια, το παθογόνο παράγει ειδικούς διεγέρτες-τελεστές από γόνους αμολυσματικότητας (Avr) οι οποίοι συνεισφέρουν στην μολυσματικότητα του παθογόνου και μπορούν να καταστείλουν την PTI. Στην τρίτη φάση, οι γόνι ανθεκτικότητας (R genes) παράγουν ειδικές πρωτεΐνες (τελεστές) οι οποίες αναγνωρίζουν αυτούς τους ειδικούς διεγέρτες αμολυσματικότητας (Avr) και μέσω των κατάλληλων σημάτων ενεργοποιείται το εγγενές αμυντικό σύστημα-effector triggered immunity (ETI) των φυτών. Έτσι, οι γόνι αμολυσματικότητας καθιστούν μια συγκεκριμένη φυλή του παθογόνου μη μολυσματική στον συγκεκριμένο ξενιστή που φέρει τον αντίστοιχο R γόνο. Η ETI οδηγεί συχνά σε αντίδραση υπερευαισθησίας στο σημείο προσβολής (Wu et al., 2014).



Εικόνα 7: Το ζιγκ-ζαγκ μοντέλο απεικονίζει το αποτέλεσμα την άμυνας του φυτού με ποσοτικό τρόπο. Το συνολικό εύρος της ανθεκτικότητας ή της ευαισθησίας είναι ανάλογο του PTI-ETS+ETI (Jones et al., 2006)

Πηγή: The zig-zag plant defense model [9]. | Download Scientific Diagram (researchgate.net)

1.6.1 Επαγόμενη & Επίκτητη διασυστηματική αντοχή (ανοσοποίηση)

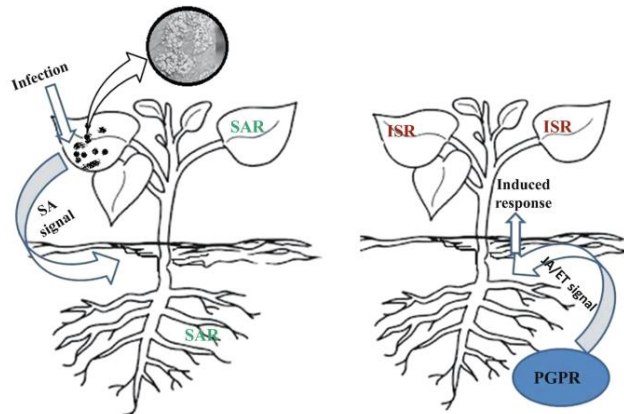
Επίκτητη ή επαγόμενη αντοχή είναι η βιολογική, βιοχημική ή χημική διέγερση λανθανόντων μηχανισμών αντοχής, ώστε ένα φυτό ευπαθές σε ένα συγκεκριμένο σύστημα ξενιστή-παθογόνου να καθίσταται ανθεκτικό στο ίδιο σύστημα (Τζάμος, 2007). Συνεπώς, πρόκειται για ανοσοποίηση των φυτών κατά των ασθενειών που προκαλούνται από μύκητες, βακτήρια ή ιούς με διέγερση λανθανόντων μηχανισμών αντοχής.

Αυτή η μορφή προστασίας διαχωρίζεται σε:

- Επίκτητη διασυστηματική αντοχή (Systemic Acquired Resistance/SAR): στην περίπτωση που η ενεργοποίηση γίνεται κατόπιν μόλυνσεως του ξενιστή με ένα παθογόνο. Μπορεί να οδηγήσει σε σχηματισμό νεκρωτικού ιστού ως αποτέλεσμα της Αντίδρασης Υπερευαισθησίας. Συνήθως εκφράζονται πρωτεΐνες παθογένεσης ενώ το σαλικυλικό οξύ φαίνεται να έχει σημαντικό ρόλο.
- Επαγόμενη διασυστηματική αντοχή (Induced Systemic Resistance/ISR): η οποία επιτυγχάνεται με βιολογικούς παράγοντες που δεν προκαλούν τοπική νέκρωση και πιο συγκεκριμένα από ριζοβακτήρια (PGPR) που αποικίζουν τις ρίζες του φυτού. Θεωρείται ότι ενεργοποιείται μέσω του ιασμονικού οξέος ενώ απαραίτητη είναι η παρουσία αιθυλενίου και της πρωτεΐνης *nrp1* η οποία είναι απαραίτητη και κατά την SAR. Μπορεί να έχει τοπική ή διασυστηματική μορφή (Van Loon, 2000).

Επιπλέον, μπορεί να είναι:

- Τοπικού χαρακτήρα ανοχή: εκφράζεται μόνο στο σημείο εισβολής του παθογόνου στο φυτό με νέκρωση των ιστών και σχετίζεται με την ΑΥ.
- Διασυστηματικού χαρακτήρα ανοχή: οι αμυντικοί μηχανισμοί του φυτού εκφράζονται και μακράν του σημείου διέγερσης



Εικόνα 8 : Επαγόμενη και Επίκτητη διασυστηματική ανοχή

Πηγή: https://link.springer.com/chapter/10.1007/978-3-030-41870-0_20

Παράγοντες διέγερσης της ανοσοποίησης των φυτών

Η διέγερση λανθανόντων μηχανισμών ανοχής, έχει διαπιστωθεί ότι μπορεί να προκληθεί από τους εξής παράγοντες (Τζάμος, 2007):

- Μη συμβατές φυλές παθογόνων μικροοργανισμών
- Μη παθογόνα στελέχη παθογόνων μικροοργανισμών
- Μη παθογόνοι μικροοργανισμοί (σαπρόφυτα), π.χ. ριζοσφαιρικά βακτήρια (κυρίως *Pseudomonas* & *Bacillus*)
- Παράγοντες αβιοτικής καταπόνησης (π.χ. ξηρασία και έλλειψη θρεπτικών στοιχείων)
- Χημικές ενώσεις (φυσικές οργανικές ενώσεις, συνθετικές οργανικές ενώσεις ή ανόργανες ενώσεις).

Σήμα ανοσοποίησης φυτών

Η διέγερση λανθανόντων μηχανισμών ανοχής πέρα της μόλυνσης προϋποθέτει βιοχημικώς τη δραστηριοποίηση ή παραγωγή χημικών παραγόντων που αποτελούν το σήμα. Αυτό ουσιαστικά αποτελεί τον καθοριστικό βιοχημικό παράγοντα της ανοσοποίησης. Στην περίπτωση βιολογικής διέγερσης το σήμα παράγεται με την

εμφάνιση νεκρωτικών κηλίδων, μετακινείται ταχέως και συνεχώς στα υπόλοιπα μέρη του φυτού μέσω των αγγείων διεγείροντας έτσι το φαινόμενο της ανοσοποίησης. Καθώς το σήμα παράγεται και μετακινείται όλο και περισσότερο, το επίπεδο της προστασίας αυξάνει. Το μέγιστο της προστασίας επιτυγχάνεται όταν έχουν πια κορεστεί όλοι οι υποδοχείς του σήματος (Τζάμος, 2007).

Βιοχημικές ενώσεις ως επαγωγείς SAR & ISR

Η αμυντική ανταπόκριση του φυτού κατά την επαγόμενη ανθεκτικότητα ρυθμίζεται από ένα δίκτυο αλληλοεπιδρώντων μονοπατιών μεταγωγής σήματος στα οποία το σαλικυλικό οξύ, το ιασμονικό οξύ και το αιθυλένιο διαδραματίζουν κεντρικό ρόλο (Pieterse and Van Loon 1999, Thomma and Penninckx 2001, Glazebrook 2001). Το σαλικυλικό οξύ θεωρείται ότι συμμετέχει σε μηχανισμούς προγραμματισμένου θανάτου των κυττάρων (apoptosis), ο οποίος οδηγεί σε καταστροφή των μολυσμένων κυττάρων και κατά συνέπεια περιορισμό των υποχρεωτικών παθογόνων. Αντίθετα τα σαπροφυτικά παθογόνα, καθώς και φυτοφάγα έντομα, αντιμετωπίζονται από τα φυτά με μηχανισμούς άμυνας που εξαρτώνται από το αιθυλένιο και το ιασμονικό οξύ.

I. Σαλικυλικό οξύ (SA)

Το σαλικυλικό οξύ παίζει κρίσιμο ρόλο στην άμυνα των φυτών και γενικά εμπλέκεται στην ενεργοποίηση της άμυνας εναντίον βιοτροφικών και ημιβιοτροφικών παθογόνων καθώς και στην ενεργοποίηση της επίκτητης διασυστηματικής ανοχής (Grant & Lamb, 2006). Παράγεται στους χλωροπλάστες μέσω του μεταβολισμού των φαινυλοπροπανοειδών και δρα τοπικά και διασυστηματικά. Βάση φυσικοχημικών ιδιοτήτων του είναι ιδανικό για τη μεταφορά του μέσα στον ηθμό και θεωρείται ότι κατέχει καίριο ρόλο στη διάχυση και στη μεταφορά του σήματος μετά τη μόλυνση από το παθογόνο. Αν και το SA απαιτείται για την SAR δεν αποτελεί τη μεταφερόμενη ουσία ως σήμα. Επίσης, θεωρείται ότι το σαλικυλικό οξύ είναι διεγέρτης της συσσώρευσης των πρωτεϊνών σχετικών με τη παθογένεση (PR proteins). Εξωγενής εφαρμογή σαλικυλικού οξέος φαίνεται να επάγει την σύνθεση PR πρωτεϊνών, κυρίως στη θέση εφαρμογής, εν αντιθέσει με τα παθογόνα που επάγουν τη σύνθεση πρωτεϊνών παθογενέσεως διασυστηματικά (Τζάμος, 2007).

II. Ιασμονικό οξύ (JA)

Το ιασμονικό οξύ όπως και ο μεθυλιωμένος εστέρας του, παράγονται από το λινολενικό οξύ. Ανήκουν στις κυκλοπεντανόνες και υπάρχουν σε όλα τα φυτά. Σύνθεση ιασμονικού οξέος προκαλείται από τραυματισμούς, παθογόνα και φυτοφάγα έντομα. Γενικά, τα έντομα και τα νεκροτροφικά παθογόνα (π.χ. *Botrytis*

cinerea) προκαλούν τη παραγωγή ιασμονικού οξέος, ενώ τα βιοτροφικά παθογόνα προκαλούν τη παραγωγή σαλικυλικού οξέος. Σε μικρές ποσότητες επάγουν πρωτεϊνικούς παρεμποδιστές, ένα σουλφιδριλικό παρεμποδιστή πρωτεΐναςών και διάφορα ένζυμα, που εμπλέκονται στους μηχανισμούς άμυνας του φυτού. Έτσι, φαίνεται να δρα ως δευτερογενής επαγωγέας της ανοσοποίησης (Τζάμος, 2007).

III. Αιθυλένιο (ET)

Το αιθυλένιο είναι μια πτητική ορμόνη, η οποία επηρεάζει το ρυθμό ανάπτυξης των φυτών καθώς επίσης και τη γήρανση. Σε ασθενή φυτά παράγεται όταν το παθογόνο διεισδύει στο φυτικό ιστό ενώ μπορεί να παραχθεί και με εφαρμογή ουσιών που διεγείρουν μηχανισμούς αμύνης. Όπως το ιασμονικό οξύ, έτσι και το αιθυλένιο σχετίζεται συνήθως με την άμυνα ενάντια σε νεκροτροφικά παθογόνα και φυτοφάγα έντομα. Η παρουσία του αιθυλενίου στο φυτό προκαλεί δομικές αλλαγές που αυξάνουν την αντοχή του κυτταρικού του τοιχώματος όπως εναπόθεση λιγνίνης. Τα παραπάνω δεδομένα επιβεβαιώνουν ότι το αιθυλένιο αποτελεί σήμα για την επαγωγή της ανοσοποίησης χωρίς όμως να αποτελεί την ουσία διεγέρσεως των λανθανόντων μηχανισμών άμυνας στα φυτά (Τζάμος, 2007).

1.7 ΤΑ ΓΟΝΙΔΙΑ *PR1*, *PIN2*, *PDF1.2* ΚΑΙ *VSP2*

Η έκφραση του γονιδίου *PATHOGENESIS-RELATED GENE 1/PR-1* σε φυτά τομάτας και *Arabidopsis thaliana* επάγεται σαν αντίδραση του φυτού ύστερα από μόλυνση από διάφορα παθογόνα τόσο τοπικά όσο και διασυστηματικά. Η έκφραση του γονιδίου αυτού είναι άμεσα συνδεδεμένη με το SA και γι'αυτό το λόγο χρησιμοποιείται συχνά ως δείκτης της επαγωγής της SAR μέσω του SA (Ryals et al., 1996). Κατά συνέπεια, η υπερέκφραση του είναι δείκτης της ενεργοποίησης του μηχανισμού άμυνας που εξαρτάται από το σαλικυλικό οξύ (Feys et al., 2000; Schenk et al., 2000).

Τα φυτά τομάτας αντιδρούν σε επίθεση από έντομα και σε συνθήκες αβιοτικής καταπόνησης όπως μετά από πληγές αυξάνοντας γρήγορα τα επίπεδα μεταγραφής των *PROTEINASE INHIBITORS 1 (PIN1)* και *2 (PIN2)*, σε γειτονικούς ιστούς και καθώς και σε μακρινούς από το σημείο τραυματισμού (Stankovic et al., 1996). Όσον αφορά το γονίδιο *PIN2*, είναι γνωστό ότι ενεργοποιείται μέσω του μονοπατιού του JA/ET.

Στα φυτά *Arabidopsis thaliana*, υπάρχουν δύο ξεχωριστά τμήματα του μονοπατιού του JA, που έχει αποδειχτεί ότι ανταγωνίζεται το ένα το άλλο. Το τμήμα ERF (Ethylene Response Factor) και το τμήμα MYC τα οποία ρυθμίζονται από το ET και το ABA αντίστοιχα (Hickman et al., 2017; Pieterse et al., 2012; Robert-μ Seilaniantz et al., 2011). Το τμήμα ERF του μονοπατιού του JA ενεργοποιείται ύστερα από τη μόλυνση με νεκροτροφικά παθογόνα και η επαγωγή του έχει ως αποτέλεσμα την ενεργοποίηση ενός μεγάλου μέρους γονιδίων όπως το *PLANT DEFENSIN1.2/PDF1.2*

(Lorenzo et al., 2003, Penninckx, Thomma, Buchala, Métraux, & Broekaert, 1998). Το τμήμα MYC ενεργοποιείται μετά το τραυματισμό ή ως αποτέλεσμα της επίθεσης φυτοφάγων εντόμων, ενώ η επαγωγή του οδηγεί σε έκφραση γονιδίων όπως των *VEGETATIVE STORAGE PROTEIN VSP1* και *VSP2* (Anderson et al., 2004; Lorenzo et al., 2004).

1.8 ΣΚΟΠΟΣ ΤΗΣ ΕΡΓΑΣΙΑΣ

Ο μύκητας *B. cinerea* αποτελεί ένα ευρύτατα διαδεδομένο παθογόνο με μεγάλο φάσμα ξενιστών. Οι σημαντικές αρνητικές επιπτώσεις του στη φυτική παραγωγή σε συνδιασμό με το γεγονός ότι αναπτύσσει ανθεκτικότητα στα χημικά σκευάσματα έχει οδηγήσει στην επιτακτική ανάγκη εύρεσης αποτελεσματικών μικροοργανισμών για την αντιμετώπιση του. Έτσι, στα πλαίσια της παρούσας μεταπτυχιακής διατριβής αξιολογήθηκε η επίδραση της έκθεσης σπόρων τομάτας και *A. thaliana*, σε πτητικές ενώσεις του στελέχους *B. velezensis* K165, της ακετοΐνης και του μύκητα *B. cinerea*, στην άμυνα εναντίον του μύκητα *B. cinerea*.

2. ΥΛΙΚΑ ΚΑΙ ΜΕΘΟΔΟΙ

2.1 ΦΥΤΙΚΟ ΥΛΙΚΟ

Σαν φυτικό υλικό για το πείραμα της παρούσας μεταπτυχιακής διατριβής, χρησιμοποιήθηκε το φυτό *Arabidopsis thaliana* οικότυπος Columbia (Col-0) και φυτά τομάτας (τομάτα μεγαλόκαρπη / Tomato Ace 55 VF). Η αποθήκευση των σπόρων των φυτών αυτών γίνεται σε θερμοκρασία 4°C.

Για την απόκτηση φυτών *A. thaliana*, αρχικά, πραγματοποιήθηκε σπορά σε εδαφικό υπόστρωμα και τοποθέτηση στους 6°C για 4 ημέρες και στην συνέχεια, οι συνθήκες ανάπτυξης των φυτών ήταν 23°C σε συνθήκες θερμοκηπίου. Στην περίπτωση της τομάτας πραγματοποιήθηκε απευθείας σπορά στο θερμοκήπιο και ακολούθησε η ανάπτυξη των φυτών κάτω από τις ίδιες συνθήκες με τα φυτά *A. thaliana*.

2.2 ΜΙΚΡΟΒΙΟΛΟΓΙΚΟ ΥΛΙΚΟ

Στην παρούσα μελέτη χρησιμοποιήθηκαν σαν βιολογικό υλικό οι μικροοργανισμοί:

- *Bacillus velezensis* K165
- *Botrytis cinerea*

Το μικροβιακό υλικό που χρησιμοποιήθηκε προερχόταν από τη συλλογή του Εργαστηρίου Φυτοπαθολογίας του Γ.Π.Α. Συγκεκριμένα, ο μύκητας υπήρχε αναπτυγμένος σε τρυβλία Petri με υπόστρωμα PDA, στους 4°C και οι απομονώσεις του στελέχους K165 βρίσκονταν σε σωλήνες Eppendorf μέσα σε 20% γλυκερόλη, σε θερμοκρασία -80°C.

2.3 ΘΡΕΠΤΙΚΑ ΥΛΙΚΑ

Soil Extract Agar (SEA)

Υλικά για 1L SEA:	Ποσότητες:
Χώμα	300gr
Απιονισμένο H ₂ O	1000ml
NaOH (50 mM)	1,2gr
Άγαρ	15gr

Potato Dextrose Agar (PDA)

Υλικά για 1L PDA	Ποσότητες:
Potato Dextrose Agar	39gr
Απιονισμένο H ₂ O	1L

Nutrient broth and Glycerol (NG)

Υλικά για 1L NG:	Ποσότητες:
Απιονισμένο H ₂ O	1 L
Nutrient broth (θρεπτικός ζωμός)	8 gr
Glycerol	20 gr

Για όλα τα θρεπτικά υλικά, ακολούθησε αποστείρωση στους 120°C σε υγρό κλίβανο, με πίεση 1atm για 20 λεπτά της ώρας.

2.4 ΠΡΟΕΤΟΙΜΑΣΙΑ ΤΟΥ ΒΙΟΛΟΓΙΚΟΥ ΠΑΡΑΓΟΝΤΑ *B. VELEZENSIS* K165

Ο σωλήνας που περιείχε τις απομονώσεις του βακτηρίου μεταφέρθηκε στον θάλαμο σταθερής νηματικής ροής έτσι ώστε όλες οι ενέργειες να πραγματοποιηθούν υπό ασηπτικές συνθήκες. Η μεταφορά του K165 έγινε από τους -80° C σε τρυβλία Petri με υλικό PDA, με την μέθοδο της γραμμικής διασποράς χρησιμοποιώντας βακτηριολογικό κρίκο, υπό ασηπτικές συνθήκες. Η καλλιέργεια των βακτηρίων πραγματοποιήθηκε σε σκοτεινό επωαστικό θάλαμο με σταθερή θερμοκρασία 28°C για 2 ημέρες. Από την καλλιέργεια διατήρησης τους σε τρυβλία Petri με PDA, μεταφέρθηκε μάζα βακτηριακών κυττάρων (σύροντας τον βακτηριολογικό κρίκο επάνω στην βακτηριακή αποικία) σε φιάλη χωρητικότητας 250ml που περιείχε 100ml NG. Ύστερα η φιάλη τοποθετήθηκε σε περιστροφικό επωαστικό θάλαμο στους 28°C και στις 140r.p.m. για 1 ημέρα.

2.5 ΠΡΟΕΤΟΙΜΑΣΙΑ ΑΚΕΤΟΪΝΗΣ

Για την προετοιμασία ακετοΐνης συγκέντρωσης 400ppm, σε κωνική φιάλη τοποθετούμε 0,4gr ακετοΐνης σε 1L δις απεσταγμένου και αποστειρωμένου νερού (ddH₂O). Καλύπτουμε το στόμιο της κωνικής με parafilm και τοποθετούμε την κωνική στον περιστροφικό επωαστικό θάλαμο για 15-30min.

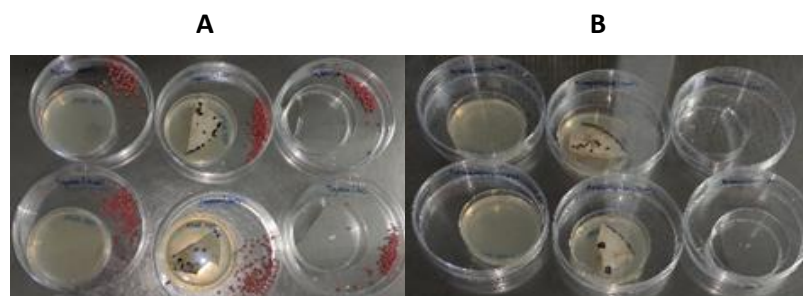
2.7 ΚΑΛΛΙΕΡΓΕΙΑ ΚΑΙ ΑΝΑΠΤΥΞΗ ΤΟΥ ΜΥΚΗΤΑ *B. CINEREA*

Ο μύκητας *B. cinerea* υπήρχε ήδη αναπτυγμένος σε τρυβλία Petri με υπόστρωμα PDA, στο ψυγείο στους 4°C. Τα τρυβλία που περιείχαν τον μύκητα μεταφέρθηκαν στον θάλαμο σταθερής νηματικής ροής και υπό ασηπτικές συνθήκες, πραγματοποιήθηκε η μεταφορά του μύκητα σε τρυβλία Petri με υλικό PDA, με τη χρήση νυστεριού. Η καλλιέργεια του φυτοπαθογόνου μύκητα πραγματοποιήθηκε σε σκοτεινό επωαστικό θάλαμο με σταθερή θερμοκρασία 28°C για 7 ημέρες. Τέλος, με την χρήση κυτταρόμετρου στο μικροσκόπιο μετρήσαμε τα σπόρια του μύκητα.

2.8 ΠΕΙΡΑΜΑ ΠΑΘΟΓΕΝΕΙΑΣ

2.8.1 Έκθεση σπόρων στις πτητικές ενώσεις

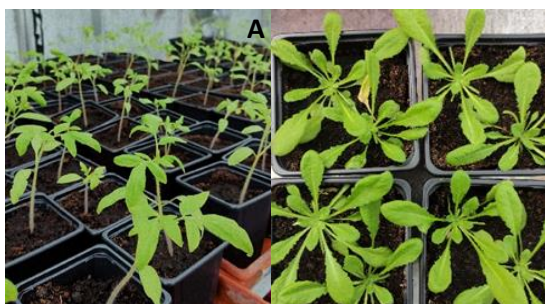
Το πρώτο στάδιο του πειράματος παθογένειας είναι η έκθεση των σπόρων στους υποψήφιους βιολογικούς παράγοντες. Έτσι, ύστερα από την προετοιμασία του βιολογικού παράγοντα *B. velezensis* K165, της ακετοΐνης και του *B. cinerea*, η οποία περιεγράφηκε παραπάνω, ακολούθησε η έκθεση των σπόρων τομάτας και *A. thaliana* στις πτητικές ενώσεις αυτών. Για την εφαρμογή με το K165, σε τρυβλία Petri διαμέτρου 5cm με υπόστρωμα PDA τοποθετήθηκαν 500μl NG (το οποίο περιείχε το βακτήριο). Στην περίπτωση του μύκητα *B. cinerea*, από ήδη ανεπτυγμένα τρυβλία με τον μύκητα, μεταφέραμε τμήμα της αποικίας σε PDA του τρυβλίου διαμέτρου 5 cm. Τέλος, για την ακετοΐνη τοποθετήθηκε 1,5ml διαλύματος ακετοΐνης συγκέντρωσης 400ppm σε τρυβλίο των 5 cm. Τα τρυβλία διαμέτρου 5 cm τοποθετήθηκαν σε τρυβλία Petri διαμέτρου 9 cm που είχαν μέσα τους σπόρους τομάτας/*A. thaliana*, με τρόπο που εξασφαλίζει ότι αποφεύγεται η επαφή του εσωτερικού του κάθε τρυβλίου με τους σπόρους. Τα τρυβλία με διάμετρο 9 cm στεγανοποιήθηκαν με parafilm και αποθηκεύτηκαν σε συνθήκες δωματίου. Στις εφαρμογές K165 και ακετοΐνη οι σπόροι εκτέθηκαν στις πτητικές ενώσεις για 2 ημέρες ενώ στην εφαρμογή με το μύκητα *B. cinerea* οι σπόροι παρέμειναν για 5-6 ημέρες.



Εικόνα 9: Έκθεση σπορών τομάτας (A) και *A. thaliana* (B) στις πτητικές ενώσεις

Πηγή: Φωτογραφικό υλικό Κοκμοτού Κατερίνα

2.8.2 Σπορά και ανάπτυξη φυτών



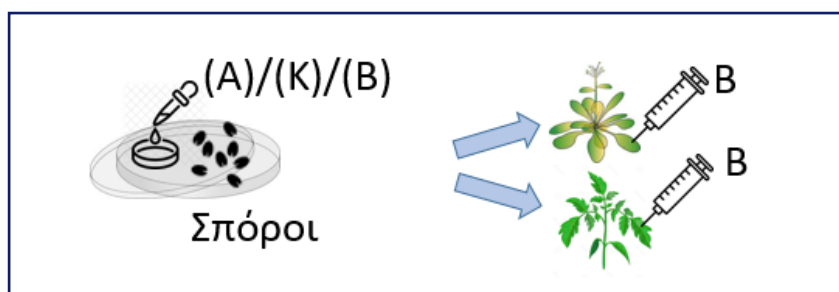
Εικόνα 10: Ανάπτυξη φυτών τομάτας (A) και *A. thaliana* (B) σε συνθήκες θερμοκηπίου

Πηγή: Φωτογραφικό υλικό Κοκμοτού Κατερίνα

Ακολουθεί σπορά των σπόρων τομάτας και *A. thaliana* που έχουν εκτεθεί στις διάφορες πτητικές ενώσεις καθώς και όσων δεν έχουν εκτεθεί οι οποίοι αποτελούν τους μάρτυρες. Η σπορά γίνεται στο θερμοκήπιο σε γλαστράκια με φυτόχωμα. Τα φυτά αναπτύσσονται σε συνθήκες θερμοκηπίου όπου και παραμένουν μέχρι το τέλος του πειράματος.

2.8.3 Μόλυνση φυτών με τον μύκητα *B. cinerea*

Στην περίπτωση της τομάτας, η μόλυνση των φυτών έγινε 27 ημέρες μετά τη μεταφύτευση ενώ στα φυτά *A. thaliana* στις 17 ημέρες. Στην τομάτα επιλέχθηκαν για μόλυνση η μια από τις δύο κοτυληδόνες και το ένα πραγματικό φύλλο. Όσον αφορά στα φυτά *A. thaliana*, έγινε επιλογή 2 φύλλων τα οποία μαρκαρίστηκαν πριν την μόλυνση. Στα μαρκαρισμένα φύλλα του κάθε φυτού προηγήθηκε ελαφρύ τρίψιμο με το χέρι για την δημιουργία πληγών εισόδου και έπειτα χρησιμοποιώντας πιπέτα εφαρμόζαμε 20μl του μύκητα *B. cinerea* (10^5 σπόρια / ml).



Εικόνα 11: Σχηματική απεικόνιση πειράματος παθογένειας

Πηγή: Κοκμοτού Κατερίνα

Έτσι οι εφαρμογές που προκύπτουν είναι οι εξής:

I. Τομάτα:

- Αρνητικοί μάρτυρες - Mock
- Θετικοί μάρτυρες με *B. cinerea* - B
- Έκθεση στην ακετοΐνη - (A)
- Έκθεση στο *B. velezensis* K165 - (K)
- Έκθεση στον *B. cinerea* - (B)

- Έκθεση στην ακετοΐνη + *B. cinerea* - (A)+B
- Έκθεση στο *B. velezensis* K165 + *B. cinerea* - (K)+B
- Έκθεση στον *B. cinerea* + *B. cinerea* - (B)+B

II. *A. thaliana*:

- Αρνητικοί μάρτυρες - Mock
- Θετικοί μάρτυρες με *B. cinerea* - B
- Έκθεση στην ακετοΐνη - (A)
- Έκθεση στο *B. velezensis* K165- (K)
- Έκθεση στον *B. cinerea* - (B)
- Έκθεση στην ακετοΐνη + *B. cinerea* - (A)+B
- Έκθεση στο *B. velezensis* K165 + *B. cinerea* - (K)+B
- Έκθεση στον *B. cinerea* + *B. cinerea* - (B)+B

2.8.4 Παρατήρηση συμπτωμάτων και δειγματοληψία

Η παρατήρηση συμπτωμάτων στην τομάτα έγινε στις 5 ημέρες μετά την μόλυνση (5dpi) ενώ στο φυτό *A. thaliana* στις 3 ημέρες (3dpi). Και στις δύο περιπτώσεις φυτών πραγματοποιήθηκε δειγματοληψία φύλλων 1 και 3 ημέρες μετά την μόλυνση (1dpi, 3dpi). Η δειγματοληψία φύλλων έγινε για την κάθε εφαρμογή και ειδικότερα, σε όσες εφαρμογές είχαν μολυνθεί με τον *B. cinerea* πήραμε δείγματα από μολυσμένα και μη φύλλα. Ύστερα, τα δείγματα τοποθετήθηκαν σε υγρό άζωτο, μεταφέρθηκαν από το θερμοκήπιο στο εργαστήριο και αποθηκεύτηκαν στους -80°C , για να ακολουθήσει μελέτη έκφρασης γονιδίων που σχετίζονται με την άμυνα.

2.9 ΜΕΛΕΤΗ ΕΚΦΡΑΣΗΣ ΓΟΝΙΔΙΩΝ

2.9.1 Απομόνωση RNA φυτών

Για την απομόνωση RNA τόσο σε φυτά *A. thaliana* όσο και σε φυτά τομάτας ακολουθήθηκε πρωτόκολλο με τα εξής βήματα:

- Αρχικά, τα φύλλα που κόπηκαν από την κάθε επέμβαση, κονιορτοποιήθηκαν με τη χρήση υγρού αζώτου σε ιγδία
- Στη συνέχεια 80-100mg κονιορτοποιημένου φυτικού ιστού τοποθετήθηκαν σε πλαστικό σωλήνα Eppendorf 1,5ml
- Στο κάθε tube τοποθετήθηκαν 400μl διαλύματος λύσης κυττάρων (cell lysis solution)
- Ακολουθεί χρήση vortex για 2-3min
- Επώαση για 5min σε θερμοκρασία δωματίου κάνοντας ανάμειξη με αναστροφή των tubes

- Προσθήκη 100μl διαλύματος καθίζησης πρωτεϊνών και DNA (protein-DNA precipitation solution)
- Επώαση για 10min στον πάγο σε θερμοκρασία 4°C
- Έπειτα, γίνεται φυγοκέντρηση για 20min σε ταχύτητα 14000rpm σε ψυχόμενη φυγόκεντρο σε θερμοκρασία 4°C
- Μεταφέρονται 300μl από το υπερκείμενο σε νέα tubes ενώ εάν υπάρχουν τυχόν υπολείμματα ύστερα από την μεταφορά, επαναλαμβάνουμε την φυγοκέντρηση για 5min και μεταφέρουμε ξανά σε νέα tubes
- Ακολουθεί προσθήκη ίδιου όγκου δηλαδή 300μl ισοπροπανόλης για την κατακρήμνιση του RNA και αναστροφή των tubes
- Επώαση σε πάγο για 10min
- Επαναλαμβάνεται φυγοκέντρηση για 10min σε ταχύτητα 14000rpm σε θερμοκρασία 4°C
- Στη συνέχεια απομακρύνεται το υπερκείμενο
- Προσθήκη 300μl αιθανόλης 70% για καθαρισμό του ιζήματος
- Φυγοκέντρηση σε 16000rpm για 1min
- Αφαιρούμε το υπερκείμενο
- Πραγματοποιείται επαναιώρηση του ιζήματος με προσθήκη 25μl α.α H₂O
- Τέλος, γίνεται προσδιορισμός της συγκέντρωσης RNA χρησιμοποιώντας Nanodrop



Εικόνα 12: Επώαση στον πάγο για την διεξαγωγή του RNA extraction

Πηγή: Φωτογραφικό υλικό Κοκμοτού Κατερίνα

2.9.2 Μέτρηση νουκλεϊκών οξέων

Αμέσως μετά την απομόνωση του RNA, ακολουθεί ο ποσοτικός προσδιορισμός του, με τη μέτρηση της οπτικής πυκνότητας (OD) με τη χρήση φασματοφωτομετρου NanoDrop ND-1000 (NanoDrop Technologies Inc., Wilmington USA). Επίσης, μετρήθηκαν οι λόγοι 260/280 και 260/230, οι οποίοι δείχνουν αν το δείγμα έχει επιμολύνσεις από DNA και πρωτεΐνες.

2.9.3 Καταστροφή υπολειμμάτων DNA

Πραγματοποιήθηκε καθαρισμός των δειγμάτων από DNA με την χρήση DNase I σύμφωνα με τις οδηγίες του κατασκευαστή. Ο καθορισμός των δειγμάτων από DNA έγινε ως εξής:

- Σε κάθε δείγμα προστέθηκε 1μl DNaseI (1unit)
- Τα δείγματα τοποθετήθηκαν για επώαση σε θερμοκρασία 37°C για 10min
- Έπειτα σε κάθε δείγμα προστέθηκε 0,5μl EDTA (5mM τελική συγκέντρωση)
- Τα δείγματα επώαστηκαν στους 75°C για 10min ώστε να απενεργοποιηθεί η DNaseI

2.9.4 Σύνθεση cDNA

Η σύνθεση του cDNA σύμφωνα με τις οδηγίες του παρασκευαστή έγινε ως εξής:

- Το RNA του κάθε δείγματος αραιώθηκε με δισαποσταγμένο και αποστειρωμένο νερό μέχρι τελικό όγκο 19,5μl
- Ακολούθησε η παρασκευή του Takara mix
- Τοποθετήθηκαν 10,5μl από το Takara mix στο κάθε δείγμα για τελικό όγκο 30μl
- Τα δείγματα τοποθετήθηκαν σε υδατόλουτρο σε θερμοκρασία 37°C για 15min
- Τέλος, τα δείγματα τοποθετήθηκαν σε Heat Block σε θερμοκρασία 85°C για 5min και αποθηκεύτηκαν στους -80°C

Αντιδραστήρια (Takara mix)	Όγκος
5x Prime Script Buffer	6μl
Random 6mers	1,5μl
Oligo(dT)20 primer	1,5μl
Prime Script RT enzyme	1,5μl

2.9.5 Μελέτη έκφρασης γονιδίων με Real time PCR

Η Real time PCR εφαρμόστηκε για τον καθορισμό του επιπέδου μεταγραφής των υπό μελέτη γονιδίων *PR1* και *PIN2* στην τομάτα και για τα *PR1*, *PDF1.2* και *VSP2* στο *A. thaliana*, καθώς και τα αντίστοιχα γονίδια αναφοράς για το κάθε φυτό. Η RT-PCR έγινε σε θερμοκυκλοποιητή της Strat agene Mx3005PTM και για τις αντιδράσεις ενίσχυσης χρησιμοποιήθηκε ένα master mix KAPASYBR Fast Universal Qpcr kit (KAPA biosystems, Woburn, MA, USA).

Τα αντιδραστήρια που χρησιμοποιήθηκαν ήταν τα εξής:

Αντιδραστήρια	Όγκος
SYBR	5μl
Εκκινητής F	0,16μl
Εκκινητής R	0,16μl
H2O	3,68μl
Δείγμα cDNA	1μl
Τελικός όγκος	10μl

Τα ζεύγη εκκινητών που χρησιμοποιήθηκαν για τη μελέτη έκφρασης των γονιδίων στο φυτό *Arabidopsis thaliana* απεικονίζονται στο παρακάτω πίνακα:

Γονίδιο στόχος	Ζεύγος εκκινητών	Αναφορά
PR1	5'-TCACAACCAGGCACGAGGAG-3' 5'-CACCGCTACCCAGGCTAAG-3'	Pantelides et al., 2010
PDF1.2	5'-CTGTTACGTCCCATGTTAAATCTACC-3' 5'-CAACGGGAAAATAAACATTTAAAACAG-3'	Pantelides et al., 2010
VSP2	5'-TCAGTGACCGTTGGAAGTTGTG-3' 5'-GTTCGAACCATTAGGCTTCAATATG-3'	Pantelides et al., 2010
TUBULIN	5'-GAGCTGAAGTGGCTTCCATGAC-3' 5'-GGTCCGACATACCCATGATCC-3'	Czechowski et al., 2005

Τα ζεύγη εκκινητών που χρησιμοποιήθηκαν για τη μελέτη έκφρασης των γονιδίων στην τομάτα απεικονίζονται στο παρακάτω πίνακα:

Γονίδιο στόχος	Ζεύγος εκκινητών	Αναφορά
PR1	5'-GAGGGCAGCCGTGCAA-3' 5'-CACATTTTTCCACCAACACATTG-3'	Block et al., 2005
PIN2	5'-TGATGCCAAGGCTGTACTAGAGA-3' 5'-AGCGGACTTCTTCTGAACGT-3'	Herman et al., 2008
ACTIN	5'-TTGCCGCATGCCATTCT-3' 5'-TCGGTGAGGATATTCATCAGGTT-3'	Herman et al., 2008

Τα επίπεδα έκφρασης του γονιδίου που είναι γονίδιο αναφοράς για το κάθε φυτό, χρησιμοποιείται σαν σταθερά για την ποσοτικοποίηση της έκφρασης των άλλων γονιδίων.

Τέλος απεικονίζεται το πρόγραμμα θερμοκρασιών που χρησιμοποιήθηκαν στις αντιδράσεις Real-time PCR:

Στάδιο:	Χρόνος	Θερμοκρασία	Αποτέλεσμα
Στάδιο 1 ^ο	3 min	95	Ενεργοποίηση της Taq DNA πολυμεράσης
Στάδιο 2 ^{ο*}	3 sec	95	Αποδιάταξη DNA
	30 sec	60	Υβριδισμός εκκινητών/Επιμήκυνση αλυσίδας
Στάδιο 3 ^ο	1 min	95	Δημιουργία της καμπύλης διαχωρισμού των προϊόντων
	30 sec	60	της RT-PCR (Dissociation curve)**
	30 sec	95	

*το 2ο στάδιο επαναλήφθηκε για 40 κύκλους

**η εξειδίκευση των εκκινητών και ο σχηματισμός των διμερών των εκκινητών παρακολούθηθηκαν από την καμπύλη διαχωρισμού της RT-PCR.

2.10 ΜΕΛΕΤΗ ΕΠΙΔΡΑΣΗΣ ΤΩΝ ΕΦΑΡΜΟΓΩΝ ΣΤΟ ΒΑΡΟΣ ΦΥΤΩΝ ΤΟΜΑΤΑΣ

Τα φυτά τομάτας των εφαρμογών που είχαν εκτεθεί στους υποψήφιους βιολογικούς παράγοντες, την ημέρα της 2^{ης} δειγματοληψίας, ζυγίστηκαν για να συγκριθεί το βάρος τους με αυτό του αρνητικού μάρτυρα.

2.11 *IN VITRO* ΜΕΛΕΤΗ ΤΗΣ ΕΠΙΔΡΑΣΗΣ ΤΩΝ ΠΤΗΤΙΚΩΝ ΕΝΩΣΕΩΝ ΣΤΟ ΜΥΚΗΤΑ *B. CINEREA*

Για την *In vitro* μελέτη της επίδρασης των πτητικών ενώσεων εναντίον του μύκητα *B. cinerea*, πραγματοποιήθηκαν δοκιμές σε τρυβλία με διαχωριστικό.

Οι εφαρμογές σε αυτό το πείραμα είναι οι εξής:

- Ακετοΐνη 100ppm

- Ακετοΐνη 400ppm
- Ακετοΐνη 800ppm
- Ακετοΐνη 1000ppm
- *B. velezensis* K165
- Θετικός Μάρτυρας (*B. cinerea*)

2.11.1 *In vitro* μελέτη της επίδρασης της πτητικής ένωσης ακετοΐνης

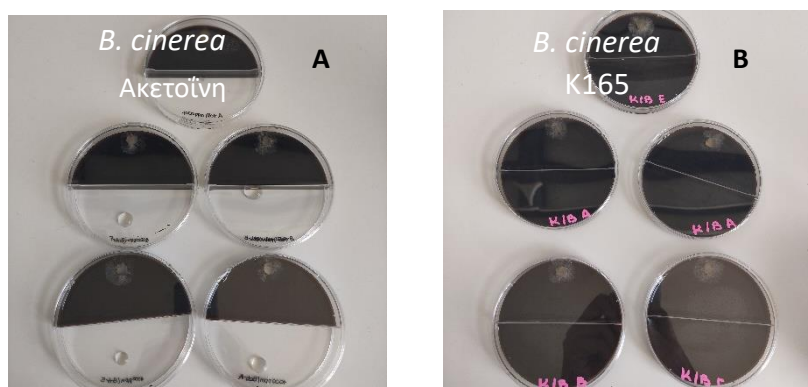
Χρησιμοποιώντας τρυβλία τα οποία είχαν στην μέση διαχωριστικό, στην μια πλευρά τοποθετήθηκε θρεπτικό υπόστρωμα Soil Extract Agar (SEA) για την ανάπτυξη του μύκητα *B. cinerea* ενώ η άλλη πλευρά αφέθηκε άδεια για την τοποθέτηση διαλυμάτων ακετοΐνης διαφορετικών συγκεντρώσεων.

Αρχικά, οι κωνικές φιάλες που χρησιμοποιήθηκαν στο εν λόγω πείραμα προηγουμένως είχαν αποστειρωθεί σε κλίβανο. Για την προετοιμασία διαλυμάτων ακετοΐνης, στις κωνικές φιάλες, με δις αποστειρωμένο και αποσταγμένο νερό (ddH₂O), προστέθηκε ακετοΐνη για την απόκτηση συγκεντρώσεων 100ppm, 400ppm, 800ppm και 1000ppm.

Έπειτα, οι κωνικές με τα διαλύματα ακετοΐνης τοποθετήθηκαν σε περιστροφικό επωαστικό θάλαμο για 15-20 λεπτά. Στο κάθε τρυβλίο στην συνέχεια, τοποθετήθηκε στην άδεια πλευρά 1,5ml ακετοΐνης, ενώ στην πλευρά με το θρεπτικό υλικό SEA ένα κυκλικό τμήμα καλλιέργειας *B. cinerea*.

2.11.2 *In vitro* μελέτη της επίδρασης των πτητικών ενώσεων του *B. velezensis* K165

Για την μελέτη της επίδρασης των πτητικών ενώσεων του βακτηρίου *B. velezensis* K165 εναντίον του *B. cinerea*, χρησιμοποιήθηκαν τρυβλία με διαχωριστικό, στα οποία τοποθετήθηκε και από τις δύο πλευρές θρεπτικό υλικό SEA. Στην μια πλευρά προστέθηκαν 250μl NG που περιείχε το K165, ενώ στην άλλη πλευρά τοποθετήθηκε κυκλικό τμήμα της καλλιέργειας *B. cinerea*.



Εικόνα 13: *In vitro* μελέτη επίδρασης πτητικών ενώσεων ακετοΐνης (Α) και *B. velezensis* K165 (Β) στην ανάπτυξη του *B. cinerea* (ανάπτυξη 2 ημερών)

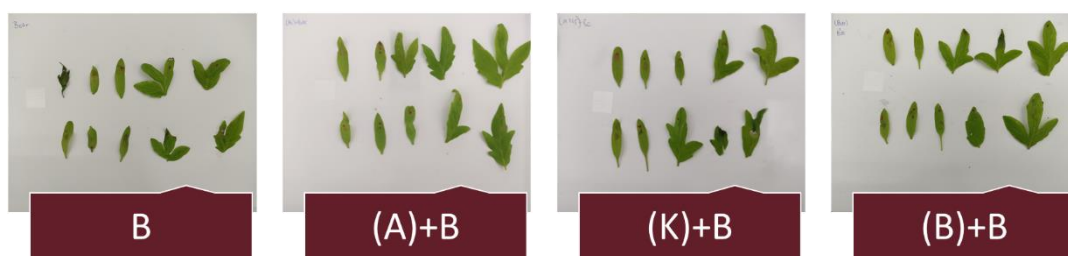
Πηγή: Φωτογραφικό υλικό Κοκμοτού Κατερίνα

3. ΑΠΟΤΕΛΕΣΜΑΤΑ

3.1 ΑΠΟΤΕΛΕΣΜΑΤΑ ΠΕΙΡΑΜΑΤΟΣ ΠΑΘΟΓΕΝΕΙΑΣ

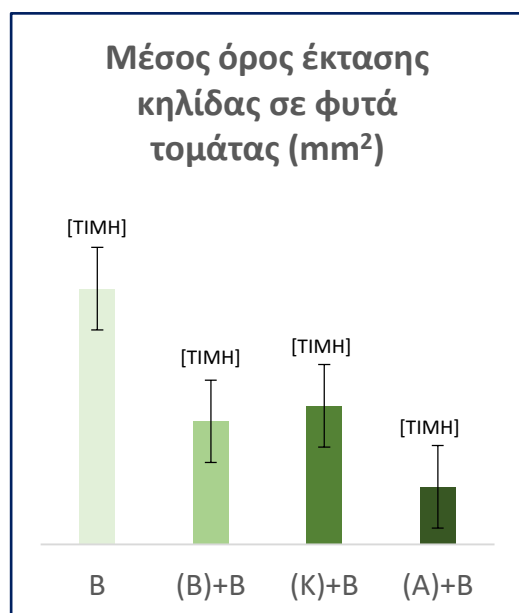
3.1.1 Αξιολόγηση πτητικών ενώσεων εναντίον του μύκητα *B. cinerea* σε φυτά τομάτας
Σε αυτό το πείραμα αξιολογήθηκε η αποτελεσματικότητα των πτητικών ενώσεων της ακετοΐνης, του στελέχους K165 και του ίδιου του *B. cinerea* κατά του φυτοπαθογόνου μύκητα *B. cinerea* σε φυτά τομάτας.

Η ασθένεια όπως γίνεται αντιληπτό από την Εικόνα 14 εμφανίζεται σημαντικά μειωμένη στα φυτά τομάτας που έχουν εκτεθεί σε πτητικές ενώσεις σε σχέση με τον μάρτυρα.

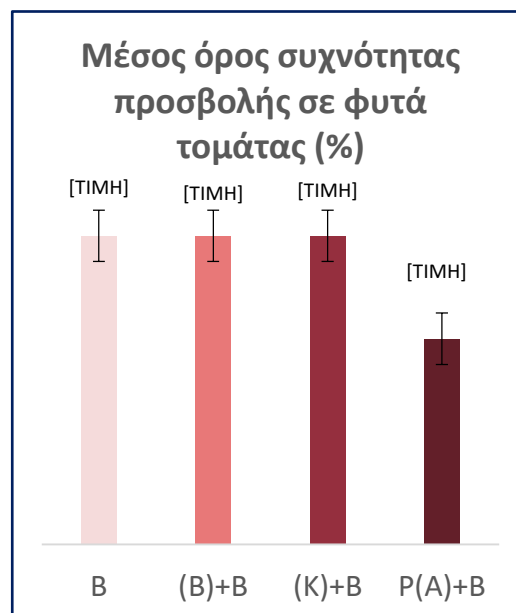


Εικόνα 14: Συμπτώματα του *B. cinerea* στα μολυσμένα φύλλα τομάτας της κάθε εφαρμογής

Πηγή: Φωτογραφικό υλικό Κοκμοπού Κατερίνα



Διάγραμμα 1: Αξιολόγηση της επίδρασης των πτητικών μέσω της σύγκρισης έκτασης της εμφανιζόμενης κηλίδας στα φύλλα φυτών τομάτας



Διάγραμμα 2: Αξιολόγηση της επίδρασης των πτητικών ενώσεων μέσω σύγκρισης του ποσοστού εμφάνισης προσβολής σε φυτά τομάτας

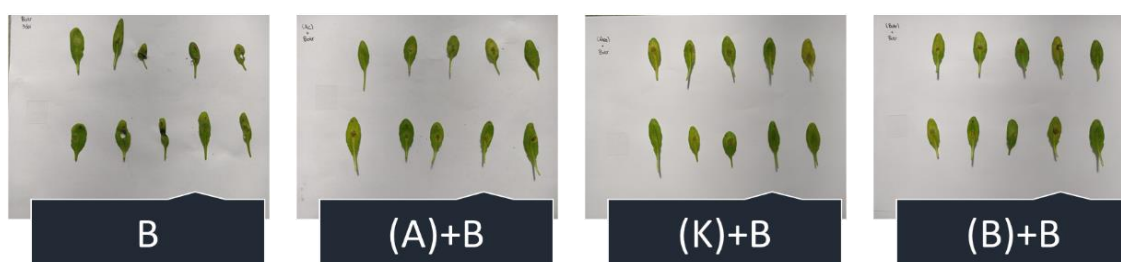
Όπως φαίνεται από το Διάγραμμα 1, τα πιο έντονα συμπτώματα, δηλαδή τις μεγαλύτερες κηλίδες, εμφάνισαν οι θετικοί μάρτυρες (B) όπως ήταν αναμενόμενο. Συμπτώματα παρουσίασαν και οι υπόλοιπες εφαρμογές σε πολύ μικρότερα όμως επίπεδα σε σχέση με τον μάρτυρα. Ειδικά η επέμβαση της ακετοΐνης (A)+B φάνηκε να παρουσιάζει σαφέστατα τα ηπιότερα συμπτώματα εν συγκρίσει με τις υπόλοιπες εφαρμογές του πειράματος παθογένειας.

Στο Διάγραμμα 2 αυτό που παρατηρείται είναι ότι τα υψηλότερα ποσοστά ασθένειας (90%) εμφανίζονται στα φυτά-μάρτυρες (B), καθώς και στις εφαρμογές στους οποίους οι σπόροι εκτέθηκαν σε πτητικές ενώσεις, ήτοι στις (B)+B και (K)+B. Ξεχωρίζει και στην περίπτωση αυτή η εφαρμογή με την ακετοΐνη, η οποία εμφάνισε ποσοστό ασθένειας 60%.

3.1.2 Αξιολόγηση πτητικών ενώσεων εναντίον του μύκητα *B. cinerea* σε φυτά *A. thaliana*

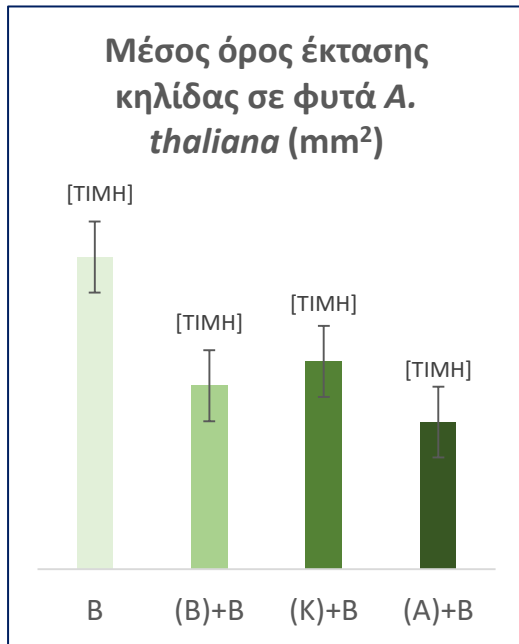
Σε αυτό το πείραμα αξιολογήθηκε η αποτελεσματικότητα των πτητικών ενώσεων της ακετοΐνης, του στελέχους K165 και του ίδιου του *B. cinerea* κατά του φυτοπαθογόνου μύκητα *B. cinerea* σε φυτά *A. thaliana*. Πραγματοποιήθηκε με τον ίδιο τρόπο όπως στα φυτά τομάτας δηλαδή με μελέτη και σύγκριση των συμπτωμάτων μέσω της έκτασης των κηλίδων και του ποσοστού ασθενών φύλλων.

Η ασθένεια όπως παρατηρείται και από την Εικόνα 15, εμφανίζεται σημαντικά μειωμένη στα φυτά *A. thaliana* που έχουν εκτεθεί σε πτητικές ενώσεις σε σχέση με τον μάρτυρα ο οποίος εμφανίζει έντονα συμπτώματα της ασθένειας. Αυτή η διαπίστωση, συνάδει όπως προαναφέρθηκε και με τα προηγούμενα αποτελέσματα καθώς η ίδια παρατήρηση έγινε και στο πείραμα με τα φυτά τομάτας.

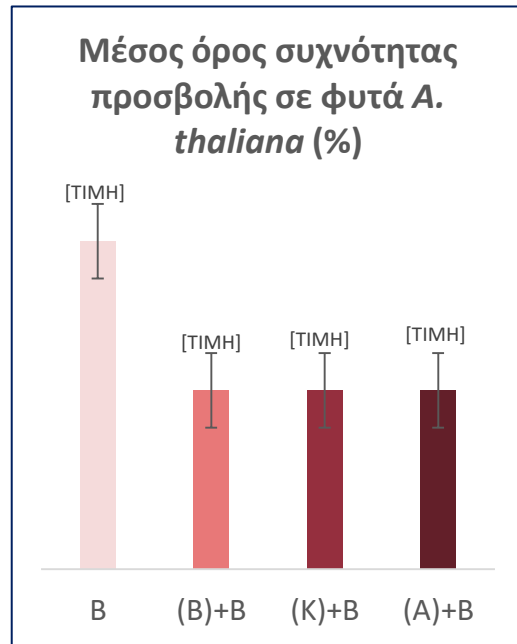


Εικόνα 15: Συμπτώματα του *B. cinerea* στα μολυσμένα φύλλα *A. thaliana* της κάθε εφαρμογής

Πηγή: Φωτογραφικό υλικό Κοκμοπού Κατερίνα



Διάγραμμα 3: Αξιολόγηση της επίδρασης των πτητικών μέσω της σύγκρισης της έκτασης της εμφανιζόμενης κηλίδας στα φύλλα φυτών *A.thaliana*



Διάγραμμα 4: Αξιολόγηση της επίδρασης των πτητικών ενώσεων μέσω σύγκρισης του ποσοστού εμφάνισης προσβολής σε φυτά *A. thaliana*

Από το Διάγραμμα 3 είναι προφανές ότι τα πιο έντονα συμπτώματα στα φυτά *A. thaliana* εμφάνισαν οι θετικοί μάρτυρες (B), όπως ήταν προβλεπόμενο. Συμπτώματα φυσικά παρουσίασαν όλες οι εφαρμογές του πειράματος παθογένειας αλλά τα ηπιότερα παρατηρήθηκαν και εδώ στην περίπτωση της εφαρμογής φυτών των οποίων οι σπόροι είχαν εκτεθεί σε ακετοΐνη (A)+B, όπως και στα φυτά τομάτας.

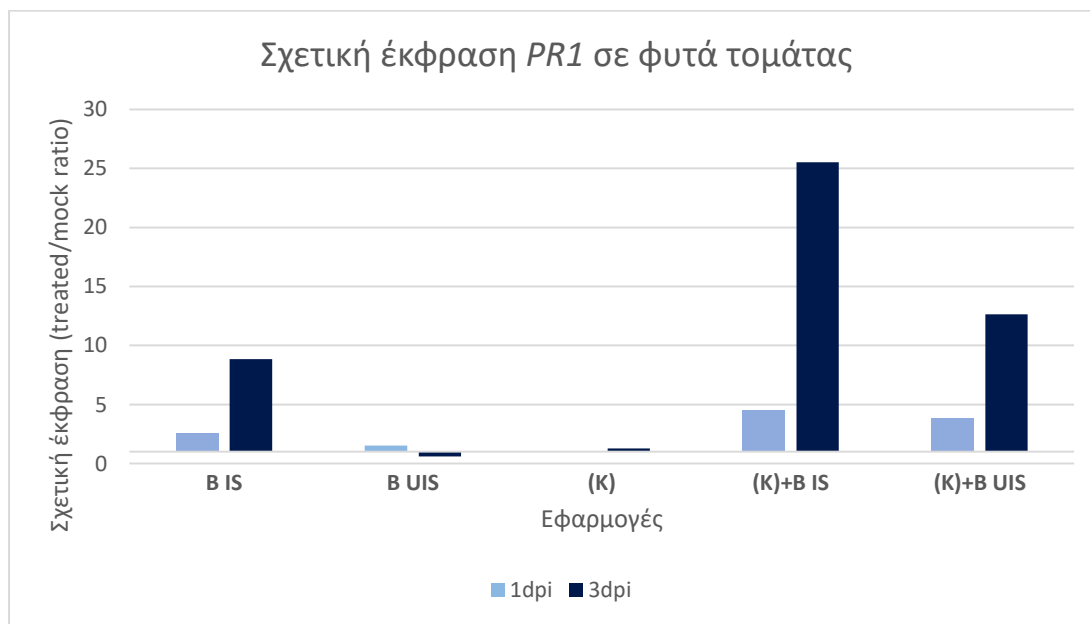
Όσον αφορά τα ποσοστά ασθένειας στο Διάγραμμα 4, τα φυτά που εκτέθηκαν σε όλες τις πτητικές ενώσεις είχαν χαμηλότερο ποσοστό ασθένειας σε σχέση με τον μάρτυρα που είχε προσβολή 100%, χωρίς όμως να υπάρχει σημαντική διαφοροποίηση μεταξύ των τριών επεμβάσεων καθώς όλες είχαν 90% προσβολή.

3.2 ΑΠΟΤΕΛΕΣΜΑΤΑ ΕΚΦΡΑΣΗΣ ΓΟΝΙΔΙΩΝ

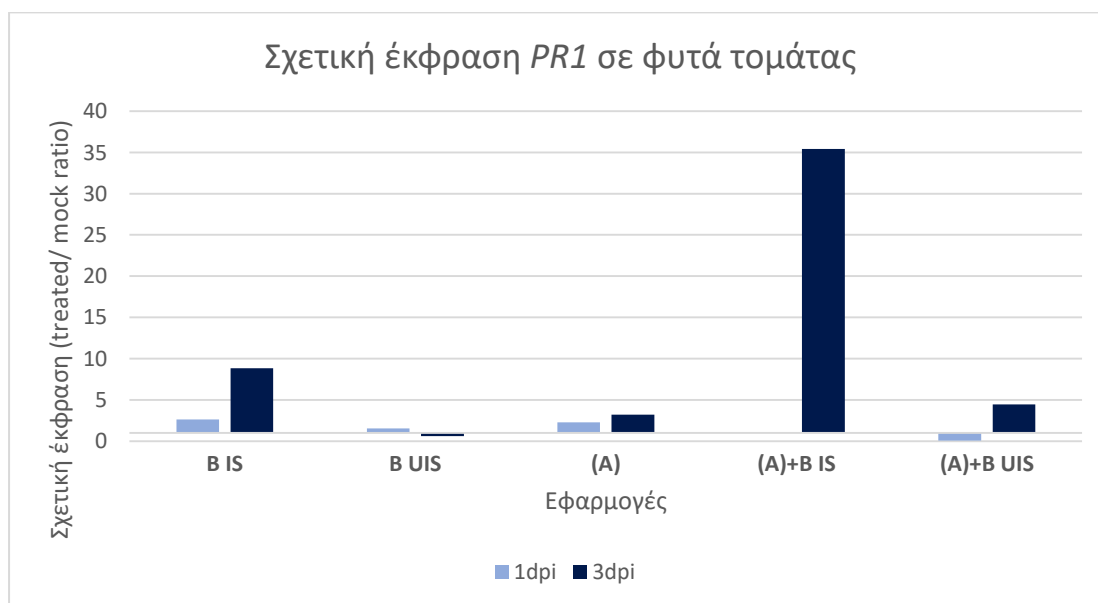
3.2.1 Αποτελέσματα έκφρασης γονιδίων στην τομάτα

Σε αυτό το πείραμα αξιολογήθηκε η έκφραση των γονιδίων *PR1* και *PIN2* που σχετίζονται με την άμυνα των φυτών τομάτας.

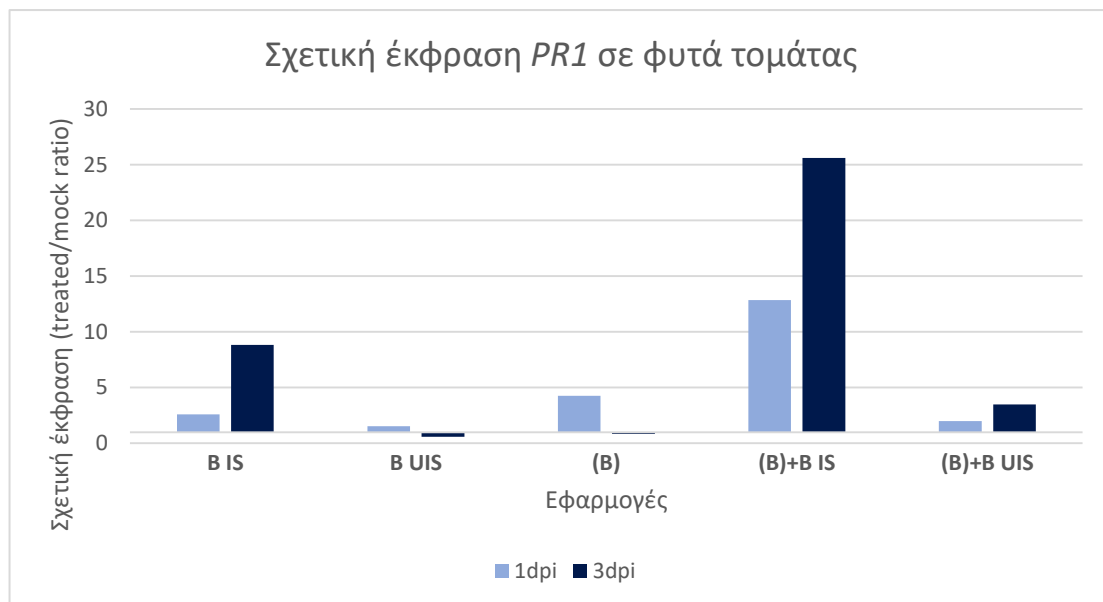
I. Γονίδιο *PR1*



Διάγραμμα 5: Επίδραση των πτητικών ενώσεων του K165 στην σχετική έκφραση του γονιδίου *PR1* σε φύλλα τομάτας μολυσμένα (IS) και μη (UIS) 1,3 dpi σε σχέση με τον θετικό μάρτυρα



Διάγραμμα 6: Επίδραση των πτητικών ενώσεων της ακετοΐνης στην σχετική έκφραση του γονιδίου *PR1* σε φύλλα τομάτας μολυσμένα (IS) και μη (UIS) 1,3 dpi σε σχέση με τον θετικό μάρτυρα



Διάγραμμα 7: Επίδραση των πτητικών ενώσεων του *B. cinerea* στην σχετική έκφραση του γονιδίου *PR1* σε φύλλα τομάτας μολυσμένα (IS) και μη (UIS) 1,3 dpi σε σχέση με τον θετικό μάρτυρα

PR1 TOM.	Ημέρες	
	1dpi	3dpi
B IS	▲ 2,61	▲ 8,84
B UIS	▲ 1,53	▼ 0,59
(K)	▲ 1,06	▲ 1,27
(K)+B IS	▲ 4,57	▲ 25,53
(K)+B UIS	▲ 3,86	▲ 12,63
(A)	▲ 2,29	▲ 3,19
(A)+B IS	▲ 1,05	▲ 35,43
(A)+B UIS	▼ 0,06	▲ 4,44
(B)	▲ 4,25	▼ 0,85
(B)+B IS	▲ 12,84	▲ 25,62
(B)+B UIS	▲ 2,00	▲ 3,48

Θετικοί μάρτυρες με *B. cinerea* - B
 Ακεταΐνη - (A)
B. velezensis K165- (K)
B. cinerea - (B)
 Ακεταΐνη + *B. cinerea* - (A)+B
B. velezensis K165 + *B. cinerea* - (K) + B
B. cinerea + *B. cinerea* - (B) + B

Πίνακας 1: Τιμές Διαγράμματος 5,6,7

σχέση με όλες τις εφαρμογές του πειράματος, ξεχωρίζει η (A)+B IS η οποία παρουσιάζει έκφραση 35 φορές μεγαλύτερη του μάρτυρα.

Όσον αφορά το γονίδιο *PR1*, οι μεγαλύτερες τιμές έκφρασης παρατηρήθηκαν σε εφαρμογές που είχαν εκτεθεί σε πτητικές ενώσεις και ύστερα ακολούθησε η μόλυνση, κυρίως 3 ημέρες μετά την μόλυνση. Οι αυξημένες αυτές τιμές έκφρασης παρατηρούνται κυρίως τοπικά (IS) αλλά και διασυστηματικά (UIS).

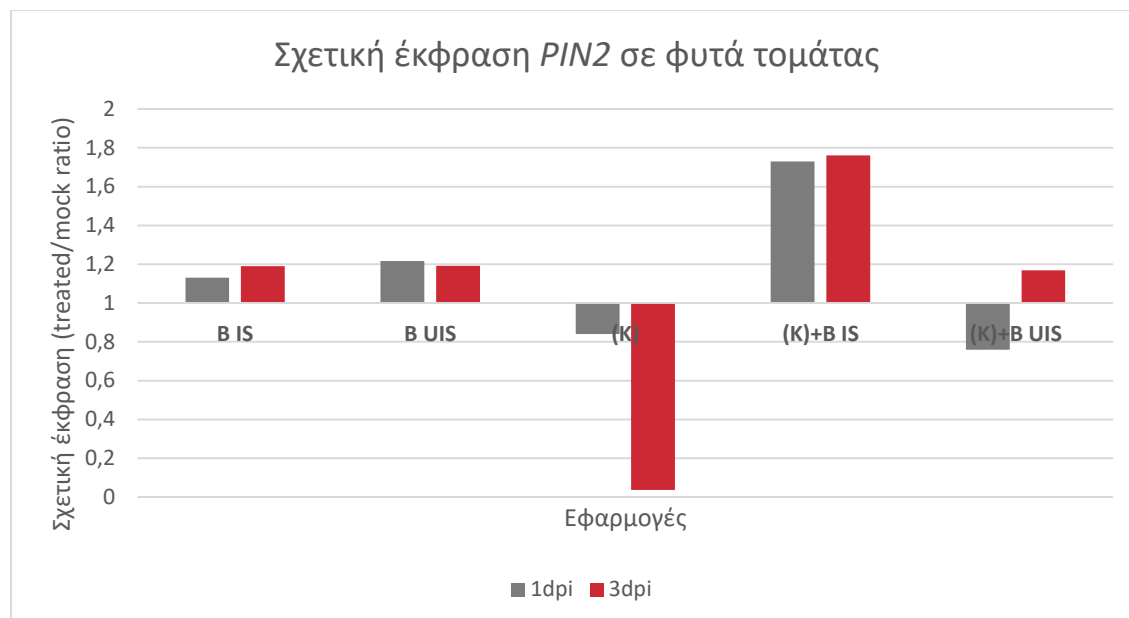
Σχετικά αυξημένη έκφραση σε σχέση με τον μάρτυρα εμφάνισαν και οι εφαρμογές φυτών που εκτέθηκαν σε πτητικές ενώσεις οι οποίες όμως δεν μολύνθηκαν με τον *B. cinerea* δηλαδή οι (A),(B),(K).

Πιο συγκεκριμένα, από το Διάγραμμα 5 παρατηρείται έντονη έκφραση στην εφαρμογή όπου τα φυτά εκτέθηκαν στις πτητικές ενώσεις του στελέχους K165 και έπειτα μολύνθηκαν, τοπικά καθώς και διασυστηματικά δηλαδή στις εφαρμογές (K)+B IS 3dpi και (K)+B UIS 3dpi.

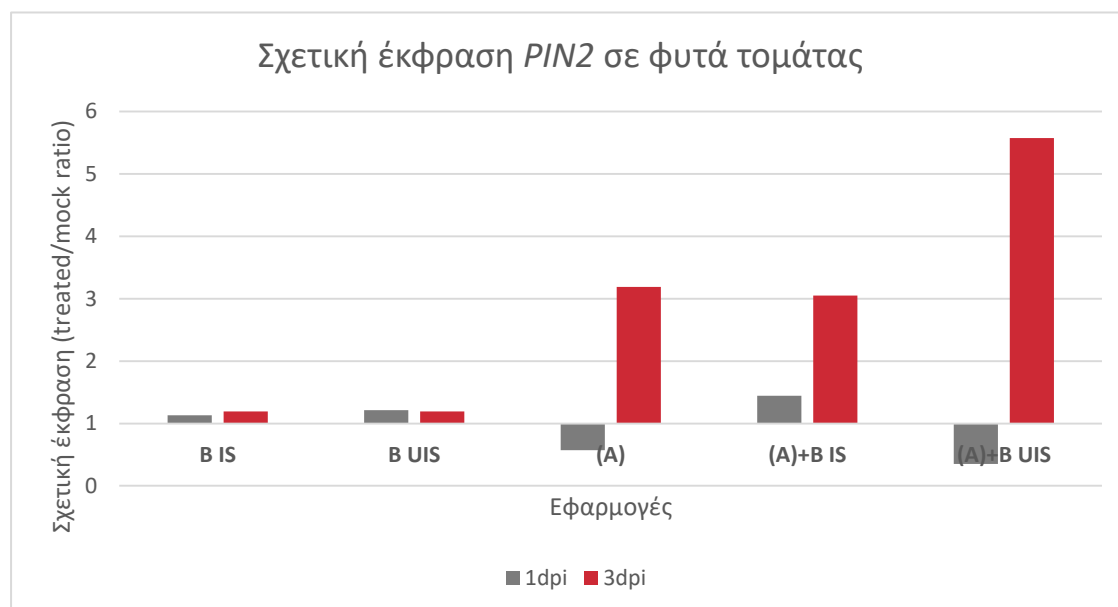
Όπως προκύπτει από το Διάγραμμα 6, το γονίδιο υπερεκφράζεται στις εφαρμογές (A)+B IS 3dpi και (A)+B UIS 3dpi. Ειδικότερα, σε

Τέλος, παρατηρώντας το Διάγραμμα 7, διαπιστώνεται έντονη υπερέκφραση του *PR1* στα φυτά που εκτέθηκαν οι σπόροι τους στις πτητικές ενώσεις του *B. cinerea* και έπειτα μολύνθηκαν ήτοι στις (B)+B IS 1dpi και (B)+B IS 3dpi.

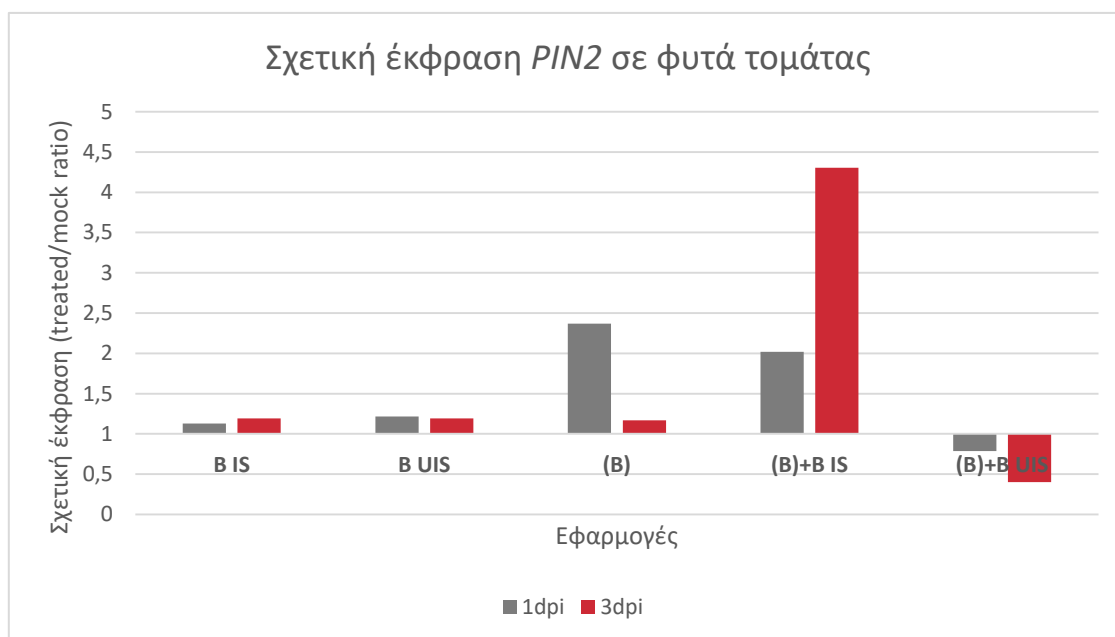
II. Γονίδιο *PIN2*



Διάγραμμα 8: Επίδραση των πτητικών ενώσεων του K165 στην σχετική έκφραση του γονιδίου *PIN2* σε φύλλα τομάτας μολυσμένα (IS) και μη (UIS) 1,3 dpi σε σχέση με τον θετικό μάρτυρα



Διάγραμμα 9: Επίδραση των πτητικών ενώσεων της ακετοΐνης στην σχετική έκφραση του γονιδίου *PIN2* σε φύλλα τομάτας μολυσμένα (IS) και μη (UIS) 1,3 dpi σε σχέση με τον θετικό μάρτυρα



Διάγραμμα 10: Επίδραση των πηκτικών ενώσεων του *B. cinerea* στην σχετική έκφραση του γονιδίου *PIN2* σε φύλλα τομάτας μολυσμένα (IS) και μη (UIS) 1,3 dpi σε σχέση με τον θετικό μάρτυρα

<i>PIN2</i> TOM.	Ημέρες	
	1dpi	3dpi
B IS	▲ 1,13	▲ 1,19
B UIS	▲ 1,22	▲ 1,19
(K)	▼ 0,84	▼ 0,04
(K)+B IS	▲ 1,73	▲ 1,76
(K)+B UIS	▼ 0,76	▲ 1,17
(A)	▼ 0,57	▲ 3,19
(A)+B IS	▲ 1,44	▲ 3,05
(A)+B UIS	▼ 0,35	▲ 5,57
(B)	▲ 2,37	▲ 1,17
(B)+B IS	▲ 2,02	▲ 4,31
(B)+B UIS	▼ 0,79	▼ 0,40

Θετικοί μάρτυρες με *B. cinerea* - B
 Ακεταϊνη - (A)
B. velezensis K165- (K)
B. cinerea - (B)
 Ακεταϊνη + *B. cinerea* - (A)+B
B. velezensis K165 + *B. cinerea* - (K) + B
B. cinerea + *B. cinerea* - (B) + B

Πίνακας 2: Τιμές Διαγράμματος 8,9,10

Στα φυτά τομάτας και στην περίπτωση του γονιδίου *PIN2*, οι μεγαλύτερες τιμές έκφρασης παρατηρήθηκαν γενικά σε εφαρμογές που είχαν εκτεθεί σε πηκτικές ενώσεις και ύστερα ακολούθησε η μόλυνση, κυρίως 3 ημέρες μετά την μόλυνση, τοπικά (IS) αλλά δευτερευόντως και διασυστηματικά (UIS).

Με την βοήθεια του Διαγράμματος 8 παρατηρείται ότι υπάρχει έντονη έκφραση του γονιδίου *PIN2*, στις εφαρμογές (K)+B IS και (K)+B UIS 3 ημέρες μετά τη μόλυνση.

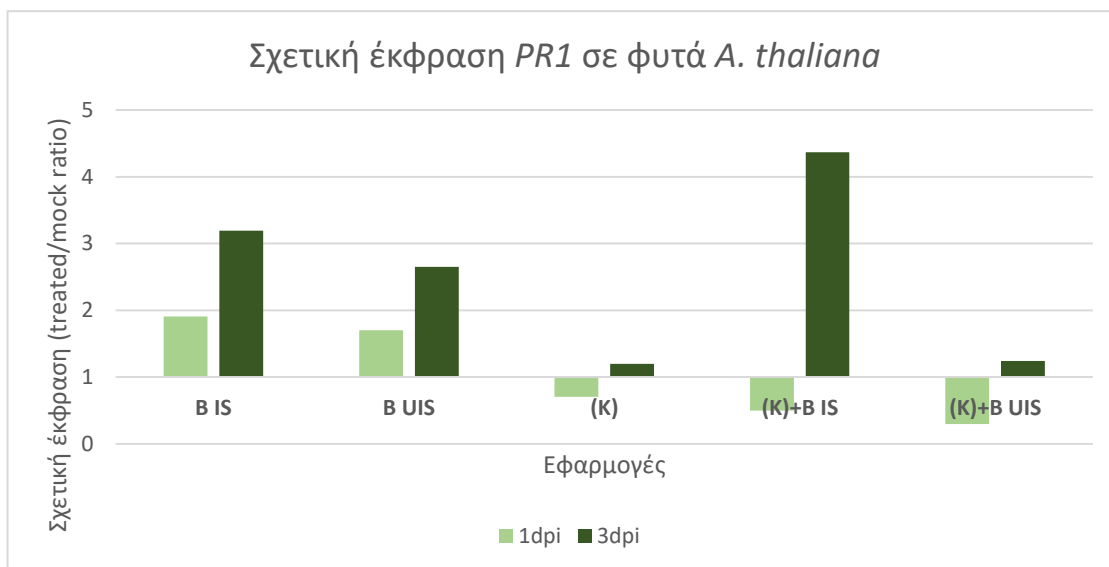
Από το Διάγραμμα 9 διαπιστώνεται ότι όπως και στην περίπτωση του γονιδίου *PR1*, ξεχωρίζει η έκφραση της επέμβασης (A)+B όμως αυτή τη φορά σε διασυστηματικό επίπεδο (UIS) με έκφραση σχεδόν 6 φορές μεγαλύτερη του mock.

Επιπλέον, παρατηρώντας το Διάγραμμα 10, αυξημένη έκφραση υπάρχει στην (B)+B IS την 1^η και ειδικά την 3^η ημέρα μετά τη μόλυνση, με έκφραση περίπου τετραπλάσια του μάρτυρα.

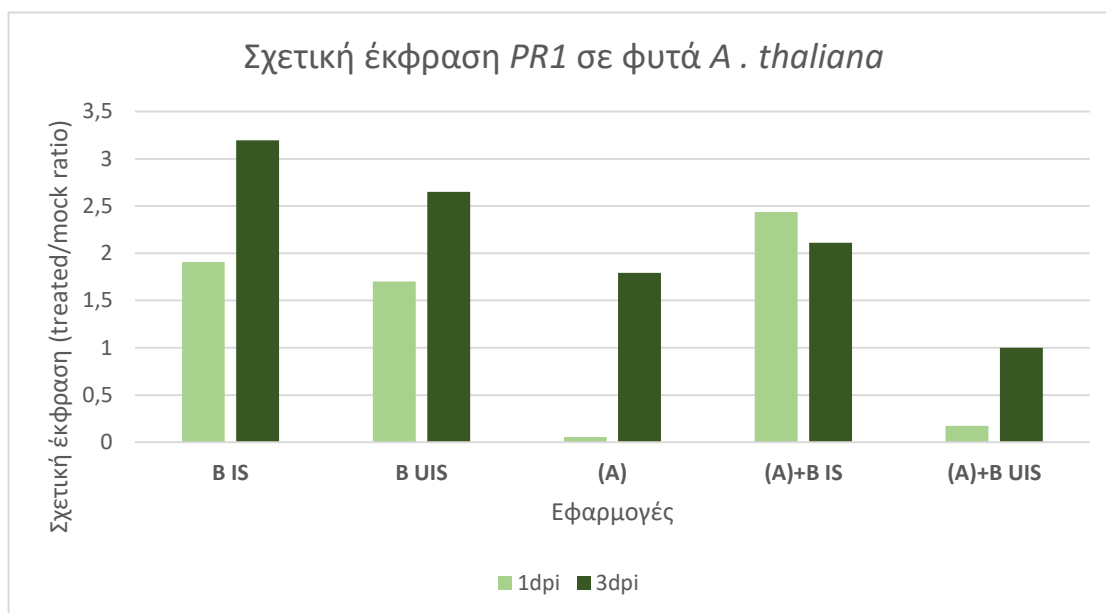
3.2.2 Αποτελέσματα έκφρασης γονιδίων στο φυτό *A. thaliana*

Σε αυτό το πείραμα αξιολογήθηκε η έκφραση των γονιδίων *PR1*, *PDF1.2*, *VSP2* που σχετίζονται με την άμυνα των φυτών *Arabidopsis thaliana*.

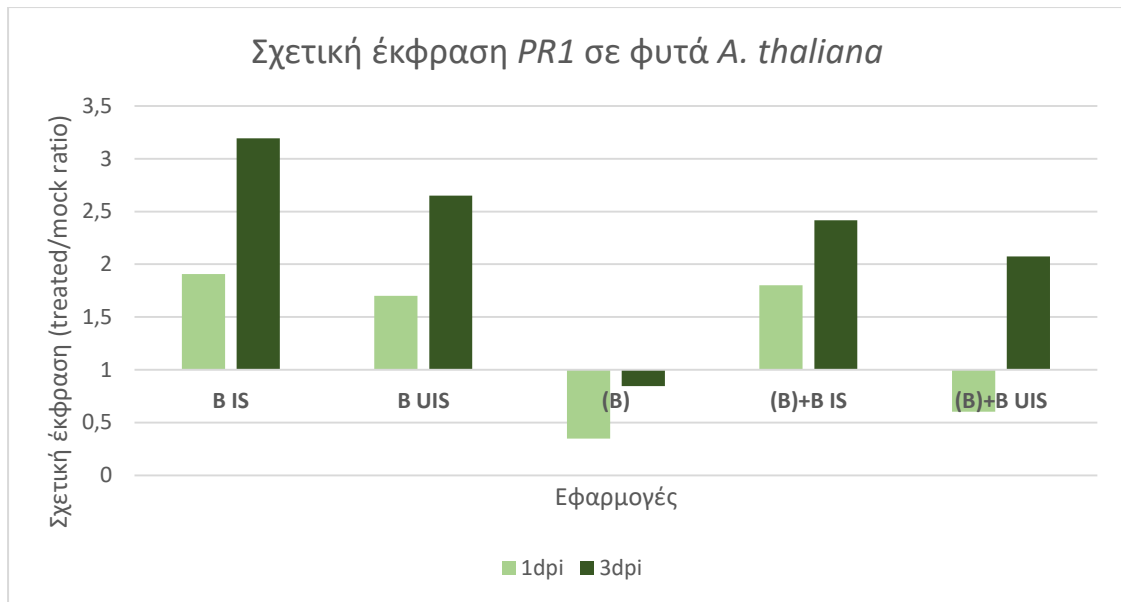
I. Γονίδιο *PR1*



Διάγραμμα 11: Επίδραση των πτητικών ενώσεων του K165 στην σχετική έκφραση του γονιδίου *PR1* σε φύλλα *A. thaliana* μολυσμένα (IS) και μη (UIS) 1,3 dpi σε σχέση με τον θετικό μάρτυρα



Διάγραμμα 12: Επίδραση των πτητικών ενώσεων της ακετοΐνης στην σχετική έκφραση του γονιδίου *PR1* σε φύλλα *A. thaliana* μολυσμένα (IS) και μη (UIS) 1,3 dpi σε σχέση με τον θετικό μάρτυρα



Διάγραμμα 13: Επίδραση των πτητικών ενώσεων του *B. cinerea* στην σχετική έκφραση του γονιδίου *PR1* σε φύλλα *A. thaliana* μολυσμένα (IS) και μη (UIS) 1,3 dpi σε σχέση με τον θετικό μάρτυρα

PR1 ARAB.	Ημέρες	
	1dpi	3dpi
B IS	▲ 1,91	▲ 3,19
B UIS	▲ 1,70	▲ 2,65
(K)	▼ 0,70	▲ 1,20
(K)+B IS	▼ 0,50	▲ 4,37
(K)+B UIS	▼ 0,30	▲ 1,24
(A)	▼ 0,05	▲ 1,79
(A)+B IS	▲ 2,44	▲ 2,11
(A)+B UIS	▼ 0,17	▲ 1,00
(B)	▼ 0,35	▼ 0,85
(B)+B IS	▲ 1,80	▲ 2,42
(B)+B UIS	▼ 0,60	▲ 2,07

Θετικοί μάρτυρες με <i>B. cinerea</i> - B	
Ακετοΐνη - (A)	
<i>B. velezensis</i> K165 - (K)	
<i>B. cinerea</i> - (B)	
Ακετοΐνη + <i>B. cinerea</i> - (A)+B	
<i>B. velezensis</i> K165 + <i>B. cinerea</i> - (K) + B	
<i>B. cinerea</i> + <i>B. cinerea</i> - (B) + B	

Πίνακας 3: Τιμές Διαγράμματος 11,12,13

Γενικά, από τα διαγράμματα που αφορούν το φυτό *A. thaliana* και το γονίδιο *PR1* παρατηρείται έντονη υπερέκφραση του θετικού μάρτυρα B IS και B UIS. Επίσης, και εδώ όπως στην περίπτωση των φυτών τομάτας, υπάρχει αυξημένη έκφραση κατά κύριο λόγο την 3^η ημέρα και σε μολυσμένα φύλλα (IS), σε εφαρμογές που έχουν εκτεθεί οι σπόροι σε πτητικές ενώσεις και έχουν μολυνθεί.

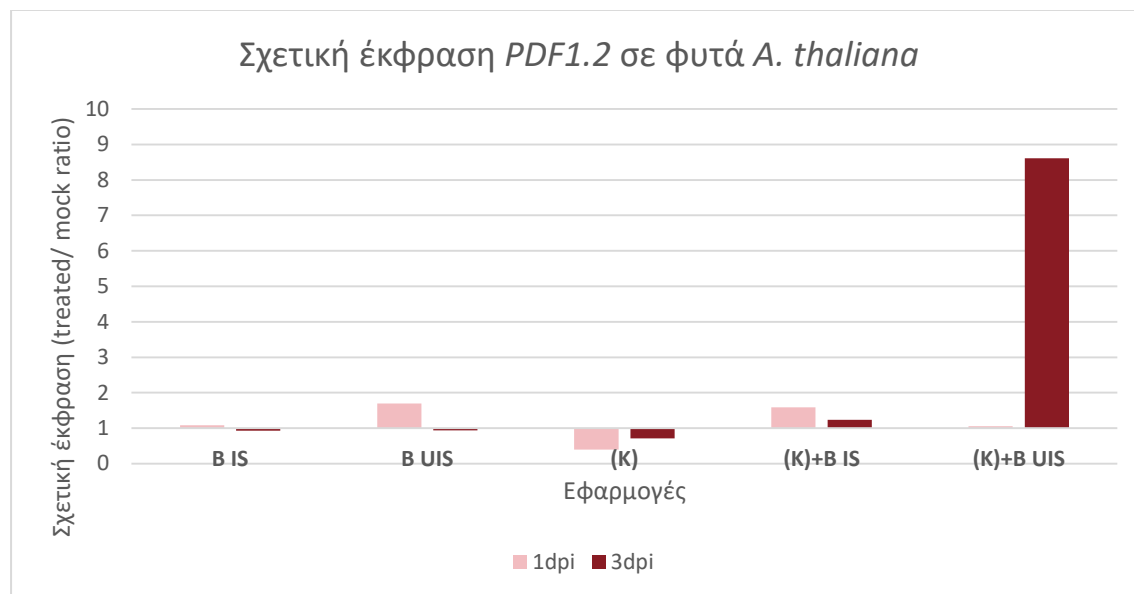
Η πιο αυξημένη έκφραση των εφαρμογών με τις πτητικές ενώσεις καταγράφεται στο Διάγραμμα 11 στην περίπτωση των φυτών (K)+B IS την 3^η ημέρα μετά την μόλυνση, ενώ και στην περίπτωση της (K)+B UIS 3dpi παρατηρούμε αυξημένη έκφραση του *PR1* σε σχέση με τον μάρτυρα.

Στο Διάγραμμα 12, διακρίνεται αυξημένη έκφραση στην εφαρμογή (A)+B IS 1dpi. Επίσης την 3^η ημέρα μετά την μόλυνση οι εφαρμογές (A)+B IS και (A)+B UIS παρουσιάζουν έκφραση αυξημένη.

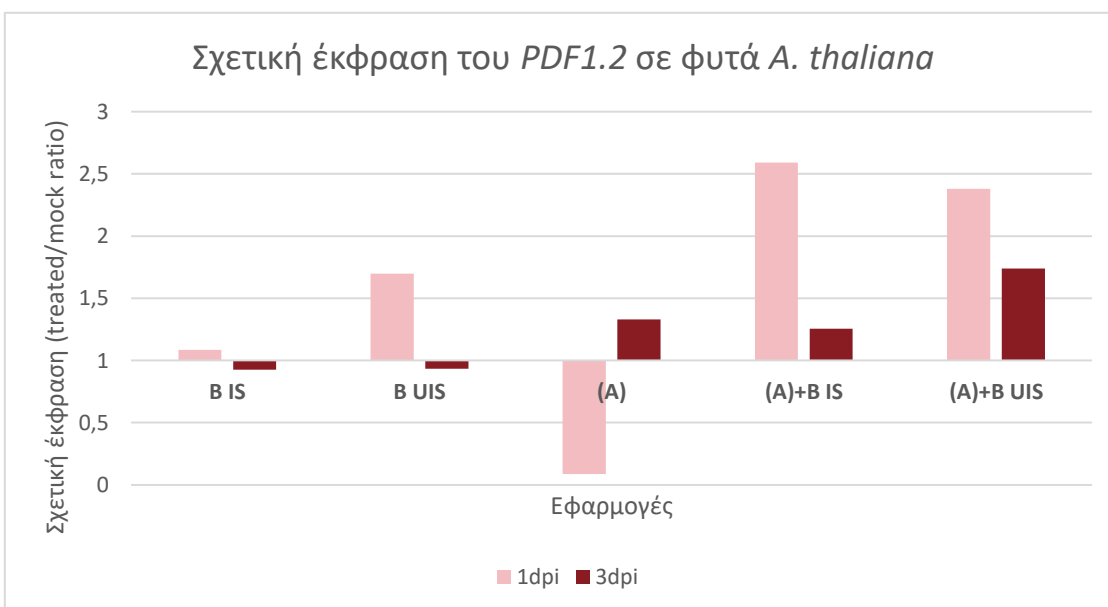
Όσον αφορά το Διάγραμμα 13, όπως και στα υπόλοιπα Διαγράμματα φαίνεται αυξημένη έκφραση στις 3dpi, κυρίως για την (B)+B IS αλλά και για την (B)+B UIS.

Κατά συνέπεια, την 3^η ημέρα μετά την μόλυνση όλες οι εφαρμογές που εκτέθηκαν σε πτητικές ενώσεις και έπειτα μολύνθηκαν εμφάνισαν αυξημένη έκφραση του *PR1* τοπικά (IS) και διασυστηματικά (UIS) σε σχέση με τον μάρτυρα.

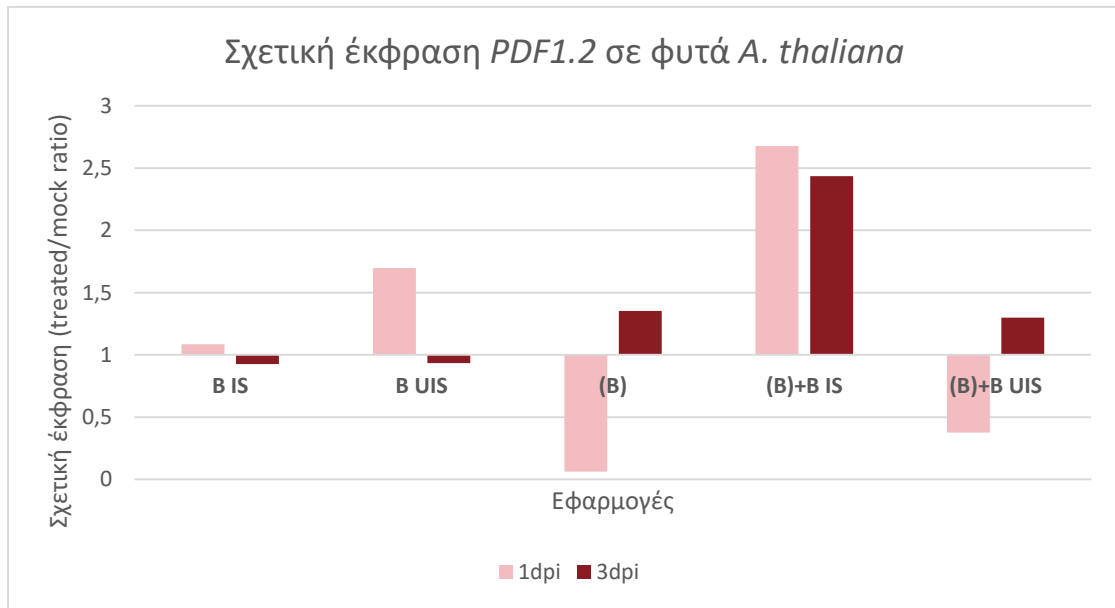
II. Γονίδιο *PDF1.2*



Διάγραμμα 14: Επίδραση των πτητικών ενώσεων του K165 στην σχετική έκφραση του γονιδίου *PDF1.2* σε φύλλα *A. thaliana* μολυσμένα (IS) και μη (UIS) 1,3 dpi σε σχέση με τον θετικό μάρτυρα



Διάγραμμα 15: Επίδραση των πτητικών ενώσεων της ακετοΐνης στην σχετική έκφραση του γονιδίου *PDF1.2* σε φύλλα *A. thaliana* μολυσμένα (IS) και μη (UIS) 1,3 dpi σε σχέση με τον θετικό μάρτυρα



Διάγραμμα 16: Επίδραση των πτητικών ενώσεων του *B. cinerea* στην σχετική έκφραση του γονιδίου *PDF1.2* σε φύλλα *A. thaliana* μολυσμένα (IS) και μη (UIS) 1,3 dpi σε σχέση με τον θετικό μάρτυρα

PDF1.2 ARAB.	Ημέρες	
	1dpi	3dpi
B IS	▲ 1,09	▼ 0,93
B UIS	▲ 1,70	▼ 0,93
(K)	▼ 0,40	▼ 0,71
(K)+B IS	▲ 1,59	▲ 1,24
(K)+B UIS	▲ 1,06	▲ 8,61
(A)	▼ 0,09	▲ 1,33
(A)+B IS	▲ 2,59	▲ 1,26
(A)+B UIS	▲ 2,38	▲ 1,74
(B)	▼ 0,06	▲ 1,35
(B)+B IS	▲ 2,68	▲ 2,44
(B)+B UIS	▼ 0,38	▲ 1,30

Θετικοί μάρτυρες με *B. cinerea* - B
 Ακεταΐνη - (A)
B. velezensis K165- (K)
B. cinerea - (B)
 Ακεταΐνη + *B. cinerea* - (A)+B
B. velezensis K165 + *B. cinerea* - (K) + B
B. cinerea + *B. cinerea* - (B) + B

Πίνακας 4: Τιμές Διαγράμματος 14,15,16

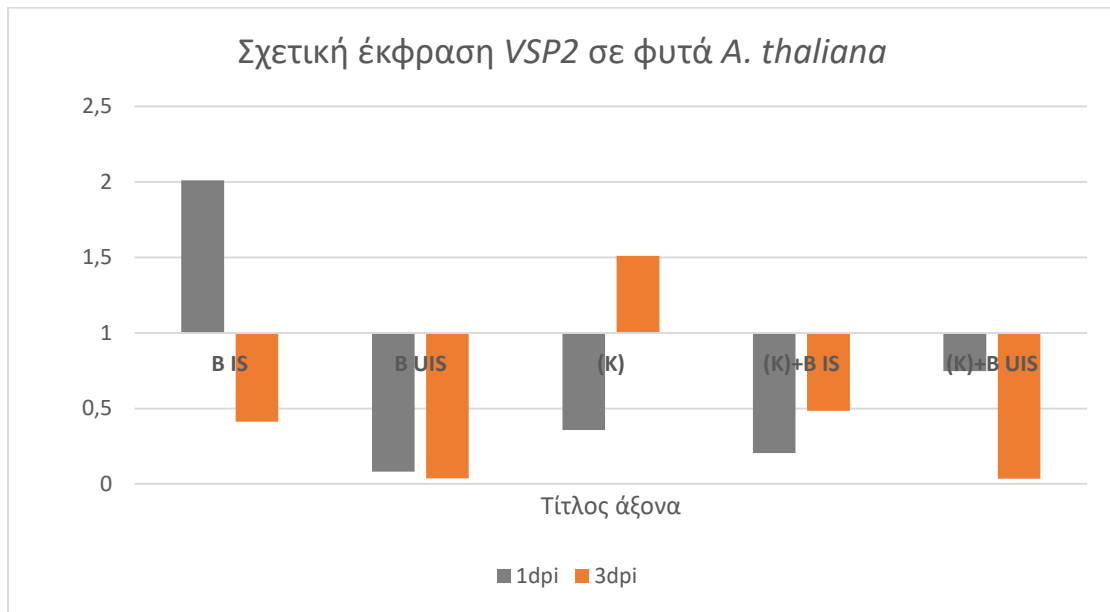
Από τα διαγράμματα για το γονίδιο *PDF1.2* παρατηρείται αυξημένη έκφραση σε σχέση με το mock, στις περισσότερες εφαρμογές, κατά την 3^η ημέρα μετά την μόλυνση.

Στο Διάγραμμα 14 υπερέκφραση καταγράφεται στην περίπτωση των εφαρμογών (K)+B IS και (K)+B UIS 1dpi και 3dpi. Ωστόσο, ξεχωρίζει η (K)+B UIS 3dpi η οποία εμφανίζει έκφραση σχεδόν 9 φορές μεγαλύτερη από τον μάρτυρα.

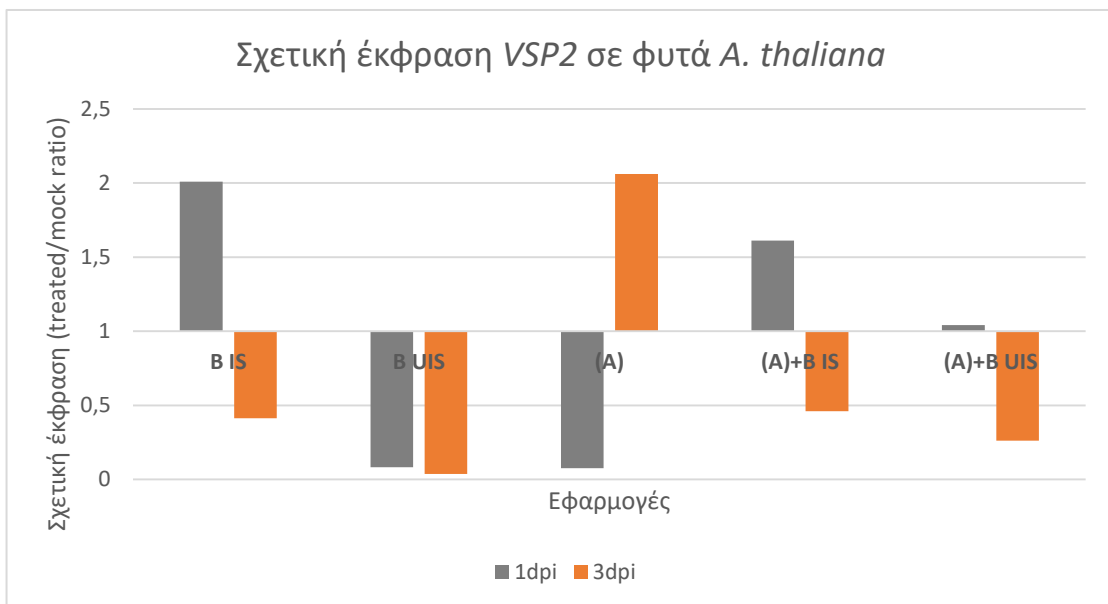
Υπερέκφραση παρατηρείται και στην περίπτωση της επέμβασης (A)+B σε μολυσμένα και μη φύλλα, ειδικά την 1^η ημέρα μετά την μόλυνση αλλά δευτερευόντως και την 3^η όπως γίνεται αντιληπτό από το Διάγραμμα 15.

Επιπρόσθετα, σύμφωνα με το Διάγραμμα 16 η εφαρμογή (B)+B IS παρουσιάζει αρκετά αυξημένη έκφραση κατά την 1^η αλλά και την 3^η ημέρα, σε σχέση με τον μάρτυρα.

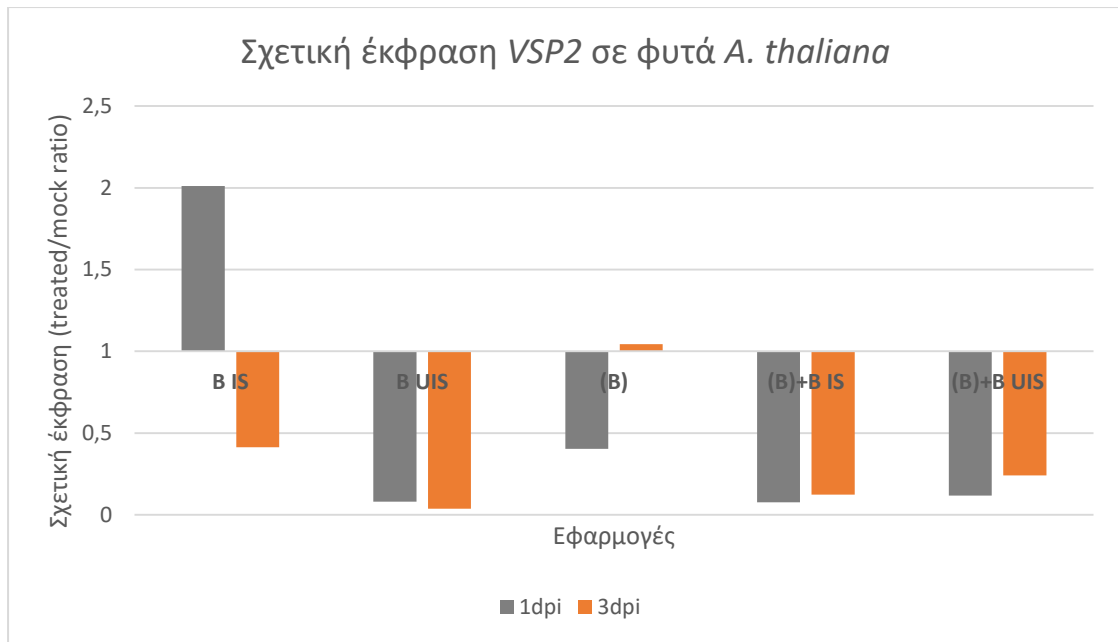
III. Γονίδιο VSP2



Διάγραμμα 17: Επίδραση των πηθικών ενώσεων του K165 στην σχετική έκφραση του γονιδίου VSP2 σε φύλλα *A. thaliana* μολυσμένα (IS) και μη (UIS) 1,3 dpi σε σχέση με τον θετικό μάρτυρα



Διάγραμμα 18: Επίδραση των πηθικών ενώσεων της ακετοΐνης στην σχετική έκφραση του γονιδίου VSP2 σε φύλλα *A. thaliana* μολυσμένα (IS) και μη (UIS) 1,3 dpi σε σχέση με τον θετικό μάρτυρα



Διάγραμμα 19: Επίδραση των πηκτικών ενώσεων του *B. cinerea* στην σχετική έκφραση του γονιδίου *VSP2* σε φύλλα *A. thaliana* μολυσμένα (IS) και μη (UIS) 1,3 dpi σε σχέση με τον θετικό μάρτυρα

VSP2 ARAB.	Ημέρες	
	1dpi	3dpi
B IS	▲ 2,01	▼ 0,41
B UIS	▼ 0,08	▼ 0,04
(K)	▼ 0,36	▲ 1,51
(K)+B IS	▼ 0,20	▼ 0,49
(K)+B UIS	▼ 0,75	▼ 0,03
(A)	▼ 0,08	▲ 2,06
(A)+B IS	▲ 1,61	▼ 0,46
(A)+B UIS	▲ 1,04	▼ 0,26
(B)	▼ 0,40	▲ 1,04
(B)+B IS	▼ 0,08	▼ 0,12
(B)+B UIS	▼ 0,12	▼ 0,24

Θετικοί μάρτυρες με *B. cinerea* - B
 Ακετοΐνη - (A)
B. velezensis K165- (K)
B. cinerea - (B)
 Ακετοΐνη + *B. cinerea* - (A)+B
B. velezensis K165 + *B. cinerea* - (K) + B
B. cinerea + *B. cinerea* - (B) + B

Πίνακας 5: Τιμές Διαγράμματος 17,18,19

Από τα διαγράμματα για το γονίδιο *VSP2* παρατηρούμε αρχικά ότι υπάρχει αυξημένη έκφραση στον θετικό μάρτυρα στα μολυσμένα φύλλα την 1^η ημέρα ύστερα την μόλυνση.

Στο Διάγραμμα 17 φαίνεται η πιο έντονη έκφραση στην περίπτωση των φυτών που εκτέθηκαν στο στέλεχος K165 χωρίς να μολυνθούν ήτοι στην επέμβαση (K). Στις υπόλοιπες εφαρμογές δεν παρατηρείται σημαντική έκφραση σε σχέση με το mock.

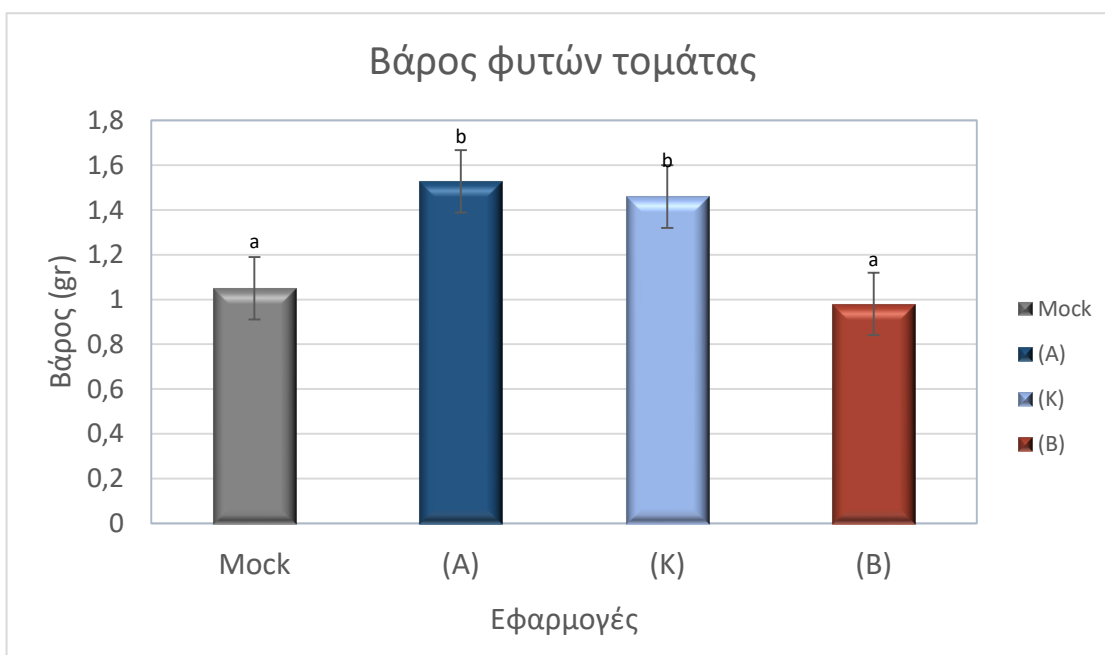
Όσον αφορά το Διάγραμμα 18, παρατηρείται υπερέκφραση του *VSP2* στην εφαρμογή (A) στις 3dpi. Επίσης, στο διάγραμμα αυτό αυξημένα επίπεδα έκφρασης διακρίνονται την 1^η ημέρα στις επεμβάσεις (A)+B IS και (A)+B UIS σε σχέση με τον μάρτυρα.

Τέλος, στο Διάγραμμα 19 υπερέκφραση παρατηρείται στην εφαρμογή (B).

Κατά συνέπεια, για το *VSP2* έντονη υπερέκφραση καταγράφεται στον θετικό μάρτυρα και στις εφαρμογές όπου εκτέθηκαν οι σπόροι σε πηκτικές ενώσεις και δεν μολύνθηκαν με τον μύκητα.

3.3 ΑΠΟΤΕΛΕΣΜΑΤΑ ΕΠΙΔΡΑΣΗΣ ΤΩΝ ΠΤΗΤΙΚΩΝ ΕΝΩΣΕΩΝ ΣΤΟ ΒΑΡΟΣ ΦΥΤΩΝ ΤΟΜΑΤΑΣ

Σε αυτό το κομμάτι του πειράματος αξιολογήθηκε η επίδραση που είχε στο βάρος των φυτών τομάτας η έκθεση των σπόρων στις πτητικές ενώσεις της ακετοΐνης, του *B. velezensis* K165 και του *B. cinerea*, σε σχέση με τον αρνητικό μάρτυρα.

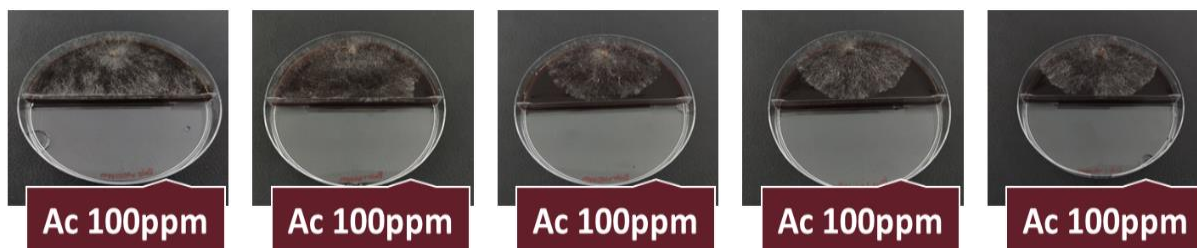


Διάγραμμα 20: Επίδραση των πτητικών ενώσεων ακετοΐνης, του K165 και του *B. cinerea* στο βάρος φυτών τομάτας

Το βάρος φυτών τομάτας σύμφωνα με το Διάγραμμα 20 είναι σαφώς μεγαλύτερο στην περίπτωση των φυτών που έχουν εκτεθεί στην ακετοΐνη (1,53gr). Μάλιστα, σε σύγκριση με τον μάρτυρα το βάρος είναι σχεδόν μιάμιση φορά μεγαλύτερο. Παρομοίως, τα φυτά που εκτέθηκαν στο K165 εμφανίζουν και αυτά μεγαλύτερο βάρος σε σχέση με τον μάρτυρα. Αντίθετα, τα φυτά που εκτέθηκαν στις πτητικές ενώσεις του *B. cinerea* εμφάνισαν ελαφρώς μειωμένο βάρος φυτών από αυτό του μάρτυρα

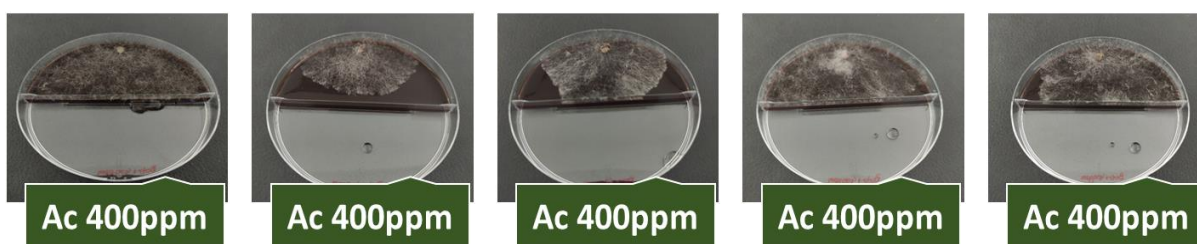
3.4 ΑΠΟΤΕΛΕΣΜΑΤΑ ΕΠΙΔΡΑΣΗΣ ΠΤΗΤΙΚΩΝ ΕΝΩΣΕΩΝ ΣΤΟ ΜΥΚΗΤΑ *B. CINEREA IN VITRO*

Σε αυτό το μέρος του πειράματος μελετήθηκε η αποτελεσματικότητα των πτητικών ενώσεων της ακετοΐνης και του *B. velezensis* K165 στον περιορισμό της ανάπτυξης του φυτοπαθογόνου μύκητα *B. cinerea* σε συνθήκες *In vitro*, κάνοντας δοκιμές σε τρυβλία με χώρισμα όπως ήδη αναφέρθηκε. Όσον αφορά την επίδραση της ακετοΐνης, αυτή μελετήθηκε σε συγκεντρώσεις 100, 400, 800, 1000ppm.



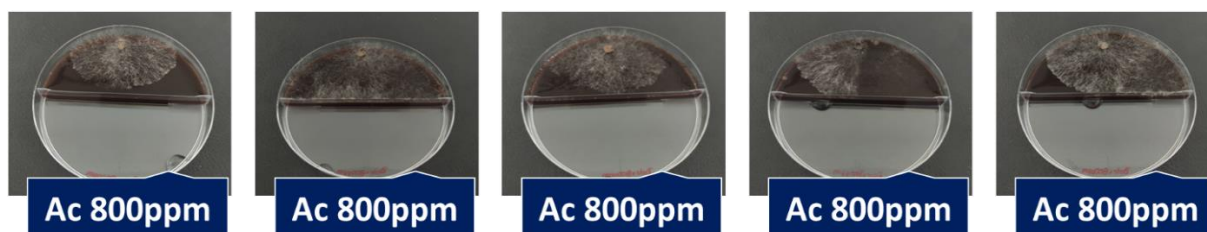
Εικόνα 16: *In vitro* μελέτη της επίδρασης της ακετοΐνης 100ppm στην ανάπτυξη του *B. cinerea* σε δοκιμή με τρυβλία

Πηγή: Φωτογραφικό υλικό Κοκμοτού Κατερίνα



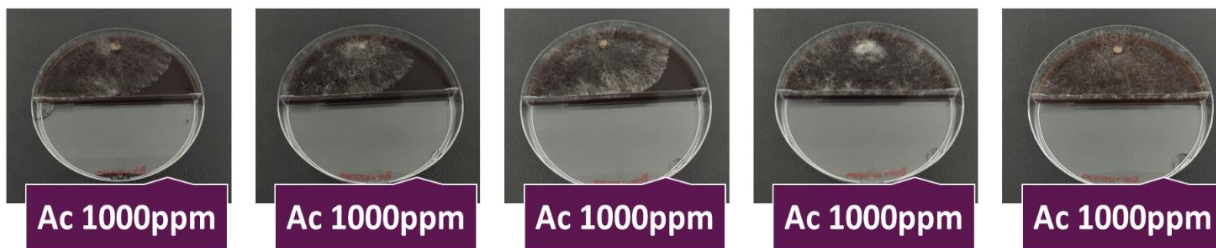
Εικόνα 17: *In vitro* μελέτη της επίδρασης της ακετοΐνης 400ppm στην ανάπτυξη του *B. cinerea* σε δοκιμή με τρυβλία

Πηγή: Φωτογραφικό υλικό Κοκμοτού Κατερίνα



Εικόνα 18: *In vitro* μελέτη της επίδρασης της ακετοΐνης 800ppm στην ανάπτυξη του *B. cinerea* σε δοκιμή με τρυβλία

Πηγή: Φωτογραφικό υλικό Κοκμοτού Κατερίνα



Εικόνα 19: In vitro μελέτη της επίδρασης της ακετοΐνης 1000ppm στην ανάπτυξη του *B. cinerea* σε δοκιμή με τρυβλία

Πηγή: Φωτογραφικό υλικό Κοκμοτού Κατερίνα



Εικόνα 20: In vitro μελέτη της επίδρασης του *B. velezensis* K165 στην ανάπτυξη του *B. cinerea* σε δοκιμή με τρυβλία

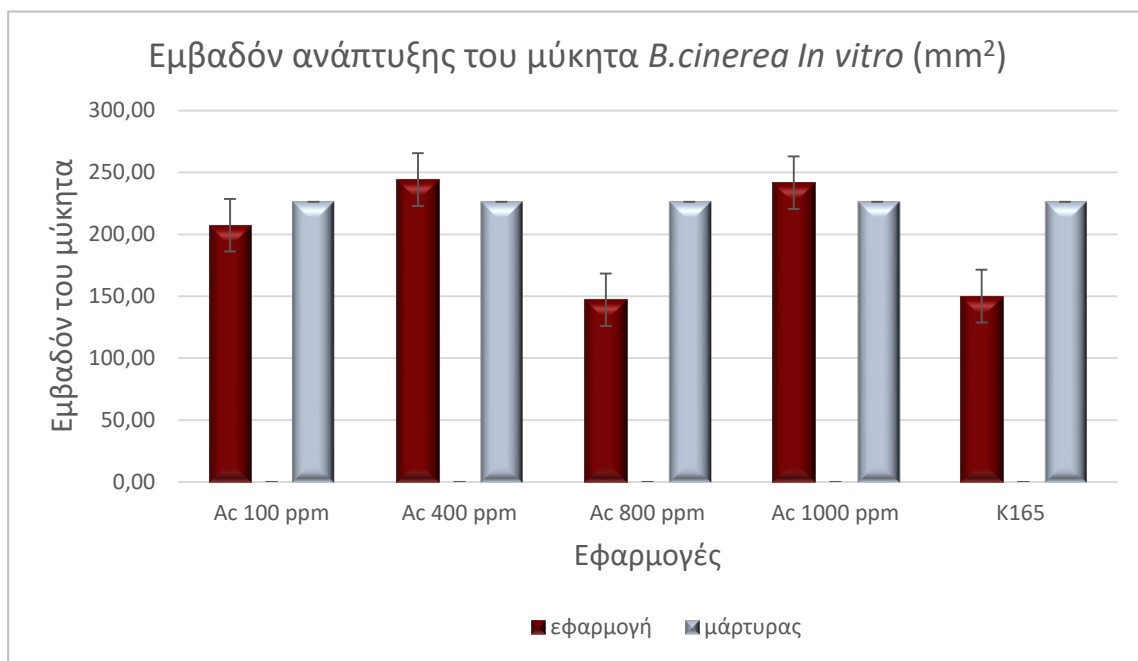
Πηγή: Φωτογραφικό υλικό Κοκμοτού Κατερίνα



Εικόνα 21: Θετικός μάρτυρας για το πείραμα μελέτης της επίδρασης των πτητικών ενώσεων στην ανάπτυξη του *B. cinerea* σε *In vitro* συνθήκες

Πηγή: Φωτογραφικό υλικό Κοκμοτού Κατερίνα

Από τις παραπάνω φωτογραφίες υπολογίστηκε το εμβαδόν ανάπτυξης του μύκητα *B. cinerea* σε *In vitro* συνθήκες και έτσι δημιουργήθηκε το Διάγραμμα 21.



Διάγραμμα 21: *In vitro* επίδραση των πτητικών ενώσεων ακετοΐνης σε συγκεντρώσεις 100, 400, 800 και 1000 ppm καθώς και του K165 στην ανάπτυξη του *B. cinerea*

Σύμφωνα με το Διάγραμμα 21, τα τρυβλία που εμφάνισαν σχετικά χαμηλότερη ανάπτυξη του μύκητα *B. cinerea* ήταν αυτά που υπήρχε το K165 ή η ακετοΐνη σε συγκέντρωση 800ppm. Ωστόσο, από την παρατήρηση της εικόνας των τρυβλίων και τα αποτελέσματα του Διαγράμματος που αφορούν το εμβαδόν ανάπτυξης του μύκητα, οι πτητικές ενώσεις δεν περιορίζουν σημαντικά την ανάπτυξη του *B. cinerea* *In vitro* υποδεικνύοντας έτσι ότι οι πτητικές ενώσεις επάγουν την φυτική άμυνα και δεν έχουν άμεση επίδραση στην ανάπτυξη του φυτοπαθογόνου μύκητα.

4. ΣΥΜΠΕΡΑΣΜΑΤΑ - ΣΥΖΗΤΗΣΗ

Ο μύκητας *B. cinerea* προκαλεί την ασθένεια τεφρά σήψη η οποία αποτελεί μια από τις πιο διαδεδομένες ασθένειες των φυτών με ευρύτατο φάσμα ξενιστών και παγκόσμια εξάπλωση. Ο *B. cinerea* θεωρείται παθογόνο υψηλού κινδύνου για την ανάπτυξη της ανθεκτικότητας και κατά το παρελθόν έχουν προκύψει πολύ σημαντικά προβλήματα ανθεκτικότητας σε πολλές χημικές ομάδες μυκητοκτόνων. Παρ' όλα αυτά, για τον φυτοπαθογόνο αυτό μύκητα δεν έχει μελετηθεί διεξοδικά η αντιμετώπισή του με χρήση βιολογικών παραγόντων.

Τα τελευταία χρόνια παρατηρείται μια έξαρση του ενδιαφέροντος σχετικά με την βιολογική αντιμετώπιση των ασθενειών και των εντόμων που προσβάλλουν τα φυτά. Αυτό συμβαίνει διότι αποτελεί την πιο σωστή και ορθολογιστική μέθοδο αντιμετώπισης των ασθενειών των καλλιεργειών, χωρίς ιδιαίτερους κινδύνους για τον άνθρωπο και για το περιβάλλον γενικότερα, ενώ δεν προκαλεί προβλήματα ανθεκτικότητας.

Η βιολογική αντιμετώπιση περιλαμβάνει τη χρήση μικροοργανισμών, οι οποίοι καταστέλλουν τη δραστηριότητα ενός φυτοπαθογόνου παρεμποδίζοντας τη μόλυνση ή περιορίζοντας την εκδήλωση μίας ασθένειας. Αφορά κυρίως την αξιολόγηση και αξιοποίηση σαπροφυτικών μη-φυτοπαθογόνων μικροοργανισμών όπως μυκήτων και βακτηρίων, που δρουν ως καταστολείς των παθογόνων μικροοργανισμών.

Τα αυξητικά ριζοβακτήρια αποτελούν μικροοργανισμούς της ριζόσφαιρας οι οποίοι μπορούν να χρησιμοποιηθούν ως βιολογικοί παράγοντες. Έχουν την ικανότητα να προάγουν την ανάπτυξη των φυτών, να ρυθμίζουν τα επίπεδα των ορμονών των φυτών και να μειώνουν τις ανασταλτικές επιδράσεις των διαφόρων παθογόνων (Glick, 2012). Τα σημαντικότερα PGPR που ενεργοποιούν την ISR ανήκουν στα γένη *Pseudomonas* και *Bacillus*. Τα τελευταία χρόνια το γένος *Bacillus* spp. έχει δεχτεί ιδιαίτερη προσοχή εξαιτίας της ικανότητας του να παράγει δραστικές ουσίες με δραστηριότητα κατά των μυκήτων και της ικανότητας τους να υπάρχουν στο έδαφος με μεγάλη βιωσιμότητα και υψηλό ποσοστό αποικισμού (Bjelić et al., 2018; Abbas et al., 2019; Miljaković et al., 2020). Χαρακτηριστικό παράδειγμα τέτοιου οργανισμού αποτελεί το βακτήριο *Bacillus velezensis* K165.

Πρόσφατα αναγνωρίστηκε ο δυνητικός ρόλος των πτητικών ενώσεων στην βιολογική αντιμετώπιση και στην προώθηση της φυτικής ανάπτυξης (Joo, 2022). Εντός του γένους *Bacillus*, οι κύριες μικροβιακές πτητικές ενώσεις που έχουν καταγραφεί με ικανότητα να προωθούν την ανάπτυξη των φυτών *A. thaliana*, για παράδειγμα μέσω αύξησης της βιομάζας του βλαστού, είναι η 2,3 -βουτανεδιόλη και η ακετοΐνη (Poveda, 2021). Επιπρόσθετα, η ακετοΐνη παραγόμενη από το βακτήριο *B. subtilis* έχει βρεθεί ότι επάγει τη διασυστηματική ανθεκτικότητα στα φυτά *A. thaliana* εναντίον του *Pseudomonas syringae* μέσω του μονοπατιού του σαλικυλικού οξέος (Rudrappa et al., 2010).

Όσον αφορά τις πτητικές ενώσεις που παράγονται από μύκητες, η μελέτη αυτών υστερεί σε σχέση με άλλων μεταβολιτών εξαιτίας μεθοδολογικών και τεχνολογικών περιορισμών (Morath et al., 2012). Ωστόσο, μερικά PGPF όπως μυκορριζικοί μύκητες, μη παθογενή στελέχη *Fusarium oxysporum*, *Trichoderma* sp. και *Penicillium* sp. GP16-2 έχει ανακαλυφθεί ότι μπορούν να μειώσουν την ασθένεια σε υπέργεια φυτικά μέρη επάγοντας την ISR (Schafer et al., 2009; Van der Ent et al., 2009; Van Loon et al., 1998).

Όπως προαναφέρθηκε, στην παρούσα μεταπτυχιακή διατριβή μελετήθηκε η επίδραση της έκθεσης των σπόρων φυτών τομάτας και *A. thaliana*, σε πτητικές ενώσεις του στελέχους *B. velezensis* K165, της ακετοΐνης καθώς και του ίδιου του *B. cinerea*, στην άμυνα εναντίον του φυτοπαθογόνου μύκητα *B. cinerea*. Ειδικότερα, στο πρώτο μέρος του πειράματος η μελέτη της επίδρασης των πτητικών ενώσεων έγινε με το πείραμα παθογένειας όπου παρατηρήθηκε η ανάπτυξη των συμπτωμάτων και η συχνότητα εμφάνισης προσβολής στα δύο φυτά σε συνθήκες θερμοκηπίου. Στο δεύτερο μέρος του πειράματος ακολούθησε μοριακή ανάλυση με εφαρμογή της ποσοτικής Real time PCR για την μελέτη έκφρασης γονιδίων τα οποία σχετίζονται με διαφορετικά μεταβολικά μονοπάτια και εμπλέκονται στην άμυνα των δύο αυτών φυτών. Στην συνέχεια, παρατηρήθηκε η επίδραση που είχε η έκθεση των σπόρων τομάτας στις υπό μελέτη πτητικές ενώσεις, στην ανάπτυξη των φυτών και συγκεκριμένα στο βάρος αυτών ενώ στο τελευταίο μέρος του πειράματος μελετήθηκε η *In vitro* επίδραση των πτητικών ενώσεων στην ανάπτυξη του *B. cinerea* σε τρυβλία.

Ξεκινώντας με το πείραμα παθογένειας που πραγματοποιήθηκε στα φυτά τομάτας, τα αποτελέσματα δείχνουν ότι τα φυτά που εκτέθηκαν στην ακετοΐνη και ύστερα μολύνθηκαν με το φυτοπαθογόνο μύκητα *B. cinerea* εμφάνισαν πολύ ήπια συμπτώματα καθώς επίσης και πολύ χαμηλή συχνότητα προσβολής σε σχέση με τις υπόλοιπες εφαρμογές. Επίσης, σε αυτή την επέμβαση τα φυτά εμφάνισαν μια πιο ζωηρή και υγιή εικόνα. Αυτό ήταν αναμενόμενο, καθώς βακτηριακές πτητικές ενώσεις και ιδίως η ακετοΐνη και η 2,3-βουτανεδιόλη ενεργοποιούν στα φυτά αμυντικές αντιδράσεις και προωθούν αποτελεσματικά την ανάπτυξη (Ping and Boland 2004; Cho et al., 2008; Ryu et al., 2003, 2004). Όσον αφορά τις υπόλοιπες εφαρμογές, οι συχνότητες προσβολής ήταν ίδιες και χαμηλότερες σε σχέση με τον μάρτυρα ενώ εμφάνισαν και μειωμένη ένταση συμπτωμάτων. Άλλωστε, όπως έχει αναφερθεί σε προηγούμενη μελέτη μας οι πτητικές ενώσεις του στελέχους K165 παρέχουν προστασία εναντίον του *B. cinerea*. Κατά συνέπεια, στην περίπτωση των φυτών τομάτας και οι τρεις εφαρμογές φάνηκαν να συνέβαλλαν με κάποιον τρόπο στην προστασία του φυτού εναντίον του μύκητα *B. cinerea*.

Συνεχίζοντας με το πείραμα παθογένειας που πραγματοποιήθηκε σε φυτά *A. thaliana*, γενικά φαίνεται να ισχύουν οι ίδιες παρατηρήσεις με αυτές στα φυτά τομάτας. Έτσι, και στην περίπτωση των φυτών *A. thaliana*, μπορούμε να συμπεράνουμε ότι οι τρεις επεμβάσεις συνέβαλλαν στην προστασία του φυτού

εναντίον του φυτοπαθογόνου μύκητα *B. cinerea* καθώς μείωσαν τα συμπτώματα και την συχνότητα προσβολής.

Από τη μοριακή ανάλυση που πραγματοποιήθηκε στα πλαίσια της παρούσας μεταπτυχιακής διατριβής σε φυτά τομάτας παρατηρούμε ότι τόσο για το γονίδιο *PR1* όσο και για το *PIN2*, εμφανίζονται μεγαλύτερες τιμές έκφρασης κυρίως την 3^η ημέρα μετά την μόλυνση (3dpi) σε σχέση με την 1^η ημέρα (1dpi). Επιπρόσθετα, παρατηρείται υπερέκφραση των εν λόγω γονιδίων και σε τοπικό και σε διασυστηματικό επίπεδο σχεδόν σε όλες τις εφαρμογές. Όμως, συγκρίνοντας την κάθε εφαρμογή ξεχωριστά, διακρίνεται εντονότερη έκφραση σε μολυσμένα φύλλα (IS) σε σχέση με μη μολυσμένα (UIS), υποδεικνύοντας ότι η επίδραση και των τριών πτητικών ενώσεων είναι κυρίως τοπική.

Συγκεκριμένα, για το γονίδιο *PR1* το οποίο ενεργοποιείται μέσω του βιοχημικού μονοπατιού του σαλικυλικού οξέος, μεγαλύτερη έκφραση παρατηρούμε σε εφαρμογές κατά την 3^η ημέρα μετά την μόλυνση (3dpi) και σε μολυσμένα φύλλα (IS). Ειδικότερα, ξεχωρίζει η εφαρμογή των φυτών που εκτέθηκαν στην ακετοΐνη και μολύνθηκαν και δευτερευόντως οι εφαρμογές που εκτέθηκαν στις υπόλοιπες υπό μελέτη πτητικές ενώσεις. Σύμφωνα και με άλλες μελέτες η 2,3-βουτανεδιόλη και η ακετοΐνη επάγουν την ISR σε φυτά μέσω του *PR1* γονιδίου, κυριάρχου ρυθμιστή του SA σήματος, μέσω της συσσώρευσης SA και ET (Silva Dias et al., 2021). Όσον αφορά τις πτητικές ενώσεις του K165 όπως προαναφέρθηκε η φυτοπροστατευτική του δραστηριότητα αποδίδεται σε μεγάλο βαθμό στην επαγωγή των μηχανισμών άμυνας των φυτών μέσω του μονοπατιού του σαλικυλικού οξέος. Σχετικά με τις πτητικές ενώσεις του *B. cinerea*, δεν φαίνεται να υπάρχουν βιβλιογραφικά δεδομένα σχετικά με το ποιες παράγει ο μύκητας και τον πιθανό τρόπο που αυτές έχουν την ικανότητα να επάγουν την φυτική άμυνα. Τέλος, το *PR1* υπερεκφράστηκε αρκετά και στον θετικό μάρτυρα το οποίο φαίνεται να είναι λογικό καθώς η SAR στην οποία το SA φαίνεται να έχει σημαντικό ρόλο, ενεργοποιείται κατόπιν μόλυνσεως με ένα παθογόνο. Γενικά, μπορούμε να πούμε ότι στα φυτά τομάτας το *PR1* ήταν το γονίδιο που εμφάνισε την πιο έντονη υπερέκφραση με αρκετά υψηλές τιμές.

Παράλληλα, και για το γονίδιο *PIN2*, στις περισσότερες περιπτώσεις μεγαλύτερη έκφραση παρουσιάζεται 3 ημέρες κατόπιν μόλυνσεως και σε μολυσμένα φύλλα (IS). Εντούτοις, ξεχωρίζει η εφαρμογή των φυτών που εκτέθηκαν στην ακετοΐνη και ύστερα μολύνθηκαν, σε διασυστηματικό επίπεδο (UIS) και έπεται η επέμβαση των φυτών που εκτέθηκαν στις πτητικές του *B. cinerea*. Γενικά, δεδομένου ότι ο μύκητας *B. cinerea* θεωρείται νεκροτροφικό παθογόνο, δικαιολογείται εν μέρει η ενεργοποίηση του μονοπατιού JA/ET και κατ'επέκταση η υπερέκφραση γονιδίων όπως το *PIN2*. Επιπρόσθετα, η υπερέκφραση του *PIN2* στην εφαρμογή με την ακετοΐνη ίσως σχετίζεται με το ότι η ακετοΐνη οδηγεί συχνά σε συσσώρευση ET και το *PIN2* σαν γονίδιο, συνδέεται με το μονοπάτι JA/ET.

Γενικά, μπορούμε να πούμε ότι στα φυτά τομάτας η έκθεση σπόρων στην ακετοΐνη, στο K165 ή στο *B. cinerea* προετοίμασε τα φυτά για την επερχόμενη μόλυνση και γι'

αυτό παρατηρήθηκε γονιδιακή υπερέκφραση των δύο υπό μελέτη γονιδίων κυρίως σε μολυσμένα φύλλα στις 3dpi.

Προχωρώντας στη μοριακή ανάλυση για τα φυτά *A. thaliana*, ειδικά στην περίπτωση των γονιδίων *PR1* και *PDF1.2* παρατηρούμε μεγαλύτερη έκφραση κατά κανόνα στην 3^η ημέρα μετά τη μόλυνση (3dpi) σε σχέση με την 1^η (1dpi) όπως ακριβώς σημειώθηκε και στα γονίδια της τομάτας. Παράλληλα, σχετικά με τη διασυστηματικότητα της προσδιδόμενης αντοχής, και στην περίπτωση αυτή φαίνεται να ισχύει η διαπίστωση ότι οι περισσότερες επεμβάσεις εμφανίζουν εντονότερη υπερέκφραση σε μολυσμένα φύλλα (IS) σε σχέση με τα μη μολυσμένα (UIS).

Πιο συγκεκριμένα, για το γονίδιο *PR1* η μεγαλύτερη έκφραση παρατηρήθηκε στην περίπτωση της εφαρμογής των φυτών που εκτέθηκαν στο K165 και ύστερα μολύνθηκαν. Αυτό φαίνεται να είναι σύμφωνο με τις παραπάνω πηγές καθώς και με τα αποτελέσματα προσφάτων πειραμάτων μας, τα οποία επισημαίνουν κατά πρώτο λόγο τη φυτοπροστατευτική δραστηριότητα των πτητικών ενώσεων του K165 και κατά δεύτερον λόγο την υπερέκφραση του γονιδίου στα φυτά *A. thaliana* που έχουν εκτεθεί σε αυτές (Κοκμοτού, 2021). Επίσης, ο θετικός μάρτυρας, εμφάνισε υψηλές τιμές έκφρασης *PR1* όπως άλλωστε αναφέρθηκε και στα φυτά τομάτας. Μεγάλη υπερέκφραση παρουσίασε και η εφαρμογή των φυτών που εκτέθηκαν στην ακετοΐνη και ύστερα μολύνθηκαν (1dpi), καθώς όπως έχει ήδη παρατηρηθεί, η εφαρμογή της ακετοΐνης μπορεί να προάγει την έκφραση του *PR1* σε φυτά *A. thaliana* (Rudrappa et al., 2010).

Στην περίπτωση του *PDF1.2*, η πιο έντονη έκφραση παρατηρήθηκε στην εφαρμογή φυτών που εκτέθηκαν στο K165 και ύστερα μολύνθηκαν (UIS 3dpi) αφού σύμφωνα και με τα προηγούμενα πειράματά μας, οι πτητικές ενώσεις του στελέχους K165, ύστερα από την μόλυνση των φυτών με τον *B. cinerea* ενεργοποίησαν την ISR καθώς υπερεκφράστηκαν τα γονίδια *PR1*, *PDF1.2* και *VSP2* (Κοκμοτού, 2021). Έντονη έκφραση παρουσίασαν και οι εφαρμογές που εκτέθηκαν στην ακετοΐνη και έπειτα μολύνθηκαν ενώ σύμφωνα με μελέτη των Rudrappa et al. τα φυτά *A. thaliana* στα οποία έχει εφαρμοστεί ακετοΐνη, εμφανίζουν αυξημένη έκφραση του *PDF1.2*, προτείνοντας ότι αυτή η ένωση στοχεύει SAR και ET μονοπάτια για αύξηση αμυντικών αντιδράσεων.

Το τελευταίο γονίδιο που μελετήθηκε, το *VSP2*, το οποίο εκφράζεται ύστερα από ενεργοποίηση του μονοπατιού του JA και συγκεκριμένα του τμήματος MYC μετά από τραυματισμό ή επίθεση φυτοφάγων εντόμων. Κατά την 1^η ημέρα, μεγαλύτερη έκφραση διαπιστώνεται στο θετικό μάρτυρα, άλλωστε το *VSP2* εκφράζεται μετά από ενεργοποίηση του JA το οποίο βοηθά στην άμυνα εναντίον νεκροτροφικών παθογόνων όπως είναι ο *B. cinerea*. Επίσης, αυξημένη έκφραση παρατηρήθηκε και στην επέμβαση των φυτών που εκτέθηκαν σε ακετοΐνη και ύστερα μολύνθηκαν άρα πιθανώς η ακετοΐνη να ενεργοποιεί και τα μονοπάτια του JA πέρα από τα μονοπάτια SA και ET. Όσον αφορά την υπερέκφραση του *VSP2* στις 3 ημέρες μετά την μόλυνση αυτή εμφανίστηκε στις εφαρμογές που εκτέθηκαν μελετώμενες

πτητικές ενώσεις στις οποίες όμως δεν ακολούθησε μόλυνση με τον φυτοπαθογόνο μύκητα. Έτσι, είναι πιθανό η έκθεση των σπόρων στις πτητικές αυτές ενώσεις, ακόμη και χωρίς μόλυνση, να ενεργοποιεί το μονοπάτι του JA.

Αξίζει ξανά να αναφερθεί ότι σχετικά με τις πτητικές ενώσεις του *B. cinerea* δεν φαίνεται να υπάρχουν βιβλιογραφικά δεδομένα σχετικά με το ποιες παράγει ο μύκητας και τον πιθανό τρόπο που αυτές επάγουν την φυτική άμυνα. Ωστόσο, η επέμβαση αυτή σύμφωνα με τα αποτελέσματα φάνηκε να παρουσιάζει αυξημένα επίπεδα έκφρασης κυρίως του *PR1* και στα δύο φυτά. Συνεπώς ένας πιθανός τρόπος δράσης των πτητικών ενώσεων του *B. cinerea* για την ενεργοποίηση της άμυνας των φυτών είναι η ενεργοποίηση του μονοπατιού του SA. Φυσικά για να διευκρινιστεί πλήρως ο τρόπος δράσης των πτητικών ενώσεων του *B. cinerea* στην φυτική άμυνα θα πρέπει αρχικά να προσδιοριστούν ποιες πτητικές ενώσεις παράγει ο μύκητας, με αέρια χρωματογραφία-φασματομετρία μάζας (GC-MS,) η οποία χάρη στον ισχυρό διαχωρισμό και στην ικανότητα ανίχνευσης με μεγάλη ευαισθησία αποτελεί την κύρια μέθοδο για ανίχνευση πτητικών ενώσεων που παράγονται από μύκητες (Matysiketal., 2009). Επιπλέον θα πρέπει να μελετηθεί περαιτέρω ο τρόπος με τον οποίο οι πιθανές αυτές πτητικές ενώσεις επάγουν την φυτική άμυνα και ποια μονοπάτια εμπλέκονται σε αυτό.

Γενικά, τα ευρήματα της μοριακής ανάλυσης υποστηρίζουν ότι στα αρχικά στάδια της μόλυνσης παρατηρούνται οι πρώτες αμυντικές αντιδράσεις οι οποίες εξασφαλίζουν μερική άμυνα στα φυτά η οποία έπειτα αυξάνεται με την πάροδο του χρόνου όπως φάνηκε την 3^η ημέρα μετά την μόλυνση. Επίσης τα δεδομένα υποδεικνύουν ότι η πρώιμη έκθεση στις πτητικές ενώσεις οδηγεί αρχικά σε ταυτόχρονη ενεργοποίηση των δύο μονοπατιών (σαλικυλικού οξέος και ιασμονικού/αιθυλενίου). Οι τυχόν διαφοροποιήσεις στα φυτά τομάτας και *A. thaliana*, όσον αφορά την υπερέκφραση των υπό μελέτη γονιδίων και κατ'επέκταση την πιθανή ενεργοποίηση διαφορετικών ορμονικών μονοπατιών, κατά πάσα πιθανότητα οφείλονται στην διαφορετικότητα των δύο αυτών φυτικών ειδών και στις διαφορετικές προκαλούμενες αμυντικές αντιδράσεις.

Από την μελέτη της επίδρασης των πτητικών ενώσεων στο βάρος φυτών τομάτας, ξεχώρισε η εφαρμογή της ακετοΐνης η οποία παρουσίασε βάρος σχεδόν μιάμιση φορά μεγαλύτερο από τον μάρτυρα ενώ όπως ήδη έχει αναφερθεί, η ακετοΐνη αποδεδειγμένα αποτελεί παράγοντα που προωθεί την ανάπτυξη των φυτών. Επιπρόσθετα, και η εφαρμογή με το στέλεχος K165 φάνηκε να έχει κάποια θετική επίδραση στο βάρος φυτών τομάτας.

Στο τελευταίο μέρος του πειράματος δηλαδή στην *In vitro* μελέτη, οι πτητικές ενώσεις που χρησιμοποιήθηκαν στα πλαίσια του πειράματος αυτού δεν αναστέλλουν την ανάπτυξη του *B. cinerea* καθώς ο μύκητας φάνηκε να αναπτύσσεται κανονικά στα τρυβλία. Μέσω αυτού γίνεται αντιληπτό ότι ο τρόπος δράσης των πτητικών ενώσεων σχετίζεται μόνο με την επαγωγή της φυτικής άμυνας και δεν υπάρχει απευθείας αναστολή της ανάπτυξης του μύκητα σε συνθήκες *In vitro*.

Συμπερασματικά, τα ευρήματα της παρούσας μεταπτυχιακής μελέτης επισημαίνουν γενικά τη φυτοπροστατευτική δραστηριότητα που εμφανίζουν οι μελετώμενες πτητικές ενώσεις η οποία μπορεί πιθανώς να αποδοθεί στην ενεργοποίηση της επαγόμενης διασυστηματικής αντοχής (ISR) εναντίον του μύκητα. Τέλος, απαιτείται περαιτέρω έρευνα για να επιβεβαιωθούν όλες οι παραπάνω παρατηρήσεις και να δημιουργηθούν νέες προοπτικές στην έρευνα για την χρήση αυτών των πιθανών βιολογικών παραγόντων στη σύγχρονη γεωργία.

Στο μέλλον, ενδιαφέρουσες προοπτικές μπορεί να βρεθούν στην επιλογή ή την γενετική τροποποίηση στελεχών PGPR για αυξημένη παραγωγή πτητικών ενώσεων που προωθούν την ανάπτυξη των φυτών ή που επάγουν διασυστηματική αντοχή (Ping et al, 2004). Επιπλέον, η εφαρμογή στα εναέρια μέρη των φυτών ιδιαίτερα ενεργών αλλά και φθινών ενώσεων όπως η ακετοΐνη για προώθηση της ανάπτυξης ή επαγωγή της ISR, μπορεί να αποτελέσει μια νέα και υποσχόμενη στρατηγική στον τομέα της γεωπονίας. Ταυτόχρονα, πρέπει να γίνουν λεπτομερείς μελέτες πάνω στη συνολική παραγωγή των πτητικών ενώσεων των οργανισμών PGPBs και PGMFs (η οποία στα αγγλικά αναφέρεται ως volatillome) για να διαπιστωθεί η τυχόν ύπαρξη αρνητικών επιδράσεων των πτητικών ενώσεων στα φυτά.

5. ΒΙΒΛΙΟΓΡΑΦΙΑ

- Agrios GN, 2005, Plant Pathology 5th edn. Elsevier. New York
- Angelopoulou D. J., E. Naska, E. Paplomatas, S. Tjamos, 2014, Biological control agents (BCAs) of verticillium wilt: influence of application rates and delivery method on plant protection, triggering of host defense mechanisms and rhizosphere populations of BCAs. Plant Pathology 63
- Bakker Peter, Ran L.X., Pieterse Corné, Van Loon L.C., 2013, Understanding the involvement of rhizobacteria-mediated induction of systemic resistance in biocontrol of plant diseases, ανακτήθηκε από https://www.researchgate.net/publication/46645603_Understanding_the_involvement_of_rhizobacteriamediated_induction_of_systemic_resistance_in_biocontrol_of_plant_diseases
- Choquer Mathias, Fournier Elisabeth, Kunz Caroline, Levis Caroline, Pradier Jean-Marc, Simon Adeline & Viaud Muriel, 2007, *Botrytis cinerea* virulence factors: new insights into a necrotrophic and polyphageous pathogen, Oxford Academic journals, ανακτήθηκε από <https://academic.oup.com>
- Elad Yigal, Williamson Brian, Tudzynski Paul and Delen Nafiz, 2007, *Botrytis* spp. and Diseases They Cause in Agricultural Systems – An Introduction In book: *Botrytis: Biology, Pathology and Control* (pp.1-8)
- Faretra F., Pollastro S., 1991, Genetic basis of resistance to benzimidazole and dicarboximide fungicides in *Botryotinia fuckeliana* (*Botrytis cinerea*), in Mycological Research Volume 95, Issue 8, August 1991, Pages 943-951
- Jarvis W.R., 1977, *Botryotinia* and *Botrytis* species - Taxonomy, physiology and pathogenicity. A guide to the literature, Monograph no. 14, Ottawa, Research Branch, Canada Department of Agriculture
- Kloepper Joseph, Ryu Choong-Min, Zhang Shouan, 2004, Induced Systemic Resistance and Promotion of Plant Growth by *Bacillus* spp, ανακτήθηκε από https://www.researchgate.net/publication/23407061_Induced_Systemic_Resistance_and_Promotion_of_Plant_Growth_by_Bacillus_spp
- Kanchiswamy CN., Malnoy M., Maffei M., 2015, Chemical diversity of microbial volatiles and their potential for plant growth and productivity, ανακτήθηκε από <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC4358370/>

- Martínez-Viveros O., Jorquera M.A., Crowley D.E., Gajardo G. and Mora M.L., 2010, Mechanisms and practical considerations involved in plant growth promotion by rhizobacteria, *J. Soil Sci. Plant Nutr.* v.10 n.3 Temuco jul. 2010 62
- Morath S., Hung R., Bennett J., 2012, Fungal volatile organic compounds: A review with emphasis on their biotechnological potential, ανακτήθηκε από <https://www.sciencedirect.com/science/article/abs/pii/S1749461312000176>
- Mulero-Aparicio Antonio , Cernava Tomislav, Turrà David , Schaefer Angelika, Di Pietro Antonio , López-Escudero Francisco Javier, Trapero Antonio and Berg Gabriele, 2019, The Role of Volatile Organic Compounds and Rhizosphere Competence in Mode of Action of the Non-pathogenic *Fusarium oxysporum* FO12 Toward *Verticillium* Wilt, ανακτήθηκε από https://www.researchgate.net/publication/334901158_The_Role_of_Volatile_Organic_Compounds_and_Rhizosphere_Compotence_in_Mode_of_Action_of_the_Nonpathogenic_Fusarium_oxysporum_FO12_Toward_Verticillium_Wilt
- Peralta I., Leadlay E., 2007, Diversity of wild and cultivated tomatoes: perspectives for conservation and sustainable use, ανακτήθηκε από <https://www.semanticscholar.org/paper/Diversity-of-wild-and-cultivated-tomatoes%3A-for-and-Peralta-Leadlay/b306684e39010717d8eef61413737923ecb890ce>
- Schulz-Bohm Kristin, Martín-Sánchez Lara and Garbeva Paolina 2017, Microbial Volatiles: Small Molecules with an Important Role in Intra- and Inter-Kingdom Interactions Department of Microbial Ecology, Netherlands Institute of Ecology (NIOO-KNAW), Wageningen, Netherlands, ανακτήθηκε από <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC5733050/>
- Sham Arjun, Al-Ashram Hibatullah, Whitley Kenna, Iratni Rabah, 2019, Metatranscriptomic Analysis of Multiple Environmental Stresses Identifies RAP2.4 Gene Associated with Arabidopsis Immunity to *Botrytis cinerea*, ανακτήθηκε από www.nature.com/scientificreports
- Van Kan, J. A. L. ,2005, Infection strategies of *Botrytis cinerea* Wageningen University, Laboratory of Phytopathology
- Vos Irene A., Moritz Liselotte , Pieterse Corné M. J., and Van Wees Saskia C. M.,2015, Impact of hormonal crosstalk on plant resistance and fitness under multi-attacker conditions, ανακτήθηκε από <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC4538242/>

- Williamson B., Tudzynski B., Tudzynski P. and J. A. L. Van Kan, 2007, *Botrytis cinerea*: the cause of grey mould disease, *Molecular Plant Pathology* (2007)
- Wu L., Chen H., Curtis C., 2014 Go in for the kill: How plants deploy effector-triggered immunity to combat pathogens, ανακτήθηκε από <https://www.tandfonline.com/doi/full/10.4161/viru.29755>
- Yarzabal Luis Andrés, Chica Eduardo J., 2019, Role of Rhizobacterial Secondary Metabolites in Crop Protection Against Agricultural Pests and Diseases in New and Future Developments in Microbial Biotechnology and Bioengineering, 2019
- Βελούκα Θ., 2013, Βιολογική δράση του καρβοξαμιδικού μυκητοκτόνου fluorogran και χαρακτηρισμός ανθεκτικών στελεχών του φυτοπαθογόνου μύκητα *Botrytis cinerea*, Διδακτορική διατριβή, Αριστοτέλειο Πανεπιστήμιο Θεσσαλονίκης
- Δούκα Α., 2018, Βιολογική αντιμετώπιση του μύκητα *Verticillium dahliae* στη καρπουζιά με το φυτοπροστατευτικό παράγοντα K165 σε 6 διαφορετικά είδη εδάφους, Μεταπτυχιακή διατριβή, Γεωπονικό Πανεπιστήμιο Αθηνών
- Ζιώγας Β.Ν. και Μάρκογλου Α.Ν., 2010. Γεωργική Φαρμακολογία. Βιοχημεία, φυσιολογία, μηχανισμοί δράσης και χρήσεις των φυτοπροστατευτικών προϊόντων. (Β' Έκδοση). Αθήνα, σελ: 1-872
- Η καλλιέργεια της τομάτας, 2017, Γεωπονικό Πανεπιστήμιο Αθηνών, ανακτήθηκε από [chrome-extension://efaidnbmnnnibpcajpcglclefindmkaj/https://www.aua.gr/ekk/wp-content/uploads/2017/01/%CE%9A%CE%91%CE%9B%CE%9B%CE%99%CE%95%CE%A1%CE%93%CE%95%CE%99%CE%91-%CE%A4%CE%9F%CE%9C%CE%91%CE%A4%CE%91%CE%A3-2017.pdf](https://www.aua.gr/ekk/wp-content/uploads/2017/01/%CE%9A%CE%91%CE%9B%CE%9B%CE%99%CE%95%CE%A1%CE%93%CE%95%CE%99%CE%91-%CE%A4%CE%9F%CE%9C%CE%91%CE%A4%CE%91%CE%A3-2017.pdf)
- Κοκμοτού Α., 2021, Επίδραση των πτητικών ενώσεων του στελέχους *Raenibacillus alvei* K165 στο μύκητα *Botrytis cinerea* σε φυτά *Arabidopsis thaliana*, Πτυχιακή διατριβή, Γεωπονικό Πανεπιστήμιο Αθηνών
- Κούμπουλα Π., 2019, Μεταπτυχιακή διατριβή: Βιολογική Αντιμετώπιση του μύκητα *Botrytis cinerea* σε φυτά τομάτας και μαρουλιού, Μεταπτυχιακή διατριβή, Γεωπονικό Πανεπιστήμιο Αθηνών
- Μαϊστρου Σ., 2011, Βιολογική αντιμετώπιση της αδροφουζαρίωσης της πεπονιάς, Μεταπτυχιακή διατριβή, Γεωπονικό Πανεπιστήμιο Αθηνών

- Ολύμπιος Χ., 2001. Η τεχνική της καλλιέργειας των κηπευτικών στα θερμοκήπια. Εκδόσεις Σταμούλης, Αθήνα
- Παντελίδης Ιάκωβος, 2009, Φυτοπαθολογική και μοριακή διερεύνηση των μηχανισμών που εμπλέκονται στην άμυνα των φυτών κατά των παθογόνων των αδρομυκώσεων, Διδακτορική διατριβή, Γεωπονικό Πανεπιστήμιο Αθηνών
- Στάσης Κ., 2018, Μελέτη της φυτοπροστατευτικής δράσης του βιολογικού παράγοντα *Raenibacillus alvei* στέλεχος K165 σε φυτά καρπουζιού εναντίον του μύκητα *Fusarium oxysporum f.sp. niveum* (fon) σε 6 διαφορετικούς τύπους υποστρώματος, Μεταπτυχιακή διατριβή, Γεωπονικό Πανεπιστήμιο Αθηνών
- Τζάμος Ε., 2007, Φυτοπαθολογία, Εκδόσεις ΑΘ. Σταμούλης, Αθήνα
Χατζηδημόπουλος Μ., 2014, Επιδημιολογία και αντιμετώπιση του βοτρυτή σε υδροπονική καλλιέργεια μαρουλιού, Διδακτορική διατριβή, Πανεπιστήμιο Θεσσαλίας
- Τσιβελίκα Ν., 2008, Τροποποίηση στην αποτελεσματικότητα της επιλογής με την εφαρμογή συνδυασμού μεθόδων βελτίωσης στην τομάτα, Μεταπτυχιακή διατριβή, Αριστοτέλειο Πανεπιστήμιο Θεσσαλονίκης