



ΠΑΝΕΠΙΣΤΗΜΙΟ ΘΕΣΣΑΛΙΑΣ

ΣΧΟΛΗ ΕΠΙΣΤΗΜΩΝ ΥΓΕΙΑΣ ΤΜΗΜΑ ΒΙΟΧΗΜΕΙΑΣ &
ΒΙΟΤΕΧΝΟΛΟΓΙΑΣ

ΔΙΠΛΩΜΑΤΙΚΗ ΕΡΓΑΣΙΑ

Η επίδραση του ενδοφυτικού μύκητα *Fusarium solani* στέλεχος K (FsK) στην απόκριση του φυτού *Lotus japonicus* σε αβιοτική καταπόνηση

Σεργίου Αντώνης

Λάρισα 2020

Thesis

Effect of the endophytic fungus *Fusarium solani* stain K (FsK) on the response of *Lotus japonicus*
to abiotic stress conditions

ΣΥΜΒΟΥΛΕΥΤΙΚΗ & ΕΞΕΤΑΣΤΙΚΗ ΕΠΙΤΡΟΠΗ

1. **Παπαδοπούλου Καλλιόπη**, Αναπληρώτρια Καθηγήτρια Βιοτεχνολογίας Φυτών, Τμήμα Βιοχημείας και Βιοτεχνολογίας, Πανεπιστήμιο Θεσσαλίας
2. **Καρπούζας Δημήτριος**, Καθηγητής Περιβαλλοντικής Μικροβιολογίας και Βιοτεχνολογίας, Τμήμα Βιοχημείας και Βιοτεχνολογίας, Πανεπιστήμιο Θεσσαλίας
3. **Τσίκου Δανιέλα**, Επίκουρος Καθηγήτρια Μοριακής και Αναπτυξιακής Βιολογίας Φυτών, Τμήμα Βιοχημείας και Βιοτεχνολογίας, Πανεπιστήμιο Θεσσαλίας

ΕΥΧΑΡΙΣΤΙΕΣ

Αρχικά θα ήθελα να ευχαριστήσω την επιβλέπουσα καθηγήτρια για τη πτυχιακή μου κυρία Καλλιόπη Παπαδοπούλου, για την ευκαιρία που μου έδωσε να συμμετέχω στο εργαστήριο και να μπορέσω να ολοκληρώσω την πτυχιακή μου σε μια δύσκολη περίοδο, λόγω της πανδημίας του COVID-19.

Ευχαριστώ επίσης την υποψήφια διδάκτορα Μαριάννα Αβραμίδου για την βοήθεια και την καθοδήγηση στην πραγματοποίηση όλων των πειραμάτων, καθώς και όλα τα μέλη του εργαστηρίου βιοτεχνολογίας φυτών και περιβάλλοντος για τη βοήθεια και την αγαστή συνεργασία.

Τέλος, ευχαριστώ τους γονείς μου για την υποστήριξη, ώστε να ολοκληρώσω τον πρώτο κύκλο σπουδών μου.

Περιεχόμενα

Περίληψη/Abstract.....	9
1.Εισαγωγή.....	10
1.1Φυτά: Lotus japonicus.....	10
1.2Άμυνα φυτών στην αβιοτική καταπόνηση.....	11
1.3Μύκητες	11
1.4 Ενδοφυτικοί μύκητες.....	13
1.5 <i>Fusarium Solani</i>	13
1.51 <i>FsK</i>	14
2. Υλικά και μέθοδοι.....	15
2.1 Προετοιμασία υποστρώματος.....	15
2.2 Συνθήκες ανάπτυξης φυτών.....	16
2.2.1 Αβιοτική καταπόνηση λόγω υψηλής θερμοκρασίας/ ψύχους	17
2.2.2 Αβιοτική καταπόνηση λόγω έλλειψης σιδήρου.....	20
2.2.3 Αβιοτική καταπόνηση λόγω οξειδωτικής καταπόνησης- Diquat	22
2.3 Συνθήκες ανάπτυξης μυκητιακών στελεχών	23
2.4 Συλλογή κωνιδίων	24
2.5 Μέτρηση κωνιδίων.....	25
2.6 Δειγματοληψία.....	27
2.7Απομόνωση γονιδιωματικού DNA	29
2.8 Ποσοτικοποίηση DNA	29
2.9 Ανίχνευση αποικισμού από τον μύκητα <i>F. solani</i> στις ρίζες του φυτού <i>Lotus japonicus</i>	30
2.10 Θρεπτικά μέσα.....	32
2.10.1. Potato dextrose Broth/ Potato dextrose Agar PDB/PDA.....	32
2.10.2. Θρεπτικό Hoagland.....	33
2.10.3 Θρεπτικό M-medium.....	33

3. Αποτελέσματα.....	28
3.1.1 Αβιοτική καταπόνηση λόγω υψηλής θερμοκρασίας/ ψύχους	28
3.1.2 Αβιοτική καταπόνηση λόγω έλλειψης σιδήρου	42
3.1.3 Αβιοτική καταπόνηση λόγω οξειδωτικής καταπόνησης- Diquat	48
3.2 Απομόνωση-Ποσοτικοποίηση DNA.....	53
3.3 Ανίχνευση αποικισμού από τον μύκητα <i>F. solani</i> στις ρίζες του φυτού <i>Lotus japonicus</i>	53
3.3.1 Αβιοτική καταπόνηση λόγω υψηλής θερμοκρασίας/ ψύχους.....	53
3.3.2 Αβιοτική καταπόνηση λόγω έλλειψης σιδήρου	57
3.3.3 Αβιοτική καταπόνηση λόγω οξειδωτικής καταπόνησης- Diquat	58
4. Συζήτηση	60
5. Βιβλιογραφικές Παραπομπές.....	61

Εικόνες:

Εικόνα 1: Φυτά <i>Lotus japonicus</i> κατά τη δειγματοληψία Fe stress 44dpi.....	8
Εικόνα 2: Δομή Βασιδιομύκητα.....	10
Εικόνα 3: Κωνίδια του μύκητα <i>FsK</i> στο οπτικό μικροσκόπιο.....	11
Εικόνα 4: Συστατικά υποστρώματος.....	12
Εικόνα 5: Φυτά <i>Lotus japonicus</i> σε γλαστράκι magenta.....	13
Εικόνα 6: φωτογραφία φύλλου <i>Lotus japonicus</i> με πιθανή ένδειξη έλλειψης Fe κατα τη διαδικασία της δειγματοληψίας του πειράματος Fe stress 44dpi.....	17
Εικόνα 7: Δομή του μύκητα <i>Fusarium solani strain K, (FsK)</i>	19
Εικόνα 8: Απεικόνιση πλάκας Neubauer.....	22
Εικόνα 9: Παρασκευή Potato dextrose Broth και Potato dextrose Agar.....	23
Εικόνα 10: Δειγματοληψία Fe stress 44dpi.....	47

Σχήματα:

Σχήμα 1: Αραιώσεις για τη μέτρηση κωνιδίων του <i>FsK</i>	22
Σχήμα 2: Υπολογισμός συγκέντρωσης στην πλακα Neubauer.....	23

Γραφήματα:

Αποτελέσματα δειγματοληψίας Αβιοτικής καταπόνησης λόγω θερμοκρασίας: Γραφήματα: 1-24.....	30-42
Αποτελέσματα δειγματοληψίας Αβιοτικής καταπόνησης λόγω έλλειψης σιδήρου: Γραφήματα: 25-34.....	43-48
Αποτελέσματα δειγματοληψίας Αβιοτικής καταπόνησης λόγω οξειδωτικής καταπόνησης: Γραφήματα: 35-43.....	50-54

Περίληψη

Τα φυτά ζουν σε συνεχώς μεταβαλλόμενα περιβάλλοντα στα οποία επικρατούν συχνά συνθήκες δυσμενείς για αύξηση και ανάπτυξη. Αυτές οι δυσμενείς περιβαλλοντικές συνθήκες περιλαμβάνουν τη βιοτική καταπόνηση, όπως η μόλυνση από παθογόνα και η επίθεση από φυτοφάγα ζώα και την αβιοτική καταπόνηση, όπως η ξηρασία, η ζέστη, το κρύο, η έλλειψη θρεπτικών ουσιών. Η αβιοτική καταπόνηση ορίζεται ως περιβαλλοντικές συνθήκες που μειώνουν την ανάπτυξη και την απόδοση κάτω από τα βέλτιστα επίπεδα. Οι απαντήσεις των φυτών στις αβιοτικές καταπονήσεις είναι δυναμικές και πολύπλοκες. Το στέλεχος K (FsK) του *Fusarium solani* είναι ένας ευεργετικός ενδοφυτικός μύκητας, απομονωμένος από ιστούς ριζών φυτών τομάτας που είχαν αναπτυχθεί σε ένα κατασταλτικό σε παθογόνα κομποστ. Ο FsK είναι σε θέση να αποικίζει τους ιστούς των ριζών και να προστατεύει τα φυτά από τα παθογόνα των ριζών και των φυλλωμάτων. Για την καλύτερη κατανόηση του ευεργετικού αποτελέσματος του FsK και του μοριακού μηχανισμού σε αβιοτική καταπόνηση, επιλέγεται το μοντέλο *Lotus japonicus* αφού είναι ένας πολύ γνωστός ξενιστής για τους συμβιωτικούς ριζικούς μικροοργανισμούς. Σε αυτή την εργασία ελέγχθηκε η επίδραση του FsK στο φυτό *Lotus japonicus* σε τρεις καταστάσεις αβιοτικής καταπόνησης: υψηλή θερμοκρασία /ψύχος, έλλειψη σιδήρου και οξειδωτική καταπόνηση.

Abstract

Plants live in constantly changing environments that are often unfavorable or stressful for growth and development. Fundamentally, plants require energy (light), water, carbon and mineral nutrients for growth. These adverse environmental conditions include biotic stress, such as pathogen infection and herbivore attack, and abiotic stress, such as drought, heat, cold, nutrient deficiency. Abiotic stress is defined as environmental conditions that reduce growth and yield below optimum levels. Plant responses to abiotic stresses are dynamic and complex. *Fusarium solani* strain K (FsK) is a root beneficial endophyte, isolated from root tissues of tomato plants grown on a pathogen-suppressive compost. FsK is able to colonize root tissues and protect plants against root and foliar pathogens. To better understand the beneficial effect of FsK and the molecular mechanism, the model legume *Lotus japonicus* is selected, since it is a well-known host for symbiotic root-microbes. This study tested the effect of FsK on abiotic stress: Cold / heat stress, Fe stress and Diquat stress.

1.Εισαγωγή

1.1Φυτά: Το φυτό *Lotus japonicus*

Ως φυτικό υλικό για τη διεξαγωγή των πειραμάτων που αφορούν αβιοτική καταπόνηση χρησιμοποιήθηκε το ψυχανθές *Lotus japonicus*. Το *L. japonicus* ανήκει στην τάξη Leguminosae και την οικογένεια των Fabaceae (ψυχανθών). Το γένος *Lotus* αποτελείται από περισσότερα από 200 είδη, με πιθανό κέντρο εξάπλωσης τη λεκάνη της Μεσογείου, όπου και απαντάται η μεγαλύτερη ποικιλία ειδών. Τα τελευταία χρόνια το διπλοειδές είδος *L. japonicus* χρησιμοποιείται ευρύτατα ως φυτικό μοντέλο για τη μελέτη της συμβιωτικής σχέσης ψυχανθών-ριζοβίων λόγω αρκετών πλεονεκτημάτων που εμφανίζει, όπως το μικρό του μέγεθος και ο σχετικά μικρός κύκλος ζωής, η αυτογονιμότητα, το μικρό μέγεθος του γενώματος και η σχετικά εύκολη δημιουργία διαγονιδιακών φυτών.



Εικόνα 1: Φυτά *Lotus japonicus* κατά τη δειγματοληψία Fe stress 44dpi

1.2 Άμυνα φυτών στην αβιοτική καταπόνηση

Τα χερσαία φυτά αναπτύσσονται σε περιβάλλοντα στα οποία επικρατούν συχνά συνθήκες καταπόνησης. Μια μεγάλη ποικιλία φυσικών ή χημικών παραγόντων επηρεάζουν την αύξηση και ανάπτυξη των φυτών, μεταξύ αυτών, η χαμηλή ή υψηλή θερμοκρασία, ανεπαρκής ή υπερβολική κατανάλωση νερού, υψηλή αλατότητα, βαριά μέταλλα και υπεριώδης ακτινοβολία (UV). Αυτές οι πιέσεις, αναφερόμενες ως αβιοτικές καταπονήσεις, αποτελούν σοβαρή απειλή για τη γεωργία και το οικοσύστημα, γεγονός που υποδηλώνει μεγάλη απώλεια παραγωγής (Wania et al., 2016). Τα φυτά ανέπτυξαν διάφορους και πολύπλοκους μηχανισμούς απόκρισης σε καταπόνηση, οι οποίοι ενορχηστρώνονται από ένα πολύπλοκο ρυθμιστικό δίκτυο, που περιλαμβάνει σηματοδοτικά μόρια συμπεριλαμβανομένων των ορμονών καταπόνησης π.χ., αποπτωτικό οξύ (ABA), αιθυλένιο, ενεργές μορφές οξυγόνου (ROS), υδρόθειο (H₂S), μονοξειδίου του αζώτου (NO), φυτοχρώματα και ασβέστιο (Ca²⁺), καθώς και άλλους παράγοντες ρύθμισης της γονιδιακής έκφρασης. (Mei He et al., 2018)

1.3 Μύκητες

Οι μύκητες είναι ευκαρυωτικοί μονοκύτταροι ή πολυκύτταροι μικροοργανισμοί, κάποιοι από τους οποίους μοιάζουν με φυτά, όμως δεν είναι ικανοί να φωτοσυνθέτουν (Ζίφα Α. et al 2011). Οι οργανισμοί αυτοί ταξινομούνται στο βασίλειο των μυκήτων το οποίο περιέχει περίπου 120.000 αναγνωρισμένα είδη, εάν και εκτιμάται ότι υπάρχουν περισσότερα. Στους μύκητες ανήκουν οργανισμοί όπως είναι τα μανιτάρια, οι τρούφες, οι ζύμες και οι μούχλες (Hawksworth et al, 2017). Το Βασίλειο των μυκήτων διαχωρίζεται σε επτά φύλα :

- 1) Βασιδιομύκητες (Basidiomycota)
- 2) Ασκομύκητες (Ascomycota)
- 3) Χυτριομύκητες (Chytridiomycota)
- 4) Μικροσπορίδια (Microsporidia)
- 5) Γκλομερομύκητες (Glomeromycota)
- 6) Βλαστοκλαδιομύκητες (Blastocladiomycota)
- 7) Νεοκαλλιμαστιγομύκητες (Neocallimastigomycota)

Στην πλειοψηφία τους, οι μύκητες απαρτίζονται από λεπτά διαπλεκόμενα νημάτια γνωστά και ως υφές με το κάθε νημάτιο να αποτελείται από κύτταρα με διαχωριστικά τοιχώματα (septa) μεταξύ τους. Μέσω των πόρων που υπάρχουν σε αυτά τα τοιχώματα επιτυγχάνεται η μεταφορά θρεπτικών και κυτταροπλάσματος μεταξύ των κυττάρων, γεγονός που οδηγεί στην ταχεία ανάπτυξη των μυκήτων κάτω από τις κατάλληλες συνθήκες. Το σύνολο των νηματίων αποτελεί το σώμα του μύκητα, γνωστό και ως μυκήλιο. Πάνω στο μυκήλιο ορισμένων μυκήτων αναπτύσσονται αναπαραγωγικές δομές αποτελούμενες από νημάτια. Παραδείγματα τέτοιων δομών είναι τα μανιτάρια και οι τρούφες. Το κυτταρικό τοίχωμα των μυκήτων σχηματίζεται από πολυσακχαρίτες και χιτίνη, όχι όμως κυτταρίνη όπως στα φυτά.

Οι μύκητες είναι ετερότροφοι οργανισμοί που μπορούν να προσλαμβάνουν τα θρεπτικά τους με τους εξής τρόπους. Οι σαπροφυτικοί μύκητες αποδομούν νεκρή οργανική ύλη, όπως είναι το ξύλο, χαρτί, δέρμα κ.τ.λ., μέσω της έκκρισης πεπτικών ενζύμων και στη συνέχεια χρησιμοποιούν το

δίκτυο των νηματίων τους για να απορροφήσουν τα θρεπτικά συστατικά. Οι παρασιτικοί μύκητες λαμβάνουν τα θρεπτικά τους από ζωντανούς οργανισμούς-ξενιστές, είτε μέσω των νηματίων τους είτε μέσω δομών όπως είναι οι μυζητήρες.

Οι μύκητες μπορούν να αναπαραχθούν με δυο τρόπους, την αγενή και την εγγενή αναπαραγωγή. Οι περισσότεροι είναι ικανοί να αναπαραχθούν και με τους δυο τρόπους. Η κυριότερη αναπαραγωγική μονάδα των μυκήτων είναι το σπόριο, που παράγεται σε ειδικά όργανα τόσο στην εγγενή αναπαραγωγή (εγγενή σπόρια) όσο και στην αγενή αναπαραγωγή (κωνίδια). Η αγενής αναπαραγωγή πραγματοποιείται μέσω εκβλαστημάτων είτε συνηθέστερα μέσω παραγωγής σπορίων (Ζίφα Α. et al 2011).



Εικόνα 2: Δομή Βασιδιομύκητα

1.4 Ενδοφυτικοί μύκητες

Οι μύκητες που χαρακτηρίζονται ως ενδόφυτα συμμετέχουν με ασυμπτωματικές συμβιώσεις με τον ξενιστή (πιθανώς ουδέτερες ή αμοιβαίας ωφέλειας). Το φυτό παρέχει τον απαραίτητο άνθρακα για την ανάπτυξη του μύκητα, ενώ ο μύκητας παρέχει συνήθως προστασία στον ξενιστή του απέναντι σε θηρευτές (π.χ με την παραγωγή αλκαλοειδών και άλλων τοξικών ουσιών). Αθροιστικά, περισσότερα από 100 χρόνια έρευνας δείχνουν ότι τα πιο πολλά, αν όχι όλα τα φυτά σε φυσικά οικοσυστήματα συμβιώνουν με δενδρόμορφους ενδομυκορριζικούς μύκητες (Petrini 1986). Απολιθωμάτα δείχνουν ότι τα φυτά συμβιώνουν με τους ενδοφυτικούς μύκητες για εκατομμύρια χρόνια και πιθανώς αυτό να συνέβη όταν τα φυτά αποίκισαν την ξηρά, με αποτέλεσμα να διαδραματίσουν σημαντικό ρόλο στην προώθηση της εξέλιξης της ζωής (Krings et al. 2007).

1.5 Το γένος *Fusarium*

Το γένος *Fusarium* αποτελείται από φυτοπαθογόνους και σαπροφυτικούς μύκητες ικανούς να μεταβολίζουν διάφορα υποστρώματα και παθογόνους παράγοντες κλινικής σημασίας. Η μοριακή φυλογενετική ανάλυση αυτού του γένους έχει αποκαλύψει ότι περιλαμβάνει τουλάχιστον 20 «σύμπλοκα ειδών» και προέρχεται από τη μεσαία Κρητιδική περίοδο περίπου 91,3 εκατομμύρια χρόνια πριν (O'Donnell et al., 2013). Το *Fusarium* είναι ένα μεγάλο, σύνθετο γένος που προκαλεί μεγάλη ποικιλία φυτικών ασθενειών. Παράγει μια σειρά μυκοτοξινών και αναγνωρίζεται όλο και περισσότερο ως σημαντικό ανθρώπινο παθογόνο (Summerell et al., 2010). Το σύμπλεγμα ειδών *Fusarium solani* (FSSC) είναι μια ομάδα που σήμερα εκτιμάται ότι περιέχει τουλάχιστον 60 φυλογενετικά διαφορετικά είδη. Πέραν του ότι είναι παθογόνα φυτών, τα μέλη της FSSC είναι υπεύθυνα για την πλειοψηφία των συστηματικών λοιμώξεων σε ανοσοκατεσταλμένους ανθρώπους και ζώα. Σε ανοσολογικά ικανά άτομα, οι ασθένειες που προκαλούνται από στελέχη FSSC μπορεί να εκδηλωθούν ως τοπικές, λιγότερο επεμβατικές λοιμώξεις, συμπεριλαμβανομένων των αποστημάτων, της ονχομυκητίασης και της κερατίτιδας (Coleman, 2016).

1.5.1 FsK

Το *Fusarium solani* στέλεχος K γνωστό και με την συντομογραφία FsK είναι ένα ενδοφυτικό, μη παθογόνο στέλεχος, το οποίο είχε απομονωθεί προηγουμένως από ρίζες φυτών τομάτας που είχαν αναπτυχθεί σε ένα συγκεκριμένο compost (Kavroulakis et al., 2007). Αρχικά παρατηρήθηκε ότι τα φυτά που μεγάλωναν σε αυτό το υπόστρωμα είχαν αυξημένη προστασία έναντι σε παθογόνα του εδάφους και του φυλλώματος, ενώ αργότερα βρέθηκε ότι υπαίτιος για αυτήν την προστασία ήταν ο FsK (Kavroulakis, et al., 2005; 2006). Ειδικά για το *L. japonicus* βρέθηκε ότι τα φυτά μπόρεσαν να ολοκληρώσουν τον κύκλο ζωής τους, ακόμη και εάν δεν παρατηρήθηκε κάποιο φανερά ευεργετικό αποτέλεσμα στην ανάπτυξη τους κάτω από φυσιολογικές συνθήκες, ενώ παράλληλα φάνηκε ότι ο FsK είναι ικανός να αποικίσει και το υπέργειο τμήμα του φυτού (Skiada et al., 2019). Ο FsK συμβάλλει και στην προστασία του φυτού από αβιοτική καταπόνηση και πιο συγκεκριμένα κατά την διάρκεια συνθήκων ξηρασίας. Υπάρχουν ενδείξεις ότι ο μύκητας μειώνει το κλείσιμο των στομάτων, ως απόκριση στις συνθήκες ξηρασίας, και πιθανώς προκαλεί αύξηση στην ποσότητα νερού που προσλαμβάνεται από τις ρίζες, με αποτέλεσμα να αποτρέπει την μείωση του ρυθμού φωτοσύνθεσης και την ελαχιστοποίηση της απώλειας νερού (Kavroulakis et al., 2018)



Εικόνα 3: Κωνίδια του μύκητα FsK στο οπτικό μικροσκόπιο

2. Υλικά και μέθοδοι

2.1 Προετοιμασία υποστρώματος

Για το υπόστρωμα ανάπτυξης των φυτών χρησιμοποιήθηκε μείγμα άμμου και βερμικουλίτη. Έγινε ανάμειξη χοντρόκοκκης και λεπτόκοκκης άμμου σε αναλογία 2:1. Στη συνέχεια έγινε ανάμειξη του μείγματος της άμμου με βερμικουλίτη σε αναλογία 2:1. Ο βερμικουλίτης είχε πρώτα πλυθεί με νερό και κοσκινιστεί για να απομακρυνθούν τυχόν προσμίξεις. Μετά την ανάμειξη το μείγμα τοποθετήθηκε σε φούρνο για ξήρανση στους 100°C για 48 ώρες. Ακολούθως έγινε μεταφορά του μείγματος σε διπλή θερμοανθεκτική σακούλα για αποστείρωση στους 121°C για 30 λεπτά. Τέλος το μείγμα χωρίστηκε σε γλάστρακια ή δοχεία mangenta (περίπου 270gr σε κάθε ένα) για τις ανάγκες του πειράματος.

Παράδειγμα:

Για την προετοιμασία 100 γλαστρών:

44 γλαστράκια χοντρόκοκκη άμμο

22 γλαστράκια λεπτόκοκκη άμμο

33 γλαστράκια βερμικουλίτη



Εικόνα 4: Συστατικά υποστρώματος.

Από αριστερά προς τα δεξιά βερμικουλίτης, χοντρόκοκκη και λεπτόκοκκη άμμος

2.2 Συνθήκες ανάπτυξης φυτών

Σπόροι του φυτού *Lotus japonicus* (60 σπόροι για κάθε κατάσταση αβιοτικής καταπόνησης, περίπου 700 σπόροι) τοποθετήθηκαν σε erpendorfs και μεταφέρθηκαν σε θάλαμο κάθετης νηματικής ροής όπου εμβαπτίστηκαν σε πυκνό διάλυμα θειικού οξέος(1 ml σε κάθε erpendorf) για 15 λεπτά με σκοπό τη διάσπαση του εξωτερικού σκληρού περιβλήματος. Στη συνέχεια ακολούθησαν τρεις διαδοχικές εκπλύσεις με παγωμένο ddH₂O και στη συνέχεια τα σποράκια τοποθετήθηκαν σε διάλυμα BUF I (NaOCl 20% + Tween 20 0,1%) υπο συνεχή ανάδευση για 20 λεπτά ώστε να γίνει επιφανειακή απολύμανση. Ακολούθως έγιναν 5-6 διαδοχικές εκπλύσεις με ddH₂O. Τέλος, αφού προστέθηκε 1 ml ddH₂O στο καθένα, τα Erpendorf καλύφθηκαν με αλουμινόχαρτο και τοποθετήθηκαν στους 4^oC για 48 ώρες. Στη συνέχεια τα σποράκια μεταφέρθηκαν σε θάλαμο κάθετης νηματικής ροής και τοποθετήθηκαν σε τρυβλία με water agar (0,8%) . Τα τρυβλία σφραγίστηκαν με parafilm, καλύφθηκαν με αλουμινόχαρτο και τοποθετήθηκαν στο σκοτάδι για 72 ώρες. Ακολούθως τα τρυβλία ξεσκεπάστηκαν (1^η μέρα για τα φυτά) και τοποθετήθηκαν στο θάλαμο ανάπτυξης (16h φως/ 8h σκοτάδι/ 25^oC, για 7 μέρες.) Την έβδομη μέρα τα φυτά μεταφέρθηκαν σε γλαστράκια ή magenta που περιείχαν περίπου 270gr υποστρώματος το οποίο προηγουμένως είχε ποτιστεί με 25 ml ddH₂O. Σε κάθε γλαστράκι φυτεύτηκαν 3 φυτά με τη βοήθεια αποστειρωμένης λαβίδας. Για κάθε συνθήκη έχουμε 5 βιολογικές επαναλήψεις. Τα γλαστράκια ή magenta τοποθετήθηκαν στον θάλαμο ανάπτυξης όπου ποτίζονταν ανά 2-3 ημέρες με απιονισμένο νερό εναλλάξ με θρεπτικό Hoagland για το πείραμα με το Diquat. Για το πείραμα καταπόνησης στη θερμοκρασία τα φυτά ποτίζονταν με απιονισμένο νερό εναλλάξ με θρεπτικό M-medium, ενώ για το πείραμα με το σίδηρο χρησιμοποιήθηκε Hoagland χωρίς σίδηρο εναλλάξ με νερό.



Εικόνα 5: Φυτά *Lotus japonicus* σε γλαστράκι magenta

2.2.1 Αβιοτική καταπόνηση λόγω υψηλής θερμοκρασίας/ ψύχους

Την έβδομη μέρα για τα φυτά, 400 εκβλαστημένοι σπόροι μεταφέρθηκαν σε 20 γλαστράκια με το μείγμα άμμου {2:1, 2(Χοντρή λεπτή άμμος):1(βερμικουλίτης)} και τοποθετήθηκαν στον θάλαμο ανάπτυξης (16h φως/ 8h σκοτάδι/ 25⁰C). Μετά απο 48 ώρες (9 ημερών φυτά) εμβολιάστηκαν με 100 κωνίδια μύκητα (FsK). Η τελική συγκέντρωση ήταν 5x10³ κωνίδια/ml, έτσι χρησιμοποιήθηκαν 20 μl από την υγρή καλλιέργεια μύκητα για κάθε φυτό. Μετά από 5 μέρες (14η μέρα) τα φυτά εκτέθηκαν σε περιβάλλον ζέστης 37 °C (heat) και ψύχους 4 °C (cold) για 48 ώρες. Την 16^η μέρα για τα φυτά (7dpi) και 29η (15 dpi) έγιναν δειγματοληψίες. Η προετοιμασία των φυτών περιγράφεται στους παρακάτω πίνακες:

Πίνακας 1: Αβιοτική καταπόνηση λόγω υψηλής θερμοκρασίας

7dpi	
heat stress	5* +M-medium (+/- FsK)= 10 γλαστράκια* 3 φυτά = 30 φυτά
	5*+dH2O (+/- FsK)= 10 γλαστράκια* 3 φυτά = 30 φυτά
no stress	3* +M-medium (+/- FsK)= γλαστράκια*3 φυτά=9 φυτά
	3* +dH2O (+/- FsK)= γλαστράκια*3 φυτά=9 φυτά
15dpi	
heat stress	5*+M-medium (+/- FsK)= 10 γλαστράκια* 3 φυτά = 30 φυτά
	5*+dH2O (+/-FsK)= 10 γλαστράκια* 3 φυτά = 30 φυτά
no stress	3* +M-medium (+/-FsK)= γλαστράκια*3 φυτά=9 φυτά
	3* +dH2O (+/-FsK)= γλαστράκια*3 φυτά=9 φυτά

Πίνακας 2: Αβιοτική καταπόνηση λόγω ψύχους

7dpi	
cold stress	5* +M-medium (+/- FsK)= 10 γλαστρακιά* 3 φυτά = 30 φυτά
	5*+dH2O (+/- FsK)= 10 γλαστρακιά* 3 φυτά = 30 φυτά
no stress	3* +M-medium (+/- FsK)= γλαστρακιά*3 φυτά=9 φυτά
	3* +dH2O (+/- FsK)= γλαστρακιά*3 φυτά=9 φυτά
15dpi	
cold stress	5*+M-medium (+/- FsK)= 10 γλαστρακιά* 3 φυτά = 30 φυτά
	5*+dH2O (+/-FsK)= 10 γλαστρακιά* 3 φυτά = 30 φυτά
no stress	3* +M-medium (+/-FsK)= γλαστρακιά*3 φυτά=9 φυτά
	3* +dH2O (+/-FsK)= γλαστρακιά*3 φυτά=9 φυτά

Άρα 5 magenta + M-medium, 5 magenta + dH2O και 6 magenta χωρίς καταπόνηση (3 για M-medium και 3 για dH2O) *4 φορές (2 δειγματολογίες και παρουσία απουσία FsK) = **64 magenta** άρα και περίπου **200** φυτά. Αυτά για μια πειραματική συνθήκη-ένα καταπόνηση *2 για να πραγματοποιήσω heat/cold. = 400 φυτά

Η πειραματική διαδικασία περιγράφεται αναλυτικά σύμφωνα με τον παρακάτω πίνακα:

Πίνακας 3: Διαδικασία

Ημέρα	Διαδικασία
1	Προετοιμασία και αποστείρωση 400 σπόρων σύμφωνα με τη διαδικασία 2.2
3	Μεταφορά σπόρων σε τρυβλία με .8% water agar για ανάπτυξη (η μεταφορά στο Laminar) και επωασμός στο σκοτάδι (τρυβλία καλυμένα με αλουμινόχαρτο)για 72 ώρες
6	Τα τρυβλία ξεσκεπάζονται από το αλουμινόχαρτο. Τα φυτά μεταφέρονται στο θάλαμο ανάπτυξης (16h φως/ 8h σκοτάδι/ 25 ⁰ C). Ημέρα 1 για τα φυτά
7	1) Προετοιμασία μείγματος άμμου σύμφωνα με τη διαδικασία 2.1 2) Προετοιμασία υγρής καλλιέργειας μύκητα (στο laminar) και επωασμός για 5 ημέρες σύμφωνα με τη διαδικασία 2.3 Ημέρα 2 για τα φυτά

Πίνακας 3: Διαδικασία

Ημέρα	Διαδικασία
12	1)Συλλογή κωνιδίων στο laminar, διαδικασία 2.5 2)Υπολογισμός της συγκέντρωσης σε πλάκα Newbouer σύμφωνα με τη διαδικασία 2.6. 3)400 εκβλαστημένοι σπόροι μεταφέρθηκαν ανα τρεις σε 40 γλαστράκια με το μείγμα άμμου Ημέρα 7 για τα φυτά
14	Επιμόλυνση με FsK Ημέρα 9 για τα φυτά
19	Έκθεση των φυτών σε σε περιβάλλον ζέστης 37 °C και ψύχους 4 °C για 48 ώρες (σε θάλαμο ανάπτυξης). Ημέρα 14 για τα φυτά
21	Πρώτη δειγματοληψία σύμφωνα με τη διαδικασία 2.7 Ημέρα 16 για τα φυτά (7dpi)
29	Δεύτερη δειγματοληψία σύμφωνα με τη διαδικασία 2.7 Ημέρα 22 για τα φυτά (15dpi)

Στη Δειγματοληψία ελέγχθηκαν ο αποικισμός της ρίζας από τον FsK (με qPCR), το μήκος της ρίζας, το βάρος της ρίζας και το βάρος των φύλλων.

2.2.2 Αβιοτική καταπόνηση λόγω έλλειψης σιδήρου

Σε αυτό το πείραμα χρησιμοποιήθηκαν 120 εκβλαστημένοι σπόροι οι οποίοι τοποθετήθηκαν ανα τρεις σε δοχεία mangenta με το μείγμα άμμου {2:1, 2(Χοντρή λεπτή άμμος):1(βερμικουλίτης)}. Στη συνέχεια τα δοχεία mangenta μεταφέρθηκαν στον θάλαμο ανάπτυξης (16h φως/ 8h σκοτάδι/ 25⁰C). Σε κάθε δειγματοληψία υπήρχαν 20 βιολογικές επαναλήψεις, (5 inoculated/+Fe, 5 inoculated/-Fe and 5 non-inoculated/+Fe, 5 non-inoculated/-Fe). Η δειγματοληψίες έγιναν την 17η και 44η μέρα. **Τα φυτά χωρίς σίδηρο ποτίζονταν με Hogland χωρίς σίδηρο εναλλάξ με νερό.**

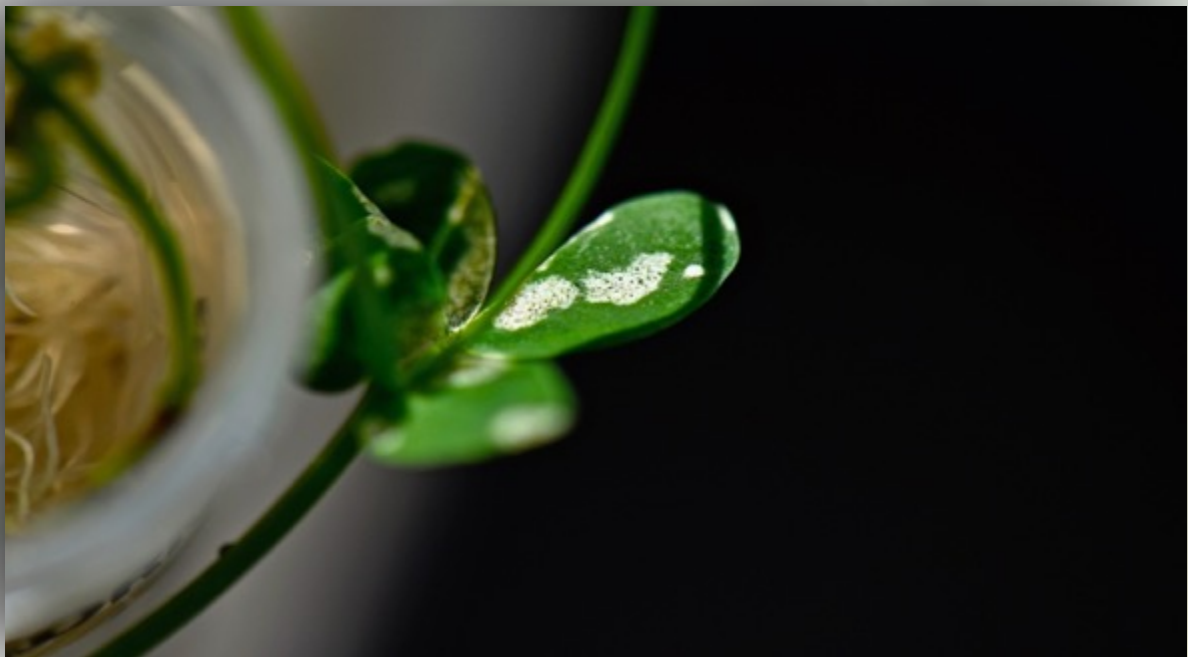
Η πειραματική διαδικασία περιγράφεται αναλυτικά σύμφωνα με τον παρακάτω πίνακα:

Πίνακας 4: Διαδικασία

Ημέρα	Διαδικασία
1	Προετοιμασία και αποστείρωση 120 σπόρων σύμφωνα με τη διαδικασία 2.2
3	Μεταφορά σπόρων σε τρυβλία με .8% water agar για ανάπτυξη (η μεταφορά στο Laminar) και επωασμός στο σκοτάδι (τρυβλία καλυμμένα με αλουμινόχαρτο)για 72 ώρες

Πίνακας 4: Διαδικασία

Ημέρα	Διαδικασία
6	Τα τρυβλία ξεσκεπάζονται από το αλουμινόχαρτο. Τα φυτά μεταφέρονται στο θάλαμο ανάπτυξης (16h φως/ 8h σκοτάδι/ 25 ⁰ C). Ημέρα 1 για τα φυτά
7	1) Προετοιμασία μείγματος άμμου σύμφωνα με τη διαδικασία 2.1 2) Προετοιμασία υγρής καλλιέργειας μύκητα (στο laminar) και επωασμός για 5 ημέρες σύμφωνα με τη διαδικασία 2.3 Ημέρα 2 για τα φυτά
12	1) Συλογή κωνιδίων στο laminar, διαδικασία 2.5 2) Υπολογισμός της συγκέντρωσης σε πλάκα Newbouer σύμφωνα με τη διαδικασία 2.6. 3) οι εκβλαστημένοι σπόροι μεταφέρθηκαν ανα τρεις σε 40 γλαστράκια με το μείγμα άμμου, αφού πρώτα το μείγμα βρέχθηκε με 35ml M-medium. Ημέρα 7 για τα φυτά
14	Επιμόλυνση με FsK Ημέρα 9 για τα φυτά
31	Πρώτη δειγματοληψία (60 φυτά) σύμφωνα με τη διαδικασία 2.7 Ημέρα 26 για τα φυτά (17dpi)
58	Δευτερη δειγματοληψία (60 φυτά) σύμφωνα με τη διαδικασία 2.7 Ημέρα 53 για τα φυτά (44dpi)



Εικόνα 6: φωτογραφία φύλλου *Lotus japonicus* με πιθανή ένδειξη έλλειψης Fe κατά τη διαδικασία της δειγματοληψίας του πειράματος Fe stress 44dpi.

2.2.3 Αβιοτική καταπόνηση λόγω οξειδωτικής καταπόνησης- Diquat

Σε αυτό το πείραμα με χρησιμοποιήθηκαν 40 magenta από 3 φυτά το καθένα. Τριάντα γλαστράκια για τρεις διαφορετικές συγκεντρώσεις Diquat 50nM , 100nM, 150nM παρουσία απουσία FsK και δέκα γλαστράκια no stress αντίστοιχα. Δεκαπέντε ημερών φυτά εμβολιάστηκαν με τον μύκητα FsK. Την 7^η μέρα μετά τον εμβολιασμό τα φυτά ποτίστηκαν με 1ml διαλύματος Diquat(50nM , 100nM, 150nM). Έξι μέρες αργότερα πραγματοποιήθηκε η δειγματοληψία, (χωρίς να ποτίσω τα φυτά).

Η πειραματική διαδικασία περιγράφεται αναλυτικά σύμφωνα με τον παρακάτω πίνακα:

Πίνακας 5: Διαδικασία

Ημέρα	Διαδικασία
1	Προετοιμασία και αποστείρωση 120 σπόρων σύμφωνα με τη διαδικασία 2.2
3	Μεταφορά σπόρων σε τρυβλία με .8% water agar για ανάπτυξη (η μεταφορά στο Lamīnar) και επωασμός στο σκοτάδι (τρυβλία καλυμμένα με αλουμινόχαρτο)για 72 ώρες
6	Τα τρυβλία ξεσκεπάζονται από το αλουμινόχαρτο. Τα φυτά μεταφέρονται στο θάλαμο ανάπτυξης (16h φως/ 8h σκοτάδι/ 25 ⁰ C). Ημέρα 1 για τα φυτά
7	1)Προετοιμασία μείγματος άμμου σύμφωνα με τη διαδικασία 2.1 2) Προετοιμασία υγρής καλλιέργειας μύκητα (στο lamīnar) και επωασμός για 5 ημέρες σύμφωνα με τη διαδικασία 2.3 Ημέρα 2 για τα φυτά
12	1)Συλλογή κωνιδίων στο lamīnar, διαδικασία 2.5 2)Υπολογισμός της συγκέντρωσης σε πλάκα Neubauer σύμφωνα με τη διαδικασία 2.6. 3)οι εκβλαστημένοι σπόροι μεταφέρθηκαν ανα τρεις σε 40 δοχεία magenta με το μείγμα άμμου,. Ημέρα 7 για τα φυτά
20	Επιμόλυνση με FsK Ημέρα 15 για τα φυτά
26	Δειγματοληψία σύμφωνα με τη διαδικασία 2.7 Ημέρα 21 για τα φυτά(6dpi)

2.3 Συνθήκες ανάπτυξης μυκητιακών στελεχών

Το στέλεχος FsK του μύκητα *Fusarium solani* καλλιεργήθηκε σε στερεές καλλιέργειες PDA (potato dextrose agar). Για την καλλιέργεια του μύκητα έγινε προετοιμασία του θρεπτικού υλικού PDB (Potato Dextrose Broth) σύμφωνα με την συνταγή 2.10.1. Στη συνέχεια έγινε η μεταφορά ενός τμήματος από τις στερεές καλλιέργειες του μύκητα σε αποστειρωμένες γυάλινες φιάσκες των 250ml που περιείχαν 100ml PDB με την βοήθεια ενός νυστεριού (η διαδικασία έγινε σε θάλαμο κάθετης νηματικής ροής). Αυτή η μεταφορά έγινε σε θάλαμο νηματικής ροής σε στείρες συνθήκες ώστε να αποφευχθούν τυχόν επιμολύνσεις της καλλιέργειας. Οι φιάσκες που περιείχαν τα στελέχη του μύκητα καλύφθηκαν με αλουμινόχαρτο και αφού σφραγίστηκαν με πάραφιλμ μεταφέρθηκαν σε έναν επωαστήρα (25°C, 160rpm) για 5 ημέρες, για την ανάπτυξη του μύκητα.



Εικόνα 7: Δομή του μύκητα *Fusarium solani strain K*, (FsK).

2.5 Συλλογή κωνιδίων

Υλικά:

- 1) Υγρή καλλιέργεια FsK
- 2) Διάλυμα NaCl 0,85%
- 3) 2 Φλάσκες των 250 ml
- 4) γυάλινο χωνί
- 5) 2 falcon 50 ml
- 6) τουλουπάνι
- 7) νυστέρι
- 8) λαβίδα

Όλα τα εργαλεία που χρησιμοποιήθηκαν για την συλλογή των κωνιδίων αποστειρώθηκαν ώστε να αποφευχθεί η πιθανότητα επιμόλυνσης.

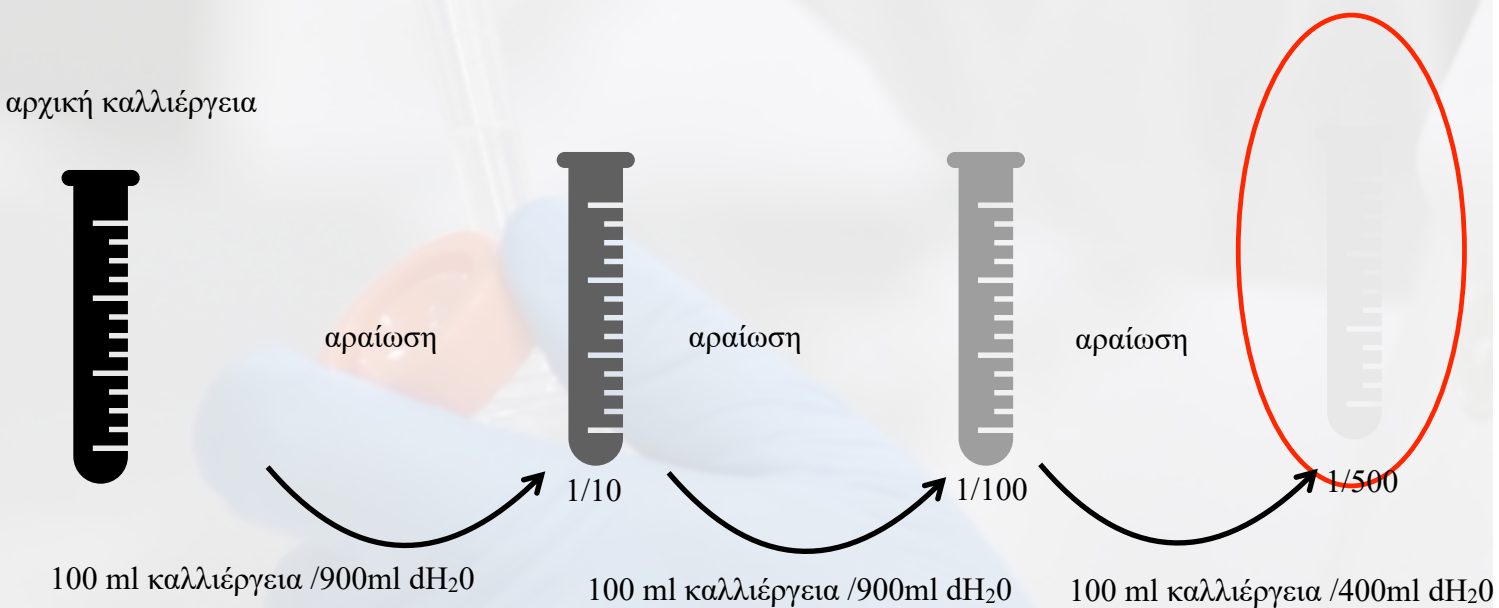
Διαδικασία: Μετά απο 5 μέρες στον επωαστήρα, οι 2 φλάσκες μεταφέρθηκαν σε θάλαμο κάθετης νηματικής ροής, ώστε να γίνει η συλλογή των κωνιδίων. Το laminar ψεκάστηκε με διάλυμα 70% αιθανόλη και ακτινοβολήθηκε με λάμπες UV για 15 λεπτά πριν την διαδικασία. Για την συλλογή κωνιδίων τοποθετήθηκε ένα γυάλινο χωνί πάνω σε ένα falcon των 50 ml, ενώ το γυάλινο χωνί ήταν καλυμμένο με ένα διπλωμένο φύλλο τουλουπάνι. Στην συνέχεια έγινε μεταφορά της υγρής καλλιέργειας του μύκητα από την φλάσκα στο χωνί, μέχρι το falcon να γεμίσει με την υγρή καλλιέργεια. Αυτή η διαδικασία έγινε και για τις 2 καλλιέργειες του μύκητα. Αφού ολοκληρώθηκε η μεταφορά αφαιρέθηκε το χωνί και αφού έγινε έλεγχος ότι τα δυο falcon είχαν το ίδιο βάρος, ακολούθησε μια φυγοκέντριση για 5 λεπτά στους 16^oC και 6500 rpm. Μετά την φυγοκέντριση έγινε απόρριψη του υπερκειμένου, και μεταφορά τις περισσεύσας υγρής καλλιέργειας του μύκητα με την χρήση του χωνιού στο falcon. Έπειτα ακολούθησε μια δεύτερη φυγοκέντριση στις ίδιες συνθήκες και απόρριψη του υπερκειμένου. Μετά έγινε επαναδιαλυτοποίηση του ιζήματος (κωνίδια FsK) με προσθήκη 5ml διαλύματος NaCl 0,85% w/v.

Τέλος έγινε μια τρίτη φυγοκέντριση, πάντα στις ίδιες συνθήκες απόρριψη του υπερκειμένου και επαναδιαλυτοποίηση του ιζήματος σε 5ml διαλύματος NaCl 0,85% w/v.

2.6 Μέτρηση κωνιδίων

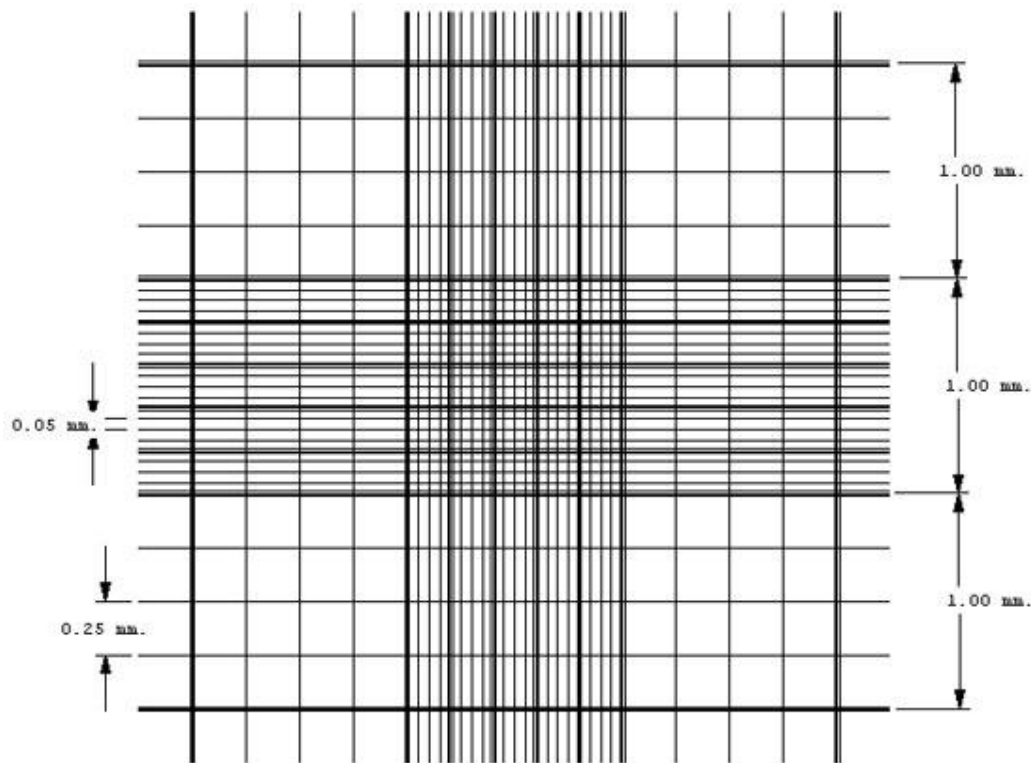
Για την μέτρηση κωνιδίων έγιναν διαδοχικές αραιώσεις του διαλύματος που περιείχε τα κωνίδια 1/10, 1/100, 1/500 και 1/1000. Αρχικά έγινε στον θάλαμο κάθετης νηματικής ροής μεταφορά 500μl από το διάλυμα του κάθε falcon σε ένα 1,5ml erpendorf tube. Έπειτα έγινε η αραιώση 1/10 χρησιμοποιώντας 100μl από το tube και 900μl αποστειρωμένο ddH₂O. Οι υπόλοιπες αραιώσεις έγιναν με παρόμοιο τρόπο χρησιμοποιώντας 900 και 400 μl ddH₂O αντίστοιχα καθώς και 100μl από την προηγούμενη αραιώση.

Έγιναν αραιώσεις σύμφωνα με το παρακάτω σχήμα:



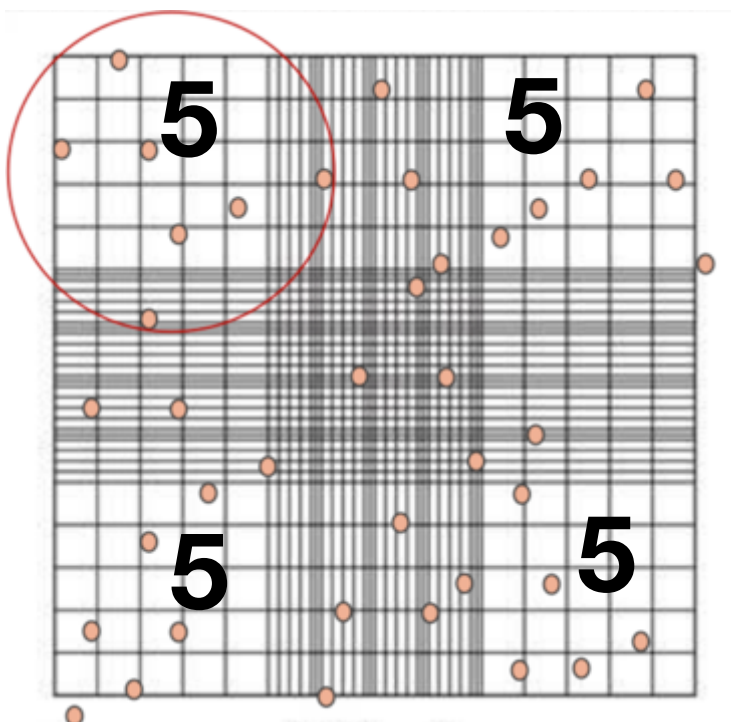
Σχήμα 1: Αραιώσεις για τη μέτρηση κωνιδίων του FsK

Για την μέτρηση των κωνιδίων χρησιμοποιήθηκε η αραιώση 1/500 (Σχήμα1). Η μέτρηση έγινε με την χρήση οπτικού μικροσκοπίου και της πλάκας Neubauer.



Εικόνα 8: Απεικόνιση πλάκας Neubauer

Απο την αραιώση 1/500 μεταφέρθηκαν με πιπέτα στην πλάκα Neubauer 10 μl και μετρήθηκε ο αριθμός των κωνιδίων (υπολογισμός συγκέντρωσης καλλιέργειας) σύμφωνα με το παρακάτω σχήμα:



Βρίσκω το μέσο όρο απο τα τέσσερα τετράγωνα και κάνω αναγωγή στο 1ml.
Για το παράδειγμα:
 $(5+5+5+5)/4 * 10^4 =$

Σχήμα 2: υπολογισμός συγκέντρωσης στην πλάκα Neubauer

Μετά τη μέτρηση έγινεν διαδοχικές αραιώσεις του αρχικού διαλύματος, χρησιμοποιώντας 900 μl διαλύματος NaCl 0,85% και 100μl από την προηγούμενη αραιώση, μέχρι να επιτευχθεί μια αραιώση περίπου 10^3 κωνίδια. Τέλος υπολογίστηκε η ποσότητα του διαλύματος από την αραιώση 10^3 που θα έπρεπε να αραιωθεί ώστε να υπάρχει την επιθυμητή τελική συγκέντρωση, στην προκείμενη περίπτωση 100 κωνίδια ανά ml. Ο εμβολιασμός των φυτών με το μύκητα έγινε απευθείας στην ρίζα μέσω πιπέτας χρησιμοποιώντας 20μl διαλύματος για το κάθε φυτό.

2.7 Δειγματοληψία

Υλικά:

- 1) Falcon 50 ml
- 2) Νυστέρι
- 3) Λαβίδες
- 4) Δηθητικό χαρτί
- 5) dH₂O
- 6) Διάλυμα 1% χλωρίνης
- 7) 2 ποτήρια ζέσεως των 100 ml
- 8) Eppendorf tubes 2ml
- 9) Υγρό άζωτο

Διαδικασία:

Ετοιμάστηκε αριθμός falcon 50 ml με νερό ανάλογος του αριθμού των magenta (γλαστράκια) της κάθε δειγματοληψίας. Δηλαδή για 65 γλαστράκια ετοιμάστηκαν 65 falcon τα οποία αριθμήθηκαν ανάλογα με το δείγμα. Σκοπός ήταν να μην υπάρξει επιμόλυνση μεταξύ δειγμάτων +/- FsK. Στη συνέχεια μεταφέρθηκαν σε ποτήρια ζέσεως 100 ml νερού και 100ml διαλύματος χλωρίνης. Από κάθε γλαστράκι (3 φυτά) αφαιρέθηκε το μείγμα άμμου και προσεκτικά μεταφέρθηκε το κάθε φυτό σε νερό όπου ξεπλύθηκε για να φύγουν τα υπολείματα άμμου από τις ρίζες. Στη συνέχεια τα φυτά μεταφέρθηκαν στο διάλυμα χλωρίνης (μεταφέρθηκαν μόνο τα φυτά που είχαν FsK για ένα λεπτό). Σκοπός να αποστειρωθεί η εξωτερική επιφάνεια της ρίζας ώστε να μπορέσουν να εξαχθούν πληροφορίες στη συνέχεια για τον αποικισμό του εσωτερικού της ρίζας από τον FsK (qPCR). Ακολούθως τα φυτά μεταφέρθηκαν με λαβίδα σε χαρτί για να στεγνώσουν και μετρήθηκε το μήκος της ρίζας. Στη συνέχεια έγινε τομή στο επίπεδο του υποκοτυλίου με νυστέρι και διαχωρίστηκε ο ιστός της ρίζας από τον ιστό των φύλλων. Τα δείγματα τοποθετήθηκαν σε eppendorf tubes και μετρήθηκε το μήκος της ρίζας, ζυγίστηκαν το βάρος των φύλλων και της ρίζας του κάθε φυτού. (για τα πειράματα αβιοτικής καταπόνησης λόγω θερμοκρασίας και οξειδωτικής καταπόνησης λήφθηκαν δεδομένα μόνο για φρέσκο βάρος φύλλων και της ρίζας λόγω μικρής μάζας των φυτών). Τα δείγματα μεταφέρθηκαν άμεσα σε υγρό άζωτο και όταν τελείωσε η διαδικασία αποθηκεύτηκαν στους -80°C. Αυτό διασφάλισε τη μακροπρόθεσμη συντήρηση και διασφάλιση της ποιότητας του ιστού για περαιτέρω ανάλυση.

2.7 Απομόνωση γονιδιωματικού DNA

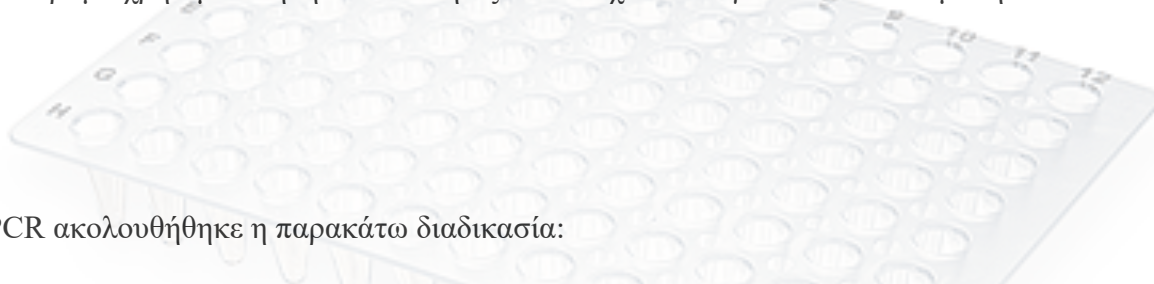
Οι ρίζες των φυτών που είχαν αποθηκευτεί στους -80°C μεταφέρθηκαν σε υγρό άζωτο και στην συνέχεια λειοτριβήθηκαν είτε με τη χρήση αποστειρωμένου γουδιού-γουδοχειριού ή με συσκευή λειοτρίβησης. Το δείγμα που προέκυψε χρησιμοποιήθηκε στην συνέχεια για απομόνωση γονιδιωματικού DNA με τη χρήση της μεθόδου CTAB. Σύμφωνα με τη μέθοδο CTAB, σε λειοτριβημένα δείγματα προστέθηκαν 300μL διαλύματος CTAB, το οποίο έχει προθερμανθεί σε υδατόλουτρο στους 65°C . Ακολούθησε ανάδευση των δειγμάτων και τοποθέτηση τους σε υδατόλουτρο στους 65°C για 15 λεπτά. Έπειτα έγινε προσθήκη 150μL διαλύματος 1:25 ισοαμυλική αλκοόλη: χλωροφόρμιο και ανάδευση με vortex για 30 δευτερόλεπτα. Ακολούθησε φυγοκέντριση των δειγμάτων στα 11.000g για 5 λεπτά και μεταφορά της επάνω φάσης του υπερκειμένου σε νέο σωλήνα erpendorf. Στην συνέχεια έγινε προσθήκη ποσότητας ισοπροπανόλης ίση με 0,7 επί του όγκου του δείγματος, ήπια ανάδευση μέσω ανάστροφης και επώαση σε θερμοκρασία δωματίου για 10 λεπτά. Έπειτα μια δεύτερη φυγοκέντριση στα 11.000g για 15 λεπτά, απόρριψη του υπερκειμένου με την βοήθεια πιπέτας και επαναδύλωση του pellet σε 500μl παγωμένης 70% αιθανόλης. Μια τρίτη φυγοκέντριση στα 11.000g για 5 λεπτά, απόρριψη του υπερκειμένου και στέγνωμα του pellet που περιείχε το DNA σε 50°C για 10 λεπτά. Η επαναδύλωση του pellet έγινε σε 15μl ddH₂O που περιείχε RNase(1μl RNase σε 50μl ddH₂O). Τέλος έγινε ένα ήπιο vortex και quick spin των δειγμάτων και αποθήκευση τους στους -20°C .

2.8 Ποσοτικοποίηση DNA

Το ολικό DNA που απομονώθηκε για κάθε δείγμα ποσοτικοποιήθηκε με τη χρήση της συσκευής Qubit (Invitrogen) σύμφωνα με τις οδηγίες του κατασκευαστή. Η κατεργασία έγινε με το Qubit dsDNA HS Assay kit της Invitrogen και ακολουθήθηκε η παρακάτω διαδικασία: Ανάμειξη 1μl dye και 199μl buffer του kit για κάθε δείγμα σε ένα master mix, τύλιγμα του master mix με αλουμινόχαρτο λόγω φωτοευαισθησίας της χρώσης. Έπειτα προσθήκη 2μl από κάθε δείγμα που περιέχει το DNA και ανάμειξη με το προηγούμενο μείγμα (198μl) για τελικό όγκο 200μl. Επώαση για 2 λεπτά σε θερμοκρασία δωματίου και στην συνέχεια χρήση της συσκευής Qubit για ποσοτικοποίηση του DNA. Χρήση Standard διαλυμάτων (10 μl + 190μl απο το master mix) που περιέχονται στο kit για την δημιουργία πρότυπης καμπύλης.

2.9 Ανίχνευση αποικισμού από τον μύκητα *F. solani* στις ρίζες του φυτού *Lotus japonicus*

Για να επιβεβαιωθεί ότι έγινε αποικισμός στις ρίζες του *Lotus japonicus* από το στέλεχος FsK του μύκητα χρησιμοποιήθηκε το DNA που απομονώθηκε με τη μέθοδο CTAB. Η επιβεβαίωση έγινε μέσω της μεθόδου αλυσιδωτής αντίδρασης πολυμεράσης πραγματικού χρόνου (Real Time PCR). Σε αυτό το πείραμα χρησιμοποιήθηκαν εκκινητές που στόχευαν το γονίδιο ITS του μύκητα.



Για την qPCR ακολουθήθηκε η παρακάτω διαδικασία:

Για κάθε δείγμα απαιτούνται 5μl Mix SYBR 0,2μl από τον κάθε εκκινητή (F και R) και 3,6μl ddH₂O. Έγινε παρασκευή master mix, το οποίο περιείχε όλα τα απαραίτητα αντιδραστήρια σε ποσότητα αρκετή για το κάθε δείγμα, για τους δείκτες τις πρότυπης καμπύλης, τα αρνητικά control και για 1 δείγμα επιπλέον ανά 10 δείγματα. Για το κάθε δείγμα χρησιμοποιήθηκαν 2 τεχνικές επαναλήψεις, ενώ για την πρότυπη καμπύλη και τους αρνητικούς μάρτυρες 3 τεχνικές επαναλήψεις. Επομένως σε κάθε αντίδραση προστέθηκαν 1μL δείγματος DNA και 9μl master mix για τελικό όγκο 10μl σε κάθε πηγαδάκι. Στην συνέχεια από τα αποτελέσματα της qPCR υπολογίστηκε ο αριθμός των αντιγράφων του ITS ανα 1ng DNA για το κάθε δείγμα. Η τιμή αυτή χρησιμοποιήθηκε για να προσδιοριστεί η επιτυχία αποικισμού του φυτού από το μύκητα. Το θερμοκρασιακό πρωτόκολλο το οποίο ακολουθήθηκε για την πραγματοποίηση της αντίδρασης qPCR περιείχε το εξής βήματα:

3 λεπτά στους 95^oC επανάληψη για 44 κύκλους των βημάτων, 15 δευτερόλεπτα στους 95^oC για αποδιάταξη και 20 δευτερόλεπτα στους 58^oC για υβριδοποίηση των εκκινητών και επιμήκυνση. Στην συνέχεια μια melting curve analysis, που περιλαμβάνει 5 δευτερόλεπτα στους 58^oC και 5 δευτερόλεπτα στους 90^oC, ώστε να ελεγχθεί η εξειδίκευση των προϊόντων της αντίδρασης.

2.10 Θρεπτικά μέσα

2.10.1. Potato dextrose Broth/ Potato dextrose Agar PDB/PDA

Σε ένα δοχείο που περιείχε ένα 1 λίτρο απιονισμένου νερού προστέθηκαν 400gr από καθαρισμένες πατάτες. Στη συνέχεια το δείγμα θερμάνθηκε και ακολούθησε διήθηση του υγρού με την βοήθεια φύλλου τουλουπάνι και μεταφορά του διηθήματος σε γυάλινο δοχείο, όπου προστέθηκαν 20 gr σουκρόζη καθώς και ποσότητα απιονισμένου νερού μέχρι ο όγκος του διηθήματος να φτάσει το 1 λίτρο. Στην συνέχεια ακολούθησε αποστείρωση του υγρού στους 121°C για 20 λεπτά. Για την παραγωγή στερεού θρεπτικού υλικού ακολουθείται η ίδια διαδικασία με την επιπλέον προσθήκη 15 gr άγαρ σε 1 λίτρο θρεπτικού πριν από την αποστείρωση. Τα υλικά και οι αντίστοιχες ποσότητες που χρησιμοποιήθηκαν αναγράφονται στον παρακάτω πίνακα:

Πίνακας 6: Υλικά για Potato dextrose Broth/Agar	
Πατάτες καθαρισμένες	400gr
Σουκρόζη	20gr
Απιονισμένο νερό	1L
Άγαρ	15gr



Εικόνα 9: Παρασκευή Potato dextrose Broth και Potato dextrose Agar

2.10.2. Θρεπτικό Hoagland +/- Fe

Το θρεπτικό Hoagland χρησιμοποιήθηκε για το πότισμα των φυτών τροφοδοτώντας τα με τα απαραίτητα θρεπτικά για ανάπτυξη. Το θρεπτικό Hoagland χωρίς σίδηρο που χρησιμοποιήθηκε για τις ανάγκες του πειράματος Fe stress έγινε με την ίδια διαδικασία χωρίς προσθήκη FeEDTA. Τα συστατικά που χρησιμοποιήθηκαν αναγράφονται στον παρακάτω πίνακα:

Πίνακας 6: Θρεπτικό Hoagland για 1L		
Διάλυμα	Συγκέντρωση	Όγκος
MgSO ₄ 7H ₂ O	1M	2ml
Ca(NO ₃) ₂ 4H ₂ O	1M	5ml
KNO ₃	1M	5ml
Microelements	-----	1ml
KCl	0,05M	1ml
FeEDTA	0,02M	1ml

Το διάλυμα αραιώθηκε σε ογκομετρικό κύλινδρο μέχρι ο όγκος να φτάσει το 1L.

2.10.3 Θρεπτικό M-medium

Για την Παρασκευή ενός λίτρου Θρεπτικού M-medium χρησιμοποιήθηκαν τα ακόλουθα συστατικά:

Πίνακας 7: Θρεπτικό M-medium για 1L	
Διάλυμα	Όγκος/μάζα
Macroelements	100ml
Ca(NO ₃) ₂ 4H ₂ O 100ml	100ml
NaFeEDTA 5ml	5ml
Vitamins 5ml	5ml
Micronutrients 1ml	1ml
KI 1ml	1ml
Sucrose 10gr	10gr

Στη συνέχεια ελέγχθηκε το pH ώστε να είναι κοντά στο 5,5. (προσθήκη NaOH ή HCl ανάλογα). Το διάλυμα που φτιάχτηκε μεταφέρθηκε σε ογκομετρικό κύλινδρο και προστέθηκε νερό μέχρι ο όγκος να φτάσει το 1L.

3. Αποτελέσματα

Μετά τη δειγματοληψία και για τις 3 διαφορετικές συνθήκες καταπόνησης (Cold/Heat, Fe , Diquat) τα δεδομένα χρησιμοποιήθηκαν για τον υπολογισμό του μέσου όρου για το βάρος της ρίζας του βλαστού και του μήκους της ρίζας. Σε αυτά τα δεδομένα έγινε ανάλυση στατιστικής σημαντικότητας. Η ανάλυση που έγινε με ANOVA test, το οποίο εξέτασε την επίδραση δυο διαφορετικών ανεξάρτητων μεταβλητών. Σε αυτή την περίπτωση κατάσταση ψύχους/ απουσία καταπόνησης παρουσία και απουσία του μύκητα FsK.

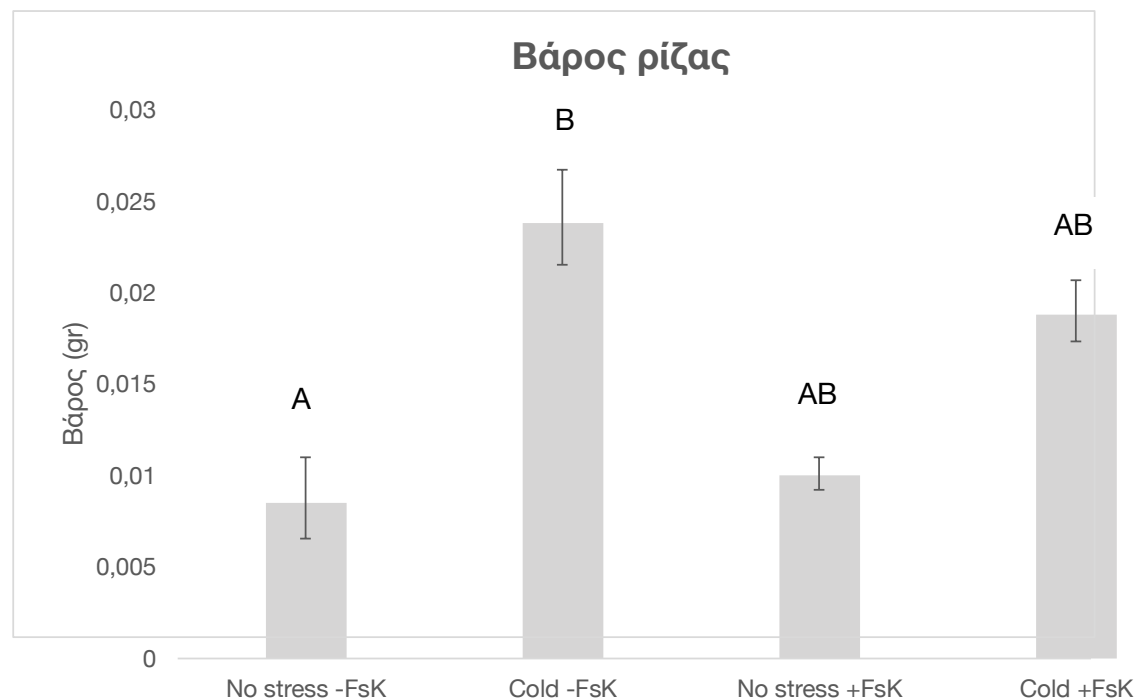
3.1.1 Αβιοτική καταπόνηση λόγω θερμοκρασίας

3.1.1.1 Αβιοτική καταπόνηση λόγω ψύχους

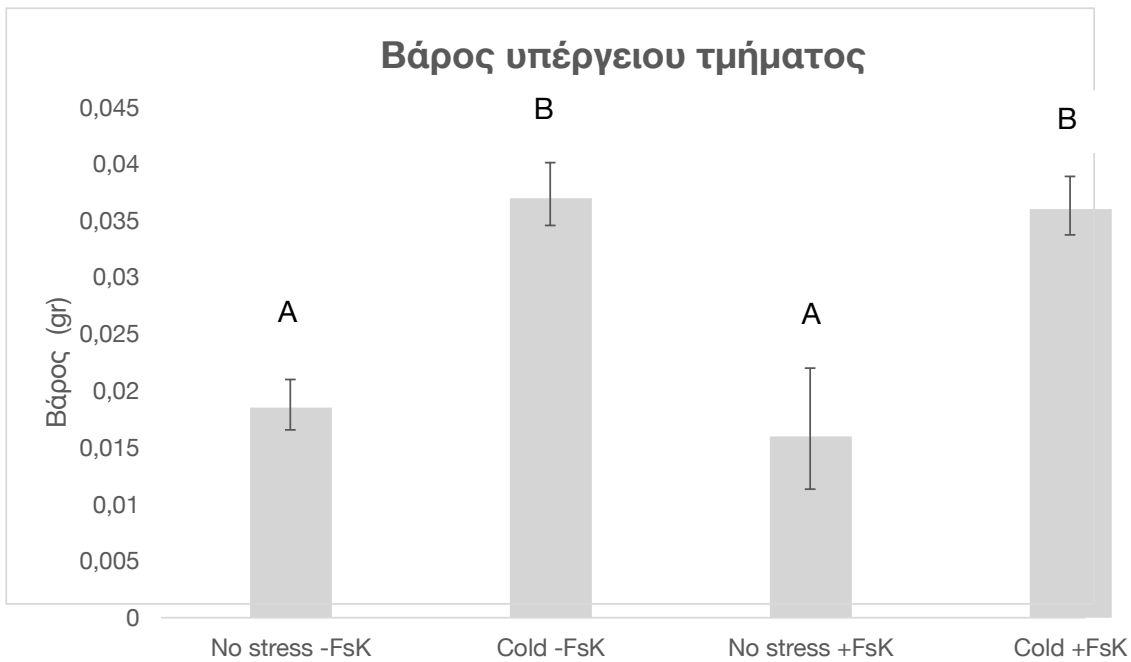
Από τη μεταχείριση των φυτών με παροδική καταπόνηση χαμηλής θερμοκρασίας, όταν αυτά είχαν δεχθεί πότισμα μόνο με νερό, προέκυψαν τα παρακάτω αποτελέσματα για τη δειγματοληψία 7dpi:

Αποτελέσματα δειγματοληψίας dH₂O 7dpi:

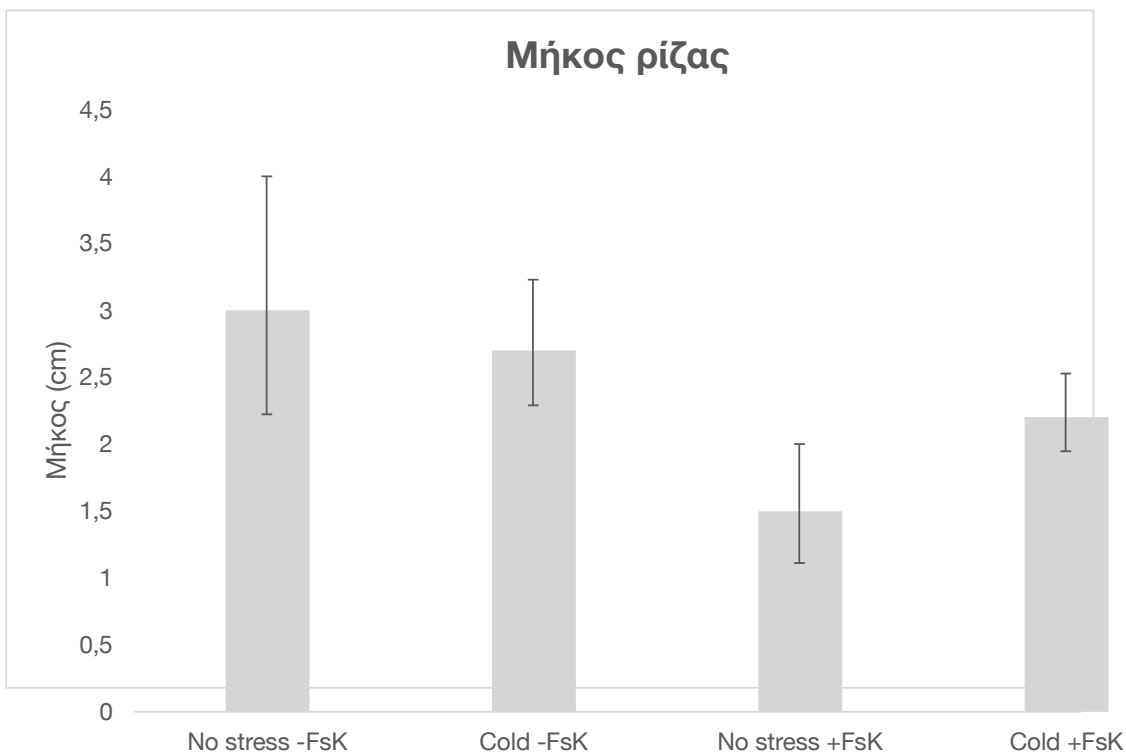
Τα παρακάτω διαγράμματα αφορούν την απεικόνιση φαινοτυπικών χαρακτηριστικών με τη σειρά που παρουσιάζονται (βάρους ρίζας, βάρους φύλλων, μήκους ρίζας) μεταξύ των φυτών ελέγχου (No stress-FsK; n=5), των φυτών που έχουν υποστεί καταπόνηση ψύχους απουσία του FsK (Cold-FsK; n=5), των φυτών χωρίς καταπόνηση στην παρουσία του FsK (No stress+FsK ; n=5) και των φυτών με καταπόνηση στην παρουσία FsK (Cold +FsK; n=5). Οι γραμμές σφάλματος δείχνουν το τυπικό σφάλμα του μέσου. Η στατιστική ανάλυση διεξήχθη για χρησιμοποιώντας μέθοδο ANOVA ακολουθούμενη από δοκιμασία Tukey's HSD. Τα γράμματα υποδεικνύουν ομάδες σημαντικότητας, με τα διαφορετικά γράμματα να υποδεικνύουν σημαντικές διαφορές (p<0.05, Tukey's HSD).



Γράφημα 1: Βάρος ρίζας. Στη ρίζα στατιστικώς σημαντική διαφορά υπήρχε μεταξύ των φυτών ελέγχου απουσία FsK -(No stress-FsK; n=5) και των φυτών που είχαν υποστεί καταπόνηση ψύχους απουσία του FsK (n=5)

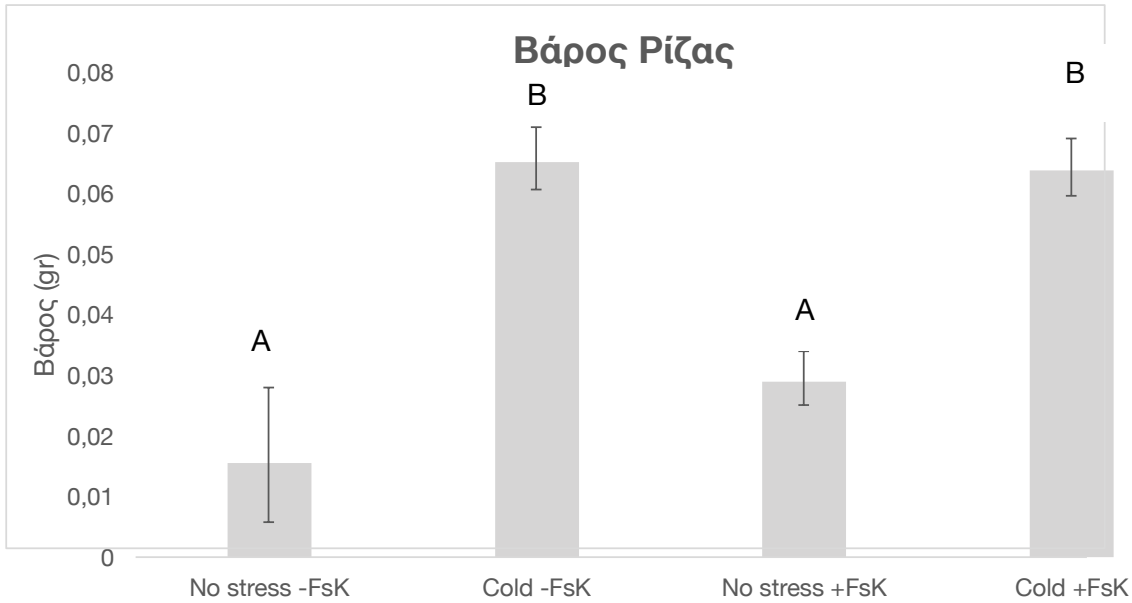


Γράφημα 2: Βάρος υπέργειου τμήματος. Στα φύλλα στατιστικώς σημαντική διαφορά υπήρχε μεταξύ των φυτών ελέγχου απουσία FsK -(No stress-FsK; $n=5$), των φυτών που είχαν υποστεί καταπόνηση ψύχους απουσία του FsK (Cold-FsK; $n=5$) και των φυτών που είχαν υποστεί καταπόνηση ψύχους παρουσία του FsK (Cold+FsK; $n=5$). Στατιστική διαφορά υπήρχε επίσης μεταξύ των φυτών ελέγχου παρουσία FsK -(No stress+FsK; $n=5$), με τα φυτά που είχαν υποστεί καταπόνηση ψύχους απουσία του FsK (Cold-FsK; $n=5$) και των φυτών που είχαν υποστεί καταπόνηση ψύχους παρουσία του FsK (Cold-FsK; $n=5$).

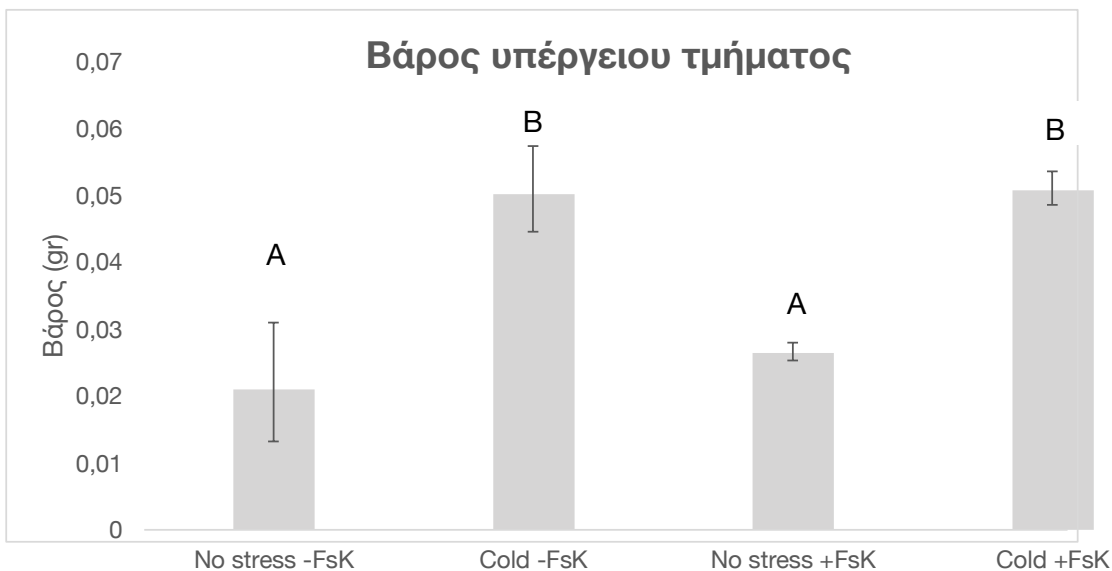


Γράφημα 3: Μήκος ρίζας. Καμία στατιστικώς σημαντική διαφορά

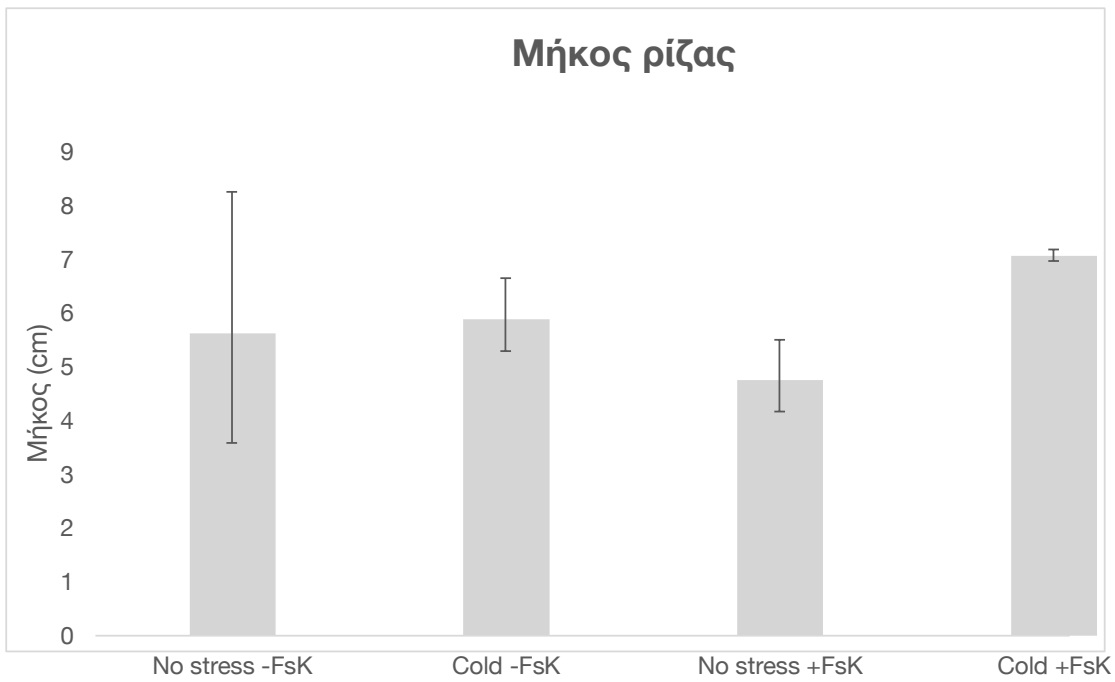
Αποτελέσματα δειγματοληψίας dH₂O 15dpi:



Γράφημα 4: Βάρος ρίζας. Στη ρίζα στατιστικώς σημαντική διαφορά υπήρχε μεταξύ των φυτών ελέγχου απουσία FsK -(No stress-FsK; $n=5$) των φυτών που είχαν υποστεί καταπόνηση ψύχους απουσία του FsK (Cold-FsK; $n=5$) και των φυτών που είχαν υποστεί καταπόνηση ψύχους παρουσία του FsK (Cold+FsK; $n=5$). Στατιστική διαφορά υπήρχε επίσης μεταξύ των φυτών ελέγχου παρουσία FsK -(No stress+FsK; $n=5$) των φυτών που είχαν υποστεί καταπόνηση ψύχους απουσία του FsK (Cold-FsK; $n=5$) και των φυτών που είχαν υποστεί καταπόνηση ψύχους παρουσία του FsK (Cold+FsK; $n=5$)



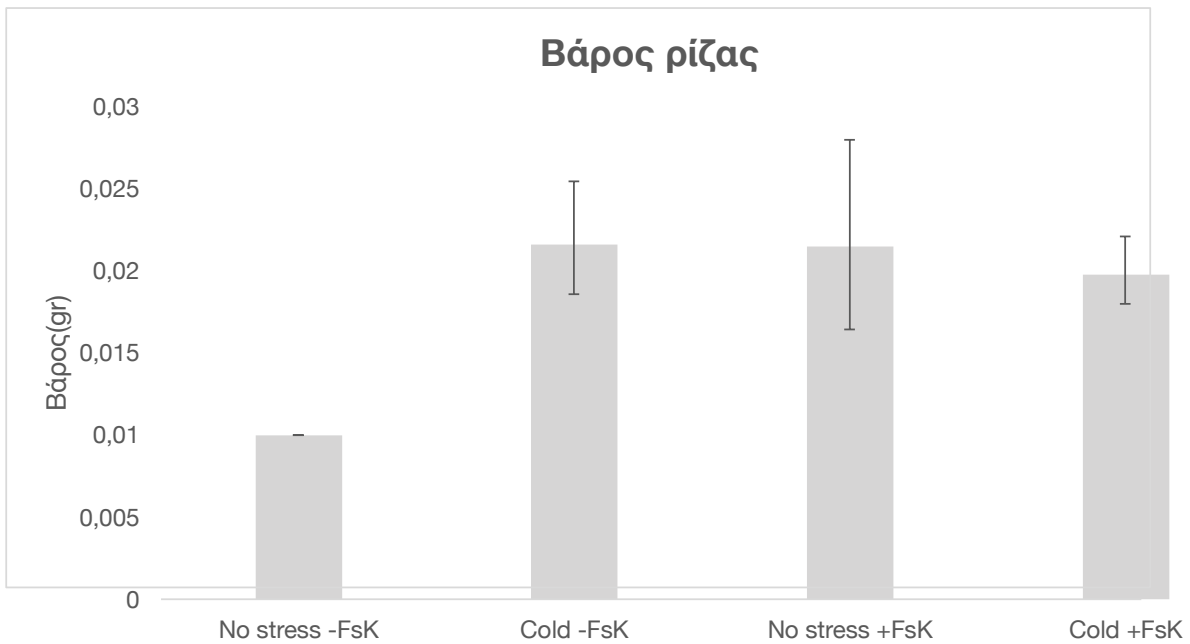
Γράφημα 5: Βάρος υπέργειου τμήματος. Στα φύλλα είχαμε στατιστικώς σημαντική διαφορά μεταξύ των φυτών ελέγχου απουσία FsK -(No stress-FsK; $n=5$) και των φυτών που είχαν υποστεί καταπόνηση ψύχους παρουσία και απουσία του FsK (Cold+FsK; $n=5$) /FsK (Cold-FsK; $n=5$). Στατιστική διαφορά υπήρχε επίσης μεταξύ των φυτών ελέγχου παρουσία FsK -(No stress+FsK; $n=5$) και των φυτών που είχαν υποστεί καταπόνηση ψύχους παρουσία και απουσία του FsK (Cold+FsK; $n=5$) /FsK (Cold-FsK; $n=5$)



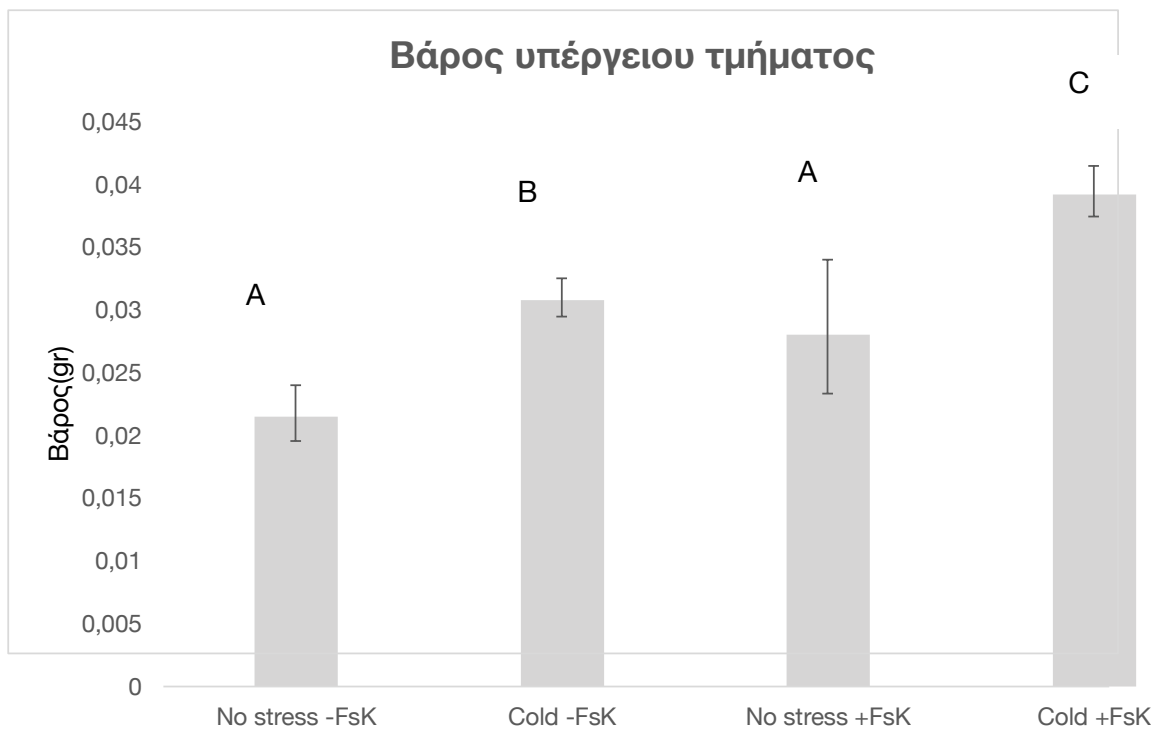
Γράφημα 6:Μήκος ρίζας. Καμία στατιστικώς σημαντική διαφορά

Από τη μεταχείριση των φυτών με παροδική καταπόνηση χαμηλής θερμοκρασίας, όταν αυτά είχαν δεχθεί **πότισμα μόνο με M-medium**, προέκυψαν τα παρακάτω αποτελέσματα:

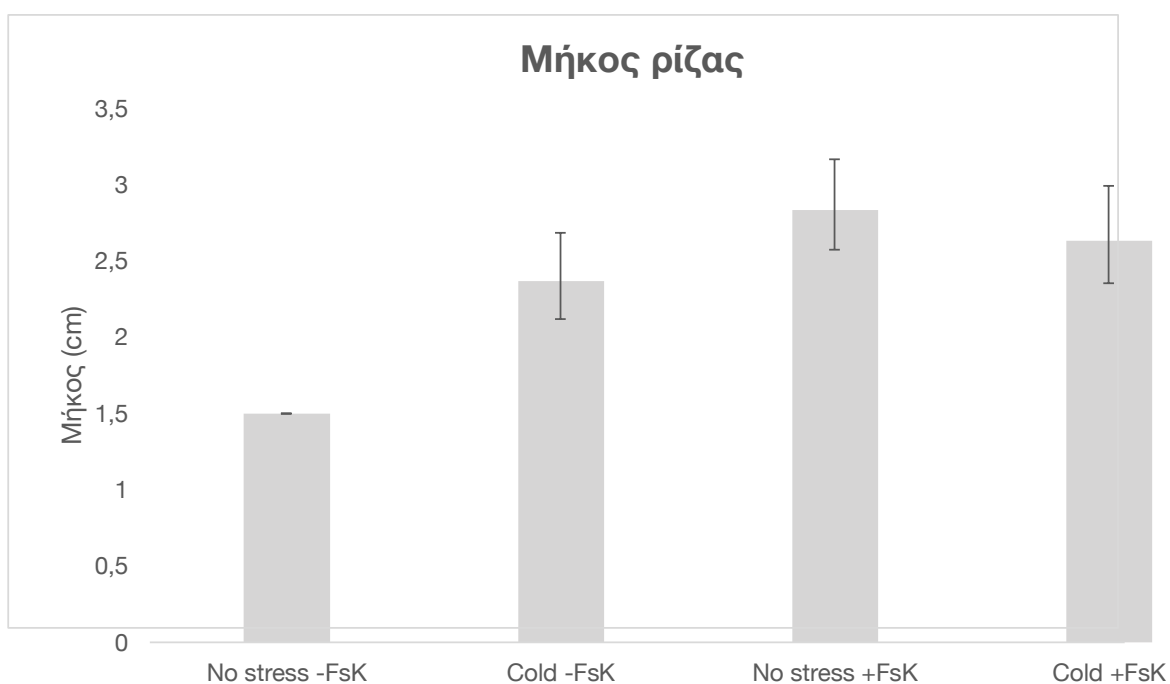
Αποτελέσματα δειγματοληψίας M-medium 7dpi:



Γράφημα 7:Βάρος ρίζας. Καμία στατιστικώς σημαντική διαφορά

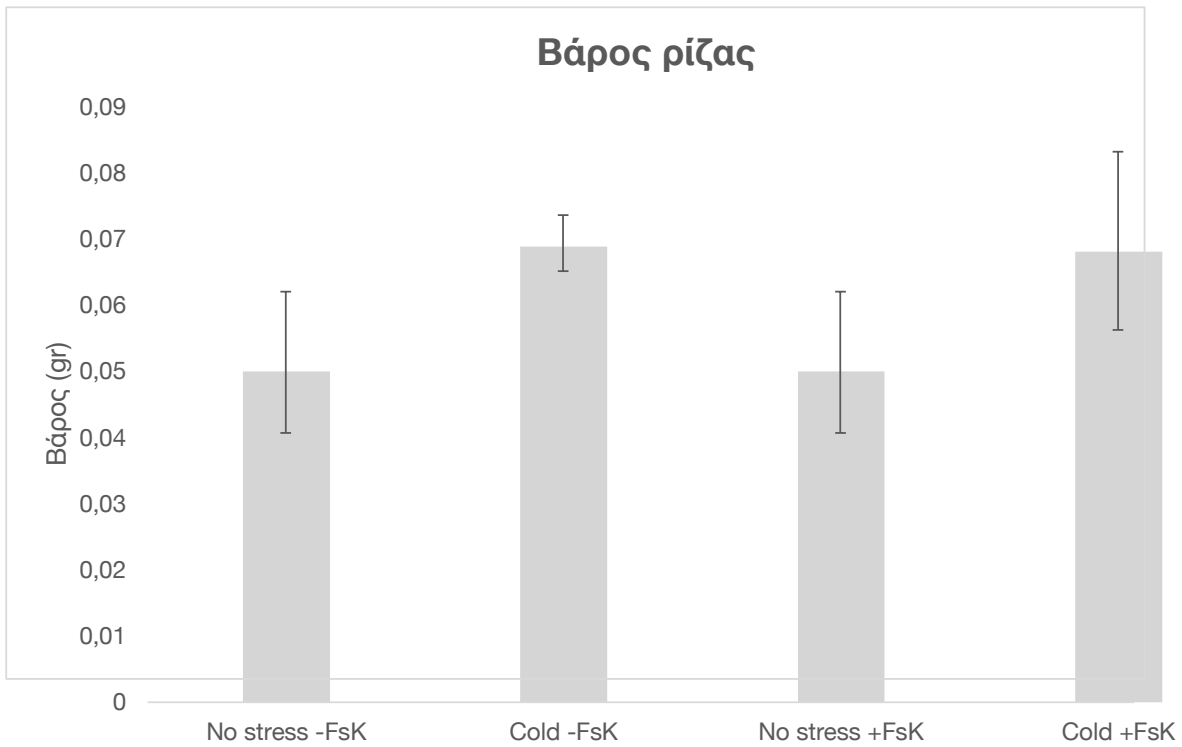


Γράφημα 8: Βάρος υπέργειου τμήματος. Στα φύλλα στατιστικώς σημαντική διαφορά υπήρχε μεταξύ των φυτών ελέγχου απουσία FsK -(No stress-FsK; $n=5$) και των φυτών που είχαν υποστεί καταπόνηση ψύχους παρουσία του FsK (Cold+FsK; $n=5$), των φυτών ελέγχου παρουσία FsK -(No stress+FsK; $n=5$) και των φυτών που είχαν υποστεί καταπόνηση ψύχους απουσία του FsK (Cold-FsK; $n=5$), καθώς και των φυτών που είχαν υποστεί καταπόνηση ψύχους απουσία FsK (Cold-FsK; $n=5$) με τα φυτά που είχαν υποστεί καταπόνηση ψύχους παρουσία FsK (Cold+FsK; $n=5$)

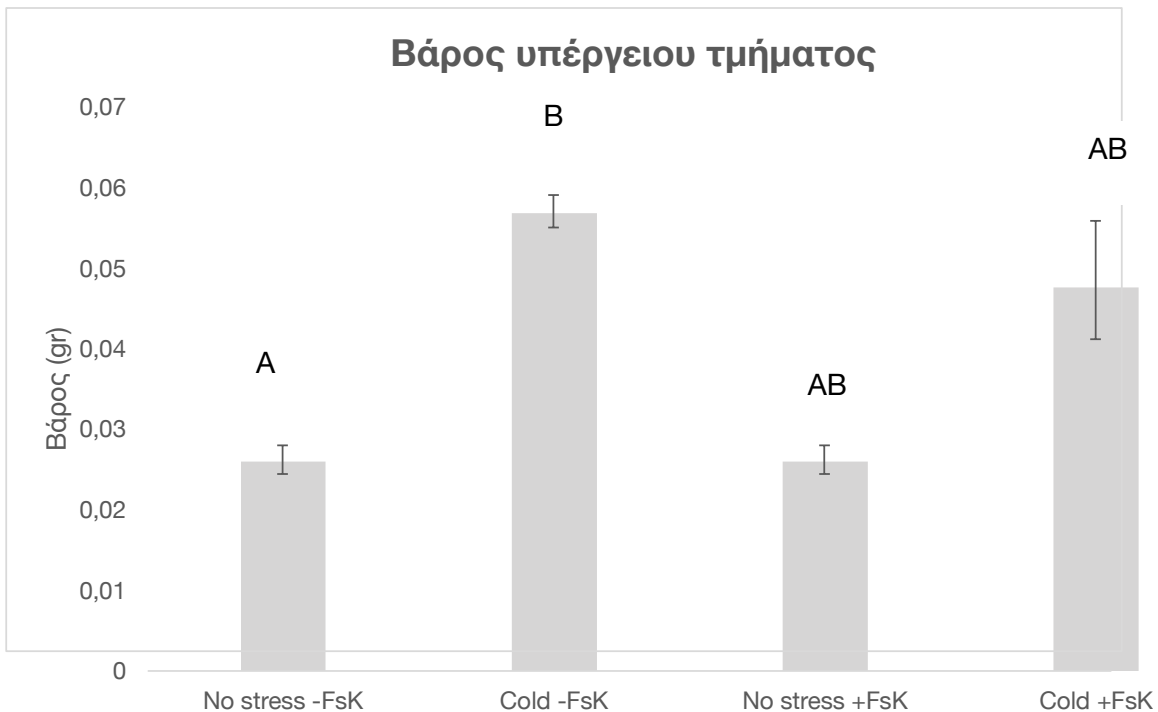


Γράφημα 9: Μήκος ρίζας. Καμία στατιστικώς σημαντική διαφορά

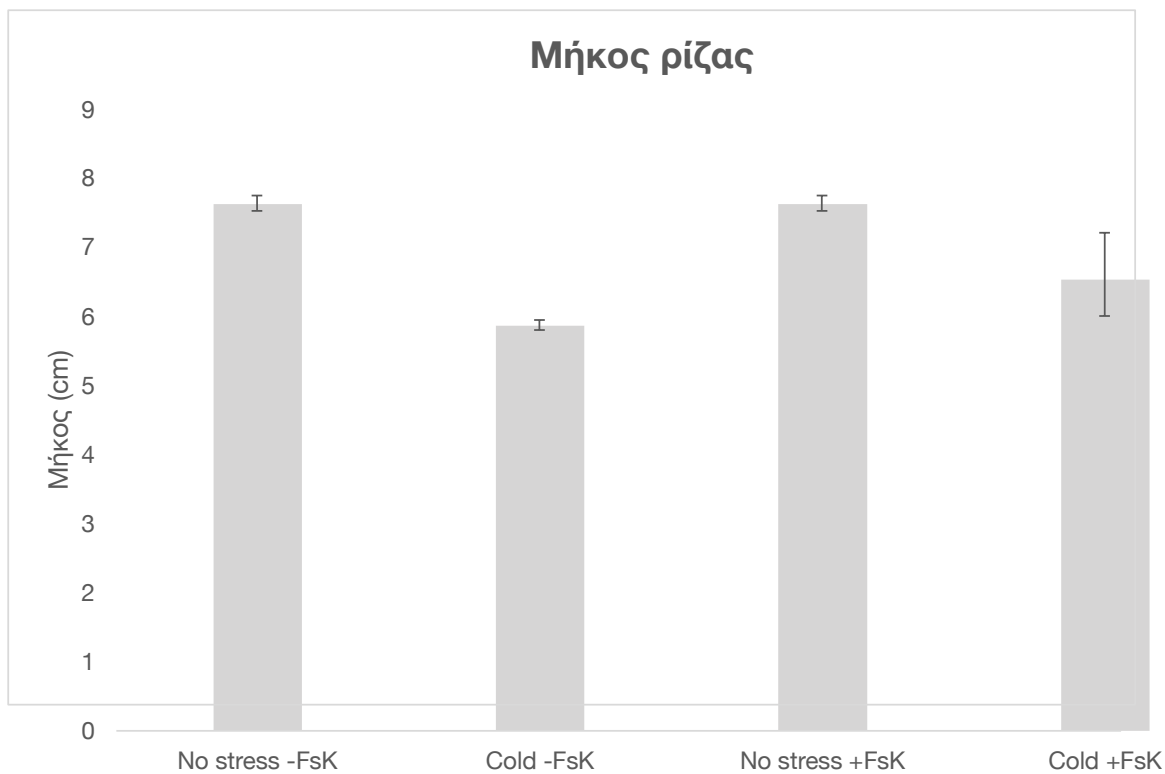
Αποτελέσματα δειγματοληψίας M-medium 15dpi:



Γράφημα 10: Βάρος ρίζας. Καμία στατιστικώς σημαντική διαφορά



Γράφημα 11: Βάρος υπέργειου τμήματος. Στα φύλλα υπήρχε στατιστικώς σημαντική διαφορά μεταξύ των φυτών ελέγχου απουσία Fsk, (No stress-Fsk; $n=5$) και των φυτών που είχαν υποστεί καταπόνηση ψύχους απουσία του Fsk, (Cold-Fsk; $n=5$).



Γράφημα 12: Μήκος ρίζας. Καμία στατιστικώς σημαντική διαφορά

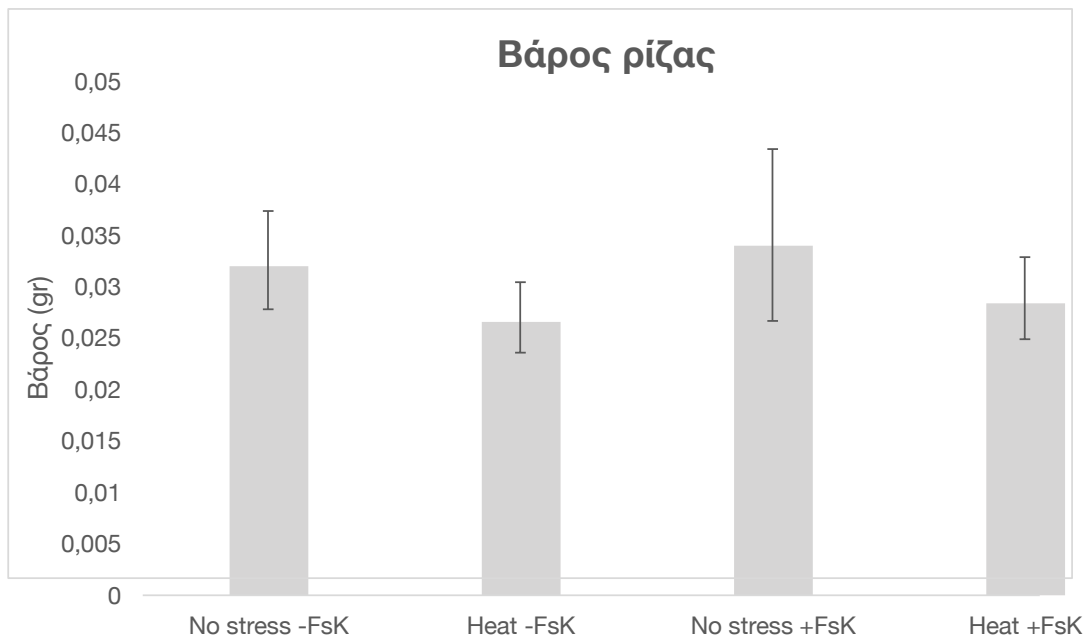
3.1.1.2 Αβιοτική καταπόνηση λόγω υψηλής θερμοκρασίας

Μετά τη δειγματοληψία και τον υπολογισμό του μέσου όρου για το βάρος της ρίζας του βλαστού και του μήκους της ρίζας. Έγινε ANOVA test το οποίο εξέτασε την επίδραση δυο διαφορετικών ανεξάρτητων μεταβλητών. Σε αυτή την περίπτωση κατάσταση υψηλής θερμοκρασίας/ απουσία καταπόνησης παρουσία και απουσία του μύκητα FsK.

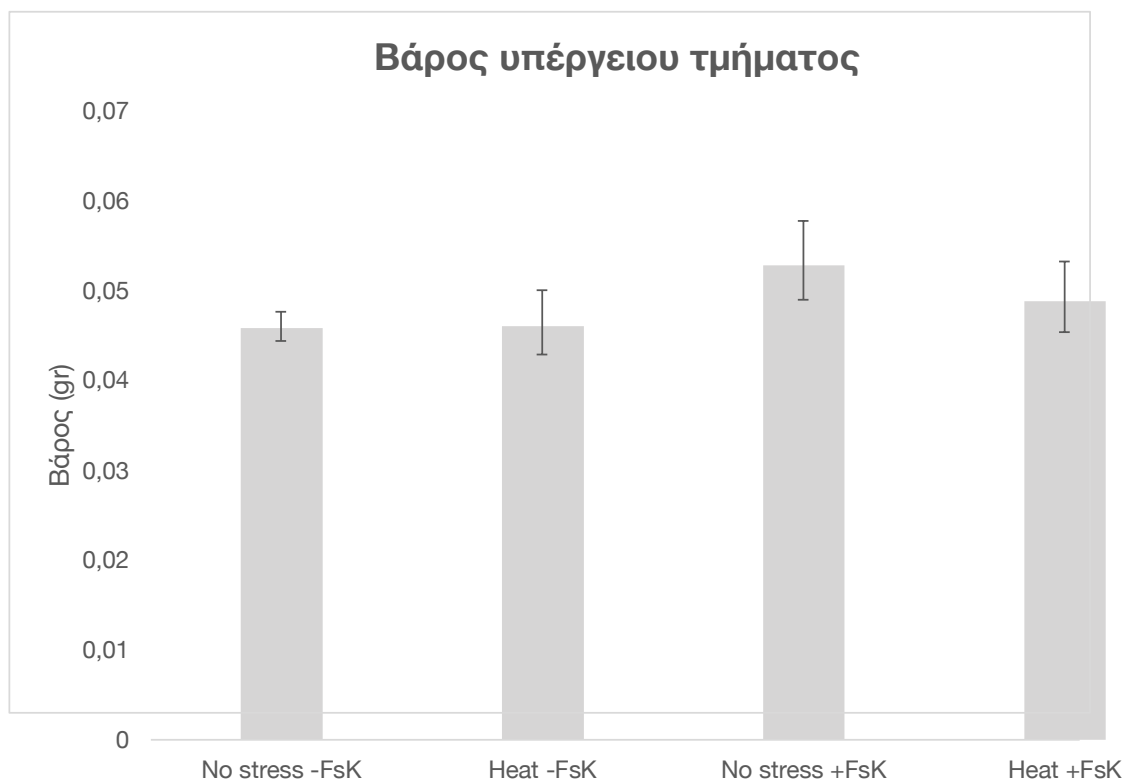
Τα παρακάτω διαγράμματα αφορούν την απεικόνιση φαινοτυπικών χαρακτηριστικών με τη σειρά που παρουσιάζονται (βάρους ρίζας, βάρους φύλων, μήκους ρίζας) μεταξύ των φυτών ελέγχου (No stress-FsK; $n=5$), των φυτών που έχουν υποστεί καταπόνηση λόγω υψηλής θερμοκρασίας απουσία του FsK (Heat -FsK; $n=5$), των φυτών χωρίς καταπόνηση στην παρουσία του FsK (No stress+FsK ; $n=5$) και των φυτών με καταπόνηση στην παρουσία FsK (Heat +FsK; $n=5$). Οι γραμμές σφάλματος δείχνουν το τυπικό σφάλμα του μέσου. Η στατιστική ανάλυση διεξήχθη για χρησιμοποιώντας μέθοδο ANOVA ακολουθούμενη από δοκιμασία Tukey's HSD. Τα γράμματα υποδεικνύουν ομάδες σημαντικότητας, με τα διαφορετικά γράμματα να υποδεικνύουν σημαντικές διαφορές ($p<0.05$, Tukey's HSD). Τα αποτελέσματα έδειξαν ότι δεν υπάρχει καμία στατιστικώς σημαντική διαφορά μεταξύ των συνθηκών σε αυτές τις συνθήκες.

Από τη μεταχείριση των φυτών με παροδική καταπόνηση υψηλής θερμοκρασίας, όταν αυτά είχαν δεχθεί πότισμα μόνο με νερό, προέκυψαν τα παρακάτω αποτελέσματα:

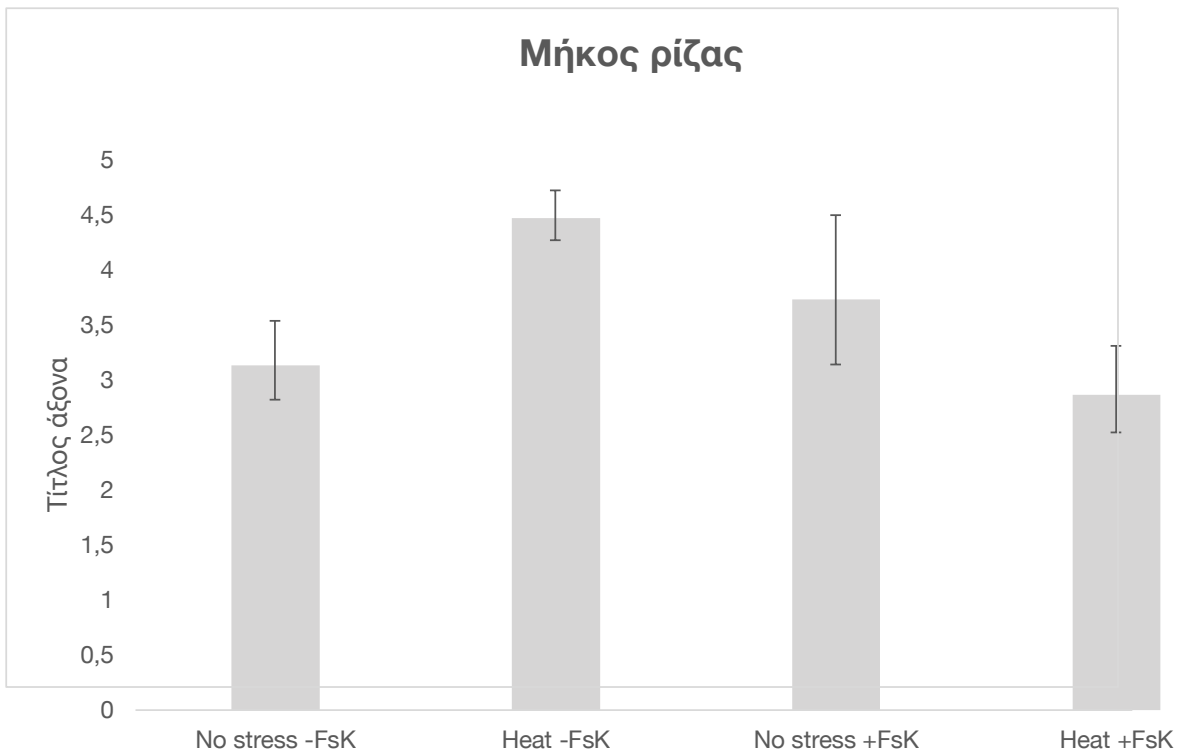
Αποτελέσματα δειγματοληψίας καταπόνησης λόγω υψηλής θερμοκρασίας dH₂O 7dpi:



Γράφημα 13: Βάρος ρίζας. Καμία στατιστικώς σημαντική διαφορά

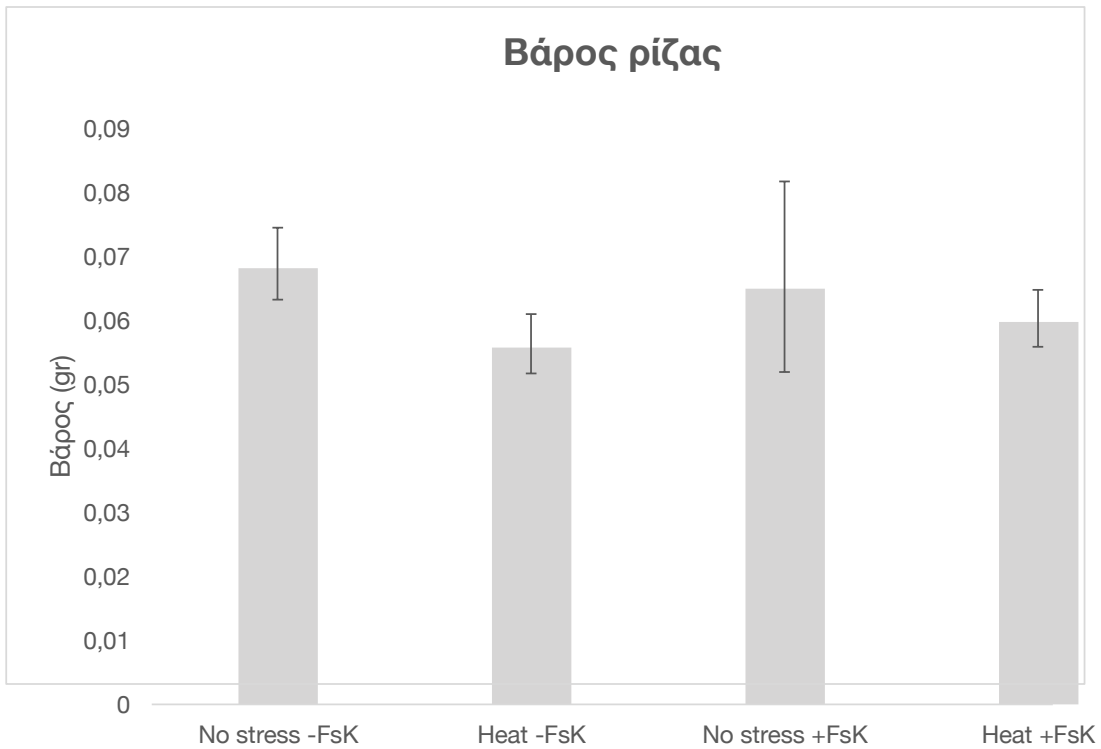


Γράφημα 14: Βάρος υπέργειου τμήματος. Καμία στατιστικώς σημαντική διαφορά

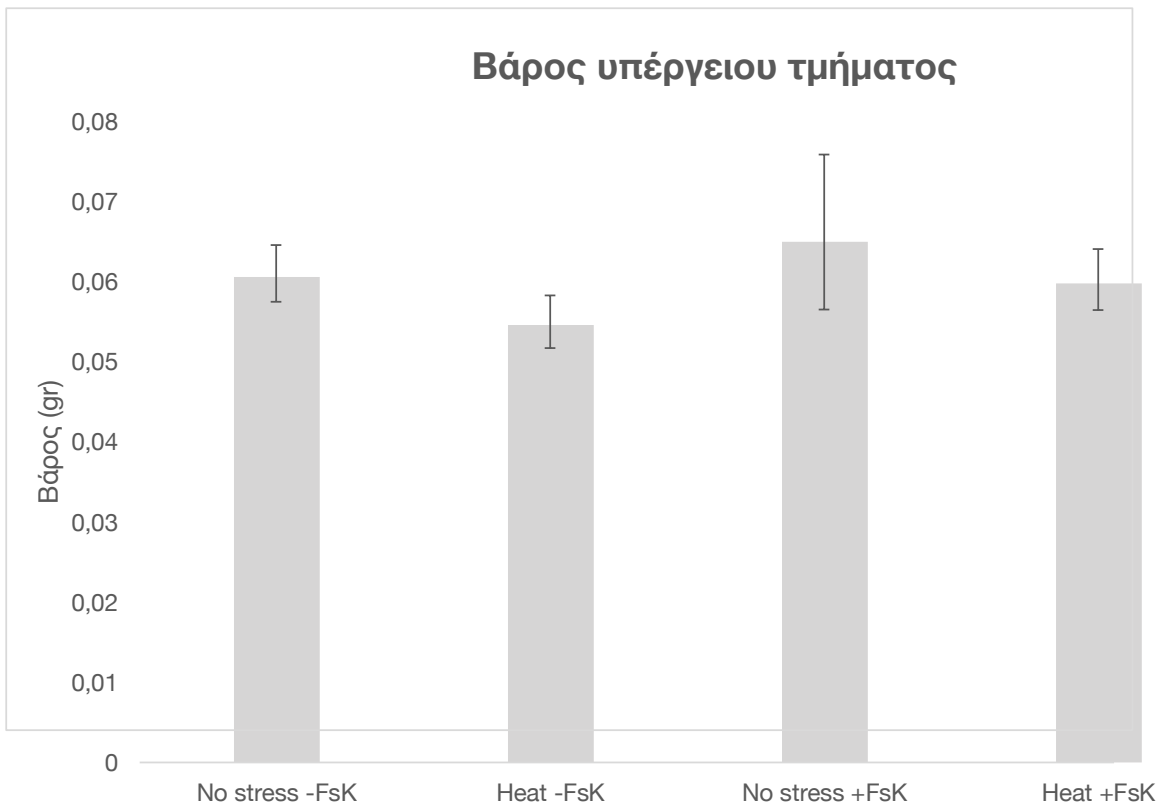


Γράφημα 15: Μήκος ρίζας. Καμία στατιστικώς σημαντική διαφορά

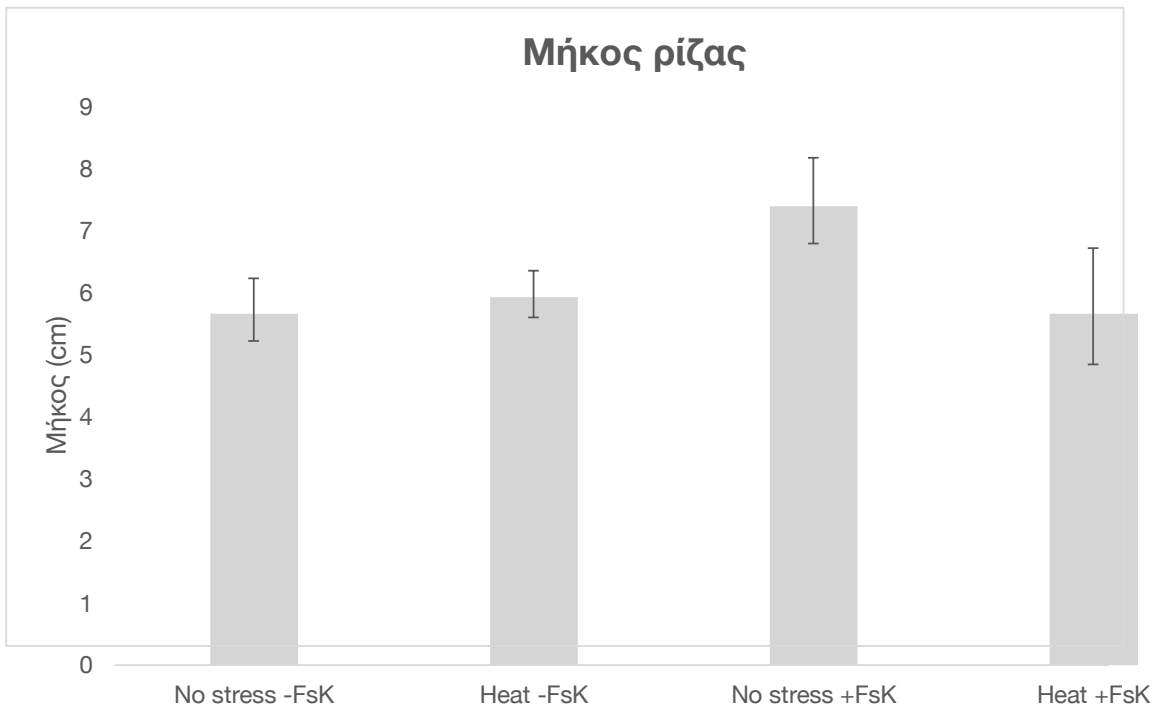
Αποτελέσματα δειγματοληψίας καταπόνησης λόγω υψηλής θερμοκρασίας dH₂O 15dpi:



Γράφημα 16: Βάρος ρίζας. Καμία στατιστικώς σημαντική διαφορά



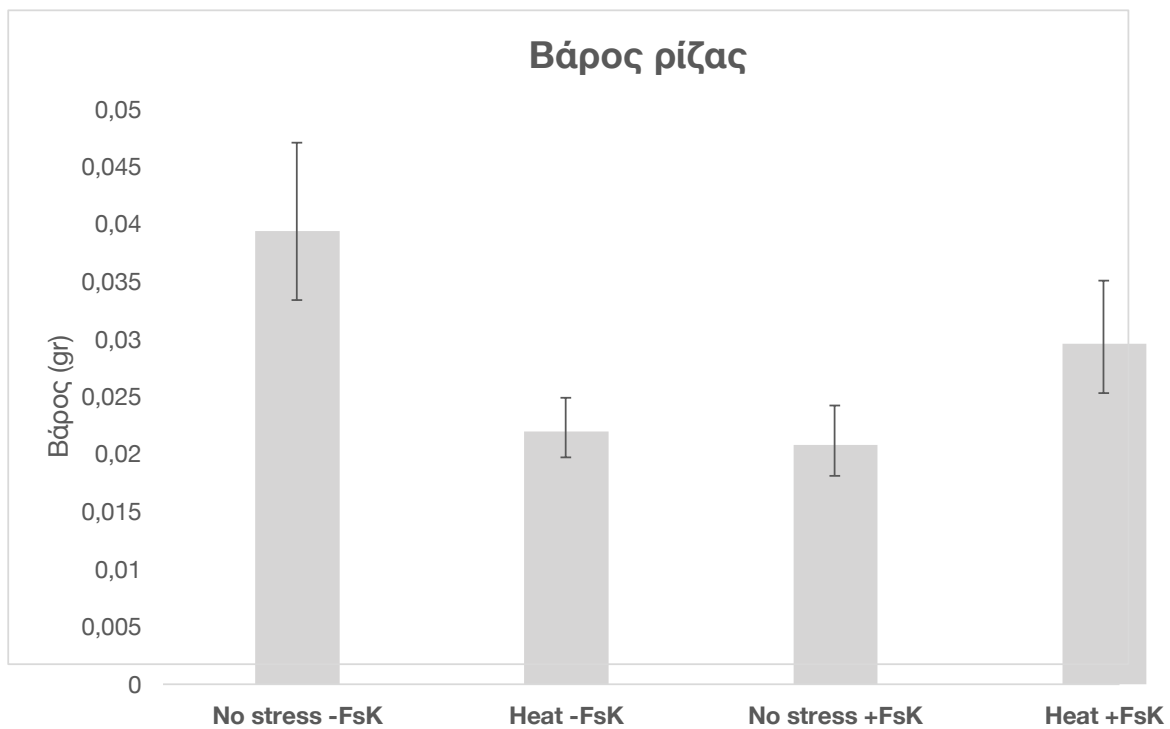
Γράφημα 17: Βάρος υπέργειου τμήματος. Καμία στατιστικώς σημαντική διαφορά



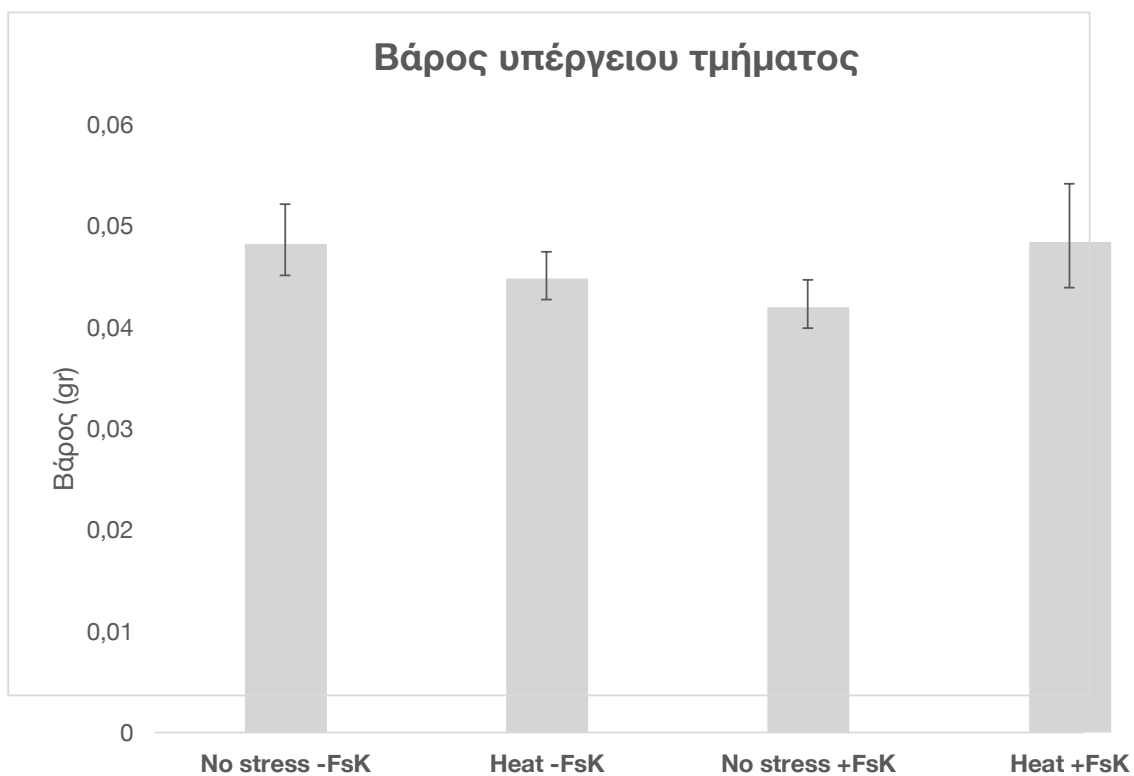
Γράφημα 18: Μήκος ρίζας. Καμία στατιστικώς σημαντική διαφορά

Από τη μεταχείριση των φυτών με παροδική καταπόνηση ψηλής θερμοκρασίας, όταν αυτά είχαν δεχθεί πότισμα μόνο με M-medium, προέκυψαν τα παρακάτω αποτελέσματα:

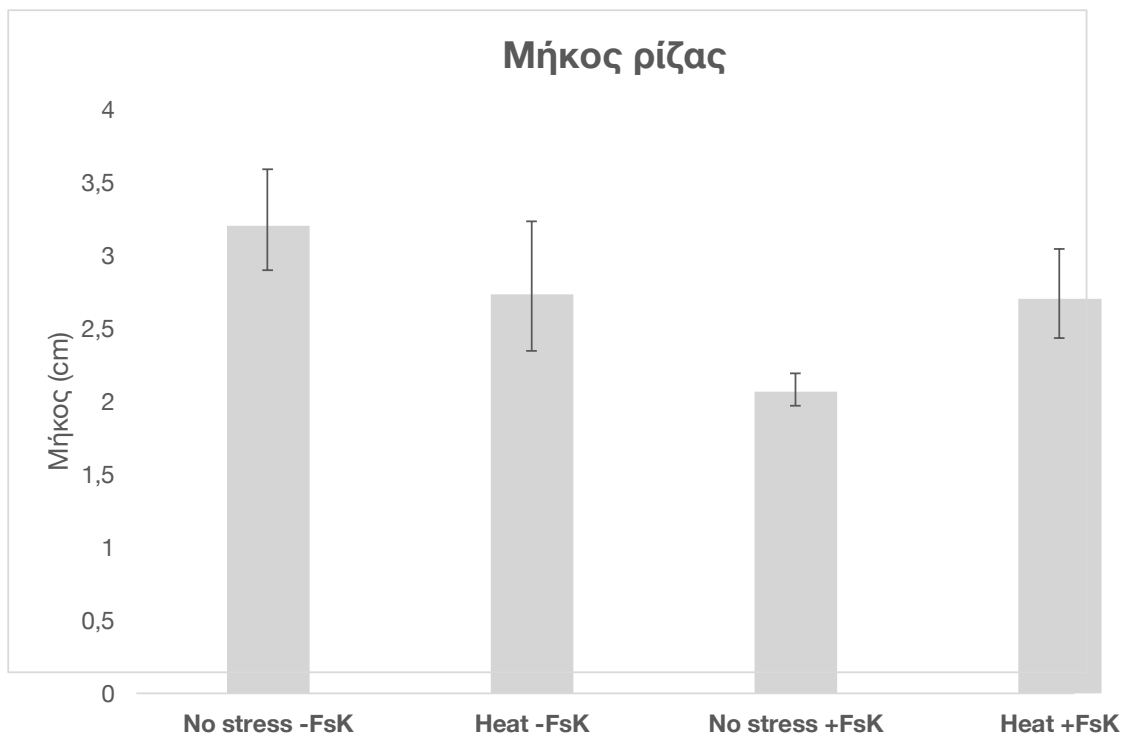
Αποτελέσματα δειγματοληψίας καταπόνησης λόγω ψηλής θερμοκρασίας M-medium 7dri:



Γράφημα 19: Βάρος ρίζας. Καμία στατιστικώς σημαντική διαφορά

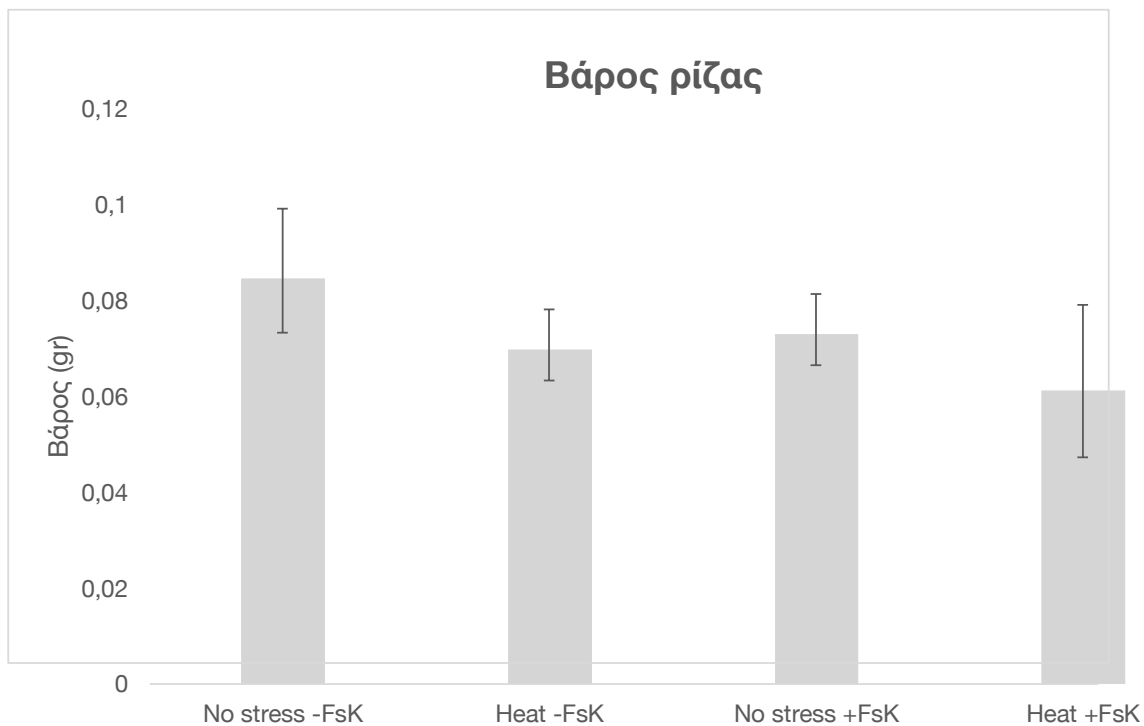


Γράφημα 20: Βάρος υπέργειου τμήματος. Καμία στατιστικώς σημαντική διαφορά

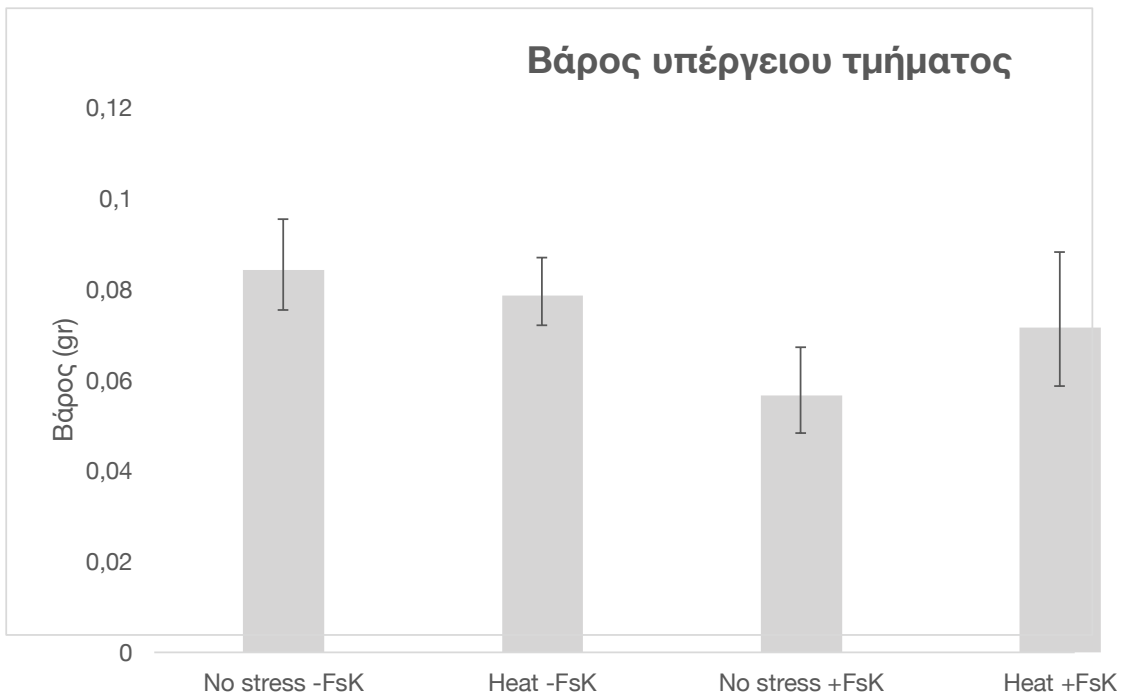


Γράφημα 21: Μήκος ρίζας. Καμία στατιστικώς σημαντική διαφορά

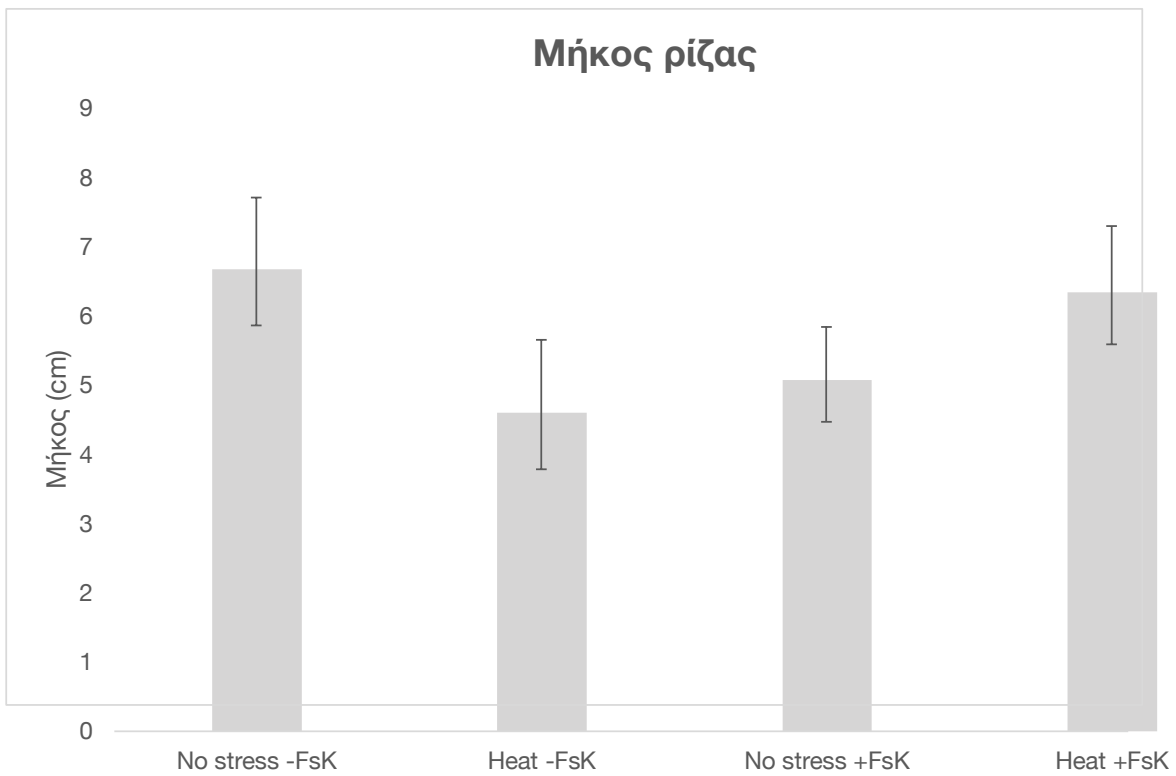
Αποτελέσματα δειγματοληψίας καταπόνησης λόγω υψηλής θερμοκρασίας M-medium 15dpi:



Γράφημα 22: Βάρος ρίζας. Καμία στατιστικώς σημαντική διαφορά



Γράφημα 23: Βάρος υπέργειου τμήματος. Καμία στατιστικώς σημαντική διαφορά



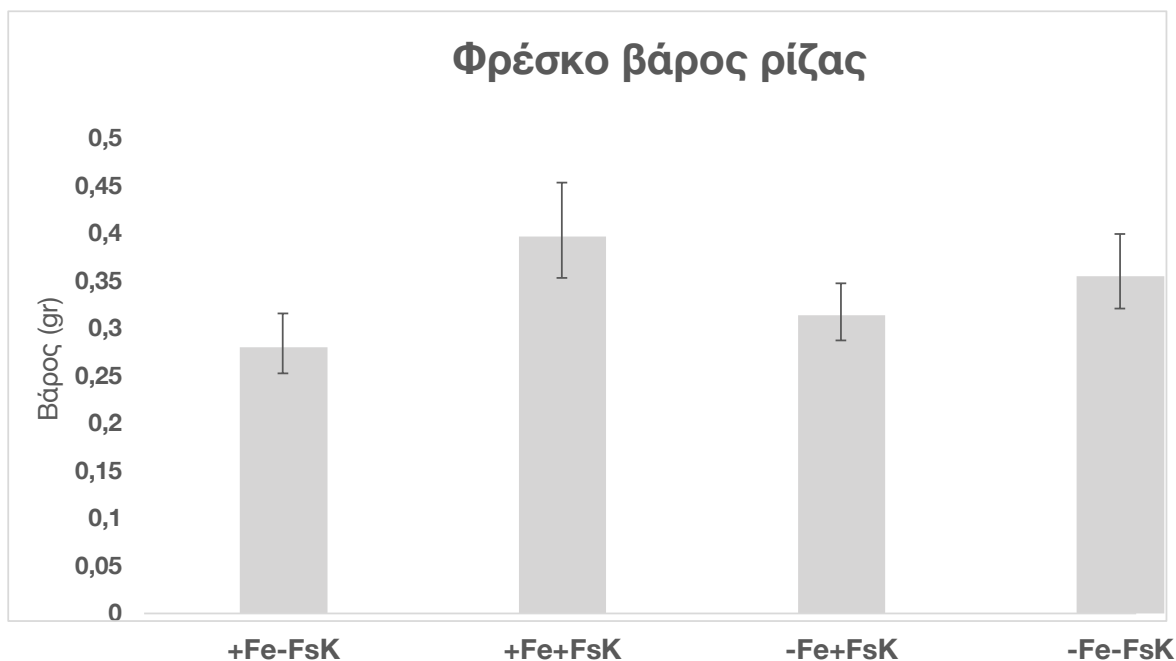
Γράφημα 24: Βάρος υπέργειου τμήματος. Καμία στατιστικώς σημαντική διαφορά

3.1.2 Αβιοτική καταπόνηση λόγω έλλειψης σιδήρου

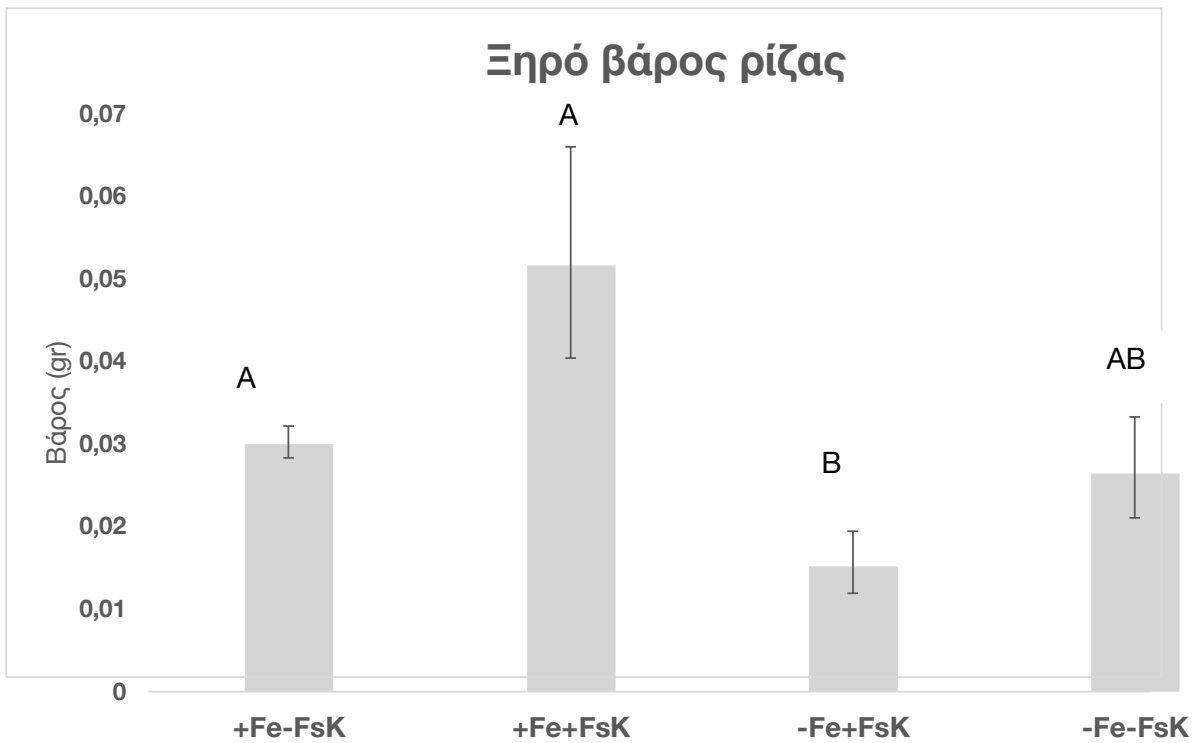
Μετά τη δειγματοληψία (17dpi,44dpi) και τον υπολογισμό του μέσου όρου για το φρέσκο και ξηρό βάρος της ρίζας του βλαστού καθώς και του μήκους της ρίζας, έγινε ANOVA test το οποίο εξέτασε την επίδραση δυο διαφορετικών ανεξάρτητων μεταβλητών. Σε αυτή την περίπτωση αβιοτικής καταπόνησης λόγω απουσίας θρεπτικών (απουσία σιδήρου) /απουσία καταπόνησης παρουσία και απουσία του μύκητα FsK.

Τα παρακάτω διαγράμματα αφορούν την απεικόνιση φαινοτυπικών χαρακτηριστικών με τη σειρά που παρουσιάζονται (φρέσκου/ξηρού βάρους ρίζας, φρέσκου/ξηρού βάρους φύλων και μήκους ρίζας) μεταξύ των φυτών ελέγχου (No stress(+Fe)-FsK; $n=5$), των φυτών που έχουν υποστεί καταπόνηση λόγω έλλειψης Fe απουσία του FsK (-Fe -FsK; $n=5$), των φυτών χωρίς καταπόνηση στην παρουσία του FsK (No stress(+Fe)+FsK ; $n=5$) και των φυτών με καταπόνηση στην παρουσία FsK (-Fe +FsK; $n=5$). Οι γραμμές σφάλματος δείχνουν το τυπικό σφάλμα του μέσου. Η στατιστική ανάλυση διεξήχθη για χρησιμοποιώντας μέθοδο ANOVA ακολουθούμενη από δοκιμασία Tukey's HSD. Τα γράμματα υποδεικνύουν ομάδες σημαντικότητας, με τα διαφορετικά γράμματα να υποδεικνύουν σημαντικές διαφορές ($p<0.05$, Tukey's HSD).

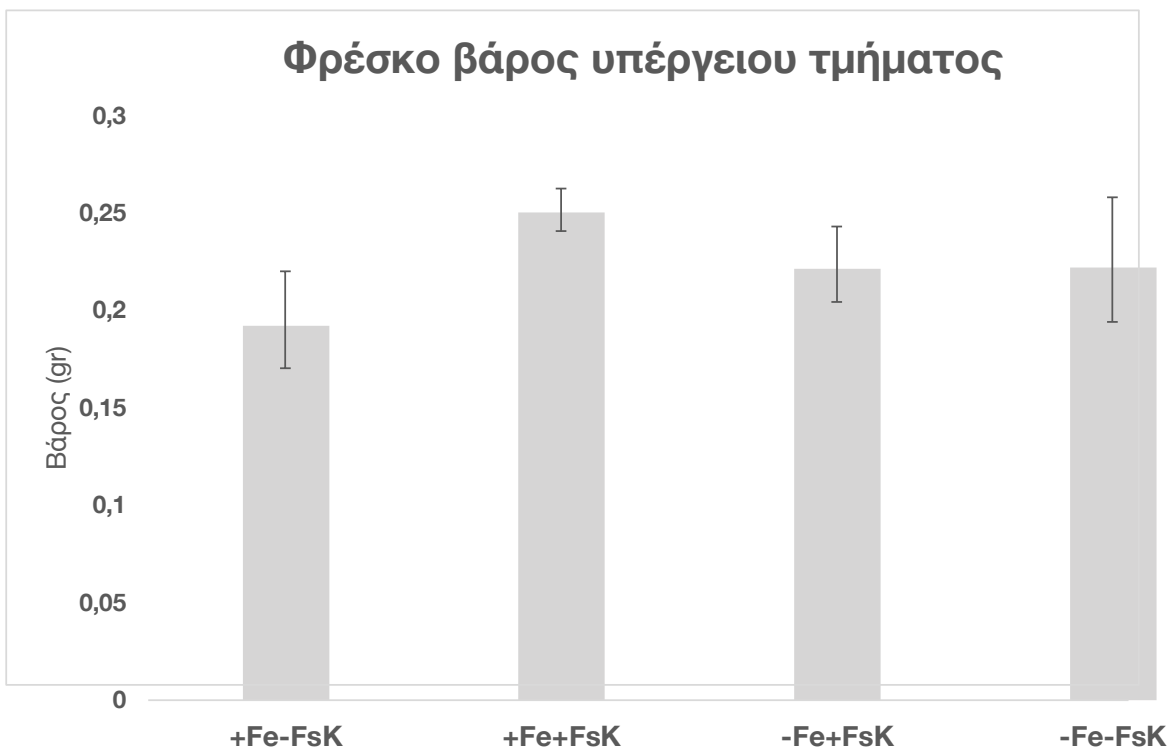
Αποτελέσματα Δειγματοληψίας έλλειψης σιδήρου 17 dpi:



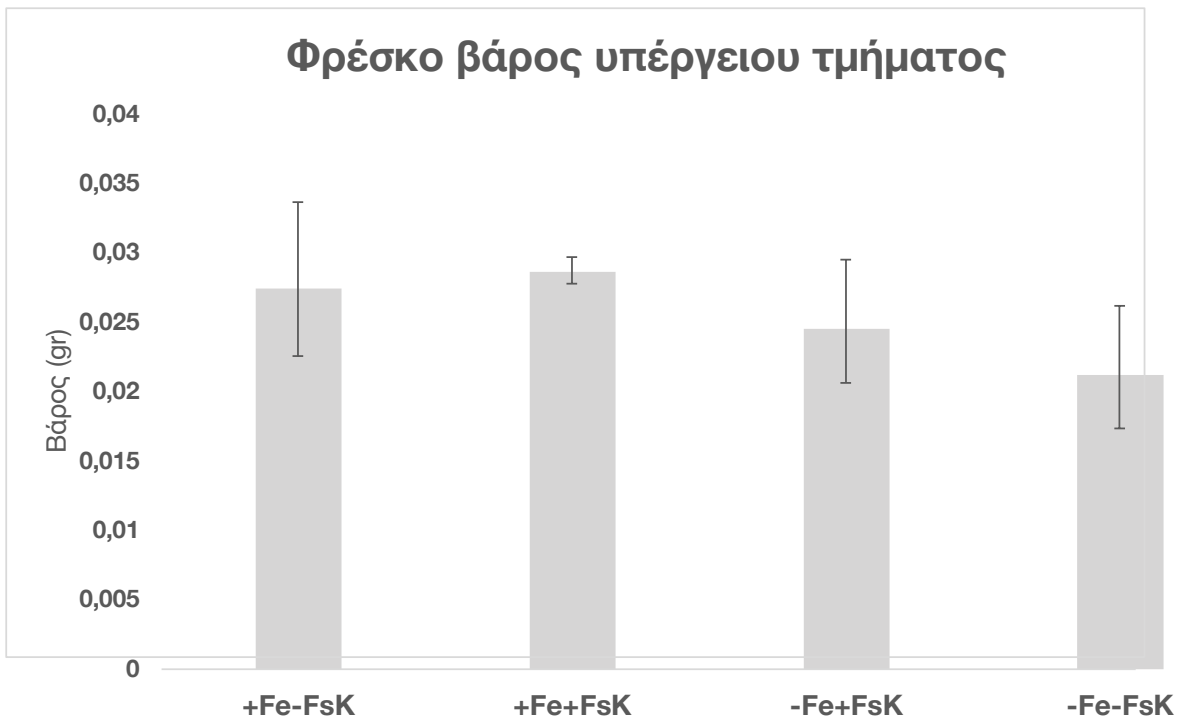
Γράφημα 25: Φρέσκο βάρος ρίζας. Καμία στατιστικώς σημαντική διαφορά



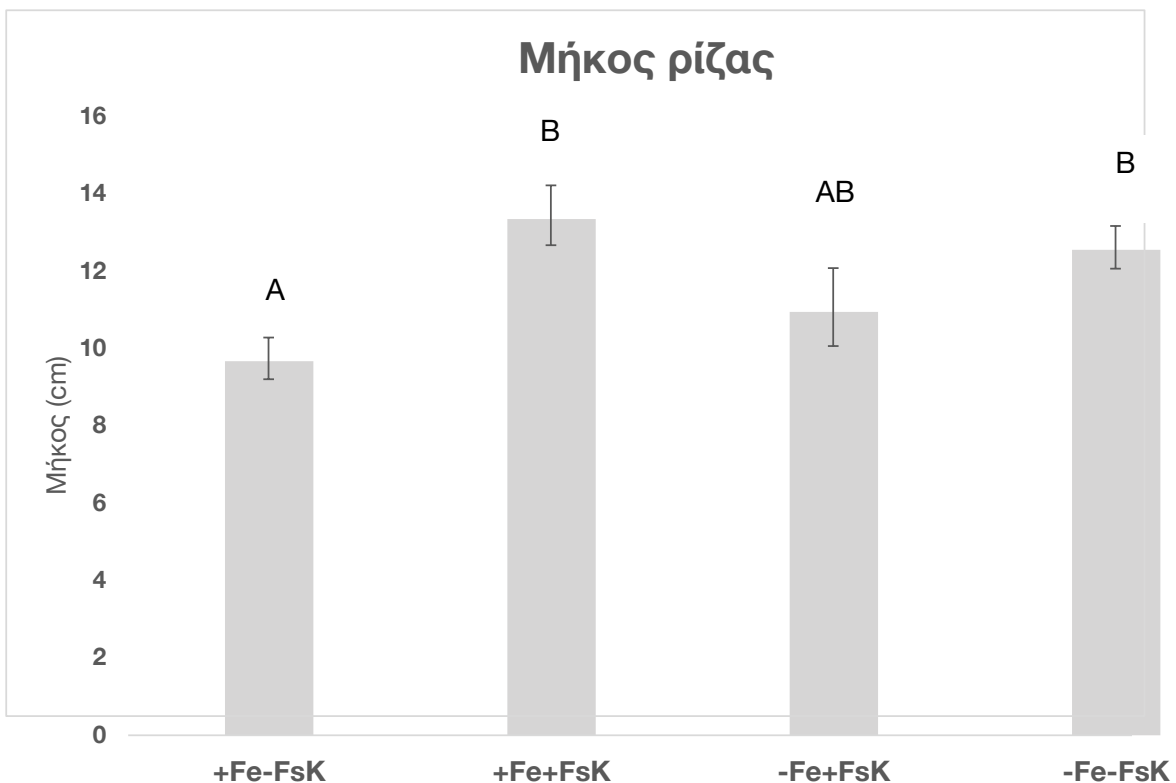
Γράφημα 26: Ξηρό βάρος ρίζας. Στη ρίζα υπήρχε στατιστικώς σημαντική διαφορά μεταξύ των φυτών ελέγχου απουσία FsK (No stress(+Fe)-FsK; $n=5$) με τα φυτά που είχαν υποστεί καταπόνηση λόγω έλλειψης Fe παρουσία του FsK (-Fe +FsK; $n=5$) και των φυτών ελέγχου παρουσία του FsK(No stress(+Fe)+FsK; $n=5$) με τα φυτά που είχαν υποστεί καταπόνηση λόγω έλλειψης Fe παρουσία του FsK (-Fe +FsK; $n=5$).



Γράφημα 27: Φρέσκο βάρος υπέργειου τμήματος. Καμία στατιστικώς σημαντική διαφορά

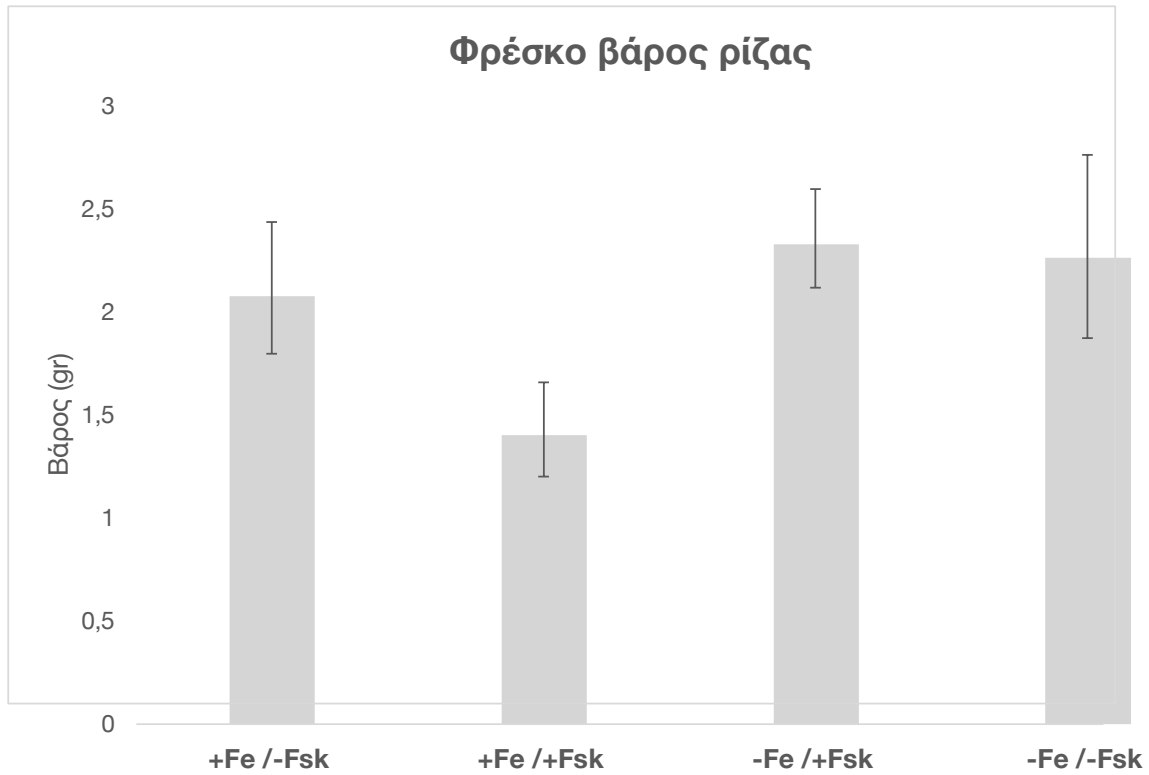


Γράφημα 28: Ξηρό βάρος υπέργειου τμήματος. Καμία στατιστικώς σημαντική διαφορά

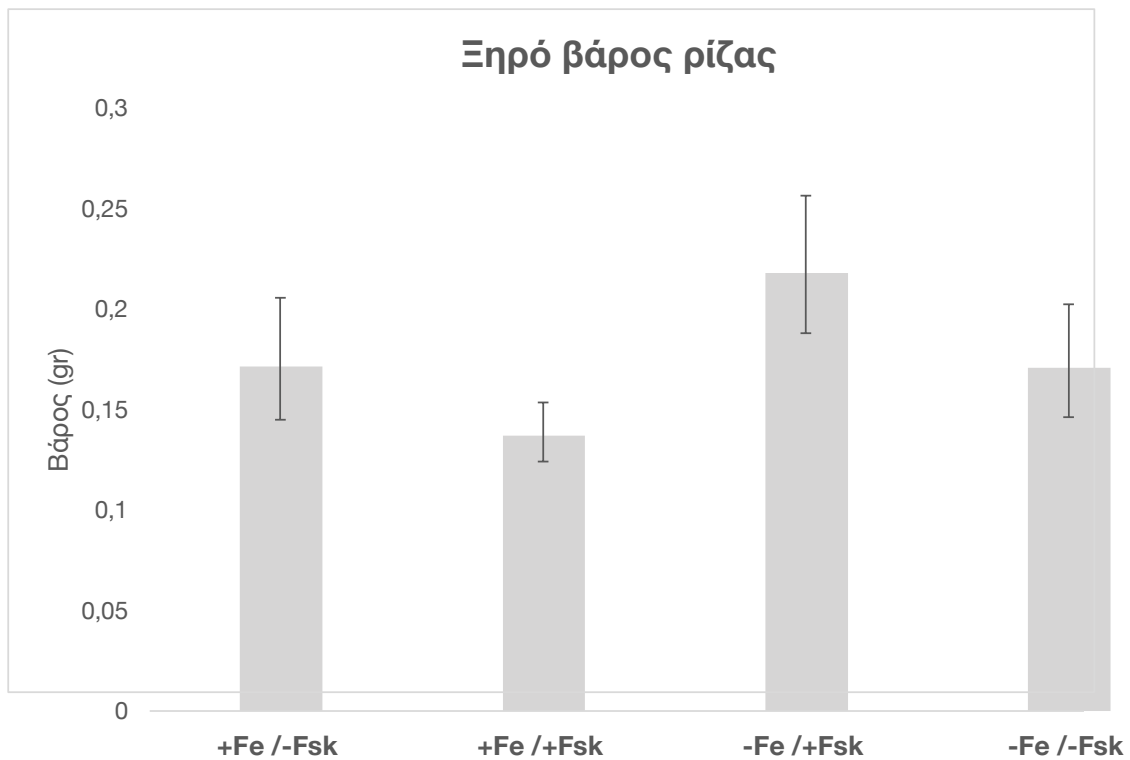


Γράφημα 29: Μήκος ρίζας. Στο μήκος της ρίζας υπήρχε στατιστικώς σημαντική διαφορά μεταξύ των φυτών ελέγχου απουσία FsK (No stress(+Fe)-FsK; $n=5$) με τα φυτά που είχαν υποστεί καταπόνηση λόγω έλλειψης Fe απουσία του FsK (-Fe -FsK; $n=5$) καθώς και των φυτών ελέγχου παρουσία του FsK (No stress(+Fe)+FsK; $n=5$) με τα φυτά ελέγχου απουσία FsK (No stress(+Fe)-FsK; $n=5$).

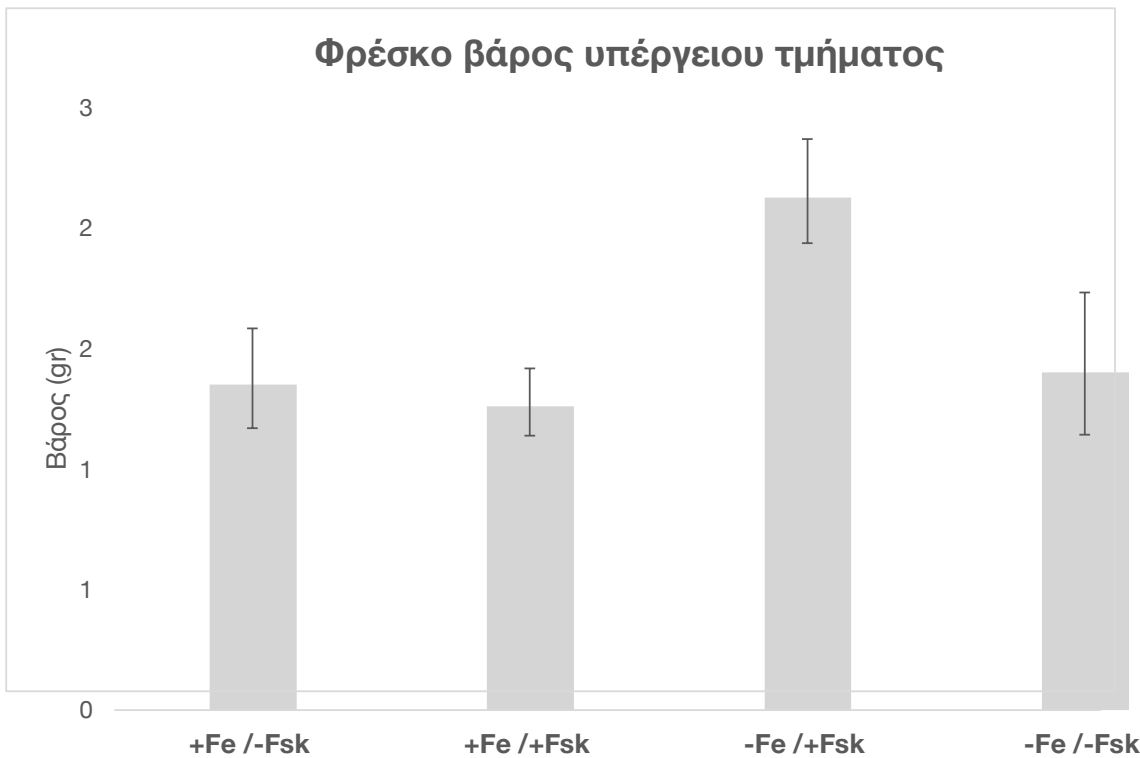
Αποτελέσματα Δειγματοληψίας έλλειψης σιδήρου 44 dpi:



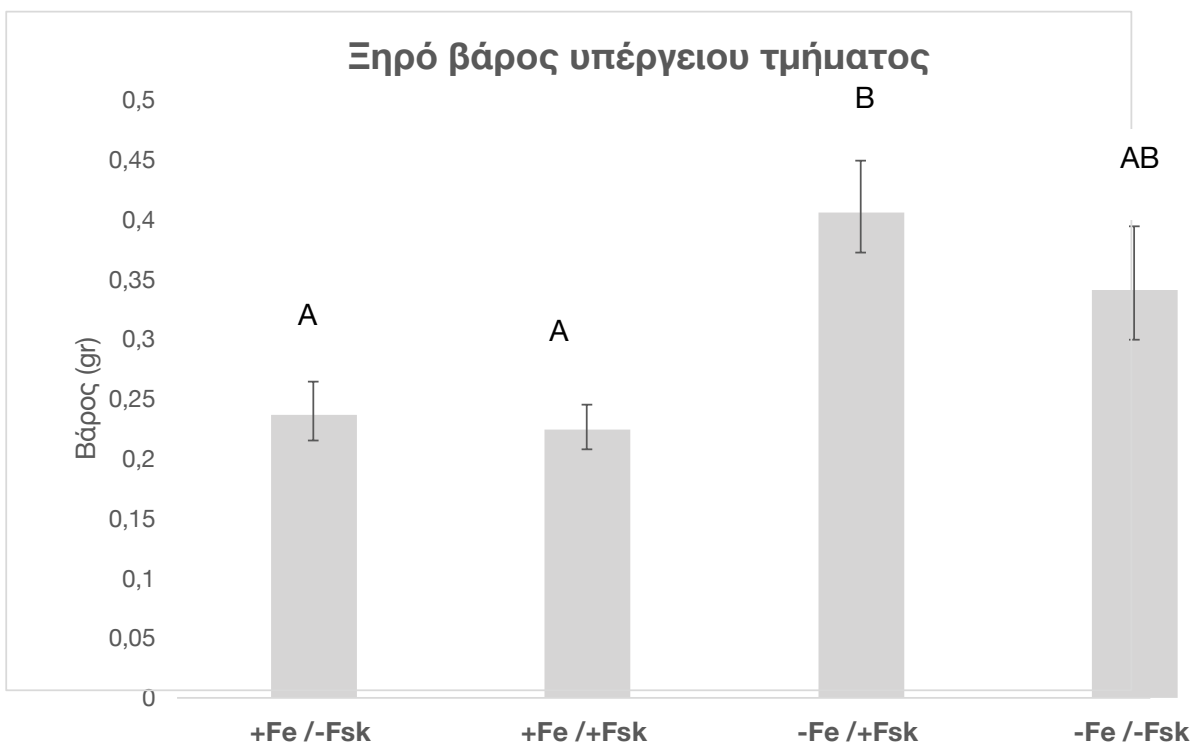
Γράφημα 30: Φρέσκο βάρος ρίζας. Καμία στατιστικώς σημαντική διαφορά



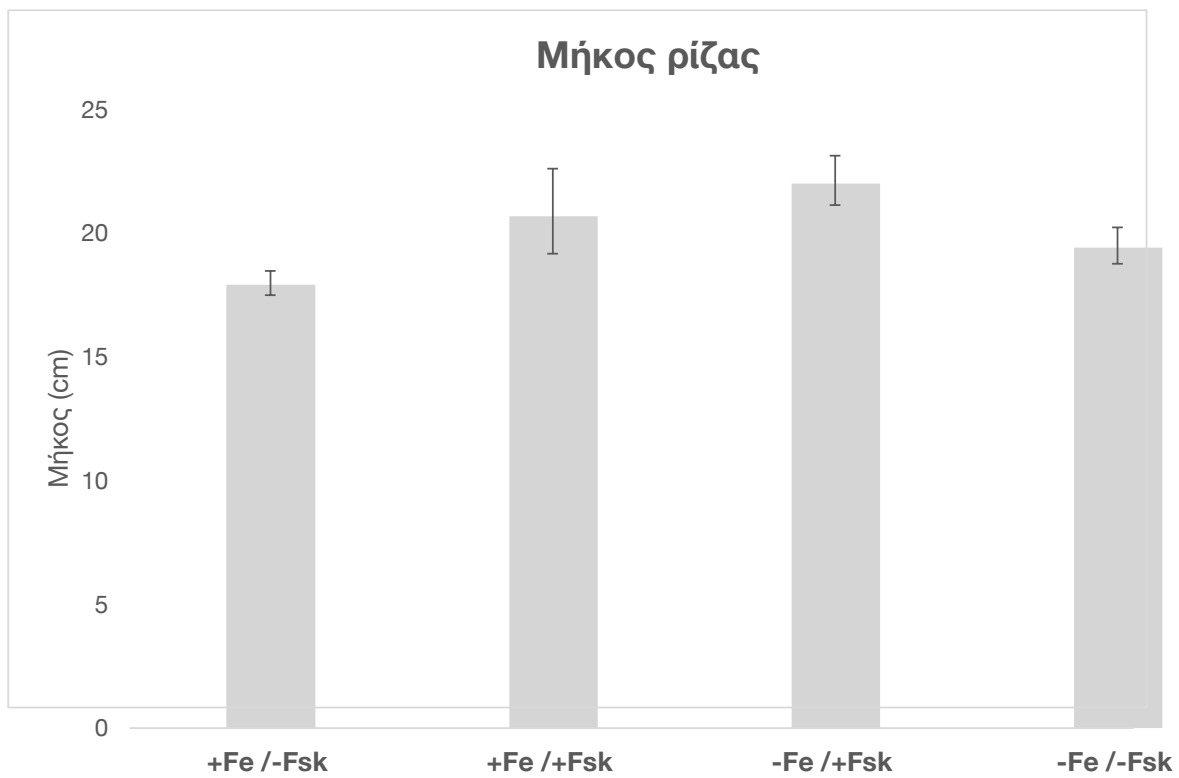
Γράφημα 31: Ξηρό βάρος ρίζας. Καμία στατιστικώς σημαντική διαφορά



Γράφημα 32: Φρέσκο βάρος υπέργειου τμήματος. Καμία στατιστικώς σημαντική διαφορά



Γράφημα 33: Ξηρό βάρος υπέργειου τμήματος. Στα φύλλα υπήρχε στατιστικώς σημαντική διαφορά μεταξύ των φυτών ελέγχου απουσία FsK (No stress(+Fe)-FsK; $n=5$) και των φυτών που έχουν υπέστησαν καταπόνηση λόγω έλλειψης Fe παρουσία του FsK (-Fe +FsK; $n=5$). Επίσης στατιστική διαφορά υπήρχε μεταξύ των φυτών ελέγχου παρουσία FsK (No stress(+Fe)+FsK; $n=5$) με τα φυτά που είχαν υποστεί καταπόνηση λόγω έλλειψης Fe παρουσία του FsK (-Fe +FsK; $n=5$).



Γράφημα 34: Μήκος ρίζας. Καμία στατιστικώς σημαντική διαφορά



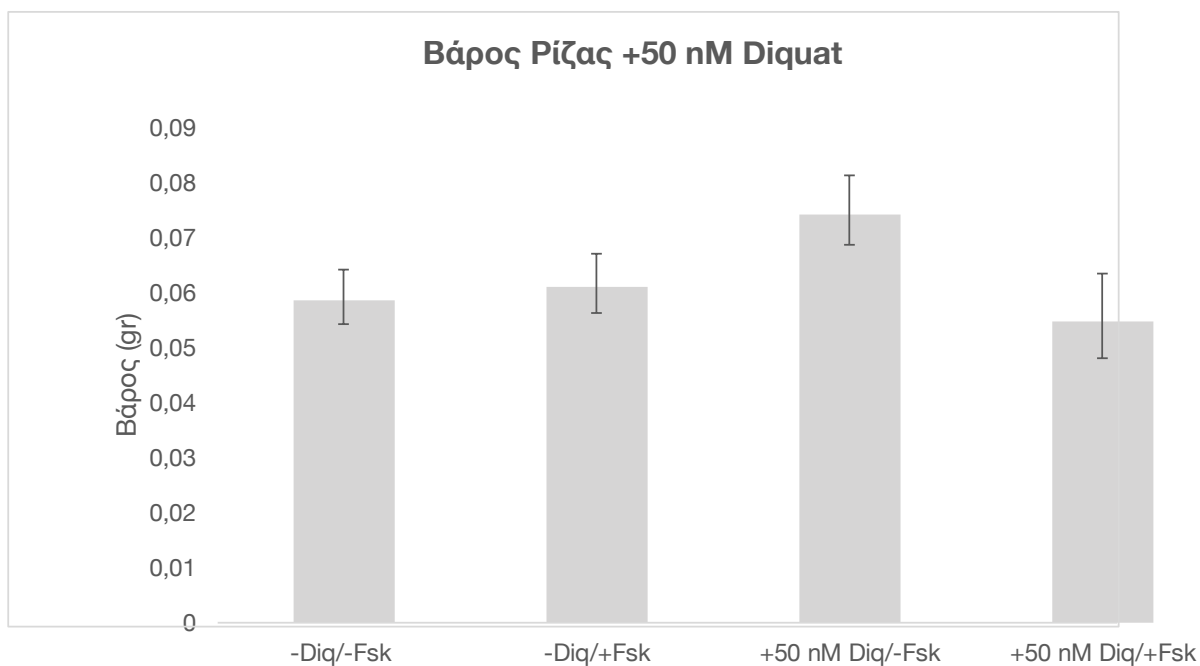
Εικόνα 10: Δειγματοληψία Fe stress 44dpi

3.1.3 Αβιοτική καταπόνηση λόγω Οξειδωτικής καταπόνησης- Diquat

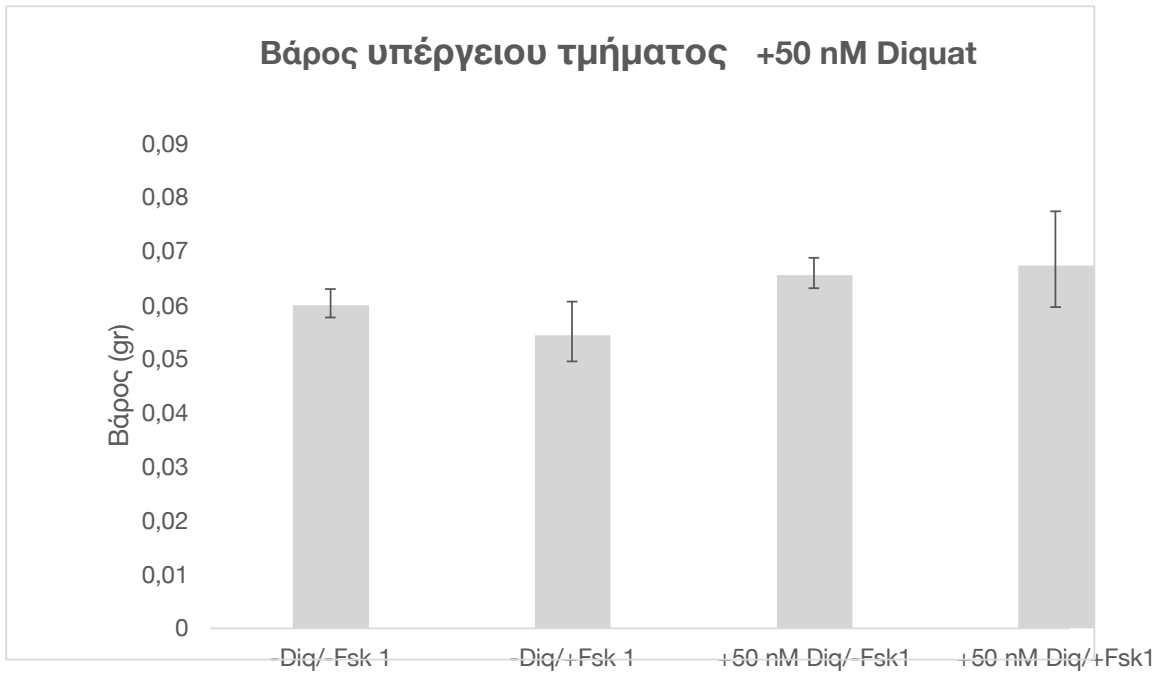
Την 21^η μέρα για τα φυτά (6dpr) έγινε δειγματοληψία. Υπολογίστηκε ο μέσος όρος για το φρέσκο βάρος της ρίζας του βλαστού καθώς και του μήκους της ρίζας. Στη συνέχεια έγινε ANOVA test το οποίο εξέτασε την επίδραση δυο διαφορετικών ανεξάρτητων μεταβλητών. Σε αυτή την περίπτωση αβιοτική καταπόνηση λόγω οξειδωτικής καταπόνησης (Diquat) και απουσία καταπόνησης παρουσία και απουσία του μύκητα FsK.

Τα παρακάτω διαγράμματα αφορούν την απεικόνιση φαινοτυπικών χαρακτηριστικών για τρεις διαφορετικές συγκεντρώσεις Diquat (50/100/150 nM) με τη σειρά που παρουσιάζονται (φρέσκου βάρους ρίζας, φρέσκου βάρους φύλων και μήκους ρίζας) μεταξύ των φυτών ελέγχου (No stress-FsK; $n=5$), των φυτών που έχουν υποστεί καταπόνηση λόγω οξειδωτικής καταπόνησης απουσία του FsK (+Diq -FsK; $n=5$), των φυτών χωρίς καταπόνηση στην παρουσία του FsK (No stress/+FsK ; $n=5$) και των φυτών με καταπόνηση στην παρουσία FsK (+Diq/+FsK; $n=5$). Οι γραμμές σφάλματος δείχνουν το τυπικό σφάλμα του μέσου. Η στατιστική ανάλυση διεξήχθη για χρησιμοποιώντας μέθοδο ANOVA ακολουθούμενη από δοκιμασία Tukey's HSD. Τα γράμματα υποδεικνύουν ομάδες σημαντικότητας, με τα διαφορετικά γράμματα να υποδεικνύουν σημαντικές διαφορές ($p<0.05$, Tukey's HSD).

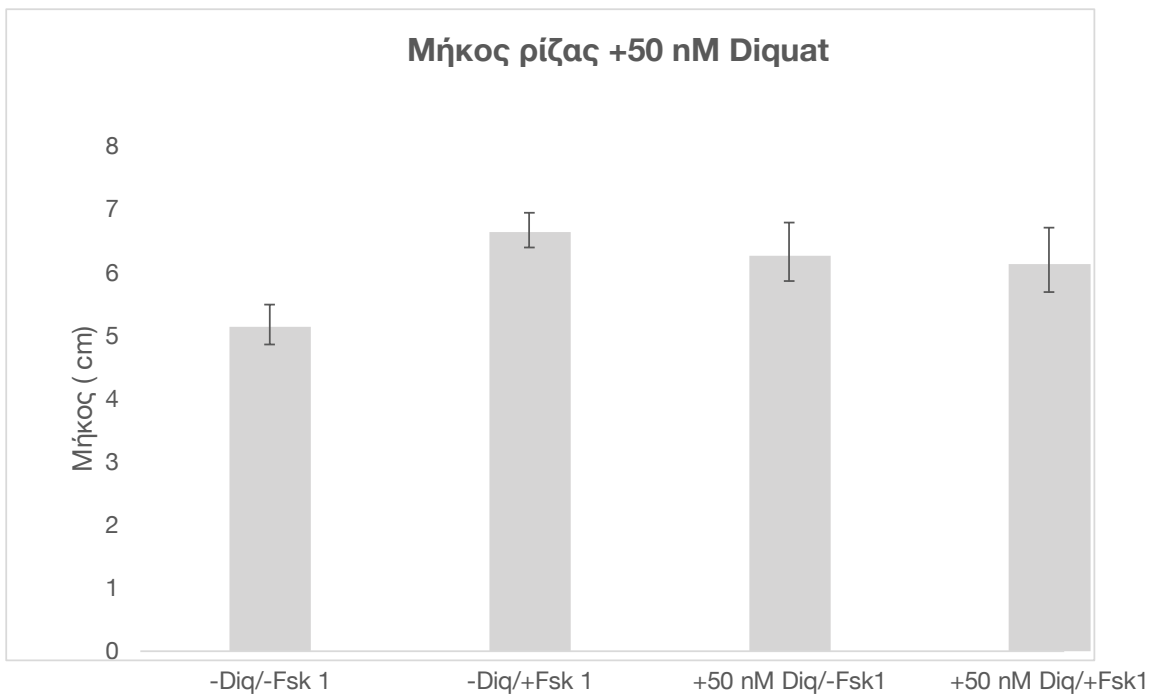
Αποτελέσματα +50nM Diquat:



Γράφημα 35: Βάρος ρίζας. Καμία στατιστικώς σημαντική διαφορά

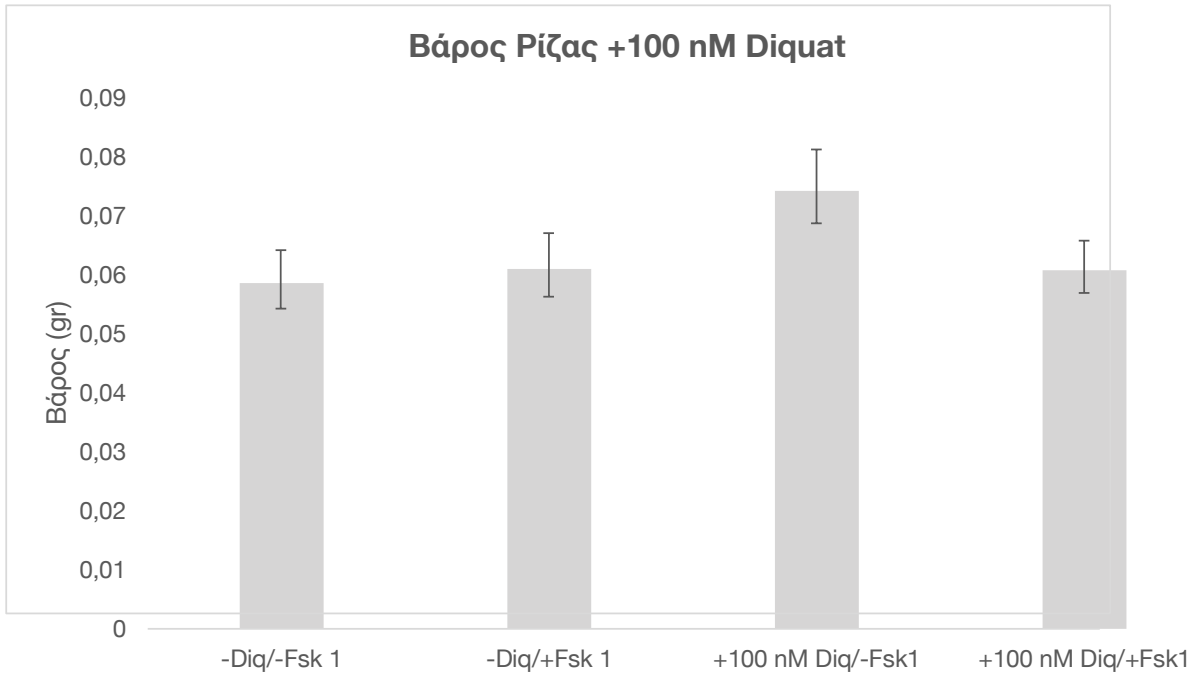


Γράφημα 36: Βάρος υπέργειου τμήματος. Καμία στατιστικώς σημαντική διαφορά

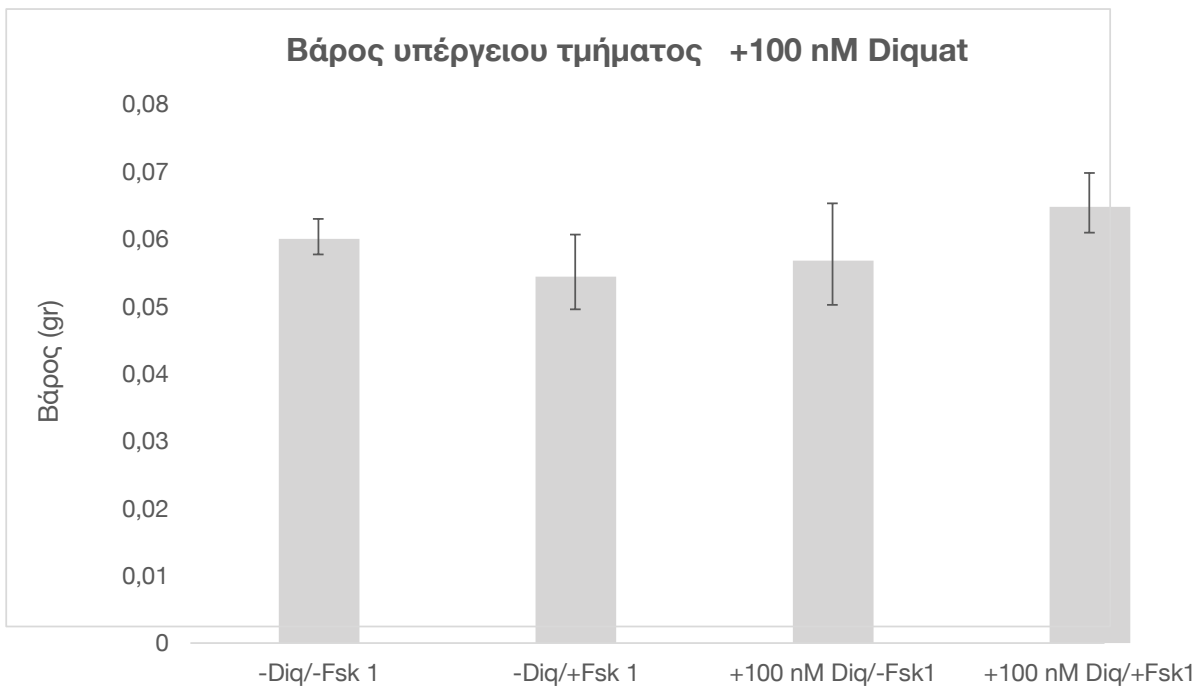


Γράφημα 37: Μήκος ρίζας. Καμία στατιστικώς σημαντική διαφορά

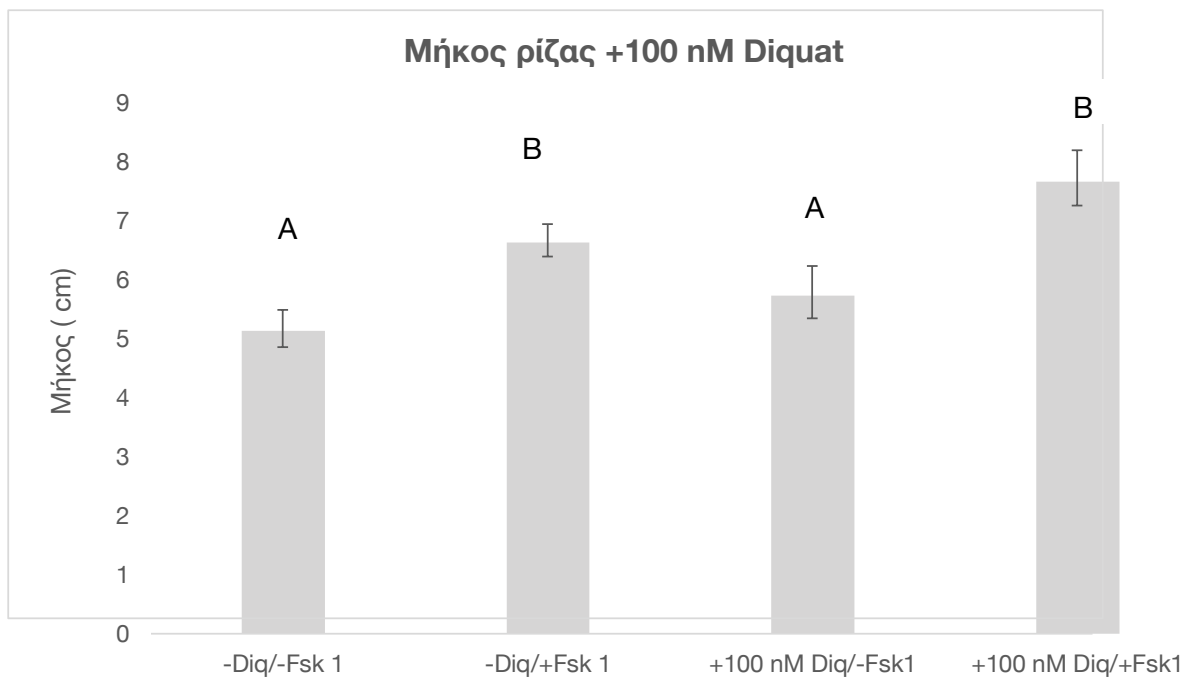
Αποτελέσματα +100nM Diquat:



Γράφημα 38: Βάρος ρίζας. Καμία στατιστικώς σημαντική διαφορά

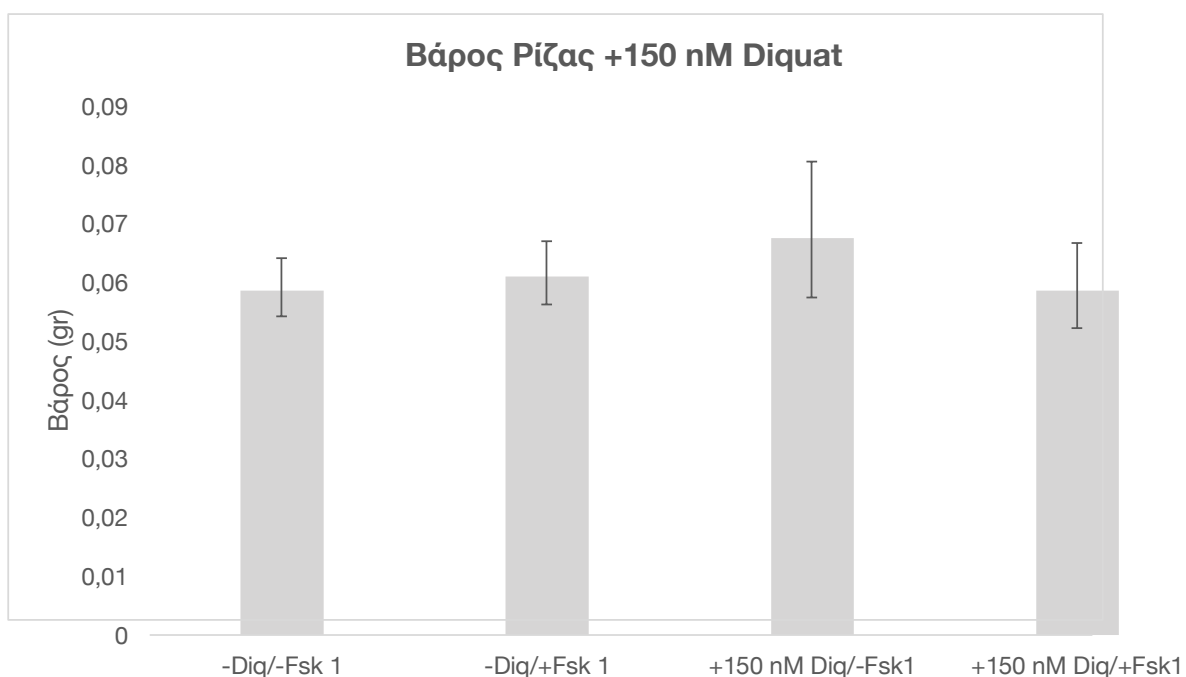


Γράφημα 39: Βάρος υπέργειου τμήματος. Καμία στατιστικώς σημαντική διαφορά

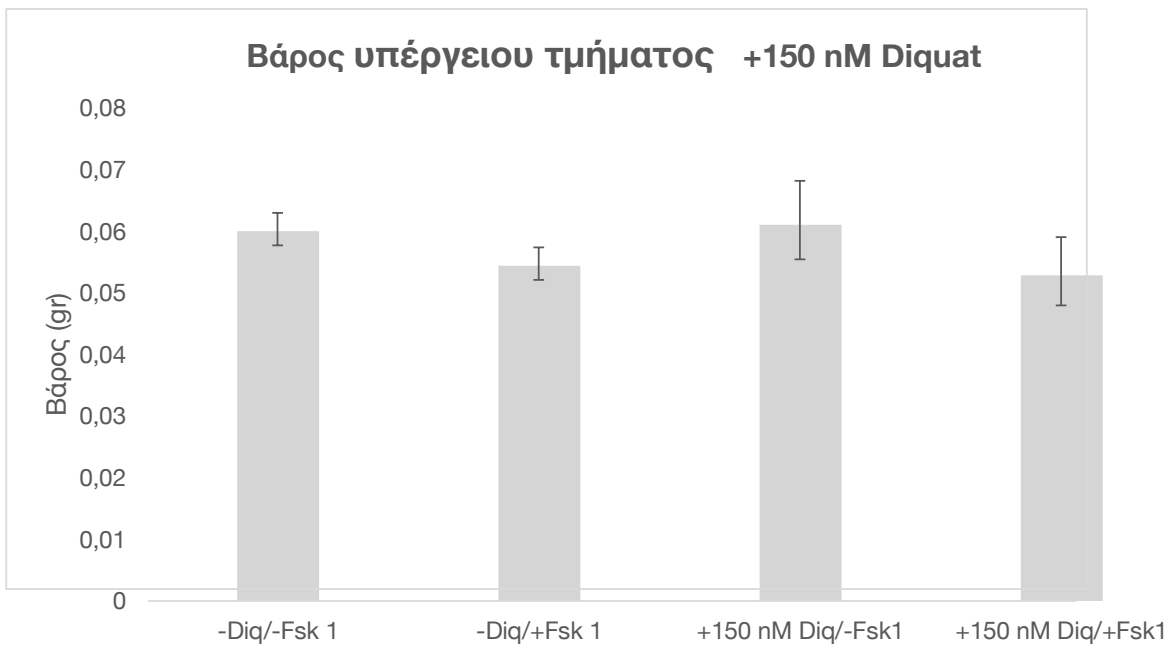


Γράφημα 40: Μήκος ρίζας. Στη ρίζα στατιστικώς σημαντική διαφορά υπήρχε μεταξύ των φυτών ελέγχου απουσία FsK, (-Diq/-FsK) και των φυτών με καταπόνηση απουσία FsK, (+100nM Diq/-FsK) σε σχέση με τα φυτά ελέγχου παρουσία FsK (-Diq/+FsK) και τα φυτά με καταπόνηση παρουσία FsK, (+100nM Diq/+FsK).

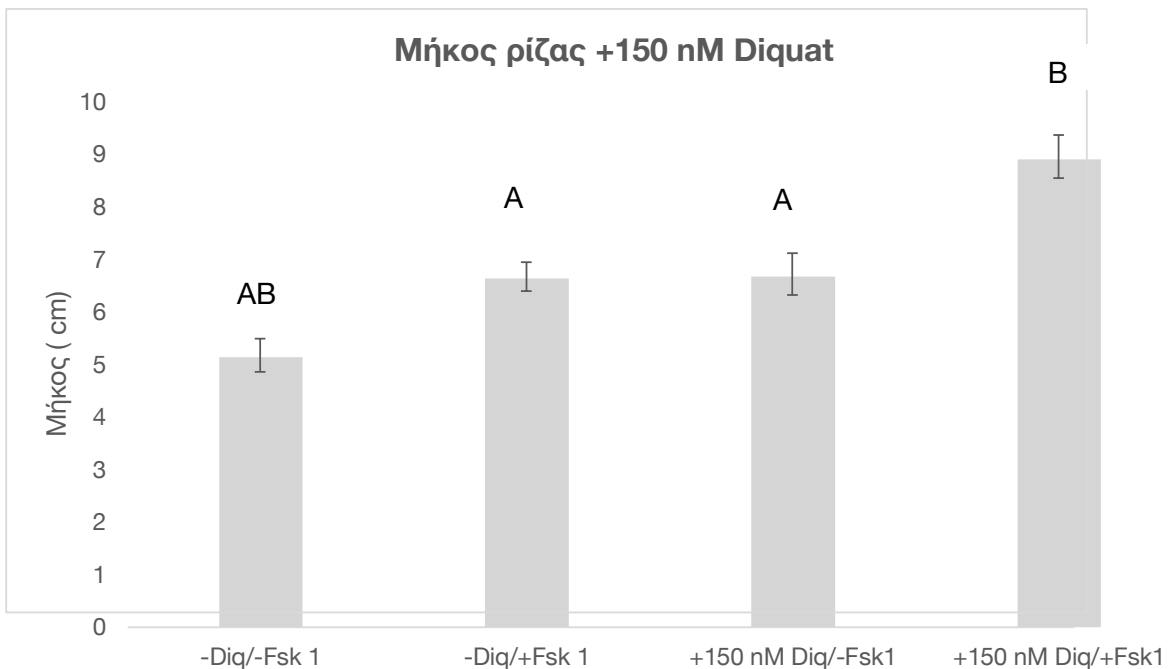
Αποτελέσματα +150nM Diquat:



Γράφημα 41: Βάρος ρίζας. Καμία στατιστικώς σημαντική διαφορά



Γράφημα 42: Βάρος υπέργειου τμήματος. Καμία στατιστικώς σημαντική διαφορά



Γράφημα 43: Μήκος ρίζας. Στη ρίζα στατιστικώς σημαντική διαφορά υπήρχε μεταξύ των φυτών ελέγχου παρουσία FsK, (-Diq/+FsK;n=5) και των φυτών με καταπόνηση απουσία FsK, (+150nM Diq/-FsK;n=5) σε σχέση με τα φυτά που υπέστησαν καταπόνηση παρουσία FsK (+50nM Diq/+FsK; n=5)

3.2 Απομόνωση-Ποσοτικοποίηση DNA

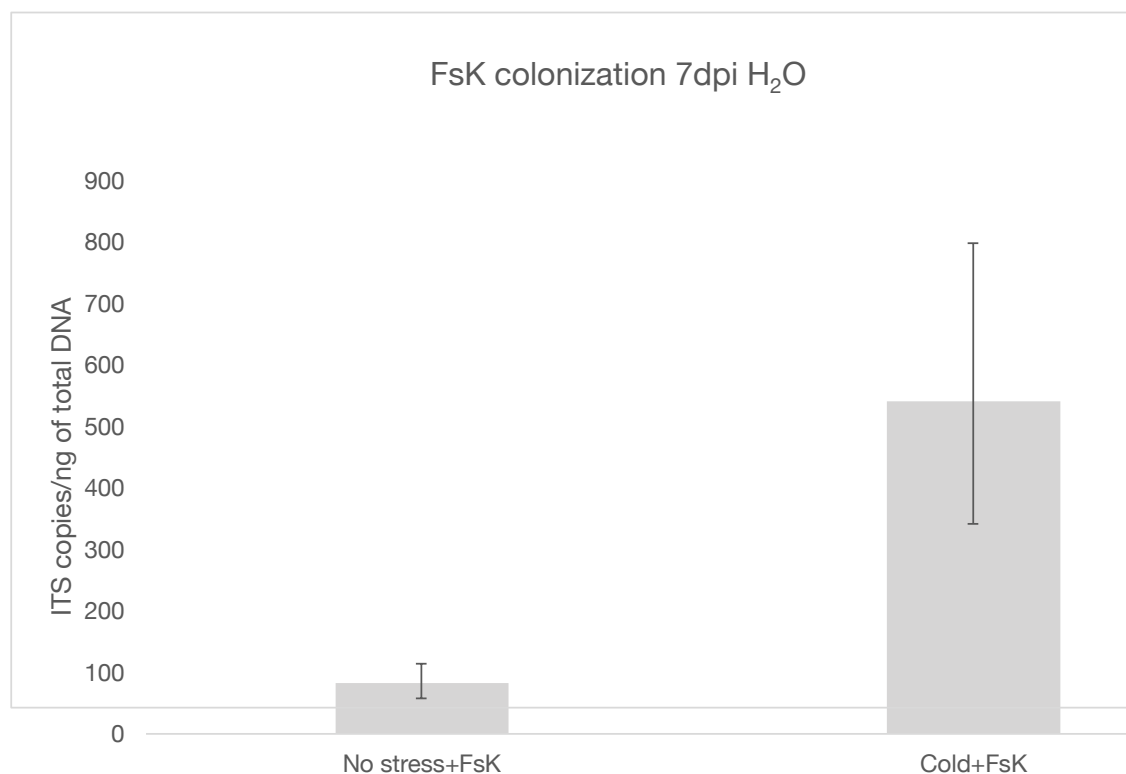
Μετά την απομόνωση του γενωμικού DNA ακολούθησε ποσοτικοποίηση του και για τις τρεις συνθήκες αβιοτικής καταπόνησης με την συσκευή Qubit.

3.3 Ανίχνευση αποικισμού από τον μύκητα στις ρίζες του φυτού *Lotus japonicus*

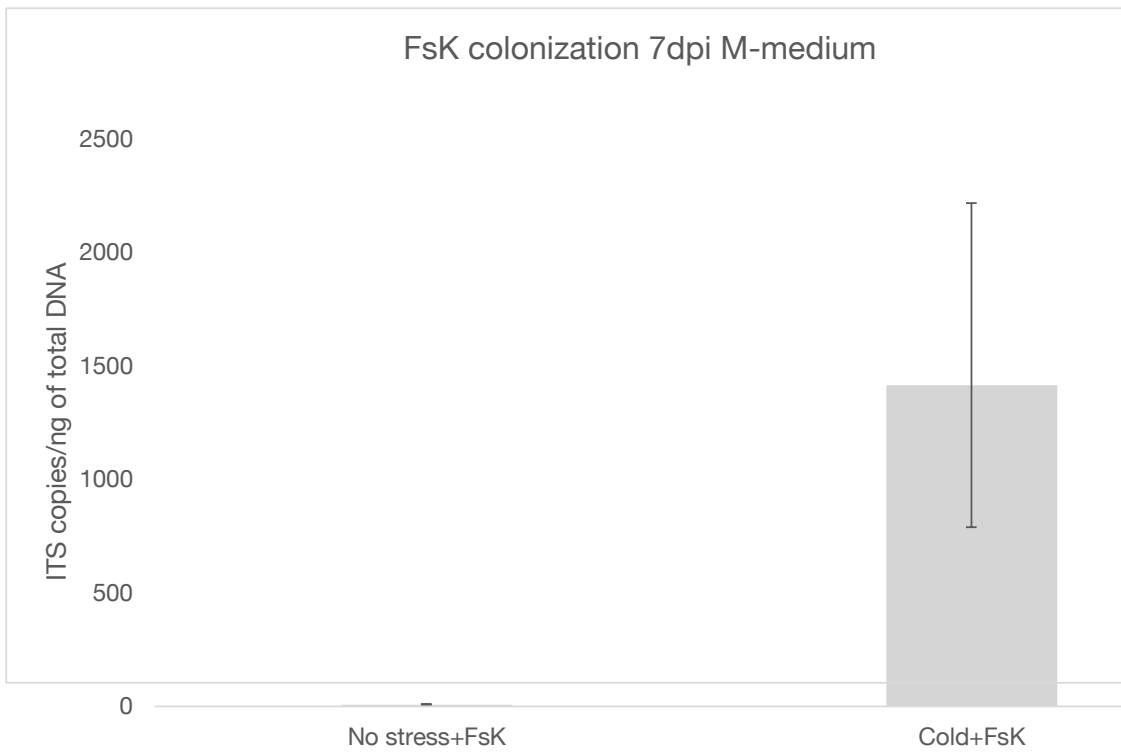
Χρησιμοποιώντας τα δεδομένα από την ποσοτικοποίηση του DNA σε συνδυασμό με τα αποτελέσματα της qPCR χρησιμοποιώντας εκκινητές για το γονίδιο ITS, προσδιορίστηκε η επιτυχία του αποικισμού του μύκητα *Fusarium solani* στις ρίζες των φυτών στις διαφορετικές συνθήκες καταπόνησης.

3.3.1 Αβιοτική καταπόνηση λόγω υψηλής θερμοκρασίας/ ψύχους

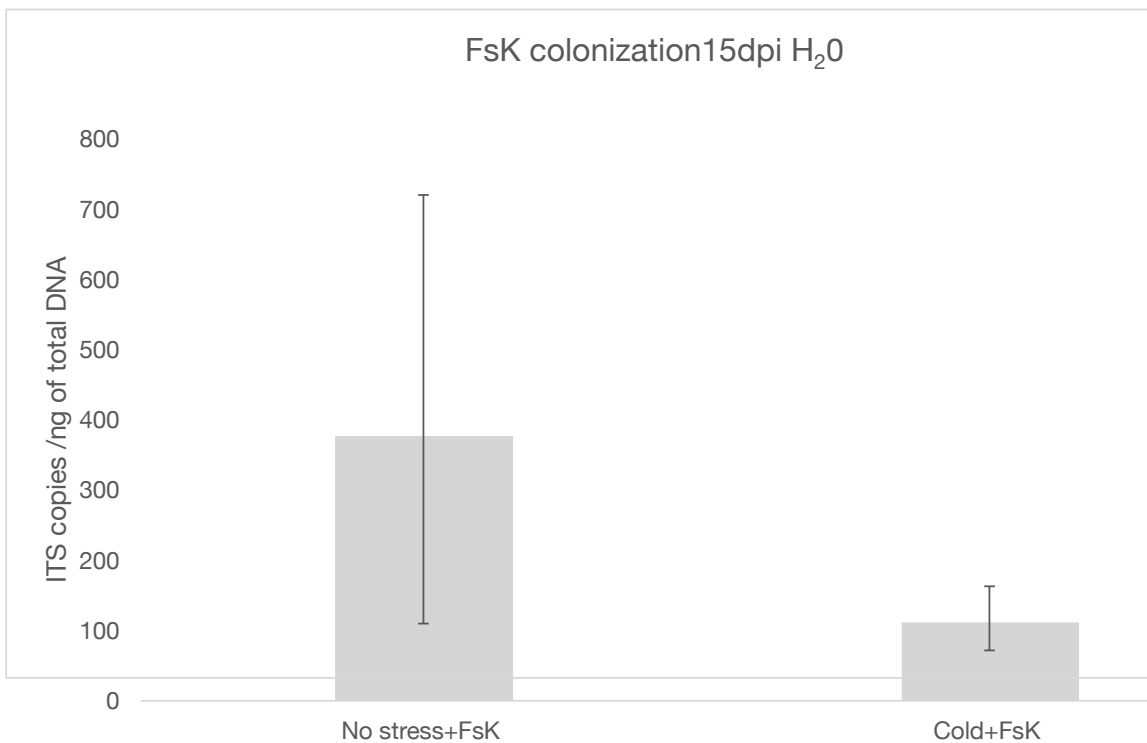
3.3.1.1 Αβιοτική καταπόνηση λόγω ψύχους



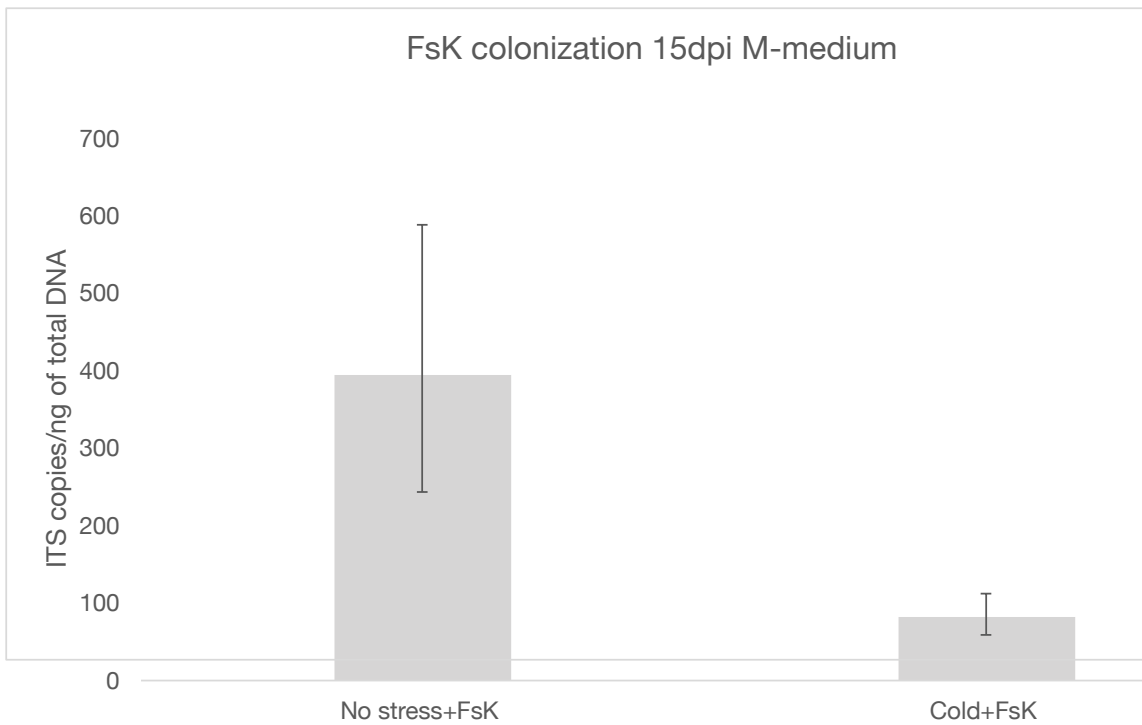
Γράφημα 44: εννέα ημερών φυτά εμβολιάστηκαν με το μύκητα και έγινε δειγματοληψία 7 μέρες μετά. Τα δεδομένα αναπαριστούν 2 τεχνικές επαναλήψεις για 5 δείγματα για τις συνθήκες ψύχους και 2 τεχνικές επαναλήψεις για 3 δείγματα για τη συνθήκη χωρίς καταπόνηση



Γράφημα 45: εννέα ημερών φυτά εμβολιάστηκαν με το μύκητα και έγινε δειγματοληψία 7 μέρες μετά. Τα δεδομένα αναπαριστούν 2 τεχνικές επαναλήψεις για 5 δείγματα για τις συνθήκες ψύχους και 3 τεχνικές επαναλήψεις για 3 δείγματα για τη συνθήκη χωρίς καταπόνηση

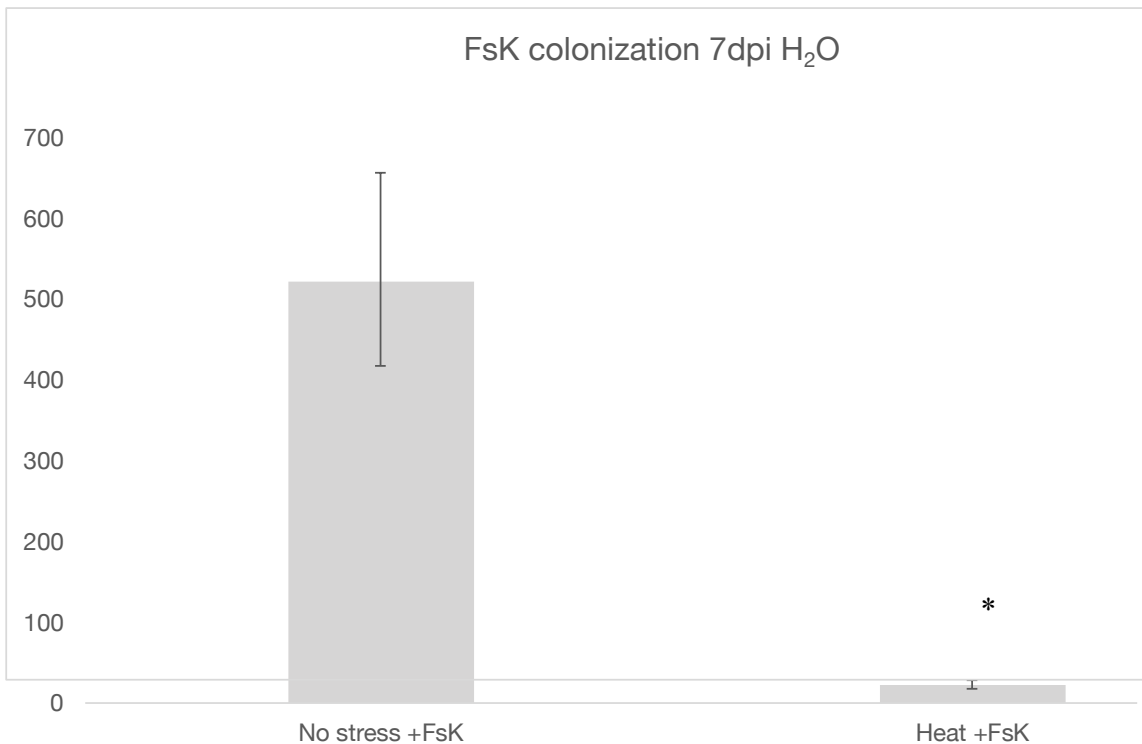


Γράφημα 46: εννέα ημερών φυτά εμβολιάστηκαν με το μύκητα και έγινε δειγματοληψία 15 μέρες μετά. Τα δεδομένα αναπαριστούν 2 τεχνικές επαναλήψεις για 5 δείγματα για τις συνθήκες ψύχους και 2 τεχνικές επαναλήψεις για 3 δείγματα για τη συνθήκη χωρίς καταπόνηση.

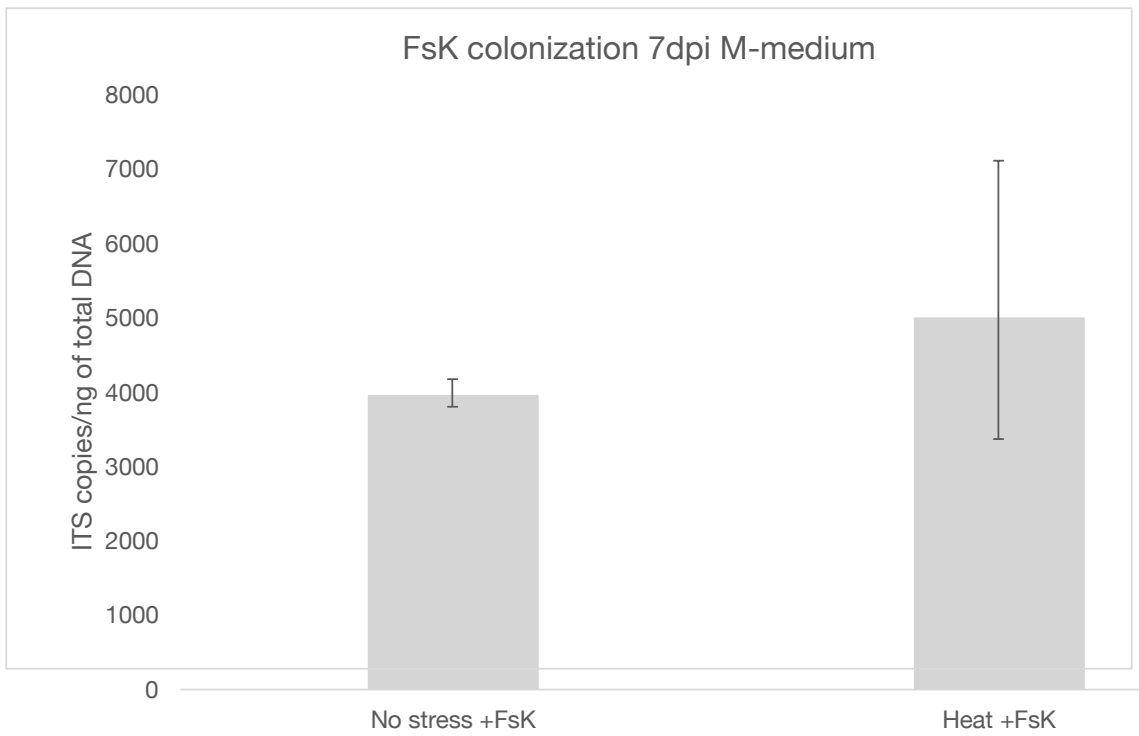


Γράφημα 47: εννέα ημερών φυτά εμβολιάστηκαν με το μύκητα και έγινε δειγματοληψία 15 μέρες μετά. Τα δεδομένα αναπαριστούν 2 τεχνικές επαναλήψεις για 5 δείγματα για τις συνθήκες ψύχους και 2 τεχνικές επαναλήψεις για 3 δείγματα για τη συνθήκη χωρίς καταπόνηση.

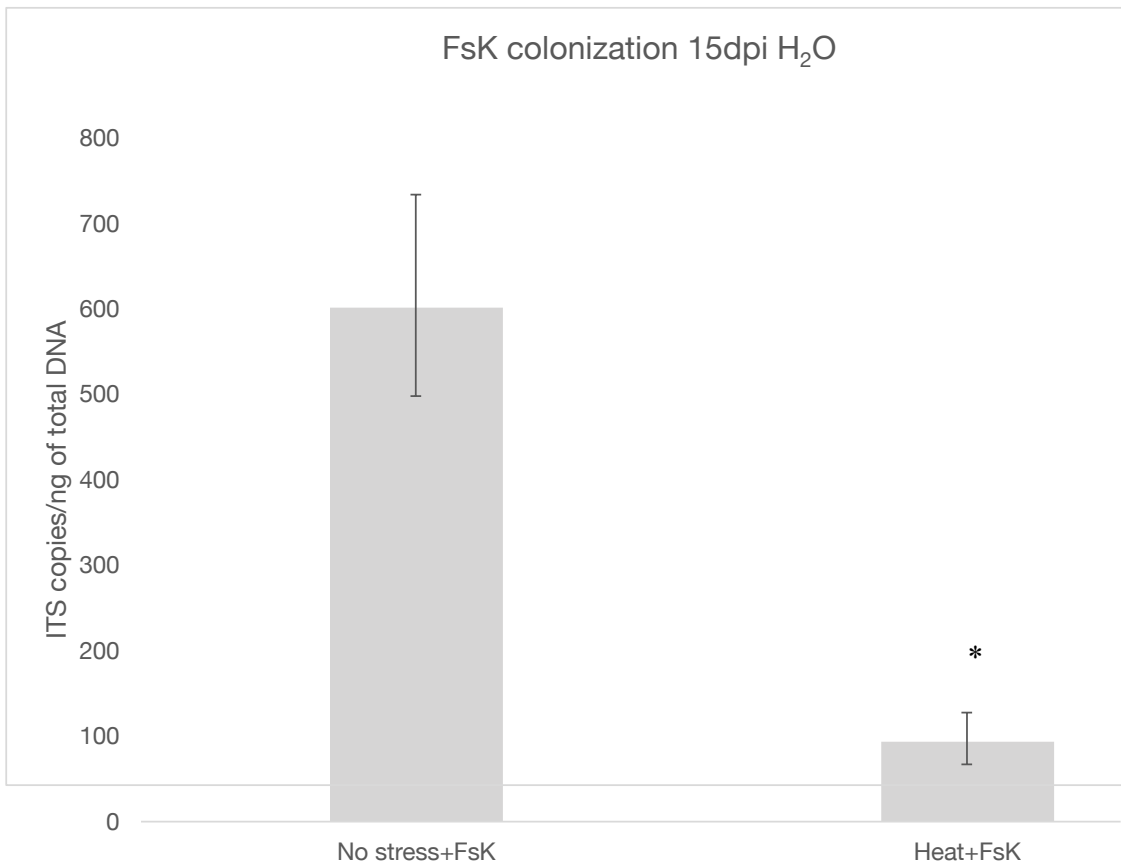
3.3.1.2 Αβιοτική καταπόνηση λόγω υψηλής θερμοκρασίας



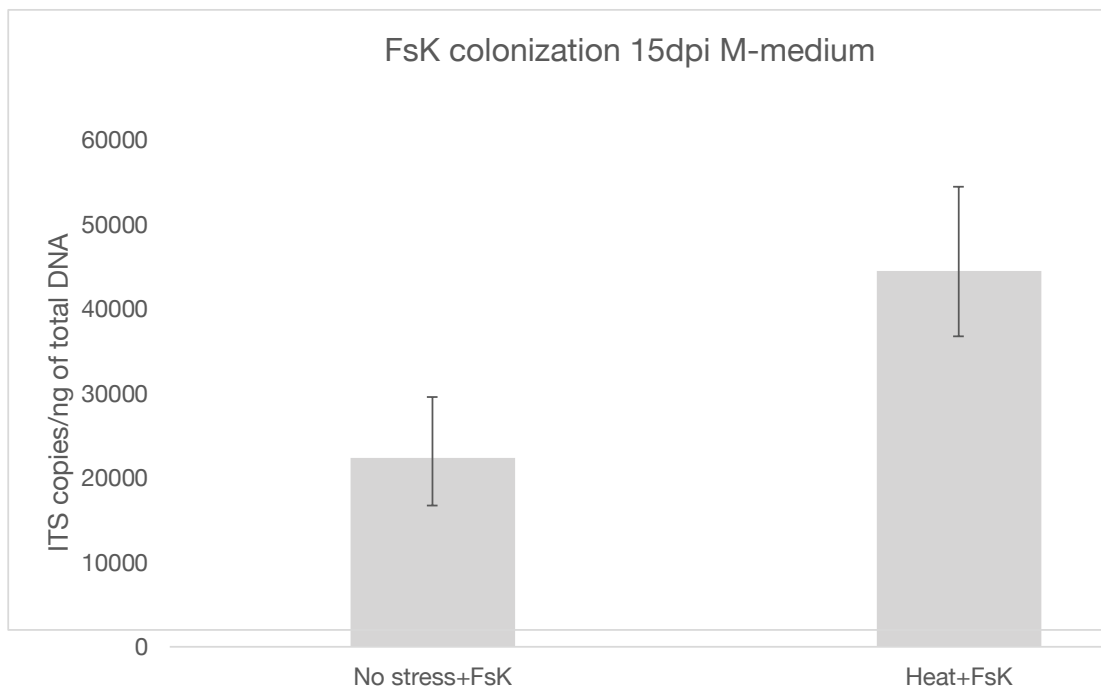
Γράφημα 48: εννέα ημερών φυτά εμβολιάστηκαν με το μύκητα και έγινε δειγματοληψία 7 μέρες μετά. Τα δεδομένα αναπαριστούν 2 τεχνικές επαναλήψεις για 5 δείγματα για τις συνθήκες υψηλής θερμοκρασίας και 2 τεχνικές επαναλήψεις για 3 δείγματα για τη συνθήκη χωρίς καταπόνηση.



Γράφημα 49: εννέα ημερών φυτά εμβολιάστηκαν με το μύκητα και έγινε δειγματοληψία 7 μέρες μετά. Τα δεδομένα αναπαριστούν 2 τεχνικές επαναλήψεις για 5 δείγματα για τις συνθήκες ψηλής θερμοκρασίας και 2 τεχνικές επαναλήψεις για 3 δείγματα για τη συνθήκη χωρίς καταπόνηση.

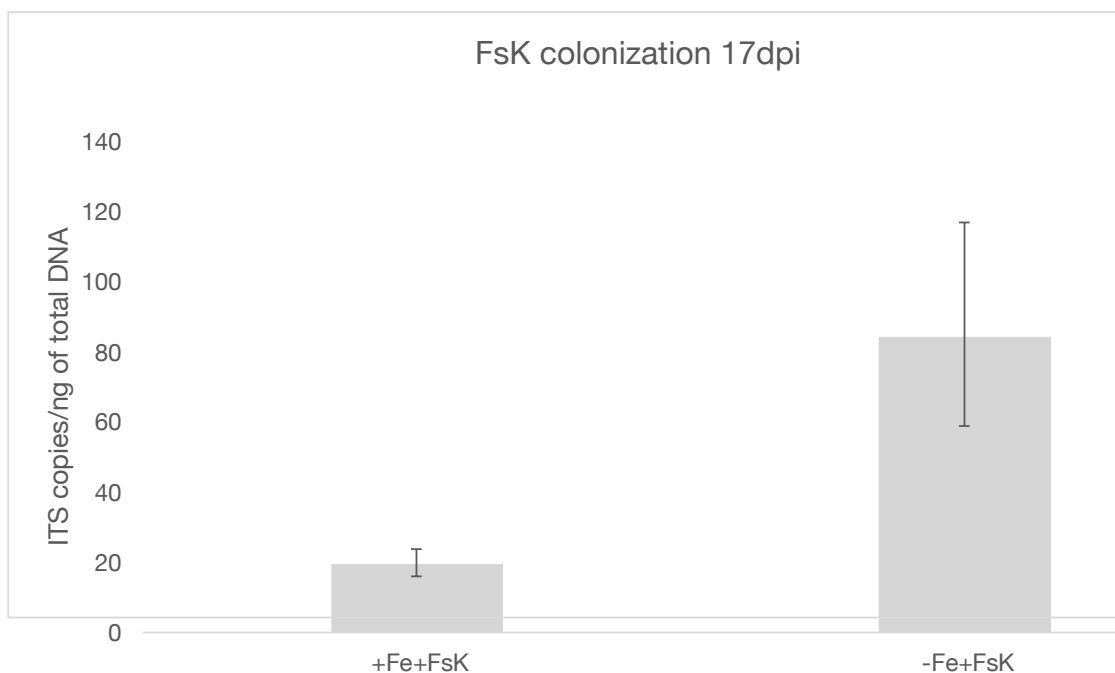


Γράφημα 50: εννέα ημερών φυτά εμβολιάστηκαν με το μύκητα και έγινε δειγματοληψία 15μέρες μετά. Τα δεδομένα αναπαριστούν 2 τεχνικές επαναλήψεις για 5 δείγματα για τις συνθήκες ψηλής θερμοκρασίας και 2 τεχνικές επαναλήψεις για 3 δείγματα για τη συνθήκη χωρίς καταπόνηση.

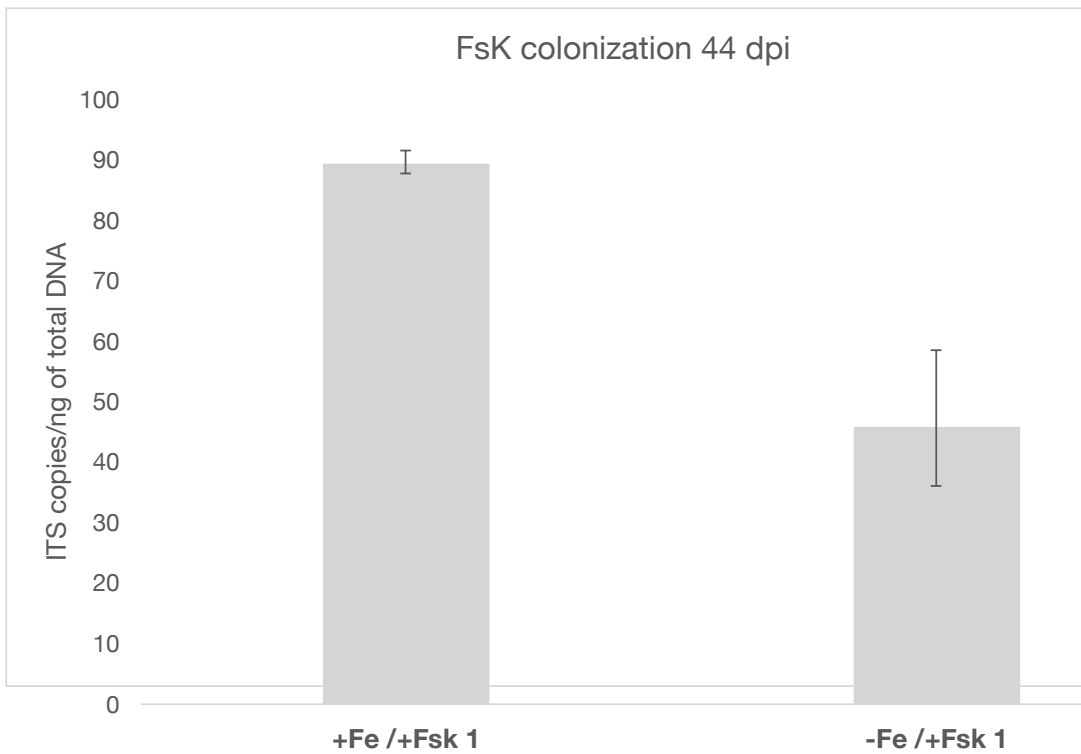


Γράφημα 51: εννέα ημερών φυτά εμβολιάστηκαν με το μύκητα και έγινε δειγματοληψία 15 μέρες μετά. Τα δεδομένα αναπαριστούν 2 τεχνικές επαναλήψεις για 5 δείγματα για τις συνθήκες υψηλής θερμοκρασίας και 2 τεχνικές επαναλήψεις για 3 δείγματα για τη συνθήκη χωρίς καταπόνηση.

3.3.2 Αβιοτική καταπόνηση λόγω έλλειψης σιδήρου

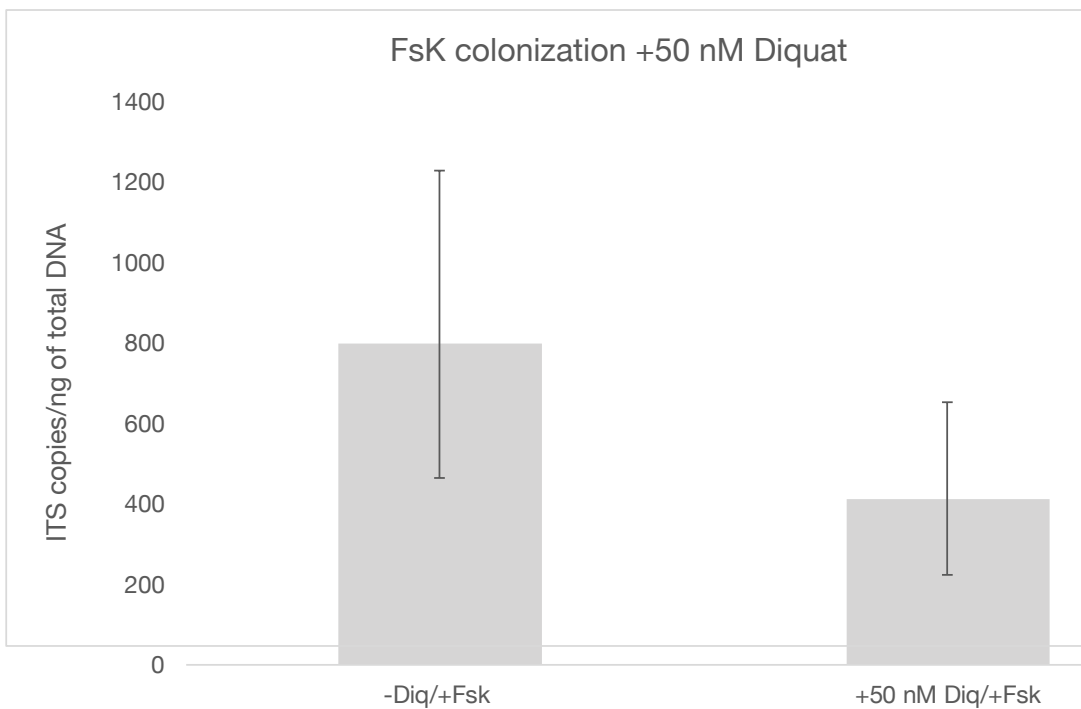


Γράφημα 52 :εννέα ημερών φυτά εμβολιάστηκαν με το μύκητα και έγινε δειγματοληψία 17 μέρες μετά. Τα δεδομένα αναπαριστούν 2 τεχνικές επαναλήψεις για 4 δείγματα για τις συνθήκες χωρίς καταπόνηση και 2 τεχνικές επαναλήψεις για 3 δείγματα για τις συνθήκες απουσίας σιδήρου.

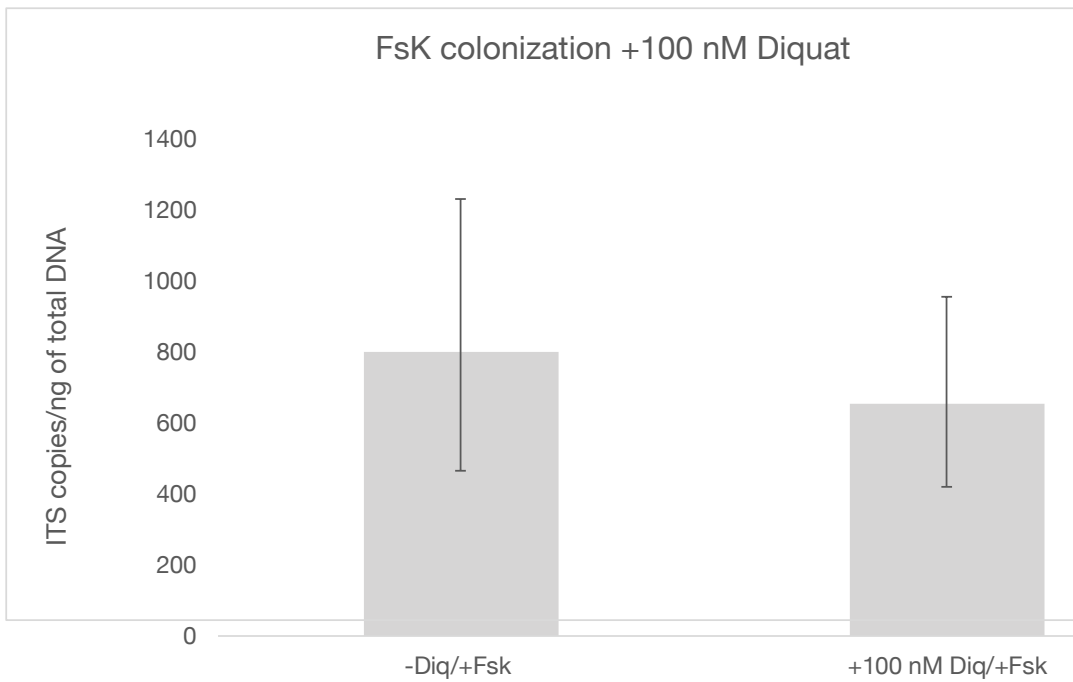


Γράφημα 53: εννέα ημερών φυτά εμβολιάστηκαν με το μύκητα και έγινε δειγματοληψία 44 μέρες μετά. Τα δεδομένα αναπαριστούν 2 τεχνικές επαναλήψεις για 5 δείγματα για τις συνθήκες χωρίς καταπόνηση και 2 τεχνικές επαναλήψεις για 3 δείγματα για τις συνθήκες απουσίας σιδήρου.

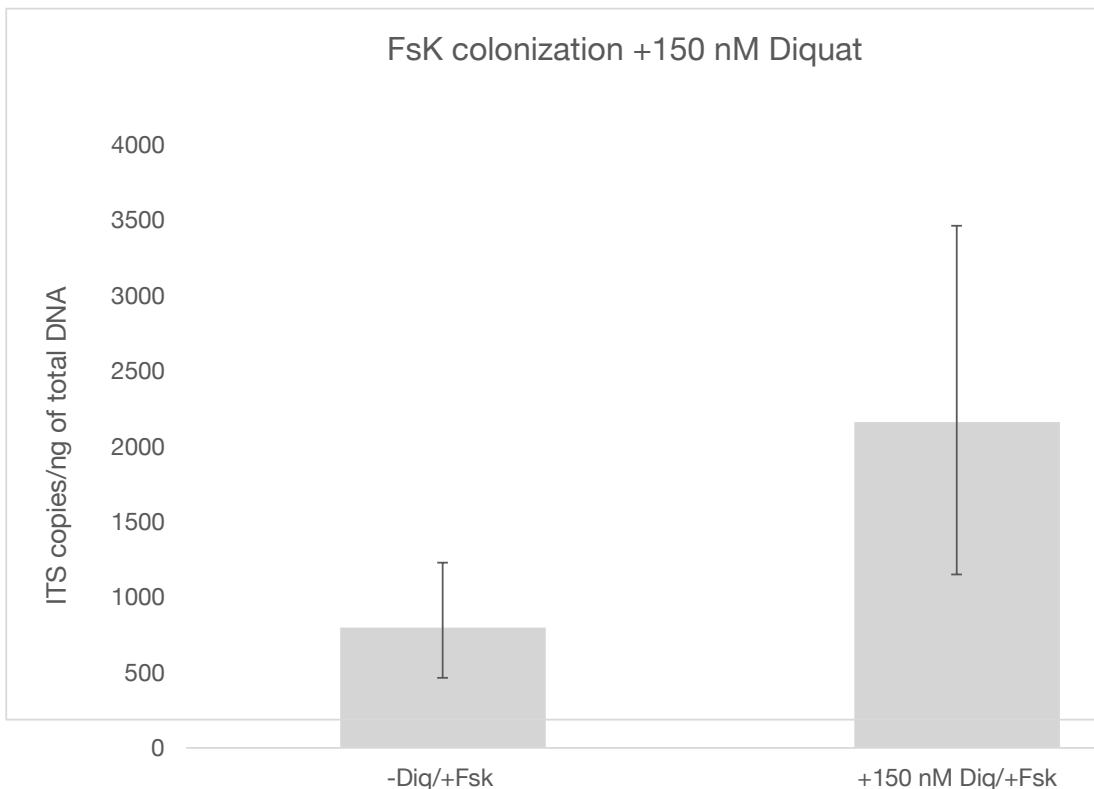
3.3.3 Οξειδωτική καταπόνηση- Diquat



Γράφημα 54: Δεκαπέντε ημερών φυτά εμβολιάστηκαν με το μύκητα και έγινε δειγματοληψία 6 μέρες μετά. Τα δεδομένα αναπαριστούν 2 τεχνικές επαναλήψεις για 3 δείγματα για τις συνθήκες χωρίς καταπόνηση και 2 τεχνικές επαναλήψεις για 5 δείγματα για τις συνθήκες μεταχείρισης με φυτοφάρμακο.



Γράφημα 55: Δεκαπέντε ημερών φυτά εμβολιάστηκαν με το μύκητα και έγινε δειγματοληψία 6 μέρες μετά. Τα δεδομένα αναπαριστούν 2 τεχνικές επαναλήψεις για 3 δείγματα για τις συνθήκες χωρίς καταπόνηση και 2 τεχνικές επαναλήψεις για 5 δείγματα για τις συνθήκες μεταχείρισης με φυτοφάρμακο.



Γράφημα 56: Δεκαπέντε ημερών φυτά εμβολιάστηκαν με το μύκητα και έγινε δειγματοληψία 6 μέρες μετά. Τα δεδομένα αναπαριστούν 2 τεχνικές επαναλήψεις για 3 δείγματα για τις συνθήκες χωρίς καταπόνηση και 2 τεχνικές επαναλήψεις για 5 δείγματα για τις συνθήκες μεταχείρισης με φυτοφάρμακο.

4. Συζήτηση

Στην παρούσα εργασία σκοπός ήταν να μελετήσουμε την επίδραση του ενδοφυτικού μύκητα *Fusarium solani* στέλεχος K (FsK) στην απόκριση του φυτού *Lotus japonicus* σε αβιοτική καταπόνηση. Αν και δεν υπάρχουν πολλά δεδομένα στη βιβλιογραφία σχετικά με το φυτό *Lotus japonicus*, με βάση προηγούμενες μελέτες γνωρίζουμε ότι η συμβίωση ενός φυτού με ενδοφυτικούς συμβιωτικούς μύκητες όπως ο FsK, μπορεί να οδηγήσει σε βελτίωση της αντοχής του φυτού σε διάφορες καταστάσεις αβιοτικής καταπόνησης. Από την ανάλυση των δεδομένων για τις τρεις καταστάσεις αβιοτικής καταπόνησης, προέκυψε ότι υπήρχαν στατιστικώς σημαντικές διαφορές μεταξύ των φυτών που ανήκαν σε διαφορετικές συνθήκες του πειράματος. Δεν υπήρχαν στατιστικώς σημαντικές διαφορές στο πείραμα με την αβιοτική καταπόνηση λόγω υψηλής θερμοκρασίας. Με βάση τα αποτελέσματα εμφανίστηκαν στατιστικώς σημαντικές διαφορές μεταξύ των συνθηκών, στα πειράματα αβιοτικής καταπόνησης λόγω ψύχους, έλλειψης σιδήρου και οξειδωτικής καταπόνησης. Συγκεκριμένα, στο πείραμα με την αβιοτική καταπόνηση λόγω ψύχους, κατά τη δειγματοληψία 7dpi όταν τα φυτά είχαν δεχθεί πότισμα μόνο με νερό και τη δειγματοληψία των 7dpi και 15dpi όταν τα φυτά δέχθηκαν πότισμα με M-medium, φαίνεται ότι η χαμηλή θερμοκρασία επηρεάζει θετικά την ανάπτυξη του υπέργειου τμήματος του φυτού (βάρος φύλλων). Ο FsK δεν φαίνεται να είχε κάποια θετική ή αρνητική επίδραση 7dpi στα φυτά που έχουν ποτισθεί με M medium, όπου ο FsK φαίνεται ότι προάγει περαιτέρω αυτή την απόκριση στο φυτό. Με βάση τα δεδομένα κατά τη δειγματοληψία 7dpi και 15 dpi όταν τα φυτά δέχθηκαν πότισμα μόνο με νερό, φαίνεται ότι η χαμηλή θερμοκρασία επηρεάζει θετικά και την αύξηση του βάρους της ρίζας.

Τα φυτά ανταποκρίνονται σε καταστάσεις αβιοτικής καταπόνησης, όπως έλλειψη θρεπτικών με αλλαγές στην φυσιολογία τους. Συγκεκριμένα, η έλλειψη θρεπτικών μπορεί να ασκήσει επίδραση στην αρχιτεκτονική του ριζικού συστήματος μεταβάλλοντας τη μάζα, το μήκος, τη γωνία, τη διάμετρο των ριζών, διαδικασία που αναφέρεται ως μορφογενετική απόκριση που προκαλείται από αβιοτική καταπόνηση Potters et al. (2009); Gruber et al. (2013). Για την αντιμετώπιση της ανεπάρκειας Fe, τα φυτά μπορούν να αυξήσουν την επιφάνεια του ριζικού συστήματος, ενισχύοντας έτσι την ικανότητα πρόσληψης θρεπτικών. Με βάση τους Gruber et al. (2013), φάνηκε ότι το μήκος της κύριας ρίζας και ο αριθμός των πλάγιων ριζών αυξάνονται με μέτρια ανεπάρκεια Fe, ενώ αυξάνονται δραστικά σε καταστάσεις αβιοτικής καταπόνησης με ολική έλλειψη Fe. Σχετικά με το πείραμα αβιοτικής καταπόνησης λόγω έλλειψης σιδήρου, τα αποτελέσματά μας έδειξαν ότι απουσία σιδήρου υπήρχε θετική επίδραση στην ανάπτυξη της ρίζας ακόμα και απουσία του μύκητα FsK

(17 dpi). Σε συνθήκες αβιοτικής καταπόνησης η παρουσία του μύκητα δεν ευνοούσε την ανάπτυξη της μάζας της ρίζας. Εντούτοις μακροπρόθεσμα (44dpi) φαίνεται ότι ο μύκητας ευνοεί την ανάπτυξη του υπέργειου τμήματος του φυτού, σε συνθήκες έλλειψης σιδήρου.

Σύμφωνα με τους Potters et al. (2009), η ανισορροπία παραγωγής ελευθέρων ριζών (ROS) σε φυτά οδηγεί σε επαγόμενες από καταπόνηση μορφογενετικές αλλαγές (SIMRs). Οι ελεύθερες ρίζες έχουν συσχετιστεί με αρνητικές επιπτώσεις για την ανάπτυξη των φυτών Apel K. & Hirt H. (2004). Η έκθεση των φυτών σε φυτοφάρμακα όπως το Diquat οδηγεί, μεταξύ άλλων, στην αναστολή της αύξησης της κύριας ρίζας (Pasternak T. Et al. 2005). Όσον αφορά το πείραμα αβιοτικής καταπόνησης λόγω οξειδωτικής καταπόνησης, οι συγκεντρώσεις που χρησιμοποιήθηκαν φαίνεται

να μην προκάλεσαν καταπόνηση στα φυτά. Πιθανόν να χρειαστεί επανάληψη του πειράματος με χορήγηση μεγαλύτερης συγκέντρωσης φυτοφαρμάκου. Στατιστικά σημαντικές διαφορές παρατηρούνται στις συγκεντρώσεις 100nM και 150nM Diquat. Συγκεκριμένα φαίνεται ότι ο FsK έχει θετική επίδραση στην αύξηση του μήκους της ρίζας τόσο στα φυτά ελέγχου όσο και στα φυτά με καταπόνηση (100 nM Diquat). Ενώ σε κατάσταση αβιοτικής καταπόνησης (150 nM Diquat) παρουσία του μύκητα, φαίνεται ότι ο FsK προάγει περισσότερο την αύξηση του μήκους της ρίζας σε σχέση με τα φυτά ελέγχου. Με βάση τα παραπάνω αποτελέσματα φαίνεται ότι η συμβίωση του φυτού με τον μύκητα επηρεάζει πολύ οριακά, θετικά την ανάπτυξη του φυτού *Lotus japonicus* σε καταστάσεις αβιοτικής καταπόνησης.



Βιβλιογραφικές Παραπομπές:

1. Ζίφα, Α., Μαμούρης, Ζ. και Μούτσου, Κ. (2011). 'Βιολογία'. 2nd ed. Βόλος: Πανεπιστημιακές Εκδόσεις Θεσσαλίας.
2. Coleman, J. J. (2016). The *Fusarium solani* species complex: Ubiquitous pathogens of agricultural importance. *Molecular Plant Pathology*, 17(2), 146–158. <https://doi.org/10.1111/mpp.12289>
3. Summerell, B. A., Laurence, M. H., Liew, E. C. Y., & Leslie, J. F. (2010, October). Biogeography and phylogeography of *Fusarium*: A review. *Fungal Diversity*, Vol. 44, pp. 3–13. <https://doi.org/10.1007/s13225-010-0060-2>
4. Handberg K., Stougaard J. (1992): *Lotus japonicus*, an autogamous, diploid legume species for classical and molecular genetics. *Plant J.* 2: 487-496.
5. He, M., He, C. and Ding, N. (2018). Abiotic Stresses: General Defenses of Land Plants and Chances for Engineering Multistress Tolerance. *Frontiers in Plant Science*.
6. Wania, S. H., Kumar, V., Shriram, V., and Sah, S. K. (2016). Phytohormones and their metabolic engineering for abiotic stress tolerance in crop plants. *Crop J.* 4, 162–176. doi: 10.1016/j.cj.2016.01.010
7. Krings, M., Taylor, T., Hass, H., Kerp, H., Dotzler, N. and Hermsen, E., (2007). Fungal endophytes in a 400-million-yr-old land plant: infection pathways, spatial distribution, and host responses. *New Phytologist*, 174(3), pp.648-657.
8. Kavroulakis, N., Ntougias, S., Zervakis, G. I., Ehaliotis, C., Haralampidis, K., & Papadopoulou, K. K. (2007). Role of ethylene in the protection of tomato plants against soil-borne fungal pathogens conferred by an endophytic *Fusarium solani* strain. *Journal of Experimental Botany*, 58(14), 3853–3864. <https://doi.org/10.1093/jxb/erm230>
9. Kavroulakis, N., Ehaliotis, C., Ntougias, S., Zervakis, G. I., & Papadopoulou, K. K. (2005). Local and systemic resistance against fungal pathogens of tomato plants elicited by a compost derived from agricultural residues. *Physiological and Molecular Plant Pathology*, 66(5), 163–174. <https://doi.org/10.1016/j.pmpp.2005.06.003>
10. Kavroulakis, N., Doupis, G., Papadakis, I. E., Ehaliotis, C., & Papadopoulou, K. K. (2018). Tolerance of tomato plants to water stress is improved by the root endophyte *Fusarium solani* FsK. *Rhizosphere*, 6, 77–85. <https://doi.org/10.1016/j.rhisph.2018.04.003>
11. Li, G., Kronzucker, H. and Shi, W., (2016). The Response of the Root Apex in Plant Adaptation to Iron Heterogeneity in Soil. *Frontiers in Plant Science*, 7.
12. Potters, G., Pasternak, T. P., Guisez, Y., and Jansen, M. A. K. (2009). Different stresses, similar morphogenic responses: integrating a plethora of pathways. *Plant Cell Environ.* 32, 158–169. doi: 10.1111/j.1365-3040.2008.01908.x
13. Gruber, B. D., Giehl, R. F. H., Friedel, S., and von Wirén, N. (2013). Plasticity of the *Arabidopsis* root system under nutrient deficiencies. *Plant Physiol.* 163, 161–179. doi:10.1104/pp.113.218453
14. Apel K. & Hirt H. (2004) Reactive oxygen species: metabolism, oxidative stress and signaltransduction. *Annual Review of Plant Biology* 55, 373–399.
15. Pasternak T., Potters G., Caubergs R. & Jansen M.A.K. (2005b) Complementary interactions between oxidative stress and auxins control plant growth responses at plant, organ, and cellular level. *Journal of Experimental Botany* 56, 1991–2001.

