



ΜΗΧΑΝΙΣΜΟΙ ΔΡΑΣΗΣ ΕΛΑΦΙΚΩΝ ΕΝΔΟΦΥΤΙΚΩΝ ΜΥΚΗΤΩΝ ΠΟΥ ΕΜΠΛΕΚΟΝΤΑΙ ΣΤΗΝ ΑΝΑΠΤΥΞΗ ΤΟΥ ΦΥΤΟΥ ΚΑΙ ΣΤΗΝ ΑΠΟΚΡΙΣΗ ΣΕ ΑΒΙΟΤΙΚΕΣ ΚΑΤΑΠΙΟΝΗΣΕΙΣ

Mode of action of soil-borne endophytic fungi involved in plant
development and responses to abiotic stress

ΔΙΔΑΚΤΟΡΙΚΗ ΔΙΑΤΡΙΒΗ

ΑΒΡΑΜΙΔΟΥ ΜΑΡΙΑΝΝΑ

2023

Το έργο συγχρηματοδοτείται από την Ελλάδα και την Ευρωπαϊκή Ένωση (Ευρωπαϊκό Κοινωνικό Ταμείο) μέσω του Επιχειρησιακού Προγράμματος «Ανάπτυξη Ανθρώπινου Δυναμικού, Εκπαίδευση και Διά Βίου Μάθηση», στο πλαίσιο της Πράξης «Ενίσχυση του ανθρώπινου ερευνητικού δυναμικού μέσω της υλοποίησης διδακτορικής έρευνας – 2^{ος} Κύκλος» (MIS-5000432), που υλοποιεί το Ίδρυμα Κρατικών Υποτροφιών (ΙΚΥ).



Επιχειρησιακό Πρόγραμμα
Ανάπτυξη Ανθρώπινου Δυναμικού,
Εκπαίδευση και Διά Βίου Μάθηση
Με τη συγχρηματοδότηση της Ελλάδας και της Ευρωπαϊκής Ένωσης



ΕΞΕΤΑΣΤΙΚΗ ΕΠΙΤΡΟΠΗ

ΤΡΙΜΕΛΗΣ ΕΠΙΤΡΟΠΗ:

ΠΑΠΑΔΟΠΟΥΛΟΥ ΚΑΛΛΙΟΠΗ (ΠΑΝΕΠΙΣΤΗΜΙΟ ΘΕΣΣΑΛΙΑΣ)

ΟΙΧΑΛΙΩΤΗΣ ΚΩΝΣΤΑΝΤΙΝΟΣ (ΠΑΝΕΠΙΣΤΗΜΙΟ ΑΘΗΝΩΝ)

ΚΑΒΡΟΥΛΑΚΗΣ ΝΕΚΤΑΡΙΟΣ (ΕΛΓΟ ΔΗΜΗΤΡΑ, ΚΡΗΤΗ)

ΕΠΤΑΜΕΛΗΣ ΕΞΕΤΑΣΤΙΚΗ ΕΠΙΤΡΟΠΗ:

ΠΑΠΑΔΟΠΟΥΛΟΥ ΚΑΛΛΙΟΠΗ (ΠΑΝΕΠΙΣΤΗΜΙΟ ΘΕΣΣΑΛΙΑΣ)

ΟΙΧΑΛΙΩΤΗΣ ΚΩΝΣΤΑΝΤΙΝΟΣ (ΠΑΝΕΠΙΣΤΗΜΙΟ ΑΘΗΝΩΝ)

ΚΑΒΡΟΥΛΑΚΗΣ ΝΕΚΤΑΡΙΟΣ (ΕΛΓΟ ΔΗΜΗΤΡΑ, ΚΡΗΤΗ)

ΚΑΡΠΟΥΖΑΣ ΔΗΜΗΤΡΙΟΣ (ΠΑΝΕΠΙΣΤΗΜΙΟ ΘΕΣΣΑΛΙΑΣ)

ΔΑΛΑΚΟΥΡΑΣ ΑΘΑΝΑΣΙΟΣ (ΕΛΓΟ ΔΗΜΗΤΡΑ, ΛΑΡΙΣΑ)

ΒΟΓΙΑΤΖΗ-ΚΑΜΒΟΥΚΟΥ ΕΛΕΝΗ (ΠΑΝΕΠΙΣΤΗΜΙΟ ΘΕΣΣΑΛΙΑΣ)

ΤΣΙΚΟΥ ΔΑΝΙΕΛΑ (ΠΑΝΕΠΙΣΤΗΜΙΟ ΘΕΣΣΑΛΙΑΣ)

Η παρούσα διδακτορική διατριβή πραγματοποιήθηκε στο εργαστήριο Βιοτεχνολογίας Φυτών και Περιβάλλοντος του τμήματος Βιοχημείας και Βιοτεχνολογίας στο Πανεπιστήμιο Θεσσαλίας. Η διδακτορική διατριβή επιτελέστηκε υπό την επίβλεψη της καθηγήτριας Παπαδοπούλου Καλλιόπης.

Το έργο συγχρηματοδοτείται από την Ελλάδα και την Ευρωπαϊκή Ένωση (Ευρωπαϊκό Κοινωνικό Ταμείο) μέσω του Επιχειρησιακού Προγράμματος «Ανάπτυξη Ανθρώπινου Δυναμικού, Εκπαίδευση και Διά Βίου Μάθηση», στο πλαίσιο της Πράξης «Ενίσχυση του ανθρώπινου ερευνητικού δυναμικού μέσω της υλοποίησης διδακτορικής έρευνας – 2^{ος} Κύκλος» (MIS-5000432), που υλοποιεί το Ίδρυμα Κρατικών Υποτροφιών (ΙΚΥ).



**Επιχειρησιακό Πρόγραμμα
Ανάπτυξη Ανθρώπινου Δυναμικού,
Εκπαίδευση και Διά Βίου Μάθηση**
Με τη συγχρηματοδότηση της Ελλάδας και της Ευρωπαϊκής Ένωσης



«Αφιερωμένο στις κόρες μου
Ειρήνη και Κατερίνα»

Ευχαριστίες

Η πολύχρονη πορεία μου στο εργαστήριο Βιοτεχνολογίας Φυτών και Περιβάλλοντος ολοκληρώνεται με αυτή εδώ τη διδακτορική διατριβή. Αν και όλη αυτή η πορεία ήταν αρκετά περιπετειώδης και πολυτάραχη αφήνει τελικά μόνο αισθήματα ευγνωμοσύνης. Ευγνωμοσύνη προς όλους τους ανθρώπους που γνώρισα και συνεργάστηκα.

Στον πρώτο άνθρωπο που θα αναφερθώ είναι η κυρία Παπαδοπούλου Καλλιόπη, στην οποία οφείλω το μεγαλύτερο ευχαριστώ. Στάθηκε δίπλα μου σε όποια δυσκολία εμφανίστηκε μπροστά μου, τόσο σε πειραματικό όσο και σε προσωπικό επίπεδο, βρίσκοντας πάντα λύση. Που πίστεψε σε μένα περισσότερο από ότι εγώ στον εαυτό μου. που στάθηκε δίπλα μου σε όλη τη διάρκεια της εγκυμοσύνης μου ακόμη και μετά έχοντας πλέον γίνει μαμά. Αν δεν ήταν εκεί δίπλα μου δεν ξέρω αν θα είχα καταφέρει να ολοκληρώσω αυτό το ταξίδι της διδακτορικής διατριβής.

Φυσικά θα ήθελα να ευχαριστήσω και τους καθηγητές του εργαστηρίου, τον κύριο Καρπούζα Δημήτρη, την κυρία Τσίκου Δανιέλα, τον Δαλακούρα Θανάση και τον κύριο Βασιλειάδη Σωτήρη καθώς ήταν πάντα εκεί όποτε χρειάστηκα την πολύτιμη συμβουλή τους και την καθοδήγηση τους.

Ιδιαίτερα θα ήθελα να εκφράσω την ευγνωμοσύνη μου στους ανθρώπους της καθημερινότητας μου στο εργαστήριο όλα αυτά τα χρόνια που από συναδέλφους τους νιώθω πλέον δικούς μου ανθρώπους. Θα ήθελα να αναφερθώ ονομαστικά στον Γκαραγκούνη Κώστα, στην Νταντάμη Έλενα, στην Σκιαδά Βασιλική, στον Καρρά Παναγιώτη.

Ευχαριστώ πολύ όλα τα παρόντα και παρελθόντα κάποια πλέον άτομα του εργαστηρίου από προπτυχιακούς φοιτητές μέχρι και μεταδιδάκτορες για την πολύτιμη βοήθεια στην εκπόνηση του διδακτορικού.

Ένα μεγάλο ευχαριστώ στην οικογένεια μου και τα αδέρφια μου για την στήριξη τους όλα αυτά τα χρόνια και την υπομονή τους μαζί μου.

Σε όλο αυτό το ταξίδι φυσικά θέλω να ευχαριστήσω και τον σύζυγο μου Στάθη που ήταν εκεί να με εμψυχώνει τις στιγμές που η απογοήτευση και το άγχος με κατέβαλλαν. Ακόμη και στις κόρες μου που με τον δικό τους τρόπο ήταν εκεί δίπλα μου σε όλο το δύσκολο ταξίδι.

Abstract/ Περίληψη

Περίληψη

Εδώ και πολλά χρόνια είναι γνωστή η σημασία των ωφέλιμων μικροοργανισμών τόσο στη διαμόρφωση της δομής του εδάφους όσο και για την ανάπτυξη των φυτών. Οι μικροοργανισμοί που αποικίζουν τη ρίζα των φυτών είτε εξωτερικά είτε και εσωτερικά φαίνεται ότι διαδραματίζουν ένα πολύ σημαντικό ρόλο στην ανάπτυξη του φυτού καθώς και στην αντοχή έναντι αβιοτικών και βιοτικών καταπονήσεων. Τα φυτά της οικογένειας των ψυχανθών συνάπτουν συμβιωτικές σχέσεις με μικροοργανισμούς (ριζόβια, δενδρόμορφοι μυκορριζικοί μύκητες), οι οποίες είναι κυρίως αμοιβαία επωφελής όμως μπορεί να γίνουν και παρασιτικές. Στη συγκεκριμένη διδακτορική διατριβή θα μελετηθεί ένας μη παθογόνος ενδοφυτικός μύκητας του γένους *Fusarium solani* στέλεχος K, γνωστός και ως FsK, και το φυτό μοντέλο των ψυχανθών *Lotus japonicus*. Ο ασκομύκητας FsK είναι ένα ενδόφυτο που αρχικά απομονώθηκε από ρίζες φυτών ντομάτας, και σύντομα αποτέλεσε αντικείμενο μελέτης, χάρις την ικανότητά του να αυξάνει την αντίσταση των φυτών έναντι τόσο σε βιοτική καταπόνηση, για παράδειγμα από το παθογόνο του φυλλώματος *Septoria lycopersici*, όσο και σε αβιοτική καταπόνηση, λόγω έλλειψης νερού. Πρόσφατες μελέτες της αλληλεπίδρασης φυτού-μύκητα σε υποκυτταρικό επίπεδο έδειξαν ότι η εγκαθίδρυση του FsK στους ιστούς των ψυχανθών φυτών, απαιτεί μια σειρά αλλαγών που αφορούν τόσο προσαρμογές στην ανάπτυξη του μύκητα αλλά και αυτόνομες αποκρίσεις των φυτικών κυττάρων. Οι περισσότερες από αυτές τις αλλαγές έχουν περιγραφεί τόσο για συμβιωτικές αλληλεπιδράσεις όσο και για σχέσεις παθογένειας μεταξύ φυτών και μικροοργανισμών. Επίσης γνωρίζουμε ότι η ανάπτυξη του μύκητα εντός του φυτού δεν είναι ούτε επιβαρυντική αλλά ούτε και ευεργετική, όταν αναπτύσσονται υπό φυσιολογικές συνθήκες ανάπτυξης και χωρίς εφαρμογή κάποιας καταπόνησης. Ένα πρώτο ερώτημα που έθεσε η παρούσα διδακτορική διατριβή να απαντήσει ήταν αν η αλληλεπίδραση φυτού-μύκητα είναι ωφέλιμη προς το φυτό σε συνθήκες αβιοτικού στρες. Διερευνήθηκε σε πρώτη φάση η ικανότητα του ενδόφυτου να προσφέρει αντίσταση στα φυτά που αναπτύσσονται υπό συνθήκες ζέστης, ψύχους όπως και οξειδωτικού στρες. Το ενδόφυτο είναι ικανό να αποικίζει τις ρίζες των ψυχανθών φυτών και υπό συνθήκες αβιοτικού στρες όμως σε μικρότερο βαθμό σε σχέση με τις κανονικές συνθήκες ανάπτυξης. Παρατηρήσαμε επίσης ότι η βιομάζα των βλαστών αυξήθηκε παρουσία του ενδοφύτου υπό ψυχρή καταπόνηση ενώ ο FsK επηρεάζει την ανάπτυξη των φυτών μέσω της αύξησης του μήκους της ρίζας υπό οξειδωτικό στρες. Προκειμένου να αποκτηθεί μια πληρέστερη εικόνα της σχέσης FsK-*Lotus* ελέγχθηκε και η επίδραση του μύκητα στην ανάπτυξη των φυτών κάτω από συνθήκες έλλειψης σιδήρου. Στη συγκεκριμένη περίπτωση ο FsK εξακολουθεί να είναι ικανός να προάγει την ανάπτυξη των φυτών μέσω του νωπού βάρους των βλαστών και των ριζών και τα φυτά που εμβολιάστηκαν με μύκητα παρουσίασαν συντομότερο χρόνο άνθησης υπό συνθήκες αβιοτικού στρες. Επιπλέον ο ενδοφυτικός μύκητας ενίσχυσε την πρόσληψη μακροθρεπτικών

στοιχείων από τα φυτά (P, K, Ca και Mg) και μικροθρεπτικών συστατικών (Fe, Cu, Zn, Mn, Mo, Co, Ni) χωρίς συνθήκες στρες. Όλα τα παραπάνω αποτελέσματα συμπληρώθηκαν με τη μελέτη του μεταγραφικού προφίλ των εμβολιασμένων με FSK φυτών, στα πρώιμα στάδια της αλληλεπίδρασης. Ένας μεγάλος αριθμός μεταγραφημάτων εντοπίστηκε ως διαφορεικά εκφραζόμενος τόσο από τη πλευρά του φυτού όσο και από τη πλευρά του μύκητα. Γνωρίζοντας λοιπόν ότι ο μύκητας βοηθάει στην πρόληψη θρεπτικών στοιχείων από το φυτό ελέγξαμε για γονίδια του μύκητα που σχετίζονται με το σίδηρο. Τα αποτελέσματα έδειξαν ότι ο μύκητας διαθέτει μία οδό πρόσληψης σιδήρου υψηλής συγγένειας.

Παράλληλα με τη μελέτη της αλληλεπίδρασης του ενδοφυτικού μυκητιακού στελέχους, *Fusarium solani* στέλεχος K, με το φυτό μοντέλο *Lotus japonicus*, υπό συνθήκες αβιοτικού στρες, μελετήσαμε και την δράση τριτερπενίων στην ικανότητα αποικισμού του. Γνωρίζουμε ότι οι δευτερογενείς μεταβολίτες είναι γνωστοί για τη δράση τους σε σημαντικές λειτουργίες του φυτού, όπως είναι η προστασία από βιοτικούς και αβιοτικούς παράγοντες καθώς και η εγκαθίδρυση συμβιωτικών σχέσεων. Τα τριτερπένια αποτελούν τη σημαντικότερη ομάδα αμυντικών μεταβολιτών ενάντια σε μύκητες και παθογόνα. Η διερεύνηση της βιοσύνθεσης των τριτερπενίων και συγκεκριμένα του ρόλου της συνθάσης της β-αμυρίνης, LjAMY2 αποτελεί κομμάτι έρευνας του εργαστηρίου καθώς έχει αποδειχθεί μέχρι σήμερα ότι αποτελεί το μοναδικό ένζυμο που καταλύει την σύνθεση της λουπεόλης και της β-αμυρίνης. Πρόσφατα αποτελέσματα του εργαστηρίου έδειξαν επίσης ότι ο ενδοφυτικός μύκητας αναγνωρίζεται από το φυτό με παρόμοιο τρόπο που αναγνωρίζονται τα ριζοβακτήρια και οι μυκορριζικοί μύκητες και είναι ικανός να επάγει το γνωστό μονοπάτι Common Symbiotic Signaling Pathway (CSSP). Έχοντας αυτά τα δεδομένα, ο επόμενος στόχος του διδακτορικού ήταν να απαντήσει στο ερώτημα αν η ικανότητα αποικισμού του FSK επηρεάζεται από το βιοσυνθετικό μονοπάτι των τριτερπενίων και πως επιδρά στη διαδικασία της φυματογένεσης. Για το σκοπό αυτό χρησιμοποιήθηκαν μεταλλαγμένα φυτά *Lotus japonicus* και συγκεκριμένα μεταλλάγματα των γονιδίων *amy2.188.1* και *cyp71D353 (cyp71-753)*. Ο μύκητας είναι ικανός να αποικίζει τις ρίζες των μεταλλαγμένων φυτών ενώ επίσης παρατηρούμε μία συνεργατική δράση του ριζοβίου με το μύκητα στη διαδικασία της φυματογένεσης μόνο σε φυτά αγρίου τύπου.

Τέλος, όλα τα παραπάνω αποτελέσματα έρχονται να συμπληρώσουν και να επιβεβαιώσουν την ωφέλιμη συμβιωτική σχέση του ενδόφυτου με το ψυχανθές φυτό. Συμπληρωματικά και τα αποτελέσματα της συνεργατικής δράσης και συνύπαρξης με ριζοβακτήρια μας υπενθυμίζουν ότι η μελέτη αυτού του ωφέλιμου ενδοφυτικού μύκητα είναι άξια διερεύνησης.

Abstract

The importance of beneficial microorganisms both in shaping the soil structure and for plant growth has been known for many years. Microorganisms that colonize plant roots either externally or internally appear to play a very important role in plant growth as well as resistance to abiotic and biotic stresses. Plants of the legume family enter into symbiotic relationships with microorganisms (rhizobia, arboreal mycorrhizal fungi), which are mainly mutually beneficial but can also become parasitic. In this particular doctoral thesis, a non-pathogenic endophytic fungus of the genus *Fusarium solani* strain K, also known as FSK, and the legume model plant *Lotus japonicus* will be studied. The ascomycete FSK is an endophyte originally isolated from tomato plant roots, and soon became the subject of study, thanks to its ability to increase plant resistance to both biotic stress, for example from the foliar pathogen *Septoria lycopersici*, and abiotic stress due to lack of water. Recent studies of the plant-fungus interaction at the subcellular level have shown that the establishment of FSK in the tissues of leguminous plants requires a series of changes involving both adaptations to the growth of the fungus and autonomous plant cell responses. Most of these changes have been described for both symbiotic interactions and pathogenicity relationships between plants and microorganisms. We also know that the growth of the fungus inside the plant is neither burdensome nor beneficial, when they grow under normal growth conditions and without the application of any stress. A first question that this PhD thesis set out to answer was whether the plant-fungus interaction is beneficial to the plant in conditions of abiotic stress. The ability of the endophyte to offer resistance to plants growing under conditions of heat, cold and oxidative stress was investigated in the first phase. The endophyte is capable of colonizing the roots of leguminous plants under abiotic stress conditions but to a lesser extent than under normal growth conditions. We also observed that shoot biomass increased in the presence of the endophyte under cold stress while FSK affects plant growth through increasing root length under oxidative stress. In order to gain a more complete picture of the FSK-Lotus relationship, the effect of the fungus on plant growth under iron deficiency conditions was also tested. In this particular case FSK is still able to promote plant growth through shoot and root fresh weight, and plants inoculated with the fungus showed a shorter flowering time under abiotic stress conditions. In addition, the endophytic fungus enhanced the uptake of macronutrients (P, K, Ca and Mg) and micronutrients (Fe, Cu, Zn, Mn, Mo, Co, Ni) by plants without stress conditions. All the above results were complemented by studying the transcriptional profile of FSK-inoculated plants, in the early stages of the interaction. A large number of transcripts were identified as differentially expressed from both the plant and fungal sides. So knowing that the fungus helps prevent nutrients from the plant we checked for iron-related fungal genes. The results showed that the fungus has a high-affinity iron uptake pathway.

Alongside the study of the interaction of the endophytic fungal strain, *Fusarium solani* strain K, with the model plant *Lotus japonicus*, under conditions of abiotic stress, we also studied the effect of triterpenes on its colonization capacity. We know that secondary metabolites are known to act in important plant functions, such as protection against biotic and abiotic agents as well as the establishment of symbiotic relationships. Triterpenes are the most important group of defense metabolites against fungi and pathogens. The investigation of the biosynthesis of triterpenes and specifically the role of β -amyrin synthase, *LjAMY2* is part of the laboratory's research as it has been proven to date that it is the only enzyme that catalyzes the synthesis of lupeol and β -amyrin. Recent laboratory results have also shown that the endophytic fungus is recognized by the plant in a similar way to rhizobacteria and mycorrhizal fungi and is capable of inducing the known Common Symbiotic Signaling Pathway (CSSP). Having these data, the next goal of the PhD was to answer the question of whether the colonization ability of FsK is affected by the triterpene biosynthetic pathway and how it affects the process of nodulation. For this purpose, *Lotus japonicus* mutant plants and specific mutants of the *AMY2.188.1* and *CYP71D353* genes were used. The fungus is able to colonize the roots of the mutant plants while we also observe a cooperative action of the rhizobia with the fungus in the nodulation process only in wild-type plants.

Finally, all the above results come to complement and confirm the beneficial symbiotic relationship of the endophyte with the leguminous plant. Additionally, the results of cooperative action and coexistence with rhizobacteria remind us that the study of this beneficial endophytic fungus is worthy of investigation.

Περιεχόμενα

Ευχαριστίες.....	6
Abstract/ Περίληψη	8
Περίληψη.....	8
Abstract	10
Μέρος Α: Εισαγωγή.....	16
1. Οικογένεια ψυχανθών	16
1.2 Το φυτό μοντέλο <i>Lotus japonicus</i>	17
2. Συμβιωτικές σχέσεις ψυχανθών	19
2.1. Συμβιωτική σχέση ψυχανθών –ριζοβίου	19
2.2 Συμβιωτική σχέση ψυχανθών-μυκορριζικών μυκήτων	21
.....	23
2.3 Ταυτόχρονη συμβίωση ψυχανθών φυτών με μύκητες και ριζόβια (tripartite symbiosis)	23
3. Αλληλεπιδράσεις φυτών και ενδοφυτικών μυκήτων	24
4. Δευτερογενείς μεταβολίτες φυτών.....	26
4.1. Τριτερπένια	27
5. Ταξινόμηση μυκήτων	28
5.1. Το μυκητιακό γένος <i>Fusarium</i>	28
5.2 Ο μύκητας <i>Fusarium solani</i> στέλεχος K (Fs-K)	31
Σκοπός διδακτορικής διατριβής.....	33
Βιβλιογραφία	35
ΚΕΦΑΛΑΙΟ 1	45
Η ΙΚΑΝΟΤΗΤΑ ΤΟΥ ΕΝΔΟΦΥΤΙΚΟΥ ΜΥΚΗΤΑ <i>FUSARIUM SOLANI</i> ΣΤΕΛΕΧΟΣ K (FSK) ΝΑ ΑΠΟΙΚΙΣΕΙ ΜΕΤΑΛΛΑΓΜΑΤΑ <i>Lotus japonicus</i> ΤΟΥ ΒΙΟΣΥΝΘΕΤΙΚΟΥ ΜΟΝΟΠΑΤΙΟΥ ΤΩΝ ΤΡΙΤΕΡΠΕΝΙΩΝ ΥΠΟ ΔΙΑΦΟΡΕΤΙΚΑ ΥΠΟΣΤΡΩΜΑΤΑ	45
Εισαγωγή.....	46
Το <i>AMY2</i> και το <i>CYP71D353</i> αποτελούν μέλη της συστοιχίας γονιδίων που εμπλέκονται στο μεταβολισμό των τριτερπενίων.	46
Μεταλλάγματα φυτών <i>Lotus japonicus</i> , <i>AMY2.188</i> και <i>CYP71-753</i>	48
Υλικά και μέθοδοι	49
Προετοιμασία υποστρώματος και συνθήκες ανάπτυξης φυτών.....	49
Συνθήκες ανάπτυξης του μύκητα Fsk και ο εμβολιασμός των φυτών.....	50
Δειγματοληψία και Απομόνωση γονιδιακού DNA.....	51
Ποσοτικοποίηση του DNA.....	52
Ανίχνευση αποικισμού από τον μύκητα <i>F. solani</i> στις ρίζες του φυτού <i>Lotus japonicus</i> ...	52
Στατιστική ανάλυση	52

Αποτελέσματα	52
Ο FsK είναι ικανός να αποικίζει και τις ρίζες των μεταλλαγμάτων AMY2-188 και CYP71-30063753 φυτών <i>Lotus japonicas</i> χωρίς να επηρεάζει παραμέτρους αύξησης και ανάπτυξης των φυτών σε αποστειρωμένο υπόστρωμα	52
Ο FsK είναι ικανός να αποικίζει τις ρίζες των μεταλλαγμάτων AMY2-188.1 και CYP71-30063753 φυτών <i>Lotus japonicas</i> χωρίς να επηρεάζεται από το διαφορετικό υπόστρωμα ανάπτυξης.	56
Συζήτηση	58
Βιβλιογραφία	60
Παράρτημα.....	71
1. Πειραματική διαδικασία	71
2. Απομόνωση γονιδιωματικού DNA	71
3. Ανάλυση αλληλούχησης της μικροβιακής κοινότητας της ενδόσφαιρας και της ριζόσφαιρας.	72
4. Ανίχνευση αποικισμού από τον μύκητα <i>F. solani</i> στις ρίζες του φυτού <i>Lotus japonicus</i>	72
Κεφάλαιο 2	75
Η ΜΕΛΕΤΗ ΤΟΥ ΑΠΟΙΚΙΣΜΟΥ ΤΟΥ ΕΝΔΟΦΥΤΙΚΟΥ ΜΥΚΗΤΑ <i>FUSARIUM SOLANI</i> ΣΤΕΛΕΧΟΣ Κ (FSK) ΤΑΥΤΟΧΡΟΝΑ ΜΕ ΤΗ ΜΟΛΥΝΣΗ ΜΕ ΤΟ ΡΙΖΟΒΙΟ <i>M. LOTI</i> ΣΤΗ ΔΙΑΔΙΚΑΣΙΑ ΦΥΜΑΤΙΟΓΕΝΕΣΗΣ ΤΟΥ ΨΥΧΑΝΘΕΣ ΦΥΤΟΥ <i>LOTUS JAPONICUS</i> ΚΑΘΩΣ ΚΑΙ ΣΕ ΜΕΤΑΛΛΑΓΜΑΤΑ ΤΟΥ ΒΙΟΣΥΝΘΕΤΙΚΟΥ ΜΟΝΟΠΑΤΙΟΥ ΤΩΝ ΤΡΙΤΕΡΠΕΝΙΩΝ.....	75
Εισαγωγή	76
Υλικά και μέθοδοι	77
Προετοιμασία υποστρώματος και συνθήκες ανάπτυξης φυτών.....	77
Συνθήκες ανάπτυξης του μύκητα FsK και του ριζοβακτηρίου <i>Mesorhizobium loti</i> R7A και ο συν-εμβολιασμός των φυτών	78
Δειγματοληψία και Απομόνωση γονιδιακού DNA.....	78
Ανίχνευση των επιπέδων αποικισμού από τον μύκητα <i>F. solani</i> στις ρίζες του φυτού <i>Lotus japonicus</i>	78
Στατιστική ανάλυση	78
Αποτελέσματα	79
Ο ενδοφυτικός μύκητας είναι ικανός να αποικίζει το ριζικό σύστημα των φυτών αγρίου τύπου και τα μεταλλάγματα AMY2 και CYP71 παρουσία του ριζοβίου.....	79
Ο ενδοφυτικός μύκητας δεν επηρεάζει τις φυσιολογικές παραμέτρους αύξησης και ανάπτυξης των φυτών αγρίου τύπου ενώ δρα συνεργατικά με το ριζόβιο στη διαδικασία της φυματιογένεσης.....	79
Ο ενδοφυτικός μύκητας δεν δρα συνεργατικά με το ριζόβιο στα μεταλλάγματα των φυτών AMY2 και CYP71 στη διαδικασία της φυματιογένεσης.	81
Συζήτηση	84
Βιβλιογραφία	88

Μέρος Β. Επίδραση του αποικισμού του <i>Fs-K</i> στο ψυχανθές φυτό <i>Lotus japonicus</i> κάτω από συνθήκες αβιοτικού στρες.	99
1. Εισαγωγή	99
1.1. Μηχανισμοί-στρατηγικές αντιμετώπισης αβιοτικών καταπονήσεων στα φυτά.....	99
ΚΕΦΑΛΑΙΟ 3	100
ΕΠΙΔΡΑΣΗ ΑΒΙΟΤΙΚΩΝ ΚΑΤΑΠΟΝΗΣΕΩΝ (ΘΕΡΜΙΚΗ ΚΑΙ ΟΞΕΙΔΩΤΙΚΗ ΚΑΤΑΠΟΝΗΣΗ) ΣΤΗΝ ΑΛΛΗΛΕΠΙΔΡΑΣΗ ΤΟΥ ΕΝΔΟΦΥΤΙΚΟΥ ΜΥΚΗΤΑ <i>FsK</i> ΜΕ ΤΟ <i>LOTUS JAPONICUS</i>	100
Εισαγωγή	101
Υλικά και Μέθοδοι	103
Επίδραση του θρεπτικού μέσου και της θερμοκρασίας στην ανάπτυξη του μυκηλίου του <i>FsK</i>	103
Συνθήκες ανάπτυξης των φυτών και καταστάσεις καταπονήσεων	104
Συνθήκες ανάπτυξης του μύκητα <i>FsK</i> και ο εμβολιασμός των φυτών	105
Δειγματοληψία και Απομόνωση γονιδιωματικού DNA	105
Ανίχνευση αποικισμού από τον μύκητα <i>F. solani</i> στις ρίζες του φυτού <i>Lotus japonicus</i>	105
Προσδιορισμός των μορφολογικών χαρακτηριστικών των φυτών	106
Στατιστική ανάλυση	106
Αποτελέσματα	106
Επίδραση της θερμοκρασίας και διαφορετικών θρεπτικών μέσων στην ανάπτυξη και αύξηση του μυκηλίου του <i>FsK</i>	106
Επίδραση διαφορετικών θρεπτικών μέσων στην ικανότητα αποικισμού του <i>FsK</i> στις ρίζες των φυτών <i>Lotus japonicus</i> υπό φυσιολογικές συνθήκες	108
Επίδραση διαφορετικών θρεπτικών μέσων στην ικανότητα αποικισμού του <i>FsK</i> στις ρίζες των φυτών <i>Lotus japonicus</i> υπό συνθήκες θερμικής καταπόνησης.....	109
Επίδραση διαφορετικής συγκέντρωσης ζιζανιοκτόνου Diquat στην ικανότητα αποικισμού <i>FsK</i> στις ρίζες των φυτών <i>Lotus japonicus</i> (υπό οξειδωτική καταπόνηση)	112
.....	113
Συζήτηση	113
Ο αποικισμός των φυτών <i>Lotus japonicus</i> από το ενδόφυτο <i>FsK</i> μειώνεται υπό συνθήκες θερμικής καταπόνησης και οξειδωτικού στρες	114
Επίδραση των αβιοτικών καταπονήσεων και του αποικισμού των φυτών από το <i>Fusarium solani</i> στελέχους K στην ανάπτυξη των φυτών	115
Συμπεράσματα	116
Βιβλιογραφία	117
Παράρτημα.....	128
ΚΕΦΑΛΑΙΟ 4	130
ΕΝΑ ΜΥΚΗΤΙΑΚΟ ΕΝΔΟΦΥΤΟ ΑΥΞΑΝΕΙ ΤΗΝ ΑΝΘΕΚΤΙΚΟΤΗΤΑ ΤΩΝ ΦΥΤΩΝ ΣΕ ΑΝΕΠΑΡΚΕΙΕΣ ΘΡΕΠΤΙΚΩΝ ΣΥΣΤΑΤΙΚΩΝ: ΠΕΡΙΠΤΩΣΗ ΠΡΟΣΛΗΨΗ ΣΙΔΗΡΟΥ ΣΤΑ ΟΣΠΡΙΑ	130

Εισαγωγή	131
Υλικά και μέθοδοι	132
Προετοιμασία κατάλληλων συνθηκών ανάπτυξης φυτών	132
Συνθήκες ανάπτυξης του μύκητα FsK και ο εμβολιασμός των φυτών	133
Διαδικασία Δειγματοληψίας και Απομόνωση γονιδιωματικού DNA	133
Ανίχνευση αποικισμού από τον μύκητα <i>F. solani</i> στις ρίζες του φυτού <i>Lotus japonicus</i> ..	133
Απομόνωση RNA για ανάλυση γονιδιακής έκφρασης.....	133
Επιλογή γονιδίων του μύκητα FsK μέσω ανάλυσης αποτελεσμάτων RNAseq.....	134
Ποσοτικοποίηση των μεταλλικών ιχνοστοιχείων του φυτού	135
Προσδιορισμός του pH του μέσου ανάπτυξης των φυτών	135
Στατιστική ανάλυση	135
Αποτελέσματα	135
Ο ενδοφυτικός μύκητας βελτιώνει την ανάπτυξη των φυτών υπό συνθήκες περιορισμένου σιδήρου και αυξάνει την περιεκτικότητα σε θρεπτικά συστατικά.	135
Ο μύκητας επηρεάζει τον μηχανισμό πρόσληψης σιδήρου σε μεταγραφικό επίπεδο. ..	139
Το στέλεχος <i>Fusarium solani</i> K διαθέτει μια οδό πρόσληψης σιδήρου υψηλής συγγένειας.	141
Συζήτηση	142
Ο αποικισμός του <i>L. japonicus</i> από το ενδόφυτο οδηγεί σε αυξημένη φυτική βιομάζα, πρόσληψη μακρο- και μικροθρεπτικών συστατικών και σε πρώιμο χρόνο ανθοφορίας.	143
Η έκφραση των γονιδίων πρόσληψης σιδήρου μεταβάλλεται από το ενδόφυτο	144
Τα γονίδια που σχετίζονται με το αιθυλένιο ενισχύονται από το ενδόφυτο.....	145
Το στέλεχος <i>Fusarium solani</i> K (FsK) χρησιμοποιεί μια οδό πρόσληψης σιδήρου υψηλής συγγένειας.....	146
Συμπεράσματα	147
Βιβλιογραφία	148
Παράρτημα.....	158
Γενικό συμπέρασμα	167

Μέρος Α: Εισαγωγή

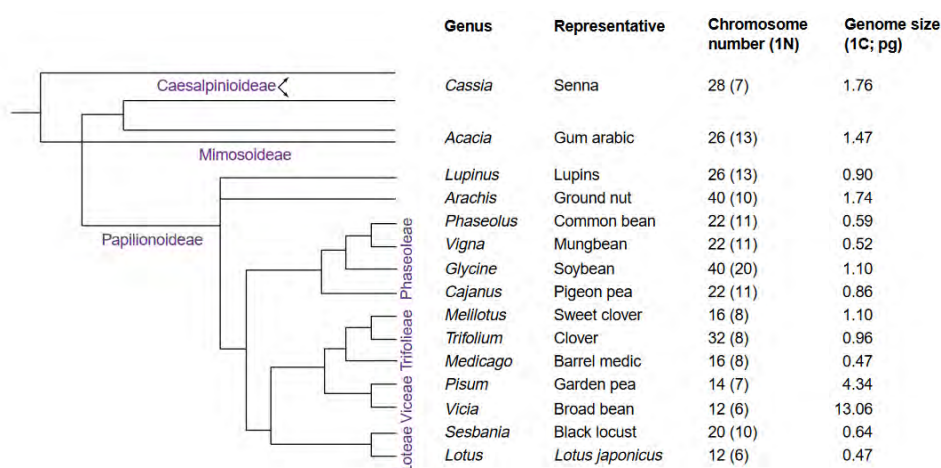
1. Οικογένεια ψυχανθών

Τα ψυχανθή φυτά (*Fabaceae* ή *Leguminosae*) είναι μια μεγάλη οικογένεια και οικονομικά σημαντική. Η ονομασία *Fabaceae* προέρχεται από το εκλιπόν γένος *Faba*, που τώρα περιλαμβάνεται στο γένος *Vicia*. Η ονομασία *Leguminosae* είναι μια παλαιότερη αλλά ακόμη έγκυρη ονομασία και αναφέρεται στον τυπικό καρπό αυτών των φυτών που αποκαλείται *legume* (όσπριο) ¹. Τα όσπρια χωρίζονται σε 3 υποοικογένειες: *Papilionoideae*, *Caesalpinioideae* και *Mimosoideae*. Πρόσφατα αποτελέσματα όμως δείχνουν ότι η οικογένεια *Caesalpinioideae* είναι στην πραγματικότητα παραφυλετική, όπως φαίνεται και στην εικόνα 1 ².

Τα ψυχανθή είναι δεύτερα σε καλλιέργεια μετά τη σιτηρά φυτά και με ποικιλία χρήσεων. Καλλιεργούνται για παραγωγή ξηρού χόρτου (σανός), σπόρου για την κτηνοτροφία και σπόρου για ανθρώπινη κατανάλωση (όσπρια). Τα όσπρια παρέχουν περίπου το ένα τρίτο όλων των διατροφικών πρωτεϊνών και το ένα τρίτο επεξεργασμένου φυτικού ελαίου για ανθρώπινη κατανάλωση ¹. Τα σπουδαιότερα ψυχανθή που καλλιεργούνται είναι η μηδική (*Medicago sativa*), ο βίκος και τα τριφύλλια, ενώ τα πιο σημαντικά ψυχανθή που καλλιεργούνται για το σπόρο τους, που χρησιμοποιούνται στη συνέχεια από την κτηνοτροφία, είναι τα μπιζέλια (*Pisum sativum*), τα κτηνοτροφικά κουκιά, τα λούπινα και η σόγια (*Glycine max*), σπόροι με υψηλή περιεκτικότητα σε πρωτεΐνες. Τέλος τα ψυχανθή που καλλιεργούνται για ανθρώπινη κατανάλωση, είναι τα όσπρια και πιο συγκεκριμένα τα φασόλια (*Phaseolus vulgaris*), ρεβίθια (*Cicer arietinum*), φακές (*Lens culinaris* Med), κουκιά, λαθούρι και μπιζέλια (*Pisum sativum*) ³.

Μια πολύ σπουδαία λειτουργία των ψυχανθών είναι η ικανότητά τους να δεσμεύουν άζωτο από την ατμόσφαιρα και να το διοχετεύουν στο έδαφος, ώστε να εμπλουτίζεται το έδαφος με το σημαντικό αυτό θρεπτικό συστατικό για την ανάπτυξη των φυτών. Τα φυτά δεν μπορούν να δεσμεύσουν απευθείας το άζωτο της ατμόσφαιρας καθώς το 80% του ατμοσφαιρικού αζώτου βρίσκεται σε μορφή διατομικού μορίου (N₂). Η φύση λύνει το πρόβλημα αυτό με μικροβιακή δέσμευσή του αέριου αζώτου της ατμόσφαιρας, το οποίο ανάγεται αρχικά σε αμμωνιακό άζωτο ¹. Οι μικροοργανισμοί αυτοί αλληλεπιδρούν και συμβιώνουν με τους φυτικούς ιστούς της ρίζας χωρίς να βλάπτουν τα φυτά αλλά και χωρίς να υφίστανται ζημιά από αυτά. Παράλληλα, η συμβίωση αυτή αποβαίνει σε αμοιβαίο όφελος, αφού τα μεν φυτά προσπορίζονται από τους μικροοργανισμούς άζωτο σε αφομοιώσιμη μορφή, το οποίο είναι αναγκαίο για την θρέψη τους, και οι δε μικροοργανισμοί λαμβάνουν από τα φυτά σάκχαρα που προέρχονται από την φωτοσύνθεση, τα οποία τους είναι

αναγκαία ως πηγές ενέργειας. Η αζωτοδέσμευση των ψυχανθών συμβάλλει αποφασιστικά στον κύκλο του αζώτου στη φύση και στη διατήρηση της παραγωγικότητας των λιβαδικών οικοσυστημάτων σε υψηλά επίπεδα, ιδιαίτερα σε φτωχά και εδάφη ³. Οι έρευνες έχουν επικεντρωθεί όλα αυτά τα χρόνια για την συλλογή πληροφοριών στα δύο φυτά-μοντέλα των ψυχανθών, το *Medicago truncatula* και το *Lotus japonicus*, καθώς και στο φυτό σόγιας λόγω της μεγάλης οικονομικής σημασίας του.



Εικόνα 1 :Σχηματική απεικόνιση του φυλογενετικού δέντρου των ψυχανθών. Στην εικόνα εμφανίζονται οι 3 κύριες υποοικογένειες των ψυχανθών, καθώς και εκτιμήσεις του αριθμού των χρωμοσωμάτων και του μεγέθους του γονιδιώματος που προέρχονται από τη βάση δεδομένων Angiosperm C-value Database (<http://www.rbqkew.org.uk/cval/homepage.html>, Release 1.0) ¹³⁹.

1.2 Το φυτό μοντέλο *Lotus japonicus*

Ένα από τα κύρια φυτά μοντέλα των ψυχανθών είναι το *Lotus japonicus*. Το φυτό αυτό προέρχεται από την Ανατολική Ασία και τα διάφορα είδη είναι κατανεμημένα στα Ιαπωνικά νησιά, στην Κορεάτικη χερσόνησο, στα ανατολικά και κεντρικά τμήματα της Κίνας καθώς υπάρχουν αναφορές και στη βόρεια Ινδία, το Πακιστάν και το Αφγανιστάν. Δύο είναι οι οικότυποι του που έχουν επιλεγεί για τις ερευνητικές μελέτες του φυτού μοντέλου, ο οικότυπος Gifu και ο οικότυπος Miyakojima (MG-20). Αποτελεί αγγειόσπερμο δικοτυλήδονο φυτό που ανήκει στην υποοικογένεια ψυχανθών *Papilionoideae* των *Fabaceae*. Είναι διπλοειδές ψυχανθές με μικρό μέγεθος γονιδιώματος (~ 450MB) που αποτελείται από 6 χρωμοσώματα και έχει απλή δομή. Επιπλέον, έχει μικρό ανάστημα, παράγει μεγάλους αριθμούς σπόρων ανά λοβό (εικ. 2B,2D), έχει σύντομο χρονικό διάστημα γενιάς (~ 2-3 μήνες), είναι αυτογονιμοποιούμενο (εικ. 2A) ⁴. Οι ιδανικές συνθήκες καλλιέργειας του φυτού είναι 18-22°C και υγρασία στο 70%. Ένα εξίσου σημαντικό πλεονέκτημα του φυτού είναι η ικανότητα του να συμβιώνει τόσο με ριζόβια όσο και με μυκορριζικούς μύκητες ⁵. Κατά τη μόλυνση με ριζόβιο, η δημιουργία των φυματίων είναι ταχεία καθώς

σχηματίζονται περίπου 7 με 10 ημέρες μετά την μόλυνση (εικ. 2C, 2E) και φτάνουν στο στάδιο των ώριμων φυματίων 21 ημέρες μετά την μόλυνση.

Ολόκληρο το γονιδίωμα του φυτού *Lotus japonicus* έχει αλληλουχηθεί, (Sato et al., 2008). Το 2016 για πρώτη φορά οι Mun et al., 2016 παρουσιάζουν τη διαδικτυακή βάση δεδομένων 'Lotus base', η οποία διαθέτει τις 2 τελευταίες εκδοχές του γονιδιώματος του φυτού *Lotus japonicus* v 2.5 και v 3.0. Και οι δύο εκδοχές περιλαμβάνουν και τα 6 χρωμοσώματα και ένα τεχνητό χρωμόσωμα 0 που περιέχει μη «συναρμολογούμενα» contigs¹.



Εικόνα 2: Διάφορα στάδια ανάπτυξης του φυτού *Lotus japonicus*. Η εικόνα απεικονίζει (α) ένα ώριμο άνθος, (β) έναν ώριμο καρπός που περιέχει μέσα περίπου 10 σπόρια του φυτού, (γ) είναι ένα ώριμο φυμάτιο 21 ημέρες μετά την μόλυνση με το ριζόβιο *Rhizobium loti* strain QJ101, (δ) ολόκληρο το φυτό στο στάδιο της άνθισης (ε) φυτό με ώριμα φυμάτια 3 εβδομάδες μετά την μόλυνση με ριζόβιο. Τα δικαιώματα της εικόνας ανήκουν στους⁵.

¹ Contigs: συνέχεια ακολουθίας DNA όπως προκύπτει από τη συμφωνία των επί μέρους αναγνωσμάτων αλληλούχησης ενός γενετικού τύπου.

2. Συμβιωτικές σχέσεις ψυχανθών

2.1. Συμβιωτική σχέση ψυχανθών –ριζοβίου

Τα ψυχανθή αποτελούν το κλειδί για την γεωργία καθώς εξασφαλίζουν άζωτο για το φυτό όταν συνάπτουν συμβιωτική σχέση με βακτήρια που ονομάζονται ριζόβια και παρέχουν στο έδαφος και στις καλλιέργειες μια ελεύθερη και ανανεώσιμη πηγή αζώτου. Μερικά από τα γένη των ριζοβίων είναι *Rhizobium*, *Bradyrhizobium*, *Sinorhizobium*, *Mesorhizobium* και *Azorhizobium*. Η συμβιωτική σχέση των ψυχανθών με τα ριζόβια είναι μία από τις πιο καλά μελετημένες αλληλεπιδράσεις.

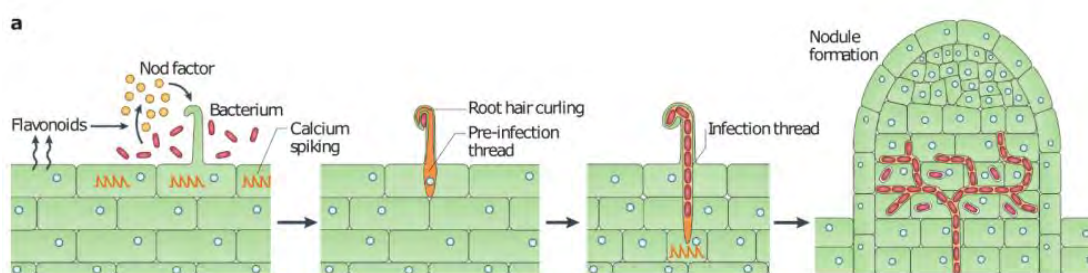
Τα βακτήρια είναι αρνητικά κατά Gram ραβδόμορφα βακτήρια με ικανότητα αυτοτελούς κίνησης. Η μόλυνση της ρίζας του ψυχανθούς με το κατάλληλο γένος ριζοβίου θα οδηγήσει στο σχηματισμό ριζικών φυματίων, τα οποία έχουν την ικανότητα να δεσμεύουν ατμοσφαιρικό άζωτο και να το μετατρέπουν σε αφομοιώσιμη για το φυτό μορφή με μία διαδικασία που ονομάζεται αζωτοδέσμευση⁸.

Η διαδικασία της φυματιογένεσης και της αζωτοδέσμευσης είναι και οι δύο εξαρτώμενες από το φυτό ξενιστή τους. Αν και τα ριζόβια παράγουν αμμωνία, δεν μπορούν να τη χρησιμοποιήσουν για την ανάπτυξη τους, καθώς το ένζυμο της συνθετάσης της γλουταμίνης που αποτελεί το κύριο ένζυμο για την αφομοίωση της αμμωνίας, είναι αδρανοποιημένο. Επίσης τα ριζόβια διαθέτουν στα χρωμοσώματά τους ή στα πλασμίδια μια σειρά γονιδίων τα οποία είναι σημαντικά για την ενδοσυμβίωση. Τα γονίδια αυτά είναι: γονίδια φυματιοποίησης (*nodulation genes*, *nod*) που κωδικοποιούν για τους παράγοντες Nod (Nod-factors, NFs), γονίδια *nif* που κωδικοποιούν πρωτεΐνες σημαντικές για την αζωτοδέσμευση και γονίδια *fix* που κωδικοποιούν πρωτεΐνες ειδικές για τα ριζόβια που χρησιμοποιούνται στην αζωτοδέσμευση. Οι Nod factors είναι λιποχιτοολιγοσακχαρίτες (Lipo-chitoooligosaccharides-LCOs), οι οποίοι παράγονται και απελευθερώνονται από τα ριζόβια, αναγνωρίζονται από τα ριζικά τριχίδια του φυτού και επάγουν έναν πολύπλοκο καταρράκτη αντιδράσεων ως απόκριση των φυτών στην παρουσία ριζοβίων. Συνεπώς, η συμβίωση και αλληλεπίδραση μεταξύ ριζοβίων-φυτού ξενιστή αποτελεί μία χημική επικοινωνία με τα πρωταρχικά μηνύματα να συνιστούν τα φλαβονοειδή από τη ρίζα του φυτού και οι παράγοντες Nod των ριζοβίων⁹.

Για τον σχηματισμό των φυματίων απαιτούνται τα εξής βήματα⁹ (εικ. 3):

- i. Το φυτό και το βακτήριο πρέπει να παρουσιάζουν έναν υψηλό βαθμό αμοιβαίας εξειδίκευσης ώστε να επιτευχθεί μία συμβιωτική σχέση, η οποία ρυθμίζεται από την ανταλλαγή χημικών σιγνάλων.

- ii. Τα φυτικά σήματα, που εξέρχονται από τη ρίζα και είναι φλαβονοειδή, ενεργοποιούν την έκφραση των *nod* γονιδίων των ριζοβίων και το αποτέλεσμα είναι η έκκριση των παραγόντων Nod.
- iii. Σχηματισμός και διείσδυση του νήματος μόλυνσης στο εσωτερικό του ριζικού τριχιδίου και προς το κύριον σώμα της ρίζας.
- iv. Σχηματισμός βακτηροειδών μέσα στα φυτικά κύτταρα και ανάπτυξη της αζωτοδεσμευτικής ικανότητας.
- v. Συνεχείς διαιρέσεις τόσο των φυτικών όσο και των βακτηριακών κυττάρων και τελική ανάπτυξη ώριμων ριζικών φυματίων.



Εικόνα 3 Τα κύρια στάδια αποικισμού του ριζοβίου και σχηματισμού του φυματίου ⁹

Στα ριζικά τριχίδια του φυτού-ξενιστή υπάρχουν μεμβρανικοί υποδοχείς, οι οποίοι είναι πρωτεϊνικά ετερομερή κινασών σερίνης/θρεονίνης και είναι απαραίτητοι για την πρόσδεση των παραγόντων Nod. Αυτοί οι υποδοχείς περιέχουν πρωτεϊνικές LysM-επικράτειες πρόσδεσης σακχάρων στην εξωκυττάρια περιοχή τους και ο ρόλος τους είναι να αναγνωρίζουν συγκεκριμένους *nod* factors και έτσι εξηγείται το γεγονός ότι ένα μικρό εύρος ριζοβίων μπορεί να εποικήσει σε ένα συγκεκριμένο ψυχανθές-ξενιστή. Η αναγνώριση αυτή προκαλεί τη μεταγωγή σήματος μέσω της περιοδικής μεταβολής του κυτταροπλασματικού ασβεστίου στα επιδερμικά κύτταρα των ριζών. Η αύξηση της συγκέντρωσης Ca^{2+} επάγει την ενεργοποίηση της κινάσης CCaMK. Η CCaMK αλληλοεπιδρά με πλήθος μεταγραφικών παραγόντων που επάγουν την έκφραση γονιδίων που σχετίζονται με τη φυματιογένεση. Εν κατακλείδι, η σύνδεση των παραγόντων *nod* στους υποδοχείς της πλασματικής μεμβράνης των ριζικών τριχιδίων θα επιφέρει αλλαγές στην έκφραση των γονιδίων του πυρήνα και ακολουθεί μια διαδικασία που αποκαλείται και ως «διαδρομή της συμβίωσης».

Μέχρι σήμερα, έχει γίνει περιγραφή για δύο τύπους φυματίων (*nodules*) με βάση τον τρόπο ανάπτυξης τους. Ο πρώτος τύπος ονομάζεται “σαφής” ή “καθορισμένος” (*determinate*) και ο δεύτερος τύπος “ασαφής” ή “ακαθόριστος” (*indeterminate*). Η πλειονότητα των ψυχανθών παρουσιάζει “*indeterminate*” *nodules*. Ειδικότερα, όλα τα γένη που απαντώνται στις υπο-οικογένειες *Caesalpinioideae*, *Mimosoideae* καθώς και στις περισσότερες φυλές (*tribes*) εντός της υπο-οικογενείας *Papilionoideae* εμφανίζουν “*indeterminate*” *nodules*. Από την άλλη το φυτό μοντέλο *Lotus japonicus* παρουσιάζει

“determinate”. Η βασική διαφορά μεταξύ των δυο τύπων φυματίων είναι ότι στα “indeterminate” διατηρείται ενεργός ο μεριστωματικός ιστός γεγονός που τους επιτρέπει να παράγουν συνεχώς νέα κύτταρα καθ’ όλη την διάρκεια της ζωής των φυματίων σε αντίθεση με τα “determinate” που ο μεριστωματικός ιστός καθίσταται ανενεργός. Ως εκ τούτου τα “indeterminate” nodules έχουν ως επί το πλείστον κυλινδρικό σχήμα για αυτό καλούνται και ως *κυλινδρικά ή μεριστωματικά* φυμάτια ενώ τα “determinate” nodules έχουν κυκλικό σχήμα και για αυτό ονομάζονται και ως *σφαιρικά* φυμάτια. Σε σπάνιες περιπτώσεις, ορισμένα ψυχανθή είναι ικανά να παράγουν και τα δυο είδη φυματίων. Ωστόσο, και τα δύο είδη φυματίων αποτελούνται στην κορυφή τους από μικρά κύτταρα που δεν έχουν μολυνθεί από βακτήρια, στο ενδιάμεσο βρίσκονται ώριμα κύτταρα προβεβλημένα και μη ενώ στη βάση τους είναι τα γηραιότερα κύτταρα μέσα στα όποια είναι εγκλωβισμένα τα βακτηριοειδή.

Οι περισσότερες ερευνητικές μελέτες έχουν εστιάσει στην αρχική φάση της αλληλεπίδρασης φυτού–βακτηρίου, που περιλαμβάνει τη μορφογένεση του φυματίου και την έναρξη της αζωτοδέσμευσης. Η φάση γήρανσης του φυματίου, η οποία πραγματοποιείται μετά το «γέμισμα» των καρπών των ετήσιων ψυχανθών, δεν είναι επαρκώς κατανοητή αν και είναι καθοριστική για την εξέλιξη της συμβίωσης ¹⁰.

2.2 Συμβιωτική σχέση ψυχανθών-μυκορριζικών μυκήτων

Ο όρος μυκόρριζα, υποδηλώνει το κοινό όργανο που δημιουργείται από την συμβίωση ρίζας-μύκητα και χρησιμοποιείται για να περιγράψει την μη παθογόνο συμβιωτική σχέση που αναπτύσσεται ανάμεσα σε ένα φυτό και ένα μύκητα.

Στη σχέση αμοιβαιότητας, ο μύκητας έχει άμεση πρόσβαση στα οργανικά οξέα του φυτού, στους υδατάνθρακες όπως η γλυκόζη και η σουκρόζη που είναι προϊόντα φωτοσύνθεσης καθώς και σε άλλες ουσίες που παράγονται κατά την διαδικασία της φωτοσύνθεσης και εκκρίνονται από τα ριζίδια του φυτού αλλά και σε αυξητικούς παράγοντες όπως οι βιταμίνες. Οι ουσίες αυτές μετακινούνται μέσα στο φυτό από τα φύλλα όπου παράγονται, προς το ριζικό σύστημα και μέσω αυτού καταλήγουν στον μύκητα ¹¹.

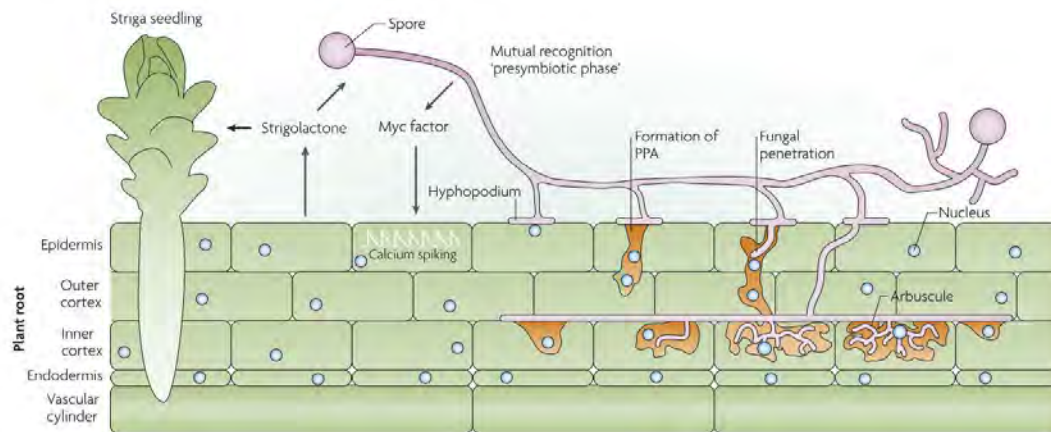
Από την άλλη ο μύκητας παρέχει στα φυτά-ξενιστές ανόργανα συστατικά όπως φώσφορο, άζωτο καθώς και πιο πολύπλοκες οργανικές ενώσεις που συνθέτει ο ίδιος (φυτορμόνες) ¹¹. Σε ανταπόδοση, το φυτό εκμεταλλεύεται το μυκήλιο του μύκητα καθώς αυξάνει την ενεργό επιφάνεια του ριζικού συστήματός του αλλά και την αποτελεσματικότερη πρόσληψη θρεπτικών στοιχείων και νερού ¹².

Η ανάπτυξη της συμβιωτικής σχέσης του μυκορριζικού μύκητα και της ρίζας του φυτού χαρακτηρίζεται από 3 διακριτά στάδια: την προσυμβιωτική επικοινωνία της

ρίζας και του μύκητα, στη συνέχεια την επαφή και τέλος την διείσδυση του μύκητα μέσω της επιδερμίδας της ρίζας στο φλοιό και τέλος σχηματίζονται δενδρόμορφες δομές (arbuscules), κύστες και σπόρια (εικ.4) ¹².

Πιο αναλυτικά η διαδικασία μόλυνσης των φυτών από του μυκορριζικούς μύκητες είναι η εξής:

- i. Στην προσυμβιωτική φάση τόσο το φυτό όσο και ο μύκητας ανταλλάσσουν χημικά μηνύματα ώστε να επιτευχθεί η συμβιωτική σχέση τους. Τα φυτά απελευθερώνουν στο έδαφος στριγκολακτόνες (SLs) και από την άλλη ο μύκητας απελευθεώνει παράγοντες Myc (Myc factors), οι οποίοι περιλαμβάνουν λιποολιγосακχαρίτες (LCOs) και χιτοολιγосακχαρίτες μικρών αλυσίδων. Οι SLs που απελευθερώνονται ενεργοποιούν το μεταβολισμό του μυκορριζικού μύκητα και ενεργοποιούν τις διακλαδώσεις της μυκητιακής υφής. Με τον τρόπο αυτό αυξάνεται η επιφάνεια του μύκητα και άρα η πιθανότητα να συναντήσει το φυτό-ξενιστή του. Παράλληλα, οι ολιγосακχαρίτες του μύκητα προσδένονται σε διαμεμβρανικούς υποδοχείς των επιδερμικών κυττάρων της ριζόσφαιρας και επάγουν την έναρξη σηματοδοτικών μονοπατιών ώστε να επιτραπεί η είσοδος του μύκητα στη ρίζα εκκινώντας τη συμβιωτική αλληλεπίδραση τους ⁹.
- ii. Κατά τη διαδικασία διείσδυσης του μύκητα πραγματοποιείται δημιουργία νέων δομών, ανακατανομή φυτικών ενδοκυτταρικών οργανιδίων και εμφάνιση ειδικών μεταφορέων που εξυπηρετούν στη μεταφορά θρεπτικών συστατικών και νερού. Ο μύκητας μετά την είσοδο στη ρίζα και τη διείσδυση του στο φλοιό σχηματίζει τις δενδρόμορφες δομές (arbuscule) και κύστες ¹¹.



Εικόνα 4: Τα κύρια στάδια ανάπτυξης του μυκορριζικού μύκητα στη ρίζα του φυτού ¹¹.

2.3 Ταυτόχρονη συμβίωση ψυχανθών φυτών με μύκητες και ριζόβια (tripartite symbiosis)

Η αλληλεπίδραση των φυτών με τους ωφέλιμους μικροοργανισμούς του εδάφους όπως με τα αζωτοδεσμευτικά βακτήρια του γένους *Rhizobium* και με τους ενδομυκορριζικούς μύκητες είναι γνωστή περισσότερο από έναν αιώνα. Όλα αυτά τα χρόνια έχουν γίνει πολλά πειράματα έτσι ώστε να γνωρίζουμε πλέον πολλούς από τους μηχανισμούς που σχετίζονται με την αλληλεπίδραση των φυτών με τους διάφορους μικροοργανισμούς.

Από την άλλη όμως όλη αυτή η γνώση βασίζεται σε μελέτες που έχουν γίνει σε μεμονωμένα ζευγάρια φυτών-ξενιστών, δηλαδή σε φυτά που συμβιώνουν με ένα συγκεκριμένο μικροοργανισμό δηλαδή εξετάζουν μεμονωμένα είτε τις σχέσεις των ψυχανθών φυτών με αζωτοδεσμευτικά βακτήρια, είτε τις σχέσεις που δημιουργούν τα φυτά με δενδρόμορφους μυκορριζικούς μύκητες. Αυτή όμως η προσέγγιση είναι περιοριστική καθώς τα φυτά στην φύση αλληλοεπιδρούν ταυτόχρονα με περισσότερους από έναν μικροοργανισμό. Αυτό έχει ως αποτέλεσμα οι μικροοργανισμοί να αλληλοεπιδρούν τόσο με το φυτό-ξενιστή όσο και με τους υπόλοιπους μικροοργανισμούς που έχουν συνάψει συμβιωτική σχέση με το ίδιο το φυτό-ξενιστή και να προκαλούν θετικές ή αρνητικές επιπτώσεις τόσο στο ίδιο το φυτό, όσο και στους υπόλοιπους μικροοργανισμούς που υπάρχουν στην ριζόσφαιρα ¹³.

Τα ψυχανθή φυτά έχουν την ικανότητα να συμβιώσουν ταυτόχρονα με ριζόβια και ενδομυκορριζικούς μύκητες ώστε να βελτιώσουν την θρέψη τους σε άζωτο και φώσφορο και να ενισχύσουν την ανάπτυξη τους. Μελέτες έχουν δείξει ότι όταν

συνυπάρχουν στο ίδιο φυτό-ξενιστή οι δύο μικροοργανισμοί, επηρεάζει το ένα το άλλο αλλά με διαφορετικό ίσως τρόπο και οι επιδράσεις που θα έχουν, εξαρτώνται από το φυτικό είδος, τους μικροσυμβιώτες και τις συνθήκες ανάπτυξης ¹⁴.

Για παράδειγμα, η ταυτόχρονη συμβίωση του ριζοβίου και του μυκορριζικού μύκητα στο ψυχανθές φυτό *Amorpha canescens* έχουν συνεργαστικά οφέλη στο φυτό αυξάνοντας την βιομάζα της ρίζας κατά 280% ¹⁵. Από την άλλη παρατηρήθηκε ότι τα ριζόβια και οι μυκορριζικοί μύκητες επηρέασαν το ένα το άλλο με διαφορετικό τρόπο. Πιο συγκεκριμένα ο εμβολιασμός με μυκόρριζα αύξησε τον αριθμό και τον όγκο (mass) των φυματίων που σχηματίστηκαν, ενώ ο εμβολιασμός με ριζόβια μείωσε το ποσοστό αποικισμού των μυκήτων στις ρίζες των φυτών ¹⁵.

3. Αλληλεπιδράσεις φυτών και ενδοφυτικών μυκήτων

Τα φυτά αλληλοεπιδρούν με τους μικροοργανισμούς που βρίσκονται τόσο στη ριζόσφαιρα όσο και στη φυλλόσφαιρα τους και άρα βρίσκονται εξωτερικά των ιστών αυτών, όμως είναι ικανά να αλληλοεπιδρούν και με αυτούς που βρίσκονται εσωτερικά δηλαδή στην ενδόσφαιρα. Έτσι οι μικροοργανισμοί διακρίνονται σε 3 κατηγορίες: αυτοί που διαβιούν ελεύθερα στη περιοχή της ριζόσφαιρας και ονοζάνται ριζοσφαιρικοί (rhizospheric), αυτοί που είναι προσδεδεδμένοι στη επιφάνεια των φυτών και ονομάζονται επιφαιτικοί (epiphytes) και τέλος εκείνοι που διαβιούν στο εσωτερικό των φυτικών ιστών και ονομάζονται ενδοφυτικοί (endophytes). Οι ενδοφυτικοί διαβιούν ένα κομμάτι ή ολόκληρο το βιολογικό τους κύκλο ενδοκυτταρικά ή/και μεταξύ των κυττάρων σχηματίζοντας αποικίες σε υγιείς φυτικούς ιστούς ^{16,17}. Ο ενδοφυτισμός (endophytism) είναι το φαινόμενο αμοιβαίας σχέσης ενός φυτού με τον μικροοργανισμό που ζει στο εσωτερικό του χωρίς να προκαλεί συμπτώματα ασθένειας ¹⁸.

Όσον αφορά τους ενδοφυτικούς μύκητες, κατηγοριοποιούνται στις εξής ομάδες ¹⁹:

1. Ενδοφυτικοί μύκητες τάξης I (ή Clavicipitaceous endophytes), οι οποίοι αποικίζουν σε ορισμένα αγρωστώδη φυτά. Οι πιο μελετημένοι ενδοφυτικοί μύκητες αυτής της τάξης είναι τα ενδόφυτα αγρωστωδών του γένους *Neotyphodium* (Clavicipitaceae), οι οποίοι σχηματίζουν στενή σχέση με τα φυτά-ξενιστές τους.
2. Ενδοφυτικοί μύκητες τάξης II, III, IV (ή Non-clavicipitaceous endophytes). Εδώ ανήκει η πλειοψηφία των ενδοφυτικών μυκήτων και είναι ικανοί να αποικίσουν σε όλα τα φυτικά είδη. Είναι μύκητες με υψηλή ποικιλομορφία και οι οποίοι διακρίνονται τουλάχιστον σε τρεις διακριτές λειτουργικές ομάδες με βάση τον τρόπο αποικισμού, τον τρόπο μετάδοσης, την οικολογική τους σημασία και τα χαρακτηριστικά της ιστορίας της εξέλιξής τους. Στην τάξη II ανήκουν οι μύκητες που αποικίζουν τη ριζόσφαιρα, τη φυλλόσφαιρα, την

ενδόσφαιρα και μεταδίδονται οριζόντια ή/ και κάθετα. Στην τάξη III ανήκουν οι μύκητες που ανήκουν στα φύλα *Ascomycota* και *Basidiomycota* και βρίσκονται κυρίως στους εναέριους φυτικούς ιστούς. Μεταδίδονται με οριζόντιο τρόπο. Στην τάξη IV ανήκουν οι σκουρόχρωμοι ενδοφυτικοί μύκητες που έχουν σέπτα στις υφές και περιορίζονται στα κύτταρα του φλοιού της ρίζας. Μεταδίδονται με οριζόντιο τρόπο.

Τα οφέλη των ενδοφυτικών μυκήτων είναι πλέον γνωστά και τεκμηριωμένα. Οι μύκητες προσφέρουν προστασία των φυτών έναντι βιοτικών και αβιοτικών παραγόντων. Επίσης έχειδειχθεί ότι προστατεύουν τα φυτά και έναντι παθογόνων.

Ένα παράδειγμα καλά μελετημένου ωφέλιμου ενδοφυτικού μύκητα είναι η *Piriformospora indica* (*Serendipita indica*). Ανήκει στους Βασιδιομύκητες και μπορεί να καλλιεργηθεί σε ποικίλα υποστρώματα, γεγονός που του προσδίδει το πλεονέκτημα για την περαιτέρω μελέτη των θετικών αλληλεπιδράσεων του με τα φυτά. Ο μύκητας αυτός μπορεί να αναπτυχθεί σε αμιγείς καλλιέργειες και φέρει παρόμοια λειτουργικά και φυσιολογικά χαρακτηριστικά με τους μύκητες που αναπτύσσονται οι δενδροειδείς μυκόρριζες με τα φυτά, όπως είναι η μεταφορά θρεπτικών στοιχείων και νερού μέσω των υφών στις ρίζες των φυτών²⁰. Ο μύκητας αυτός είναι ικανός να επάγει την ανάπτυξη τόσο σε μονοκοτυλήδονα όσο και σε δικοτυλήδονα φυτά. Συγκεκριμένα ο εμβολιασμός φυτών μεγάλης καλλιέργειας, όπως ο καπνός και το καλαμπόκι, με το μύκητα προκάλεσε αύξηση της βιομάζας τους κατά 50%. Η ωφέλιμη αυτή δράση του μύκητα οφείλεται στην ικανότητα του να διαλυτοποιεί και να μεταφέρει φωσφορικά ιόντα²⁰. Ο μύκητας προσδίδει στα φυτά αντοχή έναντι στο βιοτικό και αβιοτικό στρες: έχει αναφερθεί ότι προσδίδει στα φυτά κριθαριού αντοχή στο ήπιο στρες με αλάτι και αντοχή έναντι του μύκητα της ρίζας *Fusarium culmorum* και του μύκητα των φύλλων *Blumeria graminis*²¹. Η ικανότητα του να προσφέρει ανοχή υπό συνθήκες καταπόνησης με αλάτι έχειδειχθεί ότι σχετίζεται με σημαντική αύξηση της ποσότητας του ασκορβικού οξέος και της δραστηριότητας των αντιοξειδωτικών ενζύμων στις ρίζες του κριθαριού²². Μία έρευνα που πραγματοποιήθηκε πάνω σε δύο φαρμακευτικά φυτά, το *Spilanthes calva* και το *Withania somnifera*, ενισχύει περαιτέρω τη φήμη του μύκητα καθώς παρουσία του είχε παρατηρηθεί αυξημένη ανάπτυξη της ολικής βιομάζας, αυξημένος αριθμός ανθοταξιών και σπερμάτων και βελτιωμένη αντοχή σε συνθήκες ξηρασίας²³. Επιπλέον, στο φαρμακευτικό φυτό *Coleus forskohlii* έχειδειχθεί ότι ο μύκητας προκαλεί πρόωρη ανθοφορία και αύξηση της βιομάζας του υπέργειου τμήματος και²⁴. Επιπροσθέτως έχειδειχθεί ότι ο μύκητας είναι ικανός να αλληλεπιδρά και με φυτά που δεν αναπτύσσουν μυκορριζικές σχέσεις όπως το *Arabidopsis thaliana*, και να προάγει την ανάπτυξη τους²⁵.

Ένα άλλο παράδειγμα ωφέλιμου ενδοφυτικού μύκητα είναι το *Colletotrichum tofieldiae* (Ct). Αν και τα περισσότερα χαρακτηρισμένα είδη των μυκήτων του γένους *Colletotrichum* είναι παθογόνα, έχειδειχθεί ότι το *C. tofieldiae* (Ct) είναι ένα ενδημικό

ενδόφυτο των πληθυσμών του *Arabidopsis thaliana*. Ενώ το Ct είχε αρχικά απομονωθεί ως ένα ενδόφυτο από τα φύλλα του *A. Thaliana*, στη συνέχεια αποκαλύφθηκε ότι είναι ένα ενδόφυτο των ριζών. Ο μύκητας είναι ικανός να προάγει την ανάπτυξη των φυτών όμως αποδείχθηκε ότι αυτή η ικανότητα του εξαρτάται στενά από τη διαθεσιμότητα Pi, υποδηλώνοντάς με αυτό τον τρόπο ότι οι ευεργετικές δράσεις του ρυθμίζονται από συγκεκριμένες περιβαλλοντικές συνθήκες, όπως η ποσότητα βιοδιαθέσιμων φωσφορικών στο έδαφος. Αυτό έρχεται σε αντίθεση με το ενδόφυτο *Piriformospora indica*, το οποίο προάγει την ανάπτυξη των φυτών υπό συνθήκες τόσο χαμηλής όσο και υψηλής συγκέντρωσης φωσφορικών υπό συνθήκες έλλειψης φωσφόρου ²⁶.

4. Δευτερογενείς μεταβολίτες φυτών

Τα φυτά παράγουν χημικές ενώσεις οι οποίες διακρίνονται σε πρωτογενείς και σε δευτερογενείς μεταβολίτες. Στο παρελθόν είχε διαμορφωθεί η λανθασμένη αντίληψη ότι οι δευτερογενείς μεταβολίτες αποτελούν απόβλητα ή παραπροϊόντα του πρωτογενούς μεταβολισμού. Πλέον έχει επιβεβαιωθεί ότι η παραγωγή των δευτερογενών μεταβολιτών συνδέεται άμεσα με την ύπαρξη και τη λειτουργία θεμελιωδών αμυντικών μηχανισμών που είναι αναγκαίοι για την επιβίωση των φυτικών ειδών. Συνδέεται επίσης με την εγκαθίδρυση συμβιωτικών σχέσεων, την επικοινωνία και τον ανταγωνισμό με άλλα είδη. Έτσι επιβεβαιώνεται και ο οικολογικός ρόλος των δευτερογενών μεταβολιτών (Pagare et al., 2015).

Υπάρχει μεγάλη ποικιλομορφία δευτερογενών μεταβολιτών, ωστόσο όλοι προέρχονται από έναν περιορισμένο αριθμό βασικών δομών. Οι μεταβολίτες αυτοί προέρχονται από ενδιάμεσες ενώσεις του πρωτογενούς μεταβολισμού όπως ακετυλοσυνένζυμο-Α, ορισμένα αμινοξέα κ.ά. ²⁷. Οι δευτερογενείς μεταβολίτες Μπορούν να διακριθούν σε τρεις κατηγορίες ανάλογα τη χημική δομή τους: τα τερπενοειδή, οι φαινολικές ενώσεις και οι αζωτούχες ενώσεις. Επίσης οι δευτερογενείς μεταβολίτες διακρίνονται και σε ιδιοσυστατους, που περιλαμβάνει αυτούς με σταθερή παρουσία στο φυτό ή με σύνθεση σε συγκεκριμένο αναπτυξιακό στάδιο και σε επαγωγίσιμους, στους οποίους περιλαμβάνονται αυτοί των οποίων η σύνθεση πραγματοποιείται μόνο με την επίδραση κάποιου βιοτικού ή αβιοτικού παράγοντα.

Στο φυτό *L. jaronicus* έχουν ταυτοποιηθεί αρκετοί δευτερογενείς μεταβολίτες σε πειράματα ανάλυσης μεταβολικού προφίλ. Μερικοί από τους δευτερογενείς μεταβολίτες του φυτού είναι η κουερσετίνη, το p-κουμαρικό οξύ, το p-φερουλικό οξύ, το κινναμικό οξύ καθώς και ταννίνες και φλαβόνες. Επίσης, έχουν χαρακτηριστεί και κάποια τριτερπένια όπως το ουρσολικό, το βετουλινικό και ολεανολικό οξύ, οι σογιασαπογενόλες και η λουπεόλη ^{28,29}.

4.1. Τριτερπένια

Τα τερπενοειδή ή ισοπρενοειδή αποτελούν τη μεγαλύτερη κατηγορία μεταβολιτών που προέρχονται από τους φυτικούς οργανισμούς. Οι τερπενικές ενώσεις καθίστανται πλέον η πολυπληθέστερη ομάδα φυσικών προϊόντων (περίπου 50.000 ενώσεις). Κάποια από αυτά θεωρούνται προϊόντα του πρωτογενούς μεταβολισμού όπως οι στερόλες. Στα φυτά αποτελούν το πρόδρομο υποστρώματα για την παραγωγή φυτο-ορμονών (όπως οι γιββερελλίνες), ενώσεων που συμμετέχουν στην αλυσίδα μεταφορά ηλεκτρονίων (όπως η ουβικινόνη και η πλαστοκινόνη) και φωτοσυνθετικών χρωστικών (όπως η φυτόλη και τα καροτενοειδή). Παράλληλα, άλλα τερπενοειδή θεωρείται ότι ανήκουν στον δευτερογενή μεταβολισμό, και αυτό διότι είτε δεν συμμετέχουν στις διαδικασίες αύξησης, ανάπτυξης ή παραγωγής ενέργειας, είτε ο ρόλος τους δεν έχει διευκρινιστεί ακόμα. Τα τερπενοειδή χρησιμοποιούνται για τις χαρακτηριστικές γεύσεις και αρωματικές τους ιδιότητες (μυρωδιά ευκάλυπτου, γεύση κανέλας, γαρύφαλλου, τζίντζερ) αλλά και για τις φαρμακευτικές τους λειτουργίες (αντινεοπλασματικά, αντιβακτηριακά) ³⁰.

Όλα τα τερπενοειδή προκύπτουν ως πολυμερή του ισοπρενίου (2-μέθυλο-1,3-βουταδιένιο), ενώ στον τελικό ανθρακικό σκελετό τους μπορεί να προστεθούν διάφορες λειτουργικές ομάδες ή σάκχαρα. Τα τερπένια χωρίζονται σε διάφορες υποκατηγορίες. Μια από αυτές είναι τα τριτερπένια, (ο σκελετός τους αποτελείται από 30 άτομα C) και προκύπτει από το βιοσυνθετικό μονοπάτι του μεβαλονικού οξέως που εντοπίζεται στο κυτοσόλιο και στο υπεροξύσωμα μέσω της συμπύκνωσης δυο μορίων διφωσφορικού φαρνεσιλίου (FPP) σε σκουαλένιο, το οποίο με δράση εποξειδάσης μετατρέπεται σε 2,3-οξειδοσκουαλένιο (2,3-oxidosqualene). Αυτό το μόριο αποτελεί σημείο διακλάδωσης του πρωτογενούς και του δευτερογενούς μεταβολισμού, καθώς μπορεί να κυκλοποιηθεί προς ενώσεις είτε με στερολικό σκελετό είτε σε τριτερπένια με τη δράση ενζύμων της οικογένειας των κυκλασών του οξειδοσκουαλενίου (OSC). Τα ένζυμα αυτά καταλύουν την κυκλοποίηση του 2,3-οξειδοσκουαλενίου σταθεροποιώντας ενδιάμεσες δομές καρβοκατιόντων για να σχηματισθεί μέχρι και εξακυκλικός ανθρακικός σκελετός ³¹.

Ο ρόλος των τριτερπενίων φαίνεται να είναι κυρίως η φυτοπροστασία, αφού εκδηλώνουν ισχυρές αντιμικροβιακές ιδιότητες (Paradourou et al, 1999). Η δράση τους αυτή εκδηλώνεται κυρίως από τις γλυκοζυλιωμένες τους μορφές, τις σαπωνίνες που αποκαλούνται έτσι λόγω της ιδιότητας απορρυπαντικού που αποκτούν με αυτή την τροποποίηση. Ωστόσο έχειδειχθεί ότι μερικά τριτερπένια μπορεί να συμμετέχουν σε διαδικασίες της ανάπτυξης και αύξησης ακόμη και στη μη-γλυκοζυλιωμένη μορφή τους που ονομάζονται αγλυκόνες ³².

Στα απλά τριτερπένια ανήκουν η λουπεόλη, η α-αμυρίνη και η β-αμυρίνη. Η συνθάση της λουπεόλης κυκλοποιεί το 2,3-οξειδοσκουαλένιο με αποτέλεσμα το σχηματισμό του λουπυλ-κατιόντος, προωθεί την επέκταση του δακτυλίου και αποσπά ένα πρωτόνιο για να σχηματιστεί η λουπεόλη. Από την άλλη οι συνθάσες της β-αμυρίνης, παράγουν επίσης το κατιόν της λουπεόλης και επιτρέπουν σε μεγαλύτερο βαθμό την επέκταση του δακτυλίου (σχηματισμός ολεανυλ-κατιόντος και ορισμένες αναδιαμορφώσεις, πριν την αποπρωτονίωση προς σχηματισμό β-αμυρίνης³³

Στο *Lotus japonicus*, έχουν εντοπιστεί δύο γονίδια που κωδικοποιούν για συνθάσες της β-αμυρίνης στο χρωμόσωμα 3: Το γονίδιο *LjAMY1* που κωδικοποιεί για μία συνθάση της β-αμυρίνης και το γονίδιο *LjAMY2* που κωδικοποιεί μία συνθάση μικτής δράσης. Οι δραστηριότητες αυτών των ενζύμων έχουν διαπιστωθεί με υπερέκφρασή τους σε ζύμες²⁹. Στο *L. Japonicus* το γονίδιο *OSC3* που κωδικοποιεί τη συνθάση της λουπεόλης, έχει εντοπιστεί στο χρωμόσωμα 2. Εκφράζεται κυρίως στις ρίζες και στα φυμάτια του φυτού³⁴.

5. Ταξινόμηση μυκήτων

5.1. Το μυκητιακό γένος *Fusarium*

Το γένος *Fusarium* ανήκει στο φύλο *Ascomycota* (Sordariomycetes: Hypocreales: Nectriaceae). Οι ασκομύκητες μπορούν να αναπαραχθούν είτε αγενώς είτε εγγενώς. Κυριότερη αναπαραγωγική μονάδα είναι το σπόριο που παράγεται σε ειδικά όργανα, τα σποριάγγεια, και κατά την αγενή αναπαραγωγή (αγενή σπόρια) και κατά την εγγενή (εγγενή σπόρια). Στην εγγενή αναπαραγωγή, τα σπόρια αναπτύσσονται μέσα σε αναπαραγωγικές δομές, τους ασκούς. Όσον αφορά την αγενή αναπαραγωγή, είναι πολύ συχνή στους ασκομύκητες και λαμβάνει χώρα μέσω των κονιδίων, δηλαδή σπορίων που αποκόπτονται μέσω διαφραγμάτων στα άκρα των υφών. Τα κονίδια επιτρέπουν το γρήγορο αποικισμό μίας καινούριας πηγής και ενδέχεται να είναι πολυπύρρηνα σε ορισμένες περιπτώσεις.

Παλιότερα, πριν αποκαλυφθεί ο πλειομορφισμός και η μεγάλη ποικιλία των ειδών των μυκήτων, υπήρχαν περισσότερα από 1.000 είδη του γένους *Fusarium* βάση των παρατηρήσεων των ερευνητών. Στη συνέχεια παρουσιάστηκε η ανάγκη για ένα ακριβές και αξιόπιστο σύστημα ταξινόμησης των μυκήτων λόγω της παρατήρησης ότι τα είδη του γένους *Fusarium* είναι υπεύθυνα για σοβαρές ασθένειες τόσο στα φυτά όσο και στον άνθρωπο και τα ζώα³⁵. Κριτήρια για την ταξινόμηση των μυκήτων αποτελούν τα μορφολογικά χαρακτηριστικά και η φυλογενετική εξέλιξη τους. Έτσι το βασίλειο των μυκήτων έχει δύο διαιρέσεις, τους Γυμνομύκητες (Μυξομύκητες) και τους Ευμύκητες. Στους Μυξομύκητες ανήκουν οι οργανισμοί που δεν έχουν κυτταρικά τοιχώματα και εξετάζονται μαζί με τους μύκητες. Σχηματίζουν είτε

πλασμώδιο (μάζα γυμνού πολυπύρηνου πρωτοπλάσματος το οποίο κινείται αμοιβαδοειδώς) είτε ψευδοπλασμώδιο (ένα είδος αθροίσματος ξεχωριστών αμοιβαδοειδών κυττάρων). Το όνομά τους οφείλεται στην ιξώδη τους σύσταση. Από την άλλη, οι Ευμύκητες φέρουν όλοι κυτταρικά τοιχώματα. Διακρίνουμε πέντε υποδιαίρεσεις:

1. Μαστιγομύκητες: Περιλαμβάνει μύκητες των οποίων το μυκήλιο είναι κοινοκυττικό ενώ τα αγενή σπόρια φέρουν μαστίγιο και κινούνται αυτόνομα (ζωοσπόρια). Όταν υπάρχει εγγενής αναπαραγωγή, σχηματίζεται ένα ζυγωτό κύτταρο το οποίο συνήθως εξελίσσεται είτε σε ληθαργικό κύτταρο είτε σε σποριάγγειο. Η ομάδα αυτή θεωρείται πρόδρομη των υπολοίπων κατηγοριών.
2. Ζυγομύκητες: Το μυκήλιο των ζυγομυκήτων είναι κοινοκυττικό με πολλούς απλοειδείς πυρήνες. Τα αγενή σπόρια τα οποία διασπείρονται με τον αέρα, αναπτύσσονται σε σποριάγγεια που σχηματίζονται στα άκρα των εναέριων υφών. Ο εγγενής πολλαπλασιασμός γίνεται με τον σχηματισμό ζυγοσπορίων τα οποία περιβάλλονται από παχύ κυτταρικό τοίχωμα και μένουν σε λήθαργο όσο το περιβάλλον δεν είναι ευνοϊκό για την ανάπτυξη του μύκητα.
3. Ασκομύκητες: Οι υφές των ασκομυκήτων διαχωρίζονται με septa. Ο αγενής τους πολλαπλασιασμός γίνεται συνήθως με την παραγωγή κονιδιοσπορίων (ή κονιδίων) τα οποία σχηματίζονται πάνω σε εξειδικευμένες υφές που λέγονται κονιδιοφόροι. Ο εγγενής πολλαπλασιασμός γίνεται με τον σχηματισμό ασκών οι οποίοι περιέχουν δύο ή περισσότερα ασκοσπόρια.
4. Βασιδιομύκητες: Οι βασιδιομύκητες είναι συνήθως σαπροφυτικοί και αποικοδομούν φυτικά υπολείμματα κυρίως κυτταρίνη και λιγνίνη. Ο βιολογικός κύκλος των βασιδιομυκήτων ξεκινά με την βλάστηση ενός βασιδιοσπορίου το οποίο οδηγεί στον σχηματισμό μονοκάρυου μυκήλιου (έναν πυρήνα σε κάθε κύτταρο). Όταν κάποια υφή από το μυκήλιο αυτό συναντήσει μια άλλη υφή αντίθετου συζευκτικού τύπου γίνεται σύντηξη υφών και σχηματίζεται ένα νέο δικάρυο μυκήλιο. Το δικάρυο μυκήλιο περιέχει δύο πυρήνες σε κάθε κύτταρο: έναν από κάθε πρωταρχική υφή. Καθώς αναπτύσσεται το δικάρυο μυκήλιο σχηματίζει τα βασιδιοκάρπια με τα βασίδια. Οι δυο πυρήνες στην άκρη του βασίδιου συντήκονται και δίνουν έναν διπλοειδή ο οποίος υφίσταται στην συνέχεια μείωση και σχηματίζονται τέσσερις απλοειδείς πυρήνες που εξελίσσονται σε βασιδιοσπόρια. Μερικά εξελιγμένα είδη βασιδιομυκήτων έχουν χάσει την ικανότητά τους να αναπαράγονται με αγενή σπόρια. Στους υπόλοιπους ο αγενής πολλαπλασιασμός πραγματοποιείται με κονίδια, αρθροσπόρια κ.α

5. Δευτερομύκητες (ή Ατελείς Μύκητες): Εδώ κατατάσσονται οι μύκητες οι οποίοι στερούνται εγγενούς αναπαραγωγής (τέλειο στάδιο) ή το στάδιο αυτό δεν έχει παρατηρηθεί. Μόλις γίνει γνωστό το στάδιο αυτό μεταφέρονται στην κατάλληλη διαίρεση.

Το γένος *Fusarium* θεωρείται ως ένα από τα σημαντικότερα φυτοπαθογόνα γένη μυκήτων, διότι προκαλεί σοβαρές καταστρεπτικές ασθένειες, όπως αδρομυκώσεις, σηψιρριζίες, σήψεις της βάσεως και του στελέχους τήξεις σπορείων αλλά και εναέριες προσβολές ανθέων όπως στα σιτηρά. Επιπλέον, το γένος αυτό θεωρείται υπεύθυνο για αρκετές ασθένειες που προσβάλλουν τόσο ανθρώπους όσο και ζώα εξαιτίας της κατανάλωσης μολυσμένων τροφών από αυτούς τους μύκητες. Η μόλυνση των τροφών οφείλεται στις μυκοτοξίνες που παράγουν οι μύκητες σε προϊόντα διατροφής που καταναλώνονται ³⁶. Είναι ευρύτατα διαδεδομένοι παγκοσμίως. Το σημαντικότερο είδος είναι το *Fusarium oxysporum* το οποίο προκαλεί κυρίως αδρομυκώσεις και χαρακτηρίζεται από την παρουσία εξειδικευμένων φυλών παθογένειας ³⁷.

Όσον αφορά τη μορφολογία των μυκήτων αυτών, τα διάφορα είδη *Fusarium* παράγουν τρία είδη σπορίων: τα μακροκονίδια, τα μικροκονίδια και τα χλαμυδοσπόρια (εικ.5) ³⁸. Τα μακροκονίδια μπορούν να διαφέρουν σε σχήματα και μεγέθη. Παράγονται σε μια εξειδικευμένη δομή, που ονομάζεται σποροδόχια στα οποία η μάζα του σπόρου στηρίζεται από μια επιφανειακή μάζα από μονοφιαλίδια. Είναι πιθανόν να παράγονται και σε πολυφιαλίδια εκτός από μονοφιαλίδια στα εναέρια μυκήλια. Από την άλλη, τα μικροκονίδια εντοπίζονται ως ψευδείς κεφαλές ή αλυσίδες σε μονοφιαλίδια ή πολυφιαλίδια. Παράγονται στα εναέρια μυκήλια και ποικίλουν σε σχήματα και μεγέθη, ενώ οι αλυσίδες έχουν κυρτή βάση. Τέλος, τα χλαμυδοσπόρια διαθέτουν λιπιδικό υλικό στο εσωτερικό τους το οποίο περικλείεται από ένα παχύ τοίχωμα. Το τοίχωμα αυτό προστατεύει τους μύκητες από τις χαμηλές θερμοκρασίες του χειμώνα σε περιπτώσεις που δεν υπάρχει κάποιος ξενιστής. Παρατηρούνται σε τέσσερις μορφές, μεμονωμένα, σε ζεύγη, ως άμορφες μάζες ή ως αλυσίδες ³⁸.



Εικόνα 5: Τα μορφολογικά χαρακτηριστικά του *Fusarium oxysporum*. Στην εικόνα (α) παρατηρούνται τα μικροκονίδια, στη (b) τα μακροκονίδια και στη (c) χλαμυδοσπόριο. Η εικόνα είναι από ³⁸

5.2 Ο μύκητας *Fusarium solani* στέλεχος K (Fs-K)

Ο μύκητας *Fusarium solani* ανήκει στο Βασίλειο: μύκητες, διαίρεση: *Eumycota* υποδιαίρεση: *Deuteromycotina*, κλάση: *Hypomycetes*, τάξη: *Tuberculariales*, οικογένεια: *Tuberculariaceae*, γένος: *Fusarium*, είδος: *solani*. Το *Fusarium solani* έχει ένα ευρύ φάσμα ξενιστών στα φυτά. Οι κυριότεροι είναι η πατάτα, ο αρακάς, τα φασόλια και μέλη της οικογένειας των κολοκυθοειδών όπως πεπόνι, αγγούρι και κολοκύθα.

Αν και το γένος *Fusarium* αποτελείται κυρίως από παθογόνους μύκητες, ένα μη παθογόνο στέλεχος έχει απομονωθεί από τη ρίζα του φυτού τομάτας (*Solanum lycopersicum*)³⁹. Το στέλεχος αυτό απομονώθηκε από ένα κατασταλτικό κομπόστ παθογόνων από υπολείμματα στέμφυλων και παραπροϊόντων ελαιουργίας. Είναι ικανό να προσφέρει προστατευτική δράση έναντι του φυτοπαθογόνου μύκητα του φυλλώματος *Septoria lycopersici* και έναντι της προσβολής από το μύκητα σήψης *Fusarium oxysporum* f.sp. *radicis-lycopersici* (FORL)³⁹. Ενδεχομένως, το στέλεχος *Fs-K* να ανταγωνίζεται το παθογόνο FORL διεκδικώντας το ίδιο διαθέσιμο υπόστρωμα. Ίσως πάλι να ασκεί επίδραση στη βιωσιμότητα του παθογόνου και την ικανότητα βλάστησης των σπορίων του εξαιτίας της σύνθεσης μυκητοκτόνων ενώσεων. Βιβλιογραφικά έχουν αναφερθεί και άλλα στελέχη *Fusarium solani* τα οποία είχαν προστατευτική δράση έναντι σε ένα από τα δύο αυτά παθογόνα αλλά κανένα δεν προστάτευε και από τα δυο όπως το στέλεχος *Fs-K*. Επιπρόσθετα, ο μύκητας εμφανίζει προστατευτική δράση και έναντι του ακάρεος *Tetranychus urticae*⁴⁰ και του φυτοφάγου αρπακτικού εντόμου *Nesidiocoris tenuis* στην ντομάτα⁴¹, τέλος έχει την ικανότητα να προστατεύει τα φυτά τομάτας και από αβιοτικές καταπονήσεις όπως η ξηρασία⁴².

Επίσης, το συγκεκριμένο στέλεχος χαρακτηρίζεται από ενδοφυτική ανάπτυξη και μάλιστα στο αγωγό σύστημα των φυτών. Μπορεί να απομονωθεί από όλα τα υπόγεια μέρη του φυτού αλλά όχι από τα υπέργεια όπου δεν αναπτύσσεται καθόλου. Έχει την ικανότητα άσκησης προστατευτικής δράσης ακόμα και σε αναλογία 1/1000 σε σχέση με τους παθογόνους οργανισμούς. Αυτή η δραστηριότητα οφείλεται σε κάποιο βαθμό σε εξωκυτταρικές ενώσεις που παράγει ο μύκητας και εμποδίζουν την αύξηση των παθογόνων. Ο μηχανισμός μέσω του οποίου ασκείται η προστατευτική δράση του *Fs-K* σχετίζεται με το αιθυλένιο καθώς μεταλλαγμένες ντοματιές με ελλειμματικό σηματοδοτικό μονοπάτι αιθυλενίου δεν ήταν ανθεκτικά στα παθογόνα παρουσία του *FsK* ενώ τα WT (wild type) είχαν αυξημένη ανθεκτικότητα σε σχέση με αυτά που δεν προστέθηκε μύκητας. Από την άλλη ο μηχανισμός δράσης του μύκητα δεν σχετίζεται με το γιασμονικό οξύ καθώς μεταλλάγματα για τη σηματοδότηση γιασμονικού προστατεύονταν επαρκώς. Επίσης, τα μεταλλάγματα για το γιασμονικό προστατεύονταν καλύτερα απ' ό,τι τα WT, γεγονός που υποδηλώνει πως το γιασμονικό έχει ανασταλτικό ρόλο στην ανάπτυξη του *F. solani* *Fs-K*. Αξίζει να

σημειωθεί πως σε αντίθεση με άλλους φυτοπροστατευτικούς μικροοργανισμούς, το στέλεχος *Fs-K* δεν φαίνεται να προκαλεί την παραμικρή ζημιά στο φυτό-ξενιστή ³⁹.

Ο μύκητας *Fs-K* είναι ικανός να διεισδύει στις ρίζες του φυτού και να αναπτύσσεται στο φλοιό της ρίζας 15 ημέρες μετά τον εμβολιασμό του όπως και να εισχωρεί στους ηθμαγγειώδεις σωλήνες διαβιώντας ως ενδόφυτο. Η ικανότητα αποικισμού των ηθμαγγειωδών σωλήνων ωστόσο, είναι κάτι που χαρακτηρίζει τους μύκητες που αποτελούν παθογόνα των ριζών και για το λόγο αυτό, δυνατότητα ενός ωφέλιμου στελέχους να αναπτύσσεται άφθονα και χωρίς να προκαλεί συμπτώματα ασθένειας στο φυτό δηλώνει μια ασυνήθιστη αλληλεπίδραση μεταξύ μικροβίου και φυτού.

Ο *Fs-K*, εκτός από το φυτό τομάτας, έχει την ικανότητα να αποικίζει και τη ρίζα του ψυχανθές φυτού *Lotus japonicus*, χωρίς να προκαλεί κάποιο σύμπτωμα ⁴³. Σε αντίθεση με τα φυτά τομάτας, ο *Fs-K* είναι ικανός να μετακινηθεί από τη ρίζα στο υπέργειο μέρος του φυτού, τον βλαστό. Σε επόμενη μελέτη του *Fs-K*, μελετήθηκε ο τρόπος με τον οποίο εισέρχεται στο φυτό. Η Skiada, 2020 παρατήρησε ότι ο μύκητας αυτός είναι εξαρτώμενος από το ίδιο σηματοδοτικό μονοπάτι με τα ριζόβια και τις μυκόρριζες ώστε να καταφέρει να αποικίσει το φυτό.

Το επόμενο όμως ερώτημα είναι αν ο *Fs-K* είναι ικανός να προσφέρει και προστασία στο φυτό *Lotus japonicus* κάτω από συνθήκες στρες. Αυτός είναι και ο πρώτος στόχος αυτού του διδακτορικού.

Σκοπός διδακτορικής διατριβής

Η παρούσα διδακτορική διατριβή βασίζεται στην αλληλεπίδραση και συμβίωση του ενδοφυτικού μύκητα *Fusarium solani* στέλεχος K (FsK) με το φυτό μοντέλο *Lotus japonicus*. Ο ασκομύκητας FsK είναι ένα ενδόφυτο που αρχικά απομονώθηκε από ρίζες φυτών ντομάτας, και σύντομα αποτέλεσε αντικείμενο μελέτης, χάρις την ικανότητά του να αυξάνει την αντίσταση των φυτών έναντι τόσο σε βιοτικές όσο και σε αβιοτικές καταπονήσεις. Στη παρούσα διδακτορική διατριβή χρησιμοποιήσαμε το φυτό μοντέλο των ψυχανθών *Lotus japonicus*. Είναι γνωστά τα πλεονεκτήματα του φυτού αυτού, συγκεκριμένα είναι ένα καλά χαρακτηρισμένο φυτό μοντέλο με μικρό διπλοειδές γονιδίωμα, μικρό κύκλο ζωής και το σημαντικότερο ότι διαθέτουμε ένα σύστημα γενετικής τροποποίησης. Το φυτό αυτό όμως διαθέτει δύο ιδιότητες πάνω στις οποίες βασιστήκαμε σε αυτή τη διδακτορική διατριβή. Πρώτον, είναι ικανό να αλληλεπιδρά με ριζόβια και μυκόρριζες. Δεύτερον, έχουν ταυτοποιηθεί απλά τριτερπένια με ρόλο σε βιοτικές και αβιοτικές καταστάσεις καθώς και σε διαδικασίες όπως η φυματογένεση.

Το πρώτο όμως που έπρεπε να απαντηθεί είναι αν ο μύκητας είναι ικανός να αποικίζει τα φυτά αυτά. Πρόσφατες μελέτες της αλληλεπίδρασης φυτού-μύκητα σε υποκυτταρικό επίπεδο έδειξαν ότι η εγκαθίδρυση του FsK στους ιστούς των ψυχανθών φυτών, απαιτεί μια σειρά αλλαγών που αφορούν τόσο προσαρμογές στην ανάπτυξη του μύκητα αλλά και αυτόνομες αποκρίσεις των φυτικών κυττάρων. Οι περισσότερες από αυτές τις αλλαγές έχουν περιγραφεί τόσο για συμβιωτικές αλληλεπιδράσεις όσο και για σχέσεις παθογένειας μεταξύ φυτών και μικροοργανισμών. Επίσης γνωρίζουμε ότι η ανάπτυξη του μύκητα εντός του φυτού δεν προκαλεί συμπτώματα ασθένειας υπό φυσιολογικές συνθήκες ανάπτυξης και χωρίς εφαρμογή κάποιας καταπόνησης. Είναι επίσης γνωστό ότι τα ριζόβια και οι μυκόρριζες χρησιμοποιούν το Κοινό Σηματοδοτικό Μονοπάτι Συμβίωσης (CSSP) με σκοπό την εγκαθίδρυση τους. Σε πειράματα που πραγματοποιήθηκαν αποδείχθηκε ότι και ο FsK χρησιμοποιεί το CSSP και είναι ικανός να επάγει ταλαντώσεις ασβεστίου στον πυρήνα.

Είναι ευρέως γνωστό ότι οι δευτερογενείς μεταβολίτες είναι γνωστοί για τη δράση τους σε σημαντικές λειτουργίες του φυτού, όπως είναι η προστασία από βιοτικούς και αβιοτικούς παράγοντες καθώς και η εγκαθίδρυση συμβιωτικών σχέσεων. Τα τριτερπένια αποτελούν τη σημαντικότερη ομάδα αμυντικών μεταβολιτών ενάντια σε μύκητες και παθογόνα. Η διερεύνηση της βιοσύνθεσης των τριτερπενίων και συγκεκριμένα του ρόλου της συνθάσης της β-αμυρίνης, *LjAMY2* αποτελεί κομμάτι έρευνας του εργαστηρίου καθώς έχει αποδειχθεί μέχρι σήμερα ότι αποτελεί το μοναδικό ένζυμο που καταλύει την σύνθεση της λουπεόλης και της β-αμυρίνης. Όπως αναφέραμε παραπάνω ο ενδοφυτικός μύκητας αναγνωρίζεται από το φυτό με παρόμοιο τρόπο που αναγνωρίζονται τα ριζοβακτήρια και οι μυκόρριζικοί μύκητες

και είναι ικανός να επάγει το γνωστό μονοπάτι Common Symbiotic Signaling Pathway (CSSP). Έχοντας αυτά τα δεδομένα, ο στόχος του διδακτορικού ήταν να απαντήσει στο ερώτημα αν η ικανότητα αποικισμού του FSK επηρεάζεται από το βιοσυνθετικό μονοπάτι των τριτερπενίων και πως επιδρά στη διαδικασία της φυματιογένεσης. Για το σκοπό αυτό χρησιμοποιήθηκαν μεταλλαγμένα φυτά *Lotus japonicus* και συγκεκριμένα μεταλλάγματα των γονιδίων *amy2* και *cyp71*.

Ένα επόμενο ερώτημα που τέθηκε στη παρούσα διδακτορική διατριβή να απαντήσει ήταν αν η αλληλεπίδραση φυτού-μύκητα είναι ωφέλιμη προς το φυτό σε συνθήκες αβιοτικού στρες. Σε όλα τα παραπάνω πειράματα δεν παρατηρήθηκαν φαινοτυπικές διαφορές στα φυτά. Επομένως, διερευνήθηκε σε πρώτη φάση η ικανότητα του ενδόφυτου να προσφέρει αντίσταση στα φυτά που αναπτύσσονται υπό συνθήκες αβιοτικής καταπόνησης (ζέστης, ψύχους και οξειδωτικού στρες). Παράλληλα, και έχοντας στη διάθεση μας αποτελέσματα RNA seq από τα πρώιμα στάδια αλληλεπίδρασης του φυτού με το μύκητα, μελετήσαμε τα διαφορικά εκφραζόμενα γονίδια είτε από την πλευρά του φυτού είτε από την πλευρά του μύκητα και προέκυψαν γονίδια του μύκητα που σχετίζονται με το σίδηρο. Επόμενος στόχος ήταν να μελετήσουμε την επίδραση του μύκητα σε φυτά που βρίσκονται σε τροφопενία σιδήρου. Από τα παραπάνω πειράματα προέκυψαν τα εξής αποτελέσματα :

Ο FSK είναι ικανός να προάγει την ανάπτυξη των φυτών μέσω της αύξησης της βιομάζας σε συνθήκες καταπόνησης θρέψης σιδήρου. Είναι ικανός να ενισχύσει την πρόσληψη μακροθρεπτικών και μικροθρεπτικών υπό φυσιολογικές συνθήκες ανάπτυξης και χρησιμοποιεί την οδό σηματοδότησης του αιθυλενίου ως πιθανή για τον τρόπο δράσης του.

Τέλος, όλα τα αποτελέσματα της παρούσας διδακτορικής δουλειάς έρχονται να συμπληρώσουν και να επιβεβαιώσουν την ωφέλιμη συμβιωτική σχέση του ενδόφυτου με το ψυχανθές φυτό και μας υπενθυμίζουν ότι η μελέτη αυτού του ωφέλιμου ενδοφυτικού μύκητα είναι άξια διερεύνησης.

Βιβλιογραφία

1. Gepts P, Beavis WD, Brummer EC, et al. Legumes as a model plant family. Genomics for food and feed report of the cross-legume advances through genomics conference. *Plant Physiol.* 2005;137(4):1228-1235. doi:10.1104/pp.105.060871
2. Udvardi MK, Tabata S, Parniske M, Stougaard J. Lotus japonicus: Legume research in the fast lane. *Trends Plant Sci.* 2005;10(5):222-228. doi:10.1016/j.tplants.2005.03.008
3. Graham PH, Vance CP. Legumes: Importance and constraints to greater use. *Plant Physiol.* 2003;131(3):872-877. doi:10.1104/pp.017004
4. Handberg K, Stougaard J. for Classical and Molecular Genetics. *Plant J.* 1992;2(4):487-496.
5. Jiang Q, Gresshoff PM. Classical and molecular genetics of the model legume Lotus japonicus. *Mol Plant-Microbe Interact.* 1997;10(1):59-68. doi:10.1094/MPMI.1997.10.1.59
6. Sato S, Nakamura Y, Kaneko T, et al. Genome structure of the legume, Lotus japonicus. *DNA Res.* 2008;15(4):227-239. doi:10.1093/dnares/dsn008
7. Mun T, Bachmann A, Gupta V, Stougaard J, Andersen SU. Lotus Base: An integrated information portal for the model legume Lotus japonicus. *Sci Rep.* 2016;6:1-18. doi:10.1038/srep39447
8. V S. Nitrogen in crop production : An account of global flows adds. *Global Biogeochem Cycles.* 1999;13(2):647-662.
9. Oldroyd GED. Speak, friend, and enter: Signalling systems that promote beneficial symbiotic associations in plants. *Nat Rev Microbiol.* 2013;11(4):252-263. doi:10.1038/nrmicro2990
10. Bever JD, Simms EL. Evolution of nitrogen fixation in spatially structured populations of Rhizobium. *Heredity (Edinb).* 2000;85(4):366-372. doi:10.1046/j.1365-2540.2000.00772.x
11. Parniske M. Arbuscular mycorrhiza: The mother of plant root endosymbioses. *Nat Rev Microbiol.* 2008;6(10):763-775. doi:10.1038/nrmicro1987
12. Choi J, Summers W, Paszkowski U. Annual Review of Phytopathology Mechanisms Underlying Establishment of Arbuscular Mycorrhizal Symbioses. *Annu Rev Phytopathol.* 2018;56(May):7-8. <https://doi.org/10.1146/annurev-phyto-080516->
13. Afkhami ME, Almeida BK, Hernandez DJ, Kieseewetter KN, Revillini DP. Tripartite mutualisms as models for understanding plant-microbial interactions. *Curr Opin Plant Biol.* 2020;56:28-36. doi:10.1016/j.pbi.2020.02.003
14. Tsiknia M, Tsikou D, Papadopoulou KK, Ehaliotis C. Multi-species relationships in legume roots: From pairwise legume-symbiont interactions to the plant - Microbiome - soil continuum. *FEMS Microbiol Ecol.* 2021;97(2):1-16. doi:10.1093/femsec/fiaa222
15. Larimer AL, Clay K, Bever JD. Synergism and context dependency of interactions between arbuscular mycorrhizal fungi and rhizobia with a prairie legume. *Ecology.* 2014;95(4):1045-1054. doi:10.1890/13-0025.1
16. Brader G, Compant S, Vescio K, et al. Ecology and Genomic Insights into Plant-Pathogenic and Plant-Nonpathogenic Endophytes. *Annu Rev Phytopathol.*

- 2017;55:61-83. doi:10.1146/annurev-phyto-080516-035641
17. Wilson D. Endophyte: The Evolution of a Term, and Clarification of Its Use and Definition. *Oikos*. 1995;73(2):274. doi:10.2307/3545919
 18. White JF. An Overview of Endophytic Microbes: Endophytism Defined. *Microb Endophytes*. 2020;(January 2000):17-44. doi:10.1201/9781482277302-1
 19. Rodriguez RJ, White JF, Arnold AE, Redman RS. Fungal endophytes: Diversity and functional roles: Tansley review. *New Phytol*. 2009;182(2):314-330. doi:10.1111/j.1469-8137.2009.02773.x
 20. Varma A, Verma S, Sudha, Sahay N, Bütehorn B, Franken P. Piriformospora indica, a cultivable plant-growth-promoting root endophyte. *Appl Environ Microbiol*. 1999;65(6):2741-2744. doi:10.1128/aem.65.6.2741-2744.1999
 21. Waller F, Achatz B, Baltruschat H, et al. The endophytic fungus Piriformospora indica reprograms barley to salt-stress tolerance, disease resistance, and higher yield. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 2005;102(38):13386-13391. doi:10.1073/pnas.0504423102
 22. Baltruschat H, Fodor J, Harrach BD, et al. Salt tolerance of barley induced by the root endophyte Piriformospora indica is associated with a strong increase in antioxidants. *New Phytol*. 2008;180(2):501-510. doi:10.1111/j.1469-8137.2008.02583.x
 23. Rai M, Acharya D, Singh A, Varma A. Positive growth responses of the medicinal plants *Spilanthes calva* and *Withania somnifera* to inoculation by Piriformospora indica in a field trial. *Mycorrhiza*. 2001;11(3):123-128. doi:10.1007/s005720100115
 24. Das A, Kamal S, Shakil NA, et al. The root endophyte fungus Piriformospora indica leads to early flowering, higher biomass and altered secondary metabolites of the medicinal plant, *Coleus forskohlii*. *Plant Signal Behav*. 2012;7(1):103-112. doi:10.4161/psb.7.1.18472
 25. Abdelaziz ME, Kim D, Ali S, Fedoroff N V., Al-Babili S. The endophytic fungus Piriformospora indica enhances Arabidopsis thaliana growth and modulates Na⁺/K⁺ homeostasis under salt stress conditions. *Plant Sci*. 2017;263(May):107-115. doi:10.1016/j.plantsci.2017.07.006
 26. Hiruma K, Gerlach N, Sacristán S, et al. Root Endophyte Colletotrichum tofieldiae Confers Plant Fitness Benefits that Are Phosphate Status Dependent. *Cell*. 2016;165(2):464-474. doi:10.1016/j.cell.2016.02.028
 27. Pagare S, Bhatia M, Tripathi N, Pagare S, Bansal YK. Secondary metabolites of plants and their role: Overview. *Curr Trends Biotechnol Pharm*. 2015;9(3):293-304.
 28. García-Calderón M, Pérez-Delgado CM, Palove-Balang P, Betti M, Márquez AJ. Flavonoids and isoflavonoids biosynthesis in the model legume lotus japonicus; connections to nitrogen metabolism and photorespiration. *Plants*. 2020;9(6):1-22. doi:10.3390/plants9060774
 29. Krokida A, Delis C, Geisler K, et al. A metabolic gene cluster in Lotus japonicus discloses novel enzyme functions and products in triterpene biosynthesis. *New Phytol*. 2013;200(3):675-690. doi:10.1111/nph.12414
 30. Toll D. Biosynthesis and Biological Functions of Terpenoids in Plants. *Adv Biochem Eng Biotechnol*. 2014;123(July 2015):127-141. doi:10.1007/10
 31. Thimmappa R, Geisler K, Louveau T, O'Maille P, Osbourn A. Triterpene biosynthesis in

- plants. *Annu Rev Plant Biol.* 2014;65(September):225-257. doi:10.1146/annurev-arplant-050312-120229
32. Vincken J, Heng L, Groot A De, Gruppen H. Saponins , classification and occurrence in the plant kingdom. 2007;68:275-297. doi:10.1016/j.phytochem.2006.10.008
 33. Kushiro T, Shibuya M, Ebizuka Y. β -Amyrin synthase Cloning of oxidosqualene cyclase that catalyzes the formation of the most popular triterpene among higher plants. 244:238-244.
 34. Delis C, Krokida A, Georgiou S, et al. Role of lupeol synthase in *Lotus japonicus* nodule formation. *New Phytol.* 2011;189(1):335-346. doi:10.1111/j.1469-8137.2010.03463.x
 35. Summerell BA. Resolving *Fusarium*: Current Status of the Genus. *Annu Rev Phytopathol.* 2019;57:323-339. doi:10.1146/annurev-phyto-082718-100204
 36. Ma LJ, Geiser DM, Proctor RH, et al. *Fusarium* pathogenomics. *Annu Rev Microbiol.* 2013;67:399-416. doi:10.1146/annurev-micro-092412-155650
 37. Moretti A. Taxonomy of *Fusarium* genus: A continuous fight between lumpers and splitters. *Zb Matice Srp za Prir Nauk.* 2009;(117):7-13. doi:10.2298/zmspn0917007m
 38. Fourie G, Steenkamp ET, Ploetz RC, Gordon TR, Viljoen A. Current status of the taxonomic position of *Fusarium oxysporum* formae specialis cubense within the *Fusarium oxysporum* complex. *Infect Genet Evol.* 2011;11(3):533-542. doi:10.1016/j.meegid.2011.01.012
 39. Kavroulakis N, Ntougias S, Zervakis GI, Ehaliotis C, Haralampidis K, Papadopoulou KK. Role of ethylene in the protection of tomato plants against soil-borne fungal pathogens conferred by an endophytic *Fusarium solani* strain. *J Exp Bot.* 2007;58(14):3853-3864. doi:10.1093/jxb/erm230
 40. Pappas ML, Liapoura M, Papantoniou D, et al. The beneficial endophytic fungus *Fusarium solani* strain K alters tomato responses against spider mites to the benefit of the plant. *Front Plant Sci.* 2018;9. doi:10.3389/fpls.2018.01603
 41. Garantonakis N, Pappas ML, Varikou K, et al. Tomato inoculation with the endophytic strain *Fusarium solani* K results in reduced feeding damage by the zoophytophagous predator *nesidiocoris tenuis*. *Front Ecol Evol.* 2018;6(AUG):1-7. doi:10.3389/fevo.2018.00126
 42. Papadopoulou KK, Papadakis IE, Kavroulakis N, Doupis G, Ehaliotis C. Tolerance of tomato plants to water stress is improved by the root endophyte *Fusarium solani* FsK. *Rhizosphere.* 2018;6(March):77-85. doi:10.1016/j.rhisph.2018.04.003
 43. Skiada V, Faccio A, Kavroulakis N, Genre A, Bonfante P, Papadopoulou KK. Colonization of legumes by an endophytic *Fusarium solani* strain FsK reveals common features to symbionts or pathogens. *Fungal Genet Biol.* 2019;127(March):60-74. doi:10.1016/j.fgb.2019.03.003
 44. Skiada V, Avramidou M, Bonfante P, Genre A, Papadopoulou KK. An endophytic *Fusarium*–legume association is partially dependent on the common symbiotic signalling pathway. *New Phytol.* 2020;226(5):1429-1444. doi:10.1111/nph.16457
 45. Hill RA, Connolly JD. Triterpenoids. *Nat Prod Rep.* 2020;37(7):962-998. doi:10.1039/c9np00067d
 46. Papadopoulou K, Melton RE, Leggett M, Daniels MJ, Osbourn AE. Compromised

- disease resistance in saponin-deficient plants. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 1999;96(22):12923-12928. doi:10.1073/pnas.96.22.12923
47. Kemen AC, Honkanen S, Melton RE, et al. Investigation of triterpene synthesis and regulation in oats reveals a role for β -amyrin in determining root epidermal cell patterning. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 2014;111(23):8679-8684. doi:10.1073/pnas.1401553111
 48. Confalonieri M, Cammareri M, Biazzi E, et al. Enhanced triterpene saponin biosynthesis and root nodulation in transgenic barrel medic (*Medicago truncatula* Gaertn.) expressing a novel β -amyrin synthase (AsOXA1) gene. *Plant Biotechnol J*. 2009;7(2):172-182. doi:10.1111/j.1467-7652.2008.00385.x
 49. Qi X, Bakht S, Leggett M, Maxwell C, Melton R, Osbourn A. A gene cluster for secondary metabolism in oat: Implications for the evolution of metabolic diversity in plants. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 2004;101(21):8233-8238. doi:10.1073/pnas.0401301101
 50. Osbourn A. Secondary metabolic gene clusters: Evolutionary toolkits for chemical innovation. *Trends Genet*. 2010;26(10):449-457. doi:10.1016/j.tig.2010.07.001
 51. Iturbe-Ormaetxe I, Haralampidis K, Papadopoulou K, Osbourn AE. Molecular cloning and characterization of triterpene synthases from *Medicago truncatula* and *Lotus japonicus*. *Plant Mol Biol*. 2003;51(5):731-743. doi:10.1023/A:1022519709298
 52. Fukai E, Stougaard J, Hayashi M. Activation of an Endogenous Retrotransposon Associated with Epigenetic Changes in *Lotus japonicus* : A Tool for Functional Genomics in Legumes . *Plant Genome*. 2013;6(3):1-11. doi:10.3835/plantgenome2013.04.0009
 53. Boisson-Dernier A, Chabaud M, Garcia F, Bécard G, Rosenberg C, Barker DG. *Agrobacterium rhizogenes*-transformed roots of *Medicago truncatula* for the study of nitrogen-fixing and endomycorrhizal symbiotic associations. *Mol Plant-Microbe Interact*. 2001;14(6):695-700. doi:10.1094/MPMI.2001.14.6.695
 54. Huang AC, Jiang T, Liu YX, et al. A specialized metabolic network selectively modulates *Arabidopsis* root microbiota. *Science (80-)*. 2019;364(6440). doi:10.1126/science.aau6389
 55. Zhong Y, Xun W, Wang X, et al. Root-secreted bitter triterpene modulates the rhizosphere microbiota to improve plant fitness. *Nat Plants*. 2022;8(8):887-896. doi:10.1038/s41477-022-01201-2
 56. Bisseling T, Geurts R. Specificity in legume nodule symbiosis. *Science (80-)*. 2020;369(6504):620-621. doi:10.1126/science.abd3857
 57. Poole P, Ramachandran V, Terpolilli J. Rhizobia: From saprophytes to endosymbionts. *Nat Rev Microbiol*. 2018;16(5):291-303. doi:10.1038/nrmicro.2017.171
 58. De Boer W, Folman LB, Summerbell RC, Boddy L. Living in a fungal world: Impact of fungi on soil bacterial niche development. *FEMS Microbiol Rev*. 2005;29(4):795-811. doi:10.1016/j.femsre.2004.11.005
 59. Zhang W, Li XG, Sun K, et al. Mycelial network-mediated rhizobial dispersal enhances legume nodulation. *ISME J*. 2020;14(4):1015-1029. doi:10.1038/s41396-020-0587-5
 60. Chang HX, Noel ZA, Chilvers MI. A β -lactamase gene of *Fusarium oxysporum* alters

- the rhizosphere microbiota of soybean. *Plant J.* 2021;106(6):1588-1604. doi:10.1111/tpj.15257
61. Zhang L, Xu M, Liu Y, Zhang F, Hodge A, Feng G. Carbon and phosphorus exchange may enable cooperation between an arbuscular mycorrhizal fungus and a phosphate-solubilizing bacterium. *New Phytol.* 2016;210(3):1022-1032. doi:10.1111/nph.13838
 62. Xie XG, Zhang FM, Yang T, Chen Y, Li XG, Dai CC. Endophytic fungus drives nodulation and N₂ fixation attributable to specific root exudates. *MBio.* 2019;10(4):1-20. doi:10.1128/mBio.00728-19
 63. Wang X, Feng H, Wang Y, et al. Mycorrhizal symbiosis modulates the rhizosphere microbiota to promote rhizobia–legume symbiosis. *Mol Plant.* 2021;14(3):503-516. doi:10.1016/j.molp.2020.12.002
 64. Zhang W, Luo X, Mei YZ, et al. Priming of rhizobial nodulation signaling in the mycosphere accelerates nodulation of legume hosts. *New Phytol.* 2022;235(3):1212-1230. doi:10.1111/nph.18192
 65. Deveau A, Bonito G, Uehling J, et al. Bacterial-fungal interactions: Ecology, mechanisms and challenges. *FEMS Microbiol Rev.* 2018;42(3):335-352. doi:10.1093/femsre/fuy008
 66. Worrich A, Stryhanyuk H, Musat N, et al. Mycelium-mediated transfer of water and nutrients stimulates bacterial activity in dry and oligotrophic environments. *Nat Commun.* 2017;8(June). doi:10.1038/ncomms15472
 67. Larimer AL, Bever JD, Clay K. The interactive effects of plant microbial symbionts: A review and meta-analysis. *Symbiosis.* 2010;51(2):139-148. doi:10.1007/s13199-010-0083-1
 68. Abd-Alla MH, El-Enany AWE, Nafady NA, Khalaf DM, Morsy FM. Synergistic interaction of *Rhizobium leguminosarum* bv. *viciae* and arbuscular mycorrhizal fungi as a plant growth promoting biofertilizers for faba bean (*Vicia faba* L.) in alkaline soil. *Microbiol Res.* 2014;169(1):49-58. doi:10.1016/j.micres.2013.07.007
 69. Dabré ÉE, Hijri M, Favret C. Influence on Soybean Aphid by the Tripartite Interaction between Soybean, a *Rhizobium* Bacterium, and an Arbuscular Mycorrhizal Fungus. *Microorganisms.* 2022;10(6). doi:10.3390/microorganisms10061196
 70. Mickelbart M V., Hasegawa PM, Bailey-Serres J. Genetic mechanisms of abiotic stress tolerance that translate to crop yield stability. *Nat Rev Genet.* 2015;16(4):237-251. doi:10.1038/nrg3901
 71. Fujita M, Fujita Y, Noutoshi Y, et al. Crosstalk between abiotic and biotic stress responses: a current view from the points of convergence in the stress signaling networks. *Curr Opin Plant Biol.* 2006;9(4):436-442. doi:10.1016/j.pbi.2006.05.014
 72. Ahmad P, Abdel Latef AAH, Rasool S, Akram NA, Ashraf M, Gucel S. Role of proteomics in crop stress tolerance. *Front Plant Sci.* 2016;7(September):1-14. doi:10.3389/fpls.2016.01336
 73. Rao DE, Chaitanya K V. Photosynthesis and antioxidative defense mechanisms in deciphering drought stress tolerance of crop plants. *Biol Plant.* 2016;60(2):201-218. doi:10.1007/s10535-016-0584-8
 74. Glynnou K, Ali T, Buch AK, et al. The local environment determines the assembly of

- root endophytic fungi at a continental scale. *Environ Microbiol.* 2016;18(8):2418-2434. doi:10.1111/1462-2920.13112
75. Pietikäinen J, Pettersson M, Bååth E. Comparison of temperature effects on soil respiration and bacterial and fungal growth rates. *FEMS Microbiol Ecol.* 2005;52(1):49-58. doi:10.1016/j.femsec.2004.10.002
 76. Liu A, Wang B, Hamel C. Arbuscular mycorrhiza colonization and development at suboptimal root zone temperature. *Mycorrhiza.* 2004;14(2):93-101. doi:10.1007/s00572-003-0242-9
 77. Lv Z, Zhao M, Wang W, et al. Changing Gly311 to an acidic amino acid in the MATE family protein DTX6 enhances Arabidopsis resistance to the dihydropyridine herbicides. *Mol Plant.* 2021;14(12):2115-2125. doi:10.1016/j.molp.2021.09.002
 78. Chen J, Su Y, Lin R, et al. Effects of Acute Diquat Poisoning on Liver Mitochondrial Apoptosis and Autophagy in Ducks. *Front Vet Sci.* 2021;8(August):1-10. doi:10.3389/fvets.2021.727766
 79. Skiada V. *Colonization of Legumes by an Endophytic Fusarium Solani Strain K. Early-Stage Molecular Signaling and Sub-Cellular Responses.* Vol 224.; 2019.
 80. Hoagland DR, Arnon DI. The water-culture method for growing plants without soil. *Circ Calif Agric Exp Stn.* 1950;347(2nd edit):32 pp. <https://www.cabdirect.org/cabdirect/abstract/19500302257>.
 81. Kavroulakis N, Doupis G, Papadakis IE, Ehaliotis C, Papadopoulou KK. Tolerance of tomato plants to water stress is improved by the root endophyte *Fusarium solani* FsK. *Rhizosphere.* 2018;6:77-85. doi:10.1016/j.rhisph.2018.04.003
 82. Karimi R, Amini H, Ghabooli M. Root endophytic fungus *Piriformospora indica* and zinc attenuate cold stress in grapevine by influencing leaf phytochemicals and minerals content. *Sci Hort (Amsterdam).* 2022;293(October 2021):110665. doi:10.1016/j.scienta.2021.110665
 83. Gavito ME, Olsson PA, Rouhier H, et al. Temperature constraints on the growth and functioning of root organ cultures with arbuscular mycorrhizal fungi. *New Phytol.* 2005;168(1):179-188. doi:10.1111/j.1469-8137.2005.01481.x
 84. Lidoy J, López-García Á, Amate C, et al. Regulation of mycorrhizal colonization under stress in tomato depends on symbiotic efficiency. *Environ Exp Bot.* 2023;215(May). doi:10.1016/j.envexpbot.2023.105479
 85. Makarian H, Poozesh V, Asghari HR, Nazari M. Interaction Effects of Arbuscular Mycorrhiza Fungi and Soil Applied Herbicides on Plant Growth. *Commun Soil Sci Plant Anal.* 2016;47(5):619-629. doi:10.1080/00103624.2016.1146744
 86. Campestre MP, Castagno LN, Estrella MJ, Ruiz OA. Lotus japonicus plants of the Gifu B-129 ecotype subjected to alkaline stress improve their Fe²⁺ bio-availability through inoculation with *Pantoea eucalypti* M91. *J Plant Physiol.* 2016;192:47-55. doi:10.1016/j.jplph.2016.01.001
 87. Shahid M, Khan MS. Glyphosate induced toxicity to chickpea plants and stress alleviation by herbicide tolerant phosphate solubilizing *Burkholderia cepacia* PSBB1 carrying multifarious plant growth promoting activities. *3 Biotech.* 2018;8(2):1-17. doi:10.1007/s13205-018-1145-y

88. Riley R, Chapman V. © 1958 Nature Publishing Group. 1958.
89. Pérez-Fernández M, Alexander V. Enhanced plant performance in *Cicer arietinum* L. Due to the addition of a combination of plant growth-promoting bacteria. *Agric.* 2017;7(5). doi:10.3390/agriculture7050040
90. Chaudhary MF, Abbasi AA. Effect of Pre-emergence Herbicides on Nodulation , Nitrogen Fixation and Morphological Characters in Groundnut (*Arachis hypogaea*). *Pakistan J Biol Sci.* 2000;3:1775-1777.
91. Tétard-Jones C, Edwards R. Potential roles for microbial endophytes in herbicide tolerance in plants. *Pest Manag Sci.* 2016;72(2):203-209. doi:10.1002/ps.4147
92. Kobayashi T, Nozoye T, Nishizawa NK. Iron transport and its regulation in plants. *Free Radic Biol Med.* 2019;133(October 2018):11-20. doi:10.1016/j.freeradbiomed.2018.10.439
93. Vigani G, Murgia I. Iron-Requiring Enzymes in the Spotlight of Oxygen. *Trends Plant Sci.* 2018;23(10):874-882. doi:10.1016/j.tplants.2018.07.005
94. Pii Y, Mimmo T, Tomasi N, Terzano R, Cesco S, Crecchio C. Microbial interactions in the rhizosphere: beneficial influences of plant growth-promoting rhizobacteria on nutrient acquisition process. A review. *Biol Fertil Soils.* 2015;51(4):403-415. doi:10.1007/s00374-015-0996-1
95. Kobayashi T. Understanding the Complexity of Iron Sensing and Signaling Cascades in Plants. *Plant Cell Physiol.* 2019;60(February):1440-1446. doi:10.1093/pcp/pcz038
96. Jeong J, Guerinot M Lou. Homing in on iron homeostasis in plants. *Trends Plant Sci.* 2009;14(5):280-285. doi:10.1016/j.tplants.2009.02.006
97. García MJ, Romera FJ, Lucena C, Alcántara E, Pérez-Vicente R. Ethylene and the regulation of physiological and morphological responses to nutrient deficiencies. *Plant Physiol.* 2015;169(1):51-60. doi:10.1104/pp.15.00708
98. Pierre JL, Fontecave M. Iron and activated oxygen species in biology: The basic chemistry. *BioMetals.* 1999;12(3):195-199. doi:10.1023/A:1009252919854
99. Hou X, Tong H, Selby J, et al. Reactive Species and Antioxidants . Redox Biology Is a Fundamental Theme of Aerobic Life. 2003;133(November):274-286. doi:10.1105/tpc.001388.Nongrasses
100. Brumbarova T, Bauer P. Iron uptake and transport in plants. *Plant Membr Vacuolar Transp.* 2008;109(10):149-172. doi:10.1079/9781845934026.0149
101. Zhang X, Zhang D, Sun W, Wang T. The adaptive mechanism of plants to iron deficiency via iron uptake, transport, and homeostasis. *Int J Mol Sci.* 2019;20(10). doi:10.3390/ijms20102424
102. Grass G, Wong MD, Rosen BP, Smith RL, Rensing C. Zupt is a Zn(II) uptake system in *Escherichia coli*. *J Bacteriol.* 2002;184(3):864-866. doi:10.1128/JB.184.3.864-866.2002
103. Séguéla M, Briat JF, Vert G, Curie C. Cytokinins negatively regulate the root iron uptake machinery in *Arabidopsis* through a growth-dependent pathway. *Plant J.* 2008;55(2):289-300. doi:10.1111/j.1365-3113X.2008.03502.x
104. Lucena C, Porras R, García MJ, et al. Ethylene and Phloem Signals Are Involved in the Regulation of Responses to Fe and P Deficiencies in Roots of Strategy I Plants. *Front*

- Plant Sci.* 2019;10(October):1-14. doi:10.3389/fpls.2019.01237
105. Li L, Cheng X, Ling HQ. Isolation and characterization of Fe(III)-chelate reductase gene LeFRO1 in tomato. *Plant Mol Biol.* 2004;54(1):125-136. doi:10.1023/B:PLAN.0000028774.82782.16
 106. Waters BM, Blevins DG, Eide DJ. Characterization of FRO1, a pea ferric-chelate reductase involved in root iron acquisition. *Plant Physiol.* 2002;129(1):85-94. doi:10.1104/pp.010829
 107. Bereczky Z, Wang HY, Schubert V, Ganai M, Bauer P. Differential Regulation of nramp and irt Metal Transporter Genes in Wild Type and Iron Uptake Mutants of Tomato. *J Biol Chem.* 2003;278(27):24697-24704. doi:10.1074/jbc.M301365200
 108. Li R, Cai F, Pang G, Shen Q, Li R, Chen W. Solubilisation of Phosphate and Micronutrients by *Trichoderma harzianum* and Its Relationship with the Promotion of Tomato Plant Growth. 2015:1-16. doi:10.5061/dryad.p460c
 109. Zhang H, Sun Y, Xie X, Kim MS, Dowd SE, Paré PW. A soil bacterium regulates plant acquisition of iron via deficiency-inducible mechanisms. *Plant J.* 2009;58(4):568-577. doi:10.1111/j.1365-313X.2009.03803.x
 110. Jin CW, Ye YQ, Zheng SJ. An underground tale: Contribution of microbial activity to plant iron. *Ann Bot.* 2014;113(1):7-18. doi:10.1093/aob/mct249
 111. Mimmo T, Del Buono D, Terzano R, et al. Rhizospheric organic compounds in the soil-microorganism-plant system: Their role in iron availability. *Eur J Soil Sci.* 2014;65(5):629-642. doi:10.1111/ejss.12158
 112. Pieterse CMJ, Zamioudis C, Berendsen RL, Weller DM, Van Wees SCM, Bakker PAHM. Induced systemic resistance by beneficial microbes. *Annu Rev Phytopathol.* 2014;52:347-375. doi:10.1146/annurev-phyto-082712-102340
 113. Verbon EH, Trapet PL, Kruijs S, Temple-Boyer-Dury C, Rouwenhorst TG, Pieterse CMJ. Rhizobacteria-mediated activation of the iron deficiency response in Arabidopsis roots: Impact on iron status and signaling. *Front Plant Sci.* 2019;10(July):1-12. doi:10.3389/fpls.2019.00909
 114. Zamioudis C, Korteland J, Van Pelt JA, et al. Rhizobacterial volatiles and photosynthesis-related signals coordinate MYB72 expression in Arabidopsis roots during onset of induced systemic resistance and iron-deficiency responses. *Plant J.* 2015;84(2):309-322. doi:10.1111/tpj.12995
 115. Yuan Y, Wu H, Wang N, et al. FIT interacts with AtbHLH38 and AtbHLH39 in regulating iron uptake gene expression for iron homeostasis in Arabidopsis. *Cell Res.* 2008;18(3):385-397. doi:10.1038/cr.2008.26
 116. Bournier M, Tissot N, Mari S, et al. Arabidopsis ferritin 1 (AtFer1) gene regulation by the phosphate starvation response 1 (AtPHR1) transcription factor reveals a direct molecular link between iron and phosphate homeostasis. *J Biol Chem.* 2013;288(31):22670-22680. doi:10.1074/jbc.M113.482281
 117. Rogers EE, Guerinot M, Lou. FRD3, a member of the multidrug and toxin efflux family, controls iron deficiency responses in Arabidopsis. *Plant Cell.* 2002;14(8):1787-1799. doi:10.1105/tpc.001495
 118. Carbonnel S, Das D, Varshney K, Kolodziej MC, Villaécija-Aguilar JA, Gutjahr C. The

- karrikin signaling regulator SMAX1 controls *Lotus japonicus* root and root hair development by suppressing ethylene biosynthesis. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 2020;117(35):21757-21765. doi:10.1073/pnas.2006111117
119. Dundar F. Differential Gene Expression Analysis (DGE). *Appl Bioinforma Core*. 2020:1-13.
 120. Love MI, Huber W, Anders S. Moderated estimation of fold change and dispersion for RNA-seq data with DESeq2. *Genome Biol*. 2014;15(12):1-21. doi:10.1186/s13059-014-0550-8
 121. Huerta-Cepas J, Szklarczyk D, Heller D, et al. EggNOG 5.0: A hierarchical, functionally and phylogenetically annotated orthology resource based on 5090 organisms and 2502 viruses. *Nucleic Acids Res*. 2019;47(D1):D309-D314. doi:10.1093/nar/gky1085
 122. Rey P, Taupin-Broggini M, Couturier J, Vignols F, Rouhier N. Is there a role for glutaredoxins and BOLAs in the perception of the cellular iron status in plants? *Front Plant Sci*. 2019;10(June):1-10. doi:10.3389/fpls.2019.00712
 123. Vigani G, Bohic S, Faoro F, Vekemans B, Vincze L, Terzano R. Cellular fractionation and nanoscopic X-ray fluorescence imaging analyses reveal changes of zinc distribution in leaf cells of iron-deficient plants. *Front Plant Sci*. 2018;9(August):1-11. doi:10.3389/fpls.2018.01112
 124. Durrett TP, Gassmann W, Rogers EE. The FRD3-mediated efflux of citrate into the root vasculature is necessary for efficient iron translocation. *Plant Physiol*. 2007;144(1):197-205. doi:10.1104/pp.107.097162
 125. Lucena C, Romera FJ, García MJ, Alcántara E, Pérez-Vicente R. Ethylene participates in the regulation of Fe deficiency responses in strategy I plants and in rice. *Front Plant Sci*. 2015;6(NOVEMBER):1-16. doi:10.3389/fpls.2015.01056
 126. Philpott CC. Iron uptake in fungi: A system for every source. *Biochim Biophys Acta - Mol Cell Res*. 2006;1763(7):636-645. doi:10.1016/j.bbamcr.2006.05.008
 127. Babuin MF, Campestre MP, Rocco R, et al. Response to long-term NaHCO₃-derived alkalinity in model *Lotus japonicus* ecotypes Gifu B-129 and Miyakojima MG-20: Transcriptomic profiling and physiological characterization. *PLoS One*. 2014;9(5). doi:10.1371/journal.pone.0097106
 128. Bajaj R, Huang Y, Gebrechistos S, et al. Transcriptional responses of soybean roots to colonization with the root endophytic fungus *Piriformospora indica* reveals altered phenylpropanoid and secondary metabolism. *Sci Rep*. 2018;8(1):1-18. doi:10.1038/s41598-018-26809-3
 129. Yakti W, Kovács GM, Vági P, Franken P. Impact of dark septate endophytes on tomato growth and nutrient uptake. *Plant Ecol Divers*. 2018;11(5-6):637-648. doi:10.1080/17550874.2019.1610912
 130. Saddique MAB, Ali Z, Khan AS, Rana IA, Shamsi IH. Inoculation with the endophyte *Piriformospora indica* significantly affects mechanisms involved in osmotic stress in rice. *Rice*. 2018;11(1):1-12. doi:10.1186/s12284-018-0226-1
 131. Chen Z, Jin Y, Yao X, et al. Fungal Endophyte Improves Survival of *Lolium perenne* in Low Fertility Soils by Increasing Root Growth, Metabolic Activity and Absorption of Nutrients. *Plant Soil*. 2020;452(1-2):185-206. doi:10.1007/s11104-020-04556-7

132. Kim SA, LaCroix IS, Gerber SA, Guerinot M Lou. The iron deficiency response in *Arabidopsis thaliana* requires the phosphorylated transcription factor URI. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 2019;116(50):24933-24942. doi:10.1073/pnas.1916892116
133. Li W, Lan P. The understanding of the plant iron deficiency responses in strategy I plants and the role of ethylene in this process by omic approaches. *Front Plant Sci*. 2017;8(January):1-15. doi:10.3389/fpls.2017.00040
134. Kieu NP, Aznar A, Segond D, et al. Iron deficiency affects plant defence responses and confers resistance to *dickeya dadantii* and *botrytis cinerea*. *Mol Plant Pathol*. 2012;13(8):816-827. doi:10.1111/j.1364-3703.2012.00790.x
135. Chen W, Zhao L, Liu L, et al. Iron deficiency-induced transcription factors bHLH38/100/101 negatively modulate flowering time in *Arabidopsis thaliana*. *Plant Sci*. 2021;308(April):110929. doi:10.1016/j.plantsci.2021.110929
136. Conte SS, Walker EL. Transporters contributing to iron trafficking in plants. *Mol Plant*. 2011;4(3):464-476. doi:10.1093/mp/ssr015
137. Lemanceau P, Expert D, Gaymard F, Bakker PAHM, Briat JF. *Chapter 12 Role of Iron in Plant-Microbe Interactions*. Vol 51. 1st ed. Elsevier Ltd; 2009. doi:10.1016/S0065-2296(09)51012-9
138. Attarian R, Hu G, Sánchez-León E, et al. The monothiol glutaredoxin Grx4 regulates iron homeostasis and virulence in *cryptococcus neoformans*. *MBio*. 2018;9(6):1-23. doi:10.1128/mBio.02377-18
139. Young ND, Mudge J, Ellis THN. Legume genomes: More than peas in a pod. *Curr Opin Plant Biol*. 2003;6(2):199-204. doi:10.1016/S1369-5266(03)00006-2

ΚΕΦΑΛΑΙΟ 1

Η ΙΚΑΝΟΤΗΤΑ ΤΟΥ ΕΝΔΟΦΥΤΙΚΟΥ ΜΥΚΗΤΑ *FUSARIUM SOLANI*
ΣΤΕΛΕΧΟΣ Κ (FSK) ΝΑ ΑΠΟΙΚΙΣΕΙ ΜΕΤΑΛΛΑΓΜΑΤΑ *Lotus*
japonicus ΤΟΥ ΒΙΟΣΥΝΘΕΤΙΚΟΥ ΜΟΝΟΠΑΤΙΟΥ ΤΩΝ
ΤΡΙΤΕΡΠΕΝΙΩΝ ΥΠΟ ΔΙΑΦΟΡΕΤΙΚΑ ΥΠΟΣΤΡΩΜΑΤΑ

Εισαγωγή

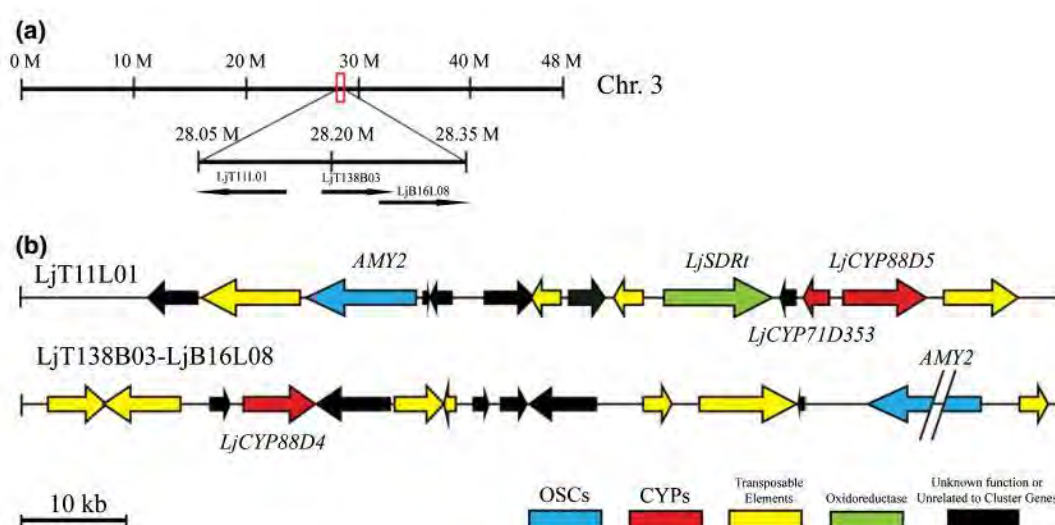
Τα τριτερπένια είναι ενώσεις αποτελούμενες από έξι μονάδες ισοπρενίου των πέντε ατόμων άνθρακα και συνθέτουν μια πολυπληθή ομάδα φυσικών προϊόντων με χαρακτηριστικό τη δομική ετερογένειά τους. Οι ενώσεις αυτές ανήκουν στη μεγάλη οικογένεια των τερπενίων και αποτελούν ενώσεις του δευτερογενούς μεταβολισμού⁴⁵. Μελέτες έχουν δείξει ότι ο δευτερογενής μεταβολισμός εμπλέκεται με την επιβίωση των φυτών ενώ ορισμένες μορφές τριτερπενίων (γλυκοζυλιωμένα τριτερπένια) έχουν περιγραφεί ότι διαθέτουν αντιμυκητιακή δράση⁴⁶. Η μελέτη της βιοσύνθεσης της β-αμυρίνης σε ψυχανθή φυτά έχει ιδιαίτερο ενδιαφέρον λόγω της ικανότητας των φυτών αυτών να συμβιώνουν με το ριζοβακτήριο (*Rhizobium*) και να σχηματίζονται ριζικά φυμάτια. Πρόσφατες εργασίες έχουν δείξει ότι ενώσεις τριτερπενίων εμπλεκονται σε διαδικασίες σημαντικές για το φυτό όπως η λουπεόλη στη φυματιογένεση³⁴ και η β-αμυρίνη στη φυματιογένεση και την ανάπτυξη της ρίζας^{47,48}.

Η έρευνα της βιοσύνθεσης των τριτερπενίων και του ρόλου τους στο μοντέλο ψυχανθές *Lotus japonicus* οδήγησε στον χαρακτηρισμό του γονιδίου *AMY2* που κωδικοποιεί μια κυκλάση οξειδοσκουαλένιου μικτής δράσης. Τα προϊόντα της κυκλοποίησης είναι η β-αμυρίνη και η λουπεόλη, εκ των οποίων η β-αμυρίνη, φαίνεται ότι εμπλέκονται σε σημαντικές διαδικασίες για την ανάπτυξη του φυτού, όπως η φυματιογένεση. Αν και το γονίδιο έχει ήδη περιγραφεί, υπάρχουν ακόμη άγνωστες πτυχές σχετικά με το ρόλο και τους μεταβολίτες του. Η διερεύνηση της βιοσύνθεσης των τριτερπενίων και συγκεκριμένα του ρόλου της συνθάσης της β-αμυρίνης, *LjAMY2* στο φυτό *Lotus japonicus*, αποτελεί αντικείμενο έρευνας του εργαστηρίου. Προηγουμένως έχει αποδειχθεί ότι ο FSK χρησιμοποιεί εν μέρη το ίδιο σηματοδοτικό μονοπάτι αναγνώρισης (Common Symbiotic Signalling Pathway) από το φυτό *L. japonicus* με τα ριζόβια και τους μυκορριζικούς μύκητες⁴⁴. Ακόμη ο FSK είναι ικανός να επάγει το γονίδιο της *AMY2* σε φυτά αγρίου τύπου. Γνωρίζοντας αυτά τα ευρήματα δημιουργήθηκε το ερώτημα αν ο μύκητας αρχικά είναι ικανός να αποικίσει και τα φυτά *amy2.188* και *cyp71-753* του βιοσυνθετικού μονοπατιού των τριτερπενίων και έπειτα αν είναι ικανός να αποικίζει και υπό διαφορετικά μη αποστειρωμένα υποστρώματα τα φυτά αυτά καθώς και τα φυτά αγρίου τύπου.

Το *AMY2* και το *CYP71D353* αποτελούν μέλη της συστοιχίας γονιδίων που εμπλέκονται στο μεταβολισμό των τριτερπενίων.

Όπως είναι ήδη γνωστό τα γονίδια που εμπλέκονται στον μεταβολισμό των τριτερπενίων εντοπίζονται σε συστοιχίες γονιδίων (gene clusters)^{49,50}. Το γονίδιο *AMY2* κωδικοποιεί μια συνθάση τριτερπενίων μικτής δράσης⁵¹. Με βάση αυτή την παρατήρηση, σε προηγούμενη δουλειά το εργαστήριο μας προχώρησε σε *in silico*

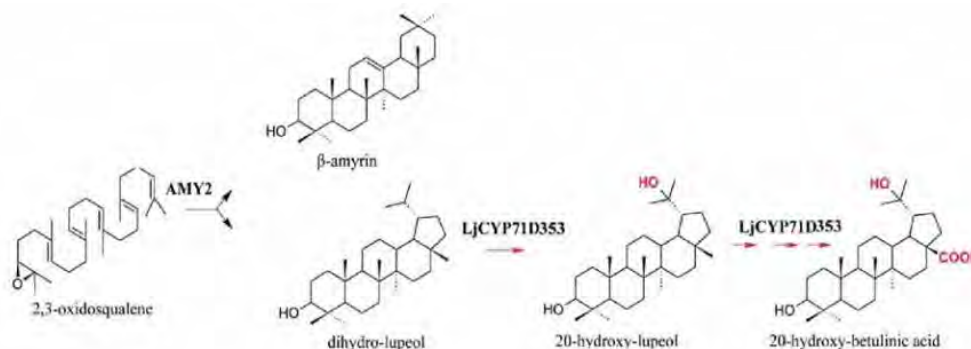
ανάλυση για την εύρεση γονιδίων εκατέρωθεν του *AMY2* που να εμπλέκονται στον δευτερογενή μεταβολισμό των τριτερπενίων²⁹. Με τη μέθοδο αυτή ταυτοποιήθηκαν στο φυτό *Lotus japonicus* δύο συστοιχίες γονιδίων, οι οποίες χαρτογραφούνται στο χρωμόσωμα 3 (Εικ.1.1) Στη μια συστοιχία, το *AMY2* που κωδικοποιεί τη συνθάση μικτής δράσης συνυπάρχει με άλλα γονίδια του μεταβολισμού, τα *LjCYP88D5* και *LjCYP71D353* (*CYP71-753*) που κωδικοποιούν τροποποιητικά ένζυμα του κυτοχρώματος P450 και το *LjSDRt* που προβλέπεται ότι κωδικοποιεί μια αναγωγή των τριτερπενίων. Τα γονίδια της συστοιχίας συνεκφράζονται κατά τη διάρκεια της ανάπτυξης της ρίζας και των φυματίων, κάτω από βιοτικές και αβιοτικές συνθήκες²⁹. Η δεύτερη συστοιχία αποκάλυψε την ύπαρξη του πιθανού ψευδογονιδίου *AMY2-like*, που φέρει σχεδόν απόλυτη ομολογία με το *AMY2*, και το *LjCYP88D*.



Εικόνα 1.1. Οργάνωση συστοιχιών γονιδίων που εμπλέκονται στον μεταβολισμό των τριτερπενίων
Ο γενωμικός κλώνος LjT11L01 αποκάλυψε τη συστοιχία του *AMY2* που αποτελείται από το *AMY2* που κωδικοποιεί τη συνθάση μικτής δράσης, τα *LjCYP88D5* και *LjCYP71D353* που προβλέπεται ότι κωδικοποιούν τροποποιητικά ένζυμα του κυτοχρώματος P450 και το *LjSDRt* που προβλέπεται ότι κωδικοποιεί μια αναγωγή. Οι δύο συνεχείς κλώνοι LjT138B03 και LjB16L08 αποκάλυψαν μια δεύτερη συστοιχία του ψευδογονιδίου *AMY2-like*, που φέρει τεράστια ομοιότητα με το *AMY2*, και το *LjCYP88D*

Από πειράματα ετερόλογης έκφρασης του γονιδίου *AMY2* σε φύλλα καπνού *Nicotiana benthamiana* αποκάλυψαν την ύπαρξη δύο μορίων, της β-αμυρίνης και της διυδρολουπεόλης (dihydrolypeol), ενώ δεν ανιχνεύτηκε λουπεόλη. Μάλιστα όταν συνεκφράστηκε το *AMY2* με το *LjCYP71D353* ανιχνεύτηκε ένα διαφορετικό προϊόν, το 20-υδροξυ-βετουλινικό οξύ (20-hydroxybetulinic acid). Ωστόσο, δεν είναι ακόμη γνωστό εάν η σύνθεση της διυδρολουπεόλης προέρχεται εξ ολοκλήρου από τη δράση της συνθάσης της β-αμυρίνης ή από συνεργική δράση της συνθάσης μαζί με κάποιο

ενδογενές ένζυμο του καπνού ή ακόμη και εάν αυτή είναι η πραγματική δομή του μορίου που ανιχνεύτηκε ^{29,34} (Εικ.1.2).



Εικόνα 1.2. Προτεινόμενες αντιδράσεις των γονιδίων *AMY2* και *LjCYP71D353*

Πρόσφατα όμως πειράματα μέσω NMR αποκάλυψαν ένα καινούριο πιθανό μονοπάτι των γονιδίων της συστοιχίας *AMY2*. Τα αποτελέσματα αυτά δεν έχουν ακόμη ολοκληρωθεί. Από τα πειράματα αυτά, τα αποτελέσματα υποστηρίζουν επίσης το ρόλο των γονιδίων *AMY2* στη διαδικασία της φυματογένεσης.

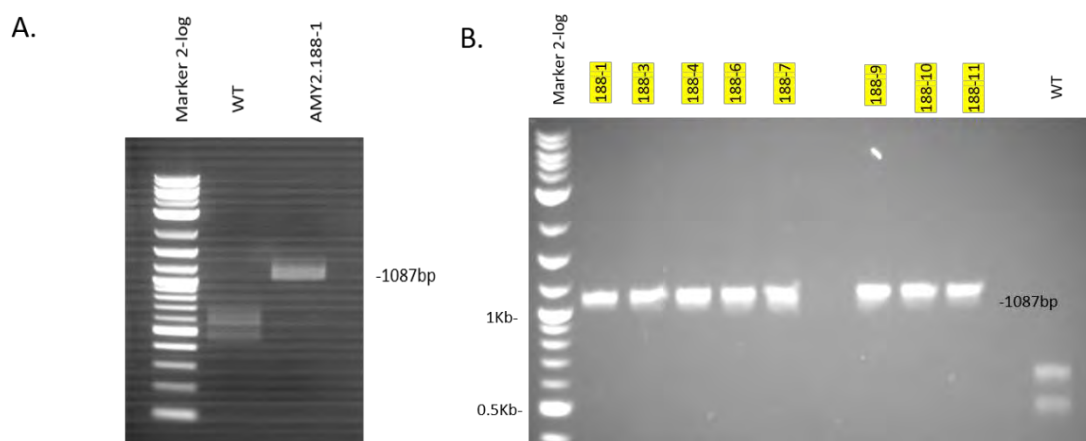
Μεταλλάγματα φυτών *Lotus japonicus*, *AMY2.188* και *CYP71-753*

Τα μεταλλάγματα του φυτού *L. japonicus* που χρησιμοποιήθηκαν είναι δύο διαφορετικά είδη. Το ένα είναι μετάλλαγμα tilling (tilling mutant) του γονιδίου *AMY2* (*amy2-188.1*) και πρόκειται για σημειακή μετάλλαξη μιας βάσης (από γουανίνη σε αδερίνη) που προκαλεί πρόωρο κωδικόνιο λήξης. Δημιουργήθηκε μέσω έκθεσης στο χημικό μεταλλαξιγόνο EMS (ethyl-methane-sulfonate). Συγκεκριμένα, καλλιεργήσαμε και συλλέξαμε σποράκια *amy2-188.1* με σκοπό να ελεγχθεί μια σειρά καθώς και οι απόγονοι της ως προς την ομοζυγία της σημειακής μετάλλαξης. Τα βήματα που ακολουθήθηκαν είναι τα παρακάτω:

1. Απομόνωση γονιδιωματικού DNA από φύλλα με τη χρήση της μεθόδου CTAB.
2. Ακολούθησε ενίσχυση του γονιδίου *AMY2* μέσω αλυσιδωτής αντίδρασης πολυμεράσης με εκκινητές ειδικούς για το γονίδιο. Οι εκκινητές που χρησιμοποιήθηκαν είναι οι εξής: *AMY2.till_F* 5'-GAAGATCTTTACTATCCCA-3' GC=37% 50°C και *AMY2.till_R* 5'-TAAGGTAGCTAACTACATAGG-3' GC=38% 55°C.
3. Πραγματοποιήθηκε πέψη με την περιοριστική ενδονουκλεάση BslI.
4. Τα αποτελέσματα ηλεκτροφόρησης σε πήκτωμα αγαρόζης 1,2% έδειξαν ότι όλοι οι απόγονοι είναι ομόζυγοι για την σημειακή μετάλλαξη του γονιδίου *AMY2* (Εικ.1.3) .

Το άλλο είδος μεταλλαγμάτων που χρησιμοποιήθηκε για το γονίδιο *cyp71-753* είναι από τη συλλογή γενετικού φυτικού υλικού LORE1. Βασίζεται στην ένθεση του *Lotus*

retrotransposon 1 (LORE1) που είναι ένα φυσικό ρετροτρανσποζόνιο τύπου LTR (long terminal repeat) του φυτού στο γονιδίωμα του *L. japonicus* GIFU⁵².



Εικόνα 1.3. Απεικόνιση των αποτελεσμάτων ηλεκτροφόρησης δειγμάτων DNA μετά από πέψη με τη περιοριστική ενδονουκλεάση BslI. Τα δείγματα ηλεκτροφορήθηκαν σε πήκτωμα αγαρόζης 1,2%.

Υλικά και μέθοδοι

Προετοιμασία υποστρώματος και συνθήκες ανάπτυξης φυτών

Για το πείραμα χρησιμοποιήθηκαν σπόροι του αγρίου τύπου φυτού *Lotus japonicus* (WT) (οικότυπος 'Gifu') καθώς και τα μεταλλάγματα *amy2-188* (Tilling mutant-Μεταλλάγματα σημειακής μετάλλαξης) και *cyp71-30063753* (*cyp71-753*) (LORE1 μεταλλάγματα) και *cyp71-30063753* WT (*CYP71-753* WT). Σπόροι τοποθετήθηκαν σε errendorfs και μεταφέρθηκαν σε θάλαμο κάθετης νηματικής ροής όπου εμβαπτίστηκαν σε πυκνό διάλυμα θειικού οξέος (1ml σε κάθε errendorf) για 15 λεπτά με σκοπό τη διάσπαση του εξωτερικού σκληρού περιβλήματος. Στη συνέχεια ακολούθησαν τρεις διαδοχικές εκπλύσεις με παγωμένο ddH₂O και στη συνέχεια τα σποράκια τοποθετήθηκαν σε διάλυμα BUF I (NaOCl 20% + Tween20 0,1%) υπό συνεχή ανάδευση για 20 λεπτά ώστε να γίνει επιφανειακή απολύμανση. Ακολούθως έγιναν 5-6 διαδοχικές εκπλύσεις με ddH₂O. Τέλος, αφού προστέθηκε 1 ml ddH₂O στο καθένα, τα Errendorf καλύφθηκαν με αλουμινόχαρτο και τοποθετήθηκαν στους 40C για 48 ώρες. Στη συνέχεια τα σποράκια μεταφέρθηκαν σε θάλαμο κάθετης νηματικής ροής και τοποθετήθηκαν σε τρυβλία με water agar (0,8%). Τα τρυβλία σφραγίστηκαν με parafilm, καλύφθηκαν με αλουμινόχαρτο και τοποθετήθηκαν στο σκοτάδι για 72 ώρες. Ακολούθως τα τρυβλία ξεσκεπάστηκαν (1η μέρα για τα φυτά) και τοποθετήθηκαν στο θάλαμο ανάπτυξης (16h φως/ 8h σκοτάδι/ 25oC, για 7 μέρες.)

Την έβδομη μέρα τα φυτά μεταφέρθηκαν σε φυτοδοχεία που περιείχαν περίπου 270gr υποστρώματος το οποίο προηγουμένως είχε ποτιστεί με 25 ml ddH₂O. Το υπόστρωμα που χρησιμοποιήθηκε είναι ανάμειξη δύο τύπων άμμου (MIT 2000: yellow silica, 3:1). Σε κάθε φυτοδοχείο (διαστάσεις: ύψος 6cm, πλάτος 7cm, μήκος 7cm) φυτεύτηκαν 3 φυτά με τη βοήθεια αποστειρωμένης λαβίδας. Για κάθε συνθήκη έχουμε 5 βιολογικές επαναλήψεις. Τα φυτοδοχεία τοποθετήθηκαν στον θάλαμο ανάπτυξης όπου ποτίζονταν ανά 2-3 ημέρες με απιονισμένο νερό εναλλάξ με θρεπτικό M-medium⁵³. Το πείραμα πραγματοποιήθηκε 5 φορές.

Σε δεύτερο στάδιο χρησιμοποιήθηκαν 2 επιπλέον είδη υποστρωμάτων μη αποστειρωμένα, ένα αμμώδες έδαφος και ένα αργιλώδες από ακαλλιέργητο αγρό. Το πείραμα αυτό πραγματοποιήθηκε 2 φορές. Σε αυτό το πείραμα οι δειγματοληψίες πραγματοποιήθηκαν στις 8 και 18 ημέρες μετά την μόλυνση λόγω της δυσκολίας απομόνωσης των φυτών από το έδαφος.

Συνθήκες ανάπτυξης του μύκητα *FsK* και ο εμβολιασμός των φυτών

Το στέλεχος *FsK* του μύκητα *Fusarium solani* καλλιεργήθηκε σε στερεές καλλιέργειες PDA (Potato Dextrose Agar). Για την καλλιέργεια του μύκητα έγινε προετοιμασία του θρεπτικού υλικού PDB (Potato Dextrose Broth). Στη συνέχεια έγινε η μεταφορά ενός τμήματος από τις στερεές καλλιέργειες του μύκητα σε αποστειρωμένες γυάλινες φλάσκες των 250ml που περιείχαν 100ml PDB με την βοήθεια ενός νυστεριού. Αυτή η μεταφορά έγινε σε θάλαμο νηματικής ροής σε στείρες συνθήκες ώστε να αποφευχθούν τυχόν επιμολύνσεις της καλλιέργειας. Οι φλάσκες που περιείχαν τον μύκητα καλύφθηκαν με αλουμινόχαρτο και αφού σφραγίστηκαν με πάραφιλμ μεταφέρθηκαν σε επωαστήρα (25°C, 160rpm) για 5 ημέρες, για την ανάπτυξη του μύκητα. Μετά από 5 μέρες στον επωαστήρα, οι 2 φλάσκες μεταφέρθηκαν σε θάλαμο κάθετης νηματικής ροής, ώστε να πραγματοποιηθεί η συλλογή των κονιδίων. Για την συλλογή κονιδίων τοποθετήθηκε ένα γυάλινο χωνί πάνω σε ένα falcon των 50 ml, ενώ το γυάλινο χωνί ήταν καλυμμένο με ένα διπλωμένο κομμάτι από τουλουπάνι. Στην συνέχεια έγινε μεταφορά της υγρής καλλιέργειας του μύκητα από την φλάσκα στο χωνί, μέχρι το falcon να γεμίσει με την υγρή καλλιέργεια. Αυτή η διαδικασία έγινε και για τις 2 καλλιέργειες του μύκητα. Αφού ολοκληρώθηκε η μεταφορά αφαιρέθηκε το χωνί και αφού έγινε έλεγχος ότι τα δυο falcon είχαν το ίδιο βάρος, ακολούθησε μια φυγοκέντρωση για 5 λεπτά στους 160C και 6500 rpm. Μετά την φυγοκέντρωση έγινε απόρριψη του υπερκείμενου, και μεταφορά τις περίσσειας υγρής καλλιέργειας του μύκητα με την χρήση του χωνιού στο falcon. Έπειτα ακολούθησε μια δεύτερη φυγοκέντρωση στις ίδιες συνθήκες και απόρριψη του υπερκείμενου. Μετά έγινε επαναδιαλυτοποίηση του ιζήματος (κονίδια *FsK*) με την προσθήκη 5ml διαλύματος NaCl 0,85% w/v. Τέλος έγινε μια τρίτη φυγοκέντρωση, πάντα στις ίδιες συνθήκες απόρριψη του υπερκείμενου και επαναδιαλυτοποίηση του ιζήματος σε 5ml διαλύματος NaCl 0,85% w/v. Για την μέτρηση κονιδίων πραγματοποιήθηκαν

διαδοχικές αραιώσεις του διαλύματος που περιείχε τα κονίδια σε συγκεντρώσεις 1/10, 1/100, 1/500 και 1/1000. Για την μέτρηση των κονιδίων χρησιμοποιήθηκε η αραιώση 1/500. Η μέτρηση έγινε με την χρήση οπτικού μικροσκοπίου και τη βοήθεια της πλάκας Neubauer. Τέλος πραγματοποιήθηκε η κατάλληλη αραιώση ώστε να επιτευχθεί στο εμβόλιο η συγκέντρωση 5×10^3 κονίδια/ml. Στην συνέχεια σε φυτά 10 ημερών πραγματοποιήθηκε εμβολιασμός με 100 κονίδια ανά ρίζα. Ακολούθησαν δύο δειγματοληψίες σε χρονικό διάστημα 5 και 14 ημερών μετά τον εμβολιασμό με τον μύκητα.

Δειγματοληψία και Απομόνωση γονιδιακού DNA

Κατά τη διάρκεια της δειγματοληψίας από κάθε γλάστρα (3 φυτά) αφαιρέθηκε το μείγμα άμμου και προσεκτικά μεταφέρθηκε το κάθε φυτό σε αποστειρωμένο νερό όπου ξεπλύθηκε για να φύγουν τα υπολείμματα άμμου από τις ρίζες. Στη συνέχεια τα φυτά μεταφέρθηκαν στο διάλυμα χλωρίνης 1%. Ακολούθως τα φυτά μεταφέρθηκαν με λαβίδα σε διηθητικό χαρτί για να στεγνώσουν και μετρήθηκε το μήκος της ρίζας. Στη συνέχεια έγινε τομή στο επίπεδο του υποκοτυλίου με νυστέρι και διαχωρίστηκε ο ιστός της ρίζας από τον ιστό των φύλλων. Τα δείγματα τοποθετήθηκαν σε errendorf tubes και μετρήθηκε το βάρος της ρίζας και των φύλλων. Τα δείγματα μεταφέρθηκαν άμεσα σε υγρό άζωτο και όταν τελείωσε η διαδικασία αποθηκεύτηκαν στους -80°C . Αυτό διασφάλισε τη μακροπρόθεσμη συντήρηση και διασφάλιση της ποιότητας του ιστού για περεταίρω ανάλυση. Με σκοπό την απομόνωση του γονιδιακού DNA οι ρίζες των φυτών που είχαν αποθηκευτεί στους -80°C μεταφέρθηκαν σε υγρό άζωτο και στην συνέχεια λειοτριβήθηκαν. Η απομόνωση του γονιδιωματικού DNA πραγματοποιήθηκε με τη χρήση της μεθόδου CTAB. Σύμφωνα με τη μέθοδο CTAB, σε λειοτριβημένα δείγματα προστέθηκαν 300μL διαλύματος CTAB, το οποίο έχει προθερμανθεί σε υδατόλουτρο στους 65°C . Ακολούθησε ανάδευση των δειγμάτων και τοποθέτηση τους σε υδατόλουτρο στους 65°C για 15 λεπτά. Έπειτα έγινε προσθήκη 150μL διαλύματος 1:25 ισοαμυλική αλκοόλη: χλωροφόρμιο και ανάδευση με vortex για 30 δευτερόλεπτα. Ακολούθησε φυγοκέντρωση των δειγμάτων στα 11.000g για 5 λεπτά και μεταφορά της επάνω φάσης του υπερκειμένου σε νέο σωλήνα errendorf. Στην συνέχεια έγινε προσθήκη ποσότητας ισοπροπανόλης ίση με 0,7 επί του όγκου του δείγματος, ήπια ανάδευση μέσω ανάστροφης και επώαση σε θερμοκρασία δωματίου για 10 λεπτά. Έπειτα μια δεύτερη φυγοκέντρωση στα 11.000g για 15 λεπτά, απόρριψη του υπερκειμένου με την βοήθεια πιπέτας και επαναδιαλυτοποίηση του pellet σε 500μL παγωμένης 70% αιθανόλης. Μια τρίτη φυγοκέντρωση στα 11.000g για 5 λεπτά, απόρριψη του υπερκειμένου και στέγνωμα του pellet που περιείχε το DNA σε 50°C για 10 λεπτά. Η επαναδιαλυτοποίηση του pellet έγινε σε 15μL ddH₂O που περιείχε RNase (1μL RNase σε 50μL ddH₂O). Τέλος έγινε ένα ήπια ανάδευση και φυγοκέντρωση

των δειγμάτων και αποθήκευση τους στους -20°C. Η ίδια διαδικασία ακολουθήθηκε και για τις δύο χρονικές στιγμές.

Ποσοτικοποίηση του DNA

Το ολικό DNA που απομονώθηκε για κάθε δείγμα ποσοτικοποιήθηκε με τη χρήση της συσκευής Qubit (Invitrogen) σύμφωνα με τις οδηγίες του κατασκευαστή. Η κατεργασία έγινε με το Qubit dsDNA HS Assay kit της Invitrogen.

Ανίχνευση αποικισμού από τον μύκητα *F. solani* στις ρίζες του φυτού *Lotus japonicus*

Για να επιβεβαιωθεί ότι έγινε αποικισμός στις ρίζες των *Lotus japonicus* φυτών μεταλλαγμένων και μη από το στέλεχος FsK του μύκητα χρησιμοποιήθηκε το DNA που απομονώθηκε με τη μέθοδο CTAB. Η επιβεβαίωση έγινε μέσω της μεθόδου αλυσιδωτής αντίδρασης πολυμεράσης πραγματικού χρόνου (Real Time PCR). Σε αυτό το πείραμα χρησιμοποιήθηκαν εκκινητές που στόχευαν το γονίδιο ITS του μύκητα. Οι εκκινητές είναι οι εξής: ITS-F (5'-TAGGGTAGCTGGGTCTGACT-3') and ITS-R (5'-ACCAAGTCTAACCCGCCTAC-3')⁴³.

Στατιστική ανάλυση

Για όλες τις στατιστικές αναλύσεις πραγματοποιήθηκε ανάλυση Student t-test. Το επίπεδο σημαντικότητας ορίστηκε στο $p < 0.05$.

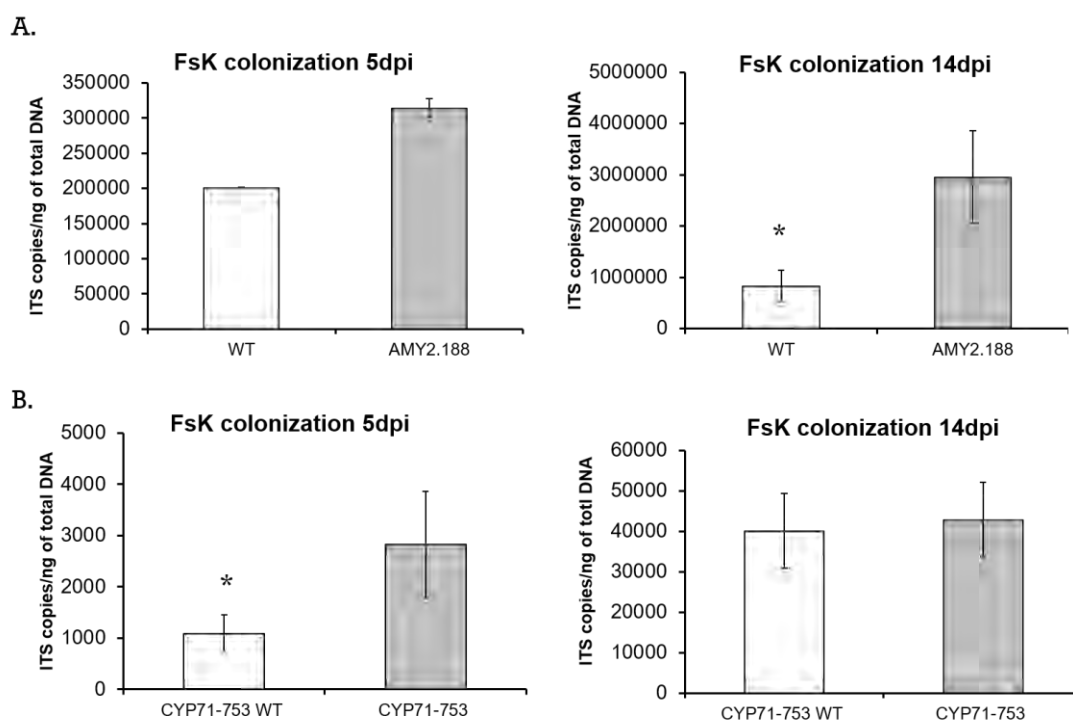
Αποτελέσματα

Ο FsK είναι ικανός να αποικίζει και τις ρίζες των μεταλλαγμάτων *amy2-188* και *cyp71-30063753* φυτών *Lotus japonicas* χωρίς να επηρεάζει παραμέτρους αύξησης και ανάπτυξης των φυτών σε αποστειρωμένο υπόστρωμα.

Ο ενδοφυτικός μύκητας όπως είναι ήδη γνωστό είναι ικανός να αποικίσει τις ρίζες του φυτού *L. japonicus* χωρίς να προκαλεί κάποιο σύμπτωμα⁴³. Στην εργασία αυτή διαπιστώθηκε ότι είναι ικανός να αποικίσει και μεταλλάγματα του βιοσυνθετικού μονοπατιού των τριτερπενίων (Εικ.1.4 Α και Β). Παρατηρήθηκε ότι στις 5 μέρες μετά τον εμβολιασμό με το ενδόφυτο τα επίπεδα αποικισμού στα μεταλλάγματα είναι σε

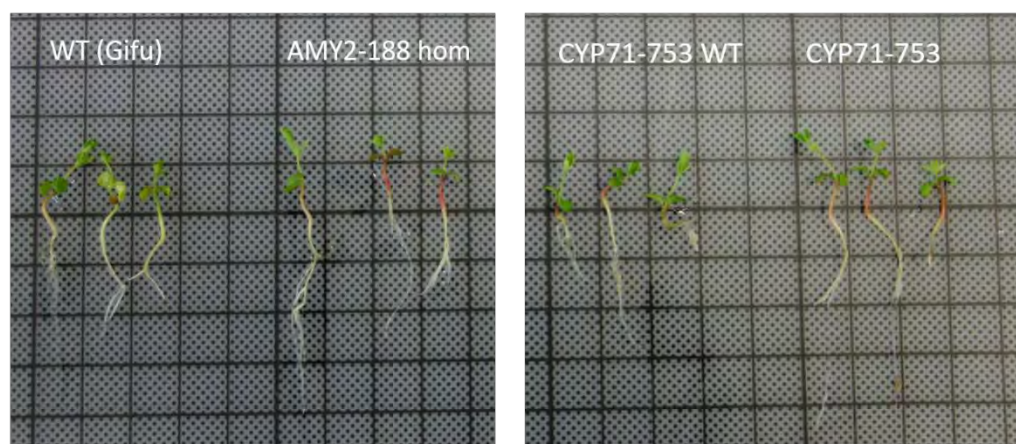
μεγαλύτερο βαθμό σε σχέση με τα αντίστοιχα φυτά αγρίου τύπου. Αυτή η διαφορά είναι στατιστικά σημαντική για τα φυτά *CYP71-30063753* ενώ στα φυτά *AMY2.188* από τις 5 φορές που έχει πραγματοποιηθεί το πείραμα, τις 3 φορές παρατηρήθηκε αυτή η τάση με στατιστικά σημαντική διαφορά ενώ τις 2 χωρίς να υπάρχει στατιστική διαφορά. Από την άλλη πλευρά, στις 14 μέρες μετά την μόλυνση η τάση αυτή στα φυτά *AMY2.188* γίνεται στατιστικά σημαντική με τα επίπεδα του μύκητα να είναι και πάλι σε μεγαλύτερο βαθμό στα φυτά αυτά σε σύγκριση με τα φυτά αγρίου τύπου. Στα φυτά *CYP71-753* σε μεταγενέστερο χρονικό στάδιο δειγματοληψίας τα επίπεδα αποικισμού είναι σε ίδιο βαθμό με τα φυτά αγρίου τύπου.

Όπως διακρίνεται στην εικόνα 1.5 ο μύκητας δεν προκαλεί κάποια αλλαγή στον φαινότυπο των φυτών και στην ανάπτυξη τους. Επίσης δεν καταγράφηκαν στατιστικά σημαντικές αλλαγές στο μήκος των ριζών και των βλαστών τόσο στις 5 όσο και στις 14 ημέρες μετά τον εμβολιασμό σε όλες τις επαναλήψεις του περάματος (Εικ.1.6).

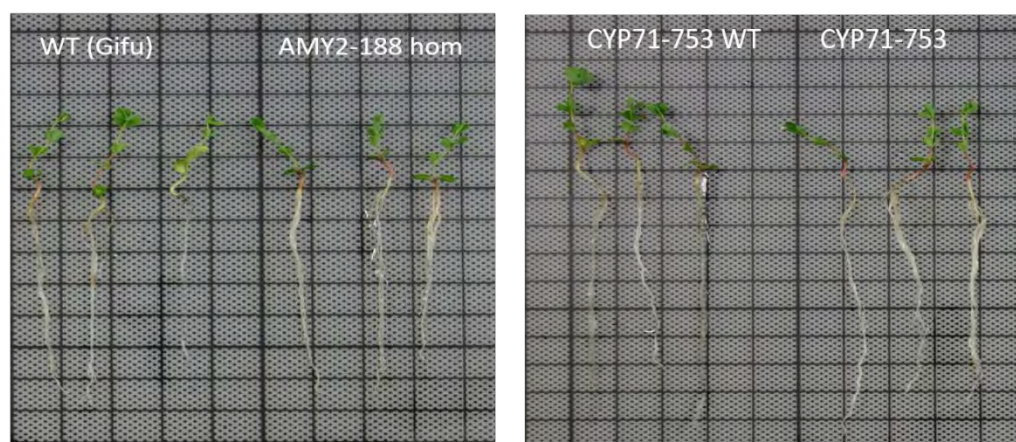


Εικόνα 1.4: Επίπεδα αποικισμού στο ριζικό σύστημα των φυτών *Lotus japonicus* τόσο αγρίου τύπου καθώς και των μεταλλαγμάτων *AMY2.188* και *CYP71-30063753* από το ενδοφύτο *Fusarium solani* στέλεχος K (FsK) στις 5 και 14dpi. Ποσοτικοποίηση του αποικισμού του μύκητα εντός των ιστών της ρίζας με qPCR χρησιμοποιώντας εκκινητές ειδικούς για το γονίδιο ITS (πρωτεύων άξονας). Οι τιμές κανονικοποιούνται ως προς τα ng του συνολικού DNA που απομονώθηκε. Τα δεδομένα είναι μέσο δύο τεχνικών επαναλήψεων για καθένα από τα τέσσερα βιολογικά αντίγραφα. Κάθε βιολογικό αντίγραφο αποτελείται από τρία φυτά. Σημαντικές διαφορές καταγράφηκαν μεταξύ των φυτών που αναπτύχθηκαν μεταξύ φυτών αγρίου τύπου και μεταλλαγμάτων μετά το Student's t-test.

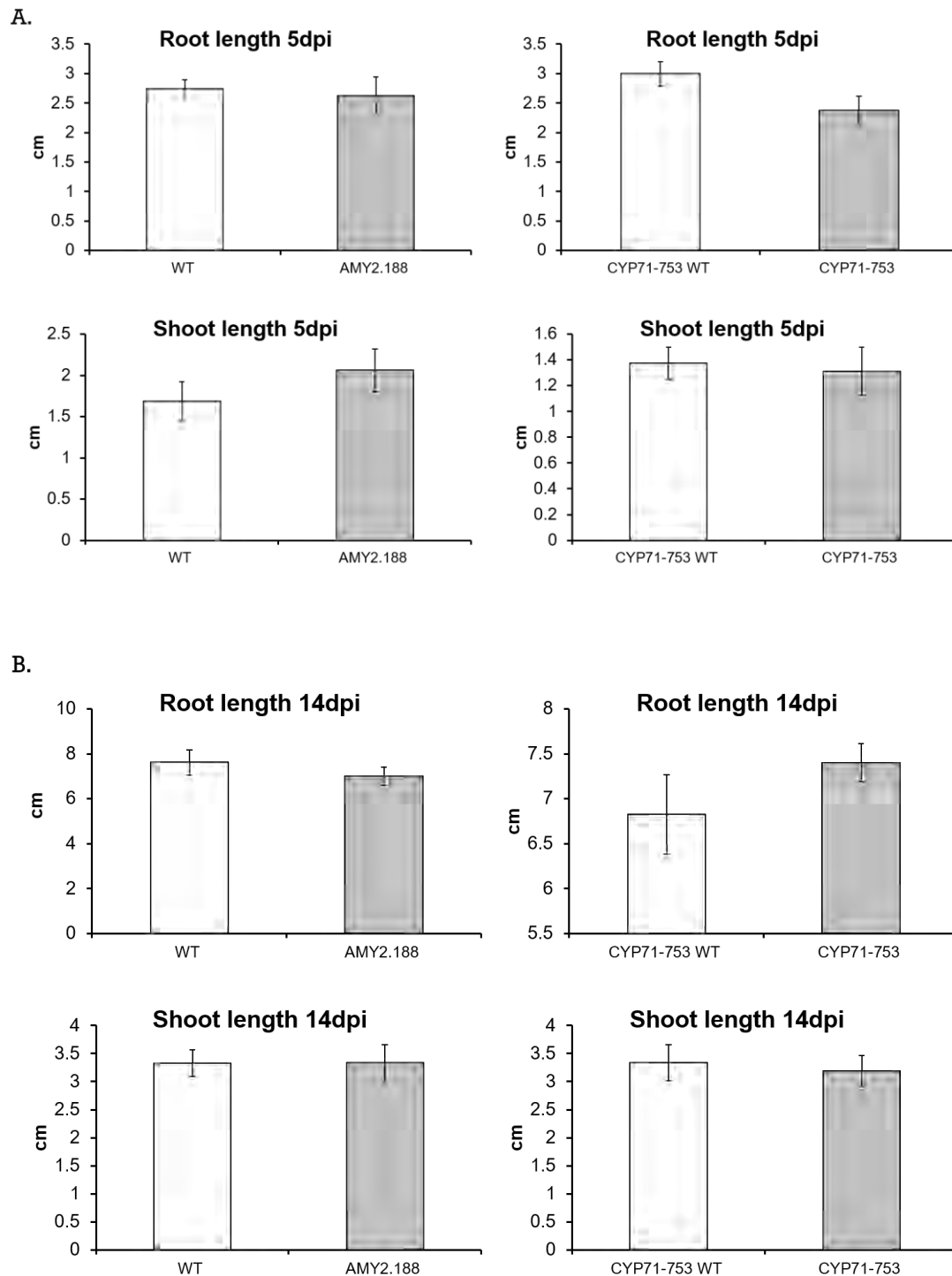
A.



B.



Εικόνα 1.5: Αντιπροσωπευτικές εικόνες απεικόνισης των φυσιολογικών παραμέτρων αύξησης των φυτών ελέγχου και των μεταλλαγμάτων AMY2.188 και CYP71-753 στις 5 (A) και 14 (B) ημέρες μετά των εμβολιασμό με τον ενδοφυτικό μύκητα FsK.

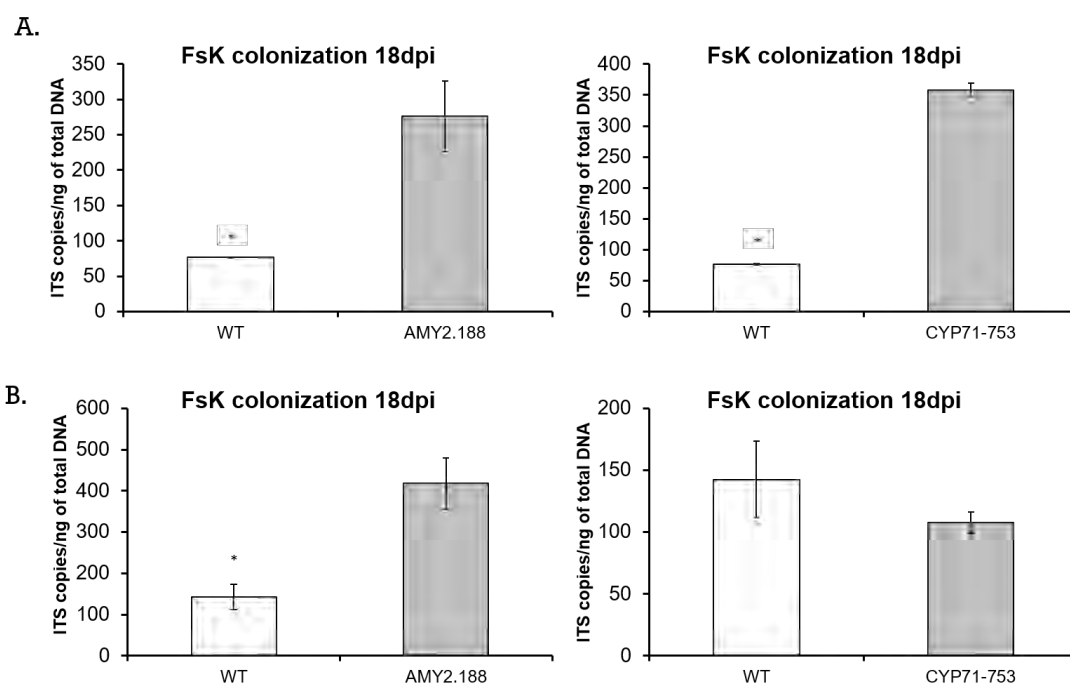


Εικόνα 1.6: Διαγράμματα απεικόνισης των φυσιολογικών παραμέτρων αύξησης, μήκος ρίζας και υπέργειου τμήματος, φυτών ελέγχου και των μεταλλαγμάτων AMY2.188 και CYP71-753 στις 5 (A) και 14 (B) ημέρες μετά των εμβολιασμό με τον ενδοφυτικό μύκητα *FsK*. Τα δεδομένα είναι ο μέσος όρος τεσσάρων βιολογικών επαναλήψεων. Κάθε βιολογική επανάληψη είναι μέσος όρος 3 φυτών. Σημαντικές διαφορές δεν καταγράφηκαν μεταξύ των φυτών που αναπτύχθηκαν δηλαδή μεταξύ φυτών αγρίου τύπου και μεταλλαγμάτων μετά το Student's t-test.

Ο FsK είναι ικανός να αποικίζει τις ρίζες των μεταλλαγμάτων *amy2-188.1* και *cyp71-30063753* φυτών *Lotus japonicas* χωρίς να επηρεάζεται από το διαφορετικό υπόστρωμα ανάπτυξης.

Αφού διαπιστώθηκε ότι είναι ικανός ο μύκητας να αποικίσει και μεταλλάγματα του βιοσυνθετικού μονοπατιού τριτερπενίων (Εικ.1.4 Α και Β) στόχος ήταν να ελέγξουμε αν αυτή η ικανότητα διατηρείται ή επηρεάζεται από την ανάπτυξη σε φυσικό έδαφος. Ο απώτερος στόχος είναι η μελέτη της επίδρασης της παρουσίας του ενδόφυτου στη μικροβιακή κοινότητα στη ριζόσφαιρα του φυτού και η συμμετοχή του βιοσυνθετικού μονοπατιού της AMY2 κυκλάσης σε αυτήν. Όσον αφορά τα αποτελέσματα στις 8 ημέρες μετά τον εμβολιασμό με τον ενδοφυτικό μύκητα (dpi), τα επίπεδα αποικισμού δεν ήταν διακριτά και επαναλαμβανόμενα καθώς δεν καταφέραμε να ανιχνεύσουμε τον μύκητα στα φυτά αγρίου τύπου.

Από την άλλη στις 18 dpi, στο αργιλώδες-ακαλλιέργητο έδαφος παρατηρούνται αυξημένα επίπεδα αποικισμού του μύκητα στα φυτά *AMY2.188* και *CYP71-753* σε σύγκριση με του αγρίου τύπου με τη διαφορά να είναι στατιστικά σημαντική (Εικ.1.7.A). Στο αμμώδες έδαφος, στις 18 dpi, καταγράφηκαν αυξημένα επίπεδα αποικισμού στα φυτά *AMY2.188* αυτά σε σύγκριση με τα φυτά αγρίου τύπου, ενώ στα φυτά *CYP71-753* στο μεταγενέστερο χρονικό στάδιο δειγματοληψίας τα επίπεδα αποικισμού είναι σε ίδιο βαθμό με τα φυτά αγρίου τύπου (Εικ.1.7. Β).



Εικόνα 1.7: Επίπεδα αποικισμού στο ριζικό των φυτών *Lotus japonicus* τόσο αγρίου τύπου καθώς και των μεταλλαγμάτων AMY2.188 και CYP71-30063753 από το ενδοφύτο *Fusarium solani* στέλεχος K (FsK) στις 18dpi υπό ανάπτυξη σε αργιλώδες-ακαλλιέργητο (Α) και αμμώδες (Β) έδαφος. Ποσοτικοποίηση του αποικισμού του μύκητα εντός των ιστών της ρίζας με qPCR χρησιμοποιώντας εκκινητές ειδικούς για το γονίδιο ITS. Οι τιμές κανονικοποιούνται ως προς τα ng του συνολικού DNA που απομονώθηκε. Τα δεδομένα είναι μέσο δύο τεχνικών επαναλήψεων για καθένα από τα τρία βιολογικά αντίγραφα. Κάθε βιολογικό αντίγραφο αποτελείται από τρία φυτά. Σημαντικές διαφορές καταγράφηκαν μεταξύ των φυτών που αναπτύχθηκαν μεταξύ φυτών αγρίου τύπου και μεταλλαγμάτων μετά το Student's t-test .

Συζήτηση

Στην παρούσα μελέτη, αξιολογήσαμε την επίδραση των μεταλλαγμάτων *amy2.188* και *cyp71-753* και τριών διαφορετικών υποστρώματων ανάπτυξης των φυτών (αποστειρωμένο, μη αποστειρωμένο-αμμώδες και μη αποστειρωμένο-αργιλώδες έδαφος) στην ικανότητα αποικισμού του ενδοφυτικού μύκητα *F. solani* στελέχους K (FsK). Καταγράψαμε τις αλλαγές σε επίπεδο αποικισμού κάτω από τις διαφορετικές συνθήκες και διαπιστώθηκε η ικανότητα του μύκητα να αποικίζει σε όλες τις διαφορετικές συνθήκες. Σε αντίθεση με τις αλλαγές που παρατηρήθηκαν σε επίπεδο αποικισμού, δεν καταγράφηκαν αλλαγές σε φυσιολογικές παραμέτρους αύξησης και ανάπτυξης όπως το μήκος ρίζας και υπέργειου τμήματος τόσο σε πρώιμο όσο και σε μεταγενέστερο στάδιο από την μόλυνση του ριζικού συστήματος με τον ενδοφυτικό μύκητα.

Όσον αφορά το αποστειρωμένο υπόστρωμα ανάπτυξης των φυτών, παρατηρούμε ότι ο μύκητας είναι ικανός να αποικίζει σε μεγαλύτερο βαθμό τα μεταλλάγματα. Ακόμη και στις περιπτώσεις που δεν υπήρξε στατιστικά σημαντική διαφορά, παρατηρήθηκε η ίδια τάση για αυξημένα επίπεδα αποικισμού των μεταλλαγμάτων σε σχέση με τα φυτά αγρίου τύπου και στις 3 επαναλήψεις. Τα αποτελέσματα αυτά μας δείχνουν ότι πιθανόν το συγκεκριμένο μονοπάτι βιοσύνθεσης τριτερπενίων λειτουργεί ως αρνητικός ρυθμιστής της ενδοφυτικής εξάπλωσης του μύκητα. Ποιος ακριβώς μεταβολίτης ευθύνεται για αυτήν τη δράση δεν έχει προσδιορισθεί και απομένει να διευκρινισθεί.

Σε επόμενο βήμα ελέγχθηκε αν ο μύκητας είναι ικανός να αποικίζει τους γενότυπους αυτούς και υπό διαφορετικά μη αποστειρωμένα υποστρώματα και άρα αν επηρεάζεται από το μικροβίωμα των εδαφών αυτών. Τα αποτελέσματα δείχνουν ότι ο μύκητας είναι ικανός να αποικίζει τις ρίζες των φυτών και υπό μη αποστειρωμένα υποστρώματα ανάπτυξης. Αρχικά παρατηρούμε μία καθυστέρηση στην ανίχνευση του μύκητα στα φυτά αγρίου τύπου. Σε μεταγενέστερο χρονικό διάστημα παρατηρούμε μια στατιστικά σημαντική διαφορά στα επίπεδα αποικισμού του μύκητα με μεγαλύτερο αποικισμό στα μεταλλάγματα σε σύγκριση με του αγρίου τύπου φυτά. Οι διαφορές αυτές που παρατηρούνται στα μη αποστειρωμένα εδάφη είναι πιθανό να επηρεάζονται από το μικροβίωμα του υποστρώματος. Επομένως ακόμη και παρουσία άλλων μικροβιακών κοινοτήτων ο μύκητας αποικίζει σε μεγαλύτερο βαθμό, επισημαίνοντας ότι το βιοσυνθετικό μονοπάτι των τριτερπενίων λειτουργεί ως αρνητικός ρυθμιστής. Παρατηρούμε επομένως μία ειδική σχέση του μύκητα με το μονοπάτι τριτερπενίων.

Ένας επόμενος στόχος θα ήταν να διερευνηθεί πως επηρεάζεται το μικροβίωμα των φυτών αυτών από την παρουσία του μύκητα και αντιστρόφως πώς επηρεάζεται ο

μύκητας από τα μεταλλάγματα αυτά. Το πείραμα αυτό έχει πραγματοποιηθεί χωρίς να υπάρχουν ακόμη τα αποτελέσματα για το αν και πώς επηρεάζεται το μικροβίωμα των φυτών παρουσία του μύκητα. Η πειραματική διαδικασία περιγράφεται στο παράρτημα 1. Γίνεται, λοιπόν, ξεκάθαρο πως υπάρχουν ακόμα πολλές άγνωστες πτυχές τόσο του ρόλου του μύκητα όσο και των τριτερπενίων στην συμβιωτική αυτή αλληλεπίδραση.

Είναι γνωστό ότι τα φυτά εκκρίνουν, μέσω των ριζών τους, οργανικές ενώσεις στο περιβάλλον της ριζόσφαιρας. Οι ενώσεις αυτές αποτελούν σήματα για τους μικροοργανισμούς ώστε να προσελκύσουν την επιφάνεια του ριζικού συστήματος. Πολλές μελέτες έχουν δείξει ότι η ποσότητα και η ποιότητα των εκκρίσεων της ρίζας καθορίζονται από τα φυτικά είδη και εξαρτώνται σημαντικά από τον βαθμό συμβίωσης εξωγενών μικροοργανισμών. Πρόσφατες μελέτες έχουν δείξει ότι προϊόντα βιοσύνθεσης των τριτερπενίων είναι ικανά να μεταβάλουν το μικροβίωμα των φυτών όπως του *Arabidopsis*⁵⁴. Επίσης έχει δειχθεί ότι ο αποικισμός ριζών από ενδοφυτικός μύκητας επηρεάζει και μεταβάλλει σημαντικά την έκκριση οργανικών ενώσεων από τις ρίζες⁵⁵.

Τέλος, σε παράλληλα πειράματα που πραγματοποιήθηκαν στα μεταλλάγματα αυτά παρατηρήθηκε ότι επηρεάζεται η διαδικασία φυματιογένεσης. Συγκεκριμένα, στα μεταλλάγματα αυτά ο αριθμός των φυματίων ήταν στατιστικά μεγαλύτερος σε σύγκριση με τα φυτά αγρίου τύπου. Παρατηρείται και πάλι το μονοπάτι βιοσύνθεσης των τριτερπενίων να δρα με ανασταλτικό τρόπο και ως προς τη διαδικασία της φυματιογένεσης. γνωρίζοντας ότι το μονοπάτι βιοσύνθεσης των τριτερπενίων δρα ανασταλτικά τόσο ως προς την ικανότητα αποικισμού του ριζικού συστήματος από τον μύκητα όσο και ως προς τη διαδικασία φυματιογένεσης, επόμενος στόχος το διδακτορικού αυτού είναι η επίδραση του μύκητα στη διαδικασία της φυματιογένεσης τόσο σε φυτά αγρίου τύπου όσο και στα μεταλλάγματα *aty2.188* και *cyp71-753* (κεφάλαιο 2).

Βιβλιογραφία

1. Gepts P, Beavis WD, Brummer EC, et al. Legumes as a model plant family. Genomics for food and feed report of the cross-legume advances through genomics conference. *Plant Physiol.* 2005;137(4):1228-1235. doi:10.1104/pp.105.060871
2. Udvardi MK, Tabata S, Parniske M, Stougaard J. Lotus japonicus: Legume research in the fast lane. *Trends Plant Sci.* 2005;10(5):222-228. doi:10.1016/j.tplants.2005.03.008
3. Graham PH, Vance CP. Legumes: Importance and constraints to greater use. *Plant Physiol.* 2003;131(3):872-877. doi:10.1104/pp.017004
4. Handberg K, Stougaard J. for Classical and Molecular Genetics. *Plant J.* 1992;2(4):487-496.
5. Jiang Q, Gresshoff PM. Classical and molecular genetics of the model legume Lotus japonicus. *Mol Plant-Microbe Interact.* 1997;10(1):59-68. doi:10.1094/MPMI.1997.10.1.59
6. Sato S, Nakamura Y, Kaneko T, et al. Genome structure of the legume, Lotus japonicus. *DNA Res.* 2008;15(4):227-239. doi:10.1093/dnares/dsn008
7. Mun T, Bachmann A, Gupta V, Stougaard J, Andersen SU. Lotus Base: An integrated information portal for the model legume Lotus japonicus. *Sci Rep.* 2016;6:1-18. doi:10.1038/srep39447
8. V S. Nitrogen in crop production : An account of global flows adds. *Global Biogeochem Cycles.* 1999;13(2):647-662.
9. Oldroyd GED. Speak, friend, and enter: Signalling systems that promote beneficial symbiotic associations in plants. *Nat Rev Microbiol.* 2013;11(4):252-263. doi:10.1038/nrmicro2990
10. Bever JD, Simms EL. Evolution of nitrogen fixation in spatially structured populations of Rhizobium. *Heredity (Edinb).* 2000;85(4):366-372. doi:10.1046/j.1365-2540.2000.00772.x
11. Parniske M. Arbuscular mycorrhiza: The mother of plant root endosymbioses. *Nat Rev Microbiol.* 2008;6(10):763-775. doi:10.1038/nrmicro1987
12. Choi J, Summers W, Paszkowski U. Annual Review of Phytopathology Mechanisms Underlying Establishment of Arbuscular Mycorrhizal Symbioses. *Annu Rev Phytopathol.* 2018;56(May):7-8. <https://doi.org/10.1146/annurev-phyto-080516->
13. Afkhami ME, Almeida BK, Hernandez DJ, Kieseewetter KN, Revillini DP. Tripartite mutualisms as models for understanding plant-microbial interactions. *Curr Opin Plant Biol.* 2020;56:28-36. doi:10.1016/j.pbi.2020.02.003
14. Tsiknia M, Tsikou D, Papadopoulou KK, Ehaliotis C. Multi-species relationships in legume roots: From pairwise legume-symbiont interactions to the plant - Microbiome - soil continuum. *FEMS Microbiol Ecol.* 2021;97(2):1-16. doi:10.1093/femsec/fiaa222

15. Larimer AL, Clay K, Bever JD. Synergism and context dependency of interactions between arbuscular mycorrhizal fungi and rhizobia with a prairie legume. *Ecology*. 2014;95(4):1045-1054. doi:10.1890/13-0025.1
16. Brader G, Compant S, Vescio K, et al. Ecology and Genomic Insights into Plant-Pathogenic and Plant-Nonpathogenic Endophytes. *Annu Rev Phytopathol*. 2017;55:61-83. doi:10.1146/annurev-phyto-080516-035641
17. Wilson D. Endophyte: The Evolution of a Term, and Clarification of Its Use and Definition. *Oikos*. 1995;73(2):274. doi:10.2307/3545919
18. White JF. An Overview of Endophytic Microbes: Endophytism Defined. *Microb Endophytes*. 2020;(January 2000):17-44. doi:10.1201/9781482277302-1
19. Rodriguez RJ, White JF, Arnold AE, Redman RS. Fungal endophytes: Diversity and functional roles: Tansley review. *New Phytol*. 2009;182(2):314-330. doi:10.1111/j.1469-8137.2009.02773.x
20. Varma A, Verma S, Sudha, Sahay N, Bütchorn B, Franken P. Piriformospora indica, a cultivable plant-growth-promoting root endophyte. *Appl Environ Microbiol*. 1999;65(6):2741-2744. doi:10.1128/aem.65.6.2741-2744.1999
21. Waller F, Achatz B, Baltruschat H, et al. The endophytic fungus Piriformospora indica reprograms barley to salt-stress tolerance, disease resistance, and higher yield. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 2005;102(38):13386-13391. doi:10.1073/pnas.0504423102
22. Baltruschat H, Fodor J, Harrach BD, et al. Salt tolerance of barley induced by the root endophyte Piriformospora indica is associated with a strong increase in antioxidants. *New Phytol*. 2008;180(2):501-510. doi:10.1111/j.1469-8137.2008.02583.x
23. Rai M, Acharya D, Singh A, Varma A. Positive growth responses of the medicinal plants *Spilanthes calva* and *Withania somnifera* to inoculation by Piriformospora indica in a field trial. *Mycorrhiza*. 2001;11(3):123-128. doi:10.1007/s005720100115
24. Das A, Kamal S, Shakil NA, et al. The root endophyte fungus Piriformospora indica leads to early flowering, higher biomass and altered secondary metabolites of the medicinal plant, *Coleus forskohlii*. *Plant Signal Behav*. 2012;7(1):103-112. doi:10.4161/psb.7.1.18472
25. Abdelaziz ME, Kim D, Ali S, Fedoroff N V., Al-Babili S. The endophytic fungus Piriformospora indica enhances Arabidopsis thaliana growth and modulates Na⁺/K⁺ homeostasis under salt stress conditions. *Plant Sci*. 2017;263(May):107-115. doi:10.1016/j.plantsci.2017.07.006
26. Hiruma K, Gerlach N, Sacristán S, et al. Root Endophyte Colletotrichum tofieldiae Confers Plant Fitness Benefits that Are Phosphate Status Dependent. *Cell*. 2016;165(2):464-474. doi:10.1016/j.cell.2016.02.028
27. Pagare S, Bhatia M, Tripathi N, Pagare S, Bansal YK. Secondary metabolites of plants and their role: Overview. *Curr Trends Biotechnol Pharm*. 2015;9(3):293-304.
28. García-Calderón M, Pérez-Delgado CM, Palove-Balang P, Betti M, Márquez AJ. Flavonoids and isoflavonoids biosynthesis in the model legume lotus japonicus;

- connections to nitrogen metabolism and photorespiration. *Plants*. 2020;9(6):1-22. doi:10.3390/plants9060774
29. Krokida A, Delis C, Geisler K, et al. A metabolic gene cluster in *Lotus japonicus* discloses novel enzyme functions and products in triterpene biosynthesis. *New Phytol*. 2013;200(3):675-690. doi:10.1111/nph.12414
 30. Toll D. Biosynthesis and Biological Functions of Terpenoids in Plants. *Adv Biochem Eng Biotechnol*. 2014;123(July 2015):127-141. doi:10.1007/10
 31. Thimmappa R, Geisler K, Louveau T, O'Maille P, Osbourn A. Triterpene biosynthesis in plants. *Annu Rev Plant Biol*. 2014;65(September):225-257. doi:10.1146/annurev-arplant-050312-120229
 32. Vincken J, Heng L, Groot A De, Gruppen H. Saponins , classification and occurrence in the plant kingdom. 2007;68:275-297. doi:10.1016/j.phytochem.2006.10.008
 33. Kushiro T, Shibuya M, Ebizuka Y. β -Amyrin synthase Cloning of oxidosqualene cyclase that catalyzes the formation of the most popular triterpene among higher plants. 244:238-244.
 34. Delis C, Krokida A, Georgiou S, et al. Role of lupeol synthase in *Lotus japonicus* nodule formation. *New Phytol*. 2011;189(1):335-346. doi:10.1111/j.1469-8137.2010.03463.x
 35. Summerell BA. Resolving *Fusarium*: Current Status of the Genus. *Annu Rev Phytopathol*. 2019;57:323-339. doi:10.1146/annurev-phyto-082718-100204
 36. Ma LJ, Geiser DM, Proctor RH, et al. *Fusarium* pathogenomics. *Annu Rev Microbiol*. 2013;67:399-416. doi:10.1146/annurev-micro-092412-155650
 37. Moretti A. Taxonomy of *Fusarium* genus: A continuous fight between lumpers and splitters. *Zb Matice Srpske Akad. Nauk*. 2009;(117):7-13. doi:10.2298/zmspn0917007m
 38. Fourie G, Steenkamp ET, Ploetz RC, Gordon TR, Viljoen A. Current status of the taxonomic position of *Fusarium oxysporum* formae specialis *cubense* within the *Fusarium oxysporum* complex. *Infect Genet Evol*. 2011;11(3):533-542. doi:10.1016/j.meegid.2011.01.012
 39. Kavroulakis N, Ntougias S, Zervakis GI, Ehaliotis C, Haralampidis K, Papadopoulou KK. Role of ethylene in the protection of tomato plants against soil-borne fungal pathogens conferred by an endophytic *Fusarium solani* strain. *J Exp Bot*. 2007;58(14):3853-3864. doi:10.1093/jxb/erm230
 40. Pappas ML, Liapoura M, Papantoniou D, et al. The beneficial endophytic fungus *Fusarium solani* strain K alters tomato responses against spider mites to the benefit of the plant. *Front Plant Sci*. 2018;9. doi:10.3389/fpls.2018.01603
 41. Garantonakis N, Pappas ML, Varikou K, et al. Tomato inoculation with the endophytic strain *Fusarium solani* K results in reduced feeding damage by the zoophytophagous predator *nesidiocoris tenuis*. *Front Ecol Evol*. 2018;6(AUG):1-7. doi:10.3389/fevo.2018.00126
 42. Papadopoulou KK, Papadakis IE, Kavroulakis N, Doupis G, Ehaliotis C. Tolerance of

- tomato plants to water stress is improved by the root endophyte *Fusarium solani* FsK. *Rhizosphere*. 2018;6(March):77-85. doi:10.1016/j.rhisph.2018.04.003
43. Skiada V, Faccio A, Kavroulakis N, Genre A, Bonfante P, Papadopoulou KK. Colonization of legumes by an endophytic *Fusarium solani* strain FsK reveals common features to symbionts or pathogens. *Fungal Genet Biol*. 2019;127(March):60-74. doi:10.1016/j.fgb.2019.03.003
 44. Skiada V, Avramidou M, Bonfante P, Genre A, Papadopoulou KK. An endophytic *Fusarium*–legume association is partially dependent on the common symbiotic signalling pathway. *New Phytol*. 2020;226(5):1429-1444. doi:10.1111/nph.16457
 45. Hill RA, Connolly JD. Triterpenoids. *Nat Prod Rep*. 2020;37(7):962-998. doi:10.1039/c9np00067d
 46. Papadopoulou K, Melton RE, Leggett M, Daniels MJ, Osbourn AE. Compromised disease resistance in saponin-deficient plants. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 1999;96(22):12923-12928. doi:10.1073/pnas.96.22.12923
 47. Kemen AC, Honkanen S, Melton RE, et al. Investigation of triterpene synthesis and regulation in oats reveals a role for β -amyrin in determining root epidermal cell patterning. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 2014;111(23):8679-8684. doi:10.1073/pnas.1401553111
 48. Confalonieri M, Cammareri M, Biazzi E, et al. Enhanced triterpene saponin biosynthesis and root nodulation in transgenic barrel medic (*Medicago truncatula* Gaertn.) expressing a novel β -amyrin synthase (AsOXA1) gene. *Plant Biotechnol J*. 2009;7(2):172-182. doi:10.1111/j.1467-7652.2008.00385.x
 49. Qi X, Bakht S, Leggett M, Maxwell C, Melton R, Osbourn A. A gene cluster for secondary metabolism in oat: Implications for the evolution of metabolic diversity in plants. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 2004;101(21):8233-8238. doi:10.1073/pnas.0401301101
 50. Osbourn A. Secondary metabolic gene clusters: Evolutionary toolkits for chemical innovation. *Trends Genet*. 2010;26(10):449-457. doi:10.1016/j.tig.2010.07.001
 51. Iturbe-Ormaetxe I, Haralampidis K, Papadopoulou K, Osbourn AE. Molecular cloning and characterization of triterpene synthases from *Medicago truncatula* and *Lotus japonicus*. *Plant Mol Biol*. 2003;51(5):731-743. doi:10.1023/A:1022519709298
 52. Fukai E, Stougaard J, Hayashi M. Activation of an Endogenous Retrotransposon Associated with Epigenetic Changes in *Lotus japonicus* : A Tool for Functional Genomics in Legumes . *Plant Genome*. 2013;6(3):1-11. doi:10.3835/plantgenome2013.04.0009
 53. Boisson-Dernier A, Chabaud M, Garcia F, Bécard G, Rosenberg C, Barker DG. Agrobacterium rhizogenes-transformed roots of *Medicago truncatula* for the study of nitrogen-fixing and endomycorrhizal symbiotic associations. *Mol Plant-Microbe Interact*. 2001;14(6):695-700. doi:10.1094/MPMI.2001.14.6.695
 54. Huang AC, Jiang T, Liu YX, et al. A specialized metabolic network selectively modulates Arabidopsis root microbiota. *Science (80-)*. 2019;364(6440).

doi:10.1126/science.aau6389

55. Zhong Y, Xun W, Wang X, et al. Root-secreted bitter triterpene modulates the rhizosphere microbiota to improve plant fitness. *Nat Plants*. 2022;8(8):887-896. doi:10.1038/s41477-022-01201-2
56. Bisseling T, Geurts R. Specificity in legume nodule symbiosis. *Science (80-)*. 2020;369(6504):620-621. doi:10.1126/science.abd3857
57. Poole P, Ramachandran V, Terpolilli J. Rhizobia: From saprophytes to endosymbionts. *Nat Rev Microbiol*. 2018;16(5):291-303. doi:10.1038/nrmicro.2017.171
58. De Boer W, Folman LB, Summerbell RC, Boddy L. Living in a fungal world: Impact of fungi on soil bacterial niche development. *FEMS Microbiol Rev*. 2005;29(4):795-811. doi:10.1016/j.femsre.2004.11.005
59. Zhang W, Li XG, Sun K, et al. Mycelial network-mediated rhizobial dispersal enhances legume nodulation. *ISME J*. 2020;14(4):1015-1029. doi:10.1038/s41396-020-0587-5
60. Chang HX, Noel ZA, Chilvers MI. A β -lactamase gene of *Fusarium oxysporum* alters the rhizosphere microbiota of soybean. *Plant J*. 2021;106(6):1588-1604. doi:10.1111/tbj.15257
61. Zhang L, Xu M, Liu Y, Zhang F, Hodge A, Feng G. Carbon and phosphorus exchange may enable cooperation between an arbuscular mycorrhizal fungus and a phosphate-solubilizing bacterium. *New Phytol*. 2016;210(3):1022-1032. doi:10.1111/nph.13838
62. Xie XG, Zhang FM, Yang T, Chen Y, Li XG, Dai CC. Endophytic fungus drives nodulation and N₂ fixation attributable to specific root exudates. *MBio*. 2019;10(4):1-20. doi:10.1128/mBio.00728-19
63. Wang X, Feng H, Wang Y, et al. Mycorrhizal symbiosis modulates the rhizosphere microbiota to promote rhizobia–legume symbiosis. *Mol Plant*. 2021;14(3):503-516. doi:10.1016/j.molp.2020.12.002
64. Zhang W, Luo X, Mei YZ, et al. Priming of rhizobial nodulation signaling in the mycosphere accelerates nodulation of legume hosts. *New Phytol*. 2022;235(3):1212-1230. doi:10.1111/nph.18192
65. Deveau A, Bonito G, Uehling J, et al. Bacterial-fungal interactions: Ecology, mechanisms and challenges. *FEMS Microbiol Rev*. 2018;42(3):335-352. doi:10.1093/femsre/fuy008
66. Worrich A, Stryhanyuk H, Musat N, et al. Mycelium-mediated transfer of water and nutrients stimulates bacterial activity in dry and oligotrophic environments. *Nat Commun*. 2017;8(June). doi:10.1038/ncomms15472
67. Larimer AL, Bever JD, Clay K. The interactive effects of plant microbial symbionts: A review and meta-analysis. *Symbiosis*. 2010;51(2):139-148. doi:10.1007/s13199-010-0083-1
68. Abd-Alla MH, El-Enany AWE, Nafady NA, Khalaf DM, Morsy FM. Synergistic interaction of *Rhizobium leguminosarum* bv. *viciae* and arbuscular mycorrhizal fungi

- as a plant growth promoting biofertilizers for faba bean (*Vicia faba* L.) in alkaline soil. *Microbiol Res.* 2014;169(1):49-58. doi:10.1016/j.micres.2013.07.007
69. Dabré EE, Hijri M, Favret C. Influence on Soybean Aphid by the Tripartite Interaction between Soybean, a Rhizobium Bacterium, and an Arbuscular Mycorrhizal Fungus. *Microorganisms.* 2022;10(6). doi:10.3390/microorganisms10061196
 70. Mickelbart M V., Hasegawa PM, Bailey-Serres J. Genetic mechanisms of abiotic stress tolerance that translate to crop yield stability. *Nat Rev Genet.* 2015;16(4):237-251. doi:10.1038/nrg3901
 71. Fujita M, Fujita Y, Noutoshi Y, et al. Crosstalk between abiotic and biotic stress responses: a current view from the points of convergence in the stress signaling networks. *Curr Opin Plant Biol.* 2006;9(4):436-442. doi:10.1016/j.pbi.2006.05.014
 72. Ahmad P, Abdel Latef AAH, Rasool S, Akram NA, Ashraf M, Gucel S. Role of proteomics in crop stress tolerance. *Front Plant Sci.* 2016;7(September):1-14. doi:10.3389/fpls.2016.01336
 73. Rao DE, Chaitanya K V. Photosynthesis and antioxidative defense mechanisms in deciphering drought stress tolerance of crop plants. *Biol Plant.* 2016;60(2):201-218. doi:10.1007/s10535-016-0584-8
 74. Glynou K, Ali T, Buch AK, et al. The local environment determines the assembly of root endophytic fungi at a continental scale. *Environ Microbiol.* 2016;18(8):2418-2434. doi:10.1111/1462-2920.13112
 75. Pietikäinen J, Pettersson M, Bååth E. Comparison of temperature effects on soil respiration and bacterial and fungal growth rates. *FEMS Microbiol Ecol.* 2005;52(1):49-58. doi:10.1016/j.femsec.2004.10.002
 76. Liu A, Wang B, Hamel C. Arbuscular mycorrhiza colonization and development at suboptimal root zone temperature. *Mycorrhiza.* 2004;14(2):93-101. doi:10.1007/s00572-003-0242-9
 77. Lv Z, Zhao M, Wang W, et al. Changing Gly311 to an acidic amino acid in the MATE family protein DTX6 enhances Arabidopsis resistance to the dihydropyridine herbicides. *Mol Plant.* 2021;14(12):2115-2125. doi:10.1016/j.molp.2021.09.002
 78. Chen J, Su Y, Lin R, et al. Effects of Acute Diquat Poisoning on Liver Mitochondrial Apoptosis and Autophagy in Ducks. *Front Vet Sci.* 2021;8(August):1-10. doi:10.3389/fvets.2021.727766
 79. Skiada V. *Colonization of Legumes by an Endophytic Fusarium Solani Strain K. Early-Stage Molecular Signaling and Sub-Cellular Responses.* Vol 224.; 2019.
 80. Hoagland DR, Arnon DI. The water-culture method for growing plants without soil. *Circ Calif Agric Exp Stn.* 1950;347(2nd edit):32 pp. <https://www.cabdirect.org/cabdirect/abstract/19500302257>.
 81. Kavroulakis N, Doupis G, Papadakis IE, Ehaliotis C, Papadopoulou KK. Tolerance of tomato plants to water stress is improved by the root endophyte *Fusarium solani* Fsk. *Rhizosphere.* 2018;6:77-85. doi:10.1016/j.rhisph.2018.04.003

82. Karimi R, Amini H, Ghabooli M. Root endophytic fungus *Piriformospora indica* and zinc attenuate cold stress in grapevine by influencing leaf phytochemicals and minerals content. *Sci Hortic (Amsterdam)*. 2022;293(October 2021):110665. doi:10.1016/j.scienta.2021.110665
83. Gavito ME, Olsson PA, Rouhier H, et al. Temperature constraints on the growth and functioning of root organ cultures with arbuscular mycorrhizal fungi. *New Phytol*. 2005;168(1):179-188. doi:10.1111/j.1469-8137.2005.01481.x
84. Lidoy J, López-García Á, Amate C, et al. Regulation of mycorrhizal colonization under stress in tomato depends on symbiotic efficiency. *Environ Exp Bot*. 2023;215(May). doi:10.1016/j.envexpbot.2023.105479
85. Makarian H, Poozesh V, Asghari HR, Nazari M. Interaction Effects of Arbuscular Mycorrhiza Fungi and Soil Applied Herbicides on Plant Growth. *Commun Soil Sci Plant Anal*. 2016;47(5):619-629. doi:10.1080/00103624.2016.1146744
86. Campestre MP, Castagno LN, Estrella MJ, Ruiz OA. Lotus japonicus plants of the Gifu B-129 ecotype subjected to alkaline stress improve their Fe²⁺ bio-availability through inoculation with *Pantoea eucalypti* M91. *J Plant Physiol*. 2016;192:47-55. doi:10.1016/j.jplph.2016.01.001
87. Shahid M, Khan MS. Glyphosate induced toxicity to chickpea plants and stress alleviation by herbicide tolerant phosphate solubilizing *Burkholderia cepacia* PSBB1 carrying multifarious plant growth promoting activities. *3 Biotech*. 2018;8(2):1-17. doi:10.1007/s13205-018-1145-y
88. Riley R, Chapman V. © 1958 Nature Publishing Group. 1958.
89. Pérez-Fernández M, Alexander V. Enhanced plant performance in *Cicer arietinum* L. Due to the addition of a combination of plant growth-promoting bacteria. *Agric*. 2017;7(5). doi:10.3390/agriculture7050040
90. Chaudhary MF, Abbasi AA. Effect of Pre-emergence Herbicides on Nodulation , Nitrogen Fixation and Morphological Characters in Groundnut (*Arachis hypogaea*). *Pakistan J Biol Sci*. 2000;3:1775-1777.
91. Tétard-Jones C, Edwards R. Potential roles for microbial endophytes in herbicide tolerance in plants. *Pest Manag Sci*. 2016;72(2):203-209. doi:10.1002/ps.4147
92. Kobayashi T, Nozoye T, Nishizawa NK. Iron transport and its regulation in plants. *Free Radic Biol Med*. 2019;133(October 2018):11-20. doi:10.1016/j.freeradbiomed.2018.10.439
93. Vigani G, Murgia I. Iron-Requiring Enzymes in the Spotlight of Oxygen. *Trends Plant Sci*. 2018;23(10):874-882. doi:10.1016/j.tplants.2018.07.005
94. Pii Y, Mimmo T, Tomasi N, Terzano R, Cesco S, Crecchio C. Microbial interactions in the rhizosphere: beneficial influences of plant growth-promoting rhizobacteria on nutrient acquisition process. A review. *Biol Fertil Soils*. 2015;51(4):403-415. doi:10.1007/s00374-015-0996-1
95. Kobayashi T. Understanding the Complexity of Iron Sensing and Signaling Cascades in

- Plants. *Plant Cell Physiol.* 2019;60(February):1440-1446. doi:10.1093/pcp/pcz038
96. Jeong J, Guerinot M Lou. Homing in on iron homeostasis in plants. *Trends Plant Sci.* 2009;14(5):280-285. doi:10.1016/j.tplants.2009.02.006
 97. García MJ, Romera FJ, Lucena C, Alcántara E, Pérez-Vicente R. Ethylene and the regulation of physiological and morphological responses to nutrient deficiencies. *Plant Physiol.* 2015;169(1):51-60. doi:10.1104/pp.15.00708
 98. Pierre JL, Fontecave M. Iron and activated oxygen species in biology: The basic chemistry. *BioMetals.* 1999;12(3):195-199. doi:10.1023/A:1009252919854
 99. Hou X, Tong H, Selby J, et al. Reactive Species and Antioxidants . Redox Biology Is a Fundamental Theme of Aerobic Life. 2003;133(November):274-286. doi:10.1105/tpc.001388.Nongrasses
 100. Brumbarova T, Bauer P. Iron uptake and transport in plants. *Plant Membr Vacuolar Transp.* 2008;109(10):149-172. doi:10.1079/9781845934026.0149
 101. Zhang X, Zhang D, Sun W, Wang T. The adaptive mechanism of plants to iron deficiency via iron uptake, transport, and homeostasis. *Int J Mol Sci.* 2019;20(10). doi:10.3390/ijms20102424
 102. Grass G, Wong MD, Rosen BP, Smith RL, Rensing C. Zupt is a Zn(II) uptake system in Escherichia coli. *J Bacteriol.* 2002;184(3):864-866. doi:10.1128/JB.184.3.864-866.2002
 103. Séguéla M, Briat JF, Vert G, Curie C. Cytokinins negatively regulate the root iron uptake machinery in Arabidopsis through a growth-dependent pathway. *Plant J.* 2008;55(2):289-300. doi:10.1111/j.1365-313X.2008.03502.x
 104. Lucena C, Porras R, García MJ, et al. Ethylene and Phloem Signals Are Involved in the Regulation of Responses to Fe and P Deficiencies in Roots of Strategy I Plants. *Front Plant Sci.* 2019;10(October):1-14. doi:10.3389/fpls.2019.01237
 105. Li L, Cheng X, Ling HQ. Isolation and characterization of Fe(III)-chelate reductase gene LeFRO1 in tomato. *Plant Mol Biol.* 2004;54(1):125-136. doi:10.1023/B:PLAN.0000028774.82782.16
 106. Waters BM, Blevins DG, Eide DJ. Characterization of FRO1, a pea ferric-chelate reductase involved in root iron acquisition. *Plant Physiol.* 2002;129(1):85-94. doi:10.1104/pp.010829
 107. Bereczky Z, Wang HY, Schubert V, Ganai M, Bauer P. Differential Regulation of nramp and irt Metal Transporter Genes in Wild Type and Iron Uptake Mutants of Tomato. *J Biol Chem.* 2003;278(27):24697-24704. doi:10.1074/jbc.M301365200
 108. Li R, Cai F, Pang G, Shen Q, Li R, Chen W. Solubilisation of Phosphate and Micronutrients by Trichoderma harzianum and Its Relationship with the Promotion of Tomato Plant Growth. 2015:1-16. doi:10.5061/dryad.p460c
 109. Zhang H, Sun Y, Xie X, Kim MS, Dowd SE, Paré PW. A soil bacterium regulates plant acquisition of iron via deficiency-inducible mechanisms. *Plant J.* 2009;58(4):568-577. doi:10.1111/j.1365-313X.2009.03803.x

110. Jin CW, Ye YQ, Zheng SJ. An underground tale: Contribution of microbial activity to plant iron. *Ann Bot.* 2014;113(1):7-18. doi:10.1093/aob/mct249
111. Mimmo T, Del Buono D, Terzano R, et al. Rhizospheric organic compounds in the soil-microorganism-plant system: Their role in iron availability. *Eur J Soil Sci.* 2014;65(5):629-642. doi:10.1111/ejss.12158
112. Pieterse CMJ, Zamioudis C, Berendsen RL, Weller DM, Van Wees SCM, Bakker PAHM. Induced systemic resistance by beneficial microbes. *Annu Rev Phytopathol.* 2014;52:347-375. doi:10.1146/annurev-phyto-082712-102340
113. Verbon EH, Trapet PL, Kruijs S, Temple-Boyer-Dury C, Rouwenhorst TG, Pieterse CMJ. Rhizobacteria-mediated activation of the iron deficiency response in Arabidopsis roots: Impact on iron status and signaling. *Front Plant Sci.* 2019;10(July):1-12. doi:10.3389/fpls.2019.00909
114. Zamioudis C, Korteland J, Van Pelt JA, et al. Rhizobacterial volatiles and photosynthesis-related signals coordinate MYB72 expression in Arabidopsis roots during onset of induced systemic resistance and iron-deficiency responses. *Plant J.* 2015;84(2):309-322. doi:10.1111/tpj.12995
115. Yuan Y, Wu H, Wang N, et al. FIT interacts with AtbHLH38 and AtbHLH39 in regulating iron uptake gene expression for iron homeostasis in Arabidopsis. *Cell Res.* 2008;18(3):385-397. doi:10.1038/cr.2008.26
116. Bournier M, Tissot N, Mari S, et al. Arabidopsis ferritin 1 (AtFer1) gene regulation by the phosphate starvation response 1 (AtPHR1) transcription factor reveals a direct molecular link between iron and phosphate homeostasis. *J Biol Chem.* 2013;288(31):22670-22680. doi:10.1074/jbc.M113.482281
117. Rogers EE, Guerinot M-L. FRD3, a member of the multidrug and toxin efflux family, controls iron deficiency responses in Arabidopsis. *Plant Cell.* 2002;14(8):1787-1799. doi:10.1105/tpc.001495
118. Carbonnel S, Das D, Varshney K, Kolodziej MC, Villaécija-Aguilar JA, Gutjahr C. The karrikin signaling regulator SMAX1 controls Lotus japonicus root and root hair development by suppressing ethylene biosynthesis. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 2020;117(35):21757-21765. doi:10.1073/pnas.2006111117
119. Dundar F. Differential Gene Expression Analysis (DGE). *Appl Bioinforma Core.* 2020:1-13.
120. Love MI, Huber W, Anders S. Moderated estimation of fold change and dispersion for RNA-seq data with DESeq2. *Genome Biol.* 2014;15(12):1-21. doi:10.1186/s13059-014-0550-8
121. Huerta-Cepas J, Szklarczyk D, Heller D, et al. EggNOG 5.0: A hierarchical, functionally and phylogenetically annotated orthology resource based on 5090 organisms and 2502 viruses. *Nucleic Acids Res.* 2019;47(D1):D309-D314. doi:10.1093/nar/gky1085
122. Rey P, Taupin-Broggini M, Couturier J, Vignols F, Rouhier N. Is there a role for glutaredoxins and BOLAs in the perception of the cellular iron status in plants? *Front Plant Sci.* 2019;10(June):1-10. doi:10.3389/fpls.2019.00712

123. Vigani G, Bohic S, Faoro F, Vekemans B, Vincze L, Terzano R. Cellular fractionation and nanoscopic X-ray fluorescence imaging analyses reveal changes of zinc distribution in leaf cells of iron-deficient plants. *Front Plant Sci.* 2018;9(August):1-11. doi:10.3389/fpls.2018.01112
124. Durrett TP, Gassmann W, Rogers EE. The FRD3-mediated efflux of citrate into the root vasculature is necessary for efficient iron translocation. *Plant Physiol.* 2007;144(1):197-205. doi:10.1104/pp.107.097162
125. Lucena C, Romera FJ, García MJ, Alcántara E, Pérez-Vicente R. Ethylene participates in the regulation of Fe deficiency responses in strategy I plants and in rice. *Front Plant Sci.* 2015;6(NOVEMBER):1-16. doi:10.3389/fpls.2015.01056
126. Philpott CC. Iron uptake in fungi: A system for every source. *Biochim Biophys Acta - Mol Cell Res.* 2006;1763(7):636-645. doi:10.1016/j.bbamcr.2006.05.008
127. Babuin MF, Campestre MP, Rocco R, et al. Response to long-term NaHCO₃-derived alkalinity in model Lotus japonicus ecotypes Gifu B-129 and Miyakojima MG-20: Transcriptomic profiling and physiological characterization. *PLoS One.* 2014;9(5). doi:10.1371/journal.pone.0097106
128. Bajaj R, Huang Y, Gebrechistos S, et al. Transcriptional responses of soybean roots to colonization with the root endophytic fungus Piriformospora indica reveals altered phenylpropanoid and secondary metabolism. *Sci Rep.* 2018;8(1):1-18. doi:10.1038/s41598-018-26809-3
129. Yakti W, Kovács GM, Vági P, Franken P. Impact of dark septate endophytes on tomato growth and nutrient uptake. *Plant Ecol Divers.* 2018;11(5-6):637-648. doi:10.1080/17550874.2019.1610912
130. Saddique MAB, Ali Z, Khan AS, Rana IA, Shamsi IH. Inoculation with the endophyte Piriformospora indica significantly affects mechanisms involved in osmotic stress in rice. *Rice.* 2018;11(1):1-12. doi:10.1186/s12284-018-0226-1
131. Chen Z, Jin Y, Yao X, et al. Fungal Endophyte Improves Survival of Lolium perenne in Low Fertility Soils by Increasing Root Growth, Metabolic Activity and Absorption of Nutrients. *Plant Soil.* 2020;452(1-2):185-206. doi:10.1007/s11104-020-04556-7
132. Kim SA, LaCroix IS, Gerber SA, Guerinot M Lou. The iron deficiency response in Arabidopsis thaliana requires the phosphorylated transcription factor URI. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 2019;116(50):24933-24942. doi:10.1073/pnas.1916892116
133. Li W, Lan P. The understanding of the plant iron deficiency responses in strategy I plants and the role of ethylene in this process by omic approaches. *Front Plant Sci.* 2017;8(January):1-15. doi:10.3389/fpls.2017.00040
134. Kieu NP, Aznar A, Segond D, et al. Iron deficiency affects plant defence responses and confers resistance to dickeya dadantii and botrytis cinerea. *Mol Plant Pathol.* 2012;13(8):816-827. doi:10.1111/j.1364-3703.2012.00790.x
135. Chen W, Zhao L, Liu L, et al. Iron deficiency-induced transcription factors bHLH38/100/101 negatively modulate flowering time in Arabidopsis thaliana. *Plant Sci.* 2021;308(April):110929. doi:10.1016/j.plantsci.2021.110929

136. Conte SS, Walker EL. Transporters contributing to iron trafficking in plants. *Mol Plant*. 2011;4(3):464-476. doi:10.1093/mp/ssr015
137. Lemanceau P, Expert D, Gaymard F, Bakker PAHM, Briat JF. *Chapter 12 Role of Iron in Plant-Microbe Interactions*. Vol 51. 1st ed. Elsevier Ltd; 2009. doi:10.1016/S0065-2296(09)51012-9
138. Attarian R, Hu G, Sánchez-León E, et al. The monothiol glutaredoxin Grx4 regulates iron homeostasis and virulence in *Cryptococcus neoformans*. *MBio*. 2018;9(6):1-23. doi:10.1128/mBio.02377-18
139. Young ND, Mudge J, Ellis THN. Legume genomes: More than peas in a pod. *Curr Opin Plant Biol*. 2003;6(2):199-204. doi:10.1016/S1369-5266(03)00006-2

Παράρτημα

1. Πειραματική διαδικασία

Ένα ακαλλιέργητο χωράφι καθώς και ένα αμώδες από τη Θεσσαλονίκη επιλέχθηκαν για το πείραμα καλλιέργειας του *Lotus japonicus* με σκοπό να ελεγχθεί η επίδραση του μύκητα στο μικροβίωμα των φυτών. Τα διαφορετικά εδάφη μεταφέρθηκαν στο εργαστήριό μας στη Λάρισα. Όλα τα πειράματα πραγματοποιήθηκαν σε θάλαμο ανάπτυξης (16 ώρες φωτοπεριόδου φωτός/8 ώρες σκοτεινής φωτοπεριόδου, 22°C). Στο πείραμα χρησιμοποιήθηκαν φυτά *Lotus japonicus* (οικότυπος: Gifu) και δύο διαφορετικές μεταλλαγμένες σειρές του βιοσυνθετικού μονοπατιού των τριτερπενίων, ο ομόζυγος *amy2-188* και ο ομόζυγος *cyp.71 30063753 T2.2*²⁹. Οι σπόροι του *Lotus japonicus* Wt και οι μεταλλαγμένοι σπόροι έχουν υποστεί χημική επεξεργασία με θειικού οξέος 15 λεπτών, πλύθηκαν καλά με απιονισμένο νερό, επώαστηκαν για 15 λεπτά σε διάλυμα BUF I (20% NaOCl και 0,1% Tween 20) και πλύθηκαν 6× με αποστειρωμένο απιονισμένο νερό. Οι σπόροι διατηρήθηκαν σε νερό στους 4 °C όλη τη νύχτα, για να προωθηθεί η βλάστηση των σπόρων, τοποθετήθηκαν στη συνέχεια σε πλάκες υδάτινου άγαρ 0,8% και αναπτύχθηκαν σε θάλαμο ανάπτυξης με φωτοπερίοδο 16 ωρών φωτός/8 ωρών σκότους και θερμοκρασίας στους 22 °C. Όταν τα φυτά ήταν 18 ημερών, μεταφυτεύτηκαν σε γλάστρες με χώμα. Ένα φυτό τοποθετείται ανά γλάστρα. Ως δείγματα ελέγχου χρησιμοποιήθηκαν γλάστρες μόνο με χώμα και χωρίς φυτό. Μετά από 6 ημέρες σε γλάστρες, τα μισά φυτά σε κάθε γονότυπο και τα μισά δείγματα ελέγχου εμβολιάστηκαν με 100 κονίδια ανά ρίζα με *Fusarium solani* στέλεχος K (FsK)³⁹. Το FsK καλλιεργήθηκε σε μέσο άγαρ δεξτρόζης πατάτας (PDA) και τα κονίδια απομονώθηκαν όπως περιγράφηκε προηγουμένως στη σελίδα 46. Όλα τα δείγματα (εμβολιασμένα: +FsK και μη εμβολιασμένα: -FsK) συλλέχθηκαν σε δύο χρονικά σημεία: 8 και 20 ημέρες μετά τη μόλυνση. Κάθε βιολογικό αντίγραφο αποτελείται από 2-6 φυτά. Συλλέχθηκαν δείγματα συγκρίσεων ριζών (συμπεριλαμβανομένης της ριζόσφαιρας, του ριζόπεδου και της ενδόσφαιρας) σύμφωνα με (Lakshmanan, Ray, & Craven, n.d.). Εν συντομία, το χώμα που είχε κολλήσει χαλαρά στις ρίζες ανακινήθηκε και οι ρίζες τοποθετούνται σε ένα καθαρό νεράκι των 50 ml και πλένονται με 12 ml ρυθμισμένο με φωσφορικό αλατούχο διάλυμα (PBS). Οι ρίζες που συλλέχθηκαν για την ενδόσφαιρα αλέστηκαν. Το χώμα ριζόσφαιρας φυγοκεντρήθηκε στα 6.000 g για 5 λεπτά και στη συνέχεια για 15 λεπτά. Το πέλετ χρησιμοποιήθηκε για την εξαγωγή DNA.

2. Απομόνωση γονιδιωματικού DNA

Από τα δείγματα εδάφους εξήχθη το συνολικό γονιδιωματικό DNA χρησιμοποιώντας το PowerSoil® DNA Isolation Kit (MoBio Laboratories, Inc., West Carlsbad, CA, USA) ακολουθώντας τις οδηγίες του κατασκευαστή. Το συνολικό DNA από τα δείγματα

ρίζας απομονώθηκε χρησιμοποιώντας τη μέθοδο CTAB (Doyle & Doyle, 1987). Η συγκέντρωση DNA προσδιορίστηκε χρησιμοποιώντας το Qubit 2.0 με κιτ ανάλυσης διπλής έλικος DNA (dsDNA) Quant-iT BR (Invitrogen, USA). Πριν από τον ποσοτικό προσδιορισμό, το DNA ελέγχθηκε μέσω ηλεκτροφόρησης γέλης αгарόζης (0,8%).

3.Ανάλυση αλληλούχησης της μικροβιακής κοινότητας της ενδόσφαιρας και της ριζόσφαιρας.

Οι επιδράσεις του στελέχους *Fusarium solani* K και του γονότυπου του *Lotus japonicus* στην κοινότητα βακτηρίων και μυκήτων προσδιορίστηκαν με ανάλυση αλληλουχίας του 16S rRNA και του ITS αντίστοιχα μέσω του HiSeq Illumina Rapid Mode 2x250 bp στο Τμήμα του Κέντρου Αλληλουχίας DNA του Βιολογία του Πανεπιστημίου Brigham Young, ΗΠΑ. Η μεταβλητή περιοχή V3-V4 του βακτηριακού γονιδίου 16S rRNA ενισχύθηκε με εκκινητές 515F (5'-GTGYCAGCMGCCGCGGT-3') (Caporaso et al., 2011; Walters et al., 2015) και 806R (5'-GACTWNTCGTAGTA-3') (Caporaso et al., 2011; Walters et al., 2015). Η αντίδραση PCR πραγματοποιήθηκε με 10μM εμπρός και ανάστροφο εκκινητή, 1 ng DNA, 20 mg/ml BSA και 5μl κύριου μείγματος Q5® High-Fidelity DNA Polymerase (NEB, Ipswich, Massachusetts, ΗΠΑ), 1,8μl αποστειρωμένο ddH₂O και ήταν 10μl τελικός όγκος. Οι συνθήκες αντίδρασης ήταν ως εξής: 98°C για 30 δευτερόλεπτα. 28 κύκλοι στους 98 °C για 30 δευτερόλεπτα. 50 °C για 30 δευτερόλεπτα. και 72 °C για 30 δευτερόλεπτα. 72 °C για 10 λεπτά και διατηρήθηκε στους 4°C. Ο δεύτερος γύρος PCR (7 κύκλοι ενίσχυσης) πραγματοποιήθηκε με εκκινητές που έφεραν δείκτες για μετα-γραμμικό κώδικα δειγμάτων. Ο όγκος του δεύτερου μίγματος για το RCR ήταν 20μl και περιείχε τις ίδιες συγκεντρώσεις αντιδραστηρίων χωρίς το BSA. Η μυκητιακή περιοχή ITS ενισχύθηκε με εκκινητές ITS7F (5'-GTGARTCATCGAATCTTTG-3') (Ihrmark et al., 2012) και ITS4R (5'-TCCTCCGCTTATTGATATGC-3') (White et al., 1990). Οι συνθήκες PCR ήταν ίδιες εκτός από τη θερμοκρασία προσαρμογής των εκκινητών στο DNA εκμαγείο που ήταν 55 °C. Οι αντιδράσεις PCR ήταν επίσης οι ίδιες. Οι εκκινητές ευρετηρίου παρουσιάζονται στον Συμπληρωματικό Πίνακα S1 για τα βακτήρια και στον Πίνακα S2 για τους μύκητες.

4.Ανίχνευση αποικισμού από τον μύκητα *F. solani* στις ρίζες του φυτού *Lotus japonicus*

Προκειμένου να επιβεβαιωθεί ο αποικισμός στις ρίζες των *Lotus japonicus* φυτών και των μεταλλαγμένων από το στέλεχος FsK ακολουθήθηκε η ίδια διαδικασία όπως περιγράφεται παραπάνω στα υλικά και μεθόδους.

Πίνακας S1.

PRIMER	SEQUENCE (5'-3')	REFERENCES
--------	------------------	------------

515F-01	TTCTATCTCGTGTGYCAGCMGCCGCGGTAA	(Walters et al., 2015)
515F-02	TTCAATCGTGTGTGYCAGCMGCCGCGGTAA	
515F-03	TTCAAGGTATGTGTGYCAGCMGCCGCGGTAA	
515F-04	TTGTATCGAGTGTGTGYCAGCMGCCGCGGTAA	
515F-05	TTGTGGTGTGTGTGYCAGCMGCCGCGGTAA	
515F-06	TTGAGTCATGTGTGYCAGCMGCCGCGGTAA	
515F-07	TTGGTTGTCGTGTGYCAGCMGCCGCGGTAA	
515F-08	TATAAGCCAGTGTGTGYCAGCMGCCGCGGTAA	
515F-09	TTCTATGCAGTGTGTGYCAGCMGCCGCGGTAA	
515F-10	TTCAATGACGTGTGTGYCAGCMGCCGCGGTAA	
515F-11	TTCGTTCTAGTGTGTGYCAGCMGCCGCGGTAA	
515F-12	TTGTAATGGTGTGTGYCAGCMGCCGCGGTAA	
515F-13	TTGATAGCAGTGTGTGYCAGCMGCCGCGGTAA	
515F-14	TTGAGAGTGGTGTGTGYCAGCMGCCGCGGTAA	
515F-15	TTGGTATGAGTGTGTGYCAGCMGCCGCGGTAA	
515F-16	TATAGTCTCGTGTGTGYCAGCMGCCGCGGTAA	
515F-17	TTCTAACAGGTGTGTGYCAGCMGCCGCGGTAA	
515F-18	TTCAACTAGGTGTGTGYCAGCMGCCGCGGTAA	
515F-19	TTCGTTGGTGTGTGTGYCAGCMGCCGCGGTAA	
515F-20	TTGTAAGTCGTGTGTGYCAGCMGCCGCGGTAA	
515F-21	TTGATCTTGGTGTGTGYCAGCMGCCGCGGTAA	
515F-22	TTGAGCCTCGTGTGTGYCAGCMGCCGCGGTAA	
515F-23	TTGGTCTATGTGTGTGYCAGCMGCCGCGGTAA	
515F-24	TATAGACAGGTGTGTGYCAGCMGCCGCGGTAA	
515F-25	TTCTAGTTGGTGTGTGYCAGCMGCCGCGGTAA	
515F-26	TTCAACATCGTGTGTGYCAGCMGCCGCGGTAA	
515F-27	TTCGTAGAGGTGTGTGYCAGCMGCCGCGGTAA	
515F-28	TTGTAGAACGTGTGTGYCAGCMGCCGCGGTAA	

Πίνακας S2.

PRIMER	SEQUENCE (5'-3')	REFERENCES
ITS4R-01	TTAGTAACCGATCCTCCGCTTATTGATATGC	(White et al., 1990)
ITS4R-02	TTAGTACGTGATCCTCCGCTTATTGATATGC	
ITS4R-03	TTAGATCCTGATCCTCCGCTTATTGATATGC	
ITS4R-04	TTAGATGAGGATCCTCCGCTTATTGATATGC	
ITS4R-05	TTAGACTACGATCCTCCGCTTATTGATATGC	
ITS4R-06	TTAGACATGGATCCTCCGCTTATTGATATGC	
ITS4R-07	TTAGAGTCAGATCCTCCGCTTATTGATATGC	
ITS4R-08	TTAGCAGATGATCCTCCGCTTATTGATATGC	
ITS4R-09	TTAGCCTGTGATCCTCCGCTTATTGATATGC	
ITS4R-10	TTAGGTACAGATCCTCCGCTTATTGATATGC	
ITS4R-11	TTAGGCGCCGATCCTCCGCTTATTGATATGC	
ITS4R-12	TTCTTATGGGATCCTCCGCTTATTGATATGC	
ITS4R-13	TTCTTACTCGATCCTCCGCTTATTGATATGC	
ITS4R-14	TTCTTAGCAGATCCTCCGCTTATTGATATGC	
ITS4R-15	TTCTTCAGTGATCCTCCGCTTATTGATATGC	

ITS4R-16	TTCTTCGACGATCCTCCGCTTATTGATATGC
ITS4R-17	TTCTTGAAGGATCCTCCGCTTATTGATATGC
ITS4R-18	TTCTTGGTTGATCCTCCGCTTATTGATATGC
ITS4R-19	TTCTATTCCGATCCTCCGCTTATTGATATGC
ITS4R-20	TTCTATAGGGATCCTCCGCTTATTGATATGC
ITS4R-21	TTCTAACAGGATCCTCCGCTTATTGATATGC
ITS4R-22	TTCTACCGAGATCCTCCGCTTATTGATATGC
ITS4R-23	TTCTAGTTGGATCCTCCGCTTATTGATATGC
ITS4R-24	TTCTAGCCTGATCCTCCGCTTATTGATATGC
ITS4R-25	TTCTAGGAAGATCCTCCGCTTATTGATATGC
ITS4R-26	TTCTCTTAGGATCCTCCGCTTATTGATATGC
ITS4R-27	TTCTCTACAGATCCTCCGCTTATTGATATGC
ITS4R-28	TTCTCTCTTGATCCTCCGCTTATTGATATGC

Κεφάλαιο 2

Η ΜΕΛΕΤΗ ΤΟΥ ΑΠΟΙΚΙΣΜΟΥ ΤΟΥ ΕΝΔΟΦΥΥΤΙΚΟΥ ΜΥΚΗΤΑ
FUSARIUM SOLANI ΣΤΕΛΕΧΟΣ Κ (FSK) ΤΑΥΤΟΧΡΟΝΑ ΜΕ ΤΗ
ΜΟΛΥΝΣΗ ΜΕ ΤΟ ΡΙΖΟΒΙΟ *M. LOTI* ΣΤΗ ΔΙΑΔΙΚΑΣΙΑ
ΦΥΜΑΤΙΟΓΕΝΕΣΗΣ ΤΟΥ ΨΥΧΑΝΘΕΣ ΦΥΤΟΥ *LOTUS JAPONICUS*
ΚΑΘΩΣ ΚΑΙ ΣΕ ΜΕΤΑΛΛΑΓΜΑΤΑ ΤΟΥ ΒΙΟΣΥΝΘΕΤΙΚΟΥ
ΜΟΝΟΠΑΤΙΟΥ ΤΩΝ ΤΡΙΤΕΡΠΕΝΙΩΝ

Εισαγωγή

Τα ψυχανθή φυτά δημιουργούν συμβιωτική σχέση με αζωτοδεσμευτικά βακτήρια του εδάφους που δεσμεύουν το άζωτο (ριζόβια) ώστε να ξεπεραστούν οι ελλείψεις αζώτου στα φυτά ⁵⁶. Υπό κανονικές συνθήκες ανάπτυξης, αυτή η συμβιωτική αλληλεπίδραση δεν είναι ποτέ αλληλεπίδραση ένας προς έναν μεταξύ ριζοβίου και οσπρίων. Αντίθετα, είναι μια αλληλεπίδραση μεταξύ ριζοβίου, του φυτού ξενιστή και άλλων μικροοργανισμών του μικροβιώματος του εδάφους ⁵⁷. Εκτός από τα ριζόβια, υπάρχει στο έδαφος μεγάλη αφθονία νηματωδών μυκήτων ⁵⁸. Τα ριζόβια συχνά αλληλεπιδρούν με νηματώδεις μύκητες πριν μολύνουν τις ρίζες των ψυχανθών και οι αλληλεπιδράσεις ριζοβίων-μυκήτων στη περιοχή της ρίζας στο έδαφος είναι αναπόφευκτες και μπορεί να εμπλέκονται στην αποτελεσματικότητα της διαδικασίας της φυματιογένεσης ^{59,60}. Πράγματι, η παρουσία των μυκήτων, όπως οι μυκορριζικοί μύκητες (AMF) και οι ενδοφυτικοί μύκητες, έχει αποδειχθεί ότι επιταχύνουν και ενισχύουν την αλληλεπίδραση των ριζοβίων με τα φυτά-ξενιστές ^{61–63}. Αν και αυτά τα ευρήματα μπορούν να εξηγηθούν έμμεσα από διάφορα γεγονότα όπως τη μεταφορά θρεπτικών ουσιών, τη διαμόρφωση του μικροβιώματος της ριζόσφαιρας και την βελτίωση της φυσικής κατάστασης του φυτού, δεν είναι ακόμη σαφές γιατί η συμβίωση με τους μύκητες ωφελεί τη συμβιωτική σχέση ριζοβίου-ψυχανθές.

Τα ψυχανθή φυτά απελευθερώνουν από τις ρίζες τους φυτικές ουσίες οι οποίες θα στρατολογήσουν τα ριζόβια. Οι φυτικές αυτές ουσίες που εκκρίνονται είναι φλαβονοειδή και λειτουργούν ως σήματα για να προκαλέσουν την επαγωγή των γονιδίων που εμπλέκονται στη διαδικασία της φυματιογένεσης (nod) και οδηγούν στην παραγωγή των παραγόντων φυματιογένεσης (Nodulation Factors, NFs). Οι παράγοντες φυματιογένεσης στη συνέχεια αναγνωρίζονται από ειδικούς υποδοχείς στα ψυχανθή φυτά, ενεργοποιώντας μια οδό σηματοδότησης, η οποία μεσολαβεί στο σχηματισμό και τη διεύθυνση του νήματος μόλυνσης στο εσωτερικό του ριζικού τριχιδίου και προς το κυρίως σώμα της ρίζας, επακολουθεί σχηματισμός βακτηροειδών μέσα στα φυτικά κύτταρα και ανάπτυξη της αζωτοδεσμευτικής ικανότητας, συνεχείς διαιρέσεις τόσο των φυτικών όσο και των βακτηριακών κυττάρων που οδηγεί στη διαμόρφωση μιας μοναδικής και εξαιρετικά οργανωμένης δομής, τα ώριμα φυμάτια ⁹.

Οι αλληλεπιδράσεις μεταξύ μυκήτων και βακτηρίων διαδραματίζουν βασικό ρόλο στη λειτουργία πολλών οικοσυστημάτων καθώς αποτελούν ακρογωνιαίο λίθο των κοινοτήτων που καθοδηγούν τους βιοχημικούς κύκλους και συμβάλλουν τόσο στην υγεία όσο και στις ασθένειες των φυτών και των ζώων. Επιπλέον, βακτήρια και μύκητες έχουν γίνει αντικείμενο εκμετάλλευσης από τον άνθρωπο για αιώνες για την παραγωγή προϊόντων διατροφής, αντιβιοτικών και δευτερογενών μεταβολιτών για φαρμακολογικές και βιοτεχνολογικές εφαρμογές. Κατά συνέπεια, τα προϊόντα των

αλληλεπιδράσεων βακτηρίων-μυκήτων έχουν αξιοποιηθεί για τη βελτίωση πολλών ανθρώπινων δραστηριοτήτων στη γεωργία, την κηπουρική, τη δασοκομία, την προστασία του περιβάλλοντος, την επεξεργασία τροφίμων, τη βιοτεχνολογία και τις ιατρικές εφαρμογές. Οι αλληλεπιδράσεις βακτηρίων-μυκήτων ποικίλλουν καθώς μπορεί να είναι συνεργασίας ή ανταγωνισμού με βάση τη φυσική επαφή ή τη χημική τους ανταλλαγή ^{64,65}. Όταν πραγματοποιούνται αλληλεπιδράσεις συνεργασίας οι μύκητες εκκρίνουν ουσίες που προκαλούν θετικό χημειοτακτισμό των βακτηρίων. Οι ενώσεις του άνθρακα βοηθούν την ανάπτυξη και την αναπαραγωγή βακτηρίων ⁶⁶. Πέρα από τα θρεπτικά συστατικά, οι μύκητες εκκρίνουν και ενώσεις που λειτουργούν ως μόρια σηματοδότησης για την έναρξη οικολογικών λειτουργιών των βακτηρίων. Για παράδειγμα, η φρουκτόζη που εκκρίνεται από AMF, ενεργοποιεί την ανοργανοποίηση του φυτικού οξέος των βακτηρίων που διαλυτοποιούν τα φωσφορικά ⁶¹. Κατά την συμβιωτική αλληλεπίδραση ψυχανθών-ριζοβίων, τα ριζόβια συχνά συνυπάρχουν με μύκητες πριν από τη συμβίωση με τις ρίζες ⁵⁹, οι οποίοι σχηματίζουν πολύπλοκες και πολύ διαφορετικές κοινότητες στη ριζόσφαιρα ⁶³. Ωστόσο, αυτό που παραμένει ασαφές είναι πώς αλληλοεπιδρούν τα ριζόβια με τους μύκητες και πώς οι αλληλεπιδράσεις αυτές επηρεάζουν την αλληλεπίδραση των ριζοβίων με τα φυτά ξενιστές.

Σε αυτή την εργασία, διερευνήσαμε την αλληλεπίδραση ριζοβίου-μύκητα και εάν αυτή επηρεάζει την επακόλουθη συμβιωτική αλληλεπίδραση του ριζοβίου με το ψυχανθές φυτό *Lotus japonicus*. Το ερώτημα που θέσαμε είναι το παρακάτω: Παίζει ρόλο η συστοιχία γονιδίων *AMY2* στην εγκαθίδρυση του ενδόφυτου FSK στο φυτό παρουσία και του ριζοβίου;

Υλικά και μέθοδοι

Προετοιμασία υποστρώματος και συνθήκες ανάπτυξης φυτών

Στο συγκεκριμένο πείραμα χρησιμοποιήθηκαν σπόροι του φυτού *Lotus japonicus* (οικότυπος 'Gifu') αγρίου τύπου (WT) καθώς και τα μεταλλάγματα *AMY2-188* (Tilling mutant- Μεταλλάγματα σημειακής μετάλλαξης) και *CYP71-30063753* (*CYP71-753*) (*LORE1* μεταλλάγματα) και *CYP71-30063753 WT* (*CYP71-753 WT*). Η διαδικασία απολύμανσης και εκβλάστησης σπόρων είναι η ίδια που ακολουθήθηκε στο κεφάλαιο 1 στην αντίστοιχη παράγραφο. Την έβδομη μέρα τα φυτά μεταφέρθηκαν σε magenta που περιείχαν περίπου 270gr υποστρώματος το οποίο προηγουμένως είχε ποτιστεί με 25 ml Hoagland χωρίς άζωτο. Το υπόστρωμα που χρησιμοποιήθηκε είναι ανάμειξη δύο τύπων άμμου (MIT 2000: yellow silica, 3:1). Το υπόστρωμα πριν χρησιμοποιηθεί πλύθηκε και στέγνωσε στους 100°C για 2 μέρες και στη συνέχεια αποστειρώθηκε. Σε κάθε magenta φυτεύτηκαν 3 φυτά με τη βοήθεια

αποστειρωμένης λαβίδας. Για κάθε συνθήκη έχουμε 5 βιολογικές επαναλήψεις. Τα magenta τοποθετήθηκαν στον θάλαμο ανάπτυξης. Την ενδέκατη ημέρα τα φυτά συν-εμβολιάστηκαν με το ριζοβακτήριο *Mesorhizobium loti* στέλεχος R7A (*M. loti* R7A) και τον ενδοφυτικό μύκητα FsK. Η δειγματοληψία πραγματοποιήθηκε στις 21 ημέρες μετά τον συν-εμβολιασμό των φυτών.

Συνθήκες ανάπτυξης του μύκητα FsK και του ριζοβακτηρίου *Mesorhizobium loti* R7A και ο συν-εμβολιασμός των φυτών

Το στέλεχος FsK του μύκητα *Fusarium solani* αναπτύχθηκε σύμφωνα με τις συνθήκες που περιγράφονται στο κεφάλαιο 1 στην αντίστοιχη παράγραφο υλικών μεθόδων. Τέλος πραγματοποιήθηκε η κατάλληλη αραιώση ώστε να επιτευχθεί στο εμβόλιο η συγκέντρωση 5×10^3 κονίδια/ml. Στην συνέχεια σε φυτά 11 ημερών πραγματοποιήθηκε εμβολιασμός με 100 κονίδια ανά ρίζα.

Το ριζοβακτήριο *Mesorhizobium loti* R7A καλλιεργήθηκε σε υγρή καλλιέργεια YMB (yeast mannitol broth) στους 28°C για 48 ώρες. Η τελική συγκέντρωση ριζοβίου που χρησιμοποιήθηκε είναι η οπτική πυκνότητα με μήκος κύματος 600nm να είναι 0.02 ($OD_{600}=0.02$). κάθε ρίζα μολύνθηκε με 1ml εμβολίου.

Η δειγματοληψία πραγματοποιήθηκε 21 μέρες μετά την μόλυνση των φυτών με το ριζόβιο και το μύκητα.

Δειγματοληψία και Απομόνωση γονιδιακού DNA

Μετά από 21 μέρες από την μόλυνση των φυτών με το ριζόβιο και το μύκητα πραγματοποιήθηκε η δειγματοληψία των φυτών. Από κάθε magenta (3 φυτά) αφαιρέθηκε το μείγμα άμμου και μεταφέρθηκε κάθε βιολογική επανάληψη σε αποστειρωμένο νερό όπου ξεπλύθηκε για να φύγουν τα υπολείμματα άμμου από τις ρίζες. Ακολουθήθηκε η διαδικασία καταμέτρησης των φυματίων και των φυσιολογικών παραμέτρων αύξησης των φυτών και αποθήκευσης των δειγμάτων. Για την απομόνωση του γονιδιωματικού DNA ακολουθήθηκε η μέθοδος CTAB όπως περιγράφεται στο κεφάλαιο 1 στην αντίστοιχα παράγραφο των υλικών μεθόδων, καθώς και η ποσοτικοποίηση του.

Ανίχνευση των επιπέδων αποικισμού από τον μύκητα *F. solani* στις ρίζες του φυτού *Lotus japonicus*

Η διαδικασία είναι αυτή που περιγράφεται στη σελίδα 39 του πρώτου κεφαλαίου.

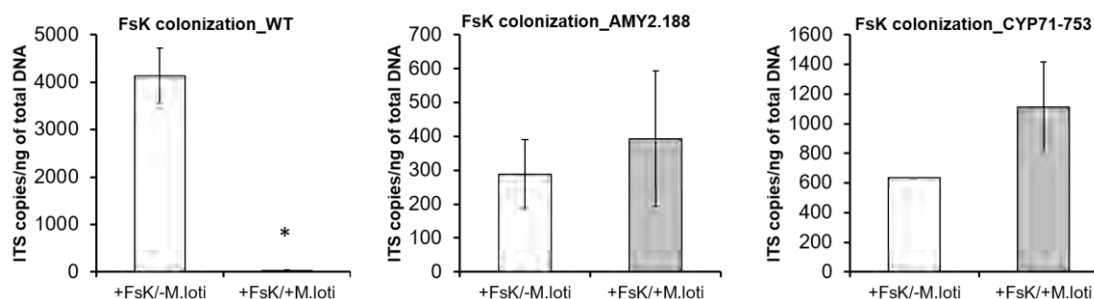
Στατιστική ανάλυση

Για όλες τις στατιστικές αναλύσεις πραγματοποιήθηκε ανάλυση διακύμανσης δύο παραγόντων (Two-way ANOVA). Όπου ήταν απαραίτητο ακολούθησε ανάλυση κατά Tukey post-hoc. Το επίπεδο σημαντικότητας ορίστηκε στο $p < 0.05$. Για την ανάλυση δυο ανεξάρτητων δειγμάτων πραγματοποιήθηκε ανάλυση Student t-test.

Αποτελέσματα

Ο ενδοφυτικός μύκητας είναι ικανός να αποικίζει το ριζικό σύστημα των φυτών αγρίου τύπου και τα μεταλλάγματα *AMY2* και *CYP71* παρουσία του ριζοβίου.

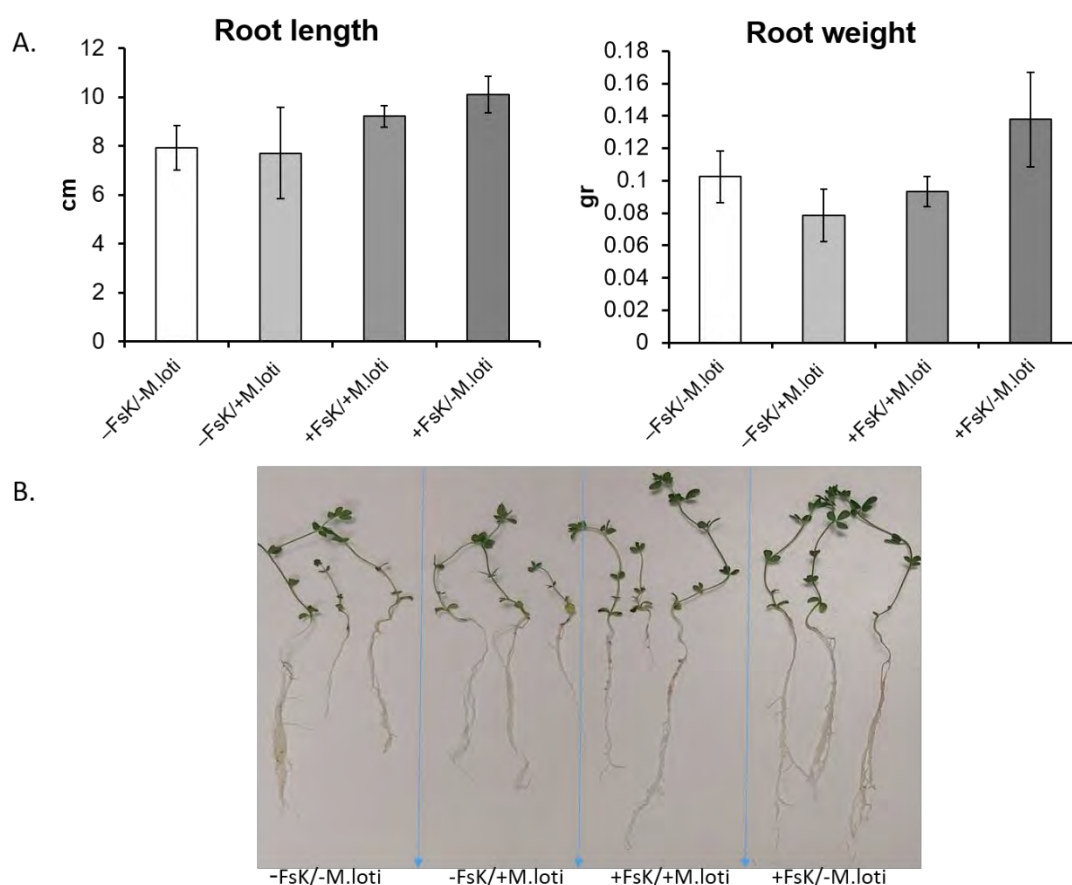
Τα αποτελέσματα μας αποδεικνύουν την ικανότητα του μύκητα να αποικίζει τα φυτά υπό διάφορες συνθήκες. Αυτή τη φορά ελέγχθηκε η ικανότητα παρουσία ενός ακόμα μικροοργανισμού και συγκεκριμένα του ριζοβίου *Mesorhizobium loti* R7A. Τα επίπεδα αποικισμού του μύκητα ελέγχθηκαν στις 21 ημέρες μετά τον συν εμβολιασμό με το ριζόβιο. Παρουσία του ριζοβίου ο μύκητας αποικίζει τα φυτά αγρίου τύπου σε στατιστικά μικρότερο επίπεδο σε σχέση με την απουσία του. Από την άλλη όμως πλευρά δεν υπάρχει αυτή η διαφορά στα μεταλλάγματα των φυτών *amy2-188.1* και *cyp71-753-N2* και ο μύκητας αποικίζει τις ρίζες των φυτών στο ίδιο επίπεδο (Εικ.2.1).



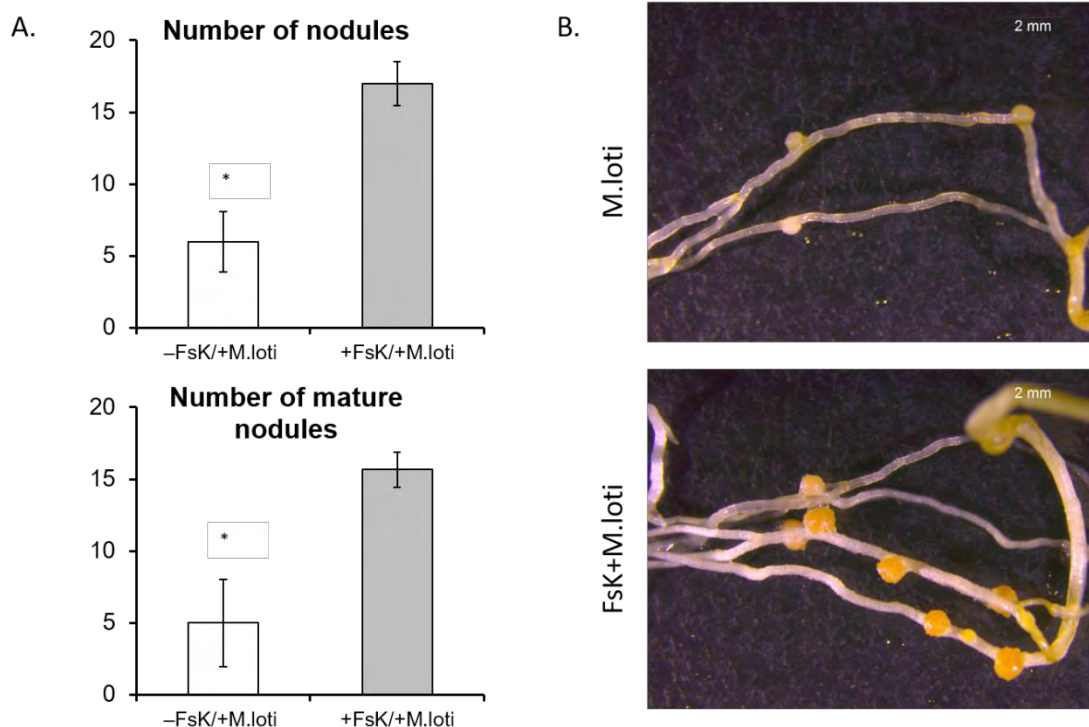
Εικόνα 2.1: Επίπεδα αποικισμού στο ριζικό των φυτών *Lotus japonicus* τόσο αγρίου τύπου καθώς και των μεταλλαγμάτων *AMY2.188.1* και *CYP71-30063753-N2* από το ενδοφύτο *Fusarium solani* στέλεχος K (Fsk) στις 21dpi σε συνθήκες συν εμβολιασμού με το ριζόβιο *M.loti* R7A. Ποσοτικοποίηση του αποικισμού του μύκητα εντός των ιστών της ρίζας με qPCR χρησιμοποιώντας εκκινητές ειδικούς για το γονίδιο ITS. Οι τιμές κανονικοποιούνται ως προς τα ng του συνολικού DNA που απομονώθηκε. Τα δεδομένα είναι μέσο δύο τεχνικών επαναλήψεων για καθένα από τα τέσσερα βιολογικά αντίγραφα. Κάθε βιολογικό αντίγραφο αποτελείται από τρία φυτά. Σημαντικές διαφορές καταγράφηκαν μεταξύ των δύο συνθηκών σε φυτά αγρίου τύπου μετά το Student's t-test.

Ο ενδοφυτικός μύκητας δεν επηρεάζει τις φυσιολογικές παραμέτρους αύξησης και ανάπτυξης των φυτών αγρίου τύπου ενώ δρα συνεργατικά με το ριζόβιο στη διαδικασία της φυματιογένεσης

Γνωρίζοντας ότι ο μύκητας και το ριζόβιο χρησιμοποιούν το ίδιο μονοπάτι αναγνώρισης από το φυτό ⁴⁴, ελέγχθηκε η δράση τους όταν τα φυτά συν εμβολιάζονται και με τα δύο. Τα αποτελέσματα έδειξαν ότι τόσο ο μύκητας όσο και το ριζόβιο δεν επηρεάζουν τις φυσιολογικές παραμέτρους αύξησης των φυτών, δηλαδή το μήκος και το βάρος της ρίζας (Εικ.2.2). Παράλληλα όμως παρατηρούμε μία αύξηση του αριθμού των φυματίων όταν τα φυτά συν εμβολιάζονται και με τον μύκητα και με το ριζόβιο. Επιπρόσθετα παρατηρήσαμε κάτω από μικροσκόπιο ότι η αύξηση αυτή του αριθμού των φυματίων οφείλεται σε αύξηση του αριθμού των ώριμων φυματίων. Τα φυμάτια που σχηματίζονται 21 ημέρες μετά την μόλυνση και με τους δυο μικροοργανισμούς είναι ώριμα ενώ στα φυτά που έχουν συμβιωτική σχέση μόνο με το ριζόβιο σχηματίζουν λιγότερα ώριμα φυμάτια σε σύγκριση με τα ανώριμα (Εικ.2.3).



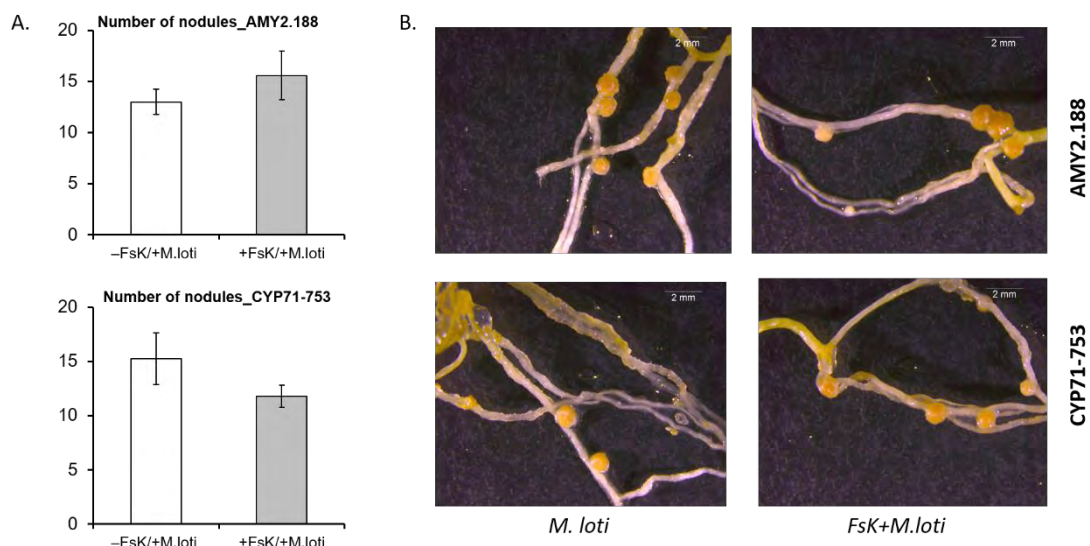
Εικόνα 2.2: Διαγράμματα απεικόνισης των παραμέτρων αύξησης, μήκος ρίζας και βάρος ρίζας (A) 21 ημέρες μετά των εμβολιασμό με τον ενδοφυτικό μύκητα Fsk και το ριζόβιο M.loti R7A σε φυτά αγρίου τύπου και (B) ενδεικτική φωτογραφία των φυτών την ημέρα της δειγματοληψίας. Τα δεδομένα είναι ο μέσος όρος τεσσάρων βιολογικών επαναλήψεων. Κάθε βιολογική επανάληψη είναι μέσος όρος 3 φυτών. Σημαντικές διαφορές δεν καταγράφηκαν μεταξύ των συνθηκών που αναπτύχθηκαν τα φυτά αγρίου τύπου μετά τα post-hoc τεστ του Tukey μετά από ANOVA: $P < 0,05$.



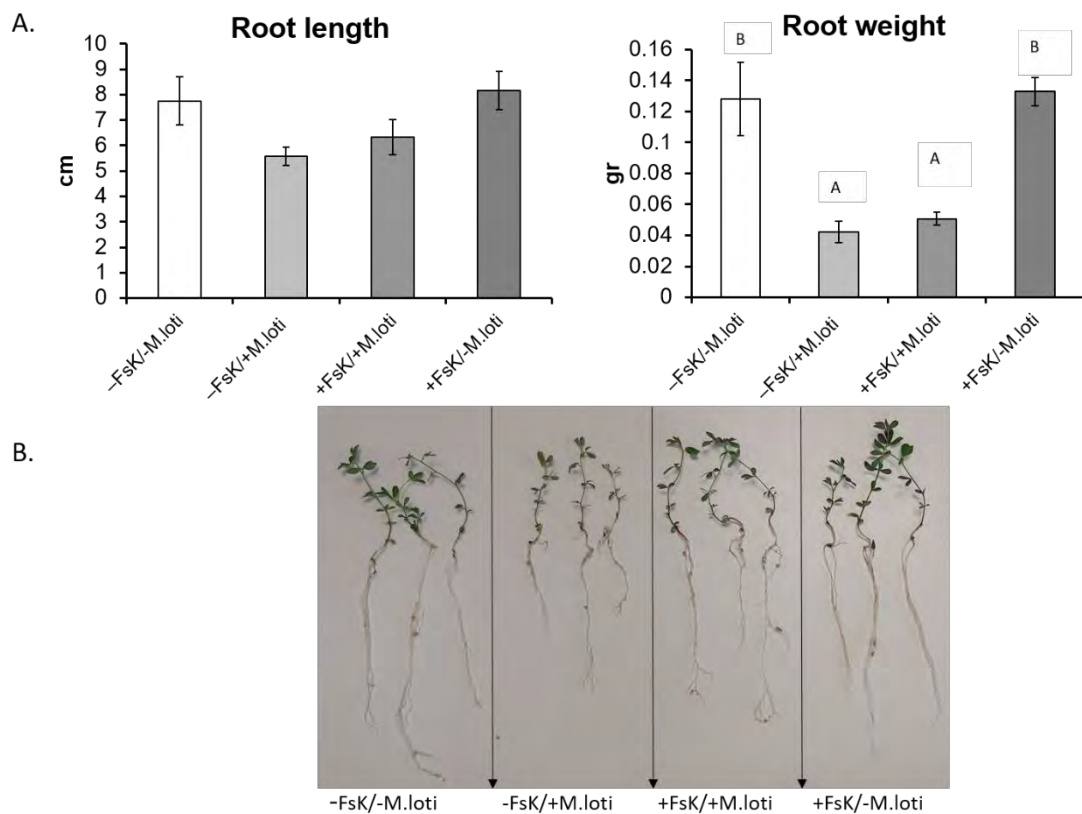
Εικόνα 2.3: Διαγράμματα απεικόνισης του συνολικού αριθμού των φυματίων και του αριθμού των ώριμων φυματίων (Α) και ενδεικτικές φωτογραφίες των φυματίων (Β) στα φυτά αγρίου τύπου. (Α) Μέσος όρος $\pm$ SE ($n = 5$) του ολικού αριθμού των φυματίων και του αριθμού των ώριμων φυματίων 21 ημέρες μετά την μόλυνση είτε μόνο με ριζόβιο είτε με συν εμβολιασμό με τον ενδοφυτικό μύκητα Fsk. Σημαντικές διαφορές καταγράφηκαν μεταξύ των δύο συνθηκών σε φυτά αγρίου τύπου μετά το Student's t-test. (Β) Λήφθηκαν φωτογραφίες φυματίων μετά από 21 ημέρες από τον εμβολιασμό με το ριζόβιο και τον ενδοφυτικό μύκητα Fsk.

Ο ενδοφυτικός μύκητας δεν δρα συνεργατικά με το ριζόβιο στα μεταλλάγματα των φυτών AMY2 και CYP71 στη διαδικασία της φυματιογένεσης.

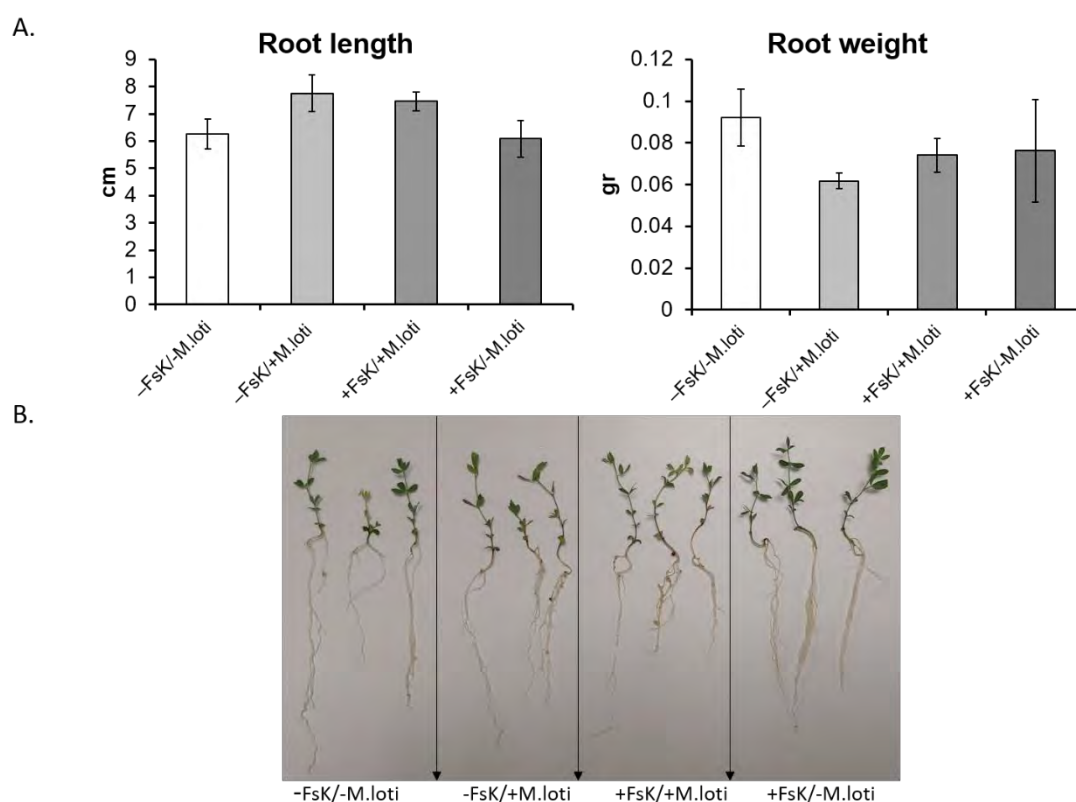
Αν και παραπάνω παρατηρούμε το ριζόβιο και τον ενδοφυτικό μύκητα να δρουν μαζί προς όφελος του φυτού και τον σχηματισμό φυματίων στα φυτά αγρίου τύπου, τα δεδομένα στα μεταλλάγματα δείχνουν ότι ο συν εμβολιασμός των φυτών δεν δρα θετικά προς το φυτό και δεν παρατηρούμε αύξηση στον αριθμό των φυματίων (Εικ.2.4.A, B). Αν και ο μύκητας δεν προκαλεί αλλαγές στα φαινοτυπικά χαρακτηριστικά, παρατηρούμε ότι το ριζόβιο είτε μόνο του είτε όταν δρα μαζί με τον ενδοφυτικό μύκητα προκαλεί μια στατιστικά σημαντική μείωση στο βάρος της ρίζας μόνο στα φυτά AMY2.188 (Εικ.2.5) και όχι στα φυτά CYP71-753 (Εικ.2.6).



Εικόνα 2.4: Διαγράμματα απεικόνισης του συνολικού αριθμού των φυματίων των φυτών *AMY2.188.1* και *CYP71-753* (A) και ενδεικτικές φωτογραφίες των φυματίων (B). (A) Μέσος όρος $\pm$ SE ($n = 5$) του ολικού αριθμού των φυματίων και του αριθμού των ώριμων φυματίων 21 ημέρες μετά την μόλυνση είτε μόνο με ριζόβιο είτε με συν εμβολιασμό με τον ενδοφυτικό μύκητα FsK. Σημαντικές διαφορές δεν καταγράφηκαν μεταξύ των δύο συνθηκών στα μεταλλάγματα των φυτών μετά το Student's t-test. (B) Λήφθηκαν φωτογραφίες φυματίων μετά από 21 ημέρες από τον εμβολιασμό με το ριζόβιο και τον ενδοφυτικό μύκητα FsK.



Εικόνα 2.5: Διαγράμματα απεικόνισης των παραμέτρων αύξησης, μήκος ρίζας και βάρος ρίζας (A) 21 ημέρες μετά των εμβολιασμό με τον ενδοφυτικό μύκητα *FsK* και το ριζόβιο *M.loti* R7A σε φυτά *AMY2.188.1* και (B) ενδεικτική φωτογραφία των φυτών την ημέρα της δειγματοληψίας. Τα δεδομένα είναι ο μέσος όρος τεσσάρων βιολογικών επαναλήψεων. Κάθε βιολογική επανάληψη είναι μέσος όρος 3 φυτών. Σημαντικές διαφορές που καταγράφηκαν μεταξύ των συνθηκών που αναπτύχθηκαν τα φυτά *AMY2* υποδεικνύονται με διαφορετικά γράμματα μετά τα post-hoc τεστ του Tukey μετά από ANOVA: $P < 0,05$.



Εικόνα 2.6: Διαγράμματα απεικόνισης των παραμέτρων αύξησης, μήκος ρίζας και βάρος ρίζας (A) 21 ημέρες μετά των εμβολιασμό με τον ενδοφυτικό μύκητα *FsK* και το ριζόβιο *M.loti* R7A σε φυτά *CYP71-753* και (B) ενδεικτική φωτογραφία των φυτών την ημέρα της δειγματοληψίας. Τα δεδομένα είναι ο μέσος όρος τεσσάρων βιολογικών επαναλήψεων. Κάθε βιολογική επανάληψη είναι μέσος όρος 3 φυτών. Σημαντικές διαφορές δεν καταγράφηκαν μεταξύ των συνθηκών που αναπτύχθηκαν τα φυτά *CYP71* μετά τα post-hoc τεστ του Tukey μετά από ANOVA: $P < 0,05$.

Συζήτηση

Στην παρούσα μελέτη, αξιολογήσαμε την αλληλεπίδραση ριζοβίου-μύκητα και εάν αυτή επηρεάζει την επακόλουθη συμβιωτική αλληλεπίδραση του ριζοβίου με το ψυχανθές φυτό *Lotus japonicus*, χρησιμοποιώντας το ριζοβακτήριο *Mesorhizobium loti* στέλεχος R7A και τον ενδοφυτικό μύκητα *Fusarium solani* στελεχος Κ. Μελετήσαμε την επίδραση του συν-εμβολιασμού στην ικανότητα αποικισμού του ενδοφυτικού μύκητα και στη διαδικασία της φυματιογένεσης. Συγκεκριμένα χρησιμοποιήσαμε τόσο φυτά αγρίου τύπου όσο και τα μεταλλάγματα AMY2.188 και CYP71-753. Καταγράψαμε τις αλλαγές σε επίπεδο αποικισμού και για τους 3 διαφορετικούς γενοτύπους. Τα αποτελέσματα έδειξαν ότι ο μύκητας είναι ικανός να αποικίζει τόσο τα φυτά αγρίου τύπου όσο και τα μεταλλάγματα. Όμως δεν παρατηρήθηκαν διαφορές στα επίπεδα αποικισμού στα μεταλλάγματα παρουσία του ριζοβίου, ενώ διαπιστώνουμε μειωμένα επίπεδα του μύκητα παρουσία του ριζοβίου στα φυτά αγρίου τύπου. Σε αντίθεση με τις αλλαγές που παρατηρήθηκαν σε επίπεδο αποικισμού στα φυτά αγρίου τύπου, δεν καταγράφηκαν αλλαγές σε φυσιολογικές παραμέτρους αύξησης όπως το μήκος ρίζας και το βάρος 21 ημέρες μετά την μόλυνση. Από την άλλη στα μεταλλάγματα AMY2.188 η παρουσία του ριζοβίου προκαλεί μείωση στο βάρος των ριζών χωρίς να επηρεάζει το μήκος των ριζών. Κάτι που σημαίνει ότι πιθανά να εμπλέκεται στο σχηματισμό πλευρικών ριζών, όμως δεν πραγματοποιήθηκε περαιτέρω ανάλυση. Δεν παρατηρείται καμία μεταβολή στους αναπτυξιακούς παράγοντες στα μεταλλάγματα CYP71-753. Παράλληλα μελετήθηκε και η επίδραση του συν-εμβολιασμού στη διαδικασία της φυματιογένεσης. Διαπιστώθηκε μια συνεργατική δράση του ριζοβίου και του μύκητα στη διαδικασία της φυματιογένεσης στα φυτά αγρίου τύπου με τον ολικό αριθμό των φυματίων και τον αριθμό των ώριμων φυματίων να είναι στατιστικά μεγαλύτερος στα φυτά που συν-εμβολιάζονται με τους 2 μικροοργανισμούς. Αυτή η συνεργατική δράση δεν παρατηρείται στα μεταλλάγματα των φυτών AMY2 και CYP71. Γνωρίζοντας από τα προηγούμενα αποτελέσματα ότι το μονοπάτι βιοσύνθεσης των τριτερπενίων δρα ανασταλτικά στον αποικισμό του FSK, παρατηρούμε τώρα ότι ο μύκητας αποικίζει στα ίδια επίπεδα τα μεταλλάγματα είτε παρουσία είτε απουσία του ριζοβίου. Άρα στα μεταλλάγματα η παρουσία του ριζοβίου δεν επηρεάζει την ανασταλτική αυτή δράση του μονοπατιού. Από την άλλη σε φυτά αγρίου τύπου η παρουσία του ριζοβίου μειώνει τα επίπεδα αποικισμού του μύκητα και γνωρίζοντας ότι αναγνωρίζονται από το ίδιο μονοπάτι πιθανά ανταγωνίζονται το ένα το άλλο. Όσον αφορά τον αριθμό φυματίων, παρατηρούμε ότι σε φυτά αγρίου τύπου παρουσία και του μύκητα σχηματίζονται περισσότερα και ώριμα φυμάτια. Απουσία όμως του βιοσυνθετικού μονοπατιού η ωφέλιμη αυτή δράση του FSK «χάνεται». Το αποτέλεσμα αυτό μας δείχνει ότι ο μύκητας πιθανά ρυθμίζει θετικά το μονοπάτι βιοσύνθεσης των τριτερπενίων καθώς απουσία του δεν παρατηρούμε την θετική

επίδραση του μύκητα στον σχηματισμό και την ωρίμανση των φυματίων. Τέλος, απουσία του μύκητα, τα φυτά αγρίου τύπου σχηματίζουν λιγότερα φυμάτια σε σχέση με τα μεταλλάγματα. Αυτό μας δείχνει ότι το βιοσυνθετικό μονοπάτι και κάποιο από τα προϊόντα του είναι αρνητικοί ρυθμιστές της εγκατάστασης και των ριζοβίων και του FSK.

Η αλληλεπίδραση των φυτών με ωφέλιμα μικρόβια του εδάφους όπως με αζωτοδεσμευτικά βακτήρια του γένους *Rhizobium*, με τους ενδομυκορριζικούς μύκητες και με ενδοφυτικούς μικροοργανισμούς είναι γνωστή περισσότερο από έναν αιώνα. Ωστόσο, σε μεγάλο βαθμό αυτή η γνώση βασίζεται σε μελέτες που έχουν γίνει σε ζευγάρια φυτών-ξενιστών, δηλαδή σε φυτά που συμβιώνουν με ένα συγκεκριμένο μικροοργανισμό καθώς τα περισσότερα πειράματα εξετάζουν μεμονωμένα τις συμβιωτικές σχέσεις, για παράδειγμα τις σχέσεις των ψυχανθών φυτών με αζωτοδεσμευτικά βακτήρια ή τις σχέσεις που δημιουργούν τα φυτά με δενδρόμορφους μυκορριζικούς μύκητες. Αυτή η προσέγγιση όμως είναι περιοριστική καθώς τα φυτά στην φύση αλληλοεπιδρούν ταυτόχρονα με περισσότερους από έναν μικροοργανισμό. Ως αποτέλεσμα οι μικροοργανισμοί αλληλεπιδρούν τόσο με το φυτό-ξενιστή όσο και με τους υπόλοιπους μικροοργανισμούς που υπάρχουν στην ριζόσφαιρα καθώς και μ μικροοργανισμούς που έχουν ήδη συνάψει συμβιωτική σχέση με το ίδιο φυτό-ξενιστή⁶⁷. Οι αλληλεπιδράσεις αυτές είναι ικανές να προκαλέσουν θετικές ή αρνητικές επιπτώσεις τόσο στο ίδιο το φυτό, όσο και στους υπόλοιπους μικροοργανισμούς. Μελέτες έχουν δείξει ότι τα ψυχανθή φυτά μπορούν να συμβιώσουν ταυτόχρονα με ριζόβια και ενδομυκορριζικούς μύκητες ώστε να βελτιώσουν την θρέψη τους σε άζωτο και φώσφορο και να ενισχύσουν την απόδοση και την ανάπτυξη τους. Όμως όταν συνυπάρχουν στο ίδιο φυτό-ξενιστή, επηρεάζει το ένα το άλλο αλλά ο τρόπος και οι επιδράσεις που θα έχουν, εξαρτάται από το φυτικό είδος, τους μικροσυμβιώτες και τις συνθήκες ανάπτυξης. Για παράδειγμα ο ταυτόχρονος εμβολιασμός με *Rhizobium leguminosarum* και ένα μείγμα από τέσσερα στελέχη μυκορριζικών μυκήτων σε κουκιά (*fabas beans*) που είχαν καλλιεργηθεί σε αλκαλικά εδάφη, βοήθησε στην ανάπτυξη των φυτών, αύξησε σημαντικά τον αριθμό και το μέγεθος των φυματίων που είχαν σχηματιστεί στις ρίζες, την δραστικότητα της νιτρογενάσης καθώς επίσης και το ποσοστό αποικισμού από μύκητες⁶⁸. Από την άλλη πλευρά, υπάρχουν μελέτες που παρατηρήθηκε ότι τα ριζόβια και οι μυκορριζικοί μύκητες επηρέασαν το ένα το άλλο αλλά όχι με τον ίδιο τρόπο. Συγκεκριμένα ο εμβολιασμός με AMF αύξησε τον αριθμό και τον όγκο των φυματίων που σχηματίστηκαν, ενώ ο εμβολιασμός με ριζόβιο μείωσε το ποσοστό αποικισμού των μυκήτων στις ρίζες των φυτών *Amorpha canescens*¹⁵. Συμπεραίνουμε λοιπόν ότι η επίδραση που έχουν οι συμβιωτές τόσο στο φυτό όσο και μεταξύ τους είναι αρκετά πολύπλοκη και εξαρτάται από πολλούς παράγοντες.

Όσον αφορά το ψυχανθές-μοντέλο *Lotus japonicus* έχουν πραγματοποιηθεί μελέτες συν εμβολιασμού με το ριζόβιο *Mesorhizobium loti* και τον δενδρόμορφο

ενδομυκορριζικό μύκητα *Rhizophagus irregularis* και τα αποτελέσματα έδειξαν ότι ο ταυτόχρονος εμβολιασμός δεν επηρέασε τη διαδικασία της φυματιογένεσης ενώ επηρέασε θετικά τον αποικισμό των ριζών από τον μύκητα ⁶⁹.

Εν κατακλείδι, τα διαφορετικά φυτικά είδη ανταποκρίνονται διαφορετικά στους διπλούς εμβολιασμούς, σύμφωνα μάλλον με τις ιδιαίτερες ανάγκες τους και τις συνθήκες ανάπτυξης. Τα αποτελέσματα μας δείχνουν ότι ο διπλός εμβολιασμός των φυτών *Lotus japonicus* έχει θετικά αποτελέσματα στη διαδικασία της φυματιογένεσης στα φυτά αγρίου τύπου.

Τα συμπεράσματα που προκύπτουν από τα παραπάνω αποτελέσματα είναι τα εξής (σχήμα 1):

Πρώτον, παρατηρούμε ότι το βιοσυνθετικό μονοπάτι των τριτερπενίων δρα ανασταλτικά στη διαδικασία αποικισμού του FsK, κατ' αναλογία και για το ριζόβιο.

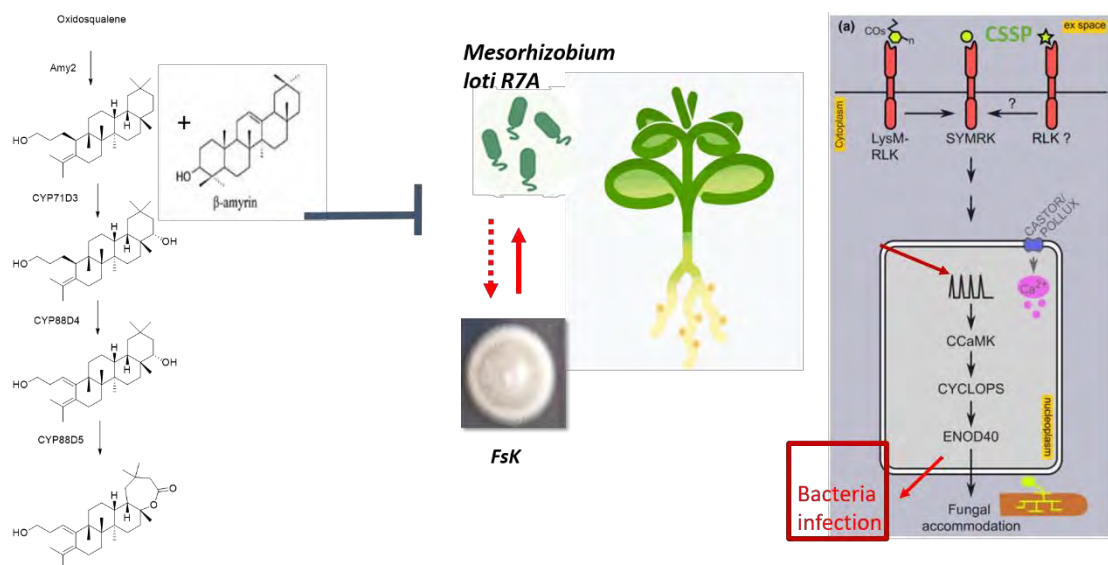
Δεύτερον, παρατηρούμε ότι στα φυτά αγρίου τύπου ο FsK δρα συνεργηστικά με το ριζόβιο και σχηματίζονται περισσότερα φυμάτια. Πως εξηγείται αυτό το φαινόμενο; Γνωρίζουμε ότι και οι δύο μικροοργανισμοί χρησιμοποιούν το ίδιο σηματοδοτικό μονοπάτι αναγνώρισης και ο μύκητας είναι ικανός να επάγει ταλαντώσεις ασβεστίου. Μία υπόθεση μπορεί να είναι ότι με την επαγωγή των ταλαντώσεων διευκολύνεται η είσοδος του ριζοβίου. Κάτι το οποίο συνάδει με τα αποτελέσματα αποικισμού του μύκητα όπου παρουσία του ριζοβίου εισέρχεται σε μικρότερο βαθμό. Μία δεύτερη και πιο απλή εξήγηση είναι ότι το φυτό μπορεί να έχει εξαντλήσει τα αποθέματα του ώστε να υποστηρίξει τον αυξημένο αποικισμό από το ριζόβιο.

Τρίτον, παρατηρούμε ότι απουσία του βιοσυνθετικού μονοπατιού επάγεται η ικανότητα αποικισμού του FsK καθώς και του ριζοβίου ενώ παρατηρείται ακόμη ότι ο FsK δεν μπορεί να δράσει προσθετικά όσον αφορά τον αριθμό των φυματίων. Άρα ο FsK δρα καθοδικά από το προϊόν της συστοιχίας AMY2. Αυτό μπορεί να οφείλεται στο γεγονός ότι το φυτό έχει φτάσει ένα μέγιστο κατώφλι φυματίων, καθώς γνωρίζουμε ότι τα φυτά διαθέτουν ένα τέτοιο σύστημα αυτορρύθμισης της φυματιογένεσης. Μία άλλη εξήγηση είναι ότι ίσως αυτή τη φορά το φυτό να έχει εξαντλήσει τα αποθέματα ενέργειας του για να υποστηρίξει τον αποικισμό του μύκητα.

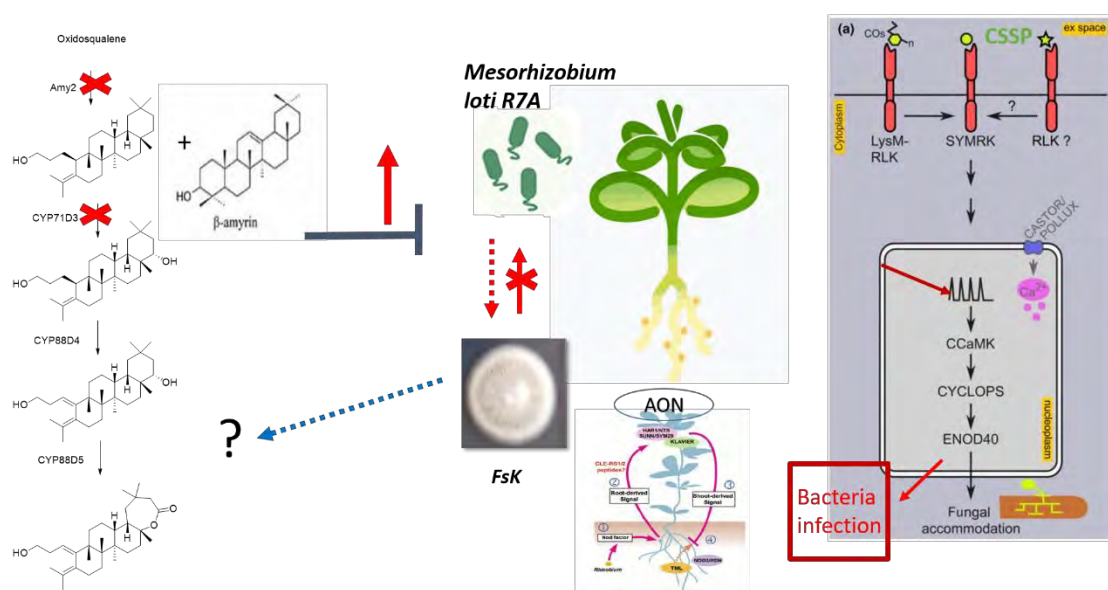
Τα αναπάντητα ερωτήματα φυσικά που δημιουργούνται είναι πολλά και αξίζει περαιτέρω έρευνα στο διπλό εμβολιασμό με τον ενδοφυτικό μύκητα FsK και το ριζόβιο *Mesorhizobium loti* R7A.

Σχήμα 1.

A.



B.



Σχήμα 1: Υποθετικό μοντέλο αλληλοσύνδεσης του βιοσυνθετικού μονοπατιού τριτερπενίων με το Κοινό Σηματοδοτικό Μονοπάτι Συμβίωσης. A. Η παρουσία του βιοσυνθετικού μονοπατιού δρα ανασταλτικά ως προς τα διαδικασία αποικισμού του μύκητα, κατ' αναλογία και του ριζοβίου. B. η απουσία του βιοσυνθετικού μονοπατιού επάγει την διαδικασία αποικισμού καθώς και τον σχηματισμό των φυματίων, παρατηρώντας και αλληλεπίδραση μεταξύ ριζοβίου και ενδοφυτικού μύκητα. Παράλληλα αποδεικνύεται η δράση του μύκητα καθοδικά της συστοιχίας γονιδίων της AMY2.

Βιβλιογραφία

1. Gepts P, Beavis WD, Brummer EC, et al. Legumes as a model plant family. Genomics for food and feed report of the cross-legume advances through genomics conference. *Plant Physiol.* 2005;137(4):1228-1235. doi:10.1104/pp.105.060871
2. Udvardi MK, Tabata S, Parniske M, Stougaard J. Lotus japonicus: Legume research in the fast lane. *Trends Plant Sci.* 2005;10(5):222-228. doi:10.1016/j.tplants.2005.03.008
3. Graham PH, Vance CP. Legumes: Importance and constraints to greater use. *Plant Physiol.* 2003;131(3):872-877. doi:10.1104/pp.017004
4. Handberg K, Stougaard J. for Classical and Molecular Genetics. *Plant J.* 1992;2(4):487-496.
5. Jiang Q, Gresshoff PM. Classical and molecular genetics of the model legume Lotus japonicus. *Mol Plant-Microbe Interact.* 1997;10(1):59-68. doi:10.1094/MPMI.1997.10.1.59
6. Sato S, Nakamura Y, Kaneko T, et al. Genome structure of the legume, Lotus japonicus. *DNA Res.* 2008;15(4):227-239. doi:10.1093/dnares/dsn008
7. Mun T, Bachmann A, Gupta V, Stougaard J, Andersen SU. Lotus Base: An integrated information portal for the model legume Lotus japonicus. *Sci Rep.* 2016;6:1-18. doi:10.1038/srep39447
8. V S. Nitrogen in crop production : An account of global flows adds. *Global Biogeochem Cycles.* 1999;13(2):647-662.
9. Oldroyd GED. Speak, friend, and enter: Signalling systems that promote beneficial symbiotic associations in plants. *Nat Rev Microbiol.* 2013;11(4):252-263. doi:10.1038/nrmicro2990
10. Bever JD, Simms EL. Evolution of nitrogen fixation in spatially structured populations of Rhizobium. *Heredity (Edinb).* 2000;85(4):366-372. doi:10.1046/j.1365-2540.2000.00772.x
11. Parniske M. Arbuscular mycorrhiza: The mother of plant root endosymbioses. *Nat Rev Microbiol.* 2008;6(10):763-775. doi:10.1038/nrmicro1987
12. Choi J, Summers W, Paszkowski U. Annual Review of Phytopathology Mechanisms Underlying Establishment of Arbuscular Mycorrhizal Symbioses. *Annu Rev Phytopathol.* 2018;56(May):7-8. <https://doi.org/10.1146/annurev-phyto-080516->
13. Afkhami ME, Almeida BK, Hernandez DJ, Kieseewetter KN, Revillini DP. Tripartite

- mutualisms as models for understanding plant–microbial interactions. *Curr Opin Plant Biol.* 2020;56:28-36. doi:10.1016/j.pbi.2020.02.003
14. Tsiknia M, Tsikou D, Papadopoulou KK, Ehaliotis C. Multi-species relationships in legume roots: From pairwise legume-symbiont interactions to the plant - Microbiome - soil continuum. *FEMS Microbiol Ecol.* 2021;97(2):1-16. doi:10.1093/femsec/fiaa222
 15. Larimer AL, Clay K, Bever JD. Synergism and context dependency of interactions between arbuscular mycorrhizal fungi and rhizobia with a prairie legume. *Ecology.* 2014;95(4):1045-1054. doi:10.1890/13-0025.1
 16. Brader G, Compant S, Vescio K, et al. Ecology and Genomic Insights into Plant-Pathogenic and Plant-Nonpathogenic Endophytes. *Annu Rev Phytopathol.* 2017;55:61-83. doi:10.1146/annurev-phyto-080516-035641
 17. Wilson D. Endophyte: The Evolution of a Term, and Clarification of Its Use and Definition. *Oikos.* 1995;73(2):274. doi:10.2307/3545919
 18. White JF. An Overview of Endophytic Microbes: Endophytism Defined. *Microb Endophytes.* 2020;(January 2000):17-44. doi:10.1201/9781482277302-1
 19. Rodriguez RJ, White JF, Arnold AE, Redman RS. Fungal endophytes: Diversity and functional roles: Tansley review. *New Phytol.* 2009;182(2):314-330. doi:10.1111/j.1469-8137.2009.02773.x
 20. Varma A, Verma S, Sudha, Sahay N, Bütehorn B, Franken P. Piriformospora indica, a cultivable plant-growth-promoting root endophyte. *Appl Environ Microbiol.* 1999;65(6):2741-2744. doi:10.1128/aem.65.6.2741-2744.1999
 21. Waller F, Achatz B, Baltruschat H, et al. The endophytic fungus Piriformospora indica reprograms barley to salt-stress tolerance, disease resistance, and higher yield. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 2005;102(38):13386-13391. doi:10.1073/pnas.0504423102
 22. Baltruschat H, Fodor J, Harrach BD, et al. Salt tolerance of barley induced by the root endophyte Piriformospora indica is associated with a strong increase in antioxidants. *New Phytol.* 2008;180(2):501-510. doi:10.1111/j.1469-8137.2008.02583.x
 23. Rai M, Acharya D, Singh A, Varma A. Positive growth responses of the medicinal plants *Spilanthes calva* and *Withania somnifera* to inoculation by *Piriformospora indica* in a field trial. *Mycorrhiza.* 2001;11(3):123-128. doi:10.1007/s005720100115
 24. Das A, Kamal S, Shakil NA, et al. The root endophyte fungus *Piriformospora indica* leads to early flowering, higher biomass and altered secondary metabolites of the medicinal plant, *Coleus forskohlii*. *Plant Signal Behav.* 2012;7(1):103-112. doi:10.4161/psb.7.1.18472
 25. Abdelaziz ME, Kim D, Ali S, Fedoroff N V., Al-Babili S. The endophytic fungus *Piriformospora indica* enhances *Arabidopsis thaliana* growth and modulates Na⁺/K⁺ homeostasis under salt stress conditions. *Plant Sci.* 2017;263(May):107-115. doi:10.1016/j.plantsci.2017.07.006
 26. Hiruma K, Gerlach N, Sacristán S, et al. Root Endophyte *Colletotrichum tofieldiae* Confers Plant Fitness Benefits that Are Phosphate Status Dependent. *Cell.*

- 2016;165(2):464-474. doi:10.1016/j.cell.2016.02.028
27. Pagare S, Bhatia M, Tripathi N, Pagare S, Bansal YK. Secondary metabolites of plants and their role: Overview. *Curr Trends Biotechnol Pharm.* 2015;9(3):293-304.
 28. García-Calderón M, Pérez-Delgado CM, Palove-Balang P, Betti M, Márquez AJ. Flavonoids and isoflavonoids biosynthesis in the model legume *lotus japonicus*; connections to nitrogen metabolism and photorespiration. *Plants.* 2020;9(6):1-22. doi:10.3390/plants9060774
 29. Krokida A, Delis C, Geisler K, et al. A metabolic gene cluster in *Lotus japonicus* discloses novel enzyme functions and products in triterpene biosynthesis. *New Phytol.* 2013;200(3):675-690. doi:10.1111/nph.12414
 30. Toll D. Biosynthesis and Biological Functions of Terpenoids in Plants. *Adv Biochem Eng Biotechnol.* 2014;123(July 2015):127-141. doi:10.1007/10
 31. Thimmappa R, Geisler K, Louveau T, O'Maille P, Osbourn A. Triterpene biosynthesis in plants. *Annu Rev Plant Biol.* 2014;65(September):225-257. doi:10.1146/annurev-arplant-050312-120229
 32. Vincken J, Heng L, Groot A De, Gruppen H. Saponins , classification and occurrence in the plant kingdom. 2007;68:275-297. doi:10.1016/j.phytochem.2006.10.008
 33. Kushiro T, Shibuya M, Ebizuka Y. β -Amyrin synthase Cloning of oxidosqualene cyclase that catalyzes the formation of the most popular triterpene among higher plants. 244:238-244.
 34. Delis C, Krokida A, Georgiou S, et al. Role of lupeol synthase in *Lotus japonicus* nodule formation. *New Phytol.* 2011;189(1):335-346. doi:10.1111/j.1469-8137.2010.03463.x
 35. Summerell BA. Resolving *Fusarium*: Current Status of the Genus. *Annu Rev Phytopathol.* 2019;57:323-339. doi:10.1146/annurev-phyto-082718-100204
 36. Ma LJ, Geiser DM, Proctor RH, et al. *Fusarium* pathogenomics. *Annu Rev Microbiol.* 2013;67:399-416. doi:10.1146/annurev-micro-092412-155650
 37. Moretti A. Taxonomy of *Fusarium* genus: A continuous fight between lumpers and splitters. *Zb Matice Srp za Prir Nauk.* 2009;(117):7-13. doi:10.2298/zmspn0917007m
 38. Fourie G, Steenkamp ET, Ploetz RC, Gordon TR, Viljoen A. Current status of the taxonomic position of *Fusarium oxysporum* formae specialis *cubense* within the *Fusarium oxysporum* complex. *Infect Genet Evol.* 2011;11(3):533-542. doi:10.1016/j.meegid.2011.01.012
 39. Kavroulakis N, Ntougias S, Zervakis GI, Ehaliotis C, Haralampidis K, Papadopoulou KK. Role of ethylene in the protection of tomato plants against soil-borne fungal pathogens conferred by an endophytic *Fusarium solani* strain. *J Exp Bot.* 2007;58(14):3853-3864. doi:10.1093/jxb/erm230
 40. Pappas ML, Liapoura M, Papantoniou D, et al. The beneficial endophytic fungus *fusarium solani* strain K alters tomato responses against spider mites to the benefit of the plant. *Front Plant Sci.* 2018;9. doi:10.3389/fpls.2018.01603

41. Garantonakis N, Pappas ML, Varikou K, et al. Tomato inoculation with the endophytic strain *Fusarium solani* K results in reduced feeding damage by the zoophytophagous predator *nesidiocoris tenuis*. *Front Ecol Evol*. 2018;6(AUG):1-7. doi:10.3389/fevo.2018.00126
42. Papadopoulou KK, Papadakis IE, Kavroulakis N, Doupis G, Ehaliotis C. Tolerance of tomato plants to water stress is improved by the root endophyte *Fusarium solani* FsK. *Rhizosphere*. 2018;6(March):77-85. doi:10.1016/j.rhisph.2018.04.003
43. Skiada V, Faccio A, Kavroulakis N, Genre A, Bonfante P, Papadopoulou KK. Colonization of legumes by an endophytic *Fusarium solani* strain FsK reveals common features to symbionts or pathogens. *Fungal Genet Biol*. 2019;127(March):60-74. doi:10.1016/j.fgb.2019.03.003
44. Skiada V, Avramidou M, Bonfante P, Genre A, Papadopoulou KK. An endophytic *Fusarium*–legume association is partially dependent on the common symbiotic signalling pathway. *New Phytol*. 2020;226(5):1429-1444. doi:10.1111/nph.16457
45. Hill RA, Connolly JD. Triterpenoids. *Nat Prod Rep*. 2020;37(7):962-998. doi:10.1039/c9np00067d
46. Papadopoulou K, Melton RE, Leggett M, Daniels MJ, Osbourn AE. Compromised disease resistance in saponin-deficient plants. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 1999;96(22):12923-12928. doi:10.1073/pnas.96.22.12923
47. Kemen AC, Honkanen S, Melton RE, et al. Investigation of triterpene synthesis and regulation in oats reveals a role for β -amyrin in determining root epidermal cell patterning. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 2014;111(23):8679-8684. doi:10.1073/pnas.1401553111
48. Confalonieri M, Cammareri M, Biazzi E, et al. Enhanced triterpene saponin biosynthesis and root nodulation in transgenic barrel medic (*Medicago truncatula* Gaertn.) expressing a novel β -amyrin synthase (*AsOXA1*) gene. *Plant Biotechnol J*. 2009;7(2):172-182. doi:10.1111/j.1467-7652.2008.00385.x
49. Qi X, Bakht S, Leggett M, Maxwell C, Melton R, Osbourn A. A gene cluster for secondary metabolism in oat: Implications for the evolution of metabolic diversity in plants. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 2004;101(21):8233-8238. doi:10.1073/pnas.0401301101
50. Osbourn A. Secondary metabolic gene clusters: Evolutionary toolkits for chemical innovation. *Trends Genet*. 2010;26(10):449-457. doi:10.1016/j.tig.2010.07.001
51. Iturbe-Ormaetxe I, Haralampidis K, Papadopoulou K, Osbourn AE. Molecular cloning and characterization of triterpene synthases from *Medicago truncatula* and *Lotus japonicus*. *Plant Mol Biol*. 2003;51(5):731-743. doi:10.1023/A:1022519709298
52. Fukai E, Stougaard J, Hayashi M. Activation of an Endogenous Retrotransposon Associated with Epigenetic Changes in *Lotus japonicus* : A Tool for Functional Genomics in Legumes . *Plant Genome*. 2013;6(3):1-11. doi:10.3835/plantgenome2013.04.0009
53. Boisson-Dernier A, Chabaud M, Garcia F, Bécard G, Rosenberg C, Barker DG.

- Agrobacterium rhizogenes*-transformed roots of *Medicago truncatula* for the study of nitrogen-fixing and endomycorrhizal symbiotic associations. *Mol Plant-Microbe Interact.* 2001;14(6):695-700. doi:10.1094/MPMI.2001.14.6.695
54. Huang AC, Jiang T, Liu YX, et al. A specialized metabolic network selectively modulates *Arabidopsis* root microbiota. *Science* (80-). 2019;364(6440). doi:10.1126/science.aau6389
 55. Zhong Y, Xun W, Wang X, et al. Root-secreted bitter triterpene modulates the rhizosphere microbiota to improve plant fitness. *Nat Plants.* 2022;8(8):887-896. doi:10.1038/s41477-022-01201-2
 56. Bisseling T, Geurts R. Specificity in legume nodule symbiosis. *Science* (80-). 2020;369(6504):620-621. doi:10.1126/science.abd3857
 57. Poole P, Ramachandran V, Terpolilli J. Rhizobia: From saprophytes to endosymbionts. *Nat Rev Microbiol.* 2018;16(5):291-303. doi:10.1038/nrmicro.2017.171
 58. De Boer W, Folman LB, Summerbell RC, Boddy L. Living in a fungal world: Impact of fungi on soil bacterial niche development. *FEMS Microbiol Rev.* 2005;29(4):795-811. doi:10.1016/j.femsre.2004.11.005
 59. Zhang W, Li XG, Sun K, et al. Mycelial network-mediated rhizobial dispersal enhances legume nodulation. *ISME J.* 2020;14(4):1015-1029. doi:10.1038/s41396-020-0587-5
 60. Chang HX, Noel ZA, Chilvers MI. A β -lactamase gene of *Fusarium oxysporum* alters the rhizosphere microbiota of soybean. *Plant J.* 2021;106(6):1588-1604. doi:10.1111/tpj.15257
 61. Zhang L, Xu M, Liu Y, Zhang F, Hodge A, Feng G. Carbon and phosphorus exchange may enable cooperation between an arbuscular mycorrhizal fungus and a phosphate-solubilizing bacterium. *New Phytol.* 2016;210(3):1022-1032. doi:10.1111/nph.13838
 62. Xie XG, Zhang FM, Yang T, Chen Y, Li XG, Dai CC. Endophytic fungus drives nodulation and N₂ fixation attributable to specific root exudates. *MBio.* 2019;10(4):1-20. doi:10.1128/mBio.00728-19
 63. Wang X, Feng H, Wang Y, et al. Mycorrhizal symbiosis modulates the rhizosphere microbiota to promote rhizobia–legume symbiosis. *Mol Plant.* 2021;14(3):503-516. doi:10.1016/j.molp.2020.12.002
 64. Zhang W, Luo X, Mei YZ, et al. Priming of rhizobial nodulation signaling in the mycosphere accelerates nodulation of legume hosts. *New Phytol.* 2022;235(3):1212-1230. doi:10.1111/nph.18192
 65. Deveau A, Bonito G, Uehling J, et al. Bacterial-fungal interactions: Ecology, mechanisms and challenges. *FEMS Microbiol Rev.* 2018;42(3):335-352. doi:10.1093/femsre/fuy008
 66. Worrich A, Stryhanyuk H, Musat N, et al. Mycelium-mediated transfer of water and nutrients stimulates bacterial activity in dry and oligotrophic environments. *Nat Commun.* 2017;8(June). doi:10.1038/ncomms15472

67. Larimer AL, Bever JD, Clay K. The interactive effects of plant microbial symbionts: A review and meta-analysis. *Symbiosis*. 2010;51(2):139-148. doi:10.1007/s13199-010-0083-1
68. Abd-Alla MH, El-Enany AWE, Nafady NA, Khalaf DM, Morsy FM. Synergistic interaction of *Rhizobium leguminosarum* bv. *viciae* and arbuscular mycorrhizal fungi as a plant growth promoting biofertilizers for faba bean (*Vicia faba* L.) in alkaline soil. *Microbiol Res*. 2014;169(1):49-58. doi:10.1016/j.micres.2013.07.007
69. Dabré ÉE, Hijri M, Favret C. Influence on Soybean Aphid by the Tripartite Interaction between Soybean, a *Rhizobium* Bacterium, and an Arbuscular Mycorrhizal Fungus. *Microorganisms*. 2022;10(6). doi:10.3390/microorganisms10061196
70. Mickelbart M V., Hasegawa PM, Bailey-Serres J. Genetic mechanisms of abiotic stress tolerance that translate to crop yield stability. *Nat Rev Genet*. 2015;16(4):237-251. doi:10.1038/nrg3901
71. Fujita M, Fujita Y, Noutoshi Y, et al. Crosstalk between abiotic and biotic stress responses: a current view from the points of convergence in the stress signaling networks. *Curr Opin Plant Biol*. 2006;9(4):436-442. doi:10.1016/j.pbi.2006.05.014
72. Ahmad P, Abdel Latef AAH, Rasool S, Akram NA, Ashraf M, Gucel S. Role of proteomics in crop stress tolerance. *Front Plant Sci*. 2016;7(September):1-14. doi:10.3389/fpls.2016.01336
73. Rao DE, Chaitanya K V. Photosynthesis and antioxidative defense mechanisms in deciphering drought stress tolerance of crop plants. *Biol Plant*. 2016;60(2):201-218. doi:10.1007/s10535-016-0584-8
74. Glynou K, Ali T, Buch AK, et al. The local environment determines the assembly of root endophytic fungi at a continental scale. *Environ Microbiol*. 2016;18(8):2418-2434. doi:10.1111/1462-2920.13112
75. Pietikäinen J, Pettersson M, Bååth E. Comparison of temperature effects on soil respiration and bacterial and fungal growth rates. *FEMS Microbiol Ecol*. 2005;52(1):49-58. doi:10.1016/j.femsec.2004.10.002
76. Liu A, Wang B, Hamel C. Arbuscular mycorrhiza colonization and development at suboptimal root zone temperature. *Mycorrhiza*. 2004;14(2):93-101. doi:10.1007/s00572-003-0242-9
77. Lv Z, Zhao M, Wang W, et al. Changing Gly311 to an acidic amino acid in the MATE family protein DTX6 enhances Arabidopsis resistance to the dihydropyridine herbicides. *Mol Plant*. 2021;14(12):2115-2125. doi:10.1016/j.molp.2021.09.002
78. Chen J, Su Y, Lin R, et al. Effects of Acute Diquat Poisoning on Liver Mitochondrial Apoptosis and Autophagy in Ducks. *Front Vet Sci*. 2021;8(August):1-10. doi:10.3389/fvets.2021.727766
79. Skiada V. *Colonization of Legumes by an Endophytic Fusarium Solani Strain K. Early-Stage Molecular Signaling and Sub-Cellular Responses*. Vol 224.; 2019.
80. Hoagland DR, Arnon DI. The water-culture method for growing plants without soil.

Circ Calif Agric Exp Stn. 1950;347(2nd edit):32 pp.
<https://www.cabdirect.org/cabdirect/abstract/19500302257>.

81. Kavroulakis N, Doupis G, Papadakis IE, Ehaliotis C, Papadopoulou KK. Tolerance of tomato plants to water stress is improved by the root endophyte *Fusarium solani* FsK. *Rhizosphere*. 2018;6:77-85. doi:10.1016/j.rhisph.2018.04.003
82. Karimi R, Amini H, Ghabooli M. Root endophytic fungus *Piriformospora indica* and zinc attenuate cold stress in grapevine by influencing leaf phytochemicals and minerals content. *Sci Hortic (Amsterdam)*. 2022;293(October 2021):110665. doi:10.1016/j.scienta.2021.110665
83. Gavito ME, Olsson PA, Rouhier H, et al. Temperature constraints on the growth and functioning of root organ cultures with arbuscular mycorrhizal fungi. *New Phytol*. 2005;168(1):179-188. doi:10.1111/j.1469-8137.2005.01481.x
84. Lidoy J, López-García Á, Amate C, et al. Regulation of mycorrhizal colonization under stress in tomato depends on symbiotic efficiency. *Environ Exp Bot*. 2023;215(May). doi:10.1016/j.envexpbot.2023.105479
85. Makarian H, Poozesh V, Asghari HR, Nazari M. Interaction Effects of Arbuscular Mycorrhiza Fungi and Soil Applied Herbicides on Plant Growth. *Commun Soil Sci Plant Anal*. 2016;47(5):619-629. doi:10.1080/00103624.2016.1146744
86. Campestre MP, Castagno LN, Estrella MJ, Ruiz OA. Lotus japonicus plants of the Gifu B-129 ecotype subjected to alkaline stress improve their Fe²⁺ bio-availability through inoculation with *Pantoea eucalypti* M91. *J Plant Physiol*. 2016;192:47-55. doi:10.1016/j.jplph.2016.01.001
87. Shahid M, Khan MS. Glyphosate induced toxicity to chickpea plants and stress alleviation by herbicide tolerant phosphate solubilizing *Burkholderia cepacia* PSBB1 carrying multifarious plant growth promoting activities. *3 Biotech*. 2018;8(2):1-17. doi:10.1007/s13205-018-1145-y
88. Riley R, Chapman V. © 1958 Nature Publishing Group. 1958.
89. Pérez-Fernández M, Alexander V. Enhanced plant performance in *Cicer arietinum* L. Due to the addition of a combination of plant growth-promoting bacteria. *Agric*. 2017;7(5). doi:10.3390/agriculture7050040
90. Chaudhary MF, Abbasi AA. Effect of Pre-emergence Herbicides on Nodulation , Nitrogen Fixation and Morphological Characters in Groundnut (*Arachis hypogaea*). *Pakistan J Biol Sci*. 2000;3:1775-1777.
91. Tétard-Jones C, Edwards R. Potential roles for microbial endophytes in herbicide tolerance in plants. *Pest Manag Sci*. 2016;72(2):203-209. doi:10.1002/ps.4147
92. Kobayashi T, Nozoye T, Nishizawa NK. Iron transport and its regulation in plants. *Free Radic Biol Med*. 2019;133(October 2018):11-20. doi:10.1016/j.freeradbiomed.2018.10.439
93. Vigani G, Murgia I. Iron-Requiring Enzymes in the Spotlight of Oxygen. *Trends Plant Sci*. 2018;23(10):874-882. doi:10.1016/j.tplants.2018.07.005

94. Pii Y, Mimmo T, Tomasi N, Terzano R, Cesco S, Crecchio C. Microbial interactions in the rhizosphere: beneficial influences of plant growth-promoting rhizobacteria on nutrient acquisition process. A review. *Biol Fertil Soils*. 2015;51(4):403-415. doi:10.1007/s00374-015-0996-1
95. Kobayashi T. Understanding the Complexity of Iron Sensing and Signaling Cascades in Plants. *Plant Cell Physiol*. 2019;60(February):1440-1446. doi:10.1093/pcp/pcz038
96. Jeong J, Guerinot M Lou. Homing in on iron homeostasis in plants. *Trends Plant Sci*. 2009;14(5):280-285. doi:10.1016/j.tplants.2009.02.006
97. García MJ, Romera FJ, Lucena C, Alcántara E, Pérez-Vicente R. Ethylene and the regulation of physiological and morphological responses to nutrient deficiencies. *Plant Physiol*. 2015;169(1):51-60. doi:10.1104/pp.15.00708
98. Pierre JL, Fontecave M. Iron and activated oxygen species in biology: The basic chemistry. *BioMetals*. 1999;12(3):195-199. doi:10.1023/A:1009252919854
99. Hou X, Tong H, Selby J, et al. Reactive Species and Antioxidants . Redox Biology Is a Fundamental Theme of Aerobic Life. 2003;133(November):274-286. doi:10.1105/tpc.001388.Nongrasses
100. Brumbarova T, Bauer P. Iron uptake and transport in plants. *Plant Membr Vacuolar Transp*. 2008;109(10):149-172. doi:10.1079/9781845934026.0149
101. Zhang X, Zhang D, Sun W, Wang T. The adaptive mechanism of plants to iron deficiency via iron uptake, transport, and homeostasis. *Int J Mol Sci*. 2019;20(10). doi:10.3390/ijms20102424
102. Grass G, Wong MD, Rosen BP, Smith RL, Rensing C. Zupt is a Zn(II) uptake system in Escherichia coli. *J Bacteriol*. 2002;184(3):864-866. doi:10.1128/JB.184.3.864-866.2002
103. Séguéla M, Briat JF, Vert G, Curie C. Cytokinins negatively regulate the root iron uptake machinery in Arabidopsis through a growth-dependent pathway. *Plant J*. 2008;55(2):289-300. doi:10.1111/j.1365-313X.2008.03502.x
104. Lucena C, Porras R, García MJ, et al. Ethylene and Phloem Signals Are Involved in the Regulation of Responses to Fe and P Deficiencies in Roots of Strategy I Plants. *Front Plant Sci*. 2019;10(October):1-14. doi:10.3389/fpls.2019.01237
105. Li L, Cheng X, Ling HQ. Isolation and characterization of Fe(III)-chelate reductase gene LeFRO1 in tomato. *Plant Mol Biol*. 2004;54(1):125-136. doi:10.1023/B:PLAN.0000028774.82782.16
106. Waters BM, Blevins DG, Eide DJ. Characterization of FRO1, a pea ferric-chelate reductase involved in root iron acquisition. *Plant Physiol*. 2002;129(1):85-94. doi:10.1104/pp.010829
107. Bereczky Z, Wang HY, Schubert V, Ganai M, Bauer P. Differential Regulation of nramp and irt Metal Transporter Genes in Wild Type and Iron Uptake Mutants of Tomato. *J Biol Chem*. 2003;278(27):24697-24704. doi:10.1074/jbc.M301365200
108. Li R, Cai F, Pang G, Shen Q, Li R, Chen W. Solubilisation of Phosphate and

- Micronutrients by *Trichoderma harzianum* and Its Relationship with the Promotion of Tomato Plant Growth. 2015:1-16. doi:10.5061/dryad.p460c
109. Zhang H, Sun Y, Xie X, Kim MS, Dowd SE, Paré PW. A soil bacterium regulates plant acquisition of iron via deficiency-inducible mechanisms. *Plant J.* 2009;58(4):568-577. doi:10.1111/j.1365-313X.2009.03803.x
 110. Jin CW, Ye YQ, Zheng SJ. An underground tale: Contribution of microbial activity to plant iron. *Ann Bot.* 2014;113(1):7-18. doi:10.1093/aob/mct249
 111. Mimmo T, Del Buono D, Terzano R, et al. Rhizospheric organic compounds in the soil-microorganism-plant system: Their role in iron availability. *Eur J Soil Sci.* 2014;65(5):629-642. doi:10.1111/ejss.12158
 112. Pieterse CMJ, Zamioudis C, Berendsen RL, Weller DM, Van Wees SCM, Bakker PAHM. Induced systemic resistance by beneficial microbes. *Annu Rev Phytopathol.* 2014;52:347-375. doi:10.1146/annurev-phyto-082712-102340
 113. Verbon EH, Trapet PL, Kruijs S, Temple-Boyer-Dury C, Rouwenhorst TG, Pieterse CMJ. Rhizobacteria-mediated activation of the iron deficiency response in Arabidopsis roots: Impact on iron status and signaling. *Front Plant Sci.* 2019;10(July):1-12. doi:10.3389/fpls.2019.00909
 114. Zamioudis C, Korteland J, Van Pelt JA, et al. Rhizobacterial volatiles and photosynthesis-related signals coordinate MYB72 expression in Arabidopsis roots during onset of induced systemic resistance and iron-deficiency responses. *Plant J.* 2015;84(2):309-322. doi:10.1111/tpj.12995
 115. Yuan Y, Wu H, Wang N, et al. FIT interacts with AtbHLH38 and AtbHLH39 in regulating iron uptake gene expression for iron homeostasis in Arabidopsis. *Cell Res.* 2008;18(3):385-397. doi:10.1038/cr.2008.26
 116. Bournier M, Tissot N, Mari S, et al. Arabidopsis ferritin 1 (AtFer1) gene regulation by the phosphate starvation response 1 (AtPHR1) transcription factor reveals a direct molecular link between iron and phosphate homeostasis. *J Biol Chem.* 2013;288(31):22670-22680. doi:10.1074/jbc.M113.482281
 117. Rogers EE, Guerinot M-L. FRD3, a member of the multidrug and toxin efflux family, controls iron deficiency responses in Arabidopsis. *Plant Cell.* 2002;14(8):1787-1799. doi:10.1105/tpc.001495
 118. Carbonnel S, Das D, Varshney K, Kolodziej MC, Villaécija-Aguilar JA, Gutjahr C. The karrikin signaling regulator SMAX1 controls *Lotus japonicus* root and root hair development by suppressing ethylene biosynthesis. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 2020;117(35):21757-21765. doi:10.1073/pnas.2006111117
 119. Dundar F. Differential Gene Expression Analysis (DGE). *Appl Bioinforma Core.* 2020:1-13.
 120. Love MI, Huber W, Anders S. Moderated estimation of fold change and dispersion for RNA-seq data with DESeq2. *Genome Biol.* 2014;15(12):1-21. doi:10.1186/s13059-014-0550-8

121. Huerta-Cepas J, Szklarczyk D, Heller D, et al. EggNOG 5.0: A hierarchical, functionally and phylogenetically annotated orthology resource based on 5090 organisms and 2502 viruses. *Nucleic Acids Res.* 2019;47(D1):D309-D314. doi:10.1093/nar/gky1085
122. Rey P, Taupin-Broggini M, Couturier J, Vignols F, Rouhier N. Is there a role for glutaredoxins and BOLAs in the perception of the cellular iron status in plants? *Front Plant Sci.* 2019;10(June):1-10. doi:10.3389/fpls.2019.00712
123. Vigani G, Bohic S, Faoro F, Vekemans B, Vincze L, Terzano R. Cellular fractionation and nanoscopic X-ray fluorescence imaging analyses reveal changes of zinc distribution in leaf cells of iron-deficient plants. *Front Plant Sci.* 2018;9(August):1-11. doi:10.3389/fpls.2018.01112
124. Durrett TP, Gassmann W, Rogers EE. The FRD3-mediated efflux of citrate into the root vasculature is necessary for efficient iron translocation. *Plant Physiol.* 2007;144(1):197-205. doi:10.1104/pp.107.097162
125. Lucena C, Romera FJ, García MJ, Alcántara E, Pérez-Vicente R. Ethylene participates in the regulation of Fe deficiency responses in strategy I plants and in rice. *Front Plant Sci.* 2015;6(NOVEMBER):1-16. doi:10.3389/fpls.2015.01056
126. Philpott CC. Iron uptake in fungi: A system for every source. *Biochim Biophys Acta - Mol Cell Res.* 2006;1763(7):636-645. doi:10.1016/j.bbamcr.2006.05.008
127. Babuin MF, Campestre MP, Rocco R, et al. Response to long-term NaHCO₃-derived alkalinity in model *Lotus japonicus* ecotypes Gifu B-129 and Miyakojima MG-20: Transcriptomic profiling and physiological characterization. *PLoS One.* 2014;9(5). doi:10.1371/journal.pone.0097106
128. Bajaj R, Huang Y, Gebrechistos S, et al. Transcriptional responses of soybean roots to colonization with the root endophytic fungus *Piriformospora indica* reveals altered phenylpropanoid and secondary metabolism. *Sci Rep.* 2018;8(1):1-18. doi:10.1038/s41598-018-26809-3
129. Yakti W, Kovács GM, Vági P, Franken P. Impact of dark septate endophytes on tomato growth and nutrient uptake. *Plant Ecol Divers.* 2018;11(5-6):637-648. doi:10.1080/17550874.2019.1610912
130. Saddique MAB, Ali Z, Khan AS, Rana IA, Shamsi IH. Inoculation with the endophyte *Piriformospora indica* significantly affects mechanisms involved in osmotic stress in rice. *Rice.* 2018;11(1):1-12. doi:10.1186/s12284-018-0226-1
131. Chen Z, Jin Y, Yao X, et al. Fungal Endophyte Improves Survival of *Lolium perenne* in Low Fertility Soils by Increasing Root Growth, Metabolic Activity and Absorption of Nutrients. *Plant Soil.* 2020;452(1-2):185-206. doi:10.1007/s11104-020-04556-7
132. Kim SA, LaCroix IS, Gerber SA, Guerinot M Lou. The iron deficiency response in *Arabidopsis thaliana* requires the phosphorylated transcription factor URI. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 2019;116(50):24933-24942. doi:10.1073/pnas.1916892116
133. Li W, Lan P. The understanding of the plant iron deficiency responses in strategy I plants and the role of ethylene in this process by omic approaches. *Front Plant Sci.* 2017;8(January):1-15. doi:10.3389/fpls.2017.00040

134. Kieu NP, Aznar A, Segond D, et al. Iron deficiency affects plant defence responses and confers resistance to *dickeya dadantii* and *botrytis cinerea*. *Mol Plant Pathol*. 2012;13(8):816-827. doi:10.1111/j.1364-3703.2012.00790.x
135. Chen W, Zhao L, Liu L, et al. Iron deficiency-induced transcription factors bHLH38/100/101 negatively modulate flowering time in *Arabidopsis thaliana*. *Plant Sci*. 2021;308(April):110929. doi:10.1016/j.plantsci.2021.110929
136. Conte SS, Walker EL. Transporters contributing to iron trafficking in plants. *Mol Plant*. 2011;4(3):464-476. doi:10.1093/mp/ssr015
137. Lemanceau P, Expert D, Gaymard F, Bakker PAHM, Briat JF. *Chapter 12 Role of Iron in Plant-Microbe Interactions*. Vol 51. 1st ed. Elsevier Ltd; 2009. doi:10.1016/S0065-2296(09)51012-9
138. Attarian R, Hu G, Sánchez-León E, et al. The monothiol glutaredoxin Grx4 regulates iron homeostasis and virulence in *cryptococcus neoformans*. *MBio*. 2018;9(6):1-23. doi:10.1128/mBio.02377-18
139. Young ND, Mudge J, Ellis THN. Legume genomes: More than peas in a pod. *Curr Opin Plant Biol*. 2003;6(2):199-204. doi:10.1016/S1369-5266(03)00006-2

Μέρος Β. Επίδραση του αποικισμού του *Fs-K* στο ψυχανθές φυτό *Lotus japonicus* κάτω από συνθήκες αβιοτικού στρες.

1. Εισαγωγή

1.1. Μηχανισμοί-στρατηγικές αντιμετώπισης αβιοτικών καταπονήσεων στα φυτά

Τα φυτά, σε αντίθεση με τους ζωικούς οργανισμούς, διαθέτουν ως μοναδική επιλογή την αντιμετώπιση των παραγόντων καταπόνησης που επικρατούν στον περιβάλλον ανάπτυξής τους. Ως καταπόνηση ορίζουμε την επίδραση δυσμενών παραγόντων (βιοτικών και αβιοτικών) του περιβάλλοντος οι οποίοι τείνουν να παρεμποδίσουν την κανονική λειτουργία των φυσιολογικών μηχανισμών των φυτών. Οι παράγοντες καταπόνησης ταξινομούνται σε αβιοτικούς και βιοτικούς. Βιοτικοί είναι όλοι οι ζωντανοί οργανισμοί ενός οικοσυστήματος όπως ζώα και μικροοργανισμοί (μύκητες, βακτήρια) ενώ οι αβιοτικοί παράγοντες είναι όλοι οι μη ζωντανοί οργανισμοί ενός οικοσυστήματος (φως, κλίμα, νερό, έδαφος)⁷⁰.

Οι αβιοτικοί παράγοντες καθορίζονται από μεγάλη παραλλακτικότητα σε ότι αφορά την ένταση και τη διάρκεια δράσης τους στα φυτά. Τα φυτά, μέσω της εξελικτικής διαδικασίας, έχουν προσαρμοστεί να επιβιώνουν και να εκτελούν τις βιολογικές και φυσιολογικές τους λειτουργίες μέσα σε καθορισμένα όρια ή τιμές των αβιοτικών παραγόντων (εύρος ανοχής ή όρια βιολογικής δραστηριότητας). Μέσα στα όρια αυτά υπάρχει μια περιοχή άριστης (optimum) λειτουργίας, όπου τα φυτά αναπτύσσονται χωρίς προβλήματα (βέλτιστα όρια ανάπτυξης). Όμως όταν τα επίπεδα ενός αβιοτικού παράγοντα βρεθούν εκτός των βέλτιστων ορίων ανάπτυξης προκαλείται στα φυτά απορρύθμιση της ομοιόστασης τους και εμφανίζονται τα πρώτα συμπτώματα καταπόνησης⁷¹.

Στα φυτά διακρίνονται τρεις κύριες στρατηγικές αντιμετώπισης των καταπονήσεων: α) η στρατηγική της διαφυγής, β) η στρατηγική της αποφυγής και γ) η στρατηγική της ανθεκτικότητας. Η στρατηγική της διαφυγής αναφέρεται στην ολοκλήρωση του κύκλου ζωής των φυτών κατά τη διάρκεια της ευνοϊκής περιόδου ενώ της αποφυγής στην παρουσία κάποιων μηχανισμών που αμβλύνουν τις επιπτώσεις της καταπόνησης. Η στρατηγική της ανθεκτικότητας αναφέρεται στην περίπτωση των φυτών, που παρουσία των παραγόντων καταπόνησης, δημιουργείται μια νέα κατάσταση ομοιόστασης η οποία χαρακτηρίζεται από υψηλή μεταβολική δραστηριότητα ανάλογη με εκείνη που παρατηρείται στις βέλτιστες συνθήκες⁷².

Παρακάτω παρουσιάζονται σε δύο κεφάλαια, ο πειραματικός σχεδιασμός και τα αποτελέσματα της διερεύνησης της επίδρασης της παρουσίας του ενδοφυτικού μύκητα στην απόκριση του φυτού *Lotus japonicus* σε αβιοτικές καταπονήσεις θερμοκρασίας και

οξειδωτικής καταπόνησης και η απόκριση σε έλλειψη επαρκούς λίπανσης και διαθεσιμότητας σιδήρου.

ΚΕΦΑΛΑΙΟ 3

ΕΠΙΔΡΑΣΗ ΑΒΙΟΤΙΚΩΝ ΚΑΤΑΠΟΝΗΣΕΩΝ (ΘΕΡΜΙΚΗ ΚΑΙ ΟΞΕΙΔΩΤΙΚΗ ΚΑΤΑΠΟΝΗΣΗ) ΣΤΗΝ ΑΛΛΗΛΕΠΙΔΡΑΣΗ ΤΟΥ ΕΝΔΟΦΥΤΙΚΟΥ ΜΥΚΗΤΑ *FSK* ΜΕ ΤΟ *LOTUS JAPONICUS*.

Εισαγωγή

Υπό φυσιολογικές συνθήκες τα φυτά εκτίθενται σε ποικίλες περιβαλλοντικές αβιοτικές καταπονήσεις. Οι αβιοτικές καταπονήσεις αποτελούν τους κύριους περιοριστικούς παράγοντες, οι οποίοι επηρεάζουν αρνητικά την ανάπτυξη και την παραγωγικότητα των φυτών. Οι πιο κοινοί αβιοτικές παράγοντες είναι η αλατότητα του εδάφους, η αυξημένη θερμοκρασία, το ψύχος, ο παγετός και η καταπόνηση νερού (ξηρασία ή πλημμύρες), τα οποία μπορούν να προκαλέσουν αλλαγές σε μια σειρά από φυσιολογικές και μεταβολικές διεργασίες του φυτού ⁷³.

Κάθε φυτικός οργανισμός αυξάνεται και αναπτύσσεται ικανοποιητικά σε ένα εύρος θερμοκρασιών το οποίο χαρακτηρίζεται ως βέλτιστο και διαθέτει κατώτερο και ανώτερο όριο. Όταν η θερμοκρασία προσεγγίζει τα όρια αυτά παρατηρείται μια αναστρέψιμη παρεμπόδιση της ανάπτυξης, ενώ εάν τα υπερβεί προκαλούνται μόνιμες φυσιολογικές βλάβες με συνέπεια ο φυτικός οργανισμός να αδυνατεί να ολοκληρώσει τον βιολογικό του κύκλο.

Λαμβάνοντας υπόψη τα όρια θερμοκρασίας εντός των οποίων αναπτύσσονται οι φυτικοί οργανισμοί μπορούμε να τους διακρίνουμε σε τρεις κατηγορίες: Ψυχρόφιλοι, των οποίων η βέλτιστη ανάπτυξη παρατηρείται σε σχετικά χαμηλές θερμοκρασίες (0-20°C), μεσόφιλοι (10-30°C) και θερμόφιλοι (30-65°C). Οι ακραίες θερμοκρασίες επιφέρουν δραματικές αλλαγές στην κινητική ενέργεια των μορίων. Οι χαμηλές θερμοκρασίες προκαλούν ακαμψία των μεμβρανών και αύξηση της απαιτούμενης ενέργειας ενεργοποίησης των βιοχημικών αντιδράσεων. Επίσης η μετάβαση του νερού από την υγρή στη στερεή κατάσταση σε συνθήκες παγετού, αποτελεί ένα κρίσιμο συμβάν για τη διατήρηση των ζωτικών λειτουργιών των κυττάρων. Από την άλλη πλευρά οι υψηλές θερμοκρασίες επιταχύνουν τις κινήσεις των μορίων, με συνέπεια να χαλαρώνουν οι δεσμοί των μεγαλομορίων και να αυξάνεται η ρευστότητα των μεμβρανών (Vieille, Burdette, & Zeikus, 1996; Walker & White, 2005).

Το οξειδωτικό στρες είναι μία διαταραχή της ισορροπίας μεταξύ της παραγωγής των δραστικών μορφών οξυγόνου και της ικανότητας ενός κυττάρου ή οργανισμού να αδρανοποιεί τα τοξικά αυτά μόρια και να επισκευάζει τις βλάβες που προκαλούνται από αυτά. Οι δραστικές μορφές οξυγόνου βλάπτουν όλα τα συστατικά του κυττάρου συμπεριλαμβανομένων των πρωτεϊνών, των λιπιδίων και του DNA. Υπό φυσιολογικές συνθήκες, το αμυντικό σύστημα του κυττάρου παρέχει επαρκή προστασία έναντι στο δραστικό οξυγόνο και τις ελεύθερες ρίζες. Όμως, τόσο φυσικές όσο και ανθρωπογενούς προέλευσης καταστάσεις καταπόνησης προκαλούν την αυξανόμενη

παραγωγή των τοξικών παραγώγων οξυγόνου. Ως αντίδραση, η ικανότητα του αντιοξειδωτικού αμυντικού συστήματος αυξάνεται. Όμως, σε άλλες περιπτώσεις η αντίδραση μπορεί να μην είναι ιδιαίτερα ισχυρή. Μελέτες έχουν δείξει ότι ο εμβολιασμός φυτών με ενδοφυτικούς μικροοργανισμούς αυξάνει την παραγωγή αντιοξειδωτικών από το φυτό σε καταστάσεις στρες. Συγκεκριμένα, εμβολιασμός των ριζών του κριθαριού και του ριζιού με τον ενδοφυτικό μύκητα *Piriformospora indica* προκάλεσε ισχυρή αύξηση της δραστηριότητας των αντιοξειδωτικών ενζύμων υπό συνθήκες αλατότητας (Bagheri, Saadatmand, Niknam, Nejadsatari, & Babaeizad, 2013; Baltruschat et al., 2008).

Παρομοίως, και η φυσιολογία, η ανάπτυξη και η αναπαραγωγή των μυκήτων επηρεάζεται από πλήθος περιβαλλοντικών παραγόντων μεταξύ των οποίων είναι το pH, το οξυγόνο, το φως, η θερμοκρασία κ.λ.π.^{74,75}. Η θερμοκρασία είναι ένας σημαντικός αβιοτικός παράγοντας που καθορίζει την ανάπτυξη και τον τρόπο ζωής των νηματωδών μυκήτων. Η θερμοκρασία θέτει όρια στην ανάπτυξη των μυκήτων. Σε χαμηλές θερμοκρασίες οι χημικές αντιδράσεις επιβραδύνονται, το κυτταρικό νερό παρουσιάζει αυξημένο ιξώδες, τα κυτταρικά ιόντα συγκεντρώνονται και οδηγούν σε απενεργοποίηση πρωτεΐνης. Σε αυξημένες θερμοκρασίες (45-55 °C), οι μύκητες συνθέτουν πρωτεΐνες θερμικού σοκ σε υψηλά επίπεδα, πρωτεΐνες στρες που λειτουργούν σαν συνοδούς, διασφαλίζοντας ότι οι πρωτεΐνες των κυττάρων διπλώνονται σωστά και ότι οι κατεστραμμένες πρωτεΐνες καταστρέφονται⁷⁶.

Το οξειδωτικό στρες είναι μία διαταραχή της ισορροπίας μεταξύ της παραγωγής των δραστικών μορφών οξυγόνου και της ικανότητας ενός κυττάρου ή οργανισμού να αδρανοποιεί τα τοξικά αυτά μόρια και να επισκευάζει τις βλάβες που προκαλούνται από αυτά. Οι δραστικές μορφές οξυγόνου βλάπτουν όλα τα συστατικά του κυττάρου συμπεριλαμβανομένων των πρωτεϊνών, των λιπιδίων και του DNA. Υπό φυσιολογικές συνθήκες, το αμυντικό σύστημα του κυττάρου παρέχει επαρκή προστασία έναντι στο δραστικό οξυγόνο και τις ελεύθερες ρίζες. Όμως, τόσο φυσικές όσο και ανθρωπογενούς προέλευσης καταστάσεις καταπόνησης προκαλούν την αυξανόμενη παραγωγή των τοξικών παραγώγων οξυγόνου. Ως αντίδραση, η ικανότητα του αντιοξειδωτικού αμυντικού συστήματος αυξάνεται. Όμως, σε άλλες περιπτώσεις η αντίδραση μπορεί να μην είναι ιδιαίτερα ισχυρή. Μελέτες έχουν δείξει ότι ο εμβολιασμός φυτών με ενδοφυτικούς μικροοργανισμούς αυξάνει την παραγωγή αντιοξειδωτικών από το φυτό σε καταστάσεις στρες. Συγκεκριμένα, εμβολιασμός των ριζών του κριθαριού και του ριζιού με τον ενδοφυτικό μύκητα *Piriformospora indica* προκάλεσε ισχυρή αύξηση της δραστηριότητας των αντιοξειδωτικών ενζύμων υπό συνθήκες αλατότητας (Bagheri, Saadatmand, Niknam, Nejadsatari, & Babaeizad, 2013; Baltruschat et al., 2008).

Στην συγκεκριμένη εργασία χρησιμοποιήσαμε ως μέσο πρόκλησης οξειδωτικού στρες το ζιζανιοκτόνο Diquat (DQ). Το DQ είναι ένα ζιζανιοκτόνο διυδροπυριδίνης που προκαλεί ισχυρό οξειδωτικό στρες σε φυτά συμπεριλαμβανομένου του *Arabidopsis*⁷⁷. Η τοξικότητα του DQ προκαλεί τη μεταφορά ηλεκτρονίων από το φωτοσύστημα I (PSI) στο O₂, δημιουργώντας έτσι ROS. Αν και για τον παραπάνω λόγο προσβάλλει κυρίως φωτοσυνθετικά όργανα, είναι επίσης ικανό να αλλάξει την κανονική ανάπτυξη των ριζών. Το υπόβαθρο αυτού του φαινομένου είναι ότι το DQ επηρεάζει τη μιτοχονδριακή αλυσίδα μεταφοράς ηλεκτρονίων όχι μόνο σε ζώα, αλλά και σε μη φωτοσυνθετικά φυτικά κύτταρα⁷⁸.

Τα ενδόφυτα που αποικίζουν τις ρίζες των φυτών, επιφέρουν μεγάλες δυνατότητες της την προώθησης της ανάπτυξης των φυτών, της ικανότητάς τους να πτησουν την της ή στις αβιοτικές καταπονήσεις. Αυτός είναι ένας ενδιαφέρων και ταχέως αναπτυσσόμενος τομέας έρευνας για την πιθανή εφαρμογή των ενδόφυτων στη γεωργία (Munns & Tester, 2008). Αρκετές πρόσφατες μελέτες δείχνουν ότι οι μύκητες ενισχύουν την ανοχή σε αβιοτικές καταπονήσεις των φυτών, καθώς βοηθούν στη βελτιωμένη ανάπτυξη των ριζών, στη βελτίωσής της ικανότητας συγκράτησης νερού των φυτών ή της ενίσχυσης πρόσληψης θρεπτικών συστατικών.

Η μελέτη των φυτικών καταπονήσεων σπάνια λαμβάνει υπόψη την αλληλεπίδραση μεταξύ της φυσιολογίας των φυτών και την συμβίωση των μυκήτων μυκήτων και τελικά πώς οι περιβαλλοντικές συνθήκες μπορούν να επηρεάσουν την εγκαθίδρυση συμβιωτικών σχέσεων τους. Στη συγκεκριμένη μελέτη του συστήματος ενδοφυτικού μύκητα *FsK* και *Lotus japonicus*, η βέλτιστη θερμοκρασία ανάπτυξης του ενδοφυτικού μύκητα *FsK* είναι 26oC (Skiada, 2019) και κατατάσσεται στους μεσόφιλους. Επίσης η βέλτιστη θερμοκρασία ανάπτυξης του φυτού είναι 22oC. Επομένως επιλέξαμε για τις συνθήκες αβιοτικού στρες τις ακραίες θερμοκρασίες 4oC και 37oC (Krokida et al., 2013). Παρομοίως, για την πρόκληση οξειδωτικής καταπόνησης επιλέξαμε το ζιζανιοκτόνο Diquat, στηριζόμενοι σε δεδομένα από προηγούμενες μελέτες στο εργαστήριο (Krokida et al., 2013).

Υλικά και Μέθοδοι

Επίδραση του θρεπτικού μέσου και της θερμοκρασίας στην ανάπτυξη του μυκηλίου του *FsK*

Για να διερευνήσουμε την επίδραση του μέσου ανάπτυξης στην ανάπτυξη του μυκηλίου *FsK*, παρασκευάσαμε 3 διαφορετικά μέσα ανάπτυξης, κατάλληλα για ανάπτυξη νηματοειδών μυκήτων: ένα θρεπτικό με μόνη προσθήκη παράγοντα πήξης άγαρ (water agar), ένα πλούσιο συνθετικό θρεπτικό (δεξτρόζης πατάτας, Potato Dextrose Agar) και ένα ελάχιστο θρεπτικό που περιέχει τα ελάχιστα θρεπτικά συστατικά για την ανάπτυξη (Minimal-medium, M-medium)⁵³. Η θερμοκρασία

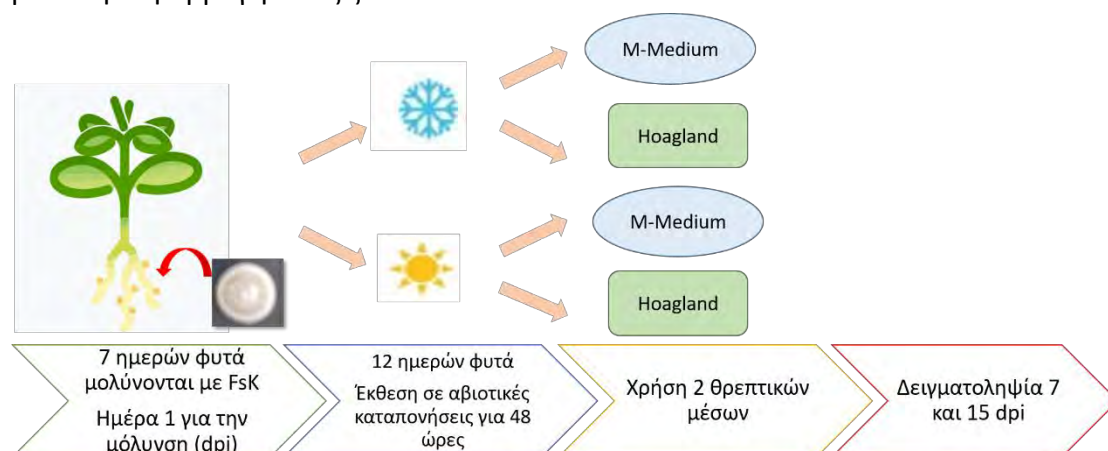
επώασης επιλέχθηκε με βάση στη βέλτιστη θερμοκρασία ανάπτυξης (25°C), την προτεινόμενη θερμοκρασία για πρόκληση θερμικού στρες (37°C) και την θερμοκρασία για πρόκληση στρες σε ψύχος (4°C) ⁷⁹. Ως εμβόλιο χρησιμοποιήθηκε ένα τμήμα του μύκητα 5 mm, το οποίο αφαιρέθηκε με φελλοτρυπητήρα από ήδη αναπτυγμένη καλλιέργεια FsK σε PDA και το οποίο τοποθετήθηκε στο κέντρο του τρυβλίου Petri διαμέτρου 90mm. Οι καλλιέργειες επώαστηκαν σε θάλαμο ανάπτυξης που ρυθμίστηκε στη βέλτιστη θερμοκρασία ανάπτυξης για 5 ημέρες και στη συνέχεια οι καλλιέργειες επώαστηκαν σε θερμοκρασίες καταπόνησης. Η ακτίνα της μυκητιακής αποικίας καθώς και το βάρος του μυκηλίου καταγράφηκαν 48 ώρες μετά την κατάσταση αβιοτικού στρες.

Συνθήκες ανάπτυξης των φυτών και καταστάσεις καταπονήσεων

Φυτά άγριου τύπου *Lotus japonicus* (WT) (οικότυπος 'Gifu') χρησιμοποιήθηκαν σε όλα τα πειράματα αβιοτικών καταπονήσεων. Σπόροι μεταφέρθηκαν σε σωληνάρια των 1,5ml. Έπειτα, καλύφθηκαν με θειικό οξύ (H₂SO₄) για 10 λεπτά επί συνεχή ήπια ανάδευση με σκοπό τη διάσπαση του εξωτερικού σκληρού περιβλήματος. Πραγματοποιήθηκαν 6 πλύσεις με κρύο δις απεσταγμένο νερό (ddH₂O). Στη συνέχεια, οι σπόροι τοποθετήθηκαν εκ νέου σε διάλυμα BUF 1 που περιείχε 20% χλωρίνη και 0,1% Tween20 για 20 λεπτά επί συνεχή ανάδευση. Μετά, πραγματοποιήθηκαν 5-7 πλύσεις με αποστειρωμένο ddH₂O και στο τέλος, αφού προστέθηκε αρκετό ddH₂O ώστε να καλυφθεί η επιφάνεια όλων των σπόρων, τα πλαστικά φιαλίδια (tubes) καλύφθηκαν με αλουμινόχαρτο, προκειμένου να δημιουργηθούν συνθήκες σκότους, και τοποθετήθηκαν στους 4°C για ολονύχτια επώαση για να προωθηθεί η βλάστηση των σπόρων. Τοποθετήθηκαν στη συνέχεια σε τρυβλία ελάχιστου-θρεπτικού άγαρ (νερό και άγαρ 0,8%) και αναπτύχθηκαν σε θάλαμο ανάπτυξης με φωτοπερίοδο 16 ωρών φωτός/8 ωρών σκότους με θερμοκρασία στους 22°C για 7 ημέρες.

Φυτά 7 ημέρων μεταφέρθηκαν σε φυτοδοχεία (διαστάσεις: ύψος 6cm, πλάτος 7cm, μήκος 7cm) με αποστειρωμένη άμμο 3:1 άμμο:βερμικουλίτη. Τοποθετήθηκαν 3 φυτά ανά γλάστρα αφού προηγουμένως το υπόστρωμα είχε ποτιστεί με 25% από το θρεπτικό που θα χρησιμοποιήσουμε για την κάθε μεταχείριση. Πραγματοποιήθηκαν διαφορετικές συνθήκες ανάπτυξης μετά από 5 ημέρες από τον εμβολιασμό (dpi) με κονίδια του μύκητα (όπως περιγράφεται παρακάτω). Στα πειράματα καταπόνησης χαμηλής θερμοκρασίας, τα φυτά μεταφέρθηκαν σε θάλαμο καλλιέργειας στους 4°C για 48 ώρες. Στα πειράματα καταπόνησης υψηλής θερμοκρασίας, τα φυτά μεταφέρθηκαν σε άλλο θάλαμο καλλιέργειας στους 37°C για 48 ώρες. Και στις δύο μεταχειρίσεις θερμικής καταπόνησης έγιναν δυο σειρές πειραμάτων όσον αφορά το θρεπτικό ποτίσματος. Τα φυτά ποτίστηκαν στο ένα πείραμα με πλήρες θρεπτικό μέσο, κατάλληλο για την ανάπτυξη φυτών (Hoagland Medium -Hoagland & Arnon, 1950) και στο άλλο με M-medium ⁵³. Η δειγματοληψία πραγματοποιήθηκε στις 7dpi και 15dpi και για τα δύο πειράματα αβιοτικού στρες (Εικ 1). Στις συνθήκες

οξειδωτικού στρες, το Diquat, ένα μη εκλεκτικό ζιζανιοκτόνο επαφής, εφαρμόστηκε στη ρίζα υπό διαφορετικές συγκεντρώσεις (50, 100, 150 nM) ως 1 ml. Αυτά τα φυτά ποτίστηκαν με πλήρες θρεπτικό Hoagland Medium. Το πείραμα διήρκεσε 7 ημέρες μετά την εφαρμογή του ζιζανιοκτόνου.



Εικόνα 1: Σχηματική αναπαράσταση του πειράματος θερμικής καταπόνησης

Συνθήκες ανάπτυξης του μύκητα FSK και ο εμβολιασμός των φυτών

Οι διαδικασίες που ακολουθήθηκαν για την ανάπτυξη και την δημιουργία του τελικού εμβολίου περιγράφονται στο κεφάλαιο 1 στην ενότητα υλικά και μέθοδοι.

Στην συνέχεια σε φυτά 15 ημερών πραγματοποιήθηκε εμβολιασμός με 100 κονίδια ανά ρίζα. Τα κοντρόλ φυτά δέχθηκαν ίδια ποσότητα 0,85% NaCl χωρίς την παρουσία κονιδίων.

Δειγματοληψία και Απομόνωση γονιδιωματικού DNA

Κατά τη διάρκεια της δειγματοληψίας τα φυτά μεταχειρίστηκαν όπως περιγράφεται με λεπτομέρεια η διαδικασία στο κεφάλαιο 1 της διατριβής. Τα δείγματα τοποθετήθηκαν σε πλαστικά φιαλίδια και μετρήθηκε το βάρος της ρίζας και των φύλλων. Μεταφέρθηκαν άμεσα σε υγρό άζωτο προκειμένου να διασφαλιστεί η μακροπρόθεσμη συντήρηση της ποιότητας του ιστού για περαιτέρω ανάλυση.

Με σκοπό την απομόνωση του γονιδιωματικού DNA οι ρίζες των φυτών που είχαν αποθηκευτεί στους -80oC μεταφέρθηκαν σε υγρό άζωτο και στην συνέχεια λειοτριβήθηκαν. Η απομόνωση του γονιδιωματικού DNA πραγματοποιήθηκε με τη χρήση της μεθόδου CTAB και ακολούθησε ποσοτικοποίηση του όπως περιγράφεται στο κεφάλαιο 1 στην αντίστοιχη παράγραφο των υλικών μεθόδων.

Ανίχνευση αποικισμού από τον μύκητα *F. solani* στις ρίζες του φυτού *Lotus japonicus*

Η ανίχνευση του πραγματοποιήθηκε μέσω της μεθόδου αλυσιδωτής αντίδρασης πολυμεράσης πραγματικού χρόνου (Real Time PCR). Σε αυτό το πείραμα χρησιμοποιήθηκαν εκκινητές που στόχευαν το γονίδιο ITS του μύκητα, οι αλληλουχίες των οποίων αναγράφονται στο κεφάλαιο 1 ⁴³.

Προσδιορισμός των μορφολογικών χαρακτηριστικών των φυτών

Οι παράμετροι ανάπτυξης των φυτών *L. jaronicus* μετρήθηκαν μετά από 48 ώρες θερμικής ή ψυχρής καταπόνησης και 7 ημέρες μετά την εφαρμογή του μυκητοκτόνου. Η απόδοση ανάπτυξης αξιολογήθηκε ως προς το μήκος ρίζας (RL) και το φρέσκο βάρος (FW) της ρίζας και του βλαστού.

Στατιστική ανάλυση

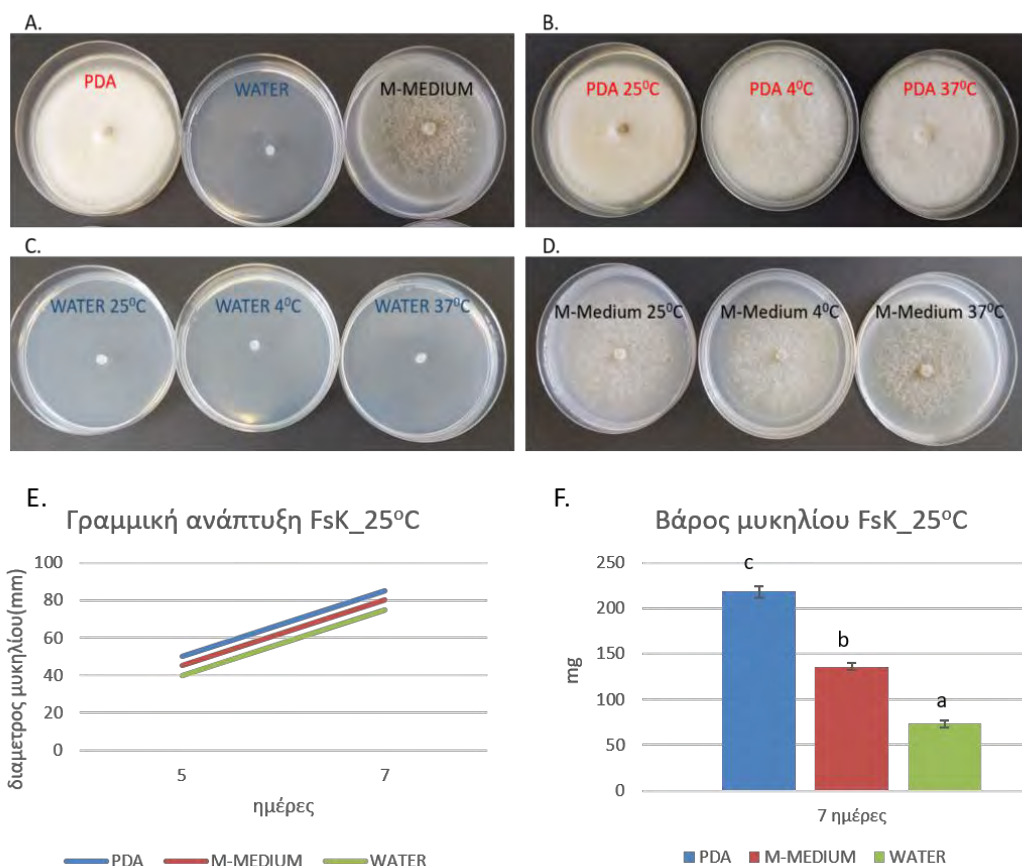
Για όλες τις στατιστικές αναλύσεις πραγματοποιήθηκε ανάλυση διακύμανσης δύο παραγόντων (Two-way ANOVA). Όπου ήταν απαραίτητο ακολούθησε ανάλυση κατά Tukey post-hoc. Το επίπεδο σημαντικότητας ορίστηκε στο $p < 0.05$. Για την ανάλυση δυο ανεξάρτητων δειγμάτων πραγματοποιήθηκε ανάλυση Student t-test.

Αποτελέσματα

Επίδραση της θερμοκρασίας και διαφορετικών θρεπτικών μέσων στην ανάπτυξη και αύξηση του μυκηλίου του FSK

Για την εκτίμηση της επίδρασης της θερμοκρασίας και των διαφορετικών μέσων στην ανάπτυξη και αύξηση του μύκητα σε *in vitro* συνθήκες δοκιμάστηκαν τρία συνήθη θρεπτικά μέσα. Συγκεκριμένα χρησιμοποιήθηκαν: ένα θρεπτικό με μόνη προσθήκη παράγοντα πήξης άγαρ (water agar), ένα πλούσιο συνθετικό θρεπτικό (δεξτρόζης πατάτας, Potato Dextrose Agar) και ένα ελάχιστο θρεπτικό που περιέχει τα ελάχιστα θρεπτικά συστατικά για την ανάπτυξη (Minimal-medium, M-medium). Αξιολογήθηκε η επίδρασή τους στην βιομάζα και την αύξηση της διαμέτρου της αποικίας του μύκητα σε τρεις διαφορετικές θερμοκρασίες (25, 4, 37°C). Η ανάπτυξη του FSK, που μετρήθηκε ως αύξηση της ακτίνας της αποικίας με την πάροδο του χρόνου, ήταν πολύ παρόμοια σε όλα τα μέσα που δοκιμάστηκαν. Η ανάπτυξη μυκήτων ήταν παρόμοια και στα 3 θρεπτικά μέσα που δοκιμάστηκαν, παρά την απουσία πρωτογενούς πηγής άνθρακα και αζώτου στο μέσο υδάτινου άγαρ. Σύμφωνα με τα παραπάνω αποτελέσματα, ο μύκητας έδειξε παρόμοια γραμμική ταχύτητα ανάπτυξης στους 4, 25 και 37°C. Δεν καταγράφηκαν στατιστικά σημαντικές διαφορές στη διάμετρο της αποικίας του μυκητιακού μυκηλίου που παρήχθη σε οποιοδήποτε από τα διαφορετικά θρεπτικά μέσα και τις θερμοκρασίες. Αντιθέτως, η επίδραση των

διαφόρων θρεπτικών μέσων στο βάρος του μυκηλίου ήταν διαφορετική από αυτή που καταγράφηκε στη διάμετρο της αποικίας με τη μέγιστη βιομάζα μυκηλίου να καταγράφεται στο μέσο PDA και τη μικρότερη στο μέσο υδάτινου άγαρ σε όλες τις θερμοκρασίες. Προς έκπληξή μας, η θερμοκρασία δεν επηρέασε το βάρος του μυκηλίου εντός ενός θρεπτικού μέσου (παράρτημα εικ.1). Συνολικά, τα διαφορετικά θρεπτικά μέσα καλλιέργειας φαίνεται να επηρεάζουν τη μάζα του μυκηλίου των μυκήτων με τρόπο που δεν εξαρτάται από τη θερμοκρασία, ενώ δεν παρατηρήθηκε καμία επίδραση στην αύξηση της διαμέτρου της αποικίας (Εικ.1). Επίσης, διαφαίνεται η ικανότητα του μύκητα να προσαρμόζεται και να αναπτύσσεται σε παρόμοιο βαθμό σε μεγάλο εύρος θερμοκρασιών στο περιβάλλον του.



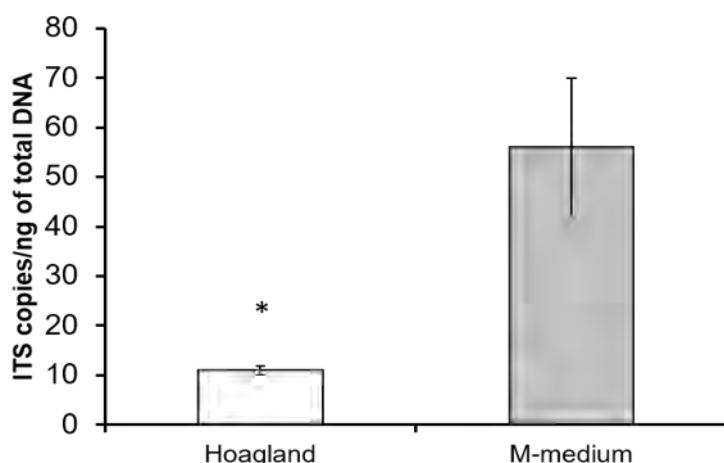
Εικόνα 1. Επίδραση διαφορετικών μέσων και θερμοκρασιών στη γραμμική ταχύτητα ανάπτυξης του μυκηλίου FSK και στο βάρος του. Το FSK αναπτύχθηκε σε τρυβλία Petri που περιείχαν: πλήρες μέσο PDA (B), νερό άγαρ (C), μέσο M-medium (D). Τρυβλία Petri επωάστηκαν σε θάλαμο ανάπτυξης (25°C) για 5 ημέρες, στη συνέχεια μεταφέρθηκαν σε άλλο θάλαμο καλλιέργειας στους 4°C και 37°C για 48 ώρες αντίστοιχα. Μετά τις συνθήκες θερμικής καταπόνησης, το πείραμα τελείωσε (7 ημέρες). Ενδεικτικά τα διαγράμματα γραμμικής ανάπτυξης του μύκητα (E) και του βάρους του (F) σε θερμοκρασία ανάπτυξης 25°C. Οι τιμές είναι μέσος όρος 3 βιολογικών επαναλήψεων.

Επίδραση διαφορετικών θρεπτικών μέσων στην ικανότητα αποικισμού του FSK στις ρίζες των φυτών *Lotus japonicus* υπό φυσιολογικές συνθήκες

Σύμφωνα με τα παραπάνω αποτελέσματα, πριν τον έλεγχο της επίδρασης της θερμοκρασίας στη διαδικασία αλληλεπίδρασης των δύο οργανισμών, αξιολογήσαμε αρχικά τα δύο θρεπτικά μέσα που χρησιμοποιούνται για την ανάπτυξη *Lotus japonicus* και του μύκητα ως προς την επίδρασή τους στον αποικισμό του φυτού από τον FSK. Το ένα είναι το μέσο Hoagland (διάλυμα 1) που χρησιμοποιείται ευρέως για την κάλυψη της λίπανσης φυτών που αναπτύσσονται εργαστηριακά και το άλλο είναι το μέσο M-medium (διάλυμα 2) που ενδείκνυται ως ένα minimal θρεπτικό μέσο μυκήτων. Η κύρια διαφορά μεταξύ του διαλύματος (1) και του διαλύματος (2) είναι

ότι το διάλυμα 2 έχει πρόσθετες βιταμίνες (γλυκίνη, θειαμίνη HCl, πυριδοξίνη HCl, νικοτινικό οξύ, μυο-ινοσιτόλη) και ιωδιούχο κάλιο (KI). Εμβολιάσαμε φυτά *L. jaronicus* με κονίδια FsK και δεν παρατηρήσαμε εμφανή επίδραση στην ανάπτυξη των φυτών υπό τις βέλτιστες συνθήκες που εφαρμόσαμε σε αυτό το πείραμα σε φυτοδοχεία.

Προκειμένου να παρακολουθήσουμε την επίδραση διαφορετικών μέσων στην ικανότητα αποικισμού FsK, ποσοτικοποιήσαμε τον αποικισμό μυκήτων σε ριζικούς φυτικούς ιστούς με qPCR. Το ενδόφυτο ανιχνεύθηκε στους ιστούς της ρίζας του *L. jaronicus* στα αρχικά στάδια της αλληλεπίδρασης (4 ημέρες μετά τον εμβολιασμό, dpi) και στις δύο μεταχειρίσεις. Καταγράφηκε, όμως, σημαντική διαφορά καθώς ο FsK ανιχνεύθηκε σε στατιστικά σημαντικά υψηλότερα επίπεδα στους ιστούς της ρίζας του *L. jaronicus* που ποτίζονταν με M-medium σε σύγκριση με τα φυτά που πότισμα με το διάλυμα Hoagland (Εικ. 2).



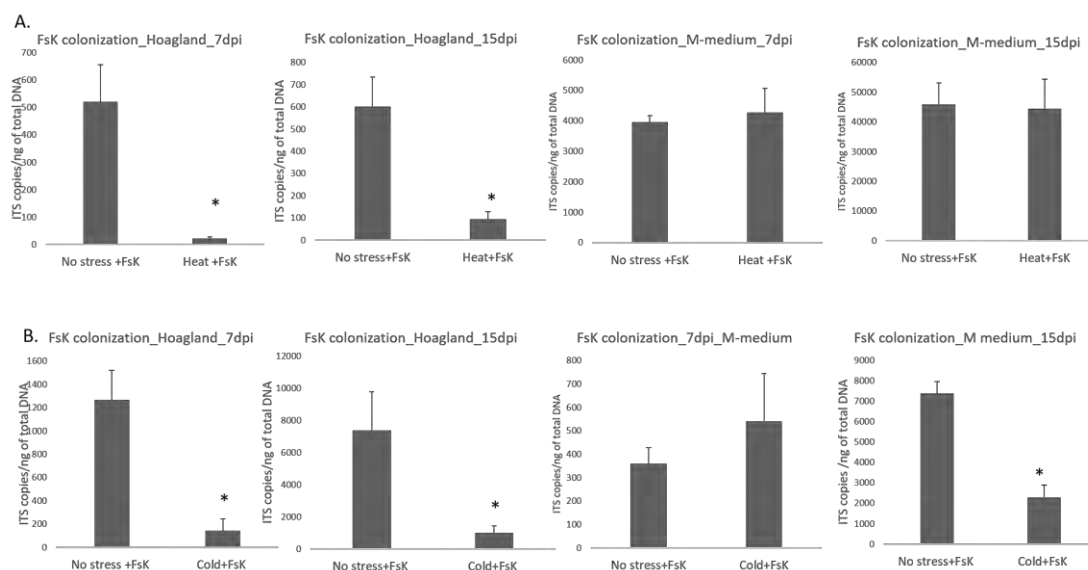
Εικόνα 2. Ποσοτικοποίηση του αποικισμού του στελέχους K (FsK) *Fusarium solani* σε φυτά *Lotus jaronicus* που ποτίζονται είτε με μέσο Hoagland είτε με M-medium. Απόλυτος ποσοτικός προσδιορισμός της εισόδου FsK στους ιστούς ρίζας του *L. jaronicus* μέσω ποσοτικής (q)PCR, χρησιμοποιώντας εκκινητές ειδικούς για ένα τμήμα του γονιδίου *Fusarium ITS*. Οι ιστοί συλλέχθηκαν στις 4 μέρες μετά τον εμβολιασμό (dpi). Οι αριθμοί αντιγράφων γονιδίων ITS κανονικοποιούνται ως προς τα ng του συνολικού DNA που εξάγεται από τον ιστό της ρίζας. Πέντε βιολογικές επαναλήψεις αξιολογήθηκαν για κάθε μέσο. Κάθε επανάληψη αποτελείται από τρία μεμονωμένα φυτά. Ο αστερίσκος αντιπροσωπεύει στατιστικά σημαντικές διαφορές μεταξύ Hoagland και M-medium στον αποικισμό FsK σε επίπεδο $P < 0,05$ (Student's t-test).

Επίδραση διαφορετικών θρεπτικών μέσων στην ικανότητα αποικισμού του FsK στις ρίζες των φυτών *Lotus jaronicus* υπό συνθήκες θερμικής καταπόνησης

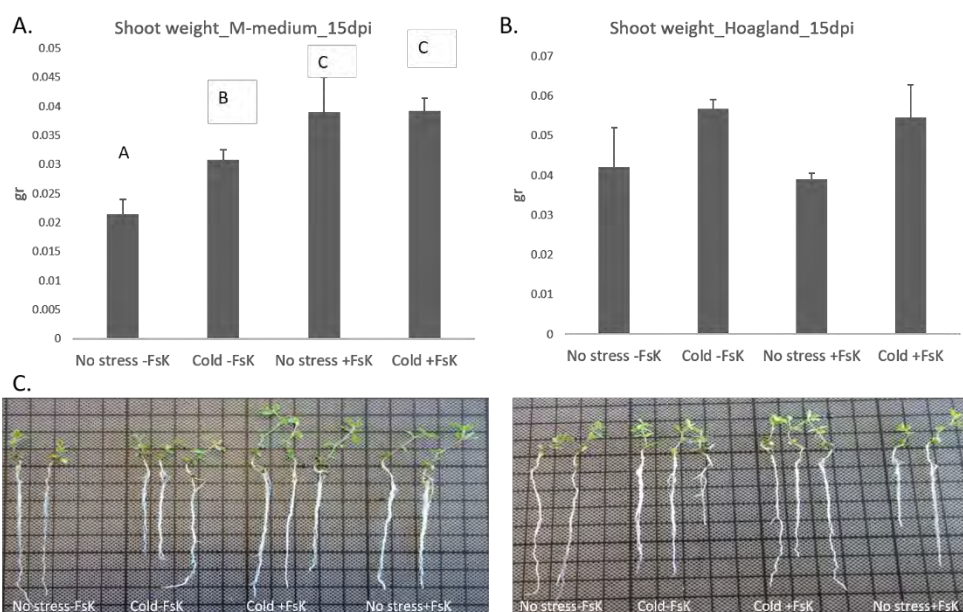
Με βάση τα αποτελέσματα αποικισμού σε διαφορετικά μέσα υπό φυσιολογικές συνθήκες, στη συνέχεια ερευνήσαμε την ικανότητα του αποικισμού FsK υπό δ

συνθήκες θερμοκρασιακής καταπόνησης (4 και 37 C). Μετρήθηκε η αύξηση των φυτών στις Χ μέρες μετά τον εμβολιασμό των φυτών και ο βαθμός αποικισμού μέσω qPCR στις ρίζες των φυτών 7 και 15 dpi. Παρατηρήσαμε ότι και στις δύο μεταχειρίσεις θερμικής καταπόνησης ο βαθμός αποικισμού του φυτού από τον μύκητα μειώνεται σε σύγκριση αυτόν στα φυτά ελέγχου αλλά αυτό παρατηρείται σταθερά μόνο όταν τα φυτά ποτίζονται με το θρεπτικό μέσο Hoagland (Εικ. 3Α). Αντίθετα, όταν ως θρεπτικό μέσο λίπανσης χρησιμοποιείται το Μ-μέσο, δεν υπήρχε στατιστικά σημαντική διαφορά στον βαθμό αποικισμού παρά μόνο στις 15 dpi όπου καταγράφηκε επίδραση και σημαντικά χαμηλότερα επίπεδα αποικισμού FSK και στα φυτά που ποτίστηκαν με το Μ-μέσο (Εικ. 3Β).

Οι παράμετροι ανάπτυξης των φυτών *L. jaronicus* μετρήθηκαν στα υποδεικνυόμενα χρονικά σημεία. Η επίδραση στην ανάπτυξη αξιολογήθηκε ως προς το μήκος της ρίζας (RL) και του υπέργειου τμήματος (SL) και του φρέσκου βάρους (FW) της ρίζας και του βλαστού. Σε συνθήκες αυξημένης θερμοκρασίας, δεν καταγράφηκαν διαφορές σε όλες τις παραμέτρους ανάπτυξης τόσο στις 7dpi όσο και στις 15dpi ανεξάρτητα από το θρεπτικό μέσο λίπανσης (παράρτημα εικ.2). Σε συνθήκες καταπόνησης ψύχους, τα αποτελέσματα έδειξαν ότι ο αποικισμός FSK επηρέασε σημαντικά θετικά το φρέσκο βάρος βλαστών στις 15dpi μόνο σε φυτά ποτισμένα με Μ-medium και όχι σε φυτά ποτισμένα με Hoagland (Εικ. 4). Αξίζει επίσης να σχολιαστεί ότι στις 15 μέρες από την μόλυνση με το ενδόφυτο στα ποτισμένα με Μ-medium φυτά παρατηρείται μια στατιστικά σημαντική αύξηση στο βάρος του υπέργειου τμήματος παρουσία FSK σε σύγκριση με τα μη-εμβολιασμένα φυτά σε φυσιολογικές συνθήκες ανάπτυξης. Αυτή την αύξηση την παρατηρήσαμε μόνο μία φορά και δεν επαναλήφθηκε.



Εικόνα 3. Ποσοτικοποίηση του αποικισμού του στελέχους *Fusarium solani* K (FsK) στις ρίζες των φυτών *Lotus japonicus* που ποτίστηκαν είτε με Hoagland είτε με M-medium υπό θερμική και ψυχρή καταπόνηση. Απόλυτος ποσοτικός προσδιορισμός της εισόδου FsK στους ιστούς ρίζας του *L. japonicus* μέσω ποσοτικής (q)PCR, χρησιμοποιώντας εκκινητές ειδικούς για ένα τμήμα του γονιδίου *Fusarium* ITS. Οι ιστοί συλλέχθηκαν στις 7 και 15 ημέρες μετά τον εμβολιασμό (dpi). Ο αριθμός αντιγράφων του γονιδίου ITS κανονικοποιήθηκε ως προς τα ng του συνολικού DNA που εξάγεται από τον ιστό της ρίζας. Πέντε βιολογικές επαναλήψεις αξιολογήθηκαν για κάθε κατάσταση. Κάθε επανάληψη αποτελείται από τρία μεμονωμένα φυτά. Ο αστερίσκος αντιπροσωπεύει στατιστικά σημαντικές διαφορές μεταξύ του αβιοτικού στρες και της κατάστασης ελέγχου στον αποικισμό FsK σε επίπεδο $P < 0,05$ (Student's t-test).

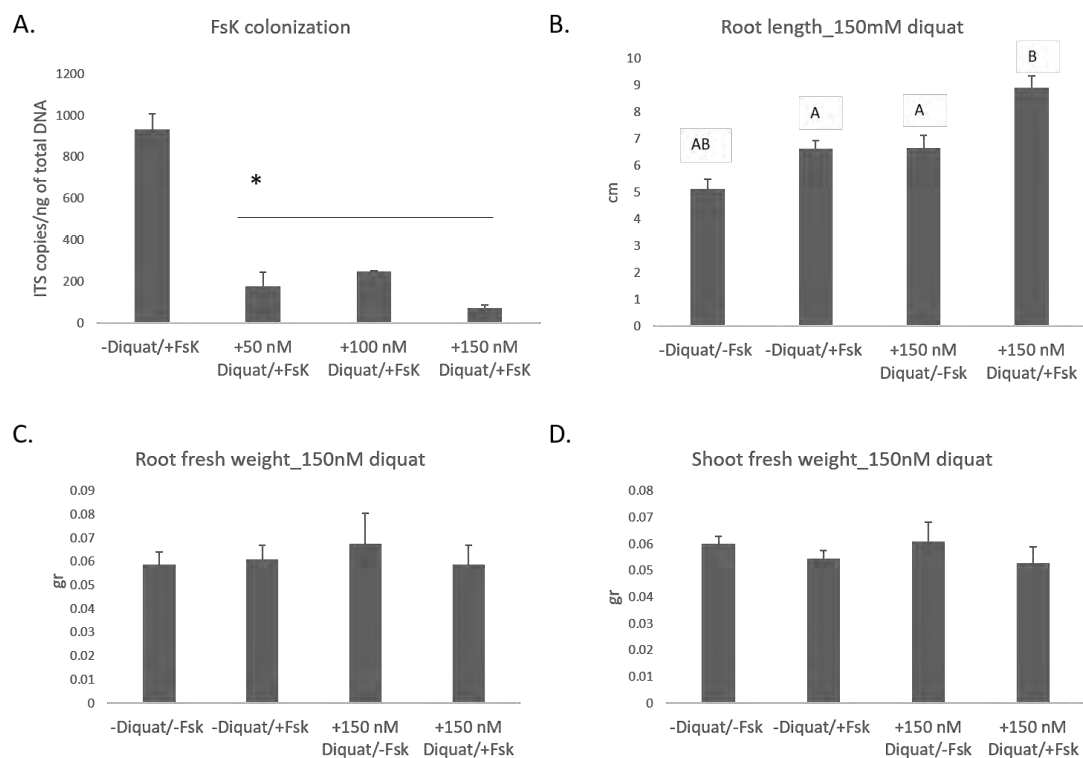


Εικόνα 4. Επίδρασεις ψυχρού στρες και αποικισμού *Lotus japonicus* από το ενδοφύτο *Fusarium solani* στέλεχος K (FsK) στο φρέσκο βάρος του βλαστού στις 15dpi. Μία εβδομάδα μετά τη σπορά των σπόρων, τα φυτά είτε εμβολιάστηκαν με το ενδοφυτικό (+FsK) είτε όχι (-FsK). Παράλληλα, τα φυτά ποτίστηκαν είτε με M-μέσο (A) είτε με πλήρες μέσο Hoagland (B) για μια περίοδο 15 ημερών μετά τον εμβολιασμό. Στις 13 dpi τα φυτά εκτέθηκαν σε ψυχρή καταπόνηση για 48 ώρες και στη συνέχεια στις 15 dpi συλλέχθηκαν ιστοί. Μέσος όρος $\pm$ SE ($n = 5$) του φρέσκου βάρους του βλαστού σε όλες τις μεταχειρίσεις. Κάθε αντίγραφο αποτελείται από τρία μεμονωμένα φυτά. Σημαντικές διαφορές μεταξύ των μεταχειρίσεων υποδεικνύονται με διαφορετικά γράμματα από τα post-hoc τεστ του Tukey μετά από ANOVA: $P < 0,001$. (Γ) Οι φωτογραφίες φαινοτύπου λήφθηκαν μετά από 15 ημέρες από τον εμβολιασμό με τον ενδοφυτικό μύκητα FsK με τα φυτά (i) να έχουν ποτιστεί με M-μέσο και τα φυτά (ii) με μέσο Hoagland.

Επίδραση διαφορετικής συγκέντρωσης ζιζανιοκτόνου Diquat στην ικανότητα αποικισμού FsK στις ρίζες των φυτών *Lotus japonicus* (υπό οξειδωτική καταπόνηση)

Διερευνήσαμε την επίδραση της παρουσίας του ζιζανιοκτόνου diquat στην ικανότητα αποικισμού FsK. Παρατηρήσαμε στατιστικά σημαντικά υψηλότερο επίπεδο αποικισμού υπό συνθήκες ελέγχου σε σύγκριση με διαφορετικές συγκεντρώσεις μυκητοκτόνου (Εικ. 5A) ενώ αντίθετα ο αποικισμός του FsK δεν επηρεάστηκε από τη χαμηλή και υψηλή δόση του ζιζανιοκτόνου. Σε αντίθεση με την απουσία διαφορών στον αποικισμό FsK μέσω της χαμηλής και της υψηλής δόσης, η παρουσία του μύκητα στις ρίζες των φυτών φαίνεται να οδηγεί σε αύξηση του φυτού μέσω μεγαλύτερου μήκους ρίζας στα φυτά που βρίσκονται υπό καταπόνηση υψηλής συγκέντρωσης του ζιζανιοκτόνου (Εικ. 5B). Όσον αφορά τις μετρήσεις των αναπτυξιακών

χαρακτηριστικών στις υπόλοιπες συγκεντρώσεις του φυτοφαρμάκου δεν παρατηρήθηκαν στατιστικά σημαντικές διαφορές (παράρτημα εικ.3).



Εικόνα 5. Επίδρασεις του οξειδωτικού στρες στον αποικισμό του *Lotus japonicus* από το ενδοφύτο *Fusarium solani* στελέχος K (FsK) και στις παραμέτρους ανάπτυξης στις 7dpi. Συγκεκριμένα μετρήθηκαν το μήκος της ρίζας (b), το φρέσκο βάρος της ρίζας (c) και του υπέργειου τμήματος (d). Μία εβδομάδα μετά τη σπορά των σπόρων, τα φυτά είτε εμβολιάστηκαν με το ενδόφυτο (+FsK) είτε όχι (-FsK). Παράλληλα, τα φυτά ποτίστηκαν με 1 ml 50, 100, 150nM diquat για μια περίοδο 7 ημερών μετά τον εμβολιασμό. (A) Ποσοτικοποίηση του αποικισμού του στελέχους *Fusarium solani* K (FsK) στις ρίζες των φυτών *Lotus japonicus* που ποτίστηκαν με τις τρεις συγκεντρώσεις diquat. Ο απόλυτος ποσοτικός προσδιορισμός της εισόδου FsK στους ιστούς ρίζας του *L. japonicus* πραγματοποιήθηκε μέσω ποσοτικής (q)PCR, χρησιμοποιώντας εκκινητές ειδικούς για ένα τμήμα του γονιδίου *Fusarium* ITS. Ο αριθμός αντιγράφων γονιδίου ITS κανονικοποιήθηκε ως προς τα ng του συνολικού DNA που εξαγεται από τον ιστό της ρίζας. Πέντε βιολογικές επαναλήψεις χρησιμοποιήθηκαν για κάθε μεταχείριση. Κάθε επανάληψη αποτελείται από τρία μεμονωμένα φυτά. Ο αστερίσκος αντιπροσωπεύει στατιστικά σημαντικές διαφορές μεταξύ του αβιοτικού στρες και της κατάστασης ελέγχου στον αποικισμό FsK σε επίπεδο $P < 0,05$ (Student's t-test). (B) Επίδραση 150nM diquat και εμβολιασμού FsK στο μήκος της ρίζας, φρέσκο βάρος ρίζας και υπέργειου τμήματος. Μέσος όρος $\pm$ SE ($n = 5$) του μήκους της ρίζας σε όλες τις καταστάσεις. Κάθε βιολογική επανάληψη αποτελείται από τρία μεμονωμένα φυτά. Σημαντικές διαφορές μεταξύ των μεταχειρίσεων υποδεικνύονται με διαφορετικά γράμματα από τα post-hoc τεστ του Tukey μετά από ANOVA: $P < 0,001$.

Συζήτηση

Στην παρούσα μελέτη, αξιολογήσαμε την επίδραση του διαφορετικού θρεπτικού μέσου και τριών διαφορετικών συνθηκών αβιοτικού στρες (θερμική καταπόνηση και

οξειδωτικό στρες) στην ικανότητα αποικισμού του ενδοφυτικού μύκητα *F. solani* στελέχους K (FsK) στις αποκρίσεις έναντι αβιοτικών καταπονήσεων. Καταγράψαμε τις αλλαγές σε επίπεδο αποικισμού κάτω από τις αβιοτικές συνθήκες. Σε αντίθεση με την απουσία διαφορών στην ανάπτυξη και αύξηση (βιομάζα) του FsK υπό διαφορετικές θερμοκρασίες *in vitro*, ο FsK αποικίζει τις ρίζες των φυτών σε χαμηλότερα επίπεδα από τις συνθήκες ελέγχου υπό θερμική καταπόνηση. Επίσης σε κατάσταση οξειδωτικού στρες, ο αποικισμός ριζών από το FsK είναι χαμηλότερος σε όλες τις δόσεις ζιζανιοκτόνου σε σύγκριση με την κατάσταση ελέγχου. Παρ' όλα αυτά, η ικανότητα προώθησης της φυτικής αύξησης από το ενδόφυτο παρατηρήθηκε τόσο στην αύξηση του υπέργειου τμήματος των φυτών σε συνθήκες καταπόνησης ψύχους και στο μήκος της ρίζας σε φυτά υπό συνθήκες οξειδωτικής καταπόνησης.

Ο αποικισμός των φυτών *Lotus japonicus* από το ενδόφυτο FsK μειώνεται υπό συνθήκες θερμικής καταπόνησης και οξειδωτικού στρες

Εργαστηριακά πειράματα και δοκιμές θερμοκηπίου υποδεικνύουν έντονα ότι τα ενδόφυτα θα μπορούσαν να μετριάσουν τις συνθήκες καταπόνησης σε σημαντικές γεωργικές καλλιέργειες και να αυξήσουν την παραγωγικότητα. Στην παρούσα διατριβή, τα αποτελέσματα της μελέτης αποικισμού έδειξαν ότι ο FsK είναι ικανός να εισέλθει στις ρίζες του φυτού *L. japonicus* και να αποικίσει τις ρίζες τόσο υπό φυσιολογικές συνθήκες όσο και υπό συνθήκες αβιοτικού στρες. Παρατηρούμε ότι σε όλες τις καταστάσεις στρες ο μύκητας καταφέρνει να εισέρχεται σε χαμηλότερο βαθμό σε σχέση με τις συνθήκες ελέγχου. Σε προηγούμενες μελέτες του εργαστηρίου, ο FsK έχει δοκιμασθεί σε φυτά τομάτας που αναπτύχθηκαν υπό αβιοτικές και βιοτικές καταπονήσεις^{40,41,81}. Συγκεκριμένα, ο μύκητας *Fusarium solani* K έχει προηγουμένως αποδειχθεί ότι μεσολαβεί στη διασυστηματική ανθεκτικότητα της τομάτας έναντι του φυτοπαθογόνου μύκητα *Septoria lycopersici*, καθώς και έναντι της προσβολής από το ριζομύκητα σήψης *Fusarium oxysporum f.sp. radicis-lycopersici* (FORL)³⁹. Επίσης προστατεύει τα φυτά τομάτας έναντι του ζωοφυτοφάγου αρπακτικού *Nesidiocoris tenuis*⁴¹. Ο ενδοφυτικός μύκητας FsK επηρεάζει τις αποκρίσεις της τομάτας στα ακάρεα προς όφελος του φυτού⁴⁰. Σε όλες αυτές τις αβιοτικές και βιοτικές καταστάσεις που μελετήθηκαν στα φυτά τομάτας παρατηρήθηκε ότι ο αποικισμός του FsK δεν έχει επηρεαστεί από τις καταπονήσεις και τα επίπεδα αποικισμού του παραμένουν σταθερά σε σχέση με τις συνθήκες ελέγχου. Ωστόσο, τα αποτελέσματα αποικισμού του FsK σε φυτά *Lotus japonicus* συνάδουν με του ριζικού ενδοφυτικού μύκητα *Piriformospora indica*. Ο μύκητας αυτός αποίκισε φυτά αμπέλου (*Vitis vinifera* L. cv *Sultana*) σε χαμηλότερα επίπεδα υπό ψυχρό στρες⁸². Η μειωμένη ικανότητα του FsK να αποικίζει τις ρίζες των φυτών σε χαμηλή θερμοκρασία θα μπορούσε να οφείλεται στην έμμεση επίδραση της μειωμένης παροχής υδατανθράκων από το φυτό ξενιστή⁸³. Επιπλέον και ο μυκορριζικός μύκητας *Rhizophagus irregularis*, βρέθηκε να αποικίζει σε μικρότερο

βαθμό φυτά τομάτας υπό συνθήκες αλατότητας ⁸⁴. Ένας συνδυασμός μυκορριζικών μυκήτων (*Glomus mosseae*, *Glomus intraradices* and *Glomus fasciculatum*) βρέθηκε να αποικίζει σε μικρότερο βαθμό φυτά κριθαριού τα οποία έχουν ραντιστεί με το ζιζανιοκτόνο metribuzin. Συγκεκριμένα χρησιμοποιήθηκαν διάφορες συγκεντρώσεις του ζιζανιοκτόνου όπου οι μυκορριζες πάντα αποίκιζαν σε μικρότερο βαθμό σε σχέση με τα φυτά που αναπτύσσονταν χωρίς ζιζανιοκτόνο ⁸⁵.

Επίδραση των αβιοτικών καταπονήσεων και του αποικισμού των φυτών από το *Fusarium solani* στελέχους K στην ανάπτυξη των φυτών

Η μελέτη μας είναι η πρώτη αναφορά του ωφέλιμου ενδοφυτικού μύκητα του εδάφους, FsK, ο οποίος επηρεάζει θετικά την ανάπτυξη των φυτών *Lotus japonicus* κάτω από τις αβιοτικές καταπονήσεις. Καταγράψαμε την προώθηση της ανάπτυξης των βλαστών αλλά όχι της ρίζας από το FsK υπό ψυχρή καταπόνηση. Το κρίνο αποτελεί σοβαρή απειλή για τη βιωσιμότητα των αποδόσεων των καλλιεργειών. Παρομοίως, έχειδειχθεί ότι ο εμβολιασμός του *L. japonicus* με *Pantoea eucalypti* M91, ένα βακτηριακό στέλεχος που προάγει την ανάπτυξη των φυτών, είναι ικανό να βελτιώσει τη βιοδιαθεσιμότητα Fe^{2+} υπό αλκαλικό στρες ⁸⁶. Μια άλλη μελέτη, που διερεύνησε τις επιδράσεις του *Piriformospora indica* σε συνδυασμό με την επεξεργασία Zn, βρήκε σημαντικά υψηλότερο μήκος ρίζας και ξηρό βάρος ρίζας στα αμπέλια ⁸². Επιπλέον, η βιομάζα ριζών και βλαστών που αποικίστηκαν από *P. indica* ήταν περίπου διπλάσια από εκείνη των φυτών υπό φυσιολογικές συνθήκες ανάπτυξης ²⁰.

Από την άλλη πλευρά, υπό οξειδωτικό στρες καταγράψαμε την προώθηση της ανάπτυξης της ρίζας από το FsK στη συνθήκη προσθήκης υψηλής συγκέντρωσης του ζιζανιοκτόνου diquat. Ανάλογες παρατηρήσεις έχουν γίνει και στο στέλεχος *Burkholderia ceracia* PSBB, το οποίο έχει αναφερθεί ότι προάγει την ανάπτυξη των φυτών μέσω του μήκους της ρίζας και του ξηρού βάρους του βλαστού στα φυτά ρεβιθιού ακόμη και υπό οξειδωτικό στρες ⁸⁷. Το συγκεκριμένο στέλεχος έχει την ικανότητα να ανέχεται ακόμη και την υψηλότερη συγκέντρωση glyphosate που χρησιμοποιήθηκε στο οξειδωτικό στρες. Πιθανή τοξικότητα του diquat στον ίδιο τον μύκητα και στα χαρακτηριστικά του που οδηγούν στην προαγωγή της ανάπτυξης των φυτών είναι άγνωστη. Είναι γνωστό ότι το diquat είναι ένα εξαιρετικά υδατοδιαλυτό, μη εκλεκτικό ζιζανιοκτόνο που προκαλεί αποξήρανση και αποφύλλωση. Όταν εφαρμόζεται σε φυτά, παρεμβαίνει στη ροή ηλεκτρονίων στη φωτοσύνθεση και έχει ως αποτέλεσμα την παραγωγή δραστικών ριζών οξυγόνου (ROS) και ταχεία αποξήρανση του φυτικού ιστού ^{77,88}. Έχει δειχθεί ότι το *Trichoderma longibrachiatum* T6 (T6) προ Έχουν αναφερθεί πολλοί μικροοργανισμοί με ικανότητα προαγωγής της ανάπτυξης των φυτών τα οποία εμφανίζουν ανθεκτικότητα σε φυτοφάρμακα. Μερικά από αυτά ανήκουν στα γένη *Bacillus* ⁸⁹, *Rhizobium* ⁹⁰, *Burkholderia* ⁹¹ κ.λ.π.

Συμπεράσματα

Συλλογικά, τα δεδομένα μας υποστηρίζουν την υπόθεση ότι ο ενδοφυτικός μύκητας *F. solani* στέλεχος K αλλάζει τις αποκρίσεις του *L. jaronicus* στις αβιοτικές καταπονήσεις προς όφελος του φυτού. Στην παρούσα μελέτη, παρατηρήσαμε ότι ο FsK είναι σε θέση να αποικίσει τη ρίζα των φυτών. Ο FsK αποδείχθηκε επίσης ότι και να ενισχύει την ανάπτυξη των φυτών ακόμη και υπό συνθήκες αβιοτικών καταπονήσεων. Ως εκ τούτου, για να εξαχθούν ασφαλή συμπεράσματα σχετικά με τον προστατευτικό ρόλο του FsK στα φυτά *L. jaronicus*, είναι επιτακτική ανάγκη να αξιολογηθούν αυτά τα αποτελέσματα περαιτέρω. Τέλος, πρέπει να σημειωθεί ότι τα πειράματά μας έγιναν με φυτά που καλλιεργήθηκαν σε μίγμα άμμου με βερμικουλίτη. Ως εκ τούτου, ορισμένες από τις διαφορές που παρατηρήθηκαν μεταξύ της παρούσας μελέτης και των προηγούμενων εργασιών μπορεί να σχετίζονται με την απουσία άλλων μικροοργανισμών του εδάφους στη μελέτη μας που σε διαφορετικά περιβάλλοντα (δηλ. όταν τα φυτά αναπτύσσονται στο έδαφος) θα μπορούσαν να αλληλοεπιδράσουν με το ενδόφυτο. Τα δεδομένα μας έδειξαν ότι το FsK έπαιξε σημαντικό ρόλο στην ενίσχυση της ανάπτυξης των φυτών υπό αβιοτικές συνθήκες, υποδηλώνοντας τη δυνατότητά του ως εμβόλιο για καλλιέργειες ψυχανθών.

Βιβλιογραφία

1. Gepts P, Beavis WD, Brummer EC, et al. Legumes as a model plant family. Genomics for food and feed report of the cross-legume advances through genomics conference. *Plant Physiol.* 2005;137(4):1228-1235. doi:10.1104/pp.105.060871
2. Udvardi MK, Tabata S, Parniske M, Stougaard J. Lotus japonicus: Legume research in the fast lane. *Trends Plant Sci.* 2005;10(5):222-228. doi:10.1016/j.tplants.2005.03.008
3. Graham PH, Vance CP. Legumes: Importance and constraints to greater use. *Plant Physiol.* 2003;131(3):872-877. doi:10.1104/pp.017004
4. Handberg K, Stougaard J. for Classical and Molecular Genetics. *Plant J.* 1992;2(4):487-496.
5. Jiang Q, Gresshoff PM. Classical and molecular genetics of the model legume Lotus japonicus. *Mol Plant-Microbe Interact.* 1997;10(1):59-68. doi:10.1094/MPMI.1997.10.1.59
6. Sato S, Nakamura Y, Kaneko T, et al. Genome structure of the legume, Lotus japonicus. *DNA Res.* 2008;15(4):227-239. doi:10.1093/dnares/dsn008
7. Mun T, Bachmann A, Gupta V, Stougaard J, Andersen SU. Lotus Base: An integrated information portal for the model legume Lotus japonicus. *Sci Rep.* 2016;6:1-18. doi:10.1038/srep39447
8. V S. Nitrogen in crop production : An account of global flows adds. *Global Biogeochem Cycles.* 1999;13(2):647-662.
9. Oldroyd GED. Speak, friend, and enter: Signalling systems that promote beneficial symbiotic associations in plants. *Nat Rev Microbiol.* 2013;11(4):252-263. doi:10.1038/nrmicro2990
10. Bever JD, Simms EL. Evolution of nitrogen fixation in spatially structured populations of Rhizobium. *Heredity (Edinb).* 2000;85(4):366-372. doi:10.1046/j.1365-2540.2000.00772.x
11. Parniske M. Arbuscular mycorrhiza: The mother of plant root endosymbioses. *Nat Rev Microbiol.* 2008;6(10):763-775. doi:10.1038/nrmicro1987
12. Choi J, Summers W, Paszkowski U. Annual Review of Phytopathology Mechanisms Underlying Establishment of Arbuscular Mycorrhizal Symbioses. *Annu Rev Phytopathol.* 2018;56(May):7-8. <https://doi.org/10.1146/annurev-phyto-080516->
13. Afkhami ME, Almeida BK, Hernandez DJ, Kieseewetter KN, Revillini DP. Tripartite mutualisms as models for understanding plant-microbial interactions. *Curr Opin Plant Biol.* 2020;56:28-36. doi:10.1016/j.pbi.2020.02.003
14. Tsiknia M, Tsikou D, Papadopoulou KK, Ehaliotis C. Multi-species relationships in legume roots: From pairwise legume-symbiont interactions to the plant - Microbiome - soil continuum. *FEMS Microbiol Ecol.* 2021;97(2):1-16. doi:10.1093/femsec/fiaa222
15. Larimer AL, Clay K, Bever JD. Synergism and context dependency of interactions between arbuscular mycorrhizal fungi and rhizobia with a prairie legume. *Ecology.* 2014;95(4):1045-1054. doi:10.1890/13-0025.1
16. Brader G, Compant S, Vescio K, et al. Ecology and Genomic Insights into Plant-Pathogenic and Plant-Nonpathogenic Endophytes. *Annu Rev Phytopathol.*

- 2017;55:61-83. doi:10.1146/annurev-phyto-080516-035641
17. Wilson D. Endophyte: The Evolution of a Term, and Clarification of Its Use and Definition. *Oikos*. 1995;73(2):274. doi:10.2307/3545919
 18. White JF. An Overview of Endophytic Microbes: Endophytism Defined. *Microb Endophytes*. 2020;(January 2000):17-44. doi:10.1201/9781482277302-1
 19. Rodriguez RJ, White JF, Arnold AE, Redman RS. Fungal endophytes: Diversity and functional roles: Tansley review. *New Phytol*. 2009;182(2):314-330. doi:10.1111/j.1469-8137.2009.02773.x
 20. Varma A, Verma S, Sudha, Sahay N, Bütehorn B, Franken P. Piriformospora indica, a cultivable plant-growth-promoting root endophyte. *Appl Environ Microbiol*. 1999;65(6):2741-2744. doi:10.1128/aem.65.6.2741-2744.1999
 21. Waller F, Achatz B, Baltruschat H, et al. The endophytic fungus Piriformospora indica reprograms barley to salt-stress tolerance, disease resistance, and higher yield. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 2005;102(38):13386-13391. doi:10.1073/pnas.0504423102
 22. Baltruschat H, Fodor J, Harrach BD, et al. Salt tolerance of barley induced by the root endophyte Piriformospora indica is associated with a strong increase in antioxidants. *New Phytol*. 2008;180(2):501-510. doi:10.1111/j.1469-8137.2008.02583.x
 23. Rai M, Acharya D, Singh A, Varma A. Positive growth responses of the medicinal plants Spilanthes calva and Withania somnifera to inoculation by Piriformospora indica in a field trial. *Mycorrhiza*. 2001;11(3):123-128. doi:10.1007/s005720100115
 24. Das A, Kamal S, Shakil NA, et al. The root endophyte fungus Piriformospora indica leads to early flowering, higher biomass and altered secondary metabolites of the medicinal plant, Coleus forskohlii. *Plant Signal Behav*. 2012;7(1):103-112. doi:10.4161/psb.7.1.18472
 25. Abdelaziz ME, Kim D, Ali S, Fedoroff N V., Al-Babili S. The endophytic fungus Piriformospora indica enhances Arabidopsis thaliana growth and modulates Na⁺/K⁺ homeostasis under salt stress conditions. *Plant Sci*. 2017;263(May):107-115. doi:10.1016/j.plantsci.2017.07.006
 26. Hiruma K, Gerlach N, Sacristán S, et al. Root Endophyte Colletotrichum tofieldiae Confers Plant Fitness Benefits that Are Phosphate Status Dependent. *Cell*. 2016;165(2):464-474. doi:10.1016/j.cell.2016.02.028
 27. Pagare S, Bhatia M, Tripathi N, Pagare S, Bansal YK. Secondary metabolites of plants and their role: Overview. *Curr Trends Biotechnol Pharm*. 2015;9(3):293-304.
 28. García-Calderón M, Pérez-Delgado CM, Palove-Balang P, Betti M, Márquez AJ. Flavonoids and isoflavonoids biosynthesis in the model legume lotus japonicus; connections to nitrogen metabolism and photorespiration. *Plants*. 2020;9(6):1-22. doi:10.3390/plants9060774
 29. Krokida A, Delis C, Geisler K, et al. A metabolic gene cluster in Lotus japonicus discloses novel enzyme functions and products in triterpene biosynthesis. *New Phytol*. 2013;200(3):675-690. doi:10.1111/nph.12414
 30. Toll D. Biosynthesis and Biological Functions of Terpenoids in Plants. *Adv Biochem Eng Biotechnol*. 2014;123(July 2015):127-141. doi:10.1007/10
 31. Thimmappa R, Geisler K, Louveau T, O'Maille P, Osbourn A. Triterpene biosynthesis in

- plants. *Annu Rev Plant Biol.* 2014;65(September):225-257. doi:10.1146/annurev-arplant-050312-120229
32. Vincken J, Heng L, Groot A De, Gruppen H. Saponins , classification and occurrence in the plant kingdom. 2007;68:275-297. doi:10.1016/j.phytochem.2006.10.008
 33. Kushiro T, Shibuya M, Ebizuka Y. β -Amyrin synthase Cloning of oxidosqualene cyclase that catalyzes the formation of the most popular triterpene among higher plants. 244:238-244.
 34. Delis C, Krokida A, Georgiou S, et al. Role of lupeol synthase in *Lotus japonicus* nodule formation. *New Phytol.* 2011;189(1):335-346. doi:10.1111/j.1469-8137.2010.03463.x
 35. Summerell BA. Resolving *Fusarium*: Current Status of the Genus. *Annu Rev Phytopathol.* 2019;57:323-339. doi:10.1146/annurev-phyto-082718-100204
 36. Ma LJ, Geiser DM, Proctor RH, et al. *Fusarium* pathogenomics. *Annu Rev Microbiol.* 2013;67:399-416. doi:10.1146/annurev-micro-092412-155650
 37. Moretti A. Taxonomy of *Fusarium* genus: A continuous fight between lumpers and splitters. *Zb Matice Srp za Prir Nauk.* 2009;(117):7-13. doi:10.2298/zmspn0917007m
 38. Fourie G, Steenkamp ET, Ploetz RC, Gordon TR, Viljoen A. Current status of the taxonomic position of *Fusarium oxysporum* formae specialis *cubense* within the *Fusarium oxysporum* complex. *Infect Genet Evol.* 2011;11(3):533-542. doi:10.1016/j.meegid.2011.01.012
 39. Kavroulakis N, Ntougias S, Zervakis GI, Ehaliotis C, Haralampidis K, Papadopoulou KK. Role of ethylene in the protection of tomato plants against soil-borne fungal pathogens conferred by an endophytic *Fusarium solani* strain. *J Exp Bot.* 2007;58(14):3853-3864. doi:10.1093/jxb/erm230
 40. Pappas ML, Liapoura M, Papantoniou D, et al. The beneficial endophytic fungus *Fusarium solani* strain K alters tomato responses against spider mites to the benefit of the plant. *Front Plant Sci.* 2018;9. doi:10.3389/fpls.2018.01603
 41. Garantonakis N, Pappas ML, Varikou K, et al. Tomato inoculation with the endophytic strain *Fusarium solani* K results in reduced feeding damage by the zoophytophagous predator *nesidiocoris tenuis*. *Front Ecol Evol.* 2018;6(AUG):1-7. doi:10.3389/fevo.2018.00126
 42. Papadopoulou KK, Papadakis IE, Kavroulakis N, Doupis G, Ehaliotis C. Tolerance of tomato plants to water stress is improved by the root endophyte *Fusarium solani* FsK. *Rhizosphere.* 2018;6(March):77-85. doi:10.1016/j.rhisph.2018.04.003
 43. Skiada V, Faccio A, Kavroulakis N, Genre A, Bonfante P, Papadopoulou KK. Colonization of legumes by an endophytic *Fusarium solani* strain FsK reveals common features to symbionts or pathogens. *Fungal Genet Biol.* 2019;127(March):60-74. doi:10.1016/j.fgb.2019.03.003
 44. Skiada V, Avramidou M, Bonfante P, Genre A, Papadopoulou KK. An endophytic *Fusarium*–legume association is partially dependent on the common symbiotic signalling pathway. *New Phytol.* 2020;226(5):1429-1444. doi:10.1111/nph.16457
 45. Hill RA, Connolly JD. Triterpenoids. *Nat Prod Rep.* 2020;37(7):962-998. doi:10.1039/c9np00067d
 46. Papadopoulou K, Melton RE, Leggett M, Daniels MJ, Osbourn AE. Compromised

- disease resistance in saponin-deficient plants. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 1999;96(22):12923-12928. doi:10.1073/pnas.96.22.12923
47. Kemen AC, Honkanen S, Melton RE, et al. Investigation of triterpene synthesis and regulation in oats reveals a role for β -amyrin in determining root epidermal cell patterning. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 2014;111(23):8679-8684. doi:10.1073/pnas.1401553111
 48. Confalonieri M, Cammareri M, Biazzi E, et al. Enhanced triterpene saponin biosynthesis and root nodulation in transgenic barrel medic (*Medicago truncatula* Gaertn.) expressing a novel β -amyrin synthase (AsOXA1) gene. *Plant Biotechnol J*. 2009;7(2):172-182. doi:10.1111/j.1467-7652.2008.00385.x
 49. Qi X, Bakht S, Leggett M, Maxwell C, Melton R, Osbourn A. A gene cluster for secondary metabolism in oat: Implications for the evolution of metabolic diversity in plants. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 2004;101(21):8233-8238. doi:10.1073/pnas.0401301101
 50. Osbourn A. Secondary metabolic gene clusters: Evolutionary toolkits for chemical innovation. *Trends Genet*. 2010;26(10):449-457. doi:10.1016/j.tig.2010.07.001
 51. Iturbe-Ormaetxe I, Haralampidis K, Papadopoulou K, Osbourn AE. Molecular cloning and characterization of triterpene synthases from *Medicago truncatula* and *Lotus japonicus*. *Plant Mol Biol*. 2003;51(5):731-743. doi:10.1023/A:1022519709298
 52. Fukai E, Stougaard J, Hayashi M. Activation of an Endogenous Retrotransposon Associated with Epigenetic Changes in *Lotus japonicus* : A Tool for Functional Genomics in Legumes . *Plant Genome*. 2013;6(3):1-11. doi:10.3835/plantgenome2013.04.0009
 53. Boisson-Dernier A, Chabaud M, Garcia F, Bécard G, Rosenberg C, Barker DG. *Agrobacterium rhizogenes*-transformed roots of *Medicago truncatula* for the study of nitrogen-fixing and endomycorrhizal symbiotic associations. *Mol Plant-Microbe Interact*. 2001;14(6):695-700. doi:10.1094/MPMI.2001.14.6.695
 54. Huang AC, Jiang T, Liu YX, et al. A specialized metabolic network selectively modulates *Arabidopsis* root microbiota. *Science (80-)*. 2019;364(6440). doi:10.1126/science.aau6389
 55. Zhong Y, Xun W, Wang X, et al. Root-secreted bitter triterpene modulates the rhizosphere microbiota to improve plant fitness. *Nat Plants*. 2022;8(8):887-896. doi:10.1038/s41477-022-01201-2
 56. Bisseling T, Geurts R. Specificity in legume nodule symbiosis. *Science (80-)*. 2020;369(6504):620-621. doi:10.1126/science.abd3857
 57. Poole P, Ramachandran V, Terpolilli J. Rhizobia: From saprophytes to endosymbionts. *Nat Rev Microbiol*. 2018;16(5):291-303. doi:10.1038/nrmicro.2017.171
 58. De Boer W, Folman LB, Summerbell RC, Boddy L. Living in a fungal world: Impact of fungi on soil bacterial niche development. *FEMS Microbiol Rev*. 2005;29(4):795-811. doi:10.1016/j.femsre.2004.11.005
 59. Zhang W, Li XG, Sun K, et al. Mycelial network-mediated rhizobial dispersal enhances legume nodulation. *ISME J*. 2020;14(4):1015-1029. doi:10.1038/s41396-020-0587-5
 60. Chang HX, Noel ZA, Chilvers MI. A β -lactamase gene of *Fusarium oxysporum* alters

- the rhizosphere microbiota of soybean. *Plant J.* 2021;106(6):1588-1604. doi:10.1111/tpj.15257
61. Zhang L, Xu M, Liu Y, Zhang F, Hodge A, Feng G. Carbon and phosphorus exchange may enable cooperation between an arbuscular mycorrhizal fungus and a phosphate-solubilizing bacterium. *New Phytol.* 2016;210(3):1022-1032. doi:10.1111/nph.13838
 62. Xie XG, Zhang FM, Yang T, Chen Y, Li XG, Dai CC. Endophytic fungus drives nodulation and N₂ fixation attributable to specific root exudates. *MBio.* 2019;10(4):1-20. doi:10.1128/mBio.00728-19
 63. Wang X, Feng H, Wang Y, et al. Mycorrhizal symbiosis modulates the rhizosphere microbiota to promote rhizobia–legume symbiosis. *Mol Plant.* 2021;14(3):503-516. doi:10.1016/j.molp.2020.12.002
 64. Zhang W, Luo X, Mei YZ, et al. Priming of rhizobial nodulation signaling in the mycosphere accelerates nodulation of legume hosts. *New Phytol.* 2022;235(3):1212-1230. doi:10.1111/nph.18192
 65. Deveau A, Bonito G, Uehling J, et al. Bacterial-fungal interactions: Ecology, mechanisms and challenges. *FEMS Microbiol Rev.* 2018;42(3):335-352. doi:10.1093/femsre/fuy008
 66. Worrich A, Stryhanyuk H, Musat N, et al. Mycelium-mediated transfer of water and nutrients stimulates bacterial activity in dry and oligotrophic environments. *Nat Commun.* 2017;8(June). doi:10.1038/ncomms15472
 67. Larimer AL, Bever JD, Clay K. The interactive effects of plant microbial symbionts: A review and meta-analysis. *Symbiosis.* 2010;51(2):139-148. doi:10.1007/s13199-010-0083-1
 68. Abd-Alla MH, El-Enany AWE, Nafady NA, Khalaf DM, Morsy FM. Synergistic interaction of *Rhizobium leguminosarum* bv. *viciae* and arbuscular mycorrhizal fungi as a plant growth promoting biofertilizers for faba bean (*Vicia faba* L.) in alkaline soil. *Microbiol Res.* 2014;169(1):49-58. doi:10.1016/j.micres.2013.07.007
 69. Dabré ÉE, Hijri M, Favret C. Influence on Soybean Aphid by the Tripartite Interaction between Soybean, a *Rhizobium* Bacterium, and an Arbuscular Mycorrhizal Fungus. *Microorganisms.* 2022;10(6). doi:10.3390/microorganisms10061196
 70. Mickelbart M V., Hasegawa PM, Bailey-Serres J. Genetic mechanisms of abiotic stress tolerance that translate to crop yield stability. *Nat Rev Genet.* 2015;16(4):237-251. doi:10.1038/nrg3901
 71. Fujita M, Fujita Y, Noutoshi Y, et al. Crosstalk between abiotic and biotic stress responses: a current view from the points of convergence in the stress signaling networks. *Curr Opin Plant Biol.* 2006;9(4):436-442. doi:10.1016/j.pbi.2006.05.014
 72. Ahmad P, Abdel Latef AAH, Rasool S, Akram NA, Ashraf M, Gucel S. Role of proteomics in crop stress tolerance. *Front Plant Sci.* 2016;7(September):1-14. doi:10.3389/fpls.2016.01336
 73. Rao DE, Chaitanya K V. Photosynthesis and antioxidative defense mechanisms in deciphering drought stress tolerance of crop plants. *Biol Plant.* 2016;60(2):201-218. doi:10.1007/s10535-016-0584-8
 74. Glynnou K, Ali T, Buch AK, et al. The local environment determines the assembly of

- root endophytic fungi at a continental scale. *Environ Microbiol.* 2016;18(8):2418-2434. doi:10.1111/1462-2920.13112
75. Pietikäinen J, Pettersson M, Bååth E. Comparison of temperature effects on soil respiration and bacterial and fungal growth rates. *FEMS Microbiol Ecol.* 2005;52(1):49-58. doi:10.1016/j.femsec.2004.10.002
 76. Liu A, Wang B, Hamel C. Arbuscular mycorrhiza colonization and development at suboptimal root zone temperature. *Mycorrhiza.* 2004;14(2):93-101. doi:10.1007/s00572-003-0242-9
 77. Lv Z, Zhao M, Wang W, et al. Changing Gly311 to an acidic amino acid in the MATE family protein DTX6 enhances Arabidopsis resistance to the dihydropyridine herbicides. *Mol Plant.* 2021;14(12):2115-2125. doi:10.1016/j.molp.2021.09.002
 78. Chen J, Su Y, Lin R, et al. Effects of Acute Diquat Poisoning on Liver Mitochondrial Apoptosis and Autophagy in Ducks. *Front Vet Sci.* 2021;8(August):1-10. doi:10.3389/fvets.2021.727766
 79. Skiada V. *Colonization of Legumes by an Endophytic Fusarium Solani Strain K. Early-Stage Molecular Signaling and Sub-Cellular Responses.* Vol 224.; 2019.
 80. Hoagland DR, Arnon DI. The water-culture method for growing plants without soil. *Circ Calif Agric Exp Stn.* 1950;347(2nd edit):32 pp. <https://www.cabdirect.org/cabdirect/abstract/19500302257>.
 81. Kavroulakis N, Doupis G, Papadakis IE, Ehaliotis C, Papadopoulou KK. Tolerance of tomato plants to water stress is improved by the root endophyte *Fusarium solani* FsK. *Rhizosphere.* 2018;6:77-85. doi:10.1016/j.rhisph.2018.04.003
 82. Karimi R, Amini H, Ghabooli M. Root endophytic fungus *Piriformospora indica* and zinc attenuate cold stress in grapevine by influencing leaf phytochemicals and minerals content. *Sci Hort (Amsterdam).* 2022;293(October 2021):110665. doi:10.1016/j.scienta.2021.110665
 83. Gavito ME, Olsson PA, Rouhier H, et al. Temperature constraints on the growth and functioning of root organ cultures with arbuscular mycorrhizal fungi. *New Phytol.* 2005;168(1):179-188. doi:10.1111/j.1469-8137.2005.01481.x
 84. Lidoy J, López-García Á, Amate C, et al. Regulation of mycorrhizal colonization under stress in tomato depends on symbiotic efficiency. *Environ Exp Bot.* 2023;215(May). doi:10.1016/j.envexpbot.2023.105479
 85. Makarian H, Poozesh V, Asghari HR, Nazari M. Interaction Effects of Arbuscular Mycorrhiza Fungi and Soil Applied Herbicides on Plant Growth. *Commun Soil Sci Plant Anal.* 2016;47(5):619-629. doi:10.1080/00103624.2016.1146744
 86. Campestre MP, Castagno LN, Estrella MJ, Ruiz OA. Lotus japonicus plants of the Gifu B-129 ecotype subjected to alkaline stress improve their Fe²⁺ bio-availability through inoculation with *Pantoea eucalypti* M91. *J Plant Physiol.* 2016;192:47-55. doi:10.1016/j.jplph.2016.01.001
 87. Shahid M, Khan MS. Glyphosate induced toxicity to chickpea plants and stress alleviation by herbicide tolerant phosphate solubilizing *Burkholderia cepacia* PSBB1 carrying multifarious plant growth promoting activities. *3 Biotech.* 2018;8(2):1-17. doi:10.1007/s13205-018-1145-y

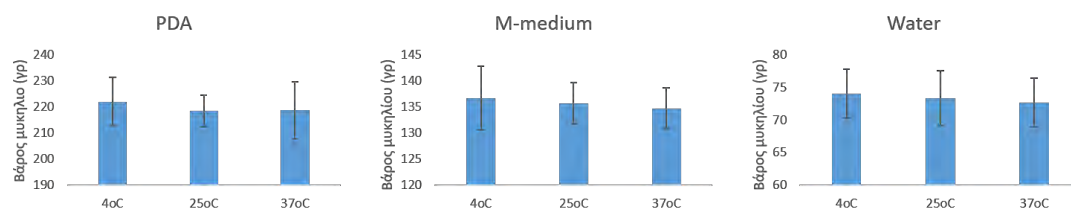
88. Riley R, Chapman V. © 1958 Nature Publishing Group. 1958.
89. Pérez-Fernández M, Alexander V. Enhanced plant performance in *Cicer arietinum* L. Due to the addition of a combination of plant growth-promoting bacteria. *Agric.* 2017;7(5). doi:10.3390/agriculture7050040
90. Chaudhary MF, Abbasi AA. Effect of Pre-emergence Herbicides on Nodulation , Nitrogen Fixation and Morphological Characters in Groundnut (*Arachis hypogaea*). *Pakistan J Biol Sci.* 2000;3:1775-1777.
91. Tétard-Jones C, Edwards R. Potential roles for microbial endophytes in herbicide tolerance in plants. *Pest Manag Sci.* 2016;72(2):203-209. doi:10.1002/ps.4147
92. Kobayashi T, Nozoye T, Nishizawa NK. Iron transport and its regulation in plants. *Free Radic Biol Med.* 2019;133(October 2018):11-20. doi:10.1016/j.freeradbiomed.2018.10.439
93. Vigani G, Murgia I. Iron-Requiring Enzymes in the Spotlight of Oxygen. *Trends Plant Sci.* 2018;23(10):874-882. doi:10.1016/j.tplants.2018.07.005
94. Pii Y, Mimmo T, Tomasi N, Terzano R, Cesco S, Crecchio C. Microbial interactions in the rhizosphere: beneficial influences of plant growth-promoting rhizobacteria on nutrient acquisition process. A review. *Biol Fertil Soils.* 2015;51(4):403-415. doi:10.1007/s00374-015-0996-1
95. Kobayashi T. Understanding the Complexity of Iron Sensing and Signaling Cascades in Plants. *Plant Cell Physiol.* 2019;60(February):1440-1446. doi:10.1093/pcp/pcz038
96. Jeong J, Guerinot M Lou. Homing in on iron homeostasis in plants. *Trends Plant Sci.* 2009;14(5):280-285. doi:10.1016/j.tplants.2009.02.006
97. García MJ, Romera FJ, Lucena C, Alcántara E, Pérez-Vicente R. Ethylene and the regulation of physiological and morphological responses to nutrient deficiencies. *Plant Physiol.* 2015;169(1):51-60. doi:10.1104/pp.15.00708
98. Pierre JL, Fontecave M. Iron and activated oxygen species in biology: The basic chemistry. *BioMetals.* 1999;12(3):195-199. doi:10.1023/A:1009252919854
99. Hou X, Tong H, Selby J, et al. Reactive Species and Antioxidants . Redox Biology Is a Fundamental Theme of Aerobic Life. 2003;133(November):274-286. doi:10.1105/tpc.001388.Nongrasses
100. Brumbarova T, Bauer P. Iron uptake and transport in plants. *Plant Membr Vacuolar Transp.* 2008;109(10):149-172. doi:10.1079/9781845934026.0149
101. Zhang X, Zhang D, Sun W, Wang T. The adaptive mechanism of plants to iron deficiency via iron uptake, transport, and homeostasis. *Int J Mol Sci.* 2019;20(10). doi:10.3390/ijms20102424
102. Grass G, Wong MD, Rosen BP, Smith RL, Rensing C. Zupt is a Zn(II) uptake system in *Escherichia coli*. *J Bacteriol.* 2002;184(3):864-866. doi:10.1128/JB.184.3.864-866.2002
103. Séguéla M, Briat JF, Vert G, Curie C. Cytokinins negatively regulate the root iron uptake machinery in *Arabidopsis* through a growth-dependent pathway. *Plant J.* 2008;55(2):289-300. doi:10.1111/j.1365-3113X.2008.03502.x
104. Lucena C, Porras R, García MJ, et al. Ethylene and Phloem Signals Are Involved in the Regulation of Responses to Fe and P Deficiencies in Roots of Strategy I Plants. *Front*

- Plant Sci.* 2019;10(October):1-14. doi:10.3389/fpls.2019.01237
105. Li L, Cheng X, Ling HQ. Isolation and characterization of Fe(III)-chelate reductase gene LeFRO1 in tomato. *Plant Mol Biol.* 2004;54(1):125-136. doi:10.1023/B:PLAN.0000028774.82782.16
 106. Waters BM, Blevins DG, Eide DJ. Characterization of FRO1, a pea ferric-chelate reductase involved in root iron acquisition. *Plant Physiol.* 2002;129(1):85-94. doi:10.1104/pp.010829
 107. Bereczky Z, Wang HY, Schubert V, Ganai M, Bauer P. Differential Regulation of nramp and irt Metal Transporter Genes in Wild Type and Iron Uptake Mutants of Tomato. *J Biol Chem.* 2003;278(27):24697-24704. doi:10.1074/jbc.M301365200
 108. Li R, Cai F, Pang G, Shen Q, Li R, Chen W. Solubilisation of Phosphate and Micronutrients by *Trichoderma harzianum* and Its Relationship with the Promotion of Tomato Plant Growth. 2015:1-16. doi:10.5061/dryad.p460c
 109. Zhang H, Sun Y, Xie X, Kim MS, Dowd SE, Paré PW. A soil bacterium regulates plant acquisition of iron via deficiency-inducible mechanisms. *Plant J.* 2009;58(4):568-577. doi:10.1111/j.1365-313X.2009.03803.x
 110. Jin CW, Ye YQ, Zheng SJ. An underground tale: Contribution of microbial activity to plant iron. *Ann Bot.* 2014;113(1):7-18. doi:10.1093/aob/mct249
 111. Mimmo T, Del Buono D, Terzano R, et al. Rhizospheric organic compounds in the soil-microorganism-plant system: Their role in iron availability. *Eur J Soil Sci.* 2014;65(5):629-642. doi:10.1111/ejss.12158
 112. Pieterse CMJ, Zamioudis C, Berendsen RL, Weller DM, Van Wees SCM, Bakker PAHM. Induced systemic resistance by beneficial microbes. *Annu Rev Phytopathol.* 2014;52:347-375. doi:10.1146/annurev-phyto-082712-102340
 113. Verbon EH, Trapet PL, Kruijs S, Temple-Boyer-Dury C, Rouwenhorst TG, Pieterse CMJ. Rhizobacteria-mediated activation of the iron deficiency response in Arabidopsis roots: Impact on iron status and signaling. *Front Plant Sci.* 2019;10(July):1-12. doi:10.3389/fpls.2019.00909
 114. Zamioudis C, Korteland J, Van Pelt JA, et al. Rhizobacterial volatiles and photosynthesis-related signals coordinate MYB72 expression in Arabidopsis roots during onset of induced systemic resistance and iron-deficiency responses. *Plant J.* 2015;84(2):309-322. doi:10.1111/tpj.12995
 115. Yuan Y, Wu H, Wang N, et al. FIT interacts with AtbHLH38 and AtbHLH39 in regulating iron uptake gene expression for iron homeostasis in Arabidopsis. *Cell Res.* 2008;18(3):385-397. doi:10.1038/cr.2008.26
 116. Bournier M, Tissot N, Mari S, et al. Arabidopsis ferritin 1 (AtFer1) gene regulation by the phosphate starvation response 1 (AtPHR1) transcription factor reveals a direct molecular link between iron and phosphate homeostasis. *J Biol Chem.* 2013;288(31):22670-22680. doi:10.1074/jbc.M113.482281
 117. Rogers EE, Guerinot M, Lou. FRD3, a member of the multidrug and toxin efflux family, controls iron deficiency responses in Arabidopsis. *Plant Cell.* 2002;14(8):1787-1799. doi:10.1105/tpc.001495
 118. Carbonnel S, Das D, Varshney K, Kolodziej MC, Villaécija-Aguilar JA, Gutjahr C. The

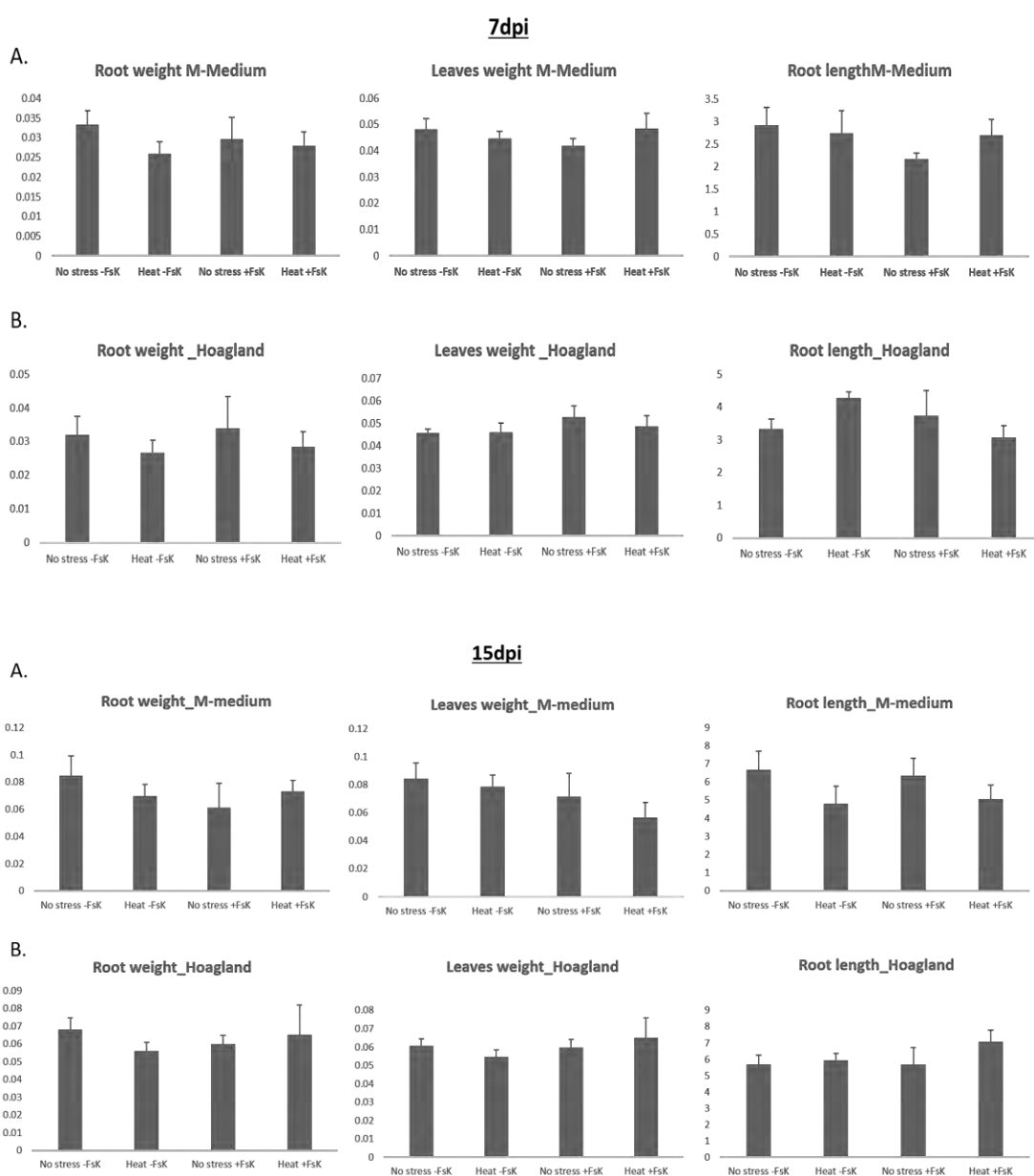
- karrikin signaling regulator SMAX1 controls *Lotus japonicus* root and root hair development by suppressing ethylene biosynthesis. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 2020;117(35):21757-21765. doi:10.1073/pnas.2006111117
119. Dundar F. Differential Gene Expression Analysis (DGE). *Appl Bioinforma Core*. 2020:1-13.
 120. Love MI, Huber W, Anders S. Moderated estimation of fold change and dispersion for RNA-seq data with DESeq2. *Genome Biol*. 2014;15(12):1-21. doi:10.1186/s13059-014-0550-8
 121. Huerta-Cepas J, Szklarczyk D, Heller D, et al. EggNOG 5.0: A hierarchical, functionally and phylogenetically annotated orthology resource based on 5090 organisms and 2502 viruses. *Nucleic Acids Res*. 2019;47(D1):D309-D314. doi:10.1093/nar/gky1085
 122. Rey P, Taupin-Broggini M, Couturier J, Vignols F, Rouhier N. Is there a role for glutaredoxins and BOLAs in the perception of the cellular iron status in plants? *Front Plant Sci*. 2019;10(June):1-10. doi:10.3389/fpls.2019.00712
 123. Vigani G, Bohic S, Faoro F, Vekemans B, Vincze L, Terzano R. Cellular fractionation and nanoscopic X-ray fluorescence imaging analyses reveal changes of zinc distribution in leaf cells of iron-deficient plants. *Front Plant Sci*. 2018;9(August):1-11. doi:10.3389/fpls.2018.01112
 124. Durrett TP, Gassmann W, Rogers EE. The FRD3-mediated efflux of citrate into the root vasculature is necessary for efficient iron translocation. *Plant Physiol*. 2007;144(1):197-205. doi:10.1104/pp.107.097162
 125. Lucena C, Romera FJ, García MJ, Alcántara E, Pérez-Vicente R. Ethylene participates in the regulation of Fe deficiency responses in strategy I plants and in rice. *Front Plant Sci*. 2015;6(NOVEMBER):1-16. doi:10.3389/fpls.2015.01056
 126. Philpott CC. Iron uptake in fungi: A system for every source. *Biochim Biophys Acta - Mol Cell Res*. 2006;1763(7):636-645. doi:10.1016/j.bbamcr.2006.05.008
 127. Babuin MF, Campestre MP, Rocco R, et al. Response to long-term NaHCO₃-derived alkalinity in model *Lotus japonicus* ecotypes Gifu B-129 and Miyakojima MG-20: Transcriptomic profiling and physiological characterization. *PLoS One*. 2014;9(5). doi:10.1371/journal.pone.0097106
 128. Bajaj R, Huang Y, Gebrechistos S, et al. Transcriptional responses of soybean roots to colonization with the root endophytic fungus *Piriformospora indica* reveals altered phenylpropanoid and secondary metabolism. *Sci Rep*. 2018;8(1):1-18. doi:10.1038/s41598-018-26809-3
 129. Yakti W, Kovács GM, Vági P, Franken P. Impact of dark septate endophytes on tomato growth and nutrient uptake. *Plant Ecol Divers*. 2018;11(5-6):637-648. doi:10.1080/17550874.2019.1610912
 130. Saddique MAB, Ali Z, Khan AS, Rana IA, Shamsi IH. Inoculation with the endophyte *Piriformospora indica* significantly affects mechanisms involved in osmotic stress in rice. *Rice*. 2018;11(1):1-12. doi:10.1186/s12284-018-0226-1
 131. Chen Z, Jin Y, Yao X, et al. Fungal Endophyte Improves Survival of *Lolium perenne* in Low Fertility Soils by Increasing Root Growth, Metabolic Activity and Absorption of Nutrients. *Plant Soil*. 2020;452(1-2):185-206. doi:10.1007/s11104-020-04556-7

132. Kim SA, LaCroix IS, Gerber SA, Guerinot M Lou. The iron deficiency response in *Arabidopsis thaliana* requires the phosphorylated transcription factor URI. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 2019;116(50):24933-24942. doi:10.1073/pnas.1916892116
133. Li W, Lan P. The understanding of the plant iron deficiency responses in strategy I plants and the role of ethylene in this process by omic approaches. *Front Plant Sci*. 2017;8(January):1-15. doi:10.3389/fpls.2017.00040
134. Kieu NP, Aznar A, Segond D, et al. Iron deficiency affects plant defence responses and confers resistance to *dickeya dadantii* and *botrytis cinerea*. *Mol Plant Pathol*. 2012;13(8):816-827. doi:10.1111/j.1364-3703.2012.00790.x
135. Chen W, Zhao L, Liu L, et al. Iron deficiency-induced transcription factors bHLH38/100/101 negatively modulate flowering time in *Arabidopsis thaliana*. *Plant Sci*. 2021;308(April):110929. doi:10.1016/j.plantsci.2021.110929
136. Conte SS, Walker EL. Transporters contributing to iron trafficking in plants. *Mol Plant*. 2011;4(3):464-476. doi:10.1093/mp/ssr015
137. Lemanceau P, Expert D, Gaymard F, Bakker PAHM, Briat JF. *Chapter 12 Role of Iron in Plant-Microbe Interactions*. Vol 51. 1st ed. Elsevier Ltd; 2009. doi:10.1016/S0065-2296(09)51012-9
138. Attarian R, Hu G, Sánchez-León E, et al. The monothiol glutaredoxin Grx4 regulates iron homeostasis and virulence in *cryptococcus neoformans*. *MBio*. 2018;9(6):1-23. doi:10.1128/mBio.02377-18
139. Young ND, Mudge J, Ellis THN. Legume genomes: More than peas in a pod. *Curr Opin Plant Biol*. 2003;6(2):199-204. doi:10.1016/S1369-5266(03)00006-2

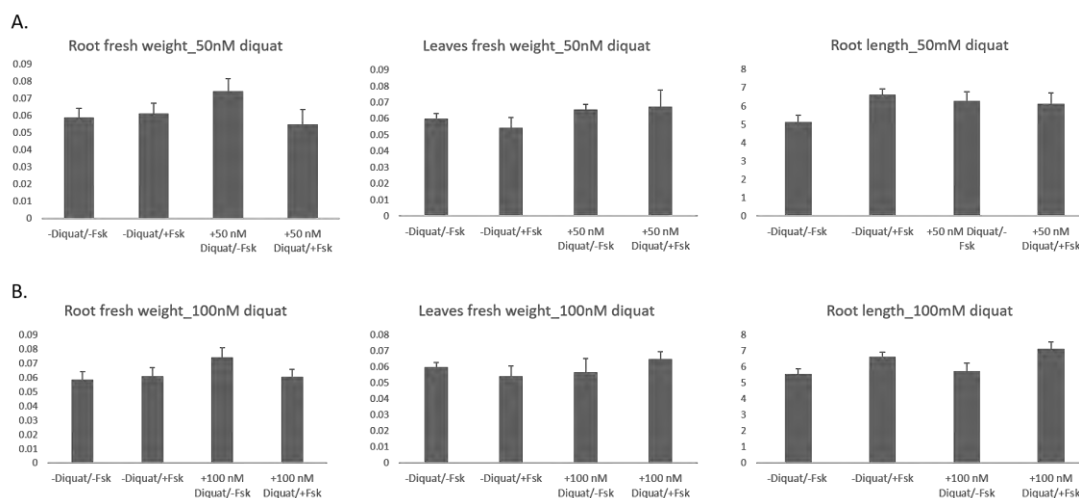
Παράρτημα



Εικόνα 6: Επίδραση διαφορετικών θερμοκρασιών στο βάρος του μυκηλίου του ενδοφυτικού μύκητα Fsk σε τρία διαφορετικά θρεπτικά μέσα ανάπτυξης. Οι τιμές είναι ο μέσος όρος 3 βιολογικών επαναλήψεων. Δεν καταγράφηκαν στατιστικά σημαντικές διαφορές μετά από ανάλυση One Way ANOVA.



Εικόνα 7: επιδράσεις της θερμικής καταπόνησης (ζέστη) και του αποικισμού του *Lotus japonicus* από το ενδοφύτο *Fusarium solani* στέλεχος K (Fsk) στις παραμέτρους ανάπτυξης των φυτών στις 7 και 15dpr. Μία εβδομάδα μετά τη σπορά των σπόρων, τα φυτά είτε εμβολιάστηκαν με το ενδοφυτικό (+Fsk) είτε όχι (-Fsk). Παράλληλα, τα φυτά ποτίστηκαν είτε με M-μέσο (A) είτε με πλήρες μέσο Hoagland (B) για μια περίοδο 7 και 15 ημερών μετά τον εμβολιασμό. Στις 5 και 13 dpr, αντίστοιχα, τα φυτά εκτέθηκαν σε θερμή καταπόνηση για 48 ώρες και στη συνέχεια στις 7 και 15 dpr συλλέχθηκαν ιστοί. Μέσος όρος $\pm$ SE ($n = 5$) του φρέσκου βάρους του βλαστού σε όλες τις μεταχειρίσεις. Κάθε αντίγραφο αποτελείται από τρία μεμονωμένα φυτά. Σημαντικές διαφορές μεταξύ των μεταχειρίσεων δεν καταγράφηκαν μετά από τα post-hoc τεστ του Tukey μετά από ANOVA: $P < 0,001$.



Εικόνα 8: Επίδραση διαφορετικής συγκέντρωσης ζιζανιοκτόνου στις αναπτυξιακές παραμέτρους του φυτού *Lotus japonicus* παρουσία ή/και απουσία από το ενδόφυτο *Fusarium solani* στέλεχος K (Fsk) στις 7dpr. Συγκεκριμένα μετρήθηκαν το μήκος της ρίζας, το φρέσκο βάρος της ρίζας και του υπέργειου τμήματος. Οι συγκεντρώσεις του ζιζανιοκτόνου που χρησιμοποιήθηκαν είναι 50nM (A) και 100nM (B). Μία εβδομάδα μετά τη σπορά των σπόρων, τα φυτά είτε εμβολιάστηκαν με το ενδόφυτο (+Fsk) είτε όχι (-Fsk). Παράλληλα, τα φυτά ποτίστηκαν με 1 ml 50, 100, 150nM diquat για μια περίοδο 7 ημερών μετά τον εμβολιασμό. (A) Ποσοτικοποίηση του αποικισμού του στελέχους *Fusarium solani* K (Fsk) στις ρίζες των φυτών *Lotus japonicus* που ποτίστηκαν με τις τρεις συγκεντρώσεις diquat. Ο απόλυτος ποσοτικός προσδιορισμός της εισόδου Fsk στους ιστούς ρίζας του *L. japonicus* πραγματοποιήθηκε μέσω ποσοτικής (q)PCR, χρησιμοποιώντας εκκινητές ειδικούς για ένα τμήμα του γονιδίου *Fusarium ITS*. Ο αριθμός αντιγράφων γονιδίου *ITS* κανονικοποιήθηκε ως προς τα ng του συνολικού DNA που εξάγεται από τον ιστό της ρίζας. Πέντε βιολογικές επαναλήψεις χρησιμοποιήθηκαν για κάθε μεταχείριση. Κάθε επανάληψη αποτελείται από τρία μεμονωμένα φυτά. Ο αστερίσκος αντιπροσωπεύει στατιστικά σημαντικές διαφορές μεταξύ του αβιοτικού στρες και της κατάστασης ελέγχου στον αποικισμό Fsk σε επίπεδο $P < 0,05$ (Student's t-test).

ΚΕΦΑΛΑΙΟ 4

ΕΝΑ ΜΥΚΗΤΙΑΚΟ ΕΝΔΟΦΥΤΟ ΑΥΞΑΝΕΙ ΤΗΝ ΑΝΘΕΚΤΙΚΟΤΗΤΑ
ΤΩΝ ΦΥΤΩΝ ΣΕ ΑΝΕΠΑΡΚΕΙΕΣ ΘΡΕΠΤΙΚΩΝ ΣΥΣΤΑΤΙΚΩΝ:
ΠΕΡΙΠΤΩΣΗ ΠΡΟΣΛΗΨΗ ΣΙΔΗΡΟΥ ΣΤΑ ΨΥΧΑΝΘΗ ΦΥΤΑ

Εισαγωγή

Όταν τα φυτά υποφέρουν από ανεπάρκεια μεταλλικών θρεπτικών συστατικών, αναπτύσσουν μορφολογικές και φυσιολογικές αποκρίσεις, με στόχο τη διευκόλυνση της κινητοποίησης και πρόσληψης του περιοριστικού θρεπτικού συστατικού ⁹². Ο σίδηρος (Fe) είναι βασικό στοιχείο για τη ζωή και λειτουργεί ως βασικός συμπαράγοντας ενός ευρέος φάσματος κυτταρικών διεργασιών ⁹³. Μαζί με το φώσφορο (P) και το άζωτο (N), η παραγωγικότητα των καλλιεργειών βασίζεται στη διαθεσιμότητα σιδήρου ⁹⁴. Για τη γεωργική βιωσιμότητα, υπάρχει επείγουσα ανάγκη να ενισχυθεί η ικανότητα των φυτών να αφομοιώνουν Fe από εδάφη χαμηλής διαθεσιμότητας Fe.

Το μεγαλύτερο μέρος του Fe, που βρίσκεται σε αφθονία στα εδάφη, υπάρχει στη μορφή [Fe(III)], ο οποίος είναι ελάχιστα διαλυτός ⁹⁵. Για να αντιμετωπιστεί αυτό, τα φυτά έχουν υιοθετήσει μηχανισμούς που βασίζονται στην αναγωγή ή τη χηλίωση του Fe ⁹⁶ για να διευκολύνουν την απόκτησή του ⁹⁷. Ταυτόχρονα, στο κύτταρο, η πιο διαλυτή μορφή σιδήρου μπορεί να δημιουργήσει ελεύθερες ρίζες οξυγόνου (ROS) μέσω της αντίδρασης Fenton ⁹⁸. Επομένως, μόλις το θρεπτικό συστατικό αποκτηθεί σε αρκετή ποσότητα, οι αποκρίσεις ανεπάρκειας σιδήρου πρέπει να απενεργοποιηθούν για να αποφευχθεί η τοξικότητα και να εξοικονομηθεί ενέργεια.

Τα αγρωστώδη φυτά εκκρίνουν από τις ρίζες τους φυτοσιδηροφόρα (PS) που δεσμεύουν εύκολα το Fe³⁺ και τα σύμπλοκα Fe-PS μεταφέρονται στη συνέχεια στις ρίζες ⁹⁹. Τα μη αγρωστώδη φυτά χρησιμοποιούν έναν μηχανισμό αναγωγής για την πρόσληψη σιδήρου, γνωστό ως στρατηγική-I. Η όλη διαδικασία είναι καλά εδραιωμένη στο *Arabidopsis thaliana* και μπορεί να περιγραφεί σε επιμέρους διαδικασίες. Πρώτον, πρωτόνια που απελευθερώνονται από τα κύτταρα της ρίζας στη ριζόσφαιρα μέσω μιας H⁺-ATPase με αποτέλεσμα οι αδιάλυτες ενώσεις σιδήρου στο έδαφος να οξειδώνονται. Στη συνέχεια, μια δεσμευμένη στη μεμβράνη χηλική αναγωγή σιδήρου, *AtFRO1* (οξειδάση αναγωγής σιδήρου), μετατρέπει τον τρισθενή σίδηρο Fe (III) σε δισθενή Fe (II), ο οποίος στη συνέχεια προσλαμβάνεται στα επιδερμικά κύτταρα της ρίζας από έναν διαμεμβρανικό μεταφορέα, τον *AtIRT1* ⁹⁹⁻¹⁰¹. Ο *IRT1* ανήκει στην οικογένεια ZIP πρωτεϊνών μεταφοράς μετάλλων ευρείας κλίμακας, η οποία ταυτοποιήθηκε σε ευκαρυώτες και βακτήρια ¹⁰². Ο βασικός μεταγραφικός παράγοντας helix-loop-helix (bHLH) FIT (FER-LIKE Iron DEFICIENCY TRANSCRIPTION FACTOR) λειτουργεί ως κεντρικός ρυθμιστής της Στρατηγικής I. Είναι ένας βασικός μεταγραφικός παράγοντας που εμπλέκεται στη ρύθμιση της έκφρασης των γονιδίων πρόσληψης σιδήρου *FRO1* και *IRT1* σε *Arabidopsis thaliana*. Το *FIT* ασκεί τη ρύθμισή του σχηματίζοντας ετεροδιμερή με τους μεταγραφικούς παράγοντες *bHLH38* και *bHLH39*. Επιπλέον, διαφορετικές φυτικές ορμόνες όπως αιθυλένιο,

αυξίνη, κυτοκινίνες¹⁰³, ιασμονικό οξύ και άλλες έχουν εμπλακεί στη ρύθμιση αυτών των αποκρίσεων^{97,101,104}.

Στην ντομάτα, το γονίδιο *LeFRO1* απομονώθηκε με κλωνοποίηση ομολογίας από το γονιδίωμα της τομάτας και σχετίζεται στενά με το *AtFRO2* του *A. thaliana* και το *PsFRO1* του *Pisum sativum* L.^{105,106}. Ομοίως, το *LeIRT1* επάχθηκε ως απόκριση στην έλλειψη σιδήρου και έδειξε την υψηλότερη ομοιότητα αλληλουχίας με το *AtIRT1*¹⁰⁷. Στο φυτό *L. japonicus*, και τα δύο γονίδια *LjFRO1* και *LjIRT1* μελετήθηκαν για το ρόλο τους στην απόκτηση σιδήρου παρουσία του ριζοβακτηρίου *Pantoea eucalypti* M91⁸⁶ που προάγει την ανάπτυξη των φυτών (PGPR).

Τα τελευταία χρόνια, αρκετές μελέτες έδειξαν ότι η εφαρμογή ορισμένων ευεργετικών μικροοργανισμών στο έδαφος μπορεί να βελτιώσει τη διατροφή των φυτών σε Fe^{104,108,109}. Οι κύριοι μηχανισμοί που προκαλούν τέτοιες επιδράσεις είναι πολύπλοκοι και δεν είναι πλήρως κατανοητοί. Ένας πιθανός μηχανισμός είναι η απελευθέρωση διαλυτοποιητικών ενώσεων Fe στα εδάφη^{94,110,111}. Επιπλέον, η μικροχλωρίδα της ριζόσφαιρας μπορεί επίσης να βελτιώσει την πρόσληψη του Fe από τα φυτά με την αλλαγή της φυσιολογίας και της αρχιτεκτονικής της ρίζας¹¹². Σε πρόσφατες μελέτες, το *Pseudomonas simiae* WCS417, ένα βακτήριο που αποικίζει τις ρίζες με ευεργετικά αποτελέσματα για τα φυτά *Arabidopsis thaliana*, αποδείχθηκε ότι ενεργοποιεί την απόκριση έλλειψης σιδήρου όταν τα φυτά αναπτύσσονται υπό συνθήκες επαρκείς σε σίδηρο. Ο μεταγραφικός παράγοντας MYB72 αποδείχθηκε ότι παίζει διπλό ρόλο στην εμφάνιση της συστημικής αντίστασης που προκαλείται από ριζοβακτήρια (ISR) και στην επιβίωση των φυτών υπό έλλειψη σιδήρου^{113,114}.

Σε αυτή τη μελέτη, διερευνήσαμε το ρόλο του ευεργετικού ενδοφυτικού μυκητιακού στελέχους *Fusarium solani* στέλεχος K (FsK) στην ομοιόσταση του Fe του φυτού *L. japonicus*.

Υλικά και μέθοδοι

Προετοιμασία κατάλληλων συνθηκών ανάπτυξης φυτών

Για το πείραμα χρησιμοποιήθηκαν σπόροι του αγρίου τύπου φυτού *Lotus japonicus* (WT) (οικότυπος 'Gifu'). Η διαδικασία προετοιμασίας των σπόρων και στη συνέχεια των φυτών είναι η ίδια που περιγράφεται στο κεφάλαιο 1 στην ενότητα των υλικών και των μεθόδων. Επτά ημερών φυτά μεταφέρθηκαν σε φυτοδοχεία που περιείχαν περίπου 270gr υποστρώματος το οποίο προηγουμένως είχε ποτιστεί με 25 ml ddH₂O. Το υπόστρωμα που χρησιμοποιήθηκε είναι ανάμειξη δύο τύπων άμμου (MIT 2000: yellow silica, 3:1) με βερμικουλίτη (3:1). Πραγματοποιήθηκαν 4 μεταχειρίσεις. Οι 2 χωρίς σίδηρο και 2 με σίδηρο. Σε κάθε μία από τις δυο μεταχειρίσεις τα φυτά εμβολιάζονταν με τον ενδοφυτικό μύκητα. Τα γλαστράκια τοποθετήθηκαν στον θάλαμο ανάπτυξης όπου ποτίζονταν ανά 2-3 ημέρες με απιονισμένο νερό εναλλάξ με

θρεπτικό Hoagland χωρίς σίδηρο για τις συνθήκες έλλειψης σιδήρου και με σίδηρο για τις φυσιολογικές συνθήκες ανάπτυξης.

Συνθήκες ανάπτυξης του μύκητα FSK και ο εμβολιασμός των φυτών

Η διαδικασία ανάπτυξης του ενδοφυτικού μύκητα ήταν αυτή που περιγράφεται στο κεφάλαιο 1. Το τελικό εμβόλιο είχε συγκέντρωση 5×10^3 κονίδια/ml. Στην συνέχεια σε φυτά 10 ημερών πραγματοποιήθηκε εμβολιασμός με 100 κονίδια ανά ρίζα. Τα κοντρόλ φυτά εμβολιάστηκαν με εμβόλιο χωρίς κονίδια.

Διαδικασία Δειγματοληψίας και Απομόνωση γονιδιωματικού DNA

Η διαδικασία της δειγματοληψίας καθώς και το πρωτόκολλο που ακολουθήσαμε με σκοπό την απομόνωση του γονιδιωματικού DNA περιγράφονται αναλυτικά στο πρώτο κεφάλαιο. Όπως και η μέθοδος ποσοτικοποίησης του.

Ανίχνευση αποικισμού από τον μύκητα *F. solani* στις ρίζες του φυτού *Lotus japonicus*

Για να επιβεβαιωθεί ότι έγινε αποικισμός στις ρίζες του *Lotus japonicus* από το στέλεχος FSK του μύκητα χρησιμοποιήθηκε το DNA που απομονώθηκε με τη μέθοδο CTAB. Η επιβεβαίωση έγινε μέσω της μεθόδου αλυσιδωτής αντίδρασης πολυμεράσης πραγματικού χρόνου (Real Time PCR). Σε αυτό το πείραμα χρησιμοποιήθηκαν εκκινητές που στόχευαν το γονίδιο ITS του μύκητα. Οι εκκινητές είναι οι εξής: ITS-F (5'-TAGGGTAGCTGGGTCTGACT-3') and ITS-R (5'-ACCAAGTCTAACCCGCCTAC-3')⁴³.

Απομόνωση RNA για ανάλυση γονιδιακής έκφρασης

Η διαδικασία απομόνωσης του RNA ακολούθησε το πρωτόκολλο των Brusslan and Tobin (1992) με χρήση LiCl. Συγκεκριμένα, το ολικό RNA απομονώθηκε από κάθε δείγμα φυτού και μύκητα και στη συνέχεια ποσοτικοποιήθηκε με τη χρήση της συσκευής Qubit (Invitrogen) σύμφωνα με τις οδηγίες που αναγράφονται από τον παρασκευαστή και υποβλήθηκε σε επεξεργασία με DNase με απώτερο σκοπό να απομακρυνθούν οποιαδήποτε υπολείμματα γενωμικού DNA. Η κατεργασία έγινε με το kit DNase I, RNase-free της Thermo Fisher Scientific σύμφωνα με τις οδηγίες του παρασκευαστή. Μετά το πέρας της κατεργασίας με DNase ελέγχθηκε η παρουσία υπολειμμάτων DNA μέσω PCR με εκκινητές ειδικούς για το γενωμικό γονίδιο της *Ubiquitin* του φυτού. Οι εκκινητές είναι: Ubl-F 5' ATGCAGATCTTTTGTGAAGAC 3' , Ubl-R 5' ACCACCACGGAAGACGGAG 3'.

Εν συνεχεία, τα δείγματα RNA υποβλήθηκαν σε qPCR ενός σταδίου χρησιμοποιώντας περίπου 10 ng δείγματος RNA με το kit Luna® Universal Probe One-Step RT-qPCR (New England Biolabs). Ο συνολικός όγκος της αντίδρασης μειώθηκε στα 10μl. Οι παράμετροι κύκλου αποτελούνταν από επώαση στους 55°C για 10 λεπτά για αντίστροφη μεταγραφή (σύνθεση cDNA), 95°C για 1 λεπτό ακολουθούμενη από 39 κύκλους των 95°C για 10 δευτερόλεπτα και στους 60°C για 30 δευτερόλεπτα (ενίσχυση). Η ανάλυση πραγματοποιήθηκε όπως περιγράφεται στο ^{29,34} χρησιμοποιώντας το γονίδιο UBIQUITIN (UBQ) ως αναφορά.

Ειδικοί για τα γονίδια εκκινητές σχεδιάστηκαν με λογισμικό Clone Manager για το *L. Japonicus*. Τα γονίδια που μελετήθηκαν είναι IRT ⁸⁶, FRO1 ⁸⁶, bHLH-38 ¹¹⁵, FER1 ¹¹⁶, FIT ¹¹⁵, FRD3 ¹¹⁷, ERF, ACC_Synthase (ACS) and ACC_Oxidase (ACO) ¹¹⁸. Οι αλληλουχίες των εκκινητών βρίσκονται στο παράρτημα στον πίνακα 1.

Επιλογή γονιδίων του μύκητα FsK μέσω ανάλυσης αποτελεσμάτων RNAseq

Έχοντας στη διάθεση μας τα αποτελέσματα του RNAseq που πραγματοποιήθηκε κατά την πρώιμη αλληλεπίδραση του φυτού με τον μύκητα ⁴³ αναζητήσαμε γονίδια που εμπλέκονται με τον σίδηρο από την πλευρά του μύκητα. Η ανάλυση διαφορικής έκφρασης πραγματοποιήθηκε χρησιμοποιώντας τα πακέτα R edgeR ¹¹⁹ και DESeq2 ¹²⁰. Η λίστα των στατιστικά σημαντικών διαφορικών σε αφθονία μεταγράφων επιλέχθηκε με βάση την q-value, η οποία εκφράζει την πιθανότητα η τιμή της p (η οποία τέθηκε: p.value <= 0.05) να οφείλεται σε τυχαίο γεγονός. Μέσω της q-value υπολογίζεται η διόρθωση ποσοστού ψευδούς ανακάλυψης, ή αλλιώς FDR (False Discovery rate correction), η οποία είναι μια προσαρμοσμένη μορφή της ακατέργαστης p-value και με αυτόν τον τρόπο λαμβάνεται υπόψιν το γεγονός ότι κάθε φορά υπάρχει ένα ποσοστό (5%) το εύρημα να προκύπτει με τυχαίο τρόπο. Με αυτόν τον τρόπο, περικόπτονται τα ψευδώς θετικά αποτελέσματα, όπως προκύπτουν τυχαία από τον ορισμό της p-value. Ακολούθησε επιλογή με βάση τον δυαδικό λογάριθμο του εύρους αλλαγής, log2-fold-change (logFC), το οποίο αντιπροσωπεύει τη διαφορά αφθονίας των μεταγράφων στις υπό διερεύνηση συνθήκες σε σχέση με τη συνθήκη ελέγχου. Επιλέχθηκε logFC <=-1 και logFC >=1, δηλαδή κρατήθηκαν μεταγράφα που η αφθονία τους βρέθηκε τουλάχιστον να υποδιπλασιάζεται ή να διπλασιάζεται αντίστοιχα. Τα κοινά γονίδια με διαφορετική έκφραση από τα δύο λογισμικά υποβλήθηκαν σε λειτουργική ανάλυση με το εργαλείο eggNOG-mapper v2.0 ¹²¹. Ελέγχοντας τα κοινά γονίδια που βρέθηκαν διαφορετικά εκφρασμένα, εντοπίσαμε μία αναγωγή σιδήρου που επιλέχθηκε για ανάλυση qPCR (FUN_015353: FUN_Ferric_reduct1: FsKFRE1). Με βάση το γονιδίωμα του FsK ⁴³ εντοπίσαμε με αναζήτηση ομολογίας ένα γονίδιο FsKBoIA που εμπλέκεται στην πρόσληψη σιδήρου στους μύκητες ¹²². Οι ειδικοί για το γονίδιο εκκινητές για FsK

σχεδιάστηκαν με λογισμικό blast εκκινητών. Οι αλληλουχίες των εκκινητών βρίσκονται στο παράρτημα στον πίνακα 1.

Ποσοτικοποίηση των μεταλλικών ιχνοστοιχείων του φυτού

Τα φύλλα των φυτών συγκομίστηκαν τόσο από φυτά που αναπτύσσονται σε συνθήκες έλλειψης σιδήρου (-Fe) όσο και επαρκούς (+Fe) καθώς και από εμβολιασμένα και μη εμβολιασμένα φυτά. Οι συγκεντρώσεις των ιχνοστοιχείων προσδιορίστηκαν χρησιμοποιώντας το πρωτόκολλο που περιγράφεται από Vigani et al., 2018. Εν συντομία, συλλέχθηκαν φύλλα από φυτά και στις δυο χρονικές στιγμές (14 και 40dpi) και ξηράθηκαν σε φούρνο στους 70°C για τέσσερις ημέρες. Το ξηρό βάρος των δειγμάτων μετρήθηκε και υποβλήθηκε σε πέψη χρησιμοποιώντας 65% νιτρικό οξύ (HNO₃) στους 120° C. Τα μεταλλοποιημένα δείγματα μεταφέρθηκαν σε δοκιμαστικούς σωλήνες πολυπροπυλενίου και αραιώθηκαν 1:40 με νερό MILLI-Q. Τέλος, η συγκέντρωση των μεταλλικών στοιχείων μετρήθηκε με Επαγωγικά συζευγμένο πλάσμα - φασματομετρία μάζας (Inductively coupled plasma mass spectrometry, ICP-MS) (BRUKER Aurora-M90 ICP-MS).

Προσδιορισμός του pH του μέσου ανάπτυξης των φυτών

Πέντε γραμμάρια (gr) άμμου από κάθε βιολογική επανάληψη συλλέχθηκαν χρησιμοποιώντας ένα αποστειρωμένο κουτάλι-σπάτουλα και τοποθετήθηκαν σε σωληνάριο των 50 ml. Τα δείγματα ξηράθηκαν στους 37°C για 1 ημέρα. Στη συνέχεια, η ξηρή άμμος εμποτίστηκε με 25 ml απεσταγμένο νερό (ddH₂O) (1:5) και ανακινήθηκε για 30 λεπτά. Το εναιώρημα αφέθηκε για 15 λεπτά για να επιτευχθεί ισορροπία και το pH μετρήθηκε με τη βοήθεια ενός pHμέτρου.

Στατιστική ανάλυση

Για όλες τις στατιστικές αναλύσεις πραγματοποιήθηκε ανάλυση διακύμανσης δύο παραγόντων (Two-way ANOVA). Όπου ήταν απαραίτητο ακολούθησε ανάλυση κατά Tukey post-hoc. Το επίπεδο σημαντικότητας ορίστηκε στο $p < 0.05$. Για την ανάλυση δυο ανεξάρτητων δειγμάτων πραγματοποιήθηκε ανάλυση Student t-test.

Αποτελέσματα

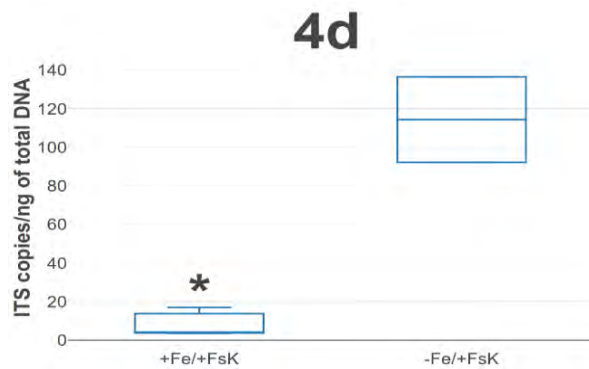
Ο ενδοφυτικός μύκητας βελτιώνει την ανάπτυξη των φυτών υπό συνθήκες περιορισμένου σιδήρου και αυξάνει την περιεκτικότητα σε θρεπτικά συστατικά.

Η ανεπάρκεια σιδήρου επηρέασε θετικά τον αποικισμό των ριζών από το FsK καθώς σε φυτά που υποβλήθηκαν σε στρες (-Fe) καταγράφηκαν υψηλότερα επίπεδα αποικισμού σε σύγκριση με τα μη καταπονημένα φυτά (+Fe) στις 14 dpi (Εικ.2.1). Αντίθετα, η ανεπάρκεια σιδήρου δεν είχε καμία επίδραση στον αποικισμό FsK στις 40 dpi και τόσο τα μη καταπονημένα φυτά όσο και τα φυτά που υποβλήθηκαν σε τροφопενία σιδήρου εμφάνισαν παρόμοια επίπεδα του μύκητα (Εικ.2.2.1)

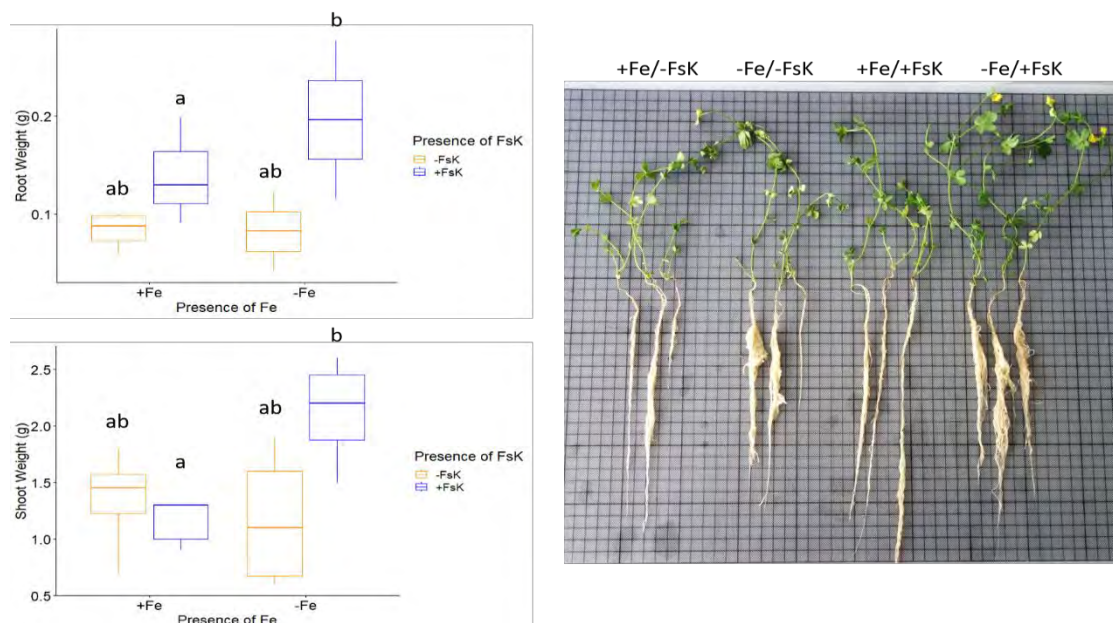
Ελέγξαμε εάν ο αποικισμός του *L.jaroonicus* από το ενδόφυτο επηρεάζει τις παραμέτρους ανάπτυξης των φυτών σε στρες (-Fe) ή σε συνθήκες ελέγχου (+Fe). Απουσία του ενδόφυτου και υπό έλλειψη σιδήρου, δεν καταγράψαμε στατιστικά σημαντική διαφορά στο νωπό βάρος των βλαστών και των ριζών των φυτών ή οποιονδήποτε ορατό φαινότυπο στην ανάπτυξη των φυτών στο πρώιμο στάδιο καταπόνησης (Εικ.2.2.2). Αντίθετα, τα φυτά που αποικίστηκαν με FsK ανεξάρτητα από τη θρεπτική κατάσταση του φυτού είχαν πολλαπλασιασμένο ριζικό σύστημα στις 14 μέρες μετά την μόλυνση με το μύκητα (dpi). Στο μεταγενέστερο χρονικό σημείο της δειγματοληψίας (40 dpi, 30 ημέρες τροφопενίας σιδήρου), καταγράφηκε αύξηση του βάρους της ρίζας παρουσία του μύκητα σε σχέση με τα φυτά στην κατάσταση ελέγχου αποικισμένα με μύκητα καθώς επίσης και αυξημένη ανάπτυξη βλαστών για τα φυτά υπό συνθήκες έλλειψης Fe, σε επίπεδα που ξεπέρασαν ακόμη και τα φυτά ελέγχου χωρίς στρες (Εικ.2.2.Α). Παρατηρήθηκε επίσης ένας φαινότυπος προγενέστερης ανθοφορίας σε σύγκριση με τα μη εμβολιασμένα φυτά (Εικ.2.2.Β).

Προκειμένου να αξιολογηθεί η θρεπτική κατάσταση των φυτών, λήφθηκαν δείγματα ολόκληρων φύλλων για ανάλυση ιόντων. Πρώτον, επαληθεύσαμε ότι το πειραματικό μας σχήμα για την πρόκληση έλλειψης σιδήρου στο φυτό ήταν επιτυχές και οδήγησε σε σημαντικά χαμηλότερες συγκεντρώσεις σιδήρου σε σύγκριση με τη συνθήκη ελέγχου και στα δύο χρονικά σημεία δειγματοληψίας (Εικόνα 2.3). Η παρουσία του ενδόφυτου δεν έχει καμία επίδραση ή κόστος για το φυτό όσον αφορά τα επίπεδα Fe σε πλήρως γονιμοποιημένα φυτά. Είναι σημαντικό, ωστόσο, ότι στις 40 dpi (30 ημέρες καταπόνησης σε θρεπτικά συστατικά), τα αποικισμένα φυτά έχουν σημαντικά αυξημένα επίπεδα περιεκτικότητας σε Fe σε σύγκριση με τα μη αποικισμένα φυτά. Σε αυτή την παρατεταμένη περίοδο καταπόνησης, τα φυτά περιείχαν περιεκτικότητα σε Fe παρόμοια με αυτή των μη καταπονημένων φυτών.

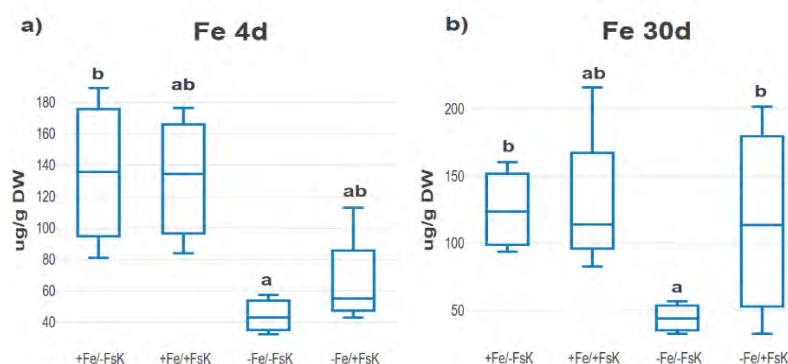
Για να κατανοήσουμε καλύτερα τον αντίκτυπο της συμβίωσης ενδοφύτων-φυτών στη διατροφή των φυτών, προσδιορίσαμε εκτός από τον Fe, έντεκα στοιχεία (Na, Mg, K, Ca, Mn, Co, Ni, Cu, Zn, Mo και P) και στα δύο στάδια έλλειψης του σιδήρου. Τα αποτελέσματά μας δείχνουν θετική επίδραση και σημαντική αύξηση όλων των θρεπτικών συστατικών, εκτός από Na, στους φυτικούς ιστούς, στο πλήρες θρεπτικό καθεστώς (Εικόνα 2.4). Παρόμοια τάση για βελτιωμένη περιεκτικότητα σε θρεπτικά συστατικά παρατηρήθηκε στην κατάσταση έλλειψης Fe. Στο μεταγενέστερο χρονικό σημείο που εξετάστηκε στις 40 dpi, αυτό το φαινόμενο δεν παρατηρήθηκε πλέον (Εικ.2.2.3).



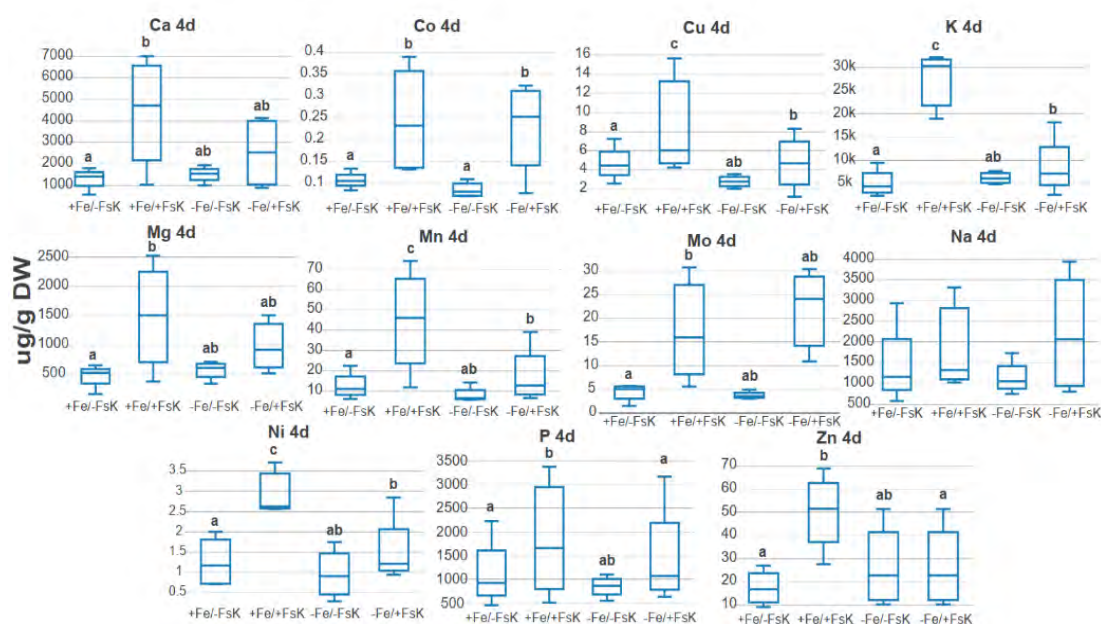
Εικόνα 2.1. Επιδράσεις της έλλειψης σιδήρου στον αποικισμό του *Lotus japonicus* από το ενδοφύτο *Fusarium solani* στέλεχος K (Fsk) στις 14dpi και αντίστοιχα 4 μέρες σε κατάσταση στρες. Ποσοτικοποίηση του αποικισμού του μύκητα εντός των ιστών της ρίζας με qPCR χρησιμοποιώντας εκκινητές ειδικούς για το γονίδιο ITS (άξονας Y). Οι τιμές κανονικοποιούνται ως προς τα ng του συνολικού DNA που απομονώθηκε. Τα δεδομένα είναι μέσο δύο τεχνικών επαναλήψεων για καθένα από τα πέντε βιολογικά αντίγραφα. Κάθε βιολογικό αντίγραφο αποτελείται από τρία φυτά. Σημαντικές διαφορές καταγράφηκαν μεταξύ των φυτών που αναπτύχθηκαν υπό την επάρκεια Fe (+Fe) και την ανεπάρκεια Fe (-Fe) μετά το Student's t-test.



Εικόνα 2.2. Επιδράσεις της έλλειψης Fe και του αποικισμού *Lotus japonicus* από το ενδοφύτο *Fusarium solani* στέλεχος K (Fsk) στις παραμέτρους ανάπτυξης των φυτών. Μία εβδομάδα μετά τη σπορά των σπόρων τα φυτά είτε εμβολιάστηκαν με το ενδόφυτο (μπλε ράβδοι, +Fsk) είτε όχι (πορτοκαλί ράβδοι, -Fsk). Παράλληλα, τα φυτά είτε ποτίστηκαν με πλήρες μέσο Hoagland (+Fe) είτε χωρίς σίδηρο (-Fe) για μια περίοδο 40 ημερών μετά τον εμβολιασμό. (Α) Μέσος όρος $\pm$ SE ($n = 5$) του φρέσκου βάρους ρίζας και του βλαστού σε όλες τις καταστάσεις. Σημαντικές διαφορές μεταξύ των θεραπειών υποδεικνύονται με διαφορετικά γράμματα από τα post-hoc τεστ του Tukey μετά από ANOVA: $P < 0,001$. (β) Λήφθηκαν φωτογραφίες φαινοτύπου μετά από 40 ημέρες από τον εμβολιασμό με τον ενδοφυτικό μύκητα Fsk. Το βέλος υποδεικνύει το φαινότυπο προγενέστερης ανθοφορίας σε σύγκριση με τα μη εμβολιασμένα φυτά.



Εικόνα 2.3: Αλλαγές στην πρόσληψη του σιδήρου σε φυτά *L. jarroenicus* που αποικίστηκαν από το *Fusarium solani* στέλεχος K (+FsK) ή/και σε έκθεση σε έλλειψη σιδήρου (-Fe) σε σύγκριση με τα φυτά ελέγχου που δεν υποβλήθηκαν σε στρες (+Fe/-FsK). Οι ιστοί συλλέχθηκαν 14 ημέρες μετά τον εμβολιασμό (dpi). Οι τιμές είναι ο μέσος όρος±SE πέντε βιολογικών επαναλήψεων. Στατιστικά σημαντικές διαφορές σε σύγκριση με δείγματα ελέγχου ανιχνεύθηκαν με ANOVA (Tukey's post-hoc tests, $P < 0,05$).



Εικόνα 2.4: Αλλαγές στην πρόσληψη μακρο- (P, K, Ca και Mg) και μικρο-θρεπτικών συστατικών (Cu, Zn, Mn, Mo, Co, Ni και Na) στα φυτά *L. jarroenicus* που αποικίζονται από το μύκητα *Fusarium solani* στέλεχος K (+FsK) και/ή εκθέτονται σε έλλειψη σιδήρου (-Fe) σε σύγκριση με τα φυτά ελέγχου χωρίς στρες (+Fe/-FsK). Οι ιστοί συλλέχθηκαν στις 14 ημέρες μετά τον εμβολιασμό (dpi). Οι τιμές είναι ο μέσος όρος±SE πέντε βιολογικών επαναλήψεων. Στατιστικά σημαντικές διαφορές σε σύγκριση με δείγματα ελέγχου ανιχνεύθηκαν με ANOVA (Tukey's post-hoc tests, $P < 0,05$).

Ο μύκητας επηρεάζει τον μηχανισμό πρόσληψης σιδήρου σε μεταγραφικό επίπεδο.

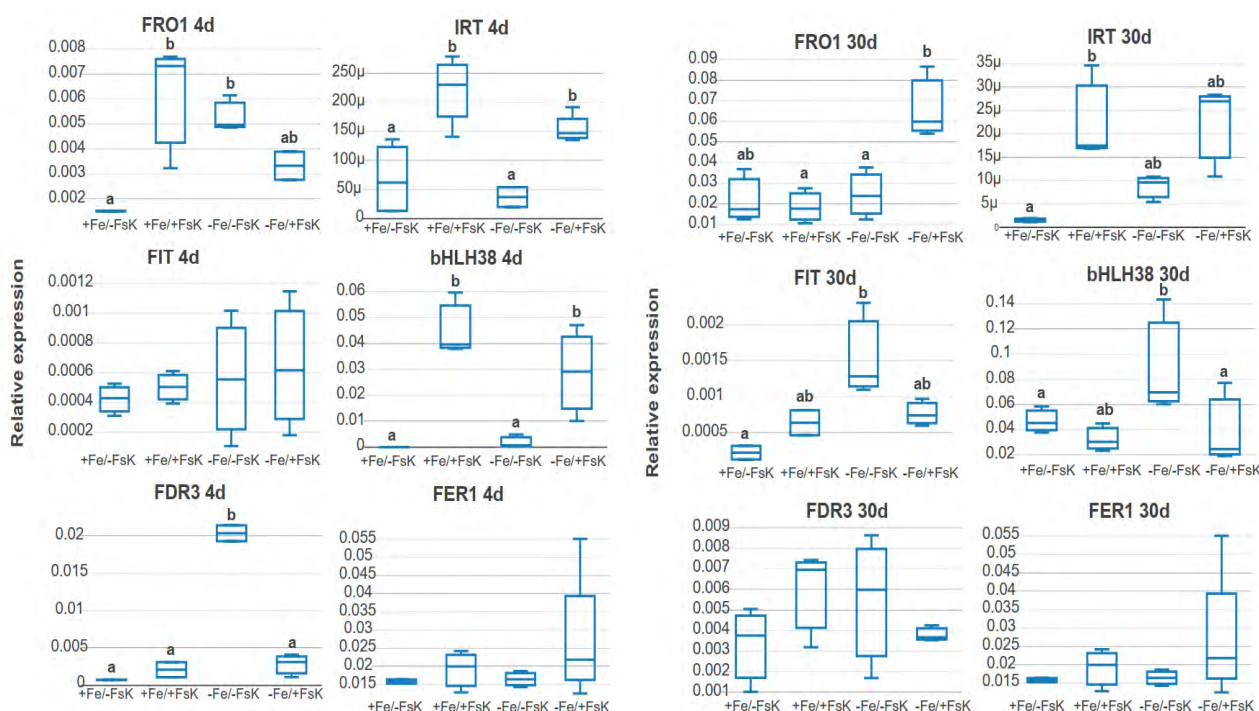
Για να αξιολογήσουμε την επίδραση του αποικισμού FSK στους μηχανισμούς πρόσληψης σιδήρου ως απόκριση στην ανεπάρκεια Fe σε μεταγραφικό επίπεδο, μελετήσαμε γονίδια που είναι γνωστό (α) ότι ρυθμίζουν την πρόσληψη Fe μέσω της Στρατηγικής I στα φυτά *L. japonicus*, π.χ. *LjFRO1*, *LjIRT1* (b) ότι εμπλέκονται στη μεταφορά σιδήρου στα φυτά, δηλαδή το γονίδιο *LjFRD3* μεταφορέα MATE, (γ) ότι παίζει ρόλο στη ρύθμιση και αποθήκευση του σιδήρου, δηλαδή το γονίδιο *LjFER1* που μοιάζει με φερριτίνη, και (δ) ως μεταγραφικοί παράγοντες που εμπλέκονται στην ομοιόσταση του Fe, π.χ. *LjFIT* και *bHLH38*^{117,124} (Εικ. 2.5).

Κάτω από συνθήκες έλλειψης Fe, στα μη αποικισμένα φυτά βρήκαμε μια επαγωγή της έκφρασης των γονιδίων *FRO1* και *FRD3*, εμφανίζοντας την αναμενόμενη γονιδιακή έκφραση στα δύο χρονικά σημεία δειγματοληψίας, καθώς και του γονιδίου *FIT* στο μεταγενέστερο στάδιο (Εικ. 2.5.A, B). Η παρουσία του ενδόφυτου κάτω από αυτές τις περιοριστικές συνθήκες οδήγησε σε επαγωγή των επιπέδων έκφρασης του γονιδίου *bHLH38* ενώ στην παρατεταμένη κατάσταση καταπόνησης των 30 ημερών (40 μέρες από τον εμβολιασμό με το μύκητα), καταγράφηκαν αυξημένα επίπεδα έκφρασης *FRO1* και *IRT* σε σύγκριση με τα μη αποικισμένα φυτά ελέγχου. Είναι ενδιαφέρον ότι τα επίπεδα έκφρασης αυτών των τριών γονιδίων προκλήθηκαν από το FSK ακόμη και σε συνθήκες επαρκούς σιδήρου στο πρώιμο χρονικό σημείο των 14dpi, υποδεικνύοντας ότι το ενδόφυτο επηρεάζει τους μηχανισμούς πρόσληψης σιδήρου στο φυτό σε μεταγραφικό επίπεδο.

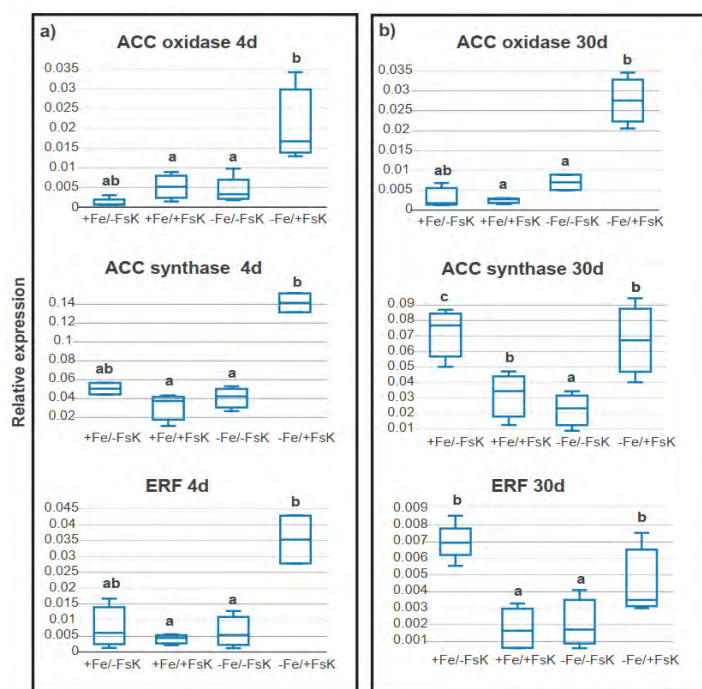
Για να διερευνήσουμε περαιτέρω τις επιδράσεις του ενδόφυτου στη μεταγραφική ρύθμιση των αποκρίσεων στην ανεπάρκεια Fe, διερευνήσαμε την καλά μελετημένη «επικοινωνία» μεταξύ της ανεπάρκειας Fe και της φυτικής ορμόνης αιθυλενίου (ET), στην οποία η πρώτη προκαλεί την έκφραση της βιοσύνθεσης και της σηματοδότησης των γονιδίων του αιθυλενίου. Από την άλλη πλευρά, έχει αποδειχθεί ότι η εξωγενής εφαρμογή αιθυλενίου ή πρόδρομων του αιθυλενίου μπορεί να αυξήσει την έκφραση των γονιδίων *FRO1* και *IRT* στο *Arabidopsis*^{97,104}. Επιπλέον, προηγούμενες μελέτες μας έχουν δείξει το αιθυλένιο ως μεσολαβητή για τον τρόπο δράσης του ενδόφυτου στα φυτά³⁹. Επομένως, συμπεριλάβαμε στη μελέτη μας τα γονίδια βιοσύνθεσης αιθυλενίου¹²⁵, το οξύτιο του 1-αμινοκυκλοπροπανο-1-καρβοξυλικού οξέος (ACO) (*Lj3g3v0652730*), τη συνθάση του 1-αμινοκυκλοπροπανο-1-καρβοξυλικού οξέος (ACS) (*Lj2g3v0909590*) και το ERF (*Lj2g3v1068730*) (Συντελεστής Απόκρισης Αιθυλενίου). Το *LjERF* έχει αποδειχθεί ότι παίζει ρόλο στη ρύθμιση της βιοσύνθεσης του αιθυλενίου στο *L. japonicus*¹¹⁸.

Ο αποικισμός από FSK των φυτών που αναπτύσσονταν υπό αστία σιδήρου οδήγησε σε σημαντική αύξηση της έκφρασης και των τριών γονιδίων *ACO*, *ACS* και *ERF* στο πρώιμο χρονικό σημείο (4 ημέρες στρες), ενώ δεν καταγράφηκε καμία επίδραση στα επίπεδα γονιδιακής έκφρασης για οποιοδήποτε από αυτά τα γονίδια σε φυτά

ελέγχου ή αποικισμένα φυτά υπό κανονικές συνθήκες ανάπτυξης. Αυτή η αλλαγή στη γονιδιακή έκφραση των τριών γονιδίων ήταν ακόμη εμφανής και στις 40 dpi στο όψιμο χρονικό σημείο δειγματοληψίας. Ωστόσο, παρατηρήθηκε και μία ανοδική ρύθμιση του *ACS* και του *ERF* στη μεταχείριση +Fe/-Fsk, υποδεικνύοντας τη διευκόλυνση της σύνθεσης ορμονών σε μεταγενέστερο στάδιο ανάπτυξης του φυτού υπό επαρκή παροχή Fe.



Εικόνα 2.5: Τα διαφορικά εκφρασμένα γονίδια πρόσληψης σιδήρου σε φυτά *L. japonicus* που αποικίστηκαν από το ενδοφύτο *Fusarium solani* στέλεχος K (+Fsk) και/ή εκτέθηκαν σε ανεπάρκεια σιδήρου (-Fe) σε σύγκριση με τα φυτά ελέγχου χωρίς στρες (+Fe/-Fsk). Οι ιστοί συλλέχθηκαν στις 14 (Α) και 40 (Β) ημέρες μετά τον εμβολιασμό (dpi). Οι τιμές είναι ο μέσος όρος±SE δύο τεχνικών επαναλήψεων για καθεμιά από τις πέντε βιολογικές επαναλήψεις. Τα επίπεδα έκφρασης για όλα τα γονίδια στόχους κανονικοποιήθηκαν ως προς τα επίπεδα έκφρασης του γονιδίου αναφοράς ουβικιτίνης. Στατιστικά σημαντικές διαφορές σε σύγκριση με δείγματα ελέγχου ανιχνεύθηκαν με ANOVA (Tukey's post-hoc tests, P < 0,05).

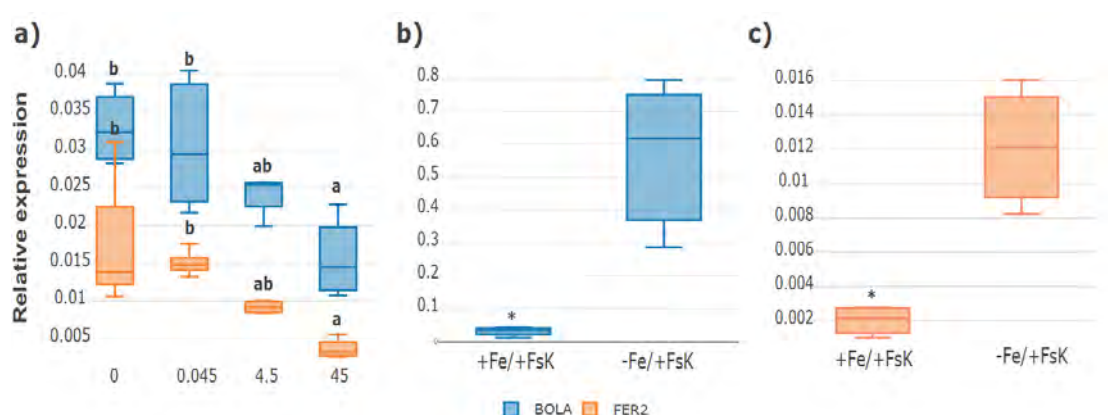


Εικόνα 2.6: Τα διαφορικά εκφρασμένα γονίδια που σχετίζονται με το αιθυλένιο σε φυτά *L. japonicus* που αποικίστηκαν από το ενδοφύτο *Fusarium solani* στέλεχος K (+Fsk) και/ή εκτέθηκαν σε ανεπάρκεια σιδήρου (-Fe) σε σύγκριση με τα φυτά ελέγχου χωρίς στρες (+Fe/-Fsk). Οι τιμές είναι ο μέσος όρος $\pm$ SE δύο τεχνικών επαναλήψεων για καθεμιά από τις πέντε βιολογικές επαναλήψεις. Τα επίπεδα έκφρασης για όλα τα γονίδια στόχους κανονικοποιήθηκαν ως προς τα επίπεδα έκφρασης του γονιδίου αναφοράς ουβικιτίνης. Στατιστικά σημαντικές διαφορές σε σύγκριση με δείγματα ελέγχου ανιχνεύθηκαν με ANOVA (Tukey's post-hoc tests, $P < 0,05$).

Το στέλεχος *Fusarium solani* K διαθέτει μια οδό πρόσληψης σιδήρου υψηλής συγγένειας.

Λαμβάνοντας υπόψη τον υψηλότερο αποικισμό της ρίζας από το Fsk όταν τα φυτά βιώνουν έλλειψη σιδήρου, αλλά και την επαγωγή γονιδίων που εμπλέκονται στην ομοιοστάση του σιδήρου απουσία οποιουδήποτε θρεπτικού στρες, ερευνήσαμε την απόκριση του μύκητα στη διαθεσιμότητα του Fe. Κάτω από περιορισμένες συνθήκες Fe, οι μύκητες χρησιμοποιούν δύο συστήματα πρόσληψης Fe υψηλής συγγένειας: ένα αναγωγικό σύστημα Fe υψηλής συγγένειας και ένα σύστημα Fe που διαμεσολαβείται από σιδηροφόρα. Για την αναγωγική οδό, ο τρισθενής σίδηρος πρέπει να αναχθεί σε δισθενή σίδηρο ¹²⁶. Έχοντας στη διάθεση μας τα αποτελέσματα των δεδομένων μεταγραφομικής της αλληλεπίδρασης Lotus-Fsk (Skiada, 2019), εντοπίσαμε δύο γονίδια που σχετίζονται με την ομοιοστάση του σιδήρου στο γονιδίωμα του Fsk, το γονίδιο *FsKFRE2* (αναγωγάση σιδήρου) και το *FsKBoIA*. Για να

αξιολογηθεί εάν η έκφραση των γονιδίων εξαρτάται από τη διαθεσιμότητα Fe, αναλύθηκαν με RT-PCR σε πραγματικό χρόνο τα επίπεδα έκφρασής τους στο μυκήλιο του *FsK* που είχε εκτεθεί σε διαφορετικές συγκεντρώσεις Fe. Η έκφραση των συστημάτων μεταφοράς Fe υψηλής συγγένειας προκαλείται συνήθως σε περιβάλλοντα με περιορισμένο Fe και καταστέλλεται σε περιβάλλοντα με επαρκή Fe. Το *FsKFRE2* παρουσίασε τα υψηλότερα επίπεδα έκφρασης στον έλεγχο του μύκητα που αναπτύχθηκε σε μέσο M-medium που περιέχει 0,045 mM Fe και 0 mM Fe. Η ανάπτυξη του μύκητα παρουσία 45 mM Fe προκάλεσε μείωση της έκφρασης των γονιδίων *FsKFRE2* και *FsKBoIA* (Εικ. 2.7). Επιβεβαιώθηκε η επαγωγή των γονιδίων αυτών και παρουσία του φυτού στις συνθήκες έλλειψη σιδήρου (Εικ.2.7.b και Εικ.2.7.c).



Εικόνα 2.7: Τα διαφορικά εκφραζόμενα γονίδια του *FsK* που σχετίζονται με τον σίδηρο. (Α) Στο μυκήλιο του *FsK* που αναπτύσσεται σε M-μέσο υπό διαφορετική συγκέντρωση σιδήρου: 0 mM, 0,045 mM, 4,5 mM ή 45 mM Fe EDTA. (Β) και (C) Σε συνθήκες έλλειψης σιδήρου σε σύγκριση με τις φυσιολογικές συνθήκες ανάπτυξης. Οι τιμές είναι ο μέσος όρος $\pm$ SE δύο τεχνικών επαναλήψεων για καθεμιά από τις πέντε βιολογικές επαναλήψεις. Τα επίπεδα έκφρασης για όλα τα γονίδια κανονικοποιήθηκαν ως προς τα επίπεδα έκφρασης του γονιδίου αναφοράς ITS. Στατιστικά σημαντικές διαφορές σε σύγκριση με δείγματα ελέγχου ανιχνεύθηκαν με ANOVA (Tukey's post-hoc tests, $P < 0,05$).

Συζήτηση

Ο αποικισμός της ρίζας του φυτού *L. japonicus* από το *FsK* είναι υψηλότερος στα φυτά που αναπτύσσονται υπό ανεπάρκεια σιδήρου σε σύγκριση με τα φυτά σε συνθήκες επαρκούς θρεπτικής αξίας, ένα αποτέλεσμα που εξομαλύνθηκε στο μεταγενέστερο χρονικό σημείο της πειραματικής μας διαδικασίας. Δεν είναι σαφές ότι το τελευταίο μπορεί να σχετίζεται με την ικανότητα του μύκητα να αποικίζει καλύτερα τους φυτικούς ιστούς υπό ανεπάρκεια θρεπτικών συστατικών. Μπορεί, εναλλακτικά, να αντανακλά το μοτίβο αποικισμού του μύκητα, το οποίο περιορίζεται κυρίως στην αγγειακή δέσμη της ρίζας (Skiada et al, 2019). Έτσι, μια ακριβής εκτίμηση της

ανάπτυξης μυκήτων μπορεί να παρεμποδιστεί από ένα αποτέλεσμα αραιώσης καθώς αυξάνεται η βιομάζα των φυτών.

Ο αποικισμός του *L. jaronicus* από το ενδόφυτο οδηγεί σε αυξημένη φυτική βιομάζα, πρόσληψη μακρο- και μικροθρεπτικών συστατικών και σε πρώιμο χρόνο ανθοφορίας.

Σε αυτή τη μελέτη, εφαρμόσαμε συνθήκες παρατεταμένης ανεπάρκειας Fe στο μοντέλο ψυχανθών *L. jaronicus*. Τα ψυχανθή, παρά την πολύπλευρη επίδρασή τους στο οικοσύστημα, συνήθως χρησιμοποιούνται ως πρότυπα φυτά για τη μελέτη κυρίως της πρόσληψης αζώτου και φωσφόρου. Ως εκ τούτου, η έκθεση των ψυχανθών φυτών υπό περιορισμένη διαθεσιμότητα Fe δεν έχει μελετηθεί και οι μοριακοί μηχανισμοί που διέπουν τις αποκρίσεις των φυτών σε αυτό το αβιοτικό στρες που σχετίζεται με τη θρέψη είναι ακόμα αδιευκρίνιστοι. Παρόλο που δεν παρατηρήσαμε εξασθένηση της ανάπτυξης των φυτών και τα τυπικά συμπτώματα μεσοφλεβικής χλώρωσης σε φυτά που καλλιεργήθηκαν υπό συνθήκες -Fe, η συσσώρευση Fe στους ιστούς των βλαστών μειώθηκε σημαντικά (περίπου 60%) υπό αυτές τις συνθήκες, υποδεικνύοντας ότι τα φυτά όντως παρουσίασαν τροφопενία Fe. Πιθανότατα, η εξαρτώμενη από την έλλειψη σιδήρου αλλαγή της μορφολογίας των φυτών μπορεί να συμβεί αργότερα σε σχέση με τις εξεταζόμενες συνθήκες. Οι ελάχιστες συγκεντρώσεις Fe και άλλων μετάλλων που είναι απαραίτητες για την ανάπτυξη των φυτών *L. jaronicus* δεν είναι γνωστές ¹²⁷ αλλά πιθανότατα υπάρχουν υπολειμματικές πηγές Fe στο σύστημα καλλιέργειας που χρησιμοποιήσαμε στα πειράματά μας (άμμος συν βερμικουλίτης), οι οποίες θα μπορούσαν να υποστηρίξουν εν μέρει την ανάπτυξη των φυτών.

Αρκετές μελέτες έχουν επίσης δείξει ότι πολλά βακτηριακά ή μυκητιακά ενδόφυτα αυξάνουν τη διαλυτοποίηση των ανόργανων θρεπτικών συστατικών στις ρίζες και τους βλαστούς των φυτών που έχουν εμβολιαστεί με αυτά και βελτιώνουν την πρόσληψη θρεπτικών συστατικών από τα φυτά ^{128,129}. Μέχρι στιγμής, σε αντίθεση με τα βακτηριακά εμβόλια, η ικανότητα των ενδοφυτικών μυκήτων να βελτιώνουν την πρόσληψη Fe στα φυτά δεν έχει διερευνηθεί ακόμη καλά. Ο εμβολιασμός με το ενδόφυτο *Serendipita indica* αύξησε τη βιομάζα των δενδρυλλίων ρυζιού και έδειξε σημαντικά υψηλότερες συγκεντρώσεις φωσφόρου (P) και ψευδαργύρου (Zn) στις ρίζες και τους βλαστούς των φυτών ¹³⁰, ενώ φάνηκε να βελτιώνει και την πρόσληψη P, νατρίου (N) και καλίου (K) στη σόγια ως αποτέλεσμα της προς τα πάνω ρύθμισης των γονιδίων μεταφοράς ¹²⁸. Σε μια μελέτη ανάπτυξης και απόκτησης θρεπτικών στοιχείων στο φυτό *Lolium perenne* διαπίστωσαν ότι η παρουσία του *Epichloë festucae* var. *lolii* αύξησε τη συγκέντρωση πολλών θρεπτικών στοιχείων σε φύλλα και ρίζες και

βελτίωσε τη συμβίωση των ριζών με ριζοβακτήρια μέσω διέγερσης της ανάπτυξης των ριζών ¹³¹.

Σε αυτή τη μελέτη, η αλληλεπίδραση του *L. japonicus* με το ενδόφυτο της ρίζας FSK οδήγησε σε αυξημένο βάρος του νωπού βλαστού και της ρίζας υπό ανεπάρκεια Fe. Ένας φαινότυπος αυξημένου όγκου του ριζικού ιστού και πολλαπλασιασμού του ήταν εμφανής στα αποικισμένα φυτά, το αποτέλεσμα αυτό είναι σύμφωνο με παρόμοιες αναφορές που παρατηρήθηκαν από τον εμβολιασμό φυτών με βακτήρια που προάγουν την ανάπτυξη των φυτών ⁸⁶. Σημειωτέων, αυτός ο φαινότυπος των αποικισμένων φυτών καταγράφηκε ακόμη και υπό κανονικές συνθήκες παροχής Fe (Εικ.2.2), αν και η βιομάζα της φρέσκιας ρίζας δεν αυξήθηκε σημαντικά σε σύγκριση με τα μη αποικισμένα φυτά. Υποστηρίζουμε ότι αυτό μπορεί να αντανάκλα μια λεπτή επίδραση που δεν μπορέσαμε να τεκμηριώσουμε επαρκώς σε αυτήν την τρέχουσα πειραματική διάταξη, αλλά αξίζει περαιτέρω προσοχής, καθώς οι επιδράσεις στην αρχιτεκτονική των ριζών από τα ενδόφυτα είναι ένα ελάχιστα μελετημένο αλλά σημαντικό χαρακτηριστικό για τον εντοπισμό εναλλακτικών μέσων για τη βελτίωση της αβιοτικής καταπόνησης στα φυτά. Επιπλέον, ένας προγενέστερος φαινότυπος ανθοφορίας καταγράφηκε σε όλα τα φυτά που αποικίστηκαν από το ενδόφυτο, ανεξάρτητα από τη θρεπτική κατάσταση του φυτού.

Παρουσία του ενδόφυτο, η συσσώρευση σιδήρου στις 40 dpi αποκαταστάθηκε πλήρως και έμοιαζε με τις συγκεντρώσεις συνθηκών πλήρους θρεπτικών συστατικών. Επιπλέον, ο εμβολιασμός με FSK συσχετίστηκε με σημαντική αύξηση της συγκέντρωσης μακρο- (P, Mg, Ca, K) και μικροθρεπτικών συστατικών (Mn, Zn, Mo, Co, Ni, Cu) στα φύλλα σε πρώιμο στάδιο έλλειψης σιδήρου (14dpi). Αυτό δεν καταγράφηκε για τον Fe, η συγκέντρωση του οποίου αυξήθηκε σαφώς σε αποικισμένα φυτά υπό συνθήκες περιορισμένου σιδήρου μόνο σε μεταγενέστερο στάδιο (40 dpi/ 30 ημέρες καταπόνησης). Πιθανότατα, αυτό να οφείλεται στην αργή απορρόφηση του σιδήρου από το θρεπτικό και λόγω της αργής κινητοποίησής του στο πάνω μέρος του φυτού.

Η έκφραση των γονιδίων πρόσληψης σιδήρου μεταβάλλεται από το ενδόφυτο

Σε μεταγραφικό επίπεδο, καταγράφηκαν αυξημένα επίπεδα γονιδίων που σχετίζονται με την πρόσληψη και τη μεταφορά Fe, όπως το *FRO1* και το κύριο ρυθμιστικό γονίδιο *FIT* που αποκρίνεται σε ανεπάρκεια Fe ^{132,133} καθώς και ο μεταφορέας MATE του Fe στο ξυλώμα *FRD3* που έχει αναφερθεί ότι επάγεται από ανεπάρκεια Fe ^{113,132-134} (Εικ.2.5), επιβεβαιώνοντας περαιτέρω τον αποτελεσματικό περιορισμό της διαθεσιμότητας Fe στην πειραματική μας μεταχείριση. Ωστόσο, ενδιαφέρον είχε η αυξημένη έκφραση των βασικών γονιδίων, όπως το *FRO1* και το *IRT*, παρουσία του ενδοφυτικού μύκητα και απουσία συνθηκών ανεπάρκειας Fe. Αν

και τα επίπεδα Fe στους φυτικούς ιστούς δεν αυξήθηκαν περαιτέρω, θα μπορούσε να υποδηλώνει μια κατάσταση βελτιωμένης πρόσληψης και χρήσης θρεπτικών συστατικών από το φυτό με τη μεσολάβηση του ενδόφυτου σε μεταγραφικό επίπεδο. Αυτό υποστηρίζεται από τα αυξημένα επίπεδα όλων των άλλων θρεπτικών συστατικών κατά την αλληλεπίδραση φυτού-ενδόφυτου. Επιπλέον, ένα σαφές αποτέλεσμα της παρουσίας του ενδόφυτου είναι η ισχυρή επαγωγή του μεταγραφικού παράγοντα *bHLH38*, ο οποίος έχει προηγουμένως αποδειχθεί ότι συμμετέχει στο μονοπάτι σηματοδότησης Fe και επάγεται έντονα υπό ανεπάρκεια Fe¹³⁵. Παρόμοια αποτελέσματα που παρατηρήθηκαν για τα γονίδια *FRO1* και *IRT*, στο πρώιμο στάδιο της έλλειψης Fe, εντοπίστηκαν και σε φυσιολογικές συνθήκες με τα γονίδια να επάγονται από το ενδόφυτο. Πρόσφατα, αποδείχθηκε ότι, στο *Arabidopsis*, ο μεταγραφικός παράγοντας *bHLH38* ρυθμίζει αρνητικά τον χρόνο ανθοφορίας υπό έλλειψη σιδήρου¹³⁵. Έτσι, η διαφορική ρύθμιση του *bHLH38* μπορεί να είναι ένας μοριακός μηχανισμός δράσης που οδηγεί στον προγενέστερο φαινότυπο ανθοφορίας που παρατηρείται σε φυτά που αποικίζονται από το ενδόφυτο. Στο τελευταίο στάδιο της ανεπάρκειας Fe στη μελέτη μας, σε σύγκριση με φυτά που δεν αποικίστηκαν από το ενδόφυτο, μετρήσαμε μειωμένα επίπεδα έκφρασης άλλων ρυθμιστικών γονιδίων, όπως στο κύριο ρυθμιστή απόκρισης στην έλλειψη σιδήρου και την ομοιόσταση του (τουλάχιστον στο *Arabidopsis*), το FIT καθώς και στην αντλία εκροής-FRD3, η οποία πρόσφατα χαρακτηρίστηκε ως μεταφορέας πολλαπλών φαρμάκων και ανήκει στην οικογένεια εκρών MATE. Θεωρείται ότι μεταφέρει κιτρικό και σύμπλοκο Fe στο ξύλωμα και συμμετέχει στη σηματοδότηση έλλειψης σιδήρου. Αυτό απεικονίζει σε μεταφραστικό επίπεδο ότι τα φυτά παύουν να βιώνουν το στρες. Το αποτέλεσμα αυτό συμφωνεί με την αποκατάσταση της περιεκτικότητας σε Fe σε επαρκή επίπεδα και επιβεβαιώνει περαιτέρω την ικανότητα του ενδόφυτου να βοηθά το φυτό να μετριάσει την κατάσταση καταπόνησης που βιώνει.

Τα γονίδια που σχετίζονται με το αιθυλένιο ενισχύονται από το ενδόφυτο

Στη μελέτη μας, καταγράψαμε επίσης σημαντικές αλλαγές στα γονίδια που σχετίζονται με το αιθυλένιο σε φυτά που αποικίστηκαν με το ενδόφυτο σε σύγκριση με τα μη αποικισμένα φυτά που βρίσκονται σε ανεπάρκεια Fe. Στο *Lotus*, δεν παρατηρήσαμε την επαγωγή γονιδίων βιοσύνθεσης αιθυλενίου από ανεπάρκεια Fe που αναφέρθηκε για το *Arabidopsis thaliana*, τουλάχιστον όχι υπό τις συνθήκες που δοκιμάστηκαν εδώ. Ωστόσο, τα αποτελέσματά μας δείχνουν ότι το FSK δρα τόσο στη βιοσύνθεση όσο και στην οδό σηματοδότησης του αιθυλενίου. Αυτό το εύρημα συμφωνεί και συμπληρώνει προηγούμενες αναφορές μας για το αιθυλένιο ως μεσολαβητή για τον τρόπο δράσης του ενδόφυτου στην προστασία των φυτών τομάτας από παθογόνα ριζών και φυλλωμάτων³⁹. Απαιτείται περαιτέρω διερεύνηση

για να χαρακτηριστούν οι συγκεκριμένες πτυχές της ρύθμισης από το FSK των συστημικών αποκρίσεων των φυτών και να κατανοηθούν οι αλληλεπιδράσεις μεταξύ Fe και αιθυλενίου που αποτελούν τον τρόπο δράσης που χρησιμοποιείται από το ενδόφυτο για την αύξηση της ανοχής των φυτών σε συνθήκες καταπόνησης θρεπτικών συστατικών.

Ο αποικισμός της ρίζας του *L. japonicus* από το FSK ήταν υψηλότερος στα φυτά που αναπτύχθηκαν με ανεπάρκεια Fe σε σύγκριση με τα φυτά με επάρκεια Fe, ένα αποτέλεσμα που εξομαλύνθηκε στο μεταγενέστερο χρονικό σημείο της πειραματικής μας μεταχείρισης. Αυτή η ικανότητα του μύκητα να αποικίζει καλύτερα τους φυτικούς ιστούς υπό ανεπάρκεια θρεπτικών συστατικών, μπορεί να σχετίζεται με το μοτίβο αποικισμού του μύκητα, το οποίο περιορίζεται κυρίως στην αγγειακή δέσμη της ρίζας (Skiada et al, 2019). Έτσι, μια ακριβής εκτίμηση της ανάπτυξης των μυκήτων μπορεί να παρεμποδίζεται ως αποτέλεσμα αραίωσης καθώς αυξάνεται η βιομάζα των φυτών.

Το στέλεχος *Fusarium solani* K (FSK) χρησιμοποιεί μια οδό πρόσληψης σιδήρου υψηλής συγγένειας

Έχει αποδειχθεί ότι οι μύκητες βελτιώνουν την απόκτηση Fe στα φυτά ξενιστές τους, ωστόσο πολύ λίγα είναι γνωστά για τους μηχανισμούς που διέπουν την απόκτηση Fe από τους μύκητες. Τα αποτελέσματά μας καταδεικνύουν για πρώτη φορά ότι ο ενδοφυτικός μύκητας *Fusarium solani* στέλεχος K διαθέτει ένα υψηλής συγγένειας αναγωγικό σύστημα πρόσληψης Fe που αποτελείται από αναγωγή σιδήρου. Έχουμε αποδείξει ότι η ανεπάρκεια Fe επάγει την ενεργοποίηση μιας αναγωγικής σιδήρου, ενός ενζύμου που μετατρέπει την αδιάλυτη μορφή Fe(III) στην πιο διαλυτή Fe(II).

Η πρόσληψη του Fe από τους μικροοργανισμούς περιλαμβάνει παρόμοια στρατηγική με αυτή των φυτών. Περιλαμβάνει τη χηλοποίηση του μη διαθέσιμου Fe από συγκεκριμένα ή από μια σειρά από σιδεροφόρα ή/και τη χρήση αναγωγαστών που βοηθούν στην αύξηση του διαθέσιμου εξωκυτταρικού Fe για πρόσληψη από τους μικροοργανισμούς ^{136,137}. Στη μελέτη μας, ο *in vitro*-επαγόμενος περιορισμός διαθεσιμότητας Fe οδηγεί σε επαγωγή δύο γονιδίων του μύκητα που υποτίθεται ότι κωδικοποιούν πρωτεΐνες με καλά εδραιωμένο ρόλο στους ευκαρυώτες στην πρόσληψη και την ομοιοστάση του Fe. Το ένα γονίδιο είναι μία αναγωγάση του σιδήρου που δρα στην επιφάνεια του κυττάρου και για να λειτουργήσει σχηματίζει μαζί με ένζυμα εξαρτώμενα από το σύμπλεγμα Fe-S και παράγοντες μεταγραφής που ελέγχουν τον μεταβολισμό του Fe, ετεροδιμερή για τη διακίνηση συμπλεγμάτων [2Fe-2S]. Το άλλο γονίδιο είναι η πρωτεΐνη BofA, με ομολογία με πρωτεΐνες που έχουν αποδειχθεί ότι ελέγχουν τη ρύθμιση και την πρόσληψη Fe σε ζυμομύκητες και ανθρώπους ¹²² και ότι έχουν ρόλο στη λοιμογόνο δράση παθογόνων μυκήτων ¹³⁸.

Στους νηματοειδείς μύκητες, λεπτομέρειες των σηματοδοτικών και κυτταρικών μηχανισμών που διαμεσολαβούνται από αυτές τις δύο εξαιρετικά διατηρημένες οικογένειες ρυθμιστικών πρωτεϊνών δεν είναι καλά γνωστές. Η επαγωγή των δύο ρυθμιστικών γονιδίων στην ενδοφυτική κατάσταση του μύκητα υποδηλώνει ότι τόσο το φυτό όσο και τα ενδόφυτα βρίσκονται σε καταπόνηση θρεπτικών συστατικών. Υποστηρίζουμε ότι, υπό συνθήκες χαμηλής διαθεσιμότητας Fe, ο μύκητας ρυθμίζει προς τα πάνω τους μηχανισμούς πρόσληψης Fe, γεγονός που έχει ως αποτέλεσμα όφελος στην απόκτηση θρεπτικών συστατικών και για το φυτό. Αυτό το αμοιβαίο κέρδος στην αλληλεπίδραση ξενιστή-μικροβίου μπορεί επίσης να εξηγήσει τα αυξημένα επίπεδα αποικισμού που παρατηρήσαμε στους ιστούς της ρίζας υπό συνθήκες καταπόνησης θρεπτικών συστατικών. Οι αλληλεπιδράσεις φυτού-μύκητα στις οποίες ένα ευεργετικό στέλεχος μυκήτων ανταλλάσσει θρεπτικά συστατικά για να αποκτήσει πρόσβαση στους ιστούς της ρίζας εξηγούνται επαρκώς, στη συμβίωση των μυκκοριζικών μυκήτων με τα φυτά, που είναι η καλύτερα μελετημένη περίπτωση όσον αφορά την απόκτηση φωσφόρου. Η αλληλεπίδραση Lotus-FsK φαινομενικά προσφέρει ένα κατάλληλο σύστημα για την κατανόηση των μοριακών μηχανισμών για τη συμβιωτική απόκτηση άλλων θρεπτικών συστατικών όπως ο σίδηρος και άλλα μέταλλα. Αυτό είναι εξαιρετικά σημαντικό καθώς μπορεί να ρίξει φως στην αποτελεσματική χρήση μικροβιακών εμβολίων για την αντιμετώπιση της αγρονομικής πρόκλησης για ενίσχυση της διαθεσιμότητας μικροθρεπτικών συστατικών και της βελτίωσης της ποιότητας και της απόδοσης των καλλιεργειών, ελαχιστοποιώντας ταυτόχρονα τις εισροές ανόργανων λιπασμάτων.

Συμπεράσματα

Εδώ, έχουμε αποδείξει ότι ο ενδοφυτικός μύκητας FsK είναι σε θέση να αποικίσει τα φυτά σε απουσία σιδήρου και αυξάνει την ανοχή των φυτών στο στρες. Ο FsK εξακολουθεί να είναι ικανός να προάγει την ανάπτυξη των φυτών μέσω του νωπού βάρους των βλαστών και των ριζών και τα φυτά που εμβολιάστηκαν με μύκητα παρουσίασαν νωρίτερο χρόνο άνθησης υπό συνθήκες αβιοτικού στρες. Ο ενδοφυτικός μύκητας ενίσχυσε την πρόσληψη μακροθρεπτικών από τα φυτά (P, K, Ca και Mg) και μικροθρεπτικών συστατικών (Fe, Cu, Zn, Mn, Mo, Co, Ni) χωρίς συνθήκες στρες. Επιπλέον, ο FsK είναι σε θέση να επάγει τα γονίδια *FRO* και *IRT* σε υψηλότερο βαθμό σε εμβολιασμένα φυτά σε σύγκριση με μη εμβολιασμένα, γεγονός που υποδηλώνει ότι ο FsK είναι ικανός να επάγει την αναγωγή του Fe^{3+} . Η οδός σηματοδότησης του αιθυλενίου ενδείκνυται για τον τρόπο δράσης που χρησιμοποιείται από τον FsK για να προσδώσει αντίσταση σε φυτά υπό συνθήκες ανεπάρκειας Fe. Τα δεδομένα μας έδειξαν ότι ο FsK έπαιξε σημαντικό ρόλο στην ενίσχυση της ανάπτυξης των φυτών σε συνθήκες έλλειψης σιδήρου, υποδηλώνοντας τη δυναμικότητά του ως εμβόλιο για καλλιέργειες ψυχανθών.

Βιβλιογραφία

1. Gepts P, Beavis WD, Brummer EC, et al. Legumes as a model plant family. Genomics for food and feed report of the cross-legume advances through genomics conference. *Plant Physiol.* 2005;137(4):1228-1235. doi:10.1104/pp.105.060871
2. Udvardi MK, Tabata S, Parniske M, Stougaard J. Lotus japonicus: Legume research in the fast lane. *Trends Plant Sci.* 2005;10(5):222-228. doi:10.1016/j.tplants.2005.03.008
3. Graham PH, Vance CP. Legumes: Importance and constraints to greater use. *Plant Physiol.* 2003;131(3):872-877. doi:10.1104/pp.017004
4. Handberg K, Stougaard J. for Classical and Molecular Genetics. *Plant J.* 1992;2(4):487-496.
5. Jiang Q, Gresshoff PM. Classical and molecular genetics of the model legume Lotus japonicus. *Mol Plant-Microbe Interact.* 1997;10(1):59-68. doi:10.1094/MPMI.1997.10.1.59
6. Sato S, Nakamura Y, Kaneko T, et al. Genome structure of the legume, Lotus japonicus. *DNA Res.* 2008;15(4):227-239. doi:10.1093/dnares/dsn008
7. Mun T, Bachmann A, Gupta V, Stougaard J, Andersen SU. Lotus Base: An integrated information portal for the model legume Lotus japonicus. *Sci Rep.* 2016;6:1-18. doi:10.1038/srep39447
8. V S. Nitrogen in crop production : An account of global flows adds. *Global Biogeochem Cycles.* 1999;13(2):647-662.
9. Oldroyd GED. Speak, friend, and enter: Signalling systems that promote beneficial symbiotic associations in plants. *Nat Rev Microbiol.* 2013;11(4):252-263. doi:10.1038/nrmicro2990
10. Bever JD, Simms EL. Evolution of nitrogen fixation in spatially structured populations of Rhizobium. *Heredity (Edinb).* 2000;85(4):366-372. doi:10.1046/j.1365-2540.2000.00772.x
11. Parniske M. Arbuscular mycorrhiza: The mother of plant root endosymbioses. *Nat Rev Microbiol.* 2008;6(10):763-775. doi:10.1038/nrmicro1987
12. Choi J, Summers W, Paszkowski U. Annual Review of Phytopathology Mechanisms Underlying Establishment of Arbuscular Mycorrhizal Symbioses. *Annu Rev Phytopathol.* 2018;56(May):7-8. <https://doi.org/10.1146/annurev-phyto-080516->
13. Afkhami ME, Almeida BK, Hernandez DJ, Kiesewetter KN, Revillini DP. Tripartite mutualisms as models for understanding plant-microbial interactions. *Curr Opin Plant Biol.* 2020;56:28-36. doi:10.1016/j.pbi.2020.02.003
14. Tsiknia M, Tsikou D, Papadopoulou KK, Ehaliotis C. Multi-species relationships in legume roots: From pairwise legume-symbiont interactions to the plant - Microbiome - soil continuum. *FEMS Microbiol Ecol.* 2021;97(2):1-16. doi:10.1093/femsec/fiaa222
15. Larimer AL, Clay K, Bever JD. Synergism and context dependency of interactions between arbuscular mycorrhizal fungi and rhizobia with a prairie legume. *Ecology.* 2014;95(4):1045-1054. doi:10.1890/13-0025.1

16. Brader G, Compant S, Vescio K, et al. Ecology and Genomic Insights into Plant-Pathogenic and Plant-Nonpathogenic Endophytes. *Annu Rev Phytopathol.* 2017;55:61-83. doi:10.1146/annurev-phyto-080516-035641
17. Wilson D. Endophyte: The Evolution of a Term, and Clarification of Its Use and Definition. *Oikos.* 1995;73(2):274. doi:10.2307/3545919
18. White JF. An Overview of Endophytic Microbes: Endophytism Defined. *Microb Endophytes.* 2020;(January 2000):17-44. doi:10.1201/9781482277302-1
19. Rodriguez RJ, White JF, Arnold AE, Redman RS. Fungal endophytes: Diversity and functional roles: Tansley review. *New Phytol.* 2009;182(2):314-330. doi:10.1111/j.1469-8137.2009.02773.x
20. Varma A, Verma S, Sudha, Sahay N, Bütehorn B, Franken P. Piriformospora indica, a cultivable plant-growth-promoting root endophyte. *Appl Environ Microbiol.* 1999;65(6):2741-2744. doi:10.1128/aem.65.6.2741-2744.1999
21. Waller F, Achatz B, Baltruschat H, et al. The endophytic fungus Piriformospora indica reprograms barley to salt-stress tolerance, disease resistance, and higher yield. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 2005;102(38):13386-13391. doi:10.1073/pnas.0504423102
22. Baltruschat H, Fodor J, Harrach BD, et al. Salt tolerance of barley induced by the root endophyte Piriformospora indica is associated with a strong increase in antioxidants. *New Phytol.* 2008;180(2):501-510. doi:10.1111/j.1469-8137.2008.02583.x
23. Rai M, Acharya D, Singh A, Varma A. Positive growth responses of the medicinal plants Spilanthes calva and Withania somnifera to inoculation by Piriformospora indica in a field trial. *Mycorrhiza.* 2001;11(3):123-128. doi:10.1007/s005720100115
24. Das A, Kamal S, Shakil NA, et al. The root endophyte fungus Piriformospora indica leads to early flowering, higher biomass and altered secondary metabolites of the medicinal plant, Coleus forskohlii. *Plant Signal Behav.* 2012;7(1):103-112. doi:10.4161/psb.7.1.18472
25. Abdelaziz ME, Kim D, Ali S, Fedoroff N V., Al-Babili S. The endophytic fungus Piriformospora indica enhances Arabidopsis thaliana growth and modulates Na⁺/K⁺ homeostasis under salt stress conditions. *Plant Sci.* 2017;263(May):107-115. doi:10.1016/j.plantsci.2017.07.006
26. Hiruma K, Gerlach N, Sacristán S, et al. Root Endophyte Colletotrichum tofieldiae Confers Plant Fitness Benefits that Are Phosphate Status Dependent. *Cell.* 2016;165(2):464-474. doi:10.1016/j.cell.2016.02.028
27. Pagare S, Bhatia M, Tripathi N, Pagare S, Bansal YK. Secondary metabolites of plants and their role: Overview. *Curr Trends Biotechnol Pharm.* 2015;9(3):293-304.
28. García-Calderón M, Pérez-Delgado CM, Palove-Balang P, Betti M, Márquez AJ. Flavonoids and isoflavonoids biosynthesis in the model legume lotus japonicus; connections to nitrogen metabolism and photorespiration. *Plants.* 2020;9(6):1-22. doi:10.3390/plants9060774
29. Krokida A, Delis C, Geisler K, et al. A metabolic gene cluster in Lotus japonicus discloses novel enzyme functions and products in triterpene biosynthesis. *New Phytol.* 2013;200(3):675-690. doi:10.1111/nph.12414
30. Toll D. Biosynthesis and Biological Functions of Terpenoids in Plants. *Adv Biochem*

- Eng Biotechnol.* 2014;123(July 2015):127-141. doi:10.1007/10
31. Thimmappa R, Geisler K, Louveau T, O'Maille P, Osbourn A. Triterpene biosynthesis in plants. *Annu Rev Plant Biol.* 2014;65(September):225-257. doi:10.1146/annurev-arplant-050312-120229
 32. Vincken J, Heng L, Groot A De, Gruppen H. Saponins , classification and occurrence in the plant kingdom. 2007;68:275-297. doi:10.1016/j.phytochem.2006.10.008
 33. Kushiro T, Shibuya M, Ebizuka Y. β -Amyrin synthase Cloning of oxidosqualene cyclase that catalyzes the formation of the most popular triterpene among higher plants. 244:238-244.
 34. Delis C, Krokida A, Georgiou S, et al. Role of lupeol synthase in *Lotus japonicus* nodule formation. *New Phytol.* 2011;189(1):335-346. doi:10.1111/j.1469-8137.2010.03463.x
 35. Summerell BA. Resolving *Fusarium*: Current Status of the Genus. *Annu Rev Phytopathol.* 2019;57:323-339. doi:10.1146/annurev-phyto-082718-100204
 36. Ma LJ, Geiser DM, Proctor RH, et al. *Fusarium* pathogenomics. *Annu Rev Microbiol.* 2013;67:399-416. doi:10.1146/annurev-micro-092412-155650
 37. Moretti A. Taxonomy of *Fusarium* genus: A continuous fight between lumpers and splitters. *Zb Matice Srpske Akad. Nauk.* 2009;(117):7-13. doi:10.2298/zmspn0917007m
 38. Fourie G, Steenkamp ET, Ploetz RC, Gordon TR, Viljoen A. Current status of the taxonomic position of *Fusarium oxysporum* formae specialis *cubense* within the *Fusarium oxysporum* complex. *Infect Genet Evol.* 2011;11(3):533-542. doi:10.1016/j.meegid.2011.01.012
 39. Kavroulakis N, Ntougias S, Zervakis GI, Ehaliotis C, Haralampidis K, Papadopoulou KK. Role of ethylene in the protection of tomato plants against soil-borne fungal pathogens conferred by an endophytic *Fusarium solani* strain. *J Exp Bot.* 2007;58(14):3853-3864. doi:10.1093/jxb/erm230
 40. Pappas ML, Liapoura M, Papantoniou D, et al. The beneficial endophytic fungus *Fusarium solani* strain K alters tomato responses against spider mites to the benefit of the plant. *Front Plant Sci.* 2018;9. doi:10.3389/fpls.2018.01603
 41. Garantonakis N, Pappas ML, Varikou K, et al. Tomato inoculation with the endophytic strain *Fusarium solani* K results in reduced feeding damage by the zoophytophagous predator *nesidiocoris tenuis*. *Front Ecol Evol.* 2018;6(AUG):1-7. doi:10.3389/fevo.2018.00126
 42. Papadopoulou KK, Papadakis IE, Kavroulakis N, Doupis G, Ehaliotis C. Tolerance of tomato plants to water stress is improved by the root endophyte *Fusarium solani* FsK. *Rhizosphere.* 2018;6(March):77-85. doi:10.1016/j.rhisph.2018.04.003
 43. Skiada V, Faccio A, Kavroulakis N, Genre A, Bonfante P, Papadopoulou KK. Colonization of legumes by an endophytic *Fusarium solani* strain FsK reveals common features to symbionts or pathogens. *Fungal Genet Biol.* 2019;127(March):60-74. doi:10.1016/j.fgb.2019.03.003
 44. Skiada V, Avramidou M, Bonfante P, Genre A, Papadopoulou KK. An endophytic *Fusarium*–legume association is partially dependent on the common symbiotic signalling pathway. *New Phytol.* 2020;226(5):1429-1444. doi:10.1111/nph.16457
 45. Hill RA, Connolly JD. Triterpenoids. *Nat Prod Rep.* 2020;37(7):962-998.

doi:10.1039/c9np00067d

46. Papadopoulou K, Melton RE, Leggett M, Daniels MJ, Osbourn AE. Compromised disease resistance in saponin-deficient plants. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 1999;96(22):12923-12928. doi:10.1073/pnas.96.22.12923
47. Kemen AC, Honkanen S, Melton RE, et al. Investigation of triterpene synthesis and regulation in oats reveals a role for β -amyrin in determining root epidermal cell patterning. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 2014;111(23):8679-8684. doi:10.1073/pnas.1401553111
48. Confalonieri M, Cammareri M, Biazzi E, et al. Enhanced triterpene saponin biosynthesis and root nodulation in transgenic barrel medic (*Medicago truncatula* Gaertn.) expressing a novel β -amyrin synthase (AsOXA1) gene. *Plant Biotechnol J*. 2009;7(2):172-182. doi:10.1111/j.1467-7652.2008.00385.x
49. Qi X, Bakht S, Leggett M, Maxwell C, Melton R, Osbourn A. A gene cluster for secondary metabolism in oat: Implications for the evolution of metabolic diversity in plants. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 2004;101(21):8233-8238. doi:10.1073/pnas.0401301101
50. Osbourn A. Secondary metabolic gene clusters: Evolutionary toolkits for chemical innovation. *Trends Genet*. 2010;26(10):449-457. doi:10.1016/j.tig.2010.07.001
51. Iturbe-Ormaetxe I, Haralampidis K, Papadopoulou K, Osbourn AE. Molecular cloning and characterization of triterpene synthases from *Medicago truncatula* and *Lotus japonicus*. *Plant Mol Biol*. 2003;51(5):731-743. doi:10.1023/A:1022519709298
52. Fukai E, Stougaard J, Hayashi M. Activation of an Endogenous Retrotransposon Associated with Epigenetic Changes in *Lotus japonicus* : A Tool for Functional Genomics in Legumes . *Plant Genome*. 2013;6(3):1-11. doi:10.3835/plantgenome2013.04.0009
53. Boisson-Dernier A, Chabaud M, Garcia F, Bécard G, Rosenberg C, Barker DG. *Agrobacterium rhizogenes*-transformed roots of *Medicago truncatula* for the study of nitrogen-fixing and endomycorrhizal symbiotic associations. *Mol Plant-Microbe Interact*. 2001;14(6):695-700. doi:10.1094/MPMI.2001.14.6.695
54. Huang AC, Jiang T, Liu YX, et al. A specialized metabolic network selectively modulates *Arabidopsis* root microbiota. *Science (80-)*. 2019;364(6440). doi:10.1126/science.aau6389
55. Zhong Y, Xun W, Wang X, et al. Root-secreted bitter triterpene modulates the rhizosphere microbiota to improve plant fitness. *Nat Plants*. 2022;8(8):887-896. doi:10.1038/s41477-022-01201-2
56. Bisseling T, Geurts R. Specificity in legume nodule symbiosis. *Science (80-)*. 2020;369(6504):620-621. doi:10.1126/science.abd3857
57. Poole P, Ramachandran V, Terpolilli J. Rhizobia: From saprophytes to endosymbionts. *Nat Rev Microbiol*. 2018;16(5):291-303. doi:10.1038/nrmicro.2017.171
58. De Boer W, Folman LB, Summerbell RC, Boddy L. Living in a fungal world: Impact of fungi on soil bacterial niche development. *FEMS Microbiol Rev*. 2005;29(4):795-811. doi:10.1016/j.femsre.2004.11.005
59. Zhang W, Li XG, Sun K, et al. Mycelial network-mediated rhizobial dispersal enhances

- legume nodulation. *ISME J.* 2020;14(4):1015-1029. doi:10.1038/s41396-020-0587-5
60. Chang HX, Noel ZA, Chilvers MI. A β -lactamase gene of *Fusarium oxysporum* alters the rhizosphere microbiota of soybean. *Plant J.* 2021;106(6):1588-1604. doi:10.1111/tpj.15257
 61. Zhang L, Xu M, Liu Y, Zhang F, Hodge A, Feng G. Carbon and phosphorus exchange may enable cooperation between an arbuscular mycorrhizal fungus and a phosphate-solubilizing bacterium. *New Phytol.* 2016;210(3):1022-1032. doi:10.1111/nph.13838
 62. Xie XG, Zhang FM, Yang T, Chen Y, Li XG, Dai CC. Endophytic fungus drives nodulation and N₂ fixation attributable to specific root exudates. *MBio.* 2019;10(4):1-20. doi:10.1128/mBio.00728-19
 63. Wang X, Feng H, Wang Y, et al. Mycorrhizal symbiosis modulates the rhizosphere microbiota to promote rhizobia–legume symbiosis. *Mol Plant.* 2021;14(3):503-516. doi:10.1016/j.molp.2020.12.002
 64. Zhang W, Luo X, Mei YZ, et al. Priming of rhizobial nodulation signaling in the mycosphere accelerates nodulation of legume hosts. *New Phytol.* 2022;235(3):1212-1230. doi:10.1111/nph.18192
 65. Deveau A, Bonito G, Uehling J, et al. Bacterial-fungal interactions: Ecology, mechanisms and challenges. *FEMS Microbiol Rev.* 2018;42(3):335-352. doi:10.1093/femsre/fuy008
 66. Worrich A, Stryhanyuk H, Musat N, et al. Mycelium-mediated transfer of water and nutrients stimulates bacterial activity in dry and oligotrophic environments. *Nat Commun.* 2017;8(June). doi:10.1038/ncomms15472
 67. Larimer AL, Bever JD, Clay K. The interactive effects of plant microbial symbionts: A review and meta-analysis. *Symbiosis.* 2010;51(2):139-148. doi:10.1007/s13199-010-0083-1
 68. Abd-Alla MH, El-Enany AWE, Nafady NA, Khalaf DM, Morsy FM. Synergistic interaction of *Rhizobium leguminosarum* bv. *viciae* and arbuscular mycorrhizal fungi as a plant growth promoting biofertilizers for faba bean (*Vicia faba* L.) in alkaline soil. *Microbiol Res.* 2014;169(1):49-58. doi:10.1016/j.micres.2013.07.007
 69. Dabré ÉE, Hijri M, Favret C. Influence on Soybean Aphid by the Tripartite Interaction between Soybean, a *Rhizobium* Bacterium, and an Arbuscular Mycorrhizal Fungus. *Microorganisms.* 2022;10(6). doi:10.3390/microorganisms10061196
 70. Mickelbart M V., Hasegawa PM, Bailey-Serres J. Genetic mechanisms of abiotic stress tolerance that translate to crop yield stability. *Nat Rev Genet.* 2015;16(4):237-251. doi:10.1038/nrg3901
 71. Fujita M, Fujita Y, Noutoshi Y, et al. Crosstalk between abiotic and biotic stress responses: a current view from the points of convergence in the stress signaling networks. *Curr Opin Plant Biol.* 2006;9(4):436-442. doi:10.1016/j.pbi.2006.05.014
 72. Ahmad P, Abdel Latif AAH, Rasool S, Akram NA, Ashraf M, Gucel S. Role of proteomics in crop stress tolerance. *Front Plant Sci.* 2016;7(September):1-14. doi:10.3389/fpls.2016.01336
 73. Rao DE, Chaitanya K V. Photosynthesis and antioxidative defense mechanisms in deciphering drought stress tolerance of crop plants. *Biol Plant.* 2016;60(2):201-218.

doi:10.1007/s10535-016-0584-8

74. Glynou K, Ali T, Buch AK, et al. The local environment determines the assembly of root endophytic fungi at a continental scale. *Environ Microbiol.* 2016;18(8):2418-2434. doi:10.1111/1462-2920.13112
75. Pietikäinen J, Pettersson M, Bååth E. Comparison of temperature effects on soil respiration and bacterial and fungal growth rates. *FEMS Microbiol Ecol.* 2005;52(1):49-58. doi:10.1016/j.femsec.2004.10.002
76. Liu A, Wang B, Hamel C. Arbuscular mycorrhiza colonization and development at suboptimal root zone temperature. *Mycorrhiza.* 2004;14(2):93-101. doi:10.1007/s00572-003-0242-9
77. Lv Z, Zhao M, Wang W, et al. Changing Gly311 to an acidic amino acid in the MATE family protein DTX6 enhances Arabidopsis resistance to the dihydropyridine herbicides. *Mol Plant.* 2021;14(12):2115-2125. doi:10.1016/j.molp.2021.09.002
78. Chen J, Su Y, Lin R, et al. Effects of Acute Diquat Poisoning on Liver Mitochondrial Apoptosis and Autophagy in Ducks. *Front Vet Sci.* 2021;8(August):1-10. doi:10.3389/fvets.2021.727766
79. Skiada V. *Colonization of Legumes by an Endophytic Fusarium Solani Strain K. Early-Stage Molecular Signaling and Sub-Cellular Responses.* Vol 224.; 2019.
80. Hoagland DR, Arnon DI. The water-culture method for growing plants without soil. *Circ Calif Agric Exp Stn.* 1950;347(2nd edit):32 pp. <https://www.cabdirect.org/cabdirect/abstract/19500302257>.
81. Kavroulakis N, Doupis G, Papadakis IE, Ehaliotis C, Papadopoulou KK. Tolerance of tomato plants to water stress is improved by the root endophyte *Fusarium solani* FsK. *Rhizosphere.* 2018;6:77-85. doi:10.1016/j.rhisph.2018.04.003
82. Karimi R, Amini H, Ghabooli M. Root endophytic fungus *Piriformospora indica* and zinc attenuate cold stress in grapevine by influencing leaf phytochemicals and minerals content. *Sci Hortic (Amsterdam).* 2022;293(October 2021):110665. doi:10.1016/j.scienta.2021.110665
83. Gavito ME, Olsson PA, Rouhier H, et al. Temperature constraints on the growth and functioning of root organ cultures with arbuscular mycorrhizal fungi. *New Phytol.* 2005;168(1):179-188. doi:10.1111/j.1469-8137.2005.01481.x
84. Lidoy J, López-García Á, Amate C, et al. Regulation of mycorrhizal colonization under stress in tomato depends on symbiotic efficiency. *Environ Exp Bot.* 2023;215(May). doi:10.1016/j.envexpbot.2023.105479
85. Makarian H, Poozesh V, Asghari HR, Nazari M. Interaction Effects of Arbuscular Mycorrhiza Fungi and Soil Applied Herbicides on Plant Growth. *Commun Soil Sci Plant Anal.* 2016;47(5):619-629. doi:10.1080/00103624.2016.1146744
86. Campestre MP, Castagno LN, Estrella MJ, Ruiz OA. Lotus japonicus plants of the Gifu B-129 ecotype subjected to alkaline stress improve their Fe²⁺ bio-availability through inoculation with *Pantoea eucalypti* M91. *J Plant Physiol.* 2016;192:47-55. doi:10.1016/j.jplph.2016.01.001
87. Shahid M, Khan MS. Glyphosate induced toxicity to chickpea plants and stress alleviation by herbicide tolerant phosphate solubilizing *Burkholderia cepacia* PSBB1

- carrying multifarious plant growth promoting activities. *3 Biotech*. 2018;8(2):1-17. doi:10.1007/s13205-018-1145-y
88. Riley R, Chapman V. © 1958 Nature Publishing Group. 1958.
 89. Pérez-Fernández M, Alexander V. Enhanced plant performance in *Cicer arietinum* L. Due to the addition of a combination of plant growth-promoting bacteria. *Agric*. 2017;7(5). doi:10.3390/agriculture7050040
 90. Chaudhary MF, Abbasi AA. Effect of Pre-emergence Herbicides on Nodulation , Nitrogen Fixation and Morphological Characters in Groundnut (*Arachis hypogaea*). *Pakistan J Biol Sci*. 2000;3:1775-1777.
 91. Tétard-Jones C, Edwards R. Potential roles for microbial endophytes in herbicide tolerance in plants. *Pest Manag Sci*. 2016;72(2):203-209. doi:10.1002/ps.4147
 92. Kobayashi T, Nozoye T, Nishizawa NK. Iron transport and its regulation in plants. *Free Radic Biol Med*. 2019;133(October 2018):11-20. doi:10.1016/j.freeradbiomed.2018.10.439
 93. Vigani G, Murgia I. Iron-Requiring Enzymes in the Spotlight of Oxygen. *Trends Plant Sci*. 2018;23(10):874-882. doi:10.1016/j.tplants.2018.07.005
 94. Pii Y, Mimmo T, Tomasi N, Terzano R, Cesco S, Crecchio C. Microbial interactions in the rhizosphere: beneficial influences of plant growth-promoting rhizobacteria on nutrient acquisition process. A review. *Biol Fertil Soils*. 2015;51(4):403-415. doi:10.1007/s00374-015-0996-1
 95. Kobayashi T. Understanding the Complexity of Iron Sensing and Signaling Cascades in Plants. *Plant Cell Physiol*. 2019;60(February):1440-1446. doi:10.1093/pcp/pcz038
 96. Jeong J, Guerinot M Lou. Homing in on iron homeostasis in plants. *Trends Plant Sci*. 2009;14(5):280-285. doi:10.1016/j.tplants.2009.02.006
 97. García MJ, Romera FJ, Lucena C, Alcántara E, Pérez-Vicente R. Ethylene and the regulation of physiological and morphological responses to nutrient deficiencies. *Plant Physiol*. 2015;169(1):51-60. doi:10.1104/pp.15.00708
 98. Pierre JL, Fontecave M. Iron and activated oxygen species in biology: The basic chemistry. *BioMetals*. 1999;12(3):195-199. doi:10.1023/A:1009252919854
 99. Hou X, Tong H, Selby J, et al. Reactive Species and Antioxidants . Redox Biology Is a Fundamental Theme of Aerobic Life. 2003;133(November):274-286. doi:10.1105/tpc.001388.Nongrasses
 100. Brumbarova T, Bauer P. Iron uptake and transport in plants. *Plant Membr Vacuolar Transp*. 2008;109(10):149-172. doi:10.1079/9781845934026.0149
 101. Zhang X, Zhang D, Sun W, Wang T. The adaptive mechanism of plants to iron deficiency via iron uptake, transport, and homeostasis. *Int J Mol Sci*. 2019;20(10). doi:10.3390/ijms20102424
 102. Grass G, Wong MD, Rosen BP, Smith RL, Rensing C. Zupt is a Zn(II) uptake system in *Escherichia coli*. *J Bacteriol*. 2002;184(3):864-866. doi:10.1128/JB.184.3.864-866.2002
 103. Séguéla M, Briat JF, Vert G, Curie C. Cytokinins negatively regulate the root iron uptake machinery in *Arabidopsis* through a growth-dependent pathway. *Plant J*. 2008;55(2):289-300. doi:10.1111/j.1365-313X.2008.03502.x

104. Lucena C, Porras R, García MJ, et al. Ethylene and Phloem Signals Are Involved in the Regulation of Responses to Fe and P Deficiencies in Roots of Strategy I Plants. *Front Plant Sci.* 2019;10(October):1-14. doi:10.3389/fpls.2019.01237
105. Li L, Cheng X, Ling HQ. Isolation and characterization of Fe(III)-chelate reductase gene LeFRO1 in tomato. *Plant Mol Biol.* 2004;54(1):125-136. doi:10.1023/B:PLAN.0000028774.82782.16
106. Waters BM, Blevins DG, Eide DJ. Characterization of FRO1, a pea ferric-chelate reductase involved in root iron acquisition. *Plant Physiol.* 2002;129(1):85-94. doi:10.1104/pp.010829
107. Bereczky Z, Wang HY, Schubert V, Ganai M, Bauer P. Differential Regulation of nramp and irt Metal Transporter Genes in Wild Type and Iron Uptake Mutants of Tomato. *J Biol Chem.* 2003;278(27):24697-24704. doi:10.1074/jbc.M301365200
108. Li R, Cai F, Pang G, Shen Q, Li R, Chen W. Solubilisation of Phosphate and Micronutrients by *Trichoderma harzianum* and Its Relationship with the Promotion of Tomato Plant Growth. 2015:1-16. doi:10.5061/dryad.p460c
109. Zhang H, Sun Y, Xie X, Kim MS, Dowd SE, Paré PW. A soil bacterium regulates plant acquisition of iron via deficiency-inducible mechanisms. *Plant J.* 2009;58(4):568-577. doi:10.1111/j.1365-313X.2009.03803.x
110. Jin CW, Ye YQ, Zheng SJ. An underground tale: Contribution of microbial activity to plant iron. *Ann Bot.* 2014;113(1):7-18. doi:10.1093/aob/mct249
111. Mimmo T, Del Buono D, Terzano R, et al. Rhizospheric organic compounds in the soil-microorganism-plant system: Their role in iron availability. *Eur J Soil Sci.* 2014;65(5):629-642. doi:10.1111/ejss.12158
112. Pieterse CMJ, Zamioudis C, Berendsen RL, Weller DM, Van Wees SCM, Bakker PAHM. Induced systemic resistance by beneficial microbes. *Annu Rev Phytopathol.* 2014;52:347-375. doi:10.1146/annurev-phyto-082712-102340
113. Verbon EH, Trapet PL, Kruijs S, Temple-Boyer-Dury C, Rouwenhorst TG, Pieterse CMJ. Rhizobacteria-mediated activation of the iron deficiency response in Arabidopsis roots: Impact on iron status and signaling. *Front Plant Sci.* 2019;10(July):1-12. doi:10.3389/fpls.2019.00909
114. Zamioudis C, Korteland J, Van Pelt JA, et al. Rhizobacterial volatiles and photosynthesis-related signals coordinate MYB72 expression in Arabidopsis roots during onset of induced systemic resistance and iron-deficiency responses. *Plant J.* 2015;84(2):309-322. doi:10.1111/tpj.12995
115. Yuan Y, Wu H, Wang N, et al. FIT interacts with AtbHLH38 and AtbHLH39 in regulating iron uptake gene expression for iron homeostasis in Arabidopsis. *Cell Res.* 2008;18(3):385-397. doi:10.1038/cr.2008.26
116. Bournier M, Tissot N, Mari S, et al. Arabidopsis ferritin 1 (AtFer1) gene regulation by the phosphate starvation response 1 (AtPHR1) transcription factor reveals a direct molecular link between iron and phosphate homeostasis. *J Biol Chem.* 2013;288(31):22670-22680. doi:10.1074/jbc.M113.482281
117. Rogers EE, Guerinot M-L. FRD3, a member of the multidrug and toxin efflux family, controls iron deficiency responses in Arabidopsis. *Plant Cell.* 2002;14(8):1787-1799. doi:10.1105/tpc.001495

118. Carbonnel S, Das D, Varshney K, Kolodziej MC, Villaécija-Aguilar JA, Gutjahr C. The karrikin signaling regulator SMAX1 controls *Lotus japonicus* root and root hair development by suppressing ethylene biosynthesis. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 2020;117(35):21757-21765. doi:10.1073/pnas.2006111117
119. Dundar F. Differential Gene Expression Analysis (DGE). *Appl Bioinforma Core*. 2020:1-13.
120. Love MI, Huber W, Anders S. Moderated estimation of fold change and dispersion for RNA-seq data with DESeq2. *Genome Biol*. 2014;15(12):1-21. doi:10.1186/s13059-014-0550-8
121. Huerta-Cepas J, Szklarczyk D, Heller D, et al. EggNOG 5.0: A hierarchical, functionally and phylogenetically annotated orthology resource based on 5090 organisms and 2502 viruses. *Nucleic Acids Res*. 2019;47(D1):D309-D314. doi:10.1093/nar/gky1085
122. Rey P, Taupin-Broggini M, Couturier J, Vignols F, Rouhier N. Is there a role for glutaredoxins and BOLAs in the perception of the cellular iron status in plants? *Front Plant Sci*. 2019;10(June):1-10. doi:10.3389/fpls.2019.00712
123. Vigani G, Bohic S, Faoro F, Vekemans B, Vincze L, Terzano R. Cellular fractionation and nanoscopic X-ray fluorescence imaging analyses reveal changes of zinc distribution in leaf cells of iron-deficient plants. *Front Plant Sci*. 2018;9(August):1-11. doi:10.3389/fpls.2018.01112
124. Durrett TP, Gassmann W, Rogers EE. The FRD3-mediated efflux of citrate into the root vasculature is necessary for efficient iron translocation. *Plant Physiol*. 2007;144(1):197-205. doi:10.1104/pp.107.097162
125. Lucena C, Romera FJ, García MJ, Alcántara E, Pérez-Vicente R. Ethylene participates in the regulation of Fe deficiency responses in strategy I plants and in rice. *Front Plant Sci*. 2015;6(NOVEMBER):1-16. doi:10.3389/fpls.2015.01056
126. Philpott CC. Iron uptake in fungi: A system for every source. *Biochim Biophys Acta - Mol Cell Res*. 2006;1763(7):636-645. doi:10.1016/j.bbamcr.2006.05.008
127. Babuin MF, Campestre MP, Rocco R, et al. Response to long-term NaHCO₃-derived alkalinity in model *Lotus japonicus* ecotypes Gifu B-129 and Miyakojima MG-20: Transcriptomic profiling and physiological characterization. *PLoS One*. 2014;9(5). doi:10.1371/journal.pone.0097106
128. Bajaj R, Huang Y, Gebrechristos S, et al. Transcriptional responses of soybean roots to colonization with the root endophytic fungus *Piriformospora indica* reveals altered phenylpropanoid and secondary metabolism. *Sci Rep*. 2018;8(1):1-18. doi:10.1038/s41598-018-26809-3
129. Yakti W, Kovács GM, Vági P, Franken P. Impact of dark septate endophytes on tomato growth and nutrient uptake. *Plant Ecol Divers*. 2018;11(5-6):637-648. doi:10.1080/17550874.2019.1610912
130. Saddique MAB, Ali Z, Khan AS, Rana IA, Shamsi IH. Inoculation with the endophyte *Piriformospora indica* significantly affects mechanisms involved in osmotic stress in rice. *Rice*. 2018;11(1):1-12. doi:10.1186/s12284-018-0226-1
131. Chen Z, Jin Y, Yao X, et al. Fungal Endophyte Improves Survival of *Lolium perenne* in Low Fertility Soils by Increasing Root Growth, Metabolic Activity and Absorption of Nutrients. *Plant Soil*. 2020;452(1-2):185-206. doi:10.1007/s11104-020-04556-7

132. Kim SA, LaCroix IS, Gerber SA, Guerinot M Lou. The iron deficiency response in *Arabidopsis thaliana* requires the phosphorylated transcription factor URI. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 2019;116(50):24933-24942. doi:10.1073/pnas.1916892116
133. Li W, Lan P. The understanding of the plant iron deficiency responses in strategy I plants and the role of ethylene in this process by omic approaches. *Front Plant Sci*. 2017;8(January):1-15. doi:10.3389/fpls.2017.00040
134. Kieu NP, Aznar A, Segond D, et al. Iron deficiency affects plant defence responses and confers resistance to *dickeya dadantii* and *botrytis cinerea*. *Mol Plant Pathol*. 2012;13(8):816-827. doi:10.1111/j.1364-3703.2012.00790.x
135. Chen W, Zhao L, Liu L, et al. Iron deficiency-induced transcription factors bHLH38/100/101 negatively modulate flowering time in *Arabidopsis thaliana*. *Plant Sci*. 2021;308(April):110929. doi:10.1016/j.plantsci.2021.110929
136. Conte SS, Walker EL. Transporters contributing to iron trafficking in plants. *Mol Plant*. 2011;4(3):464-476. doi:10.1093/mp/ssr015
137. Lemanceau P, Expert D, Gaymard F, Bakker PAHM, Briat JF. *Chapter 12 Role of Iron in Plant-Microbe Interactions*. Vol 51. 1st ed. Elsevier Ltd; 2009. doi:10.1016/S0065-2296(09)51012-9
138. Attarian R, Hu G, Sánchez-León E, et al. The monothiol glutaredoxin Grx4 regulates iron homeostasis and virulence in *cryptococcus neoformans*. *MBio*. 2018;9(6):1-23. doi:10.1128/mBio.02377-18
139. Young ND, Mudge J, Ellis THN. Legume genomes: More than peas in a pod. *Curr Opin Plant Biol*. 2003;6(2):199-204. doi:10.1016/S1369-5266(03)00006-2

Παράρτημα

Πίνακας 1.

Primer name	Use in this study	Sequence (5'→3')	References
Ubi-R	RT-qPCR	CCAGAAGAGGCCACAACAAAC	³⁴
Ubi-F	RT-qPCR	TTCACCTTGTGCTCCGTCTTC	³⁴
IRT1-R	RT-qPCR	TCCACAATCAGAGCAGTT	⁸⁶
IRT1-F	RT-qPCR	TTCAAGACCAAAGCAGTTAT	⁸⁶
FRO1-R	RT-qPCR	TAGCATTGACAGAGATGAAGAG	⁸⁶
FRO1-F	RT-qPCR	TGGTGAGTGGAGGAAGTG	⁸⁶
MYB10-R	RT-qPCR	GCTTGAGTTCAAGATACTTGA	GenBank: JN863531.1
MYB10-F	RT-qPCR	CAATGACAGACAAAATTGAGC	GenBank: JN863531.1
bHLH-38-R	RT-qPCR	TATGACTTGGGAAATTGTAGC	Gene ID: 824864
bHLH-38-F	RT-qPCR	TATCCCCTGACACTACCATG	Gene ID: 824864

FER1-R	RT-qPCR	CCTTTTCCTCATGTTCAAACCT	Ref Seq: NM_120238.4
FER1-F	RT-qPCR	GTCTTGCCAAGTTTTTCAAGG	Ref Seq: NM_120238.4
FIT-R	RT-qPCR	CCATTCAAAAATGTCAGAATTG	GenBank: AT2G28160
FIT-F	RT-qPCR	AACAGAATCAGAATCTAGCG	GenBank: AT2G28160
FRD3-R	RT-qPCR	GCTTATAATTGAATTGGCACC	Gene ID: 819995
FRD3-F	RT-qPCR	AGTTCTCTGAGAACATGAAGG	Gene ID: 819995
ERF-R	RT-qPCR	CCCTTGCTGCCATCATGTAC	Lj2g3v1068730
ERF-F	RT-qPCR	ACCTGAGTGCTTGAAGTTCAC	Lj2g3v1068730
ACC_Synth-R	RT-qPCR	CCCTGCATTCCCTTCCAAGT	Lj2g3v0909590
ACC_Synth-F	RT-qPCR	CGCTCGGAGGATGTCAAGTT	Lj2g3v0909590
ACC_Oxid-R	RT-qPCR	AGCATGTTCAATGGTCGCCT	Lj3g3v0652730
ACC_Oxid-F	RT-qPCR	TGGTCCATTGCCTCAAGTCC	Lj3g3v0652730
FsKBoIA-R	RT-qPCR	CCTAGCTTCGGCCTCCTTCT	
FsKBoIA-F	RT-qPCR	GAATGGTCTACGCCCTGCTG	
FsKFRE1-R	RT-qPCR	GGAAAGCCAGAGCCATCTCTTC	
FsKFRE1-F	RT-qPCR	ATCCCTATCCAGTCCCTTGTGC	
FsKFRE2-R	RT-qPCR	GCCCAGATACCAACTACCATGTC	
FsKFRE2-F	RT-qPCR	ATATGCGGAACTTGCTGGACG	

Πίνακας 2.

i)Macroelements stock solution

MgSO4 7H2O	7,31gr/l
KNO3	0,8 gr/l

KCl	0,65 gr/l
KH ₂ PO ₄	0,048 gr/l

ii) Vitamins stock solution

Glycine	0,09 gr in 150 ml
Thiamine HCl	0,003 gr in 150ml
Pyridoxine HCl	0,003 gr in 150ml
Nicotinic Acid	0,015 gr in 150ml
Myo-inositol	1,5 gr in 150ml

iii) Ca(NO₃)₂ 4H₂O stock solution → Ca(NO₃)₂ 4H₂O 2,88 gr/l

iv) NaFeEDTA stock solution → NaFeEDTA 0,24 gr in 150 ml

v) KI stock solution → KI 0,015 gr in 20ml

vi) Microelements stock solution

a) Dissolve 0,24gr MnCl₂ 4H₂O in 5ml dH₂O

b) Dissolve 0,118gr ZnSO₄ 7H₂O in 5ml dH₂O

c) Dissolve 0,0375 gr H₃BO₃ in 5ml dH₂O

Mix the 3 solutions to obtain solution A

d) Dissolve 0,033gr CuSO₄ 5H₂O in 2,5ml dH₂O and then transfer 0,5ml to solution A

e) Dissolve 0,0058gr (NH₄)₆Mo₇O₂₄ 4H₂O in 5ml dH₂O and then transfer 0,1ml to solution A

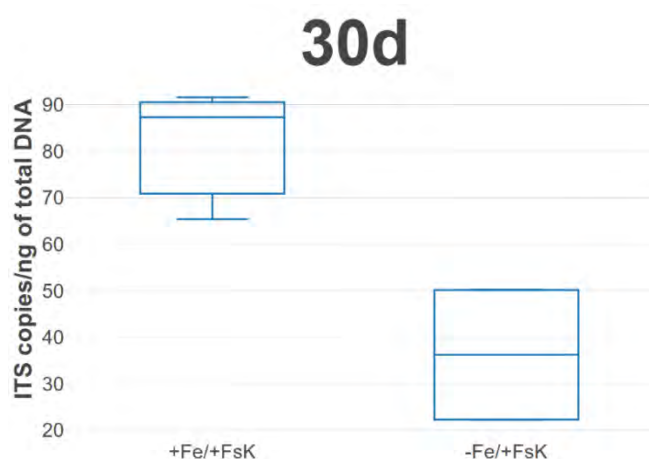
Bring volume to 25ml by adding H₂O.

To prepare 1L of M medium:

- Macroelements 100ml
- Ca(NO₃)₂ 4H₂O 100ml
- NaFeEDTA 5ml
- Vitamins 5ml
- Micronutrients 1ml
- KI 1ml
- Sucrose 10gr

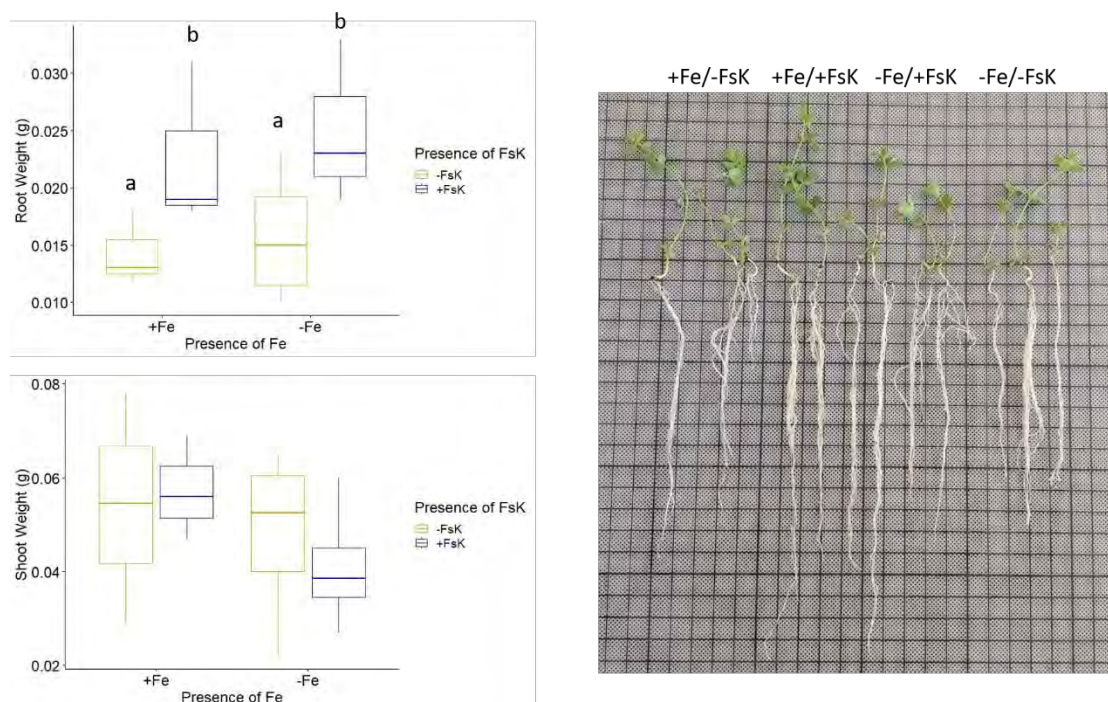
Control pH to 5,5 and bring the volume to 1L.

Εικόνα S2.1



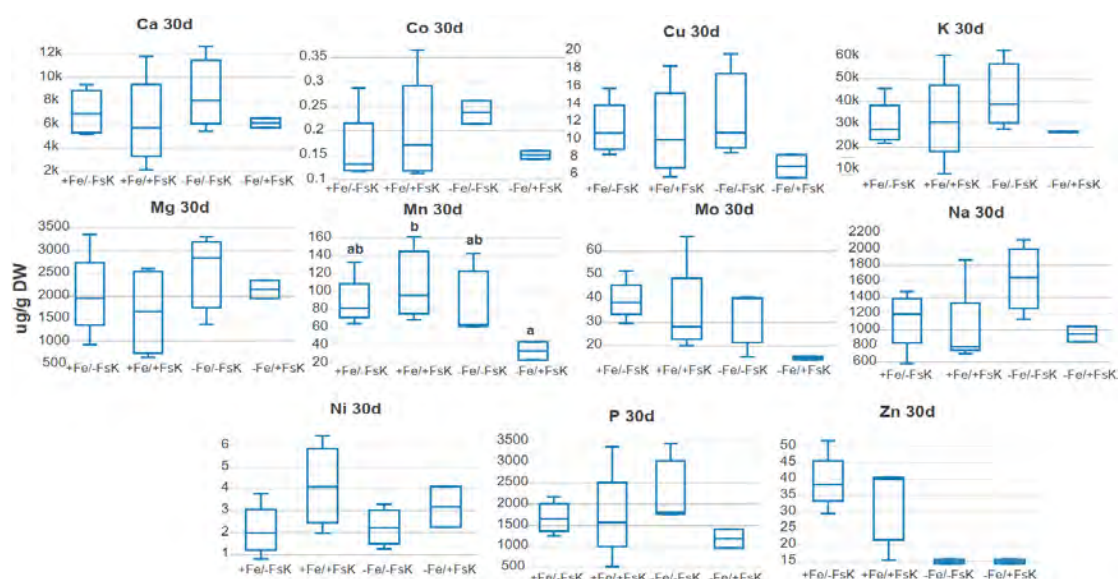
Εικόνα S2.1. Επιδράσεις της έλλειψης σιδήρου στον αποικισμό του *Lotus japonicus* από το ενδοφύτο *Fusarium solani* στέλεχος K (FsK) στις 40dpi και αντίστοιχα 30 μέρες σε κατάσταση στρες. Ποσοτικοποίηση του αποικισμού του μύκητα εντός των ιστών της ρίζας με qPCR χρησιμοποιώντας εκκινητές ειδικούς για το γονίδιο ITS (πρωτεύων άξονας). Οι τιμές κανονικοποιούνται ως προς τα ng του συνολικού DNA που απομονώθηκε. Τα δεδομένα είναι μέσο δύο τεχνικών επαναλήψεων για καθένα από τα πέντε βιολογικά αντίγραφα. Κάθε βιολογικό αντίγραφο αποτελείται από τρία φυτά. Δεν καταγράφηκαν σημαντικές διαφορές μεταξύ των φυτών που αναπτύχθηκαν υπό την επάρκεια Fe (+Fe) και την ανεπάρκεια Fe (-Fe) μετά το Student's t-test.

Εικόνα S2.2



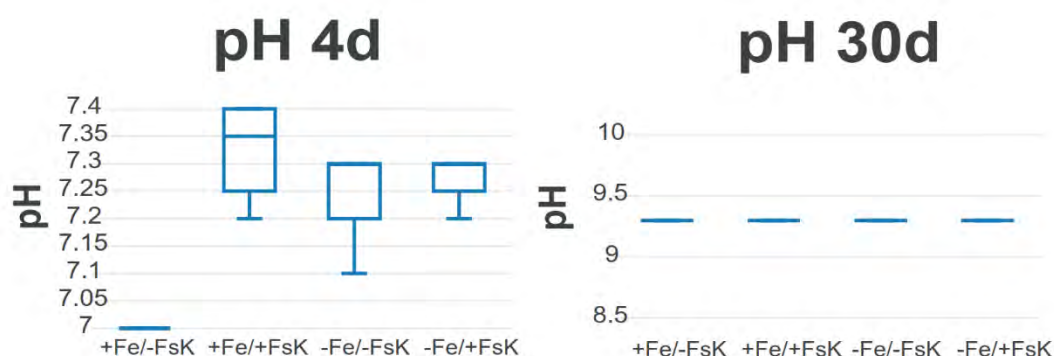
Εικόνα S2.2. Επιδράσεις της έλλειψης Fe και του αποικισμού *Lotus japonicus* από το ενδοφύτο *Fusarium solani* στέλεχος K (Fsk) στις παραμέτρους ανάπτυξης των φυτών. Μία εβδομάδα μετά τη σπορά των σπόρων τα φυτά είτε εμβολιάστηκαν με το ενδοφύτο (μπλε ράβδοι, +Fsk) είτε όχι (πορτοκαλί ράβδοι, -Fsk). Παράλληλα, τα φυτά είτε ποτίστηκαν με πλήρες μέσο Hoagland (+Fe) είτε χωρίς σίδηρο (-Fe) για μια περίοδο 14 ημερών μετά τον εμβολιασμό. (Α) Μέσος όρος $\pm$ SE ($n = 5$) του φρέσκου βάρους ρίζας και του βλαστού σε όλες τις καταστάσεις. Σημαντικές διαφορές μεταξύ των θεραπειών υποδεικνύονται με διαφορετικά γράμματα από τα post-hoc τεστ του Tukey μετά από ANOVA: $P < 0,001$. (β) Λήφθηκαν φωτογραφίες φαινοτύπου μετά από 14 ημέρες από τον εμβολιασμό με τον ενδοφυτικό μύκητα Fsk.

Εικόνα S2.3



Εικόνα S2.3: Αλλαγές στην πρόσληψη μακρο- (P, K, Ca και Mg) και μικρο-θρεπτικών συστατικών (Cu, Zn, Mn, Mo, Co, Ni και Na) στα φυτά *L. jaronicus* που αποικίζονται από το μύκητα *Fusarium solani* στέλεχος K (+Fsk) και/ή εκθέτονται σε έλλειψη σιδήρου (-Fe) σε σύγκριση με τα φυτά ελέγχου χωρίς στρες (+Fe/-Fsk). Οι ιστοί συλλέχθηκαν στις 40 ημέρες μετά τον εμβολιασμό (dpi). Οι τιμές είναι ο μέσος όρος $\pm$ SE πέντε βιολογικών επαναλήψεων. Στατιστικά σημαντικές διαφορές σε σύγκριση με δείγματα ελέγχου ανιχνεύθηκαν με ANOVA (Tukey's post-hoc tests, $P < 0,05$).

Εικόνα S2.4



Εικόνα S2.4: Αλλαγές στο pH του εδάφους (Δ Soil pH) κάτω από τις διάφορες συνθήκες επεξεργασίας. Οι ιστοί συλλέχθηκαν στις 14 (A) και 40 (B) ημέρες μετά τον εμβολιασμό (dpi). Οι τιμές είναι ο μέσος όρος $\pm$ SE πέντε βιολογικών αντιγράφων. Τιμές και στατιστικά σημαντικές διαφορές σε σύγκριση με δείγματα ελέγχου δεν ανιχνεύθηκαν με ANOVA (Tukey's post-hoc tests, $P < 0,05$).

Εικόνα S2.5

script for R:

```
# Whatever lines starts with a "#" is a comment in scripting languages

# the following command "read.table" reads tables from the folder where the session was
# set (to set the session folder go to "Session" -> "Set Working Directory" -> "Choose
# directory")

# for understanding the options of a command you need to type "?command_name"3

# in this particular case we told R to read the "formaplot.txt" table, with values separated
# by tab (as pasted by excel to sublime text), we also told R not to correct the header names
# (check.names = F), we then told R that there are no quote symbols and no comment
# characters, we also told R that there is a header and not to consider any text as factor

mat <- read.table("formaplot.txt", check.names = F, sep="\t", quote="", comment.char =
"", header=T, stringsAsFactors = F)

# every table is characterised by rows and columns and they are denoted with brackets and
# a comma. The values before the comma denote the rows and the values after the comma
# denote the columns (the complete columns can be denoted with the $ sign as shown
# below).

# in the following line we use a combination of commands to find out which lines have
# duplicated "predicted_gene_ids"... this involves the use of the commands "duplicated" and
# "which". So, in the following command we search for duplicated values in the
# mat$predicted_gene_ids column and we ask which is the number of the array position
# (which coincides with the row number) and we subtract (remove) these rows from the matrix
# using the minus sign while in the row position of the bracket... this way we are removing the
# duplicated lines (which were four for some reason and its good to double-check this)

mat <- mat[-which(duplicated(mat$predicted_gene_ids)),]

# the following command creates a scatterplot with the x axis being the first array, the y-axis
# being the second array, the point character being number 16 (check internet:
# http://www.endmemo.com/program/R/pchsymbols.php), the character expansion value
# being 0.5, the colour being provided by the array found in the mat$col column, and
# eliminating the bounding box (frame) of the plot

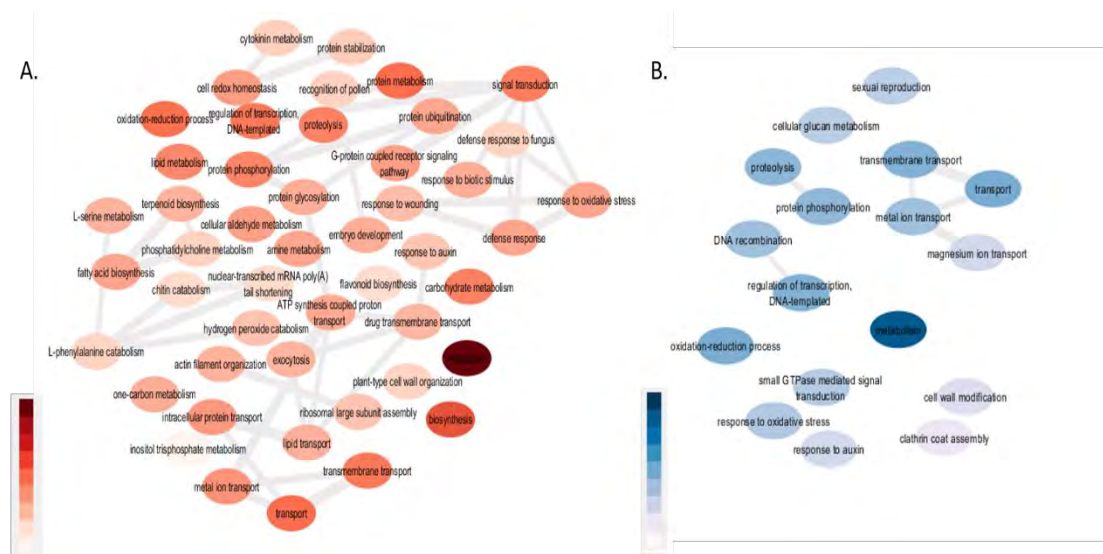
plot(mat$log10(mean_abund), mat$logFC, pch=16, cex = .5, col = mat$col, frame = F)

# the following command creates a line of zero slope and intercept of type 2 (lty=2, see
# http://www.sthda.com/english/wiki/line-types-in-r-lty) and colour "grey80"

abline(h=0, lty=2, col="grey80")
```

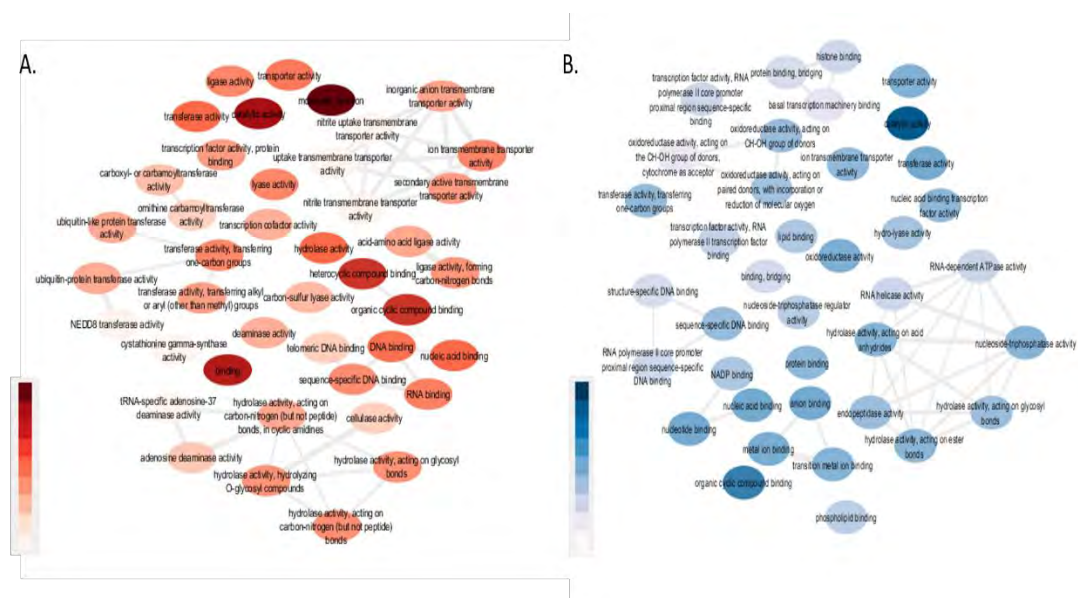
Εικόνα S2.5: Ο κώδικας που χρησιμοποιήθηκε στην γλώσσα προγραμματισμού R ώστε να διαχωριστούν τα διαφορετικά εκφραζόμενα γονίδια από την πλευρά του μήκτα FSK.

Εικόνα S2.6



Εικόνα S2.5: Διάγραμμα απεικόνισης των γονιδιακών οντολογιών του φυτού *Lotus japonicus*. Τα γονίδια που ρυθμίζονται θετικά παρουσία του μύκητα FSK εντοπίζονται στην εικόνα A ενώ αυτά που ρυθμίζονται αρνητικά στην εικόνα B. Διαβάθμιση της έντασης της έκφρασης εντός των GO που ρυθμίζονται είτε θετικά είτε αρνητικά φαίνεται με την ένταση του χρώματος. Όσο πιο έντονο το χρώμα τόσο μεγαλύτερη η ένταση της έκφρασης των γονιδιακών οντολογιών.

Εικόνα S2.7



Εικόνα S2.6: Διάγραμμα απεικόνισης των γονιδιακών οντολογιών του ενδοφυτικού μύκητα FSK. Τα γονίδια που ρυθμίζονται θετικά παρουσία του μύκητα FSK εντοπίζονται στην εικόνα A ενώ αυτά που ρυθμίζονται αρνητικά στην εικόνα B. Διαβάθμιση της έντασης της έκφρασης εντός των GO που ρυθμίζονται είτε θετικά είτε αρνητικά φαίνεται με την ένταση του χρώματος. Όσο πιο έντονο το χρώμα τόσο μεγαλύτερη η ένταση της έκφρασης των γονιδιακών οντολογιών.

Γενικό συμπέρασμα

Η συνεχής μείωση των φυσικών πόρων της γης και η αυξημένη χρήση επικίνδυνων χημικών λιπασμάτων αποτελούν μεγάλη ανησυχία για το μέλλον της γεωργίας. Τα βιολιπάσματα είναι μία πολλά υποσχόμενη εναλλακτική λύση στα επικίνδυνα χημικά λιπάσματα και αποκτούν όλο και μεγαλύτερη σημασία για την επίτευξη μιας βιώσιμης γεωργίας. Τα βιολιπάσματα έχουν ως βασικό ρόλο την αύξηση της απόδοσης των καλλιεργειών. Οι μικροοργανισμοί που μπορούν να αλληλεπιδρούν με τα φυτά και να χρησιμοποιηθούν ως βιολιπαντές είναι ικανοί να ενισχύσουν την άμυνα και την ανάπτυξη των φυτών καθώς και την πρόσληψη θρεπτικών ουσιών όπως το άζωτο, ο σίδηρος, το φώσφορο κ.ά.

Πριν όμως από τη χρήση τους είναι απαραίτητη η μελέτη της μοριακής βάση των ωφέλιμων αλληλεπιδράσεων μικροοργανισμών και φυτών. Η γνώση αυτή είναι ζωτικής σημασίας για την εγκαθίδρυση των συμβιωτικών σχέσεων καθώς και των κοινών εξελικτικών μονοπατιών. Η μελέτη αυτή αποτελεί βασική γνώση πριν τη χρήση των μικροοργανισμών ως βιολιπαντές για την βελτίωση της καλλιέργειας.

Τα δεδομένα μας έδειξαν ότι ο FSK διαδραματίζει σημαντικό ρόλο στην ενίσχυση της ανάπτυξης των φυτών σε συνθήκες έλλειψης σιδήρου. Και ως μακροπρόθεσμος στόχος είναι η χρήση του ως μικροβιακό εμβόλιο για καλλιέργειες ψυχανθών και άλλων φυτών.

ΤΕΛΟΣ