



ΠΑΝΕΠΙΣΤΗΜΙΟ ΘΕΣΣΑΛΙΑΣ
ΤΜΗΜΑ ΒΙΟΧΗΜΕΙΑΣ ΚΑΙ ΒΙΟΤΕΧΝΟΛΟΓΙΑΣ

Πτυχιακή Μελέτη

Ρόλος των φυτικών ορμονών στριγγολακτονών στη φυσιολογία ενδοφυτικών μυκήτων κατά την αλληλεπίδραση τους με ψυχανθή

The role of phytohormones strigolactones in the physiology of endophytic fungi during their interaction with legume plants



Φοιτήτρια: Αναγνώστου Μαρία

ΛΑΡΙΣΑ 2016-2017

ΜΕΛΗ ΕΞΕΤΑΣΤΙΚΗΣ ΕΠΙΤΡΟΠΗΣ

1. **Παπαδοπούλου Καλλιόπη:** Επιβλέπουσα Καθηγήτρια, Αναπληρώτρια Καθηγήτρια του Τμήματος Βιοχημείας και Βιοτεχνολογίας, Εργαστήριο Βιοτεχνολογίας Φυτών και Περιβάλλοντος
2. **Καρπούζας Δημήτριος:** Αναπληρωτής Καθηγητής του Τμήματος Βιοχημείας και Βιοτεχνολογίας, Εργαστήριο Βιοτεχνολογίας Φυτών και Περιβάλλοντος
3. **Ψαρρά Άννα- Μαρία:** Επίκουρος Καθηγήτρια του Τμήματος Βιοχημείας και Βιοτεχνολογία, Εργαστήριο Δομικής και Λειτουργικής Βιοχημείας

Περιεχόμενα

ΠΕΡΙΛΗΨΗ.....	4
ΕΙΣΑΓΩΓΗ	6
<u>Ενότητα 1^η</u> : Ενδοφυτικοί μύκητες	6
1.1 Σημασία των ενδοφυτικών μυκήτων.....	6
1.2 Κατηγορίες ενδοφυτικών μυκήτων	8
1.3 Σημαντικά παραδείγματα ενδοφυτικών μυκήτων	10
<u>Ενότητα 2^η</u> : Το γένος <i>Fusarium</i>	13
2.1 <i>Fusarium oxysporum</i>	13
2.2 <i>Fusarium solani</i> species complex.....	15
2.2.1 <i>Fusarium solani</i> στέλεχος Κ.....	16
<u>Ενότητα 3^η</u> : <i>Lotus japonicus</i>	19
<u>Ενότητα 4^η</u> : Στριγγολακτόνες	20
4.1 Κατηγορίες φυτικών ορμονών.....	20
4.2 Στριγγολακτόνες και οι ρόλοι τους.....	20
ΣΚΟΠΟΣ ΤΗΣ ΕΡΓΑΣΙΑΣ	29
ΥΛΙΚΑ ΚΑΙ ΜΕΘΟΔΟΙ.....	30
ΑΠΟΤΕΛΕΣΜΑΤΑ.....	41
ΣΥΖΗΤΗΣΗ.....	52
ΠΑΡΑΡΤΗΜΑ	54
ΒΙΒΛΙΟΓΡΑΦΙΑ	57

ΠΕΡΙΛΗΨΗ

Οι στριγγολακτόνες είναι μόρια που εμπλέκονται σε διάφορες διεργασίες έξω και μέσα στο φυτό. Στη ριζόσφαιρα δρουν ως σηματοδοτικά μόρια, καθώς εκκρίνονται από τα κύτταρα της ρίζας και προωθούν συμβιωτικές αλληλεπιδράσεις με τους Δενδροειδείς Μυκορριζικούς Μύκητες αλλά και την εκβλάστηση των ριζών παρασιτικών φυτών. Ως φυτοορμόνες, εμπλέκονται στη ρύθμιση της αρχιτεκτονικής του φυτού, στη δευτερογενή αύξηση, και στην αναπαραγωγική ανάπτυξη, ενώ νέοι ρόλοι αναδύονται συνεχώς.

Στην παρούσα μελέτη, διερευνήσαμε την επίδραση των συνθετικών αναλόγων στριγγολακτονών σε άλλες κατηγορίες μυκήτων από αυτές που μέχρι τώρα έχουν μελετηθεί διεξοδικά, και συγκεκριμένα στον ασκομύκητα *Fusarium solani* στέλεχος K (Fs-K) σε σύστημα *in vitro*. Συγκεκριμένα, μελετήθηκε η πιθανή επιρροή στη φυσιολογία του μύκητα τόσο άμεσα, με καταγραφή των επιπτώσεων στην αύξηση και στην εκβλάστηση των δομών αγενούς αναπαραγωγής του μύκητα, όσο και ενδοφυτικά, μέσω της μελέτης αλληλεπίδρασης του μύκητα με το ψυχανθές *Lotus jaronicus*. Προτείνουμε ότι οι στριγγολακτόνες διαδραματίζουν ρόλο, όχι τόσο στην εκβλάστηση των σπορίων όσο στην επιμήκυνση των υφών του Fs-K, που προκύπτουν από το βλαστικό σωλήνα των αναπαραγωγικών δομών, μέσω της επιβράδυνσης της αύξησης. Μολαταύτα, δεν παρατηρήθηκε αρνητική επίδραση στη διαδικασία αποικισμού των ριζικών ιστών του *Lotus jaronicus* από το μύκητα, σε καμία από τις συγκεντρώσεις της ορμόνης που ελέγχθηκαν υπό τις συγκεκριμένες *in vitro* συνθήκες αλληλεπίδρασης του φυτού με τον ενδοφυτικό μύκητα.

Strigolactones are multifunctional molecules involved in several processes outside and within the plant. In the rhizosphere, they act as signalling molecules; they are exuded by plants cells and have been recorded to promote symbiotic interactions with Arbuscular Mycorrhizal Fungi, as well as germination of root parasitic plants. As phytohormones, they are involved in the regulation of plant architecture, secondary growth and reproductive development, and novel roles are emerging continuously. In the present study, we investigated the influence of synthetic SLs on different

fungal categories, than those previously extensively studied, and more specifically on an ascomycetous fungus, namely *Fusarium solani* strain K (Fs-K), in an *in vitro* system. The influence was studied both directly by recording the effects on fungal growth and asexual reproductive structures germination, as well as endophytically, by studying the effects of exogenous application of the hormone on the interaction of Fs-K with the model legume *Lotus japonicus*. We propose that SLs may not play a role in the germination of Fs-K spores, but influence the elongation of hyphae originating from spore germ tubes, by delaying their growth. Nonetheless, no negative effect on the colonization process of Fs-K was observed in *Lotus* root tissues by none of the GR24 concentrations investigated under the conditions employed in this study.

ΕΙΣΑΓΩΓΗ

ΕΝΟΤΗΤΑ 1^η

ΕΝΔΟΦΥΤΙΚΟΙ ΜΥΚΗΤΕΣ

1.1 Σημασία των ενδοφυτικών μυκήτων

Αξίζει αρχικά να σημειωθεί ότι υπάρχουν δύο συμβιωτικά συστήματα, η συμβιωτική δέσμευση αζώτου και οι μυκόρριζες. Αναλυτικότερα, στη συμβιωτική δέσμευση αζώτου εμφανίζεται συμβίωση μεταξύ των αζωτοδεσμευτικών βακτηρίων *Rhizobium* με τα ψυχανθή (*Leguminosae*), είτε μεταξύ των αζωτοδεσμευτικών βακτηρίων *Frankia* με ανθόφυτα διαφόρων γενών, όπως *Alnus*, που όλα έχουν ξυλώδεις ρίζες. Στα συμβιωτικά συστήματα οι αζωτοδεσμευτικοί μικροοργανισμοί παρέχουν στο φυτό περίσσεια N υπό την μορφή NH_3 που την ενσωματώνουν σε οργανικές ενώσεις ενώ τα φυτά παρέχουν στους μικροοργανισμούς ανθρακούχες ενώσεις για την επιβίωση τους. Η αζωτοδέσμευση πραγματοποιείται στα φυμάτια, όπου το αέριο άζωτο της ατμόσφαιρας μετατρέπεται σε αμμωνία μέσω της δράσης ενζύμων που φέρουν οι αζωτοδεσμευτικοί μικροοργανισμοί (Franche C. *et al.* 2009). Επιπλέον, οι συμβιωτικοί μικροοργανισμοί που δεσμεύουν άζωτο διαδραματίζουν σημαντικό ρόλο στη ζωή του φυτού, εξασφαλίζοντας όχι μόνο την παροχή αζώτου στο φυτό αλλά και την άμυνα τους έναντι παθογόνων.

Ο όρος μυκόρριζες αναφέρεται στη συμβίωση μεταξύ μυκήτων και φυτών. Υπάρχουν δύο είδη μυκορριζικών συμβιωτικών συστημάτων, οι εκτομυκόρριζες και οι ενδομυκόρριζες- δενδρόμορφες μυκόρριζες. Οι συμβιωτικοί μύκητες που συμβιώνουν στο ριζικό σύστημα των φυτών παρέχουν διάφορα πλεονεκτήματα. Ειδικότερα, η μυκορριζική συμβίωση προσφέρει στο φυτό αυξημένη ικανότητα πρόσληψης θρεπτικών στοιχείων (κυρίως φώσφορο), αντοχή στη ξηρασία και αυξημένη προστασία από προσβολές από μύκητες, νηματώδεις και τοξικότητα μετάλλων. Γενικότερα, μυκορριζικά φυτά συνήθως παρουσιάζουν αυξημένη ανάπτυξη και παραγωγή σε σχέση με αντίστοιχα μη- μυκορριζικά φυτά.

Ο Anton de Bary, Γερμανός βοτανολόγος, ο οποίος θεωρήθηκε πατέρας της παθολογίας των φυτών, επινόησε τον όρο ενδόφυτο το 1886 για να περιγράψει μικροοργανισμούς που αποικίζουν τους εσωτερικούς ιστούς των βλαστών και των φύλλων (Wilson D. 1995). Αυτός ο ορισμός με το πέρασμα των χρόνων αναθεωρήθηκε όπου σύμφωνα με τον ορισμό του Wilson D., οι ενδοφυτικοί μύκητες είναι μικροοργανισμοί- μύκητες οι οποίοι περνούν όλο ή ένα μέρος του κύκλου ζωής τους ενδοκυτταρικά και/ή μεταξύ των κυττάρων σχηματίζοντας αποικίες σε υγιείς ιστούς των φυτών-ξενιστών τους, τυπικά χωρίς να προκαλούν εμφανή συμπτώματα ασθένειας (Wilson D. 1995). Αυτή η αλληλεπίδραση αναφέρεται ως αμοιβαία. Ωστόσο σύμφωνα με τους Schulz και Boyle (2005), αυτή η αμοιβαία αλληλεπίδραση μπορεί να είναι προσωρινή και να αλλάξει με την πάροδο του χρόνου. Ειδικότερα, η αλληλεπίδραση ενός ενδοφυτικού μύκητα με ένα φυτό ξενιστή χαρακτηρίζεται από μια λεπτά ρυθμισμένη ισορροπία μεταξύ της λοιμογόνου ικανότητας του μύκητα και της άμυνας του φυτού. Αν αυτή η ισορροπία διαταραχθεί είτε με αύξηση της φυτικής άμυνας είτε με αύξηση της λοιμογόνου ικανότητας του μύκητα, τότε αναπτύσσεται ασθένεια. Το ενδόφυτο πρέπει να συνθέτει μεταβολίτες για να ανταγωνιστεί τόσο τα επίφυτα όσο και τα παθογόνα με στόχο να αποικίσει το φυτό (Schulz *et al.* 2002). Σε μία αμοιβαία αλληλεπίδραση, επωφελούνται και οι δύο οργανισμοί καθώς το ενδόφυτο αποκτά θρεπτικά στοιχεία και προστασία από το φυτό ξενιστή ενώ το ίδιο παρέχει στο φυτό μεταβολίτες που συμβάλλουν στην αντοχή του ξενιστή έναντι παθογόνων και διάφορων αβιοτικών πιέσεων, ενισχύοντας με αυτό τον τρόπο την αρμοστικότητα του φυτού σε ένα εχθρικό περιβάλλον (Schulz and Boyle 2005).

Για τον αποικισμό των φυτών-ξενιστών, οι ενδοφυτικοί μύκητες παράγουν εξωένζυμα (Schulz *et al.* 2002). Το 1997, ο Agrios G.H ανακάλυψε ότι όλοι οι ενδοφυτικοί μύκητες που ελέγχθηκαν συνέθεταν τα ένζυμα που είναι απαραίτητα για τη διείσδυση και τον αποικισμό των φυτών- ξενιστών, παρόλο που αυτά τα ένζυμα ποικίλουν μεταξύ των στελεχών. Η διείσδυση, ο αποικισμός και η ανάπτυξη είχε ελεγχτεί μικροσκοπικά, αποκαλύπτοντας σημαντικές διαφορές μεταξύ των ενδόφυτων και των παθογόνων. Μια σημαντική διαφορά είναι ότι η ενδοφυτική διείσδυση γινόταν αντικλινώς κατά μήκος των επιδερμικών κυττάρων ενώ στην

περίπτωση των παθογόνων γινόταν απευθείας μέσω του κυτταρικού τοιχώματος (Boyle *et al.* 2001).

Εκτός από τα εξωένζυμα, οι ενδοφυτικοί μύκητες έχουν την ικανότητα να παράγουν τις ίδιες ή παρόμοιες ενώσεις που προέρχονται από τα φυτά- ξενιστές καθώς επίσης και ένα μεγάλο αριθμό ποικίλων βιοενεργών ενώσεων που εμπλέκονται στην προστασία του ξενιστή τους από παθογόνα και φυτοφάγα (Wicklow *et al.* 2005). Σύμφωνα με τους Zhang *et al.*, ο αριθμός των δευτερογενών μεταβολιτών που παράγονται από τους ενδοφυτικούς μύκητες είναι μεγαλύτερος σε σύγκριση με οποιοδήποτε άλλο ενδοφυτικό μικροοργανισμό. Για αυτό το λόγο, υπάρχει μεγαλύτερη πιθανότητα ανακάλυψης μεταβολιτών με αντιβακτηριακή δράση στους ενδοφυτικούς μύκητες.

Ο δυνητικός ρόλος των ενδοφύτων και των βιολογικά ενεργών μεταβολιτών τους στη σχέση τους με τον ξενιστή έχει μελετηθεί (Schulz *et al.* 2002). Επιπλέον η συνειδητοποίηση της ύπαρξης συνεχώς αυξανόμενης ανθεκτικότητας σε παθογόνα βακτήρια οδήγησε στην ανάγκη εύρεσης καινούριων αντιβιοτικών. Για ακόμη μία φορά οι επιστήμονες επικεντρώθηκαν στους ενδοφυτικούς μύκητες καθώς αποτελούσαν μια σχετικά ανεξερεύνητη ομάδα μυκήτων (Radić and Strukelj 2012). Αξίζει να ειπωθεί ότι ενδοφυτικοί μύκητες έχουν βρεθεί σε κάθε είδος φυτού που έχει μελετηθεί και πιστεύεται ότι υπάρχουν πάνω από 1 εκατομμύριο ενδοφυτικοί μύκητες στη φύση (Petrini 1991). Επιπρόσθετα, είναι αρκετά συχνό φαινόμενο η εύρεση του ίδιου ενδοφυτικού μύκητα σε διαφορετικό είδος φυτού ξενιστή.

1.2 Κατηγορίες ενδοφυτικών μυκήτων

Συλλογικά, περισσότερα από 100 χρόνια έρευνας οδήγησαν στο συμπέρασμα ότι τα περισσότερα, αν όχι όλα τα φυτά στα φυσικά οικοσυστήματα είναι συμβιωτικά με μυκορριζικούς μύκητες και/ή ενδοφυτικούς μύκητες. Σε αντίθεση με τους μυκορριζικούς μύκητες που αποικίζουν τις ρίζες των φυτών και αναπτύσσονται στη ριζόσφαιρα, τα ενδόφυτα κατοικούν εξ ολοκλήρου μέσα στους φυτικούς ιστούς και μπορούν να αναπτύσσονται μέσα στις ρίζες, στους κορμούς βλαστούς και/ή στα φύλλα (Rodriguez *et al.* 2008).

Γενικά, δύο μεγάλες ομάδες ενδοφυτικών μυκήτων έχουν αναγνωριστεί, αντανακλώνοντας διαφορές στην εξελικτική συγγένεια, ταξινόμηση, στα φυτά ξενιστές και στις οικολογικές λειτουργίες. Οι ομάδες αυτές είναι τα ενδόφυτα clavicipitaceous (C- endophytes) και τα ενδόφυτα nonclavicipitaceous (NC- endophytes). Η δεύτερη ομάδα αποτελείται από μύκητες με υψηλή ποικιλομορφία οι οποίοι διακρίνονται τουλάχιστον σε τρεις διακριτές λειτουργικές ομάδες με βάση την οικολογική τους σημασία και τα χαρακτηριστικά της ιστορίας της ζωής τους (Rodriguez *et. al.*, 2008).

Τα ενδόφυτα clavicipitaceous (ή αλλιώς ενδόφυτα τάξης 1) αντιπροσωπεύουν ένα μικρό αριθμό φυλογενετικά σχετιζόμενων ειδών clavicipitaceous (Bischoff and White, 2005). Αυτά τα ενδόφυτα βρίσκονται τυπικά μέσα στους βλαστούς των φυτών, όπου σχηματίζουν συστηματικές ενδοκυτταρικές λοιμώξεις. Τα ενδόφυτα τάξης 1 αυξάνουν συχνά τη φυτική βιομάζα, παρέχουν ανοχή στη ξηρασία και παράγουν χημικές ενώσεις οι οποίες είναι τοξικές στα ζώα και μειώνουν τα φυτοφάγα (Clay, 1988). Όμως τα πλεονεκτήματα που παρέχονται από αυτούς τους μύκητες φαίνεται να εξαρτώνται από το είδος του ξενιστή, το γενότυπο του ξενιστή και τις περιβαλλοντικές συνθήκες (Saikkonen *et al.*, 1999, Faeth & Sullivan, 2003, Faeth *et al.*, 2006).

Τα ενδόφυτα nonclavicipitaceous είναι υψηλά ποικιλόμορφα, αντιπροσωπεύοντας μία πολυφυλετική ομάδων ασκομυκήτων με ποικίλους και συχνά πτωχώς καθορισμένους ή άγνωστους οικολογικούς ρόλους. Αυτά τα ενδόφυτα ανακτήθηκαν από όλα τα επίγεια οικοσυστήματα (Arnold & Lutzoni, 2007). Τα ενδόφυτα nonclavicipitaceous μπορούν να διαφοροποιηθούν σε τρεις λειτουργικές τάξεις (τάξεις 2, 3 και 4) με βάση τα πρότυπα αποικισμού του ξενιστή, το μηχανισμό μεταβίβασης μεταξύ των γενεαλογιών των ξενιστών και την οικολογική λειτουργία (Rodriguez *et. al.*, 2008).

Τα συμβιωτικά κριτήρια που χρησιμοποιήθηκαν για την κατηγοριοποίηση των ενδοφυτικών μυκήτων φαίνονται στον ακόλουθο πίνακα (Πίνακας 1).

	Clavicipitaceous	Nonclavicipitaceous		
Κριτήρια	Τάξης 1	Τάξης 2	Τάξης 3	Τάξης 4
Φάσμα ξενιστών	Περιορισμένο	Ευρύ	Ευρύ	Ευρύ
Ιστός/οι που αποικίζονται	Βλαστός, ρίζωμα	Βλαστός, ρίζα, ρίζωμα	Βλαστός	Ρίζα
Αποικισμός <i>in planta</i>	Εκτεταμένος	Εκτεταμένος	Περιορισμένος	Εκτεταμένος
Βιοποικιλότητα <i>in planta</i>	Χαμηλή	Χαμηλή	Υψηλή	Άγνωστο
Μετάδοση	Κάθετη και οριζόντια	Κάθετη και οριζόντια	Οριζόντια	Οριζόντια
Οφέλη αρμοστικότητας*	a	a και b	a	a

Πίνακας 1: Συμβατικά κριτήρια για την κατηγοριοποίηση των ενδοφυτικών μυκήτων, όπου ο αστερίσκος (*) αναφέρεται σε: *Οφέλη μη εξαρτώμενα από την κατοικία (Μη προσαρμοσμένα σε ενδιαίτημα) όπως ανοχή στη ξηρασία, ενίσχυση της ανάπτυξης είναι συνήθη στα ενδόφυτα ανεξάρτητα της προέλευσης της κατοικίας (συμβολίζεται με a στον πίνακα). Οφέλη εξαρτώμενα από την κατοικία (Προσαρμοσμένα σε ενδιαίτημα) είναι για παράδειγμα το pH, η θερμοκρασία και η περιεκτικότητα σε άλατα (συμβολίζεται με b στον πίνακα) (τροποποιημένο από Rodriguez R. J. *et al.* 2009).

1.3 Σημαντικά παραδείγματα ενδοφυτικών μυκήτων

1.3.1 *Piriformospora indica*

Ένα χαρακτηριστικό παράδειγμα ενδοφυτικού μύκητα αποτελεί ο μύκητας *Piriformospora indica* (Βασιδιομύκητες) ο οποίος μπορεί να καλλιεργηθεί σε ποικίλα υποστρώματα, γεγονός που του προσδίδει πλεονέκτημα για την περαιτέρω μελέτη των θετικών αλληλεπιδράσεων του με τα φυτά.

Ο μύκητας αυτός, που μπορεί να αναπτυχθεί σε αμιγείς καλλιέργειες, φέρει παρόμοια λειτουργικά και φυσιολογικά χαρακτηριστικά με τους μύκητες που αναπτύσσουν οι δενδροειδείς μυκόρριζες με τα φυτά, όπως είναι η μεταφορά θρεπτικών στοιχείων και νερού μέσω των υφών στις ρίζες των φυτών (Varma *et al.* 1999, 2001). Επιπλέον βρέθηκε ότι ο εμβολιασμός φυτών μεγάλης καλλιέργειας,

όπως ο καπνός και το καλαμπόκι, με αυτό το μύκητα προκάλεσε αύξηση της βιομάζας τους κατά 50% (Varma *et al.* 1999). Η αυξητική δράση που ασκεί ο μύκητας οφείλεται στην ικανότητα του να διαλυτοποιεί και να μεταφέρει φωσφορικά ιόντα (Varma *et al.* 2001). Μία έρευνα που πραγματοποιήθηκε πάνω σε δύο φαρμακευτικά φυτά, το *Spilanthes calva* και το *Withania somnifera*, ενισχύει περαιτέρω τη φήμη του μύκητα καθώς παρουσία του είχε παρατηρηθεί αυξημένη ανάπτυξη της ολικής βιομάζας, αυξημένος αριθμός ανθοταξιών και σπερμάτων και βελτιωμένη αντοχή σε συνθήκες ξηρασίας (Rai *et al.* 2001). Μια διαφορετική πτυχή του μύκητα ανακαλύφθηκε από τους Peřkan- Berghöfer *et al.* (2004), που αναφερόταν στην ικανότητα του μύκητα να αλληλεπιδρά και με φυτά που δεν αναπτύσσουν μυκορριζικές σχέσεις, όπως το *Arabidopsis thaliana*, και να προάγει την ανάπτυξη τους. Ο μύκητας *Piriformospora indica* έχει διαφορετικό τρόπο ζωής στο *Arabidopsis* (δικοτυλήδονο φυτό) και στο κριθάρι (μονοκοτυλήδονο φυτό). Όσο αφορά το κριθάρι, έχει αναφερθεί ότι ο μύκητας εκμεταλλεύεται νεκρά κύτταρα για την ανάπτυξή του (Deshmukh *et al.* 2006, Zuccaro *et al.* 2011).

1.3.2 *Colletotrichum tofieldiae*

Αν και τα περισσότερα χαρακτηρισμένα είδη των μυκήτων του γένους *Colletotrichum* είναι παθογόνα, έχει δειχθεί ότι το *C. tofieldiae* (Ct) είναι ενδημικό ενδόφυτο των πληθυσμών του *Arabidopsis thaliana*. Το Ct είχε αρχικά απομονωθεί ως ένα ενδόφυτο από τα φύλλα του *A. thaliana* αλλά στη συνέχεια αποκαλύφθηκε ότι είναι ένα ενδόφυτο των ριζών (García *et al.* 2013). Ειδικότερα, μέσω πειραμάτων αποικισμού με απαλλαγμένα από μικρόβια φυτά *A. thaliana* αποκαλύφθηκε ότι το Ct ξεκινάει την ενδοφυτική ανάπτυξη μόνο μέσω ριζών, όχι μέσω των φύλλων, και περιστασιακά επεκτείνεται συστηματικά στους βλαστούς χωρίς να προκαλεί ευδιάκριτα συμπτώματα ασθένειας. Το Ct εισβάλλει στις ρίζες μέσω ανοιγμάτων μεταξύ των επιδερμικών κυττάρων για να σχηματίσει ενδοκυτταρικές υφές. Σύμφωνα με τους Deising *et al.* (2000), η είσοδος αυτών των μυκήτων πραγματοποιείται μέσω αδιαφοροποίητων υφών παρά με τη μορφή appressorium¹

¹ Appressorium: όργανο πολλών παθογόνων μυκήτων που χρησιμοποιείται από το μύκητα για να μολύνει το φυτό-ξενιστή.

και η διείσδυση μπορεί να επιτευχθεί είτε μέσα στο κύτταρο είτε μέσω των μεσοκυττάρων χώρων.

Η προώθηση της ανάπτυξης των φυτών από το Ct αποδείχθηκε ότι ρυθμίζεται στενά από τη διαθεσιμότητα Pi, υποδηλώνοντας με αυτό τον τρόπο ότι οι ευεργετικές δράσεις του μύκητα εξαρτώνται από συγκεκριμένες περιβαλλοντικές συνθήκες, όπως η ποσότητα βιοδιαθέσιμων φωσφορικών στο έδαφος. Αυτό έρχεται σε αντίθεση με το ενδόφυτο των ριζών, *Piriformospora indica*, το οποίο προάγει την ανάπτυξη των φυτών υπό συνθήκες τόσο χαμηλής όσο και υψηλής συγκέντρωσης φωσφορικών (Yadav *et al.* 2010). Επίσης, το Ct έχει την ικανότητα να προάγει την ανάπτυξη του *A. thaliana* όταν μοναδική πηγή φωσφόρου είναι ο ανόργανος υδροξυαπατίτης ($\text{Ca}_{10}(\text{PO}_4)_6(\text{OH})_2$), γεγονός που υποδηλώνει ότι ένα μέρος της ευεργετικής δράσης του Ct περιλαμβάνει τη διαλυτοποίηση του Pi από μη-προσβάσιμο για το φυτό υδροξυαπατίτη.

ΕΝΟΤΗΤΑ 2^η

ΤΟ ΓΕΝΟΣ *FUSARIUM*

Οι μύκητες του γένους *Fusarium* προκαλούν ασθένειες σε φυτά και ζώα, παράγουν μυκοτοξίνες και έχουν βρεθεί τα τελευταία 100 χρόνια πάνω από 1000 είδη με ολοκληρωμένες ακολουθίες γονιδιώματος σε προχωρημένα στάδια ταυτοποίησης. Μερικά από τα είδη που περιλαμβάνονται σε αυτό το γένος είναι τα ακόλουθα: *F. sambucinum*, *F. chlamydosporum*, *F. incarnatumequiseti*, *F. tricinctum*, *F. heterosporum*, *F. fujikuroi*, *F. nisikadoi*, *F. oxysporum*, *F. redolens*, *F. babinda*, *F. concolor*, *F. lateritium*, *F. buharicum*, *F. buxicola*, *F. staphyleae*, *F. solani*, *F. decemcellulare*, *F. albidum*, *F. dimerum* και το σύμπλοκο ειδών *F. ventricosum* (O'Donnell et al. 2013). Επιπλέον, το γένος *Fusarium* αποτελεί μία μεγάλη μονοφυλετική² ομάδα μερικών εκατοντάδων ειδών που παράγουν, με εξαίρεση μερικά είδη, χαρακτηριστικά μακροκόνidia. Το γένος περιλαμβάνει παθογόνα φυτών, ενδόφυτα και σαπρόφυτα ικανά να μεταβολίζουν διάφορα υποστρώματα και εν δυνάμει παθογόνα που έχουν κλινική σημασία. Μοριακή φυλογενετική ανάλυση αυτού του γένους αποκάλυψε ότι περιλαμβάνει τουλάχιστον 20 κλάδους ή «σύμπλεγμα ειδών» (O'Donnell et al. 2013). Η ταξινόμηση των μυκήτων του γένους *Fusarium* ήταν πάντα ένα αμφιλεγόμενο θέμα.

2.1 *Fusarium oxysporum*

Το *Fusarium oxysporum* είναι ένας ευρέως απαντώμενος μύκητας του εδάφους που περιλαμβάνει παθογόνα και μη παθογόνα στελέχη. Οι περισσότερες μελέτες του μύκητα επικεντρώνονται στην ικανότητα του *F. oxysporum* να προκαλεί αγγειακή βλάβη σε έναν συγκεκριμένο ξενιστή. Ειδικότερα, τα παθογόνα μέλη είναι γνωστά για την πρόκληση νόσων, όπως μαρασμό και σήψη της κορώνας, σε πολλές οικονομικά σημαντικές γεωργικές καλλιέργειες. Παραδείγματα καλλιεργειών που

² Μονοφυλετική ομάδα: ομάδα οργανισμών που μοιράζονται έναν κοινό πρόγονο, ειδικότερα τον πιο πρόσφατο κοινό πρόγονο. Ονομάζεται αλλιώς και κλάδος.

επηρεάζονται από αυτές τις νόσους αποτελούν η μπανάνα (*Musa spp.*), η οποία επηρεάζεται από μία ειδική μορφή του μύκητα γνωστή ως *F. oxysporum* f. sp. *cubense* (Foc) καθώς και η τομάτα, η οποία επηρεάζεται με τη σειρά της από την ασθένεια μαρασμού *Fusarium* που προκαλείται από το *F. oxysporum* f. sp. *lycopersici*.

Περιβαλλοντικές έρευνες για ένα ευρύ φάσμα οικοτόπων συχνά βρίσκουν το *F. oxysporum* σε φυτά χωρίς να έχει προκληθεί ασθένεια (Stoner MF. 1981). Αυτοί οι πληθυσμοί του *F. oxysporum*, συχνά αναφερόμενοι ως μη παθογόνοι, είναι μια σημαντική συνιστώσα των κοινοτήτων του εδάφους. Όσο αφορά τα μη παθογόνα στελέχη του *F. oxysporum* Fo 47, η προστατευτική δράση τους ενάντια σε ασθένειες που προκαλούνται από φουζάρια αποδίδεται κυρίως στον ανταγωνισμό για θρεπτικά στοιχεία αλλά και σε μικρότερη έκταση στη διέγερση ενός μηχανισμού διασυστημικής προστασίας (Fuchs *et al.* 1999, Duijff *et al.* 1998). Επίσης, το *F. oxysporum* μπορεί να μολύνει και να αποικίσει τα φυτά ασυμπτωματικά ως ενδόφυτο αλλά αυτός ο ενδοφυτικός τρόπος ζωής δεν έχει ερευνηθεί καλά. Το ενδοφυτικό *F. oxysporum* συνήθως απομονώνεται από φυτά μολυσμένα με παθογόνο *F. oxysporum* (Alves-Santos FM 1999, Fiely MB *et al.* 1995), υποδεικνύοντας ότι ο αποικισμός φυτών με πολλαπλούς γενότυπους του *F. oxysporum* μπορεί να είναι συχνός.

Όσο αφορά τον τρόπο εξάπλωσης του μύκητα, σε ευπαθή φυτά το παθογόνο *F. oxysporum* διεισδύει στη ρίζα, αποικίζει τον φλοιό της ρίζας και στη συνέχεια εξαπλώνεται μέσω του ξυλώματος στο υπόλοιπο του φυτού, προκαλώντας μαρασμό και θάνατο (Olivain C *et al.* 1999, 2003). Στην περίπτωση ξενιστών που είναι ανθεκτικοί στο παθογόνο, η εξάπλωση του μύκητα αποκλείεται και εμφανίζεται μόνο περιορισμένος αποικισμός του ιστού του ξενιστή (Baayen RP. 1988, Beckman CH 1982). Ειδικότερα, το μη παθογόνο *F. oxysporum* εμβολιασμένο σε φυτά μπορεί να αποικίσει τον φλοιό των ριζών παρομοίως με τους παθογόνους, αλλά οι αποκρίσεις των ξενιστών, όπως η πάχυνση των κυτταρικών τοιχωμάτων, φαίνεται να περιορίζουν την ανάπτυξη των ενδόφυτων.

2.2 *Fusarium solani* species complex

Το σύμπλεγμα ειδών³ *Fusarium solani* (*Fusarium solani* species complex- FSSC) είναι μια ομάδα που εκτιμάται ότι περιέχει τουλάχιστον 60 φυλογενετικά διαφορετικά είδη (Nalim *et al.* 2011, O'Donnell 2000, O'Donnell *et al.* 2008, Zhang *et al.* 2006). Όπως ορίστηκε από τους Snyder και Hansen (1941), το *Fusarium solani* ήταν το μοναδικό είδος σε αυτό που σήμερα αναγνωρίζεται ως FSSC. Δεδομένου ότι τα μέλη του FSSC έχουν μελετηθεί εκτενέστατα ως παθογόνα φυτών, αυτοί οι μύκητες υποδιαιρούνται περαιτέρω σε *formae speciales*⁴ (f. sp.) με βάση την ειδικότητα του ξενιστή. Με βάση τις μοριακές φυλογενετικές σχέσεις μεταξύ των στελεχών, το FSSC περιλαμβάνει τρεις κύριους κλάδους, όπου ο τρίτος κλάδος περιλαμβάνει με τη σειρά του όλα τα στελέχη που χαρακτηρίστηκαν ως *N. haematococca* (O'Donnell 2000, Zhang *et al.* 2006). Το σύστημα ταξινόμησης των μελών του κλάδου 3 του FSSC βασίζεται σε πολυμορφισμούς στις αλληλουχίες DNA του παράγοντα επιμήκυνσης της μετάφρασης 1α (EF 1α), στη δεύτερη μεγαλύτερη υπομονάδα της RNA πολυμεράσης II (RPB2) και στην πυρηνική ριβοσωμική περιοχή ITS (internal transcribed space) (Chang *et al.* 2006, O'Donnell *et al.* 2008).

Να σημειωθεί ότι εκτός από την ύπαρξη παθογόνων των φυτών, ορισμένα μέλη του FSSC είναι υπεύθυνα για την πλειοψηφία των συστημικών φουζαρικών μολύνσεων σε ανοσοκατεσταλμένους ανθρώπους και ζώα (Muhammed *et al.* 2013, O'Donnell *et al.* 2008, Zhang *et al.* 2006).

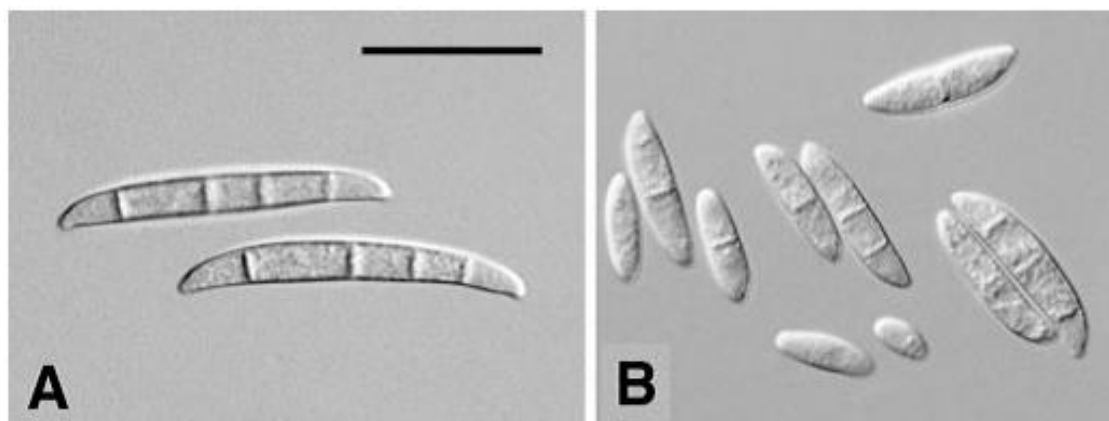
Όπως ισχύει με όλα τα *Fusaria*, τα μέλη του συμπλέγματος FSSC είναι ικανά να παράγουν άφθονους δευτερογενείς μεταβολίτες. Σε αντίθεση με τα είδη που ανήκουν στα σύμπλοκα ειδών *Fusarium sambucinum* και *F. fujikuroi*, τα μέλη του FSSC δεν είναι γνωστό να παράγουν μυκοτοξίνες⁵ φουμονισίνης και τριχοθηκίνης. Επομένως, τα βιοσυνθετικά μονοπάτια για αυτούς τους δευτερογενείς μεταβολίτες θεωρείται ότι έχουν εξελιχθεί μετά την απόκλιση του FSSC από τα υπόλοιπα *Fusaria* (O'Donnell *et al.*, 2013).

³ Σύμπλεγμα ειδών: ομάδα στενά συγγενικών ειδών με πολλά κοινά χαρακτηριστικά καθιστώντας δύσκολη την διάκριση τους

⁴ *formae speciales*: άτυπη ταξινομική ομάδα που χρησιμοποιείται για την ταξινόμηση φυτών, άλγεων και μυκήτων αλλά συχνότερα για ένα μύκητα που είναι προσαρμοσμένος σε ένα συγκεκριμένο ξενιστή.

⁵ Μυκοτοξίνες: τοξικοί δευτερογενείς μεταβολίτες που παράγονται από οργανισμούς του βασιλείου των μυκήτων και είναι ικανοί να προκαλούν ασθένειες στους ανθρώπους και στα ζώα.

Πολλοί ερευνητές συγχέουν το *F. solani* με το *F. oxysporum*. Αυτή η σύγχυση αντανακλά τις επικαλύψεις σε ορισμένες πτυχές της μορφολογίας και των οικολογικών τους θέσεων. Τα μικροκονίδια⁶ του *F. solani* τείνουν να είναι ευρύτερα, με περισσότερο ωσειδές σχήμα και με παχύτερα τοιχώματα από τα μικροκονίδια του *F. oxysporum*. Τα μακροκονίδια του *Fusarium solani* είναι σχετικά μεγάλα, ευθεία έως ελαφρά καμπυλωμένα, ενώ τα μικροκονίδια είναι ωσειδή και ελλειψοειδή (Εικόνα 2).



Εικόνα 2: Μορφολογία των μακροκονιδίων (A) και των μικροκονιδίων (B) του είδους *Fusarium solani*. Η ράβδος της κλίμακας αναπαριστά 25μm. (Τροποποιημένο από the *Fusarium Laboratory Manual*, Leslie J. and Summerell B., publishing Blackwell, 2002).

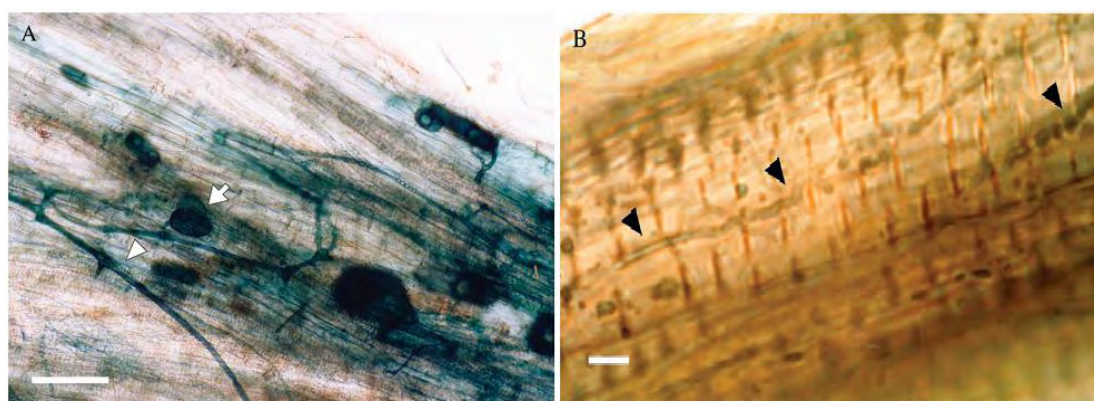
Οι ασκομύκητες, στους οποίους συμπεριλαμβάνεται και το γένος *Fusarium*, μπορούν να αναπαραχθούν είτε αγενώς είτε εγγενώς. Κυριότερη αναπαραγωγική μονάδα είναι το σπόριο που παράγεται σε ειδικά όργανα, τα σποριάγγεια, και κατά την αγενή αναπαραγωγή (αγενή σπόρια) και κατά την εγγενή (εγγενή σπόρια). Στην εγγενή αναπαραγωγή, τα σπόρια αναπτύσσονται μέσα σε αναπαραγωγικές δομές, τους ασκούς. Όσο αφορά την αγενή αναπαραγωγή, είναι πολύ συχνή στους ασκομύκητες και λαμβάνει χώρα μέσω των κονιδίων, δηλαδή σπορίων που αποκόπτονται μέσω διαφραγμάτων στα άκρα των υφών. Τα κονίδια επιτρέπουν τον γρήγορο αποικισμό μίας καινούριας πηγής και ενδέχεται να είναι πολυπύρρηνα σε ορισμένες περιπτώσεις (Raven P. and Johnson G., *Biology*, 2002).

⁶ Μικροκονίδια: αναπαραγωγική μορφή των μυκήτων, τα οποία είναι λειτουργικά όμοια με τα κονίδια απλά είναι πιο μικρά σε μέγεθος και μορφολογικά διαφορετικά από τα μακροκονίδια.

2.2.1 *Fusarium solani* στέλεχος K

Το 2005, οι Kanroulakis *et al.* παρατήρησαν την ικανότητα ενός κόμποστ, προϊόν θερμόφιλης βιοαποικοδόμησης στέμφυλων οινοποιίας και στερεών αποβλήτων ελαιουργίας, να περιορίζει την εξάπλωση του παθογόνου μύκητα *Fusarium oxysporum* f.sp. *radicis-lycopersici* στις ρίζες φυτών τομάτας σε σχέση με φυτά που είχαν αναπτυχθεί σε υπόστρωμα τύρφης. Δύο χρόνια αργότερα (2007), οι ίδιοι ερευνητές απομόνωσαν με τη χρήση ημικλεκτικών υποστρωμάτων ένα στέλεχος του γένους *Fusarium* από ρίζες φυτών τομάτας που είχε αναπτυχθεί στο ίδιο κομποστοποιημένο υλικό αναμεμιγμένο με τύρφη. Το στέλεχος αυτό έχει ταυτοποιηθεί ως *Fusarium solani* στέλεχος K (Fs-K) και δρα ανταγωνιστικά ως προς το μύκητα του εδάφους *Fusarium oxysporum* f.sp. *radicis-lycopersici* (FORL) και ως προς τον μύκητα του φυλλώματος *Septoria lycopersici*.

Ο μύκητας Fs-K είναι ικανός να διεισδύει στις ρίζες του φυτού και να αναπτύσσεται στο φλοιό της ρίζας 15 ημέρες μετά τον εμβολιασμό του καθώς και να εισχωρεί στις ηθμαγγειώδεις δεσμίδες διαβιώντας ως ενδόφυτο (Εικόνα 1). Ωστόσο η ικανότητα αποικισμού του μύκητα στις ηθμαγγειώδεις δεσμίδες είναι χαρακτηριστικό των μυκήτων που αποτελούν παθογόνα των ριζών. Για αυτό το λόγο, η δυνατότητα ενός ωφέλιμου στελέχους να αναπτύσσεται άφθονα και χωρίς να προκαλεί συμπτώματα ασθένειας στο φυτό αποκαλύπτει μια ασυνήθιστη αλληλεπίδραση μεταξύ μικροβίου και φυτού.



Εικόνα 1: Αποικισμός ριζικού ιστού τομάτας από το μύκητα Fs-K 15 ημέρες μετά τον εμβολιασμό του. Διακρίνεται ο σχηματισμός κυκλικών σωματίων (άσπρα βέλη) (A) και ο αποικισμός της ηθμαγγειώδους δεσμίδας (μαύρα βέλη) (B). (Τροποποιημένα από Kanroulakis *et al.* 2007)

Προκειμένου να διερευνηθεί ο ρόλος του αιθυλενίου και του γιασμονικού οξέος στο μηχανισμό μέσω του οποίου παρέχεται προστασία στα φυτά της τομάτας από τον μύκητα Fs-K, χρησιμοποιήθηκαν μεταλλαγμένες σειρές τομάτας ως προς τη σύνθεση αυτών των δύο ορμονών. Σύμφωνα με τα αποτελέσματα, το μονοπάτι μετάδοσης σήματος που ρυθμίζεται από το αιθυλένιο είναι απαραίτητο στην εκδήλωση της προστατευτικής δράσης του Fs-K ενώ το γιασμονικό οξύ δεν φαίνεται να παίζει κάποιο ρόλο στο μηχανισμό αυτό (Kavroulakis *et al.* 2007).

Επιπλέον, ο Fs-K προκαλεί μείωση του επιπέδου των μεταγραφημάτων των γονιδίων PR1, PR5 και PR6/PR7⁷ στις ρίζες των φυτών τομάτας ενώ δεν παρατηρήθηκε καμία εμφανής αλλαγή στα επίπεδα έκφρασης των γονιδίων που κωδικοποιούν χιτινάσες⁸ ή γλουκανάσες⁹ (Kavroulakis *et al.* 2007).

⁷ Γονίδια που σχετίζονται με την παθογένεση.

⁸ Χιτινάσες: υδρολυτικά ένζυμα που διασπούν το πολυμερές χιτίνη, που είναι συστατικό των κυτταρικών μεμβρανών των μυκήτων

⁹ Γλουκανάσες: ένζυμα που διασπούν γλυκάνιο, ένα πολυσακχαρίδιο αποτελούμενο από αρκετές μονάδες γλυκόζης

ΕΝΟΤΗΤΑ 3^η

Lotus japonicus

Η οικογένεια Leguminosae (Fabaceae) περιέχει μια σειρά από σημαντικά φυτά και ξυλώδη δέντρα. Τα ψυχανθή είναι φυτά που μπορούν να αναπτυχθούν σε εδάφη φτωχά σε θρεπτικά συστατικά λόγω της ικανότητας τους να συμβιώνουν με ριζόβια και με μύκητες του εδάφους που παρέχουν στο φυτό φώσφορο και άλλα βασικά θρεπτικά συστατικά. Η αζωτοδέσμευση πραγματοποιείται στα φυμάτια, όπου το αέριο άζωτο της ατμόσφαιρας μετατρέπεται σε αμμωνία μέσω της δράσης ενζύμων που φέρουν οι αζωτοδεσμευτικοί μικροοργανισμοί. Επιπλέον, η συμβιωτική αλληλεπίδραση των ψυχανθών με μυκορριζικούς μύκητες, αν και δεν συμβαίνει αποκλειστικά μόνο σε αυτή την οικογένεια, είναι επίσης σημαντική αλληλεπίδραση, η οποία παρέχει φώσφορο κυρίως στο φυτό. Η απόκτηση επαρκών θρεπτικών συστατικών από το έδαφος είναι ένα πρόβλημα που αντιμετωπίζουν όλα τα φυτά και 80% με 90% αυτών βρήκαν τη λύση μέσω της συμβίωσης τους με μυκορριζικούς μύκητες.

Με περίπου 18.000 διαφορετικά είδη να ανήκουν στις υπο-οικογένειες *Mimosoideae*, *Caesalpinioideae* και *Papilionoideae*, η οικογένεια των ψυχανθών είναι μια μεγάλη και ποικιλόμορφη οικογένεια φυτών, η οποία συμπεριλαμβάνει αρκετά είδη με γεωργικό ενδιαφέρον. Το *Lotus japonicus* χρησιμοποιείται ως φυτό μοντέλο στα ψυχανθή, καθώς προσφέρει αρκετά πλεονεκτήματα μελέτης των φυτών αυτών, όπως ικανότητα αυτογονιμοποίησης, μικρό μέγεθος γονιδιώματος (περίπου 450 MB), μικρό μέγεθος φυτού, μεγάλη παραγωγή σπόρων και σύντομος κύκλος ζωής (περίπου τρεις μήνες). (Márquez A.J., *Lotus japonicus Handbook*, 2005)

ΕΝΟΤΗΤΑ 4^η

Στριγγολακτόνες

4.1 Κατηγορίες φυτικών ορμονών

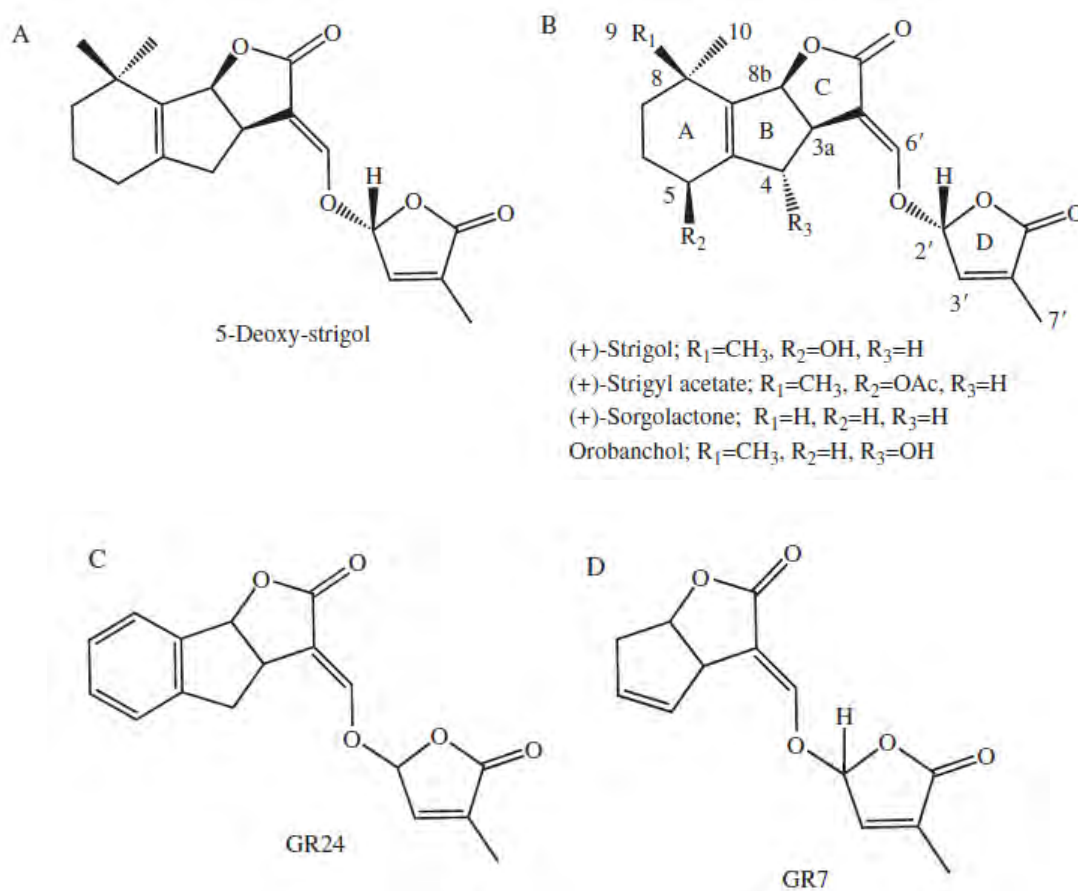
Οι ορμόνες είναι χημικοί αγγελιοφόροι που παράγονται σε ένα κύτταρο και διαμορφώνουν τις κυτταρικές διεργασίες σε ένα άλλο, μέσω αλληλεπίδρασης με συγκεκριμένες πρωτεΐνες, που καλούνται υποδοχείς. Έξι ομάδες ορμονών ρυθμίζουν κυρίως τη φυτική ανάπτυξη: αυξίνες, γιββερελλίνες, κυτοκινίνες, αιθυλένιο, αποκοπτικό οξύ και βρασσινοστεροειδή. Να σημειωθεί ότι η αυξίνη και οι κυτοκινίνες διαφέρουν από τις υπόλοιπες φυτικές ορμόνες στο γεγονός ότι είναι απαραίτητες για τη βιωσιμότητα του φυτικού εμβρύου και σε όλη τη διάρκεια της ανάπτυξης του φυτού. Άλλα μόρια σηματοδότησης που ενέχονται στην αντίσταση σε παθογόνα και στην άμυνα εναντίον φυτοφάγων έχουν επίσης αναγνωριστεί στα φυτά και συμπεριλαμβάνουν τις συμπλοκοποιημένες και μη μορφές του ιασμονικού οξέος, μικρών πεπτιδίων και του σαλικυλικού οξέος. Ένα άλλο μόριο, η στριγγολακτόνη, έχει αποδειχθεί ότι αποτελεί ένα σημαντικό μόριο στη μεταγωγή σημάτων, που ρυθμίζει για παράδειγμα την έκπτυξη των πλευρικών οφθαλμών. Η χημική αυτή ένωση θεωρείται ως μια πραγματική φυτική ορμόνη (Φυσιολογία φυτών, Lincoln Taiz & Eduardo Zeiger, Εκδόσεις Υτορία, 2013).

4.2 Στριγγολακτόνες και οι ρόλοι τους

Οι στριγγολακτόνες έχουν αναγνωριστεί ως φυτοορμόνες που εμπλέκονται στη ρύθμιση της διακλάδωσης του βλαστού στα φυτά και έτσι έχουν προταθεί ότι είναι ευρύτατα κατανεμημένες στο φυτικό βασίλειο (Gómez-Roldán *et al.* 2008, Umehara *et al.* 2008). Οι στριγγολακτόνες οι οποίες απελευθερώνονται από τις ρίζες στη ριζόσφαιρα είναι γνωστές ως επαγωγείς της βλάστησης των σπερμάτων για ριζικά-παρασιτικά ζιζάνια όπως το *Striga spp.* και *Orobanche spp.* (Bouwmeester *et al.*, 2007) και είχε ανακαλυφθεί και ο ρόλος τους ως βασικές σηματοδοτικές ενώσεις στην αλληλεπίδραση μεταξύ των φυτών και των δενδροειδών μυκορριζικών μυκήτων (Akiyama *et al.*, 2005). Να σημειωθεί ότι λίγα δεδομένα είναι διαθέσιμα για τις στριγγολακτόνες και άλλους μύκητες εκτός από τους ΔΜΜ.

4.2.1 Χημική ποικιλομορφία και κατανομή των στριγγολακτονών μεταξύ των φυτών

Οι στριγγολακτόνες έχουν απομονωθεί από εκχυλίσματα ρίζας ποικιλίας φυτών, συμπεριλαμβανομένων του αραβόσιτου, του αμπελοφάσουλου (*cowpea*) και του *Lotus japonicus* (Cook *et al.* 1966, Hauck *et al.* 1992, Yokota *et al.* 1998, Akiyama *et al.* 2005). Αν και οι στριγγολακτόνες πιστεύεται ότι είναι ευρέως διανεμημένες στο φυτικό βασίλειο, η απομόνωση και ο χαρακτηρισμός τους παρεμποδίζεται λόγω των μικρών τους συγκεντρώσεων στα εκχυλίσματα ρίζας. Μέχρι σήμερα έχουν απομονωθεί πέντε φυσικές στριγγολακτόνες ενώ έχει συντεθεί ένας αριθμός δομικών αναλόγων (Bouwmeester *et al.* 2003). Όσο αφορά την 5-δεοξυ-στριγγόλη, έχει παρασκευαστεί με οργανική σύνθεση ως παράγωγο της στριγγόλης (Frischmuth *et al.* 1991). Οι χημικές δομές των φυσικών στριγγολακτονών που έχουν απομονωθεί και των συνθετικών αναλόγων τους φαίνονται στην Εικόνα 3.



Εικόνα 3: Χημικές δομές των φυσικών στριγγολακτονών και συνθετικών αναλόγων: (A) BF που απομονώθηκε ως 5-deoxy-strigol, (B) 4 φυσικές στριγγολακτόνες, (C) συνθετικό ανάλογο GR24, (D) συνθετικό ανάλογο GR7 (Akiyama *et al.* 2006).

Οι στερεοχημικές διαφορές από τη σύζευξη των δακτυλίων B και C διαιρούν τις στριγγολακτόνες σε δυο μεγάλες κατηγορίες, τον τύπο strigol και τον τύπο orobanchol, αλλά σε όλες τις στριγγολακτόνες ο δακτύλιος D έχει συγκεκριμένη διαμόρφωση (2'R). Αυτή η λεπτή διάκριση είναι σημαντική για τη λειτουργία των στριγγολακτονών στην ανάπτυξη των φυτών. Για τη διερεύνηση των επιδράσεων των στριγγολακτονών, χρησιμοποιούταν και συνεχίζει να χρησιμοποιείται εκτενώς το συνθετικό ανάλογο GR24. Ωστόσο, είναι τυπικά ένα ρακεμικό μίγμα (rac-GR24) όπου περιλαμβάνει εναντιομερή στη 2'S διαμόρφωση μόρια, τα οποία μπορούν να ενεργοποιήσουν μονοπάτια σηματοδότησης που δεν σχετίζονται με τις στριγγολακτόνες και για αυτό χρήζει προσοχής (Waters M. *et al.* 2017).

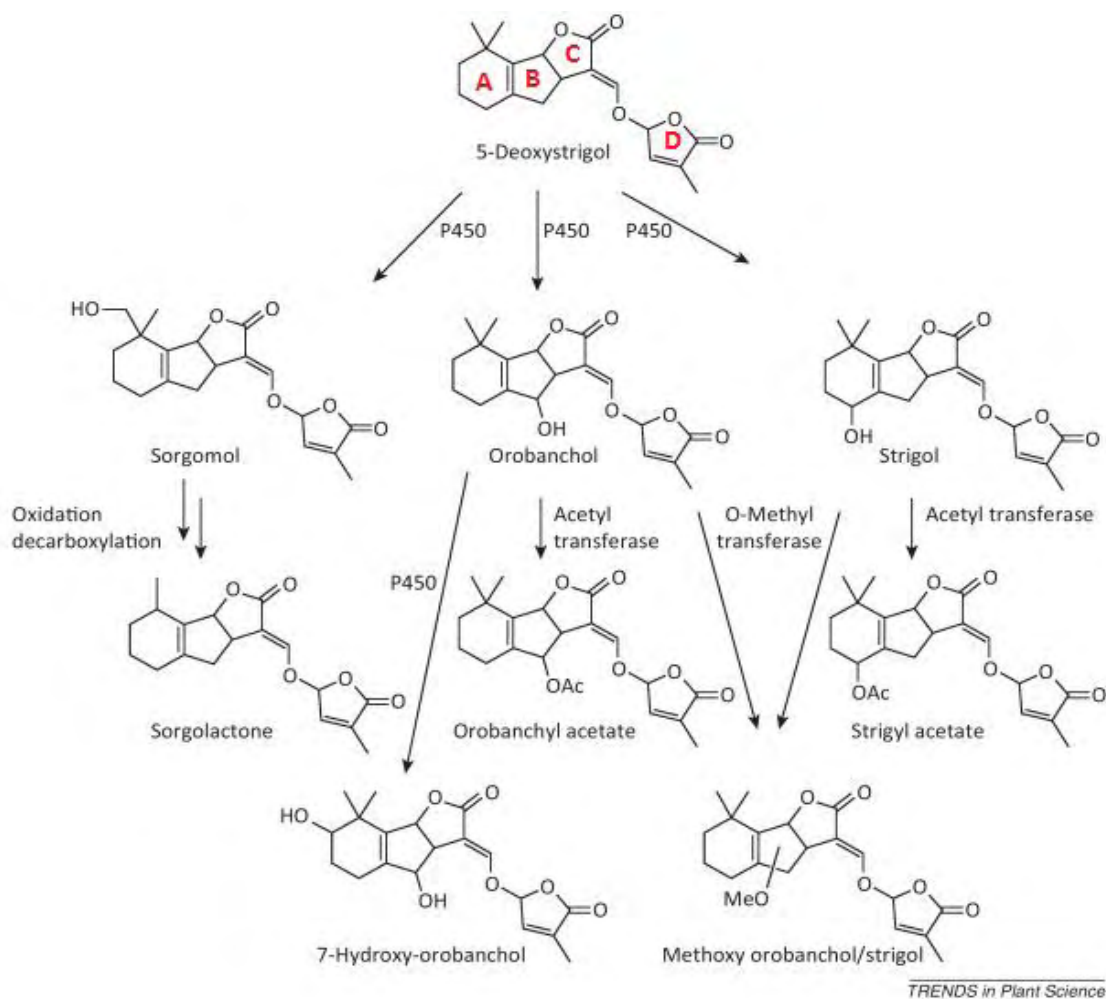
Αξίζει να σημειωθεί ότι το *Arabidopsis thaliana*, που ανήκει στη μη μυκορριζική οικογένεια Brassicaceae, βρέθηκε ότι παράγει διεγέρτες της εκβλάστησης των σπόρων αλλά σε πολύ χαμηλότερες συγκεντρώσεις σε σχέση με καλλιεργητικά φυτά καρότου και καπνού, που είναι ξενιστές των δενδρόμορφων μυκορριζικών μυκήτων (ΔΜΜ) (Westwood 2000). Η ευρεία κατανομή των στριγγολακτονών στο φυτικό βασίλειο και τα επίπεδα τους στα εκχυλίσματα ρίζας των φυτών είναι σύμφωνα με την εξειδίκευση του φυτού ξενιστή ως προς τους ΔΜΜ (Akiyama *et al.* 2006).

Όσο αφορά τη συγκέντρωση των στριγγολακτονών στο έδαφος, είναι πιθανόν πολύ μεταβλητή. Μόνο λίγες προσπάθειες έχουν γίνει για την ποσοτικοποίηση της παρουσίας στριγγολακτονών στο έδαφος. Το 2011, οι Dor *et al.* βρήκαν ότι η συγκέντρωση της orobanchol είναι περίπου 10^{-8} M σε θρεπτικό διάλυμα που συλλέχθηκε από γλάστρες όπου είχαν αναπτυχθεί τομάτες. Οι ρυθμοί έκκρισης, διάχυσης, απορρόφησης και διάσπασης των στριγγολακτονών είναι οι κύριοι παράγοντες που καθορίζουν τη συγκέντρωσή τους στο έδαφος σε διάφορες αποστάσεις από τη ρίζα. Έτσι οι μικροοργανισμοί του εδάφους εκτίθενται σε διαβαθμίσεις της συγκέντρωσης των στριγγολακτονών (Dor *et al.* 2011a).

4.2.2 Βιοσυνθετικό μονοπάτι στριγγολακτονών

Οι στριγγολακτόνες συντίθεται από τη δράση μιας ισομεράσης του β-καροτενίου (D27) και την οξειδωτική διάσπαση από δύο διοξιγενάσες διάσπασης των καροτενοειδών (CCD7 και CCD8) για να παραχθεί η κοινή πρόδρομη καρλακτόνη. Αυτά τα στάδια της οδού βιοσύνθεσης των στριγγολακτονών λαμβάνουν χώρα στο πλαστίδιο και η καρλακτόνη που παράγεται εξάγεται στη συνέχεια στο κυτταρόπλασμα. Τα επόμενα βήματα περιλαμβάνουν την οξείδωση της καρλακτόνης και περαιτέρω δημιουργίες δακτυλίων, στις οποίες εμπλέκονται μέλη της οικογένειας ενζύμων CYP711, δημιουργώντας τελικά τις στριγγολακτόνες και ενώσεις που μοιάζουν με τις στριγγολακτόνες. Αυτό σημαίνει ότι μετά την παραγωγή της καρλακτόνης υπάρχουν δύο διαφορετικοί οδοί για την παραγωγή των στριγγολακτονών, οι οποίες φαίνεται να εξαρτώνται από το είδος του φυτού. Αναλυτικότερα, στο *Arabidopsis thaliana*, η καρλακτόνη οξειδώνεται από ένα κυτόχρωμα P450 (MAX1), μεθυλιώνεται και οξειδώνεται ξανά από τη δράση μιας οξειδοοξειδοκτάσης πλευρικής διακλάδωσης. Στο ρύζι, η μετατροπή της καρλακτόνης σε στριγγολακτόνες προκύπτει από δύο ένζυμα τύπου MAX1 (López-Ráez *et al.* 2017).

Η 5-δεόξυ-στριγγόλη είναι το πρώτο προϊόν στο μονοπάτι βιοσύνθεσης των στριγγολακτονών ικανό να δράσει ως BF στους AMF καθώς και ως διεγέρτης της εκβλάστησης σε παρασιτικά ζιζάνια. Η 5-δεόξυ-στριγγόλη μπορεί να μετατραπεί περαιτέρω σε στριγγόλη και oobanchol μέσω υδροξυλίωσης στον άνθρακα C-5 και C-4, αντίστοιχα. Η σοργκολακτόνη μπορεί επίσης να συντεθεί από τη 5-δεόξυ-στριγγόλη μέσω οξειδωτικής απομεθυλίωσης στον άνθρακα C-9. Κατά συνέπεια, η 5-δεόξυ-στριγγόλη είναι πιθανό να αποτελεί σημαντικό κομβικό σημείο στη βιοσύνθεση των στριγγολακτονών (Akiyama *et al.* 2006). Η μετατροπή της 5-δεόξυ-στριγγόλη στις υπόλοιπες μορφές στριγγολακτονών φαίνονται στην ακόλουθη εικόνα (Εικόνα 4).



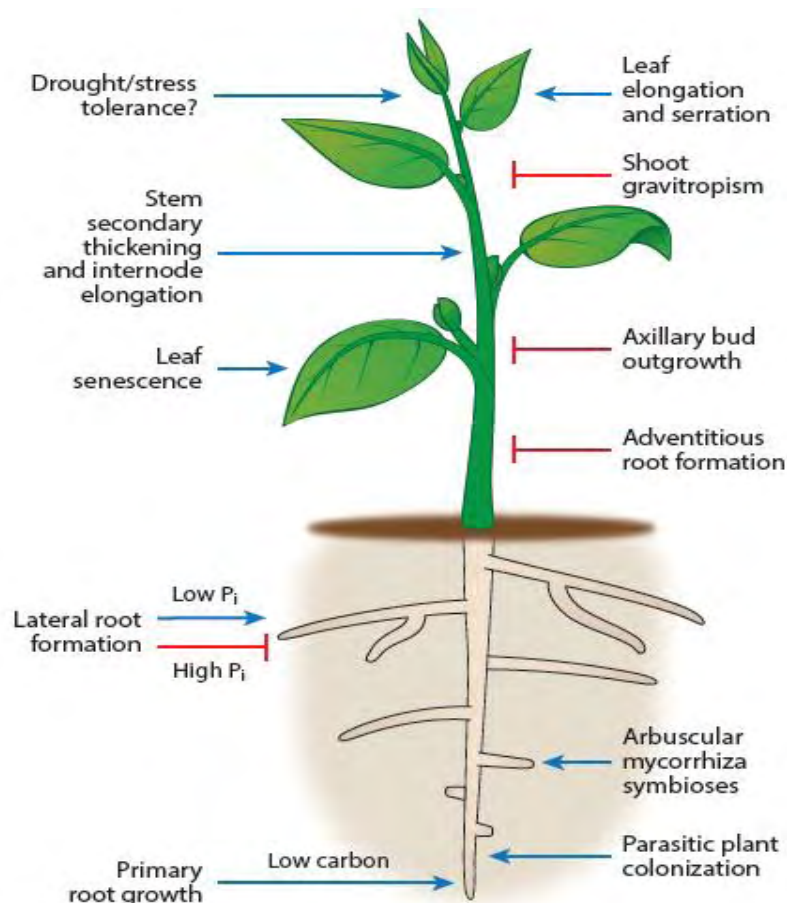
Εικόνα 4: Μονοπάτι μετατροπής της 5-δεοξυστριγγόλης στις υπόλοιπες μορφές στριγγολακτονών (τροποποιημένο από Ruyter-Spira C. *et al.* 2013).

4.2.3 Στριγγολακτόνες ως επαγωγείς της διακλάδωσης των υφών του ΔΜΜ

Ο καθαρισμός των BF έχει παρεμποδιστεί σοβαρά από τις εξαιρετικά χαμηλές συγκεντρώσεις που παράγονται και εκκρίνονται από τις ρίζες καθώς και λόγω της χημικής τους αστάθειας. Για πρώτη φορά, ένας παράγοντας διακλάδωσης απομονώθηκε με επιτυχία από τα εκχυλίσματα ρίζας του *Lotus japonicus* και ταυτοποιήθηκε ως 5-δεοξυστριγγόλη όπως αναφέρθηκε παραπάνω. Αυτός ο παράγοντας διακλάδωσης από το *L.japonicus* που παράγεται υπό συνθήκες χαμηλού φωσφορικού είναι μια λιπόφιλη ένωση.

Η φυσική 5-δεοξυστριγγόλη προκαλεί εκτεταμένη διακλάδωση υφών στα εκβλαστημένα σπόρια του ΔΜΜ *Gigaspora margarita*. Η δραστηριότητα διακλάδωσης υφών της ρακεμικής 5-δεοξυστριγγόλης (που παρασκευάστηκε με

χημική σύνθεση) ήταν συγκρίσιμη με εκείνη της φυσικής ένωσης επιβεβαιώνοντας ότι η δραστηριότητα της φυσικής 5- δεοξυστριγγόλης δεν οφείλεται σε επιμολύνσεις του δείγματος. Οι γνωστές φυσικές στριγγολακτόνες (sorgolactone, strigol) και το συνθετικό ανάλογο (GR24) προάγουν τη διακλάδωση των υφών του μύκητα σε πολύ μικρές ποσότητες, της τάξης μεγέθους πικογραμμάρια έως νανογραμμάρια. Εκτός από την επαγωγή της διακλάδωσης των υφών στους ΔΜΜ, οι στριγγολακτόνες παίζουν πολλούς ρόλους στην ανάπτυξη του φυτού όπου συνοψίζονται στην Εικόνα 5. Το 2005, οι Bécard *et al.* ανέφεραν τα διεγερτικά αποτελέσματα των συνθετικών αναλόγων GR24 και GR7 στη διακλάδωση των υφών στο ΔΜΜ *Gigaspora rosea*.



Εικόνα 5: Οι ρόλοι και τα αποτελέσματα των στριγγολακτονών στην ανάπτυξη του φυτού. Οι στριγγολακτόνες προωθούν (μπλε βέλη) ή αναστέλλουν (κόκκινες γραμμές) πολλές διαφορετικές διαδικασίες ανάπτυξης του φυτού. Στο *Arabidopsis*, οι SLs προωθούν την επέκταση του μίσχου του φύλλου, προωθώντας μια πιο ανοιχτή αρχιτεκτονική rosetta (Challis *et al.* 2013, Scaffidi *et al.* 2013, Soundappan *et al.* 2015). Στο *Medicago*, οι SLs δεν

επηρεάζουν το σχήμα του φύλλου αλλά αυξάνουν την απόπτωση των φύλλων (Lauressergues *et al.* 2014). Ο ρόλος των SLs στη ξηρασία και στην αβιοτική αντοχή δεν έχει διευκρινιστεί πλήρως (Bu *et al.* 2014). Συντομογραφίες: Pi: Ανόργανο φωσφορικό, SL: στριγγολακτόνη. (Smith *et al.* 2012)

Επιπλέον, έχει παρατηρηθεί ότι τα εκχυλίσματα ρίζας από φυτά που καλλιεργούνται υπό συνθήκες περιορισμένων φωσφορικών (Pi) παράγουν περισσότερους παράγοντες διακλάδωσης σε σχέση με εκείνα τα εκχυλίσματα από φυτά με επαρκή θρέψη με Pi, υποδηλώνοντας ότι η παραγωγή BF σε ρίζες και η έκκριση τους ρυθμίζεται από τη διαθεσιμότητα σε Pi (Nagahashi *et al.* 2000).

4.2.4 Ρόλος των στριγγολακτονών στο σχηματισμό φυματίων

Λίγα δεδομένα είναι διαθέσιμα σχετικά με την επίδραση των στριγγολακτονών σε άλλους μικροοργανισμούς εκτός από τους ΔMM και δεν ήταν τίποτα γνωστό σχετικά με το αν οι στριγγολακτόνες επηρεάζουν τη συμβίωση των ριζοβίων με τα ψυχανθή φυτά, που χαρακτηρίζεται από το σχηματισμό αζωτοδεσμευτικών φυματίων στις ρίζες των ψυχανθών. Σε αρκετές μελέτες με φυτά μπιζελιού έχει αναφερθεί ότι εκχυλίσματα από φυτά χωρίς φυμάτια παρουσιάζουν υψηλότερη δραστηριότητα εκβλάστησης των σπόρων σε σπόρους *Orobanche* από τα εκχυλίσματα φυτών με φυμάτια. Αυτό δηλώνει ότι τα επίπεδα των επαγωγέων εκβλάστησης των σπόρων είναι μειωμένα στην περίπτωση των φυτών με φυμάτια (Mabrouk *et al.* 2007a,b). Το 2009, οι Soto J.M. *et al.* έδειξαν ότι όταν τα φυτά μηδικής (alfalfa- *Medicago sativa*) αναπτύσσονται παρουσία της ορμόνης GR24, τότε επηρεάζεται η βιοσύνθεση και ο μεταβολισμός των στριγγολακτονών στη μηδική με αποτέλεσμα την αύξηση του σχηματισμού φυματίων. Επιπλέον, η εφαρμογή της ορμόνης GR24 ίσως τροποποιεί τα επίπεδα των άλλων φυτοορμονών (αυξίνη, κυτοκίνη) που παίζουν σημαντικό ρόλο στο σχηματισμό φυματίων, καθώς πρόσφατα είχε αναφερθεί ότι οι στριγγολακτόνες επηρεάζουν τα επίπεδα αυτών των ορμονών (Arite *et al.* 2007, Hayward *et al.* 2009).

Τέλος αξίζει να ειπωθεί ότι ενώ για αρκετά χρόνια θεωρούσαν ότι η έκκριση στριγγολακτονών προάγει κυρίως την αμοιβαία αλληλεπίδραση των φυτών με τους ΔMM, πλέον πιστεύεται ότι τα φυτά ανέπτυξαν εξωτερικούς μηχανισμούς άμυνας,

συμπεριλαμβανομένων των στριγγολακτονών, εναντίον των παθογόνων. Αυτή η ιδέα ενισχύεται περαιτέρω καθώς έχει βρεθεί ότι το συνθετικό ανάλογο GR24 αναστέλλει την ανάπτυξη των φυτοπαθογόνων μυκήτων. Η βασική απόκριση των περισσότερων παθογόνων μυκήτων που έχουν ελεγχθεί ήταν η αύξηση της διακλάδωσης των υφών. Αυτό σημαίνει ότι οι παθογόνοι μύκητες αποκρίνονται διαφορετικά από τους ΔΜΜ (Dor *et al.* 2011a).

ΣΚΟΠΟΣ ΤΗΣ ΕΡΓΑΣΙΑΣ

Η καθιέρωση αλληλεπιδράσεων μεταξύ των φυτών και ωφέλιμων μικροοργανισμών προϋποθέτει την αμοιβαία αναγνώριση και τον υψηλού επιπέδου συντονισμό των βιοχημικών και μορφολογικών αποκρίσεων τους. Αυτό απαιτεί συνεχή κυτταρικό και μοριακό «διάλογο» μεταξύ του φυτού και του μικροοργανισμού. Προκειμένου να εγκαθιδρυθεί η συμβιωτική σχέση, οι ρίζες των φυτών και οι μικροοργανισμοί ανταλλάσσουν χημικά σήματα στη ριζόσφαιρα. Μια κατηγορία τέτοιων σημάτων είναι οι φυτικές ορμόνες στριγγολακτόνες. Είναι ήδη γνωστό ότι οι στριγγολακτόνες εκκρίνονται από τα κύτταρα της ρίζας, γίνονται αντιληπτές από τους Δενδροειδείς Μυκορριζικούς Μύκητες, τα σπόριά τους εκβλαστάνουν, επάγεται η διακλάδωση των υφών που προκύπτουν από τα εκβλαστημένα σπόρια, και κατά αυτό τον τρόπο ξεκινά η αλληλεπίδραση φυτού-συμβιώτη και η διαδικασία αποικισμού.

Προσπάθειες έχουν γίνει τελευταία ώστε να διαλευκανθεί ο ρόλος τους στην εγκαθίδρυση άλλων συμβιωτικών σχέσεων, όπως αυτής των ψυχανθών με τα αζωτοδεσμευτικά ριζόβια. Λίγες μελέτες έχουν επεκταθεί και σε άλλες κατηγορίες μικροοργανισμών, με το ενδιαφέρον να εστιάζεται σε φυτοπαθογόνους κυρίως μύκητες. Σκοπός της παρούσας πτυχιακής μελέτης είναι η διερεύνηση του ρόλου των στριγγολακτονών, στη φυσιολογία ενδοφυτικών μυκήτων και συγκεκριμένα του ενδοφυτικού μύκητα *Fusarium solani* στέλεχος K, καθώς και στην αλληλεπίδραση του τελευταίου με το ψυχανθές *Lotus japonicus*. Στόχος είναι η αποσαφήνιση της πιθανής σημασίας των στριγγολακτονών στην καθιέρωση αλληλεπιδράσεων μεταξύ φυτού και μιας ποικιλίας μικροοργανισμών, έξω από το πλαίσιο των δυο προαναφερθέντων πολύ καλά μελετημένων συμβιωτικών σχέσεων.

ΥΛΙΚΑ ΚΑΙ ΜΕΘΟΔΟΙ

1. ΒΙΟΛΟΓΙΚΟ ΥΛΙΚΟ

1.1 ΣΤΕΛΕΧΟΣ ΜΥΚΗΤΑ ΚΑΙ ΣΕΙΡΕΣ ΦΥΤΩΝ

Το στέλεχος του μύκητα που χρησιμοποιήθηκε στην παρούσα μελέτη είναι ο ενδοφυτικός μύκητας *Fusarium solani* στέλεχος K (Fs-K), ο οποίος έχει προηγουμένως απομονωθεί από ρίζες τομάτας. Το στέλεχος αυτό αναπτύχθηκε σε θρεπτικό υλικό είτε σε Potato Dextrose Agar (PDA), στους 26°C στο σκοτάδι, για 5 ημέρες πριν τον εμβολιασμό τους στα φυτά είτε σε Potato Dextrose Browth (PDB), στους 26°C υπό συνεχή ανάδευση (160 rpm) στο σκοτάδι, για 5 ημέρες πριν τη χρήση του εμβολίου.

Ως φυτό επιλέχθηκε το ψυχανθές *Lotus japonicus* λόγω της ικανότητας του να σχηματίζει συμβίωση με ριζόβια και δενδρόμορφους μυκορριζικούς μύκητες (ΔΜΜ).

2. ΜΕΛΕΤΗ ΤΗΣ ΕΠΙΔΡΑΣΗΣ ΤΟΥ ΣΥΝΘΕΤΙΚΟΥ ΑΝΑΛΟΓΟΥ ΤΩΝ ΦΥΤΙΚΩΝ ΟΡΜΟΝΩΝ ΣΤΡΙΓΓΟΛΑΚΤΟΝΩΝ GR24 ΣΤΗΝ ΑΝΑΠΤΥΞΗ ΤΟΥ ΜΥΚΗΛΙΟΥ ΤΟΥ ΜΥΚΗΤΑ Fs-K

Για την εκτίμηση μιας πιθανής άμεσης επίδρασης της ορμόνης GR24 στην ανάπτυξη του μύκητα *Fusarium solani* K, σχεδιάστηκε η ακόλουθη in vitro δοκιμή. Στο κέντρο κάθε τρυβλίου επιστρωμένο με water agar εφαρμόστηκαν γνωστής διαμέτρου τεμάχια pda που φέρουν μυκηλιακό εμβόλιο και τα οποία λήφθηκαν από το νεαρότερο τμήμα αναπτυσσόμενης αποικίας του μύκητα, με τη χρήση φελλοτρυπητήρα διαμέτρου 5mm. Το συνθετικό ανάλογο στριγγολακτονών GR24 (Strigolab, rac GR24, MW: 298,29) που χρησιμοποιήθηκε σε όλη τη μελέτη ήταν στη μορφή ρακεμικού μίγματος που περιείχε και τα δύο εναντιομερή της ένωσης. Αρχικά διαλύθηκε σε 335μl ακετόνης προκειμένου να επιτευχθεί αραιώση 10^{-1} M και οι επόμενες αραιώσεις πραγματοποιήθηκαν σε αποστειρωμένο δις απεσταγμένο νερό. Οι συγκεντρώσεις της ορμόνης GR24 που χρησιμοποιήθηκαν για τη μελέτη της ανάπτυξης του μυκηλίου του Fs-K ήταν 10^{-6} , 10^{-7} και 10^{-8} M. Ως μάρτυρας χρησιμοποιήθηκε το αποστειρωμένο νερό.

Εικόνα 6: Αντιπροσωπευτική εικόνα τρυβλίου που χρησιμοποιήθηκε για τη μελέτη της επίδρασης της συνθετικής στριγγολακτόνης GR24 στην ανάπτυξη του μύκητα. Τα φίλτρα που έχουν χρησιμοποιηθεί έχουν κατασκευαστεί από υπέρ-λεπτές ίνες γυαλιού.

3. ΜΕΛΕΤΗ ΤΗΣ ΕΠΙΔΡΑΣΗΣ ΤΟΥ ΣΥΝΘΕΤΙΚΟΥ ΑΝΑΛΟΓΟΥ ΤΩΝ ΦΥΤΙΚΩΝ ΟΡΜΟΝΩΝ ΣΤΡΙΓΓΟΛΑΚΤΟΝΩΝ GR24 ΣΤΗΝ ΕΚΒΛΑΣΤΗΣΗ ΤΩΝ ΣΠΟΡΙΩΝ ΑΓΕΝΟΥΣ ΑΝΑΠΑΡΑΓΩΓΗΣ ΤΟΥ ΜΥΚΗΤΑ Fs-K

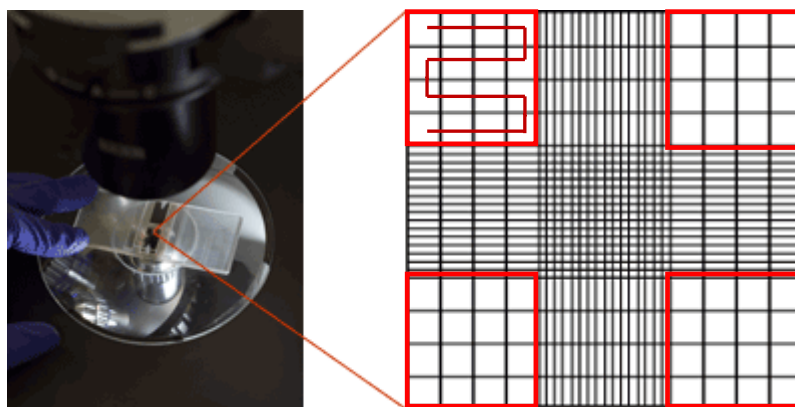
Τεμάχια PDA που φέρουν μυκηλιακό εμβόλιο και τα οποία λήφθηκαν από το νεαρότερο τμήμα αναπτυσσόμενης αποικίας του μύκητα χρησιμοποιήθηκαν για τον εμβολιασμό υγρής καλλιέργειας PDB με στόχο τη συλλογή εμβολίου μετά το πέρας 5 ημερών. Για την απομάκρυνση του μυκηλίου και τη συλλογή των κονιδίων του μύκητα χρησιμοποιήθηκαν αποστειρωμένο τουλουπάνι και αποστειρωμένα χωνιά. Αρχικά διαπέρασε το διάλυμα της υγρής καλλιέργειας του μύκητα σε PDB μέσα από το τουλουπάνι και συλλέχθηκαν τα κονίδια με φυγοκέντρηση στις 6500 στροφές για 5 λεπτά. Ακολουθεί απομάκρυνση του υπερκειμένου λόγω καθίζησης των κονιδίων του μύκητα και επαναδιάλυση του ιζήματος σε διάλυμα NaCl (0,85% w/v). Η συγκέντρωση των κονιδίων υπολογίστηκε με τη μέθοδο του αιμοκυτταρόμετρου με τη βοήθεια οπτικού μικροσκοπίου (Εικόνα 7) και με την κατάλληλη αραιώση επετεύχθη η επιθυμητή τελική συγκέντρωση του εμβολίου. Στόχος ήταν η επίστρωση ~180 κονιδίων ανά τρυβλίο. Οι συγκεντρώσεις της ορμόνης GR24 που χρησιμοποιήθηκαν για τη μελέτη της εκβλάστησης των κονιδίων ήταν 10^{-6} M και 10^{-8} M.

Πραγματοποιήθηκαν τρεις χειρισμοί για κάθε συγκέντρωση ορμόνης:

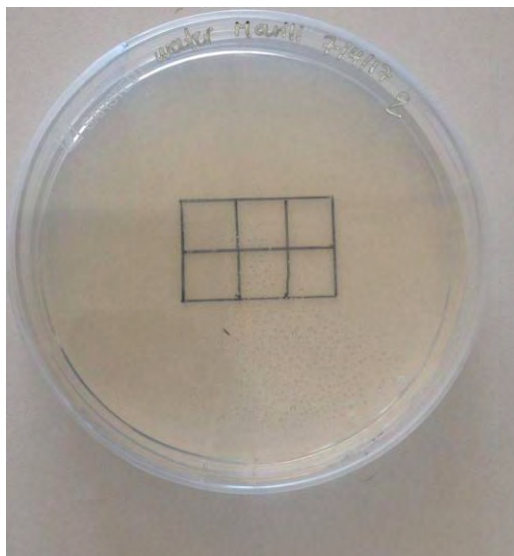
- 1) Μεταχείριση: τρυβλία με το θρεπτικό μέσο water agar επιστρωμένα με την κατάλληλη συγκέντρωση της ορμόνης,
- 2) Μάρτυρας 1: τρυβλία με το θρεπτικό μέσο water agar επιστρωμένα με την αντίστοιχη ποσότητα ακετόνης που χρησιμοποιήθηκε για τη διάλυση της ορμόνης σε κάθε αραιώση,
- 3) Μάρτυρας 2: τρυβλία μόνο με το θρεπτικό μέσο water agar.

Σε κάθε περίπτωση η κατάλληλη ποσότητα της ορμόνης ή της ακετόνης επιστρώθηκε στα τρυβλία που περιείχαν το θρεπτικό μέσο water agar (Πίνακας 3, Παράρτημα) και ακολούθως πραγματοποιήθηκε εναπόθεση των κονιδίων στο τρυβλίο. Για τη διευκόλυνση μέτρησης των εκβλαστημένων κονιδίων με τη χρήση οπτικού μικροσκοπίου (OLYMPUS CH20) είχαν σχεδιαστεί στο πίσω μέρος του τρυβλίου 6 τετράγωνα (εμβαδού 1cm^2) στα οποία έγινε η εναπόθεση κονιδίων (Εικόνα 8). Ακολούθησε επώαση, στους 26°C στο σκοτάδι, για 4 ώρες. Μετά το πέρας των 4 ωρών, πραγματοποιήθηκε υπολογισμός των εκβλαστημένων κονιδίων καθώς και του μήκους της υφής που προκύπτει από την εκβλάστηση αυτών σε κάθε τρυβλίο με τη χρήση οπτικού μικροσκοπίου. Ο υπολογισμός του μήκους της υφής πραγματοποιήθηκε με τη λήψη 25 φωτογραφιών, με τη βοήθεια της κάμερας του οπτικού μικροσκοπίου, 3 ώρες μετά την επίστρωση των κονιδίων στο τρυβλίο. Ακολούθησε επεξεργασία των φωτογραφιών με τη χρήση του προγράμματος ImageJ προκειμένου να υπολογιστεί το ακριβές μήκος της υφής.

Το πείραμα επαναλήφθηκε εις διπλούν. Η επεξεργασία των αποτελεσμάτων έγινε με τη βοήθεια υπολογιστικών φύλλων excel και η στατιστική ανάλυση έγινε με τη μέθοδο Student's t-test ($P < 0,05$).



Εικόνα 7: Απεικόνιση του αιμοκυτταρόμετρου (αριστερά) και του τρόπου υπολογισμού των κονιδίων (δεξιά). Ο αριθμός των κονιδίων υπολογίστηκε σε γνωστών διαστάσεων τετράγωνα (σημειωμένα με κόκκινο χρώμα στην εικόνα). (τροποποιημένο από Chan L., 2015. The historical development of hemocytometer)



Εικόνα 8: Απεικόνιση τρυβλίου με σχεδιασμένα τα τετράγωνα (1cm^2) για την παρατήρηση των κονιδίων του Fs-K στο οπτικό μικροσκόπιο.

4. ΜΕΛΕΤΗ ΤΗΣ ΕΠΙΔΡΑΣΗΣ ΤΟΥ ΣΥΝΘΕΤΙΚΟΥ ΑΝΑΛΟΓΟΥ ΤΩΝ ΦΥΤΙΚΩΝ ΟΡΜΟΝΩΝ ΣΤΡΙΓΓΟΛΑΚΤΟΝΩΝ GR24 ΣΤΟΝ ΑΠΟΙΚΙΣΜΟ ΤΟΥ ΨΥΧΑΝΘΟΥΣ

Lotus japonicus

Σπέρματα φυτών *Lotus japonicus* απολυμάνθηκαν σε διάλυμα χλωρίνης 20% v/v (NaOCl) για 20 λεπτά, ξεπλύθηκαν καλά με τη χρήση αποστειρωμένου απιονισμένου νερού και τοποθετήθηκαν για προβλάστηση σε τρυβλία με θρεπτικό υπόστρωμα $\frac{1}{2}$ x MS (Πίνακας 1, Παράρτημα). Η προβλάστηση προήχθη με την τοποθέτηση των τρυβλίων για δύο ημέρες στους 4°C στο σκοτάδι. Με το πέρας των δύο ημερών, απομακρύνθηκε το αλουμινόχαρτο και τα τρυβλία τοποθετήθηκαν σε θάλαμο ανάπτυξης με θερμοκρασία 22°C και 16 h φωτοπερίοδο. Τα φυτά τότε θεωρήθηκαν ηλικίας μίας ημέρας. Ακολούθως, φυτά ηλικίας 10 ημερών εμβολιάστηκαν με τον Fs-K.

Για τη μελέτη της επίδρασης της ορμόνης GR24 στη διαδικασία αποικισμού του μύκητα Fs-K σε ιστούς ρίζας *Lotus japonicus*, ο μύκητας είχε αναπτυχθεί για 5 ημέρες, πριν πραγματοποιηθεί εμβολιασμός με τον Fs-K σε φυτά ηλικίας 10 ημερών, σε τρυβλία με θρεπτικό υπόστρωμα PDA. Η αλληλεπίδραση φυτού-μύκητα πραγματοποιήθηκε σε θρεπτικό μέσο M (Πίνακας 2, Παράρτημα). Οι συγκεντρώσεις της ορμόνης GR24 που χρησιμοποιήθηκαν για τη μελέτη του

βαθμού του αποικισμού ήταν 10^{-6} M και 10^{-8} M (σε τελική συγκέντρωση στο θρεπτικό υπόστρωμα ανάπτυξης των φυτών).

Πραγματοποιήθηκαν τρεις χειρισμοί για κάθε συγκέντρωση ορμόνης:

- 1) Μεταχείριση: τρυβλία επιστρωμένα με θρεπτικό μέσο M που περιείχαν την ορμόνη σε κατάλληλη συγκέντρωση,
- 2) Μάρτυρας 1: τρυβλία επιστρωμένα με θρεπτικό μέσο M που περιείχαν την αντίστοιχη ποσότητα ακετόνης που χρησιμοποιήθηκε για τη διάλυση της ορμόνης,
- 3) Μάρτυρας 2: τρυβλία μόνο με το θρεπτικό μέσο M.

Οι αραιώσεις καθώς και οι αντίστοιχες ποσότητες ακετόνης που χρησιμοποιήθηκαν για την παρασκευή των τρυβλίων φαίνονται αναλυτικά στον Πίνακα 5 στο Παράρτημα.

Σε κάθε τρυβλίο επιστρωμένο με θρεπτικό μέσο M τοποθετήθηκαν 3 φυτά *Lotus japonicus* ηλικίας 10 ημερών (Maciá-Vicente *et al.* 2009). Ακολούθως και σε απόσταση 1cm από το άκρο της ρίζας πραγματοποιήθηκε εμβολιασμός με τον μύκητα Fs-K. Για τον εμβολιασμό των φυτών χρησιμοποιήθηκαν γνωστής διαμέτρου τεμάχια rda που φέρουν μυκηλιακό εμβόλιο και τα οποία λήφθηκαν από το νεαρότερο τμήμα αναπτυσσόμενης αποικίας του μύκητα, με τη χρήση φελλοτρυπητήρα διαμέτρου 5mm. Μετά το πέρας 3 ημερών, ο μύκητας είχε ήδη αλληλεπιδράσει με τις ρίζες των φυτών οπότε και πραγματοποιήθηκε δειγματοληψία των ριζικών ιστών ως εξής:

Αρχικά συλλέχθηκαν τα δείγματα φυτών και πραγματοποιήθηκε επιφανειακή απολύμανση με διάλυμα χλωρίνης (1% v/v) με στόχο την απομάκρυνση της περίσσειας του μύκητα που βρισκόταν στην εξωτερική επιφάνεια της ρίζας (Doyle J.J and Doyle J.L 1987). Ακολούθως πραγματοποιήθηκε συλλογή των ριζικών ιστών. Για το πάγωμα των ριζών που συλλέχθηκαν χρησιμοποιήθηκε υγρό άζωτο και η αποθήκευση τους έγινε στους -80° C μέχρι την επικείμενη εξαγωγή του DNA. Να σημειωθεί ότι κάθε βιολογική επανάληψη αποτελούνταν από 3 ρίζες φυτών.

Η εξαγωγή του DNA πραγματοποιήθηκε με τη χρήση του πρωτοκόλλου CTAB. Για τη μελέτη της επίδρασης της ορμόνης GR24 στη διαδικασία αποικισμού του μύκητα Fs-K εφαρμόστηκε αλυσιδωτή αντίδραση πολυμεράσης (PCR) με στόχο τον υπολογισμό των αντιγράφων 2 γονιδίων που χρησιμοποιούνται για φυλογενετική ανάλυση μυκήτων (Internal Transcribed Spacer-ITS, Translation Elongation Factor-TEF). Η απόλυτη ποσοτικοποίηση αυτών των γονιδίων σε ολικό DNA που έχει απομονωθεί από τους φυτικούς ιστούς, μας δίνει μια σχετική εκτίμηση του αποικισμού του μύκητα Fs-K στο ριζικό σύστημα του φυτού (βλέπε παράγραφο 4.1.2)

Το πείραμα επαναλήφθηκε εις διπλούν. Και στις δύο επαναλήψεις πραγματοποιήθηκαν 4 βιολογικές επαναλήψεις για κάθε χειρισμό. Κάθε βιολογική επανάληψη αποτελούταν από 3 ρίζες που είχαν προέλθει από 3 φυτά. Η επεξεργασία των αποτελεσμάτων έγινε με τη βοήθεια υπολογιστικών φύλλων excel και η στατιστική ανάλυση έγινε με τη μέθοδο Student's t-test ($P < 0,05$).

4.1 ΚΑΤΑΣΚΕΥΗ ΠΡΟΤΥΠΗΣ ΚΑΜΠΥΛΗΣ ΓΙΑ ΤΗΝ ΠΟΣΟΤΙΚΟΠΟΙΗΣΗ ΤΟΥ ΜΥΚΗΤΑ ΣΤΟΥΣ ΡΙΖΙΚΟΥΣ ΙΣΤΟΥΣ ΦΥΤΩΝ *Lotus japonicus*

Η αντίδραση PCR πραγματικού χρόνου είναι μια εναλλακτική και ταυτόχρονα επαναστατική μέθοδος ενίσχυσης και ποσοτικού προσδιορισμού αλληλουχιών DNA. Σε αντίθεση με την κλασική μέθοδο PCR, δίνει τη δυνατότητα παρακολούθησης της πορείας της αλυσιδωτής αντίδρασης, καθ' όλη τη διάρκεια που λαμβάνει χώρα, σε πραγματικό χρόνο. Η παρακολούθηση της εξέλιξης της αντίδρασης οφείλεται στη δυνατότητα μέτρησης των επιπέδων φθορισμού της χρωστικής SyberGreen. Η χρωστική αυτή έχει την ικανότητα να φθορίζει κατά την πρόσδεση της στα δίκλινα μόρια του DNA. Οι μετρήσεις των επιπέδων φθορισμού πραγματοποιούνται στο τέλος κάθε κύκλου με τη χρήση ρομποτικού σαρωτή. Στην παρούσα εργασία, αυτή η μέθοδος χρησιμοποιήθηκε για τη μελέτη του βαθμού αποικισμού του μύκητα Fs-K σε ριζικούς ιστούς παρουσία- απουσία της στριγγολακτόνης GR24.

4.1.1 ΕΠΙΛΟΓΗ ΤΩΝ ΕΚΚΙΝΗΤΩΝ

Στον παρακάτω πίνακα φαίνονται τα δύο ζεύγη εκκινήτων που χρησιμοποιήθηκαν στην παρούσα εργασία για απόλυτη ποσοτικοποίηση των γονιδίων ITS και Tef1a. Και τα 2 ζεύγη στοχεύουν στην ενίσχυση τμήματος των αντίστοιχων γονιδίων ειδικό για *Fusarium solani*.

Όνομασία Εκκινήτη	Νουκλεοτιδική Αλληλουχία Ορθόδρομου Εκκινήτη 5'→3'	Όνομασία Εκκινήτη	Νουκλεοτιδική Αλληλουχία Οπισθόδρομου Εκκινήτη 5'→3'
FsITS_F	TGG TCA TTT AGA GGA AGT AA	FsITS_R	GGT ATG TTC ACA GGG TTG ATG
Tef1a_F	CCC CTC CAG GAT GTC TAC AA	Tef1a_R	GGA AGA CCC TCA GTG AGC TG

Πίνακας 2: Απεικόνιση της αλληλουχίας των ζευγών των εκκινήτων που χρησιμοποιήθηκαν για απόλυτη ποσοτικοποίηση των γονιδίων ITS, Tef1a.

4.1.2 ΚΑΤΑΣΚΕΥΗ ΠΡΟΤΥΠΗΣ ΚΑΜΠΥΛΗΣ

Η απόλυτη ποσοτικοποίηση στην ποσοτική PCR πραγματοποιείται βάσει μιας πρότυπης καμπύλης, η οποία μπορεί να δημιουργηθεί από δείγματα με γνωστή συγκέντρωση ή καλύτερα από δείγματα με γνωστό αριθμό αντιγράφων του γονιδίου που πρόκειται να ποσοτικοποιηθεί.

Στην παρούσα μελέτη, για την ποσοτικοποίηση του μύκητα Fs-K στους ριζικούς ιστούς χρησιμοποιήθηκαν δύο πρότυπες καμπύλες, για τα γονίδια ITS και Tef1a. Η κατασκευή της πρότυπης καμπύλης του γονιδίου ITS είχε πραγματοποιηθεί σε προηγούμενη μελέτη ενώ η κατασκευή της πρότυπης καμπύλης του γονιδίου Tef1a πραγματοποιήθηκε στην παρούσα μελέτη. Αρχικά πραγματοποιήθηκε αλυσιδωτή αντίδραση πολυμεράσης για την ενίσχυση του γονιδίου Tef1a χρησιμοποιώντας τους εκκινήτες που αναγράφονται παραπάνω. Η ύπαρξη του επιθυμητού προϊόντος (~160 bp) επιβεβαιώθηκε με την ηλεκτροφόρηση των δειγμάτων σε gel αγαρόζης (1,5% w/v) και ακολούθησε ανάκτηση του προϊόντος από το gel με τη χρήση του πρωτοκόλλου Nucleospin gel and PCR Clean-up (Macherey-Nagel, Cat. No 740609.250). Στη συνέχεια, το

ανακτηθέν προϊόν χρησιμοποιήθηκε για ένθεση σε πλασμιδιακό φορέα pGEM με τη χρήση του πρωτοκόλλου pGEM-T and pGEM-T Easy Vector Systems (Promega, Cat. No: A1360). Το πλασμίδιο χρησιμοποιήθηκε για το μετασχηματισμό δεκτικών κυττάρων *Escherichia coli* (στέλεχος DH5a).

Για την κλωνοποίηση των τμημάτων DNA χρησιμοποιήθηκε ο πλασμιδιακός φορέας pGEM-T Easy (Promega). Ο συγκεκριμένος φορέας είναι ευθυγραμμισμένος και έχει μονόκλινα 3' άκρα που φέρουν και τα δύο βάσεις θυμίνης. Αυτό εμποδίζει την επανακυκλοποίηση του πλασμιδίου και βελτιώνει την ενσωμάτωση του ένθετου DNA στον φορέα. Ο φορέας φέρει το γονίδιο ανθεκτικότητας στην αμπικιλίνη, επιτρέποντας έτσι την επιλογή μόνο των ανασυνδυασμένων κλώνων. Επίσης, ο πλασμιδιακός φορέας περιέχει τους T7 και SP6 προαγωγείς της RNA πολυμεράσης, οι οποίοι πλαισιώνουν την πολυκλωνική θέση εντός της κωδικής περιοχής του α-πεπτιδίου του ενζύμου της β-γαλακτοσιδάσης. Απενεργοποίηση του α-πεπτιδίου με ενσωμάτωση του ένθετου DNA επιτρέπει την αναγνώριση των ανασυνδυασμένων κλώνων με βάση το χρώμα των αποικιών (οι λευκές αποικίες φέρουν το επιθυμητό γονίδιο).

Ακολούθησε επιλογή μοναδικής λευκής αποικίας, εμβολιασμός αυτής σε υγρή καλλιέργεια LB/amp (5 ml) (Πίνακας 7, Παράρτημα) και επώαση ολονυκτίως στους 37°C, 210 rpm. Την επόμενη μέρα ακολούθησε απομόνωση πλασμιδίου, και περαιτέρω επιβεβαίωση της ένθεσης σε αυτό με τη χρήση αλυσιδωτής αντίδρασης πολυμεράσης με τους κατάλληλους εκκινητές.

Για περαιτέρω επιβεβαίωση ότι οι σωστές αλληλουχίες εισήχθησαν στον πλασμιδιακό φορέα, τα δείγματα εστάλησαν σε αναλυτικό εργαστήριο για ανάγνωση της αλληλουχίας (*sequencing*). Ο προσδιορισμός της αλληλουχίας (τμήμα του TEF1a γονιδίου) έγινε με σύγκριση αυτών με ήδη καταχωρημένες αλληλουχίες της GenBank, με χρήση του αλγόριθμου BLAST, μέσω της βάσης δεδομένων NCBI.

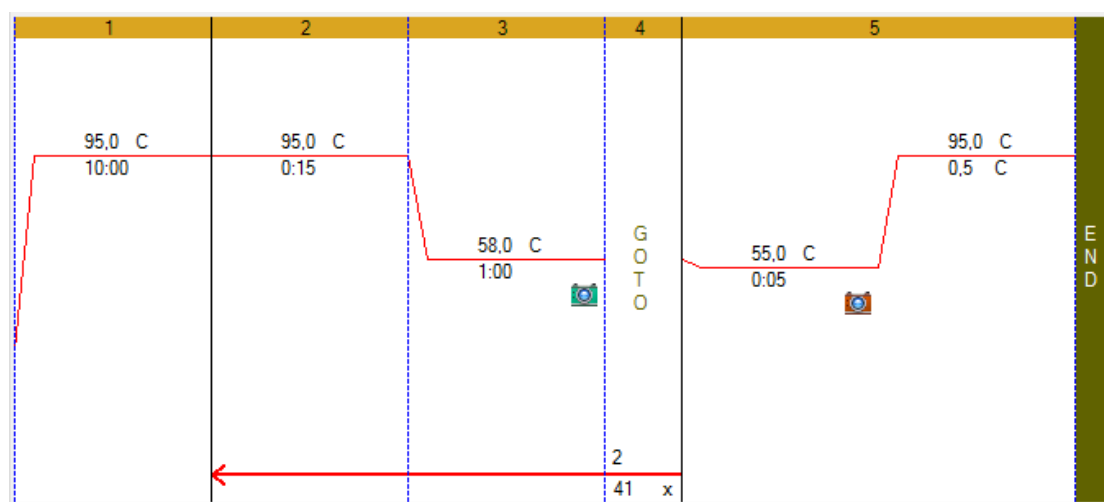
Η κατασκευή της πρότυπης καμπύλης πραγματοποιήθηκε με διαδοχικές δεκαδικές αραιώσεις του πλασμιδιακού φορέα που έφερε τμήμα του γονιδίου TEF1a. Τα αντίγραφα του γονιδίου στην κάθε αραιώση προσδιορίστηκαν με βάση τον τύπο (Whelan *et al.* 2003):

Μοριακό βάρος σε Dalton (g/mol)=
(μέγεθος του προϊόντος σε bp) × (330 Dalton × 2nt/bp)

Αντίγραφα του γονιδίου= $(\frac{\text{g}}{\text{mol}}) / \text{Αριθμό Ανογαδρο}$

4.1.3 ΑΝΤΙΔΡΑΣΗ ΤΗΣ qRT-PCR

Η αντίδραση πραγματοποιήθηκε σε συσκευή CFX Connect™ Real-Time PCR Detection System. Το θερμοκρασιακό πρόγραμμα που χρησιμοποιήθηκε φαίνεται στην Εικόνα 9.



Εικόνα 9: Θερμοκρασιακό πρόγραμμα της αλυσιδωτής αντίδρασης πολυμεράσης πραγματικού χρόνου.

Όλες οι αντιδράσεις πραγματοποιήθηκαν με το ίδιο θερμοκρασιακό πρόγραμμα και καταγράφονταν για 41 κύκλους. Σε όλες τις περιπτώσεις το μίγμα της αντίδρασης είχε τελικό όγκο 10 μl και περιλάμβανε τα συστατικά που αναγράφονται στον Πίνακα 3.

Αντιδραστήρια	10 μl
Sybr Green (2x)	5 μl
F primer (5μM)	0,6 μl
R primer (5μM)	0,6 μl
Genomic DNA	1 μl
ddH ₂ O (st.)	Μέχρι 10 μl

Πίνακας 3: Συστατικά του μίγματος της qPCR που χρησιμοποιήθηκε για την ποσοτικοποίηση των αντιγράφων του μύκητα Fs-K.

Μετά το τέλος των αντιδράσεων τα δεδομένα επεξεργάστηκαν με τη χρήση του προγράμματος Bio-Rad CFX 3.1. Σε κάθε περίπτωση πραγματοποιούνταν έλεγχος των επιδόσεων ενίσχυσης της qPCR, του συντελεστή r^2 και του αριθμού των κύκλων του ορίου (C_t), ο οποίος αντιπροσωπεύει τον αριθμό των κύκλων της αντίδρασης πάνω από τους οποίους είναι δυνατή η ανίχνευση φθορισμού. Μετά το πέρας κάθε αλυσιδωτής αντίδρασης πολυμεράσης πραγματοποιήθηκε ηλεκτροφόρηση των δειγμάτων σε gel αγαρόζης (1,5% w/v) με στόχο την επιβεβαίωση της ύπαρξης ενός μόνο επιθυμητού προϊόντος. Επιπλέον, οι δεκαδικές αραιώσεις του ανασυνδιασμένου πλασμιδίου που κυμαίνονταν από $5,9 \times 10^0$ έως $5,9 \times 10^7$ υποβλήθηκαν εις τριπλούν στην qPCR για να κατασκευαστεί η πρότυπη καμπύλη. Στο τέλος πραγματοποιήθηκε στατιστική επεξεργασία των αποτελεσμάτων με τη μέθοδο Student's t-test ($P < 0,05$).

ΑΠΟΤΕΛΕΣΜΑΤΑ**ΜΕΛΕΤΗ ΤΗΣ ΕΠΙΔΡΑΣΗΣ ΤΟΥ ΣΥΝΘΕΤΙΚΟΥ ΑΝΑΛΟΓΟΥ ΤΩΝ ΦΥΤΙΚΩΝ ΟΡΜΟΝΩΝ ΣΤΡΙΓΓΟΛΑΚΤΟΝΩΝ, GR24, ΣΤΗΝ ΑΝΑΠΤΥΞΗ ΤΟΥ ΜΥΚΗΛΙΟΥ ΤΟΥ ΜΥΚΗΤΑ Fs-K**

Προκειμένου να αξιολογηθεί μία πιθανή άμεση επίδραση των στριγγολακτονών στη φυσιολογία της ανάπτυξης του Fs-K, διεξήχθη μια *in vitro* δοκιμή με εξωγενή εφαρμογή της ορμόνης GR24 παρουσία του μύκητα. Στο κέντρο κάθε τρυβλίου επιστρωμένο με water agar εφαρμόστηκαν γνωστής διαμέτρου τεμάχια pda που φέρουν μυκηλιακό εμβόλιο του Fs-K ενώ στις άκρες του κάθε τρυβλίου εφαρμόστηκαν αντιδιαμετρικά τέσσερα αποστειρωμένα φίλτρα από υπέρ-λεπτές ίνες γυαλιού διαμέτρου 5mm στα οποία προστέθηκαν 10μl από καθεμία συγκέντρωση της ορμόνης και νερό (ως μάρτυρας). Όσον αφορά τα φίλτρα που χρησιμοποιήθηκαν για τη μελέτη της επίδρασης των στριγγολακτονών στη φυσιολογία του μύκητα, πραγματοποιήθηκε έλεγχος και φίλτρων νιτροκυτταρίνης ως φίλτρα. Ωστόσο, δεν παρατηρήθηκαν στατιστικώς σημαντικές διαφορές στη φυσιολογία του μύκητα με τη χρήση των διηθητικών χαρτιών σε αντίθεση με τα φίλτρα από υπέρ-λεπτές ίνες γυαλιού. Οι συγκεντρώσεις της ορμόνης GR24 που χρησιμοποιήθηκαν για τη μελέτη αυτή ήταν 0, 10^{-6} , 10^{-7} και 10^{-8} M (Xie et al. 2010). Οι εν λόγω συγκεντρώσεις επιλέχθηκαν γιατί σε αυτές τις συγκεντρώσεις παρατηρήθηκε επίδραση στο σχηματισμό φυματίων στο *M. sativa* παρουσία της ορμόνης (Soto et al., 2010) και αυτές είχαν επιλεχθεί για τη διερεύνηση της ενδεχόμενης εμπλοκής των στριγγολακτονών στην αύξηση του μύκητα *Botrytis cinerea* (Torres- Vera et al., 2014).

Παρατηρήθηκε θετική επίδραση της ορμόνης GR24 στην ακτίνα αύξησης του μυκηλίου του μύκητα Fs-K μόνο στις συγκεντρώσεις της ορμόνης 10^{-7} και 10^{-8} M. Εντούτοις, δεν παρατηρήθηκαν μεταβολές στη γραμμική ταχύτητα ανάπτυξης του μύκητα σε καμία από τις συγκεντρώσεις που επιλέχθηκαν προς αξιολόγηση (Πίνακας 4). Αυτά τα αποτελέσματα δείχνουν ότι υπάρχει άμεση επίδραση των στριγγολακτονών (σε συγκεντρώσεις 10^{-7} και 10^{-8} M) στην ανάπτυξη του μύκητα Fs-K ενώ στην συγκέντρωση 10^{-6} M δεν παρατηρήθηκε καμία επίδραση.

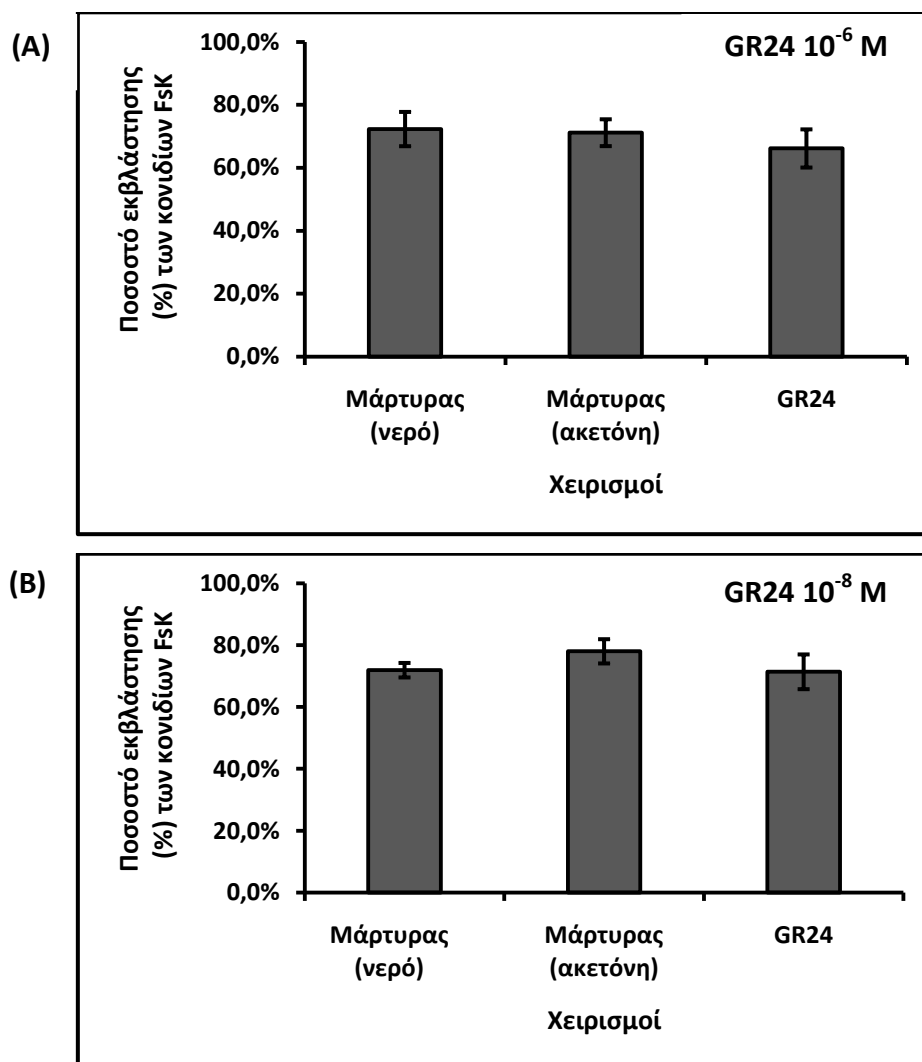
GR24 (M)	Ανάπτυξη της ακτίνας (mm) (A)	Γραμμική ταχύτητα αύξησης (mm/ημέρα)(B)
Μάρτυρας	25,20 ±0,17	5,10 ± 0,05
10 ⁻⁶	25,78 ±0,26	5,07 ± 0,05
10 ⁻⁷	25,87 ±0,19 *	5,10 ± 0,06
10 ⁻⁸	25,72 ±0,19 *	5,07 ± 0,06

Πίνακας 4: (A) Ανάπτυξη της ακτίνας του Fs-K όπως προσδιορίστηκε σε χρονική περίοδο 5 ημερών μετά την εφαρμογή 10μl των διαφορετικών συγκεντρώσεων (10⁻⁶, 10⁻⁷ και 10⁻⁸ M) του αναλόγου της στριγγολακτόνης GR24 σε φίλτρο υπέρ- λεπτων ινών γυαλιού, (B) Γραμμική ταχύτητα αύξησης της ακτίνας του μυκηλίου του Fs-K, όπως υπολογίστηκε από τα ίδια τρυβλία που χρησιμοποιήθηκαν και στο (A). Ως μάρτυρας χρησιμοποιήθηκαν 10μl αποστειρωμένου νερού. Τα νούμερα αναπαριστούν το μέσο όρο 23 βιολογικών επαναλήψεων ± τυπικό σφάλμα. Οι αστερίσκοι (*) υποδεικνύουν στατιστικά σημαντικές διαφορές σύμφωνα με το Student's t-test (* P≤0,05).

ΜΕΛΕΤΗ ΤΗΣ ΕΠΙΔΡΑΣΗΣ ΤΟΥ ΣΥΝΘΕΤΙΚΟΥ ΑΝΑΛΟΓΟΥ ΤΩΝ ΦΥΤΙΚΩΝ ΟΡΜΟΝΩΝ ΣΤΡΙΓΓΟΛΑΚΤΟΝΩΝ GR24 ΣΤΗΝ ΕΚΒΛΑΣΤΗΣΗ ΤΩΝ ΣΠΟΡΙΩΝ ΑΓΕΝΟΥΣ ΑΝΑΠΑΡΑΓΩΓΗΣ ΤΟΥ ΜΥΚΗΤΑ Fs-K

Τα κονίδια είναι δομές αγενούς αναπαραγωγής των Ασκομυκήτων. Οι στριγγολακτόνες είναι γνωστό ότι επάγουν εκβλάστηση των σπορίων στους δενδροειδείς μυκορριζικούς μύκητες (Besserer *et al.* 2006). Προκειμένου να αξιολογηθεί μια πιθανή επίδραση της ορμόνης GR24 στην εκβλάστηση των σπορίων του Fs-K, πραγματοποιήθηκε εναπόθεση κονιδίων του μύκητα σε τρυβλία επιστρωμένα με θρεπτικό μέσο νερό-άγαρ σκέτο, καθώς και σε τρυβλία με νερό-άγαρ που φέρει την κατάλληλη ποσότητα ορμόνης ή ακετόνης. Οι συγκεντρώσεις της ορμόνης που χρησιμοποιήθηκαν για τη μελέτη της εκβλάστησης των σπορίων του Fs-K ήταν 10⁻⁶ M και 10⁻⁸ M καθώς αποτελούν τις 2 ακραίες τιμές της συγκέντρωσης της ορμόνης GR24. Η πορεία της εκβλάστησης παρακολουθείτο σε χρονικά διαστήματα περίπου μιας ώρας. Για την καταμέτρηση εν τέλει επιλέχθηκε η χρονική στιγμή των 4 ωρών, διότι τότε παρατηρήθηκε εκκίνηση της εκβλάστησης των κονιδίων στο μάρτυρα (αρχή δημιουργίας του βλαστικού σωλήνα). Η

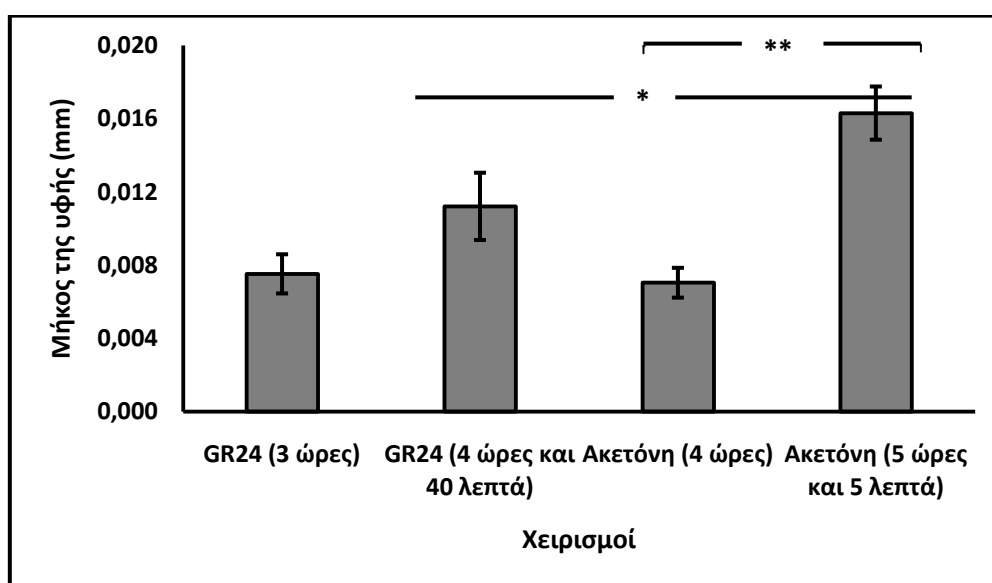
στριγγολακτόνη GR24 φαίνεται να επηρεάζει την εκβλάστηση των κονιδίων του μύκητα Fs-K (Γράφημα 1).



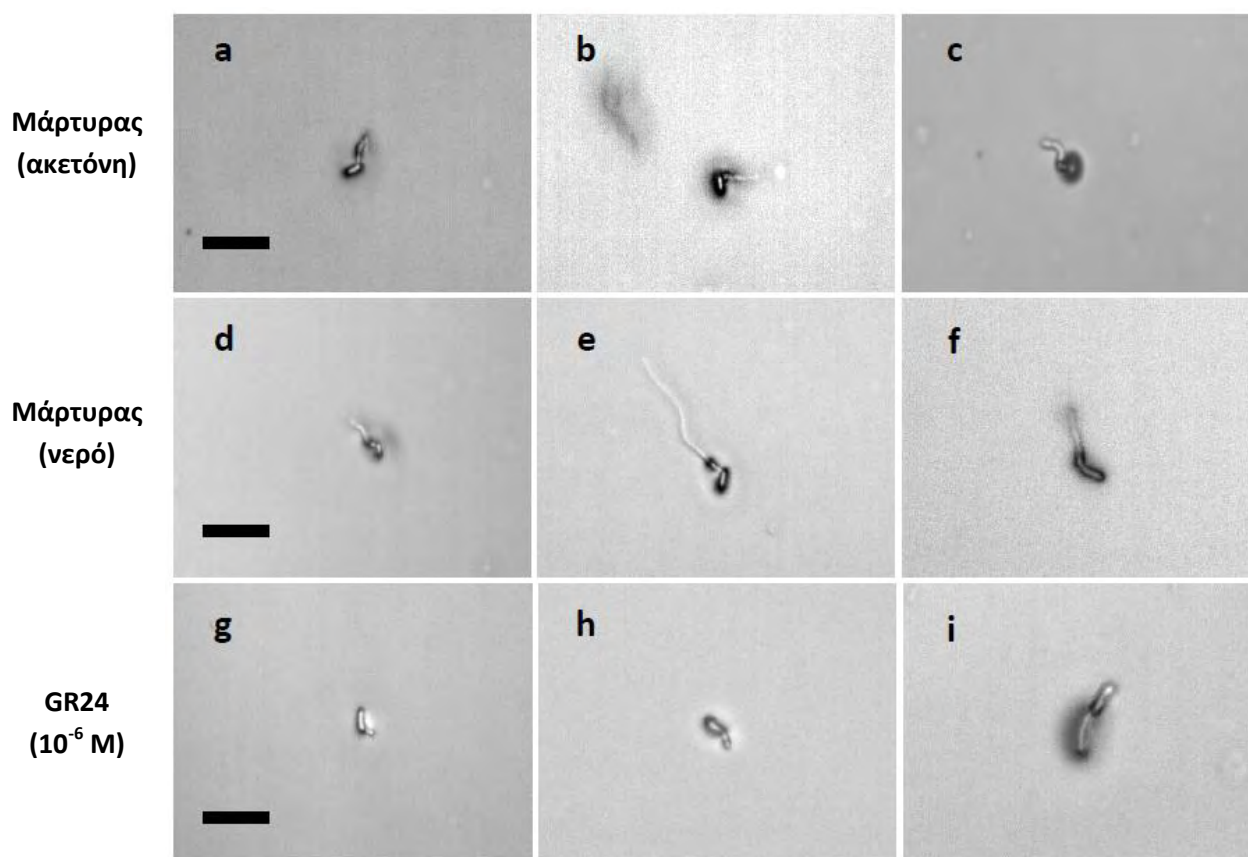
Γράφημα 1: Εκβλάστηση των κονιδίων μετά το πέρας 4 ωρών από την επίστρωση σε τρυβλία και επώαση στους 26°C (καταγραφή της εκβλάστησης περίπου 180 κονιδίων ανά βιολογική επανάληψη). Οι συγκεντρώσεις της ορμόνης GR24 που χρησιμοποιήθηκαν ήταν: Α) 10⁻⁶ Μ, Β) 10⁻⁸ Μ. Ως μάρτυρας χρησιμοποιήθηκε αποστειρωμένο νερό και ακετόνη σε ίδια συγκέντρωση με αυτή που χρησιμοποιήθηκε για την εκάστοτε συγκέντρωση της ορμόνης. Τα δεδομένα αναπαριστούν το μέσο όρο 5 βιολογικών επαναλήψεων ± τυπικό σφάλμα για κάθε χειρισμό. Κάθε βιολογική επανάληψη περιλάμβανε την καταμέτρηση εκατό κονιδίων. Δεν παρατηρήθηκαν στατιστικώς σημαντικές διαφορές στην επίδραση της GR24 στην εκβλάστηση των κονιδίων σύμφωνα με το Student's t-test (P<0,05).

Αξιοσημείωτο είναι ότι ενώ δεν παρατηρήθηκε επίδραση της ορμόνης στην εκβλάστηση των κονιδίων, κατά την παρατήρηση των εκβλαστημένων κονιδίων με

τη χρήση οπτικού μικροσκοπίου, παρατηρήθηκε διαφορά στο μήκος της υφής αυτών, και συγκεκριμένα στη συγκέντρωση της ορμόνης GR24 10^{-6} M. Για αυτό το λόγο, το πείραμα επαναλήφθηκε, και πραγματοποιήθηκε υπολογισμός του μήκους της υφής που προκύπτει έπειτα από το στάδιο του βλαστικού σωλήνα σε κάθε τρυβλίο με τη λήψη 25 τυχαίων φωτογραφιών κονιδίων, με τη βοήθεια ψηφιακής κάμερας προσαρτημένης επί του οπτικού μικροσκοπίου (Εικόνα 10). Το ακριβές μήκος των υφών υπολογίστηκε μέσω του προγράμματος ImageJ. Από την επεξεργασία των δεδομένων προέκυψε το ακόλουθο γράφημα (Γράφημα 2).



Γράφημα 2: Επίδραση της ορμόνης στο μήκος της υφής που προκύπτει από την εκβλάστηση των κονιδίων για τη συγκέντρωση ορμόνης 10^{-6} M. Ως μάρτυρας χρησιμοποιήθηκε η ακετόνη λόγω της διάλυσης της ορμόνης σε αυτή. Τα δεδομένα αναπαριστούν το μέσο όρο 25 βιολογικών επαναλήψεων. Οι αστερίσκοι (*) υποδεικνύουν στατιστικά σημαντικές διαφορές σύμφωνα με το Student's t-test (* $P < 0,05$ και ** $P \leq 0,01$).



Εικόνα 10: Αντιπροσωπευτικές εικόνες από κονίδια του μύκητα F5-K που λήφθηκαν 4 ώρες μετά τον εμβολιασμό. Τρεις χειρισμοί πραγματοποιήθηκαν: 1) ακετόνη ως μάρτυρας (a, b, c) , 2) αποστειρωμένο νερό ως μάρτυρας (d, e, f) και 3) μεταχείριση με την ορμόνη στη συγκέντρωση 10^{-6} M. Λήφθηκαν 25 τυχαίες φωτογραφίες κονιδίων, με τη βοήθεια ψηφιακής κάμερας προσαρτημένης επί του οπτικού μικροσκοπίου. (Η ράβδος της κλίμακας αναπαριστά 50 μm)

Με βάση το μέσο όρο του μήκους των υφών σε κάθε χειρισμό και τη διαφορά χρόνου μεταξύ των δύο μετρήσεων υπολογίστηκε η κατά μέσο όρο ταχύτητα εκβλάστησης των κονιδίων και για τους δύο χειρισμούς (Πίνακας 5). Αξίζει να σημειωθεί ότι η επιλογή των κονιδίων κατά τη συλλογή των φωτογραφιών ήταν τυχαία στους δύο επιλεχθέντες χρόνους καταγραφής (δεν απεικονίστηκε απαραίτητα το ίδιο κονίδιο στους δυο διαφορετικούς χρόνους καταγραφής).

Χειρισμοί	Ταχύτητα (mm/min) [$\times 10^{-3}$]
Ορμόνη GR24 10^{-6} M	0,037
Ακετόνη	0,142

Πίνακας 5: Επίδραση της ορμόνης στην ταχύτητα εκβλάστησης των κονιδίων στους δύο χειρισμούς (ορμόνη GR24 10^{-6} M και ακετόνη). Τα δεδομένα αναπαριστούν το μέσο όρο 25 τυχαίων βιολογικών επαναλήψεων. Δεδομένης της δυσκολίας εύρεσης του ίδιου σπορίου 2 φορές, δεν χρησιμοποιήθηκαν οι ίδιες βιολογικές επαναλήψεις στους επιλεχθέντες χρόνους. Η στατιστική ανάλυση έγινε σύμφωνα με το Student's t-test ($P < 0,05$). Το πείραμα επαναλήφθηκε δύο φορές με το ίδιο αποτέλεσμα.

Από τα γραφήματα, μπορούμε να συμπεράνουμε ότι παρουσία της ορμόνης παρατηρούμε μια επιβράδυνση στην ταχύτητα εκβλάστησης των κονιδίων σε σύγκριση με το μάρτυρα (ακετόνη). Η δυσκολία ταυτόχρονης απεικόνισης των υπό εκβλάστηση σπορίων στις δύο μεταχειρίσεις, εξηγεί τη μικρή διαφορά στους επιλεχθέντες χρόνους. Παρά ταύτα, παρουσία της ορμόνης παρατηρείται μία επιβράδυνση της επιμήκυνσης των αναπτυσσόμενων από το βλαστικό σωλήνα υφών, γεγονός που επιβεβαιώνεται τόσο από το μήκος της αναπτυσσόμενης υφής όσο και από την έκφραση αυτού συναρτήσει του χρόνου (ταχύτητα επιμήκυνσης της υφής).

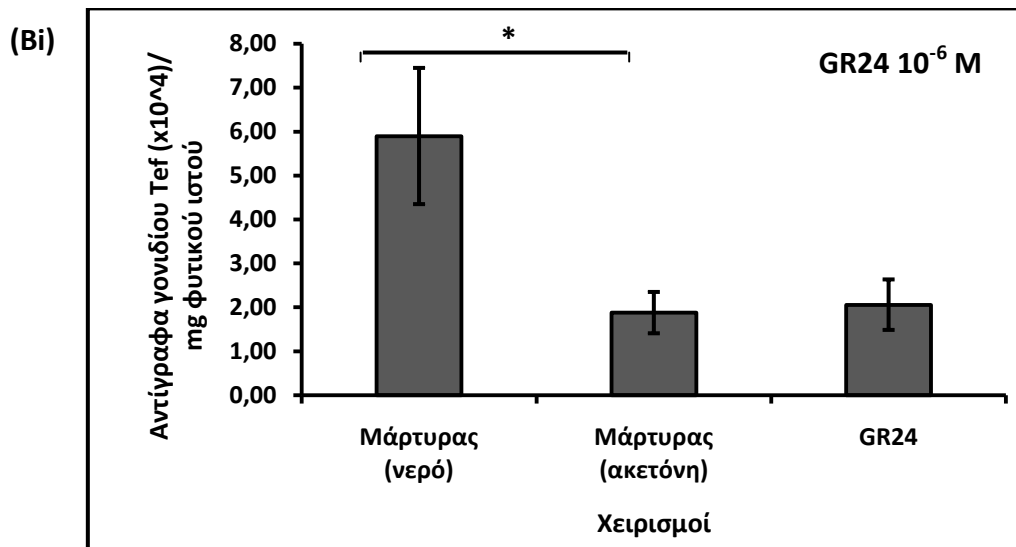
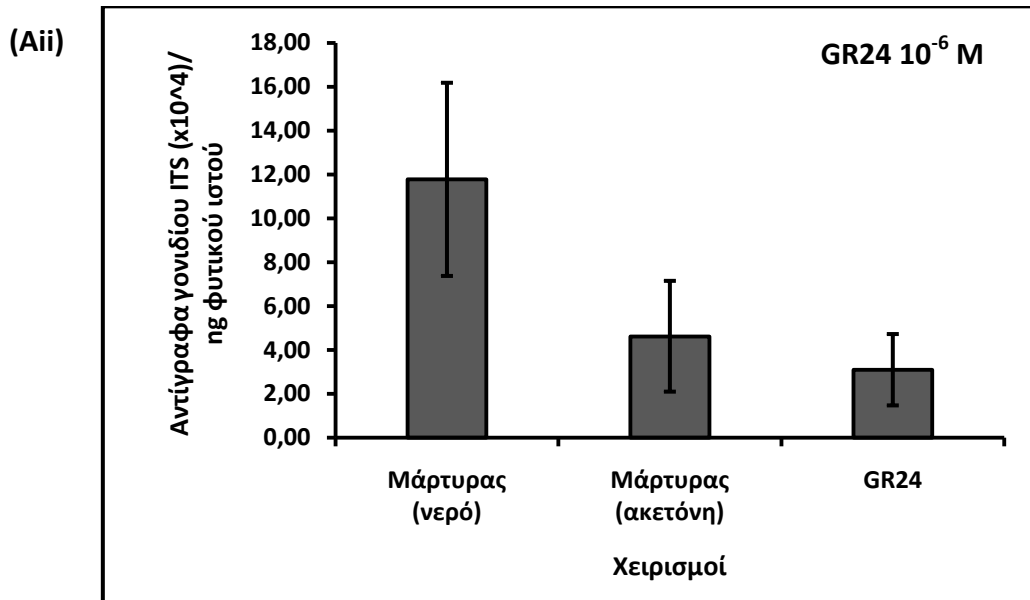
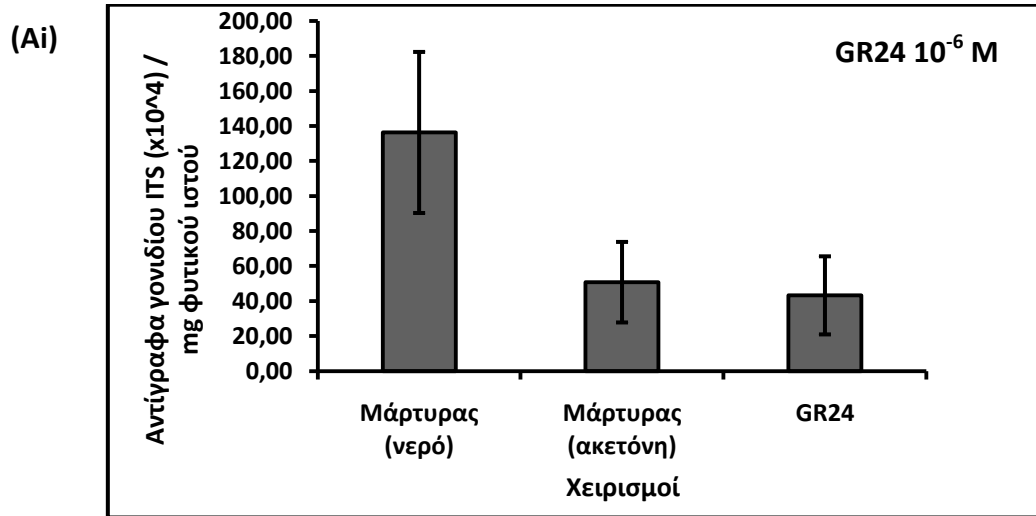
ΜΕΛΕΤΗ ΤΗΣ ΕΠΙΔΡΑΣΗΣ ΤΟΥ ΣΥΝΘΕΤΙΚΟΥ ΑΝΑΛΟΓΟΥ ΤΩΝ ΦΥΤΙΚΩΝ ΟΡΜΟΝΩΝ ΣΤΡΙΓΓΟΛΑΚΤΟΝΩΝ GR24 ΣΤΟΝ ΑΠΟΙΚΙΣΜΟ ΤΟΥ ΨΥΧΑΝΘΟΥΣ *Lotus japonicus*

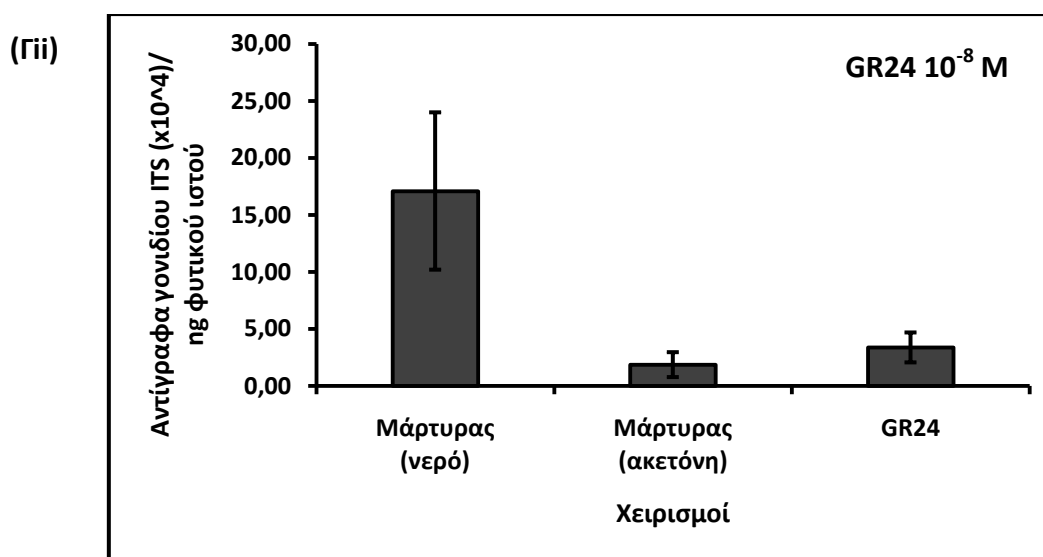
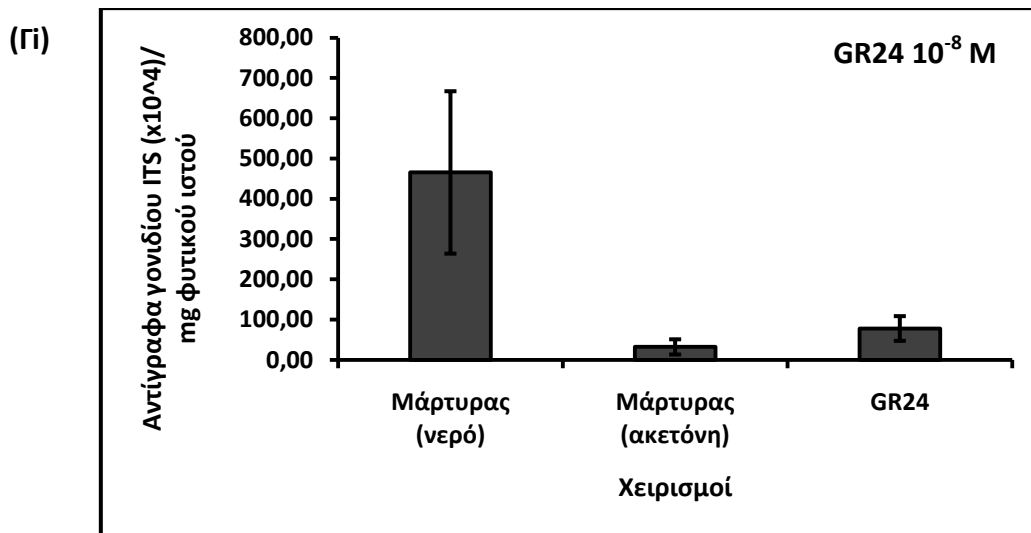
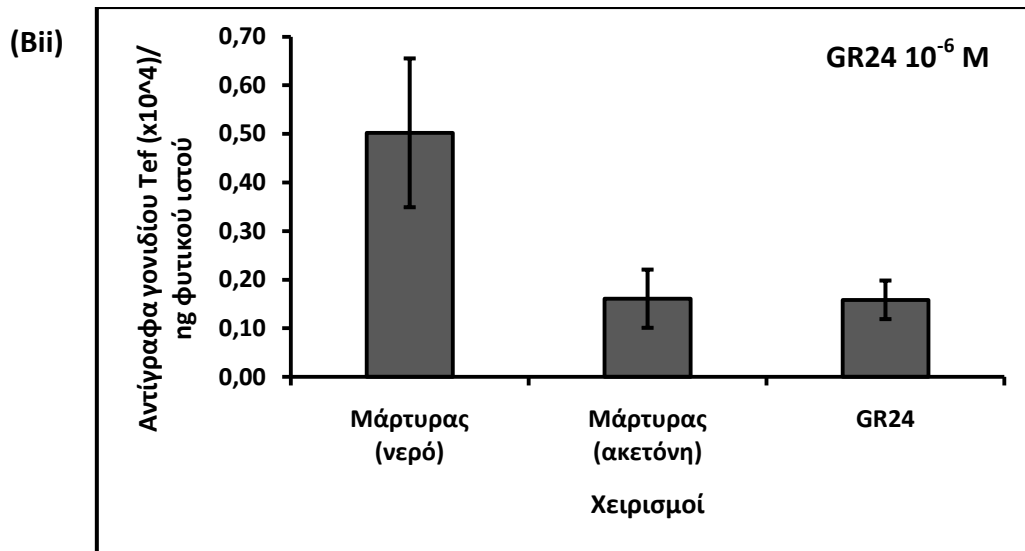
Προκειμένου να αξιολογηθεί η επίδραση της ορμόνης GR24 στον αποικισμό του Fs-K σε ιστούς ρίζας *Lotus japonicus*, πραγματοποιήθηκε εμβολιασμός με τον Fs-K φυτών ηλικίας 10 ημερών σε υπόστρωμα M, ώστε να επιτευχθεί η αλληλεπίδραση φυτού-μύκητα (Εικόνα 11). Οι δύο μάρτυρες ήταν αποστειρωμένο νερό και ακετόνη λόγω της διάλυσης της ορμόνης σε αυτή. Οι συγκεντρώσεις της ορμόνης που χρησιμοποιήθηκαν για τη μελέτη του αποικισμού των ριζών από το μύκητα Fs-K ήταν 10^{-6} M και 10^{-8} M καθώς αποτελούν τις 2 ακραίες υπό μελέτη τιμές της συγκέντρωσης της ορμόνης GR24. Για την ποσοτικοποίηση του μύκητα Fs-K στους ριζικούς ιστούς χρησιμοποιήθηκαν δύο πρότυπες καμπύλες, για τα γονίδια ITS και Tef1a. Η διαφορά των δύο γονιδίων είναι ότι το γονίδιο ITS βρίσκεται σε πολλαπλά αντίγραφα στο γονιδίωμα των ευκαρυωτών ενώ το γονίδιο Tef1a είναι σε ένα αντίγραφο (Nillson *et al.* 2014, Roger *et al.* 1999). Από τα αποτελέσματα της αλυσιδωτής αντίδρασης πολυμεράσης πραγματικού χρόνου προκύπτουν τα

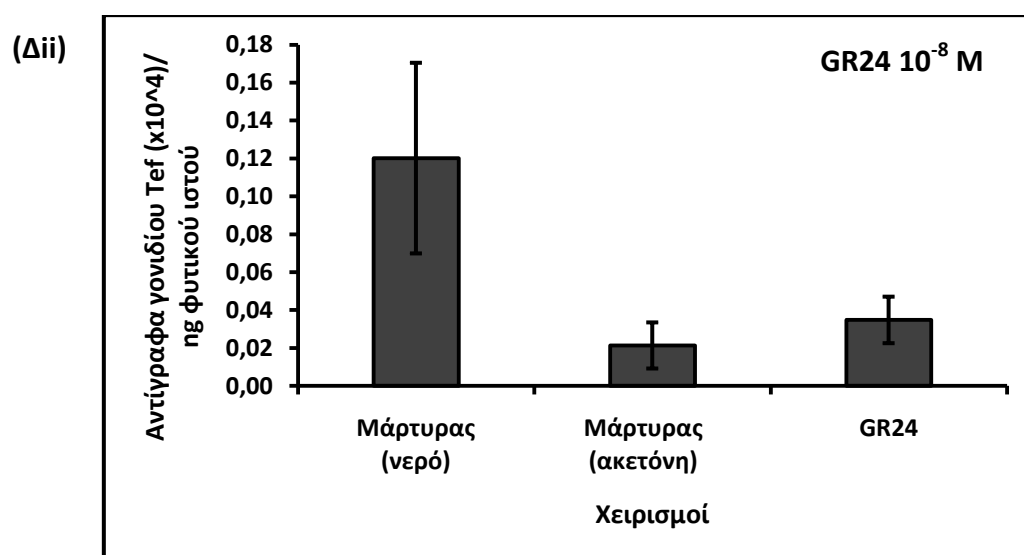
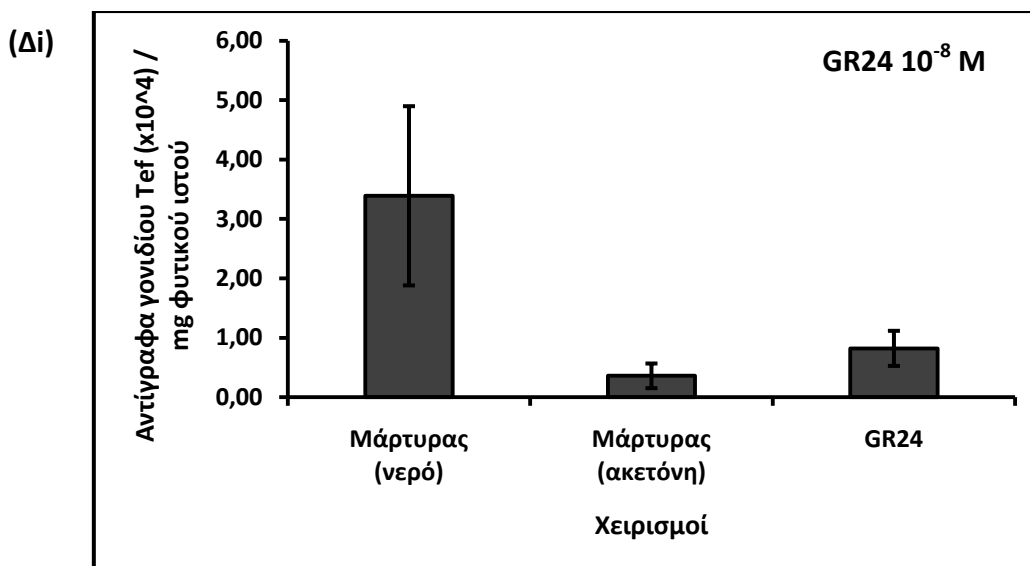
ακόλουθα γραφήματα (Γράφημα 3). Τα αποτελέσματα έδειξαν ότι η στριγγολακτόνη GR24 δεν επηρεάζει τον αποικισμό των ριζών του *Lotus japonicus* από το μύκητα Fs-K. Να σημειωθεί ότι στην περίπτωση της ακετόνης (μάρτυρας) παρατηρείται μείωση της αριθμού των αντίγραφων των γονιδίων στους ριζικούς ιστούς σε σχέση με την περίπτωση όπου μάρτυρας είναι το αποστειρωμένο νερό. Κατά συνέπεια, η ακετόνη ως διαλύτης της ορμόνης προκαλεί αρνητική επίδραση στον αποικισμό των ριζικών ιστών από το μύκητα (Davis D.J. *et al.* 1977). Όσο αφορά τα γραφήματα, παρατηρούμε μια μικρή αύξηση στον αποικισμό παρουσία της ορμόνης, ιδιαίτερα για τη συγκέντρωση της ορμόνης 10^{-8} M, αλλά η επίδραση της ακετόνης είναι μεγάλη και δε μας επιτρέπει να δούμε τις διαφορές. Όπως έχει προαναφερθεί, για την ποσοτικοποίηση του μύκητα Fs-K στους ριζικούς ιστούς χρησιμοποιήθηκαν δύο πρότυπες καμπύλες, για τα γονίδια ITS και Tef1a, όπου πραγματοποιήθηκε απόλυτη ποσοτικοποίηση των 2 γονιδίων. Τα γραφήματα περιγράφουν τα αντίγραφα του εκάστοτε γονιδίου σε mg και σε ng φυτικού ιστού. Και από τις δύο περιπτώσεις, λήφθηκε το ίδιο αποτέλεσμα.



Εικόνα 11: Αντιπροσωπευτική εικόνα του *in vitro* συστήματος που χρησιμοποιήθηκε για τη μελέτη της επίδρασης της συνθετικής στριγγολακτόνης GR24 στην αποικισμό ριζικών ιστών από το μύκητα Fs-K. Η ορμόνη προστέθηκε στο θρεπτικό μέσο ανάπτυξης. Τα φυτά *Lotus japonicus* που έχουν χρησιμοποιηθεί ήταν ηλικίας 10 ημερών ενώ εμβολιασμός με τον μύκητα Fs-K πραγματοποιήθηκε σε απόσταση 1cm από το άκρο της ρίζας.







Γράφημα 3: Τα επίπεδα αποικισμού των ριζών από το μύκητα Fs-K σε φυτά ηλικίας 10 ημερών. Οι συγκεντρώσεις της ορμόνης GR24 που χρησιμοποιήθηκαν ήταν: Α), Β) 10^{-6} M και Γ), Δ) 10^{-8} M. Η ποσοτικοποίηση του μύκητα στους ριζικούς ιστούς έγινε με βάση την πρότυπη καμπύλη του γονιδίου ITS (Α, Γ) και Tef1a (Β, Δ). Να σημειωθεί ότι τα (i), (ii) αναφέρονται σε κάθε περίπτωση στα αντίγραφα του εκάστοτε γονιδίου ανά mg και ng φυτικού ιστού, αντίστοιχα. Ως μάρτυρας σε κάθε περίπτωση χρησιμοποιήθηκε το αποστειρωμένο νερό και η ακετόνη λόγω της διάλυσης της ορμόνης σε αυτή. Τα δεδομένα αναπαριστούν το μέσο όρο 5 βιολογικών επαναλήψεων \pm τυπικό σφάλμα για κάθε επεξεργασία. Κάθε βιολογική επανάληψη αποτελείται από 3 περίπου φυτά. Δεν παρατηρήθηκαν στατιστικώς σημαντικές διαφορές στην επίδραση της GR24 στον αποικισμό των ριζών του ψυχανθούς από το μύκητα (εκτός από μία περίπτωση) σύμφωνα με το

Student's t-test ($P < 0,05$). Ο αστερίσκος (*) υποδεικνύει στατιστικά σημαντικές διαφορές σύμφωνα με το Student's t-test ($* P \leq 0,05$).

ΣΥΖΗΤΗΣΗ

Η απομόνωση και ταυτοποίηση των σημάτων που παράγονται από τα φυτά για την προώθηση της συμβίωσης άνοιξε νέους δρόμους για τη μελέτη των μηχανισμών που εμπλέκονται στην αλληλεπίδραση των φυτών με ενδοφυτικούς μύκητες. Το ψυχανθές *Lotus japonicus*, το οποίο είχε χρησιμοποιηθεί για την ταυτοποίηση των χημικών σημάτων κατά την αλληλεπίδραση του με τους δενδροειδείς μυκορριζικούς μύκητες, ήταν χρήσιμο και στην παρούσα μελέτη για την αποσαφήνιση των συμβάντων που μεσολαβούνται από αυτό το σηματοδοτικό μόριο στη συμβίωση με το μύκητα *Fusarium solani* στέλεχος K.

Από καιρό είναι γνωστό ότι οι στριγγολακτόνες οι οποίες απελευθερώνονται από τις ρίζες στη ριζόσφαιρα είναι γνωστές ως επαγωγείς της βλάστησης των σπόρων για παρασιτικά φυτά όπως το *Striga spp.* και *Orobancha spp.* (Bouwmeester *et al.*, 2007) και σχετικά πρόσφατα, είχε αποκαλυφθεί ο ρόλος τους ως βασικές σηματοδοτικές ενώσεις στην αλληλεπίδραση μεταξύ των φυτών και των δενδροειδών μυκορριζικών μυκήτων (Akiyama *et al.*, 2005). Να σημειωθεί ότι λίγα δεδομένα είναι διαθέσιμα για τις στριγγολακτόνες και άλλους μύκητες εκτός από τους ΔΜΜ. Για αυτό το λόγο, διερευνήθηκε η πιθανή επίδραση της ορμόνης GR24 στη φυσιολογία και στο πρότυπο ανάπτυξης του ενδοφυτικού μύκητα Fs-K. Τα αποτελέσματα που προέκυψαν υποδεικνύουν την πιθανή εμπλοκή των στριγγολακτονών στην ανάπτυξη του μυκηλίου και στην εκβλάστηση των σπόριων του μύκητα ώστε να επιτευχθεί η αλληλεπίδραση του με το ριζικό σύστημα του φυτού.

Αναλυτικότερα, η προσπάθεια να βρεθεί η επίδραση των στριγγολακτονών στην ανάπτυξη του μυκηλίου του μύκητα έδειξε πως το πρότυπο ανάπτυξης του μύκητα επηρεάζεται από τη παρουσία της ορμόνης GR24 στις συγκεντρώσεις 10^{-7} και 10^{-8} Μ. Αξίζει να σημειωθεί ότι οι Xie *et al.*, το 2010, έδειξαν ότι μεταξύ των δευτερογενών μεταβολιτών των φυτών που προάγουν την εκβλάστηση, οι στριγγολακτόνες είναι περισσότερο δραστικές στο εύρος συγκεντρώσεων από 10^{-7} Μ έως 10^{-15} Μ επιβεβαιώνοντας την επίδραση των προαναφερθέντων συγκεντρώσεων στην ανάπτυξη του μύκητα. Σε αντίθεση έρχεται το γεγονός ότι δεν παρατηρήθηκε κάποια αξιοσημείωτη μεταβολή στην ταχύτητα ανάπτυξης του

μύκητα Fs-K στις συγκεντρώσεις που είχε παρατηρηθεί η προαγωγή της ανάπτυξης του μυκηλίου του, εντούτοις οι διαφορές στο πρότυπο αύξησης ήταν μικρές.

Την πιθανή άμεση επίδραση των στριγγολακτονών στην εκβλάστηση των σπορίων του μύκητα Fs-K φανερώνει το γεγονός ότι η εκβλάστηση των κονιδίων ήταν η ίδια στις περιπτώσεις εφαρμογής ή μη της ορμόνης. Η διαφορά εντοπίζεται στο γεγονός ότι η ορμόνη επιβραδύνει με κάποιο τρόπο την εκβλάστηση και την επιμήκυνση των κονιδίων. Αυτή η παρατήρηση είναι αντίθετη με την περίπτωση των δενδροειδών μυκορριζικών μυκήτων, στους οποίους έχει αποδειχθεί ότι οι στριγγολακτόνες είναι γνωστές ως επαγωγείς της εκβλάστησης των σπορίων τους.

Ο προσδιορισμός της βιομάζας του μύκητα Fs-K σε σχέση με τη βιομάζα του φυτού, μπορεί να θεωρηθεί ότι αντικατοπτρίζει την ικανότητα αποικισμού και εξάπλωσης του Fs-K. Αξιοσημείωτο είναι ότι ο αποικισμός του ριζικού συστήματος των φυτών, στα οποία είχε εφαρμοστεί κατάλληλη συγκέντρωση της ορμόνης GR24, δεν μεταβάλλεται σε σχέση με τα φυτά ελέγχου. Μια πιθανή εξήγηση είναι ότι η προσθήκη της ακετόνης ως διαλύτη της ορμόνης δημιούργησε μια κατάσταση μη ευνοϊκή για την είσοδο του μύκητα στον φυτικό ιστό. Κρίνεται έτσι απαραίτητη η επανάληψη του πειράματος με τη χρήση ενός άλλου διαλύτη για την ορμόνη GR24 για τη μελέτη της επίδρασης της στον αποικισμό του μύκητα Fs-K.

Σε κάθε περίπτωση, από τα παραπάνω αποτελέσματα του πειράματος φαίνεται ότι η στριγγολακτόνη GR24 μπορεί να επηρεάσει την ικανότητα αποικισμού των ριζών του ψυχανθούς φυτού *Lotus japonicus* από τον ενδοφυτικό μύκητα Fs-K μέσω της επίδρασης της τόσο στην ανάπτυξη του μυκηλίου όσο και στην εκβλάστηση των κονιδίων του. Είναι ήδη γνωστό ότι η ορμόνη αυτή αποτελεί απαραίτητο σήμα στη διέγερση της έναρξης του μύκητα να αποικίζει το φυτό και στη καθιέρωση της συμβιωτικής σχέσης φυτού- ενδόφυτου.

Περαιτέρω μελέτες σχετικά με τις αλληλεπιδράσεις στριγγολακτονών και μικροοργανισμών στη ριζόσφαιρα μπορεί να αποκαλύψουν τη σημασία των διάφορων συνδυασμών των στριγγολακτονών για την επίτευξη των αλληλεπιδράσεων μεταξύ των φυτών και των γειτονικών παθογόνων ή ωφέλιμων μικροοργανισμών.

ΠΑΡΑΡΤΗΜΑ

½ x MS (MURASHIGE & SKOOG MEDIUM)
- Cat. No.: M0222.0050
- Εταιρία: Duchefa Biochemie
- Προετοιμασία του διαλύματος ½ x MS με άγαρ (0,4% w/v)
- Αποστείρωση διαλύματος για 26 λεπτά στους 121°C

Πίνακας 1: Συστατικά του θρεπτικού μέσου 1/2 x MS.

Σύσταση του θρεπτικού υποστρώματος M	
KI	0.015 g in 20 ml
Ca(NO ₃) ₂ .4H ₂ O	2.88 g/l
NaFeEDTA	0.24 g in 150 ml
Vitamins (keep at -20°C)	
Glycine	0.09 g in 150 ml
Thiamine HCl	0.003 g in 150 ml
Pyridoxine HCl	0.003 g in 150 ml
Nicotinic Acid	0.015 g in 150 ml
Myo-inositol	1.5 g in 150 ml
Macroelements	
MgSO ₄ .7H ₂ O	7.31 g/l
KNO ₃	0.80 g/l
KCl	0.65 g/l
KH ₂ PO ₄	0.048 g/l
Microelements	
MnCl ₂ .4H ₂ O	0.24 g in 5ml
ZnSO ₄ .7H ₂ O	0.118 g in 5ml
H ₃ BO ₃	0.0375 g in 5ml
CuSO ₄ .5H ₂ O	0.033 g in 2.5ml
(NH ₄) ₆ Mo ₇ O ₂₄ .4H ₂ O	0.0058 g in 5ml

Πίνακας 2: Σύσταση του θρεπτικού υποστρώματος M που χρησιμοποιήθηκε για την εναπόθεση των φυτών και τον επακόλουθο εμβολιασμό με τον μύκητα Fs-K.

Θρεπτικό υπόστρωμα water agar
- Προετοιμασία του διαλύματος water agar (1,5% w/v)
- Αποστείρωση διαλύματος για 26 λεπτά στους 121°C

Πίνακας 3: Στοιχεία του θρεπτικού μέσου water agar.

Φίλτρα από υπέρ-λεπτές ίνες γυαλιού	Διηθητικό χαρτί Κυτταρίνης
- Cat. No.: MN GF-6	- Cat. No.: 1001 090
- Εταιρία: Macherey- Nagel	- Εταιρία: Whatman

Πίνακας 4: Στοιχεία των φίλτρων από υπέρ-λεπτές ίνες γυαλιού και των διηθητικών χαρτιών κυτταρίνης που χρησιμοποιήθηκαν για την in vitro δοκιμή.

Αραιώσεις GR24 και αντίστοιχες ποσότητες ακετόνης			
10⁻⁶ M		10⁻⁸ M	
GR24 culture	$C_{\alpha\rho\chi} = 10^{-3} \text{ M}$, $C_{\tau\epsilon\lambda} = 10^{-6} \text{ M}$ $V_{\tau\epsilon\lambda} = 300 \text{ ml}$ τότε $V_{\alpha\rho\chi} = 300 \mu\text{l}$	GR24 culture	$C_{\alpha\rho\chi} = 10^{-5} \text{ M}$, $C_{\tau\epsilon\lambda} = 10^{-8} \text{ M}$ $V_{\tau\epsilon\lambda} = 300 \text{ ml}$ τότε $V_{\alpha\rho\chi} = 300 \mu\text{l}$
Acetone culture	10 μl ακετόνη σε 990 μl ddH ₂ O(st) $C_{\alpha\rho\chi} = 10^{-3} \text{ M}$, $C_{\tau\epsilon\lambda} = 10^{-6} \text{ M}$ $V_{\tau\epsilon\lambda} = 300 \text{ ml}$ τότε $V_{\alpha\rho\chi} = 300 \mu\text{l}$	Acetone culture	10 μl ακετόνη σε 990 μl ddH ₂ O(st) $C_{\alpha\rho\chi} = 10^{-5} \text{ M}$, $C_{\tau\epsilon\lambda} = 10^{-8} \text{ M}$ $V_{\tau\epsilon\lambda} = 300 \text{ ml}$ τότε $V_{\alpha\rho\chi} = 300 \mu\text{l}$

Πίνακας 5: Αραιώσεις της ορμόνης GR24 και οι αντίστοιχες ποσότητες ακετόνης που χρησιμοποιήθηκαν για την παρασκευή των τρυβλίων.

Potato Dextrose Broth (PDB),	
Πατάτες καθαρισμένες	400 g σε 1000 ml
Σουκρόζη	20 g σε 1000 ml
Για τρυβλία (PDA), προσθήκη άγαρ	17 g σε 1000 ml
Αποστείρωση διαλύματος για 26 λεπτά στους 121°C	

Πίνακας 6: Σύσταση των θρεπτικών μέσων PDB και PDA που χρησιμοποιήθηκαν για την ανάπτυξη του μύκητα Fs-K.

Θρεπτικό μέσο LB	
NaCl (BioChemica, Cat. No.: 6B011130)	10 g/l
Bacteriological Peptone (Lab M, Cat. No.: MC024)	10 g/l
Yeast Extract (Lab M, Cat. No.: MC001)	5 g/l
Για τρυβλία, προσθήκη άγαρ (1,5% w/v)	
Αποστείρωση διαλύματος για 26 λεπτά στους 121°C	

Πίνακας 7: Σύσταση του θρεπτικού μέσου LB που χρησιμοποιήθηκε για την ανάπτυξη βακτηρίων.

BIBΛΙΟΓΡΑΦΙΑ

- Φυσιολογία φυτών**, Lincoln Taiz & Eduardo Zeiger, Εκδόσεις Utopia, 2013.
- Biology**, Raven P. and Johnson G., published McGraw-Hill, 2002.
- Lotus japonicus Handbook**, Márquez A.J., published Springer, 2005.
- The Fusarium Laboratory Manual**, Leslie J. and Summerell B., publishing Blackwell, 2002.
- Akiyama K. and Hayashi H. 2006.** Strigolactones: Chemical Signals for Fungal Symbionts and Parasitic Weeds in Plant Roots. *Annals of Botany*. **97**: 925-931.
- Akiyama K, Matsuzaki K. Hayashi H. 2005.** Plant sesquiterpenes induce hyphal branching in arbuscular mycorrhizal fungi. *Nature* **435**: 824–827.
- Alves-Santos FM, Benito EP, Eslava AP, Díaz-Mínguez JM. 1999.** Genetic diversity of *Fusarium oxysporum* strains from common bean fields in Spain. *Appl Environ Microbiol* **65**: 3335–3340.
- Arite T., Iwata H., Ohshima K., Maekawa M., Nakajima M., Kojima M., Sakakibara H., Kyojuka J., 2007.** DWARF10, an RMS1/MAX4/DAD1 ortholog, controls lateral bud outgrowth in rice. *Plant Journal* **51**: 1019- 1029.
- Arnold AE, Lutzoni F. 2007.** Diversity and host range of foliar fungal endophytes: are tropical leaves biodiversity hotspots? *Ecology* **88**:541–549.
- Baayen RP. 1988.** Responses related to lignification and intravascular periderm formation in carnations resistant to Fusarium wilt. *Can J Bot* **66**:784–792.
- Beckman CH, Mueller WC, Tessier BJ, Harrison NA. 1982.** Recognition and callose deposition in response to vascular infection in Fusarium wilt-resistant or susceptible tomato plants. *Physiol Plant Pathol* **20**:1–10.
- Besserer A., Puech- Pagés V., Kiefer P., Gomez- Roldan V., Jauneau A., Roy S., Portais J.C., Roux C., Bécard G. and Séjalon- Delmas N. 2006.** Strigolactones stimulate Arbuscular Mycorrhizal Fungi by activating mitochondria. *PLoS Biol.***4**: 1239- 1247.
- Bischoff JF, White JF Jr 2005.** Evolutionary development of the Clavicipitaceae. In: Dighton J, White JF, Oudemans P, eds. *The fungal community: Its organization and role in the ecosystem*. Boca Raton, FL, USA: Taylor & Francis, 505–518.
- Boisson M., Gomord V., Audran C., Berger N., Dubreucq B., Granier F., Lerouge P., Faye L., Caboche M., and Lepiniec L. 2001.** Arabidopsis glucosidase I mutants reveal a critical role of N-glycan trimming in seed development. *EMBO J.* **20**: 1010–1019.
- Bouwmeester HJ, Matusova R, Zhongkui S, Beale MH. 2003.** Secondary metabolite signalling in host-parasitic plant interactions. *Current Opinion in Plant Biology* **6**: 358–364.
- Bouwmeester H.J., Roux C., López-Ráez J.A., Bécard G., 2007.** Rhizosphere communication of plants, parasitic plants and AM fungi. *Trends in Plant Science* **12**: 224-230.

- Boyle C., Götz M., Dammann-Tugend U. & Schulz B. 2001.** Endophyte- host interactions III. Local vs. systemic colonization. *Symbiosis* **31**: 259- 281.
- Bu Q, Lv T, Shen H, Luong P, Wang J, et al. 2014.** Regulation of drought tolerance by the F-box protein MAX2 in Arabidopsis. *Plant Physiol.* **164**:424–39.
- Buee M, Rossignol M, Jauneau A, Ranjeva R, Bécard G. 2000.** The pre-symbiotic growth of arbuscular mycorrhizal fungi is induced by a branching factor partially purified from plant root exudates. *Molecular Plant-Microbe Interactions.* **13**: 693–698.
- Challis RJ, Hepworth J, Mouchel C, Waites R, Leyser O. 2013.** A role for *MORE AXILLARY GROWTH1 (MAX1)* in evolutionary diversity in strigolactone signaling upstream of *MAX2*. *Plant Physiol.* **161**: 1885–902.
- Chang D.C., Grant G.B., O'Donnell K., Wannemuehler K.A., Nobel-Wang J., Rao C.Y., Jacobson L.M., Crowell C.S., Sneed R.S., Lewis F.M.T., Schaffzin J.K., Kainer M.A., Genese C.A., Alfonso E.C., Jones D.B., Srinivasan A., Fridkin S.K. and Park, B.J. 2006.** A multistate outbreak of *Fusarium keratitis* associated with use of a new contact lens solution. *J. Am. Med. Assoc.* **296**: 953–963.
- Clay K. 1988.** Fungal endophytes of grasses: a defensive mutualism between plants and fungi. *Ecology* **69**: 10–16.
- Cook CE, Whichard LP, Turner B, Wall ME, Egley GH. 1966.** Germination of witchweed (*Striga lutea* Lour.): isolation and properties of a potent stimulant. *Science* **154**: 1189–1190.
- Davis D. J., Wergin W. P., Dusbabek K. E., 1977.** Effects of organic solvents on growth and ultrastructure of plant cell suspensions. *Pesticide Biochemistry and Physiology.* **8**: 84- 97.
- Deising H.B., Werner S. and Wernitz M. 2000.** The role of fungal appressoria in plant infection. *Microbes Infect.* **2**, 1631–1641.
- Dor E., Joel M. D., Kapulnik Y., Koltai H., Hershenhorn J. 2011a.** The synthetic strigolactone GR24 influences the growth pattern of phytopathogenic fungi. *Planta* **234**: 419-427.
- Dor E, Yoneyama K, Winger S, Kapulnik Y, Yoneyama K, Koltai H, Xie X, Hershenhorn J 2011b.** Strigolactone deficiency confers resistance in tomato line SL-ORT1 to the parasitic weeds *Phelipanche* spp. and *Orobanche* spp. *Phytopathology* **101**:213–222
- Doyle J.J., Doyle J.L., 1987.** A rapid DNA isolation procedure for small quantities of fresh leaf tissue. *Phytochemical Bulletin.* **19**: 11-15.
- Duijff BJ, Pouhair D, Olivain C, Alabouvette C, Lemanceau P. 1998 .** Implication of systemic induced resistance in the suppression of *Fusarium* wilt of tomato by *Pseudomonas fluorescens* WCS417r and by non-pathogenic *Fusarium oxysporum* Fo47. *European Journal of Plant Pathology* **104**: 903 –910.
- Faeth SH, Gardner DR, Hayes CJ, Jani A, Wittlinger SK, Jones TA. 2006.** Temporal and spatial variation in alkaloid levels in *Achnatherum robustum*, a native grass infected with the endophyte *Neotyphodium*. *Journal of Chemical Ecology* **32**: 307–324.

Faeth SH, Sullivan TJ. 2003. Mutualistic, asexual endophytes in a native grass are usually parasitic. *American Naturalist* **161**: 310–325.

Fiely MB, Correll JC, Morelock TE. 1995. Vegetative compatibility, pathogenicity, and virulence diversity of *Fusarium oxysporum* recovered from spinach. *Plant Dis* **79**:990–993.

Franche C., Lindström K. and Elmerich C. 2009. Nitrogen-fixing bacteria associated with leguminous and non-leguminous plants. *Plant Soil*. **321**: 35-59.

Frischmuth K, Samson E, Kranz A, Welzel P, Meuer H, Sheldrick WS. 1991. Routes to derivatives of strigol (the witchweed germination factor) modified in the 5-position. *Tetrahedron* **47**: 9793–9806.

Fuchs J-G, Moëgne-Loccoz Y, Défago G. 1999. Ability of non-pathogenic *Fusarium oxysporum* Fo47 to protect tomato against *Fusarium* wilt. *Biological Control* **14**: 105 –110.

García E., Alonso A., Platas G., and Sacristan S. 2013. The endophytic mycobiota of *Arabidopsis thaliana*. *Fungal Divers.* **60**: 71–89.

Gómez-Roldán V., Fermas S., Brewer P.B., Puech-Pagès V., Dun E.A., Pillot J.-P., Letisse F., Matusova R., Danoun S., Portais J.-C., Bouwmeester H., Bécard G., Beveridge C.A., Rameau C., Rochange S.F., 2008. Strigolactone inhibition of shoot branching. *Nature* **455**: 189-194.

Harrison MJ. 2005. Signaling in the arbuscular mycorrhizal symbiosis. *Annual Review of Microbiology* **59**: 19–42.

Hauck C, Müller S, Schildknecht H. 1992. A germination stimulant for parasitic flowering plants from *Sorghum bicolor*, a genuine host plant. *Journal of Plant Physiology* **139**: 474–478.

Hayward A., Stirnberg P., Beveridge C., Leyser O., 2009. Interactions between auxin and strigolactone in shoot branching control. *Plant Physiology* **151**: 400- 412.

Himura K., Gerlach N., Sacristán S., Bucher M., J. O' Connell R., Schulze- Lefert P. 2016. Root Endophyte *Colletotrichum tofieldiae* Confers Plant Fitness Benefits that Are Phosphate Status Dependent. *Cell* **165**, 1–11.

Kavroulakis N, Ehalotis C, Ntougias S, Zervakis GI, Papadopoulou KK. 2005. Local and systemic resistance against fungal pathogens of tomato plants elicited by a compost deriving from agricultural residues. *Physiological and Molecular Plant Pathology* **66**: 163–174.

Kavroulakis N, Ntougias S, Zervakis GI, Ehalotis C. , Haralampidis K., Papadopoulou KK 2007. Role of ethylene in the protection of tomato plants against soil-borne fungal pathogens conferred by an endophytic *Fusarium solani* strain. *Journal of Experimental Botany* **14**: 3853–3864.

Lauressergues D, Andre O, Peng J, Wen J, Chen R, et al. 2014. Strigolactones contribute to shoot elongation and to the formation of leaf margin serrations in *Medicago truncatula* R108. *J. Exp. Bot.* **66**:1237–44

- López-Ráez J. A., Shirasu K. and Foo E. 2017.** Strigolactones in Plant Interactions with Beneficial and Dentrimental Organisms: The Yin and Yang. *Cell*. **6**: 527- 537.
- Mabrouk Y., Zourgui L., Sifi, B., Belhadj O., 2007a.** The potential of Rhizobium strains for biological control of Orobanche crenata. *Biologia* **62**: 139-143.
- Mabrouk Y., Zourgui L., Sifi B., Delavault P., Simier P., Belhadj O., 2007b.** Some compatible Rhizobium leguminosarum strains in peas decrease infections when parasitised by Orobanche crenata. *Weed Research* **47**: 44-53.
- Maciá-Vicente G. J., Jansson H-B., Lopez-Llorca V. L. 2009.** Assessing fungal root colonization for plant improvement. *Plant Signaling and Behaviour*. **4**: 445- 447.
- Matusova R, Rani K, Verstappen FW, Franssen MC, Beale MH, Bouwmeester HJ. 2005.** The strigolactone germination stimulants of the plant-parasitic Striga and Orobanche spp. are derived from the carotenoid pathway. *Plant Physiology* **139**: 920–934.
- Muhammed M., Anagnostou T., Desalermos A., Kourkoumpetis T.K., Carneiro H.A., Glavis-Bloom J., Coleman J.J. and Mylonakis E. 2013.** Fusarium infection: report of 26 cases and review of 97 cases from the literature. *Medicine (Baltimore)*, **92**: 305–316.
- Nagahashi G. & Douds D. D. 2000.** Partial separation of root exudate compounds and their effects upon the growth of germinated spores of AM fungi. *Mycol. Res.* **104**: 1453–1464.
- Nalim F.A., Samuels G.J., Wijesundera R.L. and Geiser D.M. 2011.** New species from the Fusarium solani species complex derived from perithecia and soil in the Old World tropics. *Mycologia*, **103**: 1302–1330.
- Nilsson R.H., Hyde K.D., Pawłowska J. et al. 2014.** Improving ITS sequence data for identification of plant pathogenic fungi. *Fungal Diversity* **67**: 11-19.
- O’Donnell K. 2000.** Molecular phylogeny of the Nectria haematococca–Fusarium solani species complex. *Mycologia*, **92**: 919–938.
- O’Donnell K., Sutton D.A., Fothergill A., McCarthy D., Rinaldi M.G., Brandt M.E., Zhang N. and Geiser D.M. 2008.** Molecular phylogenetic diversity, multilocus haplotype nomenclature, and in vitro antifungal resistance within the Fusarium solani species complex. *J. Clin. Microbiol.* **46**: 2477–2490
- O’Donnell, K., Rooney, A. P., Proctor, R. H., Brown, D. W., McCormick, S. P., Ward, T. J., Frandsen, R. J. N., Lysoe, E., Rehner, S. A., Aoki, T., Robert, V. A. R. G., Crous, P. W., Kang, S., and Geiser, D. M. 2013.** RPB1 and RPB2 phylogeny supports an early Cretaceous origin and a strongly supported clade comprising all agriculturally and medically important fusaria. *Fungal Genet. Biol.*
- Ohara T., I. Inoue, Namiki F., Kunoh H., Tsouge T., 2004.** REN1 is required for development of microconidia and macroconidia, but not of chlamydospores, in the plant pathogenic fungus *Fusarium oxysporum*. *Genetics* **166**: 113-124.

- Olivain C, Alabouvette C. 1999.** Process of tomato root colonization by a pathogenic strain of *Fusarium oxysporum* f. sp. *lycopersici* in comparison with a non-pathogenic strain. *New Phytol* **141**:497–510.
- Olivain C, Trouvelot S, Binet MN, Cordier C, Pugin A, Alabouvette C. 2003.** Colonization of flax roots and early physiological responses of flax cells inoculated with pathogenic and nonpathogenic strains of *Fusarium oxysporum*. *Appl Environ Microbiol* **69**:5453–5462.
- Peškan- Berghöfer T., Shahollari B., Huong Giong P., Hehl S., Markert C., Blanke V., Kost G., Varma A., Oelmüller R. 2004.** Association of *Piriformospora indica* with *Arabidopsis thaliana* roots represents a novel system to study beneficial plant- microbe interactions and involves early plant protein modifications in the endoplasmatic reticulum and at the plasma membrane. *Physiologia Plantarum* **122** (4): 465-477.
- Peters NK, Varma DPS. 1990.** Phenolic compounds as regulators of gene expression in plant-microbe interactions. *Molecular Plant-Microbe Interactions*. **3**: 4–8
- Petrini O., 1991.** Fungal endophytes of tree leaves. In: Andrews, J.H., Hirano, S.S. (Eds.), *Microbial Ecology of Leaves*. Springer Verlag, New York, pp. 179– 197.
- Rai M., Acharya D., Singh A., Varma A. 2001.** Positive growth responses of the medicinal plants *Spilanthes calva* and *Withania somnifera* to inoculation by *Piriformospora indica* in a field trial. *Mycorrhiza* **11**: 123- 128.
- Rodriguez R. J., White J. F., Arnold A. E. and Redman R. S. 2009.** Fungal endophytes: diversity and functional roles. *New phytologist*. 1-17.
- Roger AJ, Sandblom O., Doolittle WF., Philippe H. 1999.** An evaluation of elongation factor 1 alpha as a phylogenetic marker for eukaryotes. *Mol Bio Evol*. **16**: 218-233.
- Ruyter-Spira C., Al-Babili S, Bouwmeester H. 2013.** The Biology of Strigolactones. *Cell*. 2:72-83.
- Saikkonen K, Helander M, Faeth SH, Schulthess F, Wilson D. 1999.** Endophyte-grass-herbivore interactions: the case of *Neotyphodium endophytes* in Arizona fescue populations. *Oecologia* **121**: 411–420.
- Scaffidi A, Waters MT, Ghisalberti EL, Dixon KW, Flematti GR, Smith SM. 2013.** Carlacton-independent seedling morphogenesis in *Arabidopsis*. *Plant J*. **76**:1–9
- Smith SM, Waters MT, 2012.** Strigolactones: destruction-dependent perception? *Curr. Biol*. **22**: 924–27
- Soundappan I, Bennett T, Morffy N, Liang Y, Stanga JP, et al. 2015.** SMAX1-LIKE/D53 family members enable distinct MAX2-dependent responses to strigolactones and karrikins in *Arabidopsis*. *Plant Cell* **27**:3143–59
- Stoner MF. 1981.** Ecology of *Fusarium* in noncultivated soils. In Nelson PE, Toussoun TA, Cook RJ. (ed), *Fusarium: diseases, biology, and taxonomy*. The Pennsylvania State University, University Park, p 276–286.

- Tan, R. X. & Zou, W. X. 2001.** Endophytes: a rich source of functional metabolites. *Natural Products Rep.* **18**: 448- 459
- Umehara M., Hanada A., Yoshida S., Akiyama K., Arite T., Takeda-Kamiya N., Magome H., Kamiya Y., Shirasu K., Yoneyama K., Kyojuka J., Yamaguchi S., 2008.** Inhibition of shoot branching by new terpenoid plant hormones. *Nature* **455**: 195-200.
- Varma A., Verma S., Sudha, Sahay N., Bütchorn B., Franken P., 1999.** *Piriformospora indica*, a Cultivable Plant-Growth-Promoting Root Endophyte. *Applied and Environmental Microbiology* **65** (6): 2741- 2744
- Waters M., Gutjahr C., Bennett T. and Nelson D. 2017.** Strigolactone Signaling and Evolution. *Annual Review of Plant Biology.* **68**: 8.1-8.31.
- Wollenweber H. W. and Reinking A.. 1935.** Die Fusarien, Paul Parey, Berlin.
- Whelan A. J., Russel B. N., Whelan A. M. 2003.** A method for the absolute quantification of cDNA using real-time PCR. *Journal of Immunological Methods* **278**: 261– 269.
- Wicklow D.T., Roth, S., Deyrup S.T., Gloer, J.B., 2005.** A protective endophyte of maize: *Acremonium zeae* antibiotics inhibitory to *Aspergillus flavus* and *Fusarium verticillioides*. *Mycological Research* **109**, 610–618.
- Westwood JH. 2000.** Characterization of the Orobanche-Arabidopsis system for studying parasite-host interactions. *Weed. Science* **48**: 742–748.
- Wilson D. 1995.** Endophyte: the evolution of a term, and clarification of its use and definition. *Oikos* **73**:274–76
- Xie X.N., Yoneyama K. and Yoneyama K. 2010.** The strigolactone story. *Annu. Rev. Phytopathol.* **48**: 93–117.
- Yadav V., Kumar M., Deep D.K., Kumar H., Sharma R., Tripathi T., Tuteja N., Saxena A.K., and Johri A.K. 2010.** A phosphate transporter from the root endophytic fungus *Piriformospora indica* plays a role in phosphate transport to the host plant. *J. Biol. Chem.* **285**: 26532–26544.
- Yokota T, Sakai H, Okuno K, Yoneyama K, Takeuchi Y. 1998.** Alectrol and orobanchol, germination stimulants for *Orobanche minor*, from its host red clover. *Phytochemistry* **49**: 1967–1973.
- Zhang N., O'Donnell K., Sutton D.A., Nalim F.A., Summerbell R.C., Padhye A.A. and Geiser D.M. 2006.** Members of the *Fusarium solani* species complex that cause infections in humans and plants are common in the environment. *J. Clin. Microbiol.* **44**: 2186–2190.