



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

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

**Μεταπτυχιακή Διπλωματική Εργασία**

Μελέτη της δράσης του βιολογικού παράγοντα *Pseudomonas putida*  
Z13 εναντίον του μύκητα *Botrytis cinerea* σε φυτά και καρπούς τομάτας

**Λίτσα Μ. Αμπντελνούρ**

Επιβλέπων καθηγητής:

Σωτήρης Τζάμος, Αναπληρωτής Καθηγητής ΓΠΑ

**ΑΘΗΝΑ  
2023**

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

**Μεταπτυχιακή Διπλωματική Εργασία**

Μελέτη της δράσης του βιολογικού παράγοντα *Pseudomonas putida* Z13 εναντίον του μύκητα *Botrytis cinerea* σε φυτά και καρπούς τομάτας

“Study of the mode of action of biological agent *Pseudomonas putida* Z13 against fungal pathogen *Botrytis cinerea* in tomato plants and fruits”

**Λίτσα Μ. Αμπντελνούρ**

Εξεταστική επιτροπή:

Σωτήρης Τζάμος, Αναπληρωτής Καθηγητής ΓΠΑ (επιβλέπων)

Αλίκη Τζίμα, Επίκουρη Καθηγήτρια ΓΠΑ

Ιωάννης Στριγγλής, Επίκουρος Καθηγητής ΓΠΑ

## Μελέτη της δράσης του βιολογικού παράγοντα *Pseudomonas putida* Z13 εναντίον του μύκητα *Botrytis cinerea* σε φυτά και καρπούς τομάτας

ΠΜΣ «Ολοκληρωμένα Συστήματα Φυτοπροστασίας και Διαχείρισης του Περιβάλλοντος»  
Τμήμα Επιστήμης Φυτικής Παραγωγής  
Εργαστήριο Φυτοπαθολογίας

### ΠΕΡΙΛΗΨΗ

Η τεφρά σήψη που προκαλείται από τον μύκητα *Botrytis cinerea*, αποτελεί μια σημαντική ασθένεια κατά την καλλιεργητική και μετασυλλεκτική περίοδο της τομάτας. Η βασική μέθοδος καταπολέμησης του παθογόνου είναι η χρήση συνθετικών σκευασμάτων, όμως η ανάπτυξη ανθεκτικών στελεχών του μύκητα σε αυτά και η εντεινόμενη ανησυχία για τις επιπτώσεις τους στο περιβάλλον, έχουν αυξήσει τις έρευνες που αξιολογούν την δράση βιολογικών παραγόντων έναντι του μύκητα. Το είδος *Pseudomonas putida* χρησιμοποιείται συχνά σε περιβαλλοντικές μελέτες, καθώς αποσυνθέτει την κυτταρίνη και τη χιτίνη και παράγει πολλά διαφορετικά αντιβιοτικά. Η παρούσα μελέτη αποσκοπεί στην αξιολόγηση της δράσης του βιολογικού παράγοντα *Pseudomonas putida* Z13, έναντι του μύκητα *B. cinerea*, σε φυτά και καρπούς τομάτας, ανάλογα με την εφαρμογή των μεταβολιτών ή των κυττάρων του στελέχους. Παρατηρήθηκε ότι η εφαρμογή των μεταβολιτών στους καρπούς και στις ρίζες των φυτών μείωσαν την ένταση της ασθένειας. Επίσης, μείωση των συμπτωμάτων της ασθένειας διαπιστώθηκε και στην εφαρμογή του αιωρήματος κυττάρων Z13 στα φύλλα και στις ρίζες συνδυαστικά. Η qPCR ανάλυση για την καταγραφή της έκφρασης των γονιδίων *PR1* και *PDFI.2* έδειξε πως τα γονίδια υπερεκφράστηκαν σχεδόν σε όλες τις εφαρμογές του Z13. Από την βιοπληροφορική ανάλυση φάνηκε ότι το Z13 είναι ικανό να παράγει πυρρολοκινολίνη κινόνη (pgg), την σιδηροφόρο ουσία πυοβερδίνη και άλλες ενώσεις που ενεργοποιούν την άμυνα των φυτών. Επομένως, η παρατηρούμενη μείωση των συμπτωμάτων δείχνει ότι το στέλεχος Z13 καταπολεμά τον παθογόνο μύκητα κυρίως μέσω της παραγωγής σιδηροφόρων και της ενεργοποίησης της διασυστηματικής άμυνας των φυτών.

**Επιστημονική περιοχή:** Φυτοπαθολογία

**Λέξεις κλειδιά:** Βοτρύτης, βιολογική αντιμετώπιση, *Pseudomonas putida*, επαγωγή της άμυνας των φυτών

**Study of the mode of action of the biocontrol agent *Pseudomonas putida* Z13 against *Botrytis cinerea* in tomato plants and fruits**

*MSc Integrated Plant protection Systems and Environmental Management  
Department of Crop Science  
Laboratory of Plant Pathology*

**ABSTRACT**

Grey mold, caused by *Botrytis cinerea*, is an important disease during the cultivation and postharvest period of tomatoes. Although fungicide treatment has been one of the main methods for controlling gray mold, there is increasing international concern over the heavy use of fungicides on crops because of the possible harmful effects on human health and the emergence of pathogen resistance to fungicides. Therefore, there is a need to develop alternative disease control methods, such as the use of plant beneficial microorganisms. *Pseudomonas putida* is a bacterium commonly used in environmental studies, it degrades cellulose and chitin, and also produces a large number of different antibiotics. The aim of the present study was to evaluate the biocontrol activity of strain *Pseudomonas putida* Z13 against *Botrytis cinerea* in tomato plants and fruits, depending on the metabolites or cell culture application. Also, a bioinformatic analysis was carried out to identify genes in Z13 genome that are involved in synthesizing compounds linked to biocontrol activity. The application of metabolites Z13 in tomato fruits and plant roots reduced disease severity compared to controls. Also, reduced disease severity was shown when Z13 cell culture was combined in root and leaf applications. The qPCR analysis revealed that expression of the defense associated genes *PR1* and *PDF1.2* was upregulated in the majority of Z13 treated plants and fruits. Finally, the bioinformatics analysis revealed that Z13 is able to produce pyrroloquinoline quinone (pqq), the siderophore pyoverdine and other compounds that trigger plant immune responses. Therefore, Z13 may constitute a biocontrol agent that targets pathogens mainly by siderophore production and induction of systemic resistance of plants.

**Scientific area:** Plant pathology

**Key words:** Grey mould, biocontrol, *Pseudomonas putida*, induction of plant immunity

## ΕΥΧΑΡΙΣΤΙΕΣ

Αρχικά, θα ήθελα να ευχαριστήσω ιδιαίτερα τον επιβλέποντα της διπλωματικής μου μελέτης κ. Σωτήριο Τζάμο, Αναπληρωτή Καθηγητή στο Εργαστήριο Φυτοπαθολογίας του Γ.Π.Α για την επιστημονική καθοδήγηση και την εμπύχωση που μου παρείχε καθ' όλη την διάρκεια εκπόνησης της μελέτης. Επιπλέον, τον ευχαριστώ θερμά για τον πολύτιμο χρόνο που μου αφιέρωσε καθώς και για την ενθάρρυνση του να συμμετάσχω σε επιστημονικά συνέδρια κατά την διάρκεια των σπουδών μου.

Επίσης, θα ήθελα να εκφράσω τις ευχαριστίες μου σε όλους του διδάσκοντες καθηγητές του Εργαστηρίου Φυτοπαθολογίας του Γ.Π.Α και κυρίως στον κ. Ε. Παπλωματά, Καθηγητή, Διευθυντή του Εργαστηρίου Φυτοπαθολογίας, στον κ. Δ. Τσιτσιγιάννη, Καθηγητή Γ.Π.Α και στην κα. Α. Τζίμα, Επίκουρη Καθηγήτρια Γ.Π.Α για τις πολύτιμες γνώσεις που μου μετέδωσαν μέσα από τις διαλέξεις του Μεταπτυχιακού Προγράμματος και οι οποίες αποτέλεσαν την βάση για την συγγραφή αυτής της διπλωματικής μελέτης. Επίσης, ευχαριστώ τον κ. Ι. Στριγγλή, Επίκουρο Καθηγητή, για τη συμμετοχή του στη τριμελή εξεταστική επιτροπή της μεταπτυχιακής μου μελέτης.

Επίσης ευχαριστώ όλα τα μέλη του Εργαστηρίου Φυτοπαθολογίας για το ευχάριστο κλίμα που δημιούργησαν και την υποψήφιο διδάκτορα κα. Ειρήνη Πουλάκη, Γεωπόνο, για την βοήθεια που μου προσέφερε όσο εκπονούσα τα πειράματα της μελέτης μου.

Τέλος, ευχαριστώ την οικογένεια μου για την αγάπη και την στήριξη που μου παρέχουν απεριόριστα.

---

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.

## **ΣΥΝΤΟΜΟΓΡΑΦΙΕΣ**

**BCA:** Παράγοντες βιολογικής αντιμετώπισης (Biological Control Agents)

**ET:** Αιθυλένιο (Ethylene)

**ETI:** Μηχανισμός άμυνας που ενεργοποιείται από τελεστές (Effector Triggered Immunity)

**ISR:** Επαγόμενη διασυστηματική άμυνα (Induced Systemic Resistance)

**JA:** Ιασμονικό οξύ (Jasmonic Acid)

**MAMPs:** Μοριακά μοτίβα που σχετίζονται με τον μικροοργανισμό (Microbe Associated Molecular Patterns)

**PAMPs:** Μοριακά μοτίβα που σχετίζονται με το παθογόνο (Pathogen Associated Molecular Patterns)

**PDF1.2:** Πρωτεΐνη ντιφενσίνης (Plant defensin 1.2)

**PGPR:** Ριζοβακτήρια που προάγουν την αύξηση των φυτών (Plant Growth promoting Rhizobacteria)

**PR1:** Πρωτεΐνη παθογένειας 1 (Pathogenesis Related Protein 1)

**PTI:** Μηχανισμός άμυνας που ενεργοποιείται από PAMPs (PAMP Triggered Immunity)

**qPCR ή Real-time PCR:** Ποσοτική αλυσιδωτή αντίδραση πολυμεράσης ή αλυσιδωτή αντίδραση πολυμεράσης πραγματικού χρόνου

**SA:** Σαλικυλικό οξύ (Salicylic Acid)

**SAR:** Επίκτητη διασυστηματική άμυνα (Systemic Acquired Resistance)

## ΠΕΡΙΕΧΟΜΕΝΑ

<b>1. Εισαγωγή</b> .....	11
<b>1.1. Solanum lycopersicum</b> .....	11
1.1.1. Ασθένειες της καλλιέργειας.....	11
1.1.2. Μετασυλλεκτική ζωή καρπών τομάτας.....	12
<b>1.2. Ο μύκητας Botrytis cinerea</b> .....	13
1.2.1. Ταξινόμηση και περιγραφή μύκητα.....	14
1.2.2. Επιδημιολογία του παθογόνου.....	15
1.2.3. Παθογένεια του μύκητα.....	17
1.2.4. Συμπτώματα.....	19
<b>1.3. Αντιμετώπιση του μύκητα Botrytis cinerea</b> .....	19
1.3.1. Καλλιεργητικά μέτρα.....	20
1.3.2. Χημική καταπολέμηση.....	21
1.3.3. Ανθεκτικές ποικιλίες.....	22
1.3.4. Βιολογική αντιμετώπιση.....	22
<b>1.4. Η άμυνα των φυτών</b> .....	24
1.4.1. Ενεργητικοί μηχανισμοί άμυνας των φυτών.....	24
1.4.1.1. Επαγόμενη από συντηρημένες δομές παθογόνων άμυνα (PAMP triggered immunity - PTI).....	24
1.4.1.2. Επαγόμενη από τελεστές άμυνα (effector triggered immunity - ETI).....	25
1.4.1.3. Επίκτητη διασυστηματική αντοχή (SAR).....	25
1.4.1.4. Επαγόμενη διασυστηματική αντοχή (ISR).....	26
1.4.2. Παράγοντες που συμβάλλουν στην ενεργοποίηση της διασυστηματικής άμυνας των φυτών.....	28
1.4.3. Ο ρόλος των φυτοορμονών στη μεταφορά του βιοχημικού σήματος.....	29
1.4.4. Βιοχημικές αντιδράσεις που προκαλεί η ενεργοποίηση της άμυνας στα φυτά.....	31
1.4.5. Ο ρόλος των γονιδίων <i>PR1</i> και <i>PDF1.2</i> στην άμυνα των φυτών.....	31
<b>1.5. Βιολογικοί παράγοντες του γένους Pseudomonas sp.</b> .....	33
1.5.1. Μηχανισμοί δράσης των βιολογικών προαγόντων <i>Pseudomonas sp.</i> .....	33
1.5.2. Ο βιολογικός παράγοντας <i>Pseudomonas putida Z13</i> .....	35
<b>1.6. Σκοπός εργασίας</b> .....	36
<b>2. Υλικά και μέθοδοι</b> .....	37



2.1. Φυτικό υλικό.....	37
2.2. Βιολογικό υλικό.....	37
2.3. Θρεπτικά υλικά .....	37
2.4. Διαλύματα εξαγωγής RNA από φύλλα και καρπούς τομάτας.....	37
2.5. Προετοιμασία και εφαρμογή του μολύσματος <i>B. cinerea</i> .....	38
2.6. Προετοιμασία και εφαρμογή του βακτηρίου <i>P. putida</i> Z13.....	39
2.7. Προετοιμασία ψεκαστικού υγρού Polyversum και εφαρμογή.....	39
2.8. Καταγραφή συμπτωμάτων.....	41
2.9. Απομόνωση RNA από φυτά και καρπούς τομάτας.....	41
2.10.Καταστροφή υπολειμμάτων DNA.....	43
2.11.Μέτρηση νουκλεϊκών οξέων .....	43
2.12.Σύνθεση cDNA.....	43
2.13. Ποσοτικοποίηση των γονιδίων <i>PR1</i> και <i>PDF1.2</i> με qPCR.....	44
2.14.Βιοπληροφορική ανάλυση.....	45
<b>3. Αποτελέσματα.....</b>	<b>47</b>
<b>3.1. Πειράματα αξιολόγησης δράσης του βιολογικού παράγοντα Z13.....</b>	<b>47</b>
3.1.1. Αποτελέσματα πειράματος παθογένειας στα φυτά.....	48
3.1.1.1. Αποτελέσματα από την εφαρμογή του Z13 – υπερκείμενο.....	48
3.1.1.2. Αποτελέσματα από την εφαρμογή του Z13 – κύτταρα.....	49
3.1.2. Διερεύνηση έκφρασης των γονιδίων <i>PR1</i> και <i>PDF1.2</i> σε φυτά τομάτας..	50
3.1.2.1. Έκφραση των γονιδίων <i>PR1</i> και <i>PDF1.2</i> στην εφαρμογή του Z13- υπερκείμενο .....	50
3.1.2.2. Έκφραση των γονιδίων <i>PR1</i> και <i>PDF1.2</i> στην εφαρμογή του Z13- κύτταρα.....	51
3.1.3. Πείραμα παθογένειας σε καρπούς τομάτας.....	54
3.1.4. Διερεύνηση έκφρασης των γονιδίων <i>PR1</i> και <i>PDF1.2</i> στους καρπούς τομάτας.....	55
<b>3.2. Αποτελέσματα βιοπληροφορικής ανάλυσης .....</b>	<b>58</b>
3.2.1. Αναδιάταξη και συγκριτική ανάλυση.....	58
3.2.2. Ανίχνευση γονιδίων που εμπλέκονται στην δράση του <i>P. putida</i> Z13....	59
<b>4. Συμπεράσματα.....</b>	<b>64</b>
<b>5. Βιβλιογραφία.....</b>	<b>71</b>



## **1. Εισαγωγή**

### **1.1 *Solanum lycopersicum***

Η τομάτα (*Solanum lycopersicum*) κατατάσσεται ανάμεσα στις καλλιέργειες λαχανικών με την μεγαλύτερη κατανάλωση παγκοσμίως και αποτελεί απαραίτητο συστατικό τόσο στην ελληνική όσο και στην μεσογειακή διατροφή. Παγκοσμίως, η τομάτα κατέχει την τρίτη θέση σε όγκο παραγωγής μετά την πατάτα και την γλυκοπατάτα, και την πρώτη θέση όσον αφορά τους όγκους επεξεργασίας. Σύμφωνα με την EUROSTAT, το 2018, η Ελλάδα κατέλαβε την έβδομη θέση στην Ευρώπη για την παραγωγή και συγκομιδή τομάτας με όγκο 885.150 τόνων (Anastasiadis et al., 2020)

Καλλιεργείται για τον καρπό της, ο οποίος καταναλώνεται ώριμος, νωπός, αποξηραμένος, σε άλμη, ακέραιος ή σε πολτό. Η δημοτικότητα της καλλιέργειας ποικίλλει στις διάφορες χώρες, αλλά είναι ελάχιστες οι περιοχές της γης όπου η τομάτα δεν καλλιεργείται με καμία από τις μορφές καλλιέργειας της. Ως θερμοαπαιτητικό λαχανικό, η καλλιέργεια της τομάτας στην ύπαιθρο, στην Ελλάδα, είναι δυνατή μόνο κατά την διάρκεια της θερμής εποχής. Επομένως η εκτός εποχής παραγωγή τομάτας στη χώρα μας είναι δυνατή μόνο σε θερμοκήπια. (Ολύμπιος 2015).

### **1.2 Ασθένειες της καλλιέργειας**

Η καλλιέργεια της τομάτας χαρακτηρίζεται από χαμηλή γενετική ποικιλότητα λόγω της εντατικής επιλογής και του φαινομένου της στενωπού (genetic bottleneck) που προέκυψαν κατά την εξέλιξη και την εξημέρωση της. Για αυτό η τομάτα είναι πιο επιρρεπής σε προσβολές από παθογόνα φυτών κατά την περίοδο της καλλιέργειας καθώς και μετά την συγκομιδή (Panno et al., 2021).

Μέχρι σήμερα, περισσότερο από 200 παθογόνοι μικροοργανισμοί έχουν εντοπιστεί στη τομάτα, προκαλώντας απώλειες στην παραγωγή. Μερικές από τις πιο σημαντικές ασθένειες της τομάτας που προκαλούνται από παθογόνους μύκητες είναι οι αδρομυκώσεις (*Verticillium dahliae*, *Fusarium oxysporum* f. sp. *lycopersici*), περονόσπορος (*Phytophthora infestans*), ωίδιο (*Leveillula taurica*), σκληρωτινίαση (*Sclerotinia sclerotiorum*) και η τεφρά σήψη (*Botrytis cinerea*). Σημαντικές ζημιές προκαλούν επίσης οι ιοί, αφού δεν υπάρχει στην γεωργική πράξη κανένα θεραπευτικό

μέτρο κατά των ιώσεων των φυτών, όπως είναι ο ιός του μωσαϊκού του καπνού - *TMV* και ο ιός του κίτρινου καρουλιάσματος των φύλλων – *TYLCV* (Blancard et al., 2012).

Ανάμεσα στα παθογόνα που ευθύνονται για τις μετασυλλεκτικές ασθένειες των κηπευτικών συγκαταλέγονται οι μύκητες και τα πηκτινολυτικά βακτήρια. Ωστόσο, είναι γνωστό ότι κυρίως οι μύκητες, όπως *Alternaria*, *Aspergillus*, *Botrytis*, *Colletotrichum*, *Diplodia*, *Monilinia*, *Penicillium*, *Phomopsis*, *Rhizopus*, *Mucor* και *Sclerotinia*, είναι αυτοί που προκαλούν υψηλό ποσοστό μετασυλλεκτικών απωλειών στην παραγωγή των κηπευτικών. Οι περισσότεροι από αυτούς τους μικροοργανισμούς είναι παθογόνα αδυναμίας και μπορούν να εισέλθουν στο εσωτερικό του καρπού μόνο μέσω πληγών. Συνεπώς, οι μηχανικοί τραυματισμοί κατά την συγκομιδή, διαλογή, μεταφορά και αποθήκευση του προϊόντος διευκολύνουν την είσοδο τέτοιων παθογόνων (Singh & Sharma 2018).

### **1.3 Μετασυλλεκτική ζωή των καρπών τομάτας**

Ο χρόνος ζωής της τομάτας μετά την συγκομιδή δεν είναι μεγαλύτερος από 2-3 εβδομάδες και οι άριστες θερμοκρασίες κατά την αποθήκευση εξαρτώνται από το στάδιο ωριμότητας του καρπού. Για τους ανώριμους καρπούς τομάτας το εύρος των θερμοκρασιών αποθήκευσης είναι υψηλότερο από αυτό των ώριμων καρπών, για να προωθηθεί ο σχηματισμός λυκοπενίου και καροτενίου και συνεπώς να προωθηθεί η ωρίμανση (Σάββας 2016).

Χαρακτηριστική στην τομάτα όπως και στους άλλους κλιμακτηριακούς καρπούς είναι η «αυτοκαταλυτική» παραγωγή αιθυλενίου η οποία θεωρείται ότι αποτελεί το έναυσμα για φυσιολογικές και βιοχημικές αλλαγές στους καρπούς της τομάτας κατά την ωρίμανσή τους (Li et al., 2019). Παράλληλα, η δραστηριότητα των πηκτινολυτικών ενζύμων του καρπού, αυξάνει με την πάροδο του χρόνου και οδηγεί στην αποδόμηση του κυτταρικού τοιχώματος και υποβάθμιση της ποιότητας του προϊόντος. Συγκεκριμένα, οι πολυγαλακτορουνάσες (PGs) και οι πηκτινομεθυλεστεράσες (PMEs) είναι τα δύο κύρια και πιο μελετημένα πηκτινολυτικά ένζυμα στη τομάτα (Verlent et al., 2005). Επιπλέον, πρόσφατες μελέτες έχουν αποδείξει ότι κατά την διάρκεια της ωρίμανσης, ο καρπός χάνει σταδιακά την δυνατότητα ενεργοποίησης μηχανισμών άμυνας, παραγωγής αμυντικών ορμονών και μεταγενέστερων αντιδράσεων μεταγραφής. Αυτό έχει ως αποτέλεσμα ο ώριμος κόκκινος καρπός να γίνεται περισσότερο επιρρεπής σε μετασυλλεκτικές ασθένειες κατά την αποθήκευση του (Silva et al., 2020).



**Εικόνα 1:** Ευαισθησία των καρπών τομάτας στον μύκητα *B. cinerea* σε διάφορα στάδια ωριμότητας. Συμπτώματα στις 3 ημέρες μετά την εφαρμογή σπορίων του μύκητα σε πηγές των καρπών (τροποποιήθηκε από Blanco-Ulate et al., 2016)

Για να μειωθούν οι απώλειες στους αποθηκευμένους καρπούς, η αγορά τείνει σε ποικιλίες με μεγαλύτερη μετασυλλεκτική ζωή (long shelf life), όπως υβρίδια των οποίων οι καρποί περιέχουν υψηλό δείκτη σακχάρων και ταυτόχρονα διατηρούν χαμηλή απώλεια βάρους και διαθέτουν μεγαλύτερη μετασυλλεκτική ζωή (Arah et al., 2015). Επίσης, εφαρμόζονται μετασυλλεκτικοί χειρισμοί όπως η έκθεση των καρπών σε ακτινοβολία UV-C και 1- MCP, που καθυστερούν την ωρίμανση των καρπών και βελτιώνουν τα ποιοτικά τους χαρακτηριστικά όταν αποθηκεύονται σε χαμηλά επίπεδα αιθυλενίου (Pristijono et al., 2017).

## 1.2 Ο μύκητας *Botrytis cinerea*

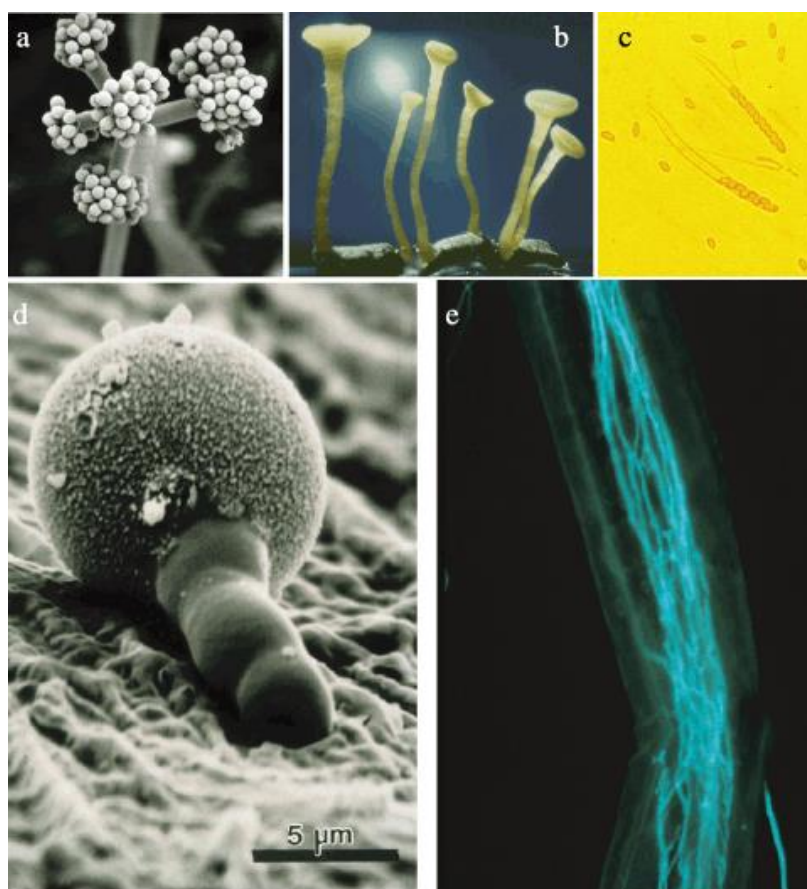
Ο μύκητας *Botrytis cinerea* προκαλεί την ασθένεια της τεφράς σήψης (gray mold), και χαρακτηρίζεται από ένα ευρύ φάσμα ξενιστών (περίπου 1000 διαφορετικά είδη). Ως νεκροτροφικός μύκητας, προτιμά να προσβάλλει και να αναπτύσσεται στους εξασθενημένους και γηρασμένους φυτικούς ιστούς, προκαλώντας τελικά κυτταρικό θάνατο. Η ασθένεια προσβάλλει τα περισσότερα καλλιεργούμενα φυτά, ειδικά αυτά που καλλιεργούνται υπό κάλυψη, προκαλώντας σοβαρές ζημιές σε κηπευτικά (όπως τομάτα, μαρούλι, αγκινάρα, λάχανο κ.ά) και καλλωπιστικά φυτά. Το παθογόνο έχει την ικανότητα να προσβάλλει φυτά όλων των ηλικιών καθώς και τους συγκομισμένους καρπούς κατά την διακίνηση και αποθήκευση (Παναγόπουλος 1995).

### 1.2.1 Ταξινόμηση και περιγραφή μύκητα:

<b><i>Botryotinia fuckeliana:</i> (τέλεια μορφή)</b>	<b><i>Botrytis cinerea:</i> (ατελής μορφή)</b>
Βασίλειο: Μύκητες	Βασίλειο: Μύκητες
Φύλλο: Ascomycota	Φύλλο: Ascomycota
Υπόφυλλο: Pezizomycotina	Κλάση: Agonomycetes
Τάξη: Leotiomycetes	Τάξη: Moniliales
Σειρά: Helotiales	Οικογένεια: Moniliaceae
Οικογένεια: Sclerotiniaceae	Γένος: Botrytis
Γένος: Botryotinia	

**Πίνακας 1:** Ταξινόμηση της τέλειας και ατελής μορφής του παθογόνου (Williamson 2007, Τζάμος 2007)

Γενικά, τα είδη της οικογένειας Moniliaceae σχηματίζουν υαλώδη μονοκύτταρα κονίδια παραγόμενα σε ελεύθερους κονιδιοφόρους ή φιαλίδια. Το αντιπροσωπευτικό είδος *B. cinerea* (ατελής μορφή) σχηματίζει κονιδιοφόρους οι οποίοι αποτελούνται από μακρύ καστανό ποδίσκο και ο οποίος στην κορυφή του, πάνω σε μακριές και σε εναλλαγή εκφυόμενες διακλαδώσεις, φέρει κονίδια κατά κεφαλές υπό μορφή βότρυος. Τα κονίδια είναι ωοειδή ή σφαιρικά μονοκύτταρα, λεία και υαλώδη. Η τέλεια μορφή (*Botryotinia fuckeliana*) προέρχεται από τα σκληρώτια του μύκητα τα οποία έχουν διάμετρο περίπου 3 mm, βλαστάνουν κάτω από ειδικές συνθήκες και παράγουν αποθήκια ή δίνουν μυκήλιο ή κονιδιοφόρους. Πρόκειται για ανθεκτικές κατασκευές μαύρου χρώματος, επίμηκες ή σφαιρικές, που σχηματίζονται όταν οι συνθήκες δεν είναι ευνοϊκές (Τζάμος 2007).

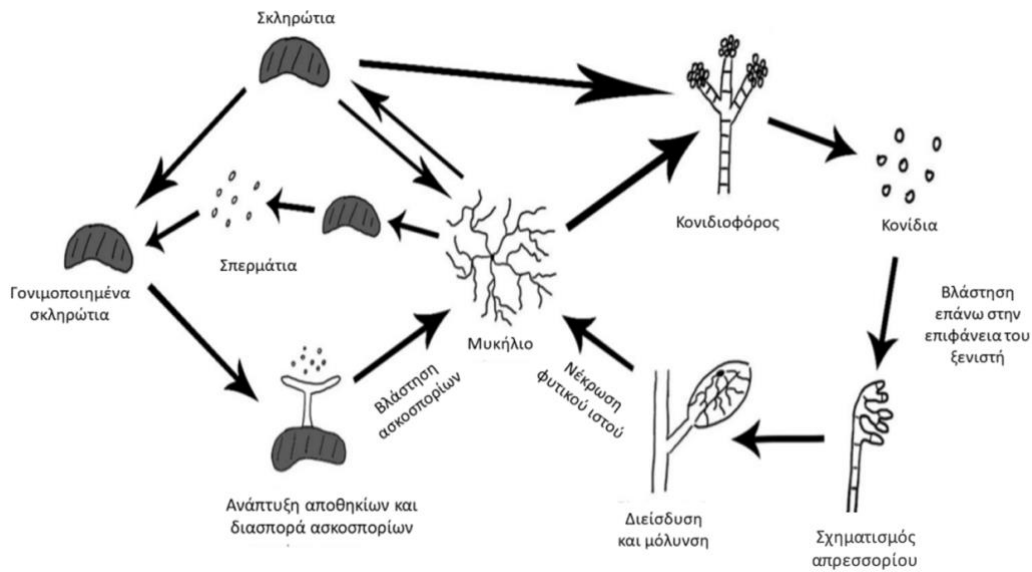


**Εικόνα 2.** **a)** Κονιδιοφόροι και κονίδια του μύκητα *B. cinerea*, **b)** Αποθήκια της ατελούς μορφής (*Botryotinia fuckeliana*), **c)** Δύο ασκοί που περιέχουν τα ασκοσπόρια του μύκητα, ανάμεσα σε άλλα ελεύθερα ασκοσπόρια, **d)** Κονίδιο που βλαστάνει χωρίς την ύπαρξη σταγονιδίων ύδατος σε οξεία επιφάνεια πετάλου τριαντάφυλλου **e)** υφές του μύκητα *B. cinerea* που αναπτύσσονται εντός των ιστών φυτού (Williamson et al., 2007)

### 1.2.3 Επιδημιολογία του παθογόνου

Η εγγενής καρποφορία του μύκητα είναι τα σκληρώτια τα οποία αντιπροσωπεύουν έναν σημαντικό μηχανισμό επιβίωσης του υπό αντίξοες συνθήκες. Η ανάπτυξη των σκληρωτίων ξεκινάει στις αρχές της άνοιξης σε εύκρατες περιοχές, για την παραγωγή κονιδιοφόρων και πολυπυρηνικών κονιδίων. Τα μυκήλια επίσης επιβιώνουν μέσα σε μολυσμένους νεκρούς ιστούς του ξενιστή που απομένουν ως υπολείμματα καλλιεργειών και μέσα σε σπόρους. Σε πολυετή φυτά, τα νεκρά φύλλα, τα άνθη και οι μουμιοποιημένοι καρποί περιέχουν μάζες μυκηλίου που συχνά βρίσκονται σε ιδανική θέση για να παράγουν κονίδια και να προκαλέσουν μετέπειτα μολύνσεις. Ωστόσο, η αγενής

καρποφορία του παθογόνου είναι οι κονιδιοφόροι και τα κονίδια τους αποτελούν την πηγή των πρωτογενών μολύνσεων της ασθένειας (Williamson et al., 2007).



**Εικόνα 3.** Βιολογικός κύκλος του μύκητα *B. cinerea* (τροποποιήθηκε από Cheung et al., 2020)

Η είσοδος του μύκητα επιτυγχάνεται κυρίως μέσω πληγών ή φυσικών ανοιγμάτων. Η είσοδος σε νεαρά τμήματα και ανώριμους καρπούς συνήθως οδηγεί σε λανθάνουσες, μικρής κλίμακας, μολύνσεις. Ανεξάρτητα από τον τύπο της μόλυνσης το παθογόνο γενικά εισέρχεται σε μια μικρής διάρκειας ασυμπτωματική, βιοτροφική φάση στην αρχή του βιολογικού του κύκλου. Η φάση αυτή συνήθως ακολουθείται από μια επιθετική νεκροτροφική περίοδο όταν τα τμήματα του φυτού περνάνε στην περίοδο της γήρανσης και ωρίμανσης, κατά την οποία το παθογόνο προκαλεί γρήγορη αποσύνθεση των μολυσμένων φυτικών ιστών (Petrasch 2019).

Είναι ευρέως γνωστό ότι οι συνθήκες του μικροκλίματος, ιδιαίτερα η θερμοκρασία και η υγρασία είναι παράγοντες κλειδιά για την προσβολή από τον μύκητα *B. cinerea*. Ο μύκητας ευνοείται από ένα μεγάλο εύρος θερμοκρασιών αφού τα κονίδια του μπορούν να βλαστάνουν σε θερμοκρασίες από 0°C έως 30°C, και με άριστες θερμοκρασίες μεταξύ 20-25°C. Σε θερμοκρασίες των 30°C και άνω, τα κονίδια δεν παράγονται και η ανάπτυξη του παθογόνου παρεμποδίζεται. Όσον αφορά την υγρασία, η συγκέντρωση των κονιδίων στον αέρα λαμβάνει μέγιστο αριθμό τις περιόδους με υψηλή



υγρασία, μετά από βροχοπτώσεις. Συνεπώς η υψηλή σχετική υγρασία του περιβάλλοντος ευνοεί σε μεγάλο βαθμό την ανάπτυξη των κονιδίων του παθογόνου (Latorre et al., 2015).

Η ελευθέρωση και διασπορά των κονιδίων γίνεται κυρίως με τον άνεμο (ξηροσπóρια) και σε μικρότερη κλίμακα με τις σταγόνες νερού. Διασπορά των μολυσμάτων (κονιδίων) και μεταφορά τους στα υγιή φυτά γίνεται επίσης με τα χέρια, τα ρούχα, και τα εργαλεία των εργατών κατά την εκτέλεση των καλλιεργητικών φροντίδων ιδιαίτερα μέσα στα θερμοκήπια (Παναγόπουλος 1995).

### 1.2.3 Παθογένεια του μύκητα

Τα στάδια στην διαδικασία μόλυνσης ενός φυτού από το παθογόνο *B. cinerea* είναι: α) η διάτρηση της επιφάνειας του ξενιστή, β) νέκρωση των φυτικών ιστών, γ) σχηματισμός αρχικής κηλίδας προσβολής, δ) επέκταση προσβολής, ε) αποδόμηση του ιστού και στ) σποροποίηση (Van Kan 2006).

Η ικανότητα του μύκητα *B. cinerea* να συνθέτει έναν μεγάλο αριθμό ενζύμων και μεταβολιτών επιτρέπει στο παθογόνο να προσβάλλει πάνω από 200 είδη ξενιστών. Κάθε ένωση που συνθέτει ο μύκητας και εμπλέκεται στην παθογένεια του, μπορεί να συμβάλλει και σε διαφορετικό στάδιο μόλυνσης (Nakajima & Akutsu 2014).

- **Ρόλος των εξωκυτταρικών πρωτεϊνών στην παθογένεια**

Το κυτταρικό τοίχωμα των φυτών είναι ένα από τα πρώτα εμπόδια που θα συναντήσει ο παθογόνος μικροοργανισμός στην προσπάθεια του να μολύνει το φυτό. Επειδή πρόκειται για μια ετερογενή δομή, αποτελούμενη κυρίως από πολυσακχαρίτες και πρωτεΐνες, ο μύκητας *B. cinerea* αδυνατεί να την διαπεράσει. Για αυτό, είναι αναγκαίο να εκκρίνει ένζυμα αποδόμησης του κυτταρικού τοιχώματος (CWDEs- cell wall degrading enzymes) ώστε να αποδομήσει τους δομικούς πολυσακχαρίτες του κυτταρικού τοιχώματος του ξενιστή. Παρόλο που το παθογόνο διαθέτει έναν μεγάλο αριθμό γονιδίων υπεύθυνα για την έκφραση τέτοιων ενζύμων, μόνο λίγα από αυτά έχουν επιβεβαιωθεί πως συμβάλλουν σημαντικά στην παθογένεια του. Συγκεκριμένα, πρόκειται για δύο ενδοπολυγαλακτορουνάσες (BcPG1 και BcPG2) που σχετίζονται με την ικανότητα του μύκητα *B. cinerea* να διεισδύει στον φυτικό ιστό και να αποδομεί με ευκολία τα κυτταρικά τοιχώματα του (Hua et al., 2018).

- **Ρόλος των ενεργών μορφών οξυγόνου στην παθογένεια**

Σε περιπτώσεις μη συμβατής σχέσης μεταξύ παθογόνου και ξενιστή, σε σύντομο χρονικό διάστημα παρατηρείται το φαινόμενο της οξειδωτικής έκρηξης (oxidative burst) όπου το φυτό προκαλεί ταχύτατη νέκρωση των κυττάρων στην περιοχή της μόλυνσης με αποτέλεσμα να απομονώνει το παθογόνο στην αρχική θέση διείσδυσης και να μην εξαπλώνεται η μόλυνση (Hofius et al. 2007).

Ως νεκροτροφικός μύκητας ο *B. cinerea* ευνοείται από αυτόν τον προγραμματισμένο κυτταρικό θάνατο και ο φυτικός ιστός γίνεται ευπαθέστερος στη προσβολή. Συνεπώς, η αντίδραση υπερευαισθησίας (hypersensitive response - HR) θεωρείται και εκείνη ένας μολυσματικός παράγοντας που οδηγεί στην επιτυχή εγκατάσταση του παθογόνου (Govrine & Levine 2000).

- **Ρόλος του οξαλικού οξέος στην παθογένεια**

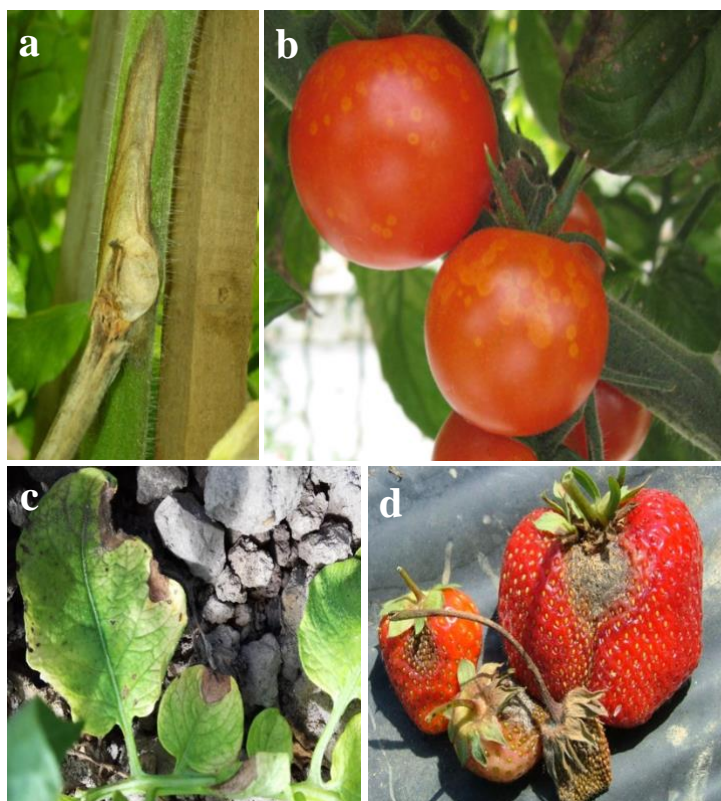
Ο ρόλος του οξαλικού οξέος (OA) είναι αρκετά γνωστός στην παθογένεια του μύκητα *Sclerotinia sclerotiorum*, συγγενικό είδος του μύκητα *B. cinerea*. Ανάμεσα στις λειτουργίες του οξαλικού οξέος είναι η αύξηση της δραστηριότητας των πολυγαλακτορουνάσεων σε χαμηλές τιμές pH, η παρεμπόδιση της δράσης των φυτοπροστατευτικών ενζύμων του ξενιστή και η αναστολή της οξειδωτικής έκρηξης. Ο μύκητας *B. cinerea* έχει την δυνατότητα να παράγει οξαλικό οξύ κατά το στάδιο επέκτασης της προσβολής σε φυτά ξενιστές (*in vivo*) καθώς και σε θρεπτικά υποστρώματα (*in vitro*), και έτσι καταφέρνει να εγκατασταθεί με επιτυχία (Nakajima & Akutsu 2014)

- **Ρόλος των τοξινών στην παθογένεια**

Είναι γνωστό ότι πολλά φυτοπαθγόνα παράγουν φυτοτοξίνες και τις χρησιμοποιούν ως χημικό όπλο στην διαδικασία της μόλυνσης. Για τον μύκητα *B. cinerea* έχουν μελετηθεί οι φυτοτοξίνες botrydial και έχει διαπιστωθεί πως προκαλούν έντονες χλωρώσεις, κυτταρική αποδόμηση και διευκολύνουν την διάτρηση του ξενιστή και την αποίκιση του φυτικού ιστού (Colmenares et al., 2002).

### 1.2.4 Συμπτώματα

Συμπτώματα που οφείλονται στην τεφρά σήψη μπορούν να εκδηλωθούν σε όλα σχεδόν τα μέρη του φυτού (φύλλα, άνθη, καρπούς, στελέχη, ρίζες). Η πιο συχνή συμπτωματολογική εικόνα σε φύλλα και ώριμους καρπούς τομάτας είναι μαλακές σήψεις και υδαρής εμφάνιση λόγω ρήξης των παρεγχυματικών ιστών η οποία ακολουθείται από ταχεία ανάπτυξη των κονιδίων του μύκητα σε μάζες γκριζου χρώματος. Η μαλακή σήψη των ώριμων καρπών τομάτας εμφανίζεται κυρίως μετασυλλεκτικά, ενώ η κηλίδα φάντασμα (ghost spot) αποτελεί σύμπτωμα των ανώριμων καρπών και υποδεικνύει την επιτυχή άμυνα του ξενιστή, στον οποίο παρόλο που δεν εγκαταστάθηκε με επιτυχία ο μύκητας, δεν παύει να μειώνεται η ποιότητα και η εμπορική αξία του προϊόντος (Williamson et al., 2007).



**Εικόνα 4.** Συμπτώματα του μύκητα *B.cinerea* **a)** σε στέλεχος τομάτας, **b)** σε ώριμους καρπούς τομάτας (κηλίδα φάντασμα), **c)** σε φύλλα και **d)** σε καρπούς φράουλας. (φωτογραφίες από την βάση δεδομένων EPPO Global database: BOTRCI)

### 1.3 Αντιμετώπιση του παθογόνου

Γενικότερα, παρουσιάζονται πολλές δυσκολίες στην προσπάθεια αντιμετώπισης της τεφράς σήψης. Τα αίτια των δυσκολιών αυτών είναι κυρίως το μεγάλο εύρος ξενιστών

του παθογόνου, οι διάφοροι μηχανισμοί παθογένειας που διαθέτει και η υψηλή ικανότητα επιβίωσης του στο περιβάλλον, με αγενείς και εγγενείς καρποφορίες (Hua et al., 2018).

Αξίζει να αναφερθεί στο σημείο αυτό πως η αδυναμία καταπολέμησης και πρόληψης του παθογόνου προσυλλεκτικά καθιστά δύσκολη την αντιμετώπιση του μετασυλλεκτικά. Αυτό συμβαίνει διότι αφενός οι συνθήκες συντήρησης και αποθήκευσης των καρπών μετά την συλλογή είναι ιδανικές για την ανάπτυξη του παθογόνου (12-15°C και υψηλή υγρασία) και αφετέρου δεν υπάρχουν πρακτικοί χειρισμοί που να μπορούν να καταπολεμήσουν αποτελεσματικά το παθογόνο κατά την μετασυλλεκτική περίοδο στις αποθήκες. Για τους λόγους αυτούς, η αντιμετώπιση του μύκητα *B. cinerea* βασίζεται κυρίως στην πρόληψη του προσυλλεκτικά, με μεγάλη βαρύτητα να έχουν τα συστήματα ολοκληρωμένης διαχείρισης (IPM – Integrated Pest Management) και τα οποία λαμβάνουν υπόψιν το κλίμα και τις καλλιεργητικές μεθόδους (Droby & Lichter 2007).

### 1.3.1 Καλλιεργητικά μέτρα

Στόχος των καλλιεργητικών μέτρων που εφαρμόζονται προσυλλεκτικά, είναι η πρόληψη και η αποφυγή τις ασθένειας μέσω της μείωσης υγρασίας και της τήρησης της καλής υγιεινής στις φυτείες. Ανάμεσα στα μέτρα αυτά συγκαταλλέγονται τα εξής: (Παναγόπουλος 1995).

- Αποφυγή μεγάλων διακυμάνσεων θερμοκρασίας που μπορεί να συντελέσουν στην συμπίκνωση υδρατμών και στην επικάλυψη σταγονιδίων νερού στα φυτά.
- Άρδευση τις πρωινές ώρες για να γίνεται γρήγορη εξάτμιση του νερού από την επιφάνεια των φυτών.
- Εξαερισμός με άνοιγμα των παραθύρων του θερμοκηπίου.
- Αφαίρεση και καταστροφή προσβεβλημένων φυτών ή φυτικών οργάνων, διότι αποτελούν εστίες μόλυνσης και σημεία εισόδου του παθογόνου.

Σχετικά με τις μετασυλλεκτικές μεταχειρίσεις για την πρόληψη του μύκητα σε καρπούς κηπευτικών, η πλειοψηφία των μελετών αναφέρεται κυρίως σε μεθόδους απομάκρυνσης του αιθυλενίου από το περιβάλλον ή παρεμπόδισης της σύνθεσης ή της δράσης του. Στόχος αυτών των χειρισμών είναι η καθυστέρηση της ωρίμανσης και η μείωση της ευαισθησίας των καρπών στην προσβολή από φυτοπαθογόνους μύκητες. Τέτοιες μεταχειρίσεις περιλαμβάνουν τη χρήση ουσιών που απορροφούν, οξειδώνουν ή παρεμποδίζουν τη δράση του αιθυλενίου (π.χ.  $\text{KMnO}_4$ , ενώσεις του αργύρου,

aminoethoxyvinylglycine - AVG, 1- μεθυλοκυκλοπροπένιο - 1-MCP). Εκτός από την μείωση του αιθυλενίου κατά την διάρκεια της αποθήκευσης, άλλες μεταχειρίσεις περιλαμβάνουν την αποθήκευση σε ελεγχόμενες ατμόσφαιρες (CO<sub>2</sub>), τροποποιημένες ατμόσφαιρες και χαμηλές θερμοκρασίες. Ωστόσο, οι χειρισμοί αυτοί δεν αποτελούν την πιο πρακτική μέθοδο πρόληψης της τεφράς σήψης και άλλων μετασυλλετικών παθογόνων στα κηπευτικά (Droby & Lichter 2007).

### 1.3.2 Χημική καταπολέμηση

Για την προστασία των εναέριων μερών των κηπευτικών καλλιεργειών συνιστώνται εβδομαδιαίοι προληπτικοί ψεκασμοί με εγκεκριμένα μυκητοκτόνα από την άνθηση έως την ωρίμανση του καρπού (Παναγόπουλος 1995).

Γενικά, τα σκευάσματα που είναι διαθέσιμα για τους προληπτικούς ψεκασμούς κατά του μύκητα *B. cinerea*, μπορούν να κατηγοριοποιηθούν σε έξι ομάδες σύμφωνα με τους βιοχημικούς τρόπους δράσης τους: 1) γενικοί αναστολείς ενζύμων (π.χ. thiram, dichlofluanid), 2) παρεμποδιστές της κυτταροδιαίρεσης (βενζιμιδαζολικά, φαινυλοκαρβαμιδικά), 3) μυκητοκτόνα που δρουν στην ώσμωση των κυττάρων (φαινυλοπυρρόλες, δικαρβοξιμιδικά), 4) μυκητοκτόνα που δρουν στην αναπνοή (QoIs, SDHIs, φαινυλοπυριδιναμίνες), 5) αναστολείς βιοσύνθεσης μεθειονίνης (ανιλινοπυριμιδίνες) και 6) παρεμποδιστές βιοσύνθεσης εργοστερόλης (fenhexamid) (Saito et al., 2019).

Παρόλα αυτά, τις τελευταίες δεκαετίες οι ανησυχίες σχετικά με την εκτεταμένη χρήση χημικών σκευασμάτων έχουν αυξηθεί, λόγω των πιθανών βλαβερών επιπτώσεων που έχουν στην ανθρώπινη υγεία και των αυξανόμενων περιπτώσεων ανθεκτικότητας των παθογόνων σε σημαντικές ομάδες χημικών σκευασμάτων. Είναι επίσης γνωστό ότι ο μύκητας *B. cinerea* αντιπροσωπεύει ένα κλασσικό παθογόνο υψηλού κινδύνου όσον αφορά την ανάπτυξη ανθεκτικότητας στα μυκητοκτόνα. Έχουν ήδη αναφερθεί στο παρελθόν περιπτώσεις πολλαπλής ανθεκτικότητας του μύκητα *B. cinerea* σε δραστικές ουσίες όπως trifloxystrobin, boscalid, fenhexamid, cyprodinil και fludioxonil, οι οποίες είναι εγκεκριμένες και χρησιμοποιούνται μέχρι σήμερα στον Ελλαδικό χώρο για την καταπολέμηση του μύκητα *B. cinerea* σε καλλιέργειες θερμοκηπιακής τομάτας (Rupp et al., 2017)

Γνωρίζοντας ότι ο κίνδυνος ανάπτυξης ανθεκτικότητας αυξάνεται όσο ένα προϊόν εφαρμόζεται επανειλημμένα, έχουν αναπτυχθεί μικτά προγράμματα ψεκασμού που

βασίζονται στη χρήση δραστικών ουσιών με διαφορετικό μηχανισμό δράσης, έως ότου να μειωθεί ο κίνδυνος εμφάνισης και διατήρησης ανθεκτικότητας για κάθε ενεργό συστατικό των φυτοφαρμάκων (Rashid et al., 2014).

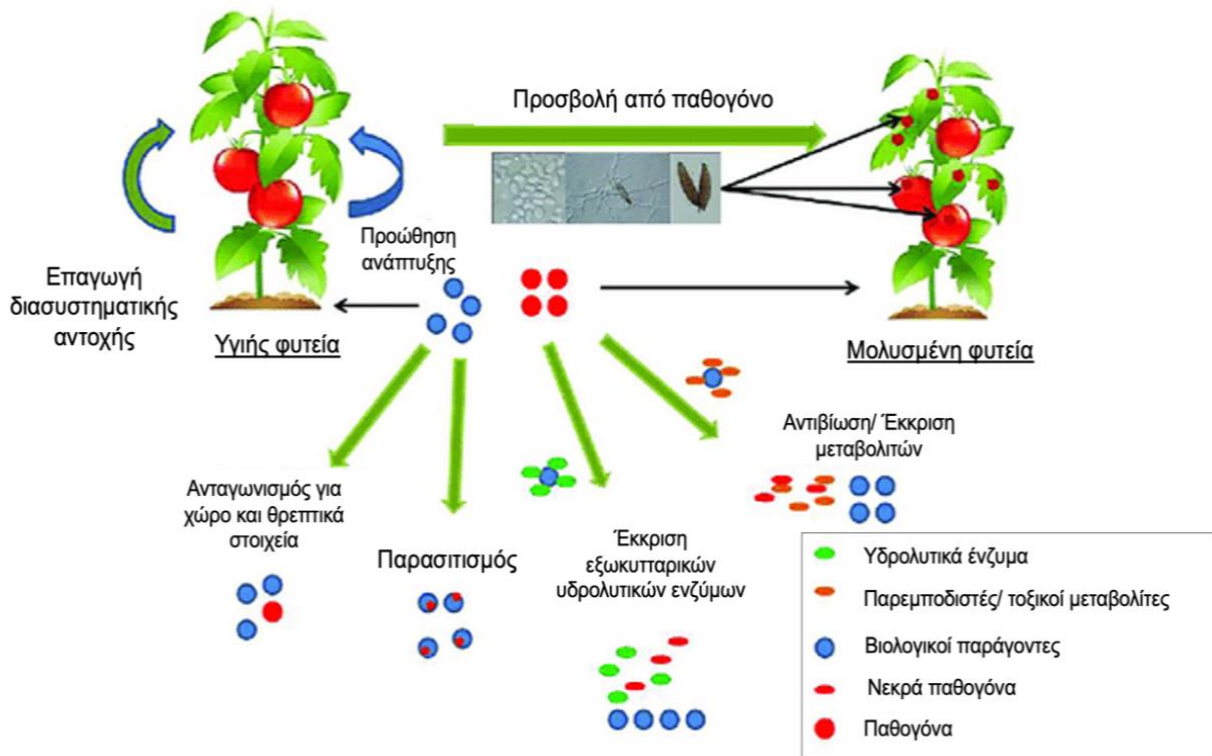
### 1.3.3 Ανθεκτικές ποικιλίες

Η εξέλιξη των άγριων ειδών και η προσαρμογή τους κυρίως στο περιβάλλον καταγωγής τους για ένα τεράστιο χρονικό διάστημα δημιούργησε μια ευρεία γενετική παραλλακτικότητα με απόκτηση γνωρισμάτων ώστε να εκδηλώσουν τις απαραίτητες ανθεκτικότητες και να αντιμετωπίσουν τις αντίξοες συνθήκες του περιβάλλοντος. Η πλειοψηφία των μελετών που εξερευνούν την ενσωμάτωση γονιδίων με ανοχή στο παθογόνο *B. cinerea* μελετούν περιοχές του γονιδιώματος συγγενικών άγριων ειδών της τομάτας, όπως το είδος *Solanum lycopersicoides*. Για παράδειγμα, μέσα από την παραλλακτικότητα του γενετικού υλικού έχουν διερευνηθεί πρωτεΐνες με δράση κατά των ενζύμων που εμπλέκονται στην παθογένεια του μύκητα, όπως η πρωτεΐνη παρεμπόδισης δράσης πολυγαλακτορουνάσεων (PGIP) (Guimarães et al., 2004). Επίσης, πρόσφατα έχουν εντοπιστεί γονίδια που μαζί με την ανθεκτικότητα στην τεφρά σήψη θα προσφέρουν και βελτιωμένα ποιοτικά γνωρίσματα όπως είναι η αυξημένη σύνθεση λυκοπενίου και το ομοιόμορφο σχήμα του καρπού (Yin et al., 2022).

### 1.3.4 Βιολογική αντιμετώπιση

Φιλικότερη προς το περιβάλλον μέθοδο αποτελεί η βιολογική αντιμετώπιση, η οποία στηρίζεται στην χρήση μικροοργανισμών που περιορίζουν ή παρεμποδίζουν την ανάπτυξη των παθογόνων. Οι μικροοργανισμοί αυτοί ονομάζονται παράγοντες βιολογικής αντιμετώπισης (biological agents - BCAs) και δρουν με τους εξής τρόπους: α) ανταγωνισμός για θέση και θρεπτικά στοιχεία, β) αντιβίωση, γ) παρασιτισμός, δ) έκκριση υδρολυτικών ενζύμων και ε) επαγωγή της άμυνας του φυτού. Ο μύκητας *B. cinerea* αντιμετωπίζεται στην πράξη αποτελεσματικά με την χρήση βιολογικών παραγόντων σε καλλιέργειες που είτε χρησιμοποιούνται αποκλειστικά τα βιολογικά σκευάσματα είτε εφαρμόζονται συμπληρωματικά των χημικών σκευασμάτων σε μικτά προγράμματα ψεκασμού. Στην ομάδα των βιολογικών σκευασμάτων που είναι σήμερα διαθέσιμα στην αγορά για την καταπολέμηση της τεφράς σήψης συγκαταλέγονται στελέχη βιολογικών παραγόντων που ανήκουν στα είδη: *Bacillus amyloliquefaciens*, *Bacillus subtilis*,

*Trichoderma gamsii*, *Trichoderma afroharzianum* *Trichoderma asperellum*, *Saccharomyces cerevisiae* και *Pseudomonas sp.* (Thambugala et al., 2020)



**Εικόνα 5.** Κύριοι μηχανισμοί δράσης των βιολογικών παραγόντων (BCAs) για την βιολογική αντιμετώπιση παθογόνων μυκήτων (τροποποιήθηκε από Thambugala et al., 2020)

Αντίστοιχα, οι μελέτες που αναφέρονται στην βιολογική αντιμετώπιση του μύκητα *B. cinerea* σε μετασυλλεκτικό επίπεδο τονίζουν την αποτελεσματικότητα των ζυμομυκήτων όταν εφαρμόζονται σε ήδη προσβεβλημένους καρπούς. Οι μηχανισμοί δράσης των ζυμών που καταπολεμούν το παθογόνο *B. cinerea* τουλάχιστον σε πειραματικό επίπεδο, ποικίλλουν. Για παράδειγμα, η εφαρμογή στελεχών της ζύμης *Pichia membranifaciens* σε καρπούς μήλων μετά την συλλογή, περιόρισε σημαντικά τις κηλίδες προσβολής από τον μύκητα *B. cinerea*, λόγω των τοξινών “killer toxins” που εκκρίνει η ζύμη (Santos et al., 2004). Παρόμοια αποτελέσματα παρατηρήθηκαν σε ζύμες που ανταγωνίζονται το παθογόνο μύκητα *B. cinerea*, όπως το είδος *Saccharomyces cerevisiae* στα σταφύλια και τα είδη *Candida pelliculosa* και *Rhodotorula rubra* στους καρπούς τομάτας (Parafati et al., 2015, Dal Bello et al., 2008).

## **1.4 Η άμυνα των φυτών**

Τα φυτά μέσω της μακροχρόνιας συνύπαρξής τους με τους παθογόνους μικροοργανισμούς έχουν αναπτύξει ένα σχετικά πολύπλοκο ανοσοποιητικό σύστημα το οποίο δομείται σε δύο βασικά επίπεδα. Το πρώτο επίπεδο περιλαμβάνει τους παθητικούς ή προϋπάρχοντες μηχανισμούς άμυνας που αποτελούν και τα πρώτα εμπόδια που θα συναντήσει ένας παθογόνος μικροοργανισμός στην προσπάθειά του να μολύνει ένα φυτό. Το δεύτερο επίπεδο περιλαμβάνει τους ενεργητικούς μηχανισμούς άμυνας που δεν προϋπήρχαν της μόλυνσης, και παράγονται εξαιτίας αυτής (Τζάμος 2007). Οι ενεργητικοί μηχανισμοί άμυνας αναφερόμενοι και ως εγγενές ανοσοποιητικό σύστημα είναι οι εξής:

### **1.4.1 Ενεργητικοί μηχανισμοί άμυνας των φυτών**

#### **1.4.1.1 Επαγόμενη από συντηρημένες δομές παθογόνων διασυστηματική άμυνα (PAMP triggered immunity - PTI)**

Στα φυτά η άμυνα PTI ενεργοποιείται ως απάντηση στα διάφορα συντηρημένα μόρια που προέρχονται από τα παθογόνα. Αυτές οι συντηρημένες μοριακές δομές των παθογόνων αναφέρονται ως PAMPs (Pathogen Associated Molecular Patterns) ή ως MAMPs (Microbe Associated molecular Patterns) καθώς δεν προέρχονται μόνο από παθογόνους αλλά και από μη παθογόνους μικροοργανισμούς. Ένα άλλο μέρος του μηχανισμού αυτού είναι οι διαμεμβρανικοί υποδοχείς (Plant pattern recognition receptors -PRRs) που αναγνωρίζουν και δεσμεύουν τους λεγόμενους γενικούς διεγέρτες (PAMPs ή MAMPs). Οι υποδοχείς αυτοί έχουν ως κύριο ρόλο την ενεργοποίηση μιας σηματοδοτικής αλληλουχίας εντός του φυτού, ή οποία επάγει την πρώτη άμυνα του φυτού, δηλαδή την PTI (Jones and Dangl 2006) Η ενεργοποίηση της PTI στα φυτά ενέχει την συμμετοχή μιας πληθώρας βιολογικών και χημικών αποκρίσεων, οι οποίες περιλαμβάνουν ροές ιόντων, σχηματισμό ενεργών μορφών οξυγόνου (ROS), ενίσχυση των κυτταρικών τοιχωμάτων με καλλόζη, ενεργοποίηση των MAP κινασών (mitogen activated protein kinase-MAPK) και ταχεία έκφραση γονιδίων άμυνας (Bigeard et al., 2015). Οι φυτικοί υποδοχείς PRRs, αναγνωρίζουν αρκετές από τις δομές των μικροοργανισμών, όπως είναι συστατικά των κυτταρικών τοιχωμάτων (γλυκάνη, χιτίνη, λιποπολυσακχαρίδια), φλατζελίνη, πεπτιδογλυκάνες, σιδηροφόρες ουσίες και τον παράγοντα επιμήκυνσης (elongation factor) Ef-Tu (Jones and Dangl 2006).



#### **1.4.1.2 Επαγόμενη από τελεστές άμυνα (effector triggered immunity -ETI)**

Ένα παθογόνο που έχει καταφέρει να ξεπεράσει τον πρώτο φραγμό κατά την είσοδο του στο φυτό επιχειρεί να προκαλέσει μόλυνση μετακινώντας μέσα στα κύτταρα του φυτού ξενιστή ή στον εξωκυττάριο χώρο του, διάφορες πρωτεΐνες που ονομάζονται τελεστές μολυσματικότητας (effectors). Η βασική λειτουργία των τελεστών είναι να αναστείλουν την πρώτη άμυνα του φυτού PTI και συνεπώς να αυξήσουν την ικανότητα του παθογόνου να μολύνει των ξενιστή (Jones and Dangl, 2006).

Τα φυτά αναγνωρίζουν τους τελεστές του παθογόνου μέσω της έκφρασης των πρωτεϊνών ανθεκτικότητας R με αποτέλεσμα την ενεργοποίησης του μηχανισμού ETI. Οι πρωτεΐνες ανθεκτικότητας προκύπτουν από την έκφραση των γονιδίων R (resistance genes) στα φυτά, ενώ οι τελεστές αποτελούν τα προϊόντα της έκφρασης των γονιδίων Avr (avirulent) στα παθογόνα. Η παραπάνω αλληλεπίδραση μεταξύ παθογόνου και φυτού ξενιστή, περιγράφηκε πρώτα από τον Harold H. Flor μέσα από μελέτες με τον μύκητα *Melampsora lini* σε φυτά λιναριού και ονομάστηκε θεωρία «γονιδίου προς γονίδιο» (gene for gene theory) (Flor 1942). Όταν στα φυτά ενεργοποιηθεί ο μηχανισμός ETI, παρατηρείται συνήθως μια ορατή αντίδραση με σκοπό την καταστολή του παθογόνου. Αυτό πραγματοποιείται μέσω της διαδικασίας του παραγραμματισμένου κυτταρικού θανάτου (programmed cell death), σχηματίζοντας μια νεκρωτική ζώνη στο σημείο της προσβολής. Αυτή η αντίδραση υπερευαισθησίας (HR) δεν παρατηρείται κατά την ενεργοποίηση του μηχανισμού PTI (Jones and Dangl 2006)

#### **1.4.1.3 Επίκτητη διασυστηματική αντοχή (systemic acquired resistance - SAR)**

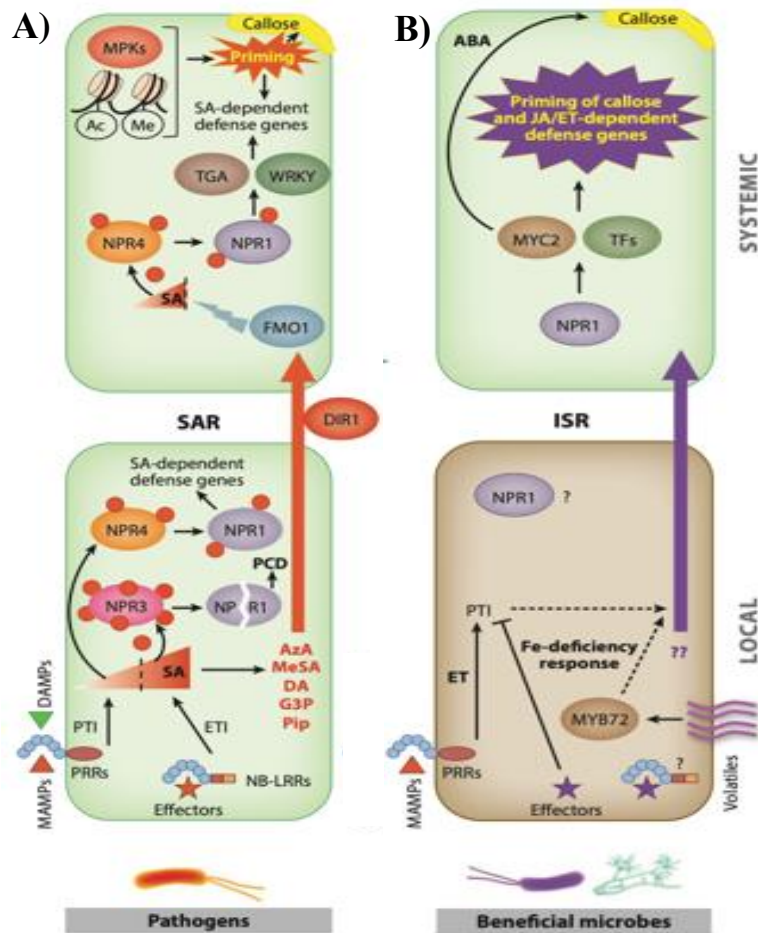
Επίκτητη διασυστηματική αντοχή είναι το φαινόμενο κατά το οποίο τα μη μολυσμένα μέρη ενός φυτού ευπαθούς σε ένα συγκεκριμένο παθογόνο καθίστανται ανθεκτικά ύστερα από μόλυνση που έχει πραγματοποιηθεί από το συγκεκριμένο παθογόνο σε διαφορετικά μέρη του ίδιου φυτού (Τζάμος 2007).

Σήμερα γνωρίζουμε ότι η επιβίωση ενός φυτικού οργανισμού μετά από την εισβολή ενός παθογόνου μικροοργανισμού, οδηγεί στην ανάπτυξη μιας ανθεκτικότητας η οποία θα το συνοδεύει και θα το προστατεύει από τυχόν μελλοντικές προσβολές του ίδιου

ή διαφορετικού φυτοπαθογόνου (Conrath 2006). Η SAR χαρακτηρίζεται από αυξημένα επίπεδα του σαλικυλικού οξέος (SA), το οποίο μέσω της πρωτεΐνης Non-expressor of PR gene1 (NPR1), που ελέγχεται από πρωτεΐνη οξειδο-επαναφοράς, ενεργοποιεί την παραγωγή μιας μεγάλης ομάδας πρωτεϊνών PR (Pathogenesis related proteins), που συμμετέχουν σε αντιδράσεις άμυνας (Εικόνα5Α) (Pieterse et al., 2012).

#### **1.4.1.4 Επαγόμενη διασυστηματική αντοχή (induced systemic resistance - ISR)**

Η επαγόμενη διασυστηματική αντοχή (ISR) αφορά την ανθεκτικότητα που επάγεται στα φυτά από μη παθογόνους μικροοργανισμούς, τα οποία διεγείρουν στα φυτά την έναρξη μια μοριακής σηματοδότησης στην οποία εμπλέκεται κυρίως το ιασμονικό οξύ (JA) και το αιθυλένιο (ET) (Εικόνα5B). Το αποτέλεσμα αυτής της μοριακής σηματοδότησης, είναι η επαγωγή διάφορων αμυντικών αποκρίσεων και μηχανισμών, οι οποίοι θα είναι σε θέση να προστατεύουν αποτελεσματικά το φυτό από τυχόν μελλοντικές προσβολές. Για παράδειγμα, η ανοσοποίηση που προκαλείται στα φυτά λόγω των ριζοβακτηρίων, εκδηλώνεται φαινοτυπικά κυρίως με την καθυστερημένη εμφάνιση των συμπτωμάτων της ασθένειας, καθώς και με μείωση στην ένταση και στο βαθμό της εξέλιξης της. Στα γένη των *Pseudomonas* και *Bacillus*, ανήκουν τα πλείστα είδη των ριζοβακτηρίων που βρέθηκαν να επάγουν αποτελεσματικά την διασυστηματική αντοχή των φυτών (Τζάμος 2007).



**Εικόνα 6.** Απεικόνιση των αντιδράσεων ενεργοποίησης του μονοπατιού της (A) SAR που ελέγχεται από το σαλικυλικό οξύ (SA) και (B) ISR που ελέγχεται από το ιασμονικό οξύ (JA)/ αιθυλένιο (ET). Στις δύο περιπτώσεις η αντίδραση ξεκινάει τοπικά (local) και εξαπλώνεται διασυστηματικά στα υπόλοιπα τμήματα του φυτού (systemic) (Pieterse et al., 2012).

Παρά τις διαφορές μεταξύ της SAR και ISR, έχει αποδειχθεί ότι η NPR1 απαιτείται και για την JA/ET-εξαρτώμενη ISR που προκαλείται από μικροοργανισμούς της ριζόσφαιρας (PGPR), αν και ο ρόλος της φαίνεται να είναι διαφορετικός στις δύο διαδικασίες. Συγκεκριμένα, στην σήμανση μέσω SA, η NPR1 σχετίζεται με λειτουργία στον πυρήνα, ενώ στη σήμανση μέσω JA/ET, σχετίζεται με λειτουργία στο κυτταρόπλασμα (Pieterse et al., 2014). Επίσης, σε ορισμένες περιπτώσεις, η επαγωγή της ISR μπορεί να απαιτεί την συσσώρευση SA (Ryu et al., 2003, Alizadeh et al, 2013).

#### 1.4.2 Παράγοντες που συμβάλλουν στην ενεργοποίηση της διασυστηματικής άμυνας των φυτών

Η διέγερση των ενεργητικών ή αλλιώς των λανθανόντων μηχανισμών ανοχής σε μέρη πέρα της μολύνσεως, προϋποθέτει τη δραστηριοποίηση και παραγωγή χημικών ουσιών που αποτελούν το σήμα το οποίο μετακινείται διασυστηματικά και προετοιμάζει τους φυτικούς ιστούς, ώστε να αμυνθούν σε περίπτωση μόλυνσης από παθογόνο μικροοργανισμό.

Η ενεργοποίηση λανθανόντων μηχανισμών ανοχής, έχει διαπιστωθεί ότι μπορεί να προκληθεί από τους εξής παράγοντες:

- Παθογόνα
- Μη συμβατικές φυλές παθογόνων μικροοργανισμών
- Μη παθογόνα στελέχη παθογόνων μικροοργανισμών
- Μη παθογόνοι μικροοργανισμοί (σαπρόφυτα) π.χ ριζοσφαιρικά βακτήρια
- Παράγοντες αβιοτικής καταπόνησης (π.χ ξηρασία και έλλειψη θρεπτικών στοιχείων)
- Χημικές ενώσεις (π.χ πτητικές ενώσεις)

Συγκεκριμένα, οι ωφέλιμοι μικροοργανισμοί όπως τα ριζοσφαιρικά βακτήρια PGPR (Plant Growth Promoting Rhizobacteria) ενεργοποιούν την ISR μέσω μοριακών μοτίβων που παράγουν και τα οποία είναι υπεύθυνα για την έναρξη της διασυστηματικής ανοσοποίησης (Τζάμος 2007).

Οι πρώτες αναφορές σχετικά με μοριακά μοτίβα MAMPs (Microbe-Associated Molecular Patterns) που παράγουν τα ωφέλιμα ριζοβακτήρια PGPR, επικεντρώθηκαν στη μελέτη λιποπολυσακχαριδίων (LPS), μεταβολιτών που ελέγχονται από το σίδηρο, όπως η σιδηροφόρος ουσία πυοβερδίνη, και το σαλικυλικό οξύ SA (Maurhofer et al., 1994) Τα τελευταία χρόνια, έχουν εντοπιστεί πολλοί άλλοι παράγοντες που ενεργοποιούν την ISR, συμπεριλαμβανομένων αντιβιοτικών ουσιών, όπως 2, 4-διακετυλοφλορογλυκινόλη (DAPG), η πυοκυανίνη, φλαγγελίνη, σιδηροφόροι και βιοεπιφανειοδραστικές ουσίες. Επιπλέον, αναφέρθηκε ότι ορισμένες οργανικές αρωματικές ενώσεις, όπως η 2, 3-βουτανεδιόλη που παράγεται από το στέλεχος *B. subtilis* GB03 (Ryu, et al., 2004) και η πτητική ένωση C13 που βιοσυνθέτει το βακτήριο *Paenibacillus polymyxa* (Lee et al., 2012), διεγείρουν την ISR. Ακόμη, αρκετά από τα μόρια διεγέρτες της ISR φαίνεται πως μπορούν να ενεργούν ανεξάρτητα. Για παράδειγμα, βακτηριακά κύτταρα του *Pseudomonas putida* WCS358 που περιέχουν LPS

στα τοιχώματα, φλαγγελίνη και η παράγουν την σιδηροφόρο ουσία πυοβερδίνη, ενεργοποιούν την ISR στο φυτό *A. thaliana* όταν εφαρμόζονται εξωγενώς στις ρίζες. Ωστόσο, μεταλλαγμένα στελέχη του WCS358 που δεν παράγουν πυοβερδίνη ή δομές LPS εξακολουθούν να είναι ικανά να προκαλέσουν ISR (Meziane et al., 2005).

#### **1.4.3 Ο ρόλος των φυτοορμονών στη μεταφορά βιοχημικού σήματος**

Όπως αναφέρθηκε προηγουμένως, η αναγνώριση των μορίων διεγέρσεως από τους αντίστοιχους υποδοχείς τους στα φυτά ενεργοποιεί μεταβολικούς μηχανισμούς μεταφέροντας ενδογενές σήμα. Το σήμα αποτελεί τον καθοριστικό βιοχημικό παράγοντα της “ανοσοποίησης” και οι ιδιότητες του στην περίπτωση της διέγερσης των μηχανισμών άμυνας των φυτών είναι οι εξής (Τζάμος, 2007):

- Το σήμα παράγεται με την εμφάνιση των νεκρωτικών κηλίδων
- Το σήμα μετακινείται ταχέως και συνεχώς στα υπόλοιπα μέρη του φυτού μέσω των αγγείων (ανοδικώς και καθοδικώς) διεγείροντας το φαινόμενο της ανοσοποίησης
- Το επίπεδο της προστασίας αυξάνει, καθώς όλο και περισσότερο σήμα παράγεται και μετακινείται εντός του φυτού
- Το μέγιστο της προστασίας επιτυγχάνεται, όταν έχουν κορεσθεί όλοι οι υποδοχείς του σήματος

Η σημασία του σαλικυλικού οξέος (SA), ιασημονικού οξέος (JA) και αιθυλενίου (ET) ως πρωτεύοντα σήματα στη ρύθμιση της άμυνας των φυτών έχει καθιερωθεί ευρέως. Τα βιοτροφικά παθογόνα είναι σε μεγάλο βαθμό πιο ευαίσθητα στις αντιδράσεις άμυνας στις οποίες μεσολαβεί το SA, ενώ τα νεκροτροφικά παθογόνα και τα φυτοφάγα έντομα επηρεάζονται περισσότερο από αντιδράσεις άμυνας που ρυθμίζονται από τις ορμόνες JA/ET. Επίσης, οι αλλαγές στην συγκέντρωση ή στην ευαισθησία των ορμονών, ενεργοποιούν ένα σύνολο αντιδράσεων σήμανσης με σκοπό να προσαρμοστεί το φυτό στις αλλαγές αυτές (Verhage et al., 2010).

- Σαλικυλικό οξύ

Το σαλικυλικό παράγεται στους χλωροπλάστες των φυτών και έχει φυσικές ιδιότητες που το καθιστούν ιδανικό για να μετακινηθεί ταχέως από το σημείο της αρχικής εφαρμογής ή συνθέσεως του σε απομακρυσμένους φυτικούς ιστούς, μέσω του ηθμού.

Το σαλικυλικό οξύ θεωρείται ότι έχει κύριο ρόλο στη διάχυση – μεταφορά σήματος μετά τη μόλυνση από το παθογόνο. Ακόμη το σαλικυλικό οξύ πιστεύεται ότι είναι διεγέρτης της συσσώρευσης των πρωτεϊνών σχετικών με την παθογένεση (PR πρωτεϊνών). Η εξωγενής εφαρμογή σαλικυλικού οξέως επάγει τη σύνθεση πρωτεϊνών παθογένειας, κυρίως στη θέση εφαρμογής, σε αντίθεση με τα παθογόνα που επάγουν πρωτεΐνες παθογένειας διασυστηματικά. (Τζάμος 2007)

- Ιασμονικό οξύ

Το ιασμονικό οξύ και ο μεθυλιωμένος εστέρας του, παράγονται από το λινολενικό οξύ και αποτελούν ενώσεις που ανήκουν στις κυκλοπεντανόνες. Εξωγενής εφαρμογή ιασμονικού οξέος προωθεί τη γήρανση και ρυθμίζει την ανάπτυξη. Τόσο το ιασμονικό όσο και το μεθυλιωμένο ιασμονικό οξύ υπάρχουν σε όλα τα φυτά και μετακινούνται με ευκολία και στην υγρή και στην αέρια φάση τους. Το μεθυλιωμένο ιασμονικό οξύ είναι ιδιαίτερος πτητικό και ίσως να δρα αναλόγως με την αέρια φυτική ορμόνη αιθυλενίου. Σε υψηλές συγκεντρώσεις οι ιασμονικές ουσίες είναι φυτοτοξικές. Ως προς τους τρόπους δράσεως του ιασμονικού οξέος μικρές ποσότητες επάγουν πρωτεΐνες, όπως η θειονίνη, ωσμοτίνη, προλίνη των κυτταρικών τοιχωμάτων, τον σουλφιδριλικό παρεμποδιστή πρωτεϊνάσεων και διάφορα ένζυμα που εμπλέκονται στους μηχανισμούς άμυνας του φυτού (Τζάμος 2007).

- Αιθυλένιο

Το αιθυλένιο είναι μία πτητική φυτική ορμόνη, που επηρεάζει το ρυθμό αναπτύξεως των φυτών και τη γήρανση. Στις περιπτώσεις ασθενών φυτών το αιθυλένιο παράγεται όταν το παθογόνο διεισδύει στο φυτικό ιστό. Παράγεται επίσης με την εφαρμογή διαφόρων ουσιών για τη διέγερση μηχανισμών άμυνας, όπου επάγει τη σύνθεση πρωτεϊνών παθογενέσεως, όπως β-1, 3-γλουκανάση, χιτινάση και β-γλουκανάση. Επιπλέον η παρουσία του αιθυλενίου προκαλεί δομικές αλλαγές που

αυξάνουν την αντοχή του κυτταρικού τοιχώματος, όπως η εναπόθεση λιγνίνης και συσσώρευση υδροξυπρολινοπρωτεϊνών (Τζάμος 2007).

#### 1.4.4 Βιοχημικές αντιδράσεις που προκαλεί η ενεργοποίηση της άμυνας στα φυτά

Το αντίκτυπο που έχει η ενεργοποίηση λανθανόντων μηχανισμών άμυνας και η μεταφορά του σήματος στα φυτά, είναι το εξής:

- Αποτελούν το έναυσμα της αντιδράσεως υπερευαισθησίας
- Διεγείρουν τη σύνθεση φυτοαλεξινών
- Επάγουν την παραγωγή γλυκοσυλο – υδρολασών, ικανών να αντιδράσουν με πολυμερή των επιφανειών των παθογόνων
- Επάγουν την σύνθεση πρωτεϊνών που παρεμποδίζουν ένζυμα των παθογόνων με ικανότητα αποσυνθέσεως των φυτικών ιστών
- Επάγουν την παραγωγή των δραστικών ομάδων οξυγόνου

Επάγουν την τροποποίηση των κυτταρικών τοιχωμάτων με εναπόθεση καλλόζης, λιγνίνης ή και γλυκοπρωτεΐνες πλούσες σε υδροξυπρολίνη (Τζάμος, 2007)

Για παράδειγμα, οι Ferrari et al. (2007), απέδειξαν πως εξειδικευμένοι διεγέρτες όπως τα ολιγο – γαλακτουρονίδια (OGs) που απελευθερώνονται από τις πολυγαλακτουρονάσες (PGs) του νεκροτροφικού παθογόνου *B. cinerea* ενισχύουν την αντοχή φυτών *Arabidopsis* κατά του παθογόνου αυξάνοντας δραματικά την παραγωγή φυτοαλεξινών μέσω υπερέκφρασης του γονιδίου *PAD3* τόσο κατά την εξωτερική εφαρμογή OGs όσο και κατά την μόλυνση με το παθογόνο (Ferrari et al., 2007). Ακόμα, έχει αναφερθεί πρόσφατα πως η εναπόθεση καλλόζης, που αποτελεί μία από τις πρώτες αντιδράσεις άμυνας του φυτού, διεγείρεται από το μυκορριζικό μύκητα *Rhizophagus irregularis* στην τομάτα και στο σιτάρι, προστατεύοντας έτσι τα φυτά από μελλοντικές προσβολές από μύκητες (Perez de Luque et al., 2017, Sanmartin et al., 2020).

#### 1.4.5 Ο ρόλος των γονιδίων *PR1* και *PDF1.2* στην άμυνα των φυτών

Η οικογένεια πρωτεϊνών PR (Pathogenesis - Related proteins) έχει μελετηθεί εκτενώς σε σχέση με τις υπόλοιπες πρωτεΐνες παθογένειας ως προς τη συσχέτιση τους με την επαγόμενη διασυστηματική άμυνα. Η έκφραση της πρωτεΐνης *PR1* επιτυγχάνεται μέσω της σηματοδότησης του μονοπατιού του σαλικυλικού οξέος, ενώ η έκφραση της

είναι συνδεδεμένη κυρίως με την ανθεκτικότητα έναντι βιοτροφικών και ημιβιοτροφικών παθογόνων. Στην τομάτα, το SA ενεργοποιεί την έκφραση των γονιδίων *PR-1(P4)*, *PR-1(P6)* και *PR7*. Τόσο η ένδειξη παραγωγής της *PR-1(P4)* όσο και της *PR-1(P6)* χρησιμοποιούνται μέχρι σήμερα ως μοριακοί δείκτες για την ενεργοποίηση της μετάδοσης σήματος του SA (Uehara et al., 2010) Παρόλα αυτά αυξημένα επίπεδα έκφρασης της *PR1* έχουν παρατηρηθεί κατά τα πρώτα στάδια προσβολής από νεκροτροφικά παθογόνα (*Botrytis cinerea*, *Alternaria brassicola* και *Plectosphaerella cucumerina*). Πιο συγκεκριμένα, το μονοπάτι του σαλικυλικού οξέος λειτουργεί ανταγωνιστικά έναντι των μονοπατιών του ιασμονικού οξέος και του αιθυλενίου, τα οποία ευθύνονται για αύξηση της ανθεκτικότητας του ξενιστή έναντι προσβολών από νεκροτροφικά παθογόνα. Επομένως αύξηση των ενδογενών επιπέδων σαλικυλικού οξέος έχει ως αποτέλεσμα της καταστολή των επιπέδων έκφρασης των πρωτεϊνών παθογενέσεως των οποίων η έκφραση τους ελέγχεται από τα μονοπάτια του ιασμονικού οξέος και του αιθυλενίου. (Laluk & Mangiste, 2010)

Η πρωτεΐνη που κωδικοποιεί το γονίδιο *PDF1.2* (plant defensin) ανήκει στις ντιφενσίνες. Στο φυτό *Arabidopsis*, οι ντιφενσίνες κωδικοποιούνται από πολλαπλά γονίδια, από τα οποία τα δεκατρία συμπεριλαμβανομένων και των τριών γονιδίων που σχετίζονται με την έκφραση του *PDF1.2* (*PDF1.2a*, *PDF1.2b* και *PDF1.2c*) κωδικοποιούν 11 διαφορετικές ντιφενσίνες. Ο ακριβής μηχανισμός της αντιμυκητιακής τους δράσης δεν έχει κατανοηθεί πλήρως εξαιτίας της μεγάλης παραλλακτικότητας τους ως προς το μηχανισμό δράσης σε κάθε φυτικό είδος. Παρόλα αυτά έχουν αναφερθεί διάφοροι μηχανισμοί δράσης συμπεριλαμβανομένου αυτού της διατάραξης της φυσιολογικής ροής ιόντων ασβεστίου που απαιτούνται για την ανάπτυξη του ακραίου τμήματος των υφών, καθώς επίσης και της επίδρασης τους στη διατάραξη της διαπερατότητας της κυτταρικής μεμβράνης ως προς την ανταλλαγή ιόντων (Manners et al., 1998)



## 1.5 Βιολογικοί παράγοντες του γένους *Pseudomonas sp.*

Τα βακτήρια *Pseudomonas sp.* είναι αερόβια, gram αρνητικά, άφθονα στο καλλιεργούμενο έδαφος και άριστα προσαρμοσμένα στις συνθήκες της ριζόσφαιρας. Διαθέτουν πολλά χαρακτηριστικά που τα καθιστούν αποτελεσματικούς βιολογικούς παράγοντες και ενισχυτές ανάπτυξης των φυτών, όπως είναι η ικανότητα γρήγορης και μαζικής παραγωγής τους *in vitro*, αποίκησης και πολλαπλασιασμού στην ριζόσφαιρα και στο εσωτερικό των φυτών, παραγωγής ευρέως φάσματος βιοδραστικών μεταβολιτών (π.χ αντιβιοτικά, σιδηροφόρες ουσίες, πτητικά και αυξηντικές ουσίες), ανταγωνισμού με άλλους μικροοργανισμούς και προσαρμογής στις περιβαλλοντικές καταπονήσεις. Το μεγαλύτερο μειονέκτημα που δυσκολεύει την τυποποίηση αυτών των βακτηρίων για εμπορική χρήση είναι η αδυναμία σχηματισμού ενδοσπορίων, σε αντίθεση με άλλα είδη *Bacillus sp.* (Weller 2007)

Στελέχη των ειδών *Pseudomonas fluorescens* και *Pseudomonas aeruginosa* έχουν αξιολογηθεί για την παρεμπόδιση της εξάπλωσης του μύκητα *B. cinerea* σε αμπέλια. Στην μελέτη, αποδείχθηκε η ικανότητα των στελεχών *Pseudomonas sp.* να επάγουν την άμυνα των φυτών (ISR) παρεμποδίζοντας έτσι την εξάπλωση της ασθένειας (Verhagen et al., 2009). Ταυτόχρονα, έχει παρατηρηθεί συνεργιστική δράση μεταξύ βακτηρίων του γένους *Pseudomonas* όπως για παράδειγμα όταν συνδυάστηκαν αποτελεσματικά τα στελέχη *P. chlororaphis* PCL1391 και *P. fluorescens* WCS 365 για την αντιμετώπιση του μύκητα *Fusarium oxysporum f.sp. radicum – lycopersici* στην τομάτα (Dekkers et al., 2000).

### 1.5.1 Μηχανισμοί δράσης των βιολογικών παραγόντων *Pseudomonas sp.*

- **Αποίκηση ριζικού συστήματος**

Οι ψευδομονάδες είναι ιδιαίτερα καλοί αποικιστές του χώρου στη ριζόσφαιρα, ειδικά όπου υπάρχει χαμηλή διαθεσιμότητα θρεπτικών συστατικών. Η σύνθεση λιποπολυσακχαριτών από ριζοβακτήρια είναι σημαντική για τον χωρικό αποικισμό στη ριζόσφαιρα, και στην περίπτωση του *Pseudomonas*, είναι επίσης ένας κρίσιμος παράγοντας, αν και αυτό μπορεί να εξαρτάται από συγκεκριμένα είδη ή στελέχη. Έχει προταθεί ότι το O-αντιγόνο του στελέχους *P. fluorescens* WCS417Rr είναι σημαντικό για τον αποικισμό των ριζών των φυτών τομάτας και για τη διείσδυση στον ιστό και ενδοσυμβίωση. Η χρήση διαφορετικών πηγών άνθρακα, η κινητικότητα, οι

χημειοτακτικές αποκρίσεις είναι επίσης σημαντικοί παράγοντες για την κατάληψη χώρου και τον περιορισμό της ανάπτυξης παθογόνων από στελέχη *Pseudomonas* (Meziane et al., 2005).

- **Παραγωγή αντιβιοτικών ουσιών**

Πολλά είδη *Pseudomonas* παράγουν ένα ευρύ φάσμα αντιβιοτικών, συμπεριλαμβανομένων της πυλουτεορίνης (PLT), της πυρρολνιτρίνης (PRN), της 2, 4-διακετυλοφλορογλουκινόλης του υδροκυανίου (2, 4 -DAPG), ενώ το στέλεχος *P. fluorescens ZX* παράγει και εκκρίνει λυτικά ένζυμα (Sharma et al., 2017).

- **Ανταγωνισμός μέσω παραγωγής σιδηροφόρων**

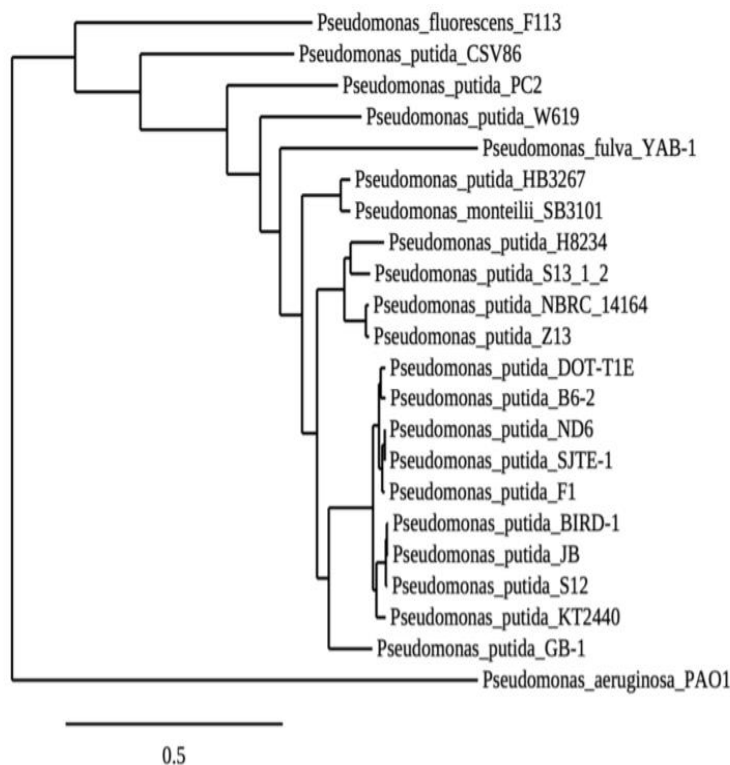
Οι σιδηροφόροι είναι οργανικά μόρια με χαμηλό μοριακό βάρος που παράγονται από τα βακτήρια σε συνθήκες χαμηλού σιδήρου και προσδένονται στα ιόντα σιδήρου που υπάρχουν στο περιβάλλον γύρω τους. Σιδηροφόροι που εκκρίνονται από το *Pseudomonas aeruginosa FP6* έχουν αντιμυκητιακή δράση σε φυτά τσίλι κατά των φυτοπαθογόνων *Rhizoctonia solani* και *Colletotrichum gloeosporioides* (Sasirekha & Srividya 2016). Έχει επίσης αποδειχθεί ότι οι σιδηροφόροι έχουν την ικανότητα προώθησης της ανάπτυξης των φυτών, όπως η πυοβερδίνη που εκκρίνεται από το *P. fluorescens C7R12* και διευκολύνει την ανάπτυξη του φυτού *Arabidopsis thaliana* υπό συνθήκες έλλειψης σιδήρου, αποδυναμώνοντας όμως την άμυνά του (Trapet et al., 2016). Το *P. fluorescens GRC2* εκκρίνει έναν υδροξυαμικού τύπου σιδηροφόρο που προωθεί την ανάπτυξη των φυτών και αναστέλλει το παθογόνο *Macrophomina phaseolina*, το αίτιο της ανθρακώδης σήψης στις αραχίδες (Gupta et al., 2002).

- **Επαγωγή της διασυστηματικής άμυνας των φυτών (ISR)**

Οι φθορίζουσες ψευδομονάδες προστατεύουν επίσης τα φυτά μειώνοντας την ένταση της ασθένειας μέσω της ενεργοποίησης της διασυστηματικής αντοχής (ISR) που προκαλείται από τα κυκλικά λιποπεπίδια (CLP), τις φαιναζίνες και τα σιδηροφόρα μόρια (Tran et al., 2007, Vleesschauwer et al., 2008)

### 1.5.2 Ο βιολογικός παράγοντας *Pseudomonas putida* Z13

Το στέλεχος *Pseudomonas putida* Z13 απομονώθηκε σε πρόσφατη μελέτη της αντιμετώπισης του μύκητα *V. dahliae* στην οποία αξιολογήθηκε η φυτοπροστατευτική δράση διάφορων ωφέλιμων βακτηρίων που αναπτύσσονται στην ριζόσφαιρα φυτών μελιτζάνας, κατά του παθογόνου. Κατά την αξιολόγηση, το στέλεχος Z13 ξεχώρισε ανάμεσα σε άλλα 16 στελέχη και σημείωσε το μεγαλύτερο ποσοστό μείωσης έντασης των συμπτωμάτων του μύκητα *V. dahliae* στα φύλλα των φυτών. Ο μηχανισμός δράσης του Z13 που προτάθηκε στην μελέτη αυτή, ήταν ο ανταγωνισμός για χώρο και θρεπτικά στοιχεία της ριζόσφαιρας (Ziazia et al., 2021).



**Εικόνα 7.** Φυλογενετικό δέντρο που κατασκευάστηκε μετά από 16s rRNA αλληλούχιση και απεικονίζει την ταξινόμηση του στελέχους *P. putida* Z13 ανάμεσα σε άλλα συγγενικά στελέχη *Pseudomonas* sp. (Ziazia et al., 2021).

## 1.7. Σκοπός εργασίας

Στην παρούσα διπλωματική εργασία διερευνήθηκε η ικανότητα του βιολογικού παράγοντα *P. putida* Z13 να αντιμετωπίσει τον παθογόνο μύκητα *B. cinerea* σε φυτά και καρπούς τομάτας. Οι στόχοι της μελέτης ήταν:

- i. Προσδιορισμός της έντασης των συμπτωμάτων μέσω πειραμάτων παθογένειας, στα οποία εφαρμόστηκαν ξεχωριστά το υπερκείμενο και το αιώρημα κυττάρων σε φυτά και καρπούς τομάτας
- ii. Καταγραφή της έκφρασης των γονιδίων *PR1* και *PDF1.2* από φύλλα και καρπούς που είχε εφαρμοσθεί ο παθογόνος μύκητας μόνος του ή/ και το στέλεχος Z13
- iii. Ανίχνευση των πιθανών γονιδίων που εμπλέκονται στην φυτοπροστατευτική δράση του βιολογικού παράγοντα *P. putida* Z13 μέσω βιοπληροφορικής ανάλυσης του γονιδιώματος του

## **2. Υλικά και μέθοδοι**

### **2.1 Φυτικό υλικό**

Το φυτικό υλικό που χρησιμοποιήθηκε ήταν σπόροι της ποικιλίας *Solanum lycopersicum* var. Beef tomato (Γενική Φυτοτεχνική Αθηνών Α.Ε.Β.Ε). Οι σπόροι διατηρήθηκαν πριν την διεξαγωγή των πειραμάτων στους 4°C.

Για τα πειράματα σε καρπούς τομάτας, χρησιμοποιήθηκαν καρποί της ποικιλίας Lobello. Οι καρποί απολυμάνθηκαν σε διάλυμα 10% οικιακής χλωρίνη πριν την χρήση τους.

### **2.2 Βιολογικό υλικό**

Στην παρούσα μελέτη χρησιμοποιήθηκαν σαν βιολογικό υλικό οι μικροοργανισμοί:

α) *Botrytis cinerea*

β) *Pseudomonas putida* Z13

Το μικροβιακό υλικό που χρησιμοποιήθηκε προερχόταν από την συλλογή του Εργαστηρίου Φυτοπαθολογίας του Γεωπονικού Πανεπιστημίου Αθηνών.

### **2.3 Θρεπτικά υλικά**

Ως στερεό θρεπτικό υλικό χρησιμοποιήθηκε εκχύλισμα πατάτας με δεξτρόζη και άγαρ (PDA - Potato Dextrose Agar). Για την παρασκευή του υλικού χρησιμοποιήθηκε σκόνη PDA της εταιρείας MERCK. Το υλικό αποστειρώθηκε στους 120°C σε υγρό κλίβανο με πίεση 1atm για 20 λεπτά. Για την παρασκευή του μολύσματος *B. cinerea*, κονίδια του μύκητα αιωρηματοποιήθηκαν σε υγρό εκχύλισμα πατάτας με δεξτρόζη (PD - Potato Dextrose), της MERCK.

Για τις βακτηριακές καλλιέργειες (*P. putida* Z13), χρησιμοποιήθηκε το υλικό NG – Nutrient broth glycerol (MERCK).

### **2.4 Διαλύματα εξαγωγής RNA από φυτικούς ιστούς:**

#### **2.4.1 Ρυθμιστικά διαλύματα απομόνωσης RNA από φύλλα φυτών τομάτας**

Διάλυμα λύσης κυττάρων (pH: 4-4, 5):

Διάλυμα	Τελική συγκέντρωση
SDS	2%
Sodium citrate	68mM
Citric acid	132mM
EDTA	1mM

Διάλυμα καθίζησης πρωτεϊνών και DNA

Διάλυμα	Τελική συγκέντρωση
NaCl	4M
Sodium acetate	16mM
Citric acid	32mM

#### 2.4.2 Ρυθμιστικό διάλυμα απομόνωσης RNA από καρπούς τομάτας

Διάλυμα λύσης κυττάρων:

Διάλυμα	Τελική συγκέντρωση
CTAB	2 %
PVP- 40	4 %
Tris-HCl	100 mM
EDTA	25 mM
NaCl	2 M
Spermidine	20 $\mu$ l/sample
$\beta$ - mercaptoethanol	30 $\mu$ l/sample

#### 2.5 Προετοιμασία και εφαρμογή του μολύσματος *B. cinerea*

Ο μύκητας είχε διατηρηθεί ως αιώρημα κονιδίων σε υδατικό διάλυμα γλυκερόλης 25% στους -80°C. Πριν την χρήση του στα πειράματα παθογένειας είχε μεταφερθεί υπό ασηπτικές συνθήκες σε τρυβλία με θρεπτικό υλικό PDA και αναπτύχθηκε στους 22°C για περίπου 10 μέρες. Για την παρασκευή του μολύσματος των πειραμάτων παθογένειας συλλέχθηκε τμήμα της αναπτυσσόμενης καλλιέργειας από το τρυβλίο PDA και μεταφέρθηκε σε 5μl δις απεσταγμένου νερού. Με την βοήθεια αιματοκυτταρόμετρου και

μετά από 10% αραίωση του αιωρήματος, δημιουργήθηκε νέο αιώρημα συγκέντρωσης  $5 \times 10^4$  κονιδίων/ml.

Για την εφαρμογή του μολύσματος στα φύλλα δημιουργήθηκαν μηχανικές πληγές σε 2-3 σημεία ανά φύλλο, τρίβοντας ελαφριά την πάνω επιφάνεια των φύλλων, και εφαρμόστηκαν 20μl μολύσματος σε κάθε σημείο – πληγή. Για την εφαρμογή του μολύσματος στους καρπούς τομάτας, δημιουργήθηκαν αβαθείς οπές (1 οπή ανά καρπό) και εφαρμόστηκαν 20μl μολύσματος σε κάθε οπή. Στα φυτά mock (αρνητικοί μάρτυρες) προστέθηκαν 20 μl απεσταγμένου νερού σε κάθε οπή.

## 2.6 Προετοιμασία και εφαρμογή βιολογικού παράγοντα Z13

Το βακτήριο είχε διατηρηθεί ως αιώρημα κυττάρων σε υδατικό διάλυμα γλυκερόλης 25% στους  $-80^\circ\text{C}$ . Πριν την χρήση του στα πειράματα παθογένειας είχε μεταφερθεί υπό ασηπτικές συνθήκες σε τρυβλία με θρεπτικό υλικό PDA και αναπτύχθηκε στους  $28^\circ\text{C}$  για δύο ημέρες. Για τις βιοδοκιμές αναπτύχθηκαν βακτηριακά κύτταρα σε υγρό θρεπτικό υλικό NG (Nutrient Broth Glycerol), σε αναδευόμενο επωαστικό θάλαμο, στις 150rpm και στους  $25^\circ\text{C}$  για δύο ημέρες.

Στα πειράματα αξιολόγησης της δράσης του βιολογικού παράγοντα Z13 έναντι του μύκητα *B. cinerea* σε φυτά τομάτας, το υπερκείμενο διάλυμα του βακτηρίου εφαρμόστηκε με ριζοπότισμα στη ριζόσφαιρα. Το υπερκείμενο συλλέχθηκε μετά από φυγοκέντρηση της βακτηριακής καλλιέργειας (NG) για 5 min, 5.000rpm και μετά από φιλτράρισμα από φίλτρα διαμέτρου 0.2 μm. Επιπλέον, σε άλλα φυτά εφαρμόστηκε αιώρημα κυττάρων του Z13 είτε με ψεκασμό στα φύλλα ή στη ριζόσφαιρα ή στα φύλλα και στη ριζόσφαιρα ταυτόχρονα. Για το αιώρημα κυττάρων συλλέχθηκε το ίζημα μετά από φυγοκέντρηση της βακτηριακής καλλιέργειας, το οποίο επαναιωρηματοποιήθηκε σε απιονισμένο νερό. Το προσκολλητικό Soldar (WG) προστέθηκε στο αιώρημα ως επιφανειοδραστική ουσία για να βελτιώσει την προσκόλληση των κυττάρων στις επιφάνειες του φυτικού ιστού. Ο βιολογικός παράγοντας εφαρμόστηκε στα φυτά τομάτας στο στάδιο των 3 φύλλων (Εικόνα 8A).

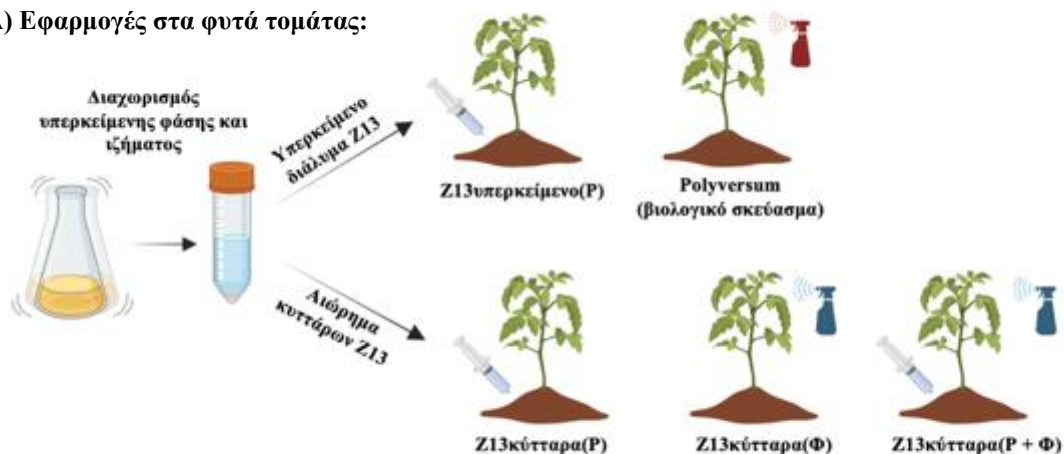
Στα πειράματα αξιολόγησης της δράσης του βιολογικού παράγοντα Z13 έναντι του μύκητα *B. cinerea* σε καρπούς τομάτας, οι καρποί εμβαπτίστηκαν στο υπερκείμενο και στο αιώρημα κυττάρων του βακτηρίου ξεχωριστά. Η προσκολλητική ουσία προστέθηκε επίσης στο αιώρημα κυττάρων (Εικόνα 8B).

## 2.7 Προετοιμασία ψεκαστικού διαλύματος Polyversum και εφαρμογή

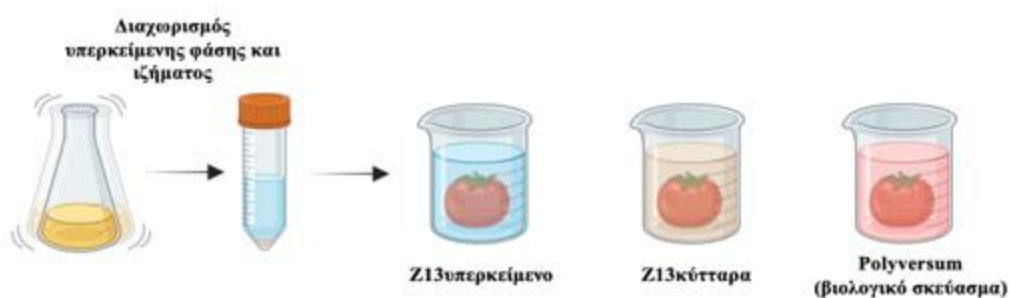
Στην παρούσα εργασία συγκρίθηκε η αποτελεσματικότητα της προληπτικής εφαρμογής του υπερκείμενου του Z13 με την αποτελεσματικότητα του μυκητοκτόνου Polyversum (WP), το οποίο διατίθεται στην αγορά και προορίζεται για την αντιμετώπιση παθογόνων μυκήτων όπως *B. cinerea* και *S. sclerotiorum*. Η δραστική ουσία του σκευάσματος αποτελείται από στελέχη του ωομύκητα *Pythium oligandrum* str. M1. Το ψεκαστικό υγρό από το βιολογικό σκεύασμα Polyversum (WP) προετοιμάστηκε σύμφωνα με τις οδηγίες τις ετικέτας και εφαρμόστηκε με διαφυλλικό ψεκασμό σε φυτά τομάτας ή με εμβάπτιση των καρπών, ανάλογα με το πείραμα.

Παρακάτω απεικονίζονται οι διαφορετικές εφαρμογές που πραγματοποιήθηκαν 2 ημέρες πριν την μόλυνση με τον μύκητα.

### A) Εφαρμογές στα φυτά τομάτας:



### B) Εφαρμογές στους καρπούς τομάτας:



**Εικόνα 8:** Σχηματική απεικόνιση των εφαρμογών για τα πειράματα παθογένειας.  
(Το διάγραμμα δημιουργήθηκε με την χρήση της ιστοσελίδας: [biorender.com](https://biorender.com))



## 2.8 Καταγραφή συμπτωμάτων

Για τη καταγραφή των συμπτωμάτων χρησιμοποιήθηκαν 20 φυτά για κάθε εφαρμογή. Το ποσοστό μόλυνσης υπολογίστηκε ως ο αριθμός των φύλλων που παρουσίαζαν κηλίδες δια το συνολικό αριθμό φύλλων που μολύνθηκαν. Η ένταση της ασθένειας υπολογίστηκε ως η συνολική επιφάνεια μόλυνσης η οποία μετρήθηκε με τη χρήση του προγράμματος ImageJ FIJI (Schneider et al., 2012).

## 2.9 Απομόνωση RNA από φυτά και καρπούς τομάτας:

Η απομόνωση ολικού RNA από τα φύλλα φυτών τομάτας πραγματοποιήθηκε ως εξής:

- Κονιορτοποίηση του φυτικού ιστού σε αποστειρωμένα ιγδία με υγρό άζωτο και τοποθέτηση 80-100mg κονιορτοποιημένου φυτικού ιστού σε erpendorf σωληνάριο χωρητικότητας 1, 5ml.
- Προσθήκη 300μl διαλύματος λύσης κυττάρων
- Έντονη ανάμειξη (vortex) για 10 δευτερόλεπτα και ανάμειξη με αναστροφή των σωληναρίων Eppendorf
- Προσθήκη 100 μl διαλύματος καθίζησης πρωτεϊνών και DNA, το οποίο έχει προψυχθεί σε πάγο
- Ελαφριά ανάμειξη, χτυπώντας και αναστρέφοντας τα σωληνάριο τύπου Eppendorf
- Επώαση για 10 λεπτά σε θερμοκρασία 4 °C
- Φυγοκέντρηση για 20 λεπτά σε 12, 000 rpm σε θερμοκρασία 4 °C
- Μεταφορά υπερκείμενου σε καινούριο σωληνάριο Eppendorf αποφεύγοντας την ενδιάμεση φάση.
- Προσθήκη ίσου όγκου ισοπροπανόλης για κατακρήμνιση του RNA κα ελαφριά ανάδεση με αναστροφή.
- Φυγοκέντρηση για 10 λεπτά σε 12, 000 rpm σε θερμοκρασία 4 °C
- Απομάκρυνση υπερκειμένου
- Προσθήκη 300μl αιθανόλης 70% για καθαρισμό του ιζήματος
- Φυγοκέντρηση για 2 λεπτά σε 12, 000 rpm σε θερμοκρασία 4 °C

- Απομάκρυνση υπερκείμενου
- Στέγνωμα του ιζήματος
- Επαναιωρηματοποίηση του ιζήματος σε 25μl αποστειρωμένο δισαπεσταγμένο νερό.
- Αποθήκευση στους -80 °C για περαιτέρω χρήση

(τροποποιημένο πρωτόκολλο των Oñate-Sánchez & Vicente-Carbajosa, 2008)

Τα βήματα που ακολουθήθηκαν για την απομόνωση του RNA από τους φυτικούς ιστούς ήταν τα εξής:

- Λήψη φυτικού ιστού από τον φλοιό των καρπών κάθε εφαρμογής
- Κονιορτοποίηση του φυτικού ιστού με υγρό άζωτο και τοποθέτηση σε σωληνάριο 1, 5ml
- Προσθήκη 750 μl διαλύματος λύσης κυττάρων (RNA extraction buffer)
- Επώαση για 10 λεπτά στους 65 °C και ανάμειξη των σωληναρίων (vortex)
- Φυγοκέντρηση για 10 λεπτά (8.000 rpm) σε θερμοκρασία 4°C
- Λήψη υπερκείμενου τμήματος και ανάμειξη με ίσο όγκο chloroform: IAA (24:1, v/v)
- Ανάμειξη και φυγοκέντρηση για 10 λεπτά (9.000 rpm) σε θερμοκρασία 4°C
- Λήψη υπερκείμενου τμήματος και προσθήκη ¼ του όγκου LiCl 10M και ελαφριά ανάμειξη
- Κατακρήμιση του RNA στους -80 °C έως την επόμενη ημέρα
- Φυγοκέντρηση για 20 λεπτά (10.000 rpm) σε θερμοκρασία 4°C
- Απομάκρυνση υπερκείμενου και προσθήκη 500μl αιθανόλης 70% για καθαρισμό του ιζήματος (2 επαναλήψεις)
- Απομάκρυνση υπερκείμενου
- Στέγνωμα του ιζήματος
- Επαναιωρηματοποίηση του ιζήματος σε 20μl αποστειρωμένο δισαπεσταγμένο νερό και ανάμειξη μέχρι να διαλυθεί το ίζημα
- Φυγοκέντρηση για ελάχιστα δευτερόλεπτα

(πρωτόκολλο των Sánchez et al., 2016)

## 2.10 Καταστροφή υπολειμμάτων DNA

Για να αποτραπεί η οποιαδήποτε επιμόλυνση του δείγματος με DNA πραγματοποιήθηκε χειρισμός του RNA με ένζυμο δεοξυριβοζονουκλεάσης DNase I (New England Biolabs) σύμφωνα με τις οδηγίες του κατασκευαστή. Ο καθαρισμός των δειγμάτων από DNA πραγματοποιήθηκε με το DNA, RNA and protein purification kit της Macherey-Nagel, έγινε ως εξής:

- Σε κάθε δείγμα προστέθηκε 1μl DNase I και 2, 5μl DNase buffer
- Τα δείγματα τοποθετήθηκαν για επώαση σε θερμοκρασία 37 °C για 10 λεπτά
- Στην συνέχεια σε κάθε δείγμα προστέθηκε 1μl EDTA (0.5 M)
- Τα δείγματα επώαστηκαν στους 75 °C για 10 λεπτά

## 2.11 Μέτρηση συγκέντρωσης νουκλεϊκών οξέων

Η ποσότητα και η καθαρότητα του RNA που απομονώθηκε από τους καρπούς και τα φύλλα προσδιορίστηκε με μετρήσεις απορρόφησης στα 260 nm και 280 nm (NanoDrop 2000c; Thermo, Fisher Scientific, Bonn, Germany).

## 2.12 Σύνθεση cDNA

Η αντίδραση αντίστροφης μεταγραφής εφαρμόστηκε για τον καθορισμό του επιπέδου έκφρασης των υπό μελέτη γονιδίων *PR1* και *PDF1.2* που πιθανόν να επάγονται από την προσθήκη του βιολογικού παράγοντα στα φυτά και στους καρπούς τομάτας και του γονιδίου *UBi3* που χρησιμοποιήθηκε σαν γονίδιο αναφοράς.

Αρχικά το RNA κάθε δείγματος αραιώθηκε με δισαπεσταγμένο και αποστειρωμένο νερό μέχρι τελικό όγκο 14,5 μl. Στη συνέχεια σε κάθε δείγμα προστέθηκαν τα παρακάτω αντιδραστήρια από το PrimeScript RT reagent kit, TAKARA:

- 1μl dntp mix
- 1μl μείγμα εκκινητών Oligo (dT) 10Mμ

Επώαση σε θερμοκρασία 65 °C για 5 λεπτά και 2 λεπτά επώαση των δειγμάτων σε πάγο.

- 4μl ρυθμιστικό διάλυμα (5x PrimeScript Buffer)
- 0, 5μl RNase inhibitor
- 1μl Xpert RTase

## 2.13 Ποσοτικοποίηση των γονιδίων *PR1* και *PDF1.2* με real-time PCR (qPCR)

Η Real-time PCR έγινε σε θερμοκυκλοποιητή της Applied Biosystems (StepOnePlus) και για τις αντιδράσεις ενίσχυσης χρησιμοποιήθηκε το master mix KAPA SYBR FAST Green I dye (2x) Universal (SigmaAldrich), ενώ τα αποτελέσματα αναλύθηκαν με το λογισμικό StepOne v.2.3. Για την ποσοτικοποίηση της έκφρασης των γονιδίων χρησιμοποιήθηκαν οι παρακάτω εκκινητές. Τα επίπεδα έκφρασης του γονιδίου *UBi3* που είναι γονίδιο αναφοράς, χρησιμοποιήθηκαν σαν σταθερά για την ποσοτικοποίηση των γονιδίων *PR1* και *PDF1.2* που ανιχνεύθηκαν με την χρήση του παρακάτω ζεύγους εκκινητών.

Γονίδιο- στόχος	Ζεύγος εκκινητών	Αναφορά
<i>PR1</i>	5'-GAGGGCAGCCGTGCAA-3' 5'-CACATTTTCCACCAACACATTG-3'	Block et al., 2005
<i>PDF1.2</i>	5'-TGATGCCAAGGCTTGTACTAGAGA-3' 5'-AGCGGACTTCCTTCTGAACGT-3'	Herman et al., 2008
<i>UBi3</i>	5'-TTGCCGCATGCCATTCT-3' 5'-TCGGTGAGGATATTCATCAGGTT-3'	Herman et al., 2008

**Πίνακας 1:** Ζεύγη εκκινητών που χρησιμοποιήθηκαν για την ποσοτικοποίηση των επιπέδων έκφρασης των γονιδίων *PR1* και *PDF1.2* με την μέθοδο της Real Time PCR και του γονιδίου αναφοράς *UBi3* βάση της έκφρασης του οποίου έγινε η κανονικοποίηση των αποτελεσμάτων.

Τα αντιδραστήρια και οι ποσότητες που χρησιμοποιήθηκαν στις αντιδράσεις της Real Time PCR, σύμφωνα με τις οδηγίες της εταιρίας της οποίας το master mix χρησιμοποιήθηκε, δίνονται στον Πίνακα 2. Οι συνθήκες της αντίδρασης Real time PCR δίνονται στον Πίνακα 3:

Αντιδραστήρια	Ποσότητα
<b>KAPA SYBR FAST Qpcr Master Mix (2X) Universal</b>	5 μl
<b>Εκκινητής F (πρόσθιος)</b>	0, 16
<b>Εκκινητής R (ανάστροφος)</b>	0, 16
<b>cDNA</b>	1μl
<b>H<sub>2</sub>O</b>	3, 68 μl
<b>Τελικός όγκος</b>	10 μl

**Πίνακας 2:** Αντιδραστήρια και ποσότητες που χρησιμοποιήθηκαν ανά αντίδραση με τις οδηγίες του κατασκευαστή του KAPA SYBR FAST Green I dye(2x) Universal mix, της SigmaAldrich.

	Χρόνος	Θερμοκρασία (°C)	Αποτέλεσμα
<b>Βήμα 1</b>	3 min	95	Ενεργοποίηση της SYBR DNA πολυμεράσης
<b>Βήμα 2</b>	2 sec	95	Αποδιάταξη του DNA
	30 sec	60	Υβριδισμός εκκινητών/ επιμήκυνση αλυσίδας
<b>Βήμα 3</b>	0.15 sec	95	Δημιουργία καμπύλης διαχωρισμού
	1 min	60	των προϊόντων της RT- PCR
	0.15 sec	95	(Dissociation curve)

**Πίνακας 3:** Θερμοκρασίες και χρόνοι για την ενίσχυση των επιθυμητών αλληλουχιών. Η κάθε αντίδραση πραγματοποιήθηκε σε τρεις επαναλήψεις. Η εξειδίκευση των εκκινητών και ο σχηματισμός των διμερών των εκκινητών παρακολούθηθηκαν από την καμπύλη διαχωρισμού της RT-PCR. Το βήμα 2 επαναλήφθηκε για 40 κύκλους.

#### 2.14 Βιοπληροφορική ανάλυση

Τα προγράμματα/ λογισμικά που χρησιμοποιήθηκαν για την ανάλυση και ανίχνευση γονιδίων που πιθανόν εμπλέκονται στην φυτοπροστατευτική δράση του *P. putida* Z13 ήταν το ProgressiveMauve, Blast, SnapGene Viewer, antiSMASH και το Proxee.

- **ProgressiveMauve**

Το λογισμικό ProgressiveMauve (version 2.4.0) επέτρεψε την στοίχιση (alignment) της αλληλουχίας αναφοράς (*Pseudomonas putida* NBRC 14164) με την γονιδιωματική αλληλουχία του στελέχους *P. putida* Z13.

- **BLAST**

Το BLAST (Basic Local Alignment Search Tool) είναι ένα εργαλείο βιοπληροφορικής που παρέχεται από το Εθνικό Κέντρο Βιοτεχνολογίας (NCBI) και δίνει την δυνατότητα αναζήτησης ομοιοτήτων μεταξύ ακολουθιών. Χρησιμοποιήθηκε το BLASTn για την σύγκριση αλληλουχιών νουκλεοτιδίων και το BLASTp για την σύγκριση πρωτεϊνών.

- **SnapGene Viewer**

Το SnapGene Viewer (version 6.2.1) επέτρεψε την προβολή ακολουθιών DNA από αρχεία της μορφής GenBank και FASTA.

- **AntiSMASH**

Το antiSMASH (version 7.0.0) συνδυάζει υπολογιστικούς αλγορίθμους και εργαλεία για την ανίχνευση γονιδιακών συστάδων που είναι υπεύθυνες για τη βιοσύνθεση δευτερογενών μεταβολιτών στα μικροβιακά γονιδιώματα.

- **Proxee:**

Το proxee χρησιμοποιήθηκε για την οπτικοποίηση ολόκληρου του γονιδιώματος του *P. putida* Z13 και την θέση των γονιδίων που μας ενδιαφέρουν.

### 3. Αποτελέσματα

#### 3.1 Πειράματα αξιολόγησης δράσης του βιολογικού παράγοντα Z13

Στην παρούσα μεταπτυχιακή μελέτη, στην οποία διερευνήθηκε η αποτελεσματικότητα της δράσης του βιολογικού παράγοντα *P. putida* Z13 έναντι του μύκητα *B. cinerea* σε φυτά και καρπούς τομάτας, έγιναν τα εξής πειράματα:

##### Για τα φυτά τομάτας:

- Πείραμα παθογένειας, για την διερεύνηση της δράσης των μεταβολιτών που περιέχει το υπερκείμενο διάλυμα του Z13. Το υπερκείμενο διάλυμα εφαρμόστηκε στα φυτά με ριζοπότισμα (P).
- Πείραμα παθογένειας για την διερεύνηση της δράσης του αιωρήματος κυττάρων του Z13. Το αιώρημα εφαρμόστηκε στα φυτά με ριζοπότισμα (P), διαφυλλικό ψεκασμό (Φ) και ταυτόχρονα στη ριζόσφαιρα και στα φύλλα (Φ/P).
- Πείραμα διερεύνησης της έκφρασης των γονιδίων *PR1* και *PDF1.2*, σε φυτά που είχε εφαρμοστεί το υπερκείμενο διάλυμα στη ριζόσφαιρα και σε φυτά που είχε εφαρμοστεί το αιώρημα κυττάρων στα φύλλα (Φ) ή στη ριζόσφαιρα (P) ή και στα δύο (Φ/P).

##### Για τους καρπούς τομάτας:

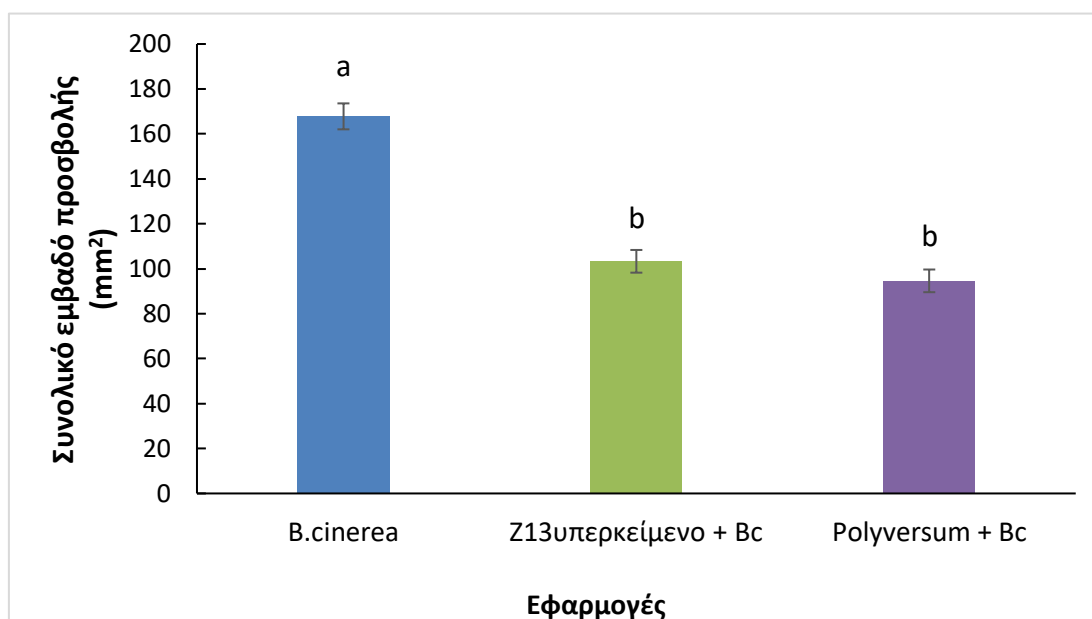
- Πείραμα παθογένειας, όπου μελετήθηκε η δράση των μεταβολιτών και των κυττάρων του Z13 συγκριτικά με αρνητικούς/θετικούς μάρτυρες.
- Πείραμα διερεύνησης της έκφρασης των γονιδίων *PR1* και *PDF1.2*, σε καρπούς που είχαν εμβλαπτιστεί σε υπερκείμενο διάλυμα και σε καρπούς που εμβλαπτίστηκαν σε αιώρημα κυττάρων του Z13 αντίστοιχα.

### 3.1.1 Αποτελέσματα πειράματος παθογένειας στα φυτά

Τα πρώτα συμπτώματα στα φυτά του πειράματος παθογένειας παρατηρήθηκαν στις 5 ημέρες μετά την εφαρμογή του μύκητα και η καταγραφή των συμπτωμάτων έγινε 9 ημέρες μετά την μόλυνση. Παρακάτω απεικονίζονται τα αποτελέσματα της δράσης του Z13, στα φυτά που είχε εφαρμοστεί το υπερκείμενο διάλυμα του (Εικόνα 9) και στα φυτά που είχε εφαρμοστεί το αιώρημα κυττάρων του (Εικόνα 10).

#### 3.1.1.1 Αποτελέσματα από την εφαρμογή του Z13 (υπερκείμενο)

Πιο συγκεκριμένα τα αποτελέσματα του πειράματος παθογένειας έδειξαν ότι το στέλεχος Z13 μειώνει σημαντικά την ένταση των συμπτωμάτων που προκαλεί ο μύκητας *B. cinerea*, στα φυτά που είχε εφαρμοστεί το υπερκείμενο διάλυμα του Z13 σε ποσοστό 38% και στα φυτά που είχε εφαρμοστεί το βιολογικό σκεύασμα Polyversum, σε ποσοστό 44% σε σχέση με τον μάρτυρα (*B. cinerea*). Ωστόσο, δεν υπάρχει σημαντική στατιστική διαφορά μεταξύ αυτών των δύο εφαρμογών.

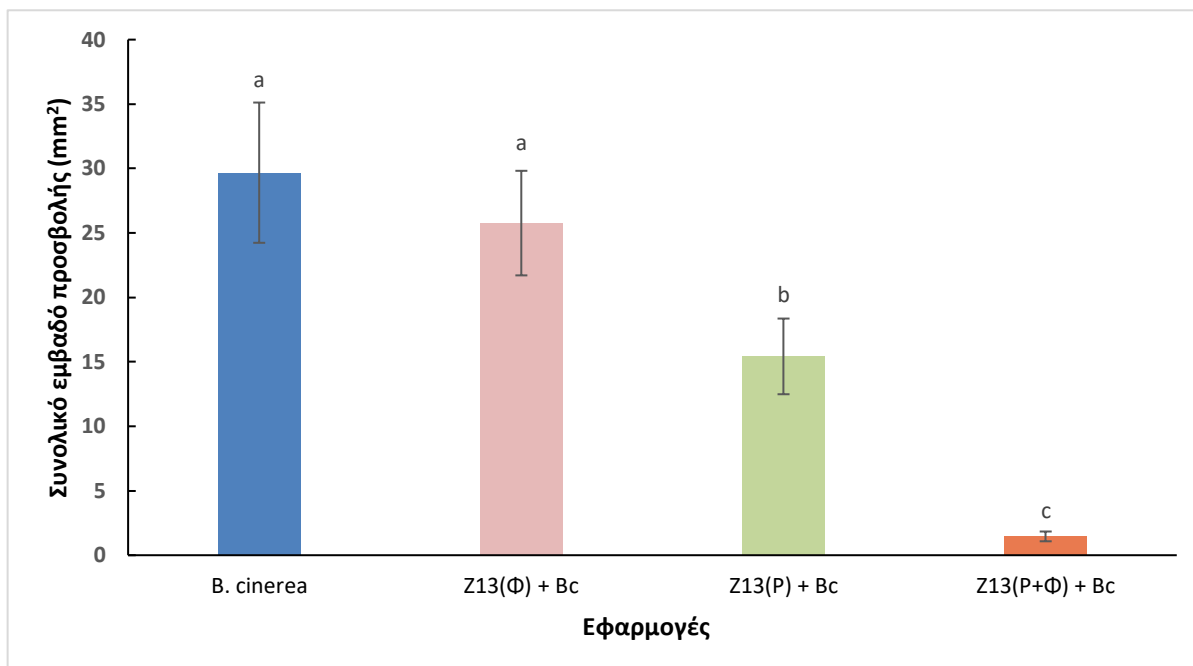


**Εικόνα 9:** Απεικόνιση του εμβαδού της ασθένειας στα φυτά μάρτυρες (*B. cinerea*) και στα φυτά όπου, μαζί με το μόλυσμα, εφαρμόστηκε το Z13-υπερκείμενο και το Polyversum αντίστοιχα. Οι κάθετες γραμμές πάνω στις στήλες αντιπροσωπεύουν το τυπικό σφάλμα και οι στήλες με διαφορετικά γράμματα εμφανίζουν στατιστικά σημαντικές διαφορές με βάση τη μέθοδο LSD σε επίπεδο σημαντικότητας  $P < 0.05$ .



### 3.1.1.2 Αποτελέσματα από την εφαρμογή του Z13 (κύτταρα)

Η ανάλυση του εμβαδού ασθένειας έδειξε πως δεν υπάρχει στατιστικά σημαντική διαφορά στην εφαρμογή όπου το αιώρημα κυττάρων Z13 ψεκάστηκε στα φύλλα πριν την μόλυνση (Z13(Φ) + Bc) σε σχέση με τον μάρτυρα (*B. cinerea*). Όμως, το Z13 όταν εφαρμόστηκε με ριζοπότισμα πριν την μόλυνση μείωσε την ασθένεια κατά 48% και όταν εφαρμόστηκε στις ρίζες και στα φύλλα των φυτών μείωσε την ασθένεια σε ακόμα μεγαλύτερο ποσοστό των 95% σε σχέση με τον μάρτυρα.

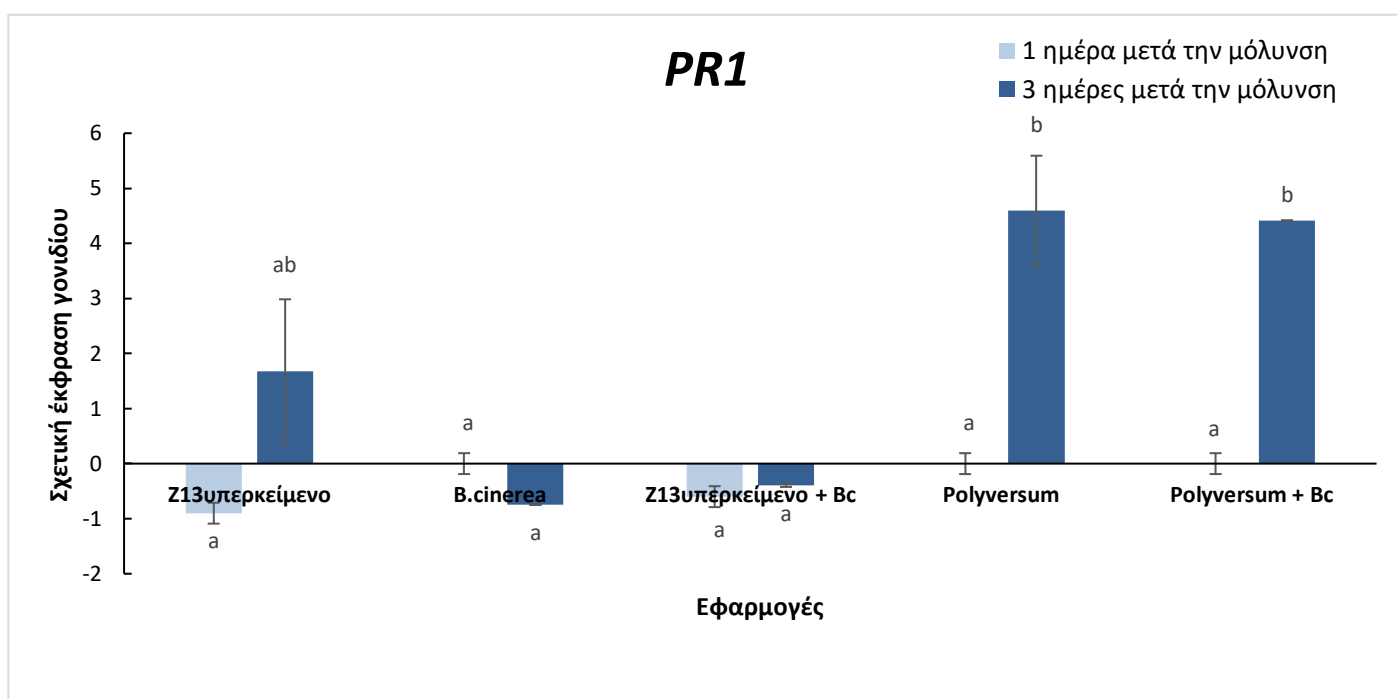


**Εικόνα 10:** Απεικόνιση του εμβαδού της ασθένειας στα φυτά μάρτυρες (*B. cinerea*) και στα φυτά όπου, πριν την μόλυνση, εφαρμόστηκε το Z13 ως αιώρημα κυττάρων στα φύλλα (Z13(Φ) + Bc) ή στη ρίζα (Z13(P) + Bc) ή και στα δύο (Z13(P+Φ) + Bc). Οι κάθετες γραμμές πάνω στις στήλες αντιπροσωπεύουν το τυπικό σφάλμα και οι στήλες με διαφορετικά γράμματα εμφανίζουν στατιστικά σημαντικές διαφορές με βάση τη μέθοδο LSD σε επίπεδο σημαντικότητας  $P < 0.05$

### 3.1.2 Διερεύνηση της έκφρασης των γονιδίων *PR1* και *PDF1.2* σε φυτά τομάτας

#### 3.1.2.1 Έκφραση των γονιδίων *PR1* και *PDF1.2* στην εφαρμογή του Z13-υπερκείμενο

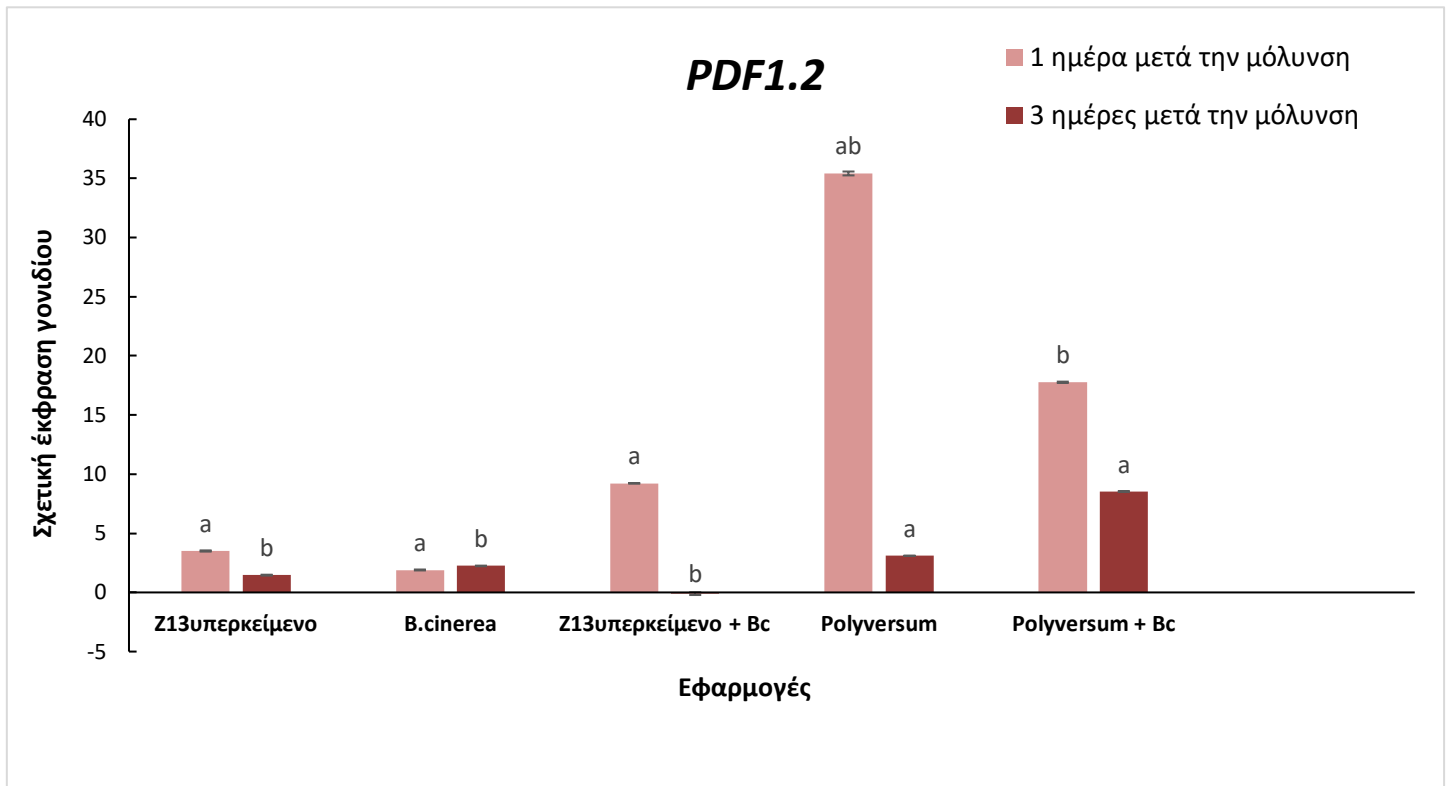
Όπως φαίνεται στην Εικ. 11 το γονίδιο *PR1* υποεκφράζεται σε όλες τις εφαρμογές στην 1 ημέρα μετά την μόλυνση. Στις 3 ημέρες μετά τη μόλυνση το γονίδιο παρουσίασε υπερέκφραση στην εφαρμογή του υπερκείμενου διαλύματος του Z13 με ριζοπότισμα χωρίς το μόλυσμα. Στατιστικά σημαντική υπερέκφραση στην 3<sup>η</sup> ημέρα, παρατηρείται στις εφαρμογές όπου είχαν ψεκαστεί τα φυτά με το βιολογικό σκεύασμα Polyversum.



**Εικόνα. 11:** Έκφραση του γονιδίου *PR1* σε φυτά που εφαρμόστηκε 1) το υπερκείμενο διάλυμα του Z13, 2) ο μύκητας *B. cinerea*, 3) το υπερκείμενο Z13 μαζί με το μόλυσμα, 4) μεμονωμένο το σκεύασμα Polyversum και 5) το Polyversum μαζί το μόλυσμα. Οι κάθετες γραμμές πάνω στις στήλες αντιπροσωπεύουν το τυπικό σφάλμα και οι στήλες με διαφορετικά γράμματα εμφανίζουν στατιστικά σημαντικές διαφορές με βάση τη μέθοδο LSD σε επίπεδο σημαντικότητας  $P < 0.05$

Την 1<sup>η</sup> μέρα μετά την μόλυνση το γονίδιο *PDF1.2* υπερεκφράζεται σχεδόν σε όλες τις εφαρμογές εκτός από τους θετικούς μάρτυρες. Οι εφαρμογές όπου τα φυτά ψεκάστηκαν με το βιολογικό σκεύασμα Polyversum πριν την μόλυνση και οι εφαρμογές

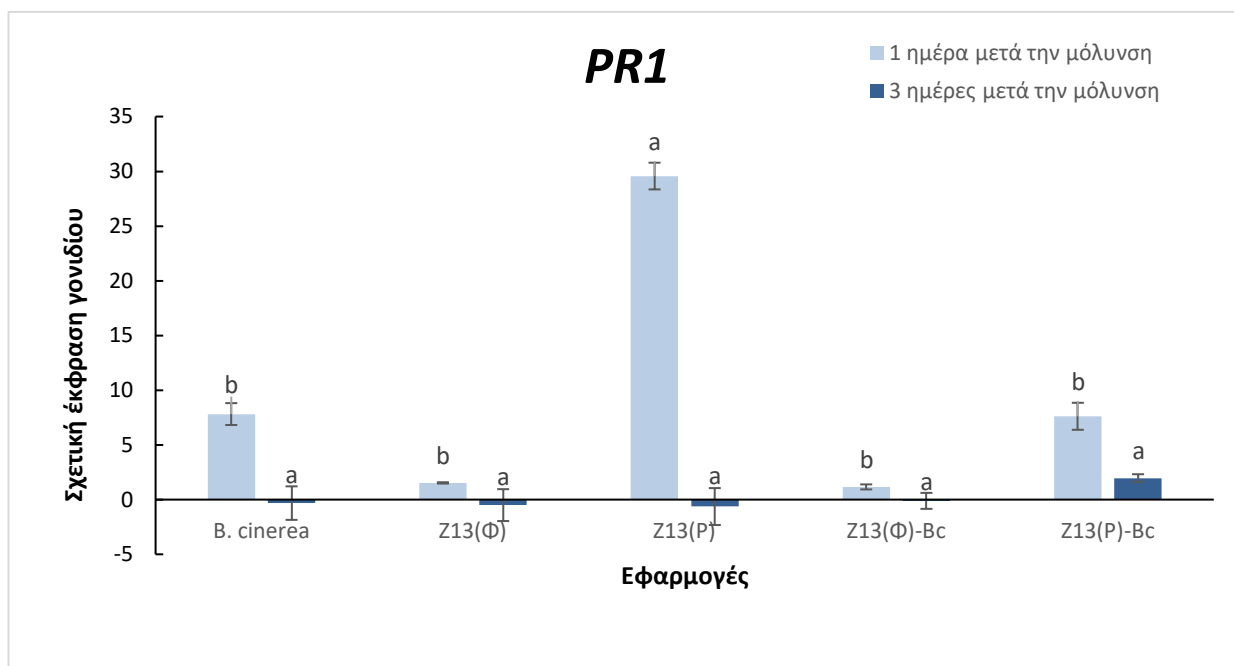
που είχε προστεθεί το υπερκείμενο Z13 με ριζοπότισμα πριν την μόλυνση, παρουσίασαν τα μεγαλύτερα επίπεδα έκφρασης την 1<sup>η</sup> ημέρα μετά την μόλυνση.



**Εικόνα 12:** Έκφραση του γονιδίου *PDF1.2* σε φυτά που εφαρμόστηκε 1) το υπερκείμενο διάλυμα του Z13, 2) ο μύκητας *B. cinerea*, 3) το υπερκείμενο Z13 μαζί με το μόλυσμα, 4) μεμονωμένο το σκεύασμα Polyversum και 5) το Polyversum μαζί το μόλυσμα. Οι κάθετες γραμμές πάνω στις στήλες αντιπροσωπεύουν το τυπικό σφάλμα και οι στήλες με διαφορετικά γράμματα εμφανίζουν στατιστικά σημαντικές διαφορές με βάση τη μέθοδο LSD σε επίπεδο σημαντικότητας  $P < 0.05$

### 3.1.2.2 Έκφραση των γονιδίων *PR1* και *PDF1.2* στην εφαρμογή του Z13 - κύτταρα

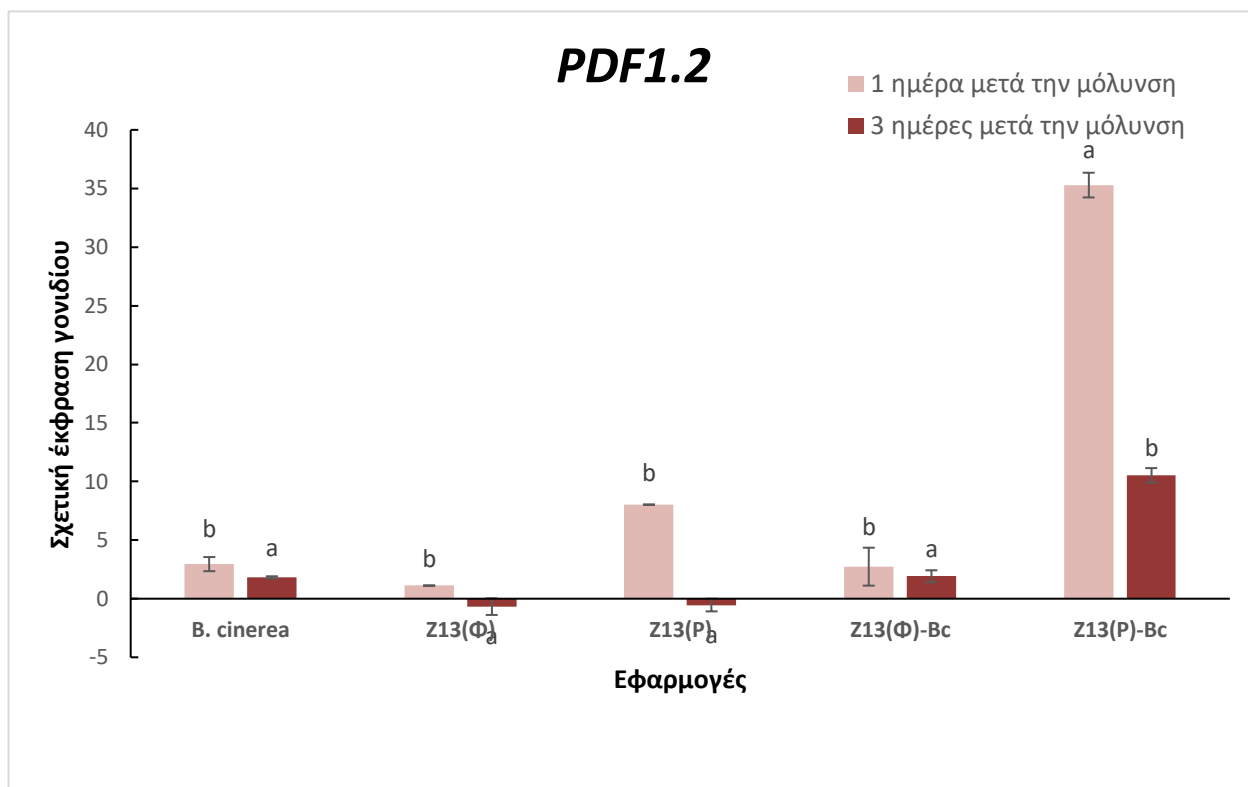
Στη 1<sup>η</sup> ημέρα μετά την μόλυνση η έκφραση του γονιδίου *PR1* φαίνεται ότι είναι αυξημένη σε όλες τις εφαρμογές, ειδικά στα φυτά που είχαν εφαρμοστεί μόνο τα κύτταρα του βακτηρίου Z13 με ριζοπότισμα. Στις 3 ημέρες μετά την μόλυνση η έκφραση του γονιδίου *PR1* μειώνεται σε όλες τις εφαρμογές και υποεκφράζεται σε όλες τις εφαρμογές εκτός από την εφαρμογή όπου εφαρμόστηκαν τα βακτηριακά κύτταρα του Z13 στις ρίζες πριν την μόλυνση.



**Εικόνα 13:** Έκφραση του γονιδίου *PR1* σε φυτά που εφαρμόστηκε 1) ο μύκητας *B.cinerea*, 2) αιώρημα κυττάρων του Z13 στα φύλλα, 3) αιώρημα κυττάρων του Z13 στις ρίζες, 4) αιώρημα κυττάρων του Z13 στα φύλλα μαζί με το μόλυσμα και 5) αιώρημα κυττάρων του Z13 στις ρίζες μαζί με το μόλυσμα. Οι κάθετες γραμμές πάνω στις στήλες αντιπροσωπεύουν το τυπικό σφάλμα και οι στήλες με διαφορετικά γράμματα εμφανίζουν στατιστικά σημαντικές διαφορές με βάση τη μέθοδο LSD σε επίπεδο σημαντικότητας  $P < 0.05$

Η έκφραση του γονιδίου *PDF1.2*, όπως φαίνεται στην Εικ.14, είναι ιδιαίτερα αυξημένη την 1<sup>η</sup> ημέρα μετά την μόλυνση σε όλες τις εφαρμογές και ιδιαίτερα στα φυτά όπου προστέθηκε το αιώρημα κυττάρων στις ρίζες πριν την μόλυνση, παρουσιάζεται

στατιστικά σημαντική διαφορά σε σχέση με τις υπόλοιπες εφαρμογές. Αντιθέτως, το *PDF1.2* υποεκφράζεται την 3<sup>η</sup> ημέρα στην εφαρμογή όπου τα φύλλα ψεκάστηκαν μόνο με το αιώρημα κυττάρων Z13 και στην εφαρμογή που στα φυτά εφαρμόστηκε το αιώρημα κυττάρων με ριζοπότισμα. Στις υπόλοιπες εφαρμογές της 3<sup>η</sup> ημέρας το γονίδιο υπερεκφράζεται με στατιστικά σημαντική διαφορά να φαίνεται στην εφαρμογή Z13(P) + Bc.

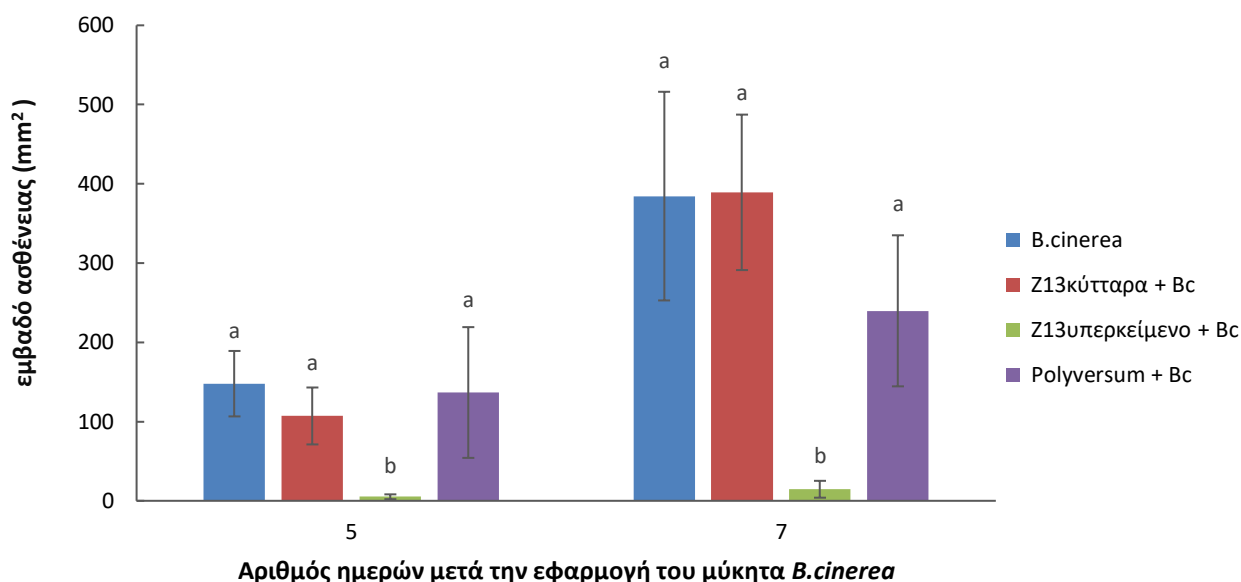


**Εικόνα 14:** Έκφραση του γονιδίου *PDF1.2* σε φυτά που εφαρμόστηκε 1) ο μύκητας *B.cinerea*, 2) αιώρημα κυττάρων του Z13 στα φύλλα, 3) αιώρημα κυττάρων του Z13 στις ρίζες, 4) αιώρημα κυττάρων του Z13 στα φύλλα μαζί με το μόλυσμα και 5) αιώρημα κυττάρων του Z13 στις ρίζες μαζί με το μόλυσμα. Οι κάθετες γραμμές πάνω στις στήλες αντιπροσωπεύουν το τυπικό σφάλμα και οι στήλες με διαφορετικά γράμματα εμφανίζουν στατιστικά σημαντικές διαφορές με βάση τη μέθοδο LSD σε επίπεδο σημαντικότητας  $P < 0.05$

### 3.1.3 Πείραμα παθογένειας σε καρπούς τομάτας

Για τη διερεύνηση της συμπτωματολογίας στους καρπούς τομάτας η καταγραφή πραγματοποιήθηκε την 5<sup>η</sup> και 7<sup>η</sup> ημέρα μετά την μόλυνση με τον μύκητα *B. cinerea*. Η μέτρηση του εμβαδού της προσβολής εκφράζεται ως το εμβαδόν της κηλίδας μαλακής σήψης, που είναι χαρακτηριστικό σύμπτωμα της ασθένειας.

Όπως φαίνεται στην Εικόνα 15, τα επίπεδα προσβολής στην εφαρμογή *B. cinerea* είναι ήδη αυξημένα την 5<sup>η</sup> ημέρα και συνεχίζουν να αυξάνονται έως και την 7<sup>η</sup> ημέρα μετρήσεων. Σχετικά με την εφαρμογή στην οποία οι καρποί εμβαπτίστηκαν σε αιώρημα κυττάρων του Z13 πριν την μόλυνση, τα επίπεδα προσβολής δεν διαφέρουν σημαντικά από εκείνα στους θετικούς μάρτυρες (*B. cinerea*). Το ίδιο ισχύει για τα επίπεδα προσβολής στους καρπούς που είχαν εμβαπτιστεί στο ψεκαστικό υγρό του σκευάσματος Polyversum πριν την μόλυνση. Αντίθετα, η ανάπτυξη της ασθένειας στην περίπτωση εφαρμογής του υπερκείμενου διαλύματος στους καρπούς πριν προστεθεί το μόλυσμα, σημείωσε σχεδόν 90% μείωση σε σχέση με τη προσβολή που σημειώθηκε στον μάρτυρα.



**Εικόνα 15.** Στο γράφημα απεικονίζεται το εμβαδόν της ασθένειας για καρπούς που μολύνθηκαν με το μύκητα (*B. cinerea*), καρπούς που εμβαπτίστηκαν σε αιώρημα κυττάρων του Z13 (Z13κύτταρα/Bc), καρπούς που εμβαπτίστηκαν σε υπερκείμενο διάλυμα του Z13 (Z13υπερκείμενο/Bc) και σε καρπούς που εμβαπτίστηκαν στο

Polyversum (Βιολ. σκεύασμα/Bc). Οι κάθετες γραμμές πάνω στις στήλες αντιπροσωπεύουν το τυπικό σφάλμα και οι στήλες με διαφορετικά γράμματα εμφανίζουν στατιστικά σημαντικές διαφορές με βάση τη μέθοδο LSD σε επίπεδο σημαντικότητας  $P < 0.05$



**B. cinerea (Bc)**

**Z13(κύτταρα) + Bc**

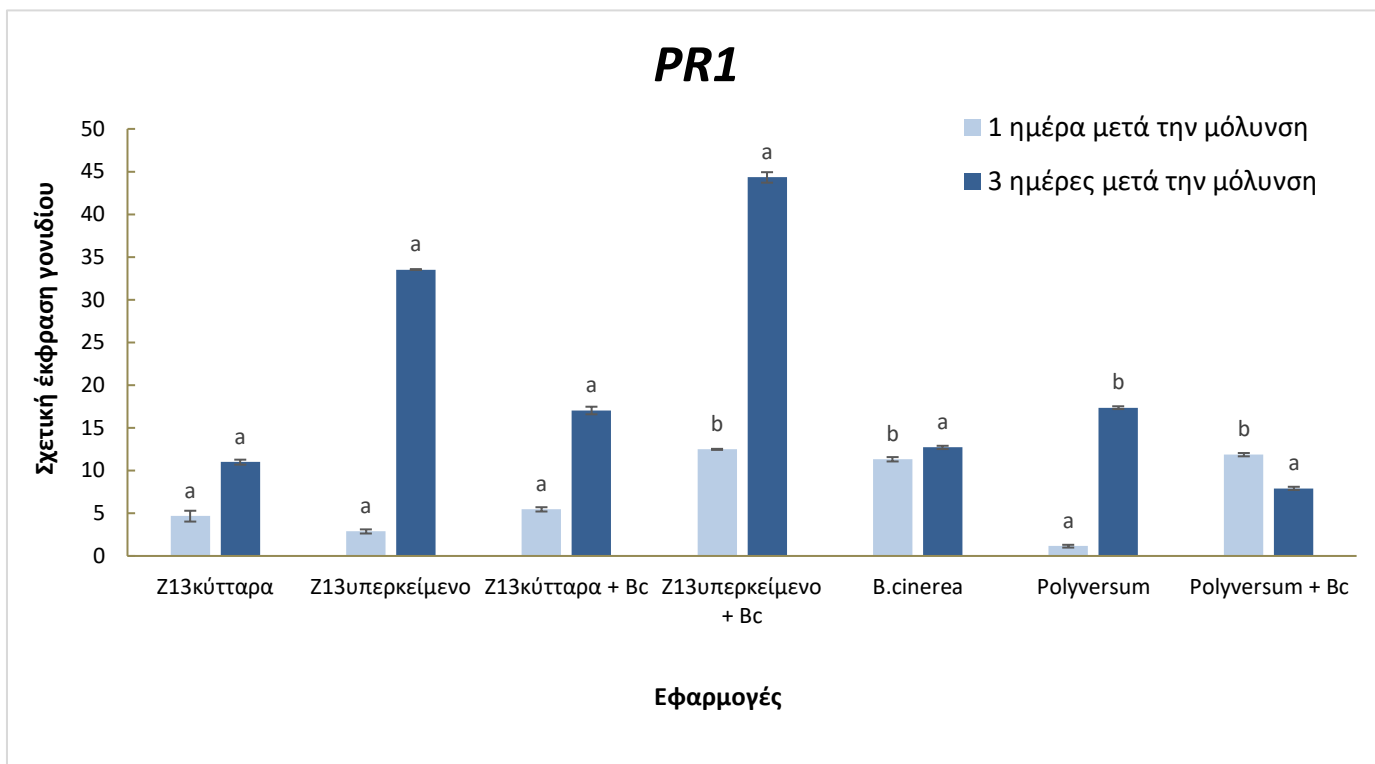
**Z13(υπερκείμενο) + Bc**

**Polyversum + Bc**

**Εικόνα 16:** Εφαρμογές από το πείραμα παθογένειας του μύκητα *B. cinerea* σε καρπούς τομάτας, 5 ημέρες μετά την μόλυνση.

### **3.1.4 Διερεύνηση της έκφρασης των γονιδίων *PR1* και *PDF1.2* στους καρπούς τομάτας**

Τα επίπεδα έκφρασης των γονιδίων *PR1* και *PDF1.2* που ανιχνεύτηκαν με qPCR από διάφορες εφαρμογές στους καρπούς τομάτας δίνονται στα παρακάτω γραφήματα. Για κάθε γονίδιο δίνεται η έκφραση του σε κάθε εφαρμογή σε σχέση με την έκφραση του γονιδίου στους αρνητικούς μάρτυρες.

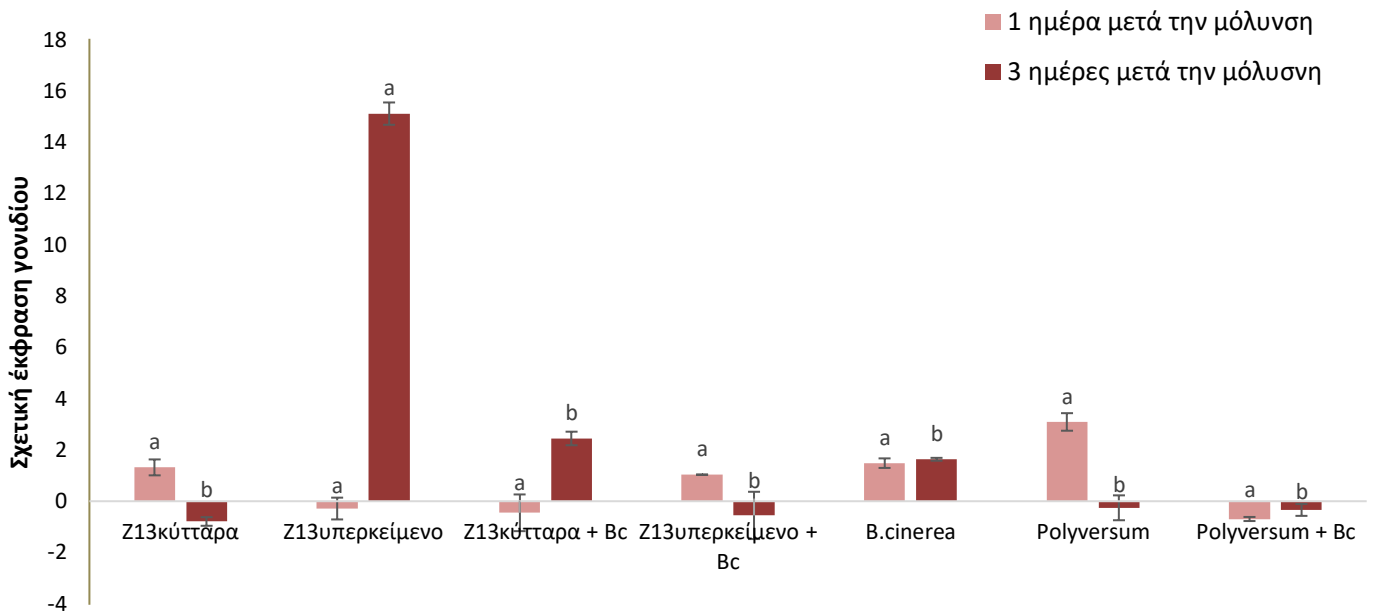


**Εικόνα 17:** Τα σχετικά επίπεδα του γονιδίου *PR1* σε καρπούς που δέχθηκαν την εφαρμογή του στελέχους Z13 (κύτταρα ή υπερκεείμενο) με ή χωρίς μόλυσμα, σε καρπούς που εφαρμόστηκε μόνο το μόλυσμα καθώς και σε καρπούς που εφαρμόστηκε το σκεύασμα με ή χωρίς μόλυνση με τον μύκητα *B. cinerea* στη 1 και 3 ημέρες μετά την μόλυνση με τον μύκητα. Οι κάθετες γραμμές πάνω στις στήλες αντιπροσωπεύουν το τυπικό σφάλμα και οι στήλες με διαφορετικά γράμματα εμφανίζουν στατιστικά σημαντικές διαφορές με βάση την μέθοδο LSD σε επίπεδο σημαντικότητας  $P < 0.05$ .

Η σχετική έκφραση του γονιδίου *PR1* είναι σε όλες τις εφαρμογές αυξημένη την 1<sup>η</sup> μέρα μετά την μόλυνση εκτός από την εφαρμογή Polyversum. Στις 3 ημέρες το γονίδιο υπερεκφράζεται σε όλες τις εφαρμογές, και η στατιστικά σημαντική αύξηση εμφανίζεται στους καρπούς που είχαν εμβλαπτιστεί στο υπερκεείμενο διάλυμα του Z13 πριν την μόλυνση (Z13υπερκεείμενο + Bc).



## PDF1.2



**Εικόνα 18:** Τα σχετικά επίπεδα του γονιδίου *PDF1.2* σε καρπούς που δέχθηκαν την εφαρμογή του στελέχους Z13 (κύτταρα ή υπερκείμενο) με ή χωρίς μόλυσμα, σε καρπούς που εφαρμόστηκε μόνο το μόλυσμα καθώς και σε καρπούς που εφαρμόστηκε το σκεύασμα με ή χωρίς μόλυνση με τον μύκητα *B. cinerea* στη 1 και 3 ημέρες μετά την μόλυνση με τον μύκητα. Οι κάθετες γραμμές πάνω στις στήλες αντιπροσωπεύουν το τυπικό σφάλμα και οι στήλες με διαφορετικά γράμματα εμφανίζουν στατιστικά σημαντικές διαφορές με βάση την μέθοδο LSD σε επίπεδο σημαντικότητας  $P < 0.05$ .

Η σχετική έκφραση του γονιδίου *PDF1.2* απεικονίζεται την Εικόνα 18, φαίνεται ότι στην 1<sup>η</sup> μέρα μετά την μόλυνση είναι ελάχιστα αυξημένη σε όλες τις εφαρμογές χωρίς να υπάρχουν όμως στατιστικά σημαντικές διαφορές ενώ στις 3 ημέρες μετά την μόλυνση παρατηρείται σημαντική αύξηση της έκφρασης του γονιδίου στα φυτά που δέχθηκαν την εφαρμογή του υπερκείμενου διαλύματος του Z13 μεμονωμένα.

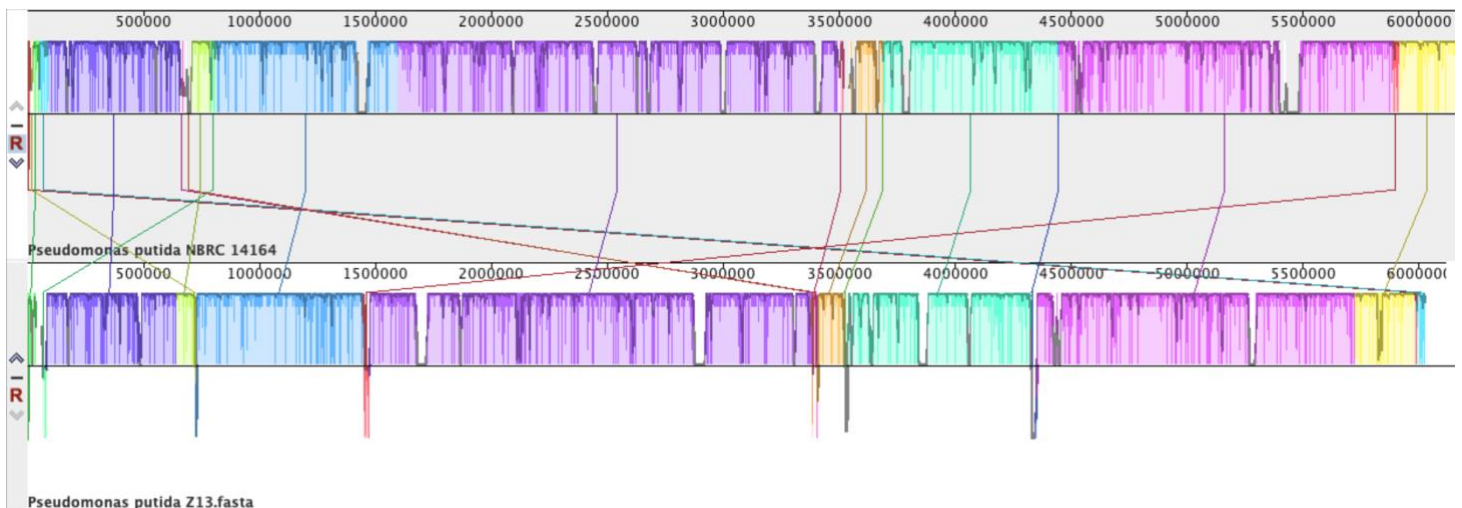
## 3.2 Αποτελέσματα βιοπληροφορικής ανάλυσης

### 3.2.1 Αναδιάταξη και συγκριτική ανάλυση

Σε προηγούμενη μελέτη είχε γίνει αλληλούχιση (short reads) του Z13 και εκ νέου συναρμολόγηση του γονιδιώματος του (de novo assembly). Αποτέλεσμα της συναρμολόγησης ήταν 201 συνεχόμενες αλληλουχίες (contigs). Για να γίνει εφικτή η περαιτέρω ανάλυση του γονιδιώματος του Z13 ήταν αναγκαία η αναδιάταξη των contigs και η στοίχιση τους βάση ενός γονιδιώματος αναφοράς. Για την αναδιάταξη επιλέχθηκε το στέλεχος *P. putida* NBRC 14164 αφού από προηγούμενη φυλογενετική ανάλυση βρέθηκε πως αποτελεί συγγενικό είδος του Z13. Ολόκληρο το γονιδίωμα του NBRC 14164 είναι γνωστό και διατίθεται από την ιστοσελίδα του NCBI (National Center of Biotechnology Information) υπό τον αριθμό RefSeq: GCF\_000412675.1.

Η συστοίχιση του Z13 με βάση ενός γονιδιώματος αναφοράς εξυπηρετεί δύο βασικούς σκοπούς:

1. Δημιουργεί ένα νέο αρχείο (FASTA) που περιέχει τη “σωστή” διάταξη των contigs, το οποίο μπορεί να χρησιμοποιηθεί σε μελλοντική ανάλυση.
2. Παρέχεται η δυνατότητα διερεύνησης των ομοιοτήτων και διαφορών μεταξύ των γονιδιωμάτων



**Εικόνα 19:** Το γράφημα απεικονίζει τη συγκριτική ανάλυση των γονιδιωμάτων του στελέχους *P. putida* Z13 και του *P. putida* NBRC 14164, με έμφαση στις συντηρημένες περιοχές και στις διαφοροποιήσεις δομής μεταξύ των δύο στελεχών. Η ευθυγράμμιση του Z13 βάση του γονιδιώματος αναφοράς NBRC 14164, πραγματοποιήθηκε με το λογισμικό ProgressiveMauve

Στην Εικόνα 19. απεικονίζεται η συστοίχιση των συνεχόμενων αλληλουχιών (contigs) βάση του γονιδιώματος αναφοράς του στελέχους NBRC 14164. Χρησιμοποιώντας την επιλογή της εστίασης στο γράφημα, επιτρέπεται η οπτικοποίηση των περιοχών με μεγάλο βαθμό ομοιότητας ή των περιοχών που λείπουν από ένα γονιδίωμα αλλά υπάρχουν στο άλλο. Οι χρωματιστές γραμμές στο ενδιάμεσο του γραφήματος αποτυπώνουν την θέση των contigs βάση της γονιδιωματικής οργάνωσης του NBRC 14164.

### **3.2.2 Ανίχνευση γονιδίων που εμπλέκονται στην φυτοπροστατευτική δράση του στελέχους *P. putida* Z13**

Στόχος της ανάλυσης ήταν η ταυτοποίηση των γονιδίων που εμπλέκονται στην φυτοπροστατευτική δράση / ανταγωνιστικότητα του στελέχους Z13 είτε μέσω βιοσύνθεσης αντιβιοτικών ουσιών, είτε με την έκκριση σιδεροφόρων ή ουσιών που ενεργοποιούν την διασυστηματική άμυνα των φυτών (ISR).

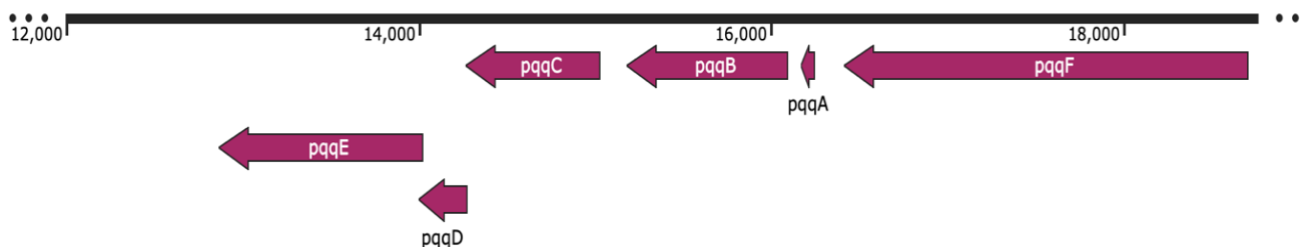
Με την βοήθεια της βάσης δεδομένων NCBI, αναζητήθηκαν οι νουκλεοτιδικές αλληλουχίες των γονιδίων που μας ενδιαφέρουν, από συγγενικά βακτηριακά στελέχη με το *P. putida* Z13. Έπειτα με τη βοήθεια της μηχανής αναζήτησης BLASTn (Basic Local Alignment Search Tool) του NCBI, έγινε σύγκριση της νουκλεοτιδικής αλληλουχίας των γονιδίων που απομονώθηκαν με την νουκλεοτιδική αλληλουχία του γονιδιώματος του *P.putida* Z13. Για την συγκριτική ανάλυση δόθηκε βάση στο ποσοστό κάλυψης (Query cover) μεταξύ των νουκλεοτιδικών αλληλουχιών, καθώς και το ποσοστό ομολογίας (Identity). Ακολούθησε η ίδια διαδικασία στην χρήση της μηχανής αναζήτησης πρωτεϊνών BLASTp. Τα αποτελέσματα των αναζητήσεων BLAST δίνονται παρακάτω:

- **Γονίδια βιοσύνθεσης αντιμικροβιακών ουσιών**

Η ανάλυση που πραγματοποιήθηκε με την βάση δεδομένων BLASTp έδειξε ότι το στέλεχος Z13 διαθέτει την ομόλογη γονιδιακή κατασκευή βιοσύνθεσης της πυρρολοκινολίνης κινόνης (PQQ). Στον Πίνακα 4 αναφέρονται τα ποσοστά ομολογίας τα οποία έχουν εύρος 82-96% και στην Εικόνα 19, απεικονίζεται η οργάνωση των γονιδίων στην κατασκευή βιοσύνθεσης της PQQ.

Μέγεθος (aa)	Ομόλογο γονίδιο	Ποσοστό ομολογίας	Κωδικός NCBI	Στέλεχος
419	<i>pqqE</i>	86.38%	YP004353289	<i>P. brassicacearum</i> <i>NFM421</i>
91	<i>pqqD</i>	82.42%	YP004356642	<i>P. brassicacearum</i> <i>NFM421</i>
250	<i>pqqC</i>	96.40%	AEA71637.1	<i>P. brassicacearum</i> <i>NFM421</i>
303	<i>pqqB</i>	85.15%	YP00436640	<i>P. brassicacearum</i> <i>NFM421</i>
24	<i>pqqA</i>	91.67%	CAA60731	<i>P. protogens CHA0</i>
813	<i>pqqF</i>	93.31%	YP005210749	<i>Pseudomonas sp. BPO1</i>

**Πίνακας 4.** Αποτελέσματα ανάλυσης BLASTp στην οποία συγκρίθηκαν γνωστές πρωτεΐνες διάφορων ψευδομονάδων με τα 6 γονίδια που απαρτίζουν την γονιδιακή κασέτα βιοσύνθεσης της PQQ.



**Εικόνα 20:** Γονιδιακή κατασκευή της πυρρολοκινολίνης κινόνης (PQQ) του *P. putida* Z13. Η γονιδιακή κατασκευή όπως παρουσιάζεται από το πρόγραμμα SnapGene Viewer.

Ωστόσο, η ανάλυση που διενεργήθηκε με τη βάση δεδομένων BLASTn έδειξε ότι τα γονίδια υπεύθυνα για την βιοσύνθεση των αντιμικροβιακών ενώσεων: 2, 4-διακετυλφλορογλουκινόλη (DAPG), φαριναζίνες (phenazines), κυανικό υδρογόνο (HCN) και πυρρολνιτρίνη (pyrrolnitrin), των οποίων τα ομόλογα συνήθως υπάρχουν σε γονιδιώματα ψευδομονάδων, δεν υπάρχουν στο γονιδίωμα του στελέχους Z13.

- **Γονίδια βιοσύνθεσης σιδηροφόρων ουσιών:**

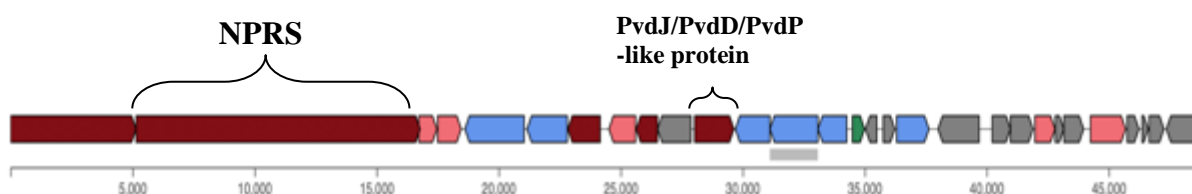
Η ανάλυση antiSMASH αναγνώρισε τις παρακάτω γονιδιακές συστάδες που είναι υπεύθυνες για την βιοσύνθεση δευτερογενών μεταβολιτών:

Αριθμός γονιδιακής κατασκευής	Είδος	Ένωση και Βαθμός ομοιότητας
9.1	Redox-co factor	Lankacidin C (13%)
32.1	NRPS	Pf-5 pyoverdine (11%)
33.1	NRPS	Pyoverdine SMX-1 (41%)
46.1	Ranthipeptide	Pf-5 pyoverdine (4%)
97.1	NRPS	Nostocyclopeptide A2 (28%)

**Πίνακας 5:** Γονιδιακές συστάδες που ανιχνεύτηκαν από την ανάλυση antiSMASH7. 0 στο γονιδίωμα του *P. putida* Z13, το είδος της συστάδας και τα ποσοστά ομοιότητας με τις «γνωστές» συστάδες της βάσης δεδομένων (most similar known cluster)

Το μεγαλύτερο ποσοστό ομοιότητας ήταν εκείνο για την συστάδα βιοσύνθεσης πυοβερδίνης (41%) που ανήκει σε αλληλουχίες μη ριβοσωμικών πεπτιδικών συνθετασών (NRPS - Non Ribosomal Peptide Synthetase) και φαίνεται πως έχει κοινές περιοχές με την γνωστή συστάδα βιοσύνθεσης πυοβερδίνης του *Pseudomonas sp. SXM-1*. Επίσης, φαίνεται πως υπάρχει 28% ομοιότητα με την συστάδα βιοσύνθεσης της ουσίας nostocyclopeptide A2 και 13% με την συστάδα βιοσύνθεσης της αντιμικροβιακής ουσίας lankacidin C.

*P. putida* Z13 – pyoverdine gene cluster:



**Εικόνα 21:** Γονιδιακή κατασκευή της σιδηροφόρου ουσίας, πυοβερδίνη, στο γονιδίωμα του *P. putida* Z13, όπως αναγνωρίστηκε από το antiSMASH. Τα διαφορετικά χρώματα εκπροσωπούν γονίδια με διαφορετικές λειτουργίες: βασικά γονίδια βιοσύνθεσης (κόκκινο), γονίδια μεταφοράς (μπλε), επιπρόσθετα γονίδια βιοσύνθεσης (ροζ), γονίδια ρύθμισης (πράσινο) και άλλα γονίδια (γκρι).

- **Γονίδια βιοσύνθεσης διεγερτών που ενεργοποιούν την ISR:**

Στον παρακάτω πίνακα φαίνονται τα γονίδια που ανιχνεύτηκαν με BLAST στο γονιδίωμα του Z13 και η αντίστοιχη λειτουργία τους:

Μόρια διεγέρτες - MAMP	Όνομα γονιδίου	Locus tag	Λειτουργία
<b>Φλαγγελίνη</b>	flgB	K7A70_23805	Basal body rod Proteins
	flgC	K7A70_23810	
	flgF	K7A70_23830	
	flgG	K7A70_23835	
	flgH	K7A70_23840	
	flgI	K7A70_23845	
	flgA	K7A70_27480	
	fliL	K7A70_12990	
	fliE	K7A70_22565	
	fliF	K7A70_22570	M-ring protein
	fliH	K7A70_22580	
	fliJ	K7A70_22590	
	flhB	K7A70_22650	Flagellar biosynthesis
	flhA	K7A70_22655	
	flhF	K7A70_22660	
	fliQ	K7A70_22630	
	fliM	K7A70_22620	Motor switch proteins
	fliN	K7A70_22625	
	fliG	K7A70_22575	
	flgE	K7A70_23820	Hook formation proteins
	flgD	K7A70_23815	
	flgK	K7A70_23855	
	fliK	K7A70_22610	
	fliD	K7A70_23880	Filament capping protein
	fliS	K7A70_23885	Export chaperone
	fliR	K7A70_22645	Type III secretion system pore protein

<b>Lipopolysaccharides (LPS)</b>	lpxA	K7A70_23045	Lipid A biosynthesis
	lpxC	K7A70_01135	
	lpxD	K7A70_19830	
	lpxK	K7A70_12705	
	waaA	K7A70_23045	Core oligosaccharide biosynthesis
	waaC	K7A70_07530	
	waaF	K7A70_07535	
	rfaq	K7A70_07515	
	lnaA	K7A70_07510	
	rfaP	K7A70_07520	
	waaL	K7A70_23090	O-antigen chain biosynthesis

**Πίνακας 6:** Γονίδια που εμπλέκονται στην βιοσύνθεση της φλαγγελίνης και των λιποπολυσακχαριδίων στο γονιδίωμα του στελέχους Z13 με γνωστή ικανότητα ενεργοποίησης της άμυνας των φυτών (Zhang et al., 2016 & Bertani and Ruiz, 2018).

#### 4. Συμπεράσματα:

Η ασθένεια της τεφράς σήψης η οποία προκαλείται από το παθογόνο μύκητα *B. cinerea* είναι από τις πιο σημαντικές οικονομικά ασθένειες στις υπό κάλυψη καλλιέργειες (κηπευτικά, καλλωπιστικά) καθώς και στους αποθηκευμένους καρπούς την μετασυλλεκτική περίοδο, διότι συνήθως το παθογόνο εισέρχεται στα αρχικά στάδια ανάπτυξης του φυτικού ιστού ενώ τα συμπτώματα εμφανίζονται μετά την ωρίμανση του καρπού (Tudzynski & Kokkelink 2009). Οι ετήσιες οικονομικές απώλειες παγκοσμίως, λόγω της τεφράς σήψης ξεπερνούν το ποσό των 10 δις δολαρίων συμπεριλαμβανομένων και των απωλειών στις αποθήκες (Hua et al., 1028) Η καταπολέμηση της ασθένειας είναι αρκετά δύσκολη καθώς ο μύκητας αναπτύσσει εύκολα ανθεκτικότητα στα μυκητοκτόνα. Έτσι, τα τελευταία χρόνια οι επιστήμονες έχουν στραφεί σε άλλες μεθόδους καταπολέμησης, όπως είναι η βιολογική αντιμετώπιση και η λήψη κατάλληλων καλλιεργητικών μέτρων (Abbey 2018).

Ως βιολογικός παράγοντας στην παρούσα μελέτη χρησιμοποιήθηκε το στέλεχος *P. putida* Z13. Το ωφέλιμο αυτό βακτήριο, όπως και η πλειοψηφία των ειδών του γένους *Pseudomonas*, αποικίζει το ριζικό σύστημα των φυτών ταχύτατα μετά την εφαρμογή και αναπτύσσει συμβιωτική σχέση με το φυτό διαμέσου της οποίας το ριζικό σύστημα εφοδιάζεται άμεσα με παράγοντες αύξησης το οποίο δεν μπορεί από μόνο του να συνθέσει (Ziazia et al., 2021). Μέρος της μελέτης ήταν η αξιολόγηση της δράσης του Z13 έναντι του παθογόνου μύκητα *B. cinerea* σε φυτά και καρπούς τομάτας. Συγκεκριμένα εξετάστηκε η ικανότητα του Z13 να προσφέρει προστασία έναντι του παθογόνου εφαρμόζοντας προληπτικά είτε το υπερκείμενο διάλυμα της καλλιέργειας του βακτηρίου είτε τα βακτηριακά του κύτταρα.

- **Ο βιολογικός παράγοντας Z13 παράγει ουσίες για την ενεργοποίηση της ISR μέσω του μονοπατιού JA/ET:**

Αρχικά, στα πειράματα που έγιναν στα φυτά τομάτας, τα αποτελέσματα δείχνουν ότι η εφαρμογή του υπερκείμενου διαλύματος του Z13 στις ρίζες των φυτών παρεμπόδισε την ασθένεια σε ποσοστό 38% ενώ στα φυτά στα οποία ψεκάστηκε διαφυλλικά το βιολογικό σκεύασμα Polyversum το ποσοστό παρεμπόδισης ήταν 44% σε σχέση με τον θετικό μάρτυρα (*B. cinerea*). Αυτή η συμπτωματολογική εικόνα συμφωνεί με τα αποτελέσματα της μοριακής ανάλυσης που ακολούθησε για την μέτρηση της έκφρασης των γονιδίων *PR1* και *PDF1.2* με qPCR.



Συγκεκριμένα, η υπερέκφραση των γονιδίων *PR1* και *PDF1.2* στις εφαρμογές του βιολογικού σκευάσματος Polyversum οφείλεται στο γεγονός ότι εκτός από τον ανταγωνισμό και έκκριση λυτικών ενζύμων το στέλεχος *Pythium oligandrum* str. M1 ενισχύει την ανάπτυξη και την φυσική άμυνα των φυτών. Έτσι, το βιολογικό σκεύασμα περιορίζει μερικώς τα συμπτώματα της ασθένειας μέσω της επαγωγής των μηχανισμών άμυνας που ελέγχονται από το SA και το JA/ET. Αντιθέτως, μόνο το *PDF1.2* υπερεκφράστηκε στις εφαρμογές όπου εφαρμόστηκε το υπερκείμενο του Z13 μεμονωμένα ή σε συνδυασμό με το μόλυσμα. Κατά συνέπεια, η προστασία που προσφέρουν οι ουσίες του υπερκείμενου διαλύματος οφείλεται στην ενεργοποίηση του μονοπατιού του JA/ET. Ενδιαφέρον έχει το γεγονός ότι το *PR1* υποεκφράζεται σημαντικά στις εφαρμογές Z13 υπερκείμενο + Bc, γεγονός που μπορεί να οφείλεται στον ανταγωνισμό μεταξύ των δύο μονοπατιών. Το μονοπάτι του SA τείνει να καταστέλλεται κατά την ενεργοποίηση του JA/ET και αντίστροφα (Pieterse et al., 2012).

- **Ο βιολογικός παράγοντας Z13 ενεργοποιεί την ISR μέσω του μονοπατιού του SA και του JA/ET κατά την εφαρμογή του στις ρίζες φυτών τομάτας:**

Προχωρώντας στα πειράματα όπου εφαρμόστηκε το αιώρημα κυττάρων του *P. putida* Z13, τα αποτελέσματα από τις δοκιμές παθογένειας δείχνουν ότι η πιο αποτελεσματική εφαρμογή έναντι του μύκητα *B. cinerea* ήταν εκείνη όπου τα βακτηριακά κύτταρα εφαρμόστηκαν διαφυλλικά και με ριζοπότισμα (Z13(Φ/P) + Bc) με ποσοστό προστασίας 95%. Επίσης στα φυτά που εφαρμόστηκαν τα βακτηριακά κύτταρα μόνο με ριζοπότισμα (Z13(P) + Bc) παρατηρήθηκε 48% μείωση των συμπτωμάτων. Η υπερέκφραση του γονιδίου *PR1* στην εφαρμογή Z13(P) δείχνει την ικανότητα του Z13 να “προετοιμάσει” τα φυτά για μια μελλοντική προσβολή. Κατά το φαινόμενο αυτό, γνωστό και ως priming, συσσωρεύονται πρωτεΐνες παθογένεσης PR, όπως είναι η *PR1* και ως ένα είδος “μνήμης” το φυτό αντιδρά γρηγορότερα σε μια επόμενη μόλυνση και την περιορίζει αποτελεσματικά (Conrath 2006). Έτσι, όταν συνδυάστηκε η εφαρμογή των βακτηριακών κυττάρων στις ρίζες μαζί με το μόλυσμα (Z13(P)-Bc), παρόλο που η σχετική έκφραση του *PR1* ήταν λιγότερη την 1<sup>η</sup> και 3<sup>η</sup> ημέρα μετά την μόλυνση, παρεμποδίστηκε η εξάπλωση της ασθένειας στα φύλλα. Επιπροσθέτως, το *PDF1.2* υπερεκφράζεται στην εφαρμογή των κυττάρων στις ρίζες (Z13(P)) καθώς και στον συνδυασμό των κυττάρων Z13 με το μόλυσμα (Z13(P) + Bc), δείχνοντας ότι ενεργοποιείται και το μονοπάτι JA/ET της ISR. Η προστασία που προσφέρει η εφαρμογή

κυττάρων του Z13 στις ρίζες και που οφείλεται στην ενεργοποίηση της διασυστηματικής άμυνας (ISR) μέσω του μονοπατιού του SA και του JA/ET έχει παρατηρηθεί και σε άλλους μικροοργανισμούς. Μερικοί ωφέλιμοι μικροοργανισμοί όπως είναι το *Bacillus velezensis* K165 (πρώην *Paenibacillus alvei* K165) παρεμπόδισε την εξάπλωση του παθογόνου *V. dahliae* μέσω priming των φυτών ενεργοποιώντας το μονοπάτι του SA (Tjamos et al., 2005), ενώ άλλοι μικροοργανισμοί όπως είναι κάποια ενδοφυτικά ακτινοβακτήρια μπορούν ενεργοποιήσουν ταυτόχρονα το μονοπάτι του SA και του JA/ET (Conn et al., 2008). Αντιθέτως, στα φυτά που ψεκάστηκαν με κύτταρα του Z13 στα φύλλα δεν σημειώθηκε σημαντική προστασία και η μοριακή ανάλυση έδειξε πως το *PR1* υποεκφράστηκε στα φυτά αυτά την 3<sup>η</sup> ημέρα μετά την μόλυνση. Παρομοίως για το *PDF1.2* η έκφραση είναι χαμηλή στην εφαρμογή Z13(Φ) και στην Z13(Φ)+Bc είναι ελάχιστα αυξημένη την 1<sup>η</sup> ημέρα μετά την μόλυνση και ανιχνεύεται σε πολύ μικρότερα ποσοστά την 3<sup>η</sup> μέρα μετά την μόλυνση.

- **Ο βιολογικός παράγοντας Z13 παράγει αντιβιοτικές ουσίες που δρουν άμεσα κατά του μύκητα *B. cinerea* ή έμμεσα ενεργοποιώντας την ISR μέσω του μονοπατιού του SA και του JA/ET, στους καρπούς τομάτας:**

Τα πειράματα στους καρπούς τομάτας έδειξαν ότι η πιο αποτελεσματική εφαρμογή είναι εκείνη όπου οι καρποί εμβαπτίστηκαν στο υπερκείμενο διάλυμα του Z13 και μολύνθηκαν με τον μύκητα μετά από 2 ημέρες. Είναι γνωστό ότι τα αντιβιοτικά που παράγονται από ορισμένους ωφέλιμους μικροοργανισμούς, μπορούν να λειτουργήσουν ως MAMPs στην ενεργοποίηση της διασυστηματικής άμυνας. Παραδείγματα αποτελούν η ουσία DAPG που παράγεται από φθορίζουσες ψευδομονάδες (Weller et al., 2002) και η πτητική ένωση 2, 3 butanediol που βιοσυνθέτουν στελέχη του είδους *Bacillus* sp. (Ryu et al., 2004). Η υπερέκφραση του *PR1* στην εφαρμογή Z13υπερκείμενο + Bc καθώς και στους καρπούς που εμβαπτίστηκαν μόνο στο υπερκείμενο του Z13, την 3<sup>η</sup> ημέρα μετά την μόλυνση υποδεικνύει ενεργοποίηση το μονοπατιού του SA. Ταυτόχρονα, η υπερέκφραση του *PDF1.2* στην εφαρμογή Z13υπερκείμενο πιθανόν να δείχνει την ικανότητα του βιολογικού παράγοντα να ενισχύει την άμυνα μέσω priming. Το αποτέλεσμα της μοριακής ανάλυσης συμφωνεί με την συμπτωματολογική εικόνα των καρπών της εφαρμογής Z13υπερκείμενο + Bc, αφού η πλειοψηφία τους δεν εμφάνισαν χαρακτηριστικά συμπτώματα της τεφράς σήψης στις δοκιμές παθογένειας. Τα ποσοστά παρεμπόδισης της ασθένειας στην εφαρμογή Z13κύτταρα + Bc και στην Polyversum +

Βε δεν εμφανίζουν στατιστικά σημαντική διαφορά από τον μάρτυρα και αυτό φαίνεται στα αποτελέσματα της μοριακής ανάλυσης. Επίσης, σε αυτές τις εφαρμογές παρόλο που υπερεκφράζεται το *PRI*, δεν παρατηρείται ιδιαίτερη αύξηση στην έκφραση του *PDF1.2*. Κατά συνέπεια, φαίνεται πως η φυτοπροστατευτική δράση του Z13 στην περίπτωση εφαρμογής του σε καρπούς τομάτας βασίζεται στην δυνατότητα του υπερκείμενου διαλύματος να περιορίσει τα συμπτώματα της ασθένειας άμεσα μέσω αντιβιοτικών ουσιών ή έμμεσα με την επαγωγή ISR μέσω του μονοπατιού άμυνας του SA και του JA/ET.

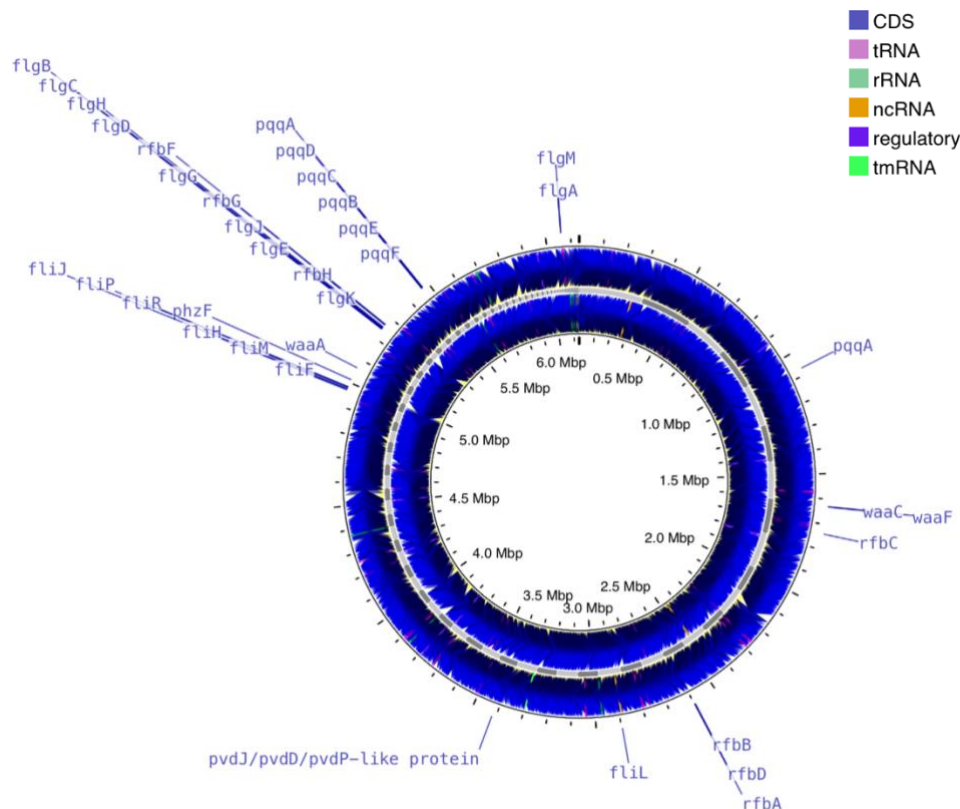
- **Ο βιολογικός παράγοντας Z13 έχει την δυνατότητα βιοσύνθεσης ενώσεων και μορίων που πιθανόν είναι υπεύθυνα για την φυτοπροστατευτική δράση έναντι του μύκητα *B. cinerea*:**

Ως δεύτερο μέρος της μελέτης και με σκοπό να εξετασθεί περαιτέρω ο μηχανισμός δράσης του στελέχους Z13 πραγματοποιήθηκε βιοπληροφορική ανάλυση του γονιδιώματος του με σκοπό την ανίχνευση γονιδίων που εμπλέκονται στην βιοσύνθεση αντιμικροβιακών ουσιών, σιδηροφόρων και διεγερτών της διασυστηματικής άμυνας των φυτών. Αρχικά, για την οργάνωση του γονιδιώματος του στην “σωστή” σειρά χρησιμοποιήθηκε ως γονιδίωμα αναφοράς το συγγενικό είδος *P. putida* NCBR 14164. Έπειτα, η ανάλυση BLASTp έδειξε πως το στέλεχος Z13 περιέχει την γονιδιακή κασέτα για την βιοσύνθεση τους αντιμικροβιακής ουσίας πυρρολοκινολίνης κινόνης (PQQ). Γενικότερα, η PQQ λειτουργεί ως συμπαράγοντας στην βιοσύνθεση και έκκριση του γλυκονικού οξέος προάγοντας την διαλυτοποίηση του φωσφόρου στο έδαφος και εμπλέκεται στην βιοσύνθεση αντιμικροβιακών ουσιών και στην επαγωγή της ανάπτυξης των φυτών (Schnider et al., 1995; Choi et al., 2008; DeWerra et al., 2009). Το 2014, οι Xu et al., μελέτησαν την αντιμυκητιακή δράση της PQQ κατασκευάζοντας ένα μεταλλαγμένο στέλεχος *Pseudomonas kilolensis* JX22 στο οποίο απουσίαζε το γονίδιο *rrqC*. Το μεταλλαγμένο στέλεχος JX22 παρεμπόδισε την ανάπτυξη του μύκητα *Fusarium oxysporum f. sp. lycopersici* σε μικρότερα ποσοστά σε σχέση με το στέλεχος άγριου τύπου, σε *in vitro* δοκιμές (Xu et al., 2014). Επίσης έχει αποδειχθεί η ικανότητα της PQQ να αυξάνει την οξύτητα του θρεπτικού υποστρώματος και να παρεμποδίζει την ανάπτυξη του παθογόνου *Saprolegnia parasitica* (Cheng et al., 2014)

Επιπλέον, από την ανάλυση antiSMASH προέκυψε ότι η κασέτα βιοσύνθεσης της σιδηροφόρου ουσίας πυοβερδίνη στο στέλεχος Z13 έχει 41% ποσοστό ομοιότητα με την

γνωστή κασέτα βιοσύνθεσης πυοβερδίνης του *P. fluorescens* X1. Σε συνθήκες έλλειψης ιόντων σιδήρου, τα βακτήρια του γένους *Pseudomonas* *sp.* συνθέτουν πυοβερδίνες, οι οποίες είναι χηλικές ενώσεις που αναζητούν και προσδένονται στα ιόντα σιδήρου και τα απορροφούν από τον χώρο της ριζόσφαιρας. Αυτό στερεί από τους παθογόνους μικροοργανισμούς τον απαραίτητο σίδηρο που χρειάζονται για να ευδοκιμήσουν, εμποδίζοντας έτσι την ανάπτυξη και επιβίωση τους. Στην παρούσα εργασία δεν έγινε κάποια δοκιμή που να επιβεβαιώνει ή να συνδέεται με την πιθανή ανταγωνιστική δράση του Z13 μέσω σιδηροφόρων ουσιών στη ριζόσφαιρα αφού ο μύκητας *B. cinerea* εφαρμόστηκε στα φύλλα ή σε καρπούς. Ωστόσο, προηγούμενη μελέτη έδειξε την φυτοπροστατευτική δράση του Z13 σε φυτά μελιτζάνας έναντι του εδαφοπαθογόνου *V. dahliae* (Ziazia et al., 2021). Γι' αυτό, η προστασία που παρείχε το στέλεχος Z13 μπορεί να αποδοθεί, μεταξύ άλλων μηχανισμών δράσης, και στην ικανότητα του να παράγει πυοβερδίνη με σκοπό τον ανταγωνισμό για ιόντα σιδήρου στην ριζόσφαιρα.

Ταυτόχρονα, ταυτοποιήθηκαν γονίδια που εμπλέκονται στην βιοσύνθεση μορίων γνωστών για την δυνατότητα τους να επάγουν την άμυνα των φυτών όπως είναι η φλαγγελίνη και τα λιποπολυσκαριδία. Η φλαγγελίνη αναγνωρίζεται από τους υποδοχείς *fls22* και *fls15* στην τομάτα και έχει αποδειχτεί ότι ενεργοποιεί μια σειρά αμυντικών αντιδράσεων όταν ανιχνεύεται από φυτά τομάτας (Zhao et al 2020). Όσον αφορά τα LPS είναι μόρια στην εξωτερική μεμβράνη των Gram αρνητικών βακτηρίων και αναγνωρίζονται από τα φυτά ως μοτίβα (MAMPs) τα οποία είναι ικανά να επάγουν μηχανισμούς άμυνας σε φυτά (Erbs G. & Newman M.A., 2003). Η εξωγενής εφαρμογή LPS του βακτηρίου *Pseudomonas simiae* WCS417 στις ρίζες φυτών *Dianthus caryophyllus* έχει δείξει ότι προκαλεί την έναρξη της ISR, με αποτέλεσμα τη μείωση των συμπτωμάτων από το μύκητα *Fusarium*. Στο ραπανάκι, τόσο το WCS374 όσο και το WCS417 επάγουν την ISR, ενώ το WCS358 δεν μπορεί. Αυτή η διαφορετική αποτελεσματικότητα στην επαγωγή της ISR αποδίδεται σε γενετικές διαφορές των LPS ανάμεσα στα στελέχη (Pieterse et al., 2021). Κάποια από τα γονίδια που πιθανώς αποτελούν την κασέτα βιοσύνθεσης των LPS και της αλυσίδας O-antigen στο στέλεχος Z13 ταυτοποιήθηκαν σε αυτή την εργασία μέσω της μηχανής αναζήτησης BLAST. Παρακάτω φαίνεται ολόκληρο το γονιδίωμα του στελέχους *P. putida* Z13 (6133624 bp) πάνω στο οποίο διακρίνονται οι περιοχές των γονιδίων που ταυτοποιήθηκαν μέσω αυτής της μελέτης.



**Εικόνα 22:** Οπτικοποίηση ολόκληρου του γονιδιώματος του στελέχους Z13 και των περιοχών των γονιδίων που εμπλέκονται στην βιοσύνθεση μορίων και ενώσεων στα οποία πιθανόν οφείλεται η φυτοπροστατευτική του δράση. Το γράφημα κατασκευάστηκε με το πρόγραμμα Proxee.

Το γεγονός ότι δεν βρέθηκαν γονίδια βιοσύνθεσης αντιβιοτικών ενώσεων που συχνά περιέχονται στα γονιδιώματα των βακτηρίων γένους *Pseudomonas*, όπως DAPG, φαιναζίνες και κυανικό υδρογόνο (HCN), ισχυροποιεί την υπόθεση πως το Z13 δρα κυρίως είτε μέσω επαγωγής της άμυνας των φυτών είτε μέσω ανταγωνισμού. Παρόλα αυτά, τα υψηλά επίπεδα προστασίας που προέκυψαν από την εφαρμογή του υπερκείμενου διαλύματος στους καρπούς μπορεί να βασίζεται στη άμεση δράση της PQQ ή άλλης αντιβιοτικής ουσίας που περιόρισε την εξάπλωση του μύκητα *B. cinerea*. Σαφώς, χρειάζεται παραπάνω μελέτη για να επιβεβαιωθεί σε τι είδους υποστρώματα παράγεται η PQQ και σε τι ποσότητες επιτυγχάνει την παρεμπόδιση ανάπτυξης του παθογόνου.

Στο σύνολο τους τα αποτελέσματα της παρούσας μελέτης επισημαίνουν τη φυτοπροστατευτική δραστηριότητα του *P. putida* Z13 έναντι του παθογόνου μύκητα *B. cinerea*, σε φυτά και καρπούς τομάτας. Τα αποτελέσματα των πειραμάτων στα φυτά και στους καρπούς καθώς και η βιοπληροφορική ανάλυση που πραγματοποιήθηκε στο

γονιδίωμα του Z13 έδειξαν ότι η κατασταλτική του δράση μπορεί να αποδοθεί είτε στην παραγωγή αντιβιοτικών ουσιών (άμεσα) ή/και στην ικανότητα του να ενεργοποιεί μηχανισμούς άμυνας των φυτών μέσω παραγωγής διεγερτών (έμμεσα). Ωστόσο, απαιτείται περαιτέρω έρευνα για να επιβεβαιωθούν όλες οι παραπάνω παρατηρήσεις και να δημιουργηθούν νέες προοπτικές στην έρευνα για την χρήση βιολογικών παραγόντων στη σύγχρονη γεωργία.

## 5. Βιβλιογραφία:

### Ξένη:

**Abbey, J. A., Percival, D., Abbey, Lord, Asiedu, S. K., Prithiviraj, B., & Schilder, A.** (2018). Biofungicides as alternative to synthetic fungicide control of grey mould (*Botrytis cinerea*) – prospects and challenges. *Biocontrol Science and Technology*, 1–22.

**Alizadeh, H., Behboudi, K., Ahmadzadeh, M., Javan-Nikkhah, M., Zamioudis, C., Pieterse, C.M., Bakker, P.A.** (2013). Induced systemic resistance in cucumber and *Arabidopsis thaliana* by the combination of *Trichoderma harzianum* Tr6 and *Pseudomonas* sp. Ps14. *Biological Control* 65, 14–23.

**Anastasiadis, F., Apostolidou, I., & Michailidis, A.** (2020). Mapping sustainable tomato supply chain in Greece: A framework for research. *Foods*, 9(5).

**Arah I. K., Amaglo H., Kumah K. E., Ofori H.** (2015). Preharvest and Postharvest Factors Affecting the Quality and Shelf Life of Harvested Tomatoes: A Mini Review. Hindawi Publishing Corporation

**Bertani B., Ruiz N.** (2008). Function and Biogenesis of Lipopolysaccharides. *EcoSal Plus*, Aug;8(1)

**Bigeard J., Colcombet J., Hirt H.** (2015). Signaling mechanisms in pattern-triggered immunity (PTI). *Molecular Plant*, 8(4):521-39.

**Blancard D.** (2012). *Tomato diseases*. Cambridge, MA, USA: Academic Press.

**Blanco - Ulate B., Vincenti E., Cantu D., Powell A.** (2016). Ripening of tomato fruit and susceptibility to *Botrytis cinerea*. *Botrytis - The Fungus, the Pathogen and its Management in Agricultural Systems* 384:412

**Block A., Schmelz E., O'Donnell P.J., Jones J.B., Klee H.J.** (2005). Systemic acquired tolerance to virulent bacterial pathogens in tomato. *Plant Physiology* 138:1481– 1490

**Cheng, X., van der Voort, M. and Raaijmakers, J.M.** (2015). PQQ-mediated antimicrobial activity in SBW25 *Environmental Microbiology Reports*, 7: 139-147

**Cheung N., Tian L., Liu X., Li X.** (2020). The Destructive Fungal Pathogen *Botrytis cinerea*-Insights from Genes Studied with Mutant Analysis. *Pathogens*. 7;9(11):923.

**Choi O., Kim J., Kim J.G., Jeong Y., Moon J.S., Park C.S. & Hwang I.** (2008). Pyrroloquinoline quinone is a plant growth promotion factor produced by *Pseudomonas fluorescens* B16. *Plant Physiology* 146: 657–668.

**Silva J., van den Abeele C., Ortega-Salazar I., Papin V., Adaskaveg J., Wang D., Casteel C., Seymour G., Blanco-Ulate B.** (2021). Host susceptibility factors render ripe tomato fruit vulnerable to fungal disease despite active immune responses. *Journal of Experimental Botany*, 72(7), 2696–2709

**Colmenares A. J., Aleu J., Duran- Patron R., Collado I. G., Hernandez- Galan R.** (2002). The putative role of botrydial and related jmetabolites in the infection mechanism of *Botrytis cinerea*. *Journal of Chemical Ecology*, 28(5), 997-1005

**Conrath U.** (2006). Systemic Acquired Resistance, *Plant Signaling & Behavior*. 1:4, 179-184,

**De Vleeschauwer D., Djavaheri, M., Bakker P.A.H.M., Hofte M.** (2008). *Pseudomonas fluorescens* WCS374r-induced systemic resistance in rice against *Magnaporthe oryzae* is based on pseudobactin-mediated priming for a salicylic acid-repressible multifaceted defense response. *Plant Physiology* 148:1996–2012

**Dal Bello G., Mónaco C., Rollan M. C., Lampugnani G., Arteta N., Abramoff C., ...Stocco M.** (2008). Biocontrol of Postharvest Grey Mould on Tomato by Yeasts. *Journal of Phytopathology*, 156(5), 257–263.

**Dekkers L. C., Mulders I. H. M., Phoelich, C. C., Chin-A-Woeng T. F. C., Wijfjes A. H. M., Lugtenberg B. J. J.** (2000). The sss Colonization Gene of the Tomato-*Fusarium oxysporum* f. sp. *radicis-lycopersici* Biocontrol Strain *Pseudomonas fluorescens* WCS365 Can Improve Root Colonization of Other Wild-type *Pseudomonas* spp. *Bacteria, Molecular Plant-Microbe Interactions*, 13(11), 1177–1183.

**DeWerra P., Pechy-Tarr M., Keel C., Maurhofer M.** (2009). Role of gluconic acid production in the regulation of biocontrol traits of *Pseudomonas fluorescens* CHA0. *Applied and Environmental Microbiology* 75: 4162–4174.

**Droby S., Lichter A.** (2007). Post-Harvest Botrytis Infection: Etiology, Development and Management. *Botrytis: Biology, Pathology and Control*, 349–367.

**Elad Y., Stewart A.** (2007). Microbial Control of *Botrytis* spp. In: Elad Y., Williamson B., Tudzynski P., Delen N. (eds) *Botrytis: Biology, Pathology and Control*, Springer, Dordrecht.

**Erbs G., Newman MA.** (2003). The role of lipopolysaccharides in induction of plant defence responses. *Molecular Plant Pathology*, Sep 1;4(5):421-5.

**Ferrari S., Galletti R., Denoux C., De Lorenzo G., Ausubel F.M., Dewdney J.** (2007). Resistance to *Botrytis cinerea* induced in Arabidopsis by elicitors is independent of salicylic acid, ethylene, or jasmonate signaling but requires PHYTOALEXIN DEFICIENT3. *Plant Physiology*. 144:367–79



**Flor H.H.** (1942). Inheritance of pathogenicity in *Melampsora lini*. *Phytopathology*, 32:653-669

**Gioti A., Simon A., Pecheur P., Giraud C., Pradier J. M., Levis C.** (2006). Expression Profiling of *Botrytis cinerea* Genes Identifies Three Patterns of Up-regulation in Planta and an FKBP12 Protein Affecting Pathogenicity. *Journal of Molecular Biology*. Vol.358. 372-386

**Govrin E. M., & Levine A.** (2000). The hypersensitive response facilitates plant infection by the necrotrophic pathogen *Botrytis cinerea*. *Current Biology*, 10(13), 751–757

**Grady E. N., MacDonald J., Ho M. T., Weselowski B., McDowell T., Solomon O., Yuan Z.-C.** (2019). Characterization and complete genome analysis of the surfactin-producing, plant-protecting bacterium *Bacillus velezensis* 9D-6. *BMC Microbiology*, 19(1)

**Guimarães R.L, Chetelat R.T, Stotz H.U.** (2004). Resistance to *Botrytis cinerea* in *Solanum lycopersicoides* is dominant in hybrids with tomato, and involves induced hyphal death. *European Journal of Plant Pathology* 110, 13-23

**Gupta C.P., Dubey R.C., Maheshwari D.K.** (2002). Plant growth enhancement and suppression of *Macrophomina phaseolina* causing charcoal rot of peanut by fluorescent *Pseudomonas*. *Biology and Fertility of Soils*, 35, 399–405.

**Herman M.A.B., Davidson J.K., Smart C.D.** (2008). Induction of plant defense gene expression by plant activators and *Pseudomonas syringe* pv. *tomato* in greenhouse-grown tomatoes. *Phytopathology* 98:1226–1232.

**Hofius D., Tsitsigiannis D. I., Jones J.D.G., Mundy J.** (2007). Inducible cell death in plant immunity, *Seminars in Cancer Biology*, 17:166–187

**Hua L., Yong C., Zhanquan Z., Boqiang L., Guozheng Q., Shiping T.** (2018). Pathogenic mechanisms and control strategies of *Botrytis cinerea* causing post-harvest decay in fruits and vegetables. *Food Quality and Safety*, 3, 111–119

**Jones J.D. & Dangl J.L.** (2006). The plant immune system. *Nature*. Nov16;444:323-9.

**Laluk K. & Mengiste T.** (2010). Necrotroph attacks on plants: wanton destruction or covert extortion?. *Arabidopsis Book*, Aug 10

**Latorre A. B., Elfar K., Ferrada E. E.** (2015). Gray mold caused by *Botrytis cinerea* limits grape production in Chile. *Ciencia Investigacion Agraria*, Vol. 42, Issue 3, 305-330

**Lee B., Farag M.A., Park H.B., Kloepper J.W., Lee S.H., Ryu C.M.** (2012). Induced Resistance by a Long-Chain Bacterial Volatile: Elicitation of Plant Systemic Defense by a C13 Volatile Produced by *Paenibacillus polymyxa*. *PLoS ONE* 7(11): e48744.

**Leroux P.** (2007). Chemical Control of Botrytis and its Resistance to Chemical Fungicides. *Botrytis: Biology, Pathology and Control*, 195–222.

**Li S., Benzhong Z., Julien P., Changjie X., Bo Z., Mondher B., Kunsong C., Donald G.** (2019). Roles of RIN and ethylene in tomato fruit ripening and ripening-associated traits. *New Phytologist*, 226: 460–475

**Lim, S. M., Yoon, M.-Y., Choi, G. J., Choi, Y. H., Jang, K. S., Shin, T. S., ... Kim, J.C.** (2017). Diffusible and Volatile Antifungal Compounds Produced by an Antagonistic *Bacillus velezensis* G341 against Various Phytopathogenic Fungi. *The Plant Pathology Journal*, 33(5), 488–498.

**Manners, J.M., Penninckx I.A., Vermaere K. et al.** (1998). The promoter of the plant defensin gene PDF1.2 from *Arabidopsis* is systemically activated by fungal pathogens and responds to methyl jasmonate but not to salicylic acid. *Plant Molecular Biology* 38, 1071–1080

**Maurhofer M., Hase C., Meuwly P., Mettraux J.P., Defago G.** (1994). Induction of systemic resistance of tobacco to tobacco necrosis virus by the root-colonizing *Pseudomonas fluorescens* strain CHAO: influence of the *gacA* gene and of pyoverdine production. *Phytopathology* 84:139–146

**Meziane H., Van Der Sluis I., Van Loon L.C., Hofte M., Bakker P.A.H.M.** (2005). Determinants of *Pseudomonas putida* WCS358 involved in inducing systemic resistance in plants. *Molecular Plant Pathology*, 6: 177-185

**Nakajima M. & Akutsu K.** (2014). Virulence factors of *Botrytis cinerea*. *Journal of General Plant Pathology*, 80:15–23

**Oñate-Sánchez L., Vicente-Carbajosa J.** (2008). DNA-free RNA isolation protocols for *Arabidopsis thaliana*, including seeds and siliques. *BMC Research Notes*, 1:93

**Panno S., Davino S., Caruso A.G., Bertacca S., Crnogorac A., Mandić A.I, Noris E., Matić S.** (2021). A Review of the Most Common and Economically Important Diseases That Undermine the Cultivation of Tomato Crop in the Mediterranean Basin. *Agronomy*, 11, 2188.

**Parafati L., Vitale A., Restuccia C., Cirvilleri G.** (2015). Biocontrol ability and action mechanism of food-isolated yeast strains against *Botrytis cinerea* causing post-harvest bunch rot of table grape. *Food Microbiology*, 47, 85–92.

**Perez-de-Luque A., Tille S., Johnson I., Pascual-Pardo D., Ton J., Cameron D.D.** (2007). The interactive effects of arbuscular mycorrhiza and plant growth-promoting rhizobacteria synergistically enhance host plant defences against pathogens,. *Scientific Reports*, 7:16409.

**Petrasch S., Knapp S. J., Van Kan A. L. J., Blanco- Ulate B.** (2019). Review: Grey mould of strawberry, a devastating disease caused by the ubiquitous necrotrophic fungal pathogen *Botrytis cinerea*. *Molecular Plant Pathology*, 20(6), 877-892.

**Pieterse C.M., Van der Does D., Zamioudis C., Leon-Reyes A., Van Wees S.C.** (2012). Hormonal modulation of plant immunity, *Annual Review of Cell and Developmental Biology*, 28:489-521.

**Pieterse C.M., Zamioudis C., Berendsen R.L., Weller D.M., Van Wees S.C., Bakker P.A.** (2014). Induced systemic resistance by beneficial microbes. *Annual Review of Phytopathology*, 52:347-75.

**Pieterse C.M., Berendsen R.L., de Jonge R. et al.** (2021). *Pseudomonas simiae* WCS417: star track of a model beneficial rhizobacterium. *Plant Soil* 461, 245–263.

**Pristijono P., Papoutsis K., Christopher J., Scarlett , Michael C., Bowyer, Quan V. V., Stathopoulos E.C., John B. Go.** (2017). Postharvest UV-C treatment combined with 1-methylcyclopropene (1-MCP), followed by storage in continuous low level ethylene atmosphere, improves the quality of tomatoes. *The Journal of Horticultural Science and Biotechnology*. Jul;55(7):2467-2475.

**Rashid M. H., Hossain M. A., Kashem M. A., Kumar S., Rafii M. Y., Latif M. A.** (2014). Efficacy of Combined Formulations of Fungicides with Different Modes of Action in Controlling Botrytis Gray Mold Disease in Chickpea. *The Scientific World Journal*, 2014, 1–6.

**Rupp S, Weber RWS, Rieger D, Detzel P and Hahn M.** (2017). Spread of Botrytis cinerea Strains with Multiple Fungicide Resistance in German Horticulture. *Frontiers in Microbiology*, 7:2075.

**Ryu C.M., Farag M.A., Hu C.H., Reddy M.S., Kloepper J.W., Paré P.W.** (2004). Bacterial volatiles induce systemic resistance in Arabidopsis. *Plant Physiology* Mar;134(3):1017-26.

**Tjamos S.E., Flemetakis, E. Paplomatas E.J., Katinakis P.** (2005). Induction of resistance to *Verticillium dahliae* in *Arabidopsis thaliana* by the biocontrol agent K-165 and pathogenesis-related proteins gene expression. *Molecular Plant and Microbe Interactions*. 18:555-561

**Saito S., Michailides T.J., Xiao C.L.** (2019). Fungicide-resistant phenotypes in *Botrytis cinerea* populations and their impact on control of gray mold on stored table grapes in California. *European Journal of Plant Pathology*, 154, 203–213

**Sánchez C., Villacreses J., Blanc N. et al.** (2016). High quality RNA extraction from Maqui berry for its application in next-generation sequencing. *SpringerPlus* 5, 1243

**Sanmartin N., Pastor V., Pastor-Fernandez J., Flors V., Pozo M.J. Sanchez-Bel P.** (2020). Role and mechanisms of callose priming in mycorrhiza-induced resistance. *Journal of Experimental Botany* 71:2769–2781.

**Santos A., Sánchez A., Marquina, D.** (2004) Yeasts as biological agents to control *Botrytis cinerea*. *Microbiological Research*, 159(4), 331–338.

**Sasirekha B. & Srividya S.** (2016). Siderophore production by *Pseudomonas aeruginosa* FP6, a biocontrol strain for *Rhizoctonia solani* and *Colletotrichum gloeosporioides* causing diseases in Chili. *Agriculture and Natural Resources*, 50, 250–256.

**Schneider C. A., Rasband W. S., Eliceiri K. W.** (2012). NIH Image to ImageJ: 25 years of image analysis. *Nature Methods*, 9(7), 671-675.

**Schnider U., Keel C., Voisard C., Defago G., Haas D.** (1995). Tn5-directed cloning of pqq genes from *Pseudomonas fluorescens* CHA0: mutational inactivation of the genes results in overproduction of the antibiotic pyoluteorin. *Applied Environmental Microbiology* 61: 3856–3864.

**Sharma P., Bora L., Puzari K., Baruah A., Baruah R., Talukdar K., Katakya L., Phukan A.** (2017). Review on bacterial blight of rice caused by *Xanthomonas oryzae* pv. *oryzae*: Different management approaches and role of *Pseudomonas fluorescens* as a potential biocontrol agent. *International Journal of Current Microbiology and Applied Sciences*, 6: 982–1005.

**Singh D. & Sharma R.R.** (2018). *Postharvest Diseases of Fruits and Vegetables and Their Management*, Chapter 1- Postharvest Disinfection of Fruits and Vegetables. Academic Press, Pages 1-52

**Su H. & Gubler W. D.** (2012). Effect of 1-methylcyclopropene (1-MCP) on reducing postharvest decay in tomatoes (*Solanum lycopersicum* L.). *Postharvest Biology and Technology*, 64(1), 133–137.

**Thambugala K., Daranagama D., Phillips A., Kannangara S., Promptuttha, I.** (2020). Fungi vs. Fungi in Biocontrol: An Overview of Fungal Antagonists Applied Against Fungal Plant Pathogens. *Frontiers in Microbiology*, 10.

**Tran H., Ficke A., Asimwe T., Hofte M., Raaijmakers J.M.** (2007). Role of the cyclic lipopeptide massetolide a in biological control of *Phytophthora infestans* and in colonization of tomato plants by *Pseudomonas fluorescens*. *New Phytologist*, 175:731–742

**Trapet P., Avoscan L., Klinguer A., Pateyron S., Citerne S., Chervin C. et al.** (2016). The *Pseudomonas fluorescens* siderophore pyoverdine weakens *Arabidopsis thaliana* defense in favor of growth in iron-deficient conditions. *Plant Physiology*, 171, 675–693.

**Tudzynski, P., & Kokkelink, L.** (2009). *Botrytis cinerea*: Molecular Aspects of a Necrotrophic Life Style. *The Mycota*, 29–50.

**Uehara T., Sugiyama S., Matura H., Arie T., Masuta C.** (2010). Resistant and susceptible responses in tomato to cyst nematode are differentially regulated by salicylic acid. *Plant Cell Physiology*, 51, 1524–1536.

**Conn V.M., Walker V.M., Franco C.M.M.** (2008). Endophytic actinobacteria induce defense pathways in *Arabidopsis thaliana*. *Molecular Plant and Microbe Interactions*, 21: 208-218

**Van Kan J. A. L.** (2006). Licensed to kill: the lifestyle of a necrotrophic plant pathogen. *Trends in Plant Science*, 11(5), 247–253.

**Verhagen B. W. M., Trotel-Aziz P., Couderchet M., Hofte M., Aziz A.** (2009). *Pseudomonas spp.*-induced systemic resistance to *Botrytis cinerea* is associated with induction and priming of defence responses in grapevine. *Journal of Experimental Botany*, 61(1), 249–260.

**Verhage A., van Wees S.C., Pieterse C.M.** (2010). Plant immunity: it's the hormones talking, but what do they say?. *Plant Physiology*, 154(2):536-40.

**Verlent I., Smout C., Duvetter T., Hendrickx M. E, Van Loey A.** (2005). Innovative Food Science and Emerging Technologies 6:293–303

**Weller D.M.** (2007). *Pseudomonas* Biocontrol Agents of Soilborne Pathogens: Looking Back Over 30 Years. *Phytopathology*, 97(2), 250–256.

**Weller D.M., Mavrodi D.V., van Pelt J.A., Pieterse C.M. J., van Loon L.C., Bakker P.A.H.M.** (2012). Induced systemic resistance in *Arabidopsis thaliana* against *Pseudomonas syringae* pv. *tomato* by 2,4-diacetylphloroglucinol-producing *Pseudomonas fluorescens*. *Phytopathology*, 102:403-412.

**Williamson B., Tudzynski B., Tudzynski P., Van Kan A. L. J.** (2007). *Botrytis cinerea*: the cause of grey mould disease. *Molecular Plant Pathology*, 8(5), 561-580

**Xu J., Deng P., Showmaker K.C., Wang H., Baird S.M., Lu S.E.** (2014). The pqqC gene is essential for antifungal activity of *Pseudomonas kilonensis* JX22 against *Fusarium oxysporum* f. sp. *lycopersici*. *FEMS Microbiology Letters*, 353(2):98-105.

**Yin Z., Liu J., Zhao H., Chu X., Liu H., Ding X., Lu C., Wang X., Zhao X., Li Y., Ding X.** (2022). SIMYB1 regulates the accumulation of lycopene, fruit shape, and resistance to *Botrytis cinerea* in tomato. Horticulture Research.

**Zhang S.D., Santini, C.L., Zhang W.J., Barbe V., Mangenot S., Wu L.F.** (2016). Genomic and physiological analysis reveals versatile metabolic capacity of deep-sea *Photobacterium phosphoreum* ANT-2200. Extremophiles.

**Zhao S., Guo Y., Wang Q., Luo H., He C., An B.** (2020). Expression of flagellin at yeast surface increases biocontrol efficiency of yeast cells against postharvest disease of tomato caused by *Botrytis cinerea*. Postharvest Biology and Technology. 162, 111112.

Ελληνική:

**Ολύμπιος Χ.,** (2015)., Η τεχνική της καλλιέργειας των υπαίθριων κηπευτικών. Εκδ. Unibooks

**Παναγόπουλος Χ.Γ.,** (1995)., Ασθένειες κηπευτικών καλλιεργών. Εκδ. Σταμούλη.

**Σάββας Δ.,** (2016)., Γενική λαχανοκομία. Εκδ. Πεδίο

**Τζάμος Ε.Κ.,** (2007)., Φυτοπαθολογία. Εκδ. Σταμούλη.