



## Καινοτόμες λύσεις για τη βιώσιμη και περιβαλλοντικά φιλική φυτοπροστασία των οπωροκηπευτικών της Ελλάδας, στην Ευρώπη του μέλλοντος

**Παραδοτέο Π1.8.1** : Μοριακό πρωτόκολλο για τον έλεγχο της απόκρισης των φυτών σε βιοδιεγέρτες ή φυσικά χημικά, έναντι των εντόμων

### Πληροφορίες για το έγγραφο

Αριθμός παραδοτέου: **Π1.8.1**

Ενότητα εργασίας: **ΕΕ1**

Επικεφαλής δικαιούχος: **ΙΤΕ**

Συγγραφείς: **Παναγιώτης Μόσχου, Γεώργιος Βλαχάκης**

Έκδοση: **1.0**

Είδος Παραδοτέου: **Έκθεση**

Ημερομηνία παράδοσης: **5 Δεκεμβρίου 2025**

### Στοιχεία Πράξης

Τίτλος: Καινοτόμες λύσεις για τη βιώσιμη και περιβαλλοντικά φιλική φυτοπροστασία των οπωροκηπευτικών της Ελλάδας, στην Ευρώπη του μέλλοντος

Τίτλος (EN): InnoPP-Innovations in Plant Protection for sustainable and environmentally friendly pest control

Κωδικός πράξης: ΤΑΕΔΡ-0535675

Ακρωνύμιο έργου: InnoPP

Ημερομηνία έναρξης: 15 Μαΐου 2023

Διάρκεια: 28 Μήνες

Συντονιστής Φορέας: Γεωπονικό Πανεπιστήμιο Αθηνών

Συντονιστής/ Επιστημονικός Υπεύθυνος: Ιωάννης Βόντας

## Πίνακας Περιεχομένων

<b>1</b>	<b>ΕΙΣΑΓΩΓΗ ΚΑΙ ΣΤΟΧΟΙ</b> .....	<b>3</b>
<b>2</b>	<b>ΠΕΡΙΓΡΑΦΗ ΤΩΝ ΕΡΓΑΣΙΩΝ</b> .....	<b>6</b>
2.1	ΥΛΙΚΑ ΚΑΙ ΜΕΘΟΔΟΙ .....	6
2.2	ΑΠΟΤΕΛΕΣΜΑΤΑ ΚΑΙ ΣΥΖΗΤΗΣΗ.....	7
<b>3</b>	<b>ΣΥΝΟΨΗ ΚΑΙ ΣΥΜΠΕΡΑΣΜΑΤΑ</b> .....	<b>9</b>
<b>4</b>	<b>ΣΥΝΟΨΗ ΚΑΙ ΣΥΜΠΕΡΑΣΜΑΤΑ</b> ..... ΣΦΑΛΜΑ! ΔΕΝ ΕΧΕΙ ΟΡΙΣΤΕΙ ΣΕΛΙΔΟΔΕΙΚΤΗΣ.	
<b>5</b>	<b>ΠΑΡΑΡΤΗΜΑ Ι</b> .....	<b>10</b>

## Περίληψη του Έργου

Το έργο «Καινοτόμες λύσεις για τη βιώσιμη και περιβαλλοντικά φιλική φυτοπροστασία των οπωροκηπευτικών της Ελλάδας, στην Ευρώπη του μέλλοντος» στοχεύει στην ανάπτυξη σύγχρονων και καινοτόμων μεθόδων για την προστασία των καλλιεργειών όπως τα κηπευτικά, τα εσπεριδοειδή και το επιτραπέζιο σταφύλι. Περιλαμβάνει τη δημιουργία προηγμένων διαγνωστικών εργαλείων για την ανίχνευση εχθρών και παθογόνων με τεχνολογίες αιχμής, όπως ηλεκτρονικές παγίδες και βιοαισθητήρες, καθώς και πλατφόρμες αλληλούχησης για τον πλήρη προσδιορισμό των ιωμάτων. Επιπλέον, θα αναπτυχθούν μοντέλα πρόβλεψης επιδημιών και καινοτόμα βιοφυτοπροστατευτικά προϊόντα, τα οποία θα αξιολογηθούν για την ασφάλεια τους σε μη στόχους οργανισμούς. Τέλος, οι νέες τεχνολογίες θα ενσωματωθούν σε συστήματα ολοκληρωμένης διαχείρισης φυτοπροστασίας και θα δοκιμαστούν σε πραγματικές συνθήκες, ενώ θα αξιολογηθούν οι κοινωνικοοικονομικές και περιβαλλοντικές επιπτώσεις τους.

## Σύνοψη της ΕΕ1

Στο πλαίσιο της ΕΕ1 του έργου, στόχος είναι η ανάπτυξη και αξιολόγηση καινοτόμων βιοφυτοπροστατευτικών προϊόντων που απευθύνονται σε εχθρούς, ασθένειες και ζιζάνια υψηλής δυσκολίας καταπολέμησης, τα οποία επηρεάζουν τα κύρια οπωροκηπευτικά της χώρας.

## Συνοπτική παρουσίαση του παραδοτέου Π1.8.1

Πρωτεΐνες σχετιζόμενες με παθογένεια (Pathogenesis-related, PR) αποτελούν μια ετερογενή ομάδα φυτικών πρωτεϊνών που επάγονται ως απόκριση σε προσβολές από παθογόνα. Ανάμεσά τους, η οικογένεια PR-1 είναι μια από τις πιο καλά μελετημένες, αποτελούμενη από πρωτεΐνες χαμηλού μοριακού βάρους με άγνωστη βιοχημική λειτουργία. Στην τομάτα (*Solanum lycopersicum*), έχει δειχθεί ότι τα γονίδια PR-1 διαδραματίζουν κρίσιμους ρόλους στις αμυντικές αποκρίσεις του φυτού απέναντι σε διάφορα παθογόνα, αλλά και σε αβιοτικές καταπονήσεις, όπως η ξηρασία. Τα γονίδια αυτά κωδικοποιούν τόσο βασικές όσο και όξινες PR-1 πρωτεΐνες. Μελέτες δείχνουν ότι τα PR-1 γονίδια εμφανίζουν διαφορετικά πρότυπα έκφρασης ως απόκριση σε ποικίλα ερεθίσματα. Ορισμένα PR-1 γονίδια εκφράζονται σταθερά σε συγκεκριμένους ιστούς, παρέχοντας πιθανώς μια προληπτική άμυνα έναντι πιθανών παθογόνων. Άλλα PR-1 γονίδια επάγονται μετά από προσβολή παθογόνου, ιδίως σε ιστούς που εμφανίζουν αντίδραση υπερευαισθησίας (hypersensitive response). Επιπλέον, η έκφραση των PR-1 γονιδίων μπορεί να ενεργοποιηθεί από μοριακά σήματα όπως το σαλικυλικό οξύ και το αιθυλένιο, τα οποία συμμετέχουν σε σηματοδοτικά μονοπάτια της φυτικής άμυνας. Συνεπώς, αναπτύξαμε μια τεχνική για τη γρήγορη ανίχνευση του PR-1 σε επίπεδο γονιδιακής έκφρασης.

## 1 ΕΙΣΑΓΩΓΗ ΚΑΙ ΣΤΟΧΟΙ

Η χρήση συνθετικών εντομοκτόνων παραμένει η κύρια στρατηγική για τη διαχείριση Η οικογένεια γονιδίων πρωτεΐνης PR της τομάτας περιλαμβάνει 13 νέες πρωτεΐνες SIPR-1 που περιέχουν το CAP domain (PF00188), το οποίο σχετίζεται με εκκριτικές πρωτεΐνες πλούσιες σε κυστεΐνη, το αντιγόνο 5 και τις πρωτεΐνες PR-1 (Akbudak et al. 2020;

Gibbs et al. 2008). Επιπλέον, η ανάλυση όρων γονιδιακής οντολογίας (GO) των πρωτεϊνών PR-1 της τομάτας αποκάλυψε τη συμμετοχή τους σε μηχανισμούς άμυνας, συμπεριλαμβανομένων των αποκρίσεων σε βιοτικές καταπονήσεις, σαλικυλικό οξύ (SA), ιασμονικό οξύ (JA), αιθυλένιο (ET) και τραυματισμό, μεταξύ άλλων λειτουργιών. Η PR1 μπορεί να συμβάλει στη δημιουργία συστημικής επίκτητης ανθεκτικότητας (SAR) στα φυτά, καθιστώντας τα πιο ανθεκτικά σε μελλοντικές επιθέσεις παθογόνων (Ali et al. 2018). Επιπλέον, τα γονίδια PR-1 έχουν συσχετιστεί με αποκρίσεις σε αβιοτικές καταπονήσεις όπως η ξηρασία, υποδηλώνοντας τη συμμετοχή τους σε ευρύτερες αποκρίσεις στρες.

## Πρόσφατη Έρευνα

Πρόσφατες μελέτες έχουν εστιάσει σε:

- Ανάλυση σε επίπεδο γονιδιώματος: Ταυτοποίηση και χαρακτηρισμός όλων των γονιδίων PR-1 στο γονιδίωμα της τομάτας.
- Προφίλ έκφρασης: Διερεύνηση των μοτίβων έκφρασης των γονιδίων PR-1 υπό διάφορα βιοτικά και αβιοτικά στρες.
- Λειτουργικές μελέτες: Διευκρίνιση των ακριβών ρόλων των πρωτεϊνών PR-1 στην άμυνα των φυτών και τις αποκρίσεις στρες.

Μεταξύ των 13 ταυτοποιημένων γονιδίων SIPR-1, μόνο λίγα έχουν χαρακτηριστεί λειτουργικά ως προς την απόκρισή τους σε βιοτικά και αβιοτικά στρες. Το SIPR-1 (SolCyc ID: Solyc01g106620.2) υπερεκφράζεται ως απόκριση σε σαλικυλικό οξύ (SA), μεθυλοϊασμονικό οξύ (MeJA) και επεξεργασίες με βακτηριακό μαρασμό, με την υψηλότερη έκφρασή του να παρατηρείται στους μίσχους της τομάτας (Chen et al. 2023). Ομοίως, το γονίδιο SIPR-1A1 (SolCyc ID: Solyc01g106610.2) υπερεκφράζεται σε τοματάκια τσερί μετά από επεξεργασία με *Bacillomycin D-C16* (ένα κυκλικό λιποπεπτιδίο) μέσω του μονοπατιού σηματοδότησης SA (Xue et al. 2023). Επιπλέον, προτάθηκε ένα δίκτυο αμυντικής απόκρισης που ενεργοποιείται από το *Bacillomycin D-C16*, στο οποίο η ενισχυμένη ανθεκτικότητα σε ασθένειες στα τοματάκια τσερί διαμεσολαβείται μέσω των φυτοορμονών SA, JA και ET. Αυτές οι ορμόνες ενεργοποιούν βασικούς μεταγραφικούς παράγοντες (WRKY, MYB, κ.λπ.), οι οποίοι ρυθμίζουν την έκφραση των γονιδίων PR-1. Το γονίδιο SIPR-1A1 αναφέρθηκε για πρώτη φορά το 1994 από τους (Tornerio et al. 1994), οι οποίοι ανέφεραν τη συστατική του έκφραση, κυρίως στις ρίζες της τομάτας, με πρόσθετη έκφραση σε φύλλα και μίσχους, η οποία επάγεται από το ET ως απόκριση σε λοιμώξεις από ιοειδή. Τα φυτά βασίζονται επίσης στη σηματοδότηση φυτοορμονών για να αποκριθούν σε διαφορετικές στρατηγικές τροφοληψίας φυτοφάγων εντόμων. Η σηματοδότηση SA ενεργοποιείται κατά τις επιθέσεις από έντομα που ρουφούν χυμούς και λοιμώξεις παθογόνων, ενώ η σηματοδότηση JA ενεργοποιείται κυρίως από επιθέσεις εντόμων που μασούν και τραυματισμό (Ali et al. 2024). Αξιοσημείωτα, οι επιθέσεις από έντομα που ρουφούν χυμούς, προκαλώντας σημαντική κυτταρική βλάβη, είναι πιο πιθανό να επάγουν αποκρίσεις σηματοδότησης JA.

Με βάση τη βιβλιογραφία, το SIPR-1A1 θα μπορούσε να χρησιμεύσει ως αξιόπιστος δείκτης για τις αμυντικές αποκρίσεις της τομάτας έναντι ποικίλων βιοτικών στρες ή ακόμη και ωφέλιμων αποκρίσεων (Gao et al. 2020). Για να ελεγχθεί αυτή η υπόθεση, θα αναπτυχθεί ένα πρωτόκολλο δοκιμής LAMP (Loop-Mediated Isothermal Amplification) για την ταχεία ανίχνευση της έκφρασης του SIPR-1A1 σε φυτά τομάτας υπό συνθήκες βιοτικού στρες (Kirası et al. 2024). Η LAMP είναι μια τεχνική μονού σωλήνα που ενισχύει το DNA

για διαγνωστικούς σκοπούς και χρησιμεύει ως εναλλακτική λύση χαμηλού κόστους για την ανίχνευση ορισμένων ασθενειών. Η LAMP, που εφευρέθηκε το 1998 από την Eiken Chemical Company στο Τόκιο, είναι μια ισοθερμοκρασιακή τεχνική ενίσχυσης νουκλεϊκών οξέων, που σημαίνει ότι πραγματοποιείται σε σταθερή θερμοκρασία και δεν χρειάζεται θερμικό κυκλοποιητή, σε αντίθεση με την αλυσιδωτή αντίδραση πολυμεράσης (PCR). Αυτή η προσέγγιση προσφέρει σημαντικό δυναμικό για εφαρμογή σε διάφορα περιβάλλοντα.

**Ο σκοπός του παρόντος εγγράφου** είναι η παρουσίαση των αποτελεσμάτων καινοτόμου έρευνας στα πλαίσια του παραδοτέου Π1.8.1, που αφορά την ανίχνευση επαγωγής γονιδίων που σχετίζονται με την άμυνα για την ανάπτυξη βιοαισθητήρων.

Το παρόν έγγραφο **ακολουθεί την παρακάτω δομή:**

**1. Εισαγωγή και Στόχοι:** Παρουσιάζεται το πλαίσιο της έρευνας και οι στόχοι του εγγράφου.

**2. Περιγραφή των Εργασιών:** 2.1. Υλικά και Μέθοδοι, 2.2. Αποτελέσματα και Συζήτηση.

**3. Σύνοψη και Συμπεράσματα:** Βασικά ευρήματα της έρευνας και σχετικά συμπεράσματα.

**4. Παράρτημα:** Βιβλιογραφικές αναφορές.

## 2 ΠΕΡΙΓΡΑΦΗ ΤΩΝ ΕΡΓΑΣΙΩΝ

### 2.1 Υλικά και Μέθοδοι

#### Φυτικό Μοντέλο:

Η Micro Tom είναι μια νάνα ποικιλία τομάτας που αναγνωρίζεται ως μοντέλο για την έρευνα της τομάτας λόγω του μικρού του μεγέθους και του σύντομου βιολογικού του κύκλου. Συνήθως μεγαλώνει μόνο 6-8 ίντσες σε ύψος, καθιστώντας το κατάλληλο για καλλιέργεια σε γλάστρες, μικρούς κήπους, αυλές, περβάζια παραθύρων ή ακόμη και σε εσωτερικούς χώρους με τεχνητό φωτισμό. Αναπτύχθηκε από τους Dr. J. W. Scott και Dr. B. K. Harbaugh του Πανεπιστημίου της Φλόριντα και παρουσιάστηκε το 1989, η Micro Tom είναι ένα νάνο ορισμένου τύπου φυτό που παράγει συστάδες μικρών, γευστικών τομάτων.

Η Micro-Tom φέρει μια μετάλλαξη στο γονίδιο DWARF (D) που οδηγεί σε λανθασμένο ματίσμα και την παραγωγή μικρότερων mRNA, με αποτέλεσμα μια περικεκομμένη πρωτεΐνη DWARF (Martí et al. 2006). Συγκεκριμένα, μια μονή μετάλλαξη βάσης (A σε T) στη θέση ματίσματος 3' AG του ιντρονίου 8 στο γονίδιο D προκαλεί αυτό το λανθασμένο ματίσμα. Το ελάττωμα της αλληλουχίας *d* συνδιάζεται με σκούρα πράσινα και ρυτιδωμένα φύλλα, που είναι χαρακτηριστικά μεταλλαγμάτων βιοσύνθεσης βρασσινοστεροειδών. Το αλληλόμορφο *d* σχετίζεται με τα βρασσινοστεροειδή και είναι υπεύθυνο για το μικρό μέγεθος του φυτού (Campos et al. 2010).

#### Επεξεργασίες:

Σπορόφυτα τομάτας Micro Tom στο στάδιο του πρώτου αληθινού φύλλου εμβολιάστηκαν με: βιοδιεγερτικά στελέχη ζυμομυκήτων (από την ομάδα του Καθ. Sarris, αδημοσίευτα δεδομένα), νερό (αρνητικός μάρτυρας), *Escherichia coli* (μάρτυρας για μη-βιοελεγκτικούς μικροοργανισμούς (Tharek et al. 2021)). Τα βιοδιεγερτικά, όπως οι ζυμομύκητες μπορεί να παίζουν κρίσιμο ρόλο στην ενίσχυση της φυσικής κατάστασης του φυτού και την ενεργοποίηση της βασικής άμυνας μέσω του μονοπατιού σηματοδότησης φυτοορμονών (Maruri-López et al. 2024; Kowalska et al. 2022; Hernández-Fernández et al. 2021). Τα στελέχη ζυμομυκήτων μπορούν να ανέχονται συνθήκες NaCl και ξηρασίας, να διαλυτοποιούν φώσφορο και κάλιο, να παράγουν ινδολο-οξικό οξύ, να έχουν ικανότητα σιδηροφόρου και να παράγουν αμινοκυκλοπροπάνιο-1-καρβοξυλικό οξύ δεαμινάση (που αποκλείει το αιθυλένιο), όλα τα οποία προάγουν την ανάπτυξη των φυτών (Raklami et al. 2024). Δείγματα ιστών (φύλλων) έχουν συλλεχθεί στις 0, 24, 72 και 168 ώρες μετά τον εμβολιασμό για μεταγενέστερη μοριακή ανάλυση.

#### Μοριακή Ανάλυση: Δοκιμές LAMP και qPCR

Η απομόνωση mRNA πραγματοποιήθηκε από τα συλλεχθέντα δείγματα και χρησιμοποιήθηκε απευθείας για δοκιμές LAMP. Τα ίδια δείγματα mRNA μετατράπηκαν σε cDNA για δοκιμές ποσοτικής PCR (qPCR). Οι εκκινητές για το SIPR-1A1 (Solyc01g106610.2) σχεδιάστηκαν χρησιμοποιώντας το λογισμικό LAMP Designer (Primer Explorer v5)(<https://primerexplorer.jp/e/>).

#### Δοκιμή qPCR για Επιβεβαίωση Έκφρασης

Οι δοκιμές qPCR πραγματοποιήθηκαν χρησιμοποιώντας τους εκκινητές PR-1A1 που σχεδιάστηκαν από τους (Gibbs et al. 2008; Akbudak et al. 2020) (Πίνακας 1.8.1-1). Τα αποτελέσματα qPCR χρησιμοποιήθηκαν τόσο ως επιβεβαίωση της έκφρασης του SIPR-1A1 μετά την επεξεργασία όσο και ως απόδειξη της αρχής λειτουργίας για τη δοκιμή LAMP.

Πίνακας 1.8.1-1. Αλληλουχίες εκκινητών.

Εκκινητής	Αλληλουχία (5'-3')	Εφαρμογή
SIPR-1A1_Fw	GCTGTGAAGATGTGGGACGA	qPCR
SIPR-1A1_Rv	ACCGACTTACGCCATACCAC	
SIPR-1A1_F3	CACAAGCTCAAACCTCCTCGA	LAMP
SIPR-1A1_B3	GCTTCTCATCGTCCCACATC	
SIPR-1A1_FIP	GGCTGCTAGACCATCGTCCCAGCTCACAATGCAGCTCGT	
SIPR-1A1_BIP	TCCACTCTGATGGCCCTTACGGCAGCACCAGCAGCGTTTA	

Fw: Εκκινητής προς τα εμπρός. Rv: Εκκινητής ανάστροφος

### Αποκλίσεις από το αρχικό σχέδιο

Λόγω χαμηλών επιπέδων πρωτεΐνης PR1, δεν ήταν δυνατή η δημιουργία δοκιμής ταινίας (strip assay)

## 2.2 Αποτελέσματα και Συζήτηση

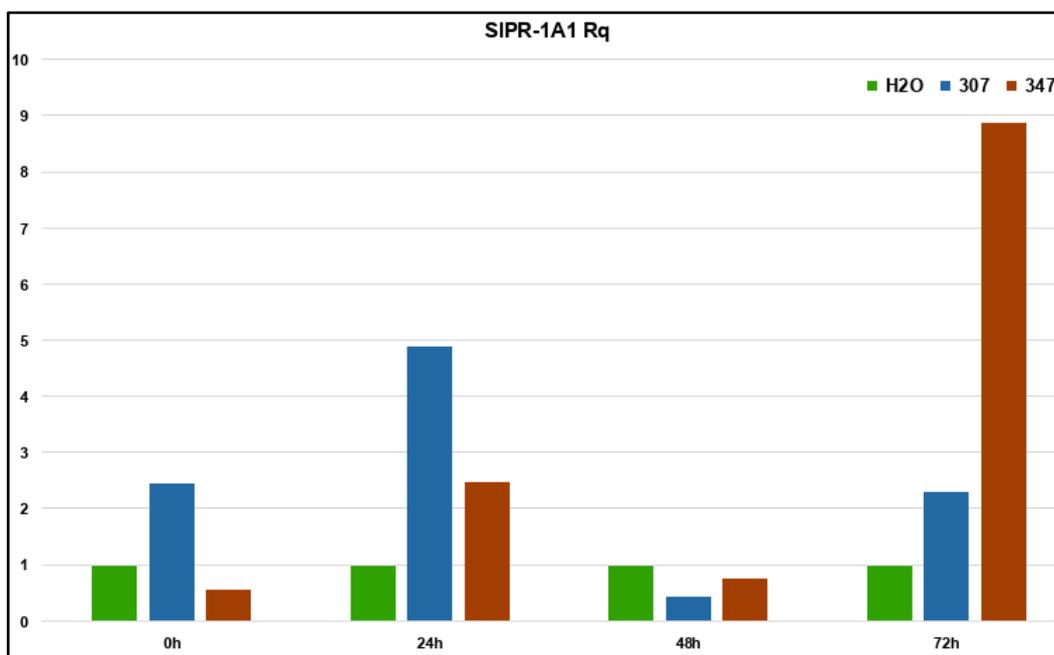
Η παρούσα έρευνα ανέδειξε την αποτελεσματικότητα των βιοδιεγερτών στην επαγωγή άμυνας έναντι εντόμων σε φυτά τομάτας Micro Tom, χρησιμοποιώντας το γονίδιο SIPR-1A1 ως μοριακό δείκτη αμυντικής απόκρισης. Τα αποτελέσματα της σχετικής ποσοτικοποίησης (Rq) με qPCR (Εικόνα 1.8.1-1 και -2) αποκάλυψαν σημαντικές διαφορές στην έκφραση του γονιδίου SIPR-1A1 μεταξύ των διαφορετικών επεξεργασιών. Τα φυτά που επώαστηκαν με το απομονωμένο στέλεχος *Streptomyces* sp. SRL307 έδειξαν αυξημένα επίπεδα έκφρασης του SIPR-1A1 σε σχέση με τον αρνητικό μάρτυρα (H<sub>2</sub>O). Αυτή η αύξηση υποδηλώνει την ενεργοποίηση αμυντικών μηχανισμών στα φυτά τομάτας ως απόκριση στην παρουσία του βακτηριακού βιοδιεγερτή.

Το απομονωμένο στέλεχος *Metschnikowia* sp. SRL347 επίσης επηρέασε την έκφραση του SIPR-1A1, αν και τα επίπεδα έκφρασης εμφάνισαν διακύμανση ανάλογα με το χρονικό σημείο δειγματοληψίας. Αυτό υποδεικνύει ότι οι ζυμομύκητες μπορούν επίσης να λειτουργήσουν ως ενεργοποιητές της φυτικής άμυνας, πιθανώς μέσω διαφορετικών μηχανισμών σηματοδότησης σε σχέση με τα βακτηριακά στελέχη.

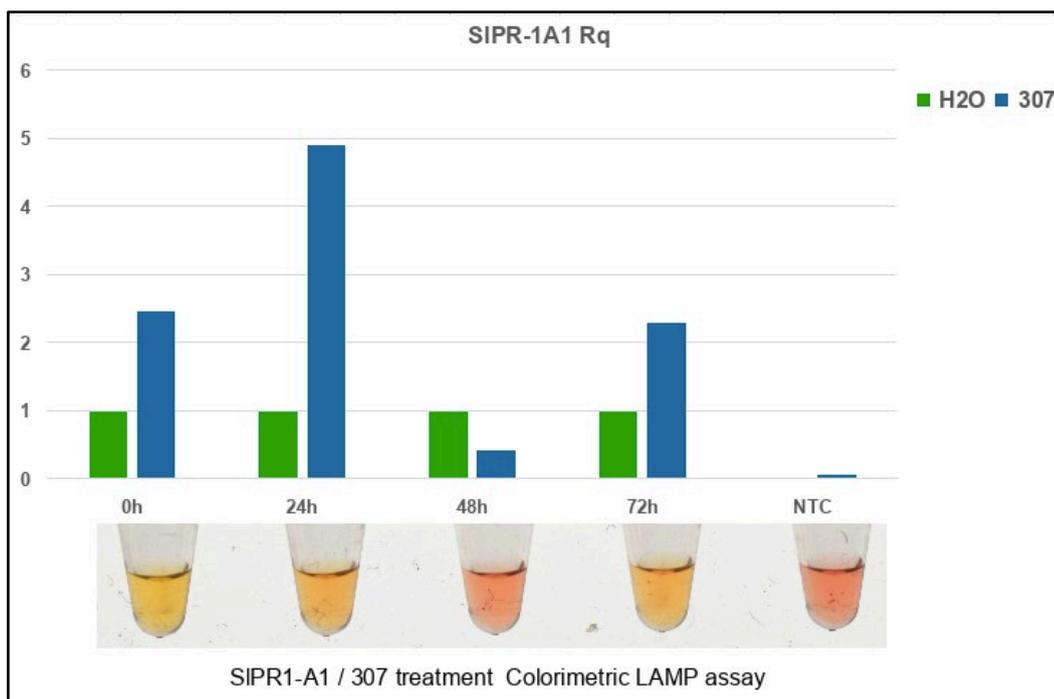
Η ανάπτυξη και εφαρμογή της χρωματομετρικής δοκιμής LAMP (Εικόνα 1.8.1-2 και -3) παρείχε μια ταχεία και οπτικά ανιχνεύσιμη μέθοδο επιβεβαίωσης της έκφρασης του SIPR-1A1. Τα αποτελέσματα της LAMP συσχετίστηκαν με τα δεδομένα qPCR, επιβεβαιώνοντας την αξιοπιστία της μεθόδου. Όπως φαίνεται στην Εικόνα 3, η χρωματομετρική δοκιμή έδειξε: **Κίτρινο χρώμα**: Θετική ενίσχυση, που υποδηλώνει την παρουσία του στόχου SIPR-1A1 mRNA, κυρίως στα δείγματα που επεξεργάστηκαν με *Streptomyces* sp. SRL307. **Κόκκινο/ροζ χρώμα**: Απουσία ενίσχυσης, παρατηρούμενη

κυρίως στους αρνητικούς μάρτυρες. **Πορτοκαλί χρώμα:** Μη ειδική ενίσχυση, πιθανώς λόγω διμερισμού εκκινητών, που απαιτεί περαιτέρω βελτιστοποίηση των συνθηκών αντίδρασης

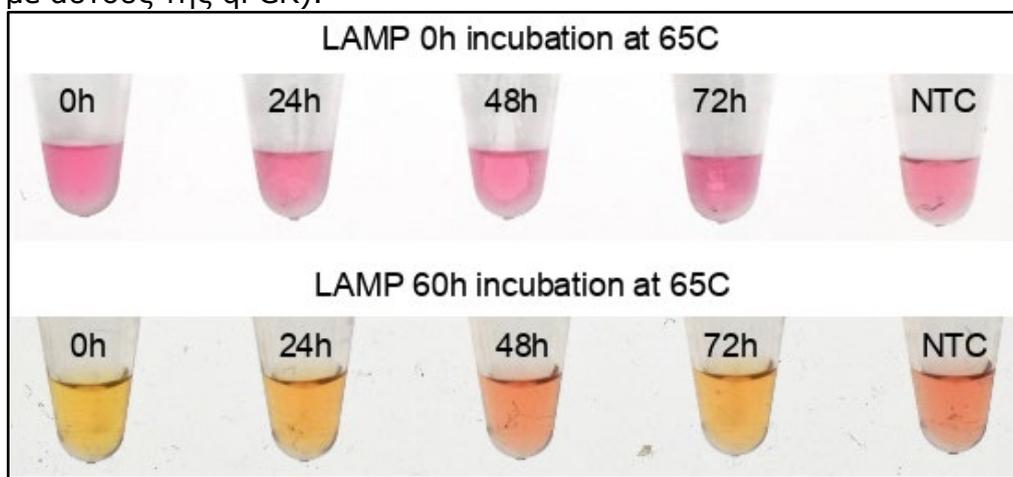
Η επαγωγή του γονιδίου SIPR-1A1 από τα βιοδιεγερτικά στελέχη SRL307 και SRL347 υποδηλώνει την ενεργοποίηση συστημικής επίκτητης ανθεκτικότητας (SAR) στα φυτά τομάτας. Οι πρωτεΐνες PR-1 είναι γνωστές ως βασικοί δείκτες της αμυντικής απόκρισης που διαμεσολαβείται από το σαλικυλικό οξύ (SA), το οποίο είναι κρίσιμο για την άμυνα έναντι βιοτροφικών παθογόνων και ορισμένων εντόμων που ρουφούν χυμούς. Η ικανότητα των μικροοργανισμών-βιοδιεγερτών να προάγουν (prime) την αμυντική απόκριση των φυτών χωρίς να προκαλούν σημαντικό στρες αποτελεί σημαντικό πλεονέκτημα για τη βιώσιμη γεωργία. Αυτή η "προπαρασκευή" καθιστά τα φυτά πιο ανθεκτικά σε μελλοντικές βιοτικές προκλήσεις, ενώ παράλληλα μειώνει την ανάγκη για χημικά φυτοπροστατευτικά προϊόντα. Παρά την επιτυχή ανάπτυξη της δοκιμής LAMP, παρατηρήθηκαν ορισμένα τεχνικά ζητήματα που απαιτούν περαιτέρω βελτιστοποίηση: **Μη ειδική ενίσχυση:** Η εμφάνιση πορτοκαλί χρώματος σε ορισμένα δείγματα υποδηλώνει διμερισμό εκκινητών. Αυτό μπορεί να αντιμετωπιστεί με τροποποίηση των συγκεντρώσεων των εκκινητών ή των συνθηκών της αντίδρασης. **Χαμηλά επίπεδα πρωτεΐνης PR1:** Όπως αναφέρθηκε, τα χαμηλά επίπεδα πρωτεΐνης PR1 δεν επέτρεψαν την ανάπτυξη δοκιμής ταινίας (strip assay). Αυτό υπογραμμίζει τη σημασία των μοριακών μεθόδων όπως η qPCR και η LAMP για την ανίχνευση έγκαιρων αλλαγών στην έκφραση γονιδίων, πριν από τη συσσώρευση σημαντικών ποσοτήτων πρωτεΐνης.



**Εικόνα 1.8.1-1.** Σχετική ποσοτικοποίηση (Rq) του SIPR-1A1 σε φυτά MicroTom που επώαστηκαν με χειρισμό H<sub>2</sub>O (mock), το απομονωμένο *Streptomyces* sp. SRL307 και το απομονωμένο *Metschnikowia* sp. SRL347 (Εργαστήριο Sarris).



**Εικόνα 1.8.1-2.** Σχετική ποσοτικοποίηση (Rq) του SIPR-1A1 σε φυτά MicroTom που επώαστηκαν με H<sub>2</sub>O (μάρτυρας), 307 *Streptomyces* sp. απομόνωση SRL307 και 347 *Metschnikowia* sp. απομόνωση SRL347, παράλληλα με χρωματομετρική δοκιμή LAMP χρησιμοποιώντας το ίδιο cDNA όπως στην qPCR (οι εκκινητές LAMP δεν είναι οι ίδιοι με αυτούς της qPCR).



**Εικόνα 1.8.1-3.** Χρωματομετρική δοκιμή LAMP για την έκφραση του SIPR-1A1 σε φυτά MicroTom που επώαστηκαν με *Streptomyces* sp. απομόνωση SRL307: Κόκκινο/ροζ καμία ενίσχυση, Κίτρινο ενίσχυση, Πορτοκαλί μη ειδική ενίσχυση πιθανώς λόγω διμερισμού εκκινητών.

### 3 ΣΥΝΟΨΗ ΚΑΙ ΣΥΜΠΕΡΑΣΜΑΤΑ

Η παρούσα έρευνα ανέδειξε την αποτελεσματικότητα των βιοδιεγερτών στην επαγωγή άμυνας έναντι εντόμων σε φυτά τομάτας Micro Tom, χρησιμοποιώντας το γονίδιο SIPR-1A1 ως μοριακό δείκτη αμυντικής απόκρισης. Η δοκιμή LAMP που αναπτύχθηκε για το SIPR-1A1 προσφέρει ένα εργαλείο ταχείας διάγνωσης χαμηλού κόστους για την αξιολόγηση της αμυντικής κατάστασης των φυτών τομάτας. Αυτό μπορεί να έχει πρακτικές εφαρμογές:

**Έλεγχος ποιότητας βιοδιεγερτών:** Γρήγορη αξιολόγηση της ικανότητας μικροοργανισμών να επάγουν αμυντικές αποκρίσεις

**Παρακολούθηση υγείας καλλιεργειών:** Ανίχνευση έγκαιρης ενεργοποίησης άμυνας σε εμπορικές καλλιέργειες

**Ερευνητικές εφαρμογές:** Μελέτη χρονοδιαγραμμάτων αμυντικής απόκρισης και αλληλεπιδράσεων φυτού-μικροβίου

## 4 ΠΑΡΑΡΤΗΜΑ Ι

### Βιβλιογραφικές Αναφορές

- Akbudak MA, Yildiz S, Filiz E (2020) Pathogenesis related protein-1 (PR-1) genes in tomato (*Solanum lycopersicum* L.): Bioinformatics analyses and expression profiles in response to drought stress. *Genomics* 112 (6):4089-4099. doi:10.1016/j.ygeno.2020.07.004
- Ali J, Tonča A, Islam T, Mir S, Mukarram M, Konôpková AS, Chen R (2024) Defense strategies and associated phytohormonal regulation in Brassica plants in response to chewing and sap-sucking insects. *Frontiers in plant science* 15. doi:10.3389/fpls.2024.1376917
- Ali S, Mir ZA, Bhat JA, Tyagi A, Chandrashekar N, Yadav P, Rawat S, Sultana M, Grover A (2018) Isolation and characterization of systemic acquired resistance marker gene PR1 and its promoter from Brassica juncea. *3 Biotech* 8 (1):10. doi:10.1007/s13205-017-1027-8
- Campos ML, Carvalho RF, Benedito VA, Peres LE (2010) Small and remarkable: The Micro-Tom model system as a tool to discover novel hormonal functions and interactions. *Plant Signal Behav* 5 (3):267-270. doi:10.4161/psb.5.3.10622
- Chen N, Shao Q, Xiong Z (2023) Isolation and characterization of a pathogenesis-related protein 1 (SIPR1) gene with induced expression in tomato (*Solanum lycopersicum*) during *Ralstonia solanacearum* infection. *Gene* 855:147105. doi:<https://doi.org/10.1016/j.gene.2022.147105>
- Gao Y-F, Liu J-K, Yang F-M, Zhang G-Y, Wang D, Zhang L, Ou Y-B, Yao Y-A (2020) The WRKY transcription factor WRKY8 promotes resistance to pathogen infection and mediates drought and salt stress tolerance in *Solanum lycopersicum*. *Physiol Plantarum* 168 (1):98-117. doi:<https://doi.org/10.1111/pp1.12978>
- Gibbs GM, Roelants K, O'Bryan MK (2008) The CAP superfamily: cysteine-rich secretory proteins, antigen 5, and pathogenesis-related 1 proteins--roles in reproduction, cancer, and immune defense. *Endocr Rev* 29 (7):865-897. doi:10.1210/er.2008-0032
- Hernández-Fernández M, Cordero-Bueso G, Ruiz-Muñoz M, Cantoral JM (2021) Culturable Yeasts as Biofertilizers and Biopesticides for a Sustainable Agriculture: A Comprehensive Review. *Plants (Basel)* 10 (5). doi:10.3390/plants10050822
- Kirasi PM, Ateka EM, Avedi EK, Yegon HK, Wanjala BW, Pappu HR (2024) A reverse transcription loop-mediated isothermal amplification assay for quick detection of tomato mosaic virus. *Plos One* 19 (6):e0304497. doi:10.1371/journal.pone.0304497
- Kowalska J, Krzysińska J, Tyburski J (2022) Yeasts as a Potential Biological Agent in Plant Disease Protection and Yield Improvement—A Short Review. *Agriculture* 12 (9):1404
- Martí E, Gisbert C, Bishop GJ, Dixon MS, García-Martínez JL (2006) Genetic and physiological characterization of tomato cv. Micro-Tom. *J Exp Bot* 57 (9):2037-2047. doi:10.1093/jxb/erj154
- Maruri-López I, Romero-Contreras YJ, Napsucialy-Mendivil S, González-Pérez E, Aviles-Baltazar NY, Chávez-Martínez AI, Flores-Cuevas EJ, Schwan-Estrada KRF, Dubrovsky JG, Jiménez-Bremont JF, Serrano M (2024) A biostimulant yeast, *Hanseniaspora opuntiae*, modifies *Arabidopsis thaliana* root architecture and improves the plant defense response against *Botrytis cinerea*. *Planta* 259 (3):53. doi:10.1007/s00425-023-04326-6
- Raklami A, Babalola OO, Jemo M, Nafis A (2024) Unlocking the plant growth-promoting potential of yeast spp.: exploring species from the Moroccan extremophilic environment for enhanced

- plant growth and sustainable farming. *FEMS Microbiology Letters* 371. doi:10.1093/femsle/fnae015
- Tharek M, Khairuddin D, Najimudin N, Ghazali AH (2021) Plant Growth Promoting Potentials of Beneficial Endophytic *Escherichia coli* USML2 in Association with Rice Seedlings. *Trop Life Sci Res* 32 (1):119-143. doi:10.21315/tlsr2021.32.1.8
- Tornero P, Conejero V, Vera P (1994) A gene encoding a novel isoform of the PR-1 protein family from tomato is induced upon viroid infection. *Mol Gen Genet* 243 (1):47-53. doi:10.1007/bf00283875
- Xue Y, Sun J, Lu F, Bie X, Li Y, Lu Y, Lu Z, Lin F (2023) Transcriptomic analysis reveals that Bacillomycin D-C16 induces multiple pathways of disease resistance in cherry tomato. *Bmc Genomics* 24 (1):218. doi:10.1186/s12864-023-09305-5