

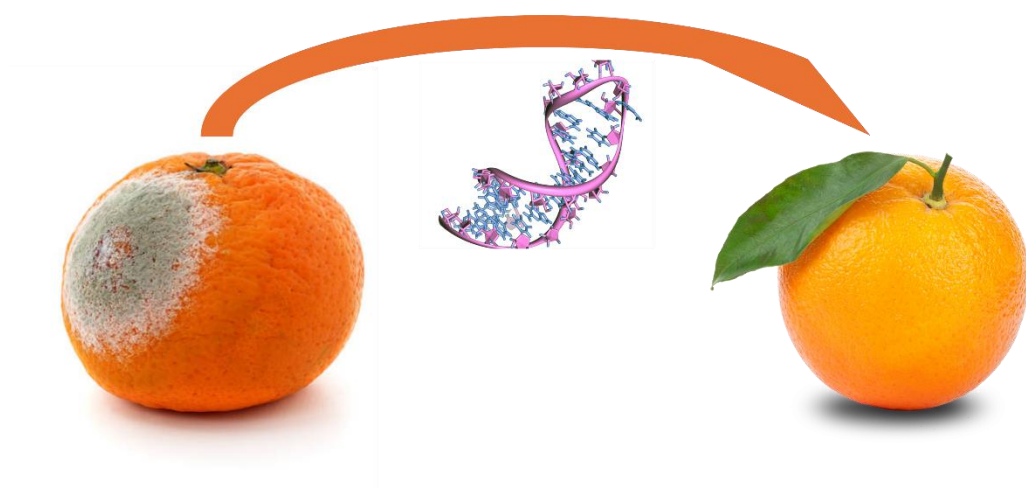
Πανεπιστήμιο Θεσσαλίας
Σχολή Επιστημών Υγείας
Τμήμα Βιοχημείας & Βιοτεχνολογίας

Εργαστήριο Φυτοπαθολογίας, Τμήμα Γεωπονίας, ΑΠΘ

Πτυχιακή Εργασία

**«Αντιμετώπιση του *Penicillium digitatum* σε εσπεριδοειδή
με βιομυκητοκτόνα τεχνολογίας SIGS (*Spray Induced Gene
Silencing*)»**

*«Treatment of *Penicillium digitatum* in Citrus Fruits Using SIGS-
Technology Biofungicides»*



Ραΐδης Χρήστος

Πατρώνυμο: Ραΐδης Παναγιώτης

Λάρισα, 2025

[1]

Τριμελής Επιτροπή

- **Καραογλανίδης Γεώργιος (επιβλέπων)**

Καθηγητής Φυτοπαθολογίας

Georgios Karaoglanidis Georgios Karaoglanidis
10.06.2025 20:48

Email: gkarao@agro.auth.gr | Τηλ. Επικοινωνίας: 2310998860

- **Καρπούζας Δημήτριος (συνεπιβλέπων)**

Καθηγητής Περιβαλλοντικής Μικροβιολογίας & Βιοτεχνολογίας

- **Παπαδοπούλου Καλλιόπη (τρίτο μέλος)**

Καθηγήτρια Βιοτεχνολογίας Φυτών

Ευχαριστίες

Θα ήθελα να ευχαριστήσω θερμά όλους όσους με στήριξαν καθ' όλη τη διάρκεια της εκτέλεσης του πειράματος και της συγγραφής της πτυχιακής μου εργασίας και της συνολικής μου πορείας στο πανεπιστήμιο.

Αρχικά, ευχαριστώ τον επιβλέποντα καθηγητή μου, κ. Καραογλανίδη Γεώργιο (Καθηγητής ΑΠΘ), για την πολύτιμη καθοδήγηση, τη διαρκή υποστήριξη και την εμπιστοσύνη που μου έδειξε καθ' όλη τη διάρκεια του έργου.

Επίσης, θα ήθελα να ευχαριστήσω θερμά τον κ. Καρπούζα Δημήτριο (Καθηγητής ΠΘ) και την κα. Παπαδοπούλου Καλλιόπη (Καθηγήτρια ΠΘ) που δέχτηκαν να αποτελέσουν μέλη της τριμελούς επιτροπής.

Ιδιαίτερες ευχαριστίες θα ήθελα να εκφράσω στον Τεστέμπαση Στέφανο (Επίκουρο Καθηγητή ΠΔΜ), ο οποίος υπήρξε πολύτιμος καθοδηγητής καθ' όλη τη διάρκεια της έρευνάς μου, και στον Τσαγγάρη Βασίλειο, με τον οποίο συνεργαστήκαμε για την ολοκλήρωση του πειράματος. Η συνεργασία τους, η υπομονή τους και οι γνώσεις που μοιραστήκαμε ήταν καθοριστικές για την επιτυχή ολοκλήρωση των πειραμάτων και τη συνολική πρόοδο της εργασίας μου. Όπως φυσικά και η συμβολή όλων των παιδιών στο εργαστήριο.

Ιδιαίτερες ευχαριστίες στους φίλους και συμφοιτητές μου για τις αμέτρητες ώρες συζήτησης, υποστήριξης και κατανόησης στις πιο απαιτητικές στιγμές.

Τέλος, ευχαριστώ την οικογένειά μου για την αγάπη, την ενθάρρυνση και τη στήριξή τους σε κάθε μου βήμα. Χωρίς αυτούς, τίποτα δεν θα ήταν το ίδιο.

Η παρούσα εργασία είναι αφιερωμένη σε όλους εσάς. Σας ευχαριστώ.

Περιεχόμενα

Περίληψη	6
Abstract	7
1. Εισαγωγή	8
1.1 Εσπεριδοειδή – Βοτανικά χαρακτηριστικά.....	8
1.2 Σημασία της καλλιέργειας των εσπεριδοειδών	8
1.3 Προσυλλεκτικές και Μετασυλλεκτικές ασθένειες εσπεριδοειδών	9
1.4 Πράσινη σήψη	10
1.5 Συμπτωματολογία της πράσινης σήψης.....	10
1.6 Παθογόνο αίτιο & Βιολογία παθογόνου.....	11
1.7 Επιδημιολογία της πράσινης σήψης	13
1.8 Μηχανισμοί μόλυνσης του <i>P. digitatum</i>	14
1.9 Αντιμετώπιση του <i>P. digitatum</i>	15
1.9.1 Χημική καταπολέμηση	15
1.9.2 Βιολογική καταπολέμηση	16
1.9.3 Εναλλακτικοί τρόποι αντιμετώπισης	16
1.10 RNAi παρεμβολή.....	18
1.11 Τεχνικές του RNAi.....	19
1.11.1 HIGS (Host-Induced Gene Silencing).....	19
1.11.2 VIGS (Virus-Induced Gene Silencing)	19
1.11.3 SIGS (Spray-Induced Gene Silencing)	20
1.12 Μηχανισμοί Λειτουργίας του SIGS	22
1.13 Εφαρμογές του SIGS.....	23
1.14 Στόχος Εργασίας	25
2. Υλικά – Μέθοδοι.....	25
2.1 Παθογόνο και Τεχνητές μολύνσεις	25
2.2 Φυτικό υλικό	26
2.3 Απομόνωση DNA μύκητα	26
2.4 Επιλογή γονιδίων και σχεδιασμός εκκινητών	27
2.5 Ενίσχυση γονιδιακών περιοχών και <i>in vitro</i> σύνθεση dsRNA.....	28
2.6 <i>In vivo</i> αξιολόγηση της αποτελεσματικότητας εφαρμογών dsRNA έναντι του <i>P. digitatum</i> σε καρπούς πορτοκαλιάς.....	29
2.7 <i>In vivo</i> αξιολόγηση της αποτελεσματικότητας εφαρμογών dsRNA έναντι του <i>P. digitatum</i> σε καρπούς άλλων εσπεριδοειδών	30
2.8 Στατιστική ανάλυση και οπτικοποίηση αποτελεσμάτων.....	31

3. Αποτελέσματα.....	31
3.1 <i>In vivo</i> αξιολόγηση της αποτελεσματικότητας εφαρμογών dsRNA έναντι του <i>P. digitatum</i> σε καρπούς πορτοκαλιάς.....	31
3.2 <i>In vivo</i> αξιολόγηση της αποτελεσματικότητας εφαρμογών dsRNA έναντι του <i>P. digitatum</i> σε καρπούς άλλων εσπεριδοειδών	38
4. Συζήτηση	42
Βιβλιογραφία	46

Περίληψη

Ο μύκητας *Penicillium digitatum* (*Pd*), θεωρείται ως ένα από τα σημαντικότερα μετασυλλεκτικά παθογόνα των εσπεριδοειδών, παγκοσμίως. Σκοπός της παρούσας έρευνας ήταν η ανάπτυξη ενός νέου βιομυκητοκτόνου εξωγενούς εφαρμογής dsRNA (Spray Induced Gene Silencing, SIGS) για την αντιμετώπιση των μετασυλλεκτικών προσβολών από τον μύκητα *Pd* σε καρπούς πορτοκαλιάς. Ειδικότερα, ελέγχθηκε η αποτελεσματικότητα καταπολέμησης του παθογόνου με την εφαρμογή dsRNA μορίων που στοχεύουν στη σίγηση των γονιδίων *Argonaute* (*AGO1*, *AGO2*), *Dicer* (*DCL1*, *DCL2*) και *ATPase*. Ο έλεγχος της αποτελεσματικότητας των εφαρμογών με dsRNA πραγματοποιήθηκε σε τεχνητά μολυσμένους καρπούς πορτοκαλιάς με το παθογόνο *Pd*, στους οποίους είχε προηγηθεί η εφαρμογή των dsRNA στο σημείο της πληγής. Η αξιολόγηση της αποτελεσματικότητας έγινε με τη μέτρηση της έντασης και του ποσοστού εμφάνισης της ασθένειας των μολυσμένων καρπών, πέντε (5) και δέκα (10) ημέρες μετά τη μόλυνση. Από το σύνολο των dsRNA που ελέγχθηκαν, η σίγηση των γονιδίων *AGO1*, *AGO2* και *DCL1* μείωσε σημαντικά ($p < 0.05$) τόσο την ένταση όσο και τη συχνότητα εμφάνισης της ασθένειας συγκριτικά με τον μάρτυρα. Η καινοτομία της παρούσας έρευνας έγκειται στη χρήση της τεχνολογίας SIGS για την ανάπτυξη ενός φιλικού προς το περιβάλλον βιομυκητοκτόνου, προσφέροντας μια νέα προσέγγιση για την αντιμετώπιση των μετασυλλεκτικών ασθενειών των εσπεριδοειδών.

Abstract

Penicillium digitatum (*Pd*) is considered as one of the most significant post-harvest pathogens of citrus fruits worldwide. The aim of this study was to develop a new biofungicide using exogenous application (Spray Induced Gene Silencing, SIGS) to address post-harvest infections caused by the fungus *Pd* in orange fruits. Specifically, the effectiveness of pathogen control was tested using exogenous applications of dsRNA targeting the silencing of the genes *Argonaute* (*AGO1*, *AGO2*), *Dicer* (*DCL1*, *DCL2*), and *ATPase*. The effectiveness of dsRNA applications was tested on artificially inoculated orange fruits with the pathogen *Pd*, where the dsRNA was applied at the wound site prior to the infection. The evaluation of effectiveness was conducted by measuring the severity and incidence of the disease in the infected fruits, seven (7) days post-inoculation. Among the dsRNAs tested, the silencing of the *AGO1*, *AGO2*, and *DCL1* genes, significantly reduced ($p < 0.05$) the severity and incidence of disease compared to the control treatment. The innovation of this study lies in the use of SIGS technology to develop an environmentally friendly new biofungicide, offering a new approach to addressing post-harvest diseases of citrus fruits.

1. Εισαγωγή

1.1 Εσπεριδοειδή – Βοτανικά χαρακτηριστικά

Τα εσπεριδοειδή (γένος *Citrus*) ανήκουν στην οικογένεια των *Aurantiaceae* ή *Hesperideae*. Μερικά από τα είδη των εσπεριδοειδών που καλλιεργούνται στη χώρα μας είναι η πορτοκαλιά, η μανταρινιά, η νεραντζιά, η λεμονιά, η κιτριά και το βοτρυόκαρπο. Τα πρώτα τρία (3) ανήκουν στην κατηγορία των εσπεριδοειδών με πορτοκαλί χρώμα καρπού και αποχωρισμένου φλοιού από τη σάρκα, ενώ τα υπόλοιπα ανήκουν στην κατηγορία με κίτρινο χρώμα καρπού και μη-αποσπώμενο φλοιό από τη σάρκα [1]. Είναι αείφυλλα είδη (πέρα από λίγες εξαιρέσεις φυλλοβόλων, πχ *P. trifoliata*), με υπόγυνα μεμονωμένα άνθη και στρογγυλούς καρπούς (εσπερίδια). Οι καρποί φέρουν φλοιό που αποτελείται από έγχρωμο δερματώδες (flavedo) και λευκό εσωτερικό στρώμα από κυτταρίνη (albedo). Στο εσωτερικό υπάρχουν οι χυμοφόροι ασκοί και τα σπέρματα (υπάρχουν και άσπερμα είδη) [1]. Κάθε καρπός διακρίνεται από το χαρακτηριστικό χρώμα του, που οφείλεται στα καροτενοειδή, και από το άρωμά του, που οφείλεται στα φλαβονοειδή, λιμονοειδή και αιθέρια έλαια του φλοιού [1].

Πέρα από το γεγονός ότι αποτελούν εξαιρετικές πηγές βιταμίνης C και κιτρικού οξέος [1], οι καρποί είναι άφθονοι σε μακροθρεπτικά (σάκχαρα και ίνες) και μικροθρεπτικά (θειαμίνη, βιταμίνη B6, ριβοφλαβίνη, κάλιο, ασβέστιο κ.α.) συστατικά, ενώ είναι χαμηλά σε ενεργειακή πυκνότητα και σχεδόν εντελώς καθαρά από νάτριο και χοληστερόλη [2].

1.2 Σημασία της καλλιέργειας των εσπεριδοειδών

Τα εσπεριδοειδή αποτελούν μία από τις σημαντικότερες καλλιέργειες οπωροφόρων δέντρων παγκοσμίως, με εμπορική παρουσία σε περισσότερες από 135 χώρες, σε ποικίλες αγροκλιματικές συνθήκες, ενώ η καλλιέργεια των εσπεριδοειδών αποτελεί έναν από τους βασικούς τομείς της ελληνικής γεωργίας, με την Ελλάδα να κατατάσσεται στην τρίτη θέση στην Ευρώπη όσον αφορά την παραγωγή, μετά από την Ισπανία και την Ιταλία [48]. Η πολυμορφία της χρήσης τους, σε συνδυασμό με τη διαρκώς αυξανόμενη ζήτηση, καθιστούν τα εσπεριδοειδή κυρίαρχη δύναμη στον παγκόσμιο αγροδιατροφικό τομέα, με συνολική παραγωγή που εκτιμάται σε περίπου 102,64 εκατομμύρια τόνους, τοποθετώντας τα πιθανότατα στην πρώτη θέση μεταξύ των καρποφόρων καλλιεργειών.

Το μεγαλύτερο ποσοστό εσόδων για τις χώρες που παράγουν εσπεριδοειδή προέρχεται από το εμπόριο νωπών καρπών, ενώ ακολουθούν τα μεταποιημένα προϊόντα και τα υποπροϊόντα τους. Η επιτυχία στις εξαγωγές νωπών εσπεριδοειδών εξαρτάται σε μεγάλο βαθμό από την ποιότητα του παραγόμενου προϊόντος, την τήρηση των φυτοϋγειονομικών απαιτήσεων που ορίζονται τόσο από τις χώρες εισαγωγής όσο και από τον Παγκόσμιο Οργανισμό Εμπορίου (WTO), καθώς και από τη σωστή μετασυλλεκτική διαχείριση, με σκοπό τη μείωση απωλειών έως τον τελικό τους δέκτη και πιο συγκεκριμένα τον καταναλωτή.[4].

1.3 Προσυλλεκτικές και Μετασυλλεκτικές ασθένειες εσπεριδοειδών

Λόγω της εκτεταμένης καλλιέργειάς τους, τα εσπεριδοειδή παρουσιάζουν αυξημένη ευαισθησία σε προσβολές από πλήθος σοβαρών ασθενειών, οι οποίες μπορούν να προκαλέσουν σοβαρές ποσοτικές και ποιοτικές απώλειες [3,4,8]. Στην καλλιέργεια των εσπεριδοειδών έχουν αναφερθεί περισσότερες από 100 ασθένειες, που προκαλούνται κυρίως από μύκητες, ιούς και, σε μικρότερο βαθμό, βακτήρια [8]. Τα παθογόνα αυτά διακρίνονται σε δύο βασικές κατηγορίες, ανάλογα με το χρονικό στάδιο εμφάνισης της μόλυνσης και των συμπτωμάτων: τα προσυλλεκτικά και τα μετασυλλεκτικά παθογόνα.

Ιδιαίτερη σημασία αποδίδεται στις μετασυλλεκτικές προσβολές των καρπών, οι οποίες θεωρούνται οι πλέον καταστροφικές, καθώς συντελούν σε σοβαρές απώλειες κατά την αποθήκευση, τη μεταφορά και την εμπορία του προϊόντος. Ειδικότερα, έχουν καταγραφεί περισσότερες από 20 μετασυλλεκτικές ασθένειες σε καρπούς εσπεριδοειδών, κυρίως μυκητολογικής αιτιολογίας, που σχετίζονται με σημαντικές οικονομικές και ποσοτικές απώλειες [48]. Από αυτές, οι σημαντικότερες είναι η πράσινη σήψη, η κυανή σήψη, η όξινη σήψη και η καστανή σήψη, που προκαλούνται αντίστοιχα από τους μύκητες *Penicillium digitatum*, *P. italicum*, *Geotrichum citri-aurantii* και από ωομύκητες του γένους *Phytophthora* [42].

Μεταξύ των μετασυλλεκτικών ασθενειών, οι σήψεις που προκαλούνται από είδη του γένους *Penicillium* θεωρούνται οι πλέον καταστροφικές. Ενδεικτικά, ο παθογόνος μύκητας *P. digitatum* ευθύνεται για περίπου το 90% των μετασυλλεκτικών απωλειών σε καρπούς εσπεριδοειδών [42].

Οι προσβολές από τα παραπάνω παθογόνα είναι σπάνιες στο προσυλλεκτικό στάδιο, ωστόσο η παρουσία τους είναι ιδιαίτερα συχνή στα στάδια μετά τη συγκομιδή, όπως στα συσκευαστήρια, στους ψυκτικούς θαλάμους, κατά τη μεταφορά, καθώς και στα σημεία πώλησης των προϊόντων.

1.4 Πράσινη σήψη

Η πράσινη σήψη (Green Mold) αποτελεί τη σημαντικότερη μετασυλλεκτική ασθένεια των εσπεριδοειδών και προκαλείται από τον μύκητα *Penicillium digitatum* [6,8]. Το παθογόνο προσβάλλει όλους τους καρπούς των εσπεριδοειδών, με ιδιαίτερη έμφαση σε πορτοκάλια, μανταρίνια και λεμόνια, όπου προκαλεί τις μεγαλύτερες απώλειες. Συγκεκριμένα, η πράσινη σήψη ευθύνεται για το 30–90% των συνολικών απωλειών κατά τη φάση αποθήκευσης και διανομής των καρπών [60], επιφέροντας σοβαρές οικονομικές συνέπειες σε παραγωγικές χώρες όπως η Ελλάδα και η Ισπανία, καθώς οι προσβεβλημένοι καρποί δεν πληρούν τις απαιτήσεις εξαγωγής των διεθνών αγορών [61]. Παράλληλα, η παρουσία της ασθένειας έχει συμβάλει σημαντικά στην αύξηση του κόστους της μετασυλλεκτικής συντήρησης των καρπών, λόγω της ανάγκης λήψης εντατικών μέτρων αντιμετώπισης, όπως εφαρμογές μυκητοκτόνων σκευασμάτων, χρήση ειδικών συνθηκών αποθήκευσης και άλλων εφαρμογών [62].

1.5 Συμπτωματολογία της πράσινης σήψης

Τα συμπτώματα που εμφανίζουν οι καρποί μολυσμένοι με την πράσινη σήψη είναι γνωστά σε όλους, χάρη στα τόσο υψηλά ποσοστά εμφάνισής της στα εσπεριδοειδή. Κατά τα αρχικά στάδια της μόλυνσης, στην περιοχή του καρπού από την οποία έγινε η διείσδυση του παθογόνου εμφανίζεται μια μαλακή, υδατώδης, ελαφρά βυθισμένη κηλίδα (0,5-1cm διάμετρος) [5,9]. Καθώς εξελίσσεται, παρατηρείται ανάπτυξη λευκού μυκηλίου, και ακολουθεί ο σχηματισμός των πράσινων σπορίων (Εικόνα 1.). Μέσα σε λίγες μέρες μπορεί να καλυφθεί ολόκληρο το φρούτο με αυτά τα σπόρια [6,8]. Σε περιβάλλον υψηλής σχετικής υγρασίας, ο καρπός μετατρέπεται σε μια μαλακή μάζα και αποσυντίθεται εντελώς, με την επέμβαση και άλλων δευτερογενών μυκήτων ή βακτηρίων. Σε συνθήκες χαμηλής υγρασίας όμως, ο καρπός αφυδατώνεται, συρρικνώνεται και «μουμιοποιείται» [5,7]. Οι μολυσμένοι καρποί φέρουν δυσάρεστη πικρή γεύση και οσμή μούχλας.



Εικόνα 1: Πορτοκάλι μολυσμένο από *P. digitatum*, εμφανίζει πράσινη σήψη [6]

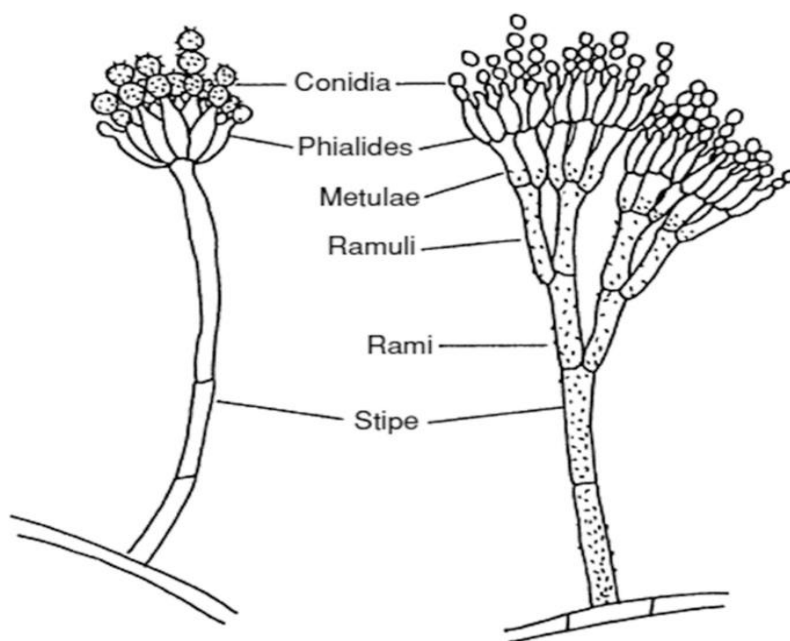
1.6 Παθογόνο αίτιο & Βιολογία παθογόνου

Το γένος *Penicillium* είναι από τα μεγαλύτερα και πιο ποικιλόμορφα γένη μυκήτων, με πάνω από 300 είδη διανεμημένα στη Γη σε ένα ευρύ φάσμα οικοτόπων, όπως στα εδάφη, στον αέρα, σε διατροφικά προϊόντα και φυσικά, στα φυτά [7]. Τα παθογόνα του γένους *Penicillium* είναι τα πλέον συνήθη και καταστρεπτικά μετασυλλεκτικά παθογόνα των εσπεριδοειδών [5], με ένα από τα πιο επικίνδυνα είδη τους να είναι το *Penicillium digitatum*, ένα παθογόνο αδυναμίας το οποίο, όπως αναφέρθηκε προηγουμένως, αποτελεί το παθογόνο αίτιο της ασθένειας της Πράσινης σήψης των εσπεριδοειδών [7].

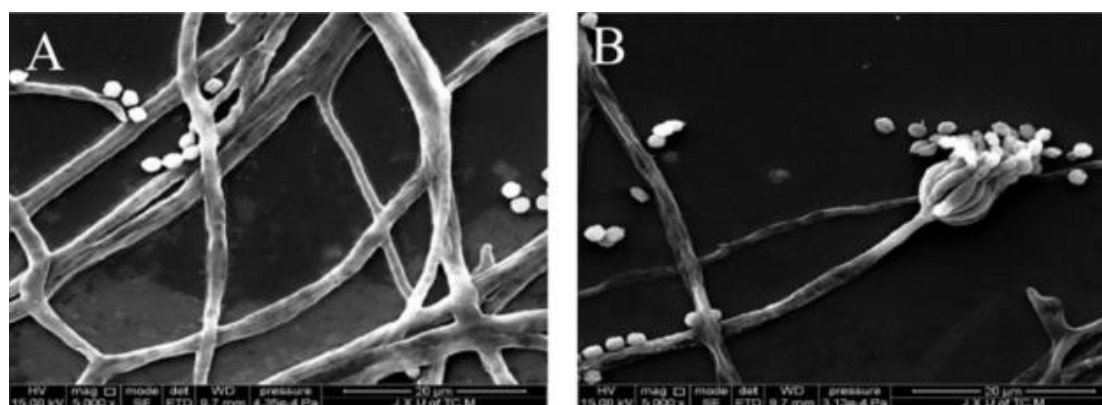
Όσον αφορά τη μορφολογία του μύκητα [41,43], παρατηρούνται χαρακτηριστικοί κονιδιοφόροι με διακλαδιζόμενη δομή, στις απολήξεις των οποίων σχηματίζονται φιαλίδια. Από τα φιαλίδια παράγονται μονοκύτταρα, σφαιρικά, υαλώδη κονίδια, τα οποία διατάσσονται σε αλυσίδες. Οι κονιδιοφόροι έχουν μήκος 61,3–155,3 μm και πλάτος 4,9–7,0 μm, ενώ το κυτταρικό τους τοίχωμα είναι λείο, χωρίς αυλακώσεις ή τραχείες επιφάνειες. Οι κονιδιοφόροι σχηματίζονται κατά πυκνές συσσωματώσεις στους προσβεβλημένους καρπούς και, σε συνδυασμό με τα πολυάριθμα κονίδια, προσδίδουν το χαρακτηριστικό πράσινο χρώμα της σήψης.

Τα κονίδια αναπτύσσονται μέσω διαδοχικής εκβλάστησης, έχουν λεία επιφάνεια, μήκος 6,1–11,9 μm και πλάτος 3,2–8,0 μm, και οργανώνονται σε αλυσίδες στις άκρες των φιαλιδίων που εκβλαστάνουν (Εικόνα 2). Ως ξηροσπόρια, τα κονίδια ελευθερώνονται είτε μέσω του αέρα είτε με μικρές μετακινήσεις των μολυσμένων καρπών, σχηματίζοντας πυκνό νέφος πάνω από τους αποσυντιθέμενους ιστούς. Στη συνέχεια, μεταφέρονται και αιωρούνται στην ατμόσφαιρα των χώρων συσκευασίας και

αποθήκευσης, αποτελώντας τη βασική πηγή δευτερογενών μολυσμάτων στα συσκευαστήρια.



Εικόνα 2: Γραφική απεικόνιση της μορφολογίας των κονιδιοφόρων του μύκητα *Penicillium digitatum* [44]



Εικόνα 3: Ηλεκτρονικές μικροφωτογραφίες του παθογόνου μύκητα *Penicillium digitatum*, αίτιου της Πράσινης Σήψης των εσπεριδοειδών (Α) δίκτυο μυκηλιακών υφών. (Β) κονιδιοφόροι με τα κονίδια του μύκητα. [41]

Το *P. digitatum* (Pd) ήταν το πρώτο παθογόνο είδος του γένους *Penicillium* για το οποίο έγινε αλληλούχηση ολόκληρου του γονιδιώματός του [9]. Αυτό αποτελείται από 6 χρωμοσώματα με συνολικό μέγεθος 26,3 εκατομμύρια βάσεις (bp) και 9.003 γονίδια [7]. Εντοπίστηκαν επίσης 39 συμπλέγματα βιοσύνθεσης δευτεροταγών μεταβολιτών (SM γονιδιακά συσσωματώματα), τα οποία περιλαμβάνουν: 11 *NRPS* (μη-ριβοσωμική πεπτιδική συνθετάση), 9 *PKS* (πολυκετιδική συνθάση), 5 συμπλέγματα τερπενίων και διάφορα συνδυασμένα συμπλέγματα των προηγούμενων [7,9]. Σε αυτά εμπλέκονται

και ένζυμα, όπως πολυγαλακτουρονάσες, λυάσες και εστεράσες (*CWDEs*= ένζυμα αποδόμησης του κυτταρικού τοιχώματος) [10], και συνδυαστικά λειτουργούν αποσυνθετικά, διασπώντας το κυτταρικό τοίχωμα των ξενιστών και διευκολύνοντας την μόλυνση και είσοδο του παθογόνου στο εσωτερικό [7,9].

1.7 Επιδημιολογία της πράσινης σήψης

Το *P. digitatum* θεωρείται ίσως το βασικό μετασυλλεκτικό παθογόνο των εσπεριδοειδών, και με απώλειες έως και 90% των φρούτων που προσβάλλει, η αντιμετώπιση του είναι άκρως σημαντική. Ένα αρχικό βήμα στην ανάπτυξη μεθόδων αντιμετώπισης του *P. digitatum* όμως, είναι η κατανόηση των συνθηκών μόλυνσης των καρπών, εξάπλωσής του και επιβίωσης στο εσωτερικό τους και σε ολόκληρες καλλιέργειες, ειδικά μετά τη συγκομιδή.

Ο *P. digitatum* είναι ένα παθογόνο αδυναμίας, το οποίο σημαίνει ότι είναι ικανός να μολύνει τους καρπούς μόνο μέσω τραυμάτων ή πληγών στο φλοιό τους. Γι' αυτό και σπανίως παρατηρούνται προσβεβλημένοι καρποί στα δέντρα. Γενικά είναι πιο σύννηθες να βρούμε τα συμπτώματα της ασθένειας σε καρπούς πληγωμένους από άλλη αιτία [5], όπως απρόσεκτος χειρισμός κατά τη συγκομιδή, κατά τις μεταφορές, την αποθήκευση, καθώς και περιβαλλοντικά αίτια, όπως άνεμο, έντονη βροχή και έντομα [9]. Η σοβαρότητα της ασθένειας βασίζεται έντονα στις συνθήκες υγρασίας και θερμοκρασίας στο γύρω της περιβάλλον. Σε ξηρές και ψυχρές συνθήκες η σήψη είναι περιορισμένη, ενώ σε βροχερό και υγρό καιρό (υγρασία >90%) τα συμπτώματα είναι πολύ έντονα [5]. Η θερμοκρασία που ευνοεί περισσότερο την ανάπτυξη των παθογόνων είναι περίπου στους 22-24°C (σε χαμηλότερες θερμοκρασίες η ανάπτυξη επιβραδύνεται, ενώ στους 37°C δεν αναπτύσσεται καθόλου [43]). Σε τέτοιες περιπτώσεις, οι σήψεις είναι ικανές να προκαλέσουν μέχρι και 90% απώλεια φρούτων, σε πολύ υψηλές ταχύτητες [5,8]. Ο βασικότερος όμως παράγοντας που επηρεάζει την εμφάνιση και τη σοβαρότητα της σήψης είναι η ύπαρξη πληγών στην επιφάνεια του καρπού (έχουν συμβεί κατά τη συλλογή και κατά την αποθήκευση) [5]. Από εκεί γίνεται η διείσδυση του παθογόνου στον καρπό, και απαραίτητο είναι να υπάρχουν διαθέσιμα θρεπτικά συστατικά για να διεγερθεί η βλάστηση των σπορίων [6].

1.8 Μηχανισμοί μόλυνσης του *P. digitatum*

Η επιτυχής αλληλούχηση του γονιδιώματος του *Penicillium digitatum* επέτρεψε την εις βάθος μελέτη πλήθους γονιδίων που εμπλέκονται στην αλληλεπίδραση του παθογόνου με τους ξενιστές του [9]. Η κατανόηση των μηχανισμών μόλυνσης αποτελεί θεμέλιο για την ανάπτυξη αποτελεσματικών στρατηγικών καταπολέμησης των φυτοπαθογόνων μυκήτων και την εφαρμογή ολοκληρωμένων μεθόδων διαχείρισής τους, ζητήματα στα οποία θα γίνει εκτενέστερη αναφορά σε επόμενο κεφάλαιο. Στο παρόν σημείο, παρουσιάζονται βασικές τεχνικές και μοριακοί μηχανισμοί που χρησιμοποιεί το *P. digitatum* για να διεισδύσει στον φυτικό ξενιστή και να εγκατασταθεί και πολλαπλασιαστεί εντός των φυτικών ιστών.

Όσον αφορά την είσοδο του στον ξενιστή, το *P. digitatum* προσβάλλει ώριμα εσπεριδοειδή μέσω πληγών στο φλοιό τους, οι οποίες έχουν δημιουργηθεί από περιβαλλοντικούς και μηχανικούς παράγοντες. Σε αυτές τις πληγές ευνοείται η βλάστηση των σπορίων του μύκητα [8], αξιοποιώντας θρεπτικά συστατικά και πτητικές ουσίες (πχ. λεμονένιο) [9] που υπάρχουν φυσικά σε εκείνο το σημείο. Σε επόμενο στάδιο, αφού το παθογόνο εισέλθει στα κύτταρα του περικαρπίου του καρπού, συνεχίζει αναπτυσσόμενο στα κύτταρα του μεσοκαρπίου, μολύνοντας παράλληλα και όλα τα παρακείμενα σε αυτά [8]. Ακολουθεί, σε μεταγενέστερη φάση, η εμφάνιση των λευκών μυκηλίων και μερικών νέο-δημιουργούμενων κονιδίων με γκριζωπό χρώμα, τα οποία θεωρούνται τα τυπικά συμπτώματα της πράσινης σήψης [5,6,8]. Την είσοδο του μύκητα στο εσωτερικό των κυττάρων του ξενιστή κάνει δυνατή η ύπαρξη των ενζύμων αποδόμησης του κυτταρικού τοιχώματος (*CWDEs*), τα οποία πολυμερίζουν τις δομές του κυτταρικού τοιχώματος όπως η κυτταρίνη και η πηκτίνη. Μάλιστα θεωρείται πως η σύνθεση των *CWDEs* μεταβάλλεται κατά τη διαδικασία της μόλυνσης [9].

Όταν λαμβάνει χώρα η αρχική αλληλεπίδραση του παθογόνου με τον καρπό, αυτός παράγει υπεροξείδιο του υδρογόνου (H_2O_2), ως μηχανισμό άμυνας του, αξιοποιώντας τις ισχυρές οξειδωτικές του ιδιότητες κατά των κυτταρικών τοιχωμάτων και των πρωτεϊνών του παθογόνου [9]. Ως απάντηση, το *P. digitatum* εκκρίνει καταλάσες (*CATs*), οι οποίες διασπούν το H_2O_2 σε νερό και οξυγόνο, με αποτέλεσμα να εξουδετερώνει τις τοξικές του δράσεις [9]. Έτσι, το παθογόνο καταφέρνει να αποφεύγει τους αμυντικούς μηχανισμούς που προστατεύουν τον καρπό. Οι προαναφερθέντες δευτερογενείς μεταβολίτες χρησιμοποιούνται επίσης σε αυτή τη φάση.

Φυσιολογικά, ο φλοιός ενός υγιούς καρπού εσπεριδοειδούς έχει pH 4,77. Το *P. digitatum* ρυθμίζει το pH στη μολυσμένη περιοχή, μειώνοντάς το στα 3,12, μέσω της έκκρισης οργανικών οξέων, όπως κιτρικό ή οξαλικό οξύ [9]. Έτσι ενεργοποιούνται ένζυμα διάσπασης (πολυγαλακτουρονάσες, πηκτινολυάσες,, τα οποία αποδομούν την πηκτίνη, την κυτταρίνη και την ημικυτταρίνη του κυτταρικού τοιχώματος, διευκολύνοντας την είσοδο του μύκητα. Αυτά τα ένζυμα ρυθμίζονται από γονίδια όπως το *PdSNF1* και το *PdprcC*, λόγω της υψηλής δραστηριότητάς τους [7,9].

1.9 Αντιμετώπιση του *P. digitatum*

Η πράσινη σήψη που προκαλεί το *P. digitatum* είναι αίτιο τεράστιων οικονομικών απωλειών στον κόσμο και μπορεί να υποβαθμίσει την ποιότητα των προϊόντων. Γι'αυτό είναι σημαντική η εύρεση και η ανάπτυξη μεθόδων και στρατηγικών αντιμετώπισης της ασθένειας [12]. Αυτοί μπορούν να είναι χημικοί ή βιολογικοί μηχανισμοί και περιλαμβάνουν διάφορες στρατηγικές που στοχεύουν είτε στη μείωση της παθογένειας του μύκητα είτε στην ευαισθητοποίησή του σε σκευάσματα που δρουν ενάντια του.

1.9.1 Χημική καταπολέμηση

Σε όλο τον κόσμο για τη χημική καταπολέμηση μετασυλλεκτικών παθογόνων, όπως το *P. digitatum*, εφαρμόζονται μυκητοκτόνα, είτε με εμβάπτιση των καρπών πριν την αποθήκευσή τους είτε με τον ψεκασμό τους πριν τη συγκομιδή. Στην Ελλάδα συγκεκριμένα, τα σκευάσματα που έχουν εγκριθεί από το Υπουργείο Αγροτικής Ανάπτυξης και Τροφίμων (ΥΠΑΑΤ) προς χρήση είναι τα imazalil και fludioxonil [52]. Ειδικότερα, το imazalil ανήκει στα τριαζολικά μυκητοκτόνα, και αναστέλλει τη δραστηριότητα του ενζύμου *CYP51*, υπεύθυνο για τη σύνθεση της εργοστερόλης. Μερικά εμπορικά σκευάσματα στα οποία βασικό συστατικό είναι το imazalil είναι το FRUITFOG-I και το CITROSOL 500 [52]. Παρατηρούνται περιπτώσεις που στελέχη του *P. digitatum* υπερεκφράζουν το ένζυμο, με αποτέλεσμα να αναπτύσσουν ανθεκτικότητα στο imazalil. Σε τέτοιες περιπτώσεις χρησιμοποιείται το pyrimethanil, το οποίο ανήκει στην χημική ομάδα των ανιλινοπυριμιδινών, και παρεμβαίνει στην βιοσύνθεση της μεθειονίνης του μύκητα. Το pyrimethanil συναντάται σε σκευάσματα όπως το PENBOTEC 400 SC και το ActiSeal PYR [52]. Ένα πιο καινούριο μυκητοκτόνο μειωμένου κινδύνου προς τον άνθρωπο είναι το fludioxonil. Αυτό ανήκει στην ομάδα των φαινυλοπυρόλιων και διαταράσσει την ρύθμιση της βιοσύνθεσης της

γλυκερόλης και του ωσμωτικού δυναμικού του του παθογόνου [53]. Το fludioxonil αποτελεί συστατικό στο Scholar 230SC [52].

1.9.2 Βιολογική καταπολέμηση

Πέρα από τη χημική καταπολέμηση, έχουν γίνει και προσπάθειες ανάπτυξης βιολογικών σκευασμάτων για την αντιμετώπιση του *P. digitatum*, οι οποίες βασίζονται στις αλληλεπιδράσεις κάποιων μικροοργανισμών με το παθογόνο προς αντιμετώπιση. Ένα τέτοιο παράδειγμα είναι μια έρευνα που εφαρμόστηκε σε ελληνικά εσπεριδοειδή και χρησιμοποίησε το ενδοφυτικό βακτήριο *Bacillus subtilis* L1-21 [54]. Το βακτήριο απομονώθηκε από υγιή πορτοκάλια, και τα αποτελέσματα που προέκυψαν παρουσίασαν σημαντικά μικρότερη ένταση ασθένειας, μέσω παραγωγής πλήθους αντιμυκητιακών ενώσεων (λιποπεπτίδια, surfactins, fengycins). Αυτές οι ενώσεις αναστέλλουν την ανάπτυξη του *P. digitatum*, με διάρρηξη της κυτταρικής μεμβράνης των κυττάρων του, παραμόρφωση των σπορίων και παρεμπόδιση της μυκηλιακής ανάπτυξης. Το παραπάνω υποστηρίζεται και από μια έρευνα του 2017 [55], στην οποία ελέγχθηκαν δέκα βακτηριακές απομονώσεις όσον αφορά τις ανταγωνιστικές ικανότητές τους κατά το *P. digitatum*. Οι ερευνητές κατέληξαν στο ότι τα βακτήρια *Bacillus subtilis* και *Agrobacterium radiobacter* εμφανίζουν τις περισσότερες προοπτικές για να χρησιμοποιηθούν ως σκευάσματα σε βιολογικό έλεγχο του *P. digitatum*, με μελλοντικές έρευνες να είναι απαραίτητες για επιβεβαίωση.

Ένα εγκεκριμένο προϊόν βιολογικής καταπολέμησης παθογόνων του γένους *Penicillium* είναι το NEXY, το οποίο περιέχει τον σακχαρομύκητα *Candida oleophila* strain O ως ενεργό συστατικό. Ο *C. oleophila* απομονώθηκε από μήλα, και λειτουργεί ως ανταγωνιστής του παθογόνου για να χρησιμοποιήσει πρώτος τα θρεπτικά συστατικά του καρπού στην περιοχή της μόλυνσης (πληγή), ενώ παράλληλα παράγει χαμηλά επίπεδα 1,3-γλουκανασών, οι οποίες είναι υδρολυτικά ένζυμα που αποδομούν τα κυτταρικά τοιχώματα φυτοπαθογόνων μυκήτων. Το σκεύασμα εφαρμόζεται στους καρπούς ανάμεσα στη συγκομιδή και την αποθήκευσή τους, και έχει αποδειχθεί ότι δεν προκαλεί παρενέργειες στην ανθρώπινη υγεία [63].

1.9.3 Εναλλακτικοί τρόποι αντιμετώπισης

Οι χημικές και βιολογικές μέθοδοι καταπολέμησης αποτελούν τα κυριότερα μέσα αντιμετώπισης του *Penicillium digitatum*. Ωστόσο, η αυξανόμενη ανησυχία των καταναλωτών σχετικά με την ασφάλεια των τροφίμων έχει εντείνει τις απαιτήσεις για

προϊόντα απαλλαγμένα από υπολείμματα μυκητοκτόνων. Ως εκ τούτου, καθίσταται επιτακτική η ανάγκη ανάπτυξης εναλλακτικών καινοτόμων προσεγγίσεων αντιμετώπισης του παθογόνου, οι οποίες να συνδυάζουν αποτελεσματικότητα με ασφάλεια, και να ευθυγραμμίζονται με τις αρχές της βιώσιμης γεωργίας και της προστασίας της δημόσιας υγείας.

Το όζον (O_3) είναι μια ισχυρή οξειδωτική ουσία, ικανή να οξειδώνει μακρομόρια, οδηγώντας σε κυτταρική βλάβη και θάνατο. Λόγω αυτής της φύσης, μπορεί να χρησιμοποιηθεί εναντίον πολλών μετασυστατικών ασθενειών. Ειδικά για τα είδη του γένους *Penicillium* (*digitatum* και *italicum*), το όζον έχει αποδειχτεί πως εμποδίζει τη βλάστηση και την παραγωγή μυκηλίων στους καρπούς που μολύνουν αυτοί οι μύκητες, μειώνοντας τη βιωσιμότητά τους κατά ~90% [56,57].

Η υπεριώδης ακτινοβολία (UV radiation) είναι επίσης αποτελεσματική στην προστασία καρπών από το *P. digitatum*. Δρα κατασταλτικά στην ανάπτυξη του μυκηλίου, διατηρεί την κυτταρική δομή του φλοιού των καρπών και παράλληλα με αυτά ενεργοποιεί τους αμυντικούς μηχανισμούς του καρπού (αυξημένη έκκριση φαινολικών και αντιοξειδωτικών ενώσεων). Αποτελεί μια μη-χημική λύση, η οποία μπορεί να χρησιμοποιηθεί ακόμα και στην απολύμανση των χώρων επεξεργασίας των καρπών [58].

Οι εδώδιμες μεμβράνες (edible films and coatings) είναι λεπτά στρώματα φυσικών υλικών που καλύπτουν τρόφιμα, με σκοπό τη βελτίωση της ποιότητάς τους. Αυτές δημιουργούν ένα φιλμ πάνω στο φλοιό των καρπών, το οποίο εμποδίζει την προσκόλληση και την είσοδο των σπορίων του μύκητα στο εσωτερικό τους. Μερικές επίσης περιέχουν αντιμυκητιακές ενώσεις και αντιοξειδωτικά τα οποία διαταράσσουν την ομαλή ανάπτυξη του μυκηλίου του *P. digitatum*, και ενεργοποιούν τους αμυντικούς μηχανισμούς του καρπού, όπως η UV [59].

Μια δραστική ουσία η οποία έχει λάβει έγκριση στην Ελλάδα είναι το έλαιο γαρύφαλλου (clove oil). Εφαρμόζεται αμέσως μετά τη συγκομιδή και πριν την αποθήκευσή των καρπών, με παρεμποδιστική δράση στην οξείδωση που προκαλεί ο παθογόνος μύκητας στους καρπούς που προσβάλλει. Χρησιμοποιείται ως ενεργό συστατικό στο προϊόν με εμπορικό όνομα XEDATHANE 20, συνδυαστικά με την pyrimethanil [64].

Όλες οι προαναφερθείσες μέθοδοι αποτελούν αναμφισβήτητα ισχυρά και αποτελεσματικά μέσα αντιμετώπισης φυτοπαθογόνων μυκήτων, όπως το *Penicillium digitatum*. Ωστόσο, τα τελευταία χρόνια έχει σημειωθεί σημαντική πρόοδος στην ανάπτυξη βιοτεχνολογικών εφαρμογών, οι οποίες προσφέρουν σειρά πλεονεκτημάτων, όπως μηδενική τοξικότητα, περιβαλλοντική συμβατότητα και δυνατότητα ενσωμάτωσης σε υπάρχουσες τεχνικές προστασίας.

Μία από τις πλέον υποσχόμενες τεχνολογίες αυτής της κατηγορίας είναι η ανάπτυξη βιομυκητοκτόνων βασισμένων στον μηχανισμό της παρεμβολής RNA (RNA interference – RNAi), ο οποίος αξιοποιείται για την ειδική καταστολή γονιδιακής έκφρασης σε παθογόνους μικροοργανισμούς.

1.10 RNAi παρεμβολή

Η RNAi παρεμβολή αποτελεί έναν φυσικό μηχανισμό στους ευκαρυωτικούς μικροοργανισμούς που καταστέλλει την έκφραση γονιδίων μέσω της δράσης μικρών μορίων RNA (sRNA), τα οποία συνήθως έχουν μήκος 20-30 νουκλεοτίδια [13], ή μέσω διπλών RNA μορίων (dsRNA). Αυτά τα RNA οδηγούν στην αποδόμηση του mRNA-στόχου, την αναστολή της μετάφρασης ή την καταστολή της μεταγραφής μέσω της ενσωμάτωσής τους στο RISC (RNA-induced silencing complex) [15]. Το RNAi προκύπτει όταν η διπλή έλικα RNA διασπάται σε μικρά μόρια RNA (siRNA) από το ένζυμο *Dicer*, και στη συνέχεια τα siRNA ενσωματώνονται στο RISC, όπου η πρωτεΐνη *Argonaute* τα χρησιμοποιεί για να καθοδηγήσει την αποδόμηση ή την αναστολή της μετάφρασης του mRNA-στόχου [14].

Το RNAi αποτελεί μια πολλά υποσχόμενη βιολογική στρατηγική για τον έλεγχο των φυτοπαθογόνων μυκήτων, όπως το *Penicillium digitatum*, με την καταστολή κρίσιμων γονιδίων που εμπλέκονται στην ανάπτυξη, την παθογένεια ή την επιβίωση του παθογόνου. Ένα παράδειγμα εφαρμογής του RNAi στο *Penicillium digitatum* [17]: το 2022-2023 διεξάχθηκε μια έρευνα στο Huazhong Agricultural University σε συνεργασία με το Georgetown University Medical Center, κατά την οποία η RNA παρεμβολή χρησιμοποιήθηκε για να εξεταστεί ο ρόλος της υπομονάδας H του *vacuolar ATPase (VmaH)* γονιδίου στην ανάπτυξη και την παθογένεια του μύκητα. Η σίγηση του γονιδίου *VmaH* έδειξε να έχει σημαντική επίδραση στον μύκητα που είχε προσβάλλει εσπεριδοειδή. Συγκεκριμένα, η σίγηση μείωσε την μυκηλιακή ανάπτυξη του παθογόνου στους καρπούς και περιόρισε σημαντικά την σπορογόνο ικανότητά του

(μείωση διαμέτρων των αποικιών του παθογόνου και βλάστησης σπορίων). Αυτό το πείραμα απέδειξε την αποτελεσματικότητα της RNAi σίγησης κατά του γονιδίου *VmaH* και κατά της παθογένειας και της ανάπτυξης του *P. digitatum*, καθιστώντας την υποψήφιο στόχο για νέες στρατηγικές ελέγχου των ασθενειών που προκαλούνται από αυτόν τον μύκητα.

1.11 Τεχνικές του RNAi

Το RNAi έχει διάφορες τεχνικές με τις οποίες μπορεί να εφαρμοστεί για την καταπολέμηση φυτοπαθογόνων μυκήτων αλλά και εντόμων στα φυτά. Μερικές από αυτές είναι η HIGS, η VIGS και η SIGS. Για την SIGS θα ακολουθήσει αναλυτική περιγραφή σε επόμενη ενότητα καθώς αποτέλεσε τη μέθοδο που χρησιμοποιήθηκε για την διεξαγωγή του πειράματος.

1.11.1 HIGS (Host-Induced Gene Silencing)

Κατά την εφαρμογή του HIGS, η RNA παρεμβολή επιτυγχάνεται μέσω γενετικά τροποποιημένων φυτών που εκφράζουν dsRNA ή siRNA εναντίον γονιδίων του παθογόνου, συνήθως υπεύθυνα για την ανάπτυξη και την προστασία του. Αυτή η τεχνική παρέχει μακροχρόνια προστασία στο φυτό, και έχει αποδειχθεί χρήσιμη σε συγκεκριμένες καλλιέργειες [31]. Ένα βασικό μειονέκτημα της είναι η ανάγκη γενετικά τροποποιημένων φυτών, το οποίο είναι ενάντια πολλών κανονισμών σε διάφορες χώρες.

Το HIGS μπορεί να εφαρμοστεί για τη σίγηση των γονιδίων *CYP51A/B/C* σε σχεδόν όλα τα είδη του γένους *Fusarium* σε *Arabidopsis* και σε κριθάρι, μειώνοντας δραστικά τη μόλυνση τους [24]. Μπορεί επίσης να χρησιμοποιηθεί για τον έλεγχο του μύκητα *Phakopsora pachyrhizi* που προσβάλλει τη σόγια, με χρήση BPMV-HIGS (bean pod mottle virus system) [30]. Επιπρόσθετα, αξιοσημείωτη είναι επίσης η χρήση της HIGS για την καταστολή της παραγωγής αφλατοξινών από τον *Aspergillus flavus* στο καλαμπόκι, προσφέροντας έναν αποτελεσματικό τρόπο μείωσης των μυκοτοξινών σε καλλιέργειες υψηλής διατροφικής σημασίας [33].

1.11.2 VIGS (Virus-Induced Gene Silencing)

Η τεχνική VIGS (Virus-Induced Gene Silencing) βασίζεται στη χρήση φυτικών ιών ως φορέων για τη μεταφορά και έκφραση δίκλωνου RNA (dsRNA) εντός παθογόνων μυκήτων ή φυτικών κυττάρων. Οι ιοί μεταφέρουν ειδικά σχεδιασμένα τμήματα του

γονιδίου-στόχου, τα οποία ενεργοποιούν τον μηχανισμό της παρεμβολής RNA (RNAi), οδηγώντας σε σίγηση της γονιδιακής έκφρασης.

Η VIGS εμφανίζει το πλεονέκτημα ότι, όταν εφαρμόζεται απευθείας σε μύκητες, δεν απαιτεί τη δημιουργία διαγονιδιακών οργανισμών, ενώ διατηρεί την ικανότητα μετάδοσης και πολλαπλασιασμού εντός των κυττάρων-ξενιστών [16]. Ωστόσο, η τεχνική παρουσιάζει ορισμένους περιορισμούς. Πρώτον, απαιτείται η χρήση ειδικού ιού-φορέα που να μπορεί να προσβάλει αποτελεσματικά τον στόχο οργανισμό. Δεύτερον, ενδέχεται να προκύψει αστάθεια στο ιικό γονιδίωμα λόγω των συνεχών γενετικών παρεμβολών.

Η VIGS έχει εφαρμοστεί επιτυχώς για την άμεση μόλυνση του μύκητα *Colletotrichum acutatum* με τροποποιημένο ιό TMV (Tobacco mosaic virus), επιτυγχάνοντας τόσο την έκφραση του γονιδίου GFP όσο και τη σίγηση γονιδίων-στόχων. Επιπλέον, έχει αξιοποιηθεί στη σίγηση γονιδίων παθογένειας του μύκητα *Puccinia triticina* σε φυτά σίτου, μέσω του συστήματος BSMV-VIGS (Barley stripe mosaic virus system) [16].

1.11.3 SIGS (Spray-Induced Gene Silencing)

Το Spray-Induced Gene Silencing (SIGS) είναι μια καινοτόμος στρατηγική προστασίας φυτών που περιλαμβάνει την εφαρμογή εξωγενών μορίων RNA, όπως dsRNA ή siRNA, απευθείας στην επιφάνεια των φυτών για την καταστολή των γονιδίων παθογόνων, μειώνοντας ή αποτρέποντας έτσι τις ασθένειες που προκαλούν. Η τεχνική SIGS βασίζεται στην αρχή του RNAi, το οποίο ανακαλύφθηκε στις αρχές της δεκαετίας του 1990, ως μηχανισμός ρύθμισης της έκφρασης γονιδίων σε φυτά και ζώα. Η ιδέα της χρήσης του RNAi για την καταπολέμηση φυτοπαθογόνων οργανισμών αναδύθηκε καθώς οι ερευνητές εξερευνούσαν το φαινόμενο του RNAi μεταξύ διαφορετικών βασιλείων, όπου μικρά RNA από ένα είδος (πχ. φυτά) μπορούν να ληφθούν από τους παθογόνους οργανισμούς (πχ. μύκητες), προκαλώντας την καταστολή συγκεκριμένων γονιδίων στους παθογόνους μικροοργανισμούς [18,21].

Το SIGS έχει αρκετά ενδιαφέροντα χαρακτηριστικά, υπεύθυνα για την καινοτομία αυτής της πολλά υποσχόμενης στρατηγικής. Το βασικότερο χαρακτηριστικό του SIGS είναι ότι δεν απαιτεί τη δημιουργία γενετικά τροποποιημένων οργανισμών (GMOs). Αντί για τη χρήση GMO φυτών για να εκφράσουν RNA που στοχεύει τα γονίδια του παθογόνου, το SIGS εφαρμόζει εξωγενή RNA (ds/siRNA) απευθείας στο φυτό, χωρίς

να τροποποιεί το DNA του φυτού. Αυτό καθιστά τα φυτά πιο αποδεκτά και συμβατά με τις απαιτήσεις σε πολλές χώρες, όπως αυτές με περιορισμούς στην χρήση GMOs.

Επίσης εμφανίζει εξαιρετική εξειδίκευση στην καταστολή των γονιδίων των παθογόνων, καθώς τα RNA που χρησιμοποιούνται είναι σχεδιασμένα για να στοχεύουν συγκεκριμένα γονίδια [21]. Για παράδειγμα, μπορεί να στοχεύσει γονίδια που είναι υπεύθυνα για την ανάπτυξη του παθογόνου ή για την παραγωγή τοξινών (όπως τα γονίδια για τα κυτοχρώματα P450 στους μύκητες). Αυτό το καθιστά ιδιαίτερα αποτελεσματικό στο να αποτρέπει ή να μειώνει τη σοβαρότητα των ασθενειών, χωρίς να επηρεάζει τους φυσιολογικούς μηχανισμούς του φυτού [19]. Αυτό επίσης αποτρέπει την ανάπτυξη οποιασδήποτε αντοχής των παθογόνων ενάντια στο RNA, χάρη στην άμεση, ειδική και αποδοτική καταστολή των παθογόνων γονιδίων. Πέρα από την έντονη εξειδίκευση που παρέχει, το SIGS μπορεί να προσαρμοστεί για να στοχεύει διάφορους παθογόνους οργανισμούς, όπως μύκητες, ωομύκητες και βακτήρια, καθιστώντας το εξαιρετικά ευέλικτο. Μπορεί να χρησιμοποιηθεί για την καταπολέμηση πολλών διαφορετικών τύπων ασθενειών σε ένα ευρύ φάσμα καλλιεργειών. Αυτό σημαίνει ότι μπορεί να εφαρμοστεί σε μια μεγάλη ποικιλία γεωργικών περιβαλλόντων και να προσφέρει προστασία από ποικίλες απειλές προς τη γεωργία [20,21].

Το SIGS επίσης θεωρείται φιλικό προς το περιβάλλον επειδή χρησιμοποιεί RNA για να καταστείλει τα γονίδια των παθογόνων δίχως να αφήνει τοξικά κατάλοιπα στο περιβάλλον, σε αντίθεση με τα παραδοσιακά χημικά φυτοφάρμακα. Το RNA, όντας ένα φυσικό μόριο που υπάρχει σε όλους τους οργανισμούς, δεν προκαλεί τη συσσώρευση τοξικών ουσιών στο έδαφος ή στο νερό, μειώνοντας έτσι τη ρύπανση και τους κινδύνους για την ανθρώπινη υγεία και τα οικοσυστήματα [19]. Αυτά τα RNA δεν περιορίζονται μόνο στην περιοχή που εφαρμόζονται στο φυτό. Έχουν την ικανότητα να μεταφέρονται μέσα στο φυτό, επιτυγχάνοντας συστημική προστασία. Αυτό σημαίνει πως οι πληροφορίες που μεταφέρονται από τα RNA μπορούν να φτάσουν σε μέρη του φυτού που δεν έχουν ψεκαστεί άμεσα, χρησιμοποιώντας το αγγειακό σύστημα του φυτού στο ξύλο και στον φλοιό. Αυτό επιτρέπει την προστασία ολόκληρου του φυτού [19,21].

1.12 Μηχανισμοί Λειτουργίας του SIGS

Οι μηχανισμοί δράσης της τεχνολογίας SIGS περιλαμβάνουν διαδοχικά στάδια και εξαρτώνται σε μεγάλο βαθμό από την αποτελεσματικότητα απορρόφησης και ενδοκυτταρικής επεξεργασίας των εξωγενώς εφαρμοζόμενων μορίων dsRNA ή siRNA από τον παθογόνο οργανισμό. Δεδομένου ότι η παρούσα εργασία επικεντρώνεται στη μελέτη της αλληλεπίδρασης μεταξύ φυτικών καρπών (ως ξενιστών) και μυκήτων (ως φυτοπαθογόνων), στη συνέχεια παρουσιάζονται οι βασικοί μηχανισμοί μέσω των οποίων το SIGS λειτουργεί ειδικά σε αυτό το βιολογικό σύστημα.

Κατά το αρχικό στάδιο της διαδικασίας, δηλαδή κατά την απορρόφηση, το dsRNA εφαρμόζεται στην επιφάνεια του φυτού και εισχωρεί στο εσωτερικό του μέσω διάφορων οδών, όπως τα στομάτια, τα τριχώματα, τα κυτταρικά τοιχώματα, είτε στα φύλλα είτε στις ρίζες [26]. Οι μελέτες δείχνουν ότι το dsRNA μπορεί να περάσει και στους αγγειακούς ιστούς (ξύλο και φλοιό) του φυτού. [21,22]. Να σημειωθεί πως συχνά χρησιμοποιούνται νανοσωματίδια ή φορείς, με σκοπό την προστασία των dsRNA από την αποδόμηση τους, και την αποτελεσματική απελευθέρωσή τους [26].

Μόλις ολοκληρωθεί η απορρόφηση του δίκλωνου RNA (dsRNA) από το φυτό, το μόριο μπορεί να μετακινηθεί μέσω του αγγειακού συστήματος και να φτάσει σε φυτικούς ιστούς που δεν είχαν άμεση επαφή με την αρχική εφαρμογή. Η διαδικασία αυτή είναι καθοριστικής σημασίας για την επίτευξη διασυστηματικής προστασίας, καθώς επιτρέπει τη διασπορά του RNA σε ολόκληρο το φυτό [19,21,22]. Η διασυστηματική μεταφορά διευκολύνεται από τα πλασμοδέσματα, μικροσκοπικά κανάλια που διαπερνούν τα κυτταρικά τοιχώματα και συνδέουν γειτονικά φυτικά κύτταρα, επιτρέποντας τη μεταφορά μακρομορίων όπως το dsRNA. Επιπλέον, για την αποτελεσματική απορρόφηση του RNA, χρησιμοποιούνται συχνά τεχνικές όπως ο ψεκασμός υψηλής πίεσης ή η εφαρμογή μέσω του μίσχου, οι οποίες αυξάνουν τη διεισδυτικότητα και βελτιώνουν τη διαθεσιμότητα του RNA στους φυτικούς ιστούς [26]. Όταν το dsRNA φτάσει στον παθογόνο μικροοργανισμό —ο οποίος διαθέτει λειτουργικό μηχανισμό RNAi— υφίσταται ενδοκυτταρική επεξεργασία από πρωτεΐνες τύπου Dicer (ή Dicer-like, DCL), με αποτέλεσμα τη δημιουργία μικρών παρεμβλλόμενων RNA (siRNAs). Τα siRNAs αυτά ενσωματώνονται σε πρωτεΐνες του συμπλέγματος Argonaute (AGO) [26], οι οποίες κατευθύνουν τη διάσπαση των αγγελιοφόρων RNA (mRNA) που φέρουν συμπληρωματική αλληλουχία, οδηγώντας

σε σίγηση γονιδίων κρίσιμων για την ανάπτυξη και την παθογόνο ικανότητα του μικροοργανισμού [21,23].

Έχουν γίνει αρκετές έρευνες κατά τις οποίες το SIGS έχει εφαρμοστεί σε έντομα. Η ιδέα πίσω από την απορρόφηση των dsRNA είναι παρόμοια με αυτά που αναφέρθηκαν παραπάνω. Στην περίπτωση των εντόμων, τα dsRNA είτε εφαρμόζονται στο φύλλωμα των φυτών και το έντομο καταναλώνει τμήματα του φυτού με το dsRNA μέσα, είτε εφαρμόζονται απευθείας στα έντομα, συνήθως σε εργαστηριακές συνθήκες [39]. Στο εσωτερικό του εντόμου ακολουθεί παρόμοια διαδικασία, κατά την οποία τα dsRNA κόβονται σε siRNA από το ένζυμο *Dicer*, και τα siRNA ενσωματώνονται στο σύμπλοκο RISC (RNA-induced silencing complex). Αυτό το σύμπλοκο χρησιμοποιεί τα siRNA για να αναγνωρίσει και να κόψει τα αντίστοιχα mRNA του εντόμου που στοχεύονταν για σίγηση, με αποτέλεσμα την παρεμπόδιση φύνθεσης κρίσιμων πρωτεϊνών για τη λειτουργία και την ανάπτυξη του εντόμου. Το σήμα που προκύπτει από αυτή τη διαδικασία διαδίδεται σε όλο το σώμα του εντόμου, μέσω πρωτεϊνών SID, οι οποίες μεταφέρουν τα dsRNA μέσα στις κυτταρικές μεμβράνες [39].

Ένα πολύ σημαντικό χαρακτηριστικό του SIGS είναι η δυνατότητα διεργασίας RNAi μεταξύ δύο βασιλείων – ενός φυτού και ενός παθογόνου για παράδειγμα. Αυτή η διαδικασία ονομάζεται cross-kingdom RNAi, και είναι μια εξελικτικά συντηρημένη διαδικασία, κατά την οποία μικρά RNA μόρια (siRNAs) μετακινούνται μεταξύ οργανισμών διαφορετικών βασιλείων, π.χ. από μύκητα σε φυτό ή αντίστροφα, και προκαλούν καταστολή γονιδίων στον αποδέκτη οργανισμό μέσω παρεμβολής RNAi [23,24]. Η μεταφορά των sRNAs γίνεται είτε μέσω εξωκυτταρικών κυστιδίων, είτε μέσω πρωτεϊνών δέσμευσης RNA [35,36]. Δηλαδή δημιουργείται ένας μηχανισμός συναρμογής ή μοριακής επικοινωνίας διπλής κατεύθυνσης, κατά τον οποίο το RNA του φυτού μπορεί να καταστείλει γονίδια του παθογόνου, και αντίστροφα, με σκοπό την επίτευξη καλύτερης άμυνας ή πιο έντονης παθογένειας [22,34].

1.13 Εφαρμογές του SIGS

Το SIGS έχει ήδη επιδείξει εντυπωσιακά αποτελέσματα στον έλεγχο διαφόρων παθογόνων, ιδιαίτερα μυκήτων, ωομυκήτων και ιών. Βασικό παράδειγμα αποτελεί η σίγηση του παθογόνου *Fusarium graminearum*, αίτιο της ασθένειας της Ξηρής σηψιρριζίας των σιτηρών. Οι μολυσμένοι ξενιστές ψεκάστηκαν με dsRNA ενάντια των γονιδίων *CYP51A/B/C*, το οποίο οδήγησε σε μείωση της ανάπτυξης μυκηλίου και της

μολυσματικότητας του μύκητα, χάρη στη μείωση της έκφρασης των γονιδίων-στόχων κατά 90% [27]. Παρόμοια αποτελέσματα εμφάνισε η σίγηση του γονιδίου *Myo5* στο μύκητα *Fusarium asiaticum*, η οποία οδήγησε σε δομικές καταστροφές του κυτταρικού τοιχώματος και γενικότερη μείωση της μολυσματικότητας και της βιομάζας του μύκητα [28].

Όσον αφορά τον μύκητα *Penicillium italicum*, ο οποίος είναι υπεύθυνος για την ανάπτυξη της μπλε σήψης στα εσπεριδοειδή και εμφανίζει στενή συγγένεια με τον *Penicillium digitatum*, έγινε σίγηση του σημαντικού για την παθογένεια γονιδίου *Pit-DCL2* με εφαρμογή των dsRNA σε πληγές των καρπών, με δοκιμή δύο δόσεων (200 και 800 ng). Η σίγηση πέτυχε έντονη καταστολή του γονιδίου και σημαντική μείωση της παθογένειάς του, και φάνηκε πως η διαδικασία ήταν δοσοεξαρτώμενη, με την μεγαλύτερη δόση (800 ng) να επιτυγχάνει καλύτερα αποτελέσματα [49].

Σημαντικά αποτελέσματα προέκυψαν και από την σίγηση γονιδίων του μύκητα *Botrytis cinerea*, που προκαλεί της ασθένεια της Τεφράς σήψης. Συγκεκριμένα εφαρμόστηκαν dsRNA ενάντια των *DCL1* και *DCL2* *Dicer* γονιδίων, και αυτό βοήθησε σημαντικά ξενιστές όπως τομάτες, φράουλες, μαρούλια και τριαντάφυλλα [29]. Το ίδιο συνέβη και με την εφαρμογή minicell-encapsulated dsRNA (ME-dsRNA). Τα ME-dsRNA είναι μια τεχνολογία που συνδυάζει την παραγωγή και τη συσκευασία dsRNA μέσα σε μικροσωματίδια που ονομάζονται minicells. Αυτά τα minicells είναι παραγόμενα από βακτήρια *E. coli* και δεν έχουν χρωμοσώματα, δηλαδή δεν μπορούν να πολλαπλασιαστούν ή να αναπτυχθούν, αλλά διατηρούν μεμβράνες και ριβοσώματα [37].

Ομοίως, στις περιπτώσεις παθογόνων όπως ο *Sclerotinia sclerotiorum* (Λευκή σήψη) και ο *Rhizoctonia solani* (σήψη των ριζών), η εφαρμογή dsRNAs στόχευσε και σίγησε ένζυμα παθογένειας σαν την *polygalacturonase*, και πέτυχε μείωση των συμπτωμάτων των ασθενειών σε φυτά *Arabidopsis* και στις ρίζες του ρυζιού αντίστοιχα [29].

Ένα σημαντικό αρνητικό που προέκυψε μέσω αυτών των πειραμάτων, το οποίο παρουσιάστηκε σε όλα τα πειράματα και αποτελεί βασικό μειονέκτημα της τεχνικής SIGS, είναι πως η δράση διαρκεί μόνο 9 ώρες χωρίς συνεχή παροχή dsRNAs, χάρη στην απουσία ενίσχυσης των siRNA από το ίδιο το παθογόνο [28,29,37].

1.14 Στόχος Εργασίας

Σκοπός της παρούσας πτυχιακής διατριβής ήταν η ανάπτυξη ενός εξωγενούς βιομυκητοκτόνου βασισμένου στην τεχνολογία Spray-Induced Gene Silencing (SIGS), με στόχο την αντιμετώπιση της μετασυλλεκτικής ασθένειας της Πράσινης Σήψης, η οποία προκαλείται από τον μύκητα *Penicillium digitatum* σε καρπούς εσπεριδοειδών. Για την επίτευξη του στόχου αυτού, πραγματοποιήθηκε προσεκτική επιλογή κατάλληλων γονιδίων-στόχων, ακολουθούμενη από τον σχεδιασμό των αντίστοιχων εκκινητών (primers). Στη συνέχεια, έγινε *in vitro* σύνθεση δίκλωνου RNA (dsRNA) και, τέλος, πραγματοποιήθηκε *in vivo* αξιολόγηση της αποτελεσματικότητας των συντιθέμενων dsRNA έναντι του *P. digitatum* σε καρπούς εσπεριδοειδών.

2. Υλικά – Μέθοδοι

2.1 Παθογόνο και Τεχνητές μολύνσεις

Για τη διεξαγωγή των πειραματικών διαδικασιών χρησιμοποιήθηκε απομονωμένο στέλεχος του μύκητα *Penicillium digitatum* (CBS 130527), το οποίο προμηθεύτηκε από την Τράπεζα Μυκητιακών Αποθεμάτων του Ινστιτούτου Βιοποικιλότητας Μυκήτων Westerdijk (Westerdijk Fungal Biodiversity Institute). Το στέλεχος καλλιεργήθηκε σε

θρεπτικό υπόστρωμα Malt Extract Agar (MEA) (LabM, Ηνωμένο Βασίλειο), σε τρυβλία Petri διαμέτρου 90 mm. Η επώαση πραγματοποιήθηκε σε θάλαμο ανάπτυξης υπό σταθερές συνθήκες θερμοκρασίας στους 27 °C για επτά (7) ημέρες. Οι καλλιέργειες που προέκυψαν φυλάχθηκαν σε ψυχόμενο θάλαμο στους 4 °C για μεταγενέστερη χρήση.

2.2 Φυτικό υλικό

Η *in vivo* αξιολόγηση της αποτελεσματικότητας των εφαρμογών με τα dsRNA, πραγματοποιήθηκε σε καρπούς πορτοκαλιάς (*cv. Salustiana*), οι οποίοι συλλέχθηκαν από βιολογικούς οπωρώνες στην περιοχή της Άρτας (Κιρκιζάτες) κατά το στάδιο της εμπορικής συγκομιδής. Επιπλέον, για τη διερεύνηση της αποτελεσματικότητας των ίδιων εφαρμογών σε άλλους καρπούς εσπεριδοειδών, πραγματοποιήθηκαν συμπληρωματικές δοκιμές σε βιολογικούς εμπορικούς καρπούς λεμονιάς (*cv. Maglini*) και μανταρινιάς (*cv. Satsuma*).

2.3 Απομόνωση DNA μύκητα

Συνολικά, πέντε (5) μυκηλιακά εμβόλια διαμέτρου 5 mm μεταφέρθηκαν σε κωνική φιάλη που περιείχε 20 ml υγρού θρεπτικού υποστρώματος Sabouraud (LabM, Ηνωμένο Βασίλειο) και επώαστηκαν σε θάλαμο ανάπτυξης υπό σκοτεινές συνθήκες για πέντε (5) ημέρες στους 27 °C. Μετά την ολοκλήρωση της επώασης, το μυκήλιο απομονώθηκε με διήθηση υπό κενό αέρος μέσω χάρτινου φίλτρου. Η συλλεχθείσα βιομάζα μεταφέρθηκε σε σωληνάριο τύπου Eppendorf 1,5 ml και υποβλήθηκε σε λυοφιλίωση.

Η απομόνωση του ολικού DNA πραγματοποιήθηκε με την χρήση ενός τροποποιημένου πρωτόκολλου CTAB (Cetyl Trimethyl Ammonium Bromide), το οποίο χρησιμοποιείται ευρέως στο Εργαστήριο Φυτοπαθολογίας, ΑΠΘ, για την απομόνωση DNA από μύκητες. Ειδικότερα, πραγματοποιήθηκε λειοτρίβηση του λυοφιλιωμένου μυκηλίου σε ομογενοποιητή (*homogenizer*), με την προσθήκη 600 µl διαλύματος CTAB ανά δείγμα, καθώς και δύο μεταλλικών σφαιριδίων (*stain steel beads*) για την ενίσχυση της μηχανικής διάσπασης του ιστού. Τα δείγματα στη συνέχεια επώαστηκαν σε υδατόλουτρο στους 65 °C για 30 λεπτά. Μετά την επώαση, τα δείγματα φυγοκεντρήθηκαν στις 4500 rpm για 30 δευτερόλεπτα και 600 µl υπερκειμένου μεταφέρθηκαν σε καθαρούς σωλήνες των 2 ml. Ακολούθως, προστέθηκαν 500 µl

μείγματος χλωροφόρμιο:ισοαμυλική αλκοόλη (24:1) σε κάθε δείγμα. Το μείγμα ανακινήθηκε σε vortex για 3 λεπτά και φυγοκεντρήθηκε στις 16.000×g για 10 λεπτά στους 4 °C. Το υπερκείμενο (400–600 μl) μεταφέρθηκε εκ νέου σε καθαρούς σωλήνες και προστέθηκαν ακόμη 500 μl του ίδιου οργανικού διαλύτη. Μετά από σύντομη ανάδευση (1 λεπτό) και δεύτερη φυγοκέντρωση στις ίδιες συνθήκες, ακολούθησε η μεταφορά 300-400 μl από την υδατική φάση και η προσθήκη 400 μl ισοπροπανόλης για την κατακρήμνιση των νουκλεϊκών οξέων, μέσω της μεταβολής της πολικότητας του διαλύματος.

Τα δείγματα αναμίχθηκαν σε vortex για 1 λεπτό και στη συνέχεια καθαρίστηκαν με χρήση εξειδικευμένων στηλών καθαρισμού DNA. Από κάθε δείγμα, 800 μl μεταφέρθηκαν στη στήλη και φυγοκεντρήθηκαν στους 6000×g για 1 λεπτό. Κατόπιν, προστέθηκαν 400 μl wash buffer και ακολούθησε φυγοκέντρωση στα 14.000×g για 1 λεπτό. Για την απομάκρυνση του υπολειπόμενου RNA, πραγματοποιήθηκε επεξεργασία με μίγμα 45 μl buffer και 5 μl RNase ανά δείγμα. Η επώαση πραγματοποιήθηκε σε θερμοκρασία δωματίου για 15 λεπτά. Ακολούθησε επιπλέον πλύσιμο των στηλών με 400 μl wash buffer, με εκκένωση της στήλης δύο φορές (τη δεύτερη με επιπλέον vortex 2 λεπτών). Στη συνέχεια, οι στήλες υποβλήθηκαν σε φυγοκέντρωση χωρίς πρόσθετο διάλυμα στα 14.000×g για 2,5 λεπτά. Το DNA εκλούστηκε με την προσθήκη 50 μl αποστειρωμένου, απαλλαγμένου από νουκλεάσες (nuclease-free) νερού, επώαστηκε για 1 λεπτό και υποβλήθηκε σε φυγοκέντρωση στα 14.000×g για 1 λεπτό. Τέλος, πραγματοποιήθηκε ποσοτικός και ποιοτικός προσδιορισμός του DNA με φασματοφωτομετρία στα 260 nm, ώστε να εκτιμηθεί η συγκέντρωση και η καθαρότητά του.

2.4 Επιλογή γονιδίων και σχεδιασμός εκκινητών

Για τις εφαρμογές SIGS στο *Penicillium digitatum*, επιλέχθηκαν και δοκιμάστηκαν συνολικά έξι γονίδια-στόχοι: *DCL1*, *DCL2* (τύπου *Dicer*), *AGO1*, *AGO2* (τύπου *Argonaute*), *ATPase1* και *GFP*. Η επιλογή των γονιδίων *Dicer* και *Argonaute* βασίστηκε στον θεμελιώδη ρόλο που διαδραματίζουν στον μηχανισμό της παρεμβολής RNA (RNAi), λειτουργώντας αντίστοιχα στην επεξεργασία του δίκλωνου RNA και στην αναγνώριση και αποικοδόμηση του mRNA-στόχου. Η σημασία των γονιδίων *DCL1* και *DCL2* έχει τεκμηριωθεί και σε προηγούμενες μελέτες στο συγγενικό είδος *Penicillium italicum* [42,49], στις οποίες παρατηρήθηκε σημαντική μείωση της

παθογένειας μετά τη σίγησή τους, γεγονός που υποδεικνύει την εξελικτική και λειτουργική συνάφεια με το *P. digitatum*. Το γονίδιο *ATPase1* επιλέχθηκε λόγω της εμπλοκής του σε βασικές μεταβολικές και ενεργειακές διεργασίες που σχετίζονται με την παθογόνο ικανότητα του *P. digitatum*, όπως έχει αναφερθεί σε προηγούμενα πειραματικά δεδομένα [17]. Τέλος, το γονίδιο *GFP*, το οποίο δεν απαντάται φυσιολογικά στο γονιδίωμα του μύκητα, χρησιμοποιήθηκε ως αρνητικός μάρτυρας (negative control), με σκοπό την επιβεβαίωση της ειδικότητας της σίγησης και την αξιολόγηση πιθανών μη ειδικών επιδράσεων των εφαρμογών SIGS.

Ο σχεδιασμός των εκκινητών για την ενίσχυση των επιλεγμένων γονιδίων πραγματοποιήθηκε με τη χρήση του λογισμικού Geneious Prime 2022.0, βασισμένος στις αλληλουχίες των γονιδίων *AGO1*, *AGO2*, *DCL1*, *DCL2*, *ATPase1* και *GFP*. Σε όλους τους εκκινητές προστέθηκε στην 5' άκρη η αλληλουχία του T7 promoter (5'-TAATAGGACTCACTATAGGGAGA-3'), η οποία αποτελεί ειδική αλληλουχία αναγνώρισης για την T7 RNA πολυμεράση, επιτρέποντας την *in vitro* σύνθεση RNA από τα ενισχυμένα προϊόντα PCR (Πίνακας 1).

Πίνακας 1: Εκκινητές για τα γονίδια *AGO1/2*, *DCL1/2*, *ATPase* και *GFP*

Όνομα εκκινητή	Γονίδια	5'-3' αλληλουχία	Tm εκκινητών (°C)	PCR προϊόν (bp)
AGO1(5)_Pd_F	<i>AGO1</i>	TAATAGGACTCACTATAGGGAGAAATCCGCTCCACTACCTCTGT	63	368
AGO1(5)_Pd_R	<i>AGO1</i>	TAATAGGACTCACTATAGGGAGACAAACAAGATGGAGTGCGGC	63	368
AGO2(3)_Pd_F	<i>AGO2</i>	TAATAGGACTCACTATAGGGAGAGTGACAATAGGGGTCGTGGC	63	399
AGO2(3)_Pd_R	<i>AGO2</i>	TAATAGGACTCACTATAGGGAGAGGGTTTCGCTTGTCTGAAGA	63	399
DCL1_Pd_F	<i>DCL1</i>	TAATAGGACTCACTATAGGGAGATGCTTCTTTCACTGCACTGC	61	350
DCL1_Pd_R	<i>DCL1</i>	TAATAGGACTCACTATAGGGAGAGCGAGGTTTTGTGCCATGTG	61	350
DCL2(5)_Pd_F	<i>DCL2</i>	TAATAGGACTCACTATAGGGAGAGAAGCCAGTATCCGTGGGAG	62	359
DCL2(5)_Pd_R	<i>DCL2</i>	TAATAGGACTCACTATAGGGAGATCAGTCTGATTGACCACCGC	62	359
ATPase(3)_Pd_F	<i>ATPase</i>	TAATAGGACTCACTATAGGGAGAGCAACATCACCGATGACCAC	62	377
ATPase(3)_Pd_R	<i>ATPase</i>	TAATAGGACTCACTATAGGGAGAGTGAGGAAGGTGGACGTGAG	62	377
eGFP_FW_T7_F	<i>GFP</i>	TAATAGGACTCACTATAGGGAGACGAGGAGCTGTTACCGG	63	347
eGFP_RV_T7_R	<i>GFP</i>	TAATAGGACTCACTATAGGGAGAGCCGTCGTCCTGAAGAAGA	63	347

2.5 Ενίσχυση γονιδιακών περιοχών και *in vitro* σύνθεση dsRNA

Η ενίσχυση των προϊόντων των γονιδίων, πραγματοποιήθηκε με την χρήση του ζεύγους εκκινητών που παρουσιάζονται στον Πίνακα 1. Το προϊόν ενισχύθηκε με PCR χρησιμοποιώντας την πολυμεράση Q5 High fidelity polymerase (NEB; New England

Biolabs, USA). Οι συνθήκες της PCR ήταν οι εξής: αρχική προθέρμανση στους 98°C για τριάντα δευτερόλεπτα ενώ στη συνέχεια ακολούθησαν τρία στάδια που επαναλήφθηκαν για 35 κύκλους, με πρώτη την αποδιάταξη του εκμαγείου στους 98°C για 10 δευτερόλεπτα, υβριδοποίηση των εκκινητών με το εκμαγείο τους στους 61-63 °C, ενώ η επέκταση των αλυσίδων έγινε στους 72 °C για 15 δευτερόλεπτα. Ακολούθησε επώαση στους 72 °C για 2 λεπτά. Στην συνέχεια, τα προϊόντα της PCR διαχωρίστηκαν με ηλεκτροφόρηση σε πηκτή αгарόζης 1% σε διάλυμα Tris-acetate (TAE) buffer και ακολούθησε η οπτικοποίησή τους κάτω από ακτινοβολία UV μετά τον χρωματισμό τους με τη μη τοξική χρωστική Midori Green (NipponGenetics, Γερμανία). Το προϊόν της PCR καθαρίστηκε με τη χρήση του QIAquick PCR Purification Kit® (Qiagen, Γερμανία) σύμφωνα με τις οδηγίες του παρασκευαστή. Η *in vitro* σύνθεση των dsRNA των γονιδίων που επιλέχθηκαν έγινε με το εμπορικό κιτ MEGAscript RNAi (ThermoFisher Scientific, Η.Π.Α) σύμφωνα με το προτεινόμενο πρωτόκολλο του παρασκευαστή. Ο ποσοτικός προσδιορισμός της συγκέντρωσης των παραγόμενων dsRNA, πραγματοποιήθηκε με την χρήση του νανο-σπεκτροφωτόμετρου FastGene® (NipponGenetics, Γερμανία) σύμφωνα με τις τιμές απορρόφησης στα 260nm (A260nm).

2.6 *In vivo* αξιολόγηση της αποτελεσματικότητας εφαρμογών dsRNA έναντι του *P. digitatum* σε καρπούς πορτοκαλιάς

Σε αυτό το στάδιο του πειράματος αξιολογήθηκε η αποτελεσματικότητα, καθώς και η χρονική επίδραση της εφαρμογής δίκλωνων RNA (dsRNA) ενάντια στο παθογόνο *Penicillium digitatum*, σε καρπούς πορτοκαλιάς ποικιλίας *Salustiana*. Για κάθε γονίδιο που εξετάστηκε, χρησιμοποιήθηκαν συνολικά 36 καρποί, οι οποίοι χωρίστηκαν ισομερώς σε τρεις ομάδες των 12 καρπών: η πρώτη ομάδα χρησιμοποιήθηκε ως αρνητικός μάρτυρας (control) χωρίς εφαρμογή dsRNA, η δεύτερη δέχθηκε προληπτική εφαρμογή dsRNA δύο ώρες πριν από τη μόλυνση με τον μύκητα (2hbi – hours before inoculation), ενώ η τρίτη υποβλήθηκε σε ταυτόχρονη εφαρμογή dsRNA και μολύσματος (0hbi). Για κάθε επέμβαση χρησιμοποιήθηκαν 12 καρποί, (4 καρποί × 3 επαναλήψεις). Πριν από οποιαδήποτε επεξεργασία, οι καρποί απολυμάνθηκαν επιφανειακά με εμβάπτιση σε διάλυμα υποχλωριώδους νατρίου 1% για 3 λεπτά. Ακολούθησαν δύο πλύσεις με αποιονισμένο νερό, για την απομάκρυνση πιθανών καταλοίπων του απολυμαντικού. Στη συνέχεια, οι καρποί μεταφέρθηκαν σε θάλαμο νηματικής ροής, όπου παρέμειναν έως την πλήρη απομάκρυνση της επιφανειακής

υγρασίας, και κατόπιν τοποθετήθηκαν σε αποστειρωμένα πλαστικά δοχεία. Το σημείο εφαρμογής σε κάθε καρπό επισημάνθηκε με μη τοξικό μαρκαδόρο, και στη συνέχεια δημιουργήθηκε μία πληγή με τη χρήση αποστειρωμένης ανατομικής βελόνας, βάθους περίπου 2–3 mm, στο κέντρο του καρπού. Στο σημείο της πληγής εφαρμόστηκαν διαδοχικά 20 μl διαλύματος dsRNA (συγκέντρωσης 40 ng/μl) και 20 μl αιωρήματος κονιδίων του *P. digitatum*, με συγκέντρωση $1,5 \times 10^5$ κονίδια/ml. Η συγκέντρωση του μολύσματος προσδιορίστηκε με χρήση αιμοκυτταρόμετρου τύπου Neubauer. Μετά την ολοκλήρωση των εφαρμογών, τα πλαστικά δοχεία που περιείχαν τους καρπούς μεταφέρθηκαν σε θάλαμο ανάπτυξης, όπου επώαστηκαν στους 25 °C για πέντε (5) και δέκα (10) ημέρες, προκειμένου να καταγραφεί η ένταση και συχνότητα προσβολής από το παθογόνο για τους δύο χρόνους εφαρμογών με τα dsRNA. Επιπρόσθετα, για κάθε μεταχείριση υπολογίστηκε η τιμή του δείκτη ασθένειας, ο οποίος προκύπτει από τον συνδυασμό της έντασης της ασθένειας και της συχνότητας προσβολής των καρπών. Ο δείκτης αυτός παρέχει μια πιο ολοκληρωμένη εκτίμηση της συνολικής σοβαρότητας της ασθένειας, καθώς λαμβάνει υπόψη τόσο τη μέση έκταση της σήψης (σε cm) όσο και το ποσοστό των καρπών που έχουν προσβληθεί. Ο υπολογισμός πραγματοποιήθηκε σύμφωνα με τον τύπο:

$$\text{Δείκτης ασθένειας (cm)} = \frac{\text{Ένταση ασθένειας} \times \text{Συχνότητα προσβολής}}{100}$$

Η ένταση εκφράζεται ως η μέση διάμετρος της σήψης στους προσβεβλημένους καρπούς, ενώ η συχνότητα προσδιορίζεται ως το ποσοστό προσβεβλημένων καρπών επί του συνόλου. Η ενιαία αυτή τιμή επιτρέπει τη συγκριτική αξιολόγηση της αποτελεσματικότητας κάθε μεταχείρισης, ανεξαρτήτως του αριθμού προσβεβλημένων καρπών ή της σοβαρότητας της κάθε προσβολής ξεχωριστά.

2.7 *In vivo* αξιολόγηση της αποτελεσματικότητας εφαρμογών dsRNA έναντι του *P. digitatum* σε καρπούς άλλων εσπεριδοειδών

Από τα ευρήματα της παραπάνω ενότητας (Ενότητα 2.3), επιλέχθηκαν τα δύο (2) πιο αποτελεσματικά dsRNA (dsAGO1, dsAGO2) και στην συνέχεια ακολούθησε η περαιτέρω αξιολόγηση της αποτελεσματικότητας τους σε καρπούς άλλων εσπεριδοειδών. Ειδικότερα, για τον έλεγχο της αποτελεσματικότητας των dsRNA των γονιδίων *AGO1/AGO2* και σε άλλους ξενιστές των εσπεριδοειδών, χρησιμοποιήθηκαν

καρποί μανταρινιάς (cv. Satsuma) και καρποί λεμονιάς (cv. Maglini). Ο πειραματισμός πραγματοποιήθηκε σύμφωνα με την μεθοδολογία που περιεγράφηκε στην υποενότητα 2.3, ενώ η αξιολόγηση των εφαρμογών έγινε 5 ημέρες μετά την μόλυνση (5dpi) και για τα δύο είδη καρπών.

2.8 Στατιστική ανάλυση και οπτικοποίηση αποτελεσμάτων

Η στατιστική επεξεργασία και οπτικοποίηση των αποτελεσμάτων πραγματοποιήθηκε με την χρήση του λογιστικού πακέτου Graphpad Prism 10.1.2. Η επεξεργασία των δεδομένων βασίστηκε στην ανάλυση παραλλακτικότητας (One-way ANOVA) και οι συγκρίσεις έγιναν με το κριτήριο Tukey σε επίπεδο σημαντικότητας $\alpha=0.05$. Τα αποτελέσματα παρουσιάζονται με την μορφή μέσων όρων και των γραμμών σφάλματος, που αντιπροσωπεύουν το τυπικό σφάλμα (Τ.Σ.) των επαναλήψεων (n) της κάθε μεταχείρισης.

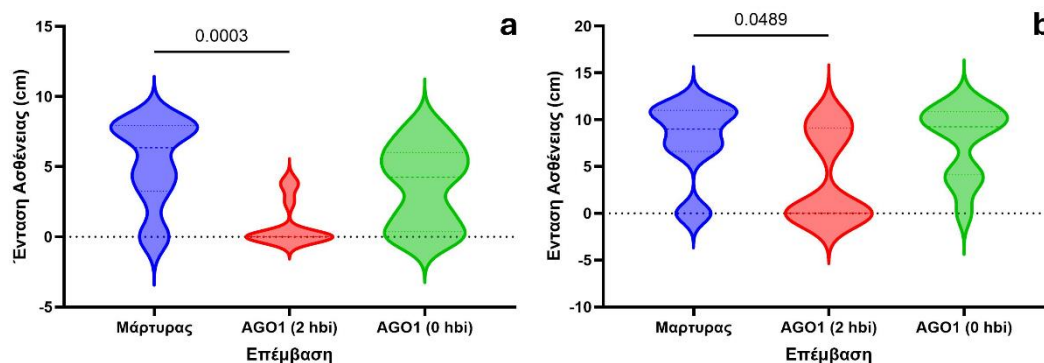
3. Αποτελέσματα

3.1 *In vivo* αξιολόγηση της αποτελεσματικότητας εφαρμογών dsRNA έναντι του *P. digitatum* σε καρπούς πορτοκαλιάς

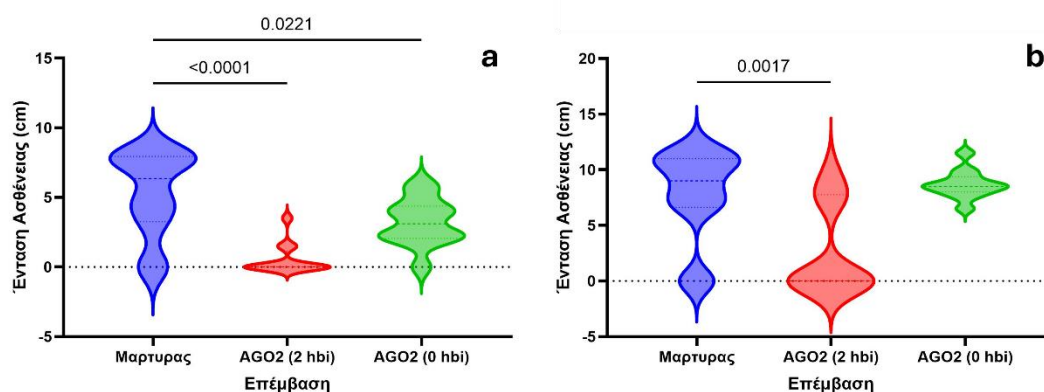
Στόχος της ενότητας αυτής ήταν η αξιολόγηση της αποτελεσματικότητας και του βέλτιστου χρόνου εφαρμογής των dsRNA που στοχεύουν στη σίγηση επιλεγμένων γονιδίων (*AGO1*, *AGO2*, *DCL1*, *DCL2*, *ATPase*, *GFP*) για την αντιμετώπιση του παθογόνου μύκητα *P. digitatum* σε καρπούς πορτοκαλιάς, πέντε (5) και δέκα (10) ημέρες μετά την μόλυνση (dpi). Τα αποτελέσματα της παρούσας ενότητας έδειξαν σημαντικές διαφορές στην αποτελεσματικότητα τόσο μεταξύ των dsRNA που δοκιμάστηκαν όσο και μεταξύ των δύο (2) χρόνων εφαρμογής (0 και 2 hbi).

Ειδικότερα, η εφαρμογή του dsRNA που στοχεύει στη σίγηση του γονιδίου *AGO1* δύο (2) ώρες πριν τη μόλυνση με το παθογόνο (2hbi) οδήγησε σε σημαντική μείωση της έντασης της ασθένειας ($p < 0.05$), σε σύγκριση τόσο με τον μάρτυρα όσο και με την ταυτόχρονη εφαρμογή dsRNA και μολύσματος (0hbi). Η μείωση της σήψης ήταν εμφανής τόσο στις πέντε (5) όσο και στις δέκα (10) ημέρες μετά τη μόλυνση (dpi) (Διάγραμμα 1) (Εικόνα 4). Ανάλογα αποτελέσματα παρατηρήθηκαν και για το dsRNA που στοχεύει το γονίδιο *AGO2*. Συγκεκριμένα, η προληπτική εφαρμογή του dsRNA (2hbi) οδήγησε σε σημαντικά μικρότερη διάμετρο σήψης σε σχέση με τις υπόλοιπες επεμβάσεις, τόσο στις 5 dpi όσο και στις 10 dpi. Στις 5 dpi, η διαφορά ήταν ιδιαίτερα

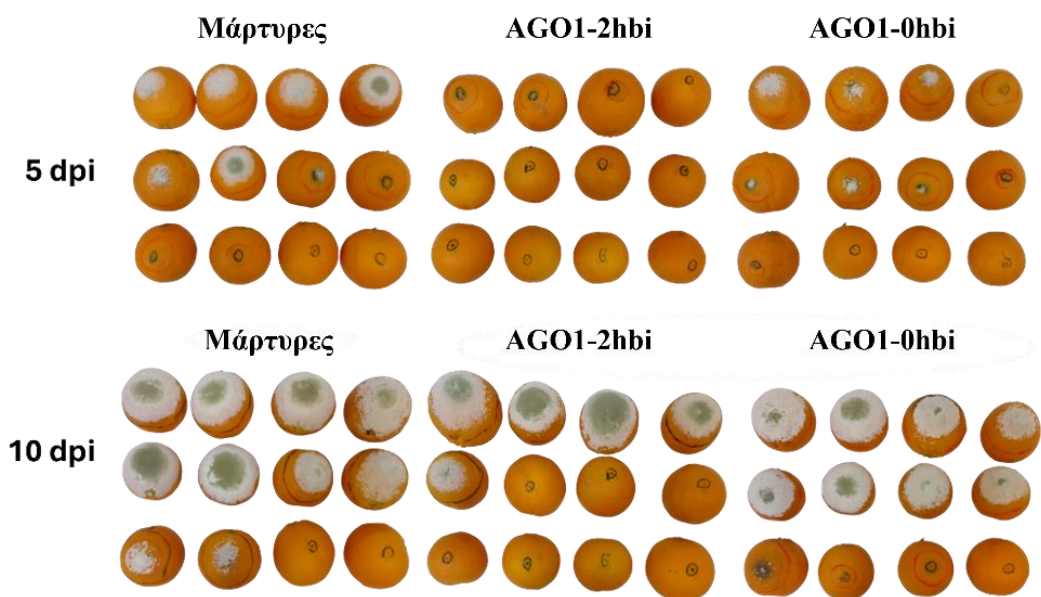
έντονη, με τη μέση ένταση της ασθένειας να είναι σημαντικά μειωμένη τόσο σε σύγκριση με τον μάρτυρα ($p < 0.0001$), όσο και με την ταυτόχρονη εφαρμογή (0hbi) ($p = 0.0221$). Αντίστοιχα, στις 10 dpi, η ομάδα προληπτικής εφαρμογής (2hbi) συνέχισε να παρουσιάζει σημαντική διαφορά από τον μάρτυρα ($p = 0.0017$), ενώ η μεταχείριση της ταυτόχρονης εφαρμογής (0hbi) δεν παρουσίασε στατιστικά σημαντική διαφορά σε σχέση με τον μάρτυρα ($p > 0.05$) (Διάγραμμα 2) (Εικόνα 5).



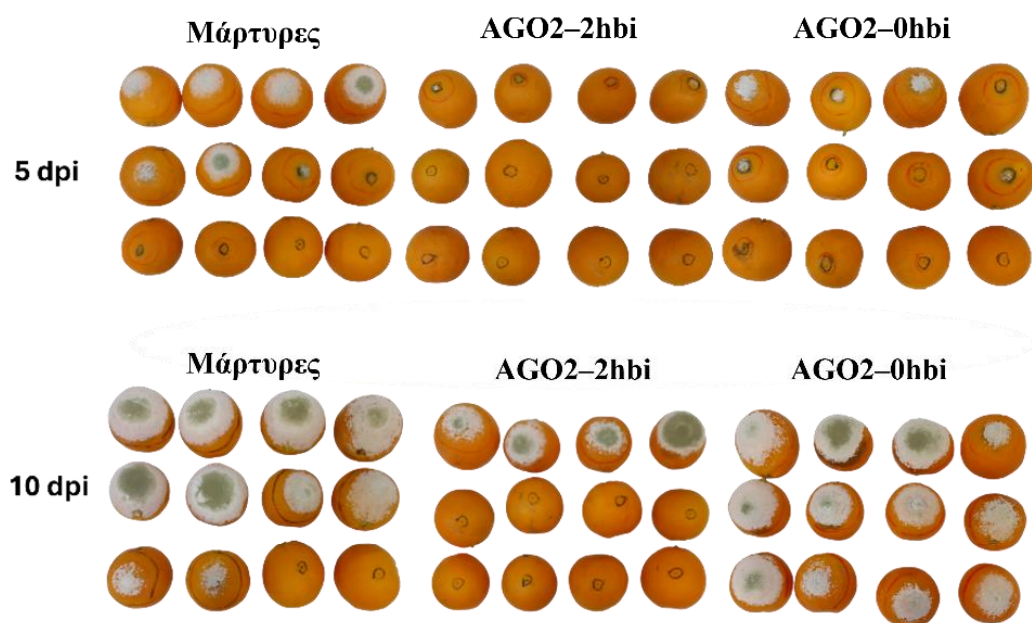
Διάγραμμα 1: Ένταση της ασθένειας σε τεχνητά μολυσμένους καρπούς πορτοκαλιάς με το παθογόνο *Penicillium digitatum*, οι οποίοι είχαν δεχθεί εφαρμογή με dsRNA που στοχεύει στη σίγηση του γονιδίου AGO1, 0 και 2 ώρες πριν τη μόλυνση (hbi)| Η αξιολόγηση της έντασης της ασθένειας πραγματοποιήθηκε (a) 5 και (b) 10 ημέρες μετά την μόλυνση (dpi), μέσω μέτρησης της διαμέτρου της σήψης στους καρπούς | Η επεξεργασία μέσω των όρων βασίστηκε στην ανάλυση παραλλακτικότητας (one-way ANOVA) και οι συγκρίσεις έγιναν με το κριτήριο Tukey σε επίπεδο σημαντικότητας $p=0.05$ | Στις επεμβάσεις που παρατηρείται στατιστικώς σημαντική διαφορά παρουσιάζεται η τιμή του επιπέδου σημαντικότητας, ενώ οι κάθετες γραμμές αντιπροσωπεύουν το τυπικό σφάλμα του μέσου όρου.



Διάγραμμα 2: Ένταση της ασθένειας σε τεχνητά μολυσμένους καρπούς πορτοκαλιάς με το παθογόνο *Penicillium digitatum*, οι οποίοι είχαν δεχθεί εφαρμογή με dsRNA που στοχεύει στη σίγηση του γονιδίου AGO2, 0 και 2 ώρες πριν τη μόλυνση (hbi)| Η αξιολόγηση της έντασης της ασθένειας πραγματοποιήθηκε (a) 5 και (b) 10 ημέρες μετά την μόλυνση (dpi), μέσω μέτρησης της διαμέτρου της σήψης στους καρπούς | Η επεξεργασία μέσω των όρων βασίστηκε στην ανάλυση παραλλακτικότητας (one-way ANOVA) και οι συγκρίσεις έγιναν με το κριτήριο Tukey σε επίπεδο σημαντικότητας $p=0.05$ | Στις επεμβάσεις που παρατηρείται στατιστικώς σημαντική διαφορά παρουσιάζεται η τιμή του επιπέδου σημαντικότητας, ενώ οι κάθετες γραμμές αντιπροσωπεύουν το τυπικό σφάλμα του μέσου όρου.

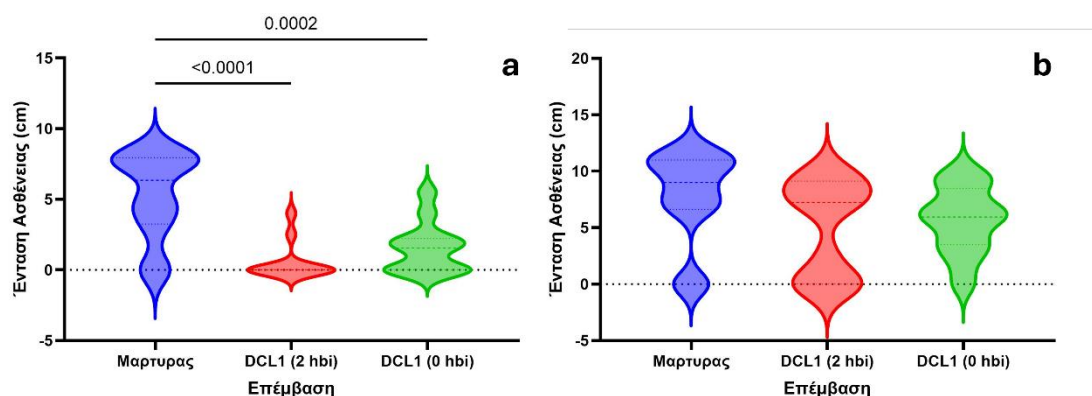


Εικόνα 4: Έντασης ασθένειας τεχνητά μολυσμένων καρπών πορτοκαλιάς με το παθογόνο *Penicillium digitatum*, οι οποίοι είχαν δεχθεί εφαρμογή με dsRNA που στοχεύει στη σίγηση του γονιδίου AGO1, 0 (0 hbi) και 2 (2 hbi) ώρες πριν τη μόλυνση τους με τον μύκητα *P. digitatum* | Η αξιολόγηση της έντασης της ασθένειας πραγματοποιήθηκε 5 (πάνω) και 10 (κάτω) ημέρες μετά την μόλυνση (dpi), μέσω μέτρησης της διαμέτρου της σήψης στους καρπούς.

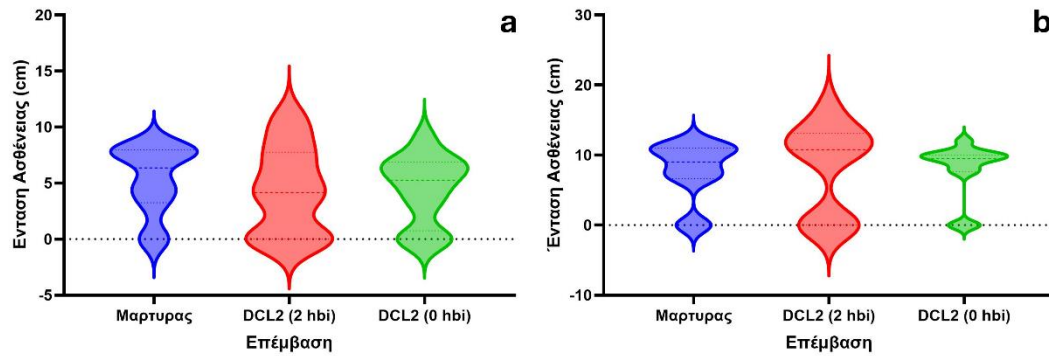


Εικόνα 5: Έντασης ασθένειας τεχνητά μολυσμένων καρπών πορτοκαλιάς με το παθογόνο *Penicillium digitatum*, οι οποίοι είχαν δεχθεί εφαρμογή με dsRNA που στοχεύει στη σίγηση του γονιδίου AGO2, 0 (0 hbi) και 2 (2 hbi) ώρες πριν τη μόλυνση τους με τον μύκητα *P. digitatum* | Η αξιολόγηση της έντασης της ασθένειας πραγματοποιήθηκε 5 (αριστερά) και 10 (δεξιά) ημέρες μετά την μόλυνση (dpi), μέσω μέτρησης της διαμέτρου της σήψης στους καρπούς.

Όσον αφορά τα γονίδια *Dicer*, και συγκεκριμένα το dsRNA που στοχεύει στη σίγηση του *DCL1*, 2 ώρες πριν τη μόλυνση με το παθογόνο (2hbi), οδήγησε σε σημαντική μείωση της έντασης της ασθένειας ($p<0.0001$) σε σύγκριση με τον μάρτυρα, με παρόμοια αποτελέσματα να δείχνει και η ταυτόχρονη εφαρμογή dsRNA και μολύσματος (0hbi) ($p=0.0002$) (Διάγραμμα 3). Η μείωση της σήψης ήταν εμφανής μόνο στις 5 ημέρες μετά τη μόλυνση (dpi), με τα αποτελέσματα στις 10 να μην εμφανίζεται σημαντική διαφορά μεταξύ του μάρτυρα και των καρπών που έγινε η σίγηση του γονιδίου. Για το dsRNA που στοχεύει το γονίδιο *DCL2* δεν παρατηρήθηκαν ανάλογα αποτελέσματα. Σε οποιαδήποτε περίπτωση, δηλαδή και στα 5dpi και στα 10dpi, και κατά την προληπτική εφαρμογή του dsRNA (2hbi) και κατά την ταυτόχρονη (0hbi), δεν παρουσιάστηκε καμία στατιστικά σημαντική διαφορά μεταξύ των καρπών που έγινε σίγηση του γονιδίου και των καρπών-μαρτύρων ($p>0.05$) (Διάγραμμα 4).

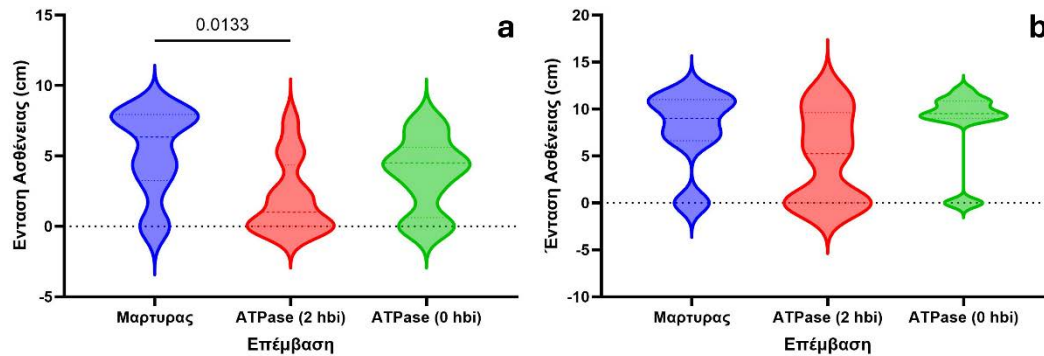


Διάγραμμα 3: Ένταση της ασθένειας σε τεχνητά μολυσμένους καρπούς πορτοκαλιάς με το παθογόνο *Penicillium digitatum*, οι οποίοι είχαν δεχθεί εφαρμογή με dsRNA που στοχεύει στη σίγηση του γονιδίου DCL1, 0 και 2 ώρες πριν τη μόλυνση (hbi)| Η αξιολόγηση της έντασης της ασθένειας πραγματοποιήθηκε (a) 5 και (b) 10 ημέρες μετά την μόλυνση (dpi), μέσω μέτρησης της διαμέτρου της σήψης στους καρπούς | Η επεξεργασία μέσω όρων βασίστηκε στην ανάλυση παραλλακτικότητας (one-way ANOVA) και οι συγκρίσεις έγιναν με το κριτήριο Tukey σε επίπεδο σημαντικότητας $p=0.05$ | Στις επεμβάσεις που παρατηρείται στατιστικώς σημαντική διαφορά παρουσιάζεται η τιμή του επιπέδου σημαντικότητας, ενώ οι κάθετες γραμμές αντιπροσωπεύουν το τυπικό σφάλμα του μέσου όρου.

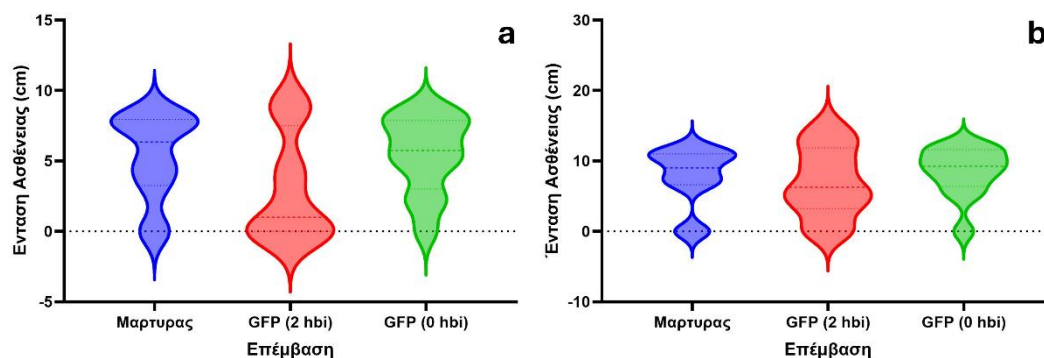


Διάγραμμα 4: Ένταση της ασθένειας σε τεχνητά μολυσμένους καρπούς πορτοκαλιάς με το παθογόνο *Penicillium digitatum*, οι οποίοι είχαν δεχθεί εφαρμογή με dsRNA που στοχεύει στη σίγηση του γονιδίου DCL2, 0 και 2 ώρες πριν τη μόλυνση (hbi). Η αξιολόγηση της έντασης της ασθένειας πραγματοποιήθηκε (a) 5 και (b) 10 ημέρες μετά την μόλυνση (dpi), μέσω μέτρησης της διαμέτρου της σήψης στους καρπούς. Η επεξεργασία μέσω όρων βασίστηκε στην ανάλυση παραλλακτικότητας (one-way ANOVA) και οι συγκρίσεις έγιναν με το κριτήριο Tukey σε επίπεδο σημαντικότητας $p=0.05$. Στις επεμβάσεις που παρατηρείται στατιστικώς σημαντική διαφορά παρουσιάζεται η τιμή του επιπέδου σημαντικότητας, ενώ οι κάθετες γραμμές αντιπροσωπεύουν το τυπικό σφάλμα του μέσου όρου.

Στην περίπτωση του dsRNA που στοχεύει στο γονίδιο της *ATPase*, όταν ελέγχθηκαν οι καρποί στα 5dpi, παρατηρήθηκε μείωση μεταξύ του μάρτυρα και των καρπών στους οποίους είχε γίνει προληπτική εφαρμογή (2hbi) των dsRNA ($p=0.0133$). Οι καρποί της ταυτόχρονης εφαρμογής (0hbi) στις 5 ημέρες, όπως και όλοι οι καρποί που ελέγχθηκαν στις 10dpi, ανεξαρτήτως χρόνου εφαρμογής (2hbi ή 0hbi) δεν παρουσίασαν στατιστικά σημαντική διαφορά σε σχέση με τον μάρτυρα ($p>0.05$) (Διάγραμμα 5). Όσον αφορά το dsRNA που στοχεύει το γονίδιο *GFP*, αντίστοιχα με το *DCL2* γονίδιο, σε καμία περίπτωση (2/0hbi, 5/10dpi) δεν παρατηρήθηκε στατιστικά σημαντική διαφορά μεταξύ του μάρτυρα και των καρπών στους οποίους εφαρμόστηκε το dsRNA ($p>0.05$) (Διάγραμμα 6). Το GFP χρησιμοποιήθηκε ως αρνητικός μάρτυρας (negative control), και τα αποτελέσματα αυτά απέδειξαν την ειδικότητα της σίγησης και το ότι δεν υπήρξε καμία μη ειδική επίδραση της εφαρμογής του SIGS.



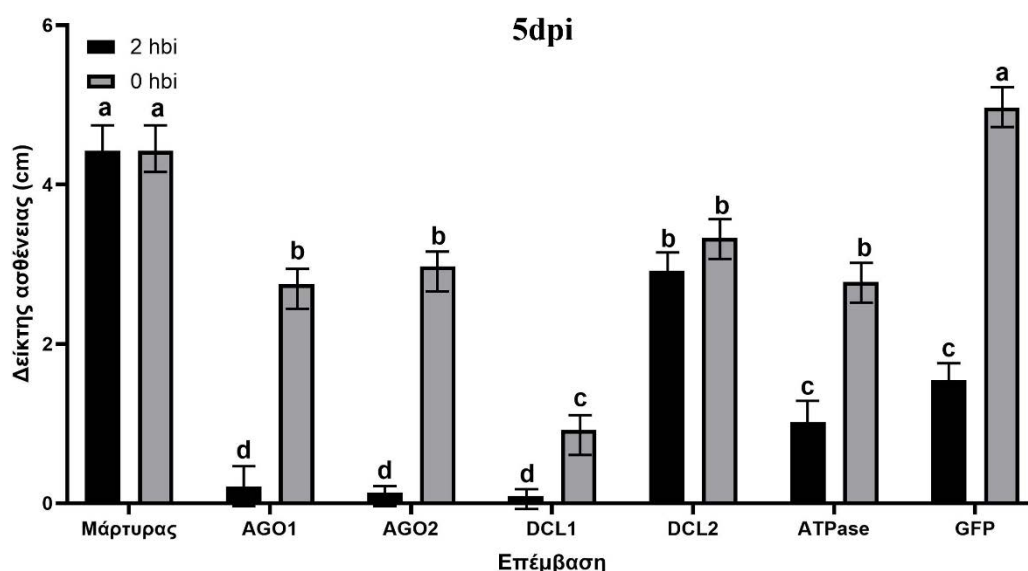
Διάγραμμα 5: Ένταση της ασθένειας σε τεχνητά μολυσμένους καρπούς πορτοκαλιάς με το παθογόνο *Penicillium digitatum*, οι οποίοι είχαν δεχθεί εφαρμογή με dsRNA που στοχεύει στη σίγηση του γονιδίου ATPase, 0 και 2 ώρες πριν τη μόλυνση (hbi)| Η αξιολόγηση της έντασης της ασθένειας πραγματοποιήθηκε (a) 5 και (b) 10 ημέρες μετά την μόλυνση (dpi), μέσω μέτρησης της διαμέτρου της σήψης στους καρπούς | Η επεξεργασία μέσω όρων βασίστηκε στην ανάλυση παραλλακτικότητας (one-way ANOVA) και οι συγκρίσεις έγιναν με το κριτήριο Tukey σε επίπεδο σημαντικότητας $p=0.05$ | Στις επεμβάσεις που παρατηρείται στατιστικώς σημαντική διαφορά παρουσιάζεται η τιμή του επιπέδου σημαντικότητας, ενώ οι κάθετες γραμμές αντιπροσωπεύουν το τυπικό σφάλμα του μέσου όρου.



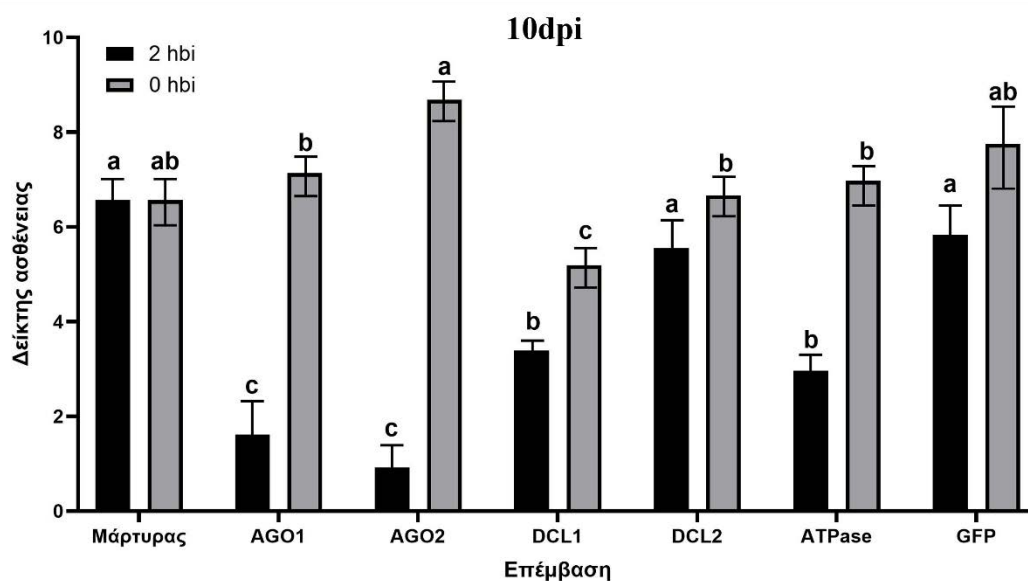
Διάγραμμα 6: Ένταση της ασθένειας σε τεχνητά μολυσμένους καρπούς πορτοκαλιάς με το παθογόνο *Penicillium digitatum*, οι οποίοι είχαν δεχθεί εφαρμογή με dsRNA που στοχεύει στη σίγηση του γονιδίου GFP, 0 και 2 ώρες πριν τη μόλυνση (hbi)| Η αξιολόγηση της έντασης της ασθένειας πραγματοποιήθηκε (a) 5 και (b) 10 ημέρες μετά την μόλυνση (dpi), μέσω μέτρησης της διαμέτρου της σήψης στους καρπούς | Η επεξεργασία μέσω όρων βασίστηκε στην ανάλυση παραλλακτικότητας (one-way ANOVA) και οι συγκρίσεις έγιναν με το κριτήριο Tukey σε επίπεδο σημαντικότητας $p=0.05$ | Στις επεμβάσεις που παρατηρείται στατιστικώς σημαντική διαφορά παρουσιάζεται η τιμή του επιπέδου σημαντικότητας, ενώ οι κάθετες γραμμές αντιπροσωπεύουν το τυπικό σφάλμα του μέσου όρου.

Για κάθε γονίδιο και κάθε χρονική στιγμή εφαρμογής των dsRNA (2hbi και 0hbi), υπολογίστηκε η τιμή του δείκτη ασθένειας, ο οποίος προκύπτει από τον συνδυασμό της έντασης της ασθένειας και της συχνότητας προσβολής των καρπών. Ο δείκτης αυτός παρέχει μια πιο ολοκληρωμένη εκτίμηση της συνολικής σοβαρότητας της ασθένειας, καθώς λαμβάνει υπόψη τόσο τη μέση έκταση της σήψης (σε cm) όσο και το ποσοστό των καρπών που έχουν προσβληθεί. Όσον αφορά τους καρπούς που ελέγχθηκαν στις 5dpi, μεταξύ των δύο τύπων εφαρμογών, δηλαδή προληπτικής (2hbi) και ταυτόχρονης

(0hbi) εφαρμογής, προέκυψε πως η προληπτική είναι πιο αποτελεσματική, με χαμηλότερο δείκτη ασθένειας για κάθε γονίδιο ανεξαιρέτως. Μεταξύ των γονιδίων, φαίνεται πως τα γονίδια *AGO1*, *AGO2* και *DCL1* στις 2hbi είχαν τον πιο χαμηλό δείκτη ασθένειας, άρα την πιο πετυχημένη σίγηση (Διάγραμμα 7), επιβεβαιώνοντας τα παραπάνω. Για τον έλεγχο στις 10dpi, προέκυψαν πάλι πιο χαμηλές τιμές του δείκτη ασθένειας για την προληπτική εφαρμογή σε σχέση με την ταυτόχρονη σε όλα τα γονίδια, αλλά αυτή τη φορά μόνο τα γονίδια *AGO1* και *AGO2* εμφάνισαν χαμηλές τιμές. Στους καρπούς που έγινε σίγηση στο *DCL1*, όπως αναφέρθηκε και παραπάνω, παρατηρήθηκε σημαντική αύξηση στην εμφάνιση της ασθένειας ανάμεσα στις 5 και στις 10dpi, και φαίνεται ξεκάθαρα στη σύγκριση των δεικτών ασθένειάς τους (Διάγραμμα 8).



Διάγραμμα 7: Σύγκριση μεταξύ προληπτικής (2 hbi) και ταυτόχρονης (0 hbi) εφαρμογής των dsRNA των επιλεγμένων γονιδίων με το τεχνητό μόλυσμα *P. digitatum* σε καρπούς πορτοκαλιάς, μέσω του δείκτη ασθένειας | hbi= hours before inoculation | Οι στήλες δείχνουν τις διαμέτρους της πράσινης σήψης που εμφανίστηκε στους καρπούς έπειτα από μόλυνση τους με το *P. digitatum* | Οι μετρήσεις έγιναν 5 ημέρες μετά την μόλυνση με το παθογόνο (5 dpi) | Οι κάθετες γραμμές αντιπροσωπεύουν το τυπικό σφάλμα του μέσου όρου.



Διάγραμμα 8: Σύγκριση μεταξύ προληπτικής (2 hbi) και ταυτόχρονης (0 hbi) εφαρμογής των dsRNA των επιλεγμένων γονιδίων με το τεχνητό μόλυσμα *P. digitatum* σε καρπούς πορτοκαλιάς, μέσω του δείκτη ασθένειας | hbi= hours before inoculation | Οι στήλες δείχνουν τις διαμέτρους της πράσινης σήψης που εμφανίστηκε στους καρπούς έπειτα από μόλυνση τους με το *P. digitatum* | Οι μετρήσεις έγιναν 10 ημέρες μετά την μόλυνση με το παθογόνο (10 dpi) | Οι κάθετες γραμμές αντιπροσωπεύουν το τυπικό σφάλμα του μέσου όρου.

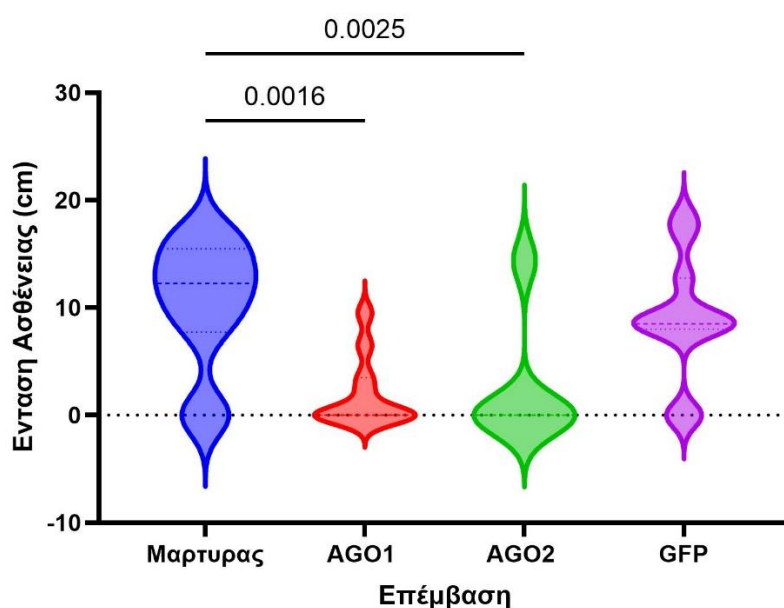
3.2 *In vivo* αξιολόγηση της αποτελεσματικότητας εφαρμογών dsRNA έναντι του *P. digitatum* σε καρπούς άλλων εσπεριδοειδών

Στόχος της ενότητας αυτής ήταν η αξιολόγηση της αποτελεσματικότητας των dsRNA που στοχεύουν στη σίγηση των γονιδίων *AGO1*, *AGO2* και *GFP* (αρνητικός μάρτυρας) για την αντιμετώπιση του παθογόνου *P. digitatum* σε καρπούς μανταρινιάς και λεμονιάς, πέντε (5) ημέρες μετά τη μόλυνσή τους (dpi), και η επιβεβαίωση της καθολικής επίδρασης των γονιδίων αυτών σε όλο το γένος των εσπεριδοειδών. Τα αποτελέσματα της παρούσας ενότητα έδειξαν σημαντικές διαφορές, όπως και της προηγούμενης ενότητας (βλ. 3.1), μεταξύ των μαρτύρων και των dsRNA που δοκιμάστηκαν.

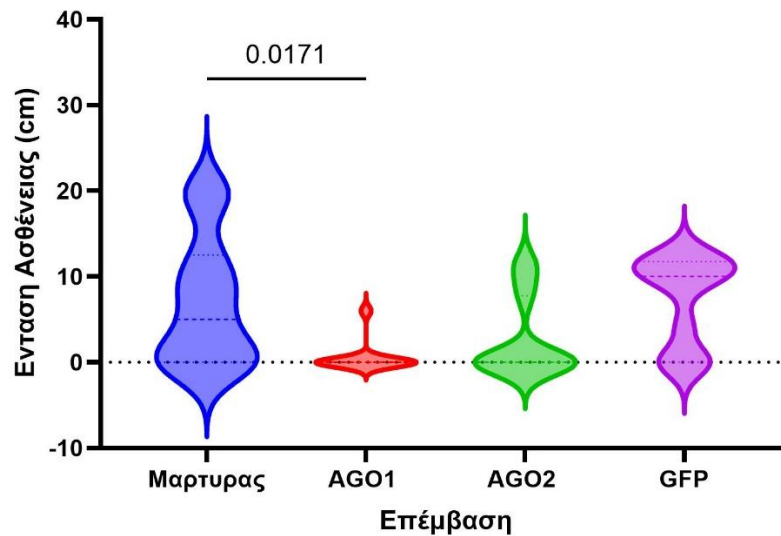
Όσον αφορά τους καρπούς μανταρινιάς, έπειτα από έλεγχο των φαινοτύπων και αξιολόγηση των διαγραμμάτων, φάνηκε μείωση της διαμέτρου των σήψεων ανάμεσα στο μάρτυρα και στους καρπούς που εφαρμόστηκαν τα dsRNA. Η εφαρμογή του dsRNA που στοχεύει στη σίγηση του *AGO1* οδήγησε σε σημαντική μείωση της ασθένειας σε σύγκριση με τον μάρτυρα ($p=0.0016$), με ανάλογα αποτελέσματα να

παρατηρούνται και στην περίπτωση του γονιδίου *AGO2* ($p=0.0025$) (Διάγραμμα 9, Εικόνα 6).

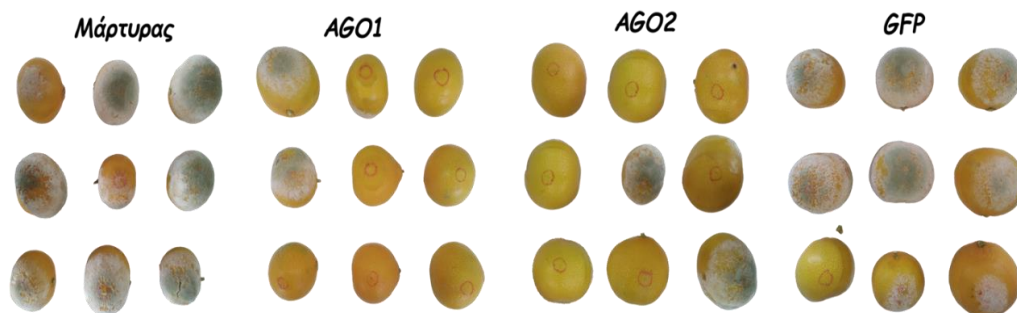
Παρόμοια και στους καρπούς λεμονιάς, ελέγχοντας τους φαινοτύπους φάνηκε μείωση της διαμέτρου των σήψεων ανάμεσα στον μάρτυρα και στους καρπούς που εφαρμόστηκαν τα dsRNA. Η εφαρμογή του dsRNA για το *AGO1* οδήγησε ξανά σε σημαντική μείωση της ασθένειας σε σχέση με τον μάρτυρα ($p=0.0171$), αλλά οι καρποί με το dsRNA για το *AGO2* δεν έδειξαν τόσο στατιστικά σημαντικά αποτελέσματα ($p>0.05$) (Διάγραμμα 10, Εικόνα 7).



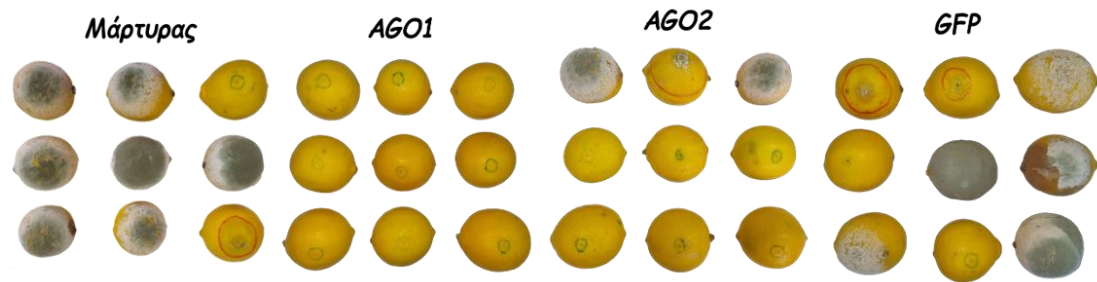
Διάγραμμα 9: Ένταση της ασθένειας σε τεχνητά μολυσμένους καρπούς μανταρινιάς με το παθογόνο *Penicillium digitatum*, οι οποίοι είχαν δεχθεί εφαρμογή με dsRNA που στοχεύουν στη σίγηση των γονιδίων *AGO1*, *AGO2* και *GFP*, 0 και 2 ώρες πριν τη μόλυνση (hbi). Η αξιολόγηση της έντασης της ασθένειας πραγματοποιήθηκε 5 ημέρες μετά την μόλυνση (dpi), μέσω μέτρησης της διαμέτρου της σήψης στους καρπούς. Η επεξεργασία μέσων όρων βασίστηκε στην ανάλυση παραλλακτικότητας (one-way ANOVA) και οι συγκρίσεις έγιναν με το κριτήριο Tukey σε επίπεδο σημαντικότητας $p=0.05$. Στις επεμβάσεις που παρατηρείται στατιστικώς σημαντική διαφορά παρουσιάζεται η τιμή του επιπέδου σημαντικότητας, ενώ οι κάθετες γραμμές αντιπροσωπεύουν το τυπικό σφάλμα του μέσου όρου.



Διάγραμμα 10: Ένταση της ασθένειας σε τεχνητά μολυσμένους καρπούς λεμονιάς με το παθογόνο *Penicillium digitatum*, οι οποίοι είχαν δεχθεί εφαρμογή με dsRNA που στοχεύουν στη σίγηση των γονιδίων AGO1, AGO2 και GFP, 0 και 2 ώρες πριν τη μόλυνση (hbi)| Η αξιολόγηση της έντασης της ασθένειας πραγματοποιήθηκε 5 ημέρες μετά την μόλυνση (dpi), μέσω μέτρησης της διαμέτρου της σήψης στους καρπούς | Η επεξεργασία μέσω όρων βασίστηκε στην ανάλυση παραλλακτικότητας (one-way ANOVA) και οι συγκρίσεις έγιναν με το κριτήριο Tukey σε επίπεδο σημαντικότητας $p=0.05$ | Στις επεμβάσεις που παρατηρείται στατιστικώς σημαντική διαφορά παρουσιάζεται η τιμή του επιπέδου σημαντικότητας, ενώ οι κάθετες γραμμές αντιπροσωπεύουν το τυπικό σφάλμα του μέσου όρου.



Εικόνα 6: Έντασης ασθένειας τεχνητά μολυσμένων καρπών μανταρινιάς με το παθογόνο *Penicillium digitatum*, οι οποίοι είχαν δεχθεί εφαρμογή με dsRNA που στοχεύουν στη σίγηση των γονιδίων AGO1, AGO2 και GFP, 2 ώρες πριν τη μόλυνση (2hbi) τους με τον μύκητα *P. digitatum* | Η αξιολόγηση της έντασης της ασθένειας πραγματοποιήθηκε 5 ημέρες μετά την μόλυνση (dpi), μέσω μέτρησης της διαμέτρου της σήψης στους καρπούς.



Εικόνα 7: Έντασης ασθένειας τεχνητά μολυσμένων καρπών λεμονιάς με το παθογόνο *Penicillium digitatum*, οι οποίοι είχαν δεχθεί εφαρμογή με dsRNA που στοχεύουν στη σίγηση των γονιδίων AGO1, AGO2 και GFP, 2 ώρες πριν τη μόλυνση (2hbi) τους με τον μύκητα *P. digitatum* | Η αξιολόγηση της έντασης της ασθένειας πραγματοποιήθηκε 5 ημέρες μετά την μόλυνση (dpi), μέσω μέτρησης της διαμέτρου της σήψης στους καρπούς.

4. Συζήτηση

Η παρούσα πτυχιακή διατριβή είχε ως στόχο την ανάπτυξη ενός βιομυκητοκτόνου εξωγενούς εφαρμογής το οποίο χρησιμοποιεί την μεθοδολογία SIGS (Spray-Induced Gene Silencing), για την αντιμετώπιση του παθογόνου μύκητα *Penicillium digitatum*, που αποτελεί το παθογόνο αίτιο της μετασυλλεκτικής ασθένειας της Πράσινης σήψης των καρπών των εσπεριδοειδών. Η SIGS αποτελεί μια τεχνική της μεθόδου σίγησης RNAi, και περιλαμβάνει την εφαρμογή εξωγενών μορίων dsRNA ή siRNA απευθείας στην επιφάνεια φυτών, με σκοπό την καταστολή σημαντικών γονιδίων για τη λειτουργία και ανάπτυξη του παθογόνου, μειώνοντας ή αποτρέποντας εντελώς την ανάπτυξη ασθένειας. Για τη διεξαγωγή του πειράματος, πραγματοποιήθηκε προσεκτική επιλογή των γονιδίων-στόχων (*AGO1*, *AGO2*, *DCL1*, *DCL2*, *ATPase*) με βάση την σημασία που διαδραματίζουν στην ανάπτυξη και παθογένεια του παθογόνου. Ακολούθησε η *in vitro* σύνθεση των dsRNA αυτών των γονιδίων, τα οποία εφαρμόστηκαν σε καρπούς εσπεριδοειδών, με στόχο την *in vivo* αξιολόγηση της αποτελεσματικότητάς τους έναντι του παθογόνου μύκητα *Pd*, αρχικά σε πορτοκάλια και έπειτα σε άλλους καρπούς εσπεριδοειδών (λεμόνια και μανταρίνια).

Στο πρώτο σκέλος της έρευνας που αφορά την αξιολόγηση της αποτελεσματικότητας των γονιδίων που επιλέχθηκαν, παρατηρήθηκε διαβάθμιση στη σίγηση των γονιδίων. Ιδιαίτερο προβληματισμό προκάλεσε η περίπτωση του γονιδίου *ATPase*, καθώς σε προγενέστερες μελέτες [17] είχε αναδειχθεί η σημασία του στην παθογένεια του *Penicillium digitatum*. Ειδικότερα, η σίγησή του είχε συσχετιστεί με μείωση της παραγωγής σπορίων και της διαμέτρου των μυκητιακών αποικιών επί των καρπών. Αντίθετα, στην παρούσα εργασία η σίγησή του παρουσίασε περιορισμένη αποτελεσματικότητα. Αυτό πιθανώς οφείλεται σε διάφορους παράγοντες, όπως σφάλματα στη σύνθεση και δράση των εκκινητών, μειωμένη ικανότητα των dsRNA να στοχεύσουν το επιθυμητό μετάγραφο του γονιδίου λόγω μειωμένης ομολογίας, υπερέκφραση του γονιδίου *ATPase*, μιας και αφορά ένζυμο καίριας σημασίας για την σωστή λειτουργία του μύκητα, ή κάποιας άλλης φυσιολογικής απόκρισης.

Αξιοσημείωτα αποτελέσματα προέκυψαν από την εφαρμογή των dsRNA που στοχεύουν τα γονίδια *AGO1* και *AGO2*, καθώς στους καρπούς που υποβλήθηκαν σε αυτές τις εφαρμογές καταγράφηκαν τα υψηλότερα επίπεδα μείωσης της ασθένειας σε σύγκριση με τα υπόλοιπα υπό μελέτη γονίδια. Η παρατήρηση αυτή είναι ιδιαιτέρως

σημαντική, καθώς υποστηρίζεται και από προηγούμενες μελέτες [51], όπου διερευνήθηκε ο ρόλος των πρωτεϊνών *Argonaute* του παθογόνου μύκητα *Botrytis cinerea* κατά την μόλυνση καρπών τομάτας. Πιο συγκεκριμένα, τα ευρήματα της εν λόγω έρευνας έδειξαν ότι λαμβάνει χώρα το φαινόμενο του cross-kingdom RNA interference (RNAi) μεταξύ του μύκητα και του φυτού-ξενιστή, με τις πρωτεΐνες *Argonaute* να εμπλέκονται τόσο στην καταστολή της αμυντικής αντίδρασης του φυτού, όσο και στη ρύθμιση γονιδίων του παθογόνου που σχετίζονται με την παθογένεια του. Συνεπώς, η σίγηση των γονιδίων *AGO* σε φυτοπαθογόνους μύκητες φαίνεται να συνδέεται άμεσα με μείωση της παθογένειάς τους. Ωστόσο, τα διαθέσιμα δεδομένα που σχετίζονται με τη συσχέτιση της σίγησης των γονιδίων *Argonaute* και της παθογένειας συγκεκριμένα σε καρπούς εσπεριδοειδών παραμένουν περιορισμένα. Οι υπάρχουσες μελέτες είτε δεν καταγράφουν τόσο έντονη αποτελεσματικότητα, όπως αυτή που παρατηρήθηκε στην παρούσα εργασία, είτε αναφέρονται σε διαφορετικά παθογόνα (π.χ. *Fusarium graminearum*) και διαφορετικούς φυτικούς ξενιστές (π.χ. κριθάρι) [45].

Αντιθέτως, σε μεγάλο αριθμό ερευνών [49] αναφέρεται ότι η στοχευμένη σίγηση των γονιδίων *Dicer* μέσω εφαρμογής dsRNA αποτελεί μία από τις πλέον αποτελεσματικές στρατηγικές μείωσης της παθογένειας φυτοπαθογόνων μυκήτων. Ωστόσο, τα ευρήματα της παρούσας μελέτης εμφανίζονται να αποκλίνουν με αυτά άλλων ερευνών. Παρότι οι εφαρμογές dsRNA που στόχευαν το γονίδιο *DCL1* παρουσίασαν αξιοσημείωτη αποτελεσματικότητα τις πρώτες ημέρες (5 dpi), συγκρίσιμη με εκείνες των γονιδίων *AGO1* και *AGO2*, στη μεταγενέστερη αξιολόγηση (10 dpi) η επίδραση της σίγησης του *DCL1* μειώθηκε σημαντικά. Μια τέτοια πτώση της αποτελεσματικότητας με την πάροδο του χρόνου είναι, έως έναν βαθμό, αναμενόμενη – όπως φάνηκε και στις εφαρμογές για τα γονίδια *AGO*. Η αποδόμηση του dsRNA από νουκλεάσες και άλλους παράγοντες του περιβάλλοντος (ξενιστή), η περιορισμένη διάρκεια δράσης της σίγησης, οι αμυντικοί μηχανισμοί του μύκητα και η δυσκολία μεταφοράς των dsRNA δίχως φορέα οφείλονται συνήθως για την πτώση μεταξύ ημερών ελέγχου [46].

Ωστόσο, στην περίπτωση του *DCL1*, η πτώση της αποτελεσματικότητας ήταν πιο έντονη, γεγονός που ενδεχομένως σχετίζεται με τις ιδιαίτερες αμυντικές ικανότητες του παθογόνου. Είναι πιθανό, κατά το διάστημα 5–10 ημερών, να έδρασε κάποιος από αυτούς τους μηχανισμούς, με αποτέλεσμα την απενεργοποίηση και την αποδόμηση των dsRNA του *DCL1*. Όλα αυτά αρμόζουν και στην περίπτωση του *DCL2*, του οποίου η

σίγηση είχε την μικρότερη αποτελεσματικότητα συγκριτικά με τα υπόλοιπα γονίδια. Αξίζει επίσης να σημειωθεί ότι τα γονίδια *Dicer* (*DCL1* και *DCL2*) και *Argonaute* (*AGO1* και *AGO2*) λειτουργούν φυσιολογικά σε συνεργασία – κατά ζεύγη – εντός του μηχανισμού RNAi, συμμετέχοντας τόσο στη σίγηση γονιδίων όσο και σε διαδικασίες όπως η διακυτταρική επικοινωνία. Δεδομένου ότι στην παρούσα μελέτη τα γονίδια εξετάστηκαν μεμονωμένα και όχι σε συνδυασμό, είναι πιθανό αυτό να επηρέασε αρνητικά την αποδοτικότητα της παρέμβασης ειδικά στην περίπτωση των *Dicer*.

Ένας ακόμη σημαντικός παράγοντας που διερευνήθηκε στο πρώτο σκέλος του πειράματος ήταν η χρονική στιγμή εφαρμογής των μορίων dsRNA στους καρπούς-ξενιστές. Συγκεκριμένα, συγκρίθηκε η προληπτική εφαρμογή των dsRNA δύο ώρες πριν τη μόλυνση με *P. digitatum*, σε σχέση με τη ταυτόχρονη εφαρμογή των dsRNA και του παθογόνου. Τα αποτελέσματα κατέδειξαν καθαρά ότι η προληπτική εφαρμογή ήταν πιο αποτελεσματική, καθώς η ένταση της ασθένειας ήταν σημαντικά χαμηλότερη, γεγονός που υποδεικνύει αυξημένη καταστολή του παθογόνου. Η ενισχυμένη αποτελεσματικότητα της προέκθεσης πιθανόν εξηγείται από τη δυνατότητα ενεργοποίησης του μηχανισμού cross-kingdom RNAi (ckRNAi). Σύμφωνα με αυτό το φαινόμενο, το φυτικό κύτταρο έχει τον χρόνο να απορροφήσει και να επεξεργαστεί τα εξωγενή μόρια dsRNA, δημιουργώντας έναν λειτουργικό μηχανισμό σίγησης πριν την εγκατάσταση του παθογόνου. Έτσι, κατά την είσοδο του μύκητα, τα σιγούμενα γονίδια –όπως τα *AGO*– είναι ήδη υπό καταστολή, με αποτέλεσμα να μειώνεται η παθογένεια. Αντίθετα, στη ταυτόχρονη εφαρμογή, δεν παρέχεται επαρκής χρόνος για την επαγωγή του μηχανισμού RNAi στον ξενιστή, με συνέπεια χαμηλότερη αποτελεσματικότητα.

Στο τελευταίο στάδιο του πειράματος, οι εφαρμογές με dsRNA που στοχεύουν την σίγηση των γονιδίων *AGO1* και *AGO2* σε άλλους ξενιστές του γένους των εσπεριδοειδών, όπως τα μανταρίνια και τα λεμόνια, εμφάνισαν μεγάλες διαφορές συγκριτικά με τους καρπούς του μάρτυρα. Η αξιολόγηση αυτών των δεδομένων απέδειξε πως ο μηχανισμός της σίγησης του παθογόνου *P. digitatum* εμφανίζει μεγάλη αποτελεσματικότητα πιθανότατα σε όλα τα εσπεριδοειδή, προτείνοντας μια συντηρημένη διαδικασία RNA σίγησης σε ξενιστές κοινού γένους. Αντίστοιχα ευρήματα έχουν αναφερθεί και σε άλλες μελέτες [47], όπου εξετάστηκε η εφαρμογή RNA σίγησης σε διαφορετικά είδη του γένους *Solanum* (π.χ. πατάτα και ντομάτα), με στόχο την αντιμετώπιση του παθογόνου *Botrytis cinerea*. Και στις δύο περιπτώσεις, παρατηρήθηκε ότι οι επεμβάσεις με dsRNA παρουσίασαν σταθερή

αποτελεσματικότητα εντός φυτών ξενιστών του ιδίου γένους. Συνεπώς, τα αποτελέσματα της παρούσας και των προγενέστερων ερευνών συγκλίνουν στην ύπαρξη ενός συντηρημένου, γονιδιακά συμβατού μηχανισμού σίγησης RNA ανάμεσα σε συγγενικά είδη φυτικών ξενιστών.

Συνολικά, τα αποτελέσματα της παρούσας έρευνας αναδεικνύουν τη δυνατότητα αξιοποίησης της μεθοδολογίας SIGS ως μια καινοτόμα και στοχευμένη στρατηγική καταπολέμησης του *Penicillium digitatum* σε καρπούς εσπεριδοειδών. Η υψηλή αποτελεσματικότητα της σίγησης των γονιδίων *AGO1* και *AGO2*, σε συνδυασμό με τη διατήρηση της δράσης τους σε διαφορετικά είδη του γένους *Citrus*, υποδεικνύει την ύπαρξη ενός συντηρημένου μηχανισμού RNA σίγησης σε φυτικούς ξενιστές κοινής φυλογενετικής προέλευσης. Παράλληλα, η διαφοροποιημένη απόκριση των γονιδίων *Dicer* και η επίδραση της χρονικής στιγμής εφαρμογής τονίζουν τη σημασία της ακριβούς βιοτεχνολογικής σχεδίασης και της κατανόησης των βιολογικών αλληλεπιδράσεων φυτού–παθογόνου. Τα ευρήματα αυτά προσφέρουν πολύτιμη γνώση για τη στοχευμένη ανάπτυξη νέων βιομυκητοκτόνων σκευασμάτων RNAi και θέτουν τη βάση για μελλοντικές εφαρμογές σε άλλα είδη φυτών και παθογόνων, με στόχο τη βιώσιμη φυτοπροστασία και την μετάβαση σε μία πιο αειφόρο γεωργία.

Βιβλιογραφία

- [1]: Μιλτιάδης Βασιλακάκης (2016), Γενική και Ειδική Δενδροκομία, Εκδόσεις Γαρταγάνη, Θεσσαλονίκη, σελ. 1137-1141
- [2]: Liu, Y., Heying, E., & Tanumihardjo, S. A. (2012). History, global distribution, and nutritional importance of citrus fruits. *Comprehensive Reviews in Food Science and Food Safety*, 11(6), 530–545. <https://doi.org/10.1111/j.1541-4337.2012.00201.x>
- [3]: Sharma, P., Roy, M., & Roy, B. (2021). A brief overview of major citrus diseases and pests and its management. In *Book Publisher International (a part of SCIENCE DOMAIN International)* (pp. 95–110). <https://doi.org/10.9734/bpi/ctas/v1/13548d>
- [4]: Naqvi, S. a. M. H. (2006). Diagnosis and Management of Pre and Post-harvest Diseases of Citrus fruit. In *Kluwer Academic Publishers eBooks* (pp. 339–359). https://doi.org/10.1007/1-4020-2606-4_8
- [5]: Παναγόπουλος Γ.Χ. (2007), Ασθένειες Καρποφόρων Δένδρων & Αμπελών, Εκδόσεις Σταμούλης, Θεσσαλονίκη, σελ. 334-338
- [6]: Ashebre, K. M. (2015). Pre-Harvest and Post-Harvest factors affecting citrus fruit and Post-Harvest treatments. *Journal of Biology Agriculture and Healthcare*, 5(23), 19–29. <https://www.iiste.org/Journals/index.php/JBAH/article/download/27566/28281>
- [7]: Wang, M., Ruan, R., & Li, H. (2021). The completed genome sequence of the pathogenic ascomycete fungus *Penicillium digitatum*. *Genomics*, 113(2), 439–446. <https://doi.org/10.1016/j.ygeno.2021.01.001>
- [8]: Cheng, Y., Lin, Y., Cao, H., & Li, Z. (2020). Citrus Postharvest Green mold: recent advances in fungal pathogenicity and fruit resistance. *Microorganisms*, 8(3), 449. <https://doi.org/10.3390/microorganisms8030449>
- [9]: Costa, J. H., Bazioli, J. M., De Moraes Pontes, J. G., & Fill, T. P. (2019). *Penicillium digitatum* infection mechanisms in citrus: What do we know so far? *Fungal Biology*, 123(8), 584–593. <https://doi.org/10.1016/j.funbio.2019.05.004>
- [10]: Ma, H., Sun, X., Wang, M., Gai, Y., Chung, K., & Li, H. (2016). The citrus postharvest pathogen *Penicillium digitatum* depends on the PdMpkB kinase for developmental and virulence functions. *International Journal of Food Microbiology*, 236, 167–176. <https://doi.org/10.1016/j.ijfoodmicro.2016.08.001>
- [12]: Sánchez-Torres, P. Molecular Mechanisms Underlying Fungicide Resistance in Citrus Postharvest Green Mold. *J. Fungi* **2021**, 7, 783. <https://doi.org/10.3390/jof7090783>

- [13]: Nicolás, F. E., & Garre, V. (2017). RNA interference in fungi: retention and loss. In *ASM Press eBooks* (pp. 657–671). <https://doi.org/10.1128/9781555819583.ch31>
- [14]: Torres-Martínez, S., & Ruiz-Vázquez, R. M. (2017). The RNAi Universe in Fungi: A varied landscape of small RNAs and biological functions. *Annual Review of Microbiology*, 71(1), 371–391. <https://doi.org/10.1146/annurev-micro-090816-093352>
- [15]: Gebremichael, D.E.; Haile, Z.M.; Negrini, F.; Sabbadini, S.; Capriotti, L.; Mezzetti, B.; Baraldi, E. RNA Interference Strategies for Future Management of Plant Pathogenic Fungi: Prospects and Challenges. *Plants* **2021**, *10*, 650. <https://doi.org/10.3390/plants10040650>
- [16]: Mascia, T., Nigro, F., Abdallah, A., Ferrara, M., De Stradis, A., Faedda, R., Palukaitis, P., & Gallitelli, D. (2014). Gene silencing and gene expression in phytopathogenic fungi using a plant virus vector. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 111(11), 4291–4296. <https://doi.org/10.1073/pnas.1315668111>
- [17]: Zhao, Y., Yan, D., Liu, J., Yang, S., Li, D., & Peng, L. (2023). Vacuolar ATPase subunit H regulates growth development and pathogenicity of *Penicillium digitatum*. *Postharvest Biology and Technology*, 199, 112295. <https://doi.org/10.1016/j.postharvbio.2023.112295>
- [18]: He, L., Zhou, Y., Mo, Q., Huang, Y., & Tang, X. (2024). Spray-induced gene silencing in phytopathogen: Mechanisms, applications, and progress. *Advanced Agrochem*. <https://doi.org/10.1016/j.aac.2024.06.001>
- [19]: Wang, M., & Jin, H. (2016). Spray-Induced Gene Silencing: a Powerful Innovative Strategy for Crop Protection. *Trends in Microbiology*, 25(1), 4–6. <https://doi.org/10.1016/j.tim.2016.11.011>
- [20]: Vetukuri, R. R., Dubey, M., Kalyandurg, P. B., Carlsson, A. S., Whisson, S. C., & Ortiz, R. (2021). Spray-induced gene silencing: an innovative strategy for plant trait improvement and disease control. *Crop Breeding and Applied Biotechnology*, 21(spe). <https://doi.org/10.1590/1984-70332021v21sa24>
- [21]: Qiao, L., Lan, C., Capriotti, L., Ah-Fong, A., Sanchez, J. N., Hamby, R., Heller, J., Zhao, H., Glass, N. L., Judelson, H. S., Mezzetti, B., Niu, D., & Jin, H. (2021). Spray-induced gene silencing for disease control is dependent on the efficiency of pathogen RNA uptake. *Plant Biotechnology Journal*, 19(9), 1756–1768. <https://doi.org/10.1111/pbi.13589>
- [22]: Koch, A., Biedenkopf, D., Furch, A., Weber, L., Rossbach, O., Abdellatif, E., Linicus, L., Johannsmeier, J., Jelonek, L., Goesmann, A., Cardoza, V., McMillan, J., Mentzel, T., & Kogel, K. (2016). An RNAi-Based Control of *Fusarium graminearum* Infections Through Spraying of Long dsRNAs Involves a Plant Passage and Is Controlled by the Fungal Silencing Machinery. *PLoS Pathogens*, 12(10), e1005901. <https://doi.org/10.1371/journal.ppat.1005901>

- [23]: Kalyandurg, P. B., Sundararajan, P., Dubey, M., Ghadamgahi, F., Zahid, M. A., Whisson, S. C., & Vetukuri, R. R. (2021). Spray-Induced Gene Silencing as a potential tool to control potato late blight disease. *Phytopathology*, 111(12), 2168–2175. <https://doi.org/10.1094/phyto-02-21-0054-sc>
- [24]: Koch, A., Höfle, L., Werner, B. T., Imani, J., Schmidt, A., Jelonek, L., & Kogel, K. (2019). SIGS vs HIGS: a study on the efficacy of two dsRNA delivery strategies to silence *Fusarium FgCYP51* genes in infected host and non-host plants. *Molecular Plant Pathology*, 20(12), 1636–1644. <https://doi.org/10.1111/mpp.12866>
- [25]: Koeppe, S., Kawchuk, L., & Kalischuk, M. (2023). RNA interference past and future applications in plants. *International Journal of Molecular Sciences*, 24(11), 9755. <https://doi.org/10.3390/ijms24119755>
- [26]: Dalakouras, A., Wassenegger, M., Dadami, E., Ganopoulos, I., Pappas, M. L., & Papadopoulou, K. (2019). Genetically Modified Organism-Free RNA interference: Exogenous application of RNA molecules in plants. *PLANT PHYSIOLOGY*, 182(1), 38–50. <https://doi.org/10.1104/pp.19.00570>
- [27]: Rank, A. P., & Koch, A. (2021). Lab-to-Field transition of RNA spray applications – How far are we? *Frontiers in Plant Science*, 12. <https://doi.org/10.3389/fpls.2021.755203>
- [28]: Song, X., Gu, K., Duan, X., Xiao, X., Hou, Y., Duan, Y., Wang, J., Yu, N., & Zhou, M. (2018). Secondary amplification of siRNA machinery limits the application of spray-induced gene silencing. *Molecular Plant Pathology*, 19(12), 2543–2560. <https://doi.org/10.1111/mpp.12728>
- [29]: Vetukuri, R. R., Dubey, M., Kalyandurg, P. B., Carlsson, A. S., Whisson, S. C., & Ortiz, R. (2021). Spray-induced gene silencing: an innovative strategy for plant trait improvement and disease control. *Crop Breeding and Applied Biotechnology*, 21(spe). <https://doi.org/10.1590/1984-70332021v21sa24>
- [30]: Hu, D., Chen, Z., Zhang, C., & Ganiger, M. (2020). Reduction of *Phakopsora pachyrhizi* infection on soybean through host- and spray-induced gene silencing. *Molecular Plant Pathology*, 21(6), 794–807. <https://doi.org/10.1111/mpp.12931>
- [31]: Bliss M. Beernink, Nazanin Amanat, Vivian H. Li, Christopher L. Manchur, Steve Whyard & Mark F. Belmonte (2024) SIGS vs. HIGS: opportunities and challenges of RNAi pest and pathogen control strategies, *Canadian Journal of Plant Pathology*, 46:6, 675-689, DOI: 10.1080/07060661.2024.2392610
- [32]: Austein G. McLoughlin, Philip L. Walker, Nick Wytinck, Daniel S. Sullivan, Steve Whyard & Mark F. Belmonte (2018) Developing new RNA interference technologies to control fungal pathogens, *Canadian Journal of Plant Pathology*, 40:3, 325-335, DOI: 10.1080/07060661.2018.1495268

- [33]: Choudry, M. W., Nawaz, P., Jahan, N., Riaz, R., Ahmed, B., Raza, M. H., Fayyaz, Z., Malik, K., & Afzal, S. (2024). RNA based gene silencing modalities to control insect and fungal plant pests – Challenges and future prospects. *Physiological and Molecular Plant Pathology*, 130, 102241. <https://doi.org/10.1016/j.pmpp.2024.102241>
- [34]: Mahanty, B., Mishra, R., & Joshi, R. K. (2023). Cross-kingdom small RNA communication between plants and fungal phytopathogens-recent updates and prospects for future agriculture. *RNA Biology*, 20(1), 109–119. <https://doi.org/10.1080/15476286.2023.2195731>
- [35]: Cai, Q., He, B., Kogel, K., & Jin, H. (2018). Cross-kingdom RNA trafficking and environmental RNAi — nature’s blueprint for modern crop protection strategies. *Current Opinion in Microbiology*, 46, 58–64. <https://doi.org/10.1016/j.mib.2018.02.003>
- [36]: Wang, M., Weiberg, A., Lin, F., Thomma, B. P. H. J., Huang, H., & Jin, H. (2016). Bidirectional cross-kingdom RNAi and fungal uptake of external RNAs confer plant protection. *Nature Plants*, 2(10). <https://doi.org/10.1038/nplants.2016.151>
- [37]: Islam, M. T., Davis, Z., Chen, L., Englaender, J., Zomorodi, S., Frank, J., Bartlett, K., Somers, E., Carballo, S. M., Kester, M., Shakeel, A., Pourtaheri, P., & Sherif, S. M. (2021). Minicell-based fungal RNAi delivery for sustainable crop protection. *Microbial Biotechnology*, 14(4), 1847–1856. <https://doi.org/10.1111/1751-7915.13699>
- [38]: McRae, A. G., Taneja, J., Yee, K., Shi, X., Haridas, S., LaButti, K., Singan, V., Grigoriev, I. V., & Wildermuth, M. C. (2023). Spray-induced gene silencing to identify powdery mildew gene targets and processes for powdery mildew control. *Molecular Plant Pathology*, 24(9), 1168–1183. <https://doi.org/10.1111/pp.13361>
- [39]: Chen, C., Imran, M., Feng, X., Shen, X., & Sun, Z. (2025). Spray-induced gene silencing for crop protection: recent advances and emerging trends. *Frontiers in Plant Science*, 16. <https://doi.org/10.3389/fpls.2025.1527944>
- [40]: Ahmed, F., Senthil-Kumar, M., Dai, X., Ramu, V. S., Lee, S., Mysore, K. S., & Zhao, P. X. (2020). pssRNAit: A Web Server for Designing Effective and Specific Plant siRNAs with Genome-Wide Off-Target Assessment. *PLANT PHYSIOLOGY*, 184(1), 65–81. <https://doi.org/10.1104/pp.20.00293>
- [41]: Lin, S., Luo, P., Yuan, E., Zhu, X., Zhang, B., & Wu, X. (2020). Physiological and Proteomic Analysis of *Penicillium digitatum* in Response to X33 Antifungal Extract Treatment. *Frontiers in Microbiology*, 11. <https://doi.org/10.3389/fmicb.2020.584331>
- [42]: Bazioli, J. M., Belinato, J. R., Costa, J. H., Akiyama, D. Y., De Moraes Pontes, J. G., Kupper, K. C., Augusto, F., De Carvalho, J. E., & Fill, T. P. (2019). Biological control of citrus postharvest phytopathogens. *Toxins*, 11(8), 460. <https://doi.org/10.3390/toxins11080460>

- [43]: Desouki, A., Reda, L. A., Shehata, S., & Rashed, M. (2023). Morphological and Molecular Identification of *Penicillium digitatum* Causing Green Mould of Citrus Fruits in Egypt. *Arab Universities Journal of Agricultural Sciences*, 0(0), 0. <https://doi.org/10.21608/ajs.2023.211771.1520>
- [44]: Fernandez-Bunster, G. (2021). Diversity, phylogenetic profiling of genus *penicillium*, and their potential applications. In *Fungal biology* (pp. 335–361). https://doi.org/10.1007/978-3-030-67561-5_10
- [45]: Werner, B. T., Gaffar, F. Y., Schuemann, J., Biedenkopf, D., & Koch, A. M. (2020). RNA-Spray-Mediated Silencing of *Fusarium graminearum* AGO and DCL Genes Improve Barley Disease Resistance. *Frontiers in Plant Science*, 11. <https://doi.org/10.3389/fpls.2020.00476>
- [46]: van Rijn C.P.E., Jongekrijg C. D., de Jong E. (2024). Risk assessment of plant protection products based on dsRNA/RNAi. *National Institute for Public Health and the Environment, RIVM*. DOI 10.21945/RIVM-2023-0456
- [47]: Sun, K., Van Tuinen, A., Van Kan, J. a. L., Wolters, A. A., Jacobsen, E., Visser, R. G. F., & Bai, Y. (2017). Silencing of DND1 in potato and tomato impedes conidial germination, attachment and hyphal growth of *Botrytis cinerea*. *BMC Plant Biology*, 17(1). <https://doi.org/10.1186/s12870-017-1184-2>
- [48]: FAO. 2021. *Citrus Fruit Statistical Compendium 2020*. Rome
- [49]: Yin, C., Zhu, H., Jiang, Y., Shan, Y., & Gong, L. (2020). Silencing Dicer-Like Genes Reduces Virulence and sRNA Generation in *Penicillium italicum*, the Cause of Citrus Blue Mold. *Cells*, 9(2), 363. <https://doi.org/10.3390/cells9020363>
- [50]: He, B., Cai, Q., Weiberg, A., Li, W., Cheng, A., Ouyang, S., Borkovich, K., Stajich, J., Abreu-Goodger, C., & Jin, H. (2023). *Botrytis cinerea* small RNAs are associated with tomato AGO1 and silence tomato defense-related target genes supporting cross-kingdom RNAi. *bioRxiv (Cold Spring Harbor Laboratory)*. <https://doi.org/10.1101/2022.12.30.522274>
- [51]: Weiberg, A., Cheng, A., Huang, L., Oberkofler, L., Johnson, N. R., Salinas, F., Wange, L., Enard, W., Glodeanu, S., & Stillman, K. (2024). Fungal Argonaute proteins act in bidirectional cross-kingdom RNA interference during plant infection. *Research Square (Research Square)*. <https://doi.org/10.21203/rs.3.rs-4183067/v1>
- [52]: <https://1click.minagric.gr/oneClickUI/frmFytoPro.zul>
- [53]: Bhatta, U. K. (2022). Alternative Management Approaches of Citrus Diseases Caused by *Penicillium digitatum* (Green Mold) and *Penicillium italicum* (Blue Mold). *Frontiers in Plant Science*, 12. <https://doi.org/10.3389/fpls.2021.833328>
- [54]: Li, Y., Xia, M., He, P., Yang, Q., Wu, Y., He, P., Ahmed, A., Li, X., Wang, Y., Munir, S., & He, Y. (2022). Developing *Penicillium digitatum* Management Strategies

on Post-Harvest Citrus Fruits with Metabolic Components and Colonization of *Bacillus subtilis* L1-21. *Journal of Fungi*, 8(1), 80. <https://doi.org/10.3390/jof8010080>

[55]: Mohammadi, P., Tozlu, E., Kotan, R., & Kotan, M. Ş. (2017). Potential of some bacteria for biological control of postharvest citrus green mould caused by *Penicillium digitatum*. *Plant Protection Science*, 53(3), 134–143. <https://doi.org/10.17221/55/2016-pps>

[56]: Lemic, D., Galešić, M. A., Bjeliš, M., & Gasparic, H. V. (2024). Ozone treatment as a sustainable alternative for suppressing blue mold in mandarins and extending shelf life. *Agriculture*, 14(7), 1196. <https://doi.org/10.3390/agriculture14071196>

[57]: Wu, W., Cao, S., Chen, H., Ruan, L., Lei, Q., Xu, S., & Li, J. (2022). Effects of Ozone Fumigation on the Main Postharvest Pathogenic Fungi *Penicillium* sp. and the Storage Quality of Blueberry in Majiang County, China. *Frontiers in Plant Science*, 13. <https://doi.org/10.3389/fpls.2022.898994>

[58]: Phonyiam, O., Ohara, H., Kondo, S., Naradisorn, M., & Setha, S. (2021). Postharvest UV-C Irradiation Influenced Cellular Structure, Jasmonic Acid Accumulation, and Resistance Against Green Mold Decay in Satsuma Mandarin Fruit (*Citrus unshiu*). *Frontiers in Sustainable Food Systems*, 5. <https://doi.org/10.3389/fsufs.2021.684434>

[59]: Díaz-Montes, E., & Castro-Muñoz, R. (2021). Edible Films and Coatings as Food-Quality Preservers: An Overview. *Foods*, 10(2), 249. <https://doi.org/10.3390/foods10020249>

[60]: Eckert, J. W., & Eaks, I. L. (1989). *Postharvest Disorders and Diseases of Citrus Fruits*. In *The Citrus Industry* (Vol. 5).

[61]: Smilanick, J. L., et al. (2006). *Control of citrus green mold by fumigation with hydrogen peroxide and ethanol*. *Postharvest Biology and Technology*, 40(3), 226-232.

[62]: Palou, L., et al. (2008). *Postharvest management of citrus fruit with antifungal chemical treatments*. *Stewart Postharvest Review*, 4(2), 1-16.

[63]: BioNext sprl, Passage des Déportés 2, B-5030 Gembloux, BELGIUM. *Candida oleophila* Strain O (021010) Fact Sheet. Ombudsman, Biopesticides and Pollution Prevention Division (7511P) Office of Pesticide Programs

[64]: <https://www.alettri.gr/products/xedathane-20>