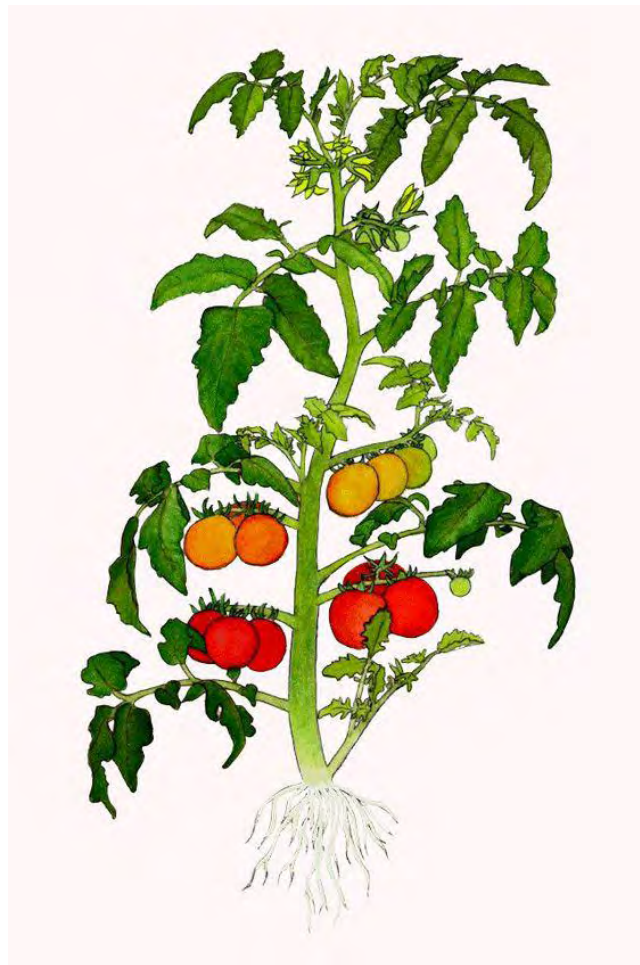




ΠΑΝΕΠΙΣΤΗΜΙΟ ΘΕΣΣΑΛΙΑΣ
ΣΧΟΛΗ ΕΠΙΣΤΗΜΩΝ ΥΓΕΙΑΣ
ΤΜΗΜΑ ΒΙΟΧΗΜΕΙΑΣ & ΒΙΟΤΕΧΝΟΛΟΓΙΑΣ

ΔΙΠΛΩΜΑΤΙΚΗ ΕΡΓΑΣΙΑ

Η επίδραση του ενδοφυτικού μύκητα
Fusarium solani στέλεχος K (FsK)
στην αντοχή φυτών τομάτας στην
ξηρασία



Βλέτσος Παναγιώτης

Λάρισα 2019

Thesis

Effect of the endophytic fungus
Fusarium solani strain K (FsK) to water
stress tolerance of tomato plants

ΣΥΜΒΟΥΛΕΥΤΙΚΗ & ΕΞΕΤΑΣΤΙΚΗ ΕΠΙΤΡΟΠΗ

1. **Παπαδοπούλου Καλλιόπη**, Αναπληρώτρια Καθηγήτρια Βιοτεχνολογίας Φυτών,
του Τμήματος Βιοχημείας και Βιοτεχνολογίας,
του Πανεπιστημίου Θεσσαλίας

2. **Καρπούζας Δημήτριος**, Καθηγητής Περιβαλλοντικής Μικροβιολογίας
και Βιοτεχνολογίας, του Τμήματος Βιοχημείας και Βιοτεχνολογίας,
του Πανεπιστημίου Θεσσαλίας

3. **Τσίκου Δανιέλα**, Επίκουρος Καθηγήτρια Μοριακής και Αναπτυξιακής Βιολογίας
Φυτών, του Τμήματος Βιοχημείας και Βιοτεχνολογίας,
του Πανεπιστημίου Θεσσαλίας

Ευχαριστίες

Αρχικά θα ήθελα να ευχαριστήσω την επιβλέπουσα καθηγήτρια μου κ. Παπαδοπούλου Καλλιόπη που μου έδωσε την ευκαιρία να συμμετέχω στο εργαστήριο της για την εκπόνηση της πτυχιακής μου εργασίας. Ευχαριστώ για τον χρόνο, τις πολύτιμες γνώσεις και συμβουλές που μου δώσατε κατά τη διάρκεια της εργασίας.

Ένα μεγάλο ευχαριστώ στην κ. Μαριάννα Αβραμίδου και στην κ. Μαρία Φέκα για την βοήθεια τους τόσο στον σχεδιασμό όσο και στην πραγματοποίηση του πειράματος. Σας ευχαριστώ για τις πολύτιμες γνώσεις και συμβουλές, για την αμέριστη βοήθεια και ενδιαφέρον που μου δείξατε.

Επίσης να ευχαριστήσω την Δήμητρα και την Τζένη για την εθελοντική τους βοήθεια που ήταν πολύτιμη για την ολοκλήρωση του πειράματος μου.

Ευχαριστώ πολύ όλη την ομάδα του εργαστηρίου Βιοτεχνολογίας Φυτών και Περιβάλλοντος για τις γνώσεις και το ευχάριστο κλίμα που πρόσφεραν, καθώς και για την υπομονή τους σε όλο το διάστημα παραμονής μου στο εργαστήριο.

Τέλος θα ήθελα να ευχαριστήσω την οικογένεια μου για την υποστήριξη που μου έδειξαν όλα αυτά τα χρόνια .

Περιεχόμενα

Περίληψη	8
Abstract	9
1. Εισαγωγή	10
1.1 Φυτά	10
1.2 Άμυνα φυτών.....	11
1.2.1 Φυτική Άμυνα έναντι φυτοφάγων.....	11
1.2.2 Φυτική Άμυνα έναντι παθογόνων	12
1.3 Απορρόφηση νερού από τις ρίζες.....	13
1.4 Water stress-Ξηρασία.....	14
1.5 Μύκητες	15
1.6 Ενδοφυτικοί μύκητες.....	17
1.7 Fusarium Solani.....	17
1.7.1 FsK.....	19
2. Υλικά και μέθοδοι.....	22
2.1 Προετοιμασία υποστρώματος	22
2.2 Field Capacity Test.....	22
2.2.1 Περιεκτικότητα Υγρασίας (ΠΥ)- Moisture Content(MC)	22
2.2.2 Ικανότητα Συγκράτησης Νερού(ΙΣΝ)- Water Holding Capacity(WHC)....	22
2.3 Φυτά και συνθήκες ανάπτυξης.....	22
2.4 Συνθήκες ανάπτυξης μυκητιακών στελεχών.....	23
2.5 Συλλογή κονιδίων	23
2.6 Μέτρηση κονιδίων	24
2.7 Δειγματοληψία	25
2.8 Απομόνωση γενωμικού DNA	25
2.9 Ποσοτικοποίηση DNA	25
2.10 Ανίχνευση αποικισμού από τον μύκητα F. solani στις ρίζες τομάτας.....	26
2.11.1. Potato dextrose Broth/ Potato dextrose Agar PDB/PDA.....	27
2.11.2. Θρεπτικό Hoagland	28
3 Αποτελέσματα.....	29
3.1 Field Capacity Test.....	29
3.1.1 Περιεκτικότητα Υγρασίας-Moisture content.....	29

3.1.2 Ικανότητα Συγκράτησης νερού- Water Holding Capacity	29
3.2 Φυτά και συνθήκες ανάπτυξης.....	30
3.4 Δειγματοληψία	34
3.5 Απομόνωση- Ποσοτικοποίηση DNA	41
3.6 Ανίχνευση αποικισμού από τον μύκητα <i>F. solani</i> στις ρίζες τομάτας	41
4. Discussion	43
5. Reference	46

Πίνακες

ΠΙΝΑΚΑΣ 1 ΤΑΞΙΝΟΜΗΣΗ ΤΟΥ <i>FUSARIUM SOLANI</i>	18
ΠΙΝΑΚΑΣ 2 ΣΥΝΤΑΓΗ ΖΩΜΟΥ ΔΕΣΤΡΟΖΗΣ ΠΑΤΑΤΑΣ	27
ΠΙΝΑΚΑΣ 3 ΘΡΕΠΤΙΚΟ ΔΙΑΛΥΜΑ HOAGLAND.....	28
ΠΙΝΑΚΑΣ 4 ΜΕΤΡΗΣΗ ΒΑΡΟΥΣ ΕΛΑΦΟΥΣ ΓΙΑ ΥΠΟΛΟΓΙΣΜΟ ΤΟΥ ΠΥ%..	29
ΠΙΝΑΚΑΣ 5 ΜΕΤΡΗΣΗ ΒΑΡΟΥΣ ΥΠΟΣΤΡΩΜΑΤΟΣ ΓΙΑ ΥΠΟΛΟΓΙΣΜΟ ΤΟΥ ΙΣΝ%	29
ΠΙΝΑΚΑΣ 6 ΜΕΤΡΗΣΗ ΣΥΝΘΕΤΩΝ ΦΥΛΛΩΝ/ ΦΥΛΛΑΡΙΩΝ	30
ΠΙΝΑΚΑΣ 7 ΜΕΤΡΗΣΗ ΚΟΝΙΔΙΩΝ ΤΟΥ ΜΥΚΗΤΑ <i>F. SOLANI</i> ΣΕ ΠΛΑΚΑ NEUBAUER	33
ΠΙΝΑΚΑΣ 8 ΑΠΟΤΕΛΕΣΜΑΤΑ ΔΕΙΓΜΑΤΟΛΗΨΙΑΣ.....	35

Εικόνες

ΕΙΚΟΝΑ 1 ΑΠΕΙΚΟΝΙΣΗ ΦΥΤΟΥ ΤΟΜΑΤΑΣ(<i>SOLANUM LYCOPERSICUM</i>)	10
ΕΙΚΟΝΑ 2 ΑΝΑΠΑΡΑΓΩΓΗ ΑΣΚΟΜΥΚΗΤΩΝ.....	16
ΕΙΚΟΝΑ 3 ΚΑΛΛΙΕΡΓΕΙΑ ΜΥΚΗΤΑ (<i>FSK</i>). ΚΟΝΙΔΙΑ ΜΥΚΗΤΑ <i>FSK</i>	19
ΕΙΚΟΝΑ 4 ΑΠΕΙΚΟΝΙΣΗ ΠΛΑΚΑΣ NEUBAUER.....	24
ΕΙΚΟΝΑ 5 ΑΠΕΙΚΟΝΙΣΗ QPCR PLATE.....	27
ΕΙΚΟΝΑ 6 ΦΥΤΑ ΤΟΜΑΤΑΣ ΚΑΤΑ ΤΗΝ 3Η ΗΜΕΡΑ ΞΗΡΑΣΙΑΣ.....	32
ΕΙΚΟΝΑ 7 ΦΥΤΑ ΤΟΜΑΤΑΣ ΚΑΤΑ ΤΗΝ 8Η ΗΜΕΡΑ ΞΗΡΑΣΙΑΣ.....	32
ΕΙΚΟΝΑ 8 ΦΥΤΑ ΤΟΜΑΤΑΣ ΚΑΤΑ ΤΗΝ 12Η ΗΜΕΡΑ ΞΗΡΑΣΙΑΣ.....	33

Διαγράμματα

FIGURE 1 ΜΕΤΡΗΣΗ ΜΕΣΟΥ ΟΡΟΥ ΑΛΗΘΙΝΩΝ ΦΥΛΛΩΝ.	31
FIGURE 2 ΜΕΤΡΗΣΗ ΜΕΣΟΥ ΟΡΟΥ ΦΥΛΛΑΡΙΩΝ ΑΝΑ ΣΥΝΘΕΤΟ ΦΥΛΛΟ	31
FIGURE 3 ΜΗΚΟΣ ΤΗΣ ΡΙΖΑΣ ΤΗΣ ΤΟΜΑΤΑΣ.....	36
FIGURE 4 ΦΡΕΣΚΟ ΒΑΡΟΣ ΡΙΖΩΝ	37
FIGURE 5 ΦΡΕΣΚΟ ΒΑΡΟΣ ΦΥΛΛΩΝ.....	37
FIGURE 6 ΦΡΕΣΚΟ ΒΑΡΟΣ ΒΛΑΣΤΩΝ	37
FIGURE 7 ΞΗΡΟ ΒΑΡΟΣ ΡΙΖΩΝ	38
FIGURE 8 ΞΗΡΟ ΒΑΡΟΣ ΦΥΛΛΩΝ	38
FIGURE 9 ΞΗΡΟ ΒΑΡΟΣ ΒΛΑΣΤΩΝ	39
FIGURE 10 ΕΠΙΠΕΔΑ ΠΕΡΙΕΚΤΙΚΟΤΗΤΑΣ ΝΕΡΟΥ ΤΩΝ ΡΙΖΩΝ	39
FIGURE 11 ΕΠΙΠΕΔΑ ΠΕΡΙΕΚΤΙΚΟΤΗΤΑΣ ΝΕΡΟΥ ΤΩΝ ΦΥΛΛΩΝ.....	40
FIGURE 12 ΕΠΙΠΕΔΑ ΠΕΡΙΕΚΤΙΚΟΤΗΤΑΣ ΝΕΡΟΥ ΤΩΝ ΒΛΑΣΤΩΝ	40
FIGURE 13 ΑΠΟΙΚΙΣΜΟΣ ΜΥΚΗΤΑ FSK.....	42
FIGURE 14 ΑΠΟΙΚΙΣΜΟΣ ΜΥΚΗΤΑ FSK-F	42

Περίληψη

Το *Fusarium solani* στέλεχος K (FsK) είναι ένα μη παθογόνο στέλεχος του *Fusarium solani*, το οποίο ανήκει στο φύλο των Ασκομυκήτων και έχει βρεθεί ότι μπορεί να δημιουργήσει ευεργετικές σχέσεις με φυτά. Πιο συγκεκριμένα ο μύκητας φαίνεται να δημιουργεί συμβιωτικές σχέσεις με το φυτό της τομάτας, όπου αποικίζει το ριζικό σύστημα του φυτού ως ενδόφυτο. Η συμβίωση με τον μύκητα έχει θετικές επιδράσεις στο φυτό, καθώς φαίνεται ότι προσφέρει στο φυτό προστασία έναντι παθογόνων μικροοργανισμών και φυτοφάγων εντόμων όπως είναι το FORL και *N. tenuis* αντιστοίχως. Επιπλέον, πρόσφατες μελέτες έδειξαν ότι πέρα από την προστασία που προσφέρει ο μύκητας έναντι βιοτικού στρες, μπορεί επιπλέον να προσφέρει αντοχή σε συνθήκες ξηρασίας (αβιοτικό στρες). Αργότερα απομονώθηκε και ένα μετάλλαγμα του στελέχους FsK, γνωστό ως FsK-F το οποίο μπορεί επίσης να προσφέρει προστασία έναντι των παθογόνων μικροοργανισμών όμως είναι άγνωστο εάν έχει διατηρήσει την ιδιότητα του να προσφέρει στα φυτά επιπλέον αντοχή στην ξηρασία.

Σκοπός της εργασίας ήταν να μελετήσουμε τις διαφορές που προκύπτουν στην ανάπτυξη φυτών τομάτας όταν εκτίθενται συγχρόνως σε δυο διαφορετικούς παράγοντες τις συνθήκες ξηρασίας και την παρουσία των δυο διαφορετικών στελεχών του μύκητα *F. solani* σε σχέση με φυτά ελέγχου που δεν εκτέθηκαν σε συνθήκες ξηρασίας και δεν εμβολιάστηκαν με τον μύκητα. Οι παράγοντες στους οποίους έγινε μελέτη για τον εντοπισμό φαινοτυπικών παραλλαγών στην ανάπτυξη των φυτών της τομάτας ήταν ο αριθμός των φύλλων, το μήκος της ρίζας, το βάρος και η περιεκτικότητα σε νερό διακριτών τμημάτων του φυτού (φύλλα, βλαστός, ρίζες). Μέσω ανάλυσης των αποτελεσμάτων που προέκυψαν από αυτούς τους παράγοντες παρατηρήθηκε ότι τα φυτά βρίσκονταν αρχικά στο ίδιο αναπτυξιακό στάδιο ανεξαρτήτως των συνθηκών στις οποίες μεγάλωσαν όμως σε μεταγενέστερα στάδια παρατηρήθηκαν μερικές σημαντικές διαφορές μεταξύ των φυτών που μεγάλωναν κάτω από συνθήκες ξηρασίας. Επίσης παρατηρήθηκαν στατιστικώς σημαντικές διαφορές όσον αναφορά την περιεκτικότητα νερού στο βλαστό καθώς και στο ξηρό και φρέσκο βάρος του βλαστού. Από αυτά τα αποτελέσματα προκύπτουν ενδείξεις πως η παρουσία του μύκητα έχει κάποια επίδραση στην ανάπτυξη του φυτού και ειδικά όταν το φυτό βρίσκεται κάτω από συνθήκες ξηρασίας.

Λέξεις κλειδιά: τομάτα, *Fusarium solani*, ξηρασία

Abstract

Fusarium solani strain K (FsK) is a non-pathogenic strain of *Fusarium solani*, which belongs to the Ascomycota phylum and has been found to be capable of forming symbiotic relationships with plants. In particular, the fungus appears to form symbiotic relationships with the tomato plant, colonizing the root system of the plant as an endophyte. Coexistence with the fungus seem to have positive effects on the plant, as it appears to provide the plant with protection against pathogenic micro-organisms and herbivores such as FOCL and *N. tenuis* respectively. Furthermore, recent studies have shown that in addition to the fungus's protection against biotic stress, it can also provide resistance to water stress-drought (abiotic stress). A mutant of the FsK strain, also known as FsK-F, was later isolated, which may also provide protection against pathogenic micro-organisms, but it is unknown whether it has retained its ability to provide the plants with additional drought resistance.

The purpose of this study was to study the effects on the development of tomato plants that occurred due to exposure to drought conditions and the presence of each variant of *F. solani* fungus in relation to control plants that were neither exposed to drought conditions nor contaminated with the FsK variants. fungus. Factors studied in order to identify variations in tomato plant growth were, among others, the number of leaves, the root's length, as well as the weight and water content of separate parts of the plant (leaves, shoots, roots). By analyzing the results that emerged from these factors, it was observed that the plants were initially at the same developmental stage regardless of the conditions in which they were grown, but in later stages some significant differences were observed between the plant that were grown under drought conditions. There were also statistically significant differences in the water content of the shoot as well as in the dry and fresh weight of the shoot. These results indicate that the presence of the fungus has some effect on the growth of the plant, especially when the plant is under drought conditions.

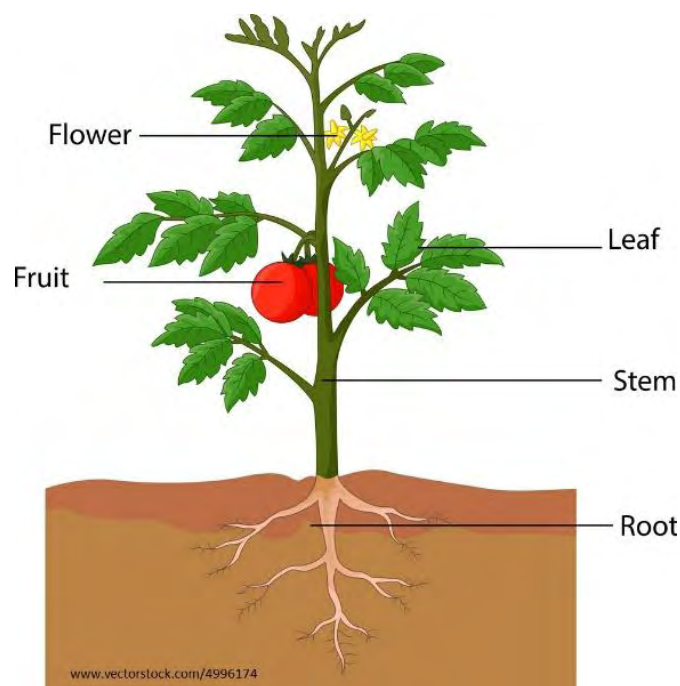
Keywords: tomato, *Fusarium solani*, drought

1. Εισαγωγή

1.1 Φυτά

Το φυτό της τομάτας, γνωστό και με την επιστημονική ονομασία *Solanum lycopersicum* ή Στρώχνων το λυκοπερσικόν, είναι ένα ανθοφόρο φυτό της οικογένειας των Στρυχνοειδών (Solanaceae), το οποίο καλλιεργείται εκτεταμένα για τους καρπούς του. Η τομάτα εισήχθη στην Ευρώπη από τους Ισπανούς στις αρχές του 16ου αιώνα και οι Ισπανοί και οι Ιταλοί φαίνεται να ήταν οι πρώτοι Ευρωπαίοι που την υιοθέτησαν ως τρόφιμα. Η καλλιεργημένη τομάτα προέρχεται από τον Νέο Κόσμο, πιθανότατα από το Μεξικό, και προήρθε από άγρια είδη που είναι ιθαγενή στην περιοχή των Άνδεων στην Νότια Αμερική, όπως είναι το Περού (Jenkins et al, 1948).

Από βοτανικής άποψης η τομάτα είναι φρούτο καθώς έχει μια δομή που φέρει σπόρους και που αναπτύσσεται από την ωοθήκη των ανθών του φυτού, όμως με βάση την διατροφική της αξία κατατάσσεται ως λαχανικό. Οι τομάτες αποτελούν μια καλή πηγή θρεπτικών ουσιών, όπως είναι η βιταμίνης C και η φυτοχημική ουσία λυκοπένιο. Το φυτό της τομάτας αναπτύσσει μια κεντρική ρίζα με αρκετές δευτερεύουσες ρίζες και ριζικά τριχίδια. Ο κεντρικός βλαστός του φυτού φέρει τα πραγματικά φύλλα, στις μασχάλες των οποίων υπάρχουν οφθαλμοί που δίνουν τους πλευρικούς βλαστούς. Αρχικά ο βλαστός είναι τρυφερός, χυμώδης, σταδιακά όμως γίνεται πιο σκληρός χωρίς να ξυλοποιείται και παραμένει σχετικά εύθραυστος. Τα πραγματικά φύλλα του φυτού είναι σύνθετα και εμφανίζονται πάνω στο βλαστό σε ελικοειδή διάταξη. Κάθε φύλλο αποτελείται από ζεύγη φυλλαρίων και παραφύλλων, με ένα μόνο τερματικό φυλλάριο. Ο αριθμός των ζευγών σε κάθε φύλλο διαφέρει ανάλογα με την ποικιλία και τη θέση του φύλλου στο βλαστό του φυτού. Στην επιφάνεια των φύλλων όπως και των βλαστών υπάρχουν αδενώδεις τρίχες γνωστές και ως τρίχωμα, οι οποίες, όταν θραύονται, αναδίδουν τη χαρακτηριστική οσμή του φυτού λόγω απελευθέρωσης αιθέριων ελαίων.



Εικόνα 1 Απεικόνιση φυτού τομάτας (*Solanum lycopersicum*)

Η ντομάτα είναι ένα από τα πιο σημαντικά λαχανικά στον κόσμο και πιθανώς η πιο προτιμώμενη καλλιέργεια για τον κήπο. Επιπλέον οι τομάτες είναι το λαχανικό που έχει τη μεγαλύτερη ποικιλία σε αριθμό υβριδίων και ποικιλιών. Σε αυτήν την εργασία χρησιμοποιήθηκε η ποικιλία Pearson, η οποία χαρακτηρίζεται από φυτά εύρωστα μέτριας ανάπτυξης, χρησιμοποιείται κυρίως σε όψιμες υπαίθριες καλλιέργειες και δίνει καρπό μέσου-μεγάλου μεγέθους, σφαιροειδή και σαρκώδη. (ΟΛΥΜΠΙΟΥ Μ.ΧΡΙΣΤΟΥ 2001)

1.2 Άμυνα φυτών

Τα φυτά έχουν αναπτύξει διάφορες στρατηγικές για την προστασία τους έναντι τόσο στους φυτοφάγους οργανισμούς όσο και στους παθογόνους μικροοργανισμούς. Τα φυτά παράγουν μια μεγάλη ποικιλία οργανικών ενώσεων που δεν συμβάλουν άμεσα σε διαδικασίες που σχετίζονται με την ανάπτυξη ή την αναπαραγωγή τους. Αυτές οι ενώσεις λέγονται δευτερογενείς μεταβολίτες και διαφέρουν από τους πρωτογενείς μεταβολίτες σε δυο βασικά χαρακτηριστικά. Αρχικά ότι η απουσία ενός δευτερογενούς μεταβολίτη δεν οδηγεί σε άμεσο θάνατο του οργανισμού, αλλά μπορεί να επιφέρει κάποια μακροπρόθεσμη βλάβη που θα επηρεάσει την επιβίωση ή την γονιμότητα του οργανισμού, ενώ μπορεί να μην προκαλέσει καμία σημαντική αλλαγή σε κάποιες περιπτώσεις.

Επιπλέον ότι ορισμένοι δευτερογενείς μεταβολίτες εμφανίζονται μόνο σε κάποιους οργανισμούς ή σε συγκεκριμένες φυλογενετικές ομάδες οργανισμών, ενώ οι πρωτογενείς μεταβολίτες συναντιούνται σε όλα τα είδη των φυτών. Οι δευτερογενείς μεταβολίτες μπορούν να διακριθούν με βάση την χημική δομή τους σε τρεις ομάδες τα τερπένια, τις φαινολικές ενώσεις και τις αζωτούχες ενώσεις. Μέσω της μελέτης που έγινε για τους δευτερογενείς μεταβολίτες, σήμερα είναι γνωστό ότι παίζουν σημαντικό ρόλο σε διάφορες λειτουργίες των φυτών όπως είναι η προστασία των φυτών από παθογόνους μικροοργανισμούς, φυτοφάγους οργανισμούς καθώς και στις συμβιωτικές σχέσεις του φυτού με μικροοργανισμούς.(Taiz & Zeiger 1991)

1.2.1 Φυτική Άμυνα έναντι φυτοφάγων

Στους μηχανισμούς άμυνας έναντι των φυτοφάγων εντόμων υπάρχουν δυο διακριτές κατηγορίες, την ιδιοσυστατική (εγγενή) άμυνα και την και την επαγόμενη άμυνα. Οι μηχανισμοί της ιδιοσυστατικής άμυνας έχουν το χαρακτηριστικό ότι είναι πάντα παρόντες στα φυτά. Στην ιδιοσυστατική άμυνα αρκετοί μηχανισμοί περιλαμβάνουν την χρήση χημικών ουσιών που παράγονται από τα ίδια τα φυτά (δευτερογενείς μεταβολίτες), οι οποίες έχουν τοξική δράση έναντι στα φυτοφάγα (ταννίνες, αλκαλοειδή). Από την άλλη οι μηχανισμοί της επαγόμενης άμυνας, όπως υποδηλώνει και το όνομα τους ενεργοποιούνται μόνο αφού επέρθει τραυματισμός του φυτού. Οι μηχανισμοί αυτής της άμυνας περιλάβουν την παραγωγή πρωτεϊνών με προστατευτική δράση (λεκτίνες) καθώς και αμυντικών δευτερογενών μεταβολιτών.

Το μονοπάτι που σχετίζεται κατά κύριο λόγο με την προστασία έναντι των φυτοφάγων είναι η οδός του οκταδεκανοϊκού που οδηγεί στη σύνθεση της φυτικής ορμόνης του ιασμονικού οξέος (JA). Τα επίπεδα του JA αυξάνονται ως απόκριση σε βλάβες που προκαλούνται από φυτοφάγα και έχει βρεθεί ότι η φυτοορμόνη συμμετέχει στην έκφραση γονιδίων που σχετίζονται με την άμυνα του φυτού. (Taiz & Zeiger 1991)

1.2.2 Φυτική Άμυνα έναντι παθογόνων

Τα φυτά βρίσκονται συνεχώς σε κίνδυνο μόλυνσεως από παθογόνους οργανισμούς, για αυτό τον λόγο έχουν αναπτύξει διάφορες στρατηγικές άμυνας για να αντιμετωπίσουν τα παθογόνα. Αρχικά στα φυτά υπάρχουν διάφορες ενώσεις με αντιμικροβιακή δράση, προϊόντα του δευτερογενούς μεταβολισμού, που παράγονται συνεχώς (πριν από εισβολή του παθογόνου) για να προστατέψουν τα φυτά. Οι περισσότερες, όμως, αμυντικές ενώσεις ενεργοποιούνται αφού γίνει εισβολή του φυτού από τον παθογόνο μικροοργανισμό.

Ένα κλασικό παράδειγμα μηχανισμού άμυνας είναι μια μορφή προγραμματισμένου κυτταρικού θανάτου γνωστή ως απόκριση υπερευαισθησίας (hypersensitive response), κατά την οποία τα κύτταρα που βρίσκονται κοντά στην περιοχή της μόλυνσης νεκρώνονται σε ραγδαίους ρυθμούς, ώστε να επιβραδύνουν την εξάπλωση του παθογόνου. Ο μηχανισμός μέσω του οποίου πραγματοποιείται η HR περιλαμβάνει την παραγωγή τοξικών χημικών ενώσεων, όπως είναι οι ελεύθερες ρίζες και δραστικές μορφές του οξυγόνου. Μια εξίσου σημαντική αμυντική απόκριση είναι η παραγωγή υδρολυτικών ενζύμων που προσβάλλουν το κυτταρικό τοίχωμα των παθογόνων. Αυτά τα ένζυμα ανήκουν σε μια ομάδα πρωτεϊνών που σχετίζονται με την παθογένεση τις PR proteins. Η καλύτερα χαρακτηρισμένη μορφή άμυνας έναντι σε παθογόνα είναι πιθανώς η παραγωγή φυτοαλεξινών. Οι φυτοαλεξίνες είναι μια ευρεία ομάδα δευτερογενών μεταβολιτών που παράγονται από έναν μεγάλο αριθμό φυτών που συσσωρεύονται στην περιοχή της μόλυνσης.

Τέλος υπάρχουν φυτά που μπορούν να αναγνωρίζουν ενώσεις που προέρχονται από τα παθογόνα και με αυτόν τον τρόπο επιτυγχάνουν πιο γρήγορες αποκρίσεις σε μολύνσεις. Ένα σύστημα του διαθέτουν αυτά τα φυτά είναι ικανό να αναγνωρίζει τα γενικά μοριακά πρότυπα που σχετίζονται με μικρόβιο (microbe-associated general molecular patterns) , που είναι καλά συντηρημένα μόρια που προέρχονται από τα παθογόνα. Ένα παρόμοιο σύστημα που προσφέρει ειδική άμυνα και αναγνώριση των παθογόνων είναι η αλληλεπίδραση μεταξύ των πρωτεϊνικών υποδοχέων που κωδικοποιούνται από το γονίδιο R των φυτών και των προϊόντων του γονιδίου Avr που προέρχεται από τα παθογόνα. (Taiz & Zeiger 1991)

Εάν το φυτό επιβιώσει από μια προηγούμενη μόλυνση που προξενήθηκε από την τοπική εισβολή ενός παθογόνου, τότε στις περισσότερες περιπτώσεις το φυτό αναπτύσσει αυξημένη ανθεκτικότητα σε μελλοντικές εισβολές από παθογόνα, ακόμη και εάν αυτές συμβούν σε διαφορετικά τμήματα του φυτού. Αυτό το φαινόμενο ονομάζεται επίκτητη συστηματική ανθεκτικότητα (systemic acquired resistance-SAR).

Η SAR εμφανίζεται μερικές μέρες έπειτα από την αρχική μόλυνση και είναι πιθανώς αποτέλεσμα των υψηλών επιπέδων πρωτεϊνών PR. Παρότι ο μηχανισμός δράσης της SAR παραμένει άγνωστος, υπάρχουν ενδείξεις ότι μια φυτοορμόνη το σαλικυλικό οξύ (SA) δρα ως σήμα σε αυτό το μονοπάτι σηματοδότησης.

Όταν από την άλλη το φυτό έρχεται σε επαφή με μη παθογόνους μικροοργανισμούς ενεργοποιείται μια άλλη μορφή ανθεκτικότητας η επαγόμενη συστηματική ανθεκτικότητα (induced systematic resistance, ISR). Για παράδειγμα ο αποικισμός της ρίζας από έναν μικροοργανισμό φαίνεται να προκαλεί τη δημιουργία και τη μεταφορά σημάτων σε όλο το φυτό. Αυτή η μεταφορά σημάτων, όπως είναι το αιθυλένιο και το ιασμονικό οξύ, οδηγεί σε αυξημένη προστασία του φυτού που το καθιστά καλύτερα προετοιμασμένο όταν γίνει μόλυνση από κάποιο παθογόνο. Αυτή η μορφή άμυνας δεν περιλαμβάνει την χρήση του SA ως σήμα ούτε και την παραγωγή PR πρωτεϊνών (Taiz & Zeiger 1991).

1.3 Απορρόφηση νερού από τις ρίζες

Το μεγαλύτερο μέρος του όγκου που έχουν τα κύτταρα στα φυτά, όπως και στους υπολοίπους οργανισμούς, οφείλεται στο νερό. Από την συνολική ποσότητα νερού που προσλαμβάνουν τα φυτά μόνο ένα μικρό ποσοστό της τάξης του 3% αξιοποιείται από το φυτό με το υπόλοιπο 97% να χάνεται στην ατμόσφαιρα λόγω της διαπνοής. Από αυτό το 3% που αξιοποιείται το 1% χρησιμοποιείται για τις μεταβολικές διεργασίες του φυτού, με κύριο παράδειγμα την φωτοσύνθεση, και το 2% χρησιμοποιείται για την ανάπτυξη του φυτού μέσω αύξησης του όγκου και επέκτασης των κυττάρων του φυτού.

Η πλειονότητα του νερού που υπάρχει στα φυτά προσλαμβάνεται από το έδαφος μέσω των ριζών. Η επαφή εδάφους- ρίζας είναι απαραίτητη για την ικανοποιητική πρόσληψη νερού από τις ρίζες, με αυτόν τον τρόπο δημιουργείται η επιφάνεια πρόσληψης νερού. Η ώριμη ανεπτυγμένη ρίζα δεν μπορεί να απορροφήσει ευκολά το νερό, λόγω ενός στρώματος της εξωδερμίδας που περιέχει υδρόφοβα μόρια στα κυτταρικά της τοιχώματα. Για αυτό τον λόγο η κύρια περιοχή απορρόφησης νερού είναι το αναπτυσσόμενο ακρόριζο. Τα ριζικά τριχίδια είναι προεκβολές επιδερμικών κυττάρων της ρίζας τα οποία αυξάνουν την επιφάνεια και την ικανότητα απορρόφησης νερού και ιόντων από την ρίζα.

Το νερό βρίσκεται ανάμεσα στους κόκκους του εδάφους και η πρόσληψη στο φυτών γίνεται μέσω των ριζών. Όμως η μεταφορά του νερού από την επιδερμίδα στο εσωτερικό της ρίζας ακολουθεί τρεις ξεχωριστές οδούς υδατικής κίνησης : την αποπλαστική, την συμπλαστική και την διαμεμβρανική οδό. Στην αποπλαστική οδό το νερό μεταφέρεται μέσω του αποπλάστη, που περιέχει τα κυτταρικά τοιχώματα και τους μεσοκυττάρους χώρους. Στην συμπλαστική οδό το νερό μεταφέρεται μέσω των πλασμοδέσμων που συνδέουν το κυτταρόπλασμα διαφορετικών κυττάρων. Τέλος στην διαμεμβρανική οδό το νερό εισέρχεται από την μια μεριά ενός κυττάρου, μεταφέρεται μέσα στο κύτταρο και εξέρχεται στην άλλη μεριά του κυττάρου. (Taiz & Zeiger 1991)

1.4 Water stress-Ξηρασία

Η ποσότητα νερού που είναι διαθέσιμη στο φυτό είναι πολύ σημαντική καθώς τόσο η έλλειψη νερού(ξηρασία) όσο και το πλεόνασμα νερού(πλημύρα) μπορούν να περιορίσουν την ανάπτυξη των φυτών. Η έλλειψη νερού ή ανεπαρκής διαθεσιμότητα νερού συναντάται στα περισσότερα φυσικά συστήματα εξαιτίας αναπάντεχων ή συνεχών περιόδων ανομβρίας. Η ανομβρία γνωστή και ξηρασία(Drought) αναφέρεται σε μια περίοδο ανεπαρκούς βροχόπτωσης που έχει ως αποτέλεσμα έλλειψη διαθέσιμου νερού στα φυτά. Η ξηρασία είναι με διαφορά το κύριο περιβαλλοντικό stress στη γεωργία που περιορίζει άμεσα την παγκόσμια παραγωγή των μεγάλων καλλιεργειών, μειώνοντας τη δυνητική απόδοση παραγωγής(yield) του φυτού.(Ximénez-Embún, 2016; 2017)

Υπάρχουν διάφοροι παράγοντες που μπορεί να οδηγήσουν το φυτό σε έλλειψη νερού. Η σχετική υγρασία του αέρα (relative humidity) επηρεάζει την διαβάθμιση της τάσης των υδρατμών μεταξύ των στομάτων και της ατμοσφαιράς, μιας διαβάθμισης που αποτελεί κύριο συντελεστή της διαπνοής. Σε πολύ χαμηλές τιμές σχετικής υγρασίας του αέρα το φυτό μπορεί να οδηγηθεί σε έλλειψη νερού, λόγω της μεγάλης διαβάθμισης τάσης ακόμη και εάν το έδαφος έχει επαρκή επίπεδα νερού.

Η αφυδάτωση του εδάφους οδηγεί στην μείωση του υδατικού δυναμικού (Ψ_w), της υδραυλικής αγωγιμότητας καθώς και σε αύξηση της συγκέντρωσης των αλάτων στο έδαφος, που οδηγεί σε ωσμωτική καταπόνηση και περαιτέρω μείωση του υδατικού δυναμικού. Όταν τα κύτταρα του φυτού χάνουν νερό μειώνεται ο όγκος τους κυρίως λόγω ενός φαινομένου του λέγεται κυτόρρηξη κατά το οποίο έχουμε κατάρρευση των κυτταρικών τοιχωμάτων. Αυτό οδηγεί σε συρρίκνωση των ριζών και καταστροφή των ριζικών τριχιδίων που έχει ως αποτέλεσμα την μειωμένη πρόσληψη νερού.

Τέλος, η έλλειψη νερού οδηγεί σε αφυδάτωση των κυττάρων που έχει αρνητικά αποτελέσματα σε φυσιολογικές διεργασίες του φυτού. Για παράδειγμα η επέκταση των κυττάρων είναι μια διεργασία που επηρεάζεται σε μεγάλο βαθμό από την διαθεσιμότητα νερού και σε καταστάσεις έλλειψης νερού προκαλείται αναστολή της επέκτασης των κυττάρων.

Εάν το έδαφος αφυδατωθεί σε μεγάλο βαθμό, η τιμή του υδατικού δυναμικού θα πέσει κάτω από το σημείο μόνιμου μαρασμού, το οποίο είναι η τιμή της εδαφικής υγρασίας(υδατικού δυναμικού) στην οποία το φυτό χάνει την ικανότητα του να επαναφέρει την πίεση σπαργής, ακόμη και εάν ενυδατωθεί εκ νέου το φυτό. Στο σημείο μόνιμου μαρασμού, η μεταφορά νερού από τις ρίζες είναι τόσο αργή ώστε δεν είναι δυνατή η αποκατάσταση της υδατικής ισορροπίας του φυτού.

Στο σημείο μόνιμου μαρασμού η υδατική ικανότητα του εδάφους είναι μικρότερη ή ίση με την ωσμωτική ικανότητα του φυτού (Ψ_s), επομένως η τιμή του σημείου μόνιμου μαρασμού επηρεάζεται όχι μόνο από έδαφος αλλά και από το είδος του φυτού. (Taiz & Zeiger 1991)

1.5 Μύκητες

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

Το Βασίλειο των μυκήτων διαχωρίζεται σε επτά φύλα :

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

Με τους βασιδιομύκητες και τους ασκομύκητες να ταξινομούνται επίσης στο υπό-βασίλειο των Δικάρυων (Dikarya). (Hibbett et al., 2007)

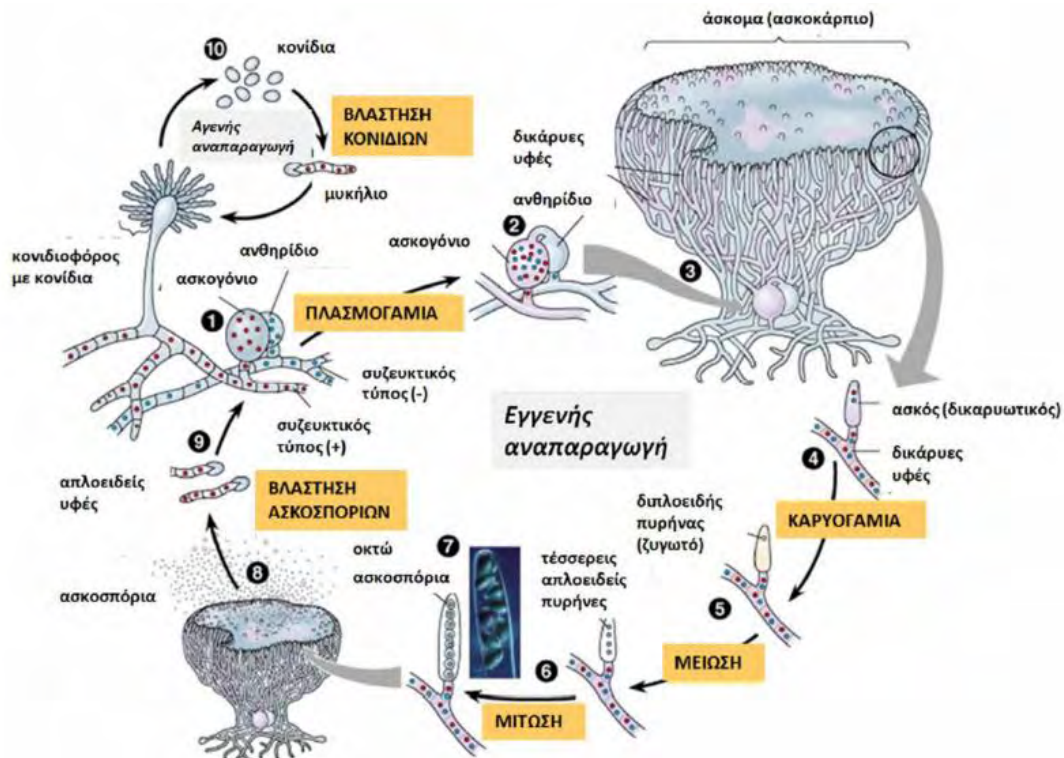
Στην πλειοψηφία τους οι μύκητες απαρτίζονται από λεπτά διαπλεκόμενα νημάτια γνωστά και ως υφές, με το κάθε νημάτιο να αποτελείται από κύτταρα με διαχωριστικά τοιχώματα (septa) μεταξύ τους. Μέσω των πόρων που υπάρχουν σε αυτά τα τοιχώματα επιτυγχάνεται η μεταφορά θρεπτικών και κυτταροπλάσματος μεταξύ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

Το κυτταρικό τοίχωμα των μυκήτων σχηματίζεται από πολυσακχαρίτες και χιτίνη, όμως όχι κυτταρίνη όπως στα φυτά. Η μίτωση στους μύκητες έχει κάποιες διαφορές σε σχέση με τους υπολοίπους ευκαρυωτικούς οργανισμούς, καθώς κατά την διάρκεια της μίτωσης ο πυρηνικός φάκελος δεν καταστρέφεται και η μιτωτική άτρακτος σχηματίζεται εντός του πυρήνα. Αυτή η παραλλαγή της μίτωσης λέγεται 'κλειστή μίτωση'.

Οι μύκητες είναι ετερότροφοι οργανισμοί που μπορούν να προσλαμβάνουν τα θρεπτικά τους με τους εξής τρόπους. Οι σαπροφυτικοί μύκητες αποδομούν νεκρή οργανική ύλη, όπως είναι το ξύλο, χαρτί, δέρμα κ.τ.λ., μέσω της έκκρισης πεπτικών ενζύμων και στην συνέχεια χρησιμοποιούν το δίκτυο των νηματίων τους για να απορροφήσουν τα θρεπτικά συστατικά τους. Οι παρασιτικοί μύκητες λαμβάνουν τα θρεπτικά τους από ζωντανούς οργανισμούς- ξενιστές είτε μέσω των νηματίων τους είτε μέσω δομών όπως είναι οι μυζητήρες.

Οι μύκητες μπορούν να αναπαραχθούν με δυο τρόπους την αγενή και την εγγενή αναπαραγωγή, με τους περισσότερους μύκητες ικανούς να αναπαραχθούν και με τους δυο τρόπους. Η κυριότερη αναπαραγωγική μονάδα των μυκήτων είναι το σπόριο που παράγεται σε ειδικά όργανα τόσο στην εγγενή αναπαραγωγή(εγγενή σπόρια) όσο και στην αγενή αναπαραγωγή(αγενή σπόρια). Η αγενής αναπαραγωγή πραγματοποιείται είναι μέσω εκβλαστημάτων είτε πιο συνηθέστερα μέσω παραγωγής σπορίων(=κονιδίων).

Η εγγενής αναπαραγωγή αποτελείται από τρία στάδια: 1)την πλασμογαμία, κατά την οποία έχουμε την συγχώνευση απλοειδών κυττάρων από δυο διαφορετικά νημάτια σε ένα, έτσι ώστε να βρεθούν οι δύο πυρήνες στο ίδιο κυτταρόπλασμα, 2) την καρυογαμία, που είναι η ένωση των δυο απλοειδών πυρήνων και ο σχηματισμός ενός διπλοειδούς ζυγωτού κυττάρου, 3) την μείωση κατά την οποία παράγονται κύτταρα με απλοειδή αριθμό χρωμοσωμάτων (Ζίφα et al 2011).



Εικόνα 2 Αναπαραγωγή Ασκομυκήτων

1.6 Ενδοφυτικοί μύκητες

Ο πιο κατάλληλος ορισμός του ενδοφυτισμού είναι η ασυμπτωματική σχέση μεταξύ φυτών και των οργανισμών που αναπτύσσονται μέσα στους ιστούς αυτών των φυτών. Υπάρχουν διάφορες κατηγορίες οργανισμών που είναι ενδόφυτα όπως είναι τα βακτήρια, τα φύκη (algae) και οι μύκητες που είναι και η πιο συχνά μελετημένοι οργανισμοί. Ακόμη και γένη φυτοπαθογόνων μυκήτων όπως είναι το Φουσάριο (*Fusarium*) και το Κολλητότριχο (*Colletotrichum*) φαίνεται να περιέχουν ενδοφυτικούς μύκητες.

Οι ενδοφυτικοί μύκητες διαφέρουν από τις μυκόριζες λόγω κάποιων βασικών διαφορών που είναι η απουσία εξειδικευμένων υφών στα σημεία επαφής με το φυτό, τα οποία υπάρχουν στις περισσότερες μυκόριζες, η απουσία της συγχρονισμένης ανάπτυξης φυτών-μυκήτων και η έλλειψη πλεονεκτημάτων για τα φυτά από την μεταφορά θρεπτικών ουσιών. Ωστόσο, τα φυτά μπορούν να επωφεληθούν έμμεσα από τα ενδόφυτα μέσω της αύξησης αντοχής των φυτών σε φυτοφάγα, παθογόνα ή στρες ή μέσω άλλων άγνωστων μηχανισμών. Αξίζει να σημειωθεί ότι έχει δοθεί ιδιαίτερη προσοχή στους ενδοφυτικούς μύκητες λόγω της ικανότητάς τους να παράγουν πληθώρα νέων δευτερογενών μεταβολιτών (Brundrett, 2004; Jia et al., 2016)

1.7 *Fusarium solani*

Το *Fusarium* είναι ένα κοσμοπολίτικο γένος στο οποίο ανήκουν νηματοειδείς μύκητες του φύλου Ασκομυκότα (Sordariomycetes: Hypocreales: Nectriaceae). Το γένος περιλαμβάνει γεωργικά σημαντικά παθογόνα φυτών, ενδόφυτα και σαπρόφυτα ικανά να μεταβολίζουν διάφορα υποστρώματα αλλά και αναδυόμενα παθογόνα κλινικής σημασίας. Συλλογικά, οι ασθένειες του προκαλούνται από τους μύκητες του γένους *Fusarium* περιλαμβάνουν την νέκρωση ιστών, τον μααρασμό, την σήψη και το έλκος (wilts, blights, rots, and cankers) διάφορων καλλιεργειών τόσο σε γεωργικά όσο και σε φυσικά οικοσυστήματα. Το γένος αυτό περιλαμβάνει πολλά παθογόνα φυτών που παράγουν μια ποικιλία από τοξικούς δευτερογενείς μεταβολίτες (μυκοτοξίνες) ,όπως είναι τα τριχοθηκένια και οι φουμονισίνες, που μπορούν να μολύνουν τα γεωργικά προϊόντα, καθιστώντας τα ακατάλληλα για τρόφιμα ή ζωοτροφές. Τα τριχοθηκένια μπορούν επίσης να δρουν ως παράγοντες λοιμογόνου χαρακτήρα σε φυτικές ασθένειες. Αν και οι ευκαιριακές μολύνσεις ανθρώπων και άλλων ζώων από μύκητες του γένους *Fusarium* είναι σχετικά σπάνιες, εμφανίζουν συνήθως μια ευρεία αντίσταση σε αντιμυκητιακά φάρμακα και περιλαμβάνει λοιμώξεις του κερατοειδούς χιτώνα (μυκητιασική κερατίτιδα) (Coleman, 2016; Ma et al., 2013; Summerell et al., 2010).

Ταξινομική κατηγορία	
Βασίλειο	Fungi
Υποβασίλειο	Dikarya
Διαίρεση	Ascomycota
Υποδιαίρεση	Pezizomycotina
Κλάση	Sordariomycetes
Τάξη	Hypocreales
Οικογένεια	Nectriaceae
Γένος	Fusarium
Είδος	Solani

Πίνακας 1 Ταξινόμηση του *Fusarium solani*

Το σύμπλεγμα ειδών *Fusarium solani* (FSSC) είναι μια ομάδα που σήμερα εκτιμάται ότι περιέχει τουλάχιστον 60 φυλογενετικά διαφορετικά είδη. Καθώς τα μέλη της FSSC έχουν μελετηθεί εκτενέστερα ως παθογόνα φυτών, αυτοί οι μύκητες έχουν περαιτέρω υποδιαιρεθεί σε ειδικές μορφές(=formae speciales (f.sp.) με βάση την ειδικότητα του ξενιστή. Πρόσφατα, είχε προταθεί η χρήση του ονόματος «*Neocosmospora haematococca*» για το τελεόμορφο αυτών των μυκήτων, με το όνομα «*Fusarium solani*» να χαρακτηρίζει το ανάμορφο. Τα μέλη της FSSC είναι σημαντικά παθογόνα για αρκετές γεωργικώς σημαντικές καλλιέργειες. Σε αντίθεση όμως με τα είδη που ανήκουν στα σύμπλοκα ειδών *Fusarium sambucinum* και *fujikuroi*, τα μέλη του FSSC δεν είναι γνωστό ότι παράγουν μυκοτοξίνες όπως είναι τα τριχοθηκένια και οι φουμονισίνες.

Το ευρύ φάσμα των ξενιστών υπάρχει όχι μόνο σε ολόκληρο το σύμπλεγμα των ειδών αλλά και σε ένα μόνο είδος. Για παράδειγμα η διερεύνηση του φάσματος ξενιστών του *F. solani* f. sp. *eumartii* αποκάλυψε ότι υπάρχουν επιπλέον φυτά ξενιστές εκτός από πατάτα, συμπεριλαμβανομένων άλλων φυτών της οικογένειας των Στρυχνοειδών, όπως η τομάτα και η πιπεριά. Πέραν του ότι είναι παθογόνα φυτών, τα μέλη της FSSC είναι υπεύθυνα για την πλειοψηφία των συστηματικών λοιμώξεων σε ανοσοκατεσταλμένους ανθρώπους και ζώα. Σε ανοσολογικά ικανά άτομα, οι ασθένειες που προκαλούνται από στελέχη FSSC μπορεί να εκδηλωθούν ως τοπικές, λιγότερο επεμβατικές λοιμώξεις, συμπεριλαμβανομένων των αποστημάτων, της ονχομυκητίασης και της κερατίτιδας.(Coleman, 2016)

1.7.1 FsK

Το *Fusarium solani* στέλεχος K γνωστό και με την συντομογραφία FsK είναι ένα ενδοφυτικό, μη παθογόνο στέλεχος του *Fusarium solani*, το οποίο είχε απομονωθεί προηγουμένως από τις ρίζες των φυτών τομάτας που είχαν αναπτυχθεί σε ένα συγκεκριμένο compost (Kavroulakis et al., 2007). Το κοπρόχωμα (compost) περιείχε στέμφυλα από σταφύλια και στερεά παραπροϊόντα παραγωγής λαδιού (olive press cake) και είχε επίσης αναμειχθεί με τύρφη. Αρχικά παρατηρήθηκε ότι τα φυτά που μεγάλωναν σε αυτό το υπόστρωμα είχαν αυξημένη προστασία έναντι σε παθογόνα του εδάφους και του φυλλώματος, ενώ αργότερα βρέθηκε ότι υπαίτιος για αυτήν την προστασία ήταν ο FsK (Kavroulakis, et al., 2005; 2006).



Εικόνα 3 (Αριστερά) Καλλιέργεια μύκητα *Fusarium solani* στέλεχος K (FsK). (Δεξιά) Κονίδια μύκητα FsK-εικόνα από μικροσκόπιο

Σε ιστούς ρίζας της τομάτας ο FsK φαίνεται να πολλαπλασιάζεται ενδοκυτταρικά από την επιδερμίδα στον φλοιό, ενώ τελικά φτάνει στους αγγειακούς ιστούς (ξύλωμα, φλοιώμα) και μέσω αυτών μεταφέρεται κατά μήκος του ριζικού συστήματος. Στην τομάτα ο FsK φαίνεται να είναι ικανός να αποικήσει μόνο το ριζικό σύστημα του φυτού καθώς δεν έχει εντοπιστεί στο υπέργειο τμήμα του φυτού, ακόμη και σε πολύ προχωρημένα στάδια ανάπτυξης του φυτού. Πιο συγκεκριμένα φαίνεται ότι η ανάπτυξη του FsK δεν μπορεί να ξεπεράσει την περιοχή του στέμματος. Έχει βρεθεί επίσης ότι ο FsK μπορεί να αποικήσει και άλλα φυτά όπως είναι το *M. truncatula* και το *L. japonicus*. Ειδικά για το *L. japonicus* βρέθηκε ότι τα φυτά μπόρεσαν να ολοκληρώσουν τον κύκλο ζωής τους ακόμη και εάν δεν παρατηρήθηκε κάποιο φανερά ευεργετικό αποτέλεσμα στην ανάπτυξη τους κάτω από φυσιολογικές συνθήκες ενώ παράλληλα φάνηκε ότι ο FsK είναι ικανός να αποικήσει και το υπέργειο τμήμα του φυτού (Skiada et al., 2019)

Όπως αναφέρθηκε και προηγουμένως, ο FsK φαίνεται να είναι ικανός να προστατεύει φυτά τομάτας από παθογόνους μικροοργανισμούς. Ειδικότερα αφού ο FsK αποικίζει τις ρίζες της τομάτας είναι ικανός να προστατεύει το φυτό από το παθογόνο *Fusarium oxysporum f.sp. radicles-lycopersici* (FORL), το οποίο είναι παθογόνο της ρίζας. Επιπλέον ο FsK φαίνεται να ενεργοποιεί την επαγόμενη συστηματική άμυνα (ISR) του φυτού έναντι στο παθογόνο του φυλλώματος *Septoria lycopersici*. Ενδιαφέρον προκαλεί το γεγονός ότι τα φυτά που είχαν εμβολιαστεί με FsK εμφάνισαν μειωμένη έκφραση για συγκεκριμένα γονίδια που σχετίζονται με την παθογένεση (PR5 and PR7) σε σχέση με φυτά που δεν είχαν εμβολιαστεί με τον FsK (Kavroulakis et al., 2007). Αξίζει να αναφερθεί ότι ο FsK, λόγω της ικανότητας να προστατεύει τα φυτά από παθογόνα, μπορεί να χρησιμοποιηθεί ως παράγοντας βιολογικής καταπολέμησης για προγράμματα διαχείρισης ασθενειών για καλλιέργειες τομάτας (integrated disease management programs) που περιέχουν διάφορα μυκητοκτόνα καθώς ο μύκητας όχι μόνο δεν επηρεάζεται σε σημαντικό βαθμό από αυτά αλλά και φαίνεται ότι κάποιιοι συνδυασμοί FsK με μυκητοκτόνο έχουν συνδυαστική δράση έναντι στο παθογόνο FORL. (Malandrakis et al., 2018)

Πέρα από την προστασία που προσφέρει ο FsK στα φυτά έναντι των παθογόνων μικροοργανισμών φαίνεται έχει δράση στην άμυνα των φυτών κατά παθογόνων εντόμων. Πιο συγκεκριμένα ο *Nesidiocoris tenuis* είναι ένα ζωοφυτοφάγο έντομο που δρα ως αποτελεσματικός παράγοντας βιολογικού ελέγχου σε φυτά όπως είναι οι τομάτες και οι μελιτζάνες κατά των παρασιτικών εντόμων (*Tuta absoluta*, *Whiteflies*, *Tetranychus urticae*). Όμως η χρήση του *N. tenuis* έχει κάποιες αρνητικές συνέπειες, καθώς όταν αυξάνεται ο πληθυσμός των εντόμων ενώ παράλληλα έχουμε μειωμένη ποσότητα παρασιτικών εντόμων, ο *N. Tenuis* τρέφεται με τους ιστούς του φυτού καθιστώντας το ως παράσιτο. Όταν ο *N. Tenuis* τρέφεται από τα φυτά δημιουργεί νεκρωτικά στίγματα (necrotic rings) στο βλαστό και στα φύλλα. Όταν όμως οι ντομάτες εμβολιάζονται με τον FsK έχει βρεθεί ότι ο αριθμός των νεκρωτικών στιγμάτων είναι μειωμένος σε σχέση με τα φυτά που δεν εμβολιάστηκαν με τον μύκητα (Garantonakis et al., 2018).

Παράλληλα ο FsK βοηθάει και στην άμυνα ενάντια του *Tetranychus urticae*, καθώς τα φυτά που εμβολιάστηκαν με τον FsK εμφάνισαν διαφορετικό πρότυπο στην έκφραση γονιδίων που σχετίζονται με την άμυνα μετά από προσβολή του *T. urticae* σε σχέση με τα φυτά που δεν εμβολιαστήκαν με τον μύκητα ή που δεν έγινε προσβολή τους από τον τετράνυχχο. Ως αποτέλεσμα η απόδοση του τετράνυχχου στα φυτά με τον FsK επηρεάστηκε αρνητικά και το πλήγμα λόγω της θρέψης του εντόμου ήταν χαμηλότερο σε σχέση με τις άλλες ομάδες (Pappas et al., 2018)

Τέλος να αναφέρουμε ότι ο FsK βοηθάει επίσης και στην προστασία του φυτού από αβιοτικό στρες και πιο συγκεκριμένα κατά την διάρκεια συνθήκων ξηρασίας. Υπάρχουν ενδείξεις ότι ο μύκητας μειώνει το κλείσιμο των στομάτων, που είναι απόκριση στις συνθήκες ξηρασίας, και πιθανώς προκαλεί αύξηση στην ποσότητα νερού που προσλαμβάνεται από τις ρίζες με αποτέλεσμα να αποτρέπει την μείωση του ρυθμού φωτοσύνθεσης και την ελαχιστοποίηση της απώλειας νερού (Kavroulakis et al., 2018)

Ο μηχανισμός με τον οποίο ο FsK δρα για να προστατέψει το φυτό από βιοτικό στρες σχετίζεται με το αιθυλένιο, καθώς σε μεταλλαγμένες σειρές τομάτας με ελλατωματικό σηματοδοτικό μονοπάτι αιθυλενίου, την *Never ripe (Nr)* που δεν είναι ευαίσθητη στο αιθυλένιο και την *epinastic (epi)* στην οποία έχουμε αυξημένη σηματοδότηση αιθυλενίου, δεν ήταν ανθεκτικά στο παθογόνο FORL παρουσία του FsK, ενώ τα wt φυτά παρουσία του μύκητα είχαν αυξημένη ανθεκτικότητα σε σχέση με αυτά του δείγματος ελέγχου. Επιπλέον χρησιμοποιήθηκαν και σειρές φυτών (*def1*) με ελαττωματική βιοσύνθεση για το ιασμονικό οξύ(JA), οι οποίες όμως δεν εμφάνισαν διαφορές σε σχέση με τα wt φυτά δείχνοντας ότι το ιασμονικό οξύ δεν είναι απαραίτητο για την προστατευτική δράση του FsK έναντι στο FORL. Στην περίπτωση όμως που το παθογόνο είναι ένα έντομο(*N. tenuis*) τα αποτελέσματα ήταν διαφορετικά.

Χρησιμοποιήθηκαν πάλι οι ίδιες μεταλλαγμένες σειρές, διότι το αιθυλένιο είχε ήδη δείξει ότι συμμετέχει στην δράση του μύκητα και το ιασμονικό οξύ γιατί είναι γνωστό ότι συμμετέχει στην απόκριση του φυτού ενάντια σε φυτοφάγα. Σε αυτό το πείραμα δείχθηκε ότι και το αιθυλένιο και το ιασμονικό οξύ ήταν απαραίτητα για την προστασία του φυτού και ότι στην σειρά *epi*, όπου είχαμε υπερπαραγωγή αιθυλενίου, δεν εμφανίστηκαν νεκρωτικά στίγματα, δίνοντας ενδείξεις ότι η υπερπαραγωγή του αιθυλενίου μπορεί να είναι το κλειδί για την αντιμετώπιση του εντόμου (Garantonakis et al., 2018; Kavroulakis et al., 2007)

Ο FsK-F είναι ένα μετάλλαγμα του στελέχους FsK, το οποίο έχει ανθεκτικότητα στο μυκητοκτόνο fludioxonil και παρουσιάζει ευαισθησία σε αυξημένη ωσμωτική πίεση NaCl (N. Kavroulakis, μη δημοσιευμένα αποτελέσματα). Σε προκαταρκτικά πειράματα έχει δειχθεί ότι ο μύκητας διατηρεί την ικανότητά του να προστατεύει τα φυτά έναντι παθογόνων (βιοτική καταπόνηση) ενώ δεν είναι γνωστό αν το στέλεχος διατηρεί την ικανότητα του να προστατεύει το φυτό σε συνθήκες ξηρασίας (αβιοτική καταπόνηση).

2. Υλικά και μέθοδοι

2.1 Προετοιμασία υποστρώματος

Ανάμειξη άμμου MIT 2000: Yellow Silica με αναλογία 2:1. Μετά την ανάμειξη ακολούθησε το κοσκίνισμα του μίγματος άμμου με ένα κόσκινο 4mm, ώστε να αφαιρεθούν οι τυχόν προσμίξεις . Έπειτα έγινε ανάμειξη μίγματος άμμου με βερμικουλίτη, οποίος είχε πλυθεί με νερό εκ των προτέρων, σε αναλογία 2:1 και μεταφορά του τελικού μίγματος σε φούρνο για ξήρανση στους 100°C για 2 μέρες. Τέλος έγινε η αποστείρωση του μείγματος στους 121°C για 30 λεπτά.

2.2 Field Capacity Test

2.2.1 Περιεκτικότητα Υγρασίας (ΠΥ)- Moisture Content(MC)

Για να υπολογιστεί η περιεκτικότητα υγρασίας(ΥΠ) του υποστρώματος ακολούθηθηκε η παρακάτω διαδικασία. Έγινε καταμέτρηση του βάρους 3 δειγμάτων του υποστρώματος(άμμου: βερμικουλίτη) και στην συνέχεια ακολούθησε η μεταφορά των δειγμάτων σε φούρνο ,στον οποίο παράμειναν για 16 ώρες στους 60°C. Την επόμενη μέρα έγινε εκ νέου καταμέτρηση του βάρους των δειγμάτων, ώστε να προσδιοριστεί η ποσότητα νερού που χάθηκε από το δείγμα.

2.2.2 Ικανότητα Συγκράτησης Νερού(ΙΣΝ)- Water Holding Capacity(WHC)

Για να υπολογιστεί η ικανότητα συγκράτησης νερού (ΙΣΝ) του υποστρώματος ακολούθηθηκε η παρακάτω διαδικασία. Αρχικά τοποθετήθηκε πάνω σε ένα γυάλινο χωνί διηθητικό χαρτί, το οποίο είχε κοπεί ώστε να έχει κωνικό σχήμα και να εφάπτεται στην επιφάνεια του χωνιού. Το χωνί τοποθετήθηκε πάνω σε μια γυάλινη κωνική φιάλη και στην συνέχεια ακολούθησε εμποτισμός του χαρτιού με απιονισμένο νερό . Στην συνέχεια προστέθηκαν περίπου 30gr υποστρώματος άμμου: βερμικουλιτή και έγινε ύγρανση του υποστρώματος με την προσθήκη απιονισμένου νερού. Αφού το νερό απορροφήθηκε έγιναν 2 επαναλήψεις του τελευταίου βήματος, καταμέτρηση του βάρους του χωνιού με το υπόστρωμα και κάλυψη του χωνιού με αλουμινόχαρτο. Την επόμενη μέρα έγινε εκ νέου καταμέτρηση του βάρους των δειγμάτων, ώστε να προσδιοριστεί η ποσότητα νερού που συγκρατήθηκε από το υπόστρωμα.

2.3 Φυτά και συνθήκες ανάπτυξης

Σπόροι τομάτας (*S. lycopersicum*, Pearson) εμβαπτίστηκαν σε διάλυμα 2,5% NaOCl (χλωρίνης) για 5 λεπτά ώστε να γίνει επιφανειακή απολύμανση των σπόρων. Στην συνέχεια ακολούθησαν 5 πλύσεις με ddH₂O και μεταφορά των σπόρων σε θάλαμο νηματικής ροής. Εκεί έγινε μεταφορά τους σε τρυβλία Petri, στα οποία είχαν προστεθεί προηγουμένως αποστειρωμένα φύλλα διηθητικού χαρτιού διαβρεγμένα με ddH₂O. Αφού έγινε η μεταφορά , τα τρυβλία σφραγίστηκαν με παραφίλμ και οι σπόροι παρέμειναν στο σκοτάδι για 8 μέρες. Την όγδοη μέρα οι σπόροι που εκβλάστασαν μεταφέρθηκαν σε γλάστρες που περιείχαν 2000gr αποστειρωμένου υποστρώματος άμμου: βερμικουλιτή με αναλογία 2:1 και είχαν ήδη ποτιστεί με 313,5 ml απιονισμένου νερού πριν τη φύτευση. Σε κάθε γλάστρα φυτεύτηκαν 3 φυτά με την βοήθεια λαβίδας και συνολικά είχαμε 5 γλάστρες για την κάθε συνθήκη του πειράματος . Οι γλάστρες τοποθετήθηκαν στον θάλαμο ανάπτυξης (16h φως, 25°C, 65% RH) όπου ποτίζονταν ανά 2-3 ημέρες με απιονισμένο νερό εναλλάξ με θρεπτικό Hoagland.

Το θρεπτικό Hoagland παρασκευάστηκε ακολουθώντας την συνταγή των Johnson et al., (1957), όπως αναγράφεται στον Πίνακα 3. Σε επόμενο στάδιο τα φυτά ποτίζονταν με διαφορετικές ποσότητες ddH₂O ώστε να ξεκινήσει το πρωτόκολλο της ξηρασίας. Από την έναρξη των συνθήκων ξηρασίας μέχρι και την ημέρα της δειγματοληψίας τα φυτά ποτίζονταν κάθε 2-3 μέρες με ddH₂O, 200ml για τα W+ φυτά και 80ml για τα W- φυτά, ώστε να διατηρηθεί στις γλάστρες το 80% και το 20% της ΊΣΝ τους. Παράλληλα με τις συνθήκες ξηρασίας γίνονταν επιπλέον καταμέτρηση των σύνθετων φύλλων και των φυλλαρίων κάθε φυτού.

2.4 Συνθήκες ανάπτυξης μυκητιακών στελεχών

Τα στελέχη FsK και FsK-F του μύκητα *Fusarium solani* καλλιεργούνταν τακτικώς σε στερεές καλλιέργειες PDA (potato dextrose agar). Για την δημιουργία υγρών καλλιεργειών για τους μύκητες αρχικά έγινε προετοιμασία του θρεπτικού υλικού PDB (potato dextrose broth) σύμφωνα με την συνταγή που βρίσκεται στον Πίνακα 2. Έπειτα έγινε η μεταφορά ενός τμήματος από τις στερεές καλλιέργειες του μύκητα σε αποστειρωμένες γυάλινες φλάσκες των 250ml που περιείχαν 100ml PDB με την βοήθεια ενός νυστεριού. Αυτή η μεταφορά έγινε σε θάλαμο νηματικής ροής κάτω από στείρες συνθήκες ώστε να αποφευχθεί η μόλυνση της καλλιέργειας από άλλους μικροοργανισμούς. Οι φλάσκες που περιείχαν τα στελέχη του μύκητα καλύφθηκαν με αλουμινοχαρτο και αφού σφραγίστηκαν με παραφιλμ μεταφέρθηκαν σε έναν επωαστήρα (27°C, 160rpm) για 5 ημέρες, ώστε να αναπτυχθούν οι μύκητες.

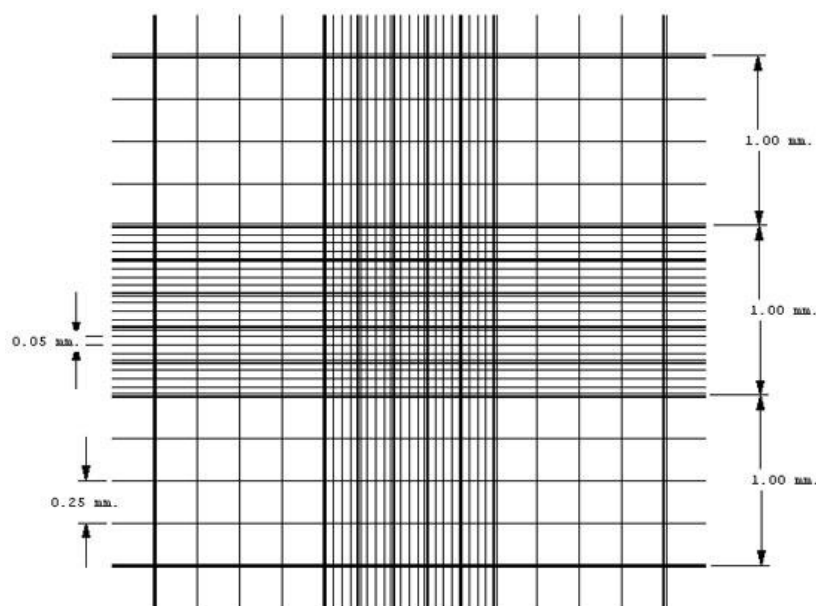
2.5 Συλλογή κονιδίων

Αφού περάσουν οι 5 ημέρες, οι φλάσκες μεταφέρονται σε θάλαμο νηματικής ροής, ώστε να γίνει η συλλογή των κονιδίων. Για την συλλογή κονιδίων τοποθετούμε ένα γυάλινο χωνί πάνω σε ένα falcon των 50ml ενώ το γυάλινο χωνί είναι καλυμμένο από ένα διπλωμένο φύλλο τουλουπάνι, το οποίο τοποθετήθηκε εκεί με την βοήθεια λαβίδας. Στην συνέχεια γίνεται η μεταφορά της υγρή καλλιέργεια του μύκητα από την φλάσκα στο χωνί, μέχρι το falcon να γεμίσει με την υγρή καλλιέργεια. Αυτή η διαδικασία γίνεται και για τις 2 καλλιέργειες του μύκητα. Αφού γίνει η μεταφορά αφαιρείται το χωνί και αφού γίνει έλεγχος ότι τα δυο falcon έχουν το ίδιο βάρος, ακολουθεί μια φυγοκέντριση τους για 5 λεπτά στους 16°C και 6500 rpm. Μετά την φυγοκέντριση έχουμε απόρριψη του υπερκειμένου, αφήνοντας τα κονίδια ως ίζημα, και μεταφορά τις περίσσειας υγρής καλλιέργειας του μύκητα με την χρήση του χωνιού στο falcon. Έπειτα ακολουθεί μια δεύτερη φυγοκέντριση στις ίδιες συνθήκες και απόρριψη του υπερκειμένου. Ακολουθεί η επαναδιαλυτοποίηση του ιζήματος με προσθήκη 5ml διαλύματος NaCl 0,85% w/v.

Τέλος γίνεται μια τρίτη φυγοκέντριση πάντα στις ίδιες συνθήκες με πριν και εκ νέου επαναδιαλυτοποίηση του ιζήματος σε 5ml διαλύματος NaCl 0,85% w/v. Όλα τα εργαλεία που χρησιμοποιήθηκαν για την συλλογή των κονιδίων είχαν αποστειρωθεί, ώστε να αποφευχθεί η πιθανότητα επιμόλυνσης, όμως μπορεί να γίνει επιπλέον ένας έλεγχος για επιμόλυνση τοποθετώντας 10μl του τελικού διαλύματος στο κέντρο ενός τρυβλίου με θρεπτικό PDA, το οποίο αφήνεται στους 26°C.

2.6 Μέτρηση κονιδίων

Για την μέτρηση κονιδίων γίνονται αρχικά κάποιες αραιώσεις του διαλύματος που περιέχει τα κονίδια, και που είναι 1/10, 1/100 και 1/500. Αρχικά γίνεται στον θάλαμο νηματικής ροής μεταφορά 500μl από το διάλυμα του κάθε falcon σε ένα 1,5ml erpendorf tube. Έπειτα γίνεται η αραιώση 1/10 χρησιμοποιώντας 100μl από το tube και 900μl αποστειρωμένο ddH₂O. Οι υπόλοιπες αραιώσεις έγιναν με παρόμοιο τρόπο χρησιμοποιώντας 900 και 400 μl ddH₂O αντίστοιχα καθώς και 100μl από την προηγούμενη αραιώση. Για την μέτρηση των κονιδίων χρησιμοποιείται η αραιώση 1/500 και η μέτρηση γίνεται με την χρήση μικροσκοπίου και του αιμοκυτταρόμετρου Neubauer.



Εικόνα 4 Απεικόνιση πλάκας Neubauer

Μετά την μέτρηση γίνονται διαδοχικές αραιώσεις του αρχικού διαλύματος, χρησιμοποιώντας 900 μl διαλύματος NaCl 0,85% και 100μl από την προηγούμενη αραιώση, μέχρι να επιτευχθεί μια αραιώση κοντά στα 10^3 κονίδια. Τέλος υπολογίζεται την ποσότητα του διαλύματος από την αραιώση 10^3 που θα πρέπει να αραιώσουμε ώστε να έχουμε την επιθυμητή τελική συγκέντρωση, στην προκείμενη περίπτωση 200 κονίδια ανά ml, στο διάλυμα με το οποίο θα εμβολιάσουμε τη ρίζα των φυτών. Η όλη διαδικασία έγινε με τον ίδιο τρόπο και για τα δυο στελέχη του μύκητα. Ο εμβολιασμός των φυτών έγινε απευθείας στην ρίζα μέσω πιπέτας και χρησιμοποιώντας 500μl διαλύματος για το κάθε φυτό.

2.7 Δειγματοληψία

Η δειγματοληψία έγινε με την εξής διαδικασία. Αρχικά έγινε προσεκτική αφαίρεση των φυτών από την γλάστρα μέσω ανάστροφης της και πλύση των φυτών με dH₂O ώστε να αφαιρεθούν τα υπολείμματα άμμου και βερμικουλίτη. Στη συνέχεια τοποθέτηση των φυτών κάθε γλάστρας σε διηθητικό χαρτί, ώστε να απορροφηθεί το επιπλέον νερό και καταγραφή του μήκους της ρίζας. Έπειτα με την χρήση νυστεριού έγινε τεμαχισμός των φυτών σε 3 τμήματα : ρίζα, βλαστός, φύλλα.

Για τα 2 φυτά της κάθε γλάστρας ακολούθησε αποθήκευση των φύλλων και των ριζών σε αλουμινόχαρτο, τοποθέτηση σε υγρό άζωτο ώστε να παγώσουν και αποθήκευση του δείγματος στην κατάψυξη (-80°C). Για το τρίτο φυτό της γλάστρας ακολούθησε μέτρηση του βάρους (φρέσκο) των επιμέρους τμημάτων του και τοποθέτηση τους σε φούρνο στους 100°C για 24 ώρες. Την επόμενη μέρα έγινε εκ νέου μέτρηση του βάρους (ξηρό) για τα τμήματα των φυτών, ώστε να υπολογισθεί η περιεκτικότητα τους σε νερό.

2.8 Απομόνωση γονιδιωματικού DNA

Οι ρίζες των φυτών που είχαν αποθηκευτεί στους -80°C μεταφέρθηκαν σε υγρό άζωτο και στην συνέχεια λειοτριβήθηκαν με τη χρήση αποστειρωμένου γουδιού-γουδοχειριού και με την προσθήκη υγρού άζωτο για να παραμένει το δείγμα παγωμένο. Το δείγμα που προκύπτει χρησιμοποιήθηκε στην συνέχεια για απομόνωση γονιδιωματικού DNA με τη χρήση της μεθόδου CTAB. Σύμφωνα με τη μέθοδο CTAB, σε λειοτριβημένα δείγματα προστέθηκαν 100μL διαλύματος CTAB, το οποίο έχει προθερμαθεί σε υδατόλουτρο στους 65°C, και 1μL β-μερκαπτοαιθανόλης. Ακολούθησε ανάδευση των δειγμάτων και τοποθέτηση τους σε υδατόλουτρο στους 65°C για 15 λεπτά. Έπειτα έγινε προσθήκη 150μL διαλύματος 1:25 ισοαμυλική αλκοόλη: χλωροφόρμιο και ανάδευση με vortex για 30 δευτερόλεπτα. Ακολουθούσε φυγοκέντριση των δειγμάτων στα 11.000g για 5 λεπτά και μεταφορά της επάνω φάσης του υπερκειμένου σε νέο σωλήνα erppendorf. Στην συνέχεια έγινε προσθήκη ποσότητας ισοπροπανόλης ίση με 0,7 επί τον όγκου του δείγματος, ήπια ανάδευση μέσω ανάστροφης και επώαση σε θερμοκρασία δωματίου για 10 λεπτά. Έπειτα μια δεύτερη φυγοκέντριση στα 11.000g για 15 λεπτά, απόρριψη του υπερκειμένου με την βοήθεια πιπέτας και επαναδιάλυση του pellet σε 500μl παγωμένης 70% αιθανόλης. Μια τρίτη φυγοκέντριση στα 11.000g για 5 λεπτά, απόρριψη του υπερκειμένου και στέγνωμα του pellet που περιέχει το DNA σε 50°C μέχρι για 10 λεπτά. Η επαναδιάλυση του pellet έγινε σε 15μl ddH₂O που περιείχε RNase(1μl RNase σε 50μl ddH₂O). Τέλος έγινε ένα ήπιο vortex και quick spin των δειγμάτων και αποθήκευση τους στους -20 °C.

2.9 Ποσοτικοποίηση DNA

Το ολικό DNA που απομονώθηκε για κάθε δείγμα ποσοτικοποιήθηκε με τη χρήση της συσκευής Qubit (Invitrogen) σύμφωνα με τις οδηγίες του παρασκευαστή. Η κατεργασία έγινε με το Qubit dsDNA HS Assay kit της Invitrogen και ακολουθήθηκε η παρακάτω διαδικασία. Ανάμειξη 1μl dye και 199μl buffer του kit για κάθε δείγμα σε ένα master mix, τύλιγμα του master mix με αλουμινόχαρτο λόγω φωτοευαισθησίας της χρώσης.

Έπειτα προσθήκη 2μl από κάθε δείγμα μας που περιέχει το DNA και ανάμειξη με το προηγούμενο μείγμα για τελικό όγκο 200μl. Επώαση για 2 λεπτά σε θερμοκρασία δωματίου και στην συνέχεια χρήση της συσκευής Qubit για ποσοτικοποίηση του DNA. Χρήση δεικτών που περιέχονται στο kit για την δημιουργία πρότυπης καμπύλης.

*2.10 Ανίχνευση αποικισμού από τον μύκητα *F. solani* στις ρίζες τομάτας*

Για να επιβεβαιωθεί ότι έγινε αποικισμός στις ρίζες της τομάτας από τα στελέχη FsK και FsK-F του μύκητα χρησιμοποιήθηκε το DNA που απομονώθηκε από την μέθοδο CTAB. Η επιβεβαίωση έγινε μέσω της μεθόδου αλυσιδωτής αντίδρασης πολυμεράσης πραγματικού χρόνου (Real Time PCR). Σε αυτό το πείραμα χρησιμοποιήθηκαν εκκινητές που στόχευαν το γονίδιο TEF-1a(Translation elongation factor 1a) του μύκητα. Η αλληλουχία των εκκινητών ήταν η εξής: για τον forward εκκινητή TEF-1a F: 5'-GGGTGGTTGAGGACAATGAC-3' και για τον reverse εκκινητή TEF-1a R: 5'-CAGCTCACTGAGGGTCTTCC -3'.

Για την qPCR έγινε η παρακάτω διαδικασία. Για κάθε δείγμα απαιτούνται 5μl Mix SYBR 0,2μl από τον κάθε εκκινητή και 3,6μl ddH₂O. Έγινε παρασκευή master mix, το οποίο περιείχε όλα τα απαραίτητα αντιδραστήρια σε ποσότητα αρκετή για το κάθε δείγμα, για τους δείκτες τις πρότυπης καμπύλης, τα αρνητικά control και για 1 δείγμα επιπλέον ανά 10 δείγματα. Για το κάθε δείγμα χρησιμοποιήθηκαν 2 τεχνικές επαναλήψεις, ενώ για την πρότυπη καμπύλη και τους αρνητικούς μάρτυρες 3 τεχνικές επαναλήψεις. Επομένως σε κάθε αντίδραση προστέθηκαν 1μL δείγματος DNA και 9μl master mix για τελικό όγκο 10μl. Στην συνέχεια από τα αποτελέσματα της qPCR υπολογίστηκε ο αριθμός των αντιγράφων του TEF-1a που υπήρχε ανά 1ng DNA για το κάθε δείγμα και αυτή η τιμή χρησιμοποιήθηκε έπειτα για να προσδιοριστεί η επιτυχία αποικισμού του μύκητα.

Το θερμοκρασιακό πρωτόκολλο το οποίο ακολουθήθηκε για την πραγματοποίηση της αντίδρασης qPCR περιείχε το εξής βήματα: 3 λεπτά στους 95°C επανάληψη για 44 κύκλους των βημάτων : 15 δευτερόλεπτα στους 95°C για αποδιάταξη και 20 δευτερόλεπτα στους 58°C για υβριδοποίηση των εκκινητών και επιμήκυνση. Στην συνέχεια μια melting curve analysis ,που περιλαμβάνει 5 δευτερόλεπτα στους 58°C και 5 δευτερόλεπτα στους 90°C , ώστε να ελεγχθεί η εξειδίκευση των προϊόντων της αντίδρασης.

	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12
A	4,2E+0	4,2E+1	4,2E+2	4,2E+3	4,2E+4	4,2E+5	4,2E+6	4,2E+7	4,2E+8	NTC		
B	4,2E+0	4,2E+1	4,2E+2	4,2E+3	4,2E+4	4,2E+5	4,2E+6	4,2E+7	4,2E+8	NTC		
C	4,2E+0	4,2E+1	4,2E+2	4,2E+3	4,2E+4	4,2E+5	4,2E+6	4,2E+7	4,2E+8	NTC		
D	FSK_11	FSK_11	FSK_12	FSK_12	FSK_13	FSK_13	FSK_14	FSK_14	FSK_15	FSK_15		
E	FSK_16	FSK_16	FSK_17	FSK_17	FSK_18	FSK_18	FSK_19	FSK_19	FSK_20	FSK_20		
F	FSK-F_21	FSK-F_21	FSK-F_22	FSK-F_22	FSK-F_23	FSK-F_23	FSK-F_24	FSK-F_24	FSK-F_25	FSK-F_25		
G	FSK-F_26	FSK-F_26	FSK-F_27	FSK-F_27	FSK-F_28	FSK-F_28	FSK-F_29	FSK-F_29	FSK-F_30	FSK-F_30		
H	Control 2	Control 2	Control 4	Control 4	Control 6	Control 6	Control 10	Control 10				

Εικόνα 5 Απεικόνιση qPCR plate

2.11 Συνταγές

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

Ζωμός δεξτρόζης πατάτας	
Υλικά	Ποσότητα για 1L θρεπτικού
Πατάτες καθαρισμένες	400gr
Σουκρόζη	20gr
Απιονισμένο νερό	1L
Άγαρ	15gr

Πίνακας 2 Συνταγή ζωμού δεξτρόζης πατάτας

Σε ένα δοχείο που περιείχε ένα 1 λίτρο απιονισμένου νερού προστέθηκαν 400gr από καθαρισμένες πατάτες και ακολουθήσε τοποθέτηση του δοχείου σε εστία θέρμανσης μέχρι να μαλακώσουν οι πατάτες. Αφού έγινε αυτό το βήμα ακολουθήσε διήθηση του υγρού με την βοήθεια φύλλου τουλουπάνι και μεταφορά του διηθήματος σε γυάλινο δοχείο, όπου προστέθηκαν στην συνέχεια 20gr σουκρόζης καθώς και ποσότητα απιονισμένου νερού μέχρι ο όγκος του διηθήματος να φτάσει το 1 λίτρο. Στην συνέχεια ακολουθήσε αποστείρωση του υγρού στους 121°C για 20 λεπτά. Για την παραγωγή στερεού θρεπτικού υλικού ακολουθείται η ίδια διαδικασία με την επιπλέον προσθήκη 15 gr άγαρ σε 1 λίτρο θρεπτικού πριν από την αποστείρωση.

2.11.2. Θρεπτικό Hoagland

Διάλυμα Hoagland					
Stock	Συγκέντρωση (M)	Όγκος (L)	Βάρος(gr)	Mr	Τελική συγκέντρωση (ml/L)
MgSO ₄ 7H ₂ O	1	0,4	98,596	246,49	1
NH ₄ H ₂ PO ₄	1	0,4	46,012	115,03	2
FeEDTA	0,02	0,045	0,330345	367,05	1
KNO ₃	1	0,4	40,44	101,1	6
Ca(NO ₃) ₂ 4H ₂ O	1	0,4	94,464	236,16	4
Microelements stock					6
H ₃ BO ₃	0,025	0,4	0,6184	61,84	1
MnSO ₄ H ₂ O	0,002	0,4	0,135208	169,01	1
ZnSO ₄ H ₂ O	0,002	0,4	0,14356	179,45	1
CuCl ₂ 5H ₂ O	0,0005	0,4	0,034096	170,48	1
Na ₂ MoO ₄ 2H ₂ O	0,0005	0,4	0,04839	241,95	1
KCl	0,05	0,4	1,491	74,55	1

Πίνακας 3 Θρεπτικό διάλυμα Hoagland, όπως χρησιμοποιήθηκε από τους Johnson et al., (1957)

Έγινε ανάμειξη όλων των μικροστοιχείων σε ένα διάλυμα, ενώ τα μακροστοιχεία παρασκευάστηκαν σε ξεχωριστά διαλύματα. Για όλα τα διαλύματα ,με εξαίρεση του FeEDTA, μετά την παρασκευή τους ακολούθησε αποστείρωση τους στους 121°C για 20 λεπτά και φύλαξη τους σε θερμοκρασία δωματίου. Το falcon του περιείχε το διάλυμα FeEDTA καλύφθηκε με αλουμινόχαρτο και τοποθετήθηκε στους 65°C για μια μέρα ώστε να διαλυθεί η ουσία και έπειτα αποθήκευση του στους 4°C.

3 Αποτελέσματα

3.1 Field Capacity Test

3.1.1 Περιεκτικότητα Υγρασίας-Moisture content

Για να υπολογιστεί η περιεκτικότητα υγρασίας (ΠΥ) χρησιμοποιήθηκε ο εξής τύπος:

$$ΠΥ=100%*(Υγρό έδαφος- Ξηρό έδαφος)/ Υγρό έδαφος$$

Δείγμα εδάφους	Υγρό έδαφος(gr)	Ξηρό έδαφος(gr)	% Περιεκτικότητα Υγρασίας
A	30,8	30,4	1,298701299
B	30,9	30,7	0,647249191
C	30,9	30,8	0,323624595

Πίνακας 4 Μέτρηση βάρους εδάφους για υπολογισμό του ΠΥ%

Ως υγρό έδαφος ορίστηκε το δείγμα υποστρώματος στο οποίο έγινε η αρχική μέτρηση, ενώ ως ξηρό έδαφος το ίδιο δείγμα αφού παρέμεινε στους 100°C για 16 ώρες.

Στην συνέχεια υπολογίστηκε ο μέσος όρος της περιεκτικότητας υγρασίας των τριών δειγμάτων και βρέθηκε ότι είναι ίσος με ΠΥ= 0,756525028%

3.1.2 Ικανότητα Συγκράτησης νερού- Water Holding Capacity

Για να υπολογιστεί η ικανότητα συγκράτησης νερού (ΙΣΝ) του υποστρώματος χρησιμοποιήθηκε ο εξής τύπος:

$$ΙΣΝ= 100%*(έδαφος μετά – ξηρό έδαφος)/έδαφος μετά$$

Δείγμα εδάφους	Έδαφος πριν (gr)	Έδαφος μετά (gr)	Ξηρό έδαφος (gr)	ΙΣΝ %
A	55,6	66,5	55,37304249	20,0945388
B	55,4	66,4	55,17304249	20,34862861
C	55,6	67,1	55,37304249	21,17809855

Πίνακας 5 Μέτρηση βάρους υποστρώματος για υπολογισμό του ΙΣΝ%

Ως έδαφος πριν ορίστηκε το δείγμα υποστρώματος στο οποίο έγινε η αρχική μέτρηση, ενώ ως έδαφος μετά το ίδιο δείγμα αφού εμποτίστηκε με νερό και που μετρήθηκε την επόμενη μέρα . Ως ξηρό έδαφος ορίστηκε το βάρος του δείγματος απουσία νερού και υπολογίστηκε αφαιρώντας από το έδαφος πριν την υγρασία που υπάρχει σε 30gr υποστρώματος- εδάφους. Αυτή η τιμή της υγρασίας προκύπτει από τον τύπο :

$$x=Mean_ΠΥ*Βάρος υποστρώματος = 0,756525028%*30gr= 0,226957509gr$$

Έπειτα υπολογίστηκε η μέση τιμή της ικανότητας συγκράτησης νερού που βρέθηκε ότι είναι ΙΣΝ= 20,54042199%. Από αυτήν την τιμή προσδιορίστηκε το 80% και το 20% της της ικανότητας συγκράτησης νερού του υποστρώματος με τιμές 20% ΙΣΝ=4,108084397και 80% ΙΣΝ= 16,43233759. Με αυτές τις τιμές εκτιμήθηκε η ποσότητα νερού σε ml που θα πρέπει να προσθέσει στο υπόστρωμα ώστε να επιτευχθεί 80% και το 20% της ΙΣΝ.

Χρησιμοποιήθηκε η τύπος:

$\text{ml H}_2\text{O} = (\text{ΙΣΝ}\% - \text{ΠΥ}\%) * \text{Βάρος υποστρώματος} \Rightarrow$

80% ΙΣΝ $\text{ml H}_2\text{O} = (16,43233759 - 0,756525028) * 2000\text{gr}/100 \Rightarrow 313,5162512 \text{ ml}$

20% ΙΣΝ $\text{ml H}_2\text{O} = (4,108084397 - 0,756525028) * 2000\text{gr}/100 \Rightarrow 67,03118738 \text{ ml}$

3.2 Φυτά και συνθήκες ανάπτυξης

Κατά την διάρκεια των συνθηκών ξηρασίας γίνονταν συχνή (κάθε 1 ή 2 μέρες) καταγραφή των σύνθετων φύλλων και των φυλλαρίων κάθε φυτού, με σκοπό να χρησιμοποιηθούν ως δεδομένα για την παρακολούθηση της ανάπτυξης των φυτών. Η μέτρηση έγινε με τον εξής τρόπο: για κάθε φυτό μετρήθηκαν τα σύνθετα φύλλα του και για κάθε φύλλο μετρήθηκαν τα φυλλάρια που είχε. Στην συνέχεια υπολογίστηκε ο μέσος όρος των σύνθετων φύλλων της κάθε γλάστρας καθώς και ο μέσος όρος των φυλλαρίων που είχε το κάθε φύλλο στην εκάστοτε γλάστρα. Έπειτα ακολουθήσε περαιτέρω ομαδοποίηση αυτών των αποτελεσμάτων ανάλογα με την κατηγορία που άνηκε η γλάστρα καθώς και ανάλυση Two-way ANOVA/Tukey Test για να εξεταστεί η πιθανότητα ύπαρξης στατιστικά σημαντικών διαφορών μεταξύ των δειγμάτων.

Ημέρα	Σύνθετα φύλλα						Φυλλάρια					
	Control +W	Control -W	FsK +W	FsK -W	FsK_F +W	FsK_F -W	Control +W	Control -W	FsK +W	FsK -W	FsK_F +W	FsK_F -W
1	2,7	2,7	2,5	2,9	2,7	2,7	2,7	2,7	2,7	3,0	2,9	2,9
2	3,1	2,9	2,9	3,1	3,2	2,9	2,9	2,8	3,0	3,1	3,0	3,0
3	3,3	2,9	2,8	3,1	3,3	2,9	3,2	2,9	3,3	3,3	3,2	3,2
5	3,5	3,0	3,4	3,8	3,7	3,2	3,3	3,2	3,6	3,5	3,6	3,4
8	3,9	3,5	4,1	3,9	4,3	4,1	3,8	3,6	3,9	4,0	3,9	3,9
10	4,1	3,4	4,3	4,1	4,5	4,0	4,0	3,9	4,0	4,0	4,0	4,0
12	4,6	3,7	4,9	4,5	4,9	4,4	4,2	4,1	4,0	4,0	4,1	4,0
15	4,7	4,1	5,1	4,7	5,4	5,0	4,4	4,1	4,2	4,2	4,3	4,0

Πίνακας 6 Μέτρηση Σύνθετων φύλλων/ Φυλλαρίων

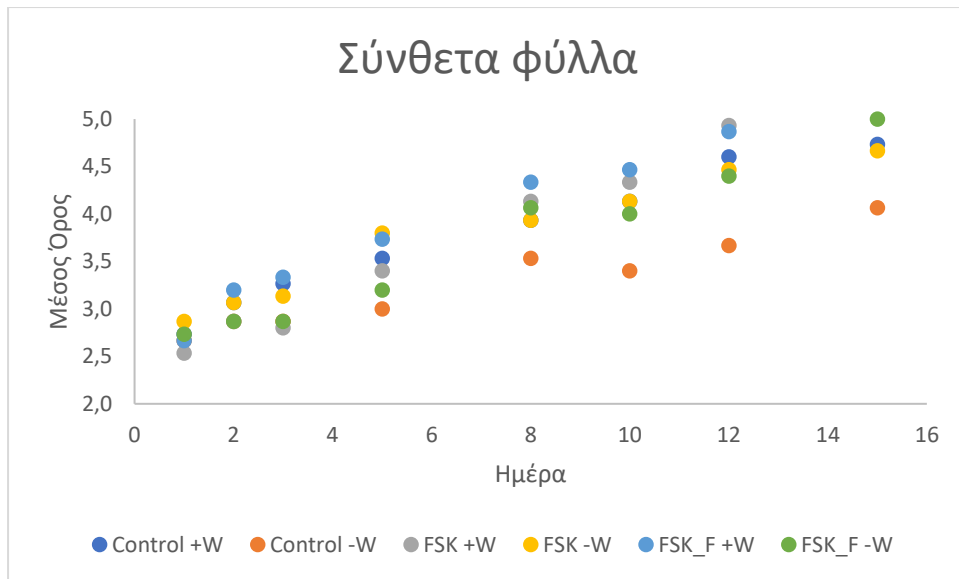


Figure 1 Μέτρηση μέσου όρου αληθινών φύλλων. Στατιστικά σημαντική διαφορά στην 10η μέρα μεταξύ των δειγμάτων Control W+ και Control W- με $P=0,013$ και μεταξύ των Control W- και FsK W- με $P=0,034$. Στην 12η μέρα μεταξύ των δειγμάτων Control W+ και Control W- με $P=0,003$, μεταξύ των Control W- και FsK W- με $P=0,02$ και μεταξύ των Control W- και FsK-F W- με $P=0,035$. Στην 15η μέρα μεταξύ των δειγμάτων Control W+ και Control W- με $P=0,021$ και μεταξύ των Control W- και FsK-F W- με $P=0,006$.

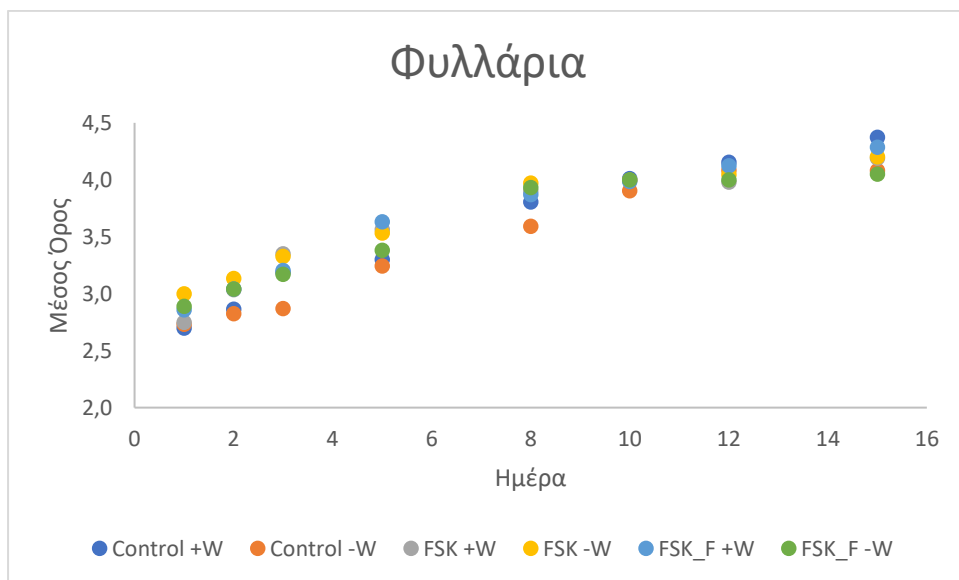
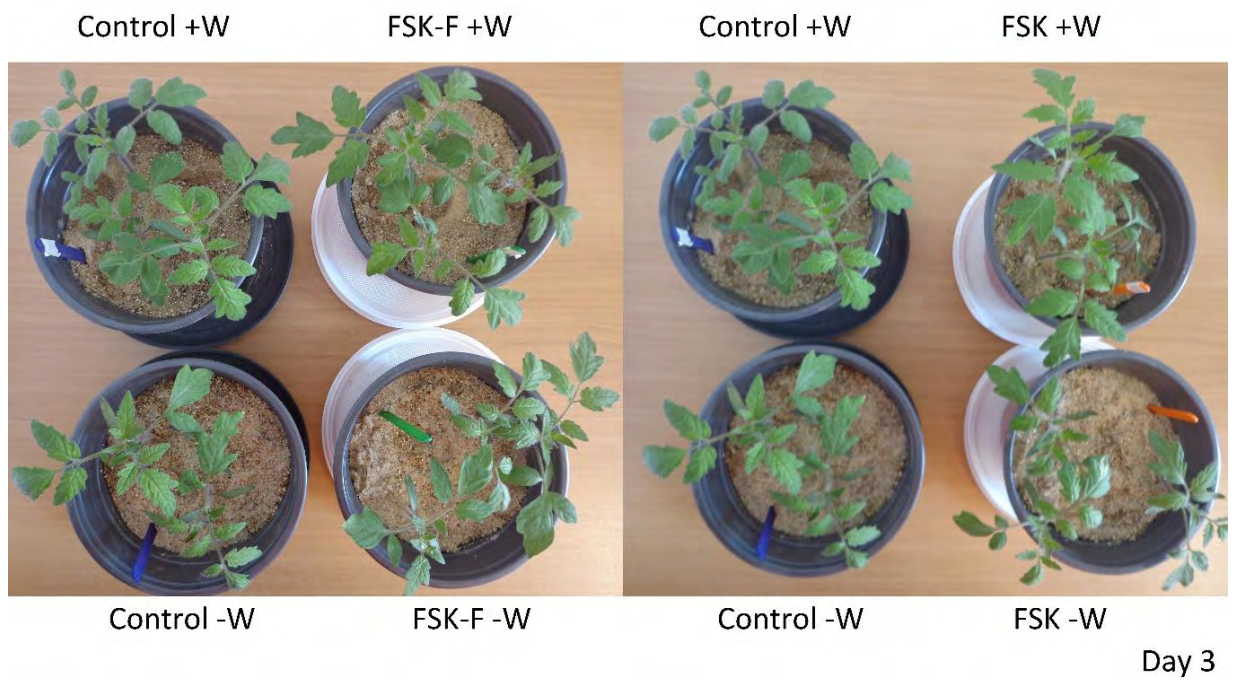
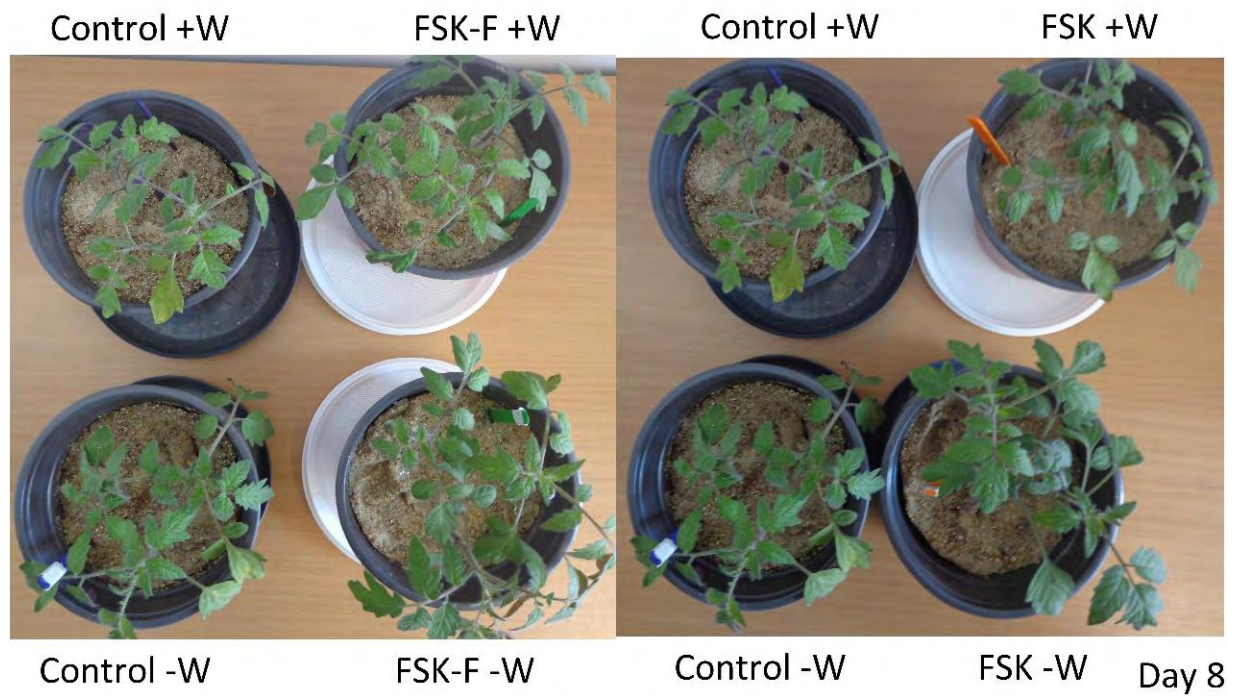


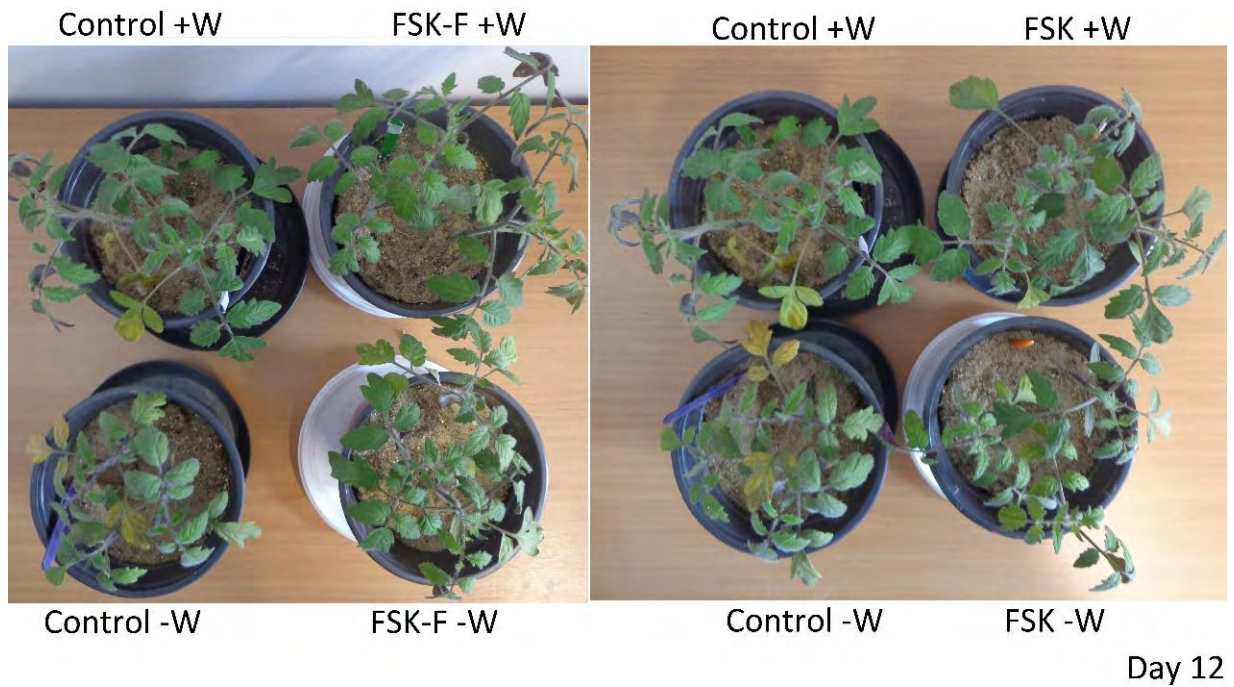
Figure 2 Μέτρηση μέσου όρου φυλλαρίων ανά σύνθετο φύλλο. Καμία στατιστικά σημαντική διαφορά.



Εικόνα 6 Φυτά τομάτας κατά την 3η ημέρα ξηρασίας.



Εικόνα 7 Φυτά τομάτας κατά την 8η ημέρα ξηρασίας.



Εικόνα 8 Φυτά τομάτας κατά την 12η ημέρα ξηρασίας.

3.3 Συλλογή- Μέτρηση κονιδίων

FsK				FsK-F											
7	2	4	2	6	4	1	3	2	1	0	1	0	1	2	3
1	4	4	4	3	1	5	6	2	2	1	0	5	0	1	3
4	3	5	7	5	3	7	7	3	1	2	1	0	1	1	2
1	5	5	4	5	6	3	3	4	2	2	4	2	1	1	1
5	2	3	5	9	3	3	3	4	0	1	4	3	2	0	2
5	5	1	2	4	2	2	7	2	0	3	1	1	2	2	2
1	3	4	5	3	4	4	6	1	4	2	4	1	0	3	4
3	0	5	3	3	4	2	3	2	6	1	2	3	2	1	4

Πίνακας 7 Μέτρηση κονιδίων του μύκητα *F. Solani* σε πλάκα Neubauer

Αριστερά το στέλεχος *FsK* και Δεξιά το στέλεχος *FsK-F*

Για το κάθε τετράγωνο θα υπολογιστεί το άθροισμα των κονιδίων και από τα 4 τετράγωνα θα βγει ο μέσος όρος.

$$FsK_M. O = (41+56+62+55)/4 = 53,5$$

$$FsK-F_M. O = (40+39+48+48)/4 = 43,75$$

Χρησιμοποιώντας τους μέσους όρους υπολογίστηκε η συγκέντρωση κονιδίων στο αρχικό διάλυμα με τον ακόλουθο τύπο:

$$\text{Conidia Concentration} = a / (V * df)$$

Όπου α ο μέσος όρος των κονιδίων, $V=10^{-4}$ ο όγκος των τετραγώνων και $df=1/500$ η αραιώση .

$$FsK_CC = 53,5 / (10^{-4} * 1/500) = 53,5 * 500 * 10^4 = 26,75 * 10^7 \text{ κονίδια/ml}$$

$$FsK_F_CC = 43,75 / (10^{-4} * 1/500) = 43,75 * 500 * 10^4 = 21,875 * 10^7 \text{ κονίδια/ml}$$

Ο εμβολιασμός του φυτού έπρεπε να γίνει με 100 κονίδια και όγκο διαλύματος 500μl. Επομένως η συγκέντρωση των κονιδίων και ο όγκος του διαλύματος θα έπρεπε να είναι θα έπρεπε να είναι:

$$C = 100 \text{ κονίδια} / 0,5 \text{ ml} = 2 * 10^2 \text{ κονίδια/ml}$$

$$V = 500 \mu\text{l} * \text{αριθμό φυτών προς εμβολιασμό} = 500 \mu\text{l} * 30 = 15 \text{ ml} \cong 20 \text{ ml}$$

Με την εξίσωση της αραιώσης υπολογίζουμε τον όγκο του αρχικού διαλύματος που πρέπει να αραιωθεί, ώστε να γίνει εμβολιασμός της ρίζας του φυτού $C_1 V_1 = C_2 V_2$

$$FsK: C_1 * V_1 = C_2 * V_2 \Rightarrow 26,75 * 10^3 * V_1 = 200 * 20 \text{ ml} \Rightarrow V_1 = 150 \mu\text{l}$$

$$V_{H_2O} = V_2 - V_1 = 19.850 \mu\text{l}$$

$$FsK-F: C_1 * V_1 = C_2 * V_2 \Rightarrow 21,875 * 10^3 * V_1 = 200 * 20 \text{ ml} \Rightarrow V_1 = 182 \mu\text{l}$$

$$V_{H_2O} = V_2 - V_1 = 19.817 \mu\text{l}$$

C1: συγκέντρωση κονιδίων μετά από διαδοχικές αραιώσεις

V1: όγκος αρχικού διαλύματος κονιδίων που πρέπει να αραιωθεί

C2: συγκέντρωση κονιδίων στο διάλυμα εμβολιασμού των φυτών

V2: όγκος στο τελικό διάλυμα εμβολιασμού των φυτών

VH₂O: όγκος νερού στον οποίο θα γίνει η αραιώση του αρχικού διαλύματος

3.4 Δειγματοληψία

Από την μέτρηση του μήκους της ρίζας αρχικά υπολογίστηκε ο μέσος όρος μεταξύ των 3 φυτών της κάθε γλάστρας και στην συνέχεια ο μέσος όρος για την κάθε κατηγορία, η οποία αποτελούνταν από 5 γλάστρες. Οι μετρήσεις για το βάρος των τμημάτων των φυτών (βλαστός, φύλλα, ρίζες) ακολούθησαν μια παρόμοια κατεργασία και επιπλέον χρησιμοποιήθηκαν για τον προσδιορισμό της περιεκτικότητας νερού των τμημάτων, που έγινε χρήση του τύπου :

$$PN(WC) = 100\% * (\text{φρέσκο βάρος} - \text{ξηρό βάρος}) / \text{φρέσκο βάρος}.$$

Δειγματοληψία			Φρέσκο βάρος(gr)			Ξηρό βάρος(gr)			Περιεκτικότητα νερού %		
N	Δείγμα	RL (cm)	SW	LW	RW	SW	LW	RW	SWC	LWC	RWC
1	Control +W1	31,00	2,05	6,3	3,35	0,21	0,81	0,2	89,76	87,14	94,03
2	Control +W2	42,00	3,6	7,4	7,9	0,39	0,99	0,85	89,17	86,62	89,24
3	Control +W3	24,00	1,17	2,13	2,62	0,17	0,5	0,32	85,47	76,53	87,79
4	Control +W4	26,33	2,1	3,89	2,2	0,22	0,44	0,24	89,52	88,69	89,09
5	Control +W5	30,17	2,65	5,25	3,1	0,15	0,41	0,28	94,34	92,19	90,97
6	Control -W1	30,00	1,25	2,12	2,53	0,1	0,17	0,13	92,00	91,98	94,86
7	Control -W2	33,50	2,21	4,45	3,25	0,19	0,47	0,14	91,40	89,44	95,69
8	Control -W3	31,83	1,85	2,75	3,85	0,13	0,33	0,24	92,97	88,00	93,77
9	Control -W4	31,17	3,04	5,1	3,95	0,29	0,55	0,26	90,46	89,22	93,42
10	Control -W5	30,17	1,86	5,22	4,83	0,14	0,7	0,18	92,47	86,59	96,27
11	FsK +W1	28,00	3,5	6,83	6,17	0,38	0,37	0,57	89,14	94,58	90,76
12	FsK +W2	45,33	2,65	3,47	4,25	0,15	0,35	0,27	94,34	89,91	93,65
13	FsK +W3	25,33	2,54	4,28	3,2	0,21	0,45	0,07	91,73	89,49	97,81
14	FsK +W4	30,17	3,9	4,06	4,41	0,3	0,49	0,27	92,31	87,93	93,88
15	FsK +W5	38,33	3,26	4,69	4,82	0,27	0,48	0,19	91,72	89,77	96,06
16	FsK -W1	37,00	1,81	4,12	3,8	0,23	0,48	0,69	87,29	88,35	81,84
17	FsK -W2	32,00	2,18	2,72	3,05	0,2	0,32	0,11	90,83	88,24	96,39
18	FsK -W3	38,67	0,87	2,08	2,6	0,11	0,24	0,27	87,36	88,46	89,62
19	FsK -W4	37,33	2,26	3,04	3,09	0,12	0,32	0,23	94,69	89,47	92,56
20	FsK -W5	38,67	2,65	5,22	4,34	0,16	0,57	0,25	93,96	89,08	94,24
21	FsK_F +W1	25,67	2,52	5,3	4,3	0,14	0,73	0,68	94,44	86,23	84,19
22	FsK_F +W2	41,00	0,92	2,73	2,28	0,09	0,31	0,21	90,22	88,64	90,79
23	FsK_F +W3	32,00	2,55	4,56	2,39	0,11	0,54	0,07	95,69	88,16	97,07
24	FsK_F +W4	42,33	2	4,52	3,46	0,09	0,73	0,42	95,50	83,85	87,86
25	FsK_F +W5	30,67	2,1	1,73	3,14	0,11	0,31	0,15	94,76	82,08	95,22
26	FsK_F -W1	26,00	1,96	4,38	3,9	0,13	0,62	0,71	93,37	85,84	81,79
27	FsK_F -W2	33,67	2,22	2,9	5,54	0,1	0,56	0,6	95,50	80,69	89,17
28	FsK_F -W3	38,67	3,88	5,24	5,38	0,3	0,61	0,16	92,27	88,36	97,03
29	FsK_F -W4	51,83	2,99	4,22	1,8	0,21	0,37	0,52	92,98	91,23	71,11
30	FsK_F -W5	31,67	3,28	4,86	3,08	0,33	0,53	0,1	89,94	89,09	96,75

Πίνακας 8 Αποτελέσματα Δειγματοληψίας. RL: μήκος ρίζας, RW: βάρος ρίζας, LW: βάρος φύλλων, SW: βάρος βλαστού

Από τα δεδομένα του βάρους και της περιεκτικότητας νερού των τμημάτων του φυτού(βλαστός, ρίζα, φύλλα) καθώς και από το μήκος της ρίζας στην συνέχεια έγινε ανάλυση στατιστικής σημαντικότητας. Η ανάλυση που έγινε ήταν Two-way ANOVA/Tukey Test, η οποία εξέτασε την επίδραση δύο διαφορετικών ανεξάρτητων μεταβλητών, σε αυτή την περίπτωση συνθήκες ξηρασίας (W +, W-) και παρουσία ή όχι στελεχών του μύκητα *F. solani* (Control, FsK, FsK-F), σε μία συνεχή εξαρτώμενη μεταβλητή.

Οι μεταβλητές που εξετάστηκαν σε αυτή την περίπτωση ήταν η περιεκτικότητα σε νερό, το φρέσκο και ξηρό βάρος στις ρίζες, τα φύλλα και τους βλαστούς καθώς και το μήκος της ρίζας. Επομένως, εκτελέστηκαν δοκιμές για καθεμία από αυτές τις μεταβλητές.

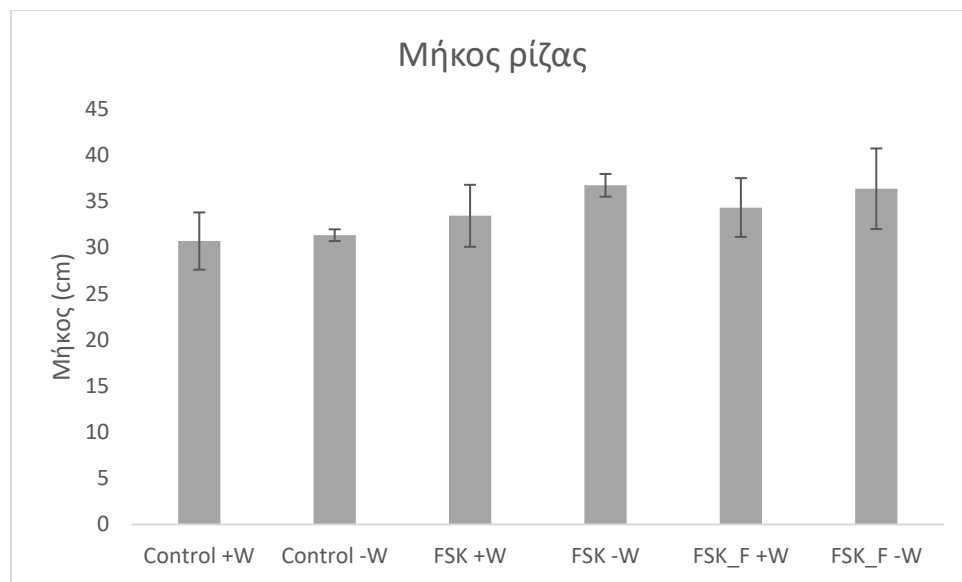


Figure 3 Μήκος της ρίζας της τομάτας Καμία στατιστικώς σημαντική διαφορά

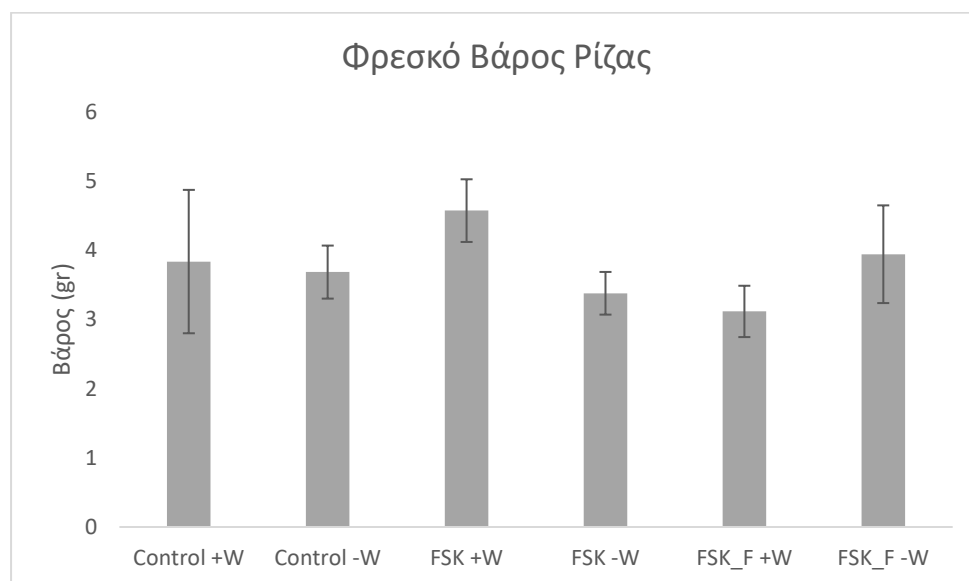


Figure 4 φρέσκο βάρος ριζών . Καμία στατιστικώς σημαντική διαφορά

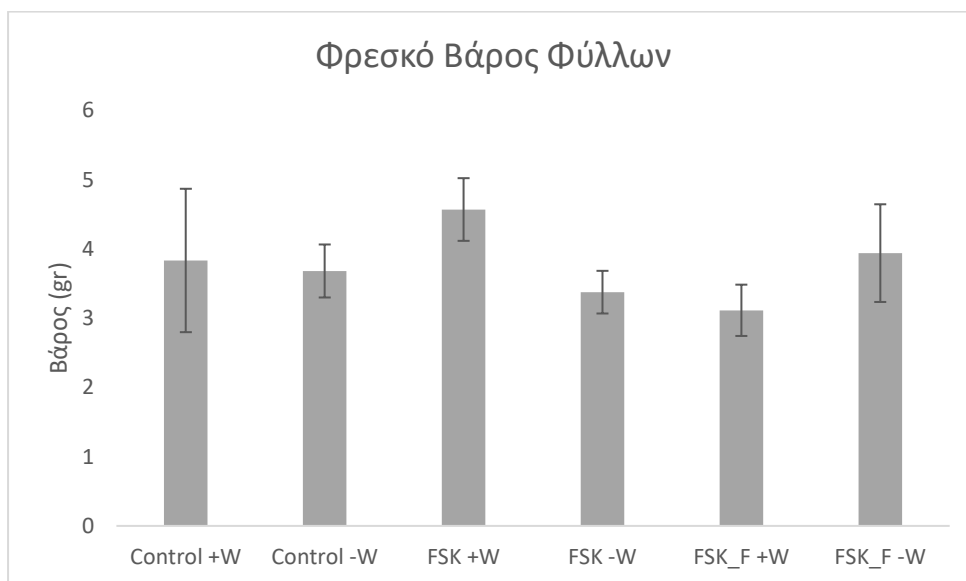


Figure 5 φρέσκο βάρος φύλλων. Καμία στατιστικώς σημαντική διαφορά

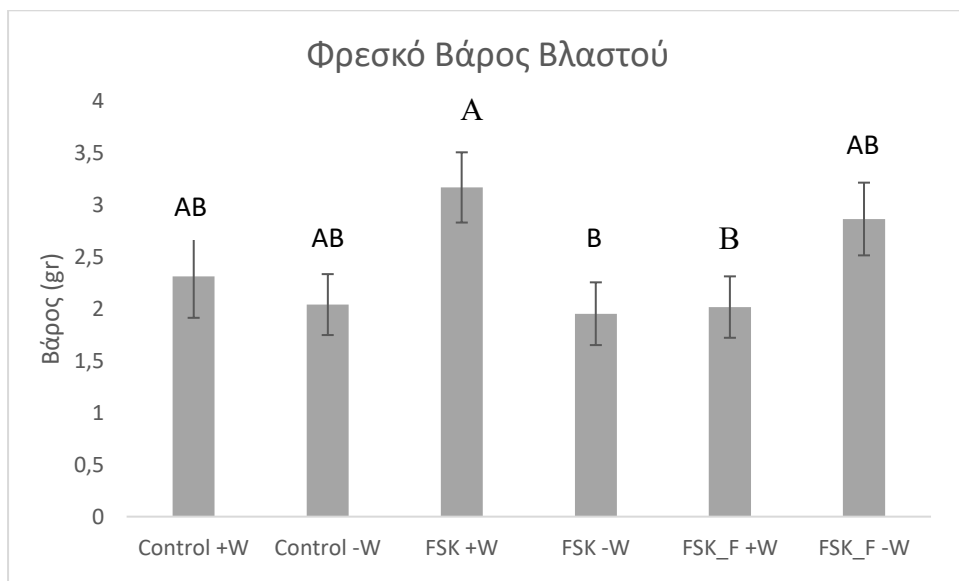


Figure 6 φρέσκο βάρος βλαστών . Στατιστικά σημαντική διαφορά μεταξύ : των FSK +W και FSK-F +W με $p=0,045$ και μεταξύ των FSK +W και FSK -W με $p=0,013$.

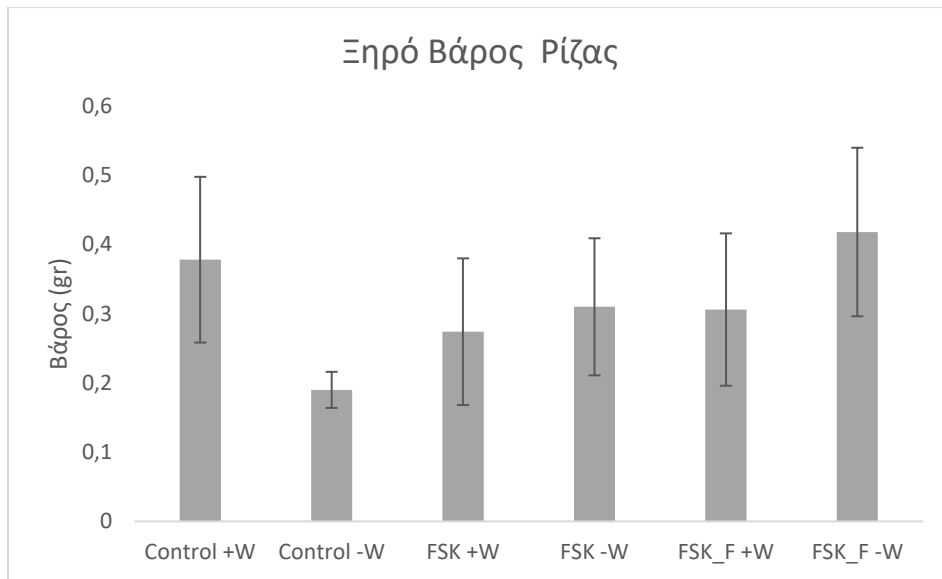


Figure 7 Ξηρό βάρος ριζών . Καμία στατιστικώς σημαντική διαφορά

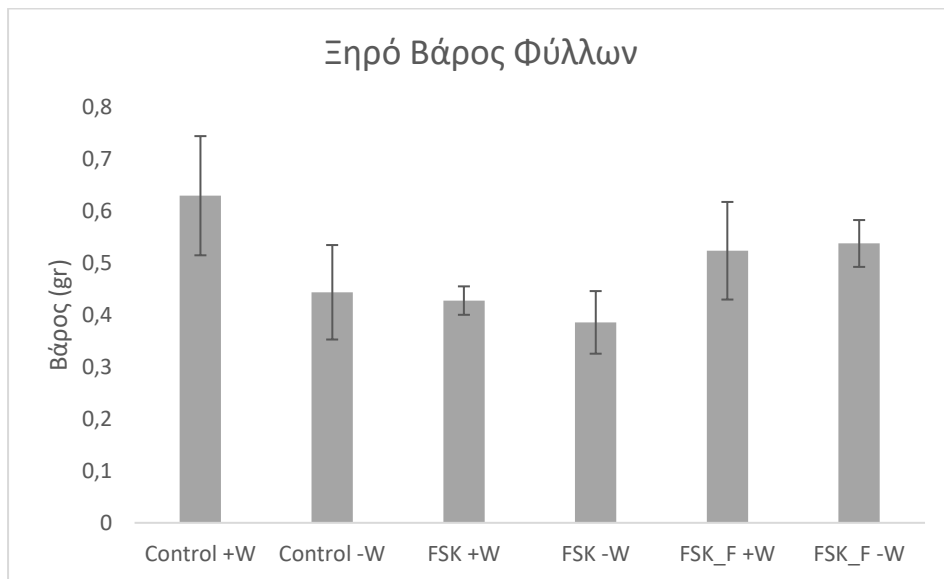


Figure 8 Ξηρό βάρος φύλλων . Καμία στατιστικώς σημαντική διαφορά

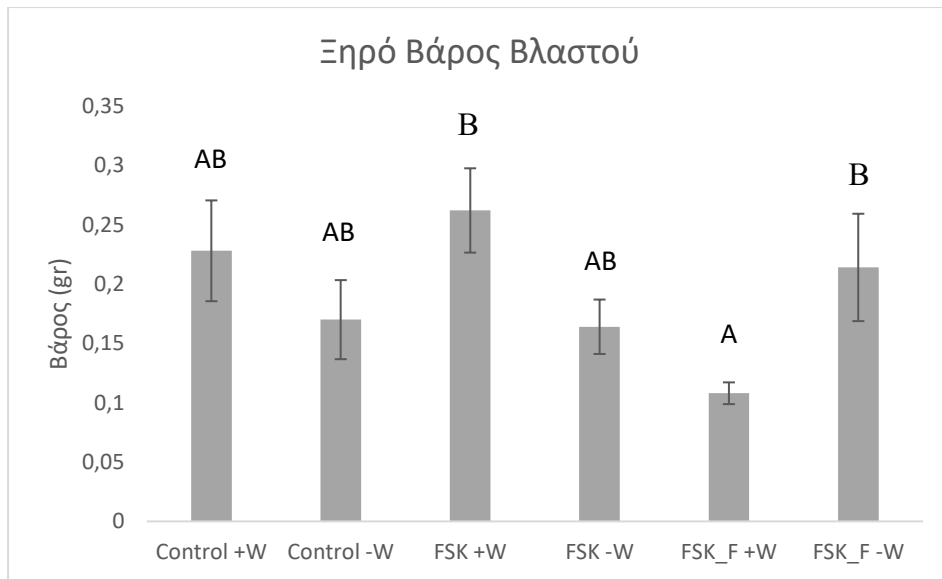


Figure 9 ξηρό βάρος βλαστών . Στον βλαστό είχαμε στατιστική διαφορά μεταξύ : των *FsK-F +W* και *FsK-F -W* με $p=0,04$ και μεταξύ των *FsK +W* και *FsK-F +W* με $p=0,011$.

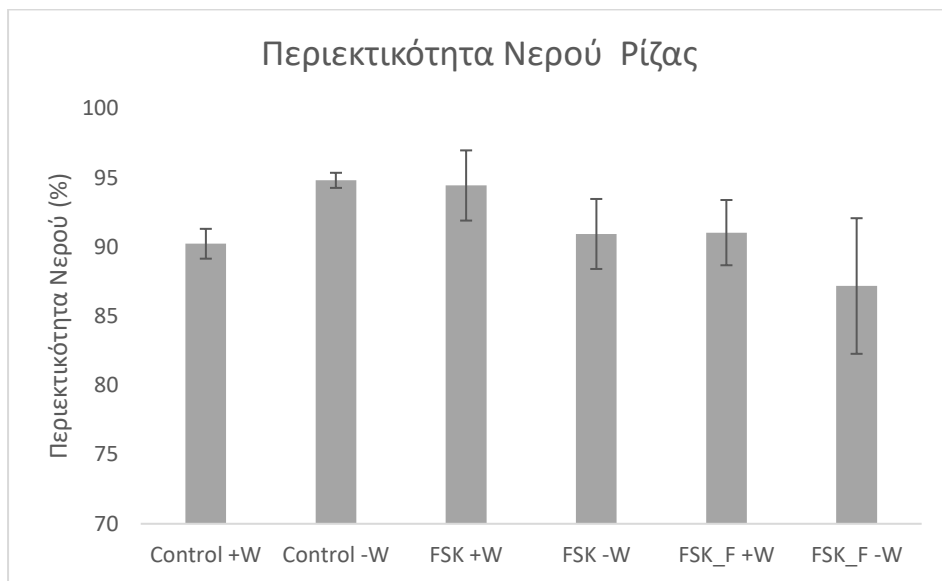


Figure 10 επίπεδα περιεκτικότητας νερού των ριζών . Καμία στατιστικώς σημαντική διαφορά

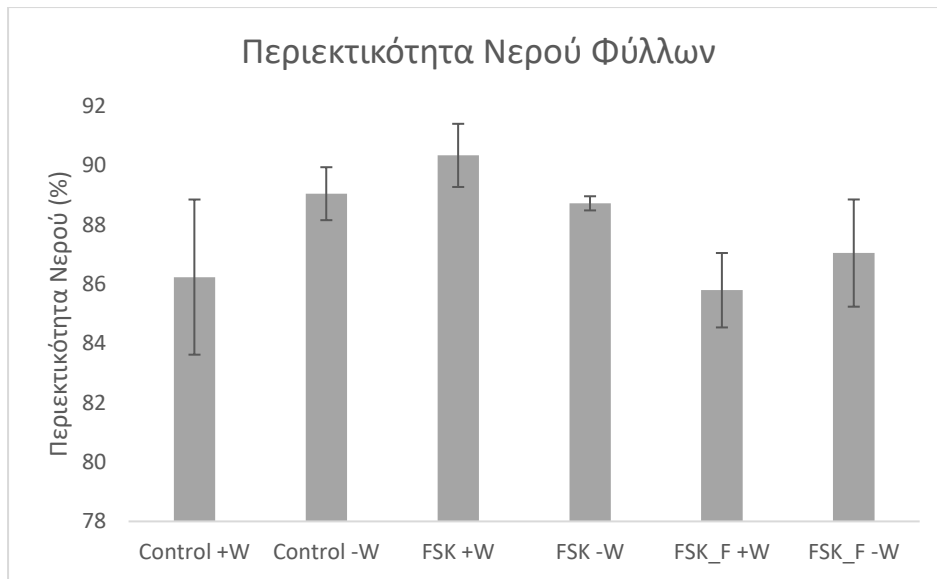


Figure 11 επίπεδα περιεκτικότητας νερού των φύλλων. Καμία στατιστικώς σημαντική διαφορά

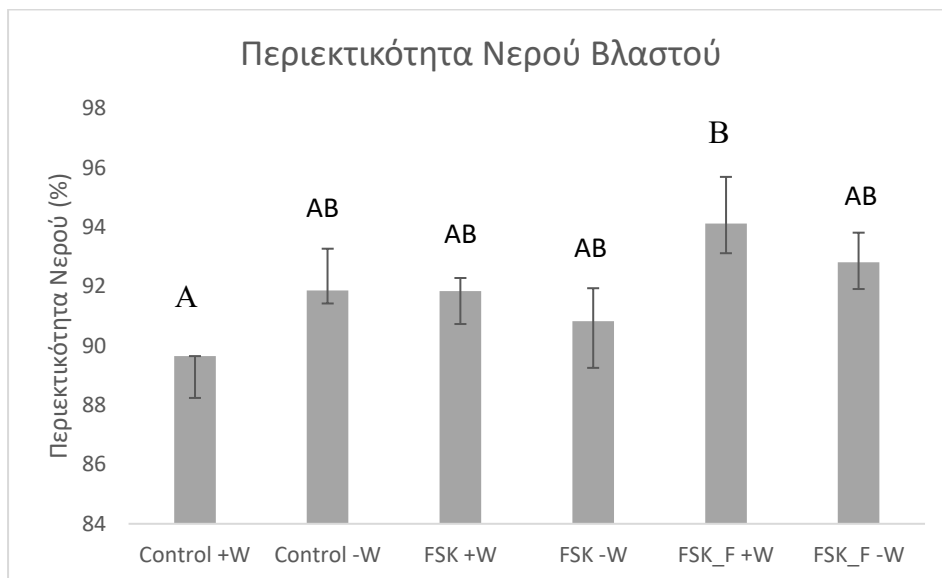


Figure 12 επίπεδα περιεκτικότητας νερού των βλαστών. Στον βλαστό είχαμε στατιστική διαφορά μεταξύ των FSK-F +W και Control +W με $p=0,021$

3.5 Απομόνωση- Ποσοτικοποίηση DNA

Μετά την απομόνωση του γενωμικού DNA ακολούθησε ποσοτικοποίηση του με την συσκευή Qubit.

Δείγμα	Qubit (ng/mL)
FsK +W1	109
FsK +W2	255
FsK +W3	148
FsK +W4	60,5
FsK +W5	277
FsK -W1	271
FsK -W2	70
FsK -W3	6,2
FsK -W4	66,7
FsK -W5	162
FsK_F +W1	232
FsK_F +W2	123
FsK_F +W3	285
FsK_F +W4	96,7
FsK_F +W5	96
FsK_F -W1	194
FsK_F -W2	31,8
FsK_F -W3	27,1
FsK_F -W4	135
FsK_F -W5	33,5
Control +W2	239
Control +W4	74,7
Control -W1	250
Control -W5	159

3.6 Ανίχνευση αποικισμού από τον μύκητα *F. solani* στις ρίζες τομάτας

Χρησιμοποιώντας τα δεδομένα που πήραμε από την ποσοτικοποίηση του DNA σε συνδυασμό με τα αποτελέσματα της qPCR προσδιορίστηκε έπειτα η επιτυχία του αποικισμού των δυο στελεχών του *Fusarium solani* στις ρίζες των φυτών της τομάτας όπως φαίνεται στα *Figure 13* και *Figure 14*.

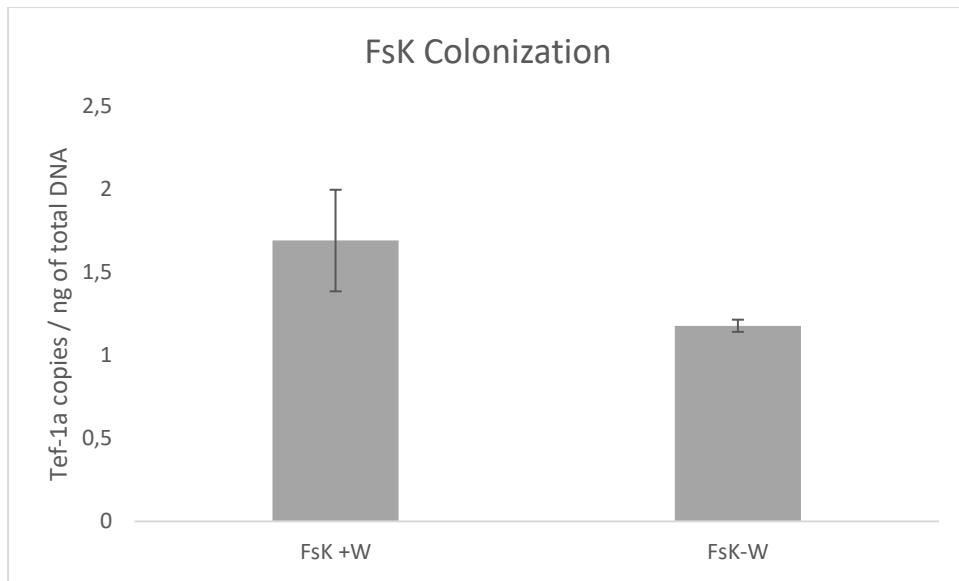


Figure 13 Αποικισμός μύκητα *FsK*

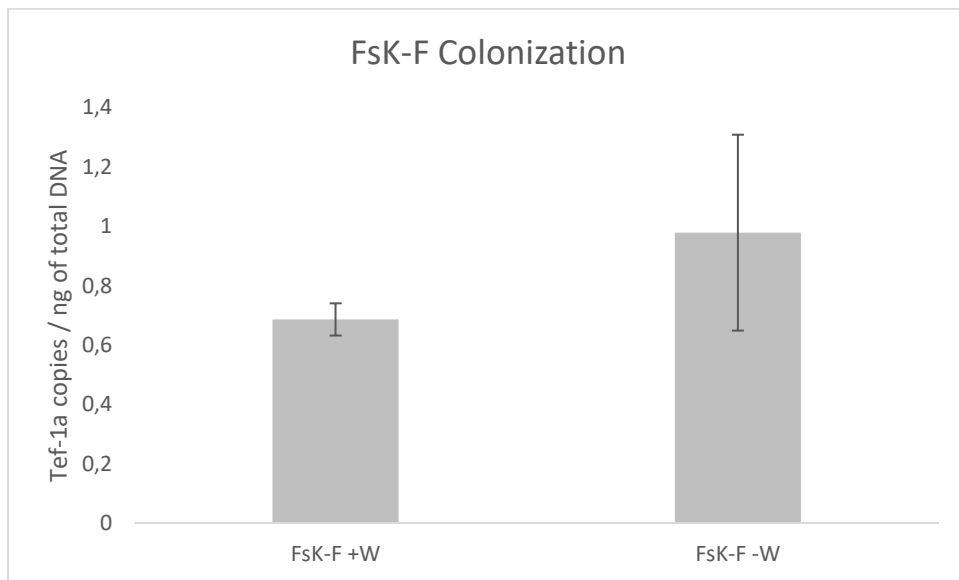


Figure 14 Αποικισμός μύκητα *FsK-F*

4. Discussion

Στην παρούσα εργασία σκοπός ήταν να μελετήσουμε την επίδραση του ενδοφυτικού μύκητα *Fusarium solani* στέλεχος K (FsK) καθώς και του μεταλλάγματος του, FsK-F, σε φυτά τομάτας υπό συνθήκες έλλειψης νερού (ξηρασίας). Με βάση προηγούμενες μελέτες γνωρίζουμε ότι η συμβίωση ενός φυτού με μύκητες μπορεί να οδηγήσει σε βελτίωση της αντοχής του φυτού σε ξηρασία μέσω πολλών μηχανισμών, όπως είναι αλλαγές στην μορφολογία των ρίζων, στην παραγωγή της κηρώδους ουσίας που σχηματίζει την εφυμενίδα στα φύλλα, αυξημένη απορρόφηση νερού και θρεπτικών από το έδαφος. Επιπλέον οι μύκητες φαίνεται ότι επηρεάζουν διάφορους βιοχημικούς μηχανισμούς που περιλαμβάνουν αλλαγές στην ωσμωτική πίεση, στα επίπεδα των φυτοορμονών και στα αντιοξειδωτικά συστήματα του φυτού (Wu, 2017). Γενικά, η παρουσία ενδοφυτικών μυκήτων φαίνεται ότι προκαλεί αύξηση στην βιομάζα των φυτών, στην περιεκτικότητα τους σε χλωροφύλλη καθώς και στην αγωγιμότητα των στομάτων. Επιπρόσθετα έχει βρεθεί ότι σε φυτά που αποικίζονται από ενδοφυτικούς μύκητες, έχουν αυξημένα επίπεδα καθαρής φωτοσύνθεσης (net photosynthesis), σχετικής περιεκτικότητας νερού (RWC) καθώς και μειωμένα επίπεδα υπεροξειδίου του υδρογόνου (H_2O_2) σε σχέση με τα μη-αποικισμένα φυτά, όταν βρεθούν κάτω από συνθήκες ξηρασίας (Dastogeer, 2018).

Τέλος, σε μια παρόμοια εργασία που έγινε για την επίδραση του FsK σε φυτά τομάτας σε *in vitro* και *in planta* πειράματα έδειξαν ότι η παρουσία του μύκητα βελτίωσε τις αρνητικές επιπτώσεις της ξηρασίας στο φυτό οδηγώντας σε υψηλά επίπεδα φωτοσύνθεσης, σχετικής περιεκτικότητας νερού και στοματικής αγωγιμότητας, ενώ παράλληλα υπήρξε μεγάλη μείωση στα επίπεδα ελεύθερης προλίνης σε σχέση με φυτά που δεν είχαν αποικιστεί από τον μύκητα. Με βάση τα δεδομένα αυτής της εργασίας υπάρχουν ενδείξεις ότι ο μύκητας οδηγεί το φυτό σε μια ανισοϋδρικού (anisohydric) τύπου απόκριση σε υδάτινο στρες, η οποία υποστηρίζει αυξημένη απορρόφηση νερού από τις ρίζες και υψηλή αγωγιμότητα νερού στο φυτό (Kavroulakis et al., 2018).

Επομένως, με βάση τα δεδομένα που είχαμε από την προαναφερθείσα μελέτη, σε αυτήν την εργασία επιχειρήσαμε να επαναλάβουμε το *in planta* πείραμα σε μια άλλη ποικιλία τομάτας, διερευνώντας και τη δράση του μεταλλάγματος FsK-F. Αρχικά να αναφερθεί ότι ο εμβολιασμός των φυτών με τα στελέχη του μύκητα ήταν επιτυχής όπως φαίνεται και στα Figure 13 και Figure 14, με τους μύκητες να έχουν αποικίσει τα φυτά στον ίδιο βαθμό ανεξάρτητου συνθήκων ξηρασίας. Έπειτα από την ανάλυση των δεδομένων, που πήραμε κατά την δειγματοληψία, η οποία έγινε μέσω Two-way ANOVA/Tukey Test, προέκυψε ότι υπήρχαν στατιστικώς σημαντικές διαφορές μεταξύ των φυτών που ανήκαν στις διαφορετικές συνθήκες του πειράματος. Εμφανίστηκαν στατιστικώς σημαντικές διαφορές μεταξύ των μεταβλητών-συνθήκων, μόνο όσον αφορά το βάρος του βλαστού του φυτού. Πιο συγκεκριμένα φαίνεται ότι στο βάρος του βλαστού υπήρχε σημαντική διαφορά μεταξύ των συνθήκων FsK +W και FsK -W καθώς και των συνθήκων FsK-F +W και FsK +W για το φρέσκο βάρος. Επίσης εντοπίστηκαν στατιστικά σημαντικές διαφορές μεταξύ των συνθήκων FsK-F +W και FsK-F -W καθώς και των συνθήκων FsK-F +W και FsK +W για το ξηρό βάρος.

Επιπλέον σημαντικές διαφορές εντοπίστηκαν και όσον αναφορά την περιεκτικότητα νερού του βλαστού, όπου φαίνεται ότι στον βλαστό υπήρχε σημαντική διαφορά μεταξύ FsK-F +W και Control +W.

Σε σχέση με το πείραμα των (Kavroulakis et al, 2018) είχαμε κάποιες διαφορές στα αποτελέσματα μας. Αρχικά όσον αναφορά το μήκος της ρίζας δεν εμφανίστηκαν μεγάλες διακυμάνσεις στην πλειονότητα των δειγμάτων. Για το φρέσκο βάρος των φυτών φαίνεται ότι στα φυτά που ποτίζονταν κανονικά (W+) το δείγμα Control είχε μειωμένο βάρος σε σχέση με τα δείγματα FsK και σε μικρότερο βαθμό με τα δείγματα FsK-F, ενώ για τα φυτά που βρίσκονταν σε συνθήκες ξηρασίας (W-) το βάρος τους εμφάνισε μικρές διακυμάνσεις με εξαίρεση το βάρος του βλαστού που ήταν πιο αυξημένο στην συνθήκη FsK-F.

Έπειτα για το ξηρό βάρος των φυτών παρατηρήθηκε ότι στα φυτά που ποτίζονταν κανονικά(W+) τα δείγματα Control φαίνεται να έχουν αυξημένο βάρος σε σχέση με τα FsK-F και FsK στα φύλλα και στις ρίζες, ενώ στον βλαστό τα δείγματα FsK έχουν το μεγαλύτερο βάρος. Αντίθετα για τα φυτά που βρίσκονταν σε συνθήκες ξηρασίας(W-) τα δείγματα Control έχουν μειωμένο βάρος σε σχέση με τα δείγματα FsK-F, ενώ εμφάνισαν τιμές ίσες ή μικρότερες με τα δείγματα FsK. Γενικά παρατηρήθηκε αυξημένο βάρος των φυτών FsK και FsK-F σε συνθήκες φυσιολογικής ύδρευσης(W+) σε σχέση με τα Control για το φρέσκο βάρος, ενώ το αντίθετο φαινόμενο παρατηρήθηκε για το ξηρό βάρος. Για το φυτά που μεγάλωσαν σε συνθήκες ξηρασίας (W-) παρατηρήθηκε ότι δεν υπήρχαν μεγάλες διακυμάνσεις μεταξύ των συνθηκών εάν και υπήρχε μια τάση για εμφάνιση μεγαλύτερων τιμών στην συνθήκη FsK-F. Για την συνθήκη FsK-F παρατηρήθηκε επίσης ότι είχαμε υψηλότερες τιμές βάρους στην συνθήκη ξηρασίας (W-) σε σχέση με την συνθήκη φυσιολογικής ύδρευσης (W+). Επιπλέον από την ανάλυση των δεδομένων για την περιεκτικότητα νερού (WHC) των τμημάτων του φυτού προέκυψαν στατιστικώς σημαντικές διαφορές στον βλαστό. Στον βλαστό παρατηρήθηκε μια διαφορά μεταξύ των τιμών FsK-F +W και Control +W.

Για τα φυτά που εμβολιάστηκαν με τον FsK και τον FsK-F δεν έχουμε μεγάλες διακυμάνσεις όσον αναφορά την περιεκτικότητα του νερού, ενώ για την συνθήκη Control έχουμε υψηλότερη περιεκτικότητα νερού στην συνθήκη ξηρασίας (W-) σε σχέση με την συνθήκη φυσιολογικής ύδρευσης(W+).

Τέλος να αναφερθεί ότι από την επεξεργασία των δεδομένων για τα αληθινά φύλλα και τα φυλλάρια των φυτών που βρίσκονται στον Πίνακα 6 Μέτρηση Σύνθετων φύλλων/ Φυλλαρίων, βλέπουμε ότι αρχικά όλα τα φυτά (W+ και W-) βρίσκονταν περίπου στο ίδιο στάδιο ανάπτυξης κατά την διάρκεια των συνθηκών ξηρασίας με μικρές διακυμάνσεις κυρίως μεταξύ των φυτών που βρίσκονταν σε συνθήκες ξηρασίας (W-).

Έπειτα παρατηρήθηκε ότι τα φυτά που βρίσκονταν στις συνθήκες φυσιολογικής ύδρευσης (W+) δεν εμφάνισαν διαφορές στην ανάπτυξη τους ενώ τα φυτά που μεγάλωσαν σε συνθηκών ξηρασίας εμφάνισαν μικρές διακυμάνσεις ως προς τον αριθμό των φυλλαρίων και στατιστικά σημαντικές διαφορές στον αριθμό των συνθέτων φύλλων.

Πιο συγκεκριμένα τα δείγματα Control είχαν μικρότερο αριθμό συνθέτων φύλλων σε σχέση με τα FsK και τα FsK-F αφού είχαν υποστεί καταπόνηση λόγω της ξηρασίας για 10 μέρες. Επίσης κατά την διάρκεια των συνθήκων ξηρασίας παρατηρήθηκε χλώρωση των φύλλων αρχικά σε φυτά της συνθήκης Control και έπειτα σε φυτά FsK και FsK-F. Η χλώρωση είναι πιθανό να προκλήθηκε λόγω των συνθήκων ξηρασίας. Αυτά τα αποτελέσματα δείχνουν ότι πιθανώς η συμβίωση με τον μύκητα επηρεάζει θετικά την ανάπτυξη του φυτού και ειδικά όταν τα φυτά βρίσκονται κάτω από συνθήκες ξηρασίας.

5. Reference

1. Johnson, C.M., R. Strout, T.C. Broyer and A.B. Carlton, 1957. 'Comparative chlorine requirements of different plant species. *Plant Soil*, 8: 327–353
2. Jenkins, J.A. *Econ Bot* (1948) 'The origin of the cultivated tomato' 2: 379.
3. Ζίφα, Α., Μαμούρης, Ζ. και Μούτου, Κ. (2011). 'Βιολογία'. 2nd ed. Βόλος: Πανεπιστημιακές Εκδόσεις Θεσσαλίας.
4. Taiz, L., & Zeiger, E. (1991). '*Plant physiology*'. Redwood City, Calif: Benjamin/Cummings Pub. Co.
5. Brundrett, M., & Brundrett, M. (2004). *Diversity and classification of mycorrhizal associations*. 473–495.
6. Coleman, J. J. (2016). The *Fusarium solani* species complex: Ubiquitous pathogens of agricultural importance. *Molecular Plant Pathology*, 17(2), 146–158. <https://doi.org/10.1111/mpp.12289>
7. Dastogeer, K. M. G. (2018). Influence of fungal endophytes on plant physiology is more pronounced under stress than well-watered conditions: a meta-analysis. *Planta*, 248(6), 1403–1416. <https://doi.org/10.1007/s00425-018-2982-y>
8. Fungal Diversity Revisited: 2.2 to 3.8 Million Species. (2017). In *The Fungal Kingdom* (pp. 79–95). <https://doi.org/10.1128/microbiolspec.funk-0052-2016>
9. Garantonakisly, N., Pappas, M. L., Varikou, K., & Skiada, V. (2018). Tomato Inoculation With the Endophytic Strain *Fusarium solani* K Results in Reduced Feeding Damage by the Zoophytophagous Predator *Nesidiocoris tenuis*. 6(August), 1–7. <https://doi.org/10.3389/fevo.2018.00126>
10. Hibbett, D. S., Binder, M., Bischoff, J. F., Blackwell, M., Cannon, P. F., Eriksson, O. E., ... Zhang, N. (2007). A higher-level phylogenetic classification of the Fungi. *Mycological Research*, 111(5), 509–547. <https://doi.org/10.1016/j.mycres.2007.03.004>
11. Jia, M., Chen, L., Xin, H., Zheng, C., Rahman, K., & Han, T. (2016). *A Friendly Relationship between Endophytic Fungi and Medicinal Plants : A Systematic Review*. 7(June), 1–14. <https://doi.org/10.3389/fmicb.2016.00906>
12. Kavroulakis, N., Doupis, G., Papadakis, I. E., Ehaliotis, C., & Papadopoulou, K. K. (2018). Tolerance of tomato plants to water stress is improved by the root endophyte *Fusarium solani* FsK. *Rhizosphere*, 6, 77–85. <https://doi.org/10.1016/j.rhisph.2018.04.003>
13. Kavroulakis, N., Ehaliotis, C., Ntougias, S., Zervakis, G. I., & Papadopoulou, K. K. (2005). Local and systemic resistance against fungal pathogens of tomato plants elicited by a compost derived from agricultural residues. *Physiological and Molecular Plant Pathology*, 66(5), 163–174. <https://doi.org/10.1016/j.pmpp.2005.06.003>
14. Kavroulakis, N., Ntougias, S., Zervakis, G. I., Ehaliotis, C., Haralampidis, K., & Papadopoulou, K. K. (2007). Role of ethylene in the protection of tomato plants against soil-borne fungal pathogens conferred by an endophytic *Fusarium solani* strain. *Journal of Experimental Botany*, 58(14), 3853–3864. <https://doi.org/10.1093/jxb/erm230>

15. Ma, L.-J., Geiser, D. M., Proctor, R. H., Rooney, A. P., O'Donnell, K., Trail, F., ... Kazan, K. (2013). Fusarium Pathogenomics . *Annual Review of Microbiology*, 67(1), 399–416. <https://doi.org/10.1146/annurev-micro-092412-155650>
16. Malandrakis, A., Daskalaki, E. R., Skiada, V., Papadopoulou, K. K., & Kavroulakis, N. (2018). A Fusarium solani endophyte vs fungicides: Compatibility in a Fusarium oxysporum f.sp. radicis-lycopersici – tomato pathosystem. *Fungal Biology*, 122(12), 1215–1221. <https://doi.org/10.1016/j.funbio.2018.10.003>
17. Pappas, M. L., Liapoura, M., Papantoniou, D., Avramidou, M., Kavroulakis, N., Weinhold, A., ... Papadopoulou, K. K. (2018). The beneficial endophytic fungus fusarium solani strain K alters tomato responses against spider mites to the benefit of the plant. *Frontiers in Plant Science*, 9. <https://doi.org/10.3389/fpls.2018.01603>
18. Skiada, V., Faccio, A., Kavroulakis, N., Genre, A., Bonfante, P., & Papadopoulou, K. K. (2019). Colonization of legumes by an endophytic Fusarium solani strain FsK reveals common features to symbionts or pathogens. *Fungal Genetics and Biology*, 127, 60–74. <https://doi.org/10.1016/j.fgb.2019.03.003>
19. Summerell, B. A., Laurence, M. H., Liew, E. C. Y., & Leslie, J. F. (2010, October). Biogeography and phylogeography of Fusarium: A review. *Fungal Diversity*, Vol. 44, pp. 3–13. <https://doi.org/10.1007/s13225-010-0060-2>
20. Wu, Q. S. (2017). Arbuscular mycorrhizas and stress tolerance of plants. *Arbuscular Mycorrhizas and Stress Tolerance of Plants*, 1–327. <https://doi.org/10.1007/978-981-10-4115-0>
21. Ximénez-Embún, M. G., Castañera, P., & Ortego, F. (2017). Drought stress in tomato increases the performance of adapted and non-adapted strains of Tetranychus urticae. *Journal of Insect Physiology*, 96, 73–81. <https://doi.org/10.1016/j.jinsphys.2016.10.015>
22. Ximénez-Embún, M. G., Ortego, F., & Castañera, P. (2016). Drought-stressed tomato plants trigger bottom-up effects on the invasive Tetranychus evansi. *PLoS ONE*, 11(1). <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0145275>