



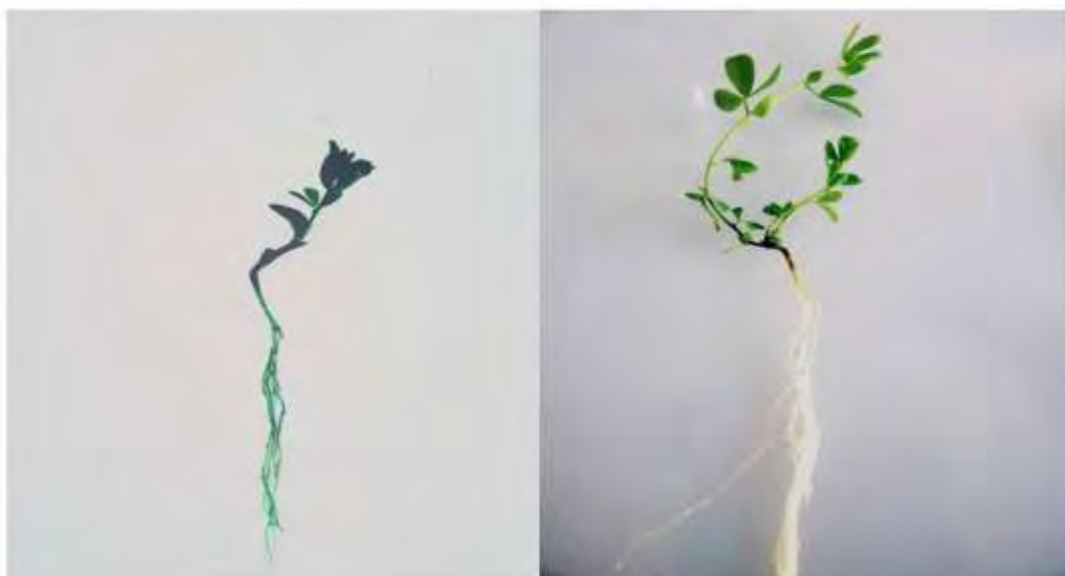
ΠΑΝΕΠΙΣΤΗΜΙΟ ΘΕΣΣΑΛΙΑΣ
Πρόγραμμα Μεταπτυχιακών Σπουδών του
Τμήματος Βιοχημείας και Βιοτεχνολογίας
ΒΙΟΤΕΧΝΟΛΟΓΙΑ – ΠΟΙΟΤΗΤΑ ΔΙΑΤΡΟΦΗΣ
ΚΑΙ ΠΕΡΙΒΑΛΛΟΝΤΟΣ



ΔΙΠΛΩΜΑΤΙΚΗ ΕΡΓΑΣΙΑ

ΕΠΙΔΡΑΣΗ ΕΝΟΣ ΕΝΔΟΦΥΤΙΚΟΥ ΜΥΚΗΤΑ ΣΤΗΝ ΑΝΑΠΤΥΞΗ ΤΟΥ ΨΥΧΑΝΘΟΥΣ *Lotus japonicus* ΥΠΟ ΣΥΝΘΗΚΕΣ ΤΡΟΦΟΠΕΝΙΑΣ ΣΙΔΗΡΟΥ

ΛΕΜΟΝΙΤΣΑΚΗ ΙΩΑΝΝΑ-ΜΑΡΙΑ



ΛΑΡΙΣΑ 2018

ΕΠΙΔΡΑΣΗ ΕΝΟΣ ΕΝΔΟΦΥΤΙΚΟΥ ΜΥΚΗΤΑ ΣΤΗΝ
ΑΝΑΠΤΥΞΗ ΤΟΥ ΨΥΧΑΝΘΟΥΣ *Lotus japonicus* ΥΠΟ
ΣΥΝΘΗΚΕΣ ΤΡΟΦΟΠΕΝΙΑΣ ΣΙΔΗΡΟΥ

THE EFFECT OF AN ENDOPHYTIC FUNGUS ON THE
GROWTH OF *Lotus japonicus* UNDER IRON
DEFICIENCY CONDITIONS

Εγκρίθηκε από τα Μέλη της Τριμελούς Εξεταστικής Επιτροπής:

1. **Παπαδοπούλου Καλλιόπη**, Επιβλέπουσα Αναπληρώτρια Καθηγήτρια Βιοτεχνολογίας Φυτών, στο Τμήμα Βιοχημείας και Βιοτεχνολογίας του Πανεπιστημίου Θεσσαλίας
2. **Λιαδάκη Καλλιόπη**, Επίκουρος Καθηγήτρια Βιοχημικής Φαρμακολογίας, στο Τμήμα Βιοχημείας και Βιοτεχνολογίας του Πανεπιστημίου Θεσσαλίας
3. **Καρπούζας Δημήτριος**, Αναπληρωτής Καθηγητής Περιβαλλοντικής Μικροβιολογίας και Βιοτεχνολογίας, στο Τμήμα Βιοχημείας και Βιοτεχνολογίας του Πανεπιστημίου Θεσσαλίας

ΕΥΧΑΡΙΣΤΙΕΣ

Η παρούσα εργασία αποτελεί διπλωματική εργασία στα πλαίσια του μεταπτυχιακού προγράμματος «**Βιοτεχνολογία - Ποιότητα διατροφής & περιβάλλοντος**» του τμήματος Βιοχημείας και Βιοτεχνολογίας του Πανεπιστημίου Θεσσαλίας.

Πριν την παρουσίαση των αποτελεσμάτων της παρούσας διπλωματικής εργασίας, αισθάνομαι την υποχρέωση να ευχαριστήσω ορισμένους από τους ανθρώπους που γνώρισα, συνεργάστηκα μαζί τους και έπαιξαν πολύ σημαντικό ρόλο στην πραγματοποίηση της.

Πρώτη από όλους θέλω να ευχαριστήσω την επιβλέπουσα καθηγήτρια της διπλωματικής εργασίας, κ. Καλλιόπη Παπαδοπούλου, Επίκουρο Καθηγήτρια του τμήματος Βιοχημείας και Βιοτεχνολογίας για την πολύτιμη καθοδήγηση της, την εμπιστοσύνη και εκτίμηση που μου έδειξε.

Στη συνέχεια θα ήθελα να ευχαριστήσω την υποψήφια διδάκτορα Αβραμίδου Μαριάννα, τον Δρ. Γκαραγκούνη Κωνσταντίνο, τη Δρ. Νταντάμη Έλενα οι οποίοι με τα πλούσια πνευματικά προσόντα και το ήθος τους συνέβαλαν ουσιαστικά στην ολοκλήρωση αυτής της εργασίας. Θα ήθελα να ευχαριστήσω πολύ και όλη την υπόλοιπη ομάδα του εργαστηρίου Βιοτεχνολογίας Φυτών και Περιβάλλοντος για την βοήθεια, την υπομονή και την ανοχή τους σε όλο το διάστημα παραμονής μου στο εργαστήριο.

Τέλος, θέλω να ευχαριστήσω την οικογένεια μου, που με υπομονή και κουράγιο πρόσφεραν την απαραίτητη ηθική συμπαράσταση για την ολοκλήρωση της μεταπτυχιακής μου εργασίας.

Πίνακας περιεχομένων

Abstract	7
Περίληψη.....	9
1.ΕΙΣΑΓΩΓΗ	1
1.1. Στοιχεία Μυκητολογίας.....	1
1.2. Μορφολογία Μυκήτων	2
1.3. Φυσιολογία Μυκήτων	4
1.4. Στοιχεία Οικολογίας Μυκήτων.....	5
1.5. Φυτοπαθογόνοι.....	6
1.6. Μη-Φυτοπαθογόνοι.....	7
1.7. Μηχανισμοί Άμυνας Φυτών.....	8
1.7.1. Επαγώγιμα Αμυντικά Συστήματα.....	9
1.8. Ψυχανθή.....	11
1.8.1. Η Αζωτοδεσμευτική και Συμβιωτική Σχέση	12
1.8.2. Συμβιωτική Σχέση Ριζόβιου Ψυχανθούς.....	14
1.9.Το Φυτό Μοντέλο <i>Lotus japonicus</i>	15
1.9.1.Στάδια Ανάπτυξης	18
1.9.2.Συνθήκες Ανάπτυξης	19
1.9.3.Λύσεις Ανάπτυξης Φυτών	20
1.9.4.Συχνά χρησιμοποιούμενα Διαλείμματα Καλλιέργειας	21
1.10. Σίδηρος	21
1.11.Το Γένος <i>Fusarium</i>	23
1.11.1. <i>Fs-K (fusarium solani strain)</i>	24
1.11.2. Επαγόμενη προστασία μέσω του <i>Fusarium solani (Fs-K)</i>	25
2.ΥΛΙΚΑ& ΜΕΘΟΔΟΙ	27
2.1.Παρασκευή Φυτικών Υποστρωμάτων	27
2.2.Θρεπτικό Διάλυμα για Μύκητες	27
2.3.Θρεπτικό Διάλυμα για Φυτά.....	28
2.4Απολύμανση Σπόρων	28
2.5Μεταφορά Σπόρων <i>Lotus Japonicus</i>	28
2.6.Εμβολιασμός Με Το <i>Fusarium solani</i> Fs-K	29
2.7.Συλλογή Κονιδίων	29
2.7.1.Μέτρηση Κονιδίων	30
2.8.Φύτεμα Και Πότισμα Με Θρεπτικό Διάλυμα.....	31

2.9.Απομόνωση Του Ενδοφυτικού Στελέχους <i>Fs-K</i>	32
2.10.Απομόνωση DNA Με Τη Χρήση Της Μεθόδου CTAB.....	32
2.11. Ποσοτικοποίηση DNA Qubit Working Solution.....	33
2.13. ΚΑΡΑ SYRB FAST qPCR	34
3.ΑΠΟΤΕΛΕΣΜΑΤΑ.....	35
3.1 Ανάπτυξη <i>Lotus japonicus</i>	35
3.2 Έλεγχος Του Αποικισμού Του <i>Fs-K</i> Με Τη Μέθοδο QPCR.....	39
4.ΣΥΖΗΤΗΣΗ	41
5.ΒΙΒΛΙΟΓΡΑΦΙΑ.....	43

Abstract

In this study we analyze the effect of an endophytic fungus in *Lotus japonicus*'s growth under the effect of iron deficiency.

Lotus japonicus belongs to the phylogenetic branch of Hologalegina and is a legume. It has many advantages for this and is used as a plant model for the physiological and genetic study of legumes. Still it is a diploid autogamous species with a good series of seeds. It is a species that can grow under a variety of conditions. *L. japonicus* is a perennial plant, that continues to grow with new branches and flowers after the removal of old branches.

Fusarium solani is a species complex of at least 26 closely related nematode fungi in the *Ascomycota* family of the *Nectriaceae* family and is the nectria of the *Nectria Haematococca*. It has non-pathogenic nematode fungus of the soil and grows in the root bark. It has the ability to interact with plant organisms. It remains in the plant for 15 days after vaccination. It can be isolated from all the underground parts of the plant but not from the overground where it does not grow at all. It has a strong antagonistic action against pathogenic fungi of plants. It has the ability to exert a protective effect even at a rate of 1/1000 compared to pathogenic organisms. Plants vaccinated with the fungus did not develop symptoms of disease.

It has been shown that the fungus *Fusarium solani* (strain *Fs-K*) improves the tolerance of tomato plants in drought. Mechanisms that maintain the effective water absorption of roots and water conduction in the plant are obvious. *Fusarium solani* is able to boost plant biomass growth and induce defensive mechanisms against root system pathogens and tomato plant foliage.

Iron deficiency (Fe) in crops is a global agricultural problem. Plants have developed several strategies to enhance the acquisition of Fe, though upcoming data have shown that inherent plant strategies alone are not sufficient to avoid Fe deficiency in Fe-limited soils. Soil micro-organisms also play a crucial role in the plant. Iron (Fe) is essential for plants because it is involved in the formation of chlorophyll. Therefore its deficiency causes chlorosis of the plant. It is also a component of many enzymes involved in electron transport such as cytochrome. Still, it participates in many biological functions such as breathing and photosynthesis.

The purpose of our study was to investigate the effect of colonization of the fungal strain (*Fs-K*) under iron deficiency conditions. Plants of *Lotus japonicus* were inoculated with the *Fs-K* strain. After the 17 and 31 days of inoculation, root tissue was harvested and total DNA was isolated. Then, the polymerase chain reaction technique amplified the area of total genetic material. The analysis confirmed the growth of the fungus in plants.

The results of this thesis have shown that inoculation of plants with the Fs-K strain induces plant responses in root length when the plants are grown under iron deficiency.

Περίληψη

Στην παρούσα εργασία αναλύουμε την επίδραση ενός ενδοφυτικού μύκητα *Fusarium solani*, στέλεχος *Fs-K*, στην ανάπτυξη του ψυχανθούς *Lotus japonicus* υπό συνθήκες τροφοπενίας σιδήρου.

Το *Lotus japonicus* ανήκει στο φυλογενετικό κλάδο *Hologalegina* και είναι ψυχανθές. Έχει πολλά πλεονεκτήματα γι' αυτό και χρησιμοποιείται ως φυτό μοντέλο για τη φυσιολογική και την γενετική μελέτη των ψυχανθών. Είναι ένα διπλοειδές αυτογαμικό είδος με καλή σειρά σπόρων, που μπορεί να αναπτυχθεί υπό ποικίλες συνθήκες. Το *L. japonicus* είναι ένα πολυετές φυτό, που συνεχίζει να αναπτύσσεται με νέα κλαδιά και άνθη μετά την αφαίρεση των παλαιών κλαδιών.

Το *Fusarium solani* είναι ένα σύμπλεγμα ειδών, τουλάχιστον 26 στενά συγγενών νηματωδών μυκήτων στη κλάση *Ascomycota*, οικογένεια *Nectriaceae* και είναι το αναμόρφω της *Nectria Haematococca*. Είναι μη παθογόνος νηματοειδής μύκητας του εδάφους και αναπτύσσεται στους ιστούς της ρίζας. Έχει την ικανότητα αλληλεπίδρασης με φυτικούς οργανισμούς. Παραμένει στο φυτό ακόμα και 15 ημέρες μετά τον εμβολιασμό. Μπορεί να απομονωθεί από όλα τα υπόγεια μέρη του φυτού αλλά όχι από τα υπέργεια όπου δεν αναπτύσσεται καθόλου. Έχει έντονη ανταγωνιστική δράση κατά παθογόνων μυκήτων των φυτών. Έχει την ικανότητα άσκησης προστατευτικής δράσης ακόμα και σε αναλογία 1/1000 σε σχέση με τους παθογόνους οργανισμούς. Φυτά που εμβολιάστηκαν με το μύκητα δεν ανέπτυξαν συμπτώματα ασθeneίας.

Έχει αποδειχθεί ότι ο ενδοφυτικός μύκητας *Fusarium solani* (στέλεχος *Fs-K*) βελτιώνει την αντοχή των φυτών τομάτας στην ξηρασία. Οι μηχανισμοί που διατηρούν την αποτελεσματική απορρόφηση του νερού από τις ρίζες και την αγωγιμότητα του νερού στο φυτό είναι εμφανείς. Το *Fusarium solani* είναι ικανό να ενισχύσει την αύξηση της βιομάζας των φυτών και να επάγει αμυντικούς μηχανισμούς ενάντια των παθογόνων του ριζικού συστήματος και του φυλλώματος φυτών τομάτας.

Η έλλειψη σιδήρου (Fe) στις καλλιέργειες είναι ένα παγκόσμιο γεωργικό πρόβλημα. Τα φυτά έχουν αναπτύξει διάφορες στρατηγικές για την ενίσχυση της απόκτησης Fe, αλλά αυξανόμενα στοιχεία έχουν δείξει ότι οι εγγενείς φυτικές στρατηγικές μόνο δεν επαρκούν για να αποφευχθεί η έλλειψη Fe σε εδάφη περιορισμένα με Fe. Οι μικροοργανισμοί εδάφους διαδραματίζουν επίσης έναν κρίσιμο ρόλο στο φυτό. Ο σίδηρος είναι απαραίτητος για τα φυτά γιατί συμμετέχει στον σχηματισμό της χλωροφύλλης. Επομένως η έλλειψη του προκαλεί χλώρωση του φυτού. Επίσης είναι συστατικό πολλών ενζύμων που συμμετέχουν στη μεταφορά ηλεκτρονίων όπως τα κυτοχρώματα. Ακόμα, συμμετέχει σε πολλές βιολογικές λειτουργίες όπως η αναπνοή και η φωτοσύνθεση.

Σκοπός της μελέτης μας ήταν να ερευνήσουμε την επίδραση που έχει η αποίκιση της ρίζας από το μυκητιακό στέλεχος (*Fs-K*) υπό συνθήκες

τροφοπενίας σιδήρου. Φυτά του ψυχανθούς *Lotus japonicus* εμβολιάστηκαν με το στέλεχος *Fs-K*. Μετά από το χρονικό διάστημα των 17 και 31 ημερών από τον εμβολιασμό συλλέχθηκε το ριζικό σύστημα και απομονώθηκε ολικό DNA. Η ανάλυση με ποσοτική αλυσιδωτή αντίδραση πολυμεράσης επιβεβαίωσε την ανάπτυξη του μύκητα στα φυτά.

Τα αποτελέσματα της παρούσας διπλωματικής έδειξαν ότι ο εμβολιασμός με το στέλεχος *Fs-K* βοήθησε στην ανάπτυξη του φυτού σε έλλειψη σιδήρου.

1.ΕΙΣΑΓΩΓΗ

1.1. Στοιχεία Μυκητολογίας

Οι μύκητες φυτοπαθογόνοι ή μη είναι γενικώς ετερότροφοι, μικροσκοπικοί μικροοργανισμοί, που δεν διαθέτουν χλωροφύλλη, στερούνται αμύλου αλλά συνθέτουν γλυκογόνο. Δεν περιέχουν πλαστίδια, έχουν όμως χυμοτόπια. Συνήθως σχηματίζουν νηματοειδείς διακλαδιζόμενες υφές, που ονομάζονται μυκήλια, διαθέτουν οργανωμένους πυρήνες(ευκαρυωτικοί) και παράγουν διαφόρων ειδών σπόρια. (Ελευθέριος Κ. Τζάμος ,2007)

Αποτελούν οργανισμούς με μεγάλη ικανότητα προσαρμογής στο περιβάλλον. Έχουν διάφορες λειτουργίες και μηχανισμούς για να εξασφαλίσουν τη διαβίωση τους, συνήθως εις βάρος κάποιου ξενιστή, με σκοπό και την αναπαραγωγή τους. Εκτός από τους παθογόνους και τους σαπροφυτικούς μύκητες, υπάρχουν και πολλοί φυτοπροστατευτικοί μύκητες. Η εύρεση και η σημασία τους για τα φυτά καθυστέρησε να γίνει αντιληπτή κυρίως λόγω της έμφασης που δόθηκε από τους ερευνητές προς τους παθογόνους μύκητες. Τα τελευταία χρόνια όμως, έχει αυξηθεί το ενδιαφέρον για τους φυτοπροστατευτικούς μύκητες, και πλέον το πεδίο της έρευνάς τους είναι πιο ενεργό με πολλές νέες μελέτες (Benhamou N. etal, 2001 , Chandanie W.A etal, 2005).

Σύμφωνα με τη μελέτη του Prescottetal (1999), υπάρχουν περίπου 1,5 εκατομμύρια είδη μυκήτων ενώ έχουν καταγραφεί και μελετηθεί πάνω από 90.000 είδη. Μεγάλη είναι η συμβολή των μυκήτων:

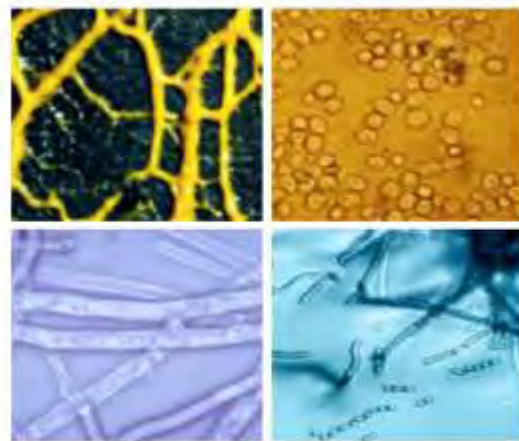
- στην αποικοδόμηση των οργανικών ουσιών και
- στην ανακύκλωση των θρεπτικών στοιχείων στο περιβάλλον.

Οι μύκητες είναι σημαντικοί:

1. Για την ικανότητα τους να παράγουν αντιβιοτικά και άλλες ουσίες χρήσιμες στη βιοχημεία και βιομηχανία τροφίμων, όπως οργανικά οξέα και βιταμίνες.
2. Για την παραγωγή ενζύμων που είναι απαραίτητα για την αποδόμηση της οργανικής ύλης στο φυσικό περιβάλλον.
3. Σε έρευνες αξιολογήσεως για την ανάπτυξη σκευασμάτων βιολογικής καταπολέμησης ασθενειών και εχθρών των καλλιεργούμενων φυτών.
4. Πολλοί εδώδιμοι βασιδιομύκητες καλλιεργούνται για νωπή κατανάλωση. (Ελευθέριος Κ. Τζάμος ,2007)

1.2. Μορφολογία Μυκήτων

Το σώμα των μυκήτων ονομάζεται θαλλός. Αποτελείται από λεπτά νημάτια που λέγονται υφές με ποικίλο πάχος που κυμαίνεται αναλόγως του είδους του μύκητα από 2-10μm. Υπάρχει λειτουργική διαφοροποίηση του θαλλού σε βλαστητικό, όταν γίνεται βλαστητική ανάπτυξη και αναπαραγωγικό, όταν διαφοροποιείται για την παραγωγή καρποφοριών με σπόρια ή μόνο σπορίων. Το σύνολο των υφών ονομάζεται μυκήλιο. (Γραβάνης, 2011)



Εικόνα 1: Το σώμα των μυκήτων

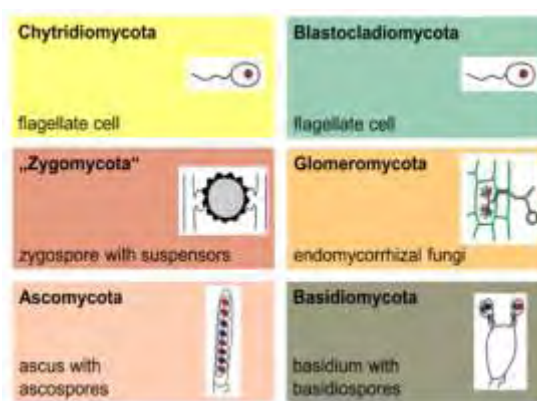
Οι υφές περιβάλλονται από κυτταρικό τοίχωμα που συνίσταται από χιτίνη. Το κυτταρικό τοίχωμα περικλείει το πρωτόπλασμα, το οποίο περιβάλλεται από πρωτοπλασματική μεμβράνη λιποπρωτεϊνικής συστάσεως. Μέσα στη πρωτοπλασματική μάζα υπάρχουν πυρήνες, οι οποίοι περιβάλλονται από διπλή πυρηνική μεμβράνη, που συνδέεται με το ενδοπλασματικό δίκτυο.



Εικόνα 2 : Υφές μυκήτων

Στους περισσότερους μύκητες οι υφές διαχωρίζονται σε κύτταρα με εγκάρσια τοιχώματα, τα οποία ονομάζονται septa. Μέσα σε κάθε κύτταρο υπάρχουν, κανονικά, 1-2 πυρήνες. Τα εγκάρσια τοιχώματα δεν είναι πλήρη, αλλά φέρουν στο κέντρο οπή, μέσω της οποίας επικοινωνούν τα κυτταροπλάσματα διαδοχικών κυτάρων, όπως επίσης μπορεί να μεταναστεύουν πυρήνες από το ένα κύτταρο στο άλλο. Το μυκήλιο, το οποίο συνίσταται από υφές που φέρουν septa, ονομάζεται πολυκύτταρο.

Πολυκύτταρο είναι το μυκήλιο των *Ascomycota*, *Basidiomycota* και *Deuteromycota*. Αντίθετα στους *Zygomycota*, οι υφές δεν φέρουν *septa*, αλλά παραμένουν με τη μορφή ενιαίου κυττάρου, μέσα στον οποίο ευρίσκονται διάσπαρτοι οι πυρήνες. Το μυκήλιο αυτό του οποίου οι υφές δεν έχουν *septa* ονομάζεται κοινοκύτταρο. Αντίστοιχα οι *Chytridiomycota*, δεν δημιουργούν σαφώς ορισμένο μυκήλιο ενώ ο θαλλός τους είναι συνεννοκυτταριακός. Τέλος οι *Glomeromycota* σε αντίθεση με τους υπόλοιπους μύκητες και με σκοπό την αναπαραγωγή τους δημιουργούν ένα καλά ορισμένο εξωτερικό μυκήλιο. (Γραβάνης, 2011)



Εικόνα 3: *Chytridiomycota*, *Blastocladiomycota*, *Zygomycota*, *Glomeromycota*, *Ascomycota*, *Basidiomycota*

Πάνω στο ενδοπλασματικό δίκτυο βρίσκονται προσκολλημένα ριβοσώματα, υπεύθυνα για την σύνθεση πρωτεϊνών. Μέσα στο πρωτόπλασμα υπάρχουν επίσης μιτοχόνδρια διαφόρων σχημάτων αλλά συνήθως επιμήκη, καθώς επίσης σωμάτια Golgi, δικτυοσώματα και χυμοτόπια περιβαλλόμενα από τονοπλάστη. Οι μύκητες στερούνται πλαστών και έτσι δεν σχηματίζουν άμυλο, αλλά αποθησαυρίζουν γλυκογόνο, το οποίο είναι άφθονο σε ηλικιωμένα κύτταρα, σε μυκηλιακές κατασκευές για αποθησαυρισμό θρεπτικών ουσιών και σε σπόρια. (Γραβάνης, 2011)

Το πρωτόπλασμα των μυκήτων έχει γενικώς ίδια κατασκευή με το πρωτόπλασμα άλλων ευκαρυωτικών οργανισμών. Ο πυρήνας περιβάλλεται από πυρηνική μεμβράνη που διαθέτει δυο στρώσεις και χαρακτηριστικούς πόρους. Χαρακτηριστικό γνώρισμα σε σύγκριση με τους άλλους ευκαρυωτικούς οργανισμούς είναι το φαινόμενο της ετεροκαρυώσεως. (Ελευθέριος Κ. Τζάμος, 2007)

Το κυτταρικό τοίχωμα αποτελείται από β-γλυκάνες (σκελετικά υλικά κρυσταλλώδους συστάσεως), χιτίνη (μικροκρυσταλλική μορφή), υδατοδιαλυτούς πολυσακχαρίτες (α-γλυκάνες & γλυκοπρωτεΐνες), λιπίδια μελανίνης, πολυμερή γαλακτοσαμίνης & πολυουρονιδίων. Ασκομύκητες, βασιδιομύκητες, ζυγομύκητες και χρώμιστα.

Οι μύκητες ανέπτυξαν ποικίλα και πολύπλοκα συστήματα αναπαραγωγής και σύζευξης για να μεταβιβάζουν γενετικές πληροφορίες από γενεά σε γενεά (Anderson et al., 1992). Οι μύκητες μπορούν να αναπαράγονται είτε αγενώς είτε εγγενώς.

- Η αγενής αναπαραγωγή γίνεται με διάφορους τρόπους. Με αποκοπή υφών οπότε το αποκομμένο τμήμα μπορεί να οδηγήσει στον σχηματισμό νέου μυκηλίου, με εκβλάστηση και με παραγωγή σπορίων (αυτός είναι ο συνηθέστερος τρόπος αγενούς αναπαραγωγής των

μυκήτων). Ανάλογα με τον τρόπο σχηματισμού τους τα σπόρια διακρίνονται σε αρθροσπόρια, χλαμυδοσπόρια, σποριαγγειοσπόρια, κονιδιοσπόρια και βλαστοσπόρια

- Η εγγενής αναπαραγωγή είναι η συνένωση δυο κυτταρικών πυρήνων αντίθετης σεξουαλικής πολικότητας. Οι πυρήνες αυτοί λέγονται γαμέτες. Ανάλογα με τον τρόπο σχηματισμού τους τα σπόρια διακρίνονται σε ωοσπόρια, ζυγοσπόρια, ασκοσπόρια, βασιδιοσπόρια. (Γραβάνης, 2011)



Εικόνα 4: Αγένης και εγγενής αναπαραγωγή μυκήτων

1.3. Φυσιολογία Μυκήτων

Οι μύκητες είναι ετερότροφοι οργανισμοί που στερούνται χλωροφύλλης. Οπότε για την ανάπτυξη του θαλλού τους και των καρποφοριών τους, την σύνθεση του πρωτοπλάσματος τους απαιτούν πρόσληψη ετοιμών οργανικών ενώσεων. Τις οργανικές ενώσεις τις παίρνουν είτε από ζωντανά κύτταρα ή από νεκρές οργανικές ύλες, γεγονός που οδηγεί τους μύκητες στον παρασιτισμό και σαπροφυτισμό, αντίστοιχα. Οι μύκητες συνίστανται από νερό και ξηρά ουσία. Η ξηρά ουσία αποτελείται από οργανικές ενώσεις και ανόργανες ενώσεις ή τέφρα.



Εικόνα 5: Διάφοροι μύκητες

Η ανάπτυξη των μυκήτων εξασφαλίζεται από την ύπαρξη βιολογικά απαραίτητων χημικών στοιχείων. Βιολογικά απαραίτητα στοιχεία είναι εκείνα που δεν μπορούν να αντικατασταθούν από άλλα. Τα απαραίτητα στοιχεία μπορεί να είναι αναγκαία :

- σε μεγάλες ποσότητες οπότε και ονομάζονται μακροστοιχεία: ο άνθρακας, το άζωτο, το θείο, ο φώσφορος, το μαγνήσιο, το υδρογόνο, το κάλιο, οξυγόνο και ασβέστιο.
- σε μικρές ποσότητες οπότε και ονομάζονται ιχνοστοιχεία :ο σίδηρος, ο ψευδάργυρος, ο χαλκός, το μαγγάνιο, το μόλυβδαίνιο, το γάλλιο, το βανάδιο και το σκάνδιο.

Εκτός από τα χημικά στοιχεία οι μύκητες για την ανάπτυξη τους έχουν ανάγκη ορισμένων ουσιών, που ονομάζονται ουσίες αναπτύξεως ή αυξητικές ουσίες. Απ' αυτές, άλλες είναι βιταμίνες, άλλες συγγενείς με τις βιταμίνες και άλλες αποτελούν ιδιαίτερα συστατικά του πρωτοπλάσματος των μυκήτων. (Γραβάνης,2011)

1.4. Στοιχεία Οικολογίας Μυκήτων

Οι φυτοπαθογόνοι μύκητες διακρίνονται αναλόγως του τρόπου και της θέσεως επιβιώσεως των σε δυο κυρίως μεγάλες κατηγορίες:

- Σε εδαφογενείς μύκητες, που κατά το μεγαλύτερο διάστημα της σαπροφύτικης φάσεως του βιολογικού τους κύκλου
- Σε παθογόνους μύκητες εναέριων οργάνων των φυτών, πολλοί εξ αυτών επιβιώνουν σε φυτικά υπολείμματα ή στο έδαφος. Είναι προφανές ότι μακροχρόνια εδαφική φάση σε πολλούς μύκητες είναι συνάρτηση της ανθεκτικότητας των κατασκευών των. (Ελευθέριος Κ. Τζάμος ,2007)

Οι μύκητες αναπτύσσονται σε οποιοδήποτε κλίμα της γης. Ακραίες θερμοκρασίες δεν αποκλείουν την ανάπτυξη των μυκήτων. Τα πλούσια σε ενέργεια ανθρακούχα παράγωγα που χρειάζονται για την ανάπτυξή τους συνθέτονται από τα πράσινα φυτά. Η ενέργεια που περιέχεται μέσα στα οργανικά αυτά παράγωγα αποδεσμεύεται αργότερα με τη διάσπαση των ουσιών αυτών από ζώα και διάφορους μικροοργανισμούς.

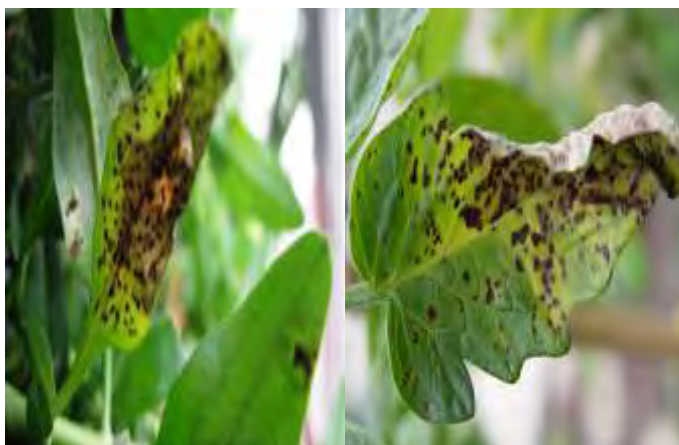
Οι μύκητες συμμετέχουν ενεργητικά στα διάφορα στάδια μεταβολών, κατά την διάρκεια των οποίων και οι υπόλοιπες ουσίες γίνονται προσιτές. Το άζωτο, το θείο, ο φώσφορος, το μαγνήσιο και άλλα μεταλλικά ιόντα μπορούν κατεξοχήν να απορροφηθούν και να χρησιμοποιηθούν στην ανόργανή τους μορφή. Το όξινο pH συμβάλλει στην ευκολότερη ανάπτυξη των μυκήτων σε σχέση με τα βακτήρια, χωρίς αυτό να αποτελεί αναγκαία προϋπόθεση. Ενώ οι μύκητες βρίσκονται σχεδόν παντού, ακόμα και σε μικρά αποθέματα θρεπτικών υλικών, δεν ευδοκίμούν σε υγιείς ιστούς φυτών και ζώων. (Ainsworthand Sussman, 1973)

Οι οικολογικές σχέσεις μεταξύ μυκήτων και άλλων μικροοργανισμών, καθώς και μερικές φορές μεταξύ διαφορετικών μυκήτων μπορεί να γίνονται τόσο στενές ώστε να δημιουργείται νέα μορφολογική και ταξινομική οντότητα (Burgeff, 1961). Ο λειχήνας π.χ. σχηματίζεται από μια άλγη και ένα μύκητα. Η μεταξύ τους ενεργητική συνύπαρξη ονομάζεται συμβίωση.

Ένα από τα βασικότερα χαρακτηριστικά των μυκήτων είναι η ικανότητά τους να ζουν, στενά συνδεδεμένοι, με άλλους οργανισμούς. Αυτό τους το χαρακτηριστικό είναι που ουσιαστικά ορίζει την παρασιτική τους φύση. 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 μια μεγάλη γκάμα ξενιστών-οργανισμών.

1.5. Φυτοπαθογόνοι

Οι μύκητες αποτελούν μια από τις σπουδαιότερες ομάδες παθογόνων των φυτών, λαμβάνοντας υπόψη το μεγάλο αριθμό ασθενειών και την οικονομική ζημιά που προκύπτει από μερικές από αυτές τις ασθένειες. Τα είδη των μυκήτων που προκαλούν ασθένειες αριθμούν περίπου τα 6.500 είδη οι οποίοι αποτελούν υποχρεωτικά παράσιτα των ανώτερων φυτών.



Εικόνα 6: Προσβεβλημένα φυτά από μύκητα

Αντίστοιχα, τα μη υποχρεωτικά παράσιτα είναι πολύ περισσότερα. Ένα μόνο γένος των Αδηλομυκήτων, το γένος *Cercospora*, διαθέτει 1200 παρασιτικά είδη. Κάποιοι από τους κατώτερους μύκητες δε διακρίνουν κυτταρικό τοίχωμα είτε σε όλη είτε σε ένα μέρος της διάρκειας του βιολογικού τους κύκλου. (Taizand Zeiger,2002)

Οι φυτοπαθογόνοι μύκητες, αν και έχει υπολογιστεί ότι είναι η μειοψηφία των μυκήτων, είναι σε θέση να προκαλέσουν ολικές καταστροφές στα φυτά. Η προσβολή του ξενιστή τους εξαρτάται από τις συνθήκες του περιβάλλοντος και την ευπάθεια του φυτού. Οι περισσότεροι φυτοπαθογόνοι μύκητες εισέρχονται στον ξενιστή είτε με ένα συνδυασμό μηχανικής πίεσης και ενζυμικής δράσης, σχηματίζοντας ειδικές δομές (τα appresoria), είτε από τα στόματα των φυτών (παράσιτα αδυναμίας) είτε από τραυματισμό του φυτού.

Η ευαισθησία, η ανεκτικότητα και η ανθεκτικότητα των φυτών απέναντι στα παθογόνα στελέχη, συνιστά συνεξελικτική διαδικασία με έντονη την επίδραση και αλληλεπίδραση βιοτικών και αβιοτικών παραγόντων. Η άμυνα των φυτών καθορίζεται από τα γονίδια και το περιβάλλον. Τα γονίδια συμβάλουν με την έκφραση αντιμυκητιακών και αντιβακτηριακών πρωτεϊνών στην ενδογενή άμυνα του φυτού, ενώ το περιβάλλον και ειδικά η θερμοκρασία και η υγρασία καθορίζουν αν οι συνθήκες θα είναι ευνοϊκές ή όχι για μια μόλυνση.

Επιπροσθέτως η παρουσία άλλων, μη παθογόνων μικροοργανισμών, μπορεί 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.

Μερικά φυτοπαθογόνα είδη μυκήτων ζουν και αναπαράγονται εντός του εδάφους, προσβάλλοντας κυρίως υπόγεια τμήματα φυτών, οι μύκητες αυτοί ονομάζονται γενικά ως «μύκητες εδάφους» και επιβιώνουν υπό μορφή σπορίων, μυκηλίου ή μυκηλιακών κατασκευών στο έδαφος ή σε υπολείμματα φυτών.

Η επιβίωση και ανάπτυξη των παθογόνων, εξαρτάται σε πολύ μεγάλο βαθμό από τις συνθήκες περιβάλλοντος, όπως την υγρασία, τη θερμοκρασία, τη διαθεσιμότητα τροφής και παράγοντες που καθορίζουν τη δυνατότητα πρόσληψης της τροφής. Οι ασθένειες που προκαλούν είναι τήξη φυματίων, σηψιρριζίες, σήψη λαιμού και αδρομυκώσεις.

1.6. Μη-Φυτοπαθογόνοι

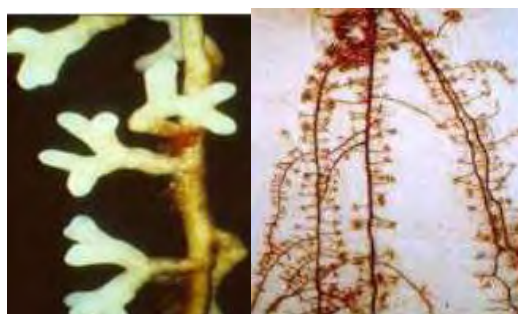
Οι μυκόρριζες είναι μύκητες του εδάφους που έχουν την ικανότητα να αναπτύσσουν συμβιωτική και αμοιβαία ωφέλιμη σχέση με τις ρίζες των περισσότερων φυτών. Το φυτό κατά τη συμβίωση παρέχει υδατάνθρακες στο μύκητα και αυτός, μέσω του εκτεταμένου εδαφικού μυκηλίου, παρέχει στο φυτό θρεπτικά στοιχεία και ιδιαίτερα φώσφορο. Σε φυσικά οικοσυστήματα οι μυκορριζικοί μύκητες καλύπτουν μέχρι και το 80% των απαιτήσεων των φυτών σε φωσφόρο. Σε ορισμένες περιπτώσεις η προσθήκη ή η ύπαρξη σημαντικών ποσοτήτων διαθέσιμου φωσφόρου, μειώνει τον αποικισμό των ριζών από μυκόρριζες. Η συμβιωτική αυτή σχέση μπορεί να προσφέρει στα φυτά:

- προστασία από παθογόνα ή βαρέα μέταλλα
- να τα βοηθά σε καταστάσεις αυξημένης αλατότητας και ξηρασίας
- θετική επίδραση και στη δομή του εδάφους, αφού θεωρείται ότι αυξάνουν τη σταθερότητα των εδαφικών συσσωματωμάτων, κυρίως μέσω της παραγωγής μιας πρωτεΐνης, της γλομαλίνης, η οποία αποτελεί σημαντικό ποσοστό της οργανικής ουσίας του εδάφους. (Δρ Νεκτάριος Καβρουλάκης, Δρ Γεώργιος Ψαρράς)
- Μερικές εξώτροφες μυκόρριζες παράγουν αντιβιοτικά υλικά που προστατεύουν τον ξενιστή από παθογόνα μικρόβια

Τα μυκορριζικά συμβιωτικά συστήματα χωρίζονται σε δυο κατηγορίες:

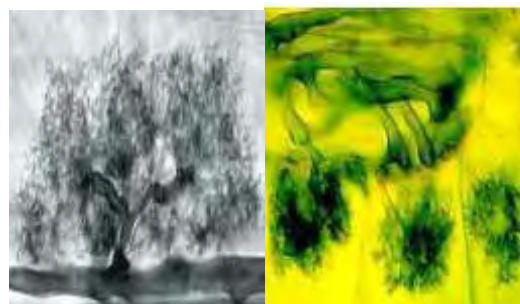
1. Εκτομυκόρριζες, οι οποίες, παρατηρούνται στις ρίζες δασικών δένδρων όπως πεύκα, έλατα. Κυρίως βασιδιομύκητες αλλά και ασκομύκητες έχει βρεθεί ότι σχηματίζουν

εκτομυκόρριζες



Εικόνα 7:Εκτομυκόρριζες

2. Ενδομυκόρριζες-Δενδρόμορφες μυκόρριζες, οι οποίες ονομάστηκαν έτσι λόγω των ενδοκυτταρικών οργάνων που σχηματίζουν και ονομάζονται *arbuscules*. Δημιουργούνται από μύκητες των γενών *Glomus*, *Gigaspora*, *Acaulospora*, *Sclerocystis*, *Paraglomus* etc

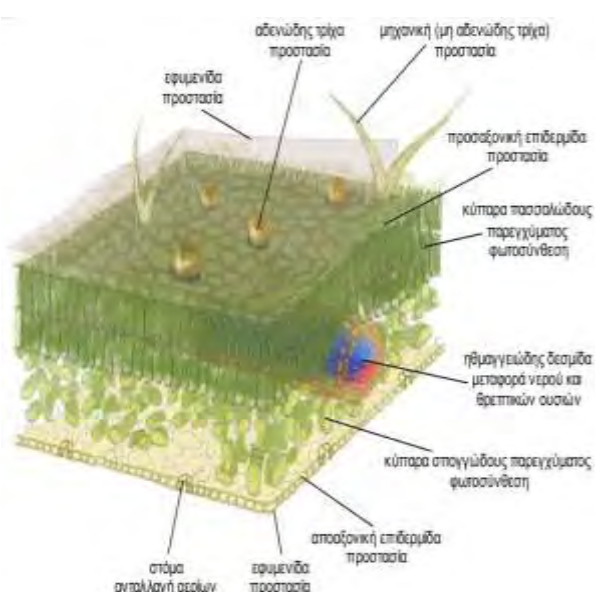


Εικόνα 8:Ενδομυκόρριζες – Δενδρόμορφες μυκόρριζες

Οι μυκόρριζες παίρνουν οργανικά συστατικά από το φυτό, στο οποίο έχουν προσκολληθεί, και του αποδίδουν υγρασία και αυξητικές ουσίες. Αυτή η διαδικασία δρα συνήθως ευεργετικά για το φυτό.

1.7. Μηχανισμοί Άμυνας Φυτών

Τα φυτά παρόλο που δεν έχουν πολύπλοκο ανοσοποιητικό σύστημα διαθέτουν παραδόξως ανθεκτικότητα σε ασθένειες που προκαλούνται από μύκητες, βακτήρια νηματώδεις και ιούς που βρίσκονται στο περιβάλλον. Οι μύκητες, τα βακτήρια και οι νηματώδεις παρεμποδίζουν την φωτοσύνθεση των φυτών οι δε ιοί χρησιμοποιούν μηχανισμούς αντιγραφής εις βάρος του ξενιστή τους. Τα φυτά δεν μπορούν να κινηθούν για να ξεφύγουν από τις περιβαλλοντικές προκλήσεις.



Εικόνα 9:μηχανισμοί άμυνας των φυτών

Οι αβιοτικοί και βιοτικοί παράγοντες καταπόνησης επηρεάζουν δυσμενώς την επιβίωση και ανάπτυξη των φυτικών οργανισμών. Οι εξελιγμένοι μηχανισμοί που διαθέτουν τα φυτά βοηθούν ώστε να αντιληφθούν αυτές τις επιθέσεις και να μετατρέψουν αυτή την αντίληψη σε μια προσαρμοστική απάντηση. (Dangland Jones, 2001)

Τα φυτοφάγα έντομα μπορεί επίσης να λειτουργούν ως φορείς ιών και άλλων παθογόνων οργανισμών.

Τα παθογόνα συνήθως χρησιμοποιούν μία από τις τρεις κύριες στρατηγικές επίθεσης τον νεκροτροφισμό, τον βιοτροφισμό ή τον ημιβιοτροφισμό.

- Τα νεκροτροφικά παθογόνα εκκρίνουν στο φυτό ή ενζυμα που αποικοδομούν το κυτταρικό τοίχωμα ή τοξίνες οι οποίες καταστρέφουν τα προσβεβλημένα φυτικά κύτταρα και τέλος οδηγούν σε μαζικά σχησιμογενή τραύματα στους ιστούς. Οι νεκροί ιστοί αποικοούνται από παθογόνα και λειτουργούν ως τροφή.
- Τα βιοτροφικά παθογόνα μετά την μόλυνση του φυτού, τρέφονται με υποστρώματα που παρέχονται από το φυτό ξενιστή χωρίς να δημιουργούν μεγάλη καταστροφή στο φυτικό ιστό.
- Τα ημιτροφικά παθογόνα είναι σαν τα βιοτροφικά όπου τα κύτταρα του ξενιστή παραμένουν ζωντανά, αλλά έχουν και ένα στάδιο νεκροτροφικό στο οποίο το παθογόνο μπορεί να προκαλέσει εκτεταμένη καταστροφή στο φυτικό ιστό.

Ενώ αυτές οι στρατηγικές εισβολής ή μόλυνσης είναι επιτυχής, οι επιδημίες από φυτικές ασθένειες είναι σπάνιες σε φυσικά οικοσυστήματα. Αυτό συμβαίνει εξαιτίας των αμυντικών στρατηγικών που έχουν αναπτύξει αποτελεσματικά τα φυτά απέναντι στο πλήθος των παθογόνων. Παρόλα αυτά οι οργανισμοί που είναι παθογόνοι έχουν αναπτύξει αντίστοιχα διάφορες στρατηγικές για να εισβάλουν στα φυτά ξενιστές. Αρχικά, εκκρίνουν λυτικά ένζυμα ώστε να διαπεράσουν την εφυμενίδα και τα κυτταρικά τοιχώματα. Η είσοδος τους, γίνεται μέσα από φυσικές διόδους όπως στόματα και φακίδια επίσης μέσω τραυμάτων.

1.7.1. Επαγώγιμα Αμυντικά Συστήματα

Τα φυτά έχουν αναπτύξει αυστηρά ρυθμισμένα επαγώγιμα αμυντικά συστήματα που είναι λιγότερο δαπανηρά για να διατηρήσουν και να συμπεριλάβουν μηχανισμούς περιορισμού της αμυντικής ανάπτυξης, εκτός εάν είναι απολύτως απαραίτητο.

Ένας συνήθης μηχανισμός άμυνας έναντι των παθογόνων είναι η υπερευαίσθητη απόκριση, κατά την οποία τα κύτταρα που περιβάλλουν τη θέση της μόλυνσης νεκρώνονται γρήγορα και έτσι περιορίζεται η εξάπλωση του παθογόνου. Συχνά πριν την υπερευαίσθητη απόκριση προηγείται η ταχεία συσσώρευση δραστικών μορφών οξυγόνου και μονοξειδίου του αζώτου. Οι δραστικές μορφές οξυγόνου μπορούν να συμβάλουν στο θάνατο του

κυττάρου ξενιστή ως μέρος της υπεραισθητής απόκρισης ή να νεκρώσουν άμεσα τον παθογόνο οργανισμό. Η ταχεία και μικρής διάρκειας παραγωγή μονοξειδίου του αζώτου συνοδεύει την οξειδωτική (έκκριση) σε μολυσμένα φύλλα. Η αύξηση του NO και των δραστικών μορφών οξυγόνου είναι απαραίτητη για την ενεργοποίηση της υπερευαίσθητης απόκρισης. Η αύξηση μόνο ενός από αυτά τα σήματα έχει μικρή επίδραση στην επαγωγή του κυτταρικού θανάτου.

Η διαδικασία άμυνας των φυτών αποτελείται τόσο από προδιαμορφωμένες όσο και από επαγόμενες άμυνες που μπορούν είτε να εμποδίσουν το παθογόνο να εισέλθει στο φυτό είτε να αποκτήσει θρεπτικό συστατικό για ανάπτυξη και αναπαραγωγή (Thatcher *et al.*, 2005, Jones and Dangl 2006)

Πολλά είδη φυτών αντιδρούν σε προσβολές από μύκητες ή βακτήρια συνθέτοντας λιγνίνη ή καλλόζη. Τα πολυμερή αυτά πιστεύεται ότι λειτουργούν ως τείχος προστασίας του φυτού εμποδίζοντας την εξάπλωση του παθογόνου στο υπόλοιπο φυτό. Μια σχετική απόκριση είναι η τροποποίηση των πρωτεϊνών του κυτταρικού τοιχώματος. Αυτή η διεργασία ενδυναμώνει τα κυτταρικά τοιχώματα των κυττάρων που γειτνιάζουν με τη θέση μόλυνσης αυξάνοντας την αντίσταση τους σε μικροβιακή διάσπαση.

Άλλη μια αμυντική απόκριση σε μολύνσεις είναι ο σχηματισμός υδρολυτικών ενζύμων που προσβάλλουν το κυτταρικό τοίχωμα του παθογόνου. Διάφορες γλυκανάσες, χιτρινάσες και άλλα υδρολυτικά ένζυμα επάγονται από την εισβολή μυκήτων. Αυτά τα ένζυμα ανήκουν σε μια ομάδα πρωτεϊνών που σχετίζονται στενά με μολύνσεις παθογόνων και αναφέρονται ως πρωτεΐνες σχετιζόμενες με τη παθογένεση.

Ένας κοινός μηχανισμός ανθεκτικότητας που αναφέρεται σε ένα μεγάλο εύρος φυτών είναι η παραγωγή φυτοαλεξίνων. Οι φυτοαλεξίνες είναι μια ποικίλη από χημικής άποψης ομάδα δευτερογενών μεταβολιτών, με ισχυρή αντιμικροβιακή δράση που συσσωρεύονται γύρω από τη θέση της μόλυνσης. Οι διάφορες οικογένειες φυτών χρησιμοποιούν ως φυτοαλεξίνες διαφορετικούς τύπους δευτερογενών μεταβολιτών. Για παράδειγμα στα ψυχανθή όπως η μηδική και η σόγια, τα ισοφλαβονοειδή είναι συνήθεις φυτοαλεξίνες. Οι φυτοαλεξίνες δεν ανιχνεύονται στο φυτό πριν την μόλυνση του, αλλά συντίθενται πολύ γρήγορα μετά τη μικροβιακή προσβολή.

Η αρχική μόλυνση από παθογόνους οργανισμούς σε ένα φυτό μπορεί να αυξήσει την ανθεκτικότητα του φυτού σε μελλοντικές επιθέσεις παθογόνων οργανισμών μέσω της ανάπτυξης της



Εικόνα 10: επίκτητη συστηματική ανθεκτικότητα (SAR)

επίκτητης συστημικής ανθεκτικότητας (SAR). Το φαινόμενο αυτό αναπτύσσεται κατά τη διάρκεια μερικών ημερών μετά την αρχική μόλυνση. Από τη θέση μόλυνσης η SAR μεταδίδεται διαμέσου του φλοιώματος σε άλλα μέρη του φυτού με αποτέλεσμα την αυξημένη ανθεκτικότητα σε όλο το φυτό. Σε αυτή τη διεργασία το σαλικυλικό οξύ και ο μεθυλεστέρας αυξάνονται σημαντικά και προκαλούν την παραγωγή πρωτεϊνών που σχετίζονται με τη παθογένεση PR. Το μεθυλοσαλικυλικό οξύ συχνά απελευθερώνεται κατά τη SAR και ίσως χρησιμεύει ως ένα πτητικό σήμα επαγωγής της SAR στα γειτονικά φυτά.

Κάποια φυτά έχουν υποδοχείς που αναγνωρίζουν εξελικτικά συντηρημένες ενώσεις προερχόμενες από τα παθογόνα, γνωστές ως γενικά μοριακά πρότυπα που σχετίζονται με μικρόβια. Διαφέρει η ανθεκτικότητα των φυτών σε παθογόνους μικροοργανισμούς και αυτό είναι αποτέλεσμα της ταχύτητας και της έντασης της απόκρισης του φυτού. Τα ανθεκτικά φυτά αποκρίνονται πιο γρήγορα και πιο έντονα στα παθογόνα σε σχέση με τα ευαίσθητα φυτά. Επομένως, είναι σημαντικός ο τρόπος με τον οποίο τα φυτά αντιλαμβάνονται τη παρουσία των παθογόνων και αρχίζουν τις αμυντικές τους αποκρίσεις.

- Μια πρώτη γραμμή ανθεκτικότητας παρέχεται από ένα σύστημα που αναγνωρίζει ευρείες κατηγορίες παθογόνων. Τα φυτά έχουν ποικίλους υποδοχείς που αναγνωρίζουν τα λεγόμενα γενικά μοριακά πρότυπα που σχετίζονται με μικρόβια (MAMP). Τα MAMP ενεργοποιούν ειδικές φυτικές αμυντικές αποκρίσεις που συμπεριλαμβάνουν τη παραγωγή μεγάλων ποσοτήτων φυτοαλεξινών. Η αποτελεσματικότητά τους είναι εκπληκτική αν ληφθεί υπ' όψιν ότι με έναν υποδοχέα ένα φυτό μπορεί να αναγνωρίζει μια πλήρη ταξινομική ομάδα που χαρακτηρίζεται από ένα συγκεκριμένο MAMP.
- Σε ένα δεύτερο σύστημα που παρέχει ειδική ανθεκτικότητα έναντι των παθογόνων οργανισμών μεσολαβεί η αλληλεπίδραση μεταξύ των προϊόντων του φυτικού γονιδίου R (ή γονιδίου ανθεκτικότητας) και των προϊόντων του γονιδίου Avr(μη τοξικό) που προέρχονται από τα παθογόνα. Οι ερευνητές έχουν απομονώσει περισσότερα από είκοσι φυτικά γονίδια R που λειτουργούν στην άμυνα των φυτών έναντι των μυκήτων, βακτηρίων και νηματωδών. (Taizand & Zeiger, 2012)

1.8. Ψυχανθή

Τα Ψυχανθή παράγουν μια πληθώρα δευτερογενών μεταβολίτων, μερικοί εκ' των οποίων μελετούνται εκτεταμένα ως βιοδραστικές ουσίες με επωφελείς επιδράσεις στην ανθρώπινη και ζωική υγεία. (Dixon&Sumner, 2003)

Τα ψυχανθή είναι φυτά που είναι ικανά να αναπτυχθούν σε εδάφη φτωχά σε θρεπτικά συστατικά λόγω της ικανότητάς τους να δημιουργούν συμβιώσεις με ριζόβια βακτήρια που δεσμεύουν το άζωτο και με μύκητες εδάφους που δεσμεύουν τα θρεπτικά συστατικά και που παρέχουν στα φυτά φωσφόρο και

άλλες βασικές θρεπτικές ουσίες. Το πιο σημαντικό χαρακτηριστικό όμως αυτής της τάξης είναι η δημιουργία ειδικών συμβιωτικών δομών στις ρίζες τους με βακτήρια των γενών *Azorhizobium*, *Bradyrhizobium*, *Mesorhizobium*, *Rhizobium* και *Sinorhizobium* (Martinez Romero & Caballero-Mellado, 1996). Τα ψυχανθή έχουν μεγάλη σημασία γιατί χρησιμοποιούνται ως πηγή τροφής για τους ανθρώπους και τα ζώα, ακόμα ως πρώτες ύλες για τη βιομηχανία (Graham & Vance, 2003).



Εικόνα 11: Διάφορα είδη ψυχανθών και τα σπέρματά τους

Αντιπροσωπεύουν περίπου το ένα τρίτο της παγκόσμιας φυτικής παραγωγής, του ανθρώπινου διαιτολογίου σε πρωτεΐνες και του επεξεργασμένου φυτικού ελαίου. Υπολογίζεται ότι περίπου 40-60 εκατομμύρια τόνοι αζώτου παρέχονται ετησίως από τα καλλιεργούμενα ψυχανθή, με αποτέλεσμα να εξοικονομούνται περίπου 10 δισεκατομμύρια σε λίπασμα (Smil, 1999). Τα ψυχανθή παγκόσμιας διατροφικής αξίας περιλαμβάνουν το φασόλι (*Phaseolus vulgaris*), τη σόγια (*Glycine max*), το μπιζέλι (*Pisum sativum*), το ρεβύθι (*Cicer arietinum*), τα κουκιά (*Vicia faba*), και τη φακή (*Lens esculenta*).

Από άποψη παραγωγής και εμπορίου, το πιο σημαντικό ψυχανθές είναι η σόγια το μεγαλύτερο ποσοστό του παραγόμενου σπόρου χρησιμοποιείται για την εκχύλιση λαδιού και ως σανός για τα ζώα. Εκτός από τη χρήση τους στη διατροφή, τα ψυχανθή χρησιμοποιούνται για τη διατήρηση του εδάφους, τη φυτοεξυγίανση, την παραγωγή ξυλείας, ως διακοσμητικά βότανα και θάμνοι, για την εκχύλιση τσίχλας, ρετσινιού και ως προσθετικά τροφίμων. Επιπλέον, τα ψυχανθή παράγουν δευτερογενείς ενώσεις με προαγωγικές για την υγεία ιδιότητες όπως τα ισοφλαβονοειδή (Dixon & Sumner 2003, Dixon 2004).

1.8.1. Η Αζωτοδεσμευτική και Συμβιωτική Σχέση

Το άζωτο απαντάται στη βιόσφαιρα σε πολλές μορφές. Η ατμόσφαιρα εμπεριέχει τεράστιες ποσότητες μοριακού αζώτου (N_2). Το μεγαλύτερο μέρος από το μεγάλο αυτό απόθεμα αζώτου δεν είναι άμεσα διαθέσιμο στους ζώντες οργανισμούς η πρόσληψη του αζώτου της ατμόσφαιρας απαιτεί την διάσπαση ενός εξαιρετικά σταθερού τριπλού ομοιοπολικού δεσμού μεταξύ δυο ατόμων αζώτου ($N \equiv N$), ώστε να παραχθεί αμμώνια (NH_3) ή νιτρικό ιόν (NO_3^-). Αυτές οι

αντιδράσεις γνωστές ως δέσμευση αζώτου μπορούν να επιτευχθούν τόσο με βιομηχανικές όσο και με φυσικές διεργασίες.

Σε υψηλές θερμοκρασίες (περίπου 200 °C) , υψηλή πίεση (περίπου 200 ατμόσφαιρες) και με τη παρουσία ενός μετάλλου ως καταλύτη (συνήθως σιδήρου) το N_2 αντιδρά με το υδρογόνο και παράγεται αμμωνία. Αυτή η αντίδραση δέσμευσης του αζώτου ονομάζεται διεργασία Haber-Bosch και είναι το εναρκτήριο σημείο για τη παραγωγή πολλών γεωργικών και βιομηχανικών προϊόντων. Η παγκόσμια βιομηχανική παραγωγή αζωτούχων λιπασμάτων ανέρχεται σε περισσότερα από 100×10^{12} g ανα έτος. (FAOSTAT, 2009)

Οι φυσικές διεργασίες που δεσμεύουν ετησίως τα 190×10^{12} g αζώτου και είναι η εξής (Schlesinger, 1997)

- Αστραπές. Οι αστραπές είναι υπεύθυνες για το 8% του δεσμευόμενου αζώτου. Οι αστραπές μετατρέπουν τους υδρατμούς και το οξυγόνο στις ιδιαίτερα δραστικές ελεύθερες ρίζες υδροξυλίου, ελεύθερα άτομα υδρογόνου και ελεύθερα άτομα οξυγόνου τα οποία επιτίθενται στο μοριακό άζωτο (N_2) για να σχηματίσουν νιτρικό οξύ (HNO_3) το νιτρικό οξύ στη συνέχεια πέφτει στη γη με τη βροχή.
- Φωτοχημικές αντιδράσεις. Περίπου το 2% του δεσμευόμενου αζώτου προέρχεται από φωτοχημικές αντιδράσεις μεταξύ αερίων μονοξειδίου του αζώτου (NO) και όζοντος (O_3) οπότε παράγεται νιτρικό οξύ (HNO_3).
- Βιολογική δέσμευση αζώτου. Το υπόλοιπο 90% προκύπτει από βιολογική αζωτοδέσμευση στην οποία βακτήρια ή κυανοπράσινα φύκη (κυανοβακτήρια) δεσμεύουν το N_2 σε αμμωνία (NH_3). Η αμμωνία αυτή διαλύεται στο νερό και σχηματίζει αμμώνιο (NH_4^+).

Από γεωργική άποψη η βιολογική δέσμευση του αζώτου είναι ζωτικής σημασίας αφού η βιομηχανική παραγωγή αζωτούχων λιπασμάτων σπάνια καλύπτει τη καλλιεργητική ζήτηση. (FAOSTAT, 2009)

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

Για την εδραίωση της αζωτοδεσμευτικής συμβίωσης είναι απαραίτητο να πραγματοποιηθούν τρία βασικά γεγονότα. Αυτά είναι η ενδοκυτταρική μόλυνση των κυττάρων του ξενιστή από τον μικροσυμβιώτη, η οργανογένεση του φυματίου και η διαδικασία της αζωτοδέσμευσης. Γενικά, κατά το σχηματισμό του φυματίου, η μόλυνση και η οργανογένεση συμβαίνουν ταυτόχρονα, ενώ αζωτοδέσμευση πραγματοποιείται μόνο αφού ολοκληρωθεί

η οργανογένεση, υπό την προϋπόθεση ότι η βακτηριακή μόλυνση είναι επιτυχής (Maunoury et al., 2008).

1.8.2. Συμβιωτική Σχέση Ριζόβιου Ψυχανθούς

Η συμβιωτική σχέση δέσμευσης του μοριακού αζώτου είναι αυτή μεταξύ ριζόβιου και ψυχανθούς. Τα φυμάτια, όπως αποκαλούνται αυτές οι χαρακτηριστικές δομές, έχουν την ικανότητα να δεσμεύουν του ατμοσφαιρικού αζώτου, σε μορφή που μπορεί να χρησιμοποιηθεί από τα φυτά. Αυτή η συμβιωτική σχέση επιτρέπει τον εμπλουτισμό των εδαφών σε νιτρικά και την παραγωγή πλούσιων σε πρωτεΐνων σπόρων των Ψυχανθών (Oldroyd et al., 2011). Εντός του φυματίου, οι διαφοροποιημένες μορφές των ριζοβίων, που ονομάζονται πλέον βακτηριοειδή, βρίσκουν το κατάλληλο περιβάλλον για να φέρουν σε πέρας τη βιοχημική μετατροπή του μοριακού αζώτου σε αμμωνία. Η παραπάνω σχέση αποβαίνει



Εικόνα 12: φυμάτια στις ρίζες φασολιάς (*Phaseolus vulgaris*). Τα φυμάτια είναι αποτέλεσμα προσβολής από *Rizobium* sp.

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 (Udvardi and Poole, 2013, Udvardi and Day, 1997, White et al., 2007)

Τα φυμάτια χωρίζονται σε δύο βασικές κατηγορίες, σύμφωνα με μορφολογικά και λειτουργικά κριτήρια. Συγκεκριμένα, στη φύση υπάρχουν τα καθορισμένα και τα μη καθορισμένα φυμάτια.

- Στα καθορισμένα φυμάτια, το πρωτογενές μερίστωμα (*primordium*) προέρχεται από το εξωτερικό και το ενδιάμεσο τμήμα του φλοιού. Η κυτταρική διαίρεση στο πρωτογενές μερίστωμα σταματά πολύ γρήγορα και δε σχηματίζεται μόνιμο μερίστωμα. Σημαντικό είναι το γεγονός ότι ο αριθμός των φυτικών κυττάρων δε μεταβάλλεται. Παρόλα αυτά το μέγεθος του φυματίου αυξάνεται, διότι τα βακτήρια που βρίσκονται μέσα στα κύτταρα του ξενιστή διαιρούνται συνεχώς και γι' αυτό το λόγο τα κύτταρα διογκώνονται ώστε να τα «φιλοξενήσουν». Συνεπώς, το μέγεθος του φυματίου εξαρτάται κυρίως από την αύξηση του μεγέθους

των μολυσμένων κυττάρων. Η αζωτοδέσμευση ξεκινά ταυτόχρονα σε όλα τα μολυσμένα κύτταρα, πριν ακόμα ολοκληρωθεί η διόγκωση των κυττάρων. Όταν τελειώσει η διαφοροποίηση του φυματίου, σταματά και η ανάπτυξη του, με αποτέλεσμα τη δημιουργία ενός σφαιρικού φυματίου που θα περιέχει μια ομοιογενή ζώνη αζωτοδέσμευσης. Επειδή τα αζωτοδεσμευτικά κύτταρα δεν ανανεώνονται, η φάση της αζωτοδέσμευσης είναι προσωρινή, και γι' αυτό το λόγο το φυμάτιο οδηγείται κάποια στιγμή στη γήρανση. Τελικά, ενώ τα φυτικά κύτταρα αποσυντίθενται, μέρος του πληθυσμού των βακτηριοειδών επιβιώνει μετά την απελευθέρωσή του από ένα γερασμένο φυμάτιο (Purro et al., 2005).

- Στα μη καθορισμένα φυμάτια, το πρωτογενές μερίστωμα προέρχεται από το εσωτερικό τμήμα του φλοιώδους παρεγχύματος της ρίζας. Η κυτταρική διαίρεση συνεχίζεται στην ακραία περιοχή του πρωτογενούς μεριστώματος το οποίο δημιουργεί το ακραίο μερίστωμα που παραμένει ενεργό καθ' όλη τη διάρκεια ζωής του φυματίου. Αυτά τα φυμάτια αυξάνουν συνεχώς σε μέγεθος λόγω της σταθερής αύξησης του κυτταρικού αριθμού, αλλά και της διόγκωσης των μολυσμένων κυττάρων. Έτσι, αποκτούν ένα επιμήκες σχήμα και διαχωρίζονται σε τέσσερις διαφορετικές ζώνες ανάλογα με τη φάση στην οποία βρίσκονται τα κύτταρα. Συγκεκριμένα, διαθέτουν τις ζώνες του ακραίου μεριστώματος, της μόλυνσης και της διαφοροποίησης, της αζωτοδέσμευσης και της γήρανσης. Γίνεται αντιληπτό ότι για να διατηρηθεί αυτή η δομή του μη καθορισμένου φυματίου θα πρέπει να υπάρχει μια απόλυτη ισορροπία μεταξύ του ρυθμού διαίρεσης του μεριστώματος και του ρυθμού μόλυνσης των μετά-μιτωτικών κυττάρων (Maunoury et al., 2008). Όταν ένα φυμάτιο παύσει να είναι ενεργό, τότε μαζί με την αυτόλυση του κυτταροπλάσματος του φυτικού κυττάρου, πεθαίνει και ολόκληρος ο πληθυσμός των βακτηριοειδών.

1.9. Το Φυτό Μοντέλο *Lotus japonicus*

Το φυτό *Lotus japonicus* [Βασίλειο: *Plantae*, τάξη : *Fabales* (*Leguminosae*) οικογένεια : *Fabaceae*, υποοικογένεια: *Faboideae*, φύλο: *Loteae*, γένος: *Lotus*] ανήκει στην τάξη των Ψυχανθών. Η τάξη των Ψυχανθών περιλαμβάνει μια σειρά από καλλιεργήσιμα είδη πέραν των διάφορων άλλων χρήσεων τους (ως καλλωπιστικά φυτά, για την παραγωγή ξυλείας, φυτοκατεργασία κτλ). Το *L. japonicus* ανήκει στο φυλογενετικό κλάδο *Hologalegina*, ο οποίος περιέχει επίσης τα *Robinieae*, *Trifolieae* (τριφύλλια), *Viceae*



Εικόνα 13: *Lotus japonicus*

(μπιζέλια και κουκιά) και τα *Cicereae* (ρεβύθια) (Szczyglowski&Stougaard, 2008).

Το *L. japonicus*, αν και είναι ένα φυτό μικρής οικονομικής σημασίας, παρέχει μια σειρά πλεονεκτημάτων σε αντίθεση με τα καλλιεργούμενα είδων που καθιστούν την γενετική και γονιδιωματική μελέτη τους ιδιαίτερα δύσκολη (Czechowski T. et al, 2005). Είναι η δεύτερη πιο σημαντική κατηγορία καλλιεργούμενων φυτών μετά τα σιτηρά, καθώς αποτελούν πλούσια πηγή τροφής για τον άνθρωπο και τα ζώα, ενώ παρέχουν πρώτες ύλες για τη βιομηχανία (Graham&Vance, 2003). Η ανάγκη για την κατανόηση της βασικής βιολογίας της ομάδας των ψυχανθών και της διαδικασίας της φυματογένεσης, με απώτερο σκοπό τη γενετική βελτίωση των καλλιεργήσιμων ειδών οδήγησε στην επιλογή του φυτού *Lotus japonicus* (Handberg και Stougaard, 1992).

Το γένος *Lotus* αποτελείται από περισσότερα των 200 είδη. Από αυτά, σύμφωνα με τις μέχρι τώρα έρευνες, μόνο τα είδη *L. corniculatus*, *L. uliginosus*, *L. tenuis* έχουν αγροοικονομική σημασία (Handberg and Stougaard, 1992). Για την επιλογή του διπλοειδούς *L. Japonicus* στη μελέτη των ψυχανθών, συνετέλεσαν τα εξής πλεονεκτήματά του:

- το μικρό του μέγεθος
- η μεγάλη σποροπαραγωγή
- ο σχετικά μικρός κύκλος ζωής (2 – 3 μήνες)
- η ικανότητα αυτογονιμοποίησης του
- το μικρό μέγεθος του γονιδιώματος του (472.1 Mb)
- η σχετικά εύκολη δημιουργία διαγονιδιακών φυτών και
- η αναγέννηση του από ιστοκαλλιέργειες



Εικόνα 14: Το φυτό μοντέλο *Lotus japonicus* και τα σπέρματά του

Το *Lotus* θεωρείται ως ένα από τα πιο χρήσιμα φυτά για τη μελέτη των ψυχανθών. Η οικογένεια *Leguminosae* (*Fabaceae*), η οποία είναι η τρίτη μεγαλύτερη οικογένεια των αγγειόσπερμων, περιέχει μια σειρά σημαντικών καλλιεργειών και ξυλωδών δέντρων, που παράγουν πρωτεΐνες (υπερέχουν στα φύλλα και στους βλαστούς), υδατάνθρακες και έλαιο για ανθρώπινη κατανάλωση, ως φυτά χλωρής λίπανσης και παραγωγή χονδροειδών ζωοτροφών.

Το φυσικό του περιβάλλον βρίσκεται στην Άπω Ανατολή περιλαμβάνοντας την περιοχή γύρω από την Ιαπωνία, την Κορέα και την Κίνα. Αποτελεί ένα εποχιακό είδος βοσκής εύκρατου κλίματος. Δύο είδη, το *L. japonicus* (Handberg και Stougaard, 1992) και το *M. truncatula* (Barker et al., 1990) έχουν επιλεγεί ως μοντέλα για την έρευνα των ψυχανθών. Προς το παρόν, έχει γίνει γρήγορα διαθέσιμη μια σειρά γενετικών πόρων και εργαλείων, συμπεριλαμβανομένων των οικοτύπων, των μεταλλαγμένων γραμμών, των γενετικών χαρτών, των γραμμών RIL, των διαδικασιών μετασχηματισμού, των αλληλουχιών EST και ενός έργου αλληλούχισης γονιδιώματος. Η κατανόηση και των δύο συμβιωτικών διεργασιών, δηλαδή με τα *Rhizobium* και *Mycorrhiza*, καθιστούν δυνατή την κλωνοποίηση αρκετών βασικών γονιδίων που εμπλέκονται στη συμβίωση.

Τα φυμάτια δημιουργούνται στις ρίζες των φυτών, έχουν την ικανότητα δέσμευσης του ατμοσφαιρικού αζώτου, σε μορφή που μπορεί να χρησιμοποιηθεί από τα φυτά. Εντός του φυματίου, οι διαφοροποιημένες μορφές των ριζοβίων, που ονομάζονται πλέον βακτηριοειδή, βρίσκουν το κατάλληλο περιβάλλον για να φέρουν σε 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 (Udvardi and Poole, 2013, Udvardi and Day, 1997, White et al., 2007). Αυτή η συμβιωτική σχέση επιτρέπει τον εμπλουτισμό των εδαφών σε νιτρικά και την παραγωγή πλούσιων σε πρωτεΐνων σπόρων των ψυχανθών (Oldroyd et al., 2011).

Ο φυσικός οικότοπος για το *L. japonicus* είναι στην Ανατολική και Κεντρική Ασία, συμπεριλαμβανομένης της περιοχής γύρω από την Ιαπωνία, την Κορέα, την Κίνα, και εκτείνεται στο Αφγανιστάν. Στη δεκαετία του 1950, ο καθηγητής Isao Hirayoshi (Πανεπιστήμιο του Κιότο) συνέλεξε τα φυτά *L. japonicus* που καλλιεργούνται σε μια όχθη του ποταμού στο Gifu. Ο καθηγητής William F. Grant (Πανεπιστήμιο McGill, Μόντρεαλ) συνέλεξε τους απογόνους του ως την φυτική σειρά B-129. Το 1992, ο Kurt Handberg και ο Jens Stougaard από το

Πανεπιστήμιο του Aarhus (Δανία) έλαβαν το B-129 και καθιέρωσαν το *Lotus* ως ένα πολύτιμο εργαλείο για τη σύγχρονη έρευνα στον τομέα των οσπρίων. Πολλοί οικοτύποι του *Lotus* μπορούν να βρεθούν στο φυσικό τους περιβάλλον. Οι πόροι για τη διερεύνηση της γενοτυπικής μεταβλητότητας που συμβάλλουν στα πραγματικά και δυναμικά χαρακτηριστικά αγρονομικής σημασίας, όπως η απόδοση των σπόρων, το ύψος των φυτών, η ανοχή στο κρύο και η ανθεκτικότητα σε ασθένειες είναι έτσι διαθέσιμα για αναγνώριση με χαρτογράφηση ποσοτικών θέσεων (QTLs). Σε αυτό το πλαίσιο, η δυνατότητα λήψης γόνιμων φυτών F1 και διαχωρισμού F2 πληθυσμών μετά την διασταύρωση του *L. japonicus* σε διπλοειδείς συγγενείς όπως οι *L. filicaulis*, *L. frondosus*, *L. schoelleri*, *L. burtii* και άλλοι (Grant et al, 1962, Pedrosa et al., 2002) αποτελεί πρόσθετη πηγή βιοποικιλότητας.

1.9.1.Στάδια Ανάπτυξης

Το *L. japonicus* είναι ένα μικρό πολυετές φυτό που έχει άφθονη ανθοφορία. Τα λουλούδια είναι κίτρινα και σχετικά μεγάλα, συνήθως δύο ανά μίσχο. Αναπτύσσεται σχετικά αργά κατά τις πρώτες εβδομάδες μετά τη βλάστηση. Το πρωτεύον φυτό είναι μικρό, επιτρέποντας βλάστηση υψηλής πυκνότητας. Το ώριμο φυτό έχει μια πυκνή ανάπτυξη με πολλά κλαδιά μήκους έως 30 cm και πολλά φύλλα, γεγονός που το καθιστά πολύ χρήσιμο για βιοχημικές, χημικές και φυσιολογικές μελέτες, αφού μπορεί να συλλεχθεί άφθονο υλικό. Ακόμα, επιδεικνύει άφθονη απροσδόκητη άνθηση, με μεγάλα κίτρινα λουλούδια, τα οποία είναι συνήθως διατεταγμένα σε ζεύγη και λιγότερο συχνά ένα ή τρία λουλούδια ανά μίσχο.

Το *L. japonicus* είναι ένα διπλοειδές αυτογαμικό είδος με καλή σειρά σπόρων και υπό συνθήκες θερμοκηπίου έχουν χρόνο παραγωγής περίπου 3 μηνών. Το απλοειδές γονιδίωμα αποτελείται από



Εικόνα 15: Διαφορετικά φυτικά όργανα και μορφολογία των φυτών *Lotus japonicus*. a-d) Αναπτυξιακά στάδια των λουλουδιών του φυτού σχετικά με την «μηχανική γονιμοποίηση». e) Λουλούδια των οικοτύπων Gifu (κίτρινα) και *Filicaulis* (κόκκινα). f) οργανίδιο-θήκη του φυτού που περιέχει 20 σπόρους. g) Τρίφυλλο φύλλο h) Φυτό 2 μηνών .

έξι χρωμοσώματα και το μέγεθος του γονιδιώματος εκτιμάται ότι είναι σχετικά μικρό (0,5 pg ανά απλοειδές συμπλήρωμα). Είναι ευαίσθητο στο *Agrobacterium tumefaciens* και τα διαγονιδιακά φυτά μπορούν να αναγεννηθούν μετά από επιλογή υδρομυκίνης ή καναμυκίνης. (Handberg and Stougaard, 1992).

Η γονιμοποίηση και το σύνολο των σπόρων πραγματοποιούνται χωρίς χειρισμό των λουλουδιών. Ο σχηματισμός των γονιδίων στα γονιμοποιημένα άνθη εμφανίζεται μέσα σε 3-4 ημέρες. Τα ώριμα σπόρια έχουν μήκος περίπου 3 cm και περιέχουν έως και 20 σπόρους. Το βάρος των ώριμων σπόρων είναι περίπου 1,0 -1,2 mg. Επειδή είναι ένα πολυετές φυτό, συνεχίζουν να αναπτύσσονται νέα κλαδιά και άνθη μετά την αφαίρεση των παλαιών κλαδιών.

1.9.2. Συνθήκες Ανάπτυξης

Είναι ένα είδος που μπορεί να αναπτυχθεί υπό ποικίλες συνθήκες. Πολλά συστήματα αναπτύξεως έχουν αναπτυχθεί ανάλογα με την τελική χρήση του φυτού, για παράδειγμα, μικροσκοπική παρατήρηση, βιοχημική ανάλυση, γενετική διαλογή κλπ. Συνήθως, οι καλύτερες συνθήκες καλλιέργειας φυτών είναι θερμοκρασίες μεταξύ 18-22 ° C και υγρασίας περίπου 70%. Οι φωτοπεριοχές 16 ωρών φωτός και 8 ωρών σκούρου είναι συνήθεις συνθήκες θαλάμου ανάπτυξης φυτών. Μεταξύ των αδρανών υλικών που χρησιμοποιούνται ως στήριγμα για την ανάπτυξη των φυτών είναι κόκκοι αργίλου (Ieca), μίγμα 50% περλίτη: βερμικουλίτης, ή ακόμη και βερμικουλίτης μόνος του, εμείς χρησιμοποιήσαμε 1/3 βερμικουλίτη με άμμο.

Επίσης, είναι κάπως ευαίσθητο στο υπερβολικό πότισμα. Το πότισμα από κάτω είναι γενικά καλύτερο από την πλημμύρα από πάνω και ένα "ημιδιαφανές" γεμισμένο με αέρα στήριγμα ριζών είναι καλύτερο από εμποτισμένο μέσο ανάπτυξης με ένα πυκνό νερό. (Szczyglowski et al., 1998). Όταν καλλιεργούνται σε τύρφη, τα φυτά μπορούν να αναπτύξουν μεγαλύτερο μέγεθος, με μίσχους μήκους έως 30 cm και πολλούς κλάδους και πλευρικούς βλαστούς, δίνοντας μια θαμνώδη εμφάνιση. Αυτή είναι η καλύτερη προϋπόθεση για την παραγωγή σπόρων. Μετά από ένα γύρο ανθοφορίας και σπόρων, παλιά κλαδιά μπορούν να αφαιρεθούν και τα φυτά μπορούν να αναγεννηθούν νέα κλαδιά και να αρχίσουν να ανθίζουν πάλι.

Τα φυτά αναπτύσσονται σε πλάκες υπό στείρες συνθήκες σε μέσον άγαρ φυτικής ανάπτυξης. Ένα εναλλακτικό σύστημα ανάπτυξης είναι η υδροπονική καλλιέργεια. Στην περίπτωση αυτή, οι σπόροι τοποθετούνται σε ένα πλέγμα και βυθίζονται σε διάλυμα ανάπτυξης φυτών, κάτω από κατάλληλες συνθήκες θερμοκρασίας και φωτοπεριόδου. Ένα παρόμοιο σύστημα είναι οι αεροπονικές καλλιέργειες, όπου τα φυτά βλαστάνονται επίσης σε ένα πλέγμα

και το διάλυμα ανάπτυξης φυτών θολώνεται γύρω από τις ρίζες. Τα φυτά αναπτύσσονται ένα μεγάλο ριζικό σύστημα κάτω από αυτές τις συνθήκες, το οποίο είναι χρήσιμο για πειράματα που απαιτούν μεγάλη ποσότητα ριζικού ιστού.

1.9.3. Λύσεις Ανάπτυξης Φυτών

Φυτά εμβολιασμένα με συμβατό *Rhizobium* μπορούν να αναπτυχθούν καλά χωρίς πρόσθετο άζωτο. Για μη εμβολιασμένα φυτά έχει επίσης χρησιμοποιηθεί διάλυμα Hornum (Handberg and Stougaard, 1992). Τα φυτά αναπτύσσονται καλύτερα σε διάλυμα Hornum που περιέχει τόσο αμμώνιο όσο και νιτρικά ως πηγές αζώτου. Μόνο τα νιτρικά μπορούν να χρησιμοποιηθούν ως πηγή αζώτου, όταν το φυτό δεν εμβολιαστεί. Μόνο το αμμώνιο δεν είναι η βέλτιστη πηγή αζώτου για το *Lotus* και η ανάπτυξη παρουσία αμμωνίου είναι πιο αργή. Παρ' όλα αυτά, έχει επίσης χρησιμοποιηθεί ως πηγή αζώτου με τη μορφή ηλεκτρικού αμμωνίου, που υποστηρίζει την ανάπτυξη των φυτών αρκετά καλά. Τα σπορόφυτα είναι ευαίσθητα και ενδέχεται να γίνουν κίτρινα σε υψηλές συγκεντρώσεις θρεπτικών ουσιών. Η καλύτερη ανάπτυξη επιτυγχάνεται συχνά με τη βλάστηση και την ανάπτυξη των φυταρίων σε νερό ή χαμηλά θρεπτικά συστατικά, ακολουθούμενη από εφαρμογή θρεπτικού διαλύματος μετά την έναρξη των φυτών για την ανάπτυξη κανονικών φύλλων. Το διάλυμα Broughton&Dilworth (1971) αραιώνεται συχνά το ένα τέταρτο και επίσης το διάλυμα Jensen έχει χρησιμοποιηθεί εκτεταμένα για πειράματα κονδυλωμάτων *L. japonicus*, αφού αυτά είναι ελεύθερα N. Το Jensens Medium συνιστάται για την ανίχνευση και την καλλιέργεια βακτηρίων που καθορίζουν το άζωτο. Η λύση Hoagland είναι συνταγή υδροπονικού θρεπτικού διαλύματος δεκαετιών που ονομάστηκε από τον ερευνητή που το ανέπτυξε. Η δημιουργία του ήταν μια προσπάθεια να δημιουργηθεί μια παγκόσμια θρεπτική λύση για τα φυτά που καλλιεργούνται σε ένα υδροπονικό περιβάλλον. Το διάλυμα Hoagland αναπτύχθηκε το 1938 σε μια προσπάθεια εξασφάλισης επαρκούς διατροφής για τα φυτά που καλλιεργούνται υδροπονικά. Σχεδιάστηκε από τους ερευνητές Hoagland και Arnon. Στη συνέχεια, ο Arnon αναθεώρησε τη λύση το 1950 για να συμπεριλάβει τα χηλικά. Αυτός ο τύπος υδροπονικού θρεπτικού διαλύματος περιέχει πολύ άζωτο και κάλιο, καθιστώντας το καλύτερο για την ανάπτυξη μεγαλύτερων φυτών, όπως ντομάτες και πιπεριές.

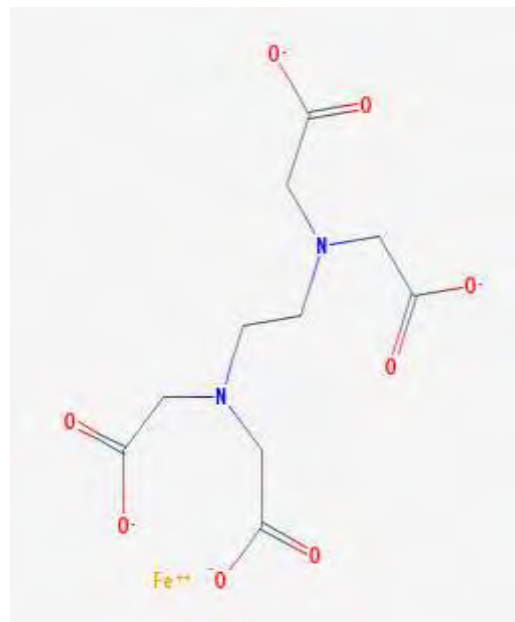
Στο πείραμα μου έκανα χρήση του διαλύματος Hoagland's σε κάποια φυτά το χρησιμοποίησα χωρίς FeEDTA για να δω την επίδραση του και πως τα επηρεάζει η ύπαρξη του.

1.9.4. Συχνά χρησιμοποιούμενα Διαλείμματα Καλλιέργειας

- ΔΙΑΛΥΜΑ HORNUM (100x απόθεμα): 40 γρ. / Λίτρο NH_4NO_3 , 30 γρ. / Λίτρο KNO_3 , 30 γραμ. / Λίτρο $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$, 10 γρ. / Λίτρο $\text{NaH}_2\text{PO}_4 \cdot \text{H}_2\text{O}$, mg / l $\text{MnSO}_4 \cdot \text{H}_2\text{O}$, 120 mg / l H_3BO_3 , 40 mg / l $\text{CuSO}_4 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$, 40 mg / l $\text{ZnSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ και 8 mg / l $\text{Na}_2\text{MoO}_4 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$. Αραιώνεται σε νερό της βρύσης και το pH ρυθμίζεται στο 6,8.
- ΔΙΑΛΥΜΑ BROUGHTON&DILWORTH: CaCl_2 1 mM, KH_2PO_4 0,5 mM, Fe-κιτρικό 10 μM , MgSO_4 0,25 mM, K_2SO_4 0,25 mM, MnSO_4 1 μM , H_3BO_3 2 μM , ZnSO_4 0,5 μM , CuSO_4 0,4 μM , CoSO_4 0,2 μM , Na_2MoO_4 0,2 μM .
- ΜΕΣΟΝ JENSEN: 0,1 g / l CaHPO_4 , 20 mg / l K_2PO_4 , 20 mg / l $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$, 20 mg / l NaCl . 10 mg / l Fe-κιτρικό, 100 μg / l $\text{Na}_2\text{MoO}_4 \cdot 4\text{H}_2\text{O}$, 200 μg / l $\text{MnSO}_4 \cdot 4\text{H}_2\text{O}$, 10 μg / l $\text{CuSO}_4 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$, 25 μg / l $\text{ZnSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$, 300 μg / l H_3BO_3 .
- ΜΕΣΟΝ HOAGLAND'S: MgSO_4 1M/2mL/L, KH_2PO_4 1M/1mL/L, FeEDTA 100Mm/1mL/L, KNO_3 20g/100mL/5m/L, $\text{Ca}(\text{NO}_3)_2 \cdot 4\text{H}_2\text{O}$ 5mL/L {2,36gr/100mL}, Microelements 1mL/L

1.10. Σίδηρος

Ο σίδηρος είναι απαραίτητος για τα φυτά, αλλά δεν είναι εύκολα προσβάσιμος. Επίσης είναι δυνητικά τοξικός και προάγει την παραγωγή δραστικών μορφών οξυγόνου. (L. A. Simeoni, W. L. Lindsay, and R. Baker, 1987) Καθώς τα φυτά αποτελούν μείζονα διαιτητική πηγή σιδήρου παγκοσμίως, η κατανόηση της ομοιόστασης του σιδήρου των φυτών είναι ζωτικής σημασίας για τη βελτίωση όχι μόνο των καλλιεργειών αλλά και της ανθρώπινης διατροφής. Ο Fe είναι το τέταρτο πλουσιότερο στοιχείο στον φλοιό της γης, αλλά η έλλειψη του είναι ένα σημερινό πρόβλημα στην παγκόσμια γεωργία λόγω της χαμηλής διαθεσιμότητας του (Abadía κ.ά., 2011). Αν και η απόκτηση σιδήρου από το περιβάλλον είναι καλά χαρακτηρισμένη, οι μεταφορείς και οι αναγωγάσες που εμπλέκονται στη μεταφορά οργανικού σιδήρου σε φυτά και ορισμένοι από τους παράγοντες μεταγραφής που ρυθμίζουν την πρόσληψη σιδήρου μόλις πρόσφατα ανακαλύφθηκαν. (Jeong J, Guerinot ML, 2009)



Εικόνα 16: Fe(II)-edta

Ο σίδηρος είναι απαραίτητος για την ανάπτυξη των φυτών και τις φυσιολογικές διεργασίες όπως η φωτοσύνθεση και η αναπνοή (Palmer et al Guerinot, 2009). Παρά την υψηλή αφθονία Fe στα περισσότερα εδάφη, η βιοδιαθεσιμότητά του είναι πολύ χαμηλότερη σε αλκαλικά ή ασβεστολιθικά εδάφη. Ο Fe σχηματίζει πολύ λίγο διαλυτά Fe^{3+} + οξυ-υδροξείδια, τα οποία δεν χρησιμοποιούνται εύκολα από τα φυτά (Guerinot and Yi, 1994). Ασβεστολιθικά εδάφη καλύπτουν περίπου το ένα τρίτο του φλοιού της γης και πολλά φυτά τα είδη που καλλιεργούνται σε αυτά τα εδάφη εμφανίζουν συχνά χλώρωση και απώλειες απόδοσης που σχετίζεται με ανεπάρκεια Fe (Abadía et al., 2011)

Ο σίδηρος συμμετέχει στον σχηματισμό της χλωροφύλλης. Επομένως η έλλειψη του προκαλεί χλώρωση στα φύλλα γιατί απαιτείται σίδηρος για τη σύνθεση μερικών από τα συμπλέγματα χλωροφύλλης-πρωτεϊνών στο χλωροπλάστη. Επίσης είναι συστατικό πολλών ενζύμων που συμμετέχουν στη μεταφορά ηλεκτρονίων όπως τα κυτοχρώματα, πρωτεΐνες που δρουν ως μεταφορέας ηλεκτρονίων στην οξειδωτική φωσφορυλίωση, την κύρια αντίδραση παραγωγής ενέργειας υπό την μορφή ATP. Έτσι, κατά τη διαδικασία μεταφοράς ηλεκτρονίων οξειδώνεται αντιστρεπτά από Fe^{2+} σε Fe^{3+} . Ο σίδηρος μπορεί να προσλαμβάνεται είτε από το ακρορρίζιο, όπως το κριθάρι (Clarkson 1985) είτε κατά μήκος ολόκληρης της επιφάνειας της ρίζας, όπως στον αραβόσιτο (Kashirad et al. 1973)

Επιπλέον, η παρατεταμένη έλλειψη σιδήρου μειώνει τη φωτοσύνθεση με τη μείωση του αριθμού των μονάδων φωτοσύνθεσης και διαταράσσοντας την υπερδομή των χλωροπλάστων (Stocking, 1975; Spiller and Terry, 1980; Terry, 1980). Ο σίδηρος είναι επίσης συμπαραγοντας για πολλά συνδεδεμένα με μεμβράνες θυλακοειδών ένζυμα που προστατεύουν τους χλωροπλάστες από δραστικά είδη οξυγόνου (Casano κ.ά., 2000; Murgia et al., 2004).

Ο σίδηρος κινείται στα αγγεία του ξύλου και στο φλοιό κυρίως προς τους χλωροπλάστες όπου τα επίπεδα του ελέγχονται με αντιστρεπτή σύνδεση με φωσφοπρωτεΐνη του Fe^{3+} και φερριτίνη. Συγκεκριμένα στα αγγεία του ξύλου μεταφέρεται ως σύμπλοκο Fe- κιτρικού ενώ στο ηθμό ως σύμπλοκο Fe-NA(νικοτιαναμίνη)(Briat 2007)

Το χηλικό σύμπλοκο σιδήρου χρησιμοποιείται συνήθως για γεωργικούς σκοπούς για την αντιμετώπιση της χλώρωσης, μιας κατάστασης στην οποία τα φύλλα παράγουν ανεπαρκή χλωροφύλλη. Στην κηπουρική, το χηλικό σύμπλοκο σιδήρου αναφέρεται συχνά ως «απομονωμένο σίδηρο» και χρησιμοποιείται ως φυτικό τονωτικό, συχνά αναμειγμένο με άλλα θρεπτικά συστατικά και φυτικά τρόφιμα (π.χ. φύκια). Συνιστάται στην διακοσμητική κηπουρική για τη διατροφή φυτών με φυτά όπως τα *Rhododendrons* εάν αναπτύσσονται σε ασβεστολιθικά εδάφη. Ο δεσμεύμενος σίδηρος είναι

διαθέσιμος στα φυτά των ριζών, χωρίς να ρυθμίζεται το pH του εδάφους, και συνεπώς εμποδίζεται η χλωροποίηση που προκαλείται από ασβέστιο.

Το χηλικό σύμπλοκο σιδήρου έχει επίσης χρησιμοποιηθεί ως δόλωμα στον χημικό έλεγχο των γυμνοσάλιαγκων, των σαλιγκαριών και των πλακούντων στη γεωργία στην Αυστραλία και τη Νέα Ζηλανδία. Έχει πλεονεκτήματα έναντι άλλων γενικότερα δηλητηριωδών ουσιών που χρησιμοποιούνται επειδή η τοξικότητά τους είναι πιο συγκεκριμένη στα μαλάκια. Το FerricEdTA χρησιμοποιείται επίσης για τον έλεγχο ορισμένων πλατύφυλλων ζιζανίων σε χλοοτάπητες.

1.11.Το Γένος *Fusarium*

Το γένος *Fusarium* θεωρείται ως ένα από τα σημαντικότερα φυτοπαθογόνα γένη μυκήτων, διότι προκαλεί σοβαρές καταστρεπτικές ασθένειες, όπως αδρομυκώσεις, σηψιρριζίες, σήψεις της βάσεως και του στελέχους τήξεις σπορείων αλλά και εναέριες προσβολές ανθέων όπως στα σιτηρά.

Σημαντικότατο είδος είναι το *Fusarium oxysporum* το οποίο προκαλεί κυρίως αδρομυκώσεις και χαρακτηρίζεται από την παρουσία εξειδικευμένων φυλών παθογένειας, όπως αναφέρονται: *Fusarium oxysporum* f. sp. *asparagi*, f. sp. *cepaе*, f. sp. *conglutinans*, f. sp. *dianthi*, f. sp. *gladioli*, f. sp. *lini*, f. sp.

lycopersici, f. sp. *melonis*, f. sp. *narcissi*, f. sp. *niveum*, f. sp. *pisi*, f. sp. *tulipae*, f. sp. *vasinfectum*. Τα μικροκονίδια δημιουργούνται πάνω σε ένα φιαλίδιο, που σχηματίζεται στην υφή ή αποτελεί διακλάδωση του κονιδιοφόρου. Είναι ωοειδή-ελλειψοειδή, κυλινδρικά, διαστάσεων 5-12X2,2-3,5μm. Τα μακροκονίδια σχηματίζονται είτε στους κονιδιοφόρους είτε στα σποριοδόχεια (τύπου *Tubercularia*). Έχουν λεπτά τοιχώματα με 3-5 εγκάρσια χωρίσματα, οξυκατάληκτα άκρα και διαστάσεων 27-46X3-5 μm (των 3 χωρισμάτων), 35-60X3-5 μm(των 5 χωρισμάτων) και 50-66X3-5 μm(των 6-7 χωρισμάτων). Τα χλαμυδοσπόρια είναι επάκρια ή ενδιάμεσα και σχηματίζονται συνήθως μεμονωμένα και περιστασιακά κατά ζεύγη ή σε αλυσίδες.(Ελευθέριος Κ. Τζάμος 2007)



Εικόνα 17:μορφολογία του γένους *Fusarium*

1.11.1. *Fs-K (fusarium solani strain)*

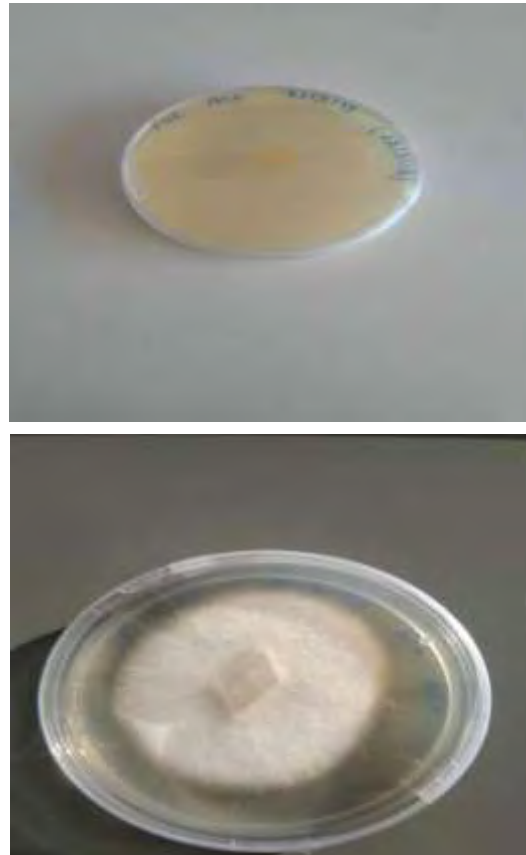
Ο μύκητας *Fusarium solani* ανήκει στο Βασίλειο: μύκητες, διαίρεση: *Eumycota* υποδιαίρεση: *Deuteromycotina*, κλάση: *Hypomycetes*, τάξη: *Tuberculariales*, οικογένεια: *Tuberculariaceae*, γένος: *Fusarium*, είδος: *Solani*

Το μυκητιακό στέλεχος *Fusarium solani* που κωδικοποιείται ως στέλεχος "*Fs-K*", το οποίο καταδεικνύει έντονη ανταγωνιστική δράση (υπό συνθήκες *in vitro*) κατά παθογόνων μυκήτων φυτών όπως *Oomycetes*, με την ικανότητα να αποικίσει στους ιστούς των ριζών, προστατεύοντας τα φυτά τομάτας από το παθογόνο φορέα *Fusarium oxysporum f.sp. radicis lycopersici* και το φύλλωμα από το παθογόνο *Septoria lycopersici*.

Το *Fusarium solani* είναι ένας μη παθογόνος νηματοειδής μύκητας που εντοπίζεται στο έδαφος και έχει την ικανότητα αλληλεπίδρασης με φυτικούς οργανισμούς. Απομονώθηκε από ένα επισχετικό για παθογόνα οργανικό υλικό (compost) κομποστ παθογόνων από υπολείμματα στέμφυλων και παραπροϊόντων ελαιουργίας. Έχει την ικανότητα να αναπτύσσεται σε πληθώρα πηγών άνθρακα, με βέλτιστο pH 5 και βέλτιστη θερμοκρασία τους 24°C.

Επιπλέον, το "*Fs-K*" στέλεχος είναι ένας ενδοφυτικός μικροοργανισμός που αναπτύσσεται στο φυτικό αγγειακό σύστημα και είναι αποτελεσματικό στην εξαιρετικά χαμηλή αναλογία ενοφθαλμισμού συγκέντρωση (κονίδια) 1:10 του παθογόνου ανταγωνιστή. Ακόμα, το στέλεχος "*Fs-K*" επιβιώνει για μεγάλες χρονικές περιόδους στα υποστρώματα ανάπτυξης φυτών, προκαλώντας έτσι μια ικανοποιητική επίδραση καταστολής έναντι παθογόνων που έχουν μεταφερθεί στο έδαφος.

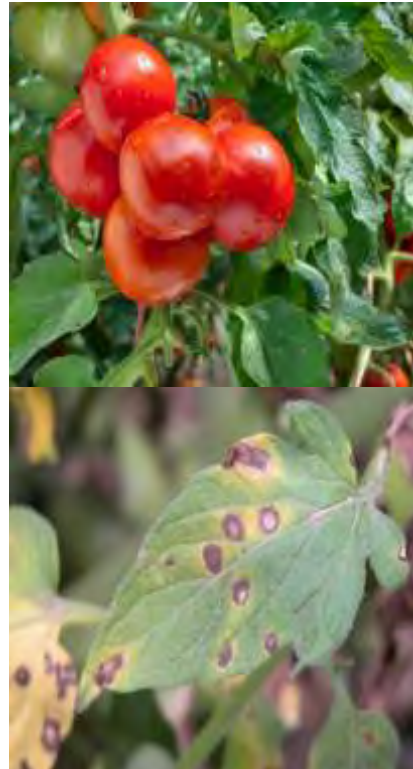
Φυτά εμβολιασμένα με τον μύκητα δεν ανέπτυξαν συμπτώματα ασθενειών. Οι παρατηρήσεις πραγματοποιήθηκαν κατά τη πειραματική περίοδο μέχρι το στάδιο της ανάπτυξης των καρπών της τομάτας. Ο ανταγωνιστικός μύκητας μπορεί να αναπτυχθεί ενδοφυτικά στα φυτά, όπως φάνηκε σε φυτά τομάτας. Ο μύκητας απομονώθηκε από τη ρίζα και το κορυφαίο ιστό αλλά ποτέ από τα ανώτερα μέρη του φυτού. (Papadopolou et al. 2011)



Εικόνα 18: μυκητιακό στέλεχος *Fusarium solani* πριν και μετά την εξάπλωση

1.11.2. Επαγόμενη προστασία μέσω του *Fusarium solani* (Fs-K)

Το στέλεχος *Fs-K* εμφανίζει την ικανότητα να επιφέρει στα φυτά ντομάτας ενεργοποίηση των μηχανισμών άμυνας έναντι του φυτοπαθογόνου μύκητα του φυλλώματος *Septoria lycopersici* (Olivain et al 1998). Ο μύκητας προστατεύει επίσης τοπικά το φυτό έναντι της προσβολής από το ριζομύκητα σήψης *Fusarium oxysporum* f.sp. *radicis-lycopersici* (FORL) (Kavroulakis et al 2007). Είναι πιθανόν ,το στέλεχος *Fs-K* να αποτελεί ένα στέλεχος το οποίο ανταγωνίζεται το παθογόνο FORL διεκδικώντας το ίδιο διαθέσιμο υπόστρωμα. Ίσως πάλι να ασκεί επίδραση στη βιωσιμότητα του παθογόνου και την ικανότητα βλάστησης των σπορίων του εξαιτίας της σύνθεσης μυκητοκτόνων ενώσεων. Έχουν αναφερθεί και άλλα στελέχη *Fusarium solani* τα οποία είχαν προστατευτική επίδραση απέναντι σε ένα από τα δύο αυτά παθογόνα αλλά κανένα δεν προστάτευε και από τα δυο όπως το στέλεχος *Fs-K*.



Εικόνα 19: Μόλυνση ντομάτας από *Septoria lycopersici*

Επίσης, το συγκεκριμένο στέλεχος χαρακτηρίζεται από ενδοφυτική ανάπτυξη και μάλιστα στο αγωγό σύστημα των φυτών. Μπορεί να απομονωθεί από όλα τα υπόγεια μέρη του φυτού αλλά όχι από τα υπέργεια όπου δεν αναπτύσσεται καθόλου. 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. Ο μηχανισμός μέσω του οποίου ασκείται η προστατευτική δράση του *Fs-K* σχετίζεται με το αιθυλένιο καθώς μεταλλαγμένες ντοματιές με λειψό σηματοδοτικό μονοπάτι αιθυλενίου δεν ήταν ανθεκτικά στα παθογόνα παρουσία του *Fs-K*, ενώ τα WT(wild type) είχαν αυξημένη ανθεκτικότητα σε σχέση με αυτά που δεν προστέθηκε μύκητας. Από την άλλη ο μηχανισμός δράσης του μύκητα δεν σχετίζεται με το γασμονικό οξύ καθώς μεταλλάγματα για τη σηματοδότηση γασμονικού προστατεύονταν επαρκώς. Επίσης, τα μεταλλάγματα για το γασμονικό προστατεύονταν καλύτερα απ' ότι τα WT, γεγονός που υποδηλώνει πως το γασμονικό έχει ανασταλτικό ρόλο στην ανάπτυξη του *F. solani* *Fs-K*. Αξίζει να σημειωθεί πως σε αντίθεση με άλλους φυτοπροστατευτικούς μικροοργανισμούς, το στέλεχος *Fs-K* δεν φαίνεται να προκαλεί την παραμικρή ζημιά στο φυτό-ξενιστή. Για να καταφέρει να επιβιώσει εντός του φυτού, ο μύκητας πρέπει να μπορεί να αντεπεξέλθει στα

αμυντικά συστήματα του. Ένας από τους κύριους δευτερογενείς μεταβολίτες στην ντομάτα είναι η α-τοματίνη που έχει γνωστή αντιμυκητιακή δράση (Ito et al, 2007, Zaccardelli et al 2011, Simons et al, 2006).

Ο μύκητας *Fs-K* είναι ικανός να διεισδύει στις ρίζες του φυτού και να αναπτύσσεται στο φλοιό της ρίζας 15 ημέρες μετά τον εμβολιασμό του όπως και να εισχωρεί στους ηθμαγγειώδεις σωλήνες διαβιώντας ως ενδόφυτο. Η ικανότητα αποικισμού των ηθμαγγειωδών σωλήνων ωστόσο, είναι κάτι που χαρακτηρίζει τους μύκητες που αποτελούν παθογόνα των ριζών και για το λόγο αυτό, δυνατότητα ενός ωφέλιμου στελέχους να αναπτύσσεται άφθονα και χωρίς να προκαλεί συμπτώματα ασθένειας στο φυτό δηλώνει μια ασυνήθιστη αλληλεπίδραση μεταξύ μικροβίου και φυτού. Προκειμένου να μπορέσει να αναπτυχθεί ο μύκητας εντός του φυτού πρέπει να μπορεί να εξουδετερώσει τον μεταβολίτη. Αυτό γίνεται μέσω ενός εξωκυτταρικού ενζύμου που ονομάζεται τοματινάση, το οποίο συναντάται και σε πολλά παθογόνα της ντομάτας. Πρόκειται για μια γλυκοσιδάση που διασπά την τοματίνη σε λιγότερο τοξικά παράγωγα. Οι τοματινάσες του *Fusarium solani* και του *Fusarium oxysporum* διασπούν την β1-συνδεδεμένη γαλακτόζη και απελευθερώνουν την β-lycotetraose και την τοματιδίνη (Roldan-Arjona et al 1999)

2.ΥΛΙΚΑ& ΜΕΘΟΔΟΙ

2.1.Παρασκευή Φυτικών Υποστρωμάτων

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

2.2.Θρεπτικό Διάλυμα για Μύκητες

Για την ανάπτυξη των μυκήτων χρησιμοποιήθηκε θρεπτικό υπόστρωμα Potato Dextrose Agar (PDA) που είναι το πλέον διαδεδομένο μέσο καλλιέργειας μυκήτων και βακτηρίων.



PDA(20'steralized)
1000ml water
400gr potato
20gr sucrose
17gr agar

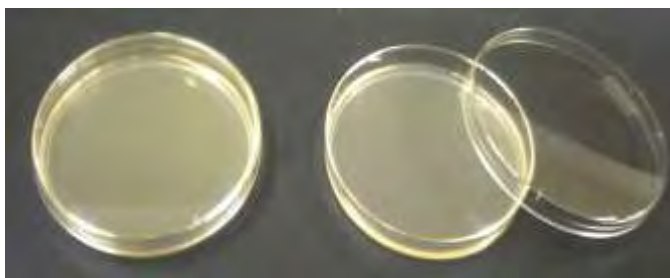
Πίνακας 1: Συστατικά του PDA

Εικόνα 23: Potato Dextrose Agar (PDA)

Αρχικά βράζουμε τις πατάτες για περίπου 20 λεπτά. Μόλις ολοκληρωθεί ο βρασμός τις σουρώνουμε με τουλουπάνι και συμπληρώνουμε όσο νερό έχει εξατμιστεί. Το θρεπτικό υλικό αφέθηκε να κρυώσει μέσα σε duran 250ml. Τέλος, παρασκευάζονται τρυβλία και τοποθετούνται στο ψυγείο.

2.3.Θρεπτικό Διάλυμα για Φυτά

Για την ανάπτυξη των σπόρων χρησιμοποιήθηκε water agar 0,8%. Το θρεπτικό υπόστρωμα αποστειρώθηκε και πριν το μοίρασμα στα τρυβλία αφέθηκε να κρυώσει.



Εικόνα 24: Water agar plates

2.4Απολύμανση 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 απολύμανση των σπόρων ακολουθήθηκε το παρακάτω πρωτόκολλο απολύμανσης του *L. japonicus*.

- 1) Μετράμε τους σπόρους θέλουμε 120 φυτά για το πείραμα
- 2) Σε κάθε tube προσθέτουμε 1ml H₂SO₄ για 10 λεπτά
- 3) Κάνουμε πλύσεις με dH₂O παγωμένο για 3 φορές
- 4) Προσθέτουμε 1ml BUFI για 20 λεπτά
- 5) Κάνουμε πλύσεις με ddH₂O μέχρι να φύγει η χλωρίνη(5-6 φορές)
- 6) Τυλίγουμε με αλουμινόχαρτο και τοποθετούμε στους 4 °C για μια μέρα
- 7) Τέλος τα βάζουμε στο θάλαμο ανάπτυξης για 5 ημέρες με το αλουμινόχαρτο

BUFI=20% χλωρίνη* +0,1% tween 20 (10μl)* για 5-10 λεπτά ($C_1 \cdot V_1 = C_2 \cdot V_2$)

2.5Μεταφορά Σπόρων *Lotus Japonicus*

- 1) Μεταφέρουμε τους σπόρους με προσοχή στα τρυβλία με το agar καλά απλωμένους για να μπορέσουν να αναπτυχθούν. (Στο laminar γίνεται η διαδικασία)
- 2) Τυλίγουμε με αλουμινόχαρτο τα τρυβλία και τα τοποθετούμε για μια μέρα στους 4°C
- 3) Τα μεταφέρουμε στο θάλαμο ανάπτυξης την επόμενη μέρα.
- 4) Τη πέμπτη μέρα βγάζουμε το αλουμινόχαρτο και αφήνουμε τα τρυβλία για 2 μέρες να αναπτυχθούν περισσότερο
- 5) Μεταφέρουμε τα φυτά σε γλάστρες (τρία φυτά σε κάθε γλάστρα)

2.6.Εμβολιασμός Με Το *Fusarium solani* Fs-K

Στο θάλαμο νηματικής ροής, αποστειρώνεται η λεπίδα στο γκαζάκι. Στη συνέχεια, κόβονται δύο με τρία τμήματα από το τριβλύο του μύκητα Fs-K, τα οποία ρίχνονται μέσα στο θρεπτικό διάλυμα για μύκητες (PDA) 100ml. Τέλος, τοποθετείται η κωνική φιάλη με το διάλυμα στους 25-26°C, στον αναδευτήρα, για 5 ημέρες, μέχρι να αναπτυχθούν.



Εικόνα 25: Ο μύκητας Fsk μέσα σε διάλυμα PDB πριν και μετά την εξάπλωση

2.7.Συλλογή Κονιδίων

Για να συλλεχθούν τα κονίδια θα πρέπει να αποστειρωθούν:

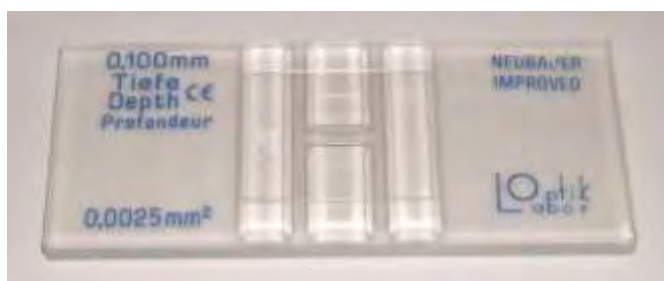
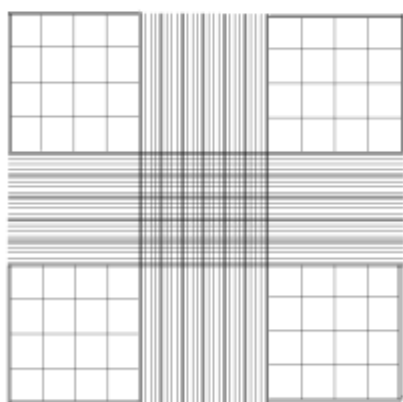
- δυο γυάλινα χωνία μικρά
- δυο φάλκον (50ml)
- δυο κομμάτια τουλουπάνι
- NaCl περιεκτικότητας 0,85%
- Δυο γυάλινες κονικές φιάλες 250 ml
- Δυο λαβίδες
- Γκαζάκι

Διαδικασία:

Σε ένα φάλλον βάζουμε το γυάλινο χωνί και μέσα στο χωνί τοποθετούμε το τουλουπάνι το χρησιμοποιούμε ώστε να συλλέξεις μόνο τα κονίδια που είναι τα αναπαραγωγικά κύτταρα του μύκητα. Ρίχνουμε μέσα το διάλυμα με τον μύκητα 50ml περίπου. Αφαιρούμε το χωνί στο οποίο έχει μείνει το μυκήλιο του μύκητα και βάζουμε το φάλλον με το υγρό στη φυγόκεντρο. Η φυγοκέντρωση γίνεται : στους 16 °C, στις 6500 στροφές για 5 min. Μετά την φυγοκέντρωση απομακρύνουμε το υγρό και αφήνουμε τα κονίδια στον πάτο του φάλλον. Στη συνέχεια ρίχνουμε και το υπόλοιπο διάλυμα, το οποίο φυγοκεντρούμε, δηλαδή γίνεται δύο φορές φυγοκέντρωση από 50ml στο φάλλον. Την δεύτερη φορά απομακρύνουμε το υγρό από το φάλλον με την πιπέτα. Ύστερα βάζουμε NaCl (0,85%) και κάνουμε πάλι φυγοκέντρωση. Τέλος, αφαιρούμε το θρεπτικό με την πιπέτα και αφήνουμε κονίδια και μυκήλιο. Το μεταφέρουμε σε errendorf 1ml όπου προσθέτουμε περίπου 4ml NaCl και το αναδεύουμε για να ομογενοποιηθεί. Εμβολιάζουμε δυο τρυβλία με 2μl δείγματος με θρεπτικό διάλυμα PDA για να δούμε αν υπάρχει κάποια επιμόλυνση.

2.7.1.Μέτρηση Κονιδίων

Για να μετρήσουμε τα κονίδια θα πρέπει να αραιώσουμε το τελικό διάλυμα. Δηλαδή θα κάνουμε αραιώση με τελική συγκέντρωση 10^2 ώστε να μολύνουμε όλα τα φυτά με την ίδια συγκέντρωση. Θα πάρουμε 10μl από το δείγμα μας και 990μl αποστειρωμένο νερό (H₂O). Στη συνέχεια, στο μικροσκόπιο χρησιμοποιώντας την πλάκα NEUBAUER, μετράμε τα κονίδια (μετρώντας 4 κουτάκια δεξιά και 4 κουτάκια αριστερά, που έχει η πλάκα και από τη κάτω μεριά από αυτά που δεν είναι πάνω στη διπλή γραμμή.) Το θρεπτικό διάλυμα του μύκητα που μας περίσσεψε μπορεί να διατηρηθεί στο ψυγείο στους 4 °C.



Εικόνα 26: πλάκα Neubauer

Μετρήσεις κονιδίων																	
Κονίδια ανα τετράγωνο																	Άθροισμα
+Fe/+FsK	4	10	10	5	7	10	9	5	7	6	6	11	7	11	5	10	123
-Fe/+FsK	6	7	7	6	5	6	5	8	12	6	9	13	11	3	5	7	116
+Fe/-FsK	7	6	13	10	11	12	9	7	9	7	7	12	10	4	12	15	151
-Fe/-FsK	9	8	6	8	8	13	8	4	9	8	10	6	6	13	11	5	132

Πίνακας 2: Μέτρηση κονιδίων

- **Μέσος Όρος** (άθροισμα αριθμών / πλήθος αριθμών)
- **M.O.**=123+151+116+132=522/4=130,5 κονίδια
- $130,5 \cdot 1 = 10^4 \cdot x \Rightarrow x = 130,5 \cdot 10^4$ κονίδια /ml
- **Df**=500(η αραιώση από το αρχικό δείγμα ή από αυτό που ήδη αραιώσαμε)
- **C**=130, 5*10⁴*500=65,2*10⁷ κονίδια /ml

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

$$C1 V1 = C2 V2$$

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

C2 = τελική συγκέντρωση του διαλύματος

V1= αρχικός όγκος

V2= τελικός όγκος

Θέλουμε CTEΛ = 102 / ml κονίδια

VTEΛ = 20ml (= φυτά x 1ml)

X = 5• 102 κονίδια

$$C1 V1 = C2 V2 \Rightarrow$$

Οπότε **VAPX** = 0,76ml ή VAPX =760 μL εμβολίου

Συμπέρασμα: Σε 20ml αποστειρωμένο νερό θα προσθέσουμε 760 μL από το διάλυμα του Fs-K, και θα εμβολιάσουμε με 1ml κάθε ρίζα του φυτού.

2.8.Φύτεμα Και Πότισμα Με Θρεπτικό Διάλυμα

Για την φύτευση των φυτών *L. japonicus*, αφού αναπτύχθηκε το ριζικό σύστημα, χρησιμοποιήθηκε βερμικουλίτης και άμμος 1/3 το οποίο και αποστειρώθηκε. Ο βερμικουλίτης αποτελεί, εξαιρετικά αποτελεσματικό υπόστρωμα για τα φυτά, είναι ένυδρο φυλλοπυριτικό ορυκτό, η μίκα (μαρμαρυγία), το οποίο εντάσσεται στην ομάδα των αργίλων και συγκεκριμένα στις κρυσταλλικές αργίλους με φυλλοειδή δομή. Χαρακτηριστικό του είναι πως περιέχει παγιδευμένο νερό ανάμεσα στις στρώσεις των φυλλιδίων του. Ο βερμικουλίτης έχει χαμηλή πυκνότητα, μικρή θερμοαγωγιμότητα, υψηλή θερμική αντίσταση, Υψηλή διαπνοή, είναι ανόργανο (δεν επηρεάζεται από φως και βροχή), δεν περιέχει αμίαντο, δεν είναι τοξικό, συγκρατεί αρκετές φορές το ίδιο του το βάρος σε νερό και δίνει στο υπόστρωμα μια ευάερη δομή. Μετά το φύτευμα και τον εμβολιασμό των

φυτών του *L. jaronicus* με το διάλυμα του ενδοφυτικού μύκητα *Fs-K* σε κάθε ρίζα του φυτού, έπεται το πότισμα. Όπου ποτίζαμε τα φυτά ανά δύο μέρες με θρεπτικό διάλυμα ανάπτυξης του φυτικού ιστού Hoagland με και χωρίς Fe EDTA εναλλάξ με νερό.

Hoagland's Solution(1000ml)					
Component	Stock Solution	25%	50%	75%	100%
MgSO ₄	1M	500mL/L	1mL/L	1,5mL/L	2mL/L
KH ₂ PO ₄	1M	250mL/L	500mL/L	0,75mL/L	1mL/L
FeEDTA	100mM	250mL/L	500mL/L	0,75mL/L	1mL/L
KNO ₃	20g/100mL	2,5mL/L	2,5mL/L	3,75mL/L	5mL/L
Ca(NO ₃) ₂ *4H ₂ O	2,36gr/100mL	2,5mL/L	2,5mL/L	3,75mL/L	5mL/L
Microelements	1mL/L	250mL/L	500mL/L	0,75mL/L	1mL/L

Πίνακας 3: Συστατικά του Hoagland's Solution

2.9.Απομόνωση Του Ενδοφυτικού Στελέχους *Fs-K*

Τα φυτά εμβολιαστήκαν με το μύκητα τη μέρα που τοποθετηθήκαν στο έδαφος. Έγιναν δυο δειγματοληψίες τη πρώτη μετά από 17 ημέρες και την δεύτερη μετά από 31 ημέρες. Ο *Fs-K* έχει την ικανότητα να εισέρχεται και να εξέρχεται από αυτές οπότε ακολουθούμε την εξής διαδικασία για να το διαπιστώσουμε. Έχοντας 10 γλαστράκια με 3 φυτά στη κάθε επανάληψη, δηλαδή 40 γλαστράκια συνολικά. Αφού βγάλαμε προσεκτικά τα φυτά από το έδαφος, τα τοποθετήσαμε σε ένα μπλ με απιονισμένο νερό και τα ξεπλύνουμε καλά, προσπαθώντας να μην κοπούν οι ρίζες και να αφαιρέσουμε όλες τις επιπλέον ύλες. Στη συνέχεια, τα τοποθετήσαμε σε ένα διηθητικό χαρτί, όπου απομακρύνουμε το υπέργειο τμήμα αφήνοντας μόνο τις ρίζες. Ζυγίσαμε τις ρίζες και τις τοποθετήσαμε σε *herpordif* και τα παγώσαμε σε υγρό άζωτο και μόλις τελειώσαμε τη διαδικασία τα τοποθετήσαμε στους -80°C.

2.10.Απομόνωση DNA Με Τη Χρήση Της Μεθόδου CTAB

Η απομόνωση του DNA έγινε με τη μέθοδο CTAB. Αρχικά έγινε η λειοτρίβιση του ιστού σε υγρό άζωτο (στην περίπτωση αυτή είναι 10mg από τις ρίζες των φυτών) με τη χρήση αποστειρωμένου εμβόλου. Παράλληλα προθερμάνθηκε το διάλυμα CTAB buffer(100mM Tris-Cl pH=8.0, 20mM EDTA pH=8, 1,4M NaCl, 2% w/v CTAB, 1% w/v PVP 40000) στους 65° C στο υδατόλουτρο. Σε κάθε tube προστέθηκαν 100μl CTAB buffer και 1μl μερκαπτοαιθανόλης και επωάστηκαν για 15 λεπτά στους 65°C στο υδατόλουτρο. Στην συνέχεια, προστέθηκαν 150μl χλωροφόρμιο και 1:25 ισοαμυλική αλκοόλη και αναμιχτήκαν με vortex. Έγινε φυγοκέντρηση για 5 λεπτά στις 13.000 rpm. Έπειτα, το υδατικό υπερκείμενο μεταφέρθηκε σε νέο tube και προστέθηκε σε αυτό 0,7 vol ισοπροπανόλης. Το μίγμα αναδεύτηκε ήπια και επωάστηκε για

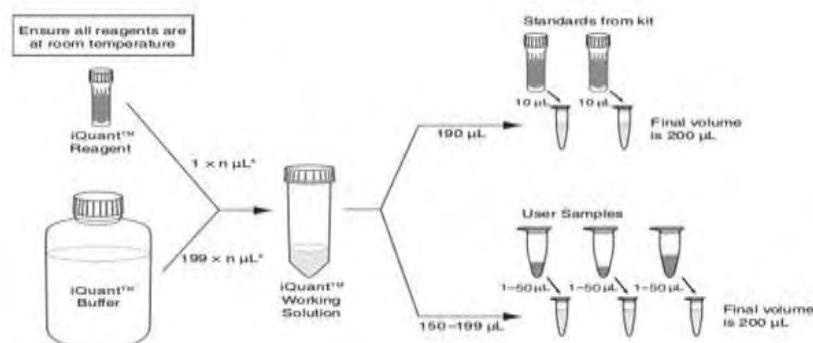
10 λεπτά σε θερμοκρασία δωματίου. Ακολούθησε φυγοκέντρηση για 15 λεπτά στις 13.000 rpm. Αφαιρέθηκε, έπειτα, το υπερκείμενο και προστέθηκαν 0,5ml παγωμένης αιθανόλης 70%. Φυγοκέντρηση για 5 λεπτά στις μέγιστες στροφές αφαιρέθηκε το διάλυμα και ξηράθηκε στους 50⁰ C για 15 λεπτά. Επαναδιαλύθηκε το DNA σε 15μl ddH₂O +RNase, επωάστηκε στο πάγο για 10 λεπτά . Ακολούθως έγινε στέγνωμα του pellet που περιείχε το απομονωμένο DNA σε 50⁰C για 15 λεπτά. Η επαναδιάλυση του pellet έγινε σε 15μl υπερκάθολου αποστειρωμένου H₂O με RNase (1μl RNase σε 50μl ddH₂O). Επωάθηκε στο πάγο για 10 λεπτά, vortex και quick spin για 10 δευτερόλεπτα και διατηρήθηκε στους -20⁰C.

2.11. Ποσοτικοποίηση DNA Qubit Working Solution

Το σύστημα Qubit σχεδιάστηκε ειδικά για τον ποσοτικό προσδιορισμό των νουκλεϊνικών οξέων και των πρωτεϊνών χρησιμοποιώντας μικρά ποσότητες προϊόντος PCR. Ο φθορίζων ανιχνευτής (αντιδραστήριο Qubit) παρεμβάλλεται διπλής έλικας DNA (dsDNA) και φθορίζει μόνο μετά από παρεμβολή. Άλλες μέθοδοι ποσοτικού προσδιορισμού DNA βασίζονται στη φασματοσκοπία UV-Vis για την ποσοτικοποίηση των νουκλεϊνικών οξέων. Ωστόσο, είναι πολύ λιγότερο συγκεκριμένες το dsDNA, το RNA και οι πρωτεΐνες απορροφούν αλληλεπικαλυπτόμενα μήκη κύματος. Από το φθοροφόρο φθορίζει μόνο μετά από παρεμβαλλόμενο dsDNA, οι συγκεντρώσεις DNA προσδιορίζονται με το Qubit συστήματος είναι πολύ πιο ακριβείς από ό, τι με άλλες μεθόδους.

Κάθε kit προσδιορισμού Qubit παρέχει συγκεντρωμένο αντιδραστήριο ανάλυσης, ρυθμιστικό διάλυμα αραιώσης και προδιαμορφωμένα πρότυπα. Αραιώσαμε το αντιδραστήριο χρησιμοποιώντας το παρεχόμενο ρυθμιστικό διάλυμα, προσθέσαμε το δείγμα (οποιοσδήποτε όγκος μεταξύ 1 μL και 20 μL) εμείς προσθέσαμε 2μL, κάναμε vortex για 2 λεπτά και τα αφήσαμε για 2 λεπτά σε θερμοκρασία δωματίου και διαβάσαμε τη συγκέντρωση στο Fluorometer Qubit. Οι δοκιμασίες διεξάγονται σε θερμοκρασία δωματίου.

- Qubit reagent+ Qubit buffer=1xn μL+ 199xn μL= Qubit working solution
 1. 190μL(Qubit working solution)+10μL (Standards from kit)= final volume is 200 μL
 2. 180-199μL(Qubit working solution)+1-20μL(user samples)= final volume is 200 μL



Εικόνα 27: Διάγραμμα κατασκευαστή του πρωτοκόλλου Qubit

2.13. KAPA SYRB FAST qPCR

Η μέτρηση των επιπέδων έκφρασης του γονιδίου *Fs-K* έγινε με τη μέθοδο της ημιποσοτικής PCR πραγματικού χρόνου (RT-qPCR).

Η real-time PCR ή PCR πραγματικού χρόνου είναι μία ποσοτική αντίδραση PCR κατά την οποία η ενίσχυση του DNA στόχου και η ανίχνευση του προϊόντος γίνονται ταυτόχρονα στο ίδιο σωληνάριο, διότι το προϊόν που παράγεται συνδέεται με τη φθορίζουσα χρωστική SYBR Green που ανιχνεύεται από το οπτικό σύστημα του ειδικού κυκλοποιητή που χρησιμοποιείται στη real-time PCR. Με το όργανο αυτό καταγράφεται η κινητική της ενίσχυσης του DNA από την ένταση του σήματος του φθορισμού που αντανακλά το ποσό του συντιθέμενου νέου DNA. Έτσι μπορεί να μετρηθεί επακριβώς το ποσό του DNA. Ο προσδιορισμός της ποσότητας των παραγόμενων προϊόντων μπορεί να γίνει είτε με σχετική ποσοτικοποίηση μετρώντας παράλληλα και τη συγκέντρωση ενός γονιδίου αναφοράς είτε απόλυτα με τη χρήση πρότυπης καμπύλης.

Ο κλασματικός αριθμός των κύκλων PCR που απαιτούνται για να παράγουν αρκετό σήμα φθορίζουσας χρωστικής που θα φθάσει σε αυτό το κατώφλι χαρακτηρίζεται ως κατώφλι κύκλου (cycle threshold, Ct). Στόχος αυτής της πρώτης αντίδρασης qPCR είναι εκτός από τον έλεγχο της ποιότητας είναι και η επεξεργασία των δειγμάτων ώστε να έχουν όλα τον ίδιο περίπου αριθμό Ct (~24). Τα αντιδραστήρια που χρησιμοποιήθηκαν περιείχονταν στο kit KAPA SYBR® FAST Master Mix 2X qPCR της εταιρίας KAPABIOSYSTEMS. Σε κάθε αντίδραση προστέθηκαν 1μL DNA μήτρας και ο τελικός όγκος της αντίδρασης ήταν 10μL. Οι συγκεντρώσεις των αντιδρώντων προστέθηκαν με βάση τις οδηγίες του κατασκευαστή. Το θερμοκρασιακό πρόγραμμα που έλαβε χώρα η αντίδραση σχεδιάστηκε με βάση τις οδηγίες του κατασκευαστή, θέτοντας ως Tm τους 58°C και επανάληψη των βημάτων της αποδιάταξης (95°C για 3'), υβριδισμού των εκκινητών (95°C για 15'') και επιμήκυνσης (58°C για 20'') για 45 κύκλους.

Η αντίδραση της PCR περιλαμβάνει τα εξής:

Αντιδραστήρια PCR	Συγκέντρωση	Όγκος
SYBR		5μl
Forward primer	10μM	0,2μl
Reverse primer	10μM	0,2μl
RNase free-water		3,6μl

Πίνακας 4: Συστατικά qPCR Buffer

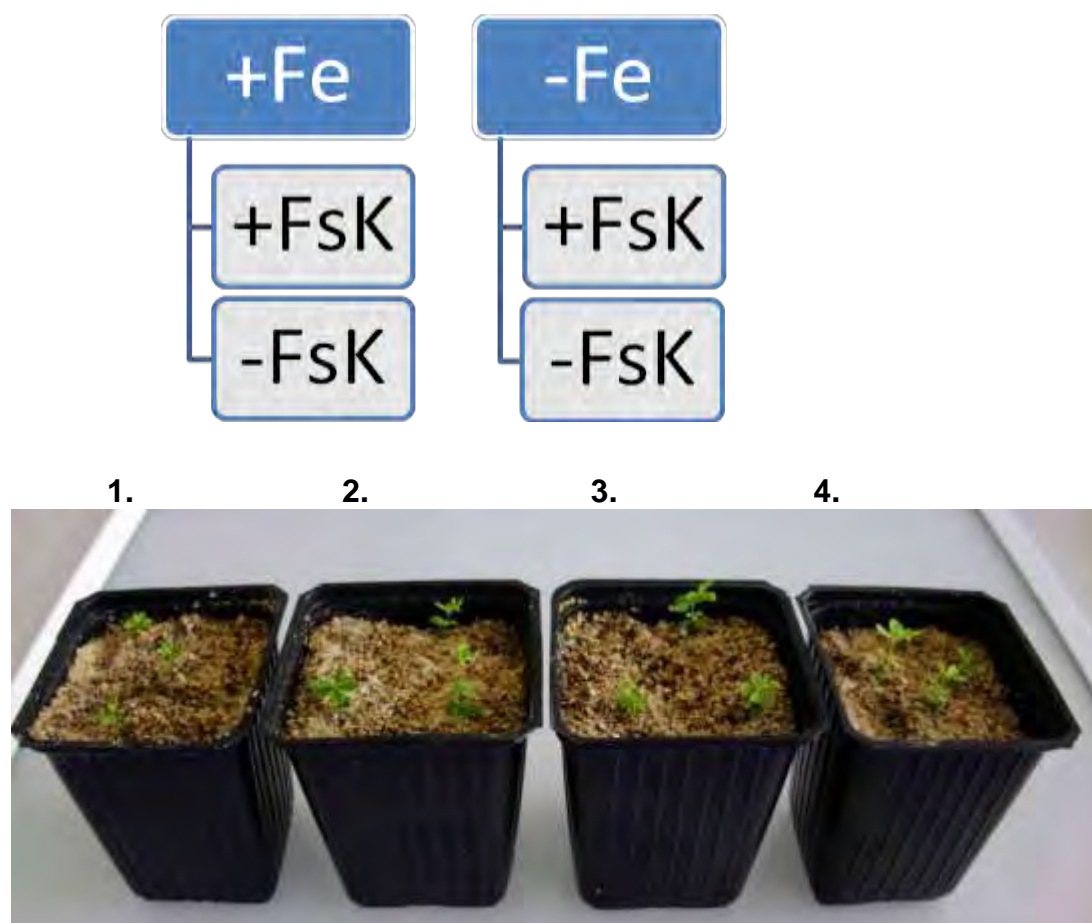
Πολλαπλασιάζουμε τον όγκο με τα δείγματα για τη δημιουργία του Buffer .

3. ΑΠΟΤΕΛΕΣΜΑΤΑ

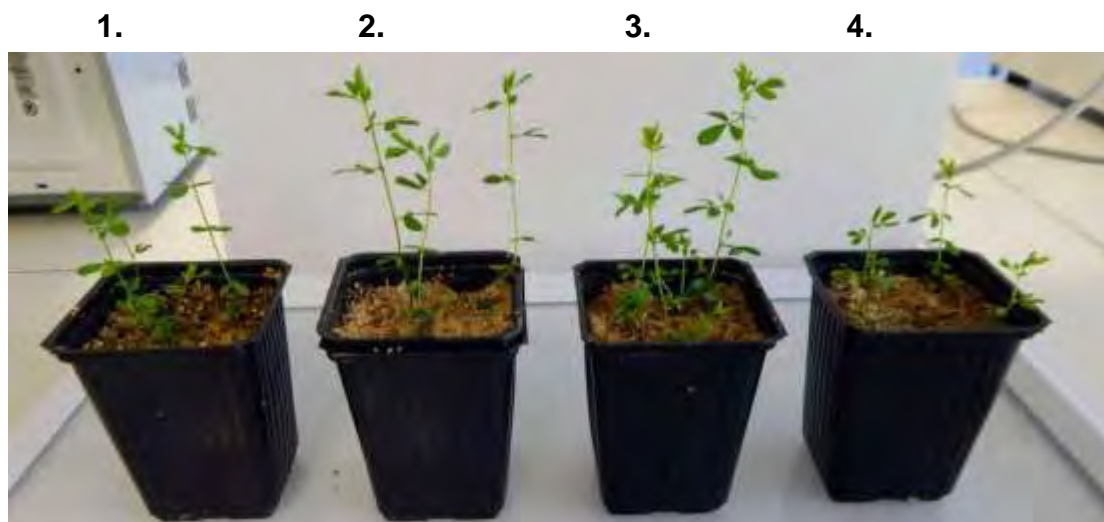
3.1 Ανάπτυξη *Lotus japonicus*

Τα φυτά του *Lotus japonicus* χωρίστηκαν σε τέσσερις κατηγορίες. Αρχικά χωρίστηκαν σε δυο μεγάλες κατηγορίες σε αυτά που ποτίζονταν με Hogland's που περιείχε σίδηρο και σε αυτά που ποτίζονταν με διάλυμα που δεν περιείχε σίδηρο και αυτά αντίστοιχα χωρίστηκαν σε δύο κατηγορίες σε φυτά εμβολιασμένα και μη εμβολιασμένα με Fs-K. (σχήμα 1) Αφού ολοκληρώθηκε η διαδικασία της φύτευσης τα φυτά αφέθηκαν στο θάλαμο ανάπτυξης για 17 ημέρες και για 31 ημέρες και παρήχθησαν οι εξής φωτογραφίες. Στις 17 ημέρες δεν φαίνεται κάποια σημαντική διαφορά στο υπέργειο τμήμα των φυτών. Στις 31 ημέρες όμως φαίνεται ότι υπάρχει μεγαλύτερη ανάπτυξη στη 2,3 ομάδα της εικόνας 28.

Σχήμα 1:



Εικόνα 28: Ανάπτυξη φυτών μετά από 17 ημέρες 1. +Fe/+FsK, 2. -Fe/+FsK, 3.+Fe/-FsK, 4. -Fe/-FsK



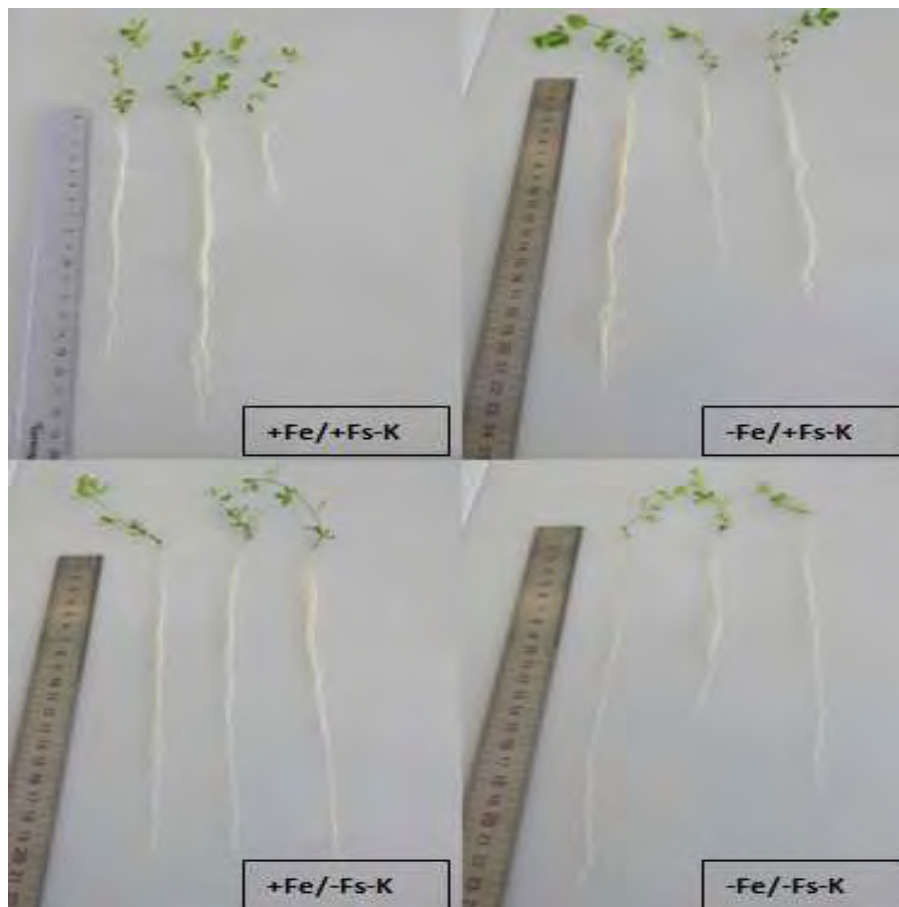
Εικόνα 29: Ανάπτυξη φυτών μετά από 31 ημέρες 1. +Fe/+FsK, 2. +Fe/-FsK, 3. -Fe/+FsK, 4. -Fe/-FsK

Κατά τη διάρκεια της δειγματοληψίας των φυτών *Lotus japonicus* από το έδαφος, μετρήσαμε το μήκος της ρίζας των φυτών και το βάρος στις τέσσερις διαφορετικές κατηγορίες που δημιουργήσαμε. Να σημειωθεί ότι κάθε βιολογική επανάληψη αποτελείται από τρία φυτά. Στις εικόνες παρακάτω φαίνεται η διαφορά ανάπτυξης των φυτών.

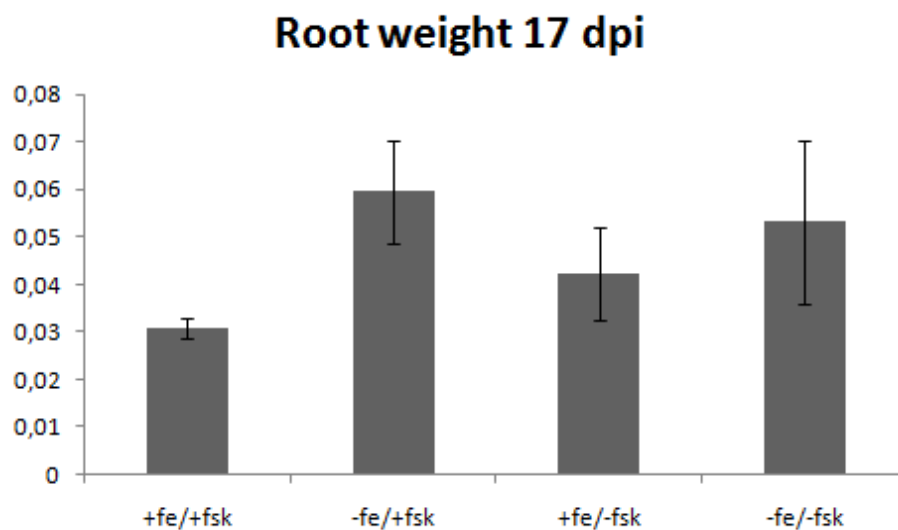
- 17 ημέρες μετά τη μόλυνση



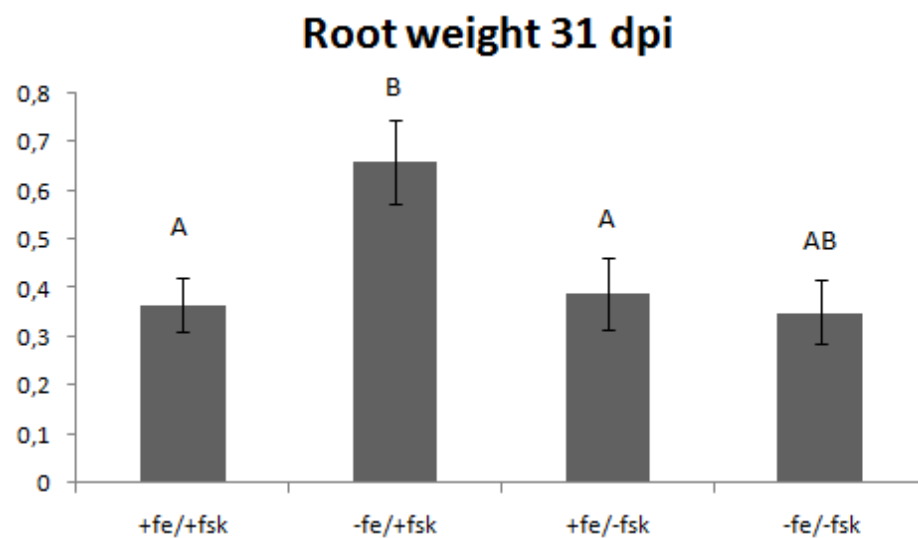
- 31 ημέρες μετά τη μόλυνση



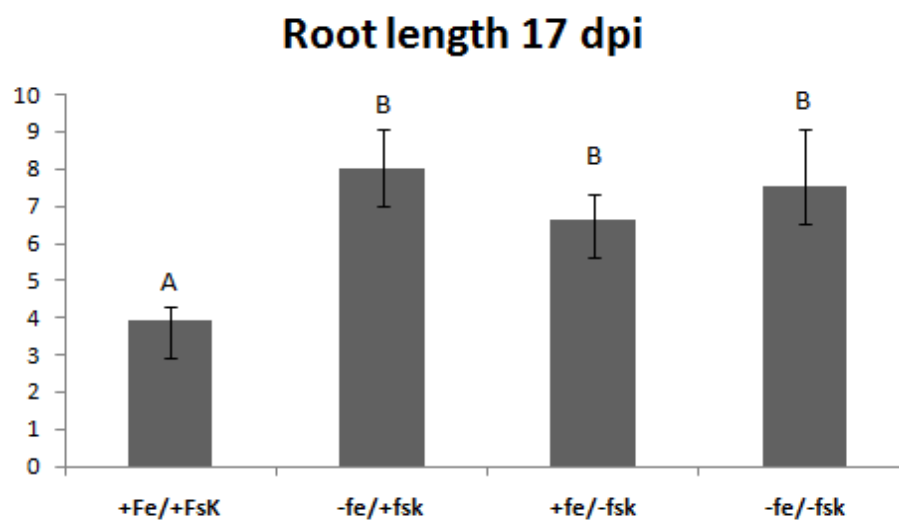
Στους παρακάτω πίνακες παρουσιάζονται αναλυτικά οι μετρήσεις της ρίζας του φυτού.



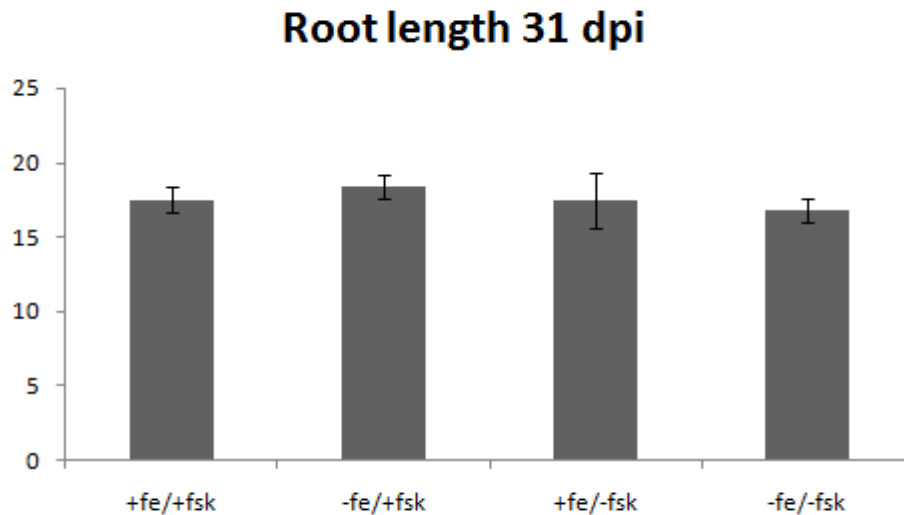
Πίνακας 5: Μέσες τιμές του βάρους της ρίζας σε 15 φυτά *L.Japonicus* 17 ημέρες μετά τη μόλυνση στις τέσσερις διαφορετικές κατηγορίες



Πίνακας 6: Μέσες τιμές του βάρους της ρίζας σε 15 φυτά *L.Japonicus* 31 ημέρες μετά τη μόλυνση στις τέσσερις διαφορετικές κατηγορίες



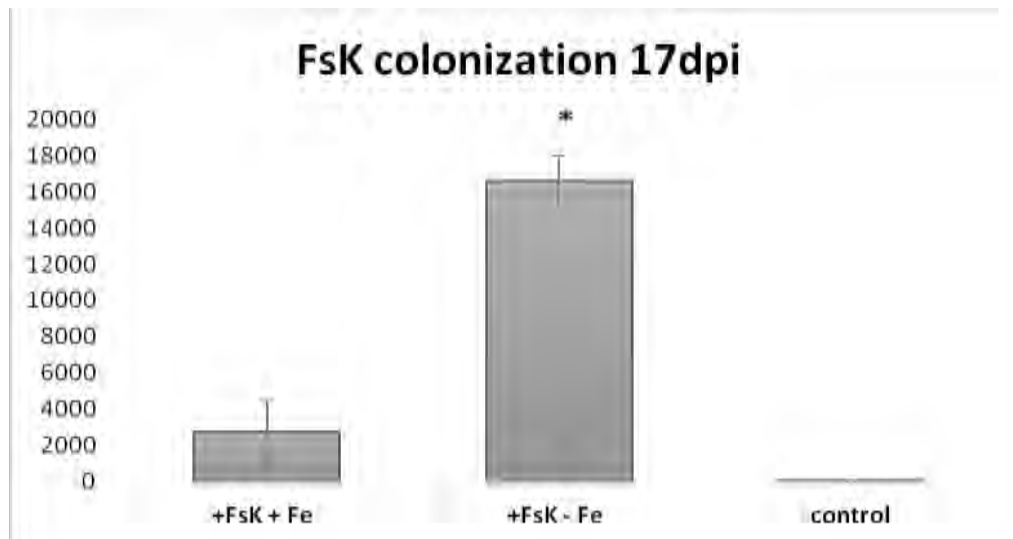
Πίνακας 7: Μέσες τιμές του μήκους της ρίζας σε 15 φυτά *L.Japonicus* 17 ημέρες μετά τη μόλυνση στις τέσσερις διαφορετικές κατηγορίες



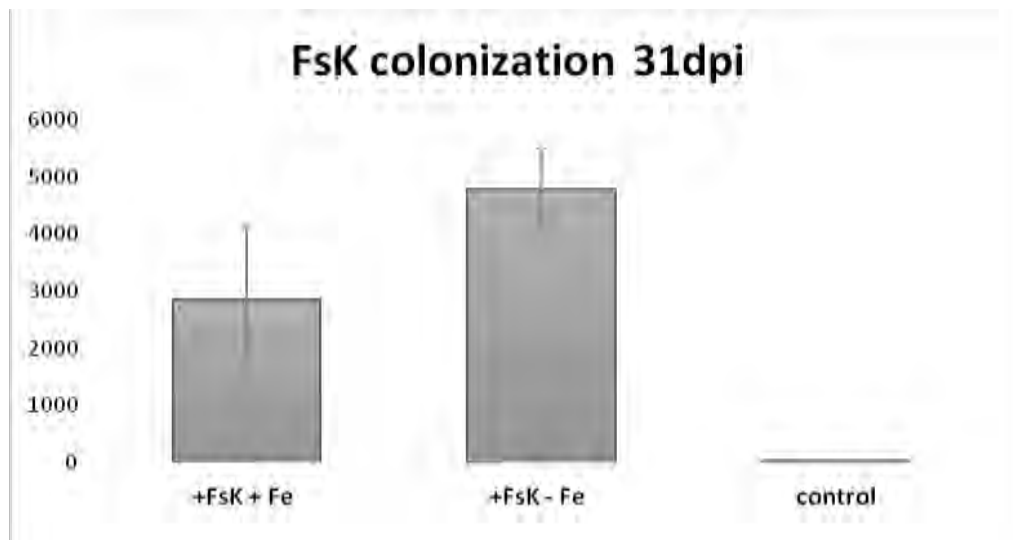
Πίνακας 8: Μέσες τιμές του μήκους της ρίζας σε 15 φυτά *L. japonicus* 31 ημέρες μετά τη μόλυνση στις τέσσερις διαφορετικές κατηγορίες

3.2 Έλεγχος Του Αποικισμού Του *Fs-K* Με Τη Μέθοδο QPCR

Τέλος, ο έλεγχος του αποικισμού του *Fs-K* στους ιστούς τις ρίζας των φυτών που εμβολιάστηκαν με τον μύκητα επιβεβαιώθηκε με τη μέθοδο της Real-Time PCR. Η ανάλυση επιβεβαίωσε την ανάπτυξη του μύκητα στα φυτά.



Πίνακας 9: Επίδραση του Fe στον αποικισμό του μύκητα *Fs-K* στους ιστούς της ρίζας του φυτού *Lotus japonicus* στις 17 ημέρες.



Πίνακας 10: Επίδραση του Fe στον αποικισμό του μύκητα Fs-K στους ιστούς της ρίζας του φυτού *Lotus japonicus* στις 31 ημέρες.

4.ΣΥΖΗΤΗΣΗ

Στην παρούσα διπλωματική εργασία μελετήθηκε η επίδραση του ενδοφυτικού μύκητα *Fusarium solani*, στελέχους *Fs-K*, στην ανάπτυξη του ψυχανθούς *Lotus japonicus* υπό συνθήκες τροφοπενίας σιδήρου. Αρκετές μελέτες έχουν διερευνήσει την επίδραση της μυκοριζικής συμβίωσης στην απορρόφηση Fe των φυτών. (Cress et al., 1986, Raju et al., 1990, Treeby, 1992; Medeiros et al., 1993; Clark and Zeto, 1996. El-Ghandour et al., 1996; Al-Karaki και Clark, 1998. Caris et al., 1998; Purakayastha et al., 1998; Pirazzi et al, 1999; Wang et al., 2007; Suri et al., 2011; Amanullah et al., 2012; Labidi et al., 2012).

Στόχος της εργασίας ήταν να εξετάσει αν ο *Fs-K* ενισχύει την ανάπτυξη του φυτού ακόμα και σε τροφοπενία Fe. Τα φυτά του *Lotus japonicus* χωρίστηκαν σε τέσσερις κατηγορίες. Αρχικά χωρίστηκαν σε δυο μεγάλες κατηγορίες σε αυτά που ποτίζονταν με Hogland's που περιείχε σίδηρο και σε αυτά που ποτίζονταν με διάλυμα που δεν περιείχε σίδηρο για να δούμε πως επηρεάζονται τα φυτά σε κατάσταση τροφοπενία σιδήρου. Έπειτα, χωρίστηκαν σε δύο υποκατηγορίες σε φυτά εμβολιασμένα και μη εμβολιασμένα με *Fs-K* για να δούμε τον τρόπο που ο μύκητας επηρεάζει τα φυτά. Έγιναν δυο δειγματοληψίες όπου καταγράφηκε το μήκος και το βάρος της ρίζας των φυτών. Η καταγραφή των φαινοτυπικών χαρακτηριστικών έγινε 17 και 31 ημέρες μετά τον εμβολιασμό με το μύκητα.

Μελετήθηκε λοιπόν, η σχετική έκφραση του DNA του γονιδίου *Fs-K* στα φυτά που εμβολιάστηκαν και επιβεβαιώθηκε με τη μέθοδο της Real-Time PCR. Η ανάλυση επιβεβαίωσε την ανάπτυξη του μύκητα στα φυτά. Μεγαλύτερη ποσότητα είδαμε στη πρώτη δειγματοληψία στις 17 ημέρες ενώ στις 31 ημέρες έχει μειωθεί η ποσότητα του μύκητα στους ιστούς του φυτού, πιθανόν γιατί το φυτό έχει αρχίσει να τον αφομοιώνει. Τα φυτά που δεν ποτίζονταν με Fe αλλά ήταν εμβολιασμένα με τον μύκητα *Fs-K* είχαν μεγαλύτερο μήκος και βάρος ρίζας. Αυτό πιθανόν συμβαίνει γιατί το φυτό αυξάνει τα μόρια αιθυλενίου και κυτοκινίνης αντιδρώντας στην έλλειψη σιδήρου με αποτέλεσμα να αναπτύσσονται περισσότερο οι ρίζες με τη βοήθεια του μύκητα. (Seguela et al., 2008). Πολλές μελέτες έχουν δείξει, ότι η εφαρμογή των ριζοβακτηρίων όπως αντίστοιχα και των μυκορριζών, βελτιώνουν την απορρόφηση φυτικών στοιχείων από τα φυτά όπως το άζωτο και Fe (Dey et al., 2004, Zhang et al., 2009, Pii et al 2015)

Οι ενδοφυτικοί μύκητες έχει αποδειχθεί ότι προστατεύουν τα φυτά από τις βιοτικές καταπονήσεις ενώ κάποιοι μπορεί επίσης να βελτιώσουν την ανεκτικότητα των φυτών σε αβιοτικές πιέσεις. Ο *Fs-K* βελτίωσε την ανάπτυξη των φυτών υπό έλλειψη Fe. Τα φυτά που εμβολιάστηκαν με τον μύκητα εμφάνισαν αξιοσημείωτα καλύτερη ανάπτυξη από ότι τα μη εμβολιασμένα φυτά. Ένας πιθανός μηχανισμός μέσω του οποίου επιτυγχάνεται η ενίσχυση

της ανάπτυξης του φυτού είναι ενίσχυση της αποτελεσματικότητας της φωτοσύνθεσης μέσω της αύξησης της χλωροφύλλης και την προαγωγή της ανάπτυξης χλωροπλαστών. Η ανεπάρκεια Fe προκαλεί συχνά χλώρωση και διακοπή της ανάπτυξης των χλωροπλαστών (Abadía et al., 2011). Όπως σε αντίστοιχες μελέτες, ο εμβολιασμός με το στέλεχος BFKC01 αύξησε τη χλωροφύλλη σε φυτά *Arabidopsis* που καλλιεργήθηκαν σε αλκαλικές συνθήκες και εμφάνισαν σοβαρά χλωρωτικά συμπτώματα, κιτρίνισμα φύλλων και χαμηλή περιεκτικότητα σε χλωροφύλλη. (Zhou C et al., 2016) Επίσης, ο εμβολιασμός με το στέλεχος GB03 που διεγείρει την απόκτηση σιδήρου και αυξάνει την περιεκτικότητα σε σίδηρο στα φυτά, πράγμα που συμβάλει στη διέγερση της φωτοσύνθεσης των φυτών (Zhang et al., 2009). Παρόμοιο φαινόμενο έχει παρατηρηθεί σε άλλα είδη φυτών όπως ο αραβόσιτος και το ρύζι που αναπτύσσεται υπό έλλειψη Fe (Briat et al., 2007; Chen et al., 2015).

Η αρχική υπόθεση επιβεβαιώθηκε από τα αποτελέσματα της εργασίας, υποδεικνύοντας την συμμετοχή του στελέχους Fs-K στην καλύτερη ανάπτυξη των φυτών και σε έλλειψη σιδήρου. Τα ευρήματα που αναφέρθηκαν από πρόσφατες μελέτες έχουν αποκαλύψει νέους δρόμους για περαιτέρω διερεύνηση αντιμετώπισης της έλλειψης Fe. Μελλοντική ερευνητική εργασία περιλαμβάνει τον έλεγχο των επιπέδων των γονιδίων που εμπλέκονται στην ομοίωση του σιδήρου. Επίσης, είναι αναγκαία η περαιτέρω διερεύνηση των διαφορών στις ιδιότητες του εδάφους και τα περιβάλλοντα ανάπτυξης των φυτών.

5.ΒΙΒΛΙΟΓΡΑΦΙΑ

1. Abadía, J., Vázquez, S., Rellán-Alvarez, R., El-Jendoubi, H., Abadía, A., Álvarez-Fernández, A., López-Millán, A.F., 2011. Towards a knowledge-based correction of iron chlorosis. *Plant Physiol. Biochem.* 49, 471e482.
2. Ainsworth, C., Sparrow, K., Sussman (EDS). *The Fungi, an advanced treatise*. Academic Press, New York, 1973
3. Amanullah MM, Archana J, Manoharan S, Subramanian KS. 2012. Influence of iron and AM inoculation on metabolically active iron, chlorophyll content and yield of hybrid maize in calcareous soil. *Journal of Agronomy* 11: 27–30
4. Briat, J.F., Curie, C., Gaymard, F., 2007. Iron utilization and metabolism in plants. *Curr. Opin. Plant Biol.* 10, 276e282.
5. Burgeff, H. *Mikrobiologie des Hochmoores*. Fischer, Stuttgart, 1961, pp.197
6. Benhamou N, Kloepper JW, Quadts-Dahlmann A, Tuzun S. 1996. Induction of defence-related ultra structural modifications in pea root tissues inoculated with endophytic bacteria. *Plant Physiology* 112, 919–929.
7. Briat JF, CURIE C, GAYMARD F. (2007) Iron utilization and metabolism in plants. *Current Opinion in Plant Biology*, 10: 276-282.
8. Caris C, Hördt W, Hawkins HJ, Römhild V, George E. 1998. Studies of iron transport by arbuscular mycorrhizal hyphae from soil to peanut and sorghum plants. *Mycorrhiza* 8: 35–39.
9. Casano, L.M., Zapata, J.M., Martín, M. and Sabater, B. (2000) Chlororespiration and poisoning of cyclic electron transport. Plastocyanin as electron transporter between thylakoid NADH dehydrogenase and peroxidase. *J. Biol. Chem.* 275, 942–948.
10. Cress WA, Johnson GV, Barton LL. 1986. The role of endomycorrhizal fungi in iron uptake by *Hilaria jamesii*. *Journal of Plant Nutrition* 9: 547–556.
11. Chandanie W.A. Kubota M. Hyakumachi M. (2005). Interactions between plant growth promoting fungi and arbuscular mycorrhizal fungus *Glomus mosseae* and induction of systemic resistance to anthracnose disease in cucumber anthracnose disease in cucumber.
12. Chen, J., Wu, F.H., Shang, Y.T., Wang, W.H., Hu, W.J., Simon, M., Liu, X., Shanguan, Z.P., Zheng, H.L., 2015. Hydrogen sulphide improves adaptation of *Zea mays* seedlings to iron deficiency. *J. Exp. Bot.* 23 pii: erv368
13. C. Zhou et al. / *Plant Physiology and Biochemistry* 105 (2016) 162e173
14. Clarkson, D.T (1985). Factors affecting mineral nutrient acquisition by plants. *Annu. Rev. Plant Physiol.* 36:77-116
15. Czechowski T, Stitt M, Altmann T, Udvardi MK, Scheible WR. (2005) Genome-wide identification and testing of superior reference genes for transcript normalization in *Arabidopsis*

16. Dey R, Pal KK, Bhatt DM, Chauhan SM. 2004. Growth promotion and yield enhancement of peanut (*Arachis hypogaea* L) by application of plant growth promoting rhizobacteria. *Microbiological Research* 159: 371–394.
17. Dangl, J.L., Jones, J.D.G. Plant pathogens and integrated defence responses to infection. *Plant Defence. Nature*, 2001, 401 : 826-833
18. David G. Barker, *Medicago truncatula*, (1990). A model plant for studying the molecular genetics of the Rhizobium-legume symbiosis
19. Dixon, R.A. and Sumner, L.W. (2003) Legume natural products: understanding and manipulating complex pathways for human and animal health. *Plant Physiology* 131, 878-885
20. Dixon, R.A. (2004) Phytoestrogens. *Annual Review of Plant Biology* 55, 225-261
21. Desjardins, Anne E. 2006 Μυκοτοξίνες *Fusarium* : Χημεία, Γενετική και Βιολογία . Η Αμερικανική Φυτοπαθολογική Εταιρεία. Άγιος Παύλος, Μινεσότα. APS Press. PP 184-185.
22. FAOSTAT.(2009) agricultural Data, Food and Agricultural Organization of the United Nations, Rome
23. Graham C.P., Vance P.H. 2003) Legumes: importance and constraints to greater use. *Plant Physiology*, 131 , 872-877
24. Grant WF, Bullen MR, Nettancourt D. (1962) The cytogenetics of *Lotus*. I. Embryo- cultured interspecific diploid hybrids closely related to *L. Corniculatus*. *Canadian Journal of Genetics and Cytology* 4, 105-128.
25. Guerinot, M.L., Yi, Y., 1994. Iron: nutritious, noxious, and not readily available. *Plant Physiol.* 104, 815-820.
26. Handberg K. & Stougaard J. (1992). *Lotus japonicus* , an autogamous, diploid legume species for classical and molecular genetics. *The Plant Journal*, 2(4), 487-496
27. Ito S, Ihara T, Tamura H, Tanaka S, Ikeda T, Kajihara H, Dissanayake C, Abdel-Motaal FF, El-Sayed MA 2007. alpha-Tomatine, the major saponin in tomato, induces programmed cell death mediated by reactive oxygen species in the fungal pathogen *Fusarium oxysporum*. *FEBS Lett.* 2007 Jul 10;581(17):3217-22. Epub 2007 Jun 15.
28. Jeong, J. , and Guerinot, M.L. (2009) Homing in on iron homeostasis on plants. *Trends Plants Sci.* 14: 280-285
29. Jones and Dangl, (2006) The Plant immune system
30. Kavroulakis N, Ehaliotis C, Ntougias S, Zervakis GI, Papadopoulou KK. (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, 163–174.
31. Kavroulakis N, Papadopoulou KK, Ntougias S, Zervakis GI, Ehaliotis C. (2006). Cytological and other aspects of pathogenesis related gene expression in tomato plants grown on a suppressive compost. *Annals of Botany* 98, 555– 564

32. Karvoulakis, N. Ntougias, S. Zervakis, Gl. Ehaliotis, C. Haralampidis, K. Papadopoulou, KK.(2007).Role of ethylene in the protection of tomato plants against soil-borne fungal pathogens conferred by an endophytic *Fusarium solani* strain. *Journal of experimental botany*.58(14):3853-3864
33. Kavroulaki S N., Psaras G. Αναπληρωτής Ερευνητής Ινστιτούτο Ελιάς,Υποτροπικών Φυτών και Αμπέλου, Συμβολή των Μυκορριζών στην Αειφορικότητα Οριακών Μεσογειακών Οικοσυστημάτων -Ανάπτυξη Μυκορριζικών Εμβολίων
34. Kashirad, A. Marschner, H. and Richer, C.H. (1973) Absorption and translocation of Fe^{59} from various parts of the corn plant. *Z. Pflanzenernahr. Bodenk.* 134: 136-147
35. Labidi S, Jeddi FB, Tisserant B, et al. 2012. Role of arbuscular mycorrhizal symbiosis in root mineral uptake under CaCO_3 stress. *Mycorrhiza* 22:337–345.
36. L. A. Simeoni, W. L. Lindsay, and R. Baker,(1987) Critical Iron Level Associated with Biological Control of *Fusarium* Wilt
37. Lincoln Taiz, Eduardo Zeiger. *Plant Physiology*. 2002,2015
38. Maunoury et al.,(2008). *Cell Biology Of Nodule Infection And Development Nitrogen-fixing Leguminous Symbioses* (pp.153-189)
39. Martínez-Romero, E. and Caballero-Mellado, J. (1996). *Rhizobium* phylogenies and bacterial genetic diversity. *Crit Rev Plant Sci.* 15(2):113-140
40. Medeiros CAB, Clark RB, Ellis JR. 1993. Effects of MES [2(N-morpholino)-ethanesulfonic acid] and pH on mineral nutrient uptake by mycorrhizal and nonmycorrhizal maize. *Journal of Plant Nutrition* 16:2255–2272.
41. Murgia, I., Tarantino, D., Vannini, C., Bracale, M., Carravieri, S. and Soave, C. (2004) *Arabidopsis thaliana* plants overexpressing thylakoidal ascorbate peroxidase show increased resistance to Paraquat-induced photooxidative stress and to nitric oxide induced cell death. *Plant J.* 38, 940–953.
42. Oldroyd GED, Downie JA.,(2004). Calcium, kinases and nodulation signalling in legumes. *Nat. Rev. Mol. Cell Biol.* 5:566–76
43. Olivain C., Alabouvette C., 1998, Process of tomato root colonization by a pathogenic strain of *Fusarium oxysporum* f. sp. *Lycopersici* in comparison with a non-pathogenic strain
44. Papadopoulou et al.(2011)The fungus *fusarium solani* strains f-s-k and its use in the biological control of plant pathogens and in the enhancement of plant growth and productivity
45. Palmer, C., Guerinot, M.L., 2009. Facing the challenges of Cu, Fe and Zn homeostasis in plants. *Nat. Chem. Biol.* 5, 333e340.
46. Pirazzi R, Rea E, Bragaloni M. 1999. Improvement of micronutrient uptake of valuable broadleaves in interaction with *Glomus mosseae*. *Geomicrobiology Journal* 16: 79–84.

47. Pii, Y., Mimmo, T., Tomasi, N., Terzano, R., Cesco, S., Crecchio, C., 2015a. Microbial interactions in the rhizosphere: beneficial influences of plant growthpromoting rhizobacteria on nutrient acquisition process. A review. *Biol. Fertil. Soils* 51, 403e415.
48. Purakayastha TJ, Singh CS, Chhondar PK. 1998. Growth and iron nutrition of broccoli (*Brassica oleracea* L. var. *italica* Planck), grown in a Typic Ustochrept, as influenced by vesicular-arbuscular mycorrhizal fungi in the presence of pyrite and farmyard manure. *Biology and Fertility of Soils* 27: 35–38.
49. Puppo, A. Groten, K., Bastian, F. , Carzaniga, R., Soussi, M., Lucas, M.M., et al. (2005). Legume nodule senescence :Role of redox and hormone signalling in the orchestration of the natural aging process. *New Phytol.* 165: 683-701
50. Prescott, L.M., Harley, J.P. and Klein, D.A. 1999. *Microbiology*. 4th edition. McGraw-hill
51. Pedrosa A., Sandal N, Stougaard J, Schweizer D, Bachmair (2002) A Chromosomal map of the model legume *Lotus japonicus*.
52. Raju PS, Clark RB, Ellis JR, Maranville JW. 1990. Effects of species of VA-mycorrhizal fungi on growth and mineral uptake of sorghum at different temperatures. *Plant and Soil* 121: 165–170.
53. Roldán-Arjona, A Pérez-Espinosa, M Ruiz-Rubio, (1999). Tomatinase from *Fusarium oxysporum* f. sp. *lycopersici* defines a new class of saponinases.):852-61
54. Spiller, S. and Terry, N. (1980) Limiting factors in photosynthesis II. Iron stress diminishes photochemical capacity by reducing the number of photosynthetic units. *Plant Physiol.* 65, 121–125.
55. Stocking, C.R. (1975) Iron deficiency and structure and physiology of maize chloroplasts. *Plant Physiol.* 55, 626–631.
56. Szczyglowski K, Shaw RS, Wopereis J, Copeland S, Hamburger D, Kasiborski B, Dazzo FB, and de Bruijn FJ. (1998) Nodule organogenesis and symbiotic mutants of the model legume *Lotus japonicus*. *MolecularPlant- MicrobeInteractions* 11, 684-697.
57. Szczyglowski K and Amyot L. (2006) Symbiosis, inventiveness by recruitment, *Plant Physiology* 131, 935-940.
58. Se'gue'la M, Briat JF, Vert G, Curie C. 2008. Cytokinins negatively regulate the root iron uptake machinery in *Arabidopsis* through a growth-dependent pathway. *The Plant Journal* 55: 289–300.
59. Snyder, W.C.; Hansen, H.N.(1941)The species concept in *Fusarium* with reference to section *Martiella*
60. Schlesinger, W.H.(1997) *Biogeochemistry An Analysis of Global Change*, 2nd ed. Academic Press, San Diego, CA
61. Smil V (1999) Nitrogen in crop production: an account for global flows. *GlobalBiogeochem. Cycles* 13, 647-662

62. Simons V, Morrissey JP, Latijnhouwers M, Csukai M, Cleaver A, Yarrow C, Osbourn A (2006). Dual effects of plant steroidal alkaloids on *Saccharomyces cerevisiae*. *Antimicrob Agents Chemother.* 2006 Aug;50(8):2732-40
63. Suri VK, Choudhary AK, Chander G, Verma TS. 2011. Influence of vesicular arbuscular mycorrhizal fungi and applied phosphorus on root colonization in wheat and plant nutrient dynamics in a phosphorus-deficient acid alfisol of western Himalayas. *Communications in Soil Science and Plant Analysis* 42: 1177–1186.
64. Treeby MT. 1992. The role of mycorrhizal fungi and non-mycorrhizal microorganisms in iron nutrition of citrus. *Soil Biology and Biochemistry* 24:857–864.
65. Thatcher et al., (2005) *Biotrophic Plant-Microbe Interactions*
66. Udvardi MK, Day DA (1997) metabolite transport across symbiotic membranes of legume nodules.
67. Udvardi M., Poole PS. (2013) Transport and metabolism in legume-rhizobia symbioses.
68. White MA, et al. (2007) Characteristics affecting expression and solubilization of yeast membrane proteins. *J Mol Biol* 365(3):621-36
69. Wang MY, Xia RX, Hu LM, Dong T, Wu QS. 2007. Arbuscular mycorrhizal fungi alleviate iron deficient chlorosis in *Poncirus trifoliata* L. Raf under calcium bicarbonate stress. *Journal of Horticultural Science and Biotechnology* 82: 776–780.
70. Zaccardelli, M., Campanile, F., Cammareri, M. and Grandillo, S. 2011. Agronomical use of α -tomatine and crude extracts of *solanum* spp. to control phytopathogenic fungi. *Acta Hort. (ISHS)* 914:401-404
71. Zhang H, Sun Y, Xie X, Kim MS, Dowd SE, Pare' PW. 2009. A soil bacterium regulates plant acquisition of iron via deficiency-inducible mechanisms. *The Plant Journal* 58: 568–577.
72. Ελευθέριος Κ. Τζάμος (2007) *Φυτοπαθολογία*
73. Φώτιος Θ. Γραβάνης, (2011) *Γενική Φυτοπαθολογία*