

ΠΑΝΕΠΙΣΤΗΜΙΟ ΘΕΣΣΑΛΙΑΣ ΣΧΟΛΗ ΕΠΙΣΤΗΜΩΝ ΥΓΕΙΑΣ

ΤΜΗΜΑ ΒΙΟΧΗΜΕΙΑΣ & ΒΙΟΤΕΧΝΟΛΟΓΙΑΣ

Πτυχιακή Εργασία

“Έκφραση γονιδίων βιοσύνθεσης τριτερπενίων κατά την συμβίωση του
ψυχανθούς *Lotus japonicus* με τον ενδοφυτικό μύκητα FsK“

“Expression of triterpene biosynthesis genes during the symbiosis of the
legume *Lotus japonicus* with the endophytic fungus FsK“



Σοφία Π. Σαρούδη

Τμήμα Βιοχημείας και Βιοτεχνολογίας

Τριμελής Συμβουλευτική Επιτροπή

Επιβλέπουσα καθηγήτρια:

Καλλιόπη Παπαδοπούλου, Καθηγήτρια Βιοτεχνολογίας Φυτών

Μέλη:

Δημήτριος Καρπούζας, Καθηγητής Περιβαλλοντικής Μικροβιολογίας και Βιοτεχνολογίας
και Πρόεδρος του Τμήματος Βιοχημείας και Βιοτεχνολογίας του Πανεπιστημίου Θεσσαλίας

Δανιέλα Τσίκου, Επίκουρος Καθηγήτρια Μοριακής και Αναπτυξιακής Βιολογίας Φυτών

ΕΥΧΑΡΙΣΤΙΕΣ

Αρχικά, θα ήθελα να εκφράσω την αμέριστη ευγνωμοσύνη μου στην επιβλέπουσα καθηγήτρια μου, κα. Καλλιόπη Παπαδοπούλου για την εμπιστοσύνη που μου έδειξε κατά την παραμονή μου στο εργαστήριο Βιοτεχνολογίας Φυτών και Περιβάλλοντος. Σας ευχαριστώ πολύ για τις χρήσιμες συμβουλές σας, για την πολύτιμη επιστημονική καθοδήγηση που μου δώσατε και για την θερμή υποδοχή που μου προσφέρατε στο εργαστήριο Βιοτεχνολογίας Φυτών και Περιβάλλοντος. Κυρίως, όμως, θα ήθελα να σας ευχαριστήσω για την κατανόηση και υποστήριξη που μου προσφέρατε σε διαπροσωπικό επίπεδο καθ' όλη την διάρκεια της συνεργασίας μας.

Οφείλω, επίσης, να εκδηλώσω τις ευχαριστίες στην υποψήφια διδάκτορα Λουκία Μαρία Κελλάρη για την απλόχερη και ουσιαστική βοήθεια που μου προσέφερε. Την ευχαριστώ ιδιαιτέρως για την τεράστια υπομονή, επιμονή καθώς και την αμέριστη υποστήριξη που έδειξε για την σωστή ολοκλήρωση της διπλωματικής μου εργασίας.

Θα ήθελα να ευχαριστήσω επίσης και τον κ. Καρπούζα και την κα Τσίκου, οι οποίοι μαζί με την κα Παπαδοπούλου συγκροτούν την τριμελή επιτροπή.

Θα ήταν παράλειψη μου να μην ευχαριστήσω και όλα τα υπόλοιπα μέλη του εργαστηρίου για την βοήθεια τους αλλά και για το ευχάριστο εργασιακό περιβάλλον που έχουν δημιουργήσει.

Τέλος, δεν θα μπορούσα να μην αναφέρω την ευγνωμοσύνη μου στην οικογένεια μου για την απεριόριστη στήριξή τους. Τους ευχαριστώ που με στήριξαν όλα αυτά τα χρόνια σε κάθε δυσκολία που πρόκυπτε και φάνταζε ανυπέρβλητη. Ένα ξεχωριστό ευχαριστώ στην αδελφή μου Ελπίδα Σαρούδη, η οποία συνεχώς με ωθούσε να γίνω καλύτερη, καθώς και στον συμφοιτητή μου Ισαάκ Πυρίλλη για το κουράγιο που μου έδωσε σε όλη την διάρκεια των κοινών σπουδών μας.

ΠΕΡΙΕΧΟΜΕΝΑ

ΠΕΡΙΛΗΨΗ

ABSTRACT

1. ΕΙΣΑΓΩΓΗ

- 1.1 Το ψυχανθές φυτό μοντέλο *Lotus japonicus*.
- 1.2 Ο ενδοφυτικός μύκητας *Fusarium solani* strain K.
- 1.3 Τα τριτερπένια.
- 1.4 Οι κυκλάσες του οξειδοσκουαλενίου στο *Lotus japonicus*.
- 1.5 Η βιοσύνθεση των τριτερπενίων.
- 1.6 Παραγωγή α- β-αμυρίνης και λουπεόλης από OSCs στο *Lotus japonicus*.
- 1.7 Οι λειτουργίες τις α- β-αμυρίνης και λουπεόλης.

2. ΣΚΟΠΟΣ

3. ΥΛΙΚΑ ΚΑΙ ΜΕΘΟΔΟΙ

- 3.1. Απομόνωση RNA με PIC και LiCl στο φυτό *Lotus japonicus*.
- 3.2. DNase I και διαγνωστική Kapa Taq PCR.
- 3.3 Αλυσιδωτή αντίδραση πολυμεράσης πραγματικού χρόνου (RT-qPCR).

4. ΑΠΟΤΕΛΕΣΜΑΤΑ

- 4.1 Έλεγχος αποικισμού του ψυχανθούς *Lotus japonicus* από τον ενδοφυτικό μύκητα FsK στις 4dpi και 7dpi.
- 4.2 Επίπεδα έκφρασης γονιδίων δεικτών παρουσίας του μύκητα.
- 4.3 Επίπεδα έκφρασης του γονιδίου *AMY-1* παρουσία του μύκητα.
- 4.4 Επίπεδα έκφρασης του γονιδίου *AMY-2* παρουσία του μύκητα.
- 4.5 Επίπεδα έκφρασης του γονιδίου *OSC3* παρουσία του μύκητα.

5. ΣΥΖΗΤΗΣΗ

6. ΒΙΒΛΙΟΓΡΑΦΙΑ

ΠΕΡΙΛΗΨΗ

Τα τριτερπένια ορίζονται ως η πιο σημαντική κατηγορία της υπεροικογένειας των τερπενίων, τα οποία λειτουργούν ως δευτερογενείς μεταβολίτες στα φυτά. Παράγονται από την κυκλοποίηση του 2,3-οξειδοσκουαλενίου, η οποία καταλύεται από ειδικά ένζυμα, τα οποία ονομάζονται κυκλάσες του οξειδοσκουαλενίου (OSCs). Στην κατηγορία των κυκλασών, περιλαμβάνονται οι OSC1 (*LjAMY1*) και OSC3, οι οποίες έχουν ταυτοποιηθεί ως συνθάσες της β-αμυρίνης και της λουπεόλης αντίστοιχα, καθώς και η OSC8 (*LjAMY2*), η οποία έχει χαρακτηριστεί ως μία συνθάση μικτής δράσης που έχει την ικανότητα να παράγει β-αμυρίνη και δίδυδρο-λουπεόλη. Σε συσχέτιση με τις συνθάσες τριτερπενίων, έχουν πραγματοποιηθεί αρκετές έρευνες σχετικά με τον πιθανό βαθμό αλλαγής της έκφρασης τους όταν το φυτό έχει αποικιστεί από ενδόφυτα, όπως ο αποικισμός του *Lotus japonicus* από τον ενδοφυτικό μύκητα *Fusarium solani* strain K (FsK). Αρκετές μελέτες έχουν δείξει ότι ο FsK επηρεάζει θετικά την ανάπτυξη του φυτού και ταυτόχρονα ενισχύει την άμυνα και την αντοχή του στο stress. Λόγω των παραπάνω, συνίσταται η μελέτη των συγκεκριμένων γονιδίων και η έκφραση τους σε σχέση με τον συγκεκριμένο μύκητα. Σε αυτήν την ανάλυση θα χρησιμοποιηθούν αγρίου τύπου (control) και αποικισμένα με το FsK φυτά *Lotus japonicus*.

ABSTRACT

Triterpenes are defined as the most important group of the terpene superfamily, which are functioned as secondary metabolites in plants. They are produced by the cyclization of 2,3-oxidosqualene catalyzed by specific enzymes, which are called cyclases of oxidosqualene (OSCs). In these group of cyclases, there are also included OSC1 (*LjAMY1*) and OSC3, which have been identified as synthase of β-amyrin and synthase of lupeol, respectively, as well as OSC8 (*LjAMY2*), which has been characterized as a mixed-action triterpenoid synthase, which has the ability to produce β-amyrin and dihydro-lupeol. In interaction with triterpene synthases, several studies have been completed on the possible degree of change in their expression when the plant has been colonized by endophytes, such as the colonization of *Lotus japonicus* by the endophytic fungus FsK. Several studies have shown that FsK affects in a positive way the growth of the plant and simultaneously it enhances its defense and stress resistance. Due to the above, it is recommended the study of those specific genes and their expression in relation to this specific fungus. In this specific analysis, wild type (control) *Lotus japonicus* plants and FsK colonized plants will be used.

1. ΕΙΣΑΓΩΓΗ

1.1 Το ψυχανθές φυτό μοντέλο *Lotus japonicus*.

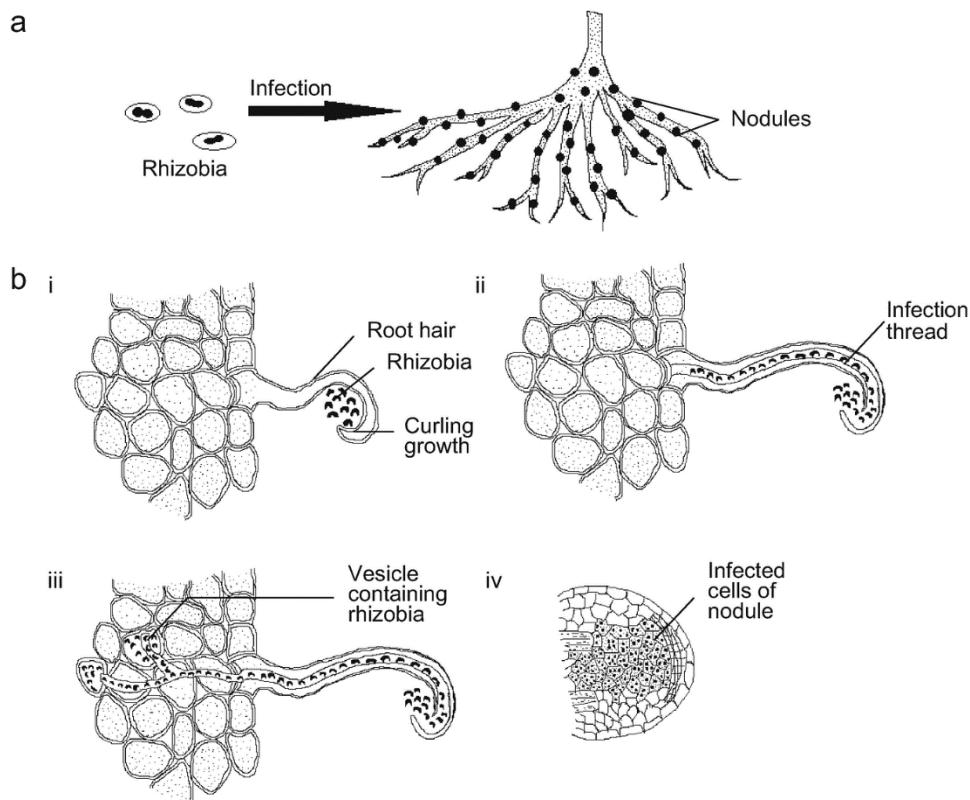
Τα ψυχανθή φυτά έχουν ιδιαίτερη σημασία τόσο για τον άνθρωπο, όσο και για τα ζώα καθώς αποτελούν πηγή τροφής και έχουν πολυάριθμες χρήσεις στη βιομηχανία (Graham & Vance, 2003). Στην τάξη των ψυχανθών ανήκει και το δικοτυλήδο *Lotus japonicus* (εικόνα 1), το οποίο ανήκει στην πολυπληθή οικογένεια του *Leguminosae* (*Fabaceae*), η οποία είναι η τρίτη μεγαλύτερη οικογένεια των αγγειόσπερμων. Ο φυσικός βióτοπος του φυτού βρίσκεται σε διάφορα μέρη της Ασίας, όπως οι Ιαπωνικοί Νήσοι, η Κορέα, η Κίνα, η Ινδία και το Αφγανιστάν. Το *Lotus japonicus* έχει γίνει πρότυπο φυτό μοντέλο λόγω των ιδανικών βιολογικών και γενετικών ιδιοτήτων του (Handberg & Stougaard 1992; Jiang & Gresshoff 1993). Σε αυτές τις ιδιότητες περιλαμβάνονται το μικρό του μέγεθος, ο σχετικά μικρός κύκλος ζωής (2 – 3 μήνες), η ικανότητα αυτογονιμοποίησης του, το μικρό μέγεθος γονιδιώματος (472.1 Mb) οργανωμένο σε 6 χρωμοσώματα ($2n=12$) και η σχετικά εύκολη δημιουργία διαγονιδιακών φυτών (Sato et al. 2008). Ακόμα, ένα ιδιαίτερο χαρακτηριστικό του φυτού *Lotus japonicus* είναι η παραγωγή εξειδικευμένων μεταβολιτών (π.χ. τερπένια και τριτερπένια) με ευνοϊκές ιδιότητες και χαρακτηριστικά για ιατρική χρήση, αγρονομική και βιομηχανική αξιοποίηση (Laszczyk, 2009; Moses, Pollier, Thevelein, & Goossens, 2013). Έτσι, το *L. japonicus* έχει καθιερωθεί ως φυτό μοντέλο για την μοριακή και γενετική ανάλυση των ψυχανθών, αλλά και για τη σύγκριση με λιγότερο συγγενικά φυτά οργανισμοί-μοντέλα, όπως το *Arabidopsis thaliana* (Barker et al. 1990, Handberg and Stougaard 1992). Στην έρευνα, χρησιμοποιούνται κυρίως δύο οικότυποι *L. japonicus*, ο οικότυπος Gifu και ο Mijakogima (MG-20), που πήραν το όνομα τους από τις περιοχές στις οποίες ανακαλύφθηκαν (Pajuelo & Stougaard, 2005).



Εικόνα 1: Φωτογραφία του ψυχανθούς φυτού μοντέλου *Lotus japonicus* (Baginsky et al. 2007).

Τα ψυχανθή αποτελούν ιδιαίτερη ομάδα φυτών, καθώς έχουν την ικανότητα να δημιουργούν συμβιωτικές σχέσεις με ριζόβια και μύκητες, γεγονός που τους επιτρέπει να αναπτύσσονται σε περιβάλλοντα με χαμηλή διαθεσιμότητα θρεπτικών (Handberg, K. and Stougaard, J., 1992) (Udvardi et al., 2005). Όσον αφορά λοιπόν την δυνατότητα ανάπτυξης συμβιωτικής σχέσης, τα ψυχανθή δημιουργούν ειδικές συμβιωτικές δομές στις ρίζες τους με βακτήρια (εικόνα 2), κυρίως του γένους *Rhizobium*, τα οποία είναι αζωτοδεσμευτικά βακτήρια και ονομάζονται ριζόβια. Αυτές οι χαρακτηριστικές δομές ονομάζονται φυμάτια και είναι ικανά να δεσμεύουν το ατμοσφαιρικό άζωτο, το οποίο μετατρέπεται από τα ριζόβια σε μορφή ικανή να χρησιμοποιηθεί από τα φυτά. Έτσι, αποφεύγονται τα αζωτούχα λιπάσματα και ελαττώνεται η διαρροή αζωτούχων ενώσεων στο υπέδαφος (Madigan, 2003), ενώ ταυτόχρονα γίνεται εμπλουτισμός του εδάφους με νιτρικά και αυξάνεται η παραγωγή των πρωτεϊνικά πλούσιων σπόρων των ψυχανθών φυτών (Oldroyd et al, 2011). Τέλος, τα

ψυχανθή αναφέρεται ότι αναπτύσσουν συμβιωτικές σχέσεις με διάφορους μύκητες. Ένα χαρακτηριστικό παράδειγμα αποτελούν οι δενδροειδής μυκορριζικοί μύκητες (AMF). Οι AMF αποτελούν το πιο συχνό παράδειγμα ανάπτυξης συμβιωτικής σχέσης φυτού-ριζοβίου (Begum et al., 2019). Οι δενδροειδείς μυκορριζικοί μύκητες βρίσκονται σχεδόν σε όλα τα φυσικά περιβάλλοντα και συμβάλλουν στην ανάπτυξη των φυτών, καθώς και στην αντοχή των φυτών στο στρες (Chen et al., 2018). Εκτός όμως από τους AMF, το *L.japonicus* μπορεί να αλληλεπιδρά συμβιωτικά και με τον ενδοφυτικό μύκητα *Fusarium solani* στέλεχος K (FsK), ο οποίος θα αναλυθεί παρακάτω.



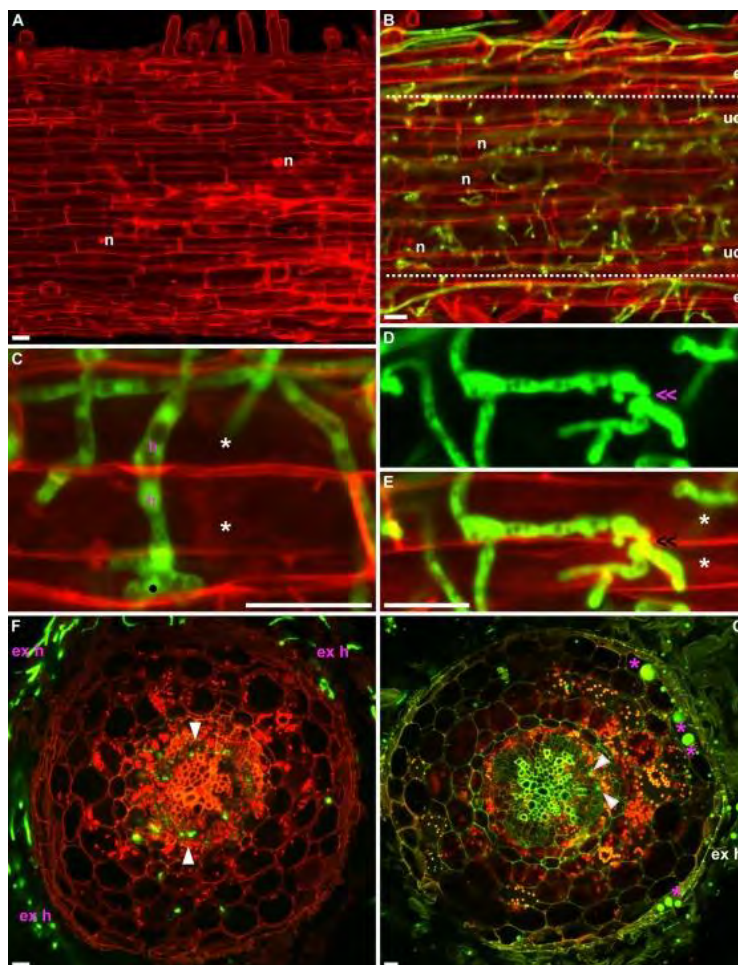
Εικόνα 2: Αναπαράσταση της διαδικασίας της φυματιογένεσης στην συμβίωση ψυχανθών φυτών-ριζοβίου (Basu & Kumar, 2020).

1.2 Ο ενδοφυτικός μύκητας *Fusarium solani* strain K.

Ως ενδόφυτο, ορίζεται ο οργανισμός που κατά τον αποικισμό του σε ζωντανούς εσωτερικούς ιστούς ξενιστών δεν προκαλεί εμφανή συμπτώματα ασθένειας (Petrini O, 1991). Οι ενδοφυτικοί μύκητες αντιπροσωπεύονται στην πλειονότητα τους από το είδος των ασκομυκήτων και στην μειονότητα τους από το είδος των βασιδομυκήτων (Madigan 2003). Στην κατηγορία των ασκομυκήτων ανήκει και το *Fusarium solani* στέλεχος K (FsK), ο μύκητας που θα μελετηθεί στην συγκεκριμένη διπλωματική εργασία. Το γένος *Fusarium*

χαρακτηρίζεται από μεγάλη προσαρμοστική ικανότητα σε διάφορα περιβάλλοντα λόγω της μεγάλης γενετικής πλαστικότητας και ποικιλομορφίας που εμφανίζει (Coleman et al., 2009). Γενικά, το γένος *Fusarium* περιλαμβάνει στην πλειονότητα του παθογόνους μύκητες, που μολύνουν φυτά σημαντικού αγρονομικού ενδιαφέροντος (Coleman, 2015), αλλά μπορούν να προσβάλλουν και τους ανθρώπους (Zhang et al., 2006). Παρόλα αυτά, ο FSK είναι ένα μη παθογόνο στέλεχος. Ειδικότερα, αποτελεί ένα ενδόφυτο το οποίο έχει απομονωθεί από τη ρίζα των φυτών της ντομάτας και ωφελεί το φυτό, προστατεύοντας το από βιοτικό και αβιοτικό στρες (Kavroulakis et al., 2007). Για παράδειγμα ο FSK, δρα ανταγωνιστικά ως προς τον μύκητα του εδάφους *Fusarium oxysporum f.sp. radicis-lycopersici* (FORL) και ως προς τον μύκητα του φυλλώματος *Septoria lycopersici*. Ακόμα, ενισχύει την αντοχή των φυτών τομάτας σε συνθήκες ξηρασίας (Kavroulakis et al., 2018, Skiada et al., 2020).

Τέλος, αυτό που αξίζει να τονιστεί είναι το γεγονός ότι ο FSK εγκαθιδρύει συμβιωτική σχέση με το *Lotus japonicus*. Πιο αναλυτικά, μετά τον εμβολιασμό, ο μύκητας πολλαπλασιάζεται πάνω στα κύτταρα της επιδερμίδας της ρίζας, στην συνέχεια τα αποικίζει και προοδευτικά εισέρχεται και στα κύτταρα του αγωγού συστήματος (εικόνα 3) (Skiada et al., 2019). Στο *L. japonicus* ο μύκητας αποικίζει προοδευτικά και το υπέργειο μέρος του φυτού (Skiada et al., 2019). Αντίθετα στην τομάτα και στην *Nicotiana bethamiana*, ο αποικισμός του FSK περιορίζεται στο ριζικό σύστημα του φυτού και μόνο (Kavroulakis et al., 2007; Dalakouras et al., 2023).

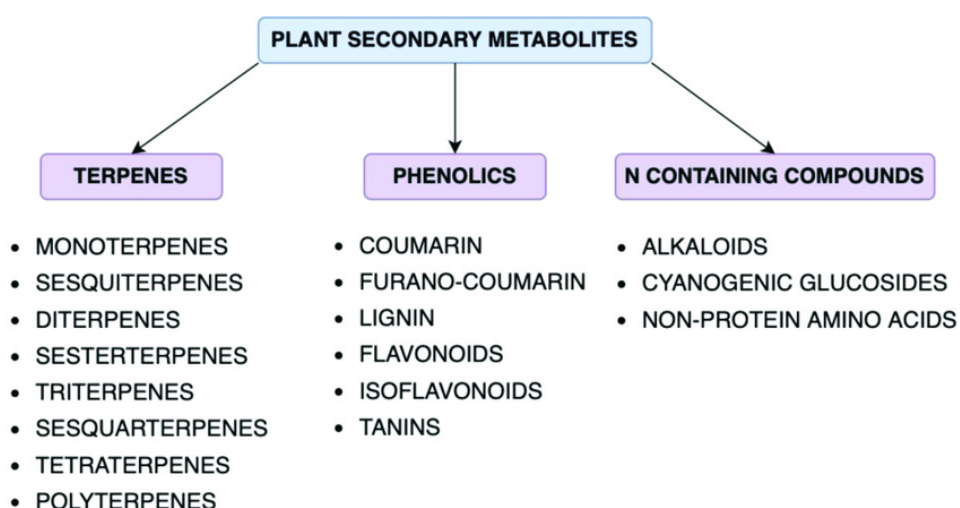


Εικόνα 3: Ο αποικισμός του FsK στο ριζικό σύστημα και στον βλαστό του *Lotus japonicus*. Οι εικόνες προέρχονται από μικροσκόπιο συνεστιακής μικροσκοπίας. Με κόκκινο φθορισμό απεικονίζεται ο ριζικός ιστός που έχει βαφτεί με ιωδιούχο προπίδιο. Με πράσινο φθορισμό απεικονίζονται οι υφές του FsK που έχει τροποποιηθεί ώστε να εκφράζει GFP. Στην εικόνα A αναπαρίστανται ιστοί ρίζας, μη αποικισμένοι από τον FsK. Στην εικόνα B βλέπουμε στις 3 ημέρες μετά τον εμβολιασμό, τον μύκητα (πράσινο) που έχει αποικίσει τα κύτταρα της επιδερμίδας και του φλοιού της ρίζας. Οι διακεκομμένες γραμμές διαχωρίζουν προσεγγιστικά τον επιδερμικό από τον φλοιώδη ιστό. Στην εικόνα C διακρίνεται μια μονή υφή (h) που διασχίζει γειτονικά κύτταρα επιδερμίδας. Στις εικόνες D και E απεικονίζεται μια διακλαδισμένη υφή του FsK που αποικίζει γειτονικά κύτταρα. Στην εικόνα F βλέπουμε εγκάρσια τομή της ρίζας όπου ο FsK ανιχνεύεται στο αγγειακό σύστημα της ρίζας (βέλη). Τέλος, στην εικόνα G βλέπουμε εγκάρσια τομή του βλαστού. Μυκητιακές δόμες φαίνονται στα επιδερμικά κύτταρα και στα κύτταρα του φλοιού (αστερίσκοι), πιθανώς και σε κύτταρα του ξυλώματος (βέλη) (Skiada et al., 2019).

1.3 Δευτερογενής μεταβολισμός και τερπένια.

Το *L. japonicus* παράγει αρκετούς δευτερογενείς μεταβολίτες. Οι δευτερογενείς μεταβολίτες παράγονται από ενδιάμεσες ενώσεις του πρωτογενούς μεταβολισμού του φυτού (Xu, Fazio, and Matsuda 2004) και εκφράζονται σε συγκεκριμένα αναπτυξιακά στάδια και ιστούς, σε αντίθεση με τους πρωτογενείς μεταβολίτες, που παράγονται και κατανέμονται συνεχώς σε όλον τον φυτικό οργανισμό όντας απαραίτητοι για αυτά (Engelberth, 2013, p.444). Οι δευτερογενείς μεταβολίτες συμβάλλουν στην επικοινωνία και στην ανάπτυξη αμυντικών μηχανισμών έναντι άλλων ειδών (Vranova et al, 2012; Philips et al, 2006). Παρόλο που οι δευτερογενείς μεταβολίτες δεν είναι αναγκαίοι για την επιβίωση του φυτού, η απουσία τους οδηγεί σε μακροπρόθεσμη βλάβη του φυτικού οργανισμού, εξασθενώντας έτσι, τους αμυντικούς μηχανισμούς του (Agostini-Costa et al., 1996; Keeling CI ,2006; Τσέκος Ι. 2004).

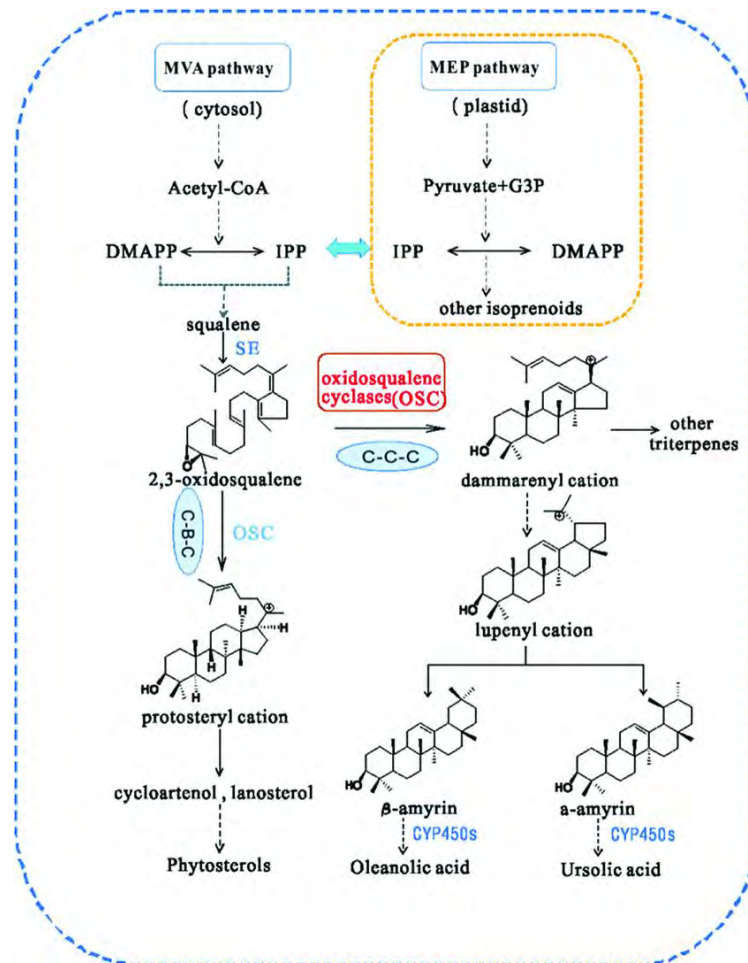
Οι δευτερογενείς μεταβολίτες, χωρίζονται σε τρεις διακριτές ομάδες (εικόνα 4) (Agostini-Costa et al., 1996; Kumar P, 2013). Αυτές οι ομάδες είναι οι φαινολικές ενώσεις, προερχόμενες από τις βιοσυνθετικές οδούς του σικιμικού και μηλονικού οξέος (Cheynier et al., 2013), οι αζωτούχες ενώσεις, προερχόμενες από τα αμινοξέα (Miyagawa, 2009) και τέλος η τρίτη ομάδα, τα τερπένια, τα οποία χαρακτηρίζονται ως μια ετερογενής ομάδα λιποειδών που συντίθενται από το μεβαλονικό οξύ και τη φωσφορική μεθυλερυθριτόλη (Vranová et al., 2012).



Εικόνα 4: Οι τρεις κύριες κατηγορίες δευτερογενών μεταβολιτών και οι ενώσεις που περιλαμβάνονται σε αυτές (Chorabik et al., 2022).

Τα τερπένια είναι η πιο δομικά και λειτουργικά ποικιλόμορφη κατηγορία δευτερογενών μεταβολιτών σε σύγκριση με τις υπόλοιπες ομάδες που αναφέρθηκαν (Sacchettini & Poulter 1997; Rodríguez-Concepción et al., 2013; Hill and Connolly 2018) και υπολογίζεται ότι υπάρχουν περισσότερες από 30.000 ενώσεις τερπενίων στα φυτά (Page et al., 2004). Με βάση τον αριθμό των μονάδων με πέντε άτομα άνθρακα που περιέχουν, τα τερπένια ταξινομούνται σε μονοτερπένια (2 C5 μονάδες), σεσκιτερπένια (3 C5 μονάδες), διτερπένια (4 C5 μονάδες), τριτερπένια (30 C), τετρατερπένια (40 C) και πολυτερπενοειδή ([C5]*n* , *n*>10).

Ανεξάρτητα από τη δομή τους όλα τα τερπένια συντίθενται από δύο πρόδρομα μόρια το πυροφωσφορικό ισοπεντενύλιο (IPP) και το πυροφωσφορικό διμεθυλαλλύλιο (DMAPP). Στα φυτά υπάρχουν δύο διακριτά μονοπάτια βιοσύνθεσης των δύο αυτών μορίων, το μονοπάτι του μεβαλονικού οξέος (MVA) (εικόνα 5) και το μονοπάτι της 4-φωσφορικής-2-μεθυλερυθρυτόλης (MEP) (εικόνα 5). Το καλύτερα μελετημένο μονοπάτι του MVA λαμβάνει χώρα στο κυτοσόλιο και είναι υπεύθυνο για την παραγωγή των σесκιτερπενίων, των στερολών και των τριτερπενίων, ενώ το μονοπάτι της MEP πραγματοποιείται στους χλωροπλάστες και βιοσυνθέτει τα μονοτερπένια, τα διτερπένια και τα τετρατερπένια.



Εικόνα 5: Τα βιοσυνθετικά μονοπάτια των τριτερπενίων (Lü et al., 2018).

Τα τερπένια, κατέχουν σημαντικότερους ρόλους στην φυτική ομοιόσταση, καθώς λειτουργούν ως ορμόνες, φωτοσυνθετικές χρωστικές, ενώ επίσης συμμετέχουν στην επικοινωνία και την άμυνα του φυτού και γενικότερα στην συμβίωση με άλλα φυτά (Harborne, 1991; McGarvey & Croteau, 1995; Liu et al., 2005). Ακόμα, έχει βρεθεί ότι γίνεται συσσώρευση στις ρίζες αρκετών φυτών πολλών ειδών τριτερπενίων, και ειδικότερα,

γλυκοζυλιωμένων τριτερπενίων, μια τροποποιημένη μορφή τους, με συμβολή στην άμυνα των φυτών έναντι μυκήτων και παθογόνων (Papadopoulos K. Et al. 1999; Haralampidis K., et al. 2001). Ένα παράδειγμα αποτελεί το τριτερπενικό γλυκοσίδιο αβενασίνη A-1 που προέρχεται από την αμυρίνη και ενισχύει την άμυνα του φυτού έναντι μυκητιακών παθογόνων στο ριζικό σύστημα (Papadopoulos, et al, 1999). Τέλος, έχει αποδειχθεί ότι ορισμένα τριτερπένια εμπλέκονται σε κρίσιμες διαδικασίες κατά τη διάρκεια της ανάπτυξης και της οργανογένεσης, όπως η λουπεόλη (lupeol) στη φυματογένεση (Delis et al. 2011) και η β-αμυρίνη (β-amygrin) στη φυματογένεση (Confalonieri et al. 2009) και στην ανάπτυξη της ρίζας (Kemen et al. 2014).

1.4 Η βιοσύνθεση των τριτερπενίων.

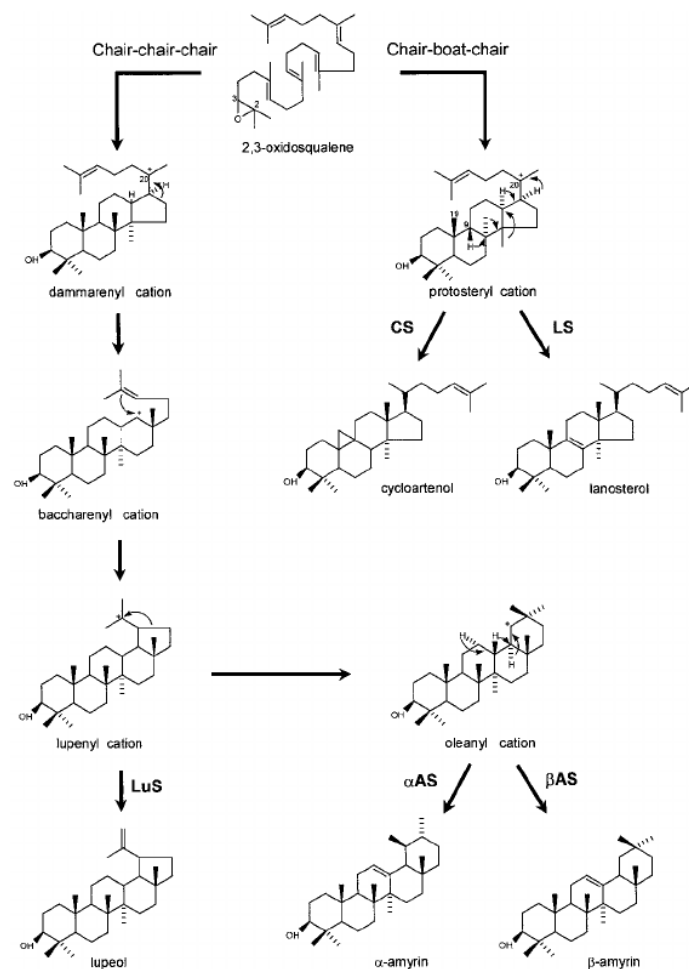
Όσον αφορά τα τριτερπένια, που προκύπτουν από το μονοπάτι του MVA, έχουν ως πρόδρομο μόριο το σκουαλένιο. Συγκεκριμένα, το IPP προστίθεται στο DMAPP προκειμένου να σχηματίσει το διφωσφορικό γερανύλιο (GPP). Περαιτέρω συμπύκνωση του GPP με την IPP προκαλεί το σχηματισμό του φαρνεσυλ-διφωσφατιδίου (FPP). Στην συνέχεια, δύο μόρια FPP ενώνονται με την δράση του ενζύμου συνθάση του σκουαλενίου (SQS), έχοντας ως αποτέλεσμα την βιοσύνθεση του σκουαλενίου (C30) (Holstein & Hohl, 2004), το οποίο στη συνέχεια οξειδώνεται σε 2,3-οξειδοσκουαλένιο (Abe et al., 1993; Haralampidis et al., 2002). Ακολουθεί η κυκλοποίηση του 2,3-οξειδοσκουαλενίου που καταλύεται από ειδικά ένζυμα που ονομάζονται κυκλάσες του οξειδοσκουαλενίου (oxidosqualene cyclases ή OSCs), οι οποίες μετατρέπουν το οξειδοσκουαλένιο σε μία ή περισσότερες κυκλικές τριτερπενικές αλκοόλες (Abe et al., 1993; Phillips et al., 2006).

Η κυκλοποίηση του 2,3-οξειδοσκουαλενίου προς τριτερπένια ή στερόλες έχει χαρακτηριστεί ως μία από τις πιο περίπλοκες ενζυμικές αντιδράσεις του μεταβολισμού των τερπενίων (Phillips et al. 2006) και σηματοδοτεί το σημείο στο οποίο θα γίνει ο διαχωρισμός του μονοπατιού για την παραγωγή μορίων του πρωτογενούς ή του δευτερογενούς μεταβολισμού του φυτού (Phillips et al., 2006). Μετά την αρχική κυκλοποίηση, οι σκελετοί των τριτερπενίων υφίστανται μια πληθώρα από τροποποιήσεις όπως οξειδώσεις, μεθυλιώσεις, ακετυλιώσεις και γλυκοσυλιώσεις από τροποποιητικά ή 'tailoring' ένζυμα, όπως ένζυμα του κυτοχρώματος P450, ακετυλοτρανσφεράσες, γλυκοζυλοτρανσφεράσες, οδηγώντας έτσι στην δημιουργία πολλών δομικά ποικίλων μορίων της ομάδας των τριτερπενίων (Osbourne et al., 2011).

1.5 Οι κυκλάσες του οξειδοσκουαλενίου στο *Lotus japonicus*.

Όπως αναφέρθηκε προηγουμένως το πρώτο βήμα της βιοσύνθεσης των τριτερπενίων είναι η κυκλοποίηση του 2,3-οξειδοσκουαλενίου, από τις κυκλάσες του οξειδοσκουαλενίου (oxidosqualene cyclases ή OSCs), καταλήγοντας στην παραγωγή τριτερπενίων απλής δομής όπως η α και β αμυρίνη και η λουπεόλη.

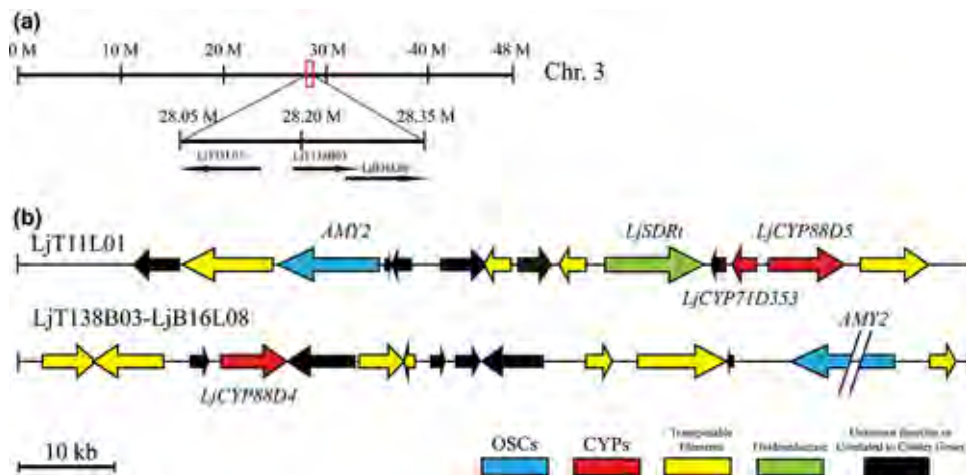
Στο φυτό *Lotus japonicus*, έχουν ταυτοποιηθεί 8 γονίδια που κωδικοποιούν για κυκλάσες του οξειδοσκουαλενίου (OSC) και βρίσκονται στο χρωμόσωμα 2 και στο χρωμόσωμα 3 (Sawai et al., 2006; Krokida et al., 2013). Η *OSC1* (*LjAMY1*) και *OSC3* έχουν ταυτοποιηθεί ως συνθάση της β -αμυρίνης και συνθάση της λουπεόλης αντίστοιχα, ενώ η *OSC8* (*LjAMY2*) χαρακτηρίζεται ως μία συνθάση τριτερπενοειδών μικτής δράσης που έχει την ικανότητα να παράγει β -αμυρίνη και δίδυδρο-λουπεόλη ως τα κύρια προϊόντα της (Krokida et al., 2013). Αναλυτικότερα, η συνθάση της λουπεόλης κυκλοποιεί το 2,3-οξειδοσκουαλένιο σχηματίζοντας έτσι το κατιόν της λουπεόλης, προωθώντας την επέκταση του δακτυλίου και αποσπώντας ένα πρωτόνιο για να σχηματιστεί η λουπεόλη. Σχετικά με την β -αμυρίνη, η συνθάση της παράγει επίσης το κατιόν της λουπεόλης επεκτείνοντας σε μεγαλύτερο βαθμό την επέκταση του δακτυλίου της λουπεόλης, πριν την αποπρωτονίωση της προς τον σχηματισμό της α - και β -αμυρίνης (εικόνα 6) (Phillips et al., 2006).



Εικόνα 6: Η κυκλοποίηση του 2,3-οξειδοσκουαλενίου προς παραγωγή τριτερπενίων (α-αμυρίνη, β-αμυρίνη και λουπεόλη) με τα υπεύθυνα ένζυμα για την κατάλυση των αντιδράσεων αυτών: η συνθάση της α-αμυρίνης (αAS), η συνθάση της β-αμυρίνης (βAS), η συνθάση της λουπεόλης (LuS). Ακόμα, διακρίνονται στο σχήμα και τα ένζυμα συνθάση της κυκλοαρτενόλης (CS) και συνθάση της λανοστερόλης (LS), τα οποία καταλύουν την μετατροπή του κατιόντος του πρωτοστερυλίου σε κυκλοαρτενόλη και λανοστερόλη αντίστοιχα. (Kushiro et al., 1999).

Συχνά στα φυτά, τα γονίδια παραγωγής τριτερπενίων είναι οργανωμένα σε μια δομή που ονομάζεται γονιδιακή συστοιχία (gene cluster). Οι γονιδιακές συστοιχίες ορίζονται ως τα γονίδια που κωδικοποιούν ένζυμα για το ίδιο βιοσυνθετικό μονοπάτι και εδράζονται γειτονικά στο ίδιο χρωμόσωμα. Η πρώτη από τις βιοσυνθετικές συστοιχίες γονιδίων τριτερπενίων που αναγνωρίστηκαν ήταν αυτής της αβενασίνης στην βρώμη. Εκτός από την βρώμη, συστοιχίες γονιδίων έχουν ταυτοποιηθεί στο *Arabidopsis thaliana* (Papadopoulou et al., 1999; Qi et al., 2004, 2006; Osbourn, 2010; Chu et al., 2011), αλλά και σε διάφορα άλλα είδη φυτών, όπως το ρύζι (Wilderman et al., 2004; Shimura et al., 2007; Swaminathan et al., 2009), το *Manihot esculenta* και η παπαρούνα (Winzer et al., 2012). Σαφώς η επαναλαμβανόμενη εμφάνιση συστοιχιών γονιδίων στα φυτά υπονοεί κάποια λειτουργική σημασία για αυτή τη μορφή γενετικής οργάνωσης.

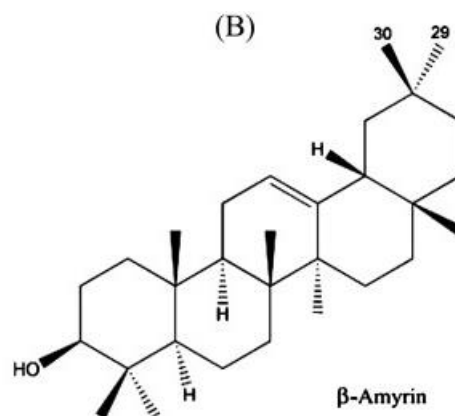
Όσον αφορά το *Lotus japonicus*, έχουν ταυτοποιηθεί δύο γονιδιωματικές περιοχές στο χρωμόσωμα 3, οι οποίες είναι οργανωμένες ως γονιδιακές συστοιχίες και κωδικοποιούν για γονίδια που εμπλέκονται στη βιοσύνθεση τριτερπενοειδών. Η πρώτη γονιδιακή συστοιχία αποτελείται από γονίδια που κωδικοποιούν το ένζυμο AMY2 και δύο ένζυμα κυτοχρώματος P450: τα LjCYP88D5 και LjCYP71D353 (Εικόνα 7). Τα δύο γονίδια του κυτοχρώματος P450 είναι γειτονικά το ένα με το άλλο σε απόσταση 60 kb από το AMY2. Ένα τέταρτο γονίδιο (LjSDRt), επίσης βρίσκεται σε αυτή την περιοχή, μεταξύ του AMY2 και των δύο γονιδίων του κυτοχρώματος P450 (Krokida et al., 2013). Η δεύτερη γονιδιακή συστοιχία βρίσκεται σε απόσταση 200 kb από την πρώτη και αποτελείται από μόλις δύο γονίδια: ένα που είναι πολύ παρόμοιο με το AMY2 (99% ομοιότητα στις αλληλουχίες των αμινοξέων τους) και ένα γονίδιο του κυτοχρώματος P450, το LjCYP88D4, που μοιάζει πολύ με το LjCYP88D5 (81% ομοιότητα στις αλληλουχίες των αμινοξέων τους). Η δεύτερη γονιδιακή συστοιχία έχει ονομαστεί ως AMY2-like (Krokida et al., 2013).



Εικόνα 7: α) Γενετικός χάρτης πιθανών γονιδιακών συστοιχιών στο χρωμόσωμα 3 του *Lotus japonicus*. β) Οργάνωση των γονιδίων της συστοιχίας του *AMY2* (Krokida et al., 2013).

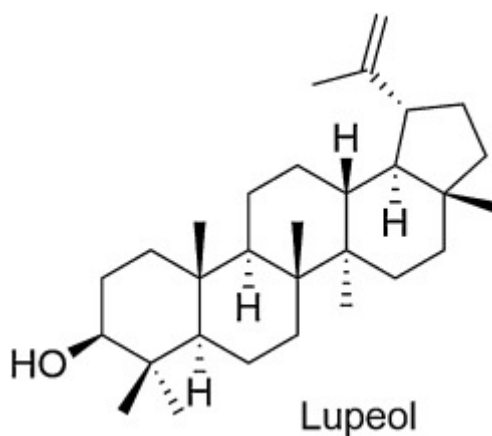
1.6 Λειτουργίες α- β- αμυρίνης και λουπεόλης.

Η α- β αμυρίνη καθώς και η λουπεόλη αποτελούν πολύ σημαντικά μόρια στον δευτερογενή μεταβολισμό των φυτών με πολλές λειτουργίες. Αναφορικά, λοιπόν, με την β-αμυρίνη (εικόνα 9), αποτελεί πρόδρομο μόριο των σαπωνινών, όπως η αντιμυκητιακή σαπωνίνη αβεννασίνη που βρίσκεται στις ρίζες του φυτού *Avena* (Papadopoulou et al., 1999; Haralampidis et al., 2001; Qi et al., 2004). Αρχικά, η β-αμυρίνη δεν έχει σημαντική αντιμικροβιακή δράση αλλά μετατρέπεται στη βιολογικά ενεργή μορφή της, μέσα από μια σειρά τροποποιήσεων των ενζύμων του κυτοχρώματος P450 (Iturbe-Ormaetxe I, Haralampidis K, Papadopoulou K, Osbourn AE, 2003). Ακόμα, σημαντική δράση έχει παρατηρηθεί να έχει σε ορισμένα φυτά όπως στο φυτό *Pisum sativum*, όπου οι σαπωνίνες συμβάλλουν στον βαρυτροπισμό και στην παραγωγή κυτταρίνης (Rahman et al., 2001). Επιπρόσθετα, έχει παρατηρηθεί στη βρώμη, ότι η αυξημένη περιεκτικότητα σε β-αμυρίνη στις ρίζες οδηγεί σε βραχύτερες ρίζες με ένα έντονο φαινότυπο hairy root (Kemen et al., 2014). Αναλυτικότερα, παρατηρήθηκε μια συσχέτιση μεταξύ του μήκους της ρίζας και της ποσότητας της β-αμυρίνης που συσσωρεύεται στις ρίζες, υποδεικνύοντας ότι η συσσώρευση αυξημένων επιπέδων β-αμυρίνης ενεργοποιεί αλλαγές στον κυτταρικό προσδιορισμό και στο μήκος της ρίζας (Moses et al., 2014). Αυτό που αξίζει να τονιστεί είναι, ότι έχει βρεθεί ότι η β-αμυρίνη είναι δομικό συστατικό της μεμβράνης κατά τη διάρκεια της φυσιολογικής ανάπτυξης στα ψυχανθή, όπως δηλαδή και το υπό μελέτη φυτό μας, και η σύνθεση της αυξάνεται κατά τη διάρκεια της δημιουργίας ριζόβιων και μυκορριζικών συμβιωτικών σχέσεων (Baisted, 1971; Hernandez & Cooke, 1996; Grandmougin-Ferjani et al., 1999; Iturbe-Ormaetxe et al., 2003).



Εικόνα 8: Η οργανική ένωση της β - αμυρίνης (Santos et al., 2012).

Αναφορικά με την λουπεόλη (εικόνα 10), συσχετίζεται με την φυματογένεση σε πολλά φυτά. Ένα χαρακτηριστικό παράδειγμα αποτελεί η συνθάση της λουπεόλης στο φυτό *Glycyrrhiza glabra*, η οποία εκφράζεται σε φυμάτια και καλλιεργημένα κύτταρα, στους ίδιους ιστούς όπου ανιχνεύεται και το βιτουλινικό οξύ που είναι μεταβολίτης της λουπεόλης (Hayashi et al., 2004). Επιπρόσθετα, η λουπεόλη αποδείχθηκε ότι εμπλέκεται στην αρνητική ρύθμιση των πρώιμων διαδικασιών της φυματογένεσης στο φυτό *Lotus japonicus* (Delis et al., 2011).



Εικόνα 10: Η οργανική ένωση της λουπεόλης (Li et al., 2021).

Συνοψίζοντας, η αλληλεπίδραση του *Lotus japonicus* με τον FsK αντιπροσωπεύει ένα πρωτότυπο σύστημα φυτού-ενδόφυτου, το οποίο μπορεί να αξιοποιηθεί για να μας βοηθήσει να κατανοήσουμε σε μεγαλύτερο βαθμό τους μηχανισμούς που χρησιμοποιούν τα ενδόφυτα, ώστε να διασφαλίσουν την εισοδό τους στον φυτικό οργανισμό και να εγκαθιδρύσουν συμβιωτική σχέση. Προς αυτήν την κατεύθυνση έγιναν μελέτες αρχικά για το γονίδιο *OSC3*, οι οποίες κατέδειξαν ότι παίζει κομβικό ρόλο στην ανάπτυξη και λειτουργία των φυματίων. Συγκεκριμένα, ύστερα από την σιγή του *OSC3* και τον μετασχηματισμό του φυτού *Lotus japonicus* με το *Mesorhizobium loti* (M. Loti), σημειώθηκε αύξηση στην παραγωγή φυματίων στα σιγισμένα φυτά, αναδεικνύοντας την λουπεόλη ως αρνητικό ρυθμιστή της παραγωγής φυματίων στις ρίζες των ψυχανθών (Delis et al., 2011). Ακολούθησε η μελέτη για το γονίδιο *AMY-2*, η οποία ανέδειξε ότι το γονίδιο αυτό αποτελεί μέρος γονιδιακής συστοιχίας (gene cluster) στο φυτό *Lotus japonicus*, τα γονίδια του οποίου συνεκφράζονται στις ρίζες του φυτού σε απόκριση στο αβιοτικό stress, αλλά και κατά την δημιουργία φυματίων τόσο σε αγρίου τύπου φυτά τόσο και σε μετασχηματισμένα με το *M. Loti* (Krokida et al., 2013). Σαφώς, η οργάνωση και η έκφραση του γονιδίου *AMY-2* μαζί με τα άλλα ρυθμιστικά γονίδια της κυκλοποίησης του 2,3-οξειδοσκουαλένιο της συστοιχίας στο φυτό υποδηλώνουν κάποια κοινή λειτουργική σημασία. Επιπλέον, η έκφραση της γονιδιακής συστοιχίας του *AMY-2* δεν μεταβλήθηκε καθόλου ακόμα και μετά τον μετασχηματισμό του φυτού με το *M. Loti* (Krokida et al., 2013). Επιπρόσθετα, το *M. loti*, ως ριζόβιο-συμβιωτικό βακτήριο, αποδείχθηκε ότι συμμετέχει στο Common Signaling Symbiotic Pathway (Skiada et al., 2020). Από την ίδια μελέτη, αποδείχθηκε ότι και ο FsK, ως συμβιώτης, συμμετέχει στο συγκεκριμένο σηματοδοτικό μονοπάτι. Όλα τα προαναφερθέντα αποτελέσματα τονίζουν τις εντυπωσιακές ομοιότητες όσον αφορά την μοριακή και κυτταρική βιολογία σύνθεσης και παραγωγής τριτερπενίων που διέπει την φυτική-ριζοβιακή αλληλεπίδραση, αναδεικνύοντας ένα κοινό μοντέλο δράσης των γονιδίων αυτών. Επομένως, εύλογα προκύπτουν τα ερωτήματα κατά πόσο ένα ενδόφυτο, όπως στην συγκεκριμένη περίπτωση ο FsK, μπορεί να επηρεάσει την έκφραση αυτών των γονιδίων καθώς και να συμμετέχει σε κοινό σηματοδοτικό μονοπάτι με αυτά.

2. ΣΚΟΠΟΣ

Στόχος τη παρούσας εργασίας ήταν να αποσαφηνίσουμε τον πιθανό βιολογικό ρόλο του ενδοφυτικού μύκητα *Fusarium solani* stain K (FsK) κατά την έκφραση των γονιδίων *AMY-1*, *AMY-2* και *OSC3*, τα οποία συμμετέχουν στην κυκλοποίηση του 2,3-οξειδοσκουαλενίου για την παραγωγή τριτερπενίων όπως είναι η α - β - αμυρίνη και η λουπεόλη, τα οποία λειτουργούν ως δευτερογενείς μεταβολίτες στα φυτά. Τα *OSC1* και *OSC3* έχουν ταυτοποιηθεί ως συνθάσες της β - αμυρίνης και λουπεόλης αντίστοιχα, ενώ η *OSC8* είναι συνθάση της οικογένειας των τριτερπενοειδών μικτής δράσης που καταλύει την σύνθεση β -αμυρίνη και δίδυδρο-λουπεόλη που αποτελεί ενδιάμεσο προϊόν του μεταβολισμού των τριτερπενίων.

3. Μέθοδοι και Υλικά

Η διαδικασία της προετοιμασίας των φυτών, ο εμβολιασμός τους και η δειγματοληψία είχαν πραγματοποιηθεί προηγουμένως στο εργαστήριο και δεν αποτέλεσαν το αντικείμενο της παρούσας πτυχιακής. Η διαδικασία που πραγματοποιήθηκε εν συντομία είναι η ακόλουθη:

Την πρώτη μέρα πραγματοποιείται ο σκαρφισμός των σπορίων MG20 του φυτού *Lotus japonicus* με την τοποθέτηση τους σε πυκνό θειϊκό (H_2SO_4) οξύ για 5 λεπτά και ύστερα ακολουθεί η έκπλυση αυτών πέντε φορές με απιονισμένο κρύο νερό. Προκειμένου να πραγματοποιηθεί η αποστείρωση των σπορίων, αυτά εμβαπτίζονται σε διάλυμα 2% υποχλωριώδους νατρίου και 0,02% Tween 20 (BDH) για 20 λεπτά. Στην συνέχεια, οι σπόροι ξεπλένονται 6 φορές με αποστειρωμένο απιονισμένο νερό. Την επόμενη ημέρα γίνεται η εκβλάστηση αυτών σε τριβλία, ο πάτος των οποίων καλύπτεται με 2 φύλλα διηθητικό χαρτί Whatmann 3MM, εμποτισμένα με αποστειρωμένο απιονισμένο dH_2O , τα οποία καλύφθηκαν στην συνέχεια με αλουμινόχαρτο. Την τρίτη ημέρα του πρωτοκόλλου αφαιρέθηκε το αλουμινόχαρτο και μετά από μία εβδομάδα πραγματοποιήθηκε το φύτευμα 3 φυτών ανά magenta (αποστειρωμένο υπόστρωμα άμμου βερμικουλίτη σε αναλογία 3:1), με 5 βιολογικές επαναλήψεις για κάθε πειραματική συνθήκη. Τα magenta ποτίστηκαν με 25 ml θρεπτικού Hoagland και ύστερα από 11 μέρες, πραγματοποιήθηκε ο εμβολιασμός των φυτών με 100 κονίδια FsK ανά ρίζα. Τέλος, ακολούθησε η δειγματοληψία στις 4 ημέρες μετά τον εμβολιασμό (dri) και στις 7dri. Η ανάπτυξη των φυτών πραγματοποιήθηκε σε θάλαμο φυτών με φωτοπερίοδο 16 h φως/8h σκοτάδι στους 22 °C.

3.1. Απομόνωση RNA με PIC και LiCl στο φυτό *Lotus japonicus*.

Αρχικά, γίνεται η προσθήκη 300 μ l διαλύματος απομόνωσης RNA (50 mM Tris-HCl, pH=8,3, 150 mM NaCl, 10mM EDTA, 1% w/v Lauryl sarcosine) και 300 μ l PIC (phenol (pH=5): isoamyl alcohol: chloroform σε αναλογία 24: 1: 24) ανά 100 mg ιστού. Στην συνέχεια, γίνεται ανάδευση με vortex για 30 sec και φυγοκέντρωση στα 13.000 rpm για 5 λεπτά σε θερμοκρασία δωματίου (RT). Το υπερκείμενο μεταφέρεται σε νέο σωληνάριο, όπου προστίθενται εκ νέου 300 μ l PIC, γίνεται ανάδευση με vortex για 30 sec και ξανά φυγοκέντρωση στα 13.000 rpm για 5 min (RT) και μεταφορά του υπερκειμένου σε νέο σωληνάριο. Στη συνέχεια, προστίθεται 0,1 επί του όγκου οξικό νάτριο 3M και 1 επί του όγκου παγωμένη ισοπροπανόλη και πραγματοποιείται απαλή ανάδευση του σωληναρίου. Στην συνέχεια, γίνεται φυγοκέντρωση στα 13.000 rpm για 15 min (RT). Μετά την απόρριψη του υπερκειμένου προστίθενται 187,5 μ l LiCl και 562,5 μ l 10T/10E (10mM Tris-HCl, pH=8,3, 10mM EDTA) και γίνεται αποθήκευση των δειγμάτων στους 4°C.

Την επόμενη μέρα, τα δείγματα φυγοκεντρούν στα 13.000 rpm για 15 min και ακολουθεί απόρριψη του υπερκειμένου. Ύστερα, γίνεται προσθήκη 500 μ l κρύας αιθανόλης 70%, φυγοκέντρωση στα 13.000 rpm για 15 min (RT) και ξανά απόρριψη του υπερκειμένου. Τα δείγματα αφήνονται για 7 λεπτά σε θερμοκρασία δωματίου και στη συνέχεια στον πάγο με ανοιχτό καπάκι, ώστε να εξατμιστεί η υπόλοιπη αιθανόλη. Ακολουθεί η επαναδιαλυτοποίηση των δειγμάτων με 15 μ l ddH_2O για δείγματα ρίζας και 30 μ l για

δείγματα βλαστού. Ακολουθεί η μέτρηση και η ποσοτικοποίηση της συγκέντρωσης τους με την χρήση του μηχανήματος Nanodrop. Τέλος, ακολουθεί η αραίωση των δειγμάτων, ώστε να έχουν τελική συγκέντρωση 10 ng/μl και τελικό όγκο 20μl και ύστερα γίνεται χρήση της DNase I στα δείγματα όπως θα γίνει αναφορά στην συνέχεια.

3.2. DNase I και διαγνωστική Kapa Taq PCR.

Τα αραιωμένα δείγματα τελικής συγκέντρωσης 10ng/μl και τελικού όγκου 20μl υφίστανται την δράση της DNase I με σκοπό την απομάκρυνση τυχών υπολειμμάτων γενωμικού DNA. Η διαδικασία πραγματοποιείται με το kit Thermoscientific, DNase I, RNase-free 1000U, με τα συστατικά και τις ποσότητες που αναγράφονται στον πίνακα 1. Τα δείγματα με την DNase I επωάζονται μηχανήμα της PCR στους 37°C για 40 λεπτά . Ύστερα ακολουθεί η διαγνωστική Kapa Taq PCR για τον τελικό έλεγχο ύπαρξης γενωμικού DNA με τα αντιδραστήρια που αναγράφονται στον πίνακα 2, τους εκκινητές που αναγράφονται στον πίνακα 3 και τις συνθήκες της αντίδρασης που αναγράφονται στον πίνακα 4. Μετά την ηλεκτροφόρηση των δειγμάτων, ακολουθεί η αδρανοποίηση της DNase I με την προσθήκη 1 μl EDTA (25mM) ανά 10 μl όγκου αντίδρασης και επώαση των δειγμάτων στους 65°C για 10 λεπτά.

Αντιδραστήρια	Ποσότητα
Δείγμα RNA (10ng/μl)	20μl
10x Reaction Buffer	2μl
DNase I (1U/μl)	2μl
RNaseOUT (40 U/μl)	2μl

--	--

Πίνακας 1: Απαιτούμενες ποσότητες και αντιδραστήρια για την αντίδραση της DNase I.

Αντιδραστήρια	Ποσότητα ($V_{\text{τελικό}}=20\mu\text{l}$)
Kapa Taq Polymerase (5 U/ μL)	0,08 μl
10x Buffer με Mg^{+2}	2 μl
10 μM Forward Primer	0,8 μl
10 μM Reverse Primer	0,8 μl
10 mM dNTPs	0,4 μl
DNase I treated RNA (10 ng/ μl)	1 μl
ddH ₂ O	14,92 μl

Πίνακας 2: Αντιδραστήρια με τις ποσότητες και τις συγκεντρώσεις τους που χρησιμοποιήθηκαν για τον έλεγχο ύπαρξης γενωμικού DNA μέσω Kapa Taq PCR.

Εκκινητές	Sequence 5' --> 3'
Εμπρόσθιος εκκινητής LjUBI_GEN_F	ATGCAGATCTTTTGTGAAGAC
Οπίσθιος εκκινητής LjUBI_GEN_R	ACCACCACGGAAGACGGAG

Πίνακας 3: Αλληλουχίες εκκινητών της διαγνωστικής Kapa Taq PCR.

Στάδια της PCR	Θερμοκρασία	Διάρκεια	Κύκλοι
Αρχική αποδιάταξη	95°C	3min	Πριν τον 1ο κύκλο
Αποδιάταξη DNA-στόχου	95°C	30 sec	40 κύκλοι
Υβριδοποίηση εκκινητών	46°C	30sec	
Επιμήκυνση εκκινητών	72°C	20sec	
Τελική επιμήκυνση	72°C	2min	Μετά τον τελευταίο κύκλο

Πίνακας 4: Στάδια και συνθήκες της PCR που χρησιμοποιήθηκαν για τον έλεγχο ύπαρξης γενωμικού DNA.

3.3 Αλυσιδωτή αντίδραση πολυμεράσης πραγματικού χρόνου (RT-qPCR).

Στην παρούσα εργασία η έκφραση των γονιδίων *Tef158*, *Prp27b*, *ENOD40*, *AMY1*, *AMY2* και *OSC3* μετρήθηκε με αλυσιδωτή αντίδραση πολυμεράσης πραγματικού χρόνου (RT-qPCR) μέσω του kit “Luna Universal one-step RT-qPCR” (New England Biolabs) σύμφωνα με τις οδηγίες του κατασκευαστή, με τους εκκινητές που αναγράφονται στον πίνακα 5 καθώς και τις συνθήκες που αναγράφονται στον πίνακα 6 και τα αντιδραστήρια που αναγράφονται στον πίνακα 7. Ως γονίδιο αναφοράς χρησιμοποιήθηκε το γονίδιο της ουβικουιτίνης (*UBI*) του *L. Jaronicus*. Για κάθε δείγμα πραγματοποιήθηκαν δύο τεχνικές επαναλήψεις και για το γονίδιο αναφοράς και για το κάθε υπό μελέτη γονίδιο. Τα επιπέδα έκφρασης των γονιδίων, υπολογίστηκαν με τη μέθοδο σχετικής ποσοτικοποίησης $2^{-\Delta Ct}$. Τα σχετικά επίπεδα έκφρασης αναπαραστήθηκαν σε διαγράμματα ράβδων. Για την στατιστική ανάλυση των

αποτελεσμάτων επιλέχθηκε η μέθοδος της ανάλυσης διακύμανσης κατά ένα παράγοντα (one-way ANOVA). Το κατώφλι στατιστικής σημαντικότητας ορίστηκε $p \text{ value} \leq 0.05$.

Γονίδια	Εκκινητές	Sequence 5' --> 3'
<i>Ουβικουιτίνη (UBI) L. japonicus</i>	LjUBI_RT_F	TTCACCTTGTGCTCCGTCTTC
	LjUBI_RT_R	CCAGAAGAGGCCACAACAAAC
<i>ENOD40 L. japonicus</i>	LjENOD40-1_F	GGAGGTATGCTCAAACATTC
	LjENOD40-1_R	CCTACTCATCTGCAGAACTG
<i>PRp27b L. japonicus</i>	LjPRp27b_F	CATGGTTATGATGTTACTGCTCGT
	LjPRp27b_R	GATCACTATAACCAGTCCTCATCT
<i>AMY-1 L. japonicus</i>	RTAMY1-2R_F	ATTTCTACTCACTACACAAAG
	RTAMY1-2R_R	GCCAGAATGAATTAAACCC
<i>AMY-2 L. japonicus</i>	AMYboth_F	ATGGCCCTAGCTGAATATC
	AMY2only_R	TTGTACAAGGTCAACTGCAG
<i>OSC3 L. japonicus</i>	OSC3_F	TCAGAGGCTTACAACTTCATTTAG
	OSC3_R	GTTGGTCCATACTCTTCACTC
<i>Tef</i> FsK	Tef158_F	GGGTGGTTGAGGACAATGAC
	Tef158_R	CAGCTCACTGAGGGTCTTCC

Πίνακας 5: Αλληλουχία εκκινητών που χρησιμοποιήθηκαν για την RT-qPCR

Στάδια της RT-qPCR	Θερμοκρασία	Διάρκεια	Κύκλοι
Αντίστροφη μεταγραφή	55°C	10min	Πριν τον 1ο κύκλο
Αρχική αποδιάταξη	95°C	1min	
Αποδιάταξη υποστρώματος	95°C	10sec	40 κύκλοι
Υβριδοποίηση εκκινητών και επιμήκυνση	60°C	30sec	

Πίνακας 6: Συνθήκες αντίδρασης της RT-qPCR.

Αντιδραστήρια	V _{τελικό} =10μl
Buffer	5μl
Enzyme Mix	0,5μl
Forward Primer	0,4μl
Reverse Primer	0,4μl
Luna Water	2,7μl
Δείγμα RNA (10 ng/μl)	1μl

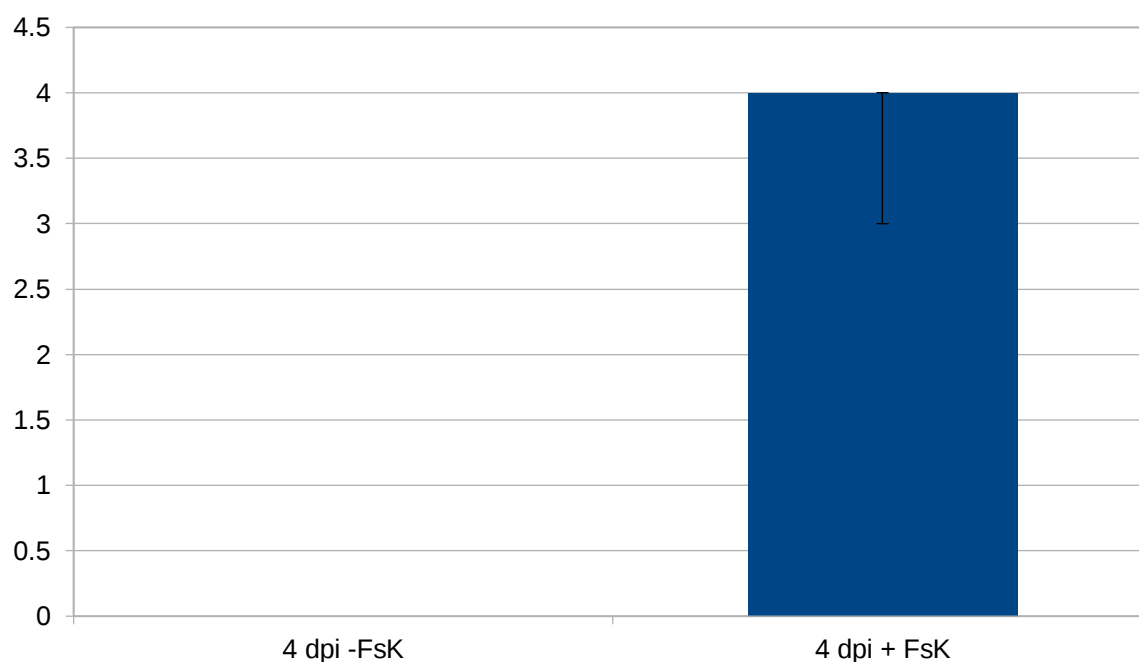
Πίνακας 7: Αντιδραστήρια και ποσότητες για την RT-qPCR.

4. ΑΠΟΤΕΛΕΣΜΑΤΑ

4.1 Έλεγχος αποικισμού του ψυχανθούς *Lotus japonicus* από τον ενδοφυτικό μύκητα FsK στις 4dpi και 7dpi.

Ο ενδοφυτικός μύκητας FsK αποικίζει το ψυχανθές *Lotus japonicus* εισέρχοντας αρχικά από το ριζικό σύστημα του φυτού. Για αυτόν τον λόγο, ελέγχθηκε ο ριζικός αποικισμός του φυτού από τον ενδοφυτικό μύκητα FsK. Αυτό πραγματοποιήθηκε με την μέθοδο της RT-qPCR με εκκινητές ειδικούς για το γονίδιο *Tef158* του μύκητα. Οι τιμές κανονικοποιήθηκαν ως προς το γονίδιο της ουβικουιτίνης του *Lotus japonicus*. Στο διάγραμμα 1 φαίνεται η συγκεκριμένη μελέτη για τις 4 μέρες μετά τον εμβολιασμό (dpi) και στο διάγραμμα 2 για τις 7 μέρες μετά τον εμβολιασμό (7dpi). Συνολικά, για τον αποικισμό ή μη του φυτού στις 4 μέρες από τον ενδοφυτικό μύκητα, πραγματοποιήθηκαν 2 τεχνικές επαναλήψεις για 5 βιολογικές επαναλήψεις. Από τις 5 βιολογικές επαναλήψεις, οι 4 σημείωσαν αποικισμό από τον ενδοφυτικό μύκητα, δηλαδή ποσοστό 80%. Στο διάγραμμα 1 αναπαρίστανται τα σχετικά επίπεδα έκφρασης του γονιδίου *Tef158* μόνο για τις βιολογικές επαναλήψεις που παρουσίασαν αποικισμό. Όσον αφορά τον αποικισμό του φυτού στις 7 μέρες, συνολικά, πραγματοποιήθηκαν 2 τεχνικές επαναλήψεις για 5 βιολογικές επαναλήψεις. Από τις 5 βιολογικές επαναλήψεις, οι 2 σημείωσαν αποικισμό από τον ενδοφυτικό μύκητα, δηλαδή ποσοστό 40%. Στο διάγραμμα 2 φαίνονται τα σχετικά επίπεδα έκφρασης του γονιδίου *Tef158* μόνο για τα 2 αποικισμένα δείγματα (4 dpi +FsK) σε σχέση με τα μη αποικισμένα control (4 dpi -FsK).

Αρχικά ελέγχθηκε η απόκριση του φυτού παρουσία του ενδοφυτικού μύκητα FsK. Συγκεκριμένα με RT-qPCR μελετήθηκε η έκφραση του γονιδίου του *Tef158*. Όπως φαίνεται και στο διάγραμμα που ακολουθεί η έκφραση του γονιδίου *Tef158* διεγείρει τον αποικισμό σε ποσοστό 80%. Τα αποτελέσματα εκφράζονται σε συνάρτηση της έκφρασης του γονιδίου της ουβικουιτίνης. Το αποτέλεσμα αναπαράγεται σε μικρότερο ποσοστό στις 7 ημέρες από τον αποικισμό υποδηλώνοντας την ύπαρξη μηχανισμών ή/και πιθανώς την εμπλοκή και άλλου μονοπατιού στην διαδικασία αποικισμού.



Διάγραμμα 1: Σχετικά επίπεδα έκφρασης του γονιδίου *Tef158* στις 4 μέρες μετά τον εμβολιασμό του φυτού (+Fsk) σε σχέση με τα μη εμβολιασμένα φυτά control (-Fsk). Τα δεδομένα αυτά αναπαριστούν μόνο τις 4 βιολογικές επαναλήψεις, οι οποίες σημείωσαν αποικισμό από τον ενδοφυτικό μύκητα.

Διάγραμμα 2: Σχετικά επίπεδα έκφρασης του γονιδίου *Tef158* στις 7 μέρες μετά τον εμβολιασμό του φυτού (+Fsk) σε σχέση με τα μη εμβολιασμένα φυτά control (-Fsk). Τα δεδομένα αυτά αναπαριστούν μόνο τις 2 βιολογικές επαναλήψεις οι οποίες σημείωσαν αποικισμό από τον ενδοφυτικό μύκητα.

4.2 Επίπεδα έκφρασης γονιδίων δεικτών παρουσίας του μύκητα.

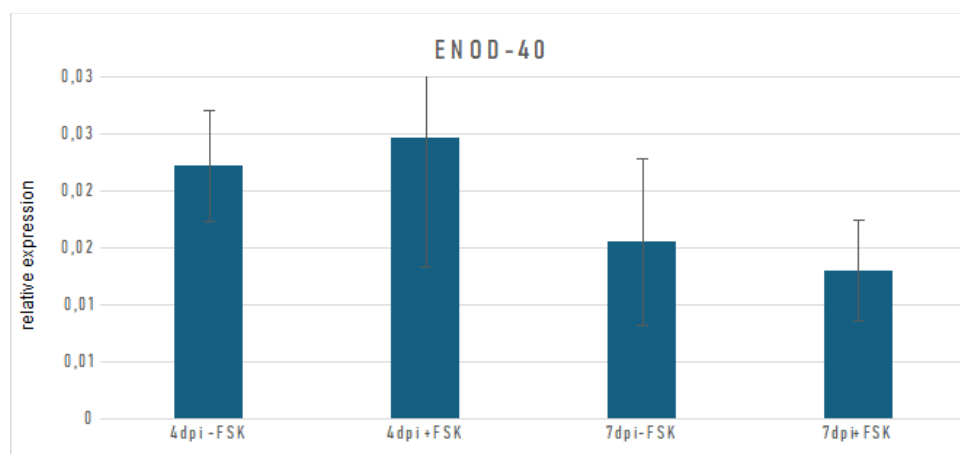
ση τα αποτελέσματα της RT-qPCR για το γονίδιο *Tef158*, ο αποικισμός του μύκητα δεν

το *Lotus japonicus* αποικίζει στις 4dpi (Σκιασα et al., 2020). Προχωρήσαμε λοιπόν στην μελέτη έκφρασης δύο γονιδίων δεικτών, τα οποία εκφράζονται στις ρίζες στα αρχικά στάδια της εγκαθίδρυσης συμβιωτικής σχέσης μεταξύ φυτού και ενδόφυτου. Αυτά τα γονίδια είναι τα *ENOD40* και *PRp27b*. Ειδικότερα, το γονίδιο *Enod40* (*Early Nodulin 40*) είναι ένα γονίδιο που εμπλέκεται στη διαδικασία σχηματισμού φυματίων στα ψυχανθή, που είναι το αποτέλεσμα

της συμβιωτικής αλληλεπίδρασης του φυτού με τα ριζόβια. Το *Enod40* εκφράζεται σχετικά νωρίς στη διαδικασία σχηματισμού αυτών (Delis et al. 2011). Όσο αναφορά την πρωτεΐνη PRp27b (pathogenesis related protein), είναι μια πρωτεΐνη πλούσια σε προλίνη που εμπλέκεται σε κρίσιμες κυτταρικές διεργασίες, συμπεριλαμβανομένης της απόκρισης στο στρες και των περιβαλλοντικών ερεθισμάτων, όπως στην δικιά μας περίπτωση που σχετίζεται με την έναρξη ανάπτυξης συμβιωτικής σχέσης του FSK με το *Lotus japonicus*. Το συγκεκριμένο γονίδιο έχει βρεθεί ότι επάγεται σε πολύ μεγάλο βαθμό (έως 25 φορές περισσότερο) στις 4-6dpi παρουσία FSK, καθώς και ότι τα επίπεδα μεταγραφής του *LjPRp27b* σε εμβολιασμένα φυτά με τον FSK παραμένουν υψηλά μέχρι και το τελευταίο χρονικό σημείο που μελετήθηκε (12dpi) στην συγκεκριμένη μελέτη (Skiada et al., 2020).

Επομένως, παρόλο που μπορεί να μην αποικίστηκαν όλα τα φυτά που μελετήσαμε, αν τα δύο αυτά γονίδια υπερεκφράζονται στα μη αποικισμένα φυτά, αυτό αποτελεί ένδειξη ότι το φυτό αντιλαμβάνεται την ύπαρξη του FSK, ακόμα και αν δεν έχει αποικιστεί ακόμα από αυτό.

Η συμβολή του *ENOD40* στην διαδικασία αποικισμού μέσω της δημιουργίας φυματίων καθώς και του γονιδίου *PRp27b* να αντιλαμβάνεται την έναρξη της συμβιωτικής σχέσης μεταξύ των 2 υπό μελέτη οργανισμών μας αποτέλεσαν τα πρώτα γονίδια που μελετήσαμε για να επιβεβαιώσουμε την υπόθεση μας. Παρουσία λοιπόν FSK σε φυτά 4dpi, τα επίπεδα έκφρασης του *ENOD40* παρουσιάζονται αυξημένα σε σχέση με τα φυτά που αναπτύχθηκαν απουσία του μύκητα, όπως φαίνεται στο διάγραμμα 3. Το συγκεκριμένο αποτέλεσμα φαίνεται να αναστρέφεται την ημέρα 7 όπου τα επίπεδα του *ENOD40* εμφανίζονται χαμηλότερα στα (+) FSK φυτά. Από τη μελέτη της έκφρασης γονιδίου, δεν επιβεβαιώθηκε η επαγωγή της έκφρασης του γονιδίου.



Διάγραμμα 3: Σχετικά επίπεδα έκφρασης του γονιδίου *ENOD40* στις 4 και 7 μέρες μετά τον εμβολιασμό του φυτού (+FSK) σε σχέση με τα μη εμβολιασμένα φυτά (-FSK). Τα δεδομένα αυτά αναπαριστούν 2 τεχνικές επαναλήψεις για 5 βιολογικές επαναλήψεις για την κάθε συνθήκη.

Η στατιστική ανάλυση των αποτελεσμάτων έγινε με την δοκιμασία one-way ANOVA. Το αποτέλεσμα ήταν $p\text{ value}=0,14$, επομένως δεν υπάρχει στατιστικά σημαντική διαφορά στην έκφραση του γονιδίου παρουσία και απουσία μύκητα.

Όσον αφορά το γονίδιο *PRp27b*, παρουσία FsK όπως φαίνεται και στο διάγραμμα 4 την ημέρα 4 τα επίπεδα έκφρασης του γονιδίου παρουσιάζονται αυξημένα σε σχέση με τα φυτά που αναπτύχθηκαν απουσία του μύκητα. Το συγκεκριμένο μοτίβο φαίνεται να είναι το ίδιο και την ημέρα 7 όπου τα επίπεδα του *PRp27b* εμφανίζονται υψηλότερα στα (+) FsK φυτά. Έτσι, ακολούθησε η στατιστική ανάλυση. Η στατιστική ανάλυση των αποτελεσμάτων έγινε με την δοκιμασία one-way ANOVA. Το αποτέλεσμα ήταν $p\text{ value}=0,15$, επομένως δεν υπάρχει στατιστικά σημαντική διαφορά στην έκφραση του γονιδίου παρουσία και απουσία μύκητα.

Διάγραμμα 4: Ποσοτικοποιημένα επίπεδα έκφρασης του γονιδίου *PRp27b* στις 4 και 7 μέρες ανάπτυξης του φυτού παρουσία (+FsK) και απουσία (-FsK) του. Τα δεδομένα αυτά αναπαριστούν 2 τεχνικές επαναλήψεις για 5 βιολογικές επαναλήψεις για την κάθε συνθήκη.

4.3 Επίπεδα έκφρασης του γονιδίου AMY-1 παρουσία του μύκητα

Όσον αναφορά το γονίδιο *AMY-1*, παρουσία λοιπόν FsK όπως φαίνεται και στο διάγραμμα 5 την ημέρα 4 τα επίπεδα έκφρασης του γονιδίου παρουσιάζονται μειωμένα σε σχέση με τα φυτά που αναπτύχθηκαν απουσία του μύκητα. Το συγκεκριμένο αποτέλεσμα φαίνεται να αναστρέφεται την ημέρα 7 όπου τα επίπεδα του γονιδίου *AMY-1* εμφανίζεται οριακά υψηλότερα στα (+) FsK φυτά. Η στατιστική ανάλυση των αποτελεσμάτων έγινε με την δοκιμασία one-way ANOVA. Το αποτέλεσμα ήταν $p\text{ value}=0,067$, επομένως δεν υπάρχει στατιστικά σημαντική διαφορά στην έκφραση του γονιδίου παρουσία και απουσία μύκητα.

Διάγραμμα 5 Ποσοτικοποιημένα επίπεδα έκφρασης του γονιδίου *AMY-1* στις 4 και 7 μέρες ανάπτυξης του φυτού παρουσία (+FsK) και απουσία (-FsK) του. Τα δεδομένα αυτά αναπαριστούν 2 τεχνικές επαναλήψεις για 5 βιολογικές επαναλήψεις για την κάθε συνθήκη.

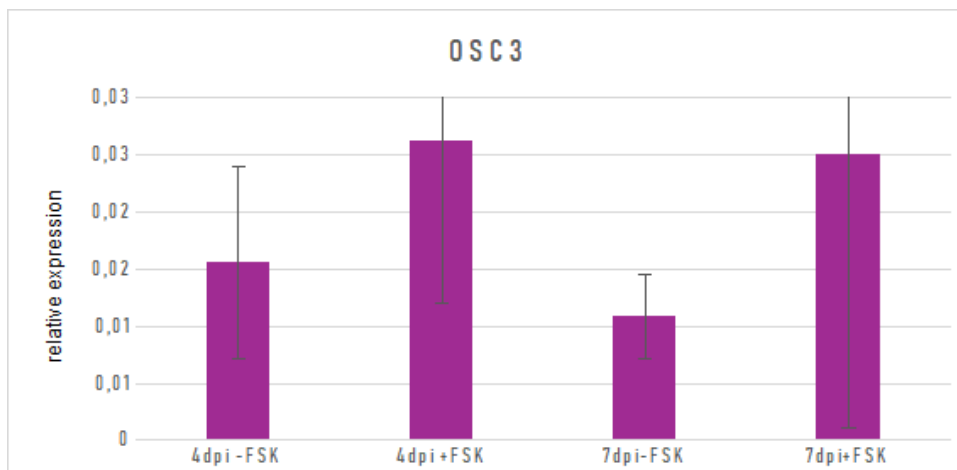
4.4 Επίπεδα έκφρασης του γονιδίου AMY-2 παρουσία του μύκητα

Όσον αναφορά το γονίδιο *AMY-2*, παρουσία λοιπόν FSK όπως φαίνεται και στο διάγραμμα 6 την ημέρα 4 τα επίπεδα έκφρασης του γονιδίου παρουσιάζονται αυξημένα σε σχέση με τα φυτά που αναπτύχθηκαν απουσία του μύκητα. Το συγκεκριμένο αποτέλεσμα φαίνεται να διατηρείται και την ημέρα 7 όπου τα επίπεδα του γονιδίου *AMY-2* εμφανίζονται οριακά μεγαλύτερα στα (+) FSK φυτά. Η στατιστική ανάλυση των αποτελεσμάτων έγινε με την δοκιμασία one-way ANOVA. Το αποτέλεσμα ήταν $p\text{ value}=0,22$, επομένως δεν υπάρχει στατιστικά σημαντική διαφορά στην έκφραση του γονιδίου παρουσία και απουσία μύκητα.

Διάγραμμα 6: Ποσοτικοποιημένα επίπεδα έκφρασης του *AMY-2* στις 4 και 7 μέρες ανάπτυξης του φυτού παρουσία (+FSK) και απουσία (-FSK) του. Τα δεδομένα αυτά αναπαριστούν 2 τεχνικές επαναλήψεις για 5 βιολογικές επαναλήψεις για την κάθε συνθήκη.

4.5 Επίπεδα έκφρασης του γονιδίου *OSC3* παρουσία του μύκητα

Όσον αναφορά το γονίδιο *OSC3*, παρουσία λοιπόν FSK όπως φαίνεται και στο διάγραμμα 7 την ημέρα 4 τα επίπεδα έκφρασης του γονιδίου παρουσιάζονται αυξημένα σε σχέση με τα φυτά που αναπτύχθηκαν απουσία του μύκητα. Το συγκεκριμένο αποτέλεσμα φαίνεται να διατηρείται και την ημέρα 7 όπου τα επίπεδα του γονιδίου *OSC3* εμφανίζεται μεγαλύτερα στα (+) FSK φυτά. Με βάση την βιβλιογραφία που προ αναφέρθηκε, αποτελεί ένα αναμενόμενο αποτέλεσμα, καθώς το τριτερπένιο λουπεόλη, της οποίας η συνθάση κωδικοποιείται από το γονίδιο *OSC3*, υπερεκφράζεται και είναι αρνητικός ρυθμιστής κατά την διαδικασία της φυματογένεσης (Delis et al., 2011). Για τον λόγο αυτό συνεχίσαμε και στην στατιστική ανάλυση του συγκεκριμένου αποτελέσματος. Η στατιστική ανάλυση των αποτελεσμάτων έγινε με την δοκιμασία one-way ANOVA. Το αποτέλεσμα ήταν $p\text{ value}=0,41$, επομένως δεν υπάρχει στατιστικά σημαντική διαφορά στην έκφραση του γονιδίου παρουσία και απουσία μύκητα.



Διάγραμμα 7: Ποσοτικοποιημένα επίπεδα έκφρασης του *OSC3* στις 4 και 7 μέρες ανάπτυξης του φυτού παρουσία (+FsK) και απουσία (-FsK) του. Τα δεδομένα αυτά αναπαράστανται 2 τεχνικές επαναλήψεις για 5 βιολογικές επαναλήψεις για την κάθε συνθήκη.

5. ΣΥΖΗΤΗΣΗ

Στόχος της παρούσας πτυχιακής εργασίας ήταν η μελέτη της επίδρασης του ενδοφυτικού μύκητα *Fusarium solani* στέλεχος K στην έκφραση γονιδίων της βιοσύνθεσης τριτερπενίων στο φυτό *Lotus japonicus*. Από αποτελέσματα προηγούμενων εργασιών του εργαστηρίου γνωρίζουμε ότι η συμβίωση του φυτού με τον ενδοφυτικό μύκητα μπορεί να έχει ευεργετικό ρόλο όχι μόνο στην αύξηση και ανάπτυξη του φυτού αλλά και στη φυματογένεση (Delis et al., 2011). Τα αποτελέσματα που προηγήθηκαν συνηγορούν στην υπόθεση μας ότι η παρουσία του ενδόφυτου διεγείρει την έκφραση συγκεκριμένων γονιδίων που εμπλέκονται στην ρύθμιση της παραγωγής τριτερπενίων διεγείροντας τις επαγόμενες από αυτά διεργασίες που ενισχύουν την συμβίωση και την επικοινωνία. Δεδομένα που προέκυψαν από τον αποικισμό παρουσία του FSK υποστηρίζουν αύξηση στην έκφραση των *AMY-1* και *AMY-2* που αποτελούν κρίσιμους ρυθμιστές στην παραγωγή β – αμυρίνης και λουπεόλης.

Τα παραπάνω ευρήματα υποδηλώνουν ότι ενδεχομένως υπάρχει η δυνατότητα πλαστικότητας του ενδοφυτικού μύκητα σχετικά με τον αποικισμό του και σε άλλα είδη φυτών όπως της ντομάτας, από την οποία πρώτο απομονώθηκε, αλλά και στο *L. japonicus* δίνοντας το έναυσμα για μια περαιτέρω μελέτη του (Skiada et al., 2020). Από μελέτες της Skiada et al. βρέθηκε επίσης πως το *Lotus japonicus* είναι ικανό να συμβιώνει με διάφορους μικροοργανισμούς, όπως μύκητες και ριζόβια στο ριζικό του σύστημα αναπτύσσοντας ερευνητικά ερωτήματα, αλλά και πιθανές ερευνητικές δυνατότητες εκμετάλλευσης της συγκεκριμένης αλληλεπίδρασης προς όφελος του φυτού και κατά επέκταση του ανθρώπου.

Τέλος, είναι σημαντικό να αναφερθεί σε αυτό το σημείο, ότι τριτερπένια, όπως η β-αμυρίνη και η λουπεόλη έχουν εντοπισθεί σε ρίζες οσπρίων κατά τη διαδικασία της εγκαθίδρυσης ριζοβιακών και μυκορριζικών συμβιώσεων (Paradouroulou et al., 1999; Qi et al., 2004, 2006; Osbourn, 2010; Chu et al., 2011). Αυτό υποδηλώνει ότι τα τριτερπενοειδή εντοπίζονται σε συγκεκριμένους φυτικούς ιστούς και παίζουν κομβικό ρόλο σε σημαντικές ρυθμιστικές διεργασίες του φυτού (Sawai et al., 2006). Όσον αφορά το γονίδιο *AMY2*, μελέτες σίγησης του οδήγησαν σε καταστολή παραγωγής φυματίων, ενώ αντίθετα, όταν ο FsK εισχώρησε σε αγρίου τύπου φυτά *Lotus japonicus* οδήγησε στην αύξηση του αριθμού των φυματίων, τονίζοντας τον ευεργητικό ρόλο του μύκητα στην διαδικασία της φυματιογένεσης. Τα παραπάνω αποτελέσματα σε συνδυασμό με ό, τι προηγήθηκε δείχνουν ότι η παρουσία του FsK δρα ενισχύοντας τους ενδογενείς μηχανισμούς ανάπτυξης του φυτού. Αυτό επιβεβαιώθηκε και από άλλα ευρήματα που υποδηλώνουν ότι η (διϋδρο)λουπεόλη ρυθμίζει την φυματιογένεση στα αρχικά στάδια στο *L. japonicus* (Delis et al., 2011), εξηγώντας την αυξημένη έκφραση της γονιδιακής συστοιχίας κατά τη διάρκεια της ανάπτυξης των ριζών και των φυματίων.

Η παρουσία του ενδόφυτου δρα διευκολύνοντας και διεγείροντας συνολικά τον αποικισμό με τρόπο που εμφανίζει την μέγιστη δράση του κατά την αρχή ανάπτυξης του ριζώματος του υπό μελέτη φυτού μας. Εν τούτης, αξίζει να σημειωθεί ότι στην συνολική ερμηνεία των αποτελεσμάτων αξιολογήθηκαν και οι 5 βιολογικές επαναλήψεις παρόλο που δεν ήταν όλες αποικισμένες. Παρόλο που στην συγκεκριμένη εργασία δεν προέκυψαν στατιστικώς σημαντικά αποτελέσματα, η συνεργιστική δράση του FsK και η έκφραση των γονιδίων *ENOD40* και *PRp27b* ενισχύουν τα προαναφερθέντα ευρήματα και μπορούν να αποτελέσουν ένα νέο πεδίο έρευνας.

Όλα τα προαναφερόμενα ευρήματα μπορούν να συμβάλουν στην οικολογική και εξελικτική σημασία των αλληλεπιδράσεων φυτών-ενδοφυτικών οργανισμών στα οικοσυστήματα. Η κατανόηση του τρόπου με τον οποίο τα φυτά διαμορφώνουν τις αλληλεπιδράσεις τους με τους υπόλοιπους μικροοργανισμούς στις ρίζες τους θα μπορούσε να προσφέρει πληροφορίες για τη συν εξελικτική δυναμική μεταξύ φυτών και μικροοργανισμών καθώς και για τους ρόλους τους στη λειτουργία του οικοσυστήματος γενικότερα.

6. ΒΙΒΛΙΟΓΡΑΦΙΑ

1. Krokida, A., Delis, C., Geisler, K., Garagounis, C., Tsikou, D., Peña-Rodríguez, L. M., Katsarou, D., Field, B., Osbourn, A. E., & Papadopoulou, K. K. (2013). A metabolic gene cluster in *Lotus japonicus* discloses novel enzyme functions and products in triterpene biosynthesis. *The New Phytologist*, 200(3), 675–690. <https://doi.org/10.1111/nph.12414>
2. Delis, C., Krokida, A., Georgiou, S., Peña-Rodríguez, L. M., Kavroulakis, N., Ioannou, E., Roussis, V., Osbourn, A. E., & Papadopoulou, K. K. (2011). Role of lupeol synthase in *Lotus japonicus* nodule formation. *The New Phytologist*, 189(1), 335–346. <https://doi.org/10.1111/j.1469-8137.2010.03463.x>
3. Graham, P. H., & Vance, C. P. (2003). Legumes: Importance and Constraints to Greater Use. *Plant Physiology*, 131(3), 872–877. <https://doi.org/10.1104/pp.017004>
4. Thykjaer, T., Stiller, J., Handberg, K., Jones, J., & Stougaard, J. (1995). The maize transposable element *Ac* is mobile in the legume *Lotus japonicus*. *Plant Molecular Biology*, 27(5), 981–993. <https://doi.org/10.1007/BF00037025>
5. Eskew, D. L., Jiang, Q., Caetano-Anolles, G., & Gresshoff, P. M. (1993). Kinetics of Nodule Development in *Glycine soja*. *Plant Physiology*, 103(4), 1139–1145. <https://doi.org/10.1104/pp.103.4.1139>
6. Sato, S., Nakamura, Y., Kaneko, T., Asamizu, E., Kato, T., Nakao, M., Sasamoto, S., Watanabe, A., Ono, A., Kawashima, K., Tsunakazu Fujishiro, Midori Katoh, Kohara, M., Kishida, Y., Minami, C., Nakayama, S., Nakazaki, N., Shimizu, Y., Sayaka Shinpo, & Takahashi, C. (2008). Genome Structure of the Legume, *Lotus japonicus*. *DNA Research*, 15(4), 227–239. <https://doi.org/10.1093/dnares/dsn008>
7. Jäger, S., Trojan, H., Kopp, T., Laszczyk, M., & Scheffler, A. (2009). Pentacyclic Triterpene Distribution in Various Plants – Rich Sources for a New Group of Multi-Potent Plant Extracts. *Molecules*, 14(6), 2016–2031. <https://doi.org/10.3390/molecules14062016>
8. Moses, T., Pollier, J., Thevelein, J. M., & Goossens, A. (2013). Bioengineering of plant (tri)terpenoids: from metabolic engineering of plants to synthetic biology in vivo and in vitro. *New Phytologist*, 200(1), 27–43. <https://doi.org/10.1111/nph.12325>
9. Derrick, P. M., Barker, H., & Oparka, K. J. (1990). Effect of virus infection on symplastic transport of fluorescent tracers in *Nicotiana clevelandii* leaf epidermis. *Planta*, 181(4), 555–559. <https://doi.org/10.1007/BF00193010>
10. Wopereis, J., Pajuelo, E., Dazzo, F. B., Jiang, Q., Gresshoff, P. M., Frans, J., Stougaard, J., & Krzysztof Szczygłowski. (2000). Short root mutant of *Lotus japonicus* with a dramatically altered symbiotic phenotype. *Plant Journal*, 23(1), 97–114. <https://doi.org/10.1046/j.1365-3113.2000.00799.x>
11. Kleffmann, T., von Zychlinski, A., Russenberger, D., Hirsch-Hoffmann, M., Gehrig, P., Gruissem, W., & Baginsky, S. (2006). Proteome Dynamics during Plastid Differentiation in Rice. *Plant Physiology*, 143(2), 912–923. <https://doi.org/10.1104/pp.106.090738>

12. Udvardi, M. K., Tabata, S., Parniske, M., & Stougaard, J. (2005). Lotus japonicus: legume research in the fast lane. Trends in Plant Science, 10(5), 222–228. <https://doi.org/10.1016/j.tplants.2005.03.008>
13. Bailey-Serres, J., Parker, J. E., Ainsworth, E. A., Oldroyd, G. E. D., & Schroeder, J. I. (2019). Genetic strategies for improving crop yields. Nature, 575(7781), 109–118. <https://doi.org/10.1038/s41586-019-1679-0>
14. Chandra, S., Satapathy, L., Basu, S., Jha, S. K., Kumar, M., & Mukhopadhyay, K. (2020). Characterization of the leaf rust responsive ARF genes in wheat (Triticum aestivum L.). Plant Cell Reports, 39(12), 1639–1654. <https://doi.org/10.1007/s00299-020-02591-3>
15. Petrini, O., Sieber, T. N., Toti, L., & Viret, O. (1993). Ecology, metabolite production, and substrate utilization in endophytic fungi. Natural Toxins, 1(3), 185–196. <https://doi.org/10.1002/nt.2620010306>
16. Skiada, V., Faccio, A., Kavroulakis, N., Genre, A., Bonfante, P., & Papadopoulou, K. K. (2019). Colonization of legumes by an endophytic Fusarium solani strain FsK reveals common features to symbionts or pathogens. Fungal Genetics and Biology, 127, 60–74. <https://doi.org/10.1016/j.fgb.2019.03.003>
17. Malandrakis, A., Daskalaki, E. R., Skiada, V., Papadopoulou, K. K., & Kavroulakis, N. (2018). A Fusarium solani endophyte vs fungicides: Compatibility in a Fusarium oxysporum f.sp. radicis-lycopersici – tomato pathosystem. Fungal Biology, 122(12), 1215–1221. <https://doi.org/10.1016/j.funbio.2018.10.003>
18. Pappas, M. L., Liapoura, M., Papantoniou, D., Avramidou, M., Kavroulakis, N., Weinhold, A., Broufas, G. D., & Papadopoulou, K. K. (2018). The Beneficial Endophytic Fungus Fusarium solani Strain K Alters Tomato Responses Against Spider Mites to the Benefit of the Plant. Frontiers in Plant Science, 9. <https://doi.org/10.3389/fpls.2018.01603>
19. Skiada, V., Avramidou, M., Bonfante, P., Genre, A., & Papadopoulou, K. K. (2020). An endophytic Fusarium –legume association is partially dependent on the common symbiotic signalling pathway. New Phytologist, 226(5), 1429–1444. <https://doi.org/10.1111/nph.16457>
20. Dalakouras, A., Katsaouni, A., Avramidou, M., Dadami, E., Tsiouri, O., Vasileiadis, S., Makris, A., Georgopoulou, M. E., & Papadopoulou, K. K. (2022). A beneficial fungal root endophyte triggers systemic RNA silencing and DNA methylation of a host reporter gene. RNA Biology, 20(1), 20–30. <https://doi.org/10.1080/15476286.2022.2159158>
21. Xu, R., Fazio, G. C., & Matsuda, S. P. T. (2004). On the origins of triterpenoid skeletal diversity. Phytochemistry, 65(3), 261–291. <https://doi.org/10.1016/j.phytochem.2003.11.014>
22. Engelberth, J., Contreras, C. F., Dalvi, C., Li, T., & Engelberth, M. (2013). Early Transcriptome Analyses of Z-3-Hexenol-Treated Zea mays Revealed Distinct Transcriptional Networks and Anti-Herbivore Defense Potential of Green Leaf Volatiles. PLoS ONE, 8(10), e77465. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0077465>
23. Beck, G., Coman, D., Herren, E., M. Águila Ruiz-Sola, Rodríguez-Concepción, M., Wilhelm Gruissem, & Vranová, E. (2013). Characterization of the GGPP synthase gene family in

Arabidopsis thaliana. *Plant Molecular Biology*, 82(4-5), 393–416.
<https://doi.org/10.1007/s11103-013-0070-z>

24. Keeling, C. I., & Bohlmann, J. (2006). Genes, enzymes and chemicals of terpenoid diversity in the constitutive and induced defence of conifers against insects and pathogens*. *New Phytologist*, 170(4), 657–675. <https://doi.org/10.1111/j.1469-8137.2006.01716.x>

25. Bellos, D., Sawidis, T., & Tsekos, I. (2004). Nutrient chemistry of River Pinios (Thessalia, Greece). *Environment International*, 30(1), 105–115. [https://doi.org/10.1016/s0160-4120\(03\)00153-3](https://doi.org/10.1016/s0160-4120(03)00153-3)

26. Pusarla Susmitha, Kumar, P., Yadav, P. S., Sahoo, S., Kaur, G., Pandey, M. K., Singh, V., Tseng, T., & Gangurde, S. S. (2023). Genome-wide association study as a powerful tool for dissecting competitive traits in legumes. *Frontiers in Plant Science*, 14. <https://doi.org/10.3389/fpls.2023.1123631>

27. V, C., G, C., Km, D., V, L., & S, M. (2013, November 1). Plant Phenolics: Recent Advances on Their Biosynthesis, Genetics, and Ecophysiology. *Plant Physiology and Biochemistry : PPB*. <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/23774057/>

28. Sacchettini, J. C. (1997). BIOCHEMISTRY: Creating Isoprenoid Diversity. *Science*, 277(5333), 1788–1789. <https://doi.org/10.1126/science.277.5333.1788>

29. Rodríguez-Concepción, M. (2014). Plant isoprenoids: a general overview. *Methods in Molecular Biology* (Clifton, N.J.), 1153, 1–5. https://doi.org/10.1007/978-1-4939-0606-2_1

30. Boronat, A., & Rodríguez-ConcepciónM. (2014). Terpenoid Biosynthesis in Prokaryotes. *Advances in Biochemical Engineering / Biotechnology*, 3–18. https://doi.org/10.1007/10_2014_285

31. McGarvey, D. J., & Croteau, R. (1995). Terpenoid metabolism. *The Plant Cell*, 7(7), 1015–1026. <https://doi.org/10.1105/tpc.7.7.1015>

32. Roy, S., Liu, W., Nandety, R. S., Crook, A., Mysore, K. S., Pislariu, C. I., Frugoli, J., Dickstein, R., & Udvardi, M. K. (2019). Celebrating 20 Years of Genetic Discoveries in Legume Nodulation and Symbiotic Nitrogen Fixation. *The Plant Cell*, 32(1), 15–41. <https://doi.org/10.1105/tpc.19.00279>

33. Morelli, M., Bahar, O., Papadopoulou, K. K., Hopkins, D. L., & Obradović, A. (2020). Editorial: Role of Endophytes in Plant Health and Defense Against Pathogens. *Frontiers in Plant Science*, 11. <https://doi.org/10.3389/fpls.2020.01312>

34. Tsiknia, M., Tsikou, D., Papadopoulou, K. K., & Ehaliotis, C. (2020). Multi-species relationships in legume roots: From pairwise legume-symbiont interactions to the plant – microbiome – soil continuum. *FEMS Microbiology Ecology*. <https://doi.org/10.1093/femsec/fiaa222>

35. Moses, T., Papadopoulou, K. K., & Osbourn, A. (2014). Metabolic and functional diversity of saponins, biosynthetic intermediates and semi-synthetic derivatives. *Critical Reviews in Biochemistry and Molecular Biology*, 49(6), 439–462. <https://doi.org/10.3109/10409238.2014.953628>

36. Kemen, E. (2014). Microbe–microbe interactions determine oomycete and fungal host colonization. *Current Opinion in Plant Biology*, 20, 75–81. <https://doi.org/10.1016/j.pbi.2014.04.005>
37. Holstein, S. A., & Hohl, R. J. (2004). Isoprenoids: Remarkable diversity of form and function. *Lipids*, 39(4), 293–309. <https://doi.org/10.1007/s11745-004-1233-3>
38. Ac, H., T, J., Yx, L., Yc, B., J, R., B, Q., A, G., Hw, N., Y, B., & A, O. (2019). A specialized metabolic network selectively modulates Arabidopsis root microbiota. *Science*, 364(6440). <https://doi.org/10.1126/science.aau6389>