

ΠΑΝΕΠΙΣΤΗΜΙΟ ΘΕΣΣΑΛΙΑΣ

ΣΧΟΛΗ ΕΠΙΣΤΗΜΩΝ ΥΓΕΙΑΣ

ΤΜΗΜΑ ΒΙΟΧΗΜΕΙΑΣ & ΒΙΟΤΕΧΝΟΛΟΓΙΑΣ

ΔΙΠΛΩΜΑΤΙΚΗ ΕΡΓΑΣΙΑ

*Η επίδραση του ενδοφυτικού μύκητα
Fusarium solani στέλεχος K (FsK) στην
ικανότητα φυματιογένεσης στο ψυχανθές
μοντέλο φυτό Lotus japonicus*



*Effect of the endophytic fungus FsK on
nodulation in Lotus japonicus*

*Κοροξενίδου Μαγδαληνή
Λάρισα, 2021*

ΤΡΙΜΕΛΗΣ ΕΠΙΤΡΟΠΗ

- Παπαδοπούλου Καλλιόπη, Αναπληρώτρια Καθηγήτρια Βιοτεχνολογίας Φυτών, Τμήμα Βιοχημείας και Βιοτεχνολογίας, Πανεπιστήμιο Θεσσαλίας

- Καρπούζας Δημήτριος, Καθηγητής Περιβαλλοντικής Μικροβιολογίας και Βιοτεχνολογίας, Τμήμα Βιοχημείας και Βιοτεχνολογίας, Πανεπιστήμιο Θεσσαλίας

- Τσίκου Δανιέλα, Επίκουρος Καθηγήτρια Μοριακής και Αναπτυξιακής Βιολογίας Φυτών, Τμήμα Βιοχημείας και Βιοτεχνολογίας, Πανεπιστήμιο

ΕΥΧΑΡΙΣΤΙΕΣ

Αρχικά θα ήθελα να ευχαριστήσω την επιβλέπουσα καθηγήτρια για τη πτυχιακή μου κυρία Καλλιόπη Παπαδοπούλου, για την ευκαιρία που μου έδωσε να ολοκληρώσω τις σπουδές μου με τη διεξαγωγή της πτυχιακής μου εργασίας στο εργαστήριο της Βιοτεχνολογίας Φυτών και Περιβάλλοντος κατά τη διάρκεια της πανδημίας του COVID-19.

Ακόμα, θα ήθελα να ευχαριστήσω ιδιαίτερα την υποψήφια διδάκτορα Μαριάννα Αβραμίδου για την πολύτιμη βοήθεια της κατά την εκπόνηση της πτυχιακής εργασίας και την καθοδήγηση της σε όλα τα βήματα της πτυχιακής.

Επίσης, ευχαριστώ όλα τα μέλη του εργαστηρίου για τη βοήθεια και τις συμβουλές που μου παρείχαν, αλλά και τον συμφοιτητή μου Μπαλακτσή Βασίλη για τη βοήθεια του κατά διεξαγωγή των πειραμάτων.

Τέλος, θα ήθελα να ευχαριστήσω τους γονείς μου για την υποστήριξη τους σε όλη τη διάρκεια των σπουδών μου και την ευκαιρία που μου έδωσαν να πραγματοποιήσω το όνειρο μου ως φοιτήτρια του τμήματος Βιοχημείας και Βιοτεχνολογίας του Πανεπιστημίου Θεσσαλίας.

ΠΕΡΙΕΧΟΜΕΝΑ

Περίληψη/Abstract.....	6
Σκοπός.....	7
1.Εισαγωγή.....	8
1.1 Φυτά: <i>Lotus japonicus</i>	8
1.1.1 Δευτερογενείς μεταβολίτες.....	8
1.1.2 Τριτερπένια	9
1.2 Μύκητες	10
1.2.1 Ενδοφυτικοί μύκητες.....	11
1.2.2 <i>Fusarium solani</i>	12
1.2.3 <i>Fusarium solani</i> στέλεχος K	12
1.3 Φυματιογένεση	13
1.3.1 Συμβίωση ριζοβίου-φυτού	13
1.3.2 Σχηματισμός φυματίων.....	14
2 Υλικά και μέθοδοι.....	15
2.1 Σειρές φυτών.....	15
2.2 Καλλιέργεια μύκητα.....	16
2.2.1 Μέτρηση Κονιδίων.....	16
2.3 Καλλιέργεια ριζοβίου	17
2.4 Προετοιμασία υποστρώματος.....	17
2.5 Απολύμανση Σπόρων.....	17
2.6 Μεταφορά Σπόρων <i>Lotus japonicus</i>	18
2.7 Επιμόλυνση φυτών.....	19
2.8 Συνθήκες Ανάπτυξης.....	19
2.8.1 1ο Πείραμα: Μελέτη της επίδρασης του FsK στη φυματιογένεση στα φυτά <i>L. japonicus</i> με τη χρήση διαφορετικών θρεπτικών διαλυμάτων.....	20
2.8.2 2ο Πείραμα: Μελέτη επίδρασης της χρήσης διαφορετικών θρεπτικών διαλυμάτων στην ικανότητα αποικισμού του FsK σε φυτικές σειρές <i>L. japonicus</i>	21
2.9 Δειγματοληψία.....	22
2.10 Απομόνωση DNA για τον έλεγχο αποικισμού του FsK με εκκινητές που στόχευαν το γονίδιο ITS του μύκητα.....	23

2.11 Ποσοτικοποίηση DNA.....	23
2.12 Απομόνωση RNA για το 2 ^ο Πείραμα.....	24
2.13 Μέτρηση αποικισμού FSK.....	24
3. Αποτελέσματα.....	26
3.1 3.1 1ο Πείραμα: Μελέτη της επίδρασης του FSK στη φυματιογένεση στα φυτά <i>L. jaronicus</i> με τη χρήση διαφορετικών θρεπτικών διαλυμάτων.....	26
3.1.1 Καταμέτρηση αριθμού φυματίων στα WT και στα MT φυτά <i>L. jaronicus</i>	26
3.1.2 Καταγραφή δεδομένων ρίζας αριθμού στα WT και στα MT φυτά <i>L. jaronicus</i>	29
3.1.2.1 Καταγραφή μήκους ρίζας αριθμού στα WT και στα MT φυτά <i>L. jaronicus</i>	29
3.1.2.2 Καταγραφή του βάρους της ρίζας στα WT και στα MT φυτά <i>L. jaronicus</i>	31
3.1.3 Καταγραφή του βάρους του βλαστού στα WT και στα MT φυτά <i>L. jaronicus</i>	34
3.2 2ο Πείραμα: Μελέτη επίδρασης της χρήσης διαφορετικών θρεπτικών διαλυμάτων στην ικανότητα αποικισμού του FSK σε φυτικές σειρές <i>L. jaronicus</i>	35
4. Συζήτηση	38
5. Βιβλιογραφικές	39

ΠΕΡΙΛΗΨΗ

Η παρούσα εργασία πραγματεύεται την επίδραση του ενδοφυτικού μύκητα *Fusarium solani* στελέχους K, FsK, στη διαδικασία της φυματιογένεσης του φυτικού μοντέλου *Lotus japonicus*, το οποίο ανήκει στην οικογένεια των Ψυχανθών. Ο μύκητας FsK είχε, αρχικά, απομονωθεί από ριζικό σύστημα φυτών ντομάτας και αποδείχθηκε ότι είχε ενεργητικό ρόλο στην επιβίωση των φυτών, η οποία καθορίζεται από πολλούς παράγοντες. Ένας από αυτούς είναι και οι φυτικοί δευτερογενείς μεταβολίτες, οι οποίοι δρουν έμμεσα για την επιβίωση του φυτού και περιλαμβάνουν μεγάλο αριθμό οργανικών ενώσεων με ετερογενή χημική δομή και βιολογική δράση. Τα τριτερπένια αποτελούν μία ομάδα των φυτικών δευτερογενών μεσολαβητών η βιοσύνθεση των οποίων στηρίζεται στην παραγωγή μίας σειράς ενζύμων για την τελική βιοσύνθεση των οξειδοαναγωγικών κυκλάσων (OSCs) με το γονίδιο της συνθάσης της της β-αμυρίνης, *AMY2*, να συμμετέχει στη βιοσύνθεση μίας από τις παραπάνω κυκλάσες. Για το λόγο αυτό χρησιμοποιήθηκαν φυτικές σειρές φυτών *L. japonicus* με σίγηση του γονιδίου *AMY2*, ώστε να διερευνηθεί η ενεργητική επίδραση του μύκητα FsK σε μεταλλαγμένα φυτά όσον αφορά τη φυματιογένεση. Ακόμα τα ψυχανθή έχουν την ικανότητα να αλληλεπιδρούν με ένα ευρύ φάσμα μικροβίων στο ριζικό τους σύστημα παρέχοντας τη δυνατότητα συν-επιμόλυνσης φυτών με αζωτοδεσμητικά βακτήρια, *Rhizobium*. Για την εκπόνηση αυτής της εργασίας αναπτύχθηκαν συμβιωτικές σχέσεις μεταξύ του μύκητα FsK, βακτηρίων *Rhizobium* και φυτών *L. japonicus* χρησιμοποιώντας διαφορετικά θρεπτικά διαλύματα, προκειμένου να αναδειχθεί η συμβολή αυτών όλων των παραγόντων στη διαδικασία της φυματιογένεσης.

ABSTRACT

This study refers to the effect of the interaction of the endophytic fungus *Fusarium solani* strain K, FsK, in the process of nodulation of the plant model *Lotus japonicus*, which belongs to the family of Legumes. FsK is a beneficial endophytic isolated of tomato, contributing in plant survival, which is influenced by many factors. One of them is the plant secondary metabolites, which affect indirectly the plant survival, and are consisted of many organic compounds with heterogeneous chemical structure and biological action. Triterpenes are a major subgroup of the terpene superfamily of plant secondary metabolites, of which formation is catalysed by oxidosqualene cyclases, OSCs, involving the gene of β-amyrin synthase, *AMY2*, in this biosynthesis. For this reason, plant series silencing the *AMY2* gene were used to investigate the positive effect of FsK on mutant plants in nodulation. Moreover, legumes can interact with a wide range of microbes in their root system by enabling plants to co-infect with nitrogen-fixing bacteria, *Rhizobia*. in the context of this study, symbiotic relationships were developed among FsK, *Rhizoba* and *L. japonicus* using different nutrient solutions, to highlight the contribution of all these factors to the process of nodulation.

ΣΚΟΠΟΣ

Ο στόχος της παρούσας εργασίας ήταν η μελέτη της επίδρασης του ενδοφυτικού μύκητα *Fusarium solani* στέλεχος K (FsK) στην ικανότητα βιογένεσης φυματίων στο μοντέλο φυτό *Lotus japonicus* προσπαθώντας να απαντήσουμε σε δύο βασικά ερωτήματα. Τα ερωτήματα αυτά προέκυψαν, έπειτα από την παρατήρηση διαφορών στα πρότυπα ανάπτυξης των φυτών σε πειράματα που διεξήχθησαν στο εργαστήριο. Το πρώτο ερώτημα αφορούσε τη διερεύνηση της επίδρασης του FsK, έπειτα από επιμόλυνση, σε φυτικές σειρές αγρίου τύπου και σε φυτικές σειρές με μετάλλαξη στο γονίδιο της συνθάσης της β-αμυρίνης, *AMY2*, στη φυματιογένεση. Το δεύτερο αφορούσε τη διερεύνηση της ικανότητας του αποικισμού του ενδοφυτικού μύκητα FsK στα φυτά *L. japonicus* χρησιμοποιώντας διαφορετικά θρεπτικά διαλύματα. Για το σκοπό αυτό, πραγματοποιήθηκε απομόνωση DNA με χρήση εξειδικευμένων εκκινητών, προκειμένου να μελετηθεί ο αποικισμός του FsK και καταμέτρηση του αριθμού των φυματίων για τη σύγκριση δεδομένων.

1. ΕΙΣΑΓΩΓΗ

1.1 Φυτά: *Lotus japonicus*

Το φυτό *Lotus japonicus* αποτελεί ένα διπλοειδές φυτό το οποίο ανήκει σε μία ποικιλόμορφη και πολυπληθή οικογένεια με περίπου 200 διαφορετικά είδη, την οικογένεια των Fabaceae (Ψυχανθών). Η οικογένεια αυτή περιλαμβάνει φυτά με σημαντικό ρόλο στη γεωργία, κτηνοτροφία αλλά και στη βιομηχανία τροφίμων με φυτά όπως σόγια, φασόλια ή αρακά που φέρουν τους καρπούς τους στους λοβούς. Για τον άνθρωπο η δυνατότητα ανάπτυξης συμβιωτικής σχέσης μεταξύ ψυχανθών και αζωτοδεσμευτικών βακτηρίων αποτελεί χρήσιμο εργαλείο, καθώς αποφεύγονται αζωτούχα λιπάσματα και ελαττώνεται η διαρροή αζωτούχων ενώσεων στο υπέδαφος (Madigan, 2003). Το *L. japonicus* χρησιμοποιείται ευρέως ως φυτό μοντέλο για τη διεξαγωγή πειραμάτων σε εργαστηριακό επίπεδο, λόγω κάποιων συγκεκριμένων χαρακτηριστικών που το καθιστούν ιδανικό. Το μικρό του μέγεθος, ο μικρός χρόνος γενιάς, ο οποίος υπολογίζεται σε περίπου τρεις μήνες, το μικρό μέγεθος του γονιδιώματος, η ευκολία δημιουργίας διαγονιδιακών σειρών αλλά και η δυνατότητα αυτογονιμοποίησης αποτελούν εργαλεία ευελιξίας για την εκπόνηση πειραμάτων και τη γρήγορη εξαγωγή συμπερασμάτων (Handberg and Stougaard, 1992). Χρησιμοποιείται για πειράματα που αφορούν τη μελέτη συμβιωτικής σχέσης με ριζόβια και μύκητες αλλά και τη μελέτη της διαδικασίας φυματογένεσης (Handberg et al, 1992)



Εικόνα 1: Το άνθος του φυτού *Lotus japonicus*.

1.1.1 Δευτερογενείς μεταβολίτες

Τα φυτά παράγουν χημικές ενώσεις, μεταβολίτες, οι οποίοι διακρίνονται σε πρωτογενείς και σε δευτερογενείς. Ο ρόλος των φυτικών πρωτογενών μεταβολιτών σχετίζεται με κυτταρικές λειτουργίες συνδεδεμένες με την επιβίωση του φυτού, προσφέροντας συστατικά όπως τα απλά σάκχαρα, λιπίδια, αμινοξέα και τα νουκλεϊκά οξέα. Αντίθετα οι φυτικοί δευτερογενείς

μεταβολίτες αποτελούν χημικές ενώσεις που παράγονται από ενδιάμεσες ενώσεις του πρωτογενούς μεταβολισμού του φυτού, χωρίς όμως να εμπλέκονται άμεσα στην επιβίωση του. Επιπλέον οι πρωτογενείς μεταβολίτες παράγονται συνεχώς με ολική κατανομή στο φυτικό οργανισμό σε όλα τα φυτικά είδη, ενώ οι δευτερογενείς μεταβολίτες παράγονται σε συγκεκριμένα αναπτυξιακά στάδια, σε επιμέρους ιστούς αλλά και σε ορισμένα είδη. Παρόλα αυτά στη φύση καθίσταται σαφής η ανάγκη παραγωγής των δευτερογενών μεταβολιτών, λόγω του διευρυμένου ρόλου τους (Τσέκος Ι. 2004).

Οι δευτερογενείς μεταβολίτες αποτελούν μία ομάδα χημικών ενώσεων με πάνω από 200.000 διαφορετικά είδη. Το γεγονός αυτό αυξάνει την ποικιλία στη φύση, ενώ ο ρόλος τους στη φυσιολογία του φυτού αλλά στους οργανισμούς με τους οποίους αλληλεπιδρούν τα φυτά αυξάνει την οικονομική τους αξία. Συγκεκριμένα ο ρόλος τους δεν περιορίζεται μόνο στις λειτουργίες της οικολογίας του φυτού με την προστασία από βιοτικές και αβιοτικές καταπονήσεις αλλά έχει παρατηρηθεί ότι συμβάλλουν στην ανάπτυξη, στην αναπαραγωγή του αλλά και στην άμυνα του φυτού επηρεάζοντας τις αλληλεπιδράσεις του με άλλους οργανισμούς αλλά και με το περιβάλλον του (Keeling CI, 2006; Τσέκος Ι. 2004). Επιπλέον η ετερόλογη και πολυπληθής ομάδα των δευτερογενών μεταβολιτών αντικατοπτρίζει το διαφορετικό τρόπο αντιμετώπισης των βιοτικών και αβιοτικών καταπονήσεων σε κάθε είδος φυτού. Με αυτό τον τρόπο διευρύνεται το φάσμα εφαρμογών στις οποίες μπορούν να χρησιμοποιηθούν σε βιομηχανικό επίπεδο ως φυτικά προϊόντα (Balandrin MF, 1985; D'Auria JC, 2005).

Παρά το μεγάλο αριθμό των ενώσεων οι δευτερογενείς μεταβολίτες μπορούν να χωριστούν σε τρεις κατηγορίες. Ο διαχωρισμός γίνεται βάσει των πρόδρομων βιομορίων του μεταβολισμού από τα οποία προκύπτουν, τα οποία μπορεί να είναι φαινολικές ενώσεις, αζωτούχες ενώσεις και τερπένια (Kumar P, 2013).

1.1.2 Τριτερπένια

Μία κύρια ομάδα των τερπενίων αποτελούν τα τριτερπένια, τα οποία συμβάλλουν στην ανάπτυξη του φυτού αλλά και στην προσαρμογή τους στις περιβαλλοντικές συνθήκες. Ιδιαίτερο ενδιαφέρον, όσον αφορά τα τριτερπένια, έχει προκαλέσει η παρατήρηση της δυνατότητας τους να επηρεάσουν την ποιότητα των τροφίμων αλλά και των οσπρίων που αποτελούν ζωοτροφές. Η ιδιότητα αυτή έχει καταστήσει τις ουσίες αυτές σημαντικές και έχει προσελκύσει το ενδιαφέρον των ερευνητών για τον έλεγχο της βιοσύνθεσης τους μέσω της μελέτης των γονιδίων που σχετίζονται με αυτή. Για τη βιοσύνθεση των τριτερπενοειδών συμμετέχουν οργανωμένα γονίδια σε συστοιχίες τα οποία μπορούν να οδηγήσουν στη σύνθεση μίας ποικιλίας τριτερπενοειδών με την έκφραση κυκλασών 2,3-οξειδοσκουαλενίου (OSCs) αλλά και την παραγωγή ενζύμων που βοηθούν την ενεργοποίηση των τριτερπενίων (Iturbe-Ormaetxe I, 2003; Krokida et al, 2013). Το γονίδιο της συνθάσης της β-αμυρίνης, *AMY2*, του φυτού *L. jaronicus* που κωδικοποιεί μία κυκλάση του 2,3-οξειδοσκουαλενίου αποτελεί έναν στόχο για τη μελέτη της επίδρασης των τριτερπενίων στην ανάπτυξη του

φυτού. Συγκεκριμένα, λόγω των ευρημάτων της β-αμυρίνης στις ρίζες των οσπρίων κατά τη δημιουργία συμβιωτικών σχέσεων ριζοβίων και μυκήτων, τίθεται το ερώτημα της δυνατότητας μίας μετάλλαξης να προκαλέσει αλλαγές στη φυσιολογία και στην ανάπτυξη του φυτού (Krokida et al, 2013).

1.2 Μύκητες

Οι μύκητες αποτελούν μία ποικίλη μικροβιακή ομάδα ευκαριωτικών οργανισμών, η οποία βρίσκεται πιο κοντά στους οργανισμούς του ζωικού βασιλείου, καθώς έχουν το πιο πρόσφατο κοινό πρόγονο μεταξύ τους. Το πρώτο χαρακτηριστικό είναι η μεγάλη ποικιλία μορφολογικών μορφών μεταξύ των μυκήτων. Οι μορφολογικές μορφές των μυκήτων κυμαίνονται από μονοκύτταρες ζύμες έως πολυκύτταρα καλούπια και μακροσκοπικάμανιτάρια. Σε αντίθεση με τα φυτά και τα ζώα, από τα οποία τα ενήλικα άτομα είναι συχνά ορατά με γυμνό μάτι κατά τη διάρκεια της ζωής του ατόμου, μικροσκοπικοί μύκητες, όπως ζύμες και μούχλες, συνήθως δεν είναι ορατοί. Πρόκειται για χημειοργανότροφους οργανισμούς οι οποίοι χρησιμοποιώντας εξωκυτταρικά ένζυμα, τα οποία εκκρίνουν, μπορούν να διασπούν πολυμερή όπως πολυσακχαρίτες ή πρωτεΐνες σε μονομερή, για να τα χρησιμοποιήσουν ως πηγή άνθρακα και εν τέλει τροφής. Μπορούν να χρησιμοποιήσουν ως θρεπτικά συστατικά είτε ζωντανά κύτταρα είτε νεκρή οργανική ύλη (ζωική ή φυτική) διασπώντας την.

Ένας μεγάλος αριθμός αυτής της ομάδας ζει στο έδαφος ή σε νεκρή φυτική ύλη συμβάλλοντας στην ορυκτοποίηση του οργανικού άνθρακα. Αποτελούν φυτοπαθογόνους οργανισμούς οι οποίοι μπορούν να προκαλέσουν ασθένειες και στα ζώα, οι οποίες ονομάζονται μυκητιάσεις. Ωστόσο έχουν τη δυνατότητα να δημιουργήσουν συμβιωτικές σχέσεις με φυτά, διευκολύνοντας την πρόσληψη μεταλλικών στοιχείων από το έδαφος αλλά και να δρουν ευεργετικά για τον άνθρωπο συμμετέχοντας σε διεργασίες μεγάλης οικονομικής σημασίας. Για παράδειγμα χρησιμοποιούνται στη βιομηχανία κατά τη διαδικασία των ζυμώσεων για την παραγωγή μπίρας, κρασιού αλλά και στην παραγωγή αντιβιοτικών όπως η πενικιλίνη.



Εικόνα 2: α) Ταμανιτάρια *Porcini* είναι ευρέως διαδεδομένα στο βόρειο ημισφαίριο και σχηματίζουν συμβιωτικούς συνδέσμους με πολλά είδη δέντρων β) *Saccharomyces cerevisiae* ένας τύπος μαγιάς που χρησιμοποιείται στις βιομηχανίες ψησίματος και ζυθοποιίας. γ) *Penicillium*

Βάσει των γονιδιακών αλληλουχιών του 18S ριβοσωμικού RNA οι μύκητες χωρίζονται σε πέντε κύρια φύλα. Αυτά περιλαμβάνουν τους Χυτριομύκητες (*Batrachochytrium*) Ζυγομύκητες (*Rhizopus*), Γκλομερομύκητες (*Glomeromycota*), Ασκομύκητες (*Saccharomyces*) και Βασιδιομύκητες (*Amanita*).

Οι μύκητες έχουν τη δυνατότητα να αναπαράγονται με δύο τρόπους, δηλαδή με αγενή και εγγενή αναπαραγωγή. Η αγενής αναπαραγωγή επιτυγχάνεται με την ανάπτυξη και διασπορά νηματίων ή υφών, με αφυλετική παραγωγή σπορίων και με κυτταρική διαίρεση. Σε αντίθεση, όμως με τους προκαρυώτες, πολλοί μύκητες είναι επίσης ικανοί για σεξουαλική αναπαραγωγή μέσω ζευγαρώματος και μείωσης.

Στην πλειοψηφία τους οι μύκητες σχηματίζουν ένα δίκτυο νηματίων ή αλλιώς υφών, οι οποίες αναπτύσσονται πάνω και ενδιάμεσα από μία επιφάνεια που ονομάζεται μυκήλιο. Οι υφές αυτές απαρτίζονται από κύτταρα τα οποία σχηματίζουν μεταξύ τους πόρους μέσω των οποίων επιτυγχάνεται η μεταφορά των θρεπτικών ουσιών μεταξύ των κυττάρων από. Από τις υφές στο μυκήλιο εκτείνονται τα αφυλετικά σπόρια ή αλλιώς κονίδια, τα οποία συμβάλλουν στη διασπορά του μύκητα σε νέα ενδιαίτηματα ((Madigan 2003).



Εικόνα 3: Οι μύκητες αποτελούνται από υφές οι οποίες διεισδύουν και απορροφούν θρεπτικά συστατικά από τα υποστρώματα στα οποία αναπτύσσονται μύκητες. Ορισμένοι μύκητες έχουν εκτεταμένα δίκτυα υφών που επιτρέπουν στο καρποφόρο σώμα των μυκήτων να μεγαλώσει πολύ.

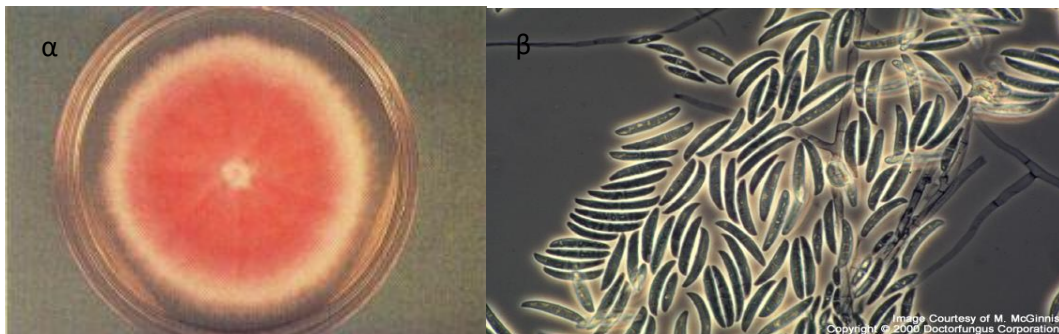
1.2.1 Ενδοφυτικοί μύκητες

Ο ορισμός του ενδόφυτου περιλαμβάνει όλους εκείνους τους οργανισμούς που, κατά τη διάρκεια μιας περισσότερο ή λιγότερο μεγάλης περιόδου της ζωής τους, αποικίζουν χωρίς συμπτώματα τους ζωντανούς εσωτερικούς ιστούς των ξενιστών (Petrini O, 1991). Οι μύκητες μπορούν να συμμετέχουν σε συμβιωτικές σχέσεις με το φυτό-ξενιστή με αμοιβαία οφέλη, τα οποία περιλαμβάνουν την παροχή πηγής ενέργειας, δηλαδή θρεπτικών συστατικών όπως

σάκχαρα για τον μύκητα για την ανάπτυξη και επιβίωση του. Ως αντάλλαγμα ο μύκητας προσφέρει στο φυτό θρεπτικά στοιχεία που δεν μπορεί να απορροφήσει από το έδαφος όπως φωσφορικά, μεταλλικά στοιχεία αλλά και νερό. Όλες οι γνωστές κατηγορίες ενδοφυτικών μυκήτων αντιπροσωπεύονται κυρίως από ασκομύκητες και σε λιγότερες περιπτώσεις από τους βασιδιομύκητες (Madigan 2003).

1.2.2 *Fusarium solani*

Το γένος *Fusarium* περιλαμβάνει μία πολυπληθή και ετερογενή ομάδα μυκήτων με σημαντικό ρόλο στη βιομηχανία τροφίμων, φαρμάκων, ιατρική και γεωργία. Το σύμπλεγμα των ειδών *Fusarium solani* που αποτελείται τουλάχιστον 60 φυλογενετικά είδη από συνδεδεμένους νηματώδεις μύκητες της οικογένειας ασκομυκήτων γνωστά ως «F. σύμπλεγμα ειδών *solani* (FSSC)» (Coleman, 2016). Τα μέλη του FSSC είναι επικίνδυνα παθογόνα φυτών και ανθρώπων και ενδόφυτα (Zhang et al., 2006). Η ικανότητά τους να προσαρμόζονται σε πληθώρα περιβαλλόντων αντικατοπτρίζει τη γενετική πλαστικότητα και τη μεταβολική τους ποικιλομορφία (Coleman et al., 2009).



Εικόνα 4: α) Τυπική αποικία ειδών *Fusarium* μετά από 6 ημέρες ανάπτυξης στο άγαρ δεξτρόζης του Sabouraud β) Κονίδια του συμπλέγματος *Fusarium solani* στο μικροσκόπιο.

1.2.3 *Fusarium solani* στέλεχος K

Το στέλεχος *Fusarium solani* K (FsK) αποτελεί ένα ενδόφυτο το οποίο έχει απομονωθεί από τη ρίζα των φυτών της ντομάτα. Πρόκειται για ένα μη παθογόνο στέλεχος η δράση του οποίου περιλαμβάνει την προστασία του φυτού από παθογόνους παράγοντες στη ρίζα και στο φύλλωμα αλλά και την ενίσχυση της αντοχής του σε συνθήκες έλλειψης νερού (Skiada et al., 2020). Σημαντική ιδιότητα του στελέχους αποτελεί η γενετική πλαστικότητα που διαθέτει, η οποία σχετίζεται με την ικανότητα του να αποικίζει περισσότερα από ένα είδη φυτού. Επιπλέον ο αποικισμός συνδέεται και με την εγκαθίδρυση του ως ευεργετικό παράγοντα ανάπτυξης και επιβίωσης για τα φυτά που αποικίζει όπως στην περίπτωση των οσπρίων. Οι αποκρίσεις που παρατηρήθηκαν έπειτα από την επιμόλυνση με το στέλεχος FsK

αποδεικνύουν την ανάπτυξη συμβιωτικών σχέσεων μεταξύ μύκητα και φυτού-ξενιστή (Skiada et al., 2019).

1.3 Φυματιογένεση

Η φυματιογένεση είναι μία διαδικασία η οποία οδηγεί στην ανταλλαγή θρεπτικών συστατικών μεταξύ δύο οργανισμών οι οποίοι αλληλεπιδρούν μεταξύ τους αναπτύσσοντας συμβιωτικές σχέσεις. Μπορεί να πραγματοποιηθεί, όταν αναπτύσσεται συμβιωτική σχέση μεταξύ βακτηρίων, τα οποία έχουν την ικανότητα δέσμευσης του αζώτου και φυτών, προκαλώντας τη δημιουργία εξειδικευμένων δομών στη ρίζα, των φυματίων. Στα φυμάτια γίνεται η δέσμευση και η μετατροπή του ατμοσφαιρικού αζώτου N_2 σε αμμώνιο NH_4^+ , μία αφομοιώσιμη μορφή αζώτου για το φυτό ($NH_3 + H^+ \rightarrow NH_4^+$) χρησιμοποιώντας ενέργεια που προέρχεται από τη φωτοσύνθεση (Guinel, 2015).

1.3.1 Συμβίωση ριζοβίου-φυτού

Τα αζωτοδεσμευτικά βακτήρια τα οποία μπορούν δημιουργούν αμοιβαίες σχέσεις με τα ψυχανθή ονομάζονται ριζόβια του γένους *Rhizobium* και ανήκουν στο είδος των α- ή β' Πρωτεβακτηρίων. Πρόκειται για βακτήρια που μπορούν να αναπτύσσονται ελευθέρως στο έδαφος ή να μολύνουν ένα ψυχανθές αναπτύσσοντας συμβιωτική σχέση μεταξύ τους, με αποτέλεσμα να αυξάνεται η διαθεσιμότητα θρεπτικών ουσιών για το φυτό. Πιο συγκεκριμένα έχουν τη δυνατότητα να επιτρέπουν τη δέσμευση του ατμοσφαιρικού αζώτου και τη μετατροπή του σε μορφή που μπορεί να χρησιμοποιηθεί από τα φυτά. Το άζωτο συναντάται στην ατμόσφαιρα σε μορφή N_2 σε ποσοστό περίπου 78%, χωρίς όμως να μπορεί να αφομοιωθεί, είτε από τα φυτά είτε από τα ζώα. Η δέσμευση του ατμοσφαιρικού αζώτου απαιτεί το ενζυμικό σύμπλοκο της νιτρογενάσης και ως εκ τούτου τη συμβολή προκαρυωτικών οργανισμών. Το σύμπλοκο της νιτρογενάσης καταλύει τη μετατροπή του NH_2 σε NH_4^+ καταναλώνοντας ενέργεια που προέρχεται από την οξείδωση των υδατανθράκων που έχουν συσταθεί από τη φωτοσυνθετική δραστηριότητα των φυτών.

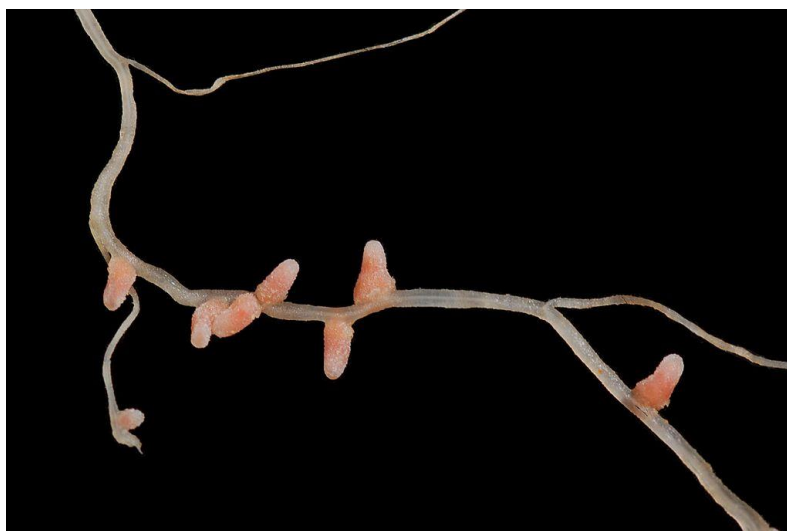
Η συμβολή αυτή επιτυγχάνεται με τον αποικισμό ριζοβίων στις ρίζες των ψυχανθών και τη δημιουργία συμβιωτικής σχέσης. Η σχέση αυτή βασίζεται στην εξειδίκευση μεταξύ του βακτηρίου και του είδους ψυχανθών. Δηλαδή η επιτυχής εγκαθίδρυση του ριζοβίου πραγματοποιείται μόνο, όταν η επιμόλυνση των ψυχανθών γίνεται με το κατάλληλο στέλεχος ριζοβίου, ώστε να δημιουργηθούν τα φυμάτια.

1.3.2 Σχηματισμός φυματίων

Η μόλυνση ριζών των ψυχανθών με ριζόβια οδηγεί στον σχηματισμό ριζικών φυματίων στα οποία βακτήρια δεσμεύουν το αέριο άζωτο N_2 .

Ο σχηματισμός φυματίων γίνεται με τον εξής τρόπο:

1. Προσκόλληση βακτηρίου στα ριζικά τριχίδια,
2. Έκκριση ολιγοσαχαριτών ή αλλιώς παραγόντων Nod από το βακτήριο
3. Είσοδος των ριζοβίων και σχηματισμός του μολυσματικού νηματίου και παραμόρφωση των ριζικών τριχιδίων
4. Μετακίνηση βακτηρίων στην κύρια ρίζα μέσω νηματίου μόλυνσης
5. Σχηματισμός τροποποιημένων βακτηριακών κυττάρων στο εσωτερικό φυτικών κυττάρων και ανάπτυξη αζωτοδεσμευτικής φάσης
6. Επαναλαμβανόμενες κυτταρικές διαιρέσεις στο βακτήριο και στο φυτό από όπου χρηματίζεται το ώριμο ριζικό φυμάτιο.



Εικόνα 5: Φυμάτια στη ρίζα κορμού *Medicago* μολυσμένη με ριζόβιο.

Εντός του φυματίου, οι διαφοροποιημένες μορφές των ριζοβίων, που ονομάζονται πλέον βακτηριοειδή, μετατρέπουν το μοριακό άζωτο σε αμμώνιο. Το άζωτο που δεσμεύεται ετησίως στα ριζικά φυμάτια συνιστά το ένα τέταρτο περίπου συνολικά δεσμευόμενου N_2 στη Γη, ενώ τα ψυχανθή μπορούν να αναπτυχθούν επαρκώς ακόμη και σε φτωχό σε άζωτο έδαφος. Συνεπώς η συμβίωση των δύο οργανισμών οδηγεί σε μία σχέση αμοιβαιότητας για την επιβίωση του εκάστοτε. Πιο συγκεκριμένα παρατηρείται η συνεχής παροχή οργανικού άνθρακα στο ριζόβιο από το φυτό, έπειτα από τη διαδικασία της φωτοσύνθεσης, σε ένα περιβάλλον χωρίς μικροβιακό ανταγωνισμό και ως αντάλλαγμα η διάθεση αζώτου σε αφομοιώσιμη μορφή για την κάλυψη των αναγκών του φυτού (Madigan 2003; Galibert F et. al., 2001; Udvardi and Poole, 2013).

2. ΥΛΙΚΑ ΚΑΙ ΜΕΘΟΔΟΙ

2.1 Σειρές φυτών

Ο *Lotus japonicus*, αν και είναι ένα φυτό μικρής οικονομικής σημασίας, παρέχει μια σειρά πλεονεκτημάτων σε αντίθεση με τα καλλιεργούμενα είδη που καθιστούν ιδανικό μοντέλο για τη διεξαγωγή εργαστηριακών πειραμάτων. Σε αυτήν την πτυχιακή εργασία επιλέχθηκαν σειρές φυτών που προήλθαν από επαναδιασταυρώσεις φυτών με σίγηση στο γονίδιο *AMY2*, MT, καθώς και σειρές αγρίου τύπου, WT, προκειμένου να έχουμε συγκρίσιμα αποτελέσματα.



Εικόνα 6: Τα φυτά *Lotus japonicus* ύστερα από τη μεταφορά των εκβλαστημένων σπόρων σε μικρές και γλάστρες.

2.2 Καλλιέργεια μύκητα

Τα φυτά εμβολιάστηκαν με το στέλεχος FsK του μύκητα *Fusarium solani*, το οποίο είχε καλλιεργηθεί σε στερεό θρεπτικό υλικό Potato Dextrose Agar (PDA). Για την προετοιμασία της επιμόλυνσης των φυτών με το στέλεχος παρασκευάστηκε το υγρό θρεπτικό διάλυμα Potato Dextrose Broth (PDB), κατάλληλο θρεπτικό υλικό για μύκητες, έπειτα από βρασμό πατατών για περίπου 20 λεπτά. Στο θάλαμο κάθετης νηματικής ροής ακολούθησε η μεταφορά του μύκητα από τη στερεή καλλιέργεια, με τη χρήση ενός αποστειρωμένου νυστεριού, σε αποστειρωμένη φλάσκα που περιείχε υγρή καλλιέργεια με PDB. Έπειτα η

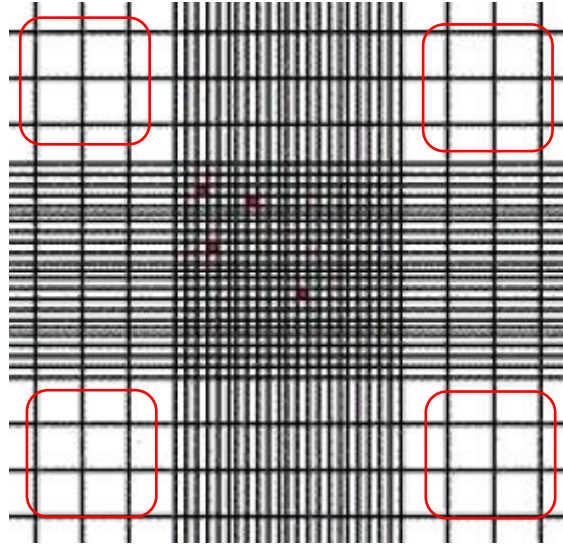
φλάσκα καλύφθηκε με αλουμινόχαρτο μεταφέρθηκε σε έναν επωαστήρα (25 °C, 160rpm) για 5 ημέρες, ώστε να αναπτυχθεί ο μύκητας.

Τέλος έγινε συλλογή του μύκητα με διαδοχικές φυγοκεντρήσεις, προκειμένου να συλλεχθεί το ίζημα και ακολούθησε η κατάλληλη αραιώση για το διάλυμα επιμόλυνσης.

2.2.1 Μέτρηση Κονιδίων

Η μέτρηση κονιδίων απαιτεί διαδοχικές αραιώσεις του διαλύματος που αρχικά βρίσκονταν τα κονίδια σε διαλύματα όγκου 10^{-1} , 10^{-2} , 2×10^{-3} και 10^{-3} . Αρχικά χρησιμοποιήθηκαν 900ml απιονισμένου νερού και 100ml αρχικού διαλύματος με την καλλιέργεια του FSK. Ακολούθησαν διαδοχικές αραιώσεις με τον ίδιο τρόπο, ώστε τελικά να χρησιμοποιείται 100ml από κάθε προηγούμενη αραιώση για την επόμενη μέχρι την επιθυμητή τελική τιμή με περίπου 10^3 κονίδια ανά 1ml διαλύματος.

Έπειτα με τη χρήση της πλάκας NEUBAUER, μετρήθηκαν τα κονίδια με τοποθέτηση 10μl από το αραιωμένο εμβόλιο (με την αραιώση 2×10^{-3}). Μετρώντας τα κουτάκια που δεν βρίσκονται στις διπλές γραμμές υπολογίζεται η συγκέντρωση κονιδίων ανά 1ml διαλύματος. Συγκεκριμένα βρίσκω το μέσο όρο μετρώντας και βρίσκοντας τον αριθμό των κονιδίων στα τέσσερα εξωτερικά κουτάκια και κάνοντας αναγωγή στο 1ml. Στη συνέχεια γίνονται αραιώσεις, ώστε να παρασκευαστεί διάλυμα με συγκέντρωση 10^2 σε 20μl. Αυτό επιτυγχάνεται με τη χρήση 900 μl διαλύματος NaCl 0,85% και 100μl από την προηγούμενη αραιώση, μέχρι να επιτευχθεί μια αραιώση με περίπου 10^3 κονίδια.. Ο εμβολιασμός των φυτών με το μύκητα έγινε απευθείας στην ρίζα μέσω πιπέτας χρησιμοποιώντας 20μl διαλύματος για το κάθε φυτό. Η επιμόλυνση των φυτών έγινε με τη χρήση πιπέτας στην περιοχή κοντά στη ρίζα με 1ml για κάθε φυτό από το διάλυμα κονιδίων. Το θρεπτικό διάλυμα του μύκητα που περίσσεψε διατηρήθηκε στους 4°C για πιθανή χρήση του σε λίγες ημέρες.



Εικόνα 7: Πλάκα Neubauer, στα 4 μεγάλα ακραία τετράγωνα, τα οποία είναι με κόκκινο σημειωμένα, γίνεται η μέτρηση των κονιδίων του FSK. Ο όγκος των τεσσάρων γωνιακών 16αδων είναι $0,1 \times 1 \times 1 = 0,1 \text{ mm}^3 = 10^{-4} \text{ ml}$.

2.3 Καλλιέργεια ριζοβίου

Η καλλιέργεια ριζοβίου πραγματοποιήθηκε σε υγρό θρεπτικό διάλυμα YMB και ακολούθησε η μεταφορά της αποστειρωμένης φλάσκας στους 30 °C υπό συνεχή ανάδευση για δυο μέρες. Για τη διεξαγωγή του πειράματος χρησιμοποιήθηκε το ριζόβιο *Mesorhizobium loti*, *M. loti*, το οποίο αποτελεί ένα αρνητικό κατά Gram είδος βακτηρίων που βρίσκεται στα φυμάτια ρίζας πολλών φυτικών ειδών (Jarvis et al, 1982). Ακολούθως έγιναν διαδοχικές φυγοκεντρήσεις στις 6.000 στροφές ανά λεπτό για 5 λεπτά στους 4°C και απομάκρυνση του υπερκείμενου. Τέλος πραγματοποιήθηκε επαναδιάλυση των κυττάρων σε 1ml του επιθυμητού θρεπτικού διαλύματος. Η επιμόλυνση των φυτών έγινε με τη χρήση πιπέτας στην περιοχή κοντά στη ρίζα με 1ml για κάθε φυτό από την καλλιέργεια ριζοβίου.

2.4 Προετοιμασία υποστρώματος

Για τη διεξαγωγή των πειραμάτων απαραίτητη κρίνεται η σωστή επεξεργασία των υποστρωμάτων ανάπτυξης των φυτών, ώστε να αποφευχθούν επιμολύνσεις και αλλοίωση των αποτελεσμάτων. Για το λόγο αυτό οι συνθήκες πρέπει να ελέγχονται σε όλη τη διάρκεια της πειραματικής διαδικασίας και τα μέσα ανάπτυξης να αποτελούν ασφαλή υποστρώματα. Στο συγκεκριμένο πείραμα το χώμα που χρησιμοποιήθηκε αποτελούσε ένα μείγμα άμμου με χοντρούς και λεπτούς κόκκους, καθώς και βερμικουλίτη με αναλογία 2:1:1 αντίστοιχα.

Έπειτα από την ανάμειξη του μείγματος, αυτό τοποθετήθηκε σε ειδικές σακούλες και μεταφέρθηκε στο αυτόκαυστο για την αποστείρωση του στους 121°C για 30 λεπτά. Στο τέλος της διαδικασίας ακολούθησε η μεταφορά και ο διαμοιρασμός του μείγματος ισόποσα σε μικρές γλάστρες, οι οποίες πρωτίστως είχαν απολυμανθεί.

2.5 Απολύμανση Σπόρων

Για την απολύμανση των σπόρων ακολουθήθηκαν τα παρακάτω βήματα. Αρχικά μετρήθηκαν οι σπόροι, ώστε να είναι επαρκείς για τις ανάγκες του πειράματος και τοποθετήθηκαν ανά 100 σε ένα erpedorf όπου προστέθηκε 1ml H₂SO₄ για 15 λεπτά. Στη συνέχεια έγιναν τρεις πλύσεις με παγωμένο απιονισμένο νερό και προστέθηκαν 1ml BUFI (20% χλωρίνη +0,1% tween) για 20 λεπτά και πλύσεις με ddH₂O μέχρι να απομακρυνθεί η χλωρίνη. Τέλος τα erpedorfs καλύφθηκαν με αλουμινόχαρτο και τοποθετήθηκαν στους 4 °C για μια με δύο μέρες.

2.6 Μεταφορά Σπόρων *Lotus japonicus*

Η μεταφορά των σπόρων πραγματοποιήθηκε σε θάλαμο κάθετης νηματικής ροής, καθώς έπρεπε να επικρατούν συνθήκες αποστείρωσης, ώστε να τοποθετηθούν με ασφαλές τρόπο σε τριβλύα με agar. Στη συνέχεια τα τριβλύα καλύφθηκαν με αλουμινόχαρτο και τοποθετήθηκαν για τρεις ημέρες στο θάλαμο ανάπτυξης. Την τέταρτη μέρα αφαιρέθηκε το αλουμινόχαρτο και τα τριβλύα παρέμειναν για 2 ημέρες εκεί, για να αναπτυχτούν περισσότερο. Τέλος έγινε η μεταφορά σε μικρές γλάστρες, όπου οι 240 εκβλαστημένοι σπόροι μεταφέρθηκαν σε 20 γλαστράκια στο μείγμα άμμου και τοποθετήθηκαν στον θάλαμο ανάπτυξης (16 ώρες φως και 8 ώρες σκοτάδι στους 25° C). Συγκεκριμένα χρησιμοποιήθηκε 25% των θρεπτικών διαλυμάτων. Σε κάθε μία μικρή γλάστρα τοποθετήθηκαν τρία φυτά και έγινε ο διαχωρισμός ανάλογα με τις συνθήκες ανάπτυξης που επιλέχθηκαν για κάθε γλάστρα.



Εικόνα 8: Τα φυτά *Lotus japonicus* διαχωρισμένα σε μικρές γλάστρες στο θάλαμο ανάπτυξης στα αρχικά στάδια της διαδικασίας ανάπτυξης τους.

2.7 Επιμόλυνση φυτών

Την ενδέκατη μέρα, αφότου έγινε η μεταφορά των φυτών στο χώμα από τα τριβλύα έγινε ο εμβολιασμός των φυτών με 10^3 ανά 1ml κονίδια FsK και της καλλιέργειας YMB με ριζόβιο *M. loti*. Η καλλιέργεια ριζοβίου παρέμεινε για 48 ώρες πριν την επιμόλυνση στους 28°C , ενώ ο εμβολιασμός πραγματοποιήθηκε 4 ώρες μετά τον εμβολιασμό με το στέλεχος FsK. Έπειτα από 4 ημέρες για το 1^ο Πείραμα και 21 ημέρες για το 2^ο Πείραμα, έγιναν οι δειγματοληψίες,

2.8 Συνθήκες Ανάπτυξης

Τα παρακάτω πειράματα οργανώθηκαν βάσει των ερωτημάτων που τέθηκαν στο σκοπό της εργασίας. Κατά την εκπόνηση της παρούσας πτυχιακής εργασίας διεξήχθησαν και δύο επαναλήψεις για το κάθε πείραμα.

Πριν τη μεταφορά των σπόρων στις μικρές γλάστρες το φυτικό υπόστρωμα προετοιμάστηκε κατάλληλα με τη χρήση διαφορετικών θρεπτικών. Κατά το πρώτο πότισμα χρησιμοποιήθηκε 25% του εκάστοτε θρεπτικού διαλύματος, για κάθε συνθήκη και μετέπειτα το 100%. Μέχρι το πέρας των ημερών για τη δειγματοληψία γινόταν πότισμα με απιονισμένο νερό και το κατάλληλο θρεπτικό διάλυμα εναλλάξ.

2.8.1 1^ο Πείραμα: Μελέτη της επίδρασης του FSK στη φυματογένεση στα φυτά *L. jaronicus* με τη χρήση διαφορετικών θρεπτικών διαλυμάτων

Οι φυτικές σειρές που χρησιμοποιήθηκαν περιλάμβαναν φυτά *L. Jaronicus* αγρίου τύπου αλλά και μεταλλαγμένα με σίγηση του γονιδίου *AMY2*. Κάθε συνθήκη είχε τρεις επαναλήψεις. Παρακάτω είναι οι πίνακες των θρεπτικών διαλυμάτων που χρησιμοποιήθηκαν για το πείραμα.

Πίνακας 1: Θρεπτικά διαλύματα που χρησιμοποιήθηκαν για το πότισμα των φυτών χωρίς την επιμόλυνση ριζοβίου.

Διάλυμα Hoagland	Συγκέντρωση	Όγκος	Διάλυμα M Medium	Όγκος
MgSO₄ 7H₂O	1M	2ml	Macroelements	100 ml
KH₂PO₄	1 M	1ml	Ca(NO ₃) ₂ 4H ₂ O	100 ml
FeEDTA	0,1M	1ml	NaFeEDTA	5ml
Microelements		1ml	Vitamins	5ml
KNO₃	2M	5ml	NaI	1ml
Ca(NO₃)₂ 4H₂O	0.1M	5ml	KCl	5ml
			Micronutrients	1ml

Τα θρεπτικά διαλύματα που παρασκευάστηκαν μεταφέρθηκαν σε ογκομετρικούς κυλίνδρους και προστέθηκε νερό μέχρι ο όγκος να φτάσει το 1L.

Πίνακας 2: Θρεπτικά διαλύματα που χρησιμοποιήθηκαν για το πότισμα των φυτών με επιμόλυνση ριζοβίου.

Διάλυμα Hoagland -N ₂	Συγκέντρωση	Όγκος	Διάλυμα M Medium- N ₂	Όγκος
MgSO₄ & H₂O	1M	2ml	Macroelements -N	100 ml
KH₂PO₄	1 M	1ml	NaFeEDTA	5ml
FeEDTA	0,1M	1ml	Vitamins	5ml
Microelements		1ml	Micronutrients	1ml
CaCl₂	0,5M	10ml	NaI	5ml
KCl	1M	5ml	CaCl ₂	5ml

Τα θρεπτικά διαλύματα που παρασκευάστηκαν μεταφέρθηκαν σε ογκομετρικούς κυλίνδρους και προστέθηκε νερό μέχρι ο όγκος να φτάσει το 1L.

Πίνακας 3: Συνθήκες Ανάπτυξης WT και MT φυτών *L.jaronicus* με δύο διαφορετικά θρεπτικά και επιμόλυνση με τον ενδοφυτικό μύκητα Fsk και το ριζόβιο, *M. loti*.

Fsk ⁻ /M.loti ⁻	Fsk ⁻ /M.loti ⁺	Fsk ⁺ /M.loti ⁻	Fsk ⁺ /M.loti ⁺
M Medium	M Medium -N ₂	M Medium	M Medium-N ₂
Hoagland	Hoagland-N ₂	Hoagland	Hoagland-N ₂
WT	WT	WT	WT
Mutant	Mutant	Mutant	Mutant

Στο θάλαμο ανάπτυξης τα φυτά ποτίζονταν ανά 2 μέρες ανάλογα με τις ανάγκες κάθε φυτού με απιονισμένο νερό αλλά και με το κατάλληλο θρεπτικό διάλυμα. Δηλαδή ανάλογα με τη συνθήκη που είχε επιλεχθεί για την ανάπτυξη των φυτών έγινε διαχωρισμός στα θρεπτικά, και, πιο συγκεκριμένα τα φυτά που είχαν επιμολυνθεί με ριζόβιο απαιτούσαν πότισμα με θρεπτικό διάλυμα χωρίς άζωτο. Ακόμη τα φυτά είχαν χωριστεί σε δύο διαφορετικές συνθήκες ποτίσματος.

2.8.2 2^ο Πείραμα: Μελέτη επίδρασης της χρήσης διαφορετικών θρεπτικών διαλυμάτων στην ικανότητα αποικισμού του Fsk σε φυτικές σειρές *L. jaronicus*

Οι φυτικές σειρές που χρησιμοποιήθηκαν περιλάμβαναν φυτά *L. jaronicus* αγρίου τύπου. Κάθε συνθήκη του πειράματος περιελάμβανε πέντε βιολογικές επαναλήψεις. Παρακάτω είναι οι πίνακες των θρεπτικών διαλυμάτων που χρησιμοποιήθηκαν για το πείραμα.

Πίνακας 4: Θρεπτικό διάλυμα Hoagland (1L), Θρεπτικό διάλυμα M Medium (1L)

Διάλυμα Hoagland	Συγκέντρωση	Όγκος	Διάλυμα M Medium	Όγκος
MgSO₄ 7H₂O	1M	2ml	Macroelements	100 ml
KH₂PO₄	1 M	1ml	Ca(NO ₃) ₂ 4H ₂ O	100 ml
FeEDTA	0,1M	1ml	NaFeEDTA	5ml
Microelements		1ml	Vitamins	5ml
KNO₃	2M	5ml	NaI	1ml
Ca(NO₃)₂ 4H₂O	0.1M	5ml	KCl	5ml
			Micronutrients	1ml

Τα διαλύματα αραιώθηκαν σε ογκομετρικούς κυλίνδρους μέχρι ο όγκος τους να φτάσει το 1L.

Πίνακας 5: Θρεπτικό διαλύματα M Medium χωρίς Vitamins (1L), Θρεπτικό διαλύματα M Medium χωρίς NaI (1L), Θρεπτικό διαλύματα M Medium χωρίς Vitamins και NaI (1L)

Διάλυμα	Όγκος	Διάλυμα	Όγκος	Διάλυμα	Όγκος
Macroelements	100 ml	Macroelements	100 ml	Macroelements	100 ml
Ca(NO ₃) ₂ 4H ₂ O	100 ml	Ca(NO ₃) ₂ 4H ₂ O	100 ml	Ca(NO ₃) ₂ 4H ₂ O	100 ml
NaFeEDTA	5ml	NaFeEDTA	5ml	NaFeEDTA	5ml
NaI	1ml	Vitamins	5ml	KCl	5ml
KCl	5ml	KCl	5ml	Micronutrients	1ml
Micronutrients	1ml	Micronutrients	1ml		

Πίνακας 6: Συνθήκες Ανάπτυξης με πέντε διαφορετικά για τα WT φυτά και MT φυτά *Lotus japonicus* με επιμόλυνση του ενδοφυτικού μύκητα *FsK* και χωρίς επιμόλυνση.

Hoagland	M Medium χωρίς Vitamins	M Medium χωρίς NaI	M Medium χωρίς Vitamins and NaI	M Medium
WT <i>FsK</i> ⁺ x5	WT <i>FsK</i> ⁺ x5	WT <i>FsK</i> ⁺ x5	WT <i>FsK</i> ⁺ x5	WT <i>FsK</i> ⁺ x5
WT <i>FsK</i> ⁻ x5	WT <i>FsK</i> ⁻ x5	WT <i>FsK</i> ⁻ x5	WT <i>FsK</i> ⁻ x5	WT <i>FsK</i> ⁻ x5

2.9 Δειγματοληψία

Έπειτα από το πέρας των 21 ημερών για το 1^ο Πείραμα και 4 ημερών για το 2^ο Πείραμα πραγματοποιήθηκε η δειγματοληψία, προκειμένου να συλλεχθεί ο κατάλληλος ιστός από τον οποίο μπορεί να απομονωθεί το DNA και το RNA του φυτού, για να επιβεβαιωθεί η επιμόλυνση του μύκητα αλλά και να ελεγχθεί η έκφραση των επιλεγμένων γονιδίων. Ακολούθως έγινε η μεταφορά των μικρών γλαστρών από τον θάλαμο ανάπτυξης, ώστε να απομακρυνθούν τα φυτά από το χώμα και να ξεπλυθούν προσεκτικά σε απιονισμένο νερό. Στη συνέχεια, διαχωρίστηκε το υπέργειο τμήμα και οι ρίζες του φυτού και οι εκάστοτε ιστοί αποθηκεύτηκαν σε eppendorfs, ώστε να μετακινηθούν στους καταψύκτες στους -80°C για διατήρηση για μελλοντική μελέτη γονιδίων και δημιουργία βιβλιοθήκης.

Μετά το διαχωρισμό των δειγμάτων από τους ιστούς των φυτών πραγματοποιήθηκε μέτρηση του βάρους της ρίζας αλλά και του υπέργειου τμήματος για πιθανή μελλοντική χρήση των δεδομένων. Όσο αφορά το 2^ο Πείραμα, έγινε μία επιπλέον δειγματοληψία στις 2 ημέρες, για τη μελλοντική μελέτη του αποικισμού του *FsK* κατά τα πρώιμα στάδια της αλληλεπίδρασης του φυτού με τον ενδοφυτικό μύκητα *FsK*. Τέλος για το 1^ο Πείραμα μελετήθηκε η επίδραση της επιμόλυνσης του *FsK* στην ανάπτυξη φυματίων στις ρίζες των φυτών *L. japonicus*. Για το λόγο αυτό, έπειτα από την πλύση των φυτών, τα φυτά

απομονώθηκαν και κάθε τριχίδιο της ρίζας παρατηρήθηκε διεξοδικά. Ακολούθησε η καταμέτρηση των φυματίων στο ριζικό σύστημα των φυτών και η καταγραφή των παρατηρήσεων.

2.10 Απομόνωση DNA για τον έλεγχο αποικισμού του *FsK* στα φυτά *L. jaronicus* με εκκινητές που στόχευαν το γονίδιο ITS του μύκητα

Με Τη Χρήση Της Μεθόδου CTAB έγινε απομόνωση του DNA για το 2^ο Πείραμα.

1. Προθέρμανση του διαλύματος CTAB buffer (100mM Tris-Cl pH=8.0, 20mM EDTA pH=8, 1,4M NaCl, 2% w/v CTAB, 1% w/v PVP 40000) στους 65°C στο υδατόλουτρο
2. Λειοτριβίση του ιστού σε υγρό άζωτο με τη χρήση αποστειρωμένου εμβόλου
3. Προσθήκη 100μl CTAB buffer και 1μl μερκαπτοαιθανόλης σε κάθε erpedorf
4. Επώαση για 15 λεπτά στους 65°C στο υδατόλουτρο.
5. Προσθήκη 150μl χλωροφόρμιου και 1:25 ισοαμλική αλκοόλη και vortex
6. Φυγοκέντρηση για 5 λεπτά στις 11.000 στροφές ανά λεπτό
7. Μεταφορά του υδατικού υπερκειμένου σε νέο erpedorf και προσθήκη σε αυτό 0,7 νοί ισοπροπανόλης
8. Ήπια ανάδευση για 10 λεπτά σε θερμοκρασία δωματίου
9. Φυγοκέντρηση για 15 λεπτά στις 11.000 στροφές ανά λεπτό
10. Αφαίρεση υπερκειμένου και προσθήκη 0,5ml παγωμένης αιθανόλης 70%
11. Φυγοκέντρηση για 5 λεπτά στις 11.000 στροφές ανά λεπτό ξηράθηκε στους 50 °C για 15 λεπτά
12. Επαναδιάλυση του DNA σε 15μl ddH₂O με RNase (1μl RNase σε 50μl ddH₂O).
13. Επώαση στο πάγο για 10 λεπτά
14. Vortex και quick spin για 10 δευτερόλεπτα
15. Μεταφορά για διατήρηση στους -80°C

2.11 Ποσοτικοποίηση DNA

Το ολικό DNA που απομονώθηκε για από το ριζικό ιστό κάθε δείγματος των φυτών *L. jaronicus* με τη χρήση της μεθόδου CTAB ποσοτικοποιήθηκε με τη χρήση της συσκευής Qubit (Invitrogen) σύμφωνα με τις οδηγίες του κατασκευαστή.

Ακολουθήθηκε η παρακάτω διαδικασία:

1. Παρασκευή ενός Master Mix το οποίο περιλαμβάνει: 1μl dye και 199μl buffer του kit για κάθε δείγμα
2. Κάλυψη του Master Mix με αλουμινόχαρτο (φωτοευαισθησίας της χρώσης)
3. Προσθήκη 2μl από κάθε δείγμα
4. Ανάμειξη με το προηγούμενο μείγμα για τελικό όγκο 200μl
5. Επώαση για 2 λεπτά σε θερμοκρασία δωματίου

6. Χρήση των Stantard διαλυμάτων που περιλαμβάνονται στο kit για την δημιουργία πρότυπης καμπύλης (10 μl + 190μl απο το Master Mix)
7. Χρήση της συσκευής Qubit για ποσοτικοποίηση του DNA

2.12 Απομόνωση RNA για μελλοντική μελέτη γονιδίων που εμπλέκονται στη φυματογένεση

1. Λειοτριβίση του ιστού σε υγρό άζωτο και αποθηκεύτηκε μέρος του ιστού σε ένα άλλο erpedorf
2. Προσθήκη 300μl extraction buffer
3. Vortex και προσθήκη 300μl PIC πάλι vortex για μισό λεπτό
4. Φυγοκέντρηση για πέντε λεπτά στις 11.000 στροφές ανά λεπτό
5. Μεταφορά την πάνω φάσης σε ένα νέο erpedorf και η προσθήκη 300μl PIC
6. Vortex και φυγοκέντρηση για πέντε λεπτά στις 11.000 στροφές ανά λεπτό
7. Προσθήκη όγκου CH₃COONa επί τρεις φορές του όγκου του διαλύματος σε erpedorf και επί 1 ο όγκος του σε ισοπροπανόλη
8. Ήπια ανάδευση και φυγοκέντρηση για δεκαπέντε λεπτά στις 11.000 στροφές ανά λεπτό
9. Διάλυση της παλέτας που δημιουργήθηκε μέσα σε 562,5μl 10T/10^E και προσθήκη 187,5μl 8M LiCl
10. Μεταφορά σε ψυγείο για μία μέρα στους 4°C
11. Φυγοκέντρηση για δεκαπέντε λεπτά στις 11.000 στροφές ανά λεπτό
12. Πλύσιμο παλέτας με 500μl 70% αιθανόλης
13. Φυγοκέντρηση για δεκαπέντε λεπτά στις 11.000 στροφές ανά λεπτό
14. Επαναδιάλυση της παλέτας σε όγκο νερού με 15μl
15. Μεταφορά για διατήρηση στους -80°C

2.13 Έλεγχος αποικισμού FsK στις ρίζες του *L. jaronicus*

Ο έλεγχος αποικισμού στις ρίζες του *L. jaronicus* από τον ενδοφυτικό μύκητα FsK πραγματοποιήθηκε με την ενίσχυση του γονιδίου ITS του μύκητα. Αρχικά έγινε η απομόνωση DNA από τους ιστούς του ριζικού συστήματος των φυτών με τη μέθοδο CTAB, προκειμένου να συλλεχθεί επιτυχώς το δείγμα για περαιτέρω αναλύσεις. Ακολούθως επιβεβαιώθηκε ο αποικισμός μέσω της μεθόδου αλυσιδωτής αντίδρασης πολυμεράσης πραγματικού χρόνου (Real Time PCR) ή ποσοτικής αλυσιδωτής αντίδρασης πολυμεράσης (qPCR). Σε αυτό το πείραμα οι εκκινητές που χρησιμοποιήθηκαν και στόχευαν το γονίδιο ITS του μύκητα είναι οι παρακάτω:

ITS-F TAGGGTAGCTGGGTCTGACT

ITS-R ACCAAGTCTAACCCGCCTAC

Για την qPCR ακολουθήθηκε η παρακάτω διαδικασία:

1. 5μl Mix SYBR για κάθε δείγμα
2. Προσθήκη 0,2μl από τον κάθε εκκινητή, Forward και Reverse, και 3,6μl ddH₂O.
3. Παρασκευή Master Mix με τα απαραίτητα αντιδραστήρια για όλα τα δείγματα, τους δείκτες της πρότυπης καμπύλης, οι αρνητικοί μάρτυρες, καθώς και για 2 επιπλέον δείγματα.

Κάθε αντίδραση πραγματοποιήθηκε σε τελικό όγκο 10μl από τα οποία τα 9μl ήταν από το Master Mix και το 1μl ήταν από το δείγμα DNA του ιστού. Το κάθε δείγμα είχε 2 τεχνικές επαναλήψεις, οι δείκτες της πρότυπης καμπύλης είχαν 3 τεχνικές επαναλήψεις όπως και οι αρνητικοί μάρτυρες. Έπειτα υπολογίστηκε ο αριθμός των αντιγράφων του ITS ανά 1ng DNA για το κάθε δείγμα με τη βοήθεια των αποτελεσμάτων της qPCR, προκειμένου να επιβεβαιωθεί ο αποικισμός του ενδοφυτικού μύκητα Fsk στις ρίζες του φυτού.

Το θερμοκρασιακό πρωτόκολλο το οποίο ακολουθήθηκε για την πραγματοποίηση της αντίδρασης qPCR περιλάμβανε 44 κύκλους των ακόλουθων βημάτων:

1. 15 δευτερόλεπτα στους 95°C για αποδιάταξη
2. 20 δευτερόλεπτα στους 58°C για υβριδοποίηση των εκκινητών και επιμήκυνση
3. 5 δευτερόλεπτα στους 58°C και 5 δευτερόλεπτα στους 90°C για μία melting curve analysis για την επιβεβαίωση της εξειδίκευσης των προϊόντων της αντίδρασης

3. ΑΠΟΤΕΛΕΣΜΑΤΑ

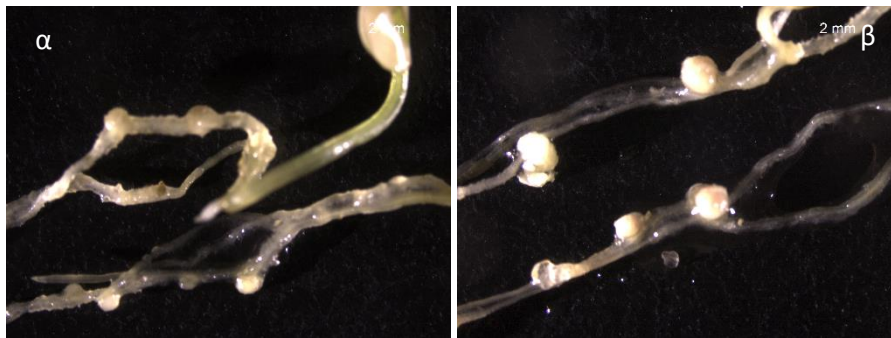
Για την εξαγωγή αποτελεσμάτων χρησιμοποιήθηκαν τα δεδομένα που συλλέχθηκαν, ύστερα από τη διαδικασία των δειγματοληψιών. Ο υπολογισμός του μέσου όρου για το μήκος και το βάρος της ρίζας, το βάρος του βλαστού, αλλά και ο αριθμός των φυματίων καταγράφηκαν και παρουσιάζονται παρακάτω. Αναφορικά με την ποσοτικοποίηση των δειγμάτων DNA, έγινε με τη βοήθεια του Qubit για την κανονικοποίηση των δεδομένων αποικισμού της ρίζας από τον ενδοφυτικό μύκητα FSK.

3.1 1^ο Πείραμα: Μελέτη της επίδρασης του FSK στη φυματιογένεση στα φυτά *L. jaronicus* με τη χρήση διαφορετικών θρεπτικών διαλυμάτων

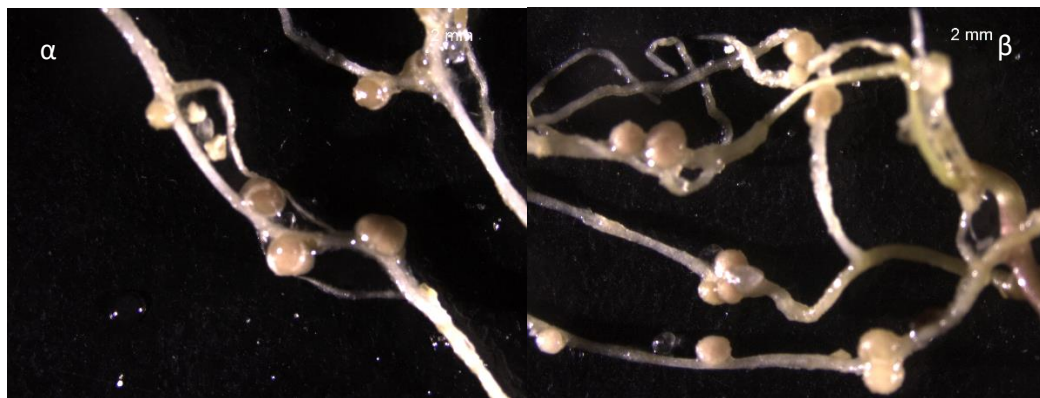
Το 1^ο Πείραμα σχετίζεται με την απάντηση στο πρώτο ερώτημα που τέθηκε κατά την εκπόνηση της πτυχιακής εργασίας. Μελετήθηκε η επίδραση του στελέχους FSK στη φυματιογένεση σε φυτά *L. jaronicus* και πιο συγκεκριμένα σε φυτά τα οποία είχαν μετάλλαξη στο γονίδιο *AMY2*. Για το λόγο αυτό, για το πείραμα που ακολούθησε χρησιμοποιήθηκαν σειρές φυτών με τη μετάλλαξη αλλά και αγρίου τύπου, για να έχουμε συγκρίσιμα αποτελέσματα και μικρές γλάστρες με χώμα το οποίο ποτίζονταν εναλλάξ με απιονισμένο νερό και με διαφορετικά θρεπτικά διαλύματα. Η συμβολή του ενδοφυτικού μύκητα FSK στη διαδικασία σχηματισμού φυματίων μελετήθηκε με την καταμέτρηση του αριθμού των φυματίων, αλλά και την καταγραφή και την ανάλυση φαινοτυπικών χαρακτηριστικών των φυτών όπως το μήκος της ρίζας και το βάρος της ρίζας και του βλαστού των φυτών. Τα δείγματα αποθηκεύτηκαν στους -80°C, έπειτα από απομόνωση RNA, προκειμένου να χρησιμοποιηθούν για τη μελέτη έκφρασης γονιδίων που σχετίζονται με τη διαδικασία της φυματιογένεσης. Τα φυτά υποβλήθηκαν σε διαφορετικές συνθήκες ανάπτυξης με τη χρήση δύο θρεπτικών διαλυμάτων Hoagland και M Medium, τη συν-επιμόλυνση ριζοβίου και μύκητα. Τα διαγράμματα και οι εικόνες που ακολουθούν αντικατοπτρίζουν τα αποτελέσματα από τις αναλύσεις.

3.1.1 Καταμέτρηση αριθμού φυματίων στα WT και στα MT φυτά *L. jaronicus*

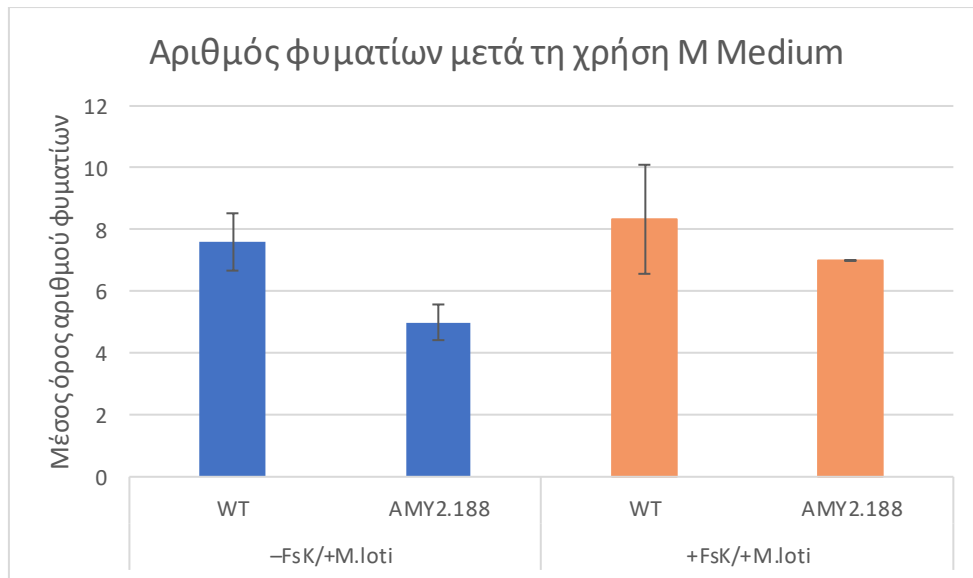
Η μελέτη της επίδρασης της επιμόλυνσης του ενδοφυτικού μύκητα FSK στη διαδικασία σχηματισμού φυματίων περιλάμβανε την καταμέτρηση και την καταγραφή του αριθμού των φυματίων, καθώς και του διαχωρισμού τους σε ώριμα και ανώριμα. Η διαδικασία αυτή πραγματοποιήθηκε μετά το πέρας των 21 ημερών κατά τη διαδικασία της δειγματοληψίας. Κατά τον υπολογισμό του μέσου όρου του αριθμού των φυματίων συνυπολογίστηκαν μόνο τα ώριμα φυμάτια.



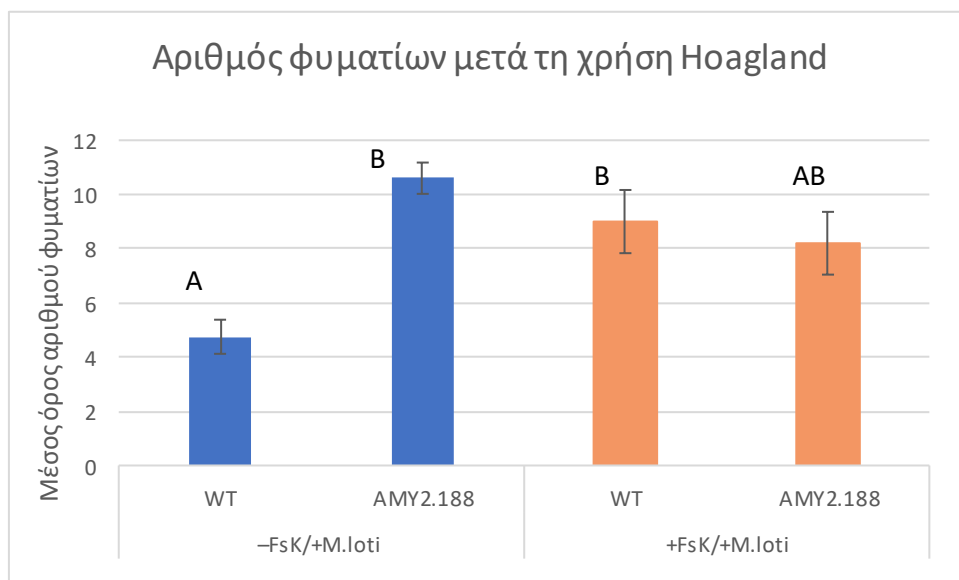
Εικόνα 9: Απεικόνιση φυματίων στους ιστούς ρίζας των WT φυτών *L. jaronicus* με τη χρήση *M Medium*. Έπειτα από τη δειγματοληψία, μετά το πέρας των 21 ημερών, ακολούθησε η καταμέτρηση και η καταγραφή του αριθμού των φυματίων και η λήψη φωτογραφιών με τη χρήση ηλεκτρονικού μικροσκοπίου. α) Στην εικόνα φαίνεται ο αριθμός φυματίων σε WT φυτά *L. jaronicus* τα οποία είχαν ποτιστεί με το θρεπτικό διάλυμα *M Medium* σε συνθήκη επιμόλυνσης με το ριζόβιο *M. loti* χωρίς την παρουσία του ενδοφυτικού μύκητα *Fsk*. β) Στην εικόνα φαίνεται ο αριθμός φυματίων σε WT φυτά *L. jaronicus* τα οποία είχαν ποτιστεί με το θρεπτικό διάλυμα *M Medium* σε συνθήκη συν-επιμόλυνσης με το στέλεχος του μύκητα *Fsk* και το ριζόβιο *M. loti*.



Εικόνα 10: Απεικόνιση φυματίων στους ιστούς ρίζας των φυτών με τη μετάλλαξη στο γονίδιο *AMY2* με τη χρήση *Hoagland*. Έπειτα από τη δειγματοληψία, μετά το πέρας των 21 ημερών, ακολούθησε η καταμέτρηση και η καταγραφή του αριθμού των φυματίων και η λήψη φωτογραφιών με τη χρήση ηλεκτρονικού μικροσκοπίου. α) Στην εικόνα φαίνεται ο αριθμός φυματίων σε φυτά *L. jaronicus* τα οποία είχαν ποτιστεί με το θρεπτικό διάλυμα *Hoagland* σε συνθήκη επιμόλυνσης με το ριζόβιο *M. loti* χωρίς την παρουσία του ενδοφυτικού μύκητα *Fsk*. β) Στην εικόνα φαίνεται ο αριθμός φυματίων σε φυτά *L. jaronicus* τα οποία είχαν ποτιστεί με το θρεπτικό διάλυμα *Hoagland* σε συνθήκη συν-επιμόλυνσης με το στέλεχος του μύκητα *Fsk* και το ριζόβιο *M. loti*.



Εικόνα 11: Η επίδραση του αποικισμού του ριζικού συστήματος από το μύκητα *FsK* στον αριθμό φυματίων με τη χρήση του θρεπτικού διαλύματος *M Medium*. Η καταμέτρηση του αριθμού των φυματίων έγινε έπειτα από το πέρας των 21 ημερών. Οι συνθήκες οι οποίες συγκρίνονται σε αυτό το διάγραμμα περιλαμβάνουν: επιμολυσμένα με ριζόβιο *M. loti* και φυτά με συν-επιμόλυνση μύκητα και ριζοβίου. Τα δεδομένα είναι ο μέσος όρος από 2 τεχνικές επαναλήψεις που η κάθε μία αποτελείται από 3 βιολογικές επαναλήψεις. Πραγματοποιήθηκε ανάλυση δεδομένων τη μέθοδο two way ANOVA και προέκυψε στατιστικά μη σημαντική διαφορά.



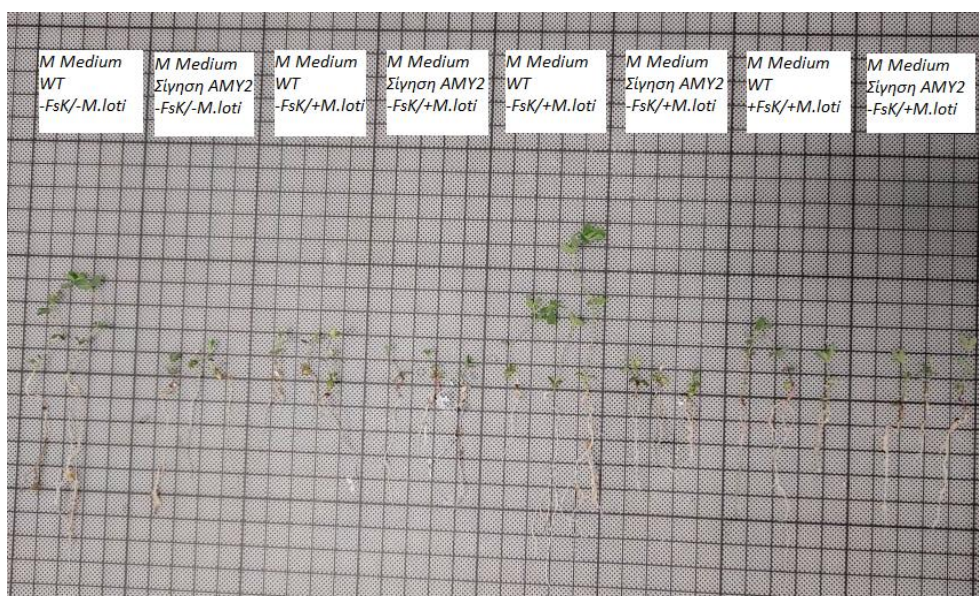
Εικόνα 12: Η επίδραση του αποικισμού του ριζικού συστήματος από το μύκητα *FsK* στον αριθμό φυματίων με τη χρήση του θρεπτικού διαλύματος *Hoagland*. Η καταμέτρηση του αριθμού των φυματίων έγινε έπειτα από το πέρας των 21 ημερών. Οι συνθήκες οι οποίες συγκρίνονται σε αυτό το διάγραμμα περιλαμβάνουν: επιμολυσμένα με ριζόβιο *M. loti* και φυτά με συν-επιμόλυνση μύκητα και ριζοβίου. Τα δεδομένα είναι ο μέσος όρος από 2 τεχνικές επαναλήψεις που η κάθε μία αποτελείται από 3 βιολογικές επαναλήψεις. Πραγματοποιήθηκε ανάλυση δεδομένων τη μέθοδο two way ANOVA και προέκυψε στατιστικά σημαντική διαφορά.

Στην περίπτωση χρήσης του θρεπτικού διαλύματος M Medium ο αριθμός των φυματίων δεν διαφοροποιούνταν με στατιστικά σημαντική διαφορά μεταξύ των συνθηκών επιμόλυνσης με τον ενδοφυτικό μύκητα FsK αλλά και μεταξύ των δύο διαφορετικών φυτικών σειρών. Αντιθέτως στην περίπτωση χρήσης του θρεπτικού διαλύματος Hoagland τα αποτελέσματα εμφάνισαν στατιστικά σημαντική διαφορά. Απουσία επιμόλυνσης με FsK ο αριθμός των φυματίων αυξήθηκε στις φυτικές σειρές με τη σίγηση του γονιδίου *AMY2* σε σχέση με τα WT, ενώ μειώθηκε παρουσία της επιμόλυνσης του FsK. Συγκρίνοντας τα WT φυτά στις συνθήκες επιμόλυνσης είναι εμφανές ότι ο αριθμός τους αυξήθηκε κατά τη συνθήκη συν-επιμόλυνσης μύκητα και ριζοβίου.

3.1.2 Καταγραφή δεδομένων ρίζας αριθμού στα WT και στα MT φυτά *L. japonicus*

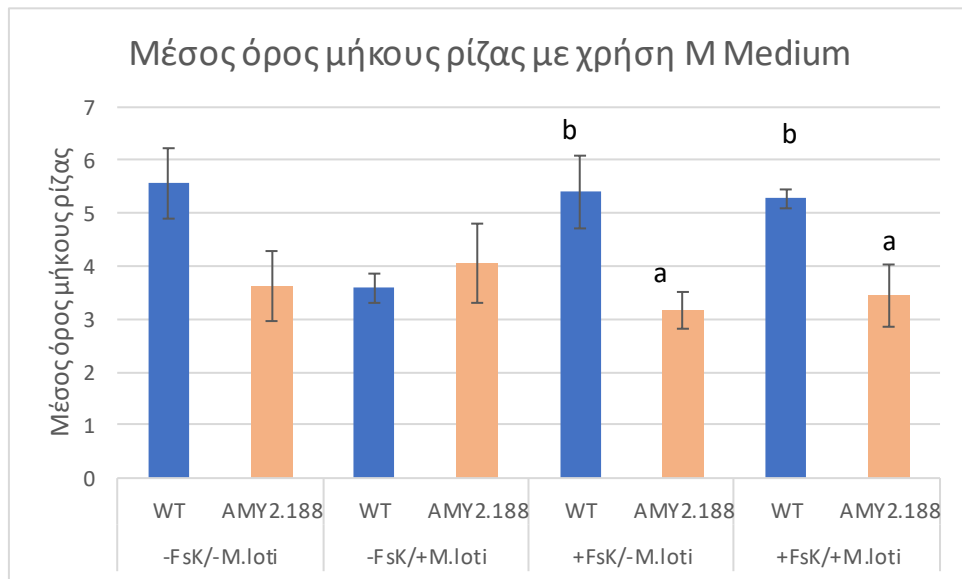
3.1.2.1 Καταγραφή μήκους ρίζας αριθμού στα WT και στα MT φυτά *L. japonicus*

Για τη μελέτη της επίδρασης της επιμόλυνσης του ενδοφυτικού μύκητα FsK στη διαδικασία φυματογένεσης καταγράφηκαν τα δεδομένα του μήκους ρίζας στα φυτά. Έπειτα από το πέρας των 21 ημερών κατά τη δειγματοληψία απομακρύνθηκαν διάφορες ίνες από τα φυτά με τη χρήση απιονισμένου νερού και ακολούθησε η μεταφορά τους σε έναν πίνακα που χρησιμοποιείται για τις μετρήσεις. Κάθε κουτάκι αντιστοιχεί σε 1 εκατοστό.

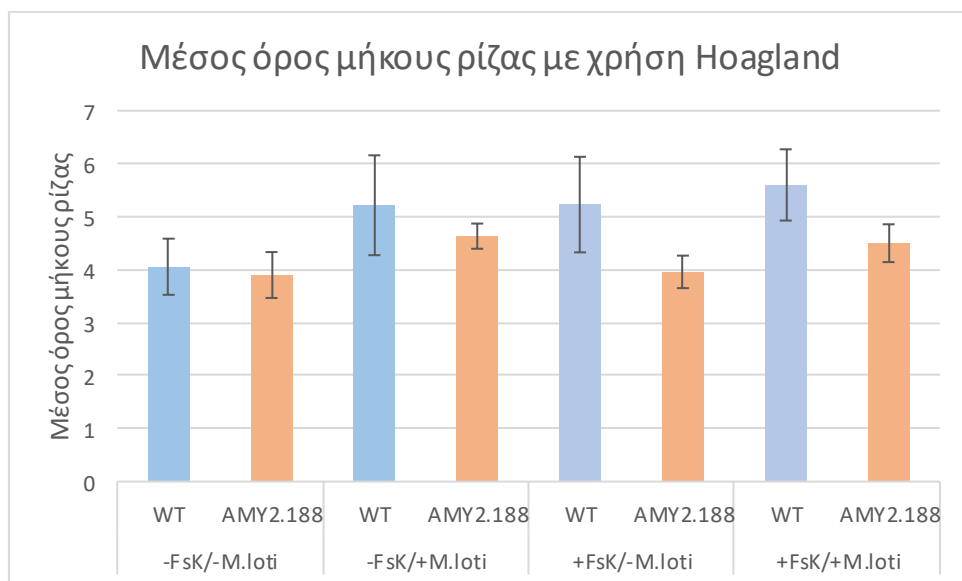


Εικόνα 13: Απεικόνιση δειγμάτων από τα φυτά *L. japonicus* αγρίου τύπου WT και με σίγηση του γονιδίου *AMY2*, έπειτα από τη χρήση θρεπτικού διαλύματος M Medium για καταγραφή του μήκους της ρίζας. Έπειτα από το πέρας 21 ημερών πραγματοποιήθηκε η δειγματοληψία κατά την οποία παρατηρήθηκαν και καταγράφηκαν φαινοτυπικά χαρακτηριστικά που στη συγκεκριμένη περίπτωση αφορούσαν το μήκος της ρίζας

του κάθε φυτού. Οι συνθήκες ανάπτυξης για τα φυτά WT και MT περιλαμβάνουν: μη επιμολυσμένα φυτά, επιμόλυνση με ριζόβιο *M. loti*, επιμόλυνση με το στέλεχος του μύκητα *FsK*, συν-επιμόλυνση μύκητα και ριζοβίου.

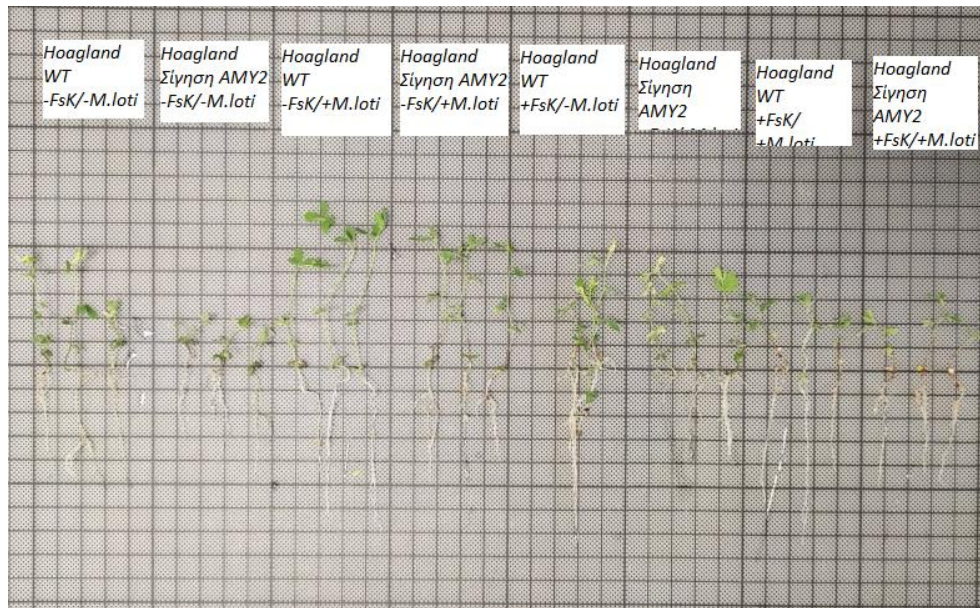


Εικόνα 14: Η επίδραση του αποικισμού του ριζικού συστήματος από το μύκητα *FsK* στο μήκος της ρίζας των φυτών τα οποία αναπτύχθηκαν σε θρεπτικό *M Medium*. Κατά τη δειγματοληψία έγινε η μέτρηση του μήκους της ρίζας. Οι συνθήκες οι οποίες συγκρίνονται σε αυτό το διάγραμμα περιλαμβάνουν μη επιμολυσμένα φυτά, επιμολυσμένα με ριζόβιο *M. loti*, επιμολυσμένα με το στέλεχος του μύκητα *FsK*, συν-επιμόλυνση μύκητα και ριζοβίου. Οι τιμές κανονικοποιούνται ως προς τα pg του ολικού DNA. Τα δεδομένα είναι ο μέσος όρος από 2 τεχνικές επαναλήψεις που η κάθε μία αποτελείται από 3 βιολογικές επαναλήψεις. Πραγματοποιήθηκε ανάλυση δεδομένων τη μέθοδο two way ANOVA και προέκυψε στατιστικά σημαντική διαφορά στις συνθήκες επιμόλυνσης με *FsK*.



Εικόνα 15: Η επίδραση του αποικισμού του ριζικού συστήματος από το μύκητα *FsK* στο μήκος της ρίζας των φυτών τα οποία αναπτύχθηκαν σε θρεπτικό *Hoagland*. Κατά τη δειγματοληψία έγινε η μέτρηση του μήκους της ρίζας. Οι συνθήκες οι οποίες συγκρίνονται σε αυτό το διάγραμμα περιλαμβάνουν μη επιμολυσμένα φυτά, επιμολυσμένα με ριζόβιο *M. loti*, επιμολυσμένα με το στέλεχος του μύκητα *FsK*, συν-επιμόλυνση μύκητα και

ριζοβίου. Τα δεδομένα είναι ο μέσος όρος από 2 τεχνικές επαναλήψεις που η κάθε μία αποτελείται από 3 βιολογικές επαναλήψεις. Πραγματοποιήθηκε ανάλυση δεδομένων τη μέθοδο two way ANOVA και προέκυψε στατιστικά μη σημαντική διαφορά.

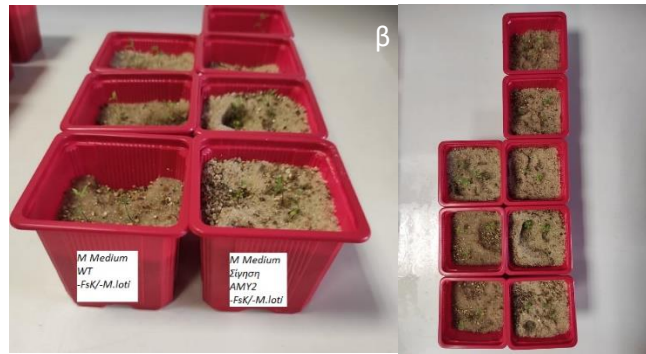


Εικόνα 16: Απεικόνιση δειγμάτων από τα φυτά *L. japonicus* αγρίου τύπου WT και με σίγηση του γονιδίου AMY2, έπειτα από τη χρήση θρεπτικού διαλύματος Hoagland για καταγραφή του μήκους της ρίζας. Έπειτα από το πέρασ 21 ημερών πραγματοποιήθηκε η δειγματοληψία κατά την οποία παρατηρήθηκαν και καταγράφηκαν φαινοτυπικά χαρακτηριστικά που στη συγκεκριμένη περίπτωση αφορούσαν το μήκος της ρίζας του κάθε φυτού. Οι συνθήκες ανάπτυξης για τα φυτά WT και MT περιλαμβάνουν: μη επιμόλυσμένα φυτά, επιμόλυνση με ριζόβιο *M. loti*, επιμόλυνση με το στέλεχος του μύκητα *FsK* και με το ριζόβιο *M. loti*, συν-επιμόλυνση μύκητα και ριζοβίου.

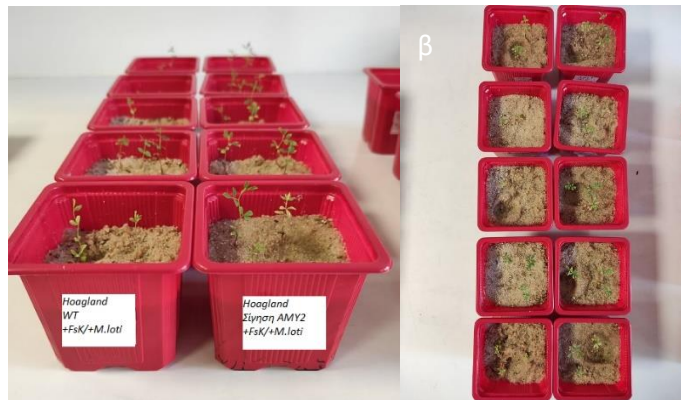
Κατά τη χρήση του διαλύματος M Medium ως θρεπτικό για την ανάπτυξη των φυτών το μήκος της ρίζας των φυτών WT και των φυτών με τη σίγηση AMY2 διαφοροποιούνταν με στατιστικά σημαντική διαφορά στις συνθήκες επιμόλυνσης με το μύκητα *FsK*. Πιο συγκεκριμένα στα διαγονιδιακά φυτά το μήκος της ρίζας τους μειωνόταν σε σχέση με του αγρίου τύπου παρουσία του ενδοφυτικού μύκητα. Στην περίπτωση χρήσης του θρεπτικού διαλύματος Hoagland τα αποτελέσματα εμφάνισαν στατιστικά μη σημαντική διαφορά.

3.1.2.2 Καταγραφή του βάρους της ρίζας στα WT και στα MT φυτά *L. japonicus*

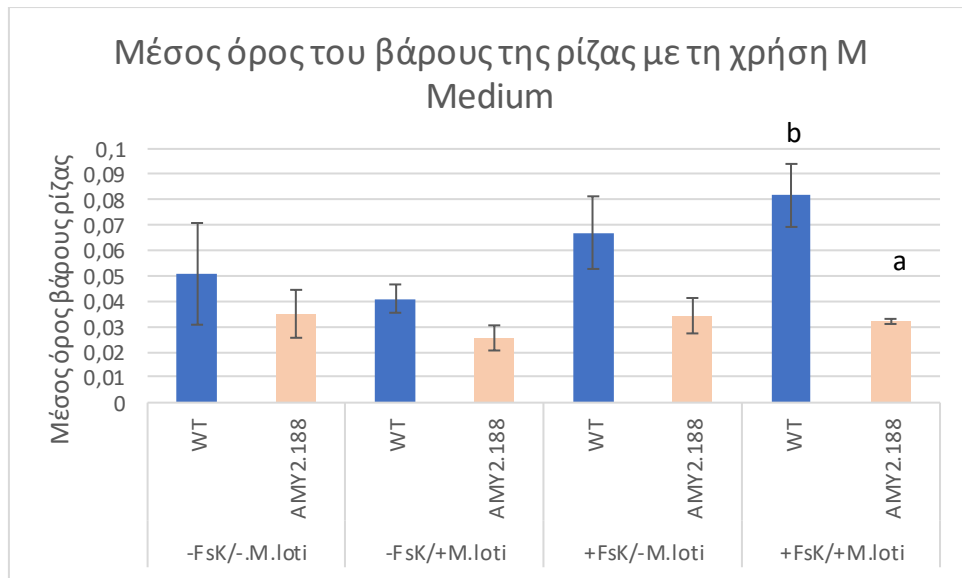
Έπειτα από τη μέτρηση του μήκους της ρίζας επιτεύχθηκε ο διαχωρισμός του ριζικού και του υπέργειου τμήματος των φυτών. Στη συνέχεια ο ιστός του ριζικού συστήματος αποθηκεύτηκε σε erpedorfs και διατηρήθηκε στους -80°C για την απομόνωση γενετικού υλικού σε μεταγενέστερη περίοδο.



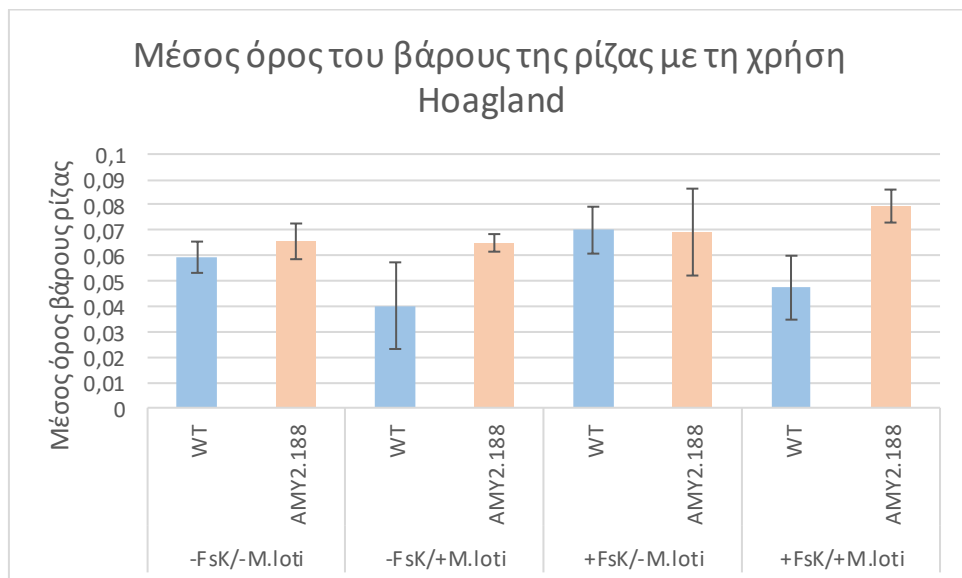
Εικόνα 17: Απεικόνιση δειγμάτων φυτών *L. jaronicus* αγρίου τύπου *WT* και με σίγηση του γονιδίου *AMY2*, έπειτα από τη χρήση θρεπτικού διαλύματος *M Medium* χωρίς επιμόλυνση. Έπειτα από το πέρας 21 ημερών πραγματοποιήθηκε η δειγματοληψία, προκειμένου να συλλεχθούν οι ιστοί για την ανάλυση δεδομένων. Στις εικόνες φαίνονται οι συνθήκες ανάπτυξης φυτών χωρίς επιμόλυνση. α) Στην εικόνα φαίνεται η σύγκριση των δύο συνθηκών μεταξύ *WT* και *MT* φυτών. β) Κατακόρυφη απεικόνιση των δειγμάτων.



Εικόνα 18: Απεικόνιση δειγμάτων φυτών *L. jaronicus* αγρίου τύπου *WT* και με σίγηση του γονιδίου *AMY2*, έπειτα από τη χρήση θρεπτικού διαλύματος *Hoagland* με συν-επιμόλυνση μύκητα και ριζοβίου. Έπειτα από το πέρας 21 ημερών πραγματοποιήθηκε η δειγματοληψία, προκειμένου να συλλεχθούν οι ιστοί για την ανάλυση δεδομένων. Στις εικόνες φαίνονται οι συνθήκες ανάπτυξης φυτών χωρίς επιμόλυνση. α) Στην εικόνα φαίνεται η σύγκριση των δύο συνθηκών μεταξύ *WT* και *MT* φυτών. β) Κατακόρυφη απεικόνιση των δειγμάτων.



Εικόνα 19: Η επίδραση του αποικισμού του ριζικού συστήματος από το μύκητα *FsK* στο βάρος της ρίζας των φυτών τα οποία αναπτύχθηκαν σε θρεπτικό M Medium. Κατά τη δειγματοληψία έγινε η μέτρηση του βάρους της ρίζας. Οι συνθήκες οι οποίες συγκρίνονται σε αυτό το διάγραμμα περιλαμβάνουν μη επιμολυσμένα φυτά, επιμολυσμένα με ριζόβιο *M. loti*, επιμολυσμένα με το στέλεχος του μύκητα *FsK*, συν-επιμόλυνση μύκητα και ριζοβίου. Οι τιμές κανονικοποιούνται ως προς τα ng του ολικού DNA. Τα δεδομένα είναι ο μέσος όρος από 2 τεχνικές επαναλήψεις που η κάθε μία αποτελείται από 3 βιολογικές επαναλήψεις. Πραγματοποιήθηκε ανάλυση δεδομένων τη μέθοδο two way ANOVA και προέκυψε στατιστικά μη σημαντική διαφορά εκτός από τη περίπτωση συν-επιμόλυνσης.

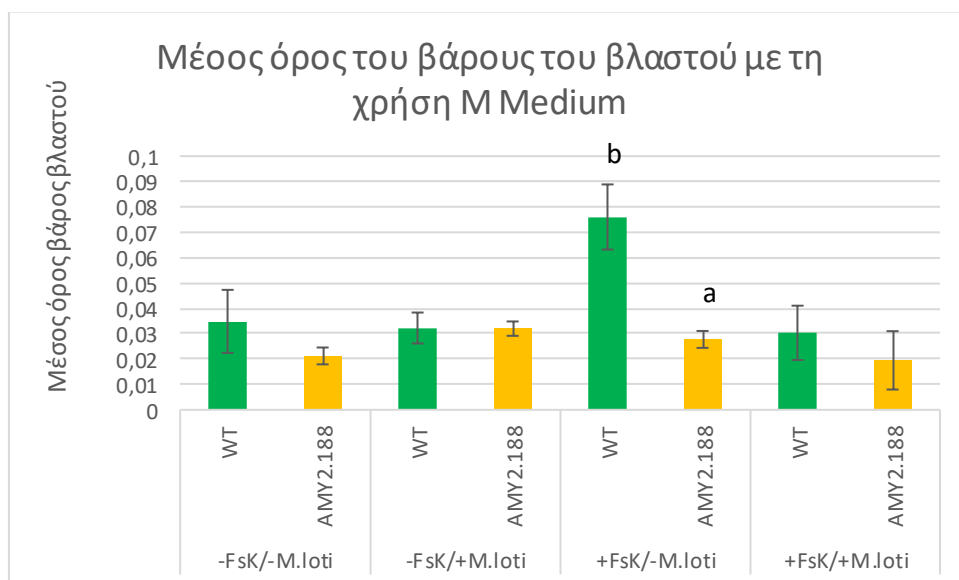


Εικόνα 20: Η επίδραση του αποικισμού του ριζικού συστήματος από το μύκητα *FsK* στο μήκος της ρίζας των φυτών τα οποία αναπτύχθηκαν σε θρεπτικό Hoagland. Κατά τη δειγματοληψία έγινε η μέτρηση του βάρους της ρίζας. Οι συνθήκες οι οποίες συγκρίνονται σε αυτό το διάγραμμα περιλαμβάνουν μη επιμολυσμένα φυτά, επιμολυσμένα με ριζόβιο *M. loti*, επιμολυσμένα με το στέλεχος του μύκητα *FsK*, συν-επιμόλυνση μύκητα και ριζοβίου. Τα δεδομένα είναι ο μέσος όρος από 2 τεχνικές επαναλήψεις που η κάθε μία αποτελείται από 3 βιολογικές επαναλήψεις. Πραγματοποιήθηκε ανάλυση δεδομένων τη μέθοδο two way ANOVA και προέκυψε στατιστικά μη σημαντική διαφορά.

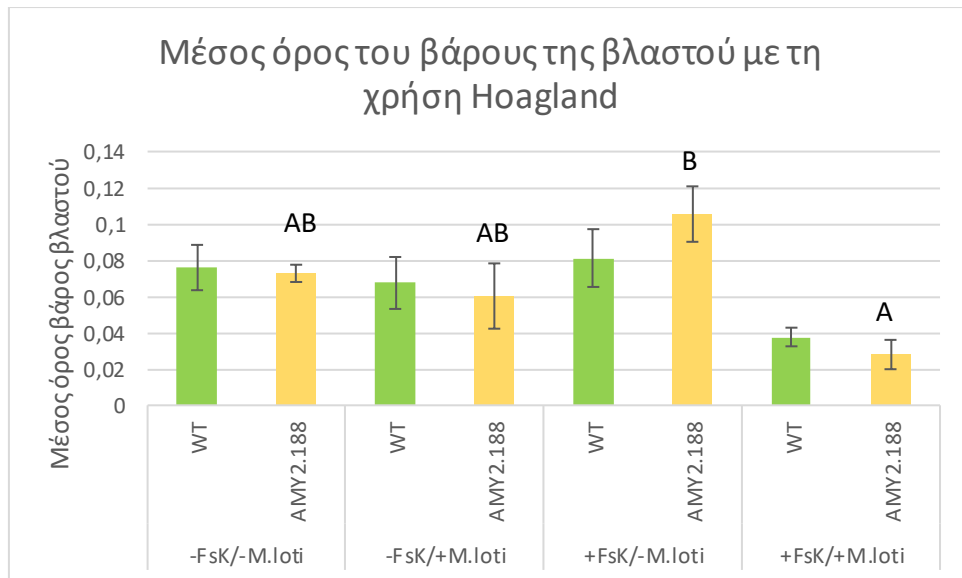
Όταν χρησιμοποιούνταν το θρεπτικό διάλυμα M Medium οι διαφορές του βάρους της ρίζας των φυτών είχαν στατιστικά μη σημαντική διαφορά εκτός από την περίπτωση συν-επιμόλυνσης, όπου το βάρος μεταξύ των WT φυτών και φυτών με τη σίγηση του AMY2 μειώθηκε. Στην περίπτωση χρήσης του θρεπτικού διαλύματος Hoagland τα αποτελέσματα εμφάνισαν στατιστικά μη σημαντική διαφορά.

3.1.3 Καταγραφή του βάρους του βλαστού στα WT και στα MT φυτά *L. japonicus*

Εκτός από τη καταγραφή και την ανάλυση δεδομένων για το ριζικό σύστημα των φυτών πραγματοποιήθηκε και ανάλυση δεδομένων για το υπέργειο τμήμα τους. Συγκεκριμένα χρησιμοποιήθηκαν δεδομένα από το βάρος του βλαστού, ενώ ο ιστός παρέμεινε αποθηκευμένος στους -80°C.



Εικόνα 21: Η επίδραση του αποικισμού του ριζικού συστήματος από το μύκητα *Fsk* στο βάρος του βλαστού των φυτών τα οποία αναπτύχθηκαν σε θρεπτικό M Medium. Κατά τη δειγματοληψία έγινε η μέτρηση του βάρους του βλαστού. Οι συνθήκες οι οποίες συγκρίνονται σε αυτό το διάγραμμα περιλαμβάνουν μη επιμολυσμένα φυτά, επιμολυσμένα με ριζόβιο *M. loti*, επιμολυσμένα με το στέλεχος του μύκητα *Fsk*, συν-επιμόλυνση μύκητα και ριζοβίου. Τα δεδομένα είναι ο μέσος όρος από 2 τεχνικές επαναλήψεις που η κάθε μία αποτελείται από 3 βιολογικές επαναλήψεις. Πραγματοποιήθηκε ανάλυση δεδομένων τη μέθοδο two way ANOVA και προέκυψε στατιστικά σημαντική διαφορά στη συνθήκη επιμόλυνσης μόνο με *Fsk*.



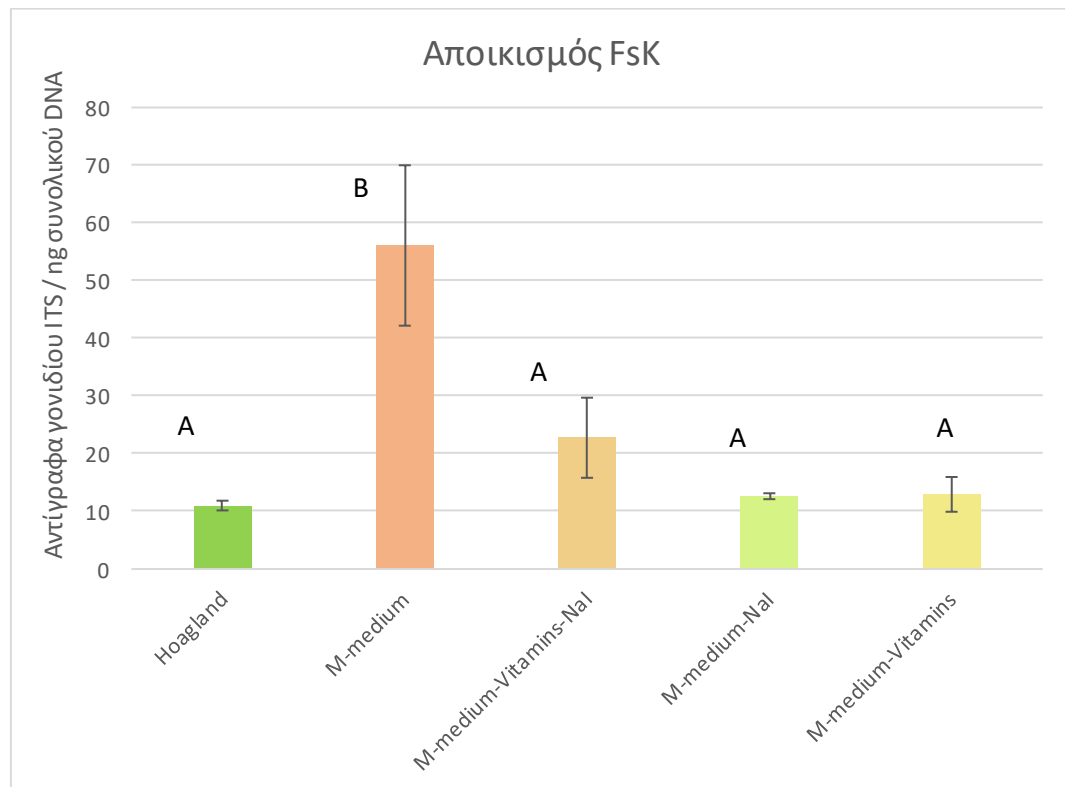
Εικόνα 22: Η επίδραση του αποικισμού του ριζικού συστήματος από το μύκητα *FsK* στο βάρος του βλαστού των φυτών τα οποία αναπτύχθηκαν σε θρεπτικό *Hoagland*. Κατά τη δειγματοληψία έγινε η μέτρηση του βάρους του βλαστού. Οι συνθήκες οι οποίες συγκρίνονται σε αυτό το διάγραμμα περιλαμβάνουν μη επιμολυσμένα φυτά, επιμολυσμένα με ριζόβιο *M. loti*, επιμολυσμένα με το στέλεχος του μύκητα *FsK*, συν-επιμόλυνση μύκητα και ριζοβίου. Τα δεδομένα είναι ο μέσος όρος από 2 τεχνικές επαναλήψεις που η κάθε μία αποτελείται από 3 βιολογικές επαναλήψεις. Πραγματοποιήθηκε ανάλυση δεδομένων τη μέθοδο two way ANOVA και προέκυψε στατιστικά σημαντική διαφορά.

Στην περίπτωση χρήσης του θρεπτικού διαλύματος M Medium το βάρος του βλαστού δεν διαφοροποιούνταν με στατιστικά σημαντική διαφορά με εξαίρεση τη συνθήκη επιμόλυνσης μόνο με *FsK*. Παρουσία του μύκητα το βάρος του βλαστού στα WT φυτά ήταν αρκετά αυξημένο, ενώ αυτό μειωνόταν στα φυτά με σίγηση του γονιδίου που εμπλέκεται στη σύνθεση των δευτερογενών μεταβολιτών. Αντιθέτως χρησιμοποιώντας το διάλυμα *Hoagland* ως θρεπτικό διάλυμα, τα αποτελέσματα εμφάνισαν στατιστικά σημαντική διαφορά. Στα φυτά με τη σίγηση στο *AMY2* και παρουσία *FsK* το βάρος του βλαστού μειώθηκε στη συνθήκη συν-επιμόλυνσης.

3.2 2^ο Πείραμα: Μελέτη επίδρασης της χρήσης διαφορετικών θρεπτικών διαλυμάτων στην ικανότητα αποικισμού του *FsK* σε φυτικές σειρές *L. jaronicus*

Το 2^ο Πείραμα σχετίζεται με την απάντηση στο δεύτερο ερώτημα του σκοπού της της πτυχιακής εργασίας. Μελετήθηκε η ικανότητα αποικισμού του ενδοφυτικού μύκητα *FsK* ανάλογα με το θρεπτικό διάλυμα το οποίο χρησιμοποιείται για την ανάπτυξη των αγρίου τύπου φυτών *L. jaronicus*. Τα θρεπτικά διαλύματα που παρασκευάστηκαν βασίστηκαν στις διαφορές που παρατηρήθηκαν μεταξύ των δύο κύριων θρεπτικών διαλυμάτων, προκειμένου να αναγνωριστεί η αιτία της διαφοράς. Η επίδραση των διαφορετικών θρεπτικών

διαλυμάτων στον αποικισμό του φυτού από τον μύκητα FSK μελετήθηκε με την ενίσχυση του γονιδίου του μύκητα, ITS, με qPCR με εκκινητές ειδικούς για το συγκεκριμένο γονίδιο (ITS-F TAGGGTAGCTGGGTCTGACT και ITS-R ACCAAGTCTAACCCGCCTAC). Οι τιμές κανονικοποιήθηκαν ως προς το ολικό DNA. Στην παρακάτω εικόνα βλέπουμε το διάγραμμα που περιγράφει την ικανότητα αποικισμού του FSK. Οι γραμμές σφάλματος δείχνουν το τυπικό σφάλμα του μέσου. Η στατιστική ανάλυση διεξήχθη για χρησιμοποιώντας μέθοδο ANOVA ακολουθούμενη από δοκιμασία Tukey's HSD.



Εικόνα 23: Η επίδραση των πέντε διαφορετικών θρεπτικών διαλυμάτων στην ικανότητα αποικισμού στο ριζικό σύστημα των φυτών αγρίου τύπου *L. jaronicus* του μύκητα FSK στο ριζικό σύστημα. Η ποσοτικοποίηση του αποικισμού του μύκητα στους ριζικούς ιστούς έγινε με qPCR χρησιμοποιώντας ειδικούς εκκινητές για το γονίδιο του μύκητα FSK, ITS, (ITS-F: TAGGGTAGCTGGGTCTGACT και ITS-R: ACCAAGTCTAACCCGCCTAC) στον άξονα x'x. Οι τιμές κανονικοποιήθηκαν ως προς τα ng του ολικού DNA. Τα δεδομένα είναι ο μέσος όρος από 2 τεχνικές επαναλήψεις που η κάθε μία αποτελείται από 5 βιολογικές επαναλήψεις. Οι γραμμές σφάλματος δείχνουν το τυπικό σφάλμα του μέσου. Το δείγμα που χρησιμοποιήθηκε συλλέχθηκε από τον ιστό που προήλθε από τις ρίζες των φυτών έπειτα από δειγματοληψία στις 4 ημέρες μετά την επιμόλυνση και τη διαδικασία απομόνωσης DNA. Η απομόνωση DNA έγινε με τη χρήση της μεθόδου CTAB. Το ολικό DNA που απομονώθηκε για κάθε δείγμα ποσοτικοποιήθηκε με τη χρήση της συσκευής Qubit (Invitrogen) σύμφωνα με τις οδηγίες του κατασκευαστή. Πραγματοποιήθηκε ανάλυση δεδομένων τη μέθοδο two way ANOVA και προέκυψε στατιστικά σημαντική διαφορά.

Η ικανότητα αποικισμού του ενδοφυτικού μύκητα FSK στα WT φυτά *L. jaronicus* επηρεαζόταν από τη χρήση των διαφορετικών θρεπτικών διαλυμάτων. Στην περίπτωση χρήσης του θρεπτικού διαλύματος M Medium είναι εμφανής η παρουσία του μύκητα στα φυτά σε μεγάλο βαθμό, ενώ στις περιπτώσεις χρήσης των υπόλοιπων θρεπτικών διαλυμάτων η ικανότητα του μύκητα να αποικίζει τα φυτά περιοριζόταν. Παρόλα αυτά δεν

είναι διακριτή η αιτία της διαφοράς αυτής μεταξύ των θρεπτικών διαλυμάτων M Medium και Hoagland, καθώς η αφαίρεση βιταμινών και NaI δεν απέδειξε το λόγο.

4 ΣΥΖΗΤΗΣΗ

Σκοπός της παρούσας πτυχιακής εργασίας ήταν η μελέτη της επίδρασης του ενδοφυτικού μύκητα *Fusarium solani* στέλεχος K, FsK, στη διαδικασία της φυματιογένεσης του φυτού *Lotus japonicus*. Παρά το γεγονός ότι δεν υπάρχουν πολλά δεδομένα στη βιβλιογραφία όσον αφορά το φυτό *L. japonicus*, με βάση τα δεδομένα από εργασίες στο εργαστήριο γνωρίζουμε ότι η συμβίωση του φυτού με ενδοφυτικό μύκητα μπορεί να έχει ευεργετικό ρόλο στη φυματιογένεση. Ωστόσο αυτό που ξέρουμε από προηγούμενη βιβλιογραφία σχετικά με τη σχέση του φυτού *L. japonicus* και του στελέχους K του μύκητα *Fusarium solani* είναι ότι μπορεί να επιτευχθεί στα πλαίσια μίας αμοιβαίας ανταλλαγής ευεργετικών, για τον εκάστοτε οργανισμό, στοιχείων. Παρόλο που ο FsK είχε αρχικά απομονωθεί από ιστό ρίζας του φυτού ντομάτας έχει αποδειχθεί η δυνατότητα πλαστικότητας σχετικά με τον αποικισμό του και σε άλλα είδη φυτών όπως στο *L. japonicus* ευνοώντας τη περαιτέρω μελέτη αυτής της αμοιβαίας σχέσης (Skiada et al., 2019). Επιπλέον η ικανότητα του φυτού να συμβιώνει με διάφορους μικροοργανισμούς στο ριζικό τους σύστημα οδήγησε τους ερευνητές στη μελέτη των αλληλεπιδράσεων μεταξύ διαφορετικών οργανισμών και φυτών, και τελικά στη διαπίστωση της ανάπτυξης της συμβιωτικής σχέσης μεταξύ μυκήτων, ριζοβίου και φυτού. Η εγκαθίδρυση των μικροοργανισμών στις ρίζες του φυτού εγείρει ερωτήματα που αφορούν τον τρόπο χρήσης των οργανισμών αυτό για το φυτό (Skiada et al., 2020).

Τα όσπρια παράγουν μια τεράστια ποικιλία δευτερογενών μεταβολιτών προσελκύνοντας το ενδιαφέρον, λόγω των ευεργετικών ιδιοτήτων σε τρόφιμα. Στις ρίζες τους έχουν εντοπιστεί απλοί σκελετοί τριτερπενίου όπως η β-αμυρίνη κατά την ανάπτυξη συμβιωτικών σχέσεων μύκητα-ριζοβίου-φυτού. Όσον αφορά τη βιοσύνθεση τριτερπενίων στα όσπρια, εργαστηριακές μελέτες συνέβαλαν στην ταυτοποίηση γονιδίων που εμπλέκονται στην παραγωγή και τροποποίηση τριτερπενίων στο *L. japonicus*. Μεταξύ αυτών είναι το γονίδιο της συνθάσης β-αμυρίνης, *AMY*, το οποίο συνδέεται με δευτερογενείς μεταβολίτες οι οποίοι συμμετέχουν στη διαδικασία της φυματιογένεσης. Συγκεκριμένα το γονίδιο *AMY2* έχει μελετηθεί σε κατασκευές σε φυτά *L. japonicus* και έχει παρατηρηθεί ότι η σίγηση του οδηγεί στη καταστολή του σχηματισμού φυματίων. Παρατηρήσεις οδήγησαν σε ερωτήματα σχετικά με την ανάπτυξη του φυτού και την αναστολή ή επαγωγή της σύνθεσης τριτερπενίων για την εύρεση του ρυθμιστικού τους ρόλου σε αυτό τον τομέα. Χρησιμοποιώντας το γονίδιο της συνθάσης της β-αμυρίνης, *AMY2*, μελετήθηκε το πρότυπο ανάπτυξης για τον έλεγχο στη ρύθμιση της ανάπτυξης του φυτού (Krokida et al, 2013).

Στο πλαίσιο αυτό στο εργαστήριο επιτεύχθηκε η συν-επιμόλυνση φυτικών σειρών αγρίου τύπου αλλά και μεταλλαγμένων, λόγω σίγησης του γονιδίου β-αμυρίνης, *AMY2*, φυτών *L. japonicus*. Από τα αποτελέσματα του πειράματος μελέτης της επίδρασης του FsK στο σχηματισμό φυματίων, κατά τη δειγματοληψία στις 21 ημέρες, όταν τα φυτά είχαν επιμολυνθεί και με τον μύκητα και με το ριζόβιο, φαινόταν ότι ο αριθμός των φυματίων μεταβαλλόταν σε κάθε περίπτωση. Η επιμόλυνση των WT φυτών με τον ενδοφυτικό μύκητα FsK οδήγησε στην αύξηση του αριθμού των φυματίων, υποδηλώνοντας την ευεργετική επίδραση της παρουσίας του μύκητα στη διαδικασία της φυματιογένεσης. Παρόλα αυτά μεταξύ των δύο γενοτύπων κάθε συνθήκης, απουσία του μύκητα παρατηρούνταν μία

αύξηση στα φυτά με τη σίγηση του γονιδίου *AMY2*, ενώ παρουσία του μία μείωση. Το γεγονός αυτό καθιστά σαφή το ρόλο και των τριτερπενίων στην ικανότητα φυματιογένεσης και συγκεκριμένα η σίγηση του γονιδίου *AMY2* εμπλέκεται με κάποιο τρόπο στη δράση του μύκητα κατά τη βιογένεση των φυματίων. Τα αποτελέσματα αυτά ήταν εμφανή μόνο στην περίπτωση χρήσης του θρεπτικού διαλύματος Hoagland, καθώς οι διαφορές με τη χρήση του θρεπτικού διαλύματος M Medium ήταν στατιστικά μη σημαντικές. Όσον αφορά το βάρος και το μήκος της ρίζας, από την ανάλυση των δεδομένων, προέκυψαν αποτελέσματα με στατιστικά μη σημαντική διαφορά. Ωστόσο με τη χρήση του M Medium παρατηρήθηκαν στατιστικά σημαντικές διαφορές στο μήκος και το βάρος της ρίζας στις συνθήκες παρουσίας FSK. Η επιμήκυνση του μήκους της ρίζας των φυτών με τη σίγηση του γονιδίου καταστέλλονταν σε σχέση με τα WT φυτά. Ακόμα το βάρος της ρίζας ελαττωνόταν μεταξύ των δύο φυτικών σειρών στη συνθήκη επιμόλυνσης μόνο με το στέλεχος FSK του μύκητα *Fusarium solani*. Τέλος, αναφορικά με το βάρος του βλαστού μόνο στην περίπτωση της χρήσης του θρεπτικού διαλύματος Hoagland είχαμε στατιστικά σημαντική διαφορά. Στην περίπτωση συνθηκών επιμόλυνσης με το μύκητα FSK και συν-επιμόλυνσης και με τους δύο μικροοργανισμούς το βάρος ήταν σε χαμηλότερα επίπεδα. Από τα παραπάνω προκύπτει ότι η επιμόλυνση του ενδοφυτικού μύκητα FSK επηρεάζει με θετικό τρόπο τη διαδικασία της φυματιογένεσης στα WT φυτά, ενώ η δράση του περιορίζεται στην περίπτωση σίγησης του γονιδίου *AMY2*. Απουσία του μύκητα, όμως, ήταν διακριτή η αύξηση του αριθμού των φυματίων και άρα της ικανότητας φυματιογένεσης στις διαγονιδιακές φυτικές σειρές σε σχέση με του αγρίου τύπου. Παράλληλα διαφαίνεται η συμμετοχή του μύκητα FSK και στην ανάπτυξη φαινοτυπικών χαρακτηριστικών με τη χρήση των δύο θρεπτικών διαλυμάτων επηρεάζοντας με διαφορετικό τρόπο τα φυτά στις δύο φυτικές σειρές. Συνεπώς καθίσταται σαφής η λειτουργία των τριτερπενίων και γενικά των δευτερογενών μεσολαβητών στη διαδικασία της φυματιογένεσης και στην ανάπτυξη των φυτών αλλά και η συμβολή τους στον τρόπο επίδρασης του ενδοφυτικού μύκητα FSK. Επιπλέον η χρήση διαφορετικών θρεπτικών διαλυμάτων δημιουργεί διαφορετικά πρότυπα ικανότητας βιογένεσης φυματίων και μπορεί να επηρεάσει με διαφορετικό τρόπο την ανάπτυξη φαινοτυπικών χαρακτηριστικών. Τα παραπάνω αποτελέσματα συμβάλλουν στη δημιουργία νέων ερωτημάτων σχετικά με τον τρόπο που επηρεάζει η επιμόλυνση του μύκητα FSK τις αντιδράσεις του φυτού. Συγκεκριμένα η φυματιογένεση επηρεάζεται από την επιμόλυνση του ενδοφυτικού μύκητα FSK και στους δύο γενοτύπους, αλλά και από την παρουσία των τριτερπενίων. Για το λόγο αυτό είναι ανάγκη να διερευνηθεί σε μελλοντικές εργασίες το ερώτημα αυτό εμβαθύνοντας ίσως στη επίδραση του μύκητα στη ρύθμιση των γονιδίων που συμμετέχουν στη διαδικασία αυτή, προκειμένου να αποσαφηνιστεί ο τρόπος δράσης του και η συμβολή των δευτερογενών μεταβολιτών σε αυτή τη διαδικασία όπως και στη φυσιολογία και ανάπτυξη του φυτού.

Ένα ακόμα μέρος της πτυχιακής εργασίας αποτελούσε η χρήση διαφορετικών θρεπτικών διαλυμάτων και συγκεκριμένα του M Medium και Hoagland. Αυτό έγινε λόγω της παρατήρησης στο εργαστήριο όπου διεξήχθησαν τα πειράματα από προηγούμενες εργασίες των μελών ότι το M Medium συμμετείχε στη βελτίωση της ικανότητας του αποικισμού του FSK στα φυτά ενώ το Hoagland στη βελτίωση του προτύπου ανάπτυξης των φυτών. Επίσης από τη βιβλιογραφία είναι γνωστό ότι η κατανόηση του αποτελέσματος της σχέσης φυτού -

μύκητα απαιτεί επιπλέον διερεύνηση, καθώς εναλλαγές στα πρώιμα στάδια σηματοδότησης μπορεί να επηρεάσει τη συμπεριφορά ενός μύκητα και περαιτέρω οδηγεί σε διαφορετικές αντιδράσεις του φυτού (Skiada et al., 2020). Συνεπώς, αποφασίσαμε να αλλάξουμε τις συνθήκες ποτίσματος, κατά την ανάπτυξη των φυτών, τα οποία επιλέχθηκαν βάσει των δεδομένων από το εργαστήριο για τη μελέτη της επίδρασης της επιμόλυνσης του FsK στη διαδικασία της φυματιογένεσης. Ακόμα προσπαθώντας να απαντήσουμε στο δεύτερο ερώτημα του σκοπού της εργασίας χρειάστηκε να ερευνήσουμε τα αίτια των διαφορετικών παρατηρήσεων. Μετά από τη σύγκριση των δύο θρεπτικών διαλυμάτων οι διαφορές στα δύο που παρατηρήθηκαν αφορούσαν την ύπαρξη ιωδίου και βιταμινών στην περίπτωση του M Medium. Για το λόγο αυτό παρασκευάστηκαν πέντε θρεπτικά διαλύματα που περιλάμβαναν το Hoagland, M Medium χωρίς ιώδιο, χωρίς βιταμίνες και χωρίς και τα δύο, τα οποία χρησιμοποιήθηκαν σε φυτικές σειρές *L. jaronicus* αγρίου τύπου για τη διερεύνηση της αιτίας της διαφοράς στην ικανότητα αποικισμού του FsK. Από τα αποτελέσματα των αναλύσεων επιβεβαιώθηκε ότι η χρήση του θρεπτικού διαλύματος M Medium ευνοεί τον αποικισμό του FsK, ενώ η χρήση του θρεπτικού Hoagland δεν αποβαίνει το ίδιο αποτελεσματική, όσον αφορά τον αποικισμό του φυτού από τον μύκητα. Ωστόσο δεν μπορούμε να διακρίνουμε ξεκάθαρα την αιτία της διαφοράς αυτή που παρατηρείται. Επιπροσθέτως προκύπτει ένα επιπλέον ερώτημα που αφορά την επιλογή του θρεπτικού διαλύματος Hoagland, αναφορικά με την ανάπτυξη του φυτού. Συγκεκριμένα δεν είναι γνωστοί οι λόγοι που ο μύκητας μπορεί να αποικίζει το φυτό με μεγαλύτερο ρυθμό, όταν χρησιμοποιείται το M Medium ως θρεπτικό διάλυμα αλλά η ανάπτυξη του φυτού ευνοείται, όταν χρησιμοποιείται το θρεπτικό διάλυμα Hoagland.

5 ΒΙΒΛΙΟΓΡΑΦΙΑ

- Τσέκος Ι. 2004. Μηχανισμοί άμυνας των φυτών και δευτερογενείς μεταβολίτες: Φυσιολογία Φυτών. Θεσσαλονίκη: Εκδοτικός οίκος αδελφών Κυριακίδη Α.Ε. 541- 568.
- Alexopoulos, Constantine John, Ahmadjian, Vernon and Moore, David, 2020, "Fungus". *Encyclopedia Britannica*
- Balandrin MF, Klocke JA, Wurtele ES, Bollinger WH., 1985, Natural plant chemicals: Sources of industrial and medicinal materials, *Science*, 228:1154-1160.
- Coleman J.J., 2016, The *Fusarium solani* species complex: ubiquitous pathogens of agricultural importance, *Plant Pathol.*, 17 (2) pp. 146-158
- Coleman J.J., S.D. Rounsley, M. Rodriguez-Carres, A. Kuo, C.C. Wasmann, J. Grimwood, et al., 2009, The genome of *Nectria haematococca*: contribution of supernumerary chromosomes to gene expansion, *PLoS Genet.*, 5 (8)
- D'Auria JC, Gershenzon J., 2005, The secondary metabolism of *Arabidopsis thaliana*: growing like a weed, *Curr Opin Plant Biol*, 8:308-16
- Galibert F, Finan TM, Long SR, Puhler A, Abola P, Ampe F, Barloy-Hubler F, Barnett MJ, Becker A, Boistard P, Bothe G, Boutry M, Bowser L, Buhrmester J, Cadieu E, Capela D, Chain P, Cowie A, Davis RW, Dreano S, Federspiel NA, Fisher RF, et al., 2001, The composite genome of the legume symbiont *Sinorhizobium meliloti*, *Science*, 293:668-72.
- Guinel F. C., 2015, Ethylene, a Hormone at the Center-Stage of Nodulation. *Frontiers in plant science*, 6, 1121. <https://doi.org/10.3389/fpls.2015.01121>
- Handberg, K., and Stougaard, J., 1992, *Lotus japonicus*, an autogamous, diploid legume species for classical and molecular genetics, *Plant J*, 2, 487–496
- Iturbe-Ormaetxe I, Haralampidis K, Papadopoulou K, Osbourn AE., 2003, Molecular cloning and characterization of triterpene synthases from *Medicago truncatula* and *Lotus japonicus*, *Plant Mol Biol*, 51:731-43
- Jarvis, B. D. W.; Pankhurst, C. E.; Patel, J. J., 1982, "Rhizobium loti, a New Species of Legume Root Nodule Bacteria", *International Journal of Systematic Bacteriology*, 32 (3): 378–380
- Keeling CI, Bohlmann J. 2006. Genes, enzymes and chemicals of terpenoid diversity in the constitutive and induced defence of conifers against insects and pathogens, *New Phytol*, 170:657-75.
- Kistner C. & Parniske M., 2002, Evolution of signal transduction in intracellular symbiosis, *Trends in Plant Science*, 7 (11) 511-518
- Krokida A, Delis C, Geisler K, Garagounis C, Tsikou D, Pena-Rodriguez LM, Katsarou D, Field B, Osbourn AE, Papadopoulou KK. 2013. A metabolic gene cluster in *Lotus japonicus* discloses

novel enzyme functions and products in triterpene biosynthesis, *New Phytologist*, 200: 675–690

Kumar P, Mina U, 2013, Life Sciences: Fundamentals and practice, *New Delhi: Pathfinder Academy*

Madigan, M. T., Martinko, J. M., & Parker, J. , 2003, Brock biology of microorganisms. Upper Saddle River, NJ: Prentice Hall/Pearson Education.

Petrini O., 1991, Fungal Endophytes of Tree Leaves. In: Andrews J.H., Hirano S.S. Microbial Ecology of Leaves. Brock/Springer Series in Contemporary Bioscience. Springer, New York, NY.

Rafal Zgadzaj, Ruben Garrido-Oter, Dorte, Bodker Jensen, Anna Koprivova, Paul Schulze-Lefert, Simona Radutoiu, 2016, Nodule symbiosis shapes *L. japonicus* microbiota, *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 113 (49) E7996-E8005

Skiada V, Faccio A, Kavroulakis N, Genre A, Bonfante P, Papadopoulou KK. 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.

Skiada V, Avramidou M, Kavroulakis N, Bonfante P, Genre A, , Papadopoulou KK. 2020, An endophytic *Fusarium*–legume association is partially dependent on the common symbiotic signalling pathway, *New Phytologist*, 226: 1429–1444

Udvardi M, Poole PS. Transport and metabolism in legume-rhizobia symbioses, *Annu Rev Plant Biol.*, 2013;64:781-805.

Zhang N, O'Donnell K, Sutton DA, Nalim FA, Summerbell RC, Padhye AA, Geiser DM., 2006, Members of the *Fusarium solani* species complex that cause infections in both humans and plants are common in the environment, *J Clin Microbiol*, ;44(6):2186-90.