



ΠΑΝΕΠΙΣΤΗΜΙΟ ΘΕΣΣΑΛΙΑΣ

ΤΜΗΜΑ ΒΙΟΧΗΜΕΙΑΣ & ΒΙΟΤΕΧΝΟΛΟΓΙΑΣ

Πτυχιακή Εργασία

***«Έλεγχος έκφρασης γονιδίων βιοσύνθεσης ορμονών του ενδοφυτικού μήκητα
Fusarium solani strain K (FsK) κατά τη διαδικασία εγκατάστασης του στο ριζικό
σύστημα της τοματας»***

Όνομα: Μπιλγκέ Επίθετο :Χουσεϊν , Όνομα πατρός: Οσκάν

Χουσεϊν Μπιλγκέ

Λάρισα 2025

ΕΞΕΤΑΣΤΙΚΗ ΕΠΙΤΡΟΠΗ

1. Παπαδοπούλου Καλλιόπη, Καθηγήτρια Βιοτεχνολογίας Φυτών του Τμήματος Βιοχημείας και Βιοτεχνολογίας του Πανεπιστημίου Θεσσαλίας
2. Καρπούζας Δημήτριος, Καθηγητής Περιβαλλοντικής Μικροβιολογίας και Βιοτεχνολογίας, του Τμήματος Βιοχημείας και Βιοτεχνολογίας, του Πανεπιστημίου Θεσσαλίας
3. Βασιλειάδης Σωτήριος, Επίκουρος Καθηγητής Μοριακής Μικροβιακής Οικολογίας-Γονιδιωματικής, του Τμήματος Βιοχημείας και Βιοτεχνολογίας, του Πανεπιστημίου Θεσσαλίας

Ευχαριστίες

Θα ήθελα να εκφράσω τις ειλικρινείς μου ευχαριστίες στην επιβλέπουσα καθηγήτριά μου, Παπαδοπούλου Καλλιόπη, Καθηγήτρια Βιοτεχνολογίας Φυτών του Τμήματος Βιοχημείας και Βιοτεχνολογίας του Πανεπιστημίου Θεσσαλίας ,για την καθοδήγηση, την εμπιστοσύνη και την πολύτιμη επιστημονική υποστήριξη που μου παρείχε σε όλα τα στάδια της παρούσας εργασίας.

Επίσης, ευχαριστώ θερμά τα μέλη της τριμελούς εξεταστικής επιτροπής, τον κ. Καρπούζα Δημήτριο, Καθηγητής Περιβαλλοντικής Μικροβιολογίας και Βιοτεχνολογίας, του Τμήματος Βιοχημείας και Βιοτεχνολογίας, του Πανεπιστημίου Θεσσαλίας ,και τον κ. Βασιλειάδη Σωτήριο, Επίκουρος Καθηγητής Μοριακής Μικροβιακής Οικολογίας-Γονιδιωματικής, του Τμήματος Βιοχημείας και Βιοτεχνολογίας, του Πανεπιστημίου Θεσσαλίας

για την πολύτιμη συμβολή και την αξιολόγησή τους.

Ιδιαίτερες ευχαριστίες εκφράζω στη Φέκα Μαρία, υποψήφια διδάκτορα, για τη σπουδαία συμβολή της στην παρούσα εργασία. Η συνεργασία μας υπήρξε όχι μόνο επιστημονικά ουσιαστική και παραγωγική, αλλά και ανθρώπινα σημαντική. Στάθηκε δίπλα μου σε κάθε στάδιο του πειραματικού μέρους, με υπομονή, διάθεση και αστείρευτη υποστήριξη. Πέρα από συνεργάτιδα, υπήρξε πραγματικό στήριγμα και φίλη – η σχέση που αναπτύξαμε, σχεδόν αδελφική, αποτέλεσε έναν από τους πιο φωτεινούς άξονες αυτής της διαδρομής.

Επίσης, ευχαριστώ θερμά τα μέλη του εργαστηρίου Βιοτεχνολογίας Φυτών και Περιβάλλοντος για την υποστήριξή τους και το ευχάριστο χώρο εργασίας.

Τέλος, οφείλω ένα μεγάλο ,ευχαριστώ, στην οικογένειά μου, για την υπομονή, τη διαρκή συναισθηματική και οικονομική στήριξη, αλλά και για την εμπιστοσύνη και πίστη στις δυνατότητές μου καθ' όλη τη διάρκεια των σπουδών μου. Ακόμα και στις πιο δύσκολες στιγμές, η αγάπη και η στήριξή τους ήταν το σταθερό μου έδαφος. Θερμές ευχαριστίες απευθύνω και στους φίλους μου, για την ενθάρρυνση, την παρέα, το χιούμορ και την κατανόηση που με συνόδευσαν σε όλα τα στάδια της προσπάθειας αυτής. Η παρουσία τους μου χάρισε ισορροπία, δύναμη και χαμόγελα, ακόμη και στις πιο απαιτητικές στιγμές.

Περιεχόμενα

Περίληψη.....	8
Abstract	9
Εισαγωγή.....	10
Το φυτό της τομάτας (<i>Solanum lycopersicum</i>)	10
Φυτικές ορμόνες	11
Αιθυλένιο.....	12
Ωφελιμοί ενδοφυτικοί μύκητες	15
Παραγωγή φυτοορμονών από ενδοφυτικούς μύκητες	16
<i>Fusarium Solani</i> Strain K	16
Υλικά και Μέθοδοι	17
Φυτικό και Μυκητιακό Υλικό.....	17
Δειγματοληψία και Στερεοσκοπική Παρατήρηση	18
Εκχύλιση RNA και Ανάλυση Γονιδιακής Έκφρασης (RT-qPCR)	18
Συνταγές Θρεπτικών Υλικών και Ρυθμιστικών Διαλυμάτων	19
Ανάλυση Ριζικού Φαινοτύπου	19
Στατιστική Ανάλυση.....	19
Αποτελέσματα	20

Συζήτηση	27
Συμπεράσματα	29
Βιβλιογραφία	31

Περίληψη

Η παρούσα εργασία μελέτησε την επίδραση του ενδοφυτικού μύκητα *Fusarium solani* στέλεχος K (FsK) στην ανάπτυξη του ριζικού συστήματος και στη γονιδιακή έκφραση φυτοορμονικών μονοπατιών τόσο του μύκητα όσο και της τομάτας (*Solanum lycopersicum* cv. Moneymaker), υπό ελεγχόμενες *in vitro* συνθήκες. Μυκηλιακοί δίσκοι τοποθετήθηκαν πλησίον των ριζών και η αλληλεπίδραση παρατηρήθηκε σε τρία χρονικά σημεία: T1 (1 cm απόσταση ρίζας-μυκηλίου), T2 (επαφή υφών με ρίζα) και T3 (τρεις ημέρες μετά την επαφή). Καταγράφηκαν φαινοτυπικές παράμετροι, όπως η επιφάνεια και το μήκος της ρίζας, ο αριθμός πλάγιων ριζών και το νωπό βάρος, ενώ πραγματοποιήθηκε και ανάλυση γονιδιακής έκφρασης φυτικών (*ACS8*, *ETR1*) και μυκητιακών (*FsKSAMT*, *FsKSUNs*, *FsKCOXX*) γονιδίων που σχετίζονται με τη βιοσύνθεση και σηματοδότηση αιθυλενίου. Τα αποτελέσματα ανέδειξαν τη θετική επίδραση του FsK στην αρχιτεκτονική της ρίζας, μέσω ρύθμισης φυτοορμονικών μονοπατιών, υποδεικνύοντας την ικανότητά του να λειτουργεί ως βιοδιεγέρτης ανάπτυξης με εφαρμογές στη βιώσιμη γεωργία.

Abstract

This study investigated the effects of the endophytic fungus *Fusarium solani* strain K (FsK) on root system development and phytohormone-related gene expression in the fungus and in tomato plants (*Solanum lycopersicum* cv. Moneymaker) under controlled *in vitro* conditions. Mycelium plugs were placed near the root zone, and the interaction was examined at three time points: T1 (1 cm distance between root and fungal mycelium), T2 (hyphal contact with root), and T3 (three days after contact). Phenotypic parameters such as root area, root hair length, lateral root number, and fresh weight were assessed, alongside expression analysis of plant (*ACS8*, *ETR1*) and fungal (*FSKSAMT*, *FSKSUNs*, *FSKCOXX*) genes related to ethylene biosynthesis and signaling. The results demonstrated that FsK promotes root development and modulates ethylene-related pathways, highlighting its potential as a plant growth-promoting endophyte for sustainable agriculture.

Εισαγωγή

Το φυτό της τομάτας (*Solanum lycopersicum*)

Η τομάτα ανήκει στην οικογένεια Solanaceae και είναι ένα ποώδες φυτό που καλλιεργείται παγκοσμίως για τους εδώδιμους καρπούς του. Οι βλαστοί και τα φύλλα της καλύπτονται από λεπτές, κολλώδεις τρίχες, ενώ τα φύλλα είναι σύνθετα, πτερωτά, με 5 έως 9 φυλλάρια. Τα άνθη είναι κίτρινα, πενταπέταλα και εμφανίζονται σε ταξιανθίες τύπου κόρυμβου. Ο καρπός είναι ράγα, με ποικιλία σε σχήμα, μέγεθος και χρώμα, ανάλογα με την ποικιλία. (<https://www.britannica.com/plant/tomato>)

Η τομάτα αποτελεί μία από τις σημαντικότερες καλλιέργειες παγκοσμίως, τόσο για φρέσκια κατανάλωση όσο και για επεξεργασμένα προϊόντα. Είναι πλούσια σε βιταμίνες Α και C, καθώς και σε λυκοπένιο, ένα ισχυρό αντιοξειδωτικό με αντικαρκινικές ιδιότητες. Η κατανάλωση τομάτας συνδέεται με την πρόληψη καρδιαγγειακών παθήσεων και την ενίσχυση του ανοσοποιητικού συστήματος. Το 2022, η παγκόσμια παραγωγή τομάτας έφτασε τους 186 εκατομμύρια τόνους, με την Κίνα να είναι ο μεγαλύτερος παραγωγός (Saira et, al 2024).

Η τομάτα έχει καθιερωθεί ως μοντέλο φυτό για τη μελέτη της ανάπτυξης σαρκωδών καρπών, της αρχιτεκτονικής των φυτών και των αλληλεπιδράσεων φυτού-παθογόνου. Η ποικιλία 'Micro-Tom' χρησιμοποιείται ευρέως λόγω του μικρού μεγέθους και του σύντομου κύκλου ζωής της, διευκολύνοντας τη γενετική και μοριακή έρευνα. Το πλήρες γονιδίωμα της τομάτας έχει αλληλουχηθεί, παρέχοντας σημαντικά εργαλεία για τη μελέτη της βιολογίας των φυτών (Raheel et al,2019). Η 'Moneymaker' είναι μια ιστορική ποικιλία τομάτας που αναπτύχθηκε στην Αγγλία στις αρχές του 20ού αιώνα και καταχωρήθηκε για εμπορική πώληση το 1913 από τον F. Stonor του Σαουθάμπτον. Χαρακτηρίζεται από την απροσδιόριστη (indeterminate) ανάπτυξη της,

φτάνοντας σε ύψος έως και 2 μέτρα και απαιτεί υποστήριξη με πασσάλους ή πλέγματα. Οι καρποί της είναι στρογγυλοί, μεσαίου μεγέθους (περίπου 100 γραμμάρια), βαθύ κόκκινο χρώμα και ισορροπημένη, γλυκόξινη γεύση. Η 'Moneymaker' είναι ανθεκτική σε υγρές και θερμές συνθήκες, καθιστώντας την κατάλληλη για καλλιέργεια σε θερμοκήπια και υπαίθριες συνθήκες.

Φυτικές ορμόνες

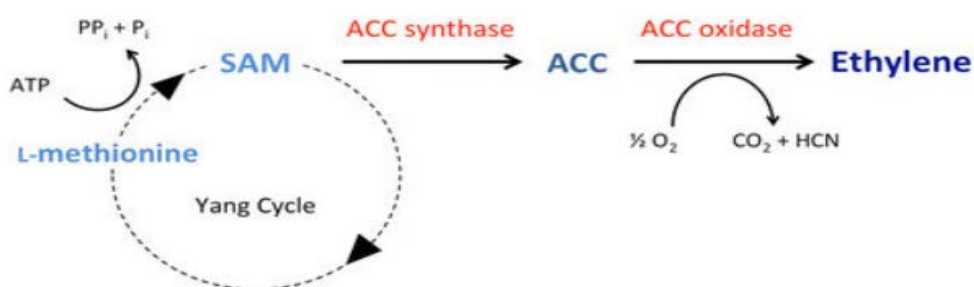
Οι ορμόνες ορίζονται γενικά ως η κατηγορία των σηματοδοτικών μορίων που απελευθερώνονται από συγκεκριμένους αδένες στους οργανισμούς και μεταφέρονται από το κυκλοφορικό σύστημα στα συγκεκριμένα όργανα για να ρυθμίσουν τη φυσιολογία και τη συμπεριφορά (Davies et al 2010). Οι ορμόνες συνδέονται με συγκεκριμένους υποδοχείς, με αποτέλεσμα την αλλαγή της κυτταρικής λειτουργίας και την ενεργοποίηση της οδού μεταγωγής σήματος στο εσωτερικό των κυττάρων (Jiang K et al 2018).

Οι φυτικές ορμόνες, φυτοορμόνες, είναι χημικές ουσίες που παράγονται από τα φυτά και διαδραματίζουν σημαντικό ρόλο στην ανάπτυξη, την άμυνα και την παραγωγικότητα των φυτών και υπάρχουν αρκετές μελέτες σχετικά με τις επιδράσεις τους στα φυτά. (Mukherjee et al 2022). Τα μόρια αυτά προέρχονται από δευτερογενή μεταβολισμό και είναι υπεύθυνα για την προσαρμογή των φυτών στις συνθήκες του περιβάλλοντος. Οι φυτικές ορμόνες επηρεάζουν την αύξηση και την διαφοροποίηση των φυτικών ιστών και οργάνων και μέσω αυτών επιτυγχάνεται η ταχεία ολοκλήρωση του κύκλου ζωής κάθε φυτού. Μία φυτοορμόνη μπορεί να ρυθμίσει πολλές κυτταρικές και αναπτυξιακές διεργασίες του φυτού. Οι κυριότερες κατηγορίες φυτοορμονών είναι οι αυξίνες, οι γιββερελίνες, οι κυτοκνίνες, τα μπρασισινοστεροειδή, το αμπισισικό οξύ (ABA) και το αιθυλένιο. Οι αυξίνες, οι γιββερελίνες, οι κυτοκνίνες και τα μπρασισινοστεροειδή ρυθμίζουν την αύξηση και τη διαφοροποίηση ενώ το αμπισισικό οξύ (ABA) και το αιθυλένιο επιδρούν σε διαδικασίες ωρίμανσης, γήρανσης, ληθάργου και άμυνας (Dongdong et al, 2017).

Αιθυλένιο

Το αιθυλένιο είναι φυτική ορμόνη που ρυθμίζει την ανάπτυξη και την απόκριση των φυτών σε βιοτικές και αβιοτικές καταπονήσεις. Επηρεάζει κυρίως τις διαδικασίες ωρίμανσης και γήρανσης. Συμβάλλει σε μεγάλο βαθμό στην ωρίμανση των καρπών, συμμετέχει σε αποκρίσεις καταπόνησης του φυτού, στη γήρανση των φυτικών οργάνων. Το αιθυλένιο, ως αέρια ορμόνη, διαχέεται ελεύθερα στις μεμβράνες (Dongdong et. Al.2017).

Η βιοσυνθετική οδός του αιθυλενίου αποτελείται από μια καταλυτική μετατροπή τριών σταδίων της L-μεθειονίνης σε αιθυλένιο. Το πρώτο βήμα είναι ο συνδυασμός ATP και L - μεθειονίνης σε S –αδενοσυλ-μεθειονίνη (SAM) από το ένζυμο S –αδενοσυλ-τρανσφεράση της μεθειονίνης. Η S -αδενοσυλ-τρανσφεράση της μεθειονίνης δεν θεωρείται ότι είναι το στάδιο περιορισμού του ρυθμού της βιοσύνθεσης αιθυλενίου, καθώς το SAM απαιτείται για την παραγωγή αιθυλενίου αλλά και για την παραγωγή των πολυαμινών και της λιγνίνης (Caren et al, 2016).



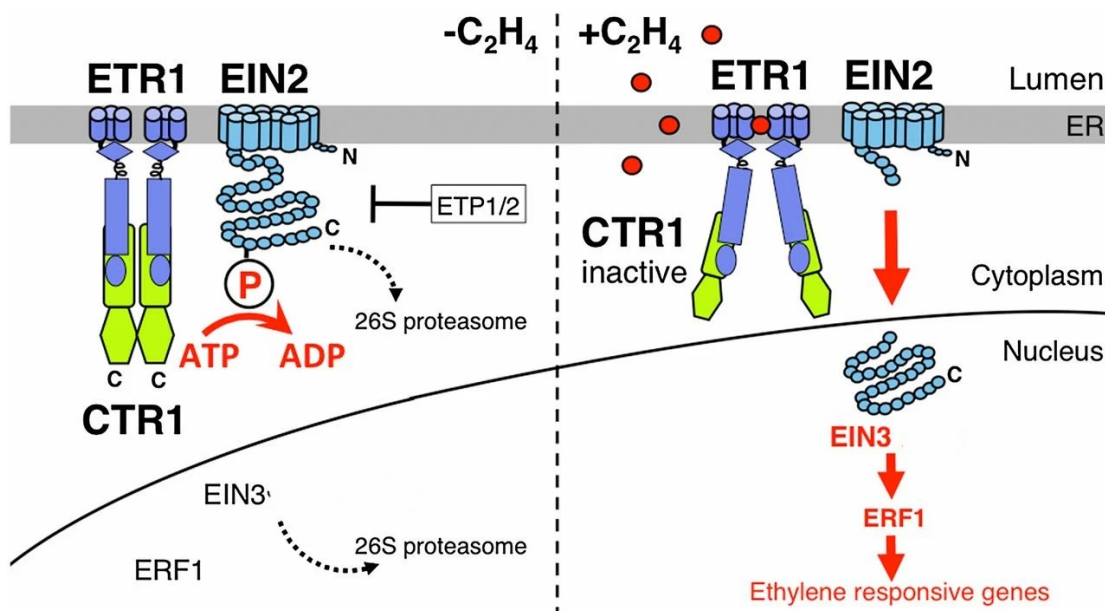
Εικόνα 1 Βιοσύνθεση αιθυλενίου στα φυτά, Caren Chang (2016)

Το SAM στη συνέχεια μετατρέπεται σε (ACC), το οποίο αντιπροσωπεύει το πρώτο βήμα της βιοσύνθεσης αιθυλενίου. Αυτή η μετατροπή προκαλείται από τη συνθάση ACC (ACS), η

οποία απαιτεί φωσφορική πυριδοξάλη για δράση. Αυτό το στάδιο ρυθμίζεται σε μεγάλο βαθμό με την αυξημένη βιοσύνθεση αιθυλενίου και εξαρτάται γενικά από την αυξημένη έκφραση του ACS καθώς είναι ένα εξαιρετικά ασταθές ένζυμο. Η υπερέκφραση του ACS έχει αποδειχθεί ότι οδηγεί σε πολύ αυξημένα επίπεδα παραγωγής αιθυλενίου (Bolt et al, 2014).

Το τελικό στάδιο της βιοσύνθεσης του αιθυλενίου είναι ο σχηματισμός αιθυλενίου από το ACC, το οποίο καταλύεται από το ένζυμο ACC οξειδάση (ACO). Το ACO απαιτεί **O₂** για να δράσει και απελευθερώνει CO₂ ως υποπροϊόν. Οι αναστολείς του ACO περιλαμβάνουν το CoCl₂ και το α-αμινοϊσοβουτυρικό οξύ. Γενικά, το ACO δεν θεωρείται ότι είναι το ρυθμιζόμενο στάδιο της παραγωγής αιθυλενίου σε μεταγραφικό επίπεδο, καθώς οι διεγέρτες της βιοσύνθεσης του αιθυλενίου συνήθως δεν προκαλούν έκφραση του γονιδίου *ACO* (Paul et. al.2003).

Η οδός σηματοδότησης αιθυλενίου εξαρτάται από υποδοχείς αιθυλενίου (ETRs) που εντοπίζονται κυρίως στο ενδοπλασματικό δίκτυο. Απουσία αιθυλενίου, οι υποδοχείς ενεργοποιούν την πρωτεΐνη CTR1 (constitutive triple response 1), μια κίναση σερίνης/θρεονίνης, που λειτουργεί ως αρνητικός ρυθμιστής, η οποία φωσφορυλιώνει την καρβόξυ-τελική επικράτεια EIN2. Έτσι, καταστέλλει τη λειτουργία των μεταγραφικών παραγόντων της οικογένειας EIN (Gavin et al., 2021).



Εικόνα 2 Μεταγωγή σήματος αιθυλενίου στα φυτά (Gavin Cesar, 2021)

Η φωσφορυλίωση του EIN2 αναστέλλει την πρωτεόλυση έτσι η καρβόξυ-τελική επικράτεια δεν μετακινείται στον πυρήνα. Οι μεταγραφικοί παράγοντες EIN3 αποικοδομούνται στον πυρήνα μετά από ουβικιτίνωση από το πρωτεάσωμα 26S. Έτσι, δεν ενεργοποιούνται αποκρίσεις στο αιθυλένιο (Lincoln Taiz et al, 2017).

Παρουσία αιθυλενίου, η σηματοδότηση μέσω του ETR1 καταστέλλεται και η CTR1 είναι ανενεργή. Το μη φωσφορυλιωμένο καρβόξυ-ακρο του EIN2 κόβεται από μια πρωτεάση και μετακινείται στον πυρήνα. Στον πυρήνα το καρβόξυ-άκρο του EIN2 αναστέλλει την ουβικιτίνωση και τον ρυθμό μετατροπής του EIN2 από το πρωτεάσωμα 26S. Ο EIN3 επάγει ένα μεταγραφικό καταρράκτη με την ενεργοποίηση γονιδίων που αποκρίνονται στο αιθυλένιο, μεταξύ των οποίων και ο μεταγραφικός παράγοντας ERF1 οδηγώντας έτσι στην απόκριση του αιθυλενίου (Lincoln Taiz et al, 2017).

Ωφελιμοί ενδοφυτικοί μύκητες

Οι ενδοφυτικοί μύκητες είναι μικροοργανισμοί που εγκαθίστανται εντός των φυτικών ιστών χωρίς να προκαλούν εμφανή συμπτώματα ασθένειας. Αυτοί οι συμβιωτικοί οργανισμοί μπορούν να ενισχύσουν την ανάπτυξη των φυτών, να αυξήσουν την ανθεκτικότητά τους σε βιοτικούς και αβιοτικούς παράγοντες καταπόνησης και να συμβάλλουν στη συνολική υγεία του φυτού (Baron et al, 2021).

Οι ενδοφυτικοί μύκητες ταξινομούνται κυρίως σε δύο κατηγορίες: τους Ασκομύκητες (Ascomycota), όπως τα γένη *Penicillium*, *Colletotrichum* και *Fusarium*, και τους Βασιδιομύκητες (Basidiomycota), όπως τα γένη *Sebacina* και *Piriformospora* (Garcia et al, 2023). Αυτές οι κατηγορίες περιλαμβάνουν είδη με ποικίλες λειτουργίες, από την προώθηση της ανάπτυξης μέχρι την προστασία από παθογόνα (Khalmuratova et al, 2020).

Η αλληλεπίδραση των ενδοφυτικών μυκήτων με το φυτό-ξενιστή βασίζεται σε πολύπλοκα μοριακά σήματα και ανταλλαγές ουσιών (Qian -xi et al, 2024). Οι μύκητες εγκαθίστανται σε διάφορα μέρη του φυτού, όπως ρίζες, βλαστούς και φύλλα, και μπορούν να βελτιώσουν την πρόσληψη θρεπτικών στοιχείων, να ενισχύσουν την ανάπτυξη του ριζικού συστήματος και να αυξήσουν την ανθεκτικότητα του φυτού σε παθογόνα και περιβαλλοντικούς παράγοντες (Garcia et al, 2023). Επιπλέον, οι ενδοφυτικοί μύκητες μπορούν να συνθέσουν ή να επηρεάσουν την παραγωγή φυτοορμονών όπως το ινδολο-3-οξικό οξύ (IAA), τις γιββερελλίνες (GA), το αμπισισικό οξύ (ABA) και το αιθυλένιο. Η παραγωγή αυτών των ορμονών από τους ενδοφυτικούς μύκητες μπορεί να επηρεάσει σημαντικά την ανάπτυξη και την ανθεκτικότητα του φυτού (Wang et al, 2024).

Η αξιοποίηση των ενδοφυτικών μυκήτων στη γεωργία προσφέρει πολλαπλά οφέλη, όπως η βιολογική καταπολέμηση παθογόνων μέσω της παραγωγής αντιμικροβιακών ουσιών, η ανθεκτικότητα σε αβιοτικούς στρεσογόνους παράγοντες όπως ξηρασία, αλατότητα και υψηλές θερμοκρασίες, και η μείωση της χρήσης χημικών λιπασμάτων και φυτοφαρμάκων, προάγοντας βιώσιμες γεωργικές πρακτικές. Επιπλέον, οι ενδοφυτικοί μύκητες μπορούν να συμβάλουν στην προσαρμογή των καλλιεργειών στις αλλαγές του κλίματος, ενισχύοντας την ανθεκτικότητά τους σε ακραίες καιρικές συνθήκες (Sravanthi et al, 2021).

Παραγωγή φυτοορμονών από ενδοφυτικούς μύκητες

Η παραγωγή φυτοορμονών από ενδοφυτικούς μύκητες, όπως το IAA και οι γιββερελλίνες, προάγει την ανάπτυξη του ριζικού συστήματος, ενισχύοντας την επιμήκυνση των ριζών και την ανάπτυξη πλευρικών ριζών. Αυτό οδηγεί σε αυξημένη απορρόφηση θρεπτικών συστατικών και νερού, βελτιώνοντας τη συνολική ανάπτυξη του φυτού (Caihong et al, 2024). Οι ενδοφυτικοί μύκητες μπορούν να ενεργοποιήσουν ή να ρυθμίσουν την ανοσολογική απόκριση του φυτού μέσω της παραγωγής φυτοορμονών όπως το αιθυλένιο και το ABA καθώς αυτές οι ορμόνες εμπλέκονται στην ενεργοποίηση αμυντικών μηχανισμών (Khan et al, 2012; 2013;2014;2015).

Η κατανόηση των μηχανισμών μέσω των οποίων οι ενδοφυτικοί μύκητες παράγουν και ρυθμίζουν τις φυτοορμόνες είναι ζωτικής σημασίας για την ανάπτυξη βιώσιμων γεωργικών πρακτικών και την ενίσχυση της ανθεκτικότητας των καλλιεργειών σε συνθήκες κλιματικής αλλαγής (Bacon et al, 2000).

***Fusarium Solani* Strain K**

Το γένος *Fusarium* είναι ένας νηματοειδής μύκητας που απαντάται στο έδαφος παγκοσμίως και συνδέεται με πολλά είδη καλλιεργειών. Το γένος *Fusarium* χωρίζεται σε 20

σύμπλοκα ειδών. Το ένα από αυτά τα σύμπλοκα είναι το *Fusarium solani* (Vrabka et al, 2019). Ο FsK, είναι ένα ενδοφυτικό, μη παθογόνο, στέλεχος του *Fusarium solani*, το οποίο είχε απομονωθεί από τις ρίζες των φυτών τομάτας που είχαν αναπτυχθεί σε ένα συγκεκριμένο είδος υποστρώματος κομπόστ (Kavroulakis et al., 2007).

Στις ρίζες της τομάτας, ο FsK πολλαπλασιάζεται ενδοκυτταρικά στο φλοιό, και καταλήγει στους αγγειακούς ιστούς. Έτσι, μέσω αυτών μεταφέρεται κατά μήκος του ριζικού συστήματος. Επίσης, έχειδειχθεί ότι βοηθάει στην προστασία του φυτού σε συνθήκες αβιοτικού στρες, όπως σε συνθήκες υδατικής καταπόνησης. Ο μύκητας επιδρά στη λειτουργία των στομάτων, με αποτέλεσμα να ελαχιστοποιεί την απώλεια νερού (Kavroulakis et al., 2018)

Υλικά και Μέθοδοι

Φυτικό και Μυκητιακό Υλικό

Οι σπόροι ντομάτας (*Solanum lycopersicum* cv. Moneymaker) αποστειρώθηκαν επιφανειακά με διάλυμα 4% υποχλωριώδους νατρίου (NaOCl) για 5 λεπτά υπό ήπια ανάδευση και ακολούθησαν έξι πλύσεις με αποστειρωμένο απιονισμένο νερό (dH₂O), η τελευταία εκ των οποίων συνοδευόταν από αναμονή 20 λεπτών. Η διαδικασία πραγματοποιήθηκε εντός θάλαμου νηματικής ροής (laminar flow) για αποφυγή επιμολύνσεων.

Τα σπόρια μεταφέρθηκαν σε τρυβλία Petri με αποστειρωμένα διηθητικά χαρτιά βρεγμένα με dH₂O. Τα τρυβλία σφραγίστηκαν με πάραφιλμ, καλύφθηκαν με αλουμινόχαρτο και τοποθετήθηκαν στο σκοτάδι για 5 ημέρες στους 4 °C ώστε να προωθηθεί η βλάστηση. Στη

συνέχεια, τα σποριόφυτα μεταφέρθηκαν σε τρυβλία με θρεπτικό μέσο Murashige and Skoog (MS) μισής δύναμης, 4 φυτά ανά τρυβλίο, με προσεκτική απόσταση για αποφυγή επικάλυψης των ριζών. Τα τρυβλία σφραγίστηκαν με παραφίλμ και τοποθετήθηκαν σε θάλαμο ανάπτυξης (growth chamber) υπό φωτοπερίοδο 16 h φως / 8 h σκοτάδι στους 22 °C.

Ο ωφέλιμος ενδοφυτικός μύκητας *Fusarium solani* στέλεχος FsK καλλιεργήθηκε σε στερεό θρεπτικό μέσο PDA (Potato Dextrose Agar) στους 26 °C για 4 ημέρες στο σκοτάδι. Για να εξεταστεί η αλληλεπίδραση του ενδόφυτου με τον ξενιστή, χρησιμοποιήθηκαν δίσκια μυκηλίου (διαμέτρου 4 mm), που τοποθετήθηκαν πλησίον του ακρορριζίου (~1 cm απόσταση). Τα φυτά μάρτυρες δεν δέχθηκαν καμία εφαρμογή με τον μύκητα.

Δειγματοληψία και Στερεοσκοπική Παρατήρηση

Η δειγματοληψία πραγματοποιήθηκε σε τρία χρονικά σημεία: (α) όταν το ακρορρίζιο απείχε περίπου 1 cm από το μυκήλιο (T1), (β) κατά την πρώτη επαφή ρίζας-μύκητα (T2) και (γ) τρεις ημέρες μετά την πρώτη επαφή (T3). Τα φυτά αφαιρέθηκαν προσεκτικά από τα τρυβλία και τεμαχίστηκαν σε ρίζα, βλαστό και φύλλα. Κάθε ιστός τοποθετήθηκε σε διαφορετικό σωλήνα erppendorf με μπίλια και καταψύχθηκε σε υγρό άζωτο και κατόπιν αποθηκεύτηκε στους -80 °C. Καθημερινά πραγματοποιήθηκε στερεοσκοπική απεικόνιση των ριζών και καταγραφή του φαινοτύπου.

Εκχύλιση RNA και Ανάλυση Γονιδιακής Έκφρασης (RT-qPCR)

Το RNA απομονώθηκε από ρίζες, χρησιμοποιώντας καθίζηση με χλωριούχο λίθιο (LiCl), μια μέθοδο που επιτρέπει την αποτελεσματική απομάκρυνση πρωτεϊνών και DNA, διασφαλίζοντας υψηλή καθαρότητα του RNA για μεταγενέστερες εφαρμογές. Η ποσοτικοποίηση της γονιδιακής έκφρασης πραγματοποιήθηκε σε δείγματα RNA 10 ng. Η αντίδραση RT-qPCR

πραγματοποιήθηκε με το kit Luna Universal One-Step RT-qPCR (NEB, USA) χρησιμοποιώντας 10 ng RNA ανά αντίδραση. Για το φυτό, το γονίδιο αναφοράς ήταν το ubiquitin, ενώ για τον μύκητα χρησιμοποιήθηκε τμήμα 170 bp του γονιδίου *TefI-α* (Translation Elongation Factor 1α).

Συνταγές Θρεπτικών Υλικών και Ρυθμιστικών Διαλυμάτων

Για την καλλιέργεια του ενδοφυτικού μύκητα χρησιμοποιήθηκε το θρεπτικό μέσο Potato Dextrose Agar (PDA), το οποίο παρασκευάστηκε με 400 g πατάτες, 20 g σουκρόζη και 15 g άγαρ ανά λίτρο απιονισμένου νερού (dH₂O).

Τα διαλύματα που χρησιμοποιήθηκαν για την εκχύλιση RNA περιλάμβαναν Tris-HCl, NaCl, EDTA, Lauryl Sarcosine, LiCl, οξικό νάτριο ρυθμισμένο σε pH 5.2, καθώς και διάλυμα TE (10 mM Tris-HCl / 10 mM EDTA). Αυτά τα ρυθμιστικά διαλύματα ήταν απαραίτητα για την απομόνωση καθαρού RNA και την προστασία του από αποικοδόμηση.

Το θρεπτικό διάλυμα Hoagland, που χρησιμοποιήθηκε για την υποστήριξη της ανάπτυξης των φυτών, περιλάμβανε αποθέματα μακροθρεπτικών στοιχείων όπως KNO₃, Ca(NO₃)₂·4H₂O, KH₂PO₄ και MgSO₄·7H₂O, καθώς και μικροθρεπτικά στοιχεία όπως H₃BO₃, MnCl₂·4H₂O, ZnSO₄·7H₂O, CuSO₄·5H₂O, MoO₃ και Fe-EDTA

Ανάλυση Ριζικού Φαινοτύπου

Η μέτρηση της επιφάνειας της ρίζας και του μήκους των ριζικών τριχών πραγματοποιήθηκε με το λογισμικό ImageJ, ένα ανοιχτού κώδικα εργαλείο επεξεργασίας και ανάλυσης εικόνων.

Στατιστική Ανάλυση

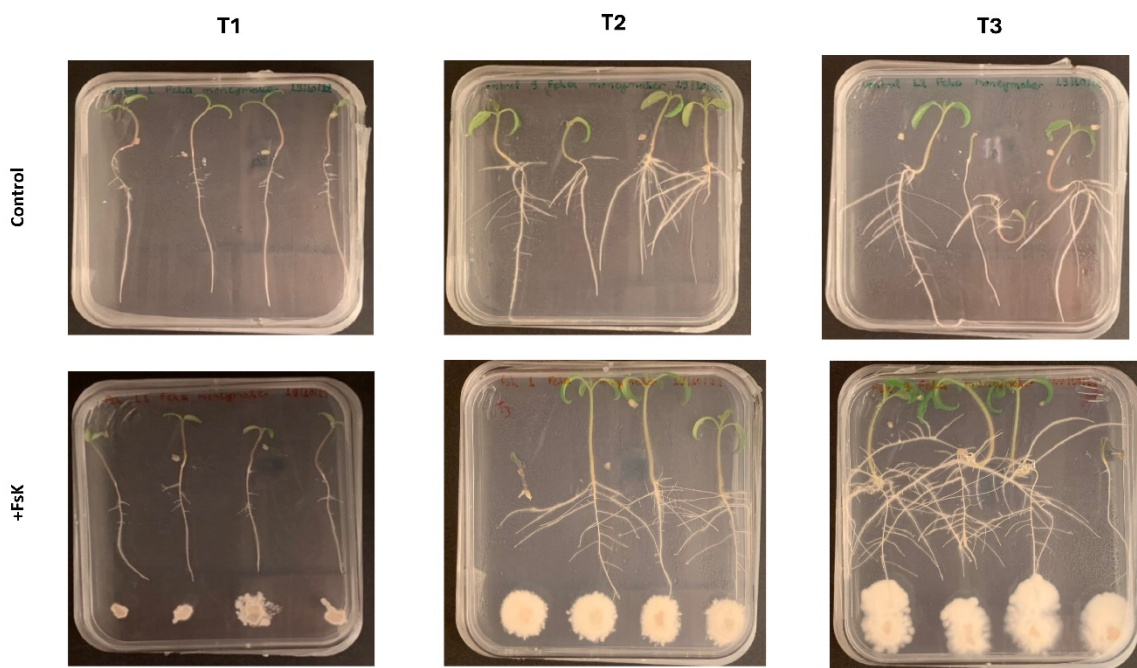
Η στατιστική ανάλυση διεξήχθη με χρήση του λογισμικού RStudio (έκδοση 20.0). Οι διαφορές μεταξύ των ομάδων αξιολογήθηκαν με t-test φοιτητή και θεωρήθηκαν στατιστικώς σημαντικές όταν $p < 0.05$.

Αποτελέσματα

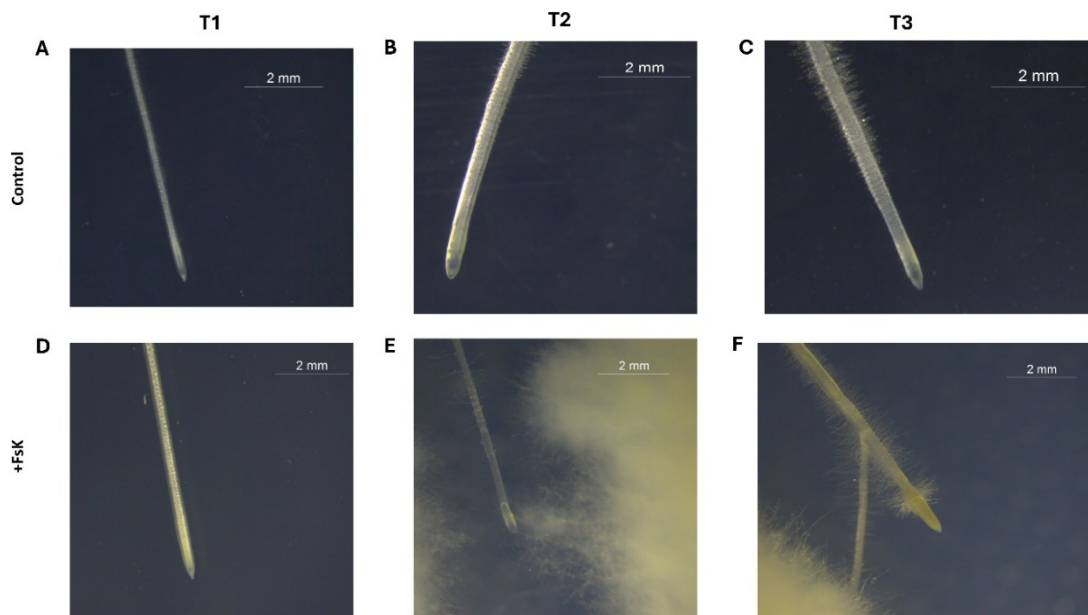
Η παρατήρηση των φυταρίων τομάτας έδειξε σαφείς μορφολογικές διαφορές στο ριζικό σύστημα μεταξύ των φυτών-μαρτύρων και αυτών που συμβίωναν με τον ενδοφυτικό μύκητα *Fusarium solani* FsK. Όπως αποτυπώνεται στις φωτογραφίες, στα χρονικά σημεία T2 και T3 παρατηρείται αυξημένη ανάπτυξη του ριζικού συστήματος στα φυτά που συνυπάρχουν με το μύκητα, με πιο έντονη παρουσία πλάγιων ριζών και μεγαλύτερη επιφάνεια ρίζας σε σχέση με τα αντίστοιχα φυτά-μάρτυρες.

Η στερεοσκοπική παρατήρηση των ριζικών ακρών σε μεγαλύτερη μεγέθυνση ανέδειξε εντυπωσιακές διαφορές στο μήκος και στην πυκνότητα των ριζικών τριχών. Ειδικότερα στο T3, τα φυτά που συμβίωναν με τον FsK παρουσίασαν πλούσια ανάπτυξη ριζικών τριχών, οι οποίες κάλυπταν μεγάλο μέρος της ριζικής επιφάνειας, σε αντίθεση με τα φυτά-μάρτυρες, στα οποία η ανάπτυξη των ριζικών τριχών ήταν σημαντικά περιορισμένη. Η μορφολογία αυτή υποδηλώνει ότι

η παρουσία του FsK ενισχύει τη λειτουργική επιφάνεια απορρόφησης της ρίζας και πιθανώς την πρόσληψη νερού και θρεπτικών στοιχείων κατά τα μεταγενέστερα στάδια της συμβίωσης (Εικ. 3-4).

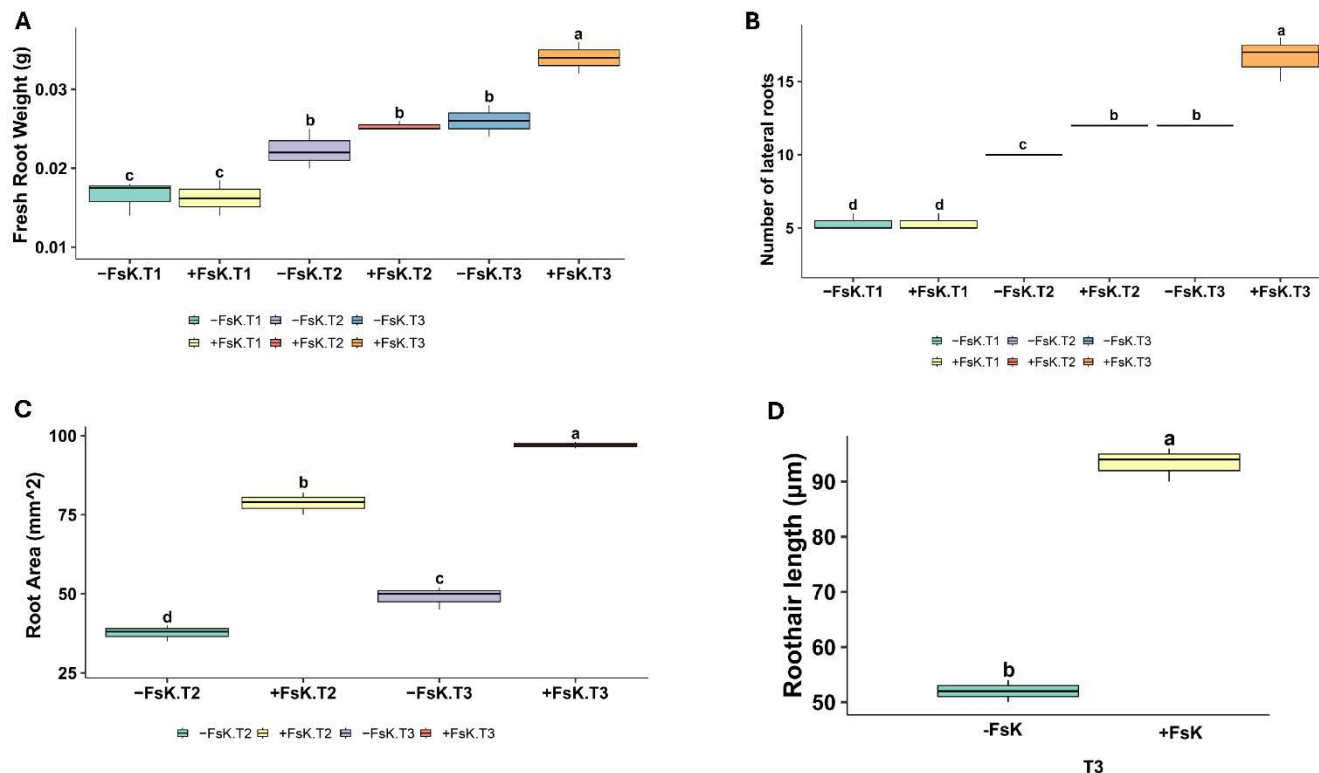


Εικόνα 3. Φωταγραφίες φυταρίων τομάτας (*Solanum lycopersicum* cv. *Moneymaker*) που αναπτύχθηκαν υπό ελεγχόμενες συνθήκες *in vitro*, με ή χωρίς παρουσία του ενδοφυτικού μύκητα *Fusarium solani* **FsK**. Οι εικόνες ελήφθησαν με στερεοσκόπιο Leica σε τρία χρονικά σημεία: T1 (1 cm απόσταση ρίζας-μυκηλίου), T2 (πρώτη επαφή υφών με τη ρίζα) και T3 (τρεις ημέρες μετά την επαφή). Πάνω σειρά: φυτά-μάρτυρες (Control, -FsK). Κάτω σειρά: φυτά που εκτέθηκαν σε plugs του FsK (+FsK). Διακρίνονται εμφανείς μορφολογικές διαφορές μεταξύ των συνθηκών, με σαφώς ενισχυμένη ανάπτυξη του ριζικού συστήματος στα φυτά με παρουσία του FsK στα χρονικά σημεία T2 και T3.



Εικόνα 4. Εικόνες από στερεοσκοπικό μικροσκόπιο (*Leica*) υψηλής μεγέθυνσης που απεικονίζουν τις ριζικές άκρες φυταρίων τομάτας (*Solanum lycopersicum* cv. *Moneymaker*), χωρίς (*Control*, A–C) ή με (+*FsK*, D–F) εφαρμογή του ενδοφυτικού μύκητα *Fusarium solani* *FsK*. Οι εικόνες αντιστοιχούν στα χρονικά σημεία T1 (1 cm απόσταση ρίζας-μυκηλίου), T2 (πρώτη επαφή υφών με τη ρίζα) και T3 (τρεις ημέρες μετά την επαφή). A–C: Ριζικές άκρες φυτών-μαρτύρων. D–F: Ριζικές άκρες φυτών σε παρουσία *FsK*. Η αύξηση του αριθμού και του μήκους των ριζικών τριχών είναι ιδιαίτερα εμφανής στο T3 στα φυτά με *FsK* (F), συγκριτικά με τα αντίστοιχα μάρτυρα (C), υποδεικνύοντας θετική επίδραση του μύκητα στην επιφάνεια απορρόφησης του ριζικού συστήματος.

Η μελέτη του φαινοτύπου του ριζικού συστήματος σε φυτά τομάτας που συμβιώνουν με τον ενδοφυτικό μύκητα *Fusarium solani* *FsK*, ανέδειξε σημαντικές διαφορές σε σχέση με τα φυτά-μάρτυρες. Η επιφάνεια της ρίζας, το μήκος των ριζικών τριχών, το νωπό βάρος και ο αριθμός των πλάγιων ριζών αποτελούν βασικούς δείκτες που χρησιμοποιήθηκαν για την κατανόηση της επίδρασης του μύκητα κατά τα αρχικά στάδια της αλληλεπίδρασης.



Γράφημα 1. Φαινοτυπικά χαρακτηριστικά του ριζικού συστήματος τομάτας υπό την παρουσία (+FsK) ή απουσία (-FsK) του ενδοφυτικού μύκητα *Fusarium solani* FsK. A: Νωπό βάρος ριζικού συστήματος. B: Αριθμός πλάγιων ριζών. C: Επιφάνεια ρίζας. D: Μήκος ριζικών τριχών. Οι μετρήσεις πραγματοποιήθηκαν σε τρία χρονικά σημεία: T1 (1 cm απόσταση ρίζας-μυκηλίου), T2 (επαφή υφών με ρίζα), και T3 (τρεις ημέρες μετά την επαφή). Για τα χαρακτηριστικά A και B, η στατιστική ανάλυση έγινε με διπαραγοντική ανάλυση διακύμανσης (two-way ANOVA), ενώ για τα χαρακτηριστικά C (επιφάνεια ρίζας, μετρήσεις μόνο σε T2 & T3) και D (μήκος ριζικών τριχών, μόνο στο T3), η στατιστική ανάλυση πραγματοποιήθηκε με t-test. Τα διαφορετικά γράμματα υποδηλώνουν στατιστικώς σημαντικές διαφορές ($p < 0.05$). Οι τιμές παρουσιάζονται ως μέσος όρος $\pm$ τυπική απόκλιση ($n = 3$).

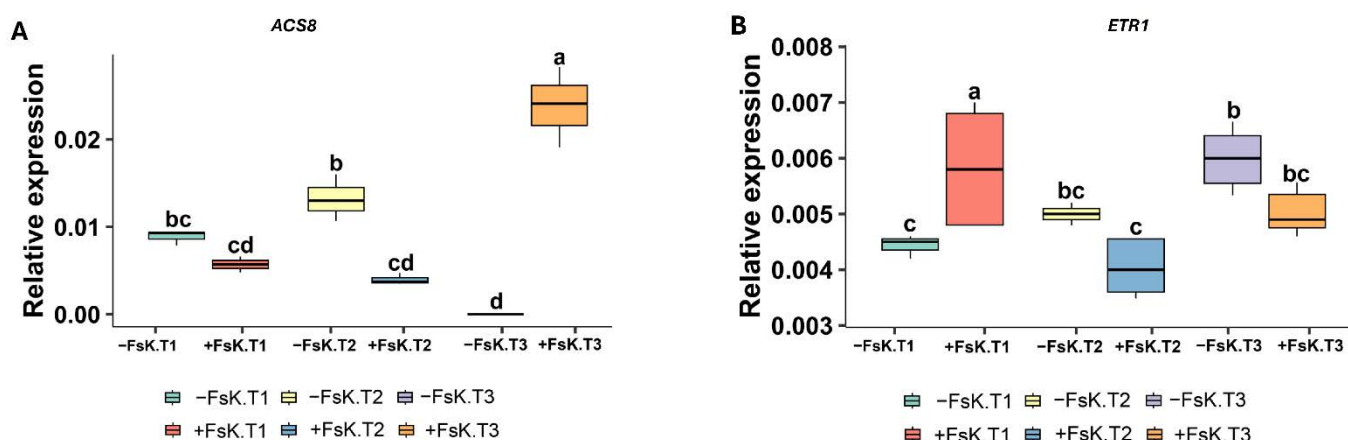
Ειδικότερα, παρατηρήθηκε αύξηση της επιφάνειας της ρίζας στα φυτά που συνυπάρχουν με τον FsK, ήδη από το χρονικό σημείο T2, γεγονός που υποδηλώνει ότι ο ενδοφυτικός μύκητας προάγει την ανάπτυξη του ριζικού συστήματος στα αρχικά στάδια. Η τάση αυτή συνεχίστηκε και στο T3, με την επιφάνεια να διατηρείται αυξημένη συγκριτικά με τους μάρτυρες, υποδηλώνοντας διαρκή επίδραση του μύκητα στη ριζική αρχιτεκτονική. Παράλληλα, ο αριθμός των πλάγιων ριζών ήταν σημαντικά αυξημένος στα φυτά που είχαν συν-καλλιεργηθεί με το ενδόφυτο στα χρονικά σημεία T2 και T3, ενώ στο T1 η αύξηση ήταν οριακή. Το αποτέλεσμα αυτό υποστηρίζει την

υπόθεση ότι ο *FsK* διεγείρει ενεργά τη δημιουργία πλάγιων ριζών, πιθανώς μέσω της ρύθμισης της βιοσύνθεσης φυτοορμονών, όπως το αμπισικό οξύ (ABA) και το αιθυλένιο.

Στο τρίτο χρονικό σημείο, παρατηρήθηκε στατιστικώς σημαντική αύξηση στο μήκος των ριζικών τριχών στα φυτά που εμβολιάστηκαν με *FsK*, γεγονός που μπορεί να σχετίζεται με βελτιωμένη πρόσληψη νερού και θρεπτικών συστατικών. Επιπλέον, το νωπό βάρος των ριζών παρουσίασε μικρή αύξηση στο T1, αλλά η διαφορά έγινε στατιστικώς σημαντική στα T2 και T3, υποδηλώνοντας συσσώρευση ριζικής βιομάζας με την πρόοδο της αλληλεπίδρασης (Γράφημα 1).

Η ανάλυση της σχετικής έκφρασης των γονιδίων *ACS8* και *ETR1* στις ρίζες τομάτας έδειξε ότι η παρουσία του *Fusarium solani* *FsK* επηρεάζει σημαντικά το μοριακό προφίλ της φυτικής απόκρισης. Το γονίδιο *ACS8*, το οποίο εμπλέκεται στη βιοσύνθεση του αιθυλενίου, παρουσίασε σημαντικά υψηλότερα επίπεδα έκφρασης στο χρονικό σημείο T3 στα φυτά που εκτέθηκαν στον μύκητα (+*FsK*), σε σύγκριση με τα φυτά-μάρτυρες, υποδεικνύοντας όψιμη ενεργοποίηση του μονοπατιού παραγωγής αιθυλενίου. Αντίστοιχα, η έκφραση του *ETR1*, ενός υποδοχέα αιθυλενίου, παρουσίασε επίσης σημαντικές διακυμάνσεις μεταξύ των συνθηκών. Η έκφραση του *ETR1* ήταν αυξημένη στο T1 στα φυτά εμβολιασμένα με *FsK*, γεγονός που μπορεί να σχετίζεται με πρόωμη αντίληψη σημάτων από τον μύκητα και ενεργοποίηση της αντίστοιχης σηματοδότησης.

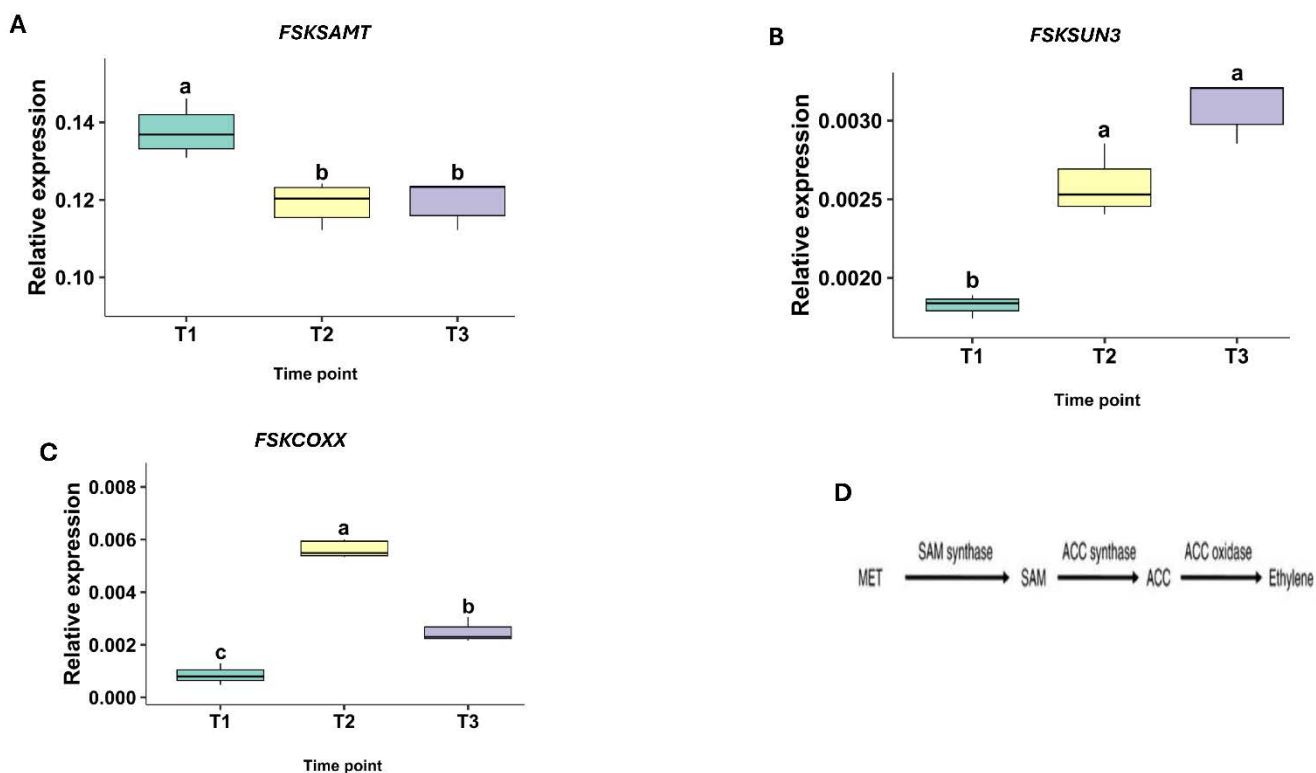
Η στατιστική ανάλυση ανέδειξε στατιστικώς σημαντικές διαφορές τόσο ως προς την παρουσία του μύκητα όσο και ως προς το χρονικό σημείο δειγματοληψίας ($p < 0.05$). Τα ευρήματα αυτά ενισχύουν την υπόθεση ότι ο FsK επηρεάζει δυναμικά την αιθυλενο-εξαρτώμενη απόκριση του φυτού κατά την εγκατάστασή του στη ρίζα, μέσα από στοχευμένη ρύθμιση βασικών γονιδίων που σχετίζονται με τη βιοσύνθεση και τη σηματοδότηση του αιθυλενίου (Γράφημα 2).



Γράφημα 2. Επίπεδα έκφρασης των γονιδίων ACS8 και ETR1 στις ρίζες τομάτας. A: ACS8. B: ETR1. Σύγκριση μεταξύ φυτών-μαρτύρων (-FsK) με φυτά που εκτέθηκαν σε plugs του FsK (+FsK). Οι μετρήσεις πραγματοποιήθηκαν σε τρία διακριτά χρονικά σημεία: T1 (όταν η ρίζα απέχει ~1 cm από το μυκήλιο), T2 (επαφή των υφών με τη ρίζα) και T3 (τρεις ημέρες μετά την αρχική επαφή). Η στατιστική ανάλυση έγινε με διπαραγοντική ανάλυση διακύμανσης (two-way ANOVA). Τα διαφορετικά γράμματα δηλώνουν στατιστικώς σημαντικές διαφορές μεταξύ των πειραματικών συνθηκών ($p < 0.05$). Οι τιμές εκφράζονται ως μέσος όρος $\pm$ τυπική απόκλιση ($n = 3$).

Σε μοριακό επίπεδο, η μελέτη της γονιδιακής έκφρασης των γονιδίων βιοσύνθεσης αιθυλενίου του FsK αποκάλυψε χρονικά ρυθμιζόμενη ενεργοποίηση. Πιο συγκεκριμένα, το γονίδιο *FSKSAMT* (SAM Synthase) παρουσίασε σημαντική αύξηση της έκφρασής του ήδη από το T1 και παρέμεινε ενεργό σε όλα τα χρονικά σημεία, γεγονός που υποδηλώνει πρόωμη και σταθερή εμπλοκή του στην έναρξη του μονοπατιού βιοσύνθεσης αιθυλενίου. Αντίθετα, το *FSKSUNI* (ACC

Synthase) ενεργοποιήθηκε μεταγενέστερα, πιθανόν συμμετέχοντας σε καθυστερημένες ή επικουρικές τροποποιήσεις του μονοπατιού. Τέλος, η διακύμανση της έκφρασης του *FSKCOXX* (ACC Oxidase) υποδεικνύει τον ρόλο του ως ρυθμιστή ακριβείας (fine-tuner) της τελικής φάσης της σύνθεσης αιθυλενίου. Οι παρατηρήσεις αυτές επιβεβαιώνουν τη δυναμική και σταδιακή συμμετοχή του FsK στην αλληλεπίδραση με τον ξενιστή μέσω ρύθμισης των αιθυλενο-εξαρτώμενων μονοπατιών (Γράφημα 3).



Γράφημα 3. Επίπεδα έκφρασης των γονιδίων βιοσύνθεσης αιθυλενίου του μύκητα *Fusarium solani* (FsK) κατά τη διάρκεια της αλληλεπίδρασης *in vitro*. A: Επίπεδα έκφρασης του γονιδίου FSKSAMT (S-adenosyl methionine synthase). B: Επίπεδα έκφρασης του γονιδίου FSKSUN3 (ACC synthase). C: Επίπεδα έκφρασης του γονιδίου FSKCOXX (ACC oxidase) σε ριζικά δείγματα. D: Προτεινόμενο μονοπάτι βιοσύνθεσης αιθυλενίου του FsK, βασισμένο στα πρότυπα έκφρασης των παραπάνω γονιδίων. Οι μετρήσεις πραγματοποιήθηκαν σε τρία διακριτά χρονικά σημεία: T1 (όταν η απόσταση μεταξύ ρίζας και μυκηλίου ήταν ~1 cm), T2 (πρώτη επαφή υφών με τη ρίζα) και T3 (τρεις ημέρες μετά την αρχική επαφή). Η στατιστική ανάλυση πραγματοποιήθηκε με μονοπαραγοντική ανάλυση διακύμανσης (one-way ANOVA). Τα διαφορετικά γράμματα υποδηλώνουν στατιστικώς σημαντικές διαφορές μεταξύ των συνθηκών ($p < 0.05$). Οι τιμές αντιστοιχούν σε μέσους όρους $\pm$ τυπική απόκλιση ($n = 3$).

Συζήτηση

Ο ενδοφυτικός μύκητας *Fusarium solani* στέλεχος FsK επηρεάζει καθοριστικά την αρχιτεκτονική του ριζικού συστήματος, καθώς προκάλεσε αξιοσημείωτη αύξηση της επιφάνειας της ρίζας, του αριθμού των πλάγιων ριζών, του μήκους των ριζικών τριχών και της συνολικής ριζικής βιομάζας. Οι μορφολογικές αυτές τροποποιήσεις υποδηλώνουν ότι ο FsK δρα μέσω της ρύθμισης φυτικών ορμονών, κυρίως του αιθυλενίου (Shahollari et al. 2007). Είναι γνωστό ότι το αιθυλένιο, σε συνεργασία με τις αυξίνες, ρυθμίζει την πλάγια ριζογονία, ενώ η καταστολή του σε ορισμένα στάδια μπορεί να επιτρέπει την έκφραση μονοπατιών κυτονιίνης, που ευνοούν τη διαφοροποίηση των κυττάρων της ριζικής επιδερμίδας (Stepanova et al, 2007; Fukaki & Tasaka, 2009). Παρόμοιες επιδράσεις έχουν καταγραφεί και σε άλλους ωφέλιμους μύκητες, όπως ο *Piriformospora indica*, ο οποίος ενισχύει την ανάπτυξη των ριζών σε κριθάρι μέσω της τροποποίησης των μονοπατιών κυτοκινινών και αυξινών (Shahollari et al. 2007). Επιπλέον, ο μυκορριζικός μύκητας *Rhizophagus irregularis* έχει αποδειχθεί ότι αυξάνει την πλάγια διακλάδωση ριζών σε *Medicago truncatula* μέσω μεταβολής της μεταφοράς και σηματοδότησης της αυξίνης (Etemadi et al. 2014). Αντίστοιχα, ο μύκητας *Trichoderma harzianum* έχει αναφερθεί ότι επηρεάζει την έκφραση γονιδίων σχετικών με τις αυξίνες και τις γιββερελίνες, επιδρώντας στην κυτταρική επιμήκυνση και την ανάπτυξη πλάγιων ριζών (Contreras-Cornejo et al, 2009; Garnica-Vergara et al, 2016). Οι παρατηρούμενες επιδράσεις του FsK φαίνεται να εντάσσονται σε ένα γενικότερο πλαίσιο ενδοσυμβιωτικών μηχανισμών που ενεργοποιούν φυτοορμονικά μονοπάτια, ευνοώντας την ανάπτυξη και προσαρμογή του ριζικού συστήματος.

Στην παρούσα μελέτη, τα φυτά που έχουν αναπτυχθεί στην παρουσία FsK εμφάνισαν έντονη αύξηση της επιφάνειας της ρίζας στα χρονικά σημεία T2 και T3, υποδηλώνοντας επίδραση του ενδοφυτικού μύκητα. Το εύρημα αυτό συμφωνεί με αποτελέσματα που αναφέρουν ότι το *Trichoderma virens* διεγείρει την επιμήκυνση και διακλάδωση των ριζών σε *Arabidopsis* μέσω της σηματοδότησης αιθυλενίου (Contreras-Cornejo et al. 2009). Η σημαντική αύξηση του μήκους των ριζικών τριχών κατά την τελευταία δειγματοληψία T3 ενισχύει την υπόθεση ότι ο FsK πιθανώς να συμβάλλει στην ενίσχυση της απορρόφησης νερού και θρεπτικών, όπως έχει παρατηρηθεί και στον *Rhizophagus intraradices*, ο οποίος αυξάνει την πυκνότητα και το μήκος των ριζικών τριχών σε αραβόσιτο (Ramírez-Flores et al. 2019).

ρύθμιση της έκφρασης των γονιδίων βιοσύνθεσης αιθυλενίου του FsK αναδεικνύει την προσαρμοστικότητα του μύκητα στα διαφορετικά στάδια της αλληλεπίδρασης. Η πρώιμη υπερέκφραση του γονιδίου *FSKSAMT* δείχνει ότι το στέλεχος ενεργοποιεί ταχύτατα το μονοπάτι σύνθεσης αιθυλενίου από τα αρχικά στάδια. Το γονίδιο *SAMT* σχετίζεται με την παραγωγή S-αδενοσυλ-μεθειονίνη, πρόδρομου μορίου τόσο για την παραγωγή αιθυλενίου όσο και για τη μεθυλίωση σημάτων, γεγονός που υποδηλώνει πολλαπλές ρυθμιστικές επιδράσεις του FsK από τα αρχικά στάδια της αλληλεπίδρασης με το φυτό (Wang et al, 2002). Στη συνέχεια, η κλιμακούμενη αύξηση του *FSKSUN3* υποδηλώνει δυναμική αναπροσαρμογή της βιοσύνθεσης αιθυλενίου. Η αυξημένη έκφραση του *SUN3* μπορεί να συσχετίζεται με αλλαγές στην κυτταρική ανάπτυξη ή τη διατήρηση της ισορροπίας αιθυλενίου–αυξίνης κατά τα επόμενα στάδια της συμβίωσης, όπως έχει παρατηρηθεί σε ενδοφυτικές αλληλεπιδράσεις με το ωφέλιμο μύκητα *Piriformospora indica* (Camehl et al, 2010). Η μεταβαλλόμενη έκφραση του *FSKCOXX* ενισχύει τη θέση ότι το εν λόγω γονίδιο λειτουργεί ως ρυθμιστής ακριβείας (fine-tuner), ανταποκρινόμενο στην φυσιολογική κατάσταση του φυτού-ξενιστή. Παρόμοιοι μηχανισμοί "fine-tuning" έχουν περιγραφεί και σε

άλλους μικροοργανισμούς που ρυθμίζουν την έκφραση σχετικών γονιδίων ανάλογα με την αντίδραση του φυτού, εξασφαλίζοντας ισορροπία ανάμεσα στην προώθηση της ανάπτυξης και στην αποφυγή ενεργοποίησης αμυντικών αποκρίσεων (Zamioudis et al, 2013).

Η ικανότητα του FsK να τροποποιεί το ριζικό σύστημα με στοχευμένο τρόπο υποδεικνύει τη δυνατότητα αξιοποίησής του ως βιοδιεγέρτη σε καλλιεργητικά συστήματα με χαμηλή διαθεσιμότητα θρεπτικών. Η ένταξη τέτοιων ωφέλιμων ενδοφυτικών μικροοργανισμών στις πρακτικές της σύγχρονης γεωργίας μπορεί να συμβάλλει στη βιώσιμη ενίσχυση της φυτικής ανάπτυξης και στην καλύτερη εκμετάλλευση των εδαφικών πόρων (Rouphael et al, 2015; Berg et al, 2020).

Συμπεράσματα

Η εργασία ανέδειξε τη σημαντική επίδραση του ενδοφυτικού μύκητα *Fusarium solani* στέλεχος K (FsK) στην τροποποίηση της μορφολογίας του ριζικού συστήματος και στην ενεργοποίηση βασικών γονιδίων που σχετίζονται με τη βιοσύνθεση και τη σηματοδότηση του αιθυλενίου σε φυτά τομάτας. Τα φυτά που εμβολιάστηκαν με τον FsK παρουσίασαν σημαντικά βελτιωμένα χαρακτηριστικά του ριζικού τους φαινοτύπου, όπως αυξημένο αριθμό πλάγιων ριζών, μεγαλύτερη επιφάνεια ρίζας, μεγαλύτερο μήκος ριζικών τριχών και αυξημένο νωπό βάρος.

Οι μοριακές αναλύσεις επιβεβαίωσαν ότι η αλληλεπίδραση φυτού-μύκητα σχετίζεται με την υπερέκφραση συγκεκριμένων γονιδίων του φυτού, όπως τα *ACS8* και *ETR1*, καθώς και γονιδίων που εμπλέκονται στο μονοπάτι βιοσύνθεσης του αιθυλενίου του FsK (*FSKSAMT*, *FSKSUNs*, *FSKCOXX*). Τα επίπεδα έκφρασης αυτών των γονιδίων κατέδειξαν χρονικά ρυθμιζόμενη ενεργοποίηση, με πρόιμη και σταδιακή συμμετοχή των επιμέρους ενζύμων,

υποδηλώνοντας έναν δυναμικό και ευέλικτο μηχανισμό ρύθμισης της συμβιωτικής αλληλεπίδρασης.

Τα ευρήματα της μελέτης αυτής συμβάλλουν στην κατανόηση του ρόλου των ενδοφυτικών μυκήτων ως βιοδιεγερτών (biostimulants) της ανάπτυξης των φυτών και αναδεικνύουν τη σημασία της ρύθμισης φυτοορμονών ως βασικού μηχανισμού στην εγκατάσταση της συμβίωσης. Ο FsK μπορεί να αποτελέσει έναν υποσχόμενο μικροοργανισμό για εφαρμογές στη βιώσιμη γεωργία, ιδιαίτερα σε συστήματα όπου απαιτείται ενίσχυση της ανάπτυξης των ριζών και προσαρμογή σε περιβαλλοντικά στρες.

Βιβλιογραφία

1. **Arpan Mukherjee, Anand Kumar Gaurav, Saurabh Singh, Shweta Yadav, Shiuly Bhowmick, Saman Abeysinghe, Jay Prakash Verma.** The bioactive potential of phytohormones. *Biotechnology Reports*, Volume 35, September 2022.
2. **Baron NC, Rigobelo EC.** Endophytic fungi: a tool for plant growth promotion and sustainable agriculture. *Mycology*. 2021 Jun 29;13(1):39-55.
3. **Berg, G.** The plant microbiome explored: implications for experimental botany. *Journal of Experimental Botany*, 71(3), 645–654, 2020.
4. **Bilal, L., Asaf, S., Hamayun, M.** Plant growth promoting endophytic fungi *Aspergillus fumigatus* TS1 and *Fusarium proliferatum* BRL1 produce gibberellins and regulate plant endogenous hormones. *Symbiosis*, 76, 117–127, 2018.
5. **Broekaert, W.F** The role of ethylene in host-pathogen interactions. *Annual Review of Phytopathology*, 44, 393–416, 2006. DOI: 10.1146/annurev.phyto.44.070505.143425
6. **Caihong Zhao, Johnmark Onyino, Xiquan Gao.** Current Advances in the Functional Diversity and Mechanisms Underlying Endophyte–Plant Interactions, 2024.
7. **Camehl, I., Sherameti, Venus Y, Betheke G, Varma A.** Ethylene signalling and gene expression during the beneficial interaction of *Piriformospora indica* and *Arabidopsis thaliana*. *Molecular Plant-Microbe Interactions*, 23(7), 857–868, 2010.
8. **Camehl, I.** The OXI1 kinase pathway mediates *Piriformospora indica*-induced growth promotion in *Arabidopsis*. *PLoS Pathogens*, 6(5), e1000891, 2010.

9. **Contreras-Cornejo, H. A.** *Trichoderma virens*, a plant beneficial fungus, enhances biomass production and promotes lateral root growth through an auxin-dependent mechanism in *Arabidopsis*. *Plant Physiology*, 149(3), 1579–1592, 2009.
10. **Davies P.J.** The plant hormones: their nature, occurrence, and functions. In: *Plant Hormones*. 2010, pp. 1–15.
11. **Dongdong Hao, Xiangzhong Sun, Biao Ma, Jin-Song Zhang, Hongwei Guo.** Hormone Metabolism and Signaling in Plants. 2017, pp. 203-241.
12. **Etemadi, M.** Auxin redistribution during lateral root formation in *Medicago truncatula* is regulated by AM symbiosis. *Plant Cell*, 26(12), 4750–4764, 2014.
13. **García-Latorre, C., Rodrigo, S., Marin-Felix, Y. et al.** Plant-growth promoting activity of three fungal endophytes isolated from plants living in dehesas and their effect on *Lolium multiflorum*. *Scientific Reports*, 13, 7354, 2023.
14. **Gavin Cesar, Barzallo Diego, Vera Humberto, Lazo Rafael.** Ethylene in post-harvest, technologies for its management and control, 2021.
15. **Hogekamp, C., & Küster, H.** A roadmap of cell-type specific gene expression during sequential stages of the arbuscular mycorrhiza symbiosis. *BMC Genomics*, 14, 306, 2013.
16. **Jiang K., Asami T.** Chemical regulators of plant hormones and their applications in basic research and agriculture. *Bioscience, Biotechnology, and Biochemistry*, 2018.
17. **Khalmuratova I., Choi D.H., Woo J.R., Jeong M.J., Oh Y., Kim Y.G., Lee I.J., Choo Y.S., Kim J.G.** Diversity and Plant Growth-Promoting Effects of Fungal Endophytes Isolated

- from Salt-Tolerant Plants. *Journal of Microbiology and Biotechnology*, 30(11):1680-1687, 2020.
18. **Khan, A. L.**, Endophytic fungi: a tool for plant growth promotion and sustainable agriculture. *Applied Microbiology and Biotechnology*, 94(5), 973–985, 2012.
 19. **Khan, A. L.**, Phytohormone Production Profiles in *Trichoderma* Species and Their Relationship to Plant Growth Promotion. *Frontiers in Microbiology*, 6, 1–10, 2015.
 20. **Khan, A. L.**, Uniting the Role of Endophytic Fungi against Plant Pathogens and Environmental Stresses. *Frontiers in Plant Science*, 4, 1–12, 2013.
 21. **Khan, A. L.**, ACC deaminase-producing endophytic fungal consortia promotes drought stress tolerance in plants. *Frontiers in Plant Science*, 5, 1–12, 2014.
 22. **Khan, A. L.**, Endophytic fungi—big player in plant-microbe symbiosis. *Plant Signaling & Behavior*, 10(9), e1046660, 2015
 23. **Larsen, Paul B.** Ethylene. In: *Encyclopedia of Hormones*, Pages 618-626, 2003.
 24. **Li, Qian-xi., Lin F.cheng , & Su, Zhen-zu.** (2025). Endophytic fungi—Big player in plant-microbe symbiosis. *Biotechnology Reports*, 35, e00748.
 25. **López-Bucio, J.** The role of ethylene in root developmental responses to phosphate deficiency. *Plant Physiology*, 134(3), 1427–1436, 2007.
 26. **Nektarios Kavroulakis, Spyridon Ntougias, Georgios I. Zervakis, Constantinos Ehaliotis, Kosmas Haralampidis, Kalliope K. Papadopoulou.** Role of ethylene in the protection of tomato plants against soil-borne fungal pathogens conferred by an endophytic *Fusarium solani* strain. *Journal of Experimental Botany*, Volume 58, Issue 14, November 2007, Pages 3853–3864.

27. **Ramírez-Flores, M. R.** Arbuscular mycorrhiza increases root hair length and density in maize. *Mycorrhiza*, 29, 155–165, 2019.
28. **Rouphael, Y.** Microbial biostimulants for sustainable agriculture: concepts, mechanisms and applications. *Agronomy for Sustainable Development*, 35(3), 851–876, 2015.
29. **Shahollari, B.** *Piriformospora indica* stimulates root growth of barley independent of plant hormone regulation. *BMC Plant Biology*, 7, 14, 2007.
30. **Taiz, L.** Φυσιολογία και ανάπτυξη φυτών (μτφρ. Κωνσταντίνος Θάνος). Εκδόσεις Utopia, page 473, 2017
31. **Wang Q, Zhang X, Xie Q, Tao J, Jia Y, Xiao Y, Tang Z, Li Q, Yuan M, Bu T.** Exploring Plant Growth-Promoting Traits of Endophytic Fungi Isolated from *Ligusticum chuanxiong* Hort and Their Interaction in Plant Growth and Development. *Journal of Fungi (Basel)*. 2024 Oct 12;10(10):713. DOI: 10.3390/jof10100713
32. **Wang, K.L.C., Li, H., & Ecker, J.R.** Ethylene biosynthesis and signaling networks. *The Plant Cell*, 14(suppl 1), S131–S151, 2002
33. **Zamioudis, C.** Rhizobacterial volatiles and photosynthesis-related signals coordinate root responses to microbial colonization. *The Plant Cell*, 25(2), 491–507, 2013.