



ΠΑΝΕΠΙΣΤΗΜΙΟ ΘΕΣΣΑΛΙΑΣ

Πρόγραμμα Μεταπτυχιακών Σπουδών του Τμήματος Βιοχημείας και Βιοτεχνολογίας

ΒΙΟΤΕΧΝΟΛΟΓΙΑ – ΠΟΙΟΤΗΤΑ ΔΙΑΤΡΟΦΗΣ ΚΑΙ ΠΕΡΙΒΑΛΛΟΝΤΟΣ

«Μελέτη του γονιδίου *TML* κατά τον ταυτόχρονο εμβολιασμό των φυτών *Lotus japonicus* από ενδομυκορριζικούς μύκητες και ριζόβια»

ΜΕΤΑΠΤΥΧΙΑΚΗ ΔΙΠΛΩΜΑΤΙΚΗ ΕΡΓΑΣΙΑ

Μεταπτυχιακή φοιτήτρια:

ΚΟΥΤΣΟΓΙΑΝΝΗ ΧΡΙΣΤΙΝΑ ΕΙΡΗΝΗ

ΛΑΡΙΣΑ, 2021

«Μελέτη του γονιδίου *TML* κατά τον ταυτόχρονο εμβολιασμό των φυτών *Lotus japonicus* από ενδομυκορριζικούς μύκητες και ριζόβια»

«Study of the *TML* gene during the simultaneous inoculation of *Lotus japonicus* plants with arbuscular mycorrhizal fungi and rhizobia»

Τριμελής Επιτροπή:

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

Ευχαριστίες

Αρχικά θα ήθελα να ευχαριστήσω την καθηγήτρια και υπεύθυνη της μεταπτυχιακής μου διατριβής Τσίκου Δανιέλα που μου έδωσε την ευκαιρία να ασχοληθώ με το αντικείμενο αλλά περισσότερο για όλες τις γνώσεις που μου χάρισε απλόχερα και για όλη την ανιδιοτελή βοήθεια που μου παρείχε κατά την διάρκεια της υλοποίησης αλλά και της συγγραφής της εργασίας.

Στην συνέχεια θα ήθελα να ευχαριστήσω την προπτυχιακή φοιτήτρια Μπακούτση Μαρία για την άριστη συνεργασία που είχαμε στο εργαστήριο κατά την διάρκεια διεξαγωγής των πειραμάτων, καθώς και όλα τα μέλη του εργαστήριο ΒΦΠ που με βοήθησαν κατά την διάρκεια της παραμονής μου στο εργαστήριο.

Τέλος θα ήθελα να ευχαριστήσω θερμά και μέσα απ' την καρδιά μου την οικογένεια μου για όλη την αγάπη, την βοήθεια και την στήριξη που μου παρείχαν καθ' όλη την διάρκεια των μεταπτυχιακών σπουδών μου καθώς και τους φίλους μου παλιούς και νέους για την παρουσία και την στήριξη τους.

Περιεχόμενα

Περίληψη.....	7
Abstract	8
Εισαγωγή	9
1.1 Ψυχανθή φυτά	11
1.2 Το φυτό <i>Lotus japonicus</i> ως φυτό- μοντέλο.....	12
1.3 Η σπουδαιότητα της αζωτοδέσμευσης	13
1.4 Συμβιωτική σχέση μεταξύ ριζοβίου – ψυχανθούς.....	16
1.5 Διαδικασία της μόλυνσης	19
1.6 Παράγοντες που επηρεάζουν τον σχηματισμό φυματίων και την αζωτοδέσμευση	21
1.7 Αυτορρύθμιση της φυματιογένεσης(Auto regulation of nodulation – AON)	22
1.8 Συμβιωτική σχέση φυτών με μυκορριζικούς μύκητες.....	23
1.9 Είδη μυκορριζικών μυκήτων	24
1.10 Δενδροειδής ενδομυκορριζικός μύκητας - ΔΕΜ (Arbuscular Mycorrhizal Fungi)...	25
1.11 Επίδραση των ΔΕΜ στο φυτό – ξενιστή.....	26
1.12 Τρόπος μόλυνσης των φυτών από ΔΕΜ (Διαδικασία μόλυνσης)	27
1.13 Μηχανισμός αυτορρύθμισης των μυκορριζών (Autoregulation of mycorrhization- AOM)	28
1.14 Ταυτόχρονη συμβίωση ψυχανθών φυτών με μύκητες και ριζόβια (tripartitesymbiosis)	29
Πειραματικό Μέρος	32
Υλικά και Μέθοδοι	32
2.1 Απολύμανση σπόρων <i>Lotus japonicus</i> :	32
2.2 Τοποθέτηση σπόρων σε τριβλία για εκβλάστηση:	33
2.3 Μεταφύτευση φυτών <i>Lotus japonicus</i> σε magentas:	33
2.3.1 Παρασκευή θρεπτικού διαλύματος LSA:	34
2.3.2 Μεταφύτευση φυτών:	34

2.4 Εμβολιασμός των φυτών με ενδομυκορριζικό μύκητα:.....	34
2.5 Υγρή καλλιέργεια ριζοβίου	35
2.6 Εμβολιασμός των φυτών με ριζόβιο:	36
2.7 Συγκομιδή των φυτών:	36
2.8 Μέτρηση του αριθμού των φυματίων	36
2.9 Υπολογισμός του ποσοστού αποικισμού από ενδομυκορριζικό μύκητα	37
2.9.1 Χρώση ριζών με μελάνι:.....	37
2.9.2 Λήψη παρατηρήσεων:	38
3.Αποτελέσματα	39
3.1 Εμβολιασμός των φυτών <i>L. japonicus</i> με δενδρόμορφο ενδομυκορριζικό μύκητα και ριζόβια.....	39
3.2 Έλεγχος της επίδρασης του ενδομυκορριζικού μύκητα <i>Rhizophagus irregularis</i> στον αποικισμό των φυτών <i>Lotus japonicus</i> από ριζόβια.....	40
3.3 Έλεγχος της επίδρασης του ριζοβίου <i>M. loti</i> στον αποικισμό των φυτών <i>Lotus japonicus</i> από τον ενδομυκορριζικό μύκητα <i>Rhizophagus irregularis</i>	43
4. Συζήτηση.....	45
5 Βιβλιογραφία.....	49

Περίληψη

Κατά την εξέλιξή τους τα φυτά έχουν αναπτύξει την ικανότητα να συμβιώνουν με διάφορους μικροοργανισμούς του εδάφους έτσι ώστε να καλύπτουν τις ανάγκες τους σε θρεπτικά συστατικά. Δύο από τις πιο διαδεδομένες και καλά μελετημένες σχέσεις αλληλεπίδρασης στην φύση είναι αυτές των φυτών με δενδρόμορφους ενδομυκορριζικούς μύκητες (ΔΕΜ) και των ψυχανθών φυτών με τα αζωτοδεσμευτικά βακτήρια του γένους *Rhizobium*. Οι δύο αυτές σχέσεις αλληλεπίδρασης των φυτών με τους μικροοργανισμούς του εδάφους φαίνεται πως έχουν αρκετά κοινά στοιχεία στα σηματοδοτικά μονοπάτια αλλά και στα γονίδια που τις ρυθμίζουν. Ακόμα, πρόσφατες μελέτες δείχνουν πως οι δύο αυτές σχέσεις εμφανίζουν αρκετά κοινά στοιχεία και στους μηχανισμούς αυτορρύθμισης τους, δηλαδή τους μηχανισμούς των φυτών που ελέγχουν την έναρξη, την ανάπτυξη και την έκταση του αποικισμού της ρίζας που θα επιτρέψουν τα φυτά να συμβεί από τους μικροσυμβιώτες. Στην παρούσα διατριβή μελετάται η πιθανή εμπλοκή του γονιδίου *TML*, το οποίο έχει σημαντικό ρόλο στον μηχανισμό αυτορρύθμισης της φυματιογένεσης, στον αποικισμό των ριζών κατά τον ταυτόχρονο εμβολιασμό των δύο συμβιωτών στις ρίζες του ψυχανθούς φυτού *Lotus japonicus*.

Λέξεις-κλειδιά: *Lotus japonicus*, *TML*, ψυχανθή φυτά, συμβιωτικές σχέσεις, δενδρόμορφους μυκορριζικούς μύκητες, ΔΕΜ, αζωτοδεσμευτικά βακτήρια, ριζόβια, φυμάτια, αζωτοδέσμευση, μηχανισμός αυτορρύθμισης, AOM, AON

Abstract

During evolution plants developed the ability to associate with soil microorganisms so that they cover their nutritional needs. Two of the most common and widely-studied symbiotic associations in nature are those of plants with arbuscular mycorrhizal fungi and of leguminous plants with nitrogen- fixing bacteria, called rhizobia.

These two types of symbiotic association between plants and soil microorganisms seem to share many similarities in the signaling pathways and the regulatory genes. Furthermore, recent studies have shown that these two types of symbiotic relationships have many common characteristics in their mechanisms of autoregulation, that is , the plant mechanisms which regulate the initiation, development and the extent of the root colonization by microbes.

In this study, we examine the putative involvement of the *TML* gene, which plays an important role in the autoregulation of nodulation, in the colonization of the roots during the simultaneous inoculation of *Lotus japonicus* plants by the two microsymbionts.

Keywords: *Lotus japonicus*, *TML*, *legumes plants*, symbiotic associations , arbuscular mycorrhizal fungi, AMF, nitrogen- fixing bacteria, rhizobia, nodules, auto regulation of mycorrhization, AOM, auto regulation of nodulation, AON

Εισαγωγή

Τα τελευταία χρόνια παρατηρείται συνεχόμενη και έντονη αύξηση του πληθυσμού στον πλανήτη καθιστώντας επιτακτική την ανάγκη για εύρεση περισσότερης τροφής ώστε να καλυφθούν οι αυξανόμενες ανάγκες των ανθρώπων. Αυτό έχει ως αποτέλεσμα την εντατικοποίηση της γεωργίας με την χρησιμοποίηση ποικιλιών υψηλότερης απόδοσης και την αυξημένη χρήση χημικών λιπασμάτων και φυτοφαρμάκων με τελικό στόχο την αύξηση της παραγωγής.

Η χρήση τεχνητών λιπασμάτων υπολογίζεται ότι ξεκίνησε στις αρχές του 17^{ου} αιώνα κατά την Αγροτική Βρετανική Επανάσταση, αν και η χρήση τους έγινε πιο έντονη κατά την Βιομηχανική Επανάσταση. Η χρήση γεωργικών λιπασμάτων και φυτοφαρμάκων αύξησε δραματικά την παγκόσμια φυτική παραγωγή. Χαρακτηριστικά, υπολογίζεται ότι ένα εκτάριο καλλιεργήσιμης έκτασης το 1908 πριν την εισαγωγή των τεχνητών λιπασμάτων στην γεωργία, παρήγαγε τροφή για 1,9 άτομα, ενώ το 2008 η παραγωγικότητα αυτή αυξήθηκε στα 4,8 άτομα ανά εκτάριο καλλιεργήσιμης γης.

Πρόσφατα αποτελέσματα επιστημονικών ερευνών δείχνουν πως τα τελευταία χρόνια ο ρυθμός εφαρμογής αζωτούχων (N) και φωσφορικών (P) λιπασμάτων έχουν αυξηθεί κατά 8 και κατά 3 φορές αντίστοιχα συγκριτικά με το 1961 (Lu C, Tian H, 2017). Αυτή η αύξηση παρά τις ευεργετικές εισφορές που έφερε στην αύξηση της παραγωγής επέφερε και σημαντικά περιβαλλοντικά προβλήματα.

Τα λιπάσματα έχουν κατασκευαστεί με τέτοιο τρόπο ώστε να είναι ευδιάλυτα έτσι ώστε να απορροφώνται εύκολα κυρίως από το ριζικό σύστημα των φυτών. Καθώς όμως τα φυτά έχουν συγκεκριμένο ρυθμό απορρόφησης νερού από το έδαφος, δεν είναι δυνατόν να απορροφήσουν όλη την ποσότητα του διαλύματος που τους παρέχεται. Αυτό έχει ως αποτέλεσμα το διαλυμένο λίπασμα να περνά στον υδροφόρο ορίζοντα, ρυπαίνοντάς τον και στην συνέχεια να καταλήγει σε υδάτινα συστήματα δημιουργώντας το φαινόμενο του ευτροφισμού. Ακόμα, σε περιπτώσεις λίπανσης με νιτρικό αμμώνιο τα φυτά απορροφούν ταχύτερα τα ιόντα αμμωνίου (NH_4^+) σε σχέση με τα νιτρικά (NO_3^-). Αυξάνοντας τα νιτρικά ιόντα στον υδροφόρο ορίζοντα, επιδρώντας στο πόσιμο νερό, καθιστώντας το επικίνδυνο για την υγεία τόσο των ανθρώπων όσο και των ζώων. Επιπλέον, η νιτρική λίπανση

μπορεί να οδηγήσει σε αυξημένη εκπομπή αερίων του θερμοκηπίου στην ατμόσφαιρα (κυρίως N_2O) (Camargo JA, Alonso A. 2006). Τέλος, πολλά λιπάσματα περιέχουν τοξικά πρόσθετα τα οποία ρυπαίνουν το έδαφος και η αλόγιστη χρήση τους προκαλεί αλλαγές στην μορφολογία του εδάφους υποβαθμίζοντας σταδιακά την γονιμότητα τους.

Εκτός από σημαντικά προβλήματα στο περιβάλλον η έντονη χρήση των λιπασμάτων έχει επιφέρει και προβλήματα στον ίδιο τον παραγωγό. Αυτό συμβαίνει διότι για την παραγωγή των φυτοφαρμάκων και των λιπασμάτων καταναλώνονται μεγάλες ποσότητες ενέργειας και μη ανανεώσιμων φυσικών πόρων καθιστώντας τα ακριβά, ανεβάζοντας το κόστος παραγωγής. Επιπλέον, οι απώλειες από την εκροή NO_3 - και την εκπομπή αερίων, οδηγούν σε μειωμένους συντελεστές απόδοσης της αζωτούχου λίπανσης και οικονομική ζημία για τους παραγωγούς.

Για τους παραπάνω λόγους όλο και πιο έντονη είναι η ανάγκη σήμερα για στροφή σε πιο βιολογικές τεχνικές οι οποίες να είναι πιο φιλικές προς το περιβάλλον αλλά και το ίδιο αποτελεσματικές.

Με το πέρασμα των χρόνων τα φυτά άρχισαν να αλληλεπιδρούν με μικροοργανισμούς του περιβάλλοντος τους, αναπτύσσοντας συμβιωτικές σχέσεις με αυτούς ώστε να αντιμετωπίσουν το πρόβλημα της έλλειψης θρεπτικών στοιχείων. Έτσι στην φύση είναι συχνό το φαινόμενο τα φυτά να αποικίζονται από βακτήρια και μύκητες του εδάφους.

Από τις πλέον μελετημένες συμβιωτικές σχέσεις που παρατηρούνται στην φύση είναι εκείνη των υγιών φυτών με ενδομυκορριζικούς μύκητες (EM) και εκείνη των ψυχανθών φυτών με αζωτοδεσμευτικά βακτήρια, τα ριζόβια. Από την σχέση αυτή επωφελούνται τόσο τα φυτά σε θρεπτικά στοιχεία, όσο και οι μικροσυμβιώτες.

Κατά τον αποικισμό των φυτών οι ενδομυκορριζικοί μύκητες βελτιώνουν την θρέψη των φυτών που αποικίζουν, παρέχοντας τους κυρίως φώσφορο αλλά και ενισχύοντας την αντοχή τους σε αβιοτικές καταπονήσεις. Από την σχέση αυτή αυξάνεται η αντοχή των φυτών στην αλατότητα και την υδατική καταπόνηση καθώς και η αντοχή σε διάφορους παθογόνους μικροοργανισμούς. Αντίστοιχα, η συμβίωση των ψυχανθών με αζωτοδεσμευτικά ριζόβια εφοδιάζει το φυτό με άζωτο.

Τα ωφέλιμα αυτά μικρόβια θεωρούνται «βιο-λιπάσματα», καθώς τα φυτά που αναπτύσσουν συμβιωτικές σχέσεις έχουν μικρότερες απαιτήσεις σε χημική λίπανση από ότι τα μη-συμβιωτικά φυτά. Αυτό ευνοεί την εφαρμογή της αειφόρου γεωργίας στα οικοσυστήματα, μειώνοντας το οικονομικό κόστος και προστατεύοντας το περιβάλλον. Για τον λόγο αυτό και για να μειωθεί η χρήση τεχνητών λιπασμάτων εφευρέθηκαν τα μικροβιολογικά λιπάσματα που αποτελούνται από επιλεγμένα μικροβιακά στελέχη που αναδείχθηκαν κυρίως μέσα από την μελέτη των σχέσεων των φυτών με ωφέλιμους μικροοργανισμούς, βακτήρια ή μύκητες.

Στην παρούσα μεταπτυχιακή έρευνα, μελετήθηκαν οι συμβιωτικές σχέσεις των ψυχανθών φυτών με ενδομυκορριζικούς μύκητες και με αζωτοδεσμευτικά ριζόβια. Πιο συγκεκριμένα, μελετήθηκε η ταυτόχρονη συμβίωση με ριζόβια και ενδομυκορριζικούς μύκητες στο ψυχανθές φυτό –μοντέλο *Lotus japonicus*, καθώς τα ψυχανθή φυτά καλούνται να διαχειριστούν και τις δύο συμβιωτικές σχέσεις στη φύση.

1.1 Ψυχανθή φυτά

Τα ψυχανθή φυτά ανήκουν στην οικογένεια *Fabaceae* (συνώνυμα *Leguminosae* ή *Papilionaceae*) και στο είδος *Fabales*. Τα ψυχανθή απασχολούν τους ανθρώπους εδώ και χιλιάδες χρόνια. Αρχικά απασχόλησαν λόγω των θρεπτικών συστατικών που φέρουν οι καρποί τους ενώ στην συνέχεια άρχισαν να μελετώνται εκτενέστερα, λόγω της σπουδαιότητας της ικανότητας τους να αναπτύσσουν συμβιωτικές σχέσεις με βακτήρια του εδάφους τα οποία στην συνέχεια αζωτοδεσμεύουν.

Η οικογένεια των ψυχανθών περιλαμβάνει πολλά γένη και είδη, τα οποία μπορεί διαφέρουν μεταξύ τους τόσο στην διάρκεια του βιολογικού τους κύκλου (ετήσια ή πολυετή) όσο και στον τρόπο ανάπτυξης τους (ποώδη, θαμνώδη ή δενδρώδη, έρποντα ή αναρριχώμενα). Τα ψυχανθή είναι δικοτυλήδονα φυτά με ισχυρό πασσαλώδες ριζικό σύστημα στο οποίο αναπτύσσονται πολλές πλάγιες διακλαδώσεις. Στις ρίζες τους σχηματίζονται χαρακτηριστικά εξογκώματα που ονομάζονται φυμάτια και είναι αποτέλεσμα της συμβίωσης των ψυχανθών με

βακτήρια του εδάφους. Ακόμα, διαθέτουν σύνθετα φύλλα και σπέρματά που ωριμάζουν μέσα σε λοβούς, ενώ το όνομα τους προέρχεται από την ειδική μορφολογία του άνθους τους που μοιάζει με ψυχή (πεταλούδα).

Τα ψυχανθή καλλιεργούνται κυρίως για την παραγωγή καρπών που χρησιμοποιούνται για την διατροφή των ανθρώπων, τα γνωστά όσπρια, αλλά και των ζώων. Επίσης μπορούν να χρησιμοποιηθούν για την παραγωγή χονδροειδών ζωοτροφών και ως φυτά χλωρής λίπανσης. Ορισμένα χαρακτηριστικά παραδείγματα ψυχανθών φυτών είναι τα φασόλια, οι φακές, τα ρεβίθια, η μηδική και το τριφύλλι.



Εικόνα 1.1 Μορφολογία του ψυχανθές - φυτού *Lotus japonicus*.

1.2 Το φυτό *Lotus japonicus* ως φυτό- μοντέλο

Το *Lotus japonicus* ανήκει στην τάξη Leguminosae ή Fabales (τάξη χεδρωπών) και την οικογένεια Fabaceae (οικ. Ψυχανθών). Το γένος *Lotus* απαριθμεί περισσότερα από 200 είδη και τα τελευταία χρόνια το διπλοειδές είδος *L. japonicus* χρησιμοποιείται ευρύτατα σαν φυτικό υλικό για την μελέτη της συμβιωτικής σχέσης ψυχανθών και ριζοβίων. Ο λόγος της επιλογής του συγκεκριμένου φυτού είναι τα πλεονεκτήματα που φέρει όσον αφορά το μικρό του μέγεθος, τον μικρό κύκλο ζωής (2-3 μήνες), την ικανότητα του να αυτογονιμοποιείται, το μικρό γονιδίωμα που διαθέτει (472MB MG20, 442.8 MB Gifu, Ito M. et al., 2000 Sato et al., 2008) το οποίο κάνει τις μελέτες σε επίπεδο γονιδιώματος πιο εύκολες (Stougaard, 2005) και η

σχετικά εύκολη δημιουργία δια-γονιδιακών φυτών. Τέλος, διαθέτει μεγάλα άνθη, μεγάλη παραγωγή σπόρων και είναι εύκολα καλλιεργήσιμο και δεκτικό σε πρωτόκολλα μετασχηματισμού (Stougaard, 2005).

Για τη μελέτη τη συμβιωτικής σχέσης μεταξύ φυτών και ριζοβίων η έρευνα έχει εστιάσει σε δύο συγκεκριμένα ζεύγη συμβιωτών. Πρόκειται για το φυτό *Medicago truncatula* με το αζωτοδεσμευτικό βακτήριο *Sinorhizobium meliloti* και για το *Lotus japonicus* με το *Mesorhizobium loti*. Το πρώτο ζεύγος χρησιμοποιείται ως σύστημα αναφοράς στην περίπτωση δημιουργίας μη καθορισμένων φυματίων, ενώ το δεύτερο, που χρησιμοποιήθηκε και στην παρούσα διπλωματική εργασία, χρησιμοποιείται στην περίπτωση των καθορισμένων φυματίων (VandenBoschandStacey,2003).

1.3 Η σπουδαιότητα της αζωτοδέσμευσης

Τα τελευταία χρόνια πολλοί είναι οι ερευνητές οι οποίοι έχουν στραφεί προς την μελέτη της συγκεκριμένης οικογένειας. Ο ρόλος των ψυχανθών στην διατήρηση και στην βελτίωση της γονιμότητας του εδάφους ήταν γνωστός πολύ καιρό πριν την χρησιμοποίηση των λιπασμάτων. Χαρακτηριστικά αναφέρεται η εισαγωγή των ψυχανθών σε συστήματα αμειψισποράς από τους αρχαίους Έλληνες, Αιγύπτιους και Κινέζους όπου είχαν ήδη ανακαλύψει την σπουδαιότητα αυτής της οικογένειας.

Το μεγαλύτερο πλεονέκτημα που φέρουν τα ψυχανθή έναντι των υπόλοιπων καλλιεργειών είναι η ικανότητα τους να αναπτύσσουν συμβιωτικές σχέσεις με αζωτοδεσμευτικά βακτήρια που υπάρχουν στο υπέδαφος. Τα ψυχανθή μέσω της συμβίωσης τους με τα ριζόβια αυτά, δεσμεύουν το άζωτο της ατμόσφαιρας με αποτέλεσμα να μπορούν να αναπτύσσονται ικανοποιητικά και να καλύπτουν σχεδόν εξ' ολοκλήρου τις ανάγκες τους σε άζωτο ακόμη και σε εδάφη με χαμηλή διαθεσιμότητα αζώτου. Επιπρόσθετα εμπλουτίζουν το έδαφος με άζωτο, το οποίο επωφελούνται οι επόμενες καλλιέργειες.

Το άζωτο αποτελεί ένα σημαντικό χημικό στοιχείο για την διατήρηση της ζωής στον πλανήτη, καθώς είναι συστατικό πολλών βιομορίων όπως των νουκλεϊκών

οξέων και των πρωτεϊνών. Το άζωτο μαζί με το υδρογόνο, τον άνθρακα και το οξυγόνο είναι τα βασικά θρεπτικά στοιχεία που χρειάζονται τα φυτά σε μεγαλύτερες ποσότητες για την κάλυψη των αναγκών τους. (Δροσόπουλος, 1998).

Το άζωτο εμφανίζεται σε πολλές χημικές μορφές στην βιόσφαιρα. Στην ατμόσφαιρα το μοριακό άζωτο βρίσκεται σε αφθονία, σε ποσοστό περίπου 78% κ.ό., όμως βρίσκεται σε μορφή (αδρανές αέριο) που δεν είναι αφομοιώσιμη από τα φυτά. Για το λόγο αυτό, η εισαγωγή του ατμοσφαιρικού αζώτου στις τροφικές αλυσίδες των οικοσυστημάτων γίνεται με την διαδικασία της αζωτοδέσμευσης, η οποία μετατρέπει το ατμοσφαιρικό άζωτο σε μορφές που μπορούν να αξιοποιηθούν από τα φυτά.

Η αζωτοδέσμευση διακρίνεται σε ατμοσφαιρική και βιολογική. Κατά την ατμοσφαιρική αζωτοδέσμευση το άζωτο της ατμόσφαιρας αντιδρά είτε με τους υδρατμούς, σχηματίζοντας αμμωνία, είτε με το ατμοσφαιρικό οξυγόνο, σχηματίζοντας νιτρικά ιόντα. Η απαραίτητη ενέργεια για την ολοκλήρωση των αντιδράσεων αυτών, προσφέρεται από τις ηλεκτρικές εκκενώσεις δηλαδή από τις αστραπές και τους κεραυνούς της ατμόσφαιρας. Στην συνέχεια η αμμωνία και τα νιτρικά ιόντα που σχηματίστηκαν μεταφέρονται με τη βροχή στο έδαφος όπου προσλαμβάνονται από τα φυτά. Η συνεισφορά όμως των διεργασιών αυτών είναι πολύ μικρή για να στηρίξει τις ανάγκες των οικοσυστημάτων σε αφομοιώσιμο άζωτο, αποφέροντας το 10% της συνολικής αζωτοδέσμευσης.

Η βιολογική αζωτοδέσμευση από την άλλη πλευρά, καταλύεται κυρίως από προκαριωτικούς οργανισμούς που ανήκουν στα ευβακτήρια και στα αρχαιοβακτήρια (Widmeretal., 1999; Zehretal., 2003). Οι μικροοργανισμοί αυτοί χωρίζονται σε τρεις κατηγορίες ανάλογα με τον τρόπο διαβίωσης τους κατά την διαδικασία δέσμευσης του ατμοσφαιρικού αζώτου. Στην πρώτη κατηγορία ανήκουν οι μικροοργανισμοί που ζουν ελεύθεροι στο έδαφος, οι οποίοι είναι είτε αναερόβιοι (π.χ. *Clostridium pasteurianum*), είτε προαιρετικά αναερόβιοι (π.χ. *Klebsiella*), είτε αερόβιοι (π.χ. *Azotobacter*, *Azospirillum*). Η συνεισφορά όμως των παραπάνω μικροοργανισμών στη δέσμευση του αζώτου είναι πολύ μικρή και υπολογίζεται σε λιγότερο από 1KgN/ha ετησίως κατά μέσο όρο (Botheetal.,1983). Μια δεύτερη κατηγορία είναι αυτή των αυτότροφων φωτοσυνθετικών κυανοπράσινων αλγών (οικ. *Nostocaceae*), τα οποία συμβάλλουν σημαντικά στον εμπλουτισμό του

εδάφους σε αφομοιώσιμο άζωτο, σε βαθμό που φτάνει τα 38KgN/ha ετησίως (Wittyetal.,1979) λόγω του ότι είναι ανεξάρτητα από την ύπαρξη οργανικού άνθρακα στο περιβάλλον τους ως πηγή ενέργειας.

Η πιο σημαντική κατηγορία αζωτοδεσμευτικών μικροοργανισμών είναι αυτή των μικροοργανισμών που δημιουργούν συμβιωτικές σχέσεις με τα ανώτερα φυτά (Mylonaetal.,1995). Στους μικροοργανισμούς αυτούς περιλαμβάνονται βακτήρια του γένους *Rhizobium*, *Mesorhizobium*, *Sinorhizobium*, *Bradyrhizobium*, *Azorhizobium* και *Allorhizobium*, τα οποία αναφέρονται συνολικά ως ριζόβια, καθώς και βακτήρια του γένους *Frankia*.

Πιο ειδικά, τα ριζόβια ανήκουν στην α-πρωτεοβακτηριακή οικογένεια *Rhizobiaceae* και διαθέτουν την ικανότητα να επάγουν το σχηματισμό ενός καινούργιου οργάνου στις ρίζες των φυτών της οικογένειας των ψυχανθών, το φυμάτιο. Από την άλλη μεριά τα βακτήρια του γένους *Frankia* είναι νηματοειδής Gram θετικό ακτινοβακτήριο που επάγει το σχηματισμό φυματίων σε ξυλώδη φυτά που ανήκουν στις οικογένειες *Betulaceae*, *Myricaceae*, *Elaeagnaceae*, *Rhamnaceae*, *Rosaceae*, *Coriariaceae* και *Datisticaceae* (Benson and Clawson,2000 ;Benson and Silvester,1993).

Έτσι, καταληκτικά θα λέγαμε ότι η βιολογική αζωτοδέσμευση πραγματοποιείται από ελεύθερους ή συμβιωτικούς μικροοργανισμούς που ζουν στο υπέδαφος. Κυριότερα αζωτοδεσμευτικά βακτήρια είναι τα βακτήρια που ζουν συμβιωτικά στις ρίζες των ψυχανθών σχηματίζοντας ειδικά εξογκώματα πάνω σ' αυτές, τα φυμάτια. Τα συγκεκριμένα βακτήρια έχουν την ικανότητα να δεσμεύουν το ατμοσφαιρικό άζωτο και να το μετατρέπουν σε νιτρικά ιόντα, τα οποία μπορούν να απορροφηθούν από τα ψυχανθή. Η βιολογική αζωτοδέσμευση κατέχει το 90% της συνολικής αζωτοδέσμευσης που πραγματοποιείται.

Τα φυτά χρησιμοποιούν τα νιτρικά ιόντα που προσλαμβάνουν από το έδαφος (είτε με τη διαδικασία της ατμοσφαιρικής είτε με αυτήν της βιολογικής αζωτοδέσμευσης) προκειμένου να συνθέσουν τις αζωτούχες ενώσεις τους όπως τις πρωτεΐνες και τα νουκλεϊκά οξέα.



Εικόνα 1.2: Σχηματισμός φυματίων από αζωτοδεσμευτικά βακτήρια στις ρίζες των ψυχανθών φυτών.

1.4 Συμβιωτική σχέση μεταξύ ριζοβίου – ψυχανθούς.

Η συμβίωση μεταξύ ψυχανθών και ριζοβίων όπως έχει αναφερθεί είναι πολύ σημαντική διαδικασία και δεν είναι μια τυχαία συμβίωση. Για να επιτευχθεί μια επιτυχημένη συμβιωτική σχέση συμβαίνουν διάφορες ανατομικές, μορφολογικές και βιοχημικές αλλαγές και στις δύο πλευρές.

Από την συμβιωτική σχέση που αναπτύσσονται επωφελούνται και οι δύο συμβιώτες. Τα μεν βακτήρια καλύπτουν το μεγαλύτερο μέρος των αναγκών του φυτού σε αφομοιώσιμο άζωτο ενώ το φυτό παρέχει στα ριζόβια ένα περιβάλλον πλούσιο σε πηγές φωτοσυνθετικού οργανικού άνθρακα και απαλλαγμένο από τον ανταγωνισμό άλλων μικροοργανισμών.

Τα ριζόβια παρουσιάζουν υψηλή εξειδίκευση σε σχέση με τον ξενιστή που θα συνδεθούν. Πιο συγκεκριμένα κάθε είδος ριζοβίου δεν αναπτύσσει συμβιωτικές σχέσεις με όλα τα ψυχανθή. Ορισμένα ριζόβια έχουν μεγάλη εξειδίκευση και σχηματίζουν φυμάτια με τα είδη ενός μόνο γένους ή με ορισμένα είδη ενός γένους, ενώ άλλα συμβιώνουν με τα είδη πολλών γενών, φέρουν δηλαδή χαμηλότερη εξειδίκευση ως προς τον ξενιστή.

Έτσι για να επιτευχθεί μια σωστή συμβιωτική σχέση και να δημιουργηθούν ενεργά φυμάτια θα πρέπει στο υπέδαφος να υπάρχουν και τα κατάλληλα αζωτοδεσμευτικά βακτήρια για την καλλιέργεια αυτή. Σε αντίθετη περίπτωση τα

φυμάτια που θα σχηματιστούν θα είναι ελάχιστα ή και ανύπαρκτα με αποτέλεσμα η βιολογική δέσμευση του αζώτου να είναι περιορισμένη.

Τέλος, σε κάποια ριζόβια η εξειδίκευση είναι τόσο μεγάλη που διαφορετικά στελέχη του ίδιου ριζοβίου μπορούν να συμβιώσουν καλύτερα με συγκεκριμένη ποικιλία του φυτού-ξενιστή.

Παρακάτω παρατίθεται πίνακας (πίνακας 1) με ορισμένα φυτά της οικογένειας των ψυχανθών και τα εξειδικευμένα συμβιωτικά αζωτοβακτήρια που μπορούν να συμβιώσουν (Amarger 2001).

Είδος ριζοβίου	Γένος ή είδος ψυχανθούς φυτού
<i>Rhizobium leguminosarum</i> <i>bv*. viciae</i> <i>bv. trifolii</i> <i>bv. Phaseoli</i>	<i>Lathyrus, Lens</i> <i>Pisum, Visia</i> <i>Trifolium</i> <i>Phaseolus</i>
<i>R. tropici</i>	<i>Phaseolus</i>
<i>R. etli</i> <i>bv. Phaseoli</i>	<i>Phaseolus</i>
<i>R. gallicum</i> <i>bv.gallicum</i> <i>bv. Phaseoli</i>	<i>Phaseolus, Onobrychis</i> <i>Phaseolus</i>
<i>R.giardinii</i> <i>bv.giardinii</i> <i>bv .phaseoli</i>	<i>Phaseolus</i> <i>Phaseolus</i>
<i>Bradyrhizobium</i> <i>B. japonicum</i> <i>B. elkanii</i> <i>B. liaoningensis</i>	<i>Glycine max</i> <i>Glycine max</i> <i>Glycine max</i>
<i>Sinorhizobium</i> <i>S. meliloti</i> <i>S. fredii</i> <i>S. medicae</i>	<i>Medicago, Melilotus</i> <i>Glycine max</i> <i>Medicago</i>
<i>Mesorhizobium</i> <i>M. loti</i> <i>M. ciceri</i> <i>M. mediterraneum</i>	<i>Lotus</i> <i>Cicer arietinum</i> <i>Cicer arietinum</i>

*bv= biovar

Πίνακας 1: Καλλιέργειες ψυχανθών φυτών και τα είδη ριζοβίων που μπορούν να αναπτύξουν αποτελεσματική συμβίωση.

Το πρώτο βήμα για την δημιουργία των φυματίων και την αρχή της δέσμευσης του αζώτου είναι η προσέλκυση των αζωτοβακτηρίων προς τα ριζικά τριχίδια. Τα ριζόβια μπορούν να εισχωρήσουν στο εσωτερικό περιβάλλον της ρίζας με ποικίλους τρόπους. Μπορούν να διεισδύσουν μέσω πληγών που έχουν δημιουργηθεί στην επιφάνεια των ριζών είτε λόγω εξωτερικών παραγόντων, όπως η ανθρώπινη παρέμβαση είτε μέσω πληγών που έχουν δημιουργηθεί κατά την διάρκεια της φυσιολογικής ανάπτυξης του ίδιου του φυτού, όπως για παράδειγμα το σπάσιμο

των πλευρικών ριζών. Ενδιαφέρον είναι το γεγονός ότι τα ριζόβια μπορούν να μολύνουν το φυτό και σε περιπτώσεις όπου δεν υπάρχουν προηγούμενες φθορές εισβάλλοντας στις ρίζες ακόμα και στον ενδιάμεσο χώρο μεταξύ των επιδερμικών κυττάρων (MatthysseandKijne, 1998).

Τέλος, ο πληθυσμός των ριζοβίων ποικίλλει και εξαρτάται από διάφορους παράγοντες όπως είναι η δομή του εδάφους, η περιεκτικό σε υγρασία και οι προηγούμενες καλλιέργειες που υπήρχαν στο έδαφος.

1.5 Διαδικασία της μόλυνσης

Παρουσία του φυτού- ξενιστή, τα ριζόβια που βρίσκονται στο έδαφος, πολλαπλασιάζονται και μετακινούνται προς την ριζόσφαιρα με στόχο να μολύνουν τα ριζικά τριχίδια και τελικά να εισέλθουν στο εσωτερικό του φυτού.

Κατά τη διαδικασία έναρξης της μόλυνσης, τα φυτά εκκρίνουν από το περίβλημα του σπόρου (Phillipset.all1995) και στην συνέχεια από τις ρίζες τους (Long 1989) φαινολικά μόρια-σήματα όπως σάκχαρα, αμινοξέα, οργανικά οξέα, και κυρίως ειδικές φλαβονοειδείς ενώσεις, οι οποίες γίνονται αντιληπτές από ορισμένους υποδοχείς των ριζοβίων που υπάρχουν στη ριζόσφαιρα.

Τα φλαβονοειδή είναι πολύ-ύδροξυ-πολυφαινολικές ενώσεις, οι οποίες παράγονται από το φυτό και λειτουργούν ως δευτερογενείς μεταβολίτες συμβάλλοντας σε ποικίλες διεργασίες, όπως στην ανάπτυξη του φυτού, στην προστασία από τη UV ακτινοβολία και στην επικοινωνία μεταξύ φυτού και μικροοργανισμών (Mathesius U., 2018). Οι φλαβονοειδείς ενώσεις που απελευθερώνονται, αναγνωρίζονται από ειδικούς υποδοχείς των ριζοβίων που βρίσκονται στην ριζόσφαιρα και ονομάζονται πρωτεΐνες Nod. Οι πρωτεΐνες αυτές, ευθύνονται για την δημιουργία των φυματίων και βρίσκονται στο γενετικό υλικό των ριζοβίων.

Η απελευθέρωση φλαβονοειδών από το φυτό, επάγει τη μεταγραφή των βακτηριακών nod γονιδίων, που κωδικοποιούν για τους παράγοντες Nod (Nodfactors-NFs) και για μόρια απαραίτητα για την απελευθέρωση αυτών. Οι Nodfactors είναι λιποχιτινικοί ολιγοσακχαρίτες (LCOs) (Lerougeet al.,1990; Spainket

al.,1991) οι οποίοι παράγονται και απελευθερώνονται από τα ριζόβια. (Oldroyd, 2013). Ο ρόλος τους είναι να ενεργοποιούν τα ριζικά κύτταρα του ξενιστή (Matthysse and Kijne,1998). Από τη στιγμή που οι υποδοχείς του φυτού θα αναγνωρίσουν τους παράγοντες Nod του ριζοβίου, μπορεί να ξεκινήσει η ουσιαστική διαδικασία της μόλυνσης.

Η αναγνώριση των Nod factors από ειδικούς διαμεμβρανικούς υποδοχείς στα ριζικά τριχίδια του φυτού επάγει έναν πολύπλοκο καταρράκτη αντιδράσεων ως απόκριση των φυτών στην παρουσία ριζοβίων. Στο *L. japonicus* οι υποδοχείς αυτοί είναι οι NFR1/NFR5. Συνεπώς, η συμβίωση και αλληλεπίδραση μεταξύ ριζοβίων-φυτού ξενιστή αποτελεί μία χημική επικοινωνία με τα πρωταρχικά μηνύματα να συνιστούν τα φλαβονοειδή και οι παράγοντες Nod (Oldroyd, 2013).

Κατόπιν της αναγνώρισης, παρατηρούνται μια σειρά μορφολογικών αλλαγών σε κυτταρικό επίπεδο (Patriarcaetal., 2004, Hayashietal., 2005). Η πρόσδεση των ριζοβίων κοντά στο άκρο του ριζικού τριχιδίου προκαλεί μια αλλαγή στην κατεύθυνση της ανάπτυξής του. Πιο συγκεκριμένα, παρατηρείται συστροφή στο άκρο των ριζικών τριχιδίων σε σχήμα «σπειράματος» με σκοπό να παγιδεύσουν τα βακτήρια στο εσωτερικό τους.

Στην συνέχεια, όταν τα βακτήρια εισχωρήσουν στο εσωτερικό των ριζικών τριχιδίων του φυτού, ακολουθεί η δημιουργία του μολυσματικού νηματίου από το φυτό, μέσω του οποίου τα βακτήρια θα οδηγηθούν στα κύτταρα του φλοιού τα ρίζας.

Ταυτόχρονα με τη διαδικασία της μόλυνσης, παρουσία των ριζοβίων πραγματοποιείται και η δημιουργία του μεριστώματος του φυματίου. Το φυμάτιο είναι ένα νέο φυτικό όργανο που δημιουργείται στις ρίζες των ψυχανθών, φιλοξενεί τα ριζόβια και μέσα σε αυτό λαμβάνει τελικά χώρα η συμβιωτική αζωτοδέσμευση.(Τσέκος, 2014)

Η μορφολογία των φυματίων που θα σχηματιστούν στις ρίζες των ψυχανθών φυτών ποικίλλει. Τα νεαρά φυμάτια είναι μικρά σφαιρικά και υποανάπτυκτα. Ωστόσο τον πιο σημαντικό ρόλο βέβαια σε όλη την αζωτοδέσμευση παίζει η δραστηριότητα των φυματίων καθώς ορισμένα ριζόβια μπορεί να είναι ανενεργά. Η παρουσία των φυματίων στις ρίζες των φυτών δεν σημαίνει ότι πραγματοποιείται και δέσμευση του αζώτου. Σε κάποιες περιπτώσεις, τα αζωτοβακτήρια μπορεί να

μην δεσμεύουν καθόλου άζωτο και να ζουν εις βάρος των ψυχανθών καθώς η σχέση των δύο είναι αμφίδρομη. (Παπακώστα-Τασοπούλου,2005)

1.6 Παράγοντες που επηρεάζουν τον σχηματισμό φυματίων και την αζωτοδέσμευση

Ο σχηματισμός των φυματίων και η ικανότητα τους να αζωτοδεσμεύουν επηρεάζονται από πολλούς παράγοντες. Ένας από αυτούς είναι η ευαισθησία στην οξύτητα του εδάφους καθώς ο σχηματισμός φυματίων ευνοείται σε εδάφη με υψηλή συγκέντρωση ασβεστίου ενώ παρατηρείται μείωση σε όξινα εδάφη με $pH < 5$.

Σύμφωνα με την βιβλιογραφία τα όξινα εδάφη στερούνται μολυβδαίνιο (Mo), στοιχείο που είναι συστατικό πολλών ενζύμων, συμπεριλαμβανομένης και της νιτρογενάσης που είναι σημαντικός παράγοντας για την αζωτοδέσμευση. Το πρόβλημα που παρατηρείται στα εδάφη αυτά δεν συνδέεται με την ευαισθησία των ριζοβίων στα εδάφη με υψηλή αλατότητα αλλά η παρεμπόδιση του σχηματισμού φυματίων οφείλεται κυρίως στην μείωση του αριθμού των ριζικών τριχιδίων και της πλάγιας ανάπτυξης τους, στην δυσκολία δημιουργίας «ινών προσβολής» και στην παρεμπόδιση της συστροφής του άκρου των ριζικών τριχιδίων.

Σημαντικό όμως ρόλο στην ικανότητα αζωτοδέσμευσης των φυματίων διαδραματίζει η περιεκτικότητα του εδάφους σε άζωτο. Σε εδάφη πλούσια σε άζωτο παρατηρείται μικρή ή καθόλου δέσμευση αζώτου από τα αζωτοβακτήρια. Αυτό συμβαίνει διότι σε εδάφη με υψηλή περιεκτικότητα αζώτου τα φυτά προτιμούν να προσλαμβάνουν το διαθέσιμο άζωτο που βρίσκεται στο έδαφος ήδη, παρά να δημιουργήσουν συμβιωτικές σχέσεις με τα ριζόβια που βρίσκονται στο έδαφος.

Τέλος, η εφαρμογή νιτρικών λιπασμάτων στο έδαφος μπορεί να περιορίσει την συγκέντρωση ριζοβίων στα ριζικά τριχίδια, να μειώσει τις λεκτίνες στην επιφάνεια των ριζικών τριχιδίων, να περιορίσει την ανάπτυξη των τριχιδίων και την συστροφή των άκρων τους, να εμποδίσει την ανάπτυξη των «ινών προσβολής» και τον σχηματισμό φυματίων και να μειώσει την δραστικότητα της νιτρογενάσης (Caetano – Anolles 1997).

1.7 Αυτορρύθμιση της φυματιογένεσης (Auto regulation of nodulation – AON)

Ο μηχανισμός της αυτορρύθμισης της φυματιογένεσης (AON) είναι πολύ σημαντικός καθώς ρυθμίζει την μικροβιακή μόλυνση και το ποσοστό αποίκησης του φυτού- ξενιστή από τα ριζόβια.

Πρόκειται για ένα μηχανισμό ο οποίος καθορίζεται από τη συνισταμένη των ενεργειακών αναγκών του φυτού. Πιο συγκεκριμένα, ο μηχανισμός φαίνεται ουσιαστικά να λειτουργεί με τέτοιο τρόπο ώστε να αποφευχθεί δυνητικά κάποια παρασιτική σχέση μεταξύ ριζοβίου και φυτού και με τρόπο τέτοιο ώστε να προστατέψει το φυτό από την υπερφυματιογένεση.

Κατά την μόλυνση και την είσοδο των ριζοβίων στα κύτταρα, στην ρίζα του φυτού επάγονται CLE γονίδια. Προϊόντα των CLE γονιδίων είναι μικρά, εκκρινόμενα πεπτίδια, που ονομάζονται CLE πεπτίδια. Τα CLE πεπτίδια λειτουργούν ως σήματα από την ρίζα που μέσω του ξηλώματος μεταφέρονται συστημικά στον βλαστό (Masahiro T. Etal, 2013). Στα ψυχανθή φυτά *L. Japonicus* τα πεπτίδια αυτά είναι τρία, το CLE-RS1 (CLEROOT SIGNAL 1), το CLE-RS2 (CLE ROOT SIGNAL 2) και το CLE-RS3 (CLE ROOT SIGNAL 3). Τα CLE πεπτίδια αναγνωρίζονται και συνδέονται στην συνέχεια με τον διαμεμβρανικό πρωτεϊνικό υποδοχέα HAR1 (HYPER NODULATION ABERRANT ROOT FORMATION 1) που βρίσκεται στον βλαστό (OkamotoS. & KawaguchiM., 2015)

Με την σύνδεση των CLE πεπτιδίων στον υποδοχέα γίνεται η έναρξη ενός σηματοδοτικού μονοπατιού που έχει ως τελικό στόχο την ρύθμιση της έκφρασης του γονιδίου *TML* στην ρίζα του φυτού. Το *TML* (TOOMUCHLOVE) εντοπίζεται στα κύτταρα της ρίζας και είναι μια F-box πρωτεΐνη που είναι υπεύθυνη για την καταστολή της φυματιογένεσης στην ρίζα (Kouchietal., 2010). Πιο συγκεκριμένα, αποτελεί μία Skp1 Cullin F-box (SCF) πρωτεΐνη, τμήμα του συμπλόκου της E3 λιγάσης της ουβικιτίνης. (Takaharaetal. 2013).

Πρόσφατα ερευνητικά δεδομένα δείχνουν ότι το μικρό RNA miR2111 (Tsikouetal. 2018) διαδραματίζει σημαντικό ρόλο στον μηχανισμό αυτορρύθμισης. Το miR2111 μεταφέρεται συστημικά από τον βλαστό στο ριζικό σύστημα του φυτού μέσω του φλοιώματος και ρυθμίζει το γονίδιο *TML* μετά-μεταγραφικά.

Μέχρι σήμερα παραμένει άγνωστος ο τρόπος με τον οποίον το *TML* δρα παρεμποδίζοντας τις επιπλέον μολύνσεις του φυτού από τα ριζόβια και καταστέλλει την δημιουργία των φυματίων. Αυτό που γνωρίζουμε είναι ότι το *TML* δρα ως αρνητικός ρυθμιστής της μόλυνσης του φυτού από τα ριζόβια και επάγεται δύο μέρες μετά την μόλυνση των φυτών από αυτά (Tsikouetal. 2018).

1.8 Συμβιωτική σχέση φυτών με μυκορριζικούς μύκητες

Μια από τις πιο συνηθισμένες συμβιωτικές σχέσεις που συναντώνται στην φύση είναι αυτή των ανώτερων φυτών με τους μύκητες του εδάφους. Υπολογίζεται ότι περίπου το 80% των υγιών φυτών σχηματίζουν συμβιωτικές σχέσεις με μύκητες κατά την διάρκεια του βιολογικού τους κύκλου (Μπουράνης, Χωριανοπούλου, 2017).

Η σύναψη συμβιωτικών σχέσεων μεταξύ των δύο δεν είναι ένα φαινόμενο που παρατηρείται τα τελευταία χρόνια καθώς έχουν βρεθεί παλαιοντολογικά ευρήματα που αποδεικνύουν ότι μυκορριζικούς μύκητες σχημάτιζαν και τα πρώτα φυτικά είδη τα οποία εμφανίστηκαν στην γη (Markmannetal 2009). Ο όρος μυκόρριζα (μύκητας + ρίζα) χρησιμοποιήθηκε για πρώτη φορά το 1885 από τον γερμανό δασικό παθολόγο A.D. Frank για να περιγράψει τις σχέσεις που αναπτύσσονται ανάμεσα σε δένδρα και μύκητες. Ενώ σήμερα ο όρος έχει γενικευτεί και νοείται ως το δομικό και λειτουργικό σύμπλεγμα που δημιουργείται μεταξύ μιας ρίζας και ενός μύκητα (Brundrett 2004).

Οι μυκορριζικοί μύκητες αλληλεπιδρούν με τα φυτά και από την σχέση που σχηματίζουν έχουν αμοιβαία οφέλη και οι δύο (Oldroyd2013). Πιο συγκεκριμένα, οι μικροοργανισμοί που αποικίζουν την ρίζα του φυτού, μπορούν να βοηθήσουν στην ανάπτυξη του φυτού με διάφορους τρόπους, είτε διευκολύνοντας την πρόσληψη θρεπτικών στοιχείων από το έδαφος, είτε ενισχύοντας την ανάπτυξη του ριζικού συστήματος, είτε ελέγχοντας την ανάπτυξη άλλων παθογόνων μικροοργανισμών. Επιπρόσθετα, βελτιώνουν την άμυνα και την αντοχή των φυτών σε διάφορες αβιοτικές καταπονήσεις. Σε αντάλλαγμα για τα οφέλη αυτά, οι μυκορριζικοί μύκητες προσλαμβάνουν οργανικές ενώσεις, κυρίως σάκχαρα από τα φυτά

(Chenet al. 2003; Smith et al. 2010; Porcelet al. 2012; Lopez- Racz 2016; Schausberger et al 2012)

Γενικά οι μυκόρριζες αποτελούν μια γέφυρα ανάμεσα στις ρίζες των φυτών και στο έδαφος και σε πολλές περιπτώσεις τα φυτά που έχουν αναπτύξει τέτοιου είδους σχέσεις είναι πιο ανταγωνιστικά σε σχέση με φυτά που δεν έχουν αποικιστεί από μύκητες (Καρπούζας Δ., Υψηλάντης Γ. 2010).

1.9 Είδη μυκορριζικών μυκήτων

Ανάλογα με την μορφολογία και την φυσιολογία τους οι μυκόρριζες χωρίζονται σε δύο κύριες ομάδες, στις εκτομυκόρριζες και στις ενδομυκόρριζες (Brundrett 2004).

Εκτομυκόρριζες (ECM, ectomycorrhizae) σχηματίζουν κυρίως οι βασιδιομύκητες και λιγότερο οι ασκομύκητες και απαντώνται σε δασικά είδη κυρίως των εύκρατων και των αρκτικών περιοχών. Ο ρόλος και η σπουδαιότητα τους θεωρείται μεγάλη για τα κωνοφόρα δάση και δημιουργούν συμβιωτικές σχέσεις με φυτά που ανήκουν στις οικογένειες Pinaceae, Fagaceae, Betulaceae και Myrtaceae (Βερεσόγλου 2002).

Οι εκτομυκορριζικοί μύκητες μπορούν να παράγουν μεγάλες ποσότητες υφών πάνω στην ρίζα και μέσα στο έδαφος και λόγω αυτών των υφών να γίνεται η μεταφορά των θρεπτικών στοιχείων στα φυτά. Στις εκτομυκόρριζες, ο μύκητας αρχικά σχηματίζει έναν παχύ κολεό μυκηλίου (μανδύα) γύρω από τις ρίζες των φυτών, οι υφές εισχωρούν στους μεσοκυττάριους χώρους του φλοιώδους παρεγχύματος σχηματίζοντας ένα δίκτυο που περιβάλλει τα κύτταρα (δίκτυο Harting) και τέλος σχηματίζει ένα εκτεταμένο δίκτυο μυκηλίων στο έδαφος (Μπουράνης, Χωριανοπούλου, 2017).

Από την άλλη μεριά οι ενδομυκορριζικοί μύκητες χωρίζονται σε τρεις τύπους. Οι δύο είναι περισσότερο εξειδικευμένοι και συναντώνται κυρίως στα φυτικά είδη της τάξης των *Ericales* (*Ericoidmycorrhizae*) ενώ ο τρίτος τύπος και ο πιο σύνηθες είναι ο δενδροειδής (*arbuscular*).

1.10 Δενδροειδής ενδομυκορριζικός μύκητας - ΔΕΜ (Arbuscular Mycorrhizal Fungi)

Οι δενδροειδής ενδομυκορριζικοί μύκητες (ΔΕΜ) (Arbuscular Mycorrhizal Fungi-AMF) ανήκουν στο φύλο Glomeromycota, ένα αρχαίο φύλο του οποίου η γέννηση υπολογίζεται πριν από 400 με 500 εκατομμύρια χρόνια (Redeckeretal. 2002;Simonetal. 1993) και φαίνεται να βοήθησε στην αποίκιση της ξηράς από τα ανώτερα φυτά (Nicolson 1967).

Οι ΔΕΜ είναι λιγότερο εξειδικευμένοι και οι πλέον διαδεδομένοι καθώς απαντώνται στις περισσότερες οικογένειες των σπερματόφυτων (Trappe 1987). Σε αντίθεση με τους εκτομυκορριζικούς μύκητες οι ΔΕΜ δεν σχηματίζουν μανδύα γύρω από τις ρίζες των φυτών που προσβάλλουν αλλά εισβάλλουν σε διάφορα στρώματα του εξωτερικού φλοιού της ρίζας, αποικίζοντας το ριζικό σύστημα των φυτών (Μπουράνης, Χωριανοπούλου, 2017).

Κατά τον αποικισμό του φυτού από τους μύκητες σχηματίζονται δενδρύλλια ή θύσανοι (arbuscule) μέσα στο ριζικό κύτταρο. Ο μύκητας αρχικά μεγαλώνει ανάμεσα στα κύτταρα, αλλά σύντομα διαπερνά το κυτταρικό τοίχος του ξενιστή και αναπτύσσεται μέσα στο κύτταρο. Σε αυτή τη σχέση ούτε το κυτταρικό τοίχωμα του μύκητα, ούτε του φυτού διαρρηγνύονται. Καθώς μεγαλώνει ο μύκητας, η κυτταρική μεμβράνη τυλίγει τον μύκητα, δημιουργώντας ένα νέο χώρο. Αυτός ο χώρος του αποπλάστη εμποδίζει την απευθείας επαφή ανάμεσα στο φυτό και το κυτόπλασμα του μύκητα, και επιτρέπει την αποδοτική μεταφορά των θρεπτικών στοιχείων ανάμεσα στους συμβιωτές. Τα δενδρύλλια ή θύσανοι έχουν σχετικά μικρή διάρκεια ζωής, λιγότερο από 15 μέρες, και μπορεί να είναι δύσκολο να παρατηρηθούν σε δείγματα που έχουν ληφθεί από τη φύση (Καρπούζας Δ. 2010). Είναι υποχρεωτικά συμβιωτικοί μικροοργανισμοί, και για τον λόγο αυτόν μέχρι πρόσφατα ήταν αδύνατη η καλλιέργεια τους σε οποιοδήποτε θρεπτικό υπόστρωμα απουσία φυτών-ξενιστών. Η πρόσφατη ανακάλυψη ότι οι ενδομυκορριζικοί μύκητες τρέφονται με λιπαρά οξέα που συντίθενται από το φυτό-ξενιστή (Jiangetal,2017), οδήγησε στην επιτυχή ασυμβιωτική ανάπτυξη του μύκητα *Rhizophagus irregularis* σε τριβλία παρουσία ειδικού λιπαρού οξέος (myristate) (Sugiuraetal, 2020).

Λόγω της μικρής εξειδίκευσης που φέρουν σχετικά με τα φυτά – ξενιστές με τα οποία μπορούν να συμβιώσουν, μπορούν να προσβάλλουν και να δημιουργήσουν συμβιωτική σχέση με έναν πολύ μεγάλο αριθμό τόσο ποωδών όσο και ξυλωδών φυτών. Χαρακτηριστικά, υπολογίζεται ότι τα δύο τρίτα των χερσαίων φυτών πάνω στον πλανήτη σχηματίζουν δενδροειδείς μυκόρριζες (Fitter, Moyersoen 1996). Πιο έντονα παρατηρείται το φαινόμενο αυτό σε εδάφη με χαμηλή διαθεσιμότητα θρεπτικών συστατικών και αφομοιώσιμου φωσφόρου.

1.11 Επίδραση των ΔΕΜ στο φυτό – ξενιστή

Όταν υπάρχει επαρκής διαθεσιμότητα θρεπτικών στοιχείων στο έδαφος και κυρίως φωσφόρου τα φυτά επιλέγουν να μην δημιουργήσουν συμβιωτικές σχέσεις με τους μύκητες και να αναπτυχθούν χωρίς την παρουσία αυτών ή ακόμα και αν συνάψουν σχέση η επίδραση τους είναι μικρή. Αντίθετα, σε εδάφη πτωχά από θρεπτικά στοιχεία και σε περιπτώσεις έλλειψης αφομοιώσιμου φωσφόρου τα φυτά δεν μπορούν να αναπτυχθούν χωρίς να συμβιώσουν με μυκορριζικούς μύκητες (Neumann G. and Römheld V. 2012).

Ο μύκητας όταν προσβάλλει το φυτό αναπτύσσει γύρω από την ρίζα ένα μυκήλιο το οποίο επεκτείνεται στην συνέχεια μέσα στο έδαφος. Με τον τρόπο αυτόν σχηματίζεται ένα εκτεταμένο δίκτυο από ελεύθερες υφές που απλώνεται μακριά από την επιφάνεια της ρίζας. Στην συνέχεια οι νέες μυκηλιακές υφές στο έδαφος λειτουργούν με τον ίδιο τρόπο όπως τα ριζικά τριχίδια του φυτού σχηματίζοντας μεγαλύτερη απορροφητική επιφάνεια από εκείνη της ρίζας με αποτέλεσμα να μπορούν να εκμεταλλεύονται αποδοτικότερα μεγαλύτερο όγκο του εδάφους (Δεληβόπουλος, 1994) και να προσλαμβάνουν καλύτερα τα θρεπτικά και το νερό από βαθύτερα στρώματα του εδάφους τα οποία το φυτό δεν μπορούσε να εκμεταλλευτεί.

Τα οφέλη που έχει το φυτό από την συμβίωση με ΔΕΜ είναι πολλαπλά καθώς οι ΔΕΜ ωφελούν τους ξενιστές τους προσλαμβάνοντας και παρέχοντας τους θρεπτικά στοιχεία και ιχνοστοιχεία που τους είναι απαραίτητα για την διαβίωση τους όπως το φώσφορο, άζωτο, κάλλιο, ασβέστιο, ψευδάργυρο και χαλκό βοηθώντας τα στην

καλύτερη θρέψη, στην ανάπτυξη και αύξηση τους (Μυλωνά 2010). Επιπρόσθετα, προστατεύουν τα φυτά σε περιόδους ξηρασίας προσλαμβάνοντας μεγαλύτερες ποσότητες νερού από βαθύτερα στρώματα του εδάφους (Chenet al. 2003).

Εκτός από την καλύτερη θρέψη του φυτού οι ενδομυκορριζικοί μύκητες μέσω μιας σειράς μηχανισμών ενισχύουν την αντοχή του φυτού απέναντι στο αβιοτικό στρες (Smith et al. 2010; Porce et al. 2012; Lopez- Racz 2016), την ανθεκτικότητα του σε ασθένειες (Bedini et al. 2018), περιορίζουν τον κίνδυνο τοξικότητας από βαρέα μέταλλα και βελτιώνουν την δομή και την μορφολογία του εδάφους στην ριζόσφαιρα των φυτών. Τέλος ελέγχουν την ανάπτυξη άλλων παθογόνων μικροοργανισμών (Schausberger et al 2012)

1.12 Τρόπος μόλυνσης των φυτών από ΔΕΜ (Διαδικασία μόλυνσης)

Η διαδικασία αναγνώρισης του φυτού και του μύκητα αρχίζει στη ριζόσφαιρα του φυτού, μέσω φυτό-χημικών ενώσεων που απελευθερώνονται και γίνονται αντιληπτές και από τους δύο συμβιώτες ενώ στη συνέχεια, ακολουθεί η διαδικασία αποικισμού των εσωτερικών ιστών της ρίζας καθώς και η εγκατάσταση μιας λειτουργικής συμβιωτικής σχέσης μεταξύ των δύο συμβιωτών. (Μπουράνης, Χωριανοπούλου, 2017)

Εναρκτήριο ερέθισμα για την ανάπτυξη της συμβιωτικής σχέσης μεταξύ των φυτών και των ΔΕΜ που βρίσκονται στην ριζόσφαιρα, είναι η απελευθέρωση στριγγολακτονών από το ριζικό σύστημα του φυτού. Οι στριγγολακτόνες είναι φυτικοί μεταβολίτες που ανήκουν στα τερπενοειδή και συμβάλλουν στην καταστολή της διακλάδωσης του βλαστού, αλλά λειτουργούν και ως σηματοδοτικά μόρια για τους μυκορριζικούς μύκητες. Η αναγνώριση των στριγγολακτονών από τους ΔΕΜ μπορεί να οδηγήσει στην εκβλάστηση των σπορίων των μυκήτων και την ανάπτυξη των υφών αυτών (Oldroyd 2013).

Στην συνέχεια οι μύκητες παράγουν παράγοντες Myc (Myc factors) που είναι διαλυτά μόρια που επάγουν την έκφραση γονιδίων σχετικά με την συμβίωση εκκινώντας, έτσι, το συμβιωτικό μονοπάτι (Oldroyd 2013). Μέχρι στιγμής δεν είναι

γνωστό αν η παραγωγή και η απελευθέρωση των Myc factors είναι απόρροια της κινητοποίησής τους από τις στριγγολακτόνες. Οι Myc factors προσδένονται σε διαμεμβρανικούς υποδοχείς στα επιδερμικά κύτταρα της ριζόσφαιρας (Heetal, 2019). Η ενεργοποίηση των υποδοχέων οδηγεί στην έναρξη ενός καταγισμού σηματοδοτικών μονοπατιών επιτρέποντας την είσοδο του μύκητα στη ρίζα του φυτού και τον σχηματισμό δενδρόμορφων δομών (arbuscules) εντός των αποικισμένων φυτικών κυττάρων (Parniske, 2008).

Το σύστημα διείσδυσης του μύκητα στα φυτικά επιδερμικά κύτταρα περιλαμβάνει τη δημιουργία νέων δομών, την ανακατανομή των φυτικών ενδοκυτταρικών οργανιδίων και την παρουσία ειδικών μεταφορέων που εξυπηρετούν στη μεταφορά θρεπτικών συστατικών και νερού (Parniske, 2008). Η διαδικασία αποικισμού των ριζών από τους μύκητες χαρακτηρίζεται ως μησυγχρονισμένη. Έτσι μπορεί στην ίδια ρίζα να συνυπάρχουν δομές που παρατηρούνται στην έναρξη της συμβιωτικής σχέσης (όπως τα υφοπόδια) με όργανα που παρατηρούνται αργότερα, μετά την εγκατάσταση της συμβιωτικής σχέσης (όπως τα δενδρύλλια) (Μπουράνης, Χωριανοπούλου, 2017).

1.13 Μηχανισμός αυτορρύθμισης των μυκορριζών (Autoregulation of mycorrhization- AOM)

Όπως έχει ήδη αναφερθεί πιο πάνω, ο μηχανισμός της αυτορρύθμισης είναι πολύ σημαντικός για το φυτό- ξενιστή, καθώς ρυθμίζει την μικροβιακή μόλυνση και το ποσοστό αποικισμού του φυτού από τους συμβιώτες κατά την διάρκεια της συμβιωτικής σχέσης.

Ο μηχανισμός αυτορρύθμισης των μυκορριζών (Autoregulation of mycorrhization- AOM) ρυθμίζει τον αποικισμό των φυτών από τους δενδρόμορφους μυκορριζικούς μύκητες του εδάφους (Meisneretal 2005) και σε αρκετά σημεία θεωρείται παρόμοιος με τον μηχανισμό της αυτορρύθμισης της φυματιογένεσης (AON) (Wangetal. 2018; Mülleretal. 2019) που είναι ο μηχανισμός που ρυθμίζει τον αποικισμό του φυτού-ξενιστή από τα ριζόβια. Ωστόσο, ο μηχανισμός AOM είναι

πολύ λιγότερο χαρακτηρισμένος και πολλά στοιχεία του μονοπατιού μένουν ακόμα να ταυτοποιηθούν.

Όπως και στον μηχανισμό AON, έτσι και στον AOM μετά την είσοδο των μικρο-συμβιωτών στο φυτό παράγοντα CLE πεπτίδια στη ρίζα και μέσω του ξηλώματος μετακινούνται συστηματικά στον βλαστό (Mülleretal 2019). Είναι σημαντικό να επισημανθεί πως διαφορετικά CLE γονίδια εκφράζονται ως απόκριση στη συμβίωση φυτού-ριζοβίου και διαφορετικά κατά την αλληλεπίδραση φυτού-EM (Mülleretal 2019). Στην συνέχεια τα CLE πεπτίδια στον βλαστό θα προσδεθούν στον υποδοχέα τους. Η ενεργοποίηση του υποδοχέα οδηγεί στην έναρξη ενός σηματοδοτικού μονοπατιού, το οποίο παραμένει άγνωστο ως σήμερα για τη συμβιωτική σχέση φυτών-EM.

Πρόσφατα ερευνητικά αποτελέσματα αποδεικνύουν ότι η παρουσία των CLE πεπτιδίων επηρεάζει το μονοπάτι της βιοσύνθεσης και απελευθέρωσης των στριγγολακτονών στη συμβιωτική σχέση φυτών-EM. Στο *M. truncatula*, το προϊόν του γονιδίου *MtCLE53* ρυθμίζει την έκφραση του γονιδίου *MtD27* καταστέλλοντάς το κατά την συμβιωτική αλληλεπίδραση με EM. Το γονίδιο *MtD27* κωδικοποιεί για την ισομεράση του β-καροτενίου, μόριο που συμμετέχει στο πρώτο βήμα για τη βιοσύνθεση των στριγγολακτονών. Έτσι, η παραγωγή των φυτικών μεταβολιτών σταματά, διακόπτοντας τον σηματοδοτικό διάλογο μεταξύ μικροοργανισμού-φυτού (Mülleretal. 2019).

1.14 Ταυτόχρονη συμβίωση ψυχανθών φυτών με μύκητες και ριζόβια (tripartitesymbiosis)

Η αλληλεπίδραση των φυτών με ωφέλιμα μικρόβια του εδάφους όπως με τα αζωτοδεσμευτικά βακτήρια του γένους *Rhizobium* και με τους ενδομυκορριζικούς μύκητες είναι γνωστή περισσότερο από έναν αιώνα (Frank 1887; Beijerinck 1907). Από τα πειράματα που έχουν γίνει ανά τα χρόνια είμαστε πλέον σε θέση να γνωρίζουμε πολλούς από τους μηχανισμούς που σχετίζονται με την αλληλεπίδραση των φυτών με τους διάφορους μικροοργανισμούς.

Ωστόσο, σε μεγάλο βαθμό αυτή η γνώση βασίζεται σε μελέτες που έχουν γίνει σε ζευγάρια φυτών-ξενιστών, δηλαδή σε φυτά που συμβιώνουν με συγκεκριμένο μικροοργανισμό καθώς τα περισσότερα πειράματα εξετάζουν μεμονωμένα είτε τις σχέσεις των ψυχανθών φυτών με αζωτοδεσμευτικά βακτήρια, είτε τις σχέσεις που δημιουργούν τα φυτά με δενδρόμορφους μυκορριζικούς μύκητες. Αυτή όμως, είναι μια περιοριστική προσέγγιση καθώς τα φυτά στην φύση αλληλεπιδρούν ταυτόχρονα με περισσότερους από έναν μικροοργανισμό. Αυτό έχει ως αποτέλεσμα οι μικροοργανισμοί να αλληλεπιδρούν τόσο με το φυτό-ξενιστή όσο και με τους υπόλοιπους μικροοργανισμούς που έχουν συνάψει συμβιωτική σχέση με το ίδιο φυτό-ξενιστή (Larimer, ClayandBever 2014) και να προκαλούν θετικές ή αρνητικές επιπτώσεις τόσο στο ίδιο το φυτό, όσο και στους υπόλοιπους μικροοργανισμούς που υπάρχουν στην ριζόσφαιρα (Palakurtyetal. 2018).

Τα ψυχανθή φυτά μπορούν να συμβιώσουν ταυτόχρονα με ριζόβια και ενδομυκορριζικούς μύκητες ώστε να βελτιώσουν την θρέψη τους σε άζωτο και φώσφορο και να ενισχύσουν την απόδοση και την ανάπτυξη τους. Μελέτες έχουν δείξει ότι όταν συνυπάρχουν στο ίδιο φυτό-ξενιστή, επηρεάζει το ένα το άλλο αλλά ο τρόπος και οι επιδράσεις που θα έχουν, εξαρτάται από το φυτικό είδος, τους μικροσυμβιώτες και τις συνθήκες ανάπτυξης (Tsikniaetal. 2020).

Έχουν αναφερθεί διαφορετικές επιδράσεις του ταυτόχρονου εμβολιασμού σε διαφορετικά στελέχη και καλλιέργειες. Για παράδειγμα ο εμβολιασμός με *Rhizobium leguminosarum* και ένα μείγμα από τέσσερα στελέχη ΔΕΜ σε κουκιά (fababeans) που είχαν καλλιεργηθεί σε ασβεστούχα εδάφη, αύξησε σημαντικά τον αριθμό και το μέγεθος των φυματίων που είχαν σχηματιστεί στις ρίζες των ψυχανθών φυτών, την δραστικότητα της νιτρογενάσης καθώς επίσης και το ποσοστό αποικισμού από μύκητες (Abd- Allaetal. 2014).

Αντίθετα, σε πειράματα που χρησιμοποιήθηκε ως φυτό -μοντέλο το ψυχανθές φυτό *A. canescens* παρατηρήθηκε ότι τα ριζόβια και οι ΔΕΜ επηρέασαν το ένα το άλλο αλλά όχι με τον ίδιο τρόπο. Πιο συγκεκριμένα ο εμβολιασμός με AMF αύξησε τον αριθμό και τον όγκο (mass) των φυματίων που σχηματίστηκαν, ενώ ο εμβολιασμός με ριζόβια μείωσε το ποσοστό αποικισμού των μυκήτων στις ρίζες των φυτών (Larimer, ClayandBever, 2014).

Συμπεραίνουμε λοιπόν ότι η επίδραση που έχουν οι συμβιώτες τόσο στο φυτό όσο και μεταξύ τους είναι αρκετά πολύπλοκη και εξαρτάται από πολλούς παράγοντες.

Στόχος της παρούσας διατριβής είναι να μελετηθούν οι αλληλεπιδράσεις που συμβαίνουν μεταξύ των φυτών με τα αζωτοδεσμευτικά βακτήρια και τους δενδρόμορφους ενδομυκορριζικούς μύκητες του εδάφους. Πιο συγκεκριμένα να αξιολογηθεί το αποτέλεσμα του ταυτόχρονου εμβολιασμού των ψυχανθών φυτών *Lotus japonicus* με το ριζόβιο *Mesorhizobium loti* και τον δενδρόμορφο ενδομυκορριζικό μύκητα *Rhizophagus irregularis*, δίνοντας ιδιαίτερη έμφαση στο να μελετηθεί ο πιθανός ρόλος του γονιδίου *TML* κατά την τριπλή αυτή αλληλεπίδραση.

Πειραματικό Μέρος

Υλικά και Μέθοδοι

Στην παρούσα μεταπτυχιακή εργασία χρησιμοποιήθηκε το φυτό-μοντέλο *Lotus japonicus*. Πιο συγκεκριμένα, για την λήψη των παρατηρήσεων χρησιμοποιήθηκαν η ποικιλία MG20 (Miyakojima) που είναι φυτά αγρίου τύπου (wildtype) και το μετάλλαγμα *atml-1*. Ο εμβολιασμός των φυτών έγινε τόσο με καλλιέργεια ριζοβίων όσο και με ενδομυκορριζικούς μύκητες. Για τον εμβολιασμό με ριζόβια χρησιμοποιήθηκε το συμβιωτικό αζωτοδεσμευτικό βακτήριο *Mesorhizobium loti* (*M. loti*), το στέλεχος R7A, ενώ για τον εμβολιασμό με τον ενδομυκορριζικό μύκητα χρησιμοποιήθηκε ο μύκητας *Rhizophagus irregularis*.

Κατά την διάρκεια της πειραματικής διαδικασίας τα φυτά αναπτύσσονταν σε θάλαμο ανάπτυξης με σταθερή θερμοκρασία 22°C και φωτοπερίοδο 16 ώρες φώς και 8 ώρες σκοτάδι.

2.1 Απολύμανση σπόρων *Lotus japonicus*:

Πρώτο βήμα για την πραγματοποίηση του πειράματος είναι η απολύμανση των σπόρων. Η διαδικασία αυτή είναι απαραίτητη για να εξασφαλιστεί πως όλοι οι σπόροι που θα χρησιμοποιηθούν στο πείραμα θα είναι απαλλαγμένοι από παθογόνους μικροοργανισμούς. Επιπρόσθετα, με την απολύμανση των σπόρων πετυχαίνεται χημική κατεργασία των σπόρων, όπου σπάει το περίβλημα και οι σπόροι εκβλαστάνουν.

Διαδικασία:

1. Καταμέτρηση σπόρων προς απολύμανση.
1. Προσθήκη πυκνού H_2SO_4 και επώαση των σπόρων για 25'.
2. Ανάδευση των σπόρων ανά 5'.
3. 5x πλύσεις με dH_2O .
4. Προσθήκη 20% χλωρίνης εμπορίου seependorf.

5. Επώαση των σπόρων στο διάλυμα χλωρίνης για 10' με ανάδευση.
6. 6xπλύσεις με dH₂O σε θάλαμο καθέτου νηματικής ροής.
7. Επώαση των σπόρων σε dH₂O στο ψυγείο στους 4°C για 12 ώρες.

2.2 Τοποθέτηση σπόρων σε τριβλία για εκβλάστηση:

Το βήμα αυτό είναι απαραίτητο έτσι ώστε οι σπόροι να βλαστήσουν και να είμαστε σίγουροι πως όλοι θα βρίσκονται στο ίδιο στάδιο ανάπτυξης και θα είναι ικανοί να χρησιμοποιηθούν στο επόμενο στάδιο. Οι σπόροι που χρησιμοποιούνται είναι οι ίδιοι που απολυμάνθηκαν την προηγούμενη μέρα. Το βήμα αυτό πραγματοποιείται σε ασηπτικές συνθήκες στο θάλαμο καθέτου νηματικής ροής.

Διαδικασία:

1. Επίστρωση τριβλίου με 3 διηθητικά χαρτάκια.
2. Προσθήκη 2,5 ml dH₂O στο τριβλίο.
3. Τοποθέτηση των σπόρων που έχουμε απολυμάνει σε σειρές με αποστάσεις μεταξύ τους.
4. Κλείσιμο του τριβλίου με parafilm.
5. Τοποθέτηση τριβλίου κάθετα στο θάλαμο ανάπτυξης φυτών.
6. Αναμονή μία εβδομάδα για την εκβλάστηση των σπόρων.

2.3 Μεταφύτευση φυτών *Lotus japonicus* σε magentas:

Μετά την εκβλάστηση των σπόρων σε τριβλία στον θάλαμο ανάπτυξης φυτών για μια εβδομάδα, τα φυτά είναι έτοιμα για μεταφύτευση σε δοχεία magentas όπου και θα παραμείνουν για όλη την διάρκεια των πειραμάτων. Για την μεταφύτευση των φυτών χρειάζεται αποστειρωμένη άμμος που έχει ψηθεί (bake) στους 180°C για τουλάχιστον 6 ώρες. Επίσης, γίνεται τοποθέτηση θρεπτικού διαλύματος LSA που περιέχει μακροστοιχεία και ιχνοστοιχεία για την σωστή θρέψη των φυτών. Η διαδικασία αυτή πραγματοποιείται σε θάλαμο με ασηπτικές συνθήκες.

2.3.1 Παρασκευή θρεπτικού διαλύματος LSA:

Nutrients	Concentration	for 1L
MgSO ₄	0,375 M	2ml
N ₂ NO ₃	1 M	1 ml
K ₂ SO ₄	0,5 M	2 ml
CaCl ₂	1 M	2 ml
Na ₂ HPO ₄	0,1 M	32 μl
FeNa EDTA	0,5 M	50 μl
MnSO ₄	0,1 M	50 μl
CuSO ₄	0,01 M	25 μl
M ₃ Bo ₃	0,1 M	250 μl
Na ₂ MoO ₄	0.025 M	2 μl

2.3.2 Μεταφύτευση φυτών:

Διαδικασία:

1. Τοποθέτηση αποστειρωμένης άμμου στα δοχεία. Η άμμος θα πρέπει να καλύπτει τα 2/3 του magenta.
2. Προσθήκη 45 ml θρεπτικού διαλύματος LSA/magenta.
3. Ανάδευση άμμου ώστε να διαβραχεί καλά.
4. Με αποστειρωμένη λαβίδα γίνεται μεταφύτευση 4 φυτών/magenta.
5. Τοποθέτηση των φυτών στον θάλαμο ανάπτυξης.

2.4 Εμβολιασμός των φυτών με ενδομυκορριζικό μύκητα:

Για τον εμβολιασμό των φυτών με τον μύκητα *Rhizophagus irregularis* κατασκευάστηκε θρεπτικό διάλυμα LSA το οποίο χρησιμοποιήθηκε για το πότισμα των φυτών. Στο ίδιο διάλυμα θα τοποθετηθεί και το εμβόλιο του μύκητα. Σύμφωνα με το σχέδιο κάθε πειράματος υπολογίστηκαν οι ποσότητες που θα χρειαστούν με βάση τα πόσα magentas θα εμβολιαστούν με τον μύκητα. Σε κάθε πείραμα

ορισμένα magenta δεν εμβολιάζονται. Η διαδικασία του εμβολιασμού γίνεται σε θάλαμο νηματικής ροής.

Διαδικασία:

1. Παρασκευή θρεπτικού διαλύματος LSA.
2. Χορήγηση 60 ml LSA στα magenta που δεν θα εμβολιάσουμε με μύκητα
3. Χορήγηση 30 ml LSA στα magenta που θα εμβολιάσουμε με μύκητα, και κατόπιν χορήγηση 30 ml LSA που περιέχουν σπόρια του μύκητα.
4. Η τελική συγκέντρωση που θα έχουμε θα είναι 500 σπόρια/magenta και καθώς έχουμε 4 φυτά/magenta σε κάθε φυτό αντιστοιχούν περίπου 125 σπόρια μύκητα.

2.5 Υγρή καλλιέργεια ριζοβίου

Για να γίνει εμβολιασμός των φυτών με ριζόβια πρέπει τα ριζόβια να αναπτυχθούν σε υγρή καλλιέργεια. Για τον λόγο αυτό υγρή καλλιέργεια *Mesorhizobium loti* (στέλεχος R7A) επωάστηκε για δύο μέρες σε θερμοκρασία 28 °C και μετά έγινε αραίωση για να χρησιμοποιηθεί σε τελική συγκέντρωση $OD_{600}=0,02$.

Διαδικασία:

1. Παρασκευή θρεπτικού YMB με pH= 6,8

Για 250 ml YMB:

Mannital	0,5 gr
yeast extact	0,1 gr
K_2HPO_4	0,124 gr
$MgSO_4 \cdot 7H_2O$	0,05vgr
NaCl	0.025 gr

2. Σε ασηπτικές συνθήκες μέσα στον θάλαμο καθέτου νηματικής ροής αραιώνουμε σε 40 ml θρεπτικού ΥΜΒ, μικρή ποσότητα ριζοβίου.
3. Επώαση σε επωαστικό θάλαμο με ανακίνηση για 2 μέρες στους 28 οC.

2.6 Εμβολιασμός των φυτών με ριζόβιο:

Ο εμβολιασμός των φυτών με ριζόβιο γίνεται με την μορφή ποτίσματος σε ασηπτικές συνθήκες μέσα στο laminar.

Διαδικασία:

1. Αραιώνουμε την καλλιέργεια που έχει επωαστεί για 2 μέρες έτσι ώστε η τελική οπτική πυκνότητα $OD_{600}=0,02$.
2. Παρασκευή LSA.
3. Χορήγηση 15 ml LSA στα φυτά που δεν θα εμβολιάσουμε με ριζόβιο.
4. Χορήγηση 15 ml LSA + καλλιέργεια ριζοβίου στα φυτά που θα εμβολιάσουμε με ριζόβιο.

2.7 Συγκομιδή των φυτών:

Μετά το πέρας του χρονικού περιθωρίου που έχει οριστεί για να ολοκληρωθεί το πείραμα γίνεται η συγκομιδή των φυτών.

Διαδικασία:

1. Αφαίρεση φυτών από την άμμο προσεκτικά ώστε να μην τραυματιστούν οι ρίζες.
2. Πλύση ριζών με H_2O .
3. Τοποθέτηση φυτών σε falcon και προσθήκη H_2O έτσι ώστε οι ρίζες να διαβρέχονται.

2.8 Μέτρηση του αριθμού των φυματίων

Μία από τις παραμέτρους που μελετήθηκε στα συγκεκριμένα πειράματα ήταν ο αριθμός των φυματίων που σχηματίστηκαν στα φυτά (nodulation). Οι

ρίζες των φυτών που συλλέχθηκαν κατά την ολοκλήρωση της πειραματικής διαδικασίας παρατηρούνται σε στερεοσκόπιο. Κατά την καταμέτρηση των φυματίων έγινε διαχωρισμός των φυματίων σε ώριμα φυμάτια που φέρουν ρόδινο χρώμα και είναι μεγαλύτερα σε μέγεθος και σε ανώριμα φυμάτια, μικρότερου μεγέθους και λευκού χρώματος.

2.9 Υπολογισμός του ποσοστού αποικισμού από ενδομυκορριζικό μύκητα

Μια δεύτερη παράμετρος που μελετάται στην παρούσα διατριβή είναι το ποσοστό αποικισμού των ριζών του φυτού από ενδομυκορριζικούς μύκητες. Για να γίνει αυτό θα πρέπει να γίνει αποκοπή του υπέργειου τμήματος του φυτού από τις ρίζες, στην συνέχεια χρώση των ριζών με ένα διάλυμα που περιείχε 5% μελάνι σε 5% οξικό οξύ και τέλος κόψιμο των ριζών σε ισομεγέθη τμήματα και τοποθέτηση τους σε αντικειμενοφόρους πλάκες για την παρατήρησή τους σε οπτικό μικροσκόπιο.

2.9.1 Χρώση ριζών με μελάνι:

Διαδικασία:

1. Με κοπίδι γίνεται απομάκρυνση του υπέργειου τμήματος των φυτών και εναποθέτηση των ριζών σε falcon.
2. Προσθήκη 5ml KOH 10% σε κάθε falcon για να γίνει αποχρωματισμός των ριζών.
3. Επώαση στο υδατόλουτρο στους 80-90 °C για 30min.
4. Απομάκρυνση του KOH.
5. Προσθήκη 5 ml οξικού οξέος 10% (στον επαγωγό).
6. 2χπλύσεις με dH₂O (στον επαγωγό).
7. Προσθήκη 5 ml διαλύματος μελανιού και επώαση στο υδατόλουτρο στους 80-90 °C για 30min.
8. 2χπλύσεις με dH₂O.

9. Προσθήκη οξικού οξέος 5% και επώαση σε θερμοκρασία δωματίου για 30min.
10. Αφαίρεση οξικού οξέος.
11. Προσθήκη dH₂O και επώαση στους 4°C για τουλάχιστον 12 ώρες.

2.9.2 Λήψη παρατηρήσεων:

Οι βαμμένες ρίζες κόβονται σε ισομεγέθη τμήματα του 1 εκατοστού και τοποθετούνται κάθετα σε αντικειμενοφόρους πλάκες. Κάθε αντικειμενοφόρος πλάκα προέρχεται από μια βιολογική επανάληψη του πειράματος (δηλαδή τα φυτά ενός δοχείου magenta) και περιέχει περίπου 12 τμήματα ριζών προς μελέτη. Στην συνέχεια οι πλάκες παρατηρούνται στο μικροσκόπιο με μεγέθυνση 40x και το ποσοστό (%) του αποικισμού υπολογίζεται από την παρατήρηση 100 οπτικών πεδίων ανά αντικειμενοφόρο. Τέσσερις αντικειμενοφόροι εξεταζόταν για κάθε χειρισμό, που αντιστοιχεί σε τέσσερις βιολογικές επαναλήψεις.

3.Αποτελέσματα

3.1 Εμβολιασμός των φυτών *L. jaronicus* με δενδρόμορφο ενδομυκορριζικό μύκητα και ριζόβια

Σκοπός του πειράματος ήταν να μελετηθούν τα επίπεδα φυματιογένεσης και τα ποσοστά αποικισμού από ΔΕΜ των φυτών *Lotus jaronicus* κατά τον ταυτόχρονο εμβολιασμό με ενδομυκορριζικούς μύκητες και ριζόβια. Οι αλληλεπιδράσεις αυτές μελετήθηκαν τόσο σε φυτά αγρίου τύπου (ποικιλία MG-20) όσο και φυτά από το μεταλλάγμα *tml-1*. Πραγματοποιήθηκε εμβολιασμός με τον ενδομυκορριζικό μύκητα *Rhizophagus irregularis* και με το συμβιωτικό αζωτοδεσμευτικό βακτήριο *Mesorhizobium loti* (*M. loti*), στέλεχος R7A.

Αρχικά, έγινε απολύμανση σπόρων *L. Jaronicus* MG-20 και *tml-1*, και μία εβδομάδα μετά, τα νεαρά φυτά μεταφέρθηκαν σε δοχεία magenta όπου και παρέμειναν καθ' όλη την διάρκεια του πειράματος. Συνολικά χρησιμοποιήθηκαν 26 δοχεία magentas (13 magentas με φυτά αγρίου τύπου και 13 με φυτά του μεταλλάγματος *tml-1*) που το καθένα περιείχε 4 φυτά *L. jaronicus*.

Τα φυτά αναπτύχθηκαν σε θάλαμο φυτών με σταθερή θερμοκρασία 22°C και φωτοπερίοδο 16 ώρες φως και 8 ώρες σκοτάδι για 6 εβδομάδες συνολικά.

Το πείραμα αποτελούνταν από τρεις χειρισμούς:

- α) φυτά εμβολιασμένα με ενδομυκορριζικό μύκητα
- β) φυτά εμβολιασμένα με ριζόβιο
- γ) φυτά εμβολιασμένα με ενδομυκορριζικό μύκητα και ριζόβιο

Ο εμβολιασμός των φυτών με τον ενδομυκορριζικό μύκητα πραγματοποιήθηκε πέντε ημέρες μετά τη μεταφορά των νεαρών φυτών στα δοχεία magenta με ριζοπότισμα. Το διάλυμα το οποίο χρησιμοποιήθηκε για τον εμβολιασμό περιείχε θρεπτικό μέσο (LSA) και σπόρια του μύκητα. Σε κάθε δοχείο magenta χορηγήθηκαν 500 σπόρια του μύκητα, δηλαδή 125 σπόρια ανά φυτό. Συνολικά εμβολιάστηκαν με τον μύκητα 20 δοχεία magentas.

Μετά από δέκα μέρες έγινε ο εμβολιασμός των φυτών με το ριζόβιο, επίσης με ριζοπότισμα. Το διάλυμα το οποίο χρησιμοποιήθηκε για τον εμβολιασμό περιείχε και πάλι θρεπτικό μέσο (LSA) καθώς και αραιωμένη καλλιέργεια ριζοβίου με τελική οπτική πυκνότητα $OD_{600} = 0.02$. Συνολικά εμβολιάστηκαν 16 magentas. Η συγκομιδή των φυτών έγινε 3,5 εβδομάδες μετά τον εμβολιασμό με το ριζόβιο και 5 εβδομάδες μετά τον εμβολιασμό με τον ενδομυκορριζικό μύκητα.

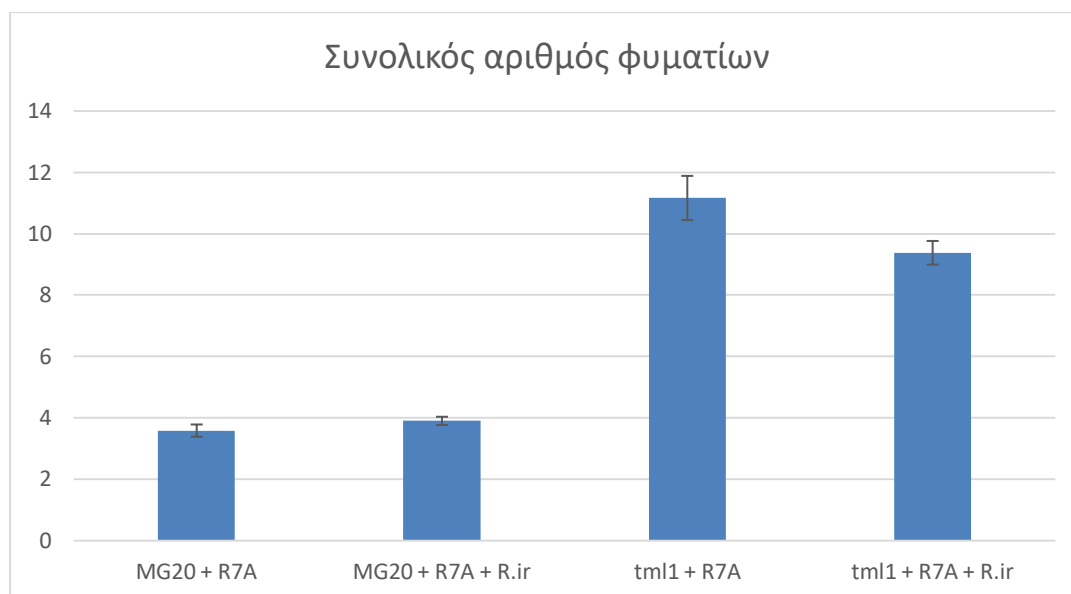


Εικόνα 3.1: Φυτά *L.japonicus* 5 εβδομάδες μετά τον εμβολιασμό με τον ΔΕΜ *R. Irregularis* (συμβολισμός R.ir) και 3,5 εβδομάδες μετά τον εμβολιασμό με το ριζόβιο *M. loti* (συμβολισμός R7A)

Από αριστερά προς δεξιά: 1) Φυτά MG20+ριζόβιο, 2) MG20+ΔΕΜ, 3) MG20+ΔΕΜ+ριζόβιο, 4) *tml1*+ριζόβιο, 5) *tml1*+ΔΕΜ, 6) *tml1*+ΔΕΜ+ριζόβιο

3.2 Έλεγχος της επίδρασης του ενδομυκορριζικού μύκητα *Rhizophagus irregularis* στον αποικισμό των φυτών *Lotus japonicus* από ριζόβια

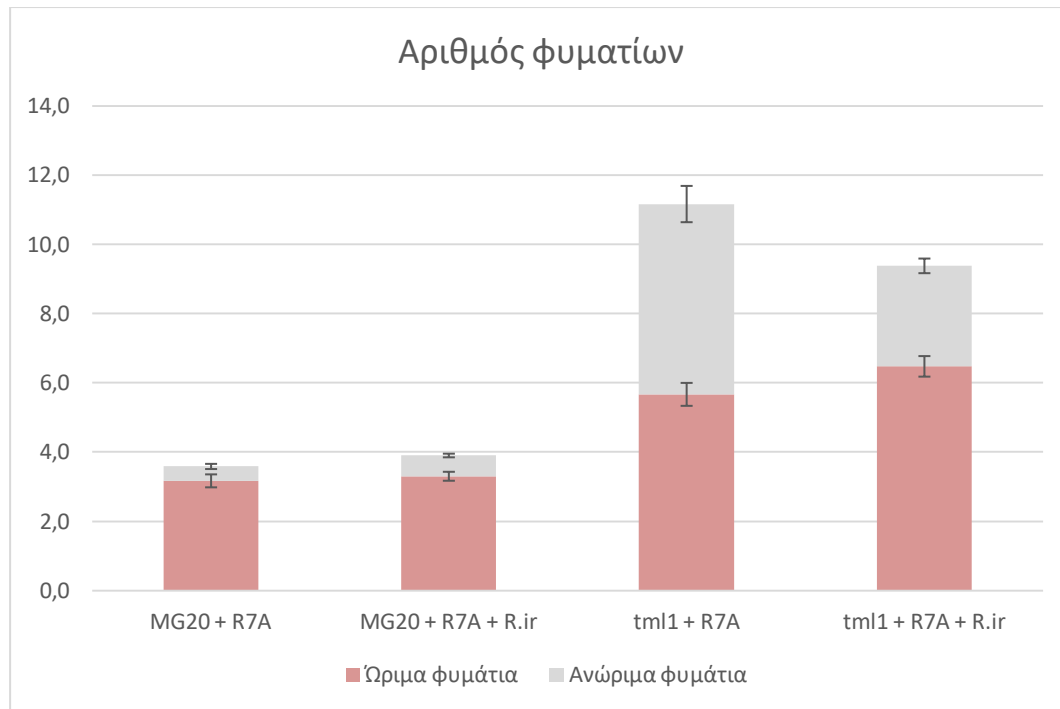
Για να μελετηθεί ο αποικισμός των ριζών από το ριζόβιο *M. loti* παρατηρήθηκαν οι ρίζες των φυτών που συλλέχθηκαν, στο στερεοσκόπιο όπως περιγράφεται στο κεφάλαιο Υλικά και Μέθοδοι, και έγινε καταμέτρηση του αριθμού των φυματίων. Το εύρος των τιμών των φυματίων που σχηματίστηκαν στις ρίζες των φυτών *Lotus japonicus* αγρίου τύπου (MG20) κυμαίνεται από 3,6 έως 3,9, ενώ το εύρος των τιμών των φυματίων που σχηματίστηκαν στις ρίζες των φυτών του μεταλλάγματος *tml-1* κυμαίνεται από 9,4 έως 11,2 (Γράφημα 1).



Γράφημα 1: Αριθμός των φυματίων που δημιουργήθηκαν στις ρίζες *Lotus japonicus*, αγρίου τύπου (MG20) και μεταλλάγματος *tml1*, από τον εμβολιασμό με το αζωτοδεσμευτικό βακτήριο *Mesorhizobium loti* (στέλεχος R7A), 3,5 εβδομάδες μετά τον εμβολιασμό των φυτών. (το σύμβολο +R.ir σημαίνει εμβολιασμός με *Rhizopagus irregularis* και το σύμβολο +R7A σημαίνει εμβολιασμός με ριζόβιο)

Η σύγκριση των φυτών αγρίου τύπου που είχαν αποικιστεί από τον ενδομυκορριζικό μύκητα και αυτών που δεν είχαν εμβολιαστεί με ενδομυκορριζικό μύκητα, έδειξε πως δεν υπάρχουν διαφορές στη φυματιογένεση εξαιτίας της παρουσία του ενδομυκορριζικού μύκητα. Η αντίστοιχη σύγκριση στα φυτά *tml1* έδειξε επίσης πως δεν υπάρχουν στατιστικώς σημαντικές διαφορές στον ολικό αριθμό των φυματίων ανάμεσα σε αποικισμένα και μη αποικισμένα με μύκητα φυτά (Γράφημα 1).

Στη συνέχεια έγινε διαχωρισμός των φυματίων με βάση το χρώμα και το μέγεθος τους, σε ώριμα φυμάτια που φέρουν ρόδινο χρώμα και είναι μεγαλύτερα σε μέγεθος και σε ανώριμα φυμάτια, μικρότερου μεγέθους και λευκού χρώματος (Γράφημα 2).



Γράφημα 2: Διαχωρισμός ώριμων και ανώριμων φυματίων που σχηματίστηκαν στις ρίζες των φυτών 3,5 εβδομάδες μετά των εμβολιασμό με το ριζόβιο *M. loti*. (το σύμβολο +R. ir σημαίνει εμβολιασμός με τον ΔΕΜ *Rhizopogon irregularis* και το σύμβολο +R7A σημαίνει εμβολιασμός με ριζόβιο)

Στα φυτά αγρίου τύπου παρατηρήθηκε ένας μικρός αριθμός ανώριμων φυματίων, ενώ στο μετάλλαγμα *tml1* παρατηρήθηκε αυξημένος αριθμός ανώριμων φυματίων. Στα φυτά αγρίου τύπου (MG-20), η σύγκριση των φυτών που είχαν αποικιστεί από τον ενδομυκορριζικό μύκητα και αυτών που δεν είχαν εμβολιαστεί με ενδομυκορριζικό μύκητα, έδειξε πως δεν υπάρχουν διαφορές στην αναλογία των ώριμων-ανώριμων φυματίων εξαιτίας της παρουσία του ενδομυκορριζικού μύκητα.

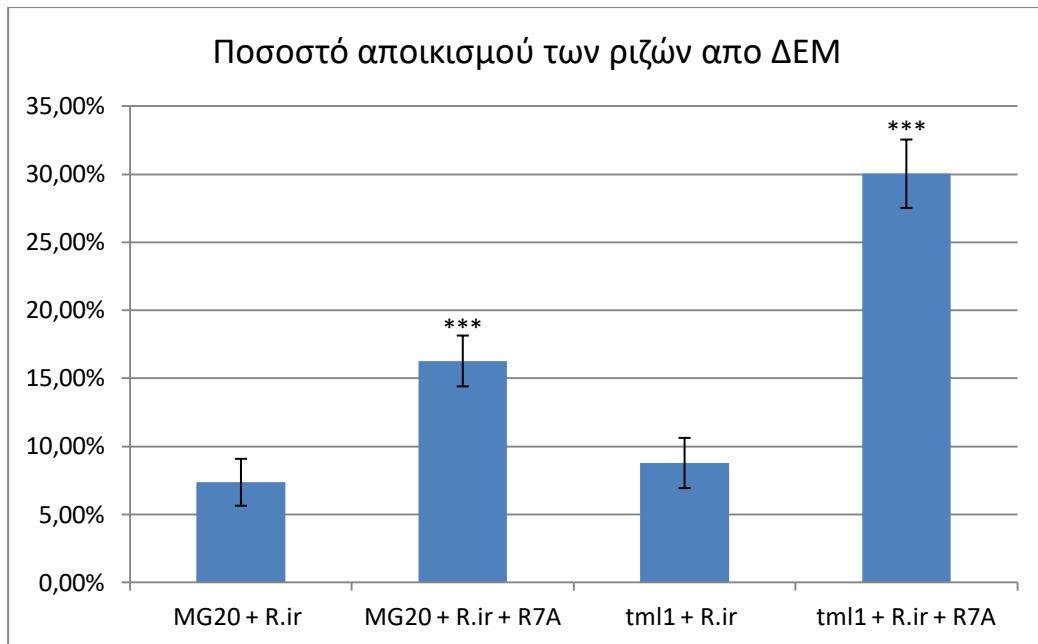
Αντίθετα, η αντίστοιχη σύγκριση στα αποτελέσματα των φυτών *tml1* έδειξε πως η παρουσία του ενδομυκορριζικού μύκητα έχει επηρεάσει σε κάποιο βαθμό την αναλογία των ώριμων-ανώριμων φυματίων που δημιουργήθηκαν στα φυτά. Συγκεκριμένα, φαίνεται πως η παρουσία του ενδομυκορριζικού μύκητα αύξησε λίγο τον αριθμό των ώριμων φυματίων και μείωσε τον αριθμό των ανώριμων (Γράφημα 2).

3.3 Έλεγχος της επίδρασης του ριζοβίου *M. loti* στον αποικισμό των φυτών *Lotus jaronicus* από τον ενδομυκορριζικό μύκητα *Rhizophagus irregularis*

Για να μελετηθεί το ποσοστό αποικισμού των ριζών με τον ενδομυκορριζικό μύκητα *Rhizophagus irregularis* έγινε χρώση των ριζών με μελάνι. Ο αποικισμός των ριζών παρατηρήθηκε στο οπτικό μικροσκόπιο, όπου οι χαρακτηριστικές δομές του μύκητα είναι ορατές εξαιτίας του έντονου μπλε χρώματος με το οποίο χρωματίζονται. Τα ποσοστά αποικισμού των ριζών υπολογίστηκαν όπως περιγράφεται στο κεφάλαιο Υλικά και Μέθοδοι.

Τα ποσοστά αποικισμού που υπολογίστηκαν για τα φυτά αγρίου τύπου και *tml1* στους διαφορετικούς χειρισμούς καταγράφονται στον παρακάτω πίνακα και παρουσιάζονται στο Γράφημα 3.

Φυτό	Χειρισμός	Ποσοστό αποικισμού από ΔΕΜ
MG20	απουσία ριζοβίου	7,37 %
MG20	παρουσία ριζοβίου	16,28 %
<i>tml1</i>	απουσία ριζοβίου	8,78 %
<i>tml1</i>	παρουσία ριζοβίου	30,05 %



Γράφημα 3: Ποσοστά αποικισμού ριζών *Lotus japonicus*, αγρίου τύπου (MG20) και μεταλλάγματος *tml1*, από τον ΔΕΜ *Rhizopagus irregularis*, 5 εβδομάδες μετά τον εμβολιασμό των φυτών. (το σύμβολο +R. ir σημαίνει εμβολιασμός με *Rhizopagus irregularis* και το σύμβολο +R7A σημαίνει εμβολιασμός με ριζόβιο) Η στατιστική ανάλυση πραγματοποιήθηκε με t-tests και οι συγκρίσεις έγιναν ξεχωριστά στα φυτά αγρίου τύπου και στα φυτά *tml1* σε παρουσία/απουσία ριζοβίου ($P < 0.001$).

Για να μελετηθεί η επίδραση του ριζοβίου στο ποσοστό αποικισμού που παρουσίασαν οι ρίζες των φυτών *Lotus japonicus* από ΔΕΜ έγινε σύγκριση των φυτών αγρίου τύπου που είχαν εμβολιαστεί μόνο με τον ΔΕΜ *Rhizopagus irregularis* με των φυτών αγρίου τύπου που είχαν εμβολιαστεί με τον ενδομυκορριζικό μύκητα και με το ριζόβιο *M. loti*.

Όπως φαίνεται στο γράφημα 3, η προσθήκη ριζοβίου αύξησε τα ποσοστά αποικισμού των ριζών των φυτών αγρίου τύπου από τον ΔΕΜ σχεδόν στο διπλάσιο. Ενώ κάτι παρόμοιο φαίνεται να ισχύει και στα φυτά του μεταλλάγματος *tml1*.

Πιο συγκεκριμένα η σύγκριση των φυτών *tml1* που είχαν εμβολιαστεί μόνο με τον ΔΕΜ με τα φυτά *tml1* που είχαν εμβολιαστεί και με ριζόβια έδειξε και πάλι ότι το ποσοστό αποικισμού των ριζών από τον μύκητα αυξήθηκε (περίπου 3,5 φορές περισσότερο) με τον εμβολιασμό των φυτών με ριζόβιο.

Συμπεραίνουμε λοιπόν ότι η προσθήκη ριζοβίου τόσο στα φυτά αγρίου τύπου όσο και στα φυτά του μεταλλάγματος *tml1* βελτίωσε τον αποικισμό των φυτών από μύκητες.

4. Συζήτηση

Στην παρούσα διατριβή μελετήθηκαν οι αλληλεπιδράσεις που συμβαίνουν μεταξύ μικροοργανισμών του εδάφους οι οποίοι συμβιώνουν με φυτά. Συγκεκριμένα μελετήθηκε η ταυτόχρονη αλληλεπίδραση ψυχανθών φυτών με ριζόβια και δενδρόμορφους ενδομυκορριζικούς μύκητες (DEM), καθώς τα ψυχανθή καλούνται να διαχειριστούν και τους δύο μικροσυμβιώτες στη φύση. Για τη μελέτη της τριπλής αυτής αλληλεπίδρασης, φυτά του ψυχανθούς-μοντέλου *Lotus japonicus* εμβολιάστηκαν με τον δενδρόμορφο ενδομυκορριζικό μύκητα *Rhizophagus irregularis* και το ριζόβιο *Mesorhizobium loti*.

Οι μελέτες στα ψυχανθή έχουν δείξει ότι υπάρχουν αρκετά κοινά στοιχεία στα σηματοδοτικά μονοπάτια και στα γονίδια που ρυθμίζουν τις συμβιωτικές σχέσεις με DEM και ριζόβια. Στοιχεία του σηματοδοτικού μονοπατιού που ενεργοποιείται για τον αποικισμό των ψυχανθών από ριζόβια έχουν βρεθεί να είναι απαραίτητα και για τον αποικισμό των φυτών από DEM (Oldroyd and Downie, 2004), και έχει προταθεί πως η φυματογένεση στα ψυχανθή έχει προκύψει εξελικτικά από την παλαιότερη συμβιωτική σχέση των φυτών με DEM (Parniske, 2008).

Ο βαθμός του αποικισμού ενός φυτού από τους μικροσυμβιώτες, ρυθμίζεται από το φυτό-ξενιστή μέσω ενός μηχανισμού που ονομάζεται «αυτορρύθμιση». Ο μηχανισμός «αυτορρύθμιση της φυματογένεσης» (autoregulation of nodulation: AON) καθορίζει την έκταση των μολύνσεων από ριζόβια και κατά συνέπεια τον αριθμό των φυματίων που θα σχηματιστούν στις ρίζες των ψυχανθών, ενώ αντίστοιχα, ο μηχανισμός «αυτορρύθμιση των μυκορριζών» (autoregulation of mycorrhization: AOM) καθορίζει την έκταση του αποικισμού των ριζών από δενδρόμορφους ενδομυκορριζικούς μύκητες (DEM). Ο μηχανισμός AON έχει μελετηθεί αρκετά καλά και πλέον γνωρίζουμε πολλά μόρια-κλειδιά, αλλά στον λιγότερο μελετημένο μηχανισμό AOM συνεχίζουν να υπάρχουν κενά στις γνώσεις μας για τον τρόπο ρύθμισης. Πρόσφατα πειραματικά δεδομένα δείχνουν πως οι δύο μηχανισμοί μοιράζονται αρκετά κοινά στοιχεία (Müller et al., 2019).

Ένα σημαντικό γονίδιο που εμπλέκεται στον μηχανισμό AON είναι το *TML* (Tsikouetal., 2018). Όταν τα επίπεδα του *TML* διατηρούνται χαμηλά το φυτό μπορεί να αποικιστεί από ριζόβια, ενώ τα υψηλά επίπεδα του *TML* παρεμποδίζουν την μόλυνση. Στα μεταλλάγματα *tml1* ο μηχανισμός AON δεν λειτουργεί και αυτό έχει ως αποτέλεσμα να σχηματίζονται στα φυτά ένας υπερβολικά μεγάλος αριθμός φυματίων (Magorietal., 2009). Παρόλο που ο ρόλος του γονιδίου *TML* είναι πολύ σημαντικός στο AON, μέχρι σήμερα δεν έχει αναφερθεί αν το γονίδιο αυτό εμπλέκεται και στον μηχανισμό AOM. Στην παρούσα εργασία μελετήθηκε η πιθανή εμπλοκή του γονιδίου *TML* στον ταυτόχρονο αποικισμό του ψυχανθούς *L. jaronicus* από ριζόβια και ΔΕΜ. Συγκεκριμένα, φυτά του μεταλλάγματος *tml1* (Magorietal., 2009) εμβολιάστηκαν με ριζόβια και ΔΕΜ, και στη συνέχεια έγινε σύγκριση του αποικισμού των φυτών *tml1* με τον αντίστοιχο αποικισμό που παρατηρήθηκε στα φυτά αγρίου τύπου.

Για να γίνουν οι απαραίτητες συγκρίσεις και να διεξαχθούν ασφαλή συμπεράσματα, πραγματοποιήθηκαν μονοί εμβολιασμοί είτε με ριζόβια είτε με ΔΕΜ, αλλά και διπλός εμβολιασμός με ριζόβια και ΔΕΜ, τόσο σε φυτά αγρίου τύπου (ποικιλία MG20) όσο και σε φυτά του μεταλλάγματος *tml1*. Όλες οι μετρήσεις στην παρούσα εργασία πάρθηκαν 3,5 εβδομάδες μετά τον εμβολιασμό των φυτών με ριζόβια και 5 εβδομάδες μετά τον εμβολιασμό με ΔΕΜ. Στον διπλό εμβολιασμό, ο εμβολιασμός με ριζόβια πραγματοποιήθηκε 1,5 εβδομάδα μετά τον εμβολιασμό με τον ΔΕΜ γιατί ο αποικισμός από ριζόβια συμβαίνει αμέσως ενώ ο ΔΕΜ χρειάζεται περισσότερο χρόνο (περίπου 10-12 ημέρες στο *L. jaronicus*) μέχρι να εισέλθει εντός των κυττάρων της ρίζας. Με αυτόν τον πειραματικό σχεδιασμό η είσοδος των δύο μικροσυμβιωτών στις ρίζες του φυτού έγινε σχεδόν ταυτοχρόνως κατά τον διπλό εμβολιασμό.

Για να δούμε εάν η παρουσία του ΔΕΜ *R.irregularis* επηρεάζει τη φυματιογένεση, συγκρίναμε τον αριθμό των φυματίων που σχηματίστηκαν στις ρίζες των φυτών ανάμεσα σε φυτά που εμβολιάστηκαν με ριζόβια μόνο (μονός εμβολιασμός) και φυτά που εμβολιάστηκαν με ριζόβια και τον ΔΕΜ (διπλός εμβολιασμός). Η σύγκριση αυτή σε φυτά αγρίου τύπου έδειξε πως η παρουσία του ΔΕΜ δεν επηρέασε τη φυματιογένεση (Γραφήματα 1 και 2).

Στα φυτά του μεταλλάγματος *tm1* ο αριθμός των φυματίων που μετρήθηκαν ήταν αυξημένος (σε σχέση με τα φυτά αγρίου τύπου) όπως ήταν αναμενόμενο. Η σύγκριση μεταξύ των φυτών *tm1* που εμβολιάστηκαν με ριζόβια μόνο και των φυτών *tm1* που εμβολιάστηκαν με ριζόβια και τον ΔΕΜ, έδειξε πως στον διπλό εμβολιασμό μειώθηκε λιγάκι ο αριθμός των φυματίων που σχηματίστηκαν, όμως η διαφορά αυτή δεν είναι στατιστικώς σημαντική (Γράφημα 1). Όταν έγινε καταμέτρηση των ώριμων και ανώριμων φυματίων ξεχωριστά, παρατηρήθηκε πως στα φυτά *tm1* που είχε γίνει διπλός εμβολιασμός, ο αριθμός των ώριμων φυματίων αυξήθηκε και αντίστοιχα ο αριθμός των ανώριμων φυματίων μειώθηκε (σε σύγκριση με τα φυτά *tm1* που είχε γίνει μονός εμβολιασμός με ριζόβια) (Γράφημα 2). Δηλαδή, ο αποικισμός των φυτών με τον ΔΕΜ *R.irregularis* επηρέασε την αναλογία ώριμων/ανώριμων φυματίων που σχηματίστηκαν στο μετάλλαγμα *tm1*. Ίσως η συμβιωτική σχέση με τον ΔΕΜ έχει βελτιώσει την θρεπτική κατάσταση των φυτών *tm1* και αυτός να είναι ο λόγος που τα φυτά αυτά κατάφεραν να σχηματίσουν περισσότερα ώριμα φυμάτια.

Για να δούμε εάν η παρουσία του ριζοβίου *M. loti* επηρεάζει τον αποικισμό των φυτών από ΔΕΜ, συγκρίναμε τα ποσοστά αποικισμού των ριζών από τον ΔΕΜ *R. Irregularis* ανάμεσα σε φυτά που εμβολιάστηκαν με τον ΔΕΜ μόνο (μονός εμβολιασμός) και φυτά που εμβολιάστηκαν με ριζόβια και τον ΔΕΜ (διπλός εμβολιασμός). Η σύγκριση αυτή, τόσο σε φυτά αγρίου τύπου όσο και στο μετάλλαγμα *tm1*, έδειξε πως η παρουσία του ριζοβίου επηρέασε θετικά τον αποικισμό των φυτών από τον ΔΕΜ. Συγκεκριμένα, ο αποικισμός από ΔΕΜ στα φυτά αγρίου τύπου σχεδόν διπλασιάστηκε, ενώ ο αποικισμός στα φυτά *tm1* αυξήθηκε σχεδόν 3,5 φορές (Γράφημα 3). Θετική επίδραση του ριζοβίου στον αποικισμό των ριζών από ΔΕΜ έχει αναφερθεί στο παρελθόν σε μια αντίστοιχη μελέτη που είχε γίνει σε φυτά σόγιας (Wangetal., 2011). Γενικότερα όμως, φαίνεται πως διαφορετικοί ΔΕΜ επηρεάζονται με διαφορετικό τρόπο από τα ριζόβια, και επίσης διαφορετικά φυτικά είδη ανταποκρίνονται διαφορετικά στους διπλούς εμβολιασμούς, σύμφωνα μάλλον με τις ιδιαίτερες ανάγκες τους και τις συνθήκες ανάπτυξης.

Η σύγκριση ανάμεσα στα φυτά αγρίου τύπου και στα φυτά *tm1* που έχουν εμβολιαστεί με τον ΔΕΜ μόνο (μονός εμβολιασμός) δείχνει πως δεν υπάρχουν

διαφορές στα ποσοστά αποικισμού από τον ΔΕΜ (Γράφημα 3). Αυτό δηλώνει πως η έλλειψη του γονιδίου *TML* (στο *tml1* μετάλλαγμα) δεν είχε κάποια επίπτωση στον αποικισμό των φυτών από τον ΔΕΜ *R. irregularis*. Από τα δεδομένα του πειράματος αυτού, λοιπόν, θα μπορούσαμε να συμπεράνουμε πως το γονίδιο *TML* δεν φαίνεται να έχει κάποιον άμεσο ρόλο στον αποικισμό των φυτών από ΔΕΜ. Παρόλα αυτά, περισσότερη έρευνα στο μέλλον είναι απαραίτητη σε αυτή την κατεύθυνση καθώς είναι πιθανό το *TML* να παίζει κάποιο ρόλο σε κάποιο άλλο στάδιο της συμβιωτικής σχέσης των φυτών με ΔΕΜ (που δεν εξετάστηκε στην παρούσα εργασία).

Ιδιαίτερο ενδιαφέρον παρουσιάζει το πολύ υψηλό ποσοστό αποικισμού στα φυτά *tml1* τα οποία έχουν εμβολιστεί και με τους δύο μικροσυμβιώτες. Ενώ η έλλειψη του γονιδίου *TML* δεν επηρέασε τον αποικισμό από ΔΕΜ στον μονό εμβολιασμό, η έλλειψή του είχε ως αποτέλεσμα τον πολύ εκτεταμένο αποικισμό από ΔΕΜ στον διπλό εμβολιασμό. Ένα πιθανό σενάριο που θα εξηγούσε το αυξημένο ποσοστό αποικισμού στα φυτά αυτά, είναι ότι επηρεάστηκε ο μηχανισμός ΑΟΜ και τα φυτά δεν έχουν την ικανότητα να ρυθμίζουν σωστά την έκταση του αποικισμού. Στα φυτά του μεταλλάγματος *tml1* ο μηχανισμός ΑΟΝ δεν λειτουργεί και αυτό ίσως να επηρεάζει και τη λειτουργία του μηχανισμού ΑΟΜ. Μελλοντικά πειράματα είναι απαραίτητα για να μελετηθεί η αλληλεπίδραση των μηχανισμών ΑΟΝ-ΑΟΜ και να διευκρινιστεί αν υπάρχει άμεση ή έμμεση εμπλοκή του γονιδίου *TML* και στον μηχανισμό ΑΟΜ.

5 Βιβλιογραφία

1. Adams MA, et al. 2018. Crops, Nitrogen, Water: Are Legumes Friend, Foe, or Misunderstood Ally? *TrendsPlantSci.* 23:539-550
2. Benson, D.R., and Clawson, M.L, (2000) Evolution of the actinorhizal plant nitrogen-fixing symbiosis
3. Benson, R.R., and Silvester, W.B., (1993) Biology of Frankia stains, actinomycete symbiontes of actinorhizal plants. *Microbiol. Rev* 57: 293-319.
4. Bevan, M. (1984) Binary *Agrobacterium* vectors for plant transformation. *Nucleic Acids Res.* 12:8711–8721.
5. Bothe, H., Yates, M.G., and Cannon, F.C (1983). Physiology, biochemistry and genetic dinitrogen fixation. In ‘Encyclopedia of plant Phisyology, New Series’
6. Brundrett MC. 1991. Mycorrhizas in nature ecosystems. In: Macfayden A, Begon M, Fitter AH (ends) *Advances in Ecological Research*, Vol. 21. Academic Press, London. Pp 171-313
7. Brundrett, M., 2004. Diversity and classification of mycorrhizal associations. *Biol. Rev.* (2004), 79, pp. 473-495.
8. Brundrett, M.C., Y. Piche and R.L. Peterson. 1984. A new method for observing the morthology of vesicular- arbuscular mycorrhizae. *Canadian Journal of Botany*
9. Camargo JA, Alonso A. 2006. Ecological and toxicological effects of inorganic nitrogen pollution in aquatic ecosystems: A global assessment. *EnvironInt.* 32:831-849
10. Jiang Wang, QiujinXie , Na Liu, Lixia Liu , Dapeng Wang, Xiaowei Zhang , Chen Yang , Xiaoya Chen , Dingzhong Tang , Ertao Wang 2017. Plants transfer lipids to sustain colonization by mutualistic mycorrhizal and parasitic fungi.
11. Larimer AL, Clay K, Bever JD. 2014. Synergism and context dependency of interactions between arbuscular mycorrhizal fungi and rhizobia with a prairie legume. *Ecology.* 95: 1045-1054
12. Lee J, Lee S, Young JPW. 2008. Improved PCR primers for the detection and identification of arbuscular mycorrhizal fungi. *FEMS Microbiology Ecology.* 65: 339–349

13. Lu C, Tian H. 2017. Global nitrogen and phosphorus fertilizer use for agriculture production in the past half century: shifted hot spots and nutrient imbalance. *EarthSyst. Sci. Data.* 9: 181–19
14. Maekawa T., Kusakabe M., Shimoda Y., Sato S., Tabata S., Murooka Y., Hayashi M.(2008) Polyubiquitin promoter-based binary vectors for overexpression and gene silencing in *Lotus japonicus*. *Mol Plant Microbe Interact.* Apr;21(4):375-82
15. Magori S, Oka-Kira E, Shibata S, et al. Too much love, a root regulator associated with the long-distance control of nodulation in *Lotus japonicus*. *Mol Plant Microbe Interact.* 2009;22(3):259-268. doi:10.1094/MPMI-22-3-0259
16. Magori S, Oka-Kira E, Shibata S, et al. Too much love, a root regulator associated with the long-distance control of nodulation in *Lotus japonicus*. *Mol Plant Microbe Interact.* 2009;22(3):259-268. doi:10.1094/MPMI-22-3-0259
17. Markmann, K. &Parniske, M. Evolution of root endosymbiosis with bacteria: how novel are nodules? *Trends Plant Sci.* 14, 77–86 (2009)
18. Masahiro Takahara, ShimpeiMagori, Takashi Soyano, Satoru Okamoto, Chie Yoshida, Koji Yano, Shusei Sato, Satoshi Tabata, Katsushi Yamaguchi, Shuji Shigenobu, Naoya Takeda, Takuya Suzuki, Masayoshi Kawaguchi, TOO MUCH LOVE, a Novel Kelch Repeat-Containing F-box Protein, Functions in the Long distance Regulation of the Legume–*Rhizobium* Symbiosis, *Plant and Cell Physiology*, Volume 54, Issue 4, April 2013, Pages 433–447
19. Matthyse, A.G., and Kijne J.W. (1998) Attachment of Rhizobiaceae to Plant Cells
20. Müller, L.M., Flokova, K., Schnabel, E. *et al.* A CLE–SUNN module regulates strigolactone content and fungal colonization in arbuscular mycorrhiza. *Nat. Plants* 5, 933–939 (2019)
21. Mylona P., Pawlowski K., Bisseling T. (1995) Symbiotic Nitrogen Fixation. *The Plant Cell*, Vol. 7, 869-885

22. Neumann G and Römheld V (2012). Rhizosphere Chemistry in Relation to Plant Nutrition. In: Marschner s Mineral Nutrition of Higher Plants, Third Edition
23. Oldroyd GE, et al. 2011. The rules of engagement in the legume-rhizobial symbiosis. *Annu Rev Genet.* 45:119-144
24. Oldroyd GED, Downie JA. 2004. Calcium, kinases and nodulation signalling in legumes. *Nat. Rev. Mol. Cell Biol.* 5:566–576
25. Oldroyd GED, Downie JA. 2004. Calcium, kinases and nodulation signalling in legumes. *Nat. Rev. Mol. Cell Biol.* 5:566–576
26. Oldroyd GED, Leyser O. A plant's diet, surviving in a variable nutrient environment. *Science.* 2020 Apr 3;368(6486):eaba0196. doi: 10.1126/science.aba0196. PMID: 32241923.
27. Oldroyd, G. Speak, friend, and enter: signalling systems that promote beneficial symbiotic associations in plants. *Nat Rev Microbiol* **11**, 252–263 (2013)
28. Parniske M. 2008. Arbuscular mycorrhiza: the mother of plant root endosymbioses. *NatRevMicrobiol.* 6:763-765.
29. Phillip A. Sharp P.A. (2001) RNA interference—2001. *Genes Dev.* 2001 15: 485-490
30. Phillips, D.A. (1980) Efficiency of symbiotic nitrogen fixation in Legumes.
31. Smith SE, Read DJ. 2008. *Mycorrhizal Symbiosis.* (San Diego, CA: Academic Press, Inc.)
32. Tsikou D, Tsiknia M, Nikolaou CN, Ehaliotis C, Papadopoulou KK. 2019. The effect of *Rhizophagus irregularis* and *Mesorhizobium loti* co-inoculation on *Lotus japonicus*. *Journal of Experimental and Molecular Biology.*
33. Tsikou D, Tsiknia M, Nikolaou CN, Papadopoulou KK, Ehaliotis C. 2018. Does rhizobium interact with arbuscular mycorrhizal fungi during legume root colonization? 13th European NitrogenFixationConference, August 18-21, Stockholm, Sweden
34. Tsikou D, Tsiknia M, Nikolaou CN, Papadopoulou KK, Ehaliotis C. 2019. Arbuscular mycorrhizal fungi and rhizobia interactions during the colonization

- of the same legume root. 4th International MolecularMycorrhizaMeeting, February 6-8, Torino, Italy
35. Wang X, Pan Q, Chen F, Yan X, Liao H. 2011. Effects of co-inoculation with arbuscular mycorrhizal fungi and rhizobia on soybean growth as related to root architecture and availability of N and P. *Mycorrhiza*. 21: 173-181
 36. Wang X., Pan Q., Chen F., Yan X., Liao H. (2011): Effects of co-inoculation with arbuscular mycorrhizal fungi and rhizobia on soybean growth as related to root architecture and availability of N and P. *Mycorrhiza*, 21, 173-181
 37. Wang, B. et al. Presence of three mycorrhizal genes in the common ancestor of land plants suggests a key role of mycorrhizas in the colonization of land by plants. *New Phytol.* 186, 514–525 (2010).
 38. Witty, J.F. (1979) Algal nitrogen fixation on temperate arable fields. The Broadbalk experiment. *Plant soil*. 52: 151-164
 39. Yuta Sugiura, Rei Akiyama, Sachiko Tanaka, Koji Yano, Hiromu Kameoka, Shiori Marui, Masanori Saito, Masayoshi Kawaguchi, Akiyama, and Katsuharu Saito. 2020 Myristate can be used as a carbon and energy source for the asymbiotic growth of arbuscular mycorrhizal fungi
 40. Βερεσόγλου, Δ. Σ. 2002 Οικολογία. Β' έκδοση, Εκδόσεις «έλλα», Λάρισα
 41. Δεληβόπουλος, Σ. Γ. 1994. Μορφολογία και Ανατομία Φυτών. Θεσσαλονίκη
 42. Καρπούζας Δ., Υψηλάντης Γ. 2010. 'Μελέτη των δενδροειδών μυκορριζικών μυκήτων'. Εργαστηριακές Ασκήσεις Περιβαλλοντικής Βιοτεχνολογίας, Πανεπιστήμιο Θεσσαλίας
 43. Μπουράνης Δ., Χωριανοπούλου Σ., Θρεψη φυτών., «Η συμβιωτική σχέση με ενδομυκορριζικούς μύκητες ως στρατηγική αφομοίωσης ανόργανων θρεπτικών από τα φυτά», 2017
 44. Παπακώστα-Τασοπούλου Δ. 2005. Ειδική Γεωργία: Σιτηρά και ψυχανθή. Συγχρονη Παιδεία
 45. Τσίκου Δανιέλα, Παπαδοπούλου Καλλιόπη. 2019. «Βιολογικά» Λιπάσματα – παρόν και μέλλον. Περιοδικό «Αγροδιατροφή». Τεύχος 3. Σελίδες 28-30.
 46. Χριστιάς, Χ., 1999. Μυκητολογία. Αγροτυπός Α.Ε. Αθήνα.