



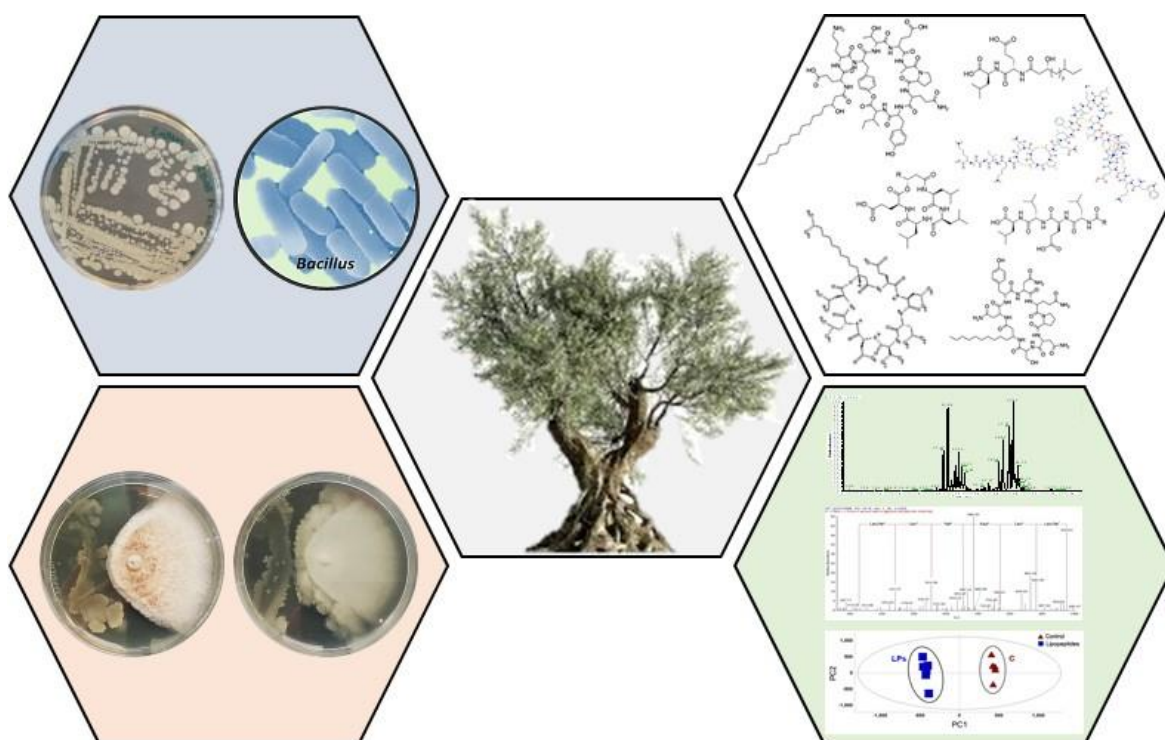
ΕΛΛΗΝΙΚΗ ΔΗΜΟΚΡΑΤΙΑ
Εθνικόν και Καποδιστριακόν
Πανεπιστήμιον Αθηνών
— ΙΔΡΥΘΕΝ ΤΟ 1837 —

ΣΧΟΛΗ ΕΠΙΣΤΗΜΩΝ ΥΓΕΙΑΣ
ΤΜΗΜΑ ΦΑΡΜΑΚΕΥΤΙΚΗΣ

ΤΟΜΕΑΣ ΦΑΡΜΑΚΟΓΝΩΣΙΑΣ ΚΑΙ
ΧΗΜΕΙΑΣ ΦΥΣΙΚΩΝ ΠΡΟΪΟΝΤΩΝ

ΜΕΤΑΠΤΥΧΙΑΚΗ ΜΕΛΕΤΗ

Ενδόφυτα Ελιάς: Μελέτη και αξιολόγησή τους ως πηγές
βιοδραστικών ουσιών για χρήση στη Φυτοπροστασία



ΑΝΝΑ-ΕΥΓΕΝΙΑ ΠΑΠΑΔΟΠΟΥΛΟΥ
ΓΕΩΠΟΝΟΣ

Π.Μ.Σ. ΑΠΟΜΟΝΩΣΗ, ΑΝΑΛΥΣΗ, ΠΑΡΑΓΩΓΗ ΚΑΙ ΕΛΕΓΧΟΣ ΒΙΟΔΡΑΣΤΙΚΩΝ
ΦΥΣΙΚΩΝ ΠΡΟΪΟΝΤΩΝ

ΕΠΙΒΛΕΠΩΝ ΚΑΘΗΓΗΤΗΣ: ΑΛΕΞΙΟΣ-ΛΕΑΝΔΡΟΣ ΣΚΑΛΤΣΟΥΝΗΣ

ΑΘΗΝΑ 2020

Εθνικό και Καποδιστριακό Πανεπιστήμιο Αθηνών
Σχολή Επιστημών Υγείας
Τμήμα Φαρμακευτικής
Τομέας Φαρμακογνωσίας και Χημείας Φυσικών Προϊόντων

Π.Μ.Σ.:

Απομόνωση, Ανάπτυξη, Παραγωγή και Έλεγχος Βιοδραστικών
Φυσικών Προϊόντων

Τίτλος μεταπτυχιακής μελέτης:

Ενδόφυτα Ελιάς: Μελέτη και αξιολόγησή τους ως πηγές βιοδραστικών
ουσιών για χρήση στη Φυτοπροστασία

Στοιχεία Φοιτήτριας:

Παπαδοπούλου Άννα-Ευγενία

A.M: 181604

Τριμελής Εξεταστική Επιτροπή:

Επιβλέπων Καθηγητής:

Σκαλτσούνης Αλέξιος-Λέανδρος, Καθηγητής Ε.Κ.Π.Α., Τομέας
Φαρμακογνωσίας και Χημείας Φυσικών Προϊόντων

Μέλη:

Χαλαμπαλάκη Μαρία, Επίκουρη Καθηγήτρια Ε.Κ.Π.Α., Τομέας
Φαρμακογνωσίας και Χημείας Φυσικών Προϊόντων

Αλιφέρης Κωνσταντίνος, Λέκτορας Γ.Π.Α., Εργ. Γεωργικής Φαρμακολογίας

Ευχαριστίες

Για την εκπόνηση της μεταπτυχιακής μου μελέτης, θα ήθελα να απευθύνω θερμές ευχαριστίες σε όλους όσους συνετέλεσαν στη διεξαγωγή και ολοκλήρωση αυτού του κύκλου σπουδών μου. Αρχικά, να ευχαριστήσω τον επιβλέποντα καθηγητή της διπλωματικής μου εργασίας κ. Αλέξιο-Λέανδρο Σκαλτσούνη, Καθηγητή του Τομέα Φαρμακογνωσίας και Χημείας Φυσικών Προϊόντων, για την επιλογή του να συμμετέχω στο συγκεκριμένο πρόγραμμα μεταπτυχιακών σπουδών, για τις ευκαιρίες που μου προσέφερε, καθώς και για την εμπιστοσύνη που μου έδειξε.

Επίσης, θα ήθελα να εκφράσω τις ευχαριστίες μου στον κ. Κωνσταντίνο Α. Αλιφέρη, Λέκτορα του Εργαστηρίου Γεωργικής Φαρμακολογίας του Γεωπονικού Πανεπιστημίου Αθηνών, για τη συμμετοχή του στην Τριμελή Εξεταστική Επιτροπή, αλλά και για τον ενεργό ρόλο του καθ' όλη τη διάρκεια της διπλωματικής μου εργασίας και την αμέριστη βοήθεια και στήριξή του από προπτυχιακό, ακόμα, επίπεδο μέχρι σήμερα. Να ευχαριστήσω, επίσης, την κ. Μαρία Χαλαμπαλάκη, Επίκουρη Καθηγήτρια του Τομέα Φαρμακογνωσίας και Χημείας Φυσικών Προϊόντων, τόσο για τη συμμετοχή της στην Τριμελή Επιτροπή, όσο και για την πολύτιμη συνεργασία και συνδρομή της στη λήψη, επεξεργασία και ερμηνεία των φασμάτων μάζας, τα οποία διαδραμάτισαν καθοριστικό ρόλο στην πειραματική πορεία. Επιπλέον, θα ήθελα να ευχαριστήσω την κ. Σοφία Μητάκου, Καθηγήτρια του Τομέα Φαρμακογνωσίας και Χημείας Φυσικών Προϊόντων, για το ενδιαφέρον, τις συμβουλές της και τη διόρθωση της παρούσας μελέτης.

Δεν θα μπορούσα να παραλείψω να ευχαριστήσω από καρδιάς το μεταδιδάκτορα Αποστόλη Αγγελή για το ασίγηστο ενδιαφέρον και ενθουσιασμό του κατά τη διάρκεια της πειραματικής διαδικασίας, τη διαρκή καθοδήγησή του και την εμπιστοσύνη και υπομονή του σε όλα τα στάδια της μεταπτυχιακής μου μελέτης. Ακόμα, ένα μεγάλο ευχαριστώ στην υποψήφια διδάκτορα Μόνικα Αντωνιάδη για την ανεκτίμητη συνεισφορά της σε όλα τα επίπεδα, από την αρχική εξοικείωση με το εργαστήριο και την εκμάθηση των εργαστηριακών τεχνικών, την εκτέλεση των πειραμάτων, τη συγγραφή της διπλωματικής εργασίας έως και την ψυχολογική υποστήριξή της.

Ιδιαίτερα σημαντική ήταν και η συμβολή της μεταδιδάκτορας Θεοδώρας Νίκου στη λήψη και ερμηνεία των φασμάτων μάζας, καθώς και του υποψήφιου διδάκτορα

Δημήτρη Μιχαηλίδη στην εξοικείωση με τις εργαστηριακές τεχνικές. Επιπροσθέτως, ευχαριστώ τον υποψήφιο διδάκτορα Ιωάννη Καλαμπόκη, η εμπειρία του οποίου φάνηκε εξαιρετικά χρήσιμη σε διάφορα στάδια της μελέτης.

Ευχαριστώ θερμά όλα τα μέλη του εργαστηρίου για την άψογη συνεργασία και το ευχάριστο κλίμα εργασίας που είχαμε κατά τη διάρκεια εκπόνησης της μελέτης, καθώς και τα μέλη της ομάδας του κ. Αλιφέρη (Pesticides Metabolomics Group) του Εργαστηρίου Γεωργικής Φαρμακολογίας του Γ.Π.Α. για την κατανόησή τους όσον αφορά τον περιορισμένο χρόνο που είχα εκεί και τη διευκόλυνση της εργασίας μου. Τέλος, δεν θα μπορούσα να μην ευχαριστήσω τα μέλη της οικογένειάς μου, για όλες τις θυσίες που έχουν κάνει και για τη στήριξή τους καθ' όλη τη διάρκεια των σπουδών μου, καθώς και τους φίλους μου που ήταν κοντά μου.

ANNA-ΕΥΓΕΝΙΑ ΠΑΠΑΔΟΠΟΥΛΟΥ

ΠΕΡΙΕΧΟΜΕΝΑ

Περίληψη.....	13
Abstract.....	15
1. Θεωρητικό Μέρος.....	17
1.1 Ελιά - <i>Olea europaea</i> L.	19
1.1.1 Ιστορικά στοιχεία και γεωγραφική εξάπλωση.....	19
1.1.2 Συστηματική κατάταξη και βοτανικά χαρακτηριστικά.....	20
1.1.3 Η σημασία της ελαιοκαλλιέργειας σε εθνικό, ευρωπαϊκό και διεθνές επίπεδο.....	22
1.2 Εχθροί και παθογόνα της ελιάς.....	26
1.2.1 Εντομολογικοί εχθροί.....	26
1.2.2 Μυκητολογικές-βακτηριολογικές ασθένειες.....	28
1.2.3 Το γλοιοσπόριο (ανθράκωση) της ελιάς (<i>Colletotrichum</i> spp.).....	30
1.2.3.1 Συμπτώματα της ασθένειας.....	30
1.2.3.2 Παθογόνο αίτιο.....	32
1.2.3.3 Συνθήκες ανάπτυξης παθογόνου-Κύκλος ασθένειας.....	33
1.2.3.4 Μέτρα αντιμετώπισης της ασθένειας.....	35
1.3 Σύγχρονες προκλήσεις που αντιμετωπίζει ο φαρμακευτικός τομέας και ο τομέας της φυτοπροστασίας και ανάγκη εύρεσης νέων πηγών βιοδραστικών ουσιών.....	36
1.4 Ενδοφυτικοί μικροοργανισμοί.....	38
1.4.1 Ορισμός και γενικά στοιχεία.....	38
1.4.2 Κατανομή και ποικιλομορφία των ενδοφύτων.....	39
1.5 Το γένος <i>Bacillus</i>	40
1.5.1 Χαρακτηριστικά γνωρίσματα.....	40
1.5.2 Συστηματική κατάταξη: Ιστορική αναδρομή και σύγχρονα στοιχεία.....	42
1.5.3 Οικολογική εξάπλωση.....	44
1.5.4 Μεταβολικό δυναμικό.....	45
1.6 Λιποπεπτίδια.....	46
1.6.1 Κυκλικά λιποπεπτίδια των βακτηρίων του γένους <i>Bacillus</i>	48
1.6.1.1 Surfactins (Σουρφακτίνες).....	49
1.6.1.2 Iturins (Ιτουρίνες).....	51

1.6.1.3 Fengycins (Φεγκυσίνες).....	53
1.6.2 Βιοσύνθεση λιποπεπτιδίων.....	55
1.6.3 Βιολογικές δράσεις λιποπεπτιδίων.....	59
1.6.3.1 Επιφανειοδραστική ιδιότητα.....	59
1.6.3.2 Αντιμικροβιακή δράση	60
1.6.3.2.1 Μηχανισμός δράσης.....	61
1.6.3.3 Δράση κατά του μυκοπλάσματος.....	64
1.6.3.4 Αντιική δράση	65
1.6.3.5 Δράση στα βιοφίλμ	66
1.6.3.6 Δράση κατά των προνυμφών κουνουπιών	67
1.6.3.7 Αντικαρκινική δράση.....	68
1.6.4 Εφαρμογές λιποπεπτιδίων.....	71
1.6.4.1 Εφαρμογές λιποπεπτιδίων στο φαρμακευτικό τομέα με χρήση τους ως φορέων φαρμάκων.....	71
1.6.4.2 Εφαρμογές λιποπεπτιδίων στον τομέα των τροφίμων	72
1.6.4.3 Χρήση λιποπεπτιδίων σε προγράμματα περιβαλλοντικής βιοαποκατάστασης	72
1.6.5 Περιορισμοί στην εμπορική χρήση των λιποπεπτιδίων και μελλοντικές προοπτικές	74
2. Σκοπός της μελέτης.....	77
3. Πειραματικό Μέρος.....	81
3.1 Υλικά και Μέθοδοι	83
3.1.1 Βιολογικό Υλικό.....	83
3.1.1.1 Στελέχη του μύκητα <i>Colletotrichum acutatum</i>	83
3.1.1.2 Φυτικό υλικό	84
3.1.2 Θρεπτικά υποστρώματα για την καλλιέργεια και διατήρηση των στελεχών μυκήτων και βακτηρίων.....	84
3.1.3 Καλλιέργεια, διατήρηση και ανανέωση των στελεχών μυκήτων και βακτηρίων	85
3.2 Τεχνικές.....	87
3.2.1 Αναλυτική Χρωματογραφία Λεπτής Στιβάδας (Analytical Thin Layer Chromatography, Analytical TLC).....	87
3.2.2 Παρασκευαστική Χρωματογραφία Λεπτής Στιβάδας (Preparative Thin Layer Chromatography, Preparative TLC)	90

3.2.3 Χρωματογραφία μοριακού αποκλεισμού (Molecular Exclusion Chromatography, Sephadex LH-20)	91
3.2.4 Χρωματογραφία κατ' αντιρροή (Centrifugal Partition Chromatography, CPC)	92
3.3 Ενδόφυτα Ελιάς: Απομόνωση, Μυκητοτοξική Δράση και Μοριακή Ταυτοποίηση	94
3.3.1 Απομόνωση ενδοφύτων από ιστούς ελιάς	94
3.3.2 Δοκιμές ενδοφύτων ελιάς στο φυτοπαθογόνο μύκητα <i>Colletotrichum acutatum</i> (γλοιοσπόριο)	97
3.3.3 Μοριακή ταυτοποίηση των δραστικών ενδοφύτων	102
3.3.3.1 Εξαγωγή DNA των δραστικών ενδοφυτικών βακτηρίων	103
3.3.3.2 Αλυσιδωτή αντίδραση πολυμεράσης (Polymerase Chain Reaction, PCR)	103
3.3.3.3 Ηλεκτροφόρηση και καθαρισμός DNA	104
3.3.3.4 Υπολογισμός της συγκέντρωσης του απομονωμένου DNA των βακτηρίων και αλληλούχισή του	105
3.3.4 Επισκόπηση απομόνωσης και μελέτης της βιοδραστικότητας ενδοφυτικών μικροοργανισμών ελιάς	107
3.4 Ενδοφυτικό βακτήριο PTA13: Παραλαβή και ανάλυση του δραστικού λιποπεπτιδικού κλάσματος	108
3.4.1 Καλλιέργεια του βακτηρίου PTA13 και παραλαβή του δραστικού λιποπεπτιδικού κλάσματος	109
3.4.2 Ανάλυση του δραστικού λιποπεπτιδικού κλάσματος	110
3.4.2.1 Ανάλυση με χρωματογραφία λεπτής στοιβάδας (TLC)	111
3.4.2.2 ¹ H NMR ανάλυση	111
3.4.2.3 UPLC-HRMS HRMS-MS Ανάλυση	113
3.4.3 Μελέτη του ρυθμού ανάπτυξης του ενδοφυτικού βακτηρίου PTA13 και της παραγωγής λιποπεπτιδίων στη διάρκεια επώασής του	129
3.5 Βιοδοκιμές του λιποπεπτιδικού κλάσματος σε ευαίσθητα και ανθεκτικά στελέχη <i>Colletotrichum acutatum</i>	136
3.5.1 Μελέτη της επίδρασης του λιποπεπτιδικού εκχυλίσματος στη γραμμική ανάπτυξη ευαίσθητων και ανθεκτικών στελεχών <i>Colletotrichum acutatum</i>	136
3.5.2 Μεταβολομική ανάλυση του στελέχους PLS_90 του φυτοπαθογόνου μύκητα <i>Colletotrichum acutatum</i> με εφαρμογή του δραστικού λιποπεπτιδικού εκχυλίσματος του ενδοφυτικού βακτηρίου PTA13	139
3.5.2.1 Πειραματικός σχεδιασμός και δειγματοληψία	141
3.5.2.2 GC/EI/MS ανάλυση	142

3.5.2.2.1 Προετοιμασία δειγμάτων	142
3.5.2.2.2 Παράμετροι Μεταβολομικής Ανάλυσης.....	143
3.5.2.2.3 Επεξεργασία χρωματογραφημάτων	144
3.5.2.2.4 Βιοπληροφορική ανάλυση για την ανακάλυψη μεταβολιτών-βιοσημαντών της επίδρασης του λιποπεπτιδικού εκχυλίσματος στο μεταβολισμό του στελέχους PLS_90 του <i>Colletotrichum acutatum</i>	144
3.5.2.2.5 Επισκόπηση της GC/EI/MS ανάλυσης του μεταβολικού προφίλ του στελέχους PLS_90 του μύκητα <i>Colletotrichum acutatum</i> παρουσία ή απουσία του λιποπεπτιδικού εκχυλίσματος του ενδοφυτικού βακτηρίου PTA13	145
3.5.2.2.6 Η επέμβαση με το λιποπεπτιδικό εκχύλισμα του ενδοφυτικού βακτηρίου PTA13 είχε σημαντική επίδραση στο μεταβολισμό του στελέχους PLS_90 του μύκητα <i>Colletotrichum acutatum</i>	147
3.5.2.2.7 Ρόλος επιλεγμένων μεταβολιτών-βιοσημαντών της επίδρασης του λιποπεπτιδικού εκχυλίσματος του ενδοφυτικού βακτηρίου PTA13 στο μεταβολισμό και τη φυσιολογία του στελέχους PLS_90 του μύκητα <i>Colletotrichum acutatum</i>	153
3.5.2.3 ¹ H NMR ανάλυση.....	156
3.5.2.3.1 Προετοιμασία δειγμάτων	156
3.5.2.3.2 Παράμετροι Μεταβολομικής Ανάλυσης.....	157
3.5.2.3.3 Επεξεργασία φασμάτων	157
3.5.2.3.4 Βιοπληροφορική ανάλυση για την ανακάλυψη τάσεων κατά την επίδραση του λιποπεπτιδικού εκχυλίσματος στο μεταβολισμό του στελέχους PLS_90 του <i>Colletotrichum acutatum</i>	158
3.5.2.3.5 Επισκόπηση της ¹ H NMR ανάλυσης του μεταβολικού προφίλ του στελέχους PLS_90 του μύκητα <i>Colletotrichum acutatum</i> παρουσία ή απουσία του λιποπεπτιδικού εκχυλίσματος του ενδοφυτικού βακτηρίου PTA13	159
3.5.2.3.6 Το λιποπεπτιδικό εκχύλισμα του ενδοφυτικού βακτηρίου PTA13 επηρέασε σημαντικά το ¹ H NMR μεταβολικό προφίλ του στελέχους <i>Colletotrichum acutatum</i> PLS_90.....	161
3.6 Κλασμάτωση του λιποπεπτιδικού εκχυλίσματος και βιοδραστικότητα των επιμέρους κλασμάτων.....	164
3.6.1 Κλασμάτωση του λιποπεπτιδικού εκχυλίσματος με εφαρμογή παρασκευαστικής χρωματογραφίας λεπτής στιβάδας (Preparative TLC)	164
3.6.2 Μελέτη διφασικών συστημάτων διαλυτών	165
3.6.3 Κλασμάτωση του λιποπεπτιδικού εκχυλίσματος με συνδυασμό υγρής-υγρής εκχύλισης και χρωματογραφίας μοριακού αποκλεισμού (Sephadex) .	170

3.6.4 Κλασμάτωση του λιποπεπτιδικού εκχυλίσματος με χρήση χρωματογραφίας κατ' αντιρροή (Centrifugal Partition Chromatography, CPC)	177
3.6.5 Μελέτη της επίδρασης επιμέρους κλασμάτων του λιποπεπτιδικού εκχυλίσματος στην ανάπτυξη ευαίσθητων και ανθεκτικών στελεχών <i>Colletotrichum acutatum</i>	191
4. Συμπεράσματα	199
5. Βιβλιογραφία	205

Περίληψη

Τα σημαντικά προβλήματα που αντιμετωπίζει ο τομέας της φυτοπροστασίας αναδεικνύουν την ανάγκη για την ανακάλυψη και ανάπτυξη νέων, εναλλακτικών και βελτιωμένων σε σχέση με τις ήδη υπάρχουσες, πηγών βιοδραστικότητας. Επιπρόσθετα, η αυστηροποίηση της σχετικής με τα φυτοπροστατευτικά προϊόντα (Φ.Π.) νομοθεσίας και η ολοένα αυξανόμενη πίεση της κοινής γνώμης προς τη βιομηχανία αγροχημικών για την ανάπτυξη νέας γενιάς Φ.Π., αποτελεσματικών και φιλικών για τον άνθρωπο και οργανισμούς μη-στόχους, επιτείνουν το πρόβλημα.

Στο πλαίσιο αυτό, η παρούσα ερευνητική εργασία, ακολουθώντας μια ολιστική προσέγγιση, είχε ως στόχο τη μελέτη ενδοφυτικών μικροοργανισμών της ελιάς και την αξιολόγησή τους ως πηγή βιοδραστικών μεταβολιτών για πιθανή αξιοποίησή τους στη φυτοπροστασία. Οι ενδοφυτικοί οργανισμοί και η μελέτη τους για εφαρμογές στις γεωπονικές επιστήμες αποτελούν μία από τις τελευταίες τάσεις της σχετικής έρευνας.

Πραγματοποιήθηκε μια σειρά πειραμάτων, η οποία περιλάμβανε την απομόνωση ενδοφύτων από διάφορους ιστούς ελιάς, τη μελέτη της δραστηκότητάς τους έναντι του φυτοπαθογόνου μύκητα *Colletotrichum acutatum*, υπεύθυνου για την πρόκληση της σοβαρής μυκητολογικής ασθένειας γλοιοσπόριο της ελιάς, καθώς και τη μοριακή ταυτοποίηση των βιοδραστικών ενδοφύτων. Το πλέον δραστικό ενδόφυτο, που ανήκει στο γένος βακτηρίων *Bacillus*, καλλιεργήθηκε σε πιλοτική κλίμακα και επεξεργάστηκε περαιτέρω με σκοπό την ανακάλυψη και παραλαβή βιοδραστικών ουσιών. Ως κύρια ομάδα μεταβολιτών απομονώθηκαν λιποπεπτιδία. Η ταυτοποίηση των κύριων κατηγοριών του λιποπεπτιδικού εκχυλίσματος πραγματοποιήθηκε με τη χρήση αναλυτή LC/ESI/MS. Παράλληλα, διεξήχθη και μελέτη επί της καλλιέργειας του επιλεγμένου ενδοφυτικού μικροοργανισμού με στόχο τον εντοπισμό του βέλτιστου χρόνου επώασης για τη μέγιστη παραγωγή του δραστικού λιποπεπτιδικού εκχυλίσματος.

Σημαντικό κομμάτι της έρευνας αποτέλεσε και η μελέτη της επίδρασης του δραστικού λιποπεπτιδικού εκχυλίσματος στο μεταβολισμό του *C. acutatum* με τη συνδυασμένη χρήση GC/EI/MS και ¹H-NMR μεταβολομικής. Ανακαλύφθηκε πλήθος μεταβολιτών-βιοσημαντών της τοξικότητας του εκχυλίσματος στο μύκητα, ενώ ένα από τα πιο σημαντικά ευρήματα ήταν η αξιοσημείωτη επίδρασή του στη βιοσύνθεση μεταβολιτών που σχετίζονται με την παθογένεια (αντιπαθογονική δράση).

Επίσης, το λιποπεπτιδικό εκχύλισμα επεξεργάστηκε με τη χρήση εκχυλιστικών και χρωματογραφικών τεχνικών (υγρή-υγρή εκχύλιση, χρωματογραφία μοριακού αποκλεισμού και χρωματογραφία κατ' αντιρροή), με αποτέλεσμα την κλασμάτωση και το διαχωρισμό τόσο των κύριων κατηγοριών (σουρφακτίνες, βακιλλομυσίνες, φεγκυσίνες) όσο και ομάδων λιποπεπτιδίων που εντοπίζονται σε μικρότερες συγκεντρώσεις (γαγεοτετρίνες, βακιλοτετρίνες). Η μελέτη της βιοδραστικότητας των παραγόμενων κλασμάτων έναντι του φυτοπαθογόνου μύκητα *C. acutatum* οδήγησαν στην εξαγωγή σημαντικών συμπερασμάτων ως προς τη δράση των επιμέρους λιποπεπτιδίων.

Συμπερασματικά, η μελέτη ανέδειξε την αποτελεσματικότητα της πειραματικής διαδικασίας που ακολουθήθηκε ως μιας ολιστικής προσέγγισης για την έρευνα και ανάπτυξη νέων πηγών βιοδραστικότητας με δυνατότητα εφαρμογών στη φυτοπροστασία αλλά και σε τομείς όπως οι ιατρικές επιστήμες.

Λέξεις-κλειδιά: ενδόφυτα, λιποπεπτίδια, φυσικά προϊόντα, φυτοπροστασία ελιάς, φυτοπροστατευτικά προϊόντα

Abstract

The issues that the plant protection sector is facing dictate the need for the discovery and development of new, alternative, and improved sources of bioactivity. Additionally, the existing legislation on plant protection products (PPPs) and the growing pressure of the public to the agrochemical industry towards the development of the new generation PPPs exhibiting features such as high effectiveness and low toxicity to human and other non-target organisms, intensifies the issue. Within this context, in the present research, a holistic approach was applied aiming at the investigation of olive tree endophytes and their evaluation as a source of bioactive metabolites for application in plant protection. The endophytic microorganisms and the exploitation of their bioactive metabolites represents one of the latest developments in the field. The first part of the research focused on the isolation of endophytes from various olive tissues, the study of their bioactivity to the phytopathogenic fungus *Colletotrichum acutatum*, responsible for the devastating disease olive anthracnose, and their molecular identification. The most bioactive endophyte, which belongs to the bacterial genus *Bacillus*, was cultivated in order to study its bioactive compounds. Lipopeptides (LPs) were extracted and isolated as the major group of metabolites. The identification of the main categories of the LPs extract was performed using an LC/ESI/MS platform. Additionally, the biosynthesis of LPs was monitored in the time course in order to dissect the biosynthetic capacity of the bacterium. Another aim of the study was the investigation of the effect of the bioactive LPs extract on the metabolism of *C. acutatum* performing GC/EI/MS and ¹H-NMR metabolomics. A large number of metabolites-biomarkers of the toxicity of the applied extract were discovered, while among the most important findings was its substantial effect on the biosynthesis of pathogenesis-related metabolites (antipathogenic action). Furthermore, the LPs extract was processed applying extraction and chromatographic techniques (liquid-liquid extraction, size exclusion chromatography and centrifugal partition chromatography). As a result, both major (surfactins, bacillomycins, and fengycins) and low abundance (gagotetrins, bacilotetrins) LPs groups were fractionated and separated. The assessment of the bioactivity of the obtained fractions to the phytopathogenic fungus *C. acutatum* revealed a variable effect of the individual LPs groups, with many of them being highly fungitoxic. The present study highlighted the potential of the developed

pipeline, which could serve as a holistic approach in the research and development of new sources of bioactivity for applications in plant protection and other fields, such as medicinal research.

Keywords: endophytes, lipopeptides, natural products, olive plant protection, plant protection products

1. Θεωρητικό Μέρος

1.1 Ελιά - *Olea europaea* L.

1.1.1 Ιστορικά στοιχεία και γεωγραφική εξάπλωση

Η ελιά (*Olea europaea* L.) θεωρείται το πιο χαρακτηριστικό δέντρο της λεκάνης της Μεσογείου (G. Besnard et al., 2013; Breton et al., 2009), επιδρώντας καθοριστικά στη διαμόρφωση του αγροτικού της τοπίου (Loumou & Giourga, 2003). Η καλλιέργειά της, ως μία από τις παλαιότερες γεωργικές δραστηριότητες που αναπτύχθηκαν στην περιοχή, έχει ανάγει το είδος αυτό σε θεμελιώδη πυλώνα της οικονομίας των μεσογειακών χωρών, ενώ η παρουσία των προϊόντων της στις διάφορες πτυχές της ανθρώπινης ζωής και καθημερινότητας έχει επηρεάσει καταλυτικά τα κοινωνικά και πολιτισμικά γνωρίσματα των χωρών αυτών (Guillaume Besnard et al., 2018; Khadari & El Bakkali, 2018; Voyiatzi et al., 1999).

Ως τόποι καταγωγής της ελιάς έχουν προταθεί κατά καιρούς διάφορες περιοχές, ενώ μέχρι και σήμερα παραμένει αμφιλεγόμενη η διαδικασία εξημέρωσής της από τους άγριους προγόνους της, την αγριελιά (*Olea europaea* var. *sylvestris*). Αυτό οφείλεται στη μεγάλη ποικιλομορφία που παρουσιάζουν οι ποικιλίες της ελιάς, η οποία έχει οδηγήσει πολλούς ερευνητές στην υπόθεση ότι η καλλιεργούμενη ελιά ενδέχεται να είναι το αποτέλεσμα ανεξάρτητων διαδικασιών εξημέρωσης στις διάφορες περιοχές εντοπισμού της (Breton et al., 2009; Khadari & El Bakkali, 2018). Παρόλα αυτά, η επικρατέστερη θεωρία υποστηρίζει ότι η πρωταρχική εξημέρωση της ελιάς πραγματοποιήθηκε στη Μέση Ανατολή πριν από περίπου 6000-7000 χρόνια (Arnan et al., 2012; Breton et al., 2006; Sebastiani & Busconi, 2017; Uylaszer & Yildiz, 2014), και αργότερα, η καλλιέργειά της διαδόθηκε μέσω της ανθρώπινης μετανάστευσης από τα ανατολικά προς τα δυτικά σε όλη τη λεκάνη της Μεσογείου, όπου και ακολούθησαν δευτερεύουσες διαδικασίες διαφοροποίησης (Arnan et al., 2012; Guillaume Besnard et al., 2018; Khadari & El Bakkali, 2018).

Η ιστορία της ελιάς, όπως είναι γνωστή μέσα από παραδόσεις, θρησκευτικά κείμενα και αρχαιολογικά ευρήματα, είναι συνυφασμένη με την άνθιση μερικών από τους αρχαιότερους πολιτισμούς (Φοίνικες, Αιγύπτιοι, Έλληνες, Ρωμαίοι, Άραβες) (G. Besnard et al., 2013; Zampounis et al., 2014). Η ελαιοκαλλιέργεια εξαπλώθηκε αρχικά στην Παλαιστίνη, το Ισραήλ, την Τουρκία και την Αίγυπτο (Cimato & Attilio, 2011), ενώ στη συνέχεια μεταφέρθηκε από τους Φοίνικες στα νησιά του Αιγαίου και

αργότερα στην ηπειρωτική Ελλάδα. Η επέκταση των ελληνικών αποικιών είχε ως αποτέλεσμα τη διάδοση της καλλιέργειας της ελιάς στη Νότια Ιταλία, αλλά η εξάπλωσή της σε ολόκληρη τη Μεσόγειο πραγματοποιήθηκε κατά την περίοδο ακμής της Ρωμαϊκής αυτοκρατορίας, με τη χρήση της ελιάς ως σύμβολο ειρήνης κατά την προσάρτηση νέων εδαφών υπό ρωμαϊκό έλεγχο (Uyulaşer & Yildiz, 2014).

Αργότερα, η καλλιέργεια της ελιάς έφτασε μέχρι το Μαρόκο, την Αλγερία, την Τυνησία και τη Λιβύη, ενώ μετά την ανακάλυψη της Αμερικής, εξαπλώθηκε νότια στο Περού, την Αργεντινή, τη Χιλή και την Ουρουγουάη και βόρεια στις παράκτιες περιοχές του Μεξικού και των Ηνωμένων Πολιτειών (Cimato & Attilio, 2011). Στη σημερινή εποχή, η καλλιέργεια της ελιάς έχει επεκταθεί και σε περιοχές που δεν έχουν παράδοση στην παραγωγή ή/και κατανάλωση των προϊόντων της, όπως είναι η Ν. Αφρική, η Αυστραλία, η Νέα Ζηλανδία, η Ιαπωνία και η Κίνα (*Εικόνα 1*) (Cimato & Attilio, 2011; Sebastiani & Busconi, 2017).



Εικόνα 1 Γεωγραφική εξάπλωση της σύγχρονης ελαιοκαλλιέργειας (με πράσινο χρώμα εμφανίζονται οι περιοχές ανά τον κόσμο όπου εντοπίζονται ελαιώνες). (Cimato & Attilio, 2011).

1.1.2 Συστηματική κατάταξη και βοτανικά χαρακτηριστικά

Η καλλιεργούμενη ελιά ανήκει στην οικογένεια *Oleaceae*, η οποία περιλαμβάνει περίπου 30 γένη και 600 είδη, και στο γένος *Olea*. Το γένος *Olea* περιλαμβάνει με τη σειρά του 30 είδη κατανομημένα σε 3 υπογένη, τα *Tetrapilus*, *Paniculatae* και

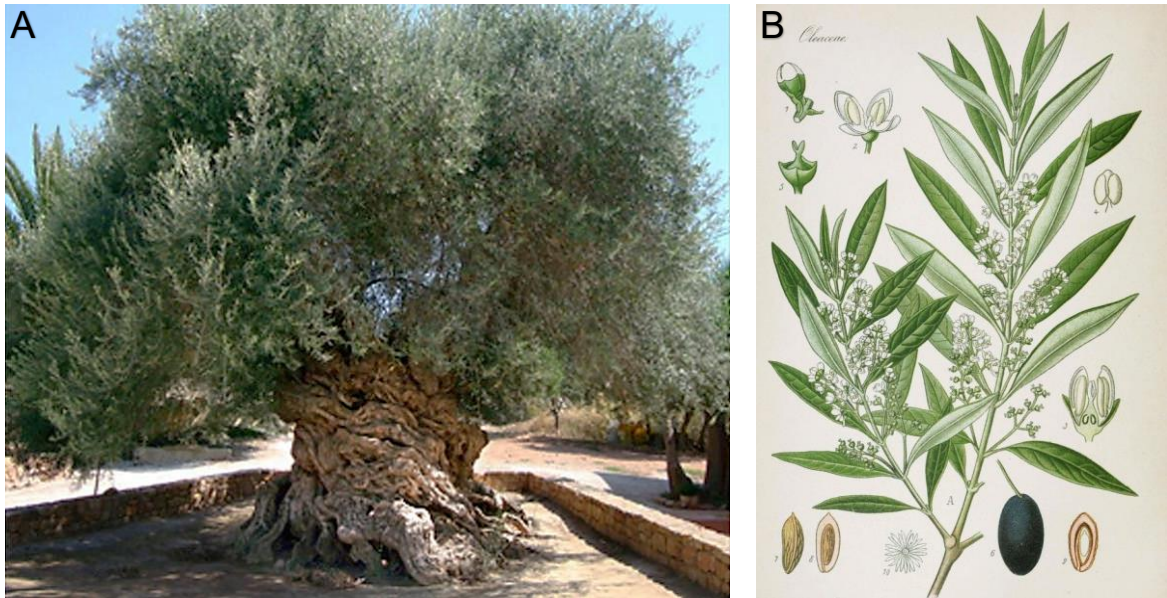
Olea (Rugini et al., 2011). Στο τελευταίο αυτό υπογένος ανήκει και το σύμπλεγμα ειδών *Olea europaea* L, αποτελούμενο από το υποείδος *O. europaea* subsp. *europaea*, στο οποίο υπάγεται η καλλιεργούμενη ελιά (var. *sativa* ή var. *europaea*) και η αγριελιά (var. *sylvestris* ή var. *oleaster*) (Breton et al., 2006). Η πλήρης συστηματική κατάταξη της καλλιεργούμενης ελιάς παρουσιάζεται στον [Πίνακα 1](#).

[Πίνακας 1](#) Συστηματική κατάταξη της καλλιεργούμενης ελιάς.

Βασίλειο	Plantae
Φύλο	Magnoliophyta
Κλάση	Magnoliopsida
Τάξη	Lamiales
Οικογένεια	<i>Oleaceae</i>
Γένος	<i>Olea</i>
Υπογένος	<i>Olea</i>
Είδος	<i>Olea europaea</i>
Υποείδος	<i>O. europaea</i> subsp. <i>europaea</i>
Ποικιλία	var. <i>europaea</i>

Το δέντρο της ελιάς είναι αειθαλές και αιωνόβιο και μπορεί να φτάσει σε ύψος τα 15-20 μέτρα ([Εικόνα 2Α](#)). Όταν αναπτύσσεται χωρίς τη μεσολάβηση ανθρώπινης επέμβασης, αποκτά θαμνοειδή όψη, ενώ με την εφαρμογή κλαδέματος στις καλλιέργειες που προορίζονται για ανθρώπινη εκμετάλλευση, διατηρείται σε χαμηλότερη διαμόρφωση, στα 4-5 μέτρα, για τη διευκόλυνση της συγκομιδής. Το ριζικό του σύστημα προέρχεται είτε από σπόρο είτε από μοσχεύματα, με το μεγαλύτερο μέρος του να αναπτύσσεται σε βάθος 60-70 cm και να αποκτά θυσσανώδη μορφή όταν το έδαφος είναι βαρύ. Ο κορμός είναι κυλινδρικός με πολλά εξογκώματα και ο φλοιός, ενώ αρχικά είναι λείος, με την πάροδο του χρόνου σχίζεται και αποκτά τεφρό χρώμα. Τα φύλλα είναι λογχοειδή, πράσινα στην άνω και αργυρόχρωμα στην κάτω επιφάνειά τους και διατάσσονται ανά δύο, αντίθετα σε κάθε γόνατο. Τα άνθη εμφανίζονται σε ταξιανθία βότρυος, είναι μικρά, κίτρινα και ερμαφρόδιτα και διαφοροποιούνται την ίδια χρονιά που δημιουργούνται. Ο καρπός της ελιάς είναι δρύπη, σχήματος σφαιρικού έως ελλειψοειδούς και αποτελείται από

το φλοιό (περικάρπιο), τη σάρκα (μεσοκάρπιο), τον πυρήνα (ενδοκάρπιο) και το σπέρμα. Το χρώμα του καρπού ποικίλει ανάλογα με το στάδιο ωρίμανσης και την ποικιλία, από πράσινο στους ανώριμους καρπούς έως πρασινοκίτρινο ή ιώδες στους ώριμους (*Εικόνα 2B*) (Θερίος, 2015).

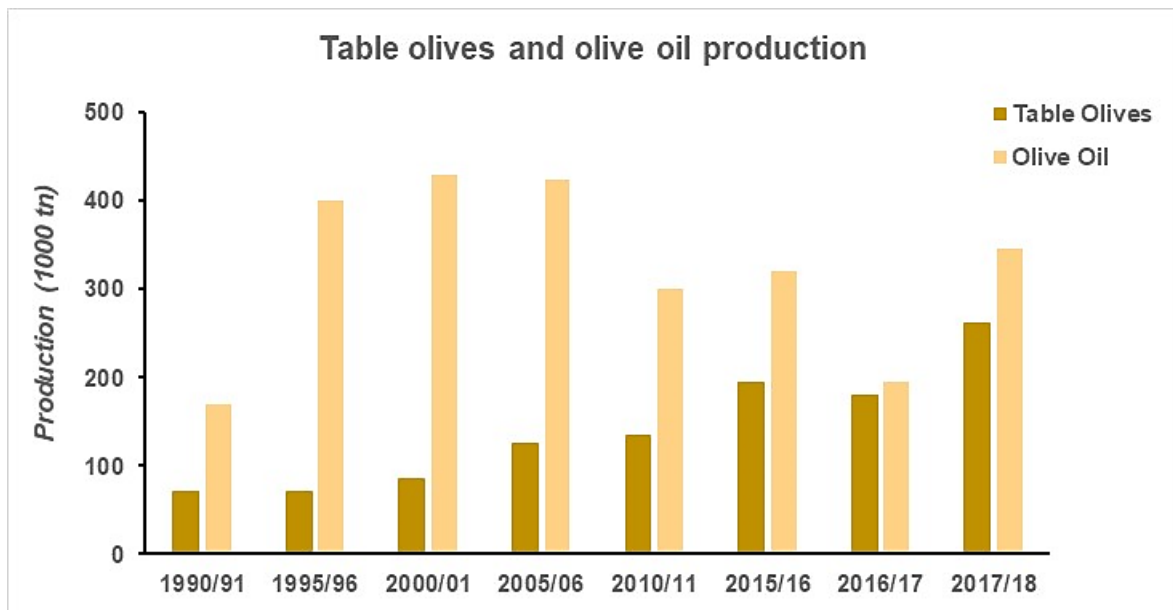


Εικόνα 2 (A) Υπεραιωνόβιο δέντρο ελιάς στην Κρήτη, *(B)* Βοτανικοί χαρακτήρες της ελιάς.

1.1.3 Η σημασία της ελαιοκαλλιέργειας σε εθνικό, ευρωπαϊκό και διεθνές επίπεδο

Στην Ελλάδα, η καλλιέργεια της ελιάς διαδραματίζει σημαντικό ρόλο στη διαμόρφωση του γεωργικού τομέα και συνεισφέρει ιδιαίτερα στην εθνική οικονομία. Σύμφωνα με τα τελευταία επίσημα στοιχεία της Γενικής Γραμματείας Εθνικής Στατιστικής Υπηρεσίας Ελλάδος που αφορούν το έτος 2017, η ελαιοκαλλιέργεια καλύπτει συνολική έκταση 7.926.425 στρεμμάτων της χώρας και αριθμεί 148.053.557 δέντρα, τα 141.944.558 εκ των οποίων συναντώνται σε κανονικούς ελαιώνες (ΕΛΣΤΑΤ, 2017). Η μέση ετήσια παραγωγή της Ελλάδας σε ελαιόλαδο και βρώσιμες ελιές έχει υπολογιστεί ότι είναι 274,6 και 185,1 χιλ. τόνοι αντίστοιχα, ενώ η μέση ετήσια κατανάλωση ελαιόλαδου ανέρχεται στους 130-140 χιλ. τόνους (International Olive Council, 2018). Ενδεικτικά, στην *Εικόνα 3* παρουσιάζεται διαγραμματικά η παραγωγή της χώρας σε βρώσιμες ελιές και ελαιόλαδο για συγκεκριμένες καλλιεργητικές περιόδους των τελευταίων 30 ετών (International

Olive Council, 2019). Από το σύνολο των ελληνικών Περιφερειών, η Πελοπόννησος και η Κρήτη αποτελούν τις κύριες περιοχές ελαιοκαλλιέργειας, όπως φαίνεται και στον [Πίνακα 2](#), όπου παρουσιάζονται οι Περιφερειακές Ενότητες (Π.Ε.) με το μεγαλύτερο αριθμό ελαιόδεντρων κατά το έτος 2017, η έκταση σε στρέμματα που καταλαμβάνουν οι ελαιώνες αυτοί, καθώς και η ποσότητα ελαιόλαδου που παράχθηκε στην εκάστοτε Π.Ε. το έτος αυτό (ΕΛΣΤΑΤ, 2017).

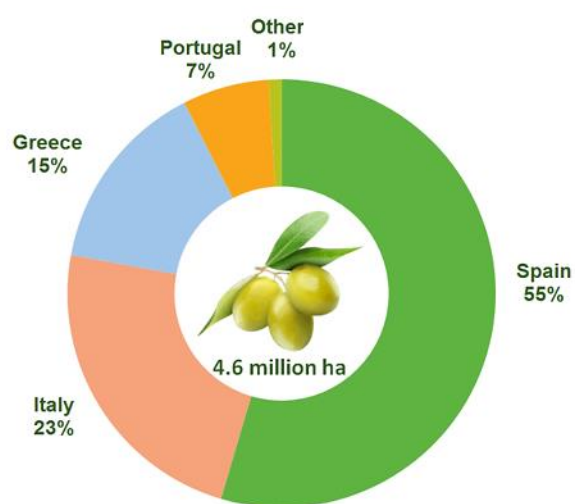


Εικόνα 3 Διαγραμματική απεικόνιση της ελληνικής παραγωγής βρώσιμων ελιών και ελαιόλαδου συγκεκριμένων καλλιεργητικών περιόδων των τελευταίων 30 ετών.

Πίνακας 2 Χαρακτηριστικά ελαιοκαλλιέργειας των κύριων ελαιοπαραγωγικών Περιφερειακών Ενοτήτων της Ελλάδας για το έτος 2017.

Περιφερειακή Ενότητα	Καλλιεργούμενη έκταση (στρ.)	Αριθμός ελαιόδεντρων	Παραγωγή ελαιόλαδου (τόνοι)
Μεσσηνίας	856.320	15.955.878	45.253
Ηρακλείου	896.446	15.747.496	37.696
Λακωνίας	693.512	13.977.391	29.345
Χανίων	437.134	9.809.995	15.555
Ηλείας	401.353	8.692.818	52.150
Φθιώτιδας	337.670	6.474.140	11.775
Λέσβου	415.326	6.054.848	7.801
Λασιθίου	270.864	5.618.032	14.542
Αιτωλοακαρνανίας	231.724	5.424.404	2.603
Χαλκιδικής	260.672	5.401.587	7.627

Σε ευρωπαϊκό επίπεδο, η συνολική έκταση που καλύπτεται από ελαιόδεντρα είναι περίπου 4.6 εκατομμύρια εκτάρια, σύμφωνα με τα αποτελέσματα της πενταετούς έρευνας που διεξάχθηκε από την Ευρωπαϊκή Ένωση (Ε.Ε.) σχετικά με τα οπωροφόρα δέντρα. Το μεγαλύτερο μέρος της παραπάνω έκτασης εντοπίζεται στις μεσογειακές χώρες, στις οποίες επικρατούν και οι πλέον ευνοϊκές συνθήκες για την καλλιέργεια της ελιάς, με την Ισπανία και την Ιταλία να καταλαμβάνουν περισσότερο από τα τρία τέταρτα αυτής, την Ελλάδα να βρίσκεται στην τρίτη θέση και την Πορτογαλία να ακολουθεί. Η εναπομείνασα έκταση κατανέμεται, βάσει της έρευνας, στη Γαλλία, Κροατία, Κύπρο και Σλοβενία (*Εικόνα 4, Πίνακας 3*) (Eurostat, 2019).



Εικόνα 4 Διαγραμματική απεικόνιση των ποσοστών καλλιεργούμενης με ελαιόδεντρα έκτασης των χωρών-μελών της Ε.Ε.

Πίνακας 3 Καλλιεργούμενη έκταση με ελαιόδεντρα στην Ε.Ε και στις κύριες ελαιοπαραγωγικές χώρες της.

Χώρα	Έκταση (ha)
Ε.Ε.	4.592.103
Ισπανία	2.505.786
Ιταλία	1.070.834
Ελλάδα	670.679
Πορτογαλία	300.415

Σε παγκόσμιο επίπεδο, η συνολική έκταση που καταλαμβάνουν τα ελαιόδεντρα υπολογίζεται περί τα 7 εκατομμύρια εκτάρια, με την Ευρωπαϊκή Ένωση να κατέχει την πρώτη θέση στην καλλιέργεια της ελιάς, την παραγωγή και εξαγωγή των προϊόντων της. Παρόλα αυτά, τα τελευταία χρόνια, η ελαιοκαλλιέργεια έχει αναπτυχθεί και σε χώρες εκτός Ε.Ε., οι οποίες σημειώνουν αξιόλογη παραγωγή βρώσιμων ελιών και ελαιόλαδου (*Πίνακας 4*) (International Olive Council, 2019).

Πίνακας 4 Παραγωγή βρώσιμων ελιών και ελαιόλαδου σε διεθνές επίπεδο για το καλλιεργητικό έτος 2017/18.

Χώρα	Παραγωγή βρώσιμων ελιών (1000 tn)	Παραγωγή ελαιόλαδου (1000 tn)
Ε.Ε.	912,5	2.188,5
Τουρκία	450	263
Μαρόκο	130	140
Αλγερία	303,5	82,5
Τυνησία	28	325
Συρία	100	100
Αργεντινή	106	45






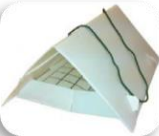












1.2 Εχθροί και παθογόνα της ελιάς

1.2.1 Εντομολογικοί εχθροί

Η ελιά προσβάλλεται από πολυάριθμους εντομολογικούς εχθρούς, οι οποίοι είναι υπεύθυνοι για την πρόκληση περισσότερο ή λιγότερο σοβαρών ζημιών στην καλλιέργειά της στην Ελλάδα. Μερικοί από αυτούς αποτελούν διαχρονικό πρόβλημα του ελαιοκομικού τομέα, καθώς προκαλούν κάθε χρόνο σημαντικές απώλειες της παραγωγής, ενώ παράλληλα υποβαθμίζουν και την ποιότητα των παραγόμενων προϊόντων, με αποτέλεσμα να κρίνεται απαραίτητη η λήψη μέτρων για την αντιμετώπισή τους. Άλλα έντομα-εχθροί της ελιάς ευθύνονται για περιστασιακές προσβολές και μειωμένες ζημιές και έτσι, δεν απαιτείται συστηματικός έλεγχός τους, παρά μόνο σε περιπτώσεις αύξησης του πληθυσμού τους. Παρακάτω, αναφέρονται οι εντομολογικοί εχθροί της ελιάς (Τζανακάκης & Κατσόγιαννος, 2003), ενώ στον [Πίνακα 5](#) περιγράφονται συνοπτικά ορισμένοι από τους συχνότερα απαντώμενους:

- *Hysteropterum grylloides* (Homoptera, Issidae)
- *Euphyllura phillyreae* (Homoptera, Aphalaridae) (κν. βαμβακάδα της ελιάς)
- *Aspidiotus nerii* (Homoptera, Diaspididae) (κν. άσπρη στρογγυλή ψώρα)
- *Lepidosaphes ulmi* (Homoptera, Diaspididae)
- *Leucaspis riccae* (Homoptera, Diaspididae)
- *Parlatoria oleae* (Homoptera, Diaspididae) (κν. παρλατόρια)
- *Lichtensia viburni* (Homoptera, Coccidae)
- *Saissetia oleae* (Homoptera, Coccidae) (κν. λεκάνιο της ελιάς)
- *Calocoris trivialis* (Hemiptera, Miridae)
- *Rhynchites cribripennis* (Coleoptera, Attelabidae) (κν. ρυγχίτης της ελιάς)
- *Hylesinus oleiperda* (Coleoptera, Scolytidae) (κν. φλοιοφάγος της ελιάς)
- *Phloeotribus scarabaeoides* (Coleoptera, Scolytidae) (κν. φλοιοτρίβης της ελιάς)
- *Dasyneura oleae* (Diptera, Cecidomyiidae) (κν. κηκιδόμυγα των φύλλων της ελιάς)
- *Prolasioptera berlesiana* (Diptera, Cecidomyiidae) (κν. κηκιδόμυγα των καρπών)
- *Resseliella oleisuga* (Diptera, Cecidomyiidae) (κν. κηκιδόμυγα των βλαστών)
- *Bactroceraq oleae* (Diptera, Tephritidae) (κν. δάκος της ελιάς)
- *Prays oleae* (Lepidoptera Yponomeutidae) (κν. πυρηνοτρήτης της ελιάς)
- *Palpita unionalis* (Lepidoptera, Pyralidae) (κν. πυραλίδα ή μαργαρόνια)

Πίνακας 5 Συνοπτική περιγραφή σημαντικών εντόμων εχθρών της καλλιέργειας της ελιάς και των μέτρων αντιμετώπισής τους.

Έντομο-εχθρός	Συμπτώματα-Ζημιές	Αντιμετώπιση	Αναφορά
<i>Bactrocera oleae</i> οικ. <i>Tephritidae</i> (δάκος) 	<ul style="list-style-type: none"> καταστροφή καρπού μειωμένη παραγωγή ποιοτική υποβάθμιση ελαιολάδου 	<ul style="list-style-type: none"> ψεκασμοί κάλυψης δολωματικοί ψεκασμοί μαζική παγίδευση 	(Broumas et al., 2002; Corrado et al., 2012; Daane & Johnson, 2010; Malheiro et al., 2015; Skouras et al., 2007; Volakakis et al., 2012)
<i>Prays oleae</i> οικ. <i>Yponomeutidae</i> (πυρηνοτρήτης) 	<ul style="list-style-type: none"> στοές σε φύλλα, άνθη και καρπούς καρπτόπτωση 	<ul style="list-style-type: none"> παρακολούθηση με φερομονικές παγίδες ψεκασμοί τον Ιούνιο (καρποί 3-5 mm) 	(Hegazi et al., 2009; N. A. Kumral et al., 2005; Nobre et al., 2018; Villa et al., 2020)
<i>Saissetia oleae</i> οικ. <i>Coccidae</i> (λεκάνιο) 	<ul style="list-style-type: none"> μύζηση μελιτώματα καπνιά 	<ul style="list-style-type: none"> δράση φυσικών εχθρών ψεκασμοί Ιουλίου, Αύγουστο 	(Ilias & Hammadi, 2017; Mahzoum et al., 2020; S. A. P. Santos et al., 2010; Tena et al., 2008)
<i>Aspidiotus nerii</i> <i>Lepidosaphes ulmi</i> <i>Leucaspis riccae</i> οικ. <i>Diaspididae</i> (σκληρές ψώρες)   	παραμόρφωση και αποχρωματισμός ιστών  	δράση φυσικών εχθρών  	(Belda et al., 2011; Erler & Tunç, 2001; Haniotakis, 2005; Henderson, 2011)
<i>Euphyllura phillyreae</i> οικ. <i>Aphalaridae</i> (βαμβακάδα) 	κηρώδεις εκκρίσεις που καλύπτουν τις ταξιανθίες 	Κατά κανόνα δεν απαιτείται. Οι ψεκασμοί για τους υπόλοιπους εντομολογικούς εχθρούς παρέχουν προστασία στα ελαιόδεντρα και από τη βαμβακάδα.	(Del Bene et al., 1997; Nabi Alper Kumral et al., 2008)

1.2.2 Μυκητολογικές-βακτηριολογικές ασθένειες

Παράλληλα με τη δράση των εντομολογικών εχθρών, η καλλιέργεια της ελιάς προσβάλλεται και από παθογόνους μικροοργανισμούς, οι οποίοι στην πλειοψηφία τους είναι μύκητες, ενώ εντοπίζονται και ορισμένα ζημιογόνα βακτήρια. Οι ασθένειες που προκαλούν, εκδηλώνονται στα διάφορα φυτικά μέρη της ελιάς, γεγονός που κατηγοριοποιεί τους μικροοργανισμούς αυτούς σε παθογόνα εδάφους-ριζών, φυλλώματος, ανθέων και καρπών, ανάλογα με το όργανο που προσβάλλουν. Η αντιμετώπιση των παθογόνων της ελιάς απαιτεί, συνήθως, την υιοθέτηση μιας προσέγγισης ολοκληρωμένης διαχείρισης της καλλιέργειας, με εφαρμογή τόσο προληπτικών και καλλιεργητικών μέτρων όσο και μέσων χημικής καταπολέμησης. Η ανάγκη αυτή έχει προκύψει από ένα συνδυασμό παραγόντων, στους οποίους περιλαμβάνεται ο κίνδυνος ανάπτυξης ανθεκτικών σε Φ.Π. πληθυσμών φυτοπαθογόνων της ελιάς, ο οποίος είναι ιδιαίτερα υψηλός σε περιπτώσεις εκτεταμένης εφαρμογής συνθετικών σκευασμάτων, καθώς και η μέχρι σήμερα απουσία αποτελεσματικής χημικής καταπολέμησης ορισμένων παθογόνων της ελιάς. Τα παραπάνω, σε συνδυασμό με το γεγονός ότι προσβεβλημένοι από δάκο ελαιόκαρποι είναι περισσότερο επιδεκτικοί σε δευτερογενείς μολύνσεις από φυτοπαθογόνα, καθιστούν απαραίτητη την προσεκτική και συνολική διαχείριση των εντόμων εχθρών και παθογόνων μικροοργανισμών της ελιάς. Στον [Πίνακα 6](#) παρουσιάζονται συνοπτικά οι σοβαρότεροι μικροοργανισμοί που προσβάλλουν την ελιά και οι ασθένειες που προκαλούν, ενώ στην [§1.2.3](#) αναλύεται λεπτομερώς μία από τις σημαντικότερες ασθένειες της ελαιοκαλλιέργειας στην Ελλάδα, το γλοιοσπόριο, το παθογόνο αίτιο της οποίας αποτελεί ο μύκητας του γένους *Colletotrichum* (Παναγόπουλος, 2007).

Πίνακας 6 Συνοπτική περιγραφή των κύριων μυκητολογικών και βακτηριολογικών ασθενειών της ελιάς και των μέτρων αντιμετώπισής τους.

Παθογόνο-Ασθένεια	Συμπτώματα	Αντιμετώπιση	Αναφορά
<p><i>Spilocaea oleagina</i> κυκλοκόνιο (μυκητολογική ασθένεια)</p> 	<ul style="list-style-type: none"> • κηλίδες σε φύλλα, μίσχους και ποδίσκους • αποφύλλωση δέντρων 	<p>Ψεκασμοί κάλυψης με χαλκούχα μυκητοκτόνα</p> 	<p>(González-Lamothe et al., 2002; Lanza et al., 2017; Obanor et al., 2011; Roca et al., 2007; Salman, 2017; Viruega et al., 2013)</p>
<p><i>Pseudocercospora cladosporioides</i> κερκόσπορα (μυκητολογική ασθένεια)</p> 	<ul style="list-style-type: none"> • χλωρωτικές/γκριζωπές περιοχές στην άνω/κάτω επιφάνεια των φύλλων • καστανές κηλίδες στους καρπούς 	<ul style="list-style-type: none"> • συνήθως δεν απαιτείται εξειδικευμένη καταπολέμηση • η αντιμετώπιση του κυκλοκονίου αρκεί 	<p>(Arantxa Ávila et al., 2005; Aránzazu Ávila et al., 2020; Roca et al., 2007; Joaquín Romero et al., 2020)</p>
<p><i>Phoma dalmatica</i> βούλα (μυκητολογική ασθένεια)</p> 	<ul style="list-style-type: none"> • καστανές κυκλικές ξηρές βυθισμένες κηλίδες στους καρπούς • καρπόπτωση 	<p>Ο μύκητας είναι παράσιτο πληγών και εισέρχεται στον καρπό από τα νύγματα του δάκου, επομένως η αντιμετώπιση του εντόμου αρκεί.</p>	<p>(J. Latinović et al., 2014; Jelena Latinović et al., 2013; Phillips et al., 2005)</p>
<p><i>Verticillium dahliae</i> βερτισίλλιο-αδρομύκωση (μυκητολογική ασθένεια)</p> 	<ul style="list-style-type: none"> • συμπτώματα σε ημιπληγία • μαρασμός κλάδων • μεταχρωματισμός αγγείων ξύλου 	<ul style="list-style-type: none"> • προληπτικά και καλλιεργητικά μέτρα • ηλιοαπολύμανση • απουσία χημικής καταπολέμησης 	<p>(Castro et al., 2020; Jiménez-Díaz et al., 2012; J. Latinović et al., 2014; Montes-Osuna & Mercado-Blanco, 2020)</p>
<p><i>Pseudomonas savastanoi pv savastanoi</i> καρκίνος-φυματίωση (βακτηριολογική ασθένεια)</p> 	<ul style="list-style-type: none"> • όγκοι (φυμάτια) σε κλάδους και κορμό • ξήρανση κλάδων 	<p>Ψεκασμός με χαλκούχα σκευάσματα</p>	<p>(Marchi et al., 2009; Ramos et al., 2012)</p>

1.2.3 Το γλοιοσπόριο (ανθράκωση) της ελιάς (*Colletotrichum* spp.)

Το γλοιοσπόριο ή ανθράκωση, που προκαλείται από διάφορα είδη του γένους *Colletotrichum*, θεωρείται η πιο επιβλαβής ασθένεια της ελιάς παγκοσμίως (Cacciola et al., 2012; Moral et al., 2009). Προσβάλλει κυρίως τους ώριμους καρπούς, με αποτέλεσμα την ελάττωση της απόδοσης των καλλιεργειών (Scheda et al., 2014; Pedro Talhinhos et al., 2015), έως και τον εκμηδενισμό της παραγωγής όταν επικρατούν ευνοϊκές, για τη ανάπτυξη του παθογόνου, συνθήκες (Moral et al., 2009). Παράλληλα, σημαντική είναι και η υποβάθμιση της ποιότητας των παραγόμενων προϊόντων και ιδιαίτερα των οργανοληπτικών χαρακτήρων του ελαιολάδου, το οποίο αποκτά ρόδινο χρώμα (*Εικόνα 5*) (Leoni et al., 2018) και θεωρείται ακατάλληλο για κατανάλωση (Carvalho et al., 2004), καθώς σημειώνεται πτώση της συγκέντρωσης των φαινολικών συστατικών και αύξηση της οξύτητάς του (Gouvinhas et al., 2019; Iliadi et al., 2018).



Εικόνα 5 Ελαιόλαδο από προσβεβλημένους (αριστερά) και υγιείς (δεξιά) καρπούς.

Η πρώτη αναφορά της ασθένειας πραγματοποιήθηκε το 1899 στην Πορτογαλία (Almeida, 1899), όπου πήρε την ονομασία “*gaffa*”, ενώ αργότερα εντοπίστηκε και στην Ισπανία (“*momificado*”, μούμιοποίηση) (Moral et al., 2017) και την Ιταλία (“*lebbra*”, λέπτρα) (GRANITI et al., 1993). Στην Ελλάδα, η πρώτη περιγραφή της ασθένειας χρονολογείται το 1920, στην Κέρκυρα, όπου εμφανίστηκε με τη μορφή επιδημίας (Petri, 1930). Τα τελευταία χρόνια έχουν καταγραφεί εκτεταμένες προσβολές από γλοιοσπόριο στη χώρα μας, κυρίως στην περιοχή της Πελοποννήσου, μία από τις κύριες ελαιοπαραγωγικές περιοχές της Ελλάδας, οι οποίες έχουν οδηγήσει σε σημαντικές οικονομικές απώλειες (Kolainis et al., 2020).

1.2.3.1 Συμπτώματα της ασθένειας

Το παθογόνο προσβάλλει κυρίως τον ελαιοκάρπο, όπου και εμφανίζονται τα τυπικά συμπτώματα της ασθένειας, ενώ σπανιότερα, μολύνσεις μπορεί να εντοπιστούν και σε φύλλα, άνθη και κλάδους της ελιάς (*Εικόνα 6*) (Kolainis et al., 2020; P. Talhinhos

et al., 2011). Σε ακόμα μικρότερο βαθμό σημειώνονται προσβολές σε βλαστούς, μίσχους και ποδίσκους ανθέων και καρπών, οι οποίες συχνά παραμένουν σε λανθάνουσα μορφή και λειτουργούν ως πηγές μόλυσματος σε μεταγενέστερες προσβολές (Azevedo-Nogueira et al., 2020; Moral et al., 2009).

Οι καρποί προσβάλλονται συνήθως κατά το στάδιο ωρίμανσής τους (Azevedo-Nogueira et al., 2020), καθώς οι ανώριμοι καρποί αποτελούν ακατάλληλο υπόστρωμα για την ανάπτυξη του παθογόνου μύκητα, εξαιτίας τόσο της χαμηλής περιεκτικότητάς τους σε σάκχαρα όσο και του υψηλού δυναμικού τους σε δευτερογενείς μεταβολίτες με αντιμικροβιακή δράση (αλκαλοειδή, ταννίνες, φαινολικά συστατικά) (Dixon, 2001; Sónia Gomes et al., 2013; Sonia Gomes et al., 2012). Παρόλα αυτά, υπό ευνοϊκές κλιματικές συνθήκες και σε ευπαθείς ποικιλίες ελιάς, είναι πιθανή η μόλυνση των καρπών και σε πιο πρώιμη φάση ανάπτυξης (Cacciola et al., 2012).

Τα αρχικά συμπτώματα της ασθένειας παρουσιάζονται στην κορυφή των καρπών στις ποικιλίες με επίμηκες σχήμα, ενώ σε εκείνες με μεγάλο σφαιρικό σχήμα καρπών, εμφανίζονται ως μικρές καστανές κηλίδες που αναπτύσσονται γρήγορα καταλαμβάνοντας το μεγαλύτερο μέρος της επιφάνειάς τους (Kolainis et al., 2020). Οι προσβεβλημένοι ιστοί βυθίζονται και καλύπτονται από τις καρποφορίες του μύκητα σε διάταξη ομόκεντρων δακτυλίων, από τις οποίες εξέρχονται τα σπόριά του ως γλοιώδης πορτοκαλί μάζα όταν επικρατούν υψηλά επίπεδα υγρασίας στην ατμόσφαιρα. Η εξέλιξη της ασθένειας οδηγεί σε πρόωρη καρπόπτωση και σήψη, ενώ υπό ξηρές κλιματολογικές συνθήκες, οι προσβεβλημένοι καρποί αφυδατώνονται και μουμιοποιούνται. Οι μουμιοποιημένοι καρποί που παραμένουν στα δέντρα αποτελούν τις βασικές εστίες μόλυσματος για τις προσβολές της επόμενης χρονιάς (Azevedo-Nogueira et al., 2020; Cacciola et al., 2012; Kolainis et al., 2020; J. Romero et al., 2018).

Στις περιπτώσεις προσβολής των φύλλων, τα συμπτώματα διακρίνονται αρχικά με τη μορφή εκτεταμένων χλωρωτικών περιοχών στην κορυφή του ελάσματος, ενώ στη συνέχεια εμφανίζονται στο ίδιο σημείο καστανές νεκρωτικές κηλίδες ασαφούς περιφέρειας, οι οποίες εξαπλώνονται και συνενώνονται μεταξύ τους, καλύπτοντας τη μισή περίπου επιφάνεια του ελάσματος. Στις νεκρωτικές αυτές περιοχές γίνονται συχνά εμφανείς οι καρποφορίες του μύκητα, διατεταγμένες σε συγκεντρικούς κύκλους όπως στην περίπτωση μόλυνσης των καρπών. Σε προχωρημένα στάδια

της ασθένειας, παρατηρείται έντονη αποφύλλωση των προσβεβλημένων ελαιόδεντρων (Moral et al., 2018).



Εικόνα 6 Τυπικά συμπτώματα προσβολής από *Colletotrichum* spp. (γλοισσπόριο) σε άνθη, φύλλα και καρπούς ελιάς.

1.2.3.2 Παθογόνο αίτιο

Κατά την πρώτη καταγραφή της ασθένειας στην Πορτογαλία το 1899, ως παθογόνο αίτιο είχε προσδιοριστεί ο μύκητας *Gloeosporium olivarum* (Almeida, 1899). Αρκετά χρόνια αργότερα, το 1957, το είδος αυτό ομαδοποιήθηκε με το *Gloeosporium fructigenum*, το οποίο είναι υπεύθυνο για την πικρή σήψη των μηλοειδών, καθώς

διαπιστώθηκε ότι δε διαφέρουν μεταξύ τους, και τα δύο προαναφερθέντα είδη μεταφέρθηκαν τελικά στο *Colletotrichum gloeosporioides* (Von Arx, 1957). Στη συνέχεια, το 1999, η ασθένεια του γλοιοσπορίου αποδόθηκε σε δύο παθογόνα είδη, τα *C. acutatum* JH Simmonds ex JH Simmonds (Martín & García-Figueroles, 1999) και *C. gloeosporioides* (Penz.) Penz. et Sacc (Simmonds, 1966).

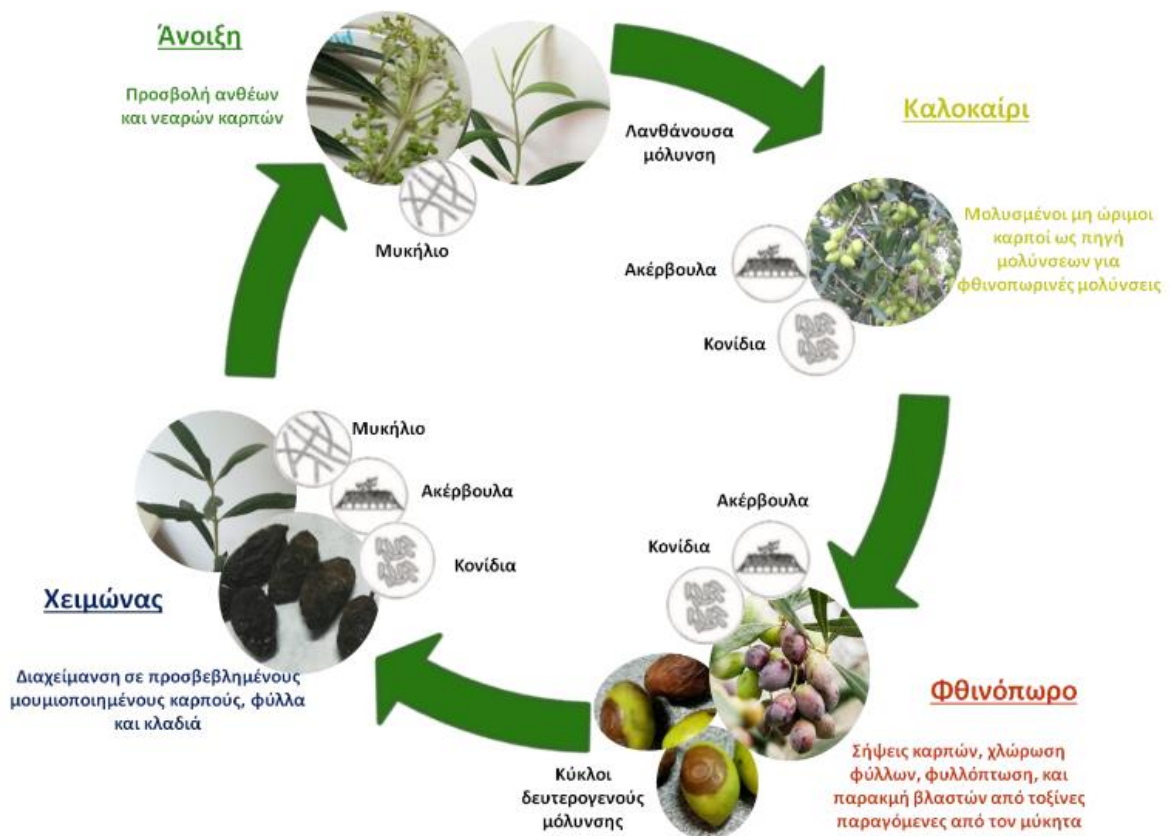
Σήμερα, η ασθένεια φαίνεται ότι αποδίδεται πλέον σε δύο σύμπλοκα είδη, τα οποία εμφανίζουν μεταξύ τους μεγάλες φαινοτυπικές και γονοτυπικές διαφορές, το *C. gloeosporioides sensu lato* (s.l.) and *C. acutatum* s.l., με το τελευταίο να υποστηρίζεται ότι κυριαρχεί στην Ελλάδα (Cacciola et al., 2012; Schena et al., 2014; Sreenivasaprasad & Talhinhas, 2005; P. Talhinhas et al., 2011). Θεωρείται, μάλιστα, ότι μερικά μόνο είδη του συμπλόκου *C. acutatum* s.l. προκαλούν μεγάλες απώλειες παραγωγής στην ελιά, τα *C. simmondsii*, *C. fioriniae*, *C. godetiae*, *C. nymphaeae* και *C. rhombiforme* (Cacciola et al., 2012; Damm et al., 2012; Sreenivasaprasad & Talhinhas, 2005).

Το γένος *Colletotrichum* αποτελείται από αδηλομύκητες, η τέλεια μορφή των οποίων (*Glomerella*) που ανήκει στους ασκομύκητες, συναντάται σπανίως στη φύση. Οι καρποφορίες του μύκητα ονομάζονται ακέρβουλα και σχηματίζονται στο μεσοκάρπιο των προσβεβλημένων καρπών, ενώ προβάλλουν στην επιφάνεια διαρρηγνύοντας τους επιφανειακούς ιστούς. Πάνω στα ακέρβουλα σχηματίζονται τα κονίδια ως ρόδινη-πορτοκαλί μάζα. Τα παραγόμενα κονίδια είναι υαλώδη, μονοκύτταρα, ελλειψοειδή και για τη διασπορά τους απαιτείται νερό (μυξοσπόρια) (Παναγόπουλος, 2007).

1.2.3.3 Συνθήκες ανάπτυξης παθογόνου-Κύκλος ασθένειας

Η ανάπτυξη του μύκητα ευνοείται σε θερμοκρασίες 10-25°C, με βέλτιστη τους 25°C, ενώ παρατηρείται μηδενική ανάπτυξη στους 0°C και ελάχιστη στους 29°C. Ως εκ τούτου, οι κατάλληλες συνθήκες για την ανάπτυξη της ασθένειας επικρατούν την άνοιξη, τις δροσερές μέρες του καλοκαιριού και το φθινόπωρο (Παναγόπουλος, 2007). Έτσι, την άνοιξη απελευθερώνονται κονίδια από τα ακέρβουλα που βρίσκονται στους προσβεβλημένους καρπούς του προηγούμενου έτους και προκαλούν τις αρχικές μολύνσεις κυρίως των ανθέων, αλλά και των ανώριμων

καρπών και σπανιότερα των φύλλων (P. Talhinhos et al., 2011). Παράλληλα, ενδέχεται να πραγματοποιηθούν προσβολές των ανθέων που παραμένουν σε λανθάνουσα μορφή, χωρίς την εμφάνιση συμπτωμάτων, τα οποία εκδηλώνονται αργότερα κατά την ωρίμανση. Το καλοκαίρι, η ασθένεια αναπτύσσεται στους μη ώριμους καρπούς όταν επικρατούν χαμηλές για την εποχή θερμοκρασίες σε συνδυασμό με υψηλή σχετική υγρασία και νεφοσκεπή ουρανό. Αργότερα, το φθινόπωρο και το χειμώνα, μολύνονται οι καρποί που βρίσκονται στο στάδιο της ωρίμανσης, εκδηλώνοντας τα χαρακτηριστικά συμπτώματα της ασθένειας. Ο κύκλος ασθένειας του παθογόνου παρουσιάζεται συνοπτικά στην [Εικόνα 7](#) (Cacciola et al., 2012; Leoni et al., 2018; Materatski et al., 2018; Moral et al., 2018; Moral & Trapero, 2012; Pedro Talhinhos et al., 2018).



[Εικόνα 7](#) Ο κύκλος ασθένειας του μύκητα *Colletotrichum acutatum* (γλοιοσπόριο της ελιάς) (Μπαρκολιάς, 2020).

1.2.3.4 Μέτρα αντιμετώπισης της ασθένειας

Η αντιμετώπιση της ασθένειας του γλοιοσπορίου προτείνεται να ακολουθεί μια ολοκληρωμένη προσέγγιση διαχείρισης του παθογόνου, περιλαμβάνοντας τόσο καλλιεργητικά όσο και χημικά μέτρα αντιμετώπισης (Leoni et al., 2018). Τα καλλιεργητικά μέτρα στοχεύουν στην ελάττωση της σχετικής υγρασίας στο εσωτερικό της κόμης των ελαιοδέντρων, η οποία επιτυγχάνεται με το κλάδεμα, για καλύτερο αερισμό. Παράλληλα, όπου καθίσταται εφικτό, συνιστάται η εγκατάσταση των νέων ελαιώνων σε περιοχές με χαμηλή υγρασία, καθώς και η αποφυγή πολύ πυκνών φυτεύσεων. Ακόμα, ιδιαίτερη προσοχή πρέπει να δίνεται στην αφαίρεση και καταστροφή προσβεβλημένων οργάνων και μουμιοποιημένων καρπών, ώστε να μειώνεται το αρχικό μόλυσμα για τις προσβολές της επόμενης άνοιξης. Τέλος, προτείνεται και η καλλιέργεια ανθεκτικών ποικιλιών, καθώς και η πρώιμη συγκομιδή, προκειμένου να ελαχιστοποιηθούν οι απώλειες της παραγωγής (Kolainis et al., 2020).

Η χημική αντιμετώπιση της ασθένειας αφορά, συνήθως, στην πραγματοποίηση δύο προληπτικών ψεκασμών στα τέλη Οκτωβρίου με αρχές Νοεμβρίου. Παρόλα αυτά, ενδέχεται να χρειάζεται και η διενέργεια ψεκασμών και κατά την άνοιξη, ανάλογα με τις κλιματικές συνθήκες της εκάστοτε περιοχής και την ευαισθησία της εκάστοτε ποικιλίας ελιάς. Έγκριση για εφαρμογή στην καλλιέργεια της ελιάς διαθέτουν χαλκούχες ενώσεις, διθειοκαρβαμιδικά (mancozeb), επιφανειοδραστικά (dodine), τριαζολικά (difenoconazole) και στρομπιλουρίνες (azoxystrobin, trifloxystrobin, pyraclostrobin) (Cacciola et al., 2012; Leoni et al., 2018; Materatski et al., 2018; Moral et al., 2018; Roca et al., 2007; J. Romero et al., 2018; Pedro Talhinas et al., 2018; ΥΠΑΑΤ, 2020).

1.3 Σύγχρονες προκλήσεις που αντιμετωπίζει ο φαρμακευτικός τομέας και ο τομέας της φυτοπροστασίας και ανάγκη εύρεσης νέων πηγών βιοδραστικών ουσιών

Τα τελευταία χρόνια παρατηρείται εντατικοποίηση των προσπάθειών ανακάλυψης και ανάπτυξης νέων αντιβιοτικών, αντικαρκινικών και χημειοθεραπευτικών παραγόντων, καθώς και νέων αγροχημικών προϊόντων. Απαραίτητες προϋποθέσεις που πρέπει να πληρούν τα παραπάνω προϊόντα αποτελούν η υψηλή αποτελεσματικότητα και χαμηλή τοξικότητά τους, ενώ παράλληλα θα πρέπει να παρουσιάζουν και μικρό περιβαλλοντικό αντίκτυπο. Η αναζήτηση αυτή είναι αποτέλεσμα της εμφάνισης πολυάριθμων προβλημάτων και προκλήσεων που καλείται να αντιμετωπίσει τόσο ο φαρμακευτικός τομέας όσο και ο τομέας της φυτοπροστασίας (Gary Strobel & Daisy, 2003).

Ένα από τα κυριότερα σύγχρονα προβλήματα που αντιμετωπίζει ο ιατροφαρμακευτικός τομέας παγκοσμίως, είναι η ανάπτυξη ανθεκτικότητας από πολλά στελέχη ανθρωποπαθογόνων βακτηρίων, όπως από είδη των γενών *Staphylococcus*, *Mycobacterium* και *Streptococcus*, στις υπάρχουσες δραστικές ουσίες, με αποτέλεσμα την ανάγκη άμεσης ανεύρεσης νέων αντιβιοτικών. Επιπλέον, η αντοχή που παρουσιάζουν συχνά τα καρκινικά κύτταρα σε πολλά χημειοθεραπευτικά σχήματα (multidrug resistance), αλλά και οι σοβαρές παρενέργειες που εμφανίζουν πολλοί χημειοθεραπευτικοί παράγοντες στους ασθενείς, υποβαθμίζουν την αποτελεσματικότητα μιας μεγάλης ποικιλίας αντικαρκινικών παραγόντων που χρησιμοποιούνται επί του παρόντος και εντείνουν την αναγκαιότητα ανακάλυψης νέων αντικαρκινικών φαρμάκων με τις ελάχιστες δυνατές παρενέργειες (G. A. Strobel, 2003a).

Ακόμα, ολοένα αυξανόμενη είναι και η ανάγκη για εξειδικευμένα αντιπικά φάρμακα για την αντιμετώπιση θανατηφόρων ιών, όπως ο HIV, αλλά και για ισχυρά αντιμυκητιασικά, κυρίως για τις περιπτώσεις ανοσοκατεσταλμένων ασθενών, όπως ασθενών με καρκίνο ή μετά από μεταμόσχευση οργάνων. Τέτοιες λοιμώξεις, οι οποίες συχνά προκαλούνται από παθογόνα του γένους *Aspergillus*, *Cryptococcus*, και *Candida*, δεν αποτελούν συνήθως μείζονα προβλήματα, αλλά μπορούν να αποβούν μοιραίες για ασθενείς με εξασθενημένο ανοσοποιητικό σύστημα. Επίσης, χρειάζονται περισσότερα φάρμακα για την αποτελεσματική αντιμετώπιση λοιμώξεων από παρασιτικά πρωτόζωα, όπως η ελονοσία, η λείσμανίαση, η

τρυπανοσωμίαση και η φιλαρίαση, οι οποίες πιθανότατα μετρούν κάθε χρόνο περισσότερα θύματα από οποιαδήποτε άλλη ομάδα μολυσματικών παραγόντων.

Όσον αφορά στη φυτοπροστασία, η αλόγιστη χρήση χημικών ουσιών με τη μορφή φυτοπροστατευτικών προϊόντων (Φ.Π.) κατά την εντατικοποίηση των καλλιεργειών, με στόχο την αντιμετώπιση εχθρών και παθογόνων των φυτών και την αύξηση των αποδόσεων, έχει αναδείξει και σε αυτόν τον τομέα το πρόβλημα της ανθεκτικότητας. Συγκεκριμένα, έχει οδηγήσει τα τελευταία χρόνια στην ανάπτυξη ανθεκτικών, σε πολλές από τις εγκεκριμένες δραστικές ουσίες, πληθυσμών φυτοπαθογόνων οργανισμών, με αποτέλεσμα, συχνά, να παρουσιάζονται αναποτελεσματικά τα μέτρα χημικής αντιμετώπισης και να καταγράφονται σε πολλές περιπτώσεις εξάρσεις ασθενειών, με τη μορφή επιδημίας (Aliferis & Jabaji, 2011, Ehler, 2006, Hoy, 1998).

Επιπλέον, τα νέα Φ.Π. που παίρνουν έγκριση και κυκλοφορούν στο εμπόριο, αποτελούνται από δραστικές ουσίες, οι οποίες εμφανίζουν συνήθως ίδιο μηχανισμό δράσης με τις ήδη υπάρχουσες. Αυτό συμβαίνει αφενός γιατί η ανακάλυψη και παραγωγή ενός νέου Φ.Π. με πραγματικά καινούριο μηχανισμό δράσης αποτελεί μια χρονοβόρα και κοστοβόρα διαδικασία και αφετέρου επειδή παρουσιάζεται και δυσκολία ανακάλυψης τέτοιων δραστικών ουσιών (Duke, 2012). Παράλληλα, οι ολοένα αυξανόμενες κοινωνικές ανησυχίες για τις επιπτώσεις της χρήσης των συνθετικών Φ.Π. στην ανθρώπινη υγεία, το περιβάλλον και σε οργανισμούς μη-στόχους, έχουν οδηγήσει στην απόσυρση πολλών από αυτά, αλλά και στην εισαγωγή νέων αυστηρότερων διαδικασιών έγκρισης Φ.Π. (European Union Council Directive 91/414/EEC).

Τα παραπάνω προβλήματα, σε συνδυασμό με την ανίχνευση υπολειμμάτων Φ.Π. σε αγροτικά προϊόντα, την εμφάνιση προβλημάτων τοξικότητας σε οργανισμούς μη-στόχους, καθώς και την ύπαρξη ασθενειών, για την αντιμετώπιση των οποίων δεν υπάρχουν μέχρι σήμερα διαθέσιμα Φ.Π. (π.χ. αδρομυκώσεις), δημιουργούν ακόμα μεγαλύτερα προβλήματα στον τομέα της φυτοπροστασίας και εντείνουν την αναγκαιότητα εύρεσης λύσεων.

Τα φυτά αποτελούσαν πάντα πηγή νέων βιοδραστικών ουσιών για την αντιμετώπιση ασθενειών και μέχρι σήμερα μελετώνται εκτενώς για το σκοπό αυτό. Παράλληλα με τη μελέτη των φυτών για την ανακάλυψη νέων χημικών ουσιών για θεραπευτικούς σκοπούς, οι ενδοφυτικοί μικροοργανισμοί αποτελούν σημαντική πηγή νέων δραστικών ουσιών (Gouda et al., 2016).

1.4 Ενδοφυτικοί μικροοργανισμοί

1.4.1 Ορισμός και γενικά στοιχεία

Οι περισσότερες έρευνες που έχουν πραγματοποιηθεί αναφορικά με την αλληλεπίδραση φυτών και μικροοργανισμών εστιάζουν στην παθογένεια των τελευταίων και στις επιπτώσεις τους στα φυτά. Ωστόσο, μετά από τη διεξαγωγή αρκετών μελετών σχετικά με τη μικροβιακή ποικιλομορφία και τη συσχέτισή της με τα διάφορα είδη φυτών, θεωρείται, πλέον, ότι ένα μικρό μόνο ποσοστό των μικροοργανισμών που αλληλεπιδρούν με τα φυτά εμφανίζει παθογόνο χαρακτήρα (Andreote et al., 2014). Η πλειοψηφία των μικροοργανισμών που αποικίζουν φυτικούς οργανισμούς διαδραματίζει σπουδαίο ρόλο στην ανάπτυξή τους και επηρεάζει ποικίλες, ζωτικής σημασίας, δραστηριότητές τους (Khare et al., 2018; Mendes et al., 2013).

Η παρουσία μη παθογόνων οργανισμών μέσα στα φυτά αναφέρθηκε για πρώτη φορά από τον De Bary (1866), ο οποίος ανίχνευσε την παρουσία μικροβιακών κυττάρων σε φυτικούς ιστούς που μελετούσε μικροσκοπικά. Ο ίδιος δημιούργησε τον πρώτο ορισμό του ενδοφύτου, περιγράφοντάς το ως “οποιοσδήποτε οργανισμός που μεγαλώνει μέσα σε φυτικούς ιστούς”. Τα επόμενα χρόνια, ο ορισμός των ενδοφύτων υπέστη αρκετές διαφοροποιήσεις από πολλούς ερευνητές (Hallmann et al., 1997; Wilson, 1995). Ο Petrini (1991) έδωσε τον καταλληλότερο ορισμό, υποστηρίζοντας ότι ενδόφυτο είναι “οποιοσδήποτε οργανισμός ο οποίος, σε κάποιο στάδιο του κύκλου ζωής του, αποικίζει τους εσωτερικούς φυτικούς ιστούς χωρίς να βλάπτει με οποιονδήποτε τρόπο το φυτό-ξενιστή”.

Σήμερα, τα ενδόφυτα ορίζονται ως μικροοργανισμοί που εγκαθίστανται στο εσωτερικό των φυτικών ιστών, ενδοκυτταρικά ή και διακυτταρικά (Das & Chandran, 2011) και περνούν ολόκληρο ή μέρος του κύκλου ζωής τους μέσα στους ξενιστές τους, χωρίς να προκαλούν συμπτώματα ασθένειας (De Silva et al., 2019; Gouda et al., 2016). Περιγράφονται λεπτομερέστερα, με βάση τη φύση τους (βακτήρια/μύκητες), αλλά και βάσει της σχέσης τους με τα φυτά-ξενιστές τους. Έτσι, κατηγοριοποιούνται σε δύο υποομάδες, τα υποχρεωτικά και προαιρετικά ενδόφυτα. Στα υποχρεωτικά ενδόφυτα ανήκουν εκείνα που στηρίζονται στο μεταβολισμό των φυτών-ξενιστών για την επιβίωσή τους και τα οποία διαδίδονται στα φυτά μέσω

φορέων (Hardoim et al., 2008). Αντιθέτως, τα προαιρετικά ενδόφυτα διαβιούν εκτός ξενιστή κατά τη διάρκεια ενός σταδίου του κύκλου ζωής τους και διαδίδονται στα φυτά συνήθως διαμέσου του εδαφικού τους περιβάλλοντος (Abreu-Tarazi et al., 2010).

1.4.2 Κατανομή και ποικιλομορφία των ενδοφύτων

Τα ενδόφυτα είναι πανταχού παρόντα στο φυτικό βασίλειο (Barkodia et al., 2018). Όλα τα ανώτερα φυτά φαίνεται ότι λειτουργούν ως ξενιστές ενός ή περισσότερων ενδοφυτικών μικροοργανισμών, καθώς τέτοια μικρόβια έχουν ανιχνευθεί σε όλα τα φυτικά είδη που έχουν μελετηθεί μέχρι σήμερα (G. A. Strobel, 2003b; G. Strobel & Daisy, 2003). Ενδοφυτικοί μικροοργανισμοί ανιχνεύονται σε φυτά που αναπτύσσονται σε διαφορετικά οικοσυστήματα, σε τροπικά, εύκρατα και βόρεια κλίματα, με τεράστιο εύρος ξενιστών, που εκτείνεται από ποώδη φυτά διαφόρων οικοτόπων έως θαλάσσια φύκια, βρύα, φτέρες, πολυάριθμα αγγειόσπερμα, γυμνόσπερμα, πλατύφυλλα δέντρα, φυτά εκβολών ποταμών, ετήσιων ποωδών και πολυετών φυλλοβόλων και αειθαλών δέντρων. Επιπλέον, τα ενδόφυτα απαντώνται σε όλους τους φυτικούς ιστούς, όπως σε σπόρους, καρπούς, βλαστούς, ρίζες, φύλλα, κονδύλους, άνθη, φλοιό και ξύλο (Barkodia et al., 2018; Kaul et al., 2012).

Ένας μικρός μόνο αριθμός φυτικών ειδών έχει μελετηθεί για το ενδοφυτικό μικροβιακό του φορτίο. Έτσι, υπάρχει μεγάλη πιθανότητα να ανακαλυφθούν νέοι πολλά υποσχόμενοι ενδοφυτικοί μικροοργανισμοί μέσα από τη μελέτη των αναρίθμητων φυτικών ειδών του πλανήτη, τα οποία διαβιούν σε πολύ διαφορετικά περιβάλλοντα και οικοσυστήματα (G. Strobel & Daisy, 2003). Οι κύριοι παράγοντες που επηρεάζουν τον αποικισμό των ενδοφύτων εντός των φυτικών ιστών και καθορίζουν την κατανομή τους στα διάφορα οικοσυστήματα περιλαμβάνουν το είδος και γονότυπο του φυτού, τις περιβαλλοντικές συνθήκες στις οποίες αναπτύσσεται, το στάδιο ανάπτυξής του και τη φυσιολογική του κατάσταση (Gaiero et al., 2013; Golinska et al., 2015; Surjit & Rupa, 2014).

1.5 Το γένος *Bacillus*

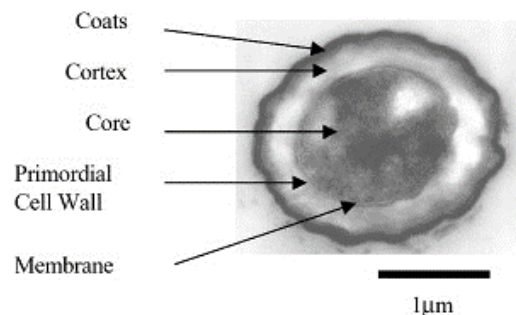
1.5.1 Χαρακτηριστικά γνωρίσματα

Το γένος *Bacillus* αποτελεί ένα πολυπληθές και ποικιλόμορφο σύνολο, περιλαμβάνοντας 543 είδη θετικών κατά Gram βακτηρίων (www.bacterio.net/bacillus.html) (τελευταία ενημέρωση Σεπτέμβρης 2020), με ραβδοειδές σχήμα κυττάρων και ικανότητα κίνησης μέσω μαστίγιων (*Εικόνα 9A*) (R. Gordon et al., 1973). Τα βακτήρια που ανήκουν στο συγκεκριμένο γένος είναι στην πλειοψηφία τους αερόβια, ενώ ορισμένα από αυτά μπορεί να συμπεριφέρονται και ως προαιρετικά αναερόβια (Turnbull, 1996). Τα διάφορα είδη που συγκαταλέγονται στο γένος παρουσιάζουν ένα ευρύ φάσμα φυσιολογικών ιδιοτήτων (Caulier et al., 2019), εμφανίζουν, όμως, ένα κοινό και ιδιαίτερα διακριτό γνώρισμα, την ικανότητα να σχηματίζουν ενδοσπόρια (Zeigler & Perkins, 2008).

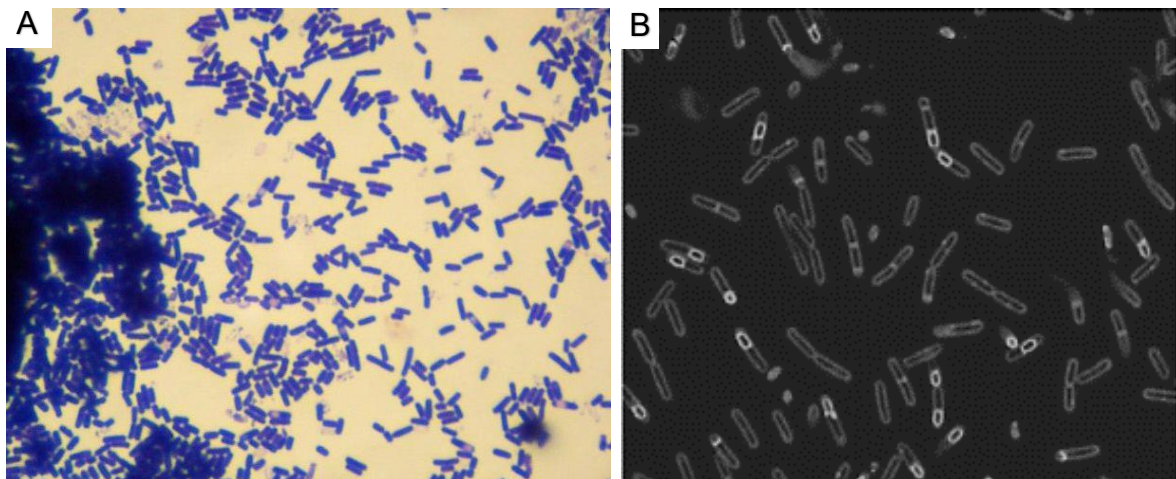
Τα ενδοσπόρια είναι ειδικές κατασκευές που δημιουργούνται μετά από μια διαδικασία διαφοροποίησης που υφίστανται τα βακτηριακά κύτταρα όταν βρεθούν κάτω από δυσμενείς περιβαλλοντικές συνθήκες, κυρίως σε περιπτώσεις έλλειψης θρεπτικών συστατικών στο περιβάλλον που διαβιούν (*Εικόνα 9B*). Τα σπόρια αυτά είναι αδρανή, δεν πραγματοποιούν μεταβολικές διεργασίες και μπορούν να επιβιώσουν με αυτή τη μορφή για χιλιάδες χρόνια, καθώς είναι εξαιρετικά ανθεκτικά σε ένα μεγάλο εύρος περιβαλλοντικών καταπονήσεων, όπως υψηλών θερμοκρασιών, υπερϊώδους ακτινοβολίας κ.α. Παρά την αδρανή φύση τους, τα ενδοσπόρια διατηρούν έναν αισθητήριο μηχανισμό, ο οποίος τους επιτρέπει να αντιλαμβάνονται την επανεμφάνιση επαρκών ποσοτήτων θρεπτικών στοιχείων στο περιβάλλον τους, κάτι που οδηγεί στη βλάστησή τους και την ανάπτυξη ενός νέου ενεργού βακτηριακού κυττάρου (Atrih & Foster, 2002).

Στην *Εικόνα 8* παρουσιάζεται η δομή ενός ώριμου ενδοσπορίου ενός στελέχους του είδους *Bacillus subtilis*, όπως φαίνεται με τη χρήση ηλεκτρονικού μικροσκοπίου. Στο εξωτερικό του σπορίου εντοπίζεται το παχύ περίβλημά του (coat), αποτελούμενο από έως και 25 διαφορετικά είδη πολυπεπτιδίων (Driks, 1999), τα οποία συνδέονται μεταξύ τους με τρόπο ώστε να σχηματίζουν 2 στρώματα, ένα πυκνό εξωτερικό και ένα αραιότερο εσωτερικό περίβλημα (Zeigler & Perkins, 2008). Ο ρόλος του περιβλήματος είναι η ενίσχυση της αντοχής του

ενδοσπορίου σε χημικές και ενζυμικές καταπονήσεις, καθώς λειτουργεί ως φυσικός φραγμός στην είσοδο τέτοιων ουσιών (Riesenman & Nicholson, 2000). Κάτω από το εξωτερικό περίβλημα, εντοπίζεται ο φλοιός του σπορίου (cortex), ο οποίος αποτελείται από ένα παχύ στρώμα πεπτιδογλυκάνης και είναι υπεύθυνος για την αποτροπή της εισόδου υγρασίας στο εσωτερικό του, ενώ παράλληλα προστατεύει το γενετικό υλικό από τη θερμότητα και την ακτινοβολία (Zeigler & Perkins, 2008). Το εσωτερικό του ενδοσπορίου ονομάζεται πυρήνας (core) και περιέχει όλα τα απαραίτητα συστατικά (πρωτεΐνες, ένζυμα, ριβοσώματα) για τη δραστηριοποίηση και βλάστηση του σπορίου όταν επικρατήσουν ευνοϊκές συνθήκες, καθώς και το γενετικό υλικό του μικροοργανισμού (Atrih & Foster, 2002). Στο αδρανές ενδοσπόριο, ο πυρήνας παραμένει αφυδατωμένος, χαρακτηριστικό που διατηρεί το περιεχόμενό του ανθεκτικό στις υψηλές θερμοκρασίες (Marquis et al., 1994).



Εικόνα 8 Απεικόνιση της δομής ενδοσπορίου στελέχους του είδους *Bacillus subtilis* με χρήση ηλεκτρονικού μικροσκοπίου (Atrih & Foster, 2002).



Εικόνα 9 (A) Απεικόνιση βακτηριακών κυττάρων του είδους *Bacillus subtilis* με χρήση ηλεκτρονικού μικροσκοπίου. Παρατηρείται το ραβδοειδές σχήμα τους καθώς και το μπλε-ιώδες χρώμα που παραμένει κατά τη χρώση κατά Gram στην περίπτωση των θετικών κατά Gram βακτηρίων. **(B)** Βακτηριακά κύτταρα του είδους *B. subtilis* κατά τη διαδικασία σχηματισμού ενδοσπορίων (Zeigler & Perkins, 2008).

1.5.2 Συστηματική κατάταξη: Ιστορική αναδρομή και σύγχρονα στοιχεία

Κατά τη δεκαετία του 1870, στο πανεπιστήμιο του Βρότσλαβ, ο Ferdinand Cohn απομόνωσε από έγχυμα σανού ένα μικρό αερόβιο βακτήριο που διέθετε την ικανότητα κίνησης και το ονόμασε *Bacillus subtilis*, που σημαίνει λεπτή ράβδος (“thin rod”). Ο Cohn παρείχε την πρώτη λεπτομερή περιγραφή του κύκλου ζωής των βακτηρίων *Bacillus*, παρουσιάζοντας το σχηματισμό, την αντοχή στη θερμότητα, τη βλάστηση και τέλος, την ανάπτυξη των ενδοσπορίων (Cohn, 1872). Μερικά χρόνια αργότερα, όταν ο Robert Koch απέδειξε ότι ένας φαινοτυπικά παρόμοιος οργανισμός (ο σημερινός *Bacillus anthracis*) ήταν το παθογόνο αίτιο της ασθένειας του άνθρακα (Blevins & Bronze, 2010), η σπουδαιότητα της νέας αυτής ομάδας οργανισμών αναδείχθηκε.

Κατά τη διάρκεια των 50 χρόνων που ακολούθησαν, πραγματοποιήθηκε πλήθος ανακαλύψεων νέων ειδών παρόμοιων με τα παραπάνω, αλλά, εξαιτίας των περιορισμένων εργαλείων και τεχνικών της εποχής, η ταξινόμησή τους αποτελούσε μια ιδιαίτερα δύσκολη και επίπονη διαδικασία. Σημαντικό σταθμό στην προσπάθεια κατάταξης των ειδών του γένους *Bacillus* αποτέλεσε η δουλειά των Nathan R. Smith, Francis E. Clark και Ruth E. Gordon κατά τις δεκαετίες του 1930 και 1940. Οι συγκεκριμένοι προχώρησαν στην κατάταξη πολλών από τα έως τότε γνωστά στελέχη σε συγκεκριμένα είδη, βάσει μορφολογικών χαρακτηριστικών και δεδομένων φυσιολογίας των μικροοργανισμών αυτών (R. E. Gordon & Smith, 1949). Υιοθέτησαν, μάλιστα, και έναν σαφή ορισμό εργασίας, σύμφωνα με τον οποίο το γένος *Bacillus* περιλαμβάνει “βακτήρια ραβδοειδούς σχήματος ικανά να σχηματίζουν ενδοσπόρια, τα οποία είναι πιο ανθεκτικά στις υψηλές θερμοκρασίες, στην ξηρασία και σε άλλους δυσμενείς παράγοντες συγκριτικά με τα αναπτυσσόμενα βακτηριακά κύτταρα” (R. E. Gordon et al., 1973).

Κατά τη δεκαετία του 1970 και στις αρχές της δεκαετίας του 1980, ο Woese και οι συνεργάτες του εισήγαγαν μια νέα εποχή συστηματικής, η οποία οδήγησε στην αναταξινόμηση όλων των γνωστών οργανισμών σε τρεις επικράτειες (domains), δύο εκ των οποίων αποτελούνταν από προκαρυωτικούς οργανισμούς (Woese & Fox, 1977). Η βασική τεχνολογία που στήριξε αυτή την “επανάσταση” ήταν η αλληλούχιση του 16S rRNA (Fox et al., 1977). Όταν τα νέα εργαλεία μοριακής ταξινόμησης εφαρμόστηκαν και στο γένος *Bacillus*, τα δεδομένα που προέκυψαν

έθεσαν σε αμφισβήτηση τα προϋπάρχοντα, σύμφωνα με τα οποία το γένος αποτελούνταν από ένα μικρό αριθμό αυστηρά καθορισμένων ειδών με ευκρινή φαινοτυπικά χαρακτηριστικά. Τα παραπάνω οδήγησαν στην αντικατάσταση της χρήσης των μορφολογικών χαρακτήρων ως μοναδικών στοιχείων στην ταξινόμηση των ειδών *Bacillus* από τη χρήση μοριακών δεδομένων, τα οποία βασίζονταν πια σε συγκρίσεις των μικροοργανισμών σε επίπεδο γονιδιώματος. Σήμερα, το γένος *Bacillus* αποτελεί ένα μικρό μόνο μέρος ενός ευρύτερου ταξινομικού συνόλου βακτηρίων με ικανότητα παραγωγής ενδοσπορίων, που ονομάζεται *Bacillus sensu lato* (Εικόνα 10) (Zeigler & Perkins, 2008). Τέλος, στον Πίνακα 7 παρουσιάζεται η συστηματική κατάταξη του ίδιου του γένους *Bacillus*.



Εικόνα 10 Φυλογενετική κατάταξη του ταξινομικού συνόλου *Bacillus sensu lato* βασισμένη στην αλληλούχιση του 16S rRNA (Zeigler & Perkins, 2008).

Πίνακας 7 Συστηματική κατάταξη του γένους *Bacillus*.

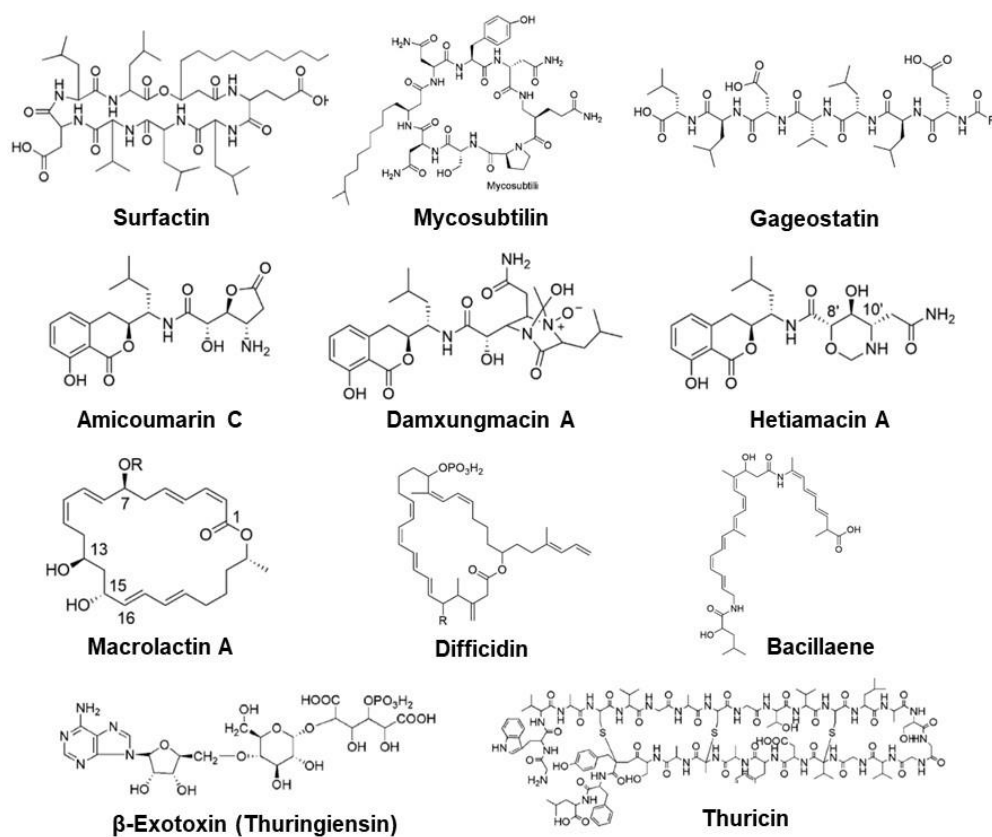
Επικράτεια	Bacteria
Φύλο	Firmicutes
Κλάση	Bacilli
Τάξη	Bacillales
Οικογένεια	<i>Bacillaceae</i>
Γένος	<i>Bacillus</i>

1.5.3 Οικολογική εξάπλωση

Η μεγάλη ποικιλομορφία που χαρακτηρίζει τα είδη του γένους *Bacillus*, η ικανότητά τους να σχηματίζουν τις ανθεκτικές κατασκευές των ενδοσπορίων καθώς και η δυνατότητα παραγωγής ποικίλων αντιμικροβιακών ουσιών εξηγεί τη μεγάλη προσαρμοστικότητα τους σε ακραίες περιβαλλοντικές συνθήκες και ευνοεί την παρουσία τους σε πλήθος οικοσυστημάτων. Τέτοια είδη έχουν ανακτηθεί από τα βάθη των ωκεανών χιλιάδες μέτρα κάτω από τη στάθμη της θάλασσας (Bae et al., 2005; Lu et al., 2001; Rügger et al., 2000), καθώς και από δείγματα αέρα δεκάδες χιλιόμετρα πάνω από αυτή (Shivaji et al., 2006). Άλλα είδη *Bacillus* έχουν απομονωθεί από όξινες θερμές πηγές (Simbahan et al., 2004), από αλκαλικά υπόγεια ύδατα (Tiago et al., 2004) και από μολυσμένα με βαρέα μέταλλα ύδατα (Switzer Blum et al., 1998). Επιπλέον, βακτηριακά είδη *Bacillus* έχουν ανακαλυφθεί σε ανθρωπογενή περιβάλλοντα, τόσο αρχαία όσο και σύγχρονα, από τάφους στο Μεξικό (Gatson et al., 2006) και φθαρμένες ρωμαϊκές τοιχογραφίες (Heyrman et al., 2003), έως σύγχρονους χώρους εγκαταστάσεων διαστημικών σκαφών (Satomi et al., 2006). Τέλος, τα φυτά εξακολουθούν να αποτελούν πλούσια πηγή νέων ειδών *Bacillus*, μερικά εκ των οποίων συμπεριφέρονται ως ενδόφυτα (Reva et al., 2002), ενώ άλλα διαβιούν στη ριζόσφαιρα (Olivera et al., 2005).

1.5.4 Μεταβολικό δυναμικό

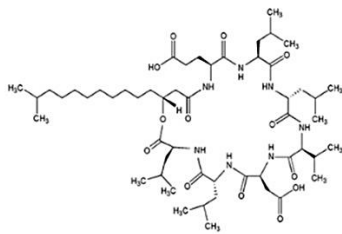
Τα βακτήρια του γένους *Bacillus* συχνά παρομοιάζονται με μικροβιακά εργοστάσια, εξαιτίας της πληθώρας και δομικής ποικιλίας μεταβολιτών που παράγουν (Ongena & Jacques, 2008). Εκτιμάται ότι το 4-5% του γονιδιώματος ενός τυπικού στελέχους του είδους *B. subtilis* είναι αφιερωμένο αποκλειστικά στη βιοσύνθεση φυσικών προϊόντων (Stein, 2005). Από αυτά, οι δευτερογενείς μεταβολίτες που ανήκουν στη χημική ομάδα των λιποπεπτιδίων έχουν μελετηθεί εκτενέστερα. Συνολικά, το ευρύ φάσμα βιολογικών ιδιοτήτων των παραγόμενων από βακτήρια *Bacillus* spp. μεταβολιτών (π.χ. αντιμικροβιακή, αντιϊική, ανοσοκατασταλτική, αντιογκογόνος κ.α.) έχει προσελκύσει το ενδιαφέρον της φαρμακευτικής βιομηχανίας και βιομηχανίας αγροδιατροφικού τομέα για την αναζήτηση πρότυπων δομών στα μικροβιακά εκχυλίσματα με σκοπό την ανάπτυξη νέων φαρμάκων και άλλων σκευασμάτων (Sansinenea & Ortiz, 2011). Στην **Εικόνα 11** συνοψίζονται ορισμένες χαρακτηριστικές χημικές δομές κατηγοριών μεταβολιτών των βακτηρίων του γένους *Bacillus*.



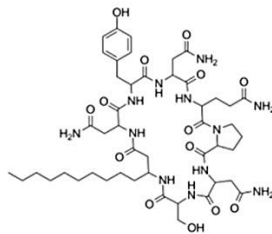
Εικόνα 11 Χημικές δομές βασικών κατηγοριών μεταβολιτών παραγόμενων από βακτήρια του γένους *Bacillus* (A) λιποπεπτιδία, (B) κουμαρίνες, (C) μακρολίδια, (D) μεταβολίτες του *B. thuringiensis*.

1.6 Λιποπεπτίδια

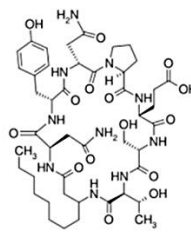
Τα λιποπεπτίδια είναι δευτερογενείς μεταβολίτες μικρού μοριακού βάρους (έως 2000 Da) που παράγονται από διάφορα γένη μυκήτων, ζυμών και βακτηρίων (Malviya et al., 2020). Τυπικό παράδειγμα μυκήτων που έχουν την ικανότητα παραγωγής τέτοιων ουσιών είναι εκείνοι που ανήκουν στο γένος *Aspergillus*, ενώ τα βακτήρια από τα οποία απομονώνονται συχνότερα οι μεταβολίτες αυτοί ανήκουν στα γένη *Streptomyces*, *Pseudomonas* και *Bacillus* (Bonmatin et al., 2003; Malviya et al., 2020). Τα μόρια των λιποπεπτιδίων εμφανίζουν αμφίφιλες ιδιότητες, καθώς αποτελούνται από μια υδρόφοβη αλυσίδα λιπαρού οξέος και ένα υδρόφιλο ευθύγραμμο ή κυκλικό ολιγοπεπτίδιο. Παρουσιάζουν μεγάλη ποικιλία δομών, η οποία μπορεί να οφείλεται σε διαφοροποιήσεις τόσο στο πεπτιδικό τμήμα όσο και στη λιπαρή αλυσίδα. Πιο συγκεκριμένα, στον πεπτιδικό σκελετό τους, η παρατηρούμενη διαφοροποίηση των δομών αφορά τόσο στο είδος και στην αλληλουχία των μονομερών αμινοξέων που το συγκροτούν, όσο και στη φύση της κυκλοποίησής του στην περίπτωση των κυκλικών λιποπεπτιδίων. Στο λιπαρό τμήμα, οι δομές διαφέρουν ως προς το είδος του λιπαρού οξέος, αλλά και ως προς το μήκος και τη διακλάδωση της αλυσίδας (Penha et al., 2020a). Στην [Εικόνα 12](#) συνοψίζονται μερικές από τις πιο συχνά απαντώμενες κατηγορίες λιποπεπτιδίων που παράγονται από διάφορους μικροοργανισμούς (Malviya et al., 2020).



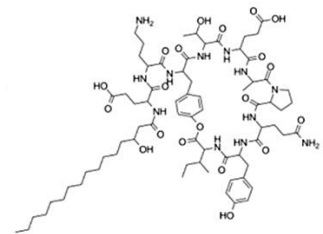
Surfactin



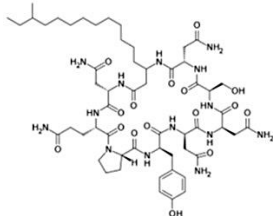
Iturin



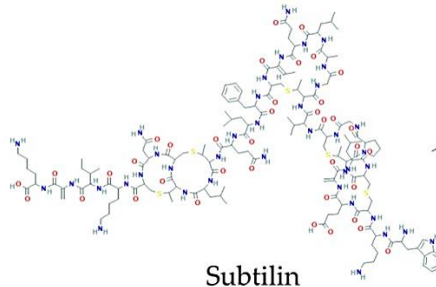
Bacillomycin



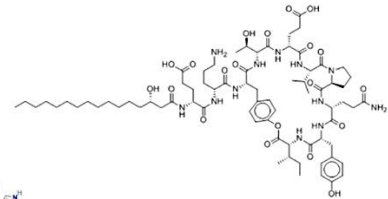
Fengycin



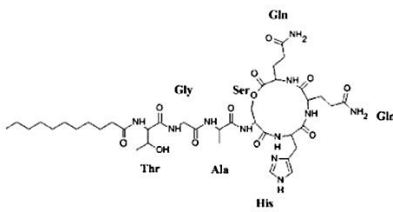
Mycosubtilin



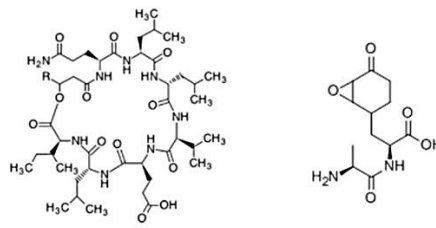
Subtilin



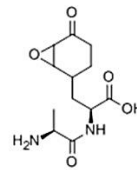
Plipastatin



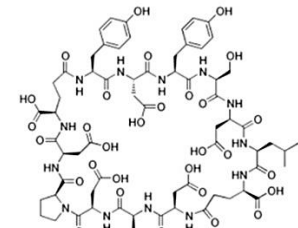
Kurstakins



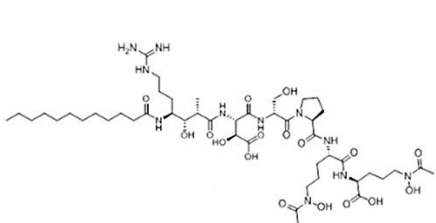
Lichenysin



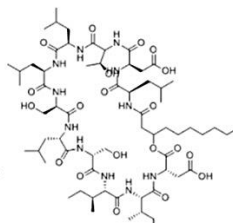
Bacilysin



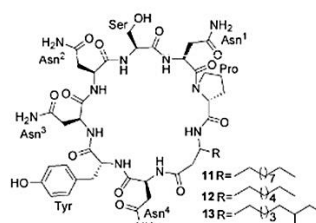
Mycobacillin



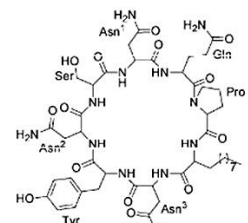
Variochelins



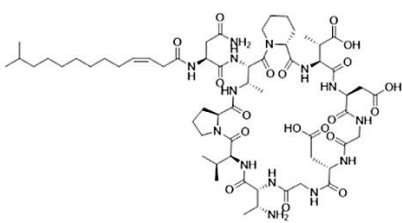
Arthrofactin



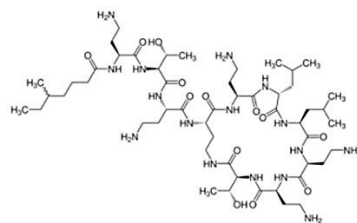
Mixirins A-C



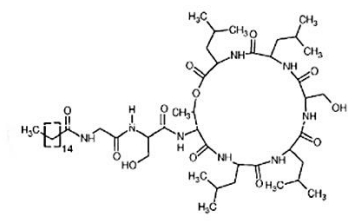
Marihysin A



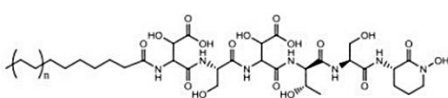
Friulimicin



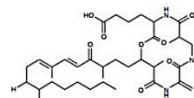
Polymyxin



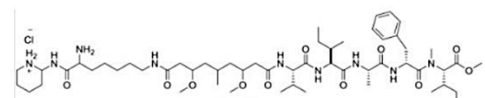
Pseudofactin



Serobactins A, B And C



Fusaristatins A



Mitsoamide

Εικόνα 12 Χημικές δομές βασικών κατηγοριών λιποπεπτιδίων παραγόμενων από διαφορετικά γένη βακτηρίων και μυκήτων.

1.6.1 Κυκλικά λιποπεπτίδια των βακτηρίων του γένους *Bacillus*

Από το σύνολο των μέχρι σήμερα γνωστών λιποπεπτιδίων, εκείνα που παράγονται από βακτήρια του γένους *Bacillus* έχουν μελετηθεί περισσότερο, με την πλειοψηφία των ερευνητικών εργασιών να εστιάζει στα κυκλικά λιποπεπτίδια (Cyclic Lipopeptides, CLPs) των βακτηρίων αυτών, εξαιτίας της πολλαπλής βιοδραστικότητας που εμφανίζουν και των εκτεταμένων εφαρμογών τους (Jiang et al., 2014; Kaspar et al., 2019; H. Zhao et al., 2017). Η δομή των τελευταίων συγκροτείται από έναν πεπτιδικό δακτύλιο 7-10 αμινοξέων ενωμένο με μία αλυσίδα λιπαρού οξέος. Τα περισσότερα CLPs των βακτηρίων *Bacillus* κατηγοριοποιούνται σε τρεις αντιπροσωπευτικές οικογένειες, με βάση τον πεπτιδικό τους σκελετό. Οι οικογένειες αυτές είναι οι surfactins (σουρφακτίνες), οι iturins (ιτουρίνες) και οι fengycins (φεγκυσίνες) (Kaspar et al., 2019; Malviya et al., 2020; H. Zhao et al., 2017).

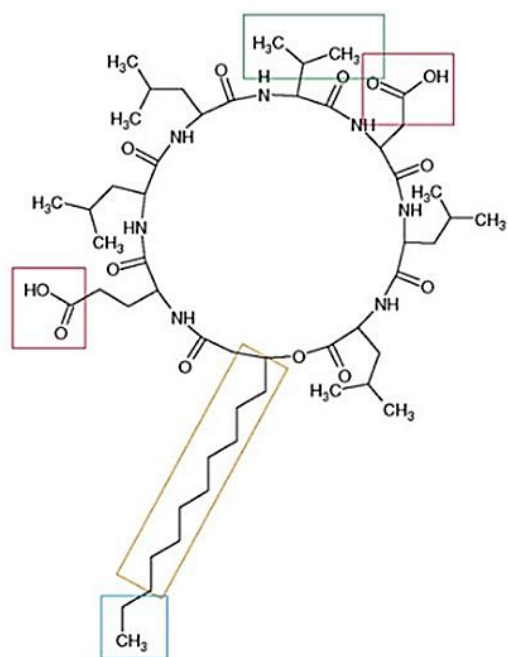
1.6.1.1 Surfactins (Σουρφακτίνες)

Το έτος 1968 οι Arima et al. κατάφεραν να απομονώσουν ένα νέο λιποπεπτιδίο από ένα στέλεχος του είδους *Bacillus subtilis*, το οποίο ονόμασαν surfactin από την αγγλική λέξη “surfactant”, χάρη στην υψηλή επιφανειοδραστική ισχύ που παρουσίαζε (Arima et al., 1968). Η αποσαφήνιση της χημικής δομής του μορίου της πρώτης αυτής σουρφακτίνης πραγματοποιήθηκε ένα χρόνο μετά, το 1969 (Kakinuma, Hori, et al., 1969; Kakinuma, Sugino, et al., 1969). Ακολούθησε η ανακάλυψη και άλλων μεταβολιτών με παρόμοια χημική δομή, στους οποίους δόθηκαν ονομασίες βάσει του είδους *Bacillus* από το οποίο απομονώθηκαν για πρώτη φορά, όπως η lichenysin από το *B. licheniformis* και η rumilacidin από το *B. rumilus* (Aleti et al., 2015; Grangemard et al., 1999, 2001; Ongena et al., 2007). Η κατηγορία λιποπεπτιδίων που δημιουργήθηκε και συμπεριέλαβε τα παραπάνω μόρια πήρε τη γενική ονομασία “surfactins” (σουρφακτίνες) (Olishevskaya et al., 2019).

Στην ομάδα αυτή συναντώνται αρκετές δομικές παραλλαγές, αλλά όλες οι ουσίες εμφανίζουν ορισμένα κοινά γνωρίσματα: Είναι επταπεπτιδία, με τη διαμόρφωση των αμινοξέων τους να υπακούει στην ακολουθία LLDLLDL, συνδεδεμένα με ένα β-υδροξυ λιπαρό οξύ με τρόπο ώστε να σχηματίζουν ένα λακτονικό δακτύλιο (Harwood et al., 2018; Olishevskaya et al., 2019; Penha et al., 2020; Santos et al., 2018). Ο κυκλικός πεπτιδικός σκελετός των μεταβολιτών αυτών αποτελείται τόσο από υδρόφοβα όσο και από υδρόφιλα μονομερή, τα οποία, μάλιστα, απαντώνται σε συγκεκριμένες θέσεις. Αναλυτικότερα, στις θέσεις 2, 3, 4, 6 και 7 του πεπτιδικού δακτυλίου μπορεί να βρίσκεται ένα από τα υδρόφοβα αμινοξέα βαλίνη (Val), λευκίνη (Leu) και ισολευκίνη (Ile), ενώ οι θέσεις 1 και 5 απαρτίζονται από τα υδρόφιλα αμινοξέα γλουταμινικό οξύ (Glu) και ασπαραγινικό οξύ (Asp) αντίστοιχα (Santos et al., 2018) (*Εικόνα 13*). Το συγκεκριμένο χαρακτηριστικό της δομής των σουρφακτινών ενισχύει τον ήδη υπάρχοντα αμφίφιλο χαρακτήρα τους.

Τα μέλη της οικογένειας των σουρφακτινών είναι οι μεταβολίτες surfactin, lichenysin (ή halobacillin), rumilacidin και esperin (Penha et al., 2020). Καθένας από αυτούς εμφανίζεται συνήθως σε μίγματα ομόλογων ουσιών, οι οποίες χαρακτηρίζονται από πανομοιότυπη λιπαρή αλυσίδα και μπορεί να διαφέρουν μεταξύ τους στα αμινοξέα των θέσεων 2, 4 και 7 του πεπτιδικού δακτυλίου (Baumgart et al., 1991; Kowall et al., 1998; Françoise PEYPOUX et al., 1991).

Παράλληλα, διακρίνονται και διαφορετικές ισομορφές των μορίων αυτών, οι οποίες αποτελούνται από πανομοιότυπο πεπτιδικό τμήμα, ενώ διαφέρουν μεταξύ τους στο μήκος ή/και στη διακλάδωση της αλυσίδας λιπαρού οξέος τους (Kowall et al., 1998; Françoise Peyroux & Michel, 1992) (Εικόνα 13).



Surfactin family

Variants

<i>Surfactin</i>	L-Glu-L- XS ₂ -D-Leu-L- XS ₄ -L-Asp-D-Leu-L- XS ₇
<i>Lichenysin</i>	L- XL ₁ -L- XL ₂ -D-Leu-L- XL ₄ -L-Asp-D-Leu-L- XL ₇
<i>Pumilacidin</i>	L-Glu-L-Leu-D-Leu-L-Leu-L-Asp-D-Leu-L- XP ₇
<i>Esperin</i>	L-Glu-L-Leu-D-Leu-L-Val-L-Asp-D-Leu-L-Leu

XS₂ = Val, Leu, Ile ; **XS**₄ = Ala, Val, Leu, Ile ; **XS**₇ = Val, Leu, Ile

XL₁ = Gln, Glu ; **XL**₂ = Leu, Ile ; **XL**₄ / **XL**₇ = Val, Ile

XP₇ = Val, Ile

Branching of the acyl chain

linear

iso

anteiso

Εικόνα 13 Αντιπροσωπευτική χημική δομή των λιποπεπτιδίων της οικογένειας των σουρφακτινών (αριστερά) και δομικές διαφοροποιήσεις μεταξύ των μελών της (δεξιά). Τα χρωματισμένα περιγράμματα επισημαίνουν τα βασικά δομικά γνωρίσματα των σουρφακτινών: Με πράσινο χρώμα σημειώνεται ενδεικτικά η υδροφοβικότητα του αμινοξέος της θέσης 4, χαρακτηριστική όλων των μονομερών των θέσεων 2, 3, 4, 6 και 7 του πεπτιδικού δακτυλίου. Με κόκκινο χρώμα σημειώνονται οι πολικές ομάδες των υδρόφιλων αμινοξέων των θέσεων 1 και 5 του πεπτιδικού δακτυλίου. Με πορτοκαλί χρώμα σημειώνεται το μήκος της αλυσίδας λιπαρού οξέος. Με μπλε χρώμα σημειώνεται ο τύπος της διακλάδωσης της λιπαρής αλυσίδας (linear, iso, anteiso) (τροποποιημένο από Ongena & Jacques, 2008).

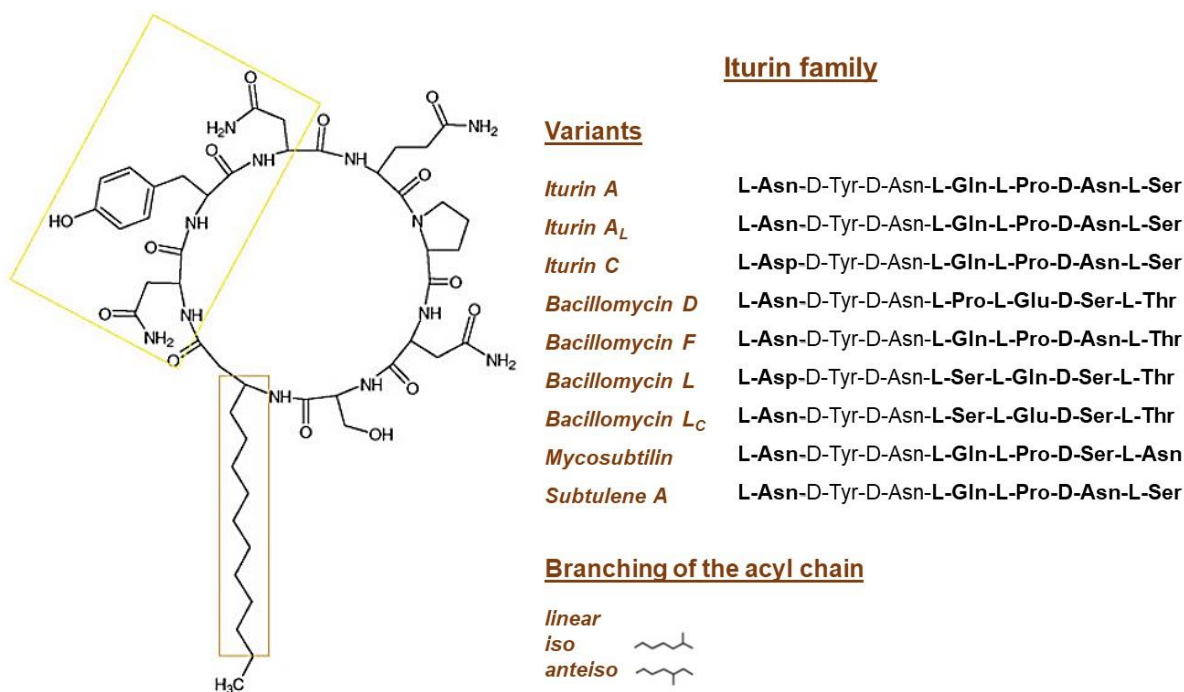
1.6.1.2 Iturins (Ιτουρίνες)

Ο πρώτος και περισσότερο μελετημένος μεταβολίτης της κατηγορίας αυτής απομονώθηκε το 1957 από ένα στέλεχος του είδους *Bacillus subtilis* που είχε ληφθεί από δείγμα χώματος της επαρχίας Ιτούρι (Ituri) του βορειοανατολικού τμήματος της Λαϊκής Δημοκρατίας του Κονγκό, από την οποία και έλαβε το όνομά του (Iturin A) (Delcambe & Devignat, 1957). Η απομόνωση, εν συνεχεία, άλλων μορίων λιποπεπτιδίων, από διάφορα στελέχη του ίδιου βακτηριακού είδους, τα οποία εμφάνιζαν κοινό μοτίβο χημικής δομής, οδήγησε στη δημιουργία της συγκεκριμένης ομάδας λιποπεπτιδίων με τη γενική ονομασία “iturins” (Mhammedi et al., 1982; Francoise PEYPOUX et al., 1985; Sugiyama & Kaneda, 1995; Workman & Mamiya, 1995).

Όλες οι ουσίες της οικογένειας αυτής είναι επταπεπτίδια, με τη σειρά των αμινοξέων τους να εμφανίζει διαμόρφωση LDDLLDL, συνδεδεμένα με ένα β-αμινο λιπαρό οξύ, με αποτέλεσμα η κυκλοποίηση του πεπτιδικού τμήματος να πραγματοποιείται με το σχηματισμό πεπτιδικού δεσμού ανάμεσα στην αμινομάδα του λιπαρού οξέος και το C-τελικό άκρο του πεπτιδίου (Harwood et al., 2018; Malviya et al., 2020). Επιπλέον, όλα τα λιποπεπτίδια της κατηγορίας των ιτουρινών παρουσιάζουν ένα κοινό τμήμα στον πεπτιδικό τους σκελετό, το οποίο συγκροτείται από τα τρία πρώτα αμινοξέα (L-Asx, D-Tyr, D-Asn), ενώ παρατηρούνται διαφοροποιήσεις στις υπόλοιπες τέσσερις θέσεις του δακτυλίου (Harwood et al., 2018; Penha et al., 2020) (*Εικόνα 14*). Η κοινή αλληλουχία των τριών αμινοξέων που χαρακτηρίζει τις ιτουρίνες φαίνεται ότι αποτελεί καθοριστικό παράγοντα για την εκδήλωση των βιολογικών τους δράσεων (Ongena & Jacques, 2008).

Η ονοματολογία της συγκεκριμένης ομάδας λιποπεπτιδίων αποκλίνει από εκείνη των υπόλοιπων δύο κατηγοριών (σουρφακτινών, φεγκκυσινών), καθώς ουσίες που έχουν πανομοιότυπο πεπτιδικό σκελετό και διαφέρουν μόνο στη λιπαρή τους αλυσίδα μπορούν να λαμβάνουν διαφορετικές ονομασίες (Kaspar et al., 2019; Olishavska et al., 2019). Για παράδειγμα, οι μεταβολίτες iturin A (Klich et al., 1994), iturin AL (Winkelmann et al., 1983) και subtulene A (Thasana et al., 2010) αποτελούνται από την ίδια αλληλουχία αμινοξέων (L-Asn, D-Tyr, D-Asn, L-Gln, L-Pro, D-Asn, L-Ser) και διαφοροποιούνται μόνο στην υδρόφοβη πλευρική αλυσίδα (Kaspar et al., 2019; Olishavska et al., 2019; Ongena & Jacques, 2008).

Τα βασικά μέλη της οικογένειας των ιτουρινών είναι οι ουσίες iturins A, A_L, C και οι bacillomycins D, F, L, L_C (ή bacilloreptin), οι οποίες διαφέρουν από τις πρώτες κυρίως στο αμινοξύ της θέσης 7, με την παρουσία θρεονίνης (Thr) στη θέση της σερίνης (Ser) (Kaspar et al., 2019). Τέλος, στην ίδια οικογένεια συγκαταλέγεται και ο μεταβολίτης mycosubtilin, η δομή του οποίου διαφοροποιείται από εκείνη των iturins με την αντιστροφή των δύο τελευταίων αμινοξέων του πεπτιδικού σκελετού (D-Ser, L-Asn αντί για D-Asn, L-Ser) (Ongena & Jacques, 2008), καθώς και ο προαναφερθείς μεταβολίτης subtilene A (Εικόνα 14).

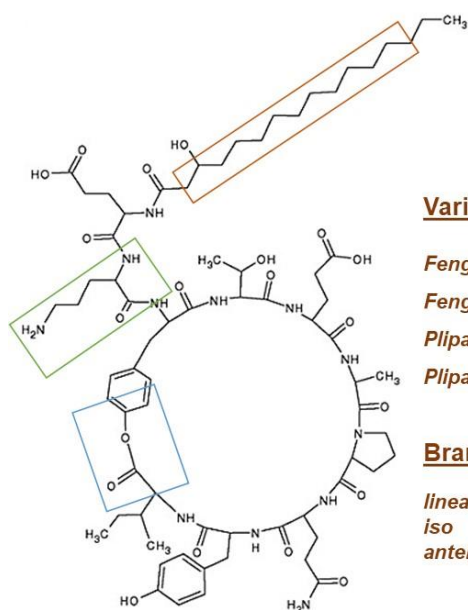


Εικόνα 14 Αντιπροσωπευτική χημική δομή των λιποπεπτιδίων της οικογένειας των ιτουρινών (αριστερά) και δομικές διαφοροποιήσεις μεταξύ των μελών της (δεξιά). Τα χρωματισμένα περιγράμματα επισημαίνουν τα βασικά δομικά γνωρίσματα των ιτουρινών: Με κίτρινο χρώμα σημειώνεται η κοινή αλληλουχία των τριών πρώτων αμινοξέων του πεπτιδικού δακτυλίου L-Asx(1)-D-Tyr(2)-D-Asn(3). Με πορτοκαλί χρώμα σημειώνεται το μήκος της αλυσίδας λιπαρού οξέος (τροποποιημένο από Ongena & Jacques, 2008).

1.6.1.3 Fengycins (Φεγκυσίνες)

Η συγκεκριμένη ομάδα λιποπεπτιδίων ανακαλύφθηκε μεταγενέστερα σε σχέση με τις άλλες δύο κύριες κατηγορίες (σουρφακίνες, ιτουρίνες), με την ταυτοποίηση της πρώτης φεγκυσίνης να καταγράφεται το 1986 (Vanittanakom et al., 1986). Όλοι οι μεταβολίτες της οικογένειας των φεγκυσινών είναι δεκαπεπτίδια, συνδεδεμένα με ένα β-υδροξυ λιπαρό οξύ, το οποίο μπορεί να είναι κορεσμένο ή ακόρεστο (Penha et al., 2020). Χαρακτηριστικό γνώρισμα των ουσιών αυτών αποτελεί η κυκλοποίηση τους, η οποία πραγματοποιείται εντός της πεπτιδικής μονάδας, με αποτέλεσμα να σχηματίζεται εσωτερικός λακτονικός δακτύλιος αποτελούμενος από οκτώ αμινοξέα, ενώ τα υπόλοιπα δύο παραμένουν εκτός δακτυλίου ως προέκταση της λιπαρής αλυσίδας (Harwood et al., 2018). Ως επιπλέον ενδιαφέρον δομικό στοιχείο, οι φεγκυσίνες περιλαμβάνουν τέσσερα αμινοξέα σε D-διαμόρφωση, καθώς και το μη πρωτεϊνικό αμινοξύ D-ορνιθίνη (D-Orn) στη θέση 2 του πεπτιδίου (Harwood et al., 2018) (*Εικόνα 15*). Ακόμα, στη θέση 5 εντοπίζεται το αμινοξύ D-θρεονίνη (D-Thr), το οποίο όμως βρίσκεται με τη μορφή του σπάνιου στερεοϊσομερούς διαμόρφωσης (2*R*, 3*R*) και ονομάζεται D-allothreonine (D-allo-Thr) (Sur et al., 2018).

Η ομάδα των φεγκυσινών χαρακτηρίζεται από σχετικά μικρή παραλλακτικότητα, με τις ουσίες που τη συγκροτούν να εμφανίζουν παρεμφερή αλληλουχία αμινοξέων (Harwood et al., 2018). Συγκεκριμένα, τα μέλη της είναι οι μεταβολίτες fengycin A και B και rlipastatin A και B. Τα δύο ζεύγη διαθέτουν την ίδια σχεδόν πεπτιδική μονάδα και διαφέρουν μεταξύ τους στη διαμόρφωση των μονομερών τυροσίνης (Tyr) των θέσεων 3 και 9 (Ongena & Jacques, 2008). Μάλιστα, η τυροσίνη της θέσης 3 αποτελεί το αμινοξύ εκείνο που συμμετέχει στην κυκλοποίηση του πεπτιδίου, σχηματίζοντας εστερικό δεσμό με το μονομερές της θέσης 10, την ισολευκίνη (Ile) (Sur et al., 2018). Επιπλέον, μέσα στο κάθε ζεύγος, οι μεταβολίτες A και B διαφέρουν μεταξύ τους στο αμινοξύ της θέσης 6 του πεπτιδικού σκελετού, το οποίο είναι η αλανίνη (Ala) για τους A και η βαλίνη (Val) για τους B (*Εικόνα 15*). Αναφορικά με το άπολο τμήμα των ουσιών αυτών, η λιπαρή αλυσίδα μπορεί να είναι ποικίλου μήκους και διακλάδωσης, ενώ η ακορεστότητά της εμφανίζεται συνήθως με την ύπαρξη διπλών δεσμών μεταξύ των θέσεων 2-3, 3-4 και 13-14 (Olishevskaya et al., 2019).



Fengycin family

Variants

- Fengycin A** L-Glu-D-Orn-**D-Tyr**-D-allo-Thr-L-Glu-**D-Ala**-L-Pro-L-Gln-**L-Tyr**-L-Ile
Fengycin B L-Glu-D-Orn-**D-Tyr**-D-allo-Thr-L-Glu-**D-Val**-L-Pro-L-Gln-**L-Tyr**-L-Ile
Plipastatin A L-Glu-D-Orn-**L-Tyr**-D-allo-Thr-L-Glu-**D-Ala**-L-Pro-L-Gln-**D-Tyr**-L-Ile
Plipastatin B L-Glu-D-Orn-**L-Tyr**-D-allo-Thr-L-Glu-**D-Val**-L-Pro-L-Gln-**D-Tyr**-L-Ile

Branching of the acyl chain

- linear*
iso
anteiso

Εικόνα 15 Αντιπροσωπευτική χημική δομή των λιποπεπτιδίων της οικογένειας των φεγκυσινών (αριστερά) και δομικές διαφοροποιήσεις μεταξύ των μελών της (δεξιά). Τα χρωματισμένα περιγράμματα επισημαίνουν τα βασικά δομικά γνωρίσματα των φεγκυσινών: Με μπλε χρώμα σημειώνεται το σημείο κυκλοποίησης με σχηματισμό εστερικού δεσμού μεταξύ της φαινόλης της τυροσίνης της θέσης 3 και της ισολευκίνης της θέσης 10 του πεπτιδίου. Με πράσινο χρώμα σημειώνεται το μη πρωτεϊνικό αμινοξύ ορνιθίνη στη θέση 2 του πεπτιδίου. Με πορτοκαλί χρώμα σημειώνεται το μήκος της αλυσίδας λιπαρού οξέος (τροποποιημένο από Ongena & Jacques, 2008).

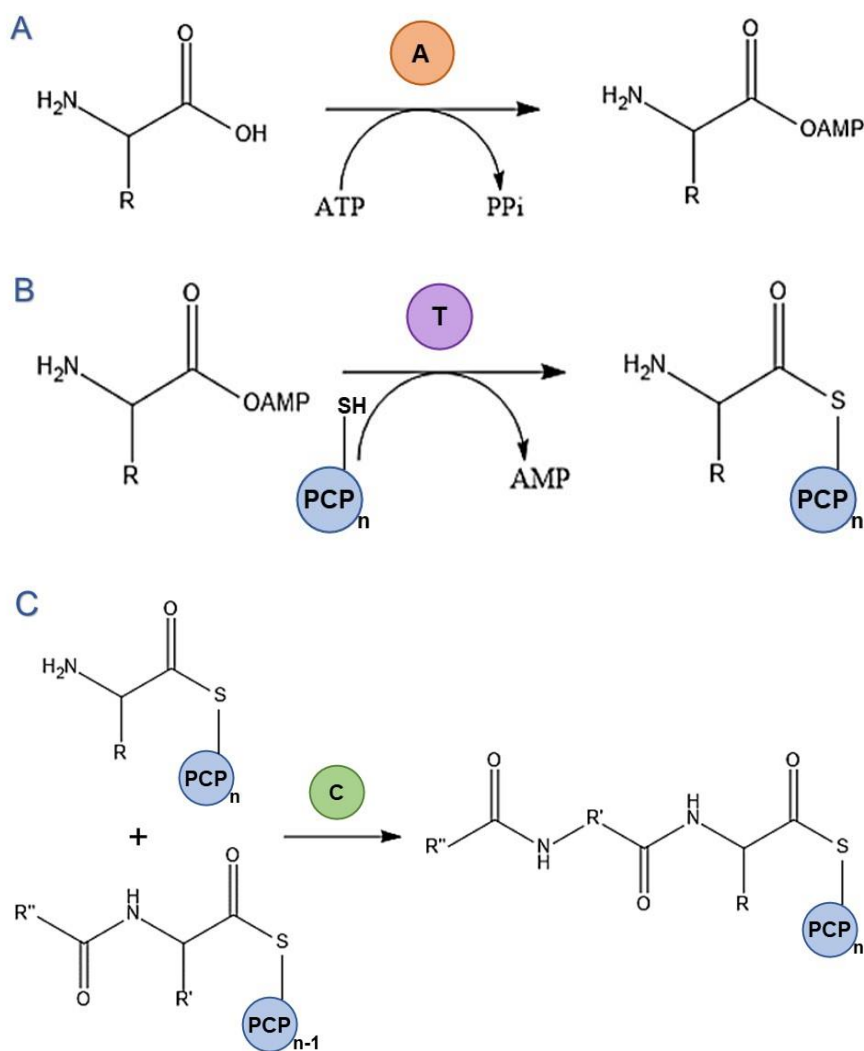
1.6.2 Βιοσύνθεση λιποπεπτιδίων

Η βιοσύνθεση των λιποπεπτιδίων πραγματοποιείται από μεγάλα πολυλειτουργικά σύμπλοκα ενζύμων, τις μη ριβοσωμικές πεπτιδικές συνθετάσες (Non-Ribosomal Peptide Synthetases, NRPSs) (Fan et al., 2018; Kaspar et al., 2019; Malviya et al., 2020; Penha et al., 2020). Τα ένζυμα αυτά αποτελούνται από πολλές επιμέρους μονάδες που είναι υπεύθυνες για την αναγνώριση, ενεργοποίηση, τροποποίηση και σύνδεση των αμινοξέων για το σχηματισμό του πεπτιδικού σκελετού των λιποπεπτιδίων (Inès & Dhouha, 2015; Koglin & Walsh, 2009). Το χαρακτηριστικό αυτό τους προσδίδει την ικανότητα να συνθέτουν μεγάλη ποικιλία δομών λιποπεπτιδίων, καθώς κάθε μονάδα μπορεί να συμπληρώνει κάθε φορά διαφορετικό αμινοξύ στο μόριο. Η ποικιλομορφία αυτή ενισχύεται και από τη δυνατότητα που έχουν τα ένζυμα να προσθέτουν ασυνήθιστα μονομερή, όπως D-, β- ή μη πρωτεϊνικά αμινοξέα (Penha et al., 2020).

Αναλυτικότερα, όσον αφορά στα δομικά τους γνωρίσματα, οι λειτουργικές μονάδες στις οποίες οργανώνονται τα ένζυμα αυτά, αποτελούνται με τη σειρά τους από εξειδικευμένους τομείς (Caulier et al., 2019). Κάθε μονάδα είναι υπεύθυνη για την ενσωμάτωση ενός μόνο αμινοξέος στο πεπτιδικό τμήμα, με αποτέλεσμα να παρατηρούνται τόσες μονάδες όσες και τα αμινοξέα που χαρακτηρίζουν την εκάστοτε κατηγορία λιποπεπτιδίων (Hu et al., 2019; Youssef et al., 2005). Επιπλέον, κάθε μονάδα περιλαμβάνει τρεις τουλάχιστον τομείς, οι οποίοι καταλύουν καθορισμένες ενζυμικές δραστηριότητες, απαραίτητες για την προσθήκη των αμινοξέων (Harwood et al., 2018; Hu et al., 2019; Inès & Dhouha, 2015; Penha et al., 2020a; V. S. V. Santos et al., 2018a).

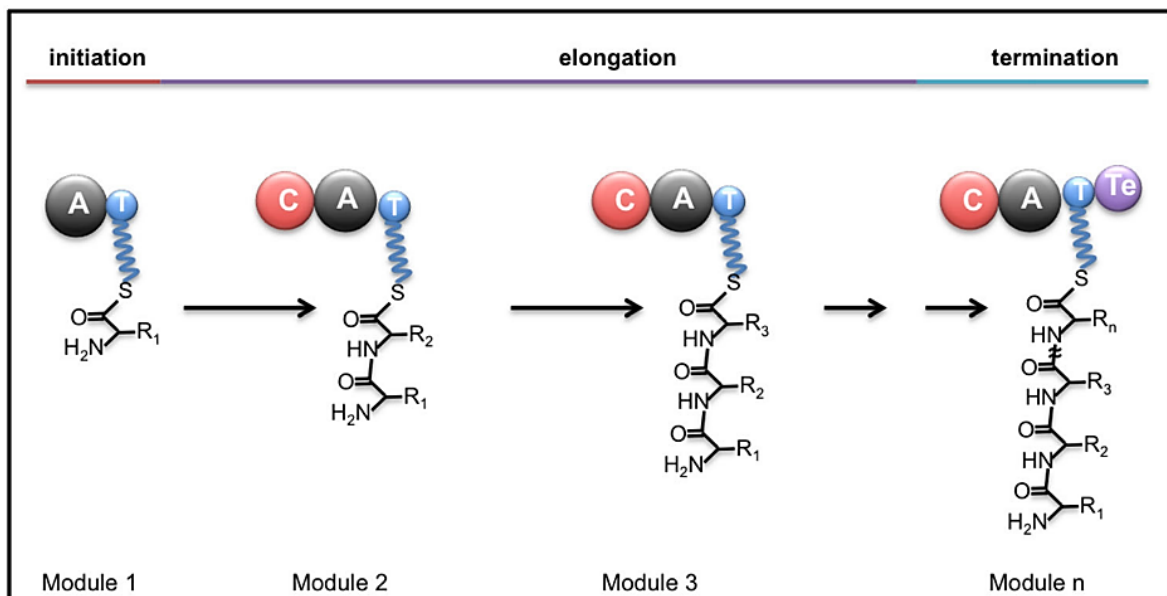
Ένας πρώτος τομέας αδενυλίωσης (Adenylation domain, A) είναι υπεύθυνος για την αναγνώριση του υποστρώματος, του συγκεκριμένου δηλαδή αμινοξέος που επιλέγει η εκάστοτε μονάδα, καθώς και για την ενεργοποίησή του μέσω μιας αντίδρασης αδενυλίωσης, κατά την οποία το αμινοξύ μετατρέπεται σε ένα αδενυλικό αμινοάκυλο ενδιάμεσο προϊόν (*Εικόνα 16A*). Ακολουθεί ο τομέας θειολίωσης (Thiolation domain, T), όπου το ενδιάμεσο προϊόν συνδέεται με την αντίστοιχη πρωτεΐνη-μεταφορέα (Peptidyl Carrier Protein, PCP) μέσω ενός θειοεστερικού δεσμού (*Εικόνα 16B*). Η πρωτεΐνη αυτή λειτουργεί ως γέφυρα μεταξύ του πρώτου και τρίτου τομέα. Ο τρίτος τομέας, της συμπύκνωσης (Condensation domain, C)

πραγματοποιεί το σχηματισμό πεπτιδικού δεσμού μεταξύ δύο διαδοχικών αμινοξέων (Εικόνα 16C). Η τελευταία μονάδα του ενζυμικού συμπλόκου περιλαμβάνει και έναν επιπλέον τομέα (Termination/Thioesterase domain, Te), ο οποίος καταλύει την απελευθέρωση του τελικού προϊόντος (Caulier et al., 2019; Donadio et al., 2007; Fan et al., 2018; Harwood et al., 2018; Hu et al., 2019; Inès & Dhouha, 2015; Mitchell et al., 2012; Mootz & Marahiel, 1997; Ongena & Jacques, 2008; Raaijmakers et al., 2010).



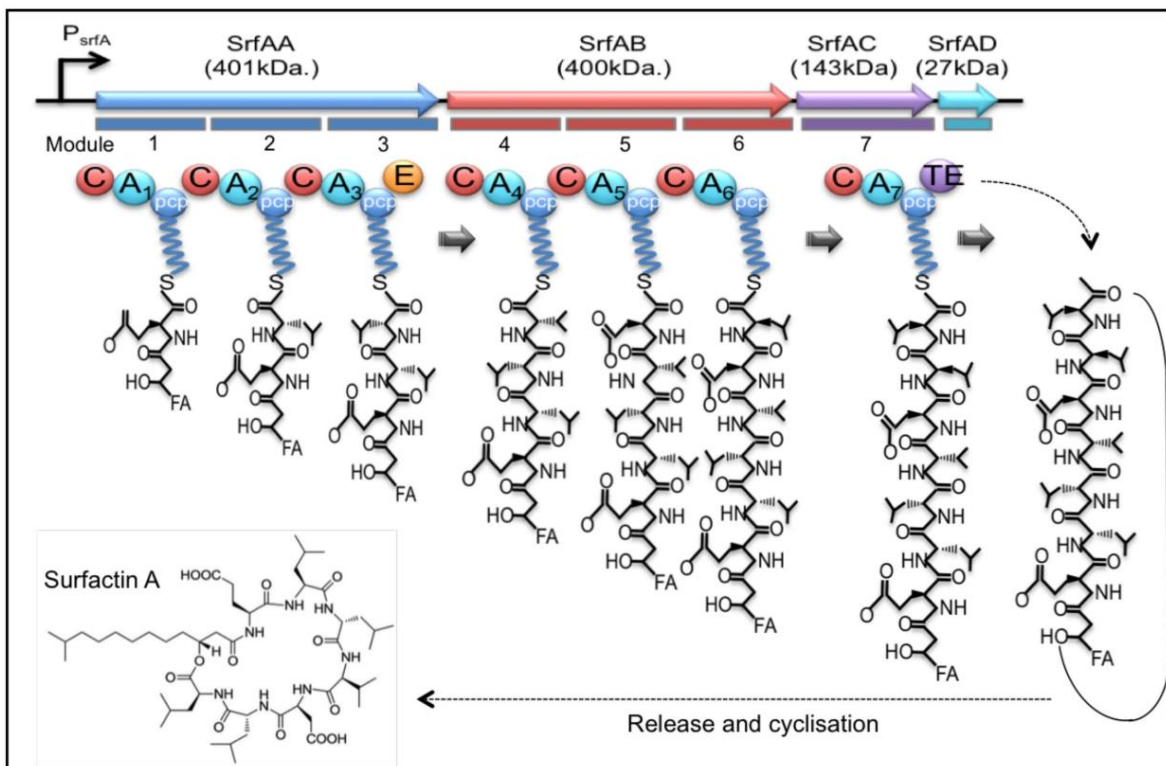
Εικόνα 16 Χημικές αντιδράσεις που καταλύουν οι τρεις βασικοί τομείς από τους οποίους αποτελούνται οι δομικές μονάδες των NRPSs; (A) αδενυλίωση του εκάστοτε αμινοξέος (Adenylation domain, A), (B) θειολίωση του αδενυλικού προϊόντος με σύνδεσή του σε μια πρωτεΐνη μεταφορέα PCP (Thiolation domain, T), (C) συμπύκνωση δύο διαδοχικών αμινοξέων με τη δημιουργία πεπτιδικού δεσμού (Condensation domain, C) (τροποποιημένο από Caulier et al., 2019).

Η διαδικασία της βιοσύνθεσης των λιποπεπτιδίων μπορεί να διαιρεθεί σε τρία μέρη, την έναρξη της σύνθεσης, την επιμήκυνση της πεπτιδικής αλυσίδας και τον τερματισμό της διεργασίας, με την απελευθέρωση του νεοσυντιθέντος λιποπεπτιδίου και την κυκλοποίησή του (*Εικόνα 17*) (Caulier et al., 2019; Harwood et al., 2018; Roongsawang et al., 2011). Οι μονάδες εκείνες που συμμετέχουν στην επιμήκυνση του πεπτιδίου περιλαμβάνουν συχνά δευτερεύοντες τομείς, συμπληρωματικούς προς τους προαναφερθέντες, οι οποίοι πραγματοποιούν συγκεκριμένες τροποποιήσεις στα βασικά δομικά χαρακτηριστικά ορισμένων μονομερών. Οι συχνότερα παρατηρούμενες τροποποιήσεις είναι η στερεοχημική μετατροπή των αμινοξέων από L σε D διαμόρφωση (Epimerization domain, E), η προσθήκη μεθυλομάδας (Methylation domain, M), η προσθήκη φορμυλομάδας (Formylation domain, F) και η κυκλοποίηση (Cyclization domain, Cy) (Caulier et al., 2019; Donadio et al., 2007; Hu et al., 2019). Με τη δράση των βοηθητικών αυτών τομέων, αυξάνεται ακόμα περισσότερο η δομική ποικιλομορφία των παραγόμενων λιποπεπτιδίων (Du et al., 2000).



Εικόνα 17 Διαδικασία βιοσύνθεσης των λιποπεπτιδίων από τα ένζυμα NRPSs. Παρουσιάζονται τα στάδια εκκίνησης, επιμήκυνσης της πεπτιδικής αλυσίδας και τερματισμού της σύνθεσης, καθώς και οι τομείς των δομικών μονάδων που εμπλέκονται: A, Adenylation; T, Thiolation; C, Condensation; Te, Termination domain (Harwood et al., 2018).

Χαρακτηριστικό παράδειγμα αποτελεί η βιοσύνθεση των μεταβολιτών της οικογένειας των σουρφακτινών, η οποία θεωρείται ότι είναι η περισσότερο μελετημένη κατηγορία λιποπεπτιδίων (*Εικόνα 18*) (Hu et al., 2019). Η συνθετάση που είναι υπεύθυνη για τη βιοσύνθεσή τους κωδικοποιείται από το οπερόνιο SrfA και αποτελείται από επτά δομικές μονάδες, μία για κάθε αμινοξύ του τελικού επταπεπτιδίου (Youssef et al., 2005). Κάθε μονάδα περιλαμβάνει τους καταλυτικούς τομείς που αναφέρθηκαν παραπάνω, ενώ στο σύνολό τους, οι επτά μονάδες αριθμούν 24 τομείς (F Peyroux et al., 1999). Παρόλα αυτά, η διαδικασία της βιοσύνθεσης του πεπτιδικού τμήματος ξεκινάει από το λιπαρό οξύ, το οποίο αναγνωρίζεται ως υπόστρωμα από την πρώτη μονάδα του ενζύμου και είναι υπεύθυνο για την έναρξη της σύνθεσης (lipoinitiation reaction) (Kraas et al., 2010). Συγκεκριμένα, ο τομέας συμπίκνωσης (Condensation domain) της πρώτης δομικής μονάδας της συνθετάσης παρουσιάζει εξειδίκευση για το εκάστοτε μήκος της αλυσίδας του β-υδροξυ λιπαρού οξέος (Hu et al., 2019).



Εικόνα 18 Διαδικασία βιοσύνθεσης των σουρφακτινών. Παρουσιάζονται τα γονίδια που είναι υπεύθυνα για την έκφραση των επτά δομικών μονάδων που συγκροτούν τα ένζυμα NRPSs, κάθε μία από τις οποίες ενσωματώνει από ένα αμινοξύ στο πεπτιδικό τμήμα του μορίου, καθώς και οι τομείς που συγκροτούν κάθε μονάδα (Harwood et al., 2018).

1.6.3 Βιολογικές δράσεις λιποπεπτιδίων

1.6.3.1 Επιφανειοδραστική ιδιότητα

Τα λιποπεπτίδια της οικογένειας των σουρφακτινών έχουν γίνει γνωστά κυρίως για τις επιφανειοδραστικές ιδιότητες που παρουσιάζουν (Carrillo et al., 2003; V. S. V. Santos et al., 2018b; T. Wang et al., 2015). Εκτός από τον εμφανή αμφίφιλο χαρακτήρα τους, που διαμορφώνεται από την ύπαρξη του υδρόφιλου πεπτιδικού δακτυλίου και της υδρόφοβης αλυδίσας λιπαρού οξέος, η τρισδιάστατη διαμόρφωση των μορίων αυτών εμφανίζει επιπλέον φορτισμένες πολικές ομάδες (των υδρόφιλων αμινοξέων των θέσεων 1 και 5 του πεπτιδικού δακτυλίου) και άπολες υδρόφοβες μονάδες (των υπόλοιπων αμινοξέων) μέσα στο ίδιο το πεπτιδικό της τμήμα (J. F. Liu et al., 2015). Το παραπάνω δομικό χαρακτηριστικό καθιστά τις σουρφακτίνες τις ισχυρότερες βιο-επιφανειοδραστικές ουσίες, με ικανότητα μείωσης της επιφανειακής τάσης του νερού από $72 \text{ mN}\cdot\text{m}^{-1}$ σε $27 \text{ mN}\cdot\text{m}^{-1}$ σε συγκέντρωση μικρότερη από $10 \mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$, που είναι αισθητά χαμηλότερη από την κρίσιμη συγκέντρωση σχηματισμού μικκυλίων (Critical Micelle Concentration, CMC) στο νερό ($23 \text{ mg}\cdot\text{L}^{-1}$), καθώς και από την αντίστοιχη άλλων επιφανειοδραστικών ουσιών (Desai & Banat, 1997; Ishigami et al., 1995; F. Peyroux et al., 1999; V. S. V. Santos et al., 2018b).

Η CMC ορίζεται ως η ελάχιστη συγκέντρωση ενός επιφανειοδραστικού παράγοντα που απαιτείται για την έναρξη σχηματισμού μικκυλίων των μορίων του. Είναι μια σημαντική ιδιότητα υπεύθυνη για την εκδήλωση των ιδιοτήτων του επιφανειοδραστικού, όπως της απορρυπαντικής δράσης και της ικανότητα διαλυτοποίησης, και καθορίζει την αποτελεσματικότητα αυτού του παράγοντα (Ying, 2006). Αποτελεί έναν κρίσιμο δείκτη κατά την αξιολόγηση του εκάστοτε επιφανειοδραστικού για χρήση του σε βιομηχανικές διεργασίες διότι, θεωρητικά, όσο χαμηλότερη είναι η CMC του τόσο πιο αποτελεσματικό είναι το μόριο, καθώς απαιτείται μικρότερη συγκέντρωσή του για την επιθυμητή μείωση της επιφανειακής τάσης (Seydlová & Snobodová, 2008). Τα λιποπεπτίδια της οικογένειας των σουρφακτινών παρουσιάζουν ισχυρή ικανότητα σύνδεσης των μορίων τους, σχηματισμού σφαιρικών μικκυλίων και μεγάλων συσσωματωμάτων ακόμη και σε συγκεντρώσεις έξι φορές χαμηλότερες από τη CMC τους, με αποτέλεσμα να

θεωρούνται εξαιρετικές βιο-επιφανειοδραστικές ουσίες (Abdel-Mawgoud et al., 2008; Zou et al., 2010).

1.6.3.2 Αντιμικροβιακή δράση

Τα λιποπεπτίδια φαίνεται ότι αποτελούν μεταβολίτες-κλειδιά για το βιολογικό έλεγχο μικροοργανισμών, καθώς η αμφίφιλη φύση τους τους επιτρέπει την αλληλεπίδραση με τις βιολογικές μεμβράνες. Δρουν ανταγωνιστικά στα φυτοπαθογόνα, είτε άμεσα με παρεμπόδισή τους μέσω διαφόρων μηχανισμών δράσης, είτε έμμεσα επάγοντας και ενεργοποιώντας τα μονοπάτια που σχετίζονται με την άμυνα των φυτών, διαδικασία που ονομάζεται επαγόμενη συστηματική αντοχή (Induced Systemic Resistance, ISR). Τα λιποπεπτίδια αυτά μπορεί να εμπλέκονται σε οποιοδήποτε από τα 3 στάδια της διαδικασίας της ISR: την αντίληψη του διεγέρτη του μικροοργανισμού, τη συστηματική μεταγωγή του σήματος και την έκφραση των γονιδίων που σχετίζονται με την άμυνα του φυτού-ξενιστή. Από τις κύριες κατηγορίες λιποπεπτιδίων, οι σουρφακτίνες εμφανίζουν ισχυρή αντιβιοτική δράση και μειωμένη αντιμυκητιασική, ενώ οι ιτουρίνες και φεγκυσίνες εμφανίζουν ισχυρή μυκητοτοξική δράση και περιορισμένη αντιβιοτική. Στον [Πίνακα 8](#) συνοψίζονται μερικοί από τους παθογόνους μικροοργανισμούς στους οποίους έχουν εμφανίσει αντιμικροβιακή δράση τα λιποπεπτίδια αυτά (Harwood et al., 2018; Kaspar et al., 2019a; Malviya et al., 2020; Olishavska et al., 2019; Penha et al., 2020b).

Πίνακας 8 Αντιμικροβιακή δράση λιποπεπτιδίων εναντίον διαφόρων παθογόνων.

Lipopeptide family	Target organism	Test's condition	References
Fengycin, iturin and surfactin	<i>Monilinia fructicola</i>	The treatment was tested on peaches and nectarines in laboratory	Yáñez-Mendizábal et al. (2012b)
Fengycin, iturin and surfactin	<i>Sclerotinia sclerotiorum</i>	Inhibition tested in petri dishes	Alvarez et al. (2012)
Fengycin, iturin and surfactin	<i>Phoma medicaginis</i>	Inhibition tested in petri dish and assay in microculture	Ben Slimene et al. (2012)
Fengycin	<i>Botrytis cinerea</i> , <i>Sphaerotheca fuliginea</i>	Inhibition tested in petri dishes	Zhang et al. (2013)
Fengycin, iturin and surfactin	<i>Fusarium oxysporum</i> f. sp. melonis	The treatment was applied on muskmelon's nursery and pot soil	Zhao et al. (2013)
Iturin and surfactin	<i>Xanthomonas arboricola</i> , <i>Pectobacterium carotovorum</i> , <i>Colletotrichum acutatum</i> , <i>Colletotrichum gloeosporioides</i> , <i>Monilinia fructigena</i> , <i>Alternaria alternata</i> , <i>F. solani</i> , <i>F. oxysporum</i> , <i>Botryosphaeria obtusa</i> , <i>Penicillium expansum</i> , <i>Mucor</i> sp., <i>Aspergillus flavus</i>	Inhibition tested in petri dishes and on apple fruits (for <i>P. expansum</i> and <i>F. oxysporum</i>) under laboratory conditions	Dimkić et al. (2013)
Fengycin, iturin and surfactin	<i>Pectobacterium carotovorum</i> , <i>Xanthomonas campestris</i> , <i>Podosphaera fusca</i>	Inhibition tested on detached melon leaves	Zerriouh et al. (2014)
Fengycin	<i>Rhizoctonia solani</i>	Inhibition tested in petri dishes	Guo et al. (2013)
Fengycin, iturin and surfactin	<i>Sclerotium rolfsii</i> , <i>S. sclerotiorum</i> , <i>R. solani</i> , <i>F. solani</i> , <i>Penicillium</i> spp.	The treatment was tested on white and black common beans under laboratory conditions	Torres et al. (2017)
Non-specified	<i>P. pachyrhizi</i>	The treatment was tested on soybeans under greenhouse conditions	Dorighello et al. (2015)
Iturin, fengycin and surfactin	<i>Z. tritici</i>	The treatment was tested on wheat under greenhouse conditions	Mejri et al. (2017)
Iturin, fengycin and surfactin	<i>G. graminis</i> var. <i>tritici</i>	Inhibition tested in petri dishes and on wheat plants under greenhouse conditions	Yang et al. (2018)
Iturin, fengycin and surfactin	<i>G. graminis</i> var. <i>tritici</i>	The treatment was tested on wheat under greenhouse conditions	Zhang et al. (2017)
Iturin, fengycin and surfactin	<i>F. graminearum</i>	Inhibition tested in petri dishes	Gong et al. (2015)
Fengycin	<i>F. graminearum</i>	Field test with maize and culture-chamber with wheat	Chan et al. (2009)
Non-specified	<i>F. solani</i>	Inhibition tested in petri dishes and on potato tubers	Mnif et al. (2015)

1.6.3.2.1 Μηχανισμός δράσης

Σουρφακτίνες

Από όλα τα λιποπεπτιδία που παράγονται από βακτήρια του γένους *Bacillus*, οι σουρφακτίνες αποτελούν τα περισσότερα μελετημένα μόρια όσον αφορά το μηχανισμό δράσης τους (Falardeau et al., 2013). Θεωρείται, μάλιστα, ότι η βιοδραστικότητα που εμφανίζουν οφείλεται σε ένα πολύπλοκο συνδυασμό περισσότερων από έναν μηχανισμών (V. S. V. Santos et al., 2018b). Οι προτεινόμενοι μηχανισμοί δράσης περιλαμβάνουν την εισαγωγή των μορίων των σουρφακτινών στη φωσφολιπιδική διπλοστιβάδα των μεμβρανών, τις τροποποιήσεις της διαπερατότητας της μεμβράνης εξαιτίας της δημιουργίας πόρων

ή διαύλων ιόντων, τη λειτουργία τους ως φορέων μονοσθενών και δισθενών κατιόντων διαμέσου των μεμβρανών, καθώς και την πλήρη διαλυτοποίηση των μεμβρανών μέσω της απορρυπαντικής δράσης τους (Fracchia et al., 2012; Malviya et al., 2020; Olishavska et al., 2019; H. Zhao et al., 2017).

Η αμφίφιλη φύση των λιποπεπτιδίων αυτών είναι υπεύθυνη για την επίδρασή τους στις κυτταρικές μεμβράνες και τη διατάραξη της σταθερότητας και ακεραιότητάς τους, με τις άπολες ομάδες τους να εισχωρούν στον υδρόφοβο πυρήνα των φωσφολιπιδίων και τις υδρόφιλες ομάδες να εξέχουν στο υδατικό περιβάλλον των μεμβρανών. Φαίνεται, μάλιστα, ότι η επίδραση των μεταβολιτών αυτών στις μεμβράνες είναι δοσοεξαρτώμενη. Η εισαγωγή ενός ή μερικών μορίων σουρφακτινών στη μεμβράνη δεν προκαλεί ισχυρή αποδιοργάνωση των φωσφολιπιδίων (Deleu et al., 2003). Η εφαρμογή χαμηλής συγκέντρωσης σουρφακτινών (λόγος σουρφακτινών/λιπιδίων μεμβράνης $R_b < 0.04$) έχει ως αποτέλεσμα την περιορισμένη διατάραξη της μεμβράνης, με τα λιποπεπτίδια να είναι αναμίξιμα με τα φωσφολιπίδια και να εισχωρούν μόνο μέχρι την εξωτερική στιβάδα της. Ακολουθώς, σε μέσες συγκεντρώσεις ($R_b = 0.05-0.1$), τα μόρια των σουρφακτινών τείνουν να συσσωματώνονται μεταξύ τους προς σχηματισμό μικκυλίων και να προκαλούν αύξηση της διαπερατότητας της μεμβράνης, με τη δημιουργία προσωρινών πόρων και διαύλων ιόντων, η οποία όμως επανέρχεται συνήθως σύντομα στη φυσιολογική της κατάσταση. Μη αναστρέψιμη δημιουργία πόρων στη διπλοστιβάδα της μεμβράνης πραγματοποιείται σε υψηλότερες τιμές του λόγου σουρφακτινών/φωσφολιπιδίων ($R_b = 0.1-0.2$), ενώ σε ακόμα μεγαλύτερες συγκεντρώσεις των λιποπεπτιδίων ($R_b = 0.22$), επικρατεί η απορρυπαντική τους δράση, με το σχηματισμό μεγάλων μικκυλιακών κατασκευών, που προκαλούν την πλήρη αποδιοργάνωση και διαλυτοποίηση της λιπιδικής διπλοστιβάδας και τον κυτταρικό θάνατο.

Φεγκυσίνες

Όπως και στην περίπτωση των δύο προηγούμενων κατηγοριών λιποπεπτιδίων, η μκητοτοξικότητα που παρουσιάζουν οι φεγκυσίνες δε φαίνεται να οφείλεται σε εξειδίκευσή τους σε συγκεκριμένο κυτταρικό στόχο, αλλά πιθανότατα είναι αποτέλεσμα των φυσικοχημικών ιδιοτήτων των μορίων τους (Jourdan et al., 2009;

H. Patel et al., 2014). Η αμφίφιλη δομή τους τους δίνει τη δυνατότητα να δεσμεύονται στις κυτταρικές μεμβράνες των μυκήτων, με τις λιπαρές αλυσίδες τους να εισέρχονται στον υδρόφοβο πυρήνα των λιπιδικών διπλοστιβάδων και τους υδρόφιλους πεπτιδικούς δακτυλίους τους να προεξέχουν από τις μεμβράνες, προκαλώντας τελικά διαρροή και λύση του κυττάρου (Sur et al., 2018).

Κατά την εκδήλωση της αντιμυκητιασικής τους δράσης, ρόλο-κλειδί στην αποδιοργάνωση του κυττάρου φαίνεται να έχει η αλληλεπίδραση των λιποπεπτιδίων με τα φωσφολιπίδια των μεμβρανών μέσω της συσσωμάτωσής τους προς σχηματισμό μικυλλίων (Sur et al., 2018). Αναλυτικότερα, σε υψηλές συγκεντρώσεις φεγκυσινών, οι μεγάλες κυκλικές πεπτιδικές δομές των συγκεντρωμένων λιποπεπτιδίων, οι οποίες βρίσκονται στο εξωτερικό της διπλοστιβάδας, αυξάνουν την καμπυλότητα των μεμβρανών, κάμπτοντάς τις εξαιτίας του κωνικού σχήματος των μορίων αυτών. Με αυτόν τον τρόπο, τα φωσφολιπίδια των μεμβρανών εξαναγκάζονται σε σχηματισμό σφαιρικών μικυλλίων, με συμμετοχή των λιποπεπτιδίων, με αποτέλεσμα τη διατάραξη της δομής και τη δημιουργία πόρων στις μεμβράνες. Ενδιαφέρον παρουσιάζει το γεγονός ότι χαμηλές συγκεντρώσεις φεγκυσινών δεν εμφανίζουν καμία επίδραση στις μεμβράνες. Παρόλα αυτά, όταν ο λόγος φεγκυσινών:φωσφολιπιδίων είναι αρκετά υψηλός, σχηματίζονται μεγάλοι πόροι, επιτρέποντας την εκροή του περιεχομένου των προσβεβλημένων κυττάρων, έως και την πλήρη διάλυση των μεμβρανών προς το σχηματισμό μεμονομένων μικυλλίων (Deleu et al., 2008; Falardeau et al., 2013) [all-or-none mechanism (Kaspar et al., 2019b; H. Patel et al., 2011)].

Ο παραπάνω μηχανισμός δράσης των φεγκυσινών παρουσιάζεται αποτελεσματικός μόνο στις περιπτώσεις μυκήτων, σε αντίθεση με τα βακτήρια, τα οποία αναφέρεται ότι παραμένουν ανεπηρέαστα από την εφαρμογή τους. Η διάκριση αυτή οφείλεται στη διαφορετική σύσταση των μεμβρανών μυκήτων και βακτηρίων, η οποία επηρεάζει την ικανότητα συσσωμάτωσης των λιποπεπτιδίων. Σύμφωνα με μελέτες, οι μικυλλιακές δομές που δημιουργούνται στις μεμβράνες μέσω της δράσης των λιποπεπτιδίων παρουσιάζονται σταθερές σε διπλοστιβάδες που συγκροτούνται από μόρια φωσφατιδυλοχολίνης (phosphatidylcholine, PC), τυπικά ευκαρυωτικών κυττάρων, ενώ είναι ασταθείς σε μεμβράνες που αποτελούνται από μίγματα φωσφατιδυλαιθανολαμίνης (phosphatidylethanolamine, PE) και φωσφατιδυλγλυκερόλης (phosphatidylglycerol, PG), τυπικά βακτηριακών κυττάρων. Συγκεκριμένα, παρά το γεγονός ότι τα μόρια των φεγκυσινών εισέρχονται

στην υδρόφοβη λιπιδική περιοχή των μεμβρανών ανεξαρτήτως σύστασής τους, μεγαλύτερα και σταθερότερα συσσωματώματα των λιποπεπτιδίων δημιουργούνται μόνο στις ευκαρυωτικού τύπου μεμβράνες (Sur et al., 2018).

Παρόλα αυτά, οι φεγκυσίνες δεν φαίνεται να βλάπτουν όλα τα ευκαρυωτικά κύτταρα. Ο μηχανισμός δράσης τους εκδηλώνεται στις μεμβράνες των μυκήτων, αλλά τα λιποπεπτίδια προκαλούν πολύ μικρότερη ζημιά στις μεμβράνες των θηλαστικών. Η εξειδίκευση αυτή θα μπορούσε να αποδοθεί στις δομικές διαφορές που παρατηρούνται μεταξύ των μεμβρανών των δύο τύπων οργανισμών, η κυριότερη των οποίων είναι η διαφοροποίηση στο στερολικό τους περιεχόμενο. Η κύρια στερόλη των μεμβρανών των μυκήτων είναι η εργοστερόλη, σε αντίθεση με τις μεμβράνες των θηλαστικών, τα οποία αποτελούνται κυρίως από χοληστερόλη. Η χοληστερόλη φαίνεται ότι προστατεύει με κάποιο τρόπο τις μεμβράνες των κυττάρων από τη δράση των μορίων των φεγκυσινών, αλλά ο ακριβής μηχανισμός με τον οποίο δρα παραμένει μέχρι σήμερα ασαφής (Sur et al., 2018).

1.6.3.3 Δράση κατά του μυκοπλάσματος

Τα μυκοπλάσματα είναι οι μικρότεροι ελεύθερα διαβιούντες μικροοργανισμοί, οι οποίοι όμως συμπεριφέρονται συνήθως ως εξωκυτταρικά παράσιτα ευκαρυωτικών κυττάρων. Ανήκουν στους προκαρυωτικούς οργανισμούς και αποτελούν έναν από τους κυριότερους μολυσματικούς παράγοντες κυτταροκαλλιιεργειών που χρησιμοποιούνται στη βασική έρευνα, αλλά και φαρμακευτικών προϊόντων, όπως εμβολίων. Επιπλέον, επηρεάζουν το μεταβολισμό και τη φυσιολογία του ξενιστή τον οποίο παρασιτούν και μπορούν να προκαλέσουν ή να επιταχύνουν την εξέλιξη σοβαρών ασθενειών, όπως του AIDS, της οξείας αναπνευστικής φλεγμονής, συμπεριλαμβανομένης της πνευμονίας, διαφόρων ουρογεννητικών λοιμώξεων και της αρθρίτιδας (V. S. V. Santos et al., 2018b).

Μελέτες για νέους αντιμυκοπλασματικούς παράγοντες έχουν δείξει ότι οι σουρφακτίνες μπορούν να αποσυνθέσουν πλήρως τη μεμβράνη των μυκοπλασμάτων, σε αντίθεση με άλλα αντιβιοτικά, τα οποία αδυνατούν να διεισδύσουν στην κυτταροπλασματική μεμβράνη τους. Η διάλυση των μεμβρανών οφείλεται στην αλληλεπίδρασή τους με τα επιφανειοδραστικά μόρια των

σουρφακτινών, τα οποία, σε πρώτο στάδιο, προκαλούν μεταβολές στη διαπερατότητά τους. Υψηλές συγκεντρώσεις των λιποπεπτιδίων αυτών οδηγούν τελικά στην πλήρη αποσύνθεση των μυκοπλασματικών μεμβρανών μέσω ωσμωτικών φαινομένων και εξαιτίας της απορρυπαντικής τους δράσης (Meena & Kanwar, 2015; T. Wang et al., 2015).

Σύμφωνα με τα παραπάνω, οι σουρφακτίνες θεωρούνται κατάλληλα μόρια για την καταπολέμηση μολύνσεων από μυκόπλασμα. Ακόμα, είναι σημαντικό να υπογραμμιστεί η χαμηλή τοξικότητα των σουρφακτινών σε *in vivo* δοκιμές σε ευκαρυωτικά κύτταρα, η οποία ευνοεί τη δυνατότητα χρήσης των λιποπεπτιδίων αυτών ως πρόσθετων παραγόντων σε μικροβιοκτόνα για την πρόληψη σεξουαλικά μεταδιδόμενων ασθενειών που προκαλούνται από μολύνσεις των γεννητικών οργάνων από μυκόπλασμα (V. S. V. Santos et al., 2018b).

1.6.3.4 Αντιϊική δράση

Τα λιποπεπτίδια της οικογένειας των σουρφακτινών μπορούν να χρησιμοποιηθούν δυνητικά και ως αντιϊικοί παράγοντες, καθώς εμφανίζουν υψηλή δραστικότητα έναντι ιών (T. Wang et al., 2015). Η δράση τους εντοπίζεται κυρίως στην περίπτωση ιών που περιβάλλονται από γλυκοπρωτεϊνική μεμβράνη (φάκελος), με τους ερπητοϊούς και τους ρετροϊούς να εμφανίζουν τη μεγαλύτερη ευαισθησία, ενώ δεν παρουσιάζονται αποτελεσματικά έναντι ιών χωρίς φάκελο (V. S. V. Santos et al., 2018b).

Η συγκεκριμένη εξειδίκευση των σουρφακτινών υποδηλώνει ότι η αντιϊική τους δράση οφείλεται κατά κύριο λόγο στις φυσικοχημικές αλληλεπιδράσεις που αναπτύσσονται μεταξύ των επιφανειοδραστικών μορίων των λιποπεπτιδίων και των ιικών μεμβρανών, γεγονός το οποίο συμφωνεί με τη γενικότερη ευαισθησία που παρουσιάζουν οι ιοί με φάκελο σε ουσίες με απορρυπαντικές ιδιότητες. Αναλυτικότερα, τα μόρια των σουρφακτινών διεισδύουν στη λιπιδική διπλοστιβάδα, προκαλώντας πλήρη αποσύνθεση του φακέλου που περιέχει τις ιικές πρωτεΐνες που εμπλέκονται στην αναγνώριση και διείσδυση των ιοσωμάτων στα κύτταρα στόχους (Meena & Kanwar, 2015; Raaijmakers et al., 2010; H. Zhao et al., 2017).

Ένας σημαντικός παράγοντας που φαίνεται ότι καθορίζει την έκφραση της αντιϊκής δράσης των σουρφακτινών είναι το μήκος της αλυσίδας λιπαρού οξέος των μορίων. Η αυξημένη υδροφοβικότητα των λιποπεπτιδίων, η οποία δημιουργείται από τον αυξημένο αριθμό ανθράκων στην υδρογονανθρακική αλυσίδα, ενισχύει την ικανότητά τους για αποσύνθεση των μεμβρανών των ιών. Επιπλέον, έχει αναφερθεί ισχυρότερη αντιϊκή δράση μορίων σουρφακτινών που αποτελούνται από ένα μόνο αρνητικό φορτίο στην πεπτιδική τους μονάδα (Deleu et al., 2003).

Συνολικά, η αντιϊκή δράση των σουρφακτινών έχει εντοπιστεί έναντι διαφόρων ιών. Μερικοί από αυτούς είναι ο ιός του δάσους Σεμλίκι (Semliki Forest virus, SFV), ο ιός του απλού έρπητα τύπου 1 και 2 (herpes simplex virus, HSV-1, HSV-2), ο ιός φουσαλιδώδους στοματίτιδας (vesicular stomatitis virus, VSV), ο ιός ανοσοανεπάρκειας του πιθήκου (Simian immunodeficiency virus, SIV), ο καλυκοϊός της γάτας (Feline calicivirus, FCV), και ο ιός εγκεφαλομυοκαρδίτιδας (murine encephalomyocarditis virus, EMCV). Τα παραπάνω δείχνουν ότι οι σουρφακτίνες μπορούν να χρησιμοποιηθούν ως αντιϊκοί παράγοντες (Meena & Kanwar, 2015).

1.6.3.5 Δράση στα βιοφίλμ

Τα βιοφίλμ είναι πολυκύτταρες κοινότητες μικροοργανισμών, οι οποίες δημιουργούνται από την προσκόλληση των κυττάρων τόσο μεταξύ τους όσο και στις επιφάνειες όπου σχηματίζονται. Η δημιουργία των βιοφίλμ στηρίζεται στην ικανότητα των μικροοργανισμών-μελών του να παράγουν και να συσσωρεύουν εξωκυτταρικές πολυμερείς ενώσεις, όπως πολυσακχαρίτες, πρωτεΐνες και λιπίδια, δημιουργώντας ένα τρισδιάστατο δίκτυο μακρομορίων (Stanley & Lazazzera, 2004). Οι κατασκευές αυτές αφενός προστατεύουν τα κύτταρα των μικροβίων και αφετέρου προσκολλώνται σε πλήθος επιφανειών, με αποτέλεσμα τον αυξημένο κίνδυνο εγκατάστασης παθογόνων μικροοργανισμών σε διάφορα περιβάλλοντα. Μερικά από αυτά μπορεί να είναι φυτικές επιφάνειες, βιομηχανικές εγκαταστάσεις, χειρουργικά εργαλεία σε νοσοκομεία ή και μηχανήματα της βιομηχανίας τροφίμων (Moryl et al., 2015).

Στο πλαίσιο της προσπάθειας ελέγχου της δημιουργίας των βιοφίλμ, έχει πραγματοποιηθεί μια σειρά μελετών, σύμφωνα με τις οποίες τα λιποπεπτίδια της

οικογένειας των σουρφακτινών παρουσιάζουν εξαιρετικές ιδιότητες στην απομάκρυνση τέτοιων κατασκευών παραγόμενων από παθογόνους μικροοργανισμούς. Συγκεκριμένα, φαίνεται ότι τα μόρια των σουρφακτινών προσροφώνται στις στερεές επιφάνειες και εν συνεχεία, παρεμποδίζουν την προσκόλληση των παθογόνων σε αυτές και άρα και το σχηματισμό των βιοφιλμ. Οι αντι-συγκολλητικές ιδιότητες των σουρφακτινών υποδεικνύουν τη δυνατότητα χρήσης τους σε διάφορες βιοιατρικές εφαρμογές (M. Z. V. Gomes & Nitschke, 2012).

1.6.3.6 Δράση κατά των προνυμφών κουνουπιών

Η εξάλειψη ασθενειών που μεταδίδονται από τα κουνούπια, όπως η ελονοσία, η φιλαρίαση και ο δάγκειος πυρετός παραμένει μέχρι σήμερα απαραίτητη και αποτελεί έναν από τους λόγους της αναγκαιότητας χρήσης συνθετικών εντομοκτόνων. Η δραστική ουσία pyriproxyfen, η οποία αποτελεί ανάλογο νεανικής ορμόνης, χρησιμοποιείται για τον έλεγχο της εξάπλωσης ευρέος φάσματος αρθροπόδων, συμπεριλαμβανομένου του *Aedes aegypti*, του πρωταρχικού φορέα κοινών ασθενειών σε τροπικές και υποτροπικές χώρες, όπως του δάγκειου και του κίτρινου πυρετού. Ωστόσο, οικολογολογικές μελέτες έχουν αναδείξει τις επιπτώσεις πολλών συνθετικών εντομοκτόνων σε οργανισμούς μη στόχους ακόμη και σε περιπτώσεις εφαρμογής τους σε χαμηλές συγκεντρώσεις (Vieira Santos et al., 2017).

Οι προσπάθειες για αποφυγή της τοξικότητας των συνθετικών εντομοκτόνων έχουν οδηγήσει στη μελέτη εναλλακτικών πηγών βιοδραστικότητας για τον έλεγχο των συγκεκριμένων φορέων ασθενειών, στο πλαίσιο των οποίων έχουν πραγματοποιηθεί δοκιμές λιποπεπτιδίων της οικογένειας των σουρφακτινών σε κουνούπια. Συγκεκριμένα, έχει εντοπιστεί κουνουποκτόνος και κυρίως προνυμφοκτόνος δράση μορίων σουρφακτινών απομονωμένων από βακτήρια του γένους *Bacillus* σε τρία είδη κουνουπιών, τα *Aedes aegypti*, *Anopheles stephensi* και *Culex quinquefasciatus* (Geetha et al., 2007). Μάλιστα, τα μόρια αυτά εμφάνισαν αποτελεσματικότητα κατά την εφαρμογή τους κάτω από διαφορετικές περιβαλλοντικές συνθήκες, ενεργώντας σε όξινο και βασικό pH και σε θερμοκρασίες κυμαινόμενες μεταξύ 25°C και 42°C, ενώ επιπλέον, παρουσίασαν σταθερότητα

στην έκθεση σε υπεριώδη ακτινοβολία (Geetha & Manonmani, 2010). Αυτά τα ευρήματα αναδεικνύουν τις σουρφακτίνες ως πιθανούς παράγοντες για χρήση σε δημόσια προγράμματα ελέγχου κατά κουνουπιών-φορέων ασθενειών (V. S. V. Santos et al., 2018b).

1.6.3.7 Αντικαρκινική δράση

Ο καρκίνος αποτελεί τη δεύτερη συχνότερη αιτία θανάτου παγκοσμίως, με τον αριθμό των θυμάτων να έχει υπολογιστεί ότι ανήλθε στα 8.8 εκατομμύρια μόνο για το έτος 2015. Μέχρι σήμερα, η χημειοθεραπεία παραμένει μία από τις κύριες αντικαρκινικές θεραπείες, με το 60% περίπου των χρησιμοποιούμενων φαρμάκων να αποτελείται από φυσικά προϊόντα, φυτικής, ζωικής ή μικροβιακής προέλευσης. Παρόλα αυτά, σημαντικοί περιορισμοί των χημειοθεραπευτικών μεθόδων, όπως η υψηλή κυτταροτοξικότητα των φαρμάκων, η μη εξειδικευμένη δράση τους και η συχνή ανάπτυξη ανθεκτικότητας των ασθενών σε πολλά χημειοθεραπευτικά σχήματα, ευθύνονται για τα σχετικά χαμηλά ποσοστά επιβίωσης που παρατηρούνται, ιδιαίτερα σε συγκεκριμένους τύπους καρκίνου (V. S. V. Santos et al., 2018b).

Τα παραπάνω εντείνουν την ανάγκη αναζήτησης και ανάπτυξης νέων αντικαρκινικών παραγόντων, με στοχευμένη δράση στα καρκινικά κύτταρα και χαμηλή πιθανότητα ανάπτυξης αντοχής των κυττάρων αυτών στις εφαρμοζόμενες δραστικές ουσίες. Από τις διάφορες πηγές δυνητικών αντικαρκινικών ουσιών, οι χαμηλού μοριακού βάρους επιφανειοδραστικοί μεταβολίτες μικροβιακής προέλευσης έχουν προσελκύσει το ενδιαφέρον για την διεξαγωγή πλήθους μελετών. Στο πλαίσιο αυτό, τα λιποπεπτίδια εμφανίζονται ως πολλά υποσχόμενα μόρια στην εκδήλωση αντιογκογόνων και αντικαρκινικών δράσεων, χάρη στην αμφίφιλη δομή τους και στην αλληλεπίδρασή τους με τα φωσφολιπίδια των κυτταρικών μεμβρανών.

Από τις ουσίες αυτές, η οικογένεια των σουρφακτινών έχει μελετηθεί περισσότερο, καθώς φαίνεται ότι παρουσιάζει τις πιο ισχυρές αντικαρκινικές ιδιότητες. Συγκεκριμένα, η αντικαρκινική δράση των σουρφακτινών έγκειται κυρίως στην ικανότητά τους να αποτρέπουν τον πολλαπλασιασμό των καρκινικών

κυττάρων και να προκαλούν την απόπτωσή τους, με αποτέλεσμα να μειώνονται και τα ενδεχόμενα μετάστασης σε άλλους ιστούς. Ο μηχανισμός με τον οποίο εκδηλώνουν τις παραπάνω δράσεις τους είναι πολλαπλός και φαίνεται να σχετίζεται με τη διακοπή του κυτταρικού κύκλου, τον έλεγχο σημαντικών σηματοδοτικών μονοπατιών (π.χ. μονοπάτια PKB, ERK/JNK, JAK/STAT), την ενεργοποίηση συγκεκριμένων λεμφοκυττάρων (T κύτταρα φυσικοί φονείς, Natural Killer T, NKT), την παρεμπόδιση υποδοχέων κυτταρικών μεμβρανών (π.χ. EGFR, VEGFR, PDGFR, IGFR) και την καταστολή της αγγειογένεσης. Στον [Πίνακα 9](#) συνοψίζονται δημοσιευμένες μελέτες της δραστηριότητας (εκφρασμένης σε τιμές IC₅₀) απομονωμένων από διάφορα στελέχη *Bacillus* σουρφακτινών σε διαφορετικές καρκινικές κυτταρικές σειρές, αποδεικνύοντας την αποτελεσματικότητα του λιποπεπτιδίου στην αναστολή κρίσιμων βιολογικών λειτουργιών των κυττάρων αυτών (S. Patel et al., 2015).

Πίνακας 9 Αποτελέσματα κυτταροτοξικότητας σουρφακτινών απομονωμένων από στελέχη *Bacillus* σε διάφορες καρκινικές κυτταρικές σειρές.

Οργανισμός	Κυτταρική σειρά	Τύπος καρκίνου	IC ₅₀	Αναφορά
<i>Bacillus natto</i> TK-1	K562	Χρόνια μυελογενής λευχαιμία	19.1 μg·mL ⁻¹	(X.-H. Cao et al., 2009)
<i>Bacillus natto</i> TK-1	BEL-7402	Ηπατοκυτταρικό καρκίνωμα	30.2 μg·mL ⁻¹	(X.-H. Cao et al., 2009)
<i>Bacillus subtilis</i> 573	T47D	Μαστού	0.18 g·L ⁻¹	(Duarte et al., 2014)
<i>Bacillus subtilis</i> 573	MDA-MB-231	Μαστού	0.45 g·L ⁻¹	(Duarte et al., 2014)
<i>Bacillus subtilis</i>	HeLa	Τραχήλου	50.2 μmol·L ⁻¹	(Nozhat et al., 2012)
<i>Bacillus subtilis</i> HSO121	Bcap-37	Τραχήλου	29.7 μg·mL ⁻¹	(X. Liu et al., 2010)
<i>Bacillus subtilis</i> HSO121	HeLa	Τραχήλου	38.8 μg·mL ⁻¹	(X. Liu et al., 2010)
<i>Bacillus subtilis</i> HSO121	B16	Μελάνωμα (αρουραίων)	20.8 μg·mL ⁻¹	(X. Liu et al., 2010)
<i>Bacillus subtilis</i> HSO121	BEL-7402	Ηπατοκυτταρικό καρκίνωμα	36.7 μg·mL ⁻¹	(X. Liu et al., 2010)
<i>Bacillus subtilis</i> HSO121	KB-3-1	Επιδερμοειδές καρκίνωμα	59.0 μg·mL ⁻¹	(X. Liu et al., 2010)
<i>Bacillus subtilis</i> HSO121	SW-1990	Αδενοκαρκίνωμα παγκρέατος	59.9 μg·mL ⁻¹	(X. Liu et al., 2010)
<i>Bacillus subtilis</i>	LoVo	Παχέος εντέρου	30.0 μmol·L ⁻¹	(Kim et al., 2007)
<i>Bacillus subtilis natto</i> T-2	K562	Χρόνια μυελογενής λευχαιμία	32.0 μg·mL ⁻¹	(C. L. Wang et al., 2007)
<i>Bacillus circulans</i> DMS-2	HCT15	Παχέος εντέρου	80.0 μg·mL ⁻¹	(Sivapathasekaran et al., 2010)
<i>Bacillus subtilis</i> CSY191	MCF7	Μαστού	9.6 μg·mL ⁻¹	(Lee et al., 2012)
<i>Bacillus subtilis natto</i> TK-1	MCF7	Μαστού	27.3 μg·mL ⁻¹	(X.-H. Cao et al., 2009)

1.6.4 Εφαρμογές λιποπεπτιδίων

1.6.4.1 Εφαρμογές λιποπεπτιδίων στο φαρμακευτικό τομέα με χρήση τους ως φορέων φαρμάκων

Η αμφίφιλη δομή των λιποπεπτιδίων και κατ' επέκταση η ικανότητά τους να συσσωματώνονται μεταξύ τους σχηματίζοντας διαφόρων μορφών δομές, αποτελεί τη βάση στην οποία στηρίζεται η δυνατότητα χρήσης των μορίων αυτών ως φορέων φαρμάκων. Οι μικυλλιακές δομές που δημιουργούν, οι οποίες είναι συνήθως σφαιρικού σχήματος, μπορούν να περικλείσουν στο εσωτερικό τους υδρόφοβα ή υδρόφιλα -ανάλογα με τη φύση του λιποπεπτιδικού μικυλλίου- μόρια δραστικών ουσιών, με σκοπό τη βελτιωμένη μεταφορά τους στον εκάστοτε ιστό-στόχο (H. Zhao et al., 2017).

Ένα τέτοιο παράδειγμα αποτελεί η προσπάθεια χρήσης μορίων σουρφακτινών για τη στοχευμένη μεταφορά ινσουλίνης, με στόχο την επίτευξη υψηλότερης βιοδιαθεσιμότητας του φαρμάκου συγκριτικά με τη χορήγησή του από του στόματος. Στην προκειμένη περίπτωση, μάλιστα, μελέτες έχουν δείξει ότι οι σουρφακτίνες μπορούν να επηρεάσουν σημαντικά τη δομή των μορίων της ινσουλίνης, κάνοντάς την πιο εύκαμπτη, με αποτέλεσμα την ευχερέστερη διείσδυσή της δια μέσου της επιθηλιακής μεμβράνης του εντέρου και επομένως, το βελτιωμένο έλεγχο της γλυκόζης στο αίμα σε καθημερινή βάση (Zhang et al., 2017).

Συμπερασματικά, τα λιποπεπτίδια, όπως και άλλες βιοεπιφανειοδραστικές ενώσεις, αποτελούν μία εναλλακτική επιλογή των συνθετικών ομολόγων τους για την εφαρμογή τους ως φορέων φαρμάκων. Η σύγχρονη, μάλιστα, τάση και οι πρόσφατες προσπάθειες χρήσης των λιποπεπτιδίων ως πρότυπες δομές για τη σύνθεση νανοσωματιδίων που μπορούν να χρησιμοποιηθούν ως φορείς φαρμάκων υποδηλώνει την αυξανόμενη ελκυστικότητα των βιοεπιφανειοδραστικών, ως πράσινη επιλογή για την αντικατάσταση των συνθετικών τασιενεργών ουσιών (Gudiña et al., 2013).

1.6.4.2 Εφαρμογές λιποπεπτιδίων στον τομέα των τροφίμων

Στη βιομηχανία των τροφίμων, η προοπτική της εφαρμογής των λιποπεπτιδίων εμφανίζει ιδιαίτερο ενδιαφέρον λόγω της ολοένα αυξανόμενης ζήτησης από την πλευρά των καταναλωτών για χρήση ασφαλών βιώσιμων υλών και φυσικών προϊόντων ως συστατικά των τροφίμων (Henkel et al., 2017). Επιπλέον, τα λιποπεπτίδια εμφανίζουν υψηλή θερμική και χημική σταθερότητα, με αποτέλεσμα να μην αποσυντίθενται κατά τη διάρκεια της επεξεργασίας που υφίστανται για την παραγωγή του τελικού προϊόντος. Στο πλαίσιο αυτό, τα λιποπεπτίδια που παράγονται από βακτήρια του γένους *Bacillus* μπορούν να χρησιμοποιηθούν ως γαλακτοματοποιητές ή σταθεροποιητές στην επεξεργασία των πρώτων υλών (Meena & Kanwar, 2015; Marcia Nitschke & Silva, 2018). Ακόμα, χάρη στις αντιμικροβιακές τους ιδιότητες, μπορούν να χρησιμοποιηθούν και για τον έλεγχο των παθογόνων μικροοργανισμών που αναπτύσσονται στα τρόφιμα, ενώ για τον ίδιο λόγο μπορεί να γίνει χρήση τους και ως πρόσθετα ζωοτροφών, με εμφανή πλεονεκτήματα τόσο στην αναστολή της ανάπτυξης και αναπαραγωγής των παθογόνων, όσο και στη γενικότερη διατήρηση της ισορροπίας της ωφέλιμης εντερικής χλωρίδας των ζώων (M. Nitschke & Costa, 2007; H. Zhao et al., 2017).

1.6.4.3 Χρήση λιποπεπτιδίων σε προγράμματα περιβαλλοντικής βιοαποκατάστασης

Η βιοαποκατάσταση ή βιοθεραπεία του περιβάλλοντος είναι μια τεχνική διαχείρισης αποβλήτων με τη χρήση μικροοργανισμών για την αφαίρεση ή εξουδετέρωση μολυντών από μία μολυσμένη θέση (Leung, 2004; Omokhagbor Adams et al., 2015). Αποτελεί μια εναλλακτική λύση της χρήσης συνθετικών τασιενεργών παραγόντων, σε μια προσπάθεια αντικατάστασής τους, εξαιτίας των προβλημάτων τοξικότητας και μακρόχρονης παραμονής που εμφανίζουν στα περιβάλλοντα που εφαρμόζονται. Στο πλαίσιο αυτό, η δυνατότητα χρήσης των λιποπεπτιδίων για την αποκατάσταση ρυπασμένων χερσαίων και υδάτινων οικοσυστημάτων έχει μελετηθεί ευρέως τα τελευταία χρόνια. Τα φυσικοχημικά χαρακτηριστικά των ουσιών αυτών και κυρίως οι εξαιρετικές επιφανειοδραστικές και γαλακτοματοποιητικές τους ιδιότητες, σε συνδυασμό με την υψηλή τους βιοαποικοδομησιμότητα και τη

μικροβιακή τους προέλευση, αναδεικνύουν την καταλληλότητά τους για εφαρμογή σε προγράμματα περιβαλλοντικής αποκατάστασης (W. C. Chen et al., 2015; Santos et al., 2018).

Ειδικότερα, έχει μελετηθεί εκτενώς η συμβολή της ομάδας των σουρφακτινών στον καθαρισμό μολυσμένων με πετρέλαιο εδαφών, τόσο με άμεσο όσο και με έμμεσο τρόπο. Η άμεση δράση των σουρφακτινών συνίσταται στην ικανότητά τους να διαλυτοποιούν και να κινητοποιούν οργανικούς ρύπους πετρελαϊκών υδρογονανθράκων προσροφημένων στα εδάφη (Santos et al., 2018). Έχει διαπιστωθεί, μάλιστα, υψηλότερη αποτελεσματικότητα απομάκρυνσης τέτοιων ρύπων μετά από εφαρμογή των συγκεκριμένων βιοεπιφανειοδραστικών ουσιών, συγκριτικά με τα αποτελέσματα της δράσης ανάλογων συνθετικών παραγόντων, όπως των Triton X-100 και Tween 80 (Lai et al., 2009). Όσον αφορά στην έμμεση λειτουργία των σουρφακτινών, έχει παρατηρηθεί ότι η εφαρμογή τους προκαλεί αύξηση της βιομάζας και διέγερση της δράσης εδαφικών μικροοργανισμών που πραγματοποιούν αποικοδόμηση πετρελαϊκών ρύπων (Whang et al., 2008).

Επιπλέον, έχει διερευνηθεί η ικανότητα των σουρφακτινών να δεσμεύουν και να απομακρύνουν βαρέα μέταλλα από εδάφη που παρουσιάζουν υψηλά επίπεδα σε αυτά. Τα δομικά γνωρίσματα των μορίων της συγκεκριμένης κατηγορίας λιποπεπτιδίων, με την εμφάνιση δύο αρνητικών φορτίων, στα μονομερή του γλουταμινικού και ασπαρτικού οξέος αντίστοιχα, επιτρέπουν τη σύνδεσή τους σε ορισμένα μέταλλα (Mulligan, 2005). Με βάση το παραπάνω γνώρισμα, έχουν πραγματοποιηθεί δοκιμές έκπλυσης, με χρήση διαλύματος σουρφακτινών, σε εδάφη με υψηλές συγκεντρώσεις βαρέων μετάλλων, όπως ψευδαργύρου (Zn), χαλκού (Cu) και καδμίου (Cd). Σύμφωνα με τα αποτελέσματα των πειραμάτων, μία σειρά από πέντε πλύσεις ενός τέτοιου εδάφους με 0.25% σουρφακτίνη εμφανίστηκε ικανή να απομακρύνει το 22% του Zn, το 70% του Cu και το 15% του Cd (Mulligan et al., 1999).

Τέλος, είναι δυνατή η χρήση λιποπεπτιδίων για τη βιοαποκατάσταση μολυσμένων με πετρέλαιο υδάτων. Ιδιαίτερα στην περίπτωση των πετρελαιοκηλίδων, οι οποίες αποτελούν μία από τις κυριότερες μορφές πετρελαϊκής ρύπανσης των υδάτων στα θαλάσσια περιβάλλοντα, η εφαρμογή λιποπεπτιδίων μπορεί να αυξήσει τη διαλυτότητα αυτών των υδρόφοβων ρύπων, μέσω του σχηματισμού συσσωματωμάτων ή αλλιώς μικκυλίων λιποπεπτιδίων (J. F. Liu et al., 2015). Αυτή η ικανότητά τους για γαλακτοματοποίηση των υδρογονανθράκων στο

νερό διευκολύνει την απελευθέρωση και αφομοίωση των ρύπων, ενισχύοντας με αυτόν τον τρόπο την αποικοδόμησή τους από τη χλωρίδα και πανίδα του περιβάλλοντος (Rosenberg & Ron, 1999).

1.6.5 Περιορισμοί στην εμπορική χρήση των λιποπεπτιδίων και μελλοντικές προοπτικές

Παρά την πληθώρα βιολογικών δράσεων και εφαρμογών των λιποπεπτιδίων, το υψηλό κόστος παραγωγής τους αποτελεί το μεγαλύτερο παρεμποδιστικό παράγοντα για τη σύνθεσή τους σε μεγάλη κλίμακα και την εκτεταμένη χρήση τους. Το κόστος αυτό οφείλεται κυρίως στις χαμηλές αποδόσεις που σημειώνονται κατά τη διαδικασία ανάκτησης, επεξεργασίας και καθαρισμού των ουσιών αυτών από τις βακτηριακές καλλιέργειες (Banat et al., 2014; W. C. Chen et al., 2015). Επιπλέον, ο ρυθμός σύνθεσής τους από τους ίδιους τους μικροοργανισμούς είναι συνήθως χαμηλός, καθώς σχετίζεται πιθανότατα με πολύπλοκους βιοσυνθετικούς μηχανισμούς, σύμφωνα με τους οποίους η παραγωγή των λιποπεπτιδίων εξαρτάται από την πυκνότητα των βακτηριακών κυττάρων της αποικίας. Αυτό έχει ως αποτέλεσμα τη διακοπτόμενη βιοσύνθεσή τους στη διάρκεια επώασης της καλλιέργειας και επομένως, τον περιορισμό των συνολικών αποδόσεων (Zhi et al., 2017).

Οι προσπάθειες αντιμετώπισης των παραπάνω προκλήσεων έχουν εστιάσει στη δημιουργία γενετικά τροποποιημένων στελεχών *Bacillus* με ενισχυμένο βιοσυνθετικό δυναμικό όσον αφορά την παραγωγή λιποπεπτιδίων, για χρήση σε εμπορική κλίμακα (Santos et al., 2018). Η πλειοψηφία των δοκιμών τροποποίησης έχει πραγματοποιηθεί σε ρυθμιστικά στοιχεία γονιδίων που εμπλέκονται στους μηχανισμούς σύνθεσης των σουρφακτινών από τα ένζυμα NRPSs. Τα γονίδια αυτά μπορεί να είναι υπεύθυνα για την έκφραση συγκεκριμένων σηματοδοτικών μορίων του μονοπατιού βιοσύνθεσης των σουρφακτινών, για την παραγωγή πρωτεϊνών-μεταφορέων των σουρφακτινών και για άλλες παρόμοιες λειτουργίες (Jung et al., 2012; Li et al., 2015). Στο ίδιο πλαίσιο, έχει δοκιμαστεί και η αντικατάσταση του εκκινήτη του οπερονίου των NRPSs που είναι υπεύθυνο για τη σύνθεση των σουρφακτινών (Jiao et al., 2017; Q. Wang et al., 2018).

Μια διαφορετική οδός για την ελάττωση του κόστους παραγωγής των λιποπεπτιδίων είναι η χρήση εναλλακτικών θρεπτικών υποστρωμάτων για την καλλιέργεια των βακτηρίων. Για παράδειγμα, έχουν γίνει προσπάθειες εκμετάλλευσης βιομηχανικών αποβλήτων, πλούσιων σε υδατάνθρακες και λιπίδια για τη μικροβιακή ανάπτυξη (Santos et al., 2018). Παράλληλα, επιδιώκεται η αξιοποίηση γεωργικών υποπροϊόντων και ανανεώσιμων πρώτων υλών, όπως πίτουρου, καλαμποκιού, πατάτας, άχυρου σίτου, μελάσας ζαχαροκάλαμου και σογιέλαιου, τα οποία μπορούν να χρησιμοποιηθούν ως πηγές άνθρακα για τη σύνθεση λιποπεπτιδίων σε βιομηχανικό επίπεδο (Banat et al., 2014). Η χρήση φθηνότερων θρεπτικών μέσων και η ανάπτυξη βιομηχανικών διεργασιών χαμηλού κόστους έχει υπολογιστεί ότι μπορούν να μειώσουν το τελικό κόστος έως και 30% (Paraszkiewicz et al., 2018).

Τέλος, ένας ακόμα σημαντικός παράγοντας που περιορίζει την ανάπτυξη εμπορικών σκευασμάτων λιποπεπτιδίων είναι ο μη εξειδικευμένος μηχανισμός δράσης που παρουσιάζουν. Η τοξικότητά τους στις βιολογικές μεμβράνες και η κυτταρική λύση που προκαλούν μπορεί να εμφανίζεται αποτελεσματική έναντι διαφόρων ανθρωπο- και φυτο-παθογόνων μικροοργανισμών, δεν αποκλείεται, όμως, να ενέχει κινδύνους και για τα κύτταρα οργανισμών μη-στόχων, όπως των θηλαστικών (S. Patel et al., 2015). Το παραπάνω, σε συνδυασμό με την ισχυρή αιμολυτική δράση ορισμένων κατηγοριών λιποπεπτιδίων, τα οποία προκαλούν αποσύνθεση των μεμβρανών των ερυθρών αιμοσφαιρίων, περιορίζει τις δυνατότητες χρήσης τους στην Ιατρική (Aranda et al., 2005; Duarte et al., 2014; P. Zhao et al., 2018). Στο πλαίσιο αυτό, η ήπια αιμολυτική δράση που παρουσιάζουν οι φεγκυσίνες συγκριτικά με τις υπόλοιπες οικογένειες λιποπεπτιδίων, καθιστά τα μόρια αυτά καταλληλότερα για πιθανές εφαρμογές στον Ιατρικό και Φαρμακευτικό τομέα (S. Patel et al., 2015).

2. Σκοπός της μελέτης

Η καλλιέργεια της ελιάς αποτελεί μία από τις σημαντικότερες καλλιέργειες της χώρας μας, με μεγάλη συνεισφορά στην εθνική οικονομία και ισχυρή παρουσία σε ευρωπαϊκό επίπεδο. Παρόλη, όμως, τη δυναμική και τις σημαντικές προοπτικές που εμφανίζει ο κλάδος της ελαιοκαλλιέργειας, απώλειες της παραγωγής που οφείλονται σε εντομολογικούς εχθρούς και μυκητολογικές ασθένειες αποτελούν τροχοπέδη για την περαιτέρω εξέλιξή του. Ανάμεσα στις μυκητολογικές ασθένειες, το γλοιοσπόριο είναι υπεύθυνο για την πρόκληση τεράστιων απωλειών, ιδιαίτερα τα τελευταία χρόνια, κατά τα οποία η ασθένεια λαμβάνει συχνά διαστάσεις επιδημίας σε πολλές περιοχές της Ελλάδας.

Παρά το γεγονός ότι υπάρχουν αρκετά εγκεκριμένα Φ.Π. για την καταπολέμηση του γλοιοσπορίου, αλλά και των περισσότερων ασθενειών της ελιάς, η ανάπτυξη ανθεκτικών σε αυτά πληθυσμών φυτοπαθογόνων έχει ως αποτέλεσμα τη μη αποτελεσματική φυτοπροστασία των καλλιεργειών. Φαινόμενα όπως αυτό της ανθεκτικότητας έρχονται να προστεθούν σε μια σειρά προκλήσεων που αντιμετωπίζει σήμερα ο τομέας της ελαιοκαλλιέργειας και της φυτοπροστασίας εν γένει, όπως είναι η τοξικότητα πολλών Φ.Π. σε οργανισμούς μη-στόχους, η κατάργηση πολλών δραστικών ουσιών και η ανίχνευση υπολειμμάτων Φ.Π. στα τρόφιμα.

Τα παραπάνω καθιστούν επιτακτική την ανάγκη ανακάλυψης νέων πηγών βιοδραστικότητας, οι οποίες ιδανικά, θα εμφανίζουν υψηλή αποτελεσματικότητα, χαμηλή τοξικότητα στον άνθρωπο και σε οργανισμούς μη-στόχους, μικρό περιβαλλοντικό αντίκτυπο και νέους μηχανισμούς δράσης. Μία τέτοια πηγή νέων βιοδραστικών μεταβολιτών είναι οι ενδοφυτικοί μικροοργανισμοί, η μελέτη των οποίων αποτελεί μία από τις τελευταίες τάσεις για αξιοποίησή τους στις γεωπονικές επιστήμες και σε άλλους τομείς έρευνας.

Στο πλαίσιο αυτό, αντικείμενο της παρούσας διπλωματικής εργασίας αποτέλεσε η απομόνωση και μελέτη ενδοφυτικών μικροοργανισμών ελιάς, με σκοπό την παραλαβή, ανάλυση, απομόνωση και ταυτοποίηση βιοδραστικών μεταβολιτών τους. Παράλληλα, η εργασία στόχευε στην ενδελεχή μελέτη της επίδρασης των μεταβολιτών των ενδοφύτων στο μεταβολισμό παθογόνων μικροοργανισμών της ελιάς, όπως του γλοιοσπορίου. Απώτερο σκοπό της μελέτης αποτέλεσε η αξιολόγηση της δυνατότητας εφαρμογών των βιοδραστικών μεταβολιτών των ενδοφύτων στη φυτοπροστασία, με χρήση τους είτε ως αυτούσια μόρια είτε ως μόρια-οδηγοί για τη σύνθεση άλλων δραστικών ουσιών.

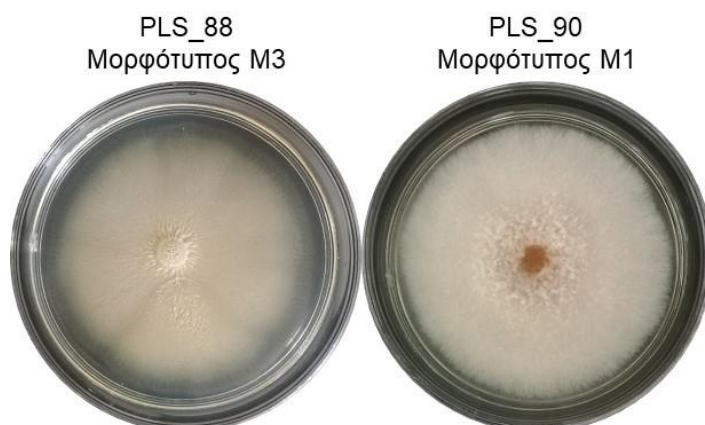
3. Πειραματικό Μέρος

3.1 Υλικά και Μέθοδοι

3.1.1 Βιολογικό Υλικό

3.1.1.1 Στελέχη του μύκητα *Colletotrichum acutatum*

Οι *in vitro* βιοδοκιμές μυκητοτοξικότητας των απομονωμένων ενδοφυτικών μικροοργανισμών ελιάς (§3.3.2), του ολικού λιποπεπτιδικού εκχυλίσματος (§3.5) και των επιμέρους κλασμάτων του (§3.6.4) επικεντρώθηκαν σε ένα είδος μύκητα, το *Colletotrichum acutatum*. Από αυτό το σύμπλοκο είδος, χρησιμοποιήθηκαν 2 στελέχη, τα PLS_88 και PLS_90 (Εικόνα 19), τα οποία έχουν απομονωθεί από προσβεβλημένους καρπούς ελιάς και ταυτοποιηθεί με μοριακές τεχνικές από την ομάδα Pesticide Metabolomics Group (PMG) του Εργαστηρίου Γεωργικής Φαρμακολογίας του Γεωπονικού Πανεπιστημίου Αθηνών. Τα δύο στελέχη έχουν κατηγοριοποιηθεί σε δύο διαφορετικούς μορφότυπους, εξαιτίας των φαινοτυπικών διαφορών που διακρίνονται ανάμεσά τους (PLS_88 με υπόλευκο μυκήλιο, PLS_90 με ανοιχτό ροζ μυκήλιο). Επιπλέον, παρουσιάζουν διαφορετική παθογόνο ικανότητα, αλλά και ευαισθησία σε εγκεκριμένα μυκητοκτόνα που εφαρμόζονται στη γεωργική πράξη για την αντιμετώπιση ασθενειών της ελιάς. Πιο συγκεκριμένα, το στέλεχος PLS_88 εμφανίζει χαμηλότερη ευαισθησία σε δραστικές ουσίες που έχουν δοκιμαστεί, κυρίως σε όσες ανήκουν στην κατηγορία των στρομπιλουρινών, συγκριτικά με το στέλεχος PLS_90, το οποίο παρουσιάζεται περισσότερο ευαίσθητο σε αυτές (Kolainis et al., 2020).



Εικόνα 19 Τα στελέχη PLS_88 (αριστερά) και PLS_90 (δεξιά) του μύκητα *Colletotrichum acutatum* όπως αυτά διαχωρίστηκαν σε μορφότυπους και οι εμφανείς φαινοτυπικές διαφορές τους.

3.1.1.2 Φυτικό υλικό

Για τη διαδικασία απομόνωσης ενδοφυτικών μικροοργανισμών, χρησιμοποιήθηκε φυτικό υλικό από ελαιόδεντρα ποικιλίας Κορωνέικης. Αναλυτικότερα, συγκεντρώθηκαν δείγματα από διάφορα μέρη των φυτών (κλάδοι, φύλλα, καρποί, ρίζες), τα οποία περιλάμβαναν αποκλειστικά υγιείς ιστούς (*Εικόνα 20*) (§3.3.1).



Εικόνα 20 Δείγματα ιστών ελιάς που χρησιμοποιήθηκαν για την απομόνωση ενδοφυτικών μικροοργανισμών.

3.1.2 Θρεπτικά υποστρώματα για την καλλιέργεια και διατήρηση των στελεχών μυκήτων και βακτηρίων

Εκχύλισμα πατάτας με δεξτρόζη και άγαρ (Potato Dextrose Agar, PDA)

Το συγκεκριμένο θρεπτικό υπόστρωμα χρησιμοποιήθηκε τόσο για την καλλιέργεια και διατήρηση των μυκήτων, όσο και ως υλικό στις βιοδοκιμές μυκητοτοξικότητας, για την αξιολόγηση της δράσης των λιποπεπτιδίων (§3.5, §3.6.4). Για την παρασκευή 1 L PDA, ογκομετρούνταν 1 L απεσταγμένου νερού και αποχύνονταν σε κωνική φιάλη των 2 L. Στη συνέχεια, ζυγίζονταν 39 g PDA (PDA, Becton, Dickinson and Company, Sparks, MD, U.S.A.) και 5 g άγαρ (Becton, Dickinson and Company, Le Pont de Clais, France) και προσθέτονταν και αυτά στην κωνική φιάλη. Ακολουθούσε θέρμανση υπό ανάδευση μέχρι την ομογενοποίηση του μίγματος (*Εικόνα 21*). Τέλος, το υλικό ογκομετρούνταν και μοιραζόταν σε μπουκάλια μικρότερου όγκου, τα οποία τοποθετούνταν σε κλίβανο υγρής αποστείρωσης, στους 120°C, για 20 min.



Εικόνα 21 Παρασκευή θρεπτικού υποστρώματος PDA (θέρμανση υπό ανάδευση).

Lysogeny Broth (LB)

Το υγρό θρεπτικό υλικό που χρησιμοποιήθηκε για την καλλιέργεια των βακτηρίων ήταν το Lysogeny Broth (LB). Για την παρασκευή 1 L LB, ογκομετρούνταν 1 L απεσταγμένου νερού και αποχύνονταν σε κωνική φιάλη των 2 L. Στη συνέχεια, ζυγίζονταν 10 g tryptone (Condalab), 10 g NaCl και 5 g yeast extract (HiMedia Laboratories) και τοποθετούνταν και αυτά στην κωνική φιάλη. Ακολουθούσε θέρμανση υπό ανάδευση μέχρι το μίγμα να ομογενοποιηθεί. Τέλος, το υλικό ογκομετρούνταν και μοιραζόταν σε μπουκάλια μικρότερου όγκου, τα οποία αποστειρώνονταν σε κλίβανο αποστείρωσης στους 120°C για 20 min.

3.1.3 Καλλιέργεια, διατήρηση και ανανέωση των στελεχών μυκήτων και βακτηρίων

Τα στελέχη των μυκήτων και βακτηρίων αναπτύσσονταν και διατηρούνταν σε πλαστικά τρυβλία Petri, διαμέτρου 9 cm, σε 15 mL θρεπτικού υποστρώματος (PDA), ενώ η επώασή τους γινόταν σε επωαστικό θάλαμο, υπό συνθήκες σκότους, σε θερμοκρασία 22°C.

Όσον αφορά στην ανανέωση των στελεχών, αυτή πραγματοποιούνταν ανά 15 ημέρες, προκειμένου να υπάρχει πάντα διαθέσιμο βιολογικό υλικό κατάλληλου σταδίου ανάπτυξης. Η διαδικασία της ανανέωσης, περιλάμβανε τα εξής βήματα:

- Αποστείρωση του θαλάμου οριζόντιας νηματικής ροής (laminar) με χρήση υπεριώδους ακτινοβολίας για 20 min
- Πλήρωση των τρυβλίων Petri με 15 mL θρεπτικού υλικού (PDA) και αναμονή μερικών λεπτών μέχρι τη στερεοποίησή του
- Χρήση φελλοτρυπητήρα διαμέτρου 5 mm στην περιφέρεια της καλλιέργειας για τη δημιουργία μυκηλιακών δίσκων ή χρήση βακτηριακού κρίκου για τη λήψη βακτηριακών κυττάρων αντίστοιχα
- Εμβολιασμός των νέων τρυβλίων με μεταφορά των μυκηλιακών δίσκων στο κέντρο τους ή μεταφορά του βακτηριακού εναιωρήματος στην επιφάνεια του τρυβλίου (streaking)
- Επώαση των τρυβλίων σε επωαστικό θάλαμο στους 22°C υπό συνθήκες σκότους

Για τη μακρόχρονη διατήρηση των στελεχών, πραγματοποιούνταν μεταφορά μυκηλιακών δίσκων διαμέτρου 5 mm ή βακτηριακού εναιωρήματος αντίστοιχα σε πλαστικά σωληνάρια τύπου Eppendorf χωρητικότητας 1,5 mL, στα οποία προστίθεντο διάλυμα γλυκερόλης:PBS (phosphate-buffered saline) 1:1 (v/v), και ακολουθούσε αποθήκευσή τους σε θερμοκρασία -80°C. Για την παρασκευή του διαλύματος γλυκερόλης, προστίθεντο στα σωληνάρια αρχικά 700 µL PBS buffer, του οποίου τα συστατικά αναγράφονται στον [Πίνακα 10](#), και στη συνέχεια 700 µL γλυκερόλης.

Όλοι οι παραπάνω χειρισμοί πραγματοποιήθηκαν υπό ασηπτικές συνθήκες.

Πίνακας 10 Συστατικά παρασκευής ρυθμιστικού διαλύματος PBS.

Συστατικά	Συγκέντρωση C (g·L⁻¹)
NaCl	8
KCl	0.2
Na ₂ HPO ₄	1.42
KH ₂ PO ₄	0.24

3.2 Τεχνικές

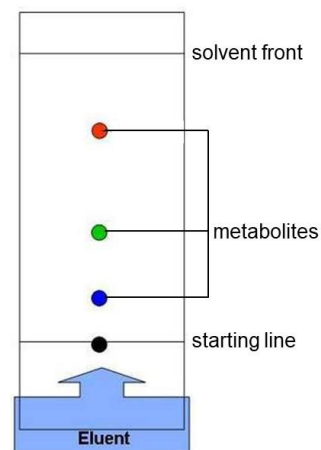
3.2.1 Αναλυτική Χρωματογραφία Λεπτής Στιβάδας (Analytical Thin Layer Chromatography, Analytical TLC)

Η Χρωματογραφία Λεπτής Στιβάδας (Thin Layer Chromatography, TLC) αποτελεί ίσως την πιο ευρέως χρησιμοποιούμενη χρωματογραφική μέθοδο σε εργαστηριακή κλίμακα (Kumar et al., 2013), με εφαρμογή σε πλήθος ερευνητικών πεδίων (Κλινική Ιατρική, Χημεία, Βιοχημεία, Φαρμακευτική Ανάλυση, Τοξικολογία, Ανάλυση τροφίμων, Κοσμητολογία) (Fried & Sherma, 1996; Hahn-Deinstrop, 2007). Η διαδεδομένη χρήση της οφείλεται στην πληθώρα πλεονεκτημάτων που παρουσιάζει, καθώς αποτελεί μια απλή, ταχεία και χαμηλού κόστους αναλυτική τεχνική (Fried & Sherma, 1996; Hahn-Deinstrop, 2007), κατάλληλη για την ανάλυση και το διαχωρισμό συστατικών πολύπλοκων δειγμάτων, τον εντοπισμό και την ταυτοποίηση συγκεκριμένων μεταβολιτών σε ένα μίγμα, τον προσδιορισμό της καθαρότητας μιας ουσίας και τον έλεγχο της εξέλιξης μιας χημικής αντίδρασης (Kumar et al., 2013).

Η TLC είναι χρωματογραφία υγρού-στερεού και στηρίζεται στην αρχή της προσρόφησης (adsorption), διαδικασίας κατά την οποία μία ουσία, αέρια ή υγρή συσσωρεύεται στην επιφάνεια ενός στερεού (Snyder, 2008). Όπως όλες οι χρωματογραφικές τεχνικές, περιλαμβάνει τη χρήση μιας στατικής και μιας κινητής φάσης (Joseph Sherma & Fried, 2005). Η στατική φάση αποτελείται συνήθως από πλάκες αλουμινίου, υάλου ή πλαστικού, επικαλυμμένες με προσροφητικά υλικά, όπως το διοξείδιο του πυριτίου ή το οξείδιο του αλουμινίου (Kumar et al., 2013; Joseph Sherma & Fried, 2005). Στην παρούσα μελέτη, χρησιμοποιήθηκαν πλάκες κανονικής φάσης TLC silica gel 60 F₂₅₄ 20x20 cm (Merck) (γέλη οξειδίου του πυριτίου με δείκτη φθορισμού σε φύλλα αλουμινίου διαστάσεων 20x20 cm). Ως κινητή φάση χρησιμοποιείται επιλεγμένος διαλύτης ή συχνότερα, σύστημα διαλυτών ανάπτυξης της πλάκας (Kumar et al., 2013).

Κατά την πειραματική διαδικασία (*Εικόνα 22*), μικρή ποσότητα του προς ανάλυση δείγματος τοποθετείται κοντά στη βάση της πλάκας (spotting) και στη συνέχεια, η πλάκα τοποθετείται σε θάλαμο ανάπτυξης που περιέχει την κινητή φάση, με τρόπο ώστε μόνο η βάση της να είναι βυθισμένη στο μίγμα διαλυτών. Με το πέρασμα του χρόνου, η κινητή φάση ανέρχεται σταδιακά στην πλάκα μέσω

τριχοειδών δυνάμεων, παρασύροντας παράλληλα τις ουσίες του δείγματος. Ο διαχωρισμός των συστατικών του επιτυγχάνεται βάσει της συγγένειας που παρουσιάζουν αυτά με τη στατική και την κινητή φάση, με τις ουσίες με μεγαλύτερη συγγένεια με τη στατική φάση να προσροφώνται ισχυρά στην πλάκα και να παραμένουν κοντά στη βάση της. Κατά αντιστοιχία, οι ουσίες με μικρότερη συγγένεια με το προσροφητικό μέσο παρασύρονται από την κινητή φάση και εμφανίζονται σε μεγαλύτερη απόσταση από την αρχική τοποθέτηση του δείγματος. Όταν το μέτωπο του διαλύτη πλησιάσει το άλλο άκρο της πλάκας, αυτή απομακρύνεται από το θάλαμο ανάπτυξης και ακολουθεί παρατήρησή της (J. Sherma & Fried, 2003).

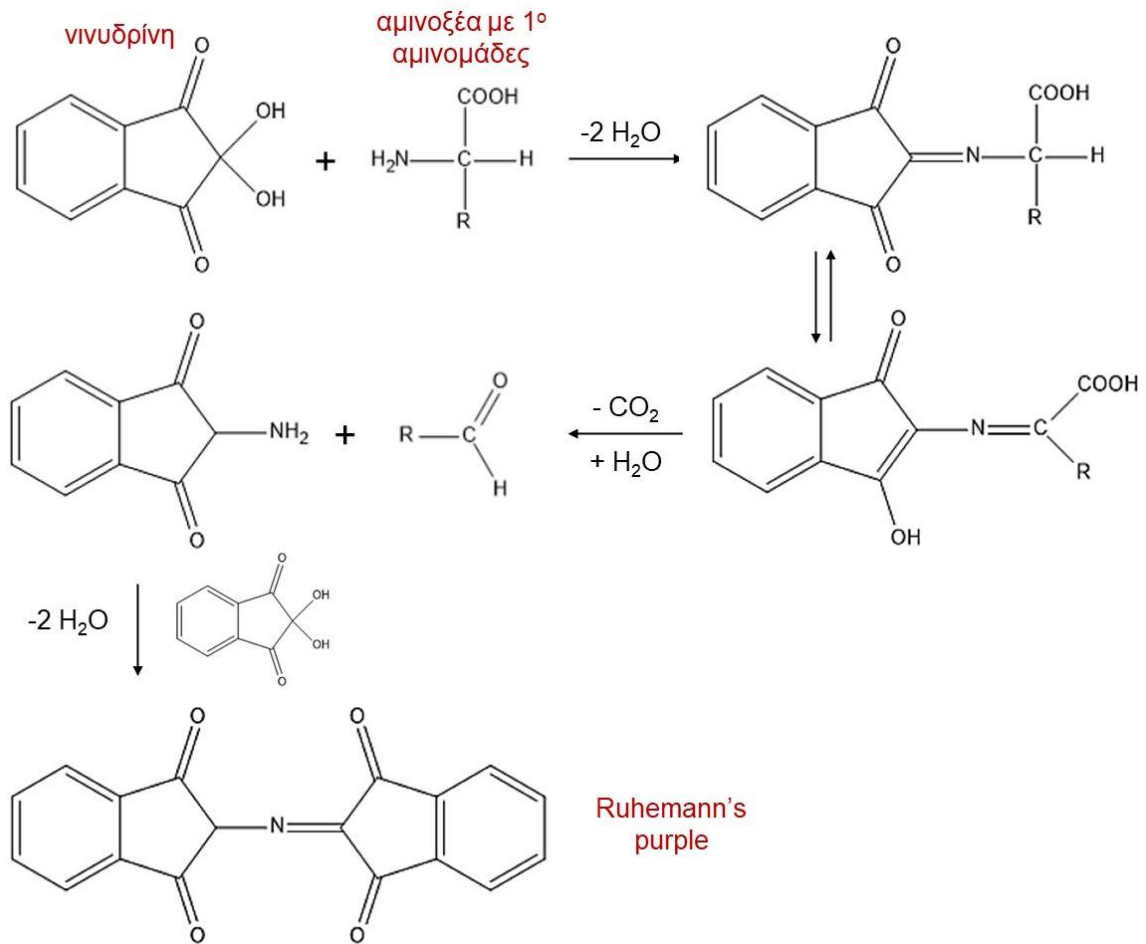


Εικόνα 22 Διαδικασία ανάπτυξης δείγματος σε πλάκα TLC

Η παρατήρηση του χρωματογραφήματος πραγματοποιείται με χρήση λάμπας υπεριώδους φωτός (UV) για τον εντοπισμό της απορρόφησης των ουσιών στα 254 και 366 nm. Στην παρούσα εργασία, η παρατήρηση των χρωματογραφημάτων TLC πραγματοποιήθηκε σε συσκευή CAMAG TLC Visualizer, ενώ για την επεξεργασία τους χρησιμοποιήθηκαν τα λογισμικά CAMAG visionCATS και winCATS. Επιπλέον, η χρήση αντιδραστηρίων γενικής χρήσης (π.χ. θειική βανιλίνη) ή ειδικών αντιδραστηρίων (π.χ. Dragendorff) επιτρέπει την εμφάνιση των συστατικών του δείγματος.

Σε αυτή τη διπλωματική μελέτη χρησιμοποιήθηκε το γενικό αντιδραστήριο θειικής βανιλίνης, η παρασκευή του οποίου πραγματοποιούνταν με ανάμιξη ίσων όγκων διαλυμάτων 10% βανιλίνης σε μεθανόλη και 10% πυκνού θειικού οξέος (H_2SO_4) σε μεθανόλη. Ακολουθούσε ψεκασμός της πλάκας TLC και θέρμανση στους $100^\circ C$ μέχρι την εμφάνιση έγχρωμων κηλίδων. Ακόμα, χρησιμοποιήθηκε και το ειδικό αντιδραστήριο νινυδρίνης, κατάλληλο για την ανίχνευση αμινομάδων. Η προετοιμασία του πραγματοποιούνταν με προσθήκη 0.2 g νινυδρίνης σε 100 mL αιθανόλης (διάλυμα νινυδρίνης 0.2% w/v σε EtOH) και ακολουθούσε και πάλι ψεκασμός της πλάκας και θέρμανση στους $100^\circ C$ μέχρι την εμφάνιση κηλίδων. Η εμφάνιση στην πλάκα κηλίδων χρώματος ρόδινο-ιώδους μετά από ψεκασμό με το συγκεκριμένο αντιδραστήριο, οφείλεται στην αντίδραση της νινυδρίνης με πρωτοταγείς αμινομάδες (*Εικόνα 23*). Το χρώμα αυτό ονομάζεται Ruhemann's purple προς τιμήν του Siegfried Ruhemann που ανακάλυψε την αντίδραση το 1910

(Friedman, 2004). Η απουσία πρωτοταγών αμινομάδων σε ένα αμινοξύ ή πεπτίδιο έχει ως αποτέλεσμα την εμφάνιση κίτρινου χρωματισμού μετά από ψεκάσμο με διάλυμα νινυδρίνης.



Εικόνα 23 Αντίδραση νινυδρίνης με αμινοξέα με πρωτοταγείς αμινομάδες προς σχηματισμό προϊόντος ρόδινου-ιώδους χρωματισμού.

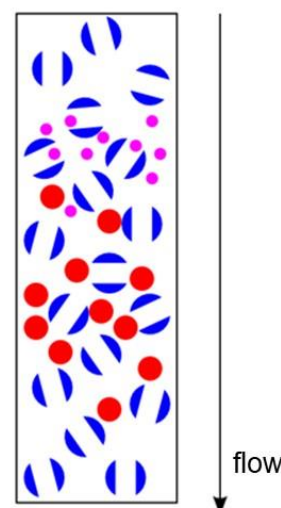
3.2.2 Παρασκευαστική Χρωματογραφία Λεπτής Στιβάδας (Preparative Thin Layer Chromatography, Preparative TLC)

Η παρασκευαστική χρωματογραφία λεπτής στιβάδας χρησιμοποιείται κατά τον ίδιο τρόπο όπως και η αναλυτική, αλλά διαφέρει από τη δεύτερη ως προς το πάχος της προσροφητικής στιβάδας, το οποίο είναι περίπου 175-225 μm για αναλυτικούς σκοπούς και 210-270 μm για παρασκευαστικούς. Στην παρούσα εργασία έγινε χρήση γυάλινων πλακών κανονικής φάσης TLC silica gel 60 F₂₅₄ 20x20 cm (Merck) (γέλη οξειδίου του πυριτίου με δείκτη φθορισμού σε γυάλινες πλάκες διαστάσεων 20x20 cm).

Η παρασκευαστική TLC αποτελεί μια χρήσιμη τεχνική για την επεξεργασία μικρής ποσότητας δείγματος και την απομόνωση συγκεκριμένων μεταβολιτών. Αναλυτικότερα, 20-25 mg δείγματος διαλυμένα σε κατάλληλο διαλύτη εφαρμόζονται σε μία οριζόντια λεπτή γραμμή περίπου 1.5 cm από τη βάση της πλάκας και η πλάκα βυθίζεται στο επιλεγμένο σύστημα ανάπτυξης όπως περιεγράφηκε στην §3.2.1. Μετά την ανάπτυξη του χρωματογραφήματος, η πλάκα παρατηρείται στο UV και σημειώνονται με μολύβι οι ζώνες των ουσιών προς απομόνωση. Στη συνέχεια, πραγματοποιείται απόξεση της στιβάδας του πυριτίου στις ζώνες που φέρουν προσροφημένο το προϊόν με χρήση λεπίδας. Ακολουθεί εκχύλιση των ουσιών με κατάλληλους διαλύτες ή μίγματά τους, διήθηση του εκχυλίσματος και τέλος, παραλαβή του καθαρού προϊόντος μετά από απομάκρυνση του διαλύτη με απόσταξη υπό κενό (Rabel & Sherma, 2017).

3.2.3 Χρωματογραφία μοριακού αποκλεισμού (Molecular Exclusion Chromatography, Sephadex LH-20)

Η χρωματογραφία μοριακού αποκλεισμού ή χρωματογραφία διαπερατότητας πηκτής (gel permeation chromatography) είναι μία μέθοδος κατά την οποία τα μόρια του δείγματος διαχωρίζονται με βάση το μέγεθός τους και σε ορισμένες περιπτώσεις, με βάση το μοριακό τους βάρος (Y. Wang et al., 2010). Η διαδικασία πραγματοποιείται σε στήλες, το πληρωτικό υλικό των οποίων είναι γέλη που αποτελείται από μικρά σφαιρίδια, τα οποία διαχωρίζουν τους μεταβολίτες με τη μέθοδο του κοσκινίσματος. Τα υλικά αυτά έχουν την ικανότητα να προσροφούν κυρίως πολικούς διαλύτες, δημιουργώντας με αυτό τον τρόπο διάκενα. Ανάλογα με την έκταση των διασταυρούμενων δεσμών της γέλης υπάρχει ένα οριακό μέγεθος για το μόριο που μπορεί να εισχωρήσει στο δίκτυό της. Όσο μεγαλύτερο είναι το μέγεθος του μορίου, τόσο πιο γρήγορα εξέρχεται από την στήλη, καθώς δεν παγιδεύεται στη γέλη και επομένως δεν επιβραδύνεται η κάθοδός του μέσα στη στήλη. Αντιθέτως, τα μικρότερα μόρια εισχωρούν στους πόρους του πληρωτικού υλικού, διανύουν περισσότερο όγκο και εκλούνται αργότερα (Mori & Barth, 2013) (Εικόνα 24). Επιλέγοντας το κατάλληλο είδος γέλης, υπάρχει δυνατότητα διαχωρισμού μορίων με εύρος βάρους από λίγα μέχρι και χιλιάδες Daltons. Στην παρούσα διπλωματική, χρησιμοποιήθηκε το πληρωτικό υλικό Sephadex LH-20 (Sigma-Aldrich), ένα κοκκώδες υλικό που αποτελείται από τροποποιημένη δεξτράνη, ένα τρισδιάστατο πλέγμα από γραμμικούς πολυσακχαρίτες με πλευρικούς υποκαταστάτες.



Εικόνα 24
Χρωματογραφία
μοριακού αποκλεισμού.

3.2.4 Χρωματογραφία κατ' αντιρροή (Centrifugal Partition Chromatography, CPC)

Η χρωματογραφία κατ' αντιρροή αναπτύχθηκε αρχικά από τον Ito το 1964, με σκοπό την αποφυγή των μειονεκτημάτων της υγρής-στερεής χρωματογραφίας -με κυριότερο την απώλεια δείγματος- και συνεπώς, την επίτευξη υψηλότερων αποδόσεων. Αργότερα, βασισμένοι στην αρχή μεθόδου της χρωματογραφίας αυτής, οι Murayama et al. (1982) ανέπτυξαν έναν νέο τύπο χρωματογραφίας κατ' αντιρροή, το CPC. Αποτελεί μία μέθοδο υγρής-υγρής χρωματογραφίας, η οποία στερείται στερεής στατικής φάσης, και προϋποθέτει την ύπαρξη δύο μη αναμίξιμων υγρών φάσεων, στις οποίες κατανέμονται οι ουσίες του εκάστοτε μίγματος προς ανάλυση. Ο διαχωρισμός των επιμέρους ουσιών που περιέχονται στο μίγμα επιτυγχάνεται με βάση τους συντελεστές κατανομής τους στις δύο φάσεις του συστήματος διαλυτών (Angelis et al., 2021; Wanasundara & Fedec, 2002).

Η οργανολογία ενός τυπικού συστήματος χρωματογραφίας κατ' αντιρροή παρουσιάζεται στην *Εικόνα 25*. Συνοπτικά, η στατική και η κινητή φάση του επιλεγμένου διφασικού συστήματος διαλυτών εισάγονται διαδοχικά στη στήλη με τη βοήθεια αντλίας και ακολουθεί η έγχυση του δείγματος. Στη συνέχεια, πραγματοποιείται κλασμάτωση του δείγματος και διαχωρισμός των εμπεριεχομένων μεταβολιτών του μέσα στη χρωματογραφική στήλη. Μία τυπική στήλη CPC διαθέτει κυλινδρικό σχήμα και περιστρέφεται πάνω σε κεντρικό άξονα, ενώ αποτελείται, στο εσωτερικό της, από μία σειρά διαδοχικά συνδεδεμένων κυψελίδων. Η φυγόκεντρος δύναμη που αναπτύσσεται λόγω της περιστροφικής κίνησης της στήλης, εξασφαλίζει τη διατήρηση της στατικής φάσης μέσα στη στήλη, καθώς διέρχεται η κινητή φάση, επιτυγχάνοντας τελικά τον επιθυμητό διαχωρισμό. Οι ουσίες που εκλούνται από τη στήλη ανιχνεύονται από ανιχνευτή UV-Vis και καταγράφονται από Η/Υ. Τα επιμέρους κλάσματα που προκύπτουν κατά τη διάρκεια της ανάλυσης, συλλέγονται με τη βοήθεια αυτόματου συλλέκτη (Marchal et al., 2003; Michailidis et al., 2019).

Τα πλεονεκτήματα που παρουσιάζει η εφαρμογή της χρωματογραφίας κατ' αντιρροή είναι πολυάριθμα. Αρχικά, λόγω της απουσίας στερεής στατικής φάσης, επιτυγχάνεται ολική ανάκτηση του δείγματος, καθώς αποφεύγεται η μη αναστρέψιμη προσρόφηση ουσιών στην επιφάνεια της στατικής φάσης. Επιπρόσθετα, η τεχνική

αυτή παρουσιάζει υψηλή εκλεκτικότητα και αποτελεσματικότητα σε μεγάλο εύρος δειγμάτων, εξαιτίας της πληθώρας συνδυασμών διαλυτών που μπορούν να χρησιμοποιηθούν. Ακόμα, εμφανίζει υψηλή επαναληψιμότητα, ενώ μπορεί να χρησιμοποιηθεί και σε μεγάλη κλίμακα, για την κλασμάτωση μεγάλης ποσότητας δείγματος, λόγω της μεγάλης χωρητικότητας της χρωματογραφικής στήλης. Ιδιαίτερο πλεονέκτημα της χρωματογραφίας αυτής αποτελεί, επίσης, το γεγονός ότι χαρακτηρίζεται από χαμηλή κατανάλωση διαλυτών, το οποίο, σε συνδυασμό με τη δυνατότητα ανακύκλωσης και επαναχρησιμοποίησής τους εξαιτίας της υγρής τους φύσης, την κατατάσσει στις «πράσινες τεχνικές» (Angelis et al., 2017).



Εικόνα 25 Οργανολογία συστήματος χρωματογραφίας κατ' αντιρροή (CPC) (τροποποιημένο από Αντωνιάδη, 2019).

3.3 Ενδόφυτα Ελιάς: Απομόνωση, Μυκητοτοξική Δράση και Μοριακή Ταυτοποίηση

3.3.1 Απομόνωση ενδοφύτων από ιστούς ελιάς

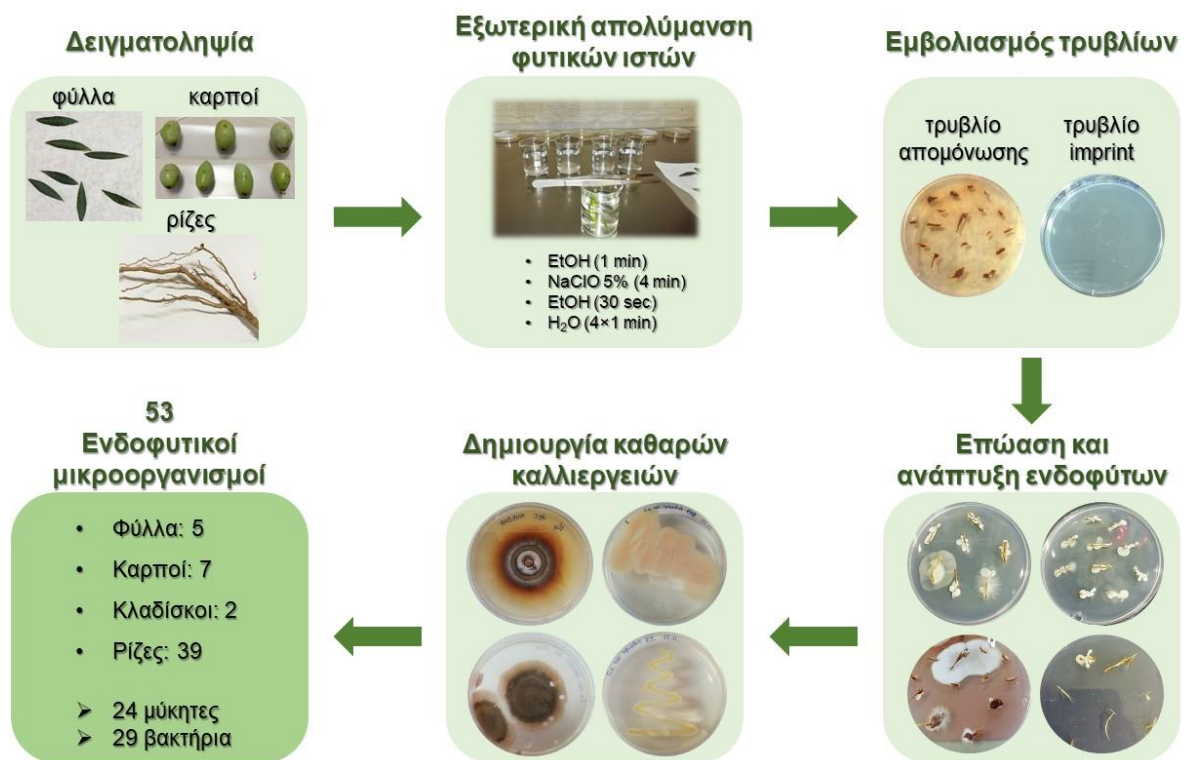
Για την απομόνωση ενδοφυτικών μικροοργανισμών, επιλέχθηκαν ελαιόδεντρα από την περιοχή της Μάνης, Κορωνέικης ποικιλίας, με γνώμονα την ευρωστία τους παρά την παντελή και μακρόχρονη έλλειψη εφαρμογής φυτοπροστατευτικών προϊόντων, η οποία θα μπορούσε να υποδηλώνει πιθανές ευεργετικές συμβιωτικές σχέσεις. Η τοποθεσία τους, μακριά από καλλιεργήσιμες εκτάσεις που δέχονται τακτικά την εφαρμογή χημικών μέσων φυτοπροστασίας αλλά και βιολογικών παραγόντων, αποτέλεσε έναν ακόμα παράγοντα για την εκλογή τους ως αρχικό βιολογικό υλικό της παρούσας μελέτης, καθώς η αλόγιστη χρήση φυτοφαρμάκων εμφανίζει συχνά αρνητικές επιπτώσεις και στο μικροβίωμα των φυτών.

Η δειγματοληψία πραγματοποιήθηκε από διάφορα μέρη των δέντρων, με αποτέλεσμα να προκύψουν δείγματα προς απομόνωση ενδοφύτων τόσο από τα υπέργεια (κλάδοι, φύλλα, καρποί) όσο και από τα υπόγεια (ρίζα, ριζικά τριχίδια) (Εικόνα 27) τμήματά τους. Ιδιαίτερη προσοχή δόθηκε στη λήψη αποκλειστικά υγιών φυτικών ιστών, απαλλαγμένων από μολύνσεις, τροφοπενίες και μεταχρωματισμούς.

Κατά την πειραματική διαδικασία της απομόνωσης (Εικόνα 26), αρχικά πραγματοποιήθηκε τεμαχισμός των φυτικών μερών σε μικρότερα κομμάτια. Ακολούθησε απολύμανση της εξωτερικής τους επιφάνειας, προκειμένου να αποφευχθεί η ανάπτυξη επιφυτικών μικροοργανισμών και να περιοριστεί η διαδικασία απομόνωσης αποκλειστικά στους ενδοφυτικούς μικροοργανισμούς των ιστών αυτών. Το πρωτόκολλο απολύμανσης περιλάμβανε τη διαδοχική εμβάπτιση των τεμαχίων σε αιθανόλη για 1 min, διάλυμα χλωρίνης 5% για 4 min, αιθανόλη για 30 sec και ολοκληρωνόταν με έκπλυση των τεμαχίων με απιονισμένο νερό. Στη συνέχεια, τα τεμάχια των ιστών τοποθετήθηκαν για μερικά δευτερόλεπτα στην επιφάνεια θρεπτικού υλικού PDA μέσα σε τρυβλίο, για τη λήψη δείγματος imprint. Τέλος, πραγματοποιήθηκαν τομές στα τεμάχια, για την ευχερέστερη έξοδο των ενδοφύτων, και οι φυτικοί ιστοί τοποθετήθηκαν σε τρυβλία με PDA (Εικόνα 28A). Η επώαση των τρυβλίων διεξάχθηκε σε επωαστικό θάλαμο, στους 22°C σε συνθήκες σκότους. Μετά την ανάπτυξη ενδοφυτικών μικροοργανισμών στα τρυβλία

απομόνωσης (*Εικόνα 28B-E*), έγιναν μεταφορές σε νέα τρυβλία με PDA για τη δημιουργία καθαρών καλλιεργειών (*Εικόνα 28F*). Όλοι οι προαναφερθέντες χειρισμοί πραγματοποιήθηκαν σε θάλαμο οριζόντιας νηματικής ροής (laminar) υπό ασηπτικές συνθήκες.

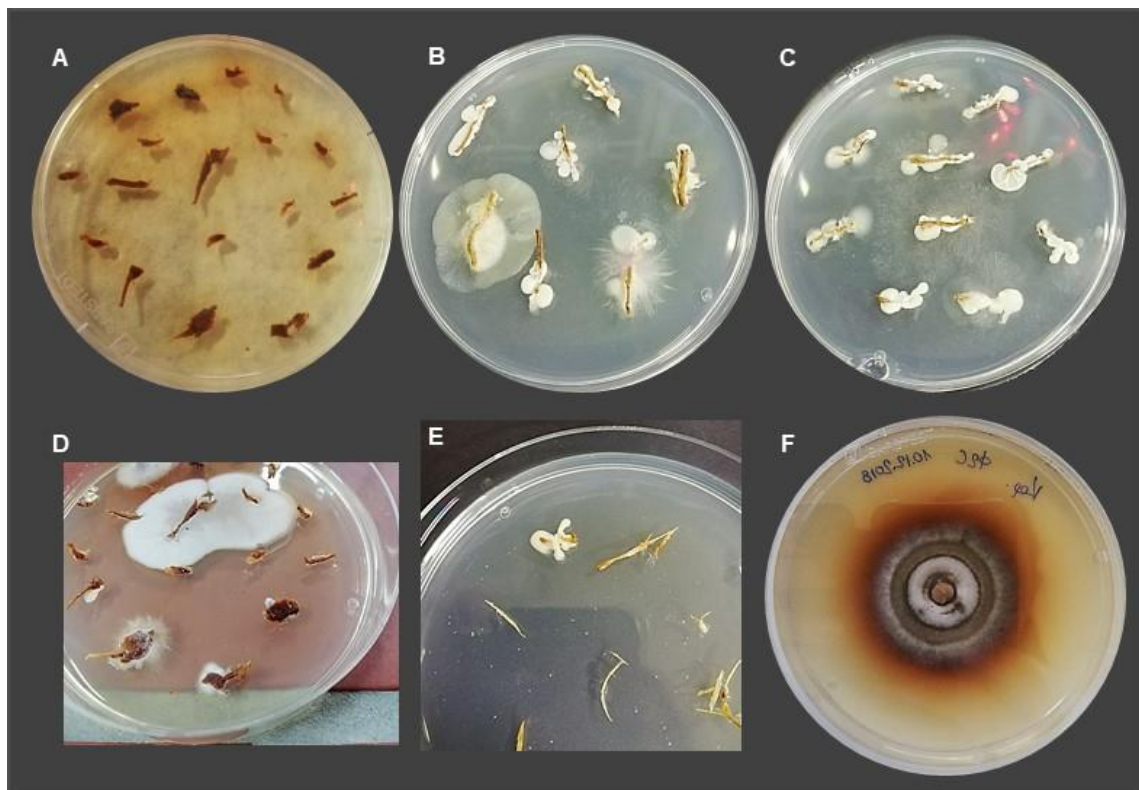
Από την παραπάνω διαδικασία προέκυψαν συνολικά 53 ενδόφυτα, 5 εκ των οποίων απομονώθηκαν από φύλλα, 7 από καρπούς, 2 από κλάδους και 39 από ρίζες και ριζικά τριχίδια. Από αυτά, 24 ήταν μύκητες και 29 βακτήρια. Η πλειοψηφία των ενδοφυτικών βακτηρίων απομονώθηκε από δείγματα υπόγειων φυτικών μερών, ενώ ενδοφυτικοί μύκητες εντοπίστηκαν τόσο σε υπέργειους όσο και σε υπόγειους φυτικούς ιστούς.



Εικόνα 26 Πειραματική πορεία απομόνωσης ενδοφυτικών μικροοργανισμών από ιστούς ελιάς.



Εικόνα 27 Δείγματα υπέργειων (κλάδοι, φύλλα, καρποί) και υπόγειων (ρίζα, ριζικά τριχίδια) φυτικών μερών ελιάς προς απομόνωση ενδοφυτικών μικροοργανισμών.



Εικόνα 28 Διαδικασία απομόνωσης ενδοφυτικών μικροοργανισμών από φυτικούς ιστούς (A) Τοποθέτηση των απολυμασμένων τεμαχίων φυτικού ιστού σε τρυβλίο με PDA (B-E) Ανάπτυξη ενδοφυτικών μικροοργανισμών (F) Καθαρή καλλιέργεια ενδοφυτικού μύκητα.

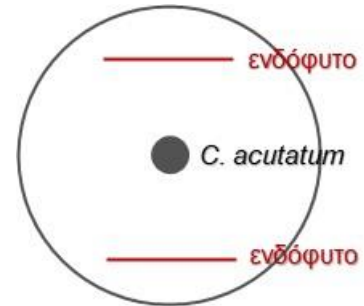
3.3.2 Δοκιμές ενδοφύτων ελιάς στο φυτοπαθογόνο μύκητα *Colletotrichum acutatum* (γλοιοσπόριο)

Τα ενδόφυτα που απομονώθηκαν από τους ιστούς ελιάς αξιολογήθηκαν εν συνεχεία ως προς τη δράση τους έναντι φυτοπαθογόνων μικροοργανισμών του φυτού. Για το σκοπό αυτό, ο εντοπισμός πιθανών δραστικών ενδοφύτων, πραγματοποιήθηκε με *in vitro* δοκιμές, μέσω συγκαλλιέργειάς τους με παθογόνα σε τρυβλία (plate confrontation assays) (Υ. Cao et al., 2018).

Ως παθογόνο της ελιάς επιλέχθηκε ο μύκητας *Colletotrichum acutatum*, υπεύθυνος για την εμφάνιση της ασθένειας γλοιοσπόριο, εξαιτίας των εκτεταμένων προσβολών που έχουν παρατηρηθεί τις τελευταίες κυρίως ελαιοκομικές περιόδους στην Ελλάδα και κυριότερα στην περιοχή της Πελοποννήσου, οι οποίες έχουν οδηγήσει σε σημαντικές οικονομικές απώλειες (Kolainis et al., 2020). Όπως αναφέρθηκε και στο θεωρητικό μέρος (§1.2.3), η ζημία αυτή έγκειται σε μείωση της ποσότητας αλλά και υποβάθμιση της ποιότητας των παραγόμενων προϊόντων, έως και εκμηδενισμό της παραγωγής σε πολλές περιπτώσεις, ενώ παράλληλα παρατηρείται και μια γενικότερη ελάττωση της παραγωγικής ικανότητας και διάρκειας ζωής των ίδιων των δέντρων. Τα παραπάνω προβλήματα εντείνουν την αναγκαιότητα εύρεσης νέων μεθόδων αντιμετώπισής του.

Συνολικά, δοκιμάστηκαν 17 ενδόφυτα (13 βακτήρια και 4 μύκητες) έναντι των δύο στελεχών γλοιοσπορίου, του PLS_90 (περισσότερο ευαίσθητο σε φ.π.) και του PLS_88 (λιγότερο ευαίσθητο σε φ.π.). Ως θρεπτικό υπόστρωμα των τρυβλίων συγκαλλιέργειας, χρησιμοποιήθηκε το στερεό υλικό PDA, ενώ για τον εμβολιασμό των τρυβλίων με τα δύο στελέχη του παθογόνου μύκητα έγινε χρήση καλλιεργειών 14 ημερών. Με τη βοήθεια φελλοτρυπητήρα λήφθηκαν από την περιφέρεια των αρχικών καλλιεργειών του γλοιοσπορίου κυκλικά εμβόλια διαμέτρου 5 mm και τοποθετήθηκαν στο κέντρο των νέων τρυβλίων. Στη συνέχεια, στην περίπτωση των βακτηριακών ενδοφύτων, πραγματοποιήθηκε μεταφορά εναιωρήματός τους με βακτηριακό κρίκο (streaking) στις δύο άκρες των τρυβλίων, σε ίση απόσταση από το κυκλικό εμβόλιο του παθογόνου μύκητα. Κατά αντιστοιχία, στην περίπτωση των ενδοφυτικών μυκήτων, πραγματοποιήθηκε μεταφορά κυκλικών εμβολίων τους διαμέτρου 5 mm στις δύο άκρες των νέων τρυβλίων, σε ίση απόσταση από το

εμβόλιο του παθογόνου μύκητα (*Εικόνα 29*). Η διαδικασία πραγματοποιήθηκε σε θάλαμο οριζόντιας νηματικής ροής (laminar) υπό ασηπτικές συνθήκες. Τέλος, τα τρυβλία τυλίχθηκαν με ταινία parafilm και επωάστηκαν σε θάλαμο θερμοκρασίας 22°C υπό σκοτάδι, για περίπου 14 ημέρες.



Εικόνα 29 Διάταξη των στελεχών ενδοφύτων και γλοιοσπορίου κατά την *in vitro* συγκαλλιέργειά τους.

Αποτελέσματα δοκιμών

Η επιλογή των δραστικών ενδοφύτων για τη συνέχιση της μελέτης τους βασίστηκε στον ποιοτικό χαρακτηρισμό της εικόνας των τρυβλίων όπου πραγματοποιήθηκαν οι συγκαλλιέργειες, λαμβάνοντας υπόψιν την ύπαρξη ή όχι παρεμποδιστικής ζώνης μεταξύ του εκάστοτε παθογόνου στελέχους και του υποψήφιου ενδοφυτικού μικροοργανισμού (*Πίνακας 11*). Με βάση τον ποιοτικό αυτό έλεγχο διαπιστώθηκε ότι:

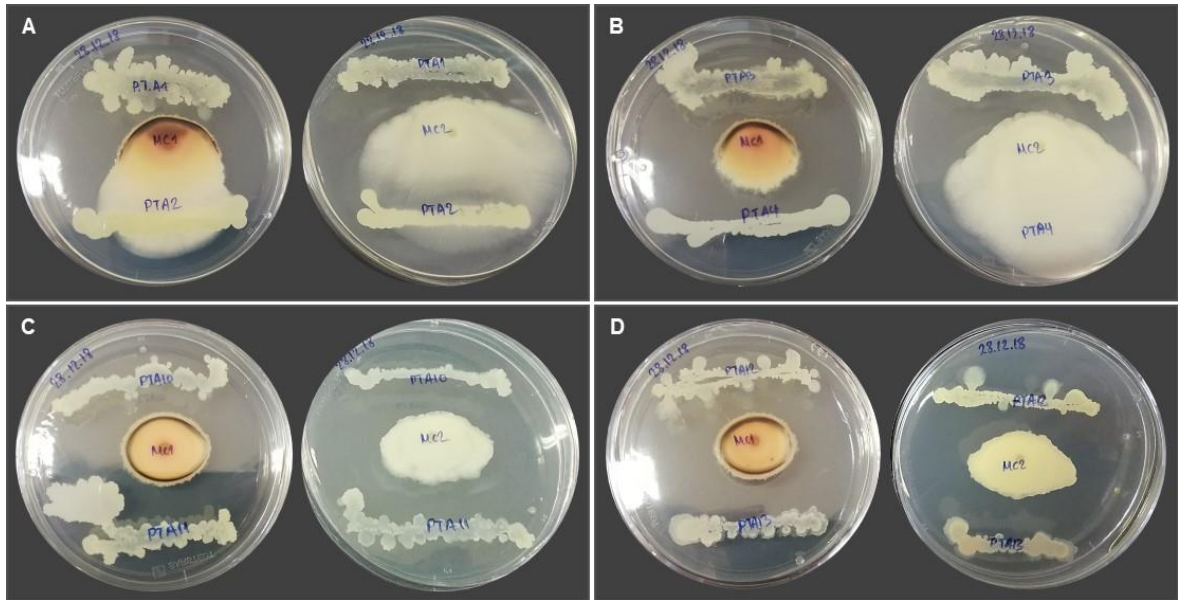
- Τα ενδόφυτα PTA1, PTA3, PTA10, PTA11, PTA12, PTA13 παρουσίασαν εκτεταμένη ζώνη παρεμπόδισης της ανάπτυξης και των δύο στελεχών του παθογόνου μύκητα (*Εικόνα 30*). Η διάμετρος της αποικίας τόσο του ευαίσθητου όσο και του ανθεκτικού στελέχους *C. acutatum* παρέμεινε περιορισμένη μετά το πέρας των 14 ημερών, ενώ και η μορφολογία τους εμφάνισε διαφοροποιήσεις, την πιο διακριτή από τις οποίες αποτέλεσε ο σκούρος μυκηλιακός χρωματισμός στην περίμετρο της αποικίας του στελέχους PLS_90.
- Τα ενδόφυτα PTA15, PA5, PB1, F2C εμφάνισαν μέτρια παρεμπόδιση της ανάπτυξης των δύο στελεχών του γλοιοσπορίου (*Εικόνα 31*). Παρουσιάστηκε στενή ζώνη μεταξύ των ενδοφύτων και των φυτοπαθογόνων μυκήτων, με επιβράδυνση της ανάπτυξης του *C. acutatum*.
- Τα ενδόφυτα PTA2, PTA4, PTA6, PTA8, PTA9, PA3, PC1 δεν παρουσίασαν καμία παρεμποδιστική δράση έναντι της ανάπτυξης και των δύο στελεχών *C. acutatum* (*Εικόνα 32*). Κατά τη διακοπή της επώασης των τρυβλίων συγκαλλιέργειας, παρατηρήθηκε ότι το μυκήλιο των μυκήτων είχε επικαλύψει την ανάπτυξη των ενδοφύτων και δεν είχε σχηματιστεί καμία ενδιάμεση ζώνη.

Τα ενδόφυτα που εμφάνισαν εκτεταμένη ζώνη παρεμπόδισης στις παραπάνω βιοδοκιμές (*Εικόνα 30*) επιλέχθηκαν για περαιτέρω μελέτη προκειμένου να

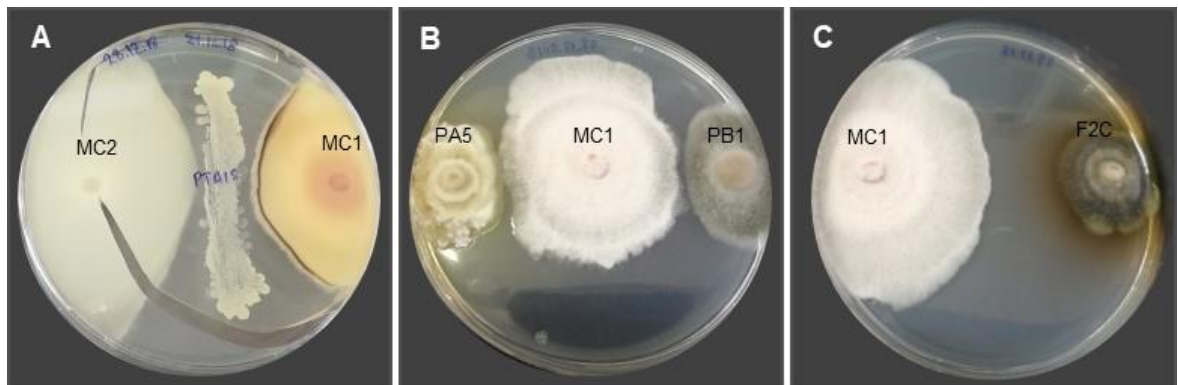
εντοπιστούν οι παράγοντες εκείνοι που τους προσδίδουν δράση και επιφέρουν ελάττωση της μυκηλιακής ανάπτυξης του μύκητα *C. acutatum*. Συνολικά, όλοι οι ενδοφυτικοί μικροοργανισμοί που εμφάνισαν ισχυρή παρεμποδιστική δράση εναντίον της ανάπτυξης και των δύο στελεχών του παθογόνου αποτελούν βακτήρια, που απομονώθηκαν από τα υπόγεια φυτικά μέρη των ελαιοδέντρων.

Πίνακας 11 Αξιολόγηση της δράσης ενδοφυτικών μικροοργανισμών ελιάς έναντι των 2 στελεχών γλοιοσπορίου MC1, MC2, όπως προέκυψε από τις παρατηρούμενες ζώνες παρεμπόδισης της ανάπτυξης του παθογόνου κατά τη συγκαλλιέργειά του με τα ενδόφυτα.

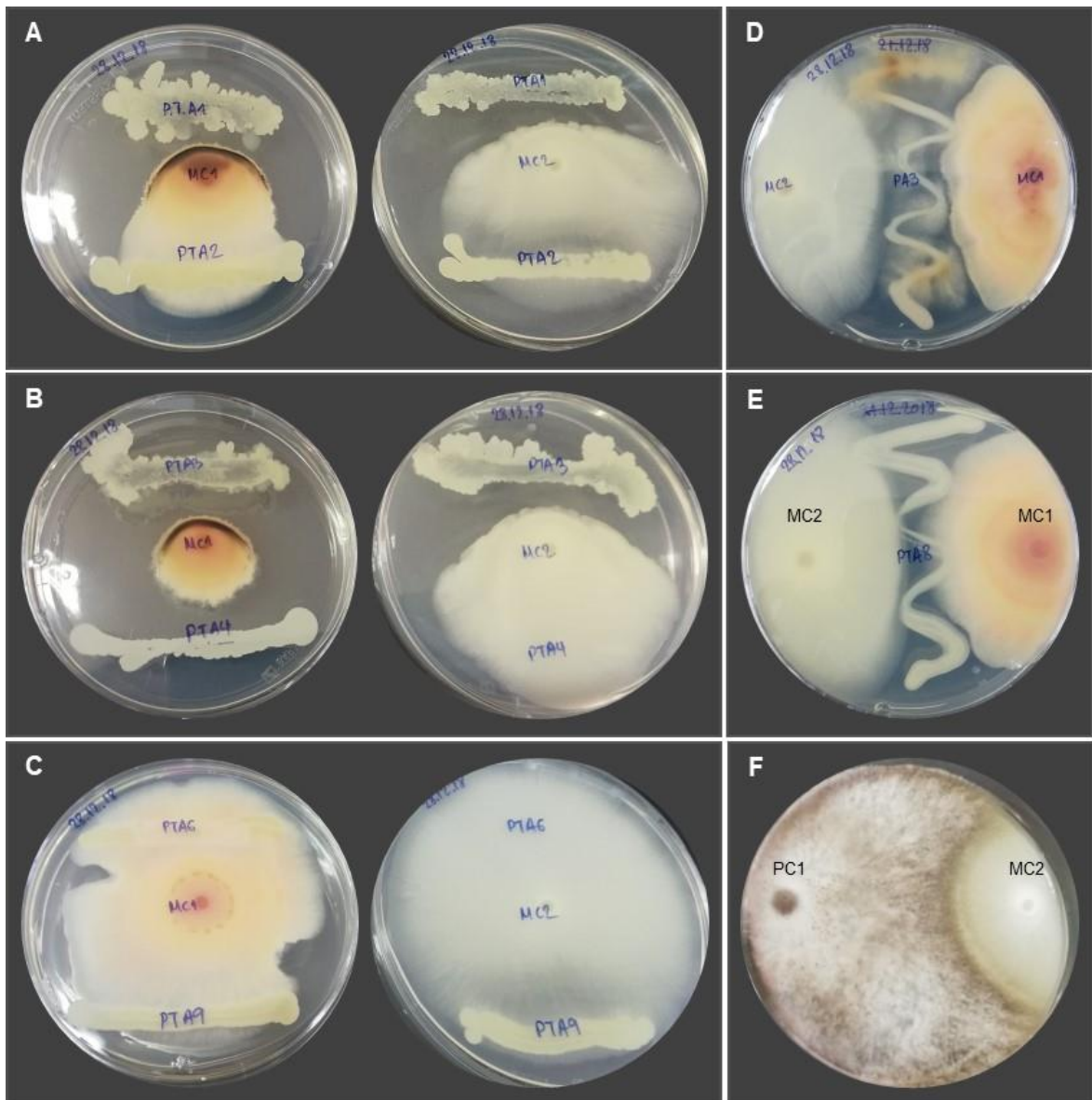
Ενδόφυτα	Παρεμποδιστική δράση		
	Ισχυρή	Μέτρια	Ασθενής
PTA1	+		
PTA2			+
PTA3	+		
PTA4			+
PTA6			+
PTA8			+
PTA9			+
PTA10	+		
PTA11	+		
PTA12	+		
PTA13	+		
PTA15		+	
PA3			+
PA5		+	
PB1		+	
PC1			+
F2C		+	



Εικόνα 30 Ενδόφυτα ελιάς με υψηλή ικανότητα παρεμπόδισης της ανάπτυξης των 2 στελεχών γλοιοσπορίου MC1 (αριστερά), MC2 (δεξιά), κατά τη συγκαλλιέργειά τους (dual culture assay) (A) PTA1, (B) PTA3, (C) PTA10, PTA11, (D) PTA12, PTA13.



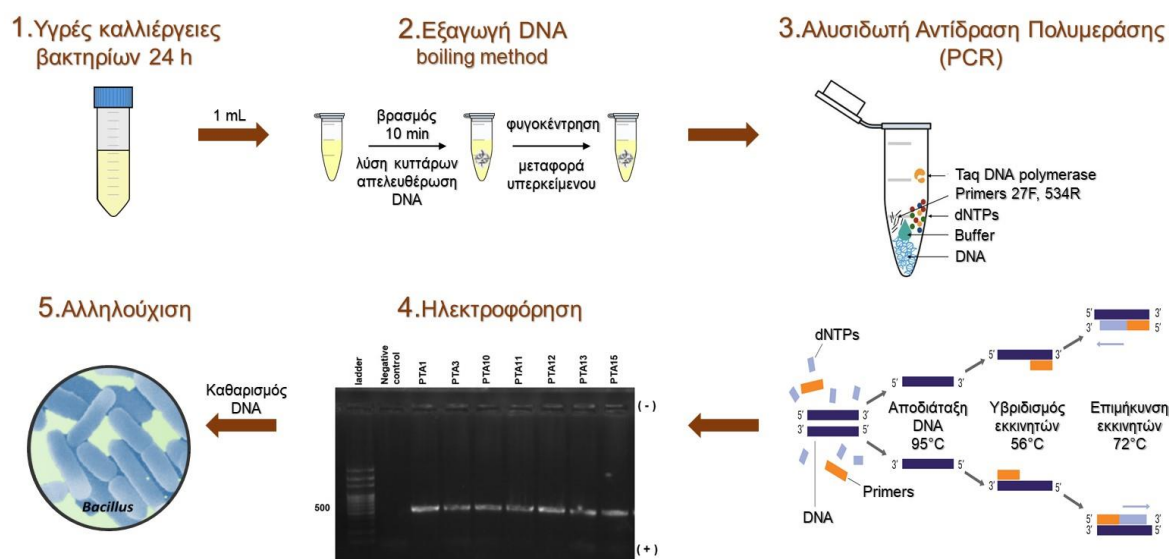
Εικόνα 31 Ενδόφυτα ελιάς με μέτρια ικανότητα παρεμπόδισης της ανάπτυξης των 2 στελεχών γλοιοσπορίου MC1, MC2, κατά τη συγκαλλιέργειά τους (dual culture assay) (A) PTA15, (B) PA5, PB1, (C) F2C.



Εικόνα 32 Ενδόφυτα ελιάς χωρίς ικανότητα παρεμπόδισης της ανάπτυξης των 2 στελεχών γλοιιοσπορίου MC1, MC2, κατά τη συγκαλλιέργειά τους (dual culture assay) (A) PTA2, (B) PTA4, (C) PTA6, PTA9, (D) PA3, (E) PTA8, (F) PC1.

3.3.3 Μοριακή ταυτοποίηση των δραστικών ενδοφύτων

Τα ενδοφυτικά βακτήρια που εμφάνισαν τη μεγαλύτερη ικανότητα παρεμπόδισης της μυκηλιακής ανάπτυξης των παθογόνων στελεχών *C. acutatum* στις *in vitro* συγκαλλιέργειες, επιλέχθηκαν για ανάλυση μέσω μοριακών τεχνικών, με σκοπό την ταυτοποίησή τους. Συνοπτικά, πραγματοποιήθηκε αρχικά εξαγωγή του DNA των βακτηρίων από υγρές καλλιέργειές τους, το οποίο χρησιμοποιήθηκε στη συνέχεια για την εφαρμογή αλυσιδωτής αντίδρασης πολυμεράσης (PCR), με επιλεγμένο ζεύγος εκκινητών. Ακολούθησε ηλεκτροφόρηση των προϊόντων που προέκυψαν από την PCR για την επιβεβαίωση της ενίσχυσης των επιθυμητών τμημάτων DNA από τα βακτήρια και μετά τον καθαρισμό τους, τα δείγματα εστάλησαν για αλληλούχιση (Εικόνα 33).



Εικόνα 33 Πειραματική πορεία ταυτοποίησης των δραστικών ενδοφύτων με εφαρμογή μοριακών τεχνικών.

3.3.3.1 Εξαγωγή DNA των δραστικών ενδοφυτικών βακτηρίων

Νέες καλλιέργειες των υπό μελέτη βακτηρίων πραγματοποιήθηκαν με εμβολιασμό 20 mL υγρού θρεπτικού υλικού LB με 1% εναιώρημα βακτηρίων από stock γλυκερόλης αποθηκευμένο στους -80°C και επωάστηκαν στους 28°C υπό συνθήκες σκότους και συνεχή ανάδευση (120 rpm) για 24 h. Μετά το πέρας των 24 h, μεταφέρθηκε 1 mL από κάθε καλλιέργεια σε Eppendorf tubes και ακολούθησε βρασμός για 10 min, με στόχο τη λύση των κυτταρικών και πυρηνικών μεμβρανών και την απελευθέρωση των εμπεριεχομένων μορίων, συμπεριλαμβανομένου και του DNA (boiling method) (Queiro-Ortuño et al., 2008). Στη συνέχεια, τα tubes φυγοκεντρήθηκαν για 2 min στα 13000 rpm και 5 μL από το υπερκείμενο διάλυμα μεταφέρθηκαν σε νέο tube. Τέλος, για κάθε δείγμα πραγματοποιήθηκε αραιώση 1:20 (1 μL υπερκείμενου και 19 μL H_2O). Το αραιωμένο DNA χρησιμοποιήθηκε στη συνέχεια για την εκτέλεση της PCR.

3.3.3.2 Αλυσιδωτή αντίδραση πολυμεράσης (Polymerase Chain Reaction, PCR)

Για τη διεξαγωγή της PCR χρησιμοποιήθηκε το ζεύγος εκκινητών 27F-534R (universal primers) (Πίνακας 12), που ενισχύει τις θέσεις 27 και 534 αντίστοιχα των βακτηριακών γονιδίων 16S rRNA (Scott et al., 2018). Η ενίσχυση των τμημάτων των γονιδίων αυτών πραγματοποιήθηκε με αντιδράσεις PCR 50 μL σε θερμικό κυκλοποιητή MJ Research PTC-200 Thermal Cycler (Marshall Scientific). Κάθε αντίδραση περιείχε τα εξής:

- 25 μL DreamTaq Green PCR Master Mix (2x) (ThermoScientific LSG)
- 2 μL Forward primer 1 μM
- 2 μL Reverse primer 1 μM
- 1 μL DNA
- 20 μL H_2O nuclease-free

Παράλληλα με τις αντιδράσεις των δειγμάτων, εφαρμόστηκε PCR και σε αρνητικό μάρτυρα (negative control), το δείγμα του οποίου περιείχε όλα τα παραπάνω συστατικά, χωρίς την προσθήκη DNA στόχου.

Οι αντιδράσεις πραγματοποιήθηκαν με βάση το παρακάτω πρωτόκολλο [τροποποιημένο από (Scott et al., 2018)]:

- i. 3 min στους 95°C (αρχική αποδιάταξη του DNA)
- ii. 30 sec στους 95°C (αποδιάταξη του DNA)
- iii. 30 sec στους 56°C (υβριδισμός των εκκινητών)
- iv. 1 min στους 72°C (επιμήκυνση των εκκινητών)
- v. 34 κύκλοι επί τα στάδια ii, iii, iv
- vi. 3 min στους 72°C (τελική επιμήκυνση)

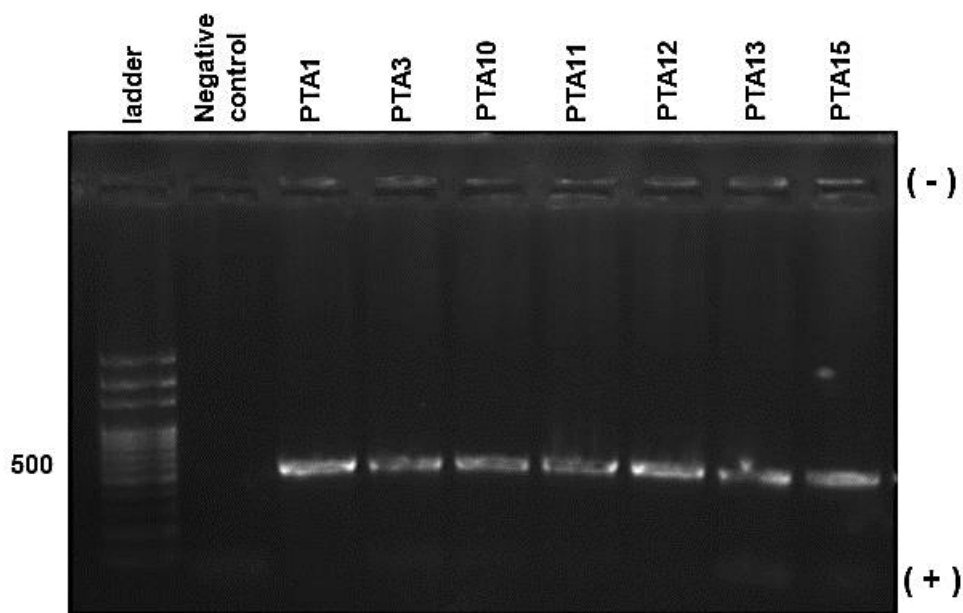
Πίνακας 12 Ζεύγος εκκινητών βακτηρίων (universal primers) που χρησιμοποιήθηκε για την ταυτοποίηση των άγνωστων ενδοφυτικών βακτηρίων.

<i>Primer</i>	<i>Sequence</i>
27F	5'-AGAGTTTGATCCTGGCTCAG-3'
534R	3'-ATTACCGCGGCTGCTGGCA-5'

3.3.3.3 Ηλεκτροφόρηση και καθαρισμός DNA

Μετά την ολοκλήρωση της PCR, πραγματοποιήθηκε ηλεκτροφόρηση των προϊόντων της αντίδρασης. Για το σκοπό αυτό, παρασκευάστηκε πηκτή (gel) αγαρόζης 1% w/v, προσθέτοντας 1 g αγαρόζης σε κωνική φιάλη με 100 mL ρυθμιστικού διαλύματος TAE και θερμαίνοντας το μίγμα μέχρι να γίνει διαυγές. Στη συνέχεια, προστέθηκαν στο διάλυμα 8 μL βρωμιούχου αιθιδίου (EtBr) συγκέντρωσης 10 $\text{mg}\cdot\text{mL}^{-1}$ (Sigma-Aldrich), προκειμένου να καταστεί δυνατή η οπτικοποίηση των αποτελεσμάτων μέσω φθορισμού του κάτω από πηγή UV ακτινοβολίας. Το gel αγαρόζης τοποθετήθηκε σε κατάλληλο εκμαγείο και αφέθηκε σε ηρεμία υπό συνθήκες σκότους (λόγω φωτοευαισθησίας του EtBr) μέχρι τη στερεοποίησή του. Στις θέσεις υποδοχής της πηκτής αγαρόζης προστέθηκαν 6 μL κάθε δείγματος, 6 μL του αρνητικού μάρτυρα, καθώς και 10 μL οδηγού μοριακού μεγέθους (DNA hyper ladder 100bp). Ακολούθησε ηλεκτροφόρηση για 40 min με εφαρμογή ηλεκτρικής τάσης 100 V. Τέλος, το gel τοποθετήθηκε κάτω από λάμπα UV για την εξέταση των αποτελεσμάτων (*Εικόνα 34*). Η εμφάνιση ζωνών στα δείγματα των ενδοφύτων και η απουσία ζώνης στον αρνητικό μάρτυρα επιβεβαίωσε

την επιτυχή ενίσχυση των επιθυμητών τμημάτων γενωμικού DNA από τα ενδοφυτικά βακτήρια. Ακολούθησε καθαρισμός των τμημάτων DNA που ενισχύθηκαν με τη διαδικασία της PCR, για την αποστολή τους για αλληλούχιση. Ο καθαρισμός των δειγμάτων πραγματοποιήθηκε με το NucleoSpin® Gel and PCR Clean-up Kit (Macherey-Nagel), σύμφωνα με τις οδηγίες του κατασκευαστή.

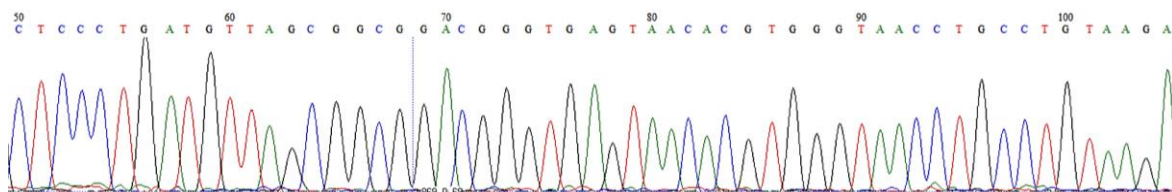


Εικόνα 34 Ηλεκτροφόρηση των προϊόντων της PCR, ενισχυμένων με το ζεύγος εκκινητών 27F-534R, σε πηκτή αραρόζης 1% w/v.

3.3.3.4 Υπολογισμός της συγκέντρωσης του απομονωμένου DNA των βακτηρίων και αλληλούχισή του

Μετά τον καθαρισμό του γενωμικού DNA των βακτηρίων, πραγματοποιήθηκε χρήση του φασματοφωτομέτρου Nanodrop ND-2000C (Thermo Scientific), με σκοπό την εκτίμηση της συγκέντρωσης (σε $\text{ng}\cdot\mu\text{L}^{-1}$) και καθαρότητας του DNA των δειγμάτων. Τα νουκλεϊκά οξέα εμφανίζουν μέγιστο απορρόφησης στα 260 nm, ενώ οι πρωτεΐνες, ως δευτερεύοντα μόρια που απομονώνονται μαζί με το DNA κατά τη διαδικασία εξαγωγής του, εμφανίζουν μέγιστο απορρόφησης στα 280 nm. Έτσι, η καθαρότητα ενός δείγματος σε DNA εκτιμάται βάσει του λόγου 260 nm/280 nm, με τιμή κυμαινόμενη από 1,8 έως 2,0 (βέλτιστη 1,8) για ένα καθαρό δείγμα. Όλα τα δείγματα των βακτηρίων που αναλύθηκαν εμφάνισαν λόγο 260/280~1,8 (1,8-1,9). Στη συνέχεια, τα δείγματα DNA αραιώθηκαν με νερό απαλλαγμένο από νουκλεάσες (nuclease-free H_2O) μέχρι τελικής συγκέντρωσης $40 \text{ ng}\cdot\mu\text{L}^{-1}$ και εστάλησαν για

αλληλούχιση στην εταιρεία CeMIA (Cellular and Molecular Immunological Applications, CeMIA SA, Greece). Στην [Εικόνα 35](#) παρουσιάζεται ενδεικτικά ένα από τα χρωματογραφήματα νουκλεοτιδικής αλληλουχίας του γονιδίου-στόχου που λήφθηκαν μετά την αλληλούχιση του DNA των ενδοφυτικών βακτηρίων. Παρατηρείται εξαιρετικά καλός διαχωρισμός των κορυφών και μη αλληλοεπικάλυψή τους, στοιχεία που επιβεβαιώνουν την επιτυχή διαδικασία αλληλούχισης των δειγμάτων. Τα συνολικά αποτελέσματα της αλληλούχισης παρουσιάζονται στον [Πίνακα 13](#), μαζί με τα αντίστοιχα της χρήσης του λογισμικού BLASTn (NCBI), σύμφωνα με τα οποία, όλα τα ενδοφυτικά βακτήρια που αναλύθηκαν με μοριακές τεχνικές προσδιορίστηκαν σε επίπεδο γένους και ταυτοποιήθηκαν ως *Bacillus* sp.



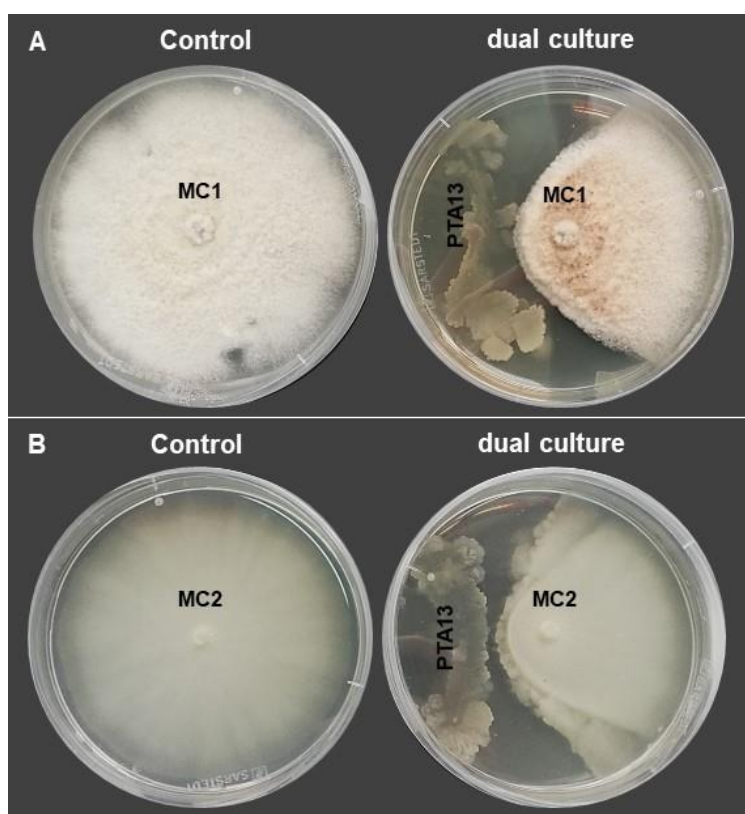
[Εικόνα 35](#) Τμήμα χρωματογραφήματος νουκλεοτιδικής αλληλουχίας του γονιδίου 16S rRNA του ενδοφυτικού βακτηρίου PTA13.

[Πίνακας 13](#) Αποτελέσματα της αλληλούχισης των ενισχυμένων τμημάτων DNA των δραστικών ενδοφυτικών βακτηρίων PTA1, PTA3, PTA11, PTA13.

Endophyte	Primer pair	Sequence	Blast results
PTA1	27F-534R	ATGGCAARGTCGAGCGGACAGATGGGAGCTTGCTCCCTGATGTTAGCGGC GGACGGKTGAGTAAWCGTGGGTTCCTGCCTGAAGACTGGGATACTCCYGG AAYCGGTGCTAAWCCGGATGGTTGACTGAACCGCATGGTAC	<i>Bacillus velezensis</i> , <i>B. amyloliquefaciens</i> , <i>B. subtilis</i> , <i>B. vallismortis</i>
PTA3	27F-534R	ATACATGCAARTCGAGCGGACAGATGGGAGCTTGCTCCCTGATGTTAGCGG CGGACGGGTGAGTAACACGTGGGTAACTGCCTGTAAGACTGGGATAACTC CGGGAAACCGGGCTAATACCGGATGGTTGTTGAACC	<i>B. siamensis</i> , <i>B. velezensis</i> , <i>B. amyloliquefaciens</i> , <i>B. subtilis</i> , <i>B. vallismortis</i> , <i>B. atrophaeus</i> , <i>B. vietnamensis</i>
PTA11	27F-534R	CTAATACATGCAGTCGAGCGGACAGATGGGAGCWTGCTCCCTGATGTTAGC GGCGGACGGGTGAGTAAC	<i>B. siamensis</i> , <i>B. velezensis</i> , <i>B. amyloliquefaciens</i> , <i>B. subtilis</i> , <i>B. vallismortis</i> , <i>B. atrophaeus</i> , <i>B. paralicheniformis</i> , <i>B. halotolerance</i> , <i>B. vietnamensis</i>
PTA13	27F-534R	ATACATGCAAGTCGAGCGGACAGATGGGAGCTTGCTCCCTGATGTTAGCGG CGGACGGGTGAGTAACACGTGGGTAACTGCCTGTAAGACTGGGATAACTC CGGGAAACCGGGCTAATACCGGATGSTTGTGTTGAACCGCATGG	<i>B. siamensis</i> , <i>B. velezensis</i> , <i>B. amyloliquefaciens</i> , <i>B. subtilis</i> , <i>B. vallismortis</i> , <i>B. atrophaeus</i> , <i>B. licheniformis</i> , <i>B. halotolerance</i> , <i>B. vietnamensis</i>

3.3.4 Επισκόπηση απομόνωσης και μελέτης της βιοδραστικότητας ενδοφυτικών μικροοργανισμών ελιάς

Οι εργασίες απομόνωσης ενδοφύτων ελιάς οδήγησαν στην παραλαβή 53 μικροοργανισμών, εκ των οποίων 29 είναι βακτηριακά στελέχη ενώ 24 ανήκουν στους μύκητες. Από αυτά, 5 απομονώθηκαν από τα φύλλα, 7 από καρπούς, 2 από κλάδους και 39 από ρίζες και ριζικά τριχίδια. Τα πειράματα ελέγχου της δραστηρότητάς τους έναντι του γλοιοσπορίου έδειξαν ότι 6 ενδόφυτα φαίνεται να διαθέτουν ισχυρή δράση. Σημαντικό είναι να τονιστεί ότι όλα τα δραστικά στελέχη είναι βακτήρια και πιο συγκεκριμένα, ανήκουν στο γένος *Bacillus* σύμφωνα με τις μελέτες μοριακής ταυτοποίησης που πραγματοποιήθηκαν. Το ενδοφυτικό βακτήριο PTA13 που απομονώθηκε από τις ρίζες τις ελιάς, έδειξε την ισχυρότερη δράση έναντι και των 2 στελεχών του γλοιοσπορίου (εκτεταμένη ζώνη παρεμπόδισης της ανάπτυξης των μυκήτων, *Εικόνα 36*). Ως εκ τούτου, το ενδόφυτο αυτό επιλέχθηκε για περαιτέρω μελέτη στα πλαίσια της παρούσας μεταπτυχιακής εργασίας.

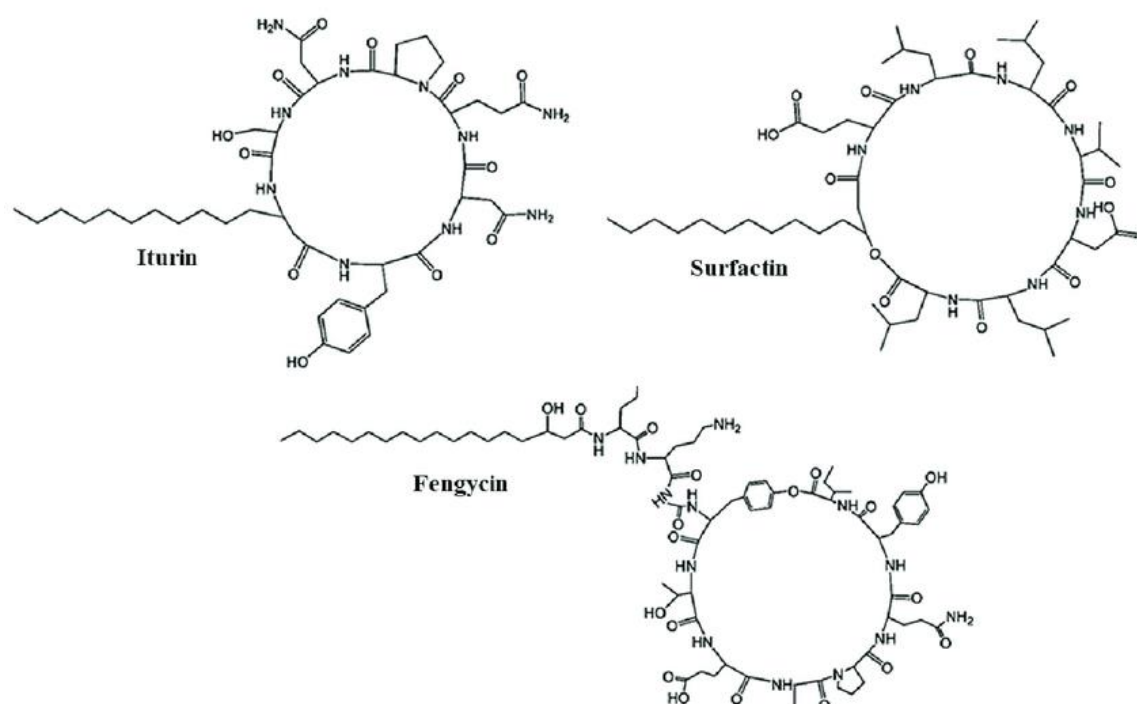


Εικόνα 36 Συγκαλλιέργεια του ενδοφυτικού βακτηρίου PTA13 με τα δύο στελέχη του παθογόνου μύκητα *Colletotrichum acutatum* PLS_90 (MC1) (A), PLS_88 (MC2) (B).

3.4 Ενδοφυτικό βακτήριο PTA13: Παραλαβή και ανάλυση του δραστικού λιποπεπτιδικού κλάσματος

Όπως αναφέρθηκε και στο θεωρητικό μέρος, τα βακτήρια του γένους *Bacillus* παρομοιάζονται συχνά με μικροβιακά εργοστάσια, εξαιτίας της πληθώρας και δομικής ποικιλίας μεταβολιτών που παράγουν, πολλοί από τους οποίους εμφανίζουν παρεμποδιστική δράση έναντι πολλών φυτοπαθογόνων (Ongena & Jacques, 2008). Συγκεκριμένα, με βάση τη βιβλιογραφία, τα βακτήρια *Bacillus* sp. έχουν μελετηθεί εκτενώς για την παραγωγή δραστικών δευτερογενών μεταβολιτών που ανήκουν στη χημική ομάδα των λιποπεπτιδίων (ουσίες με ένα πεπτιδικό δακτύλιο και μια αλυσίδα λιπαρού οξέος) (X. H. Chen et al., 2008; Kaspar et al., 2019b; Penha et al., 2020a) (Εικόνα 37).

Στην παρούσα μεταπτυχιακή εργασία, επιλέχθηκε και μελετήθηκε εκτενώς ένα από τα ενδοφυτικά βακτήρια που εμφάνισαν υψηλά επίπεδα δραστικότητας στις αρχικές βιοδοκιμές εναντίον του γλοισσπορίου και τα οποία ταυτοποιήθηκαν μοριακά ως στελέχη του γένους *Bacillus*, το PTA13. Πρωταρχικός στόχος αποτέλεσε η παραλαβή του λιποπεπτιδικού κλάσματος του βακτηρίου, η χημική ανάλυσή του και η εκτίμηση της δράσης των εμπεριεχομένων μεταβολιτών έναντι του γλοισσπορίου.



Εικόνα 37 Κύριες κατηγορίες λιποπεπτιδίων που παράγονται από βακτήρια του γένους *Bacillus*.

3.4.1 Καλλιέργεια του βακτηρίου PTA13 και παραλαβή του δραστικού λιποπεπτιδικού κλάσματος

Για την καλλιέργεια του PTA13 σε μεγάλη κλίμακα, πραγματοποιήθηκε αρχικά εμβολιασμός 20 mL υγρού θρεπτικού υλικού LB με 1% εναιώρημα βακτηρίου από stock γλυκερόλης αποθηκευμένο στους -80°C . Η επώαση της καλλιέργειας πραγματοποιήθηκε στους 28°C για 48 ώρες υπό συνεχή ανάδευση (120 rpm) και σε συνθήκες σκότους, ενώ μετά το πέρας των 2 ημερών, 3 mL καλλιέργειας μεταφέρθηκαν σε κωνικές φιάλες 500 mL που περιείχαν 300 mL LB. Μετά από 48 ώρες επώασης κάτω από τις προαναφερθείσες συνθήκες, διεξάχθηκε αφαίρεση των βακτηριακών κυττάρων με φυγοκέντρηση (8.500 rpm, 20 min, 4°C) και παραλαβή του υπερκείμενου διαλύματος.

Ο διαχωρισμός του δραστικού λιποπεπτιδικού κλάσματος από τις υπόλοιπες ουσίες του υπερκείμενου διαλύματος βασίστηκε σε γνωστά πρωτόκολλα και πραγματοποιήθηκε με όξινη κατακρήμνιση των λιποπεπτιδίων (Arima et al., 1968; Dimkic et al., 2017). Για το σκοπό αυτό, προστέθηκε στο υπερκείμενο ποσότητα διαλύματος HCl συγκέντρωσης 6M έως pH=2 και ακολούθησε διατήρησή του στους 4°C κατά τη διάρκεια της νύχτας (περίπου 18 h). Το παραγόμενο ίζημα συλλέχθηκε με φυγοκέντρηση (8.500 rpm, 20 min, 4°C), ενώ το υπερκείμενο διάλυμα που δεν υπέστη κατακρήμνιση συμπυκνώθηκε και αποθηκεύτηκε ως ξεχωριστό κλάσμα.

Ο περαιτέρω καθαρισμός του λιποπεπτιδικού κλάσματος επετεύχθη με την εκχύλιση του ιζήματος με 100 mL $\text{CHCl}_3:\text{MeOH}$ 2:1 (v/v) (H. S. Kim et al., 1997; P. I. Kim et al., 2004). Η διαδικασία επαναλήφθηκε τρεις φορές από 30 min σε λουτρό υπερήχων για την επίτευξη εξαντλητικής εκχύλισης και στη συνέχεια, το εκχύλισμα διηθήθηκε και συμπυκνώθηκε σε περιστροφικό συμπυκνωτή (Buchi Rotovapor R-210; Buchi, Inc., Flawil, Switzerland).

Εξαιτίας της χαμηλής απόδοσης της καλλιέργειας του βακτηρίου σε λιποπεπτίδια, η παραπάνω διαδικασία χρειάστηκε να επαναληφθεί αρκετές φορές προκειμένου να ανακτηθεί ικανοποιητική ποσότητα εκχυλίσματος του ιζήματος για την περαιτέρω ανάλυσή του και τη χρήση του σε βιολογικούς ελέγχους. Ενδεικτικά, η καλλιέργεια 1 L βακτηρίου είχε ως αποτέλεσμα την παραγωγή 345 mg εκχυλίσματος ιζήματος. Η παραπάνω διαδικασία περιγράφεται σχηματικά στην [Εικόνα 38](#).



Εικόνα 38 Πειραματική πορεία όξινης κατακρήμνισης και παραλαβής του λιποπεπτιδικού κλάσματος από καλλιέργεια του βακτηρίου PTA13.

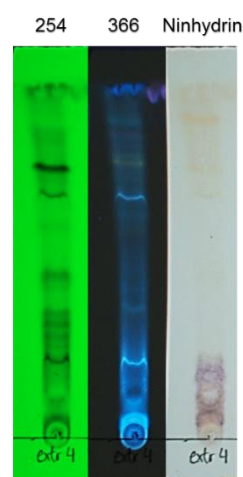
3.4.2 Ανάλυση του δραστικού λιποπεπτιδικού κλάσματος

Μετά τη διαδικασία παραλαβής και καθαρισμού του λιποπεπτιδικού κλάσματος του βακτηρίου, ακολούθησε ανάλυσή του με χρήση χρωματογραφικών και φασματοσκοπικών τεχνικών. Στόχος της αποτέλεσε η ταυτοποίηση των εμπιεχομένων μεταβολιτών του λιποπεπτιδικού εκχυλίσματος, για την περαιτέρω κατανόηση της δράσης του. Στην προσπάθεια αυτή, διεξήχθη σε πρώτο στάδιο ανάλυση με χρωματογραφία λεπτής στοιβάδας, ενώ λήφθηκε και φάσμα ¹H NMR του εκχυλίσματος, για την αρχική εκτίμηση του μεταβολικού δυναμικού του. Στη συνέχεια, πραγματοποιήθηκε εκτεταμένη χρήση της τεχνικής LC/ESI/MS για την εξαγωγή αναλυτικότερων αποτελεσμάτων. Παρακάτω παρατίθενται τα αποτελέσματα που προέκυψαν από την εφαρμογή των μεθόδων αυτών.

3.4.2.1 Ανάλυση με χρωματογραφία λεπτής στοιβάδας (TLC)

Αρχικά, πραγματοποιήθηκε ανάπτυξη του εκχυλίσματος του ιζήματος σε πλάκα TLC, για την απεικόνιση των μεταβολιτών του. Η ανάπτυξη των χρωματογραφημάτων πραγματοποιήθηκε σε πλάκα κανονικής φάσεως με το σύστημα ανάπτυξης $\text{CHCl}_3:\text{MeOH}:\text{H}_2\text{O}$ σε αναλογία 70:26:4 (v/v/v). Τα χρωματογραφήματα παρατηρήθηκαν αρχικά στο υπεριώδες (254 και 366 nm) και στη συνέχεια στο ορατό φως μετά από ψεκασμό της πλάκας με διάλυμα νινυδρίνης και θέρμανση (Εικόνα 39).

Στα χρωματογραφήματα της Εικόνας 39 παρατηρείται, με μια πρώτη ματιά, η ύπαρξη πληθώρας διαφορετικών μεταβολιτών στο εκχύλισμα. Το σύστημα διαλυτών που χρησιμοποιήθηκε για την ανάπτυξη της πλάκας κρίθηκε κατάλληλο, καθώς εμφάνισε ικανοποιητικό διαχωρισμό των ουσιών του εκχυλίσματος και για το λόγο αυτό, χρησιμοποιήθηκε εκτενώς στη συνέχεια της παρούσας μελέτης. Επιπλέον, η εμφάνιση κηλίδων χρώματος ροδίνου-ιώδους στην πλάκα μετά από ψεκασμό της με νινυδρίνη υπέδειξε την ύπαρξη αμινοξέων με πρωτοταγείς αμινομάδες στον πεπτιδικό σκελετό των λιποπεπτιδίων. Κατά αντιστοιχία, η εμφάνιση κίτρινων κηλίδων υποδήλωσε την ύπαρξη αμινοξέων που στερούνται πρωτοταγείς αμινομάδες στο πεπτιδικό τμήμα των μορίων.



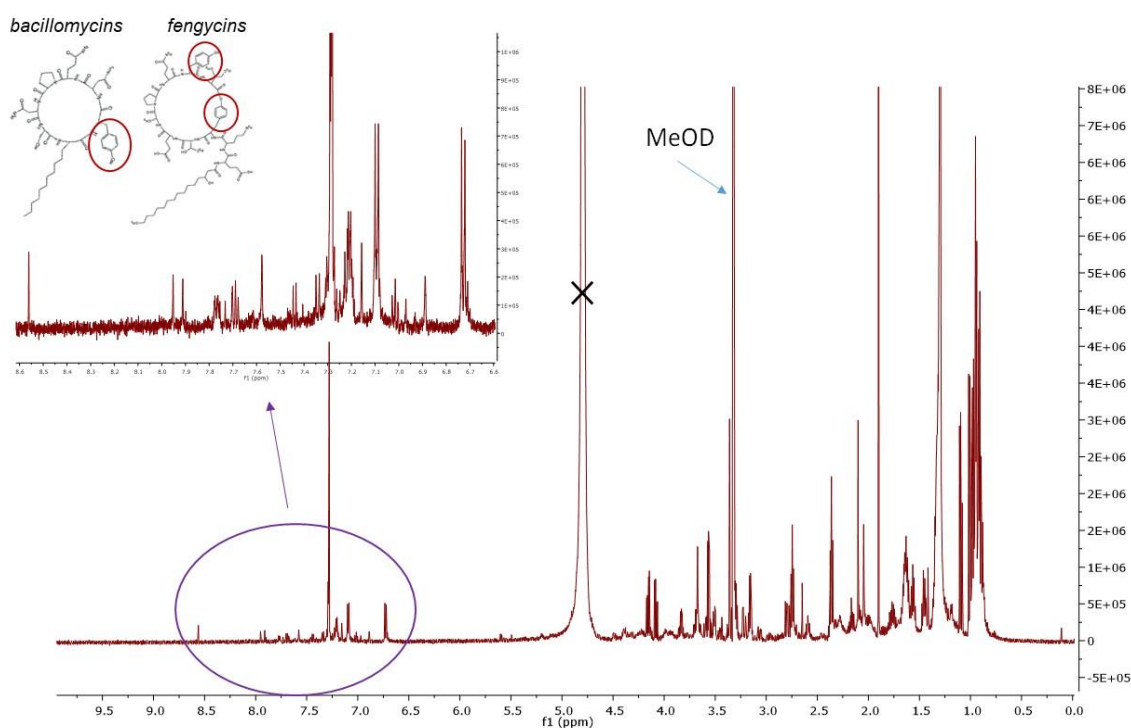
Εικόνα 39
Χρωματογράφημα του εκχυλίσματος του ιζήματος του βακτηρίου PTA13.

3.4.2.2 ^1H NMR ανάλυση

Κατά την ανάλυση του λιποπεπτιδικού εκχυλίσματος με εφαρμογή ^1H NMR, πραγματοποιήθηκαν αρχικά δοκιμές δευτεριωμένων διαλυτών, ώστε να επιτευχθεί η καλύτερη διάλυση του δείγματος και ταυτόχρονα να παραληφθεί το βέλτιστο φάσμα. Για το σκοπό αυτό, χρησιμοποιήθηκαν οι δευτεριωμένοι διαλύτες DMSO (διμεθυλοσουλφοξείδιο), DCM (χλωροφόρμιο) και MeOH (μεθανόλη), ενώ δοκιμάστηκε και η λήψη φάσματος σε πυριδίνη. Η προετοιμασία του δείγματος για την ανάλυσή του με ^1H NMR περιλάμβανε τη διάλυση ποσότητας 10 mg του ξηρού

εκχυλίσματος σε όγκο 600 μL του εκάστοτε διαλύτη και μεταφορά του διαλύματος σε NMR σωληνάκι. Όλα τα φάσματα ^1H NMR λήφθηκαν στο όργανο Bruker Avance III-600 spectrometer (Karlsruhe, Germany).

Το φάσμα πρωτονίου σε MeOD (*Εικόνα 40*) εμφάνισε την καλύτερη εικόνα σε σχέση με τα αντίστοιχα φάσματα των υπόλοιπων διαλυτών. Αναλυτικά, όσον αφορά το φάσμα, στην περιοχή 0.5-4.5 ppm εμφανίζονται οι χαρακτηριστικές κορυφές των αμινοξέων του πεπτιδικού σκελετού, ενώ στην περιοχή 1.0-2.5 ppm παρατηρούνται οι κορυφές που αντιστοιχούν στα πρωτόνια της λιπαρής αλυσίδας. Η ύπαρξη κορυφών αρωματικών πρωτονίων στα 6.5-8.5 ppm φανερώνει την παρουσία, στο μίγμα, αμινοξέων με αρωματικό δακτύλιο (Φαινυλαλανίνη, Τυροσίνη, Τρυπτοφάνη, Ιστιδίνη) και ως εκ τούτου λιποπεπτιδίων αντίστοιχων κατηγοριών, όπως bacillomycins και fengycins.



Εικόνα 40 Φάσμα πρωτονίου (^1H NMR) του λιποπεπτιδικού εκχυλίσματος του ιζήματος σε δευτεριωμένη μεθανόλη (MeOD). Στο μεγεθυμένο παράθυρο εμφανίζονται οι κορυφές των αρωματικών πρωτονίων της περιοχής 6.5-8.5 ppm του φάσματος και οι δομές των λιποπεπτιδίων των οικογενειών βακιλλομυσινών και φεγκυσινών στις οποίες σημειώνονται τα αρωματικά αμινοξέα τους.

3.4.2.3 UPLC-HRMS HRMS-MS Ανάλυση

Η ταυτοποίηση των μεταβολιτών του εκχυλίσματος του ιζήματος πραγματοποιήθηκε με UPLC-HRMS HRMS-MS ανάλυση. Για την ανάλυση του δείγματος, ποσότητα 200 $\mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$ του ξηρού εκχυλίσματος διαλύθηκε σε 1 mL μίγματος διαλυτών $\text{MeOH}:\text{H}_2\text{O}$ (MS grade) σε αναλογία 1:1 (v/v). Η ανάλυση πραγματοποιήθηκε στο μηχάνημα UPLC-Hybrid LTQ-Orbitrap Discovery HRMS σε θετικό ιονισμό, ESI(+). Η στήλη που χρησιμοποιήθηκε για το χρωματογραφικό διαχωρισμό ήταν η Ascentis Express C18 (Supelco®), με μέγεθος 150 mm x 2.1 mm και μέγεθος σωματιδίων του πληρωτικού της υλικού 2.7 μm . Κατά την ανάλυση, η θερμοκρασία της στήλης παρέμενε σταθερή στους 40°C, ενώ η πίεση κυμαινόταν στα 3500-4000 PSI. Ο ενέσιμος όγκος δείγματος ρυθμίστηκε στα 10 μL και η ροή στα 400 $\mu\text{L}\cdot\text{min}^{-1}$. Τέλος, η θερμοκρασία του δείγματος ορίστηκε στους 7°C. Για την ανάλυση, η κινητή φάση που χρησιμοποιήθηκε αποτελούνταν από H_2O περιεκτικότητας 0.1% σε φορμικό οξύ (formic acid, FA), και ACN (MS grade). Η μέθοδος που εφαρμόστηκε παρουσιάζεται στον [Πίνακα 14](#), με πραγματοποίηση βαθμιδωτής έκλουσης των εμπριεχομένων μεταβολιτών. Στη συνέχεια, για την πραγματοποίηση του ιονισμού, εφαρμόστηκε θερμοκρασία 350°C και τάση 40 V, ενώ το εύρος σάρωσης ιόντων ήταν 115-2000 m/z.

Πίνακας 14 Μέθοδος βαθμιδωτής έκλουσης που εφαρμόστηκε στην LC/MS ανάλυση του λιποπεπτιδικού εκχυλίσματος.

Time (min)	$\text{H}_2\text{O} + 0.1\% \text{ FA}$ (%)	Acetonitrile (%)
0	98	2
2	98	2
18	0	100
21	0	100
22	98	98
25	98	2

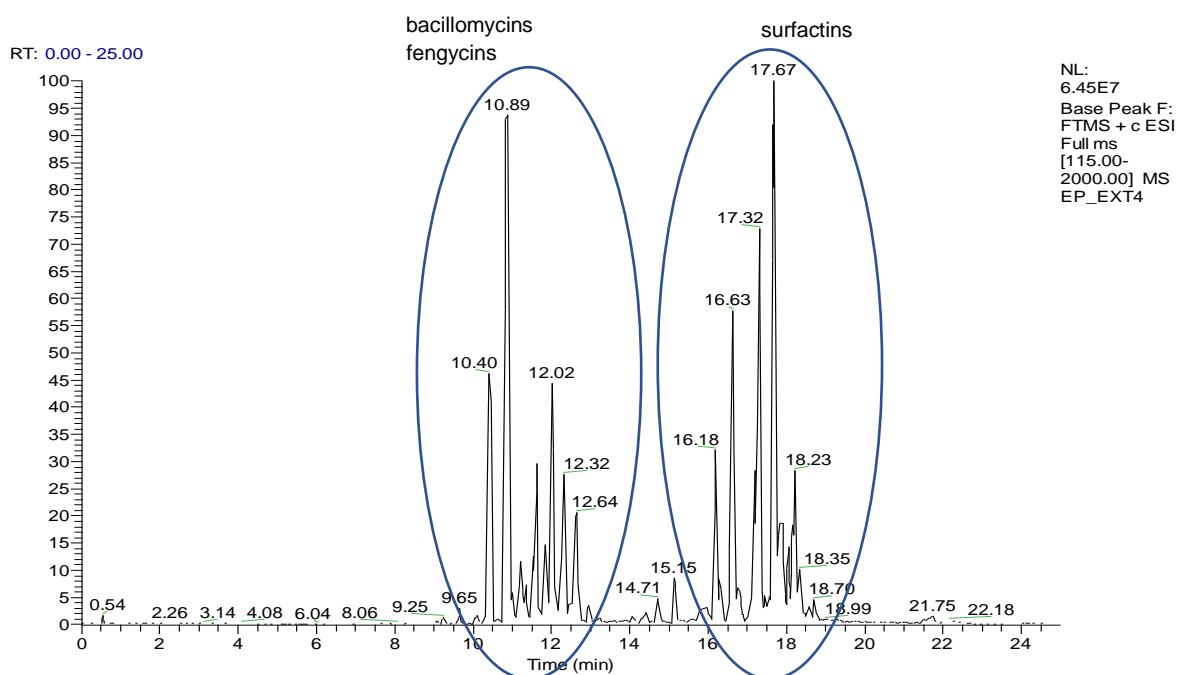
Το χρωματογράφημα που λήφθηκε από την παραπάνω ανάλυση παρουσιάζεται στην *Εικόνα 41*. Παρατηρούνται δύο διακριτές ομάδες κορυφών, οι οποίες αντιπροσωπεύουν τις κύριες κατηγορίες λιποπεπτιδίων που παράγονται από είδη του γένους *Bacillus*. Αναλυτικότερα, η φασματομετρική ανάλυση των κορυφών TIC φανέρωσε την ύπαρξη τριών κύριων κατηγοριών, των bacillomycins (βακιλλομυσίνες), των fengycins (φεγκυσίνες) και των surfactins (σουρφακτίνες) (*Πίνακας 15*).

Η πρώτη ομάδα κορυφών εκτείνεται από το 10^ο έως το 13^ο min και αποτελείται από τους μεταβολίτες των κατηγοριών βακιλλομυσινών και φεγκυσινών, ενώ η δεύτερη εκτείνεται από το 16^ο έως το 19^ο min και αποτελείται από την ομάδα των σουρφακτινών. Παράλληλα, εντοπίζονται και χαμηλότερες κορυφές, οι οποίες αντιπροσωπεύουν λιποπεπτιδικούς μεταβολίτες που περιέχονται σε μικρότερη συγκέντρωση στο ολικό βακτηριακό εκχύλισμα.

Οι κύριες κορυφές των βακιλλομυσινών (4 ταυτοποιημένα μόρια) εκλούστηκαν στους χρόνους κατακράτησης 10.40, 10.89, 11.63 και 12.05, που αντιστοιχούν στα $[M+H]^+$ m/z 1031, 1045, 1059 και 1073, καθώς και στα $[M+Na]^+$ m/z 1053, 1067, 1081 και 1095 αντίστοιχα. Επιπλέον, οι κύριες κορυφές των φεγκυσινών (8 ταυτοποιημένα μόρια, 4 φεγκυσίνες Α και 4 φεγκυσίνες Β) εκλούστηκαν σε χρόνους κατακράτησης 11.20, 11.54, 11.54, 11.84, 12.02, 12.27, 12.32 και 12.64, αντιστοιχώντας στα $[M+H]^+$ m/z 1435, 1449, 1463, 1447, 1463, 1447, 1491 και 1505, καθώς και στα $[M+H]^{2+}$ m/z 718, 725, 732, 739, 732, 739, 746 και 753 (διπλό φορτίο ιονισμού), αντίστοιχα. Τέλος, οι κύριες κορυφές των σουρφακτινών (4 ταυτοποιημένα μόρια) εκλούστηκαν σε χρόνους κατακράτησης 16.18, 16.63, 17.32 και 17.67, αντιστοιχώντας στα $[M+H]^+$ m/z 994, 1008, 1022 και 1036, καθώς και στα $[M+Na]^+$ m/z 1016, 1030, 1044 και 1058, αντίστοιχα (*Πίνακας 15*).

Η απόλυτη ταυτοποίηση των λιποπεπτιδικών μεταβολιτών του βακτηριακού εκχυλίσματος επιτεύχθηκε μέσω ανάλυσης HRMS/MS (*Εικόνες 42-55*). Πιο συγκεκριμένα, το μοτίβο θραυσματοποίησης της εκάστοτε ουσίας επέτρεψε την αποσαφήνιση του πεπτιδικού, κυρίως, σκελετού, με περισσότερο ξεκάθαρη τη θραυσματοποίηση των αμινοξέων του πεπτιδικού τμήματος των σουρφακτινών (*Εικόνες 42-45*). Με αυτόν τον τρόπο, κατέστη δυνατή η σαφής ομαδοποίηση των 16 ταυτοποιημένων μεταβολιτών σε τέσσερις ομάδες των τεσσάρων λιποπεπτιδίων, όπως φαίνεται και στον *Πίνακα 15*, τα οποία αποτελούνται από τον ίδιο πεπτιδικό σκελετό, ενώ διαφέρουν μεταξύ τους κατά μία μεθυλενική ομάδα (-CH₂) στο μήκος

της αλυσίδας του λιπαρού οξέος τους. Τέλος, ταυτοποιήθηκαν δύο διαφορετικές ομάδες που ανήκουν αμφότερες στην κατηγορία των φεγκυσινών (φεγκυσίνες Α και Β), οι οποίες διαφέρουν μεταξύ τους σε ένα μόνο αμινοξύ του πεπτιδικού τους δακτυλίου. Τα λιποπεπτίδια της κατηγορίας των φεγκυσινών Α εμφανίζουν το αμινοξύ αλανίνη (Ala) στη θέση 6 του πεπτιδικού τους τμήματος (*Εικόνες 50-53*), σε αντίθεση με εκείνα της ομάδας των φεγκυσινών Β, τα οποία εμφανίζουν το αμινοξύ βαλίνη (Val) στην αντίστοιχη θέση (*Εικόνες 54-55*).

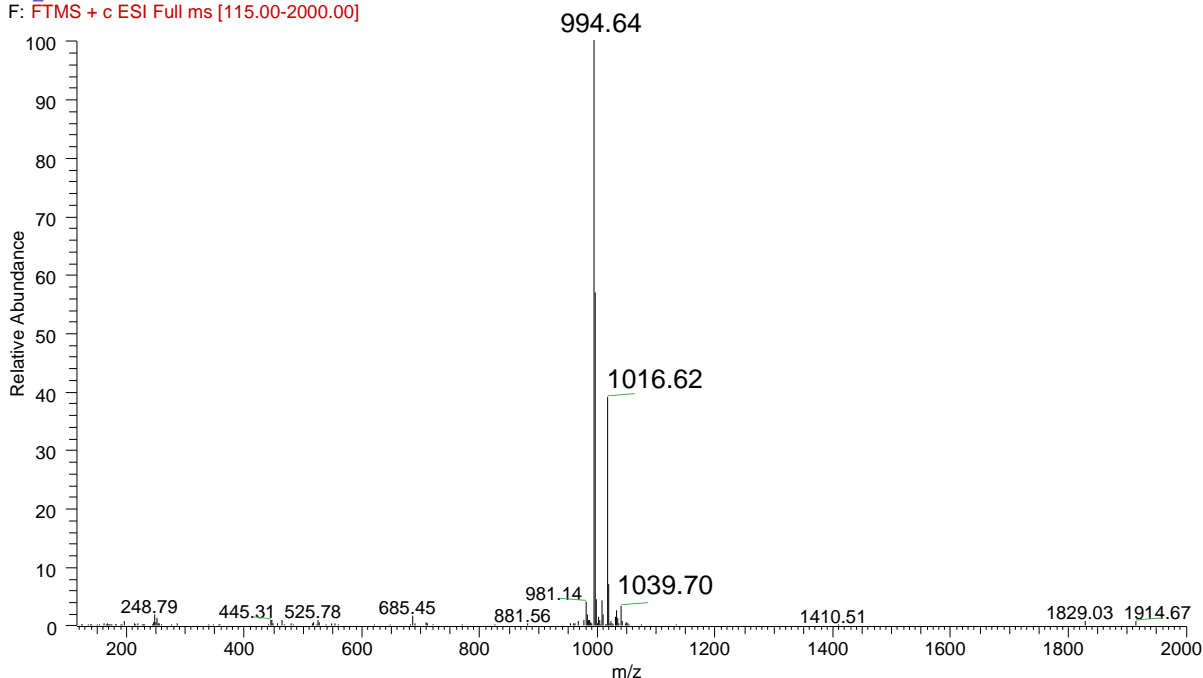


Εικόνα 41 Χρωματογράφημα TIC (ESI+) του ολικού εκχυλίσματος όπου εμφανίζονται οι κορυφές των εμπεριεχομένων λιποπεπτιδίων. Σημειώνονται οι δύο διακριτές ομάδες κορυφών και οι κύριες οικογένειες λιποπεπτιδίων που ταυτοποιήθηκαν.

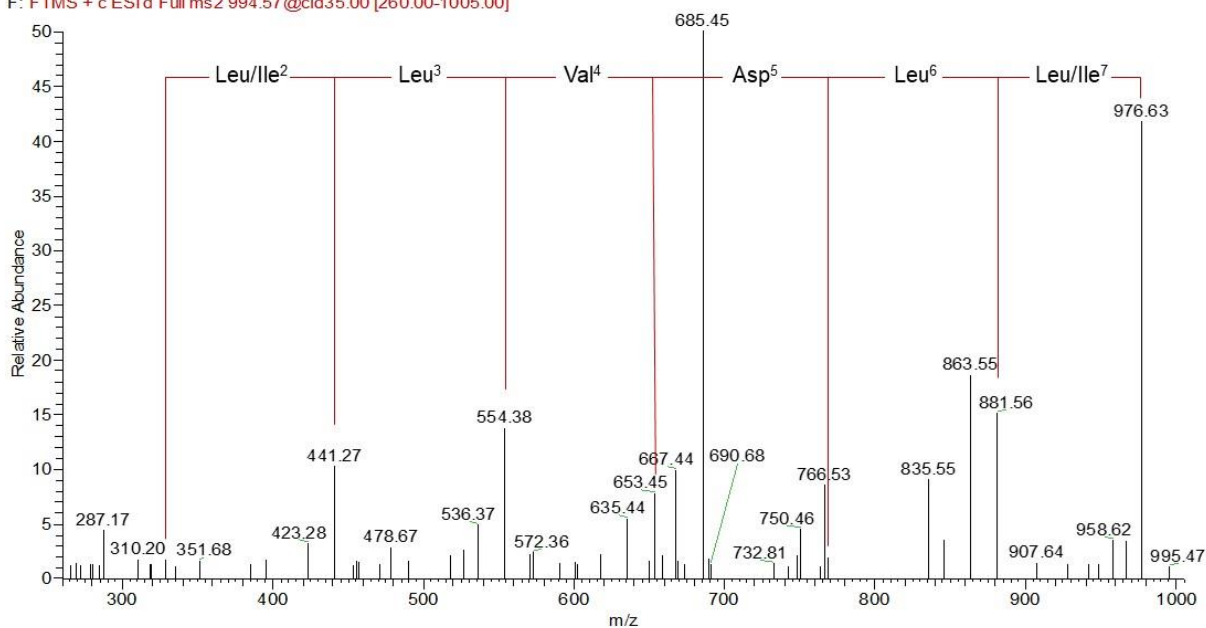
Πίνακας 15 Οι κύριες κατηγορίες λιποπεπτιδίων του βακτηριακού εκχυλίσματος.

<i>Lipopeptides</i>	<i>Rt (min)</i>	<i>Mass</i>	<i>Formula</i>	<i>Delta ppm</i>
Surfactins	16.18	994.6423	C ₅₀ H ₈₇ O ₁₃ N ₇	-1.138
	16.63	1008.6575	C ₅₁ H ₈₉ O ₁₃ N ₇	-1.569
	17.32	1022.6728	C ₅₂ H ₉₁ O ₁₃ N ₇	-1.928
	17.67	1036.6890	C ₅₃ H ₉₃ O ₁₃ N ₇	-1.401
Bacillomycins	10.40	1031.5400	C ₄₈ H ₇₄ O ₁₅ N ₁₀	-0.725
	10.89	1045.5540	C ₄₉ H ₇₆ O ₁₅ N ₁₀	-2.370
	11.63	1059.5710	C ₅₀ H ₇₈ O ₁₅ N ₁₀	-0.989
	12.05	1073.5866	C ₅₁ H ₈₀ O ₁₅ N ₁₀	-1.107
Fengycins A	11.20	1435.7688	C ₇₀ H ₁₀₆ O ₂₀ N ₁₂	-2.166
	11.54	1449.7848	C ₇₁ H ₁₀₈ O ₂₀ N ₁₂	-1.911
	12.02	1463.8005	C ₇₂ H ₁₁₀ O ₂₀ N ₁₂	-1.824
	12.27	1477.8176	C ₇₃ H ₁₁₂ O ₂₀ N ₁₂	-1.083
Fengycins B	11.54	1463.8009	C ₇₂ H ₁₁₀ O ₂₀ N ₁₂	-2.159
	11.84	1477.8173	C ₇₃ H ₁₁₂ O ₂₀ N ₁₂	-1.083
	12.32	1491.8318	C ₇₄ H ₁₁₄ O ₂₀ N ₁₂	-1.414
	12.64	1505.8480	C ₇₅ H ₁₁₆ O ₂₀ N ₁₂	-1.421

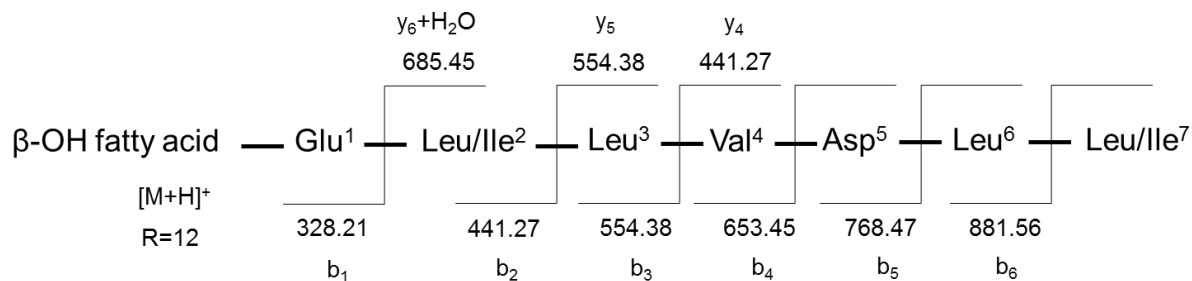
A EP_EXT4#899 RT: 16.18 AV: 1 NL: 2.08E7
 F: FTMS + c ESI Full ms [115.00-2000.00]



B EP_EXT4#889 RT: 16.16 AV: 1 NL: 4.41E5
 F: FTMS + c ESI d Full ms2 994.57 @cid35.00 [260.00-1005.00]

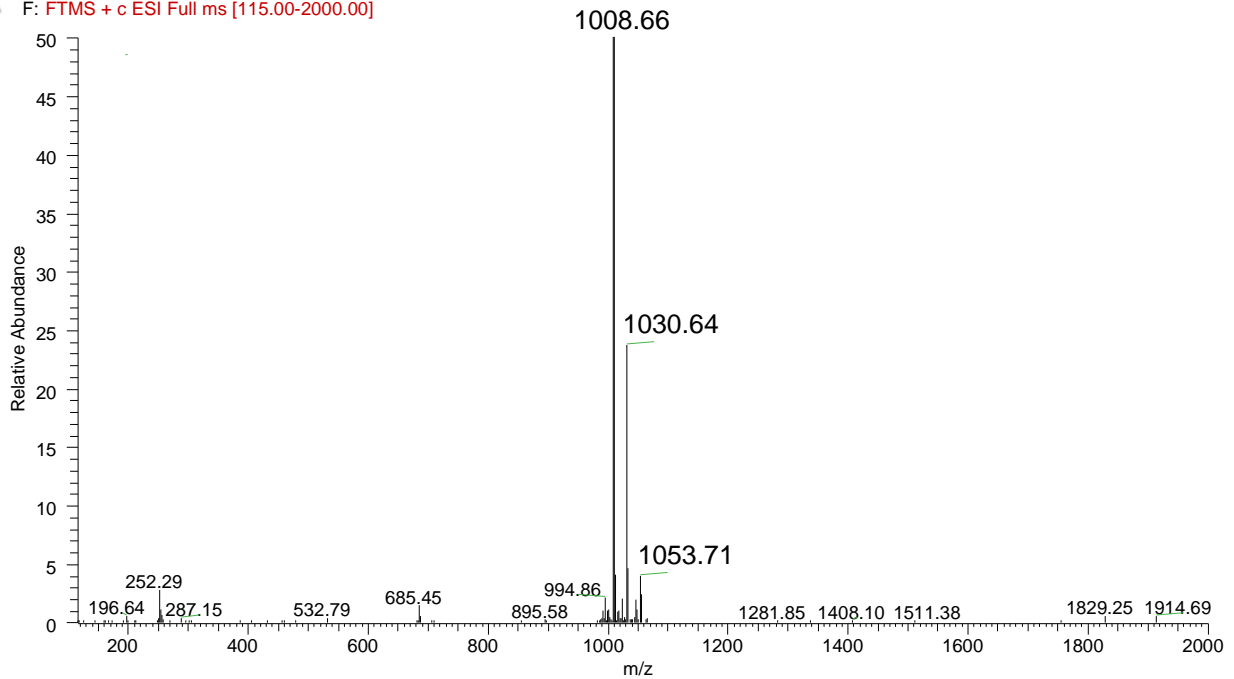


C

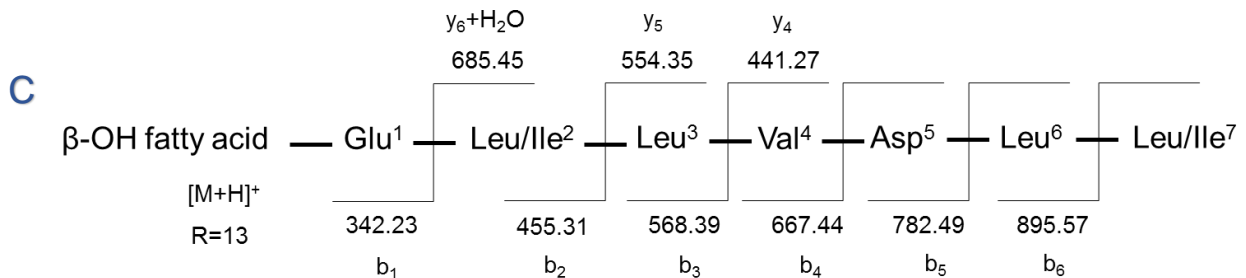
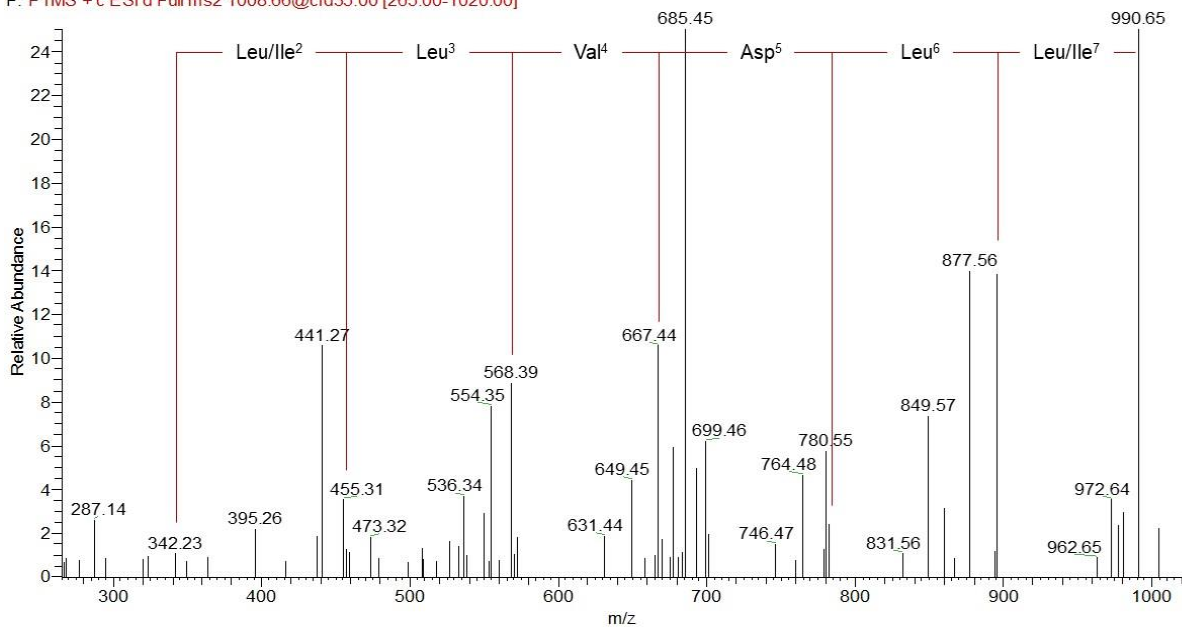


Εικόνα 42 Ταυτοποίηση της δομής της σουρφακτίνης που εκλούεται στα 16.18 min (σουρφακτίνη με λιπαρή αλυσίδα με 12 άνθρακες) (A) Φάσμα HRMS, (B) Φάσμα HRMS/MS, όπου σημειώνεται η θραυσματοποίηση των αμινοξέων του πεπτιδικού τμήματος, (C) δομή σουρφακτίνης.

A EP_EXT4#922 RT: 16.63 AV: 1 NL: 3.72E7
 F: FTMS + c ESI Full ms [115.00-2000.00]

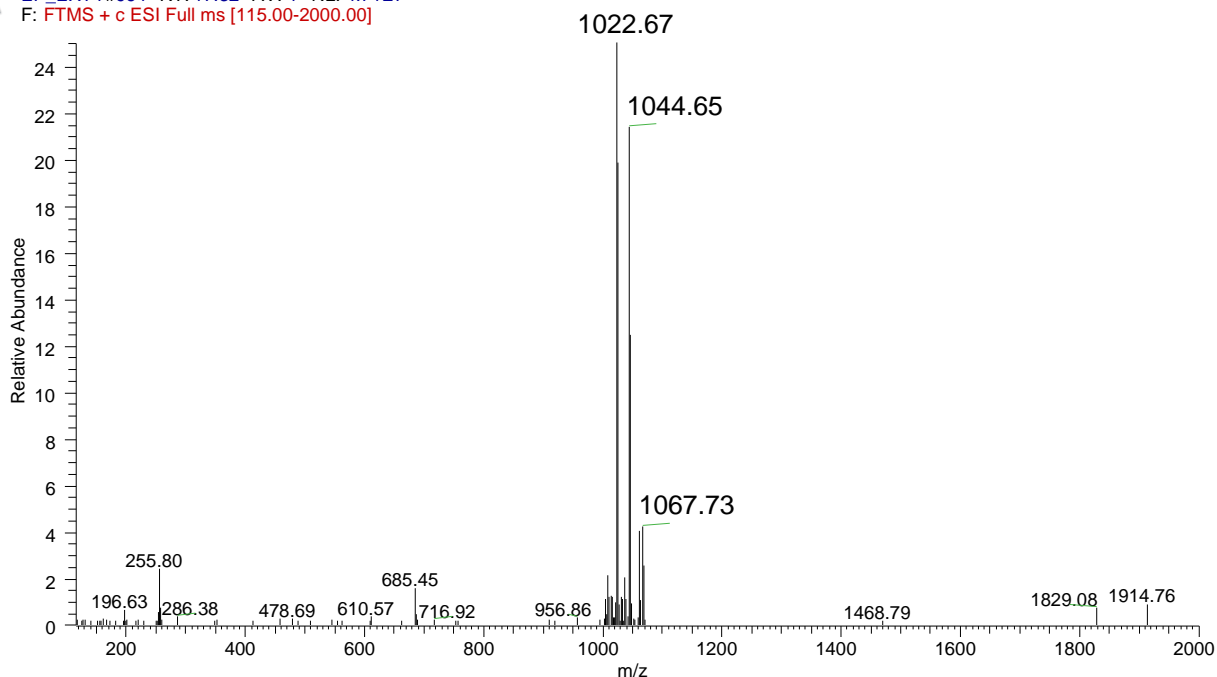


B EP_EXT4#916 RT: 16.67 AV: 1 NL: 1.89E6
 F: FTMS + c ESI d Full ms2 1008.66@cid35.00 [265.00-1020.00]

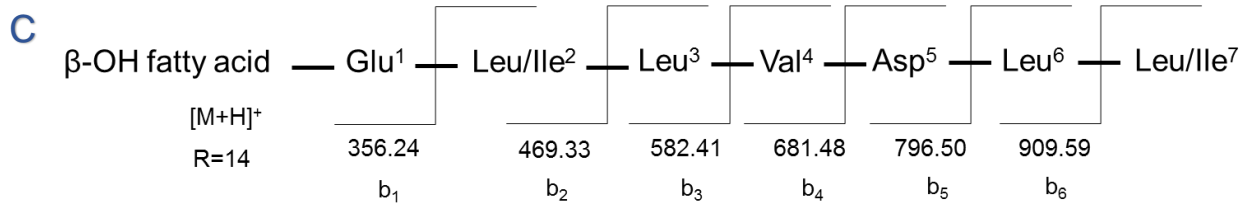
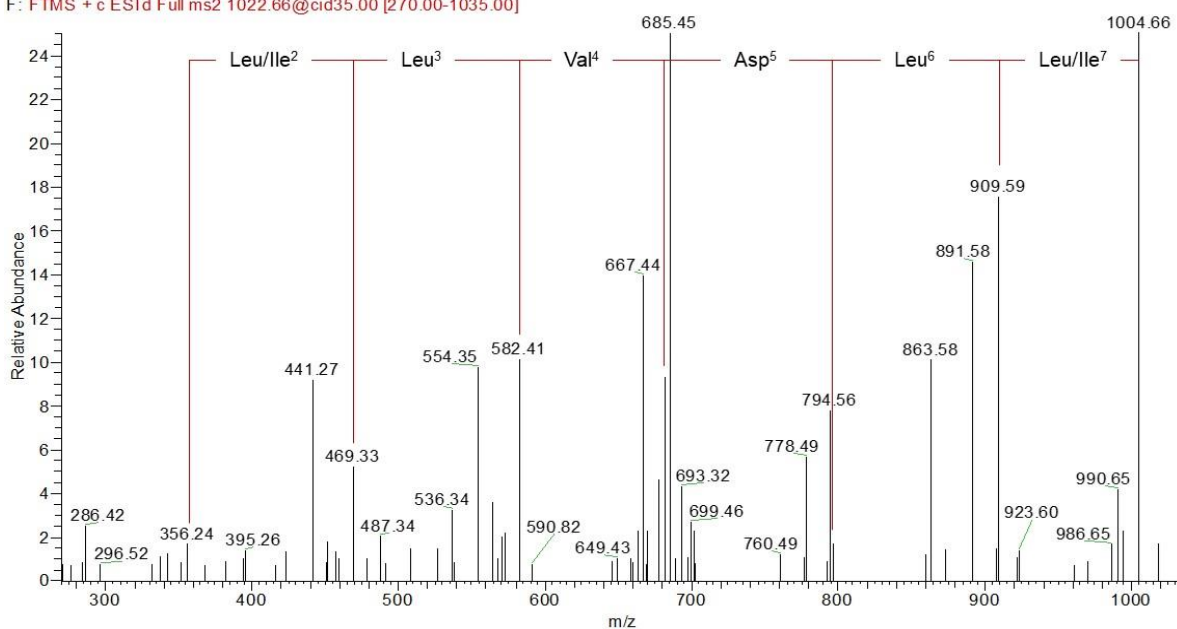


Εικόνα 43 Ταυτοποίηση της δομής της σουρφακτίνης που εκλύεται στα 16.63 min (σουρφακτίνη με λιπαρή αλυσίδα με 13 άνθρακες) (A) Φάσμα HRMS, (B) Φάσμα HRMS/MS, όπου σημειώνεται η θραυσματοποίηση των αμινοξέων του πεπτιδικού τμήματος, (C) δομή σουρφακτίνης.

A EP_EXT4#964 RT: 17.32 AV: 1 NL: 4.71E7
 F: FTMS + c ESI Full ms [115.00-2000.00]

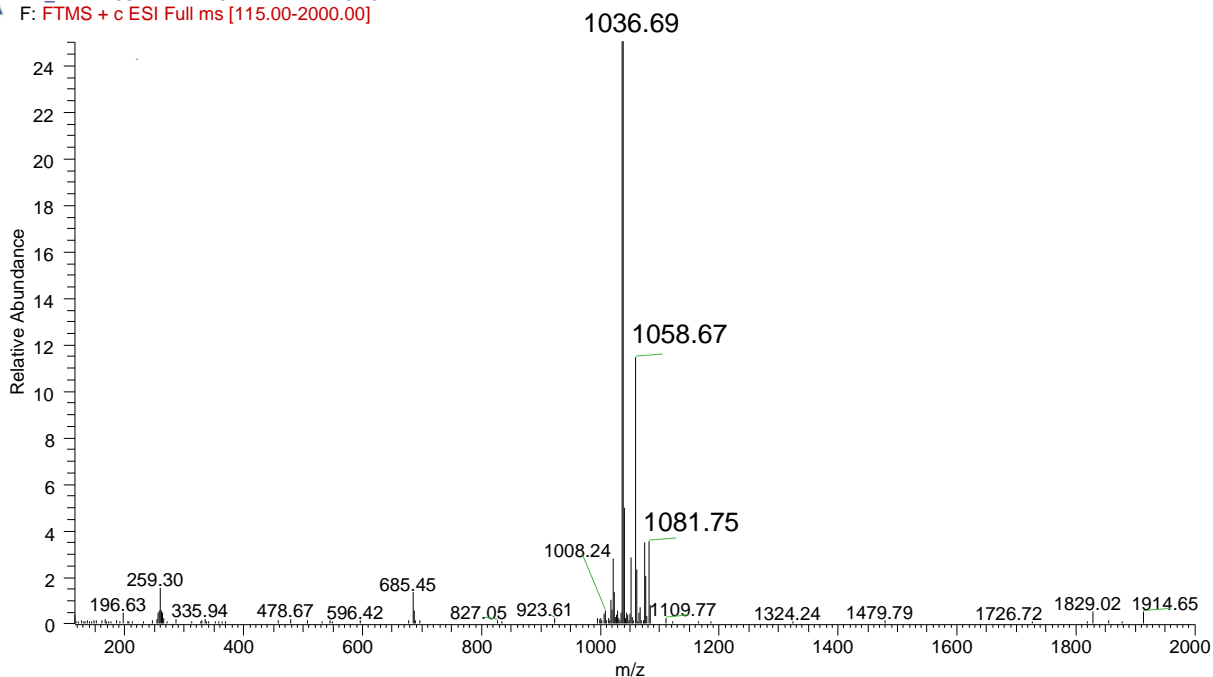


B EP_EXT4#950 RT: 17.22 AV: 1 NL: 1.03E6
 F: FTMS + c ESI d Full ms2 1022.66@cid35.00 [270.00-1035.00]

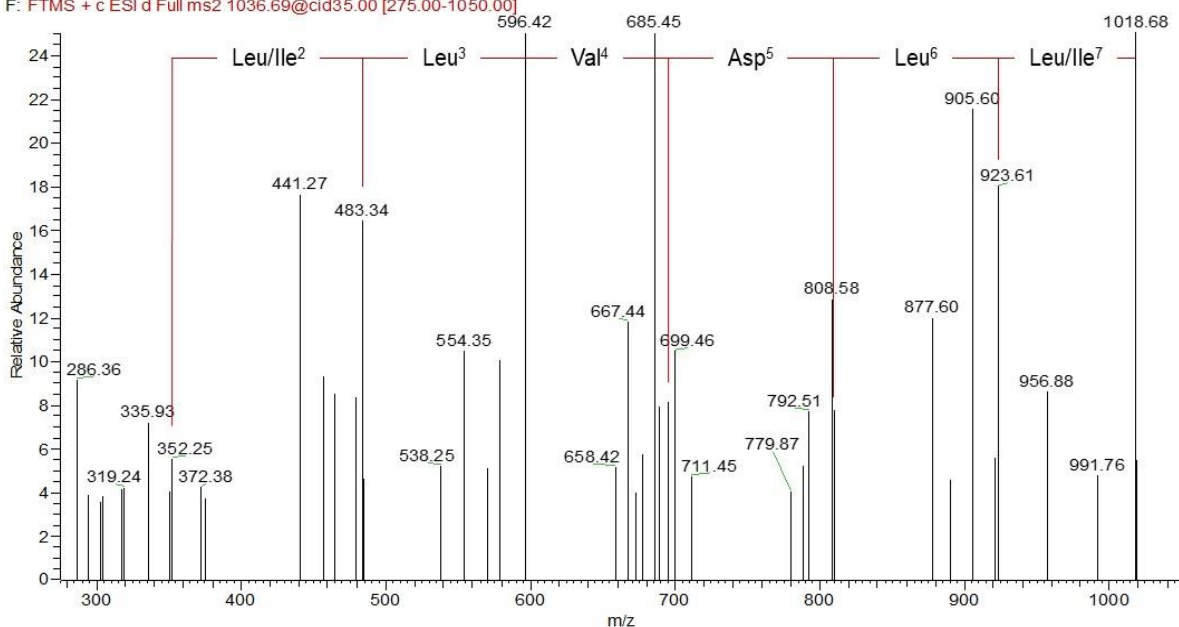


Εικόνα 44 Ταυτοποίηση της δομής της σουρφακίνης που εκλούεται στα 17.32 min (σουρφακίνη με λιπαρή αλυσίδα με 14 άνθρακες) (A) Φάσμα HRMS, (B) Φάσμα HRMS/MS, όπου σημειώνεται η θραυσματοποίηση των αμινοξέων του πεπτιδικού τμήματος, (C) δομή σουρφακίνης.

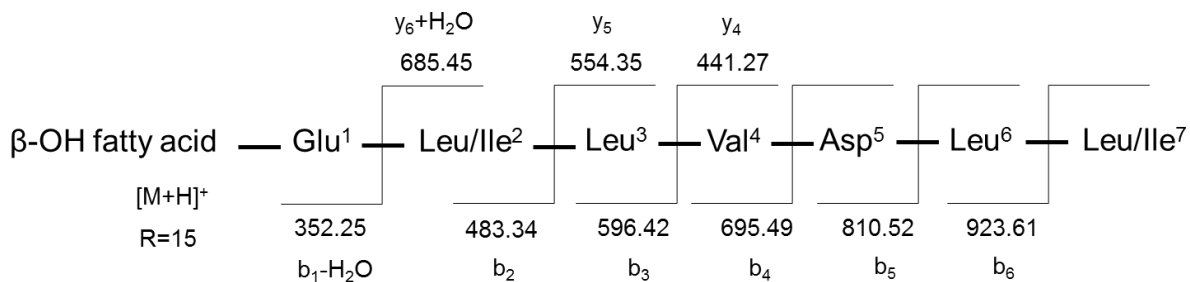
A EP_EXT4#987 RT: 17.67 AV: 1 NL: 5.19E7
 F: FTMS + c ESI Full ms [115.00-2000.00]



B EP_EXT4 #984 RT: 17.72 AV: 1 NL: 7.74E5
 F: FTMS + c ESI d Full ms2 1036.69@cid35.00 [275.00-1050.00]

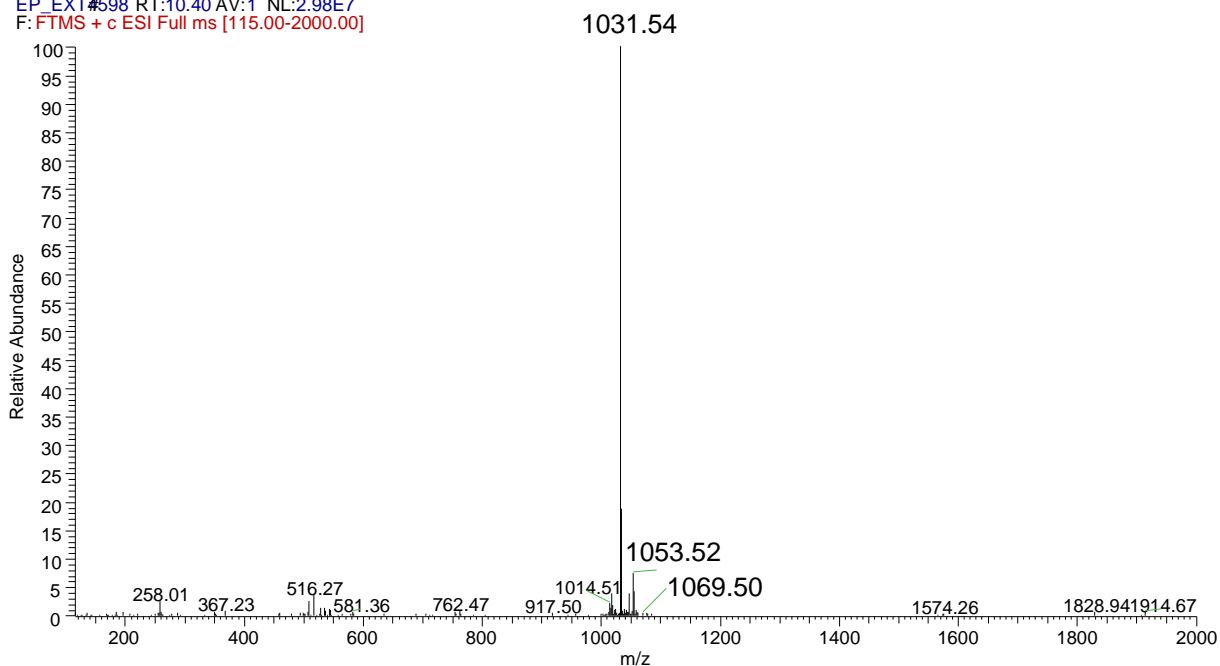


C



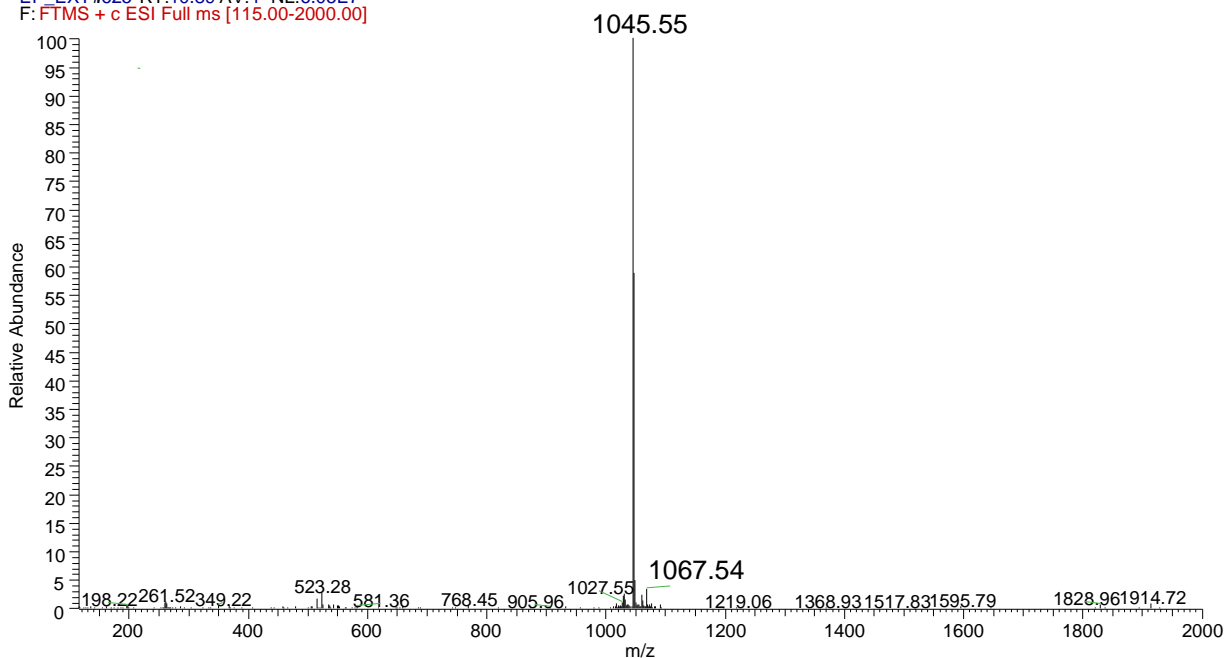
Εικόνα 45 Ταυτοποίηση της δομής της σουρφακτίνης που εκλύεται στα 17.67 min (σουρφακτίνη με λιπαρή αλυσίδα με 15 άνθρακες) (A) Φάσμα HRMS, (B) Φάσμα HRMS/MS, όπου σημειώνεται η θραυσματοποίηση των αμινοξέων του πεπτιδικού τμήματος, (C) δομή σουρφακτίνης.

EP_EXT#598 RT:10.40 AV:1 NL:2.98E7
F: FTMS + c ESI Full ms [115.00-2000.00]



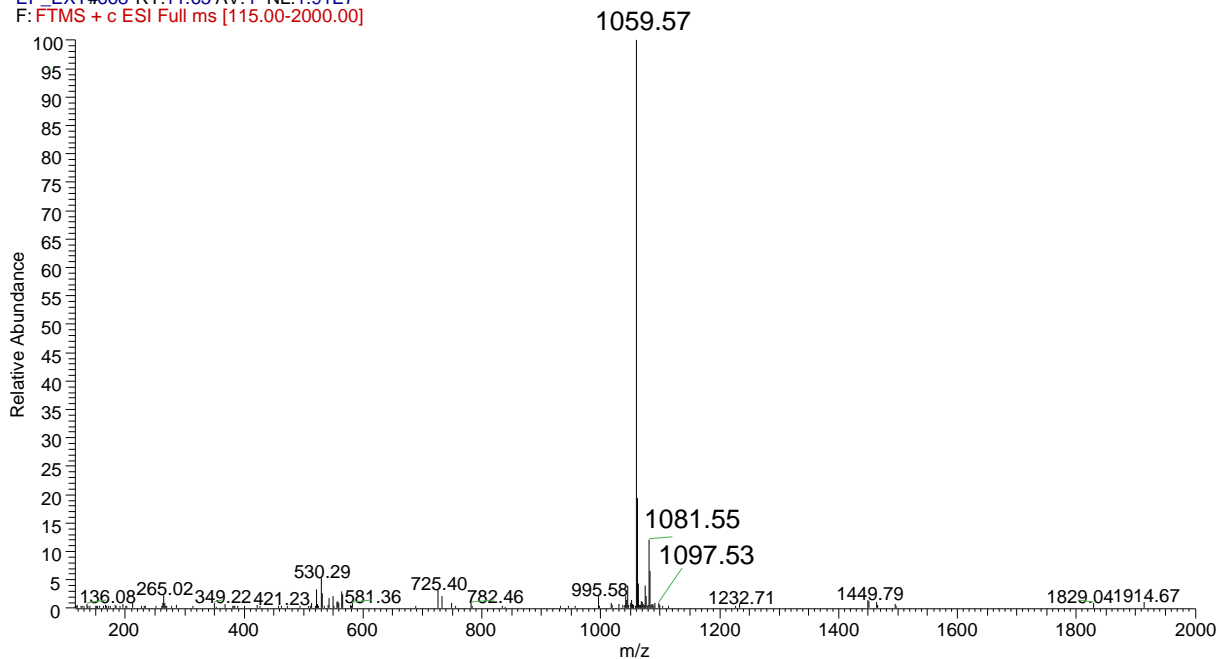
Εικόνα 46 Φάσμα HRMS της βακιλλομυσίνης που εκλούεται στα 10.40 min (βακιλλομυσίνη με λιπαρή αλυσίδα με 14 άνθρακες).

EP_EXT#625 RT:10.89 AV:1 NL:6.05E7
F: FTMS + c ESI Full ms [115.00-2000.00]



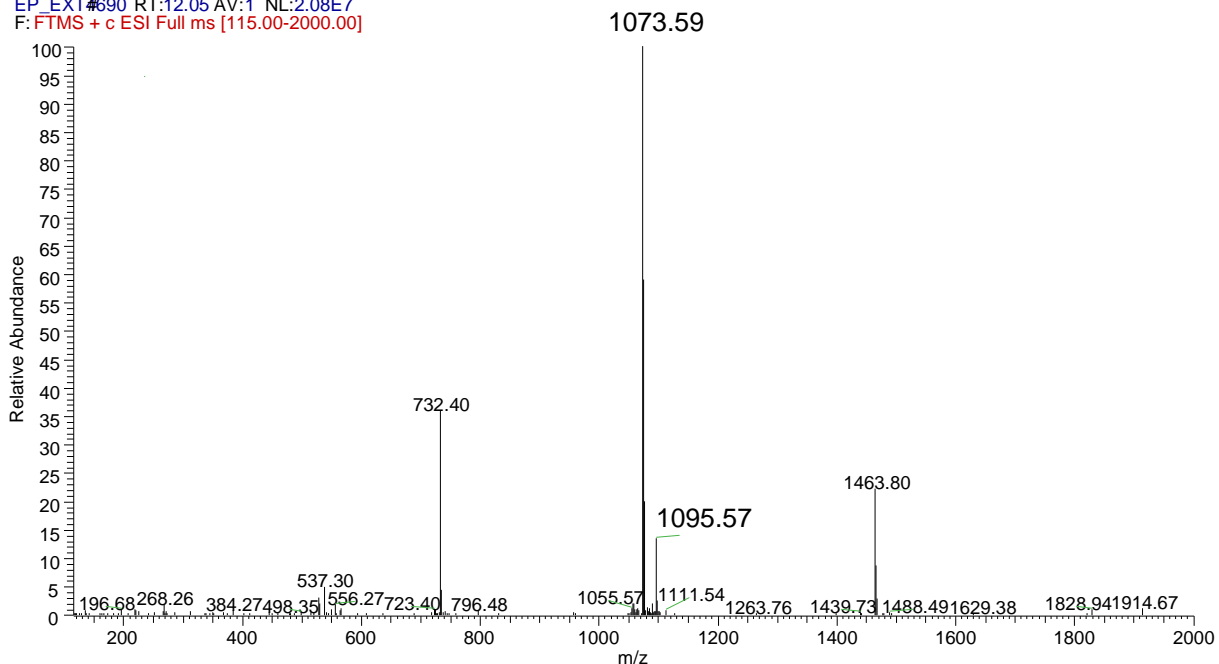
Εικόνα 47 Φάσμα HRMS της βακιλλομυσίνης που εκλούεται στα 10.89 min (βακιλλομυσίνη με λιπαρή αλυσίδα με 15 άνθρακες).

EP_EXT#668 RT:11.63 AV:1 NL:1.91E7
F: FTMS + c ESI Full ms [115.00-2000.00]



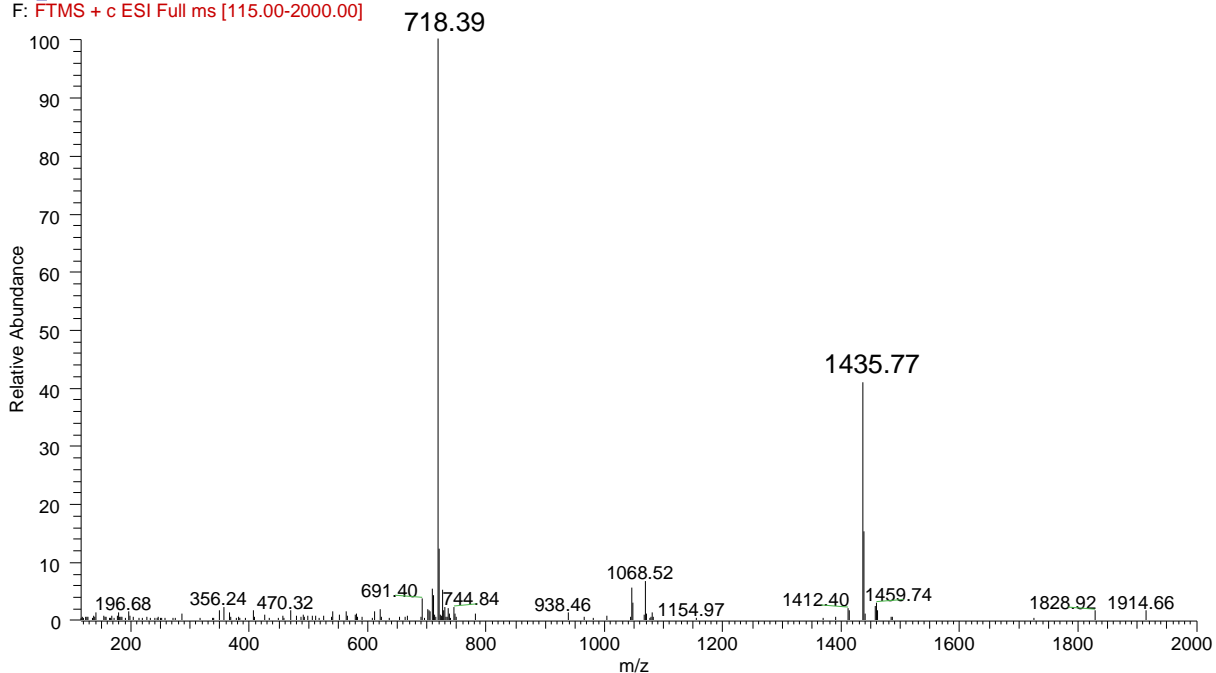
Εικόνα 48 Φάσμα HRMS της βακιλλομυσίνης που εκλύεται στα 11.63 min (βακιλλομυσίνη με λιπαρή αλυσίδα με 16 άνθρακες).

EP_EXT#690 RT:12.05 AV:1 NL:2.08E7
F: FTMS + c ESI Full ms [115.00-2000.00]

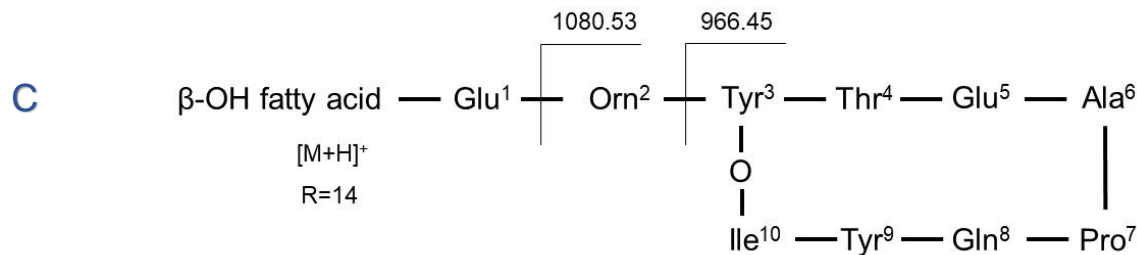
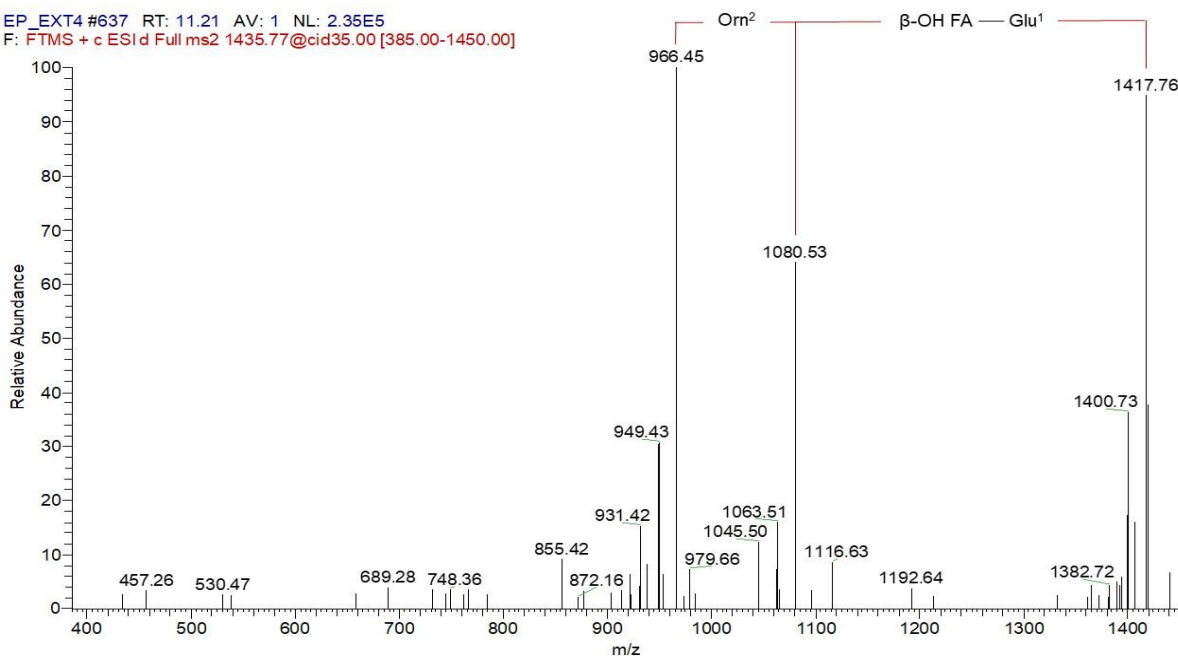


Εικόνα 49 Φάσμα HRMS της βακιλλομυσίνης που εκλύεται στα 12.05 min (βακιλλομυσίνη με λιπαρή αλυσίδα με 17 άνθρακες).

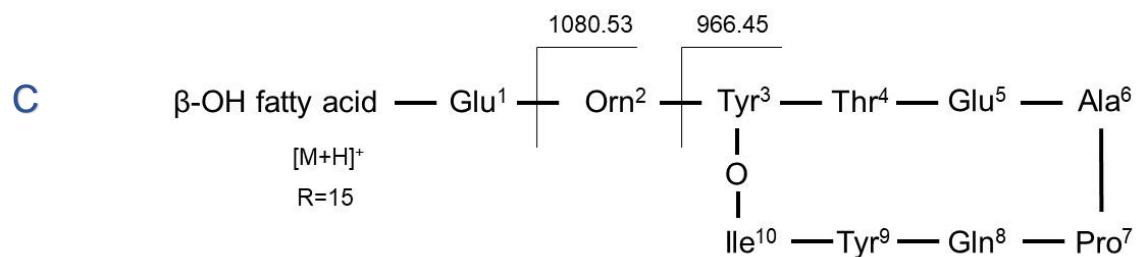
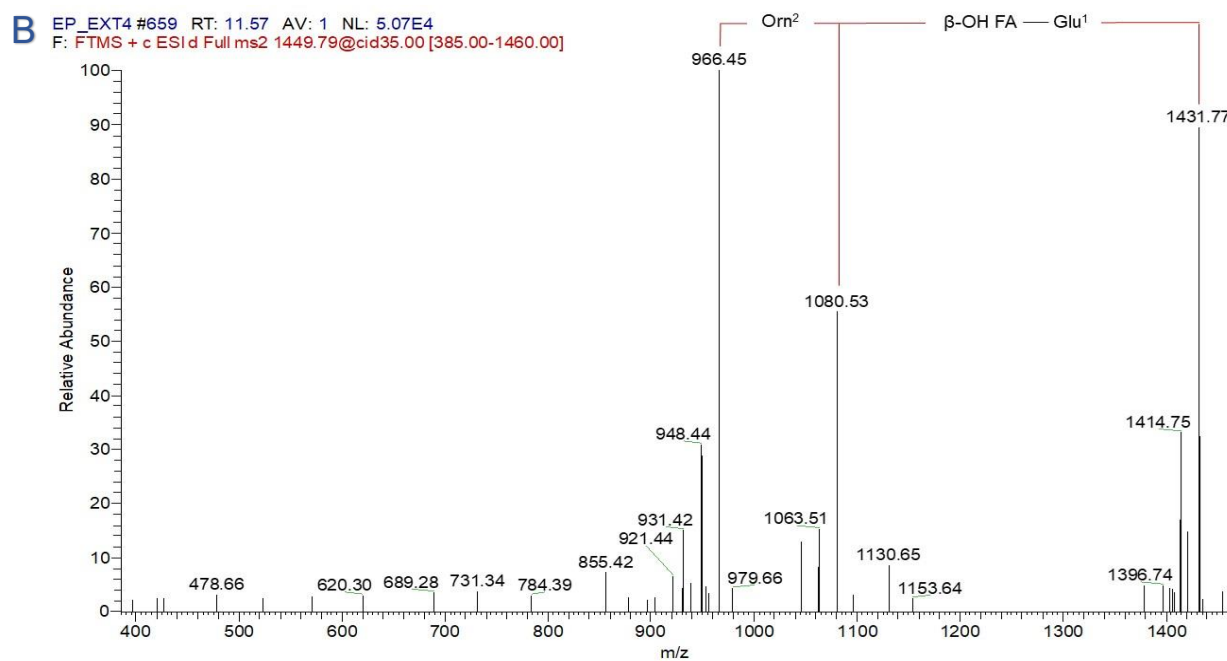
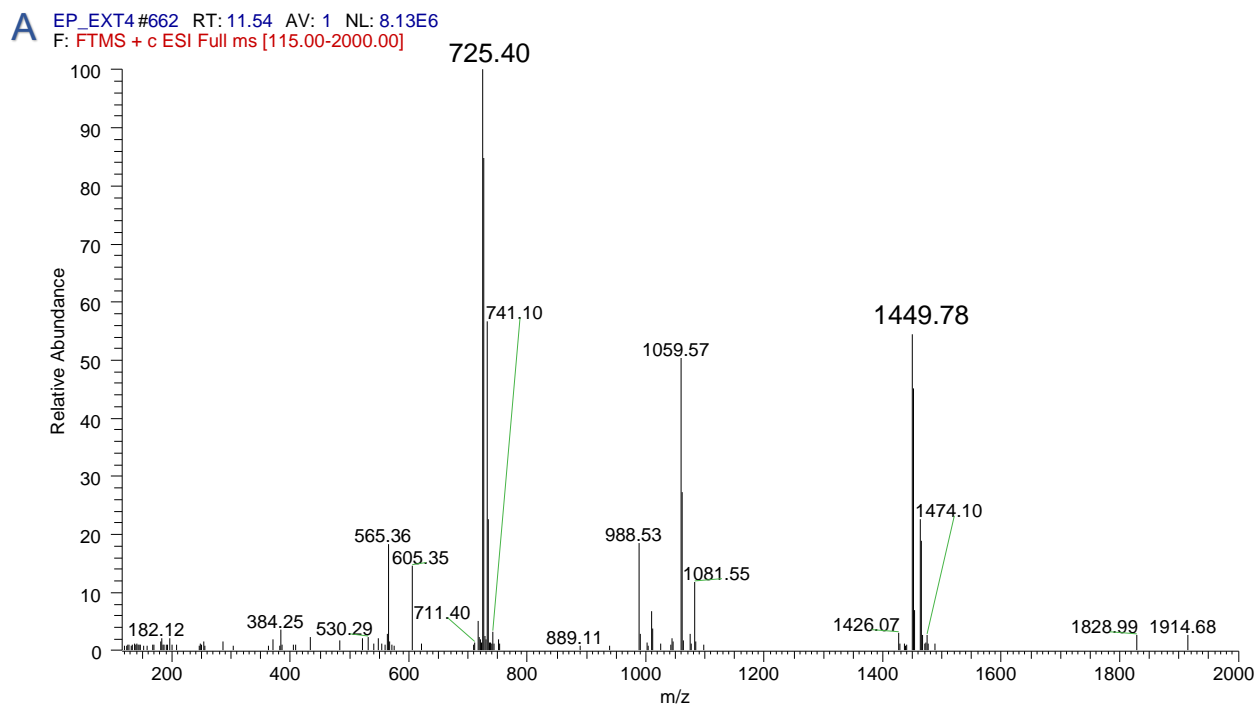
A EP_EXT4 #642 RT: 11.20 AV: 1 NL: 7.46E6
 F: FTMS + c ESI Full ms [115.00-2000.00]



B EP_EXT4 #637 RT: 11.21 AV: 1 NL: 2.35E5
 F: FTMS + c ESI d Full ms2 1435.77@cid35.00 [385.00-1450.00]

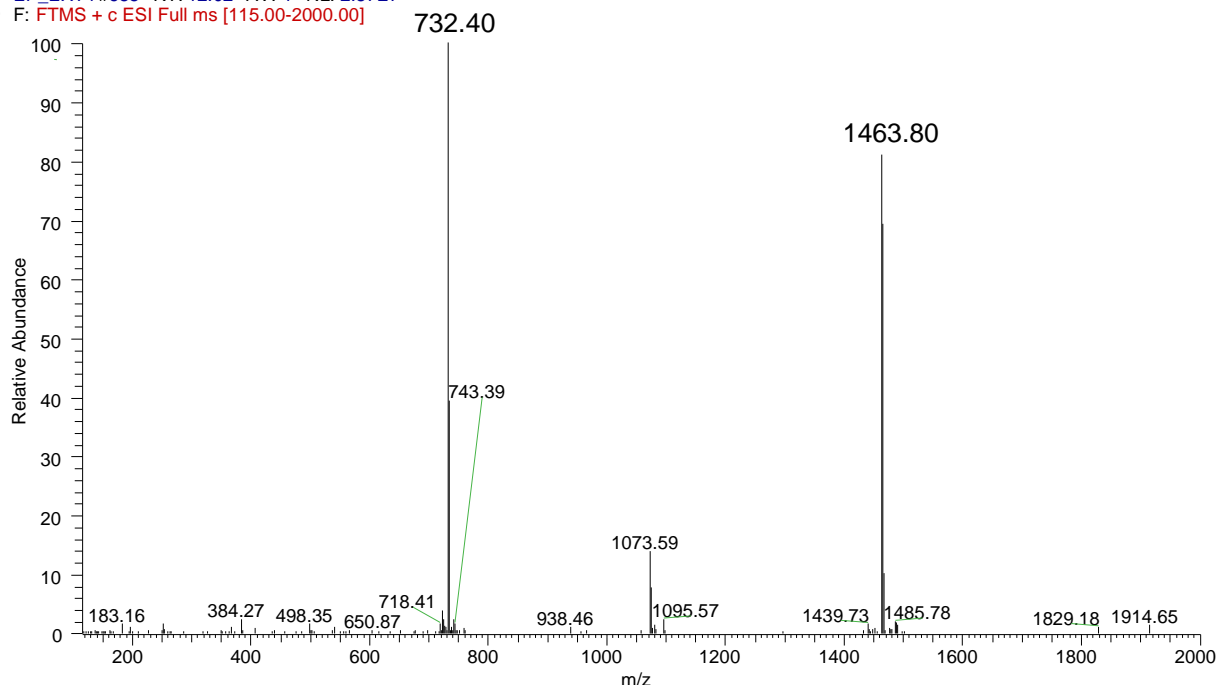


Εικόνα 50 Ταυτοποίηση της δομής της φεγκυσίνης A που εκλύεται στα 11.20 min (φεγκυσίνη A με λιπαρή αλυσίδα με 14 άνθρακες) (A) Φάσμα HRMS, (B) Φάσμα HRMS/MS, όπου σημειώνεται η παρατηρούμενη θραυσματοποίηση, (C) δομή φεγκυσίνης.

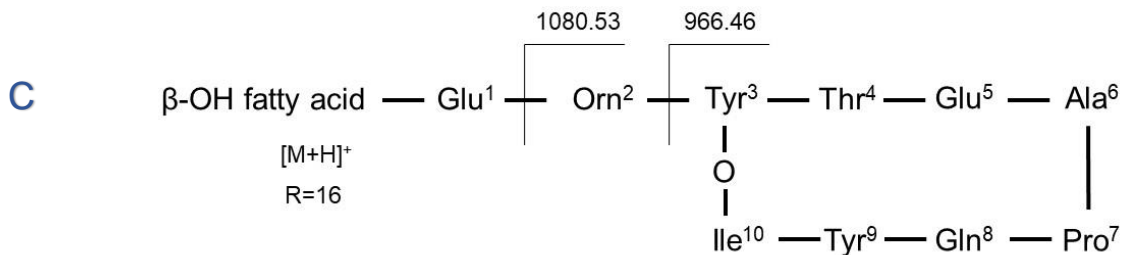
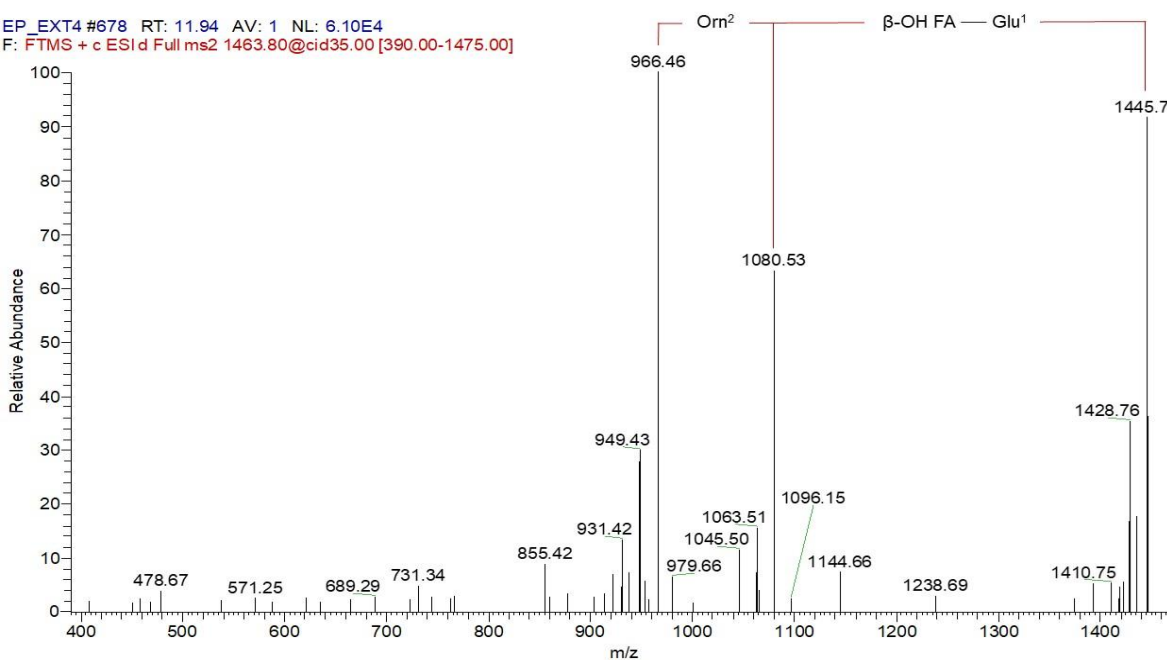


Εικόνα 51 Ταυτοποίηση της δομής της φεγκυσίνης A που εκλύεται στα 11.54 min (φεγκυσίνη A με λιπαρή αλυσίδα με 15 άνθρακες) (A) Φάσμα HRMS, (B) Φάσμα HRMS/MS, όπου σημειώνεται η παρατηρούμενη θραυσματοποίηση, (C) δομή φεγκυσίνης.

A EP_EXT4 #688 RT: 12.02 AV: 1 NL: 2.87E7
 F: FTMS + c ESI Full ms [115.00-2000.00]

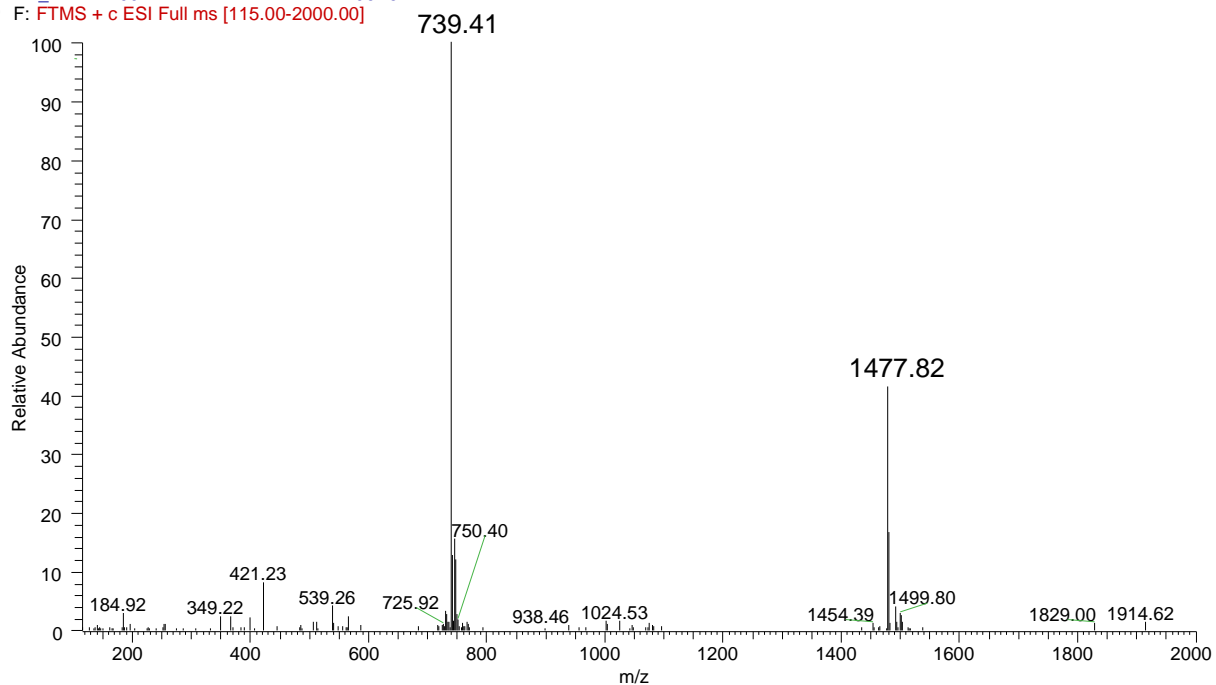


B EP_EXT4 #678 RT: 11.94 AV: 1 NL: 6.10E4
 F: FTMS + c ESI d Full ms2 1463.80@cid35.00 [390.00-1475.00]

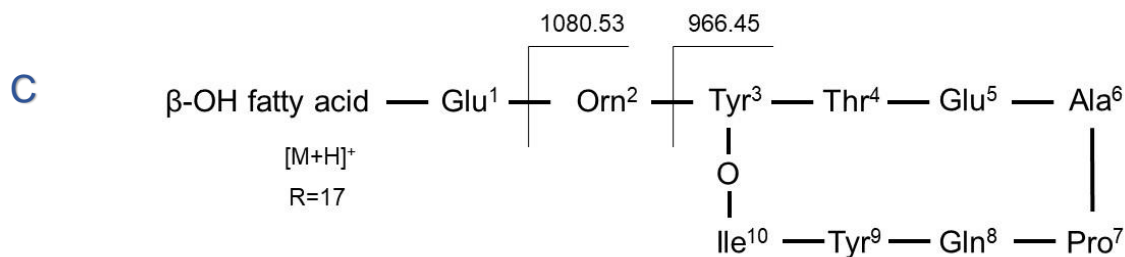
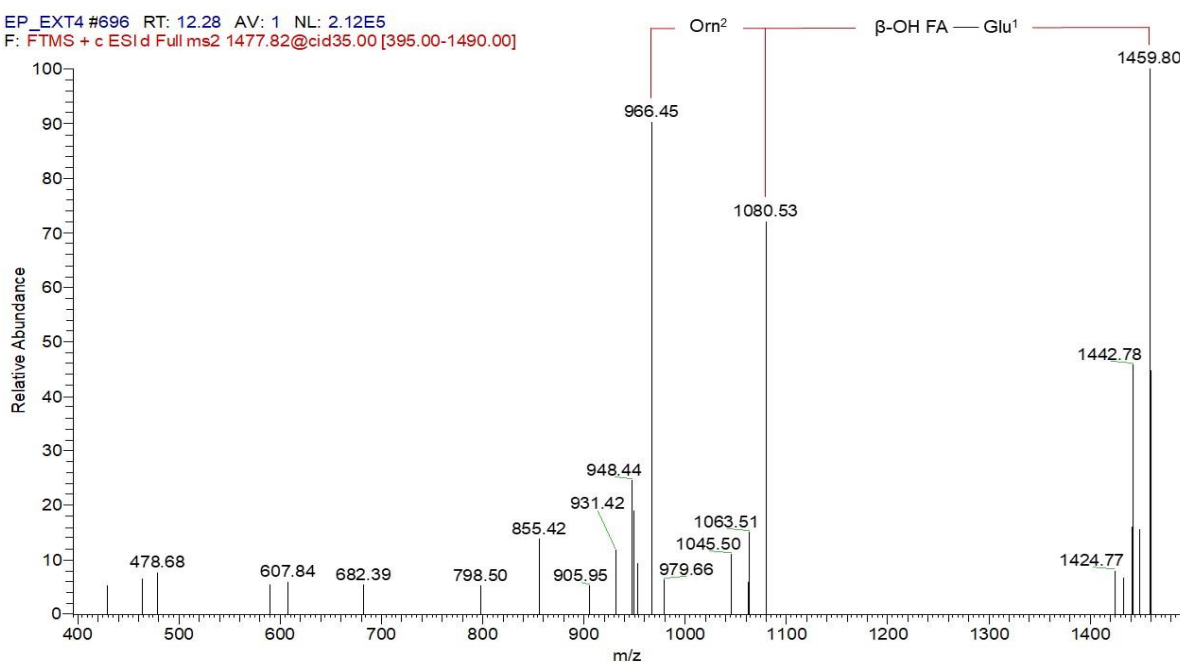


Εικόνα 52 Ταυτοποίηση της δομής της φεγκυσίνης A που εκλύεται στα 12.02 min (φεγκυσίνη A με λιπαρή αλυσίδα με 16 άνθρακες) (A) Φάσμα HRMS, (B) Φάσμα HRMS/MS, όπου σημειώνεται η παρατηρούμενη θραυσματοποίηση, (C) δομή φεγκυσίνης.

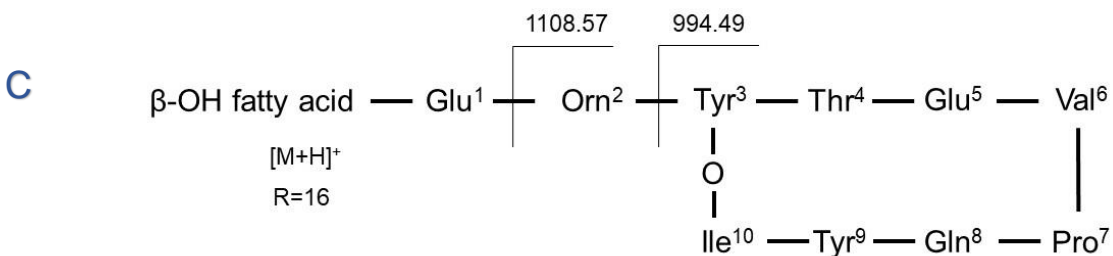
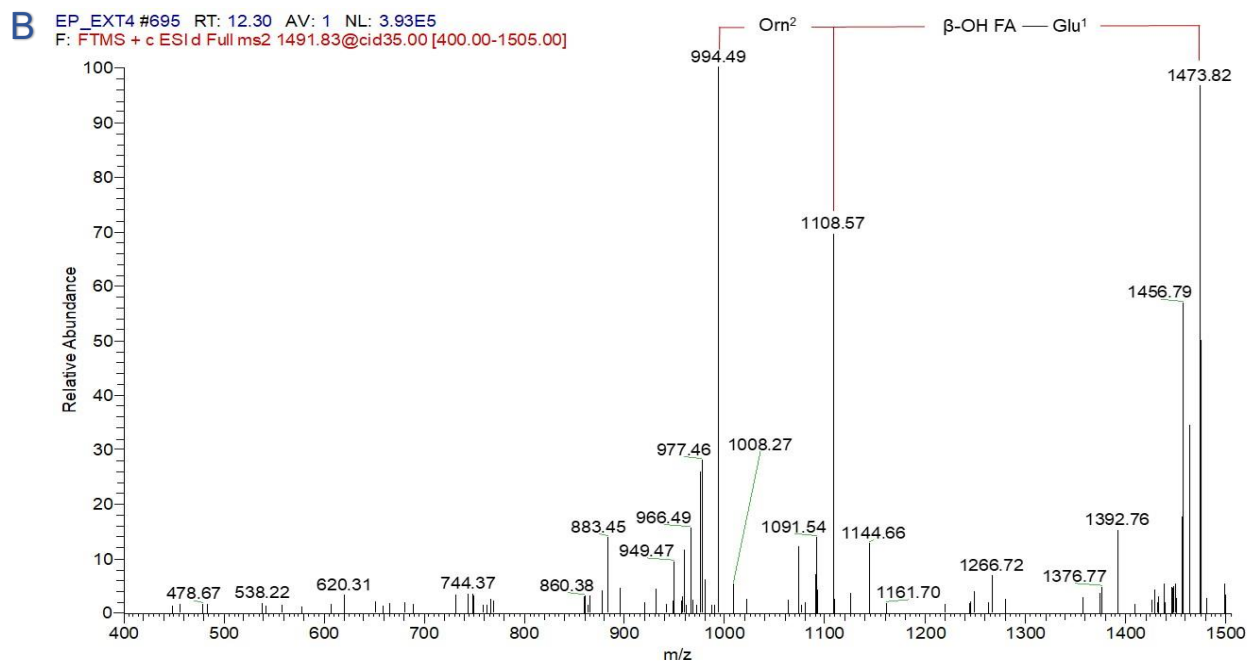
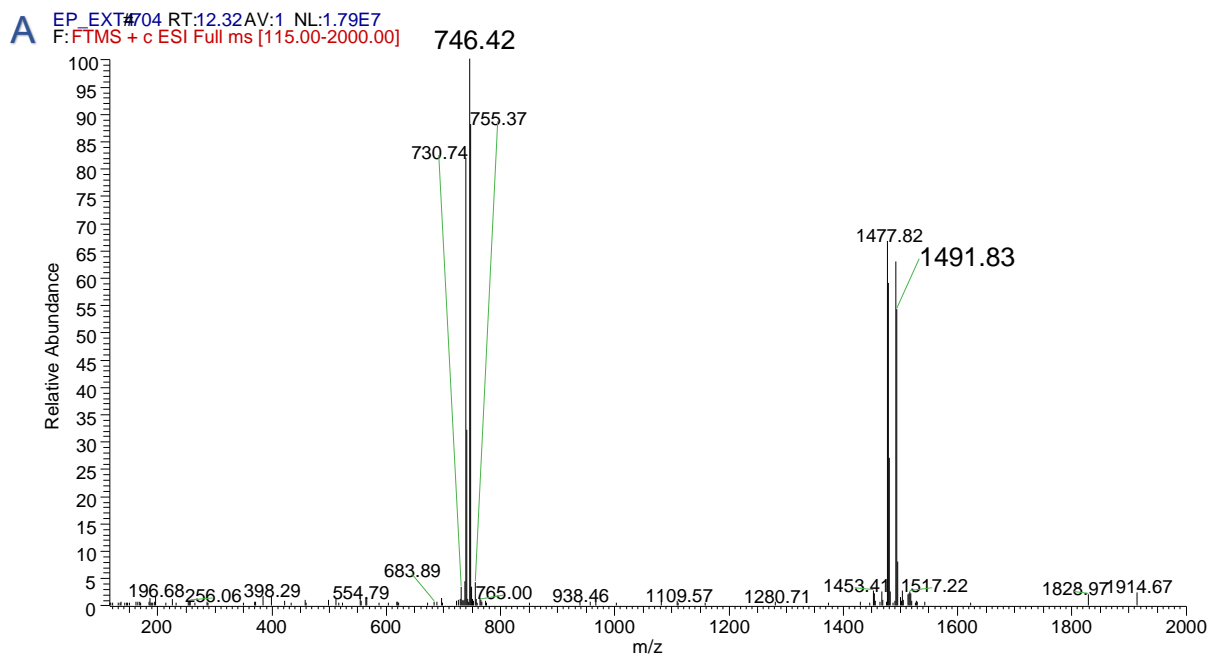
A EP_EXT4 #700 RT: 12.27 AV: 1 NL: 7.96E6
 F: FTMS + c ESI Full ms [115.00-2000.00]



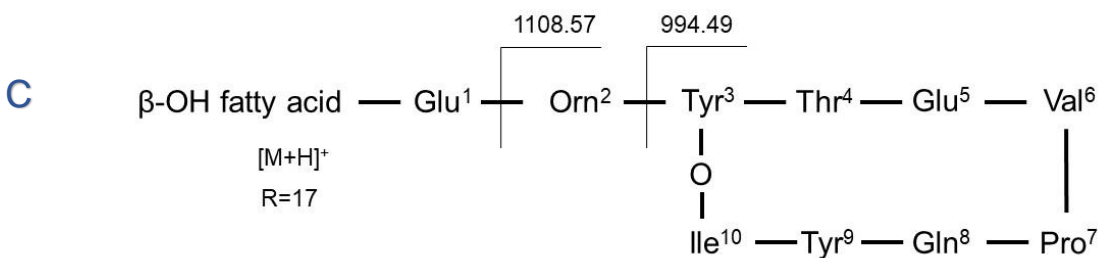
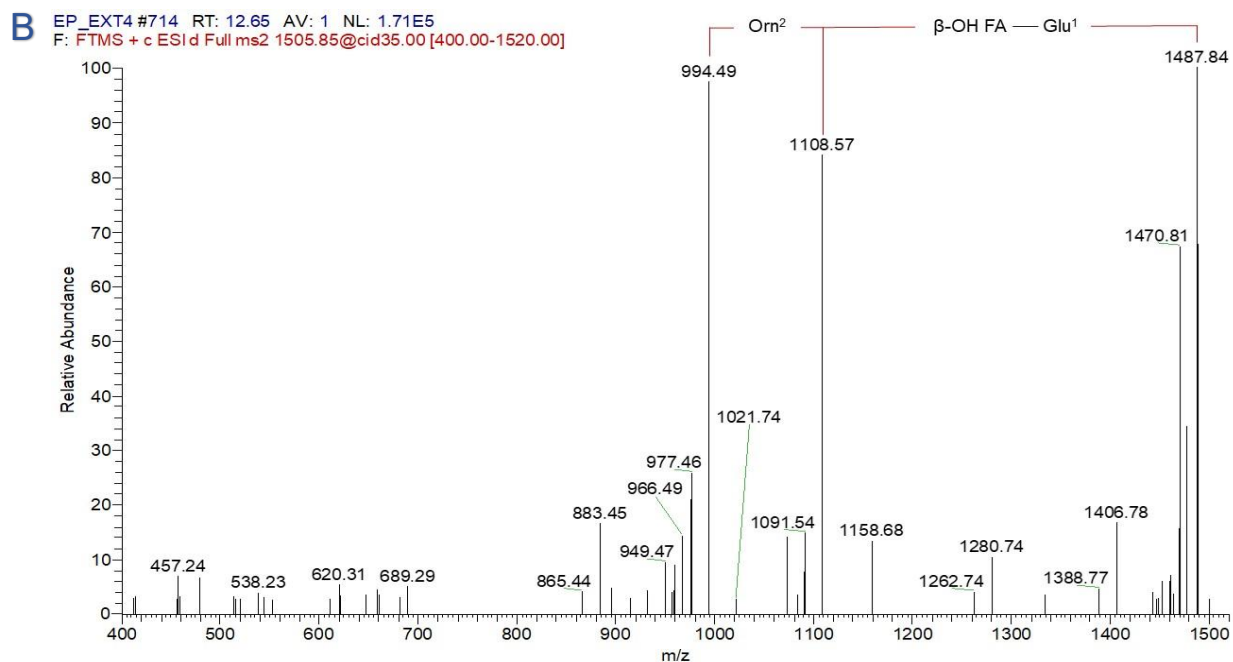
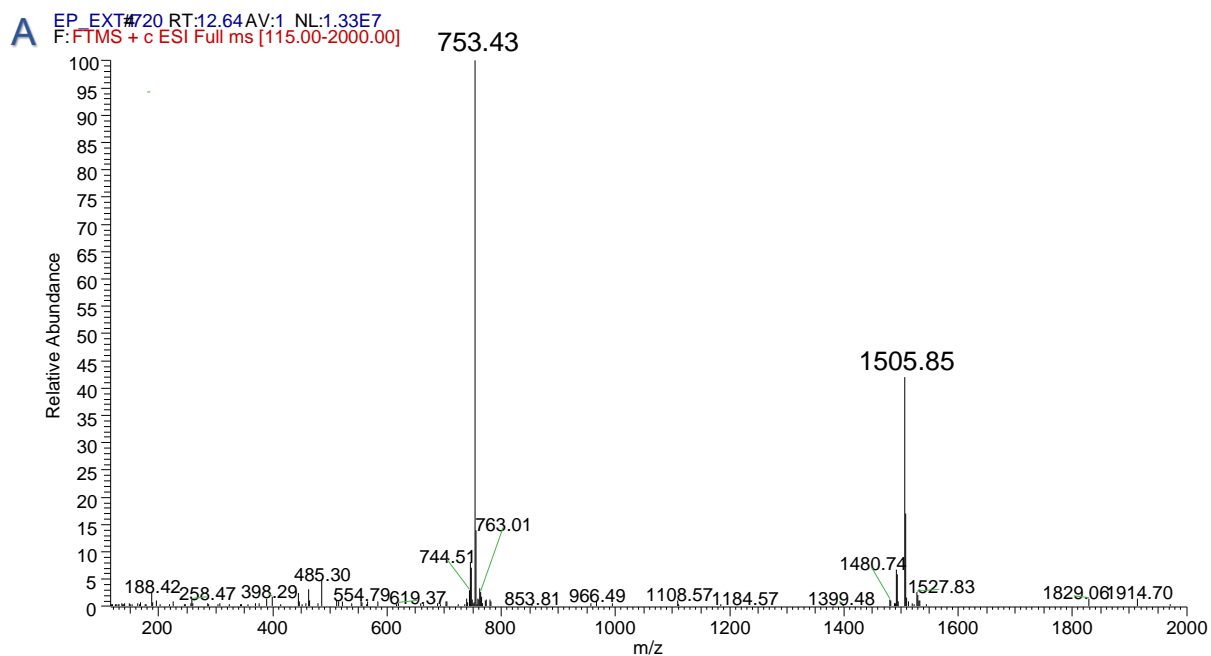
B EP_EXT4 #696 RT: 12.28 AV: 1 NL: 2.12E5
 F: FTMS + c ESI d Full ms2 1477.82@cid35.00 [395.00-1490.00]



Εικόνα 53 Ταυτοποίηση της δομής της φεγκυσίνης A που εκκλύεται στα 12.27 min (φεγκυσίνη A με λιπαρή αλυσίδα με 17 άνθρακες) (A) Φάσμα HRMS, (B) Φάσμα HRMS/MS, όπου σημειώνεται η παρατηρούμενη θραυσματοποίηση, (C) δομή φεγκυσίνης.



Εικόνα 54 Ταυτοποίηση της δομής της φεγκυσίνης B που εκλύεται στα 12.32 min (φεγκυσίνη B με λιπαρή αλυσίδα με 16 άνθρακες) (A) Φάσμα HRMS, (B) Φάσμα HRMS/MS, όπου σημειώνεται η παρατηρούμενη θραυσματοποίηση, (C) δομή φεγκυσίνης.



Εικόνα 55 Ταυτοποίηση της δομής της φεγκυσίνης Β που εκλύεται στα 12.64 min (φεγκυσίνη Β με λιπαρή αλυσίδα με 17 άνθρακες) (A) Φάσμα HRMS, (B) Φάσμα HRMS/MS, όπου σημειώνεται η παρατηρούμενη θραυσματοποίηση, (C) δομή φεγκυσίνης.

3.4.3 Μελέτη του ρυθμού ανάπτυξης του ενδοφυτικού βακτηρίου PTA13 και της παραγωγής λιποπεπτιδίων στη διάρκεια επώασής του

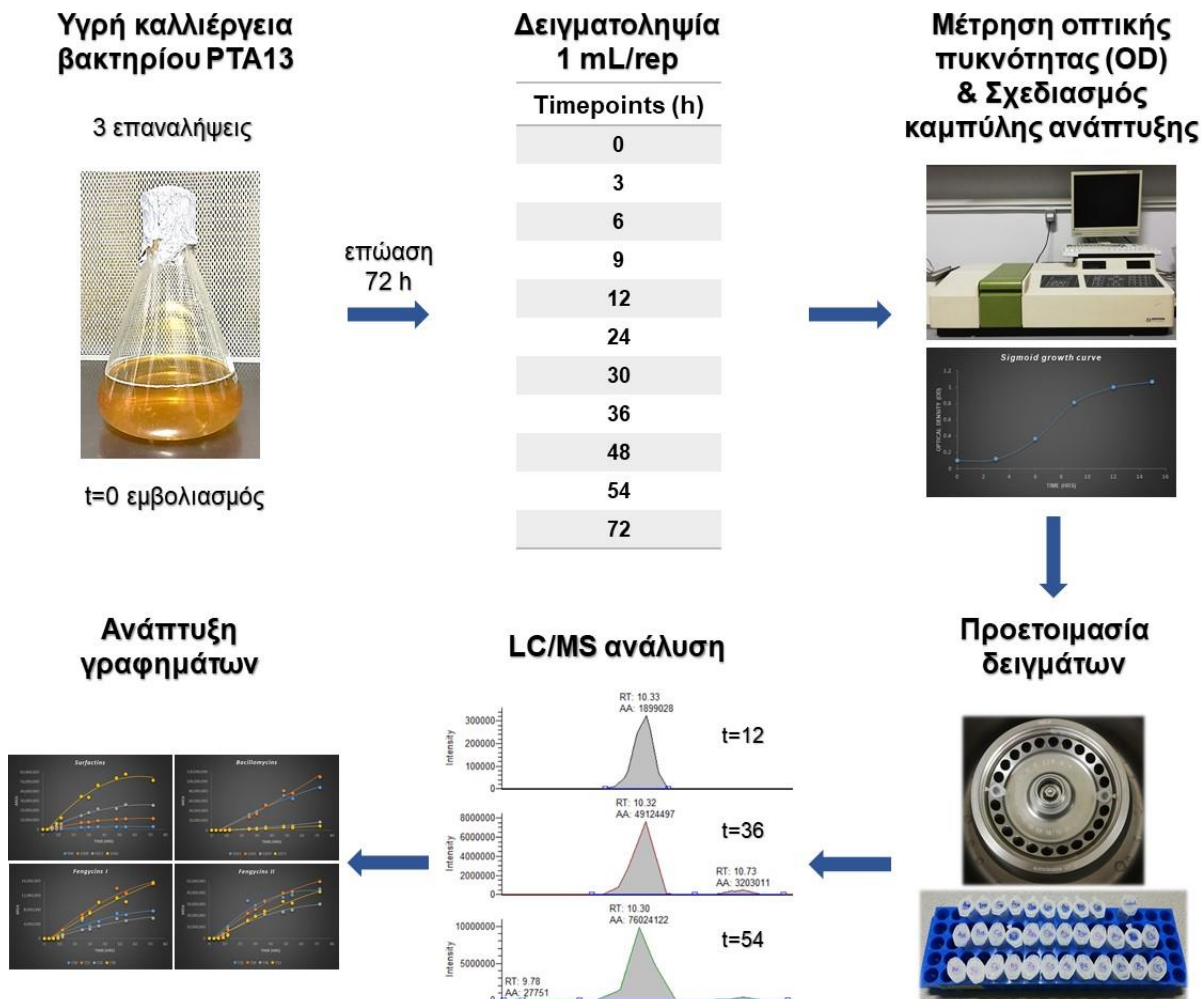
Η σχετικά χαμηλή απόδοση της καλλιέργειας του βακτηρίου PTA13 σε λιποπεπτίδια, όπως αναφέρθηκε και στην §3.4.1, αποτέλεσε αιτία για τη λεπτομερέστερη μελέτη της ανάπτυξής του, καθώς και της παραγωγής των μεταβολιτών κατά τη διάρκεια καλλιέργειάς του. Στόχος της μελέτης αυτής ήταν ο εντοπισμός του βέλτιστου χρόνου καλλιέργειας για τη μέγιστη παραγωγή λιποπεπτιδίων, στην προσπάθεια παραλαβής της μεγαλύτερης δυνατής ποσότητας κλάσματος. Δευτερεύων στόχος της διαδικασίας αυτής ήταν η διερεύνηση της σειράς παραγωγής των επιμέρους κατηγοριών λιποπεπτιδίων κατά τη διάρκεια καλλιέργειας, αλλά και η συσχέτιση της έναρξης παραγωγής της κάθε κατηγορίας με τη φάση ανάπτυξης του μικροοργανισμού.

Η πειραματική διαδικασία που ακολουθήθηκε απεικονίζεται διαγραμματικά στην *Εικόνα 56*. Η καλλιέργεια του βακτηρίου PTA13 πραγματοποιήθηκε όπως περιγράφεται στην §3.4.1. Για τη συγκεκριμένη μελέτη διεξάχθηκαν 3 επαναλήψεις, με τη χρήση 3 κωνικών φιαλών 500 mL πληρωμένων με 300 mL θρεπτικού υλικού LB, οι οποίες εμβολιάστηκαν την ίδια χρονική στιγμή ($t=0$), με τον ίδιο τρόπο και επωάστηκαν παράλληλα και υπό τις ίδιες συνθήκες για 72 ώρες.

Η παρακολούθηση της παραγωγής των λιποπεπτιδίων από το βακτήριο στη διάρκεια του χρόνου, πραγματοποιήθηκε με δειγματοληψίες 1 mL από κάθε κωνική φιάλη στα εξής χρονικά σημεία: $t= 0, 3, 6, 9, 12, 24, 30, 36, 48, 54, 72$ h. Για κάθε δειγματοληψία πραγματοποιήθηκε μέτρηση της οπτικής πυκνότητας του διαλύματος σε φασματοφωτόμετρο Uvikon 922 (Kontron Instruments) στα 600 nm, για την παρακολούθηση του ρυθμού ανάπτυξης της βακτηριακής αποικίας και το σχεδιασμό της καμπύλης ανάπτυξης του μικροοργανισμού (*Εικόνα 57*). Στη συνέχεια, τα δείγματα φυγοκεντρήθηκαν για την καταβύθιση των βακτηριακών κυττάρων (βλέπε §3.4.1) και το υπερκείμενο διάλυμα κάθε δείγματος μεταφέρθηκε σε νέο σωληνάκι τύπου Eppendorf. Τέλος, τα δείγματα συμπυκνώθηκαν μέχρι ξηρού και προετοιμάστηκαν κατάλληλα για την περαιτέρω ανάλυσή τους.

Για την παρασκευή συγκεντρώσεων κατάλληλων για τη συγκριτική μελέτη των δειγμάτων, αρχικά τα συμπυκνωμένα δείγματα επαναδιαλύθηκαν σε 1 mL H₂O MS grade. Ακολούθησε αραίωση 1/10 όλων των δειγμάτων (100 μL από κάθε δείγμα προστέθηκαν σε 900 μL διαλύτη MeOH:H₂O 50:50 v/v). Η μέθοδος και το όργανο που χρησιμοποιήθηκαν για την ανάλυση παρουσιάζονται στην §3.4.2.3. Όλα τα χρωματογραφήματα TIC (11 timepoints x 3 επαναλήψεις = 33 συνολικά χρωματογραφήματα) αναλύθηκαν με το πρόγραμμα Xcalibur (ThermoScientific) για τη διεξαγωγή μελέτης ποσοτικοποίησης.

Δεδομένου ότι το εμβαδό της κορυφής μιας ουσίας στο χρωματογράφημα TIC είναι ανάλογο της συγκέντρωσης της ουσίας αυτής στο δείγμα, πραγματοποιήθηκε, σε όλα τα δείγματα, υπολογισμός των εμβαδών των κορυφών για καθέναν από τους 16 ταυτοποιημένους μεταβολίτες του εκχυλίσματος (4 σουρφακτίνες, 4 βακιλλομυσίνες και 8 φεγκυσίνες) (βλέπε §3.4.2.3). Ακολούθησε υπολογισμός του τελικού εμβαδού της κορυφής κάθε λιποπεπτιδίου για κάθε χρονικό σημείο (μέσος όρος των 3 επαναλήψεων) και τα αποτελέσματα παρουσιάζονται (ξεχωριστά για κάθε κατηγορία) με την ανάπτυξη γραφημάτων απεικόνισης της συσχέτισης εμβαδού κορυφής-χρόνου καλλιέργειας για κάθε μία από τις ουσίες αυτές (*Εικόνες 58-61*), καθώς και των αντίστοιχων συγκεντρωτικών γραφημάτων για όλες τις ουσίες κάθε ομάδας λιποπεπτιδίων (*Εικόνα 62*).



Εικόνα 56 Πειραματική πορεία μελέτης του ρυθμού ανάπτυξης του ενδοφυτικού βακτηρίου PTA13 και της παραγωγής λιποπεπτιδίων στη διάρκεια επώασής του.

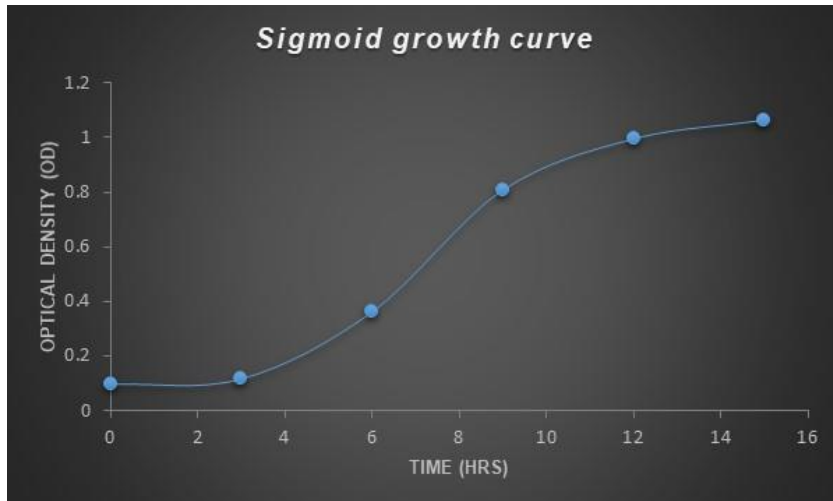
Αποτελέσματα μελέτης

Η καμπύλη ανάπτυξης του βακτηρίου PTA13 (*Εικόνα 57*) που κατασκευάστηκε βάσει των μετρήσεων οπτικής πυκνότητας του διαλύματος της καλλιέργειας, αποτελεί μια τυπική καμπύλη ανάπτυξης μικροοργανισμού, με σιγμοειδές σχήμα και διακριτές φάσεις. Παρατηρείται ότι η βακτηριακή αποικία παραμένει στη λανθάνουσα φάση ανάπτυξης της έως την 3^η ώρα καλλιέργειάς της, ενώ στη συνέχεια περνά στην επιταχυνόμενη και ακολούθως στην εκθετική φάση ανάπτυξης, η οποία διαρκεί μέχρι την 9^η ώρα καλλιέργειας. Στην 9^η ώρα επώασης, το βακτήριο περνά στην

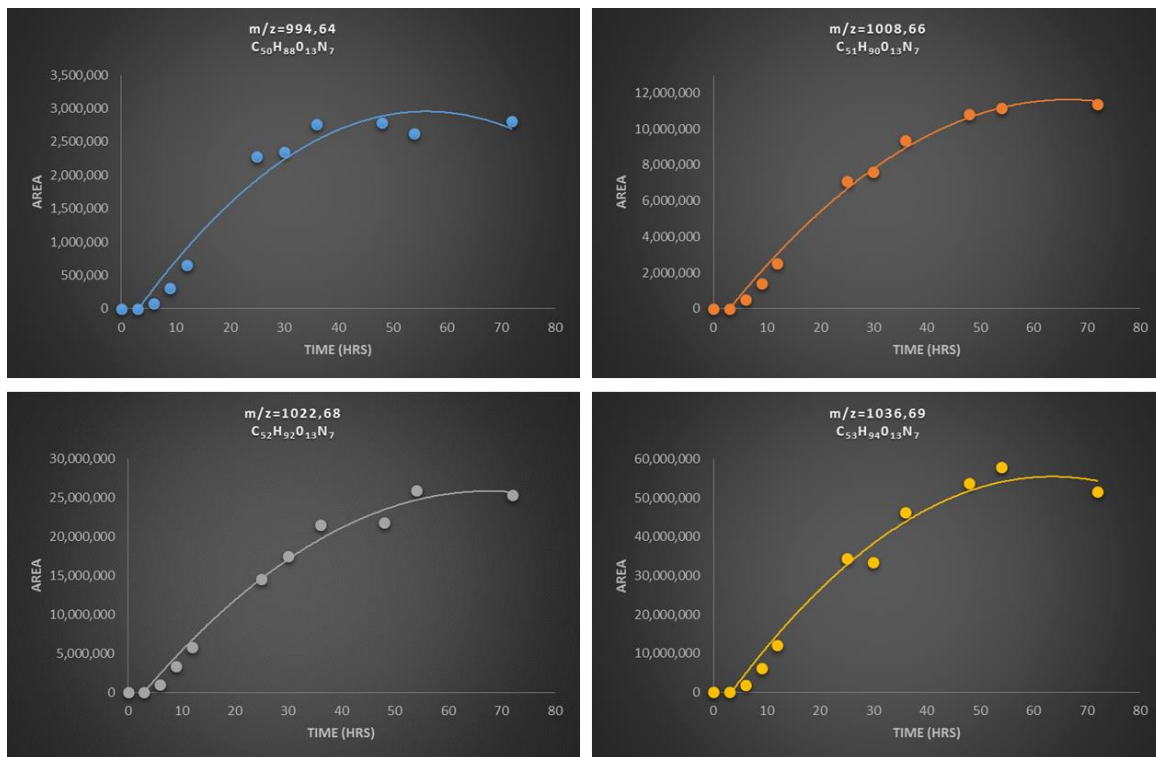
επιβραδυνόμενη φάση ανάπτυξής του, την οποία διαδέχεται η στατική φάση. Η επιβραδυνόμενη και στατική φάση ανάπτυξης ενός μικροοργανισμού αποτελούν τα στάδια εκείνα στα οποία πραγματοποιείται συνήθως η παραγωγή των δευτερογενών μεταβολιτών του. Σε αυτή τη φάση, ο μικροοργανισμός παύει να διοχετεύει ενέργεια και πηγές άνθρακα για την παραγωγή βιομάζας και στρέφεται στην παραγωγή δευτερογενών βιοδραστικών μεταβολιτών (Joyce et al., 2011).

Σε συνδυασμό με τα παραπάνω και βάσει των γραφημάτων παραγωγής των λιποπεπτιδίων στη διάρκεια επώασης της καλλιέργειας, παρατηρείται πρώιμη παραγωγή των σουρφακτινών, κατά τη διάρκεια της εκθετικής φάσης ανάπτυξης του βακτηρίου ($t=6$ h) (*Εικόνα 58*), συγκριτικά με των λιποπεπτιδίων των άλλων δύο ομάδων (βακιλλομυσίνες, φεγκυσίνες), η πλειοψηφία των οποίων αρχίζει να παράγεται από την 9^η ώρα καλλιέργειας και έπειτα (*Εικόνες 59-61*). Μία επιπλέον διαφοροποίηση παρατηρείται όσον αφορά στο μέγιστο της παραγωγής των κατηγοριών. Συγκεκριμένα, η μέγιστη παραγωγή των σουρφακτινών φαίνεται ότι είναι στις 48 h καλλιέργειας του βακτηρίου, όπου παρατηρείται πλατό στην καμπύλη τους, σε αντίθεση με τις βακιλλομυκίνες και φεγκυσίνες, των οποίων η παραγωγή συνεχίζει να αυξάνεται μέχρι τις 72 h (*Εικόνα 62*).

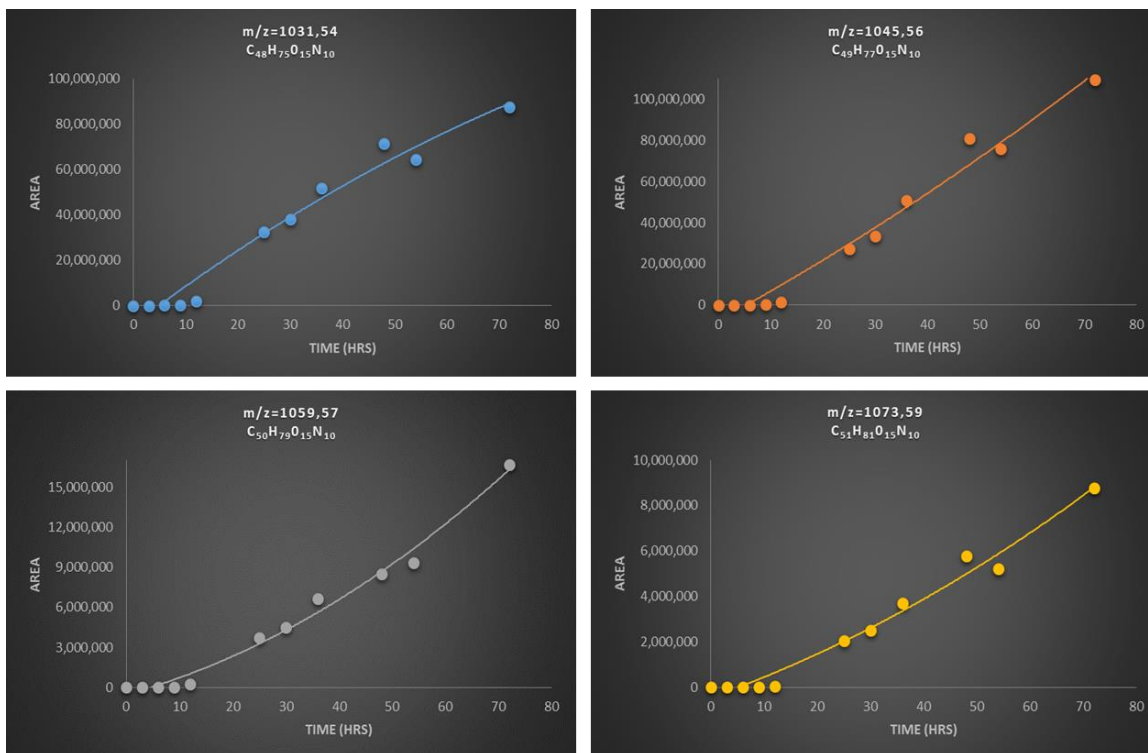
Η διαφορά στην έναρξη και πορεία παραγωγής των ουσιών αυτών από το βακτήριο πιθανόν να σχετίζεται με την κάλυψη διαφορετικών αναγκών του μικροοργανισμού από κάθε κατηγορία και επιπλέον να υποδηλώνει διαφορετική βιολογική δράση των ομάδων. Στο πλαίσιο αυτό, η πρώιμη παραγωγή των σουρφακτινών ενδεχόμενως σημαίνει ότι τα λιποπεπτίδια της ομάδας αυτής συμβάλλουν στην ευρέως φάσματος άμυνα του βακτηρίου, ενώ οι ουσίες των άλλων δύο ομάδων μπορεί να αποτελούν μια πιο εξειδικευμένη γραμμή άμυνας του μικροοργανισμού.



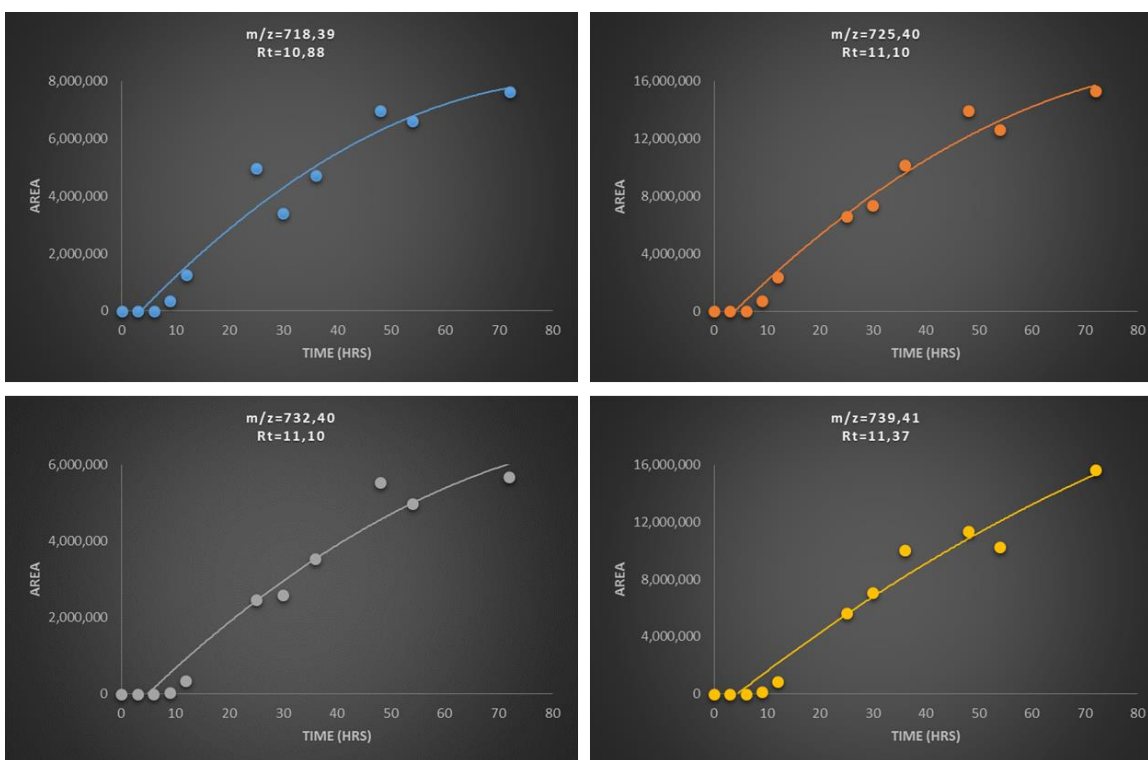
Εικόνα 57 Καμπύλη ανάπτυξης του βακτηρίου PTA13.



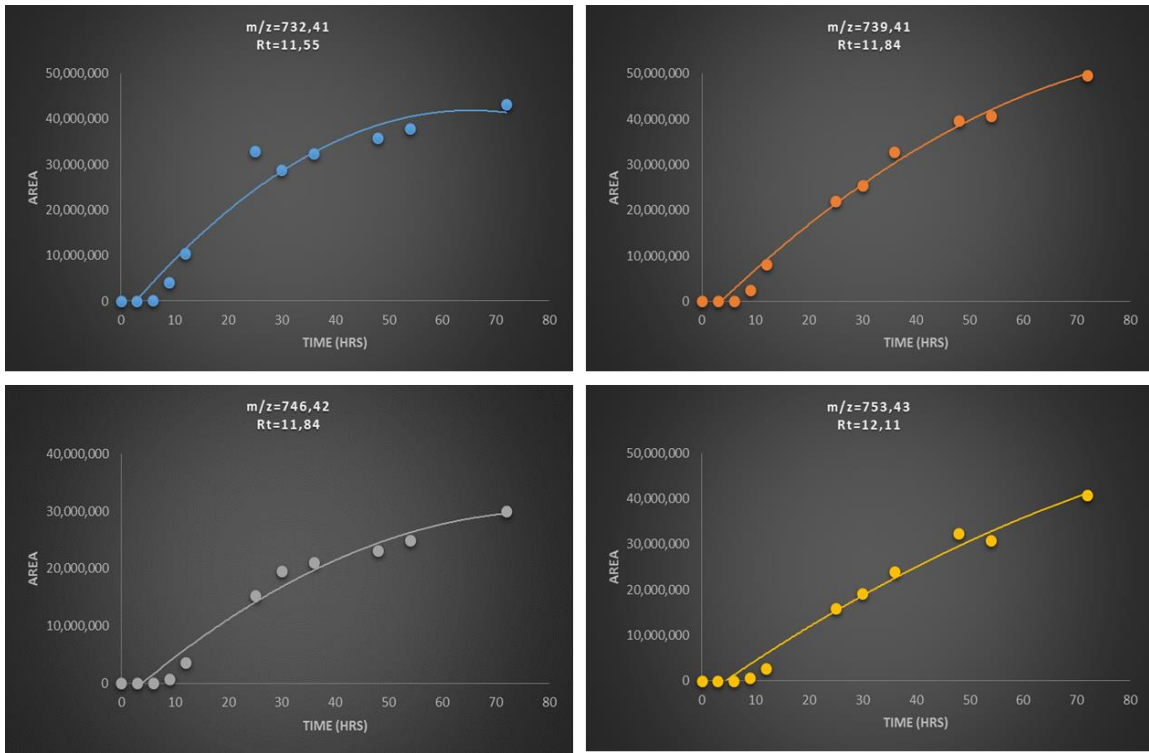
Εικόνα 58 Γραφήματα απεικόνισης της σχέσης εμβαδού κορυφής-χρόνου καλλιέργειας για τα λιποπεπτίδια της ομάδας των σουρφακτινών.



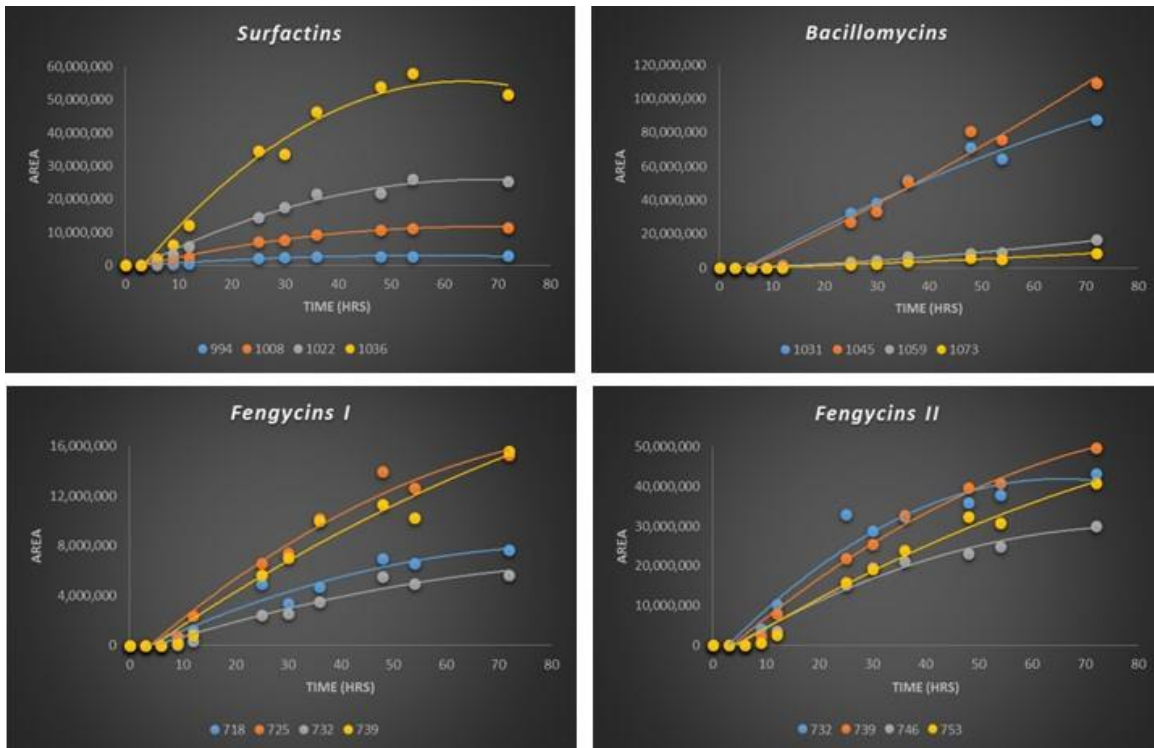
Εικόνα 59 Γραφήματα απεικόνισης της σχέσης εμβαδού κορυφής-χρόνου καλλιέργειας για τα λιποπεπτίδια της ομάδας των βακιλλομυσινών.



Εικόνα 60 Γραφήματα απεικόνισης της σχέσης εμβαδού κορυφής-χρόνου καλλιέργειας για τα λιποπεπτίδια της ομάδας A των φεγκυσινών.



Εικόνα 61 Γραφήματα απεικόνισης της σχέσης εμβαδού κορυφής-χρόνου καλλιέργειας για τα λιποπεπτίδια της ομάδας Β των φεγκυσινών.



Εικόνα 62 Συγκεντρωτικά γραφήματα απεικόνισης της σχέσης εμβαδού κορυφής-χρόνου καλλιέργειας για τα λιποπεπτίδια των 4 κατηγοριών.

3.5 Βιοδοκιμές του λιποπεπτιδικού κλάσματος σε ευαίσθητα και ανθεκτικά στελέχη *Colletotrichum acutatum*

3.5.1 Μελέτη της επίδρασης του λιποπεπτιδικού εκχυλίσματος στη γραμμική ανάπτυξη ευαίσθητων και ανθεκτικών στελεχών *Colletotrichum acutatum*

Η μελέτη της επίδρασης του λιποπεπτιδικού κλάσματος στη γραμμική ανάπτυξη των δύο στελεχών *C. acutatum* (PLS_88, PLS_90), πραγματοποιήθηκε με *in vitro* δοκιμές, εφαρμόζοντας μια σειρά συγκεντρώσεων του εκχυλίσματος στο θρεπτικό υλικό των παθογόνων μυκήτων. Από τη μελέτη αυτή, υπολογίστηκαν αρχικά τα ποσοστά παρεμπόδισης της ανάπτυξης των δύο στελεχών μετά από εφαρμογή της εκάστοτε συγκέντρωσης, ενώ εκτιμήθηκε και η συγκέντρωση του εκχυλίσματος που μειώνει στο 50% τη γραμμική ανάπτυξη των μυκήτων (Half Maximal Effective Concentration, EC₅₀).

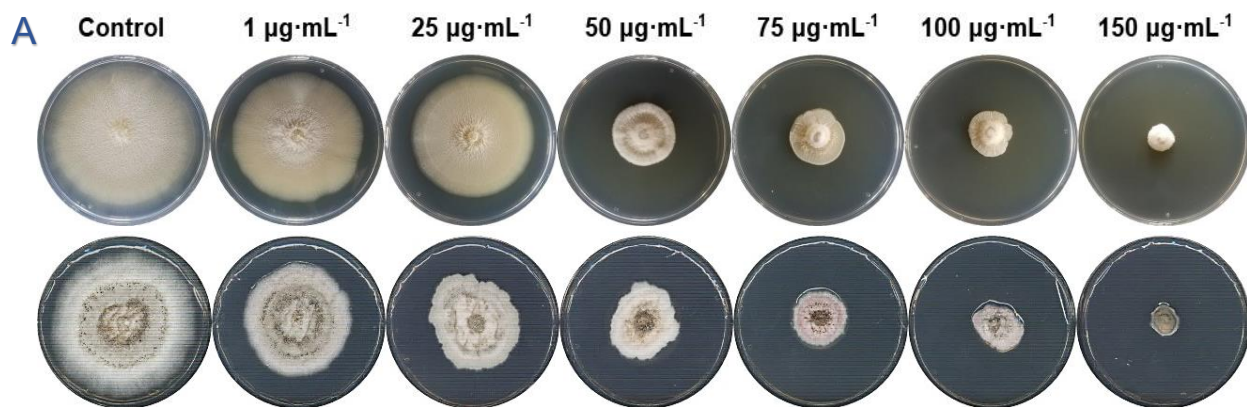
Η βιοδοκιμή πραγματοποιήθηκε σε τρυβλία Petri διαμέτρου 9 cm, τα οποία πληρώθηκαν με 20 mL θρεπτικού υλικού. Για τον εμβολιασμό, χρησιμοποιήθηκε βιολογικό υλικό από καλλιέργειες 10 ημερών των στελεχών *C. acutatum*, ενώ τα διαλύματα εργασίας (stock solutions) του λιποπεπτιδικού κλάσματος προετοιμάστηκαν σε μεθανόλη. Οι συγκεντρώσεις του εκχυλίσματος που εφαρμόστηκαν ήταν 1, 25, 50, 75, 100 και 150 $\mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$ και επιπλέον, πραγματοποιήθηκαν 3 επαναλήψεις ανά επέμβαση και για τους δύο μύκητες.

Αρχικά, πραγματοποιήθηκε η παρασκευή της συνολικής ποσότητας θρεπτικού υλικού (PDA) για την εκτέλεση του πειράματος, το οποίο στη συνέχεια μοιράστηκε σε δοχεία μικρότερου όγκου (1 δοχείο για κάθε επέμβαση). Σε αυτά προστέθηκε κατάλληλος όγκος διαλύματος εργασίας του εκχυλίσματος για την επίτευξη της εκάστοτε συγκέντρωσης για κάθε επέμβαση. Στο δοχείο που αντιστοιχούσε στο μάρτυρα, προστέθηκε ποσότητα μεθανόλης ίση με εκείνη της μέγιστης χρησιμοποιούμενης συγκέντρωσης του εκχυλίσματος, ώστε να εντοπιστεί ενδεχόμενη τοξικότητα που οφείλεται στο χρησιμοποιούμενο διαλύτη και όχι στα λιποπεπτίδια. Στη συνέχεια, ογκομετρήθηκαν 20 mL του υλικού και προστέθηκαν σε κάθε τρυβλίο, Ακολούθησε η λήψη κυκλικών εμβολίων από την περιφέρεια των μητρικών καλλιεργειών με τη βοήθεια φελλοτρυπητήρα και η τοποθέτησή τους στο κέντρο των

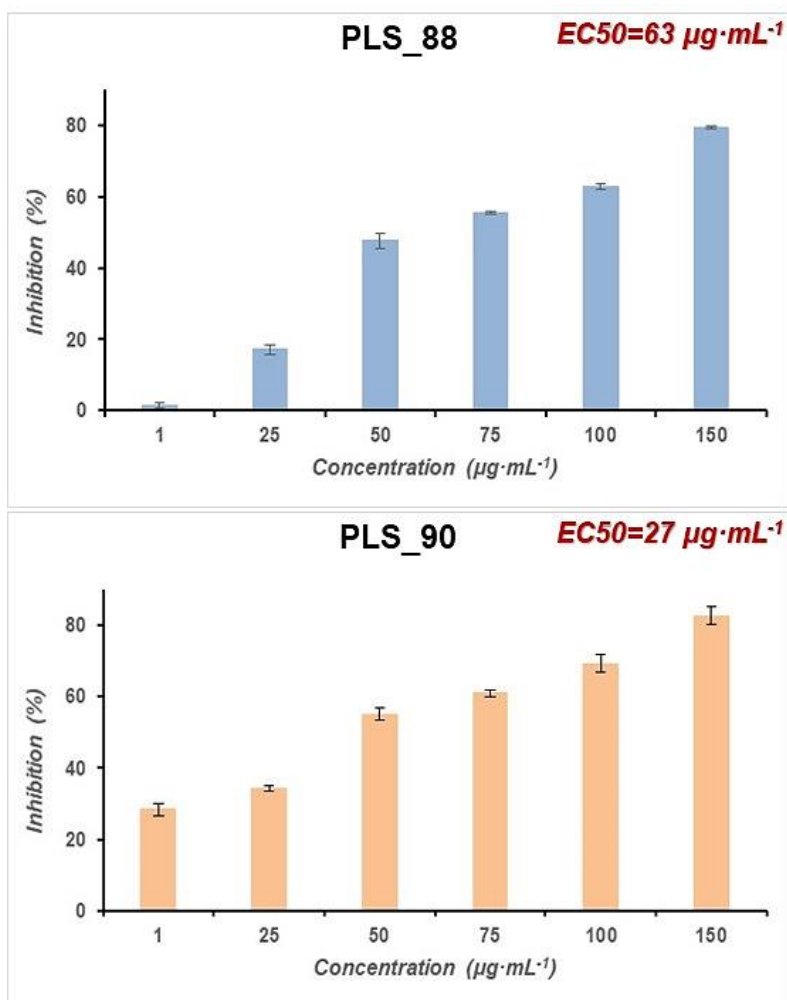
νέων τρυβλίων. Οι χειρισμοί πραγματοποιήθηκαν σε θάλαμο οριζόντιας νηματικής ροής (laminar) υπό ασηπτικές συνθήκες. Τέλος, τα τρυβλία τυλίχθηκαν με ταινία parafilm και τοποθετήθηκαν σε επωαστικό θάλαμο (22°C υπό συνθήκες σκότους).

Η επώαση διήρκεσε 17 ημέρες και για τα δύο στελέχη, στο τέλος της οποίας ελήφθησαν μετρήσεις ανάπτυξης. Ο υπολογισμός της ανάπτυξης των στελεχών πραγματοποιήθηκε με μέτρηση της διαμέτρου του μυκηλίου κάθε αποικίας. Η γραμμική ανάπτυξη των αποικιών χρησιμοποιήθηκε για την εκτίμηση της μυκητοτοξικότητας. Ακολούθησε στατιστική ανάλυση των ποσοστών παρεμπόδισης της ανάπτυξης των μυκήτων στις συγκεντρώσεις εκχυλίσματος που εφαρμόστηκαν, σε σχέση με το μάρτυρα, η οποία πραγματοποιήθηκε με το πρόγραμμα JMP v.13 (SAS Institute Inc., Cary, NC), με το Tukey's test (Tukey HSD test), σε επίπεδο σημαντικότητας $\alpha=0.05$. Ο υπολογισμός της τιμής EC_{50} του εκχυλίσματος για κάθε μύκητα πραγματοποιήθηκε με τη μέθοδο των PROBIT του προγράμματος JMP.

Τα αποτελέσματα της παραπάνω μελέτης παρουσιάζονται στην [Εικόνα 63](#), όπου απεικονίζεται η μυκηλιακή ανάπτυξη των στελεχών στις διάφορες επεμβάσεις ([Εικόνα 63A](#)), ενώ εμφανίζονται και τα γραφήματα παρεμπόδισης της γραμμικής ανάπτυξης των μυκήτων συναρτήσει της εφαρμοζόμενης συγκέντρωσης εκχυλίσματος ([Εικόνα 63B](#)). Τέλος, η EC_{50} του λιποπεπτιδικού κλάσματος υπολογίστηκε στα $63 \mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$ για το στέλεχος PLS_88 και στα $27 \mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$ για το στέλεχος PLS_90 του *C. acutatum*. Ενδιαφέρον παρουσιάζει η μεγάλη αυτή διαφορά ανάμεσα στα δύο στελέχη του ίδιου είδους φυτοπαθογόνου μύκητα, με την EC_{50} του εκχυλίσματος για το λιγότερο ευαίσθητο σε εγκεκριμένα μυκητοκτόνα στέλεχος (PLS_88) να παρουσιάζεται υψηλότερη από τη διπλάσια τιμή της αντίστοιχης του περισσότερο ευαίσθητου στελέχους (PLS_90).



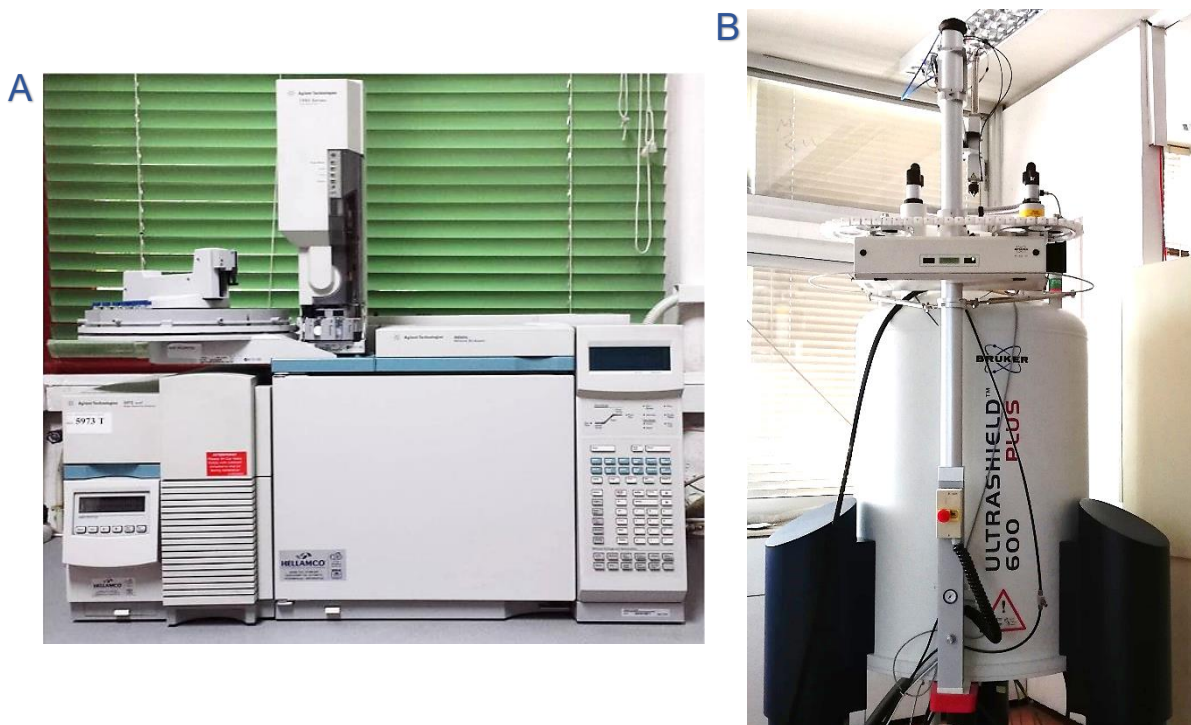
B



Εικόνα 63 (A) Επίδραση του λιποπεπτιδικού εκχυλίσματος στη γραμμική ανάπτυξη καλλιεργειών των στελεχών PLS_88 (πάνω) και PLS_90 (κάτω) του *Colletotrichum acutatum* κατά την ημέρα υπολογισμού της EC_{50} (17 ημέρες μετά τις επεμβάσεις). **(B)** Διαγραμματική απεικόνιση των ποσοστών παρεμπόδισης της γραμμικής ανάπτυξης των στελεχών PLS_88 (πάνω) PLS_90 (κάτω) του μύκητα *Colletotrichum acutatum* στις διάφορες συγκεντρώσεις του λιποπεπτιδικού εκχυλίσματος, 17 ημέρες μετά τις επεμβάσεις. Οι ράβδοι αντιστοιχούν στο μέσο όρο 3 επαναλήψεων. Η στατιστική ανάλυση πραγματοποιήθηκε με το Student's T-test ($P>95\%$). Με κόκκινα γράμματα σημειώνονται οι τιμές EC_{50} του εκχυλίσματος για τα δύο στελέχη.

3.5.2 Μεταβολομική ανάλυση του στελέχους PLS_90 του φυτοπαθογόνου μύκητα *Colletotrichum acutatum* με εφαρμογή του δραστικού λιποπεπτιδικού εκχυλίσματος του ενδοφυτικού βακτηρίου PTA13

Το στέλεχος *C. acutatum* που επιλέχθηκε για τη μελέτη της επίδρασης των λιποπεπτιδίων στο μεταβολισμό του ήταν το PLS_90 (ευαίσθητο σε μυκητοκτόνα στέλεχος γλοιοσπορίου). Η πειραματική πορεία για τη μεταβολομική ανάλυση περιλάμβανε την έκθεση του μικροοργανισμού σε υποθανάτια δόση του λιποπεπτιδικού εκχυλίσματος (EC₅₀), τη συλλογή και προετοιμασία των δειγμάτων για την εξαγωγή του ενδο-μεταβολώματος του μύκητα, την ανάλυση με GC/EI/MS (*Εικόνα 64A*) και ¹H NMR (*Εικόνα 64B*), την ταυτοποίηση των μεταβολιτών σύμφωνα με βάσεις δεδομένων και τέλος, την ανακάλυψη μεταβολιτών-βιοσημαντών της δραστηριότητας του εκχυλίσματος μέσω επεξεργασίας των δεδομένων και αναλύσεων βιοπληροφορικής (*Εικόνα 65*).



Εικόνα 64 (A) Αέριος χρωματογράφος Agilent 6890 MS με αυτόματο δειγματολήπτη 7683, σε συνδυασμό με ανιχνευτή μάζας 5973 (GC/EI/MS), *(B)* Φασματοόμετρο υγρών δειγμάτων Bruker Avance III-600 spectrometer.



Εικόνα 65 Πειραματική διαδικασία μεταβολομικής ανάλυσης του στελέχους PLS_90 του φυτοπαθογόνου μύκητα *Colletotrichum acutatum* μετά από έκθεσή του στο δραστικό λιποπεπτιδικό εκχύλισμα του ενδοφυτικού βακτηρίου PTA13.

3.5.2.1 Πειραματικός σχεδιασμός και δειγματοληψία

Το πείραμα πραγματοποιήθηκε σε τρυβλία Petri (διαμέτρου 9 cm) με 20 mL στερεού θρεπτικού υλικού PDA. Για τον εμβολιασμό των τρυβλίων, χρησιμοποιήθηκε βιολογικό υλικό από καλλιέργειες 10 ημερών του μύκητα, οι οποίες είχαν δημιουργηθεί μετά από εμβολιασμό τρυβλίων με υλικό αποθηκευμένο σε γλυκερόλη στους -80°C (§3.1.3). Τα διαλύματα εργασίας (working stock solutions) του λιποπεπτιδικού εκχυλίσματος προετοιμάστηκαν σε μεθανόλη (MS grade) και η συγκέντρωση του εκχυλίσματος που εφαρμόστηκε ήταν $27 \mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$ (EC_{50} , §3.5.1), ενώ πραγματοποιήθηκαν συνολικά 18 βιολογικές επαναλήψεις.

Το πείραμα πραγματοποιήθηκε όπως περιγράφεται στην §3.5.1, με τη διαφορά της τοποθέτησης αποστειρωμένης μεμβράνης σελοφάν (500PUT, Futamura USA Inc., Atlanta, GA, USA) στην επιφάνεια του στερεού θρεπτικού υλικού των τρυβλίων πριν τον εμβολιασμό τους με το μύκητα, ώστε να είναι εφικτός ο διαχωρισμός των μυκηλιακών υφών από το θρεπτικό υπόστρωμα, με στόχο την ανάλυση του ενδομεταβολώματος του μικροοργανισμού. Η επώαση των καλλιεργειών διήρκεσε 17 ημέρες σε θερμοκρασία 22°C και σε συνθήκες σκότους.

Μετά το πέρας των 17 ημερών, πραγματοποιήθηκε η δειγματοληψία, με συλλογή του μυκηλίου σε Eppendorf tubes (2 mL) και άμεση εμβάπτισή τους σε υγρό άζωτο (N_2) για την ακαριαία διακοπή του μεταβολισμού του μύκητα (quenching) (K. A. Aliferis & Jabaji, 2010b). Ακολούθησε κονιοποίηση των υφών των δειγμάτων σε γουδί με γουδοχέρι με τη χρήση υγρού αζώτου και ομαδοποίηση των 18 βιολογικών επαναλήψεων σε ομάδες των 3, ώστε να προκύψουν τελικά 6 συνδυασμένα (pooled) δείγματα. Επιπλέον, υποπολλαπλάσια δείγματα κάθε βιολογικής επανάληψης συνδυάστηκαν για να ληφθούν δείγματα ελέγχου ποιότητας (Quality Control, QC samples). Τα κονιοποιημένα δείγματα αποθηκεύτηκαν σε θερμοκρασία -80°C για μελλοντική χρήση.

3.5.2.2 GC/EI/MS ανάλυση

3.5.2.2.1 Προετοιμασία δειγμάτων

Για τη μεταβολομική ανάλυση με χρήση GC/MS, ζυγίστηκε ποσότητα 40 mg κονιοποιημένου μυκηλίου των δειγμάτων σε Eppendorf tubes (2 mL) και ακολούθησε εκχύλιση του ιστού με προσθήκη 700 μL μίγματος μεθανόλης:οξικού αιθυλεστέρα (MeOH:EtOAc 1:1 v/v) σε κάθε δείγμα (Kalampokis et al., 2018; Kolainis et al., 2020; Lykogianni et al., 2020). Επιπλέον, σε αυτό το στάδιο προστέθηκαν 20 μL διαλύματος ριβιτόλης σε μεθανόλη συγκέντρωσης $0.2 \text{ mg}\cdot\text{mL}^{-1}$ για χρήση του ως εσωτερικό πρότυπο (spiking). Η εκχύλιση υποβοηθήθηκε αρχικά με την τοποθέτηση των δειγμάτων σε λουτρό υπερήχων για 20 min (Ultrasonic bath, Branson 1210, Danbury, U.S.A.) και στη συνέχεια με ανάδευσή τους για 60 min σε οριζόντιο αναδευτήρα (orbital shaker, GFL 3006, Gesellschaft für Labortechnik mbH, Burgwedel, Germany) στους 24°C . Το εκχύλισμα των δειγμάτων φιλτραρίστηκε με φίλτρο διαμέτρου πόρων $0.2 \mu\text{m}$ (Macherey-Nagel, Duren, Germany) για την εξαίρεση του αδιάλυτου ιστού, τοποθετήθηκε σε νέα Eppendorf tubes και συμπυκνώθηκε υπό κενό μέχρι ξηρού (vacuum concentrator, Labconco, Kansas City, MO, U.S.A.).

Ακολούθησε παραγωγοποίηση (derivatization) των ξηρών δειγμάτων, η οποία πραγματοποιήθηκε σε δύο στάδια. Αρχικά, προστέθηκαν 80 μL διαλύματος MeOX σε πυριδίνη (methoxyamine hydrochloride 98.0%, w/w, Sigma-Aldrich), συγκέντρωσης $20 \text{ mg}\cdot\text{mL}^{-1}$ και τα δείγματα τοποθετήθηκαν σε υδατόλουτρο θερμοκρασίας 30°C για 2 h (waterbath, Daihan Labtech, Gyeonggi-do, Korea). Στο στάδιο αυτό της μεθοξυμάτωσης (methoxymation), το MeOX δεσμεύει τις καρβονυλικές ομάδες των σακχάρων, παρεμποδίζοντας το σχηματισμό δακτυλίου (ring formation), ο οποίος θα οδηγούσε στην εμφάνιση πολλαπλών χρωματογραφικών κορυφών (Bekele et al., 2014). Στη συνέχεια, προστέθηκαν 80 μL MSTFA (N-methyl-N-(trimethylsilyl)trifluoroacetamide) και τα δείγματα μεταφέρθηκαν σε υδατόλουτρο θερμοκρασίας 37°C για 90 min. Στο στάδιο αυτό της σιλυλίωσης (silylation), οι σιλυλομάδες [silyl groups, $-\text{Si}(\text{CH}_3)_3$] αντικαθιστούν τα ενεργά υδρογόνα μεταβολιτών, όπως οξέων, αλκοολών, θειολών, αμινών και αμιδίων, με αποτέλεσμα τα προϊόντα της

αντίδρασης να είναι λιγότερο πολικά, περισσότερο πτητικά και θερμικά σταθερά (F. Wang, 2008).

Μετά την ολοκλήρωση της παραγωγοποίησης, τα δείγματα μεταφέρθηκαν σε micro inserters όγκου 180 μL (Macherey-Nagel), τα οποία ήταν τοποθετημένα στα αντίστοιχα γυάλινα φιαλίδια αυτόματου δειγματολήπτη (autosampler vials 2 mL). Η παραπάνω διαδικασία ακολουθήθηκε με τον ίδιο τρόπο και για την παρασκευή τυφλών δειγμάτων (experimental blanks), με σκοπό την ανίχνευση μεταβολικών χαρακτηριστικών που δε σχετίζονται με το προς ανάλυση βιολογικό υλικό, αλλά μπορεί να προέρχονται από πιθανή μόλυνση κατά το χειρισμό των δειγμάτων, από τα αντιδραστήρια, τη στήλη ή το όργανο (Aliferis et al., 2015).

3.5.2.2.2 Παράμετροι Μεταβολομικής Ανάλυσης

Η GC/EI/MS ανάλυση του μεταβολικού προφίλ του στελέχους PLS_90 του είδους *C. acutatum* πραγματοποιήθηκε με χρήση του αέριου χρωματογράφου Agilent 6890 MS (Agilent Technologies Inc.) του Εργαστηρίου Γεωργικής Φαρμακολογίας του Γεωπονικού Πανεπιστημίου Αθηνών, εφοδιασμένου με αυτόματο δειγματολήπτη (autosampler) 7683 και συνδεδεμένου με ανιχνευτή μάζας 5973 (inert mass selective detector, MSD) (Εικόνα 64A) ακολουθώντας δημοσιευμένα πρωτόκολλα (Kalampokis et al., 2018; Lykogianni et al., 2020). Η στήλη που χρησιμοποιήθηκε ήταν η HP-5MS Ultra Inert (UI) (μήκους 30 m, διαμέτρου 0.25 mm, πάχος υμενίου 0.25 μm , Agilent Technologies Inc.). Η αναλογία της έκχυσης που εφαρμόστηκε ήταν 5:1, με τη θερμοκρασία ρυθμισμένη στους 230°C, ενώ ως φέρον αέριο χρησιμοποιήθηκε το ήλιο (He) με ροή 1 mL·min⁻¹. Η θερμοκρασία του κλίβανου διατηρούνταν αρχικά σταθερή στους 70°C για 5 min και στη συνέχεια ακολουθούσε αύξησή της με ρυθμό 5°C·min⁻¹ έως τους 310°C, όπου διατηρούνταν σταθερή για 1 min. Χρησιμοποιήθηκε θετικός ιονισμός ηλεκτρονίων στα 70 eV. Τα φάσματα μάζας πλήρους σάρωσης αποκτήθηκαν στην περιοχή μαζών 50-800 Da (4 σαρώσεις·sec⁻¹) με αρχική καθυστέρηση καταγραφής σημάτων διάρκειας 10 min. Η θερμοκρασία για την πηγή MS και το τετράπολο ήταν 230°C και 150°C αντίστοιχα.

3.5.2.2.3 Επεξεργασία χρωματογραφημάτων

Τα χρωματογραφήματα που λήφθηκαν από τη GC/EI/MS ανάλυση επεξεργάστηκαν με το λογισμικό AMDIS v.2.66 (National Institute of Standards and Technology library, NIST, Gaithersburg, MD, U.S.A.), με τη βοήθεια του οποίου πραγματοποιήθηκε η αποσυνέλιξη (deconvolution) των κορυφών. Η δυνητική ταυτοποίηση των μεταβολικών χαρακτηριστικών στηρίχθηκε στη σύγκριση των φασμάτων μάζας τους με εκείνα της βάσης NIST 08 (Gaithersburg, MD, USA) (ταύτιση σε ποσοστό μεγαλύτερο από 95%). Οι κορυφές των τυφλών δειγμάτων (experimental blanks) αποκλείστηκαν από την παραπάνω ανάλυση. Η απόλυτη ταυτοποίηση επιλεγμένων μεταβολιτών πραγματοποιήθηκε με βάση την αντιστοίχιση των φασμάτων μάζας και χρόνων κατακράτησης (Retention time, Rt) με τα αντίστοιχα αναλυτικών προτύπων στα οποία εφαρμόστηκε η ίδια μέθοδος ανάλυσης, όπως προβλέπεται από το Metabolomics Standards Initiative (MSI) (Fiehn et al., 2007).

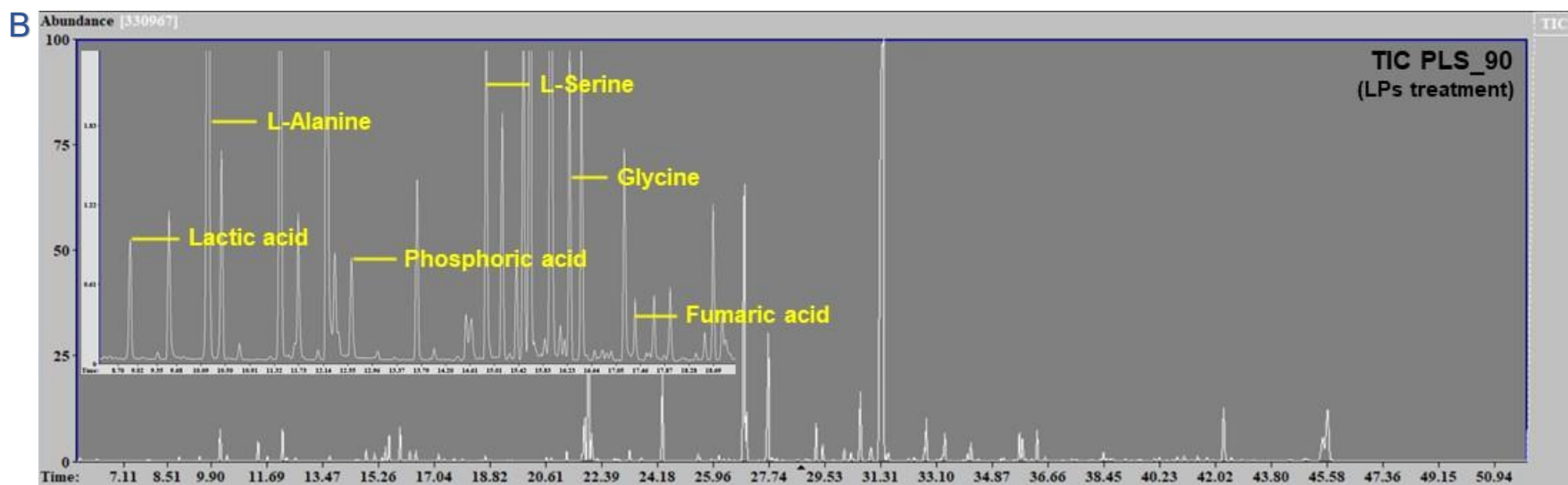
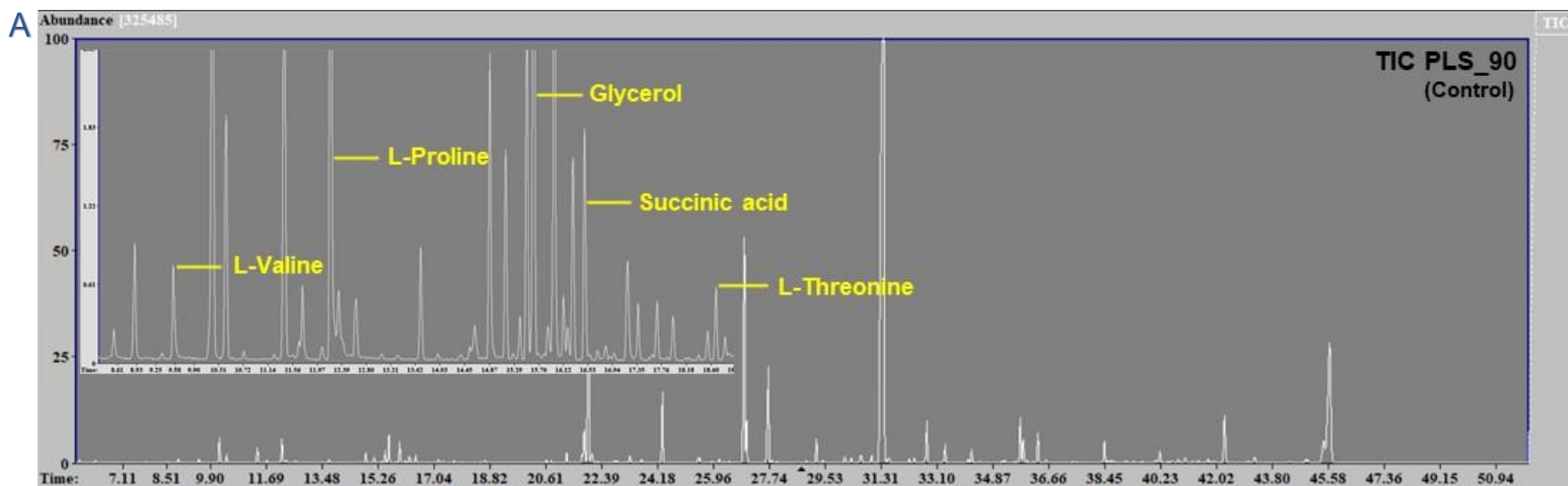
3.5.2.2.4 Βιοπληροφορική ανάλυση για την ανακάλυψη μεταβολιτών-βιοσημαντών της επίδρασης του λιποπεπτιδικού εκχυλίσματος στο μεταβολισμό του στελέχους *PLS_90* του *Colletotrichum acutatum*

Η προεπεξεργασία των δεδομένων που προέκυψαν από την GC/EI/MS ανάλυση πραγματοποιήθηκε με το λογισμικό MS DIAL v.3.70 46 (Tsugawa et al., 2015), ώστε να γίνει η απαραίτητη διόρθωση της γραμμής βάσης των χρωματογραφημάτων και η συμπλήρωση των κενών στα δεδομένα (Karamanou & Aliferis, 2020). Η μήτρα (matrix) που προέκυψε από την ανάλυση με το συγκεκριμένο λογισμικό επεξεργάστηκε περαιτέρω με το πρόγραμμα MS Excel[®]. Αναλυτικότερα, για τη βελτίωση της ακρίβειας και ενίσχυση της αξιοπιστίας της ανάλυσης, εξαιρέθηκαν κορυφές που αντιστοιχούσαν σε ουσίες που δε σχετίζονταν με το βιολογικό υλικό και κορυφές με δεδομένα σε λιγότερο από το 50% των επαναλήψεων για κάθε επέμβαση. Ακολούθως, η μήτρα εισήχθη στο λογισμικό SIMCA-P v.13.0.3 (Umetrics, Sartorius Stedim Biotech, Umea, Sweden) για την εφαρμογή πολυπαραγοντικής ανάλυσης (multivariate analysis), με

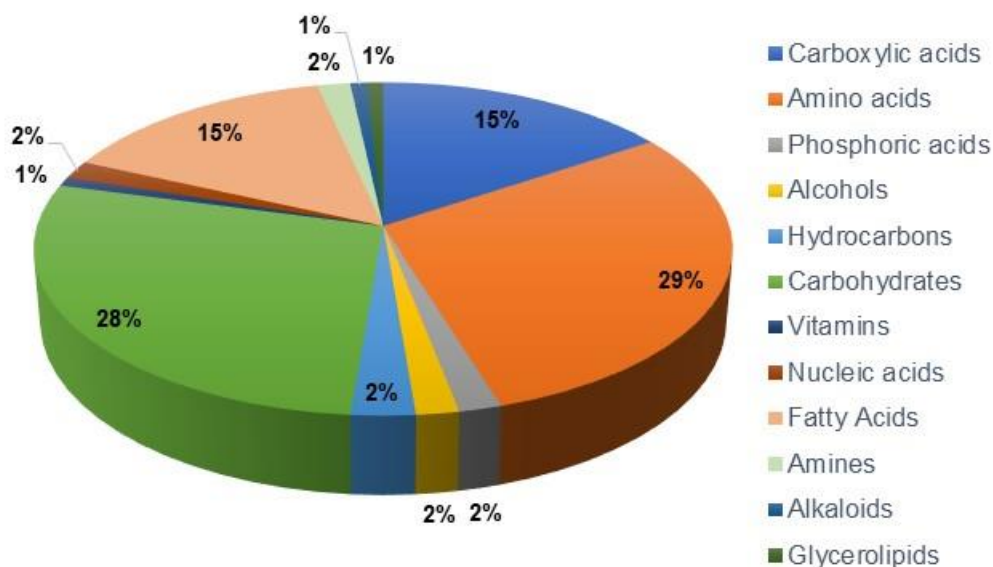
σκοπό την ανακάλυψη τάσεων μεταξύ των δεδομένων και των αντίστοιχων μεταβολικών-βιοσημαντών (biomarkers) της επίδρασης του λιποπεπτιδικού εκχυλίσματος στο μεταβολισμό του στελέχους PLS_90 του *C. acutatum* (Kalampokis et al., 2018). Η αρχική εξέταση και οπτικοποίηση του συνόλου των δεδομένων πραγματοποιήθηκε με την εκτέλεση OPLS-DA ανάλυσης ($P < 0.05$) (Orthogonal Partial Least Squares Discriminant Analysis). Η σύγκριση του ενδο-μεταβολώματος του στελέχους *C. acutatum* χωρίς και με εφαρμογή των λιποπεπτιδίων για την ανακάλυψη διαφορών και την εύρεση μεταβολικών-βιοσημαντών πραγματοποιήθηκε με τη χρήση Loadings plots, VIP plots και Coefficient plots.

3.5.2.2.5 Επισκόπηση της GC/EI/MS ανάλυσης του μεταβολικού προφίλ του στελέχους PLS_90 του μύκητα Colletotrichum acutatum παρουσία ή απουσία του λιποπεπτιδικού εκχυλίσματος του ενδοφυτικού βακτηρίου PTA13

Το βιοαναλυτικό πρωτόκολλο που εφαρμόστηκε κατά τη GC/EI/MS ανάλυση του ενδο-μεταβολώματος του ευαίσθητου μορφότυπου PLS_90 του μύκητα *C. acutatum* παρουσιάστηκε αποτελεσματικό, παρέχοντας υψηλής ποιότητας μεταβολικά προφίλ, όπως παρατηρείται στα χρωματογραφήματα GC/MS που λήφθηκαν, όπου διακρίνεται ο πολύ καλός χρωματογραφικός διαχωρισμός καθώς και η εμφάνιση οξειών κορυφών (*Εικόνα 66*). Αναλυτικότερα, η μήτρα (matrix) που δημιουργήθηκε από τη βιοπληροφορική επεξεργασία των αποτελεσμάτων με το λογισμικό MS-Dial αποτελούνταν από 194 μεταβολικά χαρακτηριστικά (metabolic features), 111 εκ των οποίων ταυτοποιήθηκαν, είτε απόλυτα είτε δυνητικά. Από αυτά, καταγράφηκαν 95 μοναδικοί μεταβολίτες, οι οποίοι ανήκαν στην πλειοψηφία τους στις χημικές ομάδες των αμινοξέων (29%), υδατανθράκων (28%), καρβοξυλικών οξέων (15%) και λιπαρών οξέων (15%), ενώ σε ένα μικρότερο ποσοστό τους σε άλλες ομάδες, όπως αμίνες, αλκαλοειδή, παράγωγα φωσφορικού οξέος, ακλοόλες, βιταμίνες κ.α. (*Εικόνα 67*).



Εικόνα 66 Αντιπροσωπευτικά ολικά χρωματογραφήματα ιόντος (TIC) του ενδο-μεταβολώματος του στελέχους PLS_90 του φυτοπαθογόνου μύκητα *Colletotrichum acutatum* (A) του μάρτυρα και (B) μετά από έκθεσή του στο δραστικό λιποπεπτιδικό εκχύλισμα του ενδοφυτικού βακτηρίου PTA13. Στα μεγεθυμένα παράθυρα σημειώνονται ενδεικτικά μεταβολίτες που αναγνωρίστηκαν.



Εικόνα 67 GC/EI/MS μεταβολικό προφίλ του ενδο-μεταβολώματος του στελέχους PLS_90 του φυτοπαθογόνου μύκητα *Colletotrichum acutatum* μετά από έκθεσή του στο δραστικό λιποπεπτιδικό εκχύλισμα του ενδοφυτικού βακτηρίου PTA13.

3.5.2.2.6 Η επέμβαση με το λιποπεπτιδικό εκχύλισμα του ενδοφυτικού βακτηρίου PTA13 είχε σημαντική επίδραση στο μεταβολισμό του στελέχους PLS_90 του μύκητα *Colletotrichum acutatum*

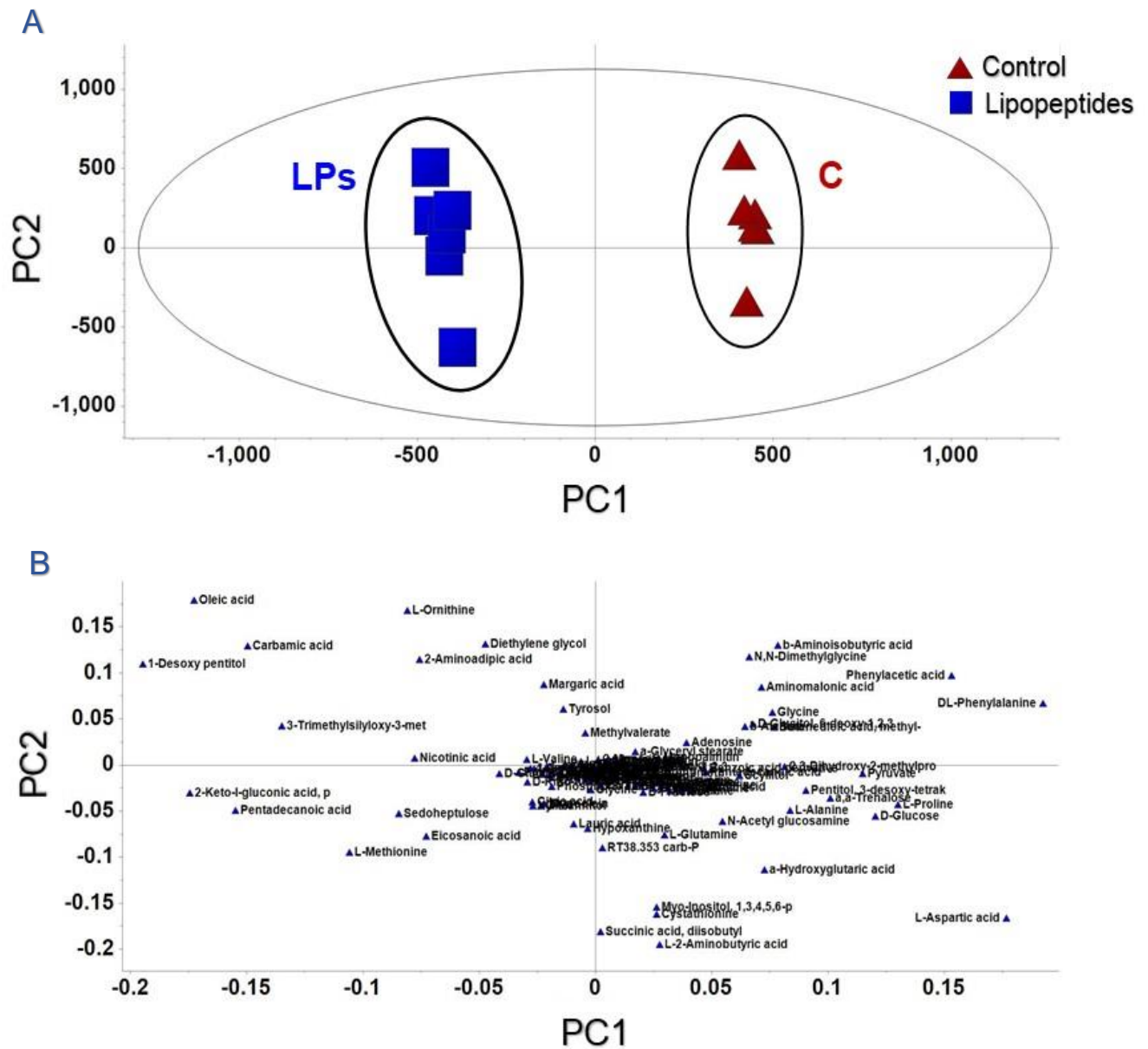
Η ανάλυση OPLS-DA που πραγματοποιήθηκε για το στέλεχος PLS_90 του μύκητα *C. acutatum* επιβεβαίωσε την ποιότητα των πειραματικών και βιοαναλυτικών πρωτοκόλλων που εφαρμόστηκαν, καταδεικνύοντας παράλληλα τις διαφορές στα μεταβολικά προφίλ του στελέχους παρουσία και απουσία του λιποπεπτιδικού εκχυλίσματος (*Εικόνα 68A*). Η επίδραση των λιποπεπτιδίων στο μεταβολισμό του μύκητα είναι εμφανής, καθώς παρατηρείται εξαιρετικός διαχωρισμός μεταξύ του μεταβολικού προφίλ του μύκητα μετά από την εφαρμογή του εκχυλίσματος και του αντίστοιχου του μάρτυρα. Σημειώνεται ότι οι αποστάσεις μεταξύ των σημείων είναι ανάλογες των διαφορών στα καταγεγραμμένα μεταβολικά προφίλ.

Η ανακάλυψη μεταβολιτών-βιοσημαντών της επίδρασης του λιποπεπτιδικού εκχυλίσματος βασίστηκε στη χρήση Loadings plot (*Εικόνα 68B*), σε συνδυασμό με VIP

(*Εικόνα 69*) και Coefficient plot (*Εικόνα 70*). Στο Loadings plot, οι μεταβολίτες με τη μεγαλύτερη απόσταση από την τομή των αξόνων είναι εκείνοι με την υψηλότερη βαρύτητα στον παρατηρούμενο διαχωρισμό και επομένως, αποτελούν υποψήφιους μεταβολίτες-βιοσημαντές της επίδρασης των λιποπεπτιδίων. Στο VIP plot, οι απόλυτες τιμές των Coefficients είναι ανάλογες της επίδρασής τους στις παρατηρούμενες διαφοροποιήσεις, με τις υψηλότερες τιμές (≥ 1) να αντιστοιχούν στους μεταβολίτες με την υψηλότερη βαρύτητα στο διαχωρισμό, που αποτελούν πιθανότατα βιοσημαντές της επέμβασης με το εκχύλισμα. Το ίδιο ισχύει και για το Coefficient plot, με τις θετικές τιμές να αντιστοιχούν σε μεταβολίτες που παρατηρούνται σε αυξημένα επίπεδα στο μύκητα μετά την έκθεσή του στο λιποπεπτιδικό εκχύλισμα, ενώ οι αρνητικές σε εκείνους που παρατηρούνται σε μειωμένα επίπεδα σε σύγκριση με το μάρτυρα.

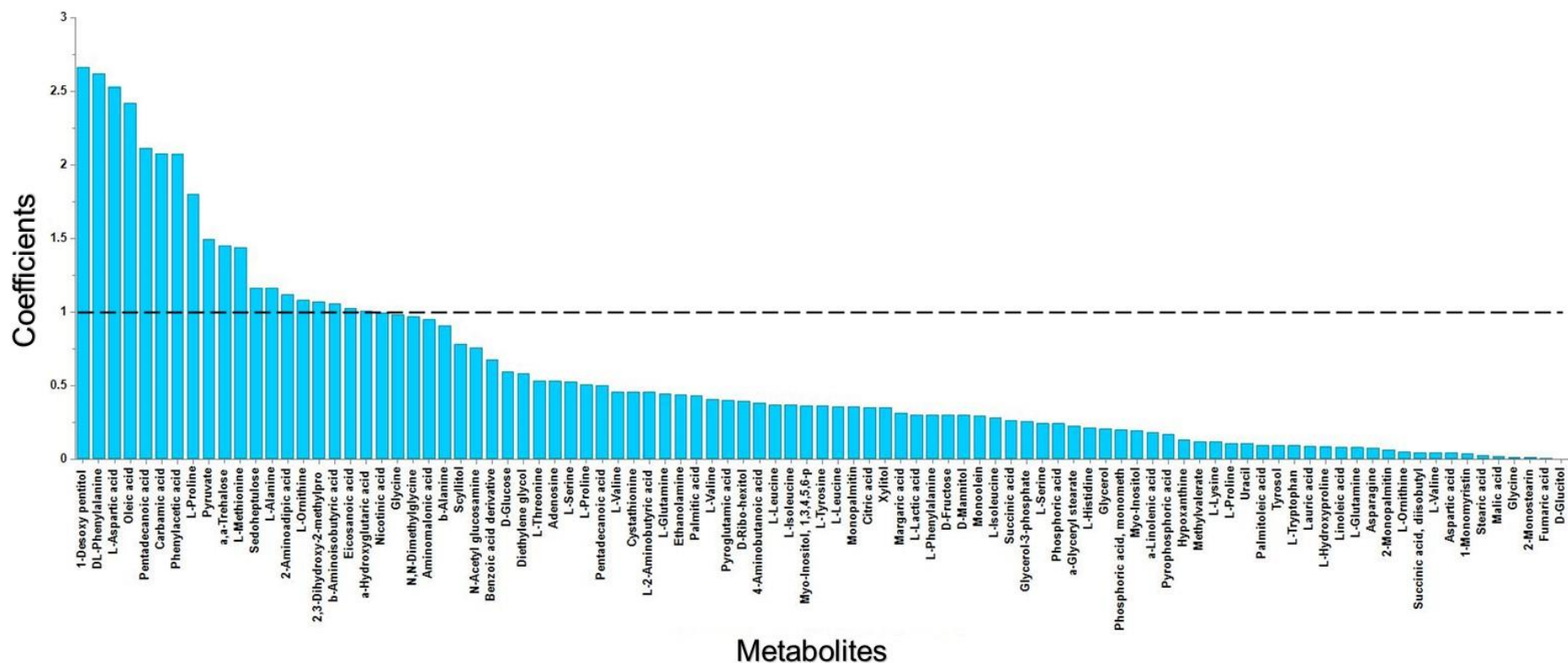
Σύμφωνα με τα παραπάνω, σημειώθηκαν διαφοροποιήσεις σε μεγάλο αριθμό μεταβολιτών, οι οποίοι παίζουν σημαντικό ρόλο στη φυσιολογία του μύκητα. Συγκεκριμένα, μετά την εφαρμογή των λιποπεπτιδίων, καταγράφηκε αυξημένη σχετική συγκέντρωση των μεταβολιτών carbamic acid (καρβαμικό οξύ), L-methionine (L-μεθειονίνη), 1-desoxy-pentitol (1-δεοξυ-πεντιτόλη), 2-keto-L-gluconic acid (2-κετο-L-γλυκονικό οξύ), pentadecanoic acid (πενταδεκανοϊκό οξύ), oleic acid (ολεϊκό οξύ) και eicosanoic acid (εικοσανοϊκό οξύ). Αντιθέτως, καταγράφηκε μειωμένη σχετική συγκέντρωση, συγκριτικά με το μεταβολικό προφίλ του μάρτυρα, των μεταβολιτών N,N-dimethylglycine (N,N-διμεθυλογλυκίνη), pyruvate (πυροσταφυλικό οξύ), glycine (γλυκίνη), phenylacetic acid (φαινυλοξικό οξύ), L-proline (L-προλίνη), L-aspartic acid (L-ασπαρτικό οξύ), β -aminoisobutyric acid (β -αμινοϊσοβουτυρικό οξύ), L-phenylalanine (L-φαινυλαλανίνη) και α,α -trehalose (α,α -τρεχαλόζη).

Με βάση τα παραπάνω, κατασκευάστηκε μεταβολικό δίκτυο του μύκητα, όπου παρουσιάζεται η σχετική συγκέντρωση των μεταβολιτών μετά από έκθεσή του στο δραστικό λιποπεπτιδικό εκχύλισμα, συγκριτικά με την αντίστοιχη του μάρτυρα (*Εικόνα 71*). Οι παρατηρούμενες διαφοροποιήσεις που παρουσιάζουν τα μεταβολικά προφίλ του *C. acutatum*, παρουσία και απουσία λιποπεπτιδικού εκχυλίσματος, στην περιεκτικότητα των παραπάνω μεταβολιτών, ενδεχομένως να σχετίζονται με την ευαισθησία του μύκητα στο εκχύλισμα και πιθανότατα να αποτελούν μια πρώτη ένδειξη του μηχανισμού δράσης των λιποπεπτιδίων.



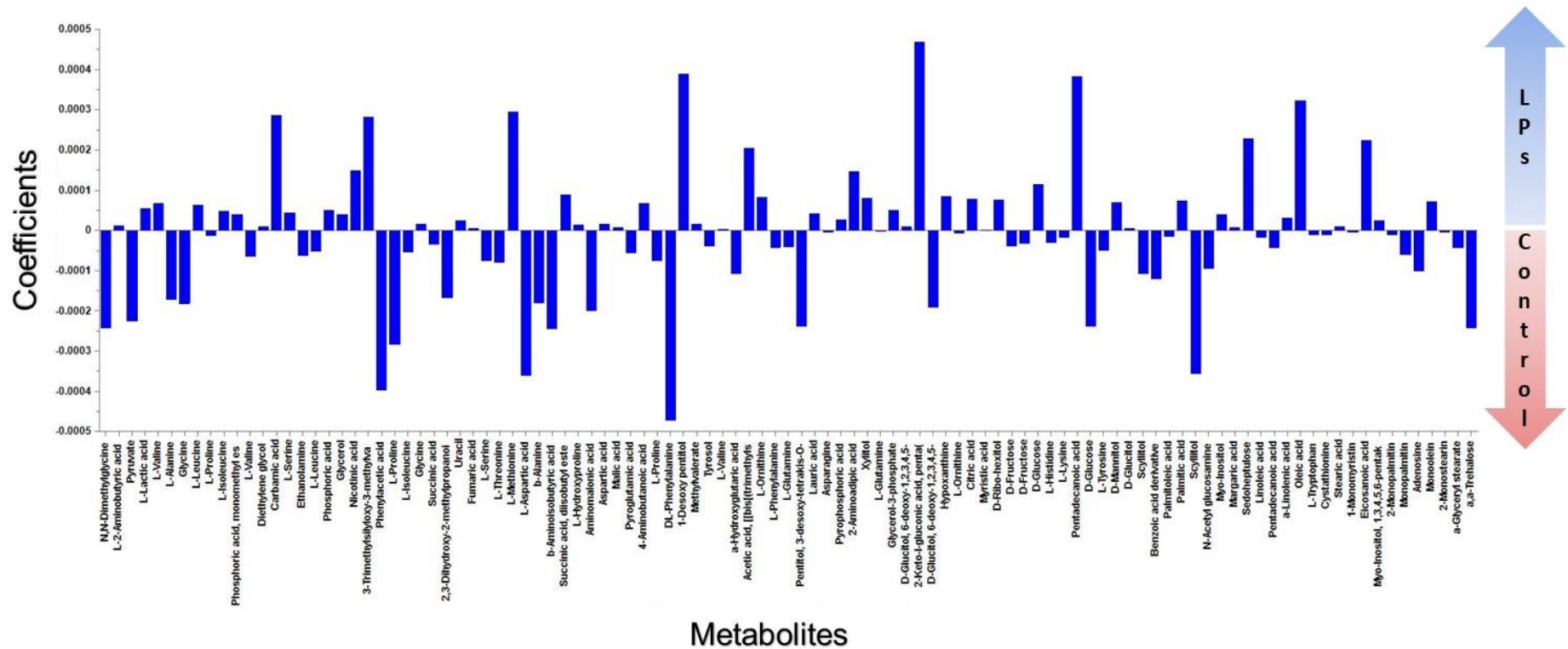
Εικόνα 68 (A) OPLS-DA score plot για το διαχωρισμό μεταξύ των GC/EI/MS μεταβολικών προφίλ του ενδο-μεταβολώματος του στελέχους PLS_90 του φυτοπαθογόνου μύκητα *Colletotrichum acutatum* απουσία (Control) και παρουσία (LPs) του δραστικού λιποπεπτιδικού εκχυλίσματος του ενδοφυτικού βακτηρίου PTA13 (PC, Principal Components, Κύριες Συνιστώσες). Συνολικά, πραγματοποιήθηκαν 18 βιολογικές επαναλήψεις ανά επέμβαση, οι οποίες συγκεντρώθηκαν σε ομάδες των 3, για να ληφθούν τελικά 6 συγκεντρωμένα δείγματα. Υποπολλαπλάσια τμήματα κάθε βιολογικής αντιγραφής συνδυάστηκαν για να δημιουργηθούν δείγματα ελέγχου ποιότητας (QC). Σημειώνεται η ομαδοποίηση των επαναλήψεων κάθε επέμβασης που επισημαίνει το διαχωρισμό μεταξύ των επεμβάσεων. **(B)** Loadings plot με τους μεταβολίτες-βιοσημαντές της διαφοροποίησης μεταξύ του μάρτυρα και της επέμβασης με λιποπεπτίδια. Οι μεταβολίτες με τη μεγαλύτερη απόσταση από την τομή των αξόνων είναι εκείνοι με την υψηλότερη βαρύτητα στον παρατηρούμενο διαχωρισμό.

VIP plot

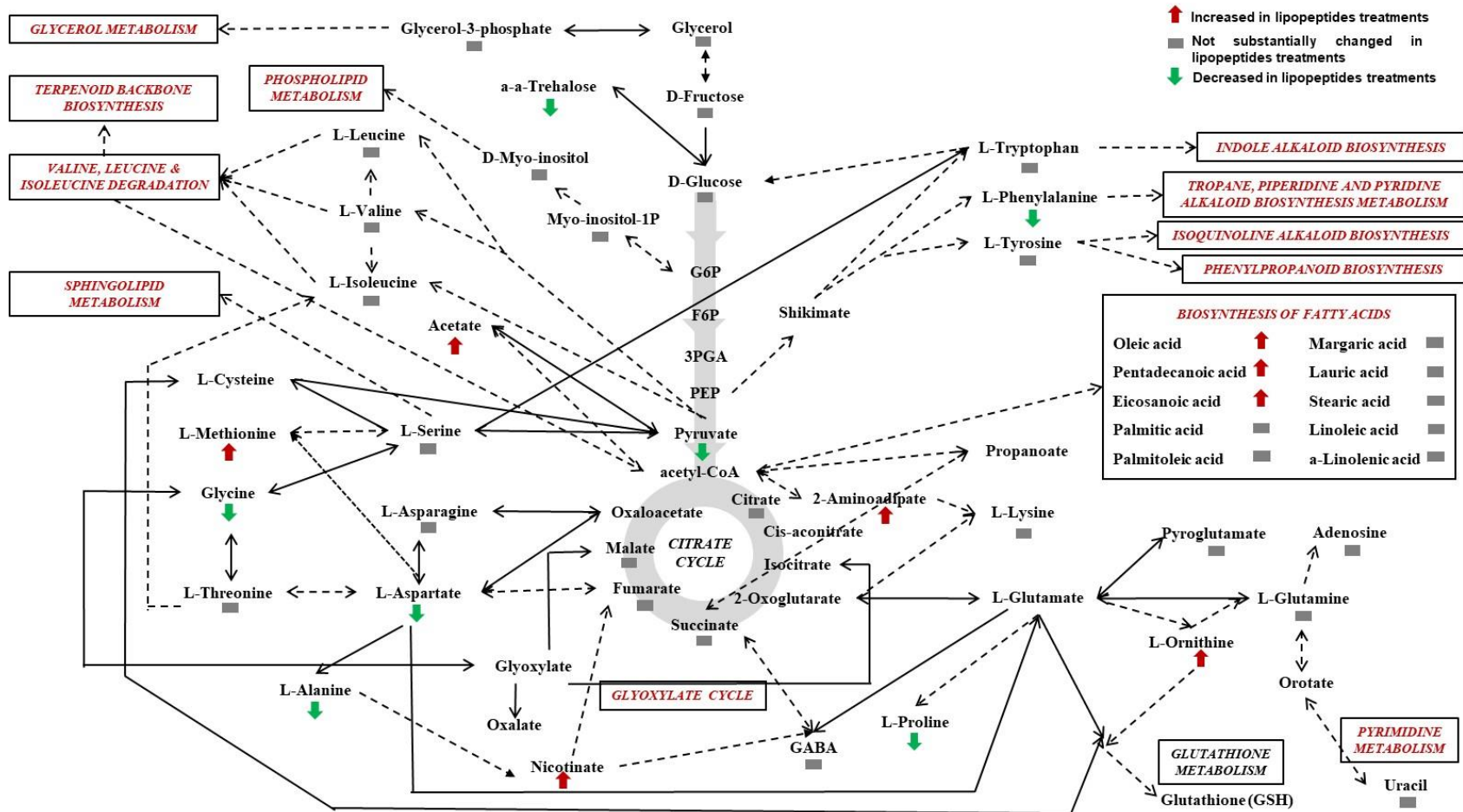


Εικόνα 69 VIP Plot με τις αντίστοιχες απόλυτες τιμές των Coefficients για τα κανονικοποιημένα και κεντραρισμένα δεδομένα (scaled and centered data) για τη σύγκριση των μεταβολικών προφίλ του στελέχους PLS₉₀ του φυτοπαθογόνου μύκητα *Colletotrichum acutatum* απουσία και παρουσία του δραστικού λιποπεπτιδικού εκχυλίσματος του ενδοφυτικού βακτηρίου PTA13. Οι υψηλότερες τιμές (≥ 1) αντιστοιχούν στους μεταβολίτες με την υψηλότερη βαρύτητα στον παρατηρούμενο διαχωρισμό.

Coefficient plot



Εικόνα 70 Contribution / Coefficient Plot με τις αντίστοιχες τιμές των Coefficients για τα κανονικοποιημένα και κεντραρισμένα δεδομένα (scaled and centered data) για τη σύγκριση των μεταβολικών προφίλ του στελέχους PLS_90 του φυτοπαθογόνου μύκητα *Colletotrichum acutatum* απουσία και παρουσία του δραστικού λιποπεπτιδικού εκχυλίσματος του ενδοφυτικού βακτηρίου PTA13. Οι υψηλές απόλυτες τιμές αντιστοιχούν σε μεταβολίτες με την υψηλότερη βαρύτητα στον παρατηρούμενο διαχωρισμό. Οι θετικές τιμές αντιστοιχούν σε μεταβολίτες που παρατηρούνται σε αυξημένα επίπεδα στο στέλεχος του μύκητα μετά την έκθεσή του στο λιποπεπτιδικό εκχύλισμα, ενώ οι αρνητικές σε εκείνους που παρατηρούνται σε μειωμένα επίπεδα σε σύγκριση με το μάρτυρα.



Εικόνα 71 Μεταβολικό δίκτυο του στελέχους PLS_90 του φυτοπαθογόνου μύκητα *Colletotrichum acutatum* μετά από έκθεσή του στο δραστικό λιποπεπτιδικό εκχύλισμα του ενδοφυτικού βακτηρίου PTA13. Η κατεύθυνση του βέλους δείχνει τη σχετική περιεκτικότητα του μικροοργανισμού στον εκάστοτε μεταβολίτη μετά από σύγκριση του μεταβολικού προφίλ του με εκείνο του μάρτυρα.

3.5.2.2.7 Ρόλος επιλεγμένων μεταβολιτών-βιοσημαντών της επίδρασης του λιποπεπτιδικού εκχυλίσματος του ενδοφυτικού βακτηρίου PTA13 στο μεταβολισμό και τη φυσιολογία του στελέχους PLS_90 του μύκητα *Colletotrichum acutatum*

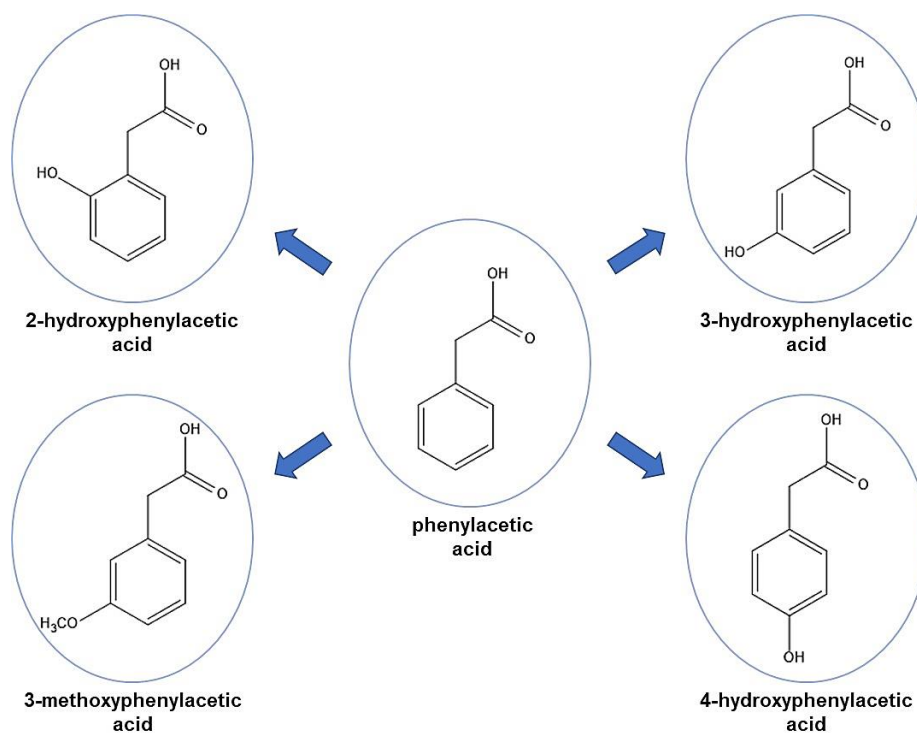
Όπως αναφέρθηκε, η εφαρμογή βιοπληροφορικής ανάλυσης ανέδειξε ένα μεγάλο αριθμό μεταβολιτών, η σχετική συγκέντρωση των οποίων εμφάνισε σημαντικές διαφορές στα μεταβολικά προφίλ του μύκητα παρουσία και απουσία του λιποπεπτιδικού εκχυλίσματος. Παρόλα αυτά, η λεπτομερής ανάλυση του συνόλου των παρατηρούμενων διαφορών δεν αποτέλεσε αντικείμενο της παρούσας εργασίας. Για αυτόν το λόγο, η μελέτη επικεντρώθηκε σε επιλεγμένους μεταβολίτες, οι οποίοι, βάσει βιβλιογραφίας, διαδραματίζουν σπουδαίο ρόλο στο μεταβολισμό και τη φυσιολογία των μυκήτων εν γένει.

Οι κυριότεροι από αυτούς ήταν οι phenylacetic acid, L-phenylalanine, L-proline και α,α-trehalose, για τους οποίους υπάρχουν βιβλιογραφικά δεδομένα αναφορικά με τη σημασία που έχουν στην εκδήλωση της παθογένειας των μυκήτων, αλλά και όσον αφορά στην παραγωγή τους ως αντίδραση των μυκήτων σε καταπονήσεις (stress). Επομένως, οι παραπάνω μεταβολίτες είναι πιθανό να εμφανίζουν παρόμοιο ρόλο και στην περίπτωση του μεταβολισμού του είδους *Colletotrichum acutatum*, με τη μεταβολή της συγκέντρωσής τους ως αποτέλεσμα της εφαρμογής του λιποπεπτιδικού εκχυλίσματος να υποδεικνύει ενδεχόμενο μηχανισμό δράσης των λιποπεπτιδίων.

Συγκεκριμένα, το phenylacetic acid και τα παράγωγά του (2-hydroxyphenylacetic, 3-hydroxyphenylacetic acid, 4-hydroxyphenylacetic acid, 3-methoxyphenylacetic acid) (*Εικόνα 72*), έχουν αναφερθεί στη βιβλιογραφία ως εξαιρετικά φυτοτοξικοί μεταβολίτες (Kobayashi & Ito, 1998), οι οποίοι παράγονται από διάφορα είδη φυτοπαθογόνων μυκήτων, όπως το *Rhizoctonia solani* (Aliferis et al., 2013; Aoki et al., 1963; Bartz et al., 2012; Iacobellis & DeVay, 1987; Mandava et al., 1980), το *Fusarium oxysporum* (Kachlicki & Jędrzycka, 1997) και το *Streptomyces humidus* (Hwang et al., 2001). Επιπλέον, η ικανότητα των μυκήτων να συνθέτουν τους μεταβολίτες αυτούς φαίνεται ότι σχετίζεται θετικά με την παθογόνο δύναμή τους (Bartz et al., 2012, 2013). Μάλιστα, σε πρόσφατα δημοσιευμένα ερευνητικά εργασία, πραγματοποιήθηκε συσχέτιση της παραγωγής του hydroxyphenylacetic acid με την παθογένεια των στελεχών PLS_88

και PLS_90 του είδους *C. acutatum* σε καρπούς ελιάς, όπου διαπιστώθηκε ότι το στέλεχος του μύκητα που παρουσίαζε υψηλότερη μολυσματική ικανότητα (PLS_90), εμφάνισε και υψηλότερη σχετική συγκέντρωση του μεταβολίτη, συγκριτικά με το στέλεχος που διέθετε χαμηλότερη μολυσματική ικανότητα (PLS_88) (Kolainis et al., 2020).

Σύμφωνα με τα παραπάνω, θα μπορούσε να σχηματιστεί η υπόθεση ότι τα λιποπεπτίδια που εφαρμόστηκαν στο στέλεχος PLS_90 του *C. acutatum*, ελάττωσαν τη μολυσματική ικανότητά του, καθώς η σχετική συγκέντρωση του μεταβολίτη phenylacetic acid εμφανίστηκε σαφώς χαμηλότερη από την αντίστοιχη του μάρτυρα. Ενδεχομένως, λοιπόν, τα λιποπεπτίδια να επιδρούν τόσο στην ανάπτυξη του μύκητα, με την εμφάνιση μειωμένης γραμμικής ανάπτυξης στις *in vitro* δοκιμές, όσο και στη διαμόρφωση της παθογένειάς του. Παρόλα αυτά, για την επιβεβαίωση της παραπάνω υπόθεσης, είναι αναγκαία η διεξαγωγή επιπλέον μελετών, προκειμένου να αποσαφηνιστεί ο μηχανισμός δράσης των διαφορετικών οικογενειών λιποπεπτιδίων, αλλά και η συνδυασμένη δράση τους στη μορφή του ολικού εκχυλίσματος.



Εικόνα 72 Χημικές δομές του μεταβολίτη phenylacetic acid και των παραγώγων του 2-hydroxyphenylacetic acid, 3-hydroxyphenylacetic acid, 4-hydroxyphenylacetic acid και 3-methoxyphenylacetic acid.

Ένας ακόμα σημαντικός μεταβολίτης, η συγκέντρωση του οποίου εμφάνισε μεγάλη διαφοροποίηση μεταξύ των μεταβολικών προφίλ του μύκητα παρουσία και απουσία λιποπεπτιδίων ήταν η L-phenylalanine. Ο μεταβολίτης αυτός ανήκει στα αρωματικά αμινοξέα και αποτελεί πρόδρομη ουσία πολυάριθμων δευτερογενών μεταβολιτών των μυκήτων, όπως των τροπανίων (tropane), των αλκαλοειδών πυριδίνης (pyridine alkaloids) και της ομάδας πιπεριδίνης (piperidine) (Εικόνα 71). Αποτελεί, μάλιστα, και πρόδρομη ένωση του προαναφερθέντος μεταβολίτη phenylacetic acid, το οποίο πιθανόν υποδηλώνει μια γενικότερη επίδραση των λιποπεπτιδίων στο συγκεκριμένο μεταβολικό μονοπάτι του μύκητα.

Η ενεργοποίηση του δευτερογενούς μεταβολισμού διαδραματίζει σημαντικό ρόλο στη φυσιολογία των μυκήτων, με τη σύνθεση διαφόρων δευτερογενών μεταβολιτών ως αντίδραση σε καταπονήσεις (Macheleidt et al., 2016). Με βάση τα παραπάνω, η μειωμένη σχετική συγκέντρωση της L-φαινυλαλανίνης στο μεταβολικό προφίλ του μύκητα μετά από εφαρμογή του λιποπεπτιδικού εκχυλίσματος, συγκριτικά με το μάρτυρα, πιθανότατα υποδηλώνει την επίδραση των λιποπεπτιδίων στο δευτερογενή μεταβολισμό του μύκητα, με αποτέλεσμα τη μειωμένη βιοσυνθετική ικανότητά του, το οποίο μπορεί να αποτελεί και έναν από τους λόγους της υψηλής καταπόνησής του και της μειωμένης ανάπτυξής του *in vitro*.

Επιπλέον, η μειωμένη, συγκριτικά με το μάρτυρα, περιεκτικότητα του μύκητα σε L-proline μετά από την εφαρμογή του δραστικού λιποπεπτιδικού κλάσματος, επιβεβαιώνει την ευαισθησία του στις ουσίες του εκχυλίσματος. Η L-proline είναι ένα αμινοξύ με αντιοξειδωτική δράση (Szabados & Savouré, 2010), ενώ παράλληλα συμβάλλει στην οσμωρύθμιση και σταθεροποιεί τις πρωτεΐνες και τις κυτταρικές μεμβράνες των μυκήτων όταν εκείνοι βρίσκονται σε συνθήκες ισχυρής καταπόνησης (Ben Rejeb et al., 2014).

Σημαντική ήταν και η διαφοροποίηση που σημειώθηκε στο μεταβολίτη α,α -trehalose ανάμεσα στα δύο μεταβολικά προφίλ. Η α,α -τρεχαλόζη είναι ένας διασacχαρίτης, ο ρόλος του οποίου εμφανίζεται ιδιαίτερα σημαντικός και πολύπλευρος στη φυσιολογία των μυκήτων. Αρχικά, σχετίζεται με την προστασία των πρωτεϊνών και τη λειτουργικότητα των κυτταρικών μεμβρανών όταν βρεθούν υπό συνθήκες καταπόνησης, όπως σε περιπτώσεις ακραίων θερμοκρασιών ή έλλειψης νερού (Aliferis

& Jabaji, 2010a; Iturriaga et al., 2009). Ακόμα, ρυθμίζει το σχηματισμό και τη διάρκεια ζωής των σπορίων των μυκήτων (Lowe et al., 2009; Ni & Yu, 2007), ενώ συμμετέχει και ρυθμίζει το γλυκολυτικό κύκλο (Ocón et al., 2007). Τέλος, φαίνεται ότι η τρεχαλόζη σχετίζεται και με την παθογόνο ικανότητα των μυκήτων (Foster et al., 2003; Murphy et al., 2005), με τα μειωμένα επίπεδά της στο στέλεχος PLS_90, μετά την εφαρμογή των λιποπεπτιδίων, να υποδηλώνουν και πάλι πιθανή επίδραση των ουσιών αυτών στην παθογένεια του *C. acutatum*.

3.5.2.3 ¹H NMR ανάλυση

3.5.2.3.1 Προετοιμασία δειγμάτων

Για τη μεταβολομική ανάλυση με χρήση ¹H NMR, ζυγίστηκε ποσότητα 100 mg κονιοποιημένου μυκηλίου των δειγμάτων σε Eppendorf tubes (2 mL) και λυοφιλοποιήθηκε για περίπου 24 h, με στόχο την πλήρη απομάκρυνση του νερού. Ακολούθησε εκχύλιση των πολικών μεταβολιτών με προσθήκη 800 μL D₂O (καθαρότητας 99.9%, με 0.05 wt. % 3-(trimethylsilyl)propionic acid-2,2,3,3-d₄-sodium salt (TSP), Sigma-Aldrich) σε κάθε δείγμα. Η εκχύλιση πραγματοποιήθηκε αρχικά με τοποθέτηση των δειγμάτων σε συσκευή υπερήχων (Branson 1210 Ultrasonic Cleaner) για 25 min και στη συνέχεια, με ανάδευσή τους για 2 h (120 rpm) στους 24°C. Το εκχύλισμα που προέκυψε από την παραπάνω διαδικασία διαχωρίστηκε από τον αδιάλυτο ιστό με φυγοκέντρηση (12000×g, 60 min, 4°C) και παραλήφθηκε το υπερκείμενο διάλυμα, το οποίο καθαρίστηκε επιπλέον με επανάληψη της φυγοκέντρησης για 30 min. Τέλος, τα δείγματα μεταφέρθηκαν σε NMR σωληνάκια και ακολούθησε η ανάλυσή τους.

3.5.2.3.2 Παράμετροι Μεταβολομικής Ανάλυσης

Η ^1H NMR ανάλυση του μεταβολικού προφίλ του στελέχους PLS_90 του είδους *C. acutatum* πραγματοποιήθηκε με χρήση του φασματομέτρου υγρών δειγμάτων Bruker Avance III-600 spectrometer (Karlsruhe, Germany) του Τομέα Φαρμακογνωσίας και Χημείας Φυσικών Προϊόντων του Τμήματος Φαρμακευτικής (ΕΚΠΑ). Η λήψη του φάσματος κάθε δείγματος πραγματοποιήθηκε με τη συλλογή 128 σαρώσεων (scans) 64 K δεδομένων (data points) με χρόνο μεταξύ των σαρώσεων 1 sec και με φασματικό εύρος 6009,6 Hz. Κατά την επεξεργασία των φασμάτων, πριν την εφαρμογή της μετατροπής κατά Fourier (Fourier Transformation, FT), η FID πολλαπλασιαζόταν με εκθετική συνάρτηση (LB=0,3), παλμό 90° διάρκειας 8,3 sec και επιπλέον γινόταν εφαρμογή zero filling διπλασιάζοντας τα δεδομένα. Η λήψη των φασμάτων NMR γινόταν σε θερμοκρασία δωματίου (298 K).

3.5.2.3.3 Επεξεργασία φασμάτων

Τα φάσματα που λήφθηκαν από την ^1H NMR ανάλυση επεξεργάστηκαν με το λογισμικό Spectrus (Advanced Chemistry Development, Inc., ACD/Labs, Toronto, Canada), με τη βοήθεια του οποίου πραγματοποιήθηκε μετασχηματισμός κατά Fourier και αυτόματη διόρθωση φάσης (phase correction) και γραμμής βάσης (baseline correction). Ακόμα, πραγματοποιήθηκε βαθμονόμηση (calibration) για την προσαρμογή των χημικών μετατοπίσεων του φάσματος με βάση το σήμα του εσωτερικού προτύπου TSP, το οποίο ορίστηκε σε χημική μετατόπιση 0.00 ppm. Επιπλέον, μικρές αποκλίσεις των χημικών μετατοπίσεων στα φάσματα διορθώθηκαν με ευθυγράμμιση των κορυφών (peak alignment). Στη συνέχεια, τα προεπεξεργασμένα φάσματα επανεισήχθησαν στο λογισμικό για περαιτέρω επεξεργασία. Ακολούθησε εξαίρεση μη χρήσιμων περιοχών του φάσματος, όπως εκείνη που αντιστοιχεί στο σήμα του νερού (4.70-4.80 ppm) και άλλες στις οποίες δεν καταγράφηκαν σήματα, και ενοποίηση της περιοχής 0.91 και 8.36 ppm, με στόχο τη βελτίωση της ποιότητας και εγκυρότητας της ανάλυσης. Για τις περιοχές που διατηρήθηκαν, πραγματοποιήθηκε ολοκλήρωση των κορυφών με

εφαρμογή του αλγορίθμου Intelligent Bucketing με εύρος τμημάτων (buckets) 0.02 ppm. Η ταυτοποίηση των μεταβολιτών βασίστηκε στις χημικές μετατοπίσεις (chemical shifts), στις σταθερές σύζευξης (J) καθώς και σε συγκρίσεις με φάσματα ^1H NMR αναλυτικών προτύπων σε D_2O , που είχαν αναλυθεί με το ίδιο λογισμικό, υπό τις ίδιες αναλυτικές συνθήκες (Aliferis & Jabaji, 2010a; Copley et al., 2017; Sevastos et al., 2018).

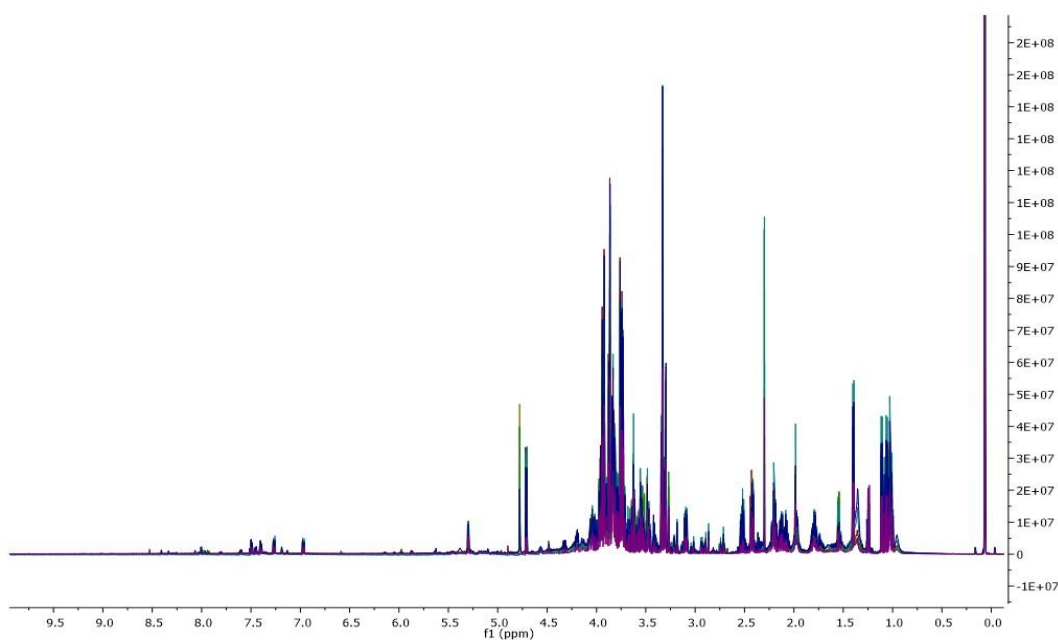
3.5.2.3.4 Βιοπληροφορική ανάλυση για την ανακάλυψη τάσεων κατά την επίδραση του λιποπεπτιδικού εκχυλίσματος στο μεταβολισμό του στελέχους PLS_90 του Colletotrichum acutatum

Η μήτρα δεδομένων που προέκυψε από την επεξεργασία των φασμάτων ^1H NMR εισήχθη, όπως και στην περίπτωση της ανάλυσης με GC/MS, στο λογισμικό SIMCA-P v.13.0.3 για την πραγματοποίηση πολυπαραγοντικής ανάλυσης και την ανακάλυψη τάσεων και μεταβολιτών-βιοσημαντών της επίδρασης του λιποπεπτιδικού εκχυλίσματος στο μεταβολισμό του παθογόνου μύκητα. Πριν από τις αναλύσεις, πραγματοποιήθηκε κλιμακοποίηση (scaling) Pareto των δεδομένων (1/HSD), η οποία αποτελεί την προτιμητέα κλιμακοποίηση για δεδομένα NMR. Η διασταυρούμενη επικύρωση πραγματοποιήθηκε βάσει προεπιλεγμένων ρυθμίσεων λογισμικού και οι αντίστοιχες τιμές του κλάσματος του αθροίσματος των τετραγώνων των X και Y εξηγούνται από το τρέχον συστατικό (R^2X και R^2Y) και από την ικανότητα πρόβλεψης $Q(\text{cum})^2$. Η ανακάλυψη των μεταβολιτών-βιοσημαντών βασίστηκε σε κλιμακούμενους συντελεστές παλινδρόμησης PLS και τα τυπικά σφάλματα υπολογίστηκαν με jack-knifing σε διάστημα εμπιστοσύνης 95%. Η απόδοση των μοντέλων αξιολογήθηκε από το αθροιστικό κλάσμα της συνολικής παραλλαγής των X που θα μπορούσε να προβλεφθεί από τα εξαγόμενα συστατικά, $Q(\text{cum})^2$, R^2X και R^2Y . Για την επισκόπηση των μεταβολικών προφίλ και των διαφορών που παρουσιάζουν, πραγματοποιήθηκε αρχικά OPLS-DA ανάλυση, ενώ συμπληρωματικά, εφαρμόστηκε ιεραρχική ανάλυση κατά συστάδες (Hierarchical Cluster Analysis, HCA) χρησιμοποιώντας το λογισμικό βιοπληροφορικής Matlab v.2016a (MathWorks, Natick, MA, USA) (Sevastos et al.,

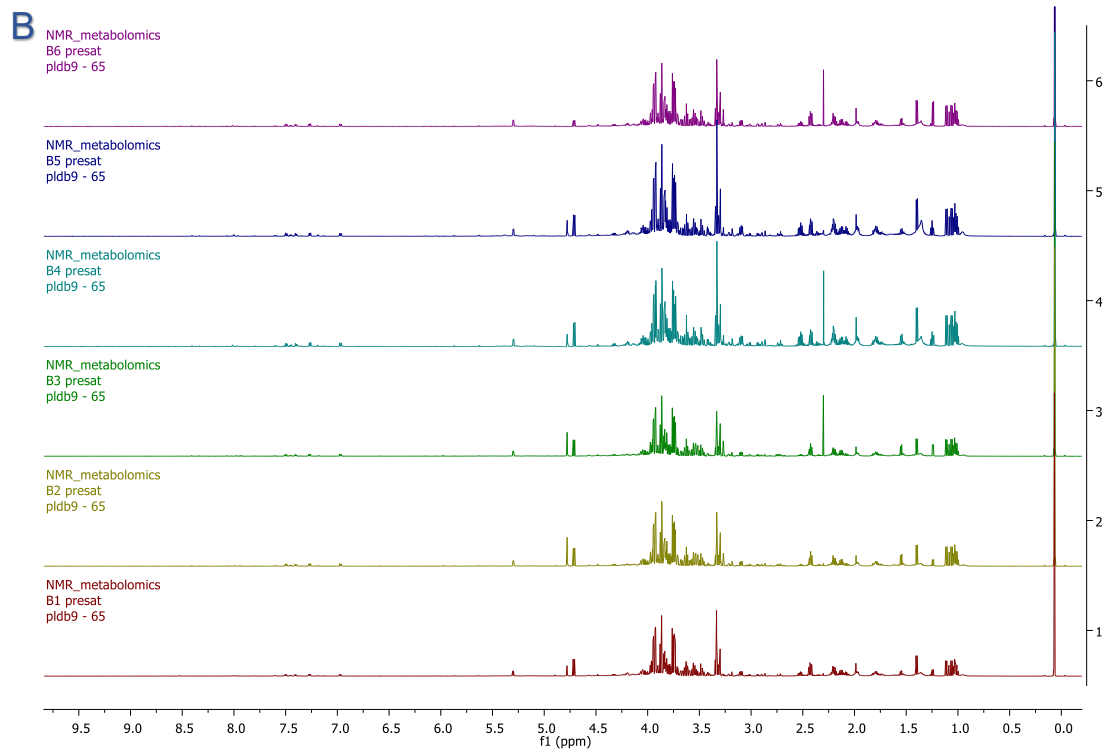
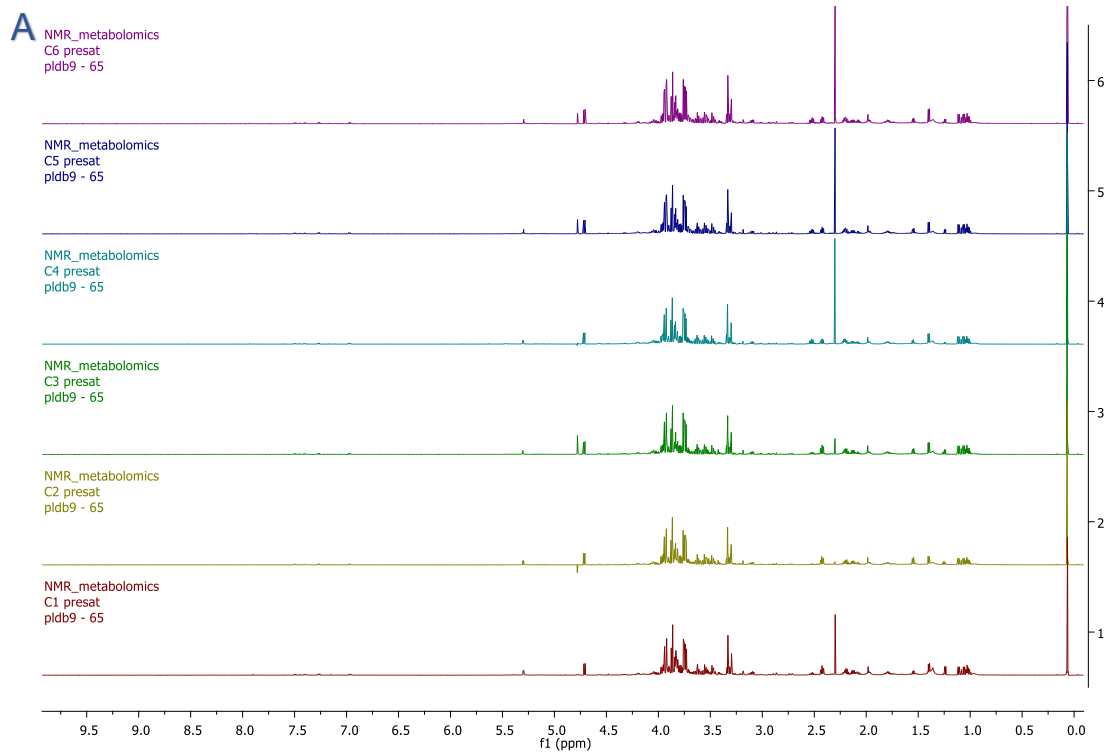
2018). Η επισήμανση των διαφορών του ενδο-μεταβολώματος μεταξύ επέμβασης και μάρτυρα και η ανακάλυψη λειτουργικών μεταβολιτών βασίστηκε και πάλι στη χρήση Coefficient plots.

3.5.2.3.5 Επισκόπηση της ^1H NMR ανάλυσης του μεταβολικού προφίλ του στελέχους PLS_90 του μύκητα *Colletotrichum acutatum* παρουσία ή απουσία του λιποπεπτιδικού εκχυλίσματος του ενδοφυτικού βακτηρίου PTA13

Το βιοαναλυτικό πρωτόκολλο που εφαρμόστηκε κατά την ^1H NMR ανάλυση του ενδο-μεταβολώματος του ευαίσθητου μορφότυπου PLS_90 του μύκητα *C. acutatum* παρουσιάστηκε αποτελεσματικό, παρέχοντας υψηλής ποιότητας μεταβολικά προφίλ, όπως είναι εμφανές από το overlap των φασμάτων που λήφθηκαν (Εικόνες 73, 74). Παράλληλα, οι μικρές μετατοπίσεις των σημάτων επίσης αποδεικνύουν την επιτυχή λειτουργία της αναλυτικής πλατφόρμας και την αποτελεσματικότητα του βιοπληροφορικού προγράμματος στην ευθυγράμμιση (alignment) των μεταβολικών προφίλ και τη δημιουργία των buckets.



Εικόνα 73 Overlap φασμάτων ^1H NMR των δειγμάτων του *Colletotrichum acutatum* PLS_90 που αναλύθηκαν.

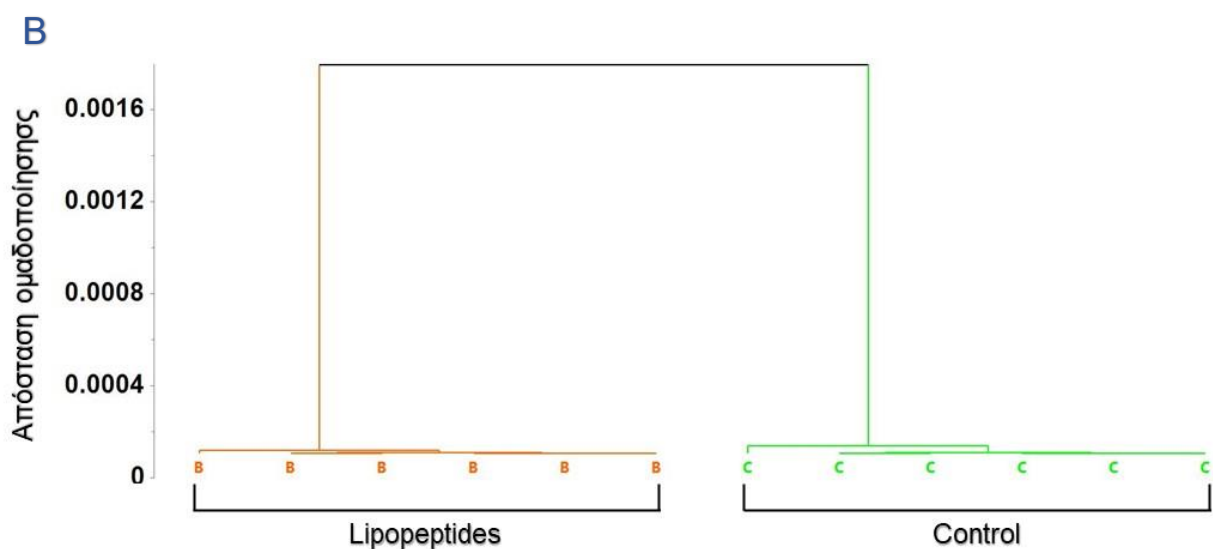
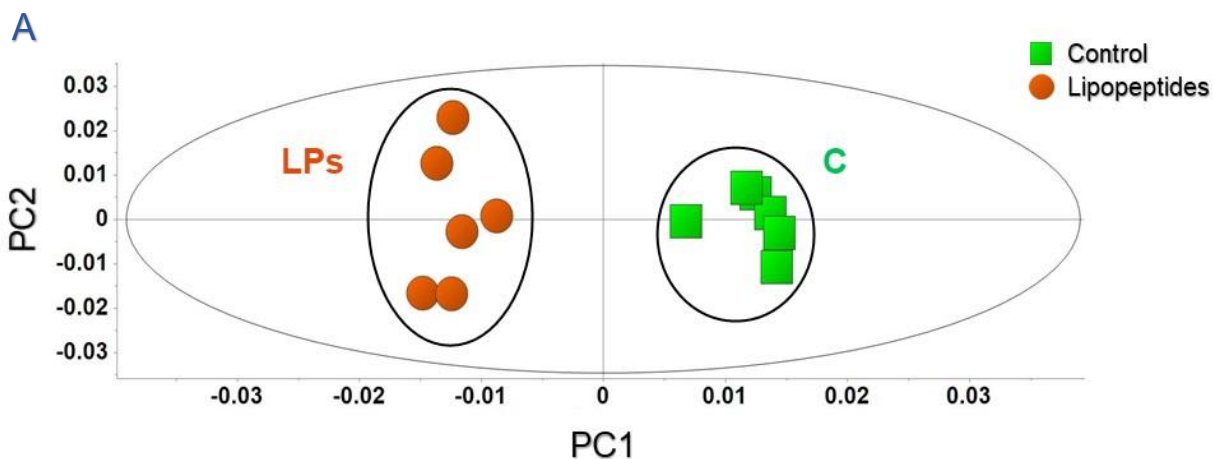


Εικόνα 74 ^1H NMR φάσματα των δειγμάτων *Colletotrichum acutatum* PLS_90 (A) του μάρτυρα και (B) της επέμβασης με λιποπεπτίδια.

3.5.2.3.6 Το λιποπεπτιδικό εκχύλισμα του ενδοφυτικού βακτηρίου PTA13 επηρέασε σημαντικά το ¹H NMR μεταβολικό προφίλ του στελέχους *Colletotrichum acutatum* PLS_90

Η ανάλυση OPLS-DA που πραγματοποιήθηκε για τα ¹H NMR μεταβολικά προφίλ του στελέχους *C. acutatum* PLS_90 επιβεβαίωσε, όπως και στην περίπτωση του GC/MS, την ποιότητα των πειραματικών και βιοαναλυτικών πρωτοκόλλων που εφαρμόστηκαν, καταδεικνύοντας τις διαφορές στο μεταβολισμό του στελέχους παρουσία και απουσία του λιποπεπτιδικού εκχυλίσματος (*Εικόνα 75*). Η επίδραση των λιποπεπτιδίων στο μεταβολισμό του *C. acutatum* είναι εμφανής, καθώς παρατηρείται εξαιρετικός διαχωρισμός μεταξύ των καταγεγραμμένων μεταβολικών προφίλ μετά από την εφαρμογή του εκχυλίσματος και του αντίστοιχου του μάρτυρα.

Η ανακάλυψη των μεταβολιτών-βιοσημαντών της επίδρασης του λιποπεπτιδικού εκχυλίσματος βασίστηκε στο Coefficient plot (*Εικόνα 76*), στο οποίο οι θετικές τιμές αντιστοιχούν σε μεταβολίτες με αυξημένα επίπεδα μετά την έκθεση του μύκητα στο λιποπεπτιδικό εκχύλισμα, ενώ οι αρνητικές σε εκείνους που καταγράφονται σε μειωμένα επίπεδα σε σύγκριση με το μάρτυρα. Αν και η ενδεδειγμένη μελέτη των αλλαγών στο μεταβολισμό του μύκητα ως αντίδραση στην επέμβαση με λιποπεπτιδία δεν ήταν στα πλαίσια της παρούσας μελέτης, εντούτοις, αξιοσημείωτο είναι ότι τα λιποπεπτιδία προκαλούν σημαντική αύξηση των επιπέδων της πλειονότητας των αμινοξέων, καθώς και των φαινολικών ουσιών που ταυτοποιήθηκαν. Αντίθετα, παρατηρήθηκε σημαντική μείωση των επιπέδων υδατανθράκων ως αντίδραση στην επέμβαση με λιποπεπτιδία. Οι παραπάνω μεταβολίτες διαδραματίζουν κομβικό ρόλο στο μεταβολισμό των μυκήτων, συμπεριλαμβανομένου της χρήσης τους ως δομικές ύλες βιοσυνθέσεων μεταβολιτών και πρωτεϊνών, παραγωγής ενέργειας, καθώς και στην αντίδραση των μυκήτων σε βιοτικές και αβιοτικές καταπονήσεις (Kalampokis et al., 2018; Lykogianni et al., 2020). Οι παρατηρήσεις αυτές επιβεβαιώνουν τη μυκοτοξικότητα του λιποπεπτιδικού εκχυλίσματος και είναι σε πλήρη συμφωνία με προηγούμενες αναφορές.

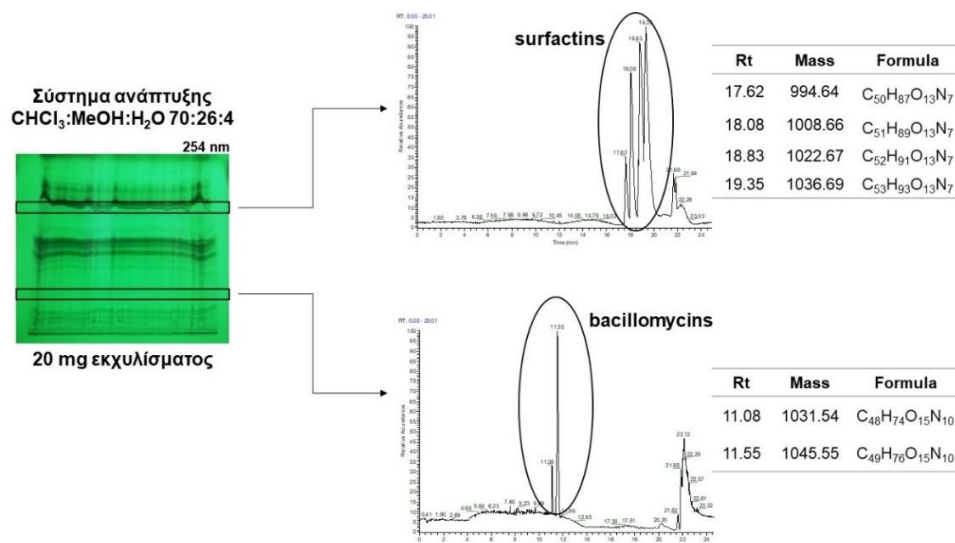


Εικόνα 75 (A) OPLS-DA score plot για το διαχωρισμό μεταξύ των ^1H NMR μεταβολικών προφίλ του ενδο-μεταβολώματος του στελέχους PLS_90 του φυτοπαθογόνου μύκητα *Colletotrichum acutatum* χωρίς (Control) και με (LPs) εφαρμογή του δραστικού λιποπεπτιδικού εκχυλίσματος του ενδοφυτικού βακτηρίου PTA13 (PC, Principal Components, Κύριες Συνιστώσες). Συνολικά, πραγματοποιήθηκαν 18 βιολογικές επαναλήψεις ανά επέμβαση, οι οποίες συγκεντρώθηκαν σε ομάδες των 3, για να ληφθούν τελικά 6 συγκεντρωμένα δείγματα. Υποπολλαπλάσια τμήματα κάθε βιολογικής αντιγραφής συνδυάστηκαν για να δημιουργηθούν δείγματα ελέγχου ποιότητας (QC). Σημειώνεται η ομαδοποίηση των επαναλήψεων κάθε επέμβασης που επισημαίνει το διαχωρισμό μεταξύ των επεμβάσεων. **(B)** Το αντίστοιχο δενδρόγραμμα ιεραρχικής ανάλυσης (Hierarchical Cluster Analysis, HCA) των ^1H NMR μεταβολικών προφίλ του μύκητα στο μάρτυρα και στην επέμβαση με λιποπεπτίδια.

3.6 Κλασμάτωση του λιποπεπτιδικού εκχυλίσματος και βιοδραστικότητα των επιμέρους κλασμάτων

3.6.1 Κλασμάτωση του λιποπεπτιδικού εκχυλίσματος με εφαρμογή παρασκευαστικής χρωματογραφίας λεπτής στιβάδας (Preparative TLC)

Η πρώτη τεχνική που χρησιμοποιήθηκε για την κλασμάτωση του λιποπεπτιδικού εκχυλίσματος του ενδοφυτικού βακτηρίου PTA13 ήταν η παρασκευαστική TLC. Για το σκοπό αυτό, 20 mg εκχυλίσματος διαλυμένα σε μεθανόλη εφαρμόστηκαν σε μία οριζόντια λεπτή γραμμή 1.5 cm από τη βάση πλάκας παρασκευαστικής TLC κανονικής φάσεως (§3.2.2). Η ανάπτυξη της πλάκας πραγματοποιήθηκε στο επιλεγμένο σύστημα διαλυτών $\text{CHCl}_3:\text{MeOH}:\text{H}_2\text{O}$ σε αναλογία 70:26:4 (v/v/v). Μετά την ανάπτυξη του χρωματογραφήματος, η πλάκα παρατηρήθηκε στο υπεριώδες (254 και 366 nm) και σημειώθηκαν με μολύβι οι ζώνες των ουσιών. Στη συνέχεια, πραγματοποιήθηκε απόξεση της στιβάδας του πυριτίου των ζωνών, εκχύλιση των ουσιών με $\text{DCM}:\text{MeOH}$ 60:40 (v/v) (x3φορές), διήθηση των εκχυλισμάτων και παραλαβή των προϊόντων μετά από απομάκρυνση του διαλύτη με απόσταξη υπό κενό. Από τη διαδικασία αυτή, απομονώθηκαν και αναλύθηκαν με LC/ESI/MS οι τέσσερις σουρφακτίνες και δύο βακιλλομυσίνες που είχαν ταυτοποιηθεί στο ολικό εκχύλισμα (Εικόνα 77).



Εικόνα 77 Απομόνωση σουρφακτινών και βακιλλομυσινών με παρασκευαστική TLC.

3.6.2 Μελέτη διφασικών συστημάτων διαλυτών

Η κλασμάτωση του λιποπεπτιδικού εκχυλίσματος με την εφαρμογή των μεθόδων της Υγρής-Υγρής Εκχύλισης (Liquid-Liquid Extraction) (βλέπε §3.6.2) και της Χρωματογραφίας κατ' Αντιρροή (Centrifugal Partition Chromatography, CPC) (βλέπε §3.6.3) προϋποθέτει την εύρεση κατάλληλου διφασικού συστήματος διαλυτών, για την επίτευξη του επιθυμητού διαχωρισμού και απομόνωσης των επιμέρους κατηγοριών λιποπεπτιδίων του βακτηριακού εκχυλίσματος. Για το σκοπό αυτό, δοκιμάστηκαν 17 διφασικά συστήματα (*Πίνακας 16*) τα οποία είτε αναφέρονται στη βιβλιογραφία, είτε έχουν χρησιμοποιηθεί ξανά από την ερευνητική ομάδα του εργαστηρίου.

Η πειραματική πορεία περιλάμβανε τη ζύγιση 10 mg ξηρού εκχυλίσματος σε δοκιμαστικό σωλήνα και εν συνεχεία, την προσθήκη των διαλυτών στην αναλογία του εκάστοτε συστήματος έως τελικού όγκου 4 mL. Ακολουθούσε ανάδευση του δοκιμαστικού σωλήνα σε συσκευή Vortex, έως ότου διαλυθεί το εκχύλισμα. Η αξιολόγηση όλων των συστημάτων διενεργήθηκε, σε πρώτο στάδιο, λαμβάνοντας υπόψιν 3 παράγοντες: το χρόνο διαχωρισμού των φάσεων (επιθυμητός χρόνος διαχωρισμού < 60 sec), την αναλογία της πάνω και κάτω φάσης και τέλος, το βαθμό διαλυτοποίησης του δείγματος στο σύστημα διαλυτών. Τα αποτελέσματα του προκαταρκτικού αυτού ελέγχου παρουσιάζονται στον *Πίνακα 16*.

Τα συστήματα διαλυτών 1 έως 9 κρίθηκαν ακατάλληλα για περαιτέρω μελέτη διότι, είτε η διαλυτότητα του εκχυλίσματος παρουσιάστηκε χαμηλή (συστήματα 1-4 και 7-9), είτε ο χρόνος διαχωρισμού (σύστημα 6) και η αναλογία των δύο φάσεων (συστήματα 2, 3, 5 και 9) δεν ήταν εντός των επιτρεπτών ορίων. Αντίθετα, τα συστήματα που πληρούσαν τα παραπάνω κριτήρια (συστήματα 10-17), αξιολογήθηκαν ως προς την κατανομή των ουσιών στις δύο φάσεις των διφασικών συστημάτων με Χρωματογραφία Λεπτής Στιβάδας.

Ίση ποσότητα από κάθε φάση του εκάστοτε συστήματος αναπτύχθηκε σε πλάκες TLC με το σύστημα ανάπτυξης $\text{CHCl}_3:\text{MeOH}:\text{H}_2\text{O}$ 70:26:4 (*Εικόνα 78*). Από τα 8 αυτά συστήματα διαλυτών, τα συστήματα 10 και 11 απορρίφθηκαν εξαιτίας της κατανομής όλων των μεταβολιτών του εκχυλίσματος αποκλειστικά στην πάνω και κάτω φάση, αντίστοιχα (*Εικόνα 78Α*). Τα υπόλοιπα 6 (12-17) εμφάνισαν ικανοποιητικό

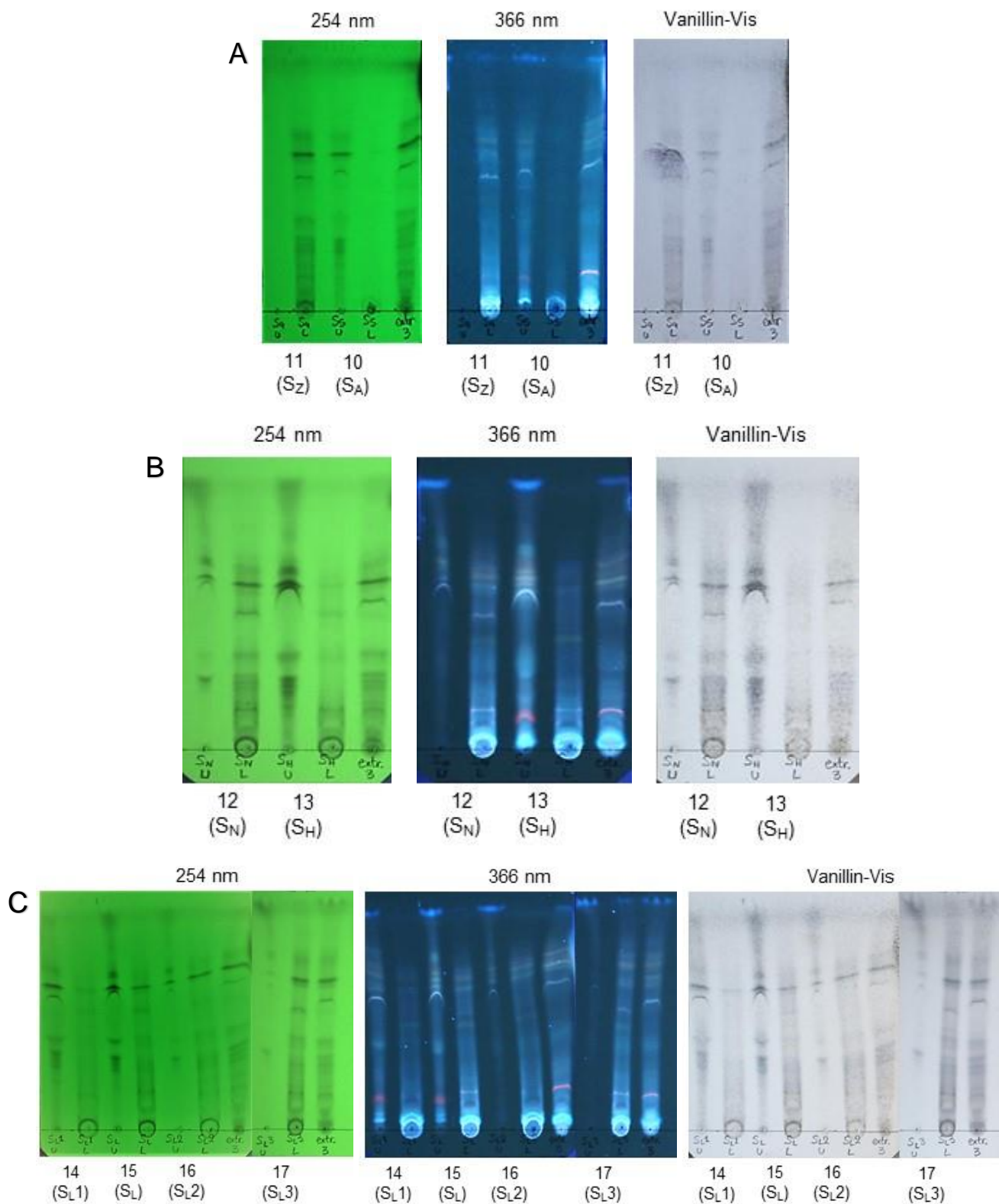
χρωματογραφικό προφίλ (*Εικόνες 78B και 78C*) και για αυτόν το λόγο, μελετήθηκαν περαιτέρω με ανάλυση με LC/MS, με στόχο τη λεπτομερέστερη απεικόνιση της κατανομής των εμπεριεχομένων μεταβολιτών τους.

Για την ανάλυση αυτή, 1 mL της άνω και κάτω φάσης κάθε συστήματος μεταφέρθηκε σε νέο Eppendorf tube και συμπυκνώθηκε έως ξηρού. Τα συμπυκνωμένα δείγματα διαλύθηκαν σε 1 mL MeOH και ακολούθησαν κατάλληλες αραιώσεις (200 µL κάθε δείγματος διαλύθηκαν σε 800 µL MeOH:H₂O 1:1 v/v) για την ανάλυσή τους με LC/MS. Η μέθοδος που ακολουθήθηκε για την ανάλυση περιγράφεται στην §3.4.2.3. Τα αποτελέσματα της ανάλυσης με τη μορφή των χρωματογραφημάτων της πάνω και κάτω φάσης κάθε ενός από αυτά τα συστήματα διαλυτών παρουσιάζονται στην *Εικόνα 79*.

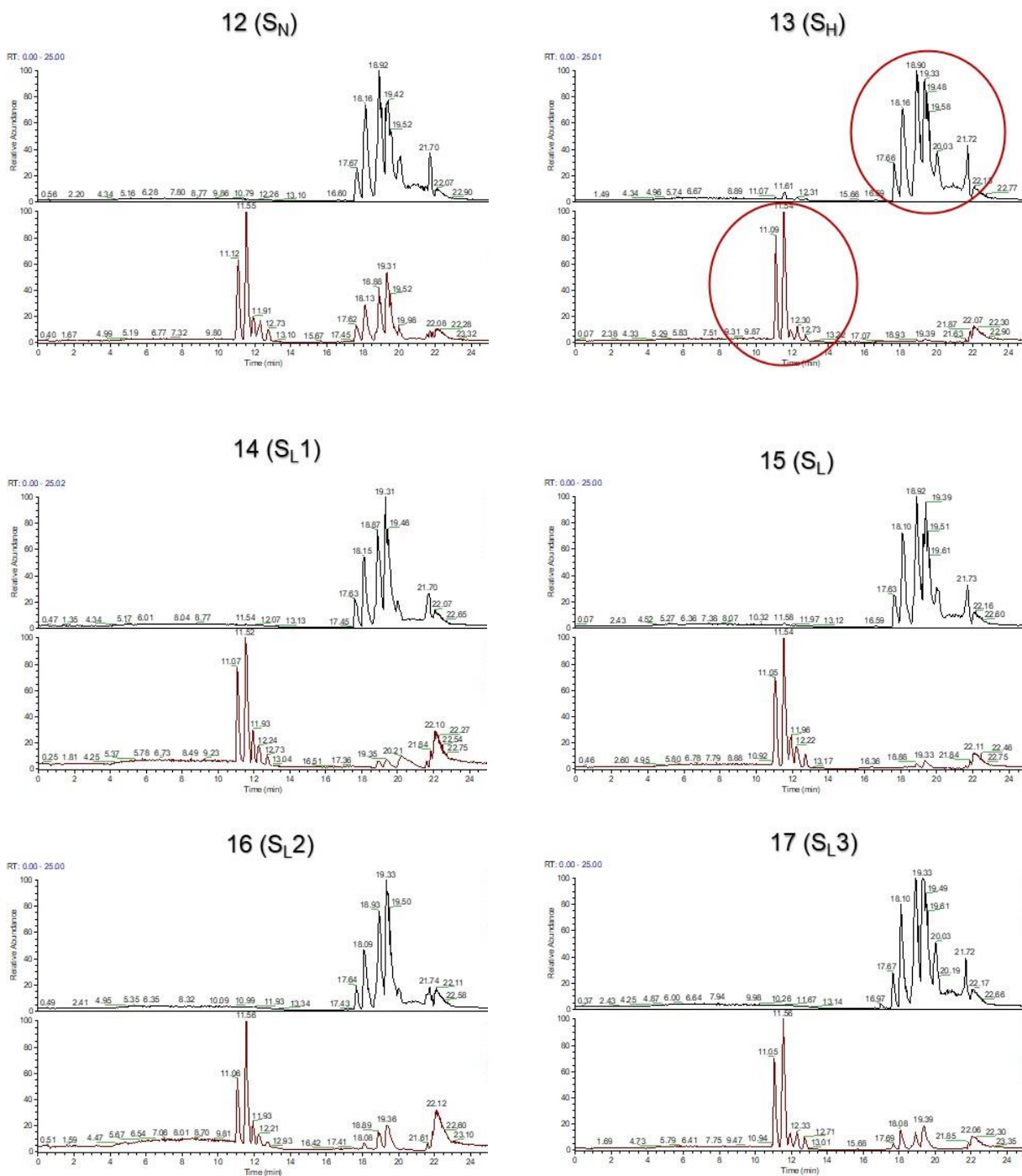
Με βάση την ανάλυση LC/MS, **το σύστημα διαλυτών 13 (S_H) (*n*-Heptane: EtOAc: MeOH: H₂O 1:3:1:3)** αξιολογήθηκε ως το καταλληλότερο για χρήση του στις **μετέπειτα εργασίες** (§3.6.2, 3.6.3). Με το σύστημα αυτό μπορεί να πραγματοποιηθεί σε ένα στάδιο, σύντομα και εύκολα ο αρχικός διαχωρισμός των σουρφακτινών που κατανέμονται στην πάνω φάση από τις βακιλλομυσίνες-φεγκυσίνες που κατανέμονται κυρίως στην κάτω φάση.

Πίνακας 16 Αξιολόγηση διφασικών συστημάτων διαλυτών για την κλασμάτωση του λιποπεπτιδικού εκχυλίσματος.

Διφασικά Συστήματα			Προκαταρκτικός Έλεγχος		
No.	Διαλύτες	Αναλογία	Χρόνος διαχωρ. (sec)	Αναλογία Upper/Lower	Διαλυτότητα εκχυλ.
1(S _A 1)	n-Hex/EtOAc/BuOH/EtOH/H ₂ O	1/11/3/5/10	45	60:40	χαμηλή
2(S _A 2)	n-Hex/EtOAc/BuOH/EtOH/H ₂ O	1/9/5/5/10	35	70:30	χαμηλή
3(S _A 3)	n-Hex/EtOAc/BuOH/EtOH/H ₂ O	1/7/7/5/10	48	80:20	χαμηλή
4(S _B 1)	n-Hex/EtOAc/BuOH/EtOH/H ₂ O	1/11/3/3/12	30	60:40	χαμηλή
5(S _B 2)	n-Hex/EtOAc/BuOH/EtOH/H ₂ O	1/9/5/3/12	57	70:30	καλή
6(S _B 3)	n-Hex/EtOAc/BuOH/EtOH/H ₂ O	1/7/7/3/12	80	60:40	καλή
7(S ₁)	n-Hex/EtOAc/BuOH/EtOH/H ₂ O	2/8/0/4/6	22	60:40	χαμηλή
8(S ₂)	n-Hex/EtOAc/BuOH/EtOH/H ₂ O	2/7/0/4/6	30	60:40	χαμηλή
9(S ₃)	n-Hex/EtOAc/BuOH/EtOH/H ₂ O	2/6/2/4/6	34	70:30	χαμηλή
10(S _A)	n-Hept/EtOAc/MeOH/H ₂ O	0/1/0/1	45	50:50	καλή
11(S _Z)	n-Hept/EtOAc/MeOH/H ₂ O	1/0/1/0	35	50:50	καλή
12(S _N)	n-Hept/EtOAc/MeOH/H ₂ O	1/1/1/1	19	40:60	μέτρια
13(S _H)	n-Hept/EtOAc/MeOH/H ₂ O	1/3/1/3	25	50:50	καλή
14(S _L 1)	n-Hept/EtOAc/MeOH/H ₂ O	1/4/2/3	30	50:50	καλή
15(S _L)	n-Hept/EtOAc/MeOH/H ₂ O	2/3/2/3	40	40:60	μέτρια
16(S _L 2)	n-Hept/EtOAc/MeOH/H ₂ O	3/2/2/3	60	50:50	μέτρια
17(S _L 3)	n-Hept/EtOAc/MeOH/H ₂ O	4/1/2/3	25	50:50	μέτρια



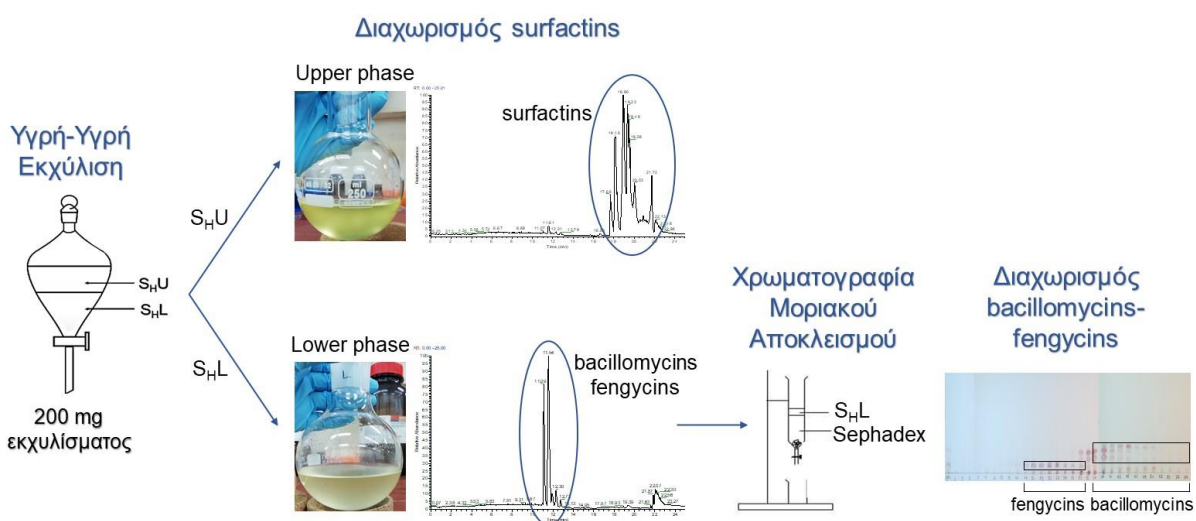
Εικόνα 78 Αξιολόγηση της κατανομής των ουσιών του λιποπεπτιδικού εκχυλίσματος στις δύο φάσεις των διφασικών συστημάτων διαλυτών (A) 10 και 11, (B) 12 και 13, (C) 14, 15, 16 και 17, με χρήση Χρωματογραφίας Λεπτής Στιβάδας (TLC) (σύστημα ανάπτυξης $\text{CHCl}_3:\text{MeOH}:\text{H}_2\text{O}$ 70:26:4).



Εικόνα 79 Χρωματογραφήματα TIC (ESI+) της άνω και κάτω φάσης των διφασικών συστημάτων διαλυτών 12-17 για την αξιολόγηση της κατανομής των ουσιών του λιποπεπτιδικού εκχυλίσματος (με κόκκινο σημειώνεται ο διαχωρισμός των κατηγοριών λιποπεπτιδίων που επιτυγχάνεται με το σύστημα 13)

3.6.3 Κλασμάτωση του λιποπεπτιδικού εκχυλίσματος με συνδυασμό υγρής-υγρής εκχύλισης και χρωματογραφίας μοριακού αποκλεισμού (Sephadex)

Η πρώτη μέθοδος που χρησιμοποιήθηκε για την κλασμάτωση του λιποπεπτιδικού εκχυλίσματος ήταν ο συνδυασμός υγρής-υγρής εκχύλισης με το σύστημα διαλυτών που επιλέχθηκε (βλέπε §3.6.2) και χρωματογραφίας μοριακού αποκλεισμού (Εικόνα 80). Η υγρή-υγρή κλασμάτωση με χρήση διαχωριστικής χοάνης εφαρμόστηκε με στόχο τον αρχικό διαχωρισμό των κατηγοριών λιποπεπτιδίων (σουρφακτίνες, βακιλλομυσίνες, φεγκυσίνες). Αναλυτικότερα, η ομάδα των σουρφακτινών κατανέμεται μόνο στην άνω φάση του διφασικού συστήματος διαλυτών 13 (S_H), με αποτέλεσμα να ανακτώνται στην κάτω φάση μόνο οι κατηγορίες των βακιλλομυσινών-φεγκυσινών. Η διαφοροποίηση των δύο τελευταίων ομάδων όσον αφορά το μοριακό τους βάρος αποτέλεσε και το κίνητρο της χρήσης εν συνεχεία της χρωματογραφίας μοριακού αποκλεισμού, προκειμένου να διαχωριστούν μεταξύ τους.



Εικόνα 80 Πειραματική πορεία κλασμάτωσης του λιποπεπτιδικού εκχυλίσματος με συνδυασμό υγρής-υγρής εκχύλισης και χρωματογραφίας μοριακού αποκλεισμού.

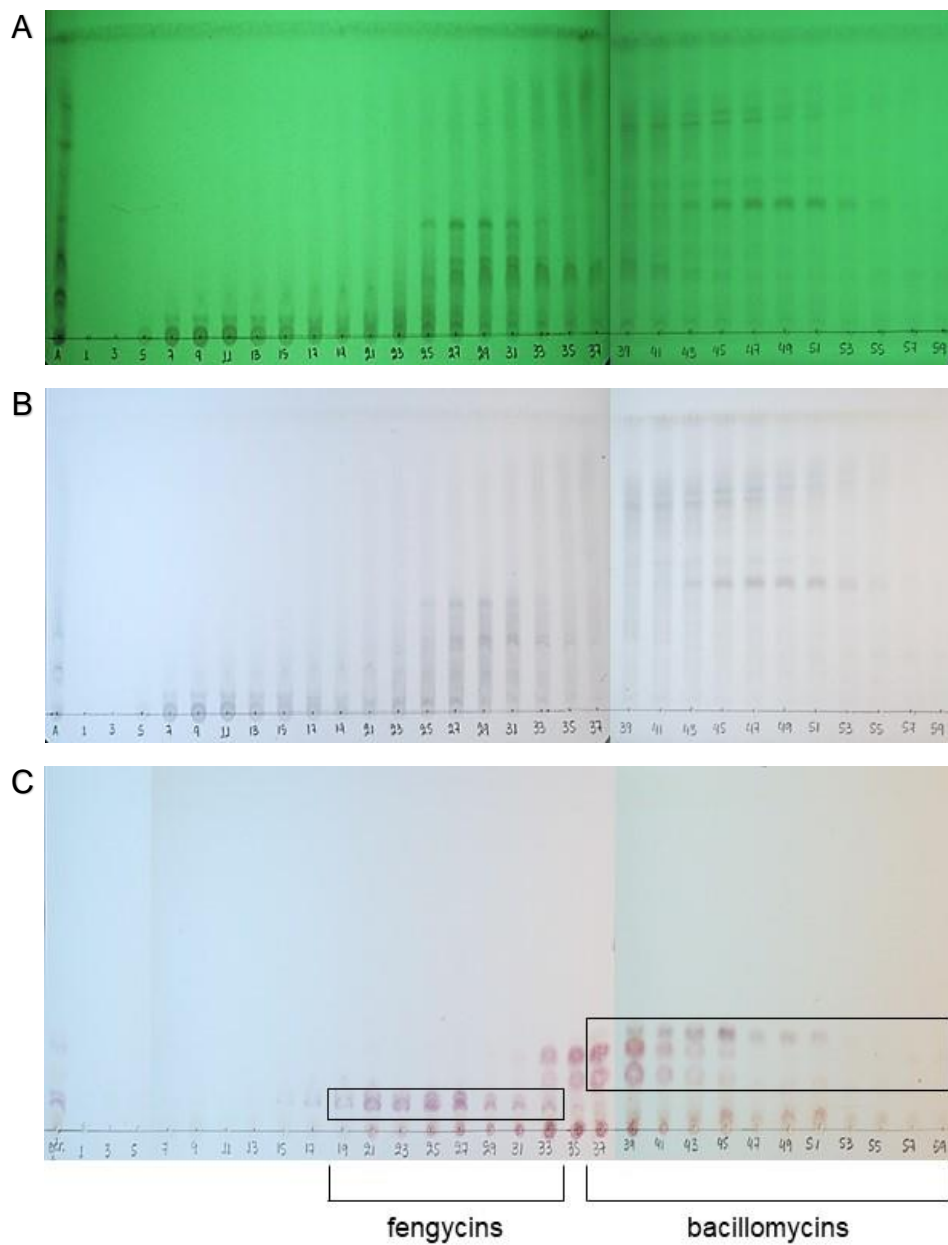
Πειραματική διαδικασία

Για την πραγματοποίηση της υγρής-υγρής εκχύλισης, χρησιμοποιήθηκαν 200 mg εκχυλίσματος του ιζήματος, τα οποία διαλύθηκαν σε 200 mL συστήματος διαλυτών 13 (S_H). Το διάλυμα προστέθηκε σε διαχωριστική χοάνη 250 mL και ακολούθησε ανάδευση της χοάνης, η οποία στη συνέχεια αφέθηκε σε ηρεμία για το σχηματισμό του διφασικού συστήματος. Η άνω και κάτω φάση παραλήφθηκαν ξεχωριστά σε προζυγισμένες σφαιρικές φιάλες, συμπυκνώθηκαν υπό κενό μέχρι ξηρού (άνω φάση=90.6 mg, κάτω φάση=92.9 mg) και στη συνέχεια, η κάτω φάση επεξεργάστηκε με χρήση χρωματογραφίας μοριακού αποκλεισμού. Αναλυτικά, 50 mg διαλύθηκαν σε 1.5 mL MeOH και αναλύθηκαν μέσω στήλης Sephadex με κινητή φάση τον διαλύτη MeOH. Συνολικά, προέκυψαν 60 κλάσματα των 2 mL, τα οποία αναπτύχθηκαν σε πλάκες TLC με σύστημα ανάπτυξης CHCl₃:MeOH:H₂O 70:26:4 και ψεκάστηκαν τόσο με διάλυμα θειικής βανιλίνης όσο και με διάλυμα νινυδρίνης. Τέλος, τα κλάσματα αναλύθηκαν με LC/MS για την επιβεβαίωση του επιτυχούς διαχωρισμού και με βάση τα αποτελέσματα, πραγματοποιήθηκαν οι κατάλληλες συνενώσεις.

Αποτελέσματα

Ανάλυση κλασμάτων με TLC

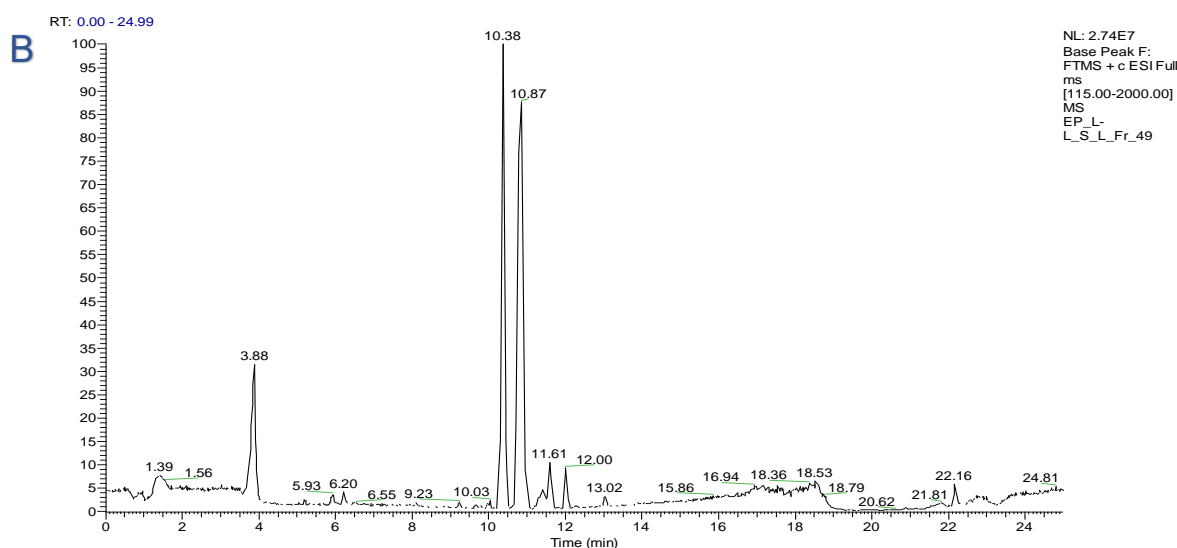
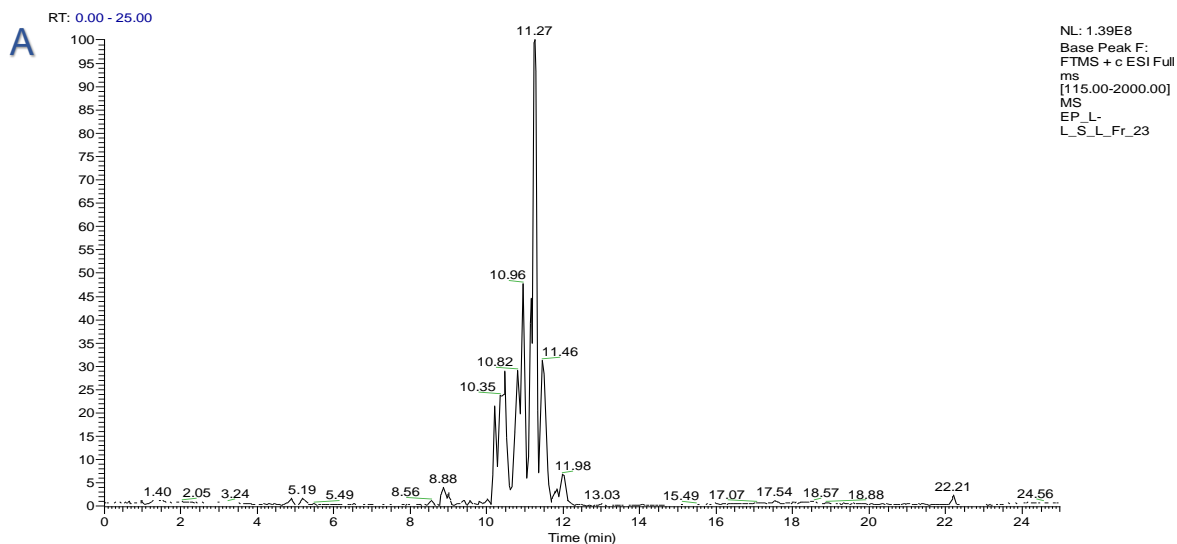
Στα χρωματογραφήματα TLC των κλασμάτων που προέκυψαν από την εφαρμογή της χρωματογραφίας μοριακού αποκλεισμού, παρατηρείται ο επιδιωκόμενος διαχωρισμός των λιποπεπτιδίων των ομάδων φεγκυσινών και βακιλλομυσινών (*Εικόνα 81*). Αναλυτικότερα, τα μόρια των φεγκυσινών, τα οποία χαρακτηρίζονται από μεγαλύτερο μοριακό βάρος, φαίνεται ότι εξέρχονται πρώτα από τη στήλη Sephadex, με τα κλάσματα 19-31 να είναι πλούσια σε αυτά. Ακολούθως, εκκλύονται από τη στήλη οι βακιλλομυσίνες, οι οποίες ανιχνεύονται στα κλάσματα 37-60. Ο παραπάνω διαχωρισμός είναι περισσότερο ευδιάκριτος μετά από ψεκάσμο της πλάκας με διάλυμα νινυδρίνης, καθώς αμφότερες οι λιποπεπτιδικές κατηγορίες περιέχουν πρωτοταγείς αμινομάδες στον πεπτιδικό τους σκελετό, με αποτέλεσμα να αντιδρούν με τη νινυδρίνη προς σχηματισμό έγχρωμων προϊόντων (*Εικόνα 81C*).



Εικόνα 81 Χρωματογραφήματα TLC των κλασμάτων που συλλέχθηκαν κατά την εφαρμογή χρωματογραφίας μοριακού αποκλεισμού στην κάτω φάση (A) παρατήρηση στα 254 nm, (B) παρατήρηση μετά από ψεκασμό της πλάκας με διάλυμα θειικής βανιλίνης και θέρμανση, (C) παρατήρηση μετά από ψεκασμό της πλάκας με διάλυμα νινυδρίνης και θέρμανση (σημειώνεται ο επιτυχής διαχωρισμός των φεγκυσινών από τις βακιλλομυσίνες).

LC/MS ανάλυση κλασμάτων

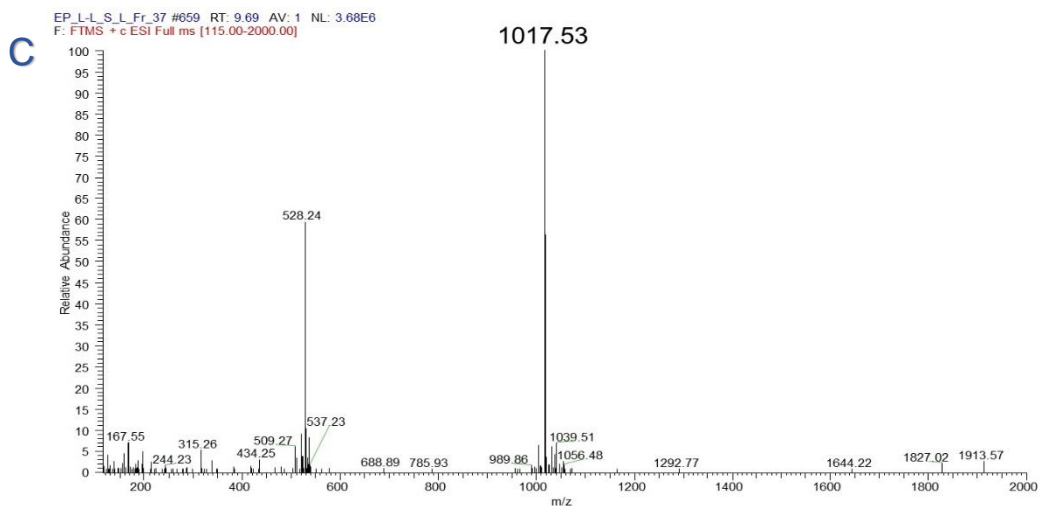
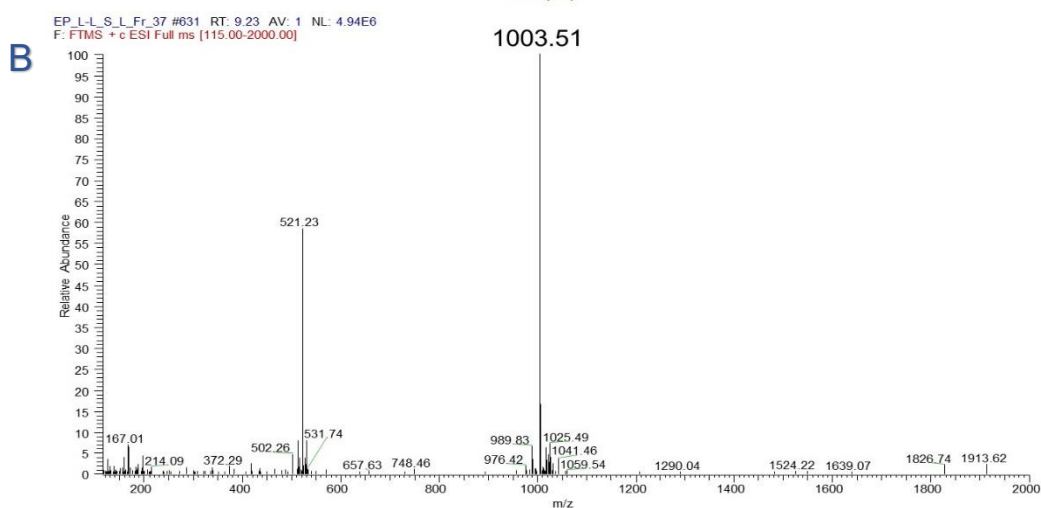
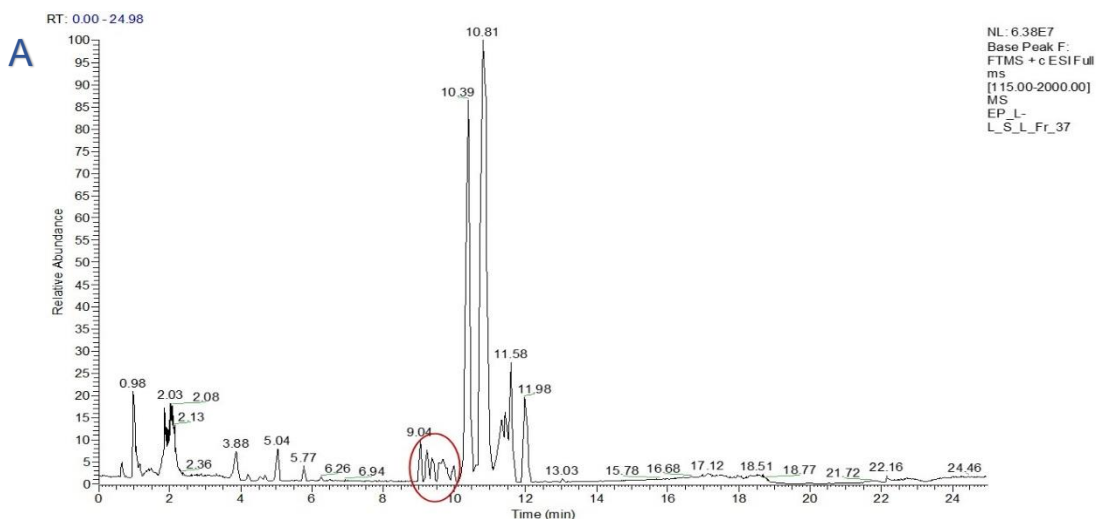
Η LC/MS ανάλυση των κλασμάτων της χρωματογραφίας μοριακού αποκλεισμού επιβεβαίωσε τον επιτυχή διαχωρισμό των δύο κατηγοριών λιποπεπτιδίων. Στην *Εικόνα 82* παρουσιάζεται ενδεικτικά ένα χρωματογράφημα LC από κάθε κατηγορία (το χρωματογράφημα του κλάσματος 23 για την ομάδα των φεγκυσινών και το αντίστοιχο του κλάσματος 49 για εκείνη των βακιλλομυσινών). Επιπλέον, η κλασμάτωση της κάτω φάσης ανέδειξε την ύπαρξη μεταβολιτών που βρίσκονται σε μικρότερες συγκεντρώσεις στο ολικό λιποπεπτιδικό εκχύλισμα και οι οποίοι δεν είχαν αναγνωριστεί κατά την ανάλυσή του. Πιο συγκεκριμένα, εντοπίστηκαν και ταυτοποιήθηκαν δύο ακόμα μόρια της οικογένειας των βακιλλομυσινών, τα οποία αποτελούνται από τον ίδιο πεπτιδικό δακτύλιο με τα προαναφερθέντα (§3.4.2.3), ενώ διαφέρουν στο μήκος της λιπαρής τους αλυσίδας, έχοντας μία (λιπαρή αλυσίδα με 13 άνθρακες) και δύο (λιπαρή αλυσίδα με 12 άνθρακες) αντίστοιχα μεθυλενικές ομάδες λιγότερες από την πρώτη βακιλλομυσίνη που είχε ταυτοποιηθεί. Στο κλάσμα 37, το οποίο εμφάνισε τη μεγαλύτερη περιεκτικότητα στις ουσίες αυτές σε σύγκριση με τα υπόλοιπα, οι κύριες κορυφές τους εκλούστηκαν στους χρόνους κατακράτησης 9.23 και 9.69, που αντιστοιχούν στα $[M+H]^+$ m/z 1003 και 1017, καθώς και στα $[M+Na]^+$ m/z 1025 και 1039 αντίστοιχα (*Πίνακας 17, Εικόνα 83*). Τέλος, σύμφωνα με τα αποτελέσματα της LC/MS ανάλυσης, πραγματοποιήθηκαν κατάλληλες συνενώσεις των κλασμάτων της χρωματογραφίας μοριακού αποκλεισμού και υπολογίστηκαν τα βάρη των συνενωμένων κλασμάτων (*Πίνακας 18*).



Εικόνα 82 Ενδεικτικά χρωματογραφήματα TIC (ESI+) (A) φεγκυσινών (Fraction 23) και (B) βακιλλομυσινών (Fraction 49) που παραλήφθηκαν μετά από LC/MS ανάλυση των κλασμάτων που συλλέχθηκαν κατά την εφαρμογή χρωματογραφίας μοριακού αποκλεισμού στην κάτω φάση.

Πίνακας 17 Μόρια βακιλλομυσινών του κλάσματος 37 της χρωματογραφίας μοριακού αποκλεισμού που βρίσκονται σε χαμηλή συγκέντρωση στο ολικό εκχύλισμα.

<i>Lipopeptides</i>	<i>Rt (min)</i>	<i>Mass</i>	<i>Formula</i>	<i>Delta ppm</i>
Minor Bacillomycins	9.23	1003.5117	C ₄₆ H ₇₀ O ₁₅ N ₁₀	2.172
	9.69	1017.5267	C ₄₇ H ₇₂ O ₁₅ N ₁₀	1.592



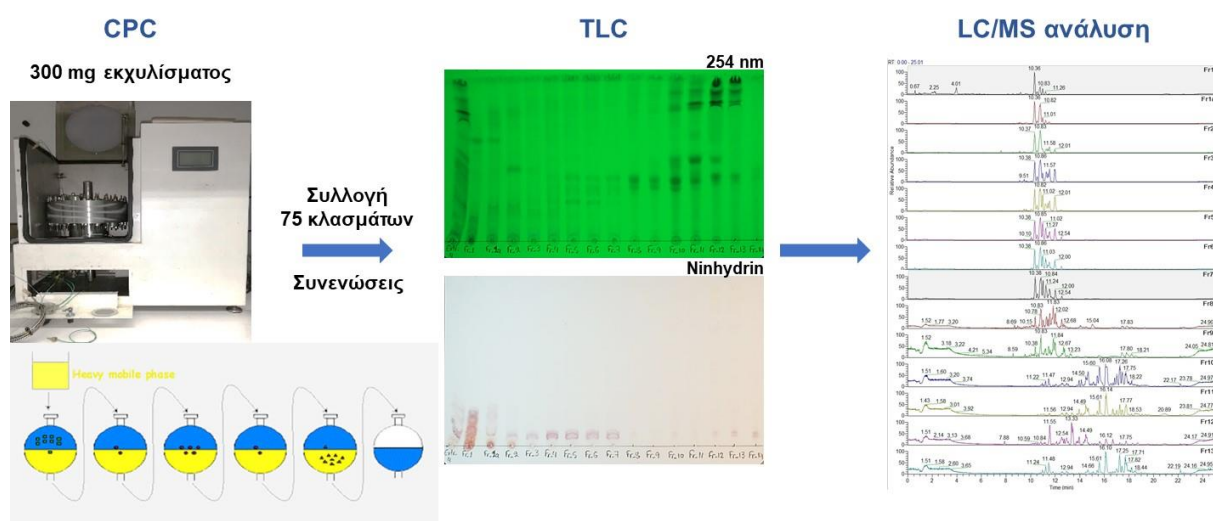
Εικόνα 83 (A) Χρωματογράφημα TIC (ESI+) βακιλλομυσινών του κλάσματος 37 που προέκυψε από την εφαρμογή χρωματογραφίας μοριακού αποκλεισμού στην κάτω φάση. Με κόκκινο σημειώνονται οι κορυφές των βακιλλομυσινών που ανιχνεύθηκαν στο κλάσμα και βρίσκονται σε μικρή συγκέντρωση στο ολικό εκχύλισμα (minor bacillomycins), **(B)** Φάσμα HRMS της βακιλλομυσίνης που εκλούεται στα 9.23 min (βακιλλομυσίνη με λιπαρή αλυσίδα με 12 άνθρακες), **(C)** Φάσμα HRMS της βακιλλομυσίνης που εκλούεται στα 9.69 min (βακιλλομυσίνη με λιπαρή αλυσίδα με 13 άνθρακες).

Πίνακας 18 Συνενώσεις των κλασμάτων που προέκυψαν από τη χρήση χρωματογραφίας μοριακού αποκλεισμού στην κάτω φάση της υγρής-υγρής εκχύλισης.

Συνενώσεις	Κλάσματα	Βάρος (mg)
1	1-18	2.6
2	19-22	2.9
3	23-31	12.3
4	32-36	8.6
5	37-60	10.1

3.6.4 Κλασμάτωση του λιποπεπτιδικού εκχυλίσματος με χρήση χρωματογραφίας κατ' αντιρροή (Centrifugal Partition Chromatography, CPC)

Η δεύτερη μέθοδος που χρησιμοποιήθηκε για την κλασμάτωση του λιποπεπτιδικού εκχυλίσματος ήταν η χρωματογραφία CPC. Πρωταρχικός στόχος αποτέλεσε και πάλι ο διαχωρισμός των επιμέρους ομάδων λιποπεπτιδίων που ταυτοποιήθηκαν στο ολικό εκχύλισμα, ενώ δευτερευόντως, η χρήση της τεχνικής αυτής αποσκοπούσε στην απομόνωση λιποπεπτιδίων που περιέχονται σε χαμηλές συγκεντρώσεις σε αυτό (minor lipopeptides). Η πειραματική διαδικασία που ακολουθήθηκε συνοψίζεται στην *Εικόνα 84* και περιγράφεται αναλυτικά παρακάτω.



Εικόνα 84 Πειραματική πορεία κλασμάτωσης του λιποπεπτιδικού εκχυλίσματος με εφαρμογή χρωματογραφίας κατ' αντιρροή (CPC).

Πειραματική διαδικασία

Η διαδικασία του CPC πραγματοποιήθηκε σε ημι-παρασκευαστική στήλη 200 mL, με χρήση του διφασικού συστήματος διαλυτών **13 (SH) (n-Heptane: EtOAc: MeOH: H₂O 1:3:1:3)** (§3.6.2), η κάτω φάση του οποίου λειτούργησε ως κινητή και η πάνω ως στατική. Για την ανάλυση, χρησιμοποιήθηκαν 300 mg ξηρού εκχυλίσματος του ιζήματος, τα οποία διαλύθηκαν σε 8 mL του συστήματος (1:1 v/v Upper:Lower phase).

Εφαρμόστηκε η μέθοδος Elution-Extrusion (Έκλουση-Εξώθηση), με χρήση 2 όγκων στήλης κατά τη διάρκεια του σταδίου έκλουσης.

Αρχικά, παρασκευάστηκαν 2 L του διφασικού συστήματος διαλυτών και πραγματοποιήθηκε διαχωρισμός της πάνω και κάτω φάσης σε διαχωριστική χοάνη. Η στήλη πληρώθηκε με τη στατική φάση σε ascending mode, με ροή 10 mL/min και ταχύτητα περιστροφής 250 rpm. Στη συνέχεια, διαβιβάστηκε η κινητή φάση σε descending mode, με ροή 10 mL/min και ταχύτητα περιστροφής 600 rpm, προκειμένου να εξισορροπηθεί το διφασικό σύστημα μέσα στη στήλη. Η εξισορρόπηση πραγματοποιήθηκε μετά από την προσθήκη 100 mL κινητής φάσης, με συντελεστή κατακράτησης $S_F=50\%$. Ακολούθησε η εισαγωγή του δείγματος στη στήλη και η συλλογή κλασμάτων όγκου 10 mL με τη βοήθεια αυτόματου συλλέκτη.

Κατά τη διάρκεια του διαχωρισμού, οι παράμετροι της ανάλυσης διατηρήθηκαν σταθερές (descending mode, ροή 10 mL/min και ταχύτητα περιστροφής 600 rpm), ενώ η πίεση σταθεροποιήθηκε στα 155-167 PSI. Κατά το στάδιο της έκλουσης, χρησιμοποιήθηκαν συνολικά 500 mL κινητής φάσης με αποτέλεσμα τη συλλογή 50 κλασμάτων, ενώ στη συνέχεια πραγματοποιήθηκε εξώθηση του περιεχομένου της στήλης με χρήση 250 mL στατικής φάσης, με αποτέλεσμα τη συλλογή 25 επιπλέον κλασμάτων. Η διαδικασία διήρκεσε 95 min και προέκυψαν συνολικά 75 κλάσματα.

Η περιεκτικότητα των κλασμάτων σε δευτερογενείς μεταβολίτες ελέγχθηκε σε πρώτο στάδιο με TLC, όπου με βάση την χημική ομοιότητα των συστατικών πραγματοποιήθηκαν συνενώσεις των κλασμάτων (*Πίνακας 19*) και ακολούθησε συμπύκνωσή τους υπό κενό και ανάπτυξή τους σε συγκεντρωτική πλάκα TLC. Σε επόμενο στάδιο, η σύσταση των κλασμάτων ελέγχθηκε με LC/MS ανάλυση.

Αποτελέσματα

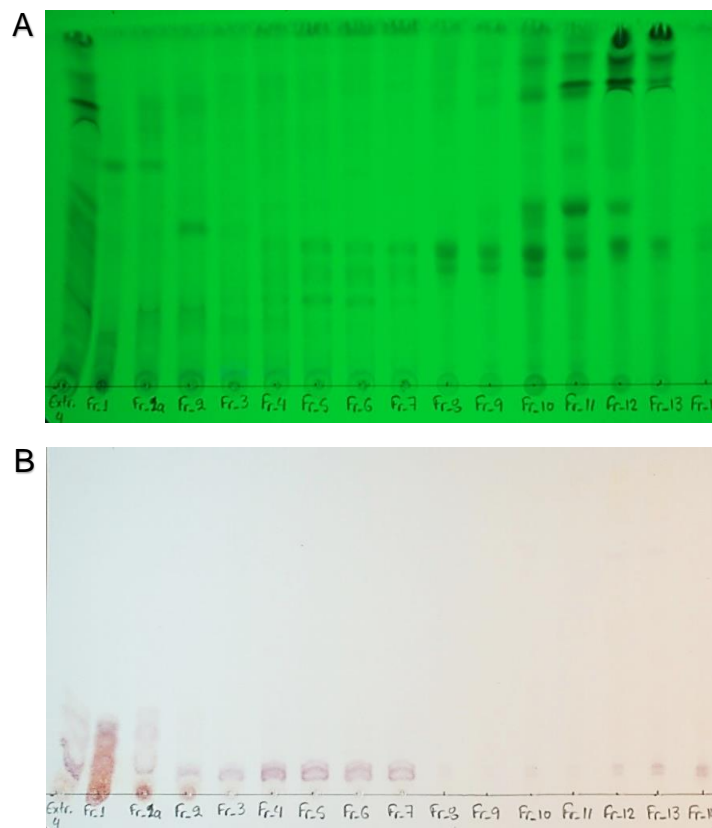
Ανάλυση των κλασμάτων με TLC

Στα χρωματογραφήματα TLC των συνενωμένων κλασμάτων (*Εικόνα 85*) παρατηρείται η κλασμάτωση που επιτεύχθηκε με τη μέθοδο του CPC. Τα τελικά κλάσματα που λήφθηκαν (Fractions 1-14) διαφέρουν μεταξύ τους ως προς τη σύσταση, με τα πρώτα από αυτά να εμφανίζουν, όπως ήταν αναμενόμενο, υψηλή περιεκτικότητα στα περισσότερα πολικά λιποπεπτίδια του ολικού εκχυλίσματος, τις βακιλλομυσίνες και

φεγκυσίνες, ενώ τα επόμενα παρουσιάζουν υψηλότερη συγκέντρωση σουρφακτινών. Συγκεκριμένα, φαίνεται ότι οι βακιλλομυσίνες απαντώνται περισσότερο στα δύο πρώτα κλάσματα (1 και 1α), οι φεγκυσίνες περιέχονται κυρίως στα κλάσματα 2-7 και οι σουρφακτίνες στα κλάσματα 10-13.

Πίνακας 19 Συνενώσεις των κλασμάτων της χρωματογραφίας CPC.

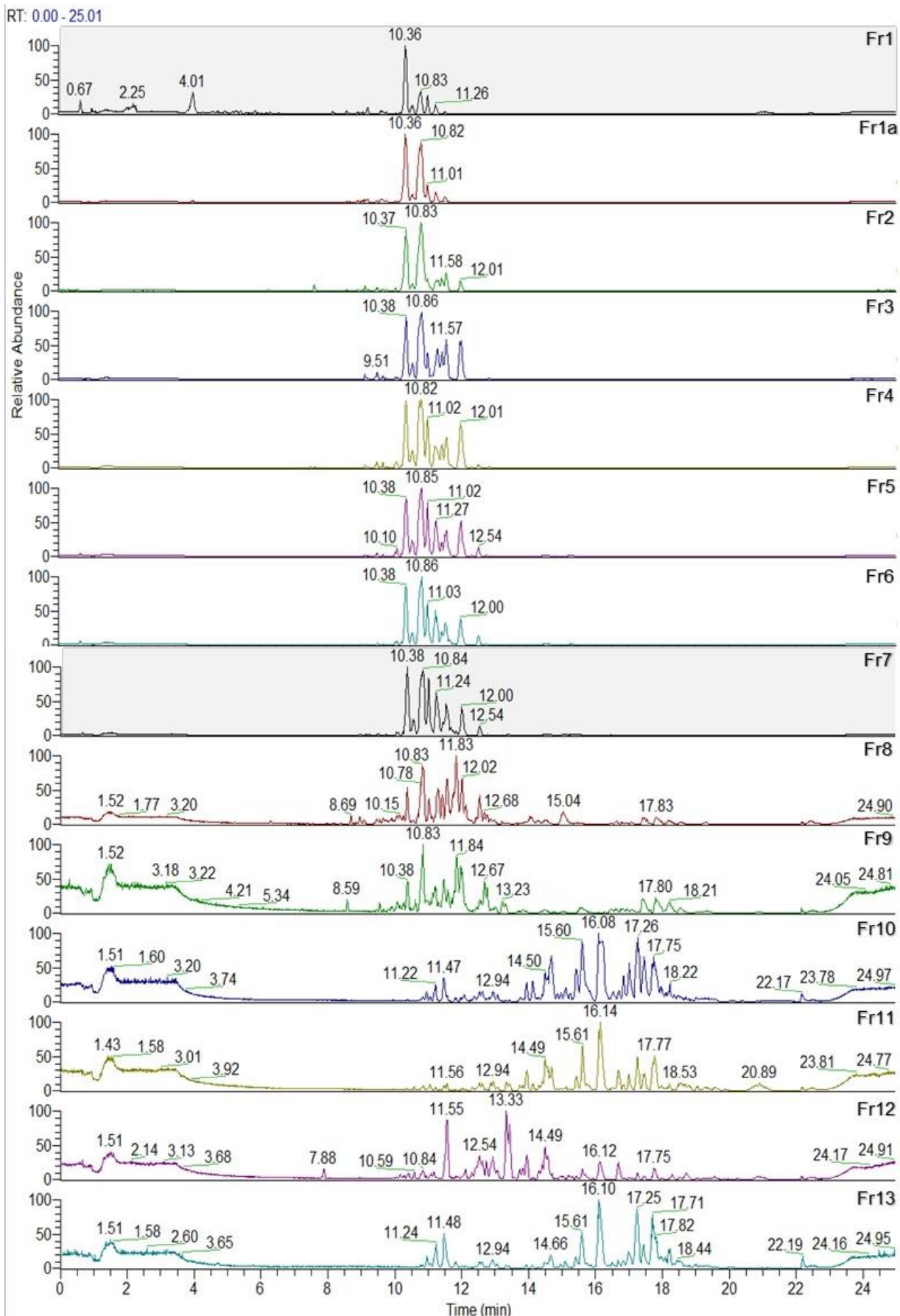
Συνενώσεις	Κλάσματα	Βάρος (mg)
1	8-9	69.4
1α	10	10.5
2	11-16	33
3	17-23	15.4
4	24-33	10.8
5	34-41	5
6	42-50	4.3
7	51-59	3.1
8	60-63	1.7
9	64-65	1.3
10	66-67	1.6
11	68-69	2.8
12	70-71	71.7
13	72-73	40.8
14	74-75	1.4



Εικόνα 85 Χρωματογραφήματα TLC των συνενωμένων κλασμάτων CPC (A) παρατήρηση στα 254 nm και (B) παρατήρηση μετά από ψεκασμό της πλάκας με διάλυμα νινυδρίνης και θέρμανση.

LC/MS ανάλυση των κλασμάτων

Τα αποτελέσματα της LC/MS ανάλυσης των συνενωμένων κλασμάτων CPC παρουσιάζουν μία σταδιακή έκλυση των κατηγοριών λιποπεπτιδίων του ολικού εκχυλίσματος που πραγματοποιήθηκε με τη μέθοδο αυτή, όπως παρατηρείται και στην **Εικόνα 86**. Η τεχνική του CPC δεν οδήγησε σε απόλυτο και σαφή διαχωρισμό και απομόνωση των επιμέρους λιποπεπτιδικών ομάδων, παρόλα αυτά, είχε ως αποτέλεσμα τη λήψη κλασμάτων με κυμαινόμενες συγκεντρώσεις και διαφορετικές αναλογίες των διαφόρων μεταβολιτών, τα οποία θα μπορούσαν να χρησιμοποιηθούν στη συνέχεια σε βιολογικούς ελέγχους, για την αξιολόγηση της συμμετοχής κάθε ουσίας στην έως τώρα παρατηρούμενη δραστηριότητα του εκχυλίσματος (βιοκατευθυνόμενη μελέτη).

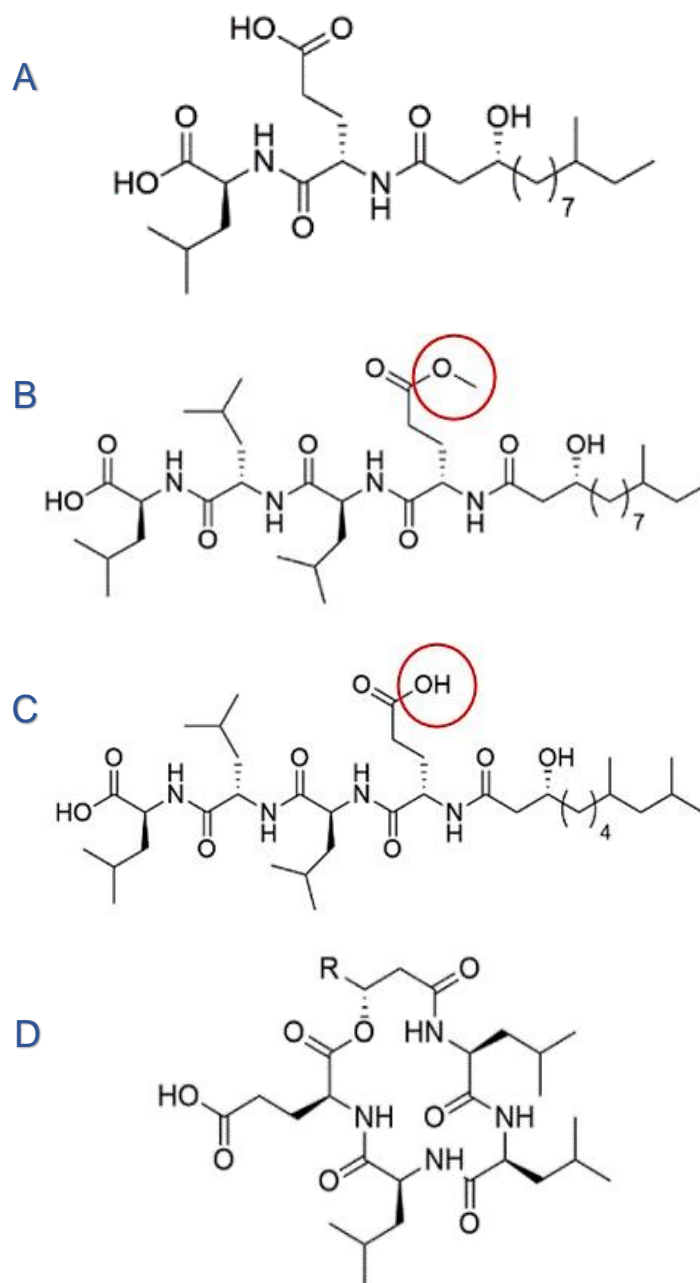


Εικόνα 86 Χρωματογραφήματα TIC (ESI+) των συνενωμένων κλασμάτων CPC. Παρατηρείται σταδιακή έκλυση των κατηγοριών λιποπεπτιδίων του ολικού εκχυλίσματος.

Επιπλέον, μέσω της χρωματογραφίας CPC, λήφθηκαν κλάσματα πλούσια σε μεταβολίτες που βρίσκονται σε χαμηλές συγκεντρώσεις στο ολικό εκχύλισμα (minor lipopeptides), και οι οποίοι δεν είχαν εντοπιστεί και ταυτοποιηθεί στην παρούσα μελέτη. Συγκεκριμένα, τα κλάσματα 10 και 11 περιέχουν υψηλές συγκεντρώσεις δύο επιπλέον κατηγοριών λιποπεπτιδίων, των gageotetrins (γαγεοτετρίνες) και bacilotetrins (βακιλοτετρίνες). Οι δύο αυτές ομάδες περιλαμβάνουν μικρά μόρια λιποπεπτιδίων, των οποίων ο πεπτιδικός σκελετός αποτελείται από 2 έως 4 αμινοξέα.

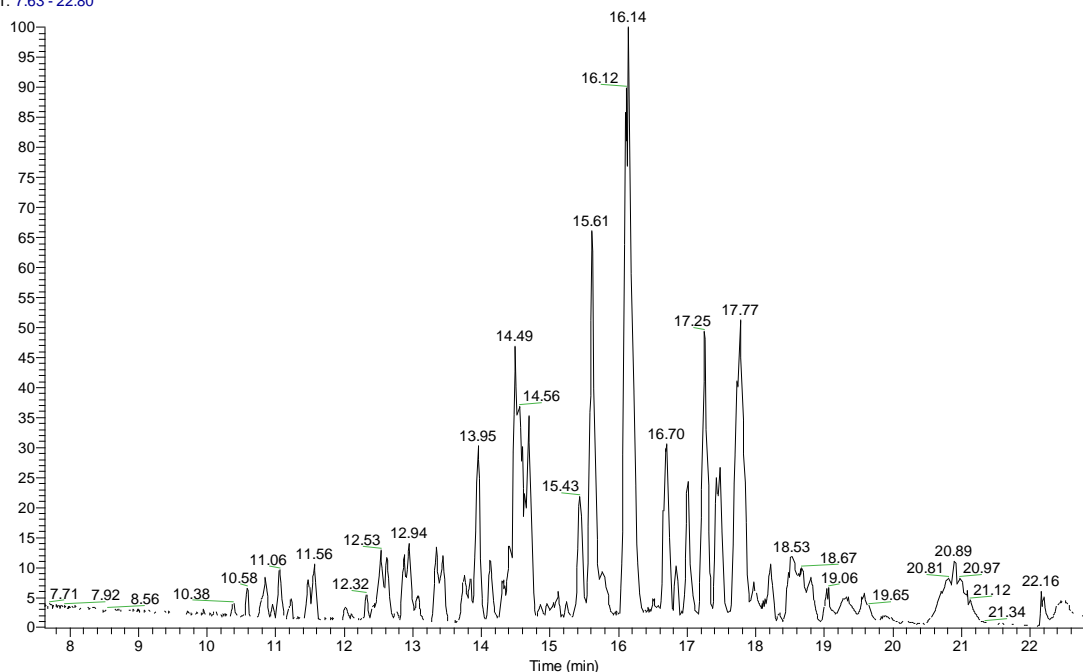
Αναλυτικότερα, η οικογένεια των γαγεοτετρινών συνίσταται από ευθύγραμμες δομές, με τις γαγεοτετρίνες A να αποτελούν τους μικρότερους λιποπεπτιδικούς μεταβολίτες που απαντώνται στη φύση, καθώς συγκροτούνται από 2 μόνο αμινοξέα και μία λιπαρή αλυσίδα ποικίλου μήκους (*Εικόνα 87A*). Οι υπόλοιπες δύο υπο-ομάδες γαγεοτετρινών (B και C) έχουν όμοιο μεταξύ τους πεπτιδικό σκελετό, με μόνη διαφορά την ύπαρξη μίας μεθόξυ ομάδας (-OCH₃) στο γλουταμινικό οξύ των γαγεοτετρινών B (*Εικόνα 87B, 87C*). Σε αντίθεση με τις γαγεοτετρίνες, οι βακιλοτετρίνες είναι κυκλικά μόρια με 4 αμινοξέα στο πεπτιδικό τους τμήμα (*Εικόνα 87D*). Όσον αφορά στις βιολογικές δράσεις που επιδεικνύουν οι παραπάνω δύο ομάδες λιποπεπτιδίων, οι γαγεοτετρίνες εμφανίζουν ευρέως φάσματος αντιμικροβιακές ιδιότητες (Tareq et al., 2014), ενώ οι βακιλοτετρίνες έχουν μελετηθεί ως προς την αντισταφυλοκοκκική τους δράση (Tareq & Shin, 2017).

Στο κλάσμα 11 του CPC (*Εικόνα 88*), το οποίο εμφάνισε τη μεγαλύτερη συγκέντρωση και καθαρότητα των προαναφερθέντων κατηγοριών, οι κορυφές των γαγεοτετρινών εκλούστηκαν σε χρόνους κατακράτησης 13.95 και 14.49 (A), 16.14 (B) και 14.69, 15.61 (C), που αντιστοιχούν στα [M+H]⁺ m/z 487, 501, 727, 699 και 713 αντίστοιχα. Επιπλέον, οι κορυφές των βακιλοτετρινών εκλούστηκαν σε χρόνους κατακράτησης 17.01 (A) και 17.43 (B), που αντιστοιχούν στα [M+H]⁺ m/z 695 και 709 (*Πίνακας 20*). Η απόλυτη ταυτοποίηση των παραπάνω λιποπεπτιδίων πραγματοποιήθηκε μέσω ανάλυσης HRMS/MS (*Εικόνες 89-94*).



Εικόνα 87 Χημικές δομές των λιποτεπτιδίων: (A) γαγεοτετρίνες A, (B) γαγεοτετρίνες B, (C) γαγεοτετρίνες C, (D) βακιλοτετρίνες. Με κόκκινο σημειώνεται η δομική διαφορά των γαγεοτετρινών B και C.

RT: 7.63 - 22.80

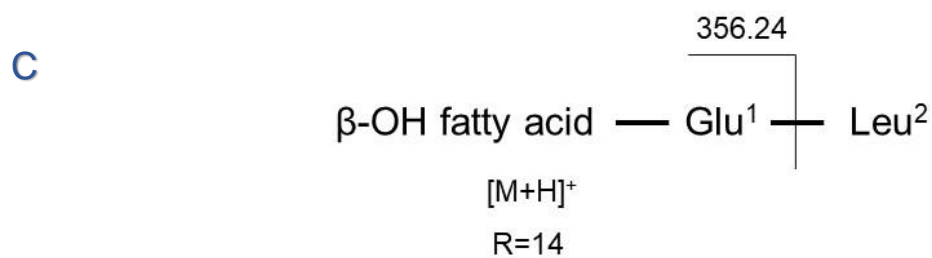
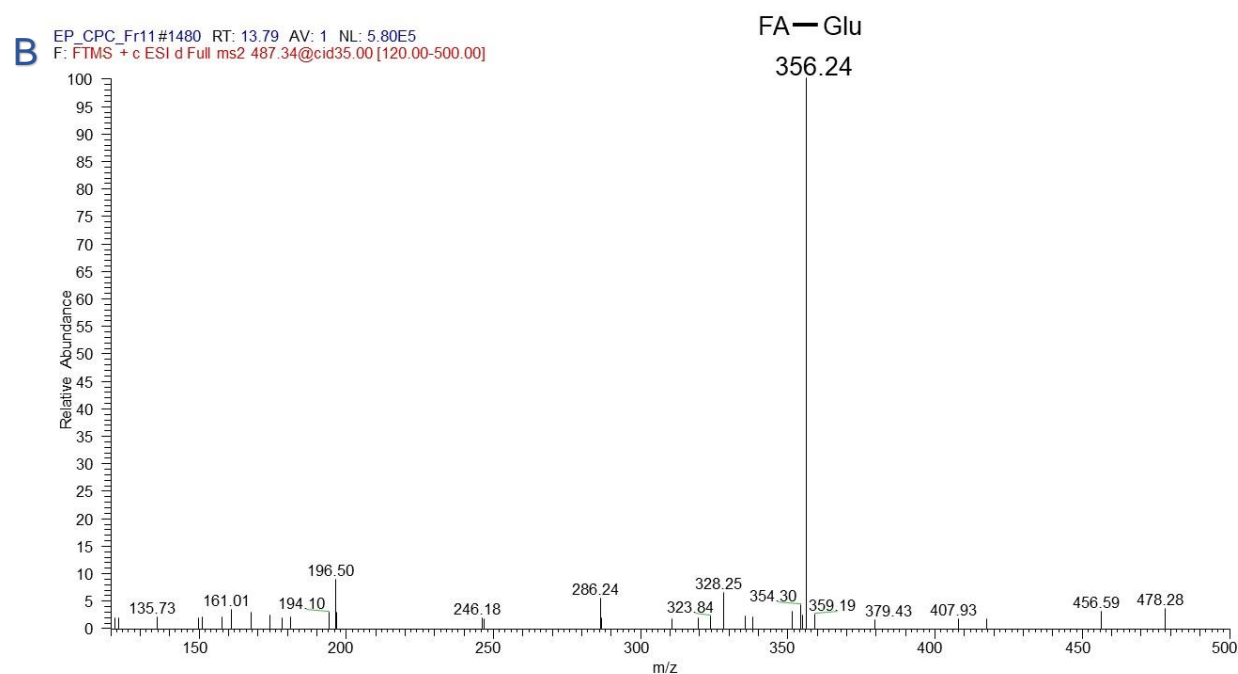
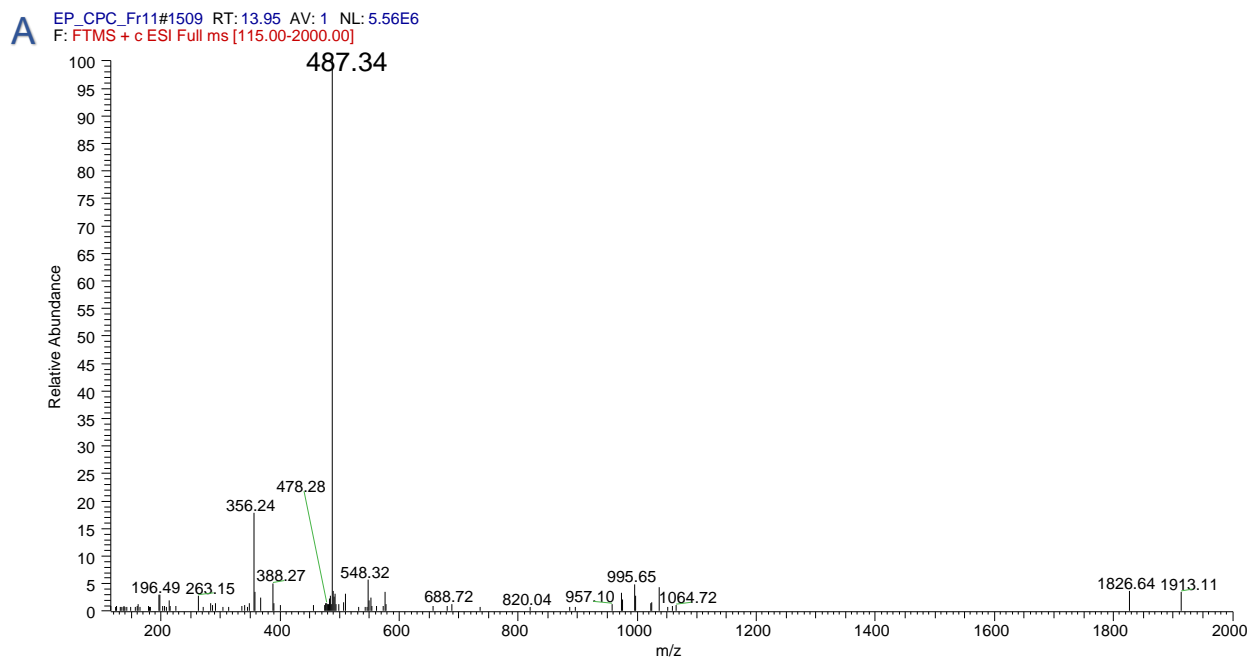


NL:
1.84E7
Base Peak F:
FTMS + c ESI
Full ms
[115.00-
2000.00] MS
ep_cpc_fr11

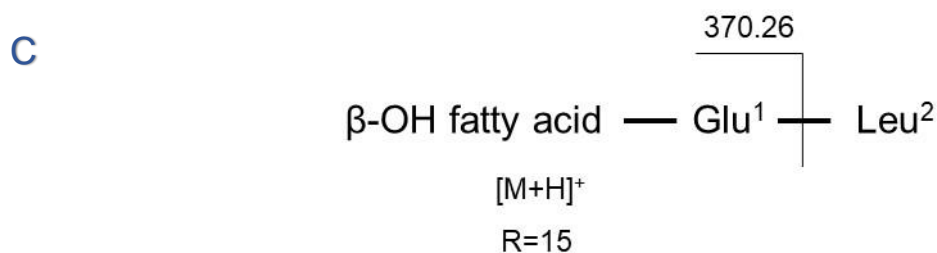
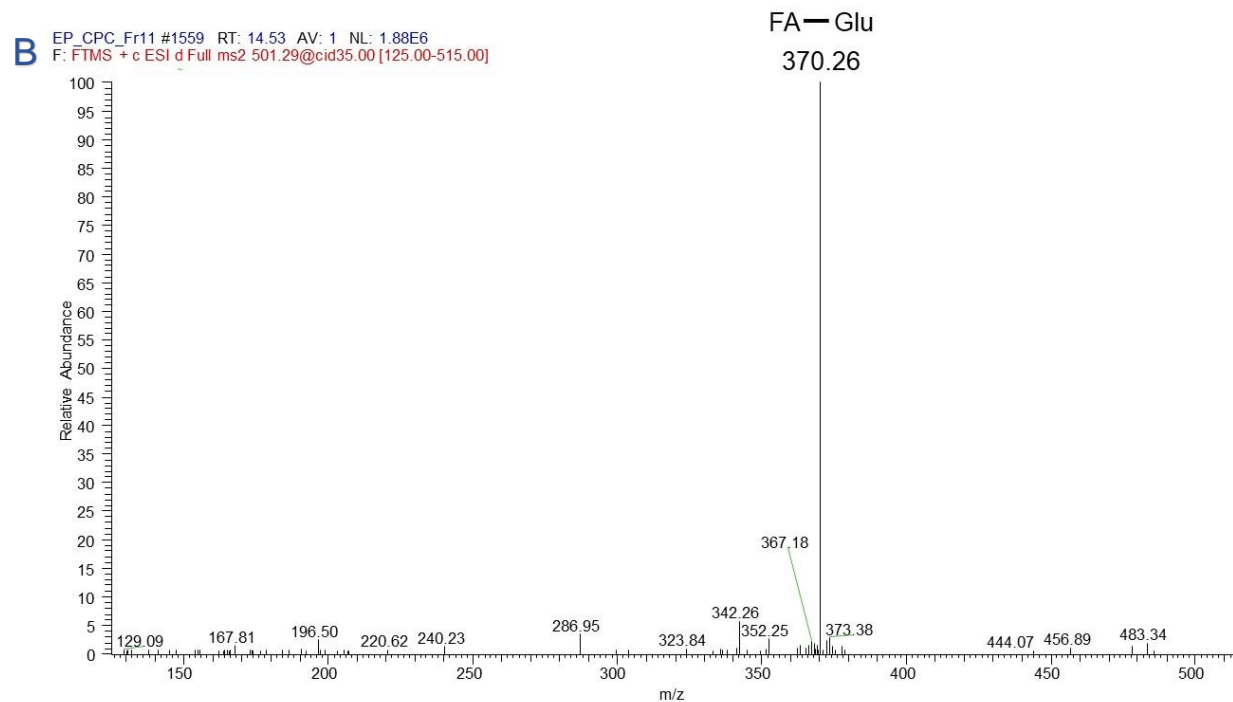
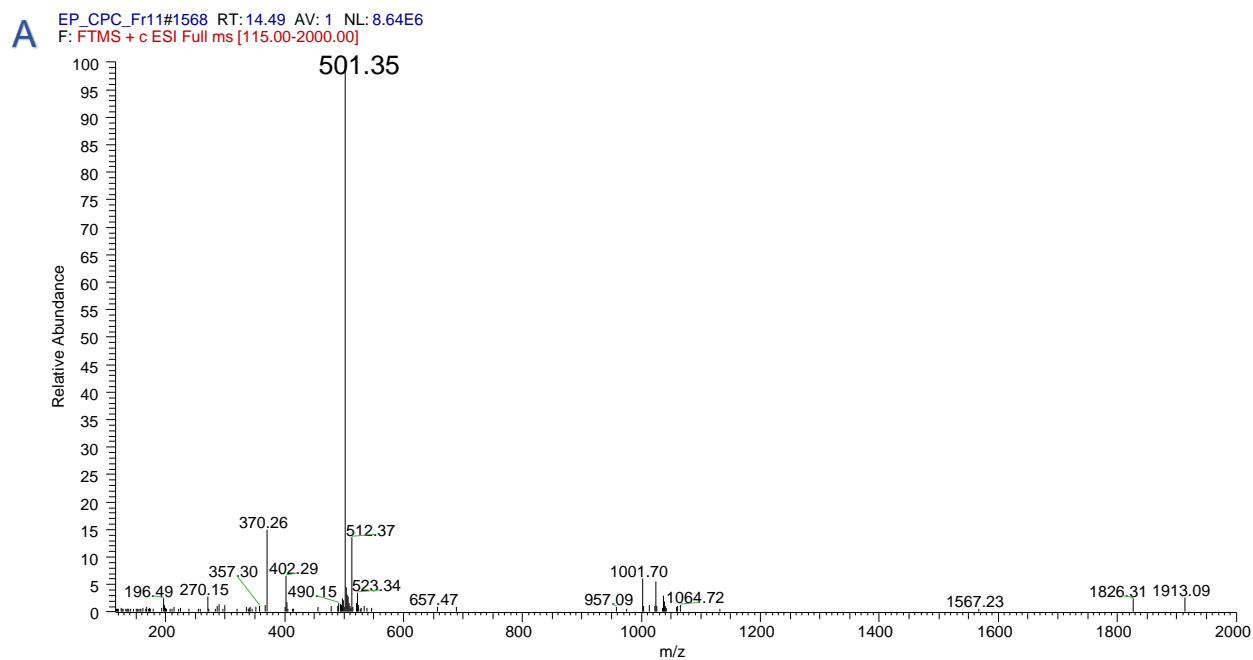
Εικόνα 88 Χρωματογράφημα TIC (ESI+) του κλάσματος 11 του CPC όπου εμφανίζονται οι κορυφές των λιποπεπτιδίων των κατηγοριών γαγεοτετρινών και βακιλοτετρινών (minor lipopeptides).

Πίνακας 20 Τα λιποπεπτίδια των κατηγοριών γαγεοτετρινών και βακιλοτετρινών (minor lipopeptides) του κλάσματος 11 του CPC.

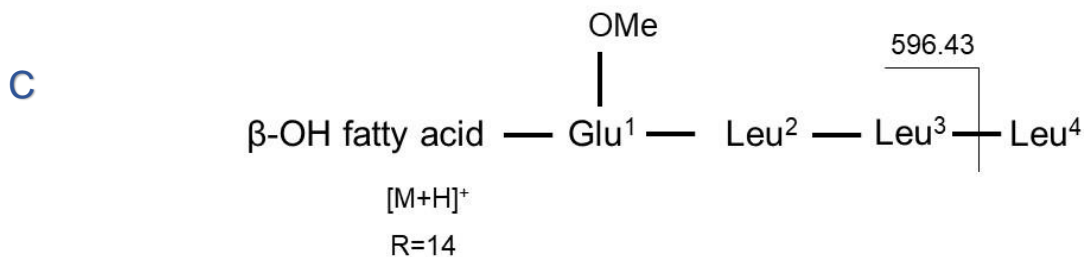
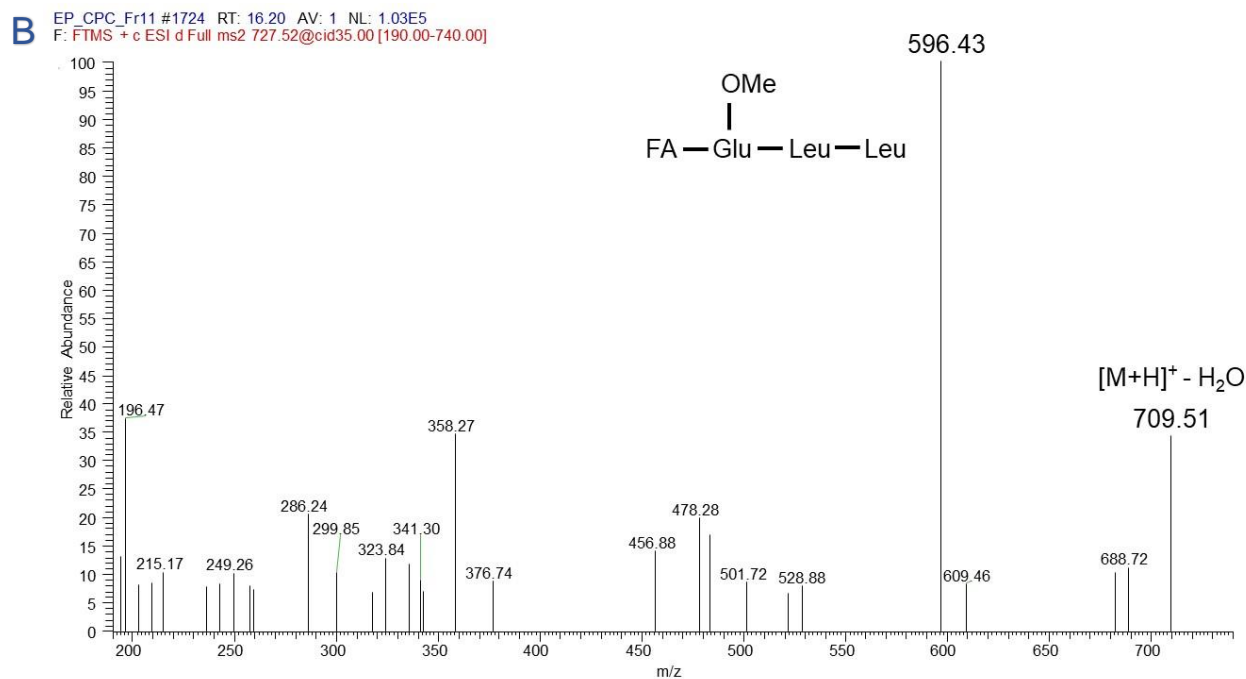
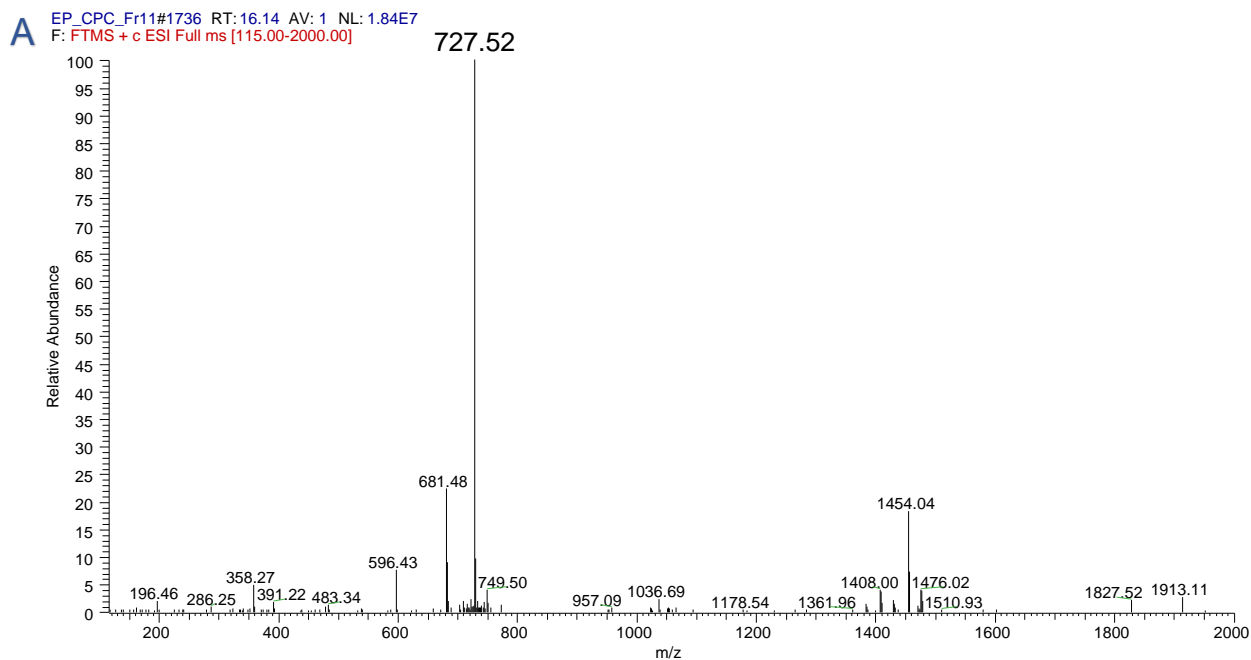
Lipopeptides		Rt	Mass	Formula	Delta ppm
Gageotetrins	A	13.95	487.3378	C ₂₅ H ₄₆ O ₇ N ₂	-0.008
		14.49	501.3536	C ₂₆ H ₄₈ O ₇ N ₂	0.152
	B	16.14	727.5231	C ₃₈ H ₇₀ O ₉ N ₄	2.081
	C	14.69	699.4916	C ₃₆ H ₆₆ O ₉ N ₄	1.979
		15.61	713.5078	C ₃₇ H ₆₈ O ₉ N ₄	2.668
Bacilotetrins	A	17.01	695.4964	C ₃₇ H ₆₆ O ₈ N ₄	1.522
	B	17.43	709.5120	C ₃₈ H ₆₈ O ₈ N ₄	1.365



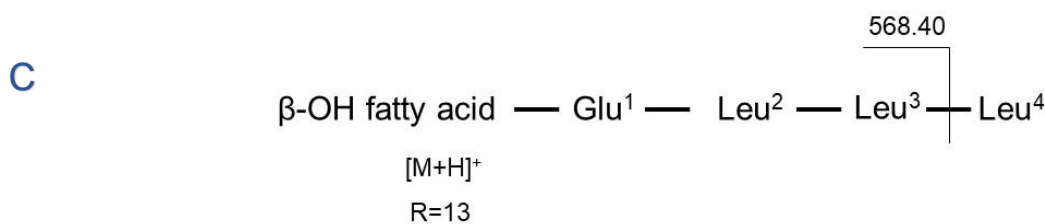
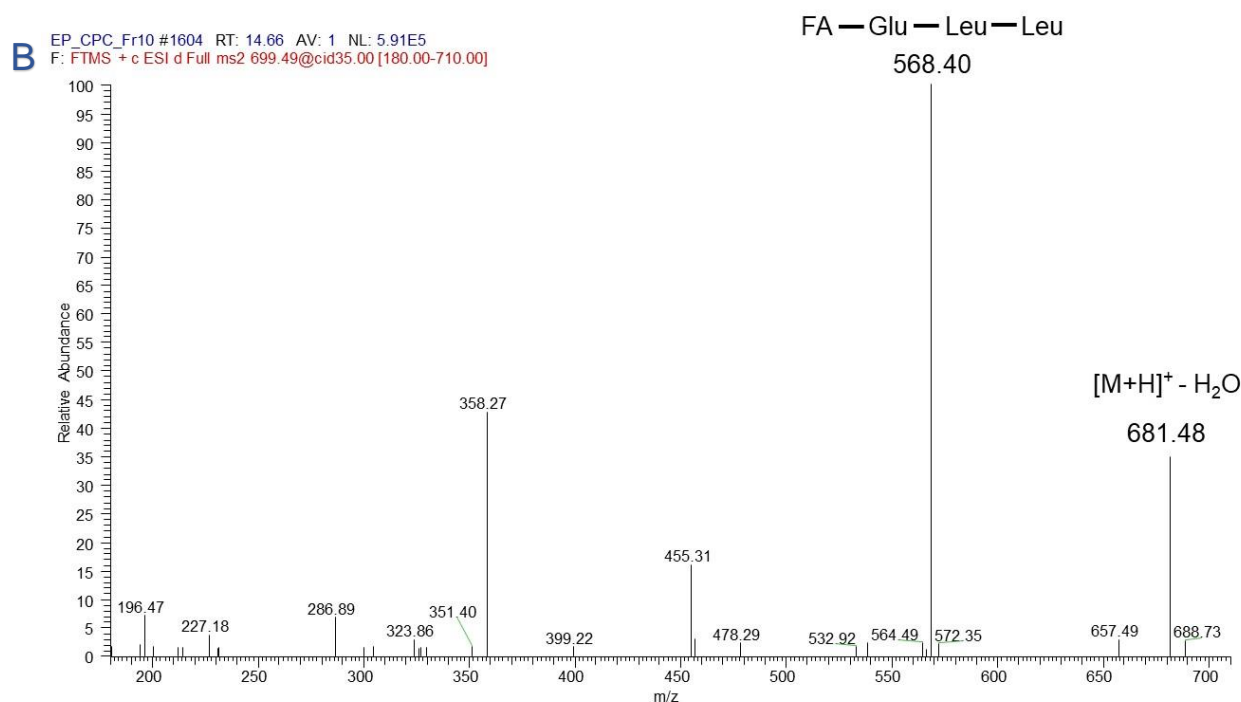
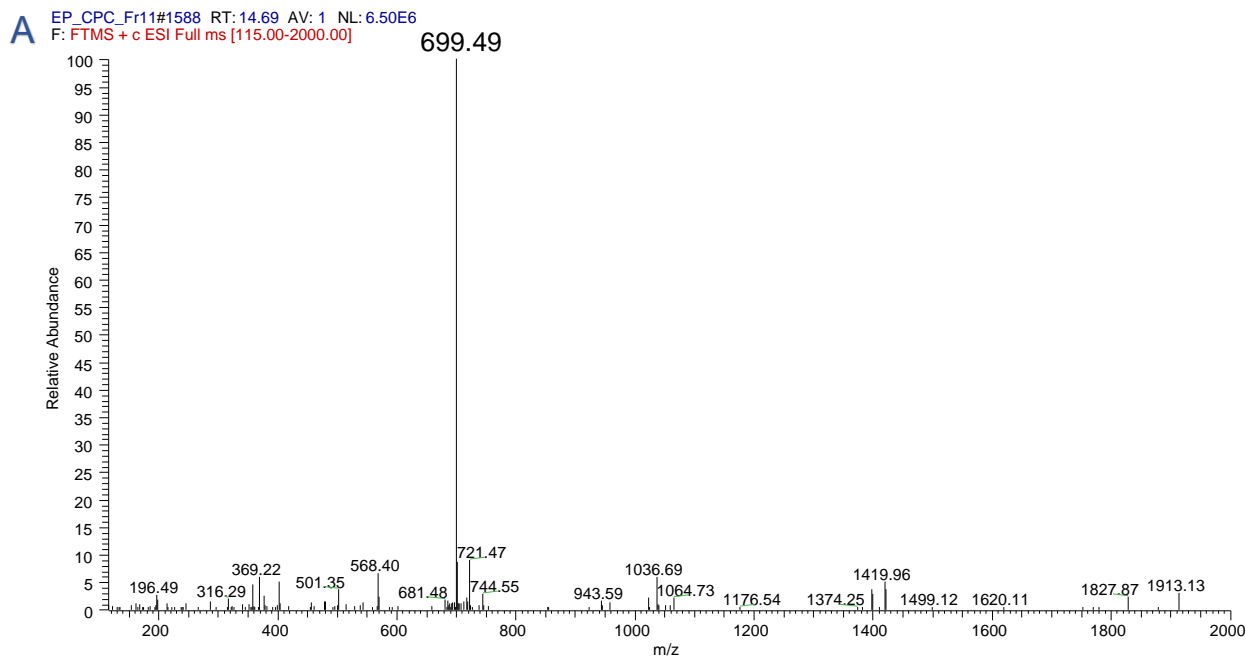
Εικόνα 89 Ταυτοποίηση της δομής της γαγεοτετρίνης A που εκλύεται στα 13.95 min (γαγεοτετρίνη A με λιπαρή αλυσίδα με 14 άνθρακες) (A) Φάσμα HRMS, (B) Φάσμα HRMS/MS, όπου σημειώνεται η παρατηρούμενη θραυσματοποίηση, (C) δομή γαγεοτετρίνης.



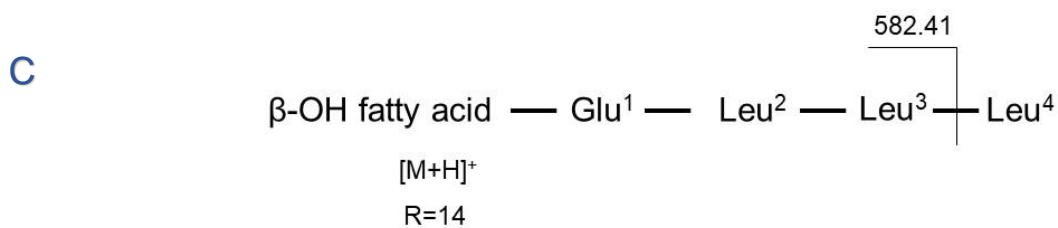
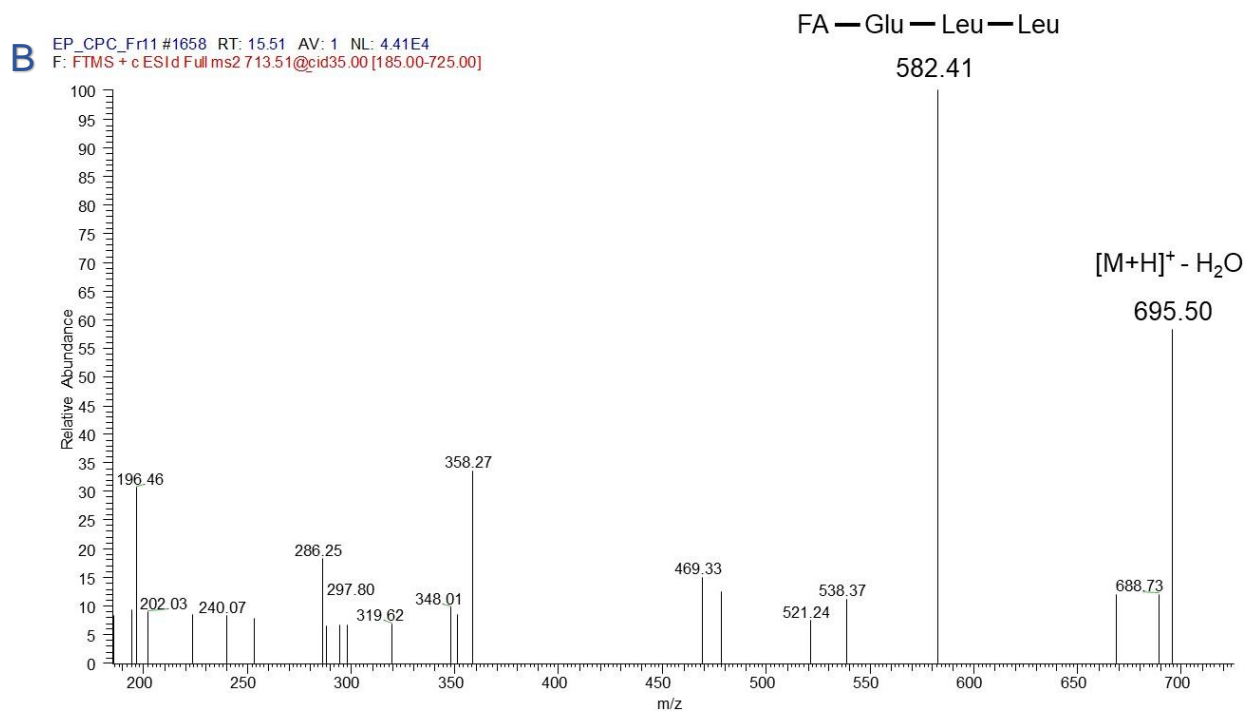
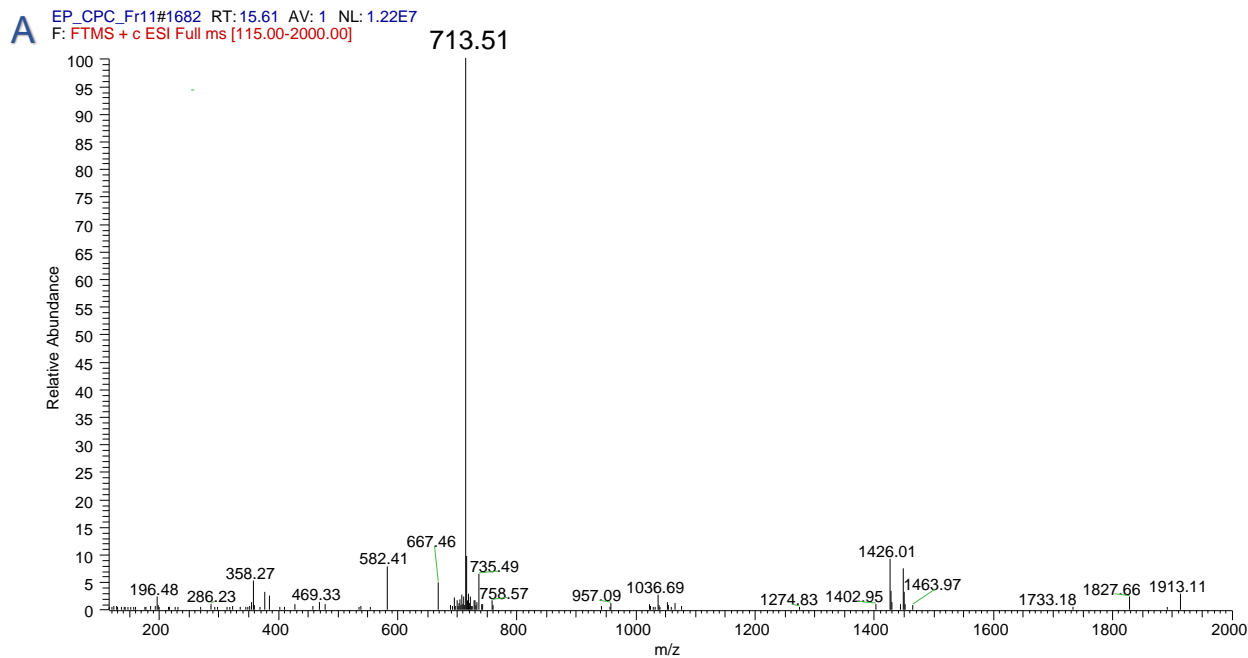
Εικόνα 90 Ταυτοποίηση της δομής της γαγεοτετρίνης A που εκλύεται στα 14.49 min (γαγεοτετρίνη A με λιπαρή αλυσίδα με 15 άνθρακες) (A) Φάσμα HRMS, (B) Φάσμα HRMS/MS, όπου σημειώνεται η παρατηρούμενη θραυσματοποίηση, (C) δομή γαγεοτετρίνης.



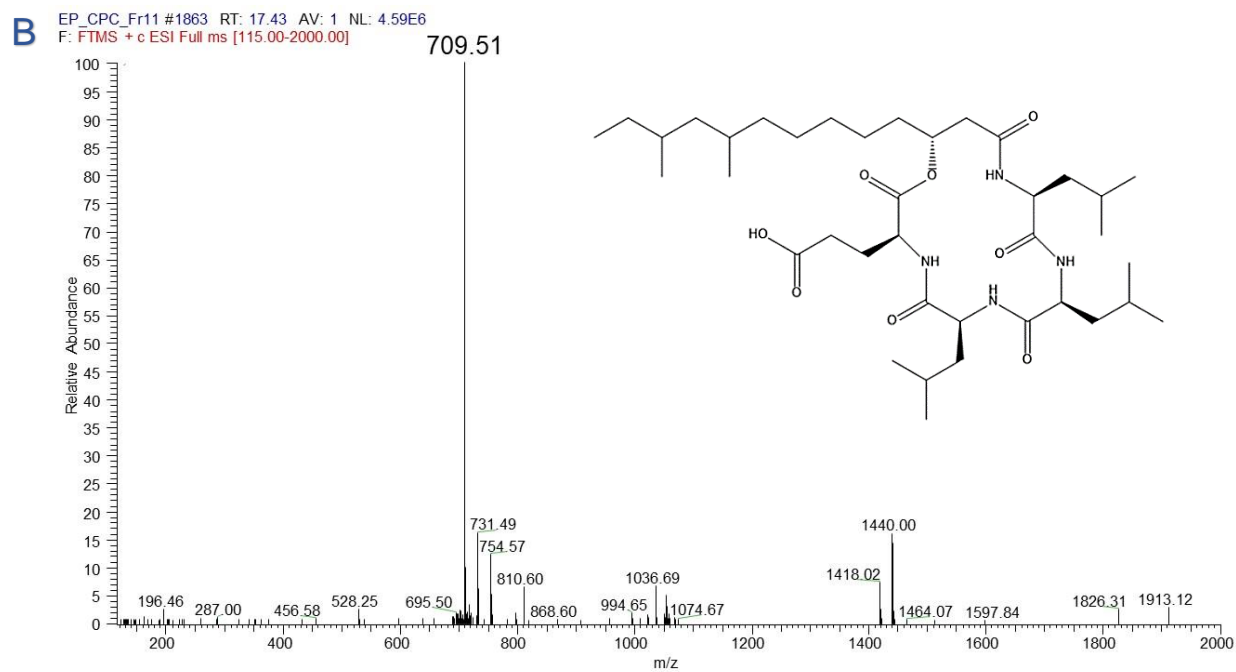
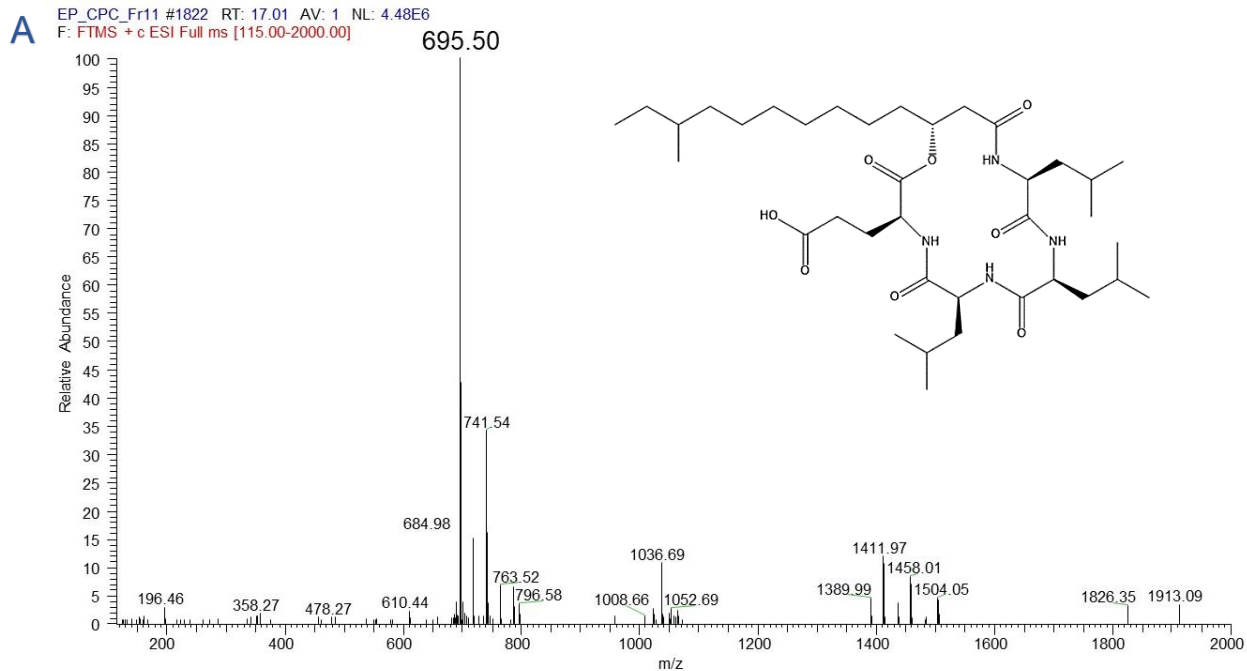
Εικόνα 91 Ταυτοποίηση της δομής της γαγεοτετρίνης B που εκλύεται στα 16.14 min (γαγεοτετρίνη B με λιπαρή αλυσίδα με 14 άνθρακες) (A) Φάσμα HRMS, (B) Φάσμα HRMS/MS, όπου σημειώνεται η παρατηρούμενη θραυσματοποίηση, (C) δομή γαγεοτετρίνης.



Εικόνα 92 Ταυτοποίηση της δομής της γαγεοτετρίνης C που εκλύεται στα 14.69 min (γαγεοτετρίνη C με λιπαρή αλυσίδα με 13 άνθρακες) (A) Φάσμα HRMS, (B) Φάσμα HRMS/MS, όπου σημειώνεται η παρατηρούμενη θραυσματοποίηση, (C) δομή γαγεοτετρίνης.



Εικόνα 93 Ταυτοποίηση της δομής της γαγεοτετρίνης C που εκλύεται στα 15.61 min (γαγεοτετρίνη C με λιπαρή αλυσίδα με 14 άνθρακες) (A) Φάσμα HRMS, (B) Φάσμα HRMS/MS, όπου σημειώνεται η παρατηρούμενη θραυσματοποίηση, (C) δομή γαγεοτετρίνης.



Εικόνα 94 (A) Φάσμα HRMS και χημική δομή της βακιλοτετρίνης A που εκλύεται στα 17.01 min, **(B)** Φάσμα HRMS και χημική δομή της βακιλοτετρίνης B που εκλύεται στα 17.43 min.

3.6.5 Μελέτη της επίδρασης επιμέρους κλασμάτων του λιποπεπτιδικού εκχυλίσματος στην ανάπτυξη ευαίσθητων και ανθεκτικών στελεχών *Colletotrichum acutatum*

Η κλασμάτωση του ολικού λιποπεπτιδικού εκχυλίσματος που πραγματοποιήθηκε με μια σειρά διαφορετικών τεχνικών, όπως αυτές περιγράφηκαν στις §3.6.3, §3.6.4, ακολουθήθηκε από την εκτέλεση βιοδοκιμών μυκητοτοξικότητας μερικών από τα κλάσματα που λήφθηκαν στα στελέχη PLS_88 και PLS_90 του *Colletotrichum acutatum*. Πρωταρχικός στόχος ήταν η μελέτη της επίδρασης των κύριων κατηγοριών λιποπεπτιδίων (σουρφακτίνες, βακιλλομυσίνες, φεγκυσίνες) στην ανάπτυξη των μυκήτων και η σύγκριση της δραστηρότητάς τους με εκείνη του ολικού εκχυλίσματος. Επιπλέον, η εφαρμογή κλασμάτων που περιείχαν μεταβολίτες που ανήκουν στις ίδιες λιποπεπτιδικές οικογένειες αλλά σε διαφορετική αναλογία, όπως ορισμένα από τα κλάσματα του CPC, αποσκοπούσε στη μελέτη της συμμετοχής των μεταβολιτών αυτών στη δραστηρότητα του ολικού εκχυλίσματος. Συνολικά, η πραγματοποίηση των παραπάνω βιοδοκιμών στόχευε στην κατανόηση της βιοδραστηρότητας του λιποπεπτιδικού εκχυλίσματος, στον εντοπισμό των επιμέρους κατηγοριών λιποπεπτιδίων που ευθύνονται για την παρατηρούμενη μυκητοτοξικότητα ή/και στην εύρεση πιθανής συνεργιστικής δράσης τους στη διαμόρφωση της βιοδραστηρότητας του εκχυλίσματος.

Πειραματική διαδικασία

Η μελέτη της επίδρασης των επιμέρους κλασμάτων στη γραμμική ανάπτυξη των δύο στελεχών *C. acutatum* (PLS_88, PLS_90), πραγματοποιήθηκε με *in vitro* δοκιμές. Τα κλάσματα που εφαρμόστηκαν περιλάμβαναν τις διαχωρισμένες κύριες κατηγορίες λιποπεπτιδίων (σουρφακτίνες, βακιλλομυσίνες, φεγκυσίνες) και ορισμένα μίγματα λιποπεπτιδικών ουσιών που λήφθηκαν μέσω της διαδικασίας του CPC. Το σύνολο των κλασμάτων που χρησιμοποιήθηκαν αναφέρεται παρακάτω:

- Η πάνω φάση της υγρής-υγρής εκχύλισης του λιποπεπτιδικού εκχυλίσματος, η οποία περιείχε τις σουρφακτίνες (S_HU, §3.6.3, *Εικόνα 95C*).

- Τα συνενωμένα κλάσματα 3 και 5 της χρωματογραφίας μοριακού αποκλεισμού που εφαρμόστηκε στην κάτω φάση της υγρής-υγρής εκχύλισης του λιποπεπτιδικού εκχυλίσματος, τα οποία περιείχαν τις φεγκυσίνες και βακιλλομυσίνες αντίστοιχα (SHL Sephadex Fractions 3 & 5, §3.6.3, *Εικόνα 95D-E*).
- Τα συνενωμένα κλάσματα 1, 1α, 6, 11 και 12 της χρωματογραφίας κατ' αντιρροή που εφαρμόστηκε στο ολικό λιποπεπτιδικό εκχύλισμα (CPC Fractions 1, 1α, 6, 11, 12, §3.6.4). Τα κλάσματα 1 και 1α αποτελούνται από υψηλές συγκεντρώσεις βακιλλομυσινών, που εκλούνται πρώτες, ενώ περιέχουν και ποσότητες φεγκυσινών. Περιλαμβάνουν τους ίδιους μεταβολίτες σε παρόμοιες αναλογίες, με τη διαφορά ότι στο Fr1α η βακιλλομυσίνη με λιπαρή αλυσίδα με 15 άτομα άνθρακα περιέχεται σε πολύ μεγαλύτερη συγκέντρωση συγκριτικά με το Fr1 (*Εικόνα 96C-D*).

Για όλα τα κλάσματα, εφαρμόστηκε μία μόνο συγκέντρωση για κάθε στέλεχος, η EC_{50} του ολικού λιποπεπτιδικού εκχυλίσματος, δηλαδή 27 και 63 $\mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$ για τα στελέχη PLS_90 και PLS_88 αντίστοιχα (§3.5.1). Η βιοδοκιμή πραγματοποιήθηκε όπως περιγράφεται στην §3.5.1, με τη διαφορά της χρήσης μικρών τρυβλίων διαμέτρου 5 cm, τα οποία πληρώθηκαν με 5 mL θρεπτικού υλικού. Για αυτόν το λόγο, η διάρκεια επώασης των καλλιεργειών μέχρι τη λήψη αποτελεσμάτων ήταν μικρότερη, συγκεκριμένα 10 ημέρες για το στέλεχος PLS_90 και 8 ημέρες για το PLS_88. Για κάθε επέμβαση πραγματοποιήθηκαν και πάλι 3 επαναλήψεις και για τους δύο μύκητες.

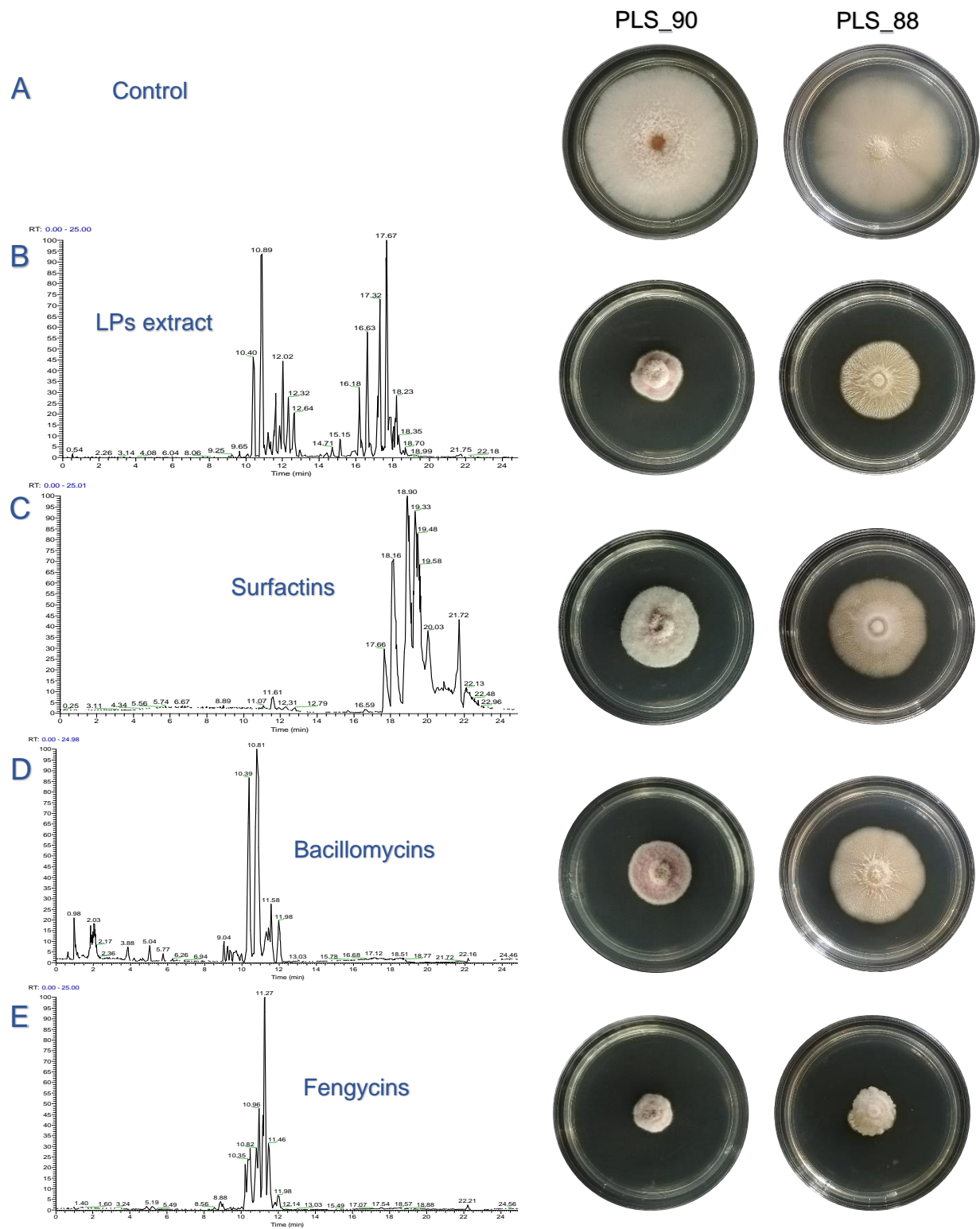
Στο τέλος της επώασης των τρυβλίων, ελήφθησαν μετρήσεις γραμμικής ανάπτυξης των καλλιεργειών, για τον υπολογισμό της μυκητοτοξικότητας των κλασμάτων. Ακολούθησε στατιστική ανάλυση των αποτελεσμάτων, με τη μορφή ποσοστών παρεμπόδισης της ανάπτυξης των μυκήτων σε σχέση με το μάρτυρα, η οποία πραγματοποιήθηκε με το πρόγραμμα JMP, με το Tukey's T-test, σε επίπεδο σημαντικότητας $\alpha=0.05$.

Αποτελέσματα

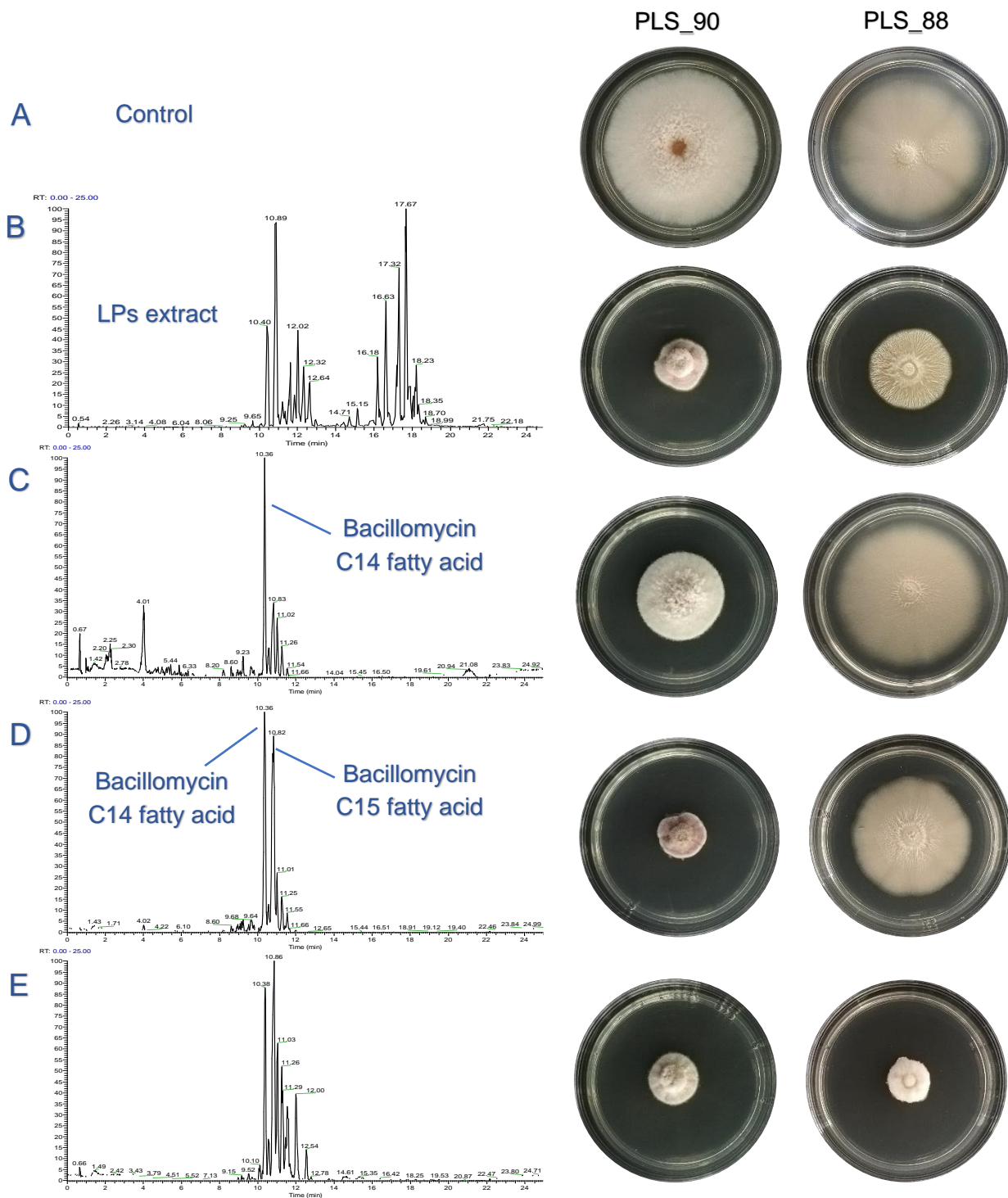
Τα αποτελέσματα της παραπάνω μελέτης παρουσιάζονται στις *Εικόνες 95-97*, όπου απεικονίζεται η μυκηλιακή ανάπτυξη των στελεχών στις διάφορες επεμβάσεις μαζί με τα χρωματογραφήματα TIC (ESI+) των κλασμάτων που χρησιμοποιήθηκαν. Επιπλέον, στην *Εικόνα 98* παρουσιάζονται και τα θηκογράμματα (boxplots) παρεμπόδισης της γραμμικής ανάπτυξης των δύο στελεχών γλοιοσπορίου που προκάλεσε η εφαρμογή των διαφόρων κλασμάτων λιποπεπτιδίων συγκριτικά με το μάρτυρα.

Το κλάσμα που εφαρμόστηκε, τα οποία περιέχουν κυρίως σουρφακτίνες, βακιλλομυσίνες και φεγκυσίνες, εμφάνισαν κυμαινόμενη τοξικότητα στα δύο στελέχη *C. acutatum*. Το κλάσμα των σουρφακτινών παρουσίασε τοξικότητα στο στέλεχος PLS 90 ίση με εκείνη του ολικού εκχυλίσματος, ενώ για το PLS 88 καταγράφηκε μειωμένη τοξικότητα, χαμηλότερη από εκείνη των φεγκυκινών και των βακιλλομυσινών. Το κλάσμα των φεγκυκινών αποδείχθηκε το πιο βιοδραστικό στα φυτοπαθογόνα, με υψηλότερη από 60% παρεμπόδιση της ανάπτυξής τους, σε σύγκριση με το μάρτυρα. Οι φεγκυσίνες είναι τα λιποπεπτίδια στα οποία αποδίδεται το μεγαλύτερο μέρος της βιοδραστικότητας των βακτηρίων *Bacillus* sp. έναντι των φυτοπαθογόνων μυκήτων (Medeot et al., 2020), το οποίο βρίσκεται σε συμφωνία με τα παραπάνω αποτελέσματα. Οι βακιλλομυσίνες παρουσίασαν μέτρια τοξικότητα και στα δύο στελέχη γλοιοσπορίου, με το PLS 90 να είναι πιο ευαίσθητο. Το κλάσμα των βακιλλομυσινών, το οποίο προέκυψε από τη χρωματογραφία μοριακού αποκλεισμού, περιέχει διάφορες βακιλλομυσίνες, η αντιμικροβιακή δράση των οποίων έχει προηγουμένως τεκμηριωθεί (Moyné et al., 2001), επιβεβαιώνοντας και πάλι τα αποτελέσματα.

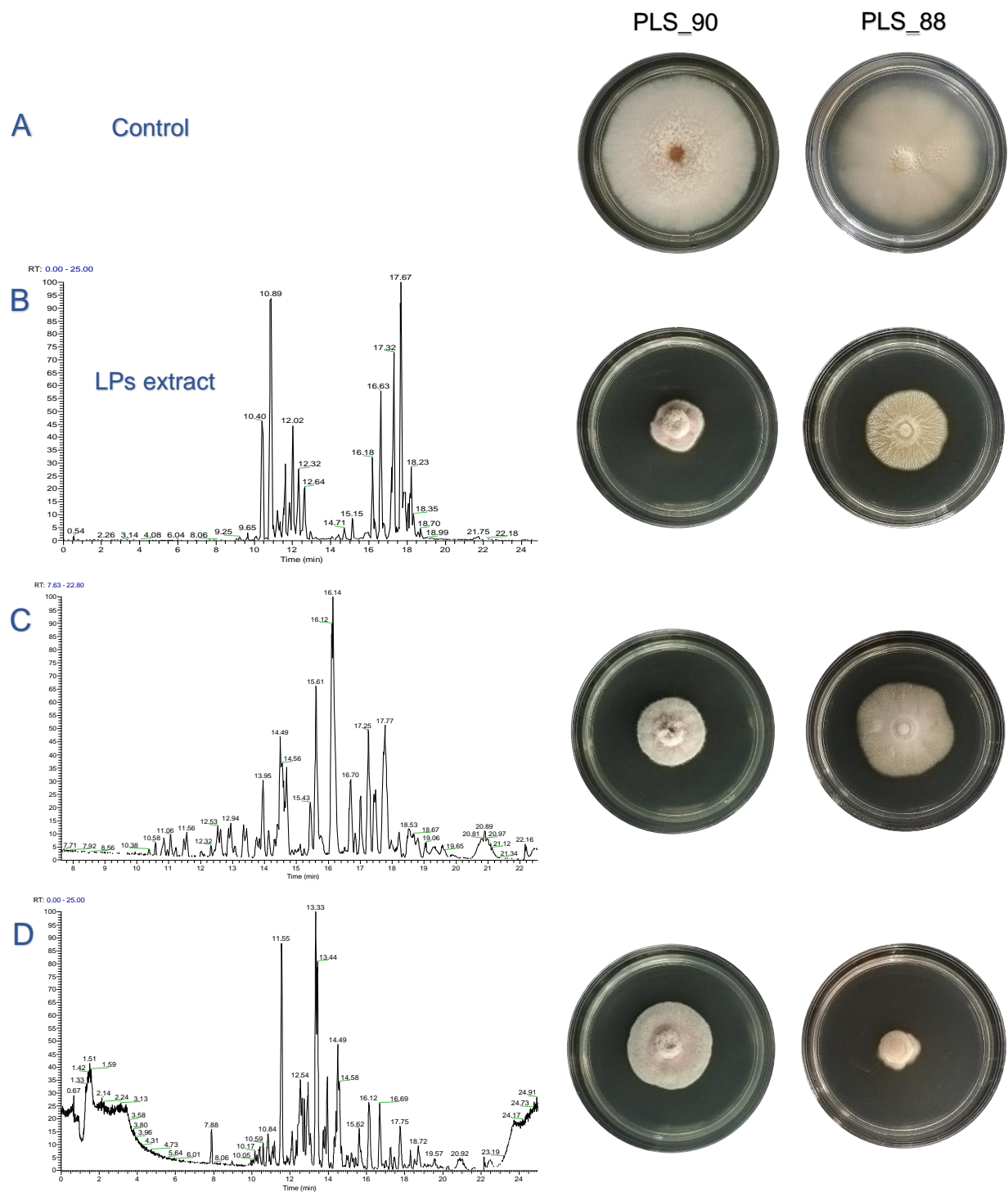
Παραδόξως, το μόνο κλάσμα που παρουσίασε εκλεκτική τοξικότητα στο ανθεκτικό στέλεχος γλοιοσπορίου PLS 88 ήταν το κλάσμα 12 του CPC, κάτι που αποτελεί ιδιαίτερα ενδιαφέρον εύρημα, καθώς πρωταρχικός στόχος των στρατηγικών φυτοπροστασίας είναι η καταπολέμηση ανθεκτικών πληθυσμών φυτοπαθογόνων. Το γεγονός ότι το κλάσμα αυτό αποτελείται από ευθύγραμμο και κυκλικά λιποπεπτίδια που περιέχονται σε χαμηλές συγκεντρώσεις στο αρχικό εκχύλισμα (π.χ. γαγεοτετρίνες, βακιλοτετρίνες), υποστηρίζει περαιτέρω την προσέγγιση της παρούσας διπλωματικής εργασίας για εις βάθος μελέτη του ολικού εκχυλίσματος προς ανακάλυψη μιας τέτοιας βιοδραστικότητας.



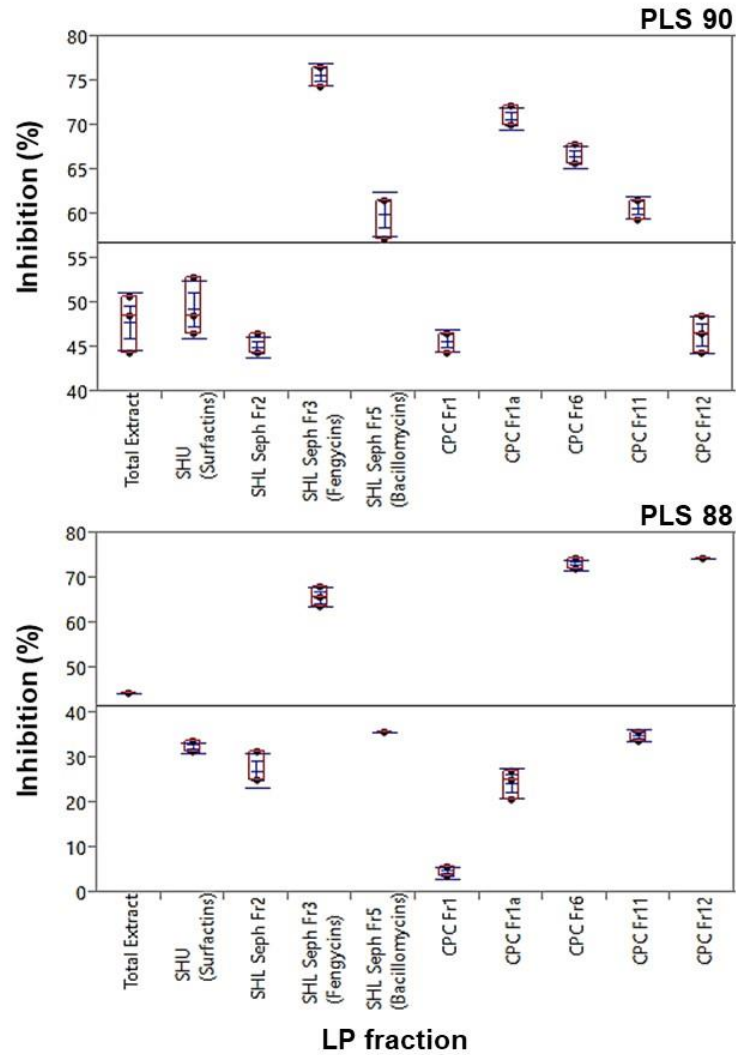
Εικόνα 95 Επίδραση των επιμέρους οικογενειών λιποπεπτιδίων στη γραμμική ανάπτυξη καλλιεργειών των στελεχών PLS_88 και PLS_90 του *Colletotrichum acutatum*, μετά από εφαρμογή τους στην τιμή EC_{50} του ολικού λιποπεπτιδικού εκχυλίσματος για κάθε στέλεχος. Αριστερά παρουσιάζονται τα χρωματογραφήματα TIC (ESI+) των κλασμάτων που χρησιμοποιήθηκαν: (A) μάρτυρας, (B) ολικό λιποπεπτιδικό εκχύλισμα, (C) S_HU (Surfactins, *Παράγραφος X*), (D) S_HL Sephadex Fr5 (Bacillomycins, *Παράγραφος X*), (E) S_HL Sephadex Fr3 (Fengycins, *Παράγραφος X*). Δεξιά εμφανίζεται η εικόνα της μυκηλιακής ανάπτυξης για κάθε επέμβαση.



Εικόνα 96 Επίδραση επιμέρους κλασμάτων διαφορετικής σύστασης, με κυμαινόμενες αναλογίες λιποπεπτιδίων, στη γραμμική ανάπτυξη καλλιεργειών των στελεχών PLS_88 και PLS_90 του *Colletotrichum acutatum*, μετά από εφαρμογή τους στην τιμή EC_{50} του ολικού λιποπεπτιδικού εκχυλίσματος για κάθε στέλεχος. Αριστερά παρουσιάζονται τα χρωματογραφήματα TIC (ESI+) των κλασμάτων που χρησιμοποιήθηκαν: (A) μάρτυρας, (B) ολικό λιποπεπτιδικό εκχύλισμα, (C) CPC Fr1, (D) CPC Fr1a, (E) CPC Fr6 (Παράγραφος X). Τα κλάσματα 1 και 1a του CPC είναι πλούσια σε βακιλλομυσίνες, ενώ σημειώνεται και η κυριότερη διαφορά που παρατηρείται στη σύστασή τους. Το κλάσμα 6 περιέχει βακιλλομυσίνες και φεγκυσίνες, με τις τελευταίες να βρίσκονται σε μεγαλύτερη συγκέντρωση συγκριτικά με τα προηγούμενα δύο κλάσματα. Δεξιά εμφανίζεται η εικόνα της μυκηλιακής ανάπτυξης για κάθε επέμβαση.



Εικόνα 97 Επίδραση επιμέρους κλασμάτων διαφορετικής σύστασης, με κυμαινόμενες αναλογίες λιποπεπτιδίων, στη γραμμική ανάπτυξη καλλιεργειών των στελεχών PLS_88 και PLS_90 του *Colletotrichum acutatum*, μετά από εφαρμογή τους στην τιμή EC₅₀ του ολικού λιποπεπτιδικού εκχυλίσματος για κάθε στέλεχος. Αριστερά παρουσιάζονται τα χρωματογραφήματα TIC (ESI+) των κλασμάτων που χρησιμοποιήθηκαν: (A) μάρτυρας, (B) ολικό λιποπεπτιδικό εκχύλισμα, (C) CPC Fr11 και (D) CPC Fr12 (Παράγραφος X). Τα κλάσματα 11 και 12 είναι πλούσια σε γαγεοτετρίνες και βακιλοτετρίνες. Δεξιά εμφανίζεται η εικόνα της μυκηλιακής ανάπτυξης για κάθε επέμβαση.



Εικόνα 98 Θηκογράμματα (boxplots) των διαφόρων κλασμάτων που εφαρμόστηκαν για την παρεμπόδιση της γραμμικής ανάπτυξης των δύο στελεχών PLS_90 (πάνω) και PLS_88 (κάτω) του *Colletotrichum acutatum*. Η στατιστική ανάλυση πραγματοποιήθηκε με το Tuckey's T-test ($P > 95\%$).

4. Συμπεράσματα

Τα προβλήματα που αντιμετωπίζει ο τομέας της φυτοπροστασίας σε συνδυασμό με την αυστηροποίηση της νομοθεσίας σχετικής με τα Φ.Π. και την ολοένα αυξανόμενη πίεση της κοινής γνώμης προς τη βιομηχανία αγροχημικών για την ανάπτυξη νέας γενιάς Φ.Π. αποτελεσματικών και φιλικών για τον άνθρωπο και οργανισμούς μη-στόχους, επιτείνουν την ανάγκη για ανακάλυψη και αξιολόγηση νέων, εναλλακτικών και βελτιωμένων σε σχέση με τις ήδη υπάρχουσες, πηγών βιοδραστικότητας. Στο πλαίσιο αυτό, η παρούσα έρευνα είχε ως αντικείμενο τη μελέτη των ενδοφύτων της ελιάς και την αξιολόγησή τους ως πηγές βιοδραστικών μεταβολιτών για πιθανή αξιοποίησή τους στη φυτοπροστασία. Η απομόνωση ενδοφυτικών μικροοργανισμών πραγματοποιήθηκε από εύρωστα ελαιόδεντρα ποικιλίας «Κορωνέικης» από την περιοχή της Ανατολικής Μάνης. Απομονώθηκαν συνολικά 53 ενδοφυτικοί οργανισμοί, από τους οποίους 5 απομονώθηκαν από φύλλα, 7 από καρπούς, 2 από κλάδους και 39 από ρίζες και ριζικά τριχίδια. Από αυτά, 24 ήταν μύκητες και 29 βακτήρια.

Για την ανακάλυψη των πιο βιοδραστικών ενδοφύτων, πραγματοποιήθηκαν *in vitro* βιοδοκιμές, μέσω συγκαλλιέργειάς τους σε τρυβλία με δύο στελέχη (ανθεκτικό και ευαίσθητο σε Φ.Π.) του παθογόνου μύκητα *C. acutatum*. Από το σύνολο των 53 απομονωμένων μικροοργανισμών, 6 ενδόφυτα που απομονώθηκαν από τα υπόγεια φυτικά μέρη των ελαιοδέντρων, εμφάνισαν ισχυρή παρεμποδιστική δράση έναντι της ανάπτυξης και των δύο στελεχών του παθογόνου. Η μοριακή ταυτοποίηση που ακολούθησε έδειξε ότι όλα τα δραστικά ενδόφυτα ήταν βακτήρια και ανήκαν στο γένος *Bacillus*. Το ενδοφυτικό βακτήριο PTA13 που εμφάνισε την ισχυρότερη δράση έναντι και των 2 στελεχών επιλέχθηκε να μελετηθεί περαιτέρω. Πρωταρχικό στόχο αποτέλεσε η παραλαβή του λιποπεπτιδικού κλάσματος του βακτηρίου, η χημική ανάλυσή του και η εκτίμηση της τοξικότητάς του έναντι του γλοιοσπορίου. Η ταυτοποίηση των λιποπεπτιδικών μεταβολιτών του εκχυλίσματος επιτεύχθηκε μέσω ανάλυσης HRMS/MS. Η ανάλυση των χρωματογραφημάτων φανέρωσε την ύπαρξη τριών κύριων κατηγοριών, βακιλλομυσίνες, φεγκυσίνες και σουρφακτίνες, ενώ το μοτίβο θραυσματοποίησης που παρουσιάστηκε στο φάσμα MS/MS της εκάστοτε κορυφής, επέτρεψε την αποσαφήνιση του πεπτιδικού σκελετού (αριθμός και σειρά αμινοξέων) και του μήκους της λιπαρής αλυσίδας.

Ακολούθησε η μελέτη της ανάπτυξης του βακτηρίου PTA13 ως προς την παραγωγή λιποπεπτιδίων σε σχέση με το χρόνο καλλιέργειας καθώς και η διερεύνηση της σειράς παραγωγής των επιμέρους κατηγοριών. Στη διάρκεια επώασης της καλλιέργειας, παρατηρήθηκε πρώιμη παραγωγή σουρφακτινών κατά τη διάρκεια της εκθετικής φάσης ανάπτυξης του βακτηρίου ($t=6$ h) συγκριτικά με τις βακιλλομυσίνες και φεγκυσίνες. Μία επιπλέον διαφοροποίηση παρατηρείται όσον αφορά στο μέγιστο της παραγωγής τους. Η μέγιστη παραγωγή σουρφακτινών καταγράφηκε στις 48 h καλλιέργειας του βακτηρίου, σε αντίθεση με τις βακιλλομυσίνες και φεγκυσίνες, των οποίων η παραγωγή συνεχίζει να αυξάνεται μέχρι τις 72 h. Η πρώιμη παραγωγή των σουρφακτινών πιθανόν να δηλώνει συμβολή των λιποπεπτιδίων της ομάδας αυτής στην ευρέου φάσματος άμυνα του βακτηρίου, ενώ οι άλλες δύο κατηγορίες αποτελούν μια πιο εξειδικευμένη γραμμή άμυνας του μικροοργανισμού.

Επίσης, πραγματοποιήθηκε μελέτη της επίδρασης του λιποπεπτιδικού εκχυλίσματος στην ανάπτυξη ευαίσθητων και ανθεκτικών στελεχών *C. acutatum*. Υπολογίστηκαν αρχικά τα ποσοστά παρεμπόδισης της ανάπτυξης των στελεχών μετά από εφαρμογή διαφορετικών συγκεντρώσεων, ενώ εκτιμήθηκε και η EC_{50} . Η EC_{50} του λιποπεπτιδικού εκχυλίσματος υπολογίστηκε στα $63 \mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$ για το στέλεχος PLS_88 (ανθεκτικό) και στα $27 \mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$ για το στέλεχος PLS_90 (ευαίσθητο).

Σημαντικό τμήμα της παρούσας εργασίας αποτέλεσε και η μελέτη της επίδρασης των λιποπεπτιδίων στο μεταβολισμό του μύκητα. Η μελέτη αυτή πραγματοποιήθηκε μέσω μεταβολομικής με τη χρήση δύο αναλυτών, των GC/MS και NMR. Μελετήθηκε το ευαίσθητο στέλεχος PLS_90 μετά την εφαρμογή του δραστικού λιποπεπτιδικού εκχυλίσματος του ενδοφυτικού βακτηρίου PTA13 συγκρινόμενο με την ανάπτυξη του ίδιου στελέχους χωρίς την επίδραση του δραστικού εκχυλίσματος. Τα χρωματογραφήματα που λήφθηκαν από τη GC/EI/MS επεξεργάστηκαν με εφαρμογή βιοπληροφορικής ανάλυσης. Ανακαλύφθηκε πλήθος μεταβολιτών-βιοσημαντών της τοξικότητας του εκχυλίσματος στο μύκητα, ενώ ένα από τα πιο σημαντικά ευρήματα ήταν η σημαντική επίδρασή του στη βιοσύνθεση μεταβολιτών που σχετίζονται με την παθογένεια (αντιπαθογονική δράση).

Επίσης μελετήθηκε η κλασμάτωση του λιποπεπτιδικού εκχυλίσματος και η παραλαβή των επιμέρους κατηγοριών λιποπεπτιδίων. Εφαρμόστηκε συνδυασμός

υγρής-υγρής εκχύλισης και χρωματογραφίας μοριακού αποκλεισμού. Η υγρή-υγρή εκχύλιση πραγματοποιήθηκε με την εφαρμογή του διφασικού συστήματος *n-Heptane: EtOAc: MeOH: H₂O 1:3:1:3* και οδήγησε στο γρήγορο και αποτελεσματικό διαχωρισμό των σουρφακτινών από τις άλλες δύο ομάδες λιποπεπτιδίων. Οι βακιλλομυσίνες διαχωρίστηκαν από τις φεγκυσίνες με την εφαρμογή της χρωματογραφίας μοριακού αποκλεισμού με πληρωτικό υλικό ρητίνη LH-20. Το ίδιο διφασικό σύστημα διαλυτών εφαρμόστηκε και στην κλασμάτωση του λιποπεπτιδικού εκχυλίσματος με χρήση χρωματογραφίας κατ' αντηροή. Τα κλάσματα που παραλήφθηκαν αναλύθηκαν με HPLC-HRMS/MS όπου παρατηρήθηκε μία σταδιακή έκλυση των διαφορετικών κατηγοριών λιποπεπτιδίων και η παραλαβή εμπλουτισμένων σε βακιλομυσίνες, φαγκυσίνες και σουρφακτίνες κλασμάτων. Επιπλέον, η ανάλυση CPC οδήγησε και σε κλάσματα πλούσια σε μεταβολίτες που βρίσκονται σε χαμηλές συγκεντρώσεις στο ολικό εκχύλισμα. Παραλήφθηκαν κλάσματα με υψηλές συγκεντρώσεις δύο επιπλέον κατηγοριών λιποπεπτιδίων, τις γαγεοτετρίνες και βακιλοτετρίνες, οι οποίες είναι μίγματα μικρών μορίων λιποπεπτιδίων με πεπτιδικό σκελετό 2 έως 4 αμινοξέων.

Τέλος, πραγματοποιήθηκε η μελέτη της επίδρασης επιμέρους κλασμάτων του λιποπεπτιδικού εκχυλίσματος στην ανάπτυξη ευαίσθητων και ανθεκτικών στελεχών *C. acutatum*. Οκτώ εμπλουτισμένα κλάσματα, σε διαφορετικές κατηγορίες λιποπεπτιδίων, μελετήθηκαν *in vitro* σε τρυβλία και σε συγκεντρώσεις αντίστοιχες με την EC₅₀ του λιποπεπτιδικού εκχυλίσματος. Τα αποτελέσματα της μελέτης έδειξαν ότι από τις κύριες κατηγορίες λιποπεπτιδίων, οι φεγκισίνες εμφάνισαν ισχυρή δράση και στα δύο στελέχη του παθογόνου μύκητα, οι βακυλομυκίνες εμφάνισαν ισχυρή δράση έναντι του ευαίσθητου στελέχους και μέτρια έναντι του ανθεκτικού, ενώ οι σουρφακτίνες εμφάνισαν μέτρια δράση και στα δύο στελέχη. Σημαντικό επίσης συμπέρασμα είναι η εμφάνιση διαφορετικής δραστηριότητας των επιμέρους βακυλομυσινών, εξαρτώμενη από το μήκος της πλευρικής λιπαρής αλυσίδας (ισχυρότερη δράση για το κλάσμα με κύριο μεταβολίτη την βακιλομυσίνη με λιπαρή αλυσίδα με C15 από το αντίστοιχο με C14 λιπαρή αλυσίδα). Τέλος, τα κλάσματα πλούσια σε γαγεοτετρίνες και βακιλοτετρίνες εμφάνισαν αξιοσημείωτη δράση έναντι και των δύο στελεχών του *C. acutatum*.

Συμπερασματικά, η παρούσα μελέτη ανέδειξε την αποτελεσματικότητα της πειραματικής διαδικασίας που ακολουθήθηκε ως μιας ολιστικής προσέγγισης για την

έρευνα και ανάπτυξη νέων πηγών βιοδραστικότητας και μπορεί να χρησιμοποιηθεί ως οδηγός σε αντίστοιχες μελλοντικές έρευνες. Παρόλα αυτά, απαιτείται περαιτέρω έρευνα ώστε να αποσαφηνιστεί ο μηχανισμός δράσης και η τοξικότητα των λιποπεπτιδίων (μιγμάτων ή/και μεμονωμένων) καθώς και η βιολογική δράση τους με σκοπό την ανάπτυξη εφαρμογών στη φυτοπροστασία αλλά και σε τομείς όπως οι ιατρικές επιστήμες.

5. Βιβλιογραφία

- Abdel-Mawgoud, A. M., Aboulwafa, M. M., & Hassouna, N. A. H. (2008). Characterization of surfactin produced by bacillus subtilis isolate BS5. *Applied Biochemistry and Biotechnology*, 150(3), 289–303. <https://doi.org/10.1007/s12010-008-8153-z>
- Abreu-Tarazi, M. F., Navarrete, A. A., Andreote, F. D., Almeida, C. V., Tsai, S. M., & Almeida, M. (2010). Endophytic bacteria in long-term in vitro cultivated “axenic” pineapple microplants revealed by PCR-DGGE. *World Journal of Microbiology and Biotechnology*, 26(3), 555–560. <https://doi.org/10.1007/s11274-009-0191-3>
- Aleti, G., Sessitsch, A., & Brader, G. (2015). Genome mining: Prediction of lipopeptides and polyketides from Bacillus and related Firmicutes. *Computational and Structural Biotechnology Journal*, 13, 192–203. <https://doi.org/10.1016/j.csbj.2015.03.003>
- Aliferis, K. A., & Jabaji, S. (2010a). 1H NMR and GC-MS metabolic fingerprinting of developmental stages of Rhizoctonia solani sclerotia. *Metabolomics*, 6(1), 96–108. <https://doi.org/10.1007/s11306-009-0180-4>
- Aliferis, K. A., & Jabaji, S. (2010b). 1H NMR and GC-MS metabolic fingerprinting of developmental stages of Rhizoctonia solani sclerotia. *Metabolomics*, 6(1), 96–108. <https://doi.org/10.1007/s11306-009-0180-4>
- Aliferis, Konstantinos A., Chamoun, R., & Jabaji, S. (2015). Metabolic responses of willow (*Salix purpurea* L.) leaves to mycorrhization as revealed by mass spectrometry and 1H NMR spectroscopy metabolite profiling. *Frontiers in Plant Science*, 6(MAY), 1–15. <https://doi.org/10.3389/fpls.2015.00344>
- Aliferis, Konstantinos A., Cubeta, M. A., & Jabaji, S. (2013). Chemotaxonomy of fungi in the Rhizoctonia solani species complex performing GC/MS metabolite profiling. *Metabolomics*, 9(SUPPL.1), 159–169. <https://doi.org/10.1007/s11306-011-0340-1>
- Aliferis, Konstantinos A., & Jabaji, S. (2011). Metabolomics – A robust bioanalytical approach for the discovery of the modes-of-action of pesticides: A review. *Pesticide Biochemistry and Physiology*, 100(2), 105–117. <https://doi.org/10.1016/j.pestbp.2011.03.004>
- Almeida, J. V. D. (1899). *La gaffa des olives en Portugal*.
- Andreote, F. D., Gumiere, T., & Durrer, A. (2014). Exploring interactions of plant

microbiomes. *Scientia Agricola*, 71(6), 528–539.
<https://doi.org/http://dx.doi.org/10.1590/0103-9016-2014-0195>

- Angelis, A., Hamzaoui, M., Aligiannis, N., Nikou, T., Michailidis, D., Gerolimos, P., Termentzi, A., Hubert, J., Halabalaki, M., Renault, J. H., & Skaltsounis, A. L. (2017). An integrated process for the recovery of high added-value compounds from olive oil using solid support free liquid-liquid extraction and chromatography techniques. *Journal of Chromatography A*, 1491(February), 126–136. <https://doi.org/10.1016/j.chroma.2017.02.046>
- Angelis, A., Michailidis, D., Antoniadis, L., Stathopoulos, P., Tsantila, V., Nuzillard, J. M., Renault, J. H., & Skaltsounis, L. A. (2021). Pilot continuous centrifugal liquid-liquid extraction of extra virgin olive oil biophenols and gram-scale recovery of pure oleocanthal, oleacein, MFOA, MFLA and hydroxytyrosol. *Separation and Purification Technology*, 255. <https://doi.org/10.1016/j.seppur.2020.117692>
- Aranda, F. J., Teruel, J. A., & Ortiz, A. (2005). Further aspects on the hemolytic activity of the antibiotic lipopeptide iturin A. *Biochimica et Biophysica Acta - Biomembranes*, 1713(1), 51–56. <https://doi.org/10.1016/j.bbamem.2005.05.003>
- Arima, K., Kakinuma, A., & Tamura, G. (1968). Surfactin, a crystalline peptidelipid surfactant produced by *Bacillus subtilis*: Isolation, characterization and its inhibition of fibrin clot formation. *Biochemical and Biophysical Research Communications*, 31(3), 488–494. [https://doi.org/10.1016/0006-291X\(68\)90503-2](https://doi.org/10.1016/0006-291X(68)90503-2)
- Arnan, X., López, B. C., Martínez-Vilalta, J., Estorach, M., & Poyatos, R. (2012). The age of monumental olive trees (*Olea europaea*) in northeastern Spain. *Dendrochronologia*, 30(1), 11–14. <https://doi.org/10.1016/j.dendro.2011.02.002>
- Atrih, A., & Foster, S. J. (2002). Bacterial endospores the ultimate survivors. *International Dairy Journal*, 12(2–3), 217–223. [https://doi.org/10.1016/S0958-6946\(01\)00157-1](https://doi.org/10.1016/S0958-6946(01)00157-1)
- Ávila, Arantxa, Groenewald, J. Z., Trapero, A., & Crous, P. W. (2005). Characterisation and epitypification of *Pseudocercospora cladosporioides*, the causal organism of *Cercospora* leaf spot of olives. *Mycological Research*, 109(8), 881–888. <https://doi.org/10.1017/S0953756205003503>
- Ávila, Aránzazu, Romero, J., Agustí-Brisach, C., Benali, A., Roca, L. F., & Trapero, A.

- (2020). Phenotypic and pathogenic characterization of *Pseudocercospora* cladosporioides, causal agent of cercospora leaf spot of olives. *European Journal of Plant Pathology*, 156(1), 45–65. <https://doi.org/10.1007/s10658-019-01861-5>
- Azevedo-Nogueira, F., Martins-Lopes, P., & Gomes, S. (2020). Current understanding of *Olea europaea* L. – *Colletotrichum acutatum* interactions in the context of identification and quantification methods – A review. *Crop Protection*, 132(February). <https://doi.org/10.1016/j.cropro.2020.105106>
- Bae, S. S., Lee, J. H., & Kim, S. J. (2005). *Bacillus alveayuensis* sp. nov., a thermophilic bacterium isolated from deep-sea sediments of the Ayu Trough. *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology*, 55(3), 1211–1215. <https://doi.org/10.1099/ijs.0.63424-0>
- Banat, I. M., Satpute, S. K., Cameotra, S. S., Patil, R., & Nyayanit, N. V. (2014). Cost effective technologies and renewable substrates for biosurfactants' production. *Frontiers in Microbiology*, 5(DEC), 1–18. <https://doi.org/10.3389/fmicb.2014.00697>
- Barkodia, M., Joshi, U., Rami, N. V., & Wati, L. (2018). Endophytes : A hidden treasure inside plant. *International Journal of Chemical Studies*, 6(5), 1660–1665.
- Bartz, F. E., Glassbrook, N. J., Danehower, D. A., & Cubeta, M. A. (2012). Elucidating the role of the phenylacetic acid metabolic complex in the pathogenic activity of *Rhizoctonia solani* anastomosis group 3. *Mycologia*, 104(4), 793–803. <https://doi.org/10.3852/11-084>
- Bartz, F. E., Glassbrook, N. J., Danehower, D. A., & Cubeta, M. A. (2013). Modulation of the phenylacetic acid metabolic complex by quinic acid alters the disease-causing activity of *Rhizoctonia solani* on tomato. *Phytochemistry*, 89, 47–52. <https://doi.org/10.1016/j.phytochem.2012.09.018>
- Baumgart, F., Kluge, B., Ullrich, C., Vater, J., & Ziessow, D. (1991). Identification of amino acid substitutions in the lipopeptide surfactin using 2D NMR spectroscopy. *Biochemical and Biophysical Research Communications*, 177(3), 998–1005. [https://doi.org/10.1016/0006-291X\(91\)90637-M](https://doi.org/10.1016/0006-291X(91)90637-M)
- Bekele, E. A., Annaratone, C. E. P., Hertog, M. L. A. T. M., Nicolai, B. M., & Geeraerd, A. H. (2014). Multi-response optimization of the extraction and derivatization

- protocol of selected polar metabolites from apple fruit tissue for GC-MS analysis. *Analytica Chimica Acta*, 824, 42–56. <https://doi.org/10.1016/j.aca.2014.03.030>
- Belda, J. E., Olivas, J., Lucas, A., & Calvo, J. (2011). Biological control of the diaspidid scales *Aspidiotus nerii* Bouché and *Aonidiella aurantii* (Maskell) by means of commercial *Aphytis melinus* DeBach (Hym.; Aphelinidae) releases: basis for an IPM strategy in Spanish citrus. *IOBC/Wprs Bulletin*, 62(January), 311–316. [http://www.researchgate.net/publication/273948838_Biological_control_of_the_diaspidid_scales_Aspidiotus_nerii_Bouch_and_Aonidiella_aurantii_\(Maskell\)_by_means_of_commercial_Aphytis_melinus_DeBach_\(Hym._Aphelinidae\)_releases_basis_for_an_IPM_strategy_in_Sp](http://www.researchgate.net/publication/273948838_Biological_control_of_the_diaspidid_scales_Aspidiotus_nerii_Bouch_and_Aonidiella_aurantii_(Maskell)_by_means_of_commercial_Aphytis_melinus_DeBach_(Hym._Aphelinidae)_releases_basis_for_an_IPM_strategy_in_Sp)
- Ben Rejeb, K., Abdelly, C., & Savouré, A. (2014). How reactive oxygen species and proline face stress together. *Plant Physiology and Biochemistry*, 80, 278–284. <https://doi.org/10.1016/j.plaphy.2014.04.007>
- Besnard, G., Khadari, B., Navascués, M., Fernández-Mazuecos, M., Bakkali, A. El, Arrigo, N., Baali-Cherif, D., Brunini-Bronzini de Caraffa, V., Santoni, S., Vargas, P., & Savolainen, V. (2013). The complex history of the olive tree: From late quaternary diversification of mediterranean lineages to primary domestication in the northern Levant. *Proceedings of the Royal Society B: Biological Sciences*, 280(1756). <https://doi.org/10.1098/rspb.2012.2833>
- Besnard, Guillaume, Terral, J. F., & Cornille, A. (2018). On the origins and domestication of the olive: A review and perspectives. *Annals of Botany*, 121(3), 385–403. <https://doi.org/10.1093/aob/mcx145>
- Blevins, S. M., & Bronze, M. S. (2010). Robert Koch and the “golden age” of bacteriology. *International Journal of Infectious Diseases*, 14(9), 744–751. <https://doi.org/10.1016/j.ijid.2009.12.003>
- Bonmatin, J.-M., Laprevote, O., & Peypoux, F. (2003). Diversity Among Microbial Cyclic Lipopeptides: Iturins and Surfactins. Activity-Structure Relationships to Design New Bioactive Agents. *Combinatorial Chemistry & High Throughput Screening*, 6(6), 541–556. <https://doi.org/10.2174/138620703106298716>
- Breton, C., Terral, J. F., Pinatel, C., Médail, F., Bonhomme, F., & Bervillé, A. (2009). The origins of the domestication of the olive tree. *Comptes Rendus - Biologies*,

332(12), 1059–1064. <https://doi.org/10.1016/j.crv.2009.08.001>

- Breton, C., Tersac, M., & Bervillé, A. (2006). Genetic diversity and gene flow between the wild olive (oleaster, *Olea europaea* L.) and the olive: Several Plio-Pleistocene refuge zones in the Mediterranean basin suggested by simple sequence repeats analysis. *Journal of Biogeography*, 33(11), 1916–1928. <https://doi.org/10.1111/j.1365-2699.2006.01544.x>
- Broumas, T., Haniotakis, G., Liaropoulos, C., Tomazou, T., & Ragoussis, N. (2002). The efficacy of an improved form of the mass-trapping method, for the control of the olive fruit fly, *Bactrocera oleae* (Gmelin) (Dipt., Tephritidae): Pilot-scale feasibility studies. *Journal of Applied Entomology*, 126(5), 217–223. <https://doi.org/10.1046/j.1439-0418.2002.00637.x>
- Cacciola, S. O., Faedda, R., Sinatra, F., Agosteo, G. E., Schena, L., Frisullo, S., & Magnano di San Lio, G. (2012). Olive anthracnose. *Journal of Plant Pathology*, 94(1), 29–44.
- Cao, X.-H., Liao, Z.-Y., Wang, C.-L., Yang, W.-Y., & Lu, M.-F. (2009). Evaluation of a lipopeptide biosurfactant from *Bacillus natto* TK-1 as a potential source of anti-adhesive, antimicrobial and antitumor activities. *Brazilian Journal of Microbiology*, 40(2), 373–379. <https://doi.org/10.1590/s1517-83822009000200030>
- Cao, Y., Pi, H., Chandrangu, P., Li, Y., Wang, Y., Zhou, H., Xiong, H., Helmann, J. D., & Cai, Y. (2018). Antagonism of Two Plant-Growth Promoting *Bacillus velezensis* Isolates Against *Ralstonia solanacearum* and *Fusarium oxysporum*. *Scientific Reports*, 8(1), 1–14. <https://doi.org/10.1038/s41598-018-22782-z>
- Carrillo, C., Teruel, J. A., Aranda, F. J., & Ortiz, A. (2003). Molecular mechanism of membrane permeabilization by the peptide antibiotic surfactin. *Biochimica et Biophysica Acta - Biomembranes*, 1611(1–2), 91–97. [https://doi.org/10.1016/S0005-2736\(03\)00029-4](https://doi.org/10.1016/S0005-2736(03)00029-4)
- Carvalho, M. T., Simões-Lopes, P., & Monteiro da Silva, M. J. (2004). Influence of different olive infection rates of *Colletotrichum acutatum* on some important olive oil chemical parameters. *In V International Symposium on Olive Growing*, 791, 555–558.
- Castro, D., Torres, M., Sampedro, I., Martínez-Checa, F., Torres, B., & Béjar, V. (2020).

- Biological control of verticillium wilt on olive trees by the salt-tolerant strain *Bacillus velezensis* XT1. *Microorganisms*, 8(7), 1–21. <https://doi.org/10.3390/microorganisms8071080>
- Caulier, S., Nannan, C., Gillis, A., Licciardi, F., Bragard, C., & Mahillon, J. (2019). Overview of the antimicrobial compounds produced by members of the *Bacillus subtilis* group. *Frontiers in Microbiology*, 10(FEB), 1–19. <https://doi.org/10.3389/fmicb.2019.00302>
- Chen, W. C., Juang, R. S., & Wei, Y. H. (2015). Applications of a lipopeptide biosurfactant, surfactin, produced by microorganisms. *Biochemical Engineering Journal*, 103, 158–169. <https://doi.org/10.1016/j.bej.2015.07.009>
- Chen, X. H., Koumoutsis, A., Scholz, R., & Borriss, R. (2008). More than anticipated - Production of antibiotics and other secondary metabolites by *Bacillus amyloliquefaciens* FZB42. *Journal of Molecular Microbiology and Biotechnology*, 16(1–2), 14–24. <https://doi.org/10.1159/000142891>
- Cimato, A., & Attilio, C. (2011). Worldwide Diffusion and relevance of olive culture. *Olive Diseases and Disorders*, April, 1–21.
- Cohn, F. J. (1872). *Ueber Bacterien, die kleinsten lebenden Wesen* (Vol. 165).
- Copley, T. R., Aliferis, K. A., Kliebenstein, D. J., & Jabaji, S. H. (2017). An integrated RNAseq- 1 H NMR metabolomics approach to understand soybean primary metabolism regulation in response to *Rhizoctonia foliar* blight disease. *BMC Plant Biology*, 17(1), 1–18. <https://doi.org/10.1186/s12870-017-1020-8>
- Corrado, G., Alagna, F., Rocco, M., Renzone, G., Varricchio, P., Coppola, V., Coppola, M., Garonna, A., Baldoni, L., Scaloni, A., & Rao, R. (2012). Molecular interactions between the olive and the fruit fly *Bactrocera oleae*. *BMC Plant Biology*, 12(86). <https://doi.org/10.1186/1471-2229-12-86>
- Daane, K. M., & Johnson, M. W. (2010). Olive fruit fly: Managing an ancient pest in modern times. *Annual Review of Entomology*, 55(January), 151–169. <https://doi.org/10.1146/annurev.ento.54.110807.090553>
- Damm, U., Cannon, P. F., Woudenberg, J. H. C., & Crous, P. W. (2012). The *Colletotrichum acutatum* species complex. *Studies in Mycology*, 73, 37–113. <https://doi.org/10.3114/sim0010>

- Das, N., & Chandran, P. (2011). Microbial Degradation of Petroleum Hydrocarbon Contaminants: An Overview. *Biotechnology Research International*, 2011, 1–13. <https://doi.org/10.4061/2011/941810>
- De Silva, N. I., Brooks, S., Lumyong, S., & Hyde, K. D. (2019). Use of endophytes as biocontrol agents. *Fungal Biology Reviews*, 33(2), 133–148. <https://doi.org/10.1016/j.fbr.2018.10.001>
- Del Bene, G., Gargani, E., & Landi, S. (1997). Observations on the life cycle and diapause of *Euphyllura olivina* (Costa) and *Euphyllura phillyreae* Foerster (Homoptera Aphalaridae). *Advances in Horticultural Science*, 11(1), 10–16.
- Delcambe, L., & Devignat, R. (1957). L'iturine, nouvel antibiotique d'origine congolaise. In *Acad. Roy. Sci. Coloniales*.
- Deleu, M., Bouffiuou, O., Razafindralambo, H., Paquot, M., Hbid, C., Thonart, P., Jacques, P., & Brasseur, R. (2003). Interaction of surfactin with membranes: A computational approach. *Langmuir*, 19(8), 3377–3385. <https://doi.org/10.1021/la026543z>
- Deleu, M., Paquot, M., & Nylander, T. (2008). Effect of fengycin, a lipopeptide produced by *Bacillus subtilis*, on model biomembranes. *Biophysical Journal*, 94(7), 2667–2679. <https://doi.org/10.1529/biophysj.107.114090>
- Desai, J. D., & Banat, I. M. (1997). Microbial production of surfactants and their commercial potential. *Microbiology and Molecular Biology Reviews: MMBR*, 61(1), 47–64. <https://doi.org/10.1128/.61.1.47-64.1997>
- Dimkic, I., Stankovic, S., Nišavic, M., Petkovic, M., Ristivojevic, P., Fira, D., & Beric, T. (2017). The profile and antimicrobial activity of *Bacillus* lipopeptide extracts of five potential biocontrol strains. *Frontiers in Microbiology*, 8(MAY), 1–12. <https://doi.org/10.3389/fmicb.2017.00925>
- Dixon, R. A. (2001). Natural products and plant disease resistance. *Nature*, 411(6839), 843–847. [papers2://publication/uuid/CAADAAD1-6859-444F-AA4F-D9B6162EBEC3](https://doi.org/10.1038/35068a)
- Donadio, S., Monciardini, P., & Sosio, M. (2007). Polyketide synthases and nonribosomal peptide synthetases: The emerging view from bacterial genomics. *Natural Product Reports*, 24(5), 1073–1079. <https://doi.org/10.1039/b514050c>

- Driks, A. (1999). *Bacillus subtilis* Spore Coat. *Microbiology and Molecular Biology Reviews*, 63(1), 1–20.
- Du, L., Sánchez, C., Chen, M., Edwards, D. J., & Shen, B. (2000). The biosynthetic gene cluster for the antitumor drug bleomycin from *Streptomyces verticillus* ATCC15003 supporting functional interactions between nonribosomal peptide synthetases and a polyketide synthase. *Chemistry and Biology*, 7(8), 623–642. [https://doi.org/10.1016/S1074-5521\(00\)00011-9](https://doi.org/10.1016/S1074-5521(00)00011-9)
- Duarte, C., Gudiña, E. J., Lima, C. F., & Rodrigues, L. R. (2014). Effects of biosurfactants on the viability and proliferation of human breast cancer cells. *AMB Express*, 4(1), 1–12. <https://doi.org/10.1186/s13568-014-0040-0>
- Duke, S. O. (2012). Why have no new herbicide modes of action appeared in recent years? *Pest Management Science*, 68(4), 505–512. <https://doi.org/10.1002/ps.2333>
- Erler, F., & Tunç, I. (2001). A survey (1992-1996) of natural enemies of diaspididae species in Antalya, Turkey. *Phytoparasitica*, 29(4), 299–305. <https://doi.org/10.1007/BF02981846>
- Eurostat. (2019). *Area under olive trees by EU Member States in EU-28, 2017*.
- Falardeau, J., Wise, C., Novitsky, L., & Avis, T. J. (2013). Ecological and Mechanistic Insights Into the Direct and Indirect Antimicrobial Properties of *Bacillus subtilis* Lipopeptides on Plant Pathogens. *Journal of Chemical Ecology*, 39(7), 869–878. <https://doi.org/10.1007/s10886-013-0319-7>
- Fan, B., Wang, C., Song, X., Ding, X., Wu, L., Wu, H., Gao, X., & Borriss, R. (2018). *Bacillus velezensis* FZB42 in 2018: The gram-positive model strain for plant growth promotion and biocontrol. *Frontiers in Microbiology*, 9(OCT), 1–14. <https://doi.org/10.3389/fmicb.2018.02491>
- Fiehn, O., Robertson, D., Griffin, J., van der Werf, M., Nikolau, B., Morrison, N., Sumner, L. W., Goodacre, R., Hardy, N. W., Taylor, C., Fostel, J., Kristal, B., Kaddurah-Daouk, R., Mendes, P., van Ommen, B., Lindon, J. C., & Sansone, S. A. (2007). The metabolomics standards initiative (MSI). *Metabolomics*, 3(3), 175–178. <https://doi.org/10.1007/s11306-007-0070-6>
- Foster, A. J., Jenkinson, J. M., & Talbot, N. J. (2003). Trehalose synthesis and

- metabolism are required at different stages of plant infection by *Magnaporthe grisea*. *EMBO Journal*, 22(2), 225–235. <https://doi.org/10.1093/emboj/cdg018>
- Fox, G. E., Pechman, K. R., & Woese, C. R. (1977). Comparative cataloging of 16S ribosomal ribonucleic acid: molecular approach to procaryotic systematics. *International Journal of Systematic Bacteriology*, 27(1), 44–57. <https://doi.org/10.1099/00207713-27-1-44>
- Fracchia, L., Cavallo, M., Giovanna, M., & M., I. (2012). Biosurfactants and Bioemulsifiers Biomedical and Related Applications – Present Status and Future Potentials. *Biomedical Science, Engineering and Technology, January 2012*. <https://doi.org/10.5772/23821>
- Fried, B., & Sherma, J. (1996). *Practical thin-layer chromatography: a multidisciplinary approach*.
- Friedman, M. (2004). Applications of the Ninhydrin Reaction for Analysis of Amino Acids, Peptides, and Proteins to Agricultural and Biomedical Sciences. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 52(3), 385–406. <https://doi.org/10.1021/jf030490p>
- Gaiero, J. R., McCall, C. A., Thompson, K. A., Day, N. J., Best, A. S., & Dunfield, K. E. (2013). Inside the root microbiome: Bacterial root endophytes and plant growth promotion. *American Journal of Botany*, 100(9), 1738–1750. <https://doi.org/10.3732/ajb.1200572>
- Gatson, J. W., Benz, B. F., Chandrasekaran, C., Satomi, M., Venkateswaran, K., & Hart, M. E. (2006). *Bacillus tequilensis* sp. nov., isolated from a 2000-year-old Mexican shaft-tomb, is closely related to *Bacillus subtilis*. *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology*, 56(7), 1475–1484. <https://doi.org/10.1099/ijs.0.63946-0>
- Geetha, I., & Manonmani, A. M. (2010). Surfactin: A novel mosquitocidal biosurfactant produced by *Bacillus subtilis* ssp. *subtilis* (VCRC B471) and influence of abiotic factors on its pupicidal efficacy. *Letters in Applied Microbiology*, 51(4), 406–412. <https://doi.org/10.1111/j.1472-765X.2010.02912.x>
- Geetha, I., Prabakaran, G., Paily, K. P., Manonmani, A. M., & Balaraman, K. (2007). Characterisation of three mosquitocidal *Bacillus* strains isolated from mangrove

- forest. *Biological Control*, 42(1), 34–40.
<https://doi.org/10.1016/j.biocontrol.2007.04.003>
- Golinska, P., Wypij, M., Agarkar, G., Rathod, D., Dahm, H., & Rai, M. (2015). Endophytic actinobacteria of medicinal plants: Diversity and bioactivity. *Antonie van Leeuwenhoek, International Journal of General and Molecular Microbiology*, 108(2), 267–289. <https://doi.org/10.1007/s10482-015-0502-7>
- Gomes, Sónia, Prieto, P., Carvalho, T., & Guedes-pinto, H. (2013). *Olive - Colletotrichum acutatum: an example of fruit-fungal Interaction*.
- Gomes, Sonia, Prieto, P., Carvalho, T., Guedes-Pinto, H., & Martins-Lopes, P. (2012). Olive – *Colletotrichum acutatum*: An Example of Fruit-Fungal Interaction. *Plant Breeding*, May 2014. <https://doi.org/10.5772/27965>
- Gomes, M. Z. V., & Nitschke, M. (2012). Evaluation of rhamnolipid and surfactin to reduce the adhesion and remove biofilms of individual and mixed cultures of food pathogenic bacteria. *Food Control*, 25, 441–447. <https://doi.org/10.1016/j.foodcont.2011.11.025>
- González-Lamothe, R., Segura, R., Trapero, A., Baldoni, L., Botella, M. A., & Valpuesta, V. (2002). Phylogeny of the fungus *Spilocaea oleagina*, the causal agent of peacock leaf spot in olive. *FEMS Microbiology Letters*, 210(1), 149–155. [https://doi.org/10.1016/S0378-1097\(02\)00598-0](https://doi.org/10.1016/S0378-1097(02)00598-0)
- Gordon, R. E., Haynes, W. C., & Pang, C. H. (1973). The genus *Bacillus*. *Washington DC: United States Department of Agriculture*.
- Gordon, R. E., & Smith, N. R. (1949). Aerobic Sporeforming Bacteria Capable of Growth At High Temperatures. *Journal of Bacteriology*, 58(3), 327–341. <https://doi.org/10.1128/jb.58.3.327-341.1949>
- Gordon, R., Haynes, W., Pang, C., & Smith, N. (1973). The Genus *Bacillus*. In *Washington DC: United States Department of Agriculture*.
- Gouda, S., Das, G., Sen, S. K., Shin, H. S., & Patra, J. K. (2016). Endophytes: A treasure house of bioactive compounds of medicinal importance. *Frontiers in Microbiology*, 7(SEP), 1–8. <https://doi.org/10.3389/fmicb.2016.01538>
- Gouvinhas, I., Martins-Lopes, P., Carvalho, T., Barros, A., & Gomes, S. (2019). Impact of *colletotrichum acutatum* pathogen on olive phenylpropanoid metabolism.

- Agriculture (Switzerland)*, 9(8). <https://doi.org/10.3390/agriculture9080173>
- Grangemard, I., Bonmatin, J. M., Bernillon, J., Das, B. C., & Peypoux, F. (1999). Lichenysins G, a novel family of lipopeptide biosurfactants from *Bacillus licheniformis* IM 1307: Production, isolation and structural evaluation by NMR and mass spectrometry. *Journal of Antibiotics*, 52(4), 363–373. <https://doi.org/10.7164/antibiotics.52.363>
- Grangemard, I., Wallach, J., Maget-Dana, R., & Peypoux, F. (2001). Lichenysin: A more efficient cation chelator than surfactin. *Applied Biochemistry and Biotechnology - Part A Enzyme Engineering and Biotechnology*, 90(3), 199–210. <https://doi.org/10.1385/ABAB:90:3:199>
- GRANITI, A., FRISULLO, S., PENNISI, A. M., & DI SAN LIO, G. M. (1993). Infections of *Glomerella cingulata* on olive in Italy. *EPPO Bulletin*, 23(3), 457–465. <https://doi.org/10.1111/j.1365-2338.1993.tb01353.x>
- Gudiña, E. J., Rangarajan, V., Sen, R., & Rodrigues, L. R. (2013). Potential therapeutic applications of biosurfactants. *Trends in Pharmacological Sciences*, 34(12), 667–675. <https://doi.org/10.1016/j.tips.2013.10.002>
- Hahn-Deinstrop, E. (2007). *Applied thin-layer chromatography: best practice and avoidance of mistakes*.
- Hallmann, J., Quadt-Hallmann, A., Mahaffee, W. F., & Kloepper, J. W. (1997). Bacterial endophytes in agricultural crops. *Canadian Journal of Microbiology*, 43(10), 895–914. <https://doi.org/10.1139/m97-131>
- Haniotakis, G. E. (2005). Olive pest control: Present status and prospects. *IOBC/WPRS Bulletin*, 28(9), 1–9.
- Harwood, C. R., Mouillon, J. M., Pohl, S., & Arnau, J. (2018). Secondary metabolite production and the safety of industrially important members of the *Bacillus subtilis* group. *FEMS Microbiology Reviews*, 42(6), 721–738. <https://doi.org/10.1093/femsre/fuy028>
- Hegazi, E. M., Konstantopoulou, M. A., Herz, A., Mazomenos, B. E., Khafagi, W. E., Agamy, E., Zaitun, A., Abd El-Aziz, G. M., Showiel, S., & Abdel-Rahman, S. M. (2009). Is mating disruption effective in controlling the olive moth, *Prays oleae*? *Crop Protection*, 28(2), 181–189. <https://doi.org/10.1016/j.cropro.2008.10.005>

- Henderson, R. . (2011). Fauna of New Zealand Ko te Aitanga Pepeke o Aotearoa Number>Nama 66. In *Diaspididae (Insecta;Hemiptera: Coccoidae)*.
- Henkel, M., Geissler, M., Weggenmann, F., & Hausmann, R. (2017). Production of microbial biosurfactants: Status quo of rhamnolipid and surfactin towards large-scale production. *Biotechnology Journal*, 12(7), 1–10. <https://doi.org/10.1002/biot.201600561>
- Heyrman, J., Balcaen, A., Rodriguez-Diaz, M., Logan, N. A., Swings, J., & De Vos, P. (2003). *Bacillus decolorationis* sp. nov., isolated from biodeteriorated parts of the mural paintings at the Servilia tomb (Roman necropolis of Carmona, Spain) and the Saint-Catherine chapel (Castle Herberstein, Austria). *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology*, 53(2), 459–463. <https://doi.org/10.1099/ijms.0.02452-0>
- Hu, F., Liu, Y., & Li, S. (2019). Rational strain improvement for surfactin production: Enhancing the yield and generating novel structures. *Microbial Cell Factories*, 18(1), 1–13. <https://doi.org/10.1186/s12934-019-1089-x>
- Hwang, B. K., Lim, S. W., Kim, B. S., Lee, J. Y., & Moon, S. S. (2001). Isolation and in Vivo and in Vitro Antifungal Activity of Phenylacetic Acid and Sodium Phenylacetate from *Streptomyces humidus*. *Applied and Environmental Microbiology*, 67(8), 3739–3745. <https://doi.org/10.1128/AEM.67.8.3739-3745.2001>
- Iacobellis, N. S., & DeVay, J. E. (1987). Studies on pathogenesis of *Rhizoctonia solani* in beans: an evaluation of the possible roles of phenylacetic acid and its hydroxy derivatives as phytotoxins. *Physiological and Molecular Plant Pathology*, 30(3), 421–432. [https://doi.org/10.1016/0885-5765\(87\)90021-X](https://doi.org/10.1016/0885-5765(87)90021-X)
- Iliadi, M. K., Tjamos, E. C., Antoniou, P. P., & Tsitsigiannis, D. I. (2018). First Report of *Colletotrichum acutatum* causing anthracnose on Olives in Greece. *Plant Disease*, 102(4), 820. <http://www.ti.com/lit/ds/symlink/cc2538.html>
- Ilias, F., & Hammadi, F. (2017). Population Dynamics of *Saissetia oleae* (Olivier) (Hemiptera: Coccidae) on Olives. *OALib*, 04(11), 1–8. <https://doi.org/10.4236/oalib.1103805>
- Inès, M., & Dhouha, G. (2015). Lipopeptide surfactants: Production, recovery and pore

- forming capacity. *Peptides*, 71, 100–112.
<https://doi.org/10.1016/j.peptides.2015.07.006>
- International Olive Council. (2018). *WORLD OLIVE OIL AND TABLE OLIVE FIGURES*.
- International Olive Council. (2019). Olive oil figures. In *International Olive Oil Council* (Issue November). <http://www.internationaloliveoil.org>
- Ishigami, Y., Osman, M., Nakahara, H., Sano, Y., Ishiguro, R., & Matsumoto, M. (1995). Significance of β -sheet formation for micellization and surface adsorption of surfactin. *Colloids and Surfaces B: Biointerfaces*, 4(6), 341–348.
[https://doi.org/10.1016/0927-7765\(94\)01183-6](https://doi.org/10.1016/0927-7765(94)01183-6)
- Iturriaga, G., Suárez, R., & Nova-Franco, B. (2009). Trehalose metabolism: From osmoprotection to signaling. *International Journal of Molecular Sciences*, 10(9), 3793–3810. <https://doi.org/10.3390/ijms10093793>
- Jiang, C., Shi, J., Liu, Y., & Zhu, C. (2014). Inhibition of *Aspergillus carbonarius* and fungal contamination in table grapes using *Bacillus subtilis*. *Food Control*, 35(1), 41–48. <https://doi.org/10.1016/j.foodcont.2013.06.054>
- Jiao, S., Li, X., Yu, H., Yang, H., Li, X., & Shen, Z. (2017). In situ enhancement of surfactin biosynthesis in *Bacillus subtilis* using novel artificial inducible promoters. *Biotechnology and Bioengineering*, 114(4), 832–842.
<https://doi.org/10.1002/bit.26197>
- Jiménez-Díaz, R., Cirulli, M., Bubici, G., Jiménez-Gasco, M., Antoniou, P., & Tjamos, E. (2012). Verticillium wilt, a major threat to olive production: current status and future prospects for its management. *The American Phytopathological Society Plant Disease*, 96(3), 304–329. <http://dx.doi.org/10.1094/PDIS-06-11-0496>
- Jourdan, E., Henry, G., Duby, F., Dommès, J., Barthélemy, J. P., Thonart, P., & Ongena, M. (2009). Insights into the Defense-Related Events Occurring in Plant Cells Following Perception of Surfactin-Type Lipopeptide from *Bacillus subtilis*. *Molecular Plant-Microbe Interactions*, 22(4), 456–468.
- Joyce, S. A., Lango, L., & Clarke, D. J. (2011). The Regulation of Secondary Metabolism and Mutualism in the Insect Pathogenic Bacterium *Photobacterium luminescens*. In *Advances in Applied Microbiology* (1st ed., Vol. 76). Elsevier Inc. <https://doi.org/10.1016/B978-0-12-387048-3.00001-5>

- Jung, J., Yu, K. O., Ramzi, A. B., Choe, S. H., Kim, S. W., & Han, S. O. (2012). Improvement of surfactin production in *Bacillus subtilis* using synthetic wastewater by overexpression of specific extracellular signaling peptides, comX and phrC. *Biotechnology and Bioengineering*, 109(9), 2349–2356. <https://doi.org/10.1002/bit.24524>
- Kachlicki, P., & Jędryczka, M. (1997). Phenylacetic acid and methyl p-hydroxyphenylacetate - Novel phytotoxins of *Fusarium oxysporum*. *Cereal Research Communications*, 25(3 II), 853–855. <https://doi.org/10.1007/bf03543874>
- Kakinuma, A., Hori, M., Isono, M., Tamura, G., & Arima, K. (1969). Determination of amino acid sequence in surfactin, a crystalline peptidelipid surfactant produced by *Bacillus subtilis*. *Agricultural and Biological Chemistry*, 33(6), 971–972. <https://doi.org/10.1080/00021369.1969.10859408>
- Kakinuma, A., Sugino, H., Isono, M., Tamura, G., & Arima, K. (1969). Determination of fatty acid in surfactin and elucidation of the total structure of surfactin. *Agricultural and Biological Chemistry*, 33(6), 973–976. <https://doi.org/10.1080/00021369.1969.10859409>
- Kalampokis, I. F., Kapetanakis, G. C., Aliferis, K. A., & Diallinas, G. (2018). Multiple nucleobase transporters contribute to boscalid sensitivity in *Aspergillus nidulans*. *Fungal Genetics and Biology*, 115(November 2017), 52–63. <https://doi.org/10.1016/j.fgb.2018.02.004>
- Karamanou, D. A., & Aliferis, K. A. (2020). Yeast (*Saccharomyces cerevisiae*) GC/EI/MS metabolomics dataset. *Data in Brief*, 29, 105208. <https://doi.org/10.1016/j.dib.2020.105208>
- Kaspar, F., Neubauer, P., & Gimpel, M. (2019a). Bioactive Secondary Metabolites from *Bacillus subtilis*: A Comprehensive Review. *Journal of Natural Products*, 82(7), 2038–2053. <https://doi.org/10.1021/acs.jnatprod.9b00110>
- Kaspar, F., Neubauer, P., & Gimpel, M. (2019b). Bioactive Secondary Metabolites from *Bacillus subtilis*: A Comprehensive Review. *Journal of Natural Products*, 82(7), 2038–2053. <https://doi.org/10.1021/acs.jnatprod.9b00110>
- Kaul, S., Gupta, S., Ahmed, M., & Dhar, M. K. (2012). Endophytic fungi from medicinal plants: A treasure hunt for bioactive metabolites. *Phytochemistry Reviews*, 11(4),

487–505. <https://doi.org/10.1007/s11101-012-9260-6>

- Khadari, B., & El Bakkali, A. (2018). Primary Selection and Secondary Diversification: Two Key Processes in the History of Olive Domestication. *International Journal of Agronomy*, 2018. <https://doi.org/10.1155/2018/5607903>
- Khare, E., Mishra, J., & Arora, N. K. (2018). Multifaceted interactions between endophytes and plant: Developments and Prospects. *Frontiers in Microbiology*, 9(NOV), 1–12. <https://doi.org/10.3389/fmicb.2018.02732>
- Kim, H. S., Yoon, B. D., Lee, C. H., Suh, H. H., Oh, H. M., Katsuragi, T., & Tani, Y. (1997). Production and properties of a lipopeptide biosurfactant from *Bacillus subtilis* C9. *Journal of Fermentation and Bioengineering*, 84(1), 41–46. [https://doi.org/10.1016/S0922-338X\(97\)82784-5](https://doi.org/10.1016/S0922-338X(97)82784-5)
- Kim, P. I., Bai, H., Bai, D., Chae, H., Chung, S., Kim, Y., Park, R., & Chi, Y. T. (2004). Purification and characterization of a lipopeptide produced by *Bacillus thuringiensis* CMB26. *Journal of Applied Microbiology*, 97(5), 942–949. <https://doi.org/10.1111/j.1365-2672.2004.02356.x>
- Kim, S. young, Kim, J. Y., Kim, S. H., Bae, H. J., Yi, H., Yoon, S. H., Koo, B. S., Kwon, M., Cho, J. Y., Lee, C. E., & Hong, S. (2007). Surfactin from *Bacillus subtilis* displays anti-proliferative effect via apoptosis induction, cell cycle arrest and survival signaling suppression. *FEBS Letters*, 581(5), 865–871. <https://doi.org/10.1016/j.febslet.2007.01.059>
- Klich, M. A., Arthur, K. S., Lax, A. R., & Bland, J. M. (1994). Iturin A: A potential new fungicide for stored grains. *Mycopathologia*, 127(2), 123–127. <https://doi.org/10.1007/BF01103068>
- Kobayashi, Y., & Ito, M. (1998). Valuation of Phytotoxic Activity of Naturally Occurring Phenolic Compounds. *Journal of Weed Science and Technology*, 43(4), 341–348. <https://doi.org/10.3719/weed.43.341>
- Koglin, A., & Walsh, C. T. (2009). Structural insights into nonribosomal peptide enzymatic assembly lines. *Natural Product Reports*, 26(8), 987–1000. <https://doi.org/10.1039/b904543k>
- Kolainis, S., Koletti, A., Lykogianni, M., Karamanou, D., Gkizi, D., Tjamos, S. E., Paraskeuopoulos, A., & Aliferis, K. A. (2020). An integrated approach to improve

- plant protection against olive anthracnose caused by the *Colletotrichum acutatum* species complex. *PLoS ONE*, 15(5), 1–22.
<https://doi.org/10.1371/journal.pone.0233916>
- Kowall, M., Vater, J., Kluge, B., Stein, T., Franke, P., & Ziessow, D. (1998). Separation and characterization of surfactin isoforms produced by *Bacillus subtilis* OKB 105. *Journal of Colloid and Interface Science*, 204(1), 1–8.
<https://doi.org/10.1006/jcis.1998.5558>
- Kraas, F. I., Helmetag, V., Wittmann, M., Strieker, M., & Marahiel, M. A. (2010). Functional dissection of surfactin synthetase initiation module reveals insights into the mechanism of lipoinitiation. *Chemistry and Biology*, 17(8), 872–880.
<https://doi.org/10.1016/j.chembiol.2010.06.015>
- Kumar, S., Jyotirmayee, K., & Sarangi, M. (2013). Thin layer chromatography: A tool of biotechnology for isolation of bioactive compounds from medicinal plants. In *International Journal of Pharmaceutical Sciences Review and Research* (Vol. 18, Issue 1, pp. 126–132).
- Kumral, N. A., Kovanci, B., & Akbudak, B. (2005). Pheromone trap catches of the olive moth, *Prays oleae* (Bern.) (Lep., Plutellidae) in relation to olive phenology and degree-day models. *Journal of Applied Entomology*, 129(7), 375–381.
<https://doi.org/10.1111/j.1439-0418.2005.00985.x>
- Kumral, Nabi Alper, Kovanci, B., & Akbudak, B. (2008). Using degree-day accumulations and host phenology for predicting larval emergence patterns of the olive psyllid, *Euphyllura phillyreae*. *Journal of Pest Science*, 81(2), 63–69.
<https://doi.org/10.1007/s10340-007-0185-6>
- Lai, C. C., Huang, Y. C., Wei, Y. H., & Chang, J. S. (2009). Biosurfactant-enhanced removal of total petroleum hydrocarbons from contaminated soil. *Journal of Hazardous Materials*, 167(1–3), 609–614.
<https://doi.org/10.1016/j.jhazmat.2009.01.017>
- Lanza, B., Ragnelli, A. M., Priore, M., & Aimola, P. (2017). Morphological and histochemical investigation of the response of *Olea europaea* leaves to fungal attack by *Spilocaea oleagina*. *Plant Pathology*, 66(8), 1239–1247.
<https://doi.org/10.1111/ppa.12671>

- Latinović, J., Hrnčić, S., Perović, T., & Latinović, N. (2014). Botryosphaeria dothidea—causal agent of olive fruit rot—pathogen of wounds or not? *Comptes Rendus de La Réunion*, *108*, 35–38.
- Latinović, Jelena, Mazzaglia, A., Latinović, N., Ivanović, M., & Gleason, M. L. (2013). Resistance of olive cultivars to Botryosphaeria dothidea, causal agent of olive fruit rot in Montenegro. *Crop Protection*, *48*, 35–40. <https://doi.org/10.1016/j.cropro.2013.02.004>
- Lee, J. H., Nam, S. H., Seo, W. T., Yun, H. D., Hong, S. Y., Kim, M. K., & Cho, K. M. (2012). The production of surfactin during the fermentation of cheonggukjang by potential probiotic Bacillus subtilis CSY191 and the resultant growth suppression of MCF-7 human breast cancer cells. *Food Chemistry*, *131*(4), 1347–1354. <https://doi.org/10.1016/j.foodchem.2011.09.133>
- Leoni, C., Bruzzone, J., Villamil, J. J., Martínez, C., Montelongo, M. J., Bentancur, O., & Conde-Innamorato, P. (2018). Percentage of anthracnose (Colletotrichum acutatum s.s.) acceptable in olives for the production of extra virgin olive oil. *Crop Protection*, *108*(February 2017), 47–53. <https://doi.org/10.1016/j.cropro.2018.02.013>
- Leung, M. (2004). Bioremediation: Techniques for Cleaning up a mess. *Bio Teach Journal*, *2*, 18–22.
- Li, X., Yang, H., Zhang, D., Li, X., Yu, H., & Shen, Z. (2015). Overexpression of specific proton motive force-dependent transporters facilitate the export of surfactin in Bacillus subtilis. *Journal of Industrial Microbiology and Biotechnology*, *42*(1), 93–103. <https://doi.org/10.1007/s10295-014-1527-z>
- Liu, J. F., Mbadinga, S. M., Yang, S. Z., Gu, J. D., & Mu, B. Z. (2015). Chemical structure, property and potential applications of biosurfactants produced by Bacillus subtilis in petroleum recovery and spill mitigation. *International Journal of Molecular Sciences*, *16*(3), 4814–4837. <https://doi.org/10.3390/ijms16034814>
- Liu, X., Tao, X., Zou, A., Yang, S., Zhang, L., & Mu, B. (2010). Effect of themicrobial lipopeptide on tumor cell lines: Apoptosis induced by disturbing the fatty acid composition of cell membrane. *Protein and Cell*, *1*(6), 584–594. <https://doi.org/10.1007/s13238-010-0072-4>

- Loumou, A., & Giourga, C. (2003). Olive groves: “The life and identity of the Mediterranean.” *Agriculture and Human Values*, 20(1), 87–95. <https://doi.org/10.1023/A:1022444005336>
- Lowe, R. G. T., Lord, M., Rybak, K., Trengove, R. D., Oliver, R. P., & Solomon, P. S. (2009). Trehalose biosynthesis is involved in sporulation of *Stagonospora nodorum*. *Fungal Genetics and Biology*, 46(5), 381–389. <https://doi.org/10.1016/j.fgb.2009.02.002>
- Lu, J., Nogi, Y., & Takami, H. (2001). *Oceanobacillus iheyensis* gen. nov., sp. nov., a deep-sea extremely halotolerant and alkaliphilic species isolated from a depth of 1050 m on the Iheya Ridge. *FEMS Microbiology Letters*, 205(2), 291–297. [https://doi.org/10.1016/S0378-1097\(01\)00493-1](https://doi.org/10.1016/S0378-1097(01)00493-1)
- Lykogianni, M., Papadopoulou, E. A., Sapalidis, A., Tsiourvas, D., Sideratou, Z., & Aliferis, K. A. (2020). Metabolomics reveals differential mechanisms of toxicity of hyperbranched poly(ethyleneimine)-derived nanoparticles to the soil-borne fungus *Verticillium dahliae* Kleb. *Pesticide Biochemistry and Physiology*, 165(January), 104535. <https://doi.org/10.1016/j.pestbp.2020.02.001>
- Macheleidt, J., Mattern, D. J., Fischer, J., Netzker, T., Weber, J., Schroeckh, V., Valiante, V., & Brakhage, A. A. (2016). Regulation and Role of Fungal Secondary Metabolites. *Annual Review of Genetics*, 50(September), 371–392. <https://doi.org/10.1146/annurev-genet-120215-035203>
- Mahzoum, A. M., Villa, M., Benhadi-Marín, J., & Pereira, J. A. (2020). Functional response of *Chrysoperla carnea* (neuroptera: Chrysopidae) larvae on *Saissetia oleae* (olivier) (hemiptera: Coccidae): implications for biological control. *Agronomy*, 10(10). <https://doi.org/10.3390/agronomy10101511>
- Malheiro, R., Casal, S., Baptista, P., & Pereira, J. A. (2015). A review of *Bactrocera oleae* (Rossi) impact in olive products: From the tree to the table. *Trends in Food Science and Technology*, 44(2), 226–242. <https://doi.org/10.1016/j.tifs.2015.04.009>
- Malviya, D., Sahu, P. K., Singh, U. B., Paul, S., Gupta, A., Gupta, A. R., Singh, S., Kumar, M., Paul, D., Rai, J. P., Singh, H. V., & Brahmaprakash, G. P. (2020). Lesson from ecotoxicity: Revisiting the microbial lipopeptides for the management

- of emerging diseases for crop protection. *International Journal of Environmental Research and Public Health*, 17(4). <https://doi.org/10.3390/ijerph17041434>
- Mandava, N. B., Orellana, R. G., David Warthen, J., Worley, J. F., Dutky, S. R., Finegold, H., & Weathington, B. C. (1980). Phytotoxins in *Rhizoctonia Solani*: Isolation and Biological Activity of m-Hydroxy-and m-Methoxyphenylacetic Acids. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 28(1), 71–75. <https://doi.org/10.1021/jf60227a009>
- Marchal, L., Legrand, J., & Foucault, A. (2003). Centrifugal partition chromatography: A survey of its history, and our recent advances in the field. *Chemical Record*, 3(3), 133–143. <https://doi.org/10.1002/tcr.10057>
- Marchi, G., Mori, B., Pollacci, P., Mencuccini, M., & Surico, G. (2009). Systemic spread of *Pseudomonas savastanoi* pv. *savastanoi* in olive explants. *Plant Pathology*, 58(1), 152–158. <https://doi.org/10.1111/j.1365-3059.2008.01935.x>
- Marquis, R. E., Sim, J., & Shin, S. Y. (1994). Molecular mechanisms of resistance to heat and oxidative damage. *Journal of Applied Bacteriology*, 76(1989), 40S-48S. <https://doi.org/10.1111/j.1365-2672.1994.tb04356.x>
- Martín, M. P., & García-Figueres, F. (1999). *Colletotrichum acutatum* and *C. gloeosporioides* cause anthracnose on olives M.P. *European Journal Of Plant Pathology*, 105, 733–741.
- Materatski, P., Varanda, C., Carvalho, T., Dias, A. B., Doroteia Campos, M., Rei, F., & Do Rosário Félix, M. (2018). Diversity of *Colletotrichum* species associated with olive anthracnose and new perspectives on controlling the disease in Portugal. *Agronomy*, 8(12). <https://doi.org/10.3390/agronomy8120301>
- Medeot, D. B., Fernandez, M., Morales, G. M., & Jofré, E. (2020). Fengycins From *Bacillus amyloliquefaciens* MEP218 Exhibit Antibacterial Activity by Producing Alterations on the Cell Surface of the Pathogens *Xanthomonas axonopodis* pv. *vesicatoria* and *Pseudomonas aeruginosa* PA01. *Frontiers in Microbiology*, 10(January), 1–12. <https://doi.org/10.3389/fmicb.2019.03107>
- Meena, K. R., & Kanwar, S. S. (2015). Lipopeptides as the antifungal and antibacterial agents: Applications in food safety and therapeutics. *BioMed Research International*, 2015. <https://doi.org/10.1155/2015/473050>

- Mendes, R., Garbeva, P., & Raaijmakers, J. M. (2013). The rhizosphere microbiome: Significance of plant beneficial, plant pathogenic, and human pathogenic microorganisms. *FEMS Microbiology Reviews*, 37(5), 634–663. <https://doi.org/10.1111/1574-6976.12028>
- Mhammedi, A., Peypoux, F., Besson, F., & Michel, G. (1982). Bacillomycin f, a new antibiotic of iturin group: Isolation and characterization. *The Journal of Antibiotics*, 35(3), 306–311. <https://doi.org/10.7164/antibiotics.35.306>
- Michailidis, D., Angelis, A., Aligiannis, N., Mitakou, S., & Skaltsounis, L. (2019). Recovery of sesamin, sesamol, and minor lignans from sesame oil using solid support-free liquid-liquid extraction and chromatography techniques and evaluation of their enzymatic inhibition properties. *Frontiers in Pharmacology*, 10(JUN), 1–13. <https://doi.org/10.3389/fphar.2019.00723>
- Mitchell, C. A., Shi, C., Aldrich, C. C., & Gulick, A. M. (2012). Structure of PA1221, a nonribosomal peptide synthetase containing adenylation and peptidyl carrier protein domains. *Biochemistry*, 51(15), 3252–3263. <https://doi.org/10.1021/bi300112e>
- Montes-Osuna, N., & Mercado-Blanco, J. (2020). Verticillium wilt of olive and its control: What did we learn during the last decade? *Plants*, 9(6), 1–31. <https://doi.org/10.3390/plants9060735>
- Mootz, H. D., & Marahiel, M. A. (1997). Biosynthetic systems for nonribosomal peptide antibiotic assembly. *Current Opinion in Chemical Biology*, 1(4), 543–551. [https://doi.org/10.1016/S1367-5931\(97\)80051-8](https://doi.org/10.1016/S1367-5931(97)80051-8)
- Moral, J., Agustí-Brisach, C., Agalliu, G., de Oliveira, R., Pérez-Rodríguez, M., Roca, L. F., Romero, J., & Trapero, A. (2018). Preliminary selection and evaluation of fungicides and natural compounds to control olive anthracnose caused by *Colletotrichum* species. *Crop Protection*, 114(February), 167–176. <https://doi.org/10.1016/j.cropro.2018.08.033>
- Moral, J., De Oliveira, R., & Trapero, A. (2009). Elucidation of the disease cycle of olive anthracnose caused by *colletotrichum acutatum*. *Phytopathology*, 99(5), 548–556. <https://doi.org/10.1094/PHYTO-99-5-0548>
- Moral, J., & Trapero, A. (2012). Mummified fruit as a source of inoculum and disease

- dynamics of olive anthracnose caused by *Colletotrichum* spp. *Phytopathology*, 102(10), 982–989. <https://doi.org/10.1094/PHYTO-12-11-0344>
- Moral, J., Xaviér, C. J., Viruega, J. R., Roca, L. F., Caballero, J., & Trapero, A. (2017). Variability in susceptibility to anthracnose in the world collection of olive cultivars of Cordoba (Spain). *Frontiers in Plant Science*, 8(November), 1–11. <https://doi.org/10.3389/fpls.2017.01892>
- Mori, S., & Barth, H. G. (2013). *Size exclusion chromatography*.
- Moryl, M., Spetana, M., Dziubek, K., Paraszkiwicz, K., Rózalska, S., Płaza, G. A., & Rózalski, A. (2015). Antimicrobial, antiadhesive and antibiofilm potential of lipopeptides synthesised by *Bacillus subtilis*, on uropathogenic bacteria. *Acta Biochimica Polonica*, 62(4), 725–732. https://doi.org/10.18388/abp.2015_1120
- Moyne, A. L., Shelby, R., Cleveland, T. E., & Tuzun, S. (2001). Bacillomycin D: An iturin with antifungal activity against *Aspergillus flavus*. *Journal of Applied Microbiology*, 90(4), 622–629. <https://doi.org/10.1046/j.1365-2672.2001.01290.x>
- Mulligan, C. N. (2005). Environmental applications for biosurfactants. *Environmental Pollution*, 133(2), 183–198. <https://doi.org/10.1016/j.envpol.2004.06.009>
- Mulligan, C. N., Yong, R. N., Gibbs, B. F., James, S., & Bennett, H. P. J. (1999). Metal removal from contaminated soil and sediments by the biosurfactant surfactin. *Environmental Science and Technology*, 33(21), 3812–3820. <https://doi.org/10.1021/es9813055>
- Murayama, W., Kobayashi, T., Kosuge, Y., Yano, H., Nunogaki, Y., & Nunogaki, K. (1982). A new centrifugal counter-current chromatograph and its application. *Journal of Chromatography A*, 239(C), 643–649. [https://doi.org/10.1016/S0021-9673\(00\)82022-1](https://doi.org/10.1016/S0021-9673(00)82022-1)
- Murphy, H. N., Stewart, G. R., Mischenko, V. V., Apt, A. S., Harris, R., McAlister, M. S. B., Driscoll, P. C., Young, D. B., & Robertson, B. D. (2005). The OtsAB pathway is essential for trehalose biosynthesis in *Mycobacterium tuberculosis*. *Journal of Biological Chemistry*, 280(15), 14524–14529. <https://doi.org/10.1074/jbc.M414232200>
- Ni, M., & Yu, J. H. (2007). A novel regulator couples sporogenesis and trehalose biogenesis in *aspergillus nidulans*. *PLoS ONE*, 2(10), 1–9.

- <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0000970>
- Nitschke, M., & Costa, S. G. V. A. O. (2007). Biosurfactants in food industry. *Trends in Food Science and Technology*, 18(5), 252–259. <https://doi.org/10.1016/j.tifs.2007.01.002>
- Nitschke, Marcia, & Silva, S. S. e. (2018). Recent food applications of microbial surfactants. *Critical Reviews in Food Science and Nutrition*, 58(4), 631–638. <https://doi.org/10.1080/10408398.2016.1208635>
- Nobre, T., Gomes, L., & Rei, F. T. (2018). Uncovered variability in olive moth (Prays oleae) questions species monophyly. *PLoS ONE*, 13(11), 1–12. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0207716>
- Nozhat, Z., Asadi, A., & Zahri, S. (2012). Properties of surfactin C-15 nanopeptide and its cytotoxic effect on human cervix cancer (HeLa) cell line. *Journal of Nanomaterials*, 2012. <https://doi.org/10.1155/2012/526580>
- Obanor, F. O., Walter, M., Jones, E. E., & Jaspers, M. V. (2011). Effects of temperature, inoculum concentration, leaf age, and continuous and interrupted wetness on infection of olive plants by *Spilopodia oleagina*. *Plant Pathology*, 60(2), 190–199. <https://doi.org/10.1111/j.1365-3059.2010.02370.x>
- Ocón, A., Hampp, R., & Requena, N. (2007). Trehalose turnover during abiotic stress in arbuscular mycorrhizal fungi. *New Phytologist*, 174(4), 879–891. <https://doi.org/10.1111/j.1469-8137.2007.02048.x>
- Olishevskaya, S., Nickzad, A., & Déziel, E. (2019). Bacillus and Paenibacillus secreted polyketides and peptides involved in controlling human and plant pathogens. *Applied Microbiology and Biotechnology*, 103(3), 1189–1215. <https://doi.org/10.1007/s00253-018-9541-0>
- Olivera, N., Siñeriz, F., & Breccia, J. D. (2005). *Bacillus patagoniensis* sp. nov., a novel alkalitolerant bacterium from the rhizosphere of *Atriplex lampa* in Patagonia, Argentina. *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology*, 55(1), 443–447. <https://doi.org/10.1099/ijs.0.63348-0>
- Omokhagbor Adams, G., Tawari Fufeyin, P., Eruke Okoro, S., & Ehinomen, I. (2015). Bioremediation, Biostimulation and Bioaugmentation: A Review. *International Journal of Environmental Bioremediation & Biodegradation*, 3(1), 28–39.

<https://doi.org/10.12691/ijebb-3-1-5>

- Ongena, M., & Jacques, P. (2008). Bacillus lipopeptides: versatile weapons for plant disease biocontrol. *Trends in Microbiology*, 16(3), 115–125. <https://doi.org/10.1016/j.tim.2007.12.009>
- Ongena, M., Jourdan, E., Adam, A., Paquot, M., Brans, A., Joris, B., Arpigny, J., & Thonart, P. (2007). Surfactin and fengycin lipopeptides of *Bacillus subtilis* as elicitors of induced systemic resistance in plants. *Environmental Microbiology*, 9(4), 1084–1090. <https://doi.org/10.1111/j.1462-2920.2006.01202.x>
- Paraszkiewicz, K., Bernat, P., Kuśmierska, A., Chojniak, J., & Płaza, G. (2018). Structural identification of lipopeptide biosurfactants produced by *Bacillus subtilis* strains grown on the media obtained from renewable natural resources. *Journal of Environmental Management*, 209, 65–70. <https://doi.org/10.1016/j.jenvman.2017.12.033>
- Patel, H., Huynh, Q., Bärlehner, D., & Heerklotz, H. (2014). Additive and synergistic membrane permeabilization by antimicrobial (LIPO)peptides and detergents. *Biophysical Journal*, 106(10), 2115–2125. <https://doi.org/10.1016/j.bpj.2014.04.006>
- Patel, H., Tscheka, C., Edwards, K., Karlsson, G., & Heerklotz, H. (2011). All-or-none membrane permeabilization by fengycin-type lipopeptides from *Bacillus subtilis* QST713. *Biochimica et Biophysica Acta - Biomembranes*, 1808(8), 2000–2008. <https://doi.org/10.1016/j.bbamem.2011.04.008>
- Patel, S., Ahmed, S., & Eswari, J. S. (2015). Therapeutic cyclic lipopeptides mining from microbes: latest strides and hurdles. *World Journal of Microbiology and Biotechnology*, 31(8), 1177–1193. <https://doi.org/10.1007/s11274-015-1880-8>
- Penha, R. O., Vandenberghe, L. P. S., Faulds, C., Soccol, V. T., & Soccol, C. R. (2020a). Bacillus lipopeptides as powerful pest control agents for a more sustainable and healthy agriculture: recent studies and innovations. *Planta*, 251(3), 70. <https://doi.org/10.1007/s00425-020-03357-7>
- Penha, R. O., Vandenberghe, L. P. S., Faulds, C., Soccol, V. T., & Soccol, C. R. (2020b). Bacillus lipopeptides as powerful pest control agents for a more sustainable and healthy agriculture: recent studies and innovations. *Planta*,

- 251(3), 1–15. <https://doi.org/10.1007/s00425-020-03357-7>
- Petri, L. (1930). Azione tossica dell'arseniato sodico sopra le spore del *Gloeosporium olivarum* Alm. *Bollettino Della Regia Stazione Di Patologia Vegetale*, 359–361.
- Petrini, O. (1991). Fungal Endophytes of Tree Leaves. *Microbial Ecology of Leaves*, 179–197. <https://doi.org/10.1201/9781351110792-4>
- Peypoux, F., Bonmatin, J. M., & Wallach, J. (1999). Recent trends in the biochemistry of surfactin. *Appl Microbiol Biotechnol*, 51, 553–563. <https://doi.org/10.1016/B978-0-12-803961-8.50001-4>
- Peypoux, F, Bonmatin, J. M., & Wallach, J. (1999). Recent trends in the biochemistry of surfactin. *Appl Microbiol Biotechnol*, 51, 553–563.
- PEYPOUX, Françoise, BONMATIN, J. -M, LABBÉ, H., DAS, B. C., PTAK, M., & MICHEL, G. (1991). Isolation and characterization of a new variant of surfactin, the [Val7]surfactin. *European Journal of Biochemistry*, 202(1), 101–106. <https://doi.org/10.1111/j.1432-1033.1991.tb16349.x>
- PEYPOUX, Françoise, MARION, D., MAGET-DANA, R., PTAK, M., DAS, B. C., & MICHEL, G. (1985). Structure of bacillomycin F, a new peptidolipid antibiotic of the iturin group. *European Journal of Biochemistry*, 153(2), 335–340. <https://doi.org/10.1111/j.1432-1033.1985.tb09307.x>
- Peypoux, Françoise, & Michel, G. (1992). Controlled biosynthesis of Val7- and Leu7-surfactins. *Applied Microbiology and Biotechnology*, 36(4), 515–517. <https://doi.org/10.1007/BF00170194>
- Phillips, A. J. L., Rumbos, I. C., Alves, A., & Correia, A. (2005). Morphology and phylogeny of *Botryosphaeria dothidea* causing fruit rot of olives. *Mycopathologia*, 159(3), 433–439. <https://doi.org/10.1007/s11046-005-0256-2>
- Queipo-Ortuño, M. I., De Dios Colmenero, J., Macias, M., Bravo, M. J., & Morata, P. (2008). Preparation of bacterial DNA template by boiling and effect of immunoglobulin g as an inhibitor in real-time PCR for serum samples from patients with brucellosis. *Clinical and Vaccine Immunology*, 15(2), 293–296. <https://doi.org/10.1128/CVI.00270-07>
- Raaijmakers, J. M., de Bruijn, I., Nybroe, O., & Ongena, M. (2010). Natural functions of lipopeptides from *Bacillus* and *Pseudomonas*: More than surfactants and

- antibiotics. *FEMS Microbiology Reviews*, 34(6), 1037–1062.
<https://doi.org/10.1111/j.1574-6976.2010.00221.x>
- Rabel, F., & Sherma, J. (2017). Review of the state of the art of preparative thin-layer chromatography. *Journal of Liquid Chromatography and Related Technologies*, 40(4), 165–176. <https://doi.org/10.1080/10826076.2017.1294081>
- Ramos, C., Matas, I. M., Bardaji, L., Aragón, I. M., & Murillo, J. (2012). *Pseudomonas savastanoi* pv. *savastanoi*: Some like it knot. *Molecular Plant Pathology*, 13(9), 998–1009. <https://doi.org/10.1111/j.1364-3703.2012.00816.x>
- Reva, O. N., Smirnov, V. V., Pettersson, B., & Priest, F. G. (2002). *Bacillus endophyticus* sp. nov., isolated from the inner tissues of cotton plants (*Gossypium* sp.). *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology*, 52(1), 101–107. <https://doi.org/10.1099/00207713-52-1-101>
- Riesenman, P. J., & Nicholson, W. L. (2000). Role of the spore coat layers in *Bacillus subtilis* spore resistance to hydrogen peroxide, artificial UV-C, UV-B, and solar UV radiation. *Applied and Environmental Microbiology*, 66(2), 620–626. <https://doi.org/10.1128/AEM.66.2.620-626.2000>
- Roca, L. F., Moral, J., Viruega, J. R., Ávila, A., Oliveira, R., & Trapero, A. (2007). Copper Fungicides in the Control of Olive Diseases. *Olea*, 26(26), 48–50.
- Romero, J., Agustí-Brisach, C., Santa Bárbara, A. E., Cherifi, F., Oliveira, R., Roca, L. F., Moral, J., & Trapero, A. (2018). Detection of latent infections caused by *Colletotrichum* sp. in olive fruit. *Journal of Applied Microbiology*, 124(1), 209–219. <https://doi.org/10.1111/jam.13610>
- Romero, Joaquín, Ávila, A., Agustí-Brisach, C., Roca, L. F., & Trapero, A. (2020). Evaluation of fungicides and management strategies against cercospora leaf spot of olive caused by *Pseudocercospora cladosporioides*. *Agronomy*, 10(2), 9–11. <https://doi.org/10.3390/agronomy10020271>
- Roongsawang, N., Washio, K., & Morikawa, M. (2011). Diversity of nonribosomal peptide synthetases involved in the biosynthesis of lipopeptide biosurfactants. *International Journal of Molecular Sciences*, 12(1), 141–172. <https://doi.org/10.3390/ijms12010141>
- Rosenberg, E., & Ron, E. Z. (1999). High- and low-molecular-mass microbial

- surfactants. *Applied Microbiology and Biotechnology*, 52(2), 154–162. <https://doi.org/10.1007/s002530051502>
- Rüger, H. J., Fritze, D., & Spröer, C. (2000). New psychrophilic and psychrotolerant *Bacillus marinus* strains from tropical and polar deep-sea sediments and emended description of the species. *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology*, 50(3), 1305–1313. <https://doi.org/10.1099/00207713-50-3-1305>
- Rugini, E., De Pace, C., Gutiérrez-Pesce, P., & Muleo, R. O. (2011). In *Wild Crop Relatives: Genomic and Breeding Resources*.
- Salman, M. (2017). Biological control of *Spilocaea oleagina*, the causal agent of olive leaf spot disease, using antagonistic bacteria. *Journal of Plant Pathology*, 99(3), 741–744. <https://doi.org/10.4454/jpp.v99i3.3958>
- Sansinenea, E., & Ortiz, A. (2011). Secondary metabolites of soil *Bacillus* spp. *Biotechnology Letters*, 33(8), 1523–1538. <https://doi.org/10.1007/s10529-011-0617-5>
- Santos, S. A. P., Pereira, J. A., Torres, L. M., & Nogueira, A. J. N. (2010). Voracity of Coccinellid species on different phenological stages of the olive pest *Saissetia Oleae* (Homoptera, Coccidae). *Applied Ecology and Environmental Research*, 7(4), 359–365. https://doi.org/10.15666/aeer/0704_359365
- Santos, V. S. V., Silveira, E., & Pereira, B. B. (2018a). Toxicity and applications of surfactin for health and environmental biotechnology. *Journal of Toxicology and Environmental Health - Part B: Critical Reviews*, 21(6–8), 382–399. <https://doi.org/10.1080/10937404.2018.1564712>
- Santos, V. S. V., Silveira, E., & Pereira, B. B. (2018b). Toxicity and applications of surfactin for health and environmental biotechnology. *Journal of Toxicology and Environmental Health - Part B: Critical Reviews*, 21(6–8), 382–399. <https://doi.org/10.1080/10937404.2018.1564712>
- Satomi, M., La Duc, M. T., & Venkateswaran, K. (2006). *Bacillus safensis* sp.nov., isolated from spacecraft and assembly-facility surfaces. *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology*, 56(8), 1735–1740. <https://doi.org/10.1099/ij.s.0.64189-0>
- Schena, L., Mosca, S., Cacciola, S. O., Faedda, R., Sanzani, S. M., Agosteo, G. E.,

- Sergeeva, V., & Magnano di San Lio, G. (2014). Species of the *Colletotrichum gloeosporioides* and *C. boninense* complexes associated with olive anthracnose. *Plant Pathology*, 63(2), 437–446. <https://doi.org/10.1111/ppa.12110>
- Scott, M., Rani, M., Samsatly, J., Charron, J. B., & Jabaji, S. (2018). Endophytes of industrial hemp (*Cannabis sativa* L.) cultivars: Identification of culturable bacteria and fungi in leaves, petioles, and seeds. *Canadian Journal of Microbiology*, 64(10), 664–680. <https://doi.org/10.1139/cjm-2018-0108>
- Sebastiani, L., & Busconi, M. (2017). Recent developments in olive (*Olea europaea* L.) genetics and genomics: applications in taxonomy, varietal identification, traceability and breeding. *Plant Cell Reports*, 36(9), 1345–1360. <https://doi.org/10.1007/s00299-017-2145-9>
- Sevastos, A., Kalampokis, I. F., Panagiotopoulou, A., Pelecanou, M., & Aliferis, K. A. (2018). Implication of *Fusarium graminearum* primary metabolism in its resistance to benzimidazole fungicides as revealed by ¹H NMR metabolomics. *Pesticide Biochemistry and Physiology*, 148(September 2017), 50–61. <https://doi.org/10.1016/j.pestbp.2018.03.015>
- Seydlová, G., & Svobodová, J. (2008). Review of surfactin chemical properties and the potential biomedical applications. *Central European Journal of Medicine*, 3(2), 123–133. <https://doi.org/10.2478/s11536-008-0002-5>
- Sherma, J., & Fried, B. (2003). *Handbook of thin-layer chromatography*.
- Sherma, Joseph, & Fried, B. (2005). Thin layer chromatographic analysis of biological samples. A review. *Journal of Liquid Chromatography and Related Technologies*, 28(15), 2297–2314. <https://doi.org/10.1080/10826070500187491>
- Shivaji, S., Chaturvedi, P., Suresh, K., Reddy, G. S. N., Dutt, C. B. S., Wainwright, M., Narlikar, J. V., & Bhargava, P. M. (2006). *Bacillus aerius* sp. nov., *Bacillus aerophilus* sp. nov., *Bacillus stratosphericus* sp. nov. and *Bacillus altitudinis* sp. nov., isolated from cryogenic tubes used for collecting air samples from high altitudes. *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology*, 56(7), 1465–1473. <https://doi.org/10.1099/ijs.0.64029-0>
- Simbahan, J., Drijber, R., & Blum, P. (2004). *Alicyclobacillus vulcanalis* sp. nov., a thermophilic acidophilic bacterium isolated from Coso Hot Springs, California,

- USA. *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology*, 54(5), 1703–1707. <https://doi.org/10.1099/ijs.0.03012-0>
- Simmonds, J. H. (1966). A study of the species of *Colletotrichum* causing ripe fruit rots in Queensland. *Journal of Agricultural and Animal Sciences*, 22(4), 437–459.
- Sivapathasekaran, C., Das, P., Mukherjee, S., Saravanakumar, J., Mandal, M., & Sen, R. (2010). Marine bacterium derived lipopeptides: Characterization and cytotoxic activity against cancer cell lines. *International Journal of Peptide Research and Therapeutics*, 16(4), 215–222. <https://doi.org/10.1007/s10989-010-9212-1>
- Skouras, P. J., Margaritopoulos, J. T., Seraphides, N. A., Ioannides, I. M., Kakani, E. G., Mathiopoulos, K. D., & Atsitsipis, J. (2007). Organophosphate resistance in olive fruit fly, *Bactrocera oleae*, populations in Greece and Cyprus. *Pest Management Science*, 63(1), 42–48. <https://doi.org/10.1002/ps.1306>
- Snyder, L. R. (2008). Solvent selectivity in normal-phase TLC. *Journal of Planar Chromatography - Modern TLC*, 21(5), 315–323. <https://doi.org/10.1556/JPC.21.2008.5.1>
- Sreenivasaprasad, S., & Talhinhas, P. (2005). Genotypic and phenotypic diversity in *Colletotrichum acutatum*, a cosmopolitan pathogen causing anthracnose on a wide range of hosts. *Molecular Plant Pathology*, 6(4), 361–378. <https://doi.org/10.1111/j.1364-3703.2005.00291.x>
- Stanley, N. R., & Lazazzera, B. A. (2004). Environmental signals and regulatory pathways that influence biofilm formation. *Molecular Microbiology*, 52(4), 917–924. <https://doi.org/10.1111/j.1365-2958.2004.04036.x>
- Stein, T. (2005). *Bacillus subtilis* antibiotics: Structures, syntheses and specific functions. *Molecular Microbiology*, 56(4), 845–857. <https://doi.org/10.1111/j.1365-2958.2005.04587.x>
- Strobel, G. A. (2003a). Endophytes as sources of bioactive products. In *Microbes and Infection* (Vol. 5, Issue 6, pp. 535–544). [https://doi.org/10.1016/S1286-4579\(03\)00073-X](https://doi.org/10.1016/S1286-4579(03)00073-X)
- Strobel, G. A. (2003b). Endophytes as sources of bioactive products. *Microbes and Infection*, 5(6), 535–544. [https://doi.org/10.1016/S1286-4579\(03\)00073-X](https://doi.org/10.1016/S1286-4579(03)00073-X)
- Strobel, G., & Daisy, B. (2003). Bioprospecting for Microbial Endophytes and Their

- Natural Products. *Microbiology and Molecular Biology Reviews*, 67(4), 491–502. <https://doi.org/10.1128/membr.67.4.491-502.2003>
- Strobel, Gary, & Daisy, B. (2003). Bioprospecting for Microbial Endophytes and Their Natural Products. *Microbiology and Molecular Biology Reviews*, 67(4), 491–502. <https://doi.org/10.1128/membr.67.4.491-502.2003>
- Sugiyama, M., & Kaneda, M. (1995). Bacillopeptins, New Cyclic Lipopeptide Antibiotics from *Bacillus subtilis* FR-2. *The Journal of Antibiotics*, 48(10), 1095–1103. <https://doi.org/10.7164/antibiotics.48.1095>
- Sur, S., Romo, T. D., & Grossfield, A. (2018). Selectivity and Mechanism of Fengycin, an Antimicrobial Lipopeptide, from Molecular Dynamics. *Journal of Physical Chemistry B*, 122(8), 2219–2226. <https://doi.org/10.1021/acs.jpccb.7b11889>
- Surjit, S. D., & Rupa, G. (2014). Beneficial properties, colonization, establishment and molecular diversity of endophytic bacteria in legumes and non legumes. *African Journal of Microbiology Research*, 8(15), 1562–1572. <https://doi.org/10.5897/ajmr2013.6541>
- Switzer Blum, J., Burns Bindi, A., Buzzelli, J., Stolz, J. F., & Oremland, R. S. (1998). *Bacillus arsenicoselenatis*, sp. nov., and *Bacillus selenitireducens*, sp. nov.: Two haloalkaliphiles from Mono Lake, California that respire oxyanions of selenium and arsenic. *Archives of Microbiology*, 171(1), 19–30. <https://doi.org/10.1007/s002030050673>
- Szabados, L., & Savouré, A. (2010). Proline: a multifunctional amino acid. *Trends in Plant Science*, 15(2), 89–97. <https://doi.org/10.1016/j.tplants.2009.11.009>
- Talhinhas, P., Mota-Capitão, C., Martins, S., Ramos, A. P., Neves-Martins, J., Guerra-Guimarães, L., Várzea, V., Silva, M. C., Sreenivasaprasad, S., & Oliveira, H. (2011). Epidemiology, histopathology and aetiology of olive anthracnose caused by *Colletotrichum acutatum* and *C. gloeosporioides* in Portugal. *Plant Pathology*, 60(3), 483–495. <https://doi.org/10.1111/j.1365-3059.2010.02397.x>
- Talhinhas, Pedro, Gonçalves, E., Sreenivasaprasad, S., & Oliveira, H. (2015). Virulence diversity of anthracnose pathogens (*Colletotrichum acutatum* and *C. gloeosporioides* species complexes) on eight olive cultivars commonly grown in Portugal. *European Journal of Plant Pathology*, 142(1), 73–83.

<https://doi.org/10.1007/s10658-014-0590-7>

- Talhinhas, Pedro, Loureiro, A., & Oliveira, H. (2018). Olive anthracnose: a yield- and oil quality-degrading disease caused by several species of *Colletotrichum* that differ in virulence, host preference and geographical distribution. *Molecular Plant Pathology*, *19*(8), 1797–1807. <https://doi.org/10.1111/mpp.12676>
- Tareq, F. S., Lee, M. A., Lee, H. S., Lee, J. S., Lee, Y. J., & Shin, H. J. (2014). Gageotetrins A-C, noncytotoxic antimicrobial linear lipopeptides from a marine bacterium *Bacillus subtilis*. *Organic Letters*, *16*(3), 928–931. <https://doi.org/10.3390/md12020871>
- Tareq, F. S., & Shin, H. J. (2017). Bacilotetrins A and B, Anti-Staphylococcal Cyclic-Lipotetrapeptides from a Marine-Derived *Bacillus subtilis*. *Journal of Natural Products*, *80*(11), 2889–2892. <https://doi.org/10.1021/acs.jnatprod.7b00356>
- Tena, A., Soto, A., & Garcia-Marí, F. (2008). Parasitoid complex of black scale *Saissetia oleae* on citrus and olives: Parasitoid species composition and seasonal trend. *BioControl*, *53*(3), 473–487. <https://doi.org/10.1007/s10526-007-9084-2>
- Thasana, N., Prapagdee, B., Rangkadilok, N., Sallabhan, R., Aye, S. L., Ruchirawat, S., & Loprasert, S. (2010). *Bacillus subtilis* SSE4 produces subtilene A, a new lipopeptide antibiotic possessing an unusual C15 unsaturated β -amino acid. *FEBS Letters*, *584*(14), 3209–3214. <https://doi.org/10.1016/j.febslet.2010.06.005>
- Tiago, I., Chung, A. P., & Veríssimo, A. (2004). Bacterial diversity in a nonsaline alkaline environment: Heterotrophic aerobic populations. *Applied and Environmental Microbiology*, *70*(12), 7378–7387. <https://doi.org/10.1128/AEM.70.12.7378-7387.2004>
- Tsugawa, H., Cajka, T., Kind, T., Ma, Y., Higgins, B., Ikeda, K., Kanazawa, M., VanderGheynst, J., Fiehn, O., & Arita, M. (2015). MS-DIAL: Data Independent MS/MS Deconvolution for Comprehensive. *Nature Methods*, *12*(6), 523–526. <https://doi.org/10.1038/nmeth.3393>
- Turnbull, P. (1996). Chapter 15: *Bacillus*. In *Medicinal Microbiology 4th edition*.
- Uylaşer, V., & Yildiz, G. (2014). The Historical Development and Nutritional Importance of Olive and Olive Oil Constituted an Important Part of the Mediterranean Diet. *Critical Reviews in Food Science and Nutrition*, *54*(8), 1092–1101.

<https://doi.org/10.1080/10408398.2011.626874>

- Vanittanakom, N., Loeffler, W., Koch, U., & Jung, G. (1986). Fengycin-A Novel Antifungal Lipopeptide Antibiotic Produced by *Bacillus Subtilis* F-29-3. *Journal of Antibiotics*, 39(7), 888–901. <https://doi.org/10.7164/antibiotics.39.888>
- Vieira Santos, V. S., Caixeta, E. S., Campos Júnior, E. O. de, & Pereira, B. B. (2017). Ecotoxicological effects of larvicide used in the control of *Aedes aegypti* on nontarget organisms: Redefining the use of pyriproxyfen. *Journal of Toxicology and Environmental Health - Part A: Current Issues*, 80(3), 155–160. <https://doi.org/10.1080/15287394.2016.1266721>
- Villa, M., Santos, S. A. P., Sousa, J. P., Ferreira, A., da Silva, P. M., Patanita, I., Ortega, M., Pascual, S., & Pereira, J. A. (2020). Landscape composition and configuration affect the abundance of the olive moth (*Prays oleae*, Bernard) in olive groves. *Agriculture, Ecosystems and Environment*, 294(December 2018), 106854. <https://doi.org/10.1016/j.agee.2020.106854>
- Viruega, J. R., Moral, J., Roca, L. F., Navarro, N., & Trapero, A. (2013). *Spilocaea oleagina* in olive groves of southern Spain: Survival, inoculum production, and dispersal. *Plant Disease*, 97(12), 1549–1556. <https://doi.org/10.1094/PDIS-12-12-1206-RE>
- Volakakis, N. G., Eyre, M. D., & Kabourakis, E. M. (2012). Olive Fly *Bactrocera oleae* (Diptera, Tephritidae) Activity and Fruit Infestation Under Mass Trapping in an Organic Table Olive Orchard in Crete, Greece. *Journal of Sustainable Agriculture*, 36(6), 683–698. <https://doi.org/10.1080/10440046.2012.672377>
- Von Arx, J. A. (1957). The species of the genus *Colletotrichum* Corda. *Phytopathologische Zeitschrift*, 29, 413–468.
- Voyiatzi, C., Tamoutseli, K., Voyiatzis, D., & Bakirtzi, O. (1999). The olive tree in ancient greek life and art. *Acta Horticulturae*, 474, 763–766. <https://doi.org/10.17660/ActaHortic.1999.474.159>
- Wanasundara, U., & Fedec, P. (2002). Centrifugal partition chromatography (CPC): Emerging separation and purification technique for lipid and related compounds. *INFORM - International News on Fats, Oils and Related Materials*, 13(9), 726–730.

- Wang, C. L., Ng, T. B., Yuan, F., Liu, Z. K., & Liu, F. (2007). Induction of apoptosis in human leukemia K562 cells by cyclic lipopeptide from *Bacillus subtilis* natto T-2. *Peptides*, 28(7), 1344–1350. <https://doi.org/10.1016/j.peptides.2007.06.014>
- Wang, F. (2008). *Biomarker methods in drug discovery and development*.
- Wang, Q., Yu, H., Wang, M., Yang, H., & Shen, Z. (2018). Enhanced biosynthesis and characterization of surfactin isoforms with engineered *Bacillus subtilis* through promoter replacement and *Vitreoscilla* hemoglobin co-expression. *Process Biochemistry*, 70(January), 36–44. <https://doi.org/10.1016/j.procbio.2018.04.003>
- Wang, T., Liang, Y., Wu, M., Chen, Z., Lin, J., & Yang, L. (2015). Natural products from *Bacillus subtilis* with antimicrobial properties. *Chinese Journal of Chemical Engineering*, 23(4), 744–754. <https://doi.org/10.1016/j.cjche.2014.05.020>
- Wang, Y., Teraoka, I., Hansen, F. Y., Peters, G. H., & Hassager, O. (2010). A theoretical study of the separation principle in size exclusion chromatography. *Macromolecules*, 43(3), 1651–1659. <https://doi.org/10.1021/ma902377g>
- Whang, L. M., Liu, P. W. G., Ma, C. C., & Cheng, S. S. (2008). Application of biosurfactants, rhamnolipid, and surfactin, for enhanced biodegradation of diesel-contaminated water and soil. *Journal of Hazardous Materials*, 151(1), 155–163. <https://doi.org/10.1016/j.jhazmat.2007.05.063>
- Wilson, D. (1995). Endophyte: The Evolution of a Term, and Clarification of Its Use and Definition. *Oikos*, 73(2), 274. <https://doi.org/10.2307/3545919>
- Winkelmann, G., Allgaier, H., Lupp, R., & Jung, G. (1983). Iturin AL-a new long chain iturin A possessing an unusual high content of C16- β -amino acids. *The Journal of Antibiotics*, 36(11), 1451–1457.
- Woese, C. R., & Fox, G. E. (1977). Phylogenetic structure of the prokaryotic domain: The primary kingdoms. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 74(11), 5088–5090. <https://doi.org/10.1073/pnas.74.11.5088>
- Workman, R. F., & Mamiya, B. M. (1995). Bacillomycin Lc, a New Antibiotic of the Iturin Group: Isolations, Structures, and Antifungal Activities of the Congeners. *The Journal of Antibiotics*, 48(11), 1240–1247. <https://doi.org/10.7164/antibiotics.48.1240>

www.bacterio.net/bacillus.html. (n.d.).

- Ying, G. G. (2006). Fate, behavior and effects of surfactants and their degradation products in the environment. *Environment International*, 32(3), 417–431. <https://doi.org/10.1016/j.envint.2005.07.004>
- Youssef, N. H., Duncan, K. E., & McInerney, M. J. (2005). Importance of 3-hydroxy fatty acid composition of lipopeptides for biosurfactant activity. *Applied and Environmental Microbiology*, 71(12), 7690–7695. <https://doi.org/10.1128/AEM.71.12.7690-7695.2005>
- Zampounis, V., Kontothanasis, K., & Christopoulou, E. (2014). Olive Oils from Greece. *Olive Oil Sensory Science*, 269–287. <https://doi.org/10.1002/9781118332511.ch11>
- Zeigler, D., & Perkins, J. (2008). The Genus Bacillus. In *Practical Handbook of Microbiology, Second Edition* (Issue August). <https://doi.org/10.1201/9781420009330.ch24>
- Zhang, L., Xing, X., Ding, J., Zhao, X., & Qi, G. (2017). Surfactin variants for intra-intestinal delivery of insulin. *European Journal of Pharmaceutics and Biopharmaceutics*, 115, 218–228. <https://doi.org/10.1016/j.ejpb.2017.03.005>
- Zhao, H., Shao, D., Jiang, C., Shi, J., Li, Q., Huang, Q., Rajoka, M. S. R., Yang, H., & Jin, M. (2017). Biological activity of lipopeptides from Bacillus. *Applied Microbiology and Biotechnology*, 101(15), 5951–5960. <https://doi.org/10.1007/s00253-017-8396-0>
- Zhao, P., Xue, Y., Gao, W., Li, J., Zu, X., Fu, D., Bai, X., Zuo, Y., Hu, Z., & Zhang, F. (2018). Bacillaceae-derived peptide antibiotics since 2000. *Peptides*, 101(December 2017), 10–16. <https://doi.org/10.1016/j.peptides.2017.12.018>
- Zhi, Y., Wu, Q., & Xu, Y. (2017). Genome and transcriptome analysis of surfactin biosynthesis in Bacillus amyloliquefaciens MT45. *Scientific Reports*, 7, 1–13. <https://doi.org/10.1038/srep40976>
- Zou, A., Liu, J., Garamus, V. M., Yang, Y., Willumeit, R., & Mu, B. (2010). Micellization activity of the natural lipopeptide [Glui, Asp5] surfactin-C15 in aqueous solution. *Journal of Physical Chemistry B*, 114(8), 2712–2718. <https://doi.org/10.1021/jp908675s>

- Αντωνιάδη, Μ. (2019). *Χρήση Χρωματογραφίας Κατ' Αντιρροή Για Την Παραλαβή Βιοδραστικών Συστατικών Υψηλής Προσπιθέμενης Αξίας Από Εκχυλίσματα Γεντιανής Και Προϊόντων Ελιάς.*
- ΕΛΣΤΑΤ. (2017). *Δενδρώδεις Καλλιέργειες. Αριθμός δένδρων και παραγωγή κυριότερων δενδρωδών καλλιεργειών, κατά Περιφέρεια και Περιφερειακή Ενότητα.*
- Θερίος, Ι. (2015). *ΕΛΑΙΟΚΟΜΙΑ.*
- Μπαρκολιάς, Ν. (2020). *In vitro και in planta αξιολόγηση σύγχρονων φυτοπροστατευτικών προϊόντων για την καλλιέργεια της ελιάς με εφαρμογή μεταβολομικής.*
- Παναγόπουλος, Χ. Γ. (2007). *Ασθένειες Καρποφόρων Δέντρων & Αμπέλου.*
- Τζανακάκης, Μ. Ε., & Κατσόγιαννος, Β. Ι. (2003). *Έντομα καρποφόρων δέντρων και αμπέλου.*
- ΥΠΑΑΤ. (2020). *Κατάλογος δραστικών ουσιών κατά καλλιέργεια και παθογόνο.*

