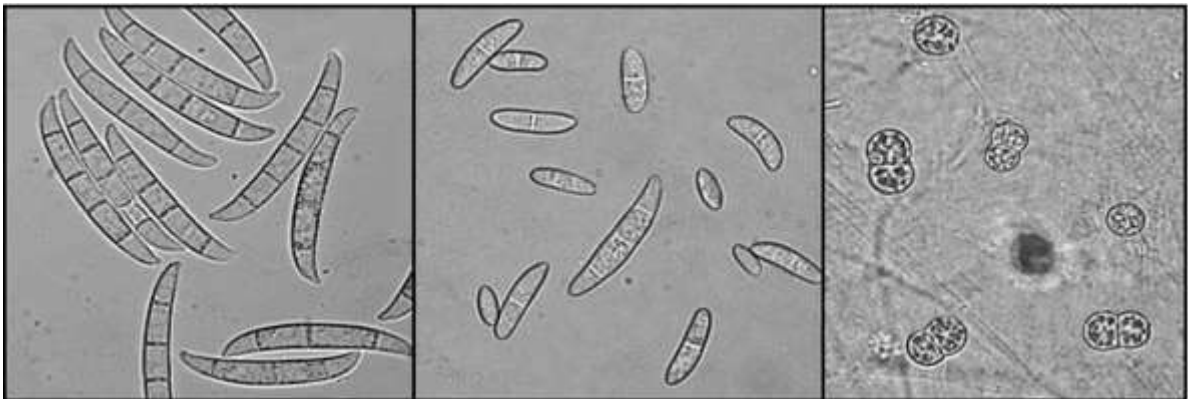


ΠΑΝΕΠΙΣΤΗΜΙΟ ΘΕΣΣΑΛΙΑΣ
Πρόγραμμα Μεταπτυχιακών Σπουδών του Τμήματος
Βιοχημείας και Βιοτεχνολογίας
ΒΙΟΤΕΧΝΟΛΟΓΙΑ – ΠΟΙΟΤΗΤΑ ΔΙΑΤΡΟΦΗΣ ΚΑΙ
ΠΕΡΙΒΑΛΛΟΝΤΟΣ

ΑΠΟΙΚΙΣΜΟΣ ΤΟΥ ΨΥΧΑΝΘΟΥΣ *Lotus japonicus* ΑΠΟ ΤΟΝ
ΕΝΔΟΦΥΤΙΚΟ ΜΥΚΗΤΑ *Fusarium solani* ΣΤΕΛΕΧΟΣ Fsk ΚΑΙ
ΕΠΙΔΡΑΣΗ ΣΤΗΝ ΑΝΑΠΤΥΞΗ ΤΟΥ ΦΥΤΟΥ



Πτυχιακή Διατριβή
Αθανασίας Παππά

ΛΑΡΙΣΑ 2013

**ΑΠΟΙΚΙΣΜΟΣ ΤΟΥ ΨΥΧΑΝΘΟΥΣ *Lotus japonicus* ΑΠΟ ΤΟΝ ΕΝΔΟΦΥΤΙΚΟ
ΜΥΚΗΤΑ *Fusarium solani* ΣΤΕΛΕΧΟΣ Fsk ΚΑΙ ΕΠΙΔΡΑΣΗ ΣΤΗΝ ΑΝΑΠΤΥΞΗ
ΤΟΥ ΦΥΤΟΥ**

**THE COLONIZATION OF THE MODEL- LEGUME PLANT *Lotus japonicus* BY THE
ENDOPHYTIC FUNGUS *Fusarium solani* STRAIN Fsk AND ITS EFFECT TO THE
GROWTH OF PLANT.**

ΣΥΜΒΟΥΛΕΥΤΙΚΗ & ΕΞΕΤΑΣΤΙΚΗ ΕΠΙΤΡΟΠΗ

1. **Παπαδοπούλου Καλλιόπη**, Επίκουρος Καθηγήτρια Βιοτεχνολογίας Φυτών,
του Τμήματος Βιοχημείας και Βιοτεχνολογίας,
του Πανεπιστημίου Θεσσαλίας
2. **Καρπούζας Δημήτριος**, Επίκουρος Καθηγητής Περιβαλλοντικής Μικροβιολογίας
και Βιοτεχνολογίας,
του Τμήματος Βιοχημείας και Βιοτεχνολογίας,
του Πανεπιστημίου Θεσσαλίας
3. **Λιαδάκη Καλλιόπη**, Λέκτορας Βιοχημικής Φαρμακολογίας,
του Τμήματος Βιοχημείας και Βιοτεχνολογίας,
του Πανεπιστημίου Θεσσαλίας

Ευχαριστίες

Πρωτίστως, θα ήθελα να εκφράσω τις βαθύτατές μου ευχαριστίες στην κ. Καλλιόπη Παπαδοπούλου, Επίκουρο Καθηγήτρια του τμήματος Βιοχημείας και Βιοτεχνολογίας του Πανεπιστημίου Θεσσαλίας, για την ανεκτίμητη συμβολή της στην εκπόνηση της πτυχιακής αυτής μελέτης, για την πολύτιμη παροχή επιστημονικής γνώσης καθώς και για την ηθική υποστήριξη που μου προσέφερε.

Επίσης, τις θερμές μου ευχαριστίες στην υποψήφια διδάκτορα Κροκιά Αφροδίτη για την ανυπολόγιστη βοήθεια και συμβολή της στην πραγματοποίηση του πειράματός μου.

Ιδιαίτερα, ένα μεγάλο ευχαριστώ στην υποψήφια διδάκτορα Σκιαδά Βασιλική για τις χρήσιμες συμβουλές, τα εύστοχα σχόλια και τις παρατηρήσεις που μου υπέδειξε.

Τέλος, θα ήθελα να ευχαριστήσω και τα υπόλοιπα μέλη του εργαστηρίου Βιοτεχνολογίας Φυτών και Περιβάλλοντος για την καλή συνεργασία και το ευχάριστο κλίμα που υπήρξε σε όλη τη διάρκεια της συνύπαρξής μας.

ΠΕΡΙΕΧΟΜΕΝΑ

ΠΕΡΙΛΗΨΗ	1
ABSTRACT	2
1. ΓΕΝΙΚΑ	4
1.1 Στοιχεία μυκητολογίας	4
1.1.1 Μύκητες	4
1.1.2 Χαρακτηριστικά μυκήτων	4
1.1.3 Παθογόνοι μύκητες	6
1.2 Μηχανισμοί άμυνας φυτών	7
1.2.1 Μηχανική άμυνα	7
1.2.2 Χημική προστασία	7
1.2.3 Γονιδιακοί μηχανισμοί	8
1.3 Ταξινόμηση αλληλεπιδράσεων	9
1.3.1 Γενικά	9
1.3.2 Μικροοργανισμοί της ριζόσφαιρας	10
1.3.3 Μικροβιακή κοινότητα της ριζόσφαιρας	11
1.3.4 Μικροοργανισμοί με φυτοπροστατευτικές ιδιότητες	12
1.4 Ψυχανθή	13
1.4.1 Η αζωτοδέσμευση και η συμβιωτική σχέση	13
1.4.2 Συμβιωτική σχέση ριζόβιου-ψυχανθούς	15
1.4.3 Η συμβιωτική στερέωση του αζώτου πραγματοποιείται σε ειδικευμένες δομές	15
2. Το γένος <i>Fusarium</i>	17
2.1 Εισαγωγή	17
2.2 <i>Fusarium solani</i>	18
2.3 Επαγόμενη προστασία μέσω του <i>Fusarium solani</i> στέλεχος Fsk	19
2.4 Συμπτώματα προσβολής του <i>Fusarium solani</i>	20
Σκοπός της εργασίας	21
3. ΥΛΙΚΑ & ΜΕΘΟΔΟΙ	23
4. ΑΠΟΤΕΛΕΣΜΑΤΑ	41
5.ΣΥΖΗΤΗΣΗ	52
ΠΑΡΑΡΤΗΜΑ Α΄	54
ΒΙΒΛΙΟΓΡΑΦΙΑ	58

Περίληψη

Στην παρούσα εργασία παραθέτονται πληροφορίες σχετικά με τον αποικισμό του ψυχανθούς *Lotus japonicus* από τον ενδοφυτικό μύκητα *Fusarium solani* στέλεχος του Fsk. Το μυκητιακό στέλεχος *Fusarium solani* (Fsk) είναι ένας μη παθογόνος νηματοειδής μύκητας που εντοπίζεται στο έδαφος και έχει την ικανότητα αλληλεπίδρασης με φυτικούς οργανισμούς. Το συγκεκριμένο στέλεχος εμφανίζει την ικανότητα να επιφέρει στα φυτά ενεργοποίηση των μηχανισμών άμυνας έναντι του φυτοπαθογόνου μύκητα του φυλλώματος *Septoria lycopersici*. Σκοπός της μελέτης μας ήταν να ερευνήσουμε την επίδραση που έχει η αποίκιση της ρίζας από το μυκητιακό στέλεχος (Fsk). Φυτά του ψυχανθούς *Lotus japonicus* (και *Arabidopsis thaliana*) εμβολιάστηκαν με Fsk και 15 ημέρες μετά τον εμβολιασμό, συλλέχθηκε η μυκόρριζα όπως και το υπέργειο τμήμα και απομονώθηκε DNA του μύκητα που εμφανίστηκε τόσο στη ρίζα όσο και στο στέλεχος του φυτού. Στη συνέχεια με τη τεχνική της αλυσιδωτής αντίδρασης της πολυμεράσης ενισχύθηκε η περιοχή του ολικού γενετικού υλικού. Τα αποτελέσματα έδειξαν ότι είναι δυνατή η ανάπτυξη του μύκητα εξίσου στο ριζικό σύστημα όσο και στο στέλεχος του φυτού. Συνοψίζοντας, τα παραπάνω καταλήγουμε στο συμπέρασμα ότι η ύπαρξη του Fsk επιδρά θετικά στην ανάπτυξη του φυτού.

Abstract

The colonization of the model-legume plant *Lotus japonicus* by the endophytic fungus *Fusarium solani*, strain Fsk was investigated. *Fusarium solani* (Fsk) is a non-pathogenic fungus with the ability to induce defense mechanisms on the plants against to soilborne and leaf-pathogens. Plants were inoculated with Fsk and root and aerial tissues were collected 15 days after inoculation. The presence of FsK inside the plant tissues was examined by DNA amplification and it was verified that fungus can proliferate in all tissues of the plant. The plant growth was increased in the presence of the endophytic fungus. Thus, the host range of the endophytic beneficial fungus expands in at least three different plant families.

ΕΙΣΑΓΩΓΗ

1. ΓΕΝΙΚΑ

1.1 ΣΤΟΙΧΕΙΑ ΜΥΚΗΤΟΛΟΓΙΑΣ

1.1.1 ΜΥΚΗΤΕΣ

Οι μύκητες είναι κατώτεροι οργανισμοί και αποτελούν ιδιαίτερο άθροισμα του Φυτικού Βασιλείου. Τα τελευταία χρόνια, υπάρχει συνεχώς διευρυνόμενη τάση υιοθέτησης ταξινομικών συστημάτων, στα οποία οι μύκητες εξετάζονται σαν ιδιαίτερο Βασίλειο. Οι μύκητες είναι ετερότροφοι οργανισμοί, διατρεφόμενοι με απορρόφηση. Η έλλειψη φωτοσυνθετικών χρωστικών χαρακτηρίζει τους μύκητες σαν ετερότροφους οργανισμούς. Ζουν παρασιτικά ή σαπροφυτικά ή συμβιών με άλλα φυτά. (Gravanis, 1986)

Τα περισσότερα είδη μυκήτων είναι σαπρόφυτα, ενώ πολλά είδη είναι παράσιτα του ανθρώπου, των ζώων και κυρίως των φυτών, προκαλώντας ασθένειες, γνωστές σαν μυκώσεις. Σαν σαπρόφυτα, είναι υπεύθυνοι για την αποσύνθεση των οργανικών ουσιών, συμβάλλοντας έτσι στη χουμοποίηση και την διατήρηση της γονιμότητας του εδάφους. (Gravanis, 1986)

Μεγάλης οικονομικής σημασίας είναι η χρησιμοποίηση μυκήτων στις χημικές βιομηχανίες για την παραγωγή μύρας, κρασιού, αντιβιοτικών (π.χ. πενικιλίνη από τον *Penicillium sp.*, βιφορμίνη από τον *Polyporous biformis*). Σαν παράσιτα του ανθρώπου και των ζώων, οι μύκητες παρόλο που δεν έχουν την σημασία των βακτηρίων και των ιών, είναι δυνατόν να προκαλέσουν σημαντικές ασθένειες, ακόμα και θανατηφόρες. Από φυτοπαθολογικής σκοπιάς, οι μύκητες είναι το σημαντικότερο άθροισμα οργανισμών, σαν υπεύθυνοι πολυάριθμων και σοβαρών ασθενειών των καλλιεργούμενων φυτών. (Gravanis, 1986)

1.1.2 ΧΑΡΑΚΤΗΡΙΣΤΙΚΑ ΤΩΝ ΜΗΚΥΤΩΝ

Οι μύκητες είναι ευκαρυωτικοί αχλωρόφυλλοι μικροοργανισμοί μονοκύτταροι ή συνηθέστερα μυκηλιακοί. Το σώμα ή θαλλός περιβάλλεται από κυτταρικό τοίχωμα που αποτελείται κυρίως από χιτίνη, β-γλυκάνες και κυτταρίνη, η αναλογία των οποίων ποικίλλει στα διάφορα είδη μυκήτων. Η σύσταση του τοιχώματος επηρεάζεται από τη θρέψη, το pH και τη θερμοκρασία, ενώ τα ζωοσπόρια (μονάδες αγενούς αναπαραγωγής) δεν έχουν κυτταρικό τοίχωμα. Οι θρεπτικές απαιτήσεις των μυκήτων τους κατατάσσουν συμβατικά σε

τρεις κατηγορίες: παράσιτα (υποχρεωτικά και δυνητικά), σαπρόβια (υποχρεωτικά και δυνητικά), και συμβιωτικά όπως είναι η μυκόρριζα που αποτελεί συμβίωση μυκήτων με ρίζες φυτών και οι λειχήνες που αποτελούν συμβίωση μυκήτων με φύκη. (Χριστιάς, 1999)

Βασική δομική μονάδα των μυκηλιακών μυκήτων είναι η υφή. Οι υφές αναπτύσσονται σε μια κατεύθυνση, γραμμικά με την προσθήκη νέων υλικών στις άκρες τους και όχι σε όλο τους το μήκος. Το σύνολό τους αποτελεί το μυκήλιο. Οι υφές μπορεί να διαχωρίζονται σε διαμερίσματα μέσω διαφραγμάτων (septa). Υπάρχουν και τα απλά διαφράγματα (simple septa) που επιτρέπουν τη διαμετακίνηση όλων των οργανιδίων και τα δολιπόρα διαφράγματα (dolipore septa) με πολύπλοκη δομή που επιτρέπουν το πέρασμα άλλων οργανιδίων πλην των πυρήνων. Υπάρχει και η περίπτωση οι υφές των μυκήτων να μη φέρουν καθόλου διαφράγματα σχηματίζοντας έτσι ένα κοινοκύτταρο μυκήλιο. (Χριστιάς, 1999)

Το γονιδίωμα των μυκήτων κατατάσσεται σε τρεις κατηγορίες: πυρηνικό, μιτοχονδριακό και πλασμιδιακό. Το κύριο πυρηνικό γονιδίωμα είναι μεγαλύτερο από αυτό των βακτηρίων αλλά πολύ μικρότερο σε σύγκριση με αυτό άλλων ευκαριωτικών οργανισμών. Κάθε χρωμόσωμα των μυκήτων αποτελείται από ένα ευθύγραμμο δίκλωνο μόριο DNA που συμπλεκόμενο με ιστόνες σχηματίζει δομή νουκλεοσώματος. Το μιτοχονδριακό γονιδίωμα ποικίλει σε δομή και είναι ενδιάμεσο σε μέγεθος μεταξύ των θηλαστικών και των ανώτερων φυτών. (Griffin, 1994, Moore, 1998)

Οι οδοί μεταφοράς του γενετικού υλικού ή αλλιώς οι τρόποι αναπαραγωγής των μυκήτων ποικίλουν. Εν συντομία, η αναπαραγωγή των μυκήτων είναι είτε αγενής είτε αγγενής.

Οι συνηθέστεροι τρόποι αγενούς αναπαραγωγής (Χριστιάς, 1999) είναι:

1. Θρυμματισμός του θαλλού έτσι ώστε κάθε θρύμμα να δώσει ένα νέο θαλλό.
2. Σχάση σωματικών κυττάρων. Καθένα από τα θυγατρικά κύτταρα δίνει ένα νέο θαλλό.
3. Εκβλάστηση σωματικών κυττάρων.
4. Παραγωγή σπορίων. Οι μύκητες παράγουν ασύλληπτα μεγάλους αριθμούς σπορίων είτε ελεύθερα είτε σε σποριαγγεία διαφόρων μορφών. Τα ελεύθερα σπόρια ονομάζονται συνήθως κονίδια.

Οικολογία Μυκήτων

Οι μύκητες αναπτύσσονται σε οποιοδήποτε κλίμα της γης. Τα πλούσια σε ενέργεια ανθρακούχα παράγωγα που χρειάζονται για την ανάπτυξή τους συνθέτονται οπωσδήποτε από τα πράσινα φυτά. Η ενέργεια που περιέχεται μέσα στα οργανικά αυτά παράγωγα

αποδεδειγμένα αργότερα από τη διάσπαση των ουσιών αυτών από ζώα και διάφορους μικροοργανισμούς. Οι μύκητες μετέχουν ενεργητικά στα διάφορα στάδια τέτοιων μεταβολών, κατά την διάρκεια των οποίων και οι υπόλοιπες ουσίες γίνονται προσιτές σε αυτούς.

Το άζωτο, το θείο, ο φώσφορος, το μαγνήσιο και άλλα μεταλλικά ιόντα μπορούν κατ'έξοχήν να απορροφηθούν και να χρησιμοποιηθούν στην ανόργανή τους μορφή. Ακραίες θερμοκρασίες δεν αποκλείουν την ανάπτυξη των μυκήτων. Το όξινο pH συμβάλει στην ευκολότερη ανάπτυξη των μυκήτων σε σχέση με τα βακτηρίδια, χωρίς αυτό να αποτελεί αναγκαία προϋπόθεση. Ενώ οι μύκητες βρίσκονται σχεδόν παντού, ακόμα και σε μικρά αποθέματα θρεπτικών υλικών, δεν ευδοκίμουν σε υγιείς ιστούς φυτών και ζώων. (Ainsworth and Sussman, 1973)

Οι οικολογικές σχέσεις μεταξύ μυκήτων και άλλων μικροοργανισμών, καθώς και μερικές φορές μεταξύ διαφορετικών μυκήτων μπορεί να γίνονται τόσο στενές ώστε να σχηματίζεται νέα μορφολογική και ταξινομική οντότητα (Burgeff, 1961). Ο λειχήνας π.χ. σχηματίζεται από μια άλγη και ένα μύκη. Η μεταξύ τους ενεργητική συνύπαρξη ονομάζεται συμβίωση. Στην ικανότητα επίσης πολλών μυκήτων να ζουν σε στενές σχέσεις με άλλους οργανισμούς βασίζεται και ο παρασιτισμός των μυκήτων. Σε αυτή την περίπτωση ο μύκητας καρπούται τα αγαθά, ενώ συγχρόνως βλάπτει τον ξενιστή του. Μύκητες που δεν συμβιών ή δεν παρασιτούν μπορούν να σαπροφυτούν και να προμηθεύονται την τροφή τους από φυτικά ή ζωικά κατάλοιπα προσβάλλοντας έτσι διάφορα προϊόντα.

1.1.3 ΠΑΘΟΓΟΝΟΙ ΜΥΚΗΤΕΣ

Οι μύκητες αποτελούν τη σπουδαιότερη ομάδα παθογόνων των φυτών λαμβάνοντας υπόψη το μεγάλο αριθμό ασθενειών και την οικονομική ζημιά που προκύπτει από μερικές από αυτές τις ασθένειες. Ο αριθμός των ειδών των μυκήτων που προκαλούν ασθένειες σε ανώτερα φυτά είναι πολύ μεγάλος. Υπολογίζονται περίπου 6.500 είδη μυκήτων που αποτελούν υποχρεωτικά παράσιτα των ανώτερων φυτών. Τα μη υποχρεωτικά παράσιτα είναι πολύ περισσότερα. Ένα μόνο γένος των Αδηλομυκήτων, το γένος *Cercospora*, διαθέτει 1200 παρασιτικά είδη. Σε κάποιους από τους κατώτερους μύκητες δε διακρίνεται κυτταρικό τοίχωμα σε όλη ή σε ένα μέρος της διάρκειας του βιολογικού τους κύκλου. (Taiz and Zeiger, 2002)

1.2 ΜΗΧΑΝΙΣΜΟΙ ΑΜΥΝΑΣ ΤΩΝ ΦΥΤΩΝ

Η ευαισθησία, η ανεκτικότητα ή η ανθεκτικότητα των φυτών απέναντι στα παθογόνα συνιστά μια μάλλον εξελικτική διαδικασία με έντονη την επίδραση και αλληλεπίδραση βιοτικών και αβιοτικών παραγόντων. Η άμυνα των φυτών σε μεγάλο βαθμό καθορίζεται από τα γονίδια και το περιβάλλον. Τα γονίδια συμβάλουν με την έκφραση αντιμυκητιακών και αντιβακτηριακών πρωτεϊνών, ενώ το περιβάλλον και ειδικά η θερμοκρασία και η υγρασία καθορίζουν αν οι συνθήκες θα είναι ευνοϊκές ή όχι για μια μόλυνση. Η παρουσία θρεπτικών και η απουσία τοξικών ουσιών, στο σημείο προσβολής, είναι ένας ακόμη σημαντικός παράγοντας.

Τα φυτά αντιμετωπίζουν διάφορους εχθρούς (μύκητες, βακτήρια, ιούς, νηματώδεις και έντομα). Η αντιμετώπιση αυτών των εχθρών δεν είναι εύκολη, αφού τα φυτά δεν μπορούν να κινηθούν, έτσι ώστε να αποφύγουν τις αντιξοότητες του κάθε περιβάλλοντος. Τα φυτά λοιπόν έχουν αναπτύξει μηχανισμούς άμυνας για να μπορέσουν να αντιμετωπίσουν τόσο τις βιοτικές όσο και αβιοτικές πιέσεις που δέχονται (Dangl and Jones, 2001).

Όσο αφορά τους αμυντικούς μηχανισμούς οι οποίοι σχετίζονται με τις βιοτικές καταπονήσεις, το φυτό δραστηριοποιείται στα παρακάτω επίπεδα.

1.2.1 ΜΗΧΑΝΙΚΗ ΑΜΥΝΑ

Η ύπαρξη μορφολογικών χαρακτηριστικών όπως μη αδενώδη και αδενώδη τριχίδια, αγκάθια και φελλώδη στρώματα θεωρούνται μηχανισμοί προστασίας έναντι των εχθρών (Mauricio and Rausher, 1997. Levin, 1973). Τα μορφολογικά χαρακτηριστικά μπορεί να συνδέονται με χημική προστασία. Ένα παράδειγμα είναι αυτό του φυτού *Artemisia tridentate* του οποίου οι δευτερογενείς μεταβολίτες (κουμαρίνες, φλαβονοειδή, μονοτερπένια και σεσκιτερπενικές λακτόνες), βρίσκονται κυρίως στα αδενώδη τριχίδια της επιφάνειας των φύλλων και προστατεύουν το φυτό από την ανάπτυξη μυκήτων. (Talley *et al.*, 2002)

1.2.2 ΧΗΜΙΚΗ ΠΡΟΣΤΑΣΙΑ

Χημική προστασία μπορεί να προέλθει από:

1. Κάλυψη των φύλλων συνήθως από ένα υδροφοβικό στρώμα, το οποίο αποτελείται από αντιβιοτικές και απωθητικές κηρώδεις ενώσεις της επιδερμίδας, ενώ μπορεί να περιέχουν και άλλους δευτερογενείς μεταβολίτες, όπως τα φλαβονοειδή.

2. Παρουσία υδρογονανθράκων και λιγνίνης : α) ως δομικών υλικών των κυτταρικών τοιχωμάτων ή β) μετά από επαγωγή στο σημείο της προσβολής ή του τραύματος.

3. Σύνθεση ανασταλτικών πρωτεϊνών ή ένζυμων τα οποία μπορούν να υποβαθμίσουν τα τοιχώματα των μικροβιακών κυττάρων και να αναστείλουν τη δράση ουσιών, όπως η περοξειδάση οι οποίες μπορούν να βοηθήσουν στην απενεργοποίηση φυτοτοξινών που προέρχονται από τους μικροοργανισμούς. Αυτά τα ένζυμα είτε υπάρχουν αποθηκευμένα στα χυμοτόπια ή παρουσιάζονται ως εξωκυτταρικά ένζυμα των φυτικών κυττάρων.

Επιπλέον κάποιες πρωτεΐνες (π.χ. αποθηκευμένες πρωτεΐνες στα ψυχανθή και στα δημητριακά), είναι συχνά ελλειπείς σε αμινοξέα απαραίτητα για τον μεταβολισμό των ζώων, όπως η λυσίνη και η μεθειονίνη. Αυτό το χαρακτηριστικό μπορεί να θεωρηθεί ως μια στρατηγική αντιμετώπισης των θηρευτών των φυτών, οι οποίοι αποφεύγουν την κατανάλωση των συγκεκριμένων φυτών.

4. Σύνθεση ενώσεων μικρού μοριακού βάρους (δευτερογενείς μεταβολίτες) με απωθητικές ή τοξικές ιδιότητες κατά των μικροοργανισμών ή άλλων εχθρών (Wink, 1988). Αυτές οι ενώσεις μπορεί να υπάρχουν εξ αρχής και να ενεργοποιούνται μετά από τραυματισμό ή προσβολή του φυτού (π.χ. τα κυανογενή γλυκοσίδια, θειογλυκοζίτες και κουμαρίνες), ή η εκ νέου σύνθεσή τους να επάγεται από προσβολή ή επίθεση εχθρού.(Bennet and Wall sgrove, 1994)

Όλα αυτά τα προϊόντα συντίθενται ή αποθηκεύονται σε στρατηγικά σημαντικές θέσεις (στους επιδερμικούς ιστούς ή μέσα σε κύτταρα παραπλεύρως της προσβολής), ή σε μέρη του φυτού τα οποία είναι πολύτιμα για την αναπαραγωγή και την επιβίωσή του.(Wink, 1998)

1.2.3 ΓΟΝΙΔΙΑΚΟΙ ΜΗΧΑΝΙΣΜΟΙ

Ορισμένα είδη φυτών έχουν την ικανότητα να αναγνωρίζουν φυτοπαθογόνα βακτήρια και μύκητες μετά από την προσβολή τους από αυτά και να ενεργοποιούν έναν μηχανισμό που είναι γνωστός ως αντίδραση υπερευαισθησίας (hyper sensitive reaction, HR). Η HR οδηγεί σε άμεση νέκρωση του προσβεβλημένου ιστού. Προκαλείται λιμοκτονία του ετερότροφου παθογόνου ή/και απελευθέρωση τοξικών για το παθογόνο ενώσεων. Όλοι οι μηχανισμοί που ακολουθούν την αναγνώριση του παθογόνου ελέγχονται και επάγονται από συγκεκριμένα γονίδια του φυτού, γνωστών ως γονίδια αντοχής, τα οποία αλληλεπιδρούν με τα γονίδια παθογόνου ικανότητας του μικροοργανισμού.(Mehdy, 1994)

Επίσης, ένας από τους μηχανισμούς τοπικού χαρακτήρα είναι και η τοπικά επίκτητη αντοχή (Local Acquired Resistance, LAR) η οποία συνιστά μια κατάσταση αυξημένης

αμυντικής ετοιμότητας και εκφράζεται σε φυτικούς ιστούς που βρίσκονται σε άμεση επαφή με το σημείο εισβολής του παθογόνου. Η LAR μπορεί να εκδηλωθεί με τη νέκρωση και την ξήρανση του φυτικού ιστού όπως και η αντίδραση υπερευαισθησίας και συνήθως προστατεύει το φυτό από δευτερογενείς προσβολές του προσβεβλημένου ιστού από μια σειρά άλλων παθογόνων. (Kombriak and Schmelzer, 2001)

Από τα παραπάνω γίνεται κατανοητό ότι τα φυτά στα πλαίσια της προσαρμογής τους σε διάφορα βιοτικά περιβάλλοντα έχουν αναπτύξει σημαντικούς αμυντικούς μηχανισμούς έτσι ώστε να μπορέσουν να επιβιώσουν και να αναπτυχθούν παρά τις πιέσεις που δέχονται. Από την άλλη πλευρά και οι εχθροί αναπτύσσουν νέους μηχανισμούς όπως ανθεκτικότητα σε κάποιες αρχικά τοξικές για αυτούς ενώσεις. Η αλληλεπίδραση φυτού και εχθρών θα καθορίσει το τελικό αποτέλεσμα αυτής της αναμέτρησης.

1.3 ΤΑΞΙΝΟΜΗΣΗ ΑΛΛΗΛΕΠΙΔΡΑΣΕΩΝ

1.3.1 ΓΕΝΙΚΑ

Συνεργασία – Αμοιβαιότητα

Οι θετικές αλληλεπιδράσεις μπορούν να διακριθούν με βάση τη συνέπεια που θα έχει σε κάθε έναν από τους δύο οργανισμούς (άτομα ή πληθυσμούς) ο τυχόν διαχωρισμός τους. Ακραίες μορφές είναι η συνεργασία και η αμοιβαιότητα. Στη συνεργασία, ο διαχωρισμός των δύο ατόμων ή πληθυσμών μειώνει τον βαθμό προσαρμοστικότητας των ατόμων ή τους ρυθμούς αύξησης των πληθυσμών, δεν προκαλεί όμως το θάνατο των ατόμων ή την εξαφάνιση των πληθυσμών. Αντίθετα, στην αμοιβαιότητα ο διαχωρισμός των δύο ατόμων ή πληθυσμών προκαλεί το θάνατο των ατόμων ή την εξαφάνιση αμφοτέρων των πληθυσμών. Δηλαδή, στη συνεργασία η συνύπαρξη δύο πληθυσμών είναι επωφελής αλλά όχι απολύτως απαραίτητη, ενώ στην αμοιβαιότητα έχει ζωτική σημασία. Ανάμεσα στους δύο αυτούς τύπους βιοτικών αλληλεπιδράσεων υπάρχει ένας άλλος τύπος στον οποίο η συνύπαρξη μεταξύ δύο πληθυσμών είναι υποχρεωτική για την επιβίωση του ενός μόνο από αυτούς.

Ένας άλλος τεχνητός ίσως τρόπος ταξινόμησης των επί μέρους αλληλεπιδράσεων μπορεί να γίνει στη βάση του αν οι αλληλεπιδρώντες οργανισμοί βρίσκονται σε φυσική επαφή μεταξύ τους (Boucher *et al.*, 1982). Στην πρώτη περίπτωση αναφερόμαστε σε άμεσες θετικές αλληλεπιδράσεις, ενώ στη δεύτερη σε έμμεσες θετικές αλληλεπιδράσεις. Οι λειχήνες, οι

μυκόρριζες, η σχέση επικονιαστών και φυτών είναι κάποια από τα παραδείγματα άμεσων θετικών αλληλεπιδράσεων.

Οι άμεσες θετικές αλληλεπιδράσεις μπορούν να διακριθούν περαιτέρω σε συμβιωτικές και μη συμβιωτικές. Στις συμβιωτικές, τα αλληλεπιδρώντα άτομα έχουν πολύ στενή φυσική σύνδεση, η οποία συνοδεύεται πολλές φορές με αντίστοιχες φυσιολογικές προσαρμογές. Με κάποιες εξαιρέσεις, οι συμβιωτικοί οργανισμοί τείνουν να συνεξελίσσονται και πολλές τέτοιες αλληλεπιδράσεις εμπίπτουν προοδευτικά στην κατηγορία της αμοιβαιότητας. Αντίθετα στις μη συμβιωτικές αλληλεπιδράσεις, η φυσική επαφή μεταξύ των αλληλεπιδρώντων ατόμων είναι παροδική και μικρής χρονικής διάρκειας και δεν συνοδεύεται από φυσιολογικές προσαρμογές. Εκτός από ελάχιστες εξαιρέσεις, οι μη συμβιωτικοί οργανισμοί δεν συνεξελίσσονται και εμπίπτουν στην κατηγορία της συνεργασίας. (Βερεσόγλου, 2004)

Άμεσες Θετικές Αλληλεπιδράσεις

Στις άμεσες θετικές αλληλεπιδράσεις, οι πιθανές ωφέλειες που μπορεί να προσφέρει ο ένας οργανισμός στον άλλο είναι: προμήθεια θρεπτικών ουσιών, προμήθεια ενέργειας, προστασία από δυσμενείς καιρικές συνθήκες ή από εχθρούς και μεταφορά, είτε των ίδιων ατόμων είτε των αναπαραγωγικών οργάνων από δυσμενή σε ευνοϊκά περιβάλλοντα. Οι συμβιωτικοί οργανισμοί γενικώς προσφέρουν ο ένας στον άλλον τις δύο πρώτες ωφέλειες και σπάνια την τρίτη. Οι μη συμβιωτικοί κάνουν χρήση όλων των παραπάνω ωφελειών. (Βερεσόγλου, 2004)

1.3.2 ΜΙΚΡΟΟΡΓΑΝΙΣΜΟΙ ΤΗΣ ΡΙΖΟΣΦΑΙΡΑΣ

Οι μικροοργανισμοί του εδάφους παίζουν σημαντικό ρόλο στην υγεία των φυτών (Ikeda *et al.*, 2006). Έχει βρεθεί ότι οι μικροοργανισμοί που αποικίζουν την ρίζα του φυτού, μπορούν να βοηθήσουν στην ανάπτυξη του φυτού με διάφορους τρόπους, είτε συμμετέχοντας στην πρόσληψη διαφόρων θρεπτικών στοιχείων από το έδαφος, είτε ενισχύοντας την ανάπτυξη του ριζικού συστήματος και κατά συνέπεια την ανάπτυξη όλου του φυτού, όπως επίσης είτε ελέγχοντας την ανάπτυξη άλλων παθογόνων μικροοργανισμών. Εκτός από την επίδραση που μπορούν να έχουν οι μικροοργανισμοί στο φυτό, το ίδιο το φυτό μέσω ουσιών που εκκρίνει, μπορεί να μεταβάλει τη σύσταση της μικροβιακής κοινότητας στην ριζόσφαιρα. Με αυτόν

τον τρόπο, η αποδόμηση των καλλιεργειών σχετίζεται άμεσα με την ορθή ανάπτυξη και επικοινωνία της βιόσφαιρας και της ρίζας του φυτού.

Γενικά, τα φυτά αναπτύσσονται φυσιολογικά στο έδαφος, χωρίς την παρέμβαση του ανθρώπου. Όμως η συνεχής καλλιέργεια, η ρύπανση του εδάφους ή η επικράτηση φυτοπαθογόνων μικροοργανισμών, σε ορισμένες περιπτώσεις έχει οδηγήσει σε σημαντικά μειωμένη παραγωγή ή ολοκληρωτική καταστροφή των καλλιεργειών.

1.3.3 ΜΙΚΡΟΒΙΑΚΗ ΚΟΙΝΟΤΗΤΑ ΤΗΣ ΡΙΖΟΣΦΑΙΡΑΣ

Μια μεγάλη ποικιλία μικροοργανισμών μπορεί να αποικίσει την ριζόσφαιρα. Είναι γενικά αποδεκτό ότι όλα τα είδη των μικροοργανισμών μπορούν να αναπτύξουν σημαντικές λειτουργίες στο οικοσύστημα. Περισσότερη γνώση υπάρχει γύρω από τις αλληλεπιδράσεις διαφόρων βακτηριακών πληθυσμών αλλά και μυκήτων, στην ριζόσφαιρα, ενώ ελάχιστα είναι γνωστά για τον ρόλο των αρχαίων. Οι μύκητες και τα βακτήρια, παρουσιάζουν διαφορετικές τροφικές συνήθειες, ενώ έχουν περιγραφεί τόσο ωφέλιμες όσο και παθογόνες αλληλεπιδράσεις (Barea *et al.*, 2005). Οι ωφέλιμοι μικροοργανισμοί που προάγουν την ανάπτυξη του φυτού μπορούν να κατηγοριοποιηθούν σε αποδομητές νεκρής οργανικής ύλης, στους ριζομύκητες και ριζοβακτήρια που προάγουν την ανάπτυξη του φυτού και τους μύκητες ή βακτήρια που ανταγωνίζονται τους παθογόνους μικροοργανισμούς της ρίζας, ενώ η σχέση των πληθυσμών αυτών με το φυτό μπορεί να είναι συμβιωτική ή μη συμβιωτική.

Οι ριζομύκητες και τα ριζοβακτήρια μπορούν να χωριστούν περαιτέρω σε δύο κατηγορίες: σε αυτά που συμμετέχουν στην ανακύκλωση των θρεπτικών στοιχείων και στην ενεργοποίηση των φυτών και σε αυτά που ελέγχουν την ανάπτυξη των παθογόνων μικροοργανισμών, παρόλα αυτά μπορεί κάποιος μικροοργανισμός να στηρίζει την ανάπτυξη του φυτού και με τους δύο τρόπους (Barea *at al.*, 2005, Naik *et al.*, 2008). Οι μικροοργανισμοί της πρώτης κατηγορίας βοηθούν την ανάπτυξη του φυτού είτε διαλυτοποιώντας ενώσεις του φωσφόρου και μέταλλα, ώστε να μπορούν να προσληφθούν από τη ρίζα, είτε παράγοντας φυτικές ορμόνες οι οποίες δρουν στο φυτό ευνοώντας την ανάπτυξή του.

Για την ανάπτυξη των φυτών, σημαντικό ρόλο παίζουν οι φυτικές ορμόνες όπως είναι το ινδολυλοξικό οξύ (IAA), το αιθυλένιο, οι κυτοκινίνες και οι γιββελλίνες. Αυτές οι ορμόνες είτε συντίθενται από το ίδιο το φυτό, είτε από μικροοργανισμούς της ριζόσφαιρας. Επιπλέον οι μικροοργανισμοί μπορούν να αλλάξουν την αναλογία της συγκέντρωσης των ορμονών.(Pieric *et al.*, 2006)

Η ικανότητα των φυτών να προσλαμβάνουν νερό και θρεπτικά συστατικά, όταν αυτά βρίσκονται σε μικρή συγκέντρωση στο έδαφος, οφείλεται στο εκτεταμένο ριζικό τους σύστημα. Αυτή η απορροφητική ικανότητα των ριζών βελτιώνεται σημαντικά όταν στις ρίζες συμβιώνουν μύκητες. Στη φύση, οι νεαρές ρίζες των περισσότερων φυτικών ειδών είναι συνδεδεμένοι με μύκητες και σχηματίζουν τη μυκόρριζα. Η μυκόρριζα αποτελείται από συμβιωτικούς σχηματισμούς οι οποίοι απαρτίζονται από μη παθογόνους μύκητες και ζωντανά κύτταρα της ρίζας. Όταν η νεαρή ρίζα προσβάλλεται από τον μύκητα, σταματά ο σχηματισμός ριζικών τριχιδίων, με αποτέλεσμα τη μείωση της επιφάνειας απορρόφησης της ρίζας (Taiz and Zeiger, 2002). Τον ρόλο αυτό αναλαμβάνουν τώρα οι υφές των μυκόρριζων. Κατά τη διάρκεια της συμβίωσης οι μύκητες παίρνουν από το φυτό οργανικές ενώσεις, κυρίως σάκχαρα και ως αντάλλαγμα μεταφέρουν στις ρίζες νερό, θρεπτικά στοιχεία και ιόντα αυξάνοντας την απορροφητική ικανότητα της ρίζας.

1.3.4 ΜΙΚΡΟΟΡΓΑΝΙΣΜΟΙ ΜΕ ΦΥΤΟΠΡΟΣΤΑΤΕΥΤΙΚΕΣ ΙΔΙΟΤΗΤΕΣ

Η χρήση μικροοργανισμών για τον περιορισμό ασθενειών στα φυτά είναι μια φιλική προς το περιβάλλον φυτοπροστατευτική μέθοδος που περιορίζει σε σημαντικό βαθμό την επιβάρυνση του περιβάλλοντος από χημικά συνθετικά γεωργικά φάρμακα. Μπορούν να χρησιμοποιηθούν μικροοργανισμοί που αποτελούν φυσικούς εχθρούς (παράσιτα) του φυτοπαθογόνου μικροοργανισμού. Ορισμένοι μύκητες που προάγουν την ανάπτυξη του φυτού έχει αναφερθεί ότι μπορούν να ελέγχουν την ανάπτυξη άλλων παθογόνων μικροοργανισμών, στην ριζόσφαιρα του φυτού (Chin-A-Woeng *et al.*, 2003, De Boer *et al.*, 2003, Persello-Cartieaux *et al.*, 2003). Ο τρόπος με τον οποίο επιτυγχάνεται μπορεί να είναι είτε δρώντας αναγκαστικά ως προς τα θρεπτικά στοιχεία και τις θέσεις προσκόλλησης στην ριζόσφαιρα, είτε παράγοντας αντιβιοτικά συνεχώς ή έπειτα από επαγωγή, είτε μέσω έμμεσης ενεργοποίησης των μηχανισμών άμυνας του ίδιου του φυτού (Lugtenbergs and Kamilona, 2009). Σε πολλές περιπτώσεις, οι μικροοργανισμοί μπορεί να χρησιμοποιούν περισσότερους από ένα μηχανισμό για τον έλεγχο των φυτοπαθογόνων.

1.4 ΨΥΧΑΝΘΗ (Leguminosae)

Η οικογένεια των ψυχανθών περιλαμβάνει περίπου 500 γένη και περισσότερα από 8.000 είδη φυτών. Από άποψη γεωργικής σημασίας, κατατάσσεται δεύτερη, μετά την οικογένεια των σιτηρών και γενικότερα των αγρωστωδών (Graminae).

Η μεγάλη σπουδαιότητα των ψυχανθών οφείλεται πρωτίστως στην ικανότητα που κατέχουν να δεσμεύουν στις ρίζες τους το άζωτο της ατμόσφαιρας, το οποίο, ως γνωστόν αποτελεί βασικό ανόργανο στοιχείο διατροφής των φυτών.

1.4.1 Η ΑΖΩΤΟΔΕΣΜΕΥΣΗ ΚΑΙ Η ΣΥΜΒΙΩΤΙΚΗ ΣΧΕΣΗ

Το άζωτο συμμετέχει ως συστατικό σε ένα μεγάλο αριθμό βιομορίων μεγάλης σπουδαιότητας για τη διατήρηση της ζωής στον πλανήτη μας όπως οι πρωτεΐνες, τα νουκλεϊκά οξέα και μερικά συνένζυμα. Την κύρια πηγή προέλευσης του οργανικού αζώτου αποτελεί η ατμόσφαιρα της γης, όπου το στοιχείο αυτό απαντάται στη μοριακή του μορφή (N_2) σε ποσοστό 80%. Παρόλα αυτά, το άζωτο σε αυτήν την μορφή χαρακτηρίζεται από χαμηλή χημική δραστηριότητα (αδρανές αέριο), λόγω της ύπαρξης του τριπλού δεσμού, η αναγωγή του οποίου απαιτεί την καταβολή μεγάλων ποσοτήτων ενέργειας (16 μόρια ATP), καθώς και την ύπαρξη εξειδικευμένου ενζυμικού μηχανισμού. Έτσι το ατμοσφαιρικό άζωτο δεν μπορεί να χρησιμοποιηθεί από την πλειοψηφία των οργανισμών. Η μετατροπή του αζώτου σε αφομοιώσιμη μορφή μπορεί να πραγματοποιηθεί με βιολογικές φυσικές και ανθρωπογενείς διεργασίες. (Δροσόπουλος, 1992)

Στις ανθρωπογενείς διεργασίες, περιλαμβάνεται η μετατροπή του μοριακού αζώτου σε αφομοιώσιμες μορφές (NH_3 , NO_3^- , CN_2^-) και ο εμπλουτισμός του εδάφους με αυτές με την μορφή χημικών λιπασμάτων. Η παραγωγή χημικών λιπασμάτων απαιτεί συνθήκες υψηλής πίεσης και θερμοκρασίας.

Στις φυσικές διεργασίες περιλαμβάνεται η αφομοίωση του μοριακού αζώτου μέσω οξειδίων (NO_2^- , NO_3^-) που δημιουργούνται κατά τη διάρκεια ατμοσφαιρικών ηλεκτρικών εκκενώσεων, τα οποία στη συνέχεια φτάνουν στο έδαφος με τη βοήθεια των ατμοσφαιρικών κατακρημνισμάτων (Δροσόπουλος, 1992). Η συνεισφορά όμως των διεργασιών αυτών είναι πολύ μικρή για να στηρίξει τις ανάγκες των οικοσυστημάτων σε αφομοιώσιμο άζωτο.

Η βιολογική αζωτοδέσμευση πραγματοποιείται κυρίως από προκαριωτικούς οργανισμούς που ανήκουν στα ευβακτήρια και στα αρχαιοβακτήρια (Widmer, F. *et al.*, 1999, Zehr, P. J. *et al.*, 2003). Όλοι οι αζωτοδεσμευτικοί οργανισμοί διαθέτουν το ενζυμικό σύστημα της

νιτρογενάσης. Οι μικροοργανισμοί αυτοί ανάλογα με τον τρόπο της διαβίωσής τους κατά τη διεργασία δέσμευσης του ατμοσφαιρικού αζώτου, διακρίνονται σε τρεις μεγάλες κατηγορίες.

Στην πρώτη κατηγορία ανήκουν οι ελεύθερα διαβιούντες μικροοργανισμοί οι οποίοι είναι είτε αναερόβιοι (π.χ. *Clostridium pasteurianum*), είτε ευκαιριακά αναερόβιοι (π.χ. *Klebsiella*), είτε τέλος αερόβιοι (π.χ. *Azotobacter*, *Azospirillum*). Η συνεισφορά όλων των παραπάνω μικροοργανισμών στη δέσμευση του αζώτου είναι πολύ μικρή και υπολογίζεται σε λιγότερο από 1Kg N/ha ετησίως κατά μέσο όρο (Bothe, *et al.*, 1983). Μια ιδιαίτερη περίπτωση είναι αυτή των αυτότροφων φωτοσυνθετικών κυανοπράσινων αλγών (οικ. *Nostocaea*), τα οποία λόγω της ανεξαρτησίας τους από την ύπαρξη οργανικού άνθρακα στο περιβάλλον τους ως πηγή ενέργειας, συμβάλουν σημαντικά στον εμπλουτισμό του εδάφους σε αφομοιώσιμο άζωτο, σε βαθμό που φτάνει τα 38 Kg N/ha ετησίως (Witty *et al.*, 1979). Τέλος, έχουν αναφερθεί περιπτώσεις ελεύθερα διαβιούντων ευκαριωτικών μικροοργανισμών, που ανήκουν στους ακτινομύκητες και τους μύκητες οι οποίοι έχουν την ικανότητα να δεσμεύουν μοριακό άζωτο, η σημασία των οποίων, όμως είναι πολύ περιορισμένη.

Στη δεύτερη κατηγορία αζωτοδεσμευτικών μικροοργανισμών που ζουν και πολλαπλασιάζονται στο αγωγό σύστημα της ρίζας και του βλαστού διαφόρων ειδών σιτηρών (De-Polli, *et al.*, 1982). Σε αυτούς περιλαμβάνονται τα γένη βακτηρίων *Azospirillum*, *Azotobacter*, *Klebsiella*, *Enterobacter* και *Pseudomonas* (Boddey and Dobereiner, 1988).

Η τρίτη και σημαντικότερη κατηγορία αζωτοδεσμευτικών μικροοργανισμών είναι αυτή που δημιουργεί συμβιωτικές σχέσεις με ανώτερα φυτά. Στους μικροοργανισμούς αυτούς περιλαμβάνονται βακτήρια που ανήκουν στα γένη *Rhizobium*, *Mesorhizobium*, *Shinorhizobium*, *Bradyrhizobium* και *Azorhizobium*, τα οποία αναφέρονται συνολικά ως ριζόβια, καθώς και στο γένος *Frankia*. Τα ριζόβια ανήκουν στην α-πρωτεοβακτηριακή οικογένεια *Rhizobiaceae* και επάγουν το σχηματισμό φυματίων σε φυτά της οικογένειας των ψυχανθών (*Fabaceae* ή *Leguminosae*), με εξαίρεση το γένος *Parasporia* των *Ulmaceae*. Το *Frankia* είναι ένας νηματοειδής Gram θετικός ακτινιμύκητας που επάγει το σχηματισμό φυματίων σε ξυλώδη φυτά που ανήκουν στις οικογένειες *Betulaceae*, *Casuarinaceae*, *Myricaceae*, *Elaeagnaceae*, *Rhamnaceae*, *Rosaceae*, *Coriariaceae* και *Datisticaceae* (Benson, D. R. and M.L. Clawson., 2000, Benson, D. R. and W. B. Silvester., 1993). Ενδιαφέρον προκαλεί πρόσφατη ανακάλυψη ότι και άλλα βακτήρια εκτός των ριζοβίων προκαλούν τον σχηματισμό φυματίων σε ψυχανθή. Για παράδειγμα, ένα στέλεχος του α-πρωτεοβακτηρίου *Methylobacterium* σχηματίζει φυμάτια στο *Crotalaria* και β-πρωτεοβακτήρια συγγενικά του *Burkholderia* με τα φυτά *Machaerium lunatum* και *Aspalathus carnosa*. Πιθανότατα αυτοί οι μικροοργανισμοί έχουν αποκτήσει γονίδια που είναι απαραίτητα για τον σχηματισμό

φυματίων και την αζωτοδέσμευση με οριζόντια μεταφορά (Moulin, L. *et al.*, 2001, Sy A. *et al.*, 2001).

1.4.2 ΣΥΜΒΙΩΤΙΚΗ ΣΧΕΣΗ ΡΙΖΟΒΙΟΥ-ΨΥΧΑΝΘΟΥΣ

Όπως αναφέρθηκε παραπάνω η πλέον σημαντική συμβιωτική σχέση δέσμευσης του μοριακού αζώτου είναι αυτή μεταξύ ριζοβίου και ψυχανθούς. Το αποτέλεσμα της συμβιωτικής αυτής σχέσης είναι ο σχηματισμός ενός νέου φυτικού οργάνου, με ιδιαίτερα μορφολογικά και φυσιολογικά χαρακτηριστικά, το οποίο ονομάζεται φυμάτιο. Εντός του φυματίου η διαφοροποιημένες μορφές των ριζοβίων, που ονομάζονται πλέον βακτηριοειδή, βρίσκουν το κατάλληλο περιβάλλον για να φέρουν εις πέρας τη βιοχημική μετατροπή του μοριακού αζώτου σε αμμωνία. Η παραπάνω σχέση αποβαίνει αμοιβαία επωφελής και για τους δύο συμβιώτες, αφού το φυτό παρέχει στα ριζόβια ένα περιβάλλον πλούσιο σε πηγές φωτοσυνθετικού οργανικού άνθρακα και απαλλαγμένο από τον ανταγωνισμό άλλων μικροοργανισμών, ενώ με τη σειρά τους τα ριζόβια καλύπτουν το μεγαλύτερο μέρος των αναγκών του φυτού σε αφομοιώσιμο άζωτο. Απαραίτητη προϋπόθεση για το σχηματισμό φυματίου είναι το ριζόβιο να είναι συμβατό με το φυτό και υπάρχει εξειδίκευση στην συμβιωτική σχέση μικροβίου-φυτού. Στην περίπτωση ασυμβατότητας είτε δεν σχηματίζεται φυμάτιο είτε το φυμάτιο είναι μη λειτουργικό.

1.4.3 Η ΣΥΜΒΙΩΤΙΚΗ ΣΤΕΡΕΩΣΗ ΤΟΥ ΑΖΩΤΟΥ ΠΡΑΓΜΑΤΟΠΟΙΕΙΤΑΙ ΣΕ ΕΙΔΙΚΕΥΜΕΝΕΣ ΔΟΜΕΣ

Συμβιωτικοί αζωτοδεσμευτικοί προκαρυωτικοί οργανισμοί κατοικούν μέσα στα φυμάτια, τα ειδικά όργανα του ξενιστού φυτού που είναι χωρισμένα από το φυτικό κυτόπλασμα από μεμβράνες προερχόμενες από την πλασματική μεμβράνη του φυτού. Στην περίπτωση του φυτού *Gunnera*, αυτά τα όργανα συνιστούν εμμίσχους αδένες που αναπτύσσονται ανεξαρτήτως του συμβιώοντος. Στην περίπτωση των χεδρωπών (legumes) τα αζωτοδεσμευτικά βακτήρια επάγουν το φυτό να σχηματίσει ριζικά φυμάτια.

Τα αγρωστώδη μπορούν επίσης να αναπτύξουν ψευδοειδικές σχέσεις με αζωτοδεσμευτικούς οργανισμούς, αλλά σε αυτές τις ενώσεις δε σχηματίζονται ριζικά φυμάτια (Smith *et al.*, 1976). Αντί αυτού, τα αζωτοδεσμευτικά βακτήρια φαίνεται να αγκυροβολούν στην επιφάνεια της ρίζας, κατά κύριο λόγο γύρω από τη ζώνη επιμηκύνσεως και τη ζώνη των ριζικών τριχών. Τα βακτήρια όπως το *Azospirillum* δεσμεύει (στερεώνει) λίγο άζωτο όταν

συνιστά ενώσεις με φυτά και ότι κάθε διέγερση της φυτικής αναπτύξεως πιθανόν προέρχεται από τη βακτηριακή παραγωγή φυτικών ορμονών όπως του ινδολυλοξικού οξέος (Vande Broek and Vanderleyden 1995).

Τα χεδρωπά (legumes) ρυθμίζουν τη διαπερατότητα των αερίων στα φυμάτιά τους, διατηρώντας ένα επίπεδο οξυγόνου μέσα στο φυμάτιο, το οποίο μπορεί να υποστηρίξει την αναπνοή, αλλά είναι αρκετά χαμηλό για να αποφευχθεί η ανενεργοποίηση της νιτρογινάσης (Kuzma *et al.*, 1993). Η διαπερατότητα του αέρα αυξάνει το φως και ελαττούται κάτω από ξηρασία ή στην έκθεση σε νιτρικό ανιόν (NO_3^-). Ο μηχανισμός ρύθμισης της διαπερατότητας του αέρα δεν είναι ακόμα γνωστός.

2. ΤΟ ΓΕΝΟΣ *Fusarium*

2.1 ΕΙΣΑΓΩΓΗ

Το γένος *Fusarium* είναι ένα από τα πλέον σημαντικά και οικονομικής άποψης γένη μυκήτων, εξαιτίας της ικανότητάς του να προκαλεί ασθένειες στα φυτά, αλλά και της πιθανής παραγωγής τοξινών, που επηρεάζουν τα ζώα και τον άνθρωπο και θεωρούνται καρκινογόνες. Επιπλέον, ορισμένα είδη είναι ικανά να επηρεάζουν απευθείας και τον άνθρωπο, ιδιαίτερα ασθενείς που βρίσκονται σε ανοσοκαταστολή. Είδη του γένους συναντώνται σε όλο τον κόσμο, ωστόσο δεν είναι όλα τα είδη κοσμοπολίτικα, αφού ορισμένα κυριαρχούν σε ψυχρότερες περιοχές και άλλα σε τροπικές και υποτροπικές. Στα φυτά τα είδη του γένους *Fusarium* μπορούν να προκαλέσουν μεγάλο εύρος ασθενειών. Θεωρείται πως όλα σχεδόν τα καλλιεργούμενα φυτά μολύνονται από ένα τουλάχιστον είδος του γένους. Μάλιστα είναι πολλές οι περιπτώσεις που οι επιδημίες που έχουν προκαλέσει αυτά τα είδη αποδείχθηκαν καταστροφικές για συγκεκριμένες καλλιέργειες ολόκληρων περιοχών.

Τα πρώτα χρόνια που ακολούθησαν την ταυτοποίηση του γένους από τον Link, ως μοναδικό κριτήριο για την κατάταξη του είδους στο γένος *Fusarium* ήταν ο σχηματισμός ή μη των χαρακτηριστικών μακροκονιδίων. Αυτό οδήγησε στο να φτάσει το γένος να αποτελείται από περίπου 1.000 είδη. Τάξη σε αυτό το χάος θέλησαν να βάλουν Wollenweber και Reinking στα μέσα του 1930 θέτοντας τις βάσεις των πολυάριθμων συστημάτων ταξινόμησης που ακολούθησαν (Wollenweber and Reinking, 1935). Σύμφωνα με αυτό το γένος χωρίστηκε σε 16 τμήματα και αποτελούνταν από 65 είδη και 77 υποείδη. Κάθε τμήμα περιέχει είδη όμοια σε κρίσιμα μορφολογικά χαρακτηριστικά, όπως η μορφή των μακροκονιδίων που περιλαμβάνει ελάχιστα είδη.

Το γένος *Fusarium* χαρακτηρίζεται από τα υαλώδη δρεπανοειδή, πολυκύτταρα σκωληκοσπόρια, το βασικό κύτταρο των οποίων δίδει την όψη πλέγματος ανθρώπου. Τα σπόρια αυτά παράγονται (τυπικά) σε χαλαρά σποριοδοχεία. Πολλά είδη παράγουν και δεύτερο είδος σπορίων τα οποία είναι μονοκύτταρα ή δικύτταρα, παραγόμενα μεμονωμένα ή σε ομάδες ή σε αλυσίδες στην κορυφή φιαλιδίων. Τα σπόρια αυτά είναι τα μικροκονίδια σε αντιδιαστολή με τα πολυκύτταρα μακροκονίδια. Είναι από τα δυσκολότερα είδη να ταξινομηθούν. Έτσι υπάρχουν διάφορα συστήματα ταξινόμησης των ειδών του γένους (Snyder and Hansen, 1940, 1941, 1945). Οι τέλειες μορφές των ειδών του γένους *Fusarium* υπάγονται στα γένη *Nectria*, *Gibberella* των Ασκομυκήτων. Το γένος *Fusarium* περιλαμβάνει

μύκητες εδάφους, που είναι προαιρετικά σαπρόφυτα πολυάριθμων φυτικών ειδών. Το είδος *F. solani* είναι μεταξύ των σπουδαιότερων.

2.2 *Fusarium solani*

Το γένος *Fusarium* περιλαμβάνει μια ευρύ και ετερογενή ομάδα μυκήτων η οποία είναι σημαντική για την βιομηχανία τροφίμων και φαρμάκων, την ιατρική και τη γεωργία. Είναι ένας μύκητας φυτοπαθογόνων και είναι ένας σημαντικός αιτιώδης παράγοντας πολλών ασθενειών των καλλιεργειών.

Ο μύκητας *Fusarium solani* χαρακτηρίζεται από τα μακρά φιαλίδια που παράγουν μικροκονίδια. Προκαλεί σήψεις παρεγχυματικών ιστών και συγκεκριμένα σήψεις λαιμού και ριζών πολυάριθμων φυτών. Από πολλούς ερευνητές αναγνωρίζονται φυσιολογική εξειδίκευση στον παρασιτισμό (*formae speciales*). Νεότερες όμως έρευνες απέδειξαν ότι η φυσιολογική εξειδίκευση δεν είναι απόλυτη, τουλάχιστον σε ορισμένα είδη φυτών. (Gravanis, 1986)

Η ταξινόμική κατάταξη του *Fusarium solani* έχει ως εξής:

ΤΑΞΙΝΟΜΙΚΗ ΚΑΤΗΓΟΡΙΑ	
Βασίλειο	Μύκητες
Διάρθρωση	Eumycota
Υποδιάρθρωση	Deuteromycotina
Κλάση	Hypomycetes
Τάξη	Tuberculariales
Οικογένεια	Tuberculariaceae
Γένος	Fusarium
Είδος	Solani

Εύρος Ξενιστών: Οι κυρίαρχοι ξενιστές για το *Fusarium solani* είναι η πατάτα, ο αρακάς, τα φασόλια, και τα μέλη της οικογένειας των κολοκυθοειδών όπως πεπόνι, αγγούρι, και κολοκύθα. Ορισμένα βακτηριακά στελέχη μπορεί να προκαλέσουν λοιμώξεις στον άνθρωπο.

2.3 ΕΠΙΓΟΜΕΝΗ ΠΡΟΣΤΑΣΙΑ ΜΕΣΩ ΤΟΥ *Fusarium solani* ΣΤΕΛΕΧΟΣ Fsk

Το στέλεχος Fsk του *Fusarium solani* είναι ένας μη παθογόνος νηματοειδής μύκητας που εντοπίζεται στο έδαφος και έχει την ικανότητα αλληλεπίδρασης με φυτικούς οργανισμούς. Απομονώθηκε από ένα επισχετικό compost από υπολείμματα στέμφυλων και παραπροϊόντων ελαιουργίας. Το συγκεκριμένο στέλεχος εμφανίζει την ικανότητα να επιφέρει στα φυτά ενεργοποίηση των μηχανισμών άμυνας έναντι του φυτοπαθογόνου μύκητα του φυλλώματος *Septoria lycopersici*. Ο μύκητας προστατεύει επίσης τοπικά το φυτό έναντι της προσβολής από το ριζομύκητα σήψης *Fusarium oxysporum radialis-lycopersici* (FORL). (Kavroulakis *et al.* 2007).

Ο μύκητας Fsk είναι ικανός να διεισδύσει στις ρίζες του φυτού και να αναπτυχθεί στο φλοιό της ρίζας 5-15 ημέρες μετά τον εμβολιασμό του όπως και να εισχωρήσει στις ηθαγγειώδεις δεσμίδες του φυτού διαβιώνοντας ενδοφυτικά. Η ικανότητα του Fsk να αποικίζει τις ηθαγγειώδεις δεσμίδες του φυτού ωστόσο, είναι κάτι που χαρακτηρίζει τους μύκητες που αποτελούν παθογόνα των ριζών και για το λόγω αυτό, η δυνατότητα ενός ωφέλιμου στελέχους να αναπτύσσεται ενδοφυτικά χωρίς να προκαλεί συμπτώματα ασθένειας στο φυτό δηλώνει μια ασυνήθιστη αλληλεπίδραση μεταξύ μύκητα και φυτού.

Ο μηχανισμός με τον οποίο περιορίζεται η εξάπλωση του παθογόνου FORL, δεν έχει διευκρινιστεί πλήρως. Πιθανόν ο μύκητας Fsk αποτελεί ένα στέλεχος το οποίο ανταγωνίζεται το παθογόνο FORL ως προς τα θρεπτικά και τις θέσεις ανάπτυξης. Εναλλακτικά έχει προταθεί ότι στον μηχανισμό δράσης του Fsk έναντι του FORL, φαίνεται να συμμετέχει το αιθυλένιο, καθώς σε γενετικά τροποποιημένα φυτά, τα οποία δεν ανταποκρίνονται στο αιθυλένιο, ο Fsk δεν φαίνεται να ασκεί προστατευτική δράση ενάντια του FORL.



Εικόνα 2.3 *Fusarium solani*

Επίσης, το συγκεκριμένο στέλεχος χαρακτηρίζεται από ενδοφυτική ανάπτυξη και μάλιστα στο αγωγό σύστημα των φυτών. Μπορεί να απομονωθεί από τα υπόγεια μέρη του φυτού αλλά όχι από τα υπέργεια όπου δεν αναπτύσσεται καθόλου. Έχει την ικανότητα να αναπτύσσει προστατευτική δράση σε σχέση με τους παθογόνους οργανισμούς. Αυτή η δραστηριότητα οφείλεται σε κάποιο βαθμό σε εξωκυτταρικές ενώσεις που παράγει ο μύκητας και εμποδίζουν την αύξηση των παθογόνων. Για να καταφέρει να επιβιώσει εντός του φυτού, ο μύκητας πρέπει να μπορεί να ανταπεξέλθει στα αμυντικά συστήματά του. Προκειμένου να μπορέσει να αναπτυχθεί ο μύκητας εντός του φυτού πρέπει να μπορεί να εξουδετερώσει τον μεταβολίτη.

2.4 ΣΥΜΠΤΩΜΑΤΑ ΠΡΟΣΒΟΛΗΣ ΤΟΥ *Fusarium solani*

Τα πρώτα συμπτώματα σήψης ριζών αποτελούν μικρές, μακριές, κόκκινες έως καφέ βλάβες στους μίσχους, που κατά μήκος συχνά αναπτύσσονται σχισμές. Οι βλάβες επεκτείνονται κάτω από την κύρια ρίζα, η οποία μπορεί να ζαρώσει, να σαπίσει και να πεθάνει. Τα συμπτώματα σε ορισμένες περιπτώσεις εκτείνονται μέχρι την υποκοτύλιο στην επιφάνεια του εδάφους. Συστάδες ινωδών ριζών (πλάγιες ρίζες ή τυχαίες ρίζες) συνήθως αναπτύσσονται πάνω από τη ζαρωμένη ρίζα. Επίσης, σοβαρές σήψεις ριζών του *Fusarium* σκοτώνει πρωτοβάθμιας και δευτεροβάθμιας ρίζες, και τις περισσότερες φορές μόνο τυχαίες ρίζες είναι ορατές. Σημειώνετε ότι τα καφεκόκκινα τυπικά συμπτώματα του *Fusarium* προκαλούν σήψεις στην κύρια ρίζα.



Εικόνα 2.2 Νέκρωση στελέχους από τον *Fusarium solani*

Το *Fusarium solani* παράγει αγενή σπόρια (μικροκονίδια και μακροκονίδια). Παράγει γλαμυδοσπόρια τα οποία διαχειμάζουν ως μυκήλιο ή σπόρια σε μολυσμένους ή νεκρούς ιστούς. Μπορεί να μεταδοθεί από τον αέρα, τον εξοπλισμό, και το νερό. Ο μύκητας μπορεί να παραμείνει στο έδαφος για πολλά χρόνια. Τα σπόρια και το μυκήλιο μεταφέρονται στο έδαφος, όπου μπορούν επίσης να μεταφερθούν από τις πλημμύρες της βροχής. Τα γλαμυδοσπόρια είναι η δομή της επιβίωσης στην απουσία ενός φυτού ξενιστή.

ΣΚΟΠΟΣ ΤΗΣ ΕΡΓΑΣΙΑΣ

Σκοπός της μελέτης μας είναι ο αποικισμός του ψυχανθούς *Lotus japonicus* (και *Arabidopsis thaliana*) από τον ενδοφυτικό μύκητα *Fusarium solani* στέλεχος Fsk, καθώς και η επίδρασή του στην ανάπτυξη του φυτού. Τα στοιχεία αυτά, θα βοηθήσουν να κατανοήσουμε ότι το μυκητιακό στέλεχος *Fusarium solani* (Fsk) είναι ένας μη παθογόνος νηματοειδής μύκητας που εντοπίζεται στο έδαφος και έχει την ικανότητα αλληλεπίδρασης με φυτικούς οργανισμούς.

ΥΛΙΚΑ & ΜΕΘΟΔΟΙ

3. ΥΛΙΚΑ & ΜΕΘΟΔΟΙ

3.1 Το ψυχανθές *Lotus japonicus* σαν φυτικό μοντέλο

Ως φυτικό υλικό για τη διεξαγωγή των πειραμάτων που αφορούν στην απομόνωση και το χαρακτηρισμό γονιδίων χρησιμοποιήθηκε το ψυχανθές *Lotus japonicus* (οικότυπος Gifu B-129-S9). Το *L. Japonicus* ανήκει στην τάξη Leguminosae ή Fabales (χεδρωπών) και την οικογένεια των Papilionaceae ή 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. Από τις μέχρι τώρα ποικιλίες, μόνο τα είδη *L. corniculatus*, *L. uliginostus* και *L. tenuis* έχουν αγροοικονομική σημασία (Swanson et al. 1990). Τα τελευταία χρόνια το διπλοειδές είδος *L. japonicus* χρησιμοποιείται ευρύτατα σαν 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 3.1 *Lotus japonicus*

3.2 *Arabidopsis thaliana* ως φυτικό μοντέλο

Για την διεξαγωγή των πειραμάτων χρησιμοποιήθηκε και το *Arabidopsis thaliana* που είναι ένα μικρό ανθοφόρο ετήσιο φυτό, το οποίο έχει χρησιμοποιηθεί ως φυτικό μοντέλο για την μελέτη όλων των πτυχών της ανάπτυξης και των φυσιολογικών αντιδράσεων των φυτών. Έχει μικρό μέγεθος με σχετικά σύντομο κύκλο ζωής, που μπορεί να τον ολοκληρώσει σε έξι εβδομάδες. Επίσης, έχει ένα από τα μικρότερα γονιδιώματα μεταξύ των φυτών. Το *A. thaliana* μπορεί να αναπτυχθεί σε τριβλύα Petri, γλάστρες, υπό φθορίζοντα φώτα ή σε ένα θερμοκήπιο. Καθένα από τα ανωτέρω κριτήρια οδηγεί ότι προτιμάται ως πρότυπος γενετικός οργανισμός.



Εικόνα 3.2 Βλαστικό στάδιο, ενήλικο φυτό, άνθος και σπόροι του *A. thaliana*

3.3 Παρασκευή θρεπτικών υποστρωμάτων

Όλα τα υλικά που παρασκευάστηκαν, αμέσως μετά την παρασκευή τους και πριν το μοίρασμα σε τρυβλία Petri, αποστειρώθηκαν στο αυστόκαυστο.

3.3.1 Θρεπτικό διάλυμα για μύκητες

Για την απομόνωση των μυκήτων χρησιμοποιήθηκε θρεπτικό υπόστρωμα **Potato Dextrose Agar (PDA)**. Το θρεπτικό υλικό αφέθηκε να κρυώσει μέσα στην κωνική φιάλη.

3.3.2 Θρεπτικό διάλυμα για φυτά

Για την ανάπτυξη των σπόρων χρησιμοποιήθηκε θρεπτικό υπόστρωμα (Ms). Το θρεπτικό υπόστρωμα πριν το μοίρασμα στα τρυβλία αφέθηκε να κρυώσει.

3.4 Απολύμανση σπόρων

Προκειμένου να μελετηθεί σωστά ο αποικισμός του ψυχανθούς *Lotus japonicus* έπρεπε να απολυμανθούν οι σπόροι, για διακοπή λήθαργου και αύξηση βλαστικής ικανότητας. Για την απομόνωση των σπόρων ακολουθήθηκε το παρακάτω πρωτόκολλο απολύμανσης του *L. japonicus*.

1. Τοποθέτηση των σπόρων του *L. japonicus* σε διάλυμα χλωρίνης, περιεκτικότητας 2,5% NaOCl .
2. Ανάδευση για 20 min .
3. Ξέπλυμα των σπόρων με αποστειρωμένο νερό, σε 6 επαναλήψεις.
4. Στην 7 επανάληψη παραμένουν στο αποστειρωμένο νερό και τοποθετούνται στο ψυγείο στους 4⁰ C για ένα βράδυ.
5. Την επομένη, τα σπόρια του *L. japonicus* στρώνονται σε τριβλύα Petri με θρεπτικό διάλυμα για φυτά (Ms), στο θάλαμο νοηματικής ροής.
6. Στη συνέχεια, αφού τα τυλίξουμε με αλουμινόχαρτο, ώστε να μην περνάει το φως, τα αφήνουμε στο ψυγείο στους 4⁰C για ακόμα ένα βράδυ.
7. Τέλος, τα βάζουμε, με το αλουμινόχαρτο, στο θάλαμο ανάπτυξης για 5 μέρες.

3.5 Εμβολιασμός με *Fusarium solani* στέλεχος Fsk

Στο θάλαμο νοηματικής ροής, αποστειρώνεται η λεπίδα στο γκαζάκι. Στη συνέχεια, κόβονται δύο με τρία τμήματα από το τριβλύο του μύκητα Fsk, τα οποία ρίχνονται μέσα στο θρεπτικό διάλυμα για μύκητες (PDA) 100ml. Τέλος , τοποθετείται η κωνική φιάλη με το διάλυμα στους 25-26⁰C, στον αναδευτήρα, για 5 ημέρες, μέχρι να διαλυθούν.

3.6 Συλλογή Κονιδίων

Για να συλλεχθούν τα κονίδια θα πρέπει να αποστειρωθούν:

- ένα χωνί γυάλινο
- δύο φάλκον
- τουλουπάνι
- tips των 5ml
- CIna περιεκτικότητας 0,05%

Διαδικασία: Σε ένα φάλκον βάζουμε το γυάλινο χωνί και μέσα στο χωνί τοποθετούμε το τουλουπάνι. Ρίχνουμε μέσα το διάλυμα με τον μύκητα Fsk, ο οποίος έχει διαλυθεί από την ανάδευση, μέχρι 50ml. Αφαιρούμε το χωνί στο οποίο έχει μείνει το μυκήλιο του μύκητα και βάζουμε το φάλκον με το υγρό στη φυγόκεντρο.

Η φυγοκέντρωση γίνεται : στους 18⁰C, στις 6500 στροφές για 5 min.

Μετά την φυγοκέντρωση απομακρύνουμε το υγρό και αφήνουμε τα κονίδια στον πάτο του φάλκον. Στη συνέχεια ρίχνουμε και το υπόλοιπο διάλυμα, το οποίο φυγοκεντρούμε, δηλαδή γίνεται δύο φορές φυγοκέντρωση από 50ml στο φάλκον. Την δεύτερη φορά απομακρύνουμε το υγρό από το φάλκον με την πιπέτα. Ύστερα βάζουμε υποχλωριώδες νάτριο (0,05%) και κάνουμε πάλι φυγοκέντρωση. Τέλος, αφαιρούμε το θρεπτικό με την πιπέτα και αφήνουμε κονίδια και μυκήλιο, όπου προσθέτουμε περίπου 2,5ml CIna.

3.6.1 Μέτρηση Κονιδίων

Για να μετρήσουμε τα κονίδια θα πρέπει να αραιώσουμε το τελικό διάλυμα. Δηλαδή θα κάνουμε αραιώση 10⁻³. Θα πάρουμε 10μl από το δείγμα μας και 990μl αποστειρωμένο νερό (H₂O). Στη συνέχεια, στο μικροσκόπιο χρησιμοποιώντας την πλάκα NEUBAUER, μετράμε τα κονίδια (μετρώντας 10 κουτάκια δεξιά και 10 κουτάκια αριστερά, που έχει η πλάκα, από αυτά που δεν είναι πάνω στη γραμμή.) Το θρεπτικό διάλυμα του μύκητα που μας περίσσεψε μπορεί να διατηρηθεί στο ψυγείο στους 4⁰C.



Εικόνα 3.3 Πλάκα NEUBAUER

Μετρήσεις:

1) 6	6) 4	1) 4	6) 3
2) 5	7) 6	2) 2	7) 4
3) 3	8) 4	3) 4	8) 4
4) 5	9) 6	4) 5	9) 1
5) 3	10) 4	5) 5	10) 3

Μέσος Όρος = άθροισμα αριθμών / πλήθος αριθμών

$$= 6+5+3+5+3+4+6+4+6+4+4+2+4+5+5+3+4+4+1+3 / 20 = 4,05$$

ΜΟ = 4,05 κονίδια

Τύπος: $a \times 4 \times 25 \times 10^4 \times df = \text{κονίδια} / \text{ml}$

a = αριθμός κονιδίων

df = η αραιώση από το αρχικό δείγμα ή από αυτό που ήδη αραιώσαμε

$$a \times 4 \times 10^4 \times df = 4,05 \times 4 \times 25 \times 10^4 \times 10^3 = \underline{4,05 \times 10^9} \text{ κονίδια}$$

Με την εξίσωση της αραιώσης υπολογίζουμε την τελική συγκέντρωση του διαλύματος, που θα εμβολιάσουμε τη ρίζα του φυτού.

$$C_1 V_1 = C_2 V_2$$

Όπου: **C₁** = αρχική συγκέντρωση του διαλύματος

C₂ = τελική συγκέντρωση του διαλύματος

V₁ = αρχικός όγκος

V₂ = τελικός όγκος

Θέλουμε **C_{TEΛ}** = $10^6 / \text{ml}$ κονίδια

$$V_{\text{TEΛ}} = 50\text{ml} (= \text{φυτά} \times 1\text{ml})$$

$$X = 4,05 \cdot 10^9 \text{ κονίδια}$$

$$C_1 V_1 = C_2 V_2 \Rightarrow V_{\text{APX}} \cdot X = 10^6 \cdot 50\text{ml}$$

$$\Rightarrow V_{\text{APX}} \cdot 4,05 \cdot 10^9 = 10^6 \cdot 50\text{ml}$$

$$\Rightarrow V_{\text{APX}} = 12,5 \cdot 10^{-3} = 0,0125\text{ml}$$

Οπότε $V_{APX} = 0,0125\text{ml}$ ή $V_{APX} = 12,5\mu\text{l}$

Συμπέρασμα: Σε 50ml αποστειρωμένο νερό θα προσθέσουμε 12,5μl από το διάλυμα του Fsk, και θα εμβολιάσουμε με 1ml κάθε ρίζα του φυτού.

3.7 Φύτεμα και πότισμα με θρεπτικό διάλυμα

Για την φύτευση των φυτών *L. jaronicus*, αφού αναπτύχθηκε το ριζικό σύστημα, χρησιμοποιήθηκε περλίτης, ο οποίος πλύθηκε και αποστειρώθηκε. Αποτελεί, εξαιρετικά αποτελεσματικό υπόστρωμα για τα φυτά, με ουδέτερο pH, που παρέχει αερισμό και βέλτιστη διατήρηση υγρασίας, καθώς έχει την ικανότητα να συγκρατεί 3-4 φορές περισσότερο νερό σε σχέση με το βάρος του.

Μετά το φύτεμα και τον εμβολιασμό των φυτών του *L. jaronicus* με το διάλυμα του ενδοφυτικού μύκητα Fsk σε κάθε ρίζα του φυτού, έπεται το πότισμα. Όπου ποτίζαμε τα φυτά ανά δύο μέρες με θρεπτικό διάλυμα ανάπτυξης του φυτικού ιστού Hoagland (πίνακας 3.1). Για την παρασκευή του θρεπτικού διαλύματος χωρίς άζωτο χρησιμοποιήθηκαν μητρικά διαλύματα των απαραίτητων στοιχείων.

Για 500ml Hoagland προστίθενται:

Reagents	25%	50%	75%	100%
MgSO₄	0,250	0,500	0,75	1
KH₂PO₄	0,125	0,250	0,375	0,5
FeEDTA	0,125	0,250	0,375	0,5
Micro Elements	0,125	0,250	0,375	0,5
KNO₃	0,625	1,25	1,875	2,5
Ca(NO₃)₂ 4H₂O	0,625	1,25	1,875	2,5
H₂O	498,125	496,250	494,375	492,5

Πίνακας 3.1 **Θρεπτικό διάλυμα φυτικού ιστού Hoagland**

3.8 Απομόνωση του ενδοφυτικού μύκητα Fsk

Αφού αναπτύχθηκαν τα φυτά, θέλουμε να εξετάσουμε, αν ο ενδοφυτικός μύκητας Fsk βρίσκεται στη ρίζα των φυτών μας. Διότι, έχει την ικανότητα να εισέρχεται και να εξέρχεται από αυτές. Για να το διαπιστώσουμε, ακολουθήθηκε η παρακάτω διαδικασία.

Έχοντας τρεις γλάστρες με 8-10 φυτά στη καθεμία, ξεπατικώσαμε τη πρώτη μετά από 5 ημέρες, την δεύτερη μετά από 10 ημέρες και την τρίτη μετά από 15 ημέρες. Αφού ξεριζώσαμε προσεκτικά τα φυτά, τα τοποθετήσαμε σε ένα τριβλύο και τα ξεπλύναμε, προσπαθώντας να μην κοπούν οι ρίζες, με αποστειρωμένο νερό σε τρεις επαναλήψεις ώστε να φύγει ο περλίτης. Στη συνέχεια, στο θάλαμο νοηματικής ροής, βάλαμε τα φυτά μέσα σε erpedorf με χλωρίνη περιεκτικότητας 0,5% NaOCl για 5 min με τη βοήθεια λαβίδας, για την απολύμανση των ριζών. Ύστερα, ξεπλύναμε με αποστειρωμένο νερό σε 5 επαναλήψεις, και στην 6η επανάληψη τα πήραμε με μια λαβίδα ένα-ένα και τα τοποθετήσαμε σε ένα τριβλύο με διηθητικό χαρτί, όπου αποκρίναμε το υπέργειο τμήμα αφήνοντας μόνο τις ρίζες. Έπειτα, κόψαμε τις ριζούλες μία-μία με τη λεπίδα και τις μεταφέραμε σε τριβλύα με θρεπτικό διάλυμα για μύκητες (PDA). Τα τριβλύα επωάζονται στους 25⁰C.

Σε περίπτωση εμφανίσεως του μύκητα συνεχίζουμε με την παρακάτω μεθοδολογία, αλλιώς επαναλαμβάνουμε την παραπάνω διαδικασία. Το ίδιο πείραμα πραγματοποιήθηκε και για το φυτό *A. thaliana*.

3.8.1 Απομόνωση DNA από τον μύκητα Fsk

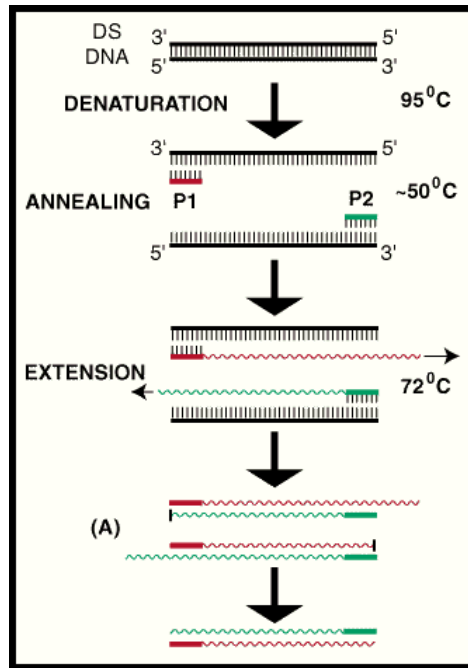
Απομονώνεται ο μύκητας σε τριβλύο Petri, από τη ρίζα του φυτού. Ακολουθεί, εμβολιασμός σε υγρή καλλιέργεια, PDA θρεπτικού διαλύματος και ανάδευση στους 25-26⁰C για 3 ημέρες. Έπειτα, συλλέγουμε το μυκήλιο σε αποστειρωμένο τουλουπάνι. Στη συνέχεια, για την απομόνωση genomic DNA χρησιμοποιήθηκε η μέθοδος της CTAB, η οποία ακολουθεί το παρακάτω πρωτόκολλο.

- 1.Λειοτριβούμε το μυκήλιο του μύκητα με υγρό άζωτο σε αποστειρωμένο γουδί, η πούδρα που δημιουργήθηκε τοποθετείται σε δοχείο erpendorf (1,5 ml).
- 2.Προσθέτουμε 200μl CTAB (προθερμασμένο στους 65⁰C) και 1μl mercaptoethanol, επωάζονται για 10-30 λεπτά στους 65⁰C, ενώ ανακινούνται με vortex ανά 10 λεπτά.
- 3.Προσθέτουμε 200μl SEVAG, ενώ ανακινούμε με vortex για 30 δευτερόλεπτα.

4. Φυγοκεντρούμε στις 13.000xg στροφές για 2 λεπτά, δημιουργώντας έτσι 3 επίπεδα-φάσεις. Την επάνω φάση την απομακρύνουμε, τοποθετώντας την σε ένα νέο δοχείο eppendorf (1,5 ml).
5. Προσθέτουμε 0,7 επί του όγκου της επάνω φάσης isopropanol και επωάζονται σε θερμοκρασία δωματίου για 10 λεπτά.
6. Φυγοκεντρούμε στις 13.000xg στροφές για 10 λεπτά και απορρίπτουμε την επάνω φάση.
7. Πλύσιμο του pellet με προσθήκη 0,5ml από διάλυμα αιθανόλης περιεκτικότητας 70% (αποθηκευμένη στους -20 °C). Φυγοκεντρούμε στις 13.000xg στροφές για 5 λεπτά.
8. Το υπερκείμενο απορρίπτεται και επαναλαμβάνουμε τη φυγοκέντρηση για 2-3 λεπτά.
9. Επαναδιαλύουμε το pellet σε 50μl αποστειρωμένο ddH₂O, με 1μl DNάση για κάθε δείγμα.

3.8.2 Αλυσιδωτή Αντίδραση Πολυμεράσης (PCR)

Η αλυσιδωτή αντίδραση της πολυμεράσης (PCR) αποτελεί την πλέον εξειδικευμένη και ευαίσθητη μέθοδο ενισχύσεως ακολουθιών DNA και RNA, *in vitro* ή και *in situ*. Η αντίδραση προϋποθέτει την ύπαρξη δύο ολιγονουκλεοτιδίων, που έχουν την ικανότητα να υβριδίζουν στις συμπληρωματικές αλυσίδες DNA ή cRNA, τα οποία δρουν ως εκκινητές της σύνθεσης της αλυσίδας του DNA. Η σχεδίαση των εκκινητών είναι τέτοια, ώστε η σύνθεση της αλυσίδας του DNA να γίνεται προς την κατεύθυνση του άλλου. Η σύνθεση γίνεται με τη δράση μιας θερμοανθεκτικής DNA πολυμεράσης, παρουσία των απαραίτητων νουκλεοτιδίων καθώς και ιόντων Mg²⁺. Κατά τη διάρκεια μιας τυπικής αντίδρασης, πρώτο στάδιο αποτελεί η αποδιάταξη του δίκλωνου DNA, με τη θέρμανση του δείγματος. Ακολουθεί μείωση της θερμοκρασίας και υβριδισμός των εκκινητών στις αποδιατεταγμένες αλυσίδες. Η σύνθεση των συμπληρωματικών αλυσίδων γίνεται με θέρμανση του δείγματος στη βέλτιστη θερμοκρασία για τη δράση της DNA πολυμεράσης. Η όλη διαδικασία αποδιάταξης, υβριδισμού των εκκινητών και σύνθεσης της συμπληρωματικής αλυσίδας επαναλαμβάνεται για ένα αριθμό κύκλων (συνήθως 20-35). Κατά τη διάρκεια των διαδοχικών κύκλων και εφ' όσον δεν υφίστανται περιοριστικοί παράγοντες όπως έλλειψη νουκλεοτιδίων και εκκινητών η παραγωγή παρεμποδιστών της πολυμεράσης, η συσσώρευση των προϊόντων της αντίδρασης γίνεται με εκθετικό ρυθμό.



Εικόνα 3.4 Τα στάδια της PCR

Πειραματικές συνθήκες: Μετά την απομόνωση του DNA ακολουθεί η ενίσχυση του με τη μέθοδο της PCR, χρησιμοποιώντας το ζεύγος των εκκινητών ITS1 F - ITS4 R. Ο αυτόματος κυκλοποιητής που χρησιμοποιήθηκε είναι το μοντέλο Sensoquest της εταιρίας labcycler. Η πολυμεράση που χρησιμοποιήθηκε είναι η KAPA Taq PCR Kit της εταιρίας KAPABIOSYSTEMS.

Με τη χρήση της PCR ενισχύθηκε η περιοχή του ολικού γενετικού υλικού, όπου πραγματοποιήθηκε ενίσχυση τμήματος ~600 βάσεων της περιοχής ITS-5.8S rDNA (ριβωσωμικό DNA). Οι αλληλουχίες των εκκινητών που χρησιμοποιήθηκαν παρουσιάζονται στον πίνακα.

		Όνομα	Αλληλουχία (5' – 3')
ITS-5.8S Rdna	Forward	ITS1	5' - CTTGGTCATTTAGAGGAAGTAA – 3'
	Reverse	ITS4	5' - TCCTCCGCTTATTGATATGC - 3'

Πίνακας 3.2 Αλληλουχίες ολιγονουκλεοτιδίων που χρησιμοποιήθηκαν για ενίσχυση τμήματος ITS-5.8S rDNA

Οι συνθήκες πραγματοποίησης της αλυσιδωτής αντίδρασης πολυμεράσης φαίνονται στον πίνακα 3.3

Στάδια	°C	Χρόνος	Κύκλοι
Αρχική αποδιάταξη (initial denaturation)	94°C	5 λεπτά	
Αποδιάταξη (denaturation)	94°C	30 δευτερόλεπτα	Επανάληψη για 30 κύκλους
Υβριδισμός εκκινητών (annealing)	55°C	30 δευτερόλεπτα	
Επιμήκυνση (extension)	72°C	60 δευτερόλεπτα	
Τελική επιμήκυνση (final extension)	72°C	10 λεπτά	
Διατήρηση (hold)	4°C	∞	

Πίνακα 3.3 Συνθήκες PCR για ενίσχυση τμήματος ITS-5.8S rDNA

3.8.3 Ηλεκτροφόρηση σε πήκτωμα αγαρόζης

Μετά την PCR ακολούθησε ηλεκτροφόρηση όλου του PCR – προϊόντος σε πήκτωμα αγαρόζης. Αυτή η μέθοδος είναι η πιο κοινή για τον διαχωρισμό και την ανάλυση του DNA. Στόχος της ηλεκτροφόρησης είναι η απομόνωση της προς μελέτη ζώνης DNA.

Για την ηλεκτροφόρηση χρησιμοποιήθηκε πήκτωμα αγαρόζης 1%. Για την παρασκευή του ζυγίστηκαν 0,5g αγαρόζης και διαλύθηκαν σε 50 ml διαλύματος TAE (1%), υπό θέρμανση σε φούρνο μικροκυμάτων μέχρι πλήρους ομογενοποίησής τους. Το διάλυμα αφέθηκε να κρυώσει, και προστέθηκαν 5ml διαλύματος βρωμιούχου αιθιδίου (10 mg/ml). Ακολούθησε ανάδευση και το διάλυμα αφέθηκε να στερεοποιηθεί στη συσκευή ηλεκτροφόρησης, αφού πρώτα προσαρμόστηκε η κατάλληλη «χτένα» ώστε να σχηματιστούν τα βοηθία φόρτωσης. Όταν το πήκτωμα στερεοποιήθηκε φορτώθηκαν τα δείγματα, αφού πρώτα προστέθηκε σε αυτά 2 μl χρωστικής φόρτωσης (loading dye). Δίπλα στα δείγματα φορτώθηκε μικρή ποσότητα μοριακού δείκτη για να είναι δυνατή η εύρεση του αριθμού των ζευγών βάσεων που αντιστοιχούν στην επιθυμητή ζώνη. Εφαρμόστηκε τέλος ηλεκτρική τάση (80 – 90 V) στη συσκευή, για την εκκίνηση ηλεκτροφόρησης των δειγμάτων.

3.8.4 Ανάκτηση DNA από πήκτωμα αγαρόζης

Μετά την ηλεκτροφόρηση πραγματοποιήθηκε ανάκτηση της επιθυμητής ζώνης του κλάσματος. Για την απομόνωση DNA από τη γέλη αγαρόζης ακολουθήθηκε το πρωτόκολλο του kit NucleoSpin® Gel and PCR clean up, της εταιρίας macherey-nager, το οποίο έχει ως εξής:

1. Κόβουμε το κομμάτι από το gel το οποίο περιέχει το DNA που θέλουμε να απομονώσουμε, τοποθετείται σε δοχείο erpendorf (1,5 ml) και ζυγίζεται.
2. Προσθέτουμε 200μl NTI ανά 100mg gel και επωάζονται στους 50°C για 5-10 λεπτά.
3. Το δείγμα τοποθετείται σε tissue column και φυγοκεντρείται στις 11.000xg στροφές για 30 δευτερόλεπτα. Το υγρό που διαπερνά τη μεμβράνη απορρίπτεται.
4. Ξέπλυμα της μεμβράνης με 700μl NT3, φυγοκεντρείται στις 11.000xg στροφές για 30 δευτερόλεπτα και το υγρό που διαπερνά τη μεμβράνη απορρίπτεται.
5. Επανάληψη του προηγούμενου βήματος.
6. Στέγνωμα της μεμβράνης με φυγοκέντρηση στις 11.000xg στροφές για 1 λεπτό, το υγρό που διαπερνά τη μεμβράνη απορρίπτεται.
7. Το tissue column τοποθετείται σε δοχείο erpendorf (1,5 ml).
8. Έκλυση DNA με 30 μl NE (προθερμασμένο στους 70 °C για 5 λεπτά, αραιωμένο κατά 1/3), επωάζεται σε θερμοκρασία δωματίου για περίπου 1 λεπτό και μετά φυγοκεντρείται στις 11.000xg στροφές για 1 λεπτό.
9. Το υγρό που διαπερνά τη μεμβράνη αποτελεί το ενισχυμένο DNA που προσπαθούμε να απομονώσουμε από το gel.

3.8.5 Ανάλυση αλληλουχιών & Φυλογενετική ανάλυση

Τα δείγματα εστάλησαν σε αναλυτικό εργαστήριο για ανάγνωση των αλληλουχιών (*sequencing*). Ο προσδιορισμός των αλληλουχιών έγινε με σύγκριση αυτών με ήδη καταχωρημένες αλληλουχίες της GenBank, με χρήση του αλγόριθμου BLAST, μέσω της βάσης δεδομένων NCBI.

3.9 Ανάπτυξη *Arabidopsis thaliana* παρουσία & μη Fsk

Τοποθετήσαμε σπόρους *A. thaliana* όπως προαναφέραμε (3.4) σε δύο τριβλύα Petri που περιέχουν θρεπτικό διάλυμα Ms/2 μέχρι να βλαστήσουν. Στη συνέχεια, αφού ανέπτυξαν το ριζικό τους σύστημα, στο ένα τριβλύο βάλαμε ένα κομμάτι του ενδοφυτικού μύκητα Fsk, ενώ το δεύτερο τριβλύο χρησιμοποιήθηκε ως control, τοποθετώντας θρεπτικό διάλυμα PDA. Τέλος, τα δύο τριβλύα τα βάλαμε στο θάλαμο ανάπτυξης παρατηρώντας τα καθημερινά.

3.10 Ανάπτυξη φυτών παρουσία & μη Fsk

Κατά τον ίδιο τρόπο αναπτύχθηκαν πάλι τα φυτά *A. thaliana* και *L. japonicus* (3.4). Τα οποία στη συνέχεια, αφού ανέπτυξαν το ριζικό τους σύστημα, φυτεύτηκαν σε 4 γλάστρες με περλίτη (3.7), όπου οι δύο από αυτές εμβολιάστηκαν με Fsk και δύο χρησιμοποιήθηκαν ως controls, από τα προαναφερθέντα φυτά. Για να εμβολιάσουμε τις ρίζες των φυτών, πήραμε τις ακόλουθες μετρήσεις κονιδίων από το τελικό διάλυμα του ενδοφυτικού μύκητα Fsk, που προέκυψαν με την ίδια διαδικασία (3.5, 3.6)

Μετρήσεις:

1) 15	6) 16	1) 10	6) 16
2) 17	7) 11	2) 21	7) 21
3) 19	8) 24	3) 15	8) 20
4) 17	9) 21	4) 7	9) 17
5) 17	10) 22	5) 19	10) 15

$$\text{Μέσος Όρος} = 340 / 20 = 17$$

$$\text{ΜΟ} = 17 \text{ κονίδια}$$

$$\text{Τύπος: } a \times 4 \times 10^4 \times df = 17 \times 4 \times 25 \times 10^4 \times 10^3 = \underline{17 \times 10^9} \text{ κονίδια}$$

3.10.1 Εμβολιασμός του φυτού *Arabidopsis thaliana*

Με την εξίσωση της αραιώσης υπολογίζουμε την τελική συγκέντρωση του διαλύματος, που θα εμβολιάσουμε τη ρίζα του *A. thaliana*.

Θέλουμε $C_{TEΛ} = 10^4 / \text{ml}$ κονίδια

$$V_{TEΛ} = 50\text{ml} \text{ (= φυτά x 1ml)}$$

$$X = 17 \cdot 10^9 \text{ κονίδια}$$

$$C_1 V_1 = C_2 V_2 \Rightarrow V_{APX} \cdot X = 10^4 \cdot 50\text{ml}$$

$$\Rightarrow V_{APX} \cdot 17 \cdot 10^9 = 10^4 \cdot 50\text{ml}$$

$$\Rightarrow V_{APX} = 2,94 \cdot 10^{-5} = 0,0000294\text{ml}$$

Οπότε $V_{APX} = 0,0000294\text{ml}$ ή $V_{APX} = 0,0294\mu\text{l}$

Επειδή η ποσότητα για να εμβολιάσουμε είναι μικρή χρησιμοποιούμε πάλι την εξίσωση της αραιώσης. Όπου: $C_{APX} = 10^6 / \text{ml}$ κονίδια

$$C_{TEΛ} = 10^4 / \text{ml} \text{ κονίδια}$$

$$V_{TEΛ} = 50\text{ml} \text{ (= φυτά x 1ml)}$$

$$C_1 V_1 = C_2 V_2 \Rightarrow V_{APX} \cdot 10^6 = 10^4 \cdot 50\text{ml}$$

$$\Rightarrow V_{APX} = 50 \cdot 10^{-2} = 0,5\mu\text{l}$$

Οπότε $V_{APX} = 0,5\mu\text{l}$

Συμπέρασμα: Σε 50ml αποστειρωμένο νερό θα προσθέσουμε 0,5μl από το διάλυμα του Fsk, και θα εμβολιάσουμε με 1ml κάθε ρίζα του *Arabidopsis thaliana*.

3.10.2 Εμβολιασμός του φυτού *Lotus japonicus*

Με την εξίσωση της αραιώσης υπολογίζουμε την τελική συγκέντρωση του διαλύματος, που θα εμβολιάσουμε τη ρίζα του *L. japonicus*.

Θέλουμε $C_{TEA} = 10^6 / \text{ml}$ κονίδια

$$V_{TEA} = 50\text{ml} \text{ (= φυτά } \times 1\text{ml)}$$

$$X = 17 \cdot 10^9 \text{ κονίδια}$$

$$C_1 V_1 = C_2 V_2 \Rightarrow V_{APX} \cdot X = 10^6 \cdot 50\text{ml}$$

$$\Rightarrow V_{APX} \cdot 17 \cdot 10^9 = 10^6 \cdot 50\text{ml}$$

$$\Rightarrow V_{APX} = 2,94 \cdot 10^{-3} = 0,00294\text{ml}$$

Οπότε $V_{APX} = 0,00294\text{ml}$ ή $V_{APX} = 2,94\mu\text{l}$

Συμπέρασμα: Σε 50ml αποστειρωμένο νερό θα προσθέσουμε 2,94μl από το διάλυμα του Fsk, και θα εμβολιάσουμε με 1ml κάθε ρίζα του *Lotus japonicus*.

3.10.3 Συλλογή υπέργειου & υπόγειου τμήματος των φυτών

Μετά τον εμβολιασμό της ρίζας, αφήσαμε τα φυτά να αναπτύξουν το ριζικό τους σύστημά, περίπου 25 ημέρες ποτίζοντας τα ανά δύο μέρες, με το παραπάνω διάλυμα (πίνακας 3.1). Στη συνέχεια ξεριζώσαμε προσεκτικά τα φυτά χωρίς να τραυματίσουμε τις ρίζες και τα τοποθετήσαμε σε επιφάνεια με χάρακα. Αφού μετρήσαμε το υπέργειο / υπόγειο τμήμα του κάθε φυτού, με και χωρίς τον ενδοφυτικό μύκητα Fsk, τα συλλέξαμε όλα μαζί σε υγρό άζωτο (N), για να απομονώσουμε το DNA με τη μέθοδο απομόνωσης DNA CTAB.

3.10.4 Απομόνωση DNA με τη μέθοδο της CTAB

Με το genomic DNA extraction εξετάσαμε το υπόγειο και υπέργειο τμήμα των φυτών με Fsk, καθώς επίσης και χωρίς Fsk. Χρησιμοποιώντας τη μέθοδο της CTAB για την απομόνωση DNA. Το πρωτόκολλο που ακολουθήθηκε είναι το παρακάτω:

1. Λειοτριβούμε τον ιστό του φυτού με υγρό άζωτο σε αποστειρωμένο γουδί, η πούδρα που δημιουργήθηκε τοποθετείται σε δοχείο eppendorf (1,5 ml).
2. Προσθέτουμε 200μl CTAB (προθερμασμένο στους 65°C) και 1μl mercaptoethanol, επωάζονται για 10-30 λεπτά στους 65°C, ενώ ανακινούνται με vortex ανά 10 λεπτά.
3. Προσθέτουμε 200μl SEVAG, ενώ ανακινούμε με vortex για 30 δευτερόλεπτα.

4. Φυγοκεντρούμε στις 13.000xg στροφές για 2 λεπτά, δημιουργώντας έτσι 3 επίπεδα-φάσεις. Την επάνω φάση την απομακρύνουμε, τοποθετώντας την σε ένα νέο δοχείο eppendorf (1,5 ml).
5. Προσθέτουμε 0,7 επί του όγκου της επάνω φάσης isopropanol και επωάζονται σε θερμοκρασία δωματίου για 10 λεπτά.
6. Φυγοκεντρούμε στις 13.000xg στροφές για 10 λεπτά και απορρίπτουμε την επάνω φάση.
7. Πλύσιμο του pellet με προσθήκη 0,5ml από διάλυμα αιθανόλης περιεκτικότητας 70% (αποθηκευμένη στους -20 °C). Φυγοκεντρούμε στις 13.000xg στροφές για 5 λεπτά.
8. Το υπερκείμενο απορρίπτεται και επαναλαμβάνουμε τη φυγοκέντρηση για 2-3 λεπτά.
9. Επαναδιαλύουμε το pellet σε 50μl αποστειρωμένο ddH₂Ost, με 1μl DNάση για κάθε δείγμα.

3.10.5 Ενίσχυση του γονιδιώματος με τη μέθοδο της PCR

Μετά την απομόνωση του DNA ακολουθεί η ενίσχυση του με τη μέθοδο της PCR, χρησιμοποιώντας το ζεύγος των εκκινητών FFsITS1-RFsITS1. Με τη χρήση της PCR ενισχύθηκε η περιοχή του ολικού γενετικού υλικού, τμήματος ~150 βάσεων. Ο αυτόματος κυκλοποιητής που χρησιμοποιήθηκε είναι το μοντέλο Sensoquest της εταιρίας labcycler. Η πολυμεράση που χρησιμοποιήθηκε είναι η KAPA Taq PCR Kit της εταιρίας KAPABIOSYSTEMS. Οι αλληλουχίες των εκκινητών που χρησιμοποιήθηκαν παρουσιάζονται στον πίνακα 3.4

	Όνομα	Αλληλουχία (5' – 3')
Forward	FsITS1	5'- TGGTCATTTAGAGGAAGTAA – 3'
Reverse	FsITS2	5'- GGTATGTTTACAGGGTTGATG – 3'

Πίνακας 3.4 Αλληλουχίες ολιγονουκλεοτιδίων που χρησιμοποιήθηκαν

Τα αντιδραστήρια και η ποσότητα αυτών παρουσιάζονται στον πίνακα 3.5

Αντιδραστήριο	Ποσότητα
Buffer (10x + Mg)	2 μl
dNTP's (10mM eachs)	0,4 μl
FFsITS1F	0,4 μl
RFsITS1R	0,4 μl
KapaTaq (5U/λ)	0,08 μl
DdH ₂ Ost	15,72 μl
DNA	1 μl

Πίνακας 3.5 Συστατικά PCR Buffer

Οι συνθήκες πραγματοποίησης της αλυσιδωτής αντίδρασης πολυμεράσης φαίνονται στον πίνακα 3.6

Στάδια	°C	Χρόνος	Κύκλοι
Αρχική αποδιάταξη (initial denaturation)	95°C	2 λεπτά	
Αποδιάταξη (denaturation)	95°C	30 δευτερόλεπτα	Επανάληψη για 35 κύκλους
Υβριδισμός εκκινητών (annealing)	50°C	45 δευτερόλεπτα	
Επιμήκυνση (extention)	72°C	45 δευτερόλεπτα	
Τελική επιμήκυνση (final etention)	72°C	5 λεπτά	
Διατήρηση (hold)	4°C	∞	

Πίνακας 3.6 Συνθήκες PCR

Καθώς και με τις ακόλουθες συνθήκες που φαίνονται στον πίνακα 3.7

Στάδια	°C	Χρόνος	Κύκλοι
Αρχική αποδιάταξη (initial denaturation)	95°C	2 λεπτά	
Αποδιάταξη (denaturation)	95°C	30 δευτερόλεπτα	Επανάληψη για 35 κύκλους
Υβριδισμός εκκινητών (annealing)	53°C	45 δευτερόλεπτα	
Επιμήκυνση (extention)	72°C	45 δευτερόλεπτα	
Τελική επιμήκυνση (final etention)	72°C	5 λεπτά	
Διατήρηση (hold)	4°C	∞	

Πίνακας 3.7 Συνθήκες PCR

3.10.6 Ηλεκτροφόρηση του ενισχυμένου γονιδιώματος

Η μέθοδος της ηλεκτροφόρησης ακολουθεί της μεθόδου της PCR, για την επιβεβαίωση ύπαρξης genomic DNA και τον πρόχειρο υπολογισμό του μεγέθους του απομονωμένου γονιδιώματος. Παρασκευάζεται γέλη περιεκτικότητας 2 % αγαρόζη στα πηγαδάκια της οποίας φορτώνεται το DNA, με 10% loading die, και ηλεκτροφορούμε στα 90V για περίπου 20-30 λεπτά.

ΑΠΟΤΕΛΕΣΜΑΤΑ

4. ΑΠΟΤΕΛΕΣΜΑΤΑ

Παρακάτω παραθέτονται τα αποτελέσματα αποικισμού του ψυχανθούς *Lotus japonicus* από τον ενδοφυτικό μύκητα *Fusarium solani* στέλεχος του Fsk καθώς και η επίδραση στην ανάπτυξη του φυτού. Επίσης, παραθέτονται στοιχεία και για το ανθοφόρο φυτό *Arabidopsis thaliana*.

Η μέθοδος απολύμανσης των σπόρων, ο εμβολιασμός από τον ενδοφυτικό μύκητα *Fusarium solani* στέλεχος του Fsk, η εξαγωγή DNA, η ενίσχυση του γονιδιώματος καθώς και η ηλεκτροφόρηση αυτού αναφέρονται στο κεφάλαιο 3(υλικά και μέθοδοι).

4.1 Απομόνωση ενδοφυτικού μύκητα Fsk



Εικόνα 4.1 *Fusarium solani* σε ρίζα του *L. japonicus*

Μετά την εκρρίζωση των φυτών και την τοποθέτηση των ριζών του *Lotus japonicus* σε τριβλύα Petri με θρεπτικό διάλυμα για μύκητες (PDA), βάλαμε τα τριβλύα στο θάλαμο επώασης στους 25⁰C. Ο ενδοφυτικός μύκητας Fsk βγήκε από την ρίζα του φυτού μετά από 15 ημέρες, ενώ από την ρίζα του ανθοφόρου *A. thaliana*, μετά από 5 ημέρες.

4.2 Ανάλυση νουκλεοτιδικής αλληλουχίας ITS-5.8S rDNA γονιδίου

Μετά την απομόνωση DNA του μύκητα Fsk από τις ρίζες του *L. japonicus* που αναφέρεται στο κεφάλαιο 3(υλικά και μέθοδοι) τάλθηκε σε αναλυτικό εργαστήριο, όπου και πραγματοποιήθηκε ανάγνωση της νουκλεοτιδικής του ακολουθίας (sequencing). Κατόπιν η ανάλυση του γονιδίου πραγματοποιήθηκε μέσω της βάσης δεδομένων NCBI (National Centre for Biotechnology Information). Συγκεκριμένα χρησιμοποιήθηκε το διαδικτυακό πρόγραμμα BLAST (Basic Local Alignment Search Tool). Παρακάτω παραθέτονται τα αποτελέσματα που πιθανόν να πρόκειται για τον ίδιο μύκητα.

Sample Code	Description
Fsk	Fusarium solani isolate FsolaniKSA13-01 internal transcribed spacer 1, partial sequence
Fsk	Fusarium solani isolate KS-14 18S ribosomal RNA gene, partial sequence
Fsk	Fusarium solani isolate FJAT-9241 18S ribosomal RNA gene, partial sequence

Πίνακας 4.1 Παρουσίαση αποτελεσμάτων φυλογενετικής ταυτοποίησης του μύκητα Fsk

4.3 Ανάπτυξη *Arabidopsis thaliana* παρουσία & μη Fsk

Με την υλοποίηση της διαδικασίας που αναφέρεται στο κεφάλαιο 3(υλικά και μέθοδοι), παρατηρήθηκε, ότι στα τριβλύα που είχαμε τοποθετήσει τον ενδοφυτικό μύκητα Fsk, δεν προσβλήθηκαν τα φυτά. Επίσης, δεν επισημάνθηκε καμία διαφορά στα φυτά με τον Fsk, σε σύγκριση με τα controls.

Τα φυτά *Arabidopsis thaliana* που δεν προσβλήθηκαν από τον ενδοφυτικό μύκητα *Fusarium solani* στέλεχος του Fsk, παρουσιάζονται στις παρακάτω φωτογραφίες σε τριβλύα με θρεπτικό διάλυμα Ms/2.



Εικόνα 4.2 *A. thaliana* σε τριβλύο παρουσία Fsk με επιμόλυνση



Εικόνα 4.3 *A. thaliana* σε τριβλύο παρουσία Fsk με επιμόλυνση



Εικόνα 4.3 *A. thaliana* σε τριβλύο παρουσία Fsk με επιμόλυνση



Εικόνα 4.4 *A. thaliana* σε τριβλύο παρουσία Fsk

4.4 Ανάπτυξη φυτών παρουσία & μη Fsk σε γλάστρα

Αφού ολοκληρώθηκε η διαδικασία της φύτευσης, όπου αναφέρεται αναλυτικά στο κεφάλαιο 3(υλικά και μέθοδοι), τα φυτά παρακολουθούνταν καθημερινώς, για την ολοκλήρωση του πειράματος. Μετά από 15 ημέρες, τραβήχτηκαν οι παρακάτω φωτογραφίες.



Εικόνα 4.5 *L. japonicus* με Fsk



Εικόνα 4.6 *L. japonicus* χωρίς Fsk



Εικόνα 4.7 *A. thaliana* με Fsk



Εικόνα 4.8 *A. thaliana* χωρίς Fsk

Τα φυτά παρέμειναν στις γλάστρες, ποτίζοντας τα με Hoagland (πίνακας 3.1) και επιβλέποντας τα μέχρι να αναπτυχθούν αρκετά. Παρατηρώντας τα καθημερινά, διαπιστώθηκε ότι τα φυτά που είχαν εμβολιαστεί με τον ενδοφυτικό μύκητα *Fusarium solani* στέλεχος του Fsk ήταν πιο “ζωντανά” καθώς ενισχύθηκε η παραγωγή χλωροφύλλης σε σύγκριση με αυτά που δεν είχαν εμβολιαστεί. Μετά από 23 ημέρες πήραμε τις ακόλουθες φωτογραφίες.



Εικόνα 4.9 *L. japonicus* με Fsk



Εικόνα 4.10 *L. japonicus* χωρίς Fsk

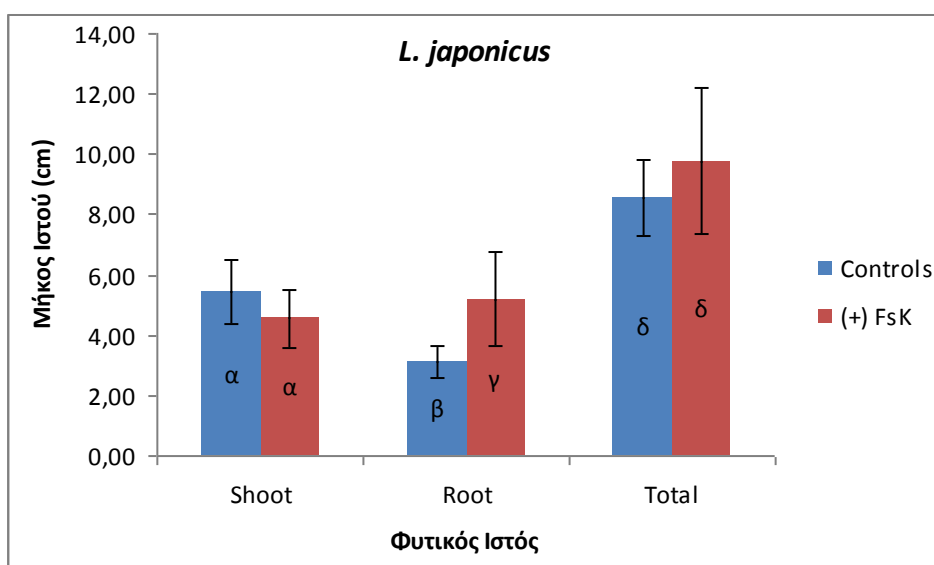


Εικόνα 4.11 *A. thaliana* με Fsk

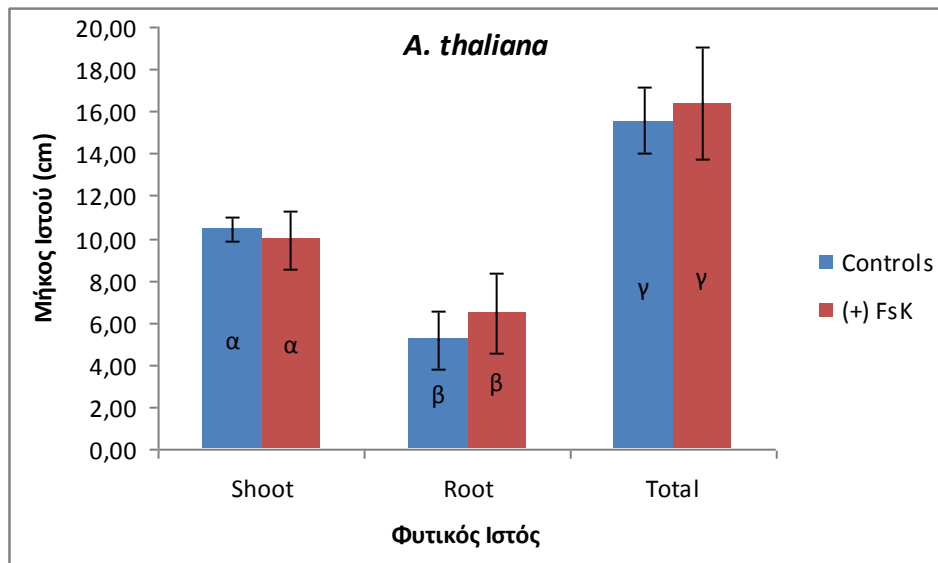


Εικόνα 4.12 *A. thaliana* χωρίς Fsk

Στη συνέχεια, αφού ξεριζώσαμε τα φυτά, *Lotus japonicus* και *Arabidopsis thaliana*, μετρήσαμε το μήκος του υπέργειου και υπόγειου τμήματος των φυτών παρουσία και απουσία (controls) του Fsk. Οι φωτογραφίες, στο παράρτημα Α', μας δείχνουν το μήκος ολόκληρου του φυτού. Από τα αποτελέσματα, παρουσιάστηκε στατιστικώς σημαντική διαφορά (Student's *t*-test) μεταξύ εμβολιασμένων φυτών και controls μόνο στο μήκος της ρίζας των φυτών *L. japonicus*. Συγκεκριμένα τα εμβολιασμένα φυτά εμφάνισαν αύξηση στο μήκος της ρίζας σε ποσοστό 68,28% σε σχέση με τα controls. Στους παρακάτω πίνακες παρουσιάζονται αναλυτικά οι μετρήσεις.



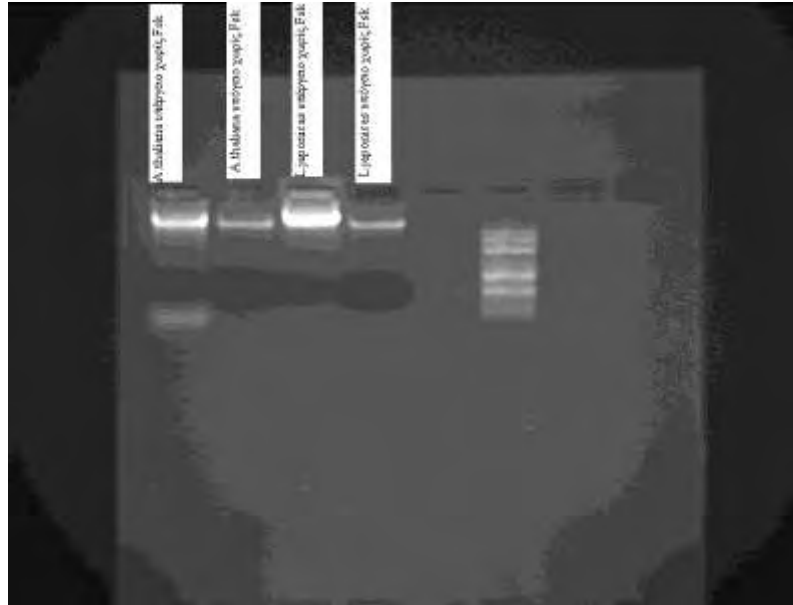
Διάγραμμα 4.1 Μέσες τιμές μήκους ιστών (cm) φυτών *L. japonicus*, 25 ημέρες μετά τον εμβολιασμό. Στατιστικώς σημαντική διαφορά (Student's *t*-test) μεταξύ των εμβολιασμένων φυτών και των controls παρουσιάστηκε μόνο στο μήκος της ρίζας.



Διάγραμμα 4.2 Μέσες τιμές μήκους ιστών (cm) φυτών *A. thaliana*, 25 ημέρες μετά τον εμβολιασμό. Δεν παρουσιάστηκε στατιστικώς σημαντική διαφορά (Student's *t*-test) μεταξύ των εμβολιασμένων φυτών και των controls.

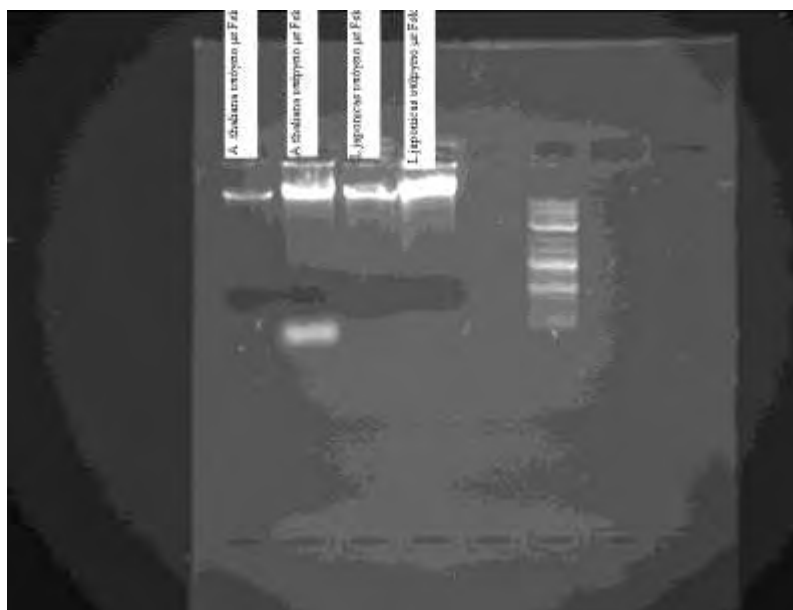
4.4.1 Απομόνωση γενωμικού υλικού

Από το υπέργειο και υπόγειο τμήμα του κάθε φυτού έγινε απομόνωση γενωμικού υλικού με τη μέθοδο της CTAB που αναφέρεται στο προηγούμενο κεφάλαιο (υλικά και μέθοδοι). Οι εικόνες που πήραμε μετά τη μέθοδο του genomic DNA από το πήκτωμα αγαρόζης περιεκτικότητας 2% είναι οι ακόλουθες, με τελικό όγκο στο DNA 26μl όπου τρέξαμε 2μl



Εικόνα 4.13 Εικόνα του genomic DNA *A. thaliana* και *L. japonicus* υπέργειου/υπόγειου τμήματος χωρίς Fsk

Τελικό όγκο στο DNA είχαμε 26μl, τρέξαμε 3μl.



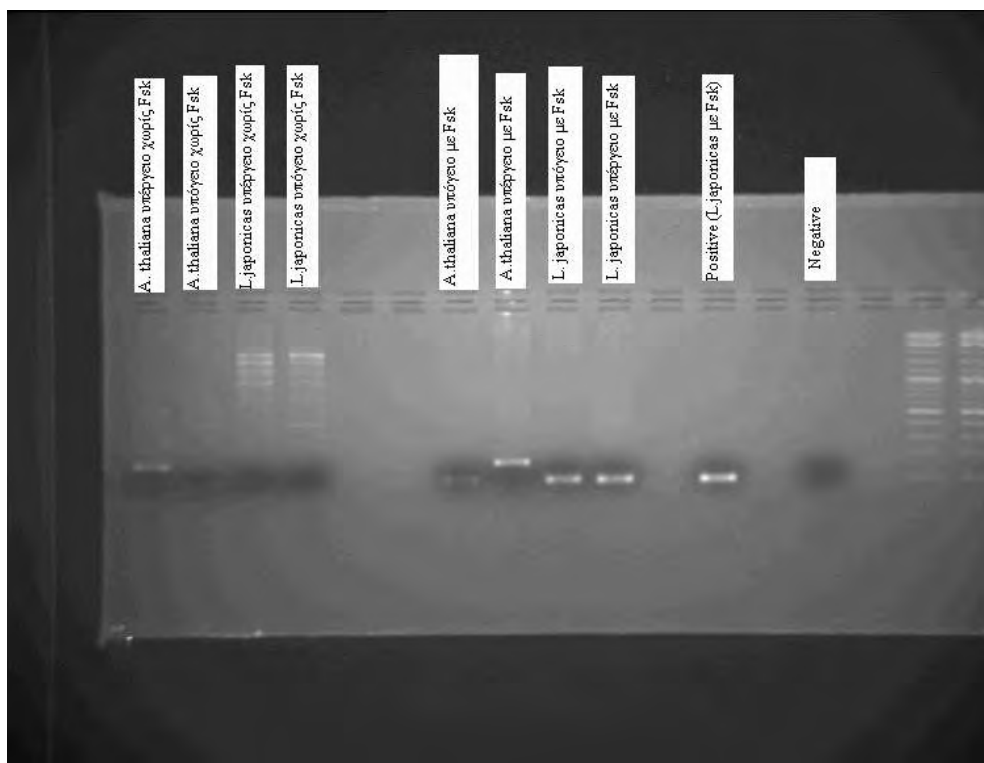
Εικόνα 4.14 Εικόνα του genomic DNA *A. thaliana* και *L. japonicus* υπέργειου/υπόγειου τμήματος με Fsk

4.4.2 Απομόνωση του γονιδιώματος με την PCR

Παρακάτω παρουσιάζονται τα αποτελέσματα της ενίσχυση του γονιδιώματος με τη μέθοδο της PCR, όπου παρατίθενται όπως αναφέρονται και στο κεφάλαιο 3(υλικά και μέθοδοι).

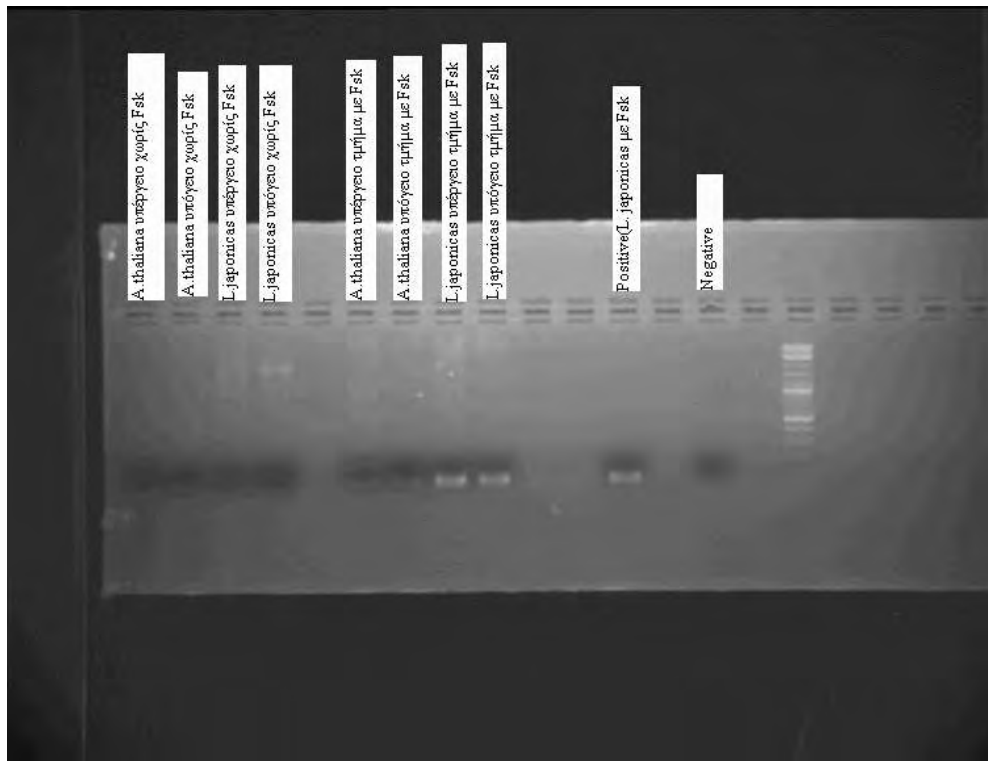
Έγινε απομόνωση DNA, με τη μέθοδο CTAB όπου απομονώθηκε το DNA του Fsk του υπέργειου και υπόγειου τμήματος του *A. thaliana* και *L. Japonicus*. Μετά το στάδιο απομόνωσης του DNA, του έκαστου δείγματος, αποφασίσαμε να κάνουμε αραιώση 10^{-1} του DNA λόγω της μεγάλης ποσότητάς του. Σε κάθε δείγμα προσθέσαμε την ίδια ποσότητα από το DNA. Πέραν του αρνητικού δείγματος χρησιμοποιήθηκε και ένα θετικό(*L. japonicus* με Fsk). Επίσης, χρησιμοποιήθηκαν εναλλακτικές οδοί ενίσχυσης του γονιδιώματος αλλάζοντας τις συνθήκες λειτουργίας του κυκλοποιητή.

Χρησιμοποιώντας το ζεύγος των εκκινητών FFsITS1-RFsITS1 και τις συνθήκες που αναφέρονται στο κεφάλαιο 3(υλικά και μέθοδοι), πήραμε την παρακάτω εικόνα, μετά την ηλεκτροφόρηση των δειγμάτων. Το πήκτωμα αγαρόζης έχει περιεκτικότητα 2% και ηλεκτροφορήσαμε για 30 λεπτά στα 90V. Τελικό όγκο στη PCR είχαμε 20μl και τρέξαμε 22μl.



Εικόνα 4.15 Εικόνα του απομονωμένου DNA, του κάθε δείγματος, μετά τη μέθοδο ενίσχυσης του γονιδιώματος της PCR. Επίσης υπάρχει πέραν του negative δείγματος και positive

Από την παραπάνω εικόνα γίνεται εμφανές η ζώνη των 100bp. Για αντικειμενικότερα αποτελέσματα έγινε ακόμη μία επανάληψη της προηγούμενης εφαρμογής. Οι συνθήκες λειτουργίας του κυκλοποιητή αναφέρονται στο προηγούμενο κεφάλαιο 3(υλικά και μέθοδοι), και οι συνθήκες ηλεκτροφόρησης είναι ίδιες με της προηγούμενης. Η εικόνα παρακάτω δίνει τα αποτελέσματα.



Εικόνα 4.16 Εικόνα του απομονωμένου DNA, του κάθε δείγματος, μετά τη μέθοδο ενίσχυσης του γονιδιώματος της PCR. Επίσης υπάρχει πέραν του negative δείγματος και positive

ΣΥΖΗΤΗΣΗ

- 51 -

5. ΣΥΖΗΤΗΣΗ

Στην παρούσα εργασία μελετήθηκε ο αποικισμός του ψυχανθές *Lotus japonicus* (και *Arabidopsis thaliana*) από τον ενδοφυτικό μύκητα *Fusarium solani* στέλεχος Fsk.

Το στέλεχος Fsk του *Fusarium solani* είναι ένας μη παθογόνος νηματοειδής μύκητας που εντοπίζεται στο έδαφος και έχει την ικανότητα αλληλεπίδρασης με φυτικούς οργανισμούς. Το συγκεκριμένο στέλεχος εμφανίζει την ικανότητα να επιφέρει στα φυτά ενεργοποίηση των μηχανισμών άμυνας έναντι του φυτοπαθογόνου μύκητα του φυλλώματος *Septoria lycopersici*. Ο μύκητας προστατεύει επίσης τοπικά το φυτό έναντι της προσβολής από το ριζομύκητα σήψης *Fusarium oxysporum radicle-lycopersici* (FORL). (Kavroulakis *et al.*, 2007).

Ο μύκητας Fsk είναι ικανός να διεισδύσει στις ρίζες του φυτού και να αναπτύσσεται στο φλοιό της ρίζας 15 μέρες μετά τον εμβολιασμό του όπως και να εισχωρεί στους ηθμαγγειώδεις σωλήνες διαβιώντας ως ενδόφυτο. Η ικανότητα αποικίσεως των ηθμαγγειωδών σωληνών ωστόσο, είναι κάτι που χαρακτηρίζει τους μύκητες που αποτελούν παθογόνα των ριζών και για το λόγο αυτό, η δυνατότητα ενός ωφέλιμου στελέχους να αναπτύσσεται άφθονα και χωρίς να προκαλεί συμπτώματα στο φυτό δηλώνει μια ασυνήθιστη αλληλεπίδραση μικροβίου και φυτού.

Πολλοί μύκητες ασκούν την ανταγωνιστική τους δράση μέσω της ενεργοποίησης λανθανόντων μηχανισμών άμυνας, όπου η προστασία του φυτού εκδηλώνεται σε σημεία πέραν της θέσης που εντοπίζεται ο προστατευτικός μύκητας. Βέβαια καθίσταται δύσκολο να εξετάσουμε την ισχύ αυτής της θεωρίας στην περίπτωση που αμφότεροι μύκητες, διαβιούν στο φυτικό ριζικό σύστημα, λόγω των άμεσων επιδράσεων που ασκεί ο ανταγωνιστικός μύκητας στο παθογόνο. Δηλαδή, ο προστατευτικός μύκητας Fsk μπορεί να αποτελεί ένα στέλεχος το οποίο καταπολεμά το παθογόνο μέσω του ανταγωνισμού για τις διαθέσιμες θέσεις αποικισμού του ριζικού συστήματος, όμως δεν μπορούμε να αποκλείσουμε την πιθανότητα να εμπλέκονται διαφορετικοί μηχανισμοί προστασίας του Fsk όπως το να επιδρά ο ανταγωνιστικός μύκητας στη βλάστηση των σπόρων του παθογόνου μέσω της σύνθεσης μυκητοκτόνων ενώσεων.

Αναλυτικά, διαπιστώθηκε ότι το μη παθογόνο στέλεχος Fsk αναπτύσσεται ενδοφυτικά στο ψυχανθές *Lotus japonicus* (και στο *Arabidopsis thaliana*), όπως και στην τομάτα μετά από εμβολιασμό. Αποδεικνύοντας, ότι αναπτύσσεται και στο ριζικό σύστημα και στο υπέργειο τμήμα του φυτού *Lotus japonicus*, ενώ στην τομάτα έχει αναφερθεί ότι έχει την ικανότητα να αποικίζει μόνο το ριζικό σύστημα και να παρέχει προστασία ενάντια του

παθογόνου μύκητα *Fusarium oxysporum* f.sp. *radicis lycopersici*. (Kavroulakis *et al.*, 2007). Δηλαδή, έχει την ικανότητα άσκησης προστατευτικής δράσης ακόμα και σε αναλογία 1/1000 σε σχέση με τους παθογόνους οργανισμούς. Αυτή η δραστηριότητα οφείλεται σε κάποιο βαθμό σε εξωκυτταρικές ενώσεις που παράγει ο μύκητας και εμποδίζουν την αύξηση των παθογόνων. Για να καταφέρει να επιβιώσει εντός του φυτού, ο μύκητας πρέπει να μπορεί να ανταπεξέλθει στα αμυντικά συστήματα του.

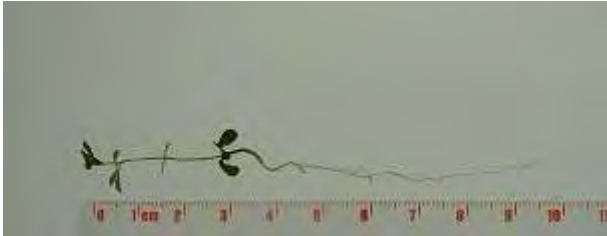
Λαμβάνοντας υπόψη, τα αποτελέσματα παρατηρήθηκε ότι δεν υπήρξε καμία απώλεια στον αποικισμό των φυτών που είχαν εμβολιαστεί με τον Fsk, όπως συμβαίνει και στην τομάτα όπου ο μύκητας μπορεί να επιδείξει την ανταγωνιστική του ιδιότητα ενάντια στο εδαφικό παθογόνο FORL με τη διαμεσολάβηση του αιθυλενίου δημιουργώντας έτσι μια πιο πολύπλοκη σχέση αλληλεπιδράσεων που καθορίζουν και την επιτυχία του Fsk ως φυτοπροστατευτικό μύκητα στις ρίζες της τομάτας. (Kavroulakis *et al.*, 2007)

Το γεγονός ότι ο εμβολισμός με τον Fsk μάλλον προκαλεί προαγωγή της αύξησης του φυτού όπως και στην τομάτα, αποτελεί πλεονέκτημα για πιθανή εμπορική χρήση του μύκητα αυτού. Η παρουσία άλλων, ωφέλιμων μυκήτων μπορεί επίσης να επηρεάσει τη διαδικασία μόλυνσης, εμποδίζοντας τους παθογόνους μύκητες. Αυτό μπορεί να γίνει μέσω της παραγωγής προϊόντων που είναι τοξικά για τα παθογόνα στελέχη, την αδρανοποίηση τοξινών, τον ανταγωνισμό για θρεπτικά στοιχεία, καθώς και την ενεργοποίηση της άμυνας του φυτού. Η επαλήθευση των ισχυρισμών αυτών και η περαιτέρω αποσαφήνιση των μηχανισμών που θεμελιώνουν την αλληλεπίδραση μεταξύ του φυτού και του ωφέλιμου μύκητα χρήζει περαιτέρω διερεύνησης.

Εν κατακλείδι, από τα αποτελέσματα διαπιστώθηκε ότι ο ενδοφυτικός μύκητας Fsk έχει ένα μεγάλο εύρος ξενιστών που εκτείνεται σε τουλάχιστον τρεις διαφορετικές οικογένειες φυτών Brassicaceae, Leguminosae πέραν των Solanaceae και προφανώς αυτό αυξάνει την πιθανότητα εφαρμογής και χρήσης του ως εναλλακτικό μέσο βελτίωσης της παραγωγής των φυτών. Επιπλέον, μπορεί να μελετηθεί σε σύγκριση με άλλους ενδοφυτικούς ωφέλιμους μύκητες όπως είναι οι μυκόρριζες, χρησιμοποιώντας τα διαθέσιμα μεταλλάγματα φυτών για αυτό το σκοπό στο μοντέλο-φυτό *Lotus japonicus*.

ΠΑΡΑΡΤΗΜΑ Α΄

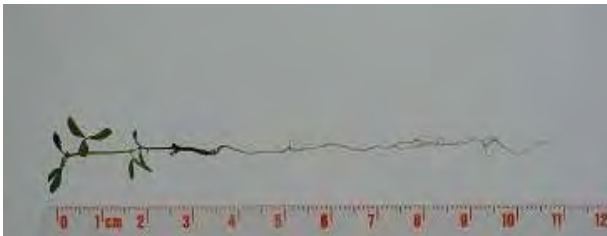
Φωτογραφικό υλικό με το μήκος ολόκληρου του φυτού *L. japonicus* που έχει εμβολιαστεί με τον ενδοφυτικό μύκητα *Fusarium solani* στέλεχος του Fsk.



Εικόνα 1 Μήκος υπέργειου & υπόγειου τμήματος του *L. japonicus* με Fsk



Εικόνα 2 Μήκος υπέργειου & υπόγειου τμήματος του *L. japonicus* με Fsk



Εικόνα 3 Μήκος υπέργειου & υπόγειου τμήματος του *L. japonicus* με Fsk



Εικόνα 4 Μήκος υπέργειου & υπόγειου τμήματος του *L. japonicus* με Fsk



Εικόνα 5 Μήκος υπέργειου & υπόγειου τμήματος του *L. japonicus* με Fsk



Εικόνα 6 Μήκος υπέργειου & υπόγειου τμήματος του *L. japonicus* με Fsk



Εικόνα 7 Μήκος υπέργειου & υπόγειου τμήματος του *L. japonicus* με Fsk



Εικόνα 8 Μήκος υπέργειου & υπόγειου τμήματος του *L. japonicus* με Fsk

Φωτογραφικό υλικό με το μήκος ολόκληρου του φυτού *A. thaliana* που έχει εμβολιαστεί με τον ενδοφυτικό μύκητα *Fusarium solani* στέλεχος του Fsk.



Εικόνα 9 Μήκος υπέργειου & υπόγειου τμήματος του *A. thaliana* με Fsk



Εικόνα 10 Μήκος υπέργειου & υπόγειου τμήματος του *A. thaliana* με Fsk



Εικόνα 11 Μήκος υπέργειου & υπόγειου τμήματος του *A. thaliana* με Fsk



Εικόνα 12 Μήκος υπέργειου & υπόγειου τμήματος του *A. thaliana* με Fsk



Εικόνα 13 Μήκος υπέργειου & υπόγειου τμήματος του *A. thaliana* με Fsk



Εικόνα 14 Μήκος υπέργειου & υπόγειου τμήματος του *A. thaliana* με Fsk



Εικόνα 15 Μήκος υπέργειου & υπόγειου τμήματος του *A. thaliana* με Fsk

Φωτογραφικό υλικό με το μήκος ολόκληρου του φυτού *L. Japonicus* χωρίς τον ενδοφυτικό μύκητα Fsk.



Εικόνα 16 Μήκος υπέργειου & υπόγειου τμήματος του *L. japonicus* χωρίς Fsk



Εικόνα 17 Μήκος υπέργειου & υπόγειου τμήματος του *L. japonicus* χωρίς Fsk



Εικόνα 18 Μήκος υπέργειου & υπόγειου τμήματος του *L. japonicus* χωρίς Fsk



Εικόνα 19 Μήκος υπέργειου & υπόγειου τμήματος του *L. japonicus* χωρίς Fsk



Εικόνα 20 Μήκος υπέργειου & υπόγειου τμήματος του *L. japonicus* χωρίς Fsk



Εικόνα 21 Μήκος υπέργειου & υπόγειου τμήματος του *L. japonicus* χωρίς Fsk



Εικόνα 22 Μήκος υπέργειου & υπόγειου τμήματος του *L. japonicus* χωρίς Fsk

Φωτογραφικό υλικό με το μήκος ολόκληρου του φυτού *A. thaliana* χωρίς τον ενδοφυτικό μύκητα Fsk.



Εικόνα 23 Μήκος υπέργειου & υπόγειου τμήματος του *A. thaliana* χωρίς Fsk



Εικόνα 24 Μήκος υπέργειου & υπόγειου τμήματος του *A. thaliana* χωρίς Fsk



Εικόνα 25 Μήκος υπέργειου & υπόγειου τμήματος του *A. thaliana* χωρίς Fsk



Εικόνα 26 Μήκος υπέργειου & υπόγειου τμήματος του *A. thaliana* χωρίς Fsk



Εικόνα 27 Μήκος υπέργειου & υπόγειου τμήματος του *A. thaliana* χωρίς Fsk



Εικόνα 28 Μήκος υπέργειου & υπόγειου τμήματος του *A. thaliana* χωρίς Fsk



Εικόνα 29 Μήκος υπέργειου & υπόγειου τμήματος του *A. thaliana* χωρίς Fsk

BIBΛΙΟΓΡΑΦΙΑ

- Ainsworth, C., Sparrow, K., Sussman (EDS).** The Fungi, an advanced treatise. Academic Press, New York, 1973
- Aoki, T., O'Donnell, K., Homma, Y., Lattanzi, AR.** Sudden-death syndrome of soybean is caused by two morphologically and phylogenetically distinct species within the *Fusarium solani* species complex— *F. virguliforme* in North America and *F. tucumaniae* in South America. *Mycologia.*, Jul-Aug 2003; 95 (4) : 660–684
- Barea, JM., Pozo, Mj., Azcon, R., Azcon-Aguilar, C.** Microbial co-operation in the rhizosphere. *J Exp Bot.* 2005, 56 : 1761-78
- Bennet, R.N. Wall sgrove, R.M.** Tansley review No.72 Secondary metabolites in plant defense mechanisms. *New Phytol.* 1994, 127 : 617-633
- Benson, D. R., Clawson, M.L.** Evolution of the actinorhizal plant nitrogen-fixing symbiosis, p.207-224. In E. Triplett (ed.) Prokariotic nitrogen fixation: a model system for the analysis of a biological process. Horizon Scientific Press, Wymondham, England
- Benson, D. R., Silvester, W. B.** Biology of Frankia strains, actinomycete symbiots of actinorhizal plant. *Microbiol.* 1993, 57 : 293-319
- Boddey, R.M., Dobereiner, J.** Nitrogen fixation associated with grasses and cereals: recent results and perspectives for future research. *Plant Soil.* 1988, 108 : 53-65
- Bothe, H., Yates, M.G., Cannon, F.G.** Physiology biochemistry and genetic dinitrogen fixation. In Encyclopedia of Plant Physiology, New series (A. Lauchi and R.L. Bielecki, eds.) Springer Verlag Berlin and New York. 1983, 15A : 241-285
- Boucher, D.H., James, S., Kesler, K.** The ecology of mutualism. *Annual Review of Ecology and Systematics.* 1982, 13 : 315-347
- Burgeff, H.** Mikrobiologie des Hochmoores. Fischer, Stuttgart, 1961, pp.197
- Dangl, J.L., Jones, J.D.G.** Plant pathogens and integrated defence responses to infection. *Plant Defence.* Nature, 2001, 401 : 826-833
- De-Polli, H., Boyer, C.D., Neyra, C.A.** Nitrogenase activity associated with root and system of field-grown corn (*Zeamays L.*) Plant. *Plant Physiol.* 1982, 70 : 1609-1613
- Chin-A-Woeng, Tfc., Bloemberg, Gv., Lustenberg, Bjj.** Phenazines and their role in biocontrol by pseudomonas bacteria. *New Phytologist.* 2003, 157 : 503-523

- Cho, J. H., Rupe, J. C., Cummings, M. S., and Gbur, E. E.**, Isolation and identification of *Fusarium solani* f. sp. *glycines* from soil on modified Nash and Snyder's medium. *Plant Dis.*, Jr. 2001; 85 : 256-260
- Griffin, H. D.** Fungal Physiology. New York, Wiley-Liss, Inc. 1994
- De Boer, M., Bom, P., Kindt, F., Keurentjer, Jb., Van Look, Lc., Bakker, PAHM.** Control Fusarium with of radish by combining *Pseudomonadas putida* strains that have different disease-suppressive methanisms. *Phytopathology*, 2003, 93 : 626-32
- Ikeda, S., Ytow, N., Ezura, H., Minamisawa, K., Fujimura, T.** Soil microbial community analysis if the environmental risk assessment of transgenic rplants. *Plant Biotechnology* 2006, 23 : 137-151
- Karvoulakis, N. Ntougias, S. Zervakis, Gl. Ehaliotis, C. Haralampidis, K. Papadopoulou, K.** 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*. 2007, 58(14):3853-3864.
- Kombrink, Schmelzer.** Agrios 1997. 2001
- Levin, D.A.** The role of trichomes in plant defence. *Quart. Rev. Biol.* 1973, 48 (1) : 3-15
- Lugtenbergs, B., Kamilona, F.** Plant-growth-promoting rzh bacteria. *Annu Rev Microbiol*, 2009, 63 : 541-56
- Mauricio, R., Rausher, M.D.** Experimental manipulation of putative selective agents provides evidence for the role of natural enemies in the evolution of plant defence. *Evolution*, 1997, 51 (5) : 1435-1444
- Mehdy, M.C.** Active oxygen species in plant defence against pathogens. *Plant Physiol.* 1994, 105 : 467-472
- Moore, D.** Fungal morphogenesis. Cambridge, Cambridge University Press, 1998
- Moulin, L. Munive, A., Dreyfus, B., Boivin Masson.** Nodulation of legumes by members of the beta-subclass of Proteobacteria. *Nature*. 2001, 411 : 948-950
- Naik, Pr., Raman, G., Narayanan, Kb., Sakthivel, N.** Assessment of genetic and functional diversity of phosphate solubilizing fluorescent pseudomonads isolated from rhizospheric soil. *BMC Microbiol*, 2008, 8 : 230-44
- Olivain, C., Alabouvette, C.** Process of tomato root colonization by a pathogenic strain of *Fusarium oxysporum* f. sp. *Lycopersici* in comparison with a non-pathogenic strain. 1998
- Persello-Cartieaux, F., Nussaume, L., Robaglia, C.** Tales from the underground: Molecular plant-rhizobacteria interactions. *Plant, Cell and Environment*, 2003, 26 : 189-199

- Pieric, R., Tholen, D., Poorter, H., Visser, E.J.W., Voesebec, L.A.J.** The janus factor of ethylene: Growth inhibition and stimulation. *Trends Plant Sci.* 2006, 11 : 176-183
- Snyder, W.C., Hansen H.N.** The species concept in *Fusarium*. *American Journal of Botany*, 1940, 27 : 64-67
- Snyder, W.C., Hansen H.N.** The species concept in *Fusarium* of reference to section *Mortiella*. *American Journal of Botany*, 1941, 28 : 738-742
- Snyder, W.C., Hansen H.N.** Variation and speciation in the genus *Fusarium*. *Annals of the New York Academy of Sciences*, 1954, 60 : 16-23
- Sy, A.E., Giraud, P., Jourand, N., Garcia, A., Willems, P. de Lajudie, Y., Prin, M., Neyra, M., Gillis, C. Boivin-Masson, Dreyfus, B.** Methylophilic Methylobacterium bacteria nodulate and fix nitrogen in symbiosis with legumes. *J. Bacteriol.* 2001, 183 : 214-220
- Taiz Lincoln, Eduardo Zeiger.** *Plant Physiology*. 2002
- Talley, S.M. , Coley, P.D., Kursar, T.A.** Antifungal leaf-surface metabolites correlate with fungal abundance in sagebrush population. *J. Chem. Ecol.* 2002, 28 (11) : 2141-2168
- van De Berg, C., Willemsen, V., Hage, W., Weisbeek, P. Scheres, B.** Cell fate in the Arabidopsis root meristem determined by directional signaling. *Nature*. 1995, 378 : 62-65
- Vincent, W. Cochrane and Jean Conn Cochrane.** Chlamydospore induction in pure culture in *Fusarium solani*. *Mycologia.*, 1971; 63 (3) : 462-477
- Widmer, F., Shaffer, B.T., Porteous, L.A., Seidler, R.J.** Analysis of nifH gene pool complexity in soil and litter at a Douglas fir forest site in the Oregon Cascades mountain range. *Appl. Environ Microbiol.* 1999, 65 : 374-380
- Wink, M.** Plant breeding importance of plant secondary metabolites of protection against pathogens and herbivores. *Theor. Appl. Genet.* 1988, 75 : 225-233
- Witty, J.F., Keay, P.J., Froggatt, P.J., Dart, P.J.** Algal nitrogen fixation on temperate arable fields. The Broadbalk experiment. *Plant Soil*, 1979, 52 : 151-164
- Wollenweber, H.W., Reinking, O.A. 1935.** Die Fusarien, ihre Beschreibung, Schadwirkung and Bekämpfung. Verlag Paul Parey, Berlin, Germany. (F, 8, 9, Acuminatum, chlamydosporum, compactum, culmorum, decemcellulare, dimerum, equiseti, lactis, lateritium, longipes, merismodes, nygamai, phylophylum, poae, sambusinum, scirpi, semitectum, sporotrichoides, subglutinans, ubum, venenatum)
- Zaccardelli, M., Vitale, S., Luongo, L., Merighi, M., Corazza, L.** Morphological and Molecular Characterization of *Fusarium solani* Isolates. *Journal of Phytopathology.*, Sept. 2008; 156 (9) : 534-541

Zehr, P. J., Jenkins, B.D., Shart, S.M., Steward, G.F. Nitrogenase gene diversity and microbial community structure: a cross-system comparison. *Environ. Microbiol.* 2003, 5 : 539-554

