

ΠΑΝΕΠΙΣΤΗΜΙΟ ΘΕΣΣΑΛΙΑΣ

ΤΜΗΜΑ ΒΙΟΧΗΜΕΙΑΣ ΚΑΙ ΒΙΟΤΕΧΝΟΛΟΓΙΑΣ



ΠΡΟΓΡΑΜΜΑ ΜΕΤΑΠΤΥΧΙΑΚΩΝ ΣΠΟΥΔΩΝ

ΑΒΡΑΜΙΔΟΥ ΜΑΡΙΑΝΝΑ



ΛΑΡΙΣΑ, 2019

**Η ΕΠΙΔΡΑΣΗ ΤΟΥ ΕΝΔΟΦΥΤΙΚΟΥ ΜΥΚΗΤΑ
FUSARIUM SOLANI ΣΤΕΛΕΧΟΣ FsK ΣΕ ΦΥΤΑ ΤΟΜΑΤΑΣ
ΣΕ ΣΥΝΘΗΚΕΣ ΠΡΟΣΒΟΛΗΣ ΑΠΟ ΤΟΝ ΤΕΤΡΑΝΥΧΟ**

**THE EFFECT OF AN ENDOPHYTIC FUNGUS *FUSARIUM SOLANI*
STRAIN K ON TOMATO PLANTS UNDER *Tetranychus urticae*
INFESTATION**

Τριμελής επιτροπή:

Παπαδοπούλου Καλλιόπη: Αναπληρώτρια Καθηγήτρια, Πανεπιστήμιο Θεσσαλίας, Τμήμα Βιοχημείας και Βιοτεχνολογίας

Καρπούζας Δημήτριος: Αναπληρωτής Καθηγητής, Πανεπιστήμιο Θεσσαλίας, Τμήμα Βιοχημείας και Βιοτεχνολογίας

Οιχαλιώτης Κωνσταντίνος: Αναπληρωτής Καθηγητής, Γεωπονικό Πανεπιστήμιο Αθηνών, Τμήμα αξιοποίησης φυσικών πόρων και γενικής μηχανικής

«The most exciting phrase to hear in science,
the one that heralds new discoveries,
is not “Eureka” but “That's funny”...»

Isaac Asimov

ΕΥΧΑΡΙΣΤΙΕΣ

Αρχικά θα ήθελα να ευχαριστήσω μέσα από την καρδιά μου την επιβλέπουσα καθηγήτρια μου κ. Παπαδοπούλου Καλλιόπη για την εμπιστοσύνη που μου έδειξε και μου έδωσε την ευκαιρία να συμμετέχω στο εργαστήριο της. Ευχαριστώ για τον χρόνο και τις συμβουλές που μου δώσατε.

Ένα μεγάλο ευχαριστώ οφείλω στον κ. Γκαραγκούνη Κώστα, την κ. Σκιαδά Βασιλική και την κ. Νταντάμη Έλενα που ήταν δίπλα μου όποτε τους χρειάστηκα. Ευχαριστώ για τις πολύτιμες γνώσεις και συμβουλές, για την αμέριστη βοήθεια και εμπιστοσύνη που μου έδειξαν.

Ευχαριστώ 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, το πιο σημαντικό ευχαριστώ το οφείλω στην οικογένεια μου για την υποστήριξη, την αγάπη και την βοήθεια τους όλα αυτά τα χρόνια. Ένα τελευταίο ευχαριστώ το οφείλω στον άνθρωπο που είναι δίπλα μου για την τεράστια υπομονή και για όλη την εμπιστοσύνη που μου έχει.

Πίνακας περιεχομένων

THE EFFECT OF AN ENDOPHYTIC FUNGUS <i>FUSARIUM SOLANI</i> STRAIN K ON TOMATO PLANTS UNDER	2
Abstract	7
ΠΕΡΙΛΗΨΗ	8
1:ΕΙΣΑΓΩΓΗ	9
1.1 : Καλλιέργεια τομάτας.....	9
1.1.1: Γονιδίωμα της τομάτας	10
1.1.2: Διατροφική αξία της τομάτας	11
1.2: Στοιχεία μυκήτων	12
1.2.1: Γενικές έννοιες μορφολογίας των μυκήτων	13
1.2.2: Αναπαραγωγικά συστήματα μυκήτων.....	14
1.3: Το γένος <i>Fusarium</i>	15
1.3.1: <i>Fusarium solani</i> στέλεχος K (FsK)	16
1.3.2 : Επαγόμενη προστασία μέσω του <i>Fusarium solani</i> (Fs-K)	17
1.4: Ακάρεα	18
1.4.1: Ο τετράνυχος <i>Tetranychus urticae</i>	18
2:ΥΛΙΚΑ ΚΑΙ ΜΕΘΟΔΟΙ.....	20
2.1: Πειραματικό σχέδιο	20
2.2: Απομόνωση RNA από φύλλα τομάτας.....	21
2.3: Σύνθεση cDNA	21
2.3: Σχετική ποσοτική PCR πραγματικού χρόνου (RT-qPCR)	21
2.4: Επίπεδα έκφρασης γονιδίων.....	22
2.5: Απομόνωση DNA από τις ρίζες των φυτών ώστε να ελεγχθεί ο αποικισμός του μύκητα FsK	23
3:ΑΠΟΤΕΛΕΣΜΑΤΑ	24
3.1: Ποσοτικοποίηση του DNA των δειγμάτων ρίζας τομάτας.....	24
3.2: Αποικισμός του ριζικού συστήματος από τον μύκητα FsK.....	24
3.3: Επίπεδα έκφρασης διαφόρων γονιδίων.....	25
4: ΣΥΖΗΤΗΣΗ	28
ΒΙΒΛΙΟΓΡΑΦΙΑ	31

Abstract

Beneficial microorganisms are known to promote plant growth and confer resistance to biotic and abiotic stressors. Soil-borne beneficial microbes in particular have shown potential in protecting plants against pathogens and herbivores via the elicitation of plant responses. In this study, we evaluated the role of *Fusarium solani* strain K (FsK) in altering plant responses to the two spotted spider mite *Tetranychus urticae* in tomato. We found evidence that FsK, a beneficial endophytic fungal strain isolated from the roots of tomato plants grown on suppressive compost, affects both direct and indirect tomato defenses against spider mites. Defense-related genes were differentially expressed on FsK-colonized plants after spider mite infestation compared to clean or spider mite infested un-colonized. Our results highlight the role of endophytic fungi in shaping plant–mite interactions and may offer the opportunity for the development of a novel tool for spider mite control.

ΠΕΡΙΛΗΨΗ

Οι ωφέλιμοι μικροοργανισμοί είναι γνωστοί ότι προάγουν την ανάπτυξη των φυτών και προσδίδουν ανθεκτικότητα στους βιοτικούς και αβιοτικούς παράγοντες καταπόνησης. Τα ωφέλιμα μικρόβια που προέρχονται από το έδαφος ειδικότερα έχουν δείξει το δυναμικό τους στην προστασία των φυτών από τους παθογόνους παράγοντες και τα φυτοφάγα ζώα μέσω της ανταπόκρισης των φυτών. Σε αυτή τη μελέτη, αξιολογήσαμε το ρόλο του στελέχους *Fusarium solani* K (FsK) στη μεταβολή των αποκρίσεων των φυτών που προσβλήθηκαν από το ακάρεο *Tetranychus urticae* στην ντομάτα. Βρήκαμε στοιχεία ότι ο FsK, ένα ευεργετικό ενδοφυτικό μυκητιακό στέλεχος που απομονώθηκε από τις ρίζες των φυτών τομάτας που καλλιεργήθηκαν σε οργανικό υλικό (κομποστ), επηρεάζει τόσο την άμεση όσο και την έμμεση άμυνα της τομάτας από τα ακάρεα. Τα γονίδια που σχετίζονται με την άμυνα εκφράστηκαν διαφορετικά σε φυτά αποικισμένα με FsK μετά από προσβολή από ακάρεα σε σύγκριση με φυτά τομάτας που δεν είχαν αποικιστεί ούτε προσβληθεί από τετράνυχο και φυτά που μόνο είχαν προσβληθεί από τον τετράνυχο και όχι από τον μύκητα. Τα αποτελέσματά μας επισημαίνουν το ρόλο των ενδοφυτικών μυκήτων στη διαμόρφωση των αλληλεπιδράσεων των φυτών και των ακάρεων και μπορούν να προσφέρουν την ευκαιρία για την ανάπτυξη ενός νέου εργαλείου για τον έλεγχο του τετράνυχου.

1:ΕΙΣΑΓΩΓΗ

1.1 : Καλλιέργεια τομάτας

Η τομάτα είναι φυτό της οικογένειας των Στρυχνοειδών (*Solanaceae*) και είναι ένα από τα 8-10 πολύ συγγενικά είδη του γένους *Lycopersicon*, το οποίο ξεχωρίζει από το πολύ συγγενικό είδος *Solanum* (πιθανός πρόγονος), από τα χαρακτηριστικά διάρρηξης των ανθών και απελευθέρωση της γύρης. Τα περισσότερα είδη του γένους *Lycopersicon* είναι θάμνοι ετήσιοι, βραχείας διάρκειας, με βιολογικό κύκλο 5 ή και λιγότερους μήνες. Η τομάτα ζει μόνο μερικά χρόνια και συνήθως καλλιεργείται ως μονοετές φυτό. Το ύψος της τυπικά φτάνει τα 3μ., αλλά δεν έχει αρκετά ανθεκτικό βλαστό και γι' αυτό στηρίζεται σε άλλα φυτά. Τα φύλλα της έχουν μήκος 10-25 εκ. και είναι σύνθετα, αποτελούμενα από 5-9 μικρότερα φύλλα το καθένα, τα οποία έχουν μάκρος μέχρι και 8 εκ. με προιονοειδή περιφέρεια. Τόσο ο βλαστός του φυτού όσο και τα φύλλα φέρουν τρίχωμα. Τα λουλούδια έχουν διάμετρο 1-2 εκ., είναι κίτρινα με πέντε μυτερούς λοβούς και μεγαλώνουν σε ομάδες αποτελούμενες από 3-12. Η ντομάτα κατάγεται από την Κεντρική και Νότια Αμερική (Περού) και εκεί καλλιεργήθηκε συστηματικά για πρώτη φορά. Ήταν άγνωστη στους κατοίκους της Ευρώπης μέχρι το 1544, όπου οι Ιταλοί βοτανολόγοι ασχολήθηκαν μαζί της και της έδωσαν το όνομα "χρυσό μήλο" (*romi d'oro*), και αυτό διότι εκείνη την εποχή η τομάτα ήταν η πιο διαδεδομένη ποικιλία για το κίτρινο ή το πορτοκαλί χρώμα που είχε η ώριμη ντομάτα. Η άγρια μορφή της τομάτας *L. esculentum var. cerasiforme* έχει βρεθεί επίσης και στο Μεξικό, στην Κεντρική Αμερική και άλλες περιοχές της Ν. Αμερικής. Αν και αρχικά επικρατούσε η άποψη ότι χώρα καταγωγής της τομάτας είναι το Περού, σήμερα με της πληροφορίες (ιστορικές, αρχαιολογικές, εθνοβοτανικές) που έδωσε ο Jenkins (1948) γίνεται δεκτό ότι καταγωγή της καλλιεργούμενης τομάτας είναι το Μεξικό και μάλιστα η περιοχή Vera Cruz-Puebla, από όπου και αρχικά μεταφέρθηκε τον 16° αιώνα στην Ευρώπη και στην συνέχεια "διασκορπίστηκε" σε αρκετές περιοχές της γης. Στην Ελλάδα εισήχθη αρχικά στην Αθήνα περί το 1818, την ίδια περίπου εποχή με την πατάτα, αλλά στην αρχή οι καρποί της εθεωρούντο δηλητηριώδεις και τοξικοί. Όποια και να είναι η γεωγραφική καταγωγή της σήμερα είναι γενικά αποδεκτό, ότι άμεσος πρόγονος της καλλιεργούμενης τομάτας είναι η *var. cerasiforme*, και με μοναδικό ίσως άλλο διεκδικητή (πρόγονο) το είδος *L. pimpinellifolium*, που είναι πιθανό να είναι μάλλον παραπροϊόν παρά μέλος της γενετικής σειράς. Όλα τα είδη του γένους *Lycopersicon* έχουν τον ίδιο αριθμό χρωμοσωμάτων ($2n=24$) και πολύ σπάνια έχουν αναφερθεί περιπτώσεις αυτοπολυπloidίας. Το *Lycopersicon esculentum* είναι αυτογονιμοποιούμενο είδος. Όπως αναφέρει ο Rick (1950), σταυρογονιμοποιούνται στις περιοχές που αυτοφύονται και σε μερικές άλλες υποτροπικές περιοχές, αλλά σε άλλα μέρη αυτογονιμοποιούνται πλήρως. Αντίθετα τα άλλα είδη του γένους *Lycopersicon* είναι αυτόστειρα και επομένως σταυρογονιμοποιούνται πλήρως με διάφορα είδη μελισσών. Η τομάτα (*L. esculentum*) μπορεί να διασταυρωθεί είτε με μικρή είτε με μεγάλη δυσκολία, με όλα τα άλλα είδη του γένους και να παράγει υβρίδια.

Η ντομάτα, όπως φαίνεται και από τον τόπο καταγωγής της, είναι φυτό των θερμών περιοχών και γι' αυτό στη χώρα μας καλλιεργείται το καλοκαίρι και κανονικά δίνει παραγωγή από τα τέλη Μαΐου έως τα τέλη Σεπτεμβρίου. Βέβαια η ντομάτα δεν λείπει καμία ημέρα από τα μανάβικα, καθώς τα θερμοκήπια έχουν αναλάβει την παραγωγή της για τους υπόλοιπους (κρύους) μήνες του χρόνου. Όμως οι χαμηλότερες θερμοκρασίες του χειμώνα εμποδίζουν τη γονιμοποίηση και την καρπόδεση, οπότε για να πάρουμε ικανοποιητική παραγωγή πρέπει να επέμβουμε με τις λεγόμενες φυτορμόνες οι οποίες είναι ουσίες που εξασφαλίζουν την ανάπτυξη πολλών και μεγάλων καρπών, χωρίς να χρειαστεί να γίνει κανονική γονιμοποίηση στα φυτά.



Εικόνα 1: Φυτό τομάτα

1.1.1: Γονιδίωμα της τομάτας

Στο περιοδικό Nature δημοσιεύτηκε το Μάιο του 2012 για πρώτη φορά το γονιδίωμα της τομάτας κατά σχεδόν 80% ολοκληρωμένο. Το πρόγραμμα για την αποκωδικοποίηση του γονιδιώματος της τομάτας είναι γνωστό ως Tomato Genome Consortium και ξεκίνησε το 2003. Στο πρόγραμμα αυτό μελετήθηκε το γονιδίωμα της ποικιλίας Heinz 1760 και της άγριας τομάτας *Solanum pimpinellifolium*. Συνολικά συμμετείχαν 300 επιστήμονες από 14 χώρες στο πρόγραμμα. Αρχικά η αποκωδικοποίηση έγινε με τον παραδοσιακό τρόπο μέχρι το 2008 και επειδή υπήρχαν πολλά κοινά χρησιμοποίησαν πιο σύγχρονες μεθόδους, όπως η whole-genome shotgun sequencing. Η τομάτα έχει στο γονιδίωμα της 12 χρωμοσώματα, στα οποία βρίσκονται 31.760 γονίδια. Εκτιμάται ότι η αποκωδικοποίηση του γονιδιώματος θα οδηγήσει σε νέες ποικιλίες σε περίπου 5 χρόνια, ενώ θα οδηγήσει σε βελτιωμένες ποικιλίες συγγενικών ειδών όπως η μελιτζάνα και η πιπεριά. Συγκεκριμένα Η τομάτα και η πατάτα έχουν το 92% των γονιδίων τους κοινά. (The Tomato Genome Consortium (TGC), 2012)

1.1.2: Διατροφική αξία της τομάτας

Η τομάτα δεν είναι ένα λαχανικό πλούσιο σε θρεπτικά στοιχεία, όμως εξαιτίας της ευρείας κατανάλωσης της παγκοσμίως τόσο ως νωπό καρπό όσο και ως μεταποιημένων προϊόντων της, κατέχει μία αξιόλογη θέση στην ημερήσια διατροφή του ανθρώπου.

Το μεγαλύτερο κομμάτι της τομάτας αποτελείται σχεδόν αποκλειστικά από νερό (από 94-95% κατά βάρος) και από ένα σύνολο θρεπτικών συστατικών. Η τομάτα είναι πτωχή σε θερμίδες και είναι μια πολύ καλή πηγή βιταμινών C, B και A (με τη μορφή του β-καροτένιου, το οποίο είναι μια μορφή προβιταμίνης A) όπως επίσης και βιταμίνης E, ελάχιστης πρωτεΐνης. Ακόμα περιέχει μεγάλες ποσότητες κιτρικών και οξαλικών οξέων, σελήνιο, μαγνήσιο, ασβέστιο, φώσφορο, σίδηρο, μαγγάνιο, κάλιο, φολικό οξύ και άλλα ιχνοστοιχεία (Yuan Li, 2016)

Η τομάτα αποτελεί την πρώτη πηγή του ανθρώπου σε λυκοπένιο, την τρίτη πηγή βιταμίνης E, την τέταρτη για την προβιταμίνη από A και την ένατη πηγή καλίου στην διατροφή του ανθρώπου.

Η τομάτα περιέχει αρκετές φυτικές ίνες, δεν περιέχει χοληστερόλη, σχεδόν καθόλου νάτριο, ούτε κορεσμένα λίπη. Οι μεταποιημένες τομάτες ενδέχεται να διαθέτουν υψηλότερα επίπεδα ορισμένων θρεπτικών συστατικών, αφενός διότι η συγκέντρωσή τους μπορεί να είναι υψηλότερη σε αυτές τις μορφές και αφετέρου διότι η μεταποίηση μπορεί να επιφέρει αλλαγές στη χημική τους δομή καθώς και στη βιοδιαθεσιμότητά τους.

Οι βιταμίνες της ομάδας B είναι υπεύθυνες για την εύρυθμη λειτουργία του μεταβολισμού και του νευρικού συστήματος. Το κάλιο είναι ένα απαραίτητο θρεπτικό συστατικό για τη φυσιολογική ανάπτυξη και διατήρηση της υγείας, το οποίο, μαζί με το ασβέστιο και το μαγνήσιο, μπορεί να διαδραματίσει ένα σημαντικό ρόλο στη μείωση της αρτηριακής πίεσης, έτσι βοηθά στην ομαλή καρδιακή λειτουργία. Το μαγνήσιο δρα ενάντια στα συμπτώματα του στρες και τις μυϊκές κράμπες. Το σελήνιο ενσωματώνεται στις σεληνιοπρωτεΐνες, οι οποίες είναι αντιοξειδωτικά ένζυμα που βοηθούν στο να αποτραπεί η καταστροφή των κυττάρων από τις ελεύθερες ρίζες, βοηθούν στη ρύθμιση της λειτουργίας του θυρεοειδούς και παίζουν σημαντικό ρόλο στο ανοσοποιητικό σύστημα. Το χρώμιο βοηθά στην αντιμετώπιση διαταραχών του μεταβολισμού της γλυκόζης, που αφορά κυρίως τους διαβητικούς. Οι διαιτητικές ίνες είναι σημαντικές για τη διατήρηση ενός υγιούς πεπτικού συστήματος και μπορούν επίσης να συμβάλουν στον έλεγχο των υψηλών επιπέδων της χοληστερόλης στο αίμα. Οι τομάτες είναι μια σημαντική πηγή φυτικών ινών, ιδίως όταν καταναλώνονται με τη φλούδα και τους σπόρους. Η τομάτα, επίσης, διαθέτει σε αφθονία φολικό οξύ, το οποίο βοηθά στην ανασυγκρότηση και την αποκατάσταση των κυττάρων του οργανισμού.

1.2: Στοιχεία μυκήτων

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 ένα είδος 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 για 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:

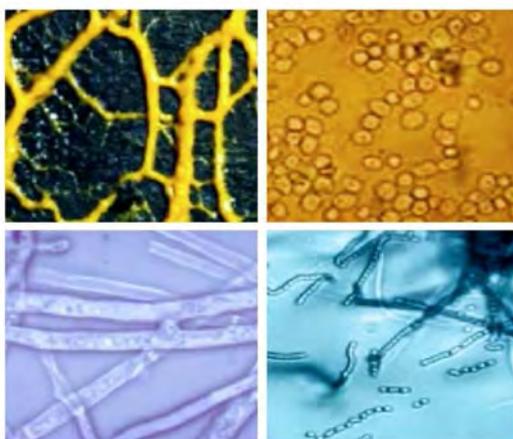
- στην αποικοδόμηση των οργανικών ουσιών και
- στην ανακύκλωση των θρεπτικών στοιχείων στο περιβάλλον.

Οι μύκητες είναι σημαντικοί:

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

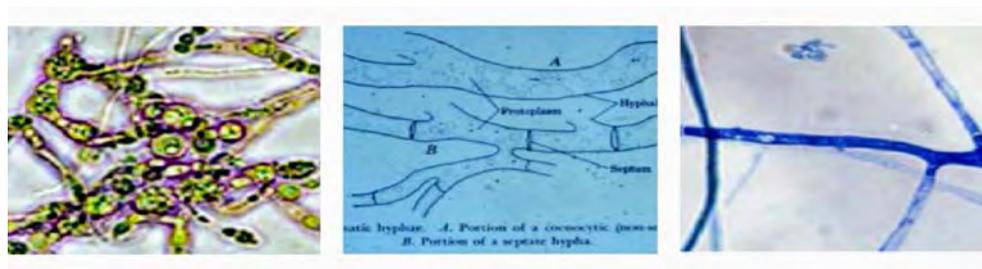
1.2.1: Γενικές έννοιες μορφολογίας των μυκήτων

Θαλλός ονομάζεται το σώμα των μυκήτων και αποτελείται από τις υφές (λεπτά σωληνοειδή νημάτια με ποικίλο πάχος που κυμαίνεται από 2-10μm αναλόγως του είδους του μύκητα) και το μυκήλιο (σύνολο των υφών). Ο θαλλός διαφοροποιείται ανάλογα με τη λειτουργία του σε βλαστητικό, όταν γίνεται βλαστητική ανάπτυξη και αναπαραγωγικό, όταν διαφοροποιείται για την παραγωγή καρποφοριών με σπόρια ή μόνο σπορίων. (Γραβάνης,2011)



Εικόνα 2: Το σώμα των μυκήτων (θαλλός)

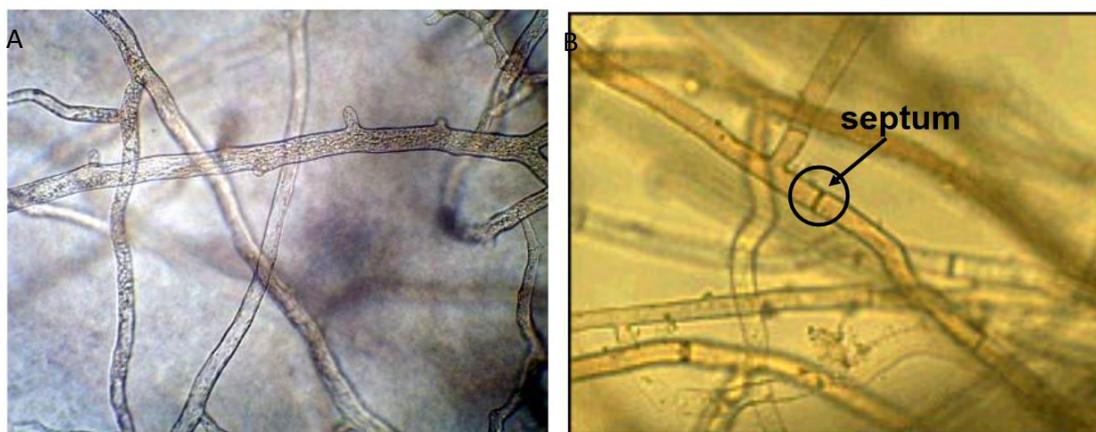
Οι υφές περιβάλλονται από κυτταρικό τοίχωμα που συνίσταται από χιτίνη. Το κυτταρικό τοίχωμα περικλείει το πρωτόπλασμα, το οποίο περιβάλλεται από πρωτοπλασματική μεμβράνη λιποπρωτεϊνικής συστάσεως. Μέσα στη πρωτοπλασματική μάζα υπάρχουν πυρήνες, οι οποίοι περιβάλλονται από διπλή πυρηνική μεμβράνη, που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



Εικόνα 3: Υφές των 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 κυττάρων, όπως επίσης μπορεί να μεταναστεύουν πυρήνες από το ένα κύτταρο στο άλλο. Το μυκήλιο, το οποίο συνίσταται από υφές που φέρουν *septa*, ονομάζεται πολυκύτταρο. Από την άλλοι

υπάρχουν και οι υφές που δεν φέρουν septa , αλλά παραμένουν με τη μορφή ενιαίου κυττάρου, μέσα στον οποίο βρίσκονται διάσπαρτοι οι πυρήνες. Το μυκήλιο αυτό του οποίου οι υφές δεν έχουν septa ονομάζεται κοινοκύτταρο.



Εικόνα 4: Α. κοινοκύτταρο και Β. πολυκύτταρο.

Πάνω στο ενδοπλασμικό δίκτυο βρίσκονται προσκολλημένα ριβοσώματα, υπεύθυνα για την σύνθεση πρωτεϊνών. Μέσα στο πρωτόπλασμα υπάρχουν επίσης μιτοχόνδρια διαφόρων σχημάτων. Επίσης βρίσκονται μέσα και 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)

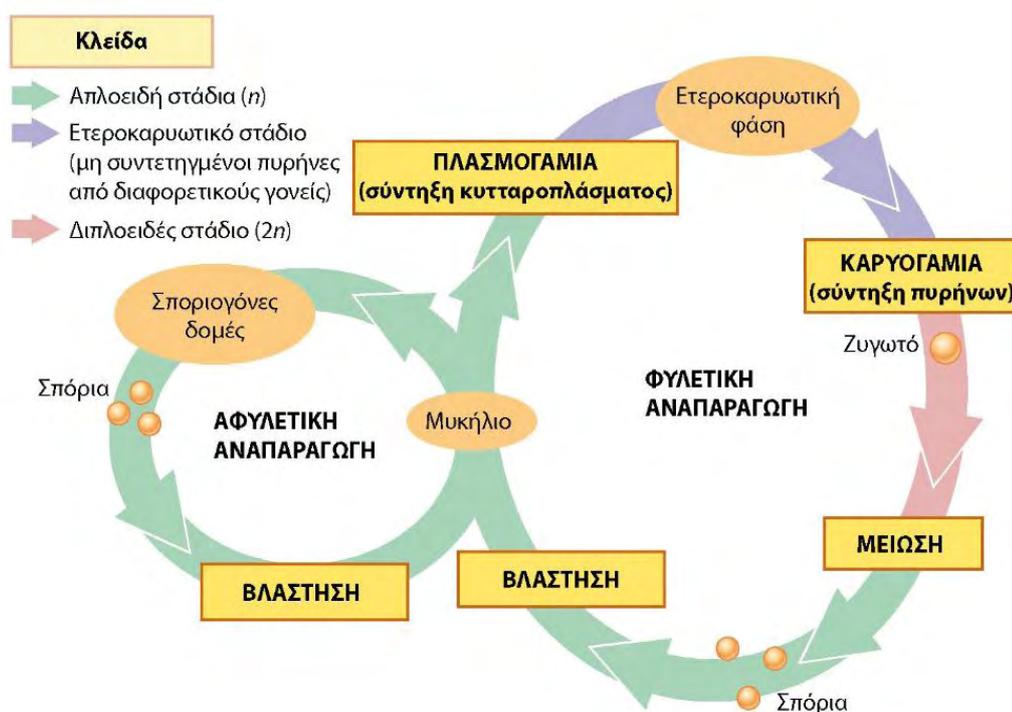
Το κυτταρικό τοίχωμα αποτελείται από β-γλυκάνες (σκελετικά υλικά κρυσταλλώδους συστάσεως), χιτίνη (μικροκρυσταλλική μορφή), υδατοδιαλυτούς πολυσακχαρίτες (α-γλυκάνες & γλυκοπρωτεΐνες), λιπίδια μελανίνης, πολυμερή γαλακτοσαμίνης & πολυουρονιδίων ασκομύκητες, βασιδιομύκητες, ζυγομύκητες και χρώμιστα.

1.2.2: Αναπαραγωγικά συστήματα μυκήτων

Οι μύκητες ανέπτυξαν ποικίλα και πολύπλοκα συστήματα αναπαραγωγής και σύζευξης για να μεταβιβάσουν γενετικές πληροφορίες από γενεά σε γενεά (Anderson et al., 1992). Οι περισσότεροι μύκητες μπορούν να αναπαράγονται και αγενώς και εγγενώς. Με την αγενή αναπαραγωγή παράγει γενετικά πανομοιότυπους οργανισμούς και αποτελεί την πιο κοινή μέθοδο αναπαραγωγής που χρησιμοποιείται στους μύκητες ενώ η εγγενής

αναπαραγωγή σε μύκητες πραγματοποιείται όταν τα θρεπτικά συστατικά ή το νερό είναι σπάνια στο περιβάλλον τους.

- ❖ Η αγενής αναπαραγωγή γίνεται με διάφορους τρόπους: α) Με αποκοπή υφών οπότε το αποκομμένο τμήμα μπορεί να οδηγήσει στον σχηματισμό νέου μυκηλίου, β) με εκβλάστηση και γ) 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 5: Τυπικός βιολογικός κύκλος μυκήτων.

1.3: 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 εναέριας

προσβολές ανθέων όπως στα σιτηρά. Οι μύκητες αυτοί παράγουν σταθερές δομές ώστε να εξασφαλίζουν την επιβίωση τους για πολλά χρόνια. Είναι ευρύτατα διαδεδομένοι παγκοσμίως.

Το σημαντικότερο 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. cepae, 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*. (Ελευθέριος Κ. Τζάμος 2007)

1.3.1: *Fusarium solani* στέλεχος K (Fsk)

Ο μύκητας *Fusarium solani* ανήκει στο Βασίλειο: μύκητες, διαίρεση: *Eumycota* υποδιαίρεση: *Deuteromycotina*, κλάση: *Hypomycetes*, τάξη: *Tuberculariales*, οικογένεια: *Tuberculariaceae*, γένος: *Fusarium*, είδος: *solani*. Το *Fusarium solani* έχει ένα εύρος ξενιστών στα φυτά. Οι κυριότεροι από αυτούς είναι η πατάτα, ο αρακάς, τα φασόλια, και τα μέλη της οικογένειας των κολοκυθοειδών όπως πεπόνι, αγγούρι και κολοκύθα. Ορισμένα βακτηριακά στελέχη μπορεί να προκαλέσουν επίσης λοιμώξεις στον άνθρωπο.

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

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

Το *Fusarium solani* στέλεχος K είναι ένας μη παθογόνος νηματοειδής μύκητας που εντοπίζεται στο έδαφος και απομονώθηκε από ένα κατασταλτικό κομπόστ παθογόνων από υπολείμματα στέμφυλων και παραπροϊόντων ελαιουργίας. Ο μύκητας αυτός έχει την ικανότητα να αλληλεπιδρά με φυτικούς οργανισμούς και την ικανότητα να αναπτύσσεται σε πληθώρα πηγών άνθρακα, με βέλτιστο pH:5 και βέλτιστη θερμοκρασία ανάπτυξης τους 24°C.

1.3.2 : 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*. 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*.

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 ελλειματικό 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 γιασμονικό οξύ καθώς μεταλλάγματα για τη σηματοδότηση γιασμονικού προστατεύονταν επαρκώς. Επίσης, τα μεταλλάγματα για το γιασμονικό προστατεύονταν καλύτερα απ' ό,τι τα WT, γεγονός που υποδηλώνει πως το γιασμονικό 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 (Kavroulakis et al, 2007).

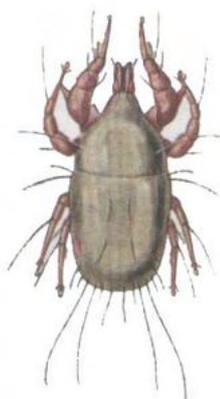
Ο μύκητας *Fs-K* είναι ικανός να διεισδύει στις ρίζες του φυτού και να αναπτύσσεται στο φλοιό της ρίζας 15 ημέρες μετά τον εμβολιασμό του όπως και να εισχωρεί στους ηθμαγγειώδεις σωλήνες διαβιώντας ως ενδόφυτο. Η ικανότητα αποικισμού των ηθμαγγειωδών σωλήνων ωστόσο, είναι κάτι που χαρακτηρίζει τους μύκητες 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.

1.4: Ακάρεα

Τα ακάρεα αποτελούν έναν από τους σημαντικότερους εχθρούς των αποθηκευμένων φυτικών προϊόντων και τροφίμων παγκοσμίως. Τα περισσότερα ακάρεα είναι πάρα πολύ μικροσκοπικά αρθρόποδα μεγέθους 300-500μm και δεν είναι ορατά δια γυμνού οφθαλμού. Τα ακάρεα ανήκουν στην υποκλάση Acari της κλάσης των Arachnida.

Τα ακάρεα ξεχωρίζουν από τα έντομα για τους εξής λόγους:

- Από την ύπαρξη τεσσάρων ζευγών ποδιών στα ενήλικα άτομα έναντι των τριών που έχουν τα έντομα.
- Το σώμα των ακάρεων είναι ενιαίο και δεν έχει πραγματική μεταμέρεια, δεν χωρίζεται σε τμήματα. Μπορεί να θεωρείται ότι χωρίζεται σε δύο μέρη (γναθόσωμα και ιδιόσωμα) σε αντίθεση με το σώμα των εντόμων που χωρίζεται σε τρία μέρη (κεφάλι, θώρακας, κοιλιά).
- Τα ακάρεα χαρακτηρίζονται από απουσία ή μικρή ανάπτυξη κυκλοφοριακού και αναπνευστικού συστήματος.
- Σε αντίθεση με τα έντομα έχουν μόνο απλούς οφθαλμούς (Ηλιόπουλος, 2009)



Εικόνα 7: Ακάρεο

1.4.1: Ο τετράνυχος *Tetranychus urticae*

Ο *Tetranychus urticae*, ο κίτρινος τετράνυχος ή «σιναπίτης» καταγράφεται στη χώρα μας για πρώτη φορά στα μέσα του 50. Είναι ευρεία γνωστό καθώς είναι πρακτικά παμφάγο αφού προσβάλλει ευρύτατο φάσμα αυτοφυών και καλλιεργούμενων φυτικών ειδών με μεγάλη οικονομική σημασία. Προσβάλλει εκτός από την τομάτα όλα τα οπωροφόρα, τα εσπεριδοειδή, το αμπέλι, τα βιομηχανικά φυτά (βαμβάκι, τεύτλα), τα λαχανικά, τα ψυχανθή, τα καλλωπιστικά και τα ανθοκομικά καθώς και αγρωστώδη. Είναι ίσως ο σοβαρότερος εχθρός των θερμοκηπιακών καλλιεργειών.

Τα θήλεα πάντως διαφέρουν σημαντικά καθώς έχουν χρώμα γενικά πράσινο-κίτρινο την άνοιξη και το θέρος, με μία ταινία ανοιχτότερου χρώματος στη μέση με δύο μεγάλα στίγματα στις δύο πλευρές της κοιλίας. Τα θήλεα του χειμώνα έχουν χρώμα ρόδινο λόγω

της περιορισμένης χλωροφύλλης και της αύξησης χρωστικών ουσιών στα φύλλα. Ο αρσενικός τετράνυχος είναι μικρότερος του θηλυκού και φέρει πράσινο-κίτρινο ανοιχτό χρώμα διατηρώντας και τις δύο κηλίδες στις δύο πλευρές της κοιλίας. Τα αυγά είναι σφαιρικά και υαλώδη και μοιάζουν με μικρά μαργαριτάρια.

Οι τετράνυχτοι προτιμούν περισσότερο τα φύλλα της τομάτας όπου στα κοιλώματα της κάτω επιφάνειας ζουν και αναπτύσσονται κατά αποικίες στις οποίες απαντώνται όλα τα βιολογικά στάδια. Το πιο κοινό σύμπτωμα των προσβολών τους από ακάρεα είναι οι υπόφαιες κηλίδες που στην άνω επιφάνεια αντιστοιχούν με ελαιοκυτταρώσεις (εικόνα 8). Εκτός από τα φύλλα ο τετράνυχος μπορεί να προσβάλει και τον καρπό. Όταν οι καρποί προσβληθούν σε νεαρό στάδιο δεν αναπτύσσονται κανονικά και δεν είναι εμπορεύσιμοι. Τα άνθη και οι βλαστοί προσβάλλονται λιγότερο.

Καταπολεμάται με εφαρμογή φυτοφαρμάκων (συνδυασμούς ακμαιοκτόνων και ωοκτόνων) που όμως συχνά είναι αναποτελεσματικά εξ αιτίας της ανάπτυξης ανθεκτικότητας. Έχει επίσης πολλούς βιολογικούς εχθρούς. Το μέγεθος των ζημιών από τους τετράνυχους εξαρτάται κυρίων από τις καλλιεργητικές φροντίδες και από τη σωστή λήψη μέτρων φυτοπροστασίας.



Εικόνα 8: Προσβολή των φύλλων της τομάτας από ακάρεο.

2:ΥΛΙΚΑ ΚΑΙ ΜΕΘΟΔΟΙ

2.1: Πειραματικό σχέδιο

Στο πείραμα χρησιμοποιήσαμε τέσσερις καταστάσεις: φυτά που αποικίστηκαν από τον Fsk (+F/-T), φυτά που αποικίστηκαν από τον Fsk και μολύνθηκαν από τον τετράνυχο (+F/+T), φυτά που μολύνθηκαν από τον τετράνυχο (-F/+T) και φυτά control (-F/-T). Κάθε κατάσταση αποτελείται από 6 βιολογικές επαναλήψεις.

Αρχικά, γίνεται απολύμανση των σπόρων τομάτας (*Solanum lycopersicum* L., cv. Ace 55 (Vf)) με 2,5% NaOCl και τοποθέτηση των σπόρων σε γλαστράκια με άμμο και βερμικουλίτη σε αναλογία 2:1. Τα φυτά ποτίζονται ανά μία μέρα με Hoagland θρεπτικό 100%. Τα φυτά που χρησιμοποιήθηκαν στο πείραμα ήταν 4 εβδομάδων.

Τα φυτά μολύνθηκαν με τον ενδοφυτικό μύκητα Fsk ο οποίος καλλιεργείται σε θρεπτικό PDB (potato dextrose broth) για 5 μέρες στους 26°C. Στη συνέχεια ακολουθεί η συλλογή κονιδίων με φυγοκέντρηση στις 4000g και αφαίρεση του μυκηλίου. Έπεται η μέτρηση των κονιδίων με τη χρήση του αιμοκυτταρόμετρου και επαναδιαλυτοποίηση των κονιδίων σε 0,85% NaCl ώστε να υπάρχει η επιθυμητή συγκέντρωση κονιδίων. Η τελική συγκέντρωση κονιδίων με την οποία μολύνονται τα φυτά είναι $5 \cdot 10^2$ κονίδια/ml. Μολύνεται η κάθε ρίζα με 20μl από το εμβόλιο.

Τα φυτά μολύνονται σε ηλικία μιας εβδομάδας και συλλέγονται μετά από δύο εβδομάδες μετά την μόλυνση.

Θρεπτικό διάλυμα ποτίσματος Hoagland

ΔΙΑΛΥΜΑ	Σ ΑΡΧΙΚΟΥ ΔΙΑΛΥΜΑΤΟΣ	ml/l ΤΕΛΙΚΟΥ ΔΙΑΛΥΜΑΤΟΣ 1L
MgSO ₄	1M	2
KH ₂ PO ₄	1M	1
Fe – EDTA	1/10 M	1
Microelements*	-	1
KNO ₃	20g/100ml	5
Ca(NO ₃) ₂ ·4H ₂ O	2,36g/100ml	5

Microelements stock solution

Micro element	gr/lt
H ₃ BO ₃	2,86
MnCl ₂ ·4H ₂ O	1,81
ZnCl ₂	0,11
CuCl ₂ ·H ₂ O	0,05
H ₂ MoO ₄	0,02

Θρεπτικό PDB(potato dextrose broth)

Σε 1 λίτρο dH₂O :

- 400γρ πατάτες καθαρισμένες
- 20γρ ζάχαρη

Βράζουμε τις πατάτες σε ένα λίτρο νερό. Μόλις ολοκληρωθεί ο βρασμός σουρώνουμε και με έναν ογκομετρικό κύλινδρο του ενός λίτρου ογκομετρούμε το εναπομείναν υγρό. Προσθήκη νερού όσο χρειάζεται για να φτάσει το 1 λίτρο. Τέλος, ακολουθεί αποστείρωση του θρεπτικού.

2.2: Απομόνωση RNA από φύλλα τομάτας

Η απομόνωση του RNA έγινε με τη χρήση LiCl σύμφωνα με τους Brusslan and Tobin (1992). Το ολικό RNA που απομονώθηκε για κάθε δείγμα ποσοτικοποιήθηκε με τη χρήση της συσκευής Qubit (Invitrogen) σύμφωνα με τις οδηγίες του παρασκευαστή και υποβλήθηκε σε επεξεργασία με DNase προκειμένου να απομακρυνθούν οποιαδήποτε υπολείματα γενωμικού DNA. Η κατεργασία έγινε με το kit DNase I, RNase-free της Thermo Fisher Scientific σύμφωνα με τις οδηγίες του παρασκευαστή. Μετά το πέρας της κατεργασίας ελέγχθηκε η παρουσία υπολειμμάτων DNA μέσω PCR με εκκινητές ειδικούς για το γενωμικό γονίδιο της *Ubiquitin* της τομάτας. Οι εκκινητές είναι: LeUbl-F 5' AAGATGGAAGGACTCTGG 3' , LeUbl-R 5' TCACAACACATCAAGGTC 3'.

2.3: Σύνθεση cDNA

Η σύνθεση της πρώτης αλυσίδας cDNA έγινε με χρήση του PrimeScript 1st strand cDNA Synthesis Kit της εταιρείας Takara σύμφωνα με τις οδηγίες της εταιρείας.

2.3: Σχετική ποσοτική PCR πραγματικού χρόνου (RT-qPCR)

Η μέτρηση των επιπέδων έκφρασης των γονιδίων JIPI-21, WIPI-II, PI-IIc, PPO-D, PPO-F, LOXD, PR-1A, PR-P6, GGPS1, GLU-A, GLU-B, CHI3 και CHI9 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

προδιορισμός 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.

Στην εργασία αυτή η έκφραση των γονιδίων μετρήθηκε με σχετική ποσοτικοποίηση (RT-qPCR) μετρώντας τα αντίγραφα cDNA του γονιδίου στο ολικό cDNA που απομονώθηκε χρησιμοποιώντας ως γονίδιο αναφοράς το γονίδιο της *Ubiquitin* της τομάτας. Πριν την τελική αντίδραση qPCR έγινε έλεγχος της ποιότητας των cDNA μέσω real time PCR με την ενίσχυση μόνο του cDNA της *Ubiquitin*. 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 περιέχονταν στο kit KAPA SYBR® FAST Master Mix 2X qPCR της εταιρίας KAPABIOSYSTEMS. Σε κάθε αντίδραση προστέθηκαν 1μL cDNA 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, θέτωντας ως Tm τους 58°C και επανάληψη των βημάτων της αποδιάταξης (95°C για 15''), υβριδισμού των εκκινητών (58°C για 20'') και επιμήκυνσης (72°C για 11'') για 40 κύκλους.

2.4: Επίπεδα έκφρασης γονιδίων

Για να υπολογιστεί η μεταβολή των επιπέδων έκφρασης των γονιδίων σε επίπεδο μεταγραφής, υπολογίστηκε η σχετική έκφραση κάθε γονιδίου στόχου σε κάθε δείγμα όπως περιεγράφηκε παραπάνω και ο λόγος της σχετικής έκφρασης κανονικοποιήθηκε ως προς την έκφραση του στα δείγματα control. Διαφορές στην έκφραση γονιδίων μεταξύ των τεσσάρων χειρισμών αναλύθηκαν με ανάλυση διασποράς δύο κατευθύνσεων (Two-way ANOVA) που ακολουθήθηκε από τις δοκιμές Tukey's HSD post hoc tests ($P < 0.05$). Τα δεδομένα δοκιμάστηκαν για κανονικότητα χρησιμοποιώντας τη δοκιμή Shapiro-Wilk (SPSS, 2011).

Οι αλληλουχίες των εκκινητών που χρησιμοποιήθηκαν στην RT-PCR εμφανίζονται στην παρακάτω εικόνα 9.

Target gene	GenBank (GB) accession	Target Gene	Primer sequence 5' to 3'
JIP-21	AJ295638.1	JIP-21_F	ACTCGTCCTGTGCTTTGTCC
<i>Jasmonate-inducible protein 21</i>		JIP-21_R	CCCAAGAGGATTTTCGTTGA
WIPI-II	AY129402.1	PI-IIf_F	GACAAGGTACTAGTAATCAATTATCC
<i>Wound-induced Proteinase Inhibitor II</i>		PI-IIf_R	GGGCATATCCCGAACCCAAGA
PI-IIc	X94946.1	PI-IIc_F	CAGGATGTACGACGTGTTGC
<i>Proteinase Inhibitor IIc</i>		PI-IIc_R	GAGTTTGCAACCCTCTCCTG
PPO-F	AK247126.1	PPO-F_F	CGGAGTTTGACGGGAGTTATAC
<i>Polyphenol-oxidase-F</i>		PPO-F_R	TTGATCTCCACACTTTCATAGG
PPO-D	Z12836.1	PPO-D_F	GCCCAATGGAGCCATATC
<i>Polyphenol-oxidase-D</i>		PPO-D_R	ACATTCGATCCACATTGCTG
LOXD		LOXD-F	F: 5'-CCTGAAATCTATGGCCCTCA-3'
<i>Lipoxygenase D</i>		LOXD-R	R: 5'-ATGGGCTTAAGTGTGCCAAC-3'
PR-1A	AJ011520	PR1a_F	F: 5'-TCTTGTGAGGCCCAAAATTC-3'
<i>Acidic pathogenesis-related protein 1a</i>		PR1a_R	R: 5'-ATAGTCTGGCCTCTCGGACA-3'
PR-P6	Y08804.1	PR-P6_F	GTACTGCATCTTCTGTTTCCA
<i>Pathogenesis related protein P6</i>		PR-P6_R	TAGATAAGTCTTGATGTGCC
GGPSI	NM_001247158.1	GGPS-I_F	GGCAGATTGTGGACTTGGCGA
<i>Geranylgeranyl pyrophosphate synthase 1</i>		GGPS-I_R	CTCATTCGCTCCACATCAACC
GLU-A	M80604	GLUA-F	F: 5'-GGTCTCAACCCGACATATT-3'
<i>Acidic β-1,3-glucanase</i>		GLUA-R	R: 5'-CACAAAGGCATCGAAAAGAT-3'
GLU-B	M80608	GLUB-F	F: 5'-TCTTGCCCCATTCAAGTTC-3'
<i>Basic β-1,3-glucanase</i>		GLUB-R	R: 5'-TGCACGTGTATCCCTCAAAA-3'
CHI3	Z15141	CHI3-F	F: 5'-TGCAGGAACATTCCTGGAG-3'
<i>Acidic chitinase</i>		CHI3-R	R: 5'-TAACGTTGTGGCATGATGGT-3'
CHI9	Z15140	CHI9-F	F: 5'-GAAATTGCTGCTTTCCTTGC-3'
<i>Basic chitinase</i>		CHI9-R	R: 5'-CTCCAATGGCTCTTCCACAT-3'
UBQ	BT012724.1	LeUbl-F	AAGATGGAAGGACTCTGG
<i>Ubiquitin</i>		LeUbl-R	TCACAACACATCACAAAGTC
Tef-1a		Tef1a_F	CCCCTCCAGGATGTCTACAA
<i>Nectria haematococca translation elongation factor 1a</i>		Tef1a_R	GGAAGACCCTCAGTGAGCTG

Εικόνα 9: Αλληλουχίες εκκινητών που χρησιμοποιήθηκαν για την ανάλυση της έκφρασης γονιδίων με qPCR.

2.5: Απομόνωση DNA από τις ρίζες των φυτών ώστε να ελεγχθεί ο αποικισμός του μύκητα Fsk

Η απομόνωση του ολικού γενομικού DNA έγινε με τη χρήση του “NucleoSpinR Plant II genomic DNA extraction” kit της εταιρείας MACHEREY-NAGEL GmbH & Co. KG σύμφωνα με τις οδηγίες του κατασκευαστή.

Τα φυτά τομάτας μολύνθηκαν από τον ενδοφυτικό μύκητα *Fusarium solani* στέλεχος K (Fsk), ο οποίος αναπτύσσεται σε θρεπτικό PDB (potato dextrose broth) στους 26°C και 160rpm.

Ο αποικισμός των ριζικών ιστών των φυτών ποσοτικοποιήθηκε με τη βοήθεια της qPCR χρησιμοποιώντας ζεύγη εκκινητών για ένα τμήμα 170bp του *Nectria haematococca* το οποίο τμήμα αντιστοιχεί στον παράγοντα επιμήκυνσης της μετάφρασης (TEF-1a) (η αλληλουχία των εκκινητών υπάρχει στην εικόνα 1). Δημιουργήθηκε μια εξωτερική πρότυπη καμπύλη για να προσδιοριστεί ποσοτικά ο αριθμός αντιγράφων του γονιδίου Tef-1a στο ολικό DNA που εξάγεται από τον ριζικό ιστό των φυτών που είναι μολυσμένα με τον Fsk.

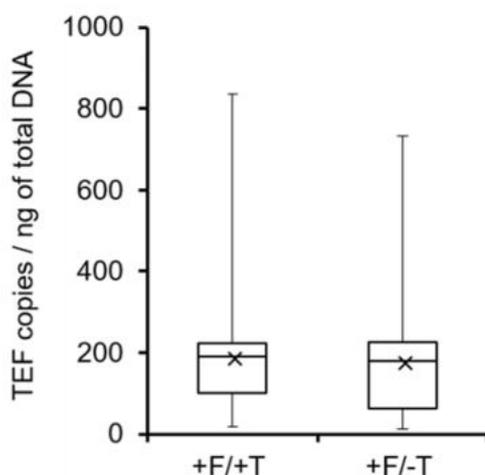
3:ΑΠΟΤΕΛΕΣΜΑΤΑ

3.1: Ποσοτικοποίηση του DNA των δειγμάτων ρίζας τομάτας

Πραγματοποιήθηκε ποσοτικοποίηση των δειγμάτων DNA με τη βοήθεια του Qubit για να γίνει μετέπειτα η κανονικοποίηση του αποικισμού της ρίζας από τον μύκητα. Αυτό διότι επιθυμούμε να ελέγξουμε τα επίπεδα του αποικισμού ως προς το συνολικό γονιδιωματικό DNA που απομονώσαμε από τον ριζικό ιστό.

3.2: Αποικισμός του ριζικού συστήματος από τον μύκητα FsK

Αρχικά μελετήθηκε η επίδραση του τετράνυχου στον αποικισμό του φυτού από τον μύκητα FsK. Η επίδραση αυτή μελετήθηκε με τη βοήθεια μίας πρότυπης καμπύλης TEF και η ποσοτικοποίηση πραγματοποιήθηκε με qPCR με εκκινητές ειδικούς για το γονίδιο *Tef-1a*. Οι τιμές κανονικοποιήθηκαν ως προς το ολικό DNA. Στην παρακάτω εικόνα 10 βλέπουμε ένα διάγραμμα box plot.



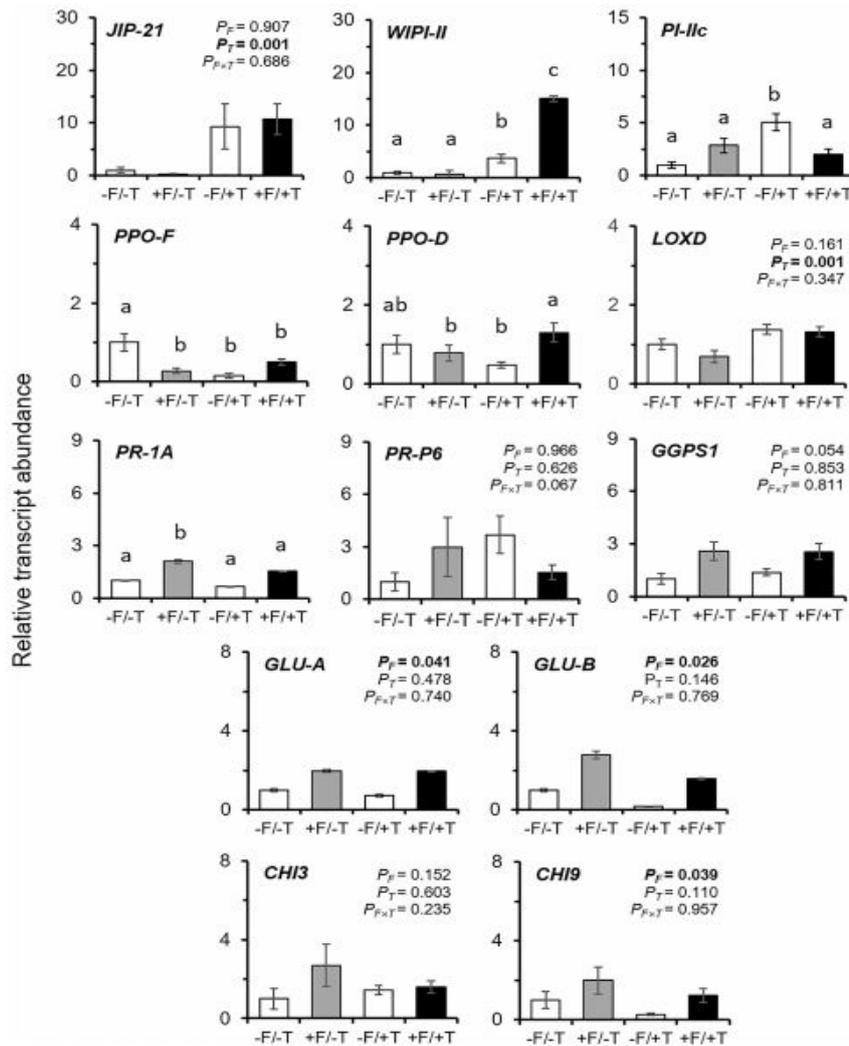
Εικόνα 10: Η επίδραση της μόλυνσης από ακάρεα σε φυτά τομάτας στον αποικισμό του μύκητα (FsK) στο ριζικό σύστημα. Η ποσοτικοποίηση του αποικισμού του μύκητα στους ριζικούς ιστούς έγινε με qPCR χρησιμοποιώντας ειδικούς εκκινητές για το γονίδιο *Fusarium Tef-1a* (άξονας X). Οι τιμές κανονικοποιούνται ως προς τα ng του ολικού DNA. Τα δεδομένα είναι ο μέσος όρος από 2 τεχνικές επαναλήψεις που η κάθε μία αποτελείται από 7 βιολογικές επαναλήψεις. Σε κάθε κουτί η μεσαία διαχωριστική οριζόντια γραμμή δείχνει τη διάμεσο, το «X» δείχνει το μέσο δείγμα, το πάνω και κάτω άκρο του κουτιού δείχνει το πρώτο και τρίτο τεταρτημόριο αντίστοιχα ενώ το ανώτερο και το κατώτερο σημείο δείχνουν τη θέση της μέγιστης και της ελάχιστης τιμής αντίστοιχα. Οι ρίζες συλλέχθηκαν από φυτά που χρησιμοποιήθηκαν για την ανάλυση γονδιακής έκφρασης. Δεν παρατηρήθηκαν στατιστικά σημαντικές διαφορές στον αποικισμό του FsK μεταξύ των φυτών που είχαν μολυνθεί με ακάρεα (+ F / + T) και αυτών που δεν μολύνθηκαν με ακάρεα (+ F / -T) μετά από δοκιμή Student's t-test.

3.3: Επίπεδα έκφρασης διαφόρων γονιδίων

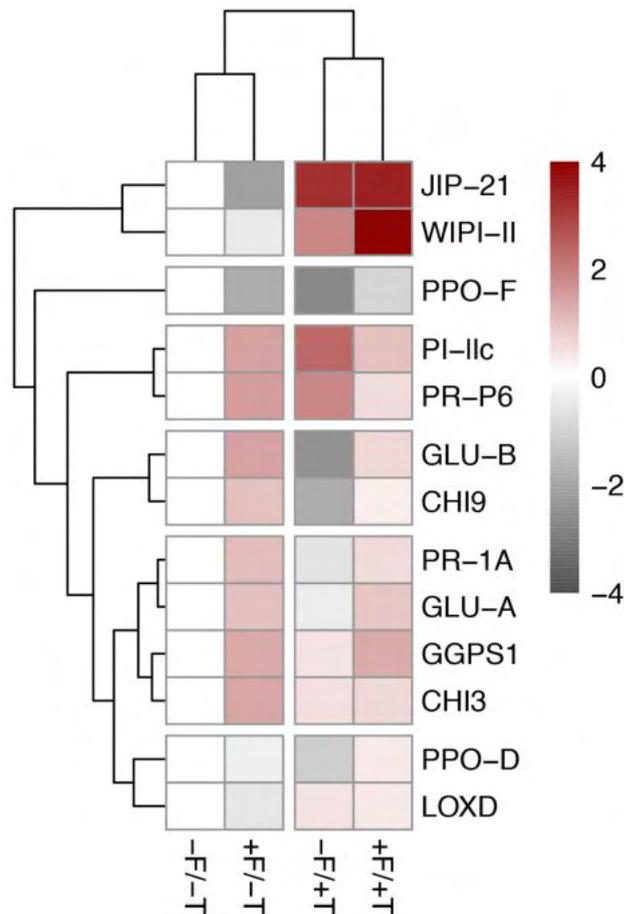
Για την εκτίμηση της επίδρασης του αποικισμού του μύκητα στην έκφραση των γονιδίων που ανταποκρίνονται στην εισβολή από ακάρεα, χρησιμοποιήσαμε καλά εδραιωμένα γονίδια δείκτες της άμυνας, τα οποία είναι γνωστό ότι ενεργοποιούν τα σηματοδοτικά μονοπάτια του γιασμονικού (JA) και του σαλικιλικού οξέος (SA). Επιπρόσθετα, στη μελέτη αυτή περιλήφθηκαν και τα γονίδια GLU-A, GLU-B, CHI3 και CHI9, που τυπικά επάγονται από μύκητες ή άλλα φυτοφάγα ζώα. Διαπιστώθηκε ότι τα επίπεδα έκφρασης των γονιδίων JIP-21, WIPI-II, PI-IIc και LOXD, επάγονται από τον τετράνυχο. Από την άλλη τα γονίδια όπως το PR-1A, PR-P6, PPO-D / F και GGPS1 δεν φάνηκε να ενεργοποιούνται άμεσα ή έμμεσα από τον τετράνυχο.

Στα φυτά ντομάτας που έχουν προσβληθεί από ακάρεα και αποικιστεί από τον FSK παρατηρήθηκε σημαντική αύξηση της έκφρασης των γονιδίων WIPI-II και PPO-D σε σύγκριση με τα μη-αποικισμένα αλλά προσβεβλημένα από τον τετράνυχο φυτά. Δεν υπήρξε καμία επίδραση στην έκφραση άλλων γονιδίων που σχετίζονται με ακάρεα, όπως το JIP-21, PPO-F, LOXD, PR-1A, PR-P6 και GGPS1.

Τέλος, στα φυτά που έχουν αποικιστεί από τον μύκητα και προσβληθεί από το ακάρεο παρατηρήθηκε σημαντική αλλαγή στα επίπεδα έκφρασης των γονιδίων GLU-A, GLU-B και CHI9 σε σύγκριση με τα φυτά που δεν προσβλήθηκαν από τετράνυχο (Εικόνα 11).



Εικόνα 11: Οι επιδράσεις στα επίπεδα έκφρασης γονιδίων δεικτών άμυνας σε φυτά τομάτας που αποικίζονται από τον ενδοφυτικό μύκητα *F. Solani* στέλεχος K (+ F) και / ή έχουν προσβληθεί με το ακάρεο (*T. urticae*, + T) σε σύγκριση με τα φυτά μάρτυρες (-F / -T). Οι τιμές είναι οι μέσες τιμές ± SE των δύο τεχνικών επαναλήψεων που αποτελείται από έξι βιολογικές επαναλήψεις ενός ανεξάρτητου πειράματος. Τα επίπεδα έκφρασης για όλα τα γονίδια-στόχους κανονικοποιήθηκαν με τον γεωμετρικό μέσο έκφρασης του γονιδίου της Ubiquitin και της *Actin* σε κάθε δείγμα ως αναφορά. Διαφορές στην έκφραση γονιδίων μεταξύ των τεσσάρων χειρισμών αναλύθηκαν με ανάλυση διασποράς δύο κατευθύνσεων (Two-way ANOVA) ($\alpha = 0.05$) και οι τιμές P-value εμφανίζονται για κάθε γονίδιο σε κάθε ομάδα με τιμές για την περίπτωση μη σημαντικών αλληλεπιδράσεων $P_{F * T} > 0,05$ και για στατιστικά σημαντικές αλληλεπιδράσεις $P < 0,05$. Οι τιμές $P < 0,05$ σημειώνονται με έντονους χαρακτήρες. $P_{F * T}$: τιμή πιθανότητας αλληλεπίδρασης F_SK με T, P_T : τιμή πιθανότητας επίδρασης του τετράνυχου και P_F : τιμή πιθανότητας επίδρασης του μύκητα. Στην περίπτωση στατιστικά σημαντικής αλληλεπίδρασης ($P_{F * T} < 0,05$) ακολουθήθηκαν αναλύσεις με τις δοκιμές Tukey's HSD post hoc tests ($P < 0.05$). Τα *JIP-21*, *WIPI-II*, *PI-IIC*, *PPO-D* / *F* και *LOXD* είναι γονίδια δείκτες του μονοπατιού του γιασμονικού (JA). Τα *PR-1A* και *PR-P6* είναι γονίδια δείκτες του μονοπατιού του σαλικυλικού οξέος (SA). Τα *GLU-A* / *B* και *CHI3* / *9* είναι γονίδια δείκτες του μύκητα. Η *GGPS1* έχει αναφερθεί ότι ανταποκρίνεται στην προσβολή από ακάρεα στη ντομάτα.



Εικόνα 12: Heatmap των διαφορετικά εκφρασμένων γονιδίων άμυνας των φυτών σε φυτά τομάτας που αποικίζονται από το στέλεχος K (+ F) του ενδοφυτικού μύκητα και / ή προσβάλλονται από τον τετράνυχο (+ T) σε σύγκριση με τα μη επεξεργασμένα φυτά μάρτυρες (-F / -T). Το ροζ δείχνει την θετικά αυξημένη ρύθμιση των επιπέδων γονιδιακής έκφρασης και μια ισχυρή ρύθμιση προς τα πάνω υποδεικνύεται με σκούρο κόκκινο χρώμα. Το ανοιχτό γκρι δείχνει την αρνητική μείωση της ρύθμισης και το σκούρο γκρι δείχνει μια ισχυρή μείωση της ρύθμισης των επιπέδων έκφρασης γονιδίων. Με λευκό υποδεικνύονται τα φυτά μάρτυρες. Η ομαδοποίηση των δειγμάτων/γονιδίων είναι ιεραρχική και βασίζεται στην ανάλυση κατά συστάδων με βάση την Ευκλείδεια απόσταση των γονιδίων στην ανάλυση διασποράς (ANOVA) (Tukey's *post hoc* tests, $P < 0.05$). Οι τιμές είναι η μέση τιμή της αλλαγής σε σύγκριση με τη σχετική έκφραση του γονιδίου στα φυτά ελέγχου (-F / -T) δύο τεχνικών επαναλήψεων για κάθε μία από τις έξι βιολογικές επαναλήψεις. Τα επίπεδα έκφρασης για όλα τα γονίδια-στόχους κανονικοποιήθηκαν ως προς τη γεωμετρική μέση τιμή των επιπέδων έκφρασης ουβικιτίνης και ακτίνης σε κάθε δείγμα ως αναφορά.

4: ΣΥΖΗΤΗΣΗ

Στην παρούσα μελέτη σκοπός ήταν να μελετήσουμε την επίδραση του ενδοφυτικού μύκητα *Fusarium solani* στέλεχος K υπό συνθήκες προσβολής φυτών τομάτας από τον τετράνυχο. Μέχρι στιγμής, η χρήση των ωφέλιμων μικροβίων εδάφους ενάντια στα ακάρεα έχει χρησιμοποιηθεί σπάνια. Από όσα γνωρίζουμε μέχρι τώρα οι μυκκόριζες είναι η κύρια ομάδα μικροβίων του εδάφους που έχουν μελετηθεί περισσότερο για αυτόν τον σκοπό. Σε αντίθεση με αυτό που είναι γενικά γνωστό για τις αρνητικές επιπτώσεις πολλών AMF για γενικούς και μεσοφυλλικούς εχθρούς (Hartley και Gange, 2009. Pineda et al., 2010; Shikano et al., 2017), ο τετράνυχος, ο οποίος είναι γενικός θηρευτής παρεγχυματικών κυττάρων, έχει δειχθεί προηγουμένως ότι επηρεάζεται θετικά από την συμβίωση των φυτών με AMF. Παρ' όλα αυτά η συμβίωση των μικροβίων του εδάφους με φυτά όπως η τομάτα και οι αλληλεπιδράσεις τους με ακάρεα παραμένουν ακόμα ανεξερεύνητα.

Η μελέτη μας είναι η πρώτη αναφορά ενός ωφέλιμου ενδοφυτικού μύκητα που επηρεάζει αρνητικά την απόδοση του τετράνυχου σε φυτά τομάτας. Ο μύκητας FsK έχει δειχθεί ότι επάγει την ενεργοποίηση των μηχανισμών άμυνας της τομάτας έναντι του φυτοπαθογόνου μύκητα του φυλλώματος *Septoria lycopersici* και προστατεύει επίσης τοπικά το φυτό έναντι της προσβολής από το ριζομύκητα σήψης *Fusarium oxysporum f.sp. radicle-lycopersici* (FORL) (Kavroulakis et al 2007). Παρομοίως, παθογόνα είδη *Fusarium* στην ντομάτα (*F. oxysporum f. sp. lycopersici* φυλή 1) έχουν αποδειχθεί ότι επάγουν την αντίσταση των φυτών ενάντια στα ακάρεα προκαλώντας μειωμένη ωτοκία σε μια φυτική σειρά τομάτας ευπρόσβλητη από *Fusarium*, στην οποία τα φυτά ήταν επίσης αφυδατωμένα (Jongebloed et al., 1992). Ο ακριβής μηχανισμός (-οι) που ο FsK εμπλέκεται στην διαμεσολαβούμενη (διασυστηματική) αντίσταση ενάντια στους παθογόνους οργανισμούς του φυλλώματος δεν είναι ακόμα γνωστός. Παρ' όλα αυτά, υπάρχουν στοιχεία για τη συμμετοχή του αιθυλενίου και της οδού σηματοδότησης του γιασμονικού οξέος (JA) στην αντίσταση που προκαλείται από FsK ενάντια στην προσβολή από τον *N. tenuis* (Garantonakis et al., 2018). Επί πλέον, μια προηγούμενη μελέτη έδειξε ότι η αντοχή της τομάτας σε ένα παθογόνο της ρίζας από το FsK εμφανίστηκε μόνο παρουσία του μονοπατιού σηματοδότησης αιθυλενίου, ανεξάρτητα από την παρουσία του JA (Kavroulakis et al 2007). Σε αυτή τη μελέτη, ο αποικισμός της ρίζας από τον FsK δεν προκάλεσε αυξημένη παραγωγή αιθυλενίου στη ρίζα και στα εναέρια μέρη, ενώ η απόκριση με τη μεσολάβηση του σηματοδοτικού μονοπατιού του σαλικιλικού οξέος (SA) στις ρίζες (αλλά όχι στα φύλλα) καταστέλλεται. Αυτά τα δεδομένα, αν και είναι περιορισμένα, προτείνουν τη συμμετοχή και των τριών σηματοδοτικών μονοπατιών να μεσολαβούν στις απαντήσεις των φυτών στα ακάρεα, με την περίπτωση αντίστασης του FsK να έχει αναφερθεί μέχρι στιγμής. Παρ' όλα αυτά, απαιτείται μια διεξοδική μελέτη της συσσώρευσης της φυτοορμόνης στα εναέρια μέρη των φυτών που έχουν αποικιστεί από τον FsK, για να διευκρινισθούν οι μηχανισμοί που εμπλέκονται στη διασυστηματική, επαγόμενη από τον FsK απόκριση και αντοχή του φυτού κατά του τετράνυχου.

Τα ακάρεα είναι γνωστό ότι είναι ευαίσθητα κυρίως στο JA και σε μικρότερο βαθμό στο SA μονοπάτι που διαμεσολαβούν την επαγωγή άμυνας του φυτού (Li et al., 2002; Kant et al., 2008; Alba et al., 2015; Ataide et al., 2016; Villarroel et al., 2016). Σύμφωνα με τα γονίδια δείκτες των JA και SA μονοπατιών, στην παρούσα μελέτη και τα δυο μονοπάτια επάγονται με την παρουσία FsK σε μολυσμένο με τον τετράνυχο φυτά. Επομένως, μπορούμε να υποθέσουμε ότι τα σηματοδοτικά μονοπάτια του JA και SA προκαλούν αποτελεσματική άμυνα σε αποικισμένα με FsK φυτά έναντι των ακάρεων. Η ενεργοποίηση JA είναι κοινή και σε άλλες συμβιωτικές σχέσεις όπως με plant growth promoting rhizobacteria (PGPR) και AMF. Σε αυτές τις περιπτώσεις, τα συμβιωτικά φυτά αναπτύσσουν άμυνα που σχετίζεται με το JA, η οποία έχει ως αποτέλεσμα την ανθεκτικότητα των φυτών από την καταστροφή τους από φυτοφάγα και νεκρότροφα παθογόνα (Pineda et al., 2010, Zamiodis and Pieterse, 2012, Pieterse et al., 2014, Shikano et al., 2017). Ως εκ τούτου, εκτός από την εμπλοκή του JA και του SA, δεν έχει ακόμη προσδιοριστεί αν ο μηχανισμός επαγόμενης γενικής άμυνας (defense priming) εμπλέκεται επίσης στην διαμεσολαβούμενη από τον FsK αντίσταση στα ακάρεα.

Στη ντομάτα, η σηματοδότηση του JA είναι ο σημαντικότερος ρυθμιστής της άμυνας που προκαλείται από ακάρεα (Kant et al., 2015, Martel et al., 2015). Παρόμοια με προηγούμενες αναφορές, καταγράψαμε επίσης σε αυτή τη μελέτη την θετική ρύθμιση της έκφρασης των γονιδίων *JIP-21*, *WIPI-II*, *LOXD* και *PI-IIC* σε απόκριση της προσβολής με ακάρεα, που είναι γνωστό ότι αποτελούν γονίδια δείκτες της σηματοδότησης του JA στην τομάτα (Kant et al., 2004; Alba et al., 2015; Martel et al., 2015). Θα πρέπει να σημειωθεί, ωστόσο, ότι το στέλεχος ακάρεων KOP που χρησιμοποιήθηκε στην παρούσα μελέτη είναι ένα στέλεχος προσαρμοσμένο στην τομάτα που έχει αποδειχθεί προηγουμένως ότι είναι ανθεκτικό στην απόκριση μέσω JA στην τομάτα (Ament et al., 2004, Kant et al., 2008). Από την άλλη πλευρά, άλλα γονίδια όπως *PR-1A*, *PR-P6*, *PPO-D/F* και *GGPS1* που έχουν προηγουμένως δειχθεί ότι ρυθμίζονται θετικά από άλλα στελέχη ακάρεων [KMB ή *T. urticae* Santroort-2 in Kant et al. (2008) and Alba et al. (2015), αντίστοιχα] δεν αποδείχθηκαν ότι επηρεάζονται σταθερά στη μελέτη μας. Αυτό θα μπορούσε να αποδοθεί στις διαφορές στον πειραματικό μας σχεδιασμό σε σχέση με προηγούμενες μελέτες (π.χ., διαφορετική ποικιλία ντομάτας και ακάρεα). Από την άλλη πλευρά, τα PPO γονίδια κωδικοποιούν πρωτεΐνες οι οποίες κανονικά μειώνουν τη διαθεσιμότητα αμινοξέων από τον φυτικό ιστό με τον οποίο θα τραφεί το ακάρεο. Ως εκ τούτου, αυτές οι ενώσεις πιστεύεται ότι έχουν μικρή ή καθόλου επίδραση στα ακάρεα, όπως ο τετράνυχος (Erbas and Hubert, 2010, Carrillo et al., 2011, Martel et al., 2015). Αυτό μπορεί να εξηγήσει γιατί η προσβολή από τετράνυχο δεν μπορεί να προκαλέσει σταθερή επαγωγή αυτών των γονιδίων. Ο αποικισμός της τομάτας από το ενδόφυτο οδήγησε σε διαφορετική έκφραση των σχετιζόμενων με την άμυνα γονιδίων. Όπως αναμένεται, τα γονίδια *GLU-A* και *CHI9*, τα οποία τυπικά επάγονται έναντι ωφέλιμων και παθογόνων μυκήτων ή άλλων φυτοφάγων [π.χ., λευκές μύγες, Puthoff et al. (2010)] φάνηκε να ρυθμίζονται θετικά σε φυτά αποικισμένα με τον FsK. Επίσης, καταγράφηκε θετική ρύθμιση και για τα γονίδια *PI-IIC* και *PR-1A*, ενώ η *PPO-F* ρυθμίστηκε αρνητικά σε φυτά αποικισμένα με τον FsK σε σύγκριση με τα μη αποικισμένα φυτά. Παρουσία του ακάρεου, ο FsK διατηρεί την ικανότητα να επάγει αυτά τα γονίδια σε σύγκριση με τα φυτά

που δεν έχουν αποικιστεί. Επιπλέον, ο αποικισμός του *FsK* οδήγησε σε σημαντική περαιτέρω αύξηση των επιπέδων μεταγραφής του *WIPI-II*. Το γονίδιο *GGPS1* που κωδικοποιεί το βιοσυνθετικό ένζυμο της συνθάσης του διφωσφορικού γερανυλίου-γερανυλίου είναι γνωστό ότι επάγεται από τον *T. urticae* (Kant et al., 2004; Ament et al., 2006). Στην παρούσα μελέτη, δεν μπορούσαμε να ανιχνεύσουμε αυτήν την σταθερή θετική ρύθμιση της έκφρασης του γονιδίου *GGPS1* 4 μέρες μετά την εναπόθεση του ακάρεου. Το ίδιο αναφέρθηκε από τους Martel et al. (2015) για φυτά που έχουν μολυνθεί με ακάρεα μόνο για 1 ημέρα. Είναι πιθανό να χρειάζεται μια χρονική καθυστέρηση για την επαγωγή μιας έμμεσης άμυνας ως απάντηση στη σίτιση των ακάρεων σε φυτά ντομάτας και αυτό μπορεί να εξηγήσει την ασυνέπεια στα επίπεδα γονιδιακής έκφρασης του γονιδίου *GGPS1*.

Συλλογικά, τα δεδομένα μας υποστηρίζουν την υπόθεση ότι το ο ενδοφυτικός μύκητας *F. solani* στέλεχος K μεταβάλλει τις αποκρίσεις τομάτας σε συνθήκες προσβολής από ακάρεα και συγκεκριμένα από τετράνυχο, προς όφελος του φυτού. Τέλος, πρέπει να σημειωθεί ότι τα πειράματά μας έγιναν με φυτά που αναπτύχθηκαν σε μίγμα άμμου με βερμικουλίτη. Ως εκ τούτου, μερικές από τις διαφορές που παρατηρήθηκαν μεταξύ της παρούσας μελέτης και των προηγούμενων εργασιών μπορεί να σχετίζονται με την απουσία άλλων μικροβίων του εδάφους στη μελέτη μας καθώς, σε διαφορετικά περιβάλλοντα (δηλ. όταν τα φυτά αναπτύσσονται στο έδαφος) θα μπορούσαν να αλληλεπιδράσουν με το ενδόφυτο ή /και να επηρεάσει τη γονιδιακή έκφραση.

ΒΙΒΛΙΟΓΡΑΦΙΑ

- Alba, J. M., Schimmel, B. C. J., Glas, J. J., Ataide, L. M. S., Pappas, M. L., Villarroel, C. A., et al. (2015). Spider mites suppress tomato defenses downstream of jasmonate and salicylate independently of hormonal crosstalk. *New Phytol.* 205, 828–840. doi: 10.1111/nph.13075
- Ament, K., Kant, M. R., Sabelis, M. W., Haring, M. A., and Schuurink, R. C. (2004). Jasmonic acid is a key regulator of spider mite-induced volatile terpenoid and methyl salicylate emission in tomato. *Plant Physiol.* 135, 2025–2037. doi: 10.1104/pp.104.048694
- Ament, K., Van Schie, C. C., Bouwmeester, H. J., Haring, M. A., and Schuurink, R. C. (2006). Induction of a leaf specific geranylgeranyl pyrophosphate synthase and emission of (E,E)-4,8,12-trimethyltrideca-1,3,7,11-tetraene in tomato are dependent on both jasmonic acid and salicylic acid signaling pathways. *Planta* 224, 1197–1208. doi: 10.1007/s00425-006-0301-5
- Ataide, L. M. S., Pappas, M. L., Schimmel, B. C. J., Lopez-Orenes, A., Alba, J. M., Duarte, M. V. A., et al. (2016). Induced plant-defenses suppress herbivore reproduction but also constrain predation of their offspring. *Plant Sci.* 252, 300–310. doi: 10.1016/j.plantsci.2016.08.004
- Carrillo, L., Martinez, M., Ramessar, K., Cambra, I., Castañera, P., Ortego, F., et al. (2011). Expression of a barley cystatin gene in maize enhances resistance against phytophagous mites by altering their cysteine-proteases. *Plant Cell Rep.* 30, 101–112. doi: 10.1007/s00299-010-0948-z
- Erban, T., and Hubert, J. (2010). Determination of pH in regions of the midguts of acaridid mites. *J. Insect Sci.* 10:42. doi: 10.1673/031.010.4201
- Garantonakis, N., Pappas, M. L., Varikou, K., Skiada, V., Broufas, G., Kavroulakis, N., et al. (2018). Tomato inoculation with the endophytic strain *Fusarium solani* K results in reduced feeding damage by the zoophytophagous predator *Nesidiocoris tenuis*. *Front. Ecol. Evol.* 6:126. doi: 10.3389/fevo.2018.00126
- Hartley, S. E., and Gange, A. C. (2009). Impacts of plant symbiotic fungi on insect herbivores: mutualism in a multitrophic context. *Annu. Rev. Entomol.* 54, 323–342. doi: 10.1146/annurev.ento.54.110807.090614
- Jongebloed, P. H. J., Elgersma, D. M., and Sabelis, M. W. (1992). Does a vascular fungus of tomato induce a defence response or a change in host plant quality that also affects the oviposition of spider mites? *Exp. Appl. Acarol.* 16, 227–236. doi: 10.1007/BF01193805
- Kant, M. R., Ament, K., Sabelis, M. W., Haring, M. A., and Schuurink, R. C. (2004). Differential timing of spider mite-induced direct and indirect defenses in tomato plants. *Plant Physiol.* 135, 483–495. doi: 10.1104/pp.103.038315
- Kant, M. R., Jonckheere, W., Knecht, B., Lemos, F., Liu, J., Schimmel, B. C. J., et al. (2015). Mechanisms and ecological consequences of plant defence induction and suppression in herbivore communities. *Ann. Bot.* 115, 1015–1051. doi: 10.1093/aob/mcv054
- Kant, M. R., Sabelis, M. W., Haring, M. A., and Schuurink, R. C. (2008). Intraspecific variation in a generalist herbivore accounts for differential induction and impact of host plant defences. *Proc. R. Soc. B Biol. Sci.* 275, 443–452. doi: 10.1098/rspb.2007.1277

- Kavroulakis, N., Ntougias, S., Zervakis, G. I., Ehaliotis, C., Haralampidis, K., and Papadopoulou, K. K. (2007). Role of ethylene in the protection of tomato plants against soil-borne fungal pathogens conferred by an endophytic *Fusarium solani* strain. *J. Exp. Bot.* 58, 3853–3864. doi: 10.1093/jxb/erm230
- Li, C., Williams, M. M., Loh, Y. T., Gyu, I. L., and Howe, G. A. (2002). Resistance of cultivated tomato to cell content-feeding herbivores is regulated by the octadecanoid-signaling pathway. *Plant Physiol.* 130, 494–503. doi: 10.1104/pp.005314
- Martel, C., Zhurov, V., Navarro, M., Martinez, M., Cazaux, M., Auger, P., et al. (2015). Tomato whole genome transcriptional response to *Tetranychus urticae* Identifies divergence of spider mite-induced responses between tomato and *Arabidopsis*. *Mol. Plant Microbe Interact.* 28, 343–361. doi: 10.1094/MPMI-09-14-0291-FI
- Pieterse, C. M. J., Zamioudis, C., Berendsen, R. L., Weller, D. M., Van Wees, S. C. M., and Bakker, P. A. H. M. (2014). Induced systemic resistance by beneficial microbes. *Annu. Rev. Phytopathol.* 52, 347–375. doi: 10.1146/annurev-phyto-082712-102340
- Pineda, A., Soler, R., Weldegergis, B. T., Shimwela, M. M., Van Loon, J. J. A., and Dicke, M. (2013). Non-pathogenic rhizobacteria interfere with the attraction of parasitoids to aphid-induced plant volatiles via jasmonic acid signalling. *Plant Cell Environ.* 36, 393–404. doi: 10.1111/j.1365-3040.2012.02581.x
- Pineda, A., Zheng, S. J., van Loon, J. J. A., Pieterse, C. M. J., and Dicke, M. (2010). Helping plants to deal with insects: the role of beneficial soil-borne microbes. *Trends Plant Sci.* 15, 507–514. doi: 10.1016/j.tplants.2010.05.007
- Puthoff, D. P., Holzer, F. M., Perring, T. M., and Walling, L. L. (2010). Tomato pathogenesis-related protein genes are expressed in response to *Trialeurodes vaporariorum* and *Bemisia tabaci* biotype B feeding. *J. Chem. Ecol.* 36, 1271–1285. doi: 10.1007/s10886-010-9868-1
- Shikano, I., Rosa, C., Tan, C. W., and Felton, G. W. (2017). Tritrophic interactions: microbe-mediated plant effects on insect herbivores. *Annu. Rev. Phytopathol.* 55, 313–331. doi: 10.1146/annurev-phyto-080516-035319
- Villarroel, C. A., Jonckheere, W., Alba, J. M., Glas, J. J., Dermauw, W., Haring, M. A., et al. (2016). Salivary proteins of spider mites suppress defenses in *Nicotiana benthamiana* and promote mite reproduction. *Plant J.* 86, 119–131
- Zamioudis, C., and Pieterse, C. M. (2012). Modulation of host immunity by beneficial microbes. *Mol. Plant Microbe Interact.* 25, 139–150. doi: 10.1094/MPMI-06-11-0179