

Βασιλική Σκιαδά – Διδακτορική διατριβή

Colonization of legumes by an endophytic *Fusarium solani* strain K. Early-stage molecular signaling and sub-cellular responses.

Πρότυπα αποικισμού ψυχανθών από τον ενδοφυτικό μύκητα *Fusarium solani* στέλεχος K. Μοριακή σηματοδότηση και υπο-κυτταρικές αποκρίσεις στα πρώιμα στάδια της αλληλεπίδρασης.

Περίληψη

Ένα μεγάλο εύρος μικροοργανισμών αλληλεπιδρούν με το ριζικό σύστημα των φυτών της οικογένειας των ψυχανθών, συνάπτοντας με αυτά από αμοιβαία επωφελείς έως και παρασιτικές σχέσεις. Τα ψυχανθή αντιλαμβάνονται τους συμβιωτικούς μικροοργανισμούς (ριζόβια, δενδρόμορφοι μυκορριζικοί μύκητες) προτού να έλθουν σε επαφή με αυτούς, μέσω αναγνώρισης της έκκρισης των μικροβιακών παραγόντων Nod, και των μέχρι σήμερα μη αναγνωρισμένων/ μη χαρακτηρισμένων παραγόντων Myc (λιποχιτολιγوسακχαρίτες, και μίγμα χιτολιγوسακχαριτών/λιποχιτολιγوسακχαριτών, αντίστοιχα). Η αναγνώριση πραγματοποιείται στην πλασματική μεμβράνη των ριζικών κυττάρων μέσω των υποδοχέων LysM που φέρουν δραστικότητα κινάσης. Ακολούθως ενεργοποιείται ένα μονοπάτι σηματοδότησης, γνωστό ως Common Symbiotic Signaling Pathway (CSSP), το οποίο μεταξύ άλλων περιλαμβάνει την επαγωγή ενδοπυρηνικών ταλαντώσεων ασβεστίου στην επιδερμίδα της ρίζας. Ο αποικισμός της ρίζας των ψυχανθών από επωφελείς συμβιώτες είναι καλά μελετημένος, και είναι γνωστό πως παρουσιάζει μια σειρά από ομοιότητες με τα πρότυπα αποικισμού της ρίζας από παθογόνους μικροοργανισμούς. Εντούτοις, ο αποικισμός από ενδοφυτικούς μύκητες, καθώς και οι υποκυττάρειες αλλαγές που αυτός περιλαμβάνει, χρήζουν περαιτέρω μελέτης.

Ο σκοπός της παρούσας εργασίας ήταν η μελέτη των πρώιμων σταδίων της αλληλεπίδρασης ενός ενδοφυτικού μυκητιακού στελέχους, του *Fusarium solani* στέλεχος K (FsK), με το φυτό μοντέλο *Lotus japonicus*, τόσο σε μοριακό όσο και σε κυτταρικό επίπεδο.

Όσον αφορά στους μοριακούς μηχανισμούς αναγνώρισης του ενδόφυτου από το φυτό, παρατηρήθηκαν ομοιότητες με τους καλά μελετημένους μηχανισμούς αναγνώρισης των συμβιωτικών μικροοργανισμών από τα ψυχανθή. Πιο συγκεκριμένα, ο FsK επήγαγε την έκφραση των LysM υποδοχέων που αναγνωρίζουν μόρια με σκελετό χιτίνης, καθώς και την έκφραση γονιδίων που ανήκουν στο CSSP, και γονιδίων που εξαρτώνται από- και δρουν κατάντη του CSSP. Επιπλέον, ο μύκητας επήγαγε την έκφραση γονιδίων που σχετίζονται με την άμυνα του φυτού. Προχωρώντας ένα βήμα παραπέρα, αποδείχθηκε πως εξωκυτταρικές ενώσεις του FsK, οι οποίες αποτελούνται τόσο από θερμοευαίσθητα όσο και από μόρια επιρρεπή στη δράση χιτινασών, φέρουν την ικανότητα επαγωγής ταλαντώσεων ασβεστίου εντός του πυρήνα των επιδερμικών κυττάρων ριζικών οργάνων *M. truncatula*, σημασμένων με το μοριακό δείκτη *cameleon*. Για την επαγωγή τέτοιων ταλαντώσεων ασβεστίου, είναι γνωστό ότι ένα λειτουργικό μονοπάτι σηματοδότησης CSSP είναι απαραίτητο. Η απόκριση αυτή των επιδερμικών κυττάρων παρατηρείται όχι

μόνο έπειτα από διέγερση αυτών με εξωκυτταρικές ενώσεις του FSK, αλλά και έπειτα από διέγερση με μια σειρά άλλων εκκριμάτων, προερχόμενα από μύκητες που συνάπτουν είτε σχέσεις αμοιβαιότητας είτε σχέσεις παθογένειας.

Η ανάλυση μιας σειράς μεταλλαγμένων φυτών *L. japonicus* οδήγησε στη συμπλήρωση των παραπάνω αποτελεσμάτων. Πιο συγκεκριμένα, καταγράφηκε προχωρημένος ενδορριζικός αποικισμός από τον FSK σε μεταλλάγματα γονιδίων που κωδικοποιούν για ορισμένους υποδοχείς LysM, ενώ περιορισμένος αποικισμός σημειώθηκε σε μεταλλάγματα γονιδίων που δρουν κατάντη των ενδοπυρηνικών ταλαντώσεων ασβεστίου (*LjCCaMK*, *LjCYCLOPS*). Είναι εμφανές, λοιπόν, με βάση τα παραπάνω αποτελέσματα, πως μέσω του μονοπατιού σηματοδότησης CSSP αναγνωρίζονται από το φυτό και άλλοι μικροοργανισμοί πλην των συμβιωτικών ριζοβίων και δενδρόμορφων μυκορριζικών μυκήτων.

Προκειμένου να μελετηθεί η αλληλεπίδραση φυτού-μύκητα εντός του φυτικού κυττάρου, χρησιμοποιήθηκαν είτε ολόκληρα φυτά *L. japonicus* είτε καλλιέργειες ριζικών οργάνων *M. truncatula* που είναι σημασμένα για συγκεκριμένα οργανίδια, επιτρέποντας έτσι λεπτομερείς παρατηρήσεις σε υποκυτταρικό επίπεδο. Μια πολωμένη αναδιοργάνωση του κυττάρου της ρίζας καταγράφηκε με τη χρήση οπτικού, συνεστιακού, ηλεκτρονικού μικροσκοπίου διέλευσης. Παρατηρήθηκε συσσώρευση ενδοπλασματικού δικτύου και κυτοπλάσματος, πυρηνική μετατόπιση στα σημεία επαφής του μύκητα στο κύτταρο, εκάστοτε ανάπτυξη θηλής (προεκβολής) στο εσωτερικό τμήμα του φυτικού κυττάρου, ακριβώς κάτω από το σημείο επαφής με υφοπόδια, καθώς και μετακινήσεις μεμβρανικών υλικών προς το σημείο διάτρησης του κυττάρου από τις διερχόμενες υφές. Επίσης σημειώθηκαν φαινόμενα κυτταρικού θανάτου στο φυτό-ξενιστή, ενώ υφές παρατηρήθηκαν και εντός του αγωγού συστήματος της ρίζας. Ο FSK μετακινήθηκε προς το υπέργειο τμήμα του φυτού, στο οποίο μάλιστα αναπτύχθηκε τόσο επιφυτικά όσο και ενδοφυτικά. Σε τομές του βλαστού πλησίον της βάσης της ρίζας, εντός επιδερμικών / κυττάρων του άνω φλοιού, καταγράφηκαν διαφοροποιημένες δομές στρόγγυλου σχήματος μυκητιακής προέλευσης. Συμπερασματικά, η εγκαθίδρυση του FSK στους ιστούς των ψυχανθών, απαιτεί μια σειρά αλλαγών που αφορούν προσαρμογές στην ανάπτυξη του μύκητα αλλά και αυτόνομες αποκρίσεις των φυτικών κυττάρων. Οι περισσότερες από αυτές τις αλλαγές έχουν περιγραφεί τόσο για συμβιωτικές όσο και για σχέσεις παθογένειας μεταξύ φυτών και μικροοργανισμών. Διακριτές αλλαγές, όμως, επίσης λαμβάνουν χώρα και είναι άξιες περαιτέρω διερεύνησης.

Μελετήθηκε επίσης ο κύκλος ζωής των εμβολιασμένων με μύκητα φυτών, προκειμένου να αποκτηθεί μια πληρέστερη εικόνα της σχέσης FSK-*Lotus*. Διαφαίνεται πως η ανάπτυξη του μύκητα εντός του φυτού δεν είναι ούτε επιβαρυντική αλλά ούτε και ευεργερτική, κάτω από φυσιολογικές συνθήκες ανάπτυξης και δίχως εφαρμογή καταπόνησης. Επιπρόσθετα διερευνήθηκε η ικανότητα του ενδόφυτου να ολοκληρώσει τον κύκλο ζωής του σε συνάρτηση με το φυτό-ξενιστή, μέσω παρακολούθησης της ικανότητάς του για κονιδιογένεση στη ριζόσφαιρα. Τουλάχιστον ως και το τελευταίο χρονικό σημείο του πειράματος, η ικανότητα του μύκητα να δημιουργεί νέες μονάδες πολλαπλασιασμού ήταν ανεξάρτητη της παρουσίας του φυτού.

Τέλος, όλα τα παραπάνω αποτελέσματα συμπληρώθηκαν με τη μελέτη του μεταγραφικού προφίλ των εμβολιασμένων με FsK φυτών, στα πρώιμα στάδια της αλληλεπίδρασης. Ένας μεγάλος αριθμός μεταγραφημάτων εντοπίστηκε ως διαφορεικά εκφραζόμενος, συμπεριλαμβανομένων γονιδίων που κωδικοποιούν πρωτεΐνες που εμπλέκονται στη (δια)μεμβρανική μεταφορά, στην ορμονική ρύθμιση, στο μεταβολισμό λιπιδίων, σε κυτταρικές τροποποιήσεις, στην άμυνα· καταδεικνύοντας τις μοριακές και κυτταρικές αλλαγές που απαιτούνται από το φυτό για την αναγνώριση και φιλοξενία ενός άλλου ευκαρυωτικού οργανισμού εντός των κυττάρων του.