

ΠΑΝΕΠΙΣΤΗΜΙΟ ΘΕΣΣΑΛΙΑΣ

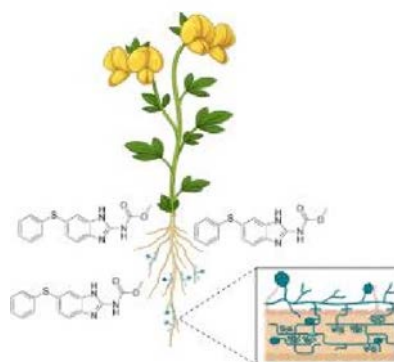
ΤΜΗΜΑ ΒΙΟΧΗΜΕΙΑΣ ΚΑΙ ΒΙΟΤΕΧΝΟΛΟΓΙΑΣ ΠΜΣ Εφαρμογές Μοριακής Βιολογίας, Μοριακής Γενετικής και Διαγνωστικοί Δείκτες

Νικολέτα Ζ. Μπασδέκη



Λάρισα, 2025

**«ΈΛΕΓΧΟΣ ΤΗΣ ΠΙΘΑΝΗΣ ΤΟΞΙΚΗΣ ΔΡΑΣΗΣ
ΤΟΥ ΑΝΘΕΛΜΙΝΘΙΚΟΥ ΠΑΡΑΣΙΤΟΚΤΟΝΟΥ
ΦΕΝΒΕΝΔΑΖΟΛΗ ΣΤΗ ΣΥΜΒΙΩΤΙΚΗ ΣΧΕΣΗ
ΤΩΝ ΦΥΤΩΝ ΜΕ ΕΝΔΟΜΥΚΟΡΡΙΖΙΚΟΥΣ
ΜΥΚΗΤΕΣ»**



**“ASSESSMENT OF THE PUTATIVE TOXIC
EFFECT OF ANTHELMINTIC DRUG
FENBENDAZOLE ON THE SYMBIOTIC
RELATIONSHIP BETWEEN PLANTS AND
ARBUSCULAR MYCORRHIZAL FUNGI”**

ΤΡΙΜΕΛΗΣ ΣΥΜΒΟΥΛΕΥΤΙΚΗ ΕΠΙΤΡΟΠΗ

Καρπούζας Δημήτριος, Καθηγητής Περιβαλλοντικής Μικροβιολογίας και Βιοτεχνολογίας (Επιβλέπων)

Βασιλειάδης Σωτήριος, Επίκουρος Καθηγητής Μοριακής Μικροβιακής Οικολογίας-Γονιδιωματικής

Παπαδοπούλου Καλλιόπη, Καθηγήτρια Βιοτεχνολογίας Φυτών

ΕΥΧΑΡΙΣΤΙΕΣ

Η παρούσα διπλωματική εργασία εκπονήθηκε στο εργαστήριο Βιοτεχνολογίας Φυτών & Περιβάλλοντος του τμήματος Βιοχημείας και Βιοτεχνολογίας του Πανεπιστημίου Θεσσαλίας. Στο σημείο αυτό, θα ήθελα να εκφράσω τις θερμές μου ευχαριστίες σε όλους όσοι με στήριξαν και συνέβαλαν ουσιαστικά στην ολοκλήρωση αυτής της προσπάθειας.

Πρώτα απ' όλα, θα ήθελα να ευχαριστήσω θερμά τον επιβλέποντα καθηγητή μου, κύριο Καρπούζα Δημήτριο, Καθηγητή Περιβαλλοντικής Μικροβιολογίας και Βιοτεχνολογίας, που μου έδωσε τη δυνατότητα να εκπονήσω την διπλωματική μου εργασία συμμετέχοντας σε αυτή την ιδιαίτερα ενδιαφέρουσα μελέτη.

Θα ήθελα, ακόμη, να ευχαριστήσω τα μέλη της τριμελούς εξεταστικής επιτροπής, την κυρία Παπαδοπούλου Καλλιόπη και τον κύριο Βασιλειάδη Σωτήριο καθώς και όλα τα μέλη του εργαστηρίου, για το φιλικό και συνεργατικό τους πνεύμα καθ' όλη τη διάρκεια της παρουσίας μου στο εργαστήριο και για την προθυμία τους να λύσουν οποιαδήποτε απορία μου.

Ιδιαίτερα, θα ήθελα να ευχαριστήσω τον Παπαδόπουλο Χρήστο, την Γοργιά Ξένια και τον Στάθη Λαγό που με τις πολύτιμες συμβουλές και τη καθοδήγησή τους συνέβαλαν στην επιτυχή ολοκλήρωση της παρούσας εργασίας.

Επίσης, οφείλω ιδιαίτερες ευχαριστίες στην κυρία Τσίκου Δανιέλα, για την αμέριστη στήριξη, την πολύτιμη βοήθεια της, αλλά και τη διαχρονική συνεργασία μας τόσο κατά τη διάρκεια των προπτυχιακών όσο και μεταπτυχιακών μου σπουδών.

Τέλος, ένα μεγάλο και ειλικρινές ευχαριστώ στην οικογένεια και τους φίλους μου, που στάθηκαν στο πλευρό μου και με στήριξαν έμπρακτα όλα αυτά τα χρόνια των σπουδών μου, συμβάλλοντας με τον δικό τους τρόπο στην υλοποίηση των στόχων μου.

ΠΕΡΙΛΗΨΗ

Οι Δενδρόμορφοι Μυκορριζικοί Μύκητες (ΔΜΜ) αποτελούν μικροσυμβιώτες των φυτών με σημαντικό ρόλο στην επίδραση της ανάπτυξης των φυτών, της γονιμότητας του εδάφους και της ανταλλαγής θρεπτικών συστατικών. Ωστόσο, αυτή η συμβιωτική σχέση μπορεί να διαταραχθεί από την παρουσία οργανικών ρύπων, όπως τα φυτοφάρμακα και τα κτηνιατρικά φάρμακα, τα οποία συσσωρεύονται συχνά στα γεωργικά εδάφη. Τα ανθελμινθικά φάρμακα, που χρησιμοποιούνται στη ζωική παραγωγή, εισέρχονται στο έδαφος κυρίως μέσω της χρήσης κοπριάς που περιέχει κατάλοιπα τέτοιων φαρμάκων. Αυτοί οι ρύποι ενδέχεται να επηρεάσουν αρνητικά τη λειτουργία των ΔΜΜ, οι οποίοι θεωρούνται ευαίσθητοι βιοδείκτες για την εκτίμηση της τοξικότητας των χημικών ουσιών στην μικροχλωρίδα του εδάφους. Σκοπός της παρούσας πειραματικής μελέτης ήταν η αξιολόγηση της πιθανής τοξικής δράσης του ανθελμινθικού φαρμάκου, fenbendazole, στη συμβιωτική σχέση φυτών-ΔΜΜ. Αρχικά, μελετήθηκε η επίδραση του φαρμάκου σε ένα εύρος συγκεντρώσεων, στο ποσοστό αποικισμού φυτών *Lotus japonicus* από τον ΔΜΜ *Rhizophagus irregularis*. Τα αποτελέσματα της μικροσκοπικής παρατήρησης έδειξαν ότι το fenbendazole φαίνεται να επηρεάζει αρνητικά τον αποικισμό ήδη από τα 0,5mg/L. Η αρνητική επίδραση επαληθεύτηκε και με μοριακή ανάλυση στις ίδιες συγκεντρώσεις fenbendazole, ελέγχοντας τον σχηματισμό και τη λειτουργικότητα των δενδρόμορφων δομών του μύκητα μέσω των επιπέδων έκφρασης των γονιδίων-δεικτών *LjSbtM1*, *LjPT4* και *LjAMT2.2* που παρουσίασαν σημαντική μείωση. Αυτά τα αποτελέσματά, παρέχουν πρώτες ενδείξεις για την τοξικότητα του fenbendazole στην συμβιωτική σχέση του ΔΜΜ *R. irregularis* με φυτά σε συγκεντρώσεις που μπορεί να εμφανιστούν σε γεωργικά εδάφη.

Λέξεις-κλειδιά:

fenbendazole, Δενδρόμορφοι Μυκορριζικοί Μύκητες, συμβιώσεις, ψυχανθή, τοξικότητα, ανθελμινθικά φάρμακα

ABSTRACT

Arbuscular mycorrhizal fungi (AMF) are plant symbiotic organisms with an important role in influencing plant growth, soil fertility and nutrient exchange. However, this symbiotic relationship can be disrupted by the presence of organic pollutants, such as pesticides and veterinary drugs, which often accumulate in agricultural soils. Anthelmintic drugs, used in animal production, enter the soil mainly through the use of manure containing residues of such drugs. These pollutants may negatively affect the function of AMF, which are considered sensitive biomarkers for assessing the toxicity of chemicals to the soil microflora. The aim of the present experimental study was to evaluate the potential toxic effect of the anthelmintic drug, fenbendazole, on AMF. Initially, the effect of the drug was studied at a range of concentrations on the colonization levels of *Lotus japonicus* plants by the fungal pathogen *Rhizophagus irregularis*. The results of microscopic observation showed that fenbendazole seems to negatively affect colonization already at 0.5mg/L. The negative effect was also verified by molecular analysis at the same concentrations of fenbendazole, by testing the formation and functionality of arbuscules through the expression levels of the marker genes *LjSbtM1*, *LjPT4* and *LjAMT2.2* which showed a significant decrease. These results provide first indications for the toxicity of fenbendazole in the symbiotic relationship of the fungal pathogen *R. irregularis* with plants at concentrations that may occur in agricultural soils.

Keywords:

Fenbendazole, Arbuscular Mycorrhizal Fungi, symbioses, legume, toxicity, anthelmintic drugs

Πίνακας περιεχομένων

1. ΕΙΣΑΓΩΓΗ	10
1.1 Σχέσεις φυτών- μικροοργανισμών	10
1.1.1 Αρνητικές αλληλεπιδράσεις	10
1.1.2 Θετικές αλληλεπιδράσεις	11
1.1.3 Ουδέτερες αλληλεπιδράσεις	12
1.2 Τα ψυχανθή φυτά - <i>Lotus japonicus</i>	12
1.3 Μυκορριζική συμβίωση	12
1.3.1 Δενδρόμορφοι Μυκορριζικοί Μύκητες (ΔΜΜ)- Arbuscular mycorrhizal fungi (AMF)	14
1.3.2 Σηματοδότηση	17
1.3.3 Προσφορά δενδρόμορφων μυκορριζών στο φυτό	19
1.4 Ανθελμινθικά φάρμακα	20
1.4.1 Το κτηνιατρικό φάρμακο Φενβενδαζόλη (Fenbendazole-FBZ)	20
1.4.2 Βιολογική Δράση	21
1.4.3 Περιβαλλοντική τύχη	23
1.5 Επίδραση των κτηνιατρικών και γεωργικών φαρμάκων στους δενδρόμορφους μυκορριζικούς μύκητες	24
1.6 Σκοπός της παρούσας πειραματικής μελέτης	25
2.ΥΛΙΚΑ ΚΑΙ ΜΕΘΟΔΟΙ	26
2.1 Βιολογικό υλικό και συνθήκες ανάπτυξης	26
2.2 Απολύμανση και εκβλάστηση σπόρων <i>Lotus japonicus</i>	26
2.3 Μεταφύτευση φυτών <i>Lotus japonicus</i> από τριβλία σε δοχεία magentas	27
2.3.1 Παρασκευή θρεπτικού LAS, εμβολίου μύκητα <i>Rhizophagus irregularis</i> και φαρμάκου	27
2.3.2 Φύτεμα σε δοχεία magentas με τη μέθοδο Sandwich	28
2.4 Συγκομιδή των φυτών και χρώση των ριζών με μελάνι	29
2.5.1 Χρώση των ριζών	29
2.5.2 Υπολογισμός ποσοστού αποικισμού από ενδομυκορριζικούς μύκητες	30
2.6 Συγκομιδή των φυτών και απομόνωση του ολικού RNA από τις ρίζες των φυτών	30
2.6.1 Απομόνωση ολικού RNA από ρίζες με τη χρήση Trizol (RNA extraction)	30
2.6.2 Απομάκρυνση του DNA με αντίδραση DNάσης	31
2.6.3 Αλυσιδωτή αντίδραση πολυμεράσης (PCR)	32
2.6.4 Ηλεκτροφόρηση σε πήκτωμα αγαρόζης	33
2.7 Σύνθεση συμπληρωματικού DNA (cDNA- Complementary DNA)	33

2.8 Ποσοτική αλυσιδωτή αντίδραση πολυμεράσης (qPCR)	34
2.8.1 Αντίδραση qPCR για την κανονικοποίηση των δειγμάτων	34
2.8.2 Αντίδραση qPCR	35
2.9 Υπολογισμός ακριβής συγκέντρωσης fenbendazole με υγρή χρωματογραφία υψηλής απόδοσης (HPLC).....	36
2.9.1 Προσδιορισμός πρότυπης καμπύλης.....	36
2.9.2 Προσδιορισμός των επιπέδων fenbendazole στην άμμο	37
2.10 Στατιστική ανάλυση.....	37
3. ΑΠΟΤΕΛΕΣΜΑΤΑ- ΣΥΖΗΤΗΣΗ.....	38
3.1 Έλεγχος της επίδρασης του ανθελμινθικού φαρμάκου fenbendazole στον αποικισμό φυτών <i>L. japonicus</i> από τον ενδομυκορριζικό μύκητα <i>Rhizophagus irregularis</i>	38
3.2 Έλεγχος της επίδρασης του ανθελμινθικού φαρμάκου fenbendazole στη συμβιωτική σχέση μεταξύ <i>L. japonicus</i> και <i>Rhizophagus irregularis</i> με μοριακή ανάλυση χρησιμοποιώντας γονίδια-δείκτες.....	41
3.3 Προσδιορισμός των επιπέδων του fenbendazole στο υπόστρωμα ανάπτυξης.....	45
4. ΣΥΖΗΤΗΣΗ	46
5. ΣΥΜΠΕΡΑΣΜΑΤΑ.....	48
6. ΒΙΒΛΙΟΓΡΑΦΙΑ	49

Πίνακας Περιεχομένων για τους πίνακες (tables)

Πίνακας 1 Θρεπτικό διάλυμα LAS (Long Aston Solution).....	27
Πίνακας 2 Διάλυμα Lysis/binding buffer	31
Πίνακας 3 Αντίδραση με DNάση	32
Πίνακας 4 Αντίδραση PCR.....	32
Πίνακας 5 Πρόγραμμα της αντίδρασης.....	33
Πίνακας 6 Πρόγραμμα αντίστροφης μεταγραφάσης (RT – PCR)	33
Πίνακας 7 Αντίδραση qPCR κανονικοποίησης	34
Πίνακας 8 Πρόγραμμα για qPCR κανονικοποίησης	35
Πίνακας 9 Εκκινητές γονιδίων που χρησιμοποιήθηκαν στην qPCR.....	35
Πίνακας 10 Αντίδραση qPCR.....	35
Πίνακας 11 Πρόγραμμα για qPCR	36
Πίνακας 13 Αναμενόμενες και ακριβείς συγκεντρώσεις του fenbendazole	38
Πίνακας 14 Συγκέντρωση RNA και καθαρότητα του δείγματος (λόγος 260/280) που απομονώθηκε από ρίζες φυτών που αναπτύχθηκαν σε απουσία φαρμάκου (control) και ρίζες όπου εφαρμόστηκε fenbendazole σε διάφορες συγκεντρώσεις. Κάθε δείγμα αντιστοιχεί σε μια βιολογική επανάληψη	42

Πίνακας Περιεχομένων για τις εικόνες (figures)

Εικόνα 1 Αλληλεπιδράσεις φυτών- μικροοργανισμών. (Created in BioRender.com)	10
Εικόνα 2 Ο ρόλος της μυκορριζικής συμβίωσης στην ανάπτυξη των φυτών (Created in BioRender.com).....	13
Εικόνα 3 Απεικόνιση δομών αποικισμού ριζών σε εκτομυκορριζικές και ενδομυκορριζικές αλληλεπιδράσεις. (Created in BioRender.com).....	14
Εικόνα 4 Σχηματική απεικόνιση των δενδρόμορφων δομών του μύκητα εντός των ριζικών κυττάρων (Created in BioRender.com).....	15
Εικόνα 5 Διείσδυση των υφών του μύκητα στα επιδερμικά κύτταρα και σχηματισμός δενδρόμορφων δομών στα κύτταρα του φλοιού της ρίζας (Created in BioRender.com)	15
Εικόνα 6 Απεικόνιση της δενδρόμορφη δομής του μύκητα στο εσωτερικό του φυτικού κυττάρου (Created in BioRender.com).....	16
Εικόνα 7 Σηματοδοτικό μονοπάτι που οδηγεί στην εγκαθίδρυση της συμβιωτικής σχέσης των ριζών με ΔΜΜ (Created in BioRender.com).....	18
Εικόνα 8 Χημική δομή και φυσικοχημικές ιδιότητες FBZ	21
Εικόνα 9 Βιομετατροπή του fenbendazole (FBZ) (Created in BioRender.com)	22
Εικόνα 10 Ο μηχανισμός δράσης του FBZ (Created in BioRender.com).....	23
Εικόνα 11 Πρώτο στάδιο- αποστείρωση των σπερμάτων (Created in BioRender.com)	26
Εικόνα 12 Δεύτερο στάδιο- εκβλάστηση των σπόρων (Created in BioRender.com). ..	26
Εικόνα 13 Φύτεμα σε δοχεία magentas με τη μέθοδο Sandwich (Created in BioRender.com)	28
Εικόνα 14: Ενδεικτική εικόνα από μικροσκόπιο της συμβίωσης (Created in BioRender.com)	29
Εικόνα 15: Βαμμένες ρίζες τοποθετημένες σε αντικειμενοφόρους πλάκες για παρατήρηση στο οπτικό μικροσκόπιο.....	30
Εικόνα 16 Δομές δενδρόμορφου μυκορριζικού μύκητα στις ρίζες του <i>L. japonicus</i> ..	39
Εικόνα 17 Ηλεκτροφόρηση σε πηκτή αгарόζης 1%, προϊόντα αντίδρασης PCR σε όλα τα δείγματα μετά από χειρισμό με DNase (ΔΜΒ: Δείκτης Μοριακού Βάρους, N_C: δείγμα αρνητικού ελέγχου , P_C: δείγμα θετικού ελέγχου)	43

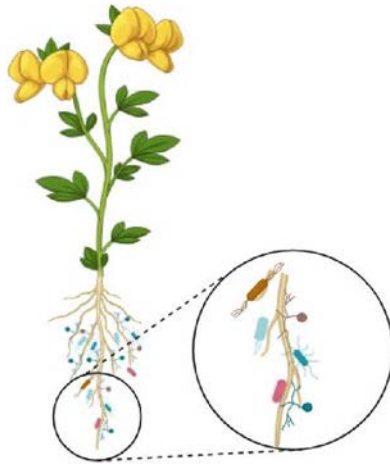
Πίνακας Περιεχομένων για τα γραφήματα (graphs)

Γράφημα 1 Η επίδραση του fenbendazole στο μήκος του βλαστού και της ρίζας των φυτών <i>L.japonicus</i> , σε απουσία φαρμάκου (control) και υπό τη παρουσία διαφόρων συγκεντρώσεων fenbendazole (0,5mg/L 5mg/L, 15mg/L). Δεν παρατηρήθηκαν στατιστικώς σημαντικές διαφορές μεταξύ των συνθηκών.....	39
Γράφημα 2 Η επίδραση του fenbendazole στο ξηρό βάρος του υπέργειου μέρους των φυτών σε απουσία φαρμάκου (control) και υπό τη παρουσία διαφόρων συγκεντρώσεων fenbendazole (0,5mg/L 5mg/L, 15mg/L). Δεν παρατηρήθηκαν στατιστικώς σημαντικές διαφορές μεταξύ των συνθηκών.....	40
Γράφημα 3 Ποσοστό αποικισμού ριζών <i>L. japonicus</i> από ΔΜΜ σε απουσία φαρμάκου (control) και σε παρουσία 0,5mg/L, 5mg/L, 15mg/L fenbendazole. Παρατηρήθηκαν στατιστικώς σημαντικές διαφορές μεταξύ των συνθηκών. Αν οι ράβδοι από πάνω συμβολίζονται με το ίδιο γράμμα δεν διαφέρουν στατιστικώς σημαντικά ενώ εάν συμβολίζονται με διαφορετικό διαφέρουν.....	41
Γράφημα 4 Επίπεδα έκφρασης του γονιδίου <i>LjAMT2.2</i> σε φυτά <i>L.japonicus</i> σε δείγματα αρνητικού ελέγχου και δείγματα όπου εφαρμόστηκε fenbendazole σε συγκεντρώσεις 0,5mg/L, 5mg/L και 15 mg/L. Αν οι ράβδοι από πάνω συμβολίζονται με το ίδιο γράμμα δεν διαφέρουν στατιστικώς σημαντικά ενώ εάν συμβολίζονται με διαφορετικό διαφέρουν.....	43
Γράφημα 5 Επίπεδα έκφρασης του γονιδίου <i>LjPT4</i> σε φυτά <i>L.japonicus</i> σε δείγματα αρνητικού ελέγχου και δείγματα όπου εφαρμόστηκε fenbendazole σε συγκεντρώσεις 0,5mg/L, 5mg/L και 15 mg/L. Αν οι ράβδοι από πάνω συμβολίζονται με το ίδιο γράμμα δεν διαφέρουν στατιστικώς σημαντικά ενώ εάν συμβολίζονται με διαφορετικό διαφέρουν.....	44
Γράφημα 6 Επίπεδα έκφρασης του γονιδίου <i>LjSbtM1</i> σε φυτά <i>L.japonicus</i> σε δείγματα αρνητικού ελέγχου και δείγματα όπου εφαρμόστηκε fenbendazole σε συγκεντρώσεις 0,5mg/L, 5mg/L και 15 mg/L. Αν οι ράβδοι από πάνω συμβολίζονται με το ίδιο γράμμα δεν διαφέρουν στατιστικώς σημαντικά ενώ εάν συμβολίζονται με διαφορετικό διαφέρουν.....	44
Γράφημα 7 Επίπεδα fenbendazole στο υπόστρωμα ανάπτυξης των φυτών. Η συγκέντρωση fenbendazole προσδιορίστηκε με ανάλυση HPLC σε δείγματα άμμου από δοχεία ματζέντα με ή χωρίς φυτά και ΔΜΜ. Η αρχική συγκέντρωση fenbendazole στο διάλυμα ήταν 5 mg L ⁻¹ . Αν οι ράβδοι από πάνω συμβολίζονται με το ίδιο γράμμα δεν διαφέρουν στατιστικώς σημαντικά ενώ εάν συμβολίζονται με διαφορετικό διαφέρουν.....	45

1. ΕΙΣΑΓΩΓΗ

1.1 Σχέσεις φυτών- μικροοργανισμών

Η αλληλεπίδραση φυτών και μικροοργανισμών αποτελεί μια διαδικασία σύνθετη, συνεχής και δυναμική που η εμφάνιση και εξέλιξη της χρονολογείται τόσο παλιά όσο και η εμφάνιση των χερσαίων φυτών στη Γή, περίπου πριν από 400 εκατομμύρια χρόνια (Wille et al 2018).



Εικόνα 1 Αλληλεπιδράσεις φυτών- μικροοργανισμών. (Created in BioRender.com)

Στα φυτά, υπάρχει ένας τεράστιος πληθυσμός μικροοργανισμών που φιλοξενούνται σε υπέργειες και υπόγειες περιοχές. Ωστόσο, η ριζοσφαιρική ζώνη είναι μακράν η πιο ενεργή λόγω του θεμελιώδη ρόλου της στην απορρόφηση θρεπτικών συστατικών, στην αντοχή σε παθογόνα, στις μεταβολικές δραστηριότητες και στην προστασία από τις καταπονήσεις. Αυτοί οι μικροοργανισμοί μπορεί να είναι βακτήρια, μύκητες, ιοί, αρχαία και άλλοι μικροοργανισμοί- που κυμαίνονται από αρνητικά κατά Gram (*Rhizobium*, *Nostoc*) και θετικά κατά Gram βακτήρια (*Frankia*), έως ωομύκητες (*Phytophthora*), χυτριομύκητες, ζυγομύκητες και μύκητες (ασκομύκητας, βασιδιομύκητας) (Pamiske 2000). Η ποικιλομορφία του φυτικού μικροβιώματος είναι τεράστια, με κάθε είδος φυτού να φιλοξενεί ένα μοναδικό σύνολο μικροοργανισμών που αλληλεπιδρούν με το φυτό με διαφορετικούς τρόπους (Εικόνα 1). Αυτές οι αλληλεπιδράσεις μπορούν να ταξινομηθούν γενικά σε αμοιβαίες, παθογόνες και συμβιωτικές, καθεμία με ξεχωριστές επιπτώσεις στην υγεία των φυτών και τη δυναμική των οικοσυστημάτων.

1.1.1 Αρνητικές αλληλεπιδράσεις

Οι αρνητικές ή οι παθογόνες αλληλεπιδράσεις συνεπάγονται αρνητικές επιπτώσεις στην υγεία των φυτών και περιλαμβάνουν αλληλεπιδράσεις φυτών με μυκητιακά παθογόνα (όπως *Phytophthora spp.*, *Fusarium spp.* και *Botrytis spp.*), βακτηριακά παθογόνα (όπως *Pseudomonas syringae*, *Xanthomonas spp.* και *Ralstonia solanacearum*) και ιογενή παθογόνα (όπως ο ιός του μωσαϊκού του καπνού (TMV), ο ιός της πατάτας Y (PVY) και ο ιός του κιτρινίσματος των φύλλων της ντομάτας (TYLCV)) (Schirawski & Perlin, 2018).

Στη πλειονότητα των περιπτώσεων τα φυτά έχουν αναπτύξει μηχανισμούς που

εμποδίζουν τη μόλυνση από παθογόνους μικροοργανισμούς, καθιστώντας την παθογένεια την εξαίρεση και όχι τον κανόνα. Για παράδειγμα, λιγότερο από το 2% από τα 100.000 είδη μυκήτων που είναι γνωστό ότι υπάρχουν προκαλούν παθογένεια σε ζωντανά φυτά (Agris, 1997). Επιπλέον, το φάσμα ξενιστών των παθογόνων μικροοργανισμών είναι περιορισμένο. Παρόλο που η αντίσταση στη μικροβιακή επίθεση έχει εξελιχθεί στα περισσότερα φυτά, οι ίδιες εξελικτικές δυνάμεις έχουν δημιουργήσει παθογόνα ικανά να υπερνικήσουν την άμυνα των φυτών, με πολλές φορές καταστροφικά αποτελέσματα (Perotto & Baluška, 2012).

Τα παθογόνα των φυτών έχουν δύο κύριους τρόπους ζωής. Από την μια πλευρά, τα νεκροτροφικά παθογόνα που καθώς μολύνουν τα ζωντανά φυτά σκοτώνουν γρήγορα τους φυτικούς ιστούς και λαμβάνουν τα θρεπτικά συστατικά από νεκρά κύτταρα. Από την άλλη πλευρά, τα βιοτροφικά παθογόνα αναπτύσσουν μια σταθερή σχέση με τα ζωντανά φυτικά κύτταρα, λαμβάνοντας θρεπτικά συστατικά από το μεταβολισμό των κυττάρων του ξενιστή (Gan et al., 2011).

Τα παράσιτα είναι μικροοργανισμοί ή ιοί και ζουν μέσα σε έναν ζωντανό φυτικό οργανισμό και λαμβάνουν από τους λειτουργικούς ιστούς μέρος ή το σύνολο των απαραίτητων θρεπτικών στοιχείων, χωρίς να προσφέρουν όφελος ή αντάλλαγμα στον ξενιστή. Τόσο τα παράσιτα όσο και τα παθογόνα μπορεί να είναι επιβλαβείς για τους ξενιστές τους. Δεν είναι όλα τα παράσιτα παθογόνα, ένα παράσιτο αναπτύσσεται, τροφοδοτείται και προστατεύεται στον οργανισμό του ξενιστή χωρίς να συμβάλλει στην επιβίωση του ξενιστή, ενώ ένα παθογόνο προκαλεί μια ασθένεια στον ξενιστή. (Long & Staskawicz 1993).

1.1.2 Θετικές αλληλεπιδράσεις

Οι θετικές αλληλεπιδράσεις αναφέρονται σε αμοιβαία επωφελείς σχέσεις μεταξύ μικροοργανισμών και φυτών που επηρεάζουν την ανάπτυξη, την εξέλιξη και τη συνολική ευημερία και των δύο εταίρων. Αυτές οι αλληλεπιδράσεις συμμετέχουν σε διάφορες διεργασίες, όπως στο κύκλο των θρεπτικών συστατικών, στη γονιμότητα του εδάφους και στην αντοχή των φυτών σε περιβαλλοντικές καταπονήσεις (Oldroyd 2013).

Πολλοί μικροοργανισμοί αναπτύσσουν μια αμοιβαία αλληλεπίδραση που περιλαμβάνει μια ευεργετική σχέση με το φυτό-ξενιστή, όπου το φυτό ξενιστής (το μακροσύμβιον) συνήθως προμηθεύει το ενδόφυτο (το μικροσύμβιον) με φωτοσυνθετικά συστατικά, με σκοπό τη βελτίωση της πρόσβασης του φυτού σε σημαντικά ανόργανα θρεπτικά συστατικά των οποίων η έλλειψη θα περιόριζε την ανάπτυξη. Τέτοιοι μικροοργανισμοί είναι τα ριζόβια (*Rhizobium*, *Bradyrhizobium*) που αναπτύσσουν συμβιωτικές σχέσεις με τα ψυχανθή σχηματίζοντας οζίδια, τα οποία ονομάζονται φυμάτια, στις ρίζες των ψυχανθών και αυτά αποκτούν πρόσβαση σε άζωτο με τη μορφή αμμωνιακών ιόντων (NH_4^+), ενώ τα ριζόβια λαμβάνουν ενώσεις άνθρακα (κυρίως με τη μορφή οργανικών οξέων) από το φυτό ξενιστή. Μια άλλη συμβίωση με αζωτοδεσμευτικά βακτήρια (RNS) είναι με τα ακτινοβακτήρια που

διαφοροποιούνται ως προς τον βακτηριακό συμβιώτη, το πρότυπο ενδοκυτταρικής μόλυνσης και τη μορφογένεση (Pawlowski, & Bisseling 1996). Επιπλέον, οι ενδομυκορριζικοί μύκητες και οι εκτομυκορριζικοί μύκητες αλληλεπιδρούν με τις ρίζες των φυτών, βελτιώνοντας την πρόσληψη νερού και θρεπτικών συστατικών μέσω των εκτεταμένων δικτύων υφών που εξαπλώνονται στο έδαφος, ειδικά του φωσφόρου σε αφομοιώσιμη μορφή φωσφορικών ιόντων (PO_4^{3-}), και ενισχύοντας την ανοχή των φυτών στις αβιοτικές καταπονήσεις (Goyal, et al 2021).

1.1.3 Ουδέτερες αλληλεπιδράσεις

Στις ουδέτερες αλληλεπιδράσεις δεν παρατηρείται καμία αισθητή επίδραση μεταξύ των μικροοργανισμών και του φυτού. Αυτού του είδους οι αλληλεπιδράσεις αφορούν μικροοργανισμούς που βρίσκονται στο περιβάλλον (έδαφος, νερό, αέρα) και αποικίζουν την επιφάνεια του φυτού χωρίς να προκαλούν τραυματισμούς. Οι μικροοργανισμοί χρησιμοποιούν οργανικές ενώσεις ως υπόστρωμα για την παραγωγή ενέργειας που προέρχονται από τα φυτά συμμετέχοντας έτσι στον κύκλο των θρεπτικών συστατικών.

1.2 Τα ψυχανθή φυτά - *Lotus japonicus*

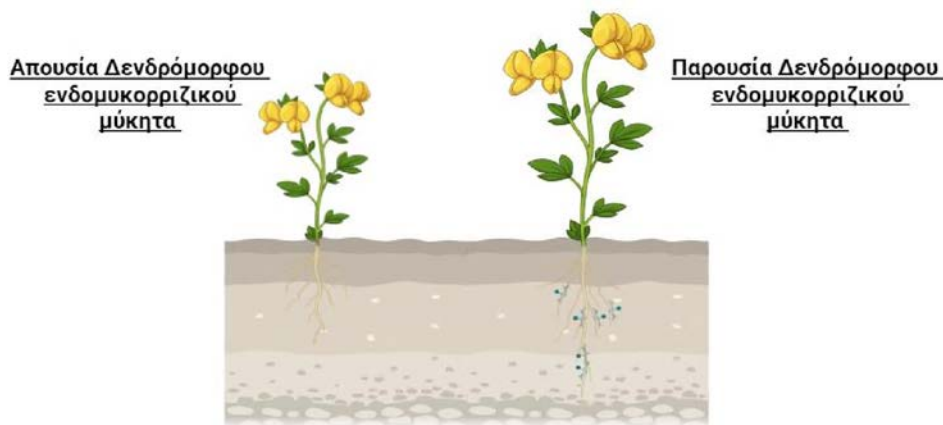
Τα ψυχανθή φυτά που ανήκουν στην οικογένεια των *Fabaceae* (*Leguminosae*) είναι η τρίτη μεγαλύτερη οικογένεια Αγγειόσπερμων, περιέχει πάνω από 18.000 είδη που κατανέμονται σε όλο τον κόσμο και χωρίζονται σε 3 υποοικογένειες *Caesalpinioideae*, *Mimosoideae* και *Papilionoideae*. Τα ψυχανθή κυμαίνονται από μικροσκοπικά φυτά έως και ξυλώδη δέντρα με μεγάλη γεωργική, οικολογική και οικονομική σημασία (Lewis et al 2005). Επιπλέον, τα περισσότερα από τα είδη μπορούν αν συμμετέχουν σε συμβιωτικές σχέσεις προμηθεύοντας τα φυτά με θρεπτικά συστατικά όπως άζωτο και φώσφορο. Τα ψυχανθή συμμετέχουν επίσης και σε τριμερείς συμβιωτικές σχέσεις τόσο με ριζόβια όσο και με μυκορριζικούς μύκητες. Τα πιο γνωστά ψυχανθή είναι το μπιζέλι (*Pisum sativum*) και η σόγια (*Glycine max*) καθώς και τα φυτά-μοντέλα όπως *Medicago truncatula* και *Lotus japonicus* (Doyle and. Luckow 2003).

Πιο συγκεκριμένα, το φυτό *Lotus japonicus* αποτελεί φυτό-μοντέλο καθώς έχει μικρό κύκλο ζωής (3-4 μηνών) και μικρό γονιδίωμα (~ 450 MB), και είναι αυτογονιμοποιούμενο. Ορισμένα άλλα σημαντικά χαρακτηριστικά είναι το μικρό μέγεθος, τα πολλά και μεγάλα άνθη, υψηλή παραγωγή σπόρων, σύντομος χρόνος ανάπτυξης καθώς και εύκολος γενετικός μετασχηματισμός. Τα άνθη του είναι κίτρινα και σχετικά μεγάλα και συνήθως εμφανίζονται ανά ζεύγος σε κάθε μίσχο. Οι βέλτιστες συνθήκες καλλιέργειας είναι θερμοκρασία 18- 22°C και σχετική υγρασία 70%. Το *L. japonicus* διαθέτει πολλούς οικότυπους με πιο καλά μελετημένους, τους MG20 (*Miyakajima*) και Gifu (Pajuelo & Stougaard).

1.3 Μυκορριζική συμβίωση

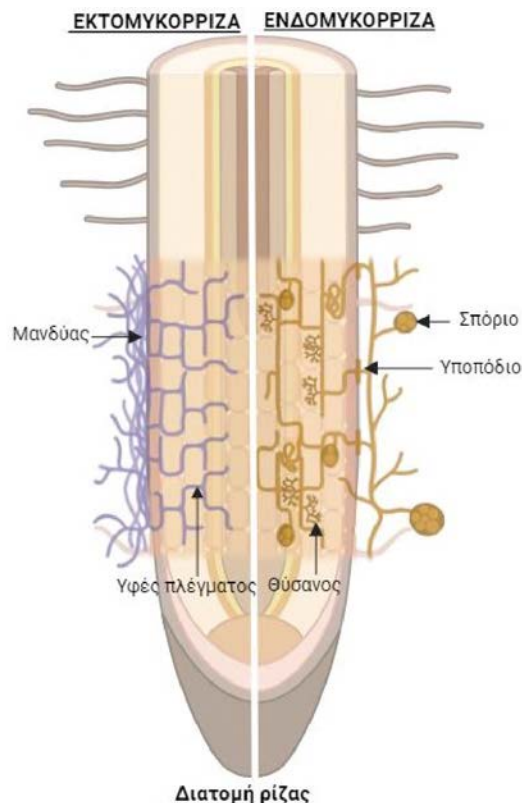
Οι μυκορριζικοί μύκητες (mycos + rhiza → μύκητας + ρίζα), αναπτύσσουν συμβιωτικές σχέσεις με τις ρίζες των ανώτερων φυτών, αποικίζοντας πάνω από το

90% των φυτικών ειδών σε ένα ευρύ φάσμα οικοτόπων, από αλπικές έως τροπικές ζώνες. Μέσω αυτής της συμβιωτικής σχέσης δημιουργούνται δίκτυα υφών στο έδαφος, βελτιώνοντας την απορρόφηση θρεπτικών συστατικών και νερού για τα φυτά ενώ σε αντάλλαγμα, το φυτό-ξενιστής είναι απαραίτητο για την ανάπτυξη και την αναπαραγωγή των μυκήτων (Bonfante & Genre 2010; Parniske 2008) (Εικόνα 2).



Εικόνα 2 Ο ρόλος της μυκορριζικής συμβίωσης στην ανάπτυξη των φυτών (Created in BioRender.com)

Οι μυκορριζικοί μύκητες ταξινομούνται σε δύο κύριες ομάδες: ασηπτικά ενδόφυτα όπως το *Glomeromycota* ή οι Ασκομύκητες (*Ascomycota*) και βασιδιομύκητες (*Basidiomycota*). Με βάση τα ανατομικά χαρακτηριστικά οι μυκόρριζες ταξινομούνται σε δύο κατηγορίες: οι εκτομυκόρριζες (EM) και οι ενδομυκόρριζες. Ανάλογα με το αν ο μύκητας αποικίζει τους γύρω από τα επιδερμικά κύτταρα χώρους της ρίζας ή αναπτύσσεται μέσα στα κύτταρα (Smith & Read 2008) (Εικόνα 3).



Εικόνα 3 Απεικόνιση δομών αποικισμού ριζών σε εκτομυκορριζικές και ενδομυκορριζικές αλληλεπιδράσεις. (Created in BioRender.com)

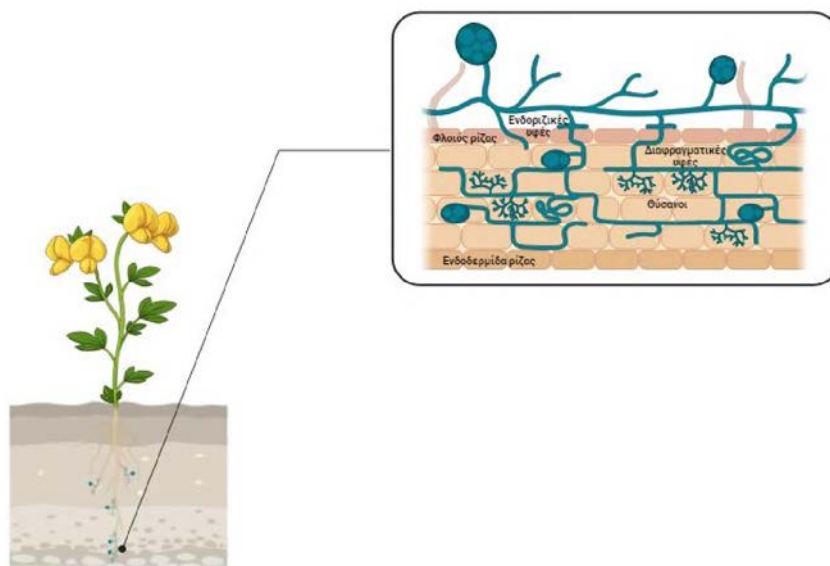
Επιπρόσθετα, οι ενδομυκορριζες διαχωρίζονται περαιτέρω σε μυκορριζες ερικοειδών (*Ericoid*), μυκορριζες ορχεοειδών (*Orchidaceous*), μυκορριζες αρμπουτοειδών (*Arbutoid*), μυκορριζες μονοτροποειδών (*Monotropoid*) και Δενδρόμορφες Μυκορριζες (*Arbuscular*). Οι Δενδρόμορφες Μυκορριζες (ΔΜ) απαντάται περίπου στο 70% των ειδών φυτών της ξηράς και είναι ίσως η πιο διαδεδομένη χερσαία συμβίωση με μύκητες που ανήκουν στο φύλο *Glomeromycota* (Bonfante & Genre 2010).

1.3.1 Δενδρόμορφοι Μυκορριζικοί Μύκητες (ΔΜΜ)- Arbuscular mycorrhizal fungi (AMF)

Οι Δενδρόμορφοι Μυκορριζικοί Μύκητες (ΔΜΜ) είναι υποχρεωτικά βιοτροφικοί οργανισμοί, βρίσκονται σε περίπου 70% των χερσαίων φυτικών ειδών έχοντας σημαντικό ρόλο στη ριζόσφαιρα των φυτών και ανήκουν στην ομάδα του μονοφυλετικού φύλου *Glomeromycotina* των *Mucoromycota* (Bonfante & Venice, 2020). Οι κύριες δομές των ΔΜΜ περιλαμβάνουν ομοιοκυτταρικές υφές και πολυπύρρηνα σπόρια. Ο σχηματισμός του ΔΜΜ είναι το αποτέλεσμα μακροχρόνιας συνεξέλιξης μεταξύ των ενδομυκορριζικών μυκήτων (ΕΜ) και των ριζών των φυτών (Genre et al., 2020).

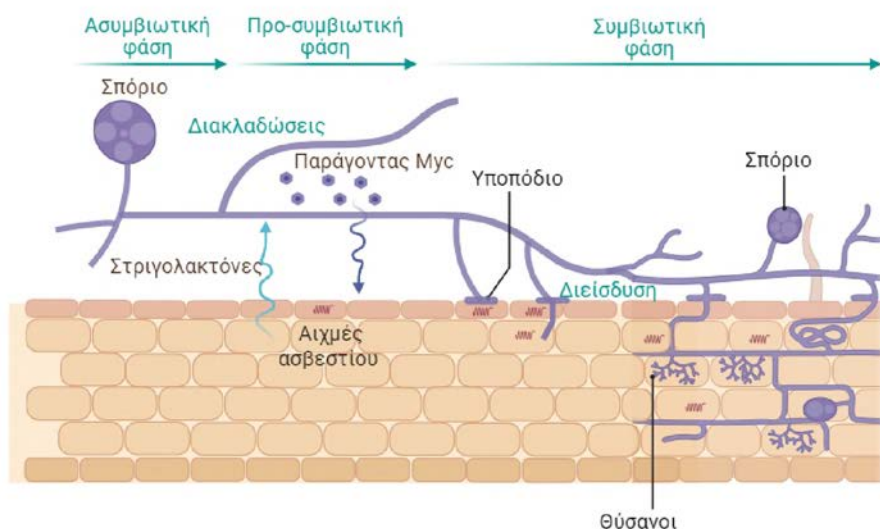
Μέσω αυτής της αλληλεπίδρασης συνδέεται το ριζικό σύστημα του φυτού-ξενιστή με το εκτεταμένο δίκτυο των υφών του μύκητα. Τα φυτά-ξενιστές λαμβάνουν

κυρίως φώσφορο (P), με τη μορφή ανόργανου φωσφορικού ιόντος (P_i) μέσω των μυκήτων, έτσι οι καλλιέργειες μπορούν να εμπλουτιστούν με P μέσω ΔΜΜ ακόμη και σε φτωχά σε P εδάφη. Επιπρόσθετα, οι ΔΜΜ παρέχουν στον ξενιστή νερό και άλλα μέταλλα καθώς και αντοχή σε αβιοτικούς και βιοτικούς παράγοντες καταπόνησης. Σε αντάλλαγμα, τα φυτά καλύπτουν τις αναπτυξιακές ανάγκες του μύκητα σε άνθρακα με προϊόντα από τη φωτοσύνθεση και με λιπίδια (Wang et al. 2024, Keymer & Gutjahr 2018).



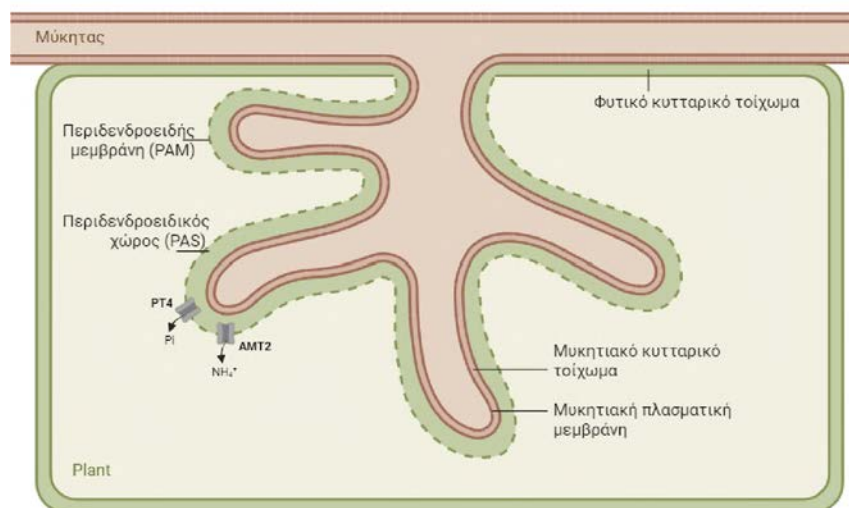
Εικόνα 4 Σχηματική απεικόνιση των δενδρόμορφων δομών του μύκητα εντός των ριζικών κυττάρων (Created in BioRender.com)

Με την εγκαθίδρυση της συμβίωσης μέσα στα φυτικά κύτταρα σχηματίζονται δενδρόμορφες υποκυτταρικές δομές, γνωστές ως θύσανοι ή arbuscules (*arbusculum* → θάμνος ή μικρό δέντρο), οι οποίες πιστεύεται ότι είναι το κύριο μέρος ανταλλαγής θρεπτικών ουσιών μεταξύ του ΔΜΜ και του φυτού-ξενιστή (Pamiske 2008) (Εικόνα 4).



Εικόνα 5 Δειξίωση των υφών του μύκητα στα επιδερμικά κύτταρα και σχηματισμός δενδρόμορφων δομών στα κύτταρα του φλοιού της ρίζας (Created in BioRender.com)

Η ανάπτυξη της συμβίωσης ξεκινά με την μοριακή αλληλεπίδραση μεταξύ των δύο συμβιωτών στη ριζόσφαιρα, η οποία ξεκινά από στριγκολακτόνες που απελευθερώνονται από τις ρίζες των φυτών καθώς και από τους "Myc παράγοντες" οι οποίοι απελευθερώνονται από τον μύκητα. Μετά από αυτή τη προ-συμβιωτική σηματοδότηση ακολουθεί η ανάπτυξη υψηλά διακλαδισμένων μυκητιακών υφών. Πιο συγκεκριμένα, πριν από την είσοδο των μυκητιακών υφών προσκολλώνται στα επιδερμικά κύτταρα της ρίζας, όπου οι άκρες των υφών διαφοροποιούνται για να σχηματίσουν υποπόδια. Στη συνέχεια, κατά την διείσδυση των μυκητιακών υφών στα ριζικά κύτταρα πραγματοποιούνται αναδιατάξεις του κυτταροσκελετού των φυτικών κυττάρων και αναδιαμόρφωση των οργανιδίων. Ο πυρήνας, προτού μεταναστεύσει κατά μήκος του επιδερμικού φυτικού κυττάρου στην αντίθετη πλευρά, μετακινείται στη θέση επαφής των υφών. Ταυτόχρονα σχηματίζεται μια εξειδικευμένη δομή που μοιάζει με τούνελ που ονομάζεται συσκευή προ-διείσδυσης (PPA) (συσσώρευση ενός πυκνού ενδοπλασματικού δικτύου, νηματίων ακτίνης και μικροσωληνίσκων). Έπειτα, η συσκευή προ-διείσδυσης (PPA) εκτείνεται σε όλο το πλάτος του επιδερμικού κυττάρου και η μυκητιακή υφή εισέρχεται στο εσωτερικό στον αυλό του κυττάρου της ρίζας. Τέλος οι μυκητιακές υφές εξαπλώνονται διακυτταρικά μέσα στη ρίζα του φυτού μέσω της στιβάδας των επιδερμικών κυττάρων μέχρι να φτάσουν στον εσωτερικό φλοιό όπου σχηματίζονται οι δενδρόμορφες δομές ή θύσανοι (arbuscules) στο εσωτερικό των φυτικών κυττάρων (Oldroyd 2013) (Εικόνα 5). Οι θύσανοι χαρακτηρίζονται από μικρή διάρκεια ζωής περίπου δύο έως οκτώ ημέρες και το φυτικό κύτταρο επιστρέφει στην αρχική του κατάσταση μετά την κατάρρευσή τους ώστε να μπορεί να ξεκινήσει ένας νέος γύρος αποικισμού (Gutjahr and Parniske 2017).



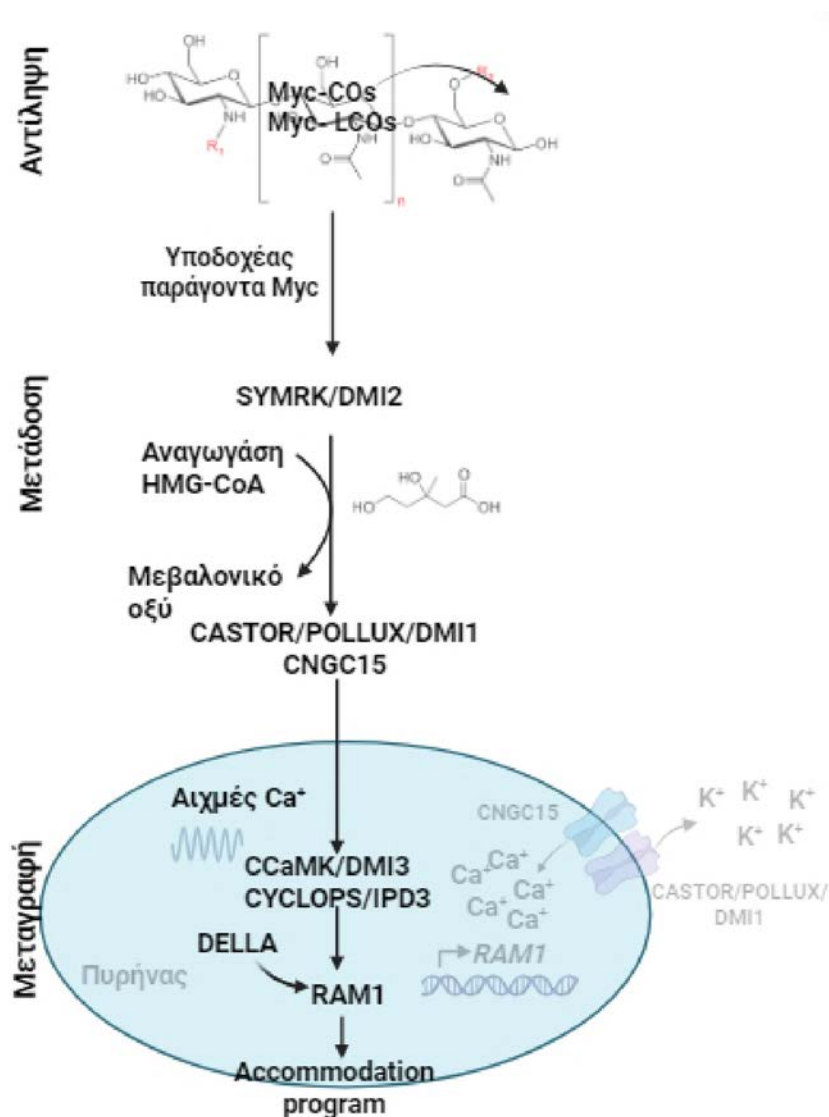
Εικόνα 6 Απεικόνιση της δενδρόμορφης δομής του μύκητα στο εσωτερικό του φυτικού κυττάρου (Created in BioRender.com)

Ο μύκητας για να εισέλθει στα κύτταρα του φλοιού διεισδύει στο κυτταρικό τοίχωμα και η πλασματική μεμβράνη διαστέλλεται για να περιβάλλει τις υφές σχηματίζοντας τη λεγόμενη περιδενδροειδή μεμβράνη (PAM), η οποία διαχωρίζει τις μυκητιακές υφές από το κυτταρόπλασμα του ξενιστή. Η βάση της δενδρόμορφης δομής σχηματίζεται από την περιοχή του κορμού όπου υπάρχουν ίδιες πρωτεΐνες με

την πλασματική μεμβράνη, ενώ στη περιοχή διακλάδωσης, στους λεπτούς κλάδους υφών της δενδρόμορφης δομή, φιλοξενούνται πρωτεΐνες που μεσολαβούν στην ανταλλαγή θρεπτικών ουσιών, συμπεριλαμβανομένων των μεταφορέων φωσφορικών και αμμωνιακών ιόντων, όπως PT4 και AMT2 αντίστοιχα (Pumplin & Harrison 2009) και μιας πρεωτεάσης σερίνης που κωδικοποιείται από το γονίδιο *SbtM1* (Takeda et al 2015). Τέλος, ο περιδενδροειδικός χώρος (PAS) είναι η περιοχή ανάμεσα στην περιδενδροειδή μεμβράνης (PAM) και στις μυκητιακές υφές και περιέχει άμορφα δομημένο υλικό φυτικού κυτταρικού τοιχώματος (Balestrini & Bonfante 2014) (Εικόνα 6).

1.3.2 Σηματοδότηση

Η εγκαθίδρυση την συμβιωτικής σχέσης ξεκινάει με το μοριακό διάλογο όπου από το φυτό παράγονται οι στριγγολακτόνες, μια ομάδα φυτοορμονών με βάση τα καροτενοειδή, ρυθμίζοντας πολλά στάδια της ανάπτυξης των φυτών. Η έκκριση στριγγολακτονών στη ριζόσφαιρα διευκολύνεται σε συνθήκες χαμηλού φωσφόρου, όπου οι μύκητες αναγνωρίζουν έναν δεκτικό ξενιστή μέσω αυτών των σημάτων. Στη συνέχεια, ενεργοποιείται ο οξειδωτικός μεταβολισμός των μυκήτων και αρχίζει η ανάπτυξη και η αύξηση των διακλαδώσεων των υφών, ώστε να αυξηθεί η πιθανότητα φυσικής επαφής των υφών με τη ρίζα του φυτού ξενιστή (Akiyama, et al 2005). Από την πλευρά τους, οι ΔΜΜ παράγουν διάχυτα σήματα που ονομάζονται συλλογικά παράγοντες Myc. Πιο συγκεκριμένα, οι παράγοντες Myc αποτελούνται από μίγμα λιποχιτοολιγοσακχαριτών (Myc-LCOs) και ολιγοσακχαριτών χιτίνης βραχείας αλυσίδας (Myc-COs) (Maillet et al 2011).



Εικόνα 7 Σηματοδοτικό μονοπάτι που οδηγεί στην εγκαθίδρυση της συμβιωτικής σχέσης των ριζών με ΔΜΜ (Created in BioRender.com)

Η σηματοδότηση μέσα στα ριζικά κύτταρα του φυτού-ξενιστή μπορεί να ταξινομηθεί ιεραρχικά σε τρία επίπεδα: 1) αντίληψη ΔΜΜ, 2) μετάδοση σήματος και 3) μεταγραφή γονιδίων (Εικόνα 7).

Αντίληψη → Το φυτό-ξενιστής αντιλαμβάνεται, μέσω κινασών που μοιάζουν με υποδοχείς με μοτίβα λυσίνης (lysine-motif receptor-like kinases, LysM-RLKs) την παρουσία λιποχιτοολιγοσακχαριτών (Myc-LCOs) και ολιγοσακχαριτών χιτίνης βραχείας αλυσίδας (Myc-COs) (MacLean et al 2017; Zhang et al 2024).

Μετάδοση → Αρχικά μετά την αντίληψη των ΔΜΜ από τους υποδοχείς η αναγωγή του HMG-CoA παράγει μεβαλονικό οξύ, και στη συνέχεια το σήμα μεταδίδεται από την πλασματική μεμβράνη στον πυρήνα όπου συμμετέχουν και τα πυρηνικά κανάλια κατιόντων CASTOR και POLLUX/DMI1. Ακολουθεί ροή Ca^{2+} με συγκεκριμένο μοτίβο ταλαντώσεων (calcium spiking) εντός του πυρήνα του φυτικού

κυττάρου (MacLean et al 2017).

Μεταγραφή → Η μεταγραφική απόκριση ενεργοποιείται με την αποκρυπτογράφηση των ταλαντώσεων του πυρηνικού Ca^{2+} από μια κινάση εξαρτώμενη από το ασβέστιο και τη καλμοδουλίνη (CCaMK). Παρουσία Ca^{2+} η καλμοδουλίνη αλληλεπιδρά με την CCaMK, αλλάζοντας διαμόρφωση και φωσφορυλιώνοντας τη πρωτεΐνη CYCLOPS (Miller et al 2013). Στη συνέχεια, η φωσφορυλιωμένη CYCLOPS σχηματίζει ένα σύμπλοκο με τη κινάση CCaMK, το οποίο δρα μαζί με μεταγραφικούς παράγοντες GRAS, για την έναρξη της έκφρασης γονιδίων όπως τα *RAM1/RAM2* (Wang et al 2012).

1.3.3 Προσφορά δενδρόμορφων μυκορριζών στο φυτό

Το φυτό-ξενιστής παρέχει έως και το 20% των φωτοσυνθετικών προϊόντων (περίπου 5 δισεκατομμύρια τόνοι άνθρακα ετησίως) στον ΔΜΜ, ενώ ο ΔΜΜ συμβάλλει στην απόκτηση θρεπτικών συστατικών, στην προστασία από παθογόνα και στην ανοχή σε αβιοτικές καταπονήσεις. Σε επίπεδο οικοσυστήματος, η συμβίωση με ΔΜΜ βελτιώνει την ποιότητα του εδάφους και αυξάνει τη βιοποικιλότητα.

Αρχικά, οι ΔΜΜ παρέχουν πρόσβαση σε θρεπτικά συστατικά στα φυτά ξενιστές που διαφορετικά δεν θα ήταν διαθέσιμα, με αποτέλεσμα την υψηλότερη πρόσληψη θρεπτικών συστατικών κυρίως φώσφορο (P) και άζωτο (N), καθώς και θείο (S), κάλιο (K), σίδηρο (Fe), χαλκό (Cu), μαγγάνιο (Mn) και ψευδάργυρο (Zn). Πιο συγκεκριμένα, κυρίως ο φώσφορος είναι ελάχιστα ευκίνητα στο έδαφος. Οι ΔΜΜ συμβάλλουν σημαντικά στην πρόσληψη φωσφόρου μέσω μεταφορέων φωσφόρου (PT4) οι οποίοι μεταφέρουν φωσφορικά ιόντα (Pi) στο φυτικό κύτταρο και βρίσκονται στην μεμβράνη γύρω από τις δενδρόμορφες δομές. Αντίστοιχοι μεταφορείς (AMT2;2) συμμετέχουν στην αποτελεσματικότερη πρόσληψη αζώτου σε αφομοιώσιμη μορφή (NH_4^+). (Luginbuehl & Oldroyd 2017).

Επιπλέον, οι ΔΜΜ μπορούν να μειώσουν τη ζημιά που προκαλείται από μύκητες, νηματώδη, βακτήρια και άλλα παθογόνα. Για παράδειγμα, τα αποικισμένα φυτά βαμβακιού είναι πιο ανθεκτικά στη μόλυνση από το παθογόνο *Thielaviopsis basicola* από τα μη-αποικισμένα. Επιπλέον, η παρουσία μυκορριζικών μυκήτων μείωσε τον αριθμό των απωλειών των φυτών που προκαλούνται από το *P. megaspera*. Όσον αφορά τα βακτήρια, ο μυκορριζικός εμβολιασμός μπορεί να μειώσει τη βλάβη σε φυτά τομάτας που προκαλείται από το *P. solanacearum* και ο *G. mosseae* μπορεί να αποτρέψει τη μόλυνση των φυτών σόγιας καταστέλλοντας τη μολυσματικότητα του παθογόνου *P. syringae* στη σόγια. Για τις ασθένειες που προκαλούνται από νηματώδη, τα συμβιωτικά AMF μπορούν να βελτιώσουν την ανοχή των φυτών στα νηματώδη, αλλά δεν μπορούν να μειώσουν ουσιαστικά τη βλάβη (Weng et al 2022).

Τέλος, οι ΔΜΜ βελτιώνουν την ανοχή και την ανθεκτικότητα των φυτών σε

αβιοτικούς παράγοντες καταπόνησης όπως η ξηρασία, η αλατότητα και η τοξικότητα από βαρέα μέταλλα. Η ρύθμιση της ανοχής των φυτών στην ξηρασία μέσω της συμβίωσης με ΔΜΜ είναι μια περίπλοκη διαδικασία που σχετίζεται με πολλούς μεταβολίτες και μεταβολικές οδούς. Ορισμένα παραδείγματα τρόπων με τους οποίους οι ΔΜΜ ενισχύουν την αντοχή των φυτών στο στρες της ξηρασίας: αυξάνοντας την αποτελεσματικότητα της χρήσης νερού και θρεπτικών συστατικών από τον ξενιστή, ενισχύοντας την ικανότητα οσμωτικής προσαρμογής, ενισχύοντας την αντιοξειδωτική ικανότητα, προκαλώντας την έκφραση γονιδίων απόκρισης σε καταπόνηση. Ακόμα, παρατηρήθηκε ότι οι ΔΜΜ βοηθούν στην αντοχή σε αυξημένη αλατότητα του εδάφους με αύξηση της πρόσληψης νερού, της αύξησης της σταθερότητας των κυτταρικών μεμβρανών και της φωτοσυνθετικής ικανότητας, της ρύθμισης της ομοιόστασης των ROS και της ρύθμισης του μεταβολισμού των υδατανθράκων. Τέλος, η συμβίωση των ΔΜΜ αυξάνει την περιεκτικότητα των φυτών σε φώσφορο προάγοντας τη συσσώρευση βιομάζας και την αραίωση των βαρέων μετάλλων στα φυτά. Ακόμη, οι ΔΜΜ δημιουργούν πολυφωσφορικά σύμπλοκα με βαρέα μέταλλα, αναστέλλοντας τη μεταφορά τους στους βλαστούς (Wang et al 2024).

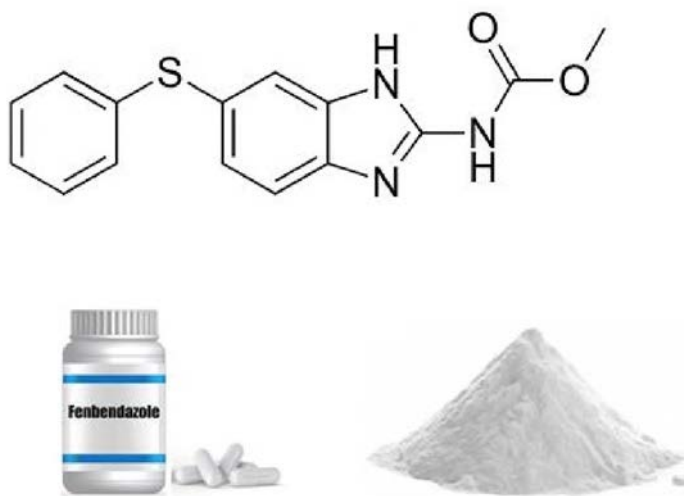
1.4 Ανθελμινθικά φάρμακα

Οι λοιμώξεις από γαστρεντερικούς νηματώδεις σκώληκες (GINs) θεωρούνται σημαντική απειλή για τα ζώα βοσκής παγκοσμίως. Η χρήση ανθελμινθικών ενώσεων (ΑΗ), είναι η κύρια στρατηγική για την πρόληψη και τη θεραπεία των GIN, δρώντας κατά των ελμινθικών λοιμώξεων (Karlan, 2020). Χωρίζονται σε οκτώ ομάδες ανάλογα με τον τρόπο δράσης και την μοριακή δομή τους, οι οποίες είναι: 1) βενζιμιδαζόλες, 2) ιμιδαζοθειαζόλες, 3) διφαινυλοσουλφίδια, 4) εξαϋδροπυραζίνες, 5) μακροκυκλικές λακτόνες, 6) σαλικυλανιλίδια, 7) τετραϋδροπυριμιδίνες και 8) τα υπόλοιπα που δεν εμφανίζουν μεταξύ τους κοινά χαρακτηριστικά. Κυρίως χορηγούνται μέσω της στοματικής οδού ή ενδοφλέβια και μέσω των ούρων και των περιττωμάτων των ζώων καταλήγουν στο χώμα ή στα επιφανειακά ύδατα. Επιπλέον, χορηγούνται σε ένα ευρύ φάσμα ζώων στη κτηνοτροφία και την υδατοκαλλιέργεια και αποτελούν έναν μεγάλο τομέα της κτηνιατρικής φαρμακευτικής βιομηχανίας. Τα ανθελμινθικά φάρμακα, λόγω της ευρείας εφαρμογής τους, αναμένεται να έχουν πιθανές επιπτώσεις στο χερσαίο και υδάτινο περιβάλλον. Τα φυτά εκτίθενται επίσης σε ανθελμινθικά, τα οποία μπορούν να επηρεάσουν την ανάπτυξη και τη φυσιολογία τους. Ο μεταβολισμός συμβαίνει σε τρεις φάσεις: η οξείδωση, η αναγωγή και η υδρόλυση του ξενοβιοτικού. Στη συνέχεια, οι ενώσεις που απεκκρίνονται, είτε αμετάβλητες είτε ως προϊόντα μεταβολισμού, μπορούν να διατηρήσουν παρασιτοκτόνο δράση. Σε ορισμένες περιπτώσεις, ο ανθελμινθικός μεταβολίτης έχει μεγαλύτερη επίδραση από την αρχική ένωση (Horvat et al. 2012).

1.4.1 Το κτηνιατρικό φάρμακο Φενβενδαζόλη (Fenbendazole-FBZ)

Το fenbendazole (FBZ) ανήκει στις ανθελμινθικές ενώσεις και πιο συγκεκριμένα στις βενζιμιδαζόλες, αποτελεί ένα φαρμακευτικό προϊόν που χρησιμοποιείται ευρέως στην κτηνιατρική (χοίρους, κοτόπουλα, γαλοπούλες και οικόσιτα σαρκοφάγα) και την

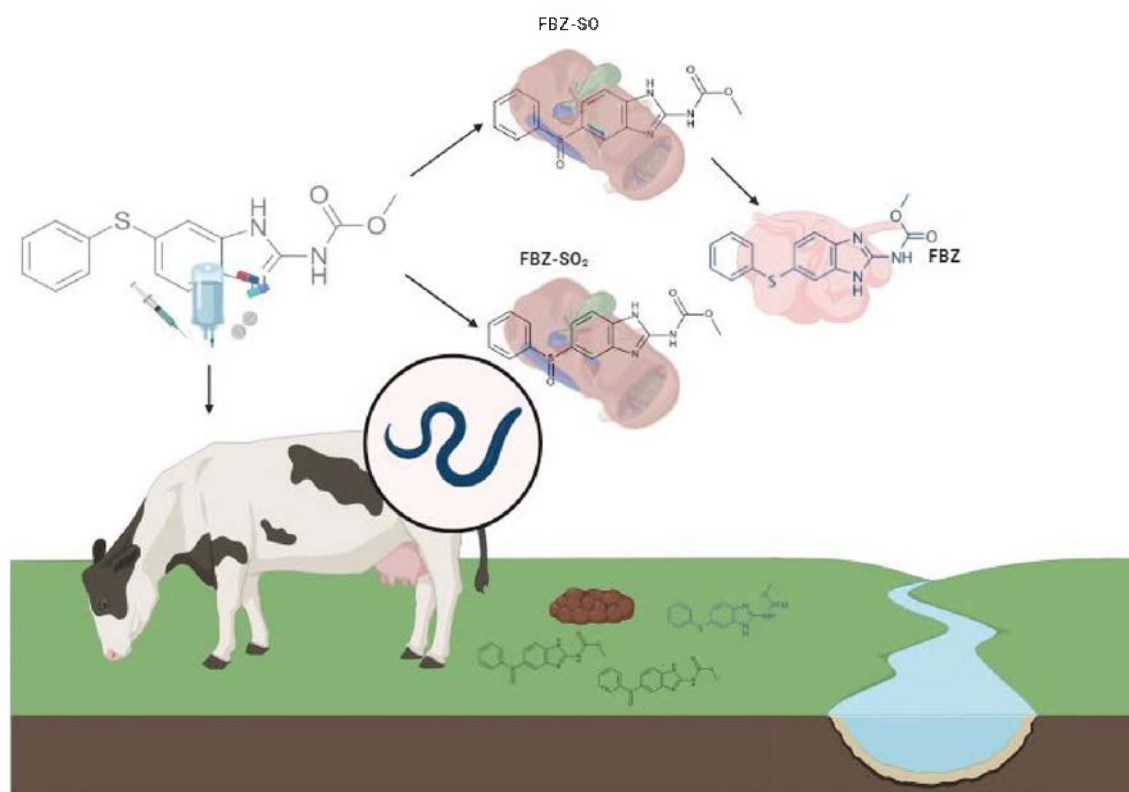
ιατρική για τη θεραπεία εντερικών παρασίτων και λοιμώξεων από νηματώδεις σκώληκες. Αυτά τα φάρμακα δεν είναι αποτελεσματικά μόνο κατά των νηματωδών, αλλά και κατά των ταινιών, των τρηματωδών και ορισμένων πρωτόζωων. Όταν το fenbendazole χορηγείται σε ζώα, η αρχική ουσία και, σε μικρότερο βαθμό, οι μεταβολίτες της (έως 5%) απεκκρίνονται κυρίως στα κόπρανα και λιγότερο στα ούρα, φτάνουν στο περιβάλλον μέσω διαφορετικών οδών και μπορούν να ανιχνευθούν στο έδαφος καθώς και στο νερό των ποταμών. Αν και οι συγκεντρώσεις του fenbendazole στο περιβάλλον δεν είναι πολύ υψηλές ($1\text{ng}\times\text{L}^{-1}$ - $1\mu\text{g}\times\text{L}^{-1}$), μπορεί να επηρεάσει αρνητικά οργανισμούς μη-στόχους στο περιβάλλον, αλλά η επίδραση του στα φυτά δεν είναι πλήρως εξακριβωμένη (Wagil et al., 2015).



Εικόνα 8 Χημική δομή και φυσικοχημικές ιδιότητες FBZ

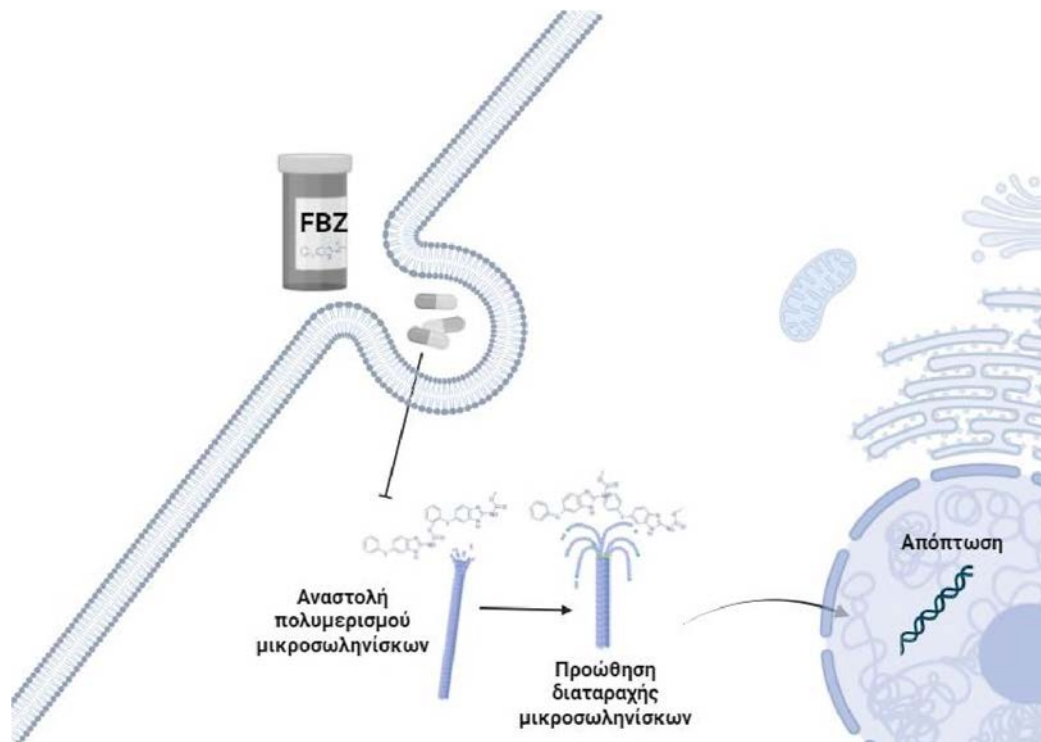
Σχετικά με τις φυσικοχημικές ιδιότητες, του fenbendazole (Methyl N-(6-phenylsulfanyl-1H-benzimidazol-2-yl)carbamate), είναι μια ένωση βενζιμιδαζόλης με μοριακό τύπο $\text{C}_{15}\text{H}_{13}\text{N}_3\text{O}_2\text{S}$ και μοριακό βάρος 299.35 g/mol . Το fenbendazole είναι λευκή, κρυσταλλική σκόνη διαλυτή σε DMSO και άλλους οργανικούς διαλύτες και πρακτικά αδιάλυτη στο νερό ($0,9\mu\text{g} \times \text{mL}^{-1}$). Η δομή του αποτελείται από έναν πυρήνα βενζιμιδαζολίου με συνδεδεμένη ομάδα θειοαιθέρα και καρβαμιδικό τμήμα (Wagil et al., 2015) (Εικόνα 8).

1.4.2 Βιολογική Δράση



Εικόνα 9 Βιομετατροπή του fenbendazole (FBZ) (Created in BioRender.com)

Τα ζώα χορήγησης του φαρμάκου είναι κυρίως βοοειδή και αιγοπρόβατα και δευτερευόντως σκύλοι, γάτες, πτηνά και ψάρια. Στα μηρυκαστικά, το φάρμακο υφίσταται μια πολύπλοκη και εκτεταμένη βιομετατροπή. Μετά την από του στόματος χορήγηση, το μητρικό φάρμακο απορροφάται στο λεπτό έντερο και μεταβολίζεται ταχέως και εκτενώς στο ήπαρ. Τα μεθυλοκαρβαμιδικά βενζιμιδαζόλια επειδή είναι πρακτικά αδιάλυτα στο νερό εμφανίζουν περιορισμένη γαστρεντερική απορρόφηση. Κατά την από του στόματος χορήγηση, το fenbendazole απορροφάται στο γαστρεντερικό σωλήνα και μεταβολίζεται μέσω οξείδωσης στο ήπαρ σε fenbendazole sulfone (FBZ-SO) (*oxfendazole*) και fenbendazole sulfoxide (FBZ-SO₂). Παραγόμενη μέσω μεταβολισμού, το FBZ-SO απελευθερώνεται πίσω στη μεγάλη κοιλία, όπου η βακτηριακή χλωρίδα την ανάγει ξανά σε FBZ (Varlamova et al 2021) (Εικόνα 9). Με βάση το βιοφαρμακευτικό σύστημα ταξινόμησης, το fenbendazole ανήκει στην κατηγορία φαρμάκων IV και έχει χαμηλή διαπερατότητα και κακή διαλυτότητα, δηλαδή το φάρμακο έχει κακή βιοδιαθεσιμότητα και απορροφάται ελάχιστα από τον εντερικό βλεννογόνο. Αυτό οδηγεί σε μείωση της ανθελμινθικής της αποτελεσματικότητας και απαιτεί αύξηση της δοσολογίας του φαρμάκου στη θεραπεία ορισμένων λοιμώξεων.



Εικόνα 10 Ο μηχανισμός δράσης του FBZ (Created in BioRender.com)

Ο μηχανισμός δράσης του FBZ είναι η αναστολή της δράσης της φουμαρικής αναγωγάσης, η μείωση της κατανάλωσης γλυκογόνου στο έντερο των ελμινθών και η βλάβη της λειτουργίας των μικροσωληνίσκων και του μεταβολισμού των μιτοχονδρίων. Πιο συγκεκριμένα, συνδέονται με τη παρασιτική β-τουμπουλίνη, απαραίτητη για το σχηματισμό μικροσωληνίσκων, αναστέλλοντας τον πολυμερισμό της στα παρασιτικά κύτταρα και όχι τα κύτταρα θηλαστικών. Συνεπώς, αναστέλλονται και όλες οι διεργασίες που βασίζονται σε μικροσωληνίσκους, όπως μειωμένη πρόσληψη της γλυκόζης που εν τέλει προκαλεί την παράλυση και τη θανάτωση των παρασίτων (Babić et al 2018).

1.4.3 Περιβαλλοντική τύχη

Οι τοξικές ουσίες, όπως τα υπολείμματα βενζιμιδαζολίων, που οι μονάδες επεξεργασίας λυμάτων αδυνατούν να απομακρύνουν, καταλήγουν στα επιφανειακά ύδατα μέσω απορροής από γεωργικές εκτάσεις εμπλουτισμένες με ζωικά περιττώματα. Μελέτες έχουν εντοπίσει υπολείμματα βενζιμιδαζολίων σε επιφανειακά ύδατα (έως 200 ng L^{-1}), σε θαλάσσια ύδατα (έως 42 ng L^{-1}) και σε ιζήματα (έως 700 ng L^{-1}). Οι ενώσεις ABZ, FBZ και τα προϊόντα οξείδωσής τους είναι από τις πιο συχνά ανιχνεύσιμες βενζιμιδαζόλες (Lagos & Karpouzas 2023).

Πιο συγκεκριμένα, η εναπόθεση κοπριάς ζώων από ζώα που έχουν υποβληθεί σε θεραπεία με βενζιμιδαζόλες σε περιοχές βόσκησης οδηγεί σε αργή διάχυση αυτών και των παραγώγων τους στο έδαφος. Στη συνέχεια, αυτά απορροφώνται από φυτά με τα οποία τρέφονται ζώα κτηνοτροφίας, προκαλώντας προβληματισμό σχετικά με την εισαγωγή υπολειμμάτων ανθελμινθικών ενώσεων στην τροφική αλυσίδα (Lagos & Karpouzas 2023).

1.5 Επίδραση των κτηνιατρικών και γεωργικών φαρμάκων στους δενδρόμορφους μυκορριζικούς μύκητες

Οι ωφέλιμοι μικροοργανισμοί του εδάφους έχουν καθοριστικό ρόλο στο οικοσύστημα, καθώς συμβάλλουν στον κύκλο των θρεπτικών στοιχείων μέσω των συμβιώσεων που αναπτύσσουν. Αυτές οι συμβιωτικές σχέσεις μπορεί να διαταραχτούν από την παρουσία οργανικών ρύπων λόγω την εκτεταμένης χρήσης φυτοφαρμάκων και κτηνιατρικών φαρμάκων. Για αυτόν το λόγο, η ενδεχόμενη τοξική δράση αυτών των φαρμάκων στους μικροοργανισμούς του εδάφους έχει αποτελέσει αντικείμενο μελέτης αρκετών ερευνών.

Πρόσφατες έρευνες έχουν εξετάσει την τοξική δράση των φυτοφαρμάκων στους ΔΜΜ (Roshanfekr et al 2025). Πιο συγκεκριμένα, δοκιμάζονται τεχνικές για την εκτίμηση της τοξικότητας των φυτοφαρμάκων στους ΔΜΜ καθώς προτάθηκε η χρήση τους ως πιθανοί βιοδείκτες για την παρακολούθηση των επιδράσεων των φυτοφαρμάκων στους μικροοργανισμούς του εδάφους.

Εκτός από τα φυτοφάρμακα, σημαντική είναι και η ανάγκη έρευνας της δράσης των κτηνιατρικών φαρμάκων στους ΔΜΜ. Όσον αφορά τις πιθανές επιδράσεις των ανθελμινθικών κτηνιατρικών φαρμάκων στους μικροοργανισμούς δεν έχουν διερευνηθεί αρκετά. Ωστόσο, πολλές μελέτες έχουν αποδείξει ότι τα ανθελμινθικά φάρμακα που χρησιμοποιούνται για τη καταπολέμηση των γαστρεντερικών νηματωδών στα ζώα βοσκής δεν μεταβολίζονται και απεκκρίνονται μέσω των κοπράνων. Με αποτελέσματα, κατά τη χρήση τους ως κοπριά μεταφέρονται στα γεωργικά εδάφη, στα υπόγεια ύδατα και κατεπέκταση στα φυτά με πιθανές επιδράσεις στους μικροοργανισμούς του εδάφους (Kaplan 2020). Οι Gkimprizi et al. (2021) ανέφεραν τις αρνητικές επιδράσεις του ABZ στην ανάπτυξη και τη λειτουργικότητα των θυσάνων των δενδρόμορφων ενδομυκορριζικών μυκήτων (ΔΜΜ), σε συγκέντρωση $0,75 \mu\text{g g}^{-1}$. Επιπλέον, έδειξαν την τοξικότητα του ABZ στην ικανότητα αποικισμού και τη λειτουργία του *R. irregularis*.

1.6 Σκοπός της παρούσας πειραματικής μελέτης

Η απελευθέρωση βενζιμιδαζολικών ανθελμινθικών φαρμάκων αποτελεί πιθανό περιβαλλοντικό κίνδυνο που οδηγεί στην ανάγκη για αποτοξικοποίηση τόσο των ρυπασμένων κοπροσωρών προτού χρησιμοποιηθούν ως λίπασμα όσο και των εδαφών με υψηλή σημειακή ρύπανση. Σκοπός της παρούσας εργασίας, ήταν η μελέτη της επίδρασης του κτηνιατρικού φαρμάκου fenbendazole στην συμβιωτική σχέση του ψυχανθούς φυτού-μοντέλου *Lotus japonicus* με τον δενδρόμορφο μυκορριζικό μύκητα *R. irregularis*, με στόχο την διερεύνηση της ενδεχόμενης τοξικής δράσης του και κατ'επέκταση την ανάδειξη του πιθανού κινδύνου επίδρασης των βενζιμιδαζολικών ανθελμινθικών φαρμάκων στις συμβιωτικές σχέσεις μεταξύ των ΔΜΜ και των ψυχανθών.

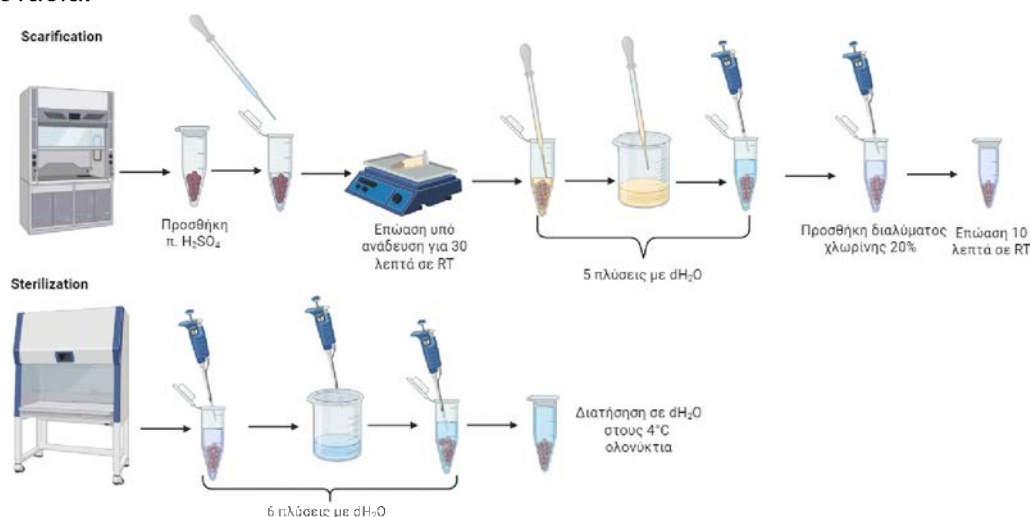
2.ΥΛΙΚΑ ΚΑΙ ΜΕΘΟΔΟΙ

2.1 Βιολογικό υλικό και συνθήκες ανάπτυξης

Στη παρούσα πειραματική μελέτη χρησιμοποιήθηκε το φυτό *Lotus japonicus* και συγκεκριμένα η ποικιλία Gifu. Ο μικροβιακός συμβιώτης που χρησιμοποιήθηκε είναι ο *Rhizophagus irregularis* και συγκεκριμένα το στέλεχος DAOM. Τα φυτά αναπτύχθηκαν μέσα σε δοχεία magentas με ψημένη άμμο και θρεπτικό διάλυμα LAS (Long Aston Solution) και τοποθετήθηκαν σε θάλαμο ανάπτυξης με φωτοπερίοδο 16 ώρες φως / 8 ώρες σκοτάδι, στους 23 °C.

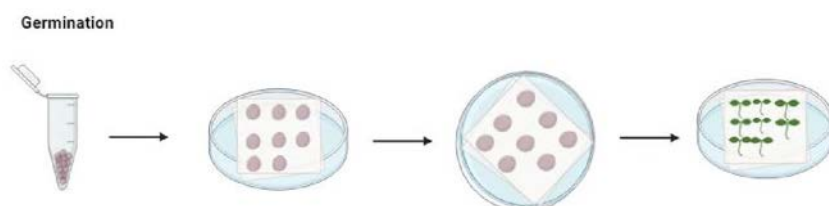
2.2 Απολύμανση και εκβλάστηση σπόρων *Lotus japonicus*

Στη συγκεκριμένη πειραματική διαδικασία, προκειμένου όλοι οι σπόροι να βρίσκονται ταυτόχρονα στο ίδιο αναπτυξιακό στάδιο και να αποφευχθεί η ανάπτυξη ανεπιθύμητων μικροοργανισμών, απαιτείται η απολύμανση και η εκβλάστηση των σπερμάτων του φυτού *L. japonicus*. Η διαδικασία αυτή πραγματοποιείται σε 2 στάδια.



Εικόνα 11 Πρώτο στάδιο- αποστείρωση των σπερμάτων (Created in BioRender.com)

Στο πρώτο στάδιο έγινε η αποστείρωση των σπερμάτων, όπου στον επαγωγό έγινε επώαση υπό ανάδευση των σπόρων σε πυκνό θειικό οξύ H_2SO_4 για 30 λεπτά. Ακολούθησαν 5 πλύσεις με dH_2O , και επώαση σε διάλυμα 20% χλωρίνης εμπορίου για 10 λεπτά. Στη συνέχεια, στο θάλαμο καθέτου νηματικής ροής (laminair) έγιναν 6 πλύσεις με dH_2O και τα σπέρματα διατηρήθηκαν σε dH_2O στους 4°C ολονύκτια (Εικόνα 11).



Εικόνα 12 Δεύτερο στάδιο- εκβλάστηση των σπόρων (Created in BioRender.com)

Την επόμενη μέρα συνεχίστηκε η διαδικασία με το δεύτερο στάδιο, όπου στο θάλαμο καθέτου νηματικής ροής (laminar) τοποθετήθηκαν σε τρυβλίο petri 3 φύλλα διηθητικό χαρτί (το ένα πάνω από το άλλο) και προστέθηκαν 2,5ml dH₂O. Τα σπέρματα τοποθετήθηκαν σε σειρά χωρίς να έρχονται σε επαφή. Τέλος, τα τρυβλία κλείστηκαν με parafilm και τοποθετήθηκαν στο θάλαμο ανάπτυξης φυτών ώστε η γωνία των διηθητικών χαρτιών να είναι βυθισμένη στο dH₂O για ~ 10 μέρες ως την εκβλάστηση των σπερμάτων (Εικόνα 12).

2.3 Μεταφύτευση φυτών *Lotus japonicus* από τριβλία σε δοχεία magentas

Νεαρά φυτάρια 10 ημερών μεταφέρονται σε αποστειρωμένα δοχεία magentas με άμμο, η οποία είχε αποστειρωθεί σε ξηραντήρα στους 180°C για τουλάχιστον 6 ώρες, και θρεπτικό διάλυμα LAS (Πίνακας 1).

2.3.1 Παρασκευή θρεπτικού LAS, εμβολίου μύκητα *Rhizophaqus irregularis* και φαρμάκου

Το θρεπτικό διάλυμα LAS χρησιμοποιείται σε πειράματα εμβολιασμού φυτών με ΔΜΜ γιατί περιέχει χαμηλή συγκέντρωση φωσφόρου, και προωθείται η εγκαθίδρυση της συμβιωτικής σχέσης. Η σύστασή του παρουσιάζεται αναλυτικά στον Πίνακα 1.

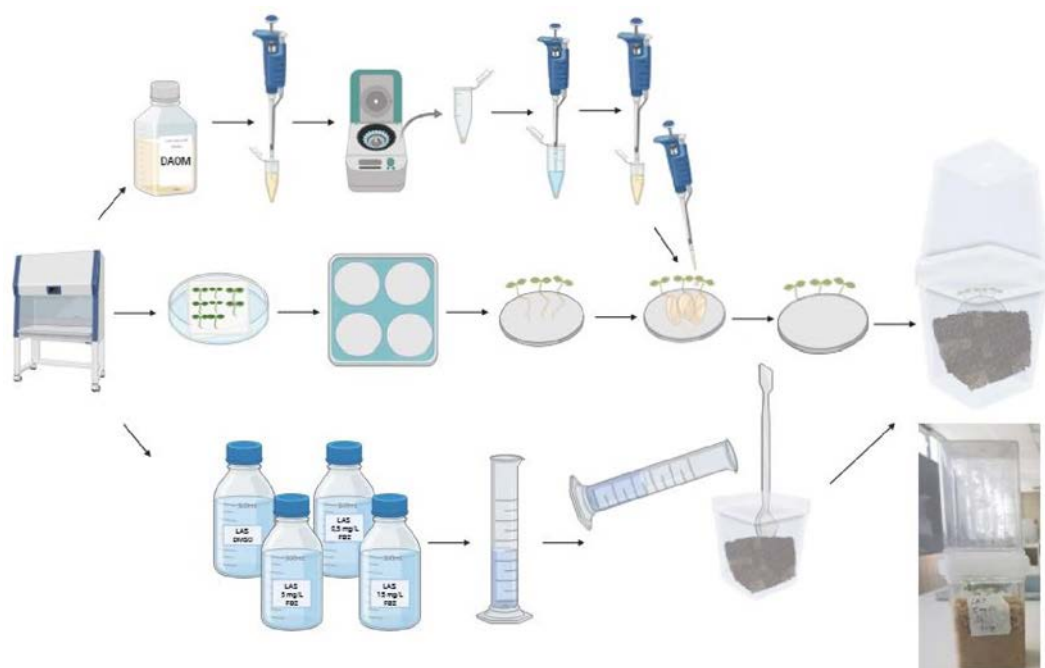
Πίνακας 1 Θρεπτικό διάλυμα LAS (Long Aston Solution)

Θρεπτικό διάλυμα LAS (Long Aston Solution)	
<u>MgSO₄</u>	0.75 Mm
<u>NaNO₃</u>	1 mM
<u>K₂SO₄</u>	1 mM
<u>CaCl₂</u>	2 mM
<u>Na₂HPO₄</u>	3.2 μM
<u>FeNa EDTA</u>	25 μM
<u>MnSO₄</u>	5 μM
<u>CuSO₄</u>	0.25 μM
<u>H₃BO₃</u>	25 μM
<u>Na₂MoO₄</u>	0.1 μM
σε H₂O	

Το μυκορριζικό εμβόλιο που χρησιμοποιήθηκε είναι εμπορικά διαθέσιμο σε υγρή μορφή, και περιέχει 2000 σπόρια του μύκητα ανά 1ml. Στον θάλαμο καθέτου νηματικής ροής (laminar), προστέθηκαν σε σωληνάριο erpendorf 2ml από το πυκνό

Για τη προετοιμασία του αρχικού πυκνού διαλύματος ανθελμινθικού φαρμάκου fenbendazole, ζυγίστηκε η κατάλληλη ποσότητα fenbendazole από σκεύασμα καθαρότητας <98% της εταιρίας Tokyo Chemical Industry® (TCI) και διαλύθηκε σε διμεθυλοσουλφοξείδιο (DMSO) (10 mg ml^{-1}). Για την καλύτερη διάλυση του φαρμάκου έγινε επώαση ~ 30 λεπτών σε υδατόλουτρο υπερήχων. Στη συνέχεια, σε θάλαμο νηματικής ροής το fenbendazole αποστειρώθηκε χρησιμοποιώντας φίλτρο. Ακολούθησαν οι απαραίτητες αραιώσεις με διαλύτη το DMSO για την παρασκευή των υπόλοιπων διαλυμάτων με τις επιθυμητές συγκεντρώσεις. Η ποσότητα DMSO σε όλα τα διαλύματα εργασίας ήταν 0.1%.

Με τη μέθοδο Sandwich είναι πιο αποτελεσματικός ο εμβολιασμός των ριζών με το μύκητα καθώς το εμβόλιο προστίθεται στις ρίζες των φυτών που είναι τοποθετημένες ανάμεσα σε δίσκους νιτροκυτταρίνης. Έτσι το εμβόλιο έρχεται σε άμεση επαφή με τις ρίζες και η πιθανότητα αποικισμού αυξάνεται. Στο θάλαμο καθέτου νηματικής ροής (laminar), σε αποστειρωμένο δοχείο magenta προστέθηκαν 360gr χοντρόκοκκης ψημένης άμμου, 60ml θρεπτικού LAS και η κατάλληλη ποσότητα φαρμάκου ανάλογα με τη συνθήκη. Στη συνέχεια, έγινε ανάμειξη άμμου και 60ml θρεπτικού και σχηματίστηκε μια σχισμή στην οποία θα τοποθετηθεί το sandwich. Για κάθε συνθήκη έγιναν 5 βιολογικές επαναλήψεις και σε κάθε magenta φυτεύτηκαν τρία φυτά (Εικόνα 13).



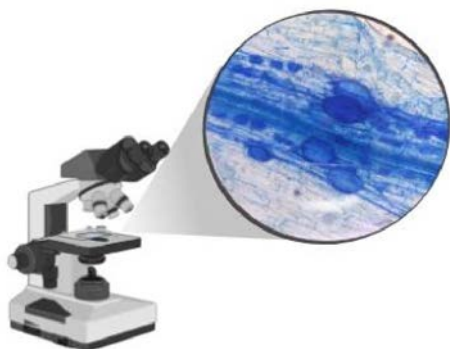
28

Για τη δημιουργία του sandwich οι δίσκοι νιτροκυτταρίνης ενυδατώθηκαν σε τρυβλίο που περιέχει νερό-άγαρ. Σε κάθε δίσκο τοποθετούνται τρία φυτά με το υπέργειο τους τμήμα να προεξέχει και προστίθενται 300μL εμβολίου *R. irregularis* (με συγκέντρωση 1000 σπόρια ανά ml) στις ρίζες των φυτών (300 σπόρια/magenta). Έπειτα, τοποθετήθηκε ο δεύτερος μη ενυδατωμένος δίσκος νιτροκυτταρίνης και το sandwich μεταφέρθηκε στη σχισμή και καλύφθηκε με άμμο, ώστε να βρίσκεται σε άμεση επαφή με το θρεπτικό διάλυμα. Ως δείγματα αρνητικού ελέγχου χρησιμοποιήθηκαν φυτά στα οποία δεν χορηγήθηκε φάρμακο αλλά προστέθηκε η ίδια συγκέντρωση διαλυτή DMSO με τα προς μελέτη δείγματα. Τα δοχεία magentas τοποθετήθηκαν στο θάλαμο ανάπτυξης φυτών στους 23°C για 4 ή 5 εβδομάδες (Εικόνα 13).

2.4 Συγκομιδή των φυτών και χρώση των ριζών με μελάνι

Για τον υπολογισμό του αποικισμού των ριζών από ενδομυκορριζικούς μύκητες, έγινε η συγκομιδή των φυτών μετά από 5 εβδομάδες. Πιο συγκεκριμένα, τα φυτά απομακρύνθηκαν από τα δοχεία magenta μέσα στα οποία αναπτύσσονται, οι ρίζες ξεπλύθηκαν σε νερό ώστε να απομακρυνθεί η άμμος και τα υπέργεια τμήματα κόπηκαν στο υποκοτύλιο. Για την μέτρηση του ξηρού βάρους των υπέργειων τμημάτων έγινε ξήρανση των δειγμάτων στους 65°C στο φούρνο για ≈ 24 ώρες

Στη συνέχεια, οι ρίζες βάφτηκαν με μελάνι με σκοπό τη μικροσκοπική παρατήρηση τόσο της συμβίωσης όσο και των δομών του μύκητα (κύστες, εσωτερικές υφές, δενδρόμορφα) που βάφονται με έντονο μπλε χρώμα και είναι ορατές με το οπτικό μικροσκόπιο (Εικόνα 14).



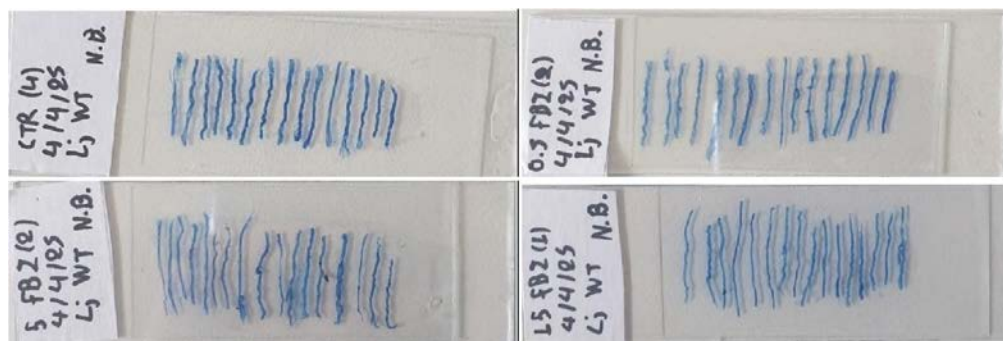
Εικόνα 14: Ενδεικτική εικόνα από μικροσκόπιο της συμβίωσης (Created in BioRender.com)

2.5.1 Χρώση των ριζών

Οι ρίζες των φυτών τοποθετήθηκαν μέσα σε σωλήνες falcon με dH₂O. Ακολούθησε επώαση των ριζών σε KOH 10% για 30 λεπτά στο υδατόλουτρο στους 80-90 °C. Το KOH 10% αφαιρέθηκε και προστέθηκε οξικό οξύ 10%. Στη συνέχεια, έγιναν 2 πλύσεις με dH₂O και επώαση με μελάνι 5% και επώαση για 30 λεπτά στο υδατόλουτρο στους 80-90 °C. Το μελάνι απομακρύνθηκε και έγιναν 2 πλύσεις με dH₂O. Προστέθηκε οξικό οξύ 5% και ακολούθησε επώαση σε θερμοκρασία δωματίου για 30 λεπτά. Τέλος, απομακρύνθηκε το οξικό οξύ και αφέθηκαν ολονύχτια σε dH₂O στους 4°C.

2.5.2 Υπολογισμός ποσοστού αποικισμού από ενδομυκορριζικούς μύκητες

Την επόμενη μέρα οι βαμμένες ρίζες τοποθετήθηκαν σε αντικειμενοφόρους πλάκες (ρίζες από τις ξεχωριστές βιολογικές επαναλήψεις τοποθετήθηκαν σε ξεχωριστές πλάκες). Από κάθε βιολογική επανάληψη τοποθετήθηκαν 15 κομμάτια ρίζας μήκους $\approx 1,5\text{cm}$. Τα δείγματα καλύφθηκαν με καλυπτρίδες, παρατηρήθηκαν στο οπτικό μικροσκόπιο και αποθηκεύτηκαν σε θερμοκρασία δωματίου (Εικόνα 15).



Εικόνα 15: Βαμμένες ρίζες τοποθετημένες σε αντικειμενοφόρους πλάκες για παρατήρηση στο οπτικό μικροσκόπιο

Η παρατήρηση των αντικειμενοφόρων πλακών έγινε σε οπτικό μικροσκόπιο με την χρήση 40x φακού και υπολογισμός των ποσοστών αποικισμού των ριζών από ΔΜΜ. Ανά αντικειμενοφόρο πλάκα λήφθηκε υπόψη η παρουσία ή μη δενδρόμορφων δομών σε 100 διαφορετικά οπτικά πεδία, για την ποσοτικοποίηση του αποικισμού. Στη συνέχεια, με τις μετρήσεις αυτές έγινε αναγωγή του αποτελέσματος σε ποσοστό %.

2.6 Συνκομιδή των φυτών και απομόνωση του ολικού RNA από τις ρίζες των φυτών

Μετά από περίπου 4 εβδομάδες από τη μεταφύτευση των φυτών, τα φυτά απομακρύνθηκαν από τα δοχεία magenta μέσα στα οποία αναπτύσσονται, οι ρίζες ξεπλύθηκαν σε νερό ώστε να απομακρυνθεί η άμμος και το υπέργειο τμήμα κόπηκε στο υποκοτύλιο και απορρίφθηκε. Τέλος, οι ρίζες τοποθετήθηκαν σε σωληνάρια errendorf, ψύχθηκαν σε υγρό N_2 και αποθηκεύτηκαν στους -80°C .

2.6.1 Απομόνωση ολικού RNA από ρίζες με τη χρήση Trizol (RNA extraction)

Η πειραματική διαδικασία ξεκίνησε με το σπάσιμο των κυτταρικών τοιχωμάτων με λειοτρίβηση (με τη χρήση εμβόλων) του ιστού των ριζών, παγωμένων σε υγρό N_2 και διατηρημένων στους -80°C . Η διαδικασία συνεχίστηκε στον πάγο όπου ο ιστός μεταφέρθηκε σε σωληνάρια errendorf των 1,5ml που περιέχουν 450 μl Lysis/binding buffer (Πίνακας 2) (γρήγορη ανάδευση-vortex) ώστε να αποδιαταχθούν οι μεμβράνες. Ακολούθησε φυγοκέντρηση για 10 λεπτά στους 4°C στις 13.000 στροφές και το υπερκείμενο από κάθε σωληνάριο errendorf μεταφέρθηκε σε νέα σωληνάρια errendorf που περιέχουν 500 μL Trizol για την απομάκρυνση των πρωτεϊνών –

μεταβολιτών με ανάδευση (vortex) για τουλάχιστον 30 δευτερόλεπτα και επώαση σε θερμοκρασία δωματίου (RT) για 5 λεπτά. Αφού έγινε φυγοκέντρηση για 5 λεπτά στους 4 °C στις 13.000 στροφές μεταφέρθηκαν οι 2 φάσεις σε νέα σωληνάρια erppendorf. Ξαναέγινε φυγοκέντρηση για 5 min στους 4 °C στις 13.000 στροφές και αφαιρέθηκε με προσοχή το υπερκείμενο από κάθε σωληνάριο erppendorf για αποφυγή διαταραχής της ενδιάμεσης φάσης και μεταφορά σε νέα σωληνάρια erppendorf που περιέχουν 125μl χλωροφόρμιο υπό ανάδευση (vortex) για τουλάχιστον 30 δευτερόλεπτα και επώαση σε θερμοκρασία δωματίου (RT) για 2 λεπτά, για να απομακρυνθούν πρωτεΐνες και το Trizol. Ακολούθησε φυγοκέντρηση για 10 λεπτά στους 4 °C στις 13.000 στροφές, απομόνωση της υπερκείμενης (υδατίνης) φάσης (420μl), μεταφορά σε νέα σωληνάρια erppendorf, προσθήκη 0.1 vol 3 M NaOAc (42μl), ανάδευση (vortex), προσθήκη 0.1 vol. οξικό οξύ (42μl) και 2.5 vol. 100% EtOH (1050 μl), ανάδευση (vortex) και επώαση σε θερμοκρασία δωματίου (RT) για 30 λεπτά. Τα σωληνάρια erppendorf αποθηκευτήκαν στους -20 °C ολονύχτια.

Πίνακας 2 Διάλυμα Lysis/binding buffer

Lysis/binding buffer	
<u>Tris-HCl (pH=7.5)</u>	100 mM
<u>LiCl</u>	500 mM
<u>EDTA (pH=8)</u>	10 mM
<u>LiDS</u>	1%
<u>DTT</u>	5 mM

Την επόμενη μέρα πραγματοποιήθηκε φυγοκέντρηση για 1h στους 4 °C στις 14.000 στροφές, το υπερκείμενο απορρίφθηκε και το ίζημα πλύθηκε με 1000μl 80% EtOH. Ακολούθησε φυγοκέντρηση για 10 λεπτά στους 4 °C στις 14.000 στροφές και απορρίφθηκε όλο το υπερκείμενο. Για την απομάκρυνση του εναπομένου υπερκειμένου έγινε φυγοκέντρηση για 1 λεπτά σε θερμοκρασία δωματίου (RT) σε μέγιστες στροφές και στέγνωμα του ιζήματος σε θερμοκρασία δωματίου για 7 λεπτά. Τέλος, το ίζημα επαναδιαλύθηκε σε 15 μl dH₂O, τα δείγματα θερμάνθηκαν στους 65°C για 2 λεπτά (σύντομη ανάδευση -vortex) και αποθηκεύτηκαν στους -20 °C.

2.6.2 Απομάκρυνση του DNA με αντίδραση DNάσης

Για τον καθαρισμό δειγμάτων RNA από DNA ακολουθήθηκε η αντίδραση απομάκρυνσης DNA με τη χρήση DNάσης όπως παρουσιάζεται στον Πίνακα 3.

Πίνακας 3 Αντίδραση με DNάση

<u>Δείγμα RNA</u>	<u>500ng</u>
<u>10x DNase Buffer</u>	<u>1 μl</u>
<u>RNaseOUT</u> <u>(40U/μl)</u>	<u>0.25 μl</u>
<u>DNase (1U/μl)</u>	<u>1 μl</u>
<u>ddH₂O</u>	<u>ως τα 10 μl</u>
Συνολικός Όγκος	10 μl

! Η ποσότητα του RNA υπολογίζεται από τις τιμές της συγκέντρωσης (ng/ μ L) που μετρήθηκαν με φασματοφωτόμετρο μικροόγκων.

Ακολούθησε επώαση για 50 λεπτά στους 37°C. Στη συνέχεια, αφού έγινε μία σύντομη φυγοκέντρηση προστέθηκε 1 μ L EDTA 25mM που περιέχει χηλικούς παράγοντες που δεσμεύουν το Mg και έτσι το ένζυμο απενεργοποιείται σε κάθε δείγμα και έγινε επώαση 10 λεπτών στους 65°C. Τέλος, έγινε σύντομη φυγοκέντρηση

2.6.3 Αλυσιδωτή αντίδραση πολυμεράσης (PCR)

Για τον έλεγχο της καθαρότητας των δειγμάτων (πλήρης απομάκρυνση του DNA) πραγματοποιείται αλυσιδωτή αντίδραση πολυμεράσης (PCR). Οι εκκινητές που χρησιμοποιήθηκαν υβριδίζουν στο ενδογενές γονίδιο ουβικιτίνης του φυτού.

Πίνακας 4 Αντίδραση PCR

<u>Δείγμα RNA (μετά από την</u> <u>αντίδραση DNάσης)</u>	<u>1 μl</u>
<u>dNTPs (10μM)</u>	<u>0.4 μl</u>
<u>10x Buffer</u>	<u>2 μl</u>
<u>Πρόσθιος εκκινητής (LjUbi F)</u> <u>(10μM)</u>	<u>0.8 μl</u>
<u>Ανάστροφος εκκινητής (LjUbi</u> <u>R)</u> <u>(10μM)</u>	<u>0.8 μl</u>
<u>Ένζυμο Taq DNA πολυμεράση</u> <u>(5U/μL)</u>	<u>0.08 μl</u>
<u>ddH₂O</u>	<u>14.92 μl</u>
Συνολικός Όγκος	20 μl

Πίνακας 5 Πρόγραμμα της αντίδρασης

	Χρόνος	Θερμοκρασία	
<u>Αρχική Αποδιάταξη</u>	5 min	95°C	
<u>Αποδιάταξη</u>	30 sec	95°C	} 40 Κύκλοι
<u>Υβριδοποίηση</u>	30 sec	55°C	
<u>Επιμήκυνση</u>	10 sec	72°C	
<u>Τελική επιμήκυνση</u>	4 min	72°C	
<u>Διατήρηση</u>	∞	4°C	

2.6.4 Ηλεκτροφόρηση σε πήκτωμα αгарόζης

Στη συνέχεια, πραγματοποιήθηκε ηλεκτροφόρηση σε πήκτωμα αгарόζης (1% πυκνότητα), ώστε να ελεγχθεί αν όντως απομακρύνθηκε το DNA από τα δείγματα μας. Εάν τα δείγματα δεν έχουν καθαρίσει επαναλαμβάνεται η αντίδραση DNAσης. Για το πήκτωμα (gel) αгарόζης πυκνότητας 1% προστέθηκαν 1,5 gr αгарόζης σε 150 ml TAE buffer. Η αгарόζη διαλύθηκε στο TAE στον φούρνο μικροκυμάτων για 2 λεπτά και προστέθηκε και EtBr. Στην ηλεκτροφόρηση χρησιμοποιήθηκε δείκτης μοριακών βαρών.

2.7 Σύνθεση συμπληρωματικού DNA (cDNA- Complementary DNA)

Για την παρασκευή συμπληρωματικού DNA από το RNA που απομονώθηκε προστέθηκε σε κάθε σωληνάριο 300ng RNA, 1μL εκκινητές oligodT (2μM), 1μl dNTPs (10mM) και ddH₂O μέχρι τελικό όγκο 14,5μL. Ακολούθησε επώαση στους 65°C για 5 λεπτά και άμεση μεταφορά στον πάγο. Προετοιμάζουμε το μίγμα (Master Mix) ώστε σε κάθε δείγμα να προστεθούν 4μL 5× ρυθμιστικού διαλύματος και 0,5μL RNaseOUT (20 units). Αναμιγνύουμε ήπια το Master Mix και το δείγμα RNA με τους εκκινητές. Στη συνέχεια, έχουμε επώαση στους 42°C για 2 λεπτά και προστίθεται 1μl ενζύμου αντίστροφης μεταγραφάσης Superscript II (200U/μL).

Πίνακας 6 Πρόγραμμα αντίστροφης μεταγραφάσης (RT – PCR)

Χρόνος	Θερμοκρασία
50 min	42°C
15 min	70°C
∞	4°C

2.8 Ποσοτική αλυσιδωτή αντίδραση πολυμεράσης (qPCR)

Για τον προσδιορισμό της έκφρασης συγκεκριμένων γονιδίων πραγματοποιήθηκε ποσοτική PCR πραγματικού χρόνου (qPCR). Με τη συγκεκριμένη μέθοδο δίνεται η δυνατότητα παρακολούθησης σε πραγματικό χρόνο, της διαδικασίας αύξησης αντιγράφων επιθυμητών τμημάτων DNA. Αυτό οφείλεται στην ικανότητα της χρωστικής να εκπέμπει φθορίζοντα σήματα. Στα συγκεκριμένα πειράματα χρησιμοποιήθηκε η χρωστική SYBR Green, η οποία προσδένεται στα δίκλωνα μόρια του DNA και φθορίζει στα 520nm. Οπότε, όσο μεγαλύτερη ποσότητα DNA υπάρχει στο κάθε δείγμα τόσο αυξάνεται η ένταση του φθορισμού.

Στην σύγκριση των δειγμάτων χρησιμοποιήθηκε η τιμή Ct (threshold cycle), η οποία αντιπροσωπεύει τον αριθμό κύκλων αντίδρασης που απαιτείται από κάθε δείγμα για να ξεπεράσει ένα συγκεκριμένο κατώφλι έντασης φθορισμού που έχει οριστεί από πριν. Ο αριθμός των κύκλων που χρειάζονται είναι αντιστρόφως ανάλογος της ποσότητας DNA του δείγματος, δηλαδή όσο πιο πολλοί κύκλοι χρειάζονται τόσο πιο μικρή είναι η ποσότητα DNA. Τέλος, η καμπύλης τήξης (melting curve) χρησιμοποιήθηκε για τον έλεγχο παραπροϊόντων.

2.8.1 Αντίδραση qPCR για την κανονικοποίηση των δειγμάτων

Αρχικά, έγινε η κανονικοποίηση των δειγμάτων έτσι ώστε οι ποσότητες cDNA να είναι ίδιες για να είναι συγκρίσιμα τα αποτελέσματα με τη χρήση των παρακάτω γονιδίων Αναφοράς (Housekeeping genes):

1. *LjATP* → γονίδιο αναφοράς για την κανονικοποίηση των δειγμάτων cDNA.
2. *LjPP2* → γονίδιο αναφοράς για την κανονικοποίηση των δειγμάτων cDNA

Πίνακας 7 Αντίδραση qPCR κανονικοποίησης

<u>cDNA</u>	<u>1 μl</u>
<u>Πρόσθιος εκκινητής (F) 10μM</u>	<u>0.2 μl</u>
<u>Ανάστροφος εκκινητής (R) 10μM</u>	<u>0.2 μl</u>
<u>ddH₂O</u>	<u>3.6 μl</u>
<u>2x Mix SYBRGreen</u>	<u>5 μl</u>
Συνολικός Όγκος	10 μl

- ! Το Mix SYBRGreen περιέχει το ρυθμιστικό διάλυμα και τα dNTPs.
- ! Αντιδράσεις της ποσοτικής RT-PCR → στο μηχάνημα CPX Connect Real-Time System (BIORAD).

Πίνακας 8 Πρόγραμμα για qPCR κανονικοποίησης

Χρόνος	Θερμοκρασία	
3 min	95°C	
10 sec	95°C	} 40 Κύκλοι
20 sec	60°C ή 58 °C	
11 sec	72°C	
5 sec	65°C	
50 sec	95 °C	

! Η θερμοκρασία υβριδοποίησης είναι είτε 58°C είτε 60°C ανάλογα με το γονίδιο και τους εκκινητές του.

2.8.2 Αντίδραση qPCR

Τα γονίδια που μελετήθηκαν στη συγκεκριμένη εργασία ήταν τα:

1. *LjSbtM1* → πρωτεάση σερίνης (Takeda N, et al 2015)
2. *LjPT4* → μεταφορά φωσφορικών ιόντων (Pumplin, N., & Harrison, M. J. 2009)
3. *LjAMT2.2* → μεταφορά αμμωνιακών ιόντων (Pumplin, N., & Harrison, M. J. 2009)

και οι εκκινητές τους φαίνονται στον Πίνακα 9

Πίνακας 9 Εκκινητές γονιδίων που χρησιμοποιήθηκαν στην qPCR

Γονίδια	Πρόσθιος εκκινητής	Οπίσθιος εκκινητής
<u><i>LjATPs</i></u>	CAATGTCGCCAAGGCCCATGGTG	AACACCACTCTCGATCATTTCTCTG
<u><i>LjPP2a</i></u>	GTAAATGCGTCTAAAGATAGGGTCC	ACTAGACTGTAGTGCTTGAGAGGC
<u><i>LjSbtM1</i></u>	CAGGTGAACCAGAAGGTTGCATAC	AGCAGCACCCCTCTCTATCTTCATGC
<u><i>LjPT4</i></u>	CCAGAACCTCACACAGAAAGACATC	AACACGGTGAACCAGTACCCTGG
<u><i>LjAMT2.2</i></u>	ACACATGCTTGCACTGCTACC	CTGCCCATCCTTGAACAACCC

Πίνακας 10 Αντίδραση qPCR

<u>Cdna</u>	2.5 μl
<u>Πρόσθιος εκκινητής (F) 10μM</u>	0.2 μl
<u>Ανάστροφος εκκινητής (R) 10μM</u>	0.2 μl
<u>ddH₂O</u>	2.1 μl
<u>2x Mix SYBRGreen</u>	5 μl
Συνολικός Όγκος	10 μl

Πίνακας 11 Πρόγραμμα για qPCR

Χρόνος	Θερμοκρασία	} 40 Κύκλοι
3 min	95°C	
10 sec	95°C	
20 sec	60°C ή 58 °C	
11 sec	72°C	
5 sec	65°C	
50 sec	95 °C	

! Η θερμοκρασία υβριδοποίησης είναι είτε 58°C είτε 60°C ανάλογα με το γονίδιο και τους εκκινητές του.

Τα σχετικά επίπεδα έκφρασης των γονιδίων αναφοράς (housekeeping) και η αποδοτικότητα της αντίδρασης PCR για κάθε γονίδιο υπολογίστηκαν από τον τύπο $PCReff^{-\Delta Ct}$, όπου ΔCt είναι η διαφορά $Ct_{gene}-Ct_{housekeeping}$ και $PCReff$ είναι η αποδοτικότητα της αντίδρασης PCR.

2.9 Υπολογισμός ακριβής συγκέντρωσης fenbendazole με υνρή χρωματογραφία υψηλής απόδοσης (HPLC)

Για τον ακριβή προσδιορισμό των συγκεντρώσεων του φαρμάκου που χορηγήθηκε στα φυτά χρησιμοποιήθηκε η μέθοδος υγρής χρωματογραφίας υψηλής απόδοσης. Πιο συγκεκριμένα, έγινε ανάλυση των δειγμάτων fenbendazole διαλυμένα σε θρεπτικό μέσο. Η ανάλυση HPLC πραγματοποιήθηκε σε σύστημα Shimatzu HPLC-DAD με ανιχνευτή φωτοδιόδων εξοπλισμένο με Grace 297 Smart RP C18 (150 mm x 4,6 mm). Το fenbendazole ανιχνεύθηκε στα 245nm χρησιμοποιώντας μια κινητή φάση διαλύματος ακετονιτριλίου/φωσφορικού οξέος (0,1%) σε αναλογία 35/65 v/v. Ο ρυθμός ροής της κινητής φάσης ήταν 1 ml min^{-1} και ο χρόνος έκλουσης 10,2 min.

2.9.1 Προσδιορισμός πρότυπης καμπύλης

Για να γίνει ο ακριβής υπολογισμός των συγκεντρώσεων φαρμάκου μέσω του συστήματος HPLC προηγήθηκε η δημιουργία πρότυπης καμπύλης, χρησιμοποιώντας αρχικό διάλυμα fenbendazole 1000mg/L σε ακετονιτρίλιο (ACN). Ακλούθησαν διαδοχικές αραιώσεις με ACN για την παρασκευή διαλυμάτων με συγκεντρώσεις: 100mg/L, 10 mg/L, 5 mg/L, 2 mg/L, 1 mg/L, 0,5 mg/L, 0,1 mg/L, 0,05 mg/L και 0,025 mg/L. Τα διαλύματα αυτά αναλύθηκαν στην HPLC από όπου προέκυψαν η πρότυπη καμπύλη.

2.9.2 Προσδιορισμός των επιπέδων fenbendazole στην άμμο

Για την εκχύλιση του fenbendazole ζυγίστηκαν 5 g άμμου/ δοχείο ματζέντα σε κωνικές φιάλες των 100ml και προστέθηκαν 10 ml ακετονιτρίλιο (ACN). Οι κωνικές φιάλες καλύφθηκαν με αλουμινένια διαφάνεια και τοποθετήθηκαν σε οριζόντιο τροχειακό αναδευτήρα για ανάδευση 1 ώρας στις 220 rpm. Ακολούθησε φυγοκέντρωση για 5 λεπτά στα 7500 r/m και συλλογή του υπερκείμενου. Πριν από την ανάλυση HPLC, το υπερκείμενο υγρό πέρασε μέσω υδρόφοβων φίλτρων σύριγγας 0,45 μm (φίλτρο σύριγγας PTFE). Η συγκέντρωση του fenbendazole στην άμμο προσδιορίστηκε με ανάλυση HPLC σε δείγματα που ελήφθησαν στις μηδέν, 14 και 28 μέρες μετά την εφαρμογή.

2.10 Στατιστική ανάλυση

Για την στατιστική ανάλυση των αποτελεσμάτων πραγματοποιήθηκε one way ANOVA (analysis of variance), προκειμένου να δούμε αν τα αποτελέσματα διαφέρουν στατιστικώς σημαντικά ($P < 0.05$).

3. ΑΠΟΤΕΛΕΣΜΑΤΑ- ΣΥΖΗΤΗΣΗ

3.1 Έλεγχος της επίδρασης του ανθελμινθικού φαρμάκου fenbendazole στον αποικισμό φυτών *L. japonicus* από τον ενδομυκορριζικό μύκητα *Rhizophagus irregularis*

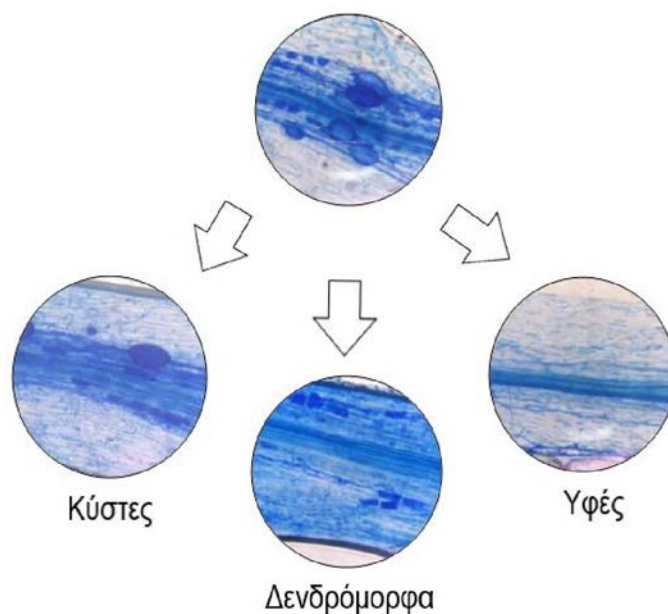
Για τον έλεγχο της επίδρασης του ανθελμινθικού φαρμάκου fenbendazole στον αποικισμό φυτών *L. japonicus* από τον μύκητα *R. irregularis*, έγινε σύγκριση των ποσοστών αποικισμού μεταξύ φυτών που αναπτύχθηκαν απουσία και παρουσία φαρμάκου σε διαφορετικές συγκεντρώσεις. Συγκεκριμένα, ελέγχθηκαν 3 συγκεντρώσεις fenbendazole (0,5mg/L, 5mg/L, 15mg/L). Οι ακριβείς συγκεντρώσεις στο θρεπτικό μέσο ανάπτυξης των φυτών έπεται από ανάλυση HPLC φαίνονται στον Πίνακα 13.

Πίνακας 12 Αναμενόμενες και ακριβείς συγκεντρώσεις του fenbendazole

Φάρμακο	Αναμενόμενες συγκεντρώσεις	Ακριβείς συγκεντρώσεις
Fenbendazole	0,5 mg/L	0,51 mg/L
	5 mg/L	5,05 mg/L
	15 mg/L	15,4 mg/L

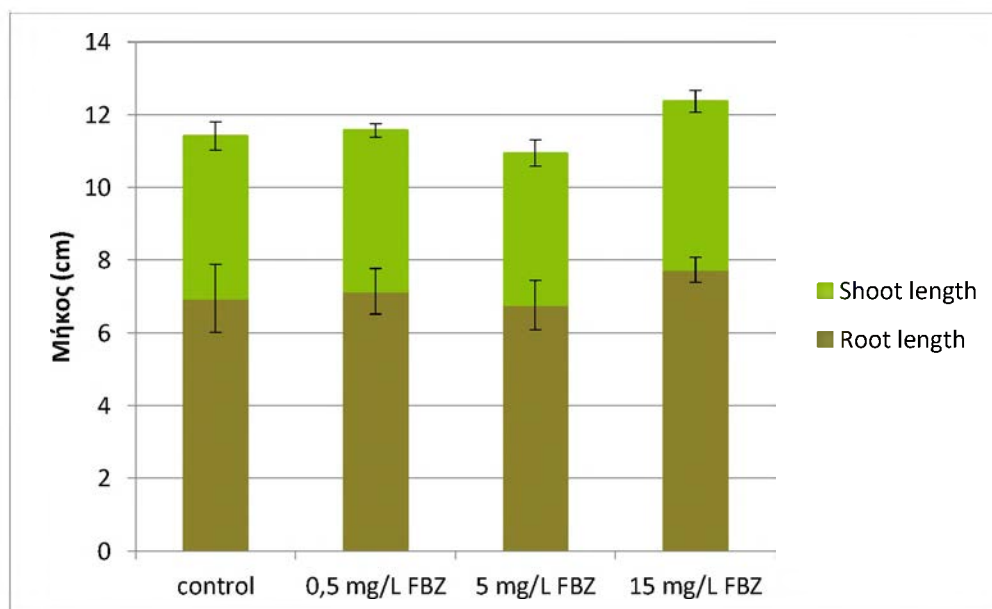
Κάθε συνθήκη είχε 5 βιολογικές επαναλήψεις (δηλαδή 5 δοχεία magenta) και σε κάθε δοχείο magenta που περιείχε αποστειρωμένη άμμο τοποθετηθήκαν με τη μέθοδο sandwich 3 φυτά. Επιπλέον, προστέθηκε θρεπτικό LAS που περιείχε αντίστοιχη ποσότητα φαρμάκου (ή στα δείγματα αρνητικού ελέγχου μόνο DMSO) και οι ρίζες εμβολιάστηκαν με 300 σπόρια του μύκητα *R. irregularis*/ ~100 σπόρια ανά φυτό. Η συγκομιδή των φυτών έγινε έπειτα από 5 εβδομάδες.

Στη συνέχεια, ακολούθησε η χρώση της ρίζας, η μικροσκοπική παρατήρηση και η ανάλυση των δεδομένων. Στην Εικόνα 16 φαίνονται οι διάφορες δομές του μύκητα που παρατηρήθηκαν στις ρίζες των φυτών του πειράματος. Στο συγκεκριμένο πείραμα, ο υπολογισμός του αποικισμού της ρίζας από ΔΜΜ βασίστηκε μόνο στην παρουσία δενδρόμορφων δομών στις ρίζες και όχι σε κύστες και υφές.



Εικόνα 16 Δομές δενδρόμορφου μυκορριζικού μύκητα στις ρίζες του *L. japonicus*

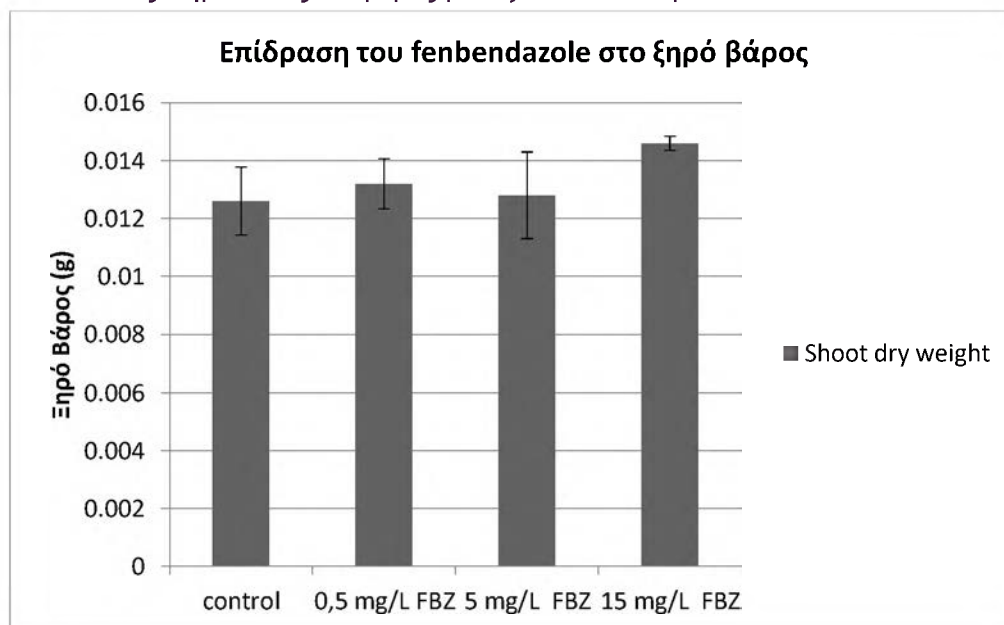
Αρχικά αξιολογήθηκε η απόκριση του φυτού στην παρουσία του φαρμάκου, μέσω μετρήσεων που αποτελούν δείκτες της ανάπτυξης του φυτού, και συγκεκριμένα μήκος βλαστού, μήκος ρίζας και ξηρό βάρος βλαστού. Υπολογίστηκε ο μέσος όρος του μήκους του βλαστού και της ρίζας των φυτών της κάθε βιολογικής επανάληψης, και έπειτα υπολογίστηκε ο μέσος όρος για κάθε συνθήκη, όπως φαίνεται στο Γράφημα 1.



Γράφημα 1 Η επίδραση του fenbendazole στο μήκος του βλαστού και της ρίζας των φυτών *L.japonicus*, σε απουσία φαρμάκου (control) και υπό τη παρουσία διαφόρων συγκεντρώσεων fenbendazole (0,5mg/L 5mg/L, 15mg/L). Δεν παρατηρήθηκαν στατιστικώς σημαντικές διαφορές μεταξύ των συνθηκών.

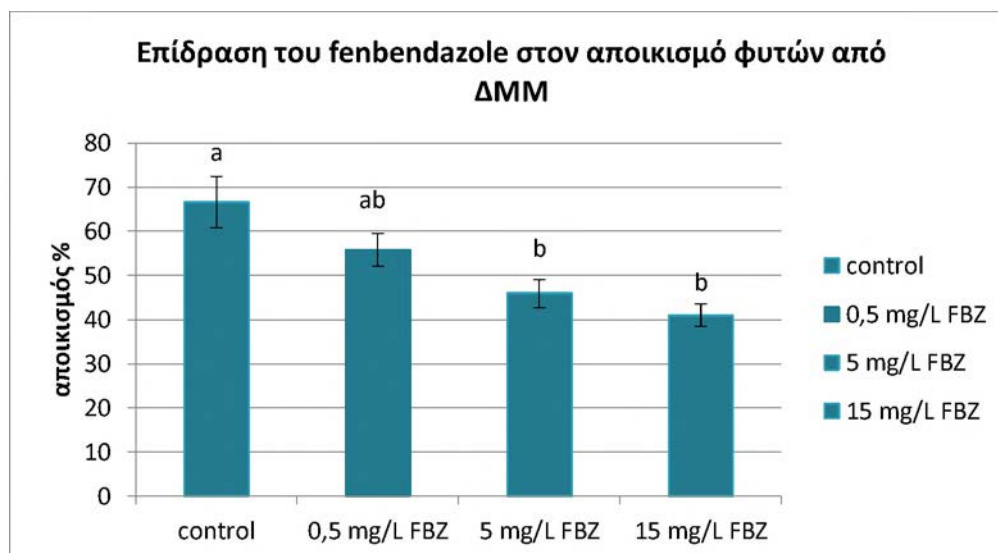
Στο Γράφημα 1 φαίνεται ότι η παρουσία fenbendazole δεν επηρέασε την ανάπτυξη των φυτών, καθώς δεν παρατηρήθηκαν στατιστικώς σημαντικές διαφορές μεταξύ των συνθηκών. Με τον στατιστικό έλεγχο επιβεβαιώθηκε ότι οποιαδήποτε ορατή διαφορά δεν είναι στατιστικώς σημαντική.

Στη συνέχεια, ελέγχτηκε η επίδραση του fenbendazole στην υπέργεια βιομάζα των φυτών, απομονώνοντας το υπέργειο τμήμα (βλαστός) κάθε φυτού και ζυγίζοντας το ξηρό βάρος του, όπως φαίνεται στο Γράφημα 2. Δεν παρατηρήθηκαν, επίσης, στατιστικώς σημαντικές διαφορές μεταξύ των συνθηκών.



Γράφημα 2 Η επίδραση του fenbendazole στο ξηρό βάρος του υπέργειου μέρους των φυτών σε απουσία φαρμάκου (control) και υπό τη παρουσία διαφόρων συγκεντρώσεων fenbendazole (0,5mg/L 5mg/L, 15mg/L). Δεν παρατηρήθηκαν στατιστικώς σημαντικές διαφορές μεταξύ των συνθηκών.

Στο Γράφημα 3 φαίνεται ο μέσος όρος του ποσοστού αποικισμού των ριζών και συγκεκριμένα η παρουσία δενδρόμορφων δομών. Στις υψηλές συγκεντρώσεις fenbendazole, δηλαδή στα 5 και 15mg/L, υπήρξε παρεμπόδιση του αποικισμού των ριζών από τον ΔΜΜ σε σχέση με τη χαμηλή συγκέντρωση φαρμάκου (0.5mg/L) ή την απουσία φαρμάκου. Ειδικότερα, το ποσοστό αποικισμού στην απουσία φαρμάκου (control) ήταν 66,61% ενώ το ποσοστό αποικισμού στις συγκεντρώσεις fenbendazole 0,5mg/L, 5mg/L και 15mg/L ήταν 55,82%, 45,88% και 41,04%, αντίστοιχα.



Γράφημα 3 Ποσοστό αποικισμού ριζών *L. japonicus* από ΔΜΜ σε απουσία φαρμάκου (control) και σε παρουσία 0,5mg/L, 5mg/L, 15mg/L fenbendazole. Παρατηρήθηκαν στατιστικώς σημαντικές διαφορές μεταξύ των συνθηκών. Αν οι ράβδοι από πάνω συμβολίζονται με το ίδιο γράμμα δεν διαφέρουν στατιστικώς σημαντικά ενώ εάν συμβολίζονται με διαφορετικό διαφέρουν.

Η στατιστική ανάλυση έδειξε τιμή p-value ίση με 0.001773, που συνεπάγεται στατιστικά σημαντική διαφορά καθώς είναι <0,005

3.2 Έλεγχος της επίδρασης του ανθελμινθικού φαρμάκου fenbendazole στη συμβιωτική σχέση μεταξύ *L. japonicus* και *Rhizorhagus irregularis* με μοριακή ανάλυση χρησιμοποιώντας νονίδια-δείκτες

Για να μελετήσουμε με περισσότερη ακρίβεια τη επίδραση του fenbendazole στη συμβιωτική σχέση των φυτών με τους ΔΜΜ, χρησιμοποιήσαμε την τεχνική της ποσοτικής PCR πραγματικού χρόνου (qPCR) που είναι περισσότερο ευαίσθητη συγκριτικά τη μικροσκοπία. Ειδικότερα, μελετήσαμε τα επίπεδα έκφρασης των γονιδίων *LjSbtM1*, *LjPT4* και *LjAMT2.2* που αποτελούν δείκτες της σωστής ανάπτυξης και της λειτουργίας των δενδρόμορφων δομών του μύκητα.

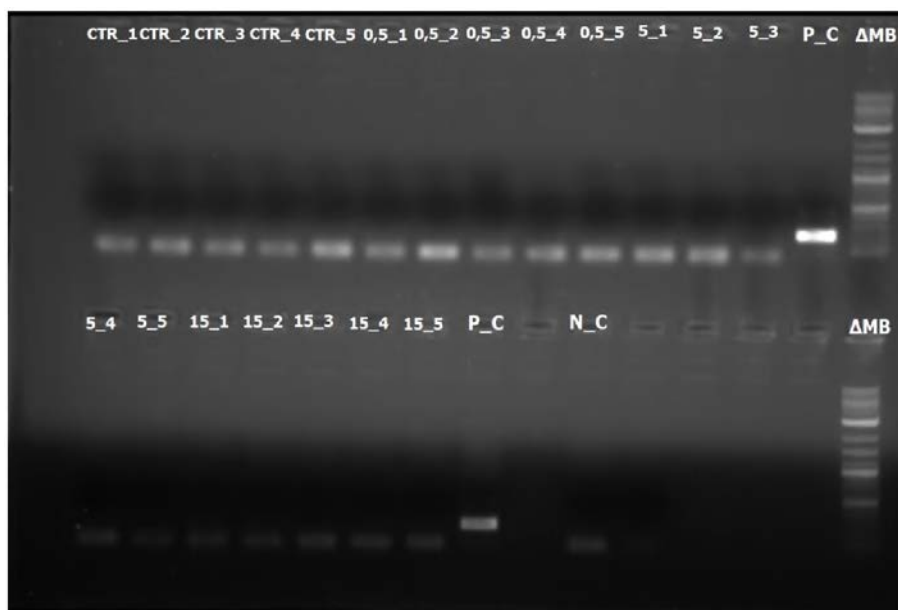
Η μοριακή ανάλυση πραγματοποιήθηκε σε φυτά που αναπτύχθηκαν σε θρεπτικό LAS που περιείχε fenbendazole διαλυμένο σε DMSO σε συγκεντρώσεις 0,5mg/L, 5mg/L και 15mg/L καθώς και σε φυτά μάρτυρες αρνητικού ελέγχου που το θρεπτικό LAS περιείχε μόνο DMSO. Συνολικά είχαμε 5 βιολογικές επαναλήψεις (δοχεία magenta) ανά συνθήκη και σε κάθε βιολογική επανάληψη φυτεύτηκαν 3 φυτά *L. japonicus* με τη μέθοδο sandwich και οι ρίζες εμβολιάστηκαν με 300 σπόρια του μύκητα *R. irregularis*. Η συγκομιδή των φυτών πραγματοποιήθηκε μετά από 4 εβδομάδες.

Στη συνέχεια, ακολούθησε η απομόνωση του ολικού RNA από τις ρίζες των φυτών για να προσδιοριστούν οι συγκεντρώσεις των δειγμάτων RNA (ng/μL) και η αναλογία 260 nm /280 nm με φασματοφωτόμετρο μικροόγκων (NanoDrop) (Πίνακας 14).

Πίνακας 13 Συγκέντρωση RNA και καθαρότητα του δείγματος (λόγος 260/280) που απομονώθηκε από ρίζες φυτών που αναπτύχθηκαν σε απουσία φαρμάκου (control) και ρίζες όπου εφαρμόστηκε fenbendazole σε διάφορες συγκεντρώσεις. Κάθε δείγμα αντιστοιχεί σε μια βιολογική επανάληψη

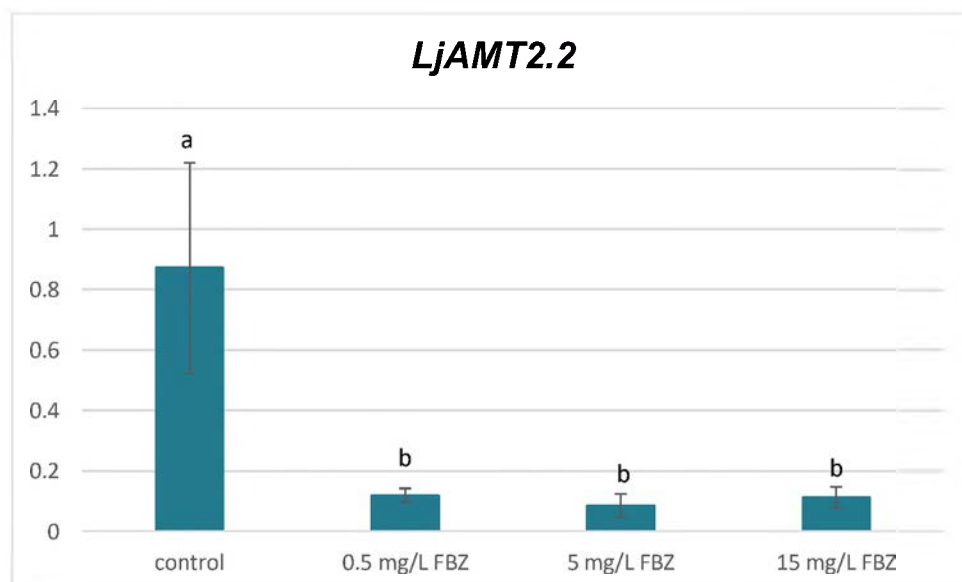
Δείγμα RNA	Συγκέντρωση(ng/μL)	Λόγος 260/280
Control_1	261,6	1,35
Control_2	523,5	1,62
Control_3	569,2	1,68
Control_4	337,2	1,36
Control_5	352	1,38
0,5 mg/L FBZ_1	823,3	1,61
0,5 mg/L FBZ_2	427,5	1,40
0,5 mg/L FBZ_3	587,3	1,50
0,5 mg/L FBZ_4	285,8	1,52
0,5 mg/L FBZ_5	342,2	1,36
5 mg/L FBZ_1	579,7	1,47
5 mg/L FBZ_2	403,8	1,46
5 mg/L FBZ_3	260	1,43
5 mg/L FBZ_4	488,7	1,45
5 mg/L FBZ_5	167,1	1,33
15 mg/L FBZ_1	563,3	1,43
15 mg/L FBZ_2	713,8	1,52
15 mg/L FBZ_3	35	1,32
15 mg/L FBZ_4	582,7	1,43
15 mg/L FBZ_5	895,4	1,23

Ακολούθησε η απομάκρυνση του γονιδιωματικού DNA με αντίδραση DNase. Έπειτα, έγινε PCR για τον έλεγχο της ολικής απομάκρυνσης του ανεπιθύμητου DNA με εκκινητές για το γονίδιο ουβικιτίνης του φυτού *L. japonicus* και ηλεκτροφόρηση σε πήκτωμα αгарόζης 1%. Όπως φαίνεται και στην Εικόνα 17 τα δείγματα ήταν πλήρως καθαρά.

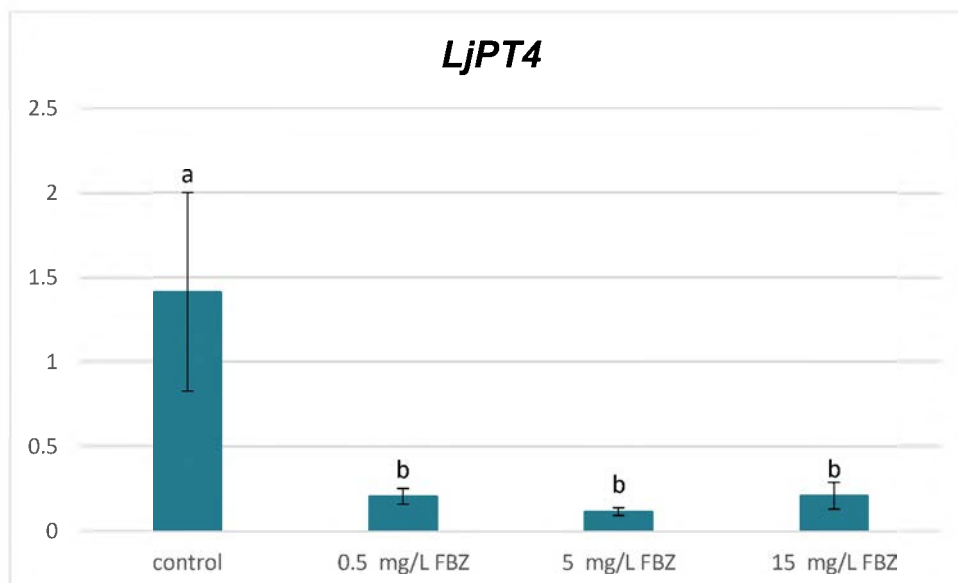


Εικόνα 17 Ηλεκτροφόρηση σε πηκτή αγαρόζης 1%, προϊόντα αντίδρασης PCR σε όλα τα δείγματα μετά από χειρισμό με DNase (ΔMB: Δείκτης Μοριακού Βάρους, N_C: δείγμα αρνητικού ελέγχου, P_C: δείγμα θετικού ελέγχου)

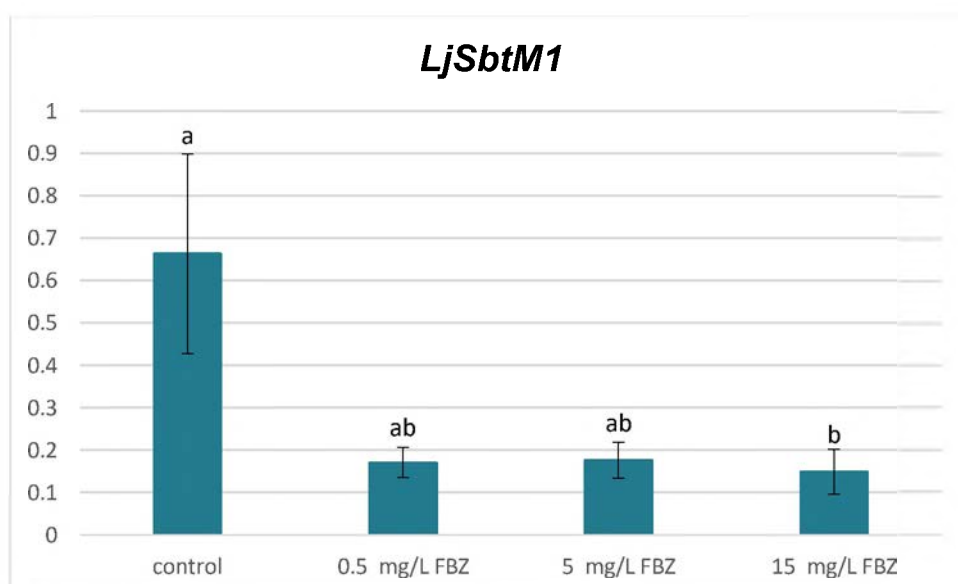
Επομένως, ακολούθησε η διαδικασία της παραγωγής cDNA με μήτρα τα δείγματα RNA. Για την κανονικοποίηση των δειγμάτων πραγματοποιήθηκε αντίδραση qPCR χρησιμοποιώντας το σταθερά εκφραζόμενο γονίδιο (housekeeping gene) της ATP συνθάσης, με σκοπό να γίνουν οι αραιώσεις που έπρεπε στα πιο πυκνά δείγματα ώστε όλα να περιέχουν την ίδια ποσότητα cDNA. Τέλος, έγιναν αντιδράσεις qPCR για τα γονίδια αναφοράς (ATP και PP2) και για τα γονίδια-δείκτες *LjSbtM1*, *LjPT4* και *LjAMT2.2*.



Γράφημα 4 Επίπεδα έκφρασης του γονιδίου *LjAMT2.2* σε φυτά *L.jaronicus* σε δείγματα αρνητικού ελέγχου και δείγματα όπου εφαρμόστηκε fenbendazole σε συγκεντρώσεις 0,5mg/L, 5mg/L και 15 mg/L. Αν οι ράβδοι από πάνω συμβολίζουν με το ίδιο γράμμα δεν διαφέρουν στατιστικώς σημαντικά ενώ εάν συμβολίζονται με διαφορετικό διαφέρουν.



Γράφημα 5 Επίπεδα έκφρασης του γονιδίου *LjPT4* σε φυτά *L.japonicus* σε δείγματα αρνητικού ελέγχου και δείγματα όπου εφαρμόστηκε fenbendazole σε συγκεντρώσεις 0,5mg/L, 5mg/L και 15 mg/L. Αν οι ράβδοι από πάνω συμβολίζονται με το ίδιο γράμμα δεν διαφέρουν στατιστικώς σημαντικά ενώ εάν συμβολίζονται με διαφορετικό διαφέρουν.



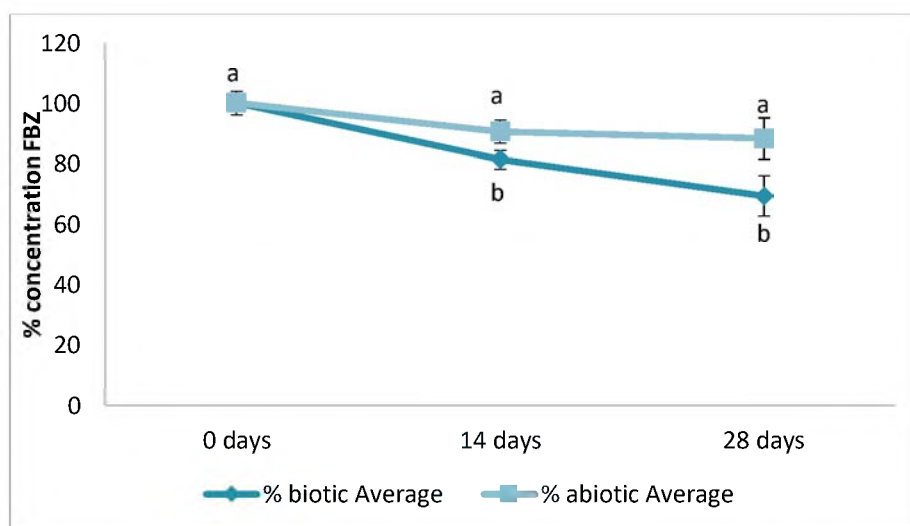
Γράφημα 6 Επίπεδα έκφρασης του γονιδίου *LjSbtM1* σε φυτά *L.japonicus* σε δείγματα αρνητικού ελέγχου και δείγματα όπου εφαρμόστηκε fenbendazole σε συγκεντρώσεις 0,5mg/L, 5mg/L και 15 mg/L. Αν οι ράβδοι από πάνω συμβολίζονται με το ίδιο γράμμα δεν διαφέρουν στατιστικώς σημαντικά ενώ εάν συμβολίζονται με διαφορετικό διαφέρουν.

Όπως είναι φανερό από τα Γραφήματα 4, 5 και 6 η παρουσία fenbendazole στο θρεπτικό ανάπτυξης των φυτών επηρεάζει σημαντικά την έκφραση των γονιδίων που ελέγχθηκαν ακόμη και στη χαμηλότερη συγκέντρωση 0,5mg/L. Συγκεκριμένα, βρέθηκε ότι τα επίπεδα έκφρασης του *LjAMT2.2* και του *LjPT4* στα δείγματα αρνητικού ελέγχου είναι περίπου 7 φορές υψηλότερα από τα επίπεδα έκφρασης στα δείγματα με του fenbendazole. Επιπρόσθετα, όσον αφορά τα επίπεδα έκφρασης του *LjSbtM1* βρέθηκαν 4 φορές χαμηλότερα στα δείγματα με fenbendazole συγκριτικά με

τα δείγματα αρνητικού ελέγχου. Οι διαφορές αυτές είναι στατιστικώς σημαντικές όπως φαίνεται και από τα p-value που υπολογίστηκαν για τα γονίδια *LjAMT2.2*, *LjPT4* και *LjSbtM1* 0.0150847, 0.0201078 και 0.0248534, αντίστοιχα.

3.3 Προσδιορισμός των επιπέδων του fenbendazole στο υπόστρωμα ανάπτυξης

Η συγκέντρωση του fenbendazole στο υπόστρωμα ανάπτυξης προσδιορίστηκε με ανάλυση HPLC. Τα αποτελέσματα έδειξαν μικρή μείωση της συγκέντρωσης του fenbendazole απουσία φυτού και ΔΜΜ με περισσότερο από το 85% της αρχικά ανιχνευθείσας ποσότητας της να παραμένει στο σύστημα μετά από 28 μέρες. Αντίθετα, παρουσία φυτού και ΔΜΜ παρατηρήσαμε μείωση της συγκέντρωσης του fenbendazole κοντά στο 30% του αρχικού επιπέδου της συγκέντρωσης (Γράφημα 7).



Γράφημα 7 Επίπεδα fenbendazole στο υπόστρωμα ανάπτυξης των φυτών. Η συγκέντρωση fenbendazole προσδιορίστηκε με ανάλυση HPLC σε δείγματα άμμου από δοχεία ματζέντα με ή χωρίς φυτά και ΔΜΜ. Η αρχική συγκέντρωση fenbendazole στο διάλυμα ήταν 5 mg L⁻¹. Αν οι ράβδοι από πάνω συμβολίζονται με το ίδιο γράμμα δεν διαφέρουν στατιστικώς σημαντικά ενώ εάν συμβολίζονται με διαφορετικό διαφέρουν.

Αυτά τα αποτελέσματα υποδηλώνουν ότι η παρουσία φυτού και ΔΜΜ διευκολύνει την απομάκρυνση του fenbendazole από την άμμο, είτε λόγω της αυξανόμενης πρόσληψης της ανθελμινθικής ένωσης από τις ρίζες είτε λόγω διάσπασης του fenbendazole από το ΔΜΜ είτε λόγω συνδυασμού και των δύο παραγόντων.

4. ΣΥΖΗΤΗΣΗ

Οι μικροοργανισμοί του εδάφους έχουν τεράστια σημασία για τα οικοσυστήματα καθώς εμπλέκονται στον κύκλο των θρεπτικών ουσιών, και αλληλεπιδρούν με τα φυτά συμμετέχοντας σε συμβιωτικές σχέσεις. Οι ωφέλιμοι μικροοργανισμοί μπορεί να εκτεθούν σε οργανικούς ρύπους όπως φυτοφάρμακα ή κτηνιατρικά φάρμακα που είναι γνωστό ότι εμφανίζονται σε γεωργικά εδάφη είτε άμεσα είτε έμμεσα με τη μορφή κοπριάς. Επομένως, η πιθανή τοξική δράση των φαρμάκων, που καταλήγουν στο έδαφος, εναντίων των ωφέλιμων μικροοργανισμών του εδάφους αποτελεί αντικείμενο ενδιαφέροντος αρκετών μελετών (Zhang et al. 2019).

Εκτός από την τοξικότητα των φυτοφαρμάκων και τους περιβαλλοντικούς τους κινδύνους, είναι αναγκαίο να διερευνηθούν και οι επιδράσεις των κτηνιατρικών φαρμάκων, συμπεριλαμβανομένων των αντιβιοτικών. Ορισμένα παραδείγματα τέτοιων φαρμάκων είναι η τετρακυκλίνη που αποδείχθηκε ότι παρουσίαζε χρόνιες ανασταλτικές επιδράσεις στην ανάπτυξη νιτροποιητικών βακτηρίων (Katipoglu-Yazan et al. 2015), ενώ η συστηματική εφαρμογή τυλοσίνης, σουλφαμεθαζίνης και χλωροτετρακυκλίνης προκάλεσε αλλαγές στην ποικιλία των βακτηρίων που δεσμεύουν το άζωτο (συμβιώνοντας με τη σόγια) στο έδαφος (Revellin et al. 2018). Όμως, οι πιθανές επιδράσεις των ανθελμινθικών κτηνιατρικών φαρμάκων στους μικροοργανισμούς του εδάφους είναι ένα πεδίο που δεν έχει διερευνηθεί αρκετά, και συγκεκριμένα για το fenbendazole (FBZ), δεν υπάρχουν μελέτες ως σήμερα. Ωστόσο, πολλές μελέτες έχουν αποδείξει ότι τα ανθελμινθικά φάρμακα που χρησιμοποιούνται για τη καταπολέμηση των γαστρεντερικών νηματώδεις στα ζώα βοσκής δεν μεταβολίζονται και απεκκρίνονται μέσω των κοπράνων. Με αποτελέσματα, κατά τη χρήση τους ως κοπριά να μεταφέρονται στα γεωργικά εδάφη, στα υπόγεια ύδατα και κατ' επέκταση στα φυτά με πιθανές επιδράσεις στους μικροοργανισμούς του εδάφους (Kaplan 2020). Υπάρχουν κάποιες μελέτες που έχουν επισημάνει τις ισχυρές ανασταλτικές επιδράσεις των βενζιμιδαζολών (*benomyl*, *carbendazim*) στους ΔΜΜ λόγω της μυκητοκτόνου δράσης τους. Επιπλέον, οι Gkimprizi et al. (2021) ανέφεραν τις αρνητικές επιδράσεις του albendazole, σε συγκέντρωση $0,75 \mu\text{g g}^{-1}$, στην ανάπτυξη και τη λειτουργικότητα των δενδρόμορφων δομών κάτι που δεν παρατηρήθηκε στη περίπτωση της ιβερμεκτίνης, λόγω του διαφορετικού τρόπου δράσης των δύο ενώσεων.

Στη συγκεκριμένη πειραματική μελέτη έγινε έλεγχος της πιθανής τοξικής δράσης του κτηνιατρικού φαρμάκου, fenbendazole, στον αποικισμό του φυτού *Lotus japonicus* από τον δενδρόμορφο μυκορριζικό μύκητα *R. irregularis*. Το συγκεκριμένο φάρμακο είναι παρασιτοκτόνο με μυκητοκτόνο δράση και χορηγείται ευρέως στη κτηνιατρική, με αποτέλεσμα να καταλήγει στο έδαφος επηρεάζοντας οργανισμούς μη στόχους (de Oliveira et al 2020). Πιο συγκεκριμένα, ο πειραματικός σχεδιασμός περιλάμβανε τη μελέτη τριών συγκεντρώσεων του φαρμάκου (FBZ $0,5\text{mg/L}$, 5mg/L , 15mg/L).

Αρχικά, για να διαπιστώσουμε εάν το fenbendazole έχει άμεση επίδραση στη συμβίωση φυτού-ΔΜΜ και τη ανάπτυξη του φυτού μετρήσαμε το μήκος του βλαστού και της ρίζας, καθώς και το ξηρό βάρος του υπέργειου μέρους του φυτού. Από τα αποτελέσματα δεν παρατηρήθηκαν διαφορές στις αναπτυξιακές παραμέτρους μεταξύ των φυτών που αναπτύχθηκαν παρουσία διαφορετικών συγκεντρώσεων fenbendazole ή απουσία fenbendazole (Γράφημα 2). Κάτι αντίστοιχο παρατηρήθηκε και κατά τη μελέτη του κτηνιατρικού φαρμάκου albendazole στη συμβίωση *L. japonicus*- *R. irregularis* (Gkimprizi et al. 2021).

Στη συνέχεια, για τον προσδιορισμό του αποικισμού της ρίζας από τον μύκητα παρατηρήθηκαν οι ρίζες στο μικροσκόπιο και μετρήθηκε το ποσοστό παρουσίας δενδρόμορφων δομών (arbuscules), που είναι οι βασικές δομές ανταλλαγής θρεπτικών. Από αυτή τη πειραματική διαδικασία παρατηρήθηκαν μειωμένα ποσοστά αποικισμού των ριζών από τον ΔΜΜ σε όλες τις συγκεντρώσεις fenbendazole που μελετήθηκαν, σε σχέση με τον αποικισμό που μετρήθηκε σε φυτά που αναπτύχθηκαν απουσία του φαρμάκου (Γράφημα 1). Το ίδιο παρατηρήθηκε και κατά τον έλεγχο του albendazole (Gkimprizi et al. 2021).

Τέλος, σε ένα δεύτερο πείραμα ακολούθησε μοριακή ανάλυση με ποσοτική PCR πραγματικού χρόνου (qPCR), καθώς είναι μια μέθοδος πιο ευαίσθητη συγκριτικά με την μικροσκοπική παρατήρηση. Κατά τη μοριακή ανάλυση ελέγχθηκαν τα επίπεδα έκφρασης τριών γονιδίων-δεικτών του φυτού τα οποία εμπλέκονται στην ανάπτυξη και τη λειτουργία των δενδρόμορφων δομών. Τα γονίδια αυτά είναι το *LjSbtM1* που αποτελεί δείκτη της σωστής ανάπτυξης των δενδρόμορφων δομών (Takeda et al 2015), και τα γονίδια *LjPT4* και *LjAMT2.2* που κωδικοποιούν για έναν μεταφορέα φωσφόρου (Pumplin & Harrison 2009) και έναν μεταφορέα αζώτου (Pumplin & Harrison 2009), αντίστοιχα, οι οποίοι βρίσκονται στην περιδενδροειδή μεμβράνη των θυσάνων και συμμετέχουν στη μεταφορά φωσφόρου και αζώτου από τον μύκητα προς το φυτό (άρα αποτελούν δείκτες της πρόσληψης P και N). Τα επίπεδα έκφρασης των τριών γονιδίων δεικτών βρέθηκαν σημαντικά μειωμένα στις ρίζες των φυτών που αναπτύχθηκαν σε θρεπτικό που περιείχε fenbendazole σε όλες τις συγκεντρώσεις που εξετάστηκαν (0,5mg/L, 5mg/L, 15mg/L). Οι Gkimprizi et al. (2021) παρατήρησαν μια αντίστοιχη μείωση των επιπέδων έκφρασης αυτών των τριών γονιδίων μετά από εφαρμογή albendazole σε φυτά *L. japonicus* αλλά σε υψηλότερη συγκέντρωση.

Συνεπώς, το fenbendazole φαίνεται να έχει μια παρόμοια δράση με το albendazole, το οποίο πιθανότατα οφείλεται στο γεγονός ότι τα δύο φάρμακα έχουν παρόμοιο τρόπο δράσης (Ramírez et al. 2001). Σύμφωνα με τα αποτελέσματα της παρούσας εργασίας, το fenbendazole έχει πιο ισχυρή ανασταλτική δράση από ότι το albendazole στη συμβιωτική σχέση *L. japonicus*- *R. irregularis*.

5. ΣΥΜΠΕΡΑΣΜΑΤΑ

Τα αποτελέσματά της παρούσας εργασίας υποδεικνύουν ότι η παρουσία fenbendazole στο έδαφος ακόμη και σε σχετικά χαμηλές συγκεντρώσεις (0,5 mg/L), που είναι πιθανό να απαντώνται σε γεωργικά εδάφη, επιφέρει αρνητική επίδραση στη συμβιωτική σχέση μεταξύ του μύκητα *R. irregularis* και του φυτού-μοντέλου *L. japonicus*. Η παρουσία του φαρμάκου επηρεάζει σημαντικά τη δυνατότητα του μύκητα να αποικίσει τη ρίζα, να φτιάξει ικανοποιητικό αριθμό θυσάνων και να παρέχει στα φυτά βασικά θρεπτικά στοιχεία, όπως φώσφορο και άζωτο.

Τέτοιου είδους μελέτες είναι απαραίτητες για τον έλεγχο της επικινδυνότητας των κτηνιατρικών φαρμάκων που μπορούν να βρεθούν στα γεωργικά εδάφη μέσω της κοπριάς και να απειλήσουν ωφέλιμες συμβιωτικές σχέσεις των φυτών, όπως δείχτηκε για το albendazole (Gkimprizi et al. 2021) και το fenbendazole (παρούσα εργασία). Μελλοντικές μελέτες αναμένονται να εξετάσουν την πιθανή τοξική δράση και άλλων κτηνιατρικών φαρμάκων, καθώς και φυτοφαρμάκων, έναντι των ΔΜΜ. Στις μελέτες αυτές θα πρέπει να λαμβάνονται υπόψη και να εξετάζονται διάφορες παράμετροι όπως διαφορετικά είδη φυτών και ΔΜΜ, φάρμακα με διαφορετικό τρόπο δράσης και σε διάφορες συγκεντρώσεις. Επιπλέον, οι μελέτες αυτές θα πρέπει να επεκταθούν και σε άλλους ωφέλιμους μικροοργανισμούς του εδάφους, όπως είναι για παράδειγμα, τα αζωτοδεσμευτικά βακτήρια που ονομάζονται ριζόβια, και συνάπτουν ωφέλιμες συμβιωτικές σχέσεις με τα ψυχανθή φυτά.

6. ΒΙΒΛΙΟΓΡΑΦΙΑ

- Agrios, G.N. (1997) Control of Plant Diseases. In: Plant Pathology, 4th Edition, Academic Press, San Diego, 200-216.
- Akiyama, K., Matsuzaki, K., & Hayashi, H. (2005). Plant sesquiterpenes induce hyphal branching in arbuscular mycorrhizal fungi. *Nature*, 435(7043), 824–827. doi:10.1038/nature03608
- Babić, S., Pavlović, D. M., Biošić, M., Ašperger, D., Škorić, I., & Runje, M. (2018). Fate of febantel in the aquatic environment—the role of abiotic elimination processes. *Environmental Science and Pollution Research*, 25(29), 28917–28927. <https://doi.org/10.1007/s11356-018-2935-9>
- Balestrini, R., & Bonfante, P. (2014). Cell wall remodeling in mycorrhizal symbiosis: a way towards biotrophism. *Frontiers in Plant Science*, 5. doi:10.3389/fpls.2014.00237
- Bonfante, P., & Genre, A. (2010). Mechanisms underlying beneficial plant–fungus interactions in mycorrhizal symbiosis. *Nature Communications*, 1(1). <https://doi.org/10.1038/ncomms1046>
- Bonfante, P., and Venice, F. (2020). Mucoromycota: Going to the roots of plant-interacting fungi. *Fungal Biol. Rev.* 34, 100–113. doi: 10.1016/j.fbr.2019.12.003
- de Oliveira, H. C., Joffe, L. S., Simon, K. S., Castelli, R. F., Reis, F. C. G., Bryan, A. M., Borges, B. S., Medeiros, L. C. S., Bocca, A. L., Del Poeta, M., & Rodrigues, M. L. (2020). Fenbendazole Controls In Vitro Growth, Virulence Potential, and Animal Infection in the *Cryptococcus* Model. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*, 64(6). <https://doi.org/10.1128/aac.00286-20>
- Doyle, J. J., and M. A. Luckow. (2003). The rest of the iceberg. Legume diversity and evolution in a phylogenetic context. *Plant Physiology* 131:900–910.
- Gan, P. H. P., Dodds, P. N., & Hardham, A. R. (2011). Plant Infection by Biotrophic Fungal and Oomycete Pathogens. *Signaling and Communication in Plant Symbiosis*, 183–212. https://doi.org/10.1007/978-3-642-20966-6_8
- Genre, A., Lanfranco, L., Perotto, S., and Bonfante, P. (2020). Unique and common traits in mycorrhizal symbioses. *Nat. Rev. Microbiol.* 18, 649–660. doi: 10.1038/s41579-020-0402-3
- Gkimprizi, E., Lagos, S., Nikolaou, C. N., Karpouzas, D. G., & Tsikou, D. (2023). Veterinary drug albendazole inhibits root colonization and symbiotic function of the arbuscular mycorrhizal fungus *Rhizophagus irregularis*. *FEMS microbiology ecology*, 99(6), fiad048. <https://doi.org/10.1093/femsec/fiad048>
- Goyal, R. K., Mattoo, A. K., & Schmidt, M. A. (2021). Rhizobial–Host Interactions and Symbiotic Nitrogen Fixation in Legume Crops Toward Agriculture Sustainability. *Frontiers in Microbiology*, 12. <https://doi.org/10.3389/fmicb.2021.669404>
- Gutjahr, C., & Parniske, M. (2017). Cell Biology: Control of Partner Lifetime in a Plant-Fungus Relationship. *Current biology : CB*, 27(11), R420–R423. <https://doi.org/10.1016/j.cub.2017.04.020>
- Horvat, A. J. M., Babić, S., Pavlović, D. M., Ašperger, D., Pelko, S., Kaštelan-Macan, M., Petrović, M., & Mance, A. D. (2012). Analysis, occurrence and fate of

anthelmintics and their transformation products in the environment. *TrAC Trends in Analytical Chemistry*, 31, 61–84. <https://doi.org/10.1016/j.trac.2011.06.023>

Kaplan, R. M. (2020). Biology, Epidemiology, Diagnosis, and Management of Anthelmintic Resistance in Gastrointestinal Nematodes of Livestock. *Veterinary Clinics of North America: Food Animal Practice*, 36(1), 17–30. <https://doi.org/10.1016/j.cvfa.2019.12.001>

Katipoglu-Yazan, T., Ubay Cokgor, E., & Orhon, D. (2014). Modeling sequential ammonia oxidation kinetics in enriched nitrifying microbial culture. *Journal of Chemical Technology & Biotechnology*, 90(1), 72–79. <https://doi.org/10.1002/jctb.4287>

Keymer, A., & Gutjahr, C. (2018). Cross-kingdom lipid transfer in arbuscular mycorrhiza symbiosis and beyond. *Current opinion in plant biology*, 44, 137–144. <https://doi.org/10.1016/j.pbi.2018.04.005>

Lagos, S., & Karpouzas, D. G. (2023). Anthelmintic Veterinary Medicines Interactions with the Soil Microbiota. *Chimia*, 77(11), 777–782. <https://doi.org/10.2533/chimia.2023.777>

Lewis G., Schrire B., Mackinder B., Lock M.. (2005). *Legumes of the world* Kew. Royal Botanic Gardens, 592

Long, S. R., & Staskawicz, B. J. (1993). Prokaryotic plant parasites. *Cell*, 73(5), 921–935. [https://doi.org/10.1016/0092-8674\(93\)90271-q](https://doi.org/10.1016/0092-8674(93)90271-q)

Luginbuehl, L. H., & Oldroyd, G. E. D. (2017). Understanding the Arbuscule at the Heart of Endomycorrhizal Symbioses in Plants. *Current Biology*, 27(17), R952–R963. <https://doi.org/10.1016/j.cub.2017.06.042>

MacLean, A. M., Bravo, A., & Harrison, M. J. (2017). Plant Signaling and Metabolic Pathways Enabling Arbuscular Mycorrhizal Symbiosis. *The Plant Cell*, 29(10), 2319–2335. doi:10.1105/tpc.17.00555

Maillet, F., Poinot, V., André, O., Puech-Pagès, V., Haouy, A., Gueunier, M., ... Dénarié, J. (2011). Fungal lipochitooligosaccharide symbiotic signals in arbuscular mycorrhiza. *Nature*, 469(7328), 58–63. doi:10.1038/nature09622

Miller, J. B., Pratap, A., Miyahara, A., Zhou, L., Bornemann, S., Morris, R. J., & Oldroyd, G. E. D. (2013). Calcium/Calmodulin-Dependent Protein Kinase Is Negatively and Positively Regulated by Calcium, Providing a Mechanism for Decoding Calcium Responses during Symbiosis Signaling. *The Plant Cell*, 25(12), 5053–5066. doi:10.1105/tpc.113.116921

Oldroyd, G. E. D. (2013). Speak, friend and enter: signalling systems that promote beneficial symbiotic associations in plants. *Nature Reviews Microbiology*, 11(4), 252–263. doi:10.1038/nrmicro2990

Pajuelo, E., & Stougaard, J. (n.d.). *Lotus japonicus's a model system*. *Lotus Japonicus Handbook*, 3–24. doi:10.1007/1-4020-3735-x_1

Parniske, M. (2008). Arbuscular mycorrhiza: the mother of plant root endosymbioses. *Nature Reviews Microbiology*, 6(10), 763–775. <https://doi.org/10.1038/nrmicro1987>

Parniske, M. (2000). Intracellular accommodation of microbes by plants: a common developmental program for symbiosis and disease? *Current Opinion in Plant Biology*, 3(4), 320–328. doi:10.1016/s1369-5266(00)00088-1

- Pawlowski, K., & Bisseling, T. (1996). Rhizobial and Actinorhizal Symbioses: What Are the Shared Features? *The Plant Cell*, 8(10), 1899. doi:10.2307/3870238
- Perotto, S., & Baluška, F. (Eds.). (2012). Signaling and Communication in Plant Symbiosis. *Signaling and Communication in Plants*. doi:10.1007/978-3-642-20966-6.
- Pumplin, N., & Harrison, M. J. (2009). Live-Cell Imaging Reveals Periarbuscular Membrane Domains and Organelle Location in *Medicago truncatula* Roots during Arbuscular Mycorrhizal Symbiosis. *PLANT PHYSIOLOGY*, 151(2), 809–819. doi:10.1104/pp.109.141854)
- Ramírez, T., Benítez-Bribiesca, L., Ostrosky-Wegman, P., & Herrera, L. A. (2001). In vitro effects of albendazole and its metabolites on the cell proliferation kinetics and micronuclei frequency of stimulated human lymphocytes. *Archives of medical research*, 32(2), 119–122. [https://doi.org/10.1016/s0188-4409\(01\)00259-4](https://doi.org/10.1016/s0188-4409(01)00259-4)
- Revellin, C., Hartmann, A., Solanas, S., & Topp, E. (2018). Long-Term Exposure of Agricultural Soil to Veterinary Antibiotics Changes the Population Structure of Symbiotic Nitrogen-Fixing Rhizobacteria Occupying Nodules of Soybeans (*Glycine max*). *Applied and Environmental Microbiology*, 84(9). <https://doi.org/10.1128/aem.00109-18>
- Roshanfekrrad M, Papadopoulos C, Calonne-Salmon M, Schneider C, Zhang K, Karpouzas D, Declerck S. (2025) Development of a high-throughput spore germination test to assess the toxicity of pesticides on arbuscular mycorrhizal fungi. *Mycorrhiza*. May 16;35(3):38. doi: 10.1007/s00572-025-01211-w.
- Schirawski, J., & Perlin, M. H. (2018). Plant–Microbe Interaction 2017—The Good, the Bad and the Diverse. *International Journal of Molecular Sciences*, 19(5), 1374. <https://doi.org/10.3390/ijms19051374>
- Smith, S. E. & Read, D. J. (2008). *Mycorrhizal Symbiosis*. <https://doi.org/10.1016/b978-0-12-370526-6.x5001-6>
- Takeda N, Handa Y, Tsuzuki S, Kojima M, Sakakibara H, Kawaguchi M. Gibberellins interfere with symbiosis signaling and gene expression and alter colonization by arbuscular mycorrhizal fungi in *Lotus japonicus*. *Plant Physiol*. 2015;167(2):545-557. doi:10.1104/pp.114.247700
- Varlamova, A. I., Kotchetkov, P. P., Arkhipov, I. A., Khalikov, S. S., Arisov, M. V., & Abramov, V. E. (2021). Pharmacokinetic profile, tissue residue depletion and anthelmintic efficacy of supramolecular fenbendazole. *International journal of pharmaceutics*, 607, 120957. <https://doi.org/10.1016/j.ijpharm.2021.120957>
- Wang, B., Xiao, Q., Geng, X., Lin, K., Li, Z., Li, Y., et al. (2024). Arbuscular mycorrhizal fungi alter rhizosphere bacterial diversity, network stability and function of lettuce in barren soil. *Sci. Hortic*. 323:112533. doi: 10.1016/j.scienta.2023.112533
- Wang, E., Schornack, S., Marsh, J. F., Gobbato, E., Schwessinger, B., Eastmond, P., ... Oldroyd, G. E. D. (2012). A Common Signaling Process that Promotes Mycorrhizal and Oomycete Colonization of Plants. *Current Biology*, 22(23), 2242–2246. doi:10.1016/j.cub.2012.09.043
- Wagil, M., Białk-Bielińska, A., Puckowski, A., Wychodnik, K., Maszkowska, J., Mulkiewicz, E., Kumirska, J., Stepnowski, P., & Stolte, S. (2015). Toxicity of anthelmintic drugs (fenbendazole and flubendazole) to aquatic organisms.

- Environmental science and pollution research international, 22(4), 2566–2573.
<https://doi.org/10.1007/s11356-014-3497-0>
- Wang, Q., Liu, M., Wang, Z., Li, J., Liu, K., & Huang, D. (2024). The role of arbuscular mycorrhizal symbiosis in plant abiotic stress. *Frontiers in Microbiology*, 14.
<https://doi.org/10.3389/fmicb.2023.1323881>
- Weng, W., Yan, J., Zhou, M., Yao, X., Gao, A., Ma, C., Cheng, J., & Ruan, J. (2022). Roles of Arbuscular mycorrhizal Fungi as a Biocontrol Agent in the Control of Plant Diseases. *Microorganisms*, 10(7), 1266.
<https://doi.org/10.3390/microorganisms10071266>
- Wille, L., Messmer, M. M., Studer, B., & Hohmann, P. (2018). Insights to plant–microbe interactions provide opportunities to improve resistance breeding against root diseases in grain legumes. *Plant, Cell & Environment*, 42(1), 20–40. Portico. <https://doi.org/10.1111/pce.13214>
- Zhang, C., Zhou, T., Zhu, L., Du, Z., Li, B., Wang, J., Wang, J., & Sun, Y. (2019). Using enzyme activities and soil microbial diversity to understand the effects of fluoxastrobin on microorganisms in fluvo-aquic soil. *Science of The Total Environment*, 666, 89–93. <https://doi.org/10.1016/j.scitotenv.2019.02.240>
- Zhang, J., Sun, J., Chiu, C. H., Landry, D., Li, K., Wen, J., Mysore, K. S., Fort, S., Lefebvre, B., Oldroyd, G. E. D., & Feng, F. (2024). A receptor required for chitin perception facilitates arbuscular mycorrhizal associations and distinguishes root symbiosis from immunity. *Current biology : CB*, 34(8), 1705–1717.e6.
<https://doi.org/10.1016/j.cub.2024.03.015>