



ΠΑΝΕΠΙΣΤΗΜΙΟ ΘΕΣΣΑΛΙΑΣ

ΣΧΟΛΗ ΕΠΙΣΤΗΜΩΝ ΥΓΕΙΑΣ

ΤΜΗΜΑ ΒΙΟΧΗΜΕΙΑΣ & ΒΙΟΤΕΧΝΟΛΟΓΙΑΣ

ΠΤΥΧΙΑΚΗ ΕΡΓΑΣΙΑ

Επίδραση του *dcl2* μεταλλάγματος του ενδοφυτικού μύκητα *Fusarium solani* στέλεχος K (*FsK*) στην αντοχή φυτών τομάτας σε συνθήκες ξηρασίας.



Γιώργος Δ. Παρθένης

UNDERGRADUATE THESIS

Effect of the *dcl2* mutant endophytic fungus *Fusarium solani* strain K (*FsK*) to water stress tolerance of tomato plants.

Τριμελής Επιτροπή

1. Παπαδοπούλου Καλλιόπη (επιβλέπουσα καθηγήτρια), Καθηγήτρια Βιοτεχνολογίας Φυτών, Τμήμα Βιοχημείας και Βιοτεχνολογίας, Πανεπιστήμιο Θεσσαλίας.
2. Καρπούζας Δημήτριος, Καθηγητής Περιβαλλοντικής Μικροβιολογίας και Βιοτεχνολογίας, Τμήμα Βιοχημείας και Βιοτεχνολογίας, Πανεπιστήμιο Θεσσαλίας.
3. Δαλακούρας Αθανάσιος, Ερευνητής Β στο ΕΛΓΟ ΔΗΜΗΤΡΑ.

Ευχαριστίες

Αρχικά θα ήθελα να ευχαριστήσω την κυρία Παπαδοπούλου Καλλιόπη που μου έδωσε την ευκαιρία να εκπονήσω την πτυχιακή μου στο εργαστήριο Βιοτεχνολογίας Φυτών και Περιβάλλοντος καθώς μέσα από τα μαθήματα της στα προηγούμενα έτη οδηγήθηκα στο σημείο όπου βρίσκομαι τώρα.

Θα ήθελα να ευχαριστήσω επίσης την Αργύρη Αντωνία για τις συμβουλές της καθώς και την καθοδήγηση της στην πτυχιακή μου. Τέλος, ευχαριστώ τον Βλέτσο Παναγιώτη, την Λουκία, την Τζένη και τους υπόλοιπους συναδέλφους στο εργαστήριο που συνέβαλαν στον εμπλουτισμό των γνώσεων μου στον τομέα του εργαστηρίου.

Πίνακας περιεχομένων

Εικόνες	6
Περίληψη	7
Abstract	8
1. Εισαγωγή	9
1.1 Τομάτα (<i>Solanum lycopersicum</i>)	9
1.2 Φυτικό στρες και ξηρασία.....	9
1.3 Μηχανισμός RNAi (RNA interference)	10
1.4 Μύκητες	13
1.5 Ενδοφυτικοί μύκητες	15
1.6 <i>Fusarium solani</i> strain K (<i>FsK</i>).....	16
2. Υλικά και μέθοδοι.....	18
2.1 Δημιουργία Υποστρώματος	18
2.2 Field Capacity Test	18
2.2.1 Περιεκτικότητα Υγρασίας (ΠΥ) - Moisture Content (MC).....	18
2.2.2 Ικανότητα Συγκράτησης Νερού(ΙΣΝ)- Water Holding Capacity(WHC)	19
2.3 Αποστείρωση σπόρων.....	19
2.4 Προετοιμασία γλαστρών & Φύτεμα σπόρων	19
2.4.1 Προετοιμασία γλαστρών.....	19
2.4.2 Φύτεμα σπόρων.	20
2.5 Συνθήκες ανάπτυξης.....	20
2.6 Προετοιμασία και εμβολιασμός μύκητα.....	20
2.6.1 Συλλογή κονιδίων	20
2.6.2 Μέτρηση κονιδίων – Πλάκα Neubauer- Εμβολιασμός	21
2.7 Δειγματοληψία	21
2.8 DNA extraction.....	22
2.9 qPCR	23
3. Αποτελέσματα.....	24
3.1 Περιεκτικότητα υγρασίας-(Moisture Content):	24

3.2	Ικανότητα συγκράτησης νερού-Water Holding Capacity (WHC)	25
3.3	Εικόνες φυτών μετά την περίοδο ξηρασίας	26
3.4	Αποτελέσματα μετρήσεων βάρους φυτών.....	28
3.5	Αποτελέσματα qPCR	33
4.	Συζήτηση-σχόλια	33
	Βιβλιογραφία	35

Εικόνες

Εικόνα 1	miRNA	11
Εικόνα 2	Μηχανισμός RNAi	13
Εικόνα 3	Κύκλος ζωής ενός απλού ασκομύκητα (T.N. et al., 2009) [12].	15
Εικόνα 4	Αλληλεπιδράσεις μεταξύ ενδοφυτικών μυκήτων και φυτών: ...	16
Εικόνα 5	Δομή FsKDCL1 και FsKDCL2. (Dalakouras et al, 2023) [23]	18
Εικόνα 6	Πλάκα Neubauer [1].....	21
Εικόνα 7	FsK Stress & FsK No Stress (sideview).....	26
Εικόνα 8	FsK Stress & FsK No Stress (sideview).....	26
Εικόνα 9	Side by side comparison of Control Stress and FsK Stress	27
Εικόνα 10	Side by side Comparison of FsK-Stress and Mutant-Stress ...	27
Εικόνα 11	Side by side comparison of Control-Stress and Mutant-Stress	28
Εικόνα 12	Νωπό βάρος φύλλων.	29
Εικόνα 13	Ξηρό βάρος φύλλων	30
Εικόνα 14	Boxplot Νωπό βάρος βλαστών	31
Εικόνα 15	Boxplot Ξηρό βάρος βλαστών	32
Εικόνα 16	Bar-plot αποτελεσμάτων qPCR.....	33

Περίληψη

Ο μύκητας *Fusarium solani* strain K (*FsK*) είναι ένας ενδοφυτικός μη παθογόνος μύκητας ο οποίος αποικίζει τις ρίζες των φυτών. Ο *FsK* μπορεί να προσδώσει ανθεκτικότητα στο βιοτικό στρες καθώς και στο αβιοτικό στρες όπως στην περίπτωση της ξηρασίας.

Ο μηχανισμός ρύθμισης της γονιδιακής έκφρασης μέσω μικρών RNA μορίων (RNAi) έχει αναφερθεί ως να διαμεσολαβεί στην επικοινωνία οργανισμών (cross-kingdom RNAi) όπως σε περιπτώσεις μεταξύ μικροοργανισμών και φυτών. Έχει προηγουμένως δειχθεί ότι ο *FsK* μεταφέρει μικρά RNAs (small RNAs, sRNAs) στον ξενιστή του, ικανά να επάγουν επιλεκτική σίγηση (RNA interference, RNAi) και επιγενετική τροποποίηση των γονιδίων-στόχων στους ιστούς υποδοχής αυτών των sRNAs.

Η υπόθεση εργασίας μας είναι ότι η επικοινωνία μέσω sRNAs με το φυτό ξενιστή αποτελεί το μηχανισμό (ή ένα από τους μηχανισμούς) μέσω του οποίου επιτυγχάνεται η βελτιωμένη απόκριση του φυτού στις αβιοτικές και βιοτικές καταπονίσεις. Σκοπός αυτής της εργασίας είναι η διερεύνηση της σημασίας υπαρξης ενός λειτουργικού RNAi μηχανισμού στον ίδιο μύκητα προκειμένου να παρατηρηθεί η ωφελιμιστική δράση του μύκητα στον φαινότυπο του φυτού-ξενιστή. Για την εξέταση αυτής της υπόθεσης χρησιμοποιήθηκε και ένα στέλεχος του *FsK* με μετάλλαξη ένθεσης στο γονίδιο *FskDCL2* και, επομένως, απουσία της πρωτεΐνης Dicer Like 2 (DCL2) η οποία κόβει δίκλωνο RNA. Αυτό το στέλεχος ονομάστηκε *dcl2* mutant. Τα φυτά τομάτας τα οποία εξετάστηκαν σε φυσιολογικές συνθήκες καθώς και σε συνθήκες ξηρασίας και παρατηρήθηκε μερική απώλεια της ικανότητας του μύκητα να βελτιώνει την απόκριση αντοχής στην ξηρασία.

Abstract

Fusarium solani strain K (*FsK*) is an endophytic non pathogenic fungi that colonizes the root system of the plants. *FsK* is capable of creating a resistance attribute towards biotic and abiotic stress just like in drought conditions.

The mechanism that regulates gene expression through small RNA molecules (RNAi) is reported to act as a mediator in the communication between organisms (cross-kingdom RNAi) as observed in many instances between plants and fungi. As it has previously been shown, *FsK* can transport small RNAs (sRNAs) to its host. These RNAs can induce selective gene silencing (RNA interference, RNAi) as well as epigenetic changes of the target-genes in the tissues that receive those small RNAs.

Our working hypothesis is that sRNA-mediated communication with the host plant represents the mechanism (or one of the mechanisms) through which the improved response of the plant to abiotic and biotic stresses is achieved. The aim of this study is to investigate the significance of functional RNAi mechanism within the fungus itself in order to assess its condition to the beneficial effects observed in the host plant phenotype. To test this hypothesis, a strain of *FsK* carrying an insertional mutation in the *FsKDCL2* gene was used, resulting in the absence of the Dicer-like 2 (DCL2) protein which cleaves double stranded RNA. This strain was named *dcl2* mutant. Tomato plants were examined under normal condition as well as under drought stress, and a partial loss of the fungus's ability to enhance drought tolerance was observed.

1. Εισαγωγή

1.1 Τομάτα (*Solanum lycopersicum*)

Η τομάτα (*Solanum lycopersicum*) είναι ένα δικοτυλήδονο αγγειόσπερμο ανθοφόρο φυτό της οικογένειας των Στρυγνοειδών (Solanaceae) η οποία περιλαμβάνει καλλιεργούμενα φυτά (πιπεριά, μελιτζάνα, πατάτα) και φαρμακευτικά φυτά (*Atropa belladonna*). Αυτό το φυτό έχει μεγάλη ιστορική σημασία καθώς προήλθε από την Αμερική και μεταφέρθηκε στην Ευρώπη από το Περού το 1535. Αρχικά ονομαζόταν “*Mala peruviana*” και “*Pomí del Peru*” καθώς οι ερευνητές πίστευαν ότι η προέλευση της ήταν από το Περού. Αργότερα, το 1554 αποδόθηκε η λατινική ονομασία “*Pomí d’oro*” η οποία σημαίνει χρυσό μήλο, στην συνέχεια στα Ιταλικά μετατράπηκε σε “*Pomodoro*” (Jenkins et al, 1948). [\[2\]](#)

Η τομάτα είναι ένα φρούτο καθώς έχει μια σύνθετη ωοθήκη ενωμένη με καρπόφυλλα και σύμφωνα με τον ορισμό του Egler (1943) «ο καρπός είναι μια ώριμη ωοθήκη ή και προϊόν πολλών ανθών με τροποποιημένους γειτονικούς ιστούς που διαχωρίζονται ως ενιαία άνθη κατά την ωρίμανση».

Η τομάτα δρα ευεργετικά στον οργανισμό καθώς περιέχει πολλές ευεργετικές ουσίες. Η σπουδαιότερη είναι ένα αντιοξειδωτικό, το λυκοπένιο, το οποίο έχει συσχετιστεί με μείωση της πιθανότητας εμφάνισης καρκίνου και άλλων καρδιαγγειακών νοσημάτων. (Blum A, Monir M, Wirsansky I, Ben-Arzi S, 2005) [\[3\]](#)

1.2 Φυτικό στρες και ξηρασία

Τα φυτά ακολουθούν τρεις βασικές στρατηγικές στην αντιμετώπιση του αβιοτικού στρες:

I. Στρατηγικές διαφυγής (escape), όπως η γρήγορη αναπαραγωγή, χρησιμοποιώντας τα αποθέματα υγρασίας από το χώμα και από τα όργανα του φυτού για την παραγωγή καρπού.

II. Στρατηγικές αποφυγής (avoidance), οι οποίες συμβαίνουν τόσο σε πολυετή όσο και σε μονοετή φυτά και περιλαμβάνουν μεγιστοποίηση της πρόσληψης νερού μέσω δημιουργίας ριζών, την μείωση απώλειας νερού μέσω του κλεισίματος των στομάτων, λυγίσματος των φύλλων και της αντανάκλασης του φωτός από το τρίχωμα των φύλλων.

III. Στρατηγικές αντοχής (tolerance).

Οι στρατηγικές αυτές δεν είναι αποκλειστικές και μπορούν να λειτουργήσουν σε συνδυασμό η μία με την άλλη. (Chaves et al, 2003) [5]

Οι φυτικές ορμόνες έχουν ένα σημαντικό ρόλο στην απόκριση του φυτού στο αβιοτικό στρες και συνεπώς στην ξηρασία. Η κύρια φυτική ορμόνη που ελέγχει αυτό το σύστημα είναι το ABA (αμπισισικό οξύ). Όταν μεταβληθούν οι περιβαλλοντικές συνθήκες (ξηρασία, θερμοκρασία, αλατότητα) στο φυτό τα επίπεδα του ABA αυξάνονται με αποτέλεσμα να κλείνουν τα στόματα του φυτού για την διατήρηση των επιπέδων του νερού. Ο τρόπος με τον οποίο το ABA αυξάνεται στο αβιοτικό στρες οφείλεται στην επαγωγή των γονιδίων παραγωγής του όπως: *LOS6/ABAI* (γονίδιο της εποξειδάσης της ζεαξανθίνης), *LOS5/ABA3* (θειάση του συμπαράγοντα μολυβδαινίου), *AAO3* (οξειδάσης της αλδεϋδης) και το *NCED3* (εποξυγενάση του 9-cis-εποξυκαροτενοειδούς). (Verma et al, 2016) [6]

1.3 Μηχανισμός RNAi (RNA interference)

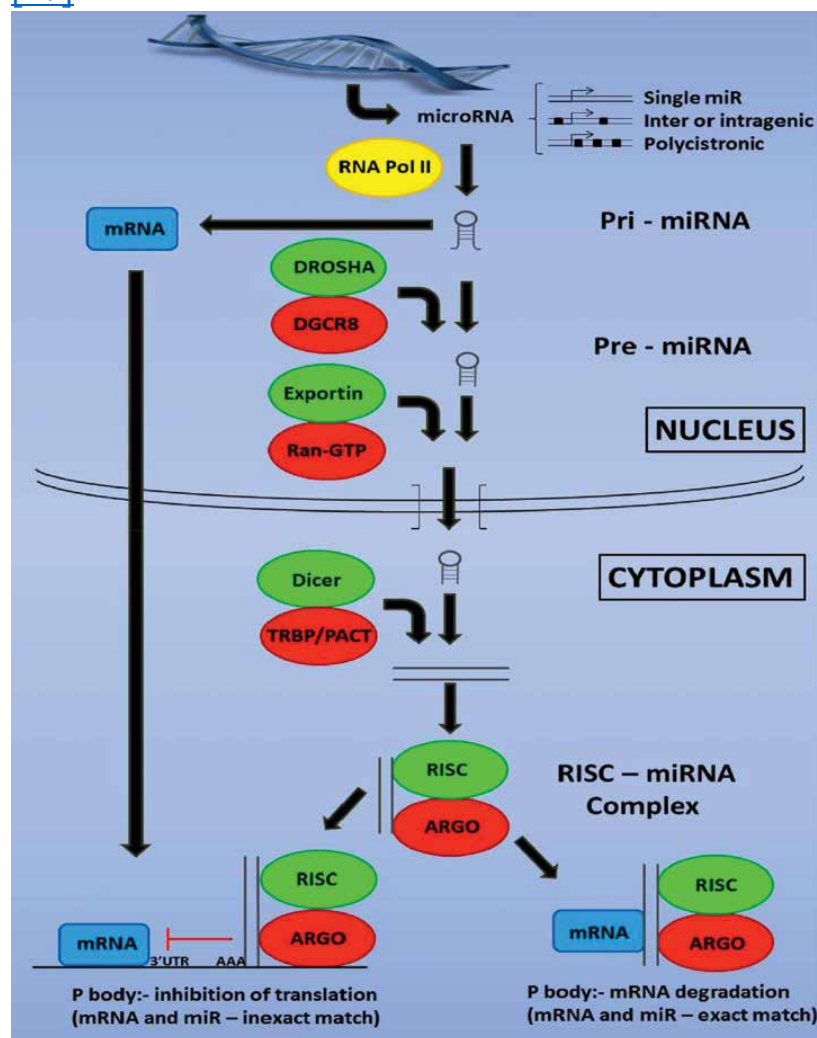
Σύμφωνα με την εθνική βιβλιοθήκη ιατρικής της Αμερικής (NIH/NLM), το RNAi (RNA Interference) ή αλλιώς PTGS (Post-Transcriptional Gene Silencing) είναι ένας εξελικτικά διατηρημένος μηχανισμός απόκρισης στο δίκλωνο RNA (dsRNA), ο οποίος μεσολαβεί στην ανθεκτικότητα τόσο σε ενδογενή όσο και σε εξωγενή νουκλεϊκά οξέα και ρυθμίζει τα γονίδια που κωδικοποιούν πρωτεΐνες. [17]

Ύστερα από πειράματα στον νηματώδη *Caenorhabditis elegans*, παρατηρήθηκε ότι ο μηχανισμός παρεμβολής RNA χρησιμοποιεί το dsRNA -το οποίο απαρτίζεται από τον σημαίνοντα και αντισημαίνοντα κλώνο- και είναι πιο αποδοτικός στην αποσιώπηση από τον σημαίνοντα ή αντισημαίνοντα κλώνο ξεχωριστά. (Fire et al, 1998) [18]

Το ένζυμο Dicer είναι μια νουκλεάση που ανήκει στην οικογένεια των RNασών III οι οποίες κόβουν δίκλωνο RNA. Η Dicer κόβει το ds RNA σε

μικρά τμήματα RNA οδηγού (21-25 νουκλεοτίδια) τα οποία ενσωματώνονται στο σύστημα RISC. Πιο συγκεκριμένα, τα μικρά τμήματα που προκύπτουν από την Dicer ονομάζονται siRNA (short interfering RNA) τα οποία θα ξεδιπλωθούν μέσω μιας ελικάσης στο σύμπλοκο RISC ώστε αυτό να αποκτήσει μια ενεργή μορφή. (Bernstein et al, 2001) [19], (Ketting et al, 2001) [20]

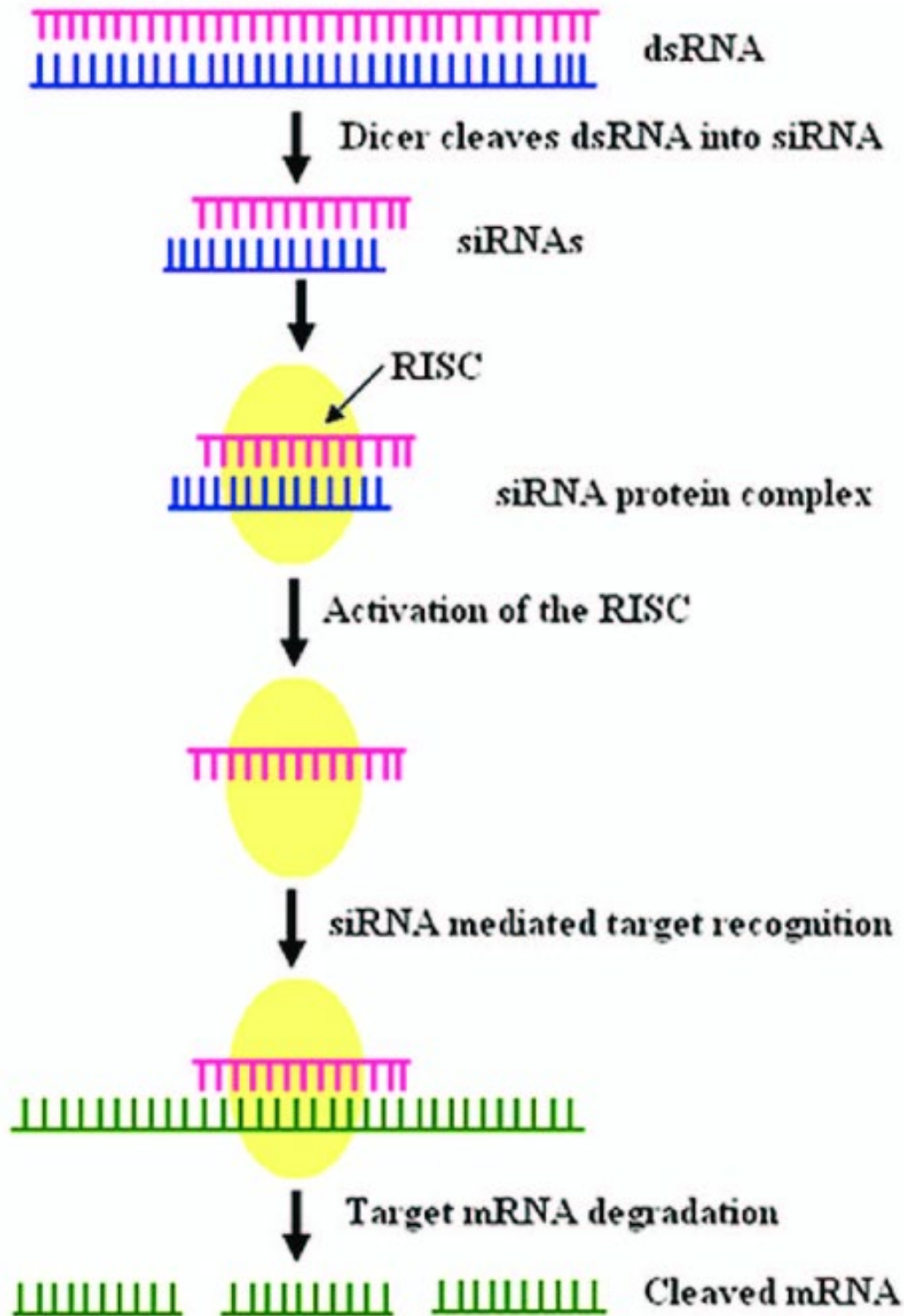
Τα microRNA (miRNA) προέρχονται από την επεξεργασία πρωτογενών miRNA (pri-miRNA) που είναι μεγαλύτερα μόρια και μεταγράφονται από την RNA πολυμεράση II. Ύστερα από επεξεργασία τα pri-miRNA μετατρέπονται σε πρόδρομα RNA (pre-miRNA) μήκους περίπου 70 νουκλεοτιδίων τα οποία έχουν δομή βρόγχου (hairpin). Τέλος η Dicer θα κόψει το pre-miRNA και θα προκύψει το ώριμο miRNA. (Mills et al, 2013) [27]



Εικόνα 1 miRNA

Στάδια παραγωγής και ωρίμανσης του miRNA. Ύστερα από την ωρίμανση του θα δημιουργήσει σύμπλοκα με άλλες πρωτεΐνες με σκοπό την καταστολή της μετάφρασης και την αποικοδόμηση του mRNA. (Mills et al, 2013) [27]

Σε πειράματα στον *Caenorhabditis elegans* και στη *Drosophila* διαπιστώθηκε ότι το σύμπλοκο RISC σχηματίζεται όταν μικρά RNA μόρια, όπως τα siRNA ή τα miRNA, ενσωματωθούν σε πρωτεΐνες αργοναύτες (AGO). Στο αρχικό στάδιο (pre-RISC) το διπλό μόριο RNA αποβάλλει το RNA επιβάτη (passenger-RNA), ενώ ο κλώνος οδηγός (guide RNA) παραμένει στην πρωτεΐνη αργοναύτη. Το guide RNA κατευθύνει το σύμπλοκο RISC σε συμπληρωματικά mRNA μόρια, τα οποία στη συνέχεια διασπώνται ή αποσιωπώνται οδηγώντας σε καταστολή της γονιδιακής έκφρασης. (Iwakawa et al, 2022) [\[21\]](#). (Ali et al, 2010) [\[22\]](#) Ο μηχανισμός RNAi δεν παρατηρείται μόνο σε μεμονωμένους οργανισμούς αλλά και σε ένα σύστημα διαφορετικών οργανισμών. Πιο συγκεκριμένα, υπάρχουν περιπτώσεις όπου μόρια RNA μπορούν να μεταφερθούν από τα φυτά στους μύκητες (και το αντίστροφο) και έτσι να επαχθεί το σύστημα RNAi των μυκήτων. (Cheng et al, 2025) [\[4\]](#) Η μεταφορά των μορίων RNA από τον ένα οργανισμό στον άλλο ονομάζεται cross-kingdom RNAi. Ένα παράδειγμα αυτού του μηχανισμού σε λειτουργία αποτελεί η μεταφορά δύο miRNA του φυτού *Gossypium hirsutum* (βαμβάκι) στις υφές του φυτοπαθογόνου μύκητα Βερτισίλιο (*Verticillium dahliae*) όπου σίγησαν γονίδια του μύκητα που σχετίζονται με την παθογονικότητα. (Qin et al, 2023) [\[24\]](#)



Εικόνα 2 Μηχανισμός RNAi

Μηχανισμός RNAi όπου απεικονίζονται οι σχέσεις μεταξύ του dsRNA, siRNA, DICER, RISC, ενεργοποίηση του RISC και τεμαχισμός του mRNA. (Ali et al, 2010) [\[22\]](#)

1.4 Μύκητες

Οι μύκητες είναι ευκαρυωτικοί οργανισμοί οι οποίοι ιστορικά περιλαμβάνονταν στο φυτικό βασίλειο. Λόγω της έλλειψης της

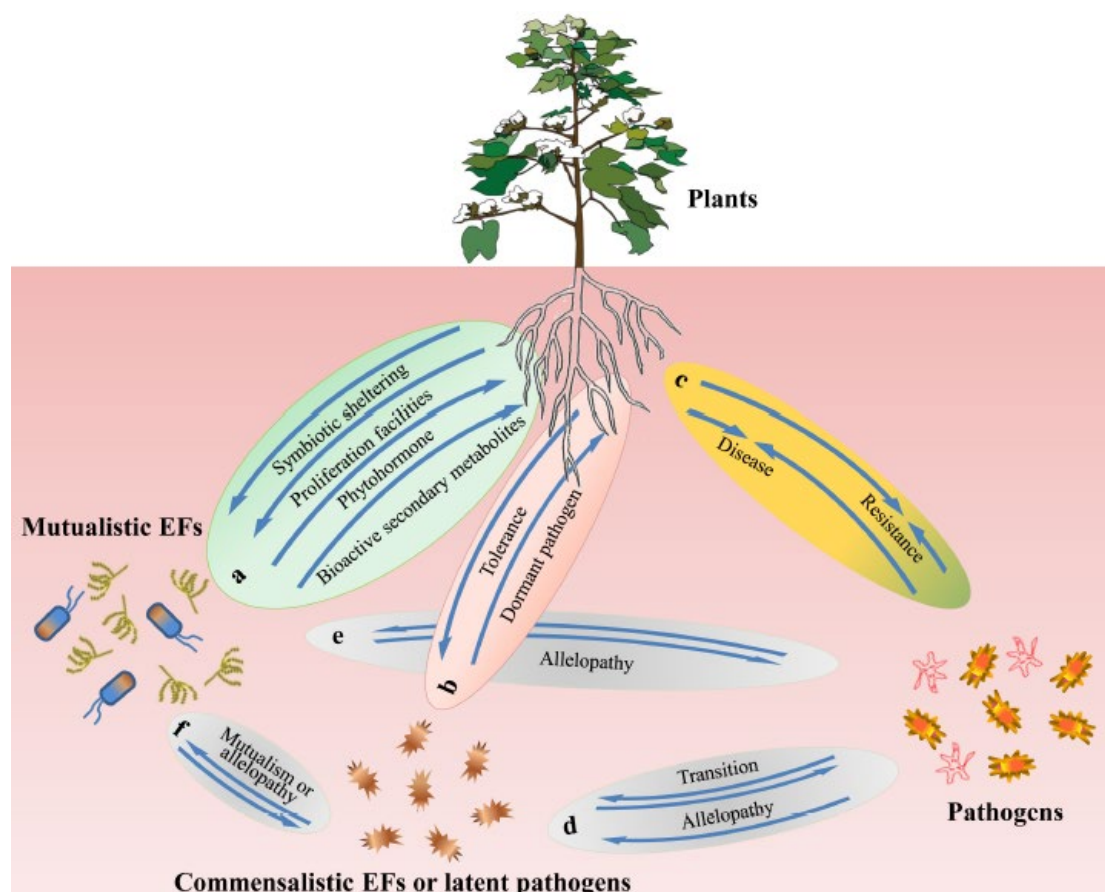
χλωροφύλλης και της διαφοράς των δομικών και μορφολογικών χαρακτηριστικών τους, διαχωρίστηκαν από αυτά. Διαφέρουν επίσης από τους άλλους ζωντανούς οργανισμούς (ζώα) καθώς η ανάπτυξή τους και η πρόσληψη θρεπτικών ουσιών έχει κοινά χαρακτηριστικά με αυτή των φυτών. Το κύριο σώμα του μύκητα ονομάζεται μυκήλιο και από αυτό αναπτύσσονται υφές οι οποίες είναι τριχοειδείς διακλαδώσεις που μοιάζουν με ρίζες φυτών. Οι Μύκητες χωρίζονται σε επτά φύλα: I. Βασιδιομύκητες. II. Ασκομύκητες. III. Γκλομερομύκητες. IV. Βλαστοκλαδιομύκητες. V. Νεοκαλλιμαστιγομύκητες. VI. Μικροσπορίδια. VII. Χυτριομύκητες. Οι Ασκομύκητες και οι Βασιδιομύκητες ανήκουν στο υποβασίλειο των Δικάρων (Britannica 2023.) [\[9\]](#)

Οι μύκητες αναπαράγονται με δύο τρόπους: Την εγγενή και την αγενή αναπαραγωγή. Με αυτόν τον τρόπο αρκετά είδη βρίσκονται σε απλοειδή και διπλοειδή μορφή. Η εγγενής αναπαραγωγή πραγματοποιείται σε τρία στάδια τα οποία περιλαμβάνουν την σύμπτυξη των απλοειδών κύτταρων του ίδιου τύπου (πλασμογαμία), την σύμπτυξη των δυο απλοειδών πυρήνων (καρυογαμία) και τέλος το καινούργιο διπλοειδές κύτταρο μπορεί να υποστεί μείωση για να παράξει καινούργια απλοειδή κύτταρα. (Warren et al, 2018) [\[10\]](#)

Στους Ασκομύκητες η αγενής αναπαραγωγή περιλαμβάνει την δημιουργία κονιδίων. Η μορφολογία των κονιδίων διαφέρει από είδος σε είδος και για αυτό και μπορεί να χρησιμοποιηθεί και για την ταξινόμηση. (Yu et al, 2010) [\[11\]](#)

αντοχή στο αβιοτικό στρες και αντοχή στην ξηρασία. Μπορούν επίσης να δράσουν ανταγωνιστικά με άλλους παθογόνους μικροοργανισμούς, συμβάλλοντας έτσι στην άμυνα του φυτού. (Poveda et al, 2021) [13]

Οι ενδοφυτικοί μύκητες μπορούν να αποικίσουν το εσωτερικό των κυττάρων ή το ενδιάμεσο κενό μεταξύ των φυτικών κυττάρων και κυρίως τις ρίζες των φυτών. Εκτός από την συμβίωση, ορισμένοι ενδοφυτικοί μύκητες μπορούν να προκαλέσουν τοξικότητα και παθογένεια στο φυτό. (Alam et al, 2021) [14]



Εικόνα 4 Αλληλεπιδράσεις μεταξύ ενδοφυτικών μυκήτων και φυτών:

α. Αλληλεπιδράσεις συμβίωσης μεταξύ ενδοφυτικών μυκήτων και φυτών. β. Αλληλεπιδράσεις μεταξύ ενδοφυτικών μυκήτων και φυτών που δεν βλάπτουν το φυτό ή μπορεί να το βλάψουν κάτω υπό ορισμένες συνθήκες. γ. Αλληλεπιδράσεις μεταξύ φυτών και παθογόνων. δ-φ. Αλληλεπιδράσεις μεταξύ των μικροβιωμάτων των αμοιβαίων, των συμβιωτικών και των παθογόνων μυκήτων. (Alam et al, 20210 [14]

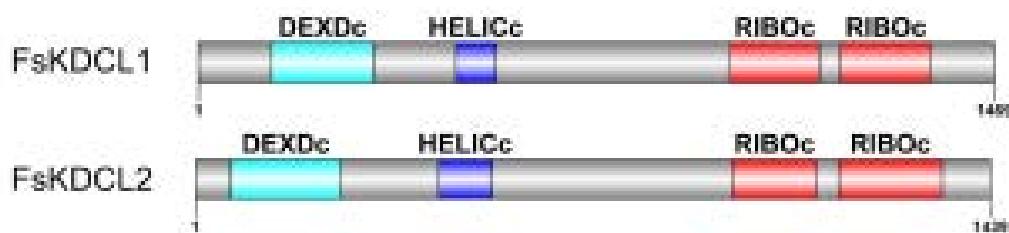
1.6 *Fusarium solani* strain K (FsK)

Ο *Fusarium solani* strain K είναι ένας ενδοφυτικός μη παθογόνος μύκητας που απομονώθηκε από τις ρίζες τομάτας. Ο μύκητας αυτός προστατεύει την τομάτα από διάφορους παθογόνους μύκητες όπως το *Fusarium oxysporum f.sp. radicis-lycopersici* (FORL). (Kavroulakis et al, 2007) [15]

Από την άλλη πλευρά, ο *FsK* καταστέλλει τα γονίδια απόκρισης στα παθογόνα (PR genes) αυξάνοντας έτσι την ευαισθησία του φυτού. (Kavroulakis et al, 2007) [\[15\]](#)

Εκτός από τα παραπάνω, ο *FsK* έχει την ιδιότητα να προσδίδει ανθεκτικότητα στα φυτά σε συνθήκες έλλειψης νερού. Αυτό έχει αποδειχθεί από μελέτες στις οποίες οι τομάτες χωρίς τον *FsK* μαραίνονταν πιο εύκολα και το φωτοσύστημα 2 (PSII) είχε μικρότερη απόδοση σε σχέση με τις τομάτες που είχαν αποικηθεί από τον *FsK*. Τα φυτά με τον *FsK* είχαν επίσης μικρότερα επίπεδα των δεικτών οξείδωσης TBARS και H_2O_2 , με αποτέλεσμα την βελτιωμένη απόκριση σε συνθήκες αβιοτικού στρες. Τέλος, ο *FsK* έχει σημαντικό ρόλο στο κλείσιμο των στομάτων επειδή πιθανόν επηρεάζει την σηματοδότηση του ABA καθυστερώντας την μεταφορά του στα φύλλα και έτσι τα στόματα κλείνουν πιο αργά. Ως αποτέλεσμα το φυτό λαμβάνει παραπάνω CO_2 από το περιβάλλον και παράγει περισσότερη ενέργεια. Το αρνητικό αυτού του μηχανισμού είναι ότι το φυτό θα χάνει περισσότερο νερό από τα στόματα· ωστόσο, ο *FsK* ενδεχομένως, μπορεί να επηρεάσει την έκφραση των ακουαπορινών με αποτέλεσμα την αύξηση της πρόσληψης νερού. (Kavroulakis et al, 2018) [\[16\]](#)

Ύστερα από πρόσφατα πειράματα που πραγματοποιήθηκαν στον *FsK* για να εξεταστεί αν διαθέτει τα βασικά συστήματα του μηχανισμού RNAi, εντοπίστηκαν 2 πρωτεΐνες Dicer Like (*FsKDCL1* και *FsKDCL2*), 2 πρωτεΐνες αργοναύτες (*FsKAGO1* και *FsKAGO2*) και τέσσερις RdRs (*FsKRDR1-4*). Οι *FsKDCL1* και *FsKDCL2* φέρουν τις τυπικές δομικές περιοχές της Dicer, όπως το DEXDc και το HELICc, καθώς και 2 περιοχές RNάσης III (RIBOc), οι οποίες ευθύνονται για την κοπή του dsRNA σε sRNA. Η *FsKDCL2* είναι πιο κοντά φυλογενετικά με τις *FgDCL2* και *NcDCL2* των *Fusarium graminearum* και *Neurospora crassa* αντίστοιχα και έχει πιο σημαντικό ρόλο στο μηχανισμό RNAi μέσω της επεξεργασίας του dsRNA σε siRNA. (Dalakouras et al, 2023) [\[23\]](#)



Εικόνα 5 Δομή FSKDCL1 και FSKDCL2. (Dalakouras et al, 2023) [23]

Στο πλαίσιο της έρευνάς μας εκτός από τον *FsK*, χρησιμοποιήθηκε και ένα μετάλλαγμα του *FsK* με όνομα « *FsK dcl2 mutant* ». Αυτό το μετάλλαγμα έχει προκύψει από μετάλλαξη ένθεσης στο γονίδιο *Dicer Like 2* με την κασέτα έκφρασης του γονιδίου ανθεκτικότητας στην υδρομυκίνη, διακόπτοντας με αυτόν τον τρόπο την έκφραση και την λειτουργία του (Argyri A et al, μη δημοσιευμένα αποτελέσματα). Ο *Fskdcl2* επιλέχτηκε ώστε να εξεταστεί αν η απουσία της πρωτεΐνης DCL2, η οποία συμμετέχει στο μηχανισμό RNAi, επηρεάζει τον αποικισμό του μύκητα στις ρίζες ή/και τον φαινότυπο της τομάτας υπό συνθήκες ξηρασίας σε σύγκριση με τον *FsK* αγρίου τύπου.

2. Υλικά και μέθοδοι

2.1 Δημιουργία Υποστρώματος

Για το παρόν πείραμα αναπτύχθηκαν 30 φυτά (*Solanum lycopersicum*). Για να καλυφθούν οι ανάγκες του πειράματος συνολικά φτιάχτηκε υπόστρωμα για 36 γλαστράκια με αναλογία άμμου προς βερμικουλίτη 3:1. Το υπόστρωμα (άμμος και βερμικουλίτης) αποστειρώθηκε στο αυτόκαυστο στους 121 βαθμούς Κελσίου για 30 λεπτά και στην συνέχεια ακολούθησε ξήρανση για 2 μέρες.

2.2 Field Capacity Test

Το Field Capacity Test χρησιμοποιήθηκε για τον υπολογισμό της περιεκτικότητας της υγρασίας -Moisture Content (MC) καθώς και για την ικανότητα συγκράτησης νερού – Water Holding Capacity (WHC).

2.2.1 Περιεκτικότητα Υγρασίας (ΠΥ) - Moisture Content (MC)

Για τον υπολογισμό της περιεκτικότητας της υγρασίας στο υπόστρωμα αρχικά λήφθηκαν 4 δείγματα. Πριν την μέτρηση του βάρους κάθε δείγματος υποστρώματος είχε ακολουθήσει η μέτρηση του αλουμινόχαρτου για κάθε δείγμα. Στην συνέχεια λήφθηκαν μετρήσεις για το βάρος του αλουμινόχαρτου μαζί με το υπόστρωμα για κάθε δείγμα.

Τέλος, αυτά τα δείγματα μεταφέρθηκαν σε φούρνο για 16 ώρες στους 60 βαθμούς και λήφθηκαν εκ νέου μετρήσεις για τον υπολογισμό της ποσότητας του νερού που χάθηκε.

2.2.2 Ικανότητα Συγκράτησης Νερού(ΙΣΝ)- Water Holding Capacity(WHC)

Για τον υπολογισμό της ικανότητας συγκράτησης νερού χρησιμοποιήθηκαν 4 φλάσκες των 250 ml (ένα για κάθε δείγμα) όπου το καθένα είχε από ένα χωνί και ένα βρεγμένο διηθητικό χαρτί. Λήφθηκαν τριών ειδών μετρήσεις: (Το υπόστρωμα μόνο του, το υπόλοιπο σύστημα χωρίς το υπόστρωμα και όλο το σύστημα μαζί). Τέλος τα δείγματα βράχθηκαν με απεσταγμένο νερό και ύστερα από την επανάληψη αυτού του βήματος τρεις φορές και τα δείγματα κλείστηκαν με αλουμινόχαρτο ξαναμετρήθηκαν ύστερα από 14 ώρες.

2.3 Αποστείρωση σπόρων

Αρχικά για την αποστείρωση των 80 σπόρων *S.lycopesicum* χρησιμοποιήθηκαν 2 σωλήνες erpendorf. Κάθε σωλήνας erpendorf περιείχε 40 σπόρους. Στην συνέχεια σε συσκευή καθέτου νηματικής ροής δημιουργήθηκε διάλυμα 1ml 5% χλωρίνης με 19 ml αποστειρωμένου dH₂O. Σε κάθε erpendorf προστέθηκε από 1 ml του παραπάνω διαλύματος και ακολούθησε ανάδευση για 5 λεπτά. Αφότου πέρασαν τα 5 λεπτά το διάλυμα αφαιρέθηκε από τα erpendorfs τα σπόρια ξεπλύθηκαν με αποστειρωμένο απιονισμένο νερό συνολικά 8 φορές και στην συνέχεια έμειναν στα tubes με το νερό για 20 λεπτά. Έπειτα, σε 4 τρυβλία τοποθετήθηκαν τρία διηθητικά χαρτιά και 3 ml στο καθένα. Στο κάθε τρυβλίο τοποθετήθηκαν από 20 σπόροι σε ίσες αποστάσεις μεταξύ τους. Τέλος, τα τρυβλία τυλίχθηκαν με ταινία parafilm και αποθηκεύτηκαν σε ένα ντουλάπι μέσα στον θάλαμο ανάπτυξης φυτών.

2.4 Προετοιμασία γλαστρών & Φύτεμα σπόρων

2.4.1 Προετοιμασία γλαστρών

Προτού φυτευτούν οι σπόροι οι γλάστρες αποστειρώθηκαν σε νερό με χλωρίνη. Στην συνέχεια προστέθηκαν 650 γραμμάρια υποστρώματος στο κάθε γλαστράκι για 30 γλαστράκια συνολικά. Στην συνέχεια προστέθηκαν 130 γραμμάρια Hoagland solution ώστε το τελικό βάρος στα γλαστράκια να είναι 780 γραμμάρια. Η συνταγή που χρησιμοποιήθηκε για την παραγωγή 1lt Hoagland με βάση τους Johnson et al. (1957) ήταν:

2ml MgSO_4 (1M)

1ml KH_2PO_4 (1M)

1m FeEDTA (0,1M)

1ml Microelements

5ml KNO_3 (2M)

5ml $\text{Ca}(\text{NO}_3)_2 \cdot 4\text{H}_2\text{O}$ (0,1M).

Με βάση τα αποτελέσματα από το Moisture Content και το Water Holding Capacity χρησιμοποιήθηκαν 4 lt Hoagland solution

2.4.2 Φύτεμα σπόρων.

Τα τρυβλία αφαιρέθηκαν 11 ημέρες μετά την αποστείρωση των σπόρων και από αυτούς επιλέχθηκαν αυτοί που είχαν την μεγαλύτερη ρίζα. Κάθε γλαστράκι είχε και ένα φυτό.

2.5 Συνθήκες ανάπτυξης

Οι τομάτες αναπτύχθηκαν σε ειδικό δωμάτιο με φωτοπερίοδο 16 ώρες φως και 8 ώρες σκοτάδι στους 25 °C και λάμβαναν 680 γραμμάρια νερού ανά 2 μέρες ώστε να επιτευχθεί WHC 80%. Δέκα μέρες μετά τον εμβολιασμό θα ξεκινήσουν οι συνθήκες ξηρασίας. Οι τομάτες χωρίστηκαν σε δυο ομάδες, αυτές που θα λάμβαναν κανονικά νερό και αυτές που θα βρισκόντουσαν σε συνθήκες ξηρασίας. Σε αυτές μειώθηκε σταδιακά το νερό μέχρι να μην λάβουν καθόλου νερό ώστε να μην στρεσαριστούν απότομα.

2.6 Προετοιμασία και εμβολιασμός μύκητα

2.6.1 Συλλογή κονιδίων

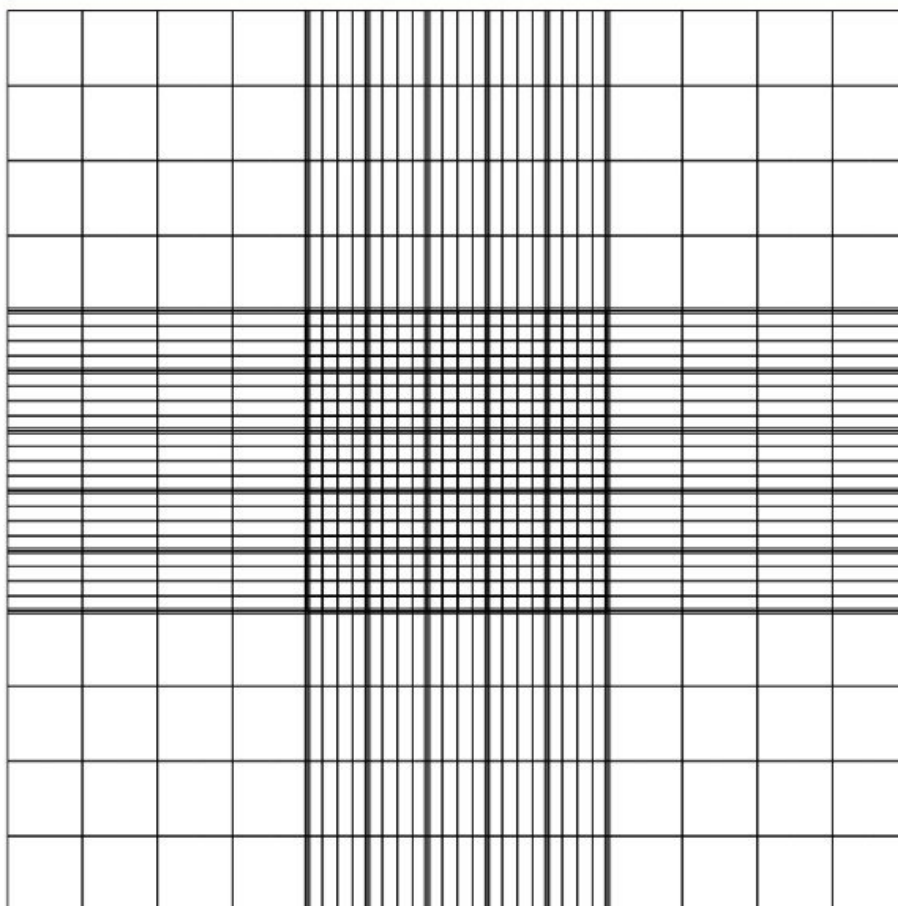
Αρχικά, σε συσκευή καθέτου νηματικής ροής χρησιμοποιήθηκαν 2 falcon των 40 ml με την υγρή καλλιέργεια του *FsK* και 2 falcon των 40 ml με την υγρή καλλιέργεια του *F3* (*FsKdcl2*). Προτού οι υγρές καλλιέργειες τοποθετηθούν στα falcon έχει προηγηθεί φιλτράρισμα μέσω τουλουπανιού σε χωνί ώστε το μυκήλιο να μείνει στο τουλουπάνι και τα κονίδια να περάσουν μέσα στο falcon. Στην συνέχεια τα falcon φυγοκεντρήθηκαν στα 5000xg για 6 λεπτά, στους 16°C. Όταν τελειώσει η φυγοκέντρηση και καθαριστούν με διάλυμα NaCl 0,85% δυο φορές, τα δυο falcon του *FsK* συνδυάζονται σε ένα falcon των 20 ml. Με αντίστοιχο τρόπο θα προκύψει και ένα falcon των 20 ml με το *F3*.

2.6.2 Μέτρηση κονιδίων – Πλάκα Neubauer- Εμβολιασμός

Για να βρεθεί η συγκέντρωση τους, χρησιμοποιήθηκε η μέτρηση με πλάκα Neubauer. Αρχικά έγιναν διαδοχικές αραιώσεις 1 προς 10 ώστε το δείγμα να είναι αραιωμένο 1:1000. Τα κονίδια μετρήθηκαν με χρήση μικροσκοπίου.

Άρα με τον τύπο: stock concentration (conidia/ml) = Average conidia * 10^4 * dilution. Το dilution είναι 10^3 . Έτσι, οι συγκεντρώσεις ήταν $2,8 \cdot 10^8$ και $2,825 \cdot 10^8$ αντίστοιχα.

Από τα 30 φυτά τα 10 εμβολιάστηκαν με 1ml που είχε 10^5 κονίδια για τον wild type *FsK*, τα άλλα 10 εμβολιάστηκαν με 1 ml που είχε 10^5 κονίδια για το *DCL2* Mutant *FsK* και τα 10 control έλαβαν 1 ml διαλύματος NaCl 0,85%.



Εικόνα 6 Πλάκα Neubauer [\[1\]](#)

2.7 Δειγματοληψία

Η διαδικασία με την οποία πραγματοποιήθηκε η δειγματοληψία ήταν:

1. Προσεκτική αφαίρεση της άμμου από τις ρίζες.
2. Αφαίρεση των φύλλων με νυστέρι και αποθήκευσή τους σε ξεχωριστές χάρτινες σακούλες (μια ξεχωριστή σακούλα για όλα τα αληθινά φύλλα κάθε φυτού).
3. Αφαίρεση του βλαστού με νυστέρι και αποθήκευση του σε χάρτινη σακούλα.
4. Πλύση των ριζών με χλωρίνη και στην συνέχεια διαδοχικά ξεπλύματα των ριζών με απεσταγμένο νερό.
5. Αφαίρεση του νερού και τοποθέτηση των ριζών σε υγρό άζωτο και στην συνέχεια στους -80°C .
6. Τα δείγματα του νωπού βλαστού και των νωπών φύλλων ζυγίστηκαν και στην συνέχεια τοποθετήθηκαν σε συσκευή ξήρανσης στους 60°C ώστε να ζυγιστούν ξανά μετά από τρεις μέρες.

2.8 DNA extraction

Για την απομόνωση του DNA ακολουθούν τα εξής βήματα:

1. Το διάλυμα CTAB αναμιγνύεται με β-μερκαπτοαιθανόλη και προθερμαίνεται στους 65°C σε υδατόλουτρο. Η β-μερκαπτοαιθανόλη δρα αναγωγικά και βοηθά στη διάσπαση πρωτεϊνών και πολυφαινολών.
2. Τα δείγματα ρίζας -τα οποία έχουν πολτοποιηθεί σε γουδί- μεταφέρονται από τους -80°C στο υγρό άζωτο.
3. Για κάθε 100 mg ιστού, προστίθενται 300 μl ζεστού CTAB buffer το οποίο περιέχει 3 μl β-μερκαπτοαιθανόλη και στην συνέχεια αναδεύεται πολύ καλά και επωάζεται στους 65°C σε υδατόλουτρο για 20 λεπτά με περιστασιακή ανάδευση.
4. Έπειτα φυγοκεντρούμε στα 13.000 rpm (11.000xg) για 5 λεπτά.
5. Μεταφορά του υδάτινης φάσης σε ένα καινούργιο tube.
6. Προσθήκη 250 μl μείγματος χλωροφόρμιου με ισοαμυλική αλκοόλη σε αναλογία 24:1 και μετά ακολουθεί πολύ καλή ανάδευση στο vortex. Για την απομόνωση του DNA το pH πρέπει να είναι ελαφρώς αλκαλικό, δηλαδή περίπου 7 με 8. Αυτό το βήμα μπορεί να επαναληφθεί παραπάνω από μία φορά, αναλόγως τον ιστό και το πόσο ακάθατο είναι.
7. Πραγματοποιείται φυγοκέντρηση για μία ακόμα φορά στα 13.000 (11.000 xg) για 5 λεπτά.
8. Μεταφορά του υπερκείμενου σε νέο tube.

9. Προσθέτουμε 0,7 επί τον όγκο της κρύας ισοπροπανόλης και αναμειγνύουμε ήπια και στην συνέχεια το επωάζουμε για 10 λεπτά σε θερμοκρασία δωματίου.
10. Δημιουργία στερεού ιζήματος DNA μέσω φυγοκέντρωσης στα 13.000rpm (=11.000xg) για 15 λεπτά σε θερμοκρασία δωματίου
11. Απορρίπτουμε το υπερκείμενο χωρίς να αναμιχθεί το ίζημα και προσθέτουμε 500 μl κρύας αιθανόλης 70%. Έπειτα φυγοκεντρούμε στα 13.000 rpm για 5 λεπτά.
12. Μετά απορρίπτουμε το υπερκείμενο και στεγνώνουμε το DNA μέχρι να εξατμιστεί πλήρως η αιθανόλη.
13. Τέλος, επαναδιαλύουμε το DNA σε 15-25 μl αποστειρωμένου ddH₂O με RNase A (1μl RNase A διαλυμένη σε 50 μl ddH₂O), το κάνουμε vortex και το αποθηκεύουμε στους -20°C.

Το διάλυμα CTAB αποτελείται από 100mM Tris HCl με PH=8, 20 mM EDTA με PH=8 1% w/v PVP, 1,4M NaCl και τέλος 2% w/v Βρωμίδιο κετυλοτριμεθυλαμμωνίου. Ακολουθεί αποστείρωση για 5 λεπτά στους 121°C.

Για 100 ml μίγματος χλωροφορμίου με ισοαμυλική αλκοόλη (24:1), αναμείξαμε 96ml χλωροφόρμιο και 4 ml ισοαμυλική αλκοόλη σε ένα γυάλινο μπουκάλι duran, το καλύψαμε με αλουμινόχαρτο και το αποθηκεύσαμε στους 4°C σε ψυγείο μέχρι να το χρησιμοποιήσουμε.

2.9 qPCR

Για την πραγματοποίηση της qPCR αρχικά προετοιμάστηκε μείγμα για 100 wells το οποίο περιείχε: 500μl 2x MM SYBR, 20 μl F(Forward primer), 20 μl R(Reverse primer) και 360 μl ddH₂O. Κάθε πηγαδάκι που χρησιμοποιήθηκε είχε από 9μl από το παραπάνω μείγμα. Πραγματοποιήθηκαν διαδοχικές αραιώσεις του πλασμιδιακού DNA (10^0 – 10^7) ώστε να δημιουργηθεί πρότυπη καμπύλη. Κάθε αραιώση είχε τρεις τεχνικές επαναλήψεις ενώ τα δείγματα που χρησιμοποιήθηκαν είχαν δυο τεχνικές επαναλήψεις. Τέλος στα πηγαδάκια για τα δείγματά μας προσθέσαμε 1μl DNA από αυτό που είχαμε πάρει από το DNA extraction. Τα πηγαδάκια με NTC είχαν 1μl ddH₂O και 9μl από το μείγμα που παρασκευάσαμε παραπάνω. Να σημειωθεί ότι για την μεταφορά όλων αυτών των αντιδραστηρίων χρησιμοποιήθηκε πιπέτα 1-10μl με συνεχή αλλαγή των tips ώστε να μην επηρεαστούν τα αποτελέσματα. Όταν τελείωσε η μεταφορά, τοποθετήθηκε ειδική μεμβράνη με την οποία τα πηγαδάκια σφραγίστηκαν ώστε να μην υπάρχει κίνδυνος επιμόλυνσης. Έστερα ακολουθήθηκε το πρωτόκολλο της αντίδρασης Luna Universal

One-Step RT-qPCR-NEB της εταιρείας New England Biolabs και η ποσοτικοποίηση των προϊόντων της αντίδρασης έγινε με την δέσμευση φθορίζουσας χρωστικής SYBR Green.

Η αντίδραση πραγματοποιήθηκε σε θερμοκυκλοποιητή πραγματικού χρόνου με το εξής πρόγραμμα θερμοκρασιών:

1. Αρχική αποδιάταξη στους 95°C για 3 λεπτά, για την ενεργοποίηση της DNA πολυμεράσης και την πλήρη αποδιάταξη των δίκλωνων μορίων DNA.
2. 40 κύκλοι ενίσχυσης, καθένας από τους οποίους περιλάμβανε: Αποδιάταξη στους 95°C για 15 δευτερόλεπτα. Υβριδισμό και πολυμερισμό στους 60°C για 20 δευτερόλεπτα, με φθορισμομετρία (Plate Read) στο τέλος κάθε κύκλου.
3. Καμπύλη τήξης (melt curve analysis): Ταχεία αποδιάταξη στους 95°C για 5 δευτερόλεπτα. Σταθεροποίηση στους 55°C για 5 δευτερόλεπτα. Σταδιακή αύξηση της θερμοκρασίας από 55°C έως 95°C, με βήματα 0,5°C, και ανάγνωση σήματος φθορισμού (Plate Read) σε κάθε βήμα, για τον έλεγχο της ειδικότητας του προϊόντος ενίσχυσης.

Οι primers που χρησιμοποιήθηκαν ήταν: ο ITS_VS_F με αλληλουχία TGGTCATTTAGAGGAAGTAA και ο ITS_VS_R με αλληλουχία GGTATGTTTACAGGGTTGATG. Από αυτούς προκύπτει προϊόν ενίσχυσης που έχει μήκος 102 ζεύγη βάσεων. Οι συγκεκριμένοι primers στοχεύουν στο ITS (Internal Transcribed Spacer) το οποίο αποτελεί ένα καθιερωμένο μοριακό δείκτη για την ανίχνευση μυκήτων. (Schoch et al, 2012) [\[26\]](#)

Τα αποτελέσματα από την qPCR με απόλυτη ποσοτικοποίηση αναλύθηκαν στο πρόγραμμα R όπου έγινε λογαρίθμηση των τιμών, levene's test, Shapiro-Wilk test, One-way Anova και Tukeys test.

3. Αποτελέσματα

3.1 Περιεκτικότητα υγρασίας-(Moisture Content):

Η περιεκτικότητα της υγρασίας υπολογίζεται από τον τύπο:

$$MC = 100\% * [(W_1 - W_2) / (W_1 - W_{cont})]$$

Το W_1 αντιστοιχεί στο βάρος του υποστρώματος και του δοχείου πριν την ξήρανση.

Το W_2 αντιστοιχεί στο βάρος του υποστρώματος και του δοχείου μετά την ξήρανση

Το W_{cont} αντιστοιχεί στο βάρος του δοχείου

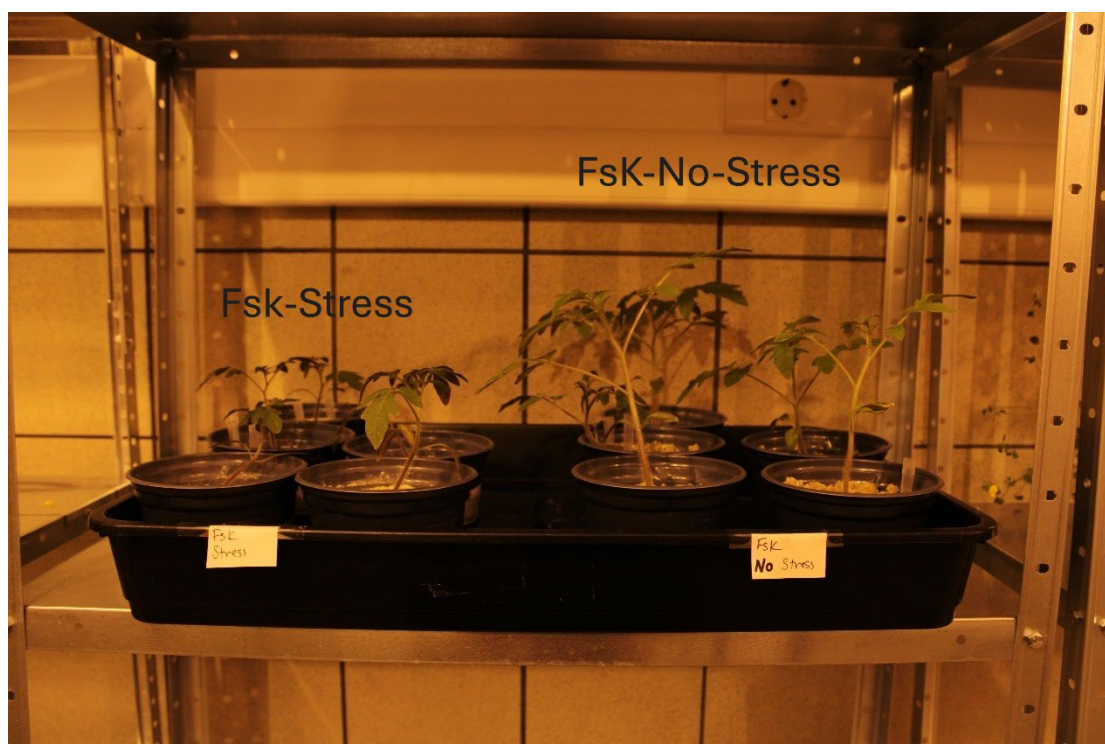
3.2 Ικανότητα συγκράτησης νερού-Water Holding Capacity (WHC)

Ο τύπος για τον υπολογισμό του WHC είναι $WHC = 100 * [(B-X) + (W_2 - W_1)] / X$

Όπου το B είναι το βάρος του εδάφους που προστέθηκε στο χωνί, X είναι το ξηρό βάρος εδάφους που προστέθηκε στο χωνί, W_2 είναι το βάρος του εδάφους μετά το πότισμα και το W_1 είναι το βάρος του εδάφους πριν το πότισμα.

Για να πετύχουμε 80% WHC βρήκαμε ότι πρέπει να ποτίσουμε με 130 ml νερού χρησιμοποιώντας τον τύπο: $\text{ml νερού} = (WHC - MC) * \text{Βάρος υποστρώματος} / 100 \%$

3.3 Εικόνες φυτών μετά την περίοδο ξηρασίας



Εικόνα 7 Fsk Stress & Fsk No Stress (sideview)



Εικόνα 8 Fsk Stress (γλαστράκι 5) & Fsk No Stress (γλαστράκι 10) (sideview)



Εικόνα 9 Side by side comparison of Control Stress (pot 26) and FsK Stress (pot 6)



Εικόνα 10 Side by side Comparison of FsK-Stress (pots 6 & 10) and Mutant-Stress (pots 17 & 20)



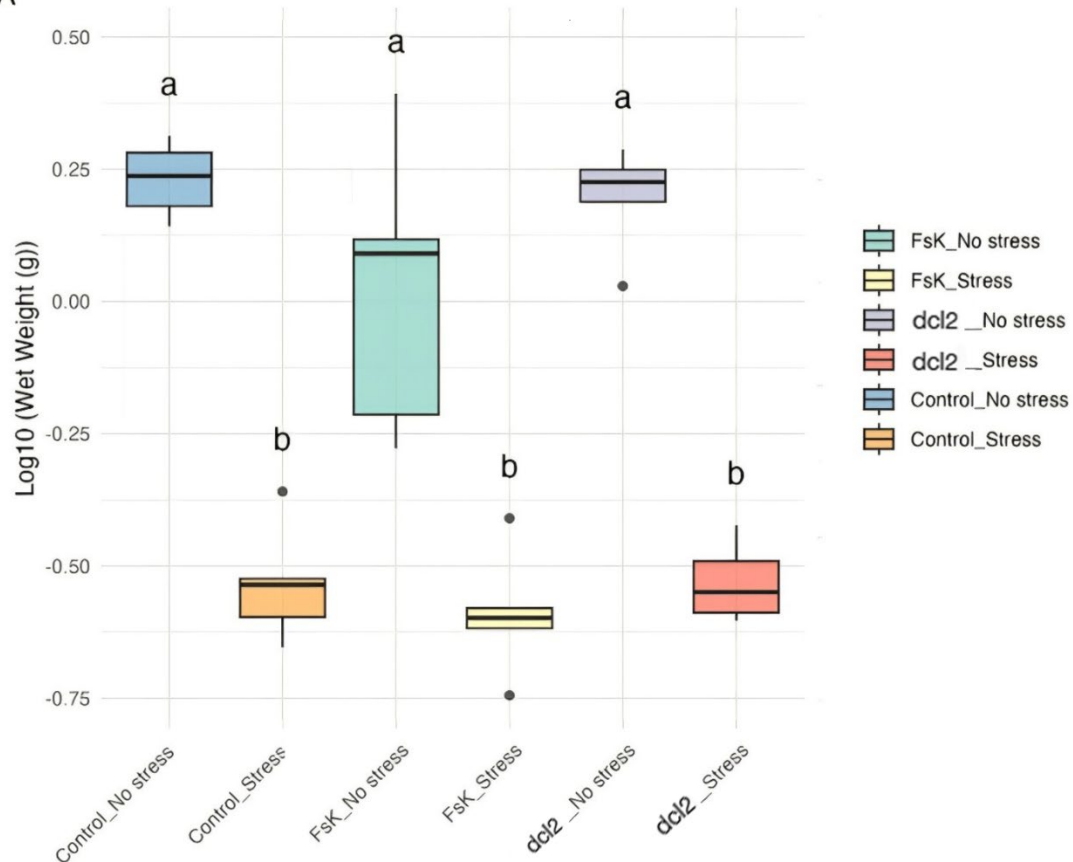
Εικόνα 11 Side by side comparison of Control-Stress (pots 27 &30) and Mutant-Stress (pots 17 &20)

3.4 Αποτελέσματα μετρήσεων βάρους φυτών

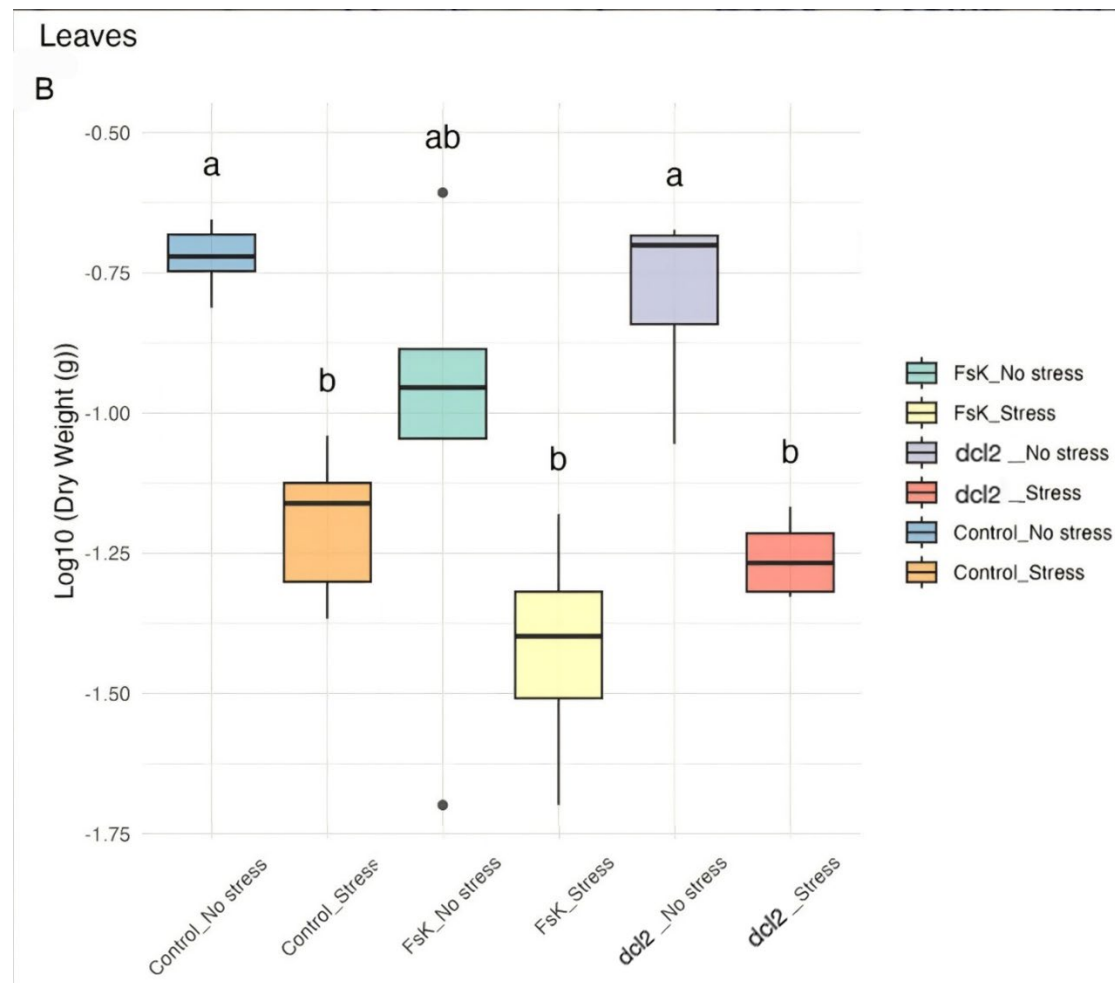
Τα βάρη αναλύθηκαν με one-way ANOVA και Tukeys και προέκυψαν τα ακόλουθα box plot:

Leaves

A



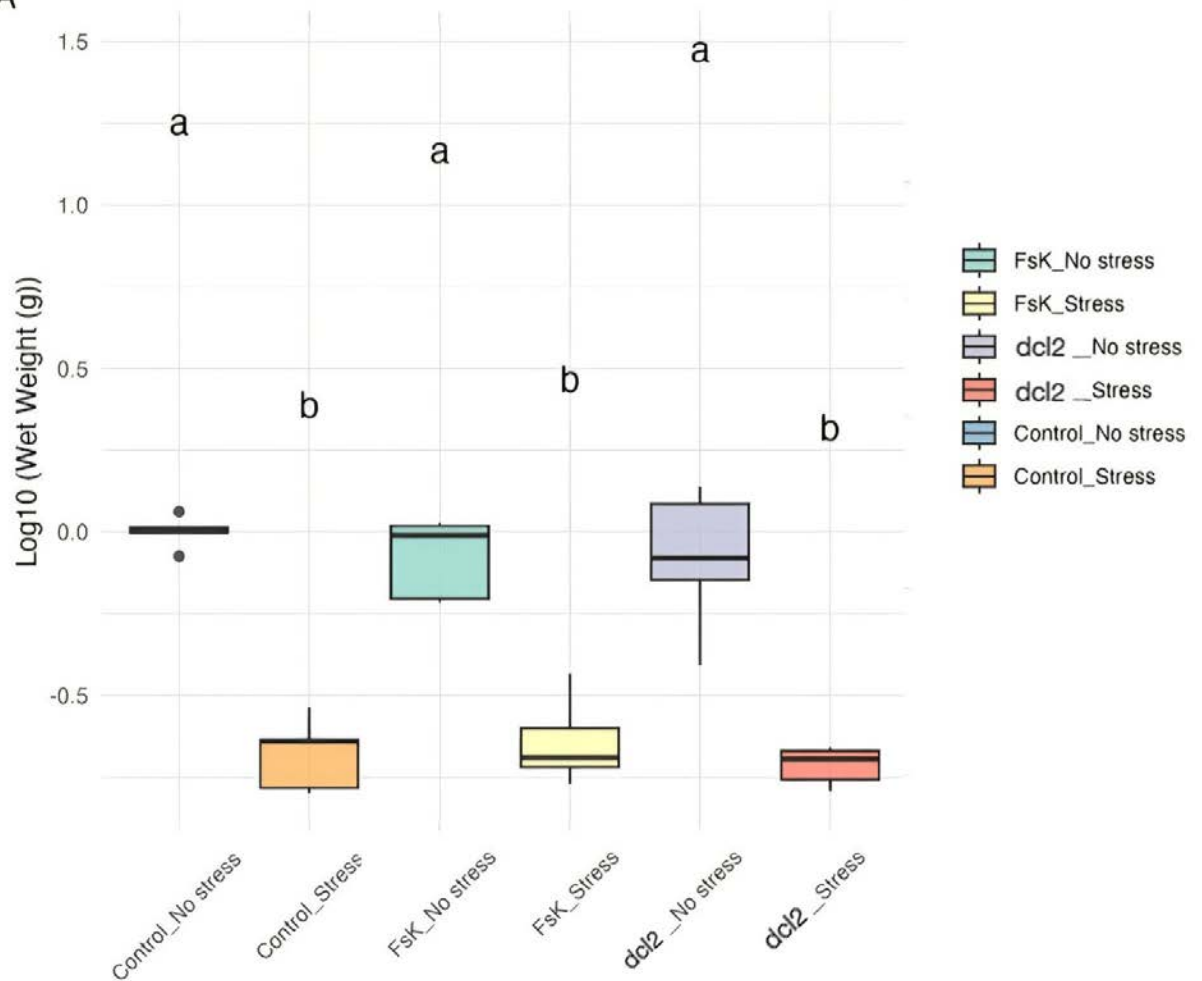
Εικόνα 12 Νωπό βάρος φύλλων ($\log_{10} g$) ανα συνθήκη (FsK_No stress, FsK_Stress, dcl2_No stress, dcl2_Stress, Control_No stress και Control_Stress) Τα FsK_No stress, dcl2_No stress και , Control_No stress συμβολίζονται με το γράμμα «α» και δεν διαφέρουν στατιστικά σημαντικά μεταξύ τους. Διαφέρουν ωστόσο με τα υπόλοιπα που έχουν το γράμμα «β».



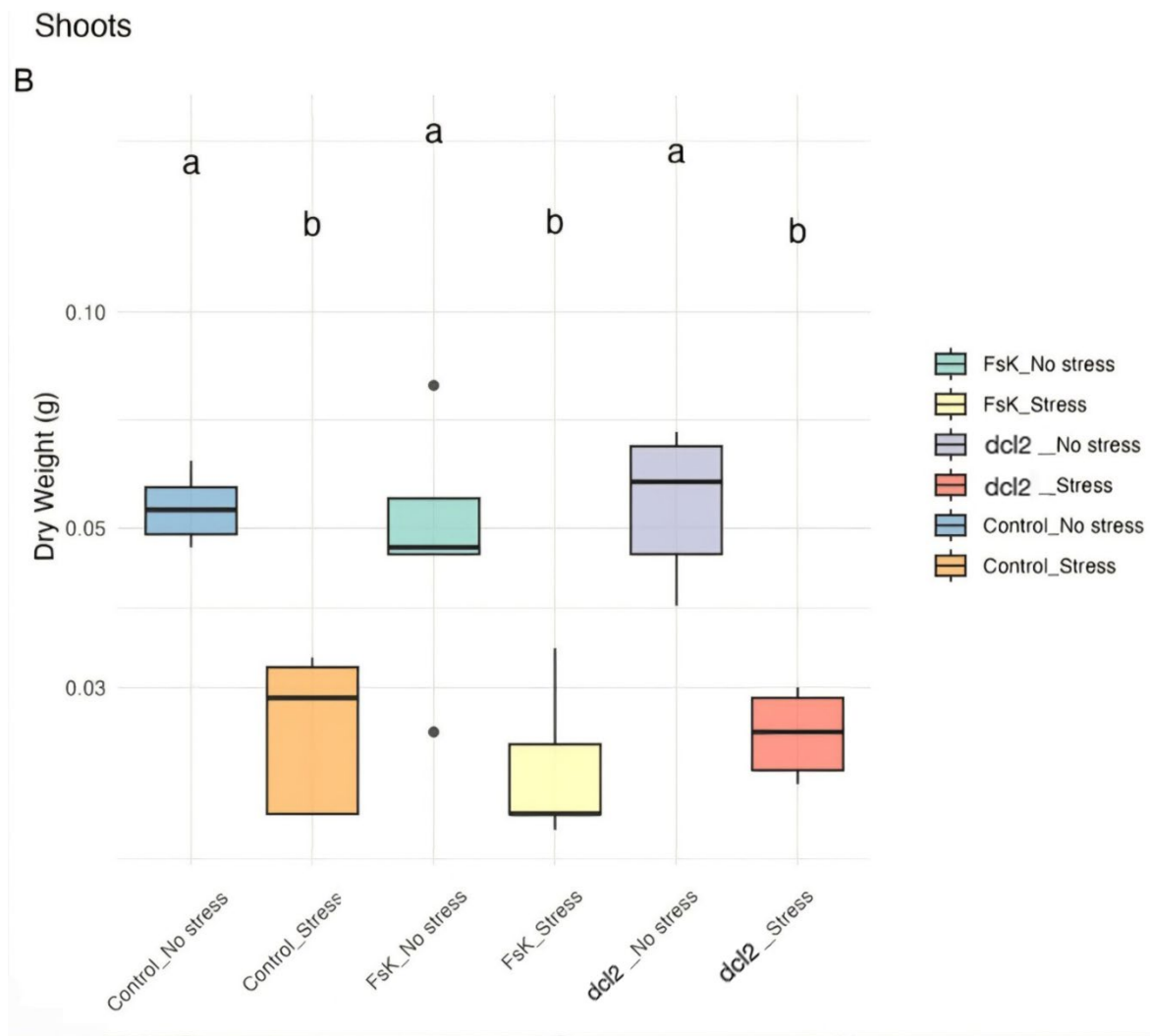
Εικόνα 13 Ξηρό βάρος φύλλων ($\log_{10}$ g) ανα συνθήκη (Fsk_No stress, Fsk_Stress, dcl2_No stress, dcl2_Stress, Control_No stress και Control_Stress) Τα Fsk_No stress, dcl2_No stress και , Control_No stress συμβολίζονται με το γράμμα «α» και δεν διαφέρουν στατιστικά σημαντικά μεταξύ τους. Διαφέρουν ωστόσο με τα υπόλοιπα που έχουν το γράμμα «β». Το Fsk_No Stress δεν διαφέρει στατιστικά από τα α και β

Shoots

A



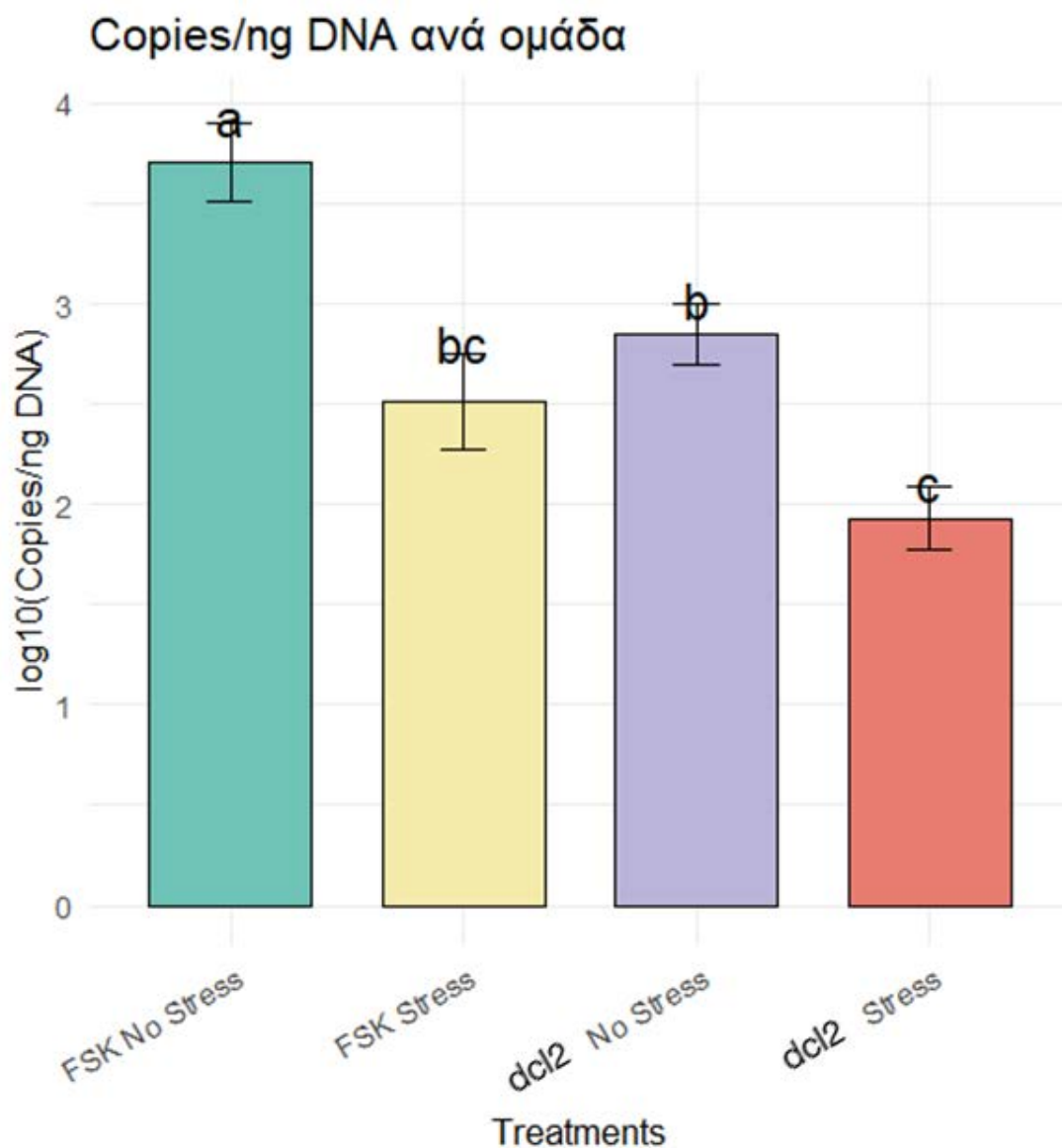
Εικόνα 14 Boxplot Νοπό βάρος βλαστών ($\log_{10}$ g) ανα συνθήκη (FsK_No stress, FsK_Stress, dcl2_No stress, dcl2_Stress, Control_No stress και Control_Stress) Τα FsK_No stress, dcl2_No stress και , Control_No stress συμβολίζονται με το γράμμα «α» και δεν διαφέρουν στατιστικά σημαντικά μεταξύ τους.



Εικόνα 15 Boxplot Ξηρό βάρος βλαστών (log10 g) ανα συνθήκη (FSK_No stress, FSK_Stress, dcl2_No stress, dcl2_Stress, Control_No stress και Control_Stress) Τα FSK_No stress, dcl2_No stress και , Control_No stress συμβολίζονται με το γράμμα «α» και δεν διαφέρουν στατιστικά σημαντικά μεταξύ τους.

3.5 Αποτελέσματα qPCR

Από την qPCR προέκυψε το ακόλουθο γράφημα:



Εικόνα 16 Bar-plot αποτελεσμάτων qPCR. Στην εικόνα απεικονίζονται 4 μπάρες με τις συνθήκες: FSK-No-Stress, FSK-Stress, dcl2-No-Stress, dcl2-Stress.

4. Συζήτηση-σχόλια

Από τις φωτογραφίες παρατηρείται ξεκάθαρα ότι τα φυτά σε συνθήκες ξηρασίας εμφανίζουν καθυστερημένη ανάπτυξη. Ωστόσο, τα φυτά που έχουν αποικιστεί με *FsK* και με το *dcl2* mutant φαίνεται να αντέχουν

καλύτερα στην ξηρασία. Σε αυτές τις συνθήκες τα φυτά με *FsK* ενδεχομένως να τα πήγαιναν καλύτερα από αυτά με το DCL2 mutant. Τα βάρη των φύλλων και των βλαστών υποστηρίζουν το παραπάνω, ωστόσο η διαφορά αυτή δεν είναι στατιστικά σημαντική. Τα οπτικά αποτελέσματα που λήφθηκαν από τα φυτά επιβεβαιώνουν το γεγονός ότι ο *FsK* προσδίδει αντοχή στην ξηρασία (Kavrulakis et al, 2007).(Papadopoulou et al, 2018).

Στην εικόνα 12 που απεικονίζει τον λογάριθμο του νωπού βάρους των φύλλων τα φυτά με *FsK*, Mutant και τα control σε συνθήκες ξηρασίας δεν έχουν καμία στατιστικά σημαντική διαφορά μεταξύ τους, αλλά διαφέρουν από τα αντίστοιχά τους που βρισκόταν σε φυσιολογικές συνθήκες. Το ίδιο μοτίβο παρατηρείται και στις εικόνες 13, 14 και 15 με την μόνη διαφορά στην εικόνα 13 όπου το *FsK*-No-Stress δεν διαφέρει στατιστικά καθόλου από τις δυο ομάδες (Stress-No-Stress) και δεν διαφέρει ούτε από τα mutant, ούτε από τα control. Αυτά τα δεδομένα έρχονται σε αντίθεση με τις φωτογραφίες των φυτών καθώς δείχνουν ότι δεν υπάρχει στατιστικά σημαντική διαφορά μεταξύ του *FsK* και των control σε συνθήκες στρες. Αυτό θα μπορούσε να οφείλεται σε μη ακριβείς μετρήσεις των βαρών λόγω ζυγού. Ωστόσο, στην περίπτωση που οι μετρήσεις της ζυγαριάς δεν είναι λανθασμένες τότε αυτό το φαινόμενο της μη στατιστικά σημαντικής διαφοράς μπορεί να οφείλεται στο συγκεκριμένο στάδιο ανάπτυξης των φυτών, δηλαδή πιθανόν να εμφανιζόταν μεγαλύτερη διαφορά αν η ξηρασία είχε εφαρμοστεί σε ένα πιο προχωρημένο στάδιο της ανάπτυξης των φυτών. Η υπόθεση αυτή προκύπτει καθώς στο πείραμα που πραγματοποιήθηκε από Kavrulakis et al, 2018, οι τομάτες που μετρήθηκαν με τον *FsK* (σε συνθήκες stress και μη) είχαν αναπτυχθεί με τον *FsK* για 15 μέρες και στην συνέχεια είχε ακολουθήσει ξηρασία για 30 μέρες (45 μέρες συνολικά από την στιγμή που έγινε ο εμβολιασμός με τον *FsK*). Στην δική μας περίπτωση, συλλέξαμε δείγματα 7 μέρες μετά τον εμβολιασμό του μύκητα στις τομάτες. Ένας άλλος λόγος που μπορεί να οφείλεται αυτό το φαινόμενο είναι η ποικιλία του φυτού της τομάτας. Στο πείραμά μας δεν χρησιμοποιήσαμε σπόρους από (*Solanum Lycopersicum* cv ACE 55) όπως στην παραπάνω μελέτη (η ποικιλία που χρησιμοποιήθηκε ήταν η “moneymaker”). Η ποικιλία της τομάτας θα μπορούσε να παίζει ένα σημαντικό ρόλο στην συμβιωτική σχέση με τον *FsK* καθώς έχει βρεθεί ότι διαφορετικές ποικιλίες τομάτας παρουσιάζουν διαφοροποιημένα επίπεδα μυκορριζικού αποικισμού και απόδοσης, ανάλογα με τον συνδυασμό φυτού-μύκητα. Για παράδειγμα, οι ποικιλίες Pisanello και Rio Grande έδειξαν αντίθετες αποκρίσεις ως προς τον αποικισμό από διαφορετικά είδη AMF, γεγονός που υποδηλώνει ότι το

γονιδιακό υπόβαθρο της ποικιλίας μπορεί να καθορίζει την αποτελεσματικότητα της συμβίωσης. (Arcidiacono et al, 2023). Τέλος, με βάση τις φωτογραφίες, είναι πιθανό αν υπήρχαν περισσότερα φυτά ανά συνθήκη, μπορεί να φαινόταν η διαφορά μεταξύ *FsK*-Stress και Control-Stress.

Στην εικόνα 16 παρατηρείται μια στατιστικά σημαντική διαφορά μεταξύ *FsK*-No-Stress και Mutant-No-Stress ενώ το *FsK*-Stress δεν έχει στατιστικά σημαντική διαφορά από τα Mutant (Stress & No-Stress). Από αυτήν την εικόνα μπορούμε να δούμε ότι τα επίπεδα των ITS για τα *FsK* αγρίου τύπου είναι αυξημένη σε σύγκριση με DCL2 mutant σε συνθήκες χωρίς στρες. Άρα ο *FsK* αγρίου τύπου έχει καλύτερο αποικισμό από ότι το DCL2 mutant. Ωστόσο σε συνθήκες ξηρασίας μειώνεται ο αποικισμός και στο αγρίου τύπου και στο DCL2 mutant. Το γεγονός ότι το DCL2 mutant σε ξηρασία έχει τα χαμηλότερα επίπεδα επιβεβαιώνει εν μέρει την αρχική μας υπόθεση ότι ο *FsK* αλληλοεπιδρά μέσω cross kingdom RNAi ωστόσο η διαφορά αυτή δεν είναι μεγάλη υποδηλώνοντας ότι μπορεί να υπάρχει και κάποιος άλλος μηχανισμός ή και άλλοι συντελεστές μέσα στον μηχανισμό του RNAi με τον οποίο αλληλεπιδρά ο *FsK* για την αντοχή στην ξηρασία στην τομάτα.

Βιβλιογραφία

- [1] Barbedo, Jayme. (2013). Automatic Object Counting In Neubauer Chambers. 10.14209/sbrt.2013.34.
- [2] Jenkins, J. A. (1948). The origin of the cultivated tomato. *Economic Botany*, 2(4), 379–392. <https://doi.org/10.1007/BF02859492>
- [3] Blum A, Monir M, Wirsansky I, Ben-Arzi S. The beneficial effects of tomatoes. *Eur J Intern Med*. 2005 Oct;16(6):402-4. doi: 10.1016/j.ejim.2005.02.017. PMID: 16198897.
- [4] Cheng, A., Huang, L., Oberkofler, L., Johnson, N. R., Glodeanu, A., Stillman, K., & Weiberg, A. (2025). Fungal Argonaute proteins act in bidirectional cross-kingdom RNA interference during plant infection. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 122(17), e2422756122. <https://doi.org/10.1073/pnas.2422756122>

[5] Chaves MM, Maroco JP, Pereira JS. Understanding plant responses to drought - from genes to the whole plant. *Funct Plant Biol*. 2003 Mar;30(3):239-264. doi: 10.1071/FP02076. PMID: 32689007.

[6] Verma, V., Ravindran, P. & Kumar, P.P. Plant hormone-mediated regulation of stress responses. *BMC Plant Biol* **16**, 86 (2016). <https://doi.org/10.1186/s12870-016-0771-y>

[7] Gupta A, Rico-Medina A, Caño-Delgado AI. The physiology of plant responses to drought. *Science*. 2020 Apr 17;368(6488):266-269. doi: 10.1126/science.aaz7614. PMID: 32299946.

[8] Hsu PK, Dubeaux G, Takahashi Y, Schroeder JI. Signaling mechanisms in abscisic acid-mediated stomatal closure. *Plant J*. 2021 Jan;105(2):307-321. doi: 10.1111/tpj.15067. Epub 2020 Dec 9. PMID: 33145840; PMCID: PMC7902384.

[9] Alexopoulos, C. J., Moore, D., & Ahmadjian, V. (2025, July 6). *Fungus*. In *Encyclopaedia Britannica*. Retrieved August 2, 2025, from <https://www.britannica.com/science/fungus>

[10] Wallen RM, Perlin MH. An Overview of the Function and Maintenance of Sexual Reproduction in Dikaryotic Fungi. *Front Microbiol*. 2018 Mar 21;9:503. doi: 10.3389/fmicb.2018.00503. PMID: 29619017; PMCID: PMC5871698.

[11] Yu JH. Regulation of Development in *Aspergillus nidulans* and *Aspergillus fumigatus*. *Mycobiology*. 2010 Dec;38(4):229-37. doi: 10.4489/MYCO.2010.38.4.229. Epub 2010 Dec 31. PMID: 23956662; PMCID: PMC3741515.

- [12] Taylor TN, Krings M, Taylor EL. Ascomycota. In: *Fossil Fungi*. Academic Press; 2015:129-171. doi:10.1016/B978-0-12-387731-4.00008-6
- [13] Poveda, J., Eugui, D., Abril-Uriás, P. *et al.* Endophytic fungi as direct plant growth promoters for sustainable agricultural production. *Symbiosis* **85**, 1–19 (2021). <https://doi.org/10.1007/s13199-021-00789-x>
- [14] Alam B, Li J, Gě Q, Khan MA, Gōng J, Mehmood S, Yuán Y, Gōng W. Endophytic Fungi: From Symbiosis to Secondary Metabolite Communications or Vice Versa? *Front Plant Sci.* 2021 Dec 17;12:791033. doi: 10.3389/fpls.2021.791033. PMID: 34975976; PMCID: PMC8718612.
- [15] Kavroulakis N, Ntougias S, Zervakis GI, Ehaliotis C, Haralampidis K, Papadopoulou KK. Role of ethylene in the protection of tomato plants against soil-borne fungal pathogens conferred by an endophytic *Fusarium solani* strain. *J Exp Bot.* 2007;58(14):3853-64. doi: 10.1093/jxb/erm230. Epub 2007 Nov 29. PMID: 18048373.
- [16] 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>
- [17] National Center for Biotechnology Information (NCBI). RNA interference (RNAi). Updated 2017. Accessed August 30, 2025. [https://www.ncbi.nlm.nih.gov/probe/docs/technai/#:~:text=RNA%20interference%20\(RNAi\)%20or%20Post,expression%20of%20protein-coding%20genes](https://www.ncbi.nlm.nih.gov/probe/docs/technai/#:~:text=RNA%20interference%20(RNAi)%20or%20Post,expression%20of%20protein-coding%20genes)
- [18] Fire A, Xu S, Montgomery MK, Kostas SA, Driver SE, Mello CC. Potent and specific genetic interference by double-stranded RNA in

Caenorhabditis elegans. *Nature*. 1998 Feb 19;391(6669):806-11. doi: 10.1038/35888. PMID: 9486653.

[19] Bernstein E, Caudy AA, Hammond SM, Hannon GJ. Role for a bidentate ribonuclease in the initiation step of RNA interference. *Nature*. 2001 Jan 18;409(6818):363-6. doi: 10.1038/35053110. PMID: 11201747.

[20] Ketting RF, Fischer SE, Bernstein E, Sijen T, Hannon GJ, Plasterk RH. Dicer functions in RNA interference and in synthesis of small RNA involved in developmental timing in *C. elegans*. *Genes Dev*. 2001 Oct 15;15(20):2654-9. doi: 10.1101/gad.927801. PMID: 11641272; PMCID: PMC312808.

[21] Iwakawa HO, Tomari Y. Life of RISC: Formation, action, and degradation of RNA-induced silencing complex. *Mol Cell*. 2022 Jan 6;82(1):30-43. doi: 10.1016/j.molcel.2021.11.026. Epub 2021 Dec 22. PMID: 34942118.

[22] Ali N, Datta SK, Datta K. RNA interference in designing transgenic crops. *GM Crops*. 2010 Jul-Sep;1(4):207-13. doi: 10.4161/gmcr.1.4.13344. PMID: 21844675.

[23] Dalakouras A, Katsaouni A, Avramidou M, Dadami E, Tsiouri O, Vasileiadis S, Makris A, Georgopoulou ME, Papadopoulou KK. A beneficial fungal root endophyte triggers systemic RNA silencing and DNA methylation of a host reporter gene. *RNA Biol*. 2023 Jan;20(1):20-30. doi: 10.1080/15476286.2022.2159158. PMID: 36573793; PMCID: PMC9809956.

[24] Qin S, Veloso J, Puccetti G, van Kan JAL. Molecular characterization of cross-kingdom RNA interference in *Botrytis cinerea* by tomato small RNAs. *Front Plant Sci*. 2023 Mar 8;14:1107888.

doi: 10.3389/fpls.2023.1107888. PMID: 36968352; PMCID: PMC10031073.

[25] Arcidiacono, M., Pellegrino, E., Nuti, M., & Ercoli, L. (2023). Field inoculation by arbuscular mycorrhizal fungi with contrasting life-history strategies differently affects tomato nutrient uptake and residue decomposition dynamics. *Plant and Soil*, 500, 105–127. <https://doi.org/10.1007/s11104-023-05995-8>

[26] Schoch CL, Seifert KA, Huhndorf S, Robert V, Spouge JL, Levesque CA, Chen W; Fungal Barcoding Consortium; Fungal Barcoding Consortium Author List. Nuclear ribosomal internal transcribed spacer (ITS) region as a universal DNA barcode marker for Fungi. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 2012 Apr 17;109(16):6241-6. doi: 10.1073/pnas.1117018109. Epub 2012 Mar 27. PMID: 22454494; PMCID: PMC3341068.

[27] Mills, S., & Cowin, A. (2013). MicroRNAs and their roles in wound repair and regeneration. *Wound Practice and Research*, 21, 26–40