



Πανεπιστήμιο Θεσσαλίας
Τμήμα βιοχημείας και Βιοτεχνολογίας

**Έλεγχος της πιθανής τοξικής δράσης του ανθελμινθικού
φαρμάκου φενβενδαζόλη στη συμβιωτική σχέση ριζοβίων-
ψυχανθών.**

**Testing the potential toxic effect of the anthelmintic drug
fenbendazole on the rhizobia-legume symbiotic relationship.**



Πτυχιακή εργασία

Σταύρος Κωνσταντινίδης του Εμμανουήλ

Σεπτέμβριος 2024

Τριμελής εξεταστική επιτροπή

Τσίκου Δανιέλα (Επιβλέπουσα)

Επίκουρος Καθηγήτρια Μοριακής και Αναπτυξιακής Βιολογίας Φυτών

Βασιλειάδης Σωτήριος

Επίκουρος Καθηγητής Μοριακής Μικροβιακής Οικολογίας-
Γονιδιωματικής

Καρπούζας Δημήτριος

Καθηγητής Περιβαλλοντικής Μικροβιολογίας & Βιοτεχνολογίας

ΠΕΡΙΕΧΟΜΕΝΑ

Πίνακας περιεχομένων

ΠΕΡΙΕΧΟΜΕΝΑ.....	3
ΠΕΡΙΛΗΨΗ.....	5
ABSTRACT	6
1. Εισαγωγή.....	7
1.1 Ψυχανθή	7
1.2 Το Φυτό Μοντέλο <i>Lotus japonicus</i>	7
1.3 Το <i>Mesorhizobium loti</i>	8
1.4 Το ενζύμικο σύμπλοκο της νιτρογενάσης	8
1.5 Συμβιωτική Αζωτοδέσμευση.....	9
1.6 Σηματοδότηση κατά την εγκαθίδρυση της συμβιωτικής σχέσης.....	10
1.7 Αυτορρύθμιση φυματιογένεσης	14
1.8 Το ανθελμινθικό φάρμακο φενβενδαζόλη	16
1.9. Σκοπός	19
2.Υλικά και μέθοδοι.....	20
2.1 Εκβλάστηση και απολύμανση σπερμάτων	20
2.2 Καλλιέργεια και Προετοιμασία του ριζοβίου για τον εμβολιασμό των φυτών...21	
2.3 Προετοιμασία θρεπτικού μέσου ανάπτυξης φυτών	22
2.3.1 Μοριακό πείραμα.....	22
2.3.2 Φαινοτυπικά πειράματα	23
2.4 Μεταφύτευση φυτών από τριβλία σε δοχεία magentas.....	24
2.5 Απομόνωση ολικού RNA από τις ρίζες του <i>Lotus japonicus</i>	25
2.6. Απομάκρυνση DNA από τα RNA δείγματα	27
2.6.1 Έλεγχος αποτελεσματικότητας του χειρισμού DNase– Αλυσιδωτή αντίδραση πολυμεράσης PCR.....	28

2.7	Σύνθεση συμπληρωματικού DNA από RNA (cDNA)	30
2.8	Κανονικοποίηση δειγμάτων με ποσοτική αλυσιδωτή αντίδραση πολυμεράσης πραγματικού χρόνου.....	30
2.9	Ποσοτική αλυσιδωτή αντίδραση πολυμεράσης πραγματικού χρόνου. RT - qPCR.	32
2.10	Στερεές και υγρές καλλιέργειες <i>Mesorhizobium loti</i>	34
2.11	Στερεές καλλιέργειες <i>Mesorhizobium loti</i>	34
2.12	Υγρές καλλιέργειες <i>Mesorhizobium loti</i>	36
3.	Αποτελέσματα	38
3.1	Έλεγχος για ύπαρξη φυτοτοξικότητας της φενβενδαζόλης στο <i>L. japonicus</i>	38
3.2	Έλεγχος της επίδρασης φενβενδαζόλης στο ριζόβιο <i>Mesorhizobium loti</i>	42
3.2.1	Επίδραση φενβενδαζόλης σε υγρές καλλιέργειες <i>Mesorhizobium loti</i> R7A	42
3.2.2	Επίδραση φενβενδαζόλης σε στερεές καλλιέργειες <i>Mesorhizobium loti</i>	44
3.3	Εκτίμηση επίδρασης της φενβενδαζόλης στη φυματιογένεση	45
3.4	Έλεγχος έκφρασης γονιδίων που σχετίζονται με τη συμβίωση σε παρουσία φενβενδαζόλης.....	49
4.	Συζήτηση	53
	ΒΙΒΛΙΟΓΡΑΦΙΑ	57
	ΠΑΡΑΡΤΗΜΑ	62

ΠΕΡΙΛΗΨΗ

Η συμβιωτική σχέση των ψυχανθών φυτών με αζωτοδεσμευτικά βακτήρια του εδάφους, έχει καθοριστικό ρόλο στο κύκλο του αζώτου και στη διατήρηση γόνιμων εδαφών μέσω της ανακύκλωσης θρεπτικών συστατικών. Τα αζωτοδεσμευτικά βακτήρια έχουν την ικανότητα να μετατρέπουν το ατμοσφαιρικό άζωτο (N_2) σε μορφή που μπορεί να αφομοιωθεί από τα φυτά, όπως η αμμωνία (NH_3). Η συμβιωτική αζωτοδέσμευση λαμβάνει χώρα σε εξειδικευμένες δομές που ονομάζονται φυμάτια. Τα φυμάτια βρίσκονται στις ρίζες των ψυχανθών και είναι το όργανο στο οποίο συγκρατείται η στενή επαφή μεταξύ φυτού και ριζοβίου. Ωστόσο, η συμβιωτική σχέση μπορεί να επηρεαστεί αρνητικά από έκθεση σε οργανικούς ρύπους όπως κτηνιατρικά φάρμακα. Τα κτηνιατρικής χρήσης φάρμακα καταλήγουν σε καλλιεργήσιμα εδάφη μέσω της κοπριάς. Στη παρούσα πτυχιακή εργασία μελετάται η επίδραση του ανθελμινθικού φαρμάκου φενβενδαζόλη στο φυτό *Lotus japonicus* και το ριζόβιο *Mesorhizobium loti*. Εξετάζονται τέσσερις συνθήκες με διαβαθμιζόμενη συγκέντρωση φενβενδαζόλης : 0 FBZ mg/L, 0.5 FBZ mg/L, 5 FBZ mg/L και 15 FBZ mg/L. Αξιολογείται η επίδραση της φενβενδαζόλης στη συμβιωτική σχέση μέσω: μέτρησης έκφρασης γονιδίων σχετιζόμενων με την σύναψη της συμβιωτικής σχέσης (πρώιμα γονίδια συμβίωσης), φαινοτυπικής παρατήρησης της φυματογένεσης. Επιπλέον, ελέγχεται η επίδραση της φενβενδαζόλης στο *L. japonicus* και στο ριζόβιο *Mesorhizobium loti* χωριστά.

ABSTRACT

The symbiotic relationship between leguminous plants and nitrogen-fixing soil bacteria plays a crucial role in the nitrogen cycle and the maintenance of fertile soils through the recycling of nutrients. Nitrogen-fixing bacteria can convert atmospheric nitrogen (N_2) into forms that can be assimilated by plants, such as ammonia (NH_3). Symbiotic nitrogen fixation occurs in specialized structures called nodules. Nodules are located on the roots of legumes and are the organs where close contact between the plant and rhizobia bacteria is maintained. However, the symbiotic relationship can be negatively affected by exposure to organic pollutants, such as veterinary drugs, which reach fertile soils through manure. In this thesis, the effect of the anthelmintic drug fenbendazole on the plant *Lotus japonicus* and the N-fixing symbiotic *Rhizobium Mesorhizobium loti* is studied. Four conditions with varying concentrations of fenbendazole are examined: 0 FBZ mg/L, 0.5 FBZ mg/L, 5 FBZ mg/L and 15 FBZ mg/L. The impact of fenbendazole on the symbiotic relationship is assessed through the analysis of the expression of genes related to the establishment of the symbiotic relationship (early symbiosis genes) and phenotypic observation of nodule formation. Additional experiments are conducted to examine the effect of fenbendazole on *Lotus japonicus* and *Mesorhizobium loti* separately.

1. Εισαγωγή

1.1 Ψυχανθή

Τα ψυχανθή έχουν μεγάλη οικονομική σημασία για τον άνθρωπο καθώς σε αυτά περιλαμβάνονται βασικές τροφές όπως η φακή (*Lens culinaris*), τα μπιζέλια (*pisum*), η φάβα (φασόλι) (*Vicia faba*), τα ρεβίθια (*Cicer arietinum*), πολλά άλλα όσπρια και κτηνοτροφές όπως ο βίκος (*Vicia ervilia*) και η μηδική (*Medicago sativa*). Αξιοσημείωτο γεγονός είναι ότι τα όσπρια (ψυχανθή) παρέχουν περίπου το 1/3 των πρωτεϊνών που καταναλώνουν οι άνθρωποι καθώς τα σπέρματά τους περιέχουν 20%-40% πρωτεΐνη (Graham and Vance, 2003). Τα ψυχανθή λόγω της ικανότητας να δημιουργούν συμβιωτικές σχέσεις με αζωτοδεσμευτικά ριζόβια βακτήρια (του γένους *Rhizobium*) και με μυκορριζικούς μύκητες, αποτελούν ένα χρήσιμο εργαλείο για την αειφόρο γεωργική ανάπτυξη (Oláh et al. 2005). Η συμβίωση με τα ριζόβια βακτήρια είναι η ειδοποιός διαφορά μεταξύ των ψυχανθών και άλλων οικογενειών από φυτά.

1.2 Το Φυτό Μοντέλο *Lotus japonicus*

Στη παρούσα πτυχιακή εργασία χρησιμοποιήθηκε το φυτό μοντέλο *Lotus japonicus*. Το ψυχανθές *L. japonicus* ανήκει στην τάξη των κυαμοδών (Fabales), στην οικογένεια των Κυαμοειδών ή χεδρωπών (Fabaceae) και στην υποοικογένεια των ψυχανθών (Papilionoideae) (NCBI:txid34305). Το *Lotus japonicus* τα τελευταία χρόνια χρησιμοποιείται για τη μελέτη της συμβιωτικής σχέσης ψυχανθών-ριζοβίων (Handberg and Stougaard, 1992) καθώς έχει πολλά θεμιτά χαρακτηριστικά που το καθιστούν ελκυστικό για την έρευνα ως φυτό μοντέλο. Κάποια από αυτά είναι: μικρό διπλοειδές γονιδίωμα (472Mbp) που οργανώνεται σε 6 χρωμοσώματα, μικρό μέγεθος, μεγάλα και άφθονα άνθη, αυτογονιμότητα, σύντομο χρόνο γενεάς και παραγωγή πολλών σπερμάτων.

1.3 Το *Mesorhizobium loti*

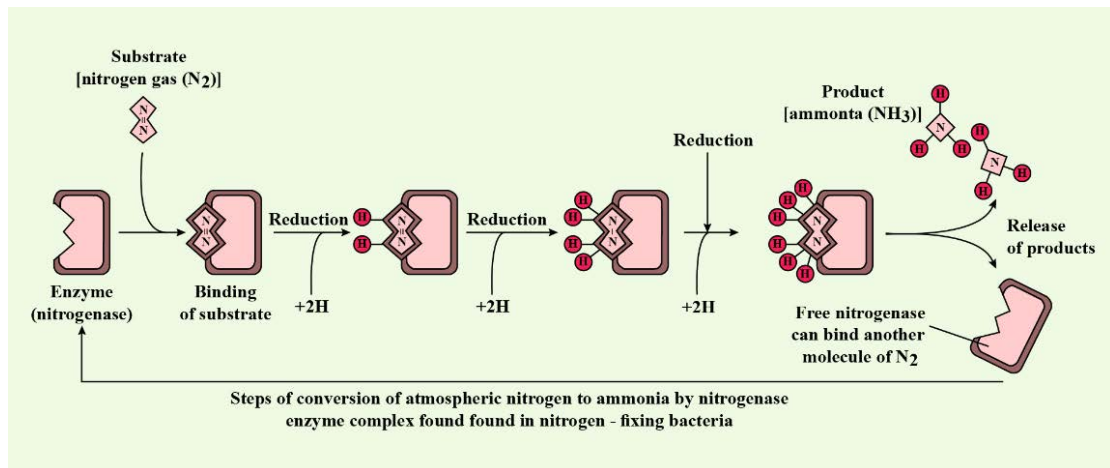
Το *Mesorhizobium loti* (στέλεχος *R7A*) απομονώθηκε πρώτη φορά το 1993 στο Όταγκο, Νέα Ζηλανδία από φυμάτια συμβίωσης στις ρίζες του ψυχανθούς *Lotus corniculatus*. Πρόκειται για ένα αερόβιο, αρνητικό κατά Gram, βάκιλλο που δε σχηματίζει σπόρια. Ανήκει στη κλάση των α-πρωτεοβακτηρίων, στην οικογένεια *Rhizobiaceae*, στη τάξη των *Rhizobiales* στο γένος *Mesorhizobium*. Τα γονίδια που σχετίζονται με τη συμβίωση περιέχονται σε ένα στοιχείο DNA 502kb με δυνατότητα ενσωμάτωσης γνωστό ως *ICEMISym*^(R7A). Το *M. loti* χρησιμοποιείται σε μελέτες όπου βρίσκεται σε συμβίωση με το ψυχανθές *Lotus japonicus* και πιο συγκεκριμένα το στέλεχος *R7A* χρησιμοποιείται για τη μελέτη των αλληλεπιδράσεων φυτού-ριζόβιου στη συμβίωση (Kelly et al. 2014)

Η περιοχή *ICEMISym*^(R7A) κωδικοποιεί 414 γονίδια συμπεριλαμβανομένων των απαραίτητων γονιδίων για τη σύνθεση των nod παραγόντων, την αζωτοδέσμευση, τη μεταφορά και την ενσωμάτωση αυτής της περιοχής (Finan 2002).

1.4 Το ενζύμικο σύμπλοκο της νιτρογενάσης

Η νιτρογενάση είναι αναμφίβολα ένα από τα πιο σημαντικά ένζυμα που έχουν ανακαλυφθεί, καθώς είναι το μόνο ένζυμο που αναπληρώνει το κύκλο του αζώτου αξιοποιώντας ατμοσφαιρικό άζωτο για παραγωγή αμμωνίας. Το σύμπλοκο της νιτρογενάσης αποτελείται από δυο υπομονάδες: υπομονάδα I ή δινιτρογενάση ένα ετεροτεταμερές μοριακού βάρους 230kDa και η υπομονάδα II ή αναγωγάση της δινιτρογενάσης ένα ετεροδιμερές μοριακού βάρους 60 kDa.

Το σύμπλοκο της νιτρογενάσης είναι αυτό που δίνει στα ριζόβια την ικανότητα της αζωτοδέσμευσης. Την αναγωγή του N₂ σε NH₃. Η αντίδραση που καταλύει το σύμπλοκο παρουσιάζεται στην [εικόνα 1](#).



Εικόνα 1 Μετατροπή του ατμοσφαιρικού αζώτου σε αμμωνία με το ενζυμικό σύμπλοκο της νιτρογενάσης.

Ένα σημαντικό χαρακτηριστικό της νιτρογενάσης είναι η ευαισθησία της στο οξυγόνο. Συγκεκριμένα, η νιτρογενάση απαιτεί αυστηρά αναερόβιες συνθήκες για να λειτουργήσει, και ως εκ τούτου, αζωτοδεσμευτικοί οργανισμοί, όπως τα ριζόβια, πρέπει να προστατεύουν τη νιτρογενάση, από έκθεση στο οξυγόνο (Poole and Hill, 1997).

1.5 Συμβιωτική Αζωτοδέσμευση

Το άζωτο είναι ένα από τα πιο βασικά στοιχεία για τη διατήρηση της ζωής. Συμμετέχει στη δομή βασικών και απαραίτητων βιομορίων όπως νουκλεϊκά οξέα και πρωτεΐνες, τα οποία είναι απαραίτητα για να υπάρξει ζωή. Στην ατμόσφαιρα της Γης το άζωτο συναντάται σε μεγάλα ποσοστά (περίπου 78% της ατμόσφαιρας), βρίσκεται κυρίως στην αέρια αλλά και αδρανή μορφή (μοριακή μορφή N_2). Στη μοριακή του μορφή σχηματίζεται τριπλός δεσμός μεταξύ των ατόμων αζώτου και απαιτείται μεγάλη ποσότητα ενέργειας και ειδικό ενζυμικό μηχανισμό για να αναχθεί, με αποτέλεσμα να μη μπορεί να αξιοποιηθεί από τα φυτά (Bernhard, 2010).

Τα ψυχανθή, για αυτό το λόγο επισυνάπτουν συμβιωτικές σχέσεις με αζωτοδεσμευτικά βακτήρια του εδάφους, και άλλους μικροοργανισμούς. Στα αζωτοδεσμευτικά βακτήρια περιλαμβάνονται τα γένη *Rhizobium*, *Mesorhizobium*, *Sinorhizobium*. κ.α. Τα αζωτοδεσμευτικά βακτήρια μπορούν να μετατρέπουν το ατμοσφαιρικό άζωτο (N_2) σε αμμωνία (NH_3). Το μεγαλύτερο ποσοστό των

ψυχανθών (88%) συμμετέχει στη συμβίωση με ριζόβια. Από τη συμβίωση υπάρχει αμοιβαίο όφελος, τα φυτά προσλαμβάνουν άζωτο και τα ριζόβια προσλαμβάνουν σάκχαρα που χρησιμοποιούνται ως πηγή ενέργειας (Faria et al. 1989).

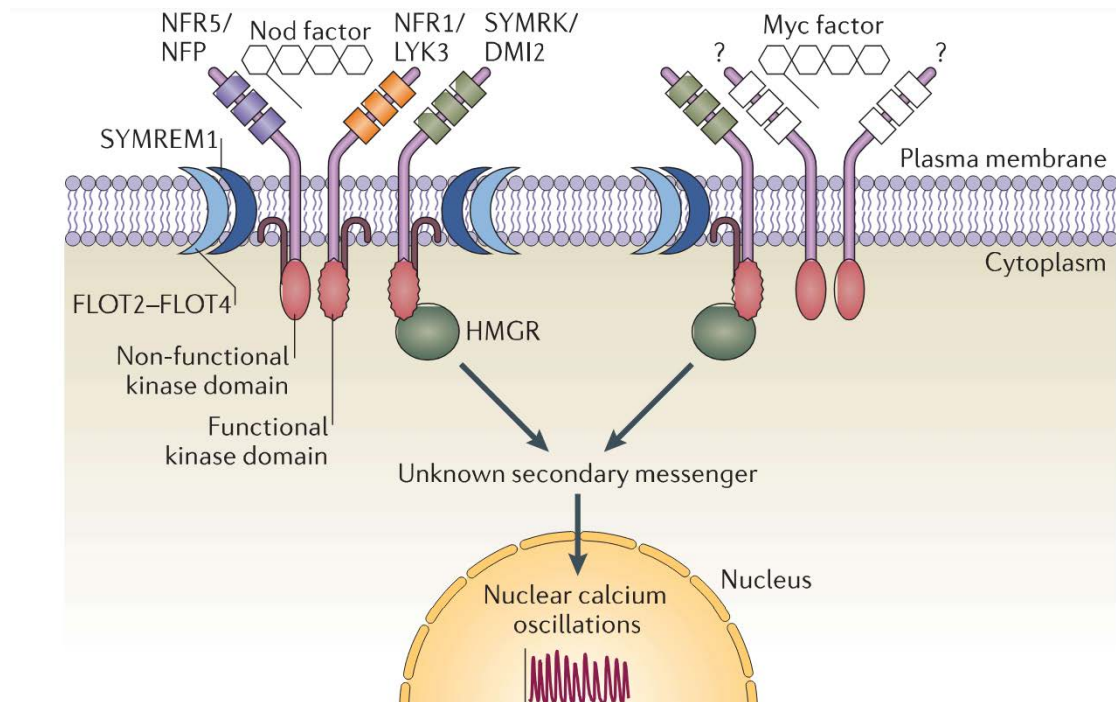
1.6 Σηματοδότηση κατά την εγκαθίδρυση της συμβιωτικής σχέσης

Η συμβιωτική σχέση ξεκινάει με την έκκριση δευτερογενών μεταβολιτών, από τις ρίζες των ψυχανθών, τα φλαβονοειδή, φαινολικές ενώσεις, που χημειοτακτικά προσελκύουν ριζόβια βακτήρια που βρίσκονται στη ριζόσφαιρα. Τα ριζόβια αντιλαμβάνονται τη παρουσία των φλαβονοειδών μέσω ειδικών υποδοχών NodD. Οι υποδοχείς NodD έχουν διττή φύση, αφού αντιληφθούν τη παρουσία των φλαβονοειδών δρουν ως μεταγραφικοί παράγοντες για γονίδια που σχετίζονται με τη δημιουργία φυματίων. Μετά την ενεργοποίηση των γονιδίων παράγονται και εκκρίνονται οι παράγοντες nod, για συντομία NF (nodulation factors). Οι παράγοντες nod είναι λιπο-χιτο-ολιγосακχαρίτες που αναγνωρίζονται από το φυτό, εξειδικευμένοι για τη συμβίωση κάθε ξενιστή και συμβιώτη. Διαφορετικοί παράγοντες nod εκφράζονται από διαφορετικά είδη ριζοβίων. Μετά την αναγνώριση των nod παραγόντων από το φυτό ξεκινά η μόλυνση των ριζών και η οργανογένεση των φυματίων (Turgeon and Bauer, 1985). Φυμάτια ονομάζονται ειδικές δομές που φιλοξενούν τα αζωτοδεσμευτικά βακτήρια στις ρίζες των ψυχανθών.

Τα φυτά αναγνωρίζουν τους παράγοντες nod μέσω ειδικών διαμεμβρανικών υποδοχών που βρίσκονται στα επιδερμικά κύτταρα της ρίζας. Οι υποδοχείς αυτοί έχουν δομή ομοίας με κινάσης, διαθέτουν εξωκυτταρικές επικράτειες *LysM* (μοτίβα λυσίνης) (Buist et al. 2008) που σχηματίζουν δεσμούς με τους λιπο-χιτο-ολιγосακχαρίτες (Lerouge et al., 1990) (Spraink et al., 1991).

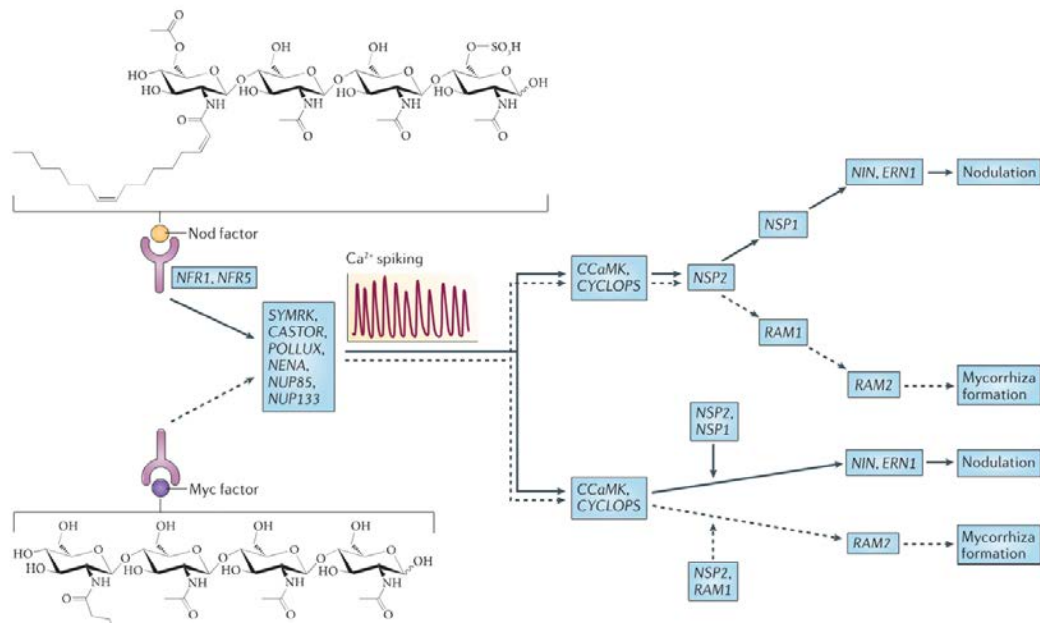
Οι παράγοντες nod είναι απαραίτητοι για τη συμβίωση ψυχανθών-ριζοβίων. Μεταλλάγματα ριζοβίων που δεν είναι ικανά για παραγωγή NF δεν είναι ικανά για συμβίωση. Το ίδιο ισχύει για φυτά μεταλλάγματα μη ικανά για αναγνώριση των NF (Dénarié et al. 1996) Οι υποδοχείς που αναγνωρίζουν τους NF στο φυτό *Lotus japonicus* είναι οι NFR1 και NFR5 (Madsen et al. 2003). Ο NFR5 φαίνεται να

έχει μια επικράτεια μη λειτουργικής κινάσης η οποία δεν είναι απαραίτητη για τον αποικισμό από ριζόβια. Αντιθέτως ο NFR1 φαίνεται να έχει λειτουργικότητα κινάσης και είναι ικανός να φωσφορυλιώσει την ενδοκυτταρική επικράτεια του NFR5, αλλά και τον εαυτό του (αυτοφωσφορυλίωση) για την καθοδική μεταγωγή σήματος (Radutoiu et al. 2003), όπως φαίνεται στην [εικόνα 2](#).



[Εικόνα 2](#) Αναγνώριση και μεταγωγή σήματος NF από τους NFR1/5 υποδοχείς στο *Lotus japonicus*. Οι υποδοχείς NFP & LYK3 αναφέρονται για το ψυχανθές *Medicago truncatula* (Oldroyd 2013)

Μετά την αναγνώριση των nod παραγόντων από τους NFR1 και NFR5, στο *L. japonicus*, προκαλείται ενεργοποίηση της πρωτεΐνης SYRMK (symbiosis receptor-like kinase) (Endre et al. 2002). Την ίδια στιγμή ενεργοποιούνται πρωτεΐνες που προκαλούν διακυμάνσεις στα επίπεδα ασβεστίου των επιδερμικών κυττάρων της ρίζας του φυτού. Αυτές οι διακυμάνσεις γίνονται αντιληπτές από τη κινάση CCaMK (κινάση εξαρτώμενη από ασβέστιο και καλμοδουλίνη) η οποία τις «αποκωδικοποιεί» και ενεργοποιεί μονοπάτια συμβίωσης (Lévy et al. 2004) ([Εικόνα 3](#)).



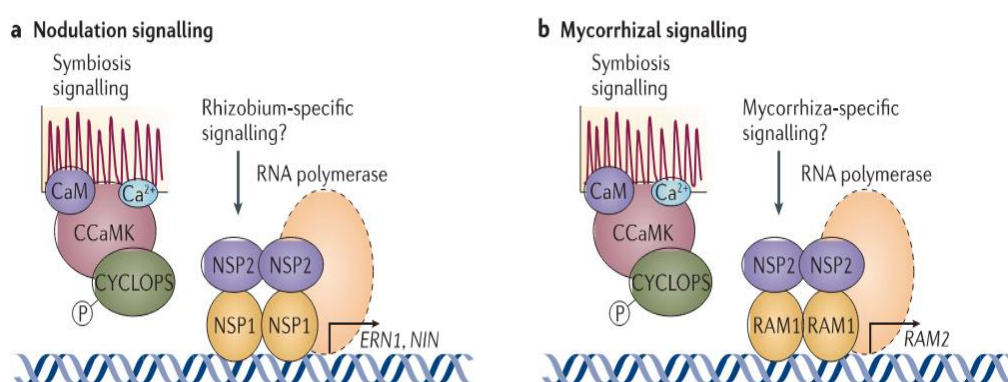
Εικόνα 3 Μετά την αναγνώριση των παραγόντων συμβίωσης (*nod* & *myc*) δημιουργούνται διακυμάνσεις ασβεστίου που αναγνωρίζονται από τη κινάση CCaMK και ενεργοποιούνται μεταγραφικοί παράγοντες που επάγουν τη συμβίωση όπως NSP1, NSP2, NIN, ERN1 (*nod*) & NSP2, RAM1, RAM2 (*Myc*). (Oldroyd 2013)

Η κινάση CCaMK ενεργοποιείται μέσω της καλμοδουλίνης ή του ασβεστίου. Σε φυτά με θετική μετάλλαξη της CCaMK (συνεχόμενη έκφραση της) έχει παρατηρηθεί έναρξη της διαδικασίας της συμβίωσης ακόμα και σε απουσία ριζοβίου (Tirichine et al. 2006). Έτσι γίνεται αντιληπτή η σημασία της.

Η CCaMK μπορεί και φωσφορυλιώνει την πρωτεΐνη CYCLOPS και δρουν μαζί για την ενεργοποίηση του συμβιωτικού μονοπατιού, τη συμβίωσης με ριζόβια (*nod* factors) και στη συμβίωση με ενδομυκορριζικούς μύκητες (*myc* factors). Στη συνέχεια ενεργοποιούνται τα γονίδια *NSP1*, *NSP2*. Τα γονίδια *NSP1* και *NSP2* κωδικοποιούν για μεταγραφικούς παράγοντες με επικράτειες GRAS.

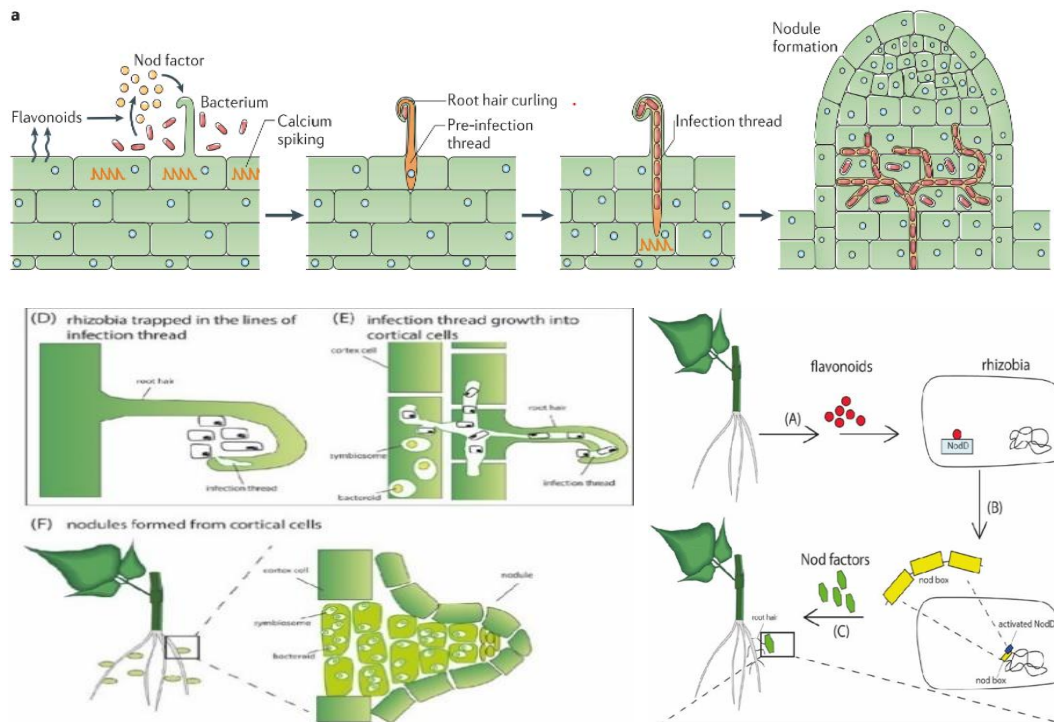
Η επικράτεια GRAS βρίσκεται αποκλειστικά σε πρωτεΐνες φυτών και ονομάστηκε από τις τρεις πρώτες πρωτεΐνες που βρέθηκε αυτή η επικράτεια. GIBBERELLIC ACID INSENSITIVE (GAI), REPRESSOR OF GAI (RGA) και SCARECROW (SCR) (Hirsch et al. 2009). Η οικογένεια GRAS πρωτεϊνών έχει αναφερθεί σε σχεδόν 300 φυτικά είδη και γενικά φαίνεται να επηρεάζει την ανάπτυξη, τις αντιδράσεις των φυτών στο περιβάλλον και τις συμβιωτικές σχέσεις μέσω ρύθμισης της μεταγραφής (Hofmann 2016).

Το γονίδιο *NSP1* φαίνεται να έχει εξειδίκευση προς την αναγνώριση και μεταγωγή σήματος από nod factors (NF) χωρίς καμία συσχέτιση με myc factors σε αντίθεση με το *NSP2* (Hirsch et al. 2009). Τα *NSP1* & *NSP2* σχηματίζουν ένα ετεροδιμερές σύμπλοκο το οποίο συνδέεται στους υποκινητές γονιδίων που επάγουν τη φυματογένεση, όπως τα γονίδια *NIN* και *ERN1*. Αυτά με τη σειρά τους εκφράζουν μεταγραφικούς παράγοντες (Hirsch et al. 2009). Το *NSP1* έχει επικράτεια δέσμησης στο DNA ενώ το *NSP2* όχι. Έτσι εξηγείται ο διμερισμός τους για την αλληλεπίδραση του *NSP2* με υποκινητές γονιδίων όπως φαίνεται στην **Εικόνα 4**.



Εικόνα 4 Διμερισμός *NSP* παραγόντων και αλληλεπίδραση με υποκινητές γονιδίων (*NIN*, *ERN1*) για την έναρξη της φυματογένεσης. (Oldroyd 2013)

Μετά την ενεργοποίηση του σηματοδοτικού μονοπατιού της συμβίωσης ξεκινάει η φυματογένεση. Τα ριζόβια αποκτούν πρόσβαση στη ρίζα του φυτού μέσω τριχιδίων της ρίζας. Αυτά μεγαλώνουν γύρω από ριζόβια τα οποία είναι προσκολλημένα στην επιφάνεια της ρίζας, παγιδεύοντας τα σε έναν βρόχο. Τα νημάτια μόλυνσης είναι εισβολές των κυττάρων της ρίζας που ξεκινούν από την περιοχή των βρόχων και επιτρέπουν την εισβολή των ριζοβίων στον ιστό της ρίζας. Ο πυρήνας του φυτικού κυττάρου μετατοπίζεται στο σημείο της μόλυνσης, και μια ευθυγράμμιση του ενδοπλασματικού δικτύου και του κυτταροσκελετού, σχηματίζει το προ-μολυσματικό νημάτιο. Η μόλυνση επεκτείνεται έως τα κύτταρα του εσωτερικού φλοιού της ρίζας και τα φυμάτια σχηματίζονται de novo μέσω ενός μεριστωματικού ιστού φυματίων στα κύτταρα του φλοιού τις ρίζας (**Εικόνα 5**).



Εικόνα 5 Εγκαθίδρυση των φυματίων (Oldroyd 2013) (Wekesa et al. 2022)

1.7 Αυτορρύθμιση φυματιογένεσης

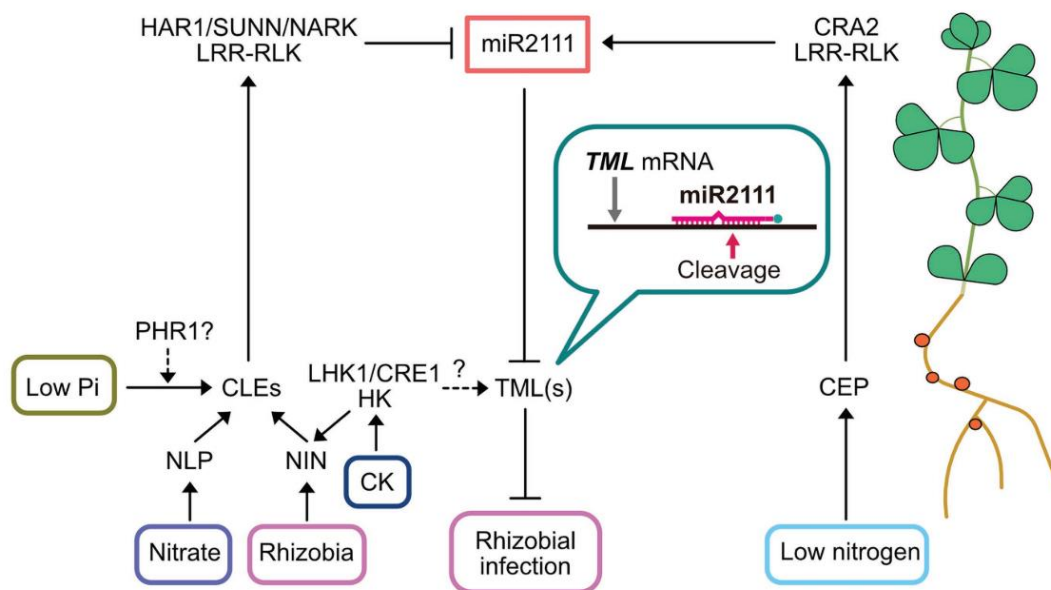
Όπως σε κάθε σχέση, ακόμα και στις συμβιωτικές, πρέπει να υπάρχουν όρια. Η μικροβιακή μόλυνση πρέπει να περιορίζεται στις ανάγκες του φυτού. Ο αριθμός των φυματίων ελέγχεται από το φυτό μέσω της διαδικασίας της αυτορρύθμισης της φυματιογένεσης AON (Autoregulation of nodulation). Φυτά με μεταλλάξεις στο μονοπάτι AON παρουσιάζουν υπέρ-φυματιογένεση, χάνουν τον έλεγχο των φυματίων και η σχέση γίνεται παρασιτική με αποτέλεσμα την καταστολή της ανάπτυξης του φυτού. Το μονοπάτι AON είναι καλά συντηρημένο σε πολλά ψυχανθή.

Το εναρκτήριο βήμα για το σηματοδοτικό μονοπάτι AON είναι η επαγωγή σημάτων της ρίζας, μετά από μόλυνση της από τα ριζόβια. Τα σήματα της ρίζας είναι τα πεπτίδια CLE (CLAVATA3/EMBRYO-SURROUNDING REGION) μικρού μεγέθους πεπτίδια που παράγονται στη ρίζα. Τα γονίδια που εκφράζουν τα πεπτίδια CLE επάγονται από μεταγραφικούς παράγοντες με επικράτειες RWP-RK όπως ο παράγοντας NIN (Yasuka et al. 2016).

Στη συνέχεια τα πεπτίδια CLE μεταφέρονται στο βλαστό μέσω του ξηλώματος και αναγνωρίζονται από πρωτεΐνες LRR-RLK (leucine rich repeat receptor-like kinase) όπως ο υποδοχέας HAR1 (HYPERNODULATION ABERRANT ROOT1), για το φυτό *L. japonicus* και SUNN για το φυτό *M. truncatula* (Schnabel et al. 2005). Μετά την ενεργοποίηση του υποδοχέα αναστέλλεται το miR2111. Ένα micro RNA που παράγεται στο βλαστό και τα φύλλα του φυτού αλλά μεταφέρεται και δρα στη ρίζα (Tsikou et al. 2018) και έχει τελικό στόχο την πρωτεΐνη TML (TOO MUCH LOVE).

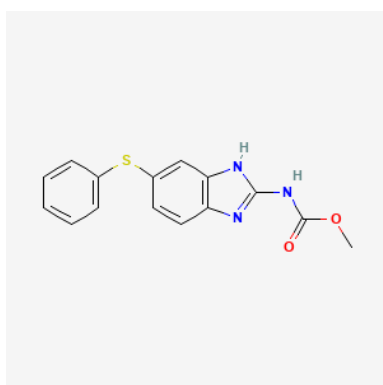
Η αναστολή του miR2111 επιτρέπει στην πρωτεΐνη TML να εκφραστεί. Η TML είναι μια Skp1 Cullin F-box (SCF) πρωτεΐνη που εντοπίζεται στον πυρήνα. Αποτελεί τμήμα του συμπλόκου της E3 λιγάσης της ουβικιτίνης και αναστέλλει (με έναν άγνωστο μέχρι και σήμερα μηχανισμό) την συμβιωτική αλληλεπίδραση μεταξύ ριζοβίων- ψυχανθών (Krusell et al 2002). Φυτά στα οποία γίνεται υπερέκφραση του miR2111 παρουσιάζουν πολύ μεγάλο αριθμό φυματίων (υπερφυματιογένεση) (Tsikou et al. 2018).

Συνεπώς η μόλυνση της ρίζας από συμβιωτικά βακτήρια προκαλεί την έκφραση παραγόντων που επάγουν την έκφραση των πεπτιδίων CLE. Τα πεπτίδια CLE μεταφέρονται στο βλαστό του φυτού όπου αναγνωρίζονται από τον υποδοχέα τους. Μετά την αναγνώριση τους από τον υποδοχέα ακολουθεί η ενεργοποίηση της πρωτεΐνης TML που δρα ως αρνητικός ρυθμιστής της φυματιογένεσης ([Εικόνα 6](#)).



Εικόνα 6 Το μονοπάτι αυτορύθμισης της φυματογένεσης (Okuma et al. 2021)

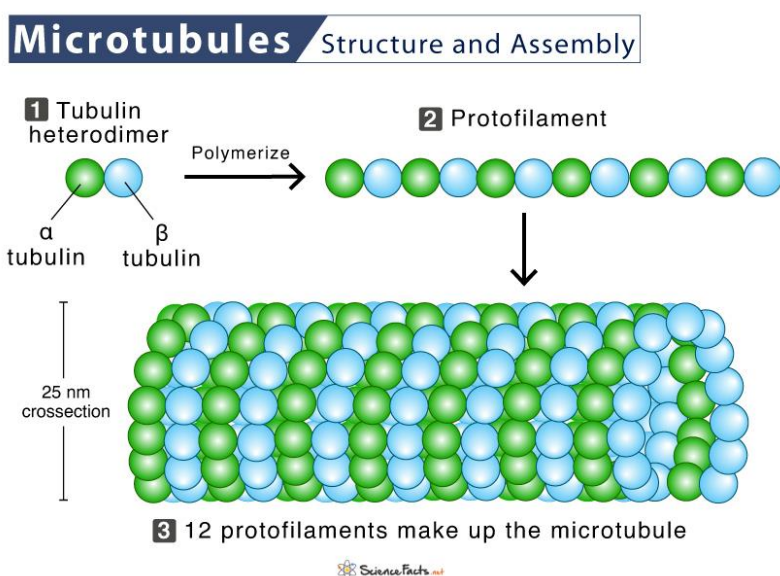
1.8 Το ανθελμινθικό φάρμακο φενβενδαζόλη



Η φενβενδαζόλη είναι ένα ανθελμινθικό φάρμακο που κατατάσσεται στη κατηγορία των βενζιμιδαζολών, φαρμακευτικά σκευάσματα με αντιπαρασιτική λειτουργία. Χρησιμοποιούνται στη κτηνοτροφία για τη θεραπεία εντερικών παρασίτων και συστηματικών λοιμώξεων από νηματοειδή παράσιτα, όχι μόνο για χρήση σε αγροτικά ζώα (πρόβατα, βοοειδή, αιγοπρόβατα, χοίροι, πουλερικά), αλλά και για ζώα συντροφιάς (άλογα, σκύλοι). (Campbell 1990).

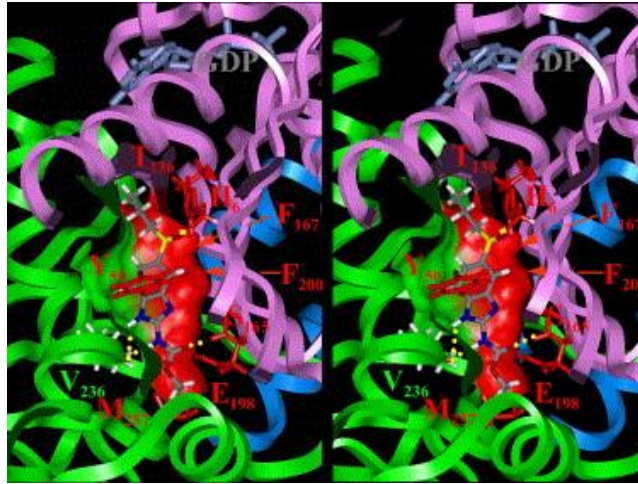
Τα βενζιμιδαζολικά ανθελμινθικά φάρμακα δρουν αναστέλλοντας τη δράση των μικροσωλινίσκων (Lacey 1990). Οι μικροσωλινίσκοι είναι κενές κυλινδρικές δομές μεγέθους 25 nm έως 200 nm που εντοπίζονται σε ευκαρυωτικά και προκαρυωτικά κύτταρα. Αποτελούν ένα κύριο μέρος του κυτταροσκελετού, προσδίδοντας δομική υποστήριξη στα κύτταρα. Συμμετέχουν σε λειτουργίες όπως η μεταφορά ενδοκυτταρικών οργανιδίων και κυστιδίων. Κατά τη κυτταρική διαίρεση σχηματίζουν τη μιτωτική άτρακτο καθώς και τα κεντροσώματα. Επιπλέον το μεγαλύτερο ποσοστό

των βακτηρίων χρησιμοποιούν δομές εξαρτώμενες ή αποτελούμενες από μικροσωληνίσκους για τη κίνηση τους (Μαστίγια, ψευδό-βλεφαρίδες). Οι μικροσωληνίσκοι σχηματίζονται από τον πολυμερισμό ενός διμερούς που αποτελείται από δύο παρόμοια ολιγοπεπτίδια : α -τουμπουλίνη και β -τουμπουλίνη (εικόνα 7).



Εικόνα 7. Δομή των μικροσωληνίσκων και πολυμερισμός της α και β τουμπουλίνης.

Τα βενζιμιδαζολικά ανθελμινθικά φάρμακα συνδέονται σε συγκεκριμένες θέσεις στις πρωτεΐνες α -τουμπουλίνη και β -τουμπουλίνη (εικόνα 8) καθιστώντας τες ανίκανες για πολυμερισμό. Συνεπώς δεν σχηματίζονται σωστά λειτουργικοί μικροσωληνίσκοι και παρεμποδίζονται ζωτικής σημασίας βιολογικές διεργασίες του κυττάρου (Robinson et al. 2004).



Εικόνα 8 Κρυσταλλογραφική απεικόνιση του προτεινόμενου μηχανισμού δέσμευσης του βένζιμιδαζολικού φαρμάκου albendazole στη β - τουμπουλίνη του νηματοειδούς παρασίτου *Haemonchus contortus* (Robinson et al 2004).

Τα φάρμακα αυτά χρησιμοποιούνται με ασφάλεια τα τελευταία 60 χρόνια με μικρές παρενέργειες για το ζώα που τα λαμβάνουν. Τα τελευταία χρόνια με την άνοδο της τεχνολογίας έχει παρατηρηθεί ότι ένας μεγάλο μέρος των φαρμάκων (έως και 50%) μέσω των απεκκρίσεων των ζώων καταλήγει σε καλλιεργήσιμο έδαφος. Τα ανθελμινθικά φάρμακα αλβενδαζόλη και ερινομεκτίνη φαίνεται να επηρεάζουν τη λειτουργία ωφέλιμων μικροοργανισμών στο έδαφος, με αποτέλεσμα να μειώνεται η ποσότητα των νιτρικών οξέων (αζώτου) που βρίσκεται καθηλωμένη στο έδαφος (Lagos et al. 2023). Έχει βρεθεί πως το ανθελμινθικό φάρμακο αλβενδαζόλη επηρεάζει αρνητικά τη συμβίωση μεταξύ του ψυχανθούς *Lotus japonicus* με τον ενδομυκορριζικό μύκητα *Rhizophagus irregularis* (Gkimprizi et al 2023), γεννάται έτσι η απορία αν επηρεάζονται και άλλες ωφέλιμες συμβιωτικές σχέσεις από αυτή τη κατηγορία φαρμάκων.

1.9. Σκοπός

Σκοπός της παρούσας εργασίας ήταν να μελετηθεί η πιθανή επίδραση του ανθελμινθικού φαρμάκου φενβενδαζόλης στην ανάπτυξη του ριζοβίου βακτηρίου *Mesorhizobium loti*, στην ανάπτυξη του ψυχανθούς φυτού-μοντέλου *Lotus japonicus* καθώς και στη συμβίωση μεταξύ τους. Για το σκοπό αυτό, εφαρμόστηκαν διαφορετικές ποσότητες του φαρμάκου σε φυτά ή καλλιέργειες ριζοβίου και μελετήθηκαν τα εξής:

- Εκτίμηση της επίδρασης της φενβενδαζόλης στην ανάπτυξη του ψυχανθούς *Lotus japonicus* (έλεγχος φυτοτοξικότητας)
- Εκτίμηση της επίδρασης της φενβενδαζόλης στην ανάπτυξη του ριζοβίου *Mesorhizobium loti*
- Εκτίμηση της επίδρασης της φενβενδαζόλης στη φυματιογένεση
- Εκτίμηση της επίδρασης της φενβενδαζόλης στην έκφραση γονιδίων που σχετίζονται με τη φυματιογένεση και την έναρξη της συμβιωτικής σχέσης.

2.Υλικά και μέθοδοι

2.1 Εκβλάστηση και απολύμανση σπερμάτων

Στην παρούσα πτυχιακή εργασία χρησιμοποιήθηκε το ψυχανθές φυτό μοντέλο *Lotus japonicus*, οικότυπος *Gifu*, αγρίου τύπου. Η εκβλάστηση των σπερμάτων και η απολύμανση έγινε με χρήση πυκνού διαλύματος, H_2SO_4 , και με διάλυμα χλωρίνης 20% .

Πειραματική διαδικασία.

1^η ημέρα

1. Τοποθέτηση σπερμάτων σε 1,5 ml Eppendorf tubes και προσθήκη H_2SO_4 (10M) για 30 λεπτά με αναδεύσεις ανα 10 λεπτά (Σε επαγωγή).
2. 5 πλύσεις με ddH₂O
3. Απολύμανση σπόρων σε διάλυμα 20% χλωρίνης για 10 λεπτά.
4. 7 πλύσεις του διαλύματος της χλωρίνης με ddH₂O σε θάλαμο νηματικής ροής (Laminar Flow)
5. Τοποθέτηση σπόρων αποθηκευμένων σε νερό στους 4 °C για 12 ώρες.

2^η ημέρα (θάλαμος νηματικής ροής)

1. Τοποθέτηση τριών (3) διηθητικών χαρτιών σε κυκλικά τριβλία.
2. Προσθήκη 3ml αποστειρωμένου dH₂O σε κάθε τριβλίο.
3. Τοποθέτηση σπερμάτων σε σειρές χωρίς να έρχονται σε επαφή.
4. Αεροστεγές κλείσιμο τριβλίων με χρήση parafilm.
5. Μεταφορά τριβλίων στο θάλαμο ανάπτυξης 21 °C με 16 ώρες φως, 8 ώρες σκοτάδι (10 μέρες για το μοριακό πείραμα, 5 μέρες για τα φαινοτυπικά πειράματα.)

2.2 Καλλιέργεια και Προετοιμασία του ριζοβίου για τον εμβολιασμό των φυτών

Το ριζοβίο βακτήριο *Mesorhizobium loti* καλλιεργήθηκε σε υγρό θρεπτικό υλικό YMB (yeast mannitol broth) σε επωαστήρα 28 °C υπό συνεχή ανάδευση απόλυτα προστατευμένο από το φως του ηλίου. Η σύσταση του θρεπτικού υλικού YMB φαίνεται στον **πίνακα 1**.

K ₂ HPO ₄	0.5 g/L
MgSO ₄ 7H ₂ O	0.2 g/L
NaCl	0.1g/L
D-Mannitol	5g/L
Yeast extract	0.4g/L
pH	6.5-6,8

Πίνακας 1. Σύσταση θρεπτικού YMB

Πειραματική διαδικασία.

1. Μεταφορά μιας ποσότητας ριζοβίου από αρχική στερεή καλλιέργεια *M. loti* σε θρεπτικό μέσω YMA (Yeast Mannitol Agar. Σε κωνική φιάλη με 20 ml YMB.
2. Επώαση Υγρής καλλιέργειας στους 28 °C υπό συνεχή ανάδευση για 48 ώρες. Προστατευμένη από φώς.
3. Σε θάλαμο νοηματικής ροής μεταφορά 500 μl dH₂O και 500 μl της καλλιέργειας σε κυψελίδες για φωτομέτρηση.
4. Φωτομέτρηση στα 600nm και στη συνέχεια μεταφορά και αραίωση της υγρής καλλιέργειας σε 50ml Falcon tubes στη θεμιτή τελική οπτική πυκνότητα OD₆₀₀=0,02.

2.3 Προετοιμασία θρεπτικού μέσου ανάπτυξης φυτών

Το θρεπτικό μέσο Broughton and Dilworth χρησιμοποιείται ευρέως σε εργαστήρια για καλλιέργεια ψυχανθών φυτών.

Στην παρούσα πτυχιική εργασία το θρεπτικό μέσο Broughton and Dilworth παρασκευάστηκε σε συγκέντρωση $\frac{1}{4}$ από την αρχική αναλογία, με επιπλέον προσθήκη γνωστής συγκέντρωσης διαλύματος φενβενδαζόλης με σκοπό τη παρασκευή τεσσάρων συγκεντρώσεων φενβενδαζόλης για τη διεξαγωγή των πειραμάτων: 0 FBZ mg/L, 0.5 FBZ mg/L, 5 FBZ mg/L και 15 FBZ mg/L.

Οι συγκεντρώσεις ακολουθούν αναλυτικά για κάθε ξεχωριστό πείραμα.

2.3.1 Μοριακό πείραμα

Για το μοριακό πείραμα χρησιμοποιήθηκαν 4 δοχεία duran των 500ml (1 δοχείο για κάθε συνθήκη φενβενδαζόλης), τα οποία περιείχαν 300ml αποστειρωμένο dH_2O το καθένα. Η σύσταση των διαλυμάτων B&D, από τα stock solution, παρουσιάζεται στον **πίνακα 2**.

Stock solution A	37.5μl
Stock solution B	37.5μl
Stock solution C	37.5μl
Stock solution D	37.5μl
KNO_3 0,4M	750 μl

Πίνακας 2. Σύσταση διαλύματος B&D.

Για κάθε συνθήκη φενβενδαζόλης χρησιμοποιήθηκε κατάλληλο αρχικό (πρότυπο) διάλυμα φενβενδαζόλης γνωστής συγκέντρωσης (**πίνακας 3**).

Συνθήκη Φαρμάκου	Συγκέντρωση αρχικού διαλύματος φενβενδαζόλης
0,5 mg/L FBZ	550 mg/L
5 mg/L FBZ	4200 mg/L
15 mg/L FBZ	13900 mg/L

Πίνακας 3. Αρχικές συγκεντρώσεις φενβενδαζόλης για τη παραγωγή κάθε συνθήκης.

Προσθήκη φενβενδαζόλης και οργανικού διαλύτη (DMSO) σε κάθε δοχείο Duran για τη παρασκευή του τελικού διαλύματος για κάθε συνθήκη φενβενδαζόλης.

πίνακας 4.

	0 mg/L FBZ	0,5 mg/L FBZ	5 mg/L FBZ	15 mg/L FBZ
Fenbendazole	-	272 μ l	357 μ l	323 μ l
DMSO	357 μ l	85 μ l	-	34 μ l

Πίνακας 4. Φενβενδαζόλη και DMSO σε δοχείο Duran.

2.3.2 Φαινοτυπικά πειράματα

Τα φαινοτυπικά περιλαμβάνουν δύο πειράματα:

- Εκτίμηση της επίδρασης της φενβενδαζόλης στην ανάπτυξη των φυτών (πείραμα φυτοξικότητας)
- Εκτίμηση επίδρασης της φενβενδαζόλης στη φυματογένεση και στη συμβίωση ριζόβιου-φυτού.

Παρασκευή θρεπτικού μέσου B&D για όλα τα πειράματα, χρησιμοποιήθηκαν 5 δοχεία duran των 500ml (1 δοχείο για τις συνθήκες 0 FBZ mg/L, 0.5 FBZ mg/L, 15 FBZ mg/L, και δύο δοχεία για τη συνθήκη 5 FBZ mg/L), τα οποία περιείχαν 400ml αποστειρωμένο dH₂O το καθένα. Η σύσταση των διαλυμάτων B&D, από τα stock solution, παρουσιάζεται στον **πίνακα 5**.

Stock solution A	50 μ l
Stock solution B	50 μ l
Stock solution C	50 μ l
Stock solution D	50 μ l
KNO ₃ 0,4M	1 ml

Πίνακας 5. Σύσταση διαλύματος B&D

Για κάθε συνθήκη φενβενδαζόλης χρησιμοποιήθηκε κατάλληλο αρχικό (πρότυπο) διάλυμα φενβενδαζόλης γνωστής συγκέντρωσης (**πίνακας 6**).

Συνθήκη Φαρμάκου	Συγκέντρωση αρχικού διαλύματος φενβενδαζόλης
0,5 mg/L FBZ	550 mg/L
5 mg/L FBZ	4200 mg/L
15 mg/L FBZ	13900 mg/L

Πίνακας 6. Αρχικές συγκεντρώσεις φενβενδαζόλης για τη παραγωγή κάθε συνθήκης.

Προσθήκη φενβενδαζόλης και οργανικού διαλύτη (DMSO) σε κάθε δοχείο Duran για τη παρασκευή του τελικού διαλύματος για κάθε συνθήκη φενβενδαζόλης (πίνακας 7).

	0 mg/L FBZ	0,5 mg/L FBZ	5 mg/L FBZ	15 mg/L FBZ
Fenbendazole	-	403 μ l	412 μ l	405 μ l
DMSO	412 μ l	9 μ l	-	7 μ l

Πίνακας 7. Φενβενδαζόλη και DMSO σε δοχεία Duran.

2.4

Μεταφύτευση φυτών από τριβλία σε δοχεία magentas

Μετά την εκβλάστηση των σπερμάτων τα νεαρά φυτά μεταφέρονται από τα σφραγισμένα τριβλία σε δοχεία Magenta (GA-7) (Διαστάσεων: 7.62(M) x 7.62(Π) x 10.16(Y) cm). Τα δοχεία magenta σφραγίζουν αεροστεγώς καθιστώντας τα ιδανικά για διατήρηση άσηπτων συνθηκών και επιθυμητών επιπέδων υγρασίας. Κάθε δοχείο magenta περιείχε άμμο και βερμικουλίτη σε αναλογία 3:1, συνολικού βάρους (250-300g).

Πειραματική διαδικασία.

1. Προσθήκη άμμου και βερμικουλίτη με αναλογία 3:1 στα δοχεία magenta.
2. Απολύμανση δοχείων magenta που περιείχαν άμμο και βερμικουλίτη στο αυτόκαυστο (autoclave) 121 °C για 20 λεπτά.
3. Μεταφορά στο ξηραντήρα στους 60°C για 3 μέρες

Στο θάλαμο νηματικής ροής

1. Προσθήκη θρεπτικού υλικού B&D σε δοχεία magenta
2. Προσθήκη φυτών σε δοχεία magenta
3. Εμβολιασμός φυτών με ριζόβιο ($OD_{600}=0.02$) απευθείας στις ρίζες.

4. Σφράγισμα και μεταφορά δοχείων στο θάλαμο ανάπτυξης: 21 °C 16 ώρες φως, 8 ώρες σκοτάδι.

Στον **πίνακα 8** παρουσιάζονται αναλυτικά τα δοχεία magenta, τα φυτά αλλά και οι ποσότητες των θρεπτικών μέσων και ριζοβιού που χρησιμοποιήθηκαν για κάθε πείραμα.

Πειράματα	Μοριακό	Φαινοτυπικό	Φυτοτοξικότητα
Συνολικά φυτά	96	36	32
Magenta	16	12	8
Magenta/συνθήκη φενβενδαζόλης	4	3	2
Φυτά/magenta	6	3	4
OD ριζόβιου	0,02	0,02	-
Εμβολιασμός	800μl/φυτό	500μl/φυτό	-
B&D/magenta	55ml	50ml	50ml
Διάρκεια καλλιέργειας	5 ημέρες	4 εβδομάδες	4 εβδομάδες

Πίνακας 8. Υλικά που χρησιμοποιήθηκαν για κάθε πείραμα

2.5 Απομόνωση ολικού RNA από τις ρίζες του *Lotus japonicus*

Η απομόνωση του RNA έγινε με τη χρήση του εργαστηριακού kit RNeasy® Plant Mini της QIAGEN

Μετά τη συγκομιδή των φυτών οι ρίζες αποκόπτονται από το βλαστό στο ύψος του υποκοτυλίου και αποθηκεύονται στους -80°C.

Πειραματική διαδικασία.

1. Λειοτρίβηση των παγωμένων ριζών με χρήση εμβόλων σε Eppendorf σωλήνες χωρίς να ξεπαγώσουν.
2. Προσθήκη 450μl RLT buffer στο διαλυμένο ιστό και έντονο vortex. * Η χρήση του RLT έγινε χωρίς προσθήκη β-Μερκαπτοαιθανόλης.
3. Μεταφορά του διαλύματος στη λιλά στήλη (QIAshredder spin column) και φυγοκέντρηση 2min, 13.300 RPM. Απορρίπτεται το ίζημα. Το υπέρκειμενο μεταφέρεται σε νέο σωληνάριο.
4. Προσθήκη 250μl 100% EtOH (αιθανόλη) και ανάδευση με χρήση πιπέτας.

5. Μεταφορά του διαλύματος στη ροζ στήλη (RNeasy spin column) και φυγοκέντρηση 1min 10.000 RPM. Απορρίπτεται το υπερκείμενο.
6. Προσθήκη 700μl RW1 buffer στη ροζ στήλη και φυγοκέντρηση 1min, 10.000 RPM. Απορρίπτεται το υπερκείμενο.
7. Προσθήκη 500μl RPE buffer στη ροζ στήλη και φυγοκέντρηση 1min, 10.000 RPM. Απορρίπτεται το υπερκείμενο.*Το RPE buffer έχει αραιωθεί 4:1 100% EtOH προς RPE buffer.
8. Προσθήκη 500μl RPE buffer στη ροζ στήλη και φυγοκέντρηση 2min, 10.000 RPM. Απορρίπτεται το υπερκείμενο.
9. Μεταφορά της στήλης σε νέο σωληνάριο 2 ml και φυγοκέντρηση 1min, 13.300 RPM.
10. Μεταφορά της στήλης σε νέο σωληνάριο 1,5 ml, προσθήκη 40 μl RNase-free water και φυγοκέντρηση 1min, 10.000 RPM.
11. Προσδιορισμός της συγκέντρωσης DNA με τη χρήση της συσκευής NanoDrop. 1μl δείγματος τοποθετείται στο NanoDrop και μετράται η συγκέντρωση και η καθαρότητα του DNA
12. Αποθήκευση του RNA.

Διαλύματα και Στήλες

Τα RLC, RW1 buffer περιέχουν χλωριούχο και θειοκυανικό γουαναμίδιο. Ισχυροί χαοτροπικοί παράγοντες που καταστρέφουν πρωτεΐνες (π.χ. νουκλεάσες) και τη κυτταρική μεμβράνη μέσω αποδιάταξης δεσμών υδρογόνων. Χρησιμοποιούνται ευρέως σε πρωτόκολλα απομόνωσης DNA/RNA καθώς δεν επηρεάζουν τα νουκλεϊκά οξέα.

Η λιλά στήλη (QIAshredder spin column) δεσμεύει αδιάλυτα κυτταρικά προϊόντα και μειώνει το ιξώδες του διαλύματος καταστρέφοντας μια στιβάδα γέλης που δημιουργείται από τη λύση των φυτικών κυττάρων.

Η ροζ στήλη (RNeasy spin column) δεσμεύει όλο το ελεύθερο RNA

Η αιθανόλη υποβοηθά τη δέσμευση του RNA στη ροζ στήλη (RNeasy spin column)

Το RPE buffer χρησιμοποιείται για έκλουση αλάτων.

2.6. Απομάκρυνση DNA από τα RNA δείγματα

Αντίδραση:

RNA sample	600ng
10x DNase I buffer with MgCl ₂	1μl
Invitrogen DNase I 1U/μl	1,1 μl
Invitrogen RNase out 5U/μl	0,25 μl
dH ₂ O	Εως τον τελικό όγκο
Συνολικός όγκος	10μl

Η ποσότητα του προστιθέμενου RNA υπολογίζεται ξεχωριστά για κάθε δείγμα σύμφωνα με τη συγκέντρωση του (αποτελέσματα nanodrop).

Πειραματική διαδικασία.

1. Μεταφορά επιθυμητής ποσότητας RNA σε σωληνάρια PCR και αραίωση τους με προσθήκη ddH₂O.
2. Παρασκευή Master Mix
3. Προσθήκη 1,25μl Master Mix σε κάθε σωληνάριο PCR
4. Τέλος προσθήκη 1,1μl ενζύμου DNase I σε κάθε σωληνάριο PCR.
5. Επώαση σε μηχανήμα PCR για min στους 37 °C για 30min
6. Προσθήκη 1μl EDTA 50mM (Invitrogen) και επώαση για 10min στους 65°C στο heatblock

2.6.1 Έλεγχος αποτελεσματικότητας του χειρισμού DNase– Αλυσιδωτή αντίδραση πολυμεράσης PCR

Για τον έλεγχο της αποτελεσματικότητας της μεθόδου εκτελείται αλυσιδωτή αντίδραση πολυμεράσης (PCR) με εκμαγείο το δείγμα RNA, και εκκινητές για ένα ιδιοσύστατο γονίδιο.

Η αλυσιδωτή αντίδραση πολυμεράσης, αποτελεί μια ευαίσθητη μέθοδο ενίσχυσης ακολουθιών DNA και RNA. Για την ενίσχυση του DNA ή RNA απαιτείται η παρουσία νουκλεοτιδίων, του ενζύμου DNA πολυμεράση (θερμοανθεκτικό) και δύο μικρών μονόκλωνων τμημάτων DNA που ονομάζονται εκκινητές. Οι εκκινητές είναι συμπληρωματικοί ως προς την αλληλουχία DNA που θα ενισχυθεί και υβριδίζονται σε αυτό. Στη συνέχεια μια θερμοανθεκτική DNA πολυμεράση συνδέεται σε αυτούς και ξεκινάει η σύνθεση του νέου DNA παρουσία ολιγονουκλεοτιδίων και κατιόντων Mg^{+2} .

RNA SAMPLE	1 μ l
10x Buffer	2 μ l
Taq Pol (Πολυμεράση του DNA)	0,08 μ l
dNTPs (10mM)	0,4 μ l
LjUbi F (Πρόσθιος εκκινητής) (10 μ M)	0,8 μ l
LjUbi R (Ανάστροφος εκκινητής) 10 μ M)	0,8 μ l
ddH ₂ O	14,92 μ l
Συνολικός όγκος	20 μ l

Πρώτο στάδιο της αντίδρασης αποτελεί η αποδιάταξη του αρχικού δίκλωνου DNA με θέρμανση περίπου στους 95°C. Η θερμοκρασία μετά πέφτει στη κατάλληλη θερμοκρασία για τον υβριδισμό των εκκινητών. Η θερμοκρασία τήξης των εκκινητών εξαρτάται από το μέγεθος τους και την αλληλουχία τους. Υπολογίζεται με τον τύπο $T_m = 4^{\circ}C * (G/C) + 2^{\circ}C * (A/T)$. Έπειτα ακολουθεί αύξηση της θερμοκρασίας για τη βέλτιστη λειτουργία της DNA πολυμεράσης. Τα στάδια αυτά επαναλαμβάνονται για αρκετούς κύκλους (25-45). Με το πέρας κάθε κύκλου τα προϊόντα της αντίδρασης συσσωρεύονται και αυξάνονται με εκθετικό ρυθμό.

Πειραματική διαδικασία.

1. Μεταφορά 1μl sample RNA σε σωληνάρια PCR.
2. Παρασκευή Master Mix
3. Προσθήκη 19 μl Master Mix σε κάθε σωληνάριο PCR
4. Καθ' όλη τη διάρκεια δουλεύουμε σε πάγο.
5. PCR πρόγραμμα: 39 κύκλοι.

Αρχική αποδιάταξη	5min	95 °C	
Αποδιάταξη	30sec	95 °C	}
Υβριδοποίηση	30sec	55 °C	
Επιμήκυνση	10sec	72 °C	
Τελική επιμήκυνση	4min	72 °C	
Hold	∞	4 °C	

Στη συνέχεια τα αποτελέσματα απεικονίζονται με ηλεκτροφόρηση.

Για την ηλεκτροφόρηση

- 100 ml gel TAE 1% (1 g) άγαρ
- 3,6 μl EtBr
- 1 μl loading dye/ PCR product
- 1 kb plus ladder

Στα δείγματα που βγαίνουν θετικά για DNA μετά τη πρώτη αντίδραση με DNASE I ακολουθεί μια δεύτερη αντίδραση με με DNASE I (Παράρτημα)

Πειραματική διαδικασία.

1. Επώαση σε heatblock για min στους 37 °C για 30min
2. Προσθήκη 1μl EDTA 25mM (Invitrogen) και επώαση για 10min στους 65°C.
3. Επανάληψη PCR και ηλεκτροφόρησης.

2.7 Σύνθεση συμπληρωματικού DNA από RNA (cDNA)

Αντίδραση:

RNA Template	250-300 ng (5μl)
oligodT	1 μl
dNTPs	1μl
ddH ₂ O	Έως τα 20μl

2^η

5xForward Strand buffer(Invitrogen)	4μl
Superscript II (200U/μl) (Invitrogen)	0,5μl
RNAse out (Invitrogen)	1μl

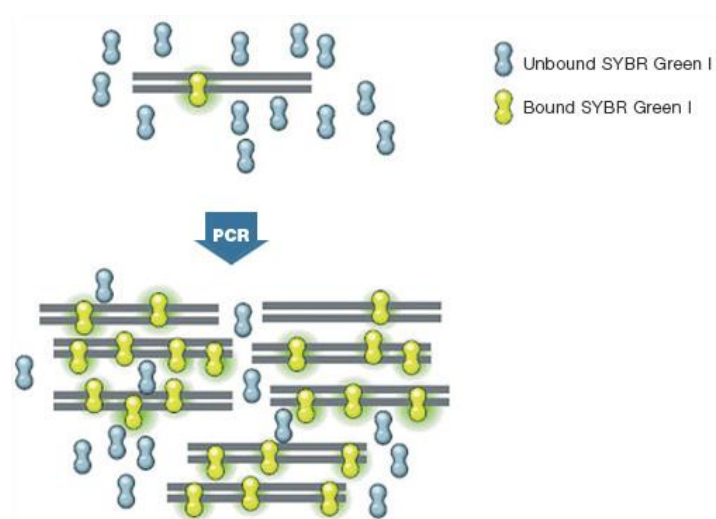
Πειραματική διαδικασία.

1. Προετοιμασία Master Mix 1 και προσθήκη 9,5μl σε κάθε σωληνάριο PCR.
2. Μεταφορά 5 μl sample RNA (DNase Treated) σε σωληνάρια PCR.
3. Μεταφορά στο μηχάνημα PCR για 5 min στους 65°C
4. Προετοιμασία Master Mix 2 και προσθήκη 4,5μl σε κάθε σωληνάριο PCR.
5. Μεταφορά στο μηχάνημα PCR προσθήκη ενζύμου superscript II RT 5μl
6. PCR για 2 min στους 42°C.
7. Πρόγραμμα PCR
8. Καθ' όλη τη διάρκεια δουλεύουμε σε πάγο.

2.8 Κανονικοποίηση δειγμάτων με ποσοτική αλυσιδωτή αντίδραση πολυμεράσης πραγματικού χρόνου.

Η ποσοτική αλυσιδωτή αντίδραση πολυμεράσης (qPCR) ή PCR πραγματικού χρόνου (RT-PCR) αποτελεί μια ευαίσθητη τεχνική που χρησιμοποιείται ευρέως για την ποσοτικοποίηση DNA. Κατά τη διάρκεια της αντίδρασης η ποσότητα του DNA που ενισχύεται παρακολουθείται μέσω φθορισμού.

Η βασική αρχή της qPCR στηρίζεται στη χρήση φθορίζοντων χρωστικών ή ειδικών φθορίζοντων ανιχνευτών που συνδέονται με το DNA και εκπέμπουν φως. Η εκπομπή του φθορισμού μετράται σε κάθε κύκλο της αντίδρασης, επιτρέποντας έτσι την ποσοτικοποίηση του DNA στο δείγμα. Στη παρούσα πτυχιακή χρησιμοποιήθηκε η φθορίζουσα χρωστική SYBR GREEN της εταιρίας KAPA. Η χρωστική SYBR Green δεσμεύεται αποκλειστικά στο δίκλωνο* (dsDNA) χωρίς κάποιά εξειδίκευση προς την αλληλουχία του. Κατά τη διάρκεια της αντίδρασής της qPCR οι εκκινητές συνδέονται με το μονόκλωνο DNA και η πολυμεράση του DNA επιμηκύνει κάθε τμήμα, η χρωστική δεσμεύεται στο νέο-σχηματιζόμενο δίκλωνο DNA και μόνο τότε φθορίζει σε μήκος κύματος 520 nm (**εικόνα 10**).



Εικόνα 10. Τρόπος λειτουργίας SYBR Green. (Bio-rad ®)

Τα δείγματα cDNA διαφέρουν μεταξύ τους ποσοτικά και ποιοτικά προς το DNA που φέρουν. Οι διαφορές αυτές μπορούν να αποδοθούν στη διαφορετική κατάσταση του αρχικού ιστού που χρησιμοποιήθηκε για τη απομόνωση RNA (μέγεθος, ρυθμοί έκφρασης γονιδίων, ενδοκυτταρικό στρες κ.α.), διαφορές στη σύνθεση cDNA και στους εργαστηριακούς χειρισμούς.

Για τη διασφάλιση της ακρίβειας και της αξιοπιστίας της qPCR είναι ανάγκη η προσαρμογή των δειγμάτων (κανονικοποίηση).

Η κανονικοποίηση συνήθως περιλαμβάνει τη χρήση ιδιοσυστατων γονιδίων, που αναφέρονται ως γονίδια αναφοράς. Τα ιδιοσυστατα γονίδια εκφράζονται σταθερά σε όλα τα δείγματα και υπό όλες συνθήκες.

- Αρχικά εκτελείται qPCR για το ιδιοσυστατο γονίδιο.
- Υπολογίζεται η τιμή Cr (. Η τιμή Cr αντιπροσωπεύει τον αριθμό κύκλων στον οποίο το σήμα φθορισμού υπερβαίνει το κατώφλι, υποδεικνύοντας ανιχνεύσιμα επίπεδα του ενισχυμένου DNA.)
- Υπολογίζεται η επιθυμητή τιμή Cr, κοινή για όλα τα δείγματα
- Υπολογίζεται η ποσότητα ddH₂O που πρέπει να προστεθεί σε κάθε δείγμα με σκοπό όλα τα δείγματα να έχουν τελική τιμή Cr με απόκλιση μικρότερη της τάξης του 10% από τη τιμή Cr στόχο.

Αντίδραση:

cDNA template	1 μ l
LjATP F (Πρόσθιος εκκινητής) (10 μ M)	0,2 μ l
LjATP R(Ανάστροφος εκκινητής) 10 μ M)	0,2 μ l
ddH ₂ O	3,6 μ l
SYBR Mix	5 μ l

2.9 Ποσοτική αλυσιδωτή αντίδραση πολυμεράσης πραγματικού χρόνου. RT - qPCR.

Η RT-qPCR είναι μια ευαίσθητη τεχνική που χρησιμοποιείται για την ενίσχυση DNA, cDNA, RNA ακόμα και από πολύ μικρές ποσότητες με μεγάλη ακρίβεια. Στη RT-qPCR μπορούμε και παρακολουθούμε τη πρόοδο της αντίδρασης σε πραγματικό χρόνο. Η τεχνική χρησιμοποιείται για ποσοτικοποίηση γονιδιακής έκφρασης.

Ελέγχθηκαν τα παρακάτω γονίδια

ATP, PP2, ENOD2, NIN → 60 °C, 45 κύκλοι

NSP1, TML2 → 58 °C, 45 κύκλοι

Αντίδραση :

cDNA template	2,5 μ l
Πρόσθιος εκκινητής	0,2 μ l
Ανάστροφος εκκινητής	0,2 μ l
ddH ₂ O	2,1 μ l
SYBR Mix	5 μ l

Πρόγραμμα qPCR:

Αρχική αποδιάταξη	3min	95 °C	40-45 Κύκλοι
Αποδιάταξη	20sec	95 °C	
Υβριδοποίηση	20sec	58-60 °C	
Επιμήκυνση	11sec	72 °C	
Τελική επιμήκυνση	5 sec	65°C	
Hold	∞	4 °C	

Πειραματική διαδικασία.

Φόρτωση των cDNA δειγμάτων σε 96-well plate σε δύο τεχνικές επαναλήψεις.

Παρασκευή Master Mix για κάθε ζεύγος εκκινητών και προσθήκη 7,5 μ l σε κάθε δείγμα/well.

Σφράγισμα plate με ειδική μεμβράνη.

Έναρξη αντίδρασης

2.10 Στερεές και υγρές καλλιέργειες *Mesorhizobium loti*.

Παρασκευή 700 ml θρεπτικού υλικού YMB (yeast mannitol broth). Η σύσταση του YMB παρουσιάζεται στον **πίνακα 10**.

K ₂ HPO ₄	0,35 g
MgSO ₄ 7H ₂ O	0,14 g
NaCl	0,07g
D-Mannitol	3,5g
Yeast extract	0,28g
pH	6,84

Πίνακας 10. Υλικά που χρησιμοποιήθηκαν για το πείραμα.

320 ml μοιράστηκαν σε 4 φλάσκες (80ml/φλάσκα) για τις στερεές καλλιέργειες.

300 ml μεταφέρονται σε δοχεία duran για τις υγρές καλλιέργειες

2.11 Στερεές καλλιέργειες *Mesorhizobium loti*

Για τη μελέτη της επίδρασης της φενβενδαζόλης σε στερεές καλλιέργειες *M. loti* χρησιμοποιήθηκαν 4 συνθήκες φαρμάκου: 0 FBZ mg/L (φενβενδαζόλη) 0.5 FBZ mg/L, 5 FBZ mg/L και 15 FBZ mg/L. Για κάθε συνθήκη χρησιμοποιούνται 3 τριβλία που περιέχουν 25ml YMB+FBZ.

Από τα αρχικά 700 ml 320 μοιράστηκαν σε 4 φλάσκες (1 για κάθε συνθήκη), 80ml/φλάσκα .

Προσθήκη φενβενδαζόλης και οργανικού διαλύτη (DMSO) σε φλάσκα για τη παρασκευή του τελικού διαλύματος για κάθε συνθήκη φενβενδαζόλης (**πίνακας 11**).

Τα προτυπά διαλύματα φενβενδαζόλης παρουσιάζονται στον **πίνακα 6**.

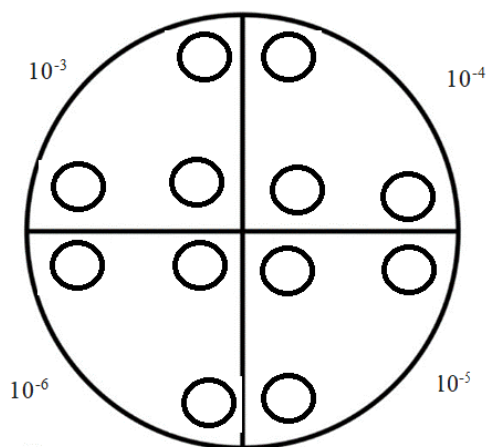
	0 mg/L FBZ	0,5 mg/L FBZ	5 mg/L FBZ	15 mg/L FBZ
Fenbendazole	-	80 μl	82,4 μl	81 μl
DMSO	82,4 μl	2,4 μl	-	1,47 μl

Πίνακας 11. Υλικά που χρησιμοποιήθηκαν για το πείραμα.

Πειραματική διαδικασία.

1. Χρήση ζυγού ακριβείας για τη παρασκευή του ΥΜΒ
2. Προσθήκη 80 ml ΥΜΒ σε κάθε φιάσκα.
3. Προσθήκη 1,2 g άγαρ σε κάθε φιάσκα (θάλαμο νηματικής ροής)
4. Αποστείρωση σε αυτόκαυστο (121 °C, 15 min)
5. Υδατόλουτρο 50 °C (αποφυγή πήξης.)
6. Μεταφορά στο θάλαμο νηματικής ροής και στρώση τριβλίων
7. Προετοιμασία αρχικής καλλιέργειας *M.loti* με $OD_{600}=0,25$.
8. Παρασκευή αραιώσεων από την αρχική καλλιέργεια από 10^{-1} έως 10^{-6}
9. Με τη μέθοδο drop plate (20 ml/,σταγόνα/ 3 σταγόνες ανά αραιώση) στρώση τρυβλίων (εικόνα 11).

Σε κάθε συνθήκη χρησιμοποιήθηκαν 3 τριβλία με θρεπτικό ΥΜΑ (22-25 ml ανά τριβλίο). Από αρχική καλλιέργεια με οπτική πυκνότητα $OD_{600}=0,25$ έγιναν αραιώσεις 10^{-1} έως 10^{-6} , τα τριβλία χωρίστηκαν σε 4 τεταρτημόρια (εικόνα 11) και χρησιμοποιήθηκε η μέθοδος drop plate (20 μl/ανά σταγόνα).



Εικόνα 11. Στρώση τρυβλίων με διαβαθμιζόμενες συγκεντρώσεις ριζοβίου.

Για τη μέθοδο drop plate το τριβλίο χωρίζεται σε τεταρτημόρια και στρώνονται οι σειριακές αραιώσεις. Σε κάθε τεταρτημόριο τοποθετούνται 3 σταγόνες ριζοβίου των 20 μl. Τα τριβλία σφραγίζονται και μεταφέρονται σε επωαστήρα στους 28 °C ,

προστατευμένα από το φως. Τη τρίτη ημέρα τοποθετούνται κάτω από το στερεοσκόπιο, σε κάθε σταγόνα σημειώνονται οι μονήρης αποικίες ή CFU(από 5 έως 50).

Υπολογίζεται ο μέσος όρος CFU σε κάθε σταγόνα για κάθε βιολογική επανάληψη.

Υπολογισμοί:

CFU/mL σταγόνας = Μέσος όρος CFU ανα σταγόνα * Τον αντίστροφο αριθμό του παράγονται αραιώσης* Συντελεστή διόρθωσης για τον όγκο της σταγόνας.

2.12 Υγρές καλλιέργειες *Mesorhizobium loti*

Για τη μελέτη της επίδρασης της φενβενδαζόλης σε υγρές καλλιέργειες *M. loti* R7A χρησιμοποιήθηκαν 4 συνθήκες φαρμάκου που περιείχαν επιπλέον το επιφανειοδραστικό tween 20 και μία συνθήκη ελέγχου: Control, 0 FBZ mg/L, 0.5 FBZ mg/L, 5 FBZ mg/L και 15 FBZ mg/L. Για κάθε συνθήκη χρησιμοποιούνται 3 σωληνάρια Falcon με 20 ml YMB. Κατά τη διάρκεια των πειραμάτων παρατηρήσαμε ότι η φενβενδαζόλη έχει τη τάση να κατακρημνίζεται σε υγρά διαλύματα. Για την αποφυγή ψευδών αποτελεσμάτων λόγω κατακρήμνισης, μαζί με τη φενβενδαζόλη χρησιμοποιήθηκε το επιφανειοδραστικό Tween 20. Τα επιφανειοδραστικά μειώνουν την επιφανειακή τάση μεταξύ του υγρού (B&D) και τις φενβενδαζόλης που είναι διαλυμένη στον οργανικό διαλύτη DMSO συνεπώς μειώνεται η κατακρίμνηση του φαρμάκου. Τα επιφανειοδραστικά μπορεί να επηρεάσουν την ανάπτυξη των βακτηριών συνεπώς προστέθηκε μια συνθήκη ελέγχου χωρίς tween 20 και φενβενδαζόλη.

Σε κάθε συνθήκη χρησιμοποιήθηκαν 3 σωλήνες Falcon των 50 ml που περιέχουν 20 ml θρεπτικού μέσω YMB με προσθήκη κατάλληλων ποσοτήτων φενβενδαζόλης, DMSO και tween 20. Οι καλλιέργειες ξεκίνησαν με προσθήκη 20 μl αραιωμένης 10^{-3} αρχικής καλλιέργειας με OD=0,25A.

Οι καλλιέργειες μεταφέρονται σε επωαστήρα στους 28 °C , υπό συνεχή ανάδευση προστατευμένες από το φως. Μετρήσεις της οπτικής πυκνότητας των καλλιεργειών (στα 600 nm), ελήφθησαν την ώρα 0 και κάθε 24 ώρες για 5 ημέρες.

Πειραματική διαδικασία.

1. Προσθήκη 60 ml YMB σε 5 φλάσκες των 100ml
2. Προσθήκη Φενβενδαζόλης, DMSO, Tween 20 (**Πίνακας 12**)
3. Μεταφορά 20 ml YMB από κάθε φλάσκα σε σωληνάρια Falcon 50 ml της αντίστοιχης συνθήκης.,
4. Αραίωση αρχικής καλλιέργειας ($OD=0,25A$) σε 10^{-3}
5. Προσθήκη 20 μ l καλλιέργειας (10^{-3}) σε κάθε Falcon.

	Control	0 FBZ mg/L	0,5 FBZ mg/L	5 FBZ mg/L	15 FBZ mg/L
YMB	60 ml	60 ml	60 ml	60 ml	60 ml
Tween 20	-	3ml	3ml	3ml	3ml
FBZ	-	-	60,4 μ l	61,8 μ l	60,8 μ l
DMSO	-	61,8 μ l	1,4 μ l	-	1 μ l

Πίνακας 12. Υλικά που χρησιμοποιήθηκαν για το πείραμα.

3. Αποτελέσματα

3.1 Έλεγχος για ύπαρξη φυτοτοξικότητας της φενβενδαζόλης στο *L. japonicus*

Για να μελετηθεί η πιθανή επίδραση του ανθελμινθικού φαρμάκου φενβενδαζόλη στην ανάπτυξη του ψυχανθούς φυτού *Lotus japonicus*, έγινε σύγκριση των μετρήσεων μήκος ρίζας, μήκος βλαστού καθώς και φρέσκου και ξηρού βάρους βλαστού, μεταξύ φυτών που είχαν μεγαλώσει σε υποστρώματα με διαφορετική συγκέντρωση φενβενδαζόλης. Πιο συγκεκριμένα χρησιμοποιήθηκαν τέσσερεις συνθήκες φαρμάκου: 0 FBZ mg/L, 0.5 FBZ mg/L, 5 FBZ mg/L και 15 FBZ mg/L. Σε κάθε συνθήκη χρησιμοποιήθηκαν δύο δοχεία magenta το καθένα με 4 φυτά *L. japonicus*. Κάθε φυτό αποτελεί μια βιολογική επανάληψη.

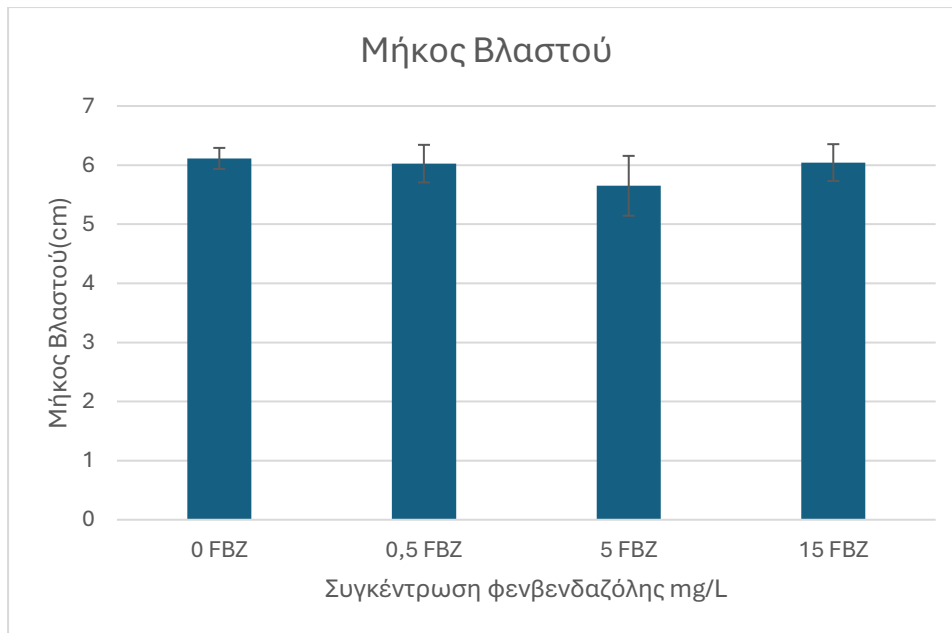
Οι παραπάνω δείκτες ανάπτυξης χρησιμοποιούνται ευρέως καθώς, το μήκος βλαστού αντικατοπτρίζει τη φωτοσυνθετική ικανότητα του φυτού, μεγαλύτεροι βλαστοί συνάδουν με υψηλότερο ρυθμό ανάπτυξης και μεγαλύτερη πρόσληψη ενέργειας. Επιπλέον το μήκος του βλαστού βοηθά στο προσδιορισμό του αναπτυξιακού σταδίου του φυτού. Μικρού μεγέθους βλαστοί «φανερώνουν» συνθήκες στρες. Το μήκος της ρίζας υποδηλώνει, μεταξύ άλλων, και αντίδραση σε περιβαλλοντικό στρες. Συχνά οι ρίζες επεκτείνονται υπό συνθήκες στρες όπως έλλειψη θρεπτικών συστατικών (άζωτο, φώσφορο, μαγνήσιο κ.α.). Η ισορροπία μεταξύ μήκους ρίζας και βλαστού (σχέση ρίζας προς βλαστό) είναι ένας σημαντικός δείκτης, που δείχνει την κατανομή των πόρων μεταξύ ανάπτυξης πάνω και κάτω από το έδαφος. Μια μη ισορροπημένη σχέση ρίζας προς βλαστό μπορεί να υποδηλώνει μια στρατηγική αντιμετώπισης κακών συνθηκών εδάφους. Το φρέσκο βάρος είναι μια στιγμιαία μέτρηση της ολικής βιομάζας του φυτού τόσο του νερού όσο και της ξηράς ύλης ένας χρήσιμος δείκτης για την αξιολόγηση της ανάπτυξης του φυτού. Το ξηρό βάρος αντιπροσωπεύει τη πραγματική βιομάζα του φυτού (πρωτεΐνες, υδατάνθρακες, καθώς και ενώσεις όπως κυτταρίνη και λιγνίνη, που συμβάλλουν στη δομή και τη λειτουργία του φυτού). Σε αντίθεση με το φρέσκο βάρος, το ξηρό βάρος δεν επηρεάζεται από προσωρινές διακυμάνσεις σε νερό, καθιστώντας το μια σταθερή και αξιόπιστη μέτρηση για σύγκριση ανάπτυξης σε διαφορετικά περιβάλλοντα.

Για το παρών πείραμα, νεαρά φυτάρια 5 ημερών μεταφυτευθήκαν σε δοχεία magenta, και τα φυτά αναπτύχθηκαν για 4 εβδομάδες. Ακολούθησε η συγκομιδή των φυτών (εικόνα 12) και πραγματοποιήθηκαν οι μετρήσεις μήκος βλαστού, μήκος ρίζας και φρέσκο βάρος βλαστού. Για τη μέτρηση ξηρού βάρους βλαστού, οι βλαστοί αποξηράθηκαν για 3 μέρες στους 65 °C.

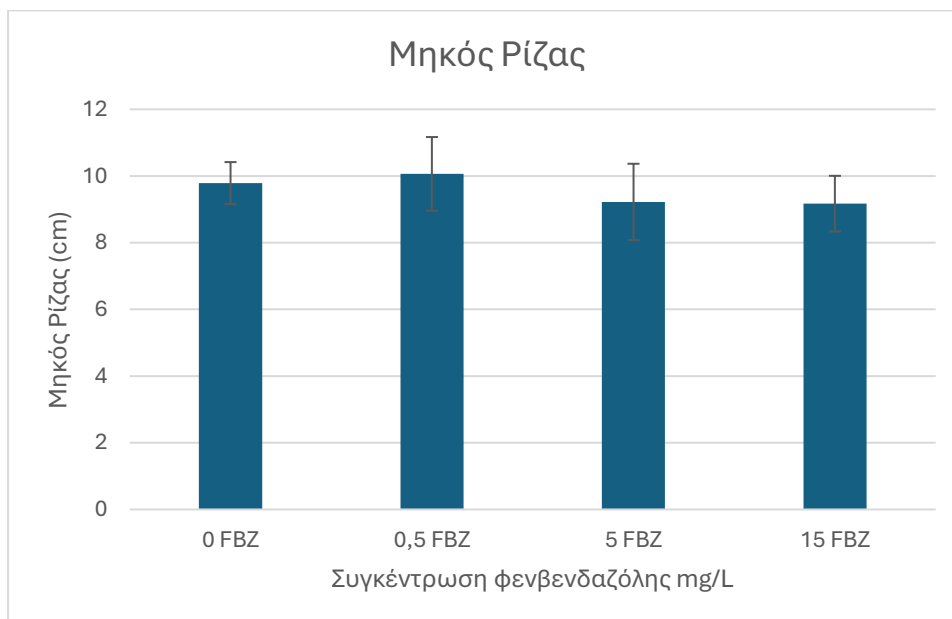


Εικόνα 12. Συγκομιδή φυτών για έλεγχο πιθανής φυτοτοξικής δράσης της φενβενδαζόλης.

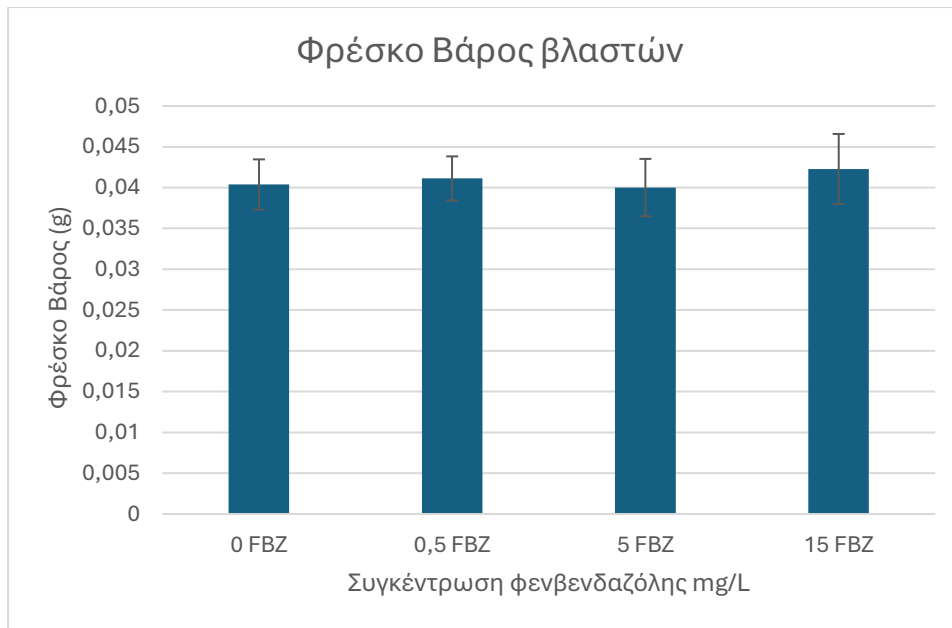
Συμφώνα με τα αποτελέσματα, δεν υπάρχει σημαντικά στατιστική διαφορά μεταξύ των φυτών-ελέγχου και των διαφόρων συνθήκων φενβενδαζόλης που εφαρμόστηκαν, σε όλες τις αναπτυξιακές παραμέτρους που μελετήθηκαν: μήκος βλαστού (εικόνα 13), μήκος ρίζας (εικόνα 14), φρέσκο βάρος βλαστού (εικόνα 15) και ξηρό βάρος βλαστού (Εικόνα 16). Είναι συνεπώς ασφαλές να υποθέσουμε ότι η φενβενδαζόλη δεν επηρεάζει άμεσα την ανάπτυξη του *Lotus japonicus*.



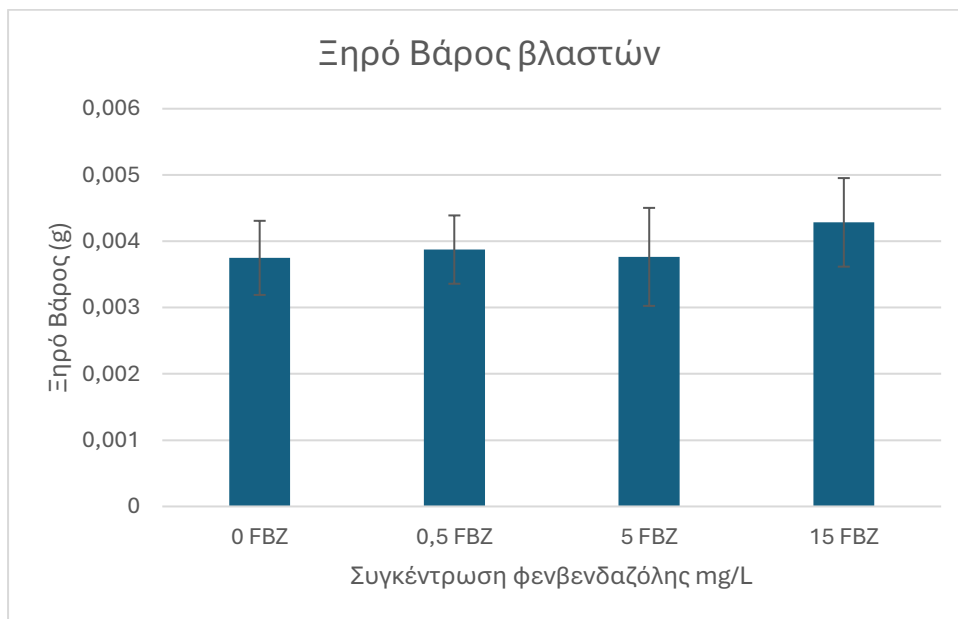
Εικόνα 13. Μέσος όρος μήκους βλαστού όλων των βιολογικών επαναλήψεων σε κάθε συνθήκη φαρμάκου.



Εικόνα 14. Μέσος όρος μήκους ρίζας όλων των βιολογικών επαναλήψεων σε κάθε συνθήκη φαρμάκου.



Εικόνα 15. Μέσος όρος φρέσκου βάρους βλαστών όλων των βιολογικών επαναλήψεων σε κάθε συνθήκη φαρμάκου.

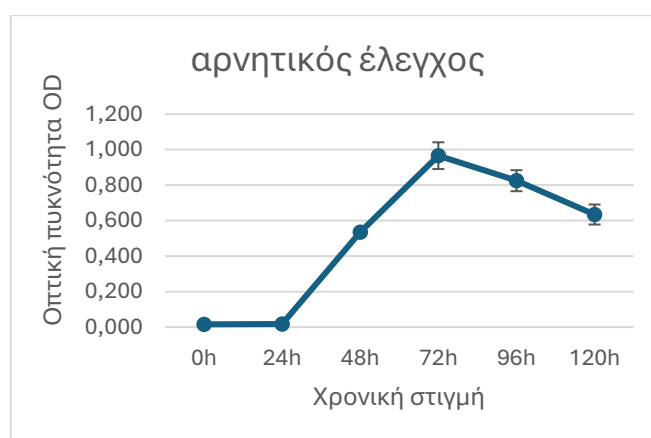


Εικόνα 16. Μέσος όρος ξηρού βάρους βλαστών όλων των βιολογικών επαναλήψεων σε κάθε συνθήκη φαρμάκου

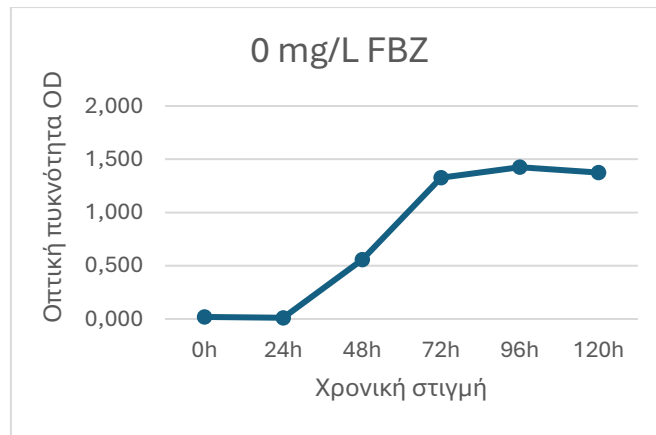
3.2 Έλεγχος της επίδρασης φενβενδαζόλης στο ριζόβιο *Mesorhizobium loti*

3.2.1 Επίδραση φενβενδαζόλης σε υγρές καλλιέργειες *Mesorhizobium loti* R7A

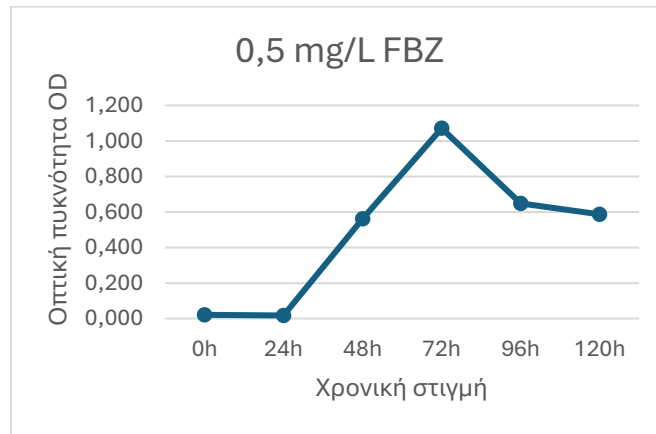
Για να μελετηθεί η πιθανή επίδραση του ανθελμινθικού φαρμάκου φενβενδαζόλη στην ανάπτυξη του βακτηρίου *Mesorhizobium loti*, έγιναν υγρές καλλιέργειες του βακτηρίου με προσθήκη φενβενδαζόλης σε 4 διαφορετικές συγκεντρώσεις: 0 FBZ mg/L, 0.5 FBZ mg/L, 5 FBZ mg/L και 15 FBZ mg/L. Μετρήσεις της οπτικής πυκνότητας των καλλιεργειών (στα 600 nm), ελήφθησαν την ώρα 0 και κάθε 24 ώρες για 5 ημέρες. Σύμφωνα με τα αποτελέσματα για την κάθε συνθήκη, δεν παρατηρείται στατιστικώς σημαντική διαφορά στους ρυθμούς ανάπτυξης των βακτηρίων μεταξύ των διαφορετικών χειρισμών: Συνθήκη αρνητικού ελέγχου (εικόνα 17), 0 FBZ mg/L (εικόνα 18), 0.5 FBZ mg/L (εικόνα 19), 5 FBZ mg/L (εικόνα 20), 15 FBZ mg/L (εικόνα 21).



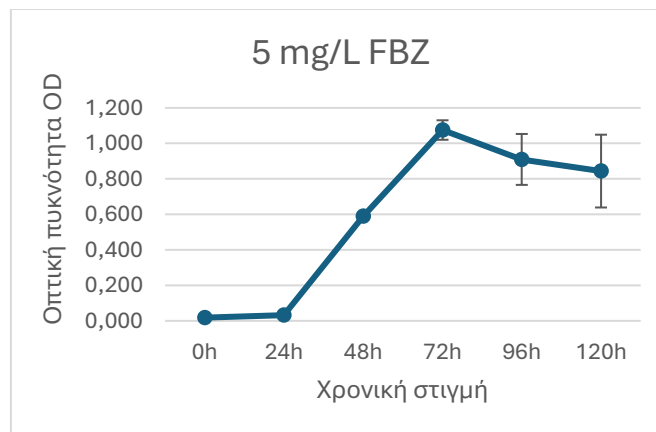
Εικόνα 17. Οπτική πυκνότητα καλλιεργειών ριζοβίου αρνητικού ελέγχου κατά τη διάρκεια των 5 ημερών.



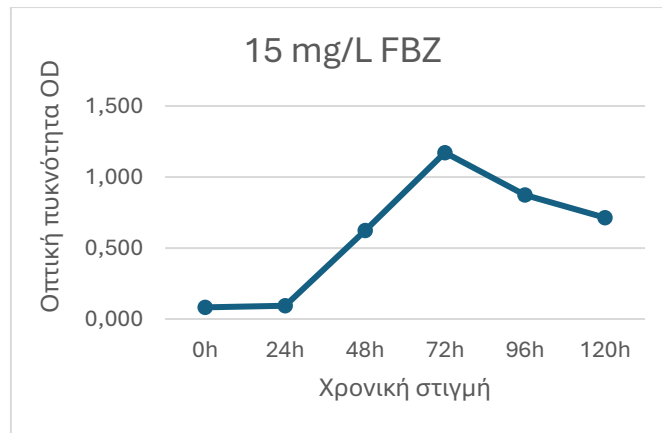
Εικόνα 18. Οπτική πυκνότητα καλλιεργειών ριζοθίου με 0 mg/L FBZ κατά τη διάρκεια των 5 ημερών.



Εικόνα 19. Οπτική πυκνότητα καλλιεργειών ριζοθίου με 0,5 mg/L FBZ κατά τη διάρκεια των 5 ημερών



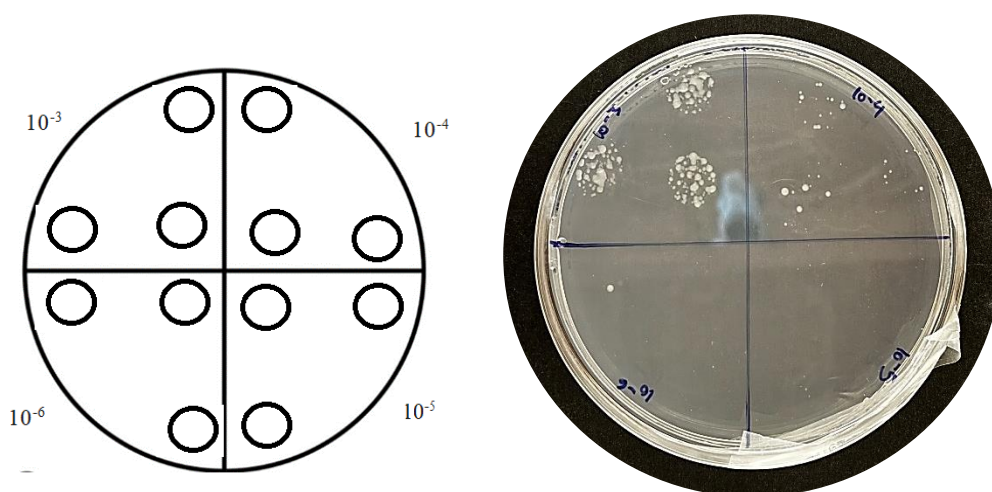
Εικόνα 20. Οπτική πυκνότητα καλλιεργειών ριζοθίου 0,5 mg/L FBZ κατά τη διάρκεια των 5 ημερών



Εικόνα 21. Οπτική πυκνότητα καλλιεργειών ριζοβίου με 15 mg/L FBZ κατά τη διάρκεια των 5 ημερών

3.2.2 Επίδραση φενβενδαζόλης σε στερεές καλλιέργειες *Mesorhizobium loti*

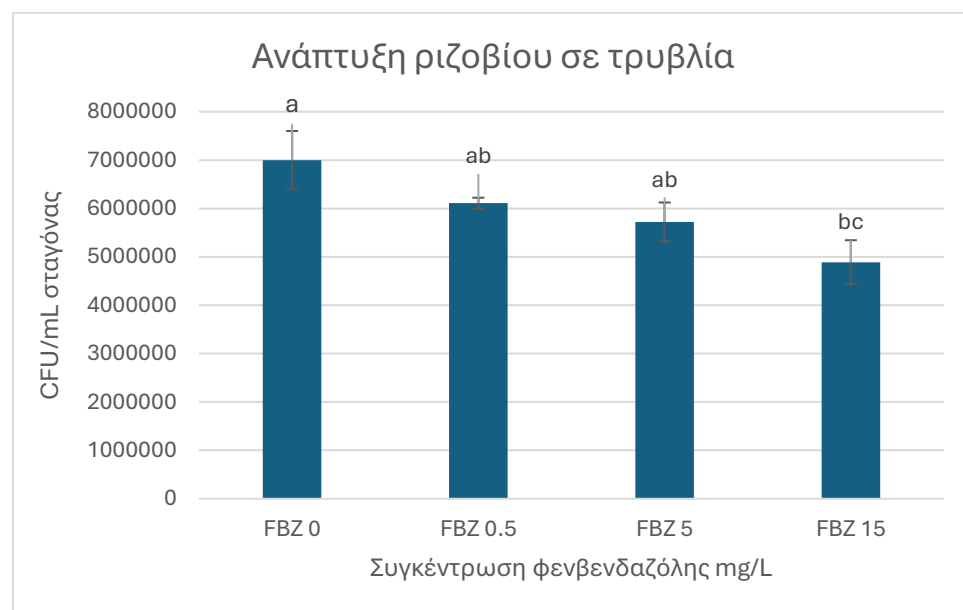
Για να μελετηθεί η πιθανή επίδραση του ανθελμινθικού φαρμάκου φενβενδαζόλη στην ανάπτυξη του βακτηρίου *M. loti*, έγιναν στερεές καλλιέργειες του βακτηρίου με προσθήκη φενβενδαζόλης στο θρεπτικό υπόστρωμα σε 4 διαφορετικές συγκεντρώσεις: 0 FBZ mg/L, 0.5 FBZ mg/L, 5 FBZ mg/L και 15 FBZ mg/L. Η βακτηριακή καλλιέργεια εφαρμόστηκε στην επιφάνεια των τρυβλίων σε μορφή σταγόνων, σε αραιώσεις 10^{-3} , 10^{-4} , 10^{-5} , 10^{-6} της αρχικής καλλιέργειας, όπως φαίνεται στην [Εικόνα 22](#).



Εικόνα 22. Ανάπτυξη των βακτηρίων σε στερεή καλλιέργεια, σε διαφορετικές αραιώσεις της αρχικής βακτηριακής καλλιέργειας: 10^{-3} 1^ο τεταρτημόριο, 10^{-4} 2^ο τεταρτημόριο, 10^{-5} 3^ο τεταρτημόριο, 10^{-6} 4^ο τεταρτημόριο. Παρατηρείται η διαφορά στην ανάπτυξη των βακτηρίων σε κάθε αραιώση.

Όπως φαίνεται στην [εικόνα 22](#), η ανάπτυξη των βακτηρίων ήταν πολύ γρήγορη στην αραιώση 10^{-3} και όλες οι μετρήσεις έγιναν στην αραιώση 10^{-4} .

Αξιολογώντας τα αποτελέσματα, παρατηρήθηκε στατιστικώς σημαντική διαφορά στην ανάπτυξη των βακτηρίων (μείωση στον αριθμό των αποικιών ανά σταγόνα) μεταξύ των συνθηκών 0 mg/L FBZ και 15 mg/L FBZ ([Εικόνα 23](#)).



[Εικόνα 23](#) Ανάπτυξη ριζοβίου σε στερρεή καλλιέργεια παρουσία διαφορετικών συγκεντρώσεων φαρμάκου. Η καταμέτρηση των βακτηριακών αποικιών έγινε στην αραιώση 10^{-4} . Τα διαφορετικά γράμματα στις μπάρες δηλώνουν στατιστικώς σημαντικές διαφορές μεταξύ των χειρισμών.

3.3 Εκτίμηση επίδρασης της φενβενδαζόλης στη φυματιογένεση

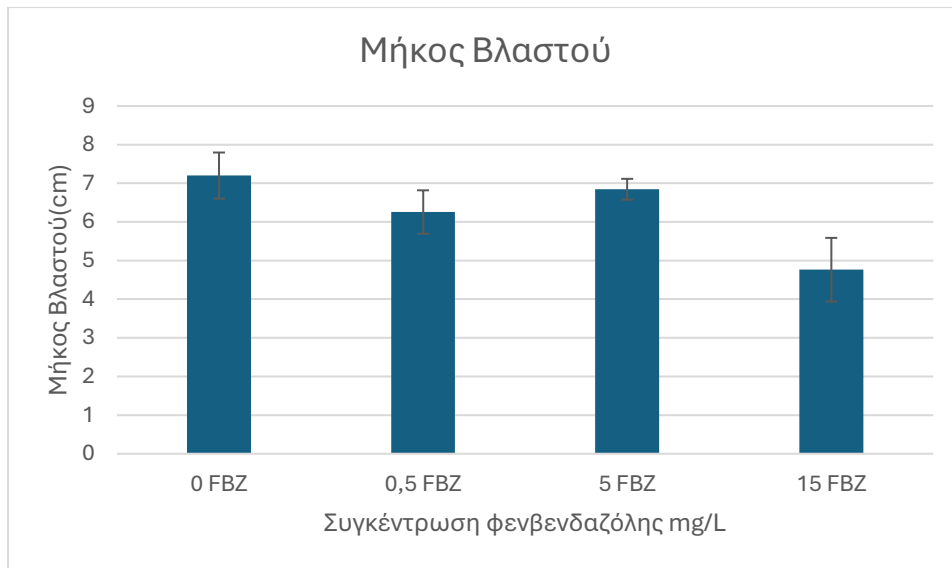
Για να μελετηθεί η πιθανή επίδραση του ανθελμινθικού φαρμάκου φενβενδαζόλη στην συμβιωτική σχέση μεταξύ του ψυχανθούς φυτού *Lotus jaronicus* και του ριζόβιου βακτηρίου *M. loti*, έγινε σύγκριση του αριθμού των φυματίων (ώριμα, ανώριμα) στις ρίζες των φυτών που αναπτύχθηκαν σε διαφορετικές συγκεντρώσεις του φαρμάκου.

Χρησιμοποιήθηκαν τέσσερις συνθήκες φαρμάκου: 0 FBZ mg/L, 0.5 FBZ mg/L, 5 FBZ mg/L και 15 FBZ mg/L. Σε κάθε συνθήκη χρησιμοποιήθηκαν 3 δοχεία magenta με 3 φυτά το καθένα. Κάθε φυτό αποτελεί μια βιολογική επανάληψη. Τα φυτά εμβολιάστηκαν με ριζόβιο, αναπτύχθηκαν για 4 εβδομάδες και συλλέχθηκαν. Η μέτρηση των φυματίων έγινε με χρήση στερεοσκοπίου.

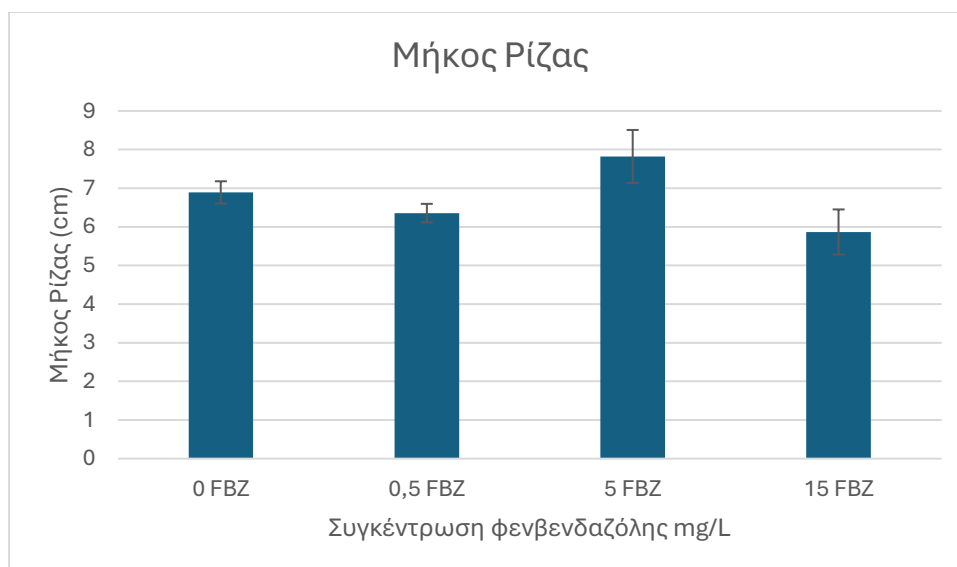
Με τη χρήση του στερεοσκοπίου μπορούμε να διακρίνουμε ώριμα και ανώριμα φυμάτια. Τα ώριμα φυμάτια είναι πλήρως αναπτυγμένα και η συμβίωση έχει εγκαθιδρυθεί. Το αγγειακό σύστημα του φυματίου έχει ολοκληρωθεί και γίνεται μεταφορά θρεπτικών μεταξύ φυτού και βακτηρίου. Τα φυμάτια είναι λειτουργικά και το ατμοσφαιρικό άζωτο μετατρέπεται σε μορφές αξιοποιήσιμες από το φυτό. Τα ώριμα φυμάτια χαρακτηρίζονται από το ροζ/κόκκινο χρώμα τους λόγω ύπαρξης της ψυχανθο-αιμοσφαιρίνης.

Τα ανώριμα φυμάτια έχουν λευκό χρώμα και μικρότερο μέγεθος. Σε αυτά δεν έχει ολοκληρωθεί η οργανογένεση που τα καθιστά λειτουργικά και απουσιάζει η ψυχανθο-αιμοσφαιρίνη.

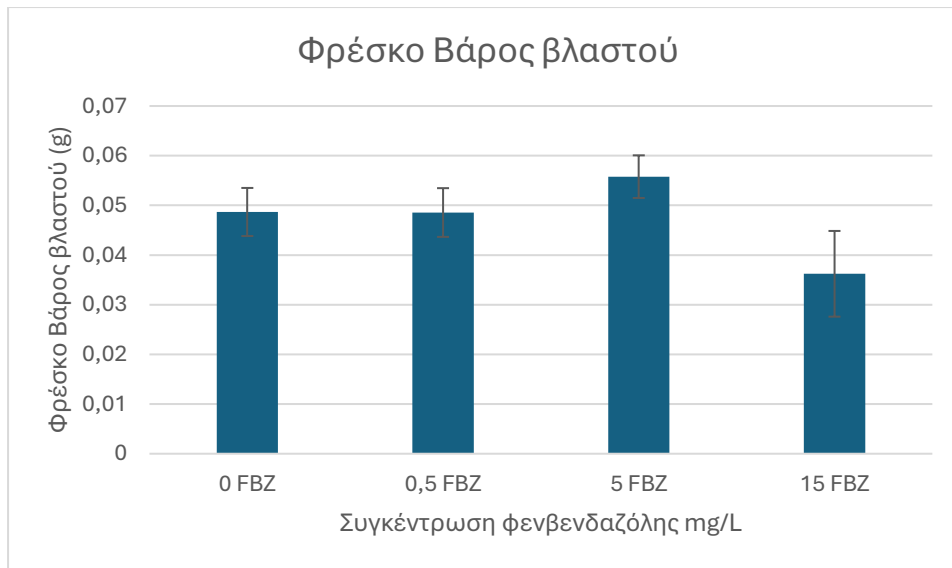
Αρχικά μετρήθηκαν κάποιες παράμετροι ανάπτυξης του φυτού, για να μελετηθεί πιθανή επίδραση του φαρμάκου στη γενικότερη ανάπτυξη των εμβολιασμένων φυτών. Σύμφωνα με τα αποτελέσματα των μετρήσεων για το φρέσκο και ξηρό βάρος βλαστού καθώς και μήκος ρίζας και μήκος βλαστού, δεν παρατηρείται κάποια διαφορά στην ανάπτυξη των φυτών μεταξύ των διάφορων συνθηκών του πειράματος: Μήκος βλαστού (εικόνα 24), Μήκος ρίζας (εικόνα 25), Φρέσκο βάρος βλαστού (εικόνα 26), Ξηρό βάρος βλαστού (εικόνα 27).



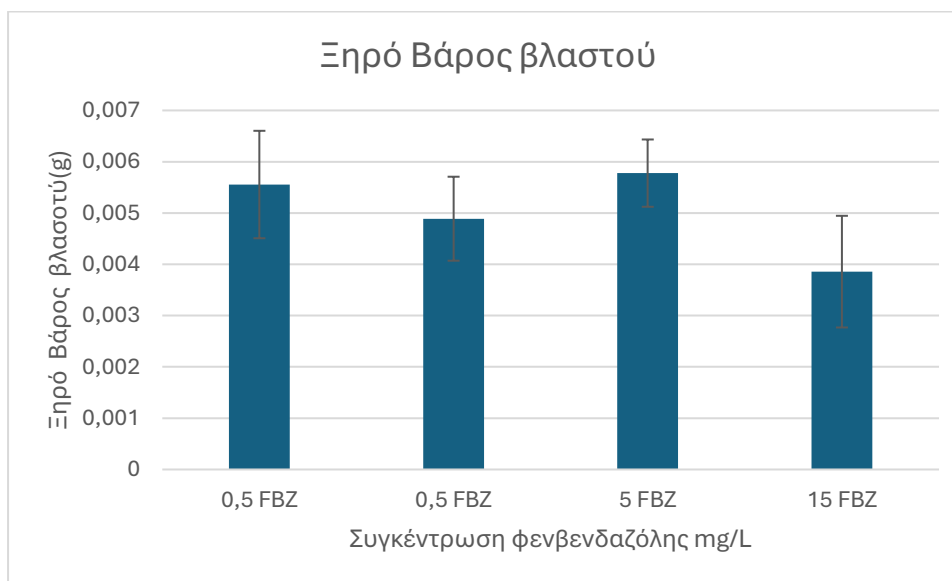
Εικόνα 24. Μέσος όρος μήκους βλαστού όλων των βιολογικών επαναλήψεων κάθε συνθήκης φαρμάκου



Εικόνα 25. Μέσος όρος μήκους ρίζας όλων των βιολογικών επαναλήψεων κάθε συνθήκης φαρμάκου.

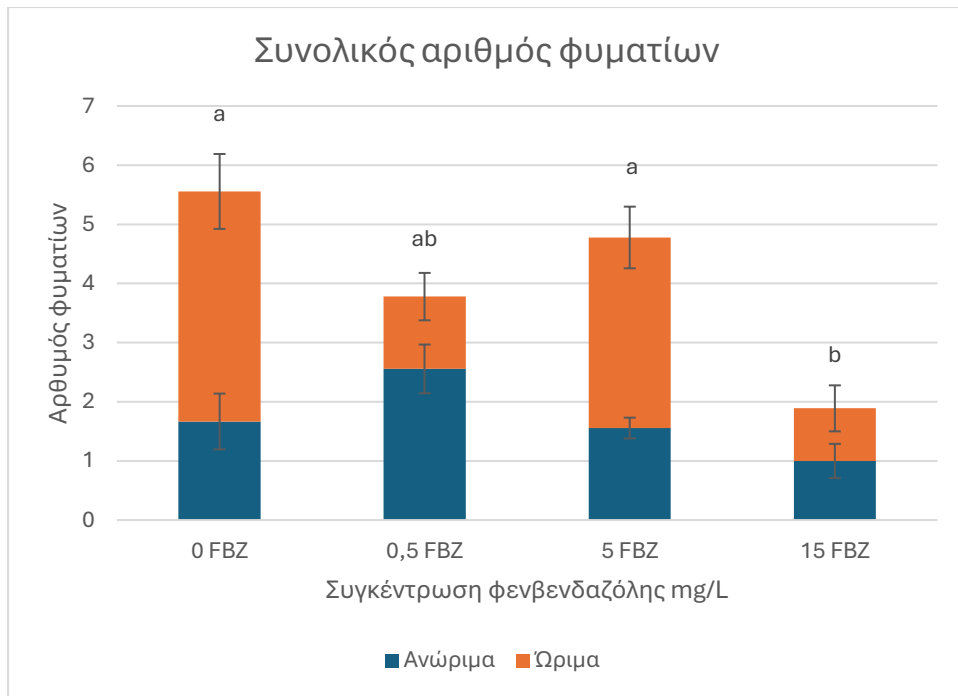


Εικόνα 26. Μέσος όρος φρέσκου βάρους όλων των βιολογικών επαναλήψεων κάθε συνθήκης φαρμάκου



Εικόνα 27. Μέσος όρος ξηρού βάρους όλων των βιολογικών επαναλήψεων κάθε συνθήκης φαρμάκου

Στη συνέχεια πραγματοποιήθηκε μέτρηση των φυματίων. Τα αποτελέσματα από τη μέτρηση του συνολικού αριθμού φυματίων (ώριμα και ανώριμα) απεικονίζονται στην **Εικόνα 28**. Παρατηρείται στατιστικώς σημαντική μείωση στον αριθμό των φυματίων στη συγκέντρωση 15 FBZ mg/L.



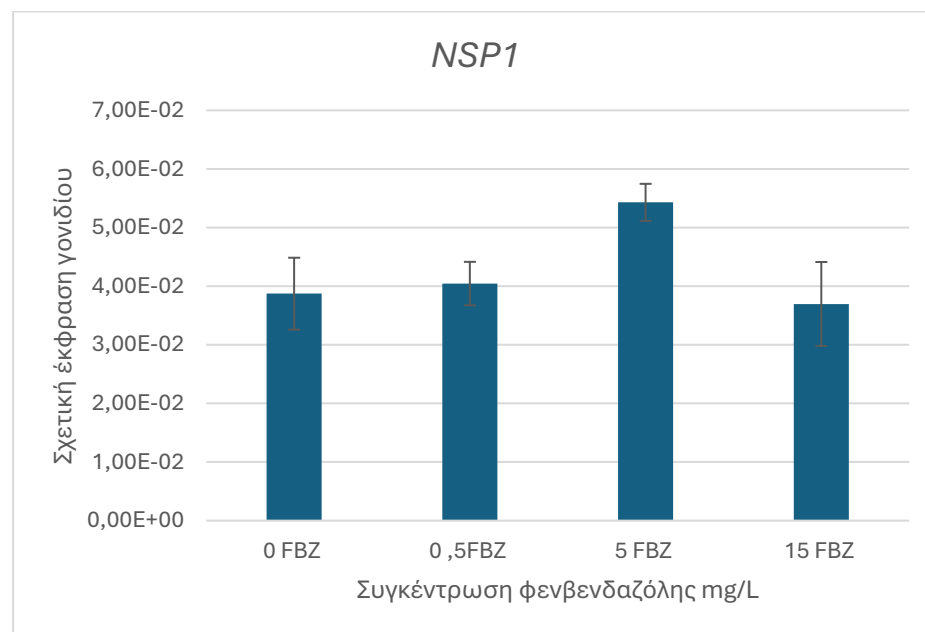
Εικόνα 28. Συνολικός αριθμός φυματίων. Με μπλε χρώμα απεικονίζονται τα ανώριμα φυμάτια, με πορτοκαλί χρώμα τα ώριμα. Τα διαφορετικά γράμματα στις μπάρες δηλώνουν στατιστικές σημαντικές διαφορές μεταξύ των χειρισμών. Η στατιστική ανάλυση πραγματοποιήθηκε στον συνολικό αριθμό των φυματίων (ώριμα και ανώριμα μαζί).

3.4 Έλεγχος έκφρασης γονιδίων που σχετίζονται με τη συμβίωση σε παρουσία φενβενδαζόλης

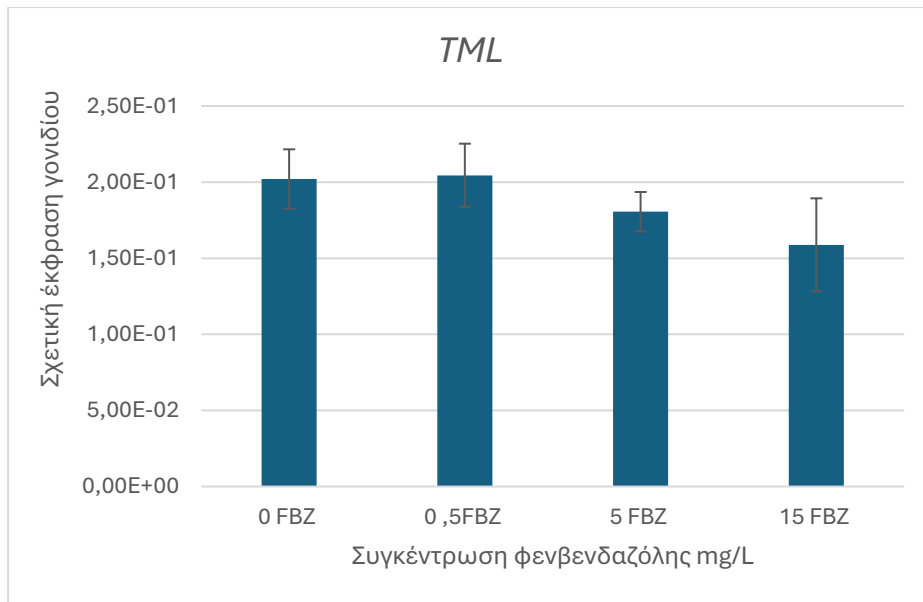
Με σκοπό τη μελέτη των επιπέδων έκφρασης γονιδίων που εμπλέκονται στη συμβίωση μεταξύ του ψυχανθούς *Lotus japonicus* και του ριζοβίου βακτηρίου *Mesorhizobium loti* αναπτύχθηκαν φυτά σε τέσσερις συνθήκες φαρμάκου: 0 FBZ mg/L, 0.5 FBZ mg/L, 5 FBZ mg/L και 15 FBZ mg/L. Σε κάθε συνθήκη χρησιμοποιήθηκαν 4 δοχεία magenta με 6 φυτά το καθένα. Νεαρά φυτάρια 10 ημερών καλλιεργήθηκαν για 5 επιπλέον ημέρες σε παρουσία φαρμάκου και συλλέχθηκαν. Οι ρίζες αποκόπηκαν από το βλαστό στο ύψος του υποκοτυλίου και αποθηκεύτηκαν στους -80 °C. Ακολούθησε απομόνωση ολικού RNA από τις ρίζες, απομάκρυνση του DNA με τη χρήση DNase I, και σύνθεση συμπληρωματικού DNA από RNA (cDNA) από τα RNA δείγματα. Ακολούθησε η κανονικοποίηση των δειγμάτων cDNA και η μελέτη της

έκφρασης των συμβιωτικών γονιδίων *NSP1*, *TML*, *ENDOD2* και *NIN* με ποσοτική PCR πραγματικού χρόνου (qPCR).

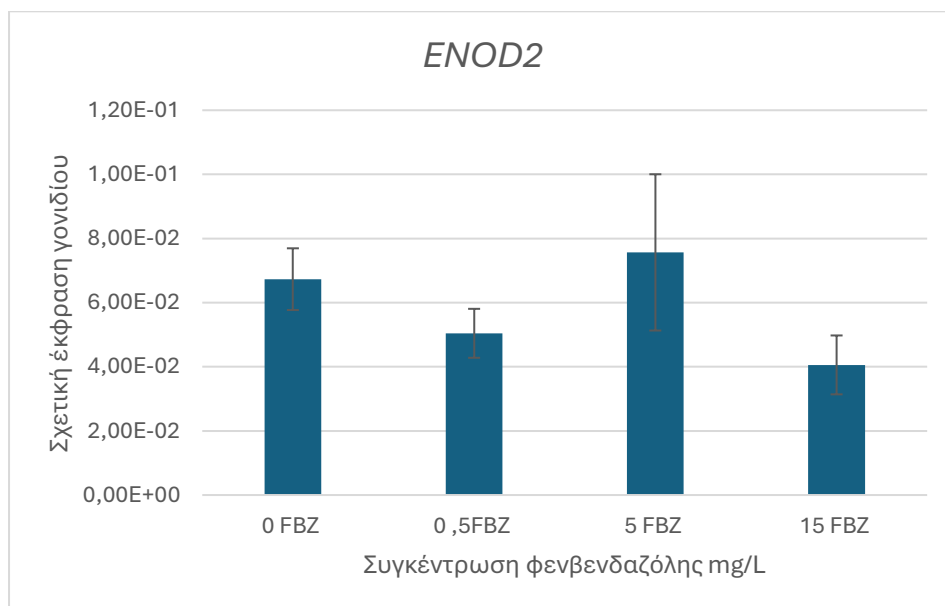
Η ανάλυση των αποτελεσμάτων από τις αντιδράσεις της qPCR δεν εντόπισε στατιστικώς σημαντικές διαφορές μεταξύ των τεσσάρων διαφορετικών συνθηκών εφαρμογής του φαρμάκου. Στα παρακάτω γραφήματα παρουσιάζεται η έκφραση των γονιδίων *NSP1* (εικόνα 29), *TML* (εικόνα 30), *ENDOD2* (εικόνα 31) και *NIN* (εικόνα 32).



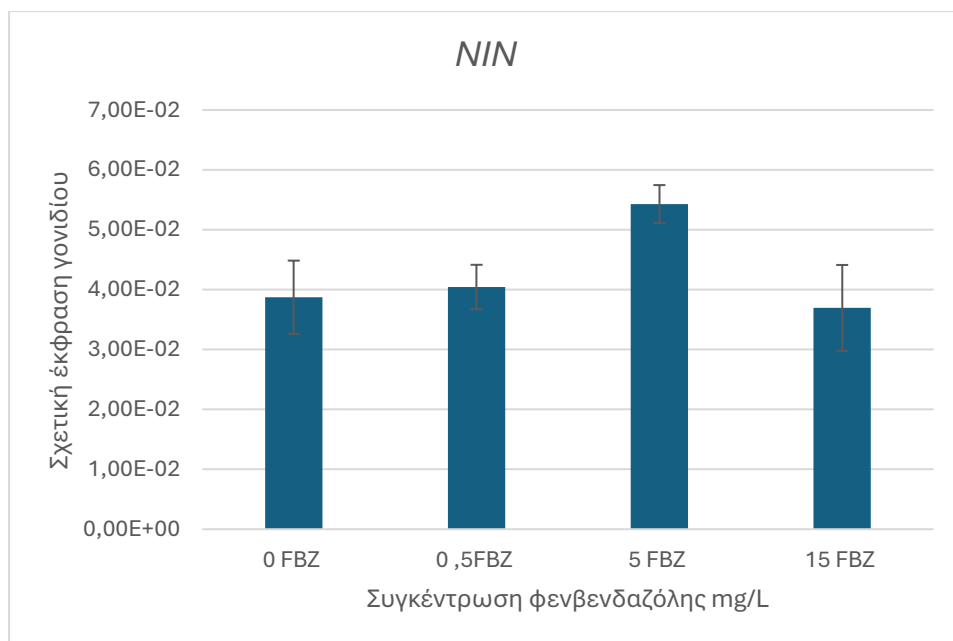
Εικόνα 29. Επίπεδα έκφρασης του γονιδίου *NSP1* μεταξύ των διάφορων συνθηκών.



Εικόνα 30.. Επίπεδα έκφρασης του γονιδίου TML μεταξύ των διάφορων συνθηκών.



Εικόνα 31.. Επίπεδα έκφρασης του γονιδίου ENOD2 μεταξύ των διάφορων συνθηκών.



Εικόνα 32.. Επίπεδα έκφρασης του γονιδίου NIN μεταξύ των διάφορων συνθηκών.

4. Συζήτηση

Οι συμβιωτικές σχέσεις μεταξύ φυτών και ωφέλιμων μικροοργανισμών του εδάφους έχουν καθοριστικό ρόλο στη ανάπτυξη των φυτών και στη διατήρηση γόνιμων εδαφών μέσω ανακύκλωσης θρεπτικών. Οι σχέσεις αυτές, όμως, μπορεί να επηρεαστούν αρνητικά από φάρμακα κτηνιατρικής χρήσης που καταλήγουν σε καλλιεργούμενα εδάφη μέσω της ζωικής κοπριάς.

Σε πρόσφατες έρευνες έχει βρεθεί ότι τα αντιπαρασιτικά φάρμακα μειώνουν τη βιοποικιλότητα του εδάφους και επηρεάζουν τη λειτουργία ωφέλιμων για το περιβάλλον μικροοργανισμών (Lagos et al. 2023). Έχει βρεθεί ότι η παρουσία του ανθελμινθικού παρασιτοκτόνου αλβενδαζόλη σε υποστρώματα ανάπτυξης φυτών *L. jaronicus* που είχαν εμβολιαστεί με τον δενδρόμορφο ενδομυκρριζικό μύκητα *Rhizophagus irregularis* επηρέασε αρνητικά την ωφέλιμη συμβίωση τους (Gkimprixi et al. 2023). Δίνεται έτσι το έναυσμα για νέα έρευνα και μελέτη διαφορετικών φαρμάκων και οργανισμών.

Στην παρούσα πτυχιακή εργασία μελετήθηκε η πιθανή επίδραση του βενζιμιδαζολικού ανθελμινθικού φαρμάκου φενβενδαζόλη στη συμβιωτική σχέση του φυτού-μοντέλου *Lotus jaronicus* και του ριζόβιου βακτηρίου *Mesorhizobium loti* καθώς και στην ανάπτυξη του κάθε οργανισμού χωριστά.

Αρχικά για την αξιολόγηση πιθανής φυτοτοξικής δράσης της φενβενδαζόλης, φυτά *L. jaronicus* αναπτύχθηκαν σε υποστρώματα με παρουσία φενβενδαζόλης σε τέσσερις διαφορετικές συγκεντρώσεις 0, 0.5, 5 και 15 mg/L FBZ. Συγκριτικές μετρήσεις σε (α) μήκος βλαστού και ρίζας και (β) φρέσκο και ξηρό βάρος βλαστού έδειξαν πως δεν παρατηρείται κάποια σημαντική αλλαγή στην ανάπτυξη των φυτών μεταξύ των διαβαθμιζόμενων συγκεντρώσεων φενβενδαζόλης. Το αποτέλεσμα αυτό είναι σε συμφωνία με αποτελέσματα προηγούμενων ερευνών στις οποίες δεν είχε παρατηρηθεί φυτοτοξικότητα του φαρμάκου αλβενδαζόλη (Prchal et al. 2016; Gkimprixi et al. 2023). Η απουσία φυτοτοξικότητας από το φάρμακο φενβενδαζόλη ήταν αναμενόμενη καθώς τα δύο φάρμακα, αλβενδαζόλη και φενβενδαζόλη,

ανήκουν στην ίδια κατηγορία φαρμάκων και έχουν κοινό τρόπο δράσης (Robinson et al. 2004).

Στη συνέχεια μελετήθηκε η πιθανή επίδραση της φενβενδαζόλης στο βακτήριο *M. loti*, και για το σκοπό αυτό εξετάστηκε η ανάπτυξη του βακτηρίου σε υγρές και στερεές καλλιέργειες. Σύμφωνα με τα αποτελέσματα, η παρουσία διαφορετικών συγκεντρώσεων φενβενδαζόλης στο θρεπτικό μέσο ανάπτυξης των βακτηρίων δεν επηρέασε τον ρυθμό ανάπτυξης των ριζοβίων στις υγρές καλλιέργειες. Αντιθέτως, στις στερεές καλλιέργειες παρατηρήθηκε στατιστικώς σημαντική μείωση στον αριθμό των αποικιών που σχηματίζει το βακτήριο, όταν εφαρμόστηκε η υψηλή συγκέντρωση του φαρμάκου (15 mg/L FBZ). Παρόλο που οι μικροσωληνίσκοι δεν έχουν μελετηθεί στο ριζόβιο βακτήριο *M. loti*, είναι γνωστό πως οι προκαρυωτικοί οργανισμοί διαθέτουν κυτοσκελετό (Bi και Lutkenhaus, 1991), επομένως είναι πιθανό η υψηλή συγκέντρωση της φενβενδαζόλης να επηρεάζει την ανάπτυξη των βακτηρίων αναστέλλοντας τη σύνθεση μικροσωληνίσκων.

Για την αξιολόγηση της πιθανής επίδρασης της φενβενδαζόλης στη συμβιωτική σχέση ριζοβίου-ψυχανθούς, αναπτύχθηκαν φυτά *L. japonicus* εμβολιασμένα με *M. loti* σε τέσσερις διαφορετικές συγκεντρώσεις φαρμάκου 0, 0,5, 5, 15 mg/L FBZ και ακολούθησε καταμέτρηση του αριθμού των φυματίων που σχηματίστηκαν στις ρίζες. Αξιολογώντας τα αποτελέσματα παρατηρήθηκε στατιστικώς σημαντική πτώση στον συνολικό αριθμό των φυματίων μεταξύ των συνθηκών 0 mg/L και 15 mg/L FBZ. Αποτέλεσμα που μπορεί να υποδεικνύει είτε αδυναμία μόλυνσης των φυτών από το ριζόβιο λόγω παρουσίας φενβενδαζόλης, είτε αδυναμία ανάπτυξης των βακτηρίων.

Για να εξεταστεί πιθανή επίδραση της φενβενδαζόλης στα αρχικά στάδια της συμβιωτικής σχέσης εξετάστηκε η έκφραση σημαντικών γονιδίων του φυτού που εμπλέκονται στην εγκαθίδρυση της συμβιωτικής σχέσης. Συγκεκριμένα, εξετάστηκαν τα γονίδια *NSP1* (Nodulation Signaling Pathway 1), *NIN* (Nodule Inception), *ENOD2* (Early Nodulin 2) και *TML* (TOO MUCH LOVE).

Η οργάνωση των φυματίων ξεκινάει με την αναγνώριση των nod παραγόντων από ειδικούς διαμεμβρανικούς υποδοχείς (Madsen et al. 2003; Radutoiu et al. 2003). Μετά την αναγνώριση των nod παραγόντων ξεκινά ένα σηματοδοτικό μονοπάτι και

καταλήγει στην ενεργοποίηση των γονιδίων *NSP1*, *NSP2*. Τα προϊόντα αυτών των γονιδίων δρουν σαν μεταγραφικοί παράγοντες και ενεργοποιούν γονίδια που επάγουν τη φυματιογένεση όπως το *NIN* και μία ειδική κατηγορία γονιδίων που ονομάζονται πρώιμες νοντουλίνες (Early nodulins) (Eckardt 2009).

Μετά την ενεργοποίηση του από το παράγοντα *NSP1*, τα επίπεδα έκφρασής του αυξάνονται δραματικά. Ο παράγοντας *NIN* δρα ως μεταγραφικός παράγοντας ενεργοποιώντας σηματοδοτικά μονοπάτια που επάγουν τη φυματιογένεση (Vernié et al. 2015). Ενεργοποιεί γονίδια για κυτοκίνινες και ορμόνες που εμπλέκονται στη κυτταρική διαίρεση, στον πολλαπλασιασμό και στη διαφοροποίηση των κυττάρων στη ζώνη του μελλοντικού φυματίου. Το γονίδιο *NIN* (Nodule Inception) θεωρείται ένα από τα πιο βασικά γονίδια για τη φυματιογένεση καθώς σε μεταλλάγματα με απώλεια λειτουργικότητας του παράγοντα *NIN* δεν παρατηρούνται φυμάτια.

Το γονίδιο *ENOD2* κωδικοποιεί για μία πρώιμη νοντουλίνη, η οποία, σε αντίθεση με το γονίδιο *NIN*, δεν δρα ως μεταγραφικός παράγοντας, αλλά εκφράζει μια γλυκοπρωτεΐνη πλούσια σε (υδροξύ)προλίνη, που εντοπίζεται στα κυτταρικά τοιχώματα. Το γονίδιο *ENOD2* εκφράζεται στα κύτταρα του φλοιού της ρίζας που περιβάλλουν την περιοχή του φυματίου που έχει μολυνθεί από τα ριζόβια. Η προτεινόμενη δράση της είναι η τροποποίηση του κυτταρικού τοιχώματος για την οργάνωση του φυματίου. Εμπλέκεται στην ανάπτυξη του φυματίου και όχι στη διαδικασία της μόλυνσης του φυτού από το ριζόβιο (Franssen et al, 1987).

Το γονίδιο *TML* (TOO MUCH LOVE) είναι ένα γονίδιο που ρυθμίζει τη συμβίωση σύμφωνα με τις ανάγκες του φυτού. Εμπλέκεται στο μονοπάτι της αυτορρύθμισης της φυματιογένεσης (AON). Πρόκειται για μια F-box πρωτεΐνη που ρυθμίζει αρνητικά τη συμβίωση. Αποτελεί τμήμα του συμπλόκου της E3 λιγάσης της ουβικιτίνης και αναστέλλει (με έναν άγνωστο μέχρι και σήμερα μηχανισμό) την συμβιωτική αλληλεπίδραση μεταξύ ριζοβίων- ψυχανθών (Takahara et al. 2013).

Στην παρούσα εργασία, η έκφραση των γονιδίων αυτών μελετήθηκε σε αρχικά στάδια κατά την εγκαθίδρυση της συμβιωτικής σχέσης, πέντε ημέρες μετά τον εμβολιασμό με το ριζόβιο, και δεν παρατηρήθηκε κάποια στατιστικώς σημαντική διαφορά στην έκφραση των γονιδίων μεταξύ των τεσσάρων συνθηκών φενβενδαζόλης.

Παρόλο που δεν παρατηρήθηκε κάποια σημαντική αλλαγή στη γονιδιακή έκφραση, ο μειωμένος αριθμός φυματίων στην υψηλή συγκέντρωση φενβενδαζόλης δείχνει πως η συμβίωση επηρεάζεται σε κάποιο βαθμό από τη παρουσία του φαρμάκου. Τα γονίδια που εξετάστηκαν εμπλέκονται στα αρχικά στάδια της συμβίωσης χωρίς να έχουμε στοιχεία για τις αλλαγές που συμβαίνουν σε μοριακό επίπεδο στα μεταγενέστερα στάδια της.

Είναι επομένως σημαντικό να διερευνηθεί περαιτέρω η επίδραση της φενβενδαζόλης στη συμβιωτική σχέση ψυχανθών-ριζοβίων. Η διατάραξη αυτών των συμβιωτικών σχέσεων μπορεί να έχει πολύ αρνητικές επιπτώσεις στις καλλιέργειες και στα καλλιεργήσιμα εδάφη.

ΒΙΒΛΙΟΓΡΑΦΙΑ

1. Aksit, D., Yalinkilinc, H. S., Sekkin, S., Boyacioğlu, M., Cirak, V. Y., Ayaz, E., & Gokbulut, C. (2015). Comparative pharmacokinetics and bioavailability of albendazole sulfoxide in sheep and goats, and dose-dependent plasma disposition in goats. *BMC Veterinary Research*, 11(1). <https://doi.org/10.1186/s12917-015-0442-5>
2. Bernhard, A. (2010). The Nitrogen Cycle: Processes, Players, and Human Impact. *Nature Education Knowledge*, 3(10).
3. Bi, E., & Lutkenhaus, J. (1991). FtsZ ring structure associated with division in *Escherichia coli*. *Nature*, 354(6349). <https://doi.org/10.1038/354161a0>
4. Buist, G., Steen, A., Kok, J., & Kuipers, O. P. (2008). LysM, a widely distributed protein motif for binding to (peptido)glycans. In *Molecular Microbiology* (Vol. 68, Issue 4). <https://doi.org/10.1111/j.1365-2958.2008.06211.x>
5. Campbell, W. C. (1990). Benzimidazoles: Veterinary uses. *Parasitology Today*, 6(4). [https://doi.org/10.1016/0169-4758\(90\)90231-R](https://doi.org/10.1016/0169-4758(90)90231-R)
6. Catoira, R., Galera, C., De Billy, F., Penmetsa, R. V., Journet, E. P., Maillet, F., Rosenberg, C., Cook, D., Gough, C., & Denarie, J. (2000). Four genes of *Medicago truncatula* controlling components of a Nod factor transduction pathway. *Plant Cell*, 12(9). <https://doi.org/10.1105/tpc.12.9.1647>
7. DE FARIA, S. M., LEWIS, G. P., SPRENT, J. I., & SUTHERLAND, J. M. (1989). Occurrence of nodulation in the Leguminosae. *New Phytologist*, 111(4). <https://doi.org/10.1111/j.1469-8137.1989.tb02354.x>
8. Dénarié, J., Debellé, F., & Promé, J. C. (1996). Rhizobium lipochitooligosaccharide nodulation factors: Signaling molecules mediating recognition and morphogenesis. In *Annual Review of Biochemistry* (Vol. 65). <https://doi.org/10.1146/annurev.bi.65.070196.002443>
9. Eckardt, N. A. (2009). Nodulation Signaling in Legumes Depends on an NSP1-NSP2 Complex. *The Plant Cell*, 21(2). <https://doi.org/10.1105/tpc.109.210214>
10. Ehrhardt, D. W., Wais, R., & Long, S. R. (1996). Calcium spiking in plant root hairs responding to rhizobium modulation signals. *Cell*, 85(5). [https://doi.org/10.1016/S0092-8674\(00\)81234-9](https://doi.org/10.1016/S0092-8674(00)81234-9)
11. Endre, G., Kereszt, A., Kevei, Z., Mihacea, S., Kaló, P., & Kiss, G. B. (2002). A receptor kinase gene regulating symbiotic nodule development. *Nature*, 417(6892). <https://doi.org/10.1038/nature00842>

12. Finan, T. M. (2002). Evolving insights: Symbiosis islands and horizontal gene transfer. In *Journal of Bacteriology* (Vol. 184, Issue 11). <https://doi.org/10.1128/JB.184.11.2855-2856.2002>
13. Gkimprixi, E., Lagos, S., Nikolaou, C. N., Karpouzas, D. G., & Tsikou, D. (2023). Veterinary drug albendazole inhibits root colonization and symbiotic function of the arbuscular mycorrhizal fungus *Rhizophagus irregularis*. *FEMS Microbiology Ecology*, 99(6). <https://doi.org/10.1093/femsec/fiad048>
14. Gleason, C., Chaudhuri, S., Yang, T., Muñoz, A., Poovaiah, B. W., & Oldroyd, G. E. D. (2006). Nodulation independent of rhizobia induced by a calcium-activated kinase lacking autoinhibition. *Nature*, 441(7097). <https://doi.org/10.1038/nature04812>
15. Graham, P. H., & Vance, C. P. (2003). Legumes: Importance and constraints to greater use. In *Plant Physiology* (Vol. 131, Issue 3). <https://doi.org/10.1104/pp.017004>
16. Handberg, K., & Stougaard, J. (1992). *Lotus japonicus*, an autogamous, diploid legume species for classical and molecular genetics. *The Plant Journal*, 2(4). <https://doi.org/10.1111/j.1365-313X.1992.00487.x>
17. Hirsch, S., Kim, J., Muñoz, A., Heckmann, A. B., Downie, J. A., & Oldroyd, G. E. D. (2009). GRAS Proteins Form a DNA Binding Complex to Induce Gene Expression during Nodulation Signaling in *Medicago truncatula*. *Plant Cell*, 21(2). <https://doi.org/10.1105/tpc.108.064501>
18. Hirsch, S., & Oldroyd, G. E. D. (2009). GRAS-domain transcription factors that regulate plant development. In *Plant Signaling and Behavior* (Vol. 4, Issue 8). <https://doi.org/10.4161/psb.4.8.9176>
19. Hofmann, N. R. (2016). A structure for plant-specific transcription factors: The gras domain revealed. In *Plant Cell* (Vol. 28, Issue 5). <https://doi.org/10.1105/tpc.16.00309>
20. Kelly, S., Sullivan, J., Ronson, C., Tian, R., Bräu, L., Munk, C., Goodwin, L., Han, C., Woyke, T., Reddy, T., Huntemann, M., Pati, A., Mavromatis, K., Markowitz, V., Ivanova, N., Kyrpides, N., & Reeve, W. (2014). Genome sequence of the *Lotus* spp. microsymbiont *Mesorhizobium loti* strain R7A. *Standards in Genomic Sciences*, 9(1). <https://doi.org/10.1186/1944-3277-9-6>
21. Krusell, L., Madsen, L. H., Sato, S., Aubert, G., Genua, A., Szczyglowski, K., Duc, G., Kaneko, T., Tabata, S., De Bruijn, F., Pajuelo, E., Sandal, N., & Stougaard, J.

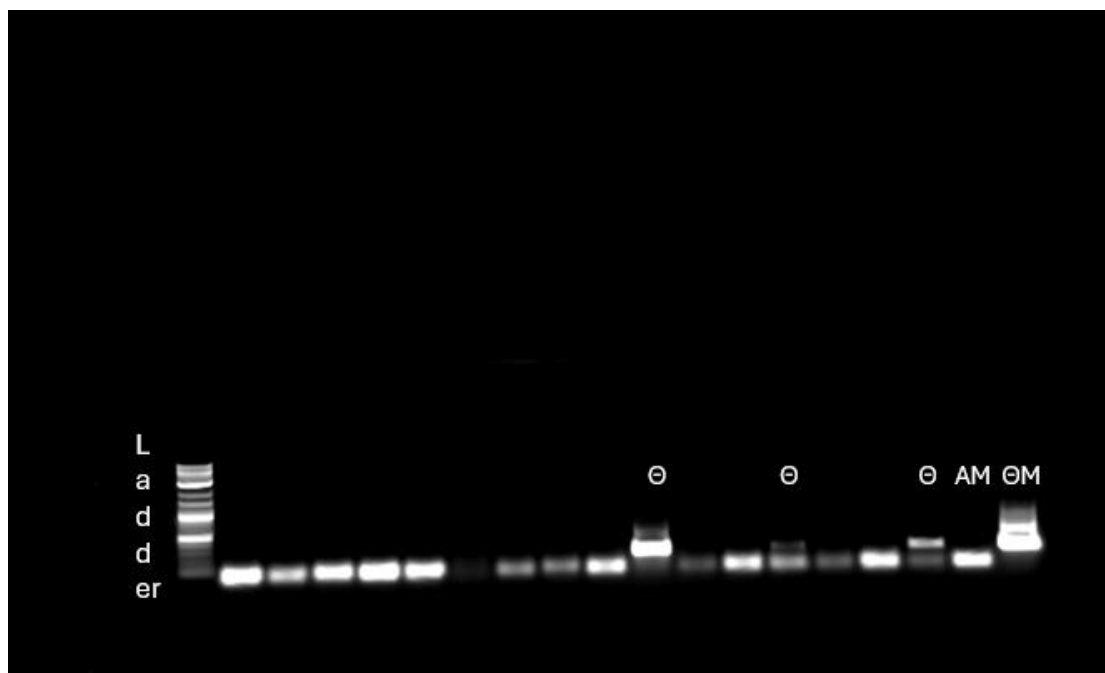
- (2002). Shoot control of root development and nodulation is mediated by a receptor-like kinase. *Nature*, 420(6914). <https://doi.org/10.1038/nature01207>
22. Lacey, E. (1990). Mode of action of benzimidazoles. *Parasitology Today*, 6(4). [https://doi.org/10.1016/0169-4758\(90\)90227-U](https://doi.org/10.1016/0169-4758(90)90227-U)
 23. Lagos, S., Tsetsekos, G., Mastrogianopoulos, S., Tyligada, M., Diamanti, L., Vasileiadis, S., Sotiraki, S., & Karpouzas, D. G. (2023). Interactions of anthelmintic veterinary drugs with the soil microbiota: Toxicity or enhanced biodegradation? *Environmental Pollution*, 334. <https://doi.org/10.1016/j.envpol.2023.122135>
 24. Lévy, J., Bres, C., Geurts, R., Chalhoub, B., Kulikova, O., Duc, G., Journet, E. P., Ané, J. M., Lauber, E., Bisseling, T., Dénarié, J., Rosenberg, C., & Debellé, F. (2004). A Putative Ca²⁺ and Calmodulin-Dependent Protein Kinase Required for Bacterial and Fungal Symbioses. *Science*, 303(5662). <https://doi.org/10.1126/science.1093038>
 25. Madsen, E. B., Madsen, L. H., Radutoiu, S., Olbryt, M., Rakwalska, M., Szczyglowski, K., Sato, S., Kaneko, T., Tabata, S., Sandal, N., & Stougaard, J. (2003). A receptor kinase gene of the LysM type is involved in legume perception of rhizobial signals. *Nature*, 425(6958). <https://doi.org/10.1038/nature02045>
 26. Martin, R. J. (1997). Modes of action of anthelmintic drugs. In *Veterinary Journal* (Vol. 154, Issue 1). [https://doi.org/10.1016/S1090-0233\(05\)80005-X](https://doi.org/10.1016/S1090-0233(05)80005-X)
 27. McKELLAR, Q. A., & SCOTT, E. W. (1990). The benzimidazole anthelmintic agents- a review. In *Journal of Veterinary Pharmacology and Therapeutics* (Vol. 13, Issue 3). <https://doi.org/10.1111/j.1365-2885.1990.tb00773.x>
 28. Okuma, N., & Kawaguchi, M. (2021). Systemic Optimization of Legume Nodulation: A Shoot-Derived Regulator, miR2111. In *Frontiers in Plant Science* (Vol. 12). <https://doi.org/10.3389/fpls.2021.682486>
 29. Oláh, B., Brière, C., Bécard, G., Dénarié, J., & Gough, C. (2005). Nod factors and a diffusible factor from arbuscular mycorrhizal fungi stimulate lateral root formation in *Medicago truncatula* via the DMI1/DMI2 signalling pathway. *Plant Journal*, 44(2). <https://doi.org/10.1111/j.1365-313X.2005.02522.x>
 30. Oldroyd, G. E. D. (2013). Speak, friend, and enter: Signalling systems that promote beneficial symbiotic associations in plants. In *Nature Reviews Microbiology* (Vol. 11, Issue 4). <https://doi.org/10.1038/nrmicro2990>

31. Poole, R. K., & Hill, S. (1997). Respiratory protection of nitrogenase activity in *Azotobacter vinelandii* - Roles of the terminal oxidases. In *Bioscience Reports* (Vol. 17, Issue 3). <https://doi.org/10.1023/A:1027336712748>
32. Radutoiu, S., Madsen, L. H., Madsen, E. B., Felle, H. H., Umehara, Y., Grønlund, M., Sato, S., Nakamura, Y., Tabata, S., Sandal, N., & Stougaard, J. (2003). Plant recognition of symbiotic bacteria requires two LysM receptor-like kinases. *Nature*, 425(6958). <https://doi.org/10.1038/nature02039>
33. Robinson, M. W., McFerran, N., Trudgett, A., Hoey, L., & Fairweather, I. (2004). A possible model of benzimidazole binding to β -tubulin disclosed by invoking an inter-domain movement. *Journal of Molecular Graphics and Modelling*, 23(3). <https://doi.org/10.1016/j.jmgm.2004.08.001>
34. Schnabel, E., Journet, E. P., De Carvalho-Niebel, F., Duc, G., & Frugoli, J. (2005). The *Medicago truncatula* SUNN gene encodes a CLV1-like leucine-rich repeat receptor kinase that regulates nodule number and root length. *Plant Molecular Biology*, 58(6). <https://doi.org/10.1007/s11103-005-8102-y>
35. Soyano, T., Hirakawa, H., Sato, S., Hayashi, M., & Kawaguchi, M. (2014). NODULE INCEPTION creates a long-distance negative feedback loop involved in homeostatic regulation of nodule organ production. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 111(40). <https://doi.org/10.1073/pnas.1412716111>
36. Takahara, M., Magori, S., Soyano, T., Okamoto, S., Yoshida, C., Yano, K., Sato, S., Tabata, S., Yamaguchi, K., Shigenobu, S., Takeda, N., Suzaki, T., & Kawaguchi, M. (2013). TOO MUCH LOVE, a novel kelch repeat-containing F-box protein, functions in the long-distance regulation of the LEGUME-rhizobium symbiosis. *Plant and Cell Physiology*, 54(4). <https://doi.org/10.1093/pcp/pct022>
37. Tirichine, L., Imaizumi-Anraku, H., Yoshida, S., Murakami, Y., Madsen, L. H., Miwa, H., Nakagawa, T., Sandal, N., Albrechtsen, A. S., Kawaguchi, M., Downie, A., Sato, S., Tabata, S., Kouchi, H., Parniske, M., Kawasaki, S., & Stougaard, J. (2006). Deregulation of a Ca^{2+} /calmodulin-dependent kinase leads to spontaneous nodule development. *Nature*, 441(7097). <https://doi.org/10.1038/nature04862>
38. Tsikou, D., Yan, Z., Holt, D. B., Abel, N. B., Reid, D. E., Madsen, L. H., Bhasin, H., Sexauer, M., Stougaard, J., & Markmann, K. (2018). Systemic control of legume susceptibility to rhizobial infection by a mobile microRNA. *Science*, 362(6411). <https://doi.org/10.1126/science.aat6907>

39. Turgeon BG, Bauer WD. 1985. Ultrastructure of infection-thread development during the infection of soybean by *Rhizobium japonicum*. *Planta* 163:328–49
40. Vernié, T., Kim, J., Frances, L., Ding, Y., Sun, J., Guan, D., Niebel, A., Gifford, M. L., de Carvalho-Niebel, F., & Oldroyd, G. E. D. (2015). The NIN transcription factor coordinates diverse nodulation programs in different tissues of the *medicago truncatula* root. *Plant Cell*, 27(12). <https://doi.org/10.1105/tpc.15.00461>
41. Wekesa, C., Jalloh, A. A., Muoma, J. O., Korir, H., Omenge, K. M., Maingi, J. M., Furch, A. C. U., & Oelmüller, R. (2022). Distribution, Characterization and the Commercialization of Elite Rhizobia Strains in Africa. In *International Journal of Molecular Sciences* (Vol. 23, Issue 12). <https://doi.org/10.3390/ijms23126599>
42. Yamaguchi, Y. L., Ishida, T., & Sawa, S. (2016). CLE peptides and their signaling pathways in plant development. In *Journal of Experimental Botany* (Vol. 67, Issue 16). <https://doi.org/10.1093/jxb/erw208>

ΠΑΡΑΡΤΗΜΑ

Αποτελέσματα ηλεκτροφόρησης δειγμάτων μετά από χειρισμό με DNase I: [Εικόνα 33](#).



[Εικόνα 33](#). Αποτελέσματα ηλεκτροφόρησης

Οι στατιστική υπολογισμοί έγιναν με τον κώδικα R :

```
value<-c(1,1,3,4,5,5,5,5,3,3,3,4,5,5,6,7,7,0,0,0,1,2,3,3,3,5)
```

```
group1 <- c(rep("0,5", 9), rep("5", 9), rep("15", 9))
```

```
my.dataframe<-data.frame(value, group1)
```

```
res.aov <- aov(value ~ group1, data = my.dataframe)
```

```
summary(res.aov)
```

```
TukeyHSD(res.aov)
```

Για το πείραμα της φυτοτοξικότητας

Root length							
Pair	Difference	SE	Q	Lower CI	Upper CI	Critical Mean	p-value
0 FBZ-0,5 FBZ	0.4458	0.8439	0.5283	-27.159	36.075	31.617	0.982
0 FBZ-5FBZ	0.5625	0.8301	0.6776	-25.478	36.728	31.103	0.9634
0 FBZ - 15 FBZ	0.4375	0.8966	0.4879	-2.922	3.797	33.595	0.9857
0,5 BFZ -5 FBZ	0.1167	0.8439	0.1383	-3.045	32.784	31.617	0.9997
0,5 FBZ-15 FBZ	0.8833	0.9094	0.9714	-25.238	42.905	34.072	0.9017
5 FBZ-15FBZ	1	0.8966	11.153	-23.595	43.595	33.595	0.8593

Shoot length							
Pair	Difference	SE	Q	Lower CI	Upper CI	Critical Mean	p-value
0 FBZ-0,5 FBZ	0.4375	0.4429	0.9878	-12.219	20.969	16.594	0.8972
0 FBZ-5FBZ	0.3167	0.4502	0.7034	-13.702	20.035	16.869	0.9593
0 FBZ - 15 FBZ	0	0.4784	0	-17.924	17.924	17.924	1
0,5 BFZ -5 FBZ	0.1208	0.4502	0.2684	-1.566	18.077	16.869	0.9975
0,5 FBZ-15 FBZ	0.4375	0.4784	0.9145	-13.549	22.299	17.924	0.9163
5 FBZ-15FBZ	0.3167	0.4852	0.6527	-15.012	21.345	18.178	0.9671

Fresh weight							
Pair	Difference	SE	Q	Lower CI	Upper CI	Critical Mean	p-value
0 FBZ-0,5 FBZ	24.375	54.425	0.4479	-179.215	227.965	20.359	0.9889
0 FBZ-5FBZ	24.375	54.425	0.4479	-179.215	227.965	20.359	0.9889
0 FBZ -15 FBZ	0.9554	56.335	0.1696	-201.183	22.029	210.736	0.9994
0,5 BFZ-5 FBZ	0	54.425	0	-20.359	20.359	20.359	1
0,5 FBZ-15 FBZ	33.929	56.335	0.6023	-176.808	244.665	210.736	0.9738
5 FBZ-15FBZ	33.929	56.335	0.6023	-176.808	244.665	210.736	0.9738

Dry weight							
Pair	Difference	SE	Q	Lower CI	Upper CI	Critical Mean	p-value
0 FBZ-0,5 FBZ	0.6875	0.7013	0.9803	-17.201	30.951	24.076	0.7687
0 FBZ-5FBZ	0.2054	0.7259	0.2829	-22.868	26.975	24.921	0.9782
0,5 BFZ-5 FBZ	0.4821	0.7259	0.6642	-2.01	29.743	24.921	0.8859

Για το φαινοτυπικό πείραμα :

Root length							
Pair	Difference	SE	Q	Lower CI	Upper CI	Critical Mean	p-value
0 FBZ-0,5 FBZ	0.75	0.5371	13.965	-12.571	27.571	20.071	0.7571
0 FBZ-5FBZ	0.6083	0.5459	11.143	-14.319	26.486	20.402	0.8597
0 FBZ -15 FBZ	0.05147	0.5291	0.09728	-19.259	20.288	19.773	0.9999
0,5 BFZ-5 FBZ	13.583	0.5459	2.488	-0.6819	33.986	20.402	0.3029
0,5 FBZ-15 FBZ	0.8015	0.5291	15.148	-11.759	27.788	19.773	0.7083
5 FBZ-15FBZ	0.5569	0.5381	10.348	-14.541	25.679	2.011	0.884

Fresh weight							
Pair	Difference	SE	Q	Lower CI	Upper CI	Critical Mean	p-value
0 FBZ-0,5 FBZ	35.556	61.052	0.5824	-191.842	262.953	227.398	0.9763
0 FBZ-5FBZ	60.556	61.052	0.9919	-166.842	287.953	227.398	0.8962
0 FBZ -15 FBZ	22.222	61.052	0.364	-205.176	24.962	227.398	0.994
0,5 BFZ-5 FBZ	96.111	61.052	15.742	-131.287	323.509	227.398	0.6827
0,5 FBZ-15 FBZ	13.333	61.052	0.2184	-214.064	240.731	227.398	0.9987
5 FBZ-15FBZ	82.778	61.052	13.559	-14.462	310.176	227.398	0.7732

Dry weight							
Pair	Difference	SE	Q	Lower CI	Upper CI	Critical Mean	p-value
x1-x2	0.05556	0.6108	0.09096	-20.348	21.459	20.904	0.9977
x1-x3	11.587	0.6529	17.747	-1.076	33.934	22.347	0.4275
x2-x3	11.032	0.6529	16.896	-11.315	33.379	22.347	0.4622

Total nodules							
Pair	Difference	SE	Q	Lower CI	Upper CI	Critical Mean	p-value
0 FBZ-0,5 FBZ	17.778	0.5408	32.875	-0.2943	38.498	2.072	0.1136
0 FBZ-5FBZ	0.7778	0.5408	14.383	-12.943	28.498	2.072	0.7408
0 FBZ -15 FBZ	36.667	0.5408	67.804	15.946	57.387	2.072	0.0002028
0,5 BFZ -5 FBZ	1	0.5408	18.492	-1.072	3.072	2.072	0.565
0,5 FBZ-15 FBZ	18.889	0.5408	34.929	-0.1832	39.609	2.072	0.08426
5 FBZ-15FBZ	28.889	0.5408	53.421	0.8168	49.609	2.072	0.003469

Immature							
Pair	Difference	SE	Q	Lower CI	Upper CI	Critical Mean	p-value
0 FBZ-0,5 FBZ	0.8889	0.3557	24.988	-0.4741	22.519	1.363	0.3075
0 FBZ-5FBZ	0.1111	0.3557	0.3123	-12.519	14.741	1.363	0.9961
0 FBZ -15 FBZ	0.6667	0.3557	18.741	-0.6964	20.297	1.363	0.5542
0,5 BFZ -5 FBZ	1	0.3557	28.111	-0.363	2.363	1.363	0.2137
0,5 FBZ-15 FBZ	15.556	0.3557	43.729	0.1925	29.186	1.363	0.02032
5 FBZ-15FBZ	0.5556	0.3557	15.617	-0.8075	19.186	1.363	0.6895

Mature							
Pair	Difference	SE	Q	Lower CI	Upper CI	Critical Mean	p-value
0 FBZ-0,5 FBZ	26.667	0.4961	5.375	0.7657	45.676	1.901	0.003259
0 FBZ-5FBZ	0.6667	0.4961	13.437	-12.343	25.676	1.901	0.7782
0 FBZ -15 FBZ	3	0.4961	60.468	1.099	4.901	1.901	0.000882
0,5 BFZ -5 FBZ	2	0.4961	40.312	0.09903	3.901	1.901	0.03619
0,5 FBZ-15 FBZ	0.3333	0.4961	0.6719	-15.676	22.343	1.901	0.964
5 FBZ-15FBZ	23.333	0.4961	47.031	0.4324	42.343	1.901	0.01134

Πείραμα με στερεές καλλιέργειες

Drop plate							
Pair	Difference	SE	Q	Lower CI	Upper CI	Critical Mean	p-value
FBZ 0 - FBZ 0.5	888.888.889	430.331.483	20.656	- 1.060.000.478	2.837.778.256	1.948.889.367	0.5006
FBZ 0 - FBZ 5	1.277.777.778	430.331.483	29.693	- 6.711.115.894	3.226.667.145	1.948.889.367	0.2318
FBZ 0 - FBZ 15	2.111.111.111	430.331.483	49.058	1.622.217.436	4.060.000.478	1.948.889.367	0.03443
FBZ 0.5 - FBZ 5	388.888.889	430.331.483	0.9037	- 1.560.000.478	2.337.778.256	1.948.889.367	0.9164
FBZ 0.5 - FBZ 15	1.222.222.222	430.331.483	28.402	- 7.266.671.454	3.171.111.589	1.948.889.367	0.2612
FBZ 5 - FBZ 15	833.333.333	430.331.483	19.365	- 1.115.556.034	2782222.7	1.948.889.367	0.5496

Mature							
Pair	Difference	SE	Q	Lower CI	Upper CI	Critical Mean	p-value
0 FBZ- 0,5 FBZ	26.667	0.4961	5.375	0.7657	45.676	1.901	0.003259
0 FBZ- 5FBZ	0.6667	0.4961	13.437	-12.343	25.676	1.901	0.7782
0 FBZ - 15 FBZ	3	0.4961	60.468	1.099	4.901	1.901	0.000882
0,5 BFZ -5 FBZ	2	0.4961	40.312	0.09903	3.901	1.901	0.03619

0,5 FBZ-15 FBZ	0.3333	0.4961	0.6719	-15.676	22.343	1.901	0.964
5 FBZ- 15FBZ	23.333	0.4961	47.031	0.4324	42.343	1.901	0.01134