



ΠΑΝΕΠΙΣΤΗΜΙΟ ΘΕΣΣΑΛΙΑΣ  
ΣΧΟΛΗ ΕΠΙΣΤΗΜΩΝ ΥΓΕΙΑΣ  
ΤΜΗΜΑ ΒΙΟΧΗΜΕΙΑΣ ΚΑΙ ΒΙΟΤΕΧΝΟΛΟΓΙΑΣ

ΔΙΠΛΩΜΑΤΙΚΗ ΕΡΓΑΣΙΑ

*Απομόνωση εκχυλισμάτων από φυτά διπλά εμβολιασμένα με ωφέλιμους  
μικροοργανισμούς και έλεγχος βιολογικής δράσης*

*Isolation and bioactivity screening of extracts derived from plants double  
inoculated with beneficial microorganisms*



Εκπόνηση: Ελευθερία Μπαζούλη  
Επιβλέπουσα καθηγήτρια: Δρ. Άννα-Μαρία Ψαρρά  
Λάρισα, 2023

Η παρούσα διπλωματική εργασία εκπονήθηκε στο εργαστήριο Δομικής και Λειτουργικής Βιοχημείας και στο εργαστήριο Βιοτεχνολογίας Φυτών και Περιβάλλοντος, του Τμήματος Βιοχημείας και Βιοτεχνολογίας, της Σχολής Επιστημών Υγείας του Πανεπιστημίου Θεσσαλίας.

### **Τριμελής επιτροπή**

#### **Ψαρρά Άννα-Μαρία**

Αναπληρώτρια καθηγήτρια Βιοχημείας, του τμήματος Βιοχημείας και Βιοτεχνολογίας του Πανεπιστημίου Θεσσαλίας

#### **Τσίκου Δανιέλα**

Επίκουρος Καθηγήτρια Μοριακής και Αναπτυξιακής Βιολογίας Φυτών, του τμήματος Βιοχημείας και Βιοτεχνολογίας του Πανεπιστημίου Θεσσαλίας

#### **Παπαδοπούλου Καλλιόπη**

Καθηγήτρια Βιοτεχνολογίας Φυτών, του τμήματος Βιοχημείας και Βιοτεχνολογίας του Πανεπιστημίου Θεσσαλίας

## Ευχαριστίες

Θα ήθελα να ευχαριστήσω θερμά την επιβλέπουσα της διπλωματικής μου εργασίας, Αναπληρώτρια Καθηγήτρια Άννα-Μαρία Ψαρρά, για την ευκαιρία που μου προσέφερε, εντάσσοντάς με στην ερευνητική της ομάδα στο Εργαστήριο Δομικής και Λειτουργικής Βιοχημείας, στο πλαίσιο της εκπόνησης της παρούσας διπλωματικής, καθώς και για την πολύτιμη καθοδήγηση και υποστήριξη που μου παρείχε, κατά τη διάρκεια της συγγραφής της.

Επιθυμώ, ακόμη, να εκφράσω τη βαθιά μου ευγνωμοσύνη στην Επίκουρο Καθηγήτρια Δανιέλα Τσίκου, ούσα τόσο επιστημονική υπεύθυνη του ερευνητικού προγράμματος “Έλεγχος φυτικών εκχυλισμάτων για αντικαρκινική και αντιφλεγμονώδη δράση” του Εμπειρικού Ιδρύματος, στο πλαίσιο του οποίου εκπονήθηκε η παρούσα διπλωματική, όσο και μέλος της τριμελούς συμβουλευτικής επιτροπής, για την αμέριστη υποστήριξη και καθοδήγησή της, όσον αφορά, αφενός το πειραματικό σκέλος της παρούσας διπλωματικής που διεξήχθη στο Εργαστήριο Βιοτεχνολογίας Φυτών και Περιβάλλοντος, και αφετέρου τη συγγραφή της διπλωματικής μου.

Θα ήθελα να ευχαριστήσω, επίσης, την Καθηγήτρια Καλλιόπη Παπαδοπούλου, ούσα μέλος της τριμελούς συμβουλευτικής επιτροπής της παρούσας διπλωματικής.

Ακόμη, δε θα μπορούσα να παραλείψω τις ειλικρινείς ευχαριστίες μου στη διδάκτορα Φωτεινή Καλούση και στον υποψήφιο διδάκτορα Μάριο Βαλμά, για τις θεωρητικές και πρακτικές γνώσεις που μου μετέδωσαν, αλλά και για την άψογη συνεργασία μας, κατά τη διεξαγωγή των πειραματικών διαδικασιών της παρούσας διπλωματικής στο εργαστήριο Δομικής και Λειτουργικής Βιοχημείας και στο εργαστήριο Βιοτεχνολογίας Φυτών και Περιβάλλοντος, αντίστοιχα. Επιπλέον, ευχαριστώ τη συμφοιτήριά μου Κατερίνα Περάτη, για την εύρυθμη και ανιδιοτελή συνεργασία μας, κατά τη διάρκεια της κοινής μας πειραματικής μελέτης.

Τέλος, θα ήθελα να ευχαριστήσω την οικογένειά μου για την πολυδιάστατη στήριξη που μου παρείχε καθόλη τη διάρκεια της ακαδημαϊκής μου πορείας στο Τμήμα Βιοχημείας και Βιοτεχνολογίας.

## Περιεχόμενα

Ευχαριστίες.....	2
Περίληψη.....	5
Abstract.....	6
1 Εισαγωγή.....	7
1.1 Αλληλεπιδράσεις μεταξύ φυτών και μικροοργανισμών.....	7
1.2 Αλληλεπίδραση μεταξύ ψυχανθών και ριζοβίων.....	7
1.3 Αλληλεπίδραση μεταξύ φυτών και Δενδρόμορφων Ενδομυκορριζικών Μυκήτων.....	9
1.4 Πρωτογενής και δευτερογενής μεταβολισμός των φυτών.....	11
1.5 Χημική σύσταση εκχυλισμάτων βλαστού και ρίζας ψυχανθών που έχουν αποικιστεί από ριζόβια.....	12
1.5.1 Πρωτογενείς μεταβολίτες.....	13
1.5.2 Δευτερογενείς μεταβολίτες.....	13
1.6 Χημική σύσταση εκχυλισμάτων βλαστού και ρίζας φυτών που έχουν αποικιστεί από ΔΕΜ.....	14
1.6.1 Πρωτογενείς μεταβολίτες.....	14
1.6.2 Δευτερογενείς μεταβολίτες.....	15
1.7 Βιολογικές δράσεις εκχυλισμάτων από φαρμακευτικά φυτά.....	19
1.7.1 Ψυχανθή φυτά.....	20
1.7.2 Φαρμακευτικά φυτά εμβολιασμένα με ΔΕΜ ή ριζόβια.....	21
1.8 Σημασία χρήσης δραστικών ουσιών φυτικής προέλευσης για τη θεραπεία του καρκίνου.....	23
1.9 Σημασία χρήσης δραστικών ουσιών φυτικής προέλευσης για τη θεραπεία φλεγμονωδών νόσων.....	23
1.10 Μοριακοί μηχανισμοί της φλεγμονής σε κύτταρα ανθρώπου.....	24
1.11 Σκοπός.....	28
2 Υλικά και μέθοδοι.....	29
2.1 Βιολογικό υλικό και συνθήκες ανάπτυξης φυτών.....	29
2.2 Καλλιέργεια και εμβολιασμός φυτών.....	30
2.2.1 Απολύμανση και εκβλάστηση σπόρων.....	30
2.2.2 Προετοιμασία εμβολίων.....	30
2.2.3 Μεταφύτευση και εμβολιασμός.....	30
2.3 Συγκομιδή φυτικών ιστών και εκτίμηση του αποικισμού των ριζών από τους μικροοργανισμούς.....	30
2.4 Εκχύλιση φυτικών μεταβολιτών.....	32
2.5 Χειρισμοί κυτταροκαλλιιεργειών.....	33
2.5.1 Κυτταρική σειρά και συνθήκες ανάπτυξης.....	33
2.5.2 Θρυψινοποίηση.....	33
2.5.3 Διαδικασία ψύξης κυττάρων για κρυοσυντήρηση.....	34
2.5.4 Διαδικασία απόψυξης κυττάρων.....	35
2.5.5 Καταμέτρηση και στρώσιμο κυττάρων.....	35
2.6 Δοκιμασία κυτταρικής βιωσιμότητας ΜΤΤ.....	36
2.6.1 Αρχή μεθόδου.....	36
2.6.2 Πειραματική διαδικασία.....	37

2.7 Δοκιμασία λουσιφεράσης/β-γαλακτοσιδάσης.....	38
2.7.1 Αρχή μεθόδου.....	38
2.7.2 Στρώσιμο και συνθήκες ανάπτυξης κυττάρων.....	40
2.7.3 Παροδική διαμόλυνση κυττάρων με πλασμιδιακούς φορείς.....	41
2.7.4 Χορήγηση εκχυλισμάτων στα κύτταρα.....	41
2.7.5 Λύση κυττάρων.....	42
2.7.6 Μέτρηση δραστηριότητας λουσιφεράσης/β-γαλακτοσιδάσης.....	42
2.8 Στατιστική ανάλυση.....	43
3. Αποτελέσματα.....	44
3.1 Διερεύνηση του αποικισμού της ρίζας από ΔΕΜ και ριζόβια.....	44
3.2 Διερεύνηση της επίδρασης των εκχυλισμάτων από βλαστούς και ρίζες φυτών που έχουν εμβολιαστεί με ωφέλιμους μικροοργανισμούς στη βιωσιμότητα των κυττάρων HEK293....	45
3.3 Διερεύνηση της επίδρασης των φυτικών εκχυλισμάτων βλαστών στην επαγόμενη από τον TNFα μεταγραφική δραστηριότητα του NF-κΒ στα κύτταρα HEK293.....	47
4. Συζήτηση-Συμπεράσματα.....	49
5. Βιβλιογραφία.....	53

## Περίληψη

Τα φυτά συνιστούν μια ανεξάντλητη πηγή άντλησης βιοδραστικών ουσιών, η απομόνωση και ο χαρακτηρισμός των οποίων μπορεί να οδηγήσει στην ανάπτυξη νέων φαρμάκων που θα συμβάλουν στην αντιμετώπιση μιας πληθώρας ασθενειών. Ιδιαίτερο ιατρικό ενδιαφέρον παρουσιάζουν οι φυτικοί μεταβολίτες, και ιδιαίτερα οι δευτερογενείς μεταβολίτες, συμπεριλαμβανομένων των τερπενοειδών, των φαινολικών ενώσεων και των αλκαλοειδών, οι οποίοι παράγονται στους φυτικούς ιστούς, υπό συγκεκριμένες περιβαλλοντικές συνθήκες ανάπτυξης. Μεταξύ των συνθηκών αυτών συγκαταλέγεται η συμβίωσή τους με ωφέλιμους μικροοργανισμούς, η οποία επάγει τον επαναπρογραμματισμό τόσο του πρωτογενούς, όσο και του δευτερογενούς μεταβολισμού των φυτών, εμπλουτίζοντας, ποιοτικά ή ποσοτικά, τη σύσταση των φυτικών ιστών σε ενώσεις με πιθανή βιολογική δράση. Μάλιστα, διαφορετικά είδη μικροοργανισμών μπορούν να προάγουν τη συσσώρευση δευτερογενών μεταβολιτών σε διαφορετικό βαθμό, στο ίδιο φυτό. Στόχος τη παρούσας εργασίας αποτελεί η διερεύνηση πιθανών αντιπολλαπλασιαστικών και αντιφλεγμονωδών δράσεων εκχυλισμάτων ριζών και βλαστών από φυτά *Lotus japonicus* μονά εμβολιασμένα με το ριζόβιο βακτήριο *Mesorhizobium loti* ή διπλά εμβολιασμένα με το *M. loti* και τον δενδρόμορφο ενδομυκορριζικό μύκητα (ΔΕΜ) *Rhizophagus irregularis*, στην ανθρώπινη κυτταρική σειρά HEK293. Παράλληλα, εξετάστηκαν και οι αντίστοιχες βιολογικές δράσεις εκχυλισμάτων από βλαστούς και ρίζες μη εμβολιασμένων φυτών, ώστε να διαπιστωθεί η επίδραση της συμβίωσης με ωφέλιμους μικροοργανισμούς στη συσσώρευση βιοενεργών ενώσεων. Αρχικά, εκτιμήθηκε η κυτταροτοξικότητα των εκχυλισμάτων σε αυξανόμενες συγκεντρώσεις, όπου φάνηκε ότι τα εκχυλίσματα από ρίζες εμβολιασμένων φυτών προκάλεσαν στατιστικά σημαντική μείωση κατά περίπου 40-55%, ενώ τα εκχυλίσματα των μη εμβολιασμένων φυτών μείωσαν την κυτταρική βιωσιμότητα κατά 12-36%. Όσον αφορά τα εκχυλίσματα των βλαστών, προκάλεσαν στατιστικά σημαντική μείωση της κυτταρικής βιωσιμότητας κατά 10-30%, συγκριτικά με τη συνθήκη ελέγχου, η οποία, ωστόσο, ήταν μικρότερη από τη μείωση που προκλήθηκε από τις αντίστοιχες συγκεντρώσεις των ριζικών εκχυλισμάτων, ενώ δεν παρατηρήθηκαν εξίσου σημαντικές διαφορές στην επίδραση μεταξύ των επιμέρους εκχυλισμάτων. Στη συνέχεια, διερευνήθηκε η πιθανή αντιφλεγμονώδη δράση των εκχυλισμάτων βλαστών σε συγκέντρωση 40μg/ml, όπου παρατηρήθηκε μια τάση μείωσης της επαγόμενης από τον Παράγοντα Νέκρωσης Όγκων άλφα (TNFα) μεταγραφικής δραστηριότητας του NF-κΒ από τα φυτικά εκχυλίσματα, χωρίς ωστόσο η μείωση αυτή να κριθεί στατιστικά σημαντική. Συνολικά, τα αποτελέσματα αυτά, θα μπορούσαν να αποτελέσουν το έναυσμα για την πραγματοποίηση περαιτέρω μελετών, *in vitro* και *in vivo*, οι οποίες θα εξετάζουν την πιθανότητα αξιοποίησης των δραστικών συστατικών των υπό μελέτη φυτικών εκχυλισμάτων, στη θεραπεία ασθενειών, όπως ο καρκίνος και οι φλεγμονώδεις νόσοι.

## Abstract

Plants are an inexhaustible source of bioactive substances, the isolation and characterization of which can be used in the development of new drugs, which could contribute to the treatment of a multitude of diseases. Plant metabolites, and particularly secondary metabolites, including terpenoids, phenolic compounds and alkaloids, are agents of particular medical interest, produced in plant tissues under specific environmental conditions of plant cultivation. These conditions include plants' symbiotic association with beneficial microorganisms, which induces the reprogramming of both primary and secondary plant metabolism, thus qualitatively or quantitatively enriching the composition of plant tissues in compounds with potential biological activity. In fact, different species of microorganisms can promote the accumulation of secondary metabolites to a different degree, in the same host plant. This work aims to investigate possible anti-proliferative and anti-inflammatory activities of root and shoot extracts derived from *Lotus japonicus* plants singly inoculated with the rhizobial microsymbiont *Mesorhizobium loti* or doubly inoculated with *M. loti* and the Arbuscular Mycorrhizal Fungus (AMF) *Rhizophagus irregularis*, in the human HEK293 cell line. At the same time, the corresponding biological activities of shoots and roots extracts derived from non-inoculated plants were examined, in order to establish the effect of symbiosis with beneficial microorganisms on the accumulation of bioactive compounds. Firstly, the cytotoxicity of the extracts at increasing concentrations was assessed, where it was shown that root extracts from inoculated plants caused a statistically significant reduction of approximately 40-55%, while extracts of non-inoculated plants reduced cell viability by 12-36%. As for the shoot extracts, they caused a statistically significant reduction in cell viability (by 10-30%), which was, however, less than the reduction caused by the corresponding concentrations of the root extracts, while significant differences in cytotoxicity were not observed between different extracts (derived from treated or untreated plants). Subsequently, the potential anti-inflammatory activity of the plant extracts of interest at a concentration of 40µg/ml was investigated, where a tendency of the plant extracts to decrease the TNF $\alpha$ -induced NF- $\kappa$ B transcriptional activity was observed, although this decrease was not considered statistically significant. Overall, these results may trigger further in vitro or in vivo studies, which could examine the possibility of utilizing the bioactive components of the plant extracts under investigation, in the treatment of diseases, such as cancer and inflammatory diseases.



## 1. Εισαγωγή

### 1.1 Αλληλεπιδράσεις μεταξύ φυτών και μικροοργανισμών

Οι αλληλεπιδράσεις των φυτών με ωφέλιμα μικρόβια, όπως είναι τα ριζόβια και οι ενδομυκορριζικοί μύκητες, καταγράφηκαν για πρώτη φορά περισσότερο από έναν αιώνα πριν. Είναι πανταχού παρούσες και είναι απαραίτητες για την υγεία τόσο των φυτών, όσο και του εδάφους. Στα υπόγεια οικοσυστήματα, πολλές από αυτές τις αλληλεπιδράσεις συμβαίνουν στη ριζόσφαιρα, όπου απαντάται 10-100 φορές περισσότερο μικροβίωμα σε σχέση με το έδαφος εκτός ριζόσφαιρας, λόγω της παροχής άνθρακα (C) από τα φυτά. Οι αλληλεπιδράσεις φυτών-μικροβίων συχνά καταλήγουν σε θετικό αποτέλεσμα όταν τα φυτά συνδέονται με ωφέλιμους μικροοργανισμούς όπως μυκορριζικοί μύκητες, ριζόβια, ενδόφυτα και βακτήρια που προάγουν την ανάπτυξη του φυτού (**Kaur et Suseela, 2021**).

Η συμβίωση μεταξύ φυτών και ωφέλιμων μικροοργανισμών διαδραματίζει σημαντικό ρόλο στη φυτική υγεία, ανάπτυξη και παραγωγικότητα, ενώ επηρεάζει δραστικά τη ρύθμιση της σύνθεσης φυτικών μεταβολιτών (**Zhao et al, 2022**). Αναλυτικότερα, οι μικροοργανισμοί αυτοί ενισχύουν την υγεία των φυτών μέσω της παροχής θρεπτικών συστατικών ή/και της ενίσχυσης της ανοχής σε αβιοτικές και βιοτικές καταπονήσεις με αντάλλαγμα την τροφοδότηση των μικροοργανισμών από τα φυτά με προϊόντα της φωτοσύνθεσης. Οι εν λόγω αλληλεπιδράσεις διαμεσολαβούνται συχνά από μια πληθώρα μεταβολιτών, διευκολύνοντας την αναγνώριση μεταξύ των συμβιωτών, προωθώντας, συγχρόνως, την επιτυχία του αποικισμού και ως εκ τούτου τα οφέλη που αποκομίζουν από τη συμβιωτική σχέση αμφοτέρωι οι οργανισμοί. Το μικροβιακό γονιδίωμα επηρεάζεται από τους μεταβολίτες των φυτών και, αντιστρόφως, το γονιδίωμα του φυτού επηρεάζεται από τους μικροβιακούς μεταβολίτες. Έτσι, η συσχέτιση μεταξύ φυτού και μικροοργανισμού προκαλεί αλλαγές στο μεταγράφομα, στο πρωτέωμα και κατ' επέκταση στο μεταβόλωμα του φυτού και των ωφέλιμων μικροοργανισμών (**Kaur et Suseela, 2021**).

### 1.2 Αλληλεπίδραση μεταξύ ψυχανθών και ριζοβίων

Η οικογένεια των ψυχανθών περιλαμβάνει περίπου 700 γένη με περισσότερα από 18.000 είδη, τα οποία απαντώνται σχεδόν σε κάθε περιβάλλον στη γη (**Desbrosses et al., 2005**). Εκτός από τον βασικό τους ρόλο στη βιομηχανία τροφίμων και στην αειφόρο ανάπτυξη του αγροοικοσυστήματος παγκοσμίως, τα ψυχανθή αποτελούν ένα μοναδικό πρότυπο σύστημα για τη μελέτη των φυτών και των συσχετιζόμενων με αυτά υπόγειων μικροβιακών κοινοτήτων. Αναλυτικότερα, τα ψυχανθή αναγνωρίζονται ως φυτά-πρωτοπόροι, λόγω της ικανότητάς τους να ξεκινούν την ανακύκλωση των θρεπτικών ουσιών σε φτωχά εδάφη χωρίς βλάστηση, μέσω της συμβίωσής τους με μικρόβια του εδάφους (**Graham and Vance 2003**). Πιο συγκεκριμένα, έχουν μια χαρακτηριστική ικανότητα να σχηματίζουν δύο θεμελιωδώς σημαντικές συσχετίσεις με μικρόβια, καθώς αναπτύσσουν τη συμβίωση με ριζόβια, μέσω ριζικών φυματίων, καθώς και τη δενδρόμορφη ενδομυκορριζική συμβίωση (**Parniske 2008**), παράλληλα με ένα ευρύ φάσμα άλλων ενδοφυτικών συσχετισμών (**Ikeda et al. 2010**). Το γεγονός αυτό, σε συνδυασμό με τη διαθεσιμότητα ενδεδειγμένων μελετημένων ψυχανθών φυτών-μοντέλων, καθιστά τα



ψυχανθή εξαιρετικό βιολογικό υλικό για τη μελέτη διαφορετικών αλληλεπιδράσεων που εμφανίζονται ταυτόχρονα στο ίδιο φυτό και στη ριζόσφαιρά του. (Tsiknia et al., 2021)

Το ψυχανθές φυτό-μοντέλο που επιλέχθηκε να χρησιμοποιηθεί για τις πειραματικές ανάγκες της παρούσας πτυχιακής είναι το *Lotus japonicus*. Το *Lotus japonicus* είναι ένα όρθιο ή αναρριχόμενο ποώδες πολυετές φυτό που ανήκει στην υποοικογένεια *Faboideae* των *Fabaceae*. Η πλούσια ταξιανθία αυτού του αυτογόνιμου φυτού φέρει συνήθως δύο μονά άνθη με κίτρινα πέταλα μήκους 8–14 mm. Οι λοβοί των σπόρων περιέχουν έως και 20 οβάλ σπόρους με διαμέτρους 1,0–1,7 μm και βάρη 1,0–1,2 mg. Ένα πλήρως ανεπτυγμένο φυτό έχει κλαδιά μήκους έως 30 cm με πολυάριθμα φύλλα. Ο φυσικός του βιότοπος εκτείνεται από την Κεντρική έως την Ανατολική Ασία και απαντάται συνηθέστερα στην Ιαπωνία, την Κορέα, την Κεντρική και τη Νότια Κίνα μέσω του Νεπάλ, του Κασμίρ και του Πακιστάν. Τα φυτά αναπτύσσονται μη εκλεκτικά ως προς το περιβάλλον τους, σε λιβάδια, βραχώδεις πλαγιές ή παράπλευρα ποτάμια και ρυάκια (Cornara et al., 2016).

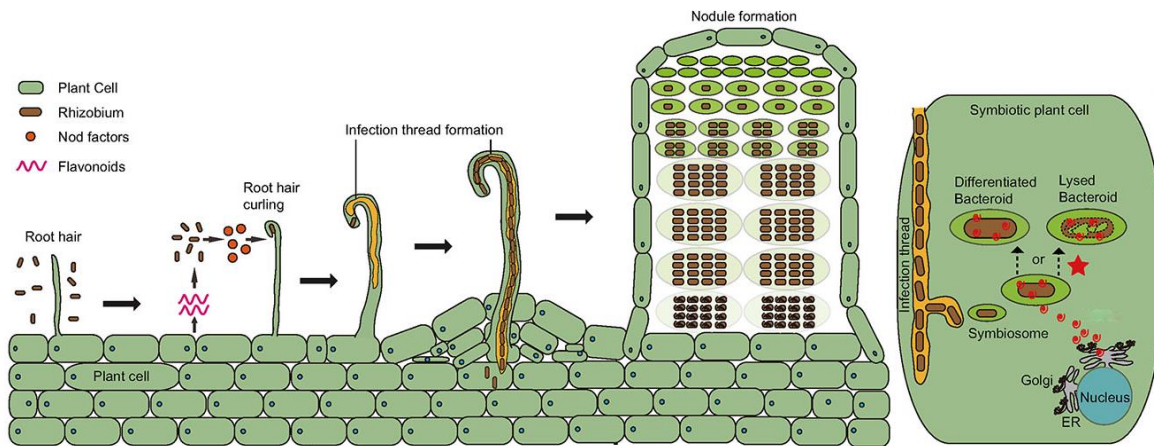
Δύο οικότυποι έχουν καθιερωθεί κυρίως ως οργανισμοί-μοντέλα στην έρευνα: ο Gifu (αριθμός προσχώρησης B-129), που είναι περισσότερο ευαίσθητος σε αβιοτικές καταπονήσεις, όπως η αλκαλικότητα, και ο Miyakojima (αριθμός προσχώρησης MG-20), που είναι πιο ανθεκτικός. Ο οικότυπος Gifu προήλθε από φυτά που συλλέχθηκαν από μια όχθη ποταμού κοντά στην ιαπωνική πόλη Gifu. Χαρακτηρίζεται από μια μικρότερη διάρκεια γενιάς και μια ευδιάκριτα πλούσια ταξιανθία (Cornara et al., 2016).

Η συμβίωση των ψυχανθών με τα βακτήρια του εδάφους του γένους *Rhizobia* αντιπροσωπεύει ένα από τα διασημότερα παραδείγματα αμοιβαίας αλληλεπίδρασης φυτών-μικροοργανισμών, λόγω της συμβολής της στη βιωσιμότητα των γεωργικών συστημάτων, αλλά και στη διατροφή του ανθρώπου. Κατά τη διάρκεια της συμβίωσης, τα ριζόβια δεσμεύουν το ατμοσφαιρικό άζωτο, το οποίο, στη συνέχεια, παρέχουν στο φυτό. Η ποσότητα του δεσμευμένου αζώτου μπορεί συχνά να καλύψει ένα σημαντικό μέρος των αναγκών του φυτού. Επιπλέον, η περίσσεια αζώτου παραμένει στο έδαφος, όντας διαθέσιμο για τις ακόλουθες καλλιέργειες, κυρίως με τη μορφή φυτικών υπολειμμάτων πλούσιων σε N (Tsiknia et al., 2021).

Κάθε αλληλεπίδραση ριζοβίου-φυτού ξενιστή είναι ειδική για τη συσχέτιση και καθορίζει τη συσσώρευση άνθρακα και μεταβολιτών αποθήκευσης ενέργειας στο εσωτερικό των μικροσυμβιωτών (Liu et al., 2020). Αυτή η περίπλοκη αλληλεπίδραση απαιτεί συγκεκριμένη γενετική και μεταβολική επικοινωνία μεταξύ των δύο οργανισμών. Η επικοινωνία αυτή διαμεσολαβείται από την παραγωγή διαφόρων σηματοδοτικών μορίων, τόσο από τα ριζόβια όσο και από το φυτό-ξενιστή, που οδηγεί στην αμοιβαία αναγνώριση και στην εγκαθίδρυση της συμβίωσης (Rispaill et al., 2010).

Κατά την εγκαθίδρυση της συμβιωτικής σχέσης (Εικόνα 1), ριζόβια και ψυχανθή ανταλλάσσουν σηματοδοτικά μόρια, συμπεριλαμβανομένων των φλαβονοειδών, τα οποία απελευθερώνονται στη ριζόσφαιρα από τη ρίζα του φυτού και πυροδοτούν, ακολούθως, την παραγωγή λιποχιτολιγোসακχαριτικών (LCO) παραγόντων φυματογένεσης (παραγόντες Nod) από ριζόβια συμβατά με το συγκεκριμένο φυτό. Η σηματοδότηση των παραγόντων Nod πυροδοτεί έναν καταρράκτη απόκρισης που έχει ως αποτέλεσμα την είσοδο των ριζοβίων στην επιδερμίδα και τον φλοιό της ρίζας μέσω νηματίων μόλυνσης, παράλληλα με τον σχηματισμό ενός πρώιμου φυματίου. Τα φυμάτια είναι πλευρικά ριζικά όργανα όπου τα ριζόβια φιλοξενούνται μεμονωμένα ή σε μικρές ομάδες. Τα ώριμα αζωτοδεσμευτικά φυμάτια

αποτελούνται από πολλά στρώματα μη μολυσμένων φυτικών κυττάρων που περιβάλλουν μια κεντρική ζώνη μολυσμένων και μη μολυσμένων φυτικών κυττάρων. Τα μολυσμένα φυτικά κύτταρα συνήθως περιέχουν χιλιάδες διαφοροποιημένα αζωτοδεσμευτικά ριζόβια, τα οποία ονομάζονται βακτηριοειδή και διαχωρίζονται από το κυτταρόπλασμα, είτε μεμονωμένα είτε σε μικρές ομάδες, από μια ειδική φυτική μεμβράνη που ονομάζεται μεμβράνη του συμβιωσώματος. Τα συμβιωσώματα αποτελούν δομές όπου λαμβάνει χώρα η συμβιωτική αζωτοδέσμευση (Desbrosses et al., 2005).



Εικόνα 1: Σχηματική αναπαράσταση της διαδικασίας της φυματιογένεσης (Wang et al., 2018)

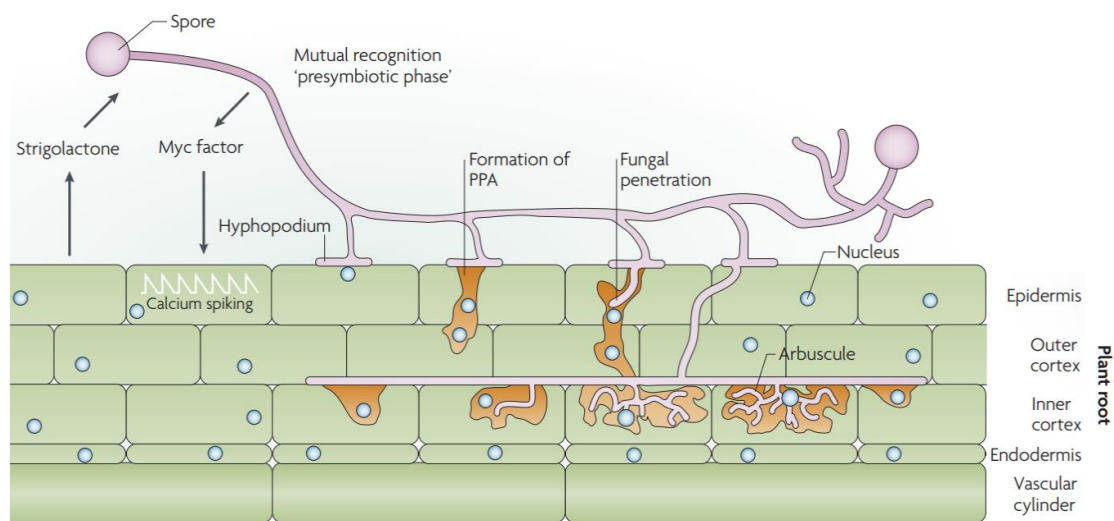
### 1.3 Αλληλεπίδραση μεταξύ φυτών και δενδρόμορφων ενδομυκορριζικών μυκήτων

Οι δενδρόμορφοι ενδομυκορριζικοί μύκητες (ΔΕΜ) μπορούν να χαρακτηριστούν ως πανταχού παρόντες μικροοργανισμοί του εδάφους δεδομένου ότι αναπτύσσουν συμβιωτικές σχέσεις με περισσότερο από το 70% των αγγειωδών φυτών. Ανήκουν στο φύλο των μυκήτων *Glomeromycota* και η συμβίωση τους με τα φυτά είναι η αρχαιότερη αμοιβαία ωφέλιμη συσχέτιση που έχει εξελιχθεί πάνω από 400 εκατομμύρια χρόνια πριν (Kaur et Suseela, 2021). Μελέτες έχουν δείξει ότι οι ΔΕΜ αυξάνουν την ανθεκτικότητα του φυτού σε συνθήκες καταπόνησης, όπως είναι η ξηρασία, η υψηλή αλατότητα, η στέρηση θρεπτικών, οι ακραίες θερμοκρασίες, η έκθεση σε βαρέα μέταλλα, η προσβολή από παράσιτα, καθώς και διάφορες ασθένειες (Zhao et al., 2022).

Σε αντίθεση με τις συμβιωτικές σχέσεις ψυχανθών-ριζοβίων που παρουσιάζουν υψηλή ειδικότητα ξενιστή-μικροσυμβιώτη, οι συσχετίσεις φυτών-ΔΕΜ είναι λιγότερο εξειδικευμένες. Ένα είδος φυτού-ξενιστή μπορεί να συσχετιστεί με διαφορετικά είδη ΔΕΜ και ένα είδος ΔΕΜ μπορεί να συσχετιστεί με πολλά είδη φυτών. Ωστόσο, δεν είναι όλες οι συσχετίσεις φυτών-ΔΕΜ αμοιβαία επωφελείς και η παραγωγικότητα του φυτού-ξενιστή (δηλαδή, το αποτέλεσμα της συσχέτισης) εξαρτάται από την ταυτότητα του ΔΕΜ-συμβιώτη. Αυτό το διαφοροποιημένο αποτέλεσμα της συμβίωσης φυτών-ΔΕΜ θα μπορούσε να οφείλεται σε διαφορές στους γονότυπους των φυτών, στους γονότυπους των ΔΕΜ, καθώς και σε διαφορετικές περιβαλλοντικές συνθήκες. Στην ειδικότητα της συσχέτισης φυτού-μύκητα μπορεί, ακόμη, να συμβάλλει και η διαφορεική ρύθμιση της ποσοτικής και ποιοτικής σύστασης των φυτικών μεταβολιτών από το εκάστοτε είδος φυτού και μύκητα. Διάφοροι μεταβολίτες επηρεάζουν τη συμβιωτική συσχέτιση μεταξύ φυτού και ΔΕΜ, ξεκινώντας από το προ-

συμβιωτικό στάδιο, έως και την εγκαθίδρυση μιας λειτουργικής συμβίωσης. (Kaur et Suseela, 2021)

Κύριο χαρακτηριστικό των ΔΕΜ είναι ο σχηματισμός θυσάνων στο εσωτερικό των κυττάρων του φλοιού των φυτών-ξενιστών. Πρόκειται για λεπτά διακλαδισμένες δομές, όπου λαμβάνει χώρα η αμφίδρομη μεταφορά θρεπτικών στοιχείων, από τα κύτταρα του μύκητα προς τα φυτικά, καθώς και ενώσεων άνθρακα προς την αντίθετη κατεύθυνση. Για την εγκαθίδρυση της συμβίωσης μεταξύ φυτού και ΔΕΜ (Εικόνα 2), κρίνεται απαραίτητη η αμοιβαία αναγνώριση σηματοδοτικών μορίων που παράγονται από αμφοτέρους τους οργανισμούς. Στο πλαίσιο αυτό, ο μύκητας εκκρίνει μίγμα από χιτοολιγοσακχαρίτες και λιποχιτοολιγοσακχαρίτες, οι οποίοι ονομάζονται παράγοντες Myc, ως απόκριση στην απελευθέρωση στριγγολακτονών στο έδαφος από τη ρίζα του φυτού. Μετά την αμοιβαία αναγνώριση των προαναφερθέντων σηματοδοτικών μορίων, οι υφές του ΔΕΜ σχηματίζουν ένα υποπόδιο στη ριζική επιδερμίδα και αποικίζουν τον ριζικό φλοιό (εσωριζικές υφές). Την ίδια στιγμή, μυκητιακές υφές εξαπλώνονται στο περιβάλλον έδαφος με τη μορφή ενός εκτεταμένου εξωριζικού μυκηλίου, το οποίο αντιπροσωπεύει το 9 έως 55% της συνολικής μικροβιακής βιομάζας του εδάφους. (Zhao et al., 2022; Parniske et al., 2008)



**Εικόνα 2:** Τα κύρια στάδια του αποικισμού των ριζών των φυτών από ΔΕΜ (Parniske et al., 2008)

Το εξωριζικό μυκήλιο ενισχύει την πρόσβαση της ρίζας σε νερό και σε μεταλλικά θρεπτικά συστατικά, με συνέπεια την ενίσχυση της φυτικής βιομάζας και της ποιότητας των καρπών. Το σπουδαιότερο όφελος που αποκομίζουν τα φυτά μέσω της συμβίωσής τους με τους ΔΕΜ είναι η μεταφορά θρεπτικών συστατικών και κυρίως φωσφόρου (P), ορισμένης ποσότητας αζώτου (N) και άλλων θρεπτικών συστατικών, όπως ο χαλκός και ο ψευδάργυρος, λόγω του εκτεταμένου δικτύου των μυκητιακών υφών. Η υψηλότερη προμήθεια θρεπτικών συστατικών μέσω του ΔΕΜ αποδίδεται στις λεπτές μυκητιακές υφές τους που εξερευνούν μεγαλύτερο όγκο εδάφους και δύνανται να φτάσουν περιοχές στις οποίες οι ρίζες δεν έχουν πρόσβαση. Εκτός από την αύξηση του όγκου ριζοβολίας, οι ΔΕΜ έχουν την ικανότητα να αποκτούν P από λιγότερο βιοδιαθέσιμα ορυκτά P μέσω χηλίωσης, οξίνισης και ενζυμικής δραστηριότητας (Kaur et Suseela, 2021).

Ο εμβολιασμός με ΔΕΜ μπορεί, ακόμη, να βελτιώσει την υγεία των φυτών ενισχύοντας είτε το αμυντικό σύστημα ολόκληρου του φυτού, γνωστό ως συστημική επίκτητη αντίσταση

(SAR), είτε την επαγόμενη συστημική αντίσταση (ISR), η οποία επιτρέπει την ταχεία απόκριση σε ενδεχόμενη προσβολή από παθογόνο. Ο ΔΕΜ παρέχει, επίσης, προστασία από πολλά φυτοφάγα έντομα και παράσιτα. Η ικανότητα τροποποίησης και καταστολής του συστήματος άμυνας των φυτών μπορεί να ποικίλει ανάλογα με τους γονότυπους φυτών και ΔΕΜ, ενώ μπορεί να επηρεαστεί και από τις εκάστοτε περιβαλλοντικές συνθήκες (**Kaur et Suseela, 2021**). Εκτός από την απόκτηση ορυκτών θρεπτικών συστατικών, οι ΔΕΜ παρέχουν επίσης πρόσθετα οφέλη στο έδαφος, τροποποιώντας τη δομή του και ενισχύοντας, κατ' επέκταση, την ποιότητα και την ευφορία του (**Zhao et al., 2022**).

#### 1.4 Πρωτογενής και δευτερογενής μεταβολισμός των φυτών

Ο πρωτογενής μεταβολισμός αναφέρεται στις αναβολικές και στις καταβολικές διεργασίες που απαιτούνται για την αναπνοή, την αφομοίωση των θρεπτικών ουσιών, την αύξηση και την ανάπτυξη. Αυτές οι διαδικασίες είναι απαραίτητες για τη συντήρηση και τον πολλαπλασιασμό των κυττάρων και εμφανίζονται σε όλα τα φυτικά κύτταρα. Η περίσσεια των πρωτογενών μεταβολιτών (ΠΜ), όπως μονοσακχαρίτες, λιπαρά οξέα, αμινοξέα και οργανικά οξέα του κύκλου των τρικαρβοξυλικών οξέων (TCA), χρησιμοποιούνται ως υποστρώματα στον δευτερογενή μεταβολισμό και μεταβολίζονται ενζυμικά σε δευτερογενείς μεταβολίτες (ΔΜ) (**Ranner et al., 2023**).

Όλα τα αγγειώδη φυτά παράγουν δευτερογενείς μεταβολίτες (ΔΜ), οι οποίοι δεν είναι κρίσιμοι για την ανάπτυξη ή την επιβίωσή τους. Οι ΔΜ παράγονται μόνο σε εξειδικευμένους κυτταρικούς τύπους, ενώ τα όργανα που είναι καθοριστικά για τη βιωσιμότητα ή την αναπαραγωγή του φυτού παράγουν μεγαλύτερες ποσότητες ΔΜ. Οι ΔΜ δεν αποτελούν μέρος του ενεργειακού μεταβολισμού, του αναβολισμού ή του καταβολισμού. Ωστόσο παίζουν κρίσιμο ρόλο στην άμυνα των φυτών έναντι βιοτικών και αβιοτικών παραγόντων καταπόνησης και στην επικοινωνία των φυτών με το περιβάλλον. Επιπλέον, οι ΔΜ είναι απαραίτητοι για την αναπαραγωγή των φυτών, καθώς προκαλούν την έλξη των επικονιαστών είτε ως αρώματα των ανθών είτε ως χρωστικές. Οι ΔΜ εμφανίζονται σε πολύ υψηλή δομική ποικιλομορφία και πολυπλοκότητα, η οποία επίσης εκφράζεται μέσα σε έναν οργανισμό με ιστο-ειδικό ή οργανο-ειδικό τρόπο. Ακόμη και η σύνθεση ΔΜ μέσα σε έναν ιστό ή όργανο ποικίλλει ανάλογα με τον πληθυσμό, το στάδιο ανάπτυξης του οργάνου και, λόγω των κερκαδικών μεταβολικών μονοπατιών, την ώρα της ημέρας. Έχει βρεθεί ότι πολλοί ΔΜ περιορίζονται σε συγκεκριμένες φυτικές οικογένειες και γένη και έχουν εξελιχθεί μέσω προσαρμογής σε οικολογικούς παράγοντες. Για παράδειγμα, σχεδόν αποκλειστικά τα μέλη της οικογένειας *Fabaceae* συνθέτουν ισοφλαβονοειδή (**Ranner et al., 2023**). Παρακάτω περιγράφεται ο ρόλος των κυριότερων ομάδων μεταβολιτών.

Η μεγαλύτερη και πιο ποικιλόμορφη ομάδα δευτερογενών μεταβολιτών είναι τα **τερπενοειδή ή τερπένια**. Πρόκειται για ενώσεις αδιάλυτες στο νερό, οι οποίες έχουν ως πρόδρομα μόρια το ακετυλο-συνένζυμο Α ή ενδιάμεσα προϊόντα της γλυκόλυσης. Ορισμένα τερπένια θεωρούνται πρωτογενείς μεταβολίτες, καθώς διαδραματίζουν σημαντικό ρόλο στην αύξηση και στην ανάπτυξη, ενώ άλλα προστατεύουν τα φυτά από φυτοφάγους οργανισμούς (**Taiz et Zeiger, 2004**). Τα τερπενοειδή συνιστούν τις κύριες βιοδραστικές ενώσεις των αιθέριων ελαίων (EOs). Τα αιθέρια έλαια είναι συμπυκνωμένα και πτητικά λιπόφιλα μείγματα δευτερογενών μεταβολιτών. Πολλές χιλιάδες συστατικών των EO, όπως τα μονοτερπένια

(όπως λιμονένιο, λιναλοόλη, γερανιόλη, νερόλη, τερπινεόλη, κ.λπ.) και τα σεσκιτερπένια (όπως bisabolene, germacrene, humulene, cadinene κ.λπ.), ανήκουν στην οικογένεια των τερπενίων. Τα ΕΟ χρησιμοποιούνται σε πολλές βιομηχανίες, όπως οι βιομηχανίες τροφίμων και φαρμάκων, λόγω τόσο των χαρακτηριστικών γευστικών και αρωματικών ιδιοτήτων τους, αλλά και άλλων βιολογικών δράσεών τους (**Amani Machiani et. al, 2022**).

Τα **καροτενοειδή** ανήκουν στην υποοικογένεια των τερπενοειδών με 40 άτομα άνθρακα και 8 μόρια ισοπρενίου στις δομές τους. Η οδός των καροτενοειδών παίζει σημαντικό ρόλο σε πολλές διαδικασίες των φυτών όπως η φωτοσύνθεση, η φωτοπροστασία, η ορμονική σύνθεση, απελευθέρωση και σηματοδότηση.

Άλλη μια σημαντική ομάδα φυτικών δευτερογενών μεταβολιτών αποτελούν οι **σαπωνίνες**, οι οποίες είναι στεροειδείς τριτερπενικοί γλυκοζίτες. Το όνομά τους προέρχεται από τις σαπωνοειδείς (απορρυπαντικές) τους ιδιότητες. Εμφανίζουν ποικιλία βιολογικών, δραστηριοτήτων, οι οποίες ενδιαφέρουν τους τομείς των φαρμάκων, των καλλυντικών και των τροφίμων (**Taiz et Zeiger, 2004**).

Άλλη μια μεγάλη ομάδα δευτερογενών μεταβολιτών είναι τα **φαινυλοπροπανοειδή**, τα οποία βιοσυντίθεται από το αρωματικό αμινοξύ φαινυλαλανίνη. Χωρίζονται περαιτέρω σε πέντε κύριες ομάδες που περιλαμβάνουν τα φλαβονοειδή, τις μονολιγνόλες, τα φαινολικά οξέα, τα στυλβένια και τις κουμαρίνες. Παίζουν σημαντικό ρόλο στη σηματοδότηση, η οποία είναι σημαντική τόσο για την ανάπτυξη των φυτών όσο και για την άμυνα (**Kaur et Suseela, 2021**). Αναλυτικότερα, οι φαινολικές ενώσεις είναι υπεύθυνες για την προστασία από την υπεριώδη ακτινοβολία, καθώς και από παθογόνα, παράσιτα και αρπακτικά. Ακόμη, παίζουν σημαντικό ρόλο στην πάχυνση του κυτταρικού τοιχώματος, στην ωσμωρρύθμιση, στην παραγωγή ορμονών, στο άρωμα και στην προστασία των φρούτων. (**Amani Machiani et. al, 2022**).

Τα **φλαβονοειδή** είναι μια σημαντική ομάδα ενώσεων στην οδό των φαινυλοπροπανοειδών. Μπορούν να χωριστούν σε φλαβόνες, φλαβονόλες, ανθοκυανίνες και ισοφλαβόνες. Τα φλαβονοειδή παρέχουν χρώμα, άρωμα και γεύση στα φυτά, αναστέλλουν την παραγωγή ROS εξαιτίας βιοτικών ή αβιοτικών καταπονήσεων και ρυθμίζουν τις συσχετίσεις φυτών-συμβιωτών (**Taiz et Zeiger, 2004**). Συνολικά, οι περισσότερες από τις ενώσεις του μονοπατιού των φαινυλοπροπανοειδών παρουσιάζουν αντιοξειδωτικές ιδιότητες, οι οποίες διασφαλίζουν την προστασία των φυτών από ROS. Αυτά τα αντιοξειδωτικά δεν είναι μόνο ευεργετικά για τα φυτά σε συνθήκες καταπόνησης, αλλά παρέχουν, συγχρόνως φαρμακευτικές ιδιότητες στο φυτό.

Τα **αλκαλοειδή** λειτουργούν ως αμυντικές ενώσεις έναντι παθογόνων και αρπακτικών λόγω της τοξικότητά τους. Οι εν λόγω οργανικές ενώσεις, που περιέχουν άζωτο, προέρχονται από την αποκαρβοξυλίωση των αμινοξέων και χωρίζονται, με βάση τα πρόδρομα αμινοξέα τους, σε επτά διαφορετικές ομάδες, συμπεριλαμβανομένων των τροπανίων, των πυρρολιδινών, των πυρρολιζιδινών, των βενζυλισκοκινολινών, των ινδολεκινολινών, των κινολιζιδινών και των πιπεριδινών (**Taiz et Zeiger, 2004**).



## 1.5 Χημική σύσταση εκχυλισμάτων βλαστού και ρίζας *Lotus japonicus* που έχει αποικιστεί από ριζόβια

Ο φυτικός μεταβολισμός στον οργανισμό μοντέλο για τα ψυχανθή *L. japonicus* έχει υποβληθεί σε μελέτη εις βάθος, με σκοπό την καλύτερη κατανόηση των βιοχημικών διεργασιών στα ψυχανθή. Συνολικά, περισσότεροι από 600 μεταβολίτες έχουν ανιχνευθεί στο *Lotus japonicus*, οι οποίοι αποδίδουν μια σφαιρική εικόνα της φυσιολογίας, της απόκρισης σε καταπονήσεις και των περισσότερο μελετημένων έως σήμερα αλληλεπιδράσεων με ωφέλιμα μικρόβια, η συμβίωση με ριζόβια και η συμβίωση με ΔΕΜ (Ranner et al., 2023). Ειδικότερα όσον αφορά τη συμβιωτική αζωτοδέσμευση, απαιτεί τη διαφοροποίηση του μεταβολισμού τόσο του φυτού, όσο και του ριζοβίου-συμβιώτη. (Desbrosses et al., 2005)

### 1.5.1 Πρωτογενείς μεταβολίτες

Η συμβιωτική αζωτοδέσμευση επιδρά στα προϊόντα του πρωτογενούς μεταβολισμού. Αναλυτικότερα, δικαρβοξυλικά οξέα, μηλικό και ηλεκτρικό, που μεταφέρονται μέσω του φλοιώματος, αποτελούν τις κύριες πηγες άνθρακα και ενέργειας για τον μεταβολισμό των φυματίων και για τη συμβιωτική αζωτοδέσμευση (Wekesa et al., 2022)

Οι Colebatch et al. (2004) μελέτησαν το μεταβολικό προφίλ οργάνων φυτών *Lotus japonicus* εμβολιασμένων με το στέλεχος R7A του *Mesorhizobium loti*, χρησιμοποιώντας αέρια χρωματογραφία συζευγμένη με φασματομετρία μάζας (GC-MS). Αναλυτικότερα, δημιούργησαν μια βιβλιοθήκη που περιέχει 6527 ετικέτες φάσματος μάζας (MSTs) προερχόμενες από δύο ανεξάρτητα δείγματα από καθένα από τα ακόλουθα έξι όργανα: πρωτογενείς ρίζες, πλευρικές ρίζες, φυμάτια, αναπτυσσόμενα φύλλα, ώριμα φύλλα και άνθη. Κάθε MST αντιπροσωπεύει έναν μοναδικό μεταβολίτη και το κανονικοποιημένο σήμα που σχετίζεται με κάθε MST αποτελεί μέτρο της σχετικής αφθονίας του αντίστοιχου μεταβολίτη σε ένα βιολογικό δείγμα. Με αυτό τον τρόπο εντοπίστηκαν 85 μη πλεονάζοντα MST, τα οποία αντιπροσωπεύουν 71 μεταβολίτες. Οι μεταβολίτες που προσδιορίστηκαν ήταν κυρίως πρωτογενείς μεταβολίτες που ανήκαν στις εξής κατηγορίες ενώσεων: αμινοξέα, οργανικά οξέα, σάκχαρα, φωσφορικά σάκχαρα, πολυόλες και άλλες αζωτούχες ενώσεις. (Colebatch et al., 2004)

Παρόμοια πειραματική διαδικασία ακολούθησαν και οι Desbrosses et al. (2005). Ειδικότερα, η σύγκριση των ετικετών φάσματος μάζας (MSTs) που προέρχονται από όργανα φυτών *Lotus japonicus*, που είχαν εμβολιαστεί με *M. loti*, με εκείνες των καθαρών ενώσεων αναφοράς επέτρεψε την ταυτοποίηση 87 ενώσεων στα χρωματογραφήματα GC-MS. Αυτές περιελάμβαναν τα περισσότερα από τα κοινά αμινοξέα, καθώς και πολυαμίνες, πολλά οργανικά οξέα, όπως ενδιάμεσα του κύκλου των τρικαρβοξυλικών οξέων και αρωματικά οξέα, σάκχαρα, φωσφορικά σάκχαρα και πολυόλες. (Desbrosses et al., 2005)

### 1.5.2 Δευτερογενείς μεταβολίτες

Η διαδικασία σχηματισμού φυματίων στα ψυχανθή περιλαμβάνει την παραγωγή από το φυτό **φλαβονοειδών, βεταϊνών και αλδονικών οξέων** στα εκκρίματα των σπόρων και της ρίζας, ως σήματα προς το ριζόβιο-συμβιώτη. Αν και τα φαινολικά οξέα είναι οι κύριες πολυφαινόλες που εμπλέκονται, η ρύθμισή τους δεν έχει λάβει την ίδια προσοχή με τα φλαβονοειδή. Μερικές φαινολικές ενώσεις από συμβιωτικά ψυχανθή είναι γνωστές για την προώθηση της ανάπτυξης ριζοβίων βακτηρίων στη ριζόσφαιρα, καθώς και για τη λειτουργία τους ως χημειοτακτικοί

παράγοντες που καθοδηγούν τα ριζοβιακά κύτταρα στα ριζικά τριχίδια των ψυχανθών. Είναι πιθανό τα φλαβονοειδή, όπως και τα φαινολικά οξέα να προστατεύουν τα διαιρούμενα κύτταρα από οξειδωτική βλάβη λόγω της δράσης τους ως αντιοξειδωτικά. (Mandal et al., 2010)

Οι Rispaill et al. (2010) αναζήτησαν αλλαγές στο δευτερογενές μεταβολικό προφίλ των ριζών του *Lotus japonicus* ως απόκριση στη συμβίωση με το ριζόβιο *Mesorhizobium loti*. Η χρωματογραφική ανάλυση του προφίλ δευτερογενών μεταβολιτών της ρίζας, μία εβδομάδα μετά τον εμβολιασμό απέδωσε ένα σύνολο 300–500 μορίων. Δεν υπήρχαν ποσοτικές διαφορές σε σχέση με τα φυτά ελέγχου, αλλά ανιχνεύθηκαν αρκετά νέα αλκαλοειδή και αζωτούχες ενώσεις, μερικές από τις οποίες ταυτοποιήθηκαν. Οι περισσότερες κορυφές που ανιχνεύθηκαν στο χρωματογράφημα αναγνωρίστηκαν ως φλαβονόλες, γλυκοσίδες, κουμεστάνες, χαλκόνες, περοκαρπένια ή πρόδρομες ουσίες φαινολών. Η σύγκριση κάθε φαινολικής κατηγορίας αποκάλυψε ότι οι περισσότερες τάξεις δεν άλλαξαν ποσοτικά από την παρουσία ριζοβιακού στελέχους. Ωστόσο, παρατηρήθηκε μια μικρή, αλλά στατιστικά σημαντική ( $p < 0,001$ ) αύξηση της περιεκτικότητας σε φλαβανόνες. Η μονόδρομη ανάλυση διασποράς (ANOVA) έδειξε ότι 14 από τις 80 ανιχνευθείσες κορυφές ή ομάδες κορυφών επηρεάστηκαν σημαντικά από τον εμβολιασμό. Συνολικά, αυτές οι ποσοτικές αλλαγές προκύπτουν, πιθανώς, από αλληλομετατροπή μεταξύ των φαινολικών τάξεων, δεδομένου ότι τα επίπεδα του ολικού φαινολικού περιεχομένου παρέμειναν σταθερά (Rispaill et al., 2010).

## 1.6 Χημική σύσταση εκχυλισμάτων βλαστού και ρίζας φυτών που έχουν αποικιστεί από ΔΕΜ

Εκτός από τις ενώσεις που παράγονται εξωγενώς για την αμοιβαία αναγνώριση μεταξύ των συμβιωτών κατά το προ-συμβιωτικό στάδιο, η εγκαθίδρυση της μυκορριζικής συμβίωσης έχει επίσης ως αποτέλεσμα τον επαναπρογραμματισμό των πρωτογενών και των δευτερογενών μεταβολικών οδών των φυτών. Η αλλαγή στις μεταβολικές οδούς των φυτών εξαρτάται από τον ΔΕΜ, τα φυτά, το περιβάλλον και τις μεταξύ τους αλληλεπιδράσεις. Η αλλαγή στον φυτικό μεταβολισμό λόγω της συμβιωτικής συσχέτισης με τον ΔΕΜ μπορεί να ποικίλλει ανάλογα με τα διαφορετικά είδη φυτών ή με τον αποικισμό από διαφορετικά είδη ΔΕΜ (Kaur et Suseela, 2021).

Κατά τη συμβίωση φυτού-ΔΕΜ, τα φυτά μεταφέρουν σχεδόν το 4-20% του φωτοσυνθετικά δεσμευμένου άνθρακα στον ΔΕΜ με τη μορφή σακχάρων και λιπιδίων. Η αποστράγγιση από τον ΔΕΜ του προερχόμενου από τη φωτοσύνθεση άνθρακα οδηγεί σε υψηλότερη φωτοσυνθετική δραστηριότητα, ενώ δημιουργεί μια δεξαμενή άνθρακα στις ρίζες. Έτσι, ο μεταβολισμός του άνθρακα είναι συχνά αυξημένος σε φυτά που έχουν εμβολιαστεί με ΔΕΜ, σε σύγκριση με μη εμβολιασμένα φυτά ελέγχου. Επιπλέον, αυτές οι παραλλαγές εξαρτώνται συχνά από το στέλεχος ΔΕΜ και από το φυτικό είδος. Οι αλλαγές στο ριζικό μεταβόλωμα που επάγονται από τον ΔΕΜ μπορούν επίσης να επηρεάσουν τους μεταβολίτες των υπέργειων οργάνων είτε λόγω σηματοδότησης είτε μέσω μεταφοράς (Kaur et Suseela, 2021).

### 1.6.1 Πρωτογενείς μεταβολίτες

Προηγούμενες μελέτες έχουν αποκαλύψει ότι τα φυτά που συμβιώνουν με ΔΕΜ διαφέρουν σημαντικά από τα μη εμβολιασμένα φυτά, όσον αφορά τη σύσταση των πρωτογενών μεταβολιτών όπως **σάκχαρα**, **οργανικά οξέα** και **αμινοξέα**. Αναλυτικότερα, τα σάκχαρα



αποτελούν σημαντικούς ρυθμιστές στη συμβιωτική συσχέτιση φυτού-ΔΕΜ, καθώς συγκαταλέγονται μεταξύ των κύριων πηγών παροχής άνθρακα από τα φυτά στους ΔΕΜ. Καθώς οι αλληλεπιδράσεις φυτού-ΔΕΜ είναι εξαιρετικά λειτουργικές υπό χαμηλή διαθεσιμότητα θρεπτικών ουσιών, παρατηρείται υψηλότερη περιεκτικότητα σε σάκχαρα στα φυτά κάτω υπό συνθήκες ανεπάρκειας φωσφόρου. Εκτός από τα σάκχαρα, ο ΔΕΜ επηρεάζει επίσης τον κύκλο των τρικαρβοξυλικών οξέων (TCA). Ο κύκλος των TCA και τα ενδιάμεσά του, στα οποία περιλαμβάνονται το κιτρικό οξύ, το μηλικό οξύ, το φουμαρικό οξύ και το ηλεκτρικό οξύ είναι σημαντικά για την κυτταρική αναπνοή και για τη σύνθεση τριφωσφορικής αδενοσίνης (ATP), γεγονός που βοηθά το φυτό στην ανάπτυξή του, καθώς και στην ανοχή του σε δυσμενείς συνθήκες στρες. Τα αμινοξέα, τα δομικά στοιχεία των πρωτεϊνών και των ενζύμων, δρουν επίσης ως σηματοδοτικά μόρια, ρυθμίζοντας την απόκριση σε περιβαλλοντικό καταπονήσεις στα φυτά. Τα αμινοξέα μπορούν να ληφθούν απευθείας μέσω του ΔΕΜ από το έδαφος, ενώ μπορούν επίσης να συντεθούν από σπόρια του ΔΕΜ χρησιμοποιώντας N από το έδαφος. Η πρόσληψη αμινοξέων από το έδαφος είναι υψηλότερη σε φυτά που συμβιώνουν με ΔΕΜ σε σύγκριση με μη μυκορριζικά φυτά. Προηγούμενες μελέτες έχουν αναφέρει αυξημένη, μειωμένη ή και καμία διακύμανση ως προς την περιεκτικότητα σε αμινοξέα στα φυτά, κατά τον αποικισμό από ΔΕΜ. Η μεταβλητή συσσώρευση των αμινοξέων σε διάφορες μελέτες ενδέχεται να αποτελεί συνάρτηση του φυτικού είδους, του μυκητιακού γονότυπου, καθώς και των περιβαλλοντικών συνθηκών (Kaur et Suseela, 2021).

Οι Fester et al. (2011) προσδιόρισαν το μεταβολικό προφίλ των ανθών και των φύλλων από φυτά *Lotus japonicus* εμβολιασμένα με τον ΔΕΜ *Glomus mosseae*, καθώς και από φυτά ελέγχου, με αποτέλεσμα την ανίχνευση 70-100 μεταβολιτών συνολικά, από τους οποίους ταυτοποιήθηκαν οι 30-40. Οι μεταβολικές αλλαγές που προσδιορίστηκαν αφορούν, κυρίως, μια μείωση των οργανικών οξέων που συνδέονται με κεντρικές καταβολικές οδούς (όπως μηλικό οξύ, κιτρικό οξύ, ηλεκτρικό οξύ), τον μεταβολισμό των αμινοξέων (όπως γλουταμικό οξύ, ασπαρτικό οξύ, γλυκίνη, ασπαραγίνη, προλίνη, τρυπτοφάνη, 4-αμινοβουτανοϊκό οξύ, 2-μεθυλο-μηλικό οξύ), τον μεταβολισμό των λιπαρών οξέων (οκταδεκανοϊκό και εξαδεκανοϊκό οξύ), τον μεταβολισμό των υδατανθράκων (ριβονικό οξύ) ή τον μεταβολισμό του ασκορβικού οξέος (θρεονικό οξύ). Ενώ υπάρχουν διαφορές μεταξύ των επιμέρους οργάνων, αυτή η γενική τάση ισχύει για όλα τα όργανα που αναλύθηκαν. Επιπλέον, παρατηρήθηκε αύξηση στις συγκεντρώσεις σακχάρων (φρουκτόζη, αλτρούζη, γαλακτόζη, τρεχαλόζη) και αλκοολών σακχάρων (ξυλιτόλη, μυο-ινοσιτόλη), ενώ ειδικότερα όσον αφορά τα φύλλα, παρουσίασαν επιπλέον μια μείωση στα επίπεδα των φωσφορικών, αλλά και των πολυολών D-πινιτόλη και ονονιτόλη (Fester et al., 2011).

### 1.6.2 Δευτερογενείς μεταβολίτες

Παρόμοια με τους πρωτογενείς μεταβολίτες, ο ΔΕΜ επηρεάζει επίσης διάφορους δευτερογενείς μεταβολίτες. Ο αποικισμός από ΔΕΜ επιδρά στην παραγωγή δευτερογενών μεταβολιτών είτε άμεσα, αυξάνοντας τη φυτική βιομάζα, είτε έμμεσα, ενεργοποιώντας βιοσυνθετικά μονοπάτια δευτερογενών μεταβολιτών. Η έκταση αυτής της επίδρασης εξαρτάται από τον γονότυπο του φυτού, το στέλεχος ΔΕΜ, αλλά και το περιβαλλοντικό πλαίσιο (φως, χρόνος συγκομιδής) (Zhao et al., 2022). Στη συμβίωση φυτού-ΔΕΜ, οι δευτερογενείς μεταβολίτες μεσολαβούν στις αλληλεπιδράσεις μεταξύ των δύο συμβιωτών, ξεκινώντας από τη φάση της αναγνώρισης έως και τον αποικισμό και την περαιτέρω εγκαθίδρυση του ΔΕΜ εντός του ιστού της ρίζας. Η επαγόμενη από τον ΔΕΜ προστασία του

φυτού έναντι βιοτικών και αβιοτικών καταπονήσεων διαμεσολαβείται από την παραγωγή αρκετών δευτερογενών μεταβολιτών. (Kaur et Suseela, 2021)

Εκτός από τα θετικά αποτελέσματα που αφορούν την πρόσληψη θρεπτικών ουσιών και νερού, την αύξηση της παραγωγικότητας, της ποιότητας των καλλιεργειών, της γονιμότητας του εδάφους και της ανοχής στις συνθήκες καταπόνησης, η συμβιωτική συσχέτιση ΔΕΜ-φυτών έχει επίσης θετικά αποτελέσματα στην ποσότητα και την ποιότητα των δευτερογενών μεταβολιτών των φαρμακευτικών και αρωματικών φυτών. Αξίζει να σημειωθεί ότι τα θεραπευτικά αποτελέσματα των φαρμακευτικών και αρωματικών φυτών αποδίδονται στην ύπαρξη βιοδραστικών συστατικών που ανήκουν στον δευτερογενή μεταβολισμό, όπως τερπενοειδή, φλαβονοειδή, φαινολικά, αλκαλοειδή, γλυκοσίδες, τανίνες κ.λπ. (Amani Machiani et. al, 2022).

Αρκετές μελέτες έχουν αναφέρει ότι ο εμβολιασμός με ΔΕΜ βελτιώνει την ποσότητα και την ποιότητα των αιθέριων ελαίων. Για παράδειγμα, η περιεκτικότητα σε **τερπενοειδή** (οξικό γερανυλεστέρα, θυμόλη, p-κυμένιο, βορνεόλη και τρανς-καρνοφυλλένιο) στο αιθέριο έλαιο μαύρου κύμινου αυξήθηκαν κατά 42,39%, 16,68%, 6,80%, 46,11% και 26,54% μετά τον εμβολιασμό με μείγμα *Funneliformis mosseae* + *Rhizophagus irregularis* (Rezaei-Chiyaneh et. al, 2021).

Ακόμη, κάποιες από τις ενώσεις που προέρχονται από την **οδό των καροτενοειδών** καθίστανται βασικοί ρυθμιστές της συμβίωσης με ΔΕΜ. Οι στριγγολακτόνες, τα σημαντικά σηματοδοτικά μόρια που ξεκινούν τη συμβίωση με ΔΕΜ, είναι φυτικές ορμόνες που συντίθενται μέσω της οδού των καροτενοειδών, υπό συνθήκες χαμηλής διαθεσιμότητας ανόργανου Ρ. Οι στριγγολακτόνες πυροδοτούν πολλαπλές αποκρίσεις στον ΔΕΜ όπως η εκβλάστηση σπορίων, η επιμήκυνση υφών και ο σχηματισμός υποποδίων. Μετά τον αποικισμό, ο ΔΕΜ με τη σειρά του επηρεάζει την οδό των καροτενοειδών, προκαλώντας την παραγωγή άλλων αποκαροτενοειδών όπως η μυκορραδικίνη και τα παράγωγα της κυκλοεξανόνης, τα οποία είναι σημαντικά για την εγκαθίδρυση και τη διατήρηση της συμβίωσης με τον ΔΕΜ. Μεταξύ των παραγώγων κυκλοεξανόνης, τα πιο άφθονα είναι οι μονο-, οι δι- και οι διακλαδισμένες τριγλυκοσίδες των μπλουμενολών. Μπλουμενόλες που παράγονται στις ρίζες βρέθηκαν να μεταφέρονται περαιτέρω στα υπέργεια όργανα των φυτών και θεωρούνται ως βιοδείκτες αποικισμού από ΔΕΜ για τους βλαστούς. Η συσσώρευση αυτών των παραγώγων κυκλοεξανόνης παρατηρήθηκε σε διαφορετικά είδη φυτών με διαφορετικά είδη ΔΕΜ, αλλά η ποσότητα τους διέφερε μεταξύ των ειδών ΔΕΜ. Επιπλέον, τα αποκαροτενοειδή παρατηρείται ότι είναι πολύ άφθονα στις αποικισμένες από ΔΕΜ ρίζες των περισσότερων ειδών φυτών. Αυτά τα αποκαροτενοειδή μπορεί να εμπλέκονται στη σύνθεση σηματοδοτικών μορίων, την αυτορρύθμιση του αποικισμού των μυκήτων και την προστασία των φυτών από παθογόνα και ROS. Η βιοσύνθεση καροτενοειδών ενεργοποιείται σχεδόν σε όλα τα μυκορριζικά φυτά και έτσι μπορεί να θεωρηθεί ως γενικό χαρακτηριστικό των μυκορριζικών φυτών. Η οδός των καροτενοειδών έχει διαφορετική εφαρμογή στη συμβίωση με ΔΕΜ ως πηγή μορίων σηματοδότησης κατά το προ-συμβιωτικό στάδιο, δεικτών αποικισμού από ΔΕΜ τόσο στη ρίζα όσο και στο βλαστό μετά την εγκαθίδρυση της συμβίωσης και ως σημαντικές ενώσεις που μεσολαβούν στην έμμεση εκκίνηση του αμυντικού συστήματος (Kaur et Suseela, 2021).

Επιπροσθέτως, μελέτες έχουν αναφέρει την αύξηση της περιεκτικότητας σε **σαπωνίνες** μετά τον αποικισμό ΔΕΜ σε φυτά ξενιστές. Για παράδειγμα, τα γλυκοζυλιωμένα τριτερπενοειδή ενισχύθηκαν ραγδαία στους βλαστούς φυτών *Anchusa officinalis*, μετά από εμβολιασμό με τον ΔΕΜ *Rhizophagus irregularis*. (**Amani Machiani et al, 2022; Zeng et al., 2013**)

Όπως και οι προαναφερθέντες δευτερογενείς μεταβολίτες, οι ενώσεις του μονοπατιού των **φαινυλοπροπανοειδών** υφίσταται σημαντικό επαναπρογραμματισμό κατά τη συμβίωση φυτού-ΔΕΜ. Ο ΔΕΜ προκαλεί μια αλλαγή τόσο στην αφθονία όσο και στη σύνθεση διαφορετικών δευτερογενών φυτικών μεταβολιτών για να εξασφαλιστεί ο αποικισμός και η εγκαθίδρυσή του στα φυτά.

Πιο συγκεκριμένα, τα **φλαβονοειδή** διαδραματίζουν ουσιαστικό ρόλο στην έναρξη και τον περιορισμό του αποικισμού. Τα φλαβονοειδή είναι σημαντικά για την ανάπτυξη των μυκητιακών υφών και η δράση τους ποικίλλει ανάλογα με τη χημική τους σύνθεση. Διαφορετικά φλαβονοειδή μπορεί να έχουν ποικίλες επιδράσεις στον αποικισμό από διαφορετικά είδη ΔΕΜ. Η βιοσύνθεση των φλαβονοειδών αυξορρυθμίζεται στα φύλλα των μυκορριζικών φυτών. Τα φλαβονοειδή, και συγκεκριμένα η φορμονονετίνη και η ονονίνη, έχουν ουσιαστικό ρόλο στην αυτορρύθμιση της συμβιωτικής σχέσης, περιορίζοντας τον αποικισμό του ΔΕΜ στο φυτό, αφού φτάσει σε έναν ουδό. Είναι αξιοσημείωτο δε, ότι αυξημένα επίπεδα ορισμένων φλαβονοειδών σε μυκορριζες, όπως η φορμονονετίνη, η μηλονυλο-γλυκοσίδη (FGM), η μεντικαρπίνη μαλονυλ-γλυκοσίδη (MGM), η διαζεΐνη και η κουμεστρόλη ενισχύουν την ικανότητα των μυκορριζικών φυτών να αντιστέκονται σε καταπονήσεις.

Εκτός από τα φλαβονοειδή, άλλα **φαινολικά οξέα** δρουν επίσης ως σηματοδοτικές ενώσεις στις φυτικές-μικροβιακές αλληλεπιδράσεις, αλλά και ως αντιοξειδωτικές ενώσεις που προστατεύουν τα φυτά από πολλές συνθήκες καταπόνησης. Η υψηλότερη αφθονία φαινολικών οξέων αντανακλά επίσης την καλύτερη ποιότητα των φυτικών προϊόντων. Επιπλέον, διαφορετικά φαινολικά οξέα ποικίλλουν σε αφθονία στο ίδιο φυτό. Η υψηλότερη αφθονία φαινολικών οξέων στα μυκορριζικά φυτά αντικατοπτρίζει την ενίσχυση του αμυντικού συστήματος του φυτού, το οποίο είναι σε θέση να προστατεύει περαιτέρω το φυτό από παθογόνα. Επιπλέον, διαφορετική συγκέντρωση στα μυκορριζικά φυτά έχουν δείξει και διάφορα παράγωγα των φαινολικών οξέων (**Kaur et Suseela, 2021**).

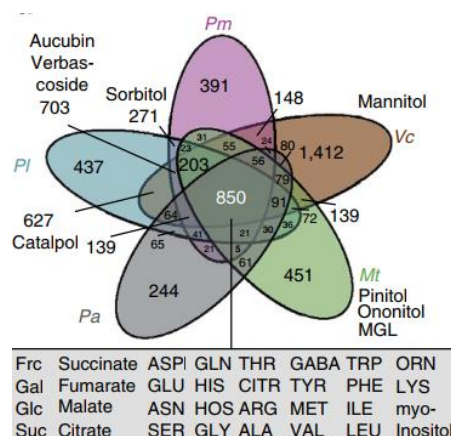
Μάλιστα, έχει βρεθεί ότι οι ΔΕΜ αυξάνουν τη συσσώρευση αντιοξειδωτικών ενώσεων του μονοπατιού των φαινυλοπροπανοειδών στα φυτά. Αυτή η αύξηση στην παραγωγή των αντιοξειδωτικών θα μπορούσε εν μέρει να αποδοθεί στα έμμεσα οφέλη που παρέχει ο ΔΕΜ, συμπεριλαμβανομένων της πρόσληψης θρεπτικών συστατικών (κυρίως P) και εν μέρει στην άμεση αλληλεπίδραση του ΔΕΜ με το φυτό, υπό μια σειρά περιβαλλοντικών συνθηκών, όπως είναι οι συνθήκες χαμηλής διαθεσιμότητας νερού. Διαφορετικά είδη ΔΕΜ μπορούν να διαδραματίσουν ξεχωριστό ρόλο στην αύξηση της παραγωγή αυτών των φαρμακευτικών ενώσεων. Διαφορές στη συσσώρευση των φαινολικών και φλαβονοειδών σε διάφορα είδη φυτών από διαφορετικά είδη ΔΕΜ δείχνει υψηλή ειδικότητα ως προς το αποτέλεσμα της συμβιωτικής συσχέτισης φυτού-ΔΕΜ. Ωστόσο, οι μηχανισμοί που κρύβονται πίσω από την υψηλότερη ειδικότητα στο αποτέλεσμα αυτής της συσχέτισης δεν έχουν διερευνηθεί επαρκώς. (**Kaur et Suseela, 2021**)

Ακόμη, πολυάριθμες προηγούμενες μελέτες ανέφεραν την αύξηση της περιεκτικότητας σε αλκαλοειδή μετά τον εμβολιασμό με ΔΕΜ (Amani Machiani et. al, 2022; Zeng et al., 2013).

Οι Hill et al. (2018) διερεύνησαν το αντίκτυπο του αποικισμού από τον ΔΕΜ *Rhizopagus irregularis* στο μεταβολικό προφίλ τόσο των υπέργειων, όσο και των υπόγειων ιστών στο φυτό-ξενιστή *Senecio jacobaea*. Στο πλαίσιο αυτό, χρησιμοποίησαν μια μη στοχευμένη μεταβολομική προσέγγιση, για να ταυτοποιήσουν ενώσεις που επάγονται κατά τον αποικισμό από τον ΔΕΜ, τόσο στις ρίζες, όσο και στους βλαστούς. Η μεταβολομική ανάλυση αποκάλυψε ότι 33 ενώσεις αυξήθηκαν σημαντικά στον ριζικό ιστό των αποικισμένων από τον ΔΕΜ φυτών, συμπεριλαμβανομένων επτά μπλουμενολών, ενώσεων φυτικής προέλευσης που είναι γνωστό ότι σχετίζονται με τον αποικισμό του ΔΕΜ. Το εύρος αύξησης της συγκέντρωσης των 33 μεταβολιτών που συσχετίστηκε με τις ρίζες που είχαν αποικιστεί από τον ΔΕΜ κυμάνθηκε από δύο έως πολλές χιλιάδες. Επιπλέον, τα αλκαλοειδή πυρρολιζιδίνης (PAs), οι βασικές ενώσεις άμυνας του εν λόγω φυτού κατά των φυτοφάγων, κυριάρχησαν στα μεταβολομικά προφίλ των εκχυλισμάτων της ρίζας και των βλαστών. Οι αναλύσεις των μεταβολικών προφίλ αποκάλυψαν αύξηση σε τέσσερις PAs στις ρίζες (αλλά όχι στους βλαστούς) των φυτών που αποικίστηκαν από τον ΔΕΜ.

Μία από τις επαγόμενες από τον ΔΕΜ μπλουμενόλες ήταν συζευγμένη με μία μονάδα μηλονυλο-σακχάρου και γλυκουρονικού οξέος, ένας συνδυασμός που δεν έχει καταγραφεί ποτέ στο παρελθόν. Ειδο-ειδικοί μεταβολίτες μπλουμενόλης έχουν παρατηρηθεί σε μια σειρά φυτικών τάξεων και έχουν προταθεί ως μηχανισμός αναγνώρισης μεταξύ των ειδών ΔΕΜ και του φυτού ξενιστή. Μέχρι στιγμής, μόνο μερικά άλλα είδη φυτών, είχαν εξεταστεί με μια μη στοχευμένη μεταβολομική προσέγγιση, όσον αφορά την απόκριση του ριζικού τους ιστού στον αποικισμό από τον ΔΕΜ. Μέχρι να εξεταστεί μια ευρύτερη ποικιλία συνδυασμών ειδών φυτών-ΔΕΜ, είναι πολύ νωρίς για να συμπεράνουμε εάν υπάρχει ειδο-ειδική σηματοδότηση στις αλληλεπιδράσεις φυτών-ΔΕΜ. (Hill et al., 2018)

Είναι αξιοσημείωτο, ωστόσο, ότι μια άλλη μελέτη, η οποία συνέκρινε τον αντίκτυπο του ΔΕΜ *Rhizopagus irregularis* στον μεταβολισμό των φύλλων πέντε διαφορετικών ειδών φυτών ανέδειξε ότι οι μεταβολικές αλλαγές που σχετίζονται με το είδος μετά τον αποικισμό υπερέβαιναν κατά πολύ τις πιο γενικές αποκρίσεις που είναι κοινές σε όλα τα είδη φυτών (Εικόνα 3). Επομένως, εκκρεμεί η αποκρυπτογράφηση του μεταβολικού προφίλ περισσότερων ειδών φυτών που συμβιώνουν με ΔΕΜ, ώστε να ανακαλυφθούν πιθανοί ειδο-ειδικοί μεταβολίτες με ενδεχόμενη βιολογική δράση φαρμακολογικού ενδιαφέροντος (Schweiger et al. 2014).



**Εικόνα 3:** Τα φυτικά είδη διαφέρουν ως προς τα μεταβολώματα των βλαστών τους, κατά τον αποικισμό από ΔΕΜ. Αριθμοί των μεταβολικών χαρακτηριστικών που εμφανίζονται και επικαλύπτονται στο Pl (*Plantago lanceolata*), Pm (*Plantago major*), Vc (*Veronica chamaedrys*), Mt (*Medicago truncatula*) και Pa (*Poa annua*) με τη μορφή διαγράμματος Venn. Ορισμένα από τα αναγνωρισμένα χαρακτηριστικά επισημαίνονται. (Schweiger et al. 2014)

Οι Cartabia et al. (2021) διεξήγαγαν δύο ανεξάρτητα πειράματα συμβίωσης του *A. officinalis* με τον ΔΕΜ *Rhizophagus irregularis*, στέλεχος MUCL 41833, σε σύστημα ημι-υδροπονικής καλλιέργειας. Τα πειράματα αποσκοπούσαν στη διερεύνηση της περιεκτικότητας σε πρωτογενείς και δευτερογενείς μεταβολίτες (ΠΜ και ΔΜ, αντίστοιχα) των βλαστών, των ριζών και των εκκριμάτων μυκορριζικών (Μ) και μη μυκορριζικών (ΝΜ) φυτών που αναπτύχθηκαν για 9 ή για 30 ημέρες. Οι διαφορές σε ΠΜ και ΔΜ εκτιμήθηκαν με μια μη στοχευμένη μεταβολομική προσέγγιση υγρής χρωματογραφία υπερυψηλής απόδοσης συζευγμένη με φασματομετρία μάζας υψηλής ευκρίνειας, σε συνδυασμό με μια πολυπαραγοντική ανάλυση δεδομένων. Παρατηρήθηκε μια ισχυρή ανοδική ρύθμιση 10 PM (συμπεριλαμβανομένων οργανικών οξέων και των αμινοξέων) και 23 ΔΜ (μεταξύ των οποίων φαινολικές ενώσεις που προέρχονται από την οδό των φαινυλπροπανοειδών, παράγωγα του καφεϊκού οξέος, τέσσερις τύποι σαπωνινών, η κουμαρίνη σκοπαρόνη και η φουρανοκουμαρίνη byakangelicin) στα εκκρίματα των μυκορριζικών φυτών. Επιπροσθέτως, δύο νέα Β παράγωγα σαλβιανολικού οξέος και ένα νέο παράγωγο ροσμαρινικού οξέος, τα οποία παρουσιάζουν κοινό μοτίβο υποκατάστασης (μεθυλίωση σε C-9" και C-9' και υδροξυλίωση στο C-8), ανιχνεύθηκαν στις ρίζες των μυκορριζικών φυτών. Η συσσώρευση διαφορετικών ενώσεων που παρατηρείται σε αποικισμένα φυτά έδειξε ότι οι ΔΕΜ έχουν τη δυνατότητα να επηρεάσουν συγκεκριμένες βιοσυνθετικές οδούς των φυτών. (Cartabia et al., 2021)

Γενικά, ενώ η συμβίωση με ΔΕΜ μπορεί να αυξήσει σημαντικά το περιεχόμενο ορισμένων δευτερογενών μεταβολιτών των φαρμακευτικών φυτών, δεν είναι σαφές κατά πόσο αλλάζει ποιοτικά τη σύσταση των φαρμακευτικών φυτών σε δευτερογενείς μεταβολίτες. Μάλιστα, μελέτες έχουν δείξει ότι η παραγωγή δευτερογενών μεταβολιτών σε διαφορετικά μέρη ενός φαρμακευτικού φυτού μπορεί είτε να ενισχυθεί, είτε να μειωθεί, ανάλογα με τον μύκητα ΔΕΜ με τον οποίο συμβιώνει. Πολλές έρευνες έχουν υποστηρίξει ότι ο βαθμός επιρροής διαφορετικών μυκήτων ΔΕΜ στο ίδιο φαρμακευτικό φυτό, ή του ίδιου μύκητα ΔΕΜ σε διαφορετικά φαρμακευτικά φυτά, μπορεί να διαφέρει. Δεδομένου ότι διαφορετικοί μύκητες ΔΕΜ μπορούν να προάγουν τη συσσώρευση δευτερογενών μεταβολιτών σε διαφορετικό βαθμό σε κάθε είδος φαρμακευτικού φυτού, απαιτείται έλεγχος μεγάλης κλίμακας μιας σειράς μυκήτων ΔΕΜ, προκειμένου να εντοπιστεί ένα ιδανικό στέλεχος (Zeng et al., 2013).

### 1.7 Βιολογικές δράσεις εκχυλισμάτων από φαρμακευτικά φυτά

Τα φαρμακευτικά φυτά έχουν αξιοποιηθεί από την αρχαιότητα ως πηγή φαρμακευτικών παραγόντων για τη θεραπεία της ασθένειας και της αδιαθεσίας. Σήμερα, εξακολουθούν να αποτελούν πηγή άντλησης βιοδραστικών ουσιών για την ανάπτυξη νέων φαρμάκων (π.χ. αντικαρκινικά). Η θεραπευτική τους αξία αποδίδεται στην παρουσία πληθώρας δραστικών συστατικών που ανήκουν στον δευτερογενή μεταβολισμό, όπως αλκαλοειδή, φλαβονοειδή, τερπενοειδή και φαινόλες. Είναι αξιοσημείωτο πως στις αναπτυσσόμενες χώρες, περισσότερο



από το 80% των ανθρώπων είναι πλήρως εξαρτώμενοι από φάρμακα βοτάνων για την πρωτογενή υγειονομική του περίθαλψη, ενώ, όσον αφορά τις ανεπτυγμένες χώρες, περισσότερο από το 25% των συνταγογραφούμενων φαρμάκων προέρχονται από φυτά αγρίου τύπου (Kaur and Suseela, 2020).

Στα πλεονεκτήματα της αξιοποίησης ουσιών προερχόμενων από φαρμακευτικά φυτά για τη θεραπεία ασθενειών συμπεριλαμβάνονται η ευρεία πολιτιστική τους αποδοχή, η υψηλή συμβατότητα και προσαρμοστικότητα με το ανθρώπινο σώμα, σε σύγκριση με τα συνθετικά χημικά (Kaur and Suseela, 2020). Η κατανόηση των βιολογικών δράσεων των φυτικών φαρμάκων σε διάφορους στόχους έρχεται με τη βοήθεια της σύγχρονης βιομοριακής επιστήμης, μέσω της οποίας ανιχνεύονται ορισμένες σημαντικές ιδιότητες, και κυρίως αντικαρκινικές, αντιφλεγμονώδεις και αντι-ιικές (Khan et al., 2019).

### 1.7.1 Ψυχανθή φυτά

Όσον αφορά τις βιολογικές δράσεις των φυτών της οικογένειας *Fabaceae*, διάφορα κτηνοτροφικά ψυχανθή έχουν παγιωμένη παράδοση στη λαϊκή ιατρική. Ως εκ τούτου, δεδομένου ότι αυτά τα φυτά είναι ευρέως διαδεδομένα και εκτεταμένα καλλιεργημένα, φαίνεται να αντιπροσωπεύουν έναν υποεκμεταλλεζόμενο, δυνητικά σημαντικό πόρο για την εξαγωγή θρεπτικών ουσιών και φαρμακολογικά δραστικών συστατικών. Δύο ευρέως συνταγογραφούμενα φάρμακα έχουν αναπτυχθεί προερχόμενα από κτηνοτροφικά ψυχανθή και συγκεκριμένα, η αντιθρομβωτική βαρφαρίνη, εμπνευσμένη από την κουμαρίνη του γλυκού τριφυλλιού, και η αντιδιαβητική μετοφορμίνη, ένα παράγωγο της γουανιδίνης (Cornara et al., 2016).

Μεταβολίτες του ψυχανθούς *Medicago sativa* ενδέχεται να έχουν αντιπολλαπλασιαστική δράση και να μπορούν να αξιοποιηθούν για τη θεραπεία ορμονο-εξαρτώμενων και άλλων τύπων καρκίνου (Cornara et al., 2016). Μια βιοκατευθυνόμενη κλασμάτωση του εκχυλίσματος τολουολίου από τα φύλλα του *Medicago sativa* έχει οδηγήσει στην ανίχνευση τερπενοειδών και φλαβονοειδών-μεταξύ των οποίων οι medicarpin, melilotocarpan E, milleripuran, triclin, και chrysoeriol-με κυτταροτοξικές επιδράσεις στη λευχαιμική κυτταρική σειρά P388 και στην αντίστοιχη P388/DOX που είναι ανθεκτική στη δοξορουβικίνη (Gatouillat et al., 2014).

Μια μελέτη *in vitro* ανέφερε αντιπολλαπλασιαστικές δράσεις των ισοφλαβονών του κόκκινου τριφυλλιού (*Trifolium pratense*) σε συνολικά 11 ανθρώπινες καρκινικές κυτταρικές σειρές, που αντιπροσωπεύουν καρκίνους του παχέος εντέρου, του προστάτη, του μαστού, του τραχήλου της μήτρας, του ήπατος, του παγκρέατος, του στομάχου και των ωοθηκών, με τη γενιστεΐνη να δείχνει ισχυρότερη δραστηριότητα (Reiter et al., 2011). Ακόμη, ένα εκχύλισμα κόκκινου τριφυλλιού βρέθηκε να αναστέλλει την ενεργοποίηση και τον πολλαπλασιασμό των λεμφοκυττάρων ποντικού, υποδηλώνοντας πιθανή καταπράυνση της φλεγμονής (Yang et al., 2008). Λοσιόν που περιέχουν το ισοφλαβονοειδές γενιστεΐνη και τους μεταβολίτες της, equol, isoequol και dehydroequol, έχει αποδειχθεί ότι μειώνουν το φλεγμονώδες οίδημα που προκαλείται από προσομοίωση ηλιακής ακτινοβολίας UV στο δέρμα άτριχων ποντικών, υποδεικνύοντας μια πιθανή κερδοφόρα χρήση αυτής της ένωσης σε αντιηλιακά προϊόντα δέρματος (Widyarini et al., 2001).

Το κίτρινο γλυκό τριφύλλι (*Melilotus officinalis*) χρησιμοποιείται στο δέρμα ως αποσυμφορητικό, στυπτικό, και καταπραϊντικό, λόγω των φλεβολογικών και των αντιφλεγμονώδων ιδιοτήτων του (Cornara et al., 2016). Αναλυτικότερα, έχουν παρατηρηθεί αντιφλεγμονώδεις δράσεις που αποδίδονται στην κουμαρίνη σε αρουραίους και κουνέλια (Foldi-Borcsok et al., 1971; Plesca Manea et al., 2002). Στο πλαίσιο αυτό, διάφορα φαρμακευτικά προϊόντα έχουν αναπτυχθεί από εκχυλίσματα κίτρινου γλυκού τριφυλλιού (Cornara et al., 2016).

Ολεανολικό οξύ, καεμπεριτρίνη και β-σιτοστερόλη που έχουν απομονωθεί από το *Lotus corniculatus* (Birdsfoot Trefoil) έχουν δείξει αντιφλεγμονώδη δράση σε μοντέλο πλευρίτιδας ποντικού (Cornara et al., 2016). Επιπλέον, μια γαλακτοζο-ειδική λεκτίνη βρέθηκε ότι ασκεί αντιπολλαπλασιαστική και αντιμεταστατική δράση σε ανθρώπινα λευχαιμικά καρκινικά κύτταρα (THP-1), σε κύτταρα καρκίνου του πνεύμονα (HOP62), καρκινώματος του παχέος εντέρου (HCT116), ενώ επάγει χαρακτηριστικά απόπτωσης σε κύτταρα THP-1 (Rafiq et al., 2013).

### 1.7.2 Φαρμακευτικά φυτά εμβολιασμένα με ΔΕΜ ή ριζοβία

Ο εμβολιασμός φαρμακευτικών φυτών με ΔΕΜ αποτελεί μια αποτελεσματική μέθοδο για την αύξηση της ποσότητας και της ποιότητας των δευτερογενών μεταβολιτών φαρμακολογικού, ιατρικού και καλλυντικού ενδιαφέροντος (Kaur and Suseela, 2020).

Πολλές μελέτες έχουν δείξει ότι το περιεχόμενο των αιθέριων ελαίων σε **τερπενοειδή** στα φαρμακευτικά φυτά αυξάνεται μετά τον εμβολιασμό των φυτών με ΔΕΜ (Kaur and Suseela, 2020). Πιο συγκεκριμένα, η περιεκτικότητα σε αρτεμισίνη, μια σημαντική σεσκιτερπενική λακτόνη που βρίσκεται στην *Artemisia annua* και είναι πολύ γνωστή για τα αποτελέσματά της στην ελονοσία και πιο πρόσφατα στον καρκίνο (Krishna et al. 2008), αυξήθηκε σε φύλλα φυτών που αποικίστηκαν από *F. mosseae* ή *R. irregularis* ή συνδυασμό *Glomus macrocarpum* και *R. fasciculatus* και καλλιεργήθηκαν είτε σε γλάστρες, είτε σε συνθήκες αγρού (Domokos et al. 2018). Η περιεκτικότητα σε φορσκολίνη, ένα διτερπένιο που χρησιμοποιείται ευρέως για τη θεραπεία καρδιακών παθήσεων, γλαυκώματος, άσθματος και ορισμένων τύπων καρκίνου, αυξήθηκε σημαντικά στις ρίζες φυτών *Coleus forskohlii* που εμβολιάστηκε με *Glomus bagyarajii* και αναπτύχθηκε σε συνθήκες θερμοκηπίου (Kavitha et al. 2010).

Αναφορικά με τις **σαπωνίνες**, μερικές από αυτές διαθέτουν αποδεδειγμένα φαρμακολογικές ιδιότητες, όπως αντικαρκινικές, ηρεμιστικές, αποχρεμπτικές, αναλγητικές και αντιφλεγμονώδεις (Hussein and El-Anssary, 2018). Έχει, μάλιστα, αναφερθεί ότι οι ΔΕΜ ενισχύουν την παραγωγή **σαπωνινών** σε φαρμακευτικά φυτά (Kaur and Suseela, 2020).

**Φαινολικές ενώσεις**, όπως τα φλαβονοειδή και η κουμαρίνη, αποτελούν βιοενεργά συστατικά σε πολλά φυτικά φαρμακευτικά προϊόντα. Πιο συγκεκριμένα, ορισμένες, φαινολικές ενώσεις έχει αποδειχθεί ότι διαθέτουν αντιφλεγμονώδεις ιδιότητες. Επιπλέον, φλαβονοειδή, όπως η τροξερουτίνη, η απιγενίνη, η καμφερόλη και η μυρικετίνη, έχουν αποδεδειγμένα εξαιρετικές αντικαρκινογόνες ιδιότητες. Άλλα φαινολικά οξέα, όπως το φερουλικό, η φερουλοϋλ-L-αραβινόζη και το κουμαρικό, έχουν εμφανίσει αντικαρκινικές ιδιότητες σε πολυάριθμες κυτταρικές σειρές (Rahman et al., 2021). Έχει αποδειχθεί ότι οι ΔΕΜ αυξάνουν την περιεκτικότητα σε φαινόλες στα φαρμακευτικά φυτά (Kaur and Suseela, 2020). Για



παράδειγμα, η παραγωγή φορμονονετίνης (αντιμικροβιακή, αντιοξειδωτική, αντιλιπιδαιμική, αντιδιαβητική, αντικαρκινική και νευροπροστατευτική φαινολική ουσία), αυξήθηκε στο ψυχανθές *Medicago sativa*, όταν αναπτύχθηκε παρουσία *R. intraradices* (Volpin et al. 1994). Η κουρκουμίνη είναι η πιο αντιπροσωπευτική πολυφαινόλη που εξάγεται από το ρίζωμα του *Curcuma longa*. Η κουρκουμίνη έχει δείξει πολυάριθμα θεραπευτικά οφέλη κατά της φλεγμονής, της οξειδωτικής βλάβης, της παχυσαρκίας, του μεταβολικού συνδρόμου, των νευροεκφυλιστικών ασθενειών και αρκετών τύπων καρκίνου. Επίσης, έχει αναφερθεί ότι εμποδίζει την ανάπτυξη πολλών όγκων, αναστέλλοντας την κυτταρική αύξηση, μπλοκάροντας τον κυτταρικό κύκλο και διεγείροντας τον αποπτωτικό θάνατο (Maiuolo et al., 2021). Η παραγωγή κουρκουμίνης αυξήθηκε κατά 26% περίπου στο *Curcuma longa* που είχε αποικιστεί από είδη ΔΕΜ που ανήκουν στα γένη *Glomus/Rhizophagus*, *Gigaspora* και *Acaulospora* sp., υπό συνθήκες θερμοκηπίου (Dutta and Neog 2016). Επιπλέον, η συγκέντρωση π-υδροξυβενζοϊκού οξέος και ρουτίνης ήταν αυξημένη σε φυτά *Viola tricolor* αποικισμένα από τον *R. irregularis* (Zubek et al. 2015).

Τα **αλκαλοειδή** παράγονται σε διάφορα όργανα σημαντικών φαρμακευτικών φυτών και χαρακτηρίζονται από μια ποικιλία φαρμακολογικών ιδιοτήτων, όπως αναλγησία, τοπική αναισθησία, καρδιακή διέγερση, αναπνευστική διέγερση και χαλάρωση, αγγειοσύσπαση, μυϊκή χαλάρωση, αντινεοπλασματική, υπερτασική και υποτασική δράση (Zhao et al., 2022). Μέχρι τώρα, περισσότερες από 20.000 αλκαλοειδείς ενώσεις έχουν ανακαλυφθεί-οι περισσότερες απομονωμένες από φυτά-από τις οποίες οι 600 είναι γνωστές ως βιοενεργές (Amani Machiani et. al, 2022). Υπήρξαν αναφορές ότι η συμβίωση με ΔΕΜ διαδραματίζει θετικό ρόλο στη συσσώρευση αλκαλοειδών σε ορισμένα σημαντικά φαρμακευτικά φυτά, όπως η καμποθεκίνη στο *Camptotheca acuminata* και τα αλκαλοειδή βίνκα στο *vinca* (*C. roseus*) που έχουν σημαντικές αντικαρκινικές ιδιότητες. Το *Coleus forskohlii* είναι ένα σημαντικό φαρμακευτικό φυτό με αλκαλοειδή και φορσκολίνη στο ριζικό του σύστημα. Χρησιμοποιείται ευρέως για τη θεραπεία καρδιακών παθήσεων, γλαυκώματος, άσθματος, και ορισμένων τύπων καρκίνων (Shah et al. 1980). Σε μελέτες που πραγματοποιήθηκαν σε θερμοκήπιο για τη διερεύνηση της επίδρασης 11 διαφορετικών ειδών ΔΕΜ στην παραγωγή *coleus*, τα αποτελέσματα έδειξαν ότι η μυκορριζική συμβίωση αυξάνει την περιεκτικότητα σε φορσκολίνη (Sailo and Bagyaraj 2005). Το σκόρδο (*Allium sativum*), που είναι πολύ δημοφιλές ως πρόσθετο στη μαγειρική, είναι επίσης γνωστό ως παραδοσιακό φάρμακο και χρησιμοποιείται συνήθως κατά της αρτηριοσκλήρωσης και της υψηλής αρτηριακής πίεσης. Μία ένωση στο σκόρδο, η αλισίνη, έχει αντιοξειδωτική και αντικαρκινογόνο δράση και είναι ικανή να επηρεάζει τη λειτουργία του καρδιαγγειακού και του ανοσοποιητικού συστήματος (Harris et al. 2001). Οι Borde et al. (2009) διαπίστωσαν ότι φυτά σκόρδου που εμβολιάστηκαν με ΔΕΜ έχουν υψηλότερα επίπεδα δραστηριότητας αλλιλίνης και αλλινάσης (ένζυμο που μετατρέπει την αλλιλίνη σε αλισίνη) από τα μη εμβολιασμένα φυτά σκόρδου σε συνθήκες αγρού.

Ενώ η γνώση για την επίδραση διαφορετικών μυκήτων ΔΕΜ σε δραστικές ουσίες των φαρμακευτικών φυτών είναι η βάση για τον έλεγχο βιοδραστηριότητας σε ένα συγκεκριμένο φαρμακευτικό φυτό, κρίνεται απαραίτητο να ληφθούν υπόψη οι συνεργιστικές επιδράσεις με άλλους μικροοργανισμούς, λόγω της πολυπλοκότητας του εδαφικού περιβάλλοντος. Επομένως, κρίνεται αναγκαίο να πραγματοποιηθεί έλεγχος βιολογικής δράσης με εμβόλια πολλαπλών μικροοργανισμών (Zeng et al., 2013). Σε μια μελέτη για τον προσδιορισμό της επίδρασης τεσσάρων διαφορετικών ΔΕΜ και δύο ελεύθερων **αζωτοδεσμευτικών βακτηρίων**

στην περιεκτικότητα σε αρτεμισίνη σε φυτά *A. annua* εμβολιασμένα με έναν ή με συνδυασμό δύο εκ των παραπάνω ωφέλιμων μικροοργανισμών, τα φυτά που ήταν διπλά εμβολιασμένα τόσο με *G. mosseae*, όσο και με ένα στέλεχος *Bacillus subtilis* παρήγαγαν 25,5-103,2% περισσότερη αρτεμισίνη σε σχέση με άλλες συνθήκες, γεγονός που υποδηλώνει συνεργική δράση μεταξύ του *G. mosseae* και του *B. Subtilis*. (Awasthi et al. 2011)

### 1.8 Σημασία χρήσης δραστικών ουσιών φυτικής προέλευσης για τη θεραπεία του καρκίνου

Ο καρκίνος είναι η δεύτερη μεγαλύτερη αιτία θνησιμότητας παγκοσμίως, λόγω του υψηλού ποσοστού εμφάνισής του. Τα κακοήθη κύτταρα σκοτώνουν 15 εκατομμύρια ανθρώπους ετησίως και ο αριθμός αυτός ολοένα και αυξάνεται. Σήμερα, για τη θεραπεία του καρκίνου εφαρμόζονται ποικίλες τεχνικές, αλλά καθώς το πρόβλημα παραμένει, απαιτούνται νέες προσεγγίσεις για τον έλεγχο της ασθένειας, ιδίως λόγω της αποτυχίας των συμβατικών χημειοθεραπευτικών προσεγγίσεων. Ως εκ τούτου, υπάρχει ανάγκη για νέες στρατηγικές για την πρόληψη και τη θεραπεία του καρκίνου, με σκοπό τον περιορισμό της θνησιμότητας της ασθένειας (Khan et al., 2019).

Μέχρι σήμερα, είναι γνωστό ότι πολλές φυτικές βιοδραστικές ενώσεις παρουσιάζουν αντικαρκινικές ιδιότητες. Αξίζει να τονιστεί ότι υπάρχουν περισσότερες από 100 φυτικές ενώσεις με κλινική χρήση ως αντικαρκινικά φάρμακα, οι οποίες είναι ικανές να σκοτώνουν μετασχηματισμένα ή καρκινικά κύτταρα, χωρίς να είναι τοξικές για τα υγιή κύτταρα (Maiuolo et al., 2021). Ειδικότερα, δευτερογενείς μεταβολίτες που εξάγονται από τη φυτική ύλη χρησιμοποιούνται για να επάγουν την απόπτωση σε καρκινικά κύτταρα. Ενώσεις, όπως π.χ. γαλλικό οξύ, αλκαλοειδή βίνκα, ποδοφυλλοτοξίνη και καμπτοθεκίνη, που λαμβάνονται από διάφορα φυτά, χρησιμοποιούνται για τη θεραπεία του καρκίνου. Πολλές μελέτες, κυρίως σε ανθρώπινες κυτταρικές σειρές, έχουν αναφέρει αναστολή ενζύμων, η οποία καταστέλλει την ανάπτυξη του όγκου. Με την αυξανόμενη κατανόηση των βιολογικών δράσεων τέτοιων φυτικών φαρμάκων, έχουν επίσης εντοπιστεί οι επιπτώσεις τους έναντι διαφόρων τύπων καρκίνου. Ωστόσο, απαιτούνται περισσότερες μελέτες, ώστε να αναδειχθεί ο μηχανισμός αντικαρκινικής δράσης των μεταβολιτών πολλών ήδη εξερευνημένων, καθώς και πολλών ανεξερευνητών φυτών. (Khan et al., 2019)

### 1.9 Σημασία χρήσης δραστικών ουσιών φυτικής προέλευσης για τη θεραπεία φλεγμονωδών νόσων

Αν και οι αντιφλεγμονώδεις παράγοντες που συνταγογραφούνται σήμερα μπορούν να αναστέλλουν έντονες φλεγμονώδεις αποκρίσεις, δυσμενείς επιδράσεις έχουν συσχετιστεί με την συνεχή χρήση αυτών των φαρμάκων για την καταπολέμηση χρόνιων φλεγμονωδών καταστάσεων. Αυτές οι δυσμενείς επιδράσεις επιβάλλουν την αναζήτηση νέων και ασφαλών παραγόντων μετριασμού της φλεγμονής που προέρχονται από φυτικές πηγές (Rahman et al., 2021).

Τα συνθετικά γλυκοκορτικοειδή, όπως η δεξαμεθαζόνη, ασκούν τη δράση τους μέσω του υποδοχέα των γλυκοκορτικοειδών (GR) και αποτελούν τα πιο συχνά συνταγογραφούμενα

φάρμακα για τη θεραπεία φλεγμονωδών και ανοσολογικών ασθενειών, λόγω των ισχυρών αντιφλεγμονωδών και ανοσοκατασταλτικών τους δράσεων. Το φάσμα των ασθενειών που αντιμετωπίζονται με γλυκοκορτικοειδή είναι εξαιρετικά ευρύ και περιλαμβάνει, μεταξύ άλλων, το άσθμα, τη ρευματοειδή αρθρίτιδα, τον τραυματισμό του ωτιαίου μυελού, την αγγειίτιδα, τη φλεγμονώδη νόσο του εντέρου, τη σαρκοείδωση και τον συστηματικό ερυθματώδη λύκο (Gerber et al., 2021). Ωστόσο, οι παρατεταμένες και υψηλές δόσεις συνθετικών γλυκοκορτικοειδών μπορεί να προκαλέσουν αρκετές παρενέργειες, όπως διαβήτης, μυϊκή ατροφία, οστεοπόρωση, υπέρταση και πεπτικά έλκη. Αυτό οδηγεί σε ερευνητική δράση που εστιάζει στην ανάπτυξη εκλεκτικών ενεργοποιητών του υποδοχέα των γλυκοκορτικοειδών για τη βελτιστοποίηση των ευεργετικών ιδιοτήτων των γλυκοκορτικοειδών και την ελαχιστοποίηση των επιβλαβών παρενεργειών τους. Σε αυτό το πλαίσιο, ενώσεις φυτικής προέλευσης, όπως τα τριτερπενοειδή, έχουν αυξήσει το ενδιαφέρον πολλών ερευνητών, λόγω των δομικών ομοιοτήτων τους με τα γλυκοκορτικοειδή και των υποσχόμενων βιολογικών δράσεών τους, επισημαίνοντας τις δυνατότητές τους ως εκλεκτικούς ρυθμιστές του υποδοχέα των γλυκοκορτικοειδών (Kalousi et al., 2022)

Επιπροσθέτως, αντιφλεγμονώδεις ιδιότητες έχει αποδειχθεί ότι επάγονται και από ορισμένες φαινολικές ενώσεις. Μια αύξηση στα επίπεδα των φαινολικών ενώσεων μπορεί να επάγει αντιφλεγμονώδη αποτελέσματα μέσω διαφόρων οδών, ενώ τα συνθετικά μόρια, συνήθως επηρεάζουν μόνο ένα συστατικό. Αναλυτικότερα, οι φαινολικές ενώσεις μπορούν να αυξορρυθμίζουν ή να μειορρυθμίζουν μεταγραφικούς παράγοντες που εμπλέκονται σε αντιοξειδωτικά μονοπάτια, όπως ο NF-κΒ ή ο Nrf-2. Η αντιοξειδωτική τους δράση και η ικανότητά τους να αναστέλλουν τα ένζυμα που εμπλέκονται στη βιοσύνθεση των εικοσανοειδών συμβάλλουν επίσης στις αντιφλεγμονώδεις ιδιότητές τους. Οι φαινολικές ενώσεις θεωρείται, επίσης, ότι καταστέλλουν τη δέσμευση των προφλεγμονωδών μεσολαβητών, τη ρύθμιση της σύνθεσης των εικοσανοειδών ή τη δραστηριότητα της συνθάσης NO και της COX-2, μέσω των ανασταλτικών τους επιδράσεων στον NF-κΒ. Οι φλεγμονώδεις μεσολαβητές, όπως η IL-6 και ο TNFα, επηρεάζονται, επίσης, από διατροφικά φλαβονοειδή (Rahman et al., 2021).

### 1.10 Μοριακοί μηχανισμοί της φλεγμονής σε κύτταρα ανθρώπου

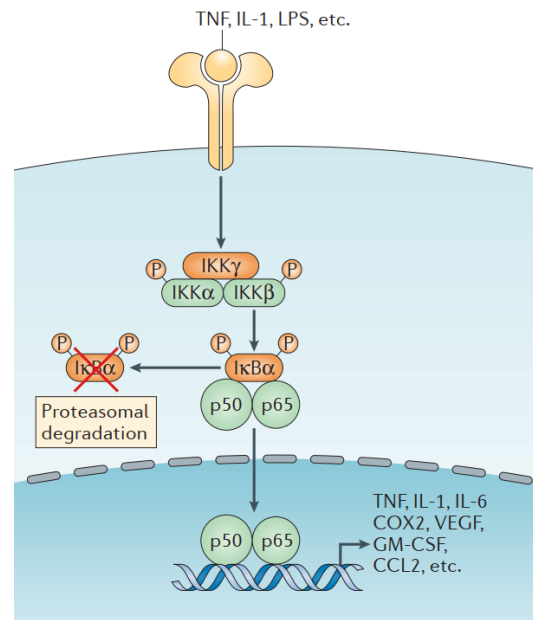
Η φλεγμονή είναι μια επιβεβλημένη και θεμελιώδης απόκριση του ανοσοποιητικού συστήματος έναντι κάθε επιβλαβούς ερεθίσματος, μικροβιακής εισβολής, μολυσμένων κυττάρων, τοξικών ουσιών και τραυματισμού, μεταξύ άλλων, και δρα απομακρύνοντας το επιζήμιο ερέθισμα και εκκινώντας τη διαδικασία της επούλωσης. Ουσιαστικά, είναι ο κυρίαρχος αμυντικός μηχανισμός του σώματος. Όταν η φλεγμονή είναι σοβαρή, μπορεί να αναπτύξει σοβαρές επιπλοκές, συμπεριλαμβανομένων νευροεκφυλιστικών διαταραχών, αυτοάνοσων νοσημάτων, νεοπλασματικών παθήσεων και καρδιακών επιπλοκών. Αρχικά, η φλεγμονή ξεκινά ως οξεία κατάσταση και, εάν δεν ρυθμιστεί το προφλεγμονώδες ερέθισμα για παρατεταμένη περίοδο, αυτό μετατρέπεται σε χρόνια. Η κατανόηση του μοριακού μηχανισμού και των οδών μεταγωγής σήματος που εμπλέκονται στη διαδικασία της φλεγμονής είναι η κύρια οδός για τον σχεδιασμό φαρμακευτικών θεραπειών που σχετίζονται με την ενίσχυση της κλινικής χρήσης φυσικών και συνθετικών αντιφλεγμονωδών ουσιών (Sharma et al., 2020).

Οι κυτοκίνες είναι οι κύριες σηματοδοτικές πρωτεΐνες που εκκρίνονται για τον περιορισμό της φλεγμονής και την καταστολή του ανοσοποιητικού συστήματος. Στις κυτοκίνες περιλαμβάνονται οι λεμφοκίνες, οι μονοκίνες, οι χημειοκίνες και οι ιντερλευκίνες. Γενικά, οι κυτοκίνες εμφανίζουν τρία είδη δράσεων: μπορούν να συνδεθούν με υποδοχείς που βρίσκονται στη μεμβράνη είτε του ίδιου κυττάρου (αυτοκρινής σηματοδότηση), είτε γειτονικών κυττάρων (παρακρινής σηματοδότηση), είτε κυττάρων στο άπω τμήμα του ανθρώπινου σώματος (ενδοκρινής σηματοδότηση). Οι κυτοκίνες συνδέονται με τους υποδοχείς τους που βρίσκονται στη μεμβράνη του κυττάρου στόχου, οι οποίοι εκκινούν έναν καταρράκτη μεταγωγής σήματος, που οδηγεί στην τροποποίηση της γονιδιακής έκφρασης, επάγοντας, συχνά την έκκριση άλλων κυτοκινών από το κύτταρο-στόχο. Οι κυτοκίνες μπορούν να έχουν τόσο προφλεγμονώδη, όσο και αντιφλεγμονώδη δράση. Στις προφλεγμονώδεις κυτοκίνες περιλαμβάνονται οι ισολευκίνες 1 και 6 (IL-1/6), ο αυξητικός παράγοντας όγκου β (TGFβ), η ιντερφερόνη γ (IFNγ) και ο παράγοντας νέκρωσης όγκου α (TNFα). Οι κυτοκίνες έχουν ποικίλους φυσιολογικούς ρόλους που περιλαμβάνουν την ανάπτυξη κυτταρικής και χυμικής ανοσίας, τις φλεγμονώδεις αντιδράσεις, τη ρύθμιση του κυτταρικού πολλαπλασιασμού και την επούλωση πληγών (**Sharma et al., 2020**) Η υπερέκκριση προφλεγμονωδών κυτοκινών, συμπεριλαμβανομένων των IL-1b, IL-6 και TNF-α, οδηγεί σε σοβαρές ασθένειες στους ενήλικες, συμπεριλαμβανομένων του άσθματος, της αθηροσκλήρωσης, των αλλεργιών και του καρκίνου (**Rahman et al., 2021**).

Κατά την εξέλιξη της φλεγμονής, οι μεταγραφικοί παράγοντες κατέχουν θεμελιώδη ρόλο στη διατήρηση της έκφρασης των προφλεγμονωδών μεσολαβητών. Αυτοί οι παράγοντες περιλαμβάνουν κυρίως τους NF-κB, STAT1 και STAT3. (**Sharma et al., 2020**). Υπάρχουν πέντε πολυπεπτίδια στην οικογένεια NFκB, τα οποία συμβάλλουν στην ποικιλομορφία του συγκεκριμένου μεταγραφικού παράγοντα (p65, cRel, Rel, καθώς και οι πρόδρομες πρωτεΐνες p100 και p105 που διασπώνται από το πρωτεάσωμα στις υπομονάδες p52 και p50). Και οι πέντε υπομονάδες περιέχουν μια συντηρημένη ομόλογη επικράτεια Rel, που επιτρέπει τον διμερισμό μεταξύ των υπομονάδων και επιτρέπει τη σύνδεση του στο DNA. Αυτές οι υπομονάδες σχηματίζουν 15 πιθανά διμερή που εμφανίζουν ιδιότητες μεταγραφικού ενεργοποιητή, καταστολέα ή καμία ικανότητα δέσμευσης DNA ανάλογα με τη σύνθεση του διμερούς (**Bekhat et al., 2017**). Σε κατάσταση ηρεμίας, το, γνωστό και ως NF-κB/Rel, σύμπλοκο παραμένει σε μια ανενεργή κατάσταση στο κυτταρόπλασμα, συνδεδεμένο με τον καταστολέα IκB (αποτελούμενος από δύο υπομονάδες κίνησης, IκBa και IκBβ), καθώς και με τη ρυθμιστική πρωτεϊνική κινάση IKKγ/NEMO. Το σύμπλοκο αυτό ενεργοποιείται με τη σύνδεση προσδετών, όπως κυτοκίνες, αυξητικοί παράγοντες, ή υπολείμματα κατεστραμμένων μικροβιακών κυττάρων, στους διαμεμβρανικούς υποδοχείς τους. Το ενεργοποιημένο σύμπλοκο IKK επάγει τη φωσφορυλίωση του IκB. Στη συνέχεια, ακολουθεί η αποικοδόμηση του φωσφορυλιωμένου IκB από το πρωτεάσωμα, που επιφέρει την ενεργοποίηση του NF-κB, ο οποίος μετατοπίζεται στον πυρήνα όπου δρα ως μεταγραφικός παράγοντας, επάγοντας την έκφραση συγκεκριμένων γονιδίων-στόχων, με αποτέλεσμα την προώθηση των ενδοκυτταρικών φλεγμονωδών αποκρίσεων (π.χ. ενεργοποίηση προφλεγμονωδών μεσολαβητών, όπως οι COX-2 και iNOS, κ.α.) (**Sharma et al., 2020**).

Ο NF-κB ήταν ο πρώτος μεταγραφικός παράγοντας που αναγνωρίστηκε στα Β κύτταρα με σημαντικό ρόλο σε φλεγμονώδεις και άλλες κυτταρικές αποκρίσεις, όπως η απόπτωση (**Sharma et al., 2020**). Μονοπάτια ενδοκυτταρικής μεταγωγής σήματος πολλαπλών υποδοχέων, όπως οι υποδοχείς τύπου toll (TLRs), ο υποδοχέας του TNF-α, ο υποδοχέας της

IL-1, καθώς και οι υποδοχείς των T- και B-κυττάρων μπορεί να συγκλίνουν στο μονοπάτι του NFκB (Bekhbat et al., 2017). Επιπλέον, παρακείμενοι φλεγμονώδεις καταρράκτες σηματοδότησης συμπεριλαμβανομένων των μονοπατιών p38/MAPK και JNK μπορούν να αλληλεπιδράσουν και να ρυθμίσουν αμοιβαία το μονοπάτι του NFκB. Ο NF-κΒ θεωρείται επίσης ότι διαδραματίζει σημαντικό ρόλο σε ασθένειες όπως η αρθρίτιδα, ο καρκίνος, το άσθμα κ.α. (Sharma et al., 2020).

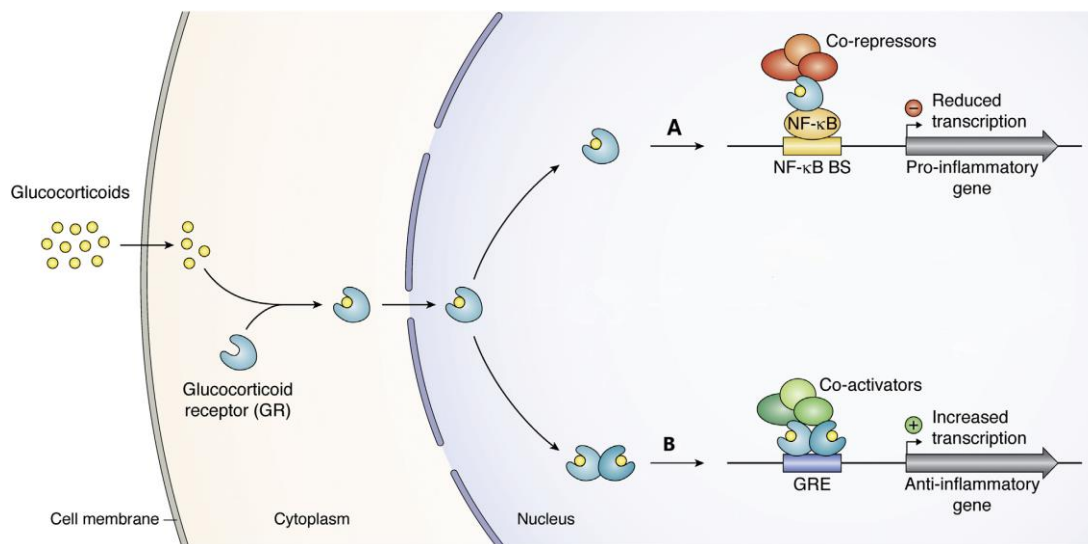


**Εικόνα 4:** Ενεργοποίηση του κλασικού σηματοδοτικού μονοπατιού του NFκB (Taniguchi and Karin, 2018)

Όπως αναφέρθηκε και στην ενότητα 1.8, έχει αναγνωριστεί για περισσότερα από 70 χρόνια ότι τα γλυκοκορτικοειδή έχουν ισχυρές αντιφλεγμονώδεις ιδιότητες, όταν χρησιμοποιούνται ως φάρμακα. Ο υποδοχέας των γλυκοκορτικοειδών (GR) είναι ένας πανταχού παρών εκφραζόμενος πυρηνικός υποδοχέας ορμονών, που λειτουργεί μέσω πυρηνικής μετατόπισης, η οποία επάγεται από τη σύνδεση του εκάστοτε ορμονικού προσδέτη και οδηγεί στην ενεργοποίηση ή την καταστολή της έκφρασης γονιδίων στόχων (Gerber et al., 2021). Μεταγραφικοί παράγοντες όπως ο GR και ο NFκB είναι υπεύθυνοι για τη διατήρηση μιας ισορροπίας μεταξύ του ενδοκρινικού και του ανοσοποιητικού συστήματος, η οποία απαιτείται για την εύρυθμη λειτουργία πολλαπλών συστημάτων οργάνων. Λόγω των αντίθετων επιδράσεών τους στις διαδικασίες της φλεγμονής, η αμοιβαία ρύθμιση και η αλληλεπίδραση μεταξύ GR και NFκB συμβάλλουν στη διαμόρφωση των επιπτώσεων του στρες στο ανοσοποιητικό σύστημα, το οποίο με τη σειρά του ρυθμίζει τη συστημική απόκριση στο στρες (Bekhbat et al., 2017).

Ο αμοιβαίος ανταγωνισμός μεταξύ GR και NFκB έχει περιγραφεί ότι συμβαίνει μέσω αρκετών καλά καθορισμένων μηχανισμών, συμπεριλαμβανομένης της trans-καταστολής (π.χ. καταστολή των προφλεγμονωδών γονιδίων-στόχων του NFκB από τον GR), της trans-ενεργοποίησης (π.χ. ενεργοποίηση γονιδίων αναστολέων του NFκB από τον GR) και του ανταγωνισμού για πρωτεϊνικούς συμπαραγόντες και συν-ενεργοποιητές, οι οποίοι είναι απαραίτητοι για τη μεταγραφική τους ενεργότητα (Bekhbat et al., 2017). Το κυρίαρχο μοντέλο επικεντρώνεται στην έννοια της κατασταλτικής πρόσδεσης, δηλαδή στις άμεσες

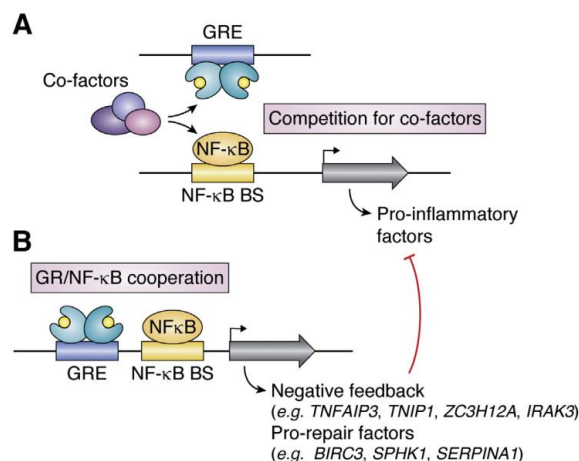
διαπρωτεϊνικές αλληλεπιδράσεις μεταξύ GR και NFκB, που οδηγούν σε μειωμένη γονιδιακή έκφραση. Σε αυτό το μοντέλο, ο GR, χωρίς να συνδέεται απευθείας στο DNA, προσδένεται στον NF-κB ή στον AP-1, με αποτέλεσμα την καταστολή της δραστηριότητάς τους, σε μια διαδικασία που αποδίδεται, συνήθως, στη στρατολόγηση μεταγραφικών συγκαταστολέων, όπως οι NCOR1 και HDAC2 (Gerber et al., 2021). Αν και μεγάλο μέρος της καταστολής του NFκB από τον GR προκαλείται από μηχανισμούς trans-καταστολής, ένα σημαντικό σύνολο στοιχείων υποδηλώνει ότι η trans-ενεργοποίηση των αντιφλεγμονωδών γονιδίων από τον GR συμβάλλει, επίσης, στην καταστολή της φλεγμονής (Εικόνα 5). Ακόμη, η ευρεία επαγωγή της μεταγραφής, μέσω του GR, έχει ως αποτέλεσμα την ταχεία, πρωτογενή καταστολή της μεταγραφής φλεγμονωδών γονιδίων, μέσω του ανταγωνισμού με τον NFκB για την πρόσδεση μεταγραφικών συν-ενεργοποιητών (Εικόνα 6.A). (Bekhat et al., 2017)



**Εικόνα 5:** Κλασικό μοντέλο καταστολής της φλεγμονής με τη μεσολάβηση του GR: A. Πρωτογενής trans-καταστολή των προφλεγμονωδών γονιδίων-στόχων του NFκB από τον GR, B. Δευτερογενής trans-ενεργοποίηση γονιδίων αναστολέων του NFκB από τον GR (Gerber et al., 2021)

Εκτός από την πρωτογενή καταστολή λόγω ανταγωνισμού, οι Gerber et al. πρότειναν ότι οι ενισχυτές με μοτίβα πρόσδεσης του GR και του NF-κB πυρηνώνουν τη μεταγραφική συνεργασία μεταξύ αυτών τους δύο παραγόντων. Η συνεργασία του GR με τον NF-κB ασκεί δευτερογενή καταστολή, μέσω της αύξησης της έκφρασης των ρυθμιστών αρνητικής ανάδρασης της φλεγμονής, του NF-κB, καθώς και παραγόντων που προάγουν την επίλυση και την αποκατάσταση της φλεγμονής (Εικόνα 6.B). Τα γονίδια που ρυθμίζονται μέσω της μεταγραφικής συνεργασίας GR-NFκB περιλαμβάνουν ένα ευρύ φάσμα αντιφλεγμονωδών και προ-επιδιορθωτικών γονιδίων, ενώ συσσωρευόμενα στοιχεία δείχνουν ότι η επαγωγή αρνητικής ανατροφοδότησης είναι απαραίτητη για την καταστολή της φλεγμονής από τα γλυκοκορτικοειδή (Gerber et al., 2021).





**Εικόνα 6:** Ένα φειδωλό διμερές μοντέλο για την καταστολή της μεταγραφής και της φλεγμονής από τον υποδοχέα γλυκοκορτικοειδών, μέσω της αλληλεπίδρασης του με τον NF-κB. (Gerber et al., 2021)

### 1.11 Σκοπός

Η παρούσα εργασία αποσκοπεί στη διερεύνηση πιθανών βιολογικών δράσεων εκχυλισμάτων από ρίζες και βλαστούς φυτών εμβολιασμένων με ωφέλιμους μικροοργανισμούς. Πιο συγκεκριμένα, μελετήθηκαν εκχυλίσματα από το φυτό-μοντέλο *Lotus japonicus*, ενώ το μεταβόλωμα του φυτού επιχειρήθηκε να ενισχυθεί, μέσω της συμβίωσής του με ωφέλιμους μικροοργανισμούς. Ειδικότερα, πραγματοποιήθηκε μονός εμβολιασμός των φυταρίων με το ριζόβιο *Mesorhizobium loti*, καθώς και διπλός εμβολιασμός με το ίδιο ριζοβιακό στέλεχος και με τον ΔΕΜ *Rhizophagus irregularis*, δεδομένου ότι διαφορετικά είδη μικροοργανισμών μπορούν να προάγουν τη συσσώρευση δευτερογενών μεταβολιτών σε διαφορετικό βαθμό, στο ίδιο φυτό. Ακολούθως, πραγματοποιήθηκε ο έλεγχος της βιοδραστικότητας των εκχυλισμάτων, ο οποίος επικεντρώθηκε στη διερεύνηση της επίδρασής τους στην κυτταρική βιωσιμότητα και στους προ-φλεγμονώδεις μηχανισμούς της ανθρώπινης κυτταρικής σειράς HEK293, με σκοπό την εκτίμηση της αντιπολλαπλασιαστικής και της αντιφλεγμονώδους δράσης των εκχυλισμάτων, αντίστοιχα.



## 2. Υλικά και μέθοδοι

### 2.1 Βιολογικό υλικό και συνθήκες ανάπτυξης φυτών

Χρησιμοποιήθηκε το ψυχανθές *Lotus japonicus* αγρίου τύπου (οικότυπος Gifu). Οι μικροσυμβιώτες που χρησιμοποιήθηκαν για τον εμβολιασμό ήταν το *Mesorhizobium loti* (στέλεχος R7A) και το εμπορικά διαθέσιμο στέλεχος DAOM του ΔΕΜ *Rhizophagus irregularis*.

Τα φυτά καλλιεργήθηκαν σε πλαστικές γλάστρες που περιείχαν μίγμα άμμου/βερμικουλίτη (σε αναλογία 2:1), το οποίο είχε προηγουμένως αποστειρωθεί (121°C για 25 min), για 5 εβδομάδες (φωτοπερίοδος 16h φως-8h σκοτάδι). Ο βερμικουλίτης επιτρέπει τη συγκράτηση της υγρασίας, για την αποφυγή της αφυδάτωσης των φυτών.

Τα μη εμβολιασμένα φυτά ελέγχου καλλιεργήθηκαν σε θάλαμο ανάπτυξης θερμοκρασίας 21°C με θρεπτικό μέσο Hoagland. Ένα λίτρο μη αραιωμένου διαλύματος Hoagland περιείχε 2,5 ml  $\text{Ca}(\text{NO}_3)_2$  (1 M), 2,5 ml  $\text{KNO}_3$  (1 M), 1 ml  $\text{MgSO}_4$  (1 M), 0,5 ml  $\text{KH}_2\text{PO}_4$  (0,1 M), 0,5 ml  $\text{Fe}(\text{III})\text{-EDTA}$  (0,01 M) και 1 ml μικροστοιχεία σε απιονισμένο νερό.

Τα φυτά που εμβολιάστηκαν με ριζόβια καλλιεργήθηκαν σε θάλαμο ανάπτυξης θερμοκρασίας 21°C, παρουσία υδατικού διαλύματος Hoagland, φτωχού σε N, ένα λίτρο του οποίου περιέχει 2,5 ml  $\text{CaCl}_2$  (1 M), 2,5 ml  $\text{KCl}$  (1 M), 1 ml  $\text{MgSO}_4$  (1 M), 0,5 ml  $\text{KH}_2\text{PO}_4$  (0,1 M), 0,5 ml  $\text{Fe}(\text{III})\text{-EDTA}$  (0,01 M) και 1 ml μικροστοιχεία. Οι συνθήκες στέρησης N, ευνοούν τη διαδικασία της φυματογένεσης.

Τα φυτά που εμβολιάστηκαν διπλά με ΔΕΜ και ριζόβια, καλλιεργήθηκαν σε θάλαμο ανάπτυξης θερμοκρασίας 25°C. Ως θρεπτικό μέσο χρησιμοποιήθηκε το υδατικό διάλυμα Long-Ashton (LAS), με σύσταση 0.75 mM  $\text{MgSO}_4$ , 1mM  $\text{NaNO}_3$ , 1mM  $\text{K}_2\text{SO}_4$ , 2mM  $\text{CaCl}_2$ , 3.2μM  $\text{NaH}_2\text{PO}_4$ , 25μM  $\text{FeNaEDTA}$ , 5μM  $\text{MnSO}_4$ , 0.25μM  $\text{CuSO}_4$ , 0.5μM  $\text{ZnSO}_4$ , 25μM  $\text{H}_3\text{BO}_3$ , 0.1μM  $\text{Na}_2\text{MoO}_4$ . Το διάλυμα LAS παρασκευάστηκε σε θάλαμο καθέτου νηματικής ροής (laminar flow hood), ώστε να διασφαλιστούν οι στείρες συνθήκες. Η χαμηλή περιεκτικότητα σε P και οι χαμηλές συγκεντρώσεις θρεπτικών συστατικών, σε αυτή την περίπτωση, δημιουργούν συνθήκες δόκιμες για τον αποικισμό των ριζών από τους ΔΕΜ.

### 2.2 Καλλιέργεια και εμβολιασμός φυτών

#### 2.2.1 Απολύμανση και εκβλάστηση σπόρων

Οι σπόροι *L. japonicus* απολυμάνθηκαν, για να αποφευχθεί η επιμόλυνση με ανεπιθύμητους μικροοργανισμούς, καθώς και για να επιτευχθεί ο συγχρονισμός των σπόρων στο ίδιο στάδιο ανάπτυξης, πριν τη διαδικασία της εκβλάστησης.

Το πρώτο στάδιο της απολύμανσης πραγματοποιήθηκε σε απαγωγό. Αρχικά, προστέθηκε στους σπόρους (50 για κάθε συνθήκη) πυκνό  $\text{H}_2\text{SO}_4$ , με τη χρήση γυάλινου σιφωνίου, και ακολούθησε επώαση για 30 min. Ακολούθησαν 5 πλύσεις με  $\text{dH}_2\text{O}$ , προσθήκη 1 ml υδατικού διαλύματος χλωρίνης εμπορίου περιεκτικότητας 20% v/v και επώαση για 5-10 min. Η συνέχεια

της διαδικασίας έλαβε χώρα σε θάλαμο καθέτου νηματικής ροής. Απομακρύνθηκε το διάλυμα χλωρίνης και έγιναν 6 πλύσεις με νερό. Τέλος, οι σπόροι επώαστηκαν με dH<sub>2</sub>O στους 4°C, για όλη τη διάρκεια της νύχτας.

Για την εκβλάστηση των σπόρων, σε κάθε τρυβλίο τοποθετήθηκαν 3 διηθητικά χαρτιά, εμποτισμένα με 3 ml dH<sub>2</sub>O, πάνω στα οποία απλώθηκαν περίπου 25 σπόροι, αποφεύγοντας τη μεταξύ τους διεπαφή. Τα τρυβλία τοποθετήθηκαν κατακόρυφα σε θάλαμο φυτικής ανάπτυξης σε θερμοκρασία 21°C, για 10 ημέρες.

### 2.2.2 Προετοιμασία εμβολίων

Το *M. loti* διατηρείται σε stock γλυκερόλης στους -80°C. Για την παρασκευή του εμβολίου, το βακτήριο αναπτύχθηκε σε στερεή καλλιέργεια θρεπτικού υλικού Yeast Mannitol Broth (YMB), στους 28°C, για 2-3 ημέρες. Έπειτα, μεταφέρθηκε σε υγρή καλλιέργεια YMB και επώαστηκε στους 28°C, υπό ανάδευση, για 2 ημέρες. Την ημέρα του εμβολιασμού, το βακτηριακό εναιώρημα αραιώθηκε με απιονισμένο νερό, σε τελική συγκέντρωση OD<sub>600nm</sub>=0,02. Για τον μηδενισμό του φωτόμετρου στα 600nm χρησιμοποιήθηκε dH<sub>2</sub>O.

Τα σπόρια του στελέχους DAOM του *R. irregularis* διατίθενται στο εμπόριο σε μορφή εναιωρήματος συγκέντρωσης 2000 σπορίων/ml, παρουσία ενός παράγοντα αναστολής μυκητιακής ανάπτυξης. Για την απομάκρυνση του αναστολέα ανάπτυξης, το εναιώρημα φυγοκεντρήθηκε (3000rpm για 1 λεπτό), το υπερκείμενο αφαιρέθηκε και το ίζημα, το οποίο περιείχε τα σπόρια του μύκητα, επαναδιαλυτοποιήθηκε σε θρεπτικό LAS, με τελική συγκέντρωση 1000 σπόρια/ml εμβολίου.

Για τον διπλό εμβολιασμό των φυτών με *R. irregularis* και *M. loti*, η καλλιέργεια ριζοβίου (OD<sub>600nm</sub>=0,02) και τα σπόρια του μύκητα (1000 σπόρια/ml) αναμείχθηκαν σε διάλυμα LAS.

### 2.2.3 Μεταφύτευση και εμβολιασμός

Επόμενο βήμα ήταν η μεταφύτευση των νεαρών φυταρίων σε πλαστικές γλάστρες και ο εμβολιασμός με τους ωφέλιμους μικροοργανισμούς. Η διαδικασία της φύτευσης περιλάμβανε:

- Γέμισμα κάθε γλάστρας με αποστειρωμένο μίγμα άμμου/βερμικουλίτη (σε αναλογία 2:1).
- Προσθήκη 100ml θρεπτικού μέσου (βλ. υποενότητα 'Βιολογικό υλικό και συνθήκες ανάπτυξης φυτών') ανά γλάστρα και ανάδευση.
- Προσθήκη 7 φυταρίων ανά γλάστρα. Συνολικά φυτεύτηκαν 35 φυτά σε 5 γλάστρες, για κάθε συνθήκη.
- Προσθήκη του κατάλληλου εμβολίου (0,5ml ανά φυτάριο), ανάλογα με τη συνθήκη (βλ. υποενότητα 'Προετοιμασία εμβολίων'), στις ρίζες κάθε φυταρίου. Στα φυτά ελέγχου δεν προστέθηκε εμβόλιο.
- Κάλυψη των ριζών με το μείγμα άμμου/βερμικουλίτη.
- Τοποθέτηση των φυτών σε θάλαμο ανάπτυξης για 5 εβδομάδες, ώστε να ολοκληρωθεί επιτυχώς η διαδικασία του αποικισμού από τους μικροοργανισμούς.

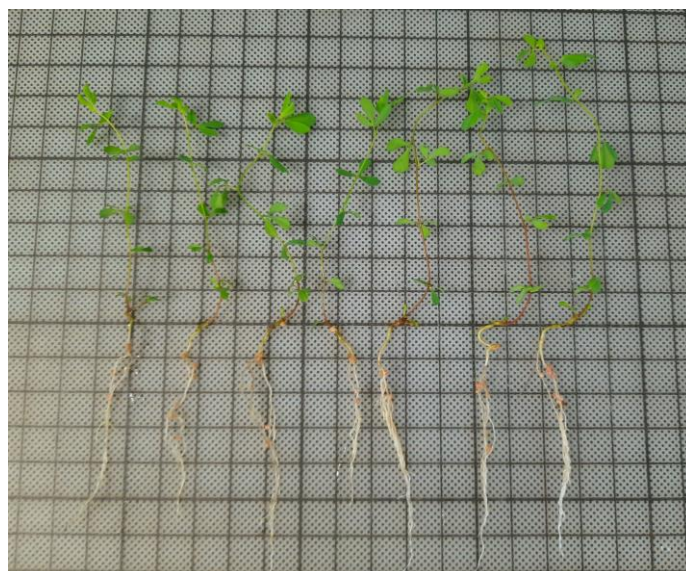
### 2.3 Συγκομιδή φυτικών ιστών και εκτίμηση του αποικισμού των ριζών από τους μικροοργανισμούς

Μετά το πέρας των 5 εβδομάδων ανάπτυξης, τα φυτά συλλέχθηκαν από τις γλάστρες (Εικόνα 7) και ακολούθησε η πλύση τους με απιονισμένο νερό για την απομάκρυνση της άμμου και ο διαχωρισμός των υπέργειων (βλαστοί) από τα υπόγεια τμήματα (ρίζες) με τη χρήση νυστεριού. Στη συνέχεια μεταφέρθηκαν σε υγρό άζωτο, ώστε να αποφευχθεί οποιαδήποτε ποιοτική αλλοίωσή τους, προς αποθήκευση στους  $-80^{\circ}\text{C}$ . Κάθε δείγμα αποτελούνταν από περίπου 30 φυτά.

Ορισμένες ρίζες επιλέχθηκαν τυχαία και διαχωρίστηκαν από τα δείγματα που καταψύχθηκαν, ώστε να ελεγχθεί η επιτυχία του αποικισμού τους από τους μικροσυμβιώτες.

Για τον προσδιορισμό του ποσοστού αποικισμού των ενδομυκορριζικών μυκήτων, οι ρίζες 5-6 διπλά εμβολιασμένων φυτών βάφτηκαν με μελάνι, το οποίο δεσμεύεται στις δομές χιτίνης του ενδομυκορριζικού μύκητα, καθιστώντας τες ορατές με οπτικό μικροσκόπιο. Η διαδικασία της χρώσης λαμβάνει χώρα σε απαγωγό και περιλαμβάνει τα εξής βήματα:

- Επώαση των ριζών σε διάλυμα 10% KOH για 30 λεπτά σε θερμοκρασία  $85^{\circ}\text{C}$ , με τη χρήση υδατόλουτρου. Το KOH έχει την ιδιότητα να αποχρωματίζει τις ρίζες και να τις μαλακώνει, καθιστώντας τες δεκτικές στο μελάνι.
- Αφαίρεση διαλύματος KOH και προσθήκη διαλύματος οξικού οξέος 10%, για την εξουδετέρωση των υπολειμμάτων KOH.
- Απομάκρυνση διαλύματος οξικού οξέος και πραγματοποίηση 2 πλύσεων με  $\text{dH}_2\text{O}$ .
- Προσθήκη διαλύματος μελανιού (5% μελάνι σε 5% οξικό οξύ) και επώαση για 30 λεπτά στους  $85^{\circ}\text{C}$  (υδατόλουτρο).
- Αφαίρεση διαλύματος μελανιού και πραγματοποίηση 2 πλύσεων με  $\text{dH}_2\text{O}$ .
- Επώαση με διάλυμα 5% οξικού οξέος για 30 min σε θερμοκρασία δωματίου, για την απομάκρυνση της περίσσειας μελανιού.
- Απομάκρυνση μελανιού και ολονύκτια επώαση με  $\text{dH}_2\text{O}$  στους  $4^{\circ}\text{C}$ .



**Εικόνα 7:** Φυτά *L. japonicus* που έχουν εμβολιαστεί με *Mesorhizobium loti*. Διακρίνονται τα φυμάτια που έχουν σχηματιστεί στις ρίζες των φυτών.

Στη συνέχεια, οι ρίζες τοποθετήθηκαν σε αντικειμενοφόρο πλάκα. Ακολούθησε η εξέταση της πλάκας με οπτικό μικροσκόπιο, σε μεγέθυνση 40x, και η καταγραφή της ύπαρξης (+) ή μη (-) αποικισμού. Το ποσοστό (%) αποικισμού υπολογίστηκε με την εξέταση τουλάχιστον 100 οπτικών πεδίων, σύμφωνα με τον τύπο:

$$\% \text{ αποικισμός} = (\text{Θετικές καταγραφές (+)} / \text{Σύνολο καταγραφών}) \times 100\%$$

Για την εκτίμηση του αποικισμού από ριζόβια, μετά τη συγκομιδή από τις γλάστρες, επιλέχθηκαν τυχαία 6 φυτά ανά συνθήκη, οι ρίζες των οποίων εξετάστηκαν με στερεοσκόπιο για την ύπαρξη φυματίων. Στη συνέχεια, καταγράφηκε ο αριθμός των πρώιμων (λευκά) και των ώριμων (ροζ) φυματίων.

## 2.4 Εκχύλιση φυτικών μεταβολιτών

Οι φυτικοί ιστοί μεταφέρθηκαν από τους  $-80^{\circ}\text{C}$ , παρουσία υγρού αζώτου, για τη διατήρησή τους. Ακολούθησε λυοφιλίωση (freeze drying) και ζύγισμα των ιστών, οι οποίοι υποβλήθηκαν, στη συνέχεια, σε συμβατική εκχύλιση με τη χρήση οξικού αιθυλεστέρα. Πρόκειται για οργανικό διαλύτη ενδιάμεσης πολικότητας, ο οποίος μπορεί να εκχυλίσει σχετικά άπολα ή μετρίως πολικά οργανικά μόρια. Η διαδικασία της εκχύλισης έλαβε χώρα σε απαγωγό. Για τις ανάγκες της εκχύλισης, οι φυτικοί ιστοί ομογενοποιήθηκαν με γουδί λειοτριβήσης με την προσθήκη 20ml οξικού αιθυλεστέρα ανά δείγμα, με τη χρήση γυάλινου σιφωνίου, και ακολούθησε διήθηση και μεταφορά τους σε γυάλινη φλάσκα μέγιστης χωρητικότητας 25ml. Στη συνέχεια, ακολούθησε εξάτμιση με τη χρήση περιστροφικού εξάτμιστή (rotary evaporator) σε θερμοκρασία  $30^{\circ}\text{C}$ , υπό συνθήκες κενού. Ακολούθως, πραγματοποιήθηκε εξάτμιση με αέριο άζωτο, υπό συνθήκες κενού. Τέλος, το δείγμα επαναδιαλύτοποιήθηκε σε διαλύτη DMSO στις επιθυμητές συγκεντρώσεις (10mg/ml για τα δείγματα των βλαστών και 5mg/ml για τα δείγματα των ριζών) και τα εκχυλίσματα αποθηκεύτηκαν στους  $-20^{\circ}\text{C}$ .

## 2.5 Χειρισμοί κυτταροκαλλιιεργειών

### 2.5.1 Κυτταρική σειρά και συνθήκες ανάπτυξης

Η ανθρώπινη κυτταρική σειρά που χρησιμοποιήθηκε για τον έλεγχο βιοδραστικότητας των εκχυλισμάτων ήταν η HEK293 (Human Embryonic Kidney). Η κυτταρική σειρά HEK293 δημιουργήθηκε το 1997 από τους Graham et al. από πρωτογενή ανθρώπινο εμβρυϊκό νεφρικό ιστό, μετασχηματισμένο με ένα τμήμα γονιδιώματος αδενοϊού (περίπου 4,35 kbp). Η ένθεση αυτού του τμήματος DNA στο χρωμόσωμα 19 των κυττάρων έχει προκαλέσει αλλαγές στον

κυτταρικό κύκλο, οι οποίες προσδίδουν στα κύτταρα ορισμένες χαρακτηριστικές ιδιότητες (π.χ. τροποποιημένος φαινότυπος, ετερογενής, ασταθής καρυότυπος, γονιδιωματική αστάθεια και ογκογένεση). Επιπλέον, τα κύτταρα της σειράς HEK293 εμφανίζουν υψηλή αποτελεσματικότητα διαμόλυνσης, υψηλό ρυθμό ανάπτυξης, υψηλή κυτταρική πυκνότητα σε φλάσκες ανακίνησης, αποδοτικό και ευέλικτο μεταβολισμό, δυνατότητα γενετικής τροποποίησης και υψηλή ευαισθησία σε περιβαλλοντικούς παράγοντες *in vitro*. Τα παραπάνω χαρακτηριστικά καθιστούν την κυτταρική σειρά HEK293 ιδανικό μοντέλο για βιοφαρμακευτική παραγωγή, καθώς και για την ανακάλυψη και τον τοξικολογικό έλεγχο νέων φαρμάκων (Hu et al., 2018).

Τα κύτταρα καλλιεργήθηκαν σε επωαστήρα σε συνθήκες 37°C και 5% CO<sub>2</sub>, σε φλάσκες που διαθέτουν καπάκι με φίλτρο διαπερατό από O<sub>2</sub> και CO<sub>2</sub>. Ως θρεπτικό μέσο χρησιμοποιήθηκε το εμπορικά διαθέσιμο Dulbecco's Modified Eagle Medium (DMEM) 1x, το οποίο περιλαμβάνει τον δείκτη κόκκινο της φαινόλης, πυροσταφυλικό οξύ και υψηλή περιεκτικότητα σε γλυκόζη (4,5g/ml), δεδομένου του υψηλού μεταβολικού ρυθμού των HEK293, το οποίο εμπλουτίστηκε (DMEM πλήρες) με 1% L-γλουταμίνη, 1% πενικιλίνη-στρεπτομυκίνη (αντιβιοτικά) και 10% FBS (βόειος εμβρυϊκός ορός πλούσιος σε ορμόνες και αυξητικούς παράγοντες). Το θρεπτικό υλικό διατηρείται στους 4°C, ενώ το FBS στους -20°C. Όλα τα προαναφερθέντα διαλύματα προεπεάζονταν σε υδατόλουτρο θερμοκρασίας 37°C, για 30 min, προτού έρθουν σε επαφή με την κυτταροκαλλιέργεια. Όλοι οι χειρισμοί της κυτταροκαλλιέργειας έλαβαν χώρα σε θάλαμο καθέτου νηματικής ροής βιοασφάλειας 2. Ανά τακτά χρονικά διαστήματα πραγματοποιούνταν αλυσιδωτή αντίδραση πολυμεράσης (PCR), για την έγκαιρη ανίχνευση πιθανής επιμόλυνσης της κυτταροκαλλιέργειας.

### 2.5.2 Θρυψινοποίηση

Τα κύτταρα HEK293 αναπτύσσονται προσκολλημένα στην επιφάνεια της φλάσκας που διαθέτει μια ειδική επίστρωση, μέσω πρωτεϊνών πρόσφυσης της κυτταρικής επιφάνειας, καθώς και μέσω του σχηματισμού φιλοποδίων. Όταν η επιφάνεια της φλάσκας γεμίζει με κύτταρα κατά 80-90%, κρίνεται απαραίτητη η πραγματοποίηση ανακαλλιέργειας, ώστε να απελευθερωθεί χώρος και να ανακτηθεί ο ρυθμός του κυτταρικού πολλαπλασιασμού. Για τον λόγο αυτό, απαιτείται ο έλεγχος της φλάσκας της κυτταροκαλλιέργειας με ανάστροφο οπτικό μικροσκόπιο (μεγέθυνση 10x), ανά 1-2 μέρες. Η ανακαλλιέργεια είναι, επίσης, αναγκαία όταν ο δείκτης κόκκινο της φαινόλης αλλάζει χρώμα και το θρεπτικό γίνεται πορτοκαλί, λόγω της μείωσης του pH, κατά τη συσσώρευση τοξικών προϊόντων του κυτταρικού μεταβολισμού. Τέλος, η ανακαλλιέργεια πραγματοποιείται όταν παρατηρείται έντονος σχηματισμός συσσωματωμάτων κυττάρων, αλλά και πριν από κάθε πειραματικό χειρισμό που απαιτεί τη χρήση ή τη μεταφορά κυττάρων. Κάθε ανακαλλιέργεια θεωρείται ως ένα πέρασμα (passage).

Η ανακαλλιέργεια πραγματοποιείται μέσω της διαδικασίας της θρυψινοποίησης, κατά την οποία χορηγείται στο θρεπτικό μέσο της καλλιέργειας θρυψίνη, η οποία πρωτεολύει τα μόρια ακτίνης των φιλοποδίων που συνδέουν τα κύτταρα με την επιφάνεια της φλάσκας, με αποτέλεσμα να διαταράσσεται η φυσιολογική μορφολογία τους και να πεθαίνουν. Η θρυψίνη, διατηρείται στους -20°C για μακροχρόνια διατήρηση, ενώ για άμεση χρήση φυλάσσεται στους 4°C. Η διαδικασία της θρυψινοποίησης περιλαμβάνει τα εξής στάδια:



- Προεπάση θρυψίνης και πλήρους θρεπτικού DMEM σε υδατόλουτρο στους 37°C για 30 min.
- Αφαίρεση υπερκείμενου θρεπτικού από τη φλάσκα καλλιέργειας με γυάλινη πιπέτα Pasteur συνδεδεμένη με αντλία κενού που καταλήγει σε υδατικό διάλυμα χλωρίνης, αποφεύγοντας την αποκόλληση των κυττάρων και αφήνοντας μικρή ποσότητα θρεπτικού στη φλάσκα, για την αποφυγή της αφυδάτωσης των κυττάρων.
- Προσθήκη θρυψίνης (1ml για τη μικρή φλάσκα, 3ml για τη μεγάλη) με σιφόνιο μίας χρήσης, συνδεδεμένο με πιπεταδόρο, στοχεύοντας στην επιφάνεια προσκόλλησης των κυττάρων, ώστε να αποκολληθούν.
- Επάση για 1-2 min στον επωαστήρα στους 37°C (θερμοκρασία δράσης θρυψίνης).
- Απομάκρυνση από τον επωαστήρα και εξέταση της φλάσκας στο μικροσκόπιο για να διαπιστωθεί αν έχουν αποκολληθεί τα κύτταρα.
- Προσθήκη του πλήρους θρεπτικού DMEM σε όγκο τετραπλάσιο από τον όγκο της θρυψίνης που προστέθηκε προηγουμένως και ανάδευση με τη χρήση σιφωνίου/πιπεταδόρου, με σκοπό την αναστολή της δράσης της θρυψίνης.
- Μεταφορά του περιεχομένου της φλάσκας σε falcon και φυγοκέντρηση στα 1000rpm για 5 min σε θερμοκρασία δωματίου.
- Αναρρόφηση υπερκείμενου με τη χρήση της αντλίας κενού.
- Επαναδιαλυτοποίηση κυτταρικού ιζήματος σε φρέσκο θρεπτικό DMEM complete.
- Μεταφορά όλης της ποσότητας στη φλάσκα για ανακαλλιέργεια.
- Σημείωση αριθμού περάσματος (passage number), ημερομηνίας και κυτταρικής σειράς στη φλάσκα.
- Έλεγχος κυττάρων για να διαπιστωθεί αν πολλαπλασιάζονται φυσιολογικά, μετά από 2 ημέρες.

### 2.5.3 Διαδικασία ψύξης κυττάρων για κρυοσυντήρηση

Όταν τα κύτταρα δεν πολλαπλασιάζονται σε υγρή καλλιέργεια, διατηρούνται στους -80°C, αποθηκευμένα σε cryovial, παρουσία FBS και DMSO σε αναλογία 9:1. Ο οργανικός διαλύτης DMSO δρα ως κρυοπροστατευτικός παράγοντας στους -80°C, ενώ σε θερμοκρασία δωματίου στην ίδια συγκέντρωση εμφανίζει υψηλή κυτταροτοξικότητα. Κατά την προετοιμασία των κυττάρων προς αποθήκευση στους -80°C, πραγματοποιείται η διαδικασία της θρυψινοποίησης, όπως περιγράφηκε παραπάνω, μέχρι το στάδιο της φυγοκέντρησης και της απομάκρυνσης του υπερκείμενου. Κατά τη διάρκεια της φυγοκέντρησης σημειώνονται στο cryovial που θα χρησιμοποιηθεί κυτταρική σειρά, passage number και ημερομηνία κατάψυξης. Στη συνέχεια, το κυτταρικό ίζημα επαναδιαλυτοποιείται με ανάδευση σε περίπου 2ml FBS (το οποίο έχει προεπωαστεί σε υδατόλουτρο στους 37°C για 30 min), μέσα σε falcon. Ακολούθως, 900μl από το περιεχόμενο του falcon μεταφέρονται σε cryovial, στο οποίο προστίθενται 100μl DMSO. Τέλος, το cryovial μεταφέρεται απευθείας στους -80°C, ώστε να αποφευχθεί η κυτταροτοξική δράση του DMSO.

### 2.5.4 Διαδικασία απόψυξης κυττάρων

Όταν επιθυμούμε να ξεκινήσουμε νέο πείραμα που απαιτεί τη χρήση κυτταροκαλλιέργειας, κρίνεται απαραίτητη η απόψυξη κυττάρων από την υπερκατάψυξη. Αρχικά, το θρεπτικό και τα συστατικά εμπλουτισμού του αποψύχονται για 30 min σε υδατόλουτρο στους 37°C. Ακολούθως, βγάζουμε το cryovial από την υπερκατάψυξη και προσθέτουμε 9 ml πλήρους θρεπτικού DMEM σε falcon των 15ml με τη χρήση σιφωνίου των 10ml και βγάζουμε το cryovial από την υπερκατάψυξη. Έπειτα, σημειώνουμε τα στοιχεία του cryovial (όνομα κυτταρικής σειράς, ημερομηνία παγώματος, αριθμός περάσματος) και, επιπλέον, την ημερομηνία απόψυξης, στη φλάσκα που θα χρησιμοποιήσουμε για την καλλιέργεια. Όταν υγροποιηθεί το μεγαλύτερο μέρος του περιεχομένου του cryovial, το αναδεύουμε με σιφώνιο των 2 ml και το προσθέτουμε στο falcon απευθείας, ώστε να αραιωθεί το DMSO και να μη δράσει κυτταροτοξικά. Ακολουθεί φυγοκέντρηση στα 1000rpm για 5 min σε θερμοκρασία δωματίου και απόρριψη του υπερκειμένου, μέσω αναρρόφησης με τη χρήση αντλίας κενού. Στη συνέχεια, το ίζημα επαναδιαλυτοποιείται σε 5ml φρέσκου πλήρους θρεπτικού DMEM και το κυτταρικό εναιώρημα μεταφέρεται στη φλάσκα και εξετάζεται στο μικροσκόπιο. Μετά από μία ημέρα απαιτείται αλλαγή θρεπτικού για την απομάκρυνση των νεκρών κυττάρων.

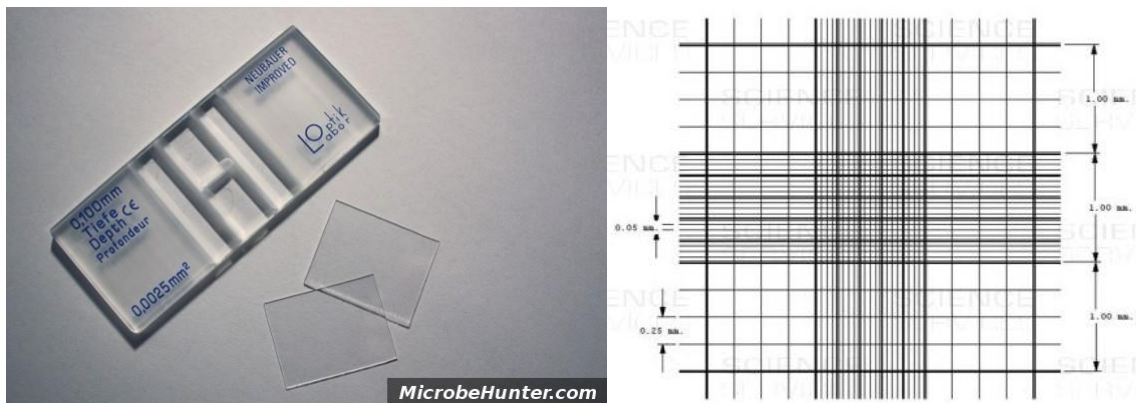
### 2.5.5 Καταμέτρηση και στρώσιμο κυττάρων

Στις πειραματικές διαδικασίες που πραγματοποιήθηκαν χρησιμοποιήθηκαν πιάτα πολλαπλών θέσεων (96 ή 24). Σε κάθε θέση απαιτείται συγκεκριμένος αριθμός κυττάρων, ανάλογα με το εκάστοτε πειραματικό πρωτόκολλο. Για το στρώσιμο του κατάλληλου αριθμού κυττάρων σε κάθε θέση, είναι απαραίτητος ο υπολογισμός της συγκέντρωσης των κυττάρων που περιέχονται στη φλάσκα της καλλιέργειας. Στο πλαίσιο αυτό, η καλλιέργεια αραιώνεται με θρυψινοποίηση και καταμετρώνται τα κύτταρα της φλάσκας μικροσκοπικά. Αναλυτικότερα, μετά την ολοκλήρωση της διαδικασίας της θρυψινοποίησης, μεταφέρεται ποσότητα καλλιέργειας από τη φλάσκα σε σωλήνα erpendorf, με τη χρήση σιφωνίου μίας χρήσης. Στη συνέχεια τοποθετούνται σε αιμοκυτταρόμετρο Neubauer (Εικόνα 8) 10μl από το erpendorf, με τη χρήση πιπέτας Gilson. Ακολουθεί παρατήρηση του πλακιδίου σε ανάστροφο οπτικό μικροσκόπιο και καταμέτρηση των κυττάρων που βρίσκονται πάνω σε κάθε τεταρτημόριο (χωρητικότητας 0,1μl) του πλακιδίου Neubauer, χωρίς να λαμβάνονται υπόψιν τα κύτταρα που βρίσκονται πάνω από τις πυκνές γραμμές του σταυρού, οι οποίες διακρίνονται στο δεξιό μέρος της εικόνας 8. Στη συνέχεια, υπολογίζεται ο μέσος όρος ( $\mu$ ) των κυττάρων ανά τεταρτημόριο, ο οποίος διαιρείται, ακολούθως, με τον όγκο της καλλιέργειας που βρίσκεται σε κάθε τεταρτημόριο (0,1μl ή 0,0001ml), ώστε να προκύψει η συγκέντρωση της καλλιέργειας σε κύτταρα/ml. Για να υπολογίσουμε τον συνολικό αριθμό κυττάρων που θα χρειαστούμε για το στρώσιμο του πιάτου (n), πολλαπλασιάζουμε τον επιθυμητό αριθμό κυττάρων ανά θέση με τον συνολικό αριθμό θέσεων του πιάτου που θα χρησιμοποιήσουμε. Στη συνέχεια, διαιρούμε το γινόμενο αυτό (n) με τη συγκέντρωση της καλλιέργειας σε κύτταρα/ml και προκύπτει ο όγκος (V) της μη αραιωμένης καλλιέργειας που περιέχει τον αριθμό των κυττάρων που απαιτείται για το στρώσιμο ολόκληρου του πιάτου.

Ακολούθως, αναδεύουμε με τη βοήθεια του πιπεταδόρου το περιεχόμενο της φλάσκας, ώστε να ομογενοποιηθεί το εναιώρημα και να αποφευχθεί η καθίζηση των κυττάρων και μεταφέρουμε ποσότητα όγκου V (που υπολογίστηκε προηγουμένως) σε ένα falcon. Ακολουθεί φυγοκέντρηση (1000rpm, για 5 min), απόρριψη του υπερκειμένου θρεπτικού και



επαναδιαλυτοποίηση του ιζήματος με ανάδευση στον όγκο του θρεπτικού που απαιτείται για την πλήρωση του πιάτου, ανάλογα με το εκάστοτε πρωτόκολλο. Ο όγκος αυτός ισούται με το γινόμενο του αριθμού των θέσεων του πιάτου που θα χρησιμοποιηθούν επί τον επιθυμητό όγκο καλλιέργειας ανά θέση, ο οποίος υπαγορεύεται από το εκάστοτε πρωτόκολλο. Τέλος, το περιεχόμενο του falcon διαμοιράζεται στις θέσεις του πιάτου στην απαιτούμενη ποσότητα ανά θέση, ανάλογα με το πειραματικό πρωτόκολλο, και ακολουθεί η παρατήρηση του πιάτου στο μικροσκόπιο και η τοποθέτησή του στον επωαστήρα, στους 37°C.

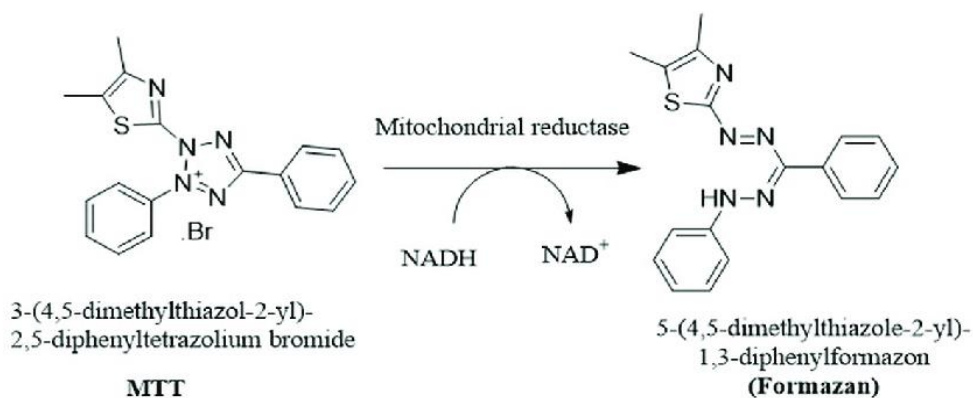


**Εικόνα 8:** Αιμοκυτταρόμετρο Neubauer (αριστερά) και σχηματική αναπαράσταση των τεταρτημορίων της πλάκας Neubauer, όπως φαίνονται στο οπτικό μικροσκόπιο (δεξιά).

## 2.6 Δοκιμασία κυτταρικής βιωσιμότητας MTT

### 2.6.1 Αρχή μεθόδου

Η δοκιμασία κυτταρικής βιωσιμότητας MTT είναι μια ποσοτική χρωματομετρική δοκιμασία για τη μέτρηση του πολλαπλασιασμού, της βιωσιμότητας, της μεταβολικής ενεργότητας και της κυτταροτοξικότητας σε κύτταρα θηλαστικών. Η δοκιμασία βασίζεται στην αναγωγή του MTT, ενός κίτρινου άλατος τετραζολίου, η οποία οδηγεί στον σχηματισμό πορφυρών κρυστάλλων φορμαζάνης (Εικόνα 9), οι οποίοι είναι αδιάλυτοι στο νερό. Η αναγωγή αυτή λαμβάνει χώρα μόνο σε ζωντανά κύτταρα από τη μιτοχονδριακή αφυδρογονάση του ηλεκτρικού. Οι κρύσταλλοι φορμαζάνης μπορούν να διαλυτοποιηθούν χρησιμοποιώντας ισοπροπανόλη ή κάποιον άλλο οργανικό διαλύτη. Η οπτική πυκνότητα του διαλυτοποιημένου προϊόντος μπορεί να μετρηθεί φασματοφωτομετρικά και συσχετίζεται άμεσα με τον αριθμό των μεταβολικά ενεργών κυττάρων της καλλιέργειας. Η δοκιμασία είναι απλή, γρήγορη και κατάλληλη για την ανάλυση μεγάλου αριθμού δειγμάτων, με τη χρήση ενός πιάτου 96 φρεατίων και ενός φασματοφωτόμετρου σάρωσης πολλαπλών φρεατίων (plate reader) (Mosmann, 1983).



**Εικόνα 9:** Μετατροπή του MTT σε κρυστάλλους φορμαζάνης από τη μιτοχονδριακή αναγωγή (Farooq et al., 2020).

### 2.6.2 Πειραματική διαδικασία

Η πειραματική διαδικασία για τη δοκιμασία MTT από το στρώσιμο των κυττάρων έως τη μέτρησή της απορρόφησης του προϊόντος της αναγωγής του MTT, διήρκεσε συνολικά 5 ημέρες. Αρχικά, πραγματοποιήθηκε θρυψινοποίηση, καταμέτρηση και στρώσιμο 10.000 κυττάρων ανά θέση (ημέρα 0) σε πιάτο 96 θέσεων (96-well plate), με τον τρόπο που περιγράφηκε στις προηγούμενες υποενότητες. Ο επιθυμητός αριθμός κυττάρων ανά θέση έχει καθοριστεί βάσει πρότυπης καμπύλης (αριθμού κυττάρων σε συνάρτηση με τον χρόνο ανάπτυξης), έτσι ώστε μετά από 48 ώρες ανάπτυξης, η κυτταροκαλλιέργεια να καταλαμβάνει το 50% του όγκου κάθε φρεατίου (well). Τα κύτταρα διαλυτοποιήθηκαν σε πλήρες θρεπτικό DMEM (σε τελικό όγκο 100μl ανά well) και επώαστηκαν για 48h στον επωαστικό κλίβανο των 37°C με 5% CO<sub>2</sub>. Έπειτα, την ημέρα 2, στα κύτταρα HEK293 χορηγήθηκαν τα φυτικά εκχυλίσματα βλαστών και ριζών διαλυτοποιημένα στο θρεπτικό μέσο σε αυξανόμενες συγκεντρώσεις (5, 10, 20 και 40 μg/ml). Για τη συνθήκη ελέγχου, τα κύτταρα επώαστηκαν με τον διαλύτη των εκχυλισμάτων (DMSO) σε αυξανόμενες ποσότητες, ανάλογες των συγκεντρώσεων των υπό μελέτη εκχυλισμάτων (1/2000, 1/1000, 1/500, 1/250, 1/125). Πραγματοποιήθηκαν συνολικά 4 βιολογικές επαναλήψεις ανά συνθήκη. Προτού χορηγηθούν στα κύτταρα, τα εκχυλίσματα αραιώθηκαν σε θρεπτικό μέσο στις επιθυμητές συγκεντρώσεις, χρησιμοποιώντας ένα eppendorf ανά συνθήκη. Στη συνέχεια, 100μl από τα αραιωμένα εκχυλίσματα προστέθηκαν στα τοιχώματα κάθε φρεατίου του πιάτου, ώστε να αποφευχθεί η αποκόλληση των κυττάρων από τον πυθμένα. Ακολούθησε επώαση 48 ωρών στους 37°C με 5% CO<sub>2</sub>. Μετά την ολοκλήρωση της επώασης (ημέρα 4), πραγματοποιήθηκε η προσθήκη του MTT. Το MTT είναι φωτοευαίσθητο και φυλάσσεται στους -20°C καλυμμένο με αλουμινόχαρτο, σε συγκέντρωση 5mg/ml σε ρυθμιστικό διάλυμα PBS. Το MTT αραιώθηκε σε θρεπτικό μέσο σε τελική συγκέντρωση 0,5mg/ml για τελικό όγκο 250μl ανά φρεάτιο και στη συνέχεια χορηγήθηκαν 50μl του αραιωμένου διαλύματος MTT σε κάθε φρεάτιο. Μετά από τριώρη επώαση (37°C με 5% CO<sub>2</sub>), το πιάτο απομακρύνθηκε από τον επωαστήρα και μεταφέρθηκε στον εργαστηριακό πάγκο καλυμμένο με αλουμινόχαρτο, όπου ακολούθησε αφαίρεση του υπερκείμενου θρεπτικού με πιπέτα Gilson. Έπειτα, προστέθηκαν 180μl ισοπροπανόλης σε κάθε well και ακολούθησε ανάδευση του πιάτου (καλυμμένου με αλουμινόχαρτο) σε shaker για 30 min, με σκοπό τη διαλυτοποίηση των κρυστάλλων φορμαζάνης που παρήχθησαν. Ακολούθησε φωτομέτρηση με τη χρήση συσκευής ανάγνωσης πιάτου (plate reader) σε μήκος κύματος 570nm, όπου παρατηρείται μέγιστη απορρόφηση των

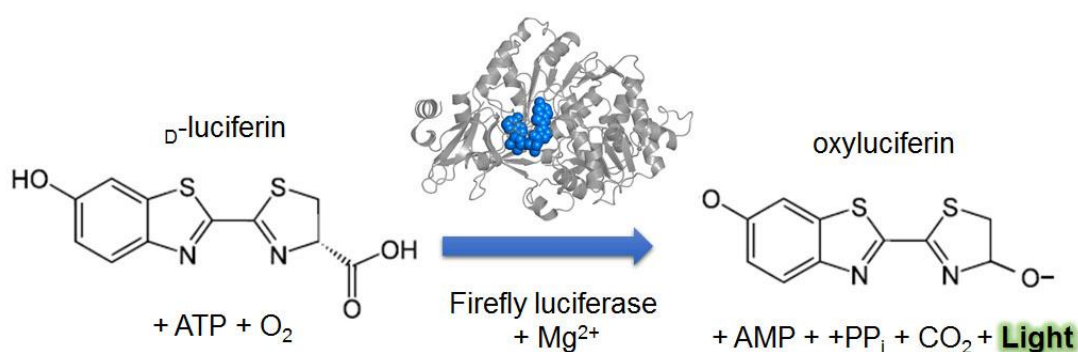
διαλυτοποιημένων κρυστάλλων φορμαζάνης και στα 630nm, ώστε να συνυπολογιστεί η απορρόφηση του θορύβου (background). Τα αποτελέσματα εκφράστηκαν ως σχετική κυτταρική βιωσιμότητα, η οποία ισούται με τον λόγο της διαφοράς απορρόφησης ( $A_{570nm} - A_{630nm}$ ) κάθε δείγματος (κύτταρα τα οποία είχαν προεπωαστεί με φυτικά εκχυλίσματα) προς τη διαφορά απορρόφησης του μάρτυρα (κύτταρα που έχουν προεπωαστεί με τον διαλύτη DMSO).

## 2.7 Δοκιμασία λουσιφεράσης/β-γαλακτοσιδάσης

### 2.7.1 Αρχή μεθόδου

Οι λουσιφεράσες είναι πρωτεΐνες με ενζυμική δραστικότητα που, παρουσία ATP, οξυγόνου και του κατάλληλου υποστρώματος (συνήθως λουσιφερίνη), καταλύουν την οξείδωση του υποστρώματος σε μια αντίδραση που έχει ως αποτέλεσμα την εκπομπή φωτονίων (Εικόνα 10) (Sun et al., 2016).

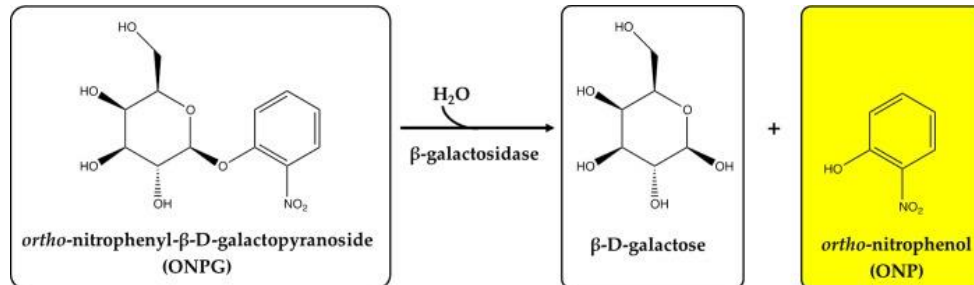
Οι δοκιμασίες με βάση τη βιοφωταύγεια έχουν χρησιμοποιηθεί ως μια ισχυρή τεχνική για πολλές εφαρμογές σε διάφορους τύπους βιοτεχνολογικών ερευνών. Οι τεχνικές αυτές είναι τόσο ευαίσθητες, που ακόμη και λίγα μόνο φωτόνια μπορούν να ανιχνευθούν με τη χρήση συστημάτων μέτρησης φωτός. Μεταξύ των σημαντικότερων πλεονεκτημάτων των τεχνικών που βασίζονται στη βιοφωταύγεια είναι ο πολύ χαμηλός θόρυβος (background) σε βιολογικά συστήματα, η ευελιξία, η μη επεμβατικότητα, η αναπαραγωγιμότητα, η υψηλή απόδοση, η υψηλή ευαισθησία και το χαμηλό κόστος (Azad et al., 2014).



**Εικόνα 10:** Οξείδωση της λουσιφερίνης κατά την αντίδραση της λουσιφεράσης της πυγολαμπίδας για την παραγωγή φωτός, οξυλουσιφερίνης, CO<sub>2</sub> και AMP (Noguchi et al., 2017).

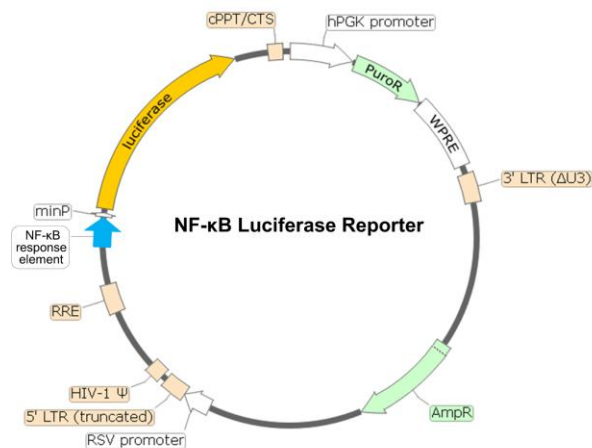
Ο φυσιολογικός ρόλος της β-γαλακτοσιδάσης σε κύτταρα *E. coli* είναι να διασπά τη λακτόζη σε γλυκόζη και γαλακτόζη, έτσι ώστε να μπορούν να χρησιμοποιηθούν ως πηγές άνθρακα/ενέργειας. Η συνθετική ένωση ο-νιτροφαινυλ-β-D-γαλακτοσίδη (ONPG) αναγνωρίζεται, επίσης, ως υπόστρωμα από τη β-γαλακτοσιδάση και διασπάται για να δώσει γαλακτόζη και ο-νιτροφαινόλη, η οποία έχει κίτρινο χρώμα και παρουσιάζει μέγιστη

απορρόφηση σε μήκος κύματος 420nm (Εικόνα 11). Όταν το ONPG είναι σε περίσσεια έναντι του ενζύμου σε μια αντίδραση, η παραγωγή ο-νιτροφαινόλης ανά μονάδα χρόνου είναι ανάλογη με τη συγκέντρωση της β-γαλακτοσιδάσης. Έτσι, η παραγωγή κίτρινου χρώματος μπορεί να χρησιμοποιηθεί για τον προσδιορισμό της συγκέντρωσης του ενζύμου, μέσω της μέτρησης της οπτικής πυκνότητας (Miller, 1972).

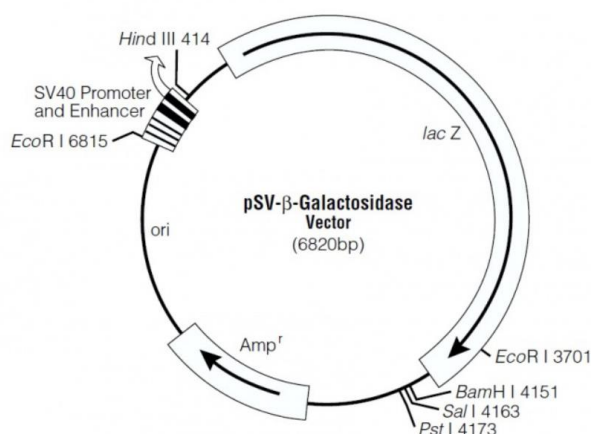


**Εικόνα 11:** Αντίδραση υδρόλυσης ορθο-νιτροφαινυλ-β-D-γαλακτοπυρανοσίδης (ONPG) παρουσία β-γαλακτοσιδάσης ως βιοκαταλύτη (Labus, 2018).

Η επίδραση των εκχυλισμάτων βλαστών (συγκέντρωσης 40μg/ml) στην επαγόμενη από τον TNFα μεταγραφική δραστηριότητα του NF-κB στα κύτταρα HEK293 προσδιορίστηκε με τη δοκιμασία λουσιφεράσης/β-γαλακτοσιδάσης. Αναλυτικότερα, τα κύτταρα διαμολύνθηκαν με τον πλασμιδιακό φορέα pMMTV-NFκB-RE-luciferase (συγκέντρωση stock 0,4μg/ml), με ένθεμα το γονίδιο της λουσιφεράσης υπό τον έλεγχο ιικού υποκινητή (ιός μαστικού όγκου ποντικού) που περιλαμβάνει στοιχεία απόκρισης στον NFκB, ώστε να προσδιοριστεί η μεταγραφική δραστηριότητα του NFκB, που αντιστοιχεί στη δραστηριότητα της λουσιφεράσης, η οποία προσδιορίζεται με μέτρηση της εκλυόμενης βιοφωταύγειας, κατά την αντίδραση που καταλύεται από τη λουσιφεράση. Ωστόσο, ο αριθμός βιώσιμων κυττάρων ανά θέση του πιάτου μπορεί να ποικίλει, γεγονός που δημιουργεί την ανάγκη κανονικοποίησης των τιμών των επιπέδων δραστηριότητας λουσιφεράσης. Στο πλαίσιο αυτό, τα κύτταρα διαμολύνθηκαν, συγχρόνως, με πλασμίδια pSV40-β-gal (συγκέντρωση stock 0,5μg/ml), τα οποία περιέχουν το γονίδιο της β-γαλακτοσιδάσης, υπό τον έλεγχο ιικού υποκινητή (ιός SV40), ώστε να προσδιοριστεί φωτομετρικά η δραστηριότητα της β-γαλακτοσιδάσης, η οποία θα είναι ανάλογη της ποσότητας των κυττάρων που περιέχονται σε κάθε θέση του πιάτου. Τα εν λόγω πλασμίδια απομονώθηκαν με τη χρήση kit της Qiagen από μετασχηματισμένα βακτήρια *Escherichia coli* από τη διδάκτορα Καλούση Φωτεινή, στο πλαίσιο του προγράμματος ‘Έλεγχος φυτικών εκχυλισμάτων για αντικαρκινική και αντιφλεγμονώδη δράση’, του Εμπειρικού ιδρύματος.



**Εικόνα 12:** Σχηματική αναπαράσταση ενδεικτικών πλασμιδιακών φορέων που περιέχουν ένα γονίδιο λουσιφεράσης πυρολαμπίδας υπό τον έλεγχο στοιχείων απόκρισης στον NF-κB που βρίσκεται ανοδικά του ρυθμιστικού στοιχείου TATA (*BPS Bioscience*).



**Εικόνα 13:** Σχηματική αναπαράσταση ενδεικτικού φορέα pSV-β-gal, ο οποίος έχει σχεδιαστεί ως φορέας θετικού ελέγχου για την παρακολούθηση της αποτελεσματικότητας της επιμόλυνσης κυττάρων θηλαστικών (*Beijing Hua Yueyang Biotechnology*).

### 2.7.2 Στρώσιμο και συνθήκες ανάπτυξης κυττάρων

Η πειραματική διαδικασία λουσιφεράσης/β-γαλακτοσιδάσης διήρκησε συνολικά 4 ημέρες. Αρχικά, πραγματοποιήθηκε θρυψινοποίηση και στρώσιμο 50.000 κυττάρων ανά θέση (ημέρα 0), σε πιάτο 24 θέσεων. Ως θρεπτικό μέσο χρησιμοποιήθηκε το εμπορικά διαθέσιμο DMEM χωρίς κόκκινο της φαινόλης (4.5g/L D-γλυκόζη, L-γλουταμίνη και 25mM HEPES), το οποίο εμπλουτίστηκε με 10% απενεργοποιημένο FBS (χωρίς στεροειδείς ορμόνες, λόγω της αλληλεπίδρασης GR-NFκB), 1% Pen/Strep και 1% L-glut, σε συνολική ποσότητα 500μl ανά well. Ακολούθησε επώαση για 24 ώρες στους 37°C με 5% CO<sub>2</sub>. Την ημέρα 1, το θρεπτικό απομακρύνθηκε και προστέθηκε φρέσκο θρεπτικό σε ποσότητα 270μL ανά well.

### 2.7.3 Παροδική διαμόλυνση κυττάρων με πλασμιδιακούς φορείς

Μετά από τρίωρη επώαση παρουσία του νέου θρεπτικού (37°C, 5% CO<sub>2</sub>), ακολούθησε η διαδικασία της διαμόλυνσης των κυττάρων με τους πλασμιδιακούς φορείς. Η διαμόλυνση



επετεύχθη με τη χορήγηση στα κύτταρα  $\text{CaCl}_2$  σε συγκέντρωση 5μl/μg πλασμιδιακού DNA, παρουσία ρυθμιστικού διαλύματος φωσφορικών HBS 2x (50mM HEPES, 1.5mM  $\text{Na}_2\text{HPO}_4$  και 280mM NaCl, pH 7,1) σε όγκο 15μl ανά well. Τα stock του διαλύματος  $\text{CaCl}_2$  συγκέντρωσης 2M, καθώς και του HBS φυλάσσονται στους  $-20^\circ\text{C}$ . Σε κάθε θέση του πιάτου απαιτούνται 0,15μg από κάθε πλασμίδιο, άρα συνολικά 0,3μg πλασμιδιακού DNA ανά well. Βάσει της ποσότητας των πλασμιδίων, υπολογίστηκε ο όγκος  $\text{CaCl}_2$  που προστέθηκε σε κάθε φρεάτιο (5μl/μg πλασμιδιακού DNA x 0,3μg πλασμιδιακού DNA = 0,15μl  $\text{CaCl}_2$  ανά well). Ο απαιτούμενος όγκος κάθε πλασμιδίου υπολογίστηκε με βάση τις συγκεντρώσεις των stock τους για τελικό όγκο 300μL ανά θέση του πιάτου. Ο όγκος των 300μl κρίνεται επαρκής στο συγκεκριμένο στάδιο, δεδομένου ότι, κατά τη διάρκεια της διαμόλυνσης, τα κύτταρα δεν πολλαπλασιάζονται. Ο απαιτούμενος όγκος (300μL) συμπληρώθηκε με την προσθήκη  $\text{dH}_2\text{O}$ , η ποσότητα του οποίου υπολογίστηκε αφαιρώντας από τον τελικό όγκο των 300μl, τον συνολικό όγκο  $\text{CaCl}_2$ , πλασμιδίων, HBS και θρεπτικού (270μL) ανά well.

Πριν τη χορήγηση στα κύτταρα, η συνολικά απαιτούμενη ποσότητα HBS αναδεύτηκε με vortex και τοποθετήθηκε σε falcon. Οι συνολικές ποσότητες  $\text{CaCl}_2$ , πλασμιδίων και  $\text{dH}_2\text{O}$  που απαιτούνταν για όλες τις θέσεις του πιάτου που καλύφθηκαν με κύτταρα τοποθετήθηκαν σε ένα erpendorf και αναμείχθηκαν με vortex σε ένα ενιαίο διάλυμα. Ακολούθησε πεντάλεπτη επώαση του διαλύματος, το οποίο προστέθηκε, ακολούθως, στο falcon που περιείχε το HBS. Στη συνέχεια, το ολικό διάλυμα αναδεύτηκε με vortex και επώαστηκε για 25 λεπτά σε θερμοκρασία δωματίου, προτού διαμοιραστεί ανά 30μL σε κάθε θέση του πιάτου. Ακολούθησε επώαση για 15-16h ( $37^\circ\text{C}$ , 5%  $\text{CO}_2$ ), ώστε να ολοκληρωθεί επιτυχώς η διαδικασία της διαμόλυνσης. Ακολούθως (ημέρα 2), το διάλυμα της διαμόλυνσης απομακρύνθηκε με αναρρόφηση και προστέθηκαν, σε κάθε θέση, 500μL φρέσκου θρεπτικού (DMEM χωρίς phenol red, εμπλουτισμένο με 10% v/v FBS), ώστε να ανακτηθεί ο κυτταρικός πολλαπλασιασμός, δεδομένου ότι επιθυμούμε να εξετάσουμε την επίδραση των εκχυλισμάτων στη μεταγραφική δραστηριότητα του NFκB, όταν τα κύτταρα βρίσκονται σε φάση πολλαπλασιασμού.

#### 2.7.4 Χορήγηση εκχυλισμάτων στα κύτταρα

Την ημέρα 3, πραγματοποιήθηκε η χορήγηση των εκχυλισμάτων σε δύο συνθήκες, με την προσθήκη ή μη TNFα, ώστε να διερευνηθεί η επίδραση των εκχυλισμάτων στη μεταγραφική δραστηριότητα του NFκB υπό συνθήκες φλεγμονής (+TNFα) ή απουσία φλεγμονής (-TNFα). Ο TNFα φυλάσσεται στους  $-80^\circ\text{C}$  σε υδατικό διάλυμα συγκέντρωσης 10μg/ml. Επιλέχθηκε να μελετηθεί η συγκέντρωση των 40μg/ml, διότι, σύμφωνα με τα αποτελέσματα της δοκιμασίας MTT, εμφανίζει τη μεγαλύτερη επίδραση στην κυτταρική βιωσιμότητα. Ως αρνητικός μάρτυρας χρησιμοποιήθηκε DMSO σε ποσότητα ίση με εκείνη των εκχυλισμάτων, ενώ ως θετικός μάρτυρας χρησιμοποιήθηκε η δεξαμεθαζόνη (dex) σε τελική συγκέντρωση 1μM. Η δεξαμεθαζόνη είναι αγωνιστής του υποδοχέα των γλυκοκορτικοειδών και επάγει τη δράση του NFκB. Η συγκέντρωση του stock της dex είναι 1mM σε διάλυμα αιθανόλης 100% v/v. Συνολικά, πραγματοποιήθηκαν 3 βιολογικές επαναλήψεις ανά συνθήκη.

Για την αραίωση των ουσιών στην επιθυμητή συγκέντρωση πριν τη χορήγησή τους στα κύτταρα προσθέτουμε σε ένα falcon εμπλουτισμένο θρεπτικό DMEM χωρίς phenol red (σε όγκο ίσο με 200μl επί τον αριθμό των κατειλημμένων θέσεων του πιάτου) και TNFα σε τελική



συγκέντρωση 20ng/ml (συνθήκη +TNFα). Σε ένα δεύτερο falcon προσθέτουμε τον ίδιο όγκο θεραπευτικού και συμπληρώνουμε με ddH<sub>2</sub>O (συνθήκη -TNFα), έτσι ώστε ο τελικός του όγκος να είναι ίσος με εκείνον του διαλύματος +TNFα (δεδομένου ότι ο TNFα είναι διαλυμένος σε ddH<sub>2</sub>O). Ακόμη, προσθέτουμε σε κάθε falcon ποσότητα αιθανόλης (αρνητικό control ως προς τη συνθήκη της δεξαμεθαζόνης) ίση με την ποσότητα δεξαμεθαζόνης που θα προστεθεί στην αντίστοιχη συνθήκη, επί τον αριθμό των φρεατίων στα οποία αντιστοιχούν οι συνθήκες των διαφορετικών εκχυλισμάτων και του DMSO. Κατόπιν, διαμοιράζουμε το περιεχόμενο των 2 falcon σε erppendorf ξεχωριστό ανά συνθήκη (ουσία ±TNFα). Προσθέτουμε την απαιτούμενη ποσότητα (για τη συγκέντρωση 40μg/ml) των εκχυλισμάτων ή του DMSO στα αντίστοιχα erppendorf. Παρομοίως, προετοιμάζουμε και τις συνθήκες της δεξαμεθαζόνης (±TNFα) σε 2 erppendorf, τα οποία θα περιέχουν από 200μL θεραπευτικού, 1μM δεξαμεθαζόνη, DMSO (διαλύτης των εκχυλισμάτων-αρνητικός μάρτυρας) σε ποσότητα ίση με την ποσότητα των εκχυλισμάτων που προστέθηκαν στα αντίστοιχα erppendorf (3μl) και 20ng/m TNFα (συνθήκη dex +TNFα) ή την αντίστοιχη ποσότητα ddH<sub>2</sub>O (συνθήκη dex -TNFα). Στη συνέχεια, διαμοιράζουμε το περιεχόμενο των erppendorf (200μl/well) στις αντίστοιχες θέσεις του πιάτου και το τοποθετούμε στον επωαστήρα (37°C, 5% CO<sub>2</sub>) για 6 ώρες.

### 2.7.5 Λύση κυττάρων

Έπειτα, μεταφέρουμε το πιάτο από τον επωαστήρα στον εργαστηριακό πάγκο παρουσία πάγου και συλλέγουμε το υπερκείμενο διάλυμα θεραπευτικού. Προσθέτουμε 70μL αραιωμένου Reporter lysis buffer 1x (από stock 5x) σε κάθε θέση του πιάτου και το επωάζουμε υπό ανάδευση στους 4°C για 30 λεπτά. Στη συνέχεια, πραγματοποιείται απόξυση των κυττάρων από την επιφάνεια των φρεατίων, συλλογή του κυτταρολύματος με πιπέτα Gilson σε διαφορετικό erppendorf ανά well και φυγοκέντρηση στα 13.000rpm για 30 λεπτά. Στη συνέχεια, συλλέγουμε το υπερκείμενο (κυτταρόλυμα) σε ξεχωριστά erppendorf, τα οποία αποθηκεύουμε στους -80°C, ενώ το ίζημα (άσπαστα κύτταρα, μεμβράνες, νουκλεϊκά οξέα) απορρίπτεται.

### 2.7.6 Μέτρηση δραστηριότητας λουσιφεράσης/β-γαλακτοσιδάσης

Για τη μέτρηση της δραστηριότητας λουσιφεράσης, παρασκευάζουμε το αντιδραστήριο λουσιφεράσης (20mM Tris-HCl με pH 8, 2.67mM MgSO<sub>4</sub>, 0.1mM EDTA, 33.3mM DTT, 270μM συνένζυμο-A, 470μM λουσιφερίνη, 530μM ATP σε dH<sub>2</sub>O). Έπειτα, προσθέτουμε 10μl από κάθε δείγμα/συνθήκη, καθώς και 10μl Reporter lysis buffer (τυφλό), σε διαφορετικούς δοκιμαστικούς σωλήνες. Έπειτα, υπό συνθήκες χαμηλού φωτισμού, προσθέτουμε σε κάθε δοκιμαστικό σωλήνα 100μl από το αντιδραστήριο λουσιφεράσης και, ακολούθως, πραγματοποιούμε μέτρηση της εκκλύμενης βιοφωταύγειας με τη χρήση λουμινομέτρου. Κατά την επεξεργασία των αποτελεσμάτων, αφαιρούμε την τιμή του τυφλού από την τιμή κάθε δείγματος.

Για τη μέτρηση της δραστηριότητας β-γαλακτοσιδάσης, μεταφέρουμε σε διαφορετικά erppendorf 20μL από κάθε δείγμα κυτταρολύματος, μετά από ανάδευση των αρχικών δειγμάτων με vortex. Στη συνέχεια, παρασκευάζουμε διάλυμα φωσφορικού νατρίου 0.1M (pH 7.5), το οποίο περιέχει 41% v/v Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub> 0.2M και 9% v/v NaH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub> 0.2M σε ddH<sub>2</sub>O (mix 1), καθώς και διάλυμα 4.5M β-μερκαπτοαιθανόλης και 0.1M MgCl<sub>2</sub> σε ddH<sub>2</sub>O (mix 2).

Ακολούθως, το mix 2 αναδεύεται με vortex και αναμειγνύεται με το mix 1. Το προκύπτον διάλυμα αναδεύεται και διαμοιράζεται στα δείγματα (200μl/δείγμα). Ακολούθως, προστίθενται σε κάθε δείγμα 66μL διαλύματος ONPG και ακολουθεί ανάδευση με vortex. Το ONPG (υπόστρωμα β-γαλακτοσιδάσης) φυλάσσεται σε συγκέντρωση 4mg/ml σε διάλυμα φωσφορικού νατρίου, στους -20°C. Στη συνέχεια, τα δείγματα επωάζονται για σύντομο χρονικό διάστημα στον επωαστικό κλίβανο (37°C), έως ότου αποκτήσουν υποκίτρινο χρώμα, λόγω του σχηματισμού του προϊόντος ο-νιτροφαινόλης (ολοκλήρωση αντίδρασης). Μόλις ολοκληρωθεί η αντίδραση, προσθέτουμε αμέσως 500μl Na<sub>2</sub>CO<sub>3</sub> (παράγοντας αναστολής της αντίδρασης) ανά δείγμα. Η παύση της αντίδρασης θα πρέπει να πραγματοποιηθεί αμέσως μετά την αλλαγή του χρώματος, ώστε να μην φτάσει σε πλατό η συγκέντρωση του παραγόμενου προϊόντος, γεγονός που θα καταστήσει αδύνατη την ποσοτική σύγκριση μεταξύ των δειγμάτων. Ακολουθεί φωτομέτρηση όλων των δειγμάτων με την ίδια πλαστική κυψελίδα στα 420nm. Για τον μηδενισμό του φωτομέτρου χρησιμοποιήθηκε ως τυφλό το Reporter lysis buffer.

Οι τιμές της μέτρησης βιοφωταύγειας λουσιφεράσης κάθε δείγματος διαιρέθηκαν αρχικά με την απορρόφηση ο-νιτροφαινόλης του αντίστοιχου δείγματος και στη συνέχεια υπολογίστηκε ο μέσος όρος των επαναλήψεων κάθε συνθήκης. Οι μέσοι όροι των υπό μελέτη δειγμάτων κανονικοποιήθηκαν ως προς τον αρνητικό μάρτυρα (διαλύτης DMSO).

## 2.8 Στατιστική ανάλυση δεδομένων

Οι κανονικοποιήσεις όλων των πειραματικών διαδικασιών πραγματοποιήθηκαν στο Microsoft Office Excel. Τα αποτελέσματα του MTT αναλύθηκαν με One-Way analysis of variance (ANOVA), σύμφωνα με τη μέθοδο των Tukey-Kramer, χρησιμοποιώντας το λογισμικό StatPlus LE. Στα αποτελέσματα της μέτρησης λουσιφεράσης/β-γαλακτοσιδάσης εφαρμόστηκε η στατιστική ανάλυση Student's t-test με το Microsoft Office Excel. Ως αποδεκτό επίπεδο σημαντικότητας ορίστηκε το  $p < 0,05$ .

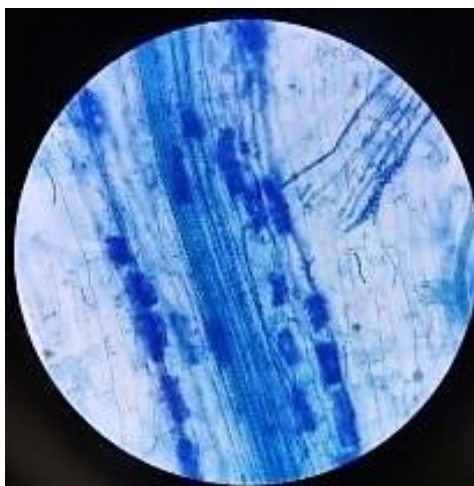
### 3. Αποτελέσματα

Στη παρούσα εργασία, απομονώσαμε εκχυλίσματα από ιστούς του φυτού *Lotus japonicus* με οξικό αιθυλεστέρα και εξετάσαμε πιθανές βιολογικές δράσεις τους. Τα εκχυλίσματα προέρχονται (α) από τις ρίζες και (β) από το υπέργειο τμήμα του φυτού, δηλαδή από βλαστούς και φύλλα, αλλά για συντομία στο εξής θα αναφέρονται ως «βλαστοί». Τα φυτά είχαν υποστεί τους εξής χειρισμούς:

- Μη εμβολιασμένα φυτά που αναπτύχθηκαν στους 21°C
- Φυτά εμβολιασμένα με το ριζόβιο *Mesorhizobium loti* (αναπτύχθηκαν στους 21°C)
- Μη εμβολιασμένα φυτά που αναπτύχθηκαν στους 25°C
- Φυτά διπλά εμβολιασμένα με *Mesorhizobium loti* και τον ΔΕΜ *R. irregularis* (αναπτύχθηκαν στους 25°C)

#### 3.1 Διερεύνηση του αποικισμού της ρίζας από ΔΕΜ και ριζόβια

Για να διαπιστωθεί ο επιτυχής αποικισμός των φυτών από τους μικροσυμβιώτες, έγινε παρατήρηση των φυματίων σε στερεοσκόπιο και παρατήρηση των δομών του ΔΕΜ σε οπτικό μικροσκόπιο, κατόπιν χρώσης (όπως περιγράφεται στην υποενότητα 2.3.). Το ποσοστό αποικισμού από τον ΔΕΜ *R. irregularis* στα δείγματα των ριζών των διπλά εμβολιασμένων φυτών ήταν 48,2%, το οποίο κρίθηκε ικανοποιητικό και αναμενόμενο, βάσει των συνθηκών του πειράματος.



**Εικόνα 14:** Αποικισμός ρίζας *Lotus japonicus* άγριου τύπου από τον *R. Irregularis*. Διακρίνονται οι δομές των θυσάνων και των μυκητιακών υφών (εικόνα από οπτικό μικροσκόπιο)

Οι ρίζες των φυτών που είχαν εμβολιαστεί με το ριζόβιο *Mesorhizobium loti* διέθεταν κατά μέσο όρο 8,8 ώριμα φυμάτια, ενώ ο μέσος όρος των πρώιμων φυματίων ανά ρίζα ήταν 1,8. Οι ρίζες των διπλά εμβολιασμένων (με ριζόβια και ΔΕΜ) φυτών περιείχαν κατά μέσο όρο 1,5 ώριμα φυμάτια και 1,25 πρώιμα φυμάτια. Στην εικόνα 15 φαίνεται ρίζα με ώριμα φυμάτια, όπως παρατηρούνται στο στερεοσκόπιο.



**Εικόνα 15:** Αποικισμός ρίζας *Lotus japonicus* από τον μικροσυμβιώτη του *M. loti*. Διακρίνονται οι δομές ώριμων φυματίων (εικόνα από στερεοσκόπιο).

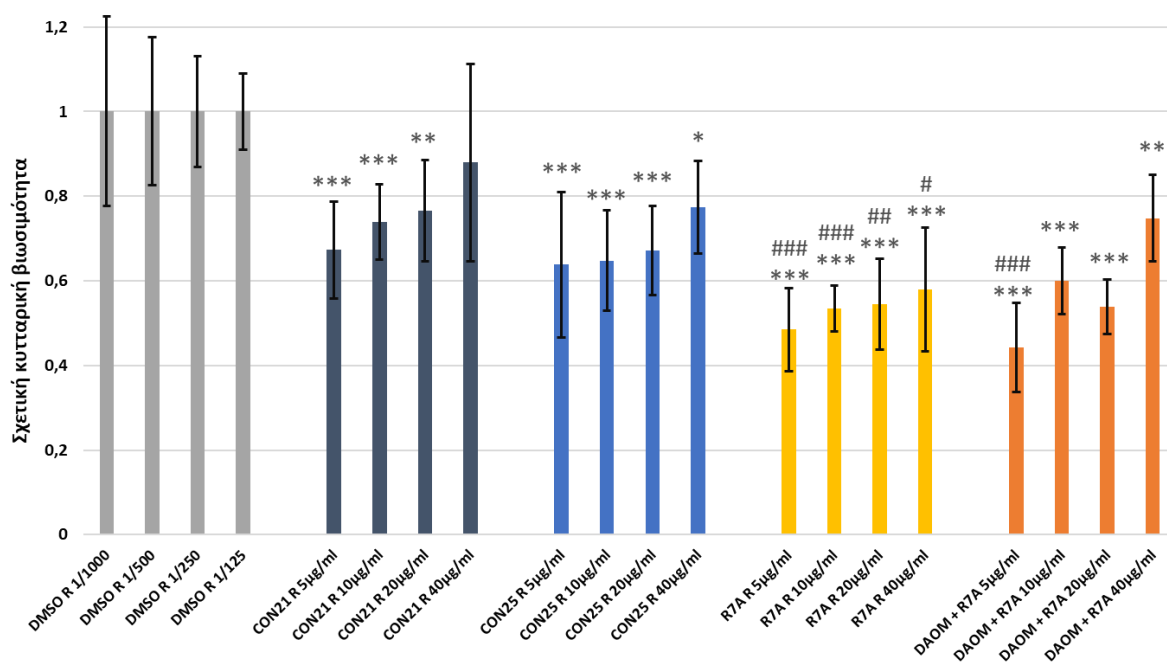
### 3.2 Διερεύνηση της επίδρασης των εκχυλισμάτων από βλαστούς και ρίζες φυτών που έχουν εμβολιαστεί με ωφέλιμους μικροοργανισμούς στη βιωσιμότητα των κυττάρων HEK293

Η κυτταροτοξικότητα των εκχυλισμάτων εκτιμήθηκε με τη δοκιμασία MTT σε κύτταρα HEK293. Όπως περιγράφεται και στην υποενότητα 2.6.2 (Υλικά και Μέθοδοι), τα κύτταρα επώαστηκαν για 48 ώρες με εκχυλίσματα ριζών ή βλαστών σε συγκεντρώσεις 5, 10, 20 και 40  $\mu\text{g/ml}$  και ακολούθησε η μέτρηση της απορρόφησης του προϊόντος της αναγωγής του MTT (570nm). Για τη συνθήκη ελέγχου, κύτταρα επώαστηκαν με αυξανόμενες συγκεντρώσεις του διαλύτη των εκχυλισμάτων DMSO (1/2000, 1/1000, 1/500, 1/250).

Η επεξεργασία των αποτελεσμάτων της μέτρησης MTT με ANOVA μονής κατεύθυνσης έδειξε ότι οι συγκεντρώσεις των εκχυλισμάτων των ριζών προκάλεσαν στατιστικά σημαντική μείωση της κυτταρικής βιωσιμότητας ( $p\text{-value} < 0,001$ ) κατά 10-50%, σε σχέση με τις αντίστοιχες ποσότητες DMSO της συνθήκης ελέγχου (Εικόνα 16). Ειδικότερα, παρατηρείται ότι τα ριζικά εκχυλίσματα συγκέντρωσης 20  $\mu\text{g/ml}$  των μονά εμβολιασμένων με ριζόβια φυτών (R7A) και των διπλά εμβολιασμένων με ριζόβια και ΔΕΜ φυτών (DAOM+R7A) προκάλεσαν κυτταρική βιωσιμότητα μειωμένη κατά 45,5% και 46,1%, αντίστοιχα, σε σχέση με τη συνθήκη ελέγχου (DMSO). Η μη αναμενόμενη αύξηση της σχετικής κυτταρικής βιωσιμότητας στη συγκέντρωση των 40  $\mu\text{g/ml}$ , σε σχέση με τις χαμηλότερες συγκεντρώσεις, μπορεί να αποδοθεί στην κυτταροτοξικότητα του διαλύτη DMSO σε συγκέντρωση 1/125 (ως προς την οποία πραγματοποιήθηκε η κανονικοποίηση).

Αξίζει, ακόμη, να επισημανθεί ότι τα εκχυλίσματα από ρίζες φυτών που είχαν εμβολιαστεί με ωφέλιμους μικροοργανισμούς φαίνεται να προκάλεσαν μεγαλύτερη αναστολή της κυτταρικής βιωσιμότητας σε σχέση με τα εκχυλίσματα ίδιας συγκέντρωσης των αντίστοιχων φυτών ελέγχου. Συγκεκριμένα, όπως φαίνεται στην εικόνα 16, τα ριζικά εκχυλίσματα των εμβολιασμένων φυτών προκάλεσαν στατιστικά σημαντική μείωση κατά περίπου 40-55%, ενώ τα εκχυλίσματα των μη εμβολιασμένων φυτών μείωσαν την κυτταρική βιωσιμότητα κατά 12-36%. Μάλιστα, διαπιστώθηκε η στατιστικώς σημαντικά μειωμένη κυτταρική βιωσιμότητα ( $p < 0,05$ ) που προκάλεσε το εκχύλισμα από ρίζες φυτών που εμβολιάστηκαν με υγρή

καλλιέργεια ριζοβίων (R7A) και καλλιεργήθηκαν σε θερμοκρασία 21°C, σε σύγκριση με την επίδραση του εκχυλίσματος ίδιας συγκέντρωσης (για όλες τις συγκεντρώσεις που ελέγχθηκαν) από ρίζες φυτών ελέγχου που αναπτύχθηκαν στην ίδια θερμοκρασία (CON21). Παρομοίως, τα ριζικά εκχυλίσματα των φυτών που εμβολιάστηκαν διπλά, τόσο με ριζόβια, όσο και με το στέλεχος DAOM του ΔΕΜ *R. irregularis* και αναπτύχθηκαν σε θερμοκρασία 25°C (R7A+DAOM), επέφεραν μεγαλύτερη αναστολή της κυτταρικής βιωσιμότητας σε σχέση με τα ριζικά εκχυλίσματα των αντίστοιχων φυτών ελέγχου (CON25), στη συγκέντρωση των 5μg/ml ( $p < 0,001$ ). Ωστόσο, δεν παρατηρήθηκε στατιστικά σημαντική διαφορά μεταξύ των εκχυλισμάτων από φυτά που είχαν εμβολιαστεί με ριζόβια (R7A), σε σχέση με τα εκχυλίσματα των φυτών που είχαν εμβολιαστεί με ριζόβια και ΔΕΜ (R7A+DAOM), όσον αφορά την επίδρασή τους στα επίπεδα της κυτταρικής βιωσιμότητας.

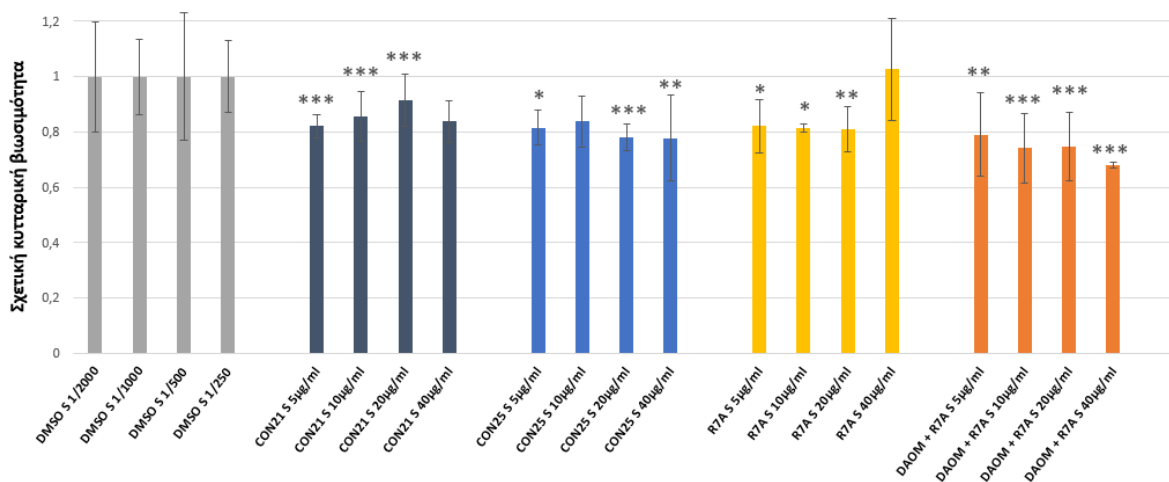


**Εικόνα 16:** Αξιολόγηση της επίδρασης των εκχυλισμάτων από τις ρίζες φυτών ελέγχου που έχουν αναπτυχθεί σε θερμοκρασία 21°C (CON21 R), φυτών ελέγχου που έχουν αναπτυχθεί σε θερμοκρασία 25°C (CON25 R), φυτών εμβολιασμένων με το στέλεχος R7A του ριζοβίου *Mesorhizobium loti* (R7A R) και φυτών που έχουν εμβολιαστεί ταυτόχρονα με το R7A και με το στέλεχος DAOM του ΔΕΜ *Rhizopagus irregularis* (DAOM + R7A R) στη βιωσιμότητα κυττάρων HEK293, μετά από επώαση 48 ωρών με αυξανόμενες συγκεντρώσεις των εκχυλισμάτων. Η σχετική κυτταρική βιωσιμότητα εκφράζεται ως η κυτταρική βιωσιμότητα παρουσία των υπό μελέτη εκχυλισμάτων συγκρινόμενη με τη συνθήκη αρνητικού ελέγχου (αντίστοιχη ποσότητα διαλύτη DMSO). Η κυτταρική βιωσιμότητα στη συνθήκη ελέγχου ορίζεται ως 1. Τα δεδομένα εκφράζονται ως ο μέσος όρος  $\pm$  SD, ( $n=3-4$ ). Οι τιμές p-value \* $p < 0,05$ , \*\* $p < 0,01$  και \*\*\* $p < 0,001$  προέκυψαν από τη σύγκριση της εκάστοτε συνθήκης με την αντίστοιχη ποσότητα διαλύτη DMSO με one-way ANOVA (Tukey-Kramer test). Οι τιμές p-value # $p < 0,05$ , ## $p < 0,01$  και ### $p < 0,001$  προέκυψαν από τη σύγκριση (Tukey-Kramer test) μεταξύ των εκχυλισμάτων μη εμβολιασμένων φυτών (CON21) και φυτών εμβολιασμένων με ριζόβια (R7A), που αναπτύχθηκαν στους 21°C, ή μεταξύ των εκχυλισμάτων μη εμβολιασμένων φυτών (CON25) και φυτών διπλά εμβολιασμένων με ΔΕΜ και ριζόβια (DAOM + R7A).

Όσον αφορά τα εκχυλίσματα των βλαστών, προκάλεσαν στατιστικά σημαντική μείωση της κυτταρικής βιωσιμότητας, συγκριτικά με τη συνθήκη ελέγχου, στις περισσότερες συγκεντρώσεις που ελέγχθηκαν (Εικόνα 17), η οποία, ωστόσο, ήταν μικρότερη από τη μείωση που προκλήθηκε από τις αντίστοιχες συγκεντρώσεις των ριζικών εκχυλισμάτων.



Συγκεκριμένα, όπως φαίνεται στην εικόνα 17, η αναστολή της κυτταρικής βιωσιμότητας από τα εκχυλίσματα των φυτών που είχαν εμβολιαστεί με ωφέλιμους μικροοργανισμούς κυμάνθηκε από 10% έως 30%. Αναφορικά με τα εκχυλίσματα των φυτών που είχαν εμβολιαστεί με ριζόβια και ΔΕΜ (R7A+DAOM) προκάλεσαν μείωση της κυτταρικής βιωσιμότητας, κατά 20-30%, (σε εύρος συγκεντρώσεων από 5μg/ml έως 40μg/ml), η οποία φαίνεται να ήταν μεγαλύτερη από τη μείωση, κατά περίπου 10-20%, που προκλήθηκε από τα εκχυλίσματα των αντίστοιχων συγκεντρώσεων των φυτών ελέγχων που αναπτύχθηκαν στην ίδια θερμοκρασία, καθώς και από τη μείωση, κατά περίπου 15%, που προκάλεσαν τα εκχυλίσματα των φυτών που είχαν εμβολιαστεί μόνο με το ριζοβιακό στέλεχος R7A. Ακόμη, η αναστολή της κυτταρικής βιωσιμότητας (κατά 20-30%) που προκλήθηκε από τα εκχυλίσματα των διπλά εμβολιασμένων φυτών (R7A+DAOM) ήταν μεγαλύτερη από τη μείωση που προκάλεσαν τα εκχυλίσματα των φυτών που είχαν εμβολιαστεί μόνο με το ριζοβιακό στέλεχος R7A, η οποία κυμάνθηκε γύρω στο 15%.



**Εικόνα 17:** Αξιολόγηση της επίδρασης των εκχυλισμάτων από τους βλαστούς φυτών ελέγχου που έχουν αναπτυχθεί σε θερμοκρασία 21°C (CON21 S), φυτών ελέγχου που έχουν αναπτυχθεί σε θερμοκρασία 25°C (CON25 S), φυτών εμβολιασμένων με το στέλεχος R7A του ριζοβίου *Mesorhizobium loti* (R7A S) και φυτών που έχουν εμβολιαστεί ταυτόχρονα με το R7A και με το στέλεχος DAOM του ΔΕΜ *Rhizophagus irregularis* (DAOM + R7A S) στη βιωσιμότητα κυττάρων HEK293, μετά από επώαση 48 ωρών με αυξανόμενες συγκεντρώσεις των εκχυλισμάτων. Η σχετική κυτταρική βιωσιμότητα εκφράζεται ως η κυτταρική βιωσιμότητα παρουσία των υπό μελέτη εκχυλισμάτων συγκρινόμενη με τη συνθήκη αρνητικού ελέγχου (αντίστοιχη συγκέντρωση του διαλύτη DMSO). Η κυτταρική βιωσιμότητα στη συνθήκη ελέγχου ορίζεται ως 1. Τα δεδομένα εκφράζονται ως ο μέσος όρος ± SD, (n=3-4), \*p<0,05, \*\*p<0.01, \*\*\*p<0.001. Οι τιμές p-value προέκυψαν από τη σύγκριση, της εκάστοτε συνθήκης με την αντίστοιχη συγκέντρωση του διαλύτη DMSO με one-way ANOVA (Tukey-Kramer test).

### 3.3 Διερεύνηση της επίδρασης των φυτικών εκχυλισμάτων βλαστών στην επαγόμενη από τον TNFα μεταγραφική δραστηριότητα του NF-κΒ

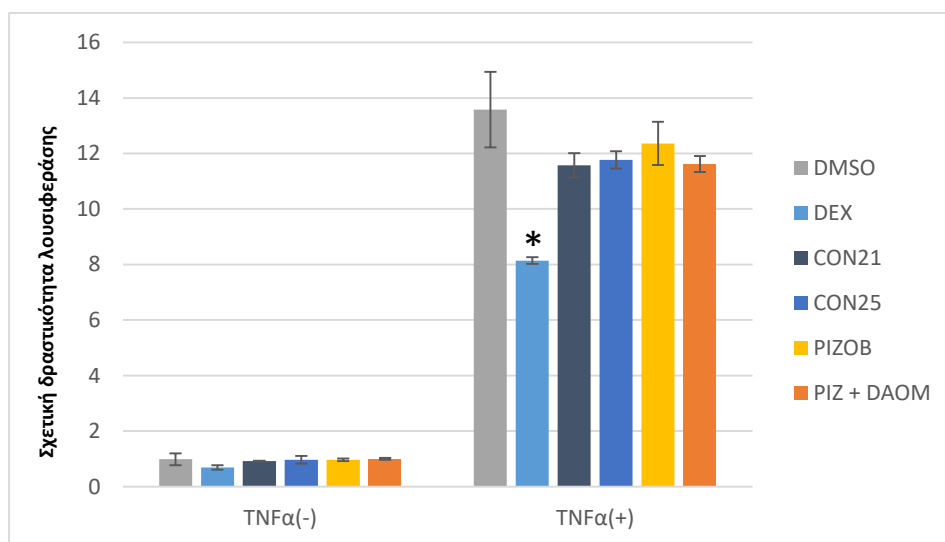
Η πιθανή αντιφλεγμονώδης δράση των εκχυλισμάτων αξιολογήθηκε μέσω της εκτίμησης της αναστολής της επαγόμενης από τον Παράγοντα Νέκρωσης Όγκων άλφα (TNFα) μεταγραφικής ενεργότητας του προ-φλεγμονώδους μεταγραφικού παράγοντα NF-κΒ, μέσω της δοκιμασίας λουσιφεράσης. Πιο συγκεκριμένα, τα κύτταρα HEK293 συν-διαμολύνθηκαν παροδικά με πλασμίδια pGS5 που περιέχουν το γονίδιο που κωδικοποιεί τη λουσιφεράση, υπό τον έλεγχο



υποκινητή, η αλληλουχία του οποίου περιλαμβάνει στοιχεία απόκρισης στον NF-κB (κατασκευή NF-κB-RE-λουσιφεράση), καθώς και πλασμίδια pMMTV, με ένθεμα το γονίδιο της β-γαλακτοσιδάσης, υπό τον έλεγχο ιικού υποκινητή (βλ. υποενότητα 2.7.3).

Ακολούθως, τα κύτταρα επώαστηκαν για 6 ώρες, παρουσία ή απουσία TNFα. Στη συνέχεια, στα κύτταρα χορηγήθηκαν τα εκχυλίσματα από βλαστούς φυτών ελέγχου που έχουν αναπτυχθεί σε θερμοκρασία 21°C (CON21), φυτών ελέγχου που έχουν αναπτυχθεί σε θερμοκρασία 25°C (CON25), φυτών εμβολιασμένων με *Mesorhizobium loti* (PIZOB.) και φυτών που έχουν εμβολιαστεί ταυτόχρονα με ριζόβια και με τον ΔΕΜ *Rhizophagus irregularis* (PIZ.+ DAOM) σε συγκέντρωση 40 μg/ml, η δεξαμεθαζόνη (DEX), σε συγκέντρωση 1μM, ως θετικός μάρτυρας, καθώς και ο αρνητικός μάρτυρας (αντίστοιχη ποσότητα DMSO), με ή χωρίς την προσθήκη 20 ng/mL TNFα, και ακολούθησε επώαση 6 ωρών.

Τα αποτελέσματα έδειξαν ότι ο TNFα αύξησε τη μεταγραφική δραστηριότητα του NF-κB κατά σχεδόν 14 φορές (Εικόνα 18). Ο θετικός μάρτυρας DEX μείωσε στατιστικά σημαντικά την επαγόμενη από τον TNFα μεταγραφική δραστηριότητα του NF-κB κατά 36,45% ( $p<0,05$ ), ενώ τα υπό μελέτη εκχυλίσματα προκάλεσαν μια μείωση της τάξης των 13% κατά προσέγγιση, η οποία, ωστόσο, δεν κρίθηκε στατιστικά σημαντική, σε σύγκριση με τον αρνητικό μάρτυρα (διαλύτης DMSO). Επίσης, δεν παρατηρήθηκαν διαφορές στην αντιφλεγμονώδη δράση των προερχόμενων από φυτά εμβολιασμένα με μικροσυμβιώτες εκχυλισμάτων, σε σχέση με τα εκχυλίσματα των φυτών ελέγχου.



**Εικόνα 18:** Καταστολή της επαγόμενης από τον TNFα μεταγραφικής δραστηριότητας του NF-κB από εκχυλίσματα (συγκέντρωσης 40 μg/ml) που απομονώθηκαν από βλαστούς φυτών ελέγχου που έχουν αναπτυχθεί σε θερμοκρασία 21°C (CON21), φυτών ελέγχου που έχουν αναπτυχθεί σε θερμοκρασία 25°C (CON25), φυτών εμβολιασμένων με το στέλεχος R7A του ριζοβίου *Mesorhizobium loti* (PIZOB.) και φυτών που έχουν εμβολιαστεί ταυτόχρονα με το R7A και με το στέλεχος DAOM του ΔΕΜ *Rhizophagus irregularis* (PIZ.+ DAOM), μετά από επώαση 6 ωρών, σε κύτταρα HEK293. Ως θετικός μάρτυρας έχει χρησιμοποιηθεί η δεξαμεθαζόνη (DEX) και ως αρνητικός μάρτυρας ο διαλύτης των εκχυλισμάτων DMSO. Η σχετική δραστηριότητα λουσιφεράσης προκύπτει μετά από κανονικοποίηση της δραστηριότητας της λουσιφεράσης με τη δραστηριότητα της β-γαλακτοσιδάσης. Η σχετική δραστηριότητα λουσιφεράσης στη συνθήκη αρνητικού ελέγχου απουσία TNFα ορίζεται ως 1. Τα δεδομένα εκφράζονται ως ο μέσος όρος ± SD, (n=2-3). Η στατιστική ανάλυση πραγματοποιήθηκε με t-test, \* $p<0,05$ .

#### 4. Συζήτηση-Συμπεράσματα

Τα φυτά αναπτύσσουν συμβιωτικές σχέσεις με ωφέλιμους μικροοργανισμούς, ώστε να εξασφαλίζουν την πρόσβαση σε θρεπτικά συστατικά, όπως το άζωτο και ο φώσφορος, παρέχοντας την περίσσεια άνθρακα που δεσμεύουν μέσω της φωτοσύνθεσης στους μικροσυμβιώτες, ως πηγή ενέργειας για την ανάπτυξή τους. Ειδικότερα, η συμβίωση των ψυχανθών τόσο με ριζόβια, όσο και με ΔΕΜ οδηγεί στον επαναπρογραμματισμό του φυτικού μεταβολισμού, ενισχύοντας ποιοτικά ή ποσοτικά την παραγωγή πρωτογενών και δευτερογενών μεταβολιτών, οι οποίοι παρουσιάζουν, συχνά, ποικίλες βιολογικές δράσεις σε ανθρώπινα κύτταρα. Στο πλαίσιο αυτό, ο εμβολιασμός με μικροσυμβιώτες ενδέχεται να εμπλουτίζει τη σύσταση των φυτικών εκχυλισμάτων σε βιοενεργά συστατικά. Η παρούσα εργασία αποσκοπεί στη διερεύνηση της πιθανής αντιπολλαπλασιαστικής και αντιφλεγμονώδους δράσης σε κύτταρα ανθρώπου, τα οποία έχουν προεπωαστεί με εκχυλίσματα από ρίζες και βλαστούς φυτών εμβολιασμένων με ωφέλιμους μικροοργανισμούς.

Ως φυτό-μοντέλο επιλέχθηκε το *Lotus japonicus*, το πλούσιο μεταβόλωμα του οποίου επιχειρήθηκε να ενισχυθεί, επάγοντας τη συμβίωσή του με ριζόβια, μέσω του μονού εμβολιασμού των φυταρίων με τον μικροσυμβιώτη του, *Mesorhizobium loti*. Επιπλέον, δεδομένου ότι διαφορετικά είδη μικροοργανισμών μπορούν να προάγουν τη συσσώρευση δευτερογενών μεταβολιτών σε διαφορετικό βαθμό στο ίδιο φυτό, πραγματοποιήθηκε διπλός εμβολιασμός των φυτών με το *M. loti* και τον δενδρόμορφο ενδομυκορριζικό μύκητα (ΔΕΜ) *Rhizophagus irregularis*, ώστε να εξεταστεί η πιθανή συνεργιστική επίδραση της συμβίωσης των ψυχανθών με ριζόβια και ΔΕΜ, ταυτόχρονα, στις βιολογικές δράσεις των φυτικών εκχυλισμάτων. Παράλληλα, εξετάστηκαν και εκχυλίσματα μη εμβολιασμένων φυτών (χειρισμός ελέγχου), ώστε να διαπιστωθεί κατά πόσο η βιοδραστικότητα των υπό μελέτη εκχυλισμάτων επηρεάζεται από τη συμβίωση του φυτού με τους μικροοργανισμούς.

Για την εκχύλιση των φυτικών ιστών από ρίζες και βλαστούς χρησιμοποιήθηκε ο οξικός αιθυλεστέρας, ένας διαλύτης ενδιάμεσης πολικότητας, ώστε να απομονωθούν σχετικώς άπολοι ή μετρίως πολικοί φυτικοί μεταβολίτες. Ο οξικός αιθυλεστέρας έχει αποδειχθεί ιδιαίτερα αποτελεσματικός όσον αφορά την εκχύλιση μεταβολιτών της οικογένειας των φλαβονοειδών (Tzanova et al., 2020; Thavamoney et al., 2018), ενώσεων που έχουν ανιχνευθεί σε υψηλές συγκεντρώσεις σε εκχυλίσματα φυτών *L. japonicus* εμβολιασμένων με *M. loti* (Rispaill et al., 2010). Ακολούθησε η εκτίμηση του αποικισμού των ριζών από τα στελέχη ΔΕΜ και ριζοβίων, βάσει της οποίας διαπιστώθηκε η επιτυχής εγκαθίδρυση της συμβίωσης των εμβολιασμένων φυτών με τους υπό μελέτη μικροοργανισμούς. Ο έλεγχος της βιοδραστικότητας των εκχυλισμάτων επικεντρώθηκε στη διερεύνηση της επίδρασής τους στην κυτταρική βιωσιμότητα και στους προ-φλεγμονώδεις μηχανισμούς της ανθρώπινης κυτταρικής σειράς HEK293, με σκοπό την εκτίμηση της αντιπολλαπλασιαστικής και της αντιφλεγμονώδους δράσης των εκχυλισμάτων, αντίστοιχα.

Η πιθανή αντιπολλαπλασιαστική δράση των φυτικών εκχυλισμάτων συγκεντρώσεων 5, 10, 20 και 40 µg/ml διερευνήθηκε μέσω της δοκιμασίας MTT. Τα αποτελέσματα στοιχειοθετούν την υπόθεση ότι οι συνθήκες ανάπτυξης του υπό μελέτη φυτού, και συγκεκριμένα η συμβίωσή του με ωφέλιμους μικροοργανισμούς μπορούν να αυξήσουν στατιστικά σημαντικά την κυτταροτοξικότητα των φυτικών εκχυλισμάτων. Παρατηρήθηκε, ακόμη, αισθητή διαφορά ως

προς την επίδραση στην κυτταροτοξικότητα μεταξύ των εκχυλισμάτων που απομονώθηκαν από διαφορετικά μέρη του φυτού, με μεγαλύτερη κυτταροτοξική δράση να επιτυγχάνεται με τη χορήγηση των ριζικών εκχυλισμάτων (Εικόνα 16), σε σύγκριση με εκείνα που προέρχονται από τους βλαστούς (Εικόνα 17). Οι προαναφερθείσες διαφορές οφείλονται, πιθανότατα, στο διαφορετικό μεταβολικό προφίλ των φυτικών ιστών, το οποίο φαίνεται να είναι πλουσιότερο ποσοτικά ή/και ποιοτικά στις ρίζες των φυτών, κατά την ανάπτυξη αμοιβαία επωφελών συμβιωτικών σχέσεων με ριζόβια ή/και ΔΕΜ. Ωστόσο, το γεγονός ότι παρατηρήθηκε στατιστικά σημαντική επίδραση στα επίπεδα κυτταρικής βιωσιμότητας και από τα εκχυλίσματα των βλαστών, επιβεβαιώνει τις παρατηρήσεις που έχουν ήδη αναφερθεί στη βιβλιογραφία (Zeng et al., 2013; Cartabia et al., 2021; Schweiger et al. 2014; Hill et al., 2018; Kaur et Suseela, 2021; Fester et al., 2011; Colebatch et al., 2004; Desbrosses et al., 2005) ότι ο αποικισμός των ριζών από τους μικροσυμβιώτες επηρεάζει τον μεταβολισμό τόσο των ριζών, όσο και των βλαστών. Αυτό μπορεί να ερμηνευτεί με την υπόθεση ότι είτε οι επαγόμενοι από τη συμβίωση φυτικοί μεταβολίτες μεταφέρονται στα υπέργεια τμήματα του φυτού μέσω του ξυλώματος, είτε η συμβίωση επάγει σηματοδότηση με κατεύθυνση από τις ρίζες προς τους βλαστούς, τροποποιώντας έμμεσα το μεταβολικό προφίλ των υπέργειων τμημάτων του φυτού.

Αξίζει, ακόμη, να σημειωθεί ότι δεν παρατηρήθηκε κάποια αξιοσημείωτη απόκλιση στη βιολογική δράση των εκχυλισμάτων ριζών που απομονώθηκαν από διπλά εμβολιασμένα φυτά, σε σχέση με τα εκχυλίσματα των φυτών που είχαν εμβολιαστεί μόνο με ριζόβια (Εικόνα 16). Το γεγονός αυτό μας οδηγεί στο συμπέρασμα ότι οι αλλαγές που προκαλεί η μυκορριζική συμβίωση στον μεταβολισμό του φυτού δεν ενισχύουν την, ήδη εμπλουτισμένη από τη συμβίωση με ριζόβια, σύσταση των ριζών σε ενώσεις με αντι-πολλαπλασιαστική δράση. Αναφορικά με την επίδραση των ριζοβίων στον φυτικό μεταβολισμό, η μελέτη των Rispaill et al. (2010) που περιλάμβανε την ανάλυση του μεταβολικού προφίλ εκχυλισμάτων φυτών *L. japonicus* εμβολιασμένων με το ριζόβιο *M. loti* (το οποίο χρησιμοποιήθηκε και στην παρούσα εργασία), οδήγησε στην ταυτοποίηση νέων αλκαλοειδών και αζωτούχων ενώσεων, ενώ ανέδειξε ποσοτικά αυξημένη περιεκτικότητα των εκχυλισμάτων σε φλαβονόνες, σε σχέση με τα εκχυλίσματα των μη εμβολιασμένων φυτών. Στο πλαίσιο αυτό, ενδέχεται ορισμένοι από αυτούς τους επαγόμενους από τα ριζόβια μεταβολίτες να παρουσιάζουν αντι-πολλαπλασιαστική δράση στα κύτταρα HEK293.

Μια παρόμοια εργασία που αποσκοπούσε στη διερεύνηση της κυτταροτοξικότητας του αιθανολικού εκχυλίσματος φυτών τζίντζερ (*Zingiber officinale*) αποικισμένων από ΔΕΜ έναντι της κυτταρικής σειράς καρκίνου του μαστού T47D έδειξε ότι το αιθανολικό εκχύλισμα του ριζώματος φυτών εμβολιασμένων με ΔΕΜ σε συγκέντρωση 10 μg/mL και 100 μg/mL ήταν σε θέση να αναστείλει στατιστικά σημαντικά την ανάπτυξη των κυττάρων T47D. Συγκεκριμένα, το εκχύλισμα συγκέντρωσης 10 μg/mL μείωσε την κυτταρική βιωσιμότητα κατά περίπου 50% (Suharty et al., 2018). Αντιστοίχως, τα αποτελέσματα της παρούσας εργασίας έδειξαν ότι το ριζικό εκχύλισμα ίδιας συγκέντρωσης (10 μg/ml) που απομονώθηκε από φυτά διπλά εμβολιασμένα με ΔΕΜ και ριζόβια (R7A+DAOM), προκάλεσε αναστολή της κυτταρικής βιωσιμότητας κατά περίπου 40% (Εικόνα 16).

Τα αποτελέσματα αυτά συμβαδίζουν με μια σχετική μελέτη στο φαρμακευτικό φυτό *Artemisia annua* που έδειξε αυξημένη περιεκτικότητα εκχυλισμάτων βλαστών που προέρχονταν από φυτά εμβολιασμένα με τον *R. irregularis*, στην αντικαρκινική τερπενοειδή ένωση αρτεμισίνη

(Domokos et al. 2018), σε σχέση με τα αντίστοιχα εκχυλίσματα μη εμβολιασμένων φυτών. Αύξηση της περιεκτικότητας των εκχυλισμάτων βλαστών *A. annua* σε αρτεμισίνη έχει δείξει και ο διπλός εμβολιασμός με τον ΔΕΜ *G. mosseae* και το ελεύθερο αζωτοδεσμευτικό βακτήριο *B. Subtilis*, σε σχέση με τα εκχυλίσματα των μονά εμβολιασμένων και των μη εμβολιασμένων φυτών (Awasthi et al. 2011). Αξίζει, ακόμη, να σημειωθεί ότι, μια μελέτη των Schweiger et al. (2014) ανέδειξε ότι οι αλλαγές στο μεταβολικό προφίλ που σχετίζονται με το είδος του φυτού-ξενιστή μετά τον αποικισμό από τον *Rhizophagus irregularis* υπερέβαιναν κατά πολύ τις γενικές μεταβολικές αποκρίσεις που είναι κοινές σε όλα τα είδη φυτών.

Στο πλαίσιο αυτό, δεδομένου ότι το μεταβολικό προφίλ φυτών *L. japonicus* διπλά εμβολιασμένων με τον συνδυασμό *M. loti* και *R. irregularis* δεν έχει χαρακτηριστεί έως τώρα, κρίνεται απαραίτητη η πραγματοποίηση περαιτέρω μελετών προς αυτή την κατεύθυνση, με σκοπό την ταυτοποίηση ειδο-ειδικών κυτταροτοξικών μεταβολιτών που παράγονται υπό αυτές τις συνθήκες στους ιστούς του φυτού και ερμηνεύουν την αντι-πολλαπλασιαστική δράση των υπό μελέτη εκχυλισμάτων. Επιπλέον, μελλοντικές μελέτες θα μπορούσαν να εστιάσουν στην αποκρυπτογράφηση των μοριακών μονοπατιών-στόχων, μέσω των οποίων οι κυτταροτοξικοί φυτικοί μεταβολίτες που περιέχονται στα υπό μελέτη εκχυλίσματα επάγουν τον κυτταρικό θάνατο στην κυτταρική σειρά HEK293. Ακόμη, κρίνεται απαραίτητη η διερεύνηση της πιθανής κυτταροτοξικής/αντικαρκινικής δράσης των υπό μελέτη εκχυλισμάτων τόσο *in vitro*, σε ανθρώπινες καρκινικές κυτταρικές σειρές, όσο και *in vivo*, σε ζωικά μοντέλα όγκων.

Εκτός από την αντιπολλαπλασιαστική δράση, εξετάστηκε και η επίδραση των υπό μελέτη εκχυλισμάτων στη μεταγραφική δραστηριότητα του προ-φλεγμονώδους μεταγραφικού παράγοντα NF-κΒ στα κύτταρα HEK293, μέσω της δοκιμασίας λουσιφεράσης/ $\beta$ -γαλακτοσιδάσης. Τα αποτελέσματα υποδεικνύουν ότι αν και παρατηρήθηκε μια τάση μείωσης της επαγόμενης από τον TNF $\alpha$  μεταγραφικής δραστηριότητας του NF-κΒ, η μείωση αυτή δεν χαρακτηρίστηκε από στατιστική σημαντικότητα (Εικόνα 18). Επομένως, η συμβίωση των φυτών *L. japonicus* με τους ωφέλιμους μικροοργανισμούς *M. loti* και *R. irregularis* δε φάνηκε να επιδρά αισθητά στην περιεκτικότητα των βλαστών σε μεταβολίτες με αντιφλεγμονώδη δράση. Ωστόσο, η εφαρμογή της ίδιας μεθοδολογία σε προηγούμενες μελέτες του εργαστηρίου ανέδειξε αντιφλεγμονώδη δράση σε (μη εμβολιασμένα) φυτικά εκχυλίσματα μαστίχας σε κύτταρα HEK293 (Kalousi et al., 2023; Kalousi et al., 2022). Ακόμη, πολλές μελέτες έχουν δείξει ότι φαινολικές ενώσεις, οι οποίες εμφανίζονται σε αυξημένη συγκέντρωση σε εκχυλίσματα από φυτά που έχουν εμβολιαστεί με ΔΕΜ (Kaur et Suseela, 2021), μπορούν να μειορρυθμίζουν μεταγραφικούς παράγοντες που εμπλέκονται σε μονοπάτια της φλεγμονής, όπως ο NF-κΒ (Rahman et al., 2021). Από την άλλη πλευρά, σε μια συναφή μελέτη, κατά την οποία διερευνήθηκε η επίδραση εκχυλισμάτων από ρίζες φυτών *Astragalus membranaceus* που έχουν αποικιστεί από ενδοφυτικά βακτήρια του γένους *Rhizobium* στην επαγωγή φλεγμονής σε κύτταρα HEK293T, φάνηκε ότι τα εκχυλίσματα προώθησαν την προφλεγμονώδη σηματοδότηση NFκΒ, μια δράση που αποδείχθηκε ότι αποδίδεται στην παρουσία ενδοφυτικών λιποπολυσακχαριτών και λιποπρωτεϊνών στα φυτικά εκχυλίσματα (Koehler et al., 2020). Στο πλαίσιο αυτό, απαιτούνται περαιτέρω μελέτες που θα εξετάζουν την επίδραση των εκχυλισμάτων από ρίζες φυτών εμβολιασμένων με *M. loti* ή/και *R. irregularis* στη σηματοδότηση της φλεγμονής, δεδομένου ότι τα εν λόγω εκχυλίσματα επηρέασαν σημαντικά τα επίπεδα βιωσιμότητας των κυττάρων HEK293 (Εικόνα 16).

Συμπερασματικά, τα εκχυλίσματα ριζών και βλαστών που απομονώθηκαν από φυτά εμβολιασμένα με ωφέλιμους μικροοργανισμούς παρουσίασαν στατιστικά σημαντική αναστολή της κυτταρικής βιωσιμότητας, ενώ δεν προκάλεσαν στατιστικά σημαντική μείωση της φλεγμονής στα κύτταρα HEK293. Τα αποτελέσματα αυτά, θα μπορούσαν να αποτελέσουν το έναυσμα για την πραγματοποίηση περαιτέρω ερευνών, *in vitro* και *in vivo*, οι οποίες θα εξετάζουν την πιθανότητα αξιοποίησης των δραστικών συστατικών των υπό μελέτη φυτικών εκχυλισμάτων, καθώς και εκχυλισμάτων από φυτά που έχουν εμβολιαστεί με διαφορετικούς συνδυασμούς ΔΕΜ και ριζοβίων, στη θεραπεία ασθενειών, όπως ο καρκίνος και οι φλεγμονώδεις νόσοι.

## Βιβλιογραφία

- Amani, M., Javanmard, A., Habibi Machiani, R., & Sadeghpour, A. (2022). Arbuscular mycorrhizal Fungi and Changes in Primary and Secondary Metabolites. *Plants (Basel, Switzerland)*, 11(17), 2183. <https://doi.org/10.3390/plants11172183>
- Awasthi, A., Bharti, N., Nair, P., Singh, R., Shukla, A. K., Gupta, M. M., ... Kalra, A. (2011). Synergistic effect of *Glomus mosseae* and nitrogen fixing *Bacillus subtilis* strain Daz26 on artemisinin content in *Artemisia annua* L. *Applied Soil Ecology*, 49, 125–130. doi: 10.1016/j.apsoil.2011.06.005
- Azad, T., Tashakor, A., & Hosseinkhani, S. (2014). Split-luciferase complementary assay: applications, recent developments, and future perspectives. *Analytical and bioanalytical chemistry*, 406(23), 5541–5560. <https://doi.org/10.1007/s00216-014-7980-8>
- Bekhat, M., Rowson, S. A., & Neigh, G. N. (2017). Checks and balances: The glucocorticoid receptor and NFκB in good times and bad. *Frontiers in neuroendocrinology*, 46, 15–31. <https://doi.org/10.1016/j.yfrne.2017.05.001>
- Borde, M., Dudhane, M., & Jite, P. K. (2009). Role of Bioinoculant (AM Fungi) Increasing in Growth, Flavor Content and Yield in *Allium sativum* L. under Field Condition. *Notulae Botanicae Horti Agrobotanici Cluj-Napoca*, 37(2), 124–128. <https://doi.org/10.15835/nbha3723289>
- Cartabia, A., Tsiokanos, E., Tsafantakis, N., Lalaymia, I., Termentzi, A., Miguel, M., Fokialakis, N., & Declerck, S. (2021). The Arbuscular Mycorrhizal Fungus *Rhizophagus irregularis* MUCL 41833 Modulates Metabolites Production of *Anchusa officinalis* L. Under Semi-Hydroponic Cultivation. *Frontiers in plant science*, 12, 724352. <https://doi.org/10.3389/fpls.2021.724352>
- Colebatch, G., Desbrosses, G., Ott, T., Krusell, L., Montanari, O., Kloska, S., Kopka, J., & Udvardi, M. K. (2004). Global changes in transcription orchestrate metabolic differentiation during symbiotic nitrogen fixation in *Lotus japonicus*. *The Plant journal:for cell and molecular biology*, 39(4), 487–512. <https://doi.org/10.1111/j.1365-313X.2004.02150.x>
- Cornara, L., Xiao, J., & Burlando, B. (2016). Therapeutic Potential of Temperate Forage Legumes: A Review. *Critical reviews in food science and nutrition*, 56 Suppl 1, S149–S161. <https://doi.org/10.1080/10408398.2015.1038378>
- Desbrosses, G. G., Kopka, J., & Udvardi, M. K. (2005). *Lotus japonicus* metabolic profiling. Development of gas chromatography-mass spectrometry resources for the study of plant-microbe interactions. *Plant physiology*, 137(4), 1302–1318. <https://doi.org/10.1104/pp.104.054957>
- Domokos, E., Jakab-Farkas, L., Darkó, B., Bíró-Janka, B., Mara, G., Albert, C., & Balog, A. (2018). Increase in *Artemisia annua* Plant Biomass Artemisinin Content and Guaiacol Peroxidase Activity Using the Arbuscular Mycorrhizal Fungus *Rhizophagus irregularis*. *Frontiers in plant science*, 9, 478. <https://doi.org/10.3389/fpls.2018.00478>
- Dutta SC, Neog B. Accumulation of secondary metabolites in responsible to antioxidant activity of Turmeric rhizomes co-inoculated with native arbuscular mycorrhizal fungi and plant growth promoting bacteria. *Sci Hortic*. 2016;204:179–184.
- Farooq, S., Mazhar, A., Ghouri, A., Ihsan-Ul-Haq, & Ullah, N. (2020). One-Pot Multicomponent Synthesis and Bioevaluation of Tetrahydroquinoline Derivatives as Potential Antioxidants, α-Amylase Enzyme Inhibitors, Anti-Cancerous and Anti-Inflammatory Agents. *Molecules (Basel, Switzerland)*, 25(11), 2710. <https://doi.org/10.3390/molecules25112710>
- Fester, T., Fetzer, I., Buchert, S., Lucas, R., Rillig, M. C., & Härtig, C. (2011). Towards a systemic metabolic signature of the arbuscular mycorrhizal interaction. *Oecologia*, 167(4), 913–924. <https://doi.org/10.1007/s00442-011-2037-6>



- Földi-Börcsök, E., Bedall, F., & Rahlfs, V. W. (1971). Die antiphlogistische und ödemhemmende Wirkung von Cumarin aus Melilotus officinalis [The anti-inflammatory and anti-edematous effects of coumarins from Melilotus officinalis]. *Arzneimittel-Forschung*, 21(12), 2025–2030.
- Gatouillat, G., Magid, A. A., Bertin, E., Okiemy-Akeli, M. G., Morjani, H., Lavaud, C., & Madoulet, C. (2014). Cytotoxicity and apoptosis induced by alfalfa (*Medicago sativa*) leaf extracts in sensitive and multidrug-resistant tumor cells. *Nutrition and cancer*, 66(3), 483–491. <https://doi.org/10.1080/01635581.2014.884228>
- Gerber, A. N., Newton, R., & Sasse, S. K. (2021). Repression of transcription by the glucocorticoid receptor: A parsimonious model for the genomics era. *The Journal of biological chemistry*, 296, 100687. <https://doi.org/10.1016/j.jbc.2021.100687>
- Graham, P. H., & Vance, C. P. (2003). Legumes: importance and constraints to greater use. *Plant physiology*, 131(3), 872–877. <https://doi.org/10.1104/pp.017004>
- Harris, J. C., Cottrell, S. L., Plummer, S., & Lloyd, D. (2001). Antimicrobial properties of *Allium sativum* (garlic). *Applied microbiology and biotechnology*, 57(3), 282–286. <https://doi.org/10.1007/s002530100722>
- Hill, E. M., Robinson, L. A., Abdul-Sada, A., Vanbergen, A. J., Hodge, A., & Hartley, S. E. (2018). Arbuscular Mycorrhizal Fungi and Plant Chemical Defence: Effects of Colonisation on Aboveground and Belowground Metabolomes. *Journal of chemical ecology*, 44(2), 198–208. <https://doi.org/10.1007/s10886-017-0921-1>
- Hussein, R.A., & El-anssary, A.A. (2018). Plants Secondary Metabolites: The Key Drivers of the Pharmacological Actions of Medicinal Plants. *Herbal Medicine*.
- Kalousi, F. D., Pollastro, F., Christodoulou, E. C., Karra, A. G., Tsialtas, I., Georgantopoulos, A., Salamone, S., & Psarra, A. G. (2022). Apoptotic, Anti-Inflammatory Activities and Interference with the Glucocorticoid Receptor Signaling of Fractions from *Pistacia lentiscus* L. var. chia Leaves. *Plants (Basel, Switzerland)*, 11(7), 934. <https://doi.org/10.3390/plants11070934>
- Kalousi, F. D., Pollastro, F., Karra, A. G., Tsialtas, I., Georgantopoulos, A., Salamone, S., & Psarra, A. G. (2023). Regulation of Energy Metabolism and Anti-Inflammatory Activities of Mastiha Fractions from *Pistacia lentiscus* L. var. chia. *Foods (Basel, Switzerland)*, 12(7), 1390. <https://doi.org/10.3390/foods12071390>
- Karin, M., & Greten, F. R. (2005). NF-kappaB: linking inflammation and immunity to cancer development and progression. *Nature reviews. Immunology*, 5(10), 749–759. <https://doi.org/10.1038/nri1703>
- Kaur, S., & Suseela, V. (2020). Unraveling Arbuscular Mycorrhiza-Induced Changes in Plant Primary and Secondary Metabolome. *Metabolites*, 10(8), 335. <https://doi.org/10.3390/metabo10080335>
- Kavitha, C., Rajamani, K., & Vadivel, E. (2010). *Coleus forskohlii* - a comprehensive review on morphology, phytochemistry and pharmacological aspects. *Journal of Medicinal Plants Research*, 4, 278-285.
- Khan, T., Ali, M., Khan, A., Nisar, P., Jan, S. A., Afridi, S., & Shinwari, Z. K. (2019). Anticancer Plants: A Review of the Active Phytochemicals, Applications in Animal Models, and Regulatory Aspects. *Biomolecules*, 10(1), 47. <https://doi.org/10.3390/biom10010047>
- Koehler, H., Puchalski, K., Ruiz, G., Jacobs, B., & Langland, J. (2020). The Role of Endophytic/Epiphytic Bacterial Constituents in the Immunostimulatory Activity of the Botanical, *Astragalus membranaceus*. *The Yale journal of biology and medicine*, 93(2), 239–250.
- Krishna, S., Bustamante, L., Haynes, R. K., & Staines, H. M. (2008). Artemisinin: their growing importance in medicine. *Trends in pharmacological sciences*, 29(10), 520–527. <https://doi.org/10.1016/j.tips.2008.07.004>

- Labus K. (2018). Effective detection of biocatalysts with specified activity by using a hydrogel-based colourimetric assay -  $\beta$ -galactosidase case study. *PLoS one*, *13*(10), e0205532. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0205532>
- Liu, A., Ku, Y. S., Contador, C. A., & Lam, H. M. (2020). The Impacts of Domestication and Agricultural Practices on Legume Nutrient Acquisition Through Symbiosis With Rhizobia and Arbuscular Mycorrhizal Fungi. *Frontiers in genetics*, *11*, 583954. <https://doi.org/10.3389/fgene.2020.583954>
- Maiuolo, J., Gliozzi, M., Carresi, C., Musolino, V., Oppedisano, F., Scarano, F., Nucera, S., Scicchitano, M., Bosco, F., Macri, R., Ruga, S., Cardamone, A., Coppoletta, A., Mollace, A., Cognetti, F., & Mollace, V. (2021). Nutraceuticals and Cancer: Potential for Natural Polyphenols. *Nutrients*, *13*(11), 3834. <https://doi.org/10.3390/nu13113834>
- Mandal, S. M., Chakraborty, D., & Dey, S. (2010). Phenolic acids act as signaling molecules in plant-microbe symbioses. *Plant signaling & behavior*, *5*(4), 359–368. <https://doi.org/10.4161/psb.5.4.10871>
- Miller, L. K., & Iveaver, F. (1976). Experiment I. *Journal of Applied Behavior Analysis*, *9*, 289–300.
- Mosmann T. (1983). Rapid colorimetric assay for cellular growth and survival: application to proliferation and cytotoxicity assays. *Journal of immunological methods*, *65*(1-2), 55–63. [https://doi.org/10.1016/0022-1759\(83\)90303-4](https://doi.org/10.1016/0022-1759(83)90303-4)
- Noguchi, T., & Golden, S.S. (2017, March 22). *Bioluminescent and fluorescent reporters in circadian rhythm studies*. Retrieved from <http://ccb.ucsd.edu/the-bioclock-studio/education-resources/reporter-review/index.html>.
- Parniske M. (2008). Arbuscular mycorrhiza: the mother of plant root endosymbioses. *Nature reviews. Microbiology*, *6*(10), 763–775. <https://doi.org/10.1038/nrmicro1987>
- Pleşca-Manea, L., Pârvu, A. E., Pârvu, M., Taămaş, M., Buia, R., & Puia, M. (2002). Effects of *Melilotus officinalis* on acute inflammation. *Phytotherapy research: PTR*, *16*(4), 316–319. <https://doi.org/10.1002/ptr.875>
- Rafiq, S., Majeed, R., Qazi, A. K., Ganai, B. A., Wani, I., Rakhshanda, S., Qurishi, Y., Sharma, P. R., Hamid, A., Masood, A., & Hamid, R. (2013). Isolation and antiproliferative activity of *Lotus corniculatus* lectin towards human tumour cell lines. *Phytomedicine: international journal of phytotherapy and phytopharmacology*, *21*(1), 30–38. <https://doi.org/10.1016/j.phymed.2013.08.005>
- Rahman, M. M., Rahaman, M. S., Islam, M. R., Rahman, F., Mithi, F. M., Alqahtani, T., Almikhlaifi, M. A., Alghamdi, S. Q., Alruwaili, A. S., Hossain, M. S., Ahmed, M., Das, R., Emran, T. B., & Uddin, M. S. (2021). Role of Phenolic Compounds in Human Disease: Current Knowledge and Future Prospects. *Molecules (Basel, Switzerland)*, *27*(1), 233. <https://doi.org/10.3390/molecules27010233>
- Ranner, J. L., Schalk, S., Martyniak, C., Parniske, M., Gutjahr, C., Stark, T. D., & Dawid, C. (2023). Primary and Secondary Metabolites in *Lotus japonicus*. *Journal of agricultural and food chemistry*, *71*(30), 11277–11303. <https://doi.org/10.1021/acs.jafc.3c02709>
- Reiter, E., Gerster, P., & Jungbauer, A. (2011). Red clover and soy isoflavones--an in vitro safety assessment. *Gynecological endocrinology: the official journal of the International Society of Gynecological Endocrinology*, *27*(12), 1037–1042. <https://doi.org/10.3109/09513590.2011.588743>
- Rezaei-Chiyaneh E., Battaglia M.L., Sadeghpour A., Shokrani F., Nasab A.D.M., Raza M.A., von Cossel M. Optimizing Intercropping Systems of Black Cumin (*Nigella sativa* L.) and Fenugreek (*Trigonella foenum-graecum* L.) through Inoculation with Bacteria and Mycorrhizal Fungi. *Adv. Sustain. Syst.* 2021;5:2000269. doi: 10.1002/adsu.202000269.
- Rispail, N., Hauck, B., Bartholomew, B., Watson, A. A., Nash, R. J., & Webb, K. J. (2010). Secondary metabolite profiling of the model legume *Lotus japonicus* during its symbiotic interaction with *Mesorhizobium loti*. *Symbiosis*, *50*(3), 119–128. doi:10.1007/s13199-010-0053-7

- Sailo, G. L., & Bagyaraj, D. J. (2005). Influence of different AM-fungi on the growth, nutrition and forskolin content of *Coleus forskohlii*. *Mycological research*, 109(Pt 7), 795–798. <https://doi.org/10.1017/s0953756205002832>
- Schweiger, R., Baier, M. C., Persicke, M., & Müller, C. (2014). High specificity in plant leaf metabolic responses to arbuscular mycorrhiza. *Nature communications*, 5, 3886. <https://doi.org/10.1038/ncomms4886>
- Shah V, Bhat SV, Bajwa BS, Dornaeur H, De Souza NJ (1980). The occurrence of forskolin in *Labiatae*. *Planta Medica*. 39:183-185
- Sharma, V., Tiwari, R. K., Shukla, S. S., & Pandey, R. K. (2020). Current and Future molecular mechanism in Inflammation and Arthritis. *Journal of pharmacopuncture*, 23(2), 54–61. <https://doi.org/10.3831/KPI.2020.23.009>
- Suharty N, Wahyuni FS, Dachriyanus. Cytotoxic Activity of Ethanol Extract of Arbuscular Mycorrhizal Fungi Induced Ginger Rhizome on T47D Breast Cancer Cell Lines. *Pharmacog J*. 2018;10(6):1133-6
- Sun, S., Yang, X., Wang, Y., & Shen, X. (2016). In Vivo Analysis of Protein-Protein Interactions with Bioluminescence Resonance Energy Transfer (BRET): Progress and Prospects. *International journal of molecular sciences*, 17(10), 1704. <https://doi.org/10.3390/ijms17101704>
- Taiz L, Zeiger E (2004) Plant physiology, 3rd edition, Sinauer Associates Publishers, Sunderland
- Taniguchi, K., & Karin, M. (2018). NF-κB, inflammation, immunity and cancer: coming of age. *Nature reviews. Immunology*, 18(5), 309–324. <https://doi.org/10.1038/nri.2017.142>
- Tsiknia, M., Tsikou, D., Papadopoulou, K. K., & Ehaliotis, C. (2021). Multi-species relationships in legume roots: From pairwise legume-symbiont interactions to the plant - microbiome - soil continuum. *FEMS microbiology ecology*, 97(2), fiae222. <https://doi.org/10.1093/femsec/fiae222>
- Volpin, H., Elkind, Y., Okon, Y., & Kapulnik, Y. (1994). A Vesicular Arbuscular Mycorrhizal Fungus (*Glomus intraradix*) Induces a Defense Response in Alfalfa Roots. *Plant physiology*, 104(2), 683–689. <https://doi.org/10.1104/pp.104.2.683>
- Wekesa, C., Jalloh, A. A., Muoma, J. O., Korir, H., Omenge, K. M., Maingi, J. M., Furch, A. C. U., & Oelmüller, R. (2022). Distribution, Characterization and the Commercialization of Elite Rhizobia Strains in Africa. *International journal of molecular sciences*, 23(12), 6599. <https://doi.org/10.3390/ijms23126599>
- Widyarini, S., Spinks, N., Husband, A. J., & Reeve, V. E. (2001). Isoflavonoid compounds from red clover (*Trifolium pratense*) protect from inflammation and immune suppression induced by UV radiation. *Photochemistry and photobiology*, 74(3), 465–470. [https://doi.org/10.1562/0031-8655\(2001\)074<0465:icfrct>2.0.co;2](https://doi.org/10.1562/0031-8655(2001)074<0465:icfrct>2.0.co;2)
- Yang, Z., Huang, X. Y., & Zeng, Y. Y. (2008). Effects of red clover extract on the activation and proliferation of mouse T lymphocytes and the NO secretion of mouse macrophages. *Yao xue xue bao = Acta pharmaceutica Sinica*, 43(10), 1019–1024.
- Zeng, Y., Guo, L. P., Chen, B. D., Hao, Z. P., Wang, J. Y., Huang, L. Q., Yang, G., Cui, X. M., Yang, L., Wu, Z. X., Chen, M. L., & Zhang, Y. (2013). Arbuscular mycorrhizal symbiosis and active ingredients of medicinal plants: current research status and perspectives. *Mycorrhiza*, 23(4), 253–265. <https://doi.org/10.1007/s00572-013-0484-0>
- Zhao, Y., Cartabia, A., Lalaymia, I., & Declerck, S. (2022). Arbuscular mycorrhizal fungi and production of secondary metabolites in medicinal plants. *Mycorrhiza*, 32(3-4), 221–256. <https://doi.org/10.1007/s00572-022-01079-0>
- Zubek, S., Rola, K., Szewczyk, A. et al. Enhanced concentrations of elements and secondary metabolites in *Viola tricolor* L. induced by arbuscular mycorrhizal fungi. *Plant Soil* 390, 129–142 (2015). <https://doi.org/10.1007/s11104-015-2388-6>

