



ΠΑΝΕΠΙΣΤΗΜΙΟ ΘΕΣΣΑΛΙΑΣ
ΤΜΗΜΑ ΒΙΟΧΗΜΕΙΑΣ & ΒΙΟΤΕΧΝΟΛΟΓΙΑΣ

ΠΤΥΧΙΑΚΗ ΕΡΓΑΣΙΑ

“Επίδραση του ενδοφυτικού μύκητα *Fusarium solani* στέλεχος FsK στο κύριο μονοπάτι σηματοδότησης του ABA στα καταφρακτικά κύτταρα σε φυτό τομάτας”

"Effect of the endophytic fungus *Fusarium solani* strain FsK on the main ABA signaling pathway in the guard cells of a tomato plant"



Μιχαλακέας Ιωάννης

Λάρισα 2024

Επιβλέπουσα Καθηγήτρια: Παπαδοπούλου Καλλιόπη

Τριμελής Επιτροπή:

1) Παπαδοπούλου Καλλιόπη: Καθηγήτρια Βιοτεχνολογίας Φυτών του Τμήματος Βιοχημείας και Βιοτεχνολογίας του Πανεπιστημίου Θεσσαλίας

2)Καρπούζας Δημήτριος: Καθηγητής Περιβαλλοντικής Μικροβιολογίας & Βιοτεχνολογίας του Τμήματος Βιοχημείας και Βιοτεχνολογίας του Πανεπιστημίου Θεσσαλίας

3) Δαλακούρας Αθανάσιος: Ερευνητής, ΕΛΓΟ- ΔΗΜΗΤΡΑ

Ευχαριστίες

Αρχικά, θα ήθελα να ευχαριστήσω την καθηγήτρια Βιοτεχνολογίας Φυτών του Τμήματος κυρία Παπαδοπούλου Καλλιόπη η οποία δέχτηκε να με φιλοξενήσει στο Εργαστήριο Φυτών και Περιβάλλοντος κατά το χρονικό διάστημα εκπόνησης της πτυχιακής μου εργασίας. Επίσης θα ήθελα να την ευχαριστήσω για τις διευκρινήσεις και τις διορθώσεις προκειμένου η πτυχιακή εργασία να φτάσει στο τελικό στάδιο της συγγραφής της. Ακόμα, θα ήθελα να ευχαριστήσω και την υποψήφια διδάκτορα του Τμήματος Φέκα Μαρία η οποία αν και είχε επιβαρυνμένο πρόγραμμα και υποχρεώσεις, δέχτηκε να με βοηθήσει προκειμένου να παρουσιάσω και εγώ ένα θέμα προερχόμενο από το διδακτορικό της. Τέλος, ένα μεγάλο ευχαριστώ σε όλους τους ανθρώπους του εργαστηρίου που με συμβούλευαν και με διευκόλυναν προκειμένου να προσαρμοστώ και εγώ στις συνθήκες και την καθημερινότητα του εργαστηρίου.

Περίληψη

Η τομάτα είναι ένα λαχανικό υψίστης διατροφικής σημασίας και ένα από τα κυριότερα φυτά μοντέλα στον τομέα της έρευνας. Η παρούσα προπτυχιακή διπλωματική εργασία αφορά τη διερεύνηση των μοριακών μηχανισμών μέσω των οποίων φυτά τομάτας εμφανίζουν αυξημένη αντοχή σε καταπόνηση ξηρασίας στην παρουσία του ενδοφυτικού μύκητα *Fusarium solani* στέλεχοςK (FsK). Η μελέτη εστιάζει στον βασικό μηχανισμό με τον οποίο τα φυτά προστατεύονται από την ξηρασία, τον μηχανισμό κλεισίματος των στομάτων στην περιοχή των φύλλων. Σε αυτό τον μηχανισμό πρωταγωνιστεί η ορμόνη του αμπισισικού οξέος ή ABA. Βρέθηκε λοιπόν ότι η ορμόνη ABA φαίνεται να βρίσκει έναν διαφορετικό τρόπο προκειμένου να ενεργοποιήσει τον μηχανισμό άμυνας του φυτού παρουσία ξηρασίας. Ο μηχανισμός αυτός, περιλαμβάνει τη συνεργασία του ABA με μία άλλη ορμόνη, αυτή του σαλικυλικού οξέος (SA).

Λέξεις κλειδιά: ABA, FsK, καταφρακτικά κύτταρα, συνθήκες ξηρασίας, OST1, SLAC1

Abstract

Tomato is a vegetable of great nutritional importance and one of the main model plants in the field of research. This undergraduate thesis is concerned with the investigation of the molecular mechanisms by which tomato plants exhibit increased resistance to drought stress in the presence of the endophytic fungus *Fusarium solani* strain K (FsK). The study focuses on the key mechanism by which plants are protected from drought, the mechanism of stomatal closure in the leaf region. In this mechanism, the hormone abscisic acid or ABA plays a leading role. It was therefore found that the ABA hormone seems to find a different way to activate the plant's defence mechanism in the presence of drought. This mechanism involves the cooperation of ABA with another hormone, that of salicylic acid (SA).

Key words: ABA, FsK, guard cells, drought conditions, OST1, SLAC1

Πίνακας Περιεχομένων

1. Εισαγωγή

- 1.1.1 Ντομάτα: Ένα φυτό-μοντέλο υψηλής σημασίας
- 1.1.2 Το φυτικό μετάλλαγμα *flacca* και ο όρος *priming*
- 1.2 Τα στόματα των φύλλων των φυτών
- 1.3 Κυτταρική ρύθμιση των επιπέδων ABA
 - 1.3.1 Βιοσύνθεση ABA
 - 1.3.2 Καταβολισμός ABA
 - 1.3.3 Μεταφορά ABA
- 1.4.1 Ενδοφυτικοί και παθογόνοι μύκητες
- 1.4.2 Δημιουργία συμβιωτικής σχέσης μικροοργανισμού-ξενιστή
- 1.4.3 Το σύμπλεγμα ειδών *Fusarium solani*
- 1.4.4 Ο μύκητας FSK

2. Σκοπός

3. Υλικά και μέθοδοι

- 3.1 Αποστείρωση σπόρων
- 3.2 Καλλιέργεια
- 3.3 Εμβολιασμός
- 3.4 Δειγματοληψία
- 3.5 Τρίψιμο ιστών
- 3.6 Απομόνωση RNA
- 3.7 PCR επιβεβαίωσης

4. Αποτελέσματα

5. Συζήτηση- Συμπεράσματα

6. Βιβλιογραφία

1.Εισαγωγή

1.1.1 Τομάτα: Ένα φυτό-μοντέλο υψηλής οικονομικής σημασίας

Η Τομάτα (*Solanum lycopersicum*), ανακαλύφθηκε στη Νότια Αμερική και αποτελεί ένα από τα σημαντικότερα λαχανικά παγκοσμίως. Αποτελεί σημαντική πηγή τροφής, διαθέτοντας παράλληλα ορισμένα χαρακτηριστικά τα οποία απουσιάζουν σε άλλα φυτά μοντέλα (π.χ Ρύζι, *Arabidopsis*) όπως σαρκώδεις καρπούς, ένα συμποδικό βλαστό και σύνθετα φύλλα. Τα παραπάνω αποδεικνύουν και την ανάγκη για καλλιέργειά της προκειμένου να βελτιωθεί η παραγωγικότητά της, η ποιότητα των καρπών και η αντοχή της σε βιοτικές και αβιοτικές καταπονήσεις (Kimura, S.; Sinha, N. 2008).

Αυτή τη στιγμή, 13 είδη τομάτας αγρίου τύπου μας είναι ήδη γνωστά (Peralta et al. 2005; Spooner et al. 2005), εκ των οποίων όλα είναι διπλοειδή ($2n=24$). Έτσι, η διασταύρωσή τους με καλλιεργούμενες τομάτες οδηγεί σε παραγωγή φυτών με επιθυμητά χαρακτηριστικά όπως αυξημένη παραγωγικότητα, ποιότητα καρπών και ανθεκτικότητα σε παθογόνα. Επίσης, οι τομάτες αποτελούν σημαντικό αντικείμενο μελέτης στην έρευνα. Συγκεκριμένα ανήκουν στην οικογένεια *Solanaceae*, ένα από τα μεγαλύτερα γένη αγγειόσπερμων, στο οποίο ανήκουν επίσης φυτά υψηλής εμπορικής σημασίας όπως η πατάτα, η μελιτζάνα, η πιπεριά, ο καπνός και η πετούνια.

Σε γενετικό επίπεδο, αποτελεί έναν διπλοειδή οργανισμό, με ικανότητα αυτογονιμοποίησης, με τη κάθε γενιά να έχει σχετικά σύντομο χρόνο ζωής. Το γονιδίωμα της τομάτας περιέχει DNA συνολικού μεγέθους 950 Mb ($n = 12$) (Arumuganathan και Earle 1991). Από αυτό μόνο οι 220 Mb (25%) είναι πλούσια σε ευχρωματίνη (Wang et al. 2006). Οι υπόλοιπες 730 Mb (75%) είναι ιετροχρωματίνη και στερείται σε μεγάλο βαθμό γονίδια. Έτσι μέσω της γνώσης του γονιδιώματος, έχουν δημιουργηθεί περισσότερα από 1000 μεταλλάγματα τομάτας, που περιλαμβάνουν τόσο αυθόρμητες όσο και επαγόμενες (μέσω ακτινοβολίας και χημικών ουσιών) μεταλλάξεις. Η χαρτογράφηση επομένως των συγκεκριμένων μεταλλάξεων (Stevens and Rick 1986), καθιστά δυνατή την μελέτη της λειτουργίας των γονιδίων στην τομάτα. Στη συγκεκριμένη περίπτωση, η ποικιλία της τομάτας που χρησιμοποιήθηκε για τα πειράματά μας είναι η *Ailsa craig* και το φυσικό μετάλλαγμα *flacca*.

1.1.2 Το φυτικό μετάλλαγμα *flacca* και ο όρος *priming*

Στην τομάτα, υπάρχουν τρία μεταλλάγματα τα οποία σχετίζονται με μειωμένη βιοσύνθεση της ορμόνης ABA και είναι τα εξής: *Notabilis*(not), *flacca*(flc) και *sitiens*(sit). Συγκεκριμένα, το φυτικό μετάλλαγμα *flacca* παρουσιάζει ανεπάρκεια ως προς τη δραστηριότητα του ενζύμου που συμμετέχει στο τελικό στάδιο της βιοσύνθεσης του ABA. Η βιοχημική βλάβη πιστεύεται ότι είναι μια λιγότερο λειτουργική μορφή της οξειδάσης της αλδεϋδης (AO). Συνοπτικά, το τελικό στάδιο βιοσύνθεσης της ορμόνης περιλαμβάνει την μετατροπή της ABA αλδεϋδης σε ABA μέσω της οξειδάσης AO η οποία ενσωματώνει έναν συμπαράγοντα μολυβδαινίου. Έχει αποδειχθεί ότι η μετάλλαξη σε επίπεδο γονιδιώματος είναι μια διαγραφή 6 βάσεων που έχει ως αποτέλεσμα την ανεπάρκεια σε μια σουλφουρυλάση που είναι υπεύθυνη για την παραγωγή του συμπαράγοντα του μολυβδαινίου (MoCo), ο οποίος απαιτείται για τη δραστηριότητα της οξειδάσης AO (Harrison et al. 2011).

Έτσι οι δύο γονότυποι τομάτας, *flacca* και αγρίου τύπου (WT) της ποικιλίας *Ailsa Craig* έχουν διαφορετικές ποσότητες της ορμόνης ABA. Αυτός είναι και ο λόγος για τον οποίο σε συνθήκες αβιοτικής καταπόνησης και ειδικότερα ξηρασίας έχει παρατηρηθεί διαφορά ως προς την απόκριση. Συγκεκριμένα, σε φυτά αγρίου τύπου υπάρχει πιο έντονο κλείσιμο των στομάτων, βιοσύνθεση ABA και συσσώρευση προλίνης σε σχέση με τα μεταλλάγματα *flacca*. Επομένως, το αμπισικό οξύ (ABA) είναι ένα βασικό μόριο που σχετίζεται με τους ρυθμιστικούς μηχανισμούς που αφορούν την απόκριση ενός φυτού στην ξηρασία, μέσα από τη ρύθμιση των καταφρακτικών κυττάρων και του κλεισίματος των στομάτων, της διατήρησης της ισορροπίας του ύδατος και της ανοχής στην οσμωτική καταπόνηση (Živanović et al. 2021).

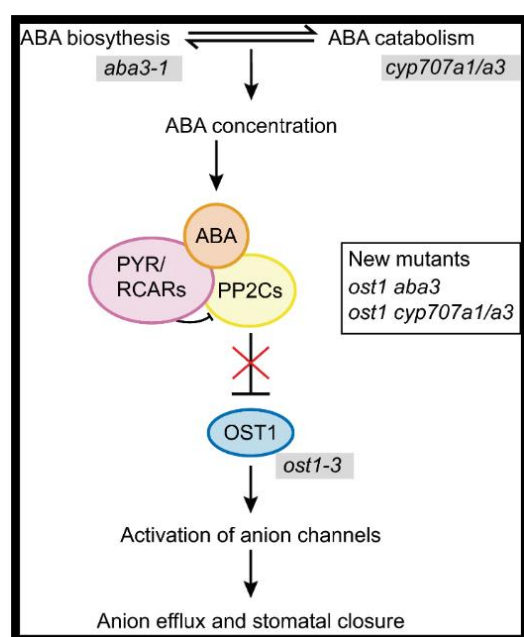
Ορισμός *priming*: Η αποτύπωση του φαινομένου της ευαισθητοποίησης (*priming*), επηρεάζει θετικά την επιβίωση του φυτού μέσα από επαναλαμβανόμενες καταστάσεις στρες. Μελέτες έχουν δείξει ότι τα φυτά που εκτίθενται εκ των προτέρων σε πολλαπλά επεισόδια καταπόνησης (και μέσω ξηρασίας) παρουσιάζουν γρηγορότερες και αποτελεσματικότερες αντιδράσεις σε σύγκριση με φυτά που βιώνουν την καταπόνηση για πρώτη φορά. Η προετοιμασία αυτή επηρεάζει τον μεταβολισμό των φυτών οδηγώντας σε αλλαγές στον πρωτογενή και δευτερογενή μεταβολισμό, διαμορφώνοντας μια βραχυπρόθεσμη μνήμη με βάση τη συσσώρευση υδατανθράκων, αμινοξέων και αντιοξειδωτικών (Živanović et al. 2021).

1.2 Τα στόματα των φύλλων των φυτών

Ορισμός: Τα στόματα, είναι μικροί πόροι που βρίσκονται στα φύλλα του φυτού, σχηματίζονται από ένα ζεύγος καταφρακτικών κυττάρων (guardcells) και είναι υπεύθυνα για την ανταλλαγή αερίων. Συγκεκριμένα, επιτρέπουν την πρόσληψη CO₂ για τη φωτοσύνθεση, με τη συνακόλουθη απώλεια νερού (Jalakas, P. et al. 2018).

Λειτουργία: Ανάλογα με τις περιβαλλοντικές συνθήκες στις οποίες βρίσκεται το φυτό, τα στόματα πρέπει να προσαρμοστούν. Αυτό επιτυγχάνεται μέσα από τη ρύθμιση του πλάτους του διαφράγματός τους (Jalakas, P. et al. 2018).

Η φυτική ορμόνη του αμπισικού οξέος (ABA) είναι αυτή που παίζει κεντρικό ρόλο στη ρύθμιση της λειτουργίας των καταφρακτικών κυττάρων. Η διαδικασία κλεισίματος των στομάτων μεσολαβούμενη από το ABA, ξεκινάει με τη σύνδεση της ορμόνης στους υποδοχείς PYR/RCAR, οδηγώντας στην απενεργοποίηση των πρωτεϊνικών φωσφατάσων τύπου 2C (PP2Cs). Αυτές με τη σειρά τους απελευθερώνουν πρωτεϊνικές κινάσες, όπως η OPEN STOMATA1 (OST1), με σκοπό την ενεργοποίηση καναλιών ιόντων στα καταφρακτικά κύτταρα συμπεριλαμβανομένου και του SLOW ANION CHANNEL1 (SLAC1). Ως αποτέλεσμα των παραπάνω, έχουμε εκροή ανιόντων, συνοδευόμενη από εκροή καλίου και νερού οδηγώντας στο κλείσιμο των στομάτων (**εικόνα1**) (Kim et al. 2010; Kollist et al. 2014).



Εικόνα 1: Σχηματική απεικόνιση της διατήρησης της ομοιόστασης του ABA εξαρτώμενη από τη βιοσύνθεση και τον καταβολισμό του και των συστατικών του σηματοδοτικού μονοπατιού που οδηγεί στο κλείσιμο των στομάτων.

1.3 Κυτταρική ρύθμιση των επιπέδων ABA

Γενικά: Η φυτική ορμόνη ABA παίζει ουσιαστικό ρόλο σε πολλές φυσιολογικές διαδικασίες, όπως ο λήθαργος και η βλάστηση των σπόρων, καθώς και σε αποκρίσεις έναντι βιοτικών και αβιοτικών καταπονήσεων. Για την επίτευξη στόχων που σχετίζονται τόσο με την ανάπτυξη του φυτού όσο και την αντοχή του σε καταστάσεις stress, απαιτείται ρύθμιση στη βιοσύνθεση, τον καταβολισμό και στη μεταφορά της ορμόνης (Yanlin, Ma. et al. 2018).

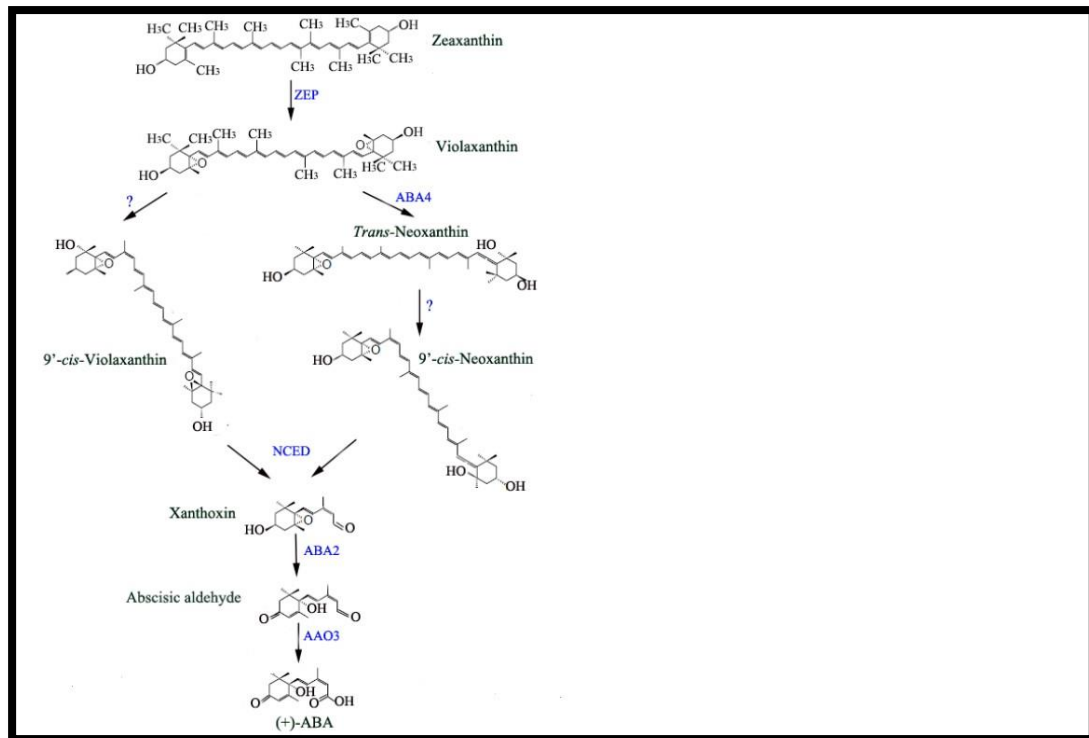
1.3.1 Βιοσύνθεση ABA

Η βιοσύνθεση της ορμόνης ABA περιλαμβάνει μία σειρά ενζυμικών αντιδράσεων με πρόδρομη ένωση το καροτενοειδές ζεαξανθίνη. Συγκεκριμένα, στο πρώτο βήμα της βιοσύνθεσης, η ζεαξανθίνη μετατρέπεται σε βιολαξανθίνη μέσω του ενζύμου εποξιδάση της ζεαξανθίνης (ZEP).

Στη συνέχεια, μέσω του ενζύμου ABA4 καταλύεται η μετατροπή της βιολαξανθίνης σε trans-νεοξανθίνη η οποία αποτελεί ενδιάμεσο για τον σχηματισμό της ένωσης 9-cis-νεοξανθίνης. Επίσης, μέσω της βιολαξανθίνης σχηματίζεται και η 9-cisβιολαξανθίνη. Η μετατροπή και των δύο cisπροϊόντων πραγματοποιείται με έναν μέχρι στιγμής άγνωστο μηχανισμό.

Οι παραπάνω ενώσεις αποτελούν υποστρώματα των διοξυγενασών NCEDs, με σκοπό τον σχηματισμό ξανθοξίνης.

Στα τελευταία βήματα της βιοσύνθεσης της ορμόνης ABA, η ξανθοξίνη μέσω του ενζύμου ABA2 θα μετατραπεί σε ABA-aldehyde, το οποίο με τη σειρά του θα μας δώσει το τελικό προϊόν, την ορμόνη ABA μέσω της οξειδάσης 3 του ABA-aldehyde AAO3 (**εικόνα 2**) (Li, Y.; Zhang, J.; et al. 2013).



Εικόνα 2: Σχηματική απεικόνιση του μονοπατιού βιοσύνθεσης της ορμόνης ABA

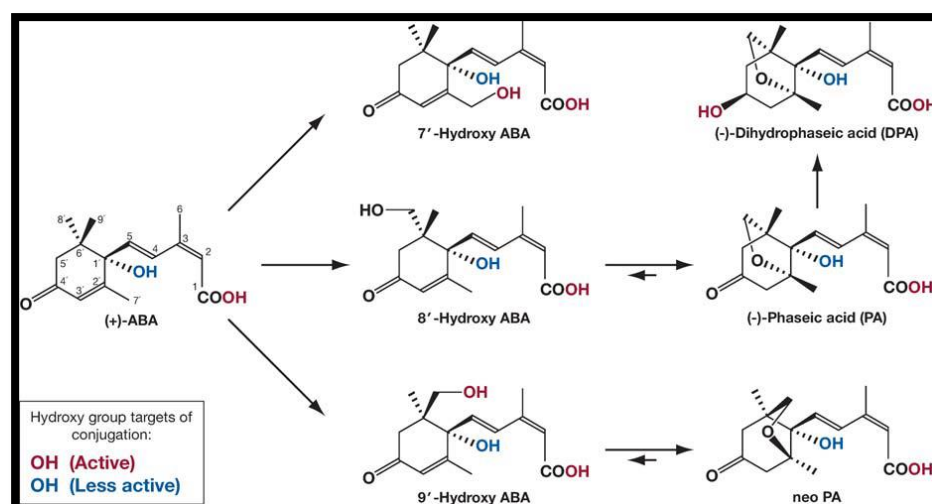
Κυτταρική διαμερισματοποίηση: Οι αντιδράσεις που πραγματοποιούνται μέχρι και τον σχηματισμό των ενώσεων 9-cis-νεοξανθίνη και 9-cis-βιολαξανθίνη λαμβάνουν χώρα στα πλαστίδια, ενώ τα στάδια μετατροπής της ξανθοξίνης στο τελικό προϊόν του αμπισισικού οξέος παρατηρούνται στο κυτταρόπλασμα.

1.3.2 Καταβολισμός ABA

Ο καταβολισμός του ABA αποτελεί μία απλούστερη διαδικασία συγκριτικά με τη βιοσύνθεσή του και αποτελείται από δύο είδη αντιδράσεων, την υδροξυλίωση και τη σύζευξη. Όσο αφορά την υδροξυλίωση, παρατηρούνται τρία διαφορετικά μονοπάτια κατά τα οποία υδροξυλιώνεται μία από τις μεθυλομάδες του δακτυλίου και συγκεκριμένα οι άνθρακες 7', 8' και 9' (Nambara, E.; Marion-Poll, A. 2005).

Μετά το τέλος της πρώτης κατηγορίας των αντιδράσεων, τα προϊόντα που προκύπτουν (8-υδροξυABA, PA, DPA και *epi*-DPA), θα γλυκοσυλιωθούν.

Σχετικά με τα ένζυμα που συμμετέχουν στις παραπάνω αντιδράσεις, η υδροξυλίωση στο όγδοο άτομο άνθρακα καταλύεται από το ένζυμο της μονοοξυγενάσης του κυτοχρώματος P450, με το 8-υδροξυ ABA να μετατρέπεται στη συνέχεια αυθόρμητα σε φασεϊκό οξύ. Τέλος, το PA θα καταβολιστεί περαιτέρω μέσω μίας ρεντουκτάσης σε διϋδροφασεϊκό οξύ DPA (εικόνα 3).



Εικόνα 3: Μονοπάτι καταβολισμού ABA

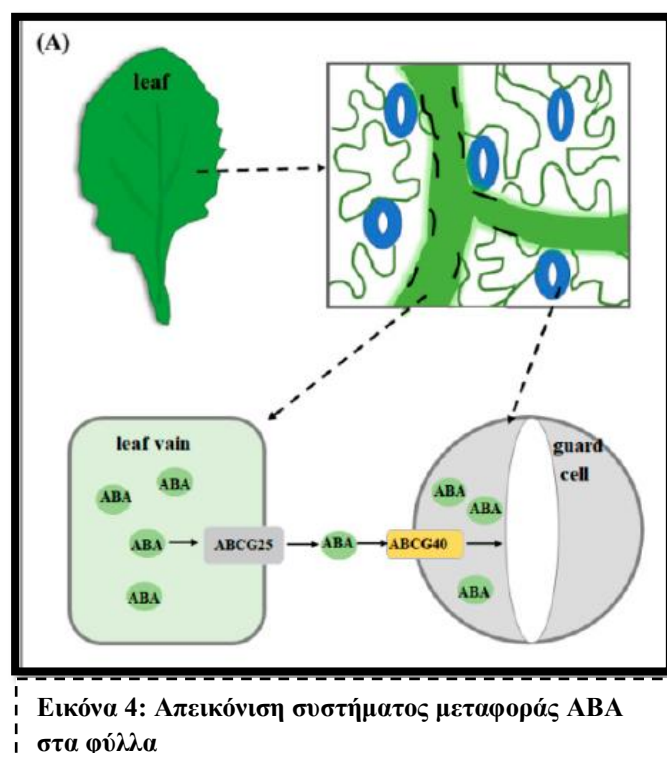
1.3.3 Μεταφορά ABA

Όσον αφορά τη μεταφορά της ορμόνης ABA, έχει αποδειχτεί πειραματικά ότι η κατεύθυνση με την οποία μεταφέρεται στο φυτό είναι από τη ρίζα στο βλαστό (Li, W.; de Ollas, C.etal.2018).

Συγκεκριμένα, έχουν ανακαλυφτεί ειδικοί μεταφορείς ABA οι οποίοι συντελούν στη διακυτταρική μεταφορά της ορμόνης μέσα στο φυτό. Οι μεταφορείς ABC-G25 (*Arabidopsisthaliana*ATP-bindingcassataG25), οι οποίοι ανήκουν στην οικογένεια μεταφορέων ABC, έχουν ταυτοποιηθεί ως μία οικογένεια μεταφορέων της ορμόνης ABA. Χωροταξικά, οι μεταφορείς αυτοί βρίσκονται στην πλασματική μεμβράνη και υπάρχουν σε υψηλά επίπεδα έκφρασης στον αγωγό ιστό τόσο των φύλλων όσο και του βλαστού (Kang, J.; Yim, S.; etal.2015).Έτσι, η ορμόνη μεταφέρεται μέσω των ABCG25 με τη διαδικασία να ευνοείται με την παρουσία ATP, ώστε το ABA να εξέλθει στην περιοχή του αποπλάστη που βρίσκεται γύρω από τακαταφρακτικά κύτταρα (Kuromori, T.; Miyaji, T.; etal 2010).

Μία άλλη κατηγορία μεταφορέων αποτελούν οι ABCG40, οι οποίοι βρίσκονται στην πλασματική μεμβράνη των καταφρακτικών κυττάρων και σε αντίθεση με τους ABCG25, εισάγουν το ABA στα κύτταρα. Οι δύο μεταφορείς που αναφέρθηκαν παραπάνω, είναι υπεύθυνοι για τη ρύθμιση της ποσότητας του ABA που βρίσκεται στα προστατευτικά κύτταρα παίζοντας παράλληλα σημαντικό ρόλο στην ομοιόσταση του ABA.

Στην παρακάτω εικόνα, παρουσιάζεται ο τρόπος με τον οποίο δρουν συνεργειακά αυτοί οι δύο μεταφορείς στα φύλλα (εικόνα 4).



Εικόνα 4: Απεικόνιση συστήματος μεταφοράς ABA στα φύλλα

1.4.1 Ενδοφυτικοί και παθογόνοι μύκητες

Το φαινόμενο της συμβίωσης μεταξύ ενός μύκητα και ενός φυτού είναι ευρέως διαδεδομένο στη φύση. Το αποτέλεσμα μιας τέτοιας αλληλεπίδρασης μπορεί να ποικίλλει οδηγώντας σε δύο πιθανά αποτελέσματα, την σχέση αμοιβαιότητας ή τον παρασιτισμό. Στις περισσότερες περιπτώσεις, το φυτό-ξενιστής δεν υποφέρει, αντιθέτως ευνοείται μέσω του αποικισμού από έναν μύκητα. Ωστόσο, είναι απαραίτητη η ύπαρξη ισορροπίας μεταξύ των αναγκών φυτού-μύκητα καθώς σε αντίθετη περίπτωση είναι πιθανή η εμφάνιση συμπτωμάτων ασθένειας (Kogel, K.H. et al. 2006).

Το 1866, ο πατέρας της σύγχρονης φυτοπαθολογίας Anton de Bary επινόησε τον όρο ενδόφυτο (endo = εντός, phyto = φυτό) αναφερόμενος σε κάθε οργανισμό που αναπτύσσεται μέσα στο φυτό. Σήμερα, ο κοινά αποδεκτός ορισμός αφορά μόνο τους οργανισμούς που δεν προκαλούν ασθένεια, ενώ κάποιες φορές ωφελούν ακόμη και τους ίδιους τους ξενιστές. Όλα τα είδη φυτών φιλοξενούν ενδοφυτικούς μικροοργανισμούς, οι οποίοι μπορούν να έχουν θετική επίδραση στα φυτά. Κάποιες από αυτές τις επιδράσεις σχετίζονται με την ανάπτυξη των φυτών, την ικανότητά τους να προσαρμόζονται σε συνθήκες αβιοτικού στρες, καθώς και στην καταπολέμηση παρασίτων και παθογόνων οργανισμών (Collinge, D.B. et al. 2022).

Επομένως ποια είναι η βασική διαφορά μεταξύ ενός ενδοφυτικού και ενός παρασιτικού μύκητα? Ενώ οι παθογόνοι μικροοργανισμοί μπορούν να υιοθετήσουν έναν ενδοφυτικό τρόπο ζωής στο φυτό ξενιστή τους, δεν πρέπει να θεωρούνται πραγματικά ενδόφυτα. Ο λόγος είναι ότι μπορούν να προκαλέσουν ασθένεια σε κάποιο στάδιο, εάν βρίσκονται στο σωστό μέρος τη σωστή στιγμή. Από την άλλη πλευρά ο ίδιος οργανισμός μπορεί να αποτελεί ένα πραγματικό ενδόφυτο σε ένα φυτό μη ξενιστή, επειδή δεν θα προκαλέσει ποτέ ασθένεια σε αυτό το φυτικό είδος (Collinge, D.B. et al. 2022).

1.4.2 Δημιουργία συμβιωτικής σχέσης μικροοργανισμού-ξενιστή

Σχετικά με τον τρόπο με τον οποίο δημιουργείται η σχέση μεταξύ μικροοργανισμού και φυτού υπάρχουν 5 διακριτά στάδια (Kogel, K.H. et al. 2006). Τα στάδια είναι τα εξής:

- 1) Ανίχνευση του μικροοργανισμού από το φυτό και σηματοδότηση
- 2) Αναγνώριση και επαναπρογραμματισμός του ξενιστή, κυτταρική προετοιμασία για διείσδυση
- 3) Διείσδυση, κυτταρική αναδιοργάνωση και αποφυγή της βασικής άμυνας του ξενιστή
- 4) Αποικισμός
- 5) Διατήρηση της αμοιβαιότητας, επιβίωση του ξενιστή, μεταφορά θρεπτικών και πολλαπλασιασμός του μύκητα

1.4.3 Το σύμπλεγμα ειδών *Fusarium solani*

Τα μέλη του συμπλέγματος ειδών *Fusarium solani* (FSSC) είναι ικανά να προκαλέσουν ασθένειες σε καλλιέργειες με υψηλή γεωργική σημασία. Επίσης, τα γονιδιώματά τους περιλαμβάνουν χρωμοσώματα που κωδικοποιούν ειδικούς για τον ξενιστή παράγοντες. Παρακάτω, θα παρουσιαστούν ορισμένα χαρακτηριστικά των μυκητών που ανήκουν στο είδος *Fusarium solani* (Coleman, J. 2016).

Ταξινόμηση: Ανήκουν στο Βασίλειο των Μυκήτων,

Στο Φύλο Ascomycota,

Στη Τάξη Sordariomycetes,

Στη Σειρά Hypocreales,

Στην Οικογένεια Nectriaceae

Πρόσφυση και διείσδυση: Έχει δειχθεί ότι μύκητες του συγκεκριμένου είδους όπως οι μύκητες FSSC 10, FSSC 11 και *F. phaseoli*, ήταν σε θέση να διεισδύσουν στο υποκοτύλιο. Αυτό συνέβαινε είτε απευθείας μέσω της επιδερμίδας (FSSC 10) είτε κυρίως μέσω των στομάτων (FSSC 11 και *F. phaseoli*). Μετά την διείσδυση στο υποκοτύλιο, οι υφές του μύκητα εξαπλώνονται στο ανώτερο τμήμα της ρίζας και του επικοτύλου, αποικίζοντας τελικά το ξύλωμα και προκαλώντας μάρανση στα υπέργεια τμήματα του φυτού ξενιστή (Stahl et al. 1994).

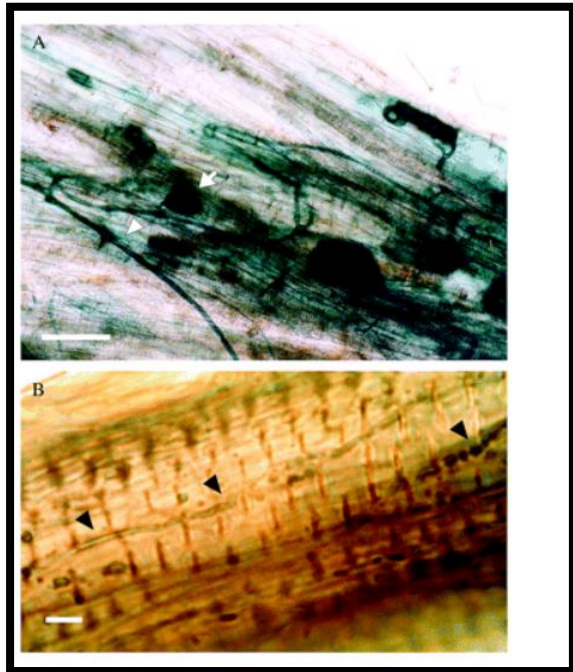
Στα παρακάτω πειράματα, ο μύκητας που χρησιμοποιήθηκε και ανήκει στην οικογένεια FSSC, ήταν ο *Fusarium solani* strain K ή FSK.

1.4.4 Ο μύκητας FSK

Ο ασκομύκητας *Fusarium solani* στέλεχος K (FsK), είναι μέλος του κλάδου των *Fusarium solani* species complex (FSSC) και είναι ένας ενδοφυτικός μύκητας που απομονώθηκε από ρίζες ντομάτας που αναπτύσσονταν σε ειδικό κομπόστ (οργανικό υπόστρωμα ανάπτυξης) (Kavroulakis et al. 2007).

Ο FsK σχηματίζει σχέσεις αμοιβαιότητας με το φυτό τομάτας *Solanum lycopersicum*, προσδίδοντάς του αντοχή έναντι βιοτικών και αβιοτικών καταπονήσεων (Garantonaki et al. 2018; Kavroulakis et al. 2007; Pappas et al., 2018).

Ο FsK μπορεί να διεισδύσει στη ρίζα του *S. lycopersicum* και να αναπτυχθεί στον ριζικό φλοιό 15 ημέρες μετά τον εμβολιασμό (dpi), σχηματίζοντας κυκλικά σώματα (εικόνα 5). Ο μύκητας εξαπλώνεται στο αγγειακό σύστημα του φυτού, φτάνοντας ως το στέμμα της ρίζας χωρίς να περνάει ωστόσο στο στέλεχος (stem) και στα φύλλα. Η ικανότητα αποικισμού των ηθμαγγειώδων σωλήνων είναι γενικά κάτι που χαρακτηρίζει παθογόνους μύκητες των ριζών, γι' αυτό και η δυνατότητα ενός ωφέλιμου στελέχους μύκητα να πολλαπλασιάζεται εκεί, χωρίς την πρόκληση συμπτωμάτων ασθένειας, δηλώνει μια ασυνήθιστη αλληλεπίδραση μεταξύ μικροβίου και φυτού (Kavroulakis et al. 2007).



Εικόνα 5: Απεικόνιση σε μικροσκόπιο ριζικού ιστού ντομάτας 15 dpi με τον FsK χρησιμοποιώντας χρώση ChlorazolBlack.

(A) Ο μύκητας διεισδύει στα κύτταρα της ρίζας σχηματίζοντας εμφανή στρογγυλά σώματα.

(B) εμφανείς αποικίες στις αγγειακές δέσμες.

Η συμβίωση με τον FsK μπορεί να προστατεύσει την τομάτα από καταπόνηση λόγω ξηρασίας. Σε πειράματα *invitro*, σποριόφυτα που είχαν έλλειψη νερού εξαιτίας ελλιπούς ποτίσματος, ήταν ικανά παρουσία του FsK να φωτοσυνθέσουν φυσιολογικά. Σε πειράματα *inplanta*, αποδείχθηκε ότι ο μύκητας μπορεί να αυξήσει την απορρόφηση νερού από τις ρίζες και να μειώσει το κλείσιμο των στομάτων στα φύλλα, με αποτέλεσμα να μη μειώνεται ο ρυθμός φωτοσύνθεσης και ταυτόχρονα να ελαχιστοποιείται η απώλεια νερού (Kavroulakis et al. 2018).

2. Σκοπός

Σκοπό της συγκεκριμένης μελέτης αποτελεί η παρατήρηση του τρόπου με τον οποίο τομάτες της ποικιλίας AilsaCraig αγρίου τύπου αλλά και τομάτες με μετάλλαξη *flacca* στο σηματοδικό μονοπάτι της ορμόνης ABA, αντιδρούν σε καταπονήσεις και συγκεκριμένα σε αυτή της ξηρασίας. Η μελέτη επικεντρώνεται στα στόματα των φύλλων, με ορισμένα από τα φυτά να εμβολιάζονται με το μύκητα *Fusariumsolani* στέλεχος K, έναν μη παθογόνο ριζικό ενδόφυτο που προστατεύει τα φυτά από παθογόνους μικροοργανισμούς (Kalliope). Επίσης, η μελέτη εστιάζει και στην αλληλεπίδραση του ABA με την ορμόνη του σαλικυλικού οξέος (cross-talking).

3. Υλικά και μέθοδοι

Οι σπόροι που χρησιμοποιήθηκαν ανήκουν στην ποικιλία τομάτας AilsaCraig. Οι σπόροι ήταν δύο ειδών, σπόροι αγρίου τύπου (WT) και σπόροι που φέρουν τη μετάλλαξη *flacca* (ABA mutant ή MT). Παρακάτω, παρουσιάζονται τα βήματα που ακολουθήθηκαν για την επίτευξη του πειράματος.

3.1 Αποστείρωση σπόρων

Πρώτο βήμα περιλάμβανε την αποστείρωση των σπόρων σε falcons που περιείχαν χλωρίνη, με ανάδευση για περίπου 10 λεπτά. Στη συνέχεια, οι σπόροι πλύθηκαν με χρήση dH₂O.

3.2 Καλλιέργεια

Επόμενο βήμα αποτέλεσε η τοποθέτηση των σπόρων σε τρυβλία, τα οποία είχαν και αυτά αποστειρωθεί. Τα τρυβλία περιλάμβαναν διηθητικό χαρτί το οποίο ήταν ποτισμένο με dH₂O. Στη συνέχεια τα τρυβλία σφραγίστηκαν με Parafilm και τοποθετήθηκαν σε θερμοκήπιο μέχρις ότου να σχηματιστούν τα νεαρά φυτά τομάτας. Μετά από λίγες μέρες, τα νεαρά φυτά τοποθετήθηκαν σε φυτοδοχεία με χοντρή και λεπτή άμμο σε αναλογία 1 προς 2, μία διαδικασία που ονομάζεται μεταφύτευση. Οι ντομάτες ποτίστηκαν με διάλυμα Hoagland και κλείστηκαν με μεμβράνη προκειμένου να διατηρηθούν τα απαραίτητα επίπεδα υγρασίας.

3.3 Εμβολιασμός

Μία εβδομάδα μετά τη μεταφύτευση ακολούθησε ο εμβολιασμός με τον μύκητα FsK(αναγνωρίζονται από το tip που υπάρχει μέσα στη γλάστρα). Σκοπός ήταν η δημιουργία φυτών τομάτας τόσο WT όσο και ABAMT, όπου η κάθε σειρά θα είχε 24 δείγματα. Συγκεκριμένα από αυτά τα 24, τα 12 φυτά θα ήταν control (χωρίς να έχουν εμβολιαστεί μεFsK), εκ των οποίων τα 6 θα είχαν υποστεί stress (ξηρασία) και τα άλλα 6 κανένα stress. Τα υπόλοιπα 12 δείγματα ήταν με τη σειρά τους φυτά εμβολιασμένα μεFsK, 6 χωρίς την επίδρασηstressκαι 6 με επίδραση stress. Τα φυτά τα οποία είχαν υποστεί stress ήταν τα φυτά τα οποία δεν ποτιζόντουσαν, σε αντίθεση με τα φυτά χωρίς stress στα οποία πάντα φροντίζαμε να διατηρείται το επίπεδο της υγρασίας.

3.4 Δειγματοληψία

Δύο εβδομάδες μετά τον εμβολιασμό με τον μύκητα FsK, πραγματοποιήθηκε η δειγματοληψία. Συγκεκριμένα πρώτα τα φυτά φωτογραφήθηκαν, και συγκρίθηκαν μεταξύ τους. Αρχικά στη πρώτη φωτογραφία συγκρίθηκαν όλα μαζί δηλαδή Controlnostress, stress και FsK nostress, stress, ενώ στη συνέχεια φωτογραφήθηκαν ανά δυάδες. Στη συνέχεια, μετρήθηκε το νωπό βάρος της ρίζας και των φύλλων του κάθε φυτού. Αναλυτικά, καθαρίστηκε ο βλαστός και η ρίζα από την άμμο, φωτογραφήθηκαν, κόψαμε τη ρίζα και τη συλλέξαμε σε αλουμινόχαρτο το οποίο τοποθετήθηκε σε υγρό άζωτο προκειμένου να γίνει η μεταφορά σε καταψύκτες στους -80 βαθμούς κελσίου. Η ίδια διαδικασία πραγματοποιήθηκε και για τα φύλλα των φυτών.

3.5 Τρίψιμο ιστών

Σκοπό του τριψίματος (grinding) αποτελεί η συλλογή εκχυλίσματος από ρίζες και φύλλα που πήραμε κατά τη δειγματοληψία, προκειμένου να απομονώσουμε RNA στο επόμενο βήμα. Η διαδικασία περιλαμβάνει τρίψιμο του ιστού σε υγρό άζωτο που αποτελεί τον διαλύτη μέχρις ότου φύλλα και ρίζες να γίνουν σκόνη. Η αποθήκευση γίνεται σε falcons ώστε να υπάρχει εφεδρικός ιστός και σε tubes στα οποία θα γίνει η απομόνωση του γενετικού υλικού. Τα τριμμένα δείγματα θα αποθηκευτούν και αυτά στους καταψύκτες στους -80.

3.6 Απομόνωση RNA

Η απομόνωση RNA αποσκοπεί στην εξαγωγή του RNA από διάφορα δείγματα. Τα διακριτά στάδια είναι τα εξής:

- a) Ρήξη ιστών και κυτταρικών δομών
- b) Απομάκρυνση πρωτεϊνών, λιπιδίων και άλλων προσμίξεων από τα νουκλεϊκά οξέα
- c) Μεταφορά των νουκλεϊκών οξέων σε νερό ή σε ρυθμιστικό διάλυμα που θα τα διατηρήσει χωρίς να παρεμποδίζει τις επόμενες εργασίες.

Το πρωτόκολλο που χρησιμοποιήθηκε περιλάμβανε τα παρακάτω βήματα:

- 1) Προσθήκη στα tubes που περιλαμβάνουν τους τριμμένους ιστούς 300μlRNAextractionbuffer και 300μlPIC
- 2) Ανάδευση με vortex και φυγοκέντρηση στις 11.000 στροφές για 15 λεπτά
- 3) Μεταφορά του υπερκείμενου σε νέο eppendorf και προσθήκη 300μlPIC
- 4) Φυγοκέντρηση στα 11.000gγια 15 λεπτά
- 5) Μεταφορά υπερκείμενου σε νέο eppendorf, προσθήκη ίσης αναλογίας PICκαιvortex
- 6) Φυγοκέντρηση στις 11.000 στροφές για 15 λεπτά
- 7) Τα DNA- RNAβρίσκονται στην υγρή φάση.Για την καθίζηση χρησιμοποιούνται 0,1volumeδιαλύματος οξικού νατρίου 3M και 1volume ισοπροπανόλης. Ακολουθεί ήπια ανάδευση
- 8) Φυγοκέντρηση στα 11.000g για 15 λεπτά σε θερμοκρασία δωματίου ή στους 4 βαθμούς κελσίου
- 9) Το DNAαπομακρύνεται με 187,5μlLiClprecipitation. Διαλύουμε το pellet σε 562,5 10E/10Tόλη τη νύκτα στους 4 βαθμούς κελσίου
- 10) Φυγοκέντρηση στα 11.000g για 15 λεπτά σε θερμοκρασία δωματίου ή στους 4 βαθμούς κελσίου
- 11) Πλύση των pellets με 500μlαιθανόλης 70% και φυγοκέντρηση στις 11.000 στροφές για 15 λεπτά
- 12) Στεγνώνουμε τα pelletσε πάγο και 7 λεπτάμασε θερμοκρασία δωματίου με το καπάκι να είναι ανοικτό
- 13) Επαναιωρούμε σε 20μl (για ρίζες) και σε 40μl (για φύλλα) με dH₂O και τα αφήγουμε 10 λεπτά στον πάγο με quickspin

14) -20 ή Qubit, -20 βαθμοί

Την επόμενη μέρα, ακολουθεί DNAsetreatment στα δείγματα RNA. Έτσι, σε PCRtubes έχουμε:

• 10μl δείγματος RNA (10ng/μl)	10μl	} MIX	20 μl
• 10X buffer με MgCl ₂ 1μl	2μl		
• DNase I 1μl	2μl		
• RNA out inhibitor	0,5μl		

Επώαση στους 37 βαθμούς για 40 λεπτά. Ακολουθεί προσθήκη 1μl EDTA 50mM στον πάγο και επώαση στους 65 βαθμούς για 10 λεπτά.

3.7 PCR επιβεβαίωσης

Η αλυσιδωτή αντίδραση πολυμεράσης ή PCR αποσκοπεί στην invitro ενίσχυση τμήματος του γονιδιώματος. Στην PCR υπάρχουν 3 διακριτά στάδια:

- 1) Αποδιάταξη των κλώνων σε θερμοκρασία 95 βαθμών κελσίου
- 2) Τήξη των εκκινητών στις συμπληρωματικές τους αλληλουχίες σε θερμοκρασία 50-60 βαθμών κελσίου
- 3) Επιμήκυνση της νεοσυντηθέμενης αλυσίδας στους 72 βαθμούς με τη βοήθεια της πολυμεράσης του DNA.

Η διαδικασία πραγματοποιείται σε μηχανήματα που ονομάζονται θερμικοί κυκλοποιητές και εκτός της πολυμεράσης του DNA, η αντίδραση περιλαμβάνει εκκινητές (Forward και Reverse), νουκλεοτίδια (dNTPs), ρυθμιστικό διάλυμα (Buffer) και ddH₂O.

Στο συγκεκριμένο πείραμα χρησιμοποιήθηκαν οι παρακάτω primers οι οποίοι είναι αποθηκευμένοι στους -20 βαθμούς:

FLeUbi: 5'-AAGATGGAAGAACTCTGGCG-3' με θερμοκρασία τήξης T_m=60

RLeUbi: 5'-TCACAACACATCACAAGGTC-3' με θερμοκρασία τήξης T_m=56

Επίσης, οι ποσότητες κάθε αντιδραστηρίου που χρησιμοποιήθηκαν ήταν οι εξής:

Buffer TAqA 10x μεMg → 2μl FLeUbi→ 0,42μl

RLeUbi→0,42μl

KapaTaq→0,42μl

ddH₂O→0,082μl

Δείγμα→1μl

4. Αποτελέσματα

Στο πλαίσιο της διπλωματικής εργασίας, η ανάλυση των δεδομένων πραγματοποιήθηκε μόνο για τα φυτά αγρίου τύπου (WT).

Τα αποτελέσματα του πειράματος σχετίζονται τόσο με την μακροσκοπική παρατήρηση των φυτών κάτω από συνθήκες ξηρασίας, όσο και με στατιστική ανάλυση γονιδίων που συμμετέχουν στο μηχανισμό κλεισίματος των στομάτων μέσω της ορμόνης ABA. Τα αποτελέσματα απεικονίζονται στις παρακάτω εικόνες:



Τομάτες ποικιλίας AilsaCraig,εμβολιασμένες και μη με τον μύκητα FsK, σε κανονικές συνθήκες ποτίσματος και σε συνθήκες μειωμένου ποτίσματος (8 μέρες υδατικής καταπόνησης)

Στην εικόνα παρατηρούμε 4 φυτά τομάτας αγρίου τύπου (WT) τα οποία δεν φέρουν τη μετάλλαξη *flacca*. Η σειρά των φυτών από αριστερά προς τα δεξιά στην εικόνα είναι:

Φυτό 1: Φυτό control δηλαδή χωρίς να είναι εμβολιασμένο με τον FsK και χωρίς να έχει υποστεί stress, καθώς έχει ποτιστεί κανονικά.

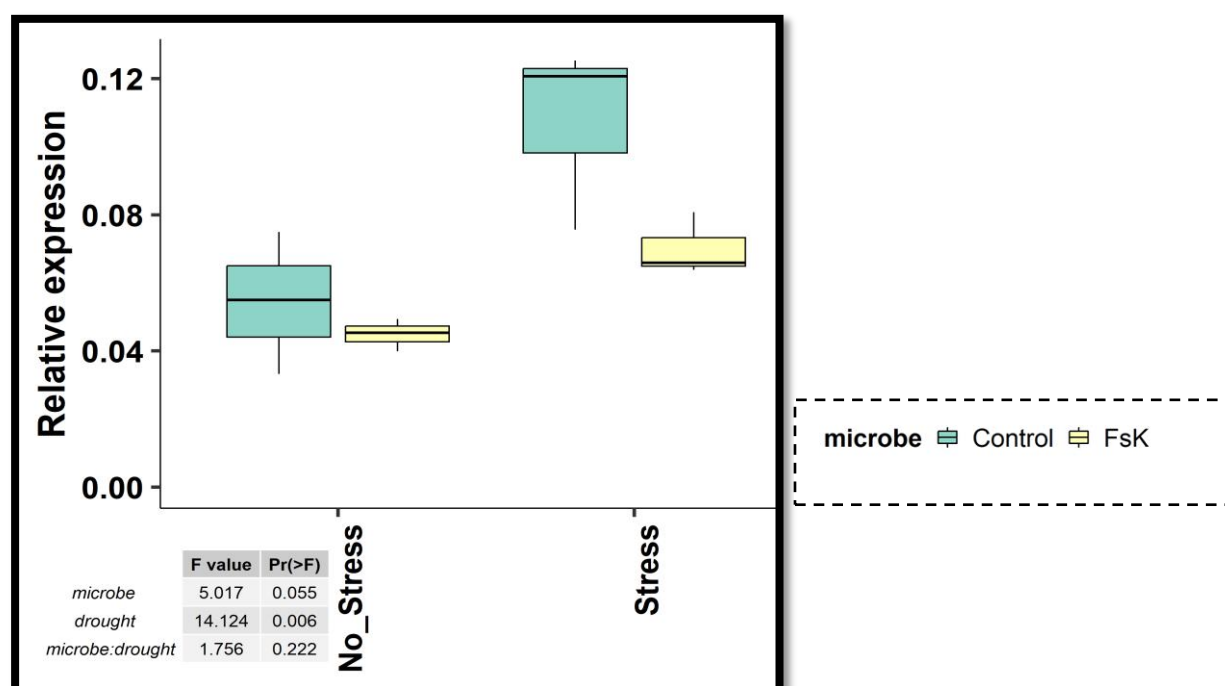
Φυτό 2: Φυτό control δηλαδή χωρίς να είναι εμβολιασμένο με τον FsK, το οποίο όμως έχει υποστεί stress εξαιτίας μειωμένου ποτίσματος

Φυτό 3: Φυτό το οποίο έχει εμβολιαστεί με τον μύκητα FsK, χωρίς να έχει υποστεί stress, καθώς έχει ποτιστεί κανονικά.

Φυτό 4: Φυτό το οποίο έχει εμβολιαστεί με τον μύκητα, το οποίο όμως έχει υποστεί stress εξαιτίας μειωμένου ποτίσματος.

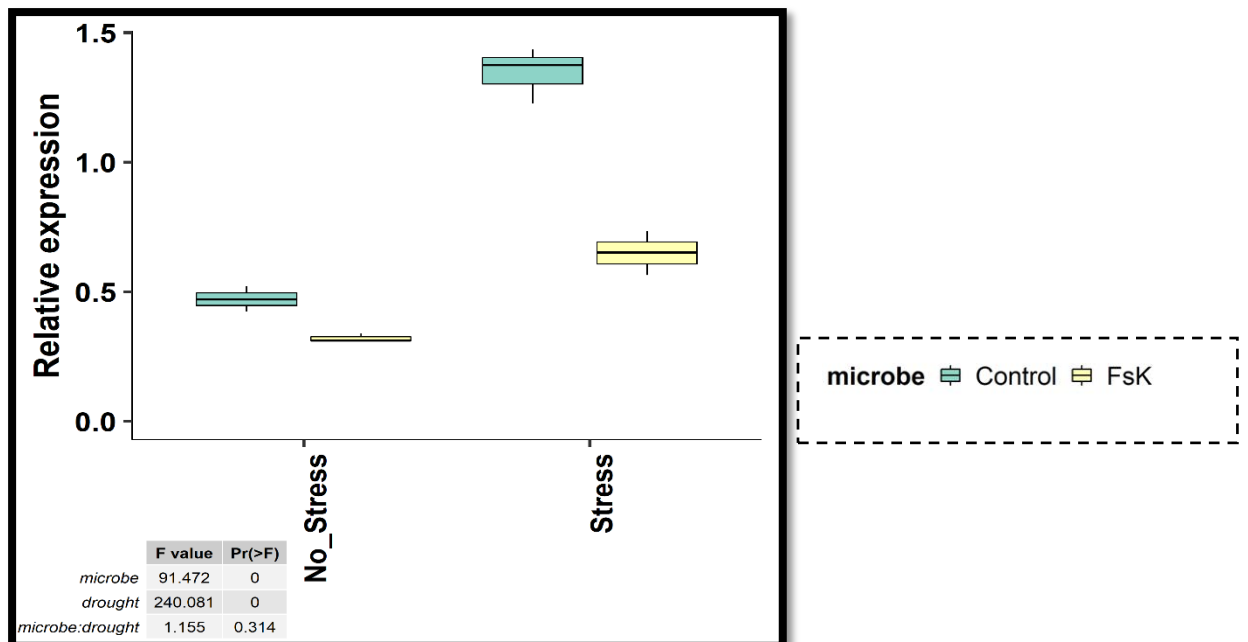
Παρακάτω, παρουσιάζονται τα αποτελέσματα τα οποία προέκυψαν με στατιστική ανάλυση. Η στατιστική ανάλυση αφορά τη μελέτη της σχετικής έκφρασης των γονιδίων που κωδικοποιούν την κίνηση OST1, το κανάλι ιόντων SLAC1 και τις κινάσες MPK9 και MPK12. Τα συγκεκριμένα γονίδια παίζουν σημαντικό ρόλο στη διαδικασία κλεισίματος των στομάτων, με την ανάλυση να γίνεται σε φυτά control και μολυσμένα με FsK, σε συνθήκες παρουσίας και απουσίας ξηρασίας (stress).

OST1



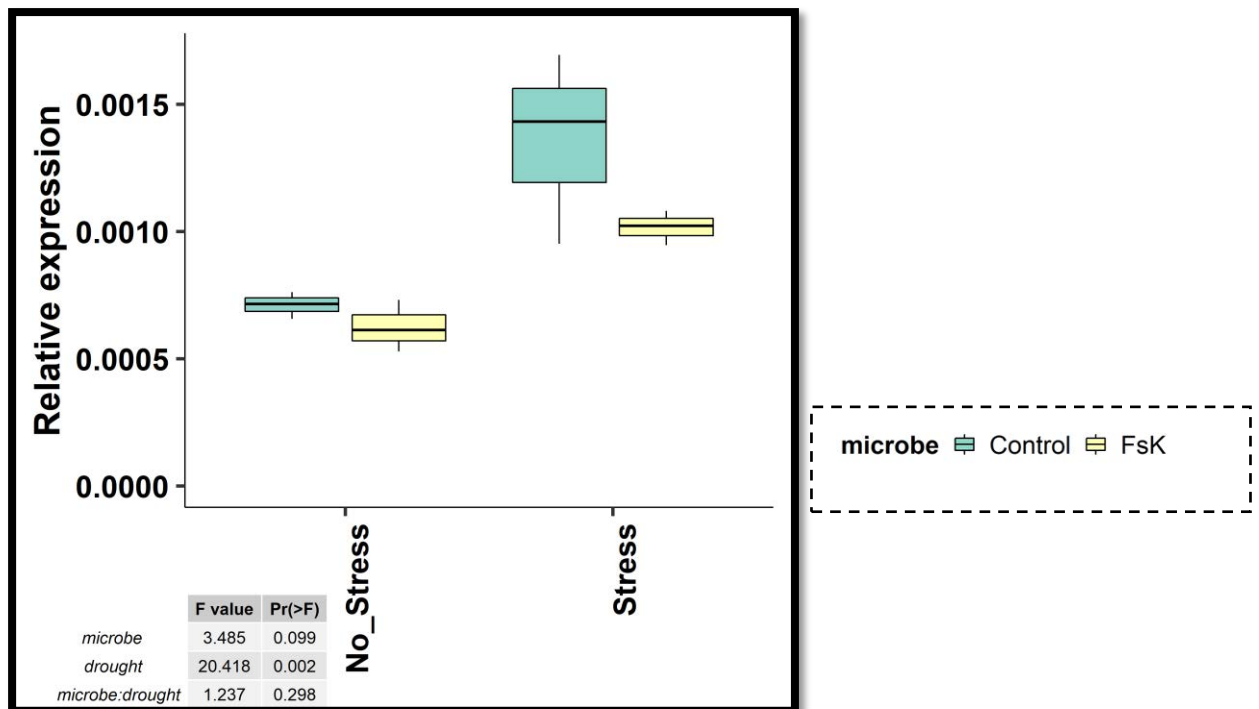
Διάγραμμα σχετικής έκφρασης της κινάσης OST1 σε φυτά control και μολυσμένα με FsK, σε συνθήκες παρουσίας και απουσίας ξηρασίας (stress)

SLAC1



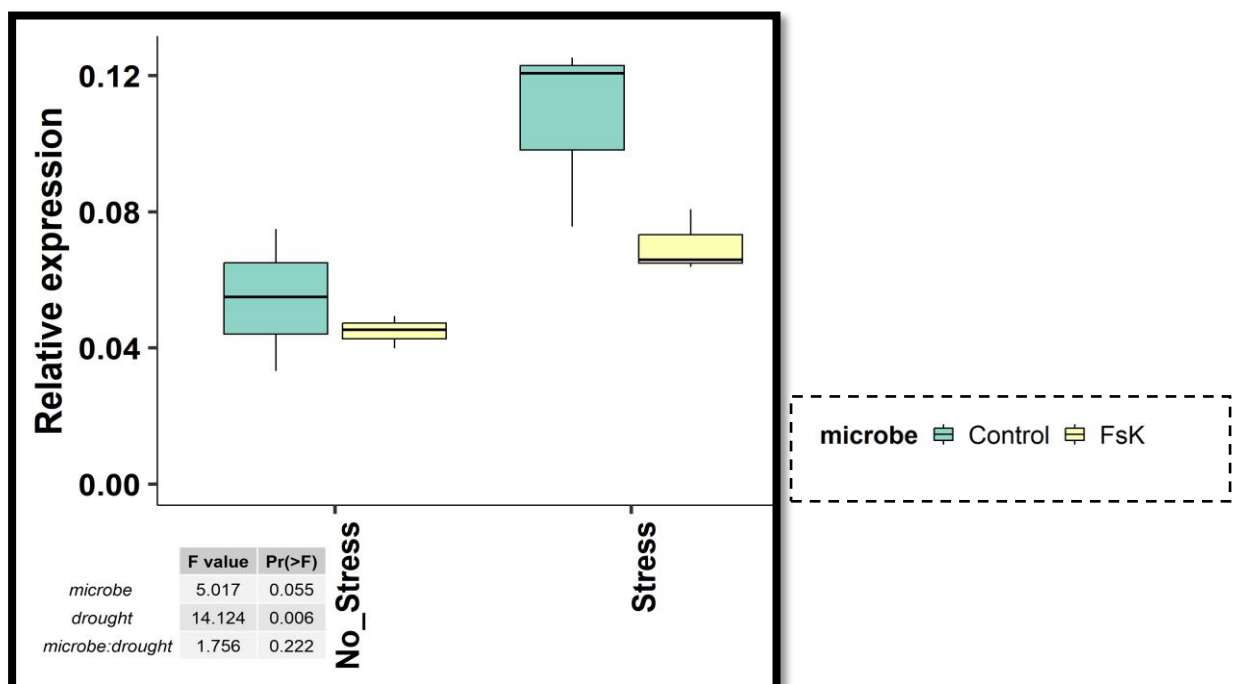
Διάγραμμα σχετικής έκφρασης του γονιδίου *SLAC1* σε φυτά control και μολυσμένα με FsK, σε συνθήκες παρουσίας και απουσίας ξηρασίας (stress)

MPK9



Διάγραμμα σχετικής έκφρασης της κινάσης *MPK9* σε φυτά control και μολυσμένα με *FsK*, σε συνθήκες παρουσίας και απουσίας ξηρασίας (stress)

MPK12



Διάγραμμα σχετικής έκφρασης της κινάσης *MPK12* σε φυτά control και μολυσμένα με *FsK*, σε συνθήκες παρουσίας και απουσίας ξηρασίας (stress)

5. Συζήτηση- Συμπεράσματα

Σχετικά με την εικόνα των τεσσάρων φυτών τομάτας αγρίου τύπου (WT) τα οποία δεν φέρουν τη μετάλλαξη *flacca*, παρατηρήσαμε ότι τα φυτά που εμβολιάστηκαν με FsK παρουσίαζαν πιο πυκνό ριζικό σύστημα σε σχέση με τα control, ενώ παράλληλα ο FsK δεν επέτρεπε την περαιτέρω ανάπτυξη του υπέργειου τμήματος του φυτού.

Επίσης συγκρίθηκαν οι συνθήκες 2 και 4, δηλαδή του φυτού control χωρίς να είναι εμβολιασμένο με τον FsK το οποίο όμως έχει υποστεί stress εξαιτίας μειωμένου ποτίσματος και του φυτού το οποίο έχει εμβολιαστεί με τον μύκητα όντας και αυτό σε συνθήκη stress. Η εικόνα μας δείχνει την αυξημένη ανθεκτικότητα που παρουσιάζει το φυτό 4 σε σχέση με το 2 του οποίου τα φύλλα έχουν μαραθεί. Ο μύκητας λοιπόν με μία πρώτη ματιά φαίνεται πως επιδρά ευεργετικά έναντι συνθηκών ξηρασίας.

Ωστόσο, για να μπορέσουμε να ερμηνεύσουμε τον τρόπο με τον οποίο ο FsK συντελεί στην επιβίωση του φυτού, έπρεπε να γίνει και στατιστική ανάλυση σε γονίδια που συμμετέχουν στο μηχανισμό προστασίας του φυτού σε συνθήκες στρες. Συγκεκριμένα μελετήθηκαν γονίδια που συμβάλουν στο κλείσιμο των στομάτων των φύλλων των φυτών ώστε τα ίδια να μπορέσουν να διατηρήσουν σε φυσιολογικές τιμές τα επίπεδα νερού. Στην αρχή, η σύγκριση θα γίνει μεταξύ των φυτών control (nostress-stress), ενώ στη συνέχεια θα συγκριθούν και τα αποτελέσματα των φυτών που εμβολιάστηκαν με τον FsK.

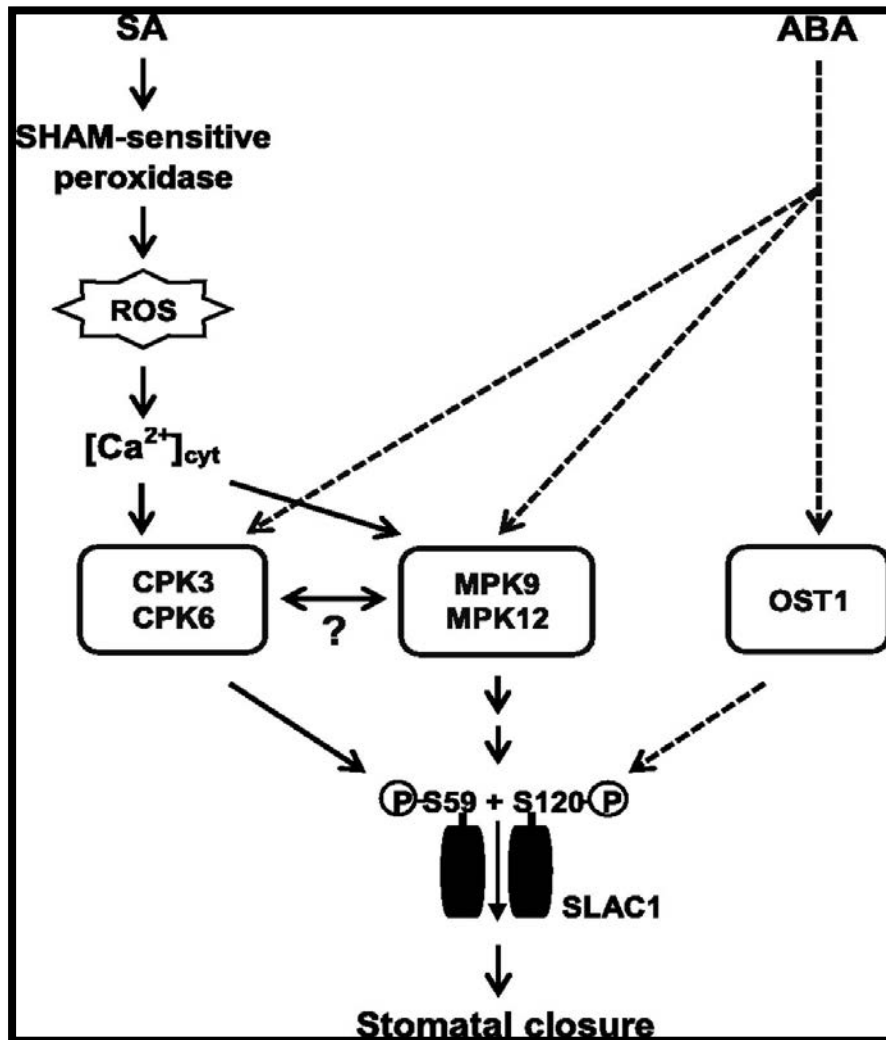
Σχετική έκφραση γονιδίων στα control φυτά

Ξεκινάμε με τη μελέτη της σχετικής έκφρασης των γονιδίων που κωδικοποιούν την κίνηση OST1 και το κανάλι SLAC1. Η δέσμευση του ABA στον υποδοχέα του (PYR/PYL/RCAR) εμποδίζει τη λειτουργία της φωσφατάσης PP2C, ώστε η φωσφοριλιωμένη OST1 να μπορέσει να ενεργοποιήσει πολλαπλά συστατικά μεταξύ των οποίων και κανάλια ανιόντων όπως τα SLAC1.

Παρατηρούμε, ότι κάτω από συνθήκες ξηρασίας έχουμε αυξημένη έκφραση του *SLAC1* σε σχέση με συνθήκες όπου το φυτό βρίσκεται σε φυσιολογική και ενυδατωμένη κατάσταση. Ωστόσο, αυτή η αυξημένη έκφραση του *SLAC1* δεν φαίνεται να συνοδεύεται και από αυξημένη έκφραση της *OST1* που την ενεργοποιεί. Τα αποτελέσματά μας δείχνουν ότι είτε σε συνθήκες stress είτε nostress, τα επίπεδα έκφρασης της κίνησης δεν διαφέρουν σημαντικά. Επομένως, φαίνεται πως υπάρχει ένας διαφορετικός μηχανισμός αποτελούμενος από διαφορετικές πρωτεΐνες οι οποίες θα ενεργοποιήσουν τον τελικό υποδοχέα του σήματος, δηλαδή τα κανάλια ανιόντων. Οι πρωτεΐνες αυτές πιθανώς είναι οι κινάσες MAPK9 και MAPK12.

Συγκρίνοντας λοιπόν τα αποτελέσματα της σχετικής έκφρασης των *MAPK9* και *MAPK12*, διακρίνουμε μεγάλη διαφορά στα επίπεδα έκφρασης τα οποία είναι αυξημένα αρκετά σε σχέση με φυτά που δεν βρίσκονται σε στρεσογόνο συνθήκη,

Το συμπέρασμα των παραπάνω είναι ότι η ορμόνη ABA φαίνεται να βρίσκει έναν διαφορετικό τρόπο προκειμένου να ενεργοποιήσει τον μηχανισμό άμυνας του φυτού παρουσία ξηρασίας. Ο μηχανισμός αυτός, περιλαμβάνει τη συνεργασία του ABA με μία άλλη ορμόνη, αυτή του σαλικλικού οξέος (SA) όπως απεικονίζεται στην παρακάτω εικόνα.



Αλληλεπίδραση των μονοπατιών σηματοδότησης του ABA και SA στον μηχανισμό κλεισίματος των φύλλων των

Αναλυτικότερα, η ορμόνη SA ενεργοποιεί μία περοξειδάση επάγοντας την δημιουργία δραστικών μορφών οξυγόνου ROS. Τα παραπάνω επάγουν την ενεργοποίηση CPKs, όχι όμως και της κινάσης OST1. Στη συνέχεια, οι CPKs μαζί με άλλες άγνωστες πρωτεϊνικές κινάσες (π.χ. CIPKs) φωσφορυλιώνουν τα κατάλοιπα σερίνης S59 και S120 της SLAC1 ενεργοποιώντας την. Ωστόσο, η ορμόνη ABA απαιτεί όχι μόνο την OST1 αλλά και τις CPKs για την ενεργοποίηση των καναλιών SLAC1. Αυτό υποδηλώνει ότι τα σηματοδοτικά μονοπάτια των ορμονών ABA και SA αλληλεπιδρούν, με τις κινάσες MPK9 και MPK12 να ρυθμίζουν και αυτές έμμεσα τη δραστηριότητα της SLAC1 με έναν άγνωστο μέχρι σήμερα μηχανισμό.

Σχετική έκφραση γονιδίων στα φυτά εμβολιασμένα με **FsK**

Ποιος είναι επομένως ο τρόπος με τον οποίο ο μύκητας δρα ευεργετικά στο φυτό; Συγκρίνοντας τα αποτελέσματα της σχετικής έκφρασης παρατηρούμε πως οι διαφορές στα επίπεδα έκφρασης μεταξύ των φυτών σε φυσιολογικές συνθήκες και σε συνθήκες ξηρασίας είναι μικρές και μάλιστα αρκετά μικρότερες σε σχέση με τη σύγκριση που έγινε προηγουμένως στα control φυτά. Αυτό μας οδηγεί στο συμπέρασμα πως ο μύκητας φαίνεται να προετοιμάζει το φυτό, αυξάνοντας τα επίπεδα έκφρασης γονιδίων απαραίτητων για την επιβίωση και συγκεκριμένα την αντοχή απέναντι στη ξηρασία, πριν το φυτό εκτεθεί στον αντίστοιχο παράγοντα. Η διαδικασία αυτή είναι γνωστή στον κόσμο των φυτών και ονομάζεται *priming*. Έτσι τα φυτικά κύτταρα θα αντιδράσουν ταχύτερα και αποτελεσματικότερα όντας προετοιμασμένα έναντι αβιοτικών καταπονήσεως όπως τραυματισμοί, συνθήκες υψηλής αλατότητας, ξηρασίας και κρύου.

Βλέπουμε λοιπόν πως ο μύκητας *FsK* μπορεί να μας δώσει φυτά με μεγαλύτερη ανθεκτικότητα έναντι συνθηκών ξηρασίας, αλλάζοντας τον βασικό μηχανισμό άμυνας του φυτού. Η παραπάνω ιδιότητα που προσδίδει στα φυτά είναι σημαντική σε κλάδους σαν αυτόν της γεωργίας δημιουργώντας περισσότερο ανθεκτικές καλλιέργειες.

6. Βιβλιογραφία

- Kimura, S.; Sinha, N. (2008). Tomato (*Solanum lycopersicum*): A Model Fruit-Bearing Crop. Cold Spring Harbor Protocols, 2008(12), pdb.emo105–pdb.emo105. doi:10.1101/pdb.emo105
- Peralta, I., Knapp, S., and Spooner, D. 2005. New species of wild tomatoes (*Solanum* section *Lycopersicon*: Solanaceae) from northern Peru. *Syst. Bot.* 30: 424–434.
- Wang, Y., Tang, X., Cheng, Z., Mueller, L., Giovannoni, J., and Tanksley, S.D. 2006. Euchromatin and pericentromeric heterochromatin: Comparative composition in the tomato genome. *Genetics* 172: 2529–2540.
- Harrison, E., Burbidge, A., Okyere, J.P. et al. Identification of the tomato ABA-deficient mutant sitiens as a member of the ABA-aldehyde oxidase gene family using genetic and genomic analysis. *Plant Growth Regul* 64, 301–309 (2011). <https://doi.org/10.1007/s10725-010-9550-1>
- Živanović B, Milić Komić S, Nikolić N, Mutavdžić D, Srećković T, Veljović Jovanović S, Prokić L. Differential Response of Two Tomato Genotypes, Wild Type cv. Ailsa Craig and Its ABA-Deficient Mutant flacca to Short-Term Drought Cycles. *Plants (Basel)*. 2021 Oct 27;10(11):2308. doi:10.3390/plants10112308. PMID: 34834671; PMCID: PMC8617711.
- Daloso DM, Medeiros DB, Dos Anjos L, Yoshida T, Araújo WL, Fernie AR. Metabolism within the specialized guard cells of plants. *New Phytol*. 2017 Dec;216(4):1018-1033. doi: 10.1111/nph.14823. Epub 2017 Oct 6. PMID: 28984366.
- Merilo E, Laanemets K, Hu H, Xue S, Jakobson L, Tulva I, Gonzalez-Guzman M, Rodriguez PL, Schroeder JI, Brosché M, Kollist H. PYR/RCAR receptors contribute to ozone-, reduced air humidity-, darkness-, and CO₂-induced stomatal regulation. *Plant Physiol*. 2013 Jul;162(3):1652-68. doi: 10.1104/pp.113.220608. Epub 2013 May 23. PMID: 23703845; PMCID: PMC3707544.
- Jalakas P, Merilo E, Kollist H, Brosché M. ABA-mediated regulation of stomatal density is OST1-independent. *Plant Direct*. 2018 Sep 19;2(9):e00082. doi: 10.1002/pld3.82. PMID: 31245747; PMCID: PMC6508810.
- Kim, T.-H., Böhmer, M., Hu, H., Nishimura, N., & Schroeder, J. I. (2010). Guard cell signal transduction network: Advances in understanding

abscisic acid, CO₂, and Ca²⁺ signaling. *Annual Review of Plant Biology*, 61, 561–591.

- Kollist, T., Moldau, H., Rasulov, B., Oja, V., Rämme, H., Hüve, K., Kollist, H. (2007). A novel device detects a rapid ozone-induced transient stomatal closure in intact *Arabidopsis* and its absence in *abi2* mutant. *Physiologia Plantarum*, 129, 796–803.
- . Ma, Yanlin; Cao, Jing; He, Jiahua; Chen, Qiaoqiao; Li, Xufeng; Yang, Yi (2018). Molecular Mechanism for the Regulation of ABA Homeostasis During Plant Development and Stress Responses. *International Journal of Molecular Sciences*, 19(11), 3643–. doi:10.3390/ijms19113643
- Li, Y.; Zhang, J.; Zhang, J.; Hao, L.; Hua, J.; Duan, L.; Zhang, M.; Li, Z. Expression of an *Arabidopsis* molybdenum cofactor sulphurase gene in soybean enhances drought tolerance and increases yield under field conditions. *Plant Biotechnol. J.* 2013, 11, 747–758.
- Nambara, Eiji; Marion-Poll, Annie (2005). ABSCISIC ACID BIOSYNTHESIS AND CATABOLISM. , 56(1), 165–185. doi:10.1146/annurev.arplant.56.032604.144046
- Li, W.; de Ollas, C.; Dodd, I.C. Long-distance ABA transport can mediate distal tissue responses by affecting local ABA concentrations. *J. Integr. Plant Biol.* 2018, 60, 16–33.
- Kang, J.; Yim, S.; Choi, H.; Kim, A.; Lee, K.P.; Lopez-Molina, L.; Martinoia, E.; Lee, Y. Abscisic acid transporters cooperate to control seed germination. *Nat. Commun.* 2015, 6, 8113.
- Kuromori, T.; Miyaji, T.; Yabuuchi, H.; Shimizu, H.; Sugimoto, E.; Kamiya, A.; Moriyama, Y.; Shinozaki, K. ABC transporter AtABCG25 is involved in abscisic acid transport and responses. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 2010, 107, 2361–2366.
- Kogel KH, Franken P, Hückelhoven R. Endophyte or parasite--what decides? *Curr Opin Plant Biol.* 2006 Aug;9(4):358-63. doi: 10.1016/j.pbi.2006.05.001. Epub 2006 May 18. PMID: 16713330
- Collinge DB, Jensen B, Jørgensen HJ. Fungal endophytes in plants and their relationship to plant disease. *Curr Opin Microbiol.* 2022 Oct;69:102177. doi: 10.1016/j.mib.2022.102177. Epub 2022 Jul 20. PMID: 35870225
- Coleman, Jeffrey J. (2016). The *Fusarium solani* species complex: ubiquitous pathogens of agricultural importance. *Molecular Plant Pathology*, 17(2), 146–158. doi:10.1111/mpp.12289
- Stahl, D.J., Theuerkauf, A., Heitefuss, R. and Schäfer, W. (1994) Cutinase of *Nectria haematococca* (*Fusarium solani* f. sp. *pisi*) is not required for fungal virulence or organ specificity on pea. *Mol. Plant–Microbe Interact.* 7, 713–725.

- 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>
- Kavroulakis, N., Ntougias, S., Zervakis, G. I., Ehaliotis, C., Haralampidis, K., & Papadopoulou, K. K. (2007). 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*, 58(14), 3853–3864. <https://doi.org/10.1093/jxb/erm230>
- 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, 126. <https://doi.org/10.3389/fevo.2018.00126>
- Prodhan MY, Munemasa S, Nahar MN, Nakamura Y, Murata Y. Guard Cell Salicylic Acid Signaling Is Integrated into Absciscic Acid Signaling via the Ca²⁺/CPK-Dependent Pathway. *Plant Physiol.* 2018 Sep;178(1):441-450. doi: 10.1104/pp.18.00321. Epub 2018 Jul 23. PMID: 30037808; PMCID: PMC6130018.