



ΠΑΝΕΠΙΣΤΗΜΙΟ ΘΕΣΣΑΛΙΑΣ

ΤΜΗΜΑ ΒΙΟΧΗΜΕΙΑΣ

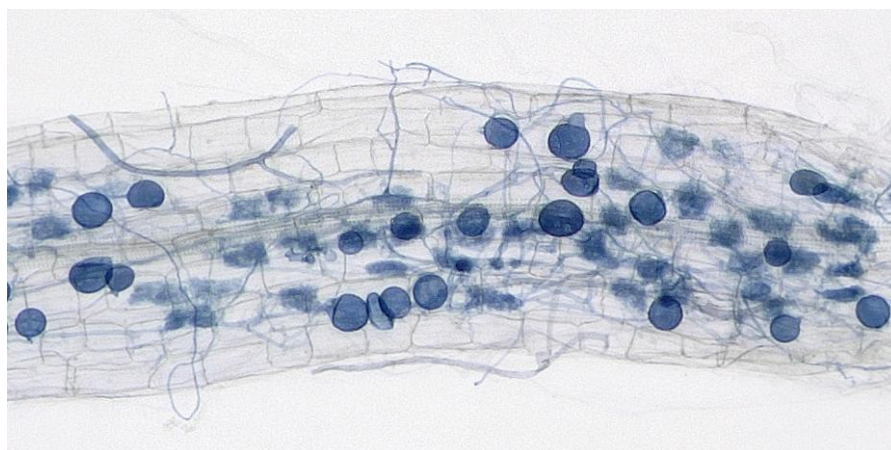
ΚΑΙ ΒΙΟΤΕΧΝΟΛΟΓΙΑΣ

ΤΙΤΛΟΣ ΠΤΥΧΙΑΚΗΣ ΕΡΓΑΣΙΑΣ:

**«Η επίδραση των γεωργικών φαρμάκων στους δενδροειδείς
μυκορριζικούς μύκητες»**

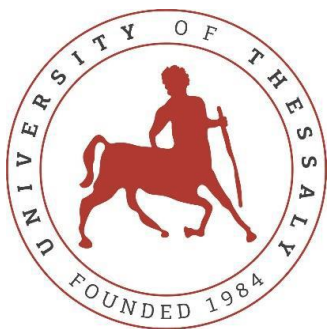
ΠΑΠΑΔΟΠΟΥΛΟΥ ΓΕΩΡΓΙΑ

ΛΑΡΙΣΑ 2023



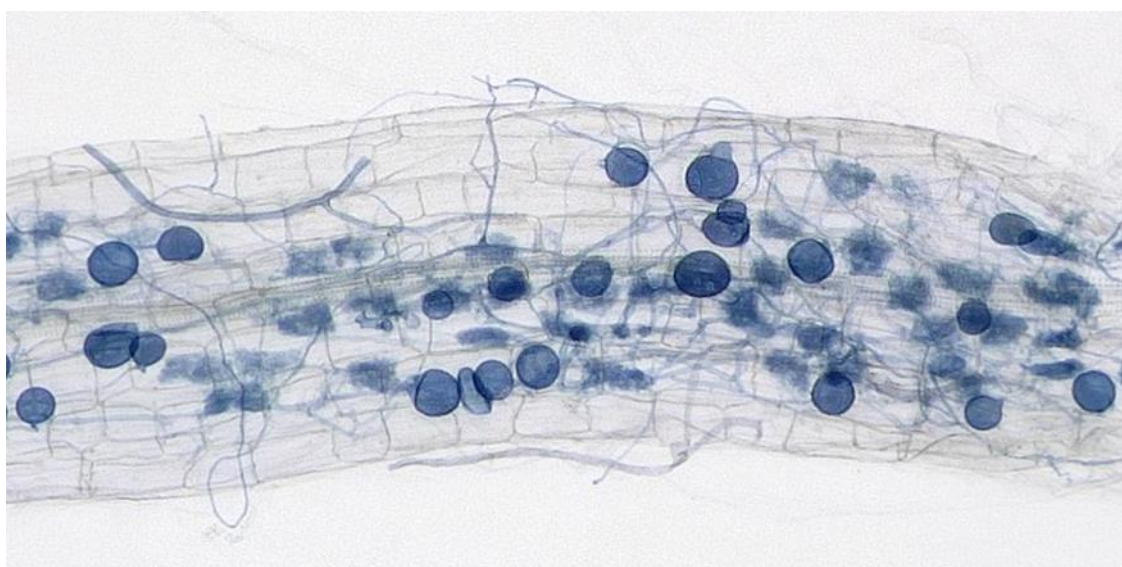
Τριμελής επιτροπή:

1. Καρπούζας Δημήτριος, Καθηγητής Περιβαλλοντικής Μικροβιολογίας και Βιοτεχνολογίας, Τμήμα Βιοχημείας και Βιοτεχνολογίας
2. Παπαδοπούλου Καλλιόπη, Καθηγήτρια Βιοτεχνολογίας Φυτών, Τμήμα Βιοχημείας και Βιοτεχνολογίας
3. Τσίκου Δανιέλα, Επίκουρος Καθηγήτρια Μοριακής και Αναπτυξιακής Βιολογίας Φυτών, Τμήμα Βιοχημείας και Βιοτεχνολογίας



UNIVERSITY OF THESSALY
DEPARTMENT OF BIOCHEMISTRY
AND BIOTECHNOLOGY

“Effects of pesticides on Arbuscular Mycorrhizal Fungi”



PAPADOPOULOU GEORGIA

LARISSA 2023

1. Karpouzas Dimitrios, Professor of Environmental Microbiology and Biotechnology, Department of Biochemistry and Biotechnology
2. Papadopoulou Kalliope, Professor of Plant Biotechnology, Department of Biochemistry and Biotechnology
3. Tsikou Daniela, Assistant Professor of Molecular and Developmental Plant Biology, Department of Biochemistry and Biotechnology

Ευχαριστίες

Η παρούσα πτυχιακή εργασία πραγματοποιήθηκε στο Πανεπιστήμιο Θεσσαλίας, στο τμήμα Βιοχημείας και Βιοτεχνολογίας και συγκεκριμένα στο Εργαστήριο Βιοτεχνολογίας Φυτών και Περιβάλλοντος.

Αρχικά, θα ήθελα να ευχαριστήσω τον υπεύθυνο καθηγητή μου κ. Καρπούζα Δημήτριο, που μέσα από το μάθημά του 'Περιβαλλοντική Βιοτεχνολογία', με ενέπνευσε να ασχοληθώ με τον συγκεκριμένο τομέα και που μου έδωσε τη δυνατότητα να συμμετάσχω σε αυτήν την τόσο ενδιαφέρουσα και χρήσιμη μελέτη.

Ακόμη, ένα μεγάλο ευχαριστώ οφείλω στον υποψήφιο διδάκτορα Παπαδόπουλο Χρήστο για την πολύτιμη βοήθεια και την καθοδήγηση που μου παρείχε σε όλη τη διάρκεια αυτής της μελέτης και τις γνώσεις που ήταν πρόθυμος να μοιραστεί μαζί μου.

Επίσης, θα ήθελα να ευχαριστήσω τους φίλους μου για την συμπαράσταση και τις χρήσιμες συμβουλές που μου παρείχαν.

Τέλος, το μεγαλύτερο ευχαριστώ οφείλω στους γονείς μου και την αδερφή μου για την τόσο σημαντική στήριξη και την εμπιστοσύνη που μου έδειξαν όλα αυτά τα χρόνια. Χάρη σε εκείνους οι στόχοι και τα όνειρά μου γίνονται πραγματικότητα.

Περιεχόμενα

Ευχαριστίες.....	3
Περίληψη.....	7
Abstract.....	8
1. Εισαγωγή	9
1.1 Γεωργικά φάρμακα και αξιολόγηση τοξικότητας	9
1.2. Δενδροειδείς μυκορριζικοί μύκητες (Arbuscular Mycorrhizal Fungi, AMF)	11
1.2.1. Ανάπτυξη δενδροειδούς μυκόρριζας	12
1.2.1.1. Προ-συμβιωτική φάση.....	12
1.2.1.2. Σηματοδότηση	13
1.2.1.3. Σχηματισμός δενδροειδούς μυκόρριζας.....	15
1.2.1.4. Συμβιωτική φάση.....	17
1.2.2. Ανταλλαγή θρεπτικών κατά την συμβιωτική σχέση.....	19
1.2.2.1 Ανταλλαγή άνθρακα (C)	19
1.2.2.2. Ανταλλαγή φωσφόρου (P)	19
1.2.2.3. Ανταλλαγή αζώτου (N).....	21
1.2.3. Αντοχή σε βιοτικές και αβιοτικές καταπονήσεις	22
1.3. AMF στην εκτίμηση τοξικότητας γεωργικών φαρμάκων	22
1.3.1. Fludioxonil	25
1.3.2. Εκτίμηση τοξικότητας Fludioxonil στους AMF	27
1.4. Σκοπός	28
2. Υλικά και μέθοδοι	29
2.1 Πειραματική διαδικασία	29
2.2. Βιολογικό υλικό και συνθήκες ανάπτυξης	30
2.2.1. Απολύμανση και εκβλάστηση σπόρων.....	30
2.2.2. Προετοιμασία του γεωργικού φαρμάκου	30
2.2.3. Προετοιμασία SLA (Long Ashton solution)	31
2.2.4. Προετοιμασία αδρανούς υποστρώματος φύτευσης	31
2.2.5. Προετοιμασία τρυβλίων άγαρ	31
2.2.6. Προετοιμασία διαλύματος μύκητα	31
2.2.7. Υλικά για μέθοδο sandwich	32
2.2.8. Μέθοδος sandwich	32
2.3. Συγκομιδή φυτών-χρώση ριζών:.....	33
2.3.1. Χρώση	33
2.3.2. Μονιμοποίηση	34
2.4. Φαινοτυπική ανάλυση	34

2.4.1. Έλεγχος για φυτοτοξική επίδραση του γεωργικού φαρμάκου.....	34
2.4.2. Μικροσκοπική παρατήρηση	34
2.4.3. Υπολογισμός EC ₅₀	34
2.5. Μελέτη της επίδρασης του fludioxonil στο επίπεδο της γονιδιακής έκφρασης.....	35
2.5.1 Απομόνωση ριβονουκλεϊκού οξέος (RNA) (Trizol / chloroform)	35
2.5.2. Απομάκρυνση DNA από τα δείγματα RNA μέσω επεξεργασίας με ένζυμο DNase..	37
2.5.3. Επιβεβαίωσης της διαδικασίας πέψης του DNA	38
2.5.4. Ποσοτική PCR (qPCR) με one step Luna protocol.....	39
2.6 Στατιστική ανάλυση	40
3. Αποτελέσματα.....	42
3.1. Πείραμα 1 – Εκτίμηση της επίδρασης του fludioxonil στην ανάπτυξη των φυτών και στα επίπεδα μυκορριζικού αποικισμού	42
3.1.1 Επίδραση fludioxonil στην ανάπτυξη του φυτού	42
3.1.3. Επίδραση fludioxonil στα επίπεδα μυκορριζικού αποικισμού	43
3.2. Πείραμα 2 – Επίδραση fludioxonil στην έκφραση γονιδίων που σχετίζονται με τον μυκορριζικό αποικισμό των φυτών	46
3.2.1. Επίδραση του fludioxonil στην έκφραση του γονιδίου LjSbtM1	47
3.2.2. Επίδραση του fludioxonil στην έκφραση του γονιδίου LjPT4	47
3.2.3. Επίδραση του fludioxonil στην έκφραση του γονιδίου LjAMT2;2	48
4. Συζήτηση.....	50
5. Βιβλιογραφία.....	54

Εικόνα 1. Σηματοδότηση για ρύθμιση της AM συμβίωσης μέσω υποδοχέων του ριζικού φυτικού κυττάρου (Nasir et al., 2021).....	14
Εικόνα 2. Οι διαφορετικοί τρόποι αποικισμού για το <i>M. truncatula</i> (A) και το <i>D. carota</i> (B).....	15
Εικόνα 3. Τα βήματα της ανάπτυξης της δενδροειδούς μυκόρριζας (Parniske, 2008).....	16
Εικόνα 4. Σχηματική απεικόνιση ενός δενδρίτη (arbuscule) (Parniske, 2008).....	17
Εικόνα 5. Χημική δομή του fludioxonil (4-(2,2-Difluoro-1,3-benzodioxol-4-yl)-1H-pyrrole-3-carbonitrile) (PubChem, n.d.).....	25
Εικόνα 6. Σύστημα ανάπτυξης φυτών <i>L. japonicus</i> με τη μέθοδο AMF-sandwich	33
Εικόνα 7. Ηλεκτροφόρηση των προϊόντων της PCR μετά από χειρισμό με DNase, σε πηκτή αгарόζης 1% [L: Lader (μάρτυρας μοριακού βάρους), P: δείγμα θετικού ελέγχου (γονιδιωματικό DNA από <i>L. japonicus</i>), N: δείγμα αρνητικού ελέγχου (ddH ₂ O)]	39
Εικόνα 8. Φυτάρια 5 εβδομάδων.....	42
Εικόνα 9. Τμήματα ρίζας του <i>L. japonicus</i> , αποικισμένα από AMF. 1. Δενδρίτες, 2. Κύστες, 3. Υφές	44
Πίνακας 1. Συγκεντρώσεις fludioxonil στο υδατικό διάλυμα SLA.	31
Πίνακας 2. Συγκεντρώσεις θρεπτικών για SLA.....	31
Πίνακας 3. Συγκεντρώσεις διαλύματος Lysis Buffer.....	35
Πίνακας 4. Συγκεντρώσεις διαλύματος LoTE	36
Πίνακας 5. Συγκέντρωση και καθαρότητα δειγμάτων RNA.	37
Πίνακας 6. Συνθήκες PCR για τον έλεγχο της δράσης της DNase	38
Πίνακας 7. Συνθήκες qPCR με Luna (* για τα γονίδια <i>LjPT4</i> και <i>LjSbtM1</i> το στάδιο του υβριδισμού πραγματοποιήθηκε στους 58°C).....	40
Πίνακας 8. Εκκινητές για <i>LjSbtM1</i> , <i>LjPt4</i> , <i>LjAMT2;2</i> , <i>LjPP2</i> (housekeeping 1) και <i>LjATPs</i> (housekeeping 2).....	40
Πίνακας 9. Ξηρό βάρος (mg) ανά φυτάριο.....	42
Πίνακας 10. Ποσοστό αποικισμού των φυτών από AMF	44
Γράφημα 1. Επίδραση του fludioxonil στο ξηρό βάρος (mg) των φυτών.....	43
Γράφημα 2. Επίδραση fludioxonil στον αποικισμό των φυτών από AMF.....	45
Γράφημα 3. Υπολογισμός EC ₅₀	46
Γράφημα 4. Επίδραση του fludioxonil στα επίπεδα έκφρασης του <i>LjSbtM1</i>	47
Γράφημα 5. Επίδραση του fludioxonil στα επίπεδα έκφρασης του <i>PT4</i>	48
Γράφημα 6. Επίδραση του fludioxonil στα επίπεδα έκφρασης του <i>AMT2;2</i>	49

Περίληψη

Τα γεωργικά φάρμακα αποτελούν αναπόσπαστο κομμάτι της σύγχρονης γεωργίας. Ωστόσο, η εφαρμογή τους συνεπάγεται σοβαρές περιβαλλοντικές επιπτώσεις λόγω της έντονης τοξικότητάς τους. Η Ευρωπαϊκή Αρχή για την Ασφάλεια των Τροφίμων (EFSA) έχει θεσπίσει ένα σύνολο τυποποιημένων δοκιμών για την αξιολόγηση της τοξικότητας γεωργικών φαρμάκων σε υδάτινα και χερσαία οικοσυστήματα. Αντιθέτως, η μελέτη της τοξικότητας των φυτοπροστατευτικών προϊόντων όσον αφορά τους μικροοργανισμούς του εδάφους φαίνεται να είναι ανεπαρκής. Οι Δενδροειδείς Μυκορριζικοί Μύκητες (AMF), αποτελούν οργανισμούς-δείκτες, λόγω του κεντρικού οικολογικού ρόλου και της ευαισθησίας τους στα γεωργικά φάρμακα και μπορούν να αξιοποιηθούν στην εκτίμηση της τοξικότητας των γεωργικών φαρμάκων. Στην παρούσα πτυχιακή εργασία, χρησιμοποιήθηκε το σύστημα AMF-sandwich, με σκοπό τη μελέτη της τοξικότητας του μυκητοκτόνου fludioxonil και της επίδρασής του στον αποικισμό και τη λειτουργικότητα της συμβιωτικής σχέσης του AMF *Rhizophagus irregularis* με το φυτό *Lotus japonicus*. Από τη μικροσκοπική παρατήρηση των δενδροειδών σχηματισμών του μύκητα στις ρίζες προέκυψε στατιστικώς σημαντική μείωση του αποικισμού σε συγκεντρώσεις fludioxonil 0,39 ppm, 3,9 ppm και 39 ppm. Από τη μελέτη της έκφρασης των γονιδίων LjSbtM1, LjPT4 και LjAMT2;2, που επάγονται αποκλειστικά κατά τη συμβιωτική σχέση, προέκυψε στατιστικώς σημαντική μείωση της έκφρασης σε συγκέντρωση fludioxonil 3,9ppm.

Abstract

Pesticides are an integral part of modern agriculture. However, their application entails serious environmental impacts due to their high toxicity. The European Food Safety Authority (EFSA) has established a set of standardized tests to assess the toxicity of pesticides in aquatic and terrestrial ecosystems. In contrast, the study of the toxicity of plant protection products with regard to soil microorganisms appears to be inadequate. Arbuscular Mycorrhizal Fungi (AMF), are good indicator organisms due to their crucial ecological role and their sensitivity to pesticides and can be exploited in the assessment of pesticide toxicity. In the present thesis, the AMF-sandwich system was used to study the toxicity of the fungicide fludioxonil and its effect on colonization and functionality of the AMF *Rhizophagus irregularis* symbiotic relationship with the plant *Lotus japonicus*. Microscopic observation of the fungal dendrites on the roots revealed a statistically significant reduction in colonization at fludioxonil concentrations of 0.39 ppm, 3.9 ppm and 39 ppm. A study of the expression of LjSbtM1, LjPT4 and LjAMT2;2 genes, which are exclusively induced during symbiotic relationship, revealed a statistically significant decrease in expression at fludioxonil concentration of 3.9 ppm.

1. Εισαγωγή

1.1 Γεωργικά φάρμακα και αξιολόγηση τοξικότητας

Τα γεωργικά φάρμακα αποτελούν αναπόσπαστο κομμάτι της γεωργίας στη σύγχρονη εποχή και χρησιμοποιούνται με σκοπό να προστατεύσουν τις καλλιέργειες και να αυξήσουν την παραγωγή. Με τον χρόνο, η χρήση των γεωργικών φαρμάκων αυξάνεται ολοένα και περισσότερο, προκειμένου η παραγωγή να ανταποκρίνεται στις απαιτήσεις του συνεχώς αυξανόμενου παγκόσμιου πληθυσμού. Ωστόσο, η εφαρμογή των γεωργικών φαρμάκων, λόγω της έντονης τοξικότητάς τους, συνεπάγεται και σοβαρές περιβαλλοντικές επιπτώσεις. Για παράδειγμα, υπολείμματα των γεωργικών φαρμάκων που εμμένουν στο έδαφος, είναι πιθανό να οδηγήσουν σε μείωση της ποικιλότητας οργανισμών ωφέλιμων για το έδαφος και διαταραχή της τροφικής αλυσίδας (Mu et al., 2023).

Πιο συγκεκριμένα, έπειτα από την εφαρμογή τους, τα γεωργικά φάρμακα απορροφώνται από το έδαφος και αλληλοεπιδρούν με τους μικροοργανισμούς που υπάρχουν σε αυτό. Σε κάποιες περιπτώσεις, οι μικροοργανισμοί έχουν τη δυνατότητα να διασπάζουν τα γεωργικά φάρμακα και να τα αξιοποιήσουν ως πηγή ενέργειας. Σε άλλες περιπτώσεις, ωστόσο, παρατηρείται συχνά τοξικότητα των γεωργικών φαρμάκων έναντι της μικροβιακής κοινότητας του εδάφους. Καθώς βλάπτονται και μειώνονται τόσο οι οργανισμοί που αποτελούν στόχο, όσο και οργανισμοί που δεν αποτελούν στόχο, φθίνει παράλληλα και ο ρυθμός με τον οποίο επιτελούνται σημαντικές μικροβιακές λειτουργίες, όπως η ανακύκλωση θρεπτικών στοιχείων και η ρύθμιση της γονιμότητας του εδάφους, η αύξηση της ανοχής των φυτών σε βιοτικούς (παράσιτα και ασθένειες) και αβιοτικούς (ξηρασία, αλατότητα) στρεσογόνους παράγοντες, η πρόσληψη θρεπτικών στοιχείων από τα φυτά και η προώθηση της ανάπτυξης των φυτών και της γεωργικής παραγωγικότητας, αλλά και η διατήρηση της δομής του εδάφους (EFSA Panel on Plant Protection Products and their Residues (PPR), 2010; Karpouzas et al., 2016, 2022).

Για τους παραπάνω λόγους, είναι σημαντικό να μελετηθεί η υπολειμματικότητα που εμφανίζουν τα διάφορα γεωργικά φάρμακα και να υπάρχει ένα ολοκληρωμένο πλαίσιο αξιολόγησης της τοξικότητάς τους (Mu et al., 2023). Σε παγκόσμιο επίπεδο, η διάθεση γεωργικών φαρμάκων στην αγορά βρίσκεται υπό τον έλεγχο ρυθμιστικών αρχών, οι

οποίες θα πρέπει να επικαιροποιούνται τακτικά ώστε να ανταποκρίνονται στην αυξανόμενη ανησυχία του κοινού για τη συχνή ανίχνευση υπολειμματικών επιπέδων γεωργικών φαρμάκων στα προϊόντα, στους υδάτινους πόρους και στο έδαφος. Σε ευρωπαϊκό επίπεδο, η διάθεση φυτοπροστατευτικών προϊόντων στην αγορά ρυθμίζεται από τον Κανονισμό 1107/2009. Όλα τα γεωργικά φάρμακα υπόκεινται σε αυστηρό έλεγχο, σύμφωνα με τον παραπάνω κανονισμό, που αποσκοπεί στον προσδιορισμό του επιπέδου περιβαλλοντικής έκθεσης που απορρέει από τη χρήση των φυτοπροστατευτικών προϊόντων και της τοξικότητας των γεωργικών φαρμάκων σε οργανισμούς διαφορετικών τροφικών επιπέδων (Karpouzas et al., 2022).

Πλέον έχει θεσπιστεί ένα σύνολο τυποποιημένων δοκιμών για την αξιολόγηση της τοξικότητας γεωργικών φαρμάκων σε υδάτινα και χερσαία οικοσυστήματα (EFSA Panel on Plant Protection Products and their Residues (PPR), 2013). Αντιθέτως, παρατηρείται μειωμένη μελέτη της τοξικότητας των φυτοπροστατευτικών προϊόντων όσον αφορά τους μικροοργανισμούς του εδάφους, παρά την έντονη συμμετοχή τους σε κρίσιμες οικολογικές διαδικασίες, όπως αναφέρει και η Ευρωπαϊκή Αρχή για την Ασφάλεια των Τροφίμων (EFSA) (EFSA Panel on Plant Protection Products and their Residues (PPR), 2010). Πιο συγκεκριμένα, επισημαίνει την ανάγκη βελτίωσης του ρυθμιστικού πλαισίου και υποδεικνύει μικροβιακούς οργανισμούς του εδάφους ως πιθανούς δείκτες οικοτοξικότητας και στόχους προστασίας προκειμένου να αποφευχθούν μη επιθυμητές επιπτώσεις στις οικολογικές διαδικασίες (Karpouzas et al., 2022).

Μέχρι στιγμής, η αξιολόγηση της τοξικότητας των γεωργικών φαρμάκων στις μικροβιακές κοινότητες στηρίζεται σε ένα απλό τεστ ανοργανοποίησης του αζώτου, το οποίο ωστόσο παρέχει μία συνολική εικόνα του ρυθμού αμμωνιοποίησης και νιτροποίησης στο έδαφος χωρίς ιδιαίτερα μεγάλη ευαισθησία. Ωστόσο, η πρόοδος που έχει σημειωθεί τα τελευταία χρόνια στην χαρτογράφηση της μικροβιακής οικολογίας του εδάφους, έχει καταστήσει δυνατή τη βαθύτερη μελέτη των επιδράσεων των γεωργικών φαρμάκων στην μικροβιακή ποικιλότητα, αφθονία και λειτουργικότητα (Karas et al., 2018). Νέες μοριακές μέθοδοι παρέχουν ανάλυση υψηλής ποιότητας του εδαφικού μικροβιόκοσμου. Παρόλα αυτά, δεν θεωρούνται από την EFSA επαρκώς τυποποιημένες ώστε να αξιοποιηθούν στην αξιολόγηση της τοξικότητας των γεωργικών φαρμάκων (Karpouzas et al., 2022).

Ένα ολοκληρωμένο πλάνο αξιολόγησης της τοξικότητας των γεωργικών φαρμάκων στην μικροβιακή κοινότητα του εδάφους μπορεί να περιλαμβάνει τα εξής χαρακτηριστικά: την ακριβή εκτίμηση της διάρκειας και της έντασης της έκθεσης, τη χρήση τυποποιημένων μεθόδων υψηλής ανάλυσης και ευαισθησίας, την κλιμακωτή αξιολόγηση του φαρμάκου (*in vitro*, *in soil* και *at field*) και την ταυτοποίηση μικροβιακών ομάδων του εδάφους που θα μπορούσαν να αποτελέσουν δείκτες της τοξικότητας των γεωργικών φαρμάκων στην μικροβιακή κοινότητα του εδάφους (Karpouzas et al., 2022).

Η επιλογή δεικτών τοξικότητας για τα υδάτινα και χερσαία οικοσυστήματα στηρίχθηκε σε συγκεκριμένα κριτήρια: να διαδραματίζουν κεντρικό οικολογικό ρόλο, να εμφανίζουν ευαισθησία στα γεωργικά φάρμακα και οικοτοξικολογική απόκριση, να είναι πολύ καλά μελετημένος ο κύκλος ζωής τους και να υπάρχουν τυποποιημένες μέθοδοι αξιολόγησης της απόκρισής τους στα γεωργικά φάρμακα. Σε αντίστοιχη λογική, θα ήταν δυνατός ο καθορισμός μικροοργανισμών- δεικτών για την αξιολόγηση της τοξικότητας των γεωργικών φαρμάκων στη μικροβιακή κοινότητα του εδάφους. Πιο συγκεκριμένα, μικροοργανισμοί του εδάφους που πληρούν τα παραπάνω κριτήρια είναι οι νιτροποιητικοί οργανισμοί (Ammonia oxidizing microorganisms ή AOM), τα αζωτοδεσμευτικά βακτήρια, τα πρώτιστα, τα μικροφύκη, τα κυανοβακτήρια και οι Δενδροειδείς Μυκορριζικοί Μύκητες (Arbuscular Mycorrhizal Fungi ή AMF). (Karpouzas et al., 2022)

Η παρούσα πτυχιακή εργασία μελετά την επίδραση των γεωργικών φαρμάκων στη λειτουργία των AMF.

1.2. Δενδροειδείς μυκορριζικοί μύκητες (Arbuscular Mycorrhizal Fungi, AMF)

Οι AMF είναι υποχρεωτικώς συμβιωτικοί μικροοργανισμοί, οι οποίοι αναπτύσσονται συμβιώνοντας στις ρίζες των περισσότερων ειδών των φυτών και ανήκουν στο φύλο *Glomeromycota* (Parniske, 2008). Σε εδάφη που είναι φτωχά σε θρεπτικά στοιχεία ή σε συνθήκες έλλειψης υγρασίας, οι AMF μέσω των εδαφικών υφών, παρέχουν στο φυτό θρεπτικά στοιχεία βελτιώνοντας την ανάπτυξη και την αναπαραγωγή του. Ο φώσφορος είναι το βασικό στοιχείο που αποκτά το φυτό μέσω της συμβιωτικής σχέσης που αναπτύσσει με τους AMF. Εκτός από φώσφορο, όμως, οι AMF παρέχουν στο φυτό και

άλλα θρεπτικά στοιχεία, όπως άζωτο (N), ψευδάργυρο (Zn), χαλκό (Cu) και κέσιο (Cs) (Boulois et al., 2006; Kuypers & Jansa, 2023). Ακόμη, βελτιώνουν την αντοχή του φυτού στην ξηρασία και στις υψηλές συγκεντρώσεις βαρέων μετάλλων, μειώνουν την απώλεια θρεπτικών, συμβάλλουν στη διατήρηση της καλής δομής του εδάφους και βελτιώνουν την ανθεκτικότητα του φυτού σε παθογόνους μικροοργανισμούς (Kuypers & Jansa, 2023). Ως αντάλλαγμα, οι AMF, λαμβάνουν από το φυτό άνθρακα καθώς αδυνατούν να παράγουν μόνοι τους τα απαραίτητα σάκχαρα. Χωρίς συμβίωση με φυτό-ξενιστή, οι AMF μπορούν να εκβλαστώνουν, αλλά δεν έχουν τη δυνατότητα να παράγουν μυκήλια και να ολοκληρώσουν τον κύκλο ζωής τους (Parniske, 2008).

1.2.1. Ανάπτυξη δενδροειδούς μυκόρριζας

Η ανάπτυξη της δενδροειδούς μυκόρριζας περιλαμβάνει **την προ-συμβιωτική φάση**, κατά την οποία γίνεται η ανταλλαγή σημάτων, η εκβλάστηση των σπόρων των AMF και η ανάπτυξη των υφών του και **την συμβιωτική φάση**, κατά την οποία οι AMF εισχωρούν και αναπτύσσονται ενδοφυτικά (Parniske, 2008).

1.2.1.1. Προ-συμβιωτική φάση

Η προ-συμβιωτική φάση χαρακτηρίζεται από τη μοριακή επικοινωνία μεταξύ του φυτού και του AMF, που επιτυγχάνεται με την ανταλλαγή δύο βασικών μοριακών σημάτων: τις στριγγολακτόνες (SLs) και τους παράγοντες Myc. Οι SLs είναι φυτοορμόνες που εκκρίνονται από τη ρίζα του φυτού στη ριζόσφαιρα, όταν αυτό βρεθεί σε συνθήκες έλλειψης θρεπτικών και λειτουργούν ως σήματα που υποδηλώνουν την ύπαρξη του φυτού-ξενιστή που είναι διαθέσιμο προς αποικισμό για τους AMF. Η ανίχνευση αυτών των μορίων από τους AMF ενεργοποιεί την εκβλάστηση των σπορίων τους και την ανάπτυξη των υφών που θα καταστήσουν δυνατή την επαφή τους με το φυτό και την εγκαθίδρυση της συμβιωτικής σχέσης (Ho-Plágaro & García-Garrido, 2022). Ωστόσο, αυτή η απόκριση των AMF μπορεί να επαχθεί και από άλλα μόρια, όπως παράγωγα N-ακετυλογλουκοσαμίνης, υδροξυ-λιπαρά οξέα και φλαβονοειδή. Η αναγνώριση των SLs επάγει την έκκριση μορίων όπως χιτοολιγοσακχαρίτες COs και λιποχιτοολιγοσακχαρίτες LCOs, που ονομάζονται παράγοντες Myc και επάγουν τη μεταγραφή γονιδίων των φυτών που σχετίζονται με τη συμβίωση (Nasir et al., 2021; Pimprakar & Gutjahr, 2018).

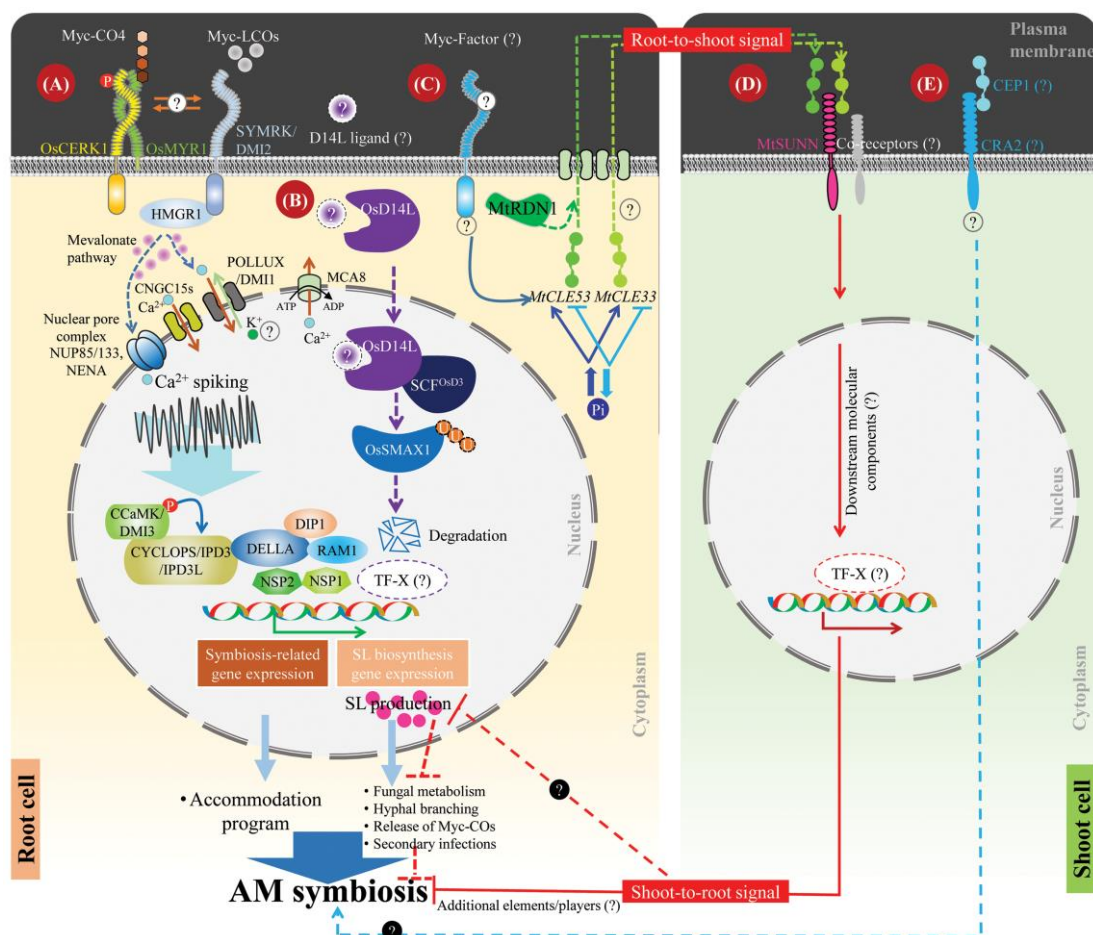
1.2.1.2. Σηματοδότηση

Στο ρύζι, οι παράγοντες Myc αναγνωρίζονται από τον υποδοχέα OsMYR1, ο οποίος στη συνέχεια φωσφορυλιώνει τον OsCERK1 δεσμεύοντάς τον και σχηματίζοντας το σύμπλοκο-υποδοχέα OsMYR1-OsCERK1. Η δημιουργία αυτού του συμπλόκου επάγει αποκρίσεις εξαρτώμενες από το σηματοδοτικό μονοπάτι συμβίωσης του φυτού (CCSP), όπως η αύξηση του ασβεστίου (Ca^{+2} spiking) και η μεταγραφή γονιδίων σχετιζόμενων με τη συμβίωση στα κύτταρα του ξενιστή. Τα γονίδια αυτά, θα δημιουργήσουν ένα περιβάλλον κατάλληλο για την ανάπτυξη της συμβιωτικής σχέσης. Επιπλέον, για την αναγνώριση των παραγόντων Myc είναι σημαντικός ο υποδοχέας SYMRK/DMI2, ο οποίος αφού προσδέσει τον παράγοντα Myc, είναι πιθανό ότι αλληλεπιδρά με τον OsCERK1 ή τον OsMYR1, ώστε να ενεργοποιήσει σηματοδοτικά μονοπάτια σχετιζόμενα με τη συμβίωση. Ακόμη, είναι πιθανό ότι η πρόσδεση των παραγόντων στους υποδοχείς επάγει την αλληλεπίδραση του SYMRK/DMI2 με το HMGR1, μόριο του μονοπατιού MVA (σύνθεση χοληστερόλης), προωθώντας τη σύνθεση επόμενων μορίων-σημάτων. Τα σήματα αυτά, φαίνεται να ενεργοποιούν τα μεμβρανικά κανάλια DMI1, τα οποία έπειτα πιθανώς δημιουργούν ένα σύμπλοκο με το CNGC15s προκειμένου να αυξήσουν το ασβέστιο εντός του πυρήνα. Το σήμα της αύξησης του ασβεστίου προκαλεί τη φωσφορυλίωση του μεταγραφικού παράγοντα CYCLOPS/IPD3/IPD3-Like από το CCaMK/DMI3, με αποτέλεσμα την επαγωγή επόμενων γονιδίων σχετιζόμενων με τη συμβίωση. Η συγκέντρωση του ασβεστίου τελικά ρυθμίζεται και διατηρείται από το MtMCA8. Είναι πιθανό ότι το CYCLOPS ανήκει σε ένα μεγάλο σύμπλοκο που αποτελείται από διάφορους μεταγραφικούς παράγοντες, όπως οι DELLA, DIP1, RAM1, NSP2 και NSP1, οι οποίοι, επίσης, συμμετέχουν στη ρύθμιση γονιδίων της συμβίωσης. Οι πρωτεΐνες DELLA σχηματίζουν τα σύμπλοκα DELLA-DIP1-RAM1 στο ρύζι και τα σύμπλοκα CCaMK-CYCLOPS-DELLA στο *Lotus japonicus*. Ο σχηματισμός αυτών των συμπλόκων επάγει την έκφραση γονιδίων της συμβίωσης. (Εικόνα 1, Α.) (Nasir et al., 2021)

Επιπλέον, στο ρύζι, με την αναγνώριση των παραγόντων Myc, κάποιος προσδέτης D14, προς το παρόν μη προσδιορισμένος, είναι πιθανό ότι προσδένεται στον υποδοχέα OsD14L, προωθώντας τον σχηματισμό ενός συμπλόκου, το οποίο επάγει την αποδόμηση του OsSMAX1. Αυτό έχει ως αποτέλεσμα την επαγωγή γονιδίων σχετιζόμενων με τη συμβίωση και την έκφραση των SLs που, όπως προαναφέρθηκε,

θα προάγουν την ενεργοποίηση του μεταβολισμού του μύκητα, τη δημιουργία υφών και την απελευθέρωση επιπλέον παραγόντων Myc. (Εικόνα 1, B) (Nasir et al., 2021)

Στην περίπτωση που υπάρχει αρκετή ποσότητα φωσφόρου στο φυτό, ενεργοποιείται η έκφραση των MtCLE53 και MtCLE33, στα ριζικά κύτταρα. Τα ίδια μόρια ενεργοποιούνται και από τον αποικισμό του φυτού από AMF. Τα μόρια αυτά, μετακινούνται από τα ριζικά κύτταρα στα κύτταρα του βλαστού, όπου δεσμεύονται είτε στον μεμβρανικό υποδοχέα MtSUNN είτε σε άλλους, σχετικούς με αυτόν, υποδοχείς, ενεργοποιώντας κάποιο σηματοδοτικό μονοπάτι ρύθμισης του αποικισμού, προκειμένου να αποφευχθεί ο υπέρμετρος αποικισμός (Εικόνα 1, C και D). Το ακριβές σηματοδοτικό μονοπάτι δεν είναι ακόμη γνωστό. Τέλος, είναι πιθανό ότι η συμβίωση ρυθμίζεται και από τον MtCEP1, μέσω της αλληλεπίδρασής του με τον υποδοχέα MtCRA2, χωρίς να υπάρχουν ακόμη περαιτέρω πληροφορίες. (Εικόνα 1, E) (Nasir et al., 2021)

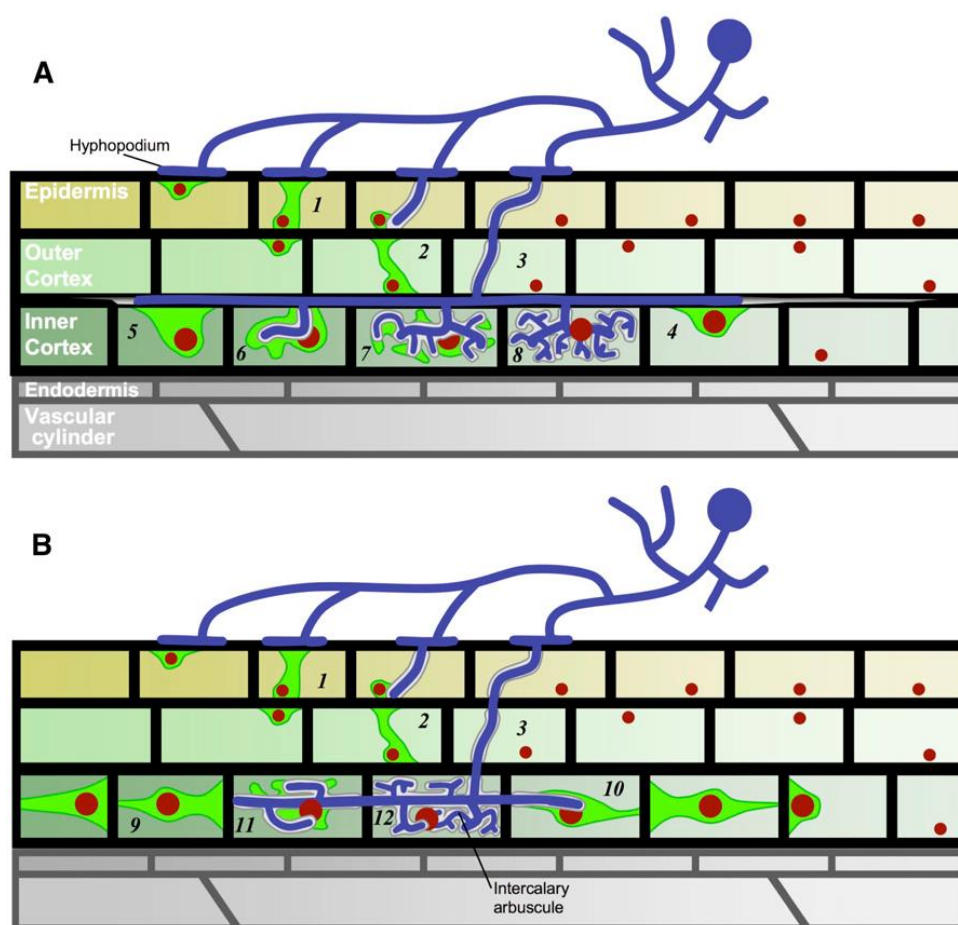


Εικόνα 1. Σηματοδότηση για ρύθμιση της AM συμβίωσης μέσω υποδοχέων του ριζικού φυτικού κυττάρου (Nasir et al., 2021)

1.2.1.3. Σχηματισμός δενδροειδούς μυκόρριζας

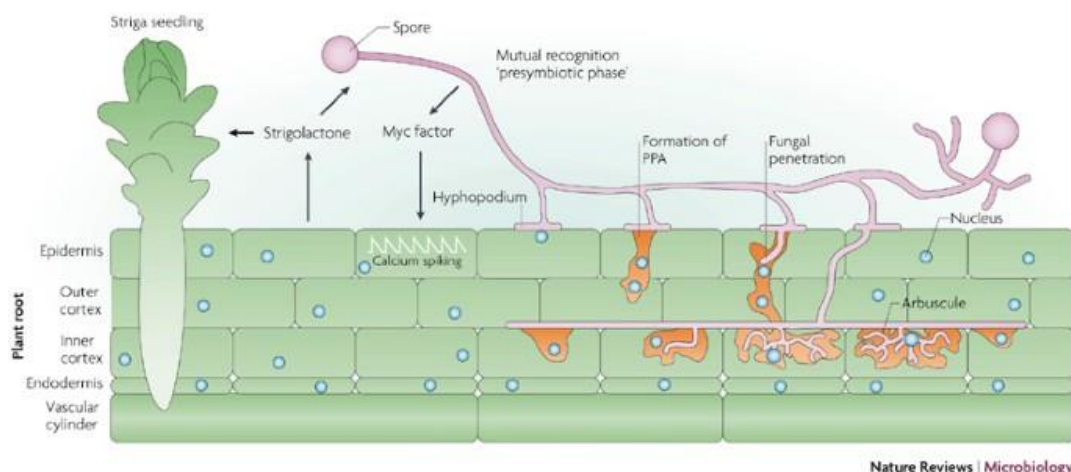
Με την ενεργοποίηση των γονιδίων που επάγουν την ανάπτυξη της συμβιωτικής σχέσης μέσω τη σηματοδότησης που αναφέρθηκε παραπάνω, θα ξεκινήσει ο σχηματισμός της δενδροειδούς μυκόρριζας.

Ο τρόπος με τον οποίο θα γίνει ο αποικισμός της ρίζας από τον μύκητα εξαρτάται από το είδος των συμβιωτών και κυρίως του φυτού-ξενιστή. Τα μοτίβα που ακολουθούνται συνήθως είναι ο τύπος Arum, που παρατηρείται στο *Medicago truncatula* και ο τύπος Paris, που παρατηρείται στο *Dacus carota*. Σύμφωνα με τον πρώτο, πραγματοποιείται ενδοκυτταρικός σχηματισμός υφών στα κύτταρα του φλοιού και έπειτα δημιουργία δενδριτών, ενώ σύμφωνα με τον δεύτερο πραγματοποιείται επιμήκυνση των υφών από το ένα κύτταρο του εσωτερικού φλοιού στο διπλανό και παράλληλα, σταδιακός σχηματισμός των δενδριτών στα ήδη αποικισμένα κύτταρα (Εικόνα 2) (Genre et al., 2008).



Εικόνα 2. Οι διαφορετικοί τρόποι μυκορριζικού αποικισμού για το *M. truncatula* (A) και το *D. carota* (B) (Genre et al., 2008)

Πιο συγκεκριμένα, στο *M. truncatula*, μετά τη δημιουργία των υποποδίων, που είναι το πρώτο σημείο τις υφής του μύκητα που έρχεται σε επαφή με τη ρίζα του φυτού, ακολουθεί ο σχηματισμός μιας υποκυτταρικής δομής στο επιδερμικό φυτικό κύτταρο, που αποτελεί έναν προ-διεισδυτικό μηχανισμό και καθορίζει την πορεία του αποικισμού του μύκητα και την ανάπτυξή του μέσα στο φυτό και ονομάζεται Pre-Penetration Apparatus Assembly (PPA). Έτσι, ξεκινά η φάση συμβίωσης με την ανάπτυξη υφών που διεισδύουν στα κύτταρα των ριζών του φυτού μέσω του PPA. Ο σχηματισμός του PPA προκαλεί τη μεταφορά του πυρήνα του φυτικού κυττάρου στο σημείο στο οποίο πρόκειται να γίνει η διείσδυση του μύκητα. Στη συνέχεια, ο πυρήνας μεταφέρεται κατά μήκος του PPA που αναπτύσσεται, καθοδηγώντας την ανάπτυξή του. Ο PPA αποτελεί μία πυκνή δομή στο κυτταρόπλασμα του φυτικού κυττάρου που συγκροτείται από κυτταροσκελετικούς μικροσωληνίσκους και μικρονημάτια. Ο σχηματισμός αυτός είναι απαραίτητος προκειμένου να πραγματοποιηθεί η διείσδυση των μυκητιακών υφών στο φυτικό κύτταρο του ξενιστή (Εικόνα 3.). (Parniske, 2008)

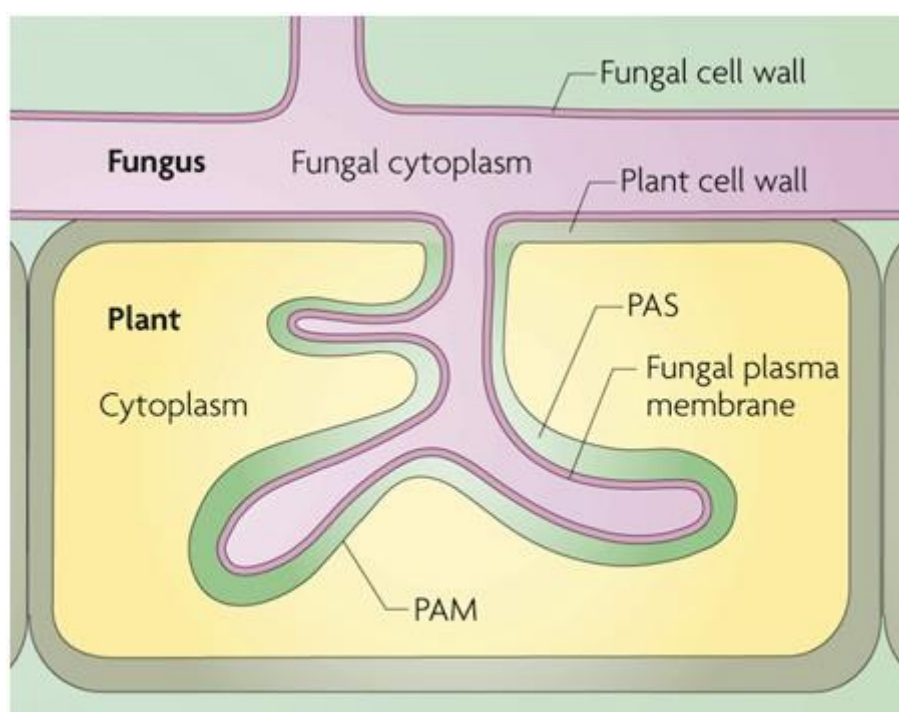


Εικόνα 3. Τα βήματα της ανάπτυξης της δενδροειδούς μυκόρριζας (Parniske, 2008)

Μόλις ο μύκητας εισέλθει ολοκληρωτικά στο επιδερμικό κύτταρο και το διασχίσει, σχηματίζεται ένας δεύτερος PPA που διασχίζει το κύτταρο του εξωτερικού φλοιού, ταυτόχρονα πάλι με την αναδιάταξη του πυρήνα προς το αντίθετο σημείο του κυττάρου από το σημείο εισόδου των υφών. Καθώς ολοκληρώνεται η είσοδος των υφών στα κύτταρα, οι PPA αποδομούνται. Ακολουθεί η επιμήκυνση των υφών στον μεσοκυττάριο χώρο των κυττάρων του εξωτερικού και του εσωτερικού φλοιού και έπειτα η διείσδυση των υφών στα κύτταρα του εσωτερικού φλοιού της ρίζας μέσω της δημιουργίας νέων PPAs (Εικόνα 3.). (Genre et al., 2008)

1.2.1.4. Συμβιωτική φάση

Καθώς πραγματοποιείται αυτή η διαδικασία, δημιουργούνται συνεχώς νέες διακλαδώσεις στις υφές, με αποτέλεσμα την χαρακτηριστική δενδροειδή μορφή του μύκητα. Κατά τη διείσδυση, η πλασματική μεμβράνη του φυτικού κυττάρου δεν υφίσταται ρήξη. Μία επέκταση της πλασματικής μεμβράνης που ονομάζεται περιδενδροειδής μεμβράνη (periarbuscular membrane ή PAM) περιβάλλει τους δενδρίτες. Ο χώρος σε αυτό το σημείο επαφής, ανάμεσα στους δενδρίτες και την PAM, ονομάζεται περιδενδροειδής χώρος (Periarbuscular space ή PAS) και σε αυτόν πραγματοποιείται η ανταλλαγή θρεπτικών και σηματοδοτικών μορίων (Εικόνα 4.). (Parniske, 2008)



Nature Reviews | Microbiology

Εικόνα 4. Σχηματική απεικόνιση ενός δενδρίτη (arbuscule) (Parniske, 2008)

Στο *D. carota* παρατηρείται όπως και στο *M. truncatula*, σχηματισμός PPA στα επιδερμικά κύτταρα μετά την επαφή των υποποδίων των AMF στην επιφάνεια των κυττάρων και την αναδιάταξη των πυρήνων στο σημείο επαφής. Παρατηρείται, ακόμη, επέκταση των υφών στα κύτταρα του εξωτερικού φλοιού της ρίζας με τρόπο ανάλογο με το *M. truncatula*. Ωστόσο, η διείσδυση των υφών στα κύτταρα του εσωτερικού φλοιού ξεκινά από ένα μεμονωμένο κύτταρο και συνεχίζεται με το πέρασμα των υφών από το ένα κύτταρο στο διπλανό του, με σχηματισμό PPAs κάθε φορά. Παράλληλα,

στα ήδη αποικισμένα κύτταρα πραγματοποιείται η δημιουργία των δενδριτών (Εικόνα 2, Β). (Genre et al., 2008)

Για την δημιουργία των ενδοκυτταρικών δομών συμβίωσης και κυρίως των δενδριτών στο φυτό *Lotus japonicus*, που χρησιμοποιήθηκε στην παρούσα πτυχιακή εργασία για τη διεξαγωγή των πειραμάτων, φάνηκε να είναι απαραίτητη η έκφραση του γονιδίου LjSbtM1. Πιο συγκεκριμένα, από σύγκριση του μεταγραφώματος κυττάρων ρίζας του *L. japonicus* που δεν είναι αποικισμένα από AMF με αντίστοιχα κύτταρα που είναι αποικισμένα από AMF, προέκυψε ότι το LjSbtM1 εμφανίζει έντονη θετική ρύθμιση κατά τον εμβολιασμό των φυτών με AMF. Η απενεργοποίηση της LjSbtM1 με RNAi επέφερε μειωμένα επίπεδα αποικισμού των ριζών και μειωμένο αριθμό δενδριτών. Είναι πιθανό ότι το LjSbtM1 στοχεύεται για έκκριση και μεταφορά στο σημείο της συμβίωσης, δηλαδή στον περιδενδροειδή χώρο. Σε αυτό το σημείο, το LjSbtM1 λειτουργεί ως πρωτεολυτικό μόριο και αυτή η πρωτεολυτική διαδικασία είναι απαραίτητη για τη δημιουργία των δενδριτών (Takeda et al., 2009).

Οι δενδρίτες επιβιώνουν για μικρότερο χρονικό διάστημα συγκριτικά με το κύτταρο-ξενιστή και επομένως, ένα κύτταρο-ξενιστής μπορεί να συμμετάσχει σε περισσότερες από μία συμβιώσεις με AMF. Η ανάπτυξή τους συνεχίζεται έως ότου φτάσουν σε ένα συγκεκριμένο μέγεθος, μετά το οποίο επάγεται η αποδόμησή τους. Ο λόγος που οι δενδρίτες έχουν μικρότερη διάρκεια ζωής από το κύτταρο-ξενιστή παρόλο που η δημιουργία τους απαιτεί κατανάλωση ενέργειας είναι ότι κάποια στιγμή παύουν να είναι λειτουργικοί. Επομένως, υπάρχει ένας μηχανισμός που επιτρέπει στο φυτό να αντλαμβάνεται τους μη λειτουργικούς δενδρίτες και να προκαλεί τον αποδόμησή τους (Parniske, 2008).

Συνολικά, ο κύκλος ζωής των δενδριτών διαρκεί περίπου 4-5 ημέρες. Μόλις τελειώσει αυτός ο κύκλος, αρχίζει η αποδόμηση των διακλαδώσεων και έπειτα η αποδόμηση ολόκληρων των υφών, έως ότου ολόκληρος ο δενδρίτης να συρρικνωθεί σε μία μικρή μάζα. Κατά τη διάρκεια αυτής της διαδικασίας, αναδιατάσσεται ξανά η περιδενδροειδής μεμβράνη, ώστε να προσαρμοστεί στο νέο περιεχόμενο. Τελικά, ο μύκητας αποικοδομείται πλήρως και το κύτταρο-ξενιστής ανακτά την αρχική του διαμόρφωση και είναι έτοιμο για έναν επόμενο αποικισμό (Bonfante & Genre, 2010).

1.2.2. Ανταλλαγή θρεπτικών κατά την συμβιωτική σχέση

1.2.2.1 Ανταλλαγή άνθρακα (C)

Όπως προαναφέρθηκε, ο στόχος αυτής της συμβιωτικής σχέσης μεταξύ φυτού και μύκητα είναι η ανταλλαγή θρεπτικών στοιχείων. Ο μύκητας λαμβάνει από το φυτό άνθρακα, προκειμένου να ολοκληρώσει τον κύκλο ζωής του. Η παροχή άνθρακα γίνεται με τη μορφή σουκρόζης, την οποία το φυτό αποκτά μέσω φωτοσύνθεσης. Η σουκρόζη ρέει προς τη ριζόσφαιρα, όπου ένα μέρος της ποσότητάς της διασπάται σε γλυκόζη και φρουκτόζη. Τελικά, μεταφέρεται στο εσωτερικό του μύκητα μέσω συστημάτων μεταφοράς τόσο του μύκητα, που εντοπίζονται στους δένδροειδείς σχηματισμούς, όσο και του φυτού. Τα συστήματα μεταφοράς του φυτού περιλαμβάνουν μεταφορείς σουκρόζης (sucrose transporters ή SUTs), μεταφορείς μονοσακχαριτών (monosaccharide transporters ή MSTs) και την οικογένεια SWEET (sugars will eventually be exported transporter). Ο άνθρακας που αποκτά ο μύκητας από το φυτό μπορεί να προέρχεται και από σάκχαρα αποθηκευμένα σε κυτταρικά διαμερίσματα, αλλά σε πολύ μικρότερο ποσοστό συγκριτικά με τα διαλυτά σάκχαρα που προέρχονται από τη σουκρόζη και μεταφέρονται στη ρίζα (Garcia et al., 2016).

Πιο συγκεκριμένα, οι μεταφορείς SUT μεταφέρουν τα σάκχαρα από τον βλαστό στη ρίζα. Η εξαγωγή σουκρόζης προς ρίζες αποικισμένες από AMF χαρακτηρίζεται από έντονη ρύθμιση των μεταφορέων. Επιπλέον, η μεταφορά μονοσακχαριτών που παράγονται μέσω διάσπασης της σουκρόζης από ινβερτάσες, γίνεται με τη βοήθεια των MSTs. Η οικογένεια μεταφορέων SWEET, που ανακαλύφθηκε πιο πρόσφατα φαίνεται να εξάγει τόσο σουκρόζη, όσο και μονοσακχαρίτες (Garcia et al., 2016).

Όσον αφορά τους μεταφορείς του μύκητα, έχουν ταυτοποιηθεί μεταφορείς μονοσακχαριτών, οι οποίοι φαίνεται να διαδραματίζουν κεντρικό ρόλο στην πρόσληψη των σακχάρων που πραγματοποιείται στην περιοχή των δενδριτών. Ωστόσο, δεν υπάρχουν ακόμη δεδομένα που να υποστηρίζουν την μεταφορά δισακχαριτών, όπως η σουκρόζη, στον AMF (Bárcenas et al., 2022; Garcia et al., 2016).

1.2.2.2. Ανταλλαγή φωσφόρου (P)

Πολλές έρευνες έχουν επιβεβαιώσει τη σημασία των AMF στην βελτιωμένη πρόσληψη φωσφόρου από το φυτό και συνεπώς, την καλύτερη ανάπτυξή του, συγκριτικά με αντίστοιχα φυτά που αποτελούν δείγματα ελέγχου και δεν αναπτύσσουν συμβιωτικές

σχέσεις με AMF. Ακόμη πιο έντονες, μάλιστα, είναι οι παρατηρήσεις αυτές σε εδάφη με χαμηλή διαθεσιμότητα θρεπτικών.

Τα φυτά έχουν υψηλές απαιτήσεις σε φώσφορο, τον οποίο αποκτούν από το έδαφος, όταν ο ίδιος βρίσκεται σε διαλυτή μορφή. Ωστόσο, ο φώσφορος εμφανίζεται στο έδαφος, κυρίως ως οργανικό σύμπλοκο ή σε ανόργανες μορφές, οι οποίες δεν είναι απευθείας διαθέσιμες στο φυτό. Έτσι, καθώς το φυτό απορροφά τον διαθέσιμο διαλυτό φώσφορο από το έδαφος, στις περιοχές που περιβάλλουν τις ρίζες του φυτού, ο διαθέσιμος φώσφορος εξαντλείται. Επομένως, η δημιουργία συμβιωτικών σχέσεων φυτού-ξενιστή με μύκητα είναι πολύ σημαντικές, καθώς ο μύκητας επεκτείνει τη ριζόσφαιρα του φυτού, δίνοντάς του πρόσβαση σε επιπλέον διαλυτό φώσφορο (*Arbuscular Mycorrhizas: Physiology and Function* | SpringerLink, n.d.).

Οι AMF λαμβάνουν τον φώσφορο από το έδαφος μέσω μεταφορέων φωσφόρου τοποθετημένων σε υφές του μύκητα που βρίσκονται εκτός των φυτικών κυττάρων. Ο φώσφορος, έπειτα, μετατρέπεται σε πολυφωσφορικά, τα οποία έπειτα διασπώνται σε μικρότερες αλυσίδες και μεταφέρονται προς τους δενδρίτες, από όπου απελευθερώνονται στον περιδενδροειδή χώρο και έτσι μπορούν να απορροφηθούν από το φυτικό κύτταρο. Οι μεταφορείς φωσφόρου που εντοπίζονται στο φυτό και μεσολαβούν στην πρόσληψη του φωσφόρου δια μέσου της περιδενδροειδούς μεμβράνης έχουν ταυτοποιηθεί σε διάφορα είδη φυτών και ανήκουν στην οικογένεια μεταφορέων φωσφόρου 1 (PHT1). Τα επίπεδα έκφρασης πολλών PHT1 μειώνονται όταν αυξάνονται τα επίπεδα φωσφόρου στο φυτικό κύτταρο, ενώ ακόμη κάποιοι PHT1 επάγονται από την ανάπτυξη συμβιωτικών σχέσεων μεταξύ φυτού και AMF. Κατά την συμβίωση με AMF επάγεται η έκφραση δύο ειδών μεταφορέων φωσφόρου: οι μυκορριζο-ειδικοί και οι μυκορριζο-επαγόμενοι (Rui et al., 2022).

Οι μυκορριζο-επαγόμενοι PHT1 εκφράζονται έντονα κατά την ανάπτυξης συμβιωτικών σχέσεων, αλλά μία μικρή ποσότητα φαίνεται να εκφράζεται και σε μη αποικισμένες ρίζες. Οι μυκορριζο-ειδικοί PHT1 έχουν ταυτοποιηθεί σε διάφορα είδη φυτών και εκφράζονται αποκλειστικά στην ανάπτυξη συμβιωτικών σχέσεων (Rui et al., 2022). Στους μυκορριζο-ειδικούς PHT1 ανήκει και ο PT4, ο οποίος βρίσκεται στην περιδενδροειδή μεμβράνη και μεταφέρει τον φώσφορο από τον περιδενδροειδή χώρο στο φυτικό κύτταρο, αξιοποιώντας την ηλεκτροχημική βαθμίδωση πρωτονίων που δημιουργείται από μία H^+ -ATPάση της πλασματικής μεμβράνης (Banasiak et al.,

2021). Ο συγκεκριμένος μεταφορέας είναι απαραίτητος για τη μεταφορά του φωσφόρου από τον μύκητα στο φυτό και τη διατήρηση της λειτουργικής συμβίωσης μεταξύ φυτού και AMF. Ακόμη, σε μεταλλάγματα του *M. truncatula*, στα οποία ο PT4 είναι απενεργοποιημένος, φαίνεται να πραγματοποιείται πρόωρη αποικοδόμηση των δενδριτών. Αυτό υποδεικνύει ότι το φυτό έχει την ικανότητα να μετρά τη μεταφορά του φωσφόρου από τους δενδρίτες και σε περίπτωση που αυτοί δεν είναι λειτουργικοί, επάγει την πρόωρη αποδόμησή τους (Luginbuehl & Oldroyd, 2017).

1.2.2.3. Ανταλλαγή αζώτου (N)

Στο έδαφος, το άζωτο βρίσκεται σε διάφορες μορφές και δεν είναι όλες αξιοποιήσιμες από το φυτό. Για αυτό, είναι σημαντικό να αναπτύσσει σχέσεις με μικροοργανισμούς που θα το βοηθήσουν να απορροφήσει το άζωτο από το έδαφος. Συνήθως, το άζωτο προσλαμβάνεται από τους οργανισμούς με τη μορφή αμμωνίου (NH_4) και νιτρικών (NO_3^-). Παρόλο που τα νιτρικά είναι η πιο άφθονη μορφή αζώτου στο έδαφος και είναι πιο διαλυτά συγκριτικά με το αμμώνιο, τις περισσότερες φορές προτιμάται το αμμώνιο ως πηγή αζώτου. Αυτό συμβαίνει διότι χρειάζεται λιγότερη ενέργεια για να αφομοιωθεί από το φυτό, να μετατραπεί, δηλαδή σε οργανική ένωση (Courty et al., 2015).

Τα νιτρικά διαπερνούν την κυτταρική μεμβράνη του φυτικού κυττάρου, μέσω ενεργειακά εξαρτώμενων μεταφορέων, όπως οι μεταφορείς νιτρικών (nitrate transporters ή NRTs) και οι μεταφορείς πεπτιδίων (peptide transporters ή PTRs). Το αμμώνιο εισάγεται στο φυτικό κύτταρο μέσω μεταφορέων αμμωνίου (ammonium transporters ή AMTs). Κάποιοι AMTs επάγονται, μόνο κατά τη διάρκεια συμβίωσης με AMF και εντοπίζονται στις περιδενδροειδείς μεμβράνες, υποδηλώνοντας ότι η μεταφορά του αμμωνίου πραγματοποιείται σε εκείνο το σημείο (Garcia et al., 2016).

Οι AMF προσλαμβάνουν το άζωτο στις υφές που βρίσκονται εκτός των ριζικών κυττάρων και το μεταφέρουν στις υφές που βρίσκονται εντός των ριζικών κυττάρων, υπό τη μορφή αργινίνης. Από εκεί το άζωτο μεταφέρεται στο φυτό σε ανόργανη μορφή. Η πρόσληψη του αζώτου από τον περιδενδροειδή χώρο γίνεται μέσω του μεταφορέα αζώτου AMT2;2, ο οποίος βρίσκεται στην περιδενδροειδή μεμβράνη. Ο συγκεκριμένος μεταφορέας εντοπίζεται κυρίως στο σημείο της συμβίωσης και ενεργοποιείται σε κύτταρα που φέρουν δενδρίτες. Ο AMT2;2 προσλαμβάνει άζωτο με τη μορφή NH_4^+ και το απελευθερώνει στο κυτταρόπλασμα του φυτού, με τρόπο pH-εξαρτώμενο και με ρυθμό πρόσληψης υψηλότερο σε όξινες συνθήκες (Guether et al., 2009).

Εκτός από φώσφορο και άζωτο, φαίνεται ότι η ανάπτυξη συμβιωτικών σχέσεων μεταξύ φυτού και AMF, συμβάλλει σημαντικά και στην πρόσληψη άλλων θρεπτικών στοιχείων, όπως ψευδάργυρο (Zn), χαλκό (Cu) και κέσιο (Cs) (Boulois et al., 2006).

1.2.3. Αντοχή σε βιοτικές και αβιοτικές καταπονήσεις

Επιπλέον, η ανάπτυξη συμβιωτικών σχέσεων του φυτού με τους AMF φαίνεται να αυξάνει την αντοχή του φυτού σε βιοτικές και αβιοτικές καταπονήσεις. Πιο συγκεκριμένα, παρατηρείται βελτιωμένη ανθεκτικότητα του φυτού σε φυτοπαθογόνους μικροοργανισμούς, που πιθανώς αποδίδεται στην καλύτερη πρόσληψη θρεπτικών συστατικών, στον ανταγωνισμό μεταξύ AMF και παθογόνου ως προς τον χώρο του αποικισμού και σε αλλαγές στη μορφολογία και την αρχιτεκτονική του ριζικού συστήματος. Οι αβιοτικές καταπονήσεις, όπως η ξηρασία, η αυξημένη αλατότητα του εδάφους και οι υψηλές θερμοκρασίες, σχετίζονται άμεσα με τη μείωση της πρόσληψης νερού από τις ρίζες του φυτού και προκαλεί αφυδάτωση στο φυτό. Η συμβίωση με AMF φαίνεται να προστατεύει το φυτό από τις επιπτώσεις της έλλειψης νερού. Ένας από τους πιο σημαντικούς τρόπους με τους οποίους επιτυγχάνεται αυτό είναι η άμεση πρόσληψη και μεταφορά του νερού στο φυτό-ξενιστή μέσω των μυκηλιακών υφών (*Arbuscular Mycorrhizas: Physiology and Function* | SpringerLink, n.d.).

Η βελτιωμένη πρόσληψη θρεπτικών συστατικών από τα φυτά με τη βοήθεια των AMF είναι ένα από τα βασικότερα χαρακτηριστικά της μυκόρριζας, καθώς προσφέρει στο φυτό αντοχή σε βιοτικές και αβιοτικές καταπονήσεις. Επιπλέον, οι AMF βελτιώνουν τα αποθέματα του εδάφους σε άνθρακα, συμβάλλουν στη διαμόρφωση και τη σταθεροποίηση της συσσωμάτωσης του εδάφους και συνεισφέρουν στην ανταλλαγή θρεπτικών στοιχείων μεταξύ των φυτών, μέσω του εκτεταμένου δικτύου μυκηλιακών υφών.

1.3. AMF στην εκτίμηση τοξικότητας γεωργικών φαρμάκων

Η αξιολόγηση της μικροβιακής τοξικότητας ενός γεωργικού φαρμάκου με μικροοργανισμό-δείκτη τους AMF, μπορεί να πραγματοποιηθεί σε διάφορα πειραματικά επίπεδα, με αυξανόμενη πολυπλοκότητα.

Σε επίπεδο *in vitro* είναι δυνατή η καλλιέργεια των AMF σε αποστειρωμένο μέσο. Αυτές οι στείρες συνθήκες επιτρέπουν την εκτίμηση της τοξικότητας των γεωργικών

φαρμάκων στα διαφορετικά στάδια του κύκλου ζωής των AMF (εκβλάστηση σπόρων, ανάπτυξη υφών, αποικισμός ρίζας) και καθιστούν δυνατή τη μελέτη των μηχανισμών τοξικότητας. Σε μονο-ξενικές καλλιέργειες, στις οποίες συνυπάρχουν μόνο ο μύκητας με το φυτό, μπορεί να μελετηθεί η τοξικότητα των γεωργικών φαρμάκων στη συμβιωτική φάση (Karpouzas et al., 2022). Συστήματα δύο διαμερισμάτων, με το ένα να περιέχει τη ρίζα του φυτού και το άλλο τις υφές των AMF, έχουν χρησιμοποιηθεί για την εκτίμηση της τοξικότητας κατά την εκβλάστηση των σπόρων, τον αποικισμό της ρίζας, την ανάπτυξη και την αρχιτεκτονική του μυκηλίου εκτός της ρίζας και την παραγωγή σπόρων. (Zocco et al., 2008). Τέλος, σε αυτότροφα συστήματα τριών διαμερισμάτων (Boulois et al., 2006) είναι δυνατή η εκτίμηση της τοξικότητας στην ικανότητα του μύκητα να αποικίζει τις ρίζες και παράλληλα η μέτρηση της πρόσληψης φωσφόρου, χωρίς βιοτικούς και αβιοτικούς παράγοντες να επηρεάζουν, καθώς ο βλαστός αναπτύσσεται σε ένα τρίτο αποστειρωμένο διαμέρισμα (Karpouzas et al., 2016). Τα *in vitro* συστήματα διευκολύνουν τον έλεγχο των περιβαλλοντικών παραγόντων και ο χειρισμός τους είναι σχετικά εύκολος. Ωστόσο, οι συνθήκες ανάπτυξης δεν είναι ρεαλιστικές και δεν χαρακτηρίζονται από την πολυπλοκότητα των φυσικών οικοσυστημάτων, καθώς εκλείπουν οι αλληλεπιδράσεις με άλλους οργανισμούς του εδάφους και οι επιδράσεις των φυσικών περιβαλλοντικών παραγόντων.

Σε επίπεδο *in planta* (ή *in situ*), γίνεται καλλιέργεια φυτών σε αποστειρωμένο υπόστρωμα, εμβολιασμός με AMF και εφαρμογή ενός εύρους συγκεντρώσεων φαρμάκου, με σκοπό τη μελέτη της επίδρασής του στην ανάπτυξη και στις αλληλεπιδράσεις φυτού-ξενιστή και AMF εντός του φυτικού κυττάρου. Ακόμη, καθιστά δυνατή τη μελέτη της ανταλλαγής θρεπτικών και των αλλαγών στη φυσιολογία της μυκόρριζας. Η σύνθεση της μικροβιακής κοινότητας είναι γνωστή και η ανάπτυξη των φυτών γίνεται σε ελεγχόμενες συνθήκες (Karpouzas et al., 2022). Το συγκεκριμένο σύστημα είναι πιο ρεαλιστικό από τα *in vitro* συστήματα, αλλά δεν αντιπροσωπεύει την πραγματική πολυπλοκότητα ενός φυσικού εδαφικού οικοσυστήματος.

Σε συστήματα *in soil* καθίσταται δυνατή η αξιολόγηση της τοξικότητας του γεωργικού φαρμάκου σε πιο ρεαλιστικές συνθήκες. Σε αυτήν την περίπτωση το έδαφος που χρησιμοποιείται δεν είναι αποστειρωμένο και τα φυτά καλλιεργούνται υπό ελεγχόμενες συνθήκες (Karpouzas et al., 2014, 2022). Μέσω αυτού του συστήματος μελετάται η

συμπεριφορά των AMF, λαμβάνοντας υπόψιν τις αλληλεπιδράσεις του με άλλους οργανισμούς του εδάφους και η ευρύτερη δυναμική του οικοσυστήματος.

Σε συστήματα *at field* τα φυτά καλλιεργούνται απευθείας στο έδαφος και εκτίθενται σε πραγματικές περιβαλλοντικές συνθήκες και συγκεντρώσεις του γεωργικού φαρμάκου (Karpouzas et al., 2016). Το σύστημα αυτό παρέχει μία συνολική εικόνα του ρόλου και των αλληλεπιδράσεων των AMF εντός πολύπλοκων οικοσυστημάτων.

Κατά την αξιολόγηση της τοξικότητας ενός γεωργικού φαρμάκου στις συμβιωτικές σχέσης φυτού-ξενιστή με AMF, είναι πολύ σημαντικό να πραγματοποιούνται οι κατάλληλες προσεγγίσεις που θα μπορούν να διαχωρίσουν εάν τα γεωργικά φάρμακα εμφανίζουν τοξικότητα απευθείας έναντι των AMF ή εάν εμφανίζουν φυτοτοξικότητα και, έτσι, επηρεάζουν έμμεσα τον μύκητα. Ακόμη, χρειάζεται προσοχή το στάδιο στο οποίο βρίσκεται η συμβίωση, καθώς όσο οι AMF εντοπίζονται εκτός των φυτικών κυττάρων είναι πιο ευάλωτοι στα γεωργικά φάρμακα, συγκριτικά με το στάδιο κατά το οποίο έχει γίνει η εισαγωγή τους στο φυτικό κύτταρο. (Karpouzas et al., 2022)

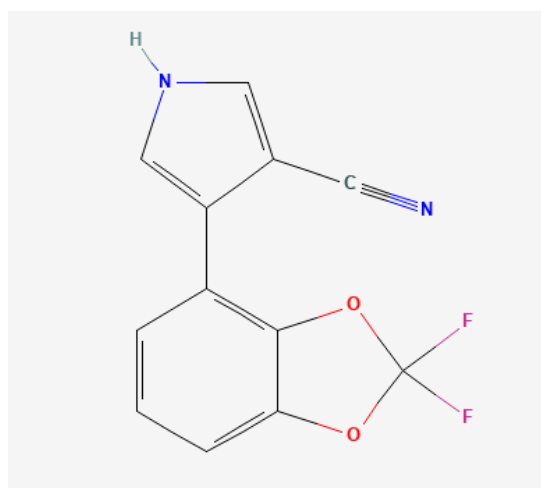
Παρόλο που έχουν γίνει επιμέρους μελέτες της τοξικότητας γεωργικών φαρμάκων στα συγκεκριμένα διαφορετικά επίπεδα, δεν υπάρχει ακόμη ένα ολοκληρωμένο πλάνο με ειδικές κατευθυντήριες οδηγίες για την εκτίμηση της τοξικότητας των γεωργικών φαρμάκων και την προστασία του εδαφικού μικροβιώματος. Σε μια τέτοια προσπάθεια, θα ήταν χρήσιμος ο συνδυασμός των μεθόδων που υπάρχουν έως τώρα, ώστε η εκτίμηση να γίνεται συνολικά, σε διάφορες βαθμίδες, αυξανόμενης πολυπλοκότητας, αξιοποιώντας μικροοργανισμούς-δείκτες, όπως οι AMF.

Γενικότερα, η αξία των μικροοργανισμών του εδάφους στη σωστή λειτουργία των οικοσυστημάτων είναι αδιαμφισβήτητη, όπως και οι αρνητικές επιπτώσεις των γεωργικών φαρμάκων σε αυτούς τους μικροοργανισμούς. Οι δομές που αναπτύσσουν οι AMF όταν συμβιώνουν με κάποιο φυτό-ξενιστή, μπορεί να εκτίθενται σε ενεργές ουσίες που περιέχουν τα γεωργικά φάρμακα, όταν αυτά εφαρμόζονται είτε στους σπόρους του φυτού, είτε στο έδαφος, είτε στα φύλλα και καταλήγουν στο έδαφος. Για να είναι δυνατός ο συνδυασμός των θετικών επιδράσεων της συμβιωτικής σχέσης του φυτού με τους AMF, με την εφαρμογή φυτοπροστατευτικών προϊόντων, είναι απαραίτητη η μελέτη των παράπλευρων επιπτώσεων των φαρμάκων στους AMF. Επομένως, είναι επιθυμητή η ταυτοποίηση των βλαβερών ουσιών και η εκτίμηση της

τοξικότητάς τους στον κύκλο ζωής των AMF, κατά την καλλιέργεια ενός φυτού και την ανάπτυξη συμβιωτικών σχέσεων. (Hage-Ahmed et al., 2019)

1.3.1. Fludioxonil

Μια κατηγορία γεωργικών φαρμάκων αποτελούν τα μυκητοκτόνα, τα οποία χρησιμοποιούνται για την καταπολέμηση των μυκήτων που μπορεί να βλάψουν το φυτό και να μειώσουν την παραγωγή, την ποιότητα και τη διάρκεια ζωής των γεωργικών προϊόντων (Brandhorst & Klein, 2019). Ένα ευρέως χρησιμοποιούμενο μυκητοκτόνο είναι το fludioxonil (Εικόνα 5), το οποίο σχεδιάστηκε βάσει της χημικής δομής του αντιμυκητιακού αντιβιοτικού pyrrolnitrin, που απομονώθηκε από το *Pseudomonas pyrrocinia*. (Lawry et al., 2017)



Εικόνα 5. Χημική δομή του fludioxonil (4-(2,2-Difluoro-1,3-benzodioxol-4-yl)-1H-pyrrole-3-carbonitrile) (PubChem, n.d.)

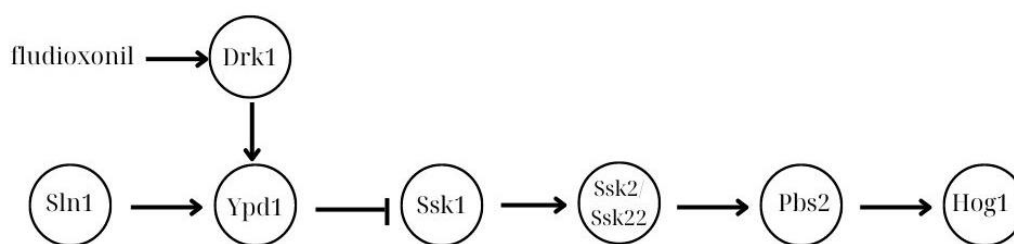
Ο αρχικός μηχανισμός δράσης που προτάθηκε για το pyrrolnitrin ήταν η αναστολή του συμπλόκου I της μιτοχονδριακής αλυσίδας μεταφοράς ηλεκτρονίων, που επιδρά στη διαδικασία της αναπνοής. Η αναστολή αυτού του συμπλόκου οδηγεί στην παραγωγή δραστικών μορφών οξυγόνου (ROS) και συγκεκριμένα υπεροξειδίου. Ωστόσο αυτή η θεωρία ήταν βασισμένη σε μελέτες που έγιναν σε κύτταρα θηλαστικών και σε απομονωμένα μιτοχόνδρια. (Brandhorst & Klein, 2019)

Έπειτα, από το pyrrolnitrin κατασκευάστηκε το fludioxonil με σκοπό να διατηρηθεί ο μηχανισμός δράσης αλλά και να μειωθεί η ταχύτητα διάσπασης στο περιβάλλον μετά την εφαρμογή του. Οι αντιμυκητιακές επιδράσεις του διατηρήθηκαν (Brandhorst & Klein, 2019).

Ο μηχανισμός της αντιμυκητιακής δράσης που προτάθηκε για το fludioxonil ήταν η αναστολή των τάξης III υβριδικών κινάσεων ιστιδίνης (class III hybrid histidine kinases ή HHK), οι οποίες είναι συντηρημένες στους μύκητες και δεν εντοπίζονται σε φυτά και ζώα. Αυτές οι κινάσες ρυθμίζουν το μονοπάτι απόκρισης στην υψηλή οσμωτικότητα (high-osmolarity glycerol ή HOG) και επικρατούσε η θεωρία ότι αποκρίνονται στο fludioxonil διεγείροντας την υπερπαραγωγή γλυκερόλης, η οποία προκαλούσε τη διόγκωση και συνεπώς τη διάσπαση των κυττάρων. Αυτή η θεωρία ενισχύονταν από το γεγονός ότι σε περιπτώσεις ανθεκτικότητας στο fludioxonil, υπό εργαστηριακές συνθήκες, εντοπίζονταν συνήθως κάποια μετάλλαξη στο συγκεκριμένο μονοπάτι. Επιπλέον, οι HHKs της τάξης III ήταν απαραίτητες για την εμφάνιση ευαισθησίας στο fludioxonil, ενώ παράλληλα οι ενεργές μορφές τους σχετίζονταν με την ανθεκτικότητα στο φάρμακο. Ωστόσο αυτή η θεωρία στην πορεία απορρίφθηκε. (Brandhorst & Klein, 2019).

Τελικά, από το 2016 και έπειτα, επικράτησε η άποψη ότι το fludioxonil ενεργοποιεί το μονοπάτι HOG, αναστέλλοντας την ενεργότητα κάποιας HHK και προωθώντας έτσι τη μετατροπή της σε φωσφατάση. Πιο συγκεκριμένα, σε φυσιολογική κατάσταση, η κινάση Sln1 αυτοφωσφορυλιώνεται και έπειτα φωσφορυλιώνει την Ypd1, η οποία παράλληλα φωσφορυλιώνεται και από την Drk1. Έτσι, η φωσφορυλιωμένη Ypd1 μεταφέρει μία φωσφορική ομάδα στην Ssk1, εμποδίζοντας με αυτόν τον τρόπο την αλληλεπίδραση της Ssk1 με τους Ssk2 και Ssk22. Ως αποτέλεσμα το μονοπάτι δε συνεχίζεται και ο Hog1 παραμένει μη φωσφορυλιωμένος. Σε συνθήκες στρες, ο Sln1 δεν αυτοφωσφορυλιώνεται και συνεπώς το μονοπάτι ενεργοποιείται, ο Hog1 φωσφορυλιώνεται, μεταφέρεται στον πυρήνα του κυττάρου, ενεργοποιώντας μεταγραφικούς παράγοντες και γονίδια. Κάποια από αυτά ρυθμίζουν την παραγωγή γλυκερόλης, η οποία σχετίζεται με τον έλεγχο του οσμωτικού στρες (Σχήμα 1). (Lawry et al., 2017)

Η μελέτη των Lawry et al, απέδειξε ότι η Drk1 επάγει την αποφωσφορυλίωση της Ypd1 ως απόκριση στο fludioxonil *in vivo*. Όπως φαίνεται το fludioxonil αλλάζει τη λειτουργία της Drk1, μετατρέποντάς την από κινάση σε φωσφατάση. Ωστόσο, υποστηρίζουν ακόμη ότι είναι πιθανό η Drk1 να δεσμεύεται εν μέρει στην Ypd1, αποτρέποντας την αλληλεπίδρασή της με την Sln1 και, συνεπώς, τη φωσφορυλίωσή της. (Lawry et al., 2017)



Σχήμα 1. Μηχανισμός δράσης του γεωργικού φαρμάκου fludioxonil

Προς το παρόν δεν υπάρχουν αρκετές μελέτες που να εξηγούν τον ακριβή μηχανισμό με τον οποίο το fludioxonil μπορεί να δρα έναντι οργανισμών μη-στόχων, όπως είναι οι AMF. Ωστόσο, υπάρχουν κάποιες μελέτες στις οποίες γίνεται μια προσπάθεια εκτίμησης της τοξικότητας του fludioxonil, μεταξύ άλλων γεωργικών φαρμάκων, χρησιμοποιώντας ως δείκτη τους AMF. Πιο συγκεκριμένα, στην έρευνα των Hilbig & Allen, φαίνεται ότι σε καλλιέργειες φυτών *Layia platyglossa* και *Lasthenia californica* όπου εφαρμόστηκε το fludioxonil, το ποσοστό αποικισμού των AMF είναι αυξημένο συγκριτικά με το ποσοστό των μη μυκορριζικών μυκήτων, ενώ παράλληλα το φάρμακο είναι αποτελεσματικό έναντι παθογόνων. Είναι πιθανό ότι καθώς οι παθογόνοι μικροοργανισμοί μειώνονται, μειώνεται και ο ανταγωνισμός που αντιμετωπίζουν οι AMF ως προς την δυνατότητα αποικισμού (Hilbig & Allen, 2019)

1.3.2. Εκτίμηση τοξικότητας Fludioxonil στους AMF

Το είδος που επιλέχθηκε για την εκπόνηση των πειραμάτων στην παρούσα πτυχιακή εργασία είναι το *Rhizophagus irregularis*. Το συγκεκριμένο είδος AMF είναι ένα από τα πιο καλά μελετημένα είδη AMF και φαίνεται να αναπτύσσει συμβιωτικές σχέσεις με διάφορα είδη φυτών. Ο εμβολιασμός του εδάφους με τον *R. irregularis* βελτιώνει την ανάπτυξη του φυτού, την παραγωγή και την ποιότητα των προϊόντων και εμφανίζει ανθεκτικότητα σε αβιοτικές καταπονήσεις. (Wendering & Nikoloski, 2022)

Το φυτό που επιλέχθηκε είναι το *Lotus japonicus*, ένα ποώδες όσπριο της οικογένειας *Fabaceae*. Φυσιολογικά αναπτύσσεται στην κεντρική και ανατολική Ασία και είναι πιο σύνηθες στην Ιαπωνία, στην Κορέα και στην Κίνα. Το *L. japonicus* εμφανίζει πολλά χαρακτηριστικά που το καθιστούν οργανισμό-μοντέλο. Έχει μικρό μέγεθος γονιδιώματος (450Mbp), πλήρως αλληλουχημένο και με υψηλή ομοιότητα με άλλα όσπρια, είναι διπλοειδές, αυτογονιμοποιείται και έχει μικρό χρόνο παραγωγής (3-4 μήνες). (Ranner et al., 2023)

Για την επεξεργασία των δειγμάτων γίνεται φαινοτυπική και μοριακή ανάλυση. Η φαινοτυπική ανάλυση περιλαμβάνει τη μέτρηση της ξηρής μάζας του βλαστού, την μικροσκοπική παρατήρηση, τη μέτρηση των ποσοστών αποικισμού και τον υπολογισμό του EC₅₀. Η μοριακή ανάλυση περιλαμβάνει τη μελέτη της έκφρασης γονιδίων του φυτού, τα οποία γνωρίζουμε ότι εκφράζονται κατά τον σχηματισμό συμβίωσης με AMF. Τα γονίδια που επιλέχθηκαν είναι το LjSbtM1, το LjPT4 και το LjAMT2;2.

Για την εκτίμηση της διαφορικής έκφρασης των παραπάνω γονιδίων, ως γονίδια κανονικοποίησης χρησιμοποιήθηκαν τα ενδογενή γονίδια της ATP συνθάσης (LjATPs) και της πρωτεϊνικής φωσφατάσης 2A (LjPP2a) του *L.japonicus*. Τα ενδογενή γονίδια είναι γονίδια που εκφράζονται σε όλους τους κυτταρικούς τύπους. Η ATPs εντοπίζεται στην εσωτερική μεμβράνη των μιτοχονδρίων και στη θυλακοειδή μεμβράνη των χλωροπλαστών. Ρόλος της είναι η σύνθεση του ATP (Neupane et al., 2019). Οι πρωτεϊνικές φωσφατάσες είναι υπεύθυνες για την αποφωσφορλίωση πρωτεϊνών, μια διαδικασία που λειτουργεί ρυθμιστικά για τη φυτική ανοσία. Η PP2a ανήκει στην οικογένεια των φωσφοπρωτεϊνικών φωσφατασών (PPP) και ο ρόλος της στα φυτά είναι η ρύθμιση της σηματοδότησης σε κατάσταση βιοτικού στρες. (Lubbers & Mohler, 2016)

1.4. Σκοπός

Η παρούσα πτυχιακή εργασία εκπονείται στο πλαίσιο μιας προσπάθειας δημιουργίας ενός ολοκληρωμένου και τυποποιημένου πλάνου αξιολόγησης της τοξικότητας γεωργικών φαρμάκων, χρησιμοποιώντας ως δείκτη τους AMF. Το φάρμακο που μελετήθηκε στη συγκεκριμένη έρευνα είναι το fludioxonil, ένα ευρέως χρησιμοποιούμενο μυκητοκτόνο, η εφαρμογή του οποίου αποσκοπεί στην βελτίωση της καλλιέργειας και την αύξηση της παραγωγής. Στο πειραματικό μέρος χρησιμοποιείται η μέθοδος AMF-sandwich (*in situ*) και αποτελεί συνέχεια των *in vitro* πειραματικών δοκιμασιών. Το σύστημα διατηρείται σε στείρες συνθήκες, ώστε να αποφευχθεί η ανάπτυξη άλλων μικροοργανισμών, εκτός από τους AMF και το φυτό ξενιστή που εξετάζουμε (gnotobiotic). Το συγκεκριμένο σύστημα έχει χρησιμοποιηθεί με επιτυχία για την αξιολόγηση της τοξικής δράσης ανθελμινθικών φαρμάκων (Gkimprizi et al., 2023).

2. Υλικά και μέθοδοι

2.1 Πειραματική διαδικασία

Για την μελέτη της επίδρασης του μυκητοκτόνου fludioxonil στον μύκητα *R. irregularis* με ξενιστή το φυτό μοντέλο *L. japonicus* χρησιμοποιήθηκε το σύστημα AMF-sandwich. Στο παρόν σύστημα 3-4 φυτάρια ηλικίας 10 ημερών, εμβολιάζονται με τον μύκητα και εσωκλείονται με δύο μεμβράνες νιτροκυτταρίνης δημιουργώντας μια δομή “sandwich”. Το “sandwich” φυτού μύκητα, φυτεύεται σε αποστειρωμένο αδρανές υλικό (άμμος) μέσα σε αποστειρωμένα δοχεία magenta. Σαν θρεπτικό υλικό χρησιμοποιήθηκε διάλυμα SLA (Long Ashton solution), το οποίο ήταν παρουσία ή απουσία διαφορετικών συγκεντρώσεων του γεωργικού φαρμάκου fludioxonil. Χρησιμοποιήθηκαν πέντε διαφορετικές συγκεντρώσεις του fludioxonil. Για κάθε συγκέντρωση πραγματοποιήθηκαν 5 βιολογικές επαναλήψεις. Το σύστημα τοποθετήθηκε σε θάλαμο ανάπτυξης φυτών για 4 ή 5 βδομάδες αντίστοιχα.

Το πρώτο μέρος της πειραματικής διαδικασίας αφορούσε της εκτίμησης της επίπτωσης του fludioxonil στο επίπεδο του αποικισμού. Τα φυτά αναπτύχθηκαν για πέντε εβδομάδες. Κατά την συλλογή, έγινε διαχωρισμός των ριζών από το υπέργειο τμήμα. Το υπέργειο τμήμα αποξηράθηκε και ζυγίστηκε ώστε να γίνει σύγκριση της βιομάζας των φυτών μεταξύ των διάφορων μεταχειρίσεων και να αξιολογηθεί η ενδεχόμενη φυτοτοξικότητα του γεωργικού φαρμάκου. Οι ρίζες υποβλήθηκαν σε χρώση για τον υπολογισμό των ποσοστών αποικισμού. Από τα αποτελέσματα του πρώτου πειράματος πραγματοποιήθηκε επανάληψη της ίδιας πειραματική διαδικασίας, χρησιμοποιώντας τις συγκεντρώσεις του fludioxonil στις οποίες δεν παρατηρήθηκε σοβαρή επίπτωση στα ποσοστά αποικισμού καθώς και μία συγκέντρωση κατά την οποία παρατηρείται (αν υπάρχει) ραγδαία μείωση του αποικισμού.

Κατά το δεύτερο πειραματικό μέρος τα φυτά αναπτύχθηκαν για 4 βδομάδες και σε αυτά έγινε εκτίμηση της επίδρασης του fludioxonil στην έκφραση λειτουργικών γονιδίων του ξενιστή, ειδικά επαγόμενων κατά την φάση της συμβίωσης.

2.2. Βιολογικό υλικό και συνθήκες ανάπτυξης

2.2.1. Απολύμανση και εκβλάστηση σπόρων

Χρησιμοποιήθηκαν φυτά αγρίου τύπου *Lotus japonicus*, οικότυπος Gifu. Αρχικά, για την αποστείρωση των σπόρων, σε απαγωγό (Fume Hood cupboard, FHC), έγινε επώαση των σπόρων σε πυκνό θειικό οξύ (H_2SO_4), σε ποσότητα κατάλληλη ώστε να εμβαπτιστούν οι σπόροι και τοποθέτηση σε ανακινητήρα για 30 λεπτά. Ακολούθησε αφαίρεση του οξέος και 5 πλύσεις με αποστειρωμένο dH_2O . Στη συνέχεια, έγινε επώαση με 20% διαλύματος χλωρίνης για 10 λεπτά και σε θάλαμο νηματικής ροής (ΘNP) ακολούθησε αφαίρεση της χλωρίνης και 6 πλύσεις με αποστειρωμένο dH_2O . Έπειτα, οι σπόροι διατηρήθηκαν στους $4^{\circ}C$, καθ' όλη τη διάρκεια της νύχτας. Την επόμενη ημέρα, στον ΘNP έγινε αφαίρεση του dH_2O και τοποθέτηση των σπόρων σε τρυβλία Petri, πάνω σε αποστειρωμένα διηθητικά χαρτιά (7X7cm), στα οποία προστέθηκαν 3-4ml dH_2O . Οι σπόροι τοποθετήθηκαν με διάταξη κατάλληλη ώστε να μην έρχονται σε επαφή μεταξύ τους και να έχουν αρκετό χώρο να εκβλαστήσουν. Τα τρυβλία κλείστηκαν με parafilm και τοποθετήθηκαν στον θάλαμο ανάπτυξης φυτών με φωτοπερίοδο 16 ώρες φως – 8 ώρες σκοτάδι, στους $25^{\circ}C$, για 10 ημέρες, σε κάθετη θέση, ώστε το διηθητικό χαρτί να έρχεται σε επαφή με το dH_2O και να παραμένει υγρό.

2.2.2. Προετοιμασία του γεωργικού φαρμάκου

Στη συγκεκριμένη μελέτη έγινε εκτίμηση της τοξικότητας του μυκητοκτόνου fludioxonil, με εμπορική ονομασία “Scholar 230SC 23%”, από την εταιρία Syngenta. Για την εφαρμογή των παρακάτω συγκεντρώσεων στα συστήματα AMF-sandwich, αρχικά απαιτείται η δημιουργία ενός πιο αραιού διαλύματος από αυτό του σκευάσματος. Σε αποστειρωμένο διπλά απιονισμένο ύδωρ (ddH_2O), έγινε διάλυση όγκου του σκευάσματος “Scholar 230SC 23%”, ακολούθησε επώαση σε υδατόλουτρο υπερήχων (sonication) για 30 λεπτά. Η συγκέντρωση του διαλύματος το οποίο χρησιμοποιήθηκε για την εφαρμογή στα AMF-sandwich μετρήθηκε μέσω χρωματογραφίας υψηλής πίεσης (UHPLC) σε φάση 70MeOH/30ddH₂O και ήταν **1307 mg/L**. Χρησιμοποιήθηκε και ένα διάλυμα συγκέντρωσης **36,4 mg/L** για να επιτευχθεί η δημιουργία των μικρότερων συγκεντρώσεων.

Οι συγκεντρώσεις εφαρμογής του φαρμάκου στο υδατικό θρεπτικό μέσο SLA παρατίθενται στον Πίνακα 1.

Fludioxonil (mg/L)	0.004	0.039	0.39	3.9	39.0
--------------------	-------	-------	------	-----	------

	0.01x	0.1x	1x	10x	100x
--	-------	------	----	-----	------

Πίνακας 1. Συγκεντρώσεις fludioxonil στο υδατικό διάλυμα SLA.

2.2.3. Προετοιμασία SLA (Long Ashton solution)

Για την προετοιμασία του θρεπτικού SLA χρησιμοποιήθηκαν οι συγκεντρώσεις των αποστειρωμένων θρεπτικών, όπως φαίνονται στον Πίνακα 2. Η παρασκευή των διαλυμάτων SLA έγινε σε δοχεία duran 1L με αποστειρωμένο dH₂O.

MgSO ₄	0.75mM
NaNO ₃	1mM
K ₂ SO ₄	1mM
CaCl ₂	2mM
Na ₂ HPO ₄	3.2μM
FeNa-EDTA	25μM
MnSO ₄	5μM
CuSO ₄	0.25μM
H ₃ BO ₃	25μM
Na ₂ MoO ₄	0.1μM
ZnSO ₄	0.5μM

Πίνακας 2. Συγκεντρώσεις θρεπτικών για SLA

2.2.4. Προετοιμασία αδρανούς υποστρώματος φύτευσης

Σαν αδρανές υπόστρωμα φύτευσης χρησιμοποιήθηκε χοντρόκοκκη άμμος. Για την αποστείρωση αλλά και την πλήρη ξήρανση του υποστρώματος, η άμμος ψήθηκε σε φούρνο ξήρανσης στους 180°C για 24 ώρες.

2.2.5. Προετοιμασία τρυβλίων άγαρ

Για την ενυδάτωση των μεμβρανών νιτροκυτταρίνης κατά τη μέθοδο AMF-sandwich χρησιμοποιήθηκε gel water agar συγκέντρωσης 1%, το οποίο αποστειρώθηκε και στερεοποιήθηκε σε τετράγωνα τρυβλία petri.

2.2.6. Προετοιμασία διαλύματος μύκητα

Από διάλυμα μύκητα *R. irregularis* στέλεχος DAOM με συγκέντρωση 2000 σπόρια/ml μεταφέρθηκε 1ml σε φιαλίδιο Eppendorf (2ml) και ακολούθησε φυγοκέντρωση στις 3000 στροφές για 1 λεπτό. Αφαιρέθηκε το υπερκείμενο και προστέθηκαν 2ml αποστειρωμένο dH₂O στο φιαλίδιο Eppendorf, οπότε το τελικό διάλυμα μύκητα είχε συγκέντρωση 1000 σπόρια/ml.

2.2.7. Υλικά για μέθοδο sandwich

Τα υλικά που χρησιμοποιήθηκαν κατά τη διεξαγωγή της μεθόδου AMF-sandwich είναι τα εξής:

- Αποστειρωμένα magenta
- Αποστειρωμένος ογκομετρικός κύλινδρος (100ml)
- Αποστειρωμένα δοχεία Duran (1L)
- Αποστειρωμένα κουτάλια
- Ζυγαριά

2.2.8. Μέθοδος sandwich

Η διαδικασία πραγματοποιήθηκε σε θάλαμο νηματικής ροής και είχε ως εξής:

- Προσθήκη 360g χοντλής άμμου σε αποστειρωμένα magenta μέχρι τα 2/3 του magenta
- Προσθήκη 60ml θρεπτικού SLA, με διαβάθμιση συγκέντρωσης ή απουσία γεωργικού φαρμάκου.
- Ανάδευση της άμμου με το διάλυμα θρεπτικού SLA και σχηματισμός μιας διαγώνιας σχισμής στην άμμο ώστε να σχηματιστεί ο χώρος που τοποθετείται το sandwich
- Ενυδάτωση των μεμβρανών νιτροκυτταρίνης σε τρυβλίο με 1% water agar σε dH₂O
- Τοποθέτηση 3-4 φυτών σε μια ενυδατωμένη μεμβράνη με τέτοιο τρόπο ώστε οι ρίζες να ακουμπάνε καλά στη μεμβράνη και ο βλαστός να μένει έξω από αυτή
- Εμβολιασμός με 300μl μύκητα από το διάλυμα σπόρων συγκέντρωσης 1000 σπόροι/ml. Τελική συγκέντρωση 100σπόροι AMF / φυτάριο.
- Τοποθέτηση δεύτερης μεμβράνης δημιουργώντας ένα σύστημα sandwich.
- Τοποθέτηση του sandwich στην άμμο με τέτοιο τρόπο ώστε να καλύπτονται πλήρως οι μεμβράνες από την άμμο
- Κλείσιμο με αντάπτορα και καπάκι
- Τοποθέτηση σε θάλαμο ανάπτυξης με φωτοπερίοδο 16 ώρες φως / 8 ώρες σκοτάδι, στους 25°C για 4 ή 5 βδομάδες αντίστοιχα.



Εικόνα 6. Σύστημα ανάπτυξης φυτών *L. japonicus* με τη μέθοδο AMF-sandwich

2.3. Συγκομιδή φυτών-χρώση ριζών:

Μετά το πέρας πέντε εβδομάδων έγινε η συγκομιδή των φυτών, ακολούθησε ο καθαρισμός των ριζών από την άμμο, η φωτογράφιση των φυταρίων, η συλλογή των υπέργειων τμημάτων προς ξήρανση και η χρώση των ριζών για την εκτίμηση του αποικισμού (κύστες, εσωτερικές υφές, δενδροειδείς δομές) στο οπτικό μικροσκόπιο. (Tsikou et al., 2023; Vierheilig et al., 1998)

2.3.1. Χρώση

- Συλλογή φυτών από κάθε βιολογική επανάληψη σε δοχεία 50ml (falcons) με dH₂O ώστε να ενυδατώνονται οι ρίζες
- Διαχωρισμός των ριζών από τα υπέργεια μέρη και τοποθέτησή τους στα falcons με dH₂O.
- Αφαίρεση νερού και επώαση σε 10% καυστικό κάλιο (KOH), στους 85°C, σε υδατόλουτρο για 30min
- Αφαίρεση KOH
- Στον απαγωγό: προσθήκη 10% οξικού οξέος
- Αφαίρεση του οξικού οξέος και 2 πλύσεις με dH₂O
- Επώαση σε διάλυμα με 5% μελάνι, διαλυμένο σε 5% οξικό οξύ, για 30min στους 85°C
- Αφαίρεση διαλύματος μελάνης
- 2 διαδοχικές πλύσεις με dH₂O
- Επώαση σε οξικό οξύ 5% για 30min σε RT
- Αφαίρεση οξικού οξέος, προσθήκη dH₂O και διατήρηση στους 4°C για όλη τη νύχτα

2.3.2. Μονιμοποίηση

Την επόμενη μέρα δείγματα ρίζας από κάθε βιολογική επανάληψη τοποθετήθηκαν σε αντικειμενοφόρους πλάκες επικαλυμμένες με κόλλα. Κάθε πλάκα αντιστοιχούσε σε μία βιολογική επανάληψη και περιείχε 15 κομμάτια ρίζας μήκους περίπου 1,5cm. Τα δείγματα καλύφθηκαν με καλυπτρίδες και φυλάχθηκαν σε θερμοκρασία δωματίου.

2.4. Φαινοτυπική ανάλυση

2.4.1. Έλεγχος για φυτοτοξική επίδραση του γεωργικού φαρμάκου.

Τα υπέργεια τμήματα του φυτού χρησιμοποιήθηκαν για μέτρηση του ξηρού βάρους τους, αφού πρώτα έγινε ξήρανση των δειγμάτων στους 60°C για 2 ημέρες. Με τη μέτρηση του ξηρού βάρους μελετάται αν το φάρμακο εμφανίζει φυτοτοξικότητα. Σε περίπτωση που τα φυτάρια, τα οποία αναπτύχθηκαν απουσία φαρμάκου, εμφανίζουν σημαντικά αυξημένο ξηρό βάρος συγκριτικά με τα φυτάρια που αναπτύχθηκαν παρουσία φαρμάκου, τότε είναι πιθανό ότι το φάρμακο επιδρά με τοξικό τρόπο στο φυτό. Σε περίπτωση φυτοτοξικότητας είναι αδύνατον να προκύψουν ασφαλή συμπεράσματα για την επίδραση του γεωργικού φαρμάκου έναντι των AMF.

2.4.2. Μικροσκοπική παρατήρηση

Το ποσοστό (%) αποικισμού υπολογίστηκε με εξέταση τουλάχιστον 100 οπτικών πεδίων ανά αντικειμενοφόρο πλάκα. Λόγω της μελέτης της επίπτωσης των γεωργικών φαρμάκων στην λειτουργικότητα των AMF, για τον υπολογισμό του αποικισμού μετρήθηκε μόνο η παρουσία ή απουσία των δενδροειδών σχηματισμών (Vierheilig et al., 1998).

2.4.3. Υπολογισμός EC₅₀

Για τον αποικισμό των ριζών από τον μύκητα υπολογίστηκε και η τιμή EC₅₀, η οποία είναι ένας τοξικολογικός δείκτης που περιγράφει την τιμή της συγκέντρωσης του φαρμάκου που απαιτείται προκειμένου το ποσοστό αποικισμού των φυτών από τον μύκητα να μειωθεί στο μισό. Οι αναλύσεις έγιναν με τη χρήση του πακέτου καμπυλών δόσης απόκρισης (drc package, dose response curve) με γλώσσα προγραμματισμού R 4.3.0. (Papadopoulou et al., 2020; Ritz et al., 2015).

2.5. Μελέτη της επίδρασης του fludioxonil στο επίπεδο της γονιδιακής έκφρασης

Από τη μικροσκοπική παρατήρηση του πρώτου πειράματος, επιλέχθηκαν οι συγκεντρώσεις του fludioxonil στις οποίες δεν φαίνεται να υπάρχουν σημαντικές διαφορές στον αποικισμό των φυτών από τους AMF συγκριτικά με τον μάρτυρα, προκειμένου να μελετηθεί αν παρουσία του γεωργικού φαρμάκου σε αυτές τις συγκεντρώσεις, υπάρχει επίδραση στην λειτουργικότητα της συμβίωσης. Επιπλέον, επιλέχθηκε και μία συγκέντρωση με εμφανώς μειωμένο αποικισμό ούτως ώστε να γίνει έλεγχος της πιστότητας της μικροσκοπικής παρατήρησης, όπως επίσης και αν σε καταστάσεις μειωμένου αποικισμού μειώνεται αντίστοιχα και η έκφραση των παραπάνω ειδικών γονιδίων. Η εκτίμηση της λειτουργικότητας πραγματοποιήθηκε μέσω του υπολογισμού των επιπέδων έκφρασης λειτουργικών γονιδίων του φυτού που επάγονται αποκλειστικά κατά την φάση της συμβίωσης.

Για τον σκοπό αυτό, διεξήχθη το δεύτερο πείραμα κατά το οποίο έγινε προετοιμασία και εκβλάστηση σπόρων όμοια με το πρώτο πείραμα. Η προετοιμασία του γεωργικού φαρμάκου και η παραγωγή του θρεπτικού SLA και του διαλύματος μύκητα ήταν επίσης όμοιες. Οι χειρισμοί ήταν οι ίδιοι αλλά μόνο για τις συγκεντρώσεις που επιλέχθηκαν από τη μικροσκοπική παρατήρηση (control, 0.01x, 0.1x, 1x και 10x). Στη μέθοδο sandwich ακολουθήθηκαν τα ίδια βήματα με τη διαφορά ότι χρησιμοποιήθηκαν μικρότερα magenta και ότι προστέθηκαν 300g άμμου με 50ml SLA. Τα φυτά τοποθετήθηκαν σε θάλαμο ανάπτυξης, στις ίδιες συνθήκες. Η συγκομιδή αυτή τη φορά έγινε στις 4 εβδομάδες και οι ρίζες πάγωσαν σε υγρό άζωτο και αποθηκεύτηκαν στους -80°C.

2.5.1 Απομόνωση ριβονουκλεϊκού οξέος (RNA) (Trizol / chloroform)

Παρασκευή Lysis Buffer (Πίνακας 3) και διαλύματος LoTE (Πίνακας 4.)

Tris-HCl (pH 7.5)	100mM
LiCl	500mM
LiDs	1%
EDTA (pH=8)	10mM
DTT	5mM
ddH ₂ O	

Πίνακας 3. Συγκεντρώσεις διαλύματος Lysis Buffer

Tris-HCl (pH 7.5)	3mM
EDTA (pH=7.5)	0.2mM
ddH ₂ O	

Πίνακας 4. Συγκεντρώσεις διαλύματος LoTE

Ημέρα 1^η

1. Δείγματα αποθηκευμένα στους -80°C τοποθετούνται σε υγρό άζωτο.
2. Ομογενοποίηση του ιστού με μηχανική πίεση με τη χρήση αποστειρωμένου εμβόλου (λειοτρίβηση), μέσα στο υγρό άζωτο.
3. Προσθήκη ≈80g από το δείγμα σε μορφή σκόνης σε 450μl lysis buffer, ανάδευση σε vortex και έπειτα στον πάγο.
4. Φυγοκέντρηση των δειγμάτων για 10 λεπτά, σε 13.000 rpm, στους 4°C.
 - Τα βήματα 5-11 πραγματοποιούνται σε απαγωγό.
5. Προσθήκη 500μl διαλύματος φαινόλης και ισοθειοκυανικής γουανιδίνης (TRIzol) σε Eppendorf και μεταφορά του υπερκειμένου της φυγοκέντρησης σε αυτό.
6. Ανάδευση (vortex) για 30 δευτερόλεπτα και επώαση σε θερμοκρασία δωματίου για 5 λεπτά.
7. Φυγοκέντρηση για 5 λεπτά σε 13.000rpm στους 4°C.
8. Μεταφορά του υπερκειμένου σε 125μl χλωροφόρμιο, ανάδευση για 30 δευτερόλεπτα, επώαση για 2 λεπτά σε θερμοκρασία δωματίου.
9. Φυγοκέντρηση για 10 λεπτά στις 13.000rpm στους 4°C .
10. Μεταφορά 420μl από το υπερκείμενο σε νέο Eppendorf και προσθήκη 42μ NaOAc 3M και ελαφρά ανακίνηση.
11. Προσθήκη 42μl οξικού οξέος και 1050μl κρύας αιθανόλης 100% και ήπια ανάδευση.
12. Αποθήκευση στους -20°C για όλη τη νύχτα.

Ημέρα 2^η

1. Φυγοκέντρηση των δειγμάτων για 1 ώρα στις 13.000 στροφές στους 4°C
2. Αφαίρεση του υπερκειμένου από τα δείγματα, προσθήκη 1ml κρύας αιθανόλης 80% στο ίζημα και φυγοκέντρηση για 10 λεπτά στις 13.000rpm στους 4°C
3. Αφαίρεση του υπερκειμένου, spin down και παραμονή των ανοιχτών σωληνάρων για 7 λεπτά σε θερμοκρασία δωματίου, προκειμένου να εξατμιστεί η αιθανόλη
4. Προσθήκη 11μl διαλύματος LoTE, επώαση για 2 λεπτά στους 65°C και σύντομη ανάδευση (vortex) και spin down για 10sec.

Έπειτα, για τον προσδιορισμό της συγκέντρωσης RNA που απομονώθηκε και της καθαρότητάς του, χρησιμοποιήθηκε το φασματοφωτόμετρο quawell Q5000. Ως τυφλό δείγμα χρησιμοποιήθηκε 1 μL διάλυμα LoTE. Στη συνέχεια, τοποθετήθηκε 1 μl από κάθε δείγμα στο φασματοφωτόμετρο και προσδιορίστηκε η συγκέντρωση των RNA (ng/μL) και η αναλογία απορρόφησης στα 260 nm/ 280 nm (Πίνακας 5)

Δείγματα RNA	Συγκέντρωση (ng/μL)	Λόγος 260/280
--------------	---------------------	---------------

Control (1)	214.1	1.59
Control (2)	175.5	1.58
Control (3)	156.9	1.7
Control (4)	251.9	1.60
Control (5)	160.2	1.7
Control (P)	292	1.6
0.01x (1)	267.2	1.72
0.01x (2)	361.2	1.64
0.01x (3)	313.9	1.63
0.01x (4)	432.9	1.65
0.01x (5)	141.2	1.65
0.01x (P)	108.4	1.55
0.1x (1)	266.6	1.6
0.1x (2)	128.9	1.64
0.1x (3)	171.3	1.67
0.1x (4)	80.3	1.7
0.1x (5)	213.1	1.67
0.1x (P)	79.5	1.55
1x (1)	158.9	1.54
1x (2)	100	1.52
1x (3)	106.2	1.67
1x (4)	408	1.57
1x (5)	159.1	1.75
1x (P)	322	1.8
10x (1)	101.9	1.76
10x (2)	96.9	1.69
10x(3)	103	1.92
10x (4)	152.8	1.72
10x (5)	111.1	1.77
10x (P)	105.9	1.83

Πίνακας 5. Συγκέντρωση και καθαρότητα δειγμάτων RNA.

2.5.2. Απομάκρυνση DNA από τα δείγματα RNA μέσω επεξεργασίας με ένζυμο DNase

Για την απομάκρυνση του DNA από τα δείγματα χρησιμοποιήθηκε το ένζυμο DNase A, το οποίο διασπά το ανεπιθύμητο DNA. Σε φιαλίδια PCR (0,2ml) προστέθηκαν με τη συγκεκριμένη σειρά:

- ddH₂O
- 1μl ρυθμιστικό διάλυμα (buffer) 10x κατάλληλο για τη DNase
- 0.25μl ενζύμου RNase OUT (10 units) που αναστέλλει τη δράση RNAσων.
- 600ng RNA
- 1μl DNase (1 unit)

Έπειτα, ακολούθησε:

- Επώαση για 50 λεπτά στους 37°C και spin down.
- Μεταφορά του προϊόντος της αντίδρασης σε φιαλίδια 1,5ml που περιείχανε 1μl EDTA (25mM).
- Επώαση για 10 λεπτά στους 65°C
- Spin down και αποθήκευση στους -80°C.

2.5.3. Επιβεβαίωσης της διαδικασίας πέψης του DNA

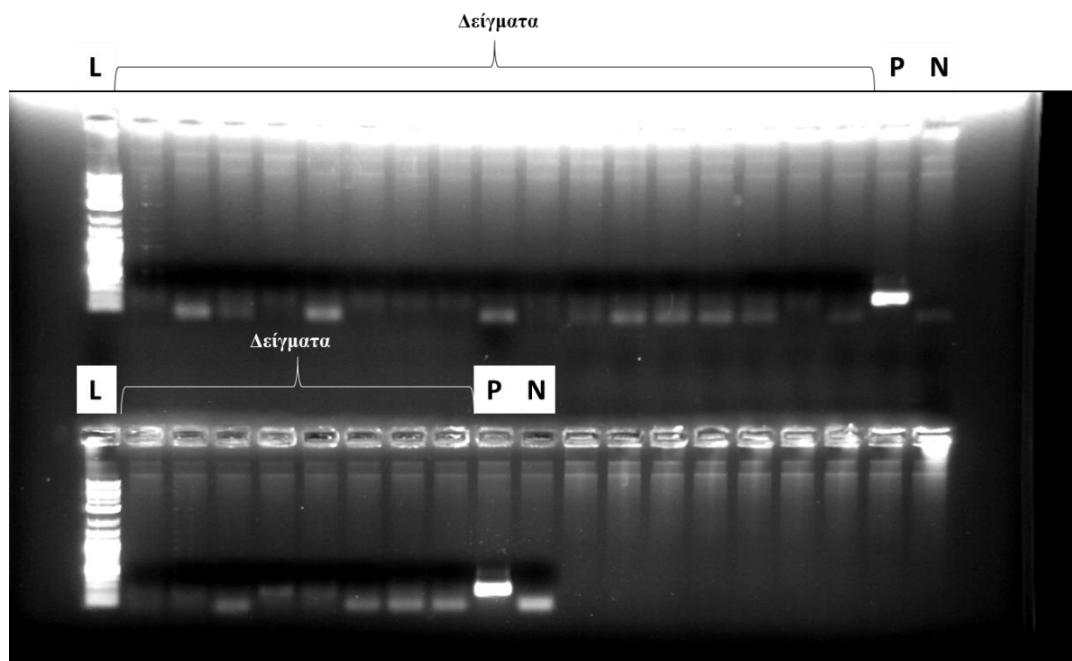
Για τον έλεγχο της δράσης της DNase σε κάθε δείγμα πραγματοποιήθηκε αντίδραση PCR (Πίνακας 6), χρησιμοποιώντας εκκινητές για το ενδογενές γονίδιο (housekeeping gene) της ουβικουτίνης (LjUbi):

- Τελικός όγκος αντίδρασης 20μl
 - 10x buffer Taq πολυμεράσης
 - 10mM dNTPs
 - 101M πρόσθιου εκκινητή (Ubi F)
 - 101M ανάστροφου εκκινητή (Ubi R)
 - 0,08μl ενζύμου Kara Taq DNA Polymerase
 - 1μl δείγματος RNA
 - ddH₂O
- Δείγματα ελέγχου:
 - Θετικός μάρτυρας: 1μl γονιδιωματικού DNA που έχει απομονωθεί από το φυτό *L. japonicus*

Στάδια	Θερμοκρασία (°C)	Χρόνος (λεπτά)	Κύκλοι
Αποδιάταξη	95	5	1
	95	30	39
Υβριδισμός	55	30	39
Επέκταση	72	10	39
	72	4	1
	4	∞	

Πίνακας 6. Συνθήκες PCR για τον έλεγχο της δράσης της DNase

Στη συνέχεια, ακολούθησε ηλεκτροφόρηση σε πήκτωμα αγαρόζης 1% σε διάλυμα TAE (Tris, οξικό οξύ, EDTA). Σε δείγματα που εμφάνισαν υπολείμματα DNA, η διαδικασία απομάκρυνσης DNA επαναλήφθηκε. (Εικόνα 7.)



Εικόνα 7. Ηλεκτροφόρηση των προϊόντων της PCR μετά από χειρισμό με DNase, σε πηκτή αгарόζης 1% [L: Lader (μάρτυρας μοριακού βάρους), P: δείγμα θετικού ελέγχου (γονιδιωματικό DNA από *L. japonicus*), N: δείγμα αρνητικού ελέγχου (ddH₂O)]

2.5.4. Ποσοτική PCR (qPCR) με one step Luna protocol

Για τον προσδιορισμό και την ποσοτικοποίηση της έκφρασης συγκεκριμένων γονιδίων χρησιμοποιήθηκε το Luna Universal One Step RT-qPCR kit, το οποίο περιλαμβάνει σε ένα διάλυμα την αντίστροφη μεταγραφή και τη DNA πολυμεράση δίνοντας τη δυνατότητα σύνθεσης του συμπληρωματικού DNA και διεξαγωγής της qPCR σε μία αντίδραση. Η μέθοδος αυτή στηρίζεται στην ανίχνευση φθορίζοντων σημάτων που εκπέμπονται από την χρωστική SYBR Green, η οποία προσδένεται σε δίκλινα μόρια DNA και φθορίζει στα 520nm. Όσο μεγαλύτερο είναι το σήμα, τόσο περισσότερο DNA υπάρχει στο δείγμα. (Cao & Shockey, 2012)

Για τη σύγκριση των δειγμάτων χρησιμοποιείται η τιμή Ct (cycle threshold), η οποία αντιστοιχεί στον αριθμό των κύκλων που χρειάζεται το δείγμα ώστε να ξεπεράσει μία συγκεκριμένη τιμή-κατώφλι.

Αρχικά, έγινε αραίωση των δειγμάτων με ddH₂O στα 10ng/μl, ώστε οι ποσότητες RNA να είναι ίδιες για όλα τα δείγματα.

Για να γίνει εκτίμηση της διαφορικής έκφρασης των παραπάνω γονιδίων, σαν γονίδια κανονικοποίησης χρησιμοποιήθηκαν το ενδογενές γονίδιο της ATP συνθάσης (LjATPs) και η πρωτεϊνικής φωσφατάσης 2A (LjPP2a) του *L. japonicus*.

Η αντίδραση περιείχε:

- 5μl Luna buffer
- 0,4μl (10Nm) πρόσθιου εκκινητή
- 0,4μl (10Nm) αντίστροφου
- 2,7μl Luna water
- 0,5 μl enzyme mix (LUNA)
- 1μl δείγμα RNA ή 1μl Luna water στον αρνητικό μάρτυρα

Η αντίδραση πραγματοποιήθηκε στο μηχάνημα CPX Connect Real-Time System (BIORAD).

Στάδια	Θερμοκρασία (°C)	Χρόνος (λεπτά)	Κύκλοι
	95	5	1
Αποδιάταξη	95	15	39
Υβριδισμός*	60	15	39
Επέκταση	72	10	39

Πίνακας 7. Συνθήκες qPCR με Luna (* για τα γονίδια LjPT4 και LjSbtM1 το στάδιο του υβριδισμού πραγματοποιήθηκε στους 58°C)

Στη συνέχεια, ακολούθησαν οι αντιδράσεις Luna qPCR για τα γονίδια LjSbtM1, LjPT4 και LjAMT2.2 (Πίνακας 7), με τις ίδιες ποσότητες αντιδραστηρίων.

Γονίδια	Πρόσθιος εκκινητής	Αντίστροφος εκκινητής
LjSbtM1	5'-AGGTGAACCAGAAGGTTGCATAC-3'	5'-AGCAGCACCCCTCTCTATCTTCATGC-3'
LjPt4	5'-CAATGTCGCCAAGGCCCA TGGTG-3'	5'-AACACCACTCTCGATCATTTCTCTG-3'
LjAMT2;2	5'-ACACATGCTTGCACTGCTACC-3'	5'-CTGCCCATCCTTGAACAACCC-3
LjPP2 (housekeeping 1)	5'-GTAAATGCGT CTAAAGATAGGGTCC-3'	5'-ACTAGACTGTAGTGCTTGAGAGGC-3'
LjATPs (housekeeping 2)	5'-CAATGTCGCCAAGGCCCA TGGTG-3'	5'-AACACCACTCTCGATCATTTCTCTG-3'

Πίνακας 8. Εκκινητές για LjSbtM1, LjPt4, LjAMT2;2, LjPP2 (housekeeping 1) και LjATPs (housekeeping 2)

Για κάθε χειρισμό έγιναν 5 βιολογικές επαναλήψεις και για κάθε γονίδιο 2 τεχνικές επαναλήψεις. Τα επίπεδα έκφρασης των γονιδίων που μελετήθηκαν υπολογίστηκαν σε αναλογία με τα επίπεδα έκφρασης των γονιδίων αναφοράς (housekeeping genes). Για τη σύγκριση της έκφρασης μεταξύ των δειγμάτων χρησιμοποιήθηκε η τιμή $\Delta Ct = Ct_{\text{επιθυμητού γονιδίου}} - Ct_{\text{γονιδίου αναφοράς}}$.

2.6 Στατιστική ανάλυση

Για τη στατιστική ανάλυση των δεδομένων χρησιμοποιήθηκε το πακέτο της γλώσσας R 4.3.0. Αρχικά, ελέγχθηκε εάν οι τιμές υπόκεινται σε κανονική τιμή με τη χρήση του Levene's test (p-value > 0.05), το οποίο έδειξε ότι όλες οι τιμές ακολουθούσαν

κανονική κατανομή. Έπειτα, έγινε ανάλυση της απόκλισης με one-way ANOVA και post hoc με δοκιμή εύρους Tukey HSD ($p\text{-adj}=0.05$), για την εύρεση των στατιστικώς σημαντικών διαφορών και τη συσχέτιση των αποτελεσμάτων.

3. Αποτελέσματα

3.1. Πείραμα 1 – Εκτίμηση της επίδρασης του fludioxonil στην ανάπτυξη των φυτών και στα επίπεδα μυκορριζικού αποικισμού

3.1.1 Επίδραση fludioxonil στην ανάπτυξη του φυτού

Από την φαινοτυπική παρατήρηση των φυτών ηλικίας 5 εβδομάδων, συγκρίνοντας τα φυτά control, στα οποία δεν έγινε εφαρμογή του fludioxonil, με τα φυτά στα οποία έγινε εφαρμογή του fludioxonil με αυξανόμενη συγκέντρωση, δεν προκύπτει κάποια επίδραση του φαρμάκου στην ανάπτυξη των φυτών.



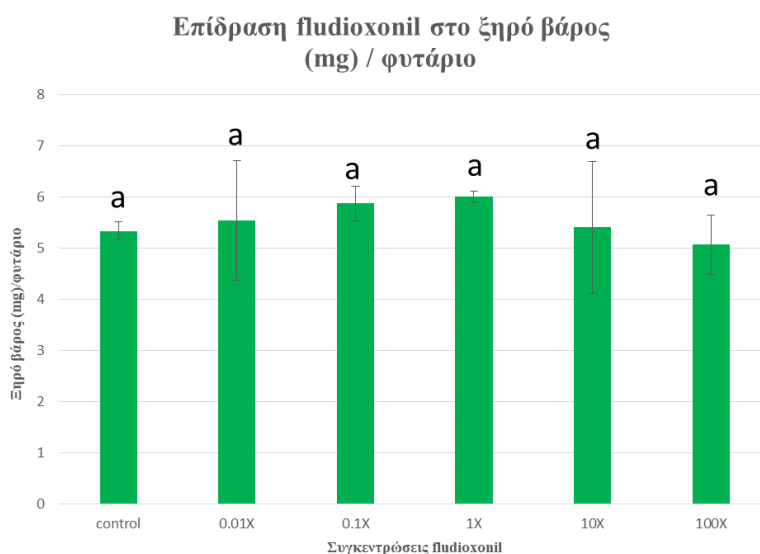
Εικόνα 8. Φυτάρια 5 εβδομάδων

Αντίστοιχα αποτελέσματα προκύπτουν και από τη μέτρηση του ξηρού βάρους των υπέργειων τμημάτων των φυτών. Στον Πίνακα 9 αναγράφονται τα ξηρά βάρη των φυτών απουσία και παρουσία των διάφορων συγκεντρώσεων του fludioxonil.

Ξηρό βάρος (mg) / φυτάριο						
No	control	0.01X	0.1X	1X	10X	100X
1	5,4	6,6	6,2	6,0	3,4	6,0
2	5,0	3,2	5,2	6,2	5,0	5,2
3	5,6	6,8	6,2	5,8	7,8	4,0
M.O.	5,33	5,53	5,87	6,0	5,4	5,1
p-value		0.9999610	0.9955133	0.9876254	0.9999998	0.9998389

Πίνακας 9. Ξηρό βάρος (mg) ανά φυτάριο

Ακολούθησε ανάλυση των δεδομένων με one-way ANOVA και TukeyHSD post hoc ($p\text{-adj}=0.05$). (Γράφημα 1)

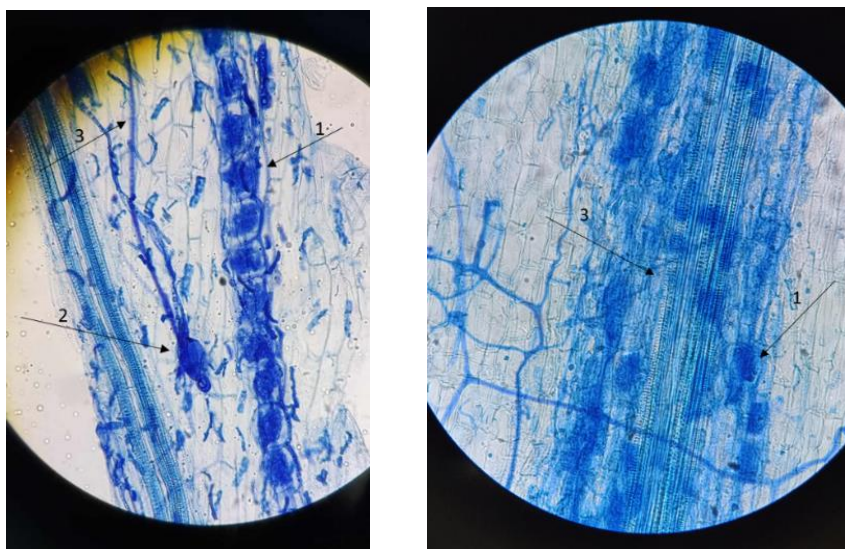


Γράφημα 1. Επίδραση του fludioxonil στο ξηρό βάρος (mg) των φυτών

Όπως μπορεί να παρατηρηθεί στο Γράφημα 1, καμία συγκέντρωση του γεωργικού φαρμάκου δεν εμφανίζει στατιστικώς σημαντική διαφορά στο ξηρό βάρος των φυτών συγκριτικά με τον μάρτυρα (Μ.Ο 5,3mg/φυτάριο), γεγονός που υποδεικνύει ότι το fludioxonil δεν εμφανίζει φυτοτοξικότητα στις συγκεντρώσεις που εξετάστηκαν.

3.1.3. Επίδραση fludioxonil στα επίπεδα μυκορριζικού αποικισμού

Στη συνέχεια έγινε χρώση των ριζών για την εκτίμηση του αποικισμού (κύστες, εσωτερικές υφές, δενδροειδείς δομές) στο οπτικό μικροσκόπιο. Το ποσοστό (%) αποικισμού υπολογίστηκε με εξέταση τουλάχιστον 100 οπτικών πεδίων ανά αντικειμενοφόρο πλάκα. Λόγω της μελέτης της επίπτωσης των γεωργικών φαρμάκων στην λειτουργικότητα των AMF, για τον υπολογισμό του αποικισμού μετρήθηκε μόνο η παρουσία ή απουσία των δενδροειδών σχηματισμών.



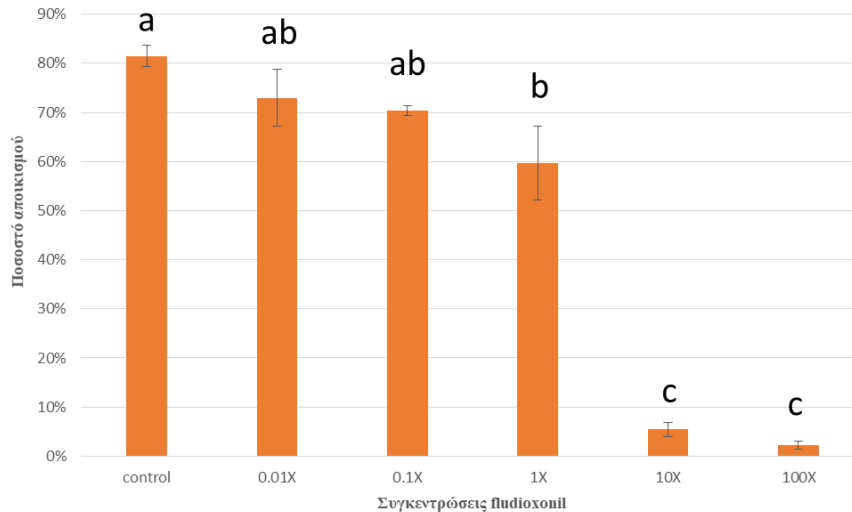
Εικόνα 9. Τμήματα ρίζας του *L. japonicus*, αποικισμένα από AMF. 1. Δενδρίτες, 2. Κύστες, 3. Υφές

Στην Εικόνα 9 φαίνονται τμήματα ρίζας που έχουν αποικιστεί από AMF και είναι διακριτές οι δενδροειδείς δομές. Από την μικροσκοπική παρατήρηση, υπολογίστηκε για κάθε χειρισμό ο μέσος όρος των ποσοστών αποικισμού που βρέθηκαν σε κάθε βιολογική επανάληψη (Πίνακας 10).

Ποσοστά αποικισμού φυτών από AMF						
No	control	0.01X	0.1X	1X	10X	100X
1	79,23	72,81	70,49	45	5,3	0
2	87,5	78,43	72,11	75,63	10,9	3
3	83,49	61,47	70	71,96	2	2,72
4	83,05	60,5	72,477	66,97	5	0,96
5	74,257	91,72	66,66	38,679	4,16	4,629
M.O.	82%	73%	70%	60%	5%	2%
p-value		0.6728028	0.3965444	0.0093950	0.0000000	0.0000000

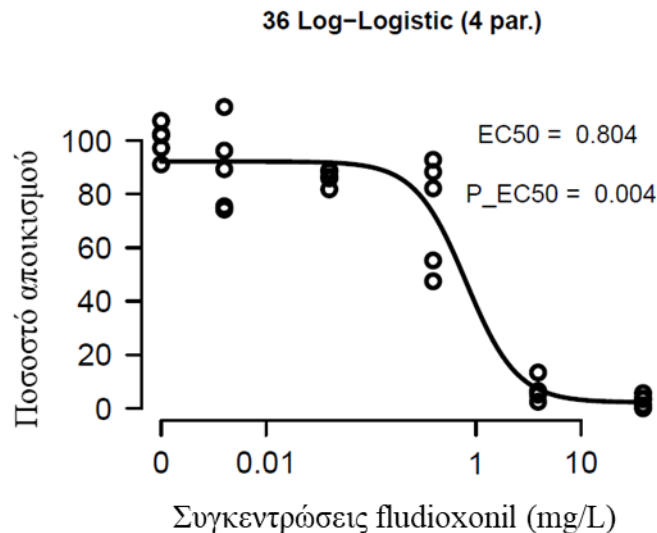
Πίνακας 10. Ποσοστό αποικισμού των φυτών από AMF

Ακολούθησε ανάλυση των δεδομένων με ANOVA και Tukey post hoc ($p\text{-adj}=0.05$). (Γράφημα 2)



Γράφημα 2. Επίδραση fludioxonil στον αποικισμό των φυτών από AMF

Όπως μπορεί να παρατηρηθεί στο Γράφημα 2, το ποσοστό αποικισμού των φυτών από τον AMF σε συγκεντρώσεις fludioxonil 0.01X και 0.1X, μειώνεται συγκριτικά με τον μάρτυρα που έχει ποσοστό αποικισμού 82% σε 73% και 70% αντίστοιχα. Ωστόσο, αυτή η διαφορά δεν είναι στατιστικώς σημαντική. Σε συγκέντρωση fludioxonil 1X, παρατηρείται μεγαλύτερη μείωση, καθώς το ποσοστό αποικισμού μειώνεται σε 60% και η διαφορά συγκριτικά με τον μάρτυρα είναι στατιστικώς σημαντική. Σε συγκεντρώσεις 10x και 100x, παρατηρείται ραγδαία μείωση των ποσοστών αποικισμού με 5% και 2% αντίστοιχα και η διαφορά αυτή, συγκριτικά με τον μάρτυρα είναι στατιστικώς σημαντική. Από τον υπολογισμό του EC₅₀ με βάση τα δεδομένα αποικισμού προέκυψε ότι το fludioxonil εμφανίζει τιμή EC₅₀ 0,804 ppm (Γράφημα 3). (Papadopoulou et al., 2020; Ritz et al., 2015)



Γράφημα 3. Υπολογισμός EC_{50} για το fludioxonil με βάση τα επίπεδα μυκορριζικού αποικισμού

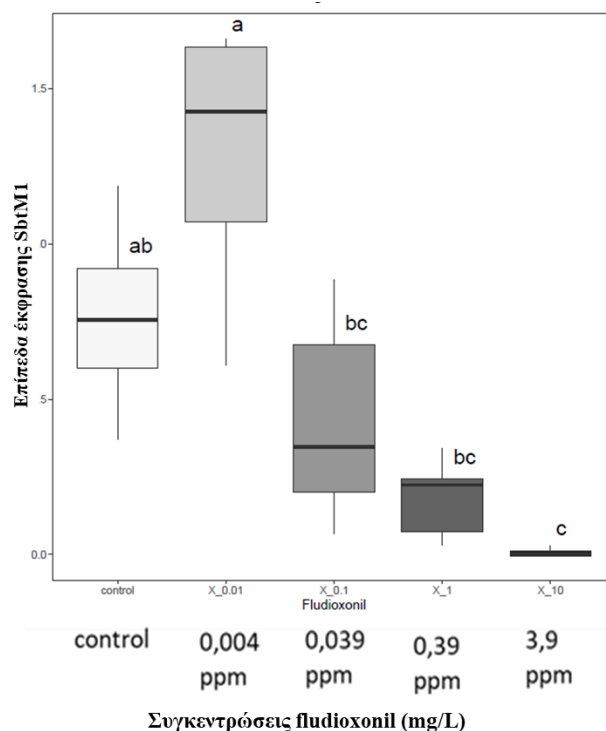
3.2. Πείραμα 2 – Επίδραση fludioxonil στην έκφραση γονιδίων που σχετίζονται με τον μυκορριζικό αποικισμό των φυτών

Από τη μικροσκοπική παρατήρηση που έγινε κατά τη διάρκεια του πρώτου πειράματος, επιλέχθηκαν οι συγκεντρώσεις fludioxonil στις οποίες δεν φαίνεται να υπάρχουν στατιστικώς σημαντικές διαφορές στον αποικισμό των φυτών από τους AMF συγκριτικά με τον μάρτυρα (0.01X, 0.1X), προκειμένου να μελετηθεί αν η παρουσία του fludioxonil στις συγκεκριμένες συγκεντρώσεις επιδρά στην λειτουργικότητα της συμβίωσης. Επιπρόσθετα, επιλέχθηκαν δύο επιπλέον συγκεντρώσεις, με στατιστικώς σημαντική διαφορά αλλά όχι μεγάλη διαφορά στο ποσοστό αποικισμού (1X) καθώς και μια συγκέντρωση με εμφανώς μειωμένο αποικισμό (10X), ώστε να γίνει έλεγχος της πιστότητας της μικροσκοπικής παρατήρησης και να διαπιστωθεί αν σε καταστάσεις μειωμένου αποικισμού μειώνεται αντίστοιχα και η έκφραση των επιλεγμένων ειδικών γονιδίων που αντικατοπτρίζουν τη λειτουργικότητα της συμβιωτικής σχέσης.

Τα γονίδια που επιλέχθηκαν είναι το γονίδιο πρωτεάσης σερίνης LjSbtM1 που διαδραματίζει σημαντικό ρόλο στη δημιουργία των ενδοκυτταρικών δομών συμβίωσης και κυρίως των δενδριτών, ο μεταφορέας φωσφόρου LjPT4 και ο μεταφορέας αζώτου LjAMT2.2.

3.2.1. Επίδραση του fludioxonil στην έκφραση του γονιδίου LjSbtM1

Όπως μπορεί να παρατηρηθεί από το Γράφημα 4, σε συγκέντρωση fludioxonil 0.01X (0,004 ppm), ο μέσος όρος της έκφρασης του γονιδίου LjSbtM1 αυξάνεται κατά περίπου 0,7 φορές συγκριτικά με τον μάρτυρα, αλλά η διαφορά δεν είναι στατιστικώς σημαντική (p-value= 0.1472702). Αντιθέτως, σε συγκεντρώσεις μεγαλύτερες του 0.01X, η έκφραση του LjSbtM1 μειώνεται συγκριτικά με τον μάρτυρα. Πιο συγκεκριμένα, σε συγκέντρωση fludioxonil 0.1X (ή 0.039ppm) η έκφραση του γονιδίου μειώνεται σχεδόν στο μισό, ενώ σε συγκέντρωση 1X (ή 0,39ppm) η έκφραση μειώνεται λίγο περισσότερο από το μισό συγκριτικά με τον μάρτυρα, χωρίς όμως να είναι στατιστικώς σημαντικές οι διαφορές (p-value= 0.4777289 και 0.0597943 αντίστοιχα). Σε συγκέντρωση 10X (ή 3,9ppm) η έκφραση του γονιδίου είναι ελάχιστη και η διαφορά είναι στατιστικώς σημαντική (p-value= 0.0099371).

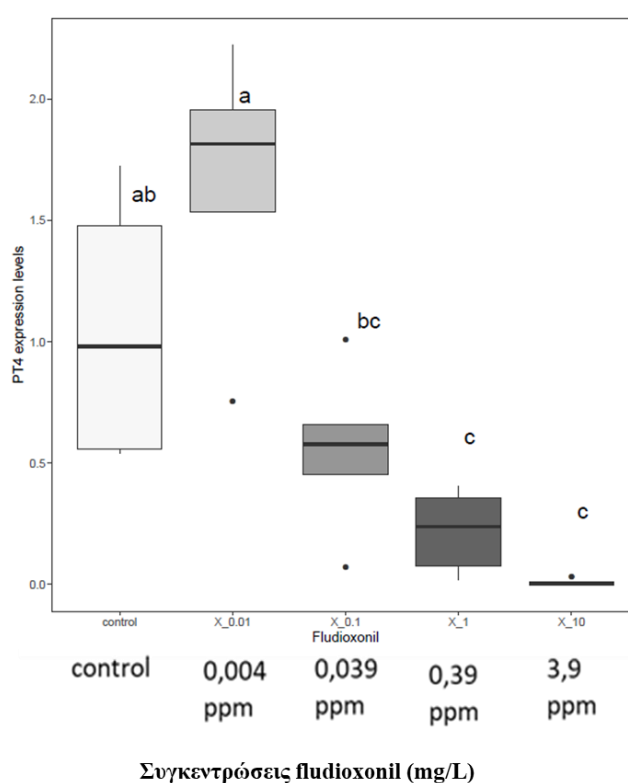


Γράφημα 4. Επίδραση του fludioxonil στα επίπεδα έκφρασης του γονιδίου LjSbtM1

3.2.2. Επίδραση του fludioxonil στην έκφραση του γονιδίου LjPT4

Όσον αφορά την έκφραση του γονιδίου LjPT4, όπως φαίνεται στο Γράφημα 5, σε συγκέντρωση fludioxonil 0.01X (ή 0,004 ppm), η έκφραση αυξάνεται κατά 0,8 φορές συγκριτικά με τον μάρτυρα, με τη διαφορά να μην είναι στατιστικώς σημαντική (p-value= 0.1919178). Αντιθέτως, σε συγκεντρώσεις fludioxonil μεγαλύτερες του 0.01X,

η έκφραση του LjPT4 μειώνεται. Σε συγκέντρωση 0.1X (ή 0.039ppm) η έκφραση του γονιδίου μειώνεται σχεδόν στο μισό, με τη διαφορά να μην είναι στατιστικώς σημαντική (p-value=0.3456880). Σε συγκέντρωση 1X (ή 0,39ppm), η έκφραση του γονιδίου μειώνεται κατά 0,7 φορές συγκριτικά με τον μάρτυρα, με τη διαφορά να είναι στατιστικώς σημαντική (p-value = 0.0345860). Τέλος, σε συγκέντρωση 10X (ή 3,9ppm) η έκφραση του γονιδίου μειώνεται ραγδαία, με στατιστικώς σημαντική διαφορά σε σχέση με τον μάρτυρα (p-value=0.0061847).

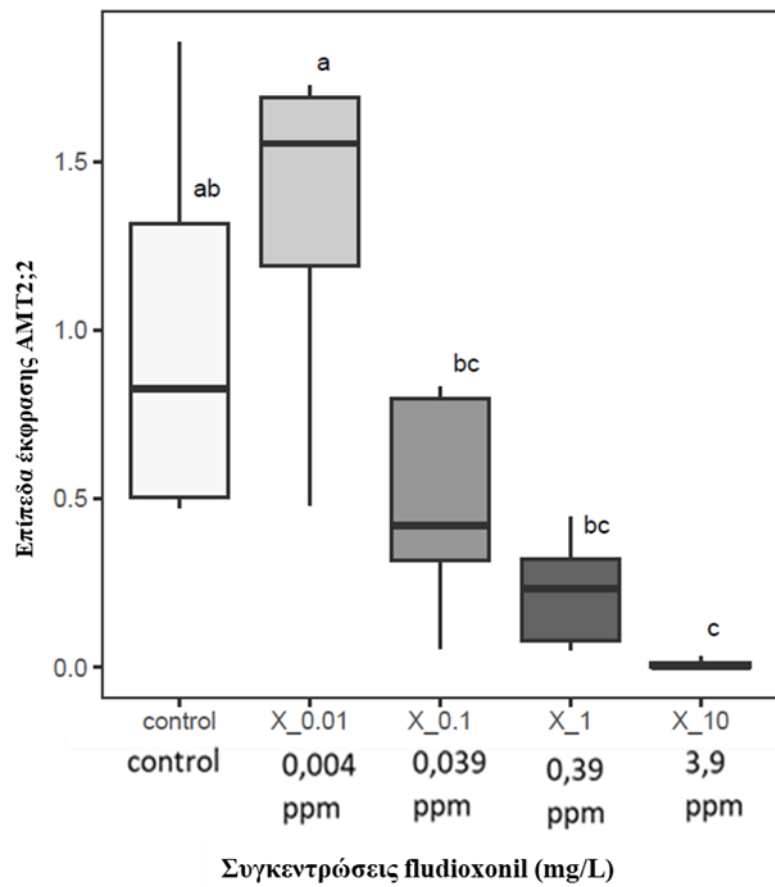


Γράφημα 5. Επίδραση του fludioxonil στα επίπεδα έκφρασης του γονιδίου LjPT4

3.2.3. Επίδραση του fludioxonil στην έκφραση του γονιδίου LjAMT2;2

Για το γονίδιο LjAMT2;2 (Γράφημα 6), σε συγκέντρωση fludioxonil 0.01X (ή 0,004 ppm), η έκφραση αυξάνεται σχεδόν κατά 0,8 φορές συγκριτικά με τον μάρτυρα, με τη διαφορά να μην είναι στατιστικώς σημαντική (p-value=0.7566081). Σε συγκεντρώσεις μικρότερες του 0,01X, η έκφραση του γονιδίου μειώνεται. Πιο συγκεκριμένα, σε συγκέντρωση fludioxonil 0.1X (ή 0.039ppm) η έκφραση του γονιδίου μειώνεται περίπου στο μισό, συγκριτικά με τον μάρτυρα, με τη διαφορά να μην είναι στατιστικώς σημαντική (p-value=0.3411439). Σε συγκέντρωση 1X (ή 0,39ppm), η έκφραση του γονιδίου μειώνεται σε λιγότερο από το μισό συγκριτικά με τον μάρτυρα, με τη διαφορά

να μην είναι στατιστικώς σημαντική ($p\text{-value}=0.0638867$). Τέλος, σε συγκέντρωση 10X (ή 3,9ppm) η έκφραση του γονιδίου είναι ελάχιστη και η διαφορά είναι στατιστικώς σημαντική ($p\text{-value}= 0.0120318$).



Γράφημα 6. Επίδραση του fludioxonil στα επίπεδα έκφρασης του γονιδίου LjAMT2;2

4. Συζήτηση

Στην παρούσα πτυχιακή εργασία, μελετήθηκε η πιθανή τοξικότητα του γεωργικού φαρμάκου fludioxonil στην ανάπτυξη συμβιωτικών σχέσεων μεταξύ του φυτού *L. japonicus* και του δενδροειδούς μυκορριζικού μύκητα *R. irregularis*. Το συγκεκριμένο γεωργικό φάρμακο είναι μυκητοκτόνο και χρησιμοποιείται για την καταπολέμηση των μυκήτων που μπορεί να βλάψουν το φυτό και να μειώσουν την παραγωγή, την ποιότητα και τη διάρκεια ζωής των γεωργικών προϊόντων. Ωστόσο, τα γεωργικά φάρμακα, στο σύνολό τους, εμφανίζουν έντονη τοξικότητα, με συνέπεια σοβαρές περιβαλλοντικές επιπτώσεις και η χρήση τους θα πρέπει να γίνεται ελεγχόμενα.

Πλέον, έχει θεσπιστεί ένα σύνολο τυποποιημένων δοκιμών για την αξιολόγηση της τοξικότητας γεωργικών φαρμάκων σε υδάτινα και χερσαία οικοσυστήματα (EFSA Panel on Plant Protection Products and their Residues (PPR), 2013). Ωστόσο, η μελέτη της τοξικότητας των φυτοπροστατευτικών προϊόντων στους μικροοργανισμούς του εδάφους δεν φαίνεται να αποτελεί προτεραιότητα του παρόντος θεσμικού πλαισίου, παρά τον σημαντικό ρόλο των μικροοργανισμών του εδάφους σε βασικές υπηρεσίες του οικοσυστήματος. Για τον λόγο αυτό είναι απαραίτητη η εγκαθίδρυση ενός ολοκληρωμένου και τυποποιημένου πλάνου αξιολόγησης της τοξικότητας των γεωργικών φαρμάκων έναντι των μικροοργανισμών του εδάφους.

Η παρούσα μελέτη έγινε στο πλαίσιο αυτής της προσπάθειας δημιουργίας ενός πλάνου εκτίμησης της τοξικότητας των γεωργικών φαρμάκων κατά της εδαφικής μικροβιακής κοινότητας. Η κατηγορία των οργανισμών που επιλέχθηκε για τη συγκεκριμένη μελέτη ήταν οι AMF, οι οποίοι λόγω των βιολογικών διεργασιών στις οποίες συμμετέχουν, διαθέτουν τα απαραίτητα χαρακτηριστικά και πληρούν τα κριτήρια που προκύπτουν από προηγούμενες μελέτες και φαίνεται ότι μπορούν να αποτελέσουν κατάλληλους βιο-δείκτες αξιολόγησης της τοξικότητας των γεωργικών φαρμάκων (Karpouzas et al., 2022).

Για τον σκοπό αυτό, πραγματοποιήθηκαν δύο πειράματα. Για τη διεξαγωγή του πρώτου πειράματος, με τη μέθοδο AMF-sandwich, αναπτύχθηκαν φυτά *L. japonicus*, εμβολιασμένα με μύκητα *R. irregularis*, στα οποία εφαρμόστηκε ένα εύρος συγκεντρώσεων του μυκητοκτόνου fludioxonil (Πίνακας 1). Σκοπός αυτού του πειράματος ήταν η εκτίμηση της φυτοτοξικότητας, ο υπολογισμός των ποσοστών αποικισμού των φυτών από τον μύκητα και ο υπολογισμός του EC₅₀. Από τα

αποτελέσματα προέκυψε ότι fludioxonil, στις συγκεντρώσεις που εξετάστηκαν δεν επιδρά σημαντικά στην ανάπτυξη των φυτών. Αντιθέτως, σε μελέτη της τοξικότητας του fludioxonil στη συμβίωση AMF με φυτά *Layia platyglossa* και *Lasthenia californica* παρατηρήθηκε αύξηση της βιομάζας των φυτών, η οποία αποδόθηκε στην πιθανή μείωση των ανταγωνιστικών μη-μυκορριζικών μυκήτων, την επικράτηση των AMF και συνεπώς την προαγωγή της ωφέλιμης συμβιωτικής σχέσης (Hilbig & Allen, 2019). Στην ίδια μελέτη, το μυκητοκτόνο metalaxyl μείωσε τη βιομάζα των φυτών.

Από τον υπολογισμό του ποσοστού αποικισμού των φυτών από τους AMF προέκυψε ότι το fludioxonil σε συγκεντρώσεις ανάλογες με την συνιστώμενη (1X) και συγκεντρώσεις 10X και 100X οδήγησε σε σημαντική μείωση του μυκορριζικού αποικισμού (Γράφημα 2.) Παρόμοια αποτελέσματα μείωσης του αποικισμού φυτών *Pisum sativum* και *Cicer arietinum* από AMF βρέθηκε να προκαλούν και τα μυκητοκτόνα metalaxyl, fludioxonil, carbathiin, thiram, thiabendazole και trifloxystrobin. (Jin et al., 2013) Αντιθέτως, σε μελέτη της τοξικότητας του fludioxonil στη συμβίωση AMF με φυτά *Layia platyglossa* και *Lasthenia californica* τα ποσοστά του αποικισμού παρουσία και απουσία fludioxonil δεν εμφάνιζαν στατιστικώς σημαντικές διαφορές, ενώ στην ίδια μελέτη το μυκητοκτόνο metalaxyl φάνηκε να μειώνει τα ποσοστά αποικισμού (Hilbig & Allen, 2019).

Ο υπολογισμός του τοξικολογικού δείκτη EC_{50} αποκαλύπτει ότι το fludioxonil εμφανίζει στατιστικώς σημαντική διαφορά στη σχέση δόσης-απόκρισης σε συγκέντρωση **0,804ppm**, όπου το ποσοστό αποικισμού μειώνεται στο 50% (Γράφημα 3.). Ωστόσο, για να καθοριστεί η κατάλληλη δόση του γεωργικού φαρμάκου, η οποία θα είναι αποτελεσματική και παράλληλα δε θα βλάπτει τη μικροβιακή κοινότητα του εδάφους είναι αναγκαίο να ακολουθήσουν αντίστοιχα πειράματα σε πιο ρεαλιστικές συνθήκες (*in soil* και *at field*), που θα λαμβάνουν υπόψιν παράγοντες που θα επηρεάσουν το ποσό του γεωργικού φαρμάκου που θα φτάσει τελικά στο έδαφος, όπως οι περιβαλλοντικές συνθήκες, η μέθοδος εφαρμογής του γεωργικού φαρμάκου, ο τύπος και τα χαρακτηριστικά του εδάφους.

Η μικροσκοπική παρατήρηση του αποικισμού των φυτών από τους AMF παρέχει τη βασική εικόνα όσον αφορά τις τοξικές επιδράσεις που εμφανίζει το γεωργικό φάρμακο στην ανάπτυξη του μύκητα και τις συμβιωτικές σχέσεις. Ωστόσο, παράλληλα με την μικροσκοπική παρατήρηση είναι απαραίτητο να γίνεται και μοριακή ανάλυση, η οποία

αποτελεί μια πιο ευαίσθητη μέθοδο και παρέχει τη δυνατότητα προσδιορισμού της λειτουργικότητας της συμβιωτικής σχέσης που παρατηρείται στο μικροσκόπιο. Στο πλαίσιο του προσδιορισμού της λειτουργικότητας της συμβίωσης μελετήθηκε η έκφραση του γονιδίου του ξενιστή LjSbtM1 που διαδραματίζει σημαντικό ρόλο στην ανάπτυξη των συμβιωτικών δομών και εκφράζεται ειδικά κατά τη δημιουργία της συμβίωσης με AMF. Σε συγκέντρωση fludioxonil 0.01X καταγράφηκε μια μη σημαντική αύξηση της έκφρασης ενώ σε συγκεντρώσεις 0.1X και 1X, η έκφραση του γονιδίου εμφανίστηκε μειωμένη χωρίς όμως οι διαφορές με τον μάρτυρα να είναι στατιστικώς σημαντικές. Αντίθετα σε επίπεδα συγκέντρωσης 10X, το fludioxonil οδήγησε σε σημαντική μείωση της έκφρασης του γονιδίου LjSbtM1. Αντίστοιχο μοτίβο έκφρασης καταγράφηκε και για τα γονίδια LjAMT2;2, που εμπλέκεται στη μεταφορά αζώτου και LjPT4 που εμπλέκεται στην μεταφορά φωσφόρου στο φυτό.

Η διακύμανση που παρατηρείται στην έκφραση των γονιδίων και περιλαμβάνει μία αρχική αύξηση, η οποία ακολουθείται από έντονη μείωση καθώς αυξάνεται η συγκέντρωση του γεωργικού φαρμάκου έχει προσδιορισθεί ως ‘φαινόμενο όρμεσης’ (hormetic effect) (Jakobsen et al., 2021). Το φαινόμενο χαρακτηρίζεται από μια υπερ-ενίσχυση του οργανισμού ως απάντηση σε κάποια διαταραχή, που στην προκειμένη περίπτωση είναι η τοξικότητα του fludioxonil. Προκειμένου ο AMF να διαχειριστεί την αβιοτική καταπόνηση, είναι πιθανό ότι ενισχύεται και συνεπώς ενισχύει τη συμβιωτική σχέση, η οποία χαρακτηρίζεται από την έκφραση των ειδικών γονιδίων. Ως αποτέλεσμα, παρατηρείται αυτή η αύξηση των επιπέδων έκφρασης των γονιδίων στη συγκεκριμένη συγκέντρωση. Το συγκεκριμένο φαινόμενο παρατηρήθηκε στη μελέτη της τοξικότητας χαμηλών συγκεντρώσεων των μυκητοκτόνων carbendazim και mancozeb κατά της συμβιωτικής σχέσης τριών ειδών AMF (*Claroideoglossum claroideum*, *Funneliformis mosseae* και *Funneliformis caledonium*) με φυτά *Pisum sativum*. Τα δυο μυκητοκτόνα σε χαμηλές συγκεντρώσεις φάνηκε να προκαλούν αύξηση στα ποσοστά αποικισμού των φυτών και στην πρόσληψη φωσφόρου από τις ρίζες του μύκητα (Jakobsen et al., 2021; Pagano et al., 2023). Ωστόσο, στην παρούσα μελέτη, το φαινόμενο της όρμεσης δεν παρατηρήθηκε στα ποσοστά αποικισμού, παρά μόνο στα επίπεδα έκφρασης των ειδικών γονιδίων LjSbtM1, LjAMT2;2 και LjPT4.

Συνολικά, η μικροσκοπική παρατήρηση του αποικισμού συμπίπτει με τα επίπεδα έκφρασης των ειδικών γονιδίων που προκύπτουν από τις μοριακές αναλύσεις, καθώς παρατηρείται ότι με την αύξηση της συγκέντρωσης του fludioxonil, μειώνεται τόσο ο

αποικισμός, όσο και η έκφραση των γονιδίων, με εξαίρεση τη συγκέντρωση 0.01X, στην οποία παρατηρείται πιθανόν το φαινόμενο της όρμεσης .

Συμπερασματικά, από την παρούσα μελέτη προκύπτει ότι το μυκητοκτόνο fludioxonil δεν εμφανίζει φυτοτοξικότητα στις συγκεντρώσεις που μελετήθηκαν, αλλά επιδρά τοξικά με δοσο-εξαρτώμενο τρόπο κατά του αποικισμού από τους AMF με τιμή $EC_{50}=0.804$ ppm. Ακόμη, φαίνεται ότι τα αποτελέσματα από τη μικροσκοπική παρατήρηση του αποικισμού συνάδουν με τα αποτελέσματα από τη μελέτη των επιπέδων έκφρασης των γονιδίων που σχετίζονται με την ανάπτυξη συμβιωτικών σχέσεων φυτού-AMF. Τέλος, σε συγκέντρωση fludioxonil 0.01X παρατηρείται το ‘φαινόμενο της όρμεσης’ στα επίπεδα έκφρασης των γονιδίων που μελετήθηκαν.

Σε συνέχεια της παρούσας μελέτης θα μπορούσε να γίνει μέτρηση του φωσφόρου στους υπέργειους ιστούς των φυτών, ώστε να συγκριθεί η πρόσληψη του φωσφόρου μεταξύ φυτών που αναπτύχθηκαν απουσία και παρουσία fludioxonil. Επιπλέον, θα μπορούσε να μελετηθεί η φαρμακοκινητική του fludioxonil στο σύστημα AMF-sandwich, καθώς επίσης και η καθαρή μορφή του fludioxonil. Ακόμη, θα μπορούσε να γίνει μελέτη του fludioxonil και σε άλλα συστήματα (*in vitro*, *in soil*, *at field*). Τέλος, θα μπορούσαν να εξεταστούν και άλλα γεωργικά φάρμακα με ποικίλους μηχανισμούς δράσης, με το σύστημα AMF-sandwich.

5. Βιβλιογραφία

Arbuscular Mycorrhizas: Physiology and Function / SpringerLink. (n.d.). Retrieved 27 July

2023, from <https://link.springer.com/book/10.1007/978-90-481-9489-6>

Banasiak, J., Jamruszka, T., Murray, J. D., & Jasiński, M. (2021). A roadmap of plant membrane transporters in arbuscular mycorrhizal and legume-rhizobium symbioses.

Plant Physiology, 187(4), 2071–2091. <https://doi.org/10.1093/plphys/kiab280>

Bárcenas, A., Salmeron-Santiago, I., Valdez-Alarcón, J. J., Pedraza-Santos, M., Santoyo, G., & Pozo, M. (2022). *Sucrose Mobilization and Catabolism in Arbuscular Mycorrhizal Plants*.

Bonfante, P., & Genre, A. (2010). Mechanisms underlying beneficial plant-fungus interactions in mycorrhizal symbiosis. *Nature Communications*, 1, 48.

<https://doi.org/10.1038/ncomms1046>

Boulois, H. D. de, Voets, L., Delvaux, B., Jakobsen, I., & Declerck, S. (2006). Transport of radiocaesium by arbuscular mycorrhizal fungi to *Medicago truncatula* under in vitro conditions. *Environmental Microbiology*, 8, 1926–1934.

<https://doi.org/10.1111/j.1462-2920.2006.01070.x>

Brandhorst, T. T., & Klein, B. S. (2019). Uncertainty surrounding the mechanism and safety of the post-harvest fungicide fludioxonil. *Food and Chemical Toxicology: An*

International Journal Published for the British Industrial Biological Research

Association, 123, 561–565. <https://doi.org/10.1016/j.fct.2018.11.037>

Cao, H., & Shockey, J. M. (2012, December 7). *Comparison of TaqMan and SYBR Green qPCR Methods for Quantitative Gene Expression in Tung Tree Tissues* (world) [Research-article]. ACS Publications; American Chemical Society.

<https://doi.org/10.1021/jf304690e>

- Courty, P. E., Smith, P., Koegel, S., Redecker, D., & Wipf, D. (2015). Inorganic Nitrogen Uptake and Transport in Beneficial Plant Root-Microbe Interactions. *Critical Reviews in Plant Sciences*, 34(1–3), 4–16. <https://doi.org/10.1080/07352689.2014.897897>
- EFSA Panel on Plant Protection Products and their Residues (PPR). (2010). Scientific Opinion on the development of specific protection goal options for environmental risk assessment of pesticides, in particular in relation to the revision of the Guidance Documents on Aquatic and Terrestrial Ecotoxicology (SANCO/3268/2001 and SANCO/10329/2002). *EFSA Journal*, 8(10), 1821. <https://doi.org/10.2903/j.efsa.2010.1821>
- EFSA Panel on Plant Protection Products and their Residues (PPR). (2013). Guidance on tiered risk assessment for plant protection products for aquatic organisms in edge-of-field surface waters. *EFSA Journal*, 11(7), 3290. <https://doi.org/10.2903/j.efsa.2013.3290>
- Garcia, K., Doidy, J., Zimmermann, S. D., Wipf, D., & Courty, P.-E. (2016). Take a Trip Through the Plant and Fungal Transportome of Mycorrhiza. *Trends in Plant Science*, 21(11), 937–950. <https://doi.org/10.1016/j.tplants.2016.07.010>
- Genre, A., Chabaud, M., Faccio, A., Barker, D. G., & Bonfante, P. (2008). Prepenetration Apparatus Assembly Precedes and Predicts the Colonization Patterns of Arbuscular Mycorrhizal Fungi within the Root Cortex of Both *Medicago truncatula* and *Daucus carota*. *The Plant Cell*, 20(5), 1407–1420. <https://doi.org/10.1105/tpc.108.059014>
- Gkimprizi, E., Lagos, S., Nikolaou, C. N., Karpouzas, D. G., & Tsikou, D. (2023). Veterinary drug albendazole inhibits root colonization and symbiotic function of the arbuscular mycorrhizal fungus *Rhizophagus irregularis*. *FEMS Microbiology Ecology*, 99(6), fiad048. <https://doi.org/10.1093/femsec/fiad048>
- Guether, M., Neuhäuser, 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>
- Hage-Ahmed, K., Rosner, K., & Steinkellner, S. (2019). Arbuscular mycorrhizal fungi and their response to pesticides. *Pest Management Science*, 75(3), 583–590.
<https://doi.org/10.1002/ps.5220>
- Hilbig, B. E., & Allen, E. B. (2019). Fungal pathogens and arbuscular mycorrhizal fungi of abandoned agricultural fields: Potential limits to restoration. *Invasive Plant Science and Management*, 12(03), 186–193. <https://doi.org/10.1017/inp.2019.19>
- Ho-Plágaro, T., & García-Garrido, J. M. (2022). Molecular Regulation of Arbuscular Mycorrhizal Symbiosis. *International Journal of Molecular Sciences*, 23(11), Article 11. <https://doi.org/10.3390/ijms23115960>
- Jakobsen, I., Murmann, L. M., & Rosendahl, S. (2021). Hormetic responses in arbuscular mycorrhizal fungi. *Soil Biology and Biochemistry*, 159, 108299.
<https://doi.org/10.1016/j.soilbio.2021.108299>
- Jin, H., Germida, J. J., & Walley, F. L. (2013). Suppressive effects of seed-applied fungicides on arbuscular mycorrhizal fungi (AMF) differ with fungicide mode of action and AMF species. *Applied Soil Ecology*, 72, 22–30.
<https://doi.org/10.1016/j.apsoil.2013.05.013>
- Karas, P. A., Baguelin, C., Pertile, G., Papadopoulou, E. S., Nikolaki, S., Storck, V., Ferrari, F., Trevisan, M., Ferrarini, A., Fornasier, F., Vasileiadis, S., Tsiamis, G., Martin-Laurent, F., & Karpouzas, D. G. (2018). Assessment of the impact of three pesticides on microbial dynamics and functions in a lab-to-field experimental approach. *Science of The Total Environment*, 637–638, 636–646.
<https://doi.org/10.1016/j.scitotenv.2018.05.073>
- Karpouzas, D. G., Papadopoulou, E., Ipsilantis, I., Friedel, I., Petric, I., Udikovic-Kolic, N., Djuric, S., Kandeler, E., Menkissoglu-Spiroudi, U., & Martin-Laurent, F. (2014). Effects

- of nicosulfuron on the abundance and diversity of arbuscular mycorrhizal fungi used as indicators of pesticide soil microbial toxicity. *Ecological Indicators*, 39, 44–53.
<https://doi.org/10.1016/j.ecolind.2013.12.004>
- Karpouzas, D. G., Tsiamis, G., Trevisan, M., Ferrari, F., Malandain, C., Sibourg, O., & Martin-Laurent, F. (2016). "LOVE TO HATE" pesticides: Felicity or curse for the soil microbial community? An FP7 IAPP Marie Curie project aiming to establish tools for the assessment of the mechanisms controlling the interactions of pesticides with soil microorganisms. *Environmental Science and Pollution Research*, 23(18), 18947–18951. <https://doi.org/10.1007/s11356-016-7319-4>
- Karpouzas, D. G., Vryzas, Z., & Martin-Laurent, F. (2022). Pesticide soil microbial toxicity: Setting the scene for a new pesticide risk assessment for soil microorganisms (IUPAC Technical Report). *Pure and Applied Chemistry*, 94(10), 1161–1194.
<https://doi.org/10.1515/pac-2022-0201>
- Kuyper, T. W., & Jansa, J. (2023). Arbuscular mycorrhiza: Advances and retreats in our understanding of the ecological functioning of the mother of all root symbioses. *Plant and Soil*. <https://doi.org/10.1007/s11104-023-06045-z>
- Lawry, S. M., Tebbets, B., Kean, I., Stewart, D., Hetelle, J., & Klein, B. S. (2017). Fludioxonil Induces Drk1, a Fungal Group III Hybrid Histidine Kinase, To Dephosphorylate Its Downstream Target, Ypd1. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*, 61(2), e01414-16. <https://doi.org/10.1128/AAC.01414-16>
- Lubbers, E. R., & Mohler, P. J. (2016). Roles and regulation of protein phosphatase 2A (PP2A) in the heart. *Journal of Molecular and Cellular Cardiology*, 101, 127–133.
<https://doi.org/10.1016/j.yjmcc.2016.11.003>
- Mu, H., Yang, X., Wang, K., Tang, D., Xu, W., Liu, X., Ritsema, C. J., & Geissen, V. (2023). Ecological risk assessment of pesticides on soil biota: An integrated field-modelling

- approach. *Chemosphere*, 326, 138428.
<https://doi.org/10.1016/j.chemosphere.2023.138428>
- Nasir, F., Bahadur, A., Lin, X., Gao, Y., & Tian, C. (2021). Novel insights into host receptors and receptor-mediated signaling that regulate arbuscular mycorrhizal symbiosis. *Journal of Experimental Botany*, 72(5), 1546–1557.
<https://doi.org/10.1093/jxb/eraa538>
- Neupane, P., Bhuju, S., Thapa, N., & Bhattarai, H. K. (2019). ATP Synthase: Structure, Function and Inhibition. *Biomolecular Concepts*, 10(1), 1–10.
<https://doi.org/10.1515/bmc-2019-0001>
- Pagano, M. C., Kyriakides, M., & Kuyper, T. W. (2023). Effects of Pesticides on the Arbuscular Mycorrhizal Symbiosis. *Agrochemicals*, 2(2), Article 2.
<https://doi.org/10.3390/agrochemicals2020020>
- Papadopoulou, E. S., Bachtsevani, E., Lampronikou, E., Adamou, E., Katsaouni, A., Vasileiadis, S., Thion, C., Menkissoglu-Spiroudi, U., Nicol, G. W., & Karpouzas, D. G. (2020). Comparison of Novel and Established Nitrification Inhibitors Relevant to Agriculture on Soil Ammonia- and Nitrite-Oxidizing Isolates. *Frontiers in Microbiology*, 11.
<https://www.frontiersin.org/articles/10.3389/fmicb.2020.581283>
- Parniske, M. (2008). Arbuscular mycorrhiza: The mother of plant root endosymbioses. *Nature Reviews. Microbiology*, 6(10), 763–775.
<https://doi.org/10.1038/nrmicro1987>
- Pimprikar, P., & Gutjahr, C. (2018). Transcriptional Regulation of Arbuscular Mycorrhiza Development. *Plant and Cell Physiology*, 59(4), 678–695.
<https://doi.org/10.1093/pcp/pcy024>
- PubChem. (n.d.). *Fludioxonil*. Retrieved 25 August 2023, from
<https://pubchem.ncbi.nlm.nih.gov/compound/86398>

- 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>
- Ritz, C., Baty, F., Streibig, J. C., & Gerhard, D. (2015). Dose-Response Analysis Using R. *PLOS ONE*, 10(12), e0146021. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0146021>
- Rui, W., Mao, Z., & Li, Z. (2022). The Roles of Phosphorus and Nitrogen Nutrient Transporters in the Arbuscular Mycorrhizal Symbiosis. *International Journal of Molecular Sciences*, 23(19), Article 19. <https://doi.org/10.3390/ijms231911027>
- Takeda, N., Sato, S., Asamizu, E., Tabata, S., & Parniske, M. (2009). Apoplastic plant subtilases support arbuscular mycorrhiza development in *Lotus japonicus*. *The Plant Journal*, 58(5), 766–777. <https://doi.org/10.1111/j.1365-313X.2009.03824.x>
- Tsikou, D., Nikolaou, C. N., Tsiknia, M., Papadopoulou, K. K., & Ehaliotis, C. (2023). Interplay between rhizobial nodulation and arbuscular mycorrhizal fungal colonization in *Lotus japonicus* roots. *Journal of Applied Microbiology*, 134(1), lxac010. <https://doi.org/10.1093/jambio/lxac010>
- Vierheilig, H., Coughlan, A. P., Wyss, U., & Piché, Y. (1998). Ink and Vinegar, a Simple Staining Technique for Arbuscular-Mycorrhizal Fungi. *Applied and Environmental Microbiology*, 64(12), 5004–5007. <https://doi.org/10.1128/AEM.64.12.5004-5007.1998>
- Wendering, P., & Nikoloski, Z. (2022). Genome-Scale Modeling Specifies the Metabolic Capabilities of *Rhizophagus irregularis*. *mSystems*, 7(1), e01216-21. <https://doi.org/10.1128/msystems.01216-21>
- Zocco, D., Fontaine, J., Lozanova, E., Renard, L., Bivort, C., Durand, R., Grandmougin-Ferjani, A., & Declerck, S. (2008). Effects of two sterol biosynthesis inhibitor fungicides (fenpropimorph and fenhexamid) on the development of an arbuscular mycorrhizal

fungus. *Mycological Research*, 112(5), 592–601.

<https://doi.org/10.1016/j.mycres.2007.11.010>