

Πανεπιστήμιο Θεσσαλίας

Τμήμα Βιοχημείας & Βιοτεχνολογίας

Επίδραση μη παθογόνου ενδοφυτικού μύκητα στην ανάπτυξη φυτών *Nicotiana benthamiana*

Effect of a non-pathogenic endophytic fungus on *Nicotiana
benthamiana* plant growth



Πτυχιακή εργασία

Κωνσταντίνιδης Επαμεινώνδας του Εμμανουήλ

Φεβρουάριος 2024

Τριμελής εξεταστική επιτροπή

Παπαδοπούλου Καλλιόπη

Καθηγήτρια Βιοτεχνολογίας Φυτών

Τσίκου Δανιέλα

Επίκουρος Καθηγήτρια Μοριακής και Αναπτυξιακής Βιολογίας Φυτών

Καρπούζας Δημήτριος

Καθηγητής Περιβαλλοντικής Μικροβιολογίας & Βιοτεχνολογίας

Contents

Abstract	5
Περίληψη	5
Εισαγωγή	6
Ενδοφυτικοί μύκητες	6
Ο ενδοφυτικός μύκητας <i>Fusarium solani</i> στέλεχος K	7
Η <i>Nicotiana benthamiana</i> ως οργανισμός-μοντέλο	9
Μύκητες που επάγουν την ανάπτυξη των φυτών	11
Ο FsK ως PGPF	14
Σκοπός της εργασίας	15
Υλικά και μέθοδοι	15
1.Αποστείρωση σπορίων <i>Nicotiana benthamiana</i> και εκβλάστηση.	15
2.Προετοιμασία δοχείων magenta.....	15
3.Υγρή καλλιέργεια μύκητα (FsK).	15
4.Απομόνωση κονιδίων μύκητα (FsK), μέτρηση και προετοιμασία εμβολίου.	16
5.Μεταφύτευση και εμβολιασμός φυτών.....	17
6.Δειγματοληψία φυτών.	18
7.Απομόνωση DNA με χρήση του διαλύματος CTAB.	18
8.Αλυσιδωτή αντίδραση πολυμεράσης πραγματικού χρόνου (qPCR).....	19
Αποτελέσματα	20
1 εβδομάδα μετά τον εμβολιασμό	21
2 εβδομάδες μετά τον εμβολιασμό	24
3 εβδομάδες μετά τον εμβολιασμό	27
4 εβδομάδες μετά τον εμβολιασμό	30
Συζήτηση	32
Βιβλιογραφία	33

Abstract

Chemicals and pesticides are still used to protect crops from pests, viruses and other pathogens, as well as against environmental factors. In recent years a new class of fungi, plant growth promoting fungi (PGPF), has been investigated as plant protecting agents, too. PGPFs are symbiotic endophytic fungi that confer resistance to both various pathogens and abiotic agents on the plants. In the present experiment, the colonization of *Nicotiana benthamiana* plants by *Fusarium solani* K (FsK) strain and its effects on plant growth are studied. FsK, an endophytic non-pathogenic fungus that is not a model organism to date, exhibits beneficial effects on several plants, including pathogen resistance and increased growth rate. However, until recently its colonization of *N. benthamiana* has remained unclear. In the experiment, *N. benthamiana* plants were inoculated with FsK and their growth was monitored for four time points, analyzing phenotypic changes. Then qPCRs were performed to determine colonization in the roots of the plants by FsK. The results showed minimal colonization of FsK in the roots of *N. benthamiana*, with low copy numbers. Compared to the expected increased growth, no significant differences were observed between inoculated and uninoculated plants. Factors such as substrate composition, moisture levels, pH, inoculum viability and inoculation methods may have influenced colonization success. Further optimisation of experimental conditions is necessary to enhance the effectiveness of colonisation and to understand plant-FsK interactions.

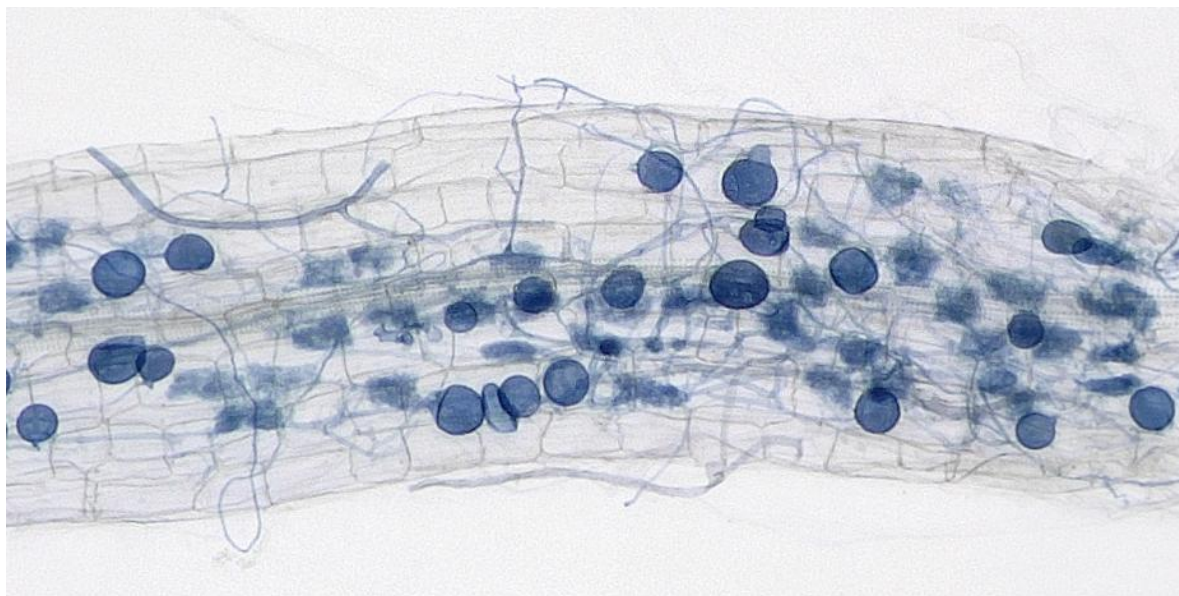
Περίληψη

Σήμερα, στις καλλιέργειες φυτών του αγρού χρησιμοποιούνται χημικά και φυτοφάρμακα για την προστασία τους από παράσιτα, ιούς, παθογόνα, αλλά και ενάντια σε περιβαλλοντικούς παράγοντες. Τα τελευταία χρόνια ερευνάται μία νέα κατηγορία μυκήτων, των plant growth promoting fungi (PGPF). Οι PGPF είναι συμβιωτικοί ενδοφυτικοί μύκητες που προσδίδουν στα φυτά ανθεκτικότητα τόσο προς διάφορους παθογόνους μικροοργανισμούς όσο και σε αβιοτικούς παράγοντες. Στο παρών πείραμα μελετάται ο αποικισμός των φυτών *Nicotiana benthamiana* από το στέλεχος *Fusarium solani* K (FsK) και οι επιπτώσεις του στην ανάπτυξη των φυτών. Ο FsK, ένας ενδοφυτικός μη παθογόνος μύκητας που δεν αποτελεί οργανισμό μοντέλο μέχρι και σήμερα, εμφανίζει ευεργετικές του επιδράσεις σε διάφορα φυτά, συμπεριλαμβανομένης της ανθεκτικότητας σε παθογόνα και του αυξημένου ρυθμού ανάπτυξης. Ωστόσο, ο αποικισμός του στο *N. benthamiana* παραμένει ασαφής. Στο πείραμα φυτά *N. benthamiana* εμβολιάστηκαν με FsK και παρακολουθήθηκε η ανάπτυξη τους για τέσσερα χρονικά στάδια, αναλύοντας φαινοτυπικές αλλαγές. Έπειτα πραγματοποιήθηκαν qPCRs για τον προσδιορισμό του αποικισμού στις ρίζες των φυτών από τον FsK. Τα αποτελέσματα έδειξαν ελάχιστο αποικισμό του FsK στις ρίζες του *N. benthamiana*, με χαμηλούς αριθμούς αντιγράφων (copy numbers). Έναντι της αναμενόμενης αυξημένης ανάπτυξης, δεν παρατηρήθηκαν σημαντικές διαφορές μεταξύ εμβολιασμένων και μη εμβολιασμένων φυτών. Παράγοντες όπως η σύνθεση του υποστρώματος, τα επίπεδα υγρασίας, το pH, η βιωσιμότητα του εμβολίου και οι μέθοδοι εμβολιασμού ενδέχεται να επηρέασαν την επιτυχία του αποικισμού. Κρίνεται απαραίτητη περαιτέρω βελτιστοποίηση των πειραματικών συνθηκών για την ενίσχυση της αποτελεσματικότητας του αποικισμού και την κατανόηση των αλληλεπιδράσεων φυτού-μύκητα.

1. Εισαγωγή

1.1 Ενδοφυτικοί μύκητες

Οι συμβιωτικοί μύκητες, ή αλλιώς ενδοφυτικοί, αποτελούν μια κατηγορία μυκήτων, που εισέρχονται στο φυτό μέσω του ριζικού συστήματος και μπορούν είτε να επωφεληθούν οι ίδιοι ή ακόμα και το φυτό με το οποίο συμβιώνουν. Ένα από τα ιδιαίτερα μελετημένα είδη είναι οι AMF (Arbuscular Mycorrhizal Fungi), μύκητες που προσδίδουν ανθεκτικότητα σε βιοτικούς (παθογόνα, ιοί, ακάρεα) αλλά και σε αβιοτικούς παράγοντες (ξηρασία, αλατότητα, υψηλές θερμοκρασίες κ.α.) (Nathalie Diagne, *et al.*, 2020). Ένα παράδειγμα αποτελεί η χρήση του AMF *Glomus intraradices* στη ντομάτα (*Lycopersicon esculentum*) όπου ελέγχθηκε η αντοχή στην ξηρασία. Τα αποτελέσματα έδειξαν πως φυτό τα οποία εκτέθηκαν για μεγάλη χρονική περίοδο σε συνθήκες ξηρασίας, παρουσίασαν παρόμοιο φαινότυπο με φυτά σε φυσιολογικές συνθήκες. Ένα δεύτερο παράδειγμα, αποτελεί ο *Glomus intraradices* που αύξησε την πρόσληψη θρεπτικών συστατικών (P, N) από το περιβάλλον και όλα τα αποικισμένα φυτά σε όλες τις συνθήκες έδειξαν αυξημένη παραγωγή ριζών, λουλουδιών και φύλλων σε σχέση με τα control (K.S. Subramanian, *et al.*, 2005). Ο μύκητας *Glomus spurgum* προσδίδει ανθεκτικότητα ενάντια σε παθογόνους μικροοργανισμούς, όπως μελετήθηκε ενάντια στο *Fusarium oxysporum* στο φυτό της ντομάτας (*Lycopersicon esculentum*) (S. Merina Prem Kumari and B. Jeberlin Prabina 2019).



Εικόνα 1. Ρίζες αποικισμένες από AMF και χρώση τους για ποσοτικοποίηση

1.2 Ο ενδοφυτικός μύκητας *Fusarium solani* στέλεχος K

Ο μύκητας που μελετήθηκε στο παρών πείραμα είναι ο ασκομύκητας *Fusarium solani* στέλεχος K (FsK) που αποτελεί μέλος του *Fusarium solani* species complex FSSC (Coleman et al., 2009). Το είδος *Fusarium* ανήκει στην οικογένεια *Nectriaceae*, και τα περισσότερα μέλη είναι παθογόνα. Έχουν μεγάλο εύρος ξενιστών με μεγάλη γεωργική σημασία και τα περισσότερα προκαλούν παθογένεια σε αυτούς. Τα συνηθέστερα συμπτώματα που προκαλούν είναι η σήψη των ριζών αλλά κάποιοι μύκητες επηρεάζουν και τα υπέργεια τμήματα των συγκεκριμένων ξενιστών-φυτών, προκαλώντας χλωρίωση, κακώσεις ή και μαρασμό. Τα είδη αυτά, προσβάλλουν το φυτό, από το στάδιο της κοτυληδόνας, είτε διαπερνώντας την επιδερμίδα είτε μέσω των στομάτων (JJ Coleman, 2019). Παραδείγματος χάριν, το είδος *Fusarium oxysporum* f. *Sp. Lycopersici* προκαλεί τον μαρασμό των φύλλων των φυτών που μολύνει (C. Srinivas et al., 2019).

Αντιθέτως ο FsK αποτελεί ένα ενδοφυτικό, μη παθογόνο στέλεχος, μέλος του FSSC. Μορφολογικά, τα κονίδια του FsK έχουν μακρύ οβάλ σχήμα όπως φαίνεται και στην εικόνα 3 και τα μυκήλια παρουσιάζουν λευκό χρώμα εικόνα 2. Ο FsK απομονώθηκε πρώτη φορά από φυτά τομάτας ανεπτυγμένα σε compost και συγκεκριμένα από τις ρίζες της (Kavroulakis et al., 2007). Εκτός από τα φυτά τομάτας, ο FsK έχει τη δυνατότητα να αποικίζει και άλλα είδη φυτών, όπως το *Lotus japonicus* και το *Medicago truncatula* (Skiada et al., 2019) που ανήκουν στην κατηγορία των ψυχανθών, αλλά και το φυτό *Nicotiana benthamiana*, ένα φυτό μοντέλο στην έρευνα της βιοτεχνολογίας φυτών (Philips et al., 2017). Ενδιαφέρον αποτελεί το γεγονός πως στα φυτά τομάτας και *N.benthamiana* ο αποικισμός του FsK περιορίζεται στο ριζικό σύστημα (Kavroulakis et al., 2007; Dalakouras et al., 2023), ενώ στο *L. japonicus* μπορεί να μεταφερθεί στον βλαστό αλλά και στα φύλλα (Skiada et al., 2019). Προηγούμενες μελέτες έχουν αποδείξει πως το στέλεχος FsK προσδίδει στα φυτά ανθεκτικότητα έναντι αβιοτικών και βιοτικών παραγόντων.



Εικόνα 2. Στερεή καλλιέργεια FSK



Εικόνα 3. Μικροσκοπική απεικόνιση των κονιδίων του FSK

1.3 Η *Nicotiana benthamiana* ως οργανισμός-μοντέλο.

Η *N. benthamiana* είναι ένα φυτό ευρέως χρησιμοποιούμενο ως οργανισμός μοντέλο (έχει μικρό κύκλο ζωής, αλληλουχημένο γονιδίωμα και ευαίσθητα φύλλα που εξυπηρετούν σε μελέτες αιθυλενίου) και προέρχεται από την Αυστραλία. Λόγω του ότι σαν οργανισμός προσβάλλεται από ένα ευρύ φάσμα ιών και άλλων παθογόνων μικροοργανισμών όπως βακτήρια, μύκητες και άλλα, η *N. benthamiana* είναι ιδανική για μελέτες ξενιστή-παθογόνου (Michael M. Goodin *et al.*, 2008). Παρά την ευρεία χρήση του φυτού στη κοινότητα της ιολογίας, η *N. benthamiana* δεν εισήλθε στον χώρο της βιολογίας των φυτών μέχρι την εισαγωγή τριών μεγάλων τεχνικών ανακαλύψεων. Πρώτα ανακαλύφθηκε η δυνατότητα έκφρασης ξένων γονιδίων από φυτικού ιούς- φορείς. Δεύτερον η ανάπτυξη της γονιδιακής σίγησης απο ιούς στα φυτά (Virus-induced gene silencing, VIGS) επέτρεψε την κατευθυνόμενη, συστηματική υπορρύθμιση σχεδόν οποιουδήποτε γονιδίου ενδιαφέροντος στα φυτά, μετατρέποντας έτσι τη *N. benthamiana* σε ένα ισχυρό σύστημα αντίστροφης γενετικής. Τρίτον η τεχνολογία που έδωσε το μεγαλύτερο βήμα στη *N. benthamiana* να χρησιμοποιηθεί ευρέως ήταν η εισαγωγή ξένων γονιδίων μέσω του αγροβακτηρίου (agroinfiltration), μία τεχνική που επιτρέπει τις πρωτεΐνες ενδιαφέροντος, συχνά εκφραζόμενες συγχωνευμένες με αυτοφθορίζουσες πρωτεΐνες, να παράγονται προσωρινά στα φυτικά κύτταρα με έναν απλό τρόπο (Michael M. Goodin *et al.*, 2008). Έχει επίσης δημιουργηθεί και μία άλλη, ξεχωριστή διαγονιδιακή σειρά της *N. benthamiana*, η 16C. Η σειρά αυτή δίνει τη δυνατότητα να εκφράζεται συνεχώς και σε υψηλά επίπεδα το ιδιοσύστατο γονίδιο που εκφράζει πρωτεΐνη GFP μέσω ενός τροποποιημένου κωδικονίου, και μεταφέρεται στο ενδοπλασματικό δίκτυο. (Goodin MM, *et al.*, 2002, Julia Bally, *et al.*, 2018).



Εικόνα 4. Ανεπτυγμένο φυτό αγρίου τύπου *Nicotiana benthamiana*.



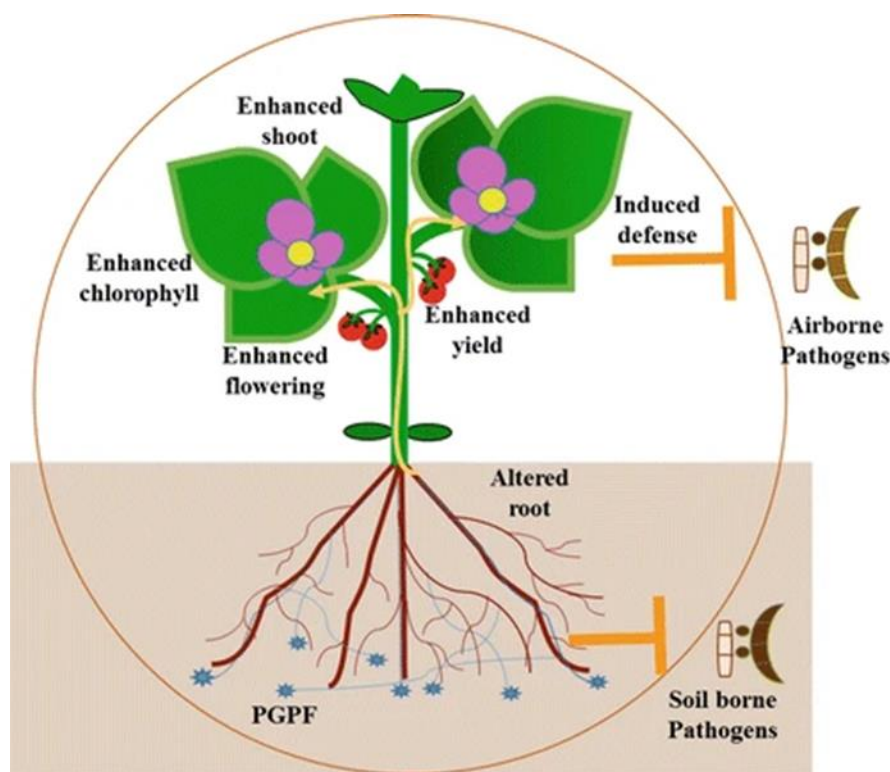
Εικόνα 5. *N. benthamiana* σειρά 16C υπό υπεριώδες φως. Διακρίνεται η έκφραση της πρωτεΐνης GFP. Το πορτοκαλί χρώμα είναι η χλωροφύλλη και το έντονο πράσινο η πρωτεΐνη GFP

1.4 Μύκητες που επάγουν την ανάπτυξη των φυτών

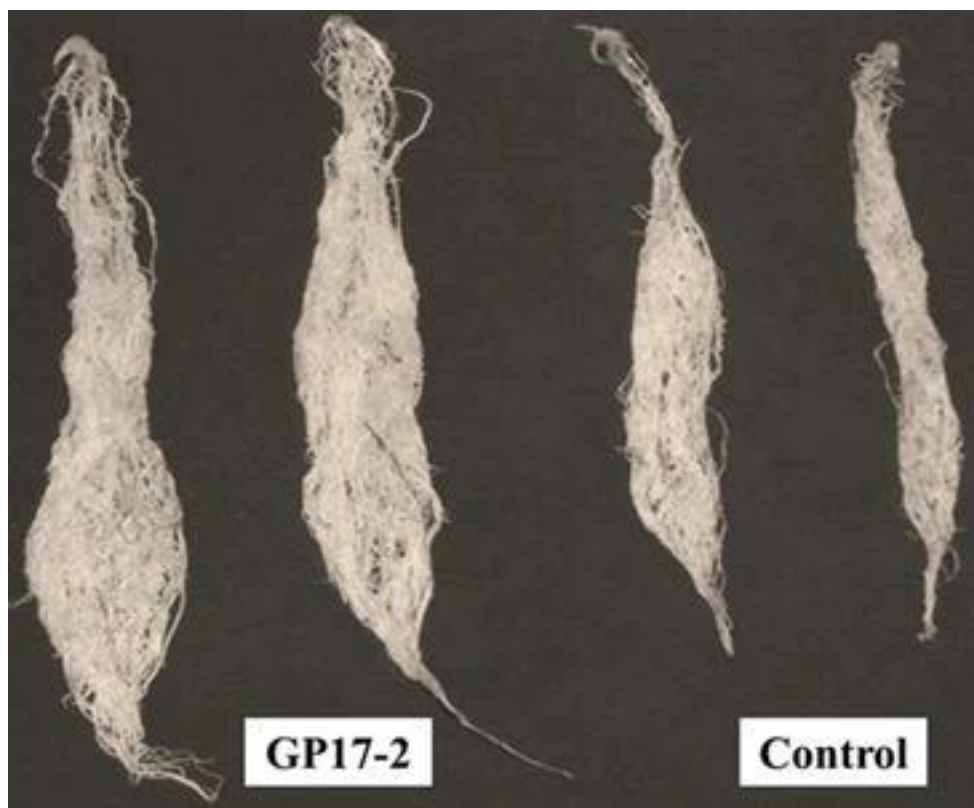
Τα περισσότερα φυτά που χρησιμοποιούνται στην καλλιέργεια είναι ευαίσθητα σε πολλά είδη ασθενειών, που προκαλούνται από άλλους παθογόνους μικροοργανισμούς όπως, μύκητες, βακτήρια, ακάρεα, όπως επίσης σε περιβαλλοντικούς παράγοντες, σαν την ξηρασία και την αλατότητα του εδάφους. Πρόσφατα ανακαλύφθηκαν νέα είδη μυκήτων τα οποία είναι πιθανόν να δώσουν λύση στα προβλήματα αυτά. Τα είδη αυτά των μυκήτων που αποικίζουν τόσο στην περιοχή των ριζών αλλά και εσωτερικά των φυτών, παρουσιάζουν λειτουργίες οι οποίες είναι ωφέλιμες για τα φυτά. Αυτά τα είδη ονομάζονται *μύκητες που επάγουν την ανάπτυξη των φυτών* (plant-growth-promoting fungi- PGPF). Οι μικροοργανισμοί που αναγνωρίζονται ως PGPF έχουν ποικίλη ταξινόμια. Σύμφωνα με την αναφερόμενη βιβλιογραφία, η πλειονότητα των πραγματικών μυκήτων που χαρακτηρίζονται ως PGPF ανήκει κυρίως στο φύλο Ascomycota (*Aspergillus*, *Aureobasidium*, *Chaetomium*, *Cladosporium*, *Colletotrichum*, *Exophiala*, *Penicillium*, *Trichoderma*, *Fusarium*, *Gliocladium*, *Phoma*, *Phomopsis*, *Purpureocillium*, και *Talaromyces*), και μερικοί από αυτούς ανήκουν στο Basidiomycota (*Limonomycetes*, *Rhodotorula*, *Rhizoctonia*, και στείροι μύκητες) και στο Zygomycota (*Mucor* και *Rhizopus*) (Md. Motaher Hossain, *et al.*, 2017). Αξίζει να σημειωθεί πως δεν έχουν όλα τα είδη των μυκήτων τη δυνατότητα να επιταχύνουν την

ανάπτυξη των φυτών, αλλά ούτε και όλα τα φυτά που αποικίζουν. Αυτό μπορεί να συμβαίνει λόγω του είδους του φυτού ή του μύκητα είτε λόγω συγκεκριμένων συνθηκών ανάπτυξης που δεν προωθούν (Md. Motaher Hossain, *et al.*, 2017).

Οι PGPF μύκητες, έχουν τη δυνατότητα να παράγουν δευτερογενείς μεταβολίτες και ορμόνες που επάγουν τους μηχανισμούς άμυνας των φυτών ενάντια σε παθογόνους μικροοργανισμούς, αλλά και να εμπλέκονται σε άλλους μηχανισμούς που βοηθούν στην ανάπτυξη και την επιβίωση των φυτών. Τέτοιοι μηχανισμοί περιλαμβάνουν τον ανταγωνισμό μεταξύ του ωφέλιμου μύκητα με τους παθογόνους για τα θρεπτικά συστατικά που βρίσκονται στο έδαφος (Omotowo, I. O. *et al.*, 2015), την παραγωγή αυξητικών ορμονών των φυτών (Akinola, Saheed & Babalola, Olubukola. 2020.) και την επαγωγή της συστημικής απόκρισης της άμυνας των φυτών (Shasmita *et al.*, 2022). Ένα χαρακτηριστικό παράδειγμα PGPF αποτελεί έρευνα πάνω στο φυτό του αγγουριού με τον μύκητα *Penicillium simplicissimum* GP17-2 ο οποίος αύξησε σημαντικά την μάζα των ριζών του φυτού για 3 εβδομάδες μετά τη φύτευση και τον εμβολιασμό, όπως φαίνεται και στην εικόνα 7.



Εικόνα 6. Σχεδιάγραμμα οπτικοποίησης θετικών διεργασιών από τους PGPF. Επίδραση των μυκήτων που προάγουν την ανάπτυξη των φυτών (PGPF) στην προώθηση της ανάπτυξης των φυτών και την καταστολή των ασθενειών. Οι PGPF διεγείρουν την ανάπτυξη των βλαστών, την ανάπτυξη των ριζών, τη φωτοσυνθετική απόδοση, την ανθοφορία και την σοδειά. Οι PGPF παίζουν ρόλο στην προστασία των φυτών από επιβλαβείς μικροοργανισμούς προκαλώντας συστημική αντίσταση



Εικόνα 7. Ρίζες αγγουριού (21 ημερών) που αναπτύχθηκαν σε έδαφος επεξεργασμένο με (GP17-2) και χωρίς (control) ένα PGPF *Penicillium simplicissimum* GP17-2.

1.5 Ο Fsk ως PGPF

Πολλά πειράματα απέδειξαν πως η συμβιωτική σχέση μεταξύ του Fsk και των φυτών της τομάτας, του *L. jaronicus* αλλά και της *N. benthamiana*, έχει πολλά οφέλη για τα φυτά. Πιο συγκεκριμένα πειράματα στο φυτό της τομάτας έδειξαν πως εφόσον ο μύκητας αποικήσει το φυτό, έχει την ικανότητα να το προστατέψει ενάντια σε ακάρεα που προσβάλλουν τα φύλλα και τις ρίζες, σε φυτοφάγα έντομα αλλά και ενάντια σε αβιοτικούς παράγοντες. (Kavroulakis *et al.*, 2007; Pappas *et al.*, 2018; Garantonakis *et al.*, 2018). Πιο συγκεκριμένα στη ντομάτα ο Fsk, μέσω του μονοπατιού του αιθυλενίου αλλά και μειορρυθμίζοντας πρωτεΐνες υπεύθυνες για την άμυνα του φυτού, φαίνεται να προσδίδει στο φυτό άμυνα ενάντια στους παθογόνους μικροοργανισμούς *Fusarium oxysporum* και *Septoria lycopersisi* (Kavroulakis *et al.*, 2007). Ένα ακόμα παράδειγμα αποτελεί η προστασία που προσδίδει ο Fsk ενάντια στο φυτοφάγο *Nesidiocoris tenuis*, όπου σε ντομάτες (*Solanum lycopersicum*) αποικισμένες από τον Fsk, φάνηκε να προκαλεί πολύ λιγότερους νεκρωτικούς τόπους σε σχέση με μη αποικισμένα φυτά (Garantonakis *et al.*, 2018). Όσον αφορά τους αβιοτικούς παράγοντες έρευνα στο φυτό της ντομάτας σε συνθήκες ξηρασίας έδειξαν πως φυτά αποικισμένα από τον Fsk, εμφάνισαν πολύ λιγότερα φαινοτυπικά συμπτώματα σε σχέση με τα μη αποικισμένα στα οποία, σταμάτησε η ανάπτυξη τους και επήλθε μαρασμός (Kavroulakis, *et al.*, 2018). Τέλος, παρατηρήθηκε πως στο φυτό *Nicotiana benthamiana* ο αποικισμός από τον Fsk, μπορεί να επιταχύνει τους ρυθμούς ανάπτυξης του φυτού τουλάχιστον μέχρι και τέσσερις εβδομάδες μετά τον εμβολιασμό (Dalakouras, *et al.*, 2023). Παρά την εμφανή χρησιμότητα του Fsk ως PGPF, δεν έχουν ανακαλυφθεί ακόμα οι ακριβείς μοριακοί μηχανισμοί με τους οποίους επάγεται η ανάπτυξη στη *N. benthamiana*. Εργαστηριακές έρευνες έχουν δείξει πως ο Fsk ενδέχεται να μεταφέρει μικρά μόρια, μέσω των οποίων προκαλεί τους ευεργετικούς για το φυτό φαινότυπους (Dalakouras *et al.*, 2023). Είναι σημαντικό να τονισθεί πως η περεταίρω μελέτη του μύκητα είναι σημαντική, καθώς οι ωφέλιμοι φαινότυποι άρα και οι μικροοργανισμοί είναι σημαντικοί για την φυτοπροστασία έναντι των παρασιτοκτόνων που χρησιμοποιούνται επί του παρόντος, τα οποία είναι βλαβερά για το περιβάλλον.

Σκοπός της εργασίας

Σκοπός της παρούσας μελέτης, είναι να διερευνηθεί ο πιθανός ρόλος του στελέχους K του *Fusarium solani* (FsK) ως μύκητα που προάγει την ανάπτυξη των φυτών (PGPF) στη *Nicotiana benthamiana*. Συγκεκριμένα, η μελέτη αποσκοπεί στα εξής:

1. Αξιολόγηση της ικανότητας του FsK να αποικίζει τις ρίζες του *N. benthamiana* και
2. Να προσδιοριστεί η επίδραση του αποικισμού του FsK στις ρίζες του φυτού, στον ρυθμό ανάπτυξης και στον φαινότυπο των φυτών *N. benthamiana*.

Μέσω ενός συνδυασμού φαινοτυπικών παρατηρήσεων και μοριακών αναλύσεων, η μελέτη αποσκοπεί στην αποκάλυψη των αλληλεπιδράσεων μεταξύ του FsK και της *N. benthamiana* και στην αξιολόγηση των δυνατοτήτων του FsK ως PGPF στο συγκεκριμένο φυτικό είδος. Απώτερος στόχος είναι να βελτιώσουμε την κατανόηση των αλληλεπιδράσεων μεταξύ φυτών και μυκήτων και να διερευνήσουμε νέες δυνατότητες για τη βελτίωση της ανάπτυξης των φυτών και της ανοχής στην καταπόνηση σε γεωργικά πλαίσια.

2. Υλικά και μέθοδοι

1. Αποστείρωση σπορίων *Nicotiana benthamiana* και εκβλάστηση.

Για την αποστείρωση τα σπόρια τοποθετήθηκαν σε διάλυμα χλωρίνης συγκέντρωσης 10% για πέντε λεπτά υπό συνεχή ανάδευση. Έπειτα έγιναν 5 πλύσεις με αποστειρωμένο dH₂O και τοποθετήθηκαν στο σκοτάδι για 2 ώρες (ενυδάτωση). Στη συνέχεια φυτεύτηκαν σε γλάστρες με αποστειρωμένο υπόστρωμα άμμου:βερμικουλίτη (3:1), ποτισμένο με dH₂O για να εκβλαστήσουν. Οι γλάστρες καλύφθηκαν με διάφανη μεμβράνη για καλύτερη διατήρηση της υγρασίας και αλουμινόχαρτο, το οποίο αφαιρέθηκε μετά από 2 ημέρες.

2. Προετοιμασία δοχείων magenta.

Τα δοχεία magenta αποστειρώθηκαν σε αραιωμένο διάλυμα χλωρίνης. Μετά το στέγνωμα, σε κάθε δοχείο magenta τοποθετήθηκαν 300 γραμμάρια υποστρώματος άμμου: βερμικουλίτη (3:1). Έπειτα τοποθετήθηκαν σε κλίβανο αποστείρωσης στους 121°C για 30 λεπτά. Με το πέρας της αποστείρωσης μεταφέρθηκαν σε ξηραντήρα (60°C) για τρεις ημέρες.

3. Υγρή καλλιέργεια μύκητα (FsK).

Για την υγρή καλλιέργεια του FsK, τμήμα μυκηλίου περίπου 1 cm² αποκόπηκε από στερεή καλλιέργεια PDA (διατηρημένη στους 4 βαθμούς κελσίου) υπό στείρες συνθήκες, μέσα σε θάλαμο κάθετης νηματικής ροής. Το τμήμα του μυκηλίου τοποθετήθηκε σε κωνική φιάλη των

250 ml που περιέχει 100 ml αποστειρωμένου θρεπτικού μέσου PDB (potato dextrose broth) και επωάστηκε στους 25°C υπό συνεχή ανάδευση για 5 ημέρες.

4.Απομόνωση κονιδίων μύκητα (FsK), μέτρηση και προετοιμασία εμβολίου.

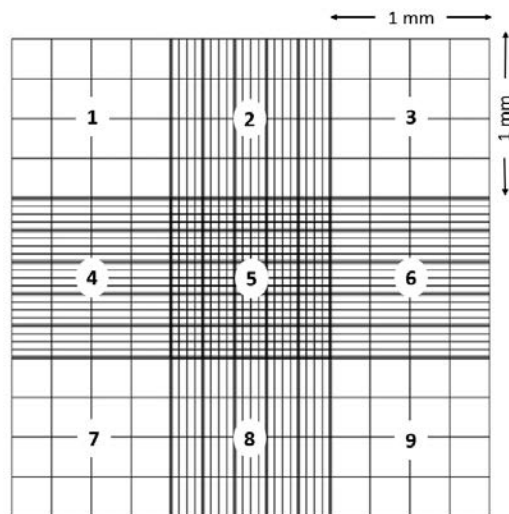
Η διαδικασία απομόνωσης των κονιδίων του μύκητα πραγματοποιήθηκε σε θάλαμο κάθετης νηματικής ροής για διατήρηση στερίων συνθηκών. Για τον διαχωρισμό του μυκηλίου από το εναιώρημα κονιδίων, η υγρή καλλιέργεια διηθείται σε αποστειρωμένο τουλουπάνι (2 στρώματα). Στη συνέχεια, πραγματοποιείται ψυχρή φυγοκέντρωση (16 βαθμούς κελσίου) στο εναιώρημα των κονιδίων στα 5000 rpm για 7 λεπτά, αφαίρεση του υπερκειμένου και 3 διαδοχικές πλύσεις με αποστειρωμένο διάλυμα NaCl (0,85%), προκειμένου να αφαιρεθεί η περίσσεια του θρεπτικού. Τέλος, τα κονίδια επαναδιαλυτοποιούνται σε 5 ml διαλύματος NaCl (0,85%) και ακολουθούν διαδοχικές αραιώσεις της καλλιέργειας από 1/10 έως 1/10.000 με διάλυμα NaCl (0,85%), που θα χρησιμοποιηθούν στην μέτρηση των κονιδίων.

Η μέτρηση των κονιδίων έγινε με την χρήση της πλάκας Neubauer (εικόνα X) σε οπτικό μικροσκόπιο. Για την μέτρηση των κονιδίων, τοποθετούνται 10 μl από την αραιώση 1/1000 της αρχικής καλλιέργειας. Ο υπολογισμός της συγκέντρωσης των κονιδίων στην αρχική καλλιέργεια προσδιορίζεται με τον παρακάτω τύπο:

Συγκέντρωση αρχικής καλλιέργειας (κονίδια/ml) = Μέσος όρος κονιδίων $\times 10^4 \times$ Παράγοντας αραιώσης.

Όπου:

- Μέσος όρος κονιδίων = άθροισμα των κονιδίων στα τέσσερα εξωτερικά τετράγωνα της πλάκας Neubauer (1,3,7,9)/4 (εικόνα X).
- 10^4 = Ο όγκος που καταλαμβάνει κάθε ένα από τα τέσσερα εξωτερικά τετράγωνα της πλάκας. Κάθε τετράγωνο έχει επιφάνεια $1 \text{ mm} \times 1 \text{ mm} = 1 \text{ mm}^2$ και βάθος 0,1 mm. Άρα κάθε τετράγωνο καταλαμβάνει όγκο ίσο με $1 \text{ mm}^2 \times 0,1 \text{ mm} = 0,1 \text{ mm}^3 = 0,1 \text{ μl}$. Επειδή μετράμε την τελική συγκέντρωση σε κύτταρα ανά ml, πολλαπλασιάζουμε με 10^4 για μετατροπή του 0,1 μl σε 1 ml.
- Παράγοντας αραιώσης = η αραιώση της αρχικής καλλιέργειας που χρησιμοποιείται για την μέτρηση. Στην περίπτωση μας χρησιμοποιήσαμε την 1/1000, άρα ο παράγοντας αραιώσης είναι 10^3 .



Εικόνα 8. Σχεδιάγραμμα πλάκας Neubauer

Μετά τον προσδιορισμό της συγκέντρωσης, η αρχική καλλιέργεια αραιώνεται κατάλληλα με διάλυμα NaCl (0,85%) ώστε να προκύψει το τελικό εμβόλιο για τα φυτά με συγκέντρωση 100 κονίδια/ml.

5.Μεταφύτευση και εμβολιασμός φυτών.

Περίπου 10 ημέρες μετά την εκβλάστηση των φυτών, τα φυτάρια μεταφυτεύτηκαν στα αποστειρωμένα magenta pots που ποτίστηκαν με διάλυμα Hoagland, τα συστατικά του οποίου αναγράφονται στον πίνακα 1. Ανάλογα την ημέρα της δειγματοληψίας σε κάθε δοχείο magenta φυτεύτηκε διαφορετικός αριθμός φυταρίων. Κάθε magenta pot θεωρείται ως μία βιολογική επανάληψη. Συγκεκριμένα:

- 1 εβδομάδα μετά τον εμβολιασμό (wpi): 12 magenta pots, 6 control, 6 εμβολιασμένα, 5 φυτά ανά magenta
- 2 εβδομάδες μετά τον εμβολιασμό wpi: 12 magenta pots, 6 control, 6 εμβολιασμένα, 3 φυτά ανά magenta
- 3 εβδομάδες μετά τον εμβολιασμό wpi: 12 magenta pots, 6 control, 6 εμβολιασμένα, 2 φυτά ανά magenta
- 4 εβδομάδες μετά τον εμβολιασμό wpi: 12 magenta pots, 6 control, 6 εμβολιασμένα, 1 φυτό ανά magenta

Ταυτόχρονα με την μεταφύτευση, πραγματοποιήθηκε και ο εμβολιασμός των φυτών με 1ml εναιωρήματος κονιδίων μύκητα, συγκέντρωσης 100 κονίδια/ml. Ο εμβολιασμός των κονιδίων έγινε στην ρίζα των φυτών. Τα magenta σκεπάστηκαν με καπάκια και τοποθετήθηκαν σε θάλαμο ανάπτυξης (25 βαθμοί κελσίου, 60% υγρασία) όπου παρέμειναν κλειστά μέχρι την ημέρα της δειγματοληψίας.

Πίνακας 1. Σύσταση θρεπτικού διαλύματος Hoagland.

ΔΙΑΛΥΜΑ HOAGLAND		
Συστατικά		Ποσότητα (Για τελικό όγκο = 1l)
MgSO ₄ 7H ₂ O(1M)		2 ml
KH ₂ PO ₄ (1M)		1 ml
Fe NaEDTA (0,1M)		1 ml
KNO ₃ (2M)		5 ml
Ca(NO ₃) ₂ 4H ₂ O (0,1M)		5 ml
H ₃ BO ₃ (1,144 gr/400 ml)	Διάλυμα Ιχνοστοιχείων	1 ml
MnCl ₂ 4H ₂ O (0,724 gr/400 ml)		
ZnCl ₂ (0,044 gr/400 ml)		
CuCl ₂ 2H ₂ O (0,0224 gr/400 ml)		
Na ₂ MoO ₄ 2H ₂ O (0,012 gr/400 ml)		

6. Δειγματοληψία φυτών.

Κατα τη δειγματοληψία τα φυτά αφαιρέθηκαν προσεχτικά από το υπόστρωμα και αποστειρώθηκαν εξωτερικά σε διάλυμα χλωρίνης συγκέντρωσης 3% για 30 δευτερόλεπτα. Έπειτα πραγματοποιήθηκαν 6 διαδοχικές πλύσεις με αποστειρωμένο απιονισμένο νερό ώστε να ξεπλυθεί το υπόλυμα της χλωρίνης. Με χρήση αποστειρωμένου νυστεριού έγινε αποκοπή της ρίζας στο σημείο που ξεκινάει ο βλαστός και οι ιστοί σκουπίστηκαν καλά για αφαίρεση της υγρασίας. Η ρίζα και το υπέργειο μέρος φυλάχτηκαν ξεχωριστά σε σωληνάρια Eppendorf των 2 ml τα οποία καταβυθίστηκαν σε υγρό άζωτο και έπειτα διατηρήθηκαν στους -80 °C.

7. Απομόνωση DNA με χρήση του διαλύματος CTAB.

Η απομόνωση DNA έγινε με το πρωτόκολλο CTAB. Τα βήματα παρουσιάζονται παρακάτω:

1. Κονιορτοποίηση των δειγμάτων υπέργειου μέρους και ριζών με χρήση του μηχανήματος TissueLyser της εταιρείας Qiagen.

2. Θέρμανση του αντιδραστήριου CTAB (Cetyl Trimethylammonium Bromide: 100mM Tris-HCl pH=8, 20mM EDTA pH=8, 1.4M NaCl, 2% w/v CTAB, 1% w/v PVP) μαζί με την β-μερκαπταιθανόλη στους 65 βαθμούς κελσίου για 15 λεπτά (Στα 300 μl CTAB, προστίθεται 1 μl β-μερκαπτοαιθανόλης).

3. Τοποθέτηση διαλυμάτων 70% αιθανόλης και ισοπροπανόλης στους -20°C.

4. Προσθήκη 300μl διαλύματος CTAB και β-μερκαπταιθανόλης σε κάθε δείγμα. Πραγματοποίηση καλής ανάδευσης με vortex και επώαση σε υδατόλουτρο στους 65 °C για 20 λεπτά.
5. Φυγοκέντρηση στα 13.000 rpm για 5 λεπτά.
6. Μεταφορά υπερεκτιμμένου σε νέα σωληνάρια erpendorf.
7. Προσθήκη 250 μl χλωροφόρμιου: ισοαμυλικής αλκοόλης (24:1) και ισχυρή ανάδευση με την χρήση vortex.
8. Φυγοκέντρηση στα 13.000rpm για 15 λεπτά.
9. Μεταφορά της υδάτινης φάσης σε νέα σωληνάρια Erpendorf.
10. Προσθήκη 0,7 x του όγκου της υδάτινης φάσης, παγωμένης ισοπροπανόλης και επώαση σε θερμοκρασία δωματίου για 10 λεπτά.
11. Φυγοκέντρηση 13.000rpm για 15 λεπτά.
12. Απόρριψη του υπερκευμένου με προσοχή ώστε να μην απορριφθεί και η πελέτα (DNA)
13. Προσθήκη 500μl παγωμένης αιθανόλης 70%.
14. Φυγοκέντρηση στα 13.000rpm για 15 λεπτά.
15. Απόρριψη του υπερκευμένου με προσοχή ώστε να μην απορριφθεί και η πελέτα (DNA).
16. Στέγνωμα των Erpendorf (ανοιχτά) στο heatblock στους 55 °C για 15 λεπτά
17. Επαναδιαλυτοποίηση του DNA με αποστειρωμένο δις-απεσταγμένο νερό στο οποίο έχει προστεθεί RNase A (Στα 50 μl ddH₂O, προστίθεται 1 μl RNase A συγκέντρωσης. Η επαναδιαλυτοποίηση γίνεται με 15μL στις ρίζες και 30μl στα φύλλα.
18. Προσδιορισμός της συγκέντρωσης DNA με τη χρήση της συσκευής NanoDrop. 1μl δείγματος τοποθετείται στο NanoDrop και μετράται η συγκέντρωση και η καθαρότητα του DNA.
19. Κατάλληλη αραιώση των δειγμάτων σε τελική συγκέντρωση 10ng/μl και αποθήκευση στους -20°C.

8. Αλυσιδωτή αντίδραση πολυμεράσης πραγματικού χρόνου (qPCR).

Για την αλυσιδωτή αντίδραση πολυμεράσης χρησιμοποιήθηκε η πολυμεράση SYBR για ενίσχυση του γονιδίου ακτίνης του μύκητα. Χρησιμοποιήθηκε το ζεύγος εκκινητών FsK_Act_F AACCCGACAGTCGCAAACACG και FsK_Act_R GGCGCGTCAGGTAAGTTGGTG. Για τον υπολογισμό των αντιγράφων χρησιμοποιήθηκε μία πρότυπη καμπύλη πλασμιδίου (φορέας CloneJet PCR cloning Kit, Thermo Fischer) που περιέχει ως ένθεμα το προϊόν που ενισχύουν οι εκκινητές FsK Act. Για την κατασκευή της καμπύλης χρησιμοποιήθηκαν διαδοχικές αραιώσεις του πλασμιδίου από 10⁰ αντίγραφα έως 10⁶. Για την καμπύλη και τον αρνητικό μάρτυρα πραγματοποιήθηκαν τρεις

τεχνικές επαναλήψεις, ενώ τα δείγματα ρίζας δύο τεχνικές επαναλήψεις. Μετά θα γράψεις πως για την qPCR χρησιμοποιήθηκε το μηχάνημα CFX connect από την Bio Rad. Με το λογισμικό του μηχανήματος υπολογίστηκε το efficiency και το R^2 της καμπύλης με σκοπό την απόλυτη ποσοτικοποίηση του αποικισμού στις ρίζες. Για τη ποσοτικοποίηση του μυκητιακού αποικισμού στις ρίζες (copy numbers) χρησιμοποιήθηκε ο λόγος του SQ mean (προκύπτει από την καμπύλη)/ng (συγκέντρωση δείγματος αντίδρασης).

3. Αποτελέσματα

Για να μελετηθεί και να επιβεβαιωθεί η υπόθεση της δράσης του FsK στο ρυθμό ανάπτυξης των φυτών *N. benthamiana*, πραγματοποιήθηκαν δύο πειραματικές διαδικασίες, μία φαινοτυπική και μία μοριακή.

1. Τα φυτά *N.benthamiana* εμβολιάστηκαν με FsK και αφέθηκαν να αναπτυχθούν για τέσσερα χρονικά στάδια, συγκεκριμένα 1, 2, 3 και 4 εβδομάδες μετά τον εμβολιασμό. Με το πέρας κάθε εβδομάδας τα φυτά φωτογραφήθηκαν με σκοπό την παρατήρηση αλλαγών στο φαινότυπο τους.
2. Μετά την φωτογράφιση ακολούθησε δειγματοληψία, και αλυσιδωτή αντίδραση πολυμεράσης πραγματικού χρόνου για ποσοτικοποίηση του αποικισμού στα εμβολιασμένα φυτά.

3.1 1 εβδομάδα μετά τον εμβολιασμό

Wt/Fsk⁻

Wt/Fsk⁺



Εικόνα 9. Φυτάρια πρώτης εβδομάδας μετά τον εμβολιασμό, πέντε ανά magenta pot. Πάνω παρατηρούνται τα ανεμβολίαστα φυτά (control) ενώ κάτω τα εμβολιασμένα (Fsk+).

Wt/Fsk⁻

Wt/Fsk⁺



Εικόνα 10. Φυτάρια πρώτης εβδομάδας μετά τον εμβολιασμό, μετά τον εμβολιασμό. Πάνω παρατηρούνται τα ανεμβολίαστα φυτά (control) ενώ κάτω τα εμβολιασμένα (Fsk+).

Στις εικόνες 9 και 10 παρουσιάζονται τα φαινοτυπικά αποτελέσματα στην ανάπτυξη των φυτών 1 εβδομάδα μετά τον εμβολιασμό με FsK. Από τις παραπάνω εικόνες παρατηρούμε ότι δεν υπάρχει κάποια οπτική διαφορά στην ανάπτυξη των ανεμβολίαστων φυτών (Wt/FsK-) σε σχέση με των εμβολιασμένων (Wt/FsK+), δηλαδή τα φυτά βρίσκονται στο ίδιο στάδιο ανάπτυξης. Αυτό θα μπορούσε να οφείλεται στο γεγονός πως δεν έχει παρέλθει αρκετός χρόνος ακόμα για τον αποικισμό των φυτών από τον μύκητα.



Εικόνα 11. Διάγραμμα απεικόνισης αποτελεσμάτων της qPCR, των control δειγμάτων της πρώτης εβδομάδας. Στον άξονα Y, βρίσκονται οι αριθμοί αντιγράφων του γονιδίου ακτίνης (act) του FsK. Στον άξονα X, βρίσκονται τα δείγματα.



Εικόνα 12. Διάγραμμα απεικόνισης αποτελεσμάτων της qPCR, των εμβολιασμένων δειγμάτων (FsK+) της πρώτης εβδομάδας. Στον άξονα Y, βρίσκονται οι αριθμοί αντιγράφων του γονιδίου ακτίνης (act) του FsK. Στον άξονα X, βρίσκονται τα δείγματα.

Προκειμένου να μελετηθεί η επιτυχία αποικισμού των φυτών από τον FsK στην 1 εβδομάδα μετά τον εμβολιασμό, πραγματοποιήθηκε αλυσιδωτή αντίδραση πολυμεράσης πραγματικού χρόνου (qPCR) στις ρίζες με εκκινητές που στοχεύουν στο γονίδιο της ακτίνης του μύκητα. Στα διαγράμματα 1 και 2 απεικονίζονται τα αποτελέσματα για 5 βιολογικές επαναλήψεις ανά συνθήκη για τα φυτά-control και τα εμβολιασμένα φυτά αντίστοιχα. Αυτό που παρατηρούμε είναι πως ο αριθμός των αντιγράφων του μύκητα στο ριζικό σύστημα των εμβολιασμένων φυτών είναι πολύ χαμηλός και οριακά ίσος με τα ανεμβολίαστα φυτά, γεγονός που εξηγεί την έλλειψη του επιθυμητού φαινοτύπου. Πιο συγκεκριμένα (διάγραμμα 1), παρατηρούμε ότι τα δείγματα FsK- (control) έχουν αριθμό αντιγράφων από 0,6 έως 3,5 (άξονα Y), αριθμοί αναμενόμενοι για δείγματα μη μολυσμένα. Αντίστοιχα στον άξονα Y των δειγμάτων εμβολιασμένα (διάγραμμα 2) με FsK (FsK+) (Εικόνα Y) παρατηρούμε χαμηλό αριθμό αντιγράφων 1 έως 3.

3.2 2 εβδομάδες μετά τον εμβολιασμό

Wt/FsK-



Wt/FsK+



Εικόνα 13. Φυτά δεύτερης εβδομάδας μετά τον εμβολιασμό, δύο ανά magenta pot. Πάνω παρατηρούνται τα ανεμβολίαστα φυτά (control) ενώ κάτω τα εμβολιασμένα (FsK+).

Wt/FsK-

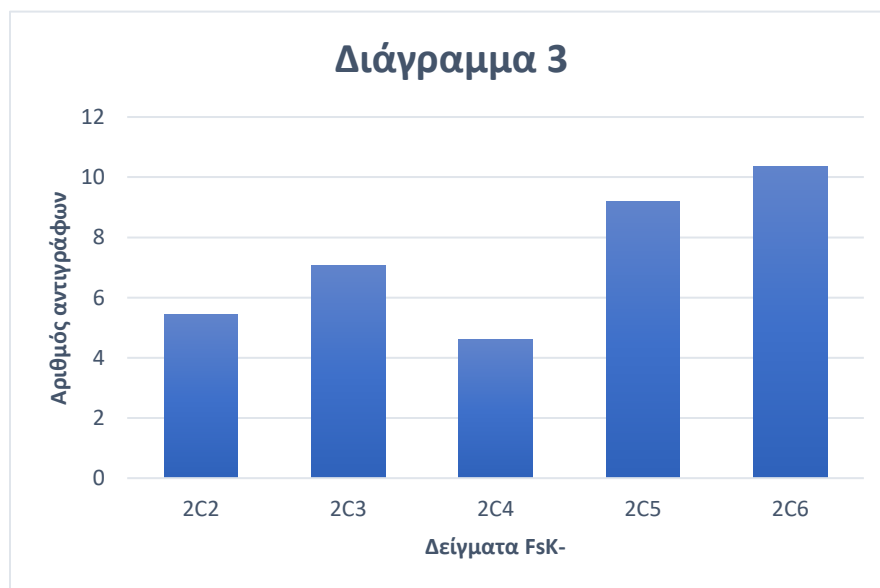


Wt/FsK+



Εικόνα 14. Φυτά δεύτερης εβδομάδας μετά τον εμβολιασμό, δύο ανά magenta pot. Πάνω παρατηρούνται τα ανεμβολίαστα φυτά (control) ενώ κάτω τα εμβολιασμένα (FsK+).

Στις εικόνες 13 και 14 παρατηρείται ότι δεν υπάρχει κάποια οπτική διαφορά στην ανάπτυξη των ανεμβολίαστων φυτών (Wt/FsK-) σε σχέση με των εμβολιασμένων (Wt/FsK+), δηλαδή βρίσκονται στο ίδιο στάδιο ανάπτυξης. Η αιτία μπορεί να αποδοθεί στο μικρό ή και καθόλου αποικισμό του FsK. Σε αντίθεση με τη πρώτη εβδομάδα όμως, θα αναμέναμε τα φυτά να έχουν αποικιστεί επαρκώς από τον μύκητα, καθώς προηγούμενα πειράματα του εργαστηρίου (Dalakouras et al., 2023) έδειξαν πως ο FsK είχε αποικίσει τα φυτά *N.benthamiana* στις 2 εβδομάδες μετά τον εμβολιασμό. Σε κοντινότερη παρατήρηση, τα φυτά δεν είναι όμοια όσον αφορά το ύψος. Παρατηρείται μία ανομοιογένεια και στα FsK- και στα FsK+ καθώς κάποια είναι πιο μεγάλα και άλλα πιο μικρά.



Εικόνα 15. Διάγραμμα απεικόνισης αποτελεσμάτων της qPCR, των control δειγμάτων (FsK-) της δεύτερης εβδομάδας. Στον άξονα Y, βρίσκονται οι αριθμοί αντιγράφων του γονιδίου ακτίνης (act) του FsK. Στον άξονα X, βρίσκονται τα δείγματα.



Εικόνα 16. Διάγραμμα απεικόνισης αποτελεσμάτων της qPCR, των εμβολιασμένων δειγμάτων (FsK+) της δεύτερης εβδομάδας. Στον άξονα Y, βρίσκονται οι αριθμοί αντιγράφων του γονιδίου ακτίνης (act) του FsK. Στον άξονα X, βρίσκονται τα δείγματα.

Από τα αποτελέσματα της αλυσιδωτής αντίδρασης πολυμεράσης πραγματικού χρόνου (qPCR) (διαγράμματα 3 και 4), παρατηρούμε πως όντως ο αριθμός των αντιγράφων (διάγραμμα 4, άξονας Y) του μύκητα στο ριζικό σύστημα των εμβολιασμένων (FsK+), φυτών είναι πολύ χαμηλός 2 έως 12 και οριακά ίσος με τα ανεμβολίαστα φυτά (διάγραμμα 3, άξονας Y) γεγονός που εξηγεί την έλλειψη του επιθυμητού φαινοτύπου. Το μόνο δείγμα που φαίνεται να έχει αποικιστεί επαρκώς είναι το δείγμα 2F6 με αριθμούς αντιγράφων περίπου 43 (διάγραμμα 4, άξονας Y), αλλά λόγω του ότι είναι το μόνο αποικισμένο δείγμα είναι φυσιολογικό να μην παρατηρείται ο ωφέλιμος φαινότυπος που αναμενόταν.

3.3 3 εβδομάδες μετά τον εμβολιασμό

Wt/FsK-



Wt/FsK+



Εικόνα 17. Φυτά τρίτης εβδομάδας μετά τον εμβολιασμό, τρία ανά magenta pot. Πάνω παρατηρούνται τα ανεμβολίαστα φυτά (control) ενώ κάτω τα εμβολιασμένα (FsK+).

Wt/FsK-



Wt/FsK+



Εικόνα 18. Φυτά τρίτης εβδομάδας μετά τον εμβολιασμό, τρία ανά magenta pot. Πάνω παρατηρούνται τα ανεμβολίαστα φυτά (control) ενώ κάτω τα εμβολιασμένα (FsK+).

Από τις εικόνες 17 και 18 παρατηρείται πως ακόμα και τρεις εβδομάδες μετά τον εμβολιασμό δεν υπάρχει αύξηση στον ρυθμό ανάπτυξης της *N. benthamiana* στα εμβολιασμένα φυτά (Wt/FsK+) καθώς είναι ακόμα περίπου στο ίδιο αναπτυξιακό στάδιο με τα μη εμβολιασμένα φυτά (Wt/FsK-). Όπως και στη δεύτερη εβδομάδα έτσι και σε αυτή όλα τα δείγματα, εμβολιασμένα και μη, εμφανίζουν ανομοιογένεια στο μέγεθος τόσο τα FsK- (control) μεταξύ τους και τα FsK+ (εμβολιασμένα) μεταξύ τους αλλά και γενικότερα ανάμεσα στις δύο συνθήκες.



Εικόνα 19. Διάγραμμα απεικόνισης αποτελεσμάτων της qPCR, των control δειγμάτων (FsK-) της τρίτης εβδομάδας. Στον άξονα Y, βρίσκονται οι αριθμοί αντιγράφων του γονιδίου ακτίνης (act) του FsK. Στον άξονα X, βρίσκονται τα δείγματα.



Εικόνα 20. Διάγραμμα απεικόνισης αποτελεσμάτων της qPCR, των control δειγμάτων (FsK+) της τρίτης εβδομάδας. Στον άξονα Y, βρίσκονται οι αριθμοί αντιγράφων του γονιδίου ακτίνης (act) του FsK. Στον άξονα X, βρίσκονται τα δείγματα.

Από τα αποτελέσματα της αλυσιδωτής αντίδρασης πολυμεράσης πραγματικού χρόνου (qPCR) (εικόνες 19 και 20), παρατηρούμε πως όντως ο αριθμός των αντιγράφων (άξονας Y εικόνα 20) του μύκητα στο ριζικό σύστημα των εμβολιασμένων (FsK+), φυτών είναι πολύ χαμηλός από 2 έως 4. Στην εικόνα 19 παρατηρούμε πως συγκριτικά με τα εμβολιασμένα φυτά (Εικόνα 20) είναι σχετικά πιο χαμηλά. Παρόλα αυτά, οι αριθμοί αντιγράφων των εμβολιασμένων φυτών, είναι τόσο χαμηλοί ώστε να μην θεωρηθούν αποικισμένα.

3.4 4 εβδομάδες μετά τον εμβολιασμό

Wt/FsK-

Wt/FsK+



Εικόνα 21. Φυτά τέταρτης εβδομάδας μετά τον εμβολιασμό, ένα ανά magenta pot. Πάνω παρατηρούνται τα ανεμβολίαστα φυτά (control) ενώ κάτω τα εμβολιασμένα (FsK+).

Wt/FsK-

Wt/FsK+



Εικόνα 22. Φυτά τέταρτης εβδομάδας μετά τον εμβολιασμό, ένα ανά magenta pot. Πάνω παρατηρούνται τα ανεμβολίαστα φυτά (control) ενώ κάτω τα εμβολιασμένα (FsK+).

Στα φυτά της τέταρτης εβδομάδας (εικόνες 21 και 22) παρατηρείται ότι τα μη εμβολιασμένα φυτά (Wt/FsK-) είναι μεγαλύτερα από τα εμβολιασμένα (Wt/FsK+), γεγονός που δεν παρατηρήθηκε στις προηγούμενες εβδομάδες. Ο φαινότυπος αυτός είναι ακριβώς αντίθετος από τον αναμενόμενο και δεν γνωρίζουμε την αιτία.



Εικόνα 23. Διάγραμμα απεικόνισης αποτελεσμάτων της qPCR, των control δειγμάτων (FsK-) της τέταρτης εβδομάδας. Στον άξονα Y, βρίσκονται οι αριθμοί αντιγράφων του γονιδίου ακτίνης (act) του FsK. Στον άξονα X, βρίσκονται τα δείγματα.



Εικόνα 24. Διάγραμμα απεικόνισης αποτελεσμάτων της qPCR, των control δειγμάτων (FsK+) της τέταρτης εβδομάδας. Στον άξονα Y, βρίσκονται οι αριθμοί αντιγράφων του γονιδίου ακτίνης (act) του FsK. Στον άξονα X, βρίσκονται τα δείγματα.

Στην εικόνα της τέταρτης εβδομάδας (διαγράμματα 7 και 8) παρατηρείται ότι τα δείγματα έχουν χαμηλό αριθμό αντιγράφων (0,5 έως 1), εκτός από το δείγμα 4C2 το οποίο εμφανίζει 250 αντίγραφα του μύκητα (άξονας Y) γεγονός που υποδεικνύει κάποια επιμόλυνση είτε κατά την ανάπτυξη του φυτού, είτε κατά τη διάρκεια της δειγματοληψίας. Στο διάγραμμα 8 παρατηρείται ότι όλα τα δείγματα εκτός από ένα (4F1) έχουν πολύ χαμηλό αριθμό αντιγράφων υποδεικνύοντας αδυναμία αποικισμού από τον μύκητα. Παρόλα αυτά το δείγμα 4F1 παρουσιάζει πολύ μεγάλο αριθμό αντιγράφων περί τις 5.500 χιλιάδες (άξονας Y), σημαίνοντας το θετικό αποικισμό του φυτού από τον FsK. Ωστόσο, ένα από τα πέντε δείγματα δεν επαρκεί για να δούμε κάποιο φαινότυπο.

Συνολικά, από τα παραπάνω αποτελέσματα καταλήγουμε στο ότι τα φυτά της *N.benthamiana* δεν αποικίστηκαν ικανοποιητικά από τον μύκητα FsK. Επομένως, η αδυναμία αποικισμού θα μπορούσε να εξηγήσει και την απουσία του επιθυμητού φαινοτύπου στην ανάπτυξη. Επιπλέον, το αποτέλεσμα στις 4 εβδομάδες μετά τον εμβολιασμό που παρατηρήθηκε μία αυξημένη ανάπτυξη των control φυτών σε σχέση με τα εμβολιασμένα, ήταν αναπάντεχο. Οι λόγοι που ο μύκητας δεν κατάφερε να αποικίσει τα φυτά παραμένουν άγνωστοι. Είναι σημαντικό, να συνεχιστούν τα πειράματα προκειμένου να βελτιστοποιηθούν οι συνθήκες ώστε ο αποικισμός να πραγματοποιείται με μεγαλύτερη αποτελεσματικότητα. Μερικά σημεία κλειδιά θα μπορούσαν να αποτελούν το στάδιο που γίνεται ο εμβολιασμός, καθώς και το θρεπτικό ανάπτυξης των φυτών.

4. Συζήτηση

Υπό φυσιολογικές συνθήκες (επιτυχημένος αποικισμός), από όσο ήδη ξέρουμε θα έπρεπε να φανεί μία αύξηση στον ρυθμό ανάπτυξης των φυτών. Από τα παραπάνω μοριακά αποτελέσματα, γίνεται αντιληπτό πως ο αποικισμός των φυτών *N. benthamiana* ήταν αποτυχής και ο FsK αποίκησε ελάχιστα φυτά. Δεδομένου του χαμηλού ποσοστού αποικισμού δικαιολογείται και η έλλειψη του επιθυμητού φαινοτύπου, δηλαδή ο μη αυξημένος ρυθμός ανάπτυξης των φυτών. Η αποτυχία του αποικισμού των φυτών μπορεί να οφείλεται σε πολλούς παράγοντες, παραδείγματος χάριν, η σύνθεση του υποστρώματος μπορεί να μην παρείχε τις ιδανικές συνθήκες για τον αποικισμό του FsK. Λόγω της αλλαγής του υποστρώματος ο FsK

υπάρχει πιθανότητα να χρειάζεται μεγαλύτερο χρόνο προσαρμογής για να εκκινήσει τον αποικισμό και ίσως ακόμα και τη χρήση κάποιου επιπλέον θρεπτικού υλικού για την αναπροσαρμογή του. Ακόμα, τα επίπεδα υγρασίας και το pH μπορούν να επηρεάσουν σημαντικά την ανάπτυξη και τον αποικισμό των μυκήτων. Ίσως το υπόστρωμα να μην είχε κατάλληλα επίπεδα υγρασίας και pH καθιστώντας την επιβίωση του μύκητα αδύνατη. Η βιωσιμότητα του εμβολίου FsK είναι επίσης πάρα πολύ σημαντική για τον επιτυχή εμβολιασμό και κατ' επέκταση αποικισμό, ή ίσως υπάρχει καλύτερη μέθοδος χορήγησης του εμβολίου.

Τέλος είναι σημαντικό να τονισθεί πως, η έρευνα όσον αφορά τους PGPF είναι υψηλού ενδιαφέροντος, ειδικότερα όσον αφορά την χρήση τους ως βιοπαρασιτοκτόνα. Τα παρόντα παρασιτοκτόνα συντίθενται από βλαβερές για το περιβάλλον χημικές ουσίες. Έτσι η ανάπτυξη και η χρήση των PGPF έχει οδηγήσει στην αντικατάσταση των χημικών φυτοφαρμάκων για την προστασία των καλλιεργειών. Οι PGPF φαίνονται αποτελεσματικοί σε μικρές ποσότητες και εμφανίζουν μεγαλύτερη εξειδίκευση ως προς τον στόχο τους σε σύγκριση με τα συμβατικά φυτοφάρμακα. Ένας μεγάλος αριθμός βιοεντομοκτόνων έχει ήδη καταχωρηθεί και κυκλοφορήσει στην αγορά. Η ανάπτυξη της αγοράς βιοεντομοκτόνων έχει βελτιώσει τις πρακτικές διαχείρισης και έχει μειώσει τη χρήση χημικών φυτοφαρμάκων. Διάφορα προϊόντα έχουν πιστοποιηθεί και εμπορευματοποιηθεί για χρήση στην προστασία των καλλιεργειών σε διάφορες χώρες. Στην ΕΕ έχουν καταχωρηθεί πολύ λιγότερα βιοεντομοκτόνα σε σύγκριση με τη Βραζιλία, την Κίνα, την Ινδία και τις Ηνωμένες Πολιτείες, λόγω των πολύπλοκων και χρονοβόρων διαδικασιών καταχώρισης (Pankaj Prakash Verma *et al.*, 2019). Πρέπει λοιπόν, δεδομένου πως οι PGPF ήδη συμπεριλαμβάνονται στην παγκόσμια αγορά και φαίνονται αποτελεσματικοί, να συνεχιστούν οι έρευνες στο πεδίο αυτό για την βελτιστοποίηση των τεχνικών εφαρμογής αλλά και την βαθύτερη κατανόηση των μηχανισμών τους.

Βιβλιογραφία

- Adedayo, A. A., & Babalola, O. O. (2023). Fungi That Promote Plant Growth in the Rhizosphere Boost Crop Growth. In *Journal of Fungi* (Vol. 9, Issue 2). MDPI.
<https://doi.org/10.3390/jof9020239>
- Bally, J., Jung, H., Mortimer, C., Naim, F., Philips, J. G., Hellens, R., Bombarely, A., Goodin, M. M., & Waterhouse, P. M. (2018). Downloaded from www.annualreviews.org Access provided by 109.242.138.135 on 11/29/23. For personal use only. *Annu. Rev. Phytopathol*, 56, 405–426.
<https://doi.org/10.1146/annurev-phyto-080417>
- Dalakouras, A., Katsaouni, A., Avramidou, M., Dadami, E., Tsiouri, O., Vasileiadis, S., Makris, A., Georgopoulou, M. E., & Papadopoulou, K. K. (2023). A beneficial fungal root endophyte triggers systemic RNA silencing and DNA methylation of a host reporter gene. *RNA Biology*, 20(1), 20–30.

- Garantonakis, N., Pappas, M. L., Varikou, K., Skiada, V., Broufas, G. D., Kavroulakis, N., & Papadopoulou, K. K. (2018). Tomato inoculation with the endophytic strain *Fusarium solani* K results in reduced feeding damage by the zoophytophagous predator *nesidiocoris tenuis*. *Frontiers in Ecology and Evolution*, 6(AUG). <https://doi.org/10.3389/fevo.2018.00126>
- Goodin, M. M., Zaitlin, D., Naidu, R. A., & Lommel, S. A. (2008). *Nicotiana benthamiana*: Its History and Future as a Model for Plant-Pathogen Interactions. / 1015 MPMI, 21(8), 1015–1026. <https://doi.org/10.1094/MPMI>
- Kavroulakis, N., Doupis, G., Papadakis, I. E., Ehaliotis, C., & Papadopoulou, K. K. (2018). Tolerance of tomato plants to water stress is improved by the root endophyte *Fusarium solani* Fsk. *Rhizosphere*, 6, 77–85. <https://doi.org/10.1016/j.rhisph.2018.04.003>
- 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>
- Subramanian, K. S., Santhanakrishnan, P., & Balasubramanian, P. (2006). Responses of field grown tomato plants to arbuscular mycorrhizal fungal colonization under varying intensities of drought stress. *Scientia Horticulturae*, 107(3), 245–253. <https://doi.org/10.1016/j.scienta.2005.07.006>
- Wang, K., & Clemente, T. (n.d.). *Nicotiana* (*Nicotiana tobaccum*, *Nicotiana benthamiana*). In *From: Methods in Molecular Biology* (Vol. 343). www.cambia.org
- Bhattacharyya, P. N., & Jha, D. K. (2012). Plant growth-promoting rhizobacteria (PGPR): Emergence in agriculture. In *World Journal of Microbiology and Biotechnology* (Vol. 28, Issue 4, pp. 1327–1350). <https://doi.org/10.1007/s11274-011-0979-9>
- Omomowo, I. O., Adedayo, A. A., & Omomowo, O. I. (2020). Biocontrol Potential of Rhizospheric Fungi from *Moringa Oleifera*, their Phytochemicals and Secondary Metabolite Assessment Against Spoilage Fungi of Sweet Orange (*Citrus Sinensis*). In *Asian Journal of Applied Sciences*. www.ajouronline.com
- Singh, D. P., Gupta, V. K., & Prabha, R. (2019). Microbial interventions in agriculture and environment: Volume 1: Research trends, priorities and prospects. In *Microbial Interventions in Agriculture and Environment: Volume 1 : Research Trends, Priorities and Prospects*. Springer Singapore. <https://doi.org/10.1007/978-981-13-8391-5>
- Singh, D. P., Singh, H. B., & Prabha, R. (2017). Plant-Microbe Interactions in Agro-Ecological Perspectives. In *Plant-Microbe Interactions in Agro-Ecological Perspectives* (Vol. 2). Springer Singapore. <https://doi.org/10.1007/978-981-10-6593-4>
- Akinola, Saheed & Babalola, Olubukola. (2020). The fungal and archaeal community within plant rhizosphere: a review on their contribution to crop safety. *Journal of Plant Nutrition*. 44. 1-19. 10.1080/01904167.2020.1845376.
- Shasmita, Swain BB, Mohapatra PK, Naik SK, Mukherjee AK. Biopriming for induction of disease resistance against pathogens in rice. *Planta*. 2022 May 3;255(6):113. doi: 10.1007/s00425-022-03900-8. PMID: 35503188.
- Diagne, N., Ndour, M., Djighaly, P. I., Ngom, D., Ngom, M. C. N., Ndong, G., Svistoonoff, S., & Cherif-Silini, H. (2020). Effect of Plant Growth Promoting Rhizobacteria (PGPR) and Arbuscular Mycorrhizal Fungi (AMF) on Salt Stress Tolerance of *Casuarina obesa* (Miq.). *Frontiers in Sustainable Food Systems*, 4. <https://doi.org/10.3389/fsufs.2020.601004>

- Prem Kumari, S. M., & Prabina, B. J. (2019). Protection of Tomato, *Lycopersicon esculentum* from Wilt Pathogen, *Fusarium oxysporum* f.sp. *lycopersici* by Arbuscular Mycorrhizal Fungi, *Glomus* sp. *International Journal of Current Microbiology and Applied Sciences*, 8(04), 1368–1378. <https://doi.org/10.20546/ijcmas.2019.804.159>
- Nektarios Kavroulakis, Spyridon Ntougias, Georgios I. Zervakis, Constantinos Ehalotis, Kosmas Haralampidis, Kalliope K. Papadopoulou, Role of ethylene in the protection of tomato plants against soil-borne fungal pathogens conferred by an endophytic *Fusarium solani* strain, *Journal of Experimental Botany*, Volume 58, Issue 14, November 2007, Pages 3853–3864, <https://doi.org/10.1093/jxb/erm230>