



ΠΑΝΕΠΙΣΤΗΜΙΟ ΘΕΣΣΑΛΙΑΣ
ΤΜΗΜΑ ΒΙΟΧΗΜΕΙΑΣ ΚΑΙ ΒΙΟΤΕΧΝΟΛΟΓΙΑΣ

ΠΤΥΧΙΑΚΗ ΕΡΓΑΣΙΑ

Απομόνωση εκχυλισμάτων από συμβιωτικά φυτά και

έλεγχος πιθανής βιολογικής δράσης

Isolation of extracts from symbiotic plants and assessment of potential
biological activity

Περάτη Αικατερίνη του Μιχαήλ

Επιβλέπουσα καθηγήτρια: Τσίκου Δανιέλα

Λάρισα, 2023

ΤΡΙΜΕΛΗΣ ΕΞΕΤΑΣΤΙΚΗ ΕΠΙΤΡΟΠΗ

Τσίκου Δανιέλα (Επιβλέπουσα)

Επίκουρος Καθηγήτρια Μοριακής και Αναπτυξιακής Βιολογίας Φυτών,
Τμήμα Βιοχημείας και Βιοτεχνολογίας, Πανεπιστήμιο Θεσσαλίας

Ψαρρά Άννα-Μαρία

Αναπληρώτρια Καθηγήτρια Βιοχημείας, Τμήμα Βιοχημείας και
Βιοτεχνολογίας, Πανεπιστήμιο Θεσσαλίας

Παπαδοπούλου Καλλιόπη

Καθηγήτρια Βιοτεχνολογίας Φυτών, Τμήμα Βιοχημείας και Βιοτεχνολογίας,
Πανεπιστήμιο Θεσσαλίας

ΠΕΡΙΕΧΟΜΕΝΑ

Περίληψη.....	5
Abstract	5
1. Εισαγωγή.....	6
1.1 Ψυχανθή φυτά: Lotus japonicus.....	6
1.2 Φυτικός μεταβολισμός.....	6
1.2.1 Πρωτογενής μεταβολισμός	6
1.2.2 Δευτερογενής μεταβολισμός	6
1.2.2.1 Φαινολικές ενώσεις.....	7
1.2.2.2 Τερπένια	8
1.2.2.3 Αζωτούχες ενώσεις	9
1.2.2.4 Βιοσύνθεση δευτερογενών μεταβολιτών	10
1.3 Συμβιωτικές σχέσεις φυτών	12
1.3.1 Μυκορριζικοί μύκητες	13
1.3.1.1 Δενδρόμορφοι ενδομυκορριζικοί μύκητες	13
1.4 Επίδραση ΔΕΜ στον φυτικό μεταβολισμό.....	15
1.4.1 Επίδραση ΔΕΜ στο δευτερογενές μεταβόλωμα	15
1.4.1.1 Επίδραση ΔΕΜ στα τερπένια	16
1.4.1.2 Επίδραση ΔΕΜ στις φαινολικές ενώσεις	18
1.4.1.3 Επίδραση ΔΕΜ στις αζωτούχες ενώσεις.....	20
1.5 Φαρμακευτικά φυτά	20
1.6 Σκοπός πτυχιακής εργασίας	22
2. Υλικά και μέθοδοι.....	23
2.1 Βιολογικό υλικό	23
2.2 Απολύμανση και εκβλάστηση σπόρων.....	23
2.3 Μεταφύτευση φυτών σε γλαστράκια	24
2.4 Εμβολιασμός με ΔΕΜ	24
2.5 Συγκομιδή φυτών	24
2.6 Χρώση ριζών και υπολογισμός ποσοστού αποικισμού	25
2.7 Εκχύλιση	25
2.8 Παραγωγή θρεπτικού PDA.....	26
2.9 Δοκιμασία αναστολής μυκητιακής ανάπτυξης	26
2.10 Κυτταροκαλλιέργειες.....	26
2.10.1 Ξεπάγωμα κυττάρων.....	27
2.10.2 Θρυψινοποίηση.....	27
2.11 Βιοχημικές δοκιμασίες.....	27
2.11.1 Δοκιμασία MTT.....	27
2.11.2 Δοκιμασία λουσιφεράσης/β-γαλακτοζιδάσης	28
2.11.2.1 Μέτρηση λουσιφεράσης.....	30

2.11.2.2 Μέτρηση β-γαλακτοζιδάσης.....	31
2.11.3 Ανοσοαποτύπωμα πρωτεϊνών κατά Western	31
2.11.3.1 Συλλογή και λύση κυττάρων	32
2.11.3.2 Προσδιορισμός ολικής πρωτεϊνικής συγκέντρωσης(Μέθοδος Bradford)32	
2.11.3.3 Ηλεκτροφόρηση SDS-PAGE.....	32
2.11.3.4 Απότύπωση σε μεμβράνη νιτροκυτταρίνης.....	33
2.11.3.5 Blocking.....	33
2.11.3.6 Ανοσοανίχνευση πρωτεϊνών και εμφάνιση σήματος	33
2.12 Ανάλυση αποτελεσμάτων	34
3. Αποτελέσματα.....	35
3.1 Διερεύνηση αντιμυκητιακής δράσης.....	35
3.2 Διερεύνηση αντί-πολλαπλασιαστικής δράσης.....	37
3.3 Διερεύνηση αντιφλεγμονώδους δράσης	37
3.4 Διερεύνηση αποπτωτικής δράσης	39
4. Συζήτηση	40
Βιβλιογραφία	43

ΠΕΡΙΛΗΨΗ

Τα φυτά αποτελούν μια πλούσια πηγή δευτερογενών μεταβολιτών, κάποιοι από τους οποίους εμφανίζουν ιδιαίτερα ενδιαφέρουσες βιολογικές δράσεις και αξιοποιούνται στη φαρμακοβιομηχανία για την αντιμετώπιση ασθενειών που μαστίζουν τους ανθρώπινους πληθυσμούς. Η συμβίωση των φυτών με ωφέλιμους μικροοργανισμούς του εδάφους, όπως τους δενδρόμορφους ενδομυκορριζικούς μύκητες, επάγει ποιοτικές και ποσοτικές τροποποιήσεις στο φυτικό δευτερογενές μεταβόλωμα. Συνεπώς, η μελέτη συμβιωτικών συστημάτων για την βελτιωμένη παραγωγή βιοενεργών ενώσεων αποτελεί ένα αντικείμενο υψηλού ενδιαφέροντος. Σκοπός της παρούσας εργασίας ήταν η διερεύνηση της αντιμυκητιακής, αντί-πολλαπλασιαστικής, αντιφλεγμονώδους και αποπτωτικής δράσης ενός εκχυλίσματος φυτών αποικισμένων με τον δενδρόμορφο ενδομυκορριζικό μύκητα *Rhizophagus irregularis*. Τα αποτελέσματα έδειξαν ειδική αντιμυκητιακή δράση ενάντια σε ένα στέλεχος φυτοπαθογόνου μύκητα, ενισχυμένη αντιφλεγμονώδη και αποπτωτική δράση και μειωμένη αντί-πολλαπλασιαστική δράση σε σύγκριση με εκχύλισμα μη αποικισμένων φυτών.

ABSTRACT

Plants are a valuable source of secondary metabolites, many of which present particularly interesting biological activities and are being used in the pharmaceutical industry to combat human diseases. Plant engagement into symbiotic relationships with microorganisms, like arbuscular mycorrhizal fungi, may cause qualitative and quantitative modification in plant secondary metabolome. Therefore, the study of symbiotic systems as means for an improved production of biopharmaceuticals is of high interest. The aim of this study was to explore the potential antifungal, antiproliferative, anti-inflammatory and apoptotic activity of an extract of plants that have been colonized with the arbuscular mycorrhizal fungus *Rhizophagus irregularis*. The results indicated specific antifungal activity against one plant pathogenic fungus, increased anti-inflammatory and apoptotic activity and decreased antiproliferative activity in comparison to an extract of non-symbiotic plants.

1. ΕΙΣΑΓΩΓΗ

1.1 ΨΥΧΑΝΘΗ ΦΥΤΑ: *LOTUS JAPONICUS*

Η οικογένεια των ψυχανθών αποτελεί την τρίτη μεγαλύτερη οικογένεια αγγειόσπερμων και περιλαμβάνει μεγάλη ποικιλία φυτών (δέντρα, θάμνους, πόες) (Mathesius, 2022). Τα ψυχανθή μπορούν να χαρακτηριστούν ως φυτά «πρωτοπόροι» μιας και είναι ικανά να αναπτύσσονται σε διαφορετικά περιβάλλοντα, αλλά και σε εδάφη με χαμηλά επίπεδα θρεπτικών στοιχείων, χάρη στην ικανότητά τους να αναπτύσσουν συμβιωτικές σχέσεις με μικροοργανισμούς του εδάφους (μύκητες και ριζόβια βακτήρια).

Τα ψυχανθή αποτελούνται από περίπου 18.000 διαφορετικά είδη. Προκειμένου να μελετηθούν, καθιερώθηκαν φυτά μοντέλα, όπως είναι το *Lotus japonicus*, το οποίο αναγνωρίστηκε για πρώτη φορά πριν από πολλούς αιώνες στην Ιαπωνία και σήμερα πολλοί οικότυποί του εντοπίζονται σε ποικίλα περιβάλλοντα (Márquez et al., 2006). Το *L.japonicus* εμφανίζει πολλές ιδιότητες που το καθιστούν ιδανικό για φυτό μοντέλο, όπως είναι το μικρό μέγεθος διπλοειδές γονιδίωμα (περίπου 450 Mb), η γονιδιακή συγγραμμικότητα με άλλα είδη ψυχανθών, ο μικρός χρόνος μεταξύ δύο γενεών, η ικανότητα ανάπτυξης συμβιωτικών σχέσεων με ριζόβια βακτήρια και μυκορριζικούς μύκητες και, τέλος, το πλούσιο μεταβόλωμά του (Stougaard, 2017).

1.2 ΦΥΤΙΚΟΣ ΜΕΤΑΒΟΛΙΣΜΟΣ

1.2.1 Πρωτογενής μεταβολισμός

Οι πρωτογενής μεταβολισμός αναφέρεται σε αναβολικές και καταβολικές διαδικασίες που είναι απαραίτητες στην αναπνοή, την αφομοίωση θρεπτικών, την αύξηση και την ανάπτυξη, διαδικασίες που συμβαίνουν σε κάθε φυτικό κύτταρο και είναι ζωτικής σημασίας για τον πολλαπλασιασμό και την ευζωία του φυτού. Πρωτογενείς μεταβολίτες σε περίσσεια (μονοσακχαρίτες, λιπαρά και οργανικά οξέα) χρησιμοποιούνται ως υποστρώματα του δευτερογενούς μεταβολισμού, και μέσω ενζύμων μεταβολίζονται σε δευτερογενείς μεταβολίτες (Kliebenstein, 2004).

1.2.2 Δευτερογενής μεταβολισμός

Οι δευτερογενείς μεταβολίτες (ΔΜ) είναι ενώσεις, οι οποίες εντοπίζονται σε εξειδικευμένα κύτταρα και δεν είναι απαραίτητες για την επιβίωση μεμονωμένων κυττάρων, αλλά για την επιβίωση του φυτού στο περιβάλλον (Kliebenstein, 2004). Οι ΔΜ δεν συμμετέχουν στον ενεργειακό μεταβολισμό και στις αναβολικές/καταβολικές διεργασίες (Wink, 2003), αλλά παίζουν πολύ σημαντικό ρόλο στις αλληλεπιδράσεις φυτού- περιβάλλοντος (Erb et al., 2020), καθώς συμμετέχουν

στην άμυνα του φυτού ενάντια σε βιοτικούς και αβιοτικούς παράγοντες καταπόνησης και στην αναπαραγωγή, προσελκύοντας επικονιαστές και διαμοιραστές σπόρων (Márquez et al., 2006).

Παράγονται σε εξειδικευμένους κυτταρικούς τύπους, ενώ όσα όργανα είναι υπεύθυνα για την βιωσιμότητα και την αναπαραγωγή παράγουν μεγαλύτερες ποσότητες ΔΜ, καθώς συνήθως εντοπίζονται σε χαμηλές συγκεντρώσεις στα φυτά (Twaij et al., 2022). Οι συγκεντρώσεις τους επηρεάζονται από περιβαλλοντικούς αβιοτικούς παράγοντες (θερμοκρασία, ξηρασία, ακτινοβολία UV) και βιοτικούς παράγοντες (επιθέσεις εντόμων/φυτοφάγων) (Yeshi et al., 2022).

Πρόκειται για ουσίες χαμηλού μοριακού βάρους (μικρότερο των 3000da) (Twaij et al., 2022), οι οποίες εμφανίζουν μεγάλη δομική πολυπλοκότητα και ποικιλία με ιστοειδικό ή οργανοειδικό τρόπο (Rispaill et al., 2005). Μέχρι σήμερα έχουν αναγνωριστεί περισσότεροι από 200.000 ΔΜ (Yeshi et al., 2022). Ανάλογα με το βιοσυνθετικό τους μονοπάτι διακρίνονται σε 3 κατηγορίες:

1. Φαινολικές ενώσεις: παράγονται από το μονοπάτι του σικιμικού οξέος
2. Τερπενοειδή: παράγονται από το μονοπάτι του μεβαλονικού οξέος
3. Αζωτούχες ενώσεις: παράγονται από τον TCA κύκλο (κύκλος του Krebs) (Jan et al., 2021)

1.2.2.1. Φαινολικές ενώσεις

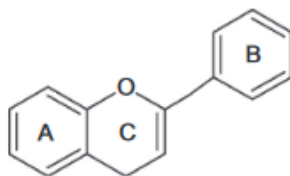
Βρίσκονται σε μεγάλη αφθονία στα φυτά και συμπεριλαμβάνουν περισσότερες από 8.000 ενώσεις. Η βασική δομή των φαινολικών ενώσεων περιλαμβάνει έναν αρωματικό δακτύλιο, που περιέχει έναν ή περισσότερους υποκαταστάτες υδροξυλίου (Vuolo et al., 2019). Οι κατηγορίες των φαινολικών ενώσεων συνοψίζονται στον Πίνακα 1.

Class	Structure
Simple phenolics, benzoquinones	C6
Hydroxybenzoic acids	C6-C1
Hydroxycinnamic acids, phenylpropanoids	C6-C3
Acetophenones, phenylacetic acids	C6-C2
Xanthenes	C6-C1-C6
Stilbenes, anthraquinones	C6-C2-C6
Flavonoids, isoflavonoids	C6-C3-C6
Lignans, neolignans	(C6-C3) ₂
Lignins	(C6-C3) _n
Condensed tannins (proanthocyanidins or flavolans)	(C6-C3-C6) _n

Πίνακας 1: Κατηγορίες φαινολικών ενώσεων (Vuolo et al., 2019)

Τα φλαβονοειδή (Εικόνα 1) αποτελούν τη μεγαλύτερη κατηγορία φαινολικών ενώσεων. Συνηθέστερα στα πράσινα φυτά, εντοπίζονται σε φύλλα, άνθη, βλαστούς και ρίζες. Έχουν έναν σκελετό 15 ατόμων άνθρακα (C6-C3-C6), και ανάλογα με τους υποκαταστάτες, τον βαθμό κορεσμού και τη διάταξη του βασικού σκελετού διακρίνονται σε 7 υποκατηγορίες:

- (a) Φλαβόνες
- (b) Φλαβονόλες
- (c) Φλαβανόνες
- (d) Ισοβλαβονοειδή
- (e) Κατεχίνες
- (f) Ανθοκυανίνες (Vuolo et al., 2019, Yeshi et al., 2022)



Εικόνα 1: Βασική δομή φλαβονοειδούς μορίου (Vuolo et al., 2019)

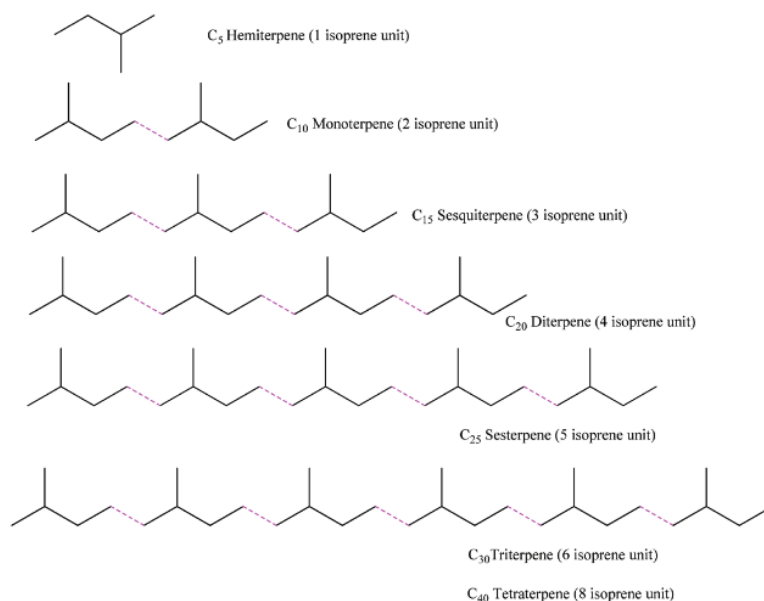
Τα φλαβονοειδή έχουν ποικίλες δράσεις:

1. Συμμετοχή στον χρωματισμό άνθεων και σπόρων (ανθοκυανίνες) (Márquez et al., 2006)
2. Συμμετοχή στην ανάπτυξη του φυτού μέσω ρύθμισης της πολικής μεταφοράς αυξίνης (φαίνεται να δρουν ως αναστολείς της πολικής μεταφοράς αυξίνης, ενισχύοντας έτσι την τοπική συσσώρευση της *in planta*) (Peer et al., 2007)
3. Ανθεκτικότητα ενάντια σε αβιοτικούς παράγοντες καταπόνησης, όπως ακτινοβολία UV (μπορούν να συνδέουν ελεύθερες ρίζες και να την φιλτράρουν) και ακραίες θερμοκρασίες
4. Δράση ως χηλικές ενώσεις και δέσμευση μετάλλων, όπως ο σίδηρος, αποτρέποντας αντιδράσεις Fenton (Yeshi et al., 2022)
5. Αντιοξειδωτική δράση-μείωση συσσώρευσης ROS (Οι ROS σε χαμηλά επίπεδα λειτουργούν ως σηματοδοτικά μόρια για την ανάπτυξη και διαφοροποίηση της γύρης, αλλά σε υψηλά επίπεδα είναι κυτταροτοξικά. Τα φλαβονοειδή, επειδή έχουν πολλές υδροξυλομάδες, μπορούν να δέχονται ηλεκτρόνια και συνεπώς να δρουν ως αντιοξειδωτικά, συμβάλλοντας στην ομοιοστάση των ROS και συνεπώς στην αναπαραγωγή) (Muhlemann et al., 2018)
6. Άμυνα ενάντια σε βιοτικούς παράγοντες, όπως επιθέσεις από θηρευτές και παθογόνα
7. Προσέλκυση φυτοφάγων/φρουτοφάγων ζώων, προάγοντας την διασπορά των σπόρων (Yeshi et al., 2022)
8. Έκκριση στο έδαφος για επικοινωνία με άλλα φυτά και χρήσιμους μικροοργανισμούς (επαγωγή έκφρασης pod γονιδίων στα ριζόβια, διέγερση σχηματισμού μυκόρριζας) (Ranner et al., 2021)

1.2.2.2. Τερπένια

Περιλαμβάνουν τουλάχιστον 35.000 ενώσεις (Twaij et al., 2022). Ο κύριος σκελετός τους αποτελείται από μονάδες ισοπρενίου (C_5H_8). Τα τερπένια έχουν μόνο μονάδες ισοπρενίου [είναι απλοί υδρογονάνθρακες (Perveen, 2018)] (Εικόνα 2), ενώ τα τερπενοειδή έχουν και άλλες λειτουργικές ομάδες, όπως κετόνες. Ανάλογα τη δομή τους μπορούν να διακριθούν στα:

1. Αλειφατικά τερπενοειδή
2. Κυκλικά τερπενοειδή (Yeshi et al., 2022)



Εικόνα 2: Ταξινόμηση τερπενοειδών βάσει του αριθμού ισοπρενίων (Perveen, 2018)

Οι δράσεις των τερπενίων είναι:

1. Προσέλκυση επικονιαστών
2. Δράση ως φυτοορμόνες (πχ οι γιββεριλλίνες είναι διτερπένια), συμμετέχουν στην φυτική ανάπτυξη και την απόκριση σε καταπονήσεις (Ranner et al., 2023)
3. Φωτοσυνθετικές χρωστικές (πχ καροτενοειδή)
4. Άμεση προστασία του φυτού (πχ απελευθέρωση φυτοαλεξινών μετά από επιθέσεις παθογόνων)
5. Έμμεση προστασία, μέσω παραγωγής μείγματος πτητικών οργανικών ουσιών (Volatile Organic Compounds, VOCs) για απώθηση θηρευτών φυτοφάγων. Τα VOCs περιλαμβάνουν τερπενοειδή, αλκάνια, αλκένια, καρβονύλια, εσθέρες, αιθέρες και οξέα.
6. Αντιοξειδωτικές ιδιότητες
7. Φωτοπροστασία (ειδικά τα τετρατερπένια)
8. Δράση ως φυτοαντισιπίνες (phytoanticipins), ενάντια σε επιθέσεις μικροοργανισμών (Yeshi et al., 2022)

1.2.2.3 Αζωτούχες ενώσεις

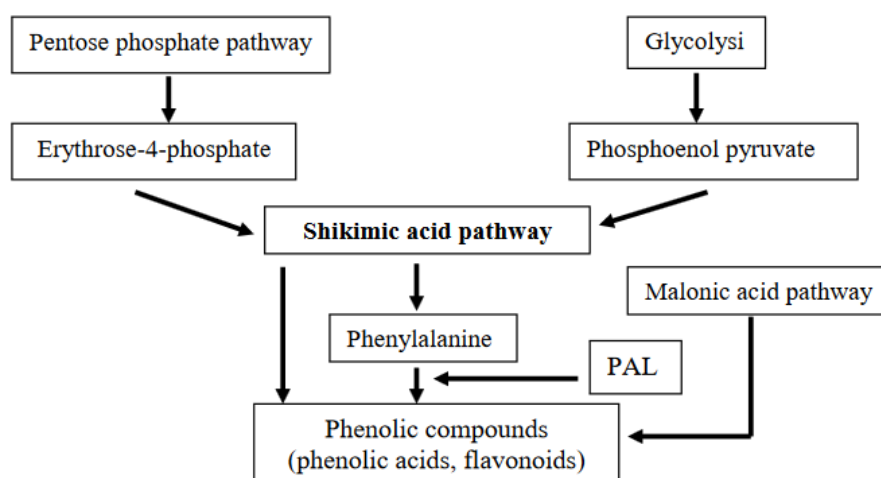
Συντίθενται από κοινά αμινοξέα και διακρίνονται σε 4 κατηγορίες:

1. Αλκαλοειδή: έχουν ένα ή παραπάνω άτομα αζώτου. Έχουν απομονωθεί πάνω από 20.000 αλκαλοειδή και ο κύριος ρόλος τους είναι αμυντικός, ενάντια σε έντομα και φυτοφάγα ζώα (Yeshi et al., 2022). Περιλαμβάνουν γνωστές ενώσεις όπως είναι η καφεΐνη, η νικοτίνη, η κοκαΐνη και η μορφίνη, οι οποίες είναι γνωστές για τις αγχολυτικές, αναλγητικές και παραισθησιογόνες δράσεις τους και συχνά επιδρούν στο κεντρικό νευρικό σύστημα. Το 50% των φαρμακευτικών ουσιών από φυτά είναι αλκαλοειδή (Twaij et al., 2022).

2. Κυανογόνοι γλυκοζίτες: Περιέχουν νιτρίλια και κατά την ενζυματική διάσπασή τους παράγουν κυάνιο (Singh, 2018). Υπάρχουν περίπου 100 γνωστές ενώσεις. Ο ρόλος τους είναι κυρίως αμυντικός ενάντια σε έντομα και άλλους φυτοφάγους οργανισμούς και γι' αυτό σε νεαρά φύλλα και αναπαραγωγικούς ιστούς εντοπίζονται σε υψηλές συγκεντρώσεις, κάτι που τους καθιστά τοξικούς (Yeshi et al., 2022).
3. Γλυκοζινολικά: Περιέχουν θείο και άζωτο. Έχουν κυρίως αμυντικό ρόλο ενάντια σε φυτοφάγα ζώα και παθογόνα (Singh, 2018). Επιπλέον συμμετέχουν στην ρύθμιση των στομάτων και στην ανοχή στην ξηρασία (Salehin et al., 2019), καθώς και στη ρύθμιση της ανάπτυξης, μέσω της ρύθμισης της αυξίνης (Erb et al., 2020).
4. Μη πρωτεϊνικά αμινοξέα: Είναι αμινοξέα τα οποία δεν συμμετέχουν στη σύνθεση πρωτεϊνών. Αντιθέτως υπάρχουν σε ελεύθερη μορφή και λειτουργούν ως αμυντικά μόρια. Επιπλέον, επειδή πολλά από αυτά έχουν παρόμοια δομή και ιδιότητες με τα κοινά αμινοξέα, δρουν ως μεταβολικοί αναστολείς ή ανταγωνιστές. Έχουν απομονωθεί περίπου 900 ενώσεις (Singh, 2018).

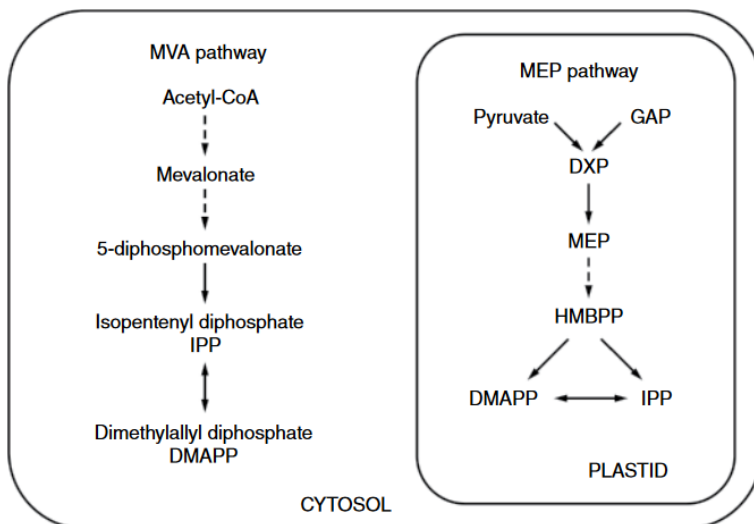
1.2.2.4 Βιοσύνθεση δευτερογενών μεταβολιτών

Η βιοσύνθεση των φαινολικών λαμβάνει χώρα στα πλαστίδια (Mir et al., 2013) και γίνεται μέσω δύο μονοπατιών, του σικιμικού και του μαλονικού (Εικόνα 3), αν και το τελευταίο δεν χρήζει ιδιαίτερης σημασίας στα ανώτερα φυτά, όπως τα ψυχανθή (Saltveit, 2017). Από το μονοπάτι του σικιμικού παράγεται φαινυλαλανίνη. Οι φαινολικές ενώσεις συντίθενται από την φαινυλαλανίνη, η οποία μέσω του ενζύμου αμμώνιο-λυσάση της φαινυλαλανίνης (Phenylalanine Ammonia Lyase, PAL) μετατρέπεται σε κινναμικό οξύ. Η PAL αποτελεί ένα πολύ καλά μελετημένο ένζυμο, καθώς συνδέει τον πρωτογενή με τον δευτερογενή μεταβολισμό, καταλύοντας ένα σημαντικό ρυθμιστικό βήμα για την παραγωγή των φαινολών. Στη συνέχεια ακολουθεί το μονοπάτι των φαινυλπροπανοειδών, το οποίο καταλήγει στη σύνθεση των φαινολικών ενώσεων (όπως τα φλαβονοειδή και τα φαινολικά οξέα) (Rehan, 2021, Saltveit, 2017).

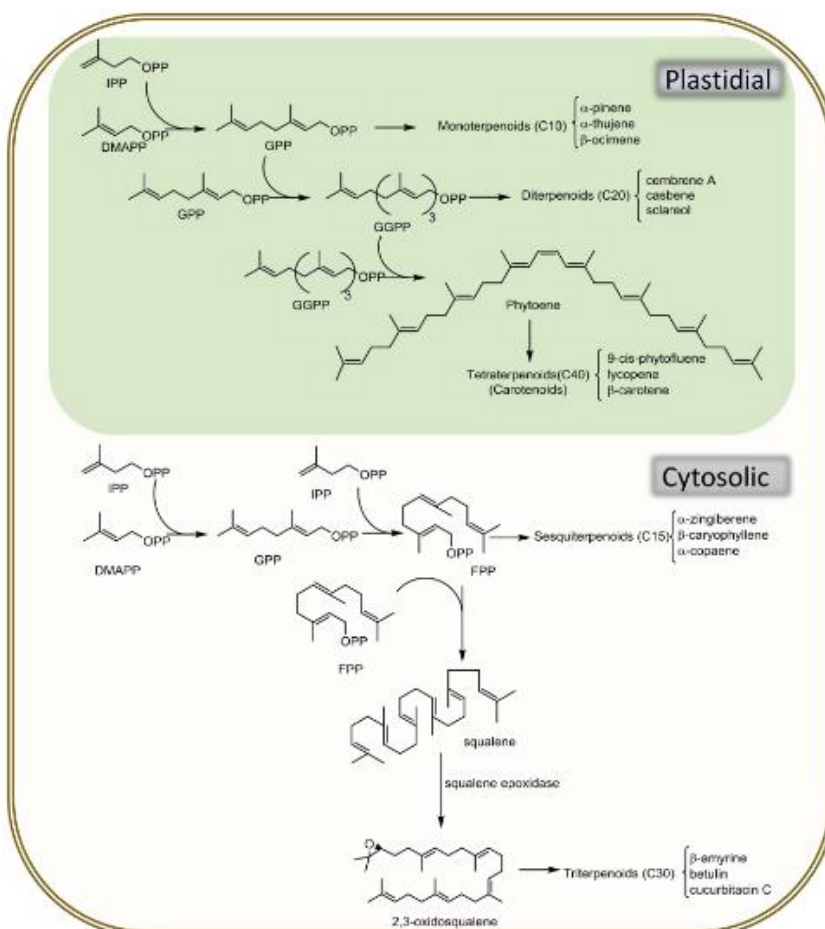


Εικόνα 3.: Σχηματική αναπαράσταση βιοσυνθετικής οδού φαινυλπροπανοειδών (Ghasemzadeh, 2011)

Η βιοσύνθεση των τερπενοειδών, συμπεριλαμβανομένων και των καροτενοειδών πραγματοποιείται μέσω δύο οδών. Στο κυτταρόπλασμα η βιοσύνθεση γίνεται μέσω του μονοπατιού του μεβαλονικού (Mevalonate Pathway, MVA) ενώ στα πλαστίδια ακολουθείται το μονοπάτι MEP (2-C-methyl-D-erythritol 4-phosphate Pathway) (Εικόνες 4 και 5). Μέσω και των δύο βιοσυνθετικών οδών παράγονται τα ίδια μόρια, που είναι το διφωσφορικό ισοπεντενύλιο (Isopentenyl Diphosphate, IPP) και το διφωσφορικό διμεθαλλύλιο (Dimethylallyl Diphosphate, DMAPP), τα οποία είναι ισομερή ισοπρενίου, έχουν 5 άτομα άνθρακα και αποτελούν τις πρόδρομες ενώσεις όλων των τερπενοειδών (Baranski et al., 2016).



Εικόνα 4.: Σχηματική απεικόνιση MVA και MEP μονοπατιών στα φυτικά κύτταρα (Baranski et al., 2016)

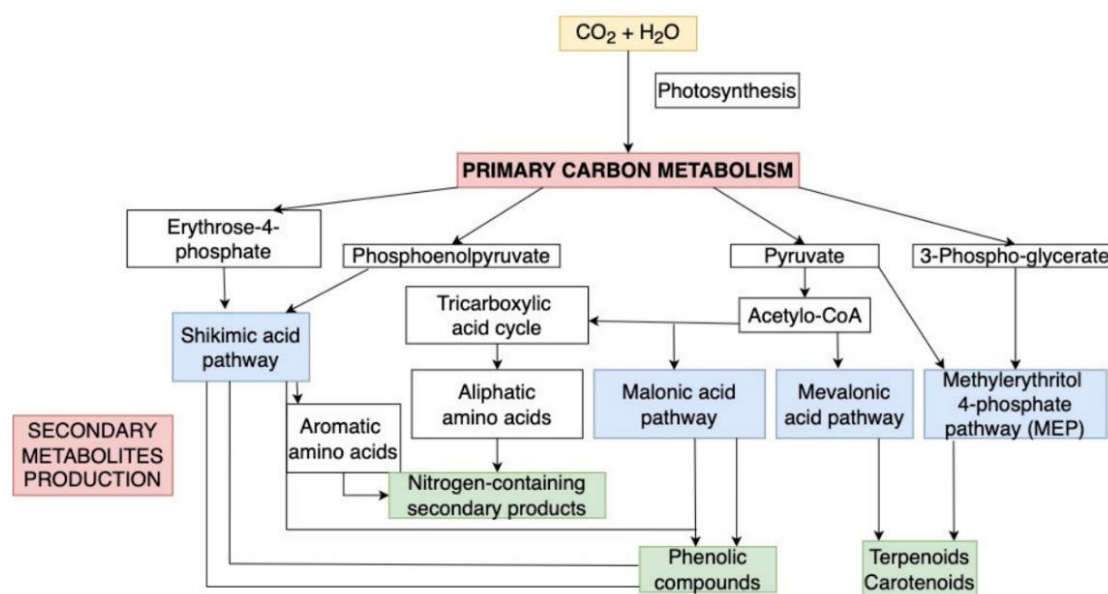


Εικόνα 5: Σχηματική αναπαράσταση βιοσυνθετικών οδών καροτενοειδών (Beyraghdar Kashkooli et al., 2018)

Οι αζωτούχοι δευτερογενείς μεταβολίτες βιοσυντίθενται από αμινοξέα. Τα αλκαλοειδή, ανάλογα με τα μόρια από τα οποία προκύπτουν, διακρίνονται σε 7 κατηγορίες:

- Αλκαλοειδή από την ορνιθίνη (πυρολιδίνες, τροπάνια, πυρολιζιδίνες)
- Αλκαλοειδή από τη λυσίνη (πιπεριδίνες, κινολιζιδίνες, ινδολιζιδίνες)
- Αλκαλοειδή από το νικοτινικό οξύ (πυριδίνες)
- Αλκαλοειδή από την τυροσίνη (τετραϋδροισοκινολίνες, τροποποιημένες ισοκινολίνες, μορφίνες, οπιοειδή)
- Αλκαλοειδή από τη τρυπτοφάνη (ινδόλια, καρβολίνια, κινολίνες)
- Αλκαλοειδή από το ανθρανιλικό οξύ (κινολίνες, ακριδίνες)
- Αλκαλοειδή από την ιστιδίνη (ιμιδαζόλια) (Dewick, 2001)

Οι βιοσυνθετικοί οδοί όλων των δευτερογενών μεταβολιτών συνοψίζονται στην παρακάτω εικόνα:



Εικόνα 6.: Σχηματική απεικόνιση βιοσυνθετικών οδών δευτερογενών μεταβολιτών (Nawrot-Chorabik et al., 2022)

1.3 ΣΥΜΒΙΩΤΙΚΕΣ ΣΧΕΣΕΙΣ ΦΥΤΩΝ

Οι αλληλεπιδράσεις των φυτών με μικροοργανισμούς του εδάφους συμβαίνουν ήδη από τα πρώτα στάδια ζωής στην Γη (Lyu et al., 2021). Μπορεί να είναι επιζήμιες για το φυτό, όπως για παράδειγμα μια μόλυνση από παθογόνο, κάτι που δρα ανασταλτικά στην επιβίωση. Όμως μεταξύ φυτών και μικροοργανισμών αναπτύσσονται και αμοιβαίως επωφελείς σχέσεις, οι οποίες ονομάζονται συμβιωτικές (Moran, 2006). Τα φυτά αναπτύσσουν τέτοιες σχέσεις τόσο με βακτήρια όσο και με μύκητες και μέσω αυτών φαίνεται να αποκομίζουν αυξημένη αντοχή σε βιοτικές και αβιοτικές καταπονήσεις και αυξημένη πρόσληψη θρεπτικών στοιχείων (Tsiknia et al., 2020).

1.3.1 Μυκορριζικοί μύκητες

Τα περισσότερα φυτά στη φύση αναπτύσσονται συμβιωτικές σχέσεις με μύκητες του εδάφους, οι οποίοι αποκαλούνται μυκορριζικοί μύκητες. Οι μυκορριζικοί μύκητες πρέπει πάντοτε να «συσχετίζονται» με ρίζες ανώτερων φυτών (περισσότερα από το 90% των φυτικών ειδών, συμπεριλαμβανομένων δασικών δέντρων, γρασιδιών και καλλιεργούμενων φυτών συμβιώνουν με μυκορριζικούς μύκητες). Και τα δύο μέλη επωφελούνται από την συμβίωση: οι μύκητες βελτιώνουν την παροχή θρεπτικών των φυτών, επηρεάζοντας την απορρόφηση θρεπτικών από το έδαφος, την απορρόφηση νερού, την αύξηση και την αντοχή σε ασθένειες και σε αντάλλαγμα το φυτό είναι απαραίτητο για την αύξηση και την αναπαραγωγή του μύκητα (Bonfante et al., 2010). Οι συμβιωτικές σχέσεις φυτών-μυκορριζικών μυκήτων εκτιμάται πως εμφανίστηκαν 450 με 530 εκατομμύρια χρόνια πριν (Lyu et al., 2021) και παρατηρούνται σε αλπικές και βόρειες ζώνες, λιβάδια, τροπικά δάση και αγροτικές καλλιέργειες. Οι μυκορριζες διακρίνονται σε εκτομυκορριζες και ενδομυκορριζες, ανάλογα με το αν ο μύκητας αποικίζει εκτός ή εντός των ριζικών κυττάρων. Οι ενδομυκορριζες διακρίνονται σε 3 υπό-κατηγορίες: ερικοειδείς μυκορριζες, ορχιδοειδείς μυκορριζες, και δενδρόμορφοι ενδομυκορριζικοί μύκητες (Bonfante, 2010).

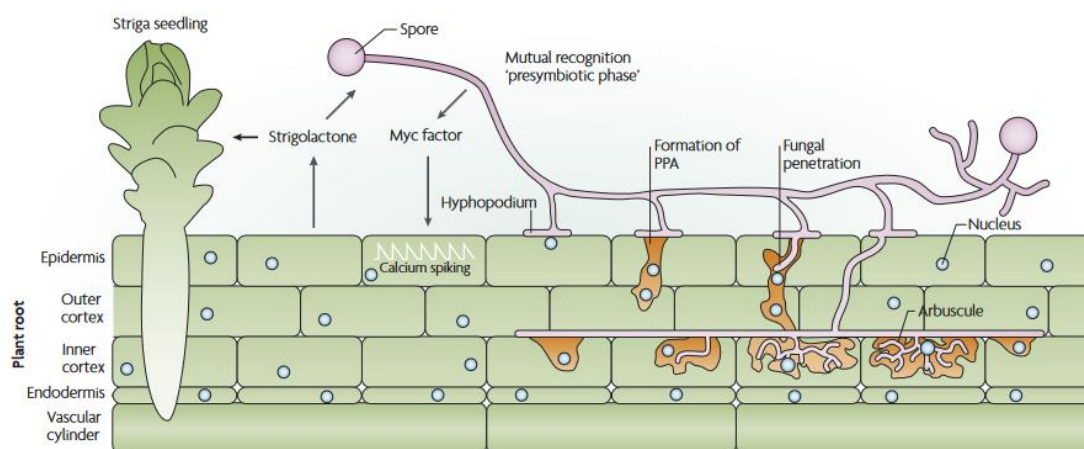
1.3.1.1 Δενδρόμορφοι ενδομυκορριζικοί μύκητες

Οι δενδρόμορφοι ενδομυκορριζικοί μύκητες (DEM) εντοπίστηκαν και περιγράφηκαν ήδη από τον 19^ο αιώνα. Είναι οι πιο κοινοί συμβιώτες των φυτών, καθώς έχουν συσχετιστεί με περισσότερα από το 80% των σύγχρονων φυτών ξηράς. Όλοι οι DEM ανήκουν στο φύλο *Glomeromycota*. Οι ξενιστές των DEM μπορούν να επιβιώσουν και χωρίς αυτούς, αλλά η συμβιωτική σχέση φαίνεται να βελτιώνει την ολική υγεία του φυτού. Αντιθέτως, οι DEM, ως υποχρεωτικοί συμβιώτες, δεν μπορούν να καλλιεργηθούν απουσία ξενιστή, λόγω της αδυναμίας τους να απορροφήσουν υδρογονάνθρακες έξω από τα ριζικά κύτταρα.

Προκειμένου να ξεκινήσει η συμβίωση, το φυτό απελευθερώνει στο έδαφος στριγγολακτόνες, οι οποίες λειτουργούν ως σηματοδοτικά μόρια, διεγείροντας τον μεταβολισμό και την διακλάδωση των DEM (Akiyama et al., 2005). Ταυτόχρονα ο μύκητας απελευθερώνει τα δικά του σηματοδοτικά μόρια, τους παράγοντες Myc, οι οποίοι είναι ολιγοσακχαρίτες χιτίνης και λιποχιτοολιγοσακχαρίτες (Lyu et al., 2021). Οι Myc ανιχνεύονται από το φυτικό κύτταρο και επάγουν απότομες ταλαντώσεις ασβεστίου. Το ασβέστιο λειτουργεί ως σηματοδοτικό μόριο και μέσω της ασβέστιο-καλμοδουλινό-εξαρτώμενης πρωτεϊνικής κινάσης (CCaMK) επάγει την έκφραση γονιδίων ειδικών για την συμβίωση με DEM (Parniske, 2008).

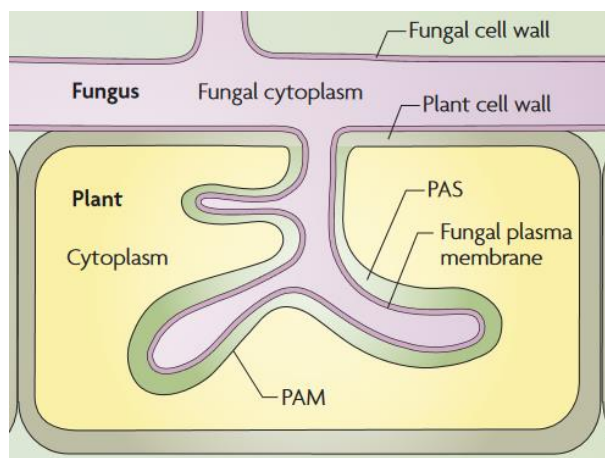
Όταν οι μυκηλιακές υφές συναντήσουν τις ρίζες του φυτού επιμηκύνονται στην επιφάνειά του, δημιουργούν μικρές διακλαδώσεις, τα λεγόμενα υποπόδια, και προσκολλώνται στην ριζική επιδερμίδα διεγείροντας την παραγωγή του προδιεισδυτικού μορίου (Prepenetration Apparatus, PPA) (Bonfante et al., 2010). Το PPA είναι μια υποκυτταρική δομή, η οποία προκαθορίζει την διαδρομή που θα ακολουθήσει ο μύκητας στο εσωτερικό των ριζικών κυττάρων. Αποτελείται από κυτταροσκελετικούς μικροσωληνίσκους και μικρονημάτια και περιβάλλεται από πυκνό ενδοπλασματικό δίκτυο. Μόνο μόλις ολοκληρωθεί η σύνθεση του PPA επιτρέπεται η είσοδος του

μύκητα στο φυτό (Parniske, 2008) και ξεκινάει ο σχηματισμός ενδοκυτταρικών δενδροειδών δομών, που ονομάζονται θύσανοι (Bonfante et al., 2010) (Εικόνα 7).



Εικόνα 7: Σχηματική απεικόνιση του αποικισμού των ριζών από ΔΕΜ (Parniske, 2008)

Οι θύσανοι του μύκητα (Εικόνα 8) δεν έρχονται σε επαφή με το φυτικό κυτταρόπλασμα, διότι τους περιβάλλει η λεγόμενη περιδενδροειδής μεμβράνη (Periarbuscular membrane, PAM), η οποία παράγεται από το φυτό. Η ανταλλαγή θρεπτικών και μηνυμάτων μεταξύ φυτού-μύκητα γίνεται μέσω της επιφάνειας διεπαφής τους, η οποία συμπεριλαμβάνει την PAM, την μυκητιακή πλασματική μεμβράνη και τον περιδενδροειδή χώρο (Periarbuscular Space, PAS) ανάμεσά τους (Parniske, 2008).



Εικόνα 8: Η δομή του θυσάνου στο εσωτερικό του φυτικού κυττάρου (Parniske, 2008)

Η συμβίωση των φυτών με ΔΕΜ έχει μεγάλο όφελος για το φυτό. Μερικές από τις θετικές επιδράσεις είναι:

1. Αύξηση της φυτικής βιομάζας (Abbott et al., 1978, Feddermann et al., 2007)
2. Αυξημένη πρόσληψη θρεπτικών – κυρίως φωσφόρου (Smith et al., 2009, Zhu et al., 2017) αλλά και αζώτου (Govindarajulu et al., 2005), ψευδαργύρου (Lambert et al., 1979, Zhu et al., 2017) και σιδήρου (Khaliq et al., 2022)
3. Προστασία ενάντια στα βαρέα μέταλλα (Khaliq et al., 2022)

4. Βελτιωμένη ανοχή σε αβιοτικές καταπονήσεις, όπως ξηρασία, αλατότητα και ακραίες θερμοκρασίες (Zhu et al., 2017, Estrada et al., 2013)
5. Βελτιωμένη ανοχή σε βιοτικές καταπονήσεις, όπως μολύνσεις από παθογόνα και επιθέσεις από έντομα και φυτοφάγους οργανισμούς (Loo et al., 2022, Dowarah et al., 2021)

Όμως και ο μύκητας επωφελείται της συμβίωσης, μιας και το φυτό τον προμηθεύει με υδρογονάνθρακες, με τη μορφή σακχάρων (Wang et al., 2017) και λιπιδίων (Keymer et al., 2017).

Οι ΔΕΜ δρουν κυρίως τροποποιώντας το περιβάλλον της ριζόσφαιρας (συμπεριλαμβανομένου του μικροβιώματος), την γονιδιακή έκφραση, την φυσιολογία και τον μεταβολισμό των φυτών (Tsiknia et al., 2020).

1.4 ΕΠΙΔΡΑΣΗ ΔΕΜ ΣΤΟΝ ΦΥΤΙΚΟ ΜΕΤΑΒΟΛΙΣΜΟ

Τα οφέλη της συμβίωσης με ΔΕΜ οφείλονται μεταξύ άλλων στην τροποποίηση των μεταβολικών μονοπατιών του φυτού, με αποτέλεσμα αλλαγές στο πρωτογενές αλλά και στο δευτερογενές μεταβόλωμα.

Όσον αφορά τους πρωτογενείς μεταβολίτες, μετά από αποικισμό με ΔΕΜ έχει παρατηρηθεί αύξηση των επιπέδων των σακχάρων στα φυτικά κύτταρα. Αυτό είναι αναμενόμενο, μιας και η συμβιωτική σχέση φυτού-ΔΕΜ εξαρτάται άμεσα από τα επίπεδα άνθρακα. Όσο περισσότερος άνθρακας, τόσο «ισχυρότερη» η συμβιωτική σχέση. Επιπλέον, η αυξημένη πρόσληψη νερού και θρεπτικών από το φυτό βελτιώνει την φωτοσυνθετική του ικανότητα, κάτι που οδηγεί σε αυξημένα επίπεδα σακχάρων. Αυξημένα βρέθηκαν και τα επίπεδα οργανικών και λιπαρών οξέων ενώ οι αυξομειώσεις στα επίπεδα των αμινοξέων που παρατηρήθηκαν διέφεραν μεταξύ των διαφορετικών ειδών ΔΕΜ και φυτών ενώ ρόλο φάνηκε να παίζουν και οι περιβαλλοντικές συνθήκες (Amani Machiani et al., 2022).

1.4.1 Επίδραση ΔΕΜ στο δευτερογενές μεταβόλωμα

Στη συμβίωση ΔΕΜ-φυτών, οι δευτερογενείς μεταβολίτες διαμεσολαβούν των αλληλεπιδράσεών τους σε όλα τα στάδια του αποικισμού. Ήδη από το προσυμβιωτικό στάδιο, απελευθερώνονται από το φυτό δευτερογενείς μεταβολίτες, και πιο συγκεκριμένα σεσκιτερπενοειδείς λακτόνες, που ονομάζονται στριγγολακτόνες, οι οποίες δρουν ως σηματοδοτικά μόρια, που επάγουν τον αποικισμό (Kaur et al., 2020). Στη συνέχεια ακολουθεί ένας μοριακός διάλογος μεταξύ ΔΕΜ-φυτού, ο οποίος καταλήγει στην καταστολή της φυτικής άμυνας και τον αποικισμό των ριζών από τον μύκητα (Kloppholz et al., 2011, Kaur et al., 2020).

Όπως αναφέρθηκε προηγουμένως, οι ΔΕΜ επάγουν την προστασία των φυτών ενάντια σε βιοτικές και αβιοτικές καταπονήσεις. Φαίνεται να ενισχύουν τόσο την ολική φυτική άμυνα (Systemic Acquired Resistance, SAR), αλλά και την επαγόμενη άμυνα (Induced Systemic Resistance, ISR). Αυτό επιτυγχάνεται μέσω της τροποποίησης μεταβολικών μονοπατιών του φυτού,

όπως είναι το μονοπάτι βιοσύνθεσης των καροτενοειδών, των φαινυλοπροπανοειδών και τα βιοσυνθετικά μονοπάτια των αλκαλοειδών (Kaur et al., 2020). Ο αποικισμός των ριζών από ΔΕΜ επηρεάζει τη συσσώρευση των δευτερογενών μεταβολιτών όχι μόνο στην ίδια τη ρίζα αλλά και σε άλλα μέρη του φυτού, όπως στα φύλλα (Copetta et al., 2007). Για παράδειγμα φύλλα φυτών τομάτας εμβολιασμένα με τον ΔΕΜ *Glomus intraradices*, εμφάνισαν αυξημένα επίπεδα της αντιμικροβιακής λιγνάνης yatein, σε σύγκριση με μη αποικισμένα φυτά, με αποτέλεσμα τα αποικισμένα φυτά να παρουσιάζουν υψηλότερη αντοχή μετά από μόλυνση με τον φυτοπαθογόνο μύκητα *Botrytis cinerea* (Sanmartín et al., 2020).

1.4.1.1 Επίδραση ΔΕΜ στα τερπένια

Τα τερπένια αποτελούν ενώσεις «κλειδιά» στην συμβιωτική σχέση φυτών-ΔΕΜ. Αρκετές ενώσεις που προέρχονται από το μονοπάτι βιοσύνθεσης των τερπενίων αποτελούν βασικούς ρυθμιστές της συμβίωσης του φυτού με ΔΕΜ (Kaur et al., 2020). Εκτός από τις στριγγολακτόνες που ήδη αναφέρθηκαν, τέτοιες ενώσεις είναι οι γιββεριλλίνες (Gibberellins, GA), μια ομάδα διτερπενοειδών φυτοορμονών, οι οποίες δρουν ως αρνητικοί ρυθμιστές της ανάπτυξης των μυκητιακών θυσάνων κατά τον αποικισμό, αλλά επάγουν την διακλάδωση των μυκητιακών υφών (Takeda et al., 2015). Ανταγωνιστικά με τις GA, δρα το αμπισισικό οξύ (Abscisic Acid, ABA), το οποίο είναι μια αποκαροτενοειδής φυτοορμόνη, που προάγει την ανάπτυξη των θυσάνων (Walter et al., 2015, Martín-Rodríguez et al., 2016, Olson, 2020).

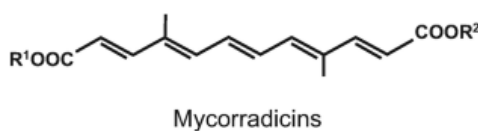
Αφού εδραιωθεί η συμβιωτική σχέση, οι ΔΕΜ επηρεάζουν τη βιοσυνθετική οδό των καροτενοειδών, επάγοντας την παραγωγή αποκαροτενοειδών ενώσεων [δηλ. ενώσεων που προέρχονται από την διάσπαση των καροτενοειδών (Hou et al., 2016)].

Υπάρχουν πολλές ενδείξεις για την ενεργοποίηση αυτής της βιοσυνθετικής οδού στις μυκόρριζες. Αρχικά έχει παρατηρηθεί ότι τα επίπεδα των ενζύμων DXS (1-deoxy-D-xylulose 5-phosphate Synthase) και DXR (1-deoxy-D-xylulose 5-phosphate Reductoisomerase), που συμμετέχουν στο MEP μονοπάτι αυξάνονται μετά από τον αποικισμό με ΔΕΜ στα ριζικά κύτταρα (Strack et al., 2006). Μελέτες έδειξαν ότι σε φυτά *Nicotiana tabacum* αποικισμένα με *G. intraradices* τα μεταγραφικά επίπεδα του ενζύμου PDS (Phytoene Desaturase) ήταν αυξημένα στα ριζικά κύτταρα και συγκεκριμένα σε αυτά που είχαν θυσάνους. Και αυτό το ένζυμο συμμετέχει στη βιοσύνθεση των καροτενοειδών, καταλύοντας την οξείδωση του φυτοενίου σε f-καροτένιο. Η ενισχυμένη δράση του PDS σε φυτά με ΔΕΜ, επιβεβαιώνεται και μέσω της αναστολής της δράσης του, η οποία οδηγεί σε μεγαλύτερη συσσώρευση φυτοενίου στις μυκόρριζες σε σχέση με τις ρίζες αγρίου τύπου φυτών (Fester et al., 2002a).

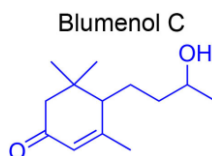
Τα παραπάνω ένζυμα δρουν στα πλαστίδια. Έχει παρατηρηθεί ότι τα αποικισμένα με ΔΕΜ ριζικά κύτταρα εμφανίζουν μεγάλα πλαστιδιακά δίκτυα, των οποίων ο σχηματισμός είναι βέλτιστος, κατά την πλήρη ανάπτυξη του θυσάνου και η αποσύνθεσή τους είναι σε άμεση συσχέτιση με την αποσύνθεση των θυσάνων (Fester et al., 2001). Εφόσον η μεταγραφική δραστηριότητα του PDS εντοπίζεται συγκεκριμένα στα αποικισμένα κύτταρα, συμπεραίνουμε ότι η βιοσύνθεση των καροτενοειδών πραγματοποιείται σε αυτά τα πλαστιδιακά δίκτυα (Fester et al., 2002a).

Τα αποκαροτενοειδή παράγονται από διοξυγενάσες διάσπασης καροτενοειδών (Carotenoid Cleavage Dioxygenases, CCDs). Τόσο η CCD7, όσο και η CCD1, συμμετέχουν στην παραγωγή των αποκαροτενοειδών που συσσωρεύονται ειδικά κατά τον αποικισμό από ΔΕΜ. Οι ενώσεις αυτές είναι παράγωγα της κυκλικής C₁₃ α-ινόλης (παλαιότερα αναφερόταν ως κυκλοεξανόνη (López-Ráez et al., 2015) και της Mycorradicin (Kaur et al., 2020) (Εικόνα 9) και σχηματίζουν το λεγόμενο σύμπλοκο κίτρινων χρωστικών, το οποίο προσδίδει ένα χαρακτηριστικό κίτρινο χρώμα στις ρίζες φυτών αποικισμένων με ΔΕΜ (López-Ráez., 2015). Αυτός ο κίτρινος χρωματισμός είχε εντοπιστεί ήδη από το 1924 και 70 χρόνια μετά, έγινε η πρώτη απομόνωση και αναγνώριση μιας από τις υπεύθυνες ουσίες, της 4,9-Dimethyl-2,4,6,8,10-dodecapentaenedioic acid, ή αλλιώς mycorradicin (Strack et al., 2006). Η ένωση αυτή συναντάται σπάνια σε ελεύθερη μορφή, καθώς κυρίως είναι εστεροποιημένη (Hou et al., 2016, López-Ráez., 2015).

Τα παράγωγα της C₁₃ α-ινόλης όπως μόνο-, δι-, και διακλαδισμένοι τριγλυκοζίτες της μπλουμενόλης (blumenols) έχουν προταθεί ως δείκτες του αποικισμού με ΔΕΜ. Οι μπλουμενόλες (Εικόνα 10) διακρίνονται σε 3 κατηγορίες: Α, Β και C. Θετική συσχέτιση έχει παρατηρηθεί μόνο μεταξύ γλυκοζιτικών μπλουμενολών που περιέχουν βασιζόμενη σε μπλουμενόλη C αγλυκόνη (Wang et al., 2018).



Εικόνα 9: Σχηματική δομή mycorradicins (García et al., 2019)



Εικόνα 10: Σχηματική δομή μπλουμενόλης C (Wang et al., 2018)

Οι μπλουμενόλες συντίθενται στις ρίζες των φυτών με ΔΕΜ και έπειτα μεταφέρονται και στα υπέργεια φυτικά τμήματα, όπου ο ρόλος τους δεν είναι πλήρως διασαφηνισμένος (You et al., 2023, Wang et al., 2018). Στις ρίζες όμως τα παράγωγα αυτά πιθανόν να συσχετίζονται άμεσα με τον ελεγχόμενο από το φυτό εκφυλισμό των θυσάνων. Με αυτόν τον τρόπο το φυτό επιτυγχάνει την άμεση ανανέωση των θυσάνων και την διατήρηση ενός ώριμου και πλήρως λειτουργικού θυσανικού πληθυσμού (Walter et al., 2015). Η θεωρία αυτή υποστηρίζεται και από τη μελέτη της συσσώρευσης της κίτρινης χρωστικής στις ρίζες, η οποία φαίνεται να συμβαίνει κατά την αποσύνθεση των θυσάνων και όχι στα πρώτα στάδια του αποικισμού (Fester et al., 2002a, Fester et al., 2002b, Walter, 2013).

Η επαγόμενη από τους ΔΕΜ αντοχή σε βιοτικούς παράγοντες καταπόνησης οφείλεται και στις αλλαγές στο προφίλ των VOCs, οι οποίες φυσιολογικά προσδίδουν ανθεκτικότητα ενάντια σε φυτοφάγα και παθογόνα. Οι ΔΕΜ φαίνεται να βελτιώνουν την φυτική άμυνα ενεργοποιώντας τη

δράση του ιασμονικού οξέος (Jasmonic Acid, JA), μιας φυτοορμόνης η οποία επάγει την έκφραση ενζύμων βιοσύνθεσης τερπενίων, τα οποία ανήκουν στους VOCs (Olson, 2020, Pozo et al., 2007). Εκτός από τους VOCs υπάρχουν και οι HIPVs (Herbivore Induced Plant Volatiles), πτητικές ενώσεις (συμπεριλαμβανομένων τερπενίων) οι οποίες απελευθερώνονται μετά από επιθέσεις φυτοφάγων εντόμων και προσελκύουν θηρευτές τους. Οι ΔΕΜ φαίνεται να επηρεάζουν τα επίπεδα και την σύνθεση των HIPVs είτε θετικά (Schausberger et al., 2011) είτε αρνητικά (Fontana et al., 2009).

Η ζαξινόνη (zaxinone) είναι αποκαροτενοειδής αρνητικός ρυθμιστής της βιοσύνθεσης στριγγολακτονών και συμμετέχει στην διαδικασία συμβίωσης με ΔΕΜ με αδιασαφήνιστο μέχρι τώρα τρόπο. Βιοσυντίθεται από το ένζυμο ZAS (Zaxinone Synthase) του οποίου η έκφραση επάγεται στα αρχικά και τελικά στάδια του αποικισμού από ΔΕΜ (Moreno et al., 2021).

1.4.1.2 Επίδραση ΔΕΜ στις φαινολικές ενώσεις

Οι ΔΕΜ τροποποιούν το προφίλ των φαινυλπροπανοειδών στα φυτά που αποικίζουν, επάγοντας αλλαγές στις συγκεντρώσεις και τη σύνθεση τους. Σε γενικές γραμμές, έχει παρατηρηθεί ότι οι ΔΕΜ αυξορρυθμίζουν την βιοσύνθεση των φαινολικών, αυξάνοντας τη συγκέντρωση του συνόλου των διαλυτών φαινυλπροπανοειδών στις ρίζες (Kaur et al., 2020, Bi et al., 2007). Όπως αναφέρθηκε και παραπάνω, οι φαινολικές ενώσεις δρουν ως σηματοδοτικά μόρια κατά τις αλληλεπιδράσεις φυτών – μικροοργανισμών, ενώ εμφανίζουν και αντιοξειδωτικές/αντιμικροβιακές ιδιότητες. Συνεπώς η αύξηση των επιπέδων τους από τους ΔΕΜ συμβάλλει στη βελτίωση της φυτικής άμυνας και τη γενικότερη υγεία του φυτού (Kaur et al., 2020).

Η συσσώρευση αυτή των φαινολικών ενώσεων οφείλεται μόνο σε μικρό ποσοστό στην αυξημένη διαθεσιμότητα φωσφόρου. Κατά κύριο λόγο υπεύθυνοι είναι οι ΔΕΜ οι οποίοι επάγουν τον επαναπρογραμματισμό της βιοσυνθετικής οδού των φαινυλπροπανοειδών, έτσι ώστε να επωφελείται η συμβίωση (Kaur et al., 2020, Schweiger et al., 2015).

Βέβαια, η επίδραση των ΔΕΜ στο φαινολικό προφίλ δεν έχει πάντα θετικό πρόσημο, καθώς φαίνεται να υπάρχει άμεση συσχέτιση των αλλαγών στα επίπεδα των φαινολικών με το στάδιο της συμβίωσης (Steinkellner et al., 2007). Έχει παρατηρηθεί πως τα επίπεδα ορισμένων φυτοαλεξινών είναι χαμηλά στα αρχικά στάδια της συμβίωσης, όταν ακόμα αναπτύσσεται ο θύσανος, ενώ αυξάνονται σημαντικά όταν ο θύσανος αποκτήσει την ώριμη μορφή του. Αυτό πιθανόν οφείλεται στις αντιμικροβιακές ιδιότητες των ενώσεων αυτών. Για παράδειγμα, η ισοφλαβονοειδής φυτοαλεξίνη medicarpin (Εικόνα 11) εμφανίζει ισχυρή ανασταλτική δράση στην ανάπτυξη των υφών. Η συσσώρευσή της σε φυτά *Medicago sativa* αποικισμένα με ΔΕΜ πιθανότατα συσχετίζεται με την καταστολή της περαιτέρω ανάπτυξης του θυσάνου στα ριζικά κύτταρα (Larose et al., 2002). Με αυτόν τον τρόπο επιτυγχάνεται η αυτορρύθμιση της συμβίωσης (Kaur et al., 2020).



Εικόνα 11: Σχηματική δομή medicarpin (Nascimento et al., 2013)

Οι ΔΕΜ τροποποιούν επίσης τα επίπεδα συζευγμένων μορφών, τόσο της medicarpin, όσο και άλλων ενώσεων, όπως η formononetin και η daidzein. Έχουν παρατηρηθεί αλλαγές στα επίπεδα της formononetin 7-O-β-6'-O-malonyl glucoside ή αλλιώς malonylononin, της formononetin-7-O glycoside, της medicarpin-3-O-glycoside και της medicarpin malonyl glucoside σε φυτά *M. truncatula* και *M. Sativa* (Morandi, 1996, Schliemann et al., 2008, Bi et al., 2007, Kaur et al., 2020). Ο λειτουργικός ρόλος αυτών των συζευγμένων μορφών δεν έχει αποσαφηνιστεί ακόμη, όμως είναι πιθανό να δρουν ως αποθήκες των αντίστοιχων αγλυκονών, και σε περίπτωση μόλυνσης γρήγορα να υδρολύονται στις ενεργές αγλυκόνες (Morandi, 1996).

Στις μέχρι τώρα μελέτες δεν φαίνεται να υπάρχει ένας καθολικός κανόνας για την επίδραση των ΔΕΜ σε κάθε φλαβονοειδές μεμονωμένα. Αντίθετα, έχει παρατηρηθεί ότι οι τροποποιήσεις των επιπέδων τους μεταξύ διαφορετικών φυτών εμβολιασμένων με ίδια στελέχη ΔΕΜ εμφάνιζαν μικρή συντήρηση, κάτι που αντικατοπτρίζει την ειδικότητα αυτών των αλληλεπιδράσεων (Schliemann et al, 2008, Schweiger et al, 2015). Η ειδικότητα αυτή φαίνεται και στην επίδραση των φλαβονοειδών στη μυκητιακή ανάπτυξη: το ίδιο φλαβονοειδές μπορεί να έχει θετική, ουδέτερη ή αρνητική επίδραση σε διαφορετικά στελέχη ΔΕΜ (Mandal et al, 2010).

Από τη συμβίωση με ΔΕΜ επηρεάζονται και τα επίπεδα των φαινολικών οξέων, καθώς και των ενώσεων που παράγονται από αυτά, με ειδικό της αλληλεπίδρασης ΔΕΜ-φυτού τρόπο (Bi et al., 2007, Kaur et al., 2020).

Η παρέμβαση των ΔΕΜ στη βιοσύνθεση των φαινυλπροπανοειδών επιβεβαιώνεται επιπλέον από μελέτες των ενζύμων που καταλύουν σημαντικά βήματα των οδών αυτών. Η PAL έχει μελετηθεί πολύ, καθώς αποτελεί ένζυμο κλειδί στη σύνθεση των φαινολικών. Η δραστηριότητά της βρέθηκε αυξημένη στις ρίζες τομάτας εμβολιασμένης με *Glomus mosseae* και στις ρίζες *M. sativa* εμβολιασμένου με *G. intraradices*, αλλά μόνο κατά τα αρχικά στάδια αποικισμού. Επίσης εντοπίστηκαν υψηλότερα επίπεδα μεταγράφων της PAL σε ριζικά κύτταρα με θυσάνους σε *Medicago truncatula* αποικισμένο με *Glomus Versiforme* (Morandi, 1996) και σε φύλλα καπνού εμβολιασμένα με *G. Mosseae* (Zhao et al., 2020). Μελέτες που έχουν γίνει και σε άλλα ένζυμα, όπως είναι υπεροξειδάσες (Peroxidases) και η πολυφαινολική οξειδάση (Polyphenol Oxidase, PPO), έδειξαν μεταβολή της δραστηριότητας τους μετά από την ανάπτυξη συμβιωτικής σχέσης με ΔΕΜ (Kaur et al., 2020, Zhao et al., 2020). Οι μεν υπεροξειδάσες οξειδώνουν τα φαινολικά οξέα των κυτταρικών τοιχωμάτων προς πιο υδρόφοβα μόρια όπως η λιγνίνη (Morandi, 1996), ενώ η PPO καταλύει την οξείδωση των φαινολικών ενώσεων προς κινόνες, οι οποίες εμφανίζουν αντιμικροβιακές και αντιοξειδωτικές ιδιότητες (El-Najjar et al., 2011, Araj et al., 2014). Οι Schliemann et al. (2008) παρατήρησαν ότι, κατά τη συμβίωση *M. truncatula* και *G. intraradices*,

μειώθηκε η μεταγραφική δραστηριότητα ενζύμων που καταλύουν τελικά στάδια της βιοσύνθεσης φλαβονοειδών, παρόλο που τα συνολικά μεταγραφικά επίπεδα των ενζύμων για το φαινυλπροπανοειδές μονοπάτι ήταν αυξημένα. Αυτό επιβεβαιώνει για ακόμα μια φορά τον αυστηρό, διαφορικό έλεγχο του δευτερογενούς μεταβολισμού κατά τη συμβίωση.

1.4.1.3 Επίδραση ΔΕΜ στις αζωτούχες ενώσεις

Όπως και με τους υπόλοιπους δευτερογενείς μεταβολίτες, οι ΔΕΜ τροποποιούν το προφίλ και των αζωτούχων ενώσεων. Πολλαπλές μελέτες έχουν αναφέρει την αύξηση των επιπέδων των αλκαλοειδών μετά από αποικισμό από ΔΕΜ (Amani Machiani et al., 2022). Για παράδειγμα, εντοπίστηκαν αυξημένα επίπεδα πυρολιζιδινών στις ρίζες του *Senecio jaboaea* κατά τη συμβίωσή του με *Rhizophagus irregularis*. Οι ενώσεις αυτές, καθώς εμφανίζουν υψηλή τοξικότητα, συσχετίζονται με την άμυνα ενάντια σε φυτοφάγα, τα οποία επηρεάζονται αρνητικά από τη συμβίωση του φυτού με ΔΕΜ (Hill et al., 2018).

Στις μυκόρριζες έχουν παρατηρηθεί τροποποιήσεις και στις συγκεντρώσεις από μονοτερπένια ινδολο-αλκαλοειδών (Monoterpene Indole Alkaloids, MIAs) (Andrade et al., 2012), αλλά και στα πυριδινικά αλκαλοειδή, όπως είναι η νικοτίνη από το φυτό *N. tabacum*. Επιπλέον παρατηρήθηκαν αλλαγές και στα μεταγραφικά επίπεδα ενζύμων που συμμετέχουν στη βιοσύνθεση της νικοτίνης, όπως είναι το PMT (Putrescine Methyl Transferase) και η οξειδοοδουκτάση A622 σε σχέση με τις ρίζες μη αποικισμένων φυτών (Andrade et al., 2012, Andrade et al., 2013).

Η επίδραση των ΔΕΜ στην βιοσύνθεση των αλκαλοειδών αλλά και των υπόλοιπων δευτερογενών μεταβολιτών εμφανίζει ιδιαίτερο ενδιαφέρον, αν αναλογιστεί κανείς τις ωφέλιμες ιδιότητες αυτών των ενώσεων.

1.5 ΦΑΡΜΑΚΕΥΤΙΚΑ ΦΥΤΑ

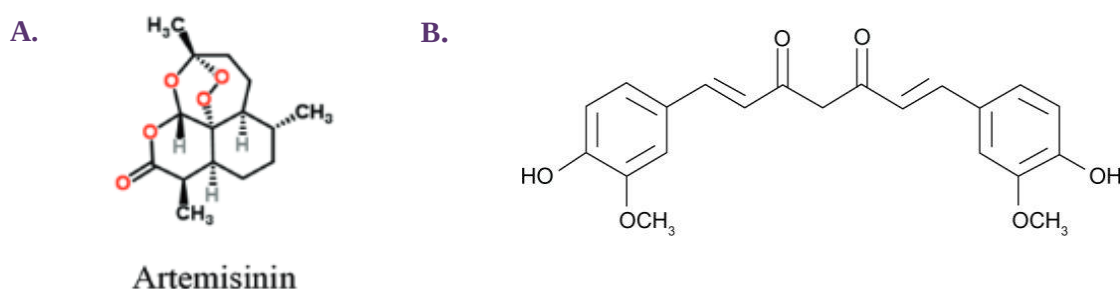
Από την αρχαιότητα οι άνθρωποι εκμεταλλεύονται τη βιοποικιλότητα των φυτών για την αντιμετώπιση ασθενειών. Μέσω χημικών αναλύσεων αποκαλύπτεται η χρήση χαμομηλιού και μυριόφυλλου ως θεραπευτικά μέσα από πληθυσμούς Νεότερνταλ πριν από 50,000 χρόνια. Στην αρχαία Κίνα, Αίγυπτο και Ινδία υπάρχουν γραπτές αποδείξεις για τη χρήση φαρμακευτικών βοτάνων περισσότερα από 4000 χρόνια πριν (Mafu et al., 2017). Η παραδοσιακή ιατρική εξακολουθεί να είναι από τις κύριες τακτικές ιατρικής περίθαλψης ανά την υφήλιο, με το 80% του παγκόσμιου πληθυσμού να βασίζεται σε αυτήν. Παρόλα αυτά με την ανάπτυξη της βιομηχανίας και των συνθετικών φαρμάκων, η χρήση βοτάνων ξεχάστηκε για αρκετά χρόνια στον δυτικό κόσμο (Khan et al., 2019).

Η αδιάκοπη μάχη της ανθρωπότητας με τις ασθένειες καθιστά επιτακτική ανάγκη την συνεχή αναζήτηση νέων φαρμάκων, ειδικά στις σύγχρονες κοινωνίες που απαρτίζονται από ολοένα αυξανόμενους πληθυσμούς. Για αυτό τα τελευταία χρόνια το ενδιαφέρον έχει στραφεί στις

θεραπευτικές ιδιότητες των φυτών. Ήδη το 25% των συνταγογραφούμενων φαρμάκων προέρχεται από φυτά, ενώ εκτιμάται ότι έως και 80,000 είδη φυτών αξιοποιούνται στη φαρμακοβιομηχανία. Τα φυτά πλέον αποτελούν την κύρια πηγή νέων φαρμακευτικών ενώσεων, οι οποίες εμφανίζουν αυξημένη συμβατότητα αλλά και προσαρμοστικότητα με το ανθρώπινο σώμα, σε σχέση με τα συνθετικά φάρμακα (Zhao et al., 2022).

Οι φαρμακευτικές ιδιότητες των φυτών οφείλονται στους δευτερογενείς μεταβολίτες, οι οποίοι εμφανίζουν αντική, αντιβακτηριακή, αντιπαρασιτική και αντιμυκητιακή δράση (Singh, 2017). Με την πρόοδο της επιστήμης διασαφηνίζονται οι επιδράσεις τους σε ποικίλες ασθένειες που μαστίζουν τους λαούς, όπως ο καρκίνος (Khan et al., 2019).

Για παράδειγμα, το σεσκιτερπενίο αρτεμισίνη (Εικόνα 12) αλλά και παράγωγά του, όπως το ημί-συνθετικό artesunate, προέρχονται από το φυτό *Artemisia annua*, και χρησιμοποιούνται ήδη από την αρχαία Κίνα ως φάρμακα για την καταπολέμηση της ελονοσίας, ενώ έχει μελετηθεί και η επίδραση τους σε καρκινικά κύτταρα. Το artesunate εμφάνισε ισχυρή αντικαρκινική δράση ενάντια στη λευχαιμία και σε καρκίνους του εντέρου. Επιπλέον η κουρκουμίνη (Εικόνα 12), μια φαινολική ένωση με αντιφλεγμονώδεις και αντιοξειδωτικές ιδιότητες, εμφάνισε αντικαρκινική δράση ενάντια σε καρκινικές σειρές (καρκίνος του μαστού, καρκίνος του εντέρου) (Khan et al., 2019).



Εικόνα 12: (A) Σχηματική δομή αρτεμισίνης (Pandey et al., 2018) (B) Σχηματική δομή κουμαρίνης (Owais et al., 2014)

Η απομόνωση των δευτερογενών μεταβολιτών (γνωστοί και με τον όρο «φυσικά προϊόντα») συνήθως γίνεται μέσω εκχύλισης, όμως πολλές φορές οι δευτερογενείς μεταβολίτες βρίσκονται σε χαμηλή συγκέντρωση στους φυτικούς ιστούς, κάτι που καθιστά δύσκολη την εμπορική εκμετάλλευσή τους, καθώς απαιτούνται πολύ μεγάλες καλλιέργειες φυτών. Γνωρίζοντας ότι η συμβίωση με ΔΕΜ τροποποιεί το φυτικό δευτερογενές μεταβόλωμα επάγοντας συνήθως την συσσώρευση δευτερογενών μεταβολιτών, μελετάται η χρήση τέτοιων συστημάτων για την παραγωγή καλύτερης ποιότητας βιοενεργών ενώσεων σε υψηλότερα επίπεδα (Andrade et al., 2012). Μέχρι σήμερα έχει παρατηρηθεί η θετική επίδραση των ΔΕΜ στη συσσώρευση διαφορετικών βιοενεργών ενώσεων: τερπενοειδών (π.χ. αρτεμισίνη, φορσκολίνη), φαινολικών (π.χ. κουρκουμίνη, φορμονονετίνη, τανίνες, cichoric οξύ) αλλά και αλκαλοειδών (π.χ. castanospermin, scopolamine) (Zhao et al., 2022).

1.6 ΣΚΟΠΟΣ ΠΤΥΧΙΑΚΗΣ ΕΡΓΑΣΙΑΣ

Σκοπός της παρούσας εργασίας ήταν η απομόνωση και μελέτη πιθανών βιολογικών δράσεων εκχυλισμάτων από το υπέργειο μέρος φυτών *Lotus japonicus*, εμβολιασμένων (ή μη) με τον δενδρόμορφο ενδομυκορριζικό μύκητα *Rhizophagus irregularis*. Τα εκχυλίσματα ελεγχθήκαν για αντιμυκητιακή δράση έναντι φυτοπαθογόνων μυκήτων, καθώς και για αντί-πολλαπλασιαστική, αντιφλεγμονώδη και αποπτωτική δράση σε ανθρώπινα εμβρυϊκά νεφρικά κύτταρα.

2. ΥΛΙΚΑ ΚΑΙ ΜΕΘΟΔΟΙ

2.1 ΒΙΟΛΟΓΙΚΟ ΥΛΙΚΟ

Στις πειραματικές διαδικασίες, χρησιμοποιήθηκε το ψυχανθές φυτό *Lotus japonicus* (ποικιλία GIFU). Ο εμβολιασμός έγινε με ένα εμπορικά διαθέσιμο σκεύος που περιέχει σπόρια και υφές του μύκητα *Rhizophagus irregularis* (στέλεχος DAOM). Η αντιμυκητιακή δράση των φυτικών εκχυλισμάτων μελετήθηκε σε 13 στελέχη φυτοπαθογόνων μυκήτων από τη συλλογή μυκήτων του εργαστηρίου μυκητολογίας του Μπενακείου Φυτοπαθολογικού Ινστιτούτου (*Sclerotinia sclerotorum*, *Alternaria alternata*, *Botryosphaeria stevensii*, *Botrytis cinerea*, *Venturia carpophila*, *Globisporangium ultimum*, *Monilia fructicola*, *Fusarium chlamydosporum*, *Aspergillus niger*, *Colletotrichum acutatum*, *Rhizoctonia solani*, *Phomopsis vexans*, *Verticillium dahlia*). Για τον έλεγχο της αντί-πολλαπλασιαστικής, αποπτωτικής και αντιφλεγμονώδους δράσης χρησιμοποιήθηκε η κυτταρική σειρά HEK-293 (Human Embryonic Kidney 293).

2.2 ΑΠΟΛΥΜΑΝΣΗ ΚΑΙ ΕΚΒΛΑΣΤΗΣΗ ΣΠΟΡΩΝ

Η πειραματική διαδικασία ξεκινάει με την απολύμανση των σπόρων του φυτού, η οποία διασφαλίζει την αποφυγή ανάπτυξης φυτοπαθογόνων μικροοργανισμών και την ταυτόχρονη ανάπτυξη των σπόρων. Η διαδικασία αυτή πραγματοποιείται σε δύο στάδια:

1^ο στάδιο:

1. Τοποθέτηση σπόρων σε σωληνάριο erpendorf, προσθήκη πυκνού H_2SO_4 και επώαση για 20 με 25 λεπτά στον απαγωγό
2. 5 πλύσεις με dH_2O
3. Προσθήκη 1 ml διαλύματος χλωρίνης εμπορίου 20% και επώαση για 10 λεπτά
4. 6 πλύσεις με dH_2O στον θάλαμο καθέτου νηματικής ροής (laminair)
5. Προσθήκη dH_2O και ολονύκτια επώαση στους $4^\circ C$

2^ο στάδιο: Πραγματοποίηση στον θάλαμο καθέτου νηματικής ροής

1. Τοποθέτηση 3 διηθητικών χαρτιών σε τριβλίο
2. Προσθήκη 3 ml dH_2O
3. Τοποθέτηση των σπόρων στο τριβλίο, με προσοχή ώστε να μην έρχονται σε επαφή
4. Κλείσιμο των τριβλίων με parafilm
5. Φύλαξη των τριβλίων στον θάλαμο ανάπτυξης φυτών στους $21^\circ C$ σε κάθετη διάταξη
6. Αναμονή περίπου 10 ημέρες για την εκβλάστηση των σπόρων

2.3 ΜΕΤΑΦΥΤΕΥΣΗ ΦΥΤΩΝ ΣΕ ΓΛΑΣΤΡΑΚΙΑ

Αφού εκβλαστήσουν οι σπόροι γίνεται η μεταφύτευσή τους σε γλαστράκια με άμμο και βερμικούλιτη (αναλογία 2:1) και θρεπτικό διάλυμα Long Ashton solution (LAS). Η σύσταση του LAS παρατίθεται στον πίνακα 3. Προς αποφυγή επιμολύνσεων, η άμμος αποστειρώνεται πριν τη χρήση (για 25 λεπτά στους 121 °C). Σε κάθε γλαστράκι (12cm διάμετρος και 8cm ύψος) τοποθετούνται 7 φυτά.

Συστατικά	Πυκνό διάλυμα	Συγκέντρωση στο LAS
MgSO ₄	0,375M	0,75mM
NaNO ₃	1M	1mM
K ₂ SO ₄	0,5M	1mM
CaCl ₂	1M	12mM
FeNaEDTA	0,1M	25μM
MnSO ₄	0,1M	5μM
CuSO ₄	0,01M	0,25μM
H ₃ BO ₃	0,1M	25μM
Na ₂ MoO ₄	0,025M	0,1μM
ZnSO ₄	0,01M	0,5μM
Na ₂ HPO ₄	0,1M	3,2μM
dH ₂ O		

Πίνακας 2: Σύσταση LAS

2.4 ΕΜΒΟΛΙΑΣΜΟΣ ΜΕ ΔΕΜ

Τα φυτά εμβολιάζονται με *Rhizophagus irregularis*. Το εμπορικά διαθέσιμο σκεύασμα του μύκητα, βρίσκεται σε συγκέντρωση 2.000 σπόρια/ml και για τον εμβολιασμό απαιτούνται 150 σπόρια ανά φυτό. Αρχικά γίνεται φυγοκέντρωση του εναιωρήματος του μύκητα (3000rpm για 1 λεπτό). Γίνεται απόρριψη του υπερκειμένου και επαναδιαλυτοποίηση του ιζήματος σε θρεπτικό LAS. Κάθε φυτό εμβολιάζεται με 300μl, με απευθείας εναπόθεση του διαλύματος στις ρίζες, με τη χρήση πιπέτας. Αφού ολοκληρωθεί ο εμβολιασμός τα γλαστράκια τοποθετούνται στον θάλαμο ανάπτυξης φυτών, στους 23-25°C.

2.5 ΣΥΓΚΟΜΙΔΗ ΦΥΤΩΝ

Η συγκομιδή των φυτών γίνεται 5 εβδομάδες μετά τον εμβολιασμό με τον μύκητα. Τα φυτά απομακρύνονται από τα γλαστράκια και ξεπλένονται με dH₂O. Γίνεται διαχωρισμός ριζών και βλαστών και οι ρίζες βάφονται με μελάνι με σκοπό να επιβεβαιωθεί ο αποικισμός της ρίζας από τον

μύκητα. Οι βλαστοί τοποθετούνται σε σωληνάρια falcon και γρήγορα παγώνονται σε υγρό άζωτο. Μακροπρόθεσμα φυλάσσονται στους -80°C .

2.6 ΧΡΩΣΗ ΡΙΖΩΝ ΚΑΙ ΥΠΟΛΟΓΙΣΜΟΣ ΠΟΣΟΣΤΟΥ ΑΠΟΙΚΙΣΜΟΥ

Διαδικασία:

1. Τοποθέτηση ριζών σε σωληνάρια falcon και επώαση σε 10% KOH για 30 λεπτά στους 85°C στο υδατόλουτρο
2. Απομάκρυνση του KOH
3. Προσθήκη 10% οξικού οξέος
4. Άμεση απομάκρυνση οξικού οξέος και 2 πλύσεις με dH_2O
5. Προσθήκη διαλύματος 5% μελανιού και επώαση για 30 λεπτά στους 85°C στο υδατόλουτρο
6. Απομάκρυνση μελανιού και 2 πλύσεις με dH_2O
7. Προσθήκη 5% οξικού οξέος και επώαση για 30 λεπτά σε θερμοκρασία δωματίου
8. Απομάκρυνση οξικού οξέος και 2 πλύσεις με dH_2O
9. Προσθήκη dH_2O και ολονύκτια επώαση στους 4°C
10. Τεμαχισμός ριζών και τοποθέτηση σε αντικειμενοφόρους πλάκες
11. Παρατήρηση σε οπτικό μικροσκόπιο με φακό 40x

Γίνεται η παρατήρηση 100 οπτικών πεδίων ανά αντικειμενοφόρο πλάκα και καταγραφή της ύπαρξης ή όχι αποικισμού. Το ποσοστό αποικισμού προκύπτει από το κλάσμα:

$$\% \text{ αποικισμού} = \frac{\text{αριθμός οπτικών πεδίων όπου κατεγράφη αποικισμός}}{\text{αριθμός συνολικών οπτικών πεδίων}} \times 100\%$$

2.7 ΕΚΧΥΛΙΣΗ

Διαδικασία:

1. Λυοφιλίωση και ζύγιση δειγμάτων.
2. Ομογενοποίηση των δειγμάτων σε γουδί λειοτριβήσεως με τη χρήση οξικού αιθυλεστέρα ως διαλύτη και διήθησή τους
3. Εξάτμιση οξικού αιθυλεστέρα σε περιστροφικό εξατμιστήρα (rotary evaporator)
4. Ζύγιση δειγμάτων μετά την εκχύλιση
5. Διαλυτοποίηση σε οργανικό διαλύτη DMSO και φύλαξη στους -20°C

2.8 ΠΑΡΑΓΩΓΗ ΘΡΕΠΤΙΚΟΥ PDA

Για παραγωγή 200 ml θρεπτικού μέσου PDA (Potato Dextrose Agar) προστίθενται σε μια κωνική φιάλη:

1. 4,8 g Potato Dextrose Broth (PDB)
2. 3g βακτηριακό άγαρ
3. 200 ml dH₂O

Έπειτα το θρεπτικό αποστειρώνεται για 15 λεπτά στους 121°C. Στο laminair, το υγρό θρεπτικό διαμοιράζεται σε τριβλία, τα οποία, αφού στερεοποιηθεί το PDA, φυλάσσονται στους 4°C.

2.9 ΔΟΚΙΜΑΣΙΑ ΑΝΑΣΤΟΛΗΣ ΜΥΚΗΤΙΑΚΗΣ ΑΝΑΠΤΥΞΗΣ

Η διαδικασία πραγματοποιείται στον θάλαμο καθέτου νηματικής ροής. Σε τριβλία με θρεπτικό PDA τοποθετούνται μικρά κομμάτια διηθητικού χαρτιού σε τριγωνική ή τετραγωνική διάταξη ανάλογα των αριθμό των δειγμάτων. Κάθε χαρτάκι διαβρέχεται με 18 μl από το επιθυμητό δείγμα (ένα χαρτάκι διαβρέχεται με DMSO, το οποίο αποτελεί τη συνθήκη ελέγχου). Στο κέντρο του τριβλίου τοποθετείται ένα κομμάτι PDA, πάνω στο οποίο αναπτύσσεται φυτοπαθογόνος μύκητας (η πλευρά με τον μύκητα να έρχεται σε επαφή με το θρεπτικό του φρέσκου τριβλίου). Το τριβλίο κλείνεται με parafilm και τοποθετείται στον επωαστήρα (25°C) μέχρι να αναπτυχθεί ο μύκητας και να καλύψει όλη την επιφάνεια του τριβλίου.

2.10 ΚΥΤΤΑΡΟΚΑΛΛΙΕΡΓΕΙΕΣ

Για τις πειραματικές δοκιμασίες χρησιμοποιήθηκε η ευκαρυωτική κυτταρική σειρά HEK293 (Human Embryonic Kidney 293). Τα HEK293 προέρχονται από πρωτογενή ανθρώπινα εμβρυικά νεφρικά κύτταρα, τα οποία μετασχηματίστηκαν με γενετικό υλικό αδενοϊού 5. Ο μετασχηματισμός τροποποίησε τον κυτταρικό κύκλο των κυττάρων, με αποτέλεσμα τα HEK293 να αποτελούν μια αθάνατη κυτταρική σειρά. Η χρήση των HEK293 στη συγκεκριμένη μελέτη στηρίζεται στα πολλαπλά πλεονεκτήματα τους στις *in vitro* μελέτες: εύκολη γενετική τροποποίηση, υψηλά ποσοστά επιτυχούς μετασχηματισμού, γρήγορος ρυθμός αύξησης και άμεση απόκριση σε εξωκυτταρικά ερεθίσματα (Hu et al., 2018). Η μεταχείριση των κυττάρων πραγματοποιείται πάντοτε σε συσκευή καθέτου νηματικής ροής (laminair).

2.10.1 Ξεπάγωμα κυττάρων

Τα κύτταρα φυλάσσονται στους -80°C σε cryovials του 1ml, διαλυτοποιημένα σε εμβρυϊκό βόειο ορό (FBS) και DMSO σε αναλογία 9:1 v/v. Το ξεπάγωμά τους είναι απαραίτητο πριν την εκκίνηση των πειραμάτων. Διαδικασία:

1. Θέρμανση θρεπτικού DMEM 4,5 g/L Glucose στο υδατόλουτρο (37°C για 30 λεπτά)
2. Θέρμανση cryovial στο υδατόλουτρο (37°C για 2-3 λεπτά)
3. Προσθήκη 9ml θρεπτικού και του περιεχομένου του cryovial (1ml) σε σωληνάριο falcon
4. Φυγοκέντρηση διαλύματος στα 1000rpm για 5 λεπτά σε θερμοκρασία δωματίου
5. Απόρριψη υπερκείμενου
6. Προσθήκη 5ml φρέσκου θρεπτικού DMEM 4,5 g/L Glucose και επαναδιαλυτοποίηση ιζήματος
7. Μεταφορά διαλύματος κυττάρων σε φλάσκα και τοποθέτηση σε επωαστικό κλίβανο (37°C , 5.0% CO_2)

2.10.2 Θρυψινοποίηση

Η θρυψινοποίηση είναι μια διαδικασία αποκόλλησης των κυττάρων από την επιφάνεια της φλάσκας, η οποία βασίζεται στην ικανότητα του πρωτεολυτικού ενζύμου θρυψίνη να διασπά πεπτιδικές αλυσίδες. Πραγματοποιείται όταν η κυτταροκαλλιέργεια καλύψει το 80-90% της φλάσκας, αλλά και πριν κάθε πείραμα που απαιτεί την χρήση κυττάρων. Διαδικασία:

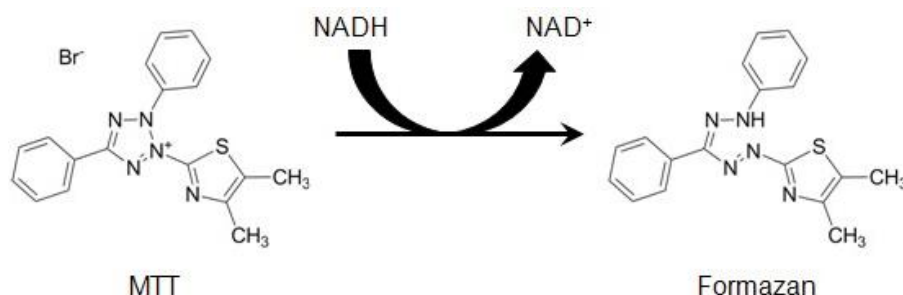
1. Θέρμανση θρυψίνης και θρεπτικού υλικού DMEM 4,5 g/L Glucose στο υδατόλουτρο στους 37°C
2. Απομάκρυνση του ήδη υπάρχοντος θρεπτικού από την φλάσκα μέσω αναρρόφησης
3. Προσθήκη θρυψίνης (1ml για T-25 φλάσκες, 2ml για T-75)
4. Τοποθέτηση φλάσκας στον επωαστικό κλίβανο για 1-2 λεπτά
5. Προσθήκη τετραπλάσιου όγκου θρεπτικού από τον όγκο θρυψίνης
6. Μεταφορά περιεχομένου φλάσκας σε σωληνάριο falcon και φυγοκέντρηση στα 1000rpm για 5 λεπτά σε θερμοκρασία δωματίου
7. Απόρριψη υπερκείμενου
8. Επαναδιαλυτοποίηση ιζήματος σε θρεπτικό DMEM 4,5 g/L Glucose

2.11 ΒΙΟΧΗΜΙΚΕΣ ΔΟΚΙΜΑΣΙΕΣ

2.11.1 Δοκιμασία MTT

Η δοκιμασία MTT [3-(4,5-Dimethylthiazol-2-yl)-2,5-diphenyltetrazolium bromide] είναι μια ποσοτική χρωματομετρική διαδικασία για τη μελέτη της κυτταροτοξικότητας και της αντι-πολλαπλασιαστικής δράσης ουσιών. Στηρίζεται στη μετατροπή του άλατος τετραζολίου MTT, το οποίο έχει κίτρινο χρώμα, σε κρυστάλλους φορμαζανίου, οι οποίοι έχουν μωβ χρώμα και είναι

αδιάλυτοι. Η μετατροπή πραγματοποιείται μόνο από τα ζωντανά κύτταρα, με τη δράση του μιτοχονδριακού ενζύμου ηλεκτρική αφυδρογονάση (Εικόνα 13). Οι κρύσταλλοι διαλυτοποιούνται μέσω ισοπροπανόλης και το διάλυμα φωτομετράται στα 570nm. Η παρατηρούμενη απορρόφηση είναι ανάλογη του αριθμού των ζωντανών και μεταβολικά ενεργών κυττάρων (Ghasemi et al., 2021).



Εικόνα 13: Μετατροπή MTT σε φορμαζάνιο (Riss et al., 2013)

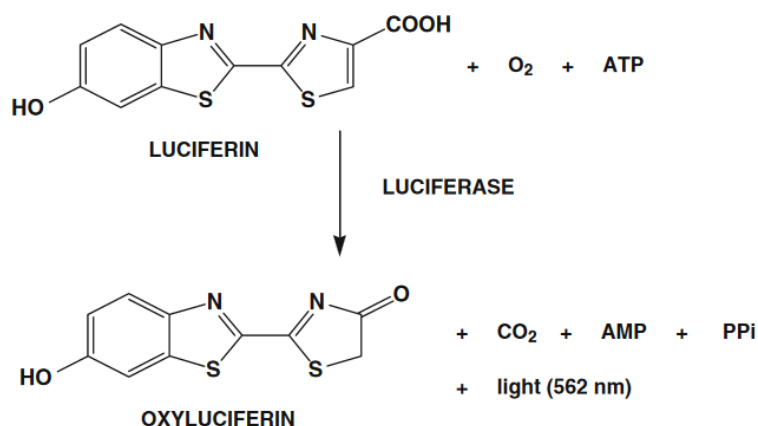
Διαδικασία:

1. Θρυψινοποίηση κυττάρων στη φλάσκα
2. Μέτρηση αριθμού κυττάρων σε 10μl (με το πλακίδιο Neubauer) και αναγωγή στο ml για τον κατά προσέγγιση υπολογισμό του συνολικού αριθμού κυττάρων στη φλάσκα
3. Στρώσιμο επιθυμητού αριθμού κυττάρων σε πλάκες μικροτιτλοδότησης 96 θέσεων (τελικός όγκος 100μl ανά πηγαδάκι)
4. Αναμονή για 48 ώρες
5. Προσθήκη των προς μελέτη εκχυλισμάτων σε αυξανόμενες συγκεντρώσεις (100 μl ανά πηγαδάκι)
6. Αναμονή για 48 ώρες
7. Προσθήκη 50μl ανά πηγαδάκι διαλύματος MTT (MTT διαλυμένο σε θρεπτικό μέσο DMEM απουσία ερυθρού της φαινόλης σε συγκέντρωση 0.5mg/ml)
8. Τοποθέτηση στον επωαστικό κλίβανο για 4 ώρες (37°C, 5.0% CO₂)
9. Αφαίρεση διαλύματος MTT
10. Προσθήκη 150 μl ισοπροπανόλης σε κάθε πηγαδάκι
11. Τοποθέτηση πλάκας στον ανακινητήρα για περίπου 30 λεπτά, ώστε να διαλυτοποιηθούν πλήρως οι κρύσταλλοι
12. Φωτομέτρηση στα 570nm για μέτρηση MTT και στα 690nm για μέτρηση θορύβου
13. Ανάλυση αποτελεσμάτων στο excel

2.11.2 Δοκιμασία λουσιφεράσης/β-γαλακτοζιδάσης

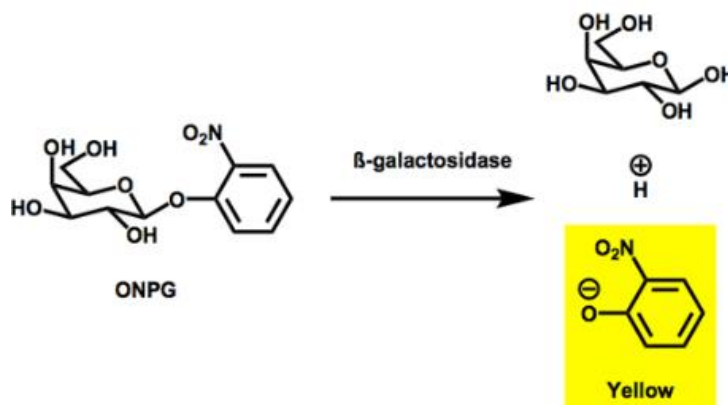
Η δοκιμασία λουσιφεράσης/β-γαλακτοζιδάσης χρησιμοποιείται για την μελέτη της αντιφλεγμονώδους δράσης των εκχυλισμάτων. Σε κύτταρα HEK293 εισάγεται πλασμιδιακός φορέας, που περιέχει το γονίδιο της λουσιφεράσης, το οποίο βρίσκεται υπό τον έλεγχο υποκινητή που περιέχει στοιχεία απόκρισης στον NF-κB, έναν μεταγραφικό παράγοντα που επάγει την

έκφραση γονιδίων απόκρισης σε φλεγμονή (πχ κυτοκίνες) μετά από έκθεση σε κάποιο στρεσογόνο παράγοντα, όπως ο παράγοντας φλεγμονής TNFα, καθώς και το πλασμίδιο της β-γαλακτοζιδάσης για την κανονικοποίηση των αποτελεσμάτων. Ο TNFα είναι μια φλεγμονώδης κυτοκίνη, που συνδεόμενος στον υποδοχέα TNFR, επάγει την απελευθέρωση του NF-κΒ από τον αρνητικό ρυθμιστή IκΒ (Inhibitory κΒ) και συνεπώς την ενεργοποίηση της μεταγραφικής δραστηριότητας του (Cooper et al., 2022). Η λουσιφεράση, με την προσθήκη κατάλληλου υποστρώματος (λουσιφερίνη) εκλύει βιοφωταύγεια, η οποία ανιχνεύεται σε λουσιφερόμετρο (Εικόνα 14) (Carter et al., 2015, Hayden et al, 2014).



Εικόνα 14: Αντίδραση λουσιφεράσης (Buccioni et al., 2011)

Για την κανονικοποίηση των αποτελεσμάτων γίνεται δοκιμή β-γαλακτοζιδάσης, η οποία στηρίζεται στην υδρόλυση του ONPG από τη β-γαλακτοζιδάση και στην παραγωγή ενός έγχρωμου προϊόντος, το οποίο ανιχνεύεται με φωτόμετρο (Εικόνα 15) (Hosseini et al., 2021).



Εικόνα 15: Αντίδραση β-γαλακτοζιδάσης (Joce et al., 2011)

Οι πλασμιδιακοί φορείς που χρησιμοποιήθηκαν για την παροδική διαμόλυνση των κυττάρων είναι οι pMMTV-NFκΒ-RE-luciferase και pGS5-β-gal, οι οποίοι παρήχθησαν από βακτήρια *Escherichia Coli* XL1-Blue. Ως θετική συνθήκη ελέγχου χρησιμοποιήθηκε η δεξαμεθαζόνη (Dexamethasone, DEX). Η DEX είναι ένας συνθετικός αγωνιστής του υποδοχέα των γλυκοκορτικοειδών, που καταστέλλει την ενεργοποίηση του NF-κΒ και για αυτό χρησιμοποιείται ως θετική συνθήκη ελέγχου (Aghai et al., 2006).

Διαδικασία:

1. Θρυψινοποίηση κυττάρων στην φλάσκα
2. Μέτρηση αριθμού κυττάρων σε 10μl (με το πλακίδιο Neubauer) και αναγωγή στο ml για τον κατά προσέγγιση υπολογισμό του συνολικού αριθμού κυττάρων στη φλάσκα
3. Στρώσιμο επιθυμητού αριθμού κυττάρων σε πιάτο καλλιέργειας 24 θέσεων με θρεπτικό DMEM 4,5 g/L Glucose απουσία ερυθρού της φαινόλης (τελικός όγκος 500μl ανά πηγαδάκι)
4. Τοποθέτηση πιάτου στον επωαστικό κλίβανο και αναμονή για 16 ώρες
5. Αφαίρεση θρεπτικού
6. Προσθήκη 270μl φρέσκου θρεπτικού DMEM 4,5 g/L Glucose απουσία ερυθρού της φαινόλης ανά πηγαδάκι
7. Παρασκευή μίγματος 1:
 - 390μl ρυθμιστικού διαλύματος HBS 2X
8. Παρασκευή μίγματος 2:
 - 3,6μl CaCl₂
 - 3,6μg pMMTV-NFκB-RE-luciferase
 - 3,6μg pGS5-β-gal
 - ddH₂O
9. Επώαση για 5 λεπτά σε θερμοκρασία δωματίου
10. Ανάμειξη μίγματος 1 και μίγματος 2
11. Επώαση για 25 λεπτά σε θερμοκρασία δωματίου
12. Προσθήκη 30μl από το μίγμα σε κάθε πηγαδάκι
13. Τοποθέτηση στον επωαστικό κλίβανο και αναμονή για 16 ώρες
14. Απομάκρυνση των 300μl θρεπτικού-μίγματος
15. Προσθήκη 500μl φρέσκου θρεπτικού DMEM 4,5 g/L Glucose απουσία ερυθρού της φαινόλης ανά πηγαδάκι
16. Τοποθέτηση πιάτου στον επωαστικό κλίβανο και αναμονή για 24 ώρες
17. Απόρριψη θρεπτικού
18. Προσθήκη των υπό μελέτη εκχυλισμάτων σε διάφορες συγκεντρώσεις διαλυμένα σε θρεπτικό DMEM 4,5 g/L Glucose απουσία ερυθρού της φαινόλης (τελικός όγκος 200μl ανά πηγαδάκι), παρουσία ή όχι TNF-α. Ως θετική συνθήκη ελέγχου χρησιμοποιείται η δεξαμεθαζόνη και ως αρνητική το DMSO
19. Τοποθέτηση στον επωαστικό κλίβανο και αναμονή για 6 ώρες
20. Απόρριψη θρεπτικού
21. Προσθήκη 70μl Reporter Lysis Buffer 1X ανά πηγαδάκι
22. Τοποθέτηση πιάτου στον αναδευτήρα στους 4°C για 30 λεπτά
23. Απόξεση επιφάνειας κυττάρων και συλλογή κυτταρολύματος σε σωληνάρια eppendorfs (το περιεχόμενο από κάθε πηγαδάκι χωριστά)
24. Φυγοκέντρηση, συλλογή υπερκείμενου και αποθήκευση στους -80°C

2.11.2.1 Μέτρηση λουσιφεράσης

Η μέτρηση της λουσιφεράσης γίνεται με την προσθήκη 100μl ειδικού αντιδραστηρίου λουσιφεράσης (περιέχει Tris HCl 20mM, MgSO₄ 2,67mM, EDTA 0,1mM, DTT 33,3mM, Co-enzymA 270μM, λουσιφερίνη 470μM, ATP 530μM και ddH₂O) σε 10μl κυτταρικού εκχυλίσματος. Αμέσως μόλις προστεθεί το αντιδραστήριο το δείγμα τοποθετείται στο λουσιφερόμετρο και φωτομετράται στα 380nm.

2.11.2.2 Μέτρηση β-γαλακτοζιδάσης

Αρχικά γίνεται η παρασκευή μίγματος, το οποίο περιέχει 200μl ρυθμιστικού διαλύματος sodium phosphate και 3μl διαλύματος β-μερκαπτοαιθανόλης 4,5M, MgCl₂ 0,1M και ddH₂O. Η αντίδραση β-γαλακτοζιδάσης γίνεται με προσθήκη 200μl από το μίγμα και 66μl από το διάλυμα υποστρώματος ONPG σε 20μl κυτταρολύματος. Μόλις τα δείγματα κιτρινίσουν, γίνεται παύση της αντίδρασης με την προσθήκη 500μl Na₂CO₃. Τα δείγματα φωτομετρούνται στα 420nm σε κλασσικό φωτόμετρο.

2.11.3 Ανοσοαποτύπωμα πρωτεϊνών κατά Western

Η ανοσοαποτύπωση κατά Western αποτελεί μια ποιοτική και ημί-ποσοτική τεχνική για τη μελέτη των πρωτεϊνών. Βασίζεται στην ειδική αλληλεπίδραση ενός πρωτογενούς αντισώματος με την προς μελέτη πρωτεΐνη. Στη συνέχεια ένα δευτερογενές αντίσωμα συνδέεται ειδικά στο πρωτογενές. Το δευτερογενές αντίσωμα είναι συζευγμένο με το ένζυμο HRP (Horse-radish peroxidase), το οποίο οξειδώνοντας κατάλληλο υπόστρωμα (ECL) εκλύει βιοφωταύγεια, η οποία μπορεί να «κάψει» φιλμ ραδιογραφίας (Yang et al., 2012).

Στην παρούσα εργασία, η μέθοδος αυτή χρησιμοποιήθηκε για τον έλεγχο της αποπτωτικής δράσης των εκχυλισμάτων, μελετώντας τα επίπεδα των προκασπάσων -3 και -9 και της πρωτεΐνης bcl-2, που αποτελούν αποπτωτικούς δείκτες. Η προκασπάση-3, βρίσκεται ανενεργή στο κυτταρόπλασμα και κατά την ενεργοποίηση των αποπτωτικών μονοπατιών μετατρέπεται στην ενεργη κασπάση-3. Η κασπάση-3 αποτελεί μια από τις κασπάσες τελεστές, οι οποίες είναι κυστεϊνοπρωτεάσες, που κατά την απόπτωση πέπτουν αναστολείς DNAσών, πυρηνικές λαμίνες και μόρια του κυτταροσκελετού οδηγώντας στον κατακερματισμό του κυττάρου (Cooper et al., 2022). Η bcl-2 είναι μια αντιαποπτωτική πρωτεΐνη, η οποία εντοπίζεται στην εξωτερική μιτοχονδριακή μεμβράνη και δρα διατηρώντας σταθερό το μεμβρανικό δυναμικό, εμποδίζοντας κατά αυτόν τον τρόπο την δημιουργία μεμβρανικών πόρων και την επακόλουθη απελευθέρωση μιτοχονδριακών παραγόντων όπως το κυτόχρωμα c στο κυτταρόπλασμα. Έτσι συμβάλλει στην καταστολή της απόπτωσης (O'Brien et al., 2008). Η προκασπάση-9, ενεργοποιείται στη δραστική κασπάση-9 μέσω της σύνδεσης με το κυτόχρωμα c, κατά το ενδογενές μιτοχονδριακό αποπτωτικό μονοπάτι και μέσω πρωτεολυτικής πέψης ενεργοποιεί τις κασπάσες τελεστές (McIlwain et al., 2013). Για την κανονικοποίηση χρησιμοποιήθηκε η β-ακτίνη και το GAPDH.

Η διαδικασία ξεκινάει με το στρώσιμο του επιθυμητού αριθμού κυττάρων σε πιάτο καλλιέργειας 6 θέσεων και μετά από 48 ώρες επώασης στον επωαστικό κλίβανο, προστίθενται τα προς μελέτη

εκχυλίσματα διαλυμένα σε θρεπτικό DMEM 4,5 g/L Glucose (1ml) και φρέσκο θρεπτικό DMEM 4,5 g/L Glucose (1ml). Το πιάτο επιστρέφεται στον κλίβανο για 48 ώρες.

2.11.3.1 Συλλογή και λύση κυττάρων

Πραγματοποιείται σε πάγο. Διαδικασία:

1. Αφαίρεση θρεπτικού
2. Προσθήκη 1ml PBS ανά πηγαδάκι
3. Απόξεση των κυττάρων από την επιφάνεια του πιάτου και μεταφορά σε σωληνάρια eppendorfs
4. Φυγοκέντρωση στα 2.000 rpm για 7 λεπτά στους 4°C
5. Απόρριψη υπερκειμένου
6. Επαναδιαλυτοποίηση ιζήματος με 50μl Lysis buffer (στο οποίο προστίθενται protease inhibitors 1/100, DDT 2mM, PMSF 1mM)
7. Αναμονή για 20 λεπτά
8. Περαιτέρω κυτταρική λύση μέσω υπερήχων (5 φορές με διάρκεια 1 δευτερολέπτου και μεσοδιαστήματα 30 δευτερολέπτων σε ένταση 50%)

2.11.3.2 Προσδιορισμός ολικής πρωτεϊνικής συγκέντρωσης (Μέθοδος Bradford)

Η μέθοδος Bradford αποτελεί μια γρήγορη και ευαίσθητη τεχνική μέτρησης των ολικών πρωτεϊνικών συγκεντρώσεων στο κυτταρόλυμα. Βασίζεται στην αλλαγή του μέγιστου απορρόφησης από 465nm στα 595nm κατά την πρόσδεση της χρωστικής Coomassie Brilliant Blue G-250 στις πρωτεΐνες (Kielkopf et al., 2020). Συνεπώς η παρατηρούμενη απορρόφηση στα 595nm είναι ανάλογη του συνόλου των πρωτεϊνών. Διαδικασία:

1. Προσθήκη 1ml αντιδραστηρίου Bradford 1X σε 1μl κυτταρολύματος
2. Ανάμειξη με vortex και αναμονή για 20 λεπτά στο σκοτάδι
3. Φωτομέτρηση στα 595nm
4. Υπολογισμός πρωτεϊνικού περιεχομένου βάσει πρότυπης καμπύλης Bradford ($y = 0,0345x + 0,0101$)

2.11.3.3 Ηλεκτροφόρηση SDS-PAGE

Η ηλεκτροφόρηση σε πηκτή πολυακρυλαμιδίου (PAGE) επιτρέπει τον διαχωρισμό των πρωτεϊνών βάσει μοριακού βάρους. Αυτό είναι δυνατό με την προσθήκη του απορρυπαντικού SDS, το οποίο φορτίζει αρνητικά τις πρωτεΐνες, με αποτέλεσμα την μετακίνησή τους στην πηκτή μετά από εφαρμογή ηλεκτρικού πεδίου (Nowakowski et al., 2014).

Αρχικά απαιτείται η παρασκευή της πηκτής διαχωρισμού, η οποία επιτρέπει τον διαχωρισμό των πρωτεϊνών και αναμονή για 25 λεπτά μέχρι να πήξει. Ακολουθεί η παρασκευή της πηκτής

επιστίβαξης, η οποία εξασφαλίζει την ταυτόχρονη κίνηση όλων των πρωτεϊνών από το ίδιο σημείο και αναμονή για ακόμα 25 λεπτά (Πίνακας 3).

Πηκτή επιστίβαξης	Πηκτή διαχωρισμού (10%)
Tris-HCl 0,125 pH 6,8	Tris-HCl 0,375 pH 8,8
SDS 0,1%	SDS 0,1%
Acrylamide 4%	Acrylamide 10%
APS 1%	APS 1%
TEMED 0,04%	TEMED 0,04%
ddH ₂ O	ddH ₂ O

Πίνακας 3: Σύνθεση πηκτών επιστίβαξης και διαχωρισμού

Έπειτα γίνεται η θέρμανση των δειγμάτων στο heatblock (95°C για 5 λεπτά), ώστε να αποδιαταχθούν οι πρωτεΐνες και η φόρτωσή τους στην πηκτή (φορτώνονται 10μl από κάθε δείγμα, τα οποία περιέχουν από 25μg πρωτεϊνικού προϊόντος, 2,5 μl Sample buffer 4X και ο όγκος συμπληρώνεται με Tris-HCl 20mM pH 7,5). Επιπλέον φορτώνεται και ένας pre-stained μάρτυρας μοριακού βάρους (3-245 kDA). Η συσκευή γεμίζει με Running buffer 1X και πραγματοποιείται η ηλεκτροφόρηση στα 80 Volt για περίπου 2 ώρες.

2.11.3.4 Αποτύπωση σε μεμβράνη νιτροκυτταρίνης

Αφού ολοκληρωθεί η ηλεκτροφόρηση, γίνεται η αποτύπωση των πρωτεϊνών σε μεμβράνη νιτροκυτταρίνης με μέγεθος πόρων 0,22μm. Αρχικά η πηκτή πολυακρυλαμίδιου και η μεμβράνη τοποθετούνται σε Transfer buffer 1X για περίπου 20 λεπτά (εξισορρόπηση). Έπειτα μεταφέρονται στην συσκευή ηλεκτρομεταφοράς μαζί με Transfer buffer 1X, σε 0,35 Amber για 70 λεπτά.

2.11.3.5 Blocking

Αφού ολοκληρωθεί η αποτύπωση, η μεμβράνη υπόκειται στο λεγόμενο blocking, ώστε να αποφευχθούν μη ειδικές αλληλεπιδράσεις με το πρωτογενές αντίσωμα. Το blocking πραγματοποιείται με τοποθέτηση της μεμβράνης σε διάλυμα blocking 10% (περιέχει γάλα 10% διαλυμένο σε T-BST 1X) στον αναδευτήρα για μία ώρα.

2.11.3.6 Ανοσοανίχνευση πρωτεϊνών και εμφάνιση σήματος

Τα πρωτογενή αντισώματα που χρησιμοποιήθηκαν παρατίθενται στον Πίνακα 4. Τα δευτερογενή αντισώματα που χρησιμοποιήθηκαν είναι anti-mouse και anti-rabbit, συζευγμένα με horseradish peroxidase (HRP).

	Πηγή	kDA
Pro-Caspase 3	Anti-rabbit	35, 19, 17
Pro-Caspase 9	Anti-mouse	47, 37, 35
b-cell lymphoma 2 (Bcl-2)	Anti-rabbit	26
Glyceraldehyde 3-phosphate dehydrogenase (GAPDH)	Anti mouse	36
β-actin	Anti mouse	42

Πίνακας 4: Πρωτογενή αντισώματα

Διαδικασία:

1. 2-3 πλύσεις της μεμβράνης με T-BST 1X
2. Επώαση μεμβράνης με πρωτογενές αντίσωμα στον αναδευτήρα για 16 ώρες στους 4°C
3. Απόρριψη πρωτογενούς αντισώματος
4. 4 πεντάλεπτες πλύσεις με T-BST 1X (στον αναδευτήρα)
5. Επώαση μεμβράνης με δευτερογενές αντίσωμα στον αναδευτήρα για 1 ώρα σε θερμοκρασία δωματίου
6. 3 πεντάλεπτες πλύσεις με T-BST 1X (στον αναδευτήρα)
7. Επώαση μεμβράνης με ECL A και ECL B (σε αναλογία 1:1) στο σκοτάδι για 3 λεπτά
8. Μεταφορά μεμβράνης σε ειδική κασετίνα έκθεσης για εμφάνιση σήματος σε φιλμ ραδιογραφίας
9. Αναμονή
10. Πλύση σε διάλυμα ανάπτυξης σήματος (Developer) έως να εμφανιστούν οι ζώνες
11. Πλύση με νερό
12. Επώαση σε διάλυμα μονιμοποίησης (Fixer) για 1 λεπτό
13. Ανάλυση αποτελεσμάτων

2.12 ΑΝΑΛΥΣΗ ΑΠΟΤΕΛΕΣΜΑΤΩΝ

- Microsoft Excel: Στατιστικές αναλύσεις Student's *t*-test (στατιστικώς σημαντικές διαφορές με p -value<0,05) και κανονικοποιήσεις των αποτελεσμάτων (λόγοι έντασης ζωνών εκχυλισμάτων υπό μελέτη προς ένταση ζωνών των μορίων αναφοράς για τα αποτελέσματα της ανοσοαποτύπωσης κατά Western). Τα αποτελέσματα της δοκιμασίας MTT και λουσιφεράσης/β-γαλακτοζιδάσης εκφράζονται ως μέσος όρος $\pm$ την τυπική απόκλιση (Standard Deviation, SD).
- ImageJ: Ποσοτικοποιήσεις των πρωτεϊνικών ζωνών από την ανοσοαποτύπωση κατά Western
- Adobe Photoshop: Δημιουργία εικόνων αποτελεσμάτων ανοσοαποτύπωσης κατά Western

3. ΑΠΟΤΕΛΕΣΜΑΤΑ

Στη παρούσα εργασία, εκμεταλλευτήκαμε την μεγάλη ποικιλία δευτερογενών μεταβολιτών που παράγονται στα φυτά και ενισχύσαμε τη συσσώρευσή τους στους φυτικούς ιστούς επάγοντας τη δημιουργία συμβιωτικής σχέσης με τον ωφέλιμο μύκητα *Rhizophagus irregularis*. Στη συνέχεια απομονώσαμε εκχυλίσματα από τους φυτικούς ιστούς με οξικό αιθυλεστέρα και εξετάσαμε διάφορες πιθανές βιολογικές δράσεις τους. Τα εκχυλίσματα προέρχονται από το υπέργειο τμήμα του φυτού, δηλαδή από βλαστούς και φύλλα, αλλά για συντομία στο εξής θα αναφέρονται ως «βλαστοί». Τα φυτά είχαν υποστεί τους εξής χειρισμούς:

- Μη εμβολιασμένα φυτά
- Φυτά εμβολιασμένα με τον ΔΕΜ *R. Irregularis*

Στα εμβολιασμένα φυτά, για να επιβεβαιωθεί η επιτυχία αποικισμού τους από τον ενδομυκορριζικό μύκητα, υπολογίστηκε το ποσοστό αποικισμού της ρίζας μέσω μικροσκοπικής παρατήρησης και βρέθηκε 15%.

Σε όλες τις βιολογικές δοκιμές έχει συμπεριληφθεί ως συνθήκη αρνητικού ελέγχου η εφαρμογή σκέτου DMSO και τα αποτελέσματα του χειρισμού αυτού χρησιμοποιήθηκαν ως τιμή αναφοράς για την κανονικοποίηση αποτελεσμάτων τους υπόλοιπους χειρισμούς.

3.1 ΔΙΕΡΕΥΝΗΣΗ ΑΝΤΙΜΥΚΗΤΙΑΚΗΣ ΔΡΑΣΗΣ

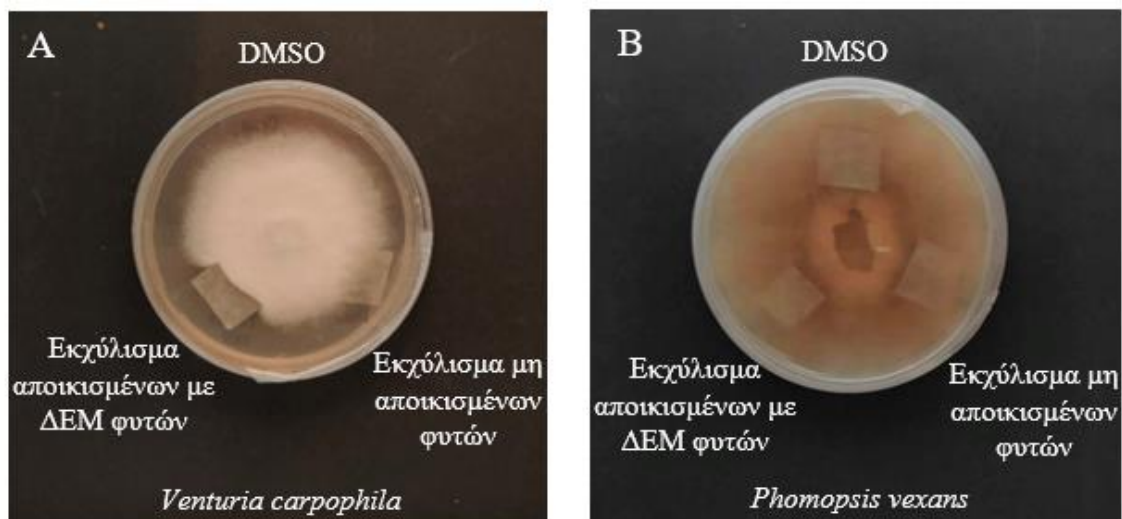
Αρχικά ελέγχθηκε η αντιμυκητιακή δράση των εκχυλισμάτων. Χρησιμοποιήθηκαν φυτικά εκχυλίσματα βλαστών *Lotus japonicus*, από μη εμβολιασμένα και εμβολιασμένα με ΔΕΜ φυτά συγκέντρωσης 4mg/ml. Η αντιμυκητιακή τους δράση ελέγχθηκε ενάντια σε 13 φυτοπαθογόνους μύκητες και τα αποτελέσματα συνοψίζονται στον Πίνακα 5.

Ονομασία μύκητα	BPIC	Βλαστοί αποικισμένων με ΔΕΜ φυτών	Βλαστοί μη εμβολιασμένων φυτών
<i>Sclerotinia sclerotorum</i>	2529	-	-
<i>Alternaria alternata</i>	2596	-	-
<i>Botryosphaeria stevensii</i>	1688	-	-
<i>Botrytis cinerea</i>	1948	-	-
<i>Venturia carpophila</i>	1350	+	-
<i>Monilia fructicola</i>	2684	-	-
<i>Fusarium chlamydosporum</i>	1127	-	-

<i>Fusarium oxysporum</i>	2550	-	-
<i>Aspergillus niger</i>	1970	-	-
<i>Colletotrichum acutatum</i>	2705	-	-
<i>Rhizoctonia solani</i>	2531	-	-
<i>Phomopsis vexans</i>	1329	-	-
<i>Verticillium dahlia</i>	2509	-	-

Πίνακας 5: Αποτελέσματα αντιμυκητιακής δράσης φυτικών εκχυλισμάτων βλαστών μη αποικισμένων *L. japonicus* 4mg/ml και βλαστών από φυτά *L. japonicus* εμβολιασμένα με *R. irregularis* 4mg/ml. Όπου (+) παρατηρείται αναστολή της ανάπτυξης του μύκητα ενώ όπου (-) δεν παρατηρείται αναστολή.

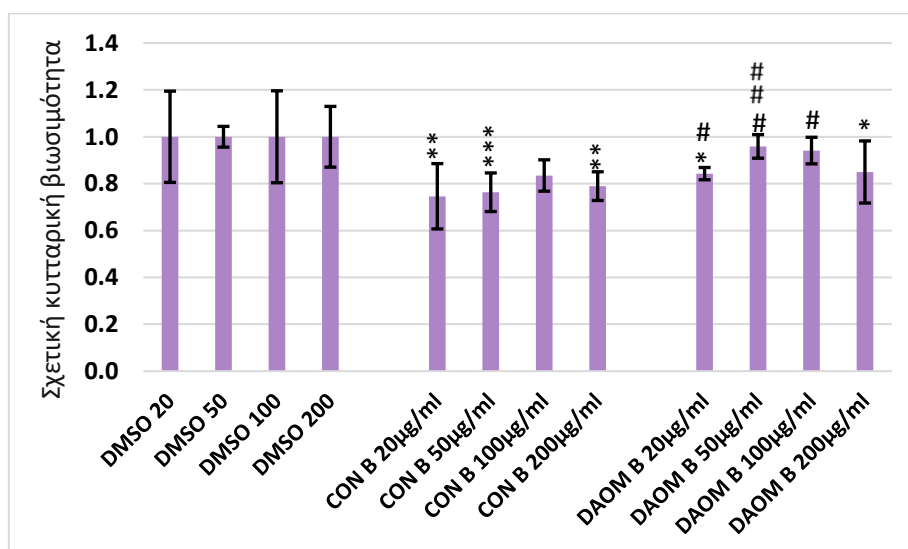
Η ύπαρξη αντιμυκητιακής δράσης καθορίζεται από την παρεμπόδιση στην ανάπτυξη του μύκητα προς το σημείο του τριβλίου, όπου βρίσκεται διηθητικό χαρτάκι εμποτισμένο με το υπό μελέτη εκχύλισμα. Αναστολή της μυκητιακής ανάπτυξης παρατηρήθηκε μόνο ενάντια του *Venturia carpophila*, και αυτό σε πολύ μικρό ποσοστό, από το εκχύλισμα που προήλθε από τα αποικισμένα με ΔΕΜ φυτά (Εικόνα 16Α). Αντίθετα, όλοι οι υπόλοιποι μύκητες αναπτύχθηκαν πλήρως στο τριβλίο (ενδεικτική απεικόνιση πλήρους ανάπτυξης στην Εικόνα 16Β).



Εικόνα 16: (Α) Αναστολή ανάπτυξης μύκητα *Venturia carpophila* από φυτικό εκχύλισμα βλαστών *L. Japonicus* εμβολιασμένων με ΔΕΜ 4mg/ml. (Β) Ενδεικτική απεικόνιση πλήρους μυκητιακής ανάπτυξης (*Phomopsis vexans*) σε τριβλίο, παρουσία φυτικών εκχυλισμάτων βλαστών μη αποικισμένων *L. japonicus* 4mg/ml και βλαστών από φυτά *L. japonicus* εμβολιασμένα με ΔΕΜ 4mg/ml.

3.2 ΔΙΕΡΕΥΝΗΣΗ ΑΝΤΙ-ΠΟΛΛΑΠΛΑΣΙΑΣΤΙΚΗΣ ΔΡΑΣΗΣ

Για τον έλεγχο της αντί-πολλαπλασιαστικής δράσης των φυτικών εκχυλισμάτων χρησιμοποιήθηκε η δοκιμασία MTT. Σε καλλιέργεια κυττάρων HEK293, προστέθηκαν τα υπό μελέτη εκχυλίσματα σε 4 διαφορετικές συγκεντρώσεις: 20μg/ml, 50μg/ml, 100μg/ml και 200μg/ml. Ως συνθήκες ελέγχου χρησιμοποιήθηκαν DMSO 1/1000, DMSO 1/400, DMSO 1/200 και DMSO 1/100. Όπως φαίνεται στην Εικόνα 17, 48 ώρες μετά την προσθήκη των εκχυλισμάτων, παρατηρείται στατιστικά σημαντική μείωση της κυτταρικής βιωσιμότητας της τάξης του 20% από το εκχύλισμα των μη αποικισμένων φυτών συγκεντρώσεων 20μg/ml, 50μg/ml και 200μg/ml. Όσον αφορά τα εκχυλίσματα από τα αποικισμένα φυτά, σε συγκέντρωση 20μg/ml και 200μg/ml, εμφάνισαν επίσης μείωση της κυτταρικής βιωσιμότητας σε σχέση με τις αντίστοιχες συνθήκες ελέγχου, αλλά σε μικρότερο βαθμό από τα μη-αποικισμένα φυτά, ενώ παρατηρείται απουσία επίδρασης στις συγκεντρώσεις 50 μg/ml και 100 μg/ml.

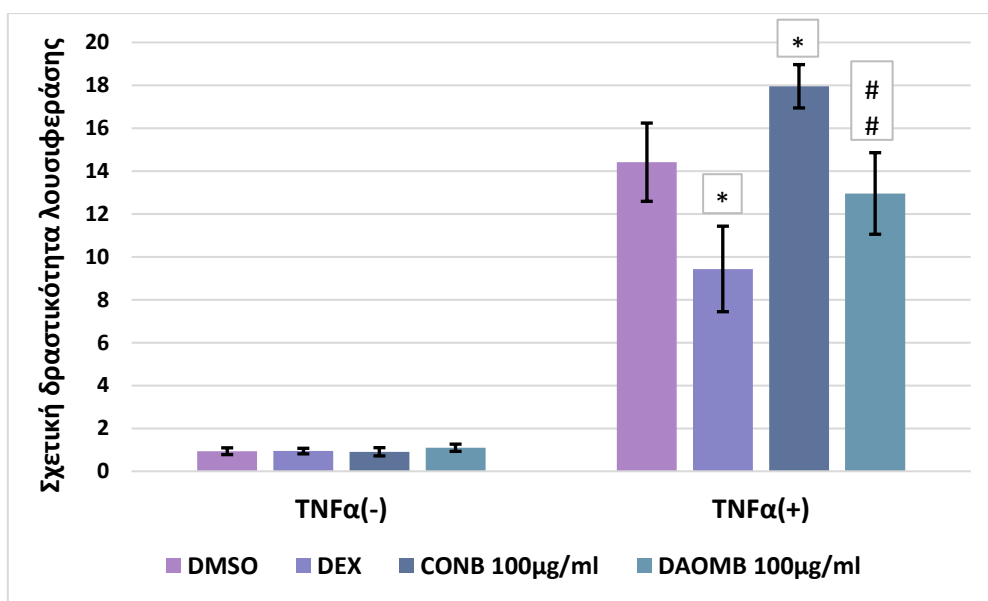


Εικόνα 17: Αξιολόγηση της αντί-πολλαπλασιαστικής δράσης των φυτικών εκχυλισμάτων βλαστών μη αποικισμένων *L. japonicus* (CON B) και βλαστών από φυτά *L. japonicus* εμβολιασμένα με *R. irregularis* (DAOM B) σε κύτταρα HEK293, μετά από επώαση 48 ωρών. Η σχετική κυτταρική βιωσιμότητα εκφράζεται ως η κυτταρική βιωσιμότητα παρουσία των υπό μελέτη εκχυλισμάτων σε σύγκριση με μια συνθήκη ελέγχου (DMSO). Η κυτταρική βιωσιμότητα στη συνθήκη ελέγχου είναι 1. Τα δεδομένα αναλύθηκαν με στατιστική ανάλυση t-test και εκφράζονται ως ο μέσος όρος $\pm$ SD, (n=4), *p<0,05, **p<0,01, ***p<0,001 σε σύγκριση με την αντίστοιχη συνθήκη ελέγχου. Επίσης, έγινε σύγκριση της σχετικής κυτταρικής βιωσιμότητας μεταξύ των 2 φυτικών εκχυλισμάτων #p<0,05, ## #p<0,001.

3.3 ΔΙΕΡΕΥΝΗΣΗ ΑΝΤΙΦΛΕΓΜΟΝΩΔΟΥΣ ΔΡΑΣΗΣ

Στη συνέχεια πραγματοποιήθηκε έλεγχος της αντιφλεγμονώδους δράσης των φυτικών εκχυλισμάτων, μέσω της δοκιμασίας λουσιφεράσης/β-γαλακτοζιδάσης, η οποία στηρίζεται στην μέτρηση της μεταγραφικής δραστηριότητας του μεταγραφικού παράγοντα NF-κΒ, μετά από έκθεση στον παράγοντα φλεγμονής TNFα. Σε καλλιέργεια κυττάρων HEK293 μελετήθηκε η επίδραση του εκχυλίσματος βλαστών από μη αποικισμένα φυτά και του εκχυλίσματος βλαστών από αποικισμένα με ΔΕΜ φυτά σε συγκέντρωση 100μg/ml, παρουσία και απουσία TNFα, μετά από επώαση 6 ωρών. Ως θετική συνθήκη ελέγχου χρησιμοποιήθηκε η DEX, ενώ ως αρνητική συνθήκη ελέγχου χρησιμοποιήθηκε DMSO 1/200.

Όπως φαίνεται στην Εικόνα 18, η παρουσία TNFα οδήγησε σε 14 φορές αύξηση της μεταγραφικής δραστηριότητας του NF-κΒ στη αρνητική συνθήκη ελέγχου (DMSO). Η θετική συνθήκη ελέγχου, DEX, προκάλεσε μείωση, της τάξης του 30%, της επαγόμενης από τον TNFα μεταγραφικής δραστηριότητας του NF-κΒ ενώ το εκχύλισμα από μη αποικισμένα φυτά προκάλεσε στατιστικώς σημαντική αύξηση στη μεταγραφική δραστηριότητα του NF-κΒ, σε ποσοστό περίπου 20%, σε σχέση με τη συνθήκη ελέγχου. Το εκχύλισμα από αποικισμένα φυτά δεν προκάλεσε στατιστικώς σημαντικές μεταβολές στην επαγόμενη από TNFα μεταγραφική δραστηριότητα του NF-κΒ σε σχέση με τη συνθήκη ελέγχου, αλλά προκάλεσε στατιστικώς σημαντική μείωση της σε σύγκριση με το εκχύλισμα από μη αποικισμένα φυτά σε ποσοστό 30%.



Εικόνα 18: Αξιολόγηση της αντιφλεγμονώδους δράσης (μέσω της καταστολής της επαγόμενης από τον TNFα μεταγραφικής δραστηριότητας του NF-κΒ) των φυτικών εκχυλισμάτων βλαστών μη αποικισμένων *L. japonicus* (CON B) και βλαστών από φυτά *L. japonicus* εμβολιασμένα με *R. irregularis* (DAOM B) σε κύτταρα HEK293, μετά από επώαση 6 ωρών. Η σχετική δραστηριότητα λουσιφεράσης προκύπτει με κανονικοποίηση της δραστηριότητας λουσιφεράσης με τη δραστηριότητα της β-γαλακτοζιδάσης. Στη συνθήκη ελέγχου (DMSO) η σχετική δραστηριότητα λουσιφεράσης ισούται με 1. Τα δεδομένα εκφράζονται ως μέσος όρος $\pm$ SD, (n=3), *p<0,05. Επίσης, σύγκριση της σχετικής δραστηριότητας λουσιφεράσης έγινε μεταξύ των 2 φυτικών εκχυλισμάτων # #p<0,01.

3.4 ΔΙΕΡΕΥΝΗΣΗ ΑΠΟΠΤΩΤΙΚΗΣ ΔΡΑΣΗΣ

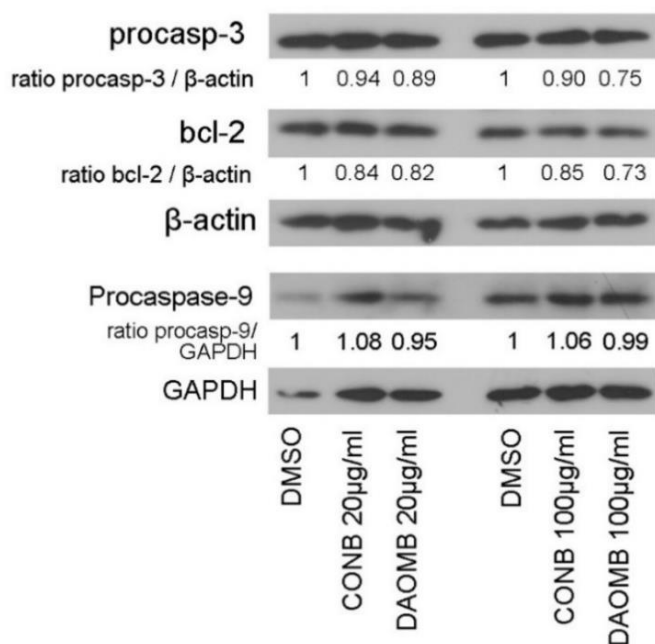
Τελευταία αξιολογήθηκε η επίδραση των φυτικών εκχυλίσμάτων στους μηχανισμούς απόπτωσης, μέσω μελέτης της επίδρασής τους στα πρωτεϊνικά επίπεδα της προκασπάσης-3, της προκασπάσης-9 και του bcl-2, εφαρμόζοντας ανοσοαποτύπωση κατά Western. Σε καλλιέργεια κυττάρων HEK293 προστέθηκαν τα εκχυλίσματα από βλαστούς μη αποικισμένων και αποικισμένων *L. Japonicus* σε συγκεντρώσεις 20μg/ml και 100μg/ml. Ως συνθήκη ελέγχου χρησιμοποιήθηκε DMSO 1/1000 και DMSO 1/200 αντίστοιχα.

Πρώτα μελετήθηκαν τα πρωτεϊνικά επίπεδα της προκασπάσης-3. Όπως φαίνεται στην Εικόνα 19, τα φυτικά εκχυλίσματα από μη αποικισμένα φυτά προκάλεσαν μικρή μείωση στα επίπεδα της προκασπάσης-3 (5-10%) και στις δύο συγκεντρώσεις, ενώ τα εκχυλίσματα αποικισμένων φυτών αποδείχθηκαν πιο δραστικά καθώς προκάλεσαν μεγαλύτερη μείωση (11% στην συγκέντρωση 20μg/ml και 15% στην συγκέντρωση 100μg/ml).

Επειτα, μελετήθηκαν τα πρωτεϊνικά επίπεδα της πρωτεΐνης bcl-2. Όπως και με την προκασπάση-3, και τα δύο φυτικά εκχυλίσματα στις συγκεντρώσεις 20μg/ml και 100μg/ml οδήγησαν σε μείωση των πρωτεϊνικών επιπέδων του bcl-2, με τη μέγιστη μείωση να παρατηρείται από το εκχύλισμα αποικισμένων φυτών συγκέντρωσης 100μg/ml (27%) (Εικόνα 19).

Τελευταία, μελετήθηκαν τα πρωτεϊνικά επίπεδα της προκασπάσης-9. Τα αποτελέσματα της δοκιμασίας, όπως φαίνεται στην Εικόνα 19, δεν έδειξαν σημαντικές μεταβολές των πρωτεϊνικών επιπέδων της προκασπάσης-9 και από τα 2 εκχυλίσματα.

Συνοψίζοντας, το πιο δραστικό φυτικό εκχύλισμα όσο αφορά τη μείωση της προκασπάσης-3 και του bcl-2, εμφανίζεται να είναι το εκχύλισμα από αποικισμένα φυτά σε συγκέντρωση 100μg/ml.



Εικόνα 19: Αξιολόγηση της επίδρασης των φυτικών εκχυλίσμάτων βλαστών μη αποικισμένων *L. japonicus* (CON B) και βλαστών από φυτά *L. japonicus* εμβολιασμένα με ΔΕΜ (DAOM B) στα επίπεδα των πρωτεϊνών προκασπάση-9, προκασπάση-3 και bcl-2 σε κύτταρα HEK293, μετά από επώαση 48 ωρών. Ο αναλογίες προκύπτουν με κανονικοποίηση της έντασης των ζωνών των υπό μελέτη εκχυλίσμάτων με τις ζώνες της β-ακτίνης ή GAPDH αντίστοιχα.

4. ΣΥΖΗΤΗΣΗ

Τα φυτά παράγουν ένα πλήθος δευτερογενών μεταβολιτών (φαινολικές ενώσεις, τερπένια και αζωτούχες ενώσεις), οι οποίοι συμμετέχουν στην επικοινωνία του φυτού με το περιβάλλον, παρέχοντας προστασία ενάντια σε βιοτικές και αβιοτικές καταπονήσεις. Πολλοί φυτικοί δευτερογενείς μεταβολίτες αξιοποιούνται από τον άνθρωπο, λόγω των φαρμακευτικών τους ιδιοτήτων, για την αντιμετώπιση και θεραπεία ασθενειών.

Εδώ και χρόνια, είναι γνωστή η επίδραση των δενδρόμορφων ενδομυκορριζικών μυκήτων στο φυτικό μεταβόλωμα κατά τη συμβίωση με φυτά. Πιο συγκεκριμένα, η συμβιωτική σχέση επάγει ποιοτικές και ποσοτικές τροποποιήσεις στους δευτερογενείς μεταβολίτες. Συνεπώς, ιδιαίτερο ενδιαφέρον παρουσιάζει η μελέτη των συμβιωτικών φυτών, ως εναλλακτικά μέσα παραγωγής δευτερογενών μεταβολιτών με βιολογικές δράσεις. Στη παρούσα εργασία, διερευνήθηκε η αντιμυκητιακή, αντί-πολλαπλασιαστική, αντιφλεγμονώδης και αποπτωτική δράση εκχυλίσματος φυτών, που συμβιώνουν με ΔΕΜ.

Για την παραγωγή εκχυλισμάτων, χρησιμοποιήθηκαν βλαστοί φυτών *L.japonicus*, που είχαν εμβολιαστεί με τον δενδρόμορφο ενδομυκορριζικό μύκητα *R.irregularis* και βλαστοί φυτών *L.japonicus* που δεν εμβολιάστηκαν με ΔΕΜ. Η εκχύλιση έγινε με οξικό αιθυλεστέρα, έναν οργανικό διαλύτη που επιτρέπει την εκχύλιση άπολων οργανικών μορίων και οργανικών μορίων μέτριας πολικότητας. Στη συνέχεια, οι δευτερογενείς μεταβολίτες διαλυτοποιήθηκαν σε DMSO, σε συγκέντρωση 4mg/ml.

Σε πρώτη φάση, διερευνήθηκε η αντιμυκητιακή δράση των εκχυλισμάτων (σε *in vitro* δοκιμές) ενάντια σε 13 φυτοπαθογόνους μύκητες. Αναστολή της μυκητιακής ανάπτυξης παρατηρήθηκε μόνο στον μύκητα *Venturia carporhila* από το εκχύλισμα των αποικισμένων φυτών. Η αναστολή παρατηρήθηκε σε μικρό βαθμό και αυτό πιθανώς οφείλεται στον σχετικά χαμηλό αποικισμό των φυτών από τον μύκητα. Ιδιαίτερο ενδιαφέρον παρουσιάζει η εξειδίκευση της αντιμυκητιακής δράσης του εκχυλίσματος, καθώς παρατηρήθηκε μόνο για έναν φυτοπαθογόνο μύκητα. Η παρατηρούμενη αναστολή πιθανόν να οφείλεται είτε στην αυξημένη συσσώρευση κάποιου ήδη υπάρχοντος δευτερογενούς μεταβολίτη ή στην *de novo* παραγωγή κάποιου δευτερογενή μεταβολίτη, που οφείλεται αποκλειστικά στη συμβίωση. Προηγούμενες μελέτες επιβεβαιώνουν τόσο την συσσώρευση δευτερογενών μεταβολιτών κατά τη συμβίωση (Santos et al., 2017, You et al., 2023), όσο και την έκφραση γονιδίων στα φυτικά κύτταρα, η οποία επάγεται αποκλειστικά κατά τη συμβίωση με ΔΕΜ (Massoumou et al., 2007, Guether et al., 2009). Σε κάθε περίπτωση, η δράση αυτού του μορίου, εντοπίζεται στο υπέργειο τμήμα του φυτού, κάτι που είναι εξαιρετικά ενδιαφέρον, καθώς η συμβιωτική σχέση εγκαθιδρύεται στις ρίζες. Το μόριο αυτό είτε παράχθηκε στις ρίζες και έπειτα μεταφέρθηκε στους βλαστούς, είτε μέσω σηματοδότησης από τις ρίζες, παράχθηκε απευθείας στο υπέργειο τμήμα. Η αντιμυκητιακή δράση βλαστών αποικισμένων με ΔΕΜ φυτών, έχει παρατηρηθεί και από προηγούμενες μελέτες. Οι Sanmartin et al. (2020) εντόπισαν αυξημένα επίπεδα της αντιμικροβιακής λιγνάνης yatein σε φύλλα φυτών τομάτας αποικισμένων με *G. intraradices*, σε σχέση με μη αποικισμένα φυτά, μετά από έκθεση στον φυτοπαθογόνο *B. cinerea*. Επιπλέον, παρατηρήθηκε αυξημένη αντιμυκητιακή δράση των αιθέριων ελαίων λεμονόχορτου εμβολιασμένου

με μείγμα ΔΕΜ, ενάντια στον μύκητα *Fusarium solani*, σε σύγκριση με μη εμβολιασμένα φυτά (Eke et al., 2020).

Στη συνέχεια, μελετήθηκε η αντί-πολλαπλασιαστική δράση των φυτικών εκχυλισμάτων, μέσω της δοκιμασίας ΜΤΤ, σε κύτταρα HEK293. Πραγματοποιήθηκε 48ώρη επώαση των κυττάρων με τα υπό μελέτη εκχυλίσματα σε συγκεντρώσεις 20μg/ml, 50μg/ml, 100μg/ml και 200μg/ml. Τα εκχυλίσματα από μη αποικισμένα φυτά, εμφάνισαν κυτταροτοξικότητα, η οποία οδήγησε σε μείωση της σχετικής κυτταρικής βιωσιμότητας της τάξης του 20%, σε σχέση με τη συνθήκη ελέγχου (σκέτο DMSO). Παρατηρήθηκε, πως τα εκχυλίσματα αποικισμένων φυτών εμφάνισαν μειωμένη κυτταροτοξικότητα σε σχέση με τα εκχυλίσματα μη αποικισμένων φυτών. Η παρατηρούμενη δράση, μπορεί να οφείλεται στη τροποποίηση του φυτικού δευτερογενούς μεταβολικού προφίλ από τους ΔΕΜ, η οποία πιθανόν οδήγησε είτε στη συσσώρευση κάποιου μορίου που αναστέλλει την αντί-πολλαπλασιαστική δράση που εμφανίζουν τα μη αποικισμένα φυτά ή στην μείωση των επιπέδων του δευτερογενούς μεταβολίτη που έχει αντί-πολλαπλασιαστικές ιδιότητες. Φαίνεται πως η σύνθεση των μεταβολιτών που συσσωρεύονται στους συμβιωτικούς ιστούς και έχουν αντί-πολλαπλασιαστική δράση, εξαρτάται τόσο από το είδος του φυτού όσο και από το είδος του μύκητα, καθώς υπάρχουν αναφορές σε προηγούμενες μελέτες, όπου παρατηρήθηκε ενισχυμένη αντί-πολλαπλασιαστική δράση στα συμβιωτικά φυτά. Για παράδειγμα, εκχυλίσματα από φυτά τζίντζερ αποικισμένα με ΔΕΜ εμφάνισαν αυξημένη αντικαρκινική δράση ενάντια σε καρκινικά κύτταρα μαστού (κυτταρική σειρά T47D) (Suhart et al., 2018, 2022). Επιπλέον, τα εκχυλίσματα αποικισμένων με ΔΕΜ φυτών που μελετήθηκαν στην παρούσα εργασία, ενδεχομένως να εμφανίζουν αντί-πολλαπλασιαστική δράση ενάντια σε άλλες κυτταρικές σειρές. Οι Torres et al. (2019), μελέτησαν την αντικαρκινική δράση διαφορετικών κλώνων *Vitis vinifera*, εμβολιασμένων με ΔΕΜ, σε 4 καρκινικές κυτταρικές σειρές, και παρατήρησαν ότι ο ίδιος κλώνος εμφάνιζε αυξομειώσεις στην παρατηρούμενη κυτταροτοξικότητα, ανάλογα με την κυτταρική σειρά, με την οποία επωαζόταν.

Η μελέτη της αντιφλεγμονώδους δράσης των εκχυλισμάτων πραγματοποιήθηκε με τη δοκιμασία λουσιφεράσης/β-γαλακτοζιδάσης, κατά την οποία κύτταρα HEK293 επώαστηκαν 6 ώρες με τα υπό μελέτη εκχυλίσματα συγκέντρωσης 100μg/ml, παρουσία και απουσία TNFα. Στη συνέχεια μετρήθηκε η μεταγραφική δραστηριότητα του παράγοντα φλεγμονής NF-κΒ. Όπως ήταν αναμενόμενο, στη αρνητική συνθήκη ελέγχου (σκέτο DMSO), η παρουσία TNFα, προκάλεσε 14 φορές αύξηση της μεταγραφικής δραστηριότητας του NF-κΒ, η οποία μειώθηκε σε ποσοστό 30% από την δεξαμεθαζόνη (DEX), μια γνωστή ουσία με αντιφλεγμονώδη δράση. Η επώαση των κυττάρων με το εκχύλισμα βλαστών από μη εμβολιασμένα φυτά, οδήγησε σε 20% αύξηση της μεταγραφικής δραστηριότητας του NF-κΒ (σε σχέση με την συνθήκη αρνητικού ελέγχου), κάτι που ίσως δείχνει την παρουσία παραγόντων φλεγμονής στο εκχύλισμα. Αξιοσημείωτη είναι η παρατηρούμενη μείωση, της τάξης του 30%, της επαγόμενης από τον TNFα μεταγραφικής δραστηριότητας του NF-κΒ, από το εκχύλισμα αποικισμένων φυτών, σε σύγκριση με το εκχύλισμα από μη αποικισμένα φυτά. Το αποτέλεσμα αυτό συνεπάγεται την παρουσία παραγόντων με αντιφλεγμονώδη δράση στο εκχύλισμα από τους βλαστούς των αποικισμένων φυτών ή εναλλακτικά αντικατοπτρίζει την καταστολή του μονοπατιού φλεγμονής από τους ΔΕΜ. Η ενίσχυση της αντιφλεγμονώδους δράσης μπορεί να επιτευχθεί με συσσώρευση δευτερογενών μεταβολιτών που έχουν αντιφλεγμονώδεις ιδιότητες. Προηγούμενες μελέτες υποστηρίζουν αυτή τη θεωρία. Για παράδειγμα, η συμβίωση του *Cichorium Intybus* με ΔΕΜ, επάγει τη συσσώρευση ενός αντιφλεγμονώδους φαινυλπροπανοειδούς, που

ονομάζεται κικορικό οξύ (chicoric acid), το οποίο δρα καταστέλλοντας το μονοπάτι του NF-κΒ (Rozpadek et al., 2014). Επιπροσθέτως, πλούσια σε αλκαλοειδή, εκχυλίσματα κόκκινου τζίντζερ (*Zingiber officinale*) αποικισμένου με ΔΕΜ, προκάλεσαν μείωση της φλεγμονώδους απόκρισης κυττάρων ποντικών, μετά από εμβολιασμό με το εμβόλιο Pfizer ενάντια στον SARS-CoV-2 (Hefni et al., 2023).

Τελευταία διερευνήθηκε η αποπτωτική δράση των εκχυλισμάτων. Κύτταρα HEK-293 επωάστηκαν για 48 ώρες με τα υπό μελέτη εκχυλίσματα, σε συγκεντρώσεις 20μg/ml και 100μg/ml και έπειτα προσδιορίστηκαν τα πρωτεϊνικά επίπεδα 3 δεικτών της απόπτωσης, της προκασπάσης-3, της προκασπάσης-9 και της αντί-αποπτωτικής πρωτεΐνης bcl-2, μέσω ανοσοαποτύπωσης κατά Western. Τα αποτελέσματα έδειξαν μείωση στα επίπεδα της προκασπάσης-3 και του bcl-2 από το εκχύλισμα αποικισμένων φυτών και στις δύο συγκεντρώσεις, με την πιο υψηλή μείωση, της τάξης του 15%, να παρατηρείται από το εκχύλισμα των αποικισμένων φυτών σε συγκέντρωση 100μg/ml. Συνεπώς, το εκχύλισμα από τα αποικισμένα φυτά φαίνεται να επάγει την διαδικασία της απόπτωσης με δόσοεξαρτώμενο τρόπο. Σε αντίθεση με τα προαναφερθέντα μόρια, τα πρωτεϊνικά επίπεδα της προκασπάσης-9 έμειναν σταθερά σε όλες τις συνθήκες. Η προκασπάση-9 συμμετέχει στο ενδογενές μιτοχondριακό αποπτωτικό μονοπάτι, όποτε εφόσον δεν εντοπίστηκαν μεταβολές στα πρωτεϊνικά επίπεδά της, συμπεραίνεται ότι η παρατηρούμενη απόπτωση, δεν συμβαίνει μέσω του συγκεκριμένου μονοπατιού. Σε προηγούμενες μελέτες, έχει καταγραφεί η αποπτωτική δράση των δευτερογενών μεταβολιτών (Bhattacharya et al., 2009, Allouche et al., 2010, Sbrana et al., 2014), η οποία σύμφωνα με την υπάρχουσα βιβλιογραφία, διεξάγεται τόσο μέσω του ενδογενούς όσο και μέσω του εξωγενούς μονοπατιού (Kumar et al., 2015). Συνεπώς, η αποπτωτική δράση των εκχυλισμάτων από τους βλαστούς φυτών αποικισμένων με ΔΕΜ, πιθανόν οφείλεται σε συσσώρευση κάποιου δευτερογενούς μεταβολίτη (ή μίγματος δευτερογενών μεταβολιτών), που επάγει την απόπτωση, κάτι που συνάδει και με παλαιότερες έρευνες. Για παράδειγμα, αιθέρια έλαια από ευκάλυπτο εμφανίζουν αποπτωτική δράση, και τα επίπεδα τους αυξάνονται κατά την συμβίωση με ΔΕΜ (Abiri et al., 2021, Bi et al., 2007). Επιπλέον, κατά τη συμβίωση *Vitis vinifera* με ΔΕΜ, παρατηρείται αύξηση των επιπέδων του πτητικού τερπενοειδούς γερανιόλη, το οποίο εμφανίζει προαποπτωτικές ιδιότητες (Velásquez et al., 2020).

Συνοψίζοντας, στην παρούσα εργασία παρατηρήθηκε η θετική επίδραση της συμβίωσης του φυτού *L. japonicus* με τον ΔΕΜ *R. irregularis* στην αντιμυκητιακή, αντιφλεγμονώδη και αποπτωτική δράση των εκχυλισμάτων που προέκυψαν από το υπέργειο τμήμα του φυτού. Αν και, ακόμα, πρέπει να διανυθεί μεγάλη απόσταση, η χρήση συμβιωτικών συστημάτων φαίνεται να είναι μια πολλά υποσχόμενη εναλλακτική μέθοδος παραγωγής ενώσεων με χρήσιμες βιολογικές δράσεις, που θα μπορούσαν να εφαρμοστούν τόσο για την αντιμετώπιση ασθενειών όσο και στη γεωργία.

ΒΙΒΛΙΟΓΡΑΦΙΑ

- ABBOTT, L. K., & ROBSON, A. D. (1978). GROWTH OF SUBTERRANEAN CLOVER IN RELATION TO THE FORMATION OF ENDOMYCORRHIZAS BY INTRODUCED AND INDIGENOUS FUNGI IN A FIELD SOIL. *New Phytologist*, 81(3), 575–585. <https://doi.org/10.1111/j.1469-8137.1978.tb01631.x>
- Abiri, R., Atabaki, N., Sanusi, R., Malik, S., Abiri, R., Safa, P., . . . Abdul-Hamid, H. (2021). New Insights into the Biological Properties of Eucalyptus-Derived Essential Oil: A Promising Green Anti-Cancer Drug. *Food Reviews International*, 38(sup1), 598–633. <https://doi.org/10.1080/87559129.2021.1877300>
- Aghai, Z. H., Kumar, S., Farhath, S., Kumar, M. A., Saslow, J., Nakhla, T., . . . Rahman, I. (2006). Dexamethasone Suppresses Expression of Nuclear Factor-kappaB in the Cells of Tracheobronchial Lavage Fluid in Premature Neonates with Respiratory Distress. *Pediatric Research*, 59(6), 811–815. <https://doi.org/10.1203/01.pdr.0000219120.92049.b3>
- Akiyama, K., Matsuzaki, K. I., & Hayashi, H. (2005). Plant sesquiterpenes induce hyphal branching in arbuscular mycorrhizal fungi. *Nature*, 435(7043), 824–827. <https://doi.org/10.1038/nature03608>
- Allouche, Y., Warleta, F., Campos, M., Sánchez-Quesada, C., Uceda, M., Beltrán, G., & Gaforio, J. J. (2010). Antioxidant, Antiproliferative, and Pro-apoptotic Capacities of Pentacyclic Triterpenes Found in the Skin of Olives on MCF-7 Human Breast Cancer Cells and Their Effects on DNA Damage. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 59(1), 121–130. <https://doi.org/10.1021/jf102319y>
- Amani Machiani, M., Javanmard, A., Habibi Machiani, R., & Sadeghpour, A. (2022). Arbuscular mycorrhizal Fungi and Changes in Primary and Secondary Metabolites. *Plants*, 11(17), 2183. <https://doi.org/10.3390/plants11172183>
- Andrade, S. A. L., Malik, S., Sawaya, A. C. H. F., Bottcher, A., & Mazzafera, P. (2012). Association with arbuscular mycorrhizal fungi influences alkaloid synthesis and accumulation in *Catharanthus roseus* and *Nicotiana tabacum* plants. *Acta Physiologiae Plantarum*, 35(3), 867–880. <https://doi.org/10.1007/s11738-012-1130-8>
- Andrade, S. A., Malik, S., Sawaya, A. C., Bottcher, A., & Mazzafera, P. (2013). Elicitation of tobacco alkaloid biosynthesis by disrupted spores and filtrate of germinating spores of the arbuscular mycorrhizal fungus *Glomus etunicatum*. *Journal of Plant Interactions*, 8(2), 162–169. <https://doi.org/10.1080/17429145.2012.702227>
- Araji, S., Grammer, T. A., Gertzen, R., Anderson, S. D., Mikulic-Petkovsek, M., Veberic, R., . . . Escobar, M. A. (2014). Novel Roles for the Polyphenol Oxidase Enzyme in Secondary Metabolism and the Regulation of Cell Death in Walnut. *Plant Physiology*, 164(3), 1191–1203. <https://doi.org/10.1104/pp.113.228593>
- Baranski, R., & Cazzonelli, C. I. (2016). Carotenoid Biosynthesis and Regulation in Plants. *Carotenoids*, 159–189. <https://doi.org/10.1002/9781118622223.ch10>
- Beyraghdar Kashkooli, A., van der Krol, A., Bouwmeester, H. (2018) Terpenoid biosynthesis in plants. Flavour Science Proceedings of 15th Weurman Research Symposium, 3-11 <http://doi.org/10.3217/978-3-85125-593-5-1>
- Bhattacharya, U., Halder, B., Mukhopadhyay, S., & Giri, A. K. (2009). Role of oxidation-triggered activation of JNK and p38 MAPK in black tea polyphenols induced apoptotic death of A375 cells. *Cancer Science*, 100(10), 1971–1978. <https://doi.org/10.1111/j.1349-7006.2009.01251.x>
- Bi H.H., Song Y.Y., and Zeng R.S. (2007). Biochemical and molecular responses of host plants to mycorrhizal infection and their roles in plant defense. *Allelopathy J.*, 20(1), 15
- Bonfante, P., & Genre, A. (2010). Mechanisms underlying beneficial plant–fungus interactions in mycorrhizal symbiosis. *Nature Communications*, 1(1). <https://doi.org/10.1038/ncomms1046>
- Buccioni, M., Marucci, G., Dal Ben, D., Giacobbe, D., Lambertucci, C., Soverchia, L., ... Cristalli, G. (2011). Innovative functional cAMP assay for studying G protein-coupled receptors: application to the pharmacological characterization of GPR17. *Purinergic Signalling*, 7(4), 463–468. doi:10.1007/s11302-011-9245-8
- Cooper, G. M., & Adams, K. W. (2022). *The Cell*. Oxford University Press.

- Copetta, A., Lingua, G., Bardi, L., Masoero, G., & Berta, G. (2007). Influence of arbuscular mycorrhizal fungi on growth and essential oil composition in *Ocimum basilicum* var. Genovese. *Caryologia*, 60(1–2), 106–110. <https://doi.org/10.1080/00087114.2007.10589555>
- Dewick, P. M. (2001). *Medicinal Natural Products*. <https://doi.org/10.1002/0470846275>
- Dowarah, B., Gill, S. S., & Agarwala, N. (2021). Arbuscular Mycorrhizal Fungi in Conferring Tolerance to Biotic Stresses in Plants. *Journal of Plant Growth Regulation*, 41(4), 1429–1444. <https://doi.org/10.1007/s00344-021-10392-5>
- Eke, P., Adamou, S., Fokom, R., Dinango Nya, V., Tsouh Fokou, P. V., Nana Wakam, L., . . . Fekam Boyom, F. (2020). Arbuscular mycorrhizal fungi alter antifungal potential of lemongrass essential oil against *Fusarium solani*, causing root rot in common bean (*Phaseolus vulgaris* L.). *Heliyon*, 6(12), e05737. <https://doi.org/10.1016/j.heliyon.2020.e05737>
- El-Najjar, N., Gali-Muhtasib, H., Ketola, R. A., Vuorela, P., Urtti, A., & Vuorela, H. (2011). The chemical and biological activities of quinones: overview and implications in analytical detection. *Phytochemistry Reviews*, 10(3), 353–370. <https://doi.org/10.1007/s11101-011-9209-1>
- Erb, M., & Kliebenstein, D. J. (2020). Plant Secondary Metabolites as Defenses, Regulators, and Primary Metabolites: The Blurred Functional Trichotomy. *Plant Physiology*, 184(1), 39–52. <https://doi.org/10.1104/pp.20.00433>
- Estrada, B., Aroca, R., Barea, J. M., & Ruiz-Lozano, J. M. (2013). Native arbuscular mycorrhizal fungi isolated from a saline habitat improved maize antioxidant systems and plant tolerance to salinity. *Plant Science*, 201–202, 42–51. <https://doi.org/10.1016/j.plantsci.2012.11.009>
- Feddermann, N., Boller, T., Salzer, P., Elfstrand, S., Wiemken, A., & Elfstrand, M. (2007). *Medicago truncatula* shows distinct patterns of mycorrhiza-related gene expression after inoculation with three different arbuscular mycorrhizal fungi. *Planta*, 227(3), 671–680. <https://doi.org/10.1007/s00425-007-0649-1>
- Fester, T., Hause, B., Schmidt, D., Halfmann, K., Schmidt, J., Wray, V., . . . Strack, D. (2002b). Occurrence and Localization of Apocarotenoids in Arbuscular Mycorrhizal Plant Roots. *Plant and Cell Physiology*, 43(3), 256–265. <https://doi.org/10.1093/pcp/pcf029>
- Fester, T., Schmidt, D., Lohse, S., Walter, M., Giuliano, G., Bramley, P., . . . Strack, D. (2002a). Stimulation of carotenoid metabolism in arbuscular mycorrhizal roots. *Planta*, 216(1), 148–154. <https://doi.org/10.1007/s00425-002-0917-z>
- Fester, T., Strack, D., & Hause, B. (2001). Reorganization of tobacco root plastids during arbuscule development. *Planta*, 213(6), 864–868. <https://doi.org/10.1007/s004250100561>
- Fontana, A., Reichelt, M., Hempel, S., Gershenzon, J., & Unsicker, S. B. (2009). The Effects of Arbuscular Mycorrhizal Fungi on Direct and Indirect Defense Metabolites of *Plantago lanceolata* L. *Journal of Chemical Ecology*, 35(7), 833–843. <https://doi.org/10.1007/s10886-009-9654-0>
- García, J. M., Pozo, M. J., & López-Ráez, J. A. (2019). Histochemical and Molecular Quantification of Arbuscular Mycorrhiza Symbiosis. *Methods in Molecular Biology*, 293–299. https://doi.org/10.1007/978-1-4939-9952-1_22
- Ghasemi, M., Turnbull, T., Sebastian, S., & Kempson, I. (2021). The MTT Assay: Utility, Limitations, Pitfalls, and Interpretation in Bulk and Single-Cell Analysis. *International Journal of Molecular Sciences*, 22(23), 12827. <https://doi.org/10.3390/ijms222312827>
- Ghasemzadeh, A. (2011). Flavonoids and phenolic acids: Role and biochemical activity in plants and human. *Journal of Medicinal Plants Research*, 5(31). <https://doi.org/10.5897/jmpr11.1404>
- Govindarajulu, M., Pfeffer, P. E., Jin, H., Abubaker, J., Douds, D. D., Allen, J. W., . . . Shachar-Hill, Y. (2005). Nitrogen transfer in the arbuscular mycorrhizal symbiosis. *Nature*, 435(7043), 819–823. <https://doi.org/10.1038/nature03610>
- Guether, M., Neuhaus, B., Balestrini, R., Dynowski, M., Ludewig, U., & Bonfante, P. (2009). A Mycorrhizal-Specific Ammonium Transporter from *Lotus japonicus* Acquires Nitrogen Released by Arbuscular Mycorrhizal Fungi. *Plant Physiology*, 150(1), 73–83. <https://doi.org/10.1104/pp.109.136390>
- Hayden, M. S., & Ghosh, S. (2014). Regulation of NF- κ B by TNF family cytokines. *Seminars in Immunology*, 26(3), 253–266. <https://doi.org/10.1016/j.smim.2014.05.004>

- HEFNI, D., HERDALINA, Y., & SUHARTI, N. (2023). ACTIVITY OF RED GINGER EXTRACT (ZINGIBER OFFICINALE VAR. RUBRUM) AGAINST INTERLEUKIN-6. *International Journal of Applied Pharmaceutics*, 21–23. <https://doi.org/10.22159/ijap.2023.v15s1.04>
- Hill, E. M., Robinson, L. A., Abdul-Sada, A., Vanbergen, A. J., Hodge, A., & Hartley, S. E. (2018). Arbuscular Mycorrhizal Fungi and Plant Chemical Defence: Effects of Colonisation on Aboveground and Belowground Metabolomes. *Journal of Chemical Ecology*, 44(2), 198–208. <https://doi.org/10.1007/s10886-017-0921-1>
- Hosseini, A., & Mas, J. (2021). The β -galactosidase assay in perspective: Critical thoughts for biosensor development. *Analytical Biochemistry*, 635, 114446. <https://doi.org/10.1016/j.ab.2021.114446>
- Hou, X., Rivers, J., León, P., McQuinn, R. P., & Pogson, B. J. (2016). Synthesis and Function of Apocarotenoid Signals in Plants. *Trends in Plant Science*, 21(9), 792–803. <https://doi.org/10.1016/j.tplants.2016.06.001>
- Hu, J., Han, J., Li, H., Zhang, X., Liu, L. L., Chen, F., & Zeng, B. (2018). Human Embryonic Kidney 293 Cells: A Vehicle for Biopharmaceutical Manufacturing, Structural Biology, and Electrophysiology. *Cells Tissues Organs*, 205(1), 1–8. <https://doi.org/10.1159/000485501>
- Jan, R., Asaf, S., Numan, M., Lubna, & Kim, K. M. (2021). Plant Secondary Metabolite Biosynthesis and Transcriptional Regulation in Response to Biotic and Abiotic Stress Conditions. *Agronomy*, 11(5), 968. <https://doi.org/10.3390/agronomy11050968>
- Joce, C., Wiener, A., & Yin, H. (2011). Transmembrane Domain Oligomerization Propensity determined by ToxR Assay. *Journal of Visualized Experiments*, (51). <https://doi.org/10.3791/2721>
- Kaur, S., & Suseela, V. (2020). Unraveling Arbuscular Mycorrhiza-Induced Changes in Plant Primary and Secondary Metabolome. *Metabolites*, 10(8), 335. <https://doi.org/10.3390/metabo10080335>
- Keymer, A., Pimprikar, P., Wewer, V., Huber, C., Brands, M., Bucerius, S. L., . . . Gutjahr, C. (2017). Lipid transfer from plants to arbuscular mycorrhiza fungi. *eLife*, 6. <https://doi.org/10.7554/elife.29107>
- Khaliq, A., Perveen, S., Alamer, K. H., Zia Ul Haq, M., Rafique, Z., Alsudays, I. M., . . . Attia, H. (2022). Arbuscular Mycorrhizal Fungi Symbiosis to Enhance Plant–Soil Interaction. *Sustainability*, 14(13), 7840. <https://doi.org/10.3390/su14137840>
- Khan, T., Ali, M., Khan, A., Nisar, P., Jan, S. A., Afridi, S., & Shinwari, Z. K. (2019). Anticancer Plants: A Review of the Active Phytochemicals, Applications in Animal Models, and Regulatory Aspects. *Biomolecules*, 10(1), 47. <https://doi.org/10.3390/biom10010047>
- Kielkopf, C. L., Bauer, W., & Urbatsch, I. L. (2020). Bradford Assay for Determining Protein Concentration. *Cold Spring Harbor Protocols*, 2020(4), pdb.prot102269. doi:10.1101/pdb.prot102269
- KLIEBENSTEIN, D. J. (2004). Secondary metabolites and plant/environment interactions: a view through Arabidopsis thaliana tinted glasses. *Plant, Cell and Environment*, 27(6), 675–684. <https://doi.org/10.1111/j.1365-3040.2004.01180.x>
- Klopffholz, S., Kuhn, H., & Requena, N. (2011). A Secreted Fungal Effector of Glomus intraradices Promotes Symbiotic Biotrophy. *Current Biology*, 21(14), 1204–1209. <https://doi.org/10.1016/j.cub.2011.06.044>
- Kumar, M., Kaur, V., Kumar, S., & Kaur, S. (2015). Phytoconstituents as apoptosis inducing agents: strategy to combat cancer. *Cytotechnology*, 68(4), 531–563. <https://doi.org/10.1007/s10616-015-9897-2>
- Lambert, D. H., Baker, D. E., & Cole, H. (1979). The Role of Mycorrhizae in the Interactions of Phosphorus with Zinc, Copper, and Other Elements. *Soil Science Society of America Journal*, 43(5), 976–980. <https://doi.org/10.2136/sssaj1979.03615995004300050033x>
- Larose, G., Chênevert, R., Moutoglis, P., Gagné, S., Piché, Y., & Vierheilig, H. (2002). Flavonoid levels in roots of Medicago sativa are modulated by the developmental stage of the symbiosis and the root colonizing arbuscular mycorrhizal fungus. *Journal of Plant Physiology*, 159(12), 1329–1339. <https://doi.org/10.1078/0176-1617-00896>
- Loo, W. T., Chua, K. O., Mazumdar, P., Cheng, A., Osman, N., & Harikrishna, J. A. (2022). Arbuscular Mycorrhizal Symbiosis: A Strategy for Mitigating the Impacts of Climate Change on Tropical Legume Crops. *Plants*, 11(21), 2875. <https://doi.org/10.3390/plants11212875>
- López-Ráez, J. A., Fernández, I., García, J. M., Berrio, E., Bonfante, P., Walter, M. H., & Pozo, M. J. (2015). Differential spatio-temporal expression of carotenoid cleavage dioxygenases regulates

apocarotenoid fluxes during AM symbiosis. *Plant Science*, 230, 59–69. <https://doi.org/10.1016/j.plantsci.2014.10.010>

- Lyu, D., Msimbira, L. A., Nazari, M., Antar, M., Pagé, A., Shah, A., . . . Smith, D. L. (2021). The Coevolution of Plants and Microbes Underpins Sustainable Agriculture. *Microorganisms*, 9(5), 1036. <https://doi.org/10.3390/microorganisms9051036>
- Mafu, S., & Zerbe, P. (2017). Plant diterpenoid metabolism for manufacturing the biopharmaceuticals of tomorrow: prospects and challenges. *Phytochemistry Reviews*, 17(1), 113–130. <https://doi.org/10.1007/s11101-017-9513-5>
- Mandal, S. M., Chakraborty, D., & Dey, S. (2010). Phenolic acids act as signaling molecules in plant-microbe symbioses. *Plant Signaling & Behavior*, 5(4), 359–368. <https://doi.org/10.4161/psb.5.4.10871>
- Márquez, A. J., Stougaard, J., Udvardi, M., Parniske, M., Spaink, H., Saalbach, G., . . . Márquez, A. (2006). *Lotus japonicus Handbook*. Springer Science & Business Media.
- Márquez, A. J., Stougaard, J., Udvardi, M., Parniske, M., Spaink, H., Saalbach, G., . . . Márquez, A. (2006). *Lotus japonicus Handbook*. Springer Science & Business Media.
- Martín-Rodríguez, J. A., Huertas, R., Ho-Plágaro, T., Ocampo, J. A., Turečková, V., Tarkowská, D., . . . García-Garrido, J. M. (2016). Gibberellin–Absciscic Acid Balances during Arbuscular Mycorrhiza Formation in Tomato. *Frontiers in Plant Science*, 7. <https://doi.org/10.3389/fpls.2016.01273>
- Massoumou, M., van Tuinen, D., Chatagnier, O., Arnould, C., Brechenmacher, L., Sanchez, L., . . . Gianinazzi-Pearson, V. (2007). Medicago truncatula gene responses specific to arbuscular mycorrhiza interactions with different species and genera of Glomeromycota. *Mycorrhiza*, 17(3), 223–234. <https://doi.org/10.1007/s00572-006-0099-9>
- Mathesius, U. (2022). Are legumes different? Origins and consequences of evolving nitrogen fixing symbioses. *Journal of Plant Physiology*, 276, 153765. <https://doi.org/10.1016/j.jplph.2022.153765>
- McIlwain, D. R., Berger, T., & Mak, T. W. (2013). Caspase Functions in Cell Death and Disease. *Cold Spring Harbor Perspectives in Biology*, 5(4), a008656–a008656. <https://doi.org/10.1101/cshperspect.a008656>
- Mir, R., Jallu, S., & Singh, T. P. (2013). The shikimate pathway: Review of amino acid sequence, function and three-dimensional structures of the enzymes. *Critical Reviews in Microbiology*, 41(2), 172–189. <https://doi.org/10.3109/1040841x.2013.813901>
- Moran, N. A. (2006). Symbiosis. *Current Biology*, 16(20), R866–R871. <https://doi.org/10.1016/j.cub.2006.09.019>
- Morandi, D. (1996). Occurrence of phytoalexins and phenolic compounds in endomycorrhizal interactions, and their potential role in biological control. *Plant and Soil*, 185(2), 241–251. <https://doi.org/10.1007/bf02257529>
- Moreno, J. C., Mi, J., Alagoz, Y., & Al-Babili, S. (2021). Plant apocarotenoids: from retrograde signaling to interspecific communication. *The Plant Journal*, 105(2), 351–375. <https://doi.org/10.1111/tpj.15102>
- Muhlemann, J. K., Younts, T. L. B., & Muday, G. K. (2018). Flavonols control pollen tube growth and integrity by regulating ROS homeostasis during high-temperature stress. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 115(47). <https://doi.org/10.1073/pnas.1811492115>
- Nascimento M. S., Santana A. L. B. D., Maranhao C. A., Oliveira L. S., Bieber, L. (2013). *Phenolic Extractives and Natural Resistance of Wood*. *Biodegradation - Life of Science*. <https://doi.org/10.5772/56358>
- Nawrot-Chorabik, K., Sułkowska, M., & Gumulak, N. (2022). Secondary Metabolites Produced by Trees and Fungi: Achievements So Far and Challenges Remaining. *Forests*, 13(8), 1338. <https://doi.org/10.3390/f13081338>
- Nowakowski, A. B., Wobig, W. J., & Petering, D. H. (2014). Native SDS-PAGE: high resolution electrophoretic separation of proteins with retention of native properties including bound metal ions. *Metallomics*, 6(5), 1068–1078. <https://doi.org/10.1039/c4mt00033a>
- O’Brien, M. A., & Kirby, R. (2008). Apoptosis: A review of pro-apoptotic and anti-apoptotic pathways and dysregulation in disease. *Journal of Veterinary Emergency and Critical Care*, 18(6), 572–585. <https://doi.org/10.1111/j.1476-4431.2008.00363.x>
- Olson, D. (2020) The Role of Gibberellic Acid in Aphid-Plant-Arbuscular Mycorrhizal Fungus Interactions. Available online: <https://digscholarship.unco.edu/theses/164>

- Owais, M., Bhavyata, D., Zia, Q., Khan, A., Beenu, & Mohammad, F. (2014). Chemotherapeutic potential of curcumin-bearing microcells against hepatocellular carcinoma in model animals. *International Journal of Nanomedicine*, 1139. <https://doi.org/10.2147/ijn.s34668>
- Pandey, D. K., Kaur, P., & Dey, A. (2018). Arbuscular Mycorrhizal Fungi: Effects on Secondary Metabolite Production in Medicinal Plants. *Fungi and Their Role in Sustainable Development: Current Perspectives*, 507–538. https://doi.org/10.1007/978-981-13-0393-7_2
- Parniske, M. (2008). Arbuscular mycorrhiza: the mother of plant root endosymbioses. *Nature Reviews Microbiology*, 6(10), 763–775. <https://doi.org/10.1038/nrmicro1987>
- Peer, W. A., & Murphy, A. S. (2007). Flavonoids and auxin transport: modulators or regulators? *Trends in Plant Science*, 12(12), 556–563. <https://doi.org/10.1016/j.tplants.2007.10.003>
- Perveen, S. (2018). Introductory Chapter: Terpenes and Terpenoids. *Terpenes and Terpenoids*. <https://doi.org/10.5772/intechopen.79683>
- Pozo, M. J., & Azcón-Aguilar, C. (2007). Unraveling mycorrhiza-induced resistance. *Current Opinion in Plant Biology*, 10(4), 393–398. <https://doi.org/10.1016/j.pbi.2007.05.004>
- Ranner, J. L., Schalk, S., Martyniak, C., Parniske, M., Gutjahr, C., Stark, T. D., & Dawid, C. (2023). Primary and Secondary Metabolites in *Lotus japonicus*. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 71(30), 11277–11303. <https://doi.org/10.1021/acs.jafc.3c02709>
- Rehan, M. (2021). Biosynthesis of Diverse Class Flavonoids via Shikimate and Phenylpropanoid Pathway. IntechOpen <https://doi.org/10.5772/intechopen.96512>
- Rispail, N., Hauck, B., Bartholomew, B., Watson, A. A., Nash, R. J., & Webb, K. J. (2010). Secondary metabolite profiling of the model legume *Lotus japonicus* during its symbiotic interaction with *Mesorhizobium loti*. *Symbiosis*, 50(3), 119–128. <https://doi.org/10.1007/s13199-010-0053-7>
- Riss TL, Moravec RA, Niles AL, et al. Cell Viability Assays. 2013 May 1 [Updated 2016 Jul 1]. In: Markossian S, Grossman A, Brimacombe K, et al., editors. Assay Guidance Manual [Internet]. Bethesda (MD): Eli Lilly & Company and the National Center for Advancing Translational Sciences; 2004-.
- Rozpądek, P., Wężowicz, K., Stojakowska, A., Malarz, J., Surówka, E., Sobczyk, . . . Turnau, K. (2014). Mycorrhizal fungi modulate phytochemical production and antioxidant activity of *Cichorium intybus* L. (Asteraceae) under metal toxicity. *Chemosphere*, 112, 217–224. <https://doi.org/10.1016/j.chemosphere.2014.04.023>
- Salehin, M., Li, B., Tang, M., Katz, E., Song, L., Ecker, J. R., . . . Estelle, M. (2019). Auxin-sensitive Aux/IAA proteins mediate drought tolerance in *Arabidopsis* by regulating glucosinolate levels. *Nature Communications*, 10(1). <https://doi.org/10.1038/s41467-019-12002-1>
- Saltveit, M. E. (2017). Synthesis and Metabolism of Phenolic Compounds. *Fruit and Vegetable Phytochemicals*, 115–124. <https://doi.org/10.1002/9781119158042.ch5>
- Sanmartín, N., Sánchez-Bel, P., Pastor, V., Pastor-Fernández, J., Mateu, D., Pozo, M. J., . . . Flors, V. (2020). Root-to-shoot signalling in mycorrhizal tomato plants upon *Botrytis cinerea* infection. *Plant Science*, 298, 110595. <https://doi.org/10.1016/j.plantsci.2020.110595>
- Santos, E. L. D., Alves da Silva, F., & Barbosa da Silva, F. S. (2017). Arbuscular Mycorrhizal Fungi Increase the Phenolic Compounds Concentration in the Bark of the Stem of *Libidibia ferrea* in Field Conditions. *The Open Microbiology Journal*, 11(1), 283–291. <https://doi.org/10.2174/1874285801711010283>
- Sbrana, C., Avio, L., & Giovannetti, M. (2014). Beneficial mycorrhizal symbionts affecting the production of health-promoting phytochemicals. *ELECTROPHORESIS*, 35(11), 1535–1546. <https://doi.org/10.1002/elps.201300568>
- Schausberger, P., Peneder, S., Jürschik, S., & Hoffmann, D. (2011). Mycorrhiza changes plant volatiles to attract spider mite enemies. *Functional Ecology*, 26(2), 441–449. <https://doi.org/10.1111/j.1365-2435.2011.01947.x>
- Schliemann, W., Ammer, C., & Strack, D. (2008). Metabolite profiling of mycorrhizal roots of *Medicago truncatula*. *Phytochemistry*, 69(1), 112–146. <https://doi.org/10.1016/j.phytochem.2007.06.032>
- Schweiger, R., & Müller, C. (2015). Leaf metabolome in arbuscular mycorrhizal symbiosis. *Current Opinion in Plant Biology*, 26, 120–126. <https://doi.org/10.1016/j.pbi.2015.06.009>
- Singh, I. (2017). Antimicrobials in higher plants: classification, mode of action and bioactivities. *Chemical Biology Letters* 4(1), 48–62

- Singh, S. K. (2018). Explorations of Plant's Chemodiversity: Role of Nitrogen-Containing Secondary Metabolites in Plant Defense. *Molecular Aspects of Plant-Pathogen Interaction*, 309–332. https://doi.org/10.1007/978-981-10-7371-7_14
- Smith, F. A., Grace, E. J., & Smith, S. E. (2009). More than a carbon economy: nutrient trade and ecological sustainability in facultative arbuscular mycorrhizal symbioses. *New Phytologist*, 182(2), 347–358. <https://doi.org/10.1111/j.1469-8137.2008.02753.x>
- Steinkellner, S., Hage-Ahmed, K., García-Garrido, J. M., Illana, A., Ocampo, J. A., & Vierheilig, H. (2011). A comparison of wild-type, old and modern tomato cultivars in the interaction with the arbuscular mycorrhizal fungus *Glomus mosseae* and the tomato pathogen *Fusarium oxysporum* f. sp. *lycopersici*. *Mycorrhiza*, 22(3), 189–194. <https://doi.org/10.1007/s00572-011-0393-z>
- Steinkellner, S., Lendzemo, V., Langer, I., Schweiger, P., Khaosaad, T., Toussaint, J. P., & Vierheilig, H. (2007). Flavonoids and Strigolactones in Root Exudates as Signals in Symbiotic and Pathogenic Plant-Fungus Interactions. *Molecules*, 12(7), 1290–1306. <https://doi.org/10.3390/12071290>
- Stougaard, J. (2017). *Lotus japonicus*: A Model Plant for the Legume Family ☆. *Reference Module in Life Sciences*. <https://doi.org/10.1016/b978-0-12-809633-8.06661-9>
- Strack, D., & Fester, T. (2006). Isoprenoid metabolism and plastid reorganization in arbuscular mycorrhizal roots. *New Phytologist*, 172(1), 22–34. <https://doi.org/10.1111/j.1469-8137.2006.01837.x>
- Suharti, N., Dachriyanus, D., Lucida, H., Sri Wahyuni, F., Hefni, D., & Pontana Putra, P. (2022). In Silico Prediction and In Vitro Cytotoxic Activity of Arbuscular Mycorrhizal Fungi Induced *Zingiber officinale* Var. *Rubrum*. *Research Journal of Pharmacy and Technology*, 4913–4918. <https://doi.org/10.52711/0974-360x.2022.00825>
- Suharty, N., Wahyuni, F. S., & Dachriyanus D, D. (2018). Cytotoxic Activity of Ethanol Extract of Arbuscular Mycorrhizal Fungi Induced Ginger Rhizome on T47D Breast Cancer Cell Lines. *Pharmacognosy Journal*, 10(6), 1133–1136. <https://doi.org/10.5530/pj.2018.6.193>
- Takeda, N., Handa, Y., Tsuzuki, S., Kojima, M., Sakakibara, H., & Kawaguchi, M. (2015). Gibberellin regulates infection and colonization of host roots by arbuscular mycorrhizal fungi. *Plant Signaling & Behavior*, 10(6), e1028706. <https://doi.org/10.1080/15592324.2015.1028706>
- Torres, N., Plano, D., Antolín, M. C., Sanmartín, C., Domínguez-Fernández, M., De Peña, M. P., . . . Goicoechea, N. (2019). Potential biomedical reuse of vegetative residuals from mycorrhized grapevines subjected to warming. *Archives of Agronomy and Soil Science*, 65(10), 1341–1353. <https://doi.org/10.1080/03650340.2018.1564907>
- Tsiknia, M., Tsikou, D., Papadopoulou, K. K., & Ehaliotis, C. (2020). Multi-species relationships in legume roots: From pairwise legume-symbiont interactions to the plant – microbiome – soil continuum. *FEMS Microbiology Ecology*, 97(2). <https://doi.org/10.1093/femsec/fiaa222>
- Twaij, B. M., & Hasan, M. N. (2022). Bioactive Secondary Metabolites from Plant Sources: Types, Synthesis, and Their Therapeutic Uses. *International Journal of Plant Biology*, 13(1), 4–14. <https://doi.org/10.3390/ijpb13010003>
- Velásquez, A., Valenzuela, M., Carvajal, M., Fiaschi, G., Avio, L., Giovannetti, M., . . . Seeger, M. (2020). The arbuscular mycorrhizal fungus *Funneliformis mosseae* induces changes and increases the concentration of volatile organic compounds in *Vitis vinifera* cv. Sangiovese leaf tissue. *Plant Physiology and Biochemistry*, 155, 437–443. <https://doi.org/10.1016/j.plaphy.2020.06.048>
- Vuolo, M. M., Lima, V. S., & Maróstica Junior, M. R. (2019). Phenolic Compounds. *Bioactive Compounds*, 33–50. <https://doi.org/10.1016/b978-0-12-814774-0.00002-5>
- Walter, M. H. (2013). Role of Carotenoid Metabolism in the Arbuscular Mycorrhizal Symbiosis. *Molecular Microbial Ecology of the Rhizosphere*, 513–524. <https://doi.org/10.1002/9781118297674.ch48>
- Walter, M. H., Stauder, R., & Tissier, A. (2015). Evolution of root-specific carotenoid precursor pathways for apocarotenoid signal biogenesis. *Plant Science*, 233, 1–10. <https://doi.org/10.1016/j.plantsci.2014.12.017>
- Wang, M., Schäfer, M., Li, D., Halitschke, R., Dong, C., McGale, E., . . . Baldwin, I. T. (2018). Blumenols as shoot markers of root symbiosis with arbuscular mycorrhizal fungi. *eLife*, 7. <https://doi.org/10.7554/elife.37093>

- Wang, W., Shi, J., Xie, Q., Jiang, Y., Yu, N., & Wang, E. (2017). Nutrient Exchange and Regulation in Arbuscular Mycorrhizal Symbiosis. *Molecular Plant*, 10(9), 1147–1158. <https://doi.org/10.1016/j.molp.2017.07.012>
- Wink, M. (2003). Evolution of secondary metabolites from an ecological and molecular phylogenetic perspective. *Phytochemistry*, 64(1), 3–19. [https://doi.org/10.1016/s0031-9422\(03\)00300-5](https://doi.org/10.1016/s0031-9422(03)00300-5)
- Yang, P. C., & Mahmood, T. (2012). Western blot: Technique, theory, and trouble shooting. *North American Journal of Medical Sciences*, 4(9), 429. <https://doi.org/10.4103/1947-2714.100998>
- Yeshi, K., Crayn, D., Ritmejerytė, E., & Wangchuk, P. (2022). Plant Secondary Metabolites Produced in Response to Abiotic Stresses Has Potential Application in Pharmaceutical Product Development. *Molecules*, 27(1), 313. <https://doi.org/10.3390/molecules27010313>
- You, Y., Ray, R., Halitschke, R., Baldwin, G., & Baldwin, I. T. (2023). Arbuscular mycorrhizal fungi-indicative blumenol-C-glucosides predict lipid accumulations and fitness in plants grown without competitors. *New Phytologist*, 238(5), 2159–2174. <https://doi.org/10.1111/nph.18858>
- Zhao F. G., Qu F., Che Y. M., Yao J. L., Liu X. (2020). Effects of arbuscular mycorrhizal fungi on metabolism of aroma substances in tobacco. *Ying Yong Sheng tai xue bao = The Journal of Applied Ecology*. 31(4), 1298-1304. <https://doi.org/10.13287/j.1001-9332.202004.031>.
- Zhao, Y., Cartabia, A., Lalaymia, I., & Declerck, S. (2022). Arbuscular mycorrhizal fungi and production of secondary metabolites in medicinal plants. *Mycorrhiza*, 32(3–4), 221–256. <https://doi.org/10.1007/s00572-022-01079-0>
- Zhu, X., Song, F., & Liu, F. (2017). Arbuscular Mycorrhizal Fungi and Tolerance of Temperature Stress in Plants. *Arbuscular Mycorrhizas and Stress Tolerance of Plants*, 163–194. https://doi.org/10.1007/978-981-10-4115-0_8