



Πανεπιστήμιο Θεσσαλίας
Σχολή Επιστημών Υγείας
Τμήμα Βιοχημείας και Βιοτεχνολογίας



ΔΙΠΛΩΜΑΤΙΚΗ ΕΡΓΑΣΙΑ

Έλεγχος της πιθανής τοξικής δράσης του ανθελμινθικού
παρασιτοκτόνου αλβενδαζόλη στη συμβιωτική σχέση ριζοβίων-
ψυχανθών

DIPLOMA THESIS

Assessment of the potential toxic effect of the anthelmintic drug
albendazole on the legume-rhizobium symbiotic relationship

Βασιλική Σαχταρίδου

Λάρισα, Φεβρουάριος 2024

Τριμελής συμβουλευτική επιτροπή

Τσίκου Δανιέλα

Επίκουρος Καθηγήτρια Μοριακής και Αναπτυξιακής
Βιολογίας Φυτών

Τμήμα Βιοχημείας και Βιοτεχνολογίας
Σχολή Επιστημών Υγείας, Πανεπιστήμιο Θεσσαλίας

Καρπούζας Δημήτριος

Καθηγητής Περιβαλλοντικής Μικροβιολογίας και
Βιοτεχνολογίας

Τμήμα Βιοχημείας και Βιοτεχνολογίας
Σχολή Επιστημών Υγείας, Πανεπιστήμιο Θεσσαλίας

Βασιλειάδης Σωτήριος

Επίκουρος Καθηγητής Μοριακής Μικροβιακής
Οικολογίας-Γονιδιωματικής

Τμήμα Βιοχημείας και Βιοτεχνολογίας
Σχολή Επιστημών Υγείας, Πανεπιστήμιο Θεσσαλίας

Περιεχόμενα

ΕΥΧΑΡΙΣΤΙΕΣ	4
ΠΕΡΙΛΗΨΗ	5
ABSTRACT	6
1. ΕΙΣΑΓΩΓΗ.....	7
1.1 ΨΥΧΑΝΘΗ ΦΥΤΑ 7	
1.1.1 Το ψυχανθές φυτό-μοντέλο <i>Lotus japonicus</i>	7
1.2 ΡΙΖΟΒΙΑ 8	
1.3 ΕΓΚΑΘΙΔΡΥΣΗ ΤΗΣ ΣΥΜΒΙΩΤΙΚΗΣ ΣΧΕΣΗΣ ΚΑΙ ΦΥΜΑΤΙΟΓΕΝΕΣΗ 8	
1.3.1. Μόλυνση των ριζών από το ριζόβιο βακτήριο	8
1.3.2 Γονίδια του ριζοβίου που σχετίζονται με τη συμβίωση.....	10
1.3.3. Σχηματισμός Φυματίων	10
1.3.4. Φυτικές ορμόνες που συντονίζουν τη φυματογένεση	12
1.3.5. Αυτορρύθμιση της φυματογένεσης.....	12
1.4 ΣΤΑΔΙΑ ΣΧΗΜΑΤΙΣΜΟΥ ΡΙΖΙΚΩΝ ΦΥΜΑΤΙΩΝ 13	
1.5 ΔΕΝΔΡΟΜΟΡΦΟΙ ΕΝΔΟΜΥΚΟΡΡΙΖΙΚΟΙ ΜΥΚΗΤΕΣ (AMF) 13	
1.6 ΠΑΡΑΣΙΤΟΚΤΟΝΟ ΑΛΒΕΝΔΑΖΟΛΗ 14	
1.7 ΑΡΝΗΤΙΚΗ ΕΠΙΔΡΑΣΗ ΤΗΣ ΑΛΒΕΝΔΑΖΟΛΗΣ ΣΕ ΩΦΕΛΙΜΟΥΣ ΜΙΚΡΟΟΡΓΑΝΙΣΜΟΥΣ ΤΟΥ ΕΛΑΦΟΥΣ 15	
1.8. ΣΚΟΠΟΣ ΤΗΣ ΠΑΡΟΥΣΑΣ ΕΡΓΑΣΙΑΣ 15	
2. ΥΛΙΚΑ & ΜΕΘΟΔΟΙ.....	17
2.1. ΒΙΟΛΟΓΙΚΟ ΥΛΙΚΟ 17	
2.2 ΑΠΟΛΥΜΑΝΣΗ ΤΩΝ ΣΠΕΡΜΑΤΩΝ 17	
2.3. ΠΡΟΕΤΟΙΜΑΣΙΑ ΑΜΜΟΥ 18	
2.4. ΥΓΡΗ ΚΑΛΛΙΕΡΓΕΙΑ ΡΙΖΟΒΙΩΝ 18	
2.5. ΘΡΕΠΤΙΚΟ ΥΛΙΚΟ ΑΝΑΠΤΥΞΗΣ ΤΩΝ ΦΥΤΩΝ 19	
2.6. ΠΡΟΣΘΗΚΗ ΑΛΒΕΝΔΑΖΟΛΗΣ 20	
2.7. ΕΜΦΥΤΕΥΣΗ ΤΩΝ ΝΕΑΡΩΝ ΦΥΤΑΡΙΩΝ 20	
2.8. ΣΥΓΚΟΜΙΔΗ ΦΥΤΙΚΩΝ ΙΣΤΩΝ ΚΑΙ ΑΠΟΘΗΚΕΥΣΗ ΔΕΙΓΜΑΤΩΝ 21	
2.9 ΑΠΟΜΟΝΩΣΗ RNA ΑΠΟ ΡΙΖΕΣ ΦΥΤΩΝ 21	
2.10 ΑΠΟΜΑΚΡΥΝΣΗ DNA ΑΠΟ ΔΕΙΓΜΑΤΑ RNA 21	
2.11 ΣΥΝΘΕΣΗ cDNA 23	
2.12 ΠΟΣΟΤΙΚΗ PCR ΠΡΑΓΜΑΤΙΚΟΥ ΧΡΟΝΟΥ 23	
3. ΑΠΟΤΕΛΕΣΜΑΤΑ	25
3.1 ΦΑΙΝΟΤΥΠΙΚΗ ΑΝΑΛΥΣΗ ΤΩΝ ΣΥΜΒΙΩΤΙΚΩΝ ΦΥΤΩΝ ΣΤΗΝ ΠΑΡΟΥΣΙΑ ΑΛΒΕΝΔΑΖΟΛΗΣ 25	
3.2. ΜΕΛΕΤΗ ΓΟΝΙΔΙΩΝ ΠΟΥ ΣΧΕΤΙΖΟΝΤΑΙ ΜΕ ΤΗ ΣΥΜΒΙΩΣΗ ΚΑΤΑ ΤΗΝ ΑΝΑΠΤΥΞΗ ΤΩΝ ΦΥΤΩΝ ΠΑΡΟΥΣΙΑ ΑΛΒΕΝΔΑΖΟΛΗΣ 26	
4. ΣΥΖΗΤΗΣΗ	30
5. ΒΙΒΛΙΟΓΡΑΦΙΑ	33

Ευχαριστίες

Η παρούσα διπλωματική εργασία εκπονήθηκε στο Τμήμα Βιοχημείας και Βιοτεχνολογίας (TBB). Τα πειράματα διεξήχθησαν στο Εργαστήριο Βιοτεχνολογίας Φυτών και Περιβάλλοντος του TBB.

Η διπλωματική αυτή εργασία διαμορφώθηκε μέσα από τις πολύτιμες αλληλεπιδράσεις διαφόρων ατόμων, καθένα από τα οποία διαδραμάτισαν σημαντικό ρόλο στην εξέλιξη της. Θα ήθελα, συνεπώς, να αφιερώσω αυτήν την σελίδα για να εκφράσω τη ευγνωμοσύνη μου προς όλα αυτά τα άτομα για την ανεκτίμητη βοήθεια που μου παρείχαν.

Αρχικά, θα ήθελα να ευχαριστήσω θερμά την επιβλέπουσα της διπλωματικής μου εργασίας, την Επίκουρο Καθηγήτρια Μοριακής και Αναπτυξιακής Βιολογίας Φυτών του Τμήματος Βιοχημείας και Βιοτεχνολογίας, κυρία Τσίκου Δανιέλα για τη συνεχή καθοδήγηση, την αμέριστη υποστήριξη, τις ουσιώδεις συμβουλές, καθώς επίσης και την αδιάκοπη συμπαράσταση και ενθάρρυνση που μου παρείχε σε όλο αυτό το χρονικό διάστημα.

Ένα μεγάλο ευχαριστώ θέλω, επίσης, να πω και στα μέλη του εργαστηρίου Βιοτεχνολογίας Φυτών, με έμφαση στην βοηθό έρευνας Ξένια Γοργία, που με την καλή της διάθεση αλλά και την όρεξη της να μεταδώσει τις γνώσεις της βοήθησε εξίσου στην επιτυχημένη ολοκλήρωση της πτυχιακής εργασίας.

Το μεγαλύτερο "ευχαριστώ" οφείλω να το πω στα αγαπημένα μου πρόσωπα, στην αδελφή μου, στους φίλους μου, και στους γονείς μου που αποδέχθηκαν και υποστήριξαν όλες τις επιλογές μου. Χωρίς την ανιδιοτελή στήριξή τους καθ' όλη τη διάρκεια αυτής της πορείας, τίποτα από όσα έχω επιτύχει μέχρι σήμερα δεν θα ήταν πραγματικότητα.

Περίληψη

Η χρήση κτηνιατρικών φαρμάκων, όπως η αλβενδαζόλη, μπορεί να έχει ανεπιθύμητες επιπτώσεις στο περιβάλλον, κυρίως μέσω της μετάδοσης των υπολειμμάτων τους στο έδαφος μέσω της ζωικής κοπριάς. Τα ριζόβια και τα ψυχανθή αποτελούν σημαντικούς οργανισμούς στην οικολογική ισορροπία του εδάφους, καθώς συμβάλλουν στη βιολογική δέσμευση του ατμοσφαιρικού αζώτου. Συνεπώς, η ανάπτυξη μιας διαταραγμένης σχέσης μεταξύ αυτών των οργανισμών μπορεί να έχει σοβαρές συνέπειες για τη βιολογική ποικιλότητα και τη γεωργική παραγωγή. Η παρούσα διπλωματική εργασία είχε ως στόχο να εξετάσει την πιθανή τοξικότητα του ανθελμινθικού παρασιτοκτόνου αλβενδαζόλη στη συμβιωτική σχέση ριζοβίων-ψυχανθών. Ειδικότερα, μελετήθηκε η επίδραση της αλβενδαζόλης στην ανάπτυξη της συμβιωτικής σχέσης μεταξύ του ριζοβίου *Mesorhizobium meliloti* και του ψυχανθούς φυτού *Lotus japonicus*. Για την αξιολόγηση της πιθανής τοξικότητας, πραγματοποιήθηκε φαινοτυπική παρατήρηση των φυτών που εκτέθηκαν στην αλβενδαζόλη. Αξιολογήθηκαν οπτικά αλλαγές στην ανάπτυξη των φυτών και τη φυματογένεση. Επιπλέον, πραγματοποιήθηκε μοριακή ανάλυση σημαντικών συμβιωτικών γονιδίων με χρήση της ποσοτικής PCR πραγματικού χρόνου ώστε να μελετηθεί η έκφραση των γονιδίων που συσχετίζονται με την φυματογένεση στην παρουσία του φαρμάκου. Σύμφωνα με τα αποτελέσματα, η αυξανόμενη συγκέντρωση αλβενδαζόλης δεν επέφερε διαφορές στην ανάπτυξη των φυτών και τη φυματογένεση. Παρόλα αυτά, η μοριακή ανάλυση ανέδειξε αρνητική επίδραση του φαρμάκου στην έκφραση γονιδίων που επάγονται στα αρχικά στάδια της συμβιωτικής σχέσης. Τα αποτελέσματα αυτά δείχνουν πως η αλβενδαζόλη επηρεάζει αρνητικά την εγκαθίδρυση της συμβιωτικής σχέσης ριζοβίων-ψυχανθών, επομένως, είναι αναγκαία περαιτέρω έρευνα για να αξιολογηθούν οι κίνδυνοι για το οικοσύστημα του εδάφους.

Abstract

The utilization of veterinary drugs, like albendazole, poses a significant concern regarding its inadvertent impact on environmental integrity, primarily mediated through the dissemination of residual compounds into soil via animal manure. Within terrestrial ecosystems, the interplay between rhizobial microorganisms and leguminous plants stands as a pivotal cornerstone for ecological equilibrium, crucially facilitating biological nitrogen fixation and soil health maintenance. Consequently, any perturbations to this delicate symbiotic association may engender profound repercussions for both biodiversity conservation and agricultural sustainability. This research endeavors to scrutinize the potential toxic ramifications of albendazole exposure on the symbiotic association between rhizobial species and leguminous plants. Specifically, the study delves into elucidating the repercussions of albendazole on the development of *Mesorhizobium meliloti* and *Lotus japonicus* symbiosis, serving as representative organisms. To assess potential toxicity, phenotypic observation of plants exposed to albendazole was performed, including plant growth parameters and nodulation. In addition, molecular analysis of important symbiotic genes was performed using quantitative real-time PCR. According to the results, increasing concentration of albendazole did not cause differences in plant growth and nodulation. However, molecular analysis revealed a negative effect of the drug on the expression of key genes known to be induced during the initial stages of the symbiotic relationship. According to these results, albendazole seems to negatively affect the symbiotic relationship between rhizobia and legumes, therefore, further research is necessary to evaluate the potential risks to the soil ecosystem.

1. Εισαγωγή

1.1 Ψυχανθή Φυτά

Τα Fabaceae έχουν παραδοσιακά χωριστεί σε τρεις υποοικογένειες: Caesalpinioideae, Mimosoideae και Faboideae (ή Papilionoideae). Η υποοικογένεια Faboideae, είναι η μεγαλύτερη ομάδα ψυχανθών, που αποτελείται από περίπου 475 γένη και σχεδόν 14.000 είδη ομαδοποιημένα σε 14 φυλές [3] (J.J. Doyle, et. al., 2001). Το όνομα της ομάδας πιθανότατα προήλθε λόγω της ομοιότητας του λουλουδιού με πεταλούδα (Λατινικά: papilio). Είναι τα μοναδικά αμφίπλευρα συμμετρικά (ζυγόμορφα) άνθη, έτσι είναι και ευκολή η αναγνώριση τους ως μέλη των Faboideae με μια ματιά. Το λουλούδι *Lathyrus odoratus* (γλυκό μπιζέλι) αποτελεί ένα παράδειγμα της υποοικογένειας αυτής, όπως και το *Trifolium* (τριφύλλι), *Medicago* (alfalfa) και το *Lotus corniculatus* (Αγριοστροφύλλι). Τα μέλη των *Papilionoideae* αναπτύχθηκαν αρχικά στις τροπικές περιοχές, αλλά φαίνεται να κυριαρχούν στα άνυδρα και εύκρατα μέρη του κόσμου, όπως στα δάση, τα λιβάδια και τις ερήμους. (Simpson et al., 2001)

Τα ψυχανθή είναι ιδιαίτερα σημαντικά φυτά καθώς αποτελούν πηγή τροφής για τον άνθρωπο αλλά και τα εκτρεφόμενα ζώα, χρησιμοποιούνται και ως ωμά υλικά για την βιομηχανία. Αποτελούν το ένα τρίτο της παγκόσμιας πρωτογενούς παραγωγής, καθώς έχουν έναν ξεχωριστό οικολογικό ρόλο που είναι η βιολογική δέσμευση του αζώτου. Αν και το στοιχειακό άζωτο αποτελεί περίπου το 80 % της ατμόσφαιρας, δεν είναι άμεσα διαθέσιμο στους ζωντανούς οργανισμούς. Μέσω μιας συμβιωτικής σχέσης μεταξύ ψυχανθών και βακτηρίων του γένους *Rhizobium*, το αέριο άζωτο (N₂) μετατρέπεται σε ενώσεις αζώτου που χρησιμοποιούνται από το φυτό ξενιστή, παρέχοντας έτσι στις καλλιέργειες μια ελεύθερη και ανανεώσιμη πηγή αζώτου. (Palmer et al., 2010)

1.1.1 Το ψυχανθές φυτό-μοντέλο *Lotus japonicus*

Το *Lotus japonicus* είναι ένα πρότυπο φυτό για τα ψυχανθή και προέρχεται από την Ανατολική Ασία και το είδος διανέμεται στα ιαπωνικά νησιά, τα ανατολικά και κεντρικά μέρη της Κίνας, και τη βόρεια Ινδία, το Πακιστάν και το Αφγανιστάν. Φυλογενετικά, το *L. japonicus* ανήκει στη ομάδα *Loteae* στα *Papilionoideae*. (Simpson et al., 2001)

Πολλά καλλιεργούμενα ψυχανθή όπως το μπιζέλι και η σόγια έχουν πολύπλοκα γονιδιώματα ή δεν επιδέχονται εύκολα σύγχρονες μεθόδους μοριακής γενετικής. Οι ευνοϊκές βιολογικές του ιδιότητες έκαναν το *L. japonicus* το πρότυπο φυτό επιλογής για την κλασική και μοριακή γενετική ανάλυση των ψυχανθών. Οι ιδιότητες του *L. japonicus* περιλαμβάνουν ένα μικρό μέγεθος γονιδιώματος περίπου 450 Mb, είναι διπλοειδή, έχουν έξι ζεύγη χρωμοσωμάτων, γονιδιωματική συγγραμμικότητα σε διαφορετικές καλλιέργειες ψυχανθών, αυτογόνιμα άνθη, σύντομο χρόνο παραγωγής από σπόρο σε σπόρο, άφθονη παραγωγή σπόρων, μικρούς σπόρους και απλούς ίσιους (μη σπειροειδείς) λοβούς σπόρων, δίνει μεγάλα άνθη που επιτρέπουν τη χειροκίνητη διασταύρωση, και

εύκολη γενετική τροποποίηση χρησιμοποιώντας πρωτόκολλα που βασίζονται στο *Agrobacterium*. (Stougaard et al., 1992)

Το *L. japonicus* χρησιμοποιείται ευρέως από ερευνητές παγκοσμίως για να μελετήσουν κυρίως τους μοριακούς μηχανισμούς που σχετίζονται με τη συμβιωτική αλληλεπίδραση με τα ριζόβια. Αρκετά βασικά συστατικά που εμπλέκονται στην οδό σηματοδότησης για την εγκαθίδρυση της συμβιωτικής σχέσης έχουν κλωνοποιηθεί και χαρακτηριστεί στο *L. japonicus*. Τα περισσότερα πειράματα μεταλλαξιγένεσης έχουν γίνει με τον οικότυπο Gifu. Ο οικότυπος MG-20 είναι ο πιο συχνά χρησιμοποιούμενος διασταυρούμενος γονέας για την έναρξη της χαρτογράφησης πληθυσμών. (Hayashi et al., 2001)

1.2 Ριζόβια

Τα ριζόβια είναι Gram-αρνητικά βακτήρια του εδάφους που έχουν την ικανότητα να αζωτοδεσμεύουν. Η χρήση των ριζοβίων στη γεωργία περιορίζεται στα ψυχανθή φυτά. (Franche et al., 2009)

Τα ριζόβια προσκολλώνται, εισέρχονται και αποικίζουν τα ριζικά κύτταρα των ψυχανθών, συμπεριλαμβανομένων της σόγιας και της μηδικής. Τα ριζόβια είναι σε θέση να προκαλέσουν το σχηματισμό ειδικών συμβιωτικών οργάνων, των φυματιών της ρίζας. Κατά την είσοδο σε ένα ριζικό τριχίδιο, τα ριζόβια διασχίζουν μια απόσταση από το ριζικό τριχίδιο μέχρι τα κύτταρα του φλοιού της ρίζας και μαζί με τα πολλαπλασιαζόμενα φυτικά κύτταρα σχηματίζουν ένα φυμάτιο. Εντός του φυματίου, τα ριζόβια δεσμεύουν το άζωτο, μετατρέποντας το μοριακό άζωτο (N₂) από τον αέρα σε αμμωνία, νιτρικά άλατα και άλλες αζωτούχες ενώσεις για να υποστηρίξουν το μεταβολισμό των φυτών. Τα ριζόβια είναι ιδιαίτερα σημαντικά για τα φυτά σε εδάφη με έλλειψη αζώτου. Σε αντάλλαγμα, τα ριζόβια λαμβάνουν οργανικές ενώσεις πλούσιες σε άνθρακα, σημαντικές για τη δική τους παραγωγή ενέργειας, από το φυτό. (Schaechter et al., 2009). Τα αρχικά στάδια της συμβίωσης περιλαμβάνουν πολύπλοκες διαδικασίες αμοιβαίας αναγνώρισης και αποικισμού των ριζών. (Foucher et al., 2000)

Τα ριζόβια μπορούν να μολύνουν τους ξενιστές τους μέσω τριών μηχανισμών: διείσδυση στο ριζικό τριχίδιο και σχηματισμός μολυσματικού νηματίου, όπως συμβαίνει στο *L. japonicus*, στο τριφύλλι, τα φασόλια και τη σόγια, είσοδος μέσω τραυμάτων ή σημείων πλευρικής εμφάνισης ρίζας όπως συμβαίνει στο φυστίκι, το όσπριο του βοσκοτόπου *Stylosanthes* και το υδρόβιο είδος *Neptunia natans* ή διείσδυση της ρίζας όπως στο *Sesbania*. (O'Hara et al., 2002)

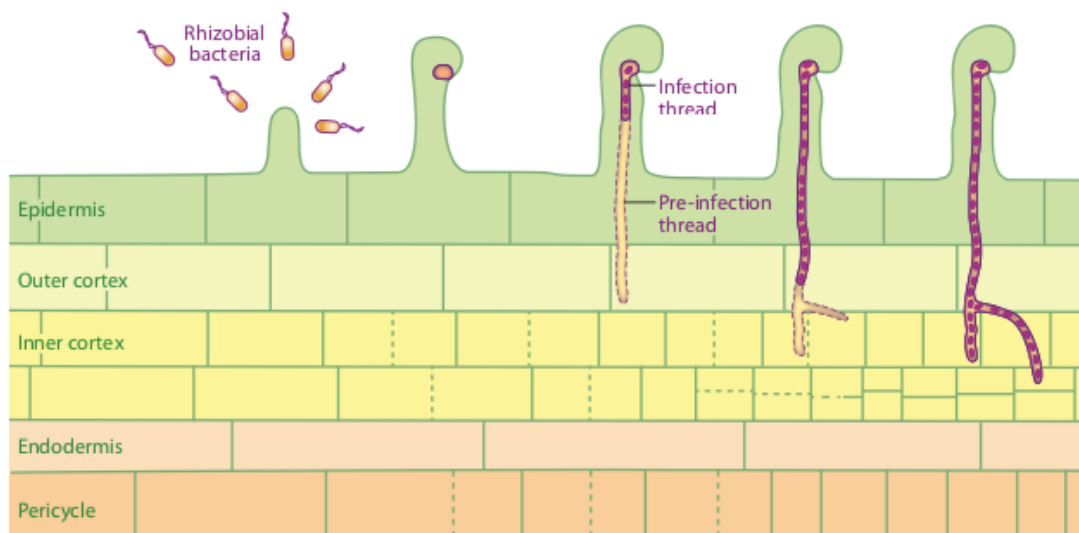
1.3 Εγκαθίδρυση της συμβιωτικής σχέσης και φυματογένεση

1.3.1. Μόλυνση των ριζών από το ριζόβιο βακτήριο

Μια αμφίδρομη αναγνώριση σήματος αρχίζει την αλληλεπίδραση ριζοβίων-ψυχανθών. Τα φλαβονοειδή που εκκρίνονται από ρίζες γίνονται αντιληπτά από τα συμβατά

βακτήρια του εδάφους, τα οποία ξεκινούν την παραγωγή και την έκκριση του ριζοβιακού συμβιωτικού σήματος, τον παράγοντα NOD. Οι παράγοντες NOD (NFs) που παράγονται από τη ριζόβια είναι λιποχιτοολιγοσακχαρίτες που γίνονται αντιληπτοί από διαμεμβρανικούς υποδοχείς που βρίσκονται στην επιφάνεια των επιδερμικών κυττάρων της ρίζας. Από την πλευρά του ξενιστή, υποδοχείς με εξωκυτταρικό μοτίβο LYSM, όπως οι υποδοχείς NFR1 και NFR5 στο *L. japonicus*, αναγνωρίζουν και δεσμεύουν τους συμβατούς παράγοντες NOD και εκκινούν τον καταρράκτη συμβιωτικής σηματοδότησης. Ο μεταγραφικός παράγοντας NIN αναγνωρίστηκε ως πρώιμος βασικός ρυθμιστής τόσο της οργανογένεσης των φυματίων όσο και του σχηματισμού μολυσματικού νήματος, ενώ η σηματοδότηση μέσω της ορμόνης κυτοκίνης, που περιλαμβάνει τον υποδοχέα κινάσης ιστιδίνης 1 (LHK1) στο *Lotus*, ελέγχει την εξέλιξη των γεγονότων σηματοδότησης από την επιδερμίδα της ρίζας στην επιδερμίδα του φλοιού (Oldroyd et al, 2013).

Στις αρχές της δεκαετίας του 1990, μια σειρά μελετών αποκάλυψε ένα περίπλοκο μοτίβο που αφορούσε τη δημιουργία, τη μετάδοση, την αναγνώριση και την επεξεργασία σημάτων μεταξύ ριζοβίων-ψυχανθών, καθιερώνοντας έναν «μοριακό διάλογο». Στην εικόνα 1 περιγράφεται η συντονισμένη ανάπτυξη βακτηριακής μόλυνσης και οργανογένεσης των φυματίων. Η κυτταρική διαίρεση (που υποδεικνύεται με διακεκομμένες γραμμές στην Εικόνα 1) στον εσωτερικό ή στο μεσαίο φλοιό και στο περικύκλιο ξεκινά νωρίς κατά την αλληλεπίδραση μεταξύ της ρίζας και των βακτηρίων. Τα βακτήρια παγιδεύονται μέσω της κύρτωσης του ριζικού τριχιδίου και από αυτό το σημείο ξεκινούν τα μολυσματικά νημάτια (ITs). Το IT προχωρά στον εσωτερικό φλοιό όπου έχει σχηματιστεί το πρώιμο φυμάτιο μέσω μιας σειράς κυτταρικών διαιρέσεων. Από αυτά τα διαιρεμένα κύτταρα, σχηματίζεται το μερίστωμα των φυματίων (Oldroyd et al., 2011)



Εικόνα 1. Ανάπτυξη βακτηριακής μόλυνσης και οργανογένεσης των φυματίων, όπως φαίνεται στο άρθρο (Oldroyd et al., 2011)

1.3.2 Γονίδια του ριζοβίου που σχετίζονται με τη συμβίωση

Παραδοσιακά, τα γονίδια του ριζοβίου που σχετίζονται με την ικανότητά του να αποικίζουν τα ψυχανθή φυτά έχουν ταξινομηθεί ως:

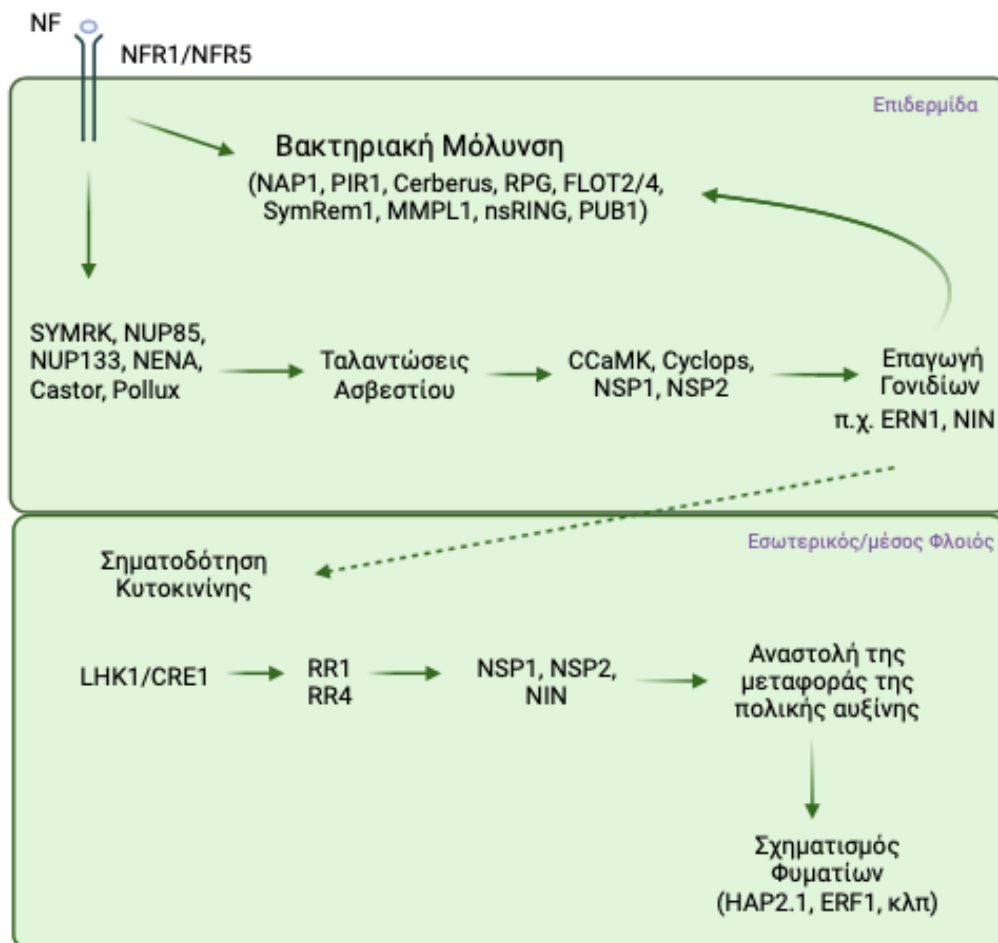
1. Ρυθμιστικά γονίδια, υπεύθυνα για τη μεταγραφή των υπολοίπων συμβιωτικών γονιδίων, κυρίως του *nodD*, αλλά και λίγων άλλων γονιδίων, όπως το *nolR* στο *Ensifer meliloti*, το *nolA* και το *nodVW* στο *Bradyrhizobium japonicum*/*B. diazoefficiens*, και *nrcR* σε *Rhizobium tropici*;
2. «κοινά γονίδια» (*nodA*, *nodB* και *nodC*) που επάγονται από τον ξενιστή και είναι απαραίτητα για τη συμβίωση (δείχνοντας υψηλό βαθμό ομοιότητας αλληλουχίας νουκλεοτιδίων και λειτουργική ομολογία μεταξύ των ριζοβιακών ειδών) και εμπλέκονται στη βιοσύνθεση των βασικών μορίων-σημάτων που συμμετέχουν στην αναγνώριση των ριζοβίων-ψυχανθών, δηλαδή τους λιποχιτοολιγοσακχαρίτες Nod παράγοντες.
3. Γονίδια «ειδικά για τον ξενιστή» (που κωδικοποιούν ένζυμα που τροποποιούν τα βασικά μόρια παράγοντα Nod), με μερικά (π.χ. *nodFE*, *nodL* και *nodM*), αλλά όχι άλλα (π.χ. *nodO*, *nodH* και *nodPQ*), να δείχνουν ομολογία αλληλουχίας μεταξύ των ριζοβιακών ειδών; Και
4. Γονίδια συμβίωσης ειδικά για τον γονότυπο που φαίνεται να διέπουν την ικανότητα να σχηματίζουν φυμάτια, δηλαδή μόνο επιλεγμένους γονότυπους μέσα σε ένα είδος ψυχανθών (π.χ. *nodX* του *Rhizobium leguminosarum* sv. *viceae* στέλεχος TOM και *nolA* του *Bradyrhizobium japonicum*). (Hungria et al., 2023)

1.3.3. Σχηματισμός Φυματίων

Η φυματιογένεση είναι η διαδικασία σχηματισμού των φυματίων που συμβαίνει στα ψυχανθή φυτά κατά τη συμβίωσή τους με τα αζωτοδεσμευτικά ριζόβια βακτήρια. Στα ψυχανθή φυτά έχουν καταγραφεί δυο κατηγορίες φυματίων, τα καθορισμένα και ακαθόριστα φυμάτια. Τα καθορισμένα φυμάτια εντοπίζονται κυρίως στα τροπικά ψυχανθή και η μεριστωματική τους δράση χάνεται γρήγορα. Έτσι, η εξέλιξη του φυματίου οφείλεται μόνο στη διόγκωση των κυττάρων, με αποτέλεσμα τα ώριμα φυμάτια να έχουν σφαιρικό σχήμα. Ενώ τα ακαθόριστα φυμάτια εντοπίζονται κυρίως στα εύκρατα ψυχανθή και διατηρούν ένα ενεργό ακραίο μερίστωμα, το οποίο παράγει νέα κύτταρα καθ' όλη την διάρκεια της ζωής του φυματίου. (Timmers et al., 2000)

Ο σχηματισμός συμβιωτικών φυματίων δέσμευσης N_2 απαιτεί δύο αναπτυξιακές διαδικασίες: οργανογένεση φυματίων και βακτηριακή μόλυνση. Αν και αυτά μπορούν να διαχωριστούν γενετικά, πρέπει να συντονιστούν τόσο με χωρικό όσο και με χρονικό τρόπο για να διασφαλιστεί η οργανογένεση των φυματίων στο σημείο της βακτηριακής μόλυνσης.

Η αναγνώριση των παραγόντων NOD από τους φυτικούς υποδοχείς ενεργοποιεί τις ταλαντώσεις του ασβεστίου εντός του πυρήνα των μολυσμένων κυττάρων και η ενεργοποίηση αυτής της οδού σηματοδότησης απαιτεί μία κινάση τύπου υποδοχέα συμβίωσης (SYMRK), συστατικά του πυρηνικού πόρου και δύο κανάλια κατιόντων που βρίσκονται στην πυρηνική μεμβράνη. Η αντίληψη των ταλαντώσεων του ασβεστίου περιλαμβάνει μια εξαρτώμενη από ασβέστιο και καλμοδουλίνη κινάση (CCaMK) που αλληλεπιδρά και φωσφορυλιώνει τον μεταγραφικό παράγοντα CYCLOPS. Κατά την του CCaMK και του CYCLOPS υπάρχουν αρκετοί μεταγραφικοί παράγοντες (NSP1, NSP2, ERF, ERN1, NIN) που ρυθμίζουν την επαγόμενη από τους NF έκφραση γονιδίων. Μόλις ενεργοποιηθεί το CCaMK, τα ανοδικά σηματοδοτικά συστατικά της οδού οργανογένεσης φυματίων είναι περιττά, υπονοώντας ότι ο πρωταρχικός ρόλος της οδού σηματοδότησης είναι η ενεργοποίηση του CCaMK, η οποία στη συνέχεια προάγει τη μορφογένεση των φυματίων. Στην εικόνα 2 βλέπουμε τις γενετικές οδούς που εμπλέκονται στην ενεργοποίηση της οργανογένεσης των φυματίων και της βακτηριακής μόλυνσης. (Oldroyd et al., 2011), (Hungria et al. 2023)



Εικόνα 2. Γενετικές οδοί που εμπλέκονται στην ενεργοποίηση της οργανογένεσης των φυματίων και της βακτηριακής μόλυνσης. Δημιουργήθηκε στο Biorender.com με βάση το άρθρο (Oldroyd et al., 2011)

Μέσα στα φύματια, δημιουργείται από τον ξενιστή ένα περιβάλλον χαμηλής περιεκτικότητας σε οξυγόνο, πλούσιο σε άνθρακα, επιτρέποντας στα βακτήρια, κατά την ενδοκυττάρωση, να ξεκινήσουν τη δέσμευση αζώτου. Η συμβιωτική δέσμευση αζώτου επαναπρογραμματίζει το μεταγραφικό και μεταβολικό τοπίο ολόκληρης της ρίζας.

1.3.4. Φυτικές ορμόνες που συντονίζουν τη φυματογένεση

Οι ρόλοι για την κυτοκίνη (CK) και την αυξίνη βασίστηκαν αρχικά σε παρατηρήσεις έναρξης φυματίων μετά από τροποποιήσεις στα επίπεδα κυτοκίνης. Κατά την ανάπτυξη του φυματίου, η εντοπισμένη σηματοδότηση κυτοκίνης στον φλοιό της ρίζας είναι απαραίτητη και επαρκής για την έναρξη των πρώιμων φυματίων (nodule primordia). Αυτές οι αυξήσεις στη σηματοδότηση της κυτοκίνης μπλοκάρουν τη μεταφορά αυξίνης μέσω της καταστολής των μεταφορέων αυξίνης PIN και φαίνεται ότι τα χαμηλά επίπεδα αυξίνης μπορεί να σχετίζονται με την έναρξη του πρώιμου φυματίου. Η ενεργοποίηση της οργανογένεσης των φυματίων απαιτεί την αναγνώριση του παράγοντα Nod (NF) στην επιφάνεια της ρίζας και αυτό επάγει τον μεταγραφικό παράγοντα NIN, ο οποίος μπορεί να είναι επαρκής για να επάγει τη σηματοδότηση κυτοκίνης στον φλοιό μέσω της ανοδικής ρύθμισης του υποδοχέα κυτοκίνης CRE1. (Lin et al., 2020)

Μελέτες στο *L. japonicus* υποδηλώνουν ότι η CK δρα κατάντη των υποδοχέων NF, *LjNFR1* και *LjNFR5* και της σηματοδότησης ασβεστίου που αποκωδικοποιείται από την *LjCCaMK*. Ταυτόχρονα, η βιοσύνθεση CK και η σηματοδότηση δρουν ανοδικά της *LjNIN* για να ρυθμίζουν θετικά την έκφρασή της. Αυτή η ρύθμιση του *LjNIN* από το CK συμβαίνει μέσω μιας περιφερικής ρυθμιστικής περιοχής cis στον υποκινητή του γονιδίου *LjNIN*. (Lin et al., 2020)

1.3.5. Αυτορρύθμιση της φυματογένεσης

Υπάρχει ένας μηχανισμός που ρυθμίζει τον αριθμό των φυματίων που θα παραχθούν: ο μηχανισμός αυτορρύθμισης της φυματογένεσης (AON: Autoregulation of nodulation). Το μονοπάτι μοριακής σηματοδότησης AON είναι ένας βρόχος αρνητικής ανάδρασης που δίνει τη δυνατότητα στο φυτό-ξενιστή να ρυθμίσει τον αριθμό των φυματίων που θα παραχθούν σύμφωνα με την ανάγκη του φυτού σε άζωτο, αποτρέποντας τον σχηματισμό υπερβολικών φυματίων. (Ferguson et al., 2019)

Το πρωταρχικό όφελος της φυματογένεσης για το φυτό ξενιστή είναι η πρόσβαση στο άζωτο, επομένως εάν το φυτό μπορεί να έχει πρόσβαση σε άζωτο από τη ριζόσφαιρα, δεν χρειάζεται να επενδύσει ενέργεια στην φυματογένεση. Για το λόγο αυτό, τα ψυχανθή έχουν αναπτύξει μια αζωτοεξαρτώμενη ρύθμιση της οδού σχηματισμού φυματίων για τη βελτιστοποίηση της χρήσης των πόρων. Για να αποφευχθεί ο σχηματισμός υπερβολικά μεγάλου αριθμού φυματίων, πεπτίδια CLE που επάγονται από τα ριζόβια παράγονται στις ρίζες, μεταφέρονται στον βλαστό και αλληλεπιδρούν με τον υποδοχέα NARK/HAR1/SUNN για την καταστολή της υπερβολικής φυματογένεσης.

Τα πεπτίδια CLE έχουν μήκος 12 έως 13 αμινοξέα και λειτουργούν ως εκκρινόμενοι πεπτιδικοί συνδέτες που συνδέονται με πρωτεΐνες που μοιάζουν με υποδοχείς εντοπισμένες στη μεμβράνη πλάσματος, ρυθμίζουν διάφορες φυσιολογικές και αναπτυξιακές διαδικασίες. Η οικογένεια γονιδίων CLE κωδικοποιεί μικρές πρωτεΐνες με μια διατηρημένη περιοχή CLE στο C-άκρο, δημιουργώντας το ώριμο πεπτίδιο CLE μετά από πρωτεολυτική επεξεργασία. Γνωστά πεπτίδια CLE που έχουν καλά μελετηθεί είναι τα *LjCLE-RS1*, *LjCLE-RS2*, *LjCLE-RS3*, στο ψυχανθές-μοντέλο *L. japonicus* και τα *MtCLE12*, *MtCLE13* και *MtCLE35* στο ψυχανθές-μοντέλο *Medicago truncatula* (Jones et al., 2022), (Valmas et al., 2023)

1.4 Στάδια σχηματισμού ριζικών φυματίων

Τα στάδια σχηματισμού των φυματίων είναι τα εξής:

1. Αμοιβαία αναγνώριση του σωστού εταίρου από την πλευρά του φυτού, αλλά και του βακτηρίου
2. Έκκριση των παραγόντων *nod* από το βακτήριο
3. Προσκόλληση του βακτηρίου στα ριζικά τριχίδια
4. Διείσδυση των βακτηρίων στο εσωτερικό του ριζικού τριχιδίου και σχηματισμός νήματος μόλυνσης.
5. Μετατόπιση από το νήμα μόλυνσεως προς το κύριο σώμα της ρίζας
6. Σχηματισμός βακτηροειδών μέσα στα φυτικά κύτταρα και ανάπτυξη αζωτοδεσμευτικής ικανότητας
7. Συνεχείς διαιρέσεις των βακτηριακών και φυτικών κυττάρων και σχηματισμός των ώριμων ριζικών φυματίων. (Sprent et al., 1989)

1.5 Δενδρόμορφοι ενδομυκορριζικοί μύκητες (AMF)

Οι δενδρόμορφοι ενδομυκορριζικοί μύκητες (Arbuscular Mycorrhizal Fungi: AMF) που ανήκουν στο γένος *Glomeromycotina* είναι μικροοργανισμοί του εδάφους που δημιουργούν αμοιβαία συμβίωση με την πλειοψηφία των ανώτερων φυτών. Αυτή η συμβιωτική αλληλεπίδραση είναι εξαιρετικά ευεργετική και βασίζεται στην αμφίδρομη μεταφορά θρεπτικών ουσιών μεταξύ των φυτών ξενιστών και των μυκήτων. Οι μύκητες AM παρέχουν στα φυτά απαραίτητα μεταλλικά θρεπτικά συστατικά όπως φώσφορο (P) και άζωτο (N) και, σε αντάλλαγμα, οι μύκητες λαμβάνουν τον άνθρακα τους από το φυτό ξενιστή με τη μορφή σακχάρων και λιπαρών οξέων. Εκτός από το ρόλο τους στην ανάπτυξη των φυτών, οι μύκητες AM ενισχύουν επίσης την ικανότητα των φυτών να προσαρμόζονται σε βιοτικές και αβιοτικές περιβαλλοντικές συνθήκες καταπόνησης (Xie et al., 2021)

Η δημιουργία της συμβιωτικής σχέσης απαιτεί από τα ριζικά κύτταρα του ξενιστή να υποστούν σημαντικές δομικές και λειτουργικές τροποποιήσεις, οδηγώντας τελικά σε αμοιβαία ευεργετικά αποτελέσματα. Κατά την εγκαθίδρυση της συμβίωσης, η αλληλεπίδραση ρυθμίζεται σε μεγάλο βαθμό και από τους δύο εταίρους σε κυτταρικό,

μοριακό και γενετικό επίπεδο. Έχουν χαρακτηριστεί διακριτά βήματα στην ανάπτυξη της συμβίωσης με AMF. Το προ-συμβιωτικό βήμα σχετίζεται με μια μοριακή διασταυρούμενη επικοινωνία μεταξύ των δύο συμβιωτών. Μετά την αναγνώριση, η φυσική επαφή δημιουργείται με το σχηματισμό ενός υποποδίου στην επιφάνεια της ρίζας. Από εδώ, ο αποικισμός των ριζών εξελίσσεται γρήγορα. Οι μύκητες εισβάλλουν στα κύτταρα του φλοιού μέσω μιας συσκευής προ-διείσδυσης (PPA) και αναπτύσσουν εξαιρετικά διακλαδισμένες μυκητιακές δομές που ονομάζονται δενδρόμορφες δομές ή θύσανοι (arbuscules) στα εσωτερικά κύτταρα του φλοιού. Οι θύσανοι είναι οι βασικές δομές της συμβίωσης και η τοποθεσία όπου λαμβάνει χώρα η αμφίδρομη ανταλλαγή θρεπτικών ουσιών. Οι δενδρόμορφες δομές καλύπτονται από την περιδενδροειδή μεμβράνη που προέρχεται από φυτά (PAM) που είναι απαραίτητη για τον έλεγχο των διαδικασιών μεταφοράς και σηματοδότησης μεταξύ των δύο εταίρων. Ο κύκλος ζωής των μυκήτων μέσα στη ρίζα ολοκληρώνεται με το σχηματισμό κυστιδίων αποθήκευσης και σπορίων. (Gutjahr C et al., 2013)

1.6 Παρασιτοκτόνο αλβενδαζόλη

Η αλβενδαζόλη αναπτύχθηκε πριν από περισσότερα από 40 χρόνια. Θεωρείται ότι δρα δεσμεύοντας την τουμπουλίνη, αναστέλλοντας τον πολυμερισμό της και μειώνοντας την πρόσληψη γλυκόζης στις προνύμφες και στα ενήλικα παράσιτα. Έτσι, εξαντλεί τα αποθέματα γλυκογόνου τους. Λόγω της μειωμένης παραγωγής ενέργειας, το παράσιτο είναι ακινητοποιημένο και τελικά πεθαίνει.

Η αλβενδαζόλη αρχικά οξειδώνεται σε σουλφοξείδιο της αλβενδαζόλης, ένα δραστικό φάρμακο, και στη συνέχεια οξειδώνεται περαιτέρω σε σουλφόνη αλβενδαζόλης, η οποία είναι ανενεργή. Η αλβενδαζόλη διεγείρει τα ένζυμα του συστήματος του κυτοχρώματος P450 που είναι υπεύθυνα για το μεταβολισμό του και η σιμετιδίνη, η οποία αναστέλλει το σύστημα του κυτοχρώματος P450, έχει τη συνολική επίδραση στην αύξηση των επιπέδων σουλφοξειδίου της αλβενδαζόλης. (Venkatesan et al., 1998)

Η αλβενδαζόλη έχει χρησιμοποιηθεί ευρέως για τη θεραπεία εντερικών παρασίτων από τα τέλη της δεκαετίας του 1980. Μέχρι σήμερα, η αλβενδαζόλη χρησιμοποιείται κυρίως για τον έλεγχο των νηματωδών ενδοπαρασιτισμού στα κατοικίδια. (Critchley et al., 2005)

Έχει υποστηριχθεί πως η χρήση της αλβενδαζόλης, δεν είναι κατάλληλη για καλλιέργειες, επομένως, αντιμετωπίζονται πολλά τεχνικά ερωτήματα, για παράδειγμα πώς να πραγματοποιηθεί συμβατότητα, πώς ελέγχεται η βέλτιστη δόση, πώς το φυτό μπορεί να την απορροφήσει καλύτερα, εάν χρειάζεται επίσης να προστεθούν άλλα ενεργά συστατικά, πώς να βελτιωθεί η επίδραση του γεωργικού φαρμάκου ή κάτι παρόμοιο. Επιπλέον, είναι πιθανό να χρειάζεται κλιμακούμενη δόση αλβενδαζόλης για να είναι αποτελεσματική. Επίσης μπορεί να διατηρηθεί η μακροπρόθεσμη επίδραση της αλβενδαζόλης στις καλλιέργειες, μολύνοντας το έδαφος και το περιβάλλον. (Critchley et al., 2005)

Όσον αφορά τις παρενέργειες της αλβενδαζόλης σε ανθρώπους και ζώα, είναι λίγες και τείνουν να είναι ήπιες. Στους ανθρώπους εμφανίζονται γαστρεντερικές διαταραχές, ζάλη,

εξάνθημα και αλωπεκία. Μετά από παρατεταμένη πρόληψη της, το 15% των ανθρώπων αναπτύσσει αναστρέψιμες αυξήσεις στις ηπατικές τρανσαμινάσες του ορού ενώ επιπλέον η αλβενδαζόλη μπορεί να είναι τερατογόνος στα ζώα. (Venkatesan et al., 1998)

1.7 Αρνητική επίδραση της αλβενδαζόλης σε ωφέλιμους μικροοργανισμούς του εδάφους

Η εφαρμογή λιπασμάτων σε γεωργικά εδάφη μπορεί ενδεχομένως να επηρεάσει τις ιδιότητες του εδάφους, τη διαθεσιμότητα θρεπτικών ουσιών και τις αποδόσεις των καλλιεργειών. Η παραδοσιακή βιολογική γεωργία με τη χρήση οργανικών λιπασμάτων, όπως υπολείμματα καλλιεργειών, ζωική κοπριά και καλλιέργειες πράσινης κοπριάς, επιτρέπει στο έδαφος να διατηρεί ευεργετικές ιδιότητες (Watson et al., 2002). Αντίθετα, τα ανόργανα λιπάσματα επιτρέπουν υψηλότερη παραγωγικότητα των καλλιεργειών, αλλά αυτό έχει περιβαλλοντικό κόστος για την ποιότητα του εδάφους και του νερού. (Hua Qin, et. al., 2015)

Σε αντίθεση με τα κτηνιατρικά αντιβιοτικά, οι πιθανές επιδράσεις των ανθελμινθικών κτηνιατρικών φαρμάκων στους μικροοργανισμούς του εδάφους, συμπεριλαμβανομένων των βασικών λειτουργικών ομάδων όπως το AMF, έχουν μελετηθεί ελάχιστα. Είναι πλέον καλά τεκμηριωμένο ότι τα ανθελμινθικά, που χρησιμοποιούνται για τον έλεγχο των προσβολών παραγωγικών ζώων από γαστρεντερικούς νηματώδεις, δεν μεταβολίζονται στο σώμα των ζώων και απεκκρίνονται με τα κόπρανα των ζώων. Στη συνέχεια χρησιμοποιούνται ως κοπριά σε γεωργικά εδάφη που συμβάλλουν στη διασπορά ανθελμινθικών ενώσεων σε γεωργικά εδάφη. Κατά τη μεταφορά τους σε γεωργικά εδάφη, ανθελμινθικά όπως βενζιμιδαζόλες (αλβενδαζόλη) και μακροκυκλικές λακτόνες (ιβερμεκτίνη και επανομεκτίνη) θα αλληλεπιδράσουν με τη χλωρίδα του εδάφους ή/και θα μεταφερθούν σε συστήματα επιφανειακών ή υπόγειων υδάτων ή θα απορροφηθούν από τα φυτά επιβάλλοντας απειλή για το περιβάλλον και την ανθρώπινη υγεία. Οι περισσότερες από τις μέχρι σήμερα μελέτες έχουν επικεντρωθεί στις πιθανές επιδράσεις των ανθελμινθικών στην πανίδα του εδάφους, ενώ λίγα είναι γνωστά για τις επιδράσεις τους εκτός στόχου στο έδαφος μικροχλωρίδα. (Gkimprizi et al., 2023)

Πρόσφατα αναφέρθηκε η αρνητική επίδραση της αλβενδαζόλης στην ωφέλιμη συμβιωτική σχέση των φυτών με τους δενδρόμορφους ενδομυκορριζικούς μύκητες. Μελέτη στο ψυχανθές-μοντέλο *L. japonicus* έδειξε πως η παρουσία αλβενδαζόλης σε ποσότητες που μπορεί να βρεθεί στα καλλιεργούμενα εδάφη, προκάλεσε μειωμένο αποικισμό των ριζών από τον μύκητα *Rhizophagus irregularis*, και παρεμπόδιση της σωστής λειτουργίας των θυσάνων (Gkimprizi et al. 2023).

1.8. Σκοπός της παρούσας εργασίας

Στην παρούσα εργασία εξετάζεται η πιθανή τοξικότητα του κτηνιατρικού φαρμάκου αλβενδαζόλη στη συμβιωτική σχέση ριζοβίων-ψυχανθών, το οποίο μπορεί να βρεθεί στο έδαφος μέσω της εφαρμογής ζωικής κοπριάς. Συγκεκριμένα, μελετήθηκε η επίδραση της

αλβενδαζόλης στη συμβιωτική σχέση του ψυχανθούς φυτού-μοντέλου *Lotus japonicus* και του ριζοβίου *Mesorhizobium meliloti*. Για τον έλεγχο της πιθανής τοξικής δράσης του φαρμάκου, πραγματοποιήθηκε φαινοτυπική παρατήρηση των φυτών που εκτέθηκαν στο φάρμακο, καθώς και μοριακή ανάλυση σημαντικών συμβιωτικών γονιδίων, με τη μέθοδο της ποσοτικής PCR πραγματικού χρόνου.

2. Υλικά & Μέθοδοι

2.1. Βιολογικό υλικό

Ως φυτικό υλικό για τη διεξαγωγή των πειραμάτων που αφορούν τη μελέτη μας χρησιμοποιήθηκε το ψυχανθές φυτό-μοντέλο *Lotus japonicus* και συγκεκριμένα ο οικότυπος GIFU.

Για τον εμβολιασμό των φυτών με αζωτοδεσμευτικά ριζόβια, χρησιμοποιήθηκε το ριζόβιο *Mesorhizobium loti* (στέλεχος R7A), που αποτελεί τον μικροσυμβιώτη του φυτού *L. japonicus*.

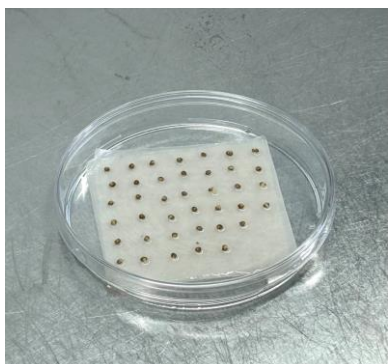
2.2 Απολύμανση των σπερμάτων

1. Τοποθετούμε τα σπέρματα του ψυχανθούς *Lotus japonicus* σε δύο erppendorf σωληνάρια.
2. Προσθέτουμε θειϊκό (H_2SO_4) οξύ με γυάλινη πιπέτα, εμβαπτίζοντας τα σπέρματα για 30 λεπτά. Το βήμα αυτό είναι σημαντικό, ώστε να εξασφαλιστεί ομοιόμορφη και γρηγορότερη βλάστηση των σπερμάτων. (Η διαδικασία εκτελείται σε απαγωγό εστία)
3. Αναδεύουμε τα erppendorf σωληνάρια ανά 10 λεπτά ώστε να μην δημιουργηθούν συσσωματώματα.
4. Αφαιρούμε το H_2SO_4
5. Εκτελούμε 2 πλύσεις με απιονισμένο και αποστειρωμένο νερό. Οι πλύσεις πρέπει να γίνουν με γρήγορο ρυθμό, καθώς το νερό σε συνδυασμό με το θειϊκό οξύ προκαλούν μια εξώθερμη αντίδραση, που αυξάνει της θερμοκρασία και οδηγεί στην καταστροφή των εμβρύων των σπερμάτων.
6. Ακολουθούν 3 πλύσεις με πιο αργό ρυθμό και ταυτόχρονη ανάδευση.
7. Αφαιρούμε το νερό και προσθέτουμε διάλυμα 20% χλωρίνης εμπορίου στα σωληνάρια, το οποίο αφήνουμε για περίπου 10 λεπτά. (Όλα τα επόμενα βήματα πραγματοποιούνται σε θάλαμο νηματοτικής ροής)
8. αφαιρούμε την χλωρίνη από τα σωληνάρια και εκτελούμε 6 πλύσεις με απιονισμένο νερό.
9. Τέλος, προσθέτουμε H_2O στα σωληνάρια και τοποθετούμε στο ψυγείο στους $4^\circ C$ για 12 ώρες.

Την επόμενη μέρα παρατηρούμε ότι τα σπόρια έχουν αλλάξει χρώμα από μαύρο σε καφέ και το μέγεθός τους έχει αυξηθεί.

10. Τοποθετούμε τα σπέρματα σε τρυβλία, στα οποία έχουμε τοποθετήσει 3 διηθητικά χαρτιά (μεγέθους 6x6 cm). (Η διαδικασία πραγματοποιείται σε θάλαμο νηματοτικής ροής)
11. Προσθέτουμε 3 ml απιονισμένο και αποστειρωμένο νερό στο τρυβλίο και αφαιρούμε τον αέρα που δημιουργείται ανάμεσα στα τρυβλία και το διηθητικό χαρτί.

12. Αφαιρούμε το απιονισμένο νερό από τα σωληνάρια και τοποθετούμε τα σπόρια πάνω στα διηθητικά χαρτιά με συγκεκριμένες αποστάσεις, όπως μπορούμε να δούμε και στην εικόνα 3



Εικόνα 3: Τοποθέτηση των σπερμάτων πάνω στο διηθητικό χαρτί, μέσα σε τρυβλίο.

13. Αφήνουμε τα τρυβλία μέσα στον θάλαμο ανάπτυξης φυτών στους 21°C, με 70% υγρασία, και με 16 ώρες φως και 8 ώρες στο σκοτάδι. Για το πρώτο πείραμα (φαινοτυπική παρατήρηση φυματίων) τα τρυβλία έμειναν στις συνθήκες αυτές για 4 μέρες, ενώ για το δεύτερο πείραμα (μοριακή ανάλυση) τα φυτά αναπτύχθηκαν στις συνθήκες αυτές για 10 μέρες.

2.3. Προετοιμασία άμμου

1. Αποστείρωση άμμου και βερμικουλίτη σε αναλογία 3:1
2. Σε κάθε δοχείο magenta τοποθετούμε 300g μίγματος άμμου/βερμικουλίτη. Η διαδικασία αυτή εκτελείται σε θάλαμο νηματικής ροής.

2.4. Υγρή καλλιέργεια ριζοβίων

1. Για την ανάπτυξη των ριζοβίων χρησιμοποιήθηκε το θρεπτικό μέσο YMB, το οποίο αποτελείται από μαννιτόλη (0,5gr), εκχύλισμα ζύμης (0,1 gr), K_2HPO_4 (0,124 gr), $MgSO_4$ (0,05gr), NaCl (0,025gr).
2. Αρχικά το ριζόβιο αναπτύσσεται σε στερεή καλλιέργεια YMB (σε τρυβλίο) για 3 ημέρες, και στη συνέχεια μια μικρή ποσότητα μεταφέρετε σε υγρό θρεπτικό μέσο YMB για την ανάπτυξη της υγρής καλλιέργειας. Ακολουθεί επώαση με συνεχόμενη ανάδευση για 2 μέρες στους 28°C.
3. Η συγκέντρωση του αρχικού εμβολίου υπολογίζεται κατόπιν μέτρησης στο φωτόμετρο. Το φωτόμετρο ρυθμίζεται σε μήκος κύματος 600nm στο φάσμα του ορατού φωτός.
4. Χρησιμοποιώντας τον τύπο $C_{αρχ} \times V_{αρχ} = C_{τελ} \times V_{τελ}$, υπολογίζουμε την επιθυμητή αραιώση του εμβολίου, με σκοπό να έχουμε τελικά εναιώρημα καλλιέργειας ριζοβίου με $OD_{600}=0,02$.

2.5. Θρεπτικό υλικό ανάπτυξης των φυτών

Για το πρώτο πείραμα (φαινοτυπική ανάλυση):

1. Σε 12 δοχεία magenta με 300gr άμμου/βερμικουλίτη προσθέτουμε 40ml θρεπτικού.
2. Προετοιμάζουμε 4 μπουκάλια Duran για τις διαφορετικές συνθήκες. Σε κάθε μπουκάλι προσθέτουμε 150ml αποστειρωμένο νερό.
3. Προσθέτουμε σε κάθε μπουκάλι 18,75 μl θρεπτικού υλικού ABCD, το οποίο αποτελείται από ασβέστιο, φώσφορο, σίδηρο και μαγνήσιο.

Αρχικό διάλυμα	Χημικός Τύπος	Ποσότητα (gr/l)
A	$\text{CaCl}_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$	294,1
B	KH_2PO_4	136,1
C	Fe-Κιτρικό	4,9
D	$\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$	123,3
	K_2SO_4	87
	$\text{MnSO}_4 \cdot \text{H}_2\text{O}$	0,338
	H_3BO_3	0,247
	$\text{ZnSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$	0,288
	$\text{CuSO}_4 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$	0,100
	$\text{CoSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$	0,056
	$\text{Na}_2\text{MoO}_4 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$	0,048

4. Επιπλέον, σε κάθε μπουκάλι προσθέτουμε 1mM νιτρικό άζωτο. Η ποσότητα του νιτρικού αζώτου πρέπει να είναι μικρή, επιτρέποντας έτσι την δημιουργία συμβιωτικών σχέσεων.
5. Προσθέτουμε σε κάθε μπουκάλι την αντίστοιχη ποσότητα αλβενδαζόλης (Παράγραφος 2.6) ώστε να δημιουργήσουμε 4 διαφορετικές συνθήκες.

Για το δεύτερο πείραμα (μοριακή ανάλυση):

1. Σε 16 δοχεία magenta με 300gr άμμου/βερμικουλίτη προσθέτουμε 40ml νερό.
2. Προετοιμάζουμε 4 μπουκάλια Duran για τις διαφορετικές συνθήκες. Σε κάθε μπουκάλι προσθέτουμε 200ml αποστειρωμένο νερό.
3. Προσθέτουμε σε κάθε μπουκάλι 25 μl θρεπτικού υλικού ABCD.
4. Σε κάθε μπουκάλι προσθέτουμε 1mM νιτρικό άζωτο.
5. Προσθέτουμε σε κάθε μπουκάλι την ποσότητα αλβενδαζόλης (Παράγραφος 2.6) ώστε να δημιουργήσουμε 4 διαφορετικές συνθήκες.
6. Για να εξασφαλίσουμε ίσο όγκο σε κάθε δοχείο συμπληρώνουμε τα αντίστοιχα μl από DMSO. (Παράγραφος 2.6)

2.6. Προσθήκη αλβενδαζόλης

Οι συνθήκες ήταν οι εξής:

Πείραμα 1.

Συγκέντρωση alb	Ποσότητα alb	Ποσότητα DMSO
0 mg/L	0 μ l	136 μ l
0,5 mg/L	98 μ l	38 μ l
5 mg/L	136 μ l	0 μ l
15mg/L	132 μ l	4 μ l

Πείραμα 2.

Συγκέντρωση alb	Ποσότητα alb	Ποσότητα DMSO
0 mg/L	0 μ l	182 μ l
0,5 mg/L	130 μ l	52 μ l
5 mg/L	182 μ l	0 μ l
15 mg/L	177 μ l	5 μ l

2.7. Εμφύτευση των νεαρών φυταρίων

1. Σε κάθε δοχείο magenta προσθέτουμε 40ml θρεπτικό υλικό ανάλογα με την συνθήκη, όπως βλέπουμε και στην εικόνα 4.



Εικόνα 4: Δοχεία magenta, γεμισμένα με άμμο/βερμικουλίτη και το θρεπτικό υλικό.

2. Ανακατεύουμε καλά το μίγμα ώστε το θρεπτικό υλικό να μεταφερθεί παντού.
3. Δημιουργούμε τρύπες σε κάθε δοχείο και προσθέτουμε σε κάθε τρύπα ένα φυτό (Εικόνα 5).
4. Σε κάθε ρίζα προσθέτουμε από 1ml του εμβολίου των ριζοβίων ($OD_{600}=0,02$).
5. Μετά τον εμβολιασμό με το ριζόβιο, τα φυτά αναπτύχθηκαν για 4 εβδομάδες για το πρώτο πείραμα και 4 μέρες για το δεύτερο πείραμα στον θάλαμο ανάπτυξης φυτών, στους 21 °C.



Εικόνα 5: Δημιουργία θέσεων στην άμμο, ώστε να τοποθετηθούν τα νεαρά φυτάρια.

2.8. Συγκομιδή φυτικών ιστών και αποθήκευση δειγμάτων

1. Τα φυτά απομακρύνθηκαν προσεκτικά από τα δοχεία magenta και τοποθετήθηκαν σε σωληνάρια falcon των 50ml που περιείχαν νερό, με τέτοιο τρόπο ώστε, οι ρίζες τους να βρίσκονται μέσα στο νερό για να μην αφυδατωθούν.
2. Χωρίζουμε την ρίζα από τον βλαστό, και ο βλαστός απορρίπτεται.
3. Τοποθετούμε τις ρίζες σε σωληνάρια erppendorf, και στην συνέχεια παγώνουμε γρήγορα τα δείγματα σε υγρό άζωτο.
4. Τα δείγματα αποθηκεύονται στην κατάψυξη στον -80°C .

2.9 Απομόνωση RNA από ρίζες φυτών

Η εξαγωγή RNA είναι μια διαδικασία που χρησιμοποιήθηκε ώστε να απομονωθεί το RNA από τα δείγματα της ρίζας των φυτών

1. Λειοτριβούμε τις ρίζες των φυτών μέσα στα σωληνάρια erppendorf με την βοήθεια ειδικών εμβόλων. Με τον τρόπο αυτό σπάμε τα κυτταρικά τοιχώματα. (Η διαδικασία αυτή πραγματοποιήθηκε μέσα σε υγρό άζωτο μέχρι οι ρίζες να γίνουν σκόνη.)
2. Για την απομόνωση του RNA χρησιμοποιήθηκε ειδικό Kit, NucleoSpin Bioanalysis
3. Το RNA επαναδιαλύθηκε σε H_2O σε τελικό όγκο 30μl
4. Τέλος, μετρήθηκε η συγκέντρωση του κάθε δείγματος στο φασματοφωτόμετρο μικροδόγκων

2.10 Απομάκρυνση DNA από δείγματα RNA

Για την ακριβή ανάλυση της γονιδιακής έκφρασης είναι σημαντικό να γίνει η απομάκρυνση του DNA που μπορεί να έχει απομείνει.

1. Η αντίδραση αυτή περιέχει:

1. RNA 600ng
2. 10x Buffer 1μl
3. RNA Inhibitor 10 units
4. DNase 1 unit
5. H₂O

2. Ακολουθεί η αντίδραση της DNase, για 50 λεπτά στους 37°C
3. Αφού τελειώσει η διαδικασία, απενεργοποιείται το ένζυμο DNase.

Αρχικά, προσθέτουμε σε κάθε δείγμα 1μl EDTA, και επωάζουμε στους 65°C για 10 λεπτά. Μόλις περάσουν τα 10 λεπτά, τοποθετούμε τα δείγματα στον πάγο.

4. Ακολουθεί η διαδικασία επαλήθευσης με διαγνωστική PCR
- Η αντίδραση περιέχει:

1. RNA 1μl
2. 10x Buffer 2μl
3. (10 mM) dNTPs 0,4μl
4. (10 μM) Εκκινητής F (Forward) 0,8μl & (10 μM) Εκκινητής R (Reverse) 0,8μl
5. (5U/μl) Taq πολυμεράση 0,08μl
6. H₂O 14,92μl (Τελικός όγκος 20μl)

Το πρόγραμμα της αντίδρασης PCR ήταν το εξής:

	Χρόνος	Θερμοκρασία	
<u>Αρχική</u>	<u>5 min</u>	<u>95°C</u>	
<u>Αποδιάταξη</u>	<u>30 sec</u>	<u>95°C</u>	
<u>Υβριδοποίηση</u>	<u>30 sec</u>	<u>55°C</u>	} <u>40 Κύκλοι</u>
<u>Επιμήκυνση</u>	<u>10 sec</u>	<u>72°C</u>	
<u>Τελική επιμήκυνση</u>	<u>4 min</u>	<u>72°C</u>	
<u>Διατήρηση</u>	<u>∞</u>	<u>4°C</u>	

Ακολούθησε ηλεκτροφόρηση των δειγμάτων σε πηκτή αгарόζης 1%.

2.11 Σύνθεση cDNA

Η σύνθεση cDNA (αντίγραφο DNA από το mRNA) χρησιμοποιείται για τη μετατροπή του mRNA σε αντίστοιχο αντίγραφο DNA. Η δημιουργία cDNA επιτρέπει στους ερευνητές να μελετήσουν, στη συνέχεια, τη γονιδιακή έκφραση.

Η αντίδραση περιέχει:

1. RNA 5μl (300 ng)
2. (2 μM) Oligo dT 1μl
3. (10 mM) dNTPs 1μl
4. H₂O 7,5μl
5. 5x Buffer 4μl

Τα τοποθετούμε στους 42°C για 2 λεπτά. Προσθέτουμε 1μl (200U) Superscript II (Invitrogen), και τα αφήνουμε στους 42°C για 50 λεπτά, και στην συνέχεια στους 70°C για άλλα 15 λεπτά.

Ακολουθεί η κανονικοποίηση δειγμάτων cDNA

Η αντίδραση περιέχει:

1. cDNA 1μl
 2. (10 μM) Εκκινητής F 0,2μl
 3. (10 μM) Εκκινητής R 0,2μl
 4. H₂O 3,6μl
 5. (2X) Syber 5μl, όπου περιέχει dNTPs, ένζυμο, buffer και φθορίζουσα χρωστική
- Τελικό Όγκος: 10μl

Μετά την αντίδραση κανονικοποίησης, ακολούθησε αραίωση των δειγμάτων με νερό, προσθέτοντας τον κατάλληλο όγκο νερού στο κάθε δείγμα.

2.12 Ποσοτική PCR πραγματικού χρόνου

Η qPCR (ποσοτική αναστροφής μετάδοσης αλυσίδας πολυμεράσης) είναι μια ισχυρή τεχνική στη μοριακή βιολογία που χρησιμοποιείται για να ποσοτικοποιήσει την ποσότητα του DNA που αντιστοιχεί σε ένα συγκεκριμένο γονίδιο ή RNA που έχει μετατραπεί σε cDNA.

Η αντίδραση περιέχει:

1. cDNA 2,5μl
 2. (10 μM) Εκκινητής F 0,2μl
 3. (10 μM) Εκκινητής R 0,2μl
 4. H₂O 2,1μl
 5. (2X) Syber 5μl
- Τελικό Όγκος: 10μl

Το πρόγραμμα των αντιδράσεων qPCR ήταν το παρακάτω:

<u>Χρόνος</u>	<u>Θερμοκρασία</u>	
<u>3 min</u>	<u>95°C</u>	
<u>6 sec</u>	<u>95°C</u>	} <u>45 Κύκλοι</u>
<u>12 sec</u>	<u>58 ή 60°C</u>	
<u>6,6 sec</u>	<u>72°C</u>	
<u>3 sec</u>	<u>65°C</u>	
<u>30 sec</u>	<u>95 °C</u>	

3. Αποτελέσματα

3.1 Φαινοτυπική ανάλυση των συμβιωτικών φυτών στην παρουσία αλβενδαζόλης

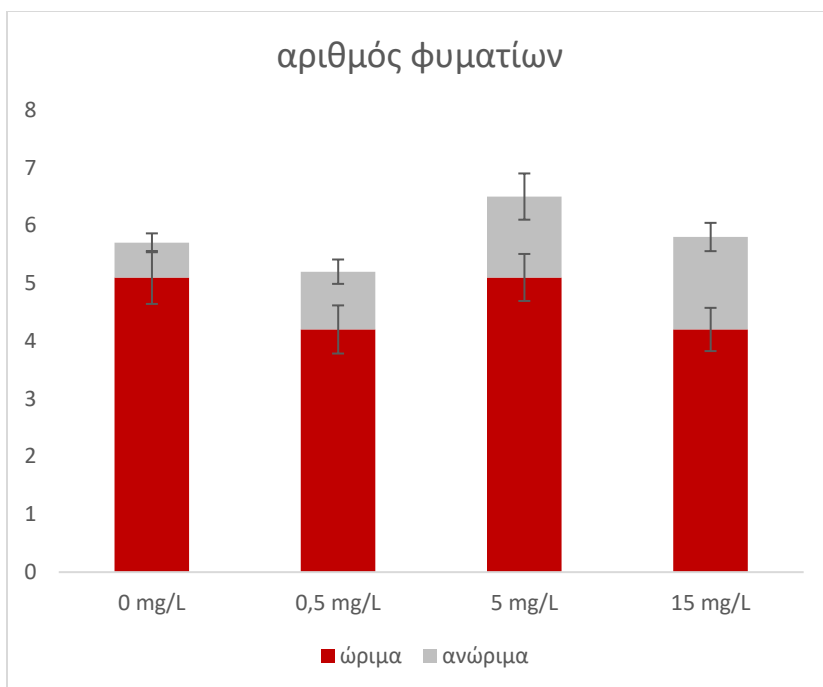
Για να εξετάσουμε την πιθανή τοξική δράση της αλβενδαζόλης στη διαδικασία της φυματογένεσης κατά τη συμβιωτική σχέση του *L. japoensis* με ριζόβια, αρχικά παρατηρήσαμε την ανάπτυξη των φυτών και τον αριθμό των φυματίων που σχηματίζονται στη ρίζα όταν τα φυτά μεγαλώνουν σε διαφορετικές συγκεντρώσεις αλβενδαζόλης. Συγκεκριμένα, νεαρά φυτάρια φυτεύτηκαν σε δοχεία magenta που περιείχαν 0,5 ή 5 ή 15 mg/L αλβενδαζόλης ή καθόλου αλβενδαζόλη (συνθήκη αρνητικού ελέγχου) και εμβολιάστηκαν με ριζόβια. Οι μετρήσεις της ανάπτυξης των φυτών και η παρατήρηση των φυματίων πραγματοποιήθηκαν τέσσερις εβδομάδες αργότερα.

Αρχικά, μετρήθηκε το μήκος του βλαστού και το μήκος ρίζας των φυτών για να διαπιστωθεί αν η αυξανόμενη συγκέντρωση αλβενδαζόλης επηρεάζει την ανάπτυξη των συμβιωτικών φυτών. Στον πίνακα 1 φαίνεται ο μέσος όρος από το μήκος του βλαστού και της ρίζας για τις 4 διαφορετικές συγκεντρώσεις αλβενδαζόλης. Η στατιστική ανάλυση των αποτελεσμάτων (one-way ANOVA) δεν έδειξε να υπάρχουν στατιστικώς σημαντικές διαφορές μεταξύ των χειρισμών.

Ποσότητα alb (mg/L)	Μήκος βλαστού (cm)	Μήκος ρίζας (cm)
0	5,62 ± 0,5	7,01 ± 0,5
0,5	6,25 ± 0,5	8,08 ± 0,5
5	6,29 ± 0,5	7,92 ± 0,5
15	5,72 ± 0,5	8,2 ± 0,5

Πίνακας 1. Μήκος βλαστού και ρίζας φυτών που αναπτύχθηκαν σε διαφορετικές συγκεντρώσεις αλβενδαζόλης. Δεν υπάρχουν στατιστικώς σημαντικές διαφορές μεταξύ των χειρισμών (one-way ANOVA).

Στη συνέχεια, μετρήθηκαν τα φυμάτια που σχηματίστηκαν στα φυτά με την χρήση στερεοσκοπίου. Συγκεκριμένα μετρήθηκαν ξεχωριστά τα ώριμα και τα ανώριμα φυμάτια που σχηματίστηκαν στις ρίζες των φυτών στην αυξανόμενη συγκέντρωση της αλβενδαζόλης. Στο Διάγραμμα 1 βλέπουμε τον μέσο όρο του αριθμού των ώριμων και ανώριμων φυματίων που σχηματίστηκαν για κάθε διαφορετική ποσότητα αλβενδαζόλης που εφαρμόστηκε στα φυτά. Στατιστική ανάλυση των αποτελεσμάτων (one-way ANOVA), η οποία πραγματοποιήθηκε στο σύνολο του αριθμού των φυματίων (ολικός αριθμός φυματίων) για τον κάθε χειρισμό, δεν έδειξε να υπάρχουν στατιστικώς σημαντικές διαφορές μεταξύ των χειρισμών.



Διάγραμμα 1. Μέσος όρος αριθμού ώριμων και ανώριμων φυματίων μετά από χορήγηση 4 διαφορετικών συγκεντρώσεων alb (0 mg/L , 0,5 mg/L, 5 mg/L & 15 mg/L). Δεν υπάρχουν στατιστικώς σημαντικές διαφορές μεταξύ των χειρισμών (one-way ANOVA).

3.2. Μελέτη γονιδίων που σχετίζονται με τη συμβίωση κατά την ανάπτυξη των φυτών παρουσία αλβενδαζόλης

Για να διαπιστώσουμε αν η παρουσία του φαρμάκου επιδρά στην ανάπτυξη της συμβιωτικής κατά τα αρχικά στάδια, μελετήσαμε την έκφραση γονιδίων που είναι γνωστό να επάγονται κατά τα αρχικά στάδια της αλληλεπίδρασης ριζοβίων-ψυχανθών. Συγκεκριμένα, μελετήθηκε η έκφραση των γονιδίων *ENOD2*, *NIN*, *NSP1* και *TML*.

Για το πείραμα αυτό, νεαρά φυτάρια 10 ημερών τοποθετήθηκαν σε δοχεία magenta στα οποία εφαρμόστηκαν διαφορετικές συγκεντρώσεις αλβενδαζόλης (0 ή 0,5 ή 5 ή 15 mg/L) και εμβολιάστηκαν με το ριζόβιο (*Mesorhizobium loti* R7A). Μαζέψαμε τα φυτά για ανάλυση μόλις 5 μέρες μετά τον εμβολιασμό τους με *M. Loti*, πριν προλάβουν να σχηματιστούν τα φυμάτια.

Η χρήση διαφορετικών συγκεντρώσεων ABZ επιτρέπει μια ανάλυση δόσης-απόκρισης, αποκαλύπτοντας πώς αλλάζει η γονιδιακή έκφραση σε απόκριση σε διάφορα επίπεδα της. Αυτό μπορεί να παρέχει πληροφορίες για την ευαισθησία συγκεκριμένων γονιδίων στις αλλαγές συγκέντρωσης ABZ.

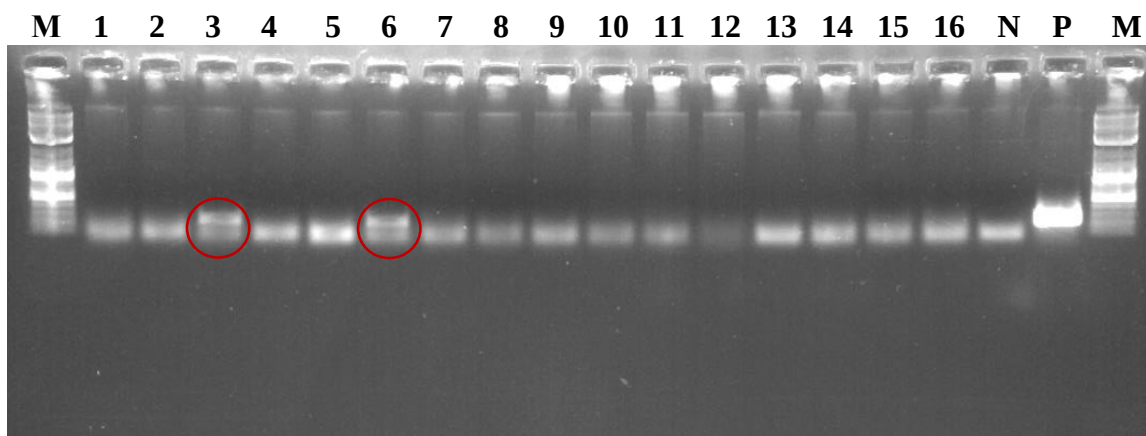
Στο πείραμα αυτό, η συμπερίληψη τεσσάρων βιολογικών επαναλήψεων διασφαλίζει την αξιοπιστία και τη στατιστική σημαντικότητα των αποτελεσμάτων που προέκυψαν από το πείραμα.

Αρχικά πραγματοποιήθηκε απομόνωση RNA και στη συνέχεια μετρήθηκε η συγκέντρωση του RNA σε κάθε δείγμα (Πίνακας 2). Η αναλογία 260/280 (απορρόφησης στα 260 nm προς την απορρόφηση στα 280 nm για κάθε δείγμα RNA) χρησιμοποιείται ως δείκτης καθαρότητας RNA, με τιμές γύρω στο 1,8 - 2,0 να θεωρούνται ιδανικές.

RNA δείγμα	χειρισμός	Συγκέντρωση ng/μl	αναλογία 260/280
1	0 mg/L alb -1	302	2,09
2	0 mg/L alb -2	342,4	2,07
3	0 mg/L alb -3	357,4	2,08
4	0 mg/L alb -4	229,2	2,07
5	0,5 mg/L alb-1	231,7	2,09
6	0,5 mg/L alb-2	190,3	2,08
7	0,5 mg/L alb-3	341,3	2
8	0,5 mg/L alb-4	233,5	2,09
9	5 mg/L alb -1	296,5	1,76
10	5 mg/L alb -2	244,2	1,96
11	5 mg/L alb -3	188	2,05
12	5 mg/L alb -4	248,6	2,08
13	15 mg/L alb -1	356,2	2,08
14	15 mg/L alb -2	233,8	2,08
15	15 mg/L alb -3	336,1	2,01
16	15 mg/L alb -4	258,7	2,09

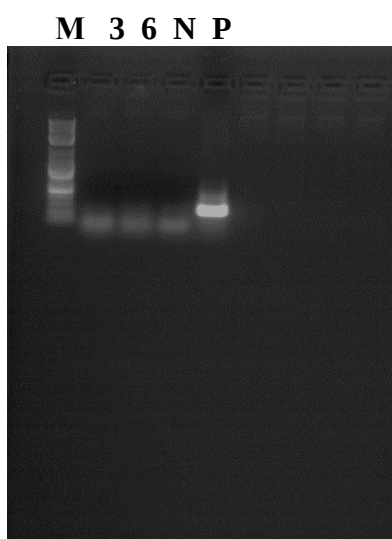
Πίνακας 2. Συγκέντρωση και καθαρότητα των δειγμάτων RNA

Στη συνέχεια ακολούθησε επεξεργασία με DNase, για να απομακρυνθούν τυχόν υπολείμματα DNA από τα δείγματα RNA. Η επιτυχής απομάκρυνση του DNA ελέγχθηκε με διαγνωστική PCR και ηλεκτροφόρηση των προϊόντων (Εικόνα 6).



Εικόνα 6. Διαγνωστική αντίδραση PCR για να ελεγχθεί η απομάκρυνση γονιδιωματικού DNA από τα δείγματα RNA. (M=μάρτυρας μοριακών βαρών, N=αρνητικός μάρτυρας, P=θετικός μάρτυρας)

Από την εικόνα 6 βλέπουμε ότι, υπάρχει υπόλοιπο DNA στα δείγματα 3 και 6. Για τον λόγο αυτό στα δείγματα αυτά επαναλήφθηκε η επεξεργασία με DNase (Εικόνα 7).



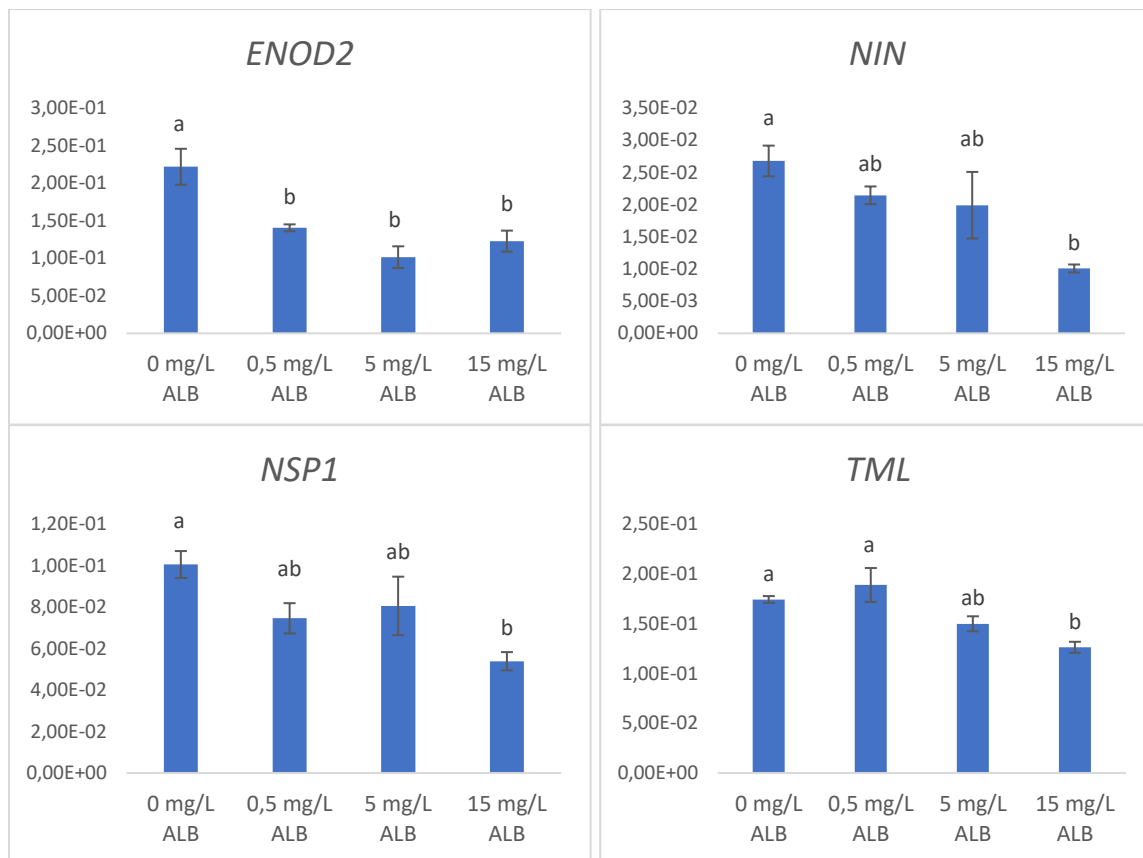
Εικόνα 7. Διαγνωστική αντίδραση PCR σε δείγματα RNA που έχουν υποστεί 2η φορά επεξεργασία με DNase.

Τέλος, μετρήθηκε η έκφραση τεσσάρων γονιδίων, με ποσοτική PCR πραγματικού χρόνου. Η μείωση ή η αύξηση στην έκφραση των γονιδίων, που στοχεύσαμε μπορούν να μας δώσουν σημαντικές πληροφορίες για πιθανή διαταραχή στην συμβιωτική σχέση ψυχανθών-ριζοβίων, αλλά και τον τρόπο με τον οποίο μπορεί η σχέση αυτή να επηρεάζεται.

Στην Εικόνα 8 μπορούμε να δούμε τις αλλαγές στην έκφραση των τεσσάρων διαφορετικών γονιδίων, κάτω από τις τέσσερις διαφορετικές συγκεντρώσεις ALB.

Για το γονίδιο *ENOD2* παρατηρείται σημαντική στατιστική διαφορά στην έκφραση του ανεξαρτήτως της συγκέντρωσης αλβενδαζόλης, ενώ για το γονίδιο *NIN* υπάρχει στατιστική διαφορά στην έκφραση του στην υψηλότερη συγκέντρωση αλβενδαζόλης (15 mg/L). Το ίδιο ισχύει και για την έκφραση του γονιδίου *NSP1*, όπου η μεγαλύτερη μείωση στην έκφραση παρατηρείται στην υψηλότερη συγκέντρωση αλβενδαζόλης. Τέλος για το γονίδιο *TML*, με βάση το διάγραμμα μπορούμε να δούμε ότι όσο αυξάνεται η συγκέντρωση της αλβενδαζόλης μειώνεται η έκφραση του γονιδίου *TML*, παρότι στην μικρότερη συγκέντρωση αλβενδαζόλης (0,5 mg/L) φαίνεται μια μικρή αύξηση της έκφρασης του γονιδίου.

Συγκεκριμένα, στατιστική ανάλυση με one-way ANOVA έδειξε τα εξής: Για το γονίδιο *ENOD2* παρατηρείται σημαντική στατιστική διαφορά μεταξύ 0 mg/L alb και 0,5 mg/L alb (p -value= 0,0157), και με 5 mg/L alb (p = 0,0008) και με 15 mg/L alb (p =0,0039). Για το γονίδιο *NIN* υπάρχει στατιστική διαφορά μεταξύ 0,5 mg/L και 15 mg/L (p = 0,0081). Για το γονίδιο *NSP1* σημαντική στατιστική διαφορά παρατηρείται μεταξύ 0,5 mg/L και 15 mg/L (p = 0,0056). Τέλος για το γονίδιο *TML*, η σημαντική στατιστική διαφορά παρατηρείται μεταξύ 0,5 mg/L και 15 mg/L (p =0,0217) αλλά και μεταξύ 0,5 mg/L και 15 mg/L (p =0,0035).



Εικόνα 8. Έκφρασης των γονιδίων *ENOD2*, *NIN*, *NSP1* & *TML*, τέσσερις μέρες μετά τον εμβολιασμό των φυτών με ριζόβιο, σε φυτά που εκτέθηκαν σε 0 mg/L, 0,5 mg/L, 5 mg/L & 15 mg/L ALB. Οι στατιστικώς σημαντικές διαφορές μεταξύ των χειρισμών εμφανίζονται με διαφορετικά γράμματα.

4. Συζήτηση

Στην παρούσα εργασία μελετήθηκε η πιθανή επίδραση του κτηνιατρικού φαρμάκου αλβενδαζόλη στη συμβιωτική σχέση των ψυχανθών φυτών με τα αζωτοδεσμευτικά ριζόβια. Η συμβίωση αυτή παρέχει στα φυτά το απαραίτητο για την ανάπτυξή τους θρεπτικό στοιχείο άζωτο. Παράγοντες που μπορεί να διαταράσσουν τις ωφέλιμες συμβιωτικές σχέσεις φυτών-μικροοργανισμών, επηρεάζουν τόσο την ανάπτυξη των φυτών όσο και την οικολογία του εδάφους.

Οι συμβιωτικές σχέσεις των φυτών μπορούν να επηρεαστούν από την παρουσία κτηνιατρικών φαρμάκων στα καλλιεργούμενα εδάφη, τα οποία είναι πιθανό να βρεθούν εκεί μέσω της εφαρμογής ζωικής κοπριάς. Πρόσφατα αναφέρθηκε η αρνητική επίδραση της αλβενδαζόλης στην ωφέλιμη σχέση του ψυχανθούς φυτού-μοντέλου *Lotus japonicus* με τον δενδρόμορφο ενδομυκορριζικό μύκητα *Rhizophagus irregularis*. Η παρουσία της αλβενδαζόλης στο υπόστρωμα ανάπτυξης των φυτών είχε ως αποτέλεσμα την διατάραξη της λειτουργίας των θυσάνων στις ρίζες των φυτών και κατ' επέκταση την σημαντικά μειωμένη συσσώρευση φωσφόρου στα φύλλα (Gkimprixi et al. 2023).

Για να μελετήσουμε την πιθανή επίδραση της αλβενδαζόλης και στη συμβιωτική σχέση ριζοβίων-ψυχανθών, χρησιμοποιήσαμε το ίδιο σύστημα, δηλαδή το ψυχανθές φυτό-μοντέλο *L. japonicus*, και εμβολιάσαμε τα φυτά με το ριζόβιο *Mesorhizobium loti*. Τα φυτά εκτέθηκαν σε αυξανόμενη συγκέντρωση αλβενδαζόλης, συγκεκριμένα 0, 0.5, 5 και 15 mg/L, και μελετήθηκε η ανάπτυξη των φυτών, η φυματογένεση, και η έκφραση σημαντικών συμβιωτικών γονιδίων.

Αρχικά, για να αξιολογήσουμε την επίδραση της αλβενδαζόλης στην ανάπτυξη των συμβιωτικών φυτών μετρήσαμε το μήκος του βλαστού και της ρίζας των φυτών. Σύμφωνα με τα αποτελέσματα, δεν παρατηρούνται σημαντικές αλλαγές στην ανάπτυξη του βλαστού και της ρίζας όταν τα συμβιωτικά φυτά αναπτύσσονται σε αυξανόμενη συγκέντρωση του φαρμάκου (Πίνακας 1). Το αποτέλεσμα αυτό είναι σύμφωνο και με προηγούμενες μελέτες που είχαν δείξει πως η αλβενδαζόλη δεν επηρεάζει την ανάπτυξη των φυτών (Prchal et al., 2016; Gkimprixi et al. 2023).

Για να μελετήσουμε την πιθανή επίδραση της αλβενδαζόλης στη διαδικασία της φυματογένεσης, μετρήσαμε τον αριθμό των ώριμων και ανώριμων φυματίων που σχηματίστηκαν στις ρίζες των φυτών. Σύμφωνα με τα αποτελέσματα, δεν παρατηρήθηκαν στατιστικώς σημαντικές διαφορές στον αριθμό των φυματίων στις ρίζες των φυτών που μεγάλωναν στην παρουσία του φαρμάκου (Διάγραμμα 1).

Στη συνέχεια, για να εξετάσουμε την πιθανή επίδραση του φαρμάκου στη συμβιωτική σχέση ριζοβίου-ψυχανθούς με μεγαλύτερη ακρίβεια, χρησιμοποιήσαμε μια μοριακή μέθοδο, την ποσοτική PCR πραγματικού χρόνου, που είναι μια ευαίσθητη μέθοδος και μπορεί να ανιχνεύσει αλλαγές που συμβαίνουν στην έκφραση γονιδίων. Συγκεκριμένα,

εξετάσαμε την έκφραση σημαντικών γονιδίων που σχετίζονται με τη συγκεκριμένη συμβιωτική σχέση σε αρχικά στάδια της συμβίωσης (5 ημέρες μετά τον εμβολιασμό των φυτών με ριζόβια) για να ελέγξουμε αν η αλβενδαζόλη επιδρά στα αρχικά στάδια κατά την εγκαθίδρυση της συμβιωτικής σχέσης.

Ένα από τα γονίδια που εξετάστηκαν ήταν το *ENOD2*, το οποίο εκφράζεται νωρίς στη διαδικασία φυματιογένεσης, εξ ου και η ονομασία "Early Nodulin 2". Η έκφρασή του χρησιμοποιείται συχνά ως δείκτης για την έναρξη της φυματιογένεσης. Το *ENOD2* εκφράζεται ιδιαίτερα στα ριζικά τριχίδια και στα κύτταρα του φλοιού των ριζών που βρίσκονται σε άμεση γειτνίαση με τη ριζόβια. Η έκφραση του *ENOD2* σημαίνει ότι το φυτό είναι έτοιμο να ξεκινήσει τη φυματιογένεση και την εγκαθίδρυση της συμβιωτικής σχέσης με τα ριζόβια (Govers, et. al. 1990). Η μειωμένη έκφρασης του γονιδίου *ENOD2* μπορεί να υποδείξει κάποιο πρόβλημα στη διαδικασία της φυματιογένεσης ή στην μόλυνση των ριζών από τα ριζόβια. Σύμφωνα με τα αποτελέσματα της παρούσας εργασίας, η έκφραση του γονιδίου μειώνεται σημαντικά στην παρουσία αλβενδαζόλης, και μάλιστα η μείωση είναι ήδη πολύ εμφανής και σημαντική στην χαμηλότερη συγκέντρωση αλβενδαζόλης που δοκιμάστηκε, δηλαδή μόλις 0,5 mg/L (Εικόνα 8).

Εξετάστηκε και το γονίδιο *NIN* (Nodule Inception), το οποίο παίζει επίσης κρίσιμο ρόλο στα αρχικά στάδια της φυματιογένεσης. Το *NIN* εμπλέκεται στο μονοπάτι σηματοδότησης που οδηγεί στην ανάπτυξη φυματίων. Συγκεκριμένα, το γονίδιο *NIN* κωδικοποιεί για ένα μεταγραφικό παράγοντα και είναι υπεύθυνο για την ενεργοποίηση της έκφρασης άλλων γονιδίων που εμπλέκονται στην φυματιογένεση. Το *NIN* εκφράζεται στους ιστούς της ρίζας ως απόκριση σε σήματα από τα ριζόβια. Η έκφραση του γονιδίου *NIN* μειώνεται σημαντικά κυρίως στην υψηλότερη συγκέντρωση αλβενδαζόλης, δηλαδή σε 15 mg/L, ενώ μια μικρή μείωση της έκφρασης του γονιδίου παρατηρείται στις χαμηλότερες συγκεντρώσεις, όπως 0,5 και 5 mg/L (Εικόνα 8).

Το *NSP1* (Nodulation Signaling Pathway 1), είναι ένα άλλο γονίδιο που εμπλέκεται στη διαδικασία σχηματισμού φυματίων στα ψυχανθή φυτά. Το *NSP1* λειτουργεί ως μεταγραφικός παράγοντας, που σημαίνει ότι ρυθμίζει την έκφραση άλλων γονιδίων που εμπλέκονται στην φυματιογένεση. Λειτουργεί σε συνδυασμό με άλλες πρωτεΐνες, όπως το *NSP2* (Nodulation Signaling Pathway 2), για να ενεργοποιήσει την έκφραση των γονιδίων που σχετίζονται με την φυματιογένεση σε απόκριση σε σήματα από τα ριζόβια. Όπως το *NIN*, το *NSP1* εκφράζεται στους ιστούς της ρίζας ως απόκριση στα ριζοβιακά σήματα. Στην εικόνα 8, βλέπουμε ότι υπάρχει μειωμένη έκφραση του γονιδίου με την προσθήκη αλβενδαζόλης, με την εντονότερη μείωση να εμφανίζεται σε 15 mg/L αλβενδαζόλης.

Η μείωση της έκφρασης των γονιδίων *NIN* και *NSP1* σε υψηλές συγκεντρώσεις αλβενδαζόλης υποδεικνύει ότι το φάρμακο μπορεί να επηρεάζει σημαντικά την έναρξη και την εξέλιξη της φυματιογένεσης, μειώνοντας τη δυνατότητα του φυτού να δημιουργήσει ενεργά φυμάτια και να εγκαθιδρύσει τη συμβίωση με τα ριζόβια.

Το γονίδιο *TML* (Too Much Love) συμμετέχει στον μηχανισμό αυτορρύθμισης της φυματογένεσης και ρυθμίζεται σε μετα-μεταγραφικό επίπεδο από το miR2111. Είναι ένα γονίδιο που επάγεται ισχυρά λίγες μόνο μέρες μετά τη μόλυνση των φυτών με το ριζόβιο. Ο ρόλος του είναι να ρυθμίζει τον αριθμό των φυματίων που θα δημιουργηθούν στη ρίζα (Tsikou et al. 2018). Σύμφωνα με τα αποτελέσματα της παρούσας εργασίας, η έκφραση του γονιδίου αυτού μειώθηκε σημαντικά όταν τα φυτά αναπτύχθηκαν στην υψηλότερη συγκέντρωση αλβενδαζόλης που δοκιμάστηκε, δηλαδή 15 mg/L (Εικόνα 8). Παρόλο όμως που η έκφραση του *TML* επηρεάστηκε αρνητικά στα αρχικά στάδια της συμβιωτικής σχέσης, αυτό δεν έδειξε να έχει κάποια ορατή επίδραση στον αριθμό των φυματίων που σχηματίστηκαν στα φυτά.

Συμπερασματικά, αυτά τα γονίδια ρυθμίζονται στενά και εκφράζονται με έναν χωρικά και χρονικά συγκεκριμένο τρόπο για να συντονίσουν το σχηματισμό φυματίων και την εγκαθίδρυση της συμβίωσης. Δουλεύουν μαζί μέσα στη ρίζα του φυτού για να ξεκινήσουν και να διευκολύνουν τη διαδικασία φυματογένεσης, η οποία τελικά οδηγεί στο σχηματισμό εξειδικευμένων δομών όπου λαμβάνει χώρα η δέσμευση του αζώτου.

Οι αλλαγές στην έκφραση των γονιδίων *ENOD2*, *NIN*, *NSP1* και *TML* υποδεικνύουν ότι η αλβενδαζόλη μπορεί να έχει τοξικές επιδράσεις στον σχηματισμό φυματίων, και στις συμβιωτικές σχέσεις ψυχανθών-ριζοβίων. Παρόλο που δεν παρατηρήθηκε μείωση στον αριθμό των φυματίων λόγω της χρήσης αλβενδαζόλης, η μειωμένη έκφραση των γονιδίων δείχνει πως η συμβιωτική σχέση έχει επηρεαστεί σε κάποιο βαθμό, και συγκεκριμένα στα αρχικά στάδια. Είναι επομένως σημαντικό να διερευνηθεί περαιτέρω η επίδραση της αλβενδαζόλης στην εγκαθίδρυση και τη λειτουργία της συμβιωτικής σχέσης ριζοβίων-ψυχανθών. Η διατάραξη της συμβιωτικής σχέσης μπορεί να επηρεάσει αρνητικά την παραγωγή των καλλιεργειών και να απαιτήσει τη χρήση περισσότερων λιπασμάτων για την αντιστάθμιση των απωλειών. Επιπλέον, η αρνητική επίδραση της αλβενδαζόλης σε ωφέλιμους μικροοργανισμούς στο έδαφος μπορεί να επηρεάσει την οικολογική ισορροπία του εδάφους.

5. Βιβλιογραφία

1. R.G. Palmer, T. Hymowitz, Soybean: Germplasm, Breeding, and Genetics, Reference Module in Food Science, Elsevier, 2016, ISBN 9780081005965
2. Michael G. Simpson, 8 - Diversity and Classification of Flowering Plants: Eudicots, Editor(s): Michael G. Simpson, Plant Systematics (Second Edition), Academic Press, 2010, Pages 275-448, ISBN 9780123743800
3. J.J. Doyle, Leguminosae, Editor(s): Sydney Brenner, Jefferey H. Miller, Encyclopedia of Genetics, Academic Press, 2001, Pages 1081-1085, ISBN 9780122270802,
4. Franche C, Lindstrom K, Elmerich C.. Nitrogen-fixing bacteria associated with leguminous and non-leguminous plants. Plant and Soil 321: 35-59, August 2009, Plant and Soil 321(1):35-59
5. Schaechter, Moselio. *Encyclopedia of microbiology*. Academic Press, 2009.
6. Foucher F, Kondorosi É (2000) Cell cycle regulation in the course of nodule organogenesis in Medicago. Plant Mol Biol 43:773–786
7. G.W. O'Hara, J.G. Howieson, P.H. Graham, CHAPTER 14 - Nitrogen Fixation and Agricultural Practice, Editor(s): G. Jeffery Leigh, Nitrogen Fixation at the Millennium, Elsevier Science, 2002, Pages 391-420, ISBN 9780444509659
8. Mariangela Hungria, Marco Antonio Nogueira, Chapter 16 - Nitrogen fixation, Zed Rengel, Ismail Cakmak, Philip J. White, Marschner's Mineral Nutrition of Plants (Fourth Edition), Academic Press, 2023, Pages 615-650, ISBN 9780128197738,
9. Ferguson BJ, Mens C, Hastwell AH, Zhang M, Su H, Jones CH, Chu X, Gresshoff PM. Legume nodulation: The host controls the party. Plant Cell Environ. 2019 Jan;42(1):41-51. doi: 10.1111/pce.13348. Epub 2018 Jun 21. PMID: 29808564.
10. H. Jones, April H. Hastwell, Peter M. Gresshoff, Brett J. Ferguson, Chapter Six - Soybean CLE peptides and their CLAVATA-like signaling pathways, Editor(s): Hon-Ming Lam, Man-Wah Li, Advances in Botanical Research, Academic Press, Volume 102, 2022, Pages 153-175, ISSN 0065-2296, ISBN 9780323912198
11. Oldroyd, G. E. D., Murray, J. D., Poole, P. S., & Downie, J. A. (2011). The Rules of Engagement in the Legume-Rhizobial Symbiosis. Annual Review of Genetics, 45(1), 119–144.
12. Marschner's Mineral Nutrition of Plants Book • Fourth Edition • 2023
13. Lin J, Frank M, Reid D. No Home without Hormones: How Plant Hormones Control Legume Nodule Organogenesis. Plant Commun. 2020 Aug 21;1(5):100104. doi: 10.1016/j.xplc.2020.100104. PMID: 33367261; PMCID: PMC7747975.

14. Timmers ACJ, Soupéne E, Auriac MC, de Billy F, Vasse J, Boistard P, Truchet G (2000) Saprophytic intracellular rhizobia in alfalfa nodules. *Mol Plant Microbe Interact* 13:1204–1213
15. Łotocka B, Kopcińska J, Golinowski W (1997) Morphogenesis of root nodules in white clover. I. Effective root nodules induced by the wild type of *Rhizobium leguminosarum* biovar. *trifolii*. *Acta Soc Bot Pol* 66:273–292
16. Sprent JI. Which steps are essential for the formation of functional legume nodules? *New Phytol.* 1989 Feb;111(2):129-153. doi: 10.1111/j.1469-8137.1989.tb00675.x. PMID: 33874257.
17. Xie K., Ren Y., Chen A., Yang C., Zheng Q., Chen J., Wang D., Li Y., Hu S., Xu G. Plant nitrogen nutrition: The roles of arbuscular mycorrhizal fungi. *J. Plant Physiol.* 2021;269:153591. doi: 10.1016/j.jplph.2021.153591.
18. Reviews. *New Phytol.* 1997 Nov;137(3):563-567. doi: 10.1111/j.1469-8137.1997.tb01248.x. PMID: 33863070.
19. Gutjahr C., Parniske M. Cell and developmental biology of arbuscular mycorrhiza symbiosis. *Annu. Rev. Cell. Dev. Biol.* 2013;29:593–617. doi: 10.1146/annurev-cellbio-101512-122413
20. Scientific Opinion addressing the state of the science on risk assessment of plant protection products for in-soil organisms, Published: 22 February 2017 by European Food Safety Authority
21. Hua Qin, Kouping Lu, P.J. Strong, Qiufang Xu, Qifeng Wu, Zuxiang Xu, Jin Xu, Hailong Wang, Long-term fertilizer application effects on the soil, root arbuscular mycorrhizal fungi and community composition in rotation agriculture, *Applied Soil Ecology*, Volume 89, 2015, Pages 35-43, ISSN 0929-1393
22. Gkimprizi E, Lagos S, Nikolaou CN, Karpouzas DG, Tsikou D. Veterinary drug albendazole inhibits root colonization and symbiotic function of the arbuscular mycorrhizal fungus *Rhizophagus irregularis*. *FEMS Microbiol Ecol.* 2023 May 31;99(6):fiad048. doi: 10.1093/femsec/fiad048. PMID: 37156498; PMCID: PMC10696295.
23. Venkatesan P. Albendazole. *J Antimicrob Chemother.* 1998 Feb;41(2):145-7. doi: 10.1093/jac/41.2.145. PMID: 9533454.
24. Critchley J, Addiss D, Gamble C, Garner P, Gelband H, Ejere H; International Filariasis Review Group. Albendazole for lymphatic filariasis. *Cochrane Database Syst Rev.* 2005 Oct 19;(4):CD003753. doi: 10.1002/14651858.CD003753.pub3. Update in: *Cochrane Database Syst Rev.* 2019 Jan 08;1:CD003753. PMID: 16235339.
25. Valmas MI, Sexauer M, Markmann K, Tsikou D. Plants Recruit Peptides and Micro RNAs to Regulate Nutrient Acquisition from Soil and Symbiosis. *Plants.* 2023; 12(1):187.
26. Zgadzaj R, Garrido-Oter R, Jensen DB, Koprivova A, Schulze-Lefert P, Radutoiu S. Root nodule symbiosis in *Lotus japonicus* drives the establishment of distinctive rhizosphere, root, and nodule bacterial communities. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 2016 Dec 6;113(49):E7996-E8005. doi: 10.1073/pnas.1616564113. Epub 2016 Nov 18. PMID: 27864511; PMCID: PMC5150415.

27. [J. Stougaard, *Lotus japonicus*: A Model Plant for the Legume Family, Reference Module in Life Sciences, Elsevier, 2017, ISBN 9780128096338,] Handberg and Stougaard 1992).
28. Hayashi M, Miyahara A, Sato S, Kato T, Yoshikawa M, Taketa M, Hayashi M, Pedrosa A, Onda R, Imaizumi-Anraku H, Bachmair A, Sandal N, Stougaard J, Murooka Y, Tabata S, Kawasaki S, Kawaguchi M, Harada K. Construction of a genetic linkage map of the model legume *Lotus japonicus* using an intraspecific F2 population. *DNA Res.* 2001 Dec 31;8(6):301-10.
29. Prchal, L., Podlipná, R., Lamka, J., Dědková, T., Skálová, L., Vokřál, I., Lecová, L., Vaněk, T., & Szotáková, B. (2016). Albendazole in environment: Faecal concentrations in lambs and impact on lower development stages of helminths and seed germination. *Environmental Science and Pollution Research International*, 23(13), 13015–13022. <https://doi.org/10.1007/s11356-016-6472-0>
30. Govers, F. Franssen, H.J. Pieterse, C.M.J. Wilmer, J. Bisseling, T. (1990), Function and regulation of the early nodulin gene ENOD2, *Genetic Engineering of Crop Plants*, pp. 259 - 269