



ΠΤΥΧΙΑΚΗ ΕΡΓΑΣΙΑ

# Λειτουργικός χαρακτηρισμός πρωτεϊνών τελεστών του *Fusarium solani* στέλεχος Κ (FsK) κατά την αλληλεπίδραση με φυτά

## Functional characterization of *Fusarium solani* strain K (FsK) effector proteins during interaction with plants



Γεωργιάδου Ευανθία, του Ιωάννη

Επιβλέπουσα καθηγήτρια: Παπαδοπούλου Καλλιόπη  
Εργαστήριο Βιοτεχνολογίας Φυτών και Περιβάλλοντος

Λάρισα, Σεπτέμβριος 2022

## **Τριμελής συμβουλευτική και εξεταστική επιτροπή:**

**1. Παπαδοπούλου Καλλιόπη** (επιβλέπουσα καθηγήτρια), Αναπληρώτρια Καθηγήτρια Βιοτεχνολογίας Φυτών, Τμήμα Βιοχημείας και Βιοτεχνολογίας, Πανεπιστήμιο Θεσσαλίας.

**2. Καρούζας Δημήτριος**, Καθηγητής Περιβαλλοντικής Μικροβιολογίας και Βιοτεχνολογίας, Τμήμα Βιοχημείας και Βιοτεχνολογίας, Πανεπιστήμιο Θεσσαλίας.

**3. Τσίκου Δανιέλα**, Επίκουρος Καθηγήτρια Μοριακής και Αναπτυξιακής Βιολογίας Φυτών, Τμήμα Βιοχημείας και Βιοτεχνολογίας, Πανεπιστήμιο Θεσσαλίας.

## Ευχαριστίες

Καταρχάς, θα ήθελα να ευχαριστήσω την επιβλέπουσα καθηγήτρια μου κυρία Παπαδοπούλου Καλλιόπη που μου έδωσε την ευκαιρία να εκπονήσω την πτυχιακή μου εργασία στο Εργαστήριο Βιοτεχνολογίας Φυτών και Περιβάλλοντος, αλλά και για τον χρόνο και τις πολύτιμες θεωρητικές και πρακτικές συμβουλές της. Η συμβολή, η όρεξη για βοήθεια και η καθοδήγησή της ήταν καθοριστικές.

Οι θερμότερες ευχαριστίες μου θα πρέπει να δοθούν στον μεταπτυχιακό απόφοιτο Νίκο Ντελκή που ήταν δίπλα μου από την αρχή της πτυχιακής εργασίας και πρόσφερε το ενδιαφέρον του, τις γνώσεις και τις συμβουλές του. Ήταν πάντα εκεί για να με βοηθήσει σε κάθε βήμα και να με στηρίξει σε κάθε αναποδιά, με την υπομονή και την καθοδήγηση του. να Επίσης, ένα μεγάλο ευχαριστώ στην υποψήφια διδάκτορα Μαρία Φέκα για τον χρόνο, το ενδιαφέρον και τις πολύτιμες γνώσεις που μου έδωσε κάθε φορά που τη χρειαζόμουν.

Εξίσου, θα ήθελα να ευχαριστήσω όλα τα μέλη του Εργαστηρίου Βιοτεχνολογίας Φυτών και Περιβάλλοντος για το υπέροχο κλίμα συνεργασίας, για τις γνώσεις και τη στήριξη που μου πρόσφεραν απλόχερα. Τζένη, Λουκία, Αφροδίτη, Παναγιώτη, Όλγα, Δήμητρα, Αντωνία, Ευθυμία σας ευχαριστώ! Ωστόσο, οφείλω ένα ιδιαίτερο ευχαριστώ στη συμφοιτήτριά μου Αργύρη Αντωνία που βρισκόταν στο πλάι μου από την αρχή της πτυχιακής εργασίας και πρόσφερε πάντα τη βοήθειά της. Είμαι ευγνώμων για τη συνεργασία και φιλία που έχουμε αναπτύξει.

Τέλος, η στήριξη της οικογένειάς μου ήταν καταλυτικής σημασίας σε όλα αυτά τα χρόνια των σπουδών μου. Δεν μπορώ να τους ευχαριστήσω αρκετά για τους κόπους και την αγάπη τους.

## Περιεχόμενα

Περίληψη .....	6
Abstract .....	7
<b>1. Εισαγωγή</b>	
1.1 Φυτά: <i>Solanum lycopersicum</i> και <i>Lotus japonicus</i> .....	8
1.2 Βιοτικές αλληλεπιδράσεις φυτών .....	9
1.2.1 Συμβιωτικές σχέσεις .....	10
1.3 Άμυνα φυτών .....	11
1.4 Μύκητες .....	12
1.5 Ενδοφυτικοί μύκητες .....	15
1.5.1 <i>Fusarium solani</i> στέλεχος K (Fsk) .....	16
1.5.2 Πρωτεΐνες τελεστές του μυκητιακού στελέχους Fsk .....	17
<b>2. Σκοπός της πειραματικής μελέτης</b> .....	21
<b>3. Υλικά και μέθοδοι</b>	
3.1 Προετοιμασία εμβολίου του στελέχους Fsk .....	22
3.2 Προετοιμασία και ανάπτυξη φυτών .....	23
3.3 Απομόνωση ολικού RNA από τις ρίζες των φυτών .....	25
3.4 Ποσοτική ανάλυση των επιπέδων mRNA του Fsk με αλυσιδωτή αντίδραση πολυμεράσης σε πραγματικό χρόνο (qPCR) .....	26
3.5 Θρεπτικά υλικά	
3.5.1 Θρεπτικό διάλυμα Hoagland .....	32
3.5.2 Potato Dextrose Broth (PDB) / Potato Dextrose Agar (PDA) .....	33
<b>4. Αποτελέσματα</b> .....	33
4.1 Ποσοτικοποίηση του ολικού απομονωμένου RNA .....	34

4.2 Ανίχνευση αποικισμού από τον μυκητιακό στέλεχος FSK στις ρίζες της τομάτας με αλυσιδωτή αντίδραση πολυμεράσης σε πραγματικό χρόνο (qPCR) .....	35
4.3 Ανίχνευση των επιπέδων έκφρασης των γονιδίων του μυκητιακού στελέχους FSK που κωδικοποιούν για τις πρωτεΐνες τελεστές με αλυσιδωτές αντιδράσεις πολυμεράσης σε πραγματικό χρόνο (qPCR) .....	37
4.4 Στατιστική ανάλυση αποτελεσμάτων .....	42
<b>5. Συζήτηση</b>	
5.1 Σύνοψη θεωρητικού υποβάθρου .....	49
5.2 Ανασκόπηση και ερμηνεία αποτελεσμάτων .....	50
5.3 Προοπτικές .....	52
<b>6. Βιβλιογραφία .....</b>	<b>53</b>

## Περίληψη

Στο φυσικό τους περιβάλλον τα φυτά αντιμετωπίζουν διάφορες προκλήσεις και αλληλεπιδρούν με διάφορους οργανισμούς. Ένας τέτοιος οργανισμός είναι ο ενδοφυτικός μύκητας *Fusarium solani* στέλεχος K (FsK). Είναι ένα ευεργετικό στέλεχος που αποικίζει τις ρίζες διαφόρων φυτών, χωρίς να εκδηλώνονται συμπτώματα ασθένειας και παράλληλα προσφέρει αντοχή σε βιοτικό και αβιοτικό στρες. Κατά την αρχική αλληλεπίδραση μεταξύ φυτού και μύκητα, εκφράζονται στον μύκητα γονίδια που πιθανώς κωδικοποιούν για πρωτεΐνες τελεστές, οι οποίες εξυπηρετούν την επικοινωνία ανάμεσα στους δύο συμβιώτες. Ωστόσο, η δράση των πρωτεϊνών τελεστών έχει μελετηθεί κυρίως για παθογόνους οργανισμούς, όπου κατά τη μόλυνση των φυτών ενεργοποιείται το φυτικό αμυντικό σύστημα. Έτσι, δεν είναι γνωστό αν αυτές οι πρωτεΐνες δρουν με τον ίδιο τρόπο σε συμβιωτικά συστήματα. Η παρούσα πειραματική εργασία αφορά τη μελέτη των πρωτεϊνών τελεστών του μυκητιακού στελέχους FsK κατά την αλληλεπίδραση με φυτά. Για τον σκοπό αυτό, έγινε εμβολιασμός φυτών τομάτας (*Solanum lycopersicum*) ποικιλία Moneymaker, καθώς και του φυτού *Lotus japonicus* οικότυπος Gifu με τα κονίδια του μυκητιακού στελέχους FsK και στη συνέχεια έγινε απομόνωση των ριζικών ιστών σε διάφορες χρονικές στιγμές μετά τον εμβολιασμό. Ακολούθησε η απομόνωση του ολικού RNA των ριζών και τελικά η μελέτη του αποικισμού και της έκφρασης των γονιδίων που κωδικοποιούν για τις πρωτεΐνες τελεστές του μύκητα με αλυσιδωτές αντιδράσεις πολυμεράσης πραγματικού χρόνου (qPCR).

## Abstract

Plants in their natural environment face many challenges and interact with many other organisms. One of these organisms is the endophytic fungus *Fusarium solani* strain K (FsK). This strain is beneficial and colonizes the roots of many plants without activating their immune system. Also, at the same time, the fungus promotes plant tolerance in biotic and abiotic stress. Actually, it is said that during the early plant and fungus interaction the fungus produces effector proteins which can have many functions. Nevertheless, only effector proteins from pathogenic strains have been studied during the plant's immune system activation. As a result, it is not known if the effector proteins have the same function in symbiotic systems. In this thesis FsK effector proteins have been studied during interaction with plants. For this reason, *Solanum lycopersicum* cultivar Moneymaker tomato plants and *Lotus japonicus* ecotype Gifu plants have been inoculated with FsK conidia and their root tissues were isolated during certain timepoints post inoculation. Afterwards, RNA extraction from these roots was performed. The FsK colonization levels and the expression levels of the genes which encode the effector proteins have been studied with real time polymerase chain reactions (qPCR).

## 1. Εισαγωγή

### 1.1 Φυτά: *Solanum lycopersicum* και *Lotus japonicus*

Το φυτό της τομάτας είναι ένα ανθοφόρο φυτό. Ταξινομικά ανήκει στα τραχεόφυτα και στη συνομοταξία των αγγειόσπερμων, διότι έχει ανεπτυγμένο αγγειακό σύστημα και παράγει σπέρματα. Επίσης, ανήκει στην ομοταξία των δικότυλων, διότι το σπέρμα περιβάλλεται από δύο κοτυληδόνες και στην τάξη των Στρυχνωδών ή αλλιώς Solanales, στην οικογένεια των Στρυχνοειδών ή αλλιώς Solanaceae, στο γένος Στρύχνον ή αλλιώς *Solanum* και τελικά στο είδος Στρύχνον το λυκοπερσικόν ή αλλιώς *Solanum lycopersicum*. Σήμερα είναι ένα ευρέως διαδεδομένο φυτό διότι είναι πηγή σημαντικών θρεπτικών στοιχείων, όπως λυκοπένιο, β-καροτένιο, φλαβονοειδή και βιταμίνη C (Gerszberg et. al. 2015).

Το γονιδίωμα της είναι διπλοειδές με 12 ζεύγη χρωμοσωμάτων και μέγεθος 950 Mbp. Μάλιστα, έχει αλληλουχηθεί το γονιδίωμα της ποικιλίας Heinz1706 σε όλο το μήκος του με συνδυασμό αλληλούχησης Sanger και νέας γενιάς (Sato et. al. 2012).

Μορφολογικά, το φυτό αυτό αναπτύσσει μία κεντρική ρίζα με αρκετές δευτερεύουσες ρίζες και ριζικά τριχίδια. Μάλιστα, έχει την ικανότητα να αναπτύσσει ριζικούς ιστούς από άλλους ανεξάρτητους ιστούς, όπως από τον βλαστό ή τα φύλλα. Αναφέρθηκε και παραπάνω ότι η τομάτα είναι δικότυλο φυτό, διότι στα αρχικά στάδια της ανάπτυξης έχει δύο εμβρυικά φύλλα. Ωστόσο, τα πραγματικά φύλλα της τομάτας είναι σύνθετα. Κάθε φύλλο αποτελείται από ζεύγη φυλλαρίων και παραφύλλων, με ένα μόνο φυλλάριο στην άκρη. Τα φύλλα εμφανίζονται σε ελικοειδή διάταξη πάνω στον βλαστό. Η επάνω επιφάνειά τους έχει χρώμα λαμπερό βαθύ πράσινο και η κάτω επιφάνεια ελαιώδες ανοιχτό πράσινο. Στην επιφάνεια των φύλλων και των βλαστών υπάρχουν αδενώδεις τρίχες. Τα άνθη εμφανίζονται σε ταξιανθίες από 2-3 ανά ταξιανθία έως και 20 ή περισσότερα. Οι ταξιανθίες εμφανίζονται επί των βλαστών και διακλαδίζονται συμμετρικά ή ασύμμετρα ανάλογα με την ποικιλία. Ο σπόρος είναι ωοειδής, πεπλατυσμένος, το χρώμα του είναι κίτρινο – καφέ και η επιφάνειά του καλύπτεται με τριχοειδείς αποφύσεις που του δίνουν μία μεταξωτή υφή. Το μέγεθος ποικίλλει μεταξύ 3-5 mm. Εσωτερικά ο σπόρος φέρει ένα κυρτό έμβρυο που περιβάλλεται από ένα μικρό ενδοσπέρμιο.



Εικόνα 1: Απεικόνιση του φυτού της τομάτας, *Biorender* (<https://biorender.com/>).

Η θερμοκρασία αποτελεί τον βασικότερο παράγοντα εξέλιξης και ωρίμανσης του φυτού. Πιο συγκεκριμένα, οι απαιτήσεις του φυτού αλλάζουν ανάλογα με το αναπτυξιακό στάδιο στο οποίο βρίσκεται. Έτσι, μέχρι τη βλάστηση των σπόρων και την εμφάνιση των κοτυληδόνων η ιδανική θερμοκρασία κυμαίνεται σε 24-27°C. Μετά την εμφάνιση των πρώτων φύλλων η ιδανική θερμοκρασία χαμηλώνει στους 18-23°C την ημέρα και 14-16°C τη νύχτα. Η τομάτα καλλιεργείται σχεδόν σε όλους τους τύπους εδάφους, αλλά επιτυγχάνονται καλύτερες αποδόσεις σε ουδέτερο ή ελαφρά όξινο έδαφος, δηλαδή σε pH 6-7. Το pH στα σωστά επίπεδα λειτουργεί ως καταλύτης για την πρόσληψη θρεπτικών συστατικών. Αναπτύσσεται εύκολα και γρήγορα στο εργαστήριο. Επίσης, εμφανίζει μικρή διάρκεια της κάθε γενιάς και μεγάλο αριθμό υβριδίων και ποικιλιών. Στη συγκεκριμένη πειραματική μελέτη χρησιμοποιήθηκε η ποικιλία *Money-maker*. Είναι μία ποικιλία τομάτας με υψηλή και εύκολη παραγωγή, αντοχή σε καταπονήσεις και φτάνει σε ύψος έως και τα 2 μέτρα.

Τέλος, είναι ένα πολύ σημαντικό φυτό για την παρούσα πειραματική μελέτη, διότι το μυκητιακό στέλεχος *FsK* την αποικίζει αναπτύσσοντας μία ευεργετική συμβιωτική σχέση μαζί της. Μάλιστα, η αρχική ανακάλυψη και απομόνωση του στελέχους έγινε στο φυτό της τομάτας.



Το φυτό *Lotus japonicus* είναι ένα ψυχανθές ανθοφόρο φυτό. Είναι τραχεόφυτο, καθώς έχει αγωγό σύστημα μεταφοράς νερού και φωτοσυνθετικών προϊόντων και αγγειόσπερμο, καθώς παράγει σπέρματα. Ανήκει στην οικογένεια Leguminosae (Fabaceae) και στο γένος *Lotus*. Είναι όσπριο και πολυετές φυτό που παράγει μεγάλο αριθμό κίτρινων ανθέων και το ώριμο φυτό παρουσιάζει θαμνώδη ανάπτυξη με πολλά κλαδιά να φτάνουν έως και τα 30 εκατοστά σε ύψος. Αναπτύσσεται εύκολα στο εργαστήριο και απαιτεί 16 ώρες φωτός και 8 ώρες σκότους, υγρασία σε επίπεδο 70% και εύρος θερμοκρασιών 18-22°C, ενώ το συχνό πότισμα αντιπροτείνεται (Stougaard, 2005). Επίσης, οι ρίζες του είναι λεπτές και ημιδιαφανείς.

Τα τελευταία χρόνια το διπλοειδές είδος *Lotus japonicus* χρησιμοποιείται ως φυτικός οργανισμός μοντέλο για μοριακές και αναπτυξιακές μελέτες. Αυτό συμβαίνει διότι εμφανίζει αρκετά πλεονεκτήματα, όπως το μικρό μέγεθος, ο μικρός κύκλος ζωής κάθε γενιάς που είναι 3 μήνες, η ικανότητα αυτογονιμοποίησης, η υψηλή παραγωγή σπόρων, τα μεγάλα άνθη, ο εύκολος μετασχηματισμός με το *Agrobacterium tumefaciens* ή το *Agrobacterium rhizogenes* και η δυνατότητα ανάπτυξης συμβιωτικών σχέσεων (Stougaard, 2005). Μάλιστα, υπάρχουν μεταλλάγματα του φυτού όσον αφορά την αλληλεπίδραση με ριζόβια ή την μορφολογική ανάπτυξη των ανθέων (Sato et. al. 2008).

Το είδος αυτό διαθέτει πολλούς οικότυπους. Ωστόσο, οι πιο καλά μελετημένοι και χρησιμοποιημένοι είναι οι MG20 (Miyakojima) και Gifu. Ο πρώτος οικότυπος εμφανίστηκε στο νησί Miyako της Ιαπωνίας, είναι διπλοειδής με 6 ζεύγη χρωμοσωμάτων και μέγεθος γονιδιώματος 472.1 Mbp. Χρησιμοποιείται για την αλληλούχηση του γονιδιώματος του φυτού, καθώς περιέχει πολλούς πολυμορφισμούς, αλλά και σε μοριακές και αναπτυξιακές μελέτες. Ο δεύτερος οικότυπος εμφανίστηκε σε ένα ποτάμι στην πόλη Gifu της Ιαπωνίας, είναι διπλοειδής με 6 ζεύγη χρωμοσωμάτων και μέγεθος γονιδιώματος 442.8 Mbp. Χρησιμοποιείται σε μοριακές μελέτες και έχει καθιερωθεί ως εργαλείο μεταλλάξεων του *Lotus*. Στη συγκεκριμένη πειραματική μελέτη χρησιμοποιήθηκε ο οικότυπος Gifu.

Τέλος, το γονιδίωμά του αλληλουχήθηκε σε όλο το μήκος του το 2008 (Sato et. al. 2008).

Υπάρχουν δύο διαδεδομένες βάσεις δεδομένων αναφορικά με το γονιδίωμα του φυτού. Η πρώτη είναι η «*Lotus base*» (<https://lotus.au.dk/>) μέσω της οποίας μπορούν να αντληθούν πληροφορίες για ολόκληρο το γονιδίωμα του φυτού, για τις χαρακτηρισμένες πρωτεΐνες και για το προφίλ έκφρασης ενός ή περισσότερων γονιδίων σε συνδυασμό και μάλιστα περιέχει αλληλουχίες και για τους δύο οικότυπους του φυτού. Η δεύτερη είναι η ευρύτερη βάση δεδομένων PlantCyc (<https://plantcyc.org/>) που περιέχει γονίδια, ένζυμα, μεταβολίτες και μεταβολικά μονοπάτια για πολλά είδη φυτών, συμπεριλαμβανομένου και του *Lotus japonicus*.

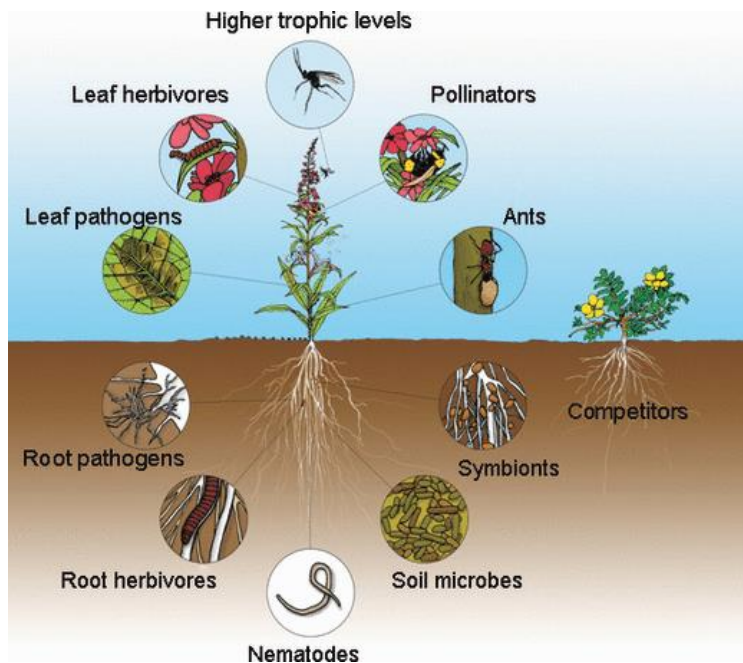


Εικόνα 2: Απεικόνιση του φυτού *Lotus japonicus*, Biorender (<https://biorender.com/>).

## 1.2 Βιοτικές αλληλεπιδράσεις φυτών

Στο φυσικό τους περιβάλλον τα φυτά αλληλεπιδρούν με πολλούς και διαφορετικούς οργανισμούς και είναι ικανά για μεγάλο εύρος αλληλεπιδράσεων. Η φύση αυτών των αλληλεπιδράσεων μπορεί να κυμαίνεται από θετική, για παράδειγμα η αλληλεπίδραση με επικονιαστές, ή ουδέτερη, για παράδειγμα ο ομοσιτισμός, έως και αρνητική, για παράδειγμα η αλληλεπίδραση με παθογόνους και φυτοφάγους οργανισμούς, με παράσιτα και η αλληλοπάθεια. Μοριακές αναλύσεις των γονιδιωμάτων διαφόρων φυτών έχουν δείξει πόσο περίπλοκη μπορεί να είναι η ρύθμιση των αποκρίσεων σε μία ή και περισσότερες βιοτικές αλληλεπιδράσεις. Αυτή η ρύθμιση γίνεται κυρίως μέσω σηματοδοτικών μονοπατιών στα οποία εμπλέκονται δευτερογενή σήματα, όπως οι ορμόνες, τα οποία στη συνέχεια μεταφέρονται στη θέση δράσης για να προκαλέσουν την κύρια φυσιολογική απόκριση (Taiz et. al. 2017). Μάλιστα, όταν αλληλεπιδρούν πολλοί οργανισμοί με το φυτό αλλά και μεταξύ τους, τελικά μπορεί να προκύψουν ανταγωνιστικά ή συναγωνιστικά αποτελέσματα. Για

παράδειγμα οι ενδοφυτικοί μύκητες, οι οποίοι αφορούν περισσότερο αυτή την πειραματική μελέτη, αλληλεπιδρούν με διάφορους παθογόνους ή ευεργετικούς οργανισμούς της ριζόσφαιρας και μπορούν να αλλάξουν το μεταβολικό τους προφίλ ώστε να επικοινωνήσουν με αυτούς (Combes et. al. 2012, Saikkonen et al. 2013).



Εικόνα 3: Οι βιοτικές αλληλεπιδράσεις φυτών. Τα φυτά αλληλεπιδρούν με επικονιαστές, έντομα, συμβιώτες, μικρόβια του εδάφους, νηματώδεις, φυτοφάγα της ρίζας και του φυλλώματος, παθογόνα της ρίζας και του φυλλώματος και τέλος με ανταγωνιστές. (Van Dam et. al. 2009).

### 1.2.1 Συμβιωτικές σχέσεις

Είναι πιθανόν οι συμβιωτικές σχέσεις ανάμεσα σε φύκη και μύκητες να προηγήθηκαν της εμφάνισης των πρώτων χερσαίων φυτών. Ωστόσο, πλέον είναι γνωστό ότι υπάρχουν αλληλεπιδράσεις που είναι ωφέλιμες για τα χερσαία φυτά, αν όχι απολύτως αναγκαίες. Τέτοιες αμοιβαία επωφελείς βιοτικές αλληλεπιδράσεις αναφέρονται ως αμοιβαιότητες ή συμβιωτικές σχέσεις. Παραδείγματα αποτελούν η αλληλεπίδραση φυτού και επικονιαστή, η αλληλεπίδραση νιτροποιητικού βακτηρίου (ριζόβιου) και ψυχανθούς, οι συνεργασίες ριζών και ενδοφυτικών ή μυκορριζικών μυκήτων καθώς και οι μύκητες της φυλλόσφαιρας. Επίσης, στο φυσικό τους περιβάλλον τα χερσαία φυτά μπορεί να αποικίζονται και από βακτήρια που δημιουργούν βιομεμβράνες στην επιφάνεια ριζών και φύλλων, ενδοφυτικά βακτήρια και αζωτοδεσμευτικά βακτήρια που περιέχονται στα φυμάτια ριζών ή βλαστών (Taiz et. al. 2017).

Γενικά, η λογική των αμοιβαία επωφελών σχέσεων στηρίζεται στην ικανότητα των μικροοργανισμών να δεσμεύουν θρεπτικά συστατικά απαραίτητα για την ανάπτυξη των φυτών και να τους τα προσφέρουν αλλά και να ενισχύουν την αντοχή σε βιοτικό και αβιοτικό στρες ενώ παράλληλα λαμβάνουν από τα φυτά ένα ασφαλές ενδιαίτημα και άνθρακα προερχόμενο από τη φωτοσύνθεση.

Έτσι, λοιπόν τα φυτά έχουν αναπτύξει την ικανότητα να αναγνωρίζουν τους μικροοργανισμούς που εισέρχονται σε αυτά και στην περίπτωση των συμβιωτικών σχέσεων να προάγουν τη μεταξύ τους συσχέτιση. Υπάρχει ένα σχετικά κοινό μοντέλο αλληλεπίδρασης μεταξύ φυτών και ξένων οργανισμών. Για παράδειγμα

στην επιδερμίδα των κυττάρων της ρίζας συμβαίνει συσσωμάτωση του κυτταροπλάσματος και τα οργανίδια του κυττάρου συμπεριλαμβανομένου του πυρήνα συσσωρεύονται στα σημεία της επαφής του φυτού με τον μικροοργανισμό. Έτσι, η ενεργοποίηση γονιδίων στον πυρήνα και η παραγωγή πρωτεϊνών που συμμετέχουν σε μονοπάτια σηματοδότησης γίνονται πολύ γρήγορα (Skiada et. al. 2019). Επίσης, κατά την αλληλεπίδραση φυτού με ριζόβια σχηματίζονται τα φυμάτια ή κατά την αλληλεπίδραση με μύκητες σχηματίζονται οι μυζητήρες (haustoria), μέσω των οποίων ο μύκητας αντλεί θρεπτικά συστατικά και εκκρίνει πρωτεΐνες τελεστές (Petre & Kamoun 2014).

Τα φυτά χρησιμοποιούν ένα περιορισμένο και συντηρημένο σετ πρωτεϊνών για τη μεταγωγή όλων αυτών των διαφορετικών σημάτων που σχετίζονται με την αλληλεπίδραση με άλλους μικροοργανισμούς. Υπάρχει ένα κοινό σηματοδοτικό μονοπάτι ή αλλιώς Common Symbiosis Pathway (CSP) που ενεργοποιείται στις περισσότερες περιπτώσεις. Τόσο για τα βακτήρια όσο και για τους μύκητες ενεργοποιείται ένας καταρράκτης σηματοδότησης που περιλαμβάνει τη γρήγορη απελευθέρωση  $Ca^{2+}$  στο κυτταρόπλασμα από θέσεις αποθήκευσης, όπως τα μιτοχόνδρια, το ενδοπλασματικό δίκτυο, τα χυμοτόπια και το κυτταρικό τοίχωμα. Τα αυξημένα επίπεδα  $Ca^{2+}$  στο κυτταρόπλασμα ενεργοποιούν μία σειρά από πρωτεΐνες στόχους. Μία από αυτές είναι η κινάση CCaMK που εξαρτάται από το  $Ca^{2+}$  και την καλμοδουλίνη. Στη συνέχεια φωσφορυλιώνεται και ενεργοποιείται ένας δεύτερος τύπος υποδοχέα που λέγεται κινάση τύπου υποδοχέα συμβίωσης ή Symbiosis Receptor-like Kinase (SYMRK). Αυτή η πρωτεΐνη περιέχει μία εξωκυτταρική επικράτεια πλούσια σε αντίγραφα λευκίνης (LRR) και μία ενδοκυτταρική επικράτεια με δράση κινάσης. Τελικά, ενισχύεται η αύξηση στη συγκέντρωση του  $Ca^{2+}$  μέσα και γύρω από τον πυρήνα των προσβεβλημένων επιδερμικών κυττάρων και ρυθμίζεται η έκφραση γονιδίων. Δηλαδή, ενεργοποιείται η μεταγραφή γονιδίων που κωδικοποιούν για προϊόντα ικανά να απαντήσουν στο ερέθισμα (Taiz et. al. 2017).

### 1.3 Άμυνα φυτών

Η πρώτη γραμμή άμυνας έναντι σε δυνητικά παθογόνους οργανισμούς είναι η επιφάνεια του φυτού. Το κλείσιμο των στομάτων και η εφυμενίδα που είναι το κηρώδες εξωτερικό στρώμα, το περίδερμα και άλλα μηχανικά φράγματα αποτελούν εμπόδια στην είσοδο βακτηρίων, μυκήτων και εντόμων. Τα μηχανικά εμπόδια που περιλαμβάνουν επιφανειακές δομές, κρυστάλλους ανόργανων στοιχείων και θιγμοναστικές κινήσεις φύλλων συχνά αποτελούν την πρώτη γραμμή άμυνας πολλών φυτών έναντι φυτοφάγων εντόμων και παθογόνων μικροοργανισμών. Μάλιστα, οι πιο διαδεδομένες επιφανειακές δομές είναι τα αγκάθια και τα τριχώματα. Τα αγκάθια προσφέρουν φυσική προστασία ενώ τα τριχώματα έχουν φυσικές και χημικές ιδιότητες. Οι αδενώδεις τρίχες περιέχουν δευτερογενείς μεταβολίτες εξειδικευμένους ανάλογα με το είδος του φυτού, όπως τερπενοειδή και φαινολικά ενθυλακωμένα ανάμεσα στα κυτταρικά τοιχώματα και την εφυμενίδα. Η επαφή προκαλεί διάρρηξη των ιστών και απελευθέρωση του περιεχομένου που έχει δυνατή οσμή και δυσάρεστη γεύση. Ωστόσο, ο ρόλος των τριχωμάτων δεν περιορίζεται στην άμυνα. Όταν καμφθούν ή τραυματιστούν λειτουργούν ως αισθητήρες διαβιβάζοντας ηλεκτρικά και χημικά σήματα στα γειτονικά κύτταρα (Taiz et. al. 2017).

Η δεύτερη γραμμή άμυνας περιλαμβάνει βιοχημικούς μηχανισμούς, οι οποίοι μπορεί να επεκτείνονται τοπικά ή συστημικά και να είναι είτε εγγενείς είτε επαγόμενοι. Οι ιδιοσυστατικές άμυνες (constitutive defenses) είναι διαρκώς παρούσες. Αντίθετα, οι επαγόμενες άμυνες (inducible defenses) απαιτούν ειδικό σύστημα εντοπισμού και σηματοδότησης, το οποίο μπορεί να αντιληφθεί την παρουσία ενός φυτοφάγου ή παθογόνου οργανισμού και να μεταβάλει την έκφραση γονιδίων και τον μεταβολισμό. Άρα, ενεργοποιούνται ως απόκριση μετά από επίθεση. Και στις δύο περιπτώσεις παράγονται πρωτογενείς και δευτερογενείς μεταβολίτες. Οι πρωτογενείς μεταβολίτες παράγονται από όλα τα φυτά και εμπλέκονται άμεσα στις διεργασίες αύξησης και ανάπτυξης. Περιλαμβάνουν σάκχαρα, αμινοξέα, λιπαρά οξέα, λιπίδια, νουκλεοτίδια καθώς και μεγαλύτερες μονάδες που προέρχονται από αυτές τις ενώσεις, όπως πρωτεΐνες, πολυσακχαρίτες, μεμβράνες και ακόμη DNA και RNA. Αντίθετα, οι δευτερογενείς μεταβολίτες παρουσιάζουν πολύ υψηλή

εξειδίκευση σε επίπεδο είδους και με βάση τη χημική τους δομή ανήκουν σε τρεις μεγάλες ομάδες: τα τερπένια, τις φαινολικές ενώσεις και τις αζωτούχες ενώσεις. Μία σημαντική εξαίρεση αυτού του κανόνα αποτελούν οι φυτικές ορμόνες κυτοκίνινες, γιββερελλίνες, βρασσινοστεροειδή, αποκοπτικό οξύ και στριγγολακτόνες, οι οποίες αν και είναι προϊόντα του δευτερογενούς μεταβολισμού θεωρούνται πρωτογενείς μεταβολίτες, διότι είναι απαραίτητες για την αύξηση και την ανάπτυξη. Πιο αναλυτικά, η ιδιοσυστατική άμυνα του φυτού περιλαμβάνει τη συνεχή παραγωγή μεταβολιτών με τοξική δράση, για παράδειγμα ταννίνες και αλκαλοειδή. Οι ιδιοσυστατικοί δευτερογενείς μεταβολίτες συσσωρεύονται στα κύτταρα αυξάνοντας την πιθανότητα αυτό-τοξικότητας. Για να αποφευχθεί αυτό πρέπει να εξασφαλιστεί η ασφαλής αποθήκευση των ουσιών αυτών σε αδιάρρηκτα κυτταρικά οργανίδια, τα οποία πρέπει να είναι σχετικά απομονωμένα. Έτσι, οι τοξικοί δευτερογενείς μεταβολίτες συσσωρεύονται στα χυμοτόπια ή σε άλλα εξειδικευμένα ανατομικά εξαρτήματα και στις αδενώδεις τρίχες. Άρα, οι τοξικές ουσίες απελευθερώνονται και εμφανίζουν δράση στα σημεία προσβολής. Ωστόσο, τα περισσότερα φυτά εκτός από την ιδιοσυστατική άμυνα έχουν αναπτύξει και μηχανισμούς επαγόμενης άμυνας. Αυτοί οι μηχανισμοί επιτρέπουν μία πιο εξειδικευμένη και ευέλικτη απάντηση στους κινδύνους. Παράγονται πρωτεΐνες με προστατευτική δράση, για παράδειγμα λεκτίνες και αμυντικοί δευτερογενείς μεταβολίτες (Taiz et. al. 2017).

Η επαγόμενη άμυνα χωρίζεται σε δύο κατηγορίες: τη συστηματική επίκτητη αντίσταση ή αλλιώς Systemic Acquired Resistance (SAR) και την επαγόμενη συστηματική αντίσταση ή αλλιώς Induced Systemic Resistance (ISR). Η πρώτη κατηγορία άμυνας είναι αποτελεσματική έναντι πολλών παθογόνων. Στηρίζεται στην παραγωγή σαλικυλικού οξέος και στην παραγωγή πρωτεϊνών που ονομάζονται Pathogenesis-Related proteins (PR). Η δεύτερη κατηγορία άμυνας εμφανίζεται ως απάντηση στον αποικισμό της ρίζας του φυτού από συγκεκριμένα μη παθογόνα βακτήρια της ριζόσφαιρας που ονομάζονται Plant Growth Promoting Rhizobacteria (PGPRs) και προάγουν την ανάπτυξη του φυτού. Χαρακτηρίζεται από τη σηματοδότηση γιασμονικού οξέος και αιθυλενίου. Αυτός ο τύπος άμυνας έχει εντοπιστεί και στο φυτό της τομάτας. Επιπλέον, πέρα από τα PGPRs, έχει βρεθεί η ύπαρξη μυκήτων που προωθούν την ανάπτυξη και την άμυνα του φυτού και επάγουν την ISR. Αυτοί οι μικροοργανισμοί ονομάζονται Plant Growth Promoting Fungi (PGPFs) και περιλαμβάνουν τον μύκητα *Fusarium solani* στέλεχος K (FsK) (Kavroulakis et. al. 2007).

Στην επαγόμενη άμυνα, τα φυτά διαθέτουν υποδοχείς στην επιφάνεια των κυττάρων τους που λέγονται surface localized Pattern Recognition Receptors (PRRs) και έχουν την ικανότητα να εντοπίζουν συντηρημένα μοριακά στοιχεία παθογόνων που λέγονται Pathogen Associated Molecular Patterns (PAMPs). Για παράδειγμα, μπορεί να είναι χιτίνη για τους μύκητες και μαστίγια για τα βακτήρια. Έτσι, επάγεται η φυτική άμυνα PAMP Triggered Immunity – PTI που προστατεύει από μεγάλο εύρος παθογόνων. Ως απάντηση οι παθογόνοι οργανισμοί απέκτησαν εξελικτικά τις πρωτεΐνες τελεστές που είναι ικανές να εισχωρήσουν στο εσωτερικό των φυτικών κυττάρων μέσω των μυζητήρων και να τροποποιήσουν τις αντιδράσεις του φυτού. Ωστόσο, οι πρωτεΐνες τελεστές δεν είναι άτρωτες, διότι οι φυτικοί οργανισμοί με τη σειρά τους απέκτησαν εξελικτικά αμυντικές πρωτεΐνες που στοχεύουν τους τελεστές σε επίπεδο στελέχους. Έτσι επάγεται η φυτική άμυνα Effector Triggered Immunity – ETI (Taiz et. al. 2017, Langin et. al. 2020).

Ένας συνήθης φυσιολογικός φαινότυπος που σχετίζεται με την ETI είναι η αντίδραση υπερευαισθησίας. Σε αυτή την περίπτωση τα κύτταρα που περιβάλλουν άμεσα το σημείο προσβολής νεκρώνονται γρήγορα, στερώντας από το παθογόνο θρεπτικά συστατικά και περιορίζοντας την εξάπλωσή του. Μάλιστα, αυτό γίνεται με τη συσσώρευση τοξικών ουσιών, όπως οι δραστικές μορφές οξυγόνου (ROS) και μονοξείδιο του αζώτου (NO). Το αποτέλεσμα είναι μία μικρή περιοχή νεκρού ιστού, αλλά το υπόλοιπο φυτό δεν επηρεάζεται.

#### 1.4 Μύκητες

Οι μύκητες αποτελούν ένα από τα πέντε βασίλεια των έμβιων όντων και περιλαμβάνουν μονοκύτταρους ή πολυκύτταρους ευκαρυωτικούς οργανισμούς (Whittaker 1969). Αυτοί οι οργανισμοί παρουσιάζουν μεγάλη ποικιλομορφία. Οι περισσότεροι μοιάζουν με φυτά, αλλά δεν έχουν χλωροπλάστες και άρα δεν έχουν

ικανότητα φωτοσύνθεσης (Ζίφα Α. et. al. 2011). Έχουν περιγραφεί περίπου 120.000 είδη μυκήτων, αλλά εκτιμάται ότι ο συνολικός αριθμός στη φύση βρίσκεται περίπου στα 1.5 εκατομμύρια (Hawksworth 2021, Kirk et. al. 2021).

Η φυλογενετική ταξινόμηση των μυκήτων έχει βασιστεί στην εύρεση ομοιοτήτων στο DNA μεταξύ οργανισμών μέσω αλληλούχησης των γονιδιωμάτων και βιοπληροφορικής ανάλυσης ή σε μορφολογικά και φυσιολογικά χαρακτηριστικά. Το βασίλειο των μυκήτων διαχωρίζεται σε οκτώ φύλα (Sratafora et. al. 2018).

- 1) Cryptomycota
- 2) Microsporidia
- 3) Blastocladiomycota
- 4) Chytridiomycota
- 5) Zoopagomycota
- 6) Mucoromycota
- 7) Ascomycota
- 8) Basidiomycota

Οι μύκητες μοιράζονται κάποια γενικά χαρακτηριστικά και αυτά είναι τα εξής (Webster & Weber 2016)

- 1) Είναι ετερότροφοι οργανισμοί αφού δε διαθέτουν φωτοσυνθετικό σύστημα. Τρέφονται κυρίως με την απορρόφηση παρά με την πρόσληψη ουσιών. Παρουσιάζουν εξωκυτταρική πέψη.
- 2) Πάνω ή μέσα στο υπόστρωμα που αναπτύσσονται δημιουργούν ακίνητα μυκήλια που αποτελούνται από μία μάζα διακλαδισμένων νηματίων (υφές). Μπορεί να προκύψουν και κινούμενες δομές.
- 3) Τα κυτταρικά τους τοιχώματα αποτελούνται κυρίως από γλυκάνες και χιτίνη.
- 4) Η μίτωση, σε αντίθεση με όλους τους ευκαρυωτικούς οργανισμούς, συμβαίνει μέσα στον πυρήνα. Ο πυρηνικός φάκελος δεν καταστρέφεται και η άτρακτος σχηματίζεται μέσα στον πυρήνα.
- 5) Οι αναπαραγωγικές τους φάσεις είναι η σεξουαλική φάση, η παρασεξουαλική φάση και τέλος η ασεξουαλική φάση.
- 6) Παράγουν σπόρια.

Όσον αφορά τα μορφολογικά τους χαρακτηριστικά, συνήθως αποτελούνται από πολύ λεπτά νημάτια, μη ορατά με γυμνό μάτι και γνωστά ως υφές. Το κάθε νημάτιο συγκροτείται από κύτταρα διαχωρισμένα μεταξύ τους με εγκάρσια διαχωριστικά τοιχώματα που διαθέτουν πόρους, τα σέπτα (septa). Έτσι, το κυτταρόπλασμα ρέει συνεχώς από το ένα κύτταρο στο άλλο κατά μήκος του νηματίου και τελικά οι πρωτεΐνες που συντίθενται στα κύτταρα των νηματίων μεταφέρονται σε διάφορα σημεία του σώματος. Το σύνολο των νηματίων αποτελεί το σώμα του μύκητα και λέγεται μυκήλιο. Πάνω στο μυκήλιο ορισμένων μυκήτων αναπτύσσονται αναπαραγωγικές δομές από διαπλεκόμενα νημάτια, όπως τα μανιτάρια και οι τρούφες.

Όσον αφορά τη θρέψη, οι μύκητες δε φωτοσυνθέτουν, άρα τρέφονται από το περιβάλλον και άλλους οργανισμούς. Έτσι, χωρίζονται σε δύο κατηγορίες και είναι προαιρετικά ή υποχρεωτικά:

- 1) Σαπροφυτικοί μύκητες: αποσυνθέτουν τη νεκρή οργανική ύλη και προσλαμβάνουν θρεπτικά από αυτήν, όπως γλυκόζη, άζωτο, οξυγόνο και υδρογόνο.
- 2) Παρασιτικοί ή βιότροφοι μύκητες: τρέφονται από ζωντανούς οργανισμούς. Πιο συγκεκριμένα, εισέρχονται στον ξενιστή και απορροφούν τα θρεπτικά συστατικά είτε μέσω των τοιχωμάτων των νηματίων είτε μέσω μυζητήρων.

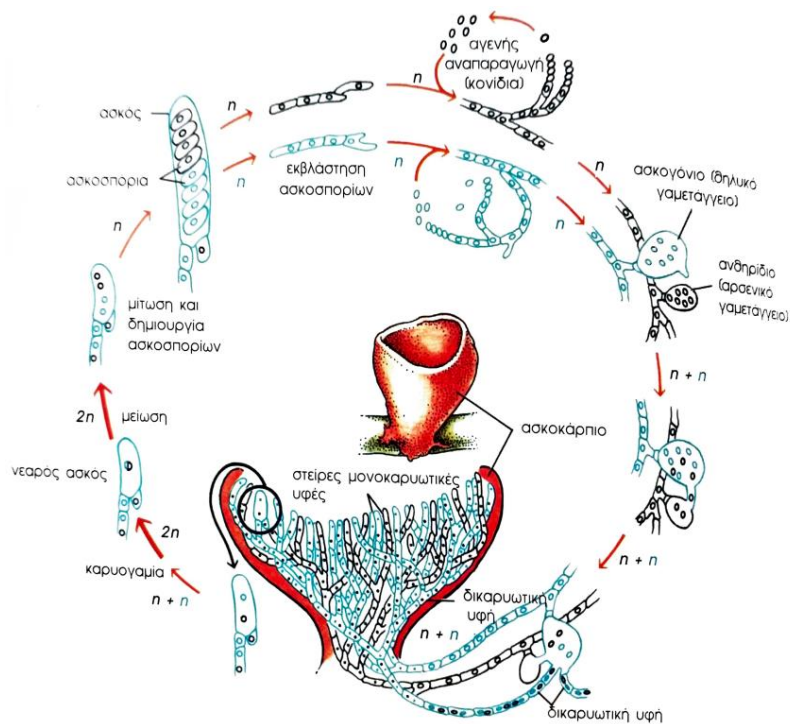
Όσον αφορά την αναπαραγωγή, γίνεται είτε αγενώς είτε εγγενώς και τα περισσότερα είδη αναπαράγονται και με τους δύο τρόπους. Η κυριότερη αναπαραγωγική μονάδα και στις δύο περιπτώσεις είναι το σπόριο. Η αγενής αναπαραγωγή πραγματοποιείται είτε με μίτωση πολλών κυττάρων είτε με εκβλαστήματα, τα οποία αναπτύσσονται από το αρχικό κύτταρο και στη συνέχεια αποκόβονται για να γίνουν ανεξάρτητα νέα κύτταρα είτε με την παραγωγή σπορίων (κονίδια) από ειδικές δομές που ονομάζονται σποριάγγεια. Η εγγενής αναπαραγωγή περιλαμβάνει τρεις φάσεις:

- 1) Πλασμογαμία: γίνεται σύζευξη κυττάρων ή μυκηλίων από μύκητες διαφορετικού φύλου.
- 2) Καρυογαμία: γίνεται η ένωση των απλοειδών πυρήνων προς σχηματισμό ενός διπλοειδούς κυττάρου.
- 3) Μείωση: οι πυρήνες επαναφέρονται στον απλοειδή αριθμό χρωμοσωμάτων.

Βάσει του τρόπου αναπαραγωγής, οι μύκητες χωρίζονται σε τέσσερις ομάδες:

- 1) Ζυγομύκητες (Zygomycota): αναπαράγονται αγενώς και εγγενώς. Κατά την αγενή αναπαραγωγή το τοίχωμα του σποριαγγείου που φιλοξενεί τα απλοειδή αγενή σπόρια αποδομείται και αυτά απελευθερώνονται και μεταφέρονται με τον αέρα. Κάτω από κατάλληλες συνθήκες θερμοκρασίας και υγρασίας, τα σπόρια βλασταίνουν δημιουργώντας νέες υφές. Κατά την εγγενή αναπαραγωγή η συγχώνευση δύο γενετικά διαφορετικών νηματίων οδηγεί άμεσα στον σχηματισμό του ζυγωτού. Το ζυγωτό αποθηκεύεται στα σποριάγγεια και η μείωση παρατηρείται λίγο πριν την εκβλάστηση.
- 2) Ασκομύκητες (Ascomycota): αναπαράγονται αγενώς και εγγενώς. Ένα ασκοσπόριο εκβλασταίνει παράγοντας ένα απλοειδές μονοκαρυωτικό μυκήλιο, το οποίο αναπαράγεται αγενώς με απλοειδή σπόρια (κονίδια). Όταν τα μυκήλια δημιουργούν γαμετάγγεια, μπορεί να αρχίσει η εγγενής αναπαραγωγή. Τότε, το αρσενικό και το θηλυκό γαμετάγγειο συντήκονται και οι πυρήνες του αρσενικού μεταφέρονται στο θηλυκό. Η υφή που δημιουργείται είναι δικαρυωτική, διότι κάθε της κύτταρο περιέχει ένα ζευγάρι απλοειδών πυρήνων. Στη συνέχεια, δημιουργείται το ασκοκάρπιο, όπου αυτή η υφή πολλαπλασιάζεται, διαφοροποιείται και δημιουργεί τους ασκούς. Μέσα στον κάθε ασκό οι δύο απλοειδείς πυρήνες τελικά συντήκονται και διαιρούνται μειωτικά προς την παραγωγή νέων απλοειδών πυρήνων που είναι ικανοί να διαιρεθούν μιτωτικά πλέον. Ο ώριμος ασκός περιέχει οκτώ απλοειδή ασκοσπόρια. Ο μύκητας *Fusarium solani* στέλεχος K είναι ένας τέτοιος μύκητας και στην περίπτωση αυτής της μελέτης αναπαράχθηκε αγενώς.
- 3) Βασιδιομύκητες (Basidiomycota): η εγγενής αναπαραγωγή είναι πιο διαδεδομένη από την αγενή. Η αναπαραγωγική δομή είναι το βασίδιο, μέσα στο οποίο σχηματίζεται το ζυγωτό και στη συνέχεια τα βασιδιοσπόρια. Τα βασιδιοσπόρια εκβλασταίνουν και δημιουργούν πρωτογενή μονοκαρυωτικά μυκήλια. Η σύντηξη δύο διαφορετικών μονοκαρυωτικών υφών δημιουργεί ένα δικαρυωτικό μυκήλιο. Αυτό αυξάνεται και διαφοροποιείται δημιουργώντας τα βασίδια που περιέχουν δύο πυρήνες. Όταν τα βασίδια ωριμάζουν, οι δύο πυρήνες συντήκονται, ακολουθεί μείωση και δημιουργία τεσσάρων απλοειδών πυρήνων. Ο κάθε απλοειδής πυρήνας δίνει γένεση σε ένα βασιδιοσπόριο και μετά αποικοδομείται.
- 4) Ατελείς μύκητες (Imperfect fungi): είναι όλοι οι μύκητες στους οποίους δεν έχει παρατηρηθεί ποτέ εγγενής αναπαραγωγή. Ωστόσο, εμφανίζουν ένα είδος γενετικού ανασυνδυασμού που ονομάζεται παρασεξουαλικότητα. Στην πλειοψηφία τους είναι ασκομύκητες.





Εικόνα 4: Η αναπαραγωγή των ασκομυκήτων (Ζίφα Α. et. al. 2011).

Τέλος, οι σχέσεις αμοιβαιότητας που αναπτύσσουν οι μύκητες με αυτότροφους οργανισμούς είναι οικολογικά σημαντικές και αφορούν τη συμβιωτική σχέση με φύκη, κυανοβακτήρια, φυτά και έντομα (Ζίφα Α. et. al. 2011).

### 1.5 Ενδοφυτικοί μύκητες

Ως ενδοφυτισμός ορίζεται η κατάσταση στην οποία ένας ενδοφυτικός οργανισμός αποικίζει τους ιστούς ενός φυτού και αναπτύσσεται μέσα σε αυτούς, χωρίς να προκαλεί αρνητικά συμπτώματα στο ίδιο το φυτό (Skiada et. al. 2019, Wilson 1995, Stone et. al. 2000, Brundrett 2004). Ο αποικισμός μπορεί να ελεγχθεί με ιστολογικές μεθόδους ή με άμεση ενίσχυση απομονωμένου DNA από φυτικό ιστό. Για τους ενδοφυτικούς οργανισμούς τα χερσαία φυτά αποτελούν ένα χωρικά και χρονικά πολύπλοκο ενδιαίτημα και τέτοιες σχέσεις είναι πολύ συχνές στη φύση. Μάλιστα, αυτές οι σχέσεις περιλαμβάνουν όλο το φάσμα της συμβίωσης. Οι ενδοφυτικοί οργανισμοί μπορεί να είναι βακτήρια, φύκη και μύκητες και μπορεί να σχηματίζουν σχέσεις αμοιβαιότητας (mutualism), ομοσιτισμού (commensalism) ή παρασιτισμού (parasitism) (Stone et. al. 2000). Ωστόσο, τα όρια είναι ρευστά και μέσω μεταλλάξεων απώλειας λειτουργίας των γονιδίων που προκαλούν τοξικότητα (Virulence Genes) κάποιες σχέσεις από αρνητικές για το φυτό μπορεί να γίνουν ουδέτερες ή θετικές (Alam et. al. 2021) ή να συμβεί και το αντίθετο. Η αλληλεπίδραση χαρακτηρίζεται από μία λεπτά ρυθμισμένη ισορροπία μεταξύ της λοιμογόνου ικανότητας του ενδόφυτου και του αμυντικού συστήματος του φυτού. Επιπλέον, φαίνεται ότι πολλά φυτά ξενιστές αναγνωρίζουν και αποκρίνονται με τα ίδια αρχικά σηματοδοτικά μονοπάτια σε ενδοφυτικούς και παθογόνους μύκητες (Skiada et. al. 2019), τονίζοντας έτσι τη στενή εξελικτική σχέση μεταξύ τους.

Κατά τον αποικισμό του φυτού οι ενδοφυτικοί μύκητες παράγουν δευτερογενείς μεταβολίτες χαμηλού μοριακού βάρους και μεγάλης ετερογένειας, κάτι που αντανάκλα και την εξειδίκευση αυτών των αλληλεπιδράσεων (Alam et. al. 2021). Μάλιστα, υποστηρίζεται ότι τα γονίδια που κωδικοποιούν για αυτούς

τους μεταβολίτες οργανώνονται σε ομάδες πάνω σε ολόκληρο το γονιδίωμα (Andersen et al. 2013), είναι προϊόν συνεξέλιξης μεταξύ του φυτού και του ενδοφυτικού οργανισμού (Vaishnav & Demain 2010) και επηρεάζονται μέσω οριζόντιας γονιδιακής μεταφοράς (Slot & Rokas 2011, Soanes & Richards 2014). Επιπλέον, ο αριθμός των δευτερογενών μεταβολιτών που παράγονται από τους ενδοφυτικούς μύκητες είναι μεγαλύτερος σε σύγκριση με οποιοδήποτε άλλο ενδοφυτικό οργανισμό και αυτό τους καθιστά πολύ σημαντικούς για πειραματικές μελέτες (Zhang et. al. 2006). Πέρα από δευτερογενείς μεταβολίτες παράγονται και πρωτεΐνες τελεστές (Alam et. al. 2021). Σκοπός τόσο των δευτερογενών μεταβολιτών όσο και των πρωτεϊνών τελεστών είναι η εξουδετέρωση επίφυτων και παθογόνων και ο επιτυχημένος αποικισμός του φυτού.

Επίσης, οι ενδοφυτικοί μύκητες είναι δυνατόν να προωθήσουν τη φυτική ανάπτυξη και την αντοχή σε βιοτικές και αβιοτικές καταπονήσεις. Αυτό μπορεί να συμβεί επεμβαίνοντας στα μεταβολικά μονοπάτια και στα μονοπάτια μοριακής σηματοδότησης του φυτού ξενιστή. Ένα πολύ σημαντικό παράδειγμα είναι η αντοχή στην ξηρασία, διότι επηρεάζει τη φωτοσύνθεση, την κυτταρική ανάπτυξη και την ορμονική ρύθμιση του φυτού (Kavroulakis et al. 2018).

Φαίνεται ότι οι ασκομύκητες αναπτύσσουν ενδοφυτικές σχέσεις σε μεγαλύτερο βαθμό από τους βασιδιομύκητες (Skiada et. al. 2019). Μάλιστα και γένη φυτοπαθογόνων μυκήτων, όπως το *Fusarium*, περιέχουν ενδοφυτικούς μύκητες. Ένα παράδειγμα είναι το μυκητιακό στέλεχος Fsk.

### 1.5.1 *Fusarium solani* στέλεχος K (Fsk)

Το γένος *Fusarium* ανήκει στο βασίλειο των μυκήτων, στο φύλο των ασκομυκήτων, στην τάξη των Sordariomycetes, στην ομοταξία των Hygrocreales και στην οικογένεια Nectriaceae (Coleman J. 2015). Ακολουθώντας, το είδος *Fusarium solani* είναι ένας ασκομύκητας και αντιπροσωπεύει την ασεξουαλική κατάσταση του μύκητα *Nectria haematococca*. Απομονώθηκε πρώτη φορά από το φυτό της τομάτας. Είναι μέλος ενός μονοφυλετικού κλάδου που περιέχει τουλάχιστον 60 διαφορετικά φυλογενετικά είδη και είναι γνωστός ως *F. solani* species complex (FSSC). Μάλιστα, τα μέλη αυτού του κλάδου είναι παθογόνα του ανθρώπου με ιατρικό ενδιαφέρον και παθογόνα, ενδοφυτικοί και σαπροτροφικοί οργανισμοί που αποικίζουν τα φυτά και εμφανίζουν αγρονομικό ενδιαφέρον (Skiada et. al. 2019). Επίσης, εντοπίζονται στο χώμα και σε φυτική ύλη που αποσυντίθεται ως αποικοδομητές (Zhang et. al. 2006). Αυτή η ικανότητα τους να αποικίζουν ποικίλα περιβάλλοντα αντανακλά τη γενετική πλαστικότητα και τη μεταβολική ποικιλομορφία τους. Το ευρύ φάσμα των ξενιστών υπάρχει σε ολόκληρο το σύμπλεγμα (FSSC), αλλά και σε κάθε είδος ξεχωριστά. Για παράδειγμα, η διερεύνηση του φάσματος των ξενιστών του *F. solani* f. sp. *eumartii* απέδειξε ότι πέρα από το φυτό της πατάτας, υπάρχουν και άλλα φυτά ξενιστές, όπως η τομάτα και η πιπεριά. Επιπλέον, υπάρχουν είδη του συμπλέγματος που είναι ικανά να προκαλέσουν ασθένειες τόσο στον άνθρωπο όσο και στα φυτά.



Εικόνα 5: Καλλιέργεια του μύκητα *Fusarium solani* στέλεχος K σε θρεπτικό υλικό PDA.

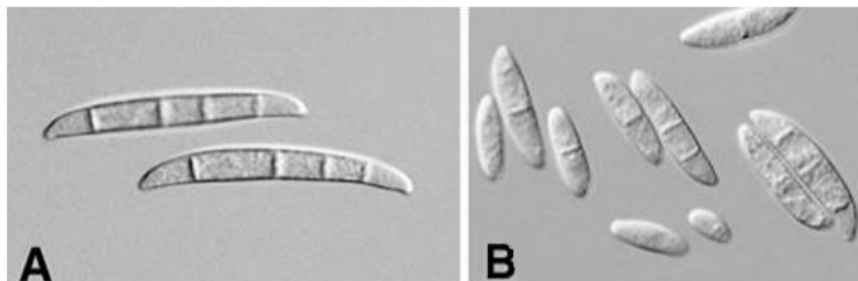
Τα είδη που συνδέονται με ευκαιριακές λοιμώξεις στον άνθρωπο και σε άλλα ζώα είναι κυρίως τα *Fusarium oxysporum* και *Fusarium solani* (Zhang et. al. 2006). Μπορούν να προκαλέσουν τοπικές ή εκτεταμένες λοιμώξεις. Κάποια παραδείγματα είναι η ονυχομυκητίαση, λοιμώξεις του δέρματος και κερατίτιδα.

Από την άλλη, τα είδη που συνδέονται με παθογένεια στα φυτά είναι κυρίως το *Fusarium proliferatum*, *Fusarium graminearum*, αλλά και τα είδη *Fusarium oxysporum* και *Fusarium solani* που αναφέρθηκαν



παραπάνω (Askun 2018). Μπορούν να προκαλέσουν μαρασμό της ρίζας και σήψη. Η έκταση της νέκρωσης του φυτικού ιστού ποικίλλει σε μεγάλο βαθμό ανάλογα με το είδος και εκδηλώνεται ως μαρασμός, παύση της αύξησης, χλώρωση και πληγές στον βλαστό και στα φύλλα (Coleman J. 2015).

Όσον αφορά τα αναπαραγωγικά χαρακτηριστικά του *Fusarium solani*, ως ασκομύκητας μπορεί να παράγει δύο είδη ασεξουαλικών κονιδίων στις υφές του. Τα μακροκονίδια είναι σχετικά μεγάλα, ευθεία ή και ελαφρώς καμπυλωμένα, ενώ τα μικροκονίδια είναι ωσειδή και ελλειψοειδή.



Εικόνα 5: Α) Μορφολογία των μακροκονιδίων Β) Μορφολογία των μικροκονιδίων. Είδος *Fusarium solani* (The *Fusarium Laboratory Manual*, Leslie J. and Summerell B., 2002).

Ωστόσο, δεν είναι όλα τα στελέχη παθογόνα. Το στέλεχος FsK είναι ένα ενδοφυτικό μη παθογόνο στέλεχος που αρχικά απομονώθηκε από ριζικούς ιστούς φυτών τομάτας. Έτσι, είναι γνωστό ότι αρχικά αναπτύσσεται ενδοφυτικά στον φλοιό της ρίζας, εισχωρεί στις ηθμαγγειώδεις δεσμίδες, πολλαπλασιάζεται στο αγγειακό σύστημα και καταλήγει στο τελικό τμήμα της ρίζας στη διεπαφή με τον βλαστό που ονομάζεται και λαιμός (crown). Ωστόσο, ο αποικισμός των ηθμαγγειωδών δεσμίδων είναι χαρακτηριστικό παθογόνων μυκήτων. Για αυτό τον λόγο, η δυνατότητα του ωφέλιμου στελέχους να αναπτύσσεται άφθονα μέσα στο φυτό χωρίς να του προκαλεί αρνητικά συμπτώματα αποκαλύπτει μία ασυνήθιστη αλληλεπίδραση. Το ενδοφυτικό στέλεχος είναι ικανό να αποικίζει ένα μεγάλο εύρος φυτών και να τα προστατεύει από παθογόνα της ρίζας και των φύλλων, αλλά και να ενισχύει την αντοχή τους σε καταπονήσεις όπως η ξηρασία. Για παράδειγμα, δρα ανταγωνιστικά με είδη όπως το *Fusarium oxysporum* που είναι παθογόνο της ρίζας και το *Septoria lycopersici* που είναι παθογόνο του φυλλώματος. Η σηματοδότηση αιθυλενίου και γιασμονικού οξέος παίζει σημαντικό ρόλο (Κανρουλάκης et. Al. 2007, 2018). Παράλληλα, το στέλεχος FsK έχει την ικανότητα να αποικίζει κι άλλα φυτά, συμπεριλαμβανομένων και ψυχανθών όπως το *Lotus japonicus* και το *Medicago truncatula*. Σε αυτή την περίπτωση το ενδόφυτο έχει την ικανότητα να αποικίσει τους ιστούς της ρίζας, του στέμματος και των φύλλων. Τέλος, διατηρεί την ικανότητα να ενισχύει την αντοχή του φυτού σε βιοτικό και αβιοτικό στρες, όπως και στην περίπτωση της τομάτας (Skiada et. Al. 2019).

### 1.5.2 Πρωτεΐνες τελεστές του μυκητιακού στελέχους FsK

Όπως προαναφέρθηκε τα φυτά διαθέτουν εξωκυτταρικούς υποδοχείς (PRRs) που εντοπίζουν συντηρημένα μοριακά στοιχεία παθογόνων (PAMPs). Έτσι, επάγεται η φυτική άμυνα PAMP Triggered Immunity – PTI και ακολουθεί η εξέλιξη των πρωτεϊνών τελεστών του εισβολέα και τέλος η εξέλιξη αντίστοιχων αμυντικών πρωτεϊνών του φυτού (Taiz et. al. 2017, Langin et. al. 2020).

Οι φυτοπαθογόνοι οργανισμοί μπορούν να παράγουν ένα ευρύ φάσμα πρωτεϊνών τελεστών, οι οποίες ενισχύουν την ικανότητά τους να αποικίσουν με επιτυχία το φυτό ξενιστή και να καταφέρουν πρόσβαση στην τροφή τους. Οι τελεστές είναι μόρια που εκκρίνονται και στοχεύουν άλλες πρωτεΐνες και μεταβάλλουν τον δομικό φυτικό μεταβολισμό και την ορμονική ρύθμιση, ενώ παράλληλα καταστέλλουν την άμυνα του φυτού (Taiz et. al. 2017, Panstruga & Dodds 2009). Διακρίνονται σε τρεις κύριες κατηγορίες: ένζυμα, τοξίνες και ρυθμιστές ανάπτυξης. Επειδή η εισβολή σε έναν κατάλληλο ξενιστή είναι συχνά το πιο δύσκολο βήμα για ένα παθογόνο, πολλά παθογόνα παράγουν υδρολυτικά ένζυμα που μπορούν να αποικοδομήσουν την εφυμενίδα των φυτών και τα πρωτογενή και δευτερογενή κυτταρικά τοιχώματα. Μεταξύ αυτών των ενζύμων υπάρχουν υμενινάσες, κυτταρινάσες, ξυλανάσες, πηκτινάσες και πολυγαλακτουρονάσες. Επιπλέον, πολλά παθογόνα παράγουν ένα πλήθος τοξινών που δρουν έναντι συγκεκριμένων πρωτεϊνών του φυτού. Για παράδειγμα, η ΗC-τοξίνη του μύκητα *Cochliobolus carbonum* και η φουζικοκκίνη του μύκητα *Fusicoccum amygdali*. Η φουζικοκκίνη οδηγεί σε άνοιγμα των στομάτων και μαρασμό του φυτού. Μερικά παθογόνα παράγουν μόρια τελεστές που παρεμποδίζουν σημαντικά την ορμονική ισορροπία του φυτού ξενιστή, για παράδειγμα ο μύκητας *Gibberella fujikuroi*, ενώ άλλα παράγουν μόρια τελεστές που στοχεύουν στον πυρήνα του φυτικού κυττάρου και προκαλούν σημαντικές αλλαγές στην έκφραση γονιδίων, για παράδειγμα το βακτήριο *Xanthomonas*. Στην τελευταία περίπτωση, οι πρωτεΐνες τελεστές είναι τύπου των ενεργοποιητών μεταγραφής (TAL), συνδέονται με το DNA του φυτού ξενιστή και ενεργοποιούν την έκφραση γονιδίων που έχουν θετική επίδραση στην ανάπτυξη και τη διάδοση του ίδιου του παθογόνου (Taiz et. al. 2017).

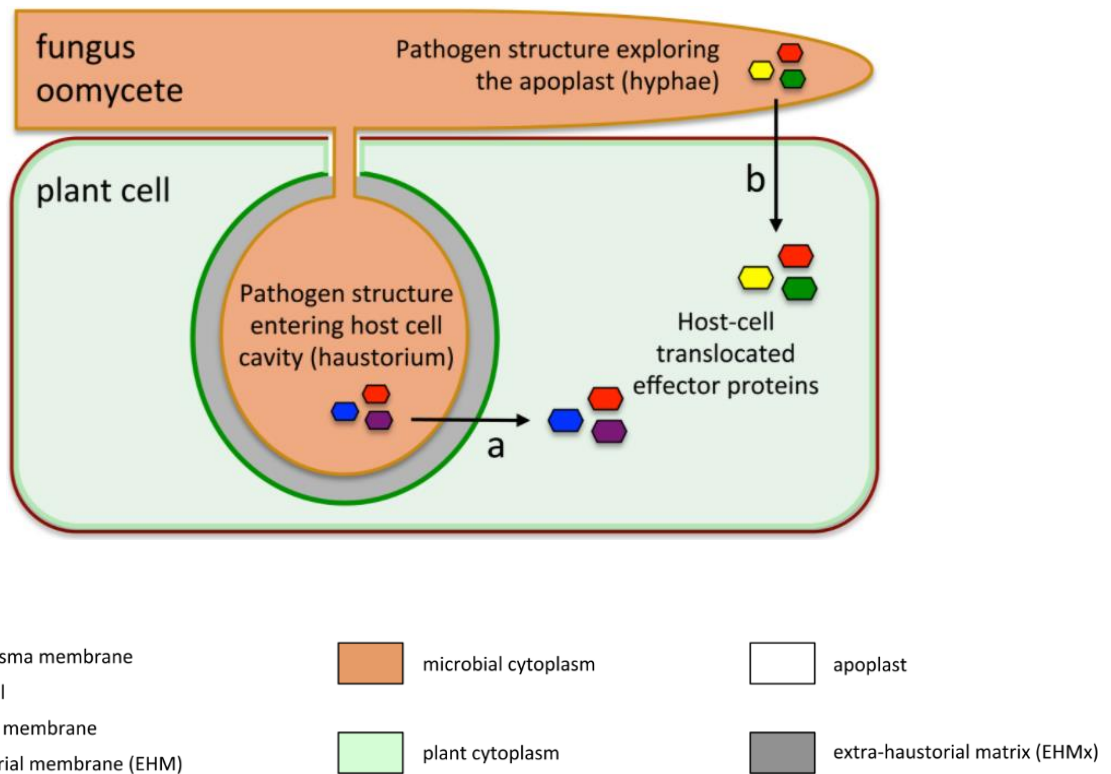
Είναι γνωστό ότι οι πρωτεΐνες τελεστές τροποποιούν τις λειτουργίες του φυτού ξενιστή, στοχεύοντας στις υποκυτταρικές του αποκρίσεις. Αυτά τα μονοπάτια που επηρεάζονται ονομάζονται Effector Targeted Pathways (ETPs). Αρχικά, οι ερευνητές θεωρούσαν ότι αυτά τα μονοπάτια σχετίζονται μόνο με την άμυνα του φυτού. Ωστόσο, πλέον γνωρίζουν ότι συμπεριλαμβάνουν έναν μεγάλο αριθμό μονοπατιών. Πιο αναλυτικά, έχουν βρεθεί πρωτεΐνες τελεστές που στοχεύουν στη διαδικασία της σίγησης της γονιδιακής έκφρασης μέσω παρεμβολής του RNA (RNAi), τη μεταγραφή του DNA, τη μεταφορά ουσιών μέσα και έξω από το κύτταρο, τη διακυτταρική σηματοδότηση και σε συντηρημένα μονοπάτια αποικοδόμησης πρωτεϊνών, όπως στο μονοπάτι ουβικουιτίνης και του πρωτεασώματος ή στην αυτοφαγία. Αυτά τα μονοπάτια είναι πολύ σημαντικά για τη λειτουργία του κυττάρου, για αυτό και αποτελούν ελκυστικούς στόχους για τα μόρια τελεστές. (Langin et. al. 2020).

Για παράδειγμα, το μονοπάτι αποικοδόμησης πρωτεϊνών που συμμετέχουν η ουβικουιτίνη και το πρωτεασώμα (Ubiquitin Proteasome System – UPS) και το μονοπάτι της αυτοφαγίας είναι πολύ σημαντικά για τη φυτική άμυνα και επηρεάζουν το τελικό αποτέλεσμα των βιοτικών αλληλεπιδράσεων. Το μονοπάτι UPS συμβάλλει στην πρωτεόσταση, δηλαδή στην απομάκρυνση λανθασμένα αναδιπλωμένων και μη λειτουργικών πρωτεϊνών ή και πρωτεϊνών που απλά δεν χρειάζεται πλέον το φυτό. Έτσι, διατηρούνται μόνο οι λειτουργικές και απαραίτητες πρωτεΐνες. Από την άλλη, το μονοπάτι της αυτοφαγίας είναι ένα άλλο σημαντικό μονοπάτι αποικοδόμησης και συμβάλλει στην κυτταρική ομοιόσταση και στην αντοχή στο στρες (Langin et. al. 2020).

Όσον αφορά το μυκητιακό στέλεχος FSK, όπως προαναφέρθηκε, είναι ένα ευεργετικό στέλεχος που προστατεύει το φυτό ξενιστή από παθογόνα της ρίζας και των φύλλων και ενισχύει την αντοχή του σε αβιοτικές καταπονήσεις. Παράγει επίσης ένα ευρύ φάσμα πρωτεϊνών τελεστών που αποτελούν κυρίως ένζυμα, πρωτεϊνικές επικράτειες και ρυθμιστές (Langin et. al. 2020). Ωστόσο, υπάρχουν πολλά ακόμα που πρέπει να διαλευκανθούν για τη λειτουργία τους. Δεν είναι γνωστό ακόμα αν δρουν με τους ίδιους μηχανισμούς που λειτουργούν οι πρωτεΐνες τελεστές παθογόνων οργανισμών.

Ένα γενικό μοντέλο για τη δράση των πρωτεϊνών τελεστών μπορεί να περιγραφεί ως εξής. Αρχικά, οι μύκητες έρχονται σε επαφή με τα κύτταρα του φυτού και είτε εξερευνούν επιφανειακά τον εξωκυτταρικό χώρο που δρα ως μεσολαβητής στη διακυτταρική επικοινωνία (αποπλάστης) με τις υφές τους είτε διεισδύουν στο εσωτερικό του κυττάρου σχηματίζοντας υφές και μυζητήρες. Έτσι, τελικά έχουν τη δυνατότητα να αντλούν θρεπτικά συστατικά από το φυτό ξενιστή και παράλληλα να εισάγουν τις πρωτεΐνες τελεστές τους σε αυτόν (Petre & Kamoun 2014). Αυτές οι πρωτεΐνες τελεστές, όπως έχει αναφερθεί, είναι κυρίως ένζυμα που τροποποιούν τα σηματοδοτικά και μεταβολικά μονοπάτια του φυτού με σκοπό τον αποικισμό και

πολλαπλασιασμό του ενδόφυτου στους φυτικούς ιστούς. Ωστόσο, εκτός από αυτό μπορεί να ενισχύσουν τη φυτική άμυνα έναντι άλλων παθογόνων ή να ενισχύσουν τους φυτικούς μηχανισμούς απορρόφησης θρεπτικών συστατικών. Πιο αναλυτικά, μπορεί να συμμετέχουν στην υδρόλυση του φυτικού κυτταρικού τοιχώματος, τη στόχευση ενώσεων του φυτού, για παράδειγμα ορμονών, ή ακόμα να δρουν ως μεταφορείς.



Εικόνα 6: Η απελευθέρωση των πρωτεϊνών τελεστών απευθείας στο εσωτερικό του φυτικού κυττάρου, όπου α) οι πρωτεΐνες τελεστές προέρχονται από τη δομή του μυζητήρα και διαπερνούν μεμβράνες του μύκητα και β) οι πρωτεΐνες τελεστές προέρχονται από τις υφές και διαπερνούν μεμβράνες του φυτικού κυττάρου (Petre & Kamoun, 2014).

Στη συγκεκριμένη πειραματική εργασία μελετήθηκε η έκφραση 7 πρωτεϊνών πιθανών τελεστών του *Fusarium solani* στέλεχος Κ. Η αλληλουχία των γονιδίων που κωδικοποιούν για αυτές τις πρωτεΐνες και οι λειτουργίες τους έχουν αποκαλυφθεί σε έναν βαθμό ύστερα από βιοπληροφορικές αναλύσεις. Για την επιλογή των συγκεκριμένων γονιδίων χρησιμοποιήθηκαν τα προγράμματα με αλγόριθμο τεχνητής νοημοσύνης που αναγνωρίζουν μοτίβα αμινοξικών αλληλουχιών SignalP 5.0, DeepLoc, Busca και Effector 2.0 (Τσιούρη Όλγα, προσωπική επικοινωνία). Έτσι, με τον αλγόριθμο SignalP 5.0 προβλέφθηκαν πρωτεΐνες που εκκρίνονται. Στη συνέχεια, με τους αλγόριθμους DeepLoc και Busca εντοπίστηκαν πρωτεΐνες του μύκητα που εκκρίνονται εξωκυτταρικά και τέλος με τον αλγόριθμο EffectorP 2.0 προβλέφθηκαν οι πρωτεΐνες που είναι πιθανό να λειτουργούν ως πρωτεΐνες τελεστές.

Από αυτές μελετήθηκαν οι εξής και ο πιθανός τους ρόλος μετα από μελέτες ομολογίας με γονίδια άλλων μυκήτων φαίνεται παρακάτω:

- FUN\_005917:** Το γονίδιο ανήκει στην ομάδα (cluster) των γονιδίων ethRABCD. Το γονίδιο ethR, έχει ρυθμιστικό ρόλο και ενεργοποιεί το γονίδιο ethB, το οποίο κωδικοποιεί για τη μονοξυγενάση / κυτόχρωμα P-450. Το γονίδιο ethA κωδικοποιεί για μία ρεδοκτάση της φερρεδοξίνης και το γονίδιο ethC κωδικοποιεί για τη φερρεδοξίνη, οι οποίες εμπλέκονται στη διαδικασία μεταφοράς ηλεκτρονίων. Τέλος, το γονίδιο ethD κωδικοποιεί για μία EthD (Ethyl-Tert-Butyl-Ether Degradation) επικράτεια που είναι απαραίτητη για την αποικοδόμηση, αλλά η λειτουργία της δεν είναι πλήρως γνωστή (Thornton et. al. 2020, Beguin et al. 2003). Αυτό το σύστημα εμπλέκεται στην αποικοδόμηση της ένωσης ETBE (Chauvaux et. al. 2001). Η ένωση αυτή είναι τοξική και παράγεται από μεθανόλη, βιοαιθανόλη και μεθυλοπροπένιο. Χρησιμοποιείται για την αύξηση των οκτανίων της βενζίνης και της απόδοσης της καύσης. Έτσι, έχει αυξηθεί η συγκέντρωσή της χύμα και στο υπόγειο νερό του εδάφους. Ένας πιθανός λόγος αποικοδόμησής της από μικροοργανισμούς του εδάφους, όπως βακτήρια και σε μικρότερο βαθμό μύκητες, είναι η άντληση άνθρακα και ενέργειας και η παράλληλη αποτοξικοποίηση του εδάφους (Thornton et. al. 2020). Ωστόσο, τα συστατικά αυτού του συστήματος και κυρίως οι φερρεδοξίνες μπορεί να εμπλέκονται και στη ρύθμιση της φωτοσύνθεσης, της άμυνας και της αντοχής στο στρες του φυτού. Για παράδειγμα, η φερρεδοξίνη συντονίζει τις φωτεινές και σκοτεινές αντιδράσεις και σε φυτά καπνού η αυξημένη έκφραση φερρεδοξίνης οδηγεί σε αύξηση της αντοχής στο αβιοτικό στρες και ειδικότερα σε συνθήκες λιγοστού φωτός. Τέλος, στο φυτό *Arabidopsis thaliana* η μειωμένη έκφραση φερρεδοξίνης φαίνεται να οδηγεί σε μειωμένη άμυνα έναντι παθογόνων, όπως διαπιστώθηκε με τον εμβολιασμό του φυτού με ένα παθογόνο βακτήριο (Wang et. al. 2018).
- FUN\_010021:** Το γονίδιο κωδικοποιεί για μία εξωκυτταρική πρωτεΐνη που περιέχει αγκυροβολημένα μόρια γλυκοζυλο-φωσφατιδυλο-ινοσιτόλης (GPI) στην κυτταρική μεμβράνη και είναι πλούσια στα αμινοξέα σερίνη (Ser) και θρεονίνη (Thr). Έχει βρεθεί ότι τέτοιες πρωτεΐνες εμπλέκονται σε διαδικασίες μεμβρανικής μεταφοράς άλλων πρωτεϊνών, προσκόλλησης κυττάρων μεταξύ τους, διακυτταρικής επικοινωνίας και στη σύνθεση και προστασία του κυτταρικού τοιχώματος του μύκητα. Έτσι, είναι συστατικό του κυτταρικού τοιχώματος του μύκητα και είναι απαραίτητη για τη διατήρηση της ακεραιότητάς του (Boisrame et. al. 2011).
- FUN\_011104:** Το γονίδιο κωδικοποιεί για μία λιπάση τύπου GDSL που ανήκει στην οικογένεια των αλκυδρολασών. Το ένζυμο αυτό περιέχει την αμινοξική ακολουθία GDSL (Gly-Asp-Ser-Leu) στο αμινοτελικό του άκρο. Παίζει ρόλο στην αποικοδόμηση ενώσεων που περιέχουν εστέρα και μπορεί να έχει δραστηριότητα θειοεστεράσης, πρωτεάσης, αρυλεστεράσης και λυσοφωσφολιπάσης. Επίσης, είναι απαραίτητη για την διάτρηση του φυτικού κυτταρικού τοιχώματος, την ανάπτυξη, την απόκριση στο στρες και την άμυνα του μύκητα (Akoḥ et. al. 2004, Su et. al. 2020). Για παράδειγμα, ακόμη και στο κριθάρι είναι υπεύθυνη για την κατακράτηση νερού από τα φύλλα, άρα ενισχύει την αντοχή στην ξηρασία (Chao Li et. al. 2017).
- FUN\_015486/FUN\_011346:** Τα γονίδια κωδικοποιούν το καθένα για μία δεοξυριβονουκλεάση τύπου I (DNase I) με σημαντικές ρυθμιστικές περιοχές που αποικοδομεί τόσο δίκλωνα όσο και μονόκλωνα τμήματα DNA. Αυτό το ένζυμο φαίνεται να είναι υπεύθυνο για την καταστολή της φυτικής άμυνας, διότι εκκρίνεται από τον μύκητα και αποικοδομεί ένα πολύπλοκο σύμπλεγμα DNA και πρωτεϊνών, όπως οι ιστόνες, που παράγει το φυτό εξωκυτταρικά για να προστατευτεί από παθογόνα. Δηλαδή, φυσιολογικά τα φυτικά κύτταρα της ρίζας και άλλων ιστών παράγουν αυτό το «δίχτυ» για να προστατευθούν από μύκητες, βακτήρια, ιούς και άλλα παράσιτα, ενώ παράλληλα έτσι προσελκύσουν και θρεπτικά συστατικά, όπως  $Mg^{2+}$ . Για παράδειγμα, σε μία περίπτωση υπερέκφρασης τέτοιου γονιδίου στον μύκητα *Nectria haematococca* αυξήθηκε η ικανότητα προσβολής του φυτού (Park et. al. 2019). Τα συγκεκριμένα γονίδια έχουν ένα μεγάλο ποσοστό κοινής αλληλουχίας. Πιο αναλυτικά, ολόκληρη η αλληλουχία του

γονιδίου FUN\_011346 εμπεριέχεται στην αλληλουχία του γονιδίου FUN\_015486. Άρα, η αλληλουχία του τελευταίου γονιδίου είναι λίγο μεγαλύτερη από του πρώτου.

- **FUN\_015931:** Το γονίδιο κωδικοποιεί για μία υπεροξειδική δισμουτάση που περιέχει χαλκό και ψευδάργυρο. Είναι ένα ένζυμο που βρίσκεται στην πρώτη γραμμή έναντι των δραστικών μορφών οξυγόνου – Reactive Oxygen Species (ROS) στα φυτά (Berwal & Ram 2018). Στους μύκητες εκφράζεται ιδι�σύστατα και είναι απαραίτητο για την εξουδετέρωση δραστικών ριζών υπεροξειδίου σε υπεροξειδίο του υδρογόνου και μοριακό οξυγόνο. Βρίσκεται στο κυτοσόλιο, τον πυρήνα, τα υπεροξειδιοσώματα και την εσωτερική μεμβράνη των μιτοχονδρίων. Πιθανώς το ένζυμο λειτουργεί έτσι ώστε να εξουδετερώνει τις τοξικές δραστικές μορφές οξυγόνου που παράγει το φυτό έναντι του μύκητα, αλλά και γενικότερα σε καταστάσεις στρες (Cox et. al. 2003).
- **FUN\_010034:** Δεν είναι γνωστός ο χαρακτηρισμός του γονιδίου.

## 2. Σκοπός της πειραματικής μελέτης

Σκοπός της πειραματικής μελέτης είναι η ανίχνευση των επιπέδων έκφρασης των γονιδίων του μυκητιακού στελέχους FsK που κωδικοποιούν για τις πρωτεΐνες με πιθανή δράση τελεστών σε διάφορες χρονικές στιγμές μετά τον εμβολιασμό των φυτών με τα κονίδια του μύκητα. Είναι σημαντικό να διερευνηθεί αν υπάρχουν κάποια παροδικά μοτίβα στην έκφραση των πρωτεϊνών τελεστών του και πώς αυτά τα μοτίβα θα μπορούσαν να εξηγήσουν τον μηχανισμό του αποικισμού και τον τρόπο δράσης των πρωτεϊνών τελεστών.

Έτσι, η εργασία χωρίστηκε σε τρία μέρη:

Το πρώτο μέρος αφορά την καλλιέργεια του μύκητα και την απομόνωση των κονιδίων του, την προετοιμασία των φυτών τομάτας *Solanum lycopersicum*, τον εμβολιασμό τους με τα κονίδια και την λήψη ριζικού ιστού σε διάφορες χρονικές στιγμές μετά τον εμβολιασμό. Πιο συγκεκριμένα, αυτές οι χρονικές στιγμές είναι 6 ώρες, 18 ώρες, 30 ώρες, 2 ημέρες, 4 ημέρες και 7 ημέρες μετά τον εμβολιασμό (6hpi, 18hpi, 30hpi, 2dpi, 4dpi, 7dpi).

Το δεύτερο μέρος αφορά την απομόνωση του ολικού RNA και ακολούθως τις αλυσιδωτές αντιδράσεις πολυμεράσης σε πραγματικό χρόνο (qPCR) για την μελέτη των επιπέδων του αποικισμού από το μυκητιακό στέλεχος FsK στους ριζικούς ιστούς της τομάτας και για την μελέτη των επιπέδων έκφρασης των γονιδίων του που κωδικοποιούν για τις πρωτεΐνες τελεστές.

Το τρίτο μέρος αφορά την μελέτη των επιπέδων έκφρασης των ίδιων γονιδίων που αναφέρθηκαν παραπάνω σε δείγματα cDNA και πάλι με αλυσιδωτές αντιδράσεις πολυμεράσης σε πραγματικό χρόνο. Τα δείγματα cDNA προέρχονται από το ολικό απομονωμένο RNA των ριζών του φυτού *Lotus japonicus* σε διάφορες χρονικές στιγμές μετά τον εμβολιασμό με τον μύκητα. Πιο συγκεκριμένα, αυτές οι χρονικές στιγμές είναι 1 ημέρα, 2 ημέρες, 4 ημέρες και 12 ημέρες μετά τον εμβολιασμό (1dpi, 2dpi, 4dpi, 12dpi).

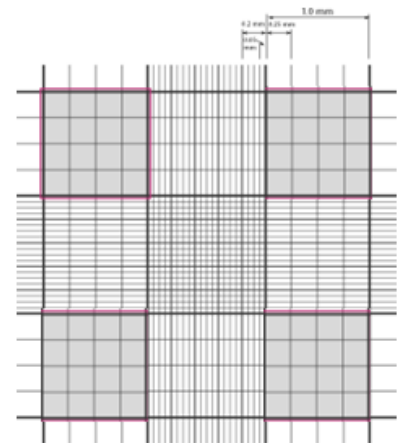
### 3. Υλικά και μέθοδοι

#### 3.1 Προετοιμασία εμβολίου του στελέχους FSK

Το εμβόλιο του στελέχους FSK περιείχε τα κονίδια του μύκητα. Αρχικά, το μυκητιακό στέλεχος FSK ανακαλλιεργήθηκε από παλαιότερη καλλιέργεια σε στερεό θρεπτικό υλικό PDA (Potato Dextrose Agar). Η ανακαλλιέργεια έγινε με αποκοπή ενός κομματιού της υφής του μύκητα με νυστέρι και μεταφορά του σε νέο τρυβλίο με το θρεπτικό υλικό PDA. Ακολούθησε η καλλιέργεια του μυκητιακού στελέχους σε υγρό θρεπτικό υλικό PDB (Potato Dextrose Broth). Αυτό έγινε με αποκοπή ενός κομματιού της υφής του μύκητα από την στερεή καλλιέργεια με νυστέρι και μεταφορά του σε μία αποστειρωμένη γυάλινη φιάσκα των 250 ml που περιείχε 100 ml του υγρού θρεπτικού υλικού PDB. Στη συνέχεια, το στόμιο της φιάσκας καλύφθηκε με αλουμινόχαρτο και τυλίχθηκε με πάραφιλμ για την αποφυγή επιμολύνσεων. Όλη αυτή η προετοιμασία έγινε στον θάλαμο καθέτου νηματικής ροής σε αποστειρωμένες συνθήκες. Τέλος, η φιάσκα μεταφέρθηκε σε επωαστήρα με συνθήκες θερμοκρασίας 25°C και ανάδευση 160rpm για 5 ημέρες για την ανάπτυξη του μύκητα.

Με την πάροδο των 5 ημερών, ο μύκητας είχε αναπτυχθεί και είχε παραγάγει κονίδια. Άρα, ακολούθησε η απομόνωση των κονιδίων στον θάλαμο καθέτου νηματικής ροής με αποστειρωμένα υλικά και πάλι για την αποφυγή επιμολύνσεων. Πρώτα, τοποθετήθηκε ένα αποστειρωμένο γυάλινο χωνί με διπλό τουλουπάνι πάνω σε μία αποστειρωμένη φιάσκα των 250 ml. Έτσι μεταφέρθηκαν τα 100 ml της υγρής καλλιέργειας του μύκητα στη φιάσκα. Μάλιστα, εφόσον υπήρχε το τουλουπάνι, πέρασαν στη φιάσκα μόνο τα κονίδια του μύκητα και όχι οι υφές του. Μετά, μοιράστηκαν ισόποσα από 50 ml σε δύο falcon. Ακολούθησε η φυγοκέντρηση των δύο falcon σε συνθήκες 4.000g και 16°C για 7 λεπτά, ώστε να κατακρημνιστούν τα κονίδια και να σχηματίσουν ίζημα. Συνεπώς, μετά τη φυγοκέντρηση απορρίφθηκε το υπερκείμενο από τα δύο falcon και προστέθηκαν 5 ml διαλύματος NaCl 0.85% w/v στο καθένα. Σε αυτό το διάλυμα διαλύθηκε το ίζημα και ακολούθησε δεύτερη φυγοκέντρηση στις ίδιες συνθήκες. Και πάλι απορρίφθηκε το υπερκείμενο και προστέθηκαν 5 ml διαλύματος NaCl 0.85% w/v σε ένα από τα δύο falcons. Το περιεχόμενο και των δύο falcon ενώθηκε σε ένα και ακολούθησε η τελευταία φυγοκέντρηση σε συνθήκες 4.000g, 16°C για 10 λεπτά. Τέλος, απορρίφθηκε και πάλι το υπερκείμενο και έγινε διαλυτοποίηση του ιζήματος σε 5 ml NaCl 0.85% w/v.

Για την μέτρηση των κονιδίων έγιναν διαδοχικές αραιώσεις του παραπάνω διαλύματος 1:10, 1:100 και 1:500. Για την πρώτη αραιώση ο τελικός όγκος ήταν 1000 μl, άρα σε ένα erpendorf tube τοποθετήθηκαν 900 μl διάλυμα NaCl 0.85% w/v και 100 μl από το διάλυμα των κονιδίων. Για τη δεύτερη αραιώση ο τελικός όγκος ήταν 1000 μl, άρα σε ένα δεύτερο erpendorf tube τοποθετήθηκαν 900 μl NaCl 0.85% w/v και 100 μl από το αραιωμένο 1:10 διάλυμα. Για την τρίτη αραιώση ο τελικός όγκος ήταν 1000 μl, άρα τοποθετήθηκαν 800 μl NaCl 0.85% w/v και 200 μl από το αραιωμένο 1:100 διάλυμα. Τελικά, χρησιμοποιήθηκε η τελευταία αραιώση για τον υπολογισμό της ποσότητας των κονιδίων σε οπτικό μικροσκόπιο με την πλάκα Neubauer. Πιο αναλυτικά, τοποθετήθηκαν 10 μl από το αραιωμένο 1:500 διάλυμα στην πλάκα Neubauer με τη χρήση πιπέτας. Ακολούθησε η οπτική παρατήρηση και μέτρηση των κονιδίων στα τέσσερα επισημασμένα τετράγωνα της εικόνας. Προστέθηκε ο αριθμός που υπολογίστηκε για κάθε τετράγωνο και έγινε διαίρεση με το 4, δηλαδή  $Average\_Conidia = (sq1 + sq2 + sq3 + sq4)/4$ . Αυτοί οι υπολογισμοί αντιστοιχούν στο αραιωμένο διάλυμα 1:500. Για το μη αραιωμένο διάλυμα ισχύει  $Final\_Conidia = Average\_Conidia * 500 * 10^4$ . Ο επιθυμητός αριθμός κονιδίων για τον εμβολιασμό ήταν 500 κονίδια ανά ρίζα.



Εικόνα 7: Απεικόνιση πλάκας Neubauer.

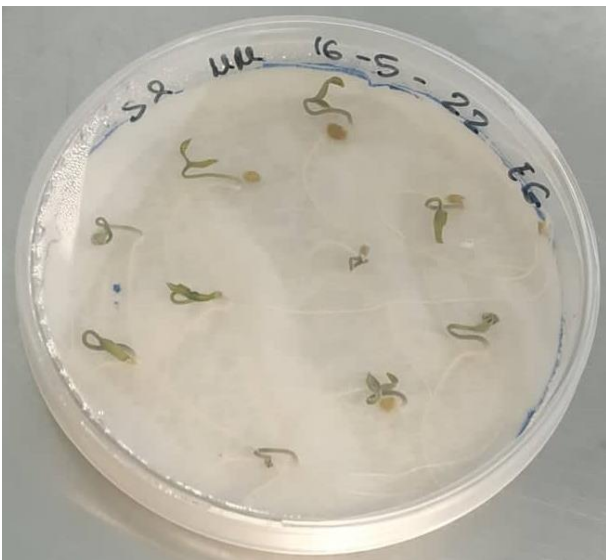


### 3.2 Προετοιμασία και ανάπτυξη φυτών

Για την ανάπτυξη των φυτών χρησιμοποιήθηκε ως υπόστρωμα ένα μίγμα ασβεστολιθικής άμμου ουδέτερου pH και βερμικουλίτη που διατηρεί την υγρασία. Πιο συγκεκριμένα, χρειάστηκε μίξη χοντρόκοκκης και λεπτόκοκκης άμμου σε αναλογία 2:1 αντίστοιχα και μετά μίξη της συνολικής άμμου και βερμικουλίτη σε αναλογία 2:1 αντίστοιχα. Συνολικά, η αναλογία ήταν 4:2:3 χοντρόκοκκη άμμος : λεπτόκοκκη άμμος : βερμικουλίτη αντίστοιχα.

Όσον αφορά τους σπόρους που χρησιμοποιήθηκαν ήταν σπόροι τομάτας του είδους *Solanum lycopersicum* ποικιλίας Moneymaker. Χρειάστηκαν  $12 \times 6 \times 2 = 144$  σπόροι, διότι τόσα ήταν και τα φυτά που υπολογίστηκαν να φυτευτούν συνολικά. Όπου 12 είναι τα magenta pots και για τις δύο συνθήκες φυτών με και χωρίς τον μύκητα, 6 είναι ο αριθμός των χρονικών στιγμών που μελετήθηκαν και 2 είναι ο αριθμός των φυτών σε κάθε ένα magenta pot. Έτσι, χρησιμοποιήθηκαν 300 σπόροι για προβλάστηση. Οι διαδικασίες για την προετοιμασία των σπόρων έγιναν στον θάλαμο καθέτου νηματικής ροής, για τη διατήρηση αποστειρωμένων συνθηκών και την αποφυγή επιμολύνσεων. Αρχικά, για την αποστείρωσή τους οι σπόροι εμβαπτίστηκαν σε διάλυμα 10% NaOCl (χλωρίνης) και ακολούθησε ανάδευση στον αναδευτήρα για 7 λεπτά. Έγιναν 6 πλύσεις με κρύο ddH<sub>2</sub>O και μετά την τελευταία πλύση το falcon που περιείχε τους σπόρους τυλίχτηκε με αλουμινόχαρτο και αναδεύτηκε στον αναδευτήρα για 20 λεπτά.

Στη συνέχεια, έγινε ο διαμοιρασμός των σπόρων ανά 10άδες σε 30 τρυβλία Petri, στα οποία τοποθετήθηκαν 2 φύλλα διηθητικού χαρτιού διαβρεγμένα με 2 ml ddH<sub>2</sub>O. Είναι σημαντικό να τονιστεί ότι η τομάτα είναι ανταγωνιστικό φυτό και έτσι οι σπόροι χρειάζονται αρκετό κενό μεταξύ τους για να αναπτυχθούν. Κάθε τρυβλίο σφραγίστηκε με πάραφιλμ για την αποφυγή επιμολύνσεων. Αμέσως μετά, τα τρυβλία ανά 10άδες τυλίχθηκαν με αλουμινόχαρτο και τοποθετήθηκαν σε σκοτάδι στον θάλαμο ανάπτυξης για 4 ημέρες με κάθετο προσανατολισμό. Με αυτόν τον τρόπο, αναπαρίσταται η συνθήκη όπου οι σπόροι βρίσκονται στο χώμα και η ρίζα αρχίζει να αναπτύσσεται προς τα κάτω. Άρα, την τέταρτη μέρα που άρχισε να αναπτύσσεται η ρίζα στους περισσότερους σπόρους, τα τρυβλία τοποθετήθηκαν στο φως στον θάλαμο ανάπτυξης για 3 ημέρες. Ο θάλαμος ανάπτυξης λειτουργεί με μία φωτοπερίοδο 16 ωρών φωτός και 8 ωρών σκότους, η υγρασία είναι σε επίπεδο 60% και η θερμοκρασία βρίσκεται στους 23°C.



Εικόνα 8: Τρυβλίο με 2 φύλλα διηθητικού χαρτιού διαβρεγμένα με ddH<sub>2</sub>O, στο οποίο έχουν αναπτυχθεί οι ρίζες και οι κοτυληδόνες των περισσότερων σπόρων *Solanum lycopersicum* cv Moneymaker.



Εικόνα 9: Ο θάλαμος ανάπτυξης φυτών.

Μετά τις παραπάνω μέρες οι σπόροι εκβλάστησαν και ακολούθησε η φύτευσή τους στα magenta pots. Η διαδικασία αυτή έγινε και πάλι στον θάλαμο καθέτου νηματικής ροής με αποστειρωμένα υλικά. Το χώμα σε κάθε magenta pot διαβρέχθηκε με 25 ml από το θρεπτικό διάλυμα Hoagland 100% και ομογενοποιήθηκε περαιτέρω καθώς ανακατεύτηκε με τη βοήθεια λαβίδας. Φυτεύτηκαν δύο σπόροι αντιδιαμετρικά μεταξύ τους σε κάθε magenta pot, τα οποία μετά τοποθετήθηκαν στον θάλαμο ανάπτυξης για 7 ημέρες.



Εικόνα 10: Η τοποθέτηση των magenta pots μετά την φύτευση των σπόρων *Solanum lycopersicum* cv *MoneyMaker* στον θάλαμο ανάπτυξης φυτών.

Ακολούθησε ο εμβολιασμός των φυτών της συνθήκης +FsK με τα κονίδια του μύκητα. Η διαδικασία έγινε στον θάλαμο καθέτου νηματικής ροής. Ο εμβολιασμός έγινε σε μικρό βάθος στο χώμα, στοχεύοντας περίπου στη βάση της ρίζας. Εμβολιάστηκαν 500 κονίδια ανά ρίζα. Άρα χρησιμοποιήθηκε 1 ml από το αραιωμένο διάλυμα των κονιδίων του μύκητα με συγκέντρωση 500 κονίδια / ml για κάθε φυτό. Τα φυτά της συνθήκης -FsK δεν εμβολιάστηκαν.

Επόμενο βήμα ήταν οι δειγματοληψίες σε χρονικές στιγμές 6 ώρες, 18 ώρες, 30 ώρες, 2 ημέρες, 4 ημέρες και 7 ημέρες μετά τον εμβολιασμό. Κάθε δειγματοληψία έγινε σε καθαρή επιφάνεια με αποστειρωμένα υλικά. Αρχικά, κάθε φυτό αφαιρέθηκε προσεκτικά από τη γλάστρα μέσω αναστροφής και τοποθετήθηκε σε νερό με λίγη χλωρίνη, ώστε να αφαιρεθούν τα υπολείμματα άμμου και βερμικουλίτη και να θανατωθούν τα μυκητιακά στελέχη FsK που μπορεί να βρίσκονται επιφανειακά της ρίζας και να μην έχουν εισχωρήσει στον ιστό. Στη συνέχεια, η ρίζα κάθε φυτού ξεπλύθηκε με νερό για την απομάκρυνση της χλωρίνης. Ακολούθησε η αποκοπή της ρίζας από το υπόλοιπο φυτικό σώμα και η τοποθέτησή της σε erpendorf tube με υγρό άζωτο για να παγώσει. Τελικά, οι ιστοί ομογενοποιήθηκαν σε συσκευή λειοτρίβησης με τη βοήθεια αποστειρωμένων beads που εφάρμοσαν πίεση στον ιστό και αποθηκεύτηκαν στους  $-80^{\circ}\text{C}$ .



Εικόνα 11: Φυτό *Solanum lycopersicum* cv *MoneyMaker* σε magenta pot, συνθήκης 7dpi +FsK κατά τη δειγματοληψία.



### 3.3 Απομόνωση ολικού RNA από τις ρίζες των φυτών

Ο ριζικός ιστός που λειοτριβήθηκε προορίστηκε για την απομόνωση του ολικού RNA που είχε παραχθεί τόσο από το φυτό όσο και από τον μύκητα μέχρι τη στιγμή της δειγματοληψίας. Η διαδικασία της απομόνωσης του ολικού RNA ξεκίνησε στον θάλαμο καθέτου νηματικής ροής. Τα δείγματα ριζικού ιστού μεταφέρθηκαν από την κατάψυξη  $-80^{\circ}\text{C}$  με υγρό άζωτο στον θάλαμο καθέτου νηματικής ροής. Ακολούθως, τόσο τα δείγματα όσο και τα διαλύματα που χρησιμοποιήθηκαν για την απομόνωση του RNA βρίσκονταν συνεχώς σε πάγο, με σκοπό την απενεργοποίηση RNase ενζύμων και τη διατήρηση του RNA. Η διαδικασία ξεκίνησε με την προσθήκη 300  $\mu\text{l}$  RNA extraction buffer και με την προσθήκη 300  $\mu\text{l}$  PIC (Phenol Isoamyl alcohol Chloroform). Το RNA extraction buffer περιείχε Tris-HCl συγκέντρωσης 50mM, NaCl συγκέντρωσης 150 mM, EDTA συγκέντρωσης 10mM και 1% N-lauroylsarcosine sodium salt. Ακολούθησε ανάδευση με vortex για 30 δευτερόλεπτα και φυγοκέντρηση στα 11.000 g για 5 λεπτά. Το RNA βρισκόταν στην υδάτινη φάση και για αυτό έγινε μεταφορά του υπερκειμένου σε νέα αντίστοιχα tubes. Προστέθηκαν πάλι 300  $\mu\text{l}$  PIC και έγινε ανάδευση με vortex για 30 δευτερόλεπτα. Ακολούθησε ξανά φυγοκέντρηση στα 11.000 g για 5 λεπτά και η υδάτινη φάση μεταφέρθηκε σε νέα αντίστοιχα tubes. Προστέθηκαν 0.1x του όγκου της υδάτινης φάσης Sodium Acetate 3M και 1x ισοπροπανόλη. Έγινε ήπια ανάδευση. Ακολούθησε φυγοκέντρηση στα 11.000 g για 15 λεπτά. Μετά, το RNA κατακρημνίστηκε ως ίζημα, άρα απορρίφθηκε το υπερκείμενο. Προστέθηκαν στο ίζημα 187,5  $\mu\text{l}$  LiCl 8M και 562,5  $\mu\text{l}$  10T/10E (Tris-HCl/EDTA). Ακολούθησε επώαση στους  $4^{\circ}\text{C}$  όλο το βράδυ. Την επόμενη μέρα έγινε φυγοκέντρηση στα 11.000 g για 15 λεπτά και απορρίφθηκε το υπερκείμενο. Προστέθηκαν 500  $\mu\text{l}$  70% αιθανόλης και έγινε πάλι φυγοκέντρηση στις ίδιες ακριβώς συνθήκες. Στη συνέχεια, τα tubes αφέθηκαν σε θερμοκρασία δωματίου μέχρι να εξατμιστεί η αιθανόλη. Μετά προστέθηκαν 20  $\mu\text{l}$  ddH<sub>2</sub>O και έγινε σύντομο vortex.

Είναι σημαντικό να σημειωθεί πως μετά από την προσθήκη αντιδραστηρίου που περιείχε EDTA τα δείγματα προστατεύονταν με αλουμινόχαρτο, διότι το EDTA είναι φωτοευαίσθητη ένωση. Όσον αφορά τη χρησιμότητα των αντιδραστηρίων:

- 1) Το EDTA απενεργοποιεί ένζυμα όπως η RNase.
- 2) Το Tris-HCl ρυθμίζει ή σταθεροποιεί το pH του διαλύματος.
- 3) Το άλας NaCl τροποποιεί το φορτίο του RNA προς ουδέτερο και έτσι γίνεται διαχωρισμός από διαλυτές στο νερό πρωτεΐνες.
- 4) Το N-lauroylsarcosine sodium salt χρησιμοποιείται για τη διαλυτοποίηση και τον διαχωρισμό πρωτεϊνών και γλυκοπρωτεϊνών.
- 5) Το PIC είναι τοξικό αντιδραστήριο και αποδιατάσσει τις πρωτεΐνες και τα λιπίδια και τα απομονώνει στην οργανική φάση, ενώ το RNA παραμένει στην υδάτινη φάση.
- 6) Το Sodium Acetate τροποποιεί το φορτίο του RNA προς ουδέτερο, άρα το καθιστά λιγότερο υδρόφιλο και έτσι κατακρημνίζεται.
- 7) Η ισοπροπανόλη επιτρέπει την κατακρήμνιση μεγάλων κομματιών RNA, διότι το RNA δεν είναι πολύ διαλυτό σε αυτήν.
- 8) Η ένωση LiCl περιέχει μέταλλο που κάνει το RNA πιο βαρύ και το βοηθά να καθιζάνει. Δεν κατακρημνίζει DNA ή πρωτεΐνες.
- 9) Η αιθανόλη βοηθά στον καθαρισμό του RNA και στην κατακρήμνισή του.
- 10) Το ddH<sub>2</sub>O διατηρεί τη σταθερότητα του RNA

Η ποσοτικοποίηση του ολικού απομονωμένου RNA για κάθε δείγμα έγινε με τη χρήση της συσκευής Nanodrop. Αρχικά, έγινε καθαρισμός της συσκευής με ddH<sub>2</sub>O, μετά τέθηκε το ddH<sub>2</sub>O στο οποίο διαλύθηκε το RNA ως blank δείγμα και ξεκίνησαν οι μετρήσεις των δειγμάτων.

Μετά την απομόνωση του RNA ακολούθησε μία αντίδραση DNάσης στον θερμοκυκλοποιητή, για να απομακρυνθεί το απομονωμένο DNA και να παραμείνει το ολικό απομονωμένο RNA σε κάθε δείγμα. Έτσι, η συγκέντρωση κάθε δείγματος αραιώθηκε στα 10 ng/ $\mu\text{l}$  με την προσθήκη κατάλληλης ποσότητας ddH<sub>2</sub>O. Σε

PCR tubes τοποθετήθηκαν 20 µl από κάθε αραιωμένο δείγμα, 2 µl από το 10x DNase I Buffer που περιέχει MgCl<sub>2</sub>, 1 µl από το ένζυμο DNase I και 1 µl RNase out inhibitor. Το θερμοκρασιακό πρωτόκολλο της αντίδρασης ήταν 37°C για 40 λεπτά, έγινε παύση της αντίδρασης με προσθήκη EDTA και συνεχίστηκε στους 65°C για 10 λεπτά στον θερμοκυκλοποιητή.

Όλα τα δείγματα με το απομονωμένο RNA αποθηκεύτηκαν στους -20°C βραχυπρόθεσμα και μετά στους -80°C μακροπρόθεσμα.

### 3.4 Ποσοτική ανάλυση επιπέδων mRNA του FsK με αλυσιδωτή αντίδραση πολυμεράσης σε πραγματικό χρόνο (qPCR)

Όσον αφορά τα φυτά *Solanum lycopersicum*, η ποσοτική ανάλυση των επιπέδων mRNA του FsK έγινε αρχικά για την ανίχνευση του αποικισμού του στα διάφορα timepoints που εξετάστηκαν και αφορούσε συγκεκριμένα το mRNA που παράχθηκε από τα γονίδια του μύκητα *ITS* και *Tef1a*. Το γονίδιο *ITS* βρίσκεται στο γονιδίωμα του μύκητα σε 2 αντίγραφα, κωδικοποιεί για μία ενδιάμεση περιοχή *Internal Transcribed Spacer* ανάμεσα στις δύο ριβοσωμικές υπομονάδες του μύκητα και λειτουργεί ως γονίδιο αναφοράς για τον εντοπισμό του στους ιστούς του φυτού. Το γονίδιο *Tef1a* κωδικοποιεί τον *Transcription elongation factor 1 alpha*, βρίσκεται σε ένα αντίγραφο στο γονιδίωμα του μύκητα και λειτουργεί ως γονίδιο αναφοράς για τον εντοπισμό του στους ιστούς του φυτού. Έτσι, λοιπόν ο αποικισμός του μύκητα μελετήθηκε με τη μέθοδο της αλυσιδωτής αντίδρασης πολυμεράσης πραγματικού χρόνου (Real Time PCR ή quantitative PCR). Μάλιστα, ακολουθήθηκε το πρωτόκολλο της αντίδρασης Luna® Universal One-Step RT-qPCR – NEB της εταιρείας New England Biolabs<sup>inc</sup> όπου η σύνθεση των cDNA από το διαθέσιμο RNA και η ενίσχυση τους γίνονται σε ένα βήμα σε ένα και μοναδικό tube. Αυτό συμβαίνει διότι σε ένα tube συνδυάζονται τα ένζυμα Luna Warm Start activated reverse transcriptase και Hot Start Taq DNA polymerase. Τα ένζυμα ενεργοποιούνται το καθένα σε εξειδικευμένη θερμοκρασία και αυτό αυξάνει την αποτελεσματικότητα της αντίδρασης. Η ποσοτικοποίηση των προϊόντων της αντίδρασης έγινε με τη δέσμευση της φθορίζουσας χρωστικής SYBR Green στο νεοσυντιθέμενο δίκλωνο cDNA μιας και ο φθορισμός της χρωστικής αυτής ενισχύεται πάνω από 1000 φορές όταν δεσμεύεται σε δίκλωνο DNA. Η ποσοτικοποίηση της έκφρασης ήταν σχετική, διότι χρησιμοποιήθηκε ως σύγκριση η έκφραση ενός γονιδίου αναφοράς και όχι μία πρότυπη καμπύλη. Το γονίδιο αναφοράς ήταν η ουβικουιτίνη.

Οι εκκινητές που στόχευαν τα μετάγραφα του γονιδίου *Tef1a* και του γονιδίου της ουβικουιτίνης που μετατράπηκαν σε cDNA είχαν τις εξής αλληλουχίες.

Εκκινητής	Αλληλουχία (5' - 3')
Tef1a _F	GGGTGGTTGAGGACAATGAC
Tef1a _R	CAGCTCACTGAGGGTCTTCC
Le Ubi _F	AAGATGGAAGAAGCTCTGGCG
Le Ubi _R	TCACAACACATCACAAGGTC

Πίνακας 1: Η αλληλουχία του εκκινητή *Tef1a* που στοχεύει στο γονίδιο *Tef1a* του μύκητα και η αλληλουχία του εκκινητή *Le Ubi* που στοχεύει στο γονίδιο της ουβικουιτίνης του φυτού *Solanum lycopersicum*.

Για κάθε δείγμα απαιτούνται 1 µl RNA του δείγματος, 0.5 µl του Luna® Universal One-Step RT-qPCR ενζύμου συγκέντρωσης 20x, 5 µl του buffer του ενζύμου συγκέντρωσης 2x, 0.4 µl του εμπρόσθιου εκκινητή (Primer F), 0.4 µl του ανάστροφου εκκινητή (Primer R) και 2.7 µl αποστειρωμένο ddH<sub>2</sub>O. Άρα, ο τελικός όγκος της αντίδρασης ήταν 10 µl. Το buffer περιέχει την Hot Start Taq DNA Polymerase, dNTPs, συστατικά απαραίτητα για τη σταθεροποίηση της αντίδρασης, τη φθορίζουσα χρωστική SYBR Green και μία χρωστική που δεν είναι

φθορίζουσα αλλά δίνει χρώμα το οποίο φαίνεται με γυμνό μάτι και διευκολύνει το set up της αντίδρασης. Από την άλλη, το Luna® Universal One-Step RT-qPCR ένζυμο είναι ένα Mix που περιέχει την Luna Warm Start activated reverse transcriptase και έναν αναστολέα Rnase για την προστασία του RNA από αποικοδόμηση. Ξεχωριστά, τοποθετήθηκε 1 µl RNA σε κάθε πηγάδι του plate και όλα τα υπόλοιπα συστατικά της αντίδρασης αναμείχθηκαν για τη δημιουργία MasterMix, όπως φαίνεται παρακάτω.

Συστατικά MasterMix	Ποσότητα (µl)
Luna buffer (2x)	5
Primer F	0.4
Primer R	0.4
ddH <sub>2</sub> O	2.7
Luna enzyme (20x)	0.5

Πίνακας 2: Τα συστατικά MasterMix της Luna® Universal One-Step RT-qPCR.

Το θερμοκρασιακό πρωτόκολλο της αντίδρασης στον θερμοκυκλοποιητή ακολουθεί τα εξής βήματα. Ξεκινά η αντίστροφη μεταγραφή του RNA 10 λεπτά στους 55°C. Μετά γίνεται η αρχική αποδιάταξη του δίκλωνου cDNA 1 λεπτό στους 95°C. Ακολουθεί εναλλαγή 39 κύκλων από τους 95°C για 10 δευτερόλεπτα που συμβαίνει η αποδιάταξη του δίκλωνου cDNA στους 60°C για 30 δευτερόλεπτα που συμβαίνει η υβριδοποίηση των εκκινητών στα σημεία στόχους και η επιμήκυνσή του. Στη συνέχεια, γίνεται η melt curve analysis που περιλαμβάνει 5 δευτερόλεπτα στους 65°C και 5 δευτερόλεπτα στους 95°C, ώστε να ελεγχθεί η εξειδίκευση των προϊόντων. Τα βήματα αυτά συνοψίζονται και στον πίνακα παρακάτω.

Διαδικασία	Θερμοκρασία (°C)	Χρόνος	Κύκλοι
Αντίστροφη μεταγραφή	55°C	10 λεπτά	1
Αρχική αποδιάταξη	95°C	1 λεπτό	1
Αποδιάταξη	95°C	10 δευτερόλεπτα	39
Επιμήκυνση	60°C	30 δευτερόλεπτα	
Melt curve analysis	65°C	5 δευτερόλεπτα	1
	95°C	5 δευτερόλεπτα	

Πίνακας 3: Το θερμοκρασιακό πρωτόκολλο της Luna® Universal One-Step RT-qPCR.

Το plate της qPCR που αφορούσε τη μελέτη του αποικισμού του FsK στα φυτά της τομάτας *Solanum lycopersicum* μέσω της μελέτης της έκφρασης του γονιδίου *ITS* 6 ώρες, 18 ώρες και 30 ώρες μετά τον εμβολιασμό φαίνεται στον πίνακα παρακάτω.

	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12
A	6hpi +FsK1	6hpi +FsK1	6hpi +FsK2	6hpi +FsK2	6hpi +FsK3	6hpi +FsK3	6hpi +FsK4	6hpi +FsK4	6hpi -FsK1	6hpi -FsK1	6hpi -FsK2	6hpi -FsK2
B	6hpi -FsK3	6hpi -FsK3	6hpi -FsK4	6hpi -FsK4	18hpi +FsK1	18hpi +FsK1	18hpi +FsK2	18hpi +FsK2	18hpi +FsK3	18hpi +FsK3	18hpi +FsK4	18hpi +FsK4
C	18hpi -FsK1	18hpi -FsK1	18hpi -FsK2	18hpi -FsK2	18hpi -FsK3	18hpi -FsK3	30hpi +FsK1	30hpi +FsK1	30hpi +FsK2	30hpi +FsK2	30hpi +FsK3	30hpi +FsK3
D	30hpi +FsK4	30hpi +FsK4	30hpi -FsK1	30hpi -FsK1	30hpi -FsK2	30hpi -FsK2	30hpi -FsK3	30hpi -FsK3	ddH <sub>2</sub> O	ddH <sub>2</sub> O		
E	6hpi +FsK1	6hpi +FsK1	6hpi +FsK2	6hpi +FsK2	6hpi +FsK3	6hpi +FsK3	6hpi +FsK4	6hpi +FsK4	6hpi -FsK1	6hpi -FsK1	6hpi -FsK2	6hpi -FsK2
F	6hpi -FsK3	6hpi -FsK3	6hpi -FsK4	6hpi -FsK4	18hpi +FsK1	18hpi +FsK1	18hpi +FsK2	18hpi +FsK2	18hpi +FsK3	18hpi +FsK3	18hpi +FsK4	18hpi +FsK4
G	18hpi -FsK1	18hpi -FsK1	18hpi -FsK2	18hpi -FsK2	18hpi -FsK3	18hpi -FsK3	30hpi +FsK1	30hpi +FsK1	30hpi +FsK2	30hpi +FsK2	30hpi +FsK3	30hpi +FsK3
H	30hpi +FsK4	30hpi +FsK4	30hpi -FsK1	30hpi -FsK1	30hpi -FsK2	30hpi -FsK2	30hpi -FsK3	30hpi -FsK3	ddH <sub>2</sub> O	ddH <sub>2</sub> O		

Το plate της qPCR που αφορούσε τη μελέτη του αποικισμού του Fsk στα φυτά της τομάτας *Solanum lycopersicum* μέσω της μελέτης της έκφρασης του γονιδίου *Tef1a* 2 ημέρες, 4 ημέρες και 7 ημέρες μετά τον εμβολιασμό φαίνεται στον πίνακα παρακάτω.

	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12
<b>A</b>	2dpi +Fsk1	2dpi +Fsk1	2dpi +Fsk2	2dpi +Fsk2	2dpi + Fsk3	2dpi + Fsk3	2dpi + Fsk4	2dpi + Fsk4	2dpi - Fsk1	2dpi - Fsk1	2dpi -Fsk3	2dpi-Fsk3
<b>B</b>	2dpi - Fsk4	2dpi - Fsk4	4dpi +Fsk1	4dpi +Fsk1	4dpi + Fsk2	4dpi + Fsk2	4dpi +Fsk3	4dpi +Fsk3	4dpi +Fsk4	4dpi +Fsk4	4dpi -Fsk1	4dpi -Fsk1
<b>C</b>	4dpi -Fsk2	4dpi -Fsk2	4dpi -Fsk3	4dpi -Fsk3	4dpi -Fsk4	4dpi -Fsk4	7dpi +Fsk1	7dpi +Fsk1	7dpi +Fsk2	7dpi +Fsk2	7dpi +Fsk3	7dpi +Fsk3
<b>D</b>	7dpi +Fsk4	7dpi +Fsk4	7dpi -Fsk1	7dpi -Fsk1	7dpi -Fsk2	7dpi -Fsk2	7dpi -Fsk3	7dpi -Fsk3	7dpi -Fsk4	7dpi -Fsk4	ddH <sub>2</sub> O	ddH <sub>2</sub> O
<b>E</b>	2dpi +Fsk1	2dpi +Fsk1	2dpi +Fsk2	2dpi +Fsk2	2dpi +Fsk3	2dpi +Fsk3	2dpi +Fsk4	2dpi +Fsk4	2dpi Fsk-1	2dpi -Fsk1	2dpi -Fsk3	2dpi -Fsk3
<b>F</b>	2dpi -Fsk4	2dpi -Fsk4	4dpi +Fsk1	4dpi +Fsk1	4dpi +Fsk2	4dpi +Fsk2	4dpi +Fsk3	4dpi +Fsk3	4dpi +Fsk4	4dpi +Fsk4	4dpi -Fsk1	4dpi -Fsk1
<b>G</b>	4dpi -Fsk2	4dpi -Fsk2	4dpi -Fsk3	4dpi -Fsk3	4dpi -Fsk4	4dpi -Fsk4	7dpi +Fsk1	7dpi +Fsk1	7dpi +Fsk2	7dpi +Fsk2	7dpi +Fsk3	7dpi +Fsk3
<b>H</b>	7dpi +Fsk4	7dpi +Fsk4	7dpi -Fsk1	7dpi -Fsk1	7dpi -Fsk2	7dpi -Fsk2	7dpi -Fsk3	7dpi -Fsk3	7dpi -Fsk4	7dpi -Fsk4	ddH <sub>2</sub> O	ddH <sub>2</sub> O

Πίνακας 5: Ο σχεδιασμός του plate της Luna® Universal One-Step RT-qPCR για τη μελέτη του αποικισμού στις χρονικές στιγμές 2 ημέρες, 4 ημέρες και 7 ημέρες μετά τον εμβολιασμό με τον μύκητα.

Εφόσον επιβεβαιώθηκε ο αποικισμός των εμβολιασμένων φυτών τομάτας από τον μύκητα, το επόμενο βήμα ήταν η ποσοτική ανάλυση των επιπέδων mRNA που παράγονται από τα γονίδια του μύκητα τα οποία κωδικοποιούν για τις πρωτεΐνες τελεστές στα διάφορα timepoints που εξετάστηκαν. Ουσιαστικά, ο σκοπός ήταν η ανίχνευση της έκφρασης αυτών των γονιδίων. Έτσι, χρησιμοποιήθηκε και πάλι το πρωτόκολλο της αντίδρασης Luna® Universal One-Step RT-qPCR – NEB. Η ποσοτικοποίηση των προϊόντων της αντίδρασης έγινε και πάλι με τη δέσμευση της φθορίζουσας χρωστικής SYBR Green στο νεοσυντιθέμενο cDNA και ήταν σχετική, διότι συγκρίθηκε με το γονίδιο αναφοράς ουβικουιτίνη και όχι με πρότυπη καμπύλη. Οι εκκινητές για τη μελέτη της έκφρασης του γονιδίου της ουβικουιτίνης ήταν και πάλι οι Le Ubi όπως αναγράφονται στον πίνακα 1. Ωστόσο, κατά τη μελέτη της έκφρασης των γονιδίων που κωδικοποιούν για τις πρωτεΐνες τελεστές χρησιμοποιήθηκαν εξειδικευμένοι εκκινητές για κάθε γονίδιο ξεχωριστά. Τα συστατικά της αντίδρασης και το θερμοκρασιακό πρωτόκολλο είναι και πάλι αυτά που αναφέρθηκαν παραπάνω στους πίνακες 2 και 3.

Άρα τελικά, έγιναν 3 αντιδράσεις qPCR με τον ίδιο σχεδιασμό και σε κάθε μία μελετήθηκε η έκφραση δύο γονιδίων που κωδικοποιούν για πρωτεΐνες τελεστές.

1) Το plate της qPCR που αφορούσε τη μελέτη της έκφρασης των πρωτεϊνών τελεστών **FUN\_015486/FUN\_011346** και **FUN\_010034** στα RNA που απομονώθηκαν από το φυτό *Solanum lycopersicum* στις χρονικές στιγμές 2 ημέρες, 4 ημέρες και 7 ημέρες μετά τον εμβολιασμό στη συνθήκη +Fsk σχεδιάστηκε όπως φαίνεται στον πίνακα. Το γονίδιο αναφοράς ήταν η **ουβικουιτίνη**.

2) Το plate της qPCR που αφορούσε τη μελέτη της έκφρασης των πρωτεϊνών τελεστών **FUN\_005917** και **FUN\_011104** στα RNA που απομονώθηκαν από το φυτό *Solanum lycopersicum* στις χρονικές στιγμές 2 ημέρες, 4 ημέρες και 7 ημέρες μετά τον εμβολιασμό στη συνθήκη +Fsk σχεδιάστηκε όπως φαίνεται στον πίνακα. Το γονίδιο αναφοράς ήταν η **ουβικουιτίνη**.

3) Το plate της qPCR που αφορούσε τη μελέτη της έκφρασης των πρωτεϊνών τελεστών **FUN\_010021** και **FUN\_015931** στα RNA που απομονώθηκαν από το φυτό *Solanum lycopersicum* στις χρονικές στιγμές 2 ημέρες, 4 ημέρες και 7 ημέρες μετά τον εμβολιασμό στη συνθήκη +Fsk σχεδιάστηκε όπως φαίνεται στον πίνακα. Το γονίδιο αναφοράς ήταν η **ουβικουιτίνη**.

	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12
A	2dpi +Fsk1	2dpi +Fsk1	2dpi +Fsk2	2dpi +Fsk2	2dpi +Fsk3	2dpi +Fsk3	2dpi +Fsk4	2dpi +Fsk4	4dpi +Fsk1	4dpi +Fsk1	4dpi +Fsk2	4dpi +Fsk2
B	4dpi +Fsk3	4dpi +Fsk3	4dpi +Fsk4	4dpi +Fsk4	7dpi +Fsk1	7dpi +Fsk1	7dpi +Fsk2	7dpi +Fsk2	7dpi +Fsk3	7dpi +Fsk3	7dpi +Fsk4	7dpi +Fsk4
C	4dpi -Fsk2	4dpi -Fsk2	7dpi -Fsk2	7dpi -Fsk2	7dpi -Fsk4	7dpi -Fsk4	ddH <sub>2</sub> O	ddH <sub>2</sub> O	2dpi +Fsk1	2dpi +Fsk1	2dpi +Fsk2	2dpi +Fsk2
D	2dpi +Fsk3	2dpi +Fsk3	2dpi +Fsk4	2dpi +Fsk4	4dpi +Fsk1	4dpi +Fsk1	4dpi +Fsk2	4dpi +Fsk2	4dpi +Fsk3	4dpi +Fsk3	4dpi +Fsk4	4dpi +Fsk4
E	7dpi +Fsk1	7dpi +Fsk1	7dpi +Fsk2	7dpi +Fsk2	7dpi +Fsk3	7dpi +Fsk3	7dpi +Fsk4	7dpi +Fsk4	4dpi -Fsk2	4dpi -Fsk2	7dpi -Fsk2	7dpi -Fsk2
F	7dpi -Fsk4	7dpi -Fsk4	ddH <sub>2</sub> O	ddH <sub>2</sub> O	2dpi +Fsk1	2dpi +Fsk1	2dpi +Fsk2	2dpi +Fsk2	2dpi +Fsk3	2dpi +Fsk3	2dpi +Fsk4	2dpi +Fsk4
G	4dpi +Fsk1	4dpi +Fsk1	4dpi +Fsk2	4dpi +Fsk2	4dpi +Fsk3	4dpi +Fsk3	4dpi +Fsk4	4dpi +Fsk4	7dpi +Fsk1	7dpi +Fsk1	7dpi +Fsk2	7dpi +Fsk2
H	7dpi +Fsk3	7dpi +Fsk3	7dpi +Fsk4	7dpi +Fsk4	4dpi -Fsk2	4dpi -Fsk2	7dpi -Fsk2	7dpi -Fsk2	7dpi -Fsk4	7dpi -Fsk4	ddH <sub>2</sub> O	ddH <sub>2</sub> O

Πίνακας 6: Ο σχεδιασμός του plate της Luna® Universal One-Step RT-qPCR για τη μελέτη της έκφρασης των γονιδίων που κωδικοποιούν για τις πρωτεΐνες τελεστές.

Όσον αφορά τα εμβολιασμένα φυτά *Lotus japonicus*, η σύνθεση cDNA από το απομονωμένο RNA είχε γίνει σε ξεχωριστό βήμα. Συνεπώς, δε χρειάστηκε η σύνθεσή του με το πρωτόκολλο της αντίδρασης Luna®. Αντιθέτως, η ενίσχυση και ποσοτικοποίηση του cDNA έγιναν με το πρωτόκολλο SYBR® Green qPCR της εταιρείας Kapa Taq Biosystems. Πιο συγκεκριμένα, η ενίσχυση του cDNA έγινε με το ένζυμο Taq DNA polymerase και η ποσοτικοποίηση έγινε πάλι με τη δέσμευση της φθορίζουσας χρωστικής SYBR Green στο νεοσυντιθέμενο DNA. Επίσης, όπως και πριν, η ποσοτικοποίηση της έκφρασης των γονιδίων ήταν σχετική, διότι έγινε σύγκριση με το γονίδιο αναφοράς ουβικουιτίνη και όχι με πρότυπη καμπύλη. Μάλιστα, για τη μελέτη της έκφρασης του γονιδίου της ουβικουιτίνης χρησιμοποιήθηκαν οι ειδικοί εκκινητές για το φυτό Lj Ubi. Η αλληλουχία τους φαίνεται στον πίνακα 7. Ωστόσο, πάλι κατά τη μελέτη της έκφρασης των γονιδίων που κωδικοποιούν για τις πρωτεΐνες τελεστές χρησιμοποιήθηκαν εξειδικευμένοι εκκινητές για κάθε γονίδιο ξεχωριστά.

Εκκινητής	Αλληλουχία (5' - 3')
Lj Ubi_F	TTCACCTTGTGCTCCGTCCTTC
Lj Ubi_R	CCAGAAGAGGCCACAACAAC

Πίνακας 7: Η αλληλουχία των εκκινητών Lj Ubi που στοχεύουν στο γονίδιο της ουβικουιτίνης του φυτού *Lotus japonicus*.

Για κάθε δείγμα απαιτούνται 1 μl του cDNA του δείγματος, 5 μl του SYBR Mix (2x), 0.2 μl του εμπρόσθιου εκκινητή (Primer F), 0.2 μl του ανάστροφου εκκινητή (Primer R) και 3.6 μl ddH<sub>2</sub>O. Το SYBR Mix περιέχει dNTPs, Taq DNA polymerase, buffer και τη χρωστική SYBR Green. Ο τελικός όγκος της αντίδρασης ήταν 10 μl. Ξεχωριστά, τοποθετήθηκε 1 μl cDNA σε κάθε πηγάδι του plate και όλα τα υπόλοιπα συστατικά της αντίδρασης αναμείχθηκαν για τη δημιουργία MasterMix, όπως φαίνεται παρακάτω.

Συστατικά MasterMix	Ποσότητα (μl)
Mix SYBR Green (2x)	5
Primer F	0,2
Primer R	0,2
ddH <sub>2</sub> O	3,6

Πίνακας 8: Τα συστατικά MasterMix της SYBR® Green qPCR.

Το θερμοκρασιακό πρωτόκολλο της αντίδρασης στον κυκλοποιητή σχεδιάστηκε με βάση τις οδηγίες του κατασκευαστή BioRad στα εξής βήματα. Ξεκινά με 3 λεπτά στους 95°C και σε επανάληψη 44 κύκλων 15 δευτερόλεπτα στους 95°C με σκοπό την αποδιάταξη του DNA και 20 δευτερόλεπτα στους 58°C με σκοπό την υβριδοποίηση των εκκινητών στα σημεία στόχους και την επιμήκυνση. Ακολουθεί η melt curve analysis που περιλαμβάνει 5 δευτερόλεπτα στους 55°C και 5 δευτερόλεπτα στους 95°C, ώστε να ελεγχθεί η εξειδίκευση των προϊόντων. Τα βήματα αυτά συνοψίζονται και στον πίνακα παρακάτω.

Διαδικασία	Θερμοκρασία (°C)	Χρόνος	Κύκλοι
Αρχική αποδιάταξη	95°C	3 λεπτά	1
Αποδιάταξη	95°C	15 δευτερόλεπτα	44
Υβριδοποίηση Επιμήκυνση	58°C	20 δευτερόλεπτα	
Melt curve analysis	55°C 95°C	5 δευτερόλεπτα 5 δευτερόλεπτα	1

Πίνακας 9: Το θερμοκρασιακό πρωτόκολλο της SYBR® Green qPCR.

Άρα τελικά, έγιναν δύο αντιδράσεις qPCR με τον ίδιο σχεδιασμό και σε κάθε μία μελετήθηκε η έκφραση δύο γονιδίων που κωδικοποιούν για πρωτεΐνες τελεστές.

1) Το plate της qPCR που αφορούσε τη μελέτη της έκφρασης των πρωτεϊνών τελεστών **FUN\_015486/FUN\_011346** και **FUN\_010034** στα cDNAs που προήλθαν από το απομονωμένο RNA από τις ρίζες του *Lotus jaronicus* στις χρονικές στιγμές 1 ημέρα, 2 ημέρες, 4 ημέρες και 12 ημέρες μετά τον εμβολιασμό στη συνθήκη +Fsk σχεδιάστηκε όπως φαίνεται στον παρακάτω πίνακα. Το γονίδιο αναφοράς ήταν η **ουβικουιτίνη**.

2) Το plate της qPCR που αφορούσε τη μελέτη της έκφρασης των πρωτεϊνών τελεστών **FUN\_05917** και **FUN\_011104** στα cDNAs που προήλθαν από το απομονωμένο RNA από τις ρίζες του *Lotus jaronicus* στις χρονικές στιγμές 1 ημέρα, 2 ημέρες, 4 ημέρες και 12 ημέρες μετά τον εμβολιασμό στη συνθήκη +Fsk σχεδιάστηκε όπως φαίνεται στον παρακάτω πίνακα. Το γονίδιο αναφοράς ήταν η **ουβικουιτίνη**.

	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12
A	1dpi +Fsk1	1dpi +Fsk1	1dpi +Fsk2	1dpi +Fsk2	1dpi +Fsk3	1dpi +Fsk3	1dpi +Fsk4	1dpi +Fsk4	2dpi +Fsk1	2dpi +Fsk1	2dpi +Fsk2	2dpi +Fsk2
B	2dpi +Fsk3	2dpi +Fsk3	2dpi +Fsk4	2dpi +Fsk4	4dpi +Fsk1	4dpi +Fsk1	4dpi +Fsk2	4dpi +Fsk2	4dpi +Fsk3	4dpi +Fsk3	12dpi +Fsk1	12dpi +Fsk1
C	12dpi +Fsk2	12dpi +Fsk2	12dpi +Fsk3	12dpi +Fsk3	12dpi +Fsk4	12dpi +Fsk4	ddH <sub>2</sub> O	ddH <sub>2</sub> O	1dpi +Fsk1	1dpi +Fsk1	1dpi +Fsk2	1dpi +Fsk2
D	1dpi +Fsk3	1dpi +Fsk3	1dpi +Fsk4	1dpi +Fsk4	2dpi +Fsk1	2dpi +Fsk1	2dpi +Fsk2	2dpi +Fsk2	2dpi +Fsk3	2dpi +Fsk3	2dpi +Fsk4	2dpi +Fsk4
E	4dpi +Fsk1	4dpi +Fsk1	4dpi +Fsk2	4dpi +Fsk2	4dpi +Fsk3	4dpi +Fsk3	12dpi +Fsk1	12dpi +Fsk1	12dpi +Fsk2	12dpi +Fsk2	12dpi +Fsk3	12dpi +Fsk3
F	12dpi +Fsk4	12dpi +Fsk4	ddH <sub>2</sub> O	ddH <sub>2</sub> O	1dpi +Fsk1	1dpi +Fsk1	1dpi +Fsk2	1dpi +Fsk2	1dpi +Fsk3	1dpi +Fsk3	1dpi +Fsk4	1dpi +Fsk4
G	2dpi +Fsk1	2dpi +Fsk1	2dpi +Fsk2	2dpi +Fsk2	2dpi +Fsk3	2dpi +Fsk3	2dpi +Fsk4	2dpi +Fsk4	4dpi +Fsk1	4dpi +Fsk1	4dpi +Fsk2	4dpi +Fsk2
H	4dpi +Fsk3	4dpi +Fsk3	12dpi +Fsk1	12dpi +Fsk1	12dpi +Fsk2	12dpi +Fsk2	12dpi +Fsk3	12dpi +Fsk3	12dpi +Fsk4	12dpi +Fsk4	ddH <sub>2</sub> O	ddH <sub>2</sub> O

Πίνακας 10: Ο σχεδιασμός του plate της SYBR® Green qPCR για τη μελέτη της έκφρασης των γονιδίων που κωδικοποιούν για τις πρωτεΐνες τελεστές.

Επίσης, έγιναν άλλες δύο αντιδράσεις qPCR με τον ίδιο σχεδιασμό και σε κάθε μία μελετήθηκε η έκφραση ενός γονιδίου που κωδικοποιεί για μία πρωτεΐνη τελεστή αντίστοιχα.

1) Το plate της qPCR που αφορούσε τη μελέτη της έκφρασης της πρωτεΐνης τελεστή **FUN\_010021** στα cDNAs που προήλθαν από το απομονωμένο RNA από τις ρίζες του *Lotus jaronicus* στις χρονικές στιγμές 1 ημέρα, 2 ημέρες, 4 ημέρες και 12 ημέρες μετά τον εμβολιασμό στη συνθήκη +Fsk σχεδιάστηκε όπως φαίνεται στον παρακάτω πίνακα. Το γονίδιο αναφοράς ήταν η **ουβικουιτίνη**.

2) Το plate της qPCR που αφορούσε τη μελέτη της έκφρασης της πρωτεΐνης τελεστή **FUN\_015931** στα cDNAs που προήλθαν από το απομονωμένο RNA από τις ρίζες του *Lotus jaronicus* στις χρονικές στιγμές 1 ημέρα, 2 ημέρες, 4 ημέρες και 12 ημέρες μετά τον εμβολιασμό στη συνθήκη +Fsk σχεδιάστηκε όπως φαίνεται στον παρακάτω πίνακα. Το γονίδιο αναφοράς ήταν η **ουβικουιτίνη**.



	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12
A	1dpi +FsK1	1dpi +FsK1	1dpi +FsK2	1dpi +FsK2	1dpi +FsK3	1dpi +FsK3	1dpi +FsK4	1dpi +FsK4	2dpi +FsK1	2dpi +FsK1	2dpi +FsK2	2dpi +FsK2
B	2dpi +FsK3	2dpi +FsK3	2dpi +FsK4	2dpi +FsK4	4dpi +FsK1	4dpi +FsK1	4dpi +FsK2	4dpi +FsK2	4dpi +FsK3	4dpi +FsK3	12dpi +FsK1	12dpi +FsK1
C	12dpi +FsK2	12dpi +FsK2	12dpi +FsK3	12dpi +FsK3	12dpi +FsK4	12dpi +FsK4	ddH <sub>2</sub> O	ddH <sub>2</sub> O	1dpi +FsK1	1dpi +FsK1	1dpi +FsK2	1dpi +FsK2
D	1dpi +FsK3	1dpi +FsK3	1dpi +FsK4	1dpi +FsK4	2dpi +FsK1	2dpi +FsK1	2dpi +FsK2	2dpi +FsK2	2dpi +FsK3	2dpi +FsK3	2dpi +FsK4	2dpi +FsK4
E	4dpi +FsK1	4dpi +FsK1	4dpi +FsK2	4dpi +FsK2	4dpi +FsK3	4dpi +FsK3	12dpi +FsK1	12dpi +FsK1	12dpi +FsK2	12dpi +FsK2	12dpi +FsK3	12dpi +FsK3
F	12dpi +FsK4	12dpi +FsK4	ddH <sub>2</sub> O	ddH <sub>2</sub> O								
G												
H												

Πίνακας 11: Ο σχεδιασμός του plate της SYBR<sup>®</sup> Green qPCR για τη μελέτη της έκφρασης των γονιδίων που κωδικοποιούν για τις πρωτεΐνες τελεστές.

Τέλος, έγινε μία αντίδραση qPCR με το πρωτόκολλο SYBR<sup>®</sup> Green qPCR της εταιρείας Kapa Taq Biosystems, με σκοπό την προσθήκη αρνητικών control στη μελέτη όσον αφορά το φυτό *Lotus japonicus* ώστε να ελεγχθεί ότι πράγματι μελετώνται γονίδια που εκφράζονται μόνο στον μύκητα και άρα βλέπουμε την έκφρασή τους μόνο στη συνθήκη +FsK. Ο σχεδιασμός του plate φαίνεται στον πίνακα 12. Στην πρώτη σειρά ελέγχθηκε η έκφραση του γονιδίου αναφοράς ουβικουτίνη. Τα υπόλοιπα γονίδια που ελέγχθηκαν είναι FUN\_005917, FUN\_010021, FUN\_011104, FUN\_015486/FUN\_011346, FUN\_15931 και FUN\_010034 αντίστοιχα σε κάθε σειρά.

	1	2	3	4	5	6	7	8
A	1dpi -FsK1	1dpi -FsK1	2dpi -FsK1	2dpi -FsK1	4dpi -FsK1	4dpi -FsK1	12dpi -FsK1	12dpi -FsK1
B	1dpi -FsK1	1dpi -FsK1	2dpi -FsK1	2dpi -FsK1	4dpi -FsK1	4dpi -FsK1	12dpi -FsK1	12dpi -FsK1
C	1dpi -FsK1	1dpi -FsK1	2dpi -FsK1	2dpi -FsK1	4dpi -FsK1	4dpi -FsK1	12dpi -FsK1	12dpi -FsK1
D	1dpi -FsK1	1dpi -FsK1	2dpi -FsK1	2dpi -FsK1	4dpi -FsK1	4dpi -FsK1	12dpi -FsK1	12dpi -FsK1
E	1dpi -FsK1	1dpi -FsK1	2dpi -FsK1	2dpi -FsK1	4dpi -FsK1	4dpi -FsK1	12dpi -FsK1	12dpi -FsK1
F	1dpi -FsK1	1dpi -FsK1	2dpi -FsK1	2dpi -FsK1	4dpi -FsK1	4dpi -FsK1	12dpi -FsK1	12dpi -FsK1
G	1dpi -FsK1	1dpi -FsK1	2dpi -FsK1	2dpi -FsK1	4dpi -FsK1	4dpi -FsK1	12dpi -FsK1	12dpi -FsK1

Πίνακας 12: Αρνητικά control για το φυτό *Lotus japonicus*.

Όπως αναφέρθηκε παραπάνω, κατά τη μελέτη της έκφρασης των γονιδίων που κωδικοποιούν για τις πρωτεΐνες τελεστές στα δύο φυτά χρησιμοποιήθηκαν εξειδικευμένοι εκκινητές για κάθε γονίδιο ξεχωριστά. Ο σχεδιασμός αυτών των εκκινητών έγινε με τη βοήθεια του προγράμματος PrimerBlast. Αρχικά, δόθηκε στο πρόγραμμα η κατάλληλη αλληλουχία DNA σε μορφή FASTA του κάθε γονιδίου που κωδικοποιεί για μία πρωτεΐνη τελεστή. Το PCR product size επιλέχθηκε να είναι 80-180 bp, το Primer melting temperature (T<sub>m</sub>) επιλέχθηκε να είναι 57-63°C, ενώ το βέλτιστο T<sub>m</sub> επιλέχθηκε να είναι 60°C και η διαφορά των T<sub>m</sub> ανάμεσα στον εμπρόσθιο και στον ανάστροφο εκκινητή επιλέχθηκε να είναι το πολύ 1°C. Στη συνέχεια επιλέχθηκε η nr (non-redundant) database και ως οργανισμοί επιλέχθηκαν οι *Lotus japonicus*, *Solanum lycopersicum* και *Nectria haematococca MPVI 77-13-4 (taxid:660122)*. Ο FsK αποτελεί την ασεξουαλική φάση του μύκητα *Nectria haematococca*. Επιπλέον, ορίστηκε η περιεκτικότητα των εκκινητών σε GC σε ποσοστό 40-70%, η επανάληψη ενός νουκλεοτιδίου μπορούσε να συμβαίνει το πολύ έως 3 φορές συνεχόμενα (για παράδειγμα AAA) και τέθηκαν κριτήρια για την ειδικότητα των εκκινητών, δηλαδή ορίστηκε πως δε θα πρέπει να υπάρχουν πάνω από 4 αστοχίες μεταξύ αλληλουχίας στόχου και εκκινητή. Τέλος, ελέγχθηκε η συμπληρωματικότητα των δύο εκκινητών μεταξύ τους αλλά και του καθένα με τον εαυτό του για την αποφυγή μη ειδικών προϊόντων. Η αλληλουχία και το T<sub>m</sub> τους φαίνονται στον πίνακα παρακάτω. Όσον αφορά τα γονίδια FUN\_15486 και FUN\_011346, μοιράζονται κάποια σημεία κοινής αλληλουχίας DNA. Δηλαδή, ολόκληρη η αλληλουχία του γονιδίου FUN\_011346 εμπεριέχεται στην αλληλουχία του γονιδίου

FUN\_015486. Άρα, η αλληλουχία του τελευταίου γονιδίου είναι λίγο μεγαλύτερη από του πρώτου και υποχρεωτικά έχουν το ίδιο σετ εκκινητών.

Εκκινητής	Αλληλουχία (5' - 3')	Tm (°C)
FUN_005917_F	CCACTCTTGCTGCGTGC	52
FUN_005917_R	GTAGCGGGTAATGTTGAAGTAGG	
FUN_010021_F	CGTCCTCGCTCTTCTGGC	54
FUN_010021_R	GCTCGTTATCCTCGCACCC	
FUN_011104_F	CCGATTACTACAACCTCAGCG	54
FUN_011104_R	CCTGCTCAACTCCTCATTGG	
FUN_15486-011346_F	GGTGACTTTCGGCGGTTGG	55
FUN_15486-011346_R	GTAGTAGGCGTTGTGCGCAGG	
FUN_015931_F	AAGGGCTCCATCCTCGCC	57
FUN_015931_R	ATCTTGCCGTGCTTGCCG	
FUN_010034_F	CGACCTGCTTCGTCACCG	54
FUN_010034_R	TCGTTGTTGCTCTCGTGGC	

Πίνακας 13: Οι αλληλουχίες και το melting temperature (Tm) των εκκινητών που στοχεύουν στα γονίδια που κωδικοποιούν για τις πρωτεΐνες τελεστές.

### 3.5 Θρεπτικά υλικά

#### 3.5.1 Θρεπτικό διάλυμα Hoagland

Το θρεπτικό διάλυμα Hoagland χρησιμοποιήθηκε για την προετοιμασία του υποστρώματος κατά τη διαδικασία της φύτευσης. Πιο συγκεκριμένα, η άμμος διαβρέχθηκε με 25 ml διαλύματος Hoagland λίγο πριν τη φύτευση, με σκοπό την παροχή του απαραίτητου νερού και των θρεπτικών συστατικών για την ανάπτυξη των φυτών. Τα συστατικά για 1 L διαλύματος Hoagland 100% σύμφωνα με τους Johnson et al. (1957) είναι τα εξής:

Stock	Αρχική συγκέντρωση (M)	Τελικός όγκος (ml)
MgSO <sub>4</sub>	1M	2 ml
KH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub>	1 M	1 ml
FeEDTA	0,1 M	1 ml
Microelements	---	1 ml
KNO <sub>3</sub>	2M	5 ml
Ca(NO <sub>3</sub> ) <sub>2</sub>	0,1 M	5 ml

Πίνακας 14: Τα συστατικά του θρεπτικού διαλύματος Hoagland.

Άρα, ο τελικός όγκος ήταν ο όγκος που χρησιμοποιήσαμε από κάθε ένα από τα stock αρχικά διαλύματα. Έγινε ανάμειξη και το τελικό διάλυμα αραιώθηκε με dH<sub>2</sub>O σε ογκομετρικό κύλινδρο έως τελικό όγκο 1 L. Στη συνέχεια, περάστηκε από υδρόφιλο φίλτρο PTFE-L διαμέτρου 0.45μm για την αποστείρωσή του και τοποθετήθηκε σε αποστειρωμένο duran.



### 3.5.2 Potato Dextrose Broth (PDB) / Potato Dextrose Agar (PDA)

Τα θρεπτικά μέσα PDB και PDA είναι μέσα ανάπτυξης μυκήτων. Αρχικά και τα δύο θρεπτικά μέσα που χρησιμοποιήθηκαν προέρχονται από την NEOGEN Culture Media και βρίσκονται σε μορφή σκόνης. Τελικά, μετά την παρασκευή, το θρεπτικό μέσο PDB είναι σε υγρή μορφή, ενώ το θρεπτικό μέσο PDA είναι σε στερεή μορφή, διότι περιέχει άγαρ.

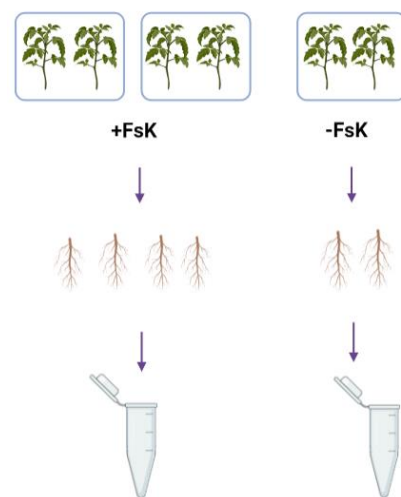
Για την καλλιέργεια του μύκητα σε υγρό θρεπτικό μέσο PDB, όπως αναφέρθηκε παραπάνω, χρειάστηκαν 100 ml θρεπτικού υλικού. Σε 1L dH<sub>2</sub>O διαλύονται 24 gr της σκόνης. Άρα, χρησιμοποιήθηκαν 2,4 gr σκόνης που αναμείχθηκαν σε 100 ml dH<sub>2</sub>O. Ακολούθησε αποστείρωση στους 121°C για 20 λεπτά σύμφωνα με τις οδηγίες του παρασκευαστή.

Για την ανακαλλιέργεια του μύκητα στο στερεό θρεπτικό μέσο PDA, χρειάζονται περίπου 25 ml θρεπτικού υλικού που επιστρώθηκαν σε τρυβλίο Petri. Σε 1L dH<sub>2</sub>O διαλύονται 39 gr της σκόνης. Ακολουθεί και πάλι αποστείρωση στους 121°C για 20 λεπτά σύμφωνα με τις οδηγίες του παρασκευαστή.

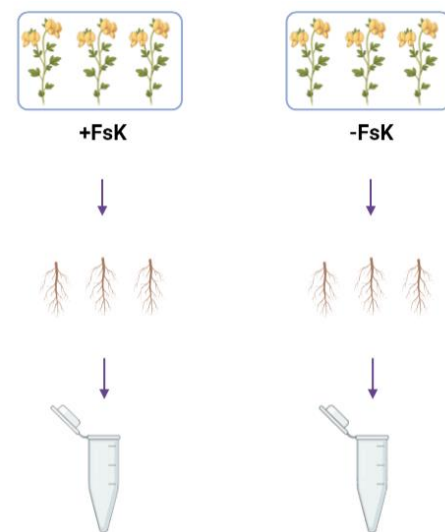
## 4. Αποτελέσματα

Όσον αφορά τον σχεδιασμό του πειράματος για το φυτό *Solanum lycopersicum* υπολογίστηκαν 8 magenta pots για τη συνθήκη +FsK (φυτά εμβολιασμένα με τον μύκητα) και 4 magenta pots για τη συνθήκη -FsK (φυτά που δεν εμβολιάστηκαν με τον μύκητα) για κάθε χρονική στιγμή μετά τον εμβολιασμό που μελετήθηκε (6hpi, 18hpi, 30hpi, 2dpi, 4dpi, 7dpi). Επίσης, τοποθετήθηκαν 2 φυτά σε κάθε magenta pot. Άρα, συνολικά χρειάστηκαν  $(8+4)*6 = 12*6 = 72$  magenta pots. Κάθε magenta pot περιείχε περίπου 200 gr από το μίγμα άμμου και βερμικουλίτη, συνεπώς χρειάστηκαν  $72*200 = 14.400 \text{ gr} = 14,4 \text{ kg}$  του μίγματος. Για διευκόλυνση υπολογίστηκαν 16 kg και μάλιστα με αριθμό magenta pot. Έτσι, το μίγμα περιείχε 36 magenta pot χοντρόκοκκης άμμου, 18 magenta pot λεπτόκοκκης άμμου και 26 magenta pot βερμικουλίτη. Συνολικά για τη συνθήκη +FsK υπήρχαν 16 ρίζες που τοποθετήθηκαν ανά 4 σε 1 erpendorf tube και για τη συνθήκη -FsK υπήρχαν 8 ρίζες που τοποθετήθηκαν ανά 2 σε 1 erpendorf tube. Άρα τελικά είχαμε 4 erpendorf tubes που σημαίνει 4 βιολογικές επαναλήψεις για κάθε συνθήκη σε κάθε χρονική στιγμή μετά τον εμβολιασμό με τον μύκητα.

Όσον αφορά τον σχεδιασμό του πειράματος για το φυτό *Lotus japonicus* υπολογίστηκαν 4 magenta pots για τη συνθήκη +FsK και 4 magenta pots για τη συνθήκη -FsK. Επίσης, τοποθετήθηκαν 3 φυτά σε κάθε magenta pot. Συνολικά για κάθε συνθήκη υπήρχαν 12 ρίζες που τοποθετήθηκαν ανά 3 σε 1 erpendorf tube. Άρα τελικά είχαμε 4 erpendorf tubes που σημαίνει 4 βιολογικές επαναλήψεις για κάθε συνθήκη σε κάθε χρονική στιγμή μετά τον εμβολιασμό με τον μύκητα.



Εικόνα 12: Πειραματικός σχεδιασμός για το φυτό *Solanum lycopersicum*.



Εικόνα 13: Πειραματικός σχεδιασμός για το φυτό *Lotus japonicus* (Διδακτορική διατριβή, Σκιαδά 2019).

#### 4.1 Ποσοτικοποίηση του ολικού απομονωμένου RNA

Τόσο για την ανίχνευση του αποικισμού του FsK όσο και για τη μελέτη της έκφρασης των πρωτεϊνών τελεστών ήταν απαραίτητη η ποσοτικοποίηση του απομονωμένου RNA. Όσον αφορά το απομονωμένο RNA από το φυτό *Solanum lycopersicum* η ποσοτικοποίηση έγινε με τη συσκευή Nanodrop και αφορά τα δείγματα στον παρακάτω πίνακα.

Χρονική στιγμή και συνθήκη	260/280 (nm)	RNA (ng/μl)
6hpi +FsK1	1.22	30.6
6hpi +FsK2	1.45	30.2
6hpi +FsK3	1.93	164.7
6hpi +FsK4	1.75	89.1
6hpi -FsK1	1.33	99.2
6hpi -FsK2	1.45	59.7
6hpi -FsK3	1.81	105.5
6hpi -FsK4	1.63	27.4
18hpi +FsK1	1.84	99.3
18hpi +FsK2	1.95	318.5
18hpi +FsK3	1.96	202.5
18hpi +FsK4	1.25	54.6
18hpi -FsK1	1.79	127.4
18hpi -FsK2	1.77	107.3
18hpi -FsK3	1.66	68
30hpi +FsK1	1.87	120.2
30hpi +FsK2	1.80	81.5
30hpi +FsK3	1.93	452.3
30hpi +FsK4	2.25	315.7
30hpi -FsK1	1.69	95.8
30hpi -FsK2	1.77	56.6
30hpi -FsK3	1.91	57.4
2dpi +FsK1	1.82	144.0
2dpi +FsK2	1.93	368.0
2dpi +FsK3	1.82	186.5
2dpi +FsK4	1.95	193.9
2dpi -FsK1	1.87	126.5
2dpi -FsK2	1.39	29.9
2dpi -FsK3	1.90	112.0
2dpi -FsK4	1.85	129.2
4dpi +FsK1	1.96	206.4
4dpi +FsK2	2.02	593.4
4dpi +FsK3	2.00	419.5
4dpi +FsK4	2.02	166.0
4dpi -FsK1	1.80	70.2
4dpi -FsK2	1.71	58.6
4dpi -FsK3	1.86	58.8
4dpi -FsK4	1.68	137.0
7dpi +FsK1	1.91	201.8
7dpi +FsK2	1.88	184.1
7dpi +FsK3	1.94	416.3

7dpi +Fsk4	1.91	171.9
7dpi -Fsk1	1.86	122.7
7dpi -Fsk2	1.80	49.4
7dpi -Fsk3	1.47	91.6
7dpi -Fsk4	1.89	137.4

Πίνακας 15: Η ποσότητα και καθαρότητα του απομονωμένου RNA στα διάφορα δείγματα *Solanum lycopersicum*.

Όσον αφορά το απομονωμένο RNA από το φυτό *Lotus japonicus* η ποσοτικοποίηση είχε γίνει ήδη με τη συσκευή Qubit. Τα δείγματα που μελετήθηκαν αναγράφονται στον παρακάτω πίνακα.

Χρονική στιγμή και συνθήκη	RNA (ng/μl)
1dpi -Fsk1	16.6
1dpi -Fsk2	22
1dpi -Fsk3	22.6
1dpi -Fsk4	38.4
1dpi +Fsk1	49.4
1dpi +Fsk2	38
1dpi +Fsk3	24.9
1dpi +Fsk4	22.6
2dpi -Fsk1	19.7
2dpi -Fsk2	25.7
2dpi -Fsk3	33.5
2dpi -Fsk4	46.1
2dpi +Fsk1	54.1
2dpi +Fsk2	52.8
2dpi +Fsk3	39.9
2dpi +Fsk4	51.6
4dpi -Fsk1	80.8
4dpi -Fsk2	72.7
4dpi -Fsk3	43.1
4dpi -Fsk4	113
4dpi +Fsk1	114
4dpi +Fsk2	82.6
4dpi +Fsk3	64.7
12dpi -Fsk1	32
12dpi -Fsk2	67.6
12dpi -Fsk3	71.1
12dpi -Fsk4	75.7
12dpi +Fsk1	93.3
12dpi +Fsk2	98.6
12dpi +Fsk3	82.6
12dpi +Fsk4	129

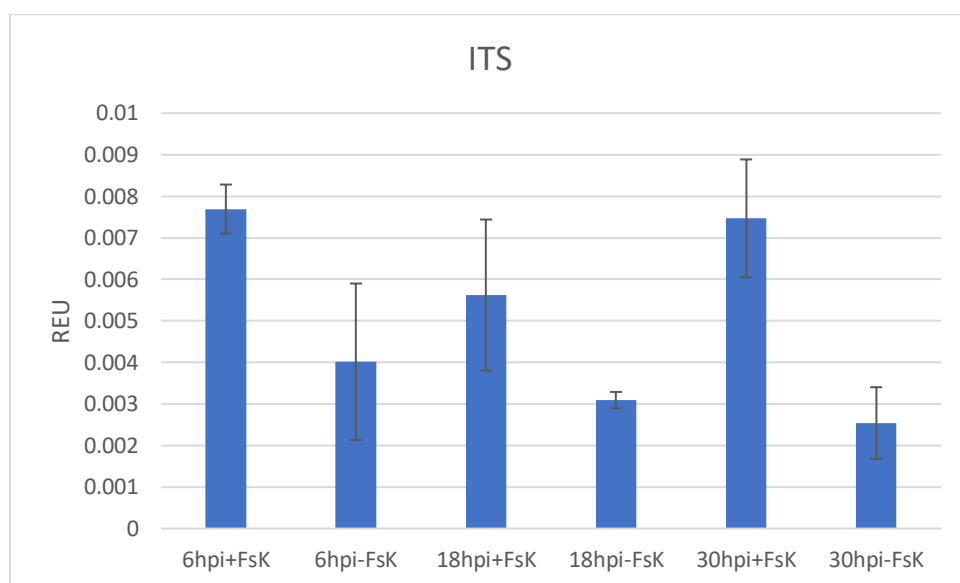
Πίνακας 16: Η ποσότητα και καθαρότητα του απομονωμένου RNA στα διάφορα δείγματα *Lotus japonicus*.

#### 4.2 Ανίχνευση αποικισμού από τον μυκητιακό στέλεχος Fsk στις ρίζες της τομάτας με αλυσιδωτή αντίδραση πολυμεράσης σε πραγματικό χρόνο (qPCR)

Χρησιμοποιώντας τα αποτελέσματα που αποκτήθηκαν από κάθε qPCR δημιουργήθηκαν διαγράμματα που δείχνουν την έκφραση γονιδίων του μύκητα κατά την αλληλεπίδραση με το φυτό *Solanum lycopersicum*, με

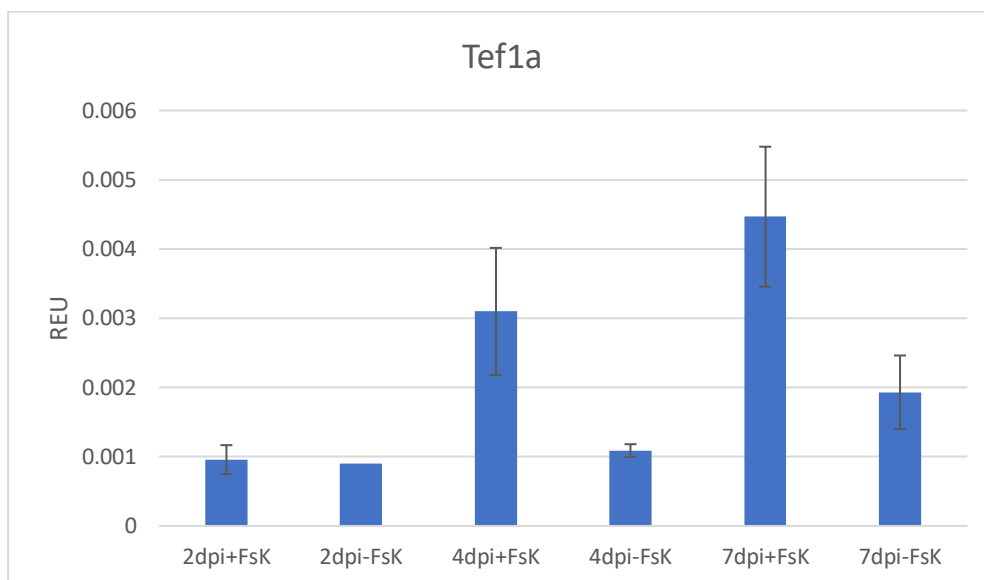
σκοπό την ανίχνευση του αποικισμού. Στον άξονα x αναγράφονται οι χρονικές στιγμές μετά τον εμβολιασμό για κάθε συνθήκη (+Fsk/-Fsk) και στον άξονα y αναγράφονται οι Relative Expression Units, δηλαδή φαίνεται η σχετική έκφραση. Η ποσοτικοποίηση έγινε με τη μέθοδο  $2^{-\Delta Ct}$ .

Στο παρακάτω διάγραμμα φαίνονται τα επίπεδα της σχετικής έκφρασης του γονιδίου *ITS* του μύκητα ως προς το γονίδιο αναφοράς ουβικουϊτίνη κατά την αλληλεπίδραση με το φυτό. Συνεπώς, φαίνονται τα επίπεδα του αποικισμού στις χρονικές στιγμές 6 ώρες, 18 ώρες και 30 ώρες μετά τον εμβολιασμό. Η έκφραση του γονιδίου είναι υψηλότερη στα εμβολιασμένα φυτά σε σχέση με τα μη εμβολιασμένα με τον μύκητα. Ωστόσο, δε φαίνεται κάποιο μοτίβο έκφρασης.



Διάγραμμα 1: Τα επίπεδα αποικισμού του μύκητα στο φυτό 6 ώρες, 18 ώρες και 30 ώρες μετά τον εμβολιασμό.

Στο παρακάτω διάγραμμα φαίνονται τα επίπεδα της σχετικής έκφρασης του γονιδίου *Tef1a* του μύκητα ως προς το γονίδιο της ουβικουϊτίνης κατά την αλληλεπίδραση με το φυτό *Solanum lycopersicum*. Συνεπώς, φαίνονται τα επίπεδα του αποικισμού στις χρονικές στιγμές 2 ημέρες, 4 ημέρες και 7 ημέρες μετά τον εμβολιασμό. Η έκφραση του γονιδίου είναι υψηλότερη στα εμβολιασμένα φυτά σε σχέση με τα μη εμβολιασμένα με τον μύκητα. Φαίνεται ότι η έκφραση του γονιδίου αυξάνεται όσο προχωρά από τις 2 ημέρες, στις 4 ημέρες και τελικά στις 7 ημέρες μετά τον εμβολιασμό. Ωστόσο, σε σχέση με το παραπάνω διάγραμμα συνολικά δε φαίνεται κάποιο μοτίβο έκφρασης.



Διάγραμμα 2: Τα επίπεδα αποικισμού του μύκητα στο φυτό 2 ημέρες, 4 ημέρες και 7 ημέρες μετά τον εμβολιασμό.

### 4.3 Ανίχνευση των επιπέδων έκφρασης των γονιδίων του μυκητιακού στελέχους FsK που κωδικοποιούν για τις πρωτεΐνες τελεστές με αλυσιδωτές αντιδράσεις πολυμεράσης σε πραγματικό χρόνο (qPCR)

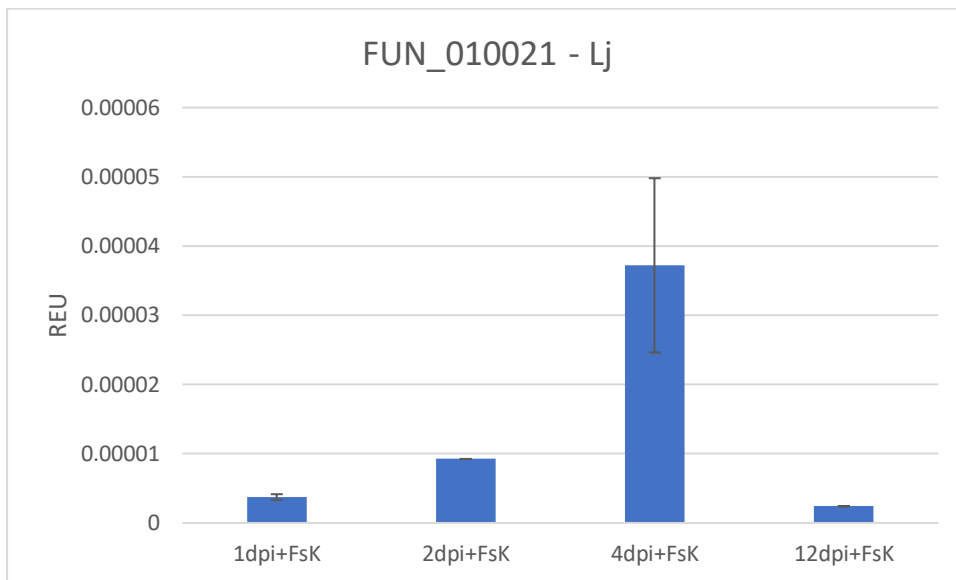
Χρησιμοποιώντας τα αποτελέσματα που αποκτήθηκαν από κάθε qPCR δημιουργήθηκαν διαγράμματα που δείχνουν τη σχετική έκφραση των γονιδίων που κωδικοποιούν για τις πρωτεΐνες τελεστές ως προς το γονίδιο αναφοράς ουβικουτίνη. Παρακάτω φαίνεται η έκφραση κάθε γονιδίου κατά την αλληλεπίδραση του μύκητα FsK με το φυτό *Solanum lycopersicum* και *Lotus japonicus* αντίστοιχα. Στον άξονα x αναγράφονται οι χρονικές στιγμές μετά τον εμβολιασμό για τη συνθήκη +FsK και στον άξονα y αναγράφονται οι Relative Expression Units, δηλαδή φαίνεται η σχετική έκφραση. Μάλιστα, προτιμήθηκαν οι χρονικές στιγμές 2 ημέρες, 4 ημέρες και 7 ημέρες μετά τον εμβολιασμό, διότι παρουσίασαν πιο έμπιστα αποτελέσματα και κάποιες πρώτες ενδείξεις για ένα πρότυπο αποικισμού που αυξάνεται όσο περνάνε οι ημέρες και μεγιστοποιείται στις 7 ημέρες. Η ποσοτικοποίηση έγινε και πάλι με τη μέθοδο  $2^{-\Delta Ct}$ .

- **FUN\_005917:**

Δεν ανιχνεύθηκε έκφραση αυτού του γονιδίου κατά την αλληλεπίδραση του FsK με το φυτό *Solanum lycopersicum*, αλλά ούτε και κατά την αλληλεπίδραση με το φυτό *Lotus japonicus*.

- **FUN\_010021:**

- 1) Δεν ανιχνεύθηκε έκφραση αυτού του γονιδίου κατά την αλληλεπίδραση του FsK με το φυτό *Solanum lycopersicum*.
- 2) Ωστόσο, στο διάγραμμα παρακάτω φαίνεται η έκφραση του γονιδίου κατά την αλληλεπίδραση του FsK με το φυτό *Lotus japonicus*. Η έκφραση του γονιδίου αυξάνεται από τη 1 ημέρα στις 2 ημέρες και το μέγιστο της έκφρασης φαίνεται στις 4 ημέρες. Ύστερα, στις 12 ημέρες η έκφραση μειώνεται.

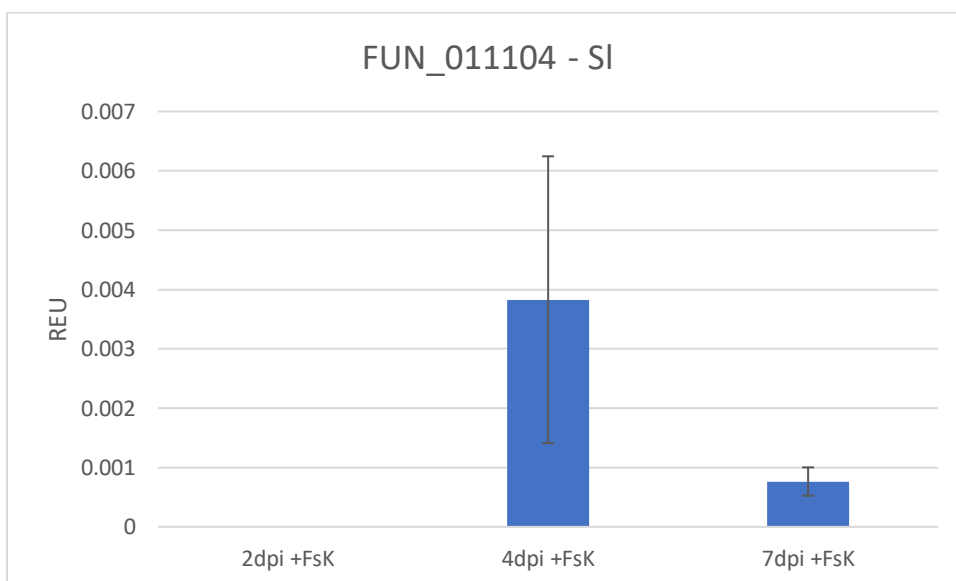


Διάγραμμα 3: Η σχετική έκφραση του γονιδίου FUN\_010021 του μύκητα στο φυτό *Lotus japonicus*.

- **FUN\_011104:**

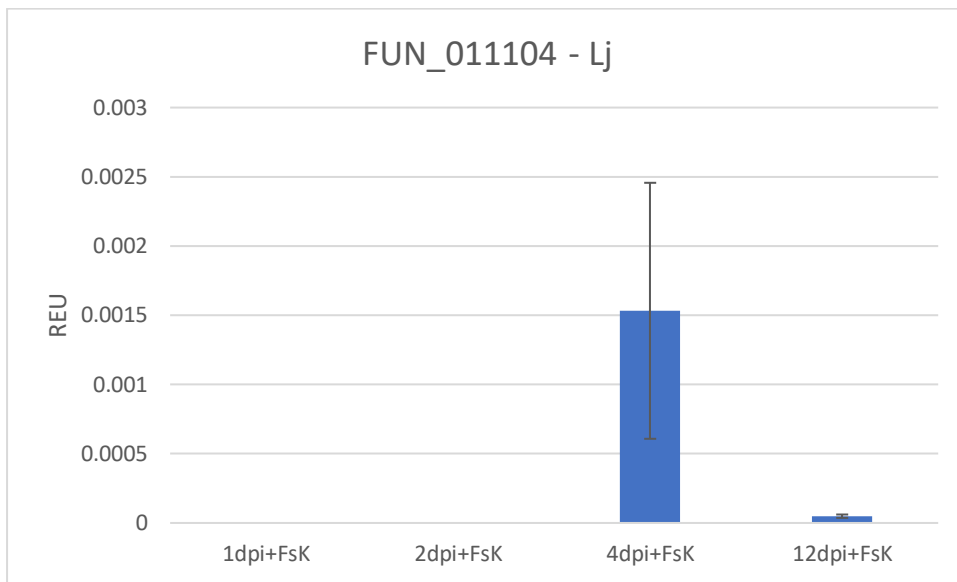
Ανιχνεύθηκε έκφραση αυτού του γονιδίου κατά την αλληλεπίδραση του Fsk και με τα δύο φυτά.

- 1) Στο φυτό *Solanum lycopersicum* δεν υπάρχει καθόλου έκφραση του γονιδίου στις 2 ημέρες, ενώ αυξάνεται στις 4 ημέρες και τελικά μειώνεται στις 7 ημέρες.



Διάγραμμα 4: Η σχετική έκφραση του γονιδίου FUN\_011104 του μύκητα στο φυτό *Solanum lycopersicum*.

- 2) Παρομοίως, στο φυτό *Lotus japonicus* δεν υπάρχει καθόλου έκφραση του γονιδίου στη 1 ημέρα και 2 ημέρες, ενώ αυξάνεται στις 4 ημέρες και μειώνεται στις 12 ημέρες.

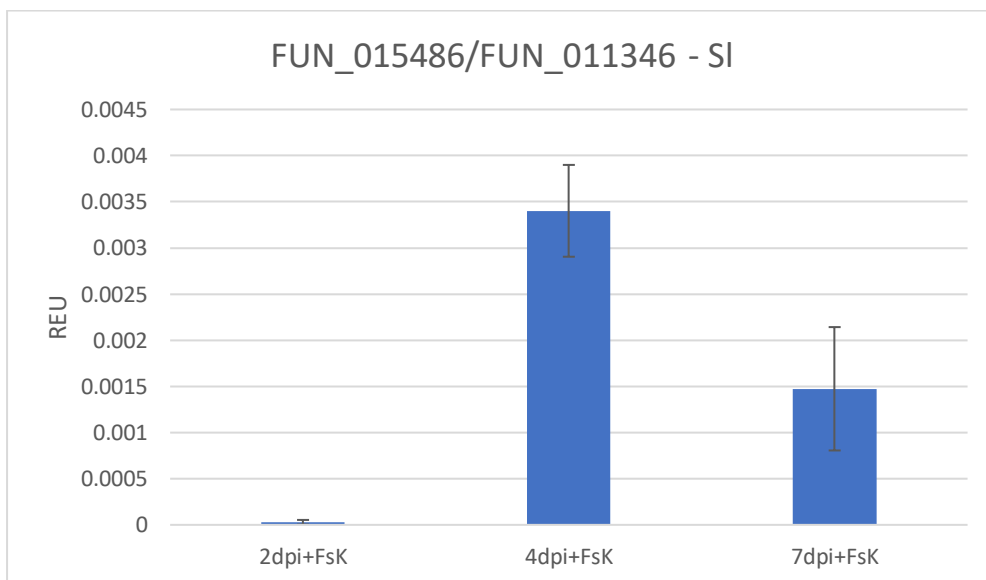


Διάγραμμα 5: Η σχετική έκφραση του γονιδίου FUN\_011104 του μύκητα στο φυτό *Lotus japonicus*.

- **FUN\_015486/FUN\_011346:**

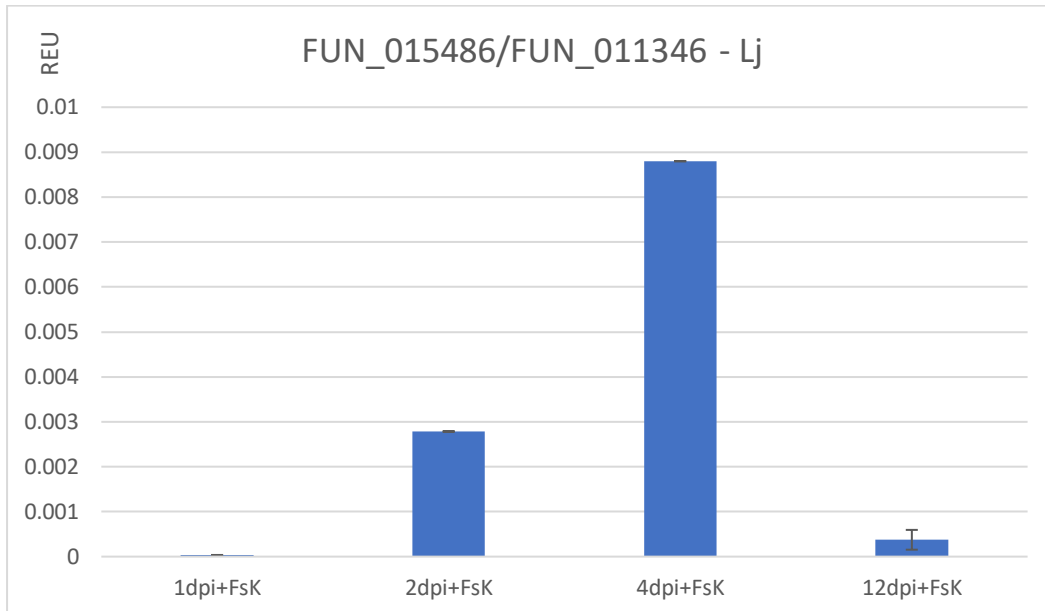
Ανιχνεύθηκε έκφραση των γονιδίων κατά την αλληλεπίδραση του FSK και με τα δύο φυτά.

- 1) Στο φυτό *Solanum lycopersicum* η έκφραση είναι χαμηλή στις 2 ημέρες, αυξάνεται στις 4 ημέρες και τελικά μειώνεται στις 7 ημέρες.



Διάγραμμα 6: Η σχετική έκφραση του γονιδίου FUN\_015486/FUN\_011346 του μύκητα στο φυτό *Solanum lycopersicum*.

- 2) Παρομοίως, στο φυτό *Lotus japonicus* η έκφραση είναι χαμηλή στη 1 ημέρα, αυξάνεται στις 2 ημέρες και μεγιστοποιείται στις 4 ημέρες, ενώ τελικά μειώνεται στις 12 ημέρες.

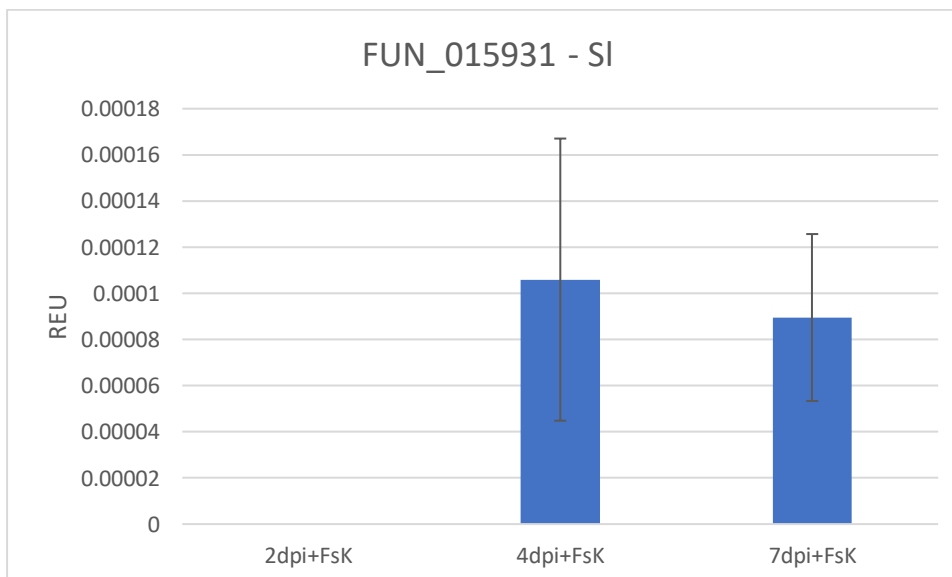


Διάγραμμα 7: Η σχετική έκφραση του γονιδίου FUN\_015486/FUN\_011346 του μύκητα στο φυτό *Lotus japonicus*.

- **FUN\_015931:**

Ανιχνεύθηκε έκφραση αυτού του γονιδίου κατά την αλληλεπίδραση του Fsk και με τα δύο φυτά.

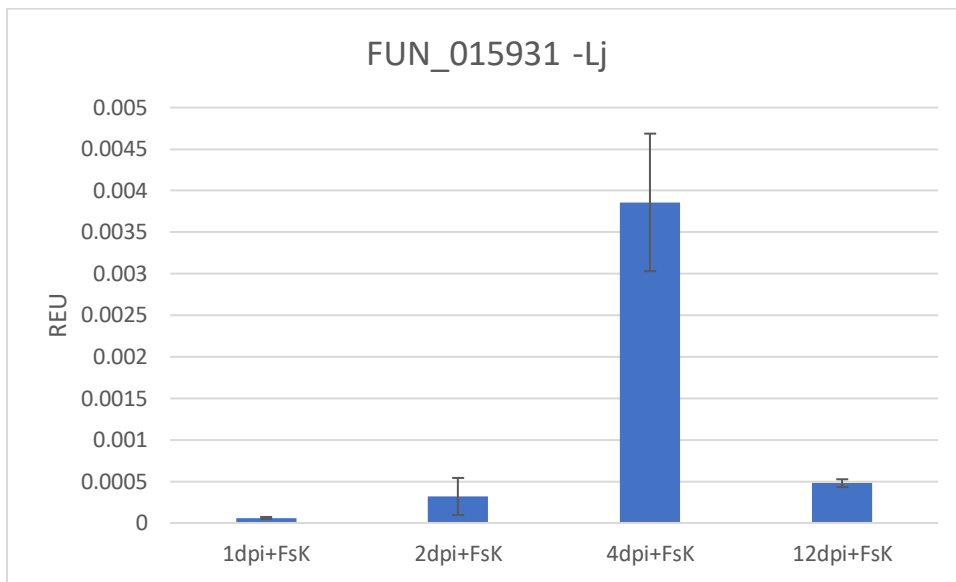
- 1) Στο φυτό *Solanum lycopersicum* δεν υπάρχει έκφραση του γονιδίου στις 2 ημέρες, αυξάνεται στις 4 ημέρες και τελικά μειώνεται λίγο στις 7 ημέρες.



Διάγραμμα 8: Η σχετική έκφραση του γονιδίου FUN\_015931 του μύκητα στο φυτό *Solanum lycopersicum*.

- 2) Παρομοίως, στο φυτό *Lotus japonicus* η έκφραση είναι χαμηλή στη 1 ημέρα, αυξάνεται λίγο στις 2 ημέρες και μεγιστοποιείται στις 4 ημέρες, ενώ τελικά μειώνεται στις 12 ημέρες.

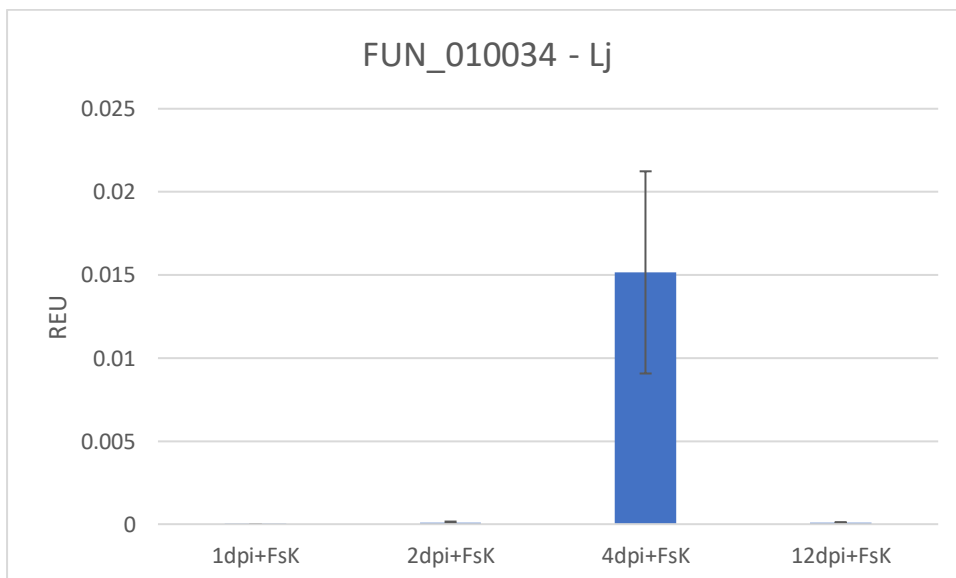




Διάγραμμα 9: Η σχετική έκφραση του γονιδίου FUN\_015931 του μύκητα στο φυτό *Lotus japonicus*.

- **FUN\_010034:**

- 1) Δεν ανιχνεύθηκε έκφραση αυτού του γονιδίου κατά την αλληλεπίδραση του Fsk με το φυτό *Solanum lycopersicum*.
- 2) Ωστόσο, στο διάγραμμα παρακάτω φαίνεται η έκφραση του γονιδίου κατά την αλληλεπίδραση του Fsk με το φυτό *Lotus japonicus*. Δεν υπάρχει έκφραση του γονιδίου στη 1 ημέρα, ενώ στις 2 ημέρες η έκφραση αυξάνεται λίγο και μεγιστοποιείται στις 4 ημέρες. Τέλος, μειώνεται και πάλι στις 12 ημέρες.



Διάγραμμα 10: Η σχετική έκφραση του γονιδίου FUN\_010034 του μύκητα στο φυτό *Lotus japonicus*.

#### 4.4 Στατιστική ανάλυση αποτελεσμάτων

Αρχικά, έγινε στατιστική ανάλυση των αποτελεσμάτων για τον αποικισμό του *FsK* στο φυτό *Solanum lycopersicum*. Ως στατιστική σημαντικότητα ορίστηκε η τιμή  $p \leq 0.05$ .

Ξεκινώντας από το διάγραμμα που αφορά τις χρονικές στιγμές 6 ώρες, 18 ώρες και 30 ώρες μετά τον εμβολιασμό του φυτού με τον μύκητα, έγινε ανάλυση διακύμανσης κατά έναν παράγοντα (ANOVA), για να διαπιστωθεί αν υπάρχουν στατιστικά σημαντικές διαφορές ανάμεσα στους μέσους των τιμών που αντιπροσωπεύουν τη σχετική έκφραση του γονιδίου *ITS* στις 6 ώρες, 18 ώρες και 30 ώρες τόσο στα φυτά που εμβολιάστηκαν με τον *FsK* όσο και στα φυτά που δεν εμβολιάστηκαν. Άρα, έγινε σύγκριση μεταξύ των δειγμάτων 6hpi +*FsK*, 6hpi -*FsK*, 18hpi +*FsK*, 18hpi -*FsK*, 30hpi +*FsK* και 30hpi -*FsK*. Τα αποτελέσματα φαίνονται παρακάτω.

ΣΥΜΠΕΡΑΣΜΑ						
Ομάδες	Πλήθος	Άθροισμα	Μέσος όρος	Διακύμανση		
4hpi+FsK	3	0,0230777	0,0076926	1,04E-06		
4hpi-FsK	2	0,0080341	0,004017	7,08E-06		
12hpi+FsK	3	0,0168649	0,0056216	9,91E-06		
12hpi-FsK	2	0,0061854	0,0030927	7,726E-08		
1dpi+FsK	3	0,0224058	0,0074686	6,03E-06		
1dpi-FsK	2	0,0050804	0,0025402	1,492E-06		
ΑΝΑΛΥΣΗ ΔΙΑΚΥΜΑΝΣΗΣ						
Προέλευση διακύμ	SS	μοί ελευθερ	MS	F	τιμή-P	κριτήριο F
Μεταξύ ομάδ	5,955E-05	5	1,191E-05	2,5157505	0,1084842	3,4816587
Μέσα στις ο	4,261E-05	9	4,734E-06			
Σύνολο	0,0001022	14				

Πίνακας 17: Ανάλυση διακύμανσης κατά έναν παράγοντα για τα δείγματα 6hpi +*FsK*, 6hpi -*FsK*, 18hpi +*FsK*, 18hpi -*FsK*, 30hpi +*FsK* και 30hpi -*FsK* όσον αφορά τον αποικισμό του μύκητα.

Στη συνέχεια, ακολούθησε το t-test. Σε αυτή τη στατιστική δοκιμασία σκοπός ήταν να γίνει σύγκριση μεταξύ δύο και μόνο μέσων κάθε φορά και να βρεθεί αν υπάρχει στατιστικά σημαντική διαφορά μεταξύ τους. Έτσι, έγινε σύγκριση των δειγμάτων 6hpi +*FsK*, 6hpi -*FsK*, 18hpi +*FsK*, 18hpi -*FsK*, 30hpi +*FsK* και 30hpi -*FsK* ανά δύο. Τα αποτελέσματα φαίνονται παρακάτω. Οι μόνες στατιστικά σημαντικές διαφορές βρίσκονται ανάμεσα στα δείγματα 6hpi +*FsK* και 30hpi -*FsK* ( $p = 0.0413637$ ) και ανάμεσα στα 6hpi +*FsK* και 18hpi -*FsK* ( $p = 0.0103094$ ).

	6hpi+FsK	6hpi-FsK	18hpi+FsK	18hpi-FsK	30hpi+FsK	30hpi-FsK
6hpi+FsK		0,2802402	0,3746049	0,0103094	0,8943108	0,0413637
6hpi-FsK	0,2802402		0,5890022	0,7092555	0,2739619	0,5753561
18hpi+FsK	0,3746049	0,5890022		0,2981299	0,4703602	0,2319913
18hpi-FsK	0,0103094	0,7092555	0,2981299		0,0882334	0,6368629
30hpi+FsK	0,8943108	0,2739619	0,4703602	0,0882334		0,0604425
30hpi-FsK	0,0413637	0,5753561	0,2319913	0,6368629	0,0604425	

Πίνακας 18: T-test για τα δείγματα 6hpi +*FsK*, 6hpi -*FsK*, 18hpi +*FsK*, 18hpi -*FsK*, 30hpi +*FsK* και 30hpi -*FsK* όσον αφορά τον αποικισμό του μύκητα.

Συνεχίζοντας με το διάγραμμα που αφορά τις χρονικές στιγμές 2 ημέρες, 4 ημέρες και 7 ημέρες μετά τον εμβολιασμό του φυτού με τον μύκητα, έγινε και πάλι ανάλυση διακύμανσης κατά έναν παράγοντα (ANOVA),

για να διαπιστωθεί αν υπάρχουν στατιστικά σημαντικές διαφορές ανάμεσα στους μέσους των τιμών που αντιπροσωπεύουν τη σχετική έκφραση του γονιδίου *Tef1a* στις 2 ημέρες, 4 ημέρες και 7 ημέρες τόσο στα φυτά που εμβολιάστηκαν με τον Fsk όσο και στα φυτά που δεν εμβολιάστηκαν. Άρα, έγινε σύγκριση μεταξύ των δειγμάτων 2dpi +Fsk, 2dpi -Fsk, 4dpi +Fsk, 4dpi -Fsk, 7dpi +Fsk και 7dpi -Fsk. Τα αποτελέσματα φαίνονται παρακάτω.

ΣΥΜΠΕΡΑΣΜΑ				
Ομάδες	Πλήθος	Άθροισμα	Μέσος όρος	Διακύμανση
2dpi+	3	0,0021289	0,0007096	2,293E-07
2dpi-	2	0,0019513	0,0009757	2,323E-07
4dpi+	4	0,012396	0,003099	3,366E-06
4dpi-	3	0,0024669	0,0008223	2,224E-07
7dpi+	4	0,01787	0,0044675	4,083E-06
7dpi-	4	0,0077269	0,0019317	1,126E-06

ΑΝΑΛΥΣΗ ΔΙΑΚΥΜΑΝΣΗΣ						
Προέλευση διακύμ	SS	μοί ελευθερ	MS	F	τιμή-P	κριτήριο F
Μεταξύ ομά	3,943E-05	5	7,886E-06	4,1102494	0,0165868	#ΑΡΙΘ!
Μέσα στις ο	2,686E-05	14	1,919E-06			
Σύνολο	6,629E-05	19				

Πίνακας 19: Ανάλυση διακύμανσης κατά έναν παράγοντα για τα δείγματα 2dpi +Fsk, 2dpi -Fsk, 4dpi +Fsk, 4dpi -Fsk, 7dpi +Fsk και 7dpi -Fsk όσον αφορά τον αποικισμό του μύκητα.

Και πάλι ακολούθησε το t-test, ώστε να γίνει σύγκριση μεταξύ δύο και μόνο μέσων κάθε φορά και να βρεθεί αν υπάρχει στατιστικά σημαντική διαφορά μεταξύ τους. Έτσι, έγινε σύγκριση των δειγμάτων 2dpi +Fsk, 2dpi -Fsk, 4dpi +Fsk, 4dpi -Fsk, 7dpi +Fsk και 7dpi -Fsk ανά δύο. Τα αποτελέσματα φαίνονται παρακάτω. Οι στατιστικά σημαντικές διαφορές βρίσκονται ανάμεσα στα δείγματα 2dpi +Fsk και 7dpi +Fsk ( $p = 0.0376562$ ), 2dpi -Fsk και 7dpi +Fsk ( $p = 0.0360207$ ) και ανάμεσα στα 7dpi +Fsk και 4dpi -Fsk ( $p = 0.0324151$ ).

	2dpi+	2dpi-	4dpi+	4dpi-	7dpi+	7dpi-
2dpi+		0,9702105	0,0995495	0,7181565	0,0376562	0,1680748
2dpi-	0,9702105		0,1018738	0,755591	0,0360207	0,2047047
4dpi+	0,0995495	0,1018738		0,0850805	0,3550016	0,3227719
4dpi-	0,755591	0,755591	0,0850805		0,0324151	0,1307364
7dpi+	0,0376562	0,0360207	0,3550016	0,0324151		0,0823962
7dpi-	0,1680748	0,2047047	0,3227719	0,1307364	0,0823962	

Πίνακας 20: T-test για τα δείγματα 2dpi +Fsk, 2dpi -Fsk, 4dpi +Fsk, 4dpi -Fsk, 7dpi +Fsk και 7dpi -Fsk όσον αφορά τον αποικισμό του μύκητα.

Το επόμενο βήμα ήταν η στατιστική ανάλυση των αποτελεσμάτων για την έκφραση των γονιδίων που κωδικοποιούν για τις πρωτεΐνες τελεστές κατά την αλληλεπίδραση του Fsk με τα φυτά *Solanum lycopersicum* και *Lotus japonicus*. Και σε αυτή την περίπτωση η στατιστική σημαντικότητα των αποτελεσμάτων μελετήθηκε με ανάλυση διακύμανσης κατά έναν παράγοντα (ANOVA) και t-test.

- **FUN\_005917:**

Δεν ανιχνεύθηκε έκφραση αυτού του γονιδίου κατά την αλληλεπίδραση του Fsk με κανένα από τα δύο φυτά. Δε γίνεται στατιστική ανάλυση.

- **FUN\_010021:**

1) Δεν ανιχνεύθηκε έκφραση αυτού του γονιδίου κατά την αλληλεπίδραση του Fsk με το φυτό *Solanum lycopersicum*. Δε γίνεται στατιστική ανάλυση.

2) Η στατιστική ανάλυση έγινε στο διάγραμμα που δείχνει τη σχετική έκφραση του γονιδίου FUN\_010021 τις χρονικές στιγμές 1 ημέρα, 2 ημέρες, 4 ημέρες και 12 ημέρες μετά τον εμβολιασμό του φυτού *Lotus japonicus* με τον μύκητα. Δεν υπάρχει κάποια στατιστικά σημαντική διαφορά. Τα αποτελέσματα φαίνονται παρακάτω.

ΣΥΜΠΕΡΑΣΜΑ						
Ομάδες	Πλήθος	Άθροισμα	Μέσος όρος	Διακύμανση		
1dpi +FsK	3	1,12145E-05	3,738E-06	5,156E-13		
2dpi +FsK	2	1,48705E-05	7,435E-06	6,56E-12		
4dpi +FsK	3	0,000111614	3,72E-05	4,757E-10		
12dpi +FsK	2	5,63347E-06	2,817E-06	3,141E-13		
ΑΝΑΛΥΣΗ ΔΙΑΚΥΜΑΝΣΗΣ						
Προέλευση διακύμ	SS	ιθμοί ελευθερί	MS	F	τιμή-P	κριτήριο F
Μεταξύ ομά	2,26648E-09	3	7,555E-10	4,7255524	0,0506718	#ΑΡΙΘ!
Μέσα στις ο	9,59244E-10	6	1,599E-10			
Σύνολο	3,22572E-09	9				

Πίνακας 21: Ανάλυση διακύμανσης κατά έναν παράγοντα για τα δείγματα 1dpi +FsK, 2dpi +FsK, 4dpi +FsK και 12dpi +FsK όσον αφορά το γονίδιο FUN\_010021 κατά την αλληλεπίδραση του μύκητα με το φυτό *Lotus japonicus*.

	1dpi +FsK	2dpi +FsK	4dpi +FsK	12dpi +FsK
1dpi +FsK		0,2773985	0,1170406	0,2148478
2dpi +FsK	0,2773985		0,1391906	0,2251351
4dpi +FsK	0,1170406	0,1391906		0,111858
12dpi +FsK	0,2148478	0,2251351	0,111858	

Πίνακας 22: T-test για τα δείγματα 1dpi +FsK, 2dpi +FsK, 4dpi +FsK και 12dpi +FsK όσον αφορά το γονίδιο FUN\_010021 κατά την αλληλεπίδραση του μύκητα με το φυτό *Lotus japonicus*.

- **FUN\_011104:**

1) Η στατιστική ανάλυση έγινε στο διάγραμμα που δείχνει τη σχετική έκφραση του γονιδίου FUN\_011104 τις χρονικές στιγμές 2 ημέρες, 4 ημέρες και 7 ημέρες μετά τον εμβολιασμό του φυτού *Solanum lycopersicum* με τον μύκητα. Δεν υπάρχει κάποια στατιστικά σημαντική διαφορά. Τα αποτελέσματα φαίνονται παρακάτω.

ΣΥΜΠΕΡΑΣΜΑ						
Ομάδες	Πλήθος	Άθροισμα	Μέσος όρος	Διακύμανση		
2dpi +FsK	1	0,0002707	0,0002707	#ΔΙΑΠ/0!		
4dpi +FsK	3	0,0114832	0,0038277	1,752E-05		
7dpi +FsK	2	0,0015272	0,0007636	1,143E-07		
ΑΝΑΛΥΣΗ ΔΙΑΚΥΜΑΝΣΗΣ						
Προέλευση διακύμ	SS	μοί ελευθερ	MS	F	τιμή-P	κριτήριο F
Μεταξύ ομά	1,58E-05	2	7,898E-06	0,6738836	0,5731687	#ΑΡΙΘ!
Μέσα στις ο	3,516E-05	3	1,172E-05			
Σύνολο	5,096E-05	5				

Πίνακας 23: Ανάλυση διακύμανσης κατά έναν παράγοντα για τα δείγματα 2dpi +FsK, 4dpi +FsK και 7dpi +FsK όσον αφορά το γονίδιο FUN\_011104 κατά την αλληλεπίδραση του μύκητα με το φυτό *Solanum lycopersicum*.

Σχετικά με το δείγμα 2dpi +FsK δεν υπήρχαν επαρκείς βιολογικές επαναλήψεις που γινόταν να ληφθούν υπόψη αξιόπιστα, οπότε δε συμμετείχε στη στατιστική ανάλυση του t-test.

	2dpi +FsK	4dpi +FsK	7dpi +FsK
2dpi +FsK		-	-
4dpi +FsK	-		0,3322132
7dpi +FsK	-	0,3322132	

Πίνακας 24: T-test για τα δείγματα 4dpi +FsK και 7dpi +FsK όσον αφορά το γονίδιο FUN\_011104 κατά την αλληλεπίδραση του μύκητα με το φυτό *Solanum lycopersicum*.

2) Η στατιστική ανάλυση έγινε στο διάγραμμα που δείχνει τη σχετική έκφραση του γονιδίου FUN\_011104 τις χρονικές στιγμές 1 ημέρα, 2 ημέρες, 4 ημέρες και 12 ημέρες μετά τον εμβολιασμό του φυτού *Lotus japonicus* με τον μύκητα. Ωστόσο, δεν παρατηρήθηκε καθόλου έκφραση του γονιδίου τις χρονικές στιγμές 1 ημέρα και 2 ημέρες, οπότε τα αντίστοιχα δείγματα δε συμπεριλήφθηκαν στη στατιστική ανάλυση. Δεν υπάρχει κάποια στατιστικά σημαντική διαφορά. Τα αποτελέσματα φαίνονται παρακάτω.

ΣΥΜΠΕΡΑΣΜΑ						
Ομάδες	Πλήθος	Άθροισμα	Μέσος όρος	Διακύμανση		
4dpi +FsK	3	0,004596969	0,0015323	2,564E-06		
12dpi +FsK	2	9,76515E-05	4,883E-05	2,978E-10		
ΑΝΑΛΥΣΗ ΔΙΑΚΥΜΑΝΣΗΣ						
Προέλευση διακύμ	SS	μοί ελευθερί	MS	F	τιμή-P	κριτήριο F
Μεταξύ ομά	2,64092E-06	1	2,641E-06	1,5449885	0,3021706	#ΑΡΙΘ!
Μέσα στις ο	5,12803E-06	3	1,709E-06			
Σύνολο	7,76895E-06	4				

Πίνακας 25: Ανάλυση διακύμανσης κατά έναν παράγοντα για τα δείγματα 4dpi +FsK και 12dpi +FsK όσον αφορά το γονίδιο FUN\_011104 κατά την αλληλεπίδραση του μύκητα με το φυτό *Lotus japonicus*.

	1dpi+FsK	2dpi+FsK	4dpi+FsK	12dpi+FsK
1dpi+FsK		-	-	-
2dpi+FsK	-		-	-
4dpi+FsK	-	-		0,2497501
12dpi+FsK	-	-	0,2497501	

Πίνακας 26: T-test για τα δείγματα 4dpi +FsK και 12dpi +FsK όσον αφορά το γονίδιο FUN\_011104 κατά την αλληλεπίδραση του μύκητα με το φυτό *Lotus japonicus*.

- **FUN\_015486/FUN\_011346:**

- 1) Η στατιστική ανάλυση έγινε στο διάγραμμα που δείχνει τη σχετική έκφραση του γονιδίου FUN\_015486/FUN\_011346 τις χρονικές στιγμές 2 ημέρες, 4 ημέρες και 7 ημέρες μετά τον εμβολιασμό του φυτού *Solanum lycopersicum* με τον μύκητα. Βλέπουμε στατιστικά σημαντική διαφορά συνολικά ( $p = 0.046914$ ). Τα αποτελέσματα φαίνονται παρακάτω.

ΣΥΜΠΕΡΑΣΜΑ				
Ομάδες	Πλήθος	Άθροισμα	Μέσος όρος	Διακύμανση
2dpi +FsK	2	5,70383E-05	2,85192E-05	1,257E-09
4dpi +FsK	2	0,006804217	0,003402108	4,945E-07
7dpi +FsK	3	0,004422531	0,001474177	1,339E-06

ΑΝΑΛΥΣΗ ΔΙΑΚΥΜΑΝΣΗΣ						
Προέλευση διακύμ	SS	θμοί ελευθερί	MS	F	τιμή-P	κριτήριο F
Μεταξύ ομά	1,148E-05	2	5,74039E-06	7,2337626	0,046914	#APIΘ!
Μέσα στις ο	3,174E-06	4	7,93556E-07			
Σύνολο	1,466E-05	6				

Πίνακας 27: Ανάλυση διακύμανσης κατά έναν παράγοντα για τα δείγματα 2dpi +FsK, 4dpi +FsK και 7dpi +FsK όσον αφορά το γονίδιο FUN\_015486/FUN\_011346 κατά την αλληλεπίδραση του μύκητα με το φυτό *Solanum lycopersicum*.

	2dpi +FsK	4dpi +FsK	7dpi +FsK
2dpi +FsK		0,0924648	0,1627558
4dpi +FsK	0,0924648		0,1037868
7dpi +FsK	0,1627558	0,1037868	

Πίνακας 28: T-test για τα δείγματα 2dpi +FsK, 4dpi +FsK και 7dpi +FsK όσον αφορά το γονίδιο FUN\_015486/FUN\_011346 κατά την αλληλεπίδραση του μύκητα με το φυτό *Solanum lycopersicum*.

- 2) Η στατιστική ανάλυση έγινε στο διάγραμμα που δείχνει τη σχετική έκφραση του γονιδίου FUN\_015486/FUN\_011346 τις χρονικές στιγμές 1 ημέρα, 2 ημέρες, 4 ημέρες και 12 ημέρες μετά τον εμβολιασμό του φυτού *Lotus japonicus* με τον μύκητα. Τα αποτελέσματα φαίνονται παρακάτω.

ΣΥΜΠΕΡΑΣΜΑ				
Ομάδες	Πλήθος	Άθροισμα	Μέσος όρος	Διακύμανση
1dpi +FsK	3	8,7567E-05	2,919E-05	3,52256E-10
2dpi +FsK	4	0,01113735	0,0027843	1,02639E-05
4dpi +FsK	2	0,01759608	0,008798	9,73479E-06
12dpi +FsK	4	0,00149731	0,0003743	1,19605E-08

ΑΝΑΛΥΣΗ ΔΙΑΚΥΜΑΝΣΗΣ						
Προέλευση διακύμ	SS	θμοί ελευθερι	MS	F	τιμή-P	κριτήριο F
Μεταξύ ομ	0,0001157	3	3,856E-05	8,555306282	0,00531282	#ΑΡΙΘ!
Μέσα στις ε	4,056E-05	9	4,507E-06			
Σύνολο	0,0001562	12				

Πίνακας 29: Ανάλυση διακύμανσης κατά έναν παράγοντα για τα δείγματα 1dpi +FsK, 2dpi +FsK, 4dpi +FsK και 12dpi +FsK όσον αφορά το γονίδιο FUN\_015486/FUN\_011346 κατά την αλληλεπίδραση του μύκητα με το φυτό *Lotus japonicus*.

	1dpi +FsK	2dpi +FsK	4dpi +FsK	12dpi +FsK
1dpi +FsK		0,1839265	0,15690736	0,006792
2dpi +FsK	0,1839265		0,15011987	0,2295104
4dpi +FsK	0,1569074	0,1501199		0,1628804
12dpi +FsK	0,006792	0,2295104	0,16288041	

Πίνακας 30: T-test για τα δείγματα 1dpi +FsK, 2dpi +FsK, 4dpi +FsK και 12dpi +FsK όσον αφορά το γονίδιο FUN\_015486/FUN\_011346 κατά την αλληλεπίδραση του μύκητα με το φυτό *Lotus japonicus*.

#### • FUN\_015931:

1) Η στατιστική ανάλυση έγινε στο διάγραμμα που δείχνει τη σχετική έκφραση του γονιδίου FUN\_015931 τις χρονικές στιγμές 2 ημέρες, 4 ημέρες και 7 ημέρες μετά τον εμβολιασμό του φυτού *Solanum lycopersicum* με τον μύκητα. Ωστόσο, δεν παρατηρήθηκε καθόλου έκφραση του γονιδίου τη χρονική στιγμή των 2 ημερών, οπότε το αντίστοιχο δείγμα δε συμπεριλήφθηκε στη στατιστική ανάλυση. Δεν υπάρχει κάποια στατιστικά σημαντική διαφορά. Τα αποτελέσματα φαίνονται παρακάτω.

ΣΥΜΠΕΡΑΣΜΑ				
Ομάδες	Πλήθος	Άθροισμα	Μέσος όρος	Διακύμανση
4dpi +FsK	2	0,0002119	0,0001059	7,47375E-09
7dpi +FsK	3	0,0002685	8,952E-05	3,92503E-09

ΑΝΑΛΥΣΗ ΔΙΑΚΥΜΑΝΣΗΣ						
Προέλευση διακύμ	SS	μοί ελευθερ	MS	F	τιμή-P	κριτήριο F
Μεταξύ ομ	3,237E-10	1	3,237E-10	0,063371403	0,81750444	#ΑΡΙΘ!
Μέσα στις ε	1,532E-08	3	5,108E-09			
Σύνολο	1,565E-08	4				

Πίνακας 31: Ανάλυση διακύμανσης κατά έναν παράγοντα για τα δείγματα 4dpi +FsK και 7dpi +FsK όσον αφορά το γονίδιο FUN\_015931 κατά την αλληλεπίδραση του μύκητα με το φυτό *Solanum lycopersicum*.



	2dpi+FsK	4dpi+FsK	7dpi+FsK
2dpi+FsK		-	-
4dpi+FsK	-		0,8417033
7dpi+FsK	-	0,8417033	

Πίνακας 32: T-test για τα δείγματα 4dpi +FsK και 7dpi +FsK όσον αφορά το γονίδιο FUN\_015931 κατά την αλληλεπίδραση του μύκητα με το φυτό *Solanum lycopersicum*.

2) Η στατιστική ανάλυση έγινε στο διάγραμμα που δείχνει τη σχετική έκφραση του γονιδίου FUN\_015931 τις χρονικές στιγμές 1 ημέρα, 2 ημέρες, 4 ημέρες και 12 ημέρες μετά τον εμβολιασμό του φυτού *Lotus japonicus* με τον μύκητα. Βλέπουμε στατιστικά σημαντική διαφορά συνολικά ( $p = 0.0003212$ ). Τα αποτελέσματα φαίνονται παρακάτω.

ΣΥΜΠΕΡΑΣΜΑ				
Ομάδες	Πλήθος	Άθροισμα	Μέσος όρος	Διακύμανση
1dpi +FsK	3	0,0001804	6,014E-05	4,447E-10
2dpi +FsK	4	0,0012743	0,0003186	1,998E-07
4dpi +FsK	3	0,0115761	0,0038587	2,055E-06
12dpi +FsK	3	0,0014373	0,0004791	6,627E-09

ΑΝΑΛΥΣΗ ΔΙΑΚΥΜΑΝΣΗΣ						
Προέλευση διακύμ.	SS	μοί ελευθερ.	MS	F	τιμή-P	κριτήριο F
Μεταξύ ομάδων	2,967E-05	3	9,891E-06	18,845453	0,0003212	#ΑΡΙΘ!
Μέσα στις ομάδες	4,723E-06	9	5,248E-07			
Σύνολο	3,44E-05	12				

Πίνακας 33: Ανάλυση διακύμανσης κατά έναν παράγοντα για τα δείγματα 1dpi +FsK, 2dpi +FsK, 4dpi +FsK και 12dpi +FsK όσον αφορά το γονίδιο FUN\_015931 κατά την αλληλεπίδραση του μύκητα με το φυτό *Lotus japonicus*.

Υπάρχουν στατιστικά σημαντικές διαφορές ανάμεσα στα δείγματα 1dpi +FsK και 4dpi +FsK ( $p = 0.0443134$ ), 1dpi +FsK και 12dpi +FsK ( $p = 0.0088555$ ) και τέλος στα 2dpi +FsK και 4dpi +FsK ( $p = 0.0424451$ ).

	1dpi +FsK	2dpi +FsK	4dpi +FsK	12dpi +FsK
1dpi +FsK		0,3314043	0,0443134	0,0088555
2dpi +FsK	0,3314043		0,0424451	0,5289197
4dpi +FsK	0,0443134	0,0424451		0,0546352
12dpi +FsK	0,0088555	0,5289197	0,0546352	

Πίνακας 34: T-test για τα δείγματα 1dpi +FsK, 2dpi +FsK, 4dpi +FsK και 12dpi +FsK όσον αφορά το γονίδιο FUN\_015931 κατά την αλληλεπίδραση του μύκητα με το φυτό *Lotus japonicus*.

- FUN\_010034:**

1) Δεν ανιχνεύθηκε έκφραση αυτού του γονιδίου κατά την αλληλεπίδραση του FsK με το φυτό *Solanum lycopersicum*. Δεν γίνεται στατιστική ανάλυση.

- 2) Η στατιστική ανάλυση έγινε στο διάγραμμα που δείχνει τη σχετική έκφραση του γονιδίου FUN\_010034 τις χρονικές στιγμές 1 ημέρα, 2 ημέρες, 4 ημέρες και 12 ημέρες μετά τον εμβολιασμό του φυτού *Lotus japonicus* με τον μύκητα. Τα αποτελέσματα φαίνονται παρακάτω.

ΣΥΜΠΕΡΑΣΜΑ				
Ομάδες	Πλήθος	Άθροισμα	Μέσος όρος	Διακύμανση
1dpi +FsK	1	1,358E-07	1,358E-07	#ΔΙΑΙΡ/0!
2dpi +FsK	3	0,0003012	0,0001004	9,60552E-09
4dpi +FsK	3	0,0790438	0,0263479	0,000413099
12dpi +FsK	4	0,0003793	9,484E-05	2,89106E-09

ΑΝΑΛΥΣΗ ΔΙΑΚΥΜΑΝΣΗΣ						
Προέλευση διακύμ	SS	μοί ελευθερ	MS	F	τιμή-P	κριτήριο F
Μεταξύ ομάδων	0,0015049	3	0,0005016	4,249942165	0,052476794	#ΑΡΙΘ!
Μέσα στις ομάδες	0,0008262	7	0,000118			
Σύνολο	0,0023311	10				

Πίνακας 35: Ανάλυση διακύμανσης κατά έναν παράγοντα για τα δείγματα 1dpi +FsK, 2dpi +FsK, 4dpi +FsK και 12dpi +FsK όσον αφορά το γονίδιο FUN\_010034 κατά την αλληλεπίδραση του μύκητα με το φυτό *Lotus japonicus*.

Σχετικά με το δείγμα 1dpi +FsK δεν υπήρχαν επαρκείς βιολογικές επαναλήψεις που γινόταν να ληφθούν υπόψη αξιόπιστα, οπότε δε συμμετείχε στη στατιστική ανάλυση του t-test. Δεν υπάρχουν στατιστικά σημαντικές διαφορές, όπως φαίνεται παρακάτω.

	1dpi +FsK	2dpi +FsK	4dpi +FsK	12dpi +FsK
1dpi +FsK		-	-	-
2dpi +FsK	-		0,1547664	0,934972
4dpi +FsK	-	0,1547664		0,1547176
12dpi +FsK	-	0,934972	0,1547176	

Πίνακας 36: T-test για τα δείγματα 2dpi +FsK, 4dpi +FsK και 12dpi +FsK όσον αφορά το γονίδιο FUN\_010034 κατά την αλληλεπίδραση του μύκητα με το φυτό *Lotus japonicus*.

## 5. Συζήτηση

### 5.1 Σύνοψη θεωρητικού υποβάθρου

Στην παρούσα πειραματική μελέτη χρησιμοποιήθηκαν δύο φυτά που παρουσιάζουν ομοιότητες αλλά και διαφορές: το φυτό *Solanum lycopersicum* ποικιλίας MoneyMaker και το φυτό *Lotus japonicus*.

Οι ομοιότητες τους έγκεινται στο ότι και τα δύο:

- 1) Είναι ανθοφόρα φυτά.
- 2) Ανήκουν στα τραχεόφυτα, σπερματόφυτα και τελικά αγγειόσπερμα φυτά, καθώς έχουν ανεπτυγμένο αγωγό σύστημα μεταφοράς νερού και φωτοσυνθετικών προϊόντων και παράγουν σπέρματα.

- 3) Είναι δικότυλα φυτά, διότι το σπέρμα περιβάλλεται από δύο κοτυληδόνες.
- 4) Αναπτύσσουν συμβιωτικές σχέσεις με πολλούς μικροοργανισμούς, συμπεριλαμβανομένου του μυκητιακού στελέχους FSK.
- 5) Περιέχουν γονίδια που κωδικοποιούν για κοινά συστατικά κοινών σηματοδοτικών μονοπατιών στα αγγειόσπερμα, όπως το μονοπάτι CSSP.
- 6) Αναπτύσσονται εύκολα στο εργαστήριο. Μάλιστα, αναπτύσσονται στις ίδιες συνθήκες στον θάλαμο ανάπτυξης φυτών του εργαστηρίου. Ο θάλαμος ανάπτυξης λειτουργεί με μία φωτοπερίοδο 16 ωρών φωτός και 8 ωρών σκότους, η υγρασία είναι σε επίπεδο 60% και η θερμοκρασία βρίσκεται στους 23°C.

Οι διαφορές τους έγκεινται στο ότι:

- 1) Μορφολογικά είναι διαφορετικοί οργανισμοί. Για παράδειγμα παράγουν διαφορετικά άνθη και το φυτό *Solanum lycopersicum* αναπτύσσει πιο μεγάλο και δυνατό βλαστό.
- 2) Το φυτό *Lotus japonicus* είναι ένα ψυχανθές φυτό και έτσι έχει τη μοναδική ικανότητα να αλληλεπιδρά με ριζόβια, σχηματίζοντας φυμάτια και απορροφώντας έτσι άζωτο από το έδαφος. Αντίθετα, το φυτό της τομάτας δεν μπορεί να υποστηρίξει αυτό το είδος αλληλεπίδρασης.
- 3) Στο φυτό *Lotus japonicus* το μυκητιακό στέλεχος FSK έχει βρεθεί να αποικίζει τους ιστούς της ρίζας, του στέμματος και των φύλλων. Αντίθετα, στο φυτό *Solanum lycopersicum* το μυκητιακό στέλεχος FSK δεν έχει εντοπιστεί στα μέρη του φυτού που βρίσκονται πάνω από το χώμα, αλλά μόνο στη ρίζα έως και το στέμμα (Skiada et. al. 2019).
- 4) Τα δύο φυτά έχουν διαφορετικό γονιδίωμα και βρίσκονται σε εξελικτική απόσταση μεταξύ τους. Συνεπώς, ίσως οι μικροοργανισμοί που τους αποικίζουν εκμεταλλεύονται διαφορετικά γονίδια και στοχεύουν σε διαφορετικά μονοπάτια σε κάθε φυτό (Sugimura & Saito 2017).

Είναι πλέον γνωστό ότι το μυκητιακό στέλεχος FSK είναι ένας ενδοφυτικός και ευεργετικός μύκητας που έχει την ικανότητα να αποικίζει τόσο το φυτό *Solanum lycopersicum* όσο και το φυτό *Lotus japonicus* και να αναπτύσσει συμβιωτικές σχέσεις μαζί τους. Σε αυτές τις αλληλεπιδράσεις μεταξύ των φυτών και του μύκητα, ο μύκητας παράγει δευτερογενείς μεταβολίτες και πρωτεΐνες τελεστές με σκοπό την εγκαθίδρυση του αποικισμού, την εξουδετέρωση ανταγωνιστών, τον πολλαπλασιασμό του και την προστασία του φυτού από βιοτικές και αβιοτικές καταπονήσεις. Τα μονοπάτια που επηρεάζονται από τις πρωτεΐνες τελεστές ονομάζονται Effector Targeted Pathways (ETPs) και συμπεριλαμβάνουν την επεξεργασία του RNA, τη μεταγραφή του DNA, τη μεταφορά ουσιών μέσα και έξω από το κύτταρο, τη διακυτταρική σηματοδότηση και συντηρημένα μονοπάτια αποικοδόμησης πρωτεϊνών. Έτσι, επηρεάζονται λειτουργίες των φυτών, όπως ο μεταβολισμός, η μοριακή σηματοδότηση και η άμυνα (Langin et. al. 2020).

Τελικά, ο σκοπός της πειραματικής μελέτης είναι η ανίχνευση των επιπέδων έκφρασης των γονιδίων του μυκητιακού στελέχους FSK που κωδικοποιούν για τις πρωτεΐνες τελεστές σε διάφορες χρονικές στιγμές μετά τον εμβολιασμό των φυτών με κονίδια του μύκητα.

## 5.2 Ανασκόπηση και ερμηνεία αποτελεσμάτων

Συνολικά, μελετήθηκαν το ποσοστό του αποικισμού του μυκητιακού στελέχους FSK στο φυτό *Solanum lycopersicum* και η έκφραση των 7 πιθανών γονιδίων που κωδικοποιούν για τις πρωτεΐνες τελεστές τόσο στο φυτό *Solanum lycopersicum* όσο και στο φυτό *Lotus japonicus*.

Πιο αναλυτικά, κατά τη μελέτη του αποικισμού τις χρονικές στιγμές 6 ώρες, 18 ώρες και 30 ώρες μετά τον εμβολιασμό με τον μύκητα έγινε ποσοτικοποίηση του mRNA που παράχθηκε από το γονίδιο του μύκητα *ITS* ως προς το mRNA που παράχθηκε από το γονίδιο της ουβικουιτίνης. Τα αποτελέσματα δε δηλώνουν κάποιο μοτίβο αποικισμού και δεν είναι στατιστικά σημαντικά. Δε φαίνεται η σχετική έκφραση του γονιδίου *ITS* να αυξάνεται ή να μειώνεται ξεκάθαρα με το πέρασμα των ωρών. Επίσης, κατά τη μελέτη του αποικισμού τις

χρονικές στιγμές 2 ημέρες, 4 ημέρες και 7 ημέρες μετά τον εμβολιασμό έγινε ποσοτικοποίηση του mRNA που παράχθηκε από το γονίδιο του μύκητα *Tef1a* ως προς το mRNA που παράχθηκε από το γονίδιο της ουβικουιτίνης. Φαίνεται ότι η έκφραση του γονιδίου *Tef1a* όλο και αυξάνεται με το πέρασμα των ημερών και υπάρχουν στατιστικά σημαντικές διαφορές. Άρα, είναι πιθανό ο αποικισμός του μύκητα στο φυτό να εγκαθιδρύεται στο μέγιστο περίπου την 7 ημέρα. Μάλιστα, για κάθε χρονική στιγμή, η έκφραση των γονιδίων του μύκητα στα εμβολιασμένα φυτά είναι υψηλότερη από τα μη εμβολιασμένα φυτά, όπως είναι αναμενόμενο.

Τα επίπεδα του αποικισμού του μυκητιακού στελέχους FSK στο φυτό *Lotus japonicus* έχουν ελεγχθεί και είναι στατιστικά σημαντικά (Διδακτορική διατριβή Σκιαδά 2019). Ωστόσο, τα επίπεδα του αποικισμού του μυκητιακού στελέχους FSK στο φυτό *Solanum lycopersicum* δεν ήταν ικανοποιητικά, όπως φάνηκε και στα διαγράμματα 1 και 2. Προηγούμενα πειράματα έχουν αποδείξει ότι ο FSK είναι ικανός να αποικίσει το φυτό της τομάτας σε εργαστηριακές συνθήκες, να αναπτυχθεί και να πολλαπλασιαστεί ενδοφυτικά στη ρίζα, αλλά δεν έχει εντοπιστεί στα τμήματα του φυτού της τομάτας πάνω από το έδαφος (Κανρουλάκης et. al. 2007, 2018). Το μικρό ποσοστό αποικισμού του FSK που εντοπίστηκε στα φυτά της τομάτας μπορεί να οφείλεται:

- 1) Στις χρονικές στιγμές της δειγματοληψίας των ριζών, διότι παρατηρήθηκε σημαντική αύξηση του αποικισμού μόνο όταν πέρασαν έως και 2 μέρες μετά τον εμβολιασμό των φυτών. Συνεπώς, κατά τις χρονικές στιγμές 6 ώρες, 18 ώρες και 30 ώρες μετά τον εμβολιασμό πιθανώς να ήταν πολύ νωρίς για την ανίχνευση του αποικισμού σε ικανοποιητικά επίπεδα.
- 2) Στο μυκητιακό στέλεχος FSK που χρησιμοποιήθηκε, διότι είναι πιθανό λόγω των συνεχών ανακαλλιεργειών στο εργαστήριο να έχει υποστεί μεταλλάξεις απώλειας λειτουργίας σε γονίδια σημαντικά για τον αποικισμό.
- 3) Σε λανθασμένους χειρισμούς κατά την απομόνωση και μέτρηση των κονιδίων του μύκητα, καθώς και κατά τον εμβολιασμό των φυτών με αυτά. Είναι πιθανό ο εμβολιασμός της ρίζας να αύξησε το κυτταρικό στρες.
- 4) Σε επιμόλυνση κατά την προβλάπηση των σπόρων, κατά την προετοιμασία του υποστρώματος των φυτών ή κατά τη δειγματοληψία. Η επιμόλυνση με άλλους μικροοργανισμούς μπορεί να έχει αρνητικά αποτελέσματα για τον αποικισμό του μυκητιακού στελέχους FSK, καθώς θα υπάρχει ανταγωνισμός.

Όσον αφορά την έκφραση των γονιδίων που κωδικοποιούν για τις πρωτεΐνες τελεστές:

- 1) Δεν ανιχνεύθηκε έκφραση του γονιδίου που κωδικοποιεί για την πιθανή πρωτεΐνη τελεστή FUN\_005917 κατά την αλληλεπίδραση του FSK με τα δύο φυτά. Είναι πιθανό η λειτουργία του γονιδίου να είναι άλλη από αυτή που προβλέφθηκε. Ωστόσο, αν η πρωτεΐνη όντως εμπλέκεται στην αποικοδόμηση της τοξικής ένωσης ETBE, αυτή η ένωση δεν εμφανίστηκε στο κλειστό σύστημα στο magenta pot.
- 2) Δεν ανιχνεύθηκε έκφραση των γονιδίων που κωδικοποιούν για τις πιθανές πρωτεΐνες τελεστές FUN\_010021 και FUN\_010034 κατά την αλληλεπίδραση του FSK με το φυτό *Solanum lycopersicum*. Ωστόσο, ανιχνεύθηκε η έκφραση των γονιδίων κατά την αλληλεπίδραση του FSK με το φυτό *Lotus japonicus*. Η έκφραση των γονιδίων αυξάνεται έως την 4<sup>η</sup> μέρα μετά τον εμβολιασμό και τη 12<sup>η</sup> μέρα έχει μειωθεί. Η πρωτεΐνη τελεστής FUN\_010021 είναι πολύ σημαντική για τη διατήρηση της ακεραιότητας και για τη λειτουργικότητα σηματοδοτικών μονοπατιών του μύκητα, διότι όπως προαναφέρθηκε πιθανώς να λειτουργεί ως συστατικό του κυτταρικού τοιχώματος του μύκητα και να εμπλέκεται σε διαδικασίες μεταφοράς πρωτεϊνών (Boisrame et. al. 2011). Πιθανοί λόγοι που δεν ανιχνεύθηκε η έκφραση των γονιδίων αυτών στο φυτό *Solanum lycopersicum*, ενώ ανιχνεύθηκε στο φυτό *Lotus japonicus* είναι τα χαμηλά επίπεδα αποικισμού του μύκητα στην τομάτα, ενώ ο αποικισμός του μύκητα στο φυτό *Lotus japonicus* ήταν σε ικανοποιητικά και στατιστικά σημαντικά επίπεδα. Δηλαδή, πιθανώς να χρειάζεται ένα επίπεδο αποικισμού του μύκητα παραπάνω από αυτό που επιτεύχθηκε για

την έκφραση του συγκεκριμένου γονιδίου. Επίσης, τα δύο φυτά δεν έχουν κοινό γονιδίωμα. Αυτό οδηγεί σε μορφολογικές αλλά και φυσιολογικές διαφορές. Για παράδειγμα, έχει μελετηθεί η έκφραση γονιδίων του μυκορριζικού μύκητα *Rhizophagus irregularis* στα δύο φυτά *Solanum lycopersicum* και *Lotus japonicus* και βρέθηκε ότι μόνο το 1/4 με 1/3 των γονιδίων του μύκητα εκφράζονταν με τον ίδιο τρόπο κατά την αλληλεπίδραση (Sugimura & Saito 2017).

- 3) Ανιχνεύθηκε η έκφραση των γονιδίων που κωδικοποιούν για τις πιθανές πρωτεΐνες τελεστές FUN\_015931, FUN\_015486/FUN\_011346 και FUN\_011104 και στα δύο φυτά. Μάλιστα, το πρότυπο έκφρασης σε κάθε περίπτωση ήταν το ίδιο. Δηλαδή, η έκφραση των γονιδίων αυξάνεται έως και την 4<sup>η</sup> μέρα και ύστερα μειώνεται. Η πρωτεΐνη FUN\_015931 είναι υπεροξειδική δισμουτάση που εκφράζεται ιδιόσυστατα και είναι απαραίτητη για την εξουδετέρωση δραστικών ριζών υπεροξειδίου, οι πρωτεΐνες FUN\_015486/FUN\_011346 είναι δεοξυριβονουκλεάσες τύπου I με πιθανό ρόλο στην καταστολή της άμυνας του φυτού και τέλος η πρωτεΐνη FUN\_011104 είναι μία λιπάση απαραίτητη για την διάτρηση του φυτικού κυτταρικού τοιχώματος, την ανάπτυξη, την απόκριση στο στρες και την άμυνα. Συμπερασματικά, αυτές οι πρωτεΐνες είναι απαραίτητες για την επιβίωση και τον αποικισμό του μύκητα και είναι αναμενόμενη η ανίχνευση της έκφρασής τους.

Τελικά, το πιο επικρατές πρότυπο που παρατηρήθηκε κατά την αλληλεπίδραση του μύκητα και με τα δύο φυτά είναι η αύξηση της έκφρασης των περισσότερων γονιδίων που μελετήθηκαν στις χρονικές στιγμές έως και την 4<sup>η</sup> μέρα μετά τον εμβολιασμό, όπου παρατηρήθηκε η μέγιστη έκφραση. Την επόμενη χρονική στιγμή η έκφραση μειώθηκε. Δηλαδή, οι πρωτεΐνες τελεστές παράγονται με αυξανόμενο ρυθμό έως και την 4<sup>η</sup> ημέρα, για να υποστηρίξουν τον αποικισμό του μύκητα που φτάνει στο μέγιστο την 7<sup>η</sup> μέρα εξαιτίας της δράσης τους. Στη συνέχεια, τόσο η παραγωγή των πρωτεϊνών τελεστών όσο και ο αποικισμός του μύκητα μειώνονται.

Όσον αφορά την περαιτέρω επιβεβαίωση των πιθανών πρωτεϊνών τελεστών, έχει αναγνωριστεί η σημασία τους σε παθογόνα συστήματα. Φυλογενετικές μελέτες του γένους *Fusarium* που περιλαμβάνουν τα είδη *Fusarium graminearum*, *Fusarium verticillioides* και *Fusarium oxysporum* f. sp. *lycopersici* πρόβλεψαν πρωτεΐνες που εκκρίνονται και σχετίζονται με την παθογένεια ως πρωτεΐνες τελεστές. Πιο συγκεκριμένα, όπως προαναφέρθηκε, εντοπίστηκαν πρωτεΐνες που αποικοδομούν τα κυτταρικά τοιχώματα φυτών και μυκήτων, πρωτεΐνες μεταφορείς έως και μεταγραφικοί παράγοντες. Μάλιστα, αποδείχθηκε ότι αυτές οι πρωτεΐνες παράγονται στα αρχικά στάδια της αλληλεπίδρασης των μυκήτων με τα ριζικά κύτταρα του φυτού *Solanum lycopersicum* (Li-Jun Ma et. al. 2010). Για παράδειγμα, η λιπάση FGL1 εκκρίνεται από τον μύκητα *Fusarium graminearum* και λειτουργεί ως τοξικός παράγοντας και πρωτεΐνη τελεστής στη μόλυνση του σιταριού. Επιπλέον, έχει βρεθεί ότι οι λιπάσες παίζουν σημαντικό ρόλο ως πρωτεΐνες τελεστές, καθώς εκκρίνονται από τον παθογόνο μύκητα *Fusarium oxysporum* f. sp. *lycopersici* και όταν μειώθηκε η λιπολυτική τους δραστηριότητα λόγω ελλείματος των αντίστοιχων ρυθμιστικών τους γονιδίων, μειώθηκαν και τα επίπεδα του αποικισμού του μύκητα στο φυτό *Solanum lycopersicum*. Άρα, η εξωκυτταρική λιπολυτική δραστηριότητα πρωτεϊνών τελεστών είναι απαραίτητη για την είσοδο και τον αποικισμό του μύκητα στο φυτό (Blumke et. al. 2014, Voigt et. al. 2005, Bravo-Ruiz et. al. 2013).

### 5.3 Προοπτικές

Τα αποτελέσματα αυτής της πτυχιακής εργασίας προσφέρουν τις πρώτες ενδείξεις για την έκφραση μόλις 7 πιθανών γονιδίων από τα πολλά γονίδια του μύκητα που κωδικοποιούν για τις διάφορες πρωτεΐνες τελεστές. Μάλιστα, χρειάζεται περαιτέρω διερεύνηση και επαλήθευση των αποτελεσμάτων.

Η δράση των πρωτεϊνών τελεστών δεν είναι καλά μελετημένη σε συμβιωτικά συστήματα. Για αυτό τον λόγο, η διερεύνηση της συμπεριφοράς του μυκητιακού στελέχους FsK είναι τόσο σημαντική. Η συμβιωτική σχέση

του μύκητα με το φυτό μπορεί να αποκαλύψει μία άλλη δράση των πρωτεϊνών τελεστών, εξειδικευμένη για τις συμβιωτικές αλληλεπιδράσεις ή συντηρημένη από τις παρασιτικές αλληλεπιδράσεις.

Επίσης, ο χαρακτηρισμός των στόχων των πρωτεϊνών τελεστών μπορεί να αποκαλύψει παλιά και νέα μόρια που συμμετέχουν σε μονοπάτια του φυτού, όπως η άμυνα, η σίγηση της γονιδιακής έκφρασης με παρεμβολή RNA (RNAi), η μεταγραφή του DNA, η μεταφορά ουσιών μέσα και έξω από το κύτταρο, η διακυτταρική σηματοδότηση και η αποικοδόμηση πρωτεϊνών. Τέλος, μπορούν να αντληθούν περισσότερες πληροφορίες μέσω πρόκλησης μεταλλάξεων και τελικά σίγησης της έκφρασης γονιδίων του μύκητα που κωδικοποιούν για τις πρωτεΐνες τελεστές με το σύστημα CRISPR/Cas9 και εμβολιασμός τέτοιων μυκήτων σε νέα φυτά. Έτσι, βλέποντας αν τα επίπεδα αποικισμού αυξάνονται ή μειώνονται και αν επηρεάζονται παράγοντες όπως η αναγνώριση του φυτού ξενιστή από τον μύκητα σε επίπεδο είδους, μπορούν να αντληθούν συμπεράσματα για την πραγματική λειτουργία και σημασία αυτών των πρωτεϊνών (Schweizer et. al. 2018).

## 6. Βιβλιογραφία

1. Kavroulakis, N., Ntougias, S., Zervakis, G. I., Ehaliotis, C., Haralampidis, K., & Papadopoulou, K. K. (2007). *Role of ethylene in the protection of tomato plants against soil-borne fungal pathogens conferred by an endophytic Fusarium solani strain*. Journal of Experimental Botany, 58(14), 3853–3864.
2. Kavroulakis, N., Doupis, G., Papadakis, I. E., Ehaliotis, C., & Papadopoulou, K. K. (2018). *Tolerance of tomato plants to water stress is improved by the root endophyte Fusarium solani FsK*. Rhizosphere, 6, 77–85.
3. Skiada, V., Faccio, A., Kavroulakis, N., Genre, A., Bonfante, P., & Papadopoulou, K. K. (2019). *Colonization of Legumes by an Endophytic Fusarium solani strain FsK Reveals Common Features to Symbionts or Pathogens*. Fungal Genetics and Biology.
4. Skiada V., Avramidou M., Bonfante P., Genre A., Papadopoulou K. K. (2019). *Symbiotic signalling is at the core of an endophytic Fusarium solani-legume association*. bioRxiv.
5. Sonah, H., Deshmukh, R. K., & Bélanger, R. R. (2016). *Computational Prediction of Effector Proteins in Fungi: Opportunities and Challenges*. Frontiers in Planet Science, 7.
6. Petre, B., & Kamoun, S. (2014). *How Do Filamentous Pathogens Deliver Effector Proteins into Plant Cells?* PLoS Biology, 12(2), e1001801.
7. Garantonakis, N., Pappas, M. L., Varikou, K., Skiada, V., Broufas, G. D., Kavroulakis, N., & Papadopoulou, K. K. (2018). *Tomato Inoculation With the Endophytic Strain Fusarium solani K Results in Reduced Feeding Damage by the Zoophytophagous Predator Nesidiocoris tenuis*. Frontiers in Ecology and Evolution, 6.
8. Huang Z., Li H., Zhou Y., Bao Y., Duan Z., Wang C., Powell CA., Chen B., Zhang M., Yao W. (2022) *Predication of the Effector Proteins Secreted by Fusarium sacchari Using Genomic Analysis and Heterogenous Expression*. J Fungi (Basel). 2022 Jan 6;8(1):59.
9. Li H., Jiang F., Wu P., Wang K., Cao Y. (2020) *A High-Quality Genome Sequence of Model Legume Lotus japonicus (MG-20) Provides Insights into the Evolution of Root Nodule Symbiosis*. Genes (Basel). 2020 Apr 29;11(5):483.
10. Genre, A., Ortu, G., Bertoldo, C., Martino, E., & Bonfante, P. (2009). *Biotic and Abiotic Stimulation of Root Epidermal Cells Reveals Common and Specific Responses to Arbuscular Mycorrhizal Fungi*. PLANT PHYSIOLOGY, 149(3), 1424–1434.
11. Kosuta, S., Hazledine, S., Sun, J., Miwa, H., Morris, R. J., Downie, J. A., & Oldroyd, G. E. D. (2008). *Differential and chaotic calcium signatures in the symbiosis signaling pathway of legumes*. Proceedings of the National Academy of Sciences, 105(28), 9823–9828.
12. Sato S., Nakamura Y., Kaneko T., Asamizu E., Kato T., Nakao M., Sasamoto S., Watanabe A., Ono A., Kawashima K., Fujishiro T., Katoh M., Kohara M., Kishida Y., Minami C., Nakayama S., Nakazaki N.,



Shimizu Y., Shinpo S., Takahashi C., Wada T., Yamada M., Ohmido N., Hayashi M., Fukui K., Baba T., Nakamichi T., Mori H., Tabata S., *Genome Structure of the Legume, Lotus japonicus*, DNA Research, Volume 15, Issue 4, August 2008, Pages 227–239

13. Genre A. & Russo G. *Does a Common Pathway Transduce Symbiotic Signals in Plant-Microbe Interactions?* Front Plant Sci. 2016 Feb 16;7:96.
14. Alam B., Li J., Ge Q., Khan M. A., Gong J., Mehmood S., Yuan Y., Go W. (2021). *Endophytic Fungi: From Symbiosis to Secondary Metabolite Communications or Vice Versa?* Front. Plant Sci., 17 December 2021 Sec. Plant Symbiotic Interactions.
15. Kemen, A. C., Agler, M. T., & Kemen, E. (2015). *Host-microbe and microbe-microbe interactions in the evolution of obligate plant parasitism*. New Phytologist, 206(4), 1207–1228.
16. Taiz, L. and Zeiger, E. (1991) *Plant physiology: Mineral nutrition*. The Benjamin Cummings Publishing Co., Inc. Redwood City, 100-119.
17. Webster J. & Weber R. W. S. (2007). *Introduction to fungi*. Cambridge University Press.
18. 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. 2006 Jun;44(6):2186-90.
19. Coleman, J. J. (2015). *The Fusarium solani species complex: ubiquitous pathogens of agricultural importance*. Molecular Plant Pathology, 17(2), 146–158.
20. Tulin Askun (2018). *Fusarium: Plant Disease, Pathogen Diversity, Genetic Diversity, Resistance and Molecular Markers. Introductory Chapter: Fusarium: Pathogenicity, Infections, Diseases, Mycotoxins and Management*. CHAPTER METRICS OVERVIEW.
21. O'Donnell, K. (2000). *Molecular phylogeny of the Nectria haematococca-Fusarium solani species complex*. Mycologia, 92(5), 919–938.
22. Langin, G., Gouguet, P., & Üstün, S. (2020). *Microbial Effector Proteins – A Journey through the Proteolytic Landscape*. Trends in Microbiology, 28(7), 523–535.
23. Van Dam, N. M. (2009). *How plants cope with biotic interactions*. Plant Biology, 11(1), 1–5.
24. Li, C., Chen, G., Mishina, K., Yamaji, N., Ma, J. F., Yukuhiro, F., ... Komatsuda, T. (2017). *A GDSL-motif esterase/acyltransferase/lipase is responsible for leaf water retention in barley*. Plant Direct, 1(5), e00025.
25. Park HJ, Wang W, Curlango-Rivera G, Xiong Z, Lin Z, Huskey DA, Hawes MC, VanEtten HD, Turgeon BG. *A DNase from a Fungal Phytopathogen Is a Virulence Factor Likely Deployed as Counter Defense against Host-Secreted Extracellular DNA*. mBio. 2019 Mar 5;10(2):e02805-18.
26. Almagro Armenteros, J. J., Tsirigos, K. D., Sønderby, C. K., Petersen, T. N., Winther, O., Brunak, S., ... Nielsen, H. (2019). *SignalP 5.0 improves signal peptide predictions using deep neural networks*. Nature Biotechnology, 37(4), 420–423.
27. José Juan Almagro Armenteros, Casper Kaae Sønderby, Søren Kaae Sønderby, Henrik Nielsen, Ole Winther, DeepLoc: prediction of protein subcellular localization using deep learning, Bioinformatics, Volume 33, Issue 21, 01 November 2017, Pages 3387–3395.
28. Berndt, U., Oellerer, S., Zhang, Y., Johnson, A. E., & Rospert, S. (2009). *A signal-anchor sequence stimulates signal recognition particle binding to ribosomes from inside the exit tunnel*. Proceedings of the National Academy of Sciences, 106(5), 1398–1403.
29. Savojardo C, Martelli PL, Fariselli P, Profiti G, Casadio R. BUSCA: an integrative web server to predict subcellular localization of proteins. Nucleic Acids Res. 2018 Jul 2;46(W1):W459-W466.
30. Sperschneider J, Gardiner DM, Dodds PN, Tini F, Covarelli L, Singh KB, Manners JM, Taylor JM. EffectorP: predicting fungal effector proteins from secretomes using machine learning. New Phytol. 2016 Apr;210(2):743-61.
31. Thornton, S. F., Nicholls, H. C. G., Rolfe, S. A., Mallinson, H. E. H., & Spence, M. J. (2020). *Biodegradation and fate of ethyl tert-butyl ether (ETBE) in soil and groundwater: A review*. Journal of Hazardous Materials, 391, 122046.



32. P. Beguin, S. Chauvaux, I. Miras, A. François, F. Fayolle, F. Monot. *Genes Involved in the Degradation of Ether Fuels by Bacteria of the Mycobacterium/Rhodococcus Group*. Oil & Gas Science and Technology - Revue d'IFP Energies nouvelles, Institut Français du Pétrole (IFP), 2003, 58 (4), pp.489-495.
33. Wang M, Rui L, Yan H, Shi H, Zhao W, Lin JE, Zhang K, Blakeslee JJ, Mackey D, Tang D, Wei Z, Wang GL. *The major leaf ferredoxin Fd2 regulates plant innate immunity in Arabidopsis*. Mol Plant Pathol. 2018 Jun;19(6):1377-1390.
34. Boisramé A, Cornu A, Da Costa G, Richard ML. *Unexpected role for a serine/threonine-rich domain in the Candida albicans Iff protein family*. Eukaryot Cell. 2011 Oct;10(10):1317-30.
35. Akoh CC, Lee GC, Liaw YC, Huang TH, Shaw JF. *GDSL family of serine esterases/lipases*. Prog Lipid Res. 2004 Nov;43(6):534-52.
36. Li Chao, Chen G, Mishina K, Yamaji N, Ma JF, Yukuhiro F, Tagiri A, Liu C, Pourkheirandish M, Anwar N, Ohta M, Zhao P, Lundqvist U, Li X, Komatsuda T. *A GDSL-motif esterase/acyltransferase/lipase is responsible for leaf water retention in barley*. Plant Direct. 2017 Nov 3;1(5):e00025.
37. Park HJ, Wang W, Curlango-Rivera G, Xiong Z, Lin Z, Huskey DA, Hawes MC, VanEtten HD, Turgeon BG. *A DNase from a Fungal Phytopathogen Is a Virulence Factor Likely Deployed as Counter Defense against Host-Secreted Extracellular DNA*. mBio. 2019 Mar 5;10(2):e02805-18.
38. Berwal, M. K. , Ram, C., 2018, '*Superoxide Dismutase: A Stable Biochemical Marker for Abiotic Stress Tolerance in Higher Plants*', in A. o. de Oliveira (ed.), Abiotic and Biotic Stress in Plants, IntechOpen, London. 10.5772/intechopen.82079.
39. Cox GM, Harrison TS, McDade HC, Taborda CP, Heinrich G, Casadevall A, Perfect JR. *Superoxide dismutase influences the virulence of Cryptococcus neoformans by affecting growth within macrophages*. Infect Immun. 2003 Jan;71(1):173-80.
40. Sugimura, Y., & Saito, K. (2017). *Comparative transcriptome analysis between Solanum lycopersicum L. and Lotus japonicus L. during arbuscular mycorrhizal development*. Soil Science and Plant Nutrition, 63(2), 127–136.
41. Ma, LJ., van der Does, H., Borkovich, K. et al. *Comparative genomics reveals mobile pathogenicity chromosomes in Fusarium*. Nature 464, 367–373 (2010).
42. Blümke A, Falter C, Herrfurth C, Sode B, Bode R, Schäfer W, Feussner I, Voigt CA. *Secreted fungal effector lipase releases free fatty acids to inhibit innate immunity-related callose formation during wheat head infection*. Plant Physiol. 2014 May;165(1):346-58.
43. Schweizer G, Münch K, Mannhaupt G, Schirawski J, Kahmann R, Dutheil JY. *Positively Selected Effector Genes and Their Contribution to Virulence in the Smut Fungus Sporisorium reilianum*. Genome Biol Evol. 2018 Feb 1;10(2):629-645.
44. Pajuelo, E., Stougaard, J. (2005). *Lotus japonicus's a model system*. In: Márquez, A.J. (eds) Lotus japonicus Handbook. Springer, Dordrecht.
45. Møller, Ian & Taiz, Lincoln & Zeiger, Eduardo & Murphy, Angus. (2017). *Plant Physiology and Development*.