



Τμήμα Βιοχημείας και Βιοτεχνολογίας
Πανεπιστήμιο Θεσσαλίας

ΠΤΥΧΙΑΚΗ ΕΡΓΑΣΙΑ

«Μελέτη των *miR2111-TML* κατά τον ταυτόχρονο
αποικισμό των ψυχανθών από ενδομυκορριζικούς
μύκητες και ριζόβια»



Όνομα: Ελευθερία Α. Λουκά

Επιβλέπουσα καθηγήτρια: Δανιέλα Τσίκου

ΠΤΥΧΙΑΚΗ ΕΡΓΑΣΙΑ

Λουκά Ελευθερία, του Αριστοφάνη

«Μελέτη των miR2111-*TML* κατά τον ταυτόχρονο αποικισμό των ψυχανθών από ενδομυκορριζικούς μύκητες και ριζόβια»

"Study of miR2111-*TML* during the simultaneous colonization of legumes by arbuscular mycorrhizal fungi and rhizobial bacteria "

Τριμελής εξεταστική επιτροπή:

- Τσίκου Δανιέλα, Επίκουρος Καθηγήτρια Μοριακής και Αναπτυξιακής Βιολογίας Φυτών
- Παπαδοπούλου Καλλιόπη, Αναπληρώτρια Καθηγήτρια Βιοτεχνολογίας Φυτών
- Γιακουντής Αντώνιος, Επίκουρος Καθηγητής. Μοριακής Βιολογίας και Γονιδιωματικής.

ΠΕΡΙΕΧΟΜΕΝΑ	
ΠΕΡΙΛΗΨΗ	5
ABSTRACT	6
1. ΕΙΣΑΓΩΓΗ.....	7
1.1 Βιοτικές αλληλεπιδράσεις φυτών – συμβιωτικές σχέσεις.....	7
1.2 Κύκλος του αζώτου – αζωτοδέσμευση.....	8
1.3 Αζωτοδεσμευτικά βακτήρια – ριζόβια.....	9
1.3.1 Σηματοδότηση κατά τη συμβίωση ριζοβίων με ψυχανθή.....	10
1.3.2 Αυτορρύθμιση της φυματιογένεσης (AON).....	12
1.4 Ενδομυκορριζικοί μύκητες	14
1.4.1 Σηματοδότηση κατά τη συμβίωση των φυτών με ενδομυκορριζικούς μύκητες	14
1.4.2 Αυτορρύθμιση κατά το σχηματισμό μυκορριζών (AOM).....	16
1.5 Τριπλές αλληλεπιδράσεις (φυτό-ριζόβια-ενδομυκορριζικοί μύκητες)	16
1.6 Σκοπός της παρούσας πειραματικής μελέτης	17
2. ΥΛΙΚΑ ΚΑΙ ΜΕΘΟΔΟΙ	18
2.1 Βιολογικό υλικό και συνθήκες ανάπτυξης	18
2.2 Απολύμανση και εκβλάστηση σπόρων <i>Lotus japonicus</i>	18
2.3 Μεταφορά των φυτών <i>Lotus japonicus</i> από τα τριβλία σε δοχεία magenta.	19
2.3.α Μέθοδος sandwich	19
2.4 Ανάπτυξη των ριζοβίων σε υγρή καλλιέργεια και εμβολιασμός των φυτών <i>Lotus japonicus</i>	19
2.5 Συγκομιδή των φυτών και χρώση των ριζών με μελάνι.....	20
2.6 Υπολογισμός αποικισμού από ενδομυκορριζικούς μύκητες.....	21
2.7 Απομόνωση του ολικού RNA από τις ρίζες των φυτών.....	21
2.8 Απομάκρυνση του DNA με αντίδραση DNάσης	22
2.9 Αλυσιδωτή αντίδραση πολυμεράσης (PCR).....	23
2.10 Σύνθεση συμπληρωματικού DNA (cDNA).....	24
2.11 Αλυσιδωτή αντίδραση πολυμεράσης σε πραγματικό χρόνο (qPCR).....	25
3. ΑΠΟΤΕΛΕΣΜΑΤΑ	28
3.1 Έλεγχος του αποικισμού φυτών αγρίου τύπου και του μεταλλάγματος <i>tml-6</i> από ενδομυκορριζικό μύκητα παρουσία – απουσία ριζοβίων.....	28
3.2 Διερεύνηση των επιπέδων έκφρασης του μικρού RNA <i>miR2111</i> και του γονιδίου <i>TML</i> κατά τον ταυτόχρονο αποικισμό των φυτών από ενδομυκορριζικό μύκητα και ριζόβια.	32

4. ΣΥΖΗΤΗΣΗ.....	40
------------------	----

ΠΕΡΙΛΗΨΗ

Είναι γνωστό πως τα φυτά έχουν την ικανότητα να αναπτύσσουν επωφελείς συμβιωτικές σχέσεις με μικροοργανισμούς του εδάφους που τους παρέχουν θρεπτικά συστατικά όπως φώσφορο και άζωτο. Οι πιο γνωστές συμβιωτικές σχέσεις είναι εκείνες με τα αζωτοδεσμευτικά βακτήρια και τους ενδομυκορριζικούς μύκητες. Έχει βρεθεί ότι οι δύο αυτές συμβιωτικές σχέσεις μοιράζονται αρκετά κοινά στοιχεία στη σηματοδότηση τους και ένα από αυτά φαίνεται να είναι ο μηχανισμός αυτορρύθμισης. Με τον μηχανισμό αυτορρύθμισης τα φυτά ελέγχουν την έναρξη και την έκταση του αποικισμού τους από τους συμβιωτικούς μικροοργανισμούς. Ο μηχανισμός αυτορρύθμισης της φυματιογένεσης (AON) έχει μελετηθεί εκτενώς και έχει βρεθεί ότι σημαντικά «συστατικά» του είναι το μικρό RNA mir2111, το οποίο ρυθμίζει μεταμεταγραφικά το γονίδιο *TML*, που κωδικοποιεί για έναν αναστολέα της μόλυνσης του φυτού από ριζόβια. Ο μηχανισμός αυτορρύθμισης κατά των σχηματισμό μυκόρριζων (AOM) αν και δεν έχει μελετηθεί εκτενώς, έχει βρεθεί πως μοιράζεται κοινά με τον μηχανισμό AON. Στην παρούσα ερευνητική εργασία, χρησιμοποιήσαμε το φυτό - μοντέλο *Lotus japonicus* με σκοπό να διερευνήσουμε τον ρόλο του miR2111 και του *TML*, κατά τον ταυτόχρονο αποικισμό των ψυχανθών από ενδομυκορριζικούς μύκητες και αζωτοδεσμευτικά βακτήρια.

ABSTRACT

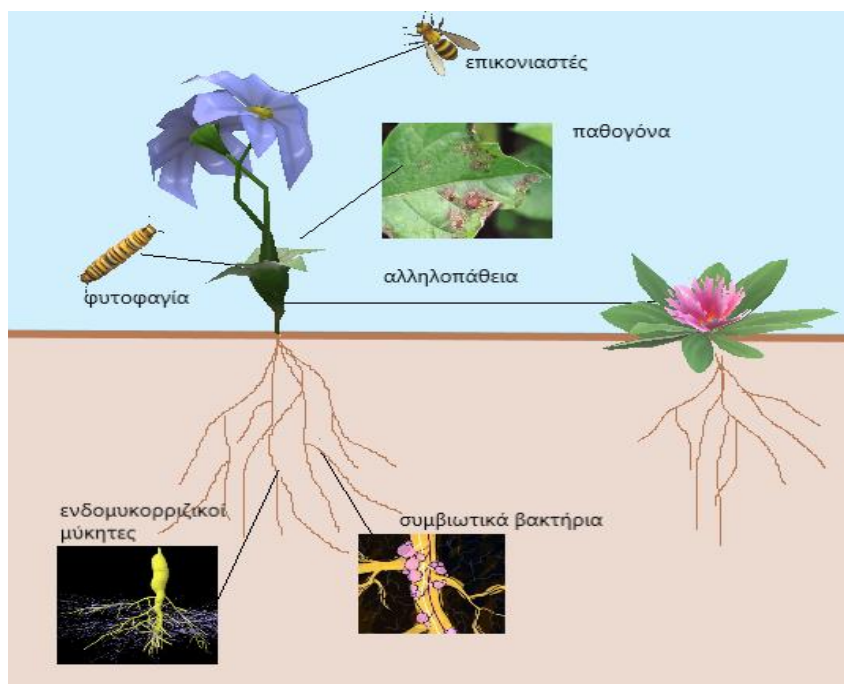
As it is commonly known, plants possess the ability to develop beneficial symbiotic relationships with soil microorganisms which provide them nutrients such as phosphorus and nitrogen. The two most well-known symbiotic relationships are those with nitrogen-fixing bacteria and arbuscular mycorrhizal fungi. These symbiotic relationships share some common mechanisms and components in their signaling pathways and one of these seems to be the auto-regulatory mechanism. Through this mechanism plants control the initiation and the extent of colonization by symbiotic microorganisms. The auto-regulation of nodulation (AON) mechanism has been extensively studied and the small RNA miR2111 was reported to play an important role. The miR2111 regulates post-transcriptionally the *TML* gene, which encodes an important inhibitor of the rhizobial infection. Although, the auto-regulation of mycorrhization(AOM) mechanism has not been extensively studied, it has been found to be sharing a lot in common with AON. In the present study, we used the *Lotus japonicus* plant model to further investigate the role of miR2111 and *TML* during the simultaneous colonization of the plant by arbuscular mycorrhizal fungi and nitrogen-fixing bacteria.

1.ΕΙΣΑΓΩΓΗ

1.1 Βιοτικές αλληλεπιδράσεις φυτών – συμβιωτικές σχέσεις

Τα φυτά αναπτύσσονται μέσα σε φυσικά οικοσυστήματα και αλληλεπιδρούν τόσο με βιοτικούς όσο και με αβιοτικούς παράγοντες, γεγονός που επηρεάζει την ανάπτυξη και την επιβίωση τους. Οι αλληλεπιδράσεις αυτές μπορεί να είναι είτε ωφέλιμες είτε επιβλαβείς. Συγκεκριμένα στην περίπτωση των βιοτικών παραγόντων, παραδείγματα αμοιβαίων επωφελών σχέσεων αποτελούν η αλληλεπίδραση φυτού-επικονιαστή^[1,2], νιτροποιητικού βακτηρίου-ψυχανθούς και οι ενδομυκορριζικοί μύκητες της ριζόσφαιρας^[3,4]. Αντίθετα μερικά παραδείγματα επιβλαβών αλληλεπιδράσεων είναι οι προσβολές από παθογόνους μικροοργανισμούς, η φυτοφαγία και η αλληλοπάθεια.^(εικόνα 1) ^[5]

Τα φυτά έχουν τη δυνατότητα να αναγνωρίζουν τους μικροοργανισμούς που εισβάλουν σε αυτά και είτε να περιορίζουν την εισβολή τους, όπως στην περίπτωση των παθογόνων, είτε να προάγουν την μεταξύ τους συσχέτιση, όπως στην περίπτωση των συμβιωτών, με την οποία θα ασχοληθούμε στην παρούσα εργασία. Ειδικότερα, οι πιο μελετημένες συμβιωτικές σχέσεις φυτών με μικροοργανισμούς, που θα μας απασχολήσουν, είναι εκείνες με τους ενδομυκορριζικούς μύκητες και τα αζωτοδεσμευτικά βακτήρια (ριζόβια), με τις πρώτες να εμφανίζονται προγενέστερα. Το κοινό γνώρισμα των συμβιωτικών σχέσεων είναι η ικανότητα των μικροοργανισμών να δεσμεύουν θρεπτικά συστατικά, απαραίτητα για την ανάπτυξη των φυτών και να τα παρέχουν σε αυτά, ενώ παράλληλα λαμβάνουν από τα φυτά άνθρακα για την ανάπτυξη τους (ο οποίος προέρχεται από τη φωτοσύνθεση). ^[6]

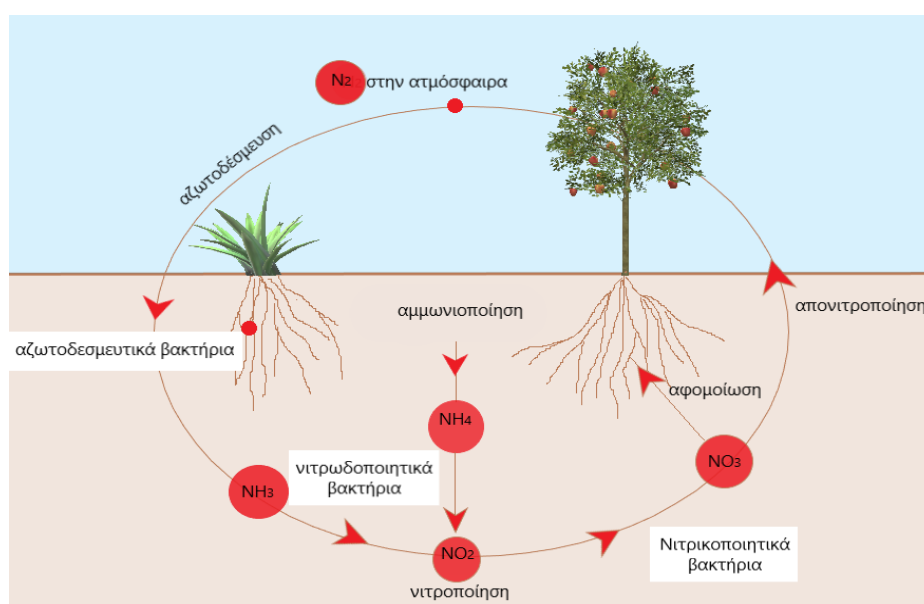


Εικόνα 1: παραδείγματα βιοτικών αλληλεπιδράσεων

Αν και τα φυτά κατά κύριο λόγο είναι ικανά να δεσμεύουν το μεγαλύτερο ποσοστό των αναγκαίων, για την ανάπτυξη τους, θρεπτικών, δεν έχουν την δυνατότητα να δεσμεύουν το άζωτο και το φώσφορο από το περιβάλλον τους σε ικανοποιητικές ποσότητες. Καθώς και τα δύο αποτελούν κύρια θρεπτικά στοιχεία των φυτών, τα φυτά αλληλεπιδρούν με τους μικροοργανισμούς για να τα αποκτήσουν. Τα αζωτοδεσμευτικά βακτήρια όπως τα ριζόβια δεσμεύουν το άζωτο της ατμόσφαιρας, ενώ οι ενδομυκορριζικοί μύκητες μπορούν και δεσμεύουν το φώσφορο (αλλά και άλλα στοιχεία) από σημεία του εδάφους που δεν είναι προσβάσιμα στις ρίζες των φυτών.^[7] Βέβαια, εκτός από την προφανή βοήθεια που προσφέρουν οι μικροοργανισμοί στα φυτά σχετικά με την πρόσληψη θρεπτικών, αυξάνουν και την αντοχή τους στη βιοτική και αβιοτική καταπόνηση και βοηθούν στον έλεγχο των παθογόνων. ^[8,9]

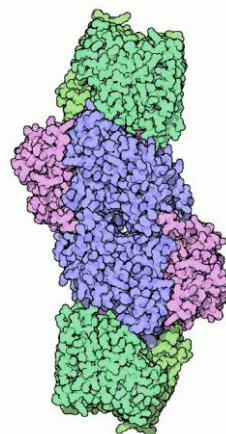
1.2 Κύκλος του αζώτου – αζωτοδέσμευση

Το άζωτο είναι ένα από τα κύρια θρεπτικά συστατικά που χρειάζονται οι οργανισμοί για να επιβιώσουν και είναι απαραίτητο συστατικό πολλών βιομορίων όπως οι πρωτεΐνες, το DNA και η χλωροφύλλη. Αν και βρίσκεται σε άφθονη ποσότητα στην ατμόσφαιρα με τη μορφή αερίου αζώτου (N_2), χρειάζεται να μετατραπεί σε αμμωνία (NH_3) για να αξιοποιηθεί από τους οργανισμούς, όπως και στην περίπτωση των φυτών. Γενικά, όμως, βρίσκεται σε διάφορες μορφές, οργανικές και ανόργανες, συμπεραίνοντας ότι υφίσταται ορισμένους μετασχηματισμούς σε ένα οικοσύστημα. Οι μετασχηματισμοί αυτοί συνιστούν τον κύκλο του αζώτου, (εικόνα 2) του οποίου οι βασικές μετατροπές είναι η αζωτοδέσμευση, η νιτροποίηση, η απονιτροποίηση και η αμμωνιοποίηση, στις οποίες μάλιστα, βασικό στοιχείο για την πραγματοποίησή τους αποτελεί συχνά πλήθος μικροοργανισμών.

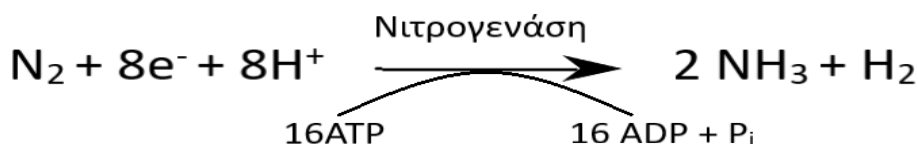


Εικόνα 2: συνοπτικά ο κύκλος του αζώτου σε ένα οικοσύστημα

Συγκεκριμένα, κατά την διάρκεια της αζωτοδέσμευσης, το αέριο άζωτο δεσμεύεται και μετατρέπεται σε αμμωνία. Η ενεργειακά κοστοβόρα αυτή διαδικασία (απαιτεί 8 ηλεκτρόνια και 12 μόρια ATP) πραγματοποιείται από μικροοργανισμούς που είτε βρίσκονται ελεύθεροι στο έδαφος (όπως βακτήρια του γένους *Azotobacter* και *Azospirillum*) είτε συμβιώνουν με κάποιο φυτό (όπως συμβιωτικά βακτήρια των γενών *Rhizobium*, *Bradyrhizobium* και ακτινοβακτήρια του γένους *Frankia*). Το κοινό αυτών των μικροοργανισμών είναι ότι διαθέτουν το ενζυμικό σύμπλοκο της νιτρογενάσης(εικόνα 3), το οποίο καταλύει τη διάσπαση του τριπλού ομοιοπολικού δεσμού, που συνδέει τα άτομα αζώτου και την προσθήκη τριών ατόμων υδρογόνου σε κάθε άτομο αζώτου (εικόνα 4). Η δράση της μπορεί να ανασταλεί από το οξυγόνο. [10] Το σύμπλοκο αυτό αποτελείται από δύο συστατικά, μια ετεροτετραμερή πρωτεΐνη μόλυβδου-σιδήρου(μπλε-μωβ) και μια ομοδιμερή πρωτεΐνη σιδήρου(πράσινο). [11]



Εικόνα 3: Ενζυμικό σύμπλοκο νιτρογενάσης[11]



Εικόνα 4: Η χημική αντίδραση που πραγματοποιείται κατά την αζωτοδέσμευση

1.3 Αζωτοδεσμευτικά βακτήρια – ριζόβια

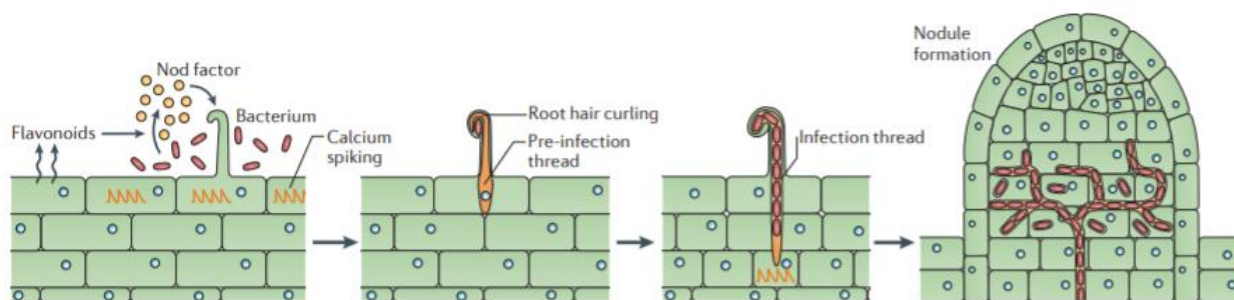
Οι συμβιωτικές σχέσεις των φυτών με τα αζωτοδεσμευτικά βακτήρια και ειδικά τα ριζόβια έχουν μελετηθεί εκτενώς. Τα ριζόβια είναι gram αρνητικά βακτηρία που ζουν στο έδαφος και αποικίζουν τα ριζικά κύτταρα ψυχανθών φυτών, όπως όσπρια, σόγια και τριφύλλι (*alfalfa*). Κατά τη συμβίωση τα ριζόβια δεσμεύουν ατμοσφαιρικό άζωτο και το παρέχουν στο φυτό, ενώ η ποσότητα που θα δεσμευτεί καθορίζεται από τις ανάγκες του ίδιου του φυτού.[12]



Εικόνα 5: φυμάτια σε ρίζες σόγιας [1]

Κέντρα της αζωτοδέσμευσης αποτελούν τα φυμάτια, όπως φαίνεται και στην εικόνα 5, όργανα του φυτού-ξενιστή που περικλείουν τα ριζόβια και ο σχηματισμός τους επάγεται από τα βακτήρια. Η κύρια λειτουργία των φυματίων είναι να δημιουργούν ένα περιβάλλον που ευνοεί την αζωτοδέσμευση. Περιέχουν

ψυχανθαιμοσφαιρίνη, μια πρωτεΐνη που έχει αίμη ως προσθετική ομάδα, της οποίας ο ρόλος είναι η δέσμευση και παροχή οξυγόνου στα αζωτοδεσμευτικά βακτήρια σε ποσότητα, τέτοια, που δεν θα απενεργοποιήσει το σύμπλοκο της νιτρογενάσης. [13] Για να σχηματιστούν λειτουργικά φυμάτια χρειάζεται να έχει προηγηθεί μόλυνση του φυτού από ριζόβια και να ακολουθήσει οργανογένεση των φυματίων. (εικόνα 6)



Εικόνα 6: Τα στάδια της εγκαθίδρυσης της συμβιωτικής σχέσης ριζοβίων - ψυχανθών [6]

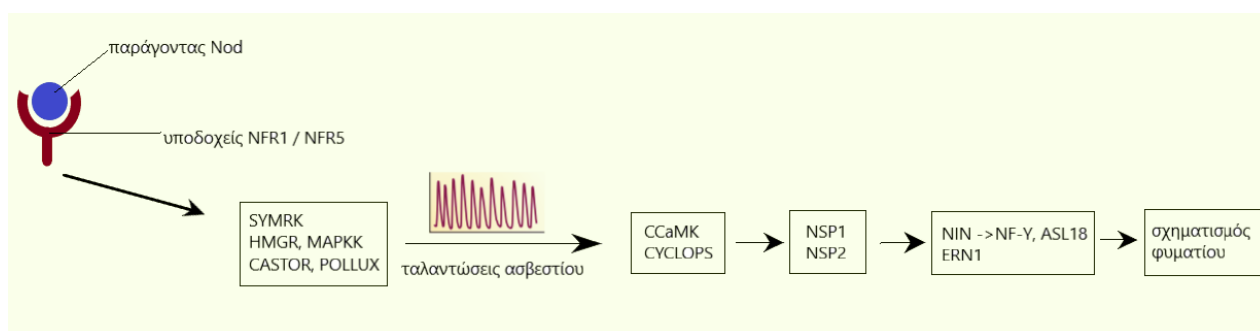
1.3.1 Σηματοδότηση κατά τη συμβίωση ριζοβίων με ψυχανθή

Σε συνθήκες περιορισμένου αζώτου, πραγματοποιείται χημική «επικοινωνία» μεταξύ των ριζοβίων που βρίσκονται στη ριζόσφαιρα και των ριζών των ξενιστών φυτών. Τα φυτά απελευθερώνουν φλαβονοειδή που έλκουν χημικά τα ριζόβια προς την επιφάνεια της ρίζας για να επιτευχθεί η μόλυνση και ενεργοποιούν στα ριζόβια την έκφραση των γονιδίων *nodABC* τα οποία κωδικοποιούν πρωτεΐνες που εμπλέκονται στη σύνθεση των παραγόντων Nod, οι οποίοι και απελευθερώνονται τελικά. [14] Η έκφραση των γονιδίων *nod* επάγεται από τις πρωτεΐνες NodD οι οποίες είναι μεταγραφικοί παράγοντες και ενεργοποιούνται από φλαβονοειδή. [15] Μάλιστα, πρωτεΐνες NodD από διάφορα ριζόβια, αναγνωρίζουν συγκεκριμένα φλαβονοειδή που εκκρίνονται από διαφορετικά όσπρια, αποτελώντας ένα αρχικό σημείο ελέγχου της συμβίωσης. [16] Οι παράγοντες Nod, που απελευθερώνονται, είναι λιποχιτοολιγοσακχαρίτες (LCO) με ένα σκελετό χιτινο-β-1->4-συνδεδεμένης N-ακετυλό-γλυκοζαμίνης και μια αλυσίδα λιπαρών οξέων στον δεύτερο άνθρακα του μη αναγωγικού σακχάρου. Ο βαθμός κορεσμού της ακυλο-αλυσίδας των λιπαρών οξέων καθώς και οι διάφοροι υποκαταστάτες που μπορούν να προστεθούν στα σάκχαρα του σκελετού της χιτίνης, δημιουργούν ένα μεγάλο εύρος παραγόντων Nod οι οποίοι παράγονται από διαφορετικά είδη ριζοβίων και εξειδικεύουν τις αλληλεπιδράσεις φυτού-βακτηρίου. [17,18]

Στη συνέχεια οι παράγοντες Nod αναγνωρίζονται από ειδικούς υποδοχείς Nod που εντοπίζονται στην επιδερμίδα της ρίζας. Είναι υποδοχείς με εξωκυτταρικές επικράτειες μοτίβων λυσίνης (LysM) και κυτταροπλασματικές επικράτειες κινάσης. Έχουν βρεθεί δύο μορφές αυτών των υποδοχέων να συμμετέχουν στη σηματοδότηση Nod: οι LysM I που περιλαμβάνουν τον NFR1 στο *Lotus japonicus* και οι LysM II που περιλαμβάνουν τον NFR5 στο *L. japonicus*. Οι υποδοχείς αυτοί

δεσμεύουν παράγοντες Nod σε ποσότητες που απαιτούνται για την ενεργοποίηση σηματοδοτικών διαδικασιών κατά τη συμβίωση, όπως θα αναφέρουμε παρακάτω. Είναι σημαντικοί για τον αποικισμό από ριζόβια και επιπλέον αλληλεπιδρούν μεταξύ τους.^[19-22] Ο NFR5 δεν έχει λειτουργική επικράτεια κινάσης, ενώ αντίθετα η επικράτεια κινάσης του NFR1 είναι λειτουργική και ικανή να προάγει τόσο την αυτοφωσφορυλίωση της, όσο και την φωσφορυλίωση της κινάσης του NFR5. Βάσει αυτού προτείνεται ότι οι υποδοχείς λειτουργούν ως ετεροδιμερή ή μεγαλύτερα ετερό-σύμπλοκα. ^[20,23] Απαραίτητος για την σηματοδότηση είναι και ο SYMRK στο *L. japonicus*, ένας υποδοχέας με περιοχή κινάσης και μια περιοχή πλούσια σε λευκίνη, ο οποίος πιθανόν δρα ως συν-υποδοχέας με τους υποδοχείς LysM. ^[24,25] Όταν λοιπόν, το φυτό αντιληφθεί ένα συμβατό LCO, ενεργοποιείται ένας καταρράκτης σηματοδότησης που τελικά οδηγεί στο σχηματισμό του φυματίου. Αναλυτικότερα, μετά την λήψη του «μηνύματος» από τους υποδοχείς, το σήμα ενεργοποιεί ένα μονοπάτι, γνωστό ως κοινό συμβιωτικό μονοπάτι, CSP (common symbiotic pathway) που περιλαμβάνει κοινά στοιχεία με το αντίστοιχο σηματοδοτικό μονοπάτι που ενεργοποιείται κατά τη συμβίωση των φυτών με ενδομυκορριζικούς μύκητες. ^[26-28] Αρχικά, ενεργοποιείται ο SYMRK, του οποίου ο συνδέτης παραμένει άγνωστος, και συσχετίζεται με μόρια όπως το ένζυμο HMGR και η πρωτεϊνική κινάση MAPKK που θα μπορούσαν να συντονίζουν τη μεταφορά σήματος μεταξύ των υποδοχέων της πλασματικής μεμβράνης και κάποιων καναλιών ιόντων στον πυρήνα. Η SYMRK δρα ανοδικά των ταλαντώσεων ασβεστίου που συμβαίνουν στην περιοχή γύρω από τον πυρήνα. ^[29,30] Οι ταλαντώσεις ασβεστίου περιλαμβάνουν την απελευθέρωση ασβεστίου από ένα διαμέρισμα αποθήκευσης ασβεστίου, πιθανός τον πυρηνικό φάκελο, μέσω αντλιών ασβεστίου. Κανάλια διαπερατά σε κάλιο, όπως τα CASTOR και POLLUX στο *L. japonicus*, αντισταθμίζουν την ανισορροπία φορτίου που προκύπτει. ^[31-34] Οι διακυμάνσεις ασβεστίου ενεργοποιούν την CCaMK, πρωτεΐνη κινάση που εξαρτάται από το ασβέστιο και την καλμοδουλίνη. Η κινάση αυτή, περιέχει έναν τομέα αυτοαναστολής που όταν αφαιρεθεί, οδηγεί σε επαγωγή σχηματισμού φυματίων ακόμη και όταν δεν υπάρχουν ριζόβια.^[35] Η CCaMK σχηματίζει σύμπλοκο με την πρωτεΐνη CYCLOPS που είναι απαραίτητη για τον αποικισμό τόσο από ριζόβια, όσο και από μυκορριζικούς μύκητες.^[36] Με τη βοήθεια του CYCLOPS, η CCaMK πιθανώς φωσφορυλιώνει μεταγραφικούς παράγοντες που υπάρχουν ήδη στο κύτταρο, τους NSP1 και NSP2, οι οποίοι επηρεάζουν την έκφραση πολλών γονιδίων που σχετίζονται με την συμβίωση. Τα NSP1 και NSP2 σχηματίζουν ένα ετεροσυμπλέγμα που συνδέεται με τους υποκινητές γονιδίων που επάγονται από τον παράγοντα Nod.^[37,38] Τέτοια γονίδια είναι τα *NIN* και *ERN1*, τα οποία είναι μεταγραφικοί παράγοντες. Συγκεκριμένα, το *NIN* είναι ένας μεταγραφικός παράγοντας που αυξάνει την έκφραση των *NF-YA1*, *NF-YB1* και *ASL18/LBD16*. Οι *NF-Y* και *ASL18* είναι πρωτεΐνες που αλληλεπιδρούν μεταξύ τους για την αναμετάδοση του σήματος

από τα ριζόβια το οποίο ξεκινά τελικά την ανάπτυξη του αρχικού φυματίου, καθώς ενεργοποιείται η κυτταρική διαίρεση στο στρώμα του φλοιού. [39,40] (εικόνα 7) Παράλληλα, εκτός από τους παράγοντες Nod, τα ριζόβια παράγουν και εξωπολυσακχαρίτες (EPS), λιποπολυσακχαρίτες (LPS) και καψιδικούς πολυσακχαρίτες (KPS) που θεωρούνται σημαντικοί για την εγκαθίδρυση της συμβίωσης. Τα συστατικά προτείνεται πως είναι ικανά να καταστέλλουν την άμυνα των φυτών, αλλά ο ρόλος τους στην προώθηση της βακτηριακής μόλυνσης και της δημιουργίας φυματίων παραμένει προς το παρόν αόριστος. Συγκεκριμένα, όμως, για τους εξωπολυσακχαρίτες, έχει αποδειχθεί ότι απαιτούνται για την μόλυνση από ριζόβια σε πολλές περιπτώσεις συμβίωσης. Επιπλέον, βρέθηκε στο *L. japonicus* ο υποδοχέας *EPR3* (πρωτεΐνη στην επιφάνεια του κυττάρου με τρεις εξωκυτταρικές επικράτειες μοτίβου λυσίνης και μια ενδοκυτταρική επικράτεια κινάσης) ο οποίο δεσμεύει τους EPS των ριζοβίων. Η έκφραση του γονιδίου *EPR3* εξαρτάται από την σηματοδότηση των παραγόντων Nod. [ανασκόπηση στο 41]



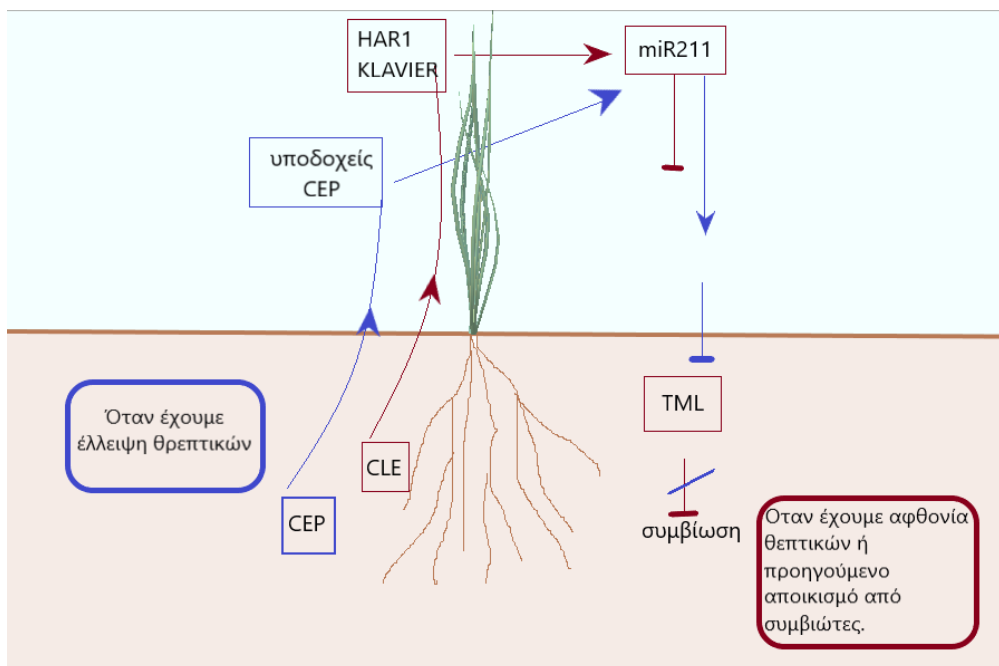
Εικόνα 7: Σηματοδότηση από παράγοντες Nod

1.3.2 Αυτορρύθμιση της φυματιογένεσης (AON)

Η συμβιωτική αζωτοδέσμευση είναι μια ενεργειακά κοστοβόρα διαδικασία και ωφελεί το φυτό μόνο όταν έχει έλλειψη αζώτου, αλλά έχει αφθονία άνθρακα. Για αυτό το λόγο ο ξενιστής ελέγχει αυστηρά τον αριθμό των μολύνσεων από τα βακτήρια και κατ' επέκταση τον αριθμό φυματίων που θα δημιουργηθούν. Ο βέλτιστος αριθμός φυματίων διατηρείται μέσω μια διαδικασία μεγάλων αποστάσεων, τον μηχανισμό αυτορρύθμισης, ο οποίος επάγεται από την παρουσία ριζοβίων. (εικόνα 8) Βέβαια, τα φυτά διαθέτουν και έναν δεύτερο μηχανισμό ελέγχου της διαδικασίας της αζωτοδέσμευσης με βάση την ποσότητα NO_3^- . Αυτός περιλαμβάνει κυρίως τα πεπτιδία CEP τα οποία παράγονται στις ρίζες που «βιώνουν» έλλειψη αζώτου, μεταναστεύουν στον βλαστό μέσω του ξηλώματος όπου ανιχνεύονται από υποδοχείς CEP και οδηγούν στην παραγωγή των πεπτιδίων CEPD, τα οποία δρουν στις ρίζες και ρυθμίζουν θετικά την έκφραση μεταφορέων των νιτρικών στις ρίζες που «βιώνουν» αφθονία αζώτου. [42-44]

Ο μηχανισμός αυτορρύθμισης της φυματιογένεσης AON ξεκινά από την παραγωγή πεπτιδίων CLE (LjCLE-RS1-RS2 και -RS3 στο *L. japonicus*) κατά την πρώτη διαίρεση των κυττάρων του φλοιού της ρίζας που επάγεται από τα ριζόβια και καθ' όλη την ανάπτυξη των φυματίων και της αζωτοδέσμευσης.

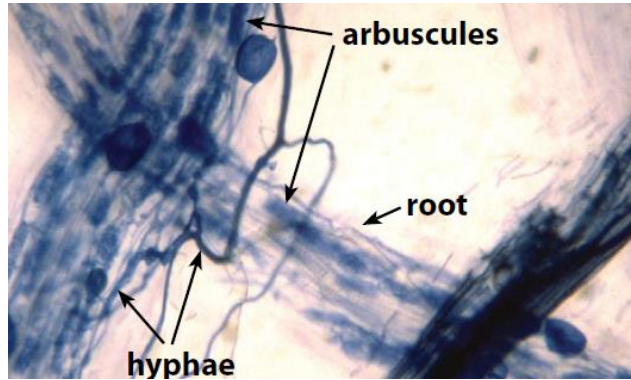
Η ενεργοποίηση των γονιδίων των CLE ρυθμίζεται από την αλληλεπίδραση των μεταγραφικών παραγόντων NIN και του NNC1 (ρύθμιση αριθμού φυματίων) και από το miR172c.^[45-47] Στη συνέχεια καθώς τα πεπτίδια CLE αραβουσιώνονται από το ένζυμο PLENTY,^[48] μεταφέρονται από τη ρίζα στο βλαστό μέσω του ξηλώματος όπου και ανιχνεύονται από τους υποδοχείς HAR1 και KLAVIER (στο *L. japonicus*).^[49-51] Η αντίληψη των πεπτιδίων οδηγεί στην καταστολή της έκφρασης του miR2111 η οποία λειτουργεί ως σήμα προς τη ρίζα για τη ρύθμιση της πρωτεΐνης TML, η οποία παρεμποδίζει τη μόλυνση από ριζόβια και συνεπώς τον σχηματισμό φυματίων. Αντίθετα όταν το miR2111 εκφράζεται κανονικά κατευθύνεται προς τη ρίζα όπου στόχος του είναι το TML του οποίου περιορίζει τη συσσώρευση μεταγραφημάτων με αποτέλεσμα να καθιστά το φυτό έτοιμο για συμβίωση.^[52,53] Τα πεπτίδια CEP ενισχύουν την έκφραση του miR2111.^[54]



Εικόνα 8: Σχηματικά ο μηχανισμός αυτορρύθμισης της φυματιογένεσης

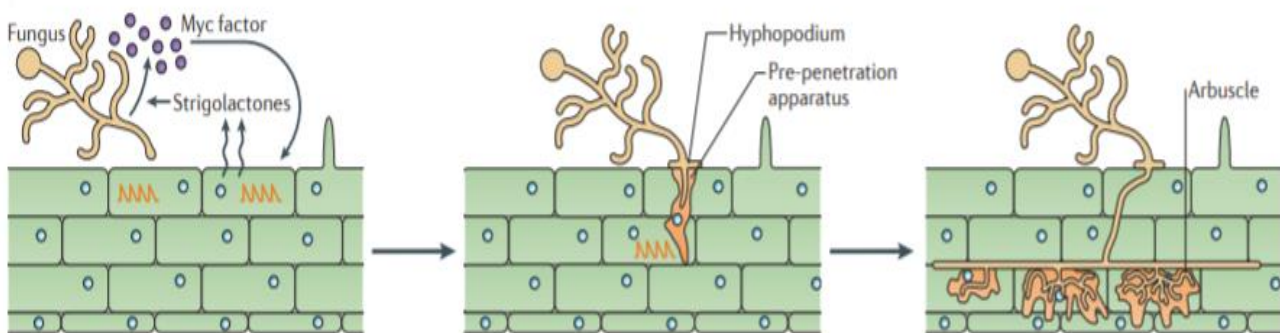
1.4 Ενδομυκορριζικοί μύκητες

Οι ενδομυκορριζικοί μύκητες ανήκουν κυρίως στο φύλο *Glomeromycota* κι έχουν τη δυνατότητα να δημιουργούν συμβιωτικές σχέσεις με την πλειονότητα των φυτών (πχ ανθοφόρα, βρυόφυτα και φτέρες). [55,56] Οι μύκητες αυτοί είναι υποχρεωτικά βιότροφοι και λαμβάνουν από το φυτό-ξενιστή



Εικόνα 9: Ενδομυκορριζικοί μύκητες και δομές τους στη ρίζα [11]

άνθρακα, που προέρχεται από τη φωτοσύνθεση, σε μορφή λιπιδίων και σακχάρων. Ως αντάλλαγμα παρέχουν στο φυτό ανόργανα θρεπτικά συστατικά όπως φώσφορο και σε μικρότερο βαθμό άζωτο, χάρις στις διακλαδισμένες μυκηλιακές υφές τους που φτάνουν σε μεγαλύτερες αποστάσεις στο έδαφος συγκριτικά με τις ρίζες του φυτού. [57] Σε αντίθεση με τα ριζόβια, στην περίπτωση αυτή δεν έχουμε σχηματισμό νέων οργάνων στο φυτό (φυμάτια). Οι μύκητες διεισδύουν στη ρίζα μέσω των επιδερμικών κυττάρων της επιφάνειας της και δημιουργούνται οι δενδρόμορφες δομές (*arbuscules*), που θεωρούνται τα συμβιωτικά οργανίδια, εντός των κυττάρων. (εικόνα 9) Η διαδικασία αυτή της συμβίωσης συντελείται σταδιακά με διαφορετικές δομές να παρατηρούνται στα διάφορα στάδια της, ενώ είναι μη συγχρονισμένη (στην ίδια ρίζα μπορεί να συνυπάρχουν δομές διαφόρων σταδίων, όπως φαίνεται και στην εικόνα 10). [58]

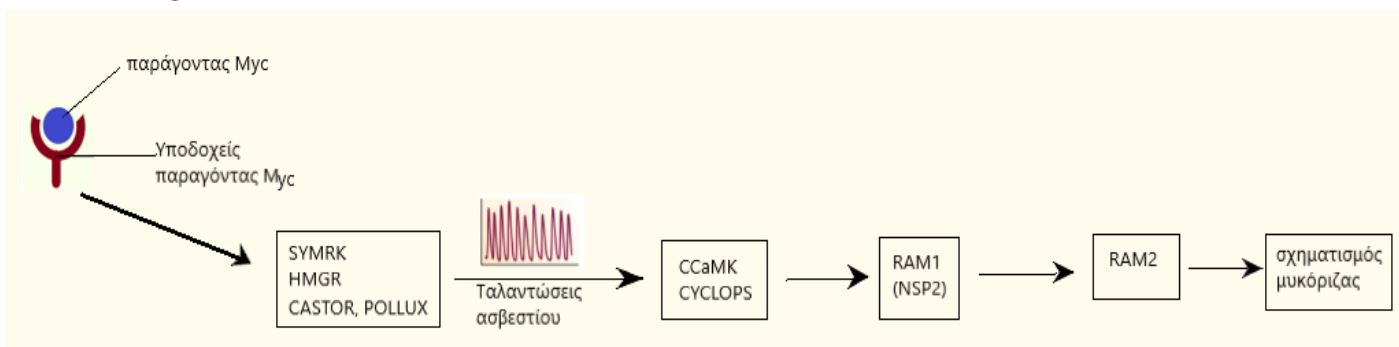


Εικόνα 10: Τα στάδια της εγκαθίδρυσης της συμβιωτικής σχέσης φυτών με ενδομυκορριζικούς μύκητες [7]

1.4.1 Σηματοδότηση κατά τη συμβίωση των φυτών με ενδομυκορριζικούς μύκητες

Σε συνθήκες έλλειψης Ρi πραγματοποιείται χημική επικοινωνία μεταξύ του φυτού ξενιστή και των μυκήτων που βρίσκονται στο έδαφος. Συγκεκριμένα, τα φυτά απελευθερώνουν στη ριζόσφαιρα στριγγολακτόνες, ορμόνες που συντίθενται από καρετονοειδή, με σημαντικό ρόλο τόσο στη συμβίωση με ενδομυκορριζικούς

μύκητες, όσο και στην ανάπτυξη του φυτού, οι οποίες ενεργοποιούν τον μεταβολισμό των μυκήτων των και τη διακλάδωση των υφών.^[59,60] Επιπλέον, η αναγνώριση των στριγγολακτόνων από τους μύκητες ενεργοποιεί ως απάντηση την απελευθέρωση των παραγόντων *Myc*. (εικόνα 11) Οι παράγοντες αυτοί είναι μίγμα μορίων δομικά παρόμοιων με τους παράγοντες *Nod* και συγκεκριμένα πρόκειται για χιτοολιγοσακχαρίτες (COs) και λιποχιτοολιγοσακχαρίτες (LCOs).^[61] Τα μόρια αυτά προσδέονται σε φυτικούς υποδοχείς που βρίσκονται στα κύτταρα της ρίζας και ξεκινά έτσι το σηματοδοτικό μονοπάτι της συμβίωσης. Οι υποδοχείς που αναγνωρίζουν τους παράγοντες *Myc* είναι υποδοχείς με εξωκυτταρικές επικράτειες μοτίβων λυσίνης (LysM) και κυτταροπλασματικές επικράτειες κινάσης. Μέχρι στιγμής έχει ανακαλυφθεί ο υποδοχέας MYR1/LYK2 στο ρύζι^[80] Στη συνέχεια το μήνυμα αναγνωρίζεται από την πρωτεΐνη υποδοχέα SYMRK (στο *Lotus japonicus*), στην πλασματική μεμβράνη, η οποία συσχετίζεται με το ένζυμο HMGR το οποίο θεωρείται απαραίτητο για την παραγωγή ταλαντώσεων ασβεστίου που απαιτείται για να ξεκινήσει μια μεταγενέστερη μεταγραφική απόκριση.^[65,66] Καθώς πρόκειται για κοινό σηματοδοτικό μονοπάτι (CSP) με εκείνο στην περίπτωση των ριζοβίων και εδώ οι ταλαντώσεις ασβεστίου περιλαμβάνουν την απελευθέρωση ασβεστίου από ένα διαμέρισμα αποθήκευσης ασβεστίου μέσω αντλιών ασβεστίου. Ενώ τα κανάλια CASTOR και POLLUX αντισταθμίζουν την ανισορροπία φορτίου που προκύπτει. Η πρωτεΐνη κινάση που εξαρτάται από το ασβέστιο και την καλμοδουλίνη CCaMK λειτουργεί ως κύριος αποκωδικοποιητής των ταλαντώσεων ασβεστίου με τελικό αποτέλεσμα την μεταγραφική απόκριση φωσφοριλώνοντας αρχικά την πρωτεΐνη στόχο CYCLOPS.^[67] Η CCaMK μαζί με την CYCLOPS σχηματίζουν ένα σύμπλοκο και ενεργοποιούν πρωτεΐνες με σημαντικότερη από αυτές στην συμβίωση με ενδομυκορριζικούς μύκητες την RAM1 (πρωτεΐνη με τομέα GRAS). Η RAM1 εμπλέκεται στην ρύθμιση της έκφρασης του γονιδίου *RAM2* σημαντικό για τον σχηματισμό των υποποδίων (*hyphopodia*). Τα υποπόδια είναι εξειδικευμένες μυκητιακές υφές και χρησιμεύουν στην προσκόλληση των μυκήτων και στην απορρόφηση της τροφής. Ενδιαφέρον είναι ότι η RAM1 φαίνεται να αλληλεπιδρά με το NSP2 κάτι το οποίο δείχνει ότι η απόφαση ενεργοποίησης αποκρίσεων είτε για ριζόβια είτε για ενδομυκορριζικούς μύκητες έγκειται στο αν θα σχηματιστεί το σύμπλοκο NSP1-NSP2 (όπως είδαμε παραπάνω) ή το RAM1-NSP2. ^[6,68,69]



Εικόνα 11: σηματοδότηση από παράγοντες *Myc*

1.4.2 Αυτορρύθμιση κατά το σχηματισμό μυκορριζών (AOM)

Έχει προταθεί ότι η συμβίωση των φυτών με ριζόβια εξελίχθηκε από τις αρχαιότερες συμβιωτικές αλληλεπιδράσεις των φυτών με ενδομυκορριζικούς μύκητες. Αυτό εξηγεί το γεγονός ότι οι δύο αυτές συμβιωτικές αλληλεπιδράσεις εμφανίζουν κοινά σηματοδοτικά μονοπάτια, όπως είδαμε παραπάνω, αλλά και κοινά στοιχεία που συμμετέχουν στους μηχανισμούς αυτορρύθμισης του αποικισμού. Ωστόσο, ο μηχανισμός αυτορρύθμισης κατά των σχηματισμό μυκορριζών(AOM) είναι λιγότερο μελετημένος συγκριτικά με εκείνον κατά την φυματογένεση (AON) και δεν έχουν αναγνωριστεί όλα τα στοιχεία που συμμετέχουν. Στόχος του μηχανισμού είναι να ρυθμίσει τον αποικισμό με βάση την διαθεσιμότητα του φωσφόρου ώστε η αλληλεπίδραση με τον μύκητα να μην καταλήξει ιδιαίτερα κοστοβόρα για το φυτό. Όταν υπάρχει αποικισμός από ενδομυκορριζικούς μύκητες ή έλλειψη φωσφόρου παράγονται πεπτίδια CLE διαφορετικά από εκείνα του AON.^[70] Τα πεπτίδια αυτά μεταφέρονται από την ρίζα στον βλαστό μέσω του ξηλώματος, όπου και θα προσδεθούν σε έναν υποδοχέα τύπου CLAVATA. Δεν έχουν εντοπιστεί ακόμα όμως ποια στοιχεία βρίσκονται καθοδικά των υποδοχέων. Επιπλέον, έχει βρεθεί ότι το miR2111 επάγεται σε συνθήκες έλλειψης φωσφόρου, χωρίς να έχει διαπιστωθεί ο ρόλος του στο μονοπάτι της αυτορρύθμισης.^[71] Μένει να βρεθεί αν όντως το miR2111 και το *TML* έχουν κάποιο ρόλο στον μηχανισμό. Επίσης, πρόσφατα βρέθηκε πως τα γονίδια *CLE* συμμετέχουν στην ρύθμιση της παραγωγής στριγγολακτονών, ελέγχοντας έτσι τον αποικισμό (πχ το MtCLE53 μειώνει τα επίπεδα των στριγγολακτόνων, επηρεάζοντας έτσι αρνητικά τον αποικισμό).^[72]

1.5 Τριπλές αλληλεπιδράσεις (φυτό-ριζόβια-ενδομυκορριζικοί μύκητες)

Στη φύση είναι πιθανό τα ψυχανθή να αποικίζονται ταυτόχρονα τόσο από αζωτοδεσμευτικά βακτήρια, όσο και από ενδομυκορριζικούς μύκητες. Οι μικροοργανισμοί αλληλεπιδρούν ο ένας με τον άλλον ανάλογα με το περιβάλλον και συνολικά φαίνεται να επιδρούν θετικά στην ανάπτυξη και παραγωγικότητα του φυτού αυξάνοντας την παροχή αζώτου και φωσφόρου σε αυτό. Ωστόσο, σε πειράματα συν-εμβολιασμού έχουν καταγραφεί διάφορες επιδράσεις ανάλογα τα στελέχη και τις καλλιέργειες. Πειραματικά δεδομένα έχουν δείξει ότι οι μικροοργανισμοί μπορεί να επηρεάζουν με διάφορους τρόπους ο ένας τον άλλο.^[73,74] Είναι επίσης πιθανό να επηρεάσουν και την έκφραση γονιδίων του φυτού (πχ αναστροφή έκφρασης). Επιπλέον, λόγω ανταγωνισμού για τα θρεπτικά που τους παρέχει το φυτό είναι πιθανό να υπάρξουν αρνητικές συνέπειες στον συν-αποικισμό.^[75] Εξαιτίας λοιπόν των συχνά αλληλοσυγκρουόμενων παρατηρήσεων είναι απαραίτητη η εξειδικευμένη μελέτη των διαφορετικών τριπλών αλληλεπιδράσεων για να εξαχθούν αξιόπιστα αποτελέσματα.

1.6 Σκοπός της παρούσας πειραματικής μελέτης

Σκοπός της παρούσας εργασίας είναι να μελετήσουμε περαιτέρω τους μηχανισμούς αυτορρύθμισης AON και AOM στα ψυχανθή και την πιθανή αλληλεπίδρασή τους κατά τον ταυτόχρονο αποικισμό των φυτών από ενδομυκορριζικό μύκητα και ριζόβια. Για τον σκοπό αυτό, φυτά *Lotus japonicus* εμβολιάστηκαν ταυτόχρονα με τον ενδομυκορριζικό μύκητα *Rhizophagus irregularis* και το αζωτοδεσμευτικό βακτήριο *Mesorhizobium loti*. Η εργασία αυτή εστίασε στη μελέτη του ζεύγους *miR2111-TML*, που έχει βρεθεί να παίζει έναν πολύ σημαντικό ρόλο στον μηχανισμό AON^[53], αλλά δεν είναι ακόμη γνωστό αν συμμετέχει στον μηχανισμό AOM

2. ΥΛΙΚΑ ΚΑΙ ΜΕΘΟΔΟΙ

2.1 Βιολογικό υλικό και συνθήκες ανάπτυξης

Στη παρούσα πειραματική μελέτη χρησιμοποιήθηκε το φυτό *Lotus japonicus* και συγκεκριμένα η ποικιλία αγρίου τύπου Gifu και το μετάλλαγμα *tml-6*, στο οποίο η έκφραση του γονιδίου *TML* παρεμποδίζεται εξαιτίας της παρουσίας του τρανσποζονίου LORE1 στην κωδική περιοχή του *TML*. Οι συμβιώτες που χρησιμοποιήθηκαν είναι ο *Rhizophagus irregularis* και συγκεκριμένα το στέλεχος DAOM και το *Mesorhizobium loti* και συγκεκριμένα το στέλεχος R7A.

Τα φυτά αναπτύχθηκαν μέσα σε δοχεία magentas με ψημένη άμμο και θρεπτικό διάλυμα LAS (0.75 mM MgSO₄, 1 mM NaNO₃, 1 mM K₂SO₄, 2 mM CaCl₂, 3.2 μM Na₂HPO₄, 25 μM FeNa EDTA, 5 μM MnSO₄, 0.25 μM CuSO₄, 25 μM H₃BO₃, 0.1 μM Na₂MoO₄ in H₂O) και τοποθετήθηκαν σε θάλαμο ανάπτυξης με φωτοπερίοδο 16 ώρες φως / 8 ώρες σκοτάδι, στους 22-23 °C.

2.2 Απολύμανση και εκβλάστηση σπόρων *Lotus japonicus*

Είναι απαραίτητο τα φυτά να βρίσκονται στο ίδιο αναπτυξιακό στάδιο και να μην υπάρξουν επιμολύνσεις από μικροοργανισμούς. Για αυτό το λόγο ακολουθείται μια συγκεκριμένη διαδικασία απολύμανσης των σπόρων και έπειτα οι σπόροι αφήνονται να εκβλαστήσουν. Η διαδικασία αυτή αποτελείται από δύο στάδια.

1^ο στάδιο:

- Προσθήκη πυκνού H₂SO₄ σε σωληνάριο Eppendorf που μέσα βρίσκονται τα σποράκια και επώαση για 25 λεπτά.
- 5 πλύσεις με H₂O
- Προσθήκη διαλύματος 20% χλωρίνης και επώαση για 10 λεπτά υπό ανάδευση.
- 6 πλύσεις με H₂O σε θάλαμο καθέτου νηματικής ροής
- Επώαση των σπόρων σε dH₂O στους 4 °C όλη τη νύχτα.

2^ο στάδιο:

- Τοποθέτηση των σπόρων σε σειρά και με απόσταση μεταξύ τους σε τριβλία με νερό/άγαρ.
- Κλείσιμο του τριβλίου με parafilm.
- Τοποθέτηση των τριβλίων μέσα στον θάλαμο ανάπτυξης φυτών.
- Αναμονή 10 μέρες (1^ο πείραμα) και 8 μέρες (2^ο πείραμα) μέχρι την εκβλάστηση των σπόρων.

2.3 Μεταφορά των φυτών *Lotus japonicus* από τα τριβλία σε δοχεία magenta.

Μετά το πέρας των ημερών που χρειάστηκαν για την εκβλάστηση των σπόρων, τα φυτά μεταφέρονται σε δοχεία magentas με άμμο και θρεπτικό διάλυμα LAS, όπως αναφέρθηκε παραπάνω. Τα δοχεία είναι αποστειρωμένα για να μην υπάρξει μόλυνση και η άμμος έχει προηγουμένως τοποθετηθεί σε ξηραντήρα (180°C | O/N) ώστε να μην έχει υγρασία. Με αυτό το τρόπο ελέγχεται η υγρασία μέσα σε κάθε δοχείο.

2.3.α Μέθοδος sandwich

Με τη μέθοδο αυτή οι ρίζες τοποθετούνται ανάμεσα σε δίσκους νιτροκυτταρίνης κι έτσι βρίσκονται σε άμεση επαφή με το εμβόλιο που προσθέτουμε, αυξάνοντας την πιθανότητα αποικισμού.

Η διαδικασία έχει ως εξής:

- Προσθήκη της άμμου μέχρι τα 2/3 κάθε δοχείου magenta
- Προσθήκη 60ml θρεπτικού LAS σε κάθε δοχείο
- Ανάμιξη άμμου και θρεπτικού και σχηματισμός μια σχισμής στην οποία θα τοποθετηθεί το sandwich
- Ενυδάτωση των δίσκων σε τριβλίο που περιέχει νερό-άγαρ
- Σε κάθε δίσκο τοποθετούνται τρία φυτά με το υπέργειο τους τμήμα να προεξέχει
- Προσθήκη 300μL εμβολίου *R. irregularis* (με συγκέντρωση 1000 σπόριο ανά ml) ή 300μL θρεπτικό διάλυμα στις ρίζες των φυτών με κατεύθυνση από πάνω προς τα κάτω
- Τοποθέτηση του 2^{ου} δίσκου νιτροκυτταρίνης
- Τοποθέτηση του sandwich στη σχισμή και κλείσιμο αυτής, ώστε το sandwich να βρίσκεται σε άμεση επαφή με την άμμο και το θρεπτικό μέσο

2.4 Ανάπτυξη των ριζοβίων σε υγρή καλλιέργεια και εμβολιασμός των φυτών *Lotus japonicus*

Αρχικά, τα ριζόβια αναπτύχθηκαν σε τριβλίο το οποίο περιείχε θρεπτικό υλικό YMB ώστε να γίνει η στερεά καλλιέργεια. Το τριβλίο τοποθετήθηκε στον επωαστήρα στους 28°C για 2 μέρες και στη συνέχεια αποθηκεύτηκε στους 4°C. Έπειτα, για την δημιουργία της υγρής καλλιέργειας, απομονώθηκαν αποικίες ριζοβίων από το τριβλίο και προστέθηκαν σε φλάσκα που περιείχε 5ml θρεπτικού YMB(εκχύλισμα ζύμης, μαννιτόλη, NaCl, MgSO₄H₂O, K₂HPO₄. Η φλάσκα τοποθετήθηκε στον επωαστήρα στους 28°C για 2 μέρες. Οι διαδικασίες αυτές πραγματοποιήθηκαν όλες στον θάλαμο καθέτου νηματικής ροής για να μην υπάρξουν επιμολύνσεις στις καλλιέργειες.

Μετά το πέρας των δύο ημερών πραγματοποιήθηκε ο εμβολισμός των φυτών τα οποία είχαν ήδη μεταφυτευθεί στα δοχεία magentas εδώ και δύο εβδομάδες.

Διαδικασία:

- Μέτρηση της οπτικής πυκνότητας της υγρής καλλιέργειας και υπολογισμός του αρχικού όγκου που θα χρησιμοποιηθεί από την καλλιέργεια ώστε η τελική οπτική πυκνότητα του εμβολίου να είναι $OD_{600}=0.02$.
- Δημιουργία σχισμής στην άμμο και αφαίρεση του ενός δίσκου νιτροκυτταρίνης από κάθε sandwich. Προσθήκη 1ml εμβολίου στις ρίζες των φυτών ή 1ml dH₂O στην περίπτωση των φυτών ελέγχου ή των φυτών που εμβολιάζονται μόνο με ενδομυκορριζικούς μύκητες.
- Κλείσιμο της σχισμής ώστε η άμμος να βρίσκεται σε άμεση επαφή με τις ρίζες των φυτών.

2.5 Συγκομιδή των φυτών και χρώση των ριζών με μελάνι

Για τον υπολογισμό του αποικισμού των ριζών από ενδομυκορριζικούς μύκητες χρειάζεται να φυτά να απομακρυνθούν από τα δοχεία magenta μέσα στα οποία αναπτύσσονται, να ξεπλυθεί η άμμος από τις ρίζες τους και στη συνέχεια να αποκοπεί το υπέργειο τμήμα τους, Έπειτα, οι ρίζες που απομένουν βάφονται με μελάνι για να καταστεί εφικτή η μικροσκοπική παρατήρηση τους, καθώς οι δομές του μύκητα (κύστες, εσωτερικές υφές, δενδρόμορφα) βάφονται με έντονο μπλε χρώμα και είναι ορατές με το οπτικό μικροσκόπιο.

Η διαδικασία της χρώσης των ριζών έχει ως εξής:

- Οι ρίζες τοποθετούνται μέσα σε σωλήνες falcon
- Προσθήκη KOH 10% και αφήνεται για επώαση για 30λεπτά στο υδατόλουτρο στους 80-90 °C.
- Απομάκρυνση του KOH
- Προσθήκη οξικού οξέος 10% μέσα στον επαγωγό
- 2 πλύσεις με dH₂O μέσα στον επαγωγό
- Προσθήκη μελανιού και επώαση για 30 λεπτά στο υδατόλουτρο στους 80-90 °C
- Απομάκρυνση του διαλύματος με το μελάνι
- 2 πλύσεις με dH₂O μέσα στον επαγωγό
- Προσθήκη οξικού οξέος 5% και επώαση σε θερμοκρασία δωματίου για 30 λεπτά
- Απομάκρυνση του οξικού οξέος και προσθήκη dH₂O
- Επώαση τους 4°C όλη νύχτα

2.6 Υπολογισμός αποικισμού από ενδομυκορριζικούς μύκητες

Μετά τη χρώση των ριζών, ακολουθεί ο τεμαχισμός τους σε κομμάτια μήκους 1 με 1,5 εκατοστών και η τοποθέτηση τους σε αντικειμενοφόρους πλάκες ώστε να παρατηρηθούν έπειτα στο μικροσκόπιο. Κάθε αντικειμενοφόρος πλάκα προέρχεται από φυτά που αναπτύσσονταν στο ίδιο δοχείο magenta και αποτελεί μια βιολογική επανάληψη του πειράματος. Σε κάθε πλάκα γίνεται παρατήρηση 100 οπτικών πεδίων (με χρήση του 40x φακού) και σε κάθε πεδίο σημειώνεται η ύπαρξη ή όχι αποικισμού. Για το τελικό ποσοστό αποικισμού κάθε πλάκας τα αποτελέσματα ανάγονται σε ποσοστό επί τοις %.

2.7 Απομόνωση του ολικού RNA από τις ρίζες των φυτών

Διαλύματα:

- Διάλυμα Lysis/binding :
 - 100mM Tris-HCL (pH 7,5)
 - 500mM LiCL
 - 10mM EDTA (pH 8)
 - 1% LiDS
 - 5mM DT
- Διάλυμα LoTE :
 - 3mM Tris-HCL (pH 7,5)
 - 0.2 mM EDTA (pH 7,5)

Η διαδικασία της απομόνωσης είναι η εξής:

Αρχικά είναι υποχρεωτική η διατήρηση των δειγμάτων καθ' όλη την διάρκεια μέσα σε υγρό άζωτο ή πάγο.

- Λειοτρίβηση του ιστού, που είχε διατηρηθεί στους -80°C
- Μεταφορά του ιστού μέσα σε σωληνάριο Eppendorf των 1,5ml
- Προσθήκη 450μL διαλύματος Lysis-binding μέσα σε κάθε σωληνάριο Eppendorf και απευθείας ανάδευση (vortex)
- Φυγοκέντρηση για 10λεπτά στους 4°C και στις 13.000 στροφές
- Αφαίρεση του υπερκείμενου από κάθε σωληνάριο Eppendorf και μεταφορά σε νέα σωληνάρια Eppendorf που περιέχουν 500μL Trizol
- Ανάδευση (vortex) για τουλάχιστον 30 δευτερόλεπτα και επώαση σε θερμοκρασία δωματίου για 5 λεπτά
- Φυγοκέντρηση για 5 λεπτά (μέγιστες στροφές)
- Αφαίρεση του υπερκείμενου από κάθε σωληνάριο Eppendorf (με προσοχή για αποφυγή διαταραχής της ενδιάμεσης φάσης) και μεταφορά σε νέα σωληνάρια Eppendorf που περιέχουν 125μL χλωροφόρμιο

- Ανάδευση (vortex) για 30 δευτερόλεπτα και επώαση σε θερμοκρασία δωματίου για 2 λεπτά
- Φυγοκέντρηση για 5 λεπτά
- Απομόνωση της υπερκείμενης φάσης (420μL) και μεταφορά σε νέα σωληνάρια Eppendorf
- Προσθήκη 1/10 του όγκου NaOAc (42μL) και ανάδευση (vortex)
- Προσθήκη 1/10 του όγκου ακετοξικό οξύ (42μL) και ανάδευση με το χέρι
- Προσθήκη 2,5/10 του όγκου 100% EtOH (1050μL) και επώαση σε θερμοκρασία δωματίου για 20 λεπτά
- Αποθήκευση στους -20°C όλη νύχτα
- Φυγοκέντρηση στους -4°C για 1 ώρα (μέγιστες στροφές)
- Πλύση του ιζήματος με 1000μL 80% EtOH
- Φυγοκέντρηση για 10 λεπτά (μέγιστες στροφές)
- Απομάκρυνση του υπερκείμενου
- Φυγοκέντρηση για μερικά δευτερόλεπτα
- Απομάκρυνση του εναπομένοντος υπερκείμενου και στέγνωμα του ιζήματος σε θερμοκρασία δωματίου για 7 λεπτά
- Προσθήκη 10 - 20μL διάλυμα LoTE
- Θέρμανση των δειγμάτων στους 65°C για 2 λεπτά και σύντομη ανάδευση (vortex)
- Αποθήκευση στους -20°C

2.8 Απομάκρυνση του DNA με αντίδραση DNάσης

Αντιδραστήρια:

❖ Δείγμα RNA	800ng
❖ 10x διάλυμα αντίδρασης DNάσης	1μL
❖ RNaseOUT (40U/μL)	0,25μL
❖ DNάση (1U/μL)	1μL
❖ ddH ₂ O	ως το τελικό όγκο

Τελικός όγκος αντίδρασης	10μL
--------------------------	------

Η ποσότητα του RNA υπολογίζεται από τις τιμές ng/μL που βρέθηκαν με τη χρήση του nanodrop.

Η διαδικασία είναι ως εξής:

- Επώαση για 50 λεπτά στους 37°C
- Προσθήκη 1 μL EDTA
- Επώαση για 10 λεπτά στους 65°C
- Για τον έλεγχο της απομάκρυνσης του DNA από τα δείγματα πραγματοποιείται αλυσιδωτή αντίδραση πολυμεράσης (PCR)

2.9 Αλυσιδωτή αντίδραση πολυμεράσης (PCR)

Η αλυσιδωτή αντίδραση πολυμεράσης είναι μια ενζυμική μέθοδος ενίσχυσης ενός τμήματος DNA γνωστής αλληλουχίας με εκμαγείο το ίδιο το DNA. Χρειάζεται η υβριδοποίηση κατάλληλα σχεδιασμένων εκκινητών στα άκρα του τμήματος για τον επιτυχή πολυμερισμό των κλώνων. Η αντίδραση εκτελείται σε τρία επαναλαμβανόμενα στάδια: I. Αποδιάταξη του γενετικού υλικού, II. υβριδισμός των εκκινητών πάνω στη συμπληρωματική αλυσίδα του DNA, III. επιμήκυνση της νεοσυντιθέμενης αλυσίδας. Οι συνθήκες της αντίδρασης καθορίζονται από τις απαιτήσεις του εκάστοτε πειράματος, καθώς η θερμοκρασία αποδιάταξης και υβριδοποίησης των εκκινητών εξαρτάται από το ποσοστό επι τοις % των βάσεων G-C του τμήματος που ενισχύεται και από τη θερμοκρασία τήξης των εκκινητών, αντίστοιχα.


Στο συγκεκριμένο πείραμα οι εκκινητές που χρησιμοποιήθηκαν υβριδίζουν στο ενδογενές γονίδιο της ουβικουτίνης.

Αντίδραση:

- Δείγμα (μετά από την αντίδραση DNAσης)	1 μL
- 10x ρυθμιστικό διάλυμα	2 μL
- Πρόσθιος εκκινητής (F) (10 μM)	0.8 μL
- Οπίσθιος εκκινητής (R) (10 μM)	0.8 μL
- Ένζυμο Taq πολυμεράσης (5U/ μL)	0.08 μL
- ddH ₂ O	14.94 μL
<hr/>	
Τελικός όγκος της αντίδρασης	20 μL

Πρόγραμμα αντίδρασης:

	ΧΡΟΝΟΣ	ΘΕΡΜΟΚΡΑΣΙΑ
Αρχική αποδιάταξη	5min	95°C
Αποδιάταξη	30sec	95°C
Υβριδοποίηση	30sec	55°C
Επιμήκυνση	10sec	72°C
Τελική επιμήκυνση	4min	72°C
Hold	∞	4 °C



✦ 40 κύκλοι

Για να ελεγχθεί αν όντως απομακρύνθηκε το DNA από τα δείγματα μας, στη συνέχεια πραγματοποιείται ηλεκτροφόρηση σε πήκτωμα αγαρόζης και έλεγχος του gel με την ύπαρξη θετικού και αρνητικού μάρτυρα.

2.10 Σύνθεση συμπληρωματικού DNA (cDNA)

Η διαδικασία είναι η εξής:

- | | |
|--------------------------------------|-----------------------|
| - Δείγμα από την αντίδραση DNάσης | 400ng |
| - oligodT (2μL) | 1μL |
| - miR2111-stemloop εκκινητής (0.5μM) | 1μL |
| - ddH ₂ O | μέχρι τον τελικό όγκο |

Τελικός όγκος αντίδρασης

17μL

- Επώαση στους 70°C για 5 λεπτά
- Master mix
 - 5x διάλυμα 5μL
 - Τριφωσφορικά νουκλεοτίδια (10mM) 1.5μL
 - RNaseOUT (40U/μL) 0.5μL
 - Superscript II (200U/μL) 1μL
- Ήπια ανάμιξη του master mix και του αρχικού δείγματος
- Πρόγραμμα αντίστροφης μεταγραφάσης (RT – PCR)

ΧΡΟΝΟΣ	ΘΕΡΜΟΚΡΑΣΙΑ
30min	16°C
30sec	30 °C
30sec	42 °C
1sec	50 °C
5min	85 °C
∞	4 °C

2.11 Αλυσιδωτή αντίδραση πολυμεράσης σε πραγματικό χρόνο (qPCR)

Η αλυσιδωτή αντίδραση πολυμεράσης πραγματικού χρόνου ή ποσοτική αλυσιδωτή αντίδραση πολυμεράσης είναι μια τεχνική που βασίζεται στην τεχνική της απλής PCR με το πλεονέκτημα όμως ότι γίνεται ποσοτικός προσδιορισμός των αντιγράφων του τμήματος DNA καθ' όλη τη διάρκεια της αντίδρασης. Αυτό κατέστη εφικτό με την παρακολούθηση της αύξησης φθορίζοντος σήματος εκπομπής από κάποια φθορίζουσα χρωστική. Στη συγκεκριμένη αντίδραση χρησιμοποιήθηκε η χρωστική SYBR green η οποία προσδένεται ασθενώς σε μονόκλιωνα τμήματα και ισχυρά σε δίκλιωνα τμήματα DNA. Η χρωστική φθορίζει στο πράσινο φάσμα (520nm) και η ανίχνευση του φθορίζοντος σήματος εκπομπής γίνεται με τη χρήση δέσμης laser. Η ένταση του φθορισμού είναι ανάλογη της ποσότητας του προϊόντος της αντίδρασης. Η μέτρηση του φθορισμού πραγματοποιείται κατά την εκθετική φάση της καμπύλης (logphase), κατά την οποία ενισχύονται τα τμήματα DNA μετά την υβριδοποίηση των εκκινητών. Η qPCR για τον ακριβή ποσοτικό προσδιορισμό του προϊόντος της αντίδρασης συνδέει τον αρχικό αριθμό των αντιγράφων του δείγματος (DNA)

με τον πρώτο κύκλο της αντίδρασης, όπου το προϊόν της αντίδρασης είναι ανιχνεύσιμο. Ορίζεται λοιπόν, από το μηχάνημα της qPCR, ένα κατώφλι και στο Ct ο ανιχνεύσιμος φθορισμός του προϊόντος το έχει ξεπεράσει.

Αρχικά, πραγματοποιήθηκε μια αντίδραση qPCR με σκοπό την κανονικοποίηση των δειγμάτων cDNA. Τα επίπεδα έκφρασης των γονιδίων του *L. japonicus* που κωδικοποιούν για ATP χρησιμοποιήθηκαν ως εσωτερικός έλεγχος για να γίνει αυτή η κανονικοποίηση στις μικρές διαφορές που παρουσιαζόταν στις ποσότητες του cDNA.

Αντίδραση qPCR για την κανονικοποίηση:

- cDNA	1μL
- πρόσθιος εκκινητής (F) (10μM)	0.2μL
- οπίσθιος εκκινητής (R) (10μM)	0.2μL
- ddH ₂ O	3.6μL
- SYBR green	5μL

Τελικός όγκος αντίδρασης 10μL

Εφόσον κανονικοποιηθούν τα δεδομένα, υπολογίζεται πόσο ddH₂O χρειάζεται να προστεθεί σε κάθε δείγμα (αραίωση πυκνών δειγμάτων cDNA) και ακολουθεί η αντίδραση qPCR.

Αντίδραση:

- cDNA	2.5μL
- πρόσθιος εκκινητής (F) (10μM)	0.2μL
- οπίσθιος εκκινητής (R) (10μM)	0.2μL
- ddH ₂ O	2.1μL
- SYBR green	5μL

Τελικός όγκος αντίδρασης 10μL

Διαδικασία:

- Οι αντιδράσεις της ποσοτικής RT-PCR πραγματοποιήθηκαν στο μηχάνημα CPX Connect Real-Time System (BIORAD)
- Το πρόγραμμα του PCR περιλάμβανε 5 λεπτά επώαση στους 95°C και ακολούθησαν 40 κύκλοι με 95°C για 15sec, 60°C για 15 sec και 72°C για 10 sec.
- Τα επίπεδα έκφρασης του κάθε γονιδίου (gene) υπολογίστηκαν σε αναλογία προς τα επίπεδα έκφρασης των γονιδίων

αναφοράς(housekeeping). Στην παρούσα εργασία χρησιμοποιήθηκαν ως γονίδια αναφοράς, τα γονίδια *ATP* και *PP2*. Τα σχετικά επίπεδα έκφρασης υπολογίστηκαν από τον τύπο $PCReff^{-\Delta Ct}$, όπου ΔCt είναι η διαφορά $Ct_{gene} - Ct_{housekeeping}$ και $PCReff$ είναι η αποδοτικότητα της αντίδρασης PCR

- Η αποδοτικότητα της αντίδρασης PCR για κάθε γονίδιο υπολογίστηκε από την γραμμική συνάρτηση του λογαρίθμου της απορρόφησης ανά κύκλο αντίδρασης, χρησιμοποιώντας το λογισμικό LinRegPCR

ΓΟΝΙΔΙΑ	Πρόσθιος εκκινητής	Οπίσθιος εκκινητής
LjSbtM1	CAGGTGAACCCAGAAGGTTGCATAC	AGCAGCACCCCTCTCTATCTTCATGC
LjATPs	CAATGTCGCCAAGGCCCA TGGTG	AACACCACTCTCGATCATTCTCTG
LjPP2a	GTAAATGCGT CTAAAGATAGGGTCC	ACTAGACTGTAGTGCTTGAGAGGC
LjTML	GC CAACAATTGCCTGAAACCAGATG	CTTTATGGTGTTTCTCTCTATGAATGC TG
miR2111 a/b	GCGCGTAATCTGCATCCTGAG	AGTGCAGGGTCCGAGGTATTC

[Πίνακας με τις αλληλουχίες των εκκινητών των γονιδίων που χρησιμοποιήθηκαν]

3. ΑΠΟΤΕΛΕΣΜΑΤΑ

3.1 Έλεγχος του αποικισμού φυτών αγρίου τύπου και του μεταλλάγματος *tml-6* από ενδομυκορριζικό μύκητα παρουσία – απουσία ριζοβίων

Για να μελετηθεί η πιθανή εμπλοκή του γονιδίου *TML* κατά τον ταυτόχρονο αποικισμό των φυτών από ενδομυκορριζικούς μύκητες και ριζόβια, έγινε σύγκριση των επιπέδων αποικισμού από τον ενδομυκορριζικό μύκητα μεταξύ αγρίου τύπου φυτών και φυτών του μεταλλάγματος *tml-6*, σε παρουσία και απουσία ριζοβίου.

Στο πείραμα αυτό χρησιμοποιήθηκαν φυτά αγρίου τύπου (GIFU) και φυτά από το μετάλλαγμα *tml-6*, τα οποία εμβολιάστηκαν αρχικά με τον ενδομυκορριζικό μύκητα *Rhizopogon irregularis* (στέλεχος DAOM) και μετά από 2 εβδομάδες εμβολιάστηκαν με το ριζόβιο *Mesorhizobium loti* (στέλεχος R7A).

Νεαρά φυτάρια *Lotus japonicus* GIFU και *tml-6*, ηλικίας 8 ημερών, μεταφέρθηκαν σε δοχεία magentas και στη συνέχεια εμβολιάστηκαν με τους μικροοργανισμούς. Το πείραμα περιλάμβανε 4 συνθήκες:

1. φυτά αγρίου τύπου εμβολιασμένα με ενδομυκορριζικό μύκητα
2. φυτά αγρίου τύπου εμβολιασμένα με ενδομυκορριζικό μύκητα και ριζόβια
3. φυτά του μεταλλάγματος *tml-6* εμβολιασμένα με ενδομυκορριζικό μύκητα
4. φυτά του μεταλλάγματος *tml-6* εμβολιασμένα με ενδομυκορριζικό μύκητα και ριζόβια

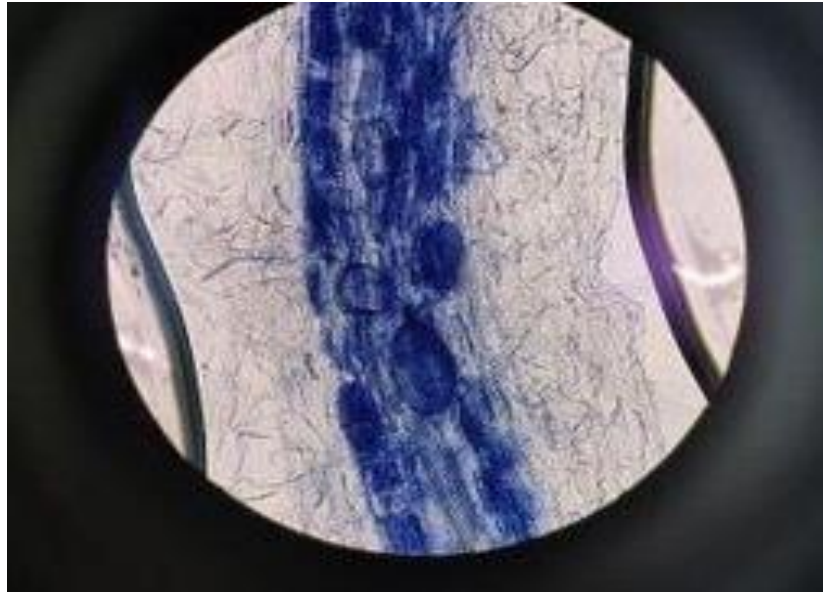
Συνολικά το πείραμα περιλάμβανε 4 δοχεία magentas για κάθε συνθήκη, άρα 4 βιολογικές επαναλήψεις.



Εικόνα 12: Φυτά *L.jaronicus*, 5 εβδομάδες μετά τον εμβολιασμό με *R. irregularis* στέλεχος DAOM και 3 εβδομάδες μετά τον εμβολιασμό με *M. loti* στέλεχος R7A. Αριστερά, φυτά αγρίου τύπου, δεξιά μεταλλάγματα *tml-6*

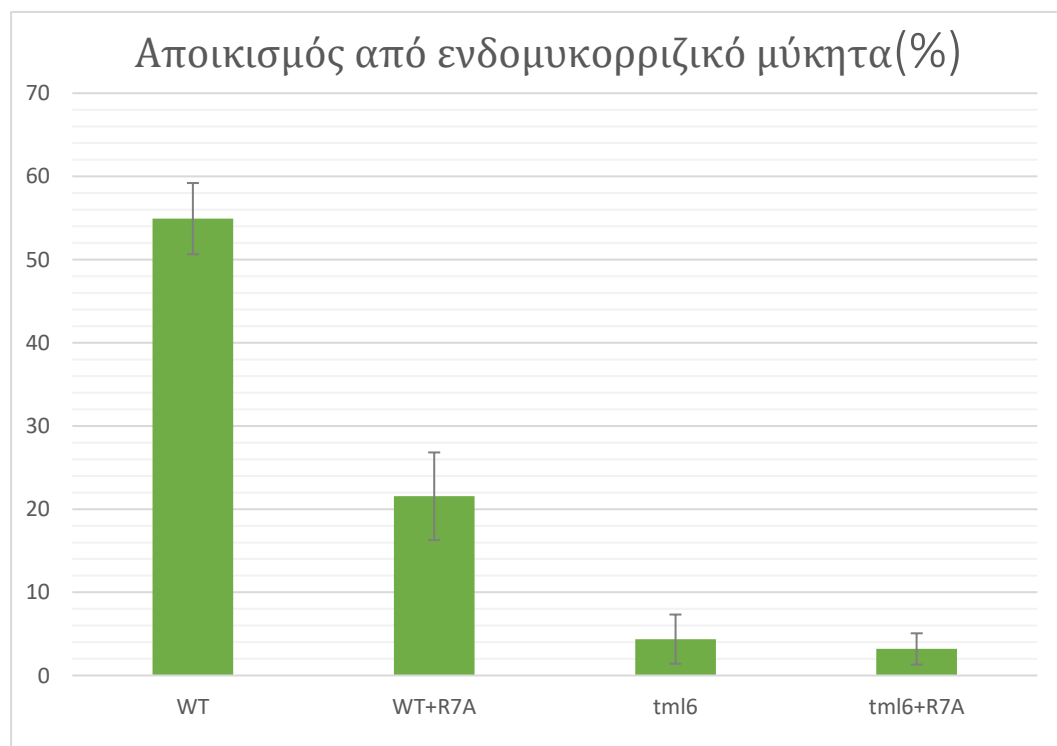
Τρεις εβδομάδες μετά τον εμβολιασμό με ριζόβια και συνεπώς 5 εβδομάδες μετά τον εμβολιασμό με τον ενδομυκορριζικό μύκητα, πραγματοποιήθηκε η συγκομιδή των φυτών. Όπως φαίνεται στην εικόνα 12, η ανάπτυξη των φυτών του μεταλλάγματος *tml-6* είναι περιορισμένη σε σχέση με τα φυτά αγρίου τύπου. Στα φυτά μεταλλάγματος *tml-6* και λιγότερο στα φυτά αγρίου τύπου, η παρουσία του ριζοβίου φαίνεται να επηρεάζει μάλλον αρνητικά την ανάπτυξη των φυτών.

Ακολούθησε χρώση των ριζών με μελάνι για την παρατήρηση του αποικισμού των ριζών από τον ενδομυκορριζικό μύκητα. Ο αποικισμός υπολογίστηκε κατόπιν παρατήρησης των χαρακτηριστικών δομών του μύκητα στο οπτικό μικροσκόπιο (εικόνα 13) και το ποσοστό αποικισμού (%) υπολογίστηκε όπως περιγράφηκε στο κεφάλαιο «Υλικά και Μέθοδοι».



Εικόνα 13: Εικόνα από οπτικό μικροσκόπιο. Διακρίνονται χαρακτηριστικές δομές του μύκητα (δενδρόμορφα και κύστες)

Τα ποσοστά αποικισμού των ριζών από τον ενδομυκορριζικό μύκητα στις διαφορετικές συνθήκες του πειράματος παρουσιάζονται στην Εικόνα 14. Είναι εμφανές ότι ο αποικισμός των ριζών στα φυτά του μεταλλάγματος *tml-6* είναι αρκετά μειωμένος σε σύγκριση με τον αποικισμό που παρατηρείται στα φυτά αγρίου τύπου. Επιπλέον, η παρουσία ριζοβίου φαίνεται να επηρεάζει αρνητικά τον αποικισμό των φυτών αγρίου τύπου από τον ενδομυκορριζικό μύκητα.



Εικόνα 14: Ποσοστά αποικισμού των φυτών *L.jaronicus* ανά συνθήκη πειράματος

Για να διαπιστωθεί αν οι διαφορές που παρατηρήθηκαν στον αποικισμό των φυτών είναι σημαντικές, πραγματοποιήθηκε στατιστική ανάλυση των αποτελεσμάτων με το πρόγραμμα t-test calculator GraphPad.

Ομάδα I	Ομάδα II	p-value	
WT	WT + R7A	0.0027	Αυτή η διαφορά θεωρείται πολύ στατιστικώς σημαντική. [**]
<i>tml-6</i>	<i>tml-6</i> + R7A	0.7461	Αυτή η διαφορά δεν θεωρείται στατιστικώς σημαντική. [-]
WT	<i>tml-6</i>	0.0001	Αυτή η διαφορά θεωρείται εξαιρετικά στατιστικώς σημαντική. [***]

* : αναφέρεται σε $p < 0.05$, ** : αναφέρεται σε $p < 0.01$, *** : αναφέρεται σε $p < 0.001$

Σύμφωνα με τα παραπάνω αποτελέσματα, παρατηρείται στατιστικώς σημαντική μείωση του αποικισμού στα φυτά του μεταλλάγματος *tml-6* σε σύγκριση με τον αποικισμό στα αγρίου τύπου φυτά. Άρα η απουσία λειτουργίας του *TML* έχει αρνητική επίπτωση στον αποικισμό των φυτών από τον ενδομυκορριζικό μύκητα. Στην περίπτωση συν-αποικισμού των ριζών με μύκητα και ριζόβια, παρατηρείται στατιστικώς σημαντική μείωση του αποικισμού από ενδομυκορριζικό μύκητα στα αγρίου τύπου φυτά, εξαιτίας της παρουσίας του ριζοβίου. Στα φυτά του μεταλλάγματος *tml-6*, η παρουσία ριζοβίων δεν προκαλεί ανάλογη στατιστικώς σημαντική μείωση του αποικισμού από ενδομυκορριζικό μύκητα, ίσως γιατί στο μέταλλαγμα *tml-6* ο αποικισμός με ενδομυκορριζικό μύκητα είναι ήδη μειωμένος (σε σχέση με τα φυτά αγρίου τύπου).

3.2 Διερεύνηση των επιπέδων έκφρασης του μικρού RNA *miR2111* και του γονιδίου *TML* κατά τον ταυτόχρονο αποικισμό των φυτών από ενδομυκορριζικό μύκητα και ριζόβια.

Για να μελετηθεί η πιθανή εμπλοκή του μικρού RNA *miR2111* και του γονιδίου *TML* κατά τον ταυτόχρονο αποικισμό από ενδομυκορριζικούς μύκητες και ριζόβια, έγινε σύγκριση των επιπέδων έκφρασης αυτών μεταξύ μη εμβολιασμένων και εμβολιασμένων με μικροοργανισμούς, φυτών.

Τα αγρίου τύπου φυτά (GIFU) που χρησιμοποιήθηκαν εμβολιάστηκαν με τον ενδομυκορριζικό μύκητα *Rhizophagus irregularis* (στέλεχος DAOM) και μετά από 14 ημέρες εμβολιάστηκαν με το ριζόβιο *Mesorhizobium loti* (στέλεχος R7A).

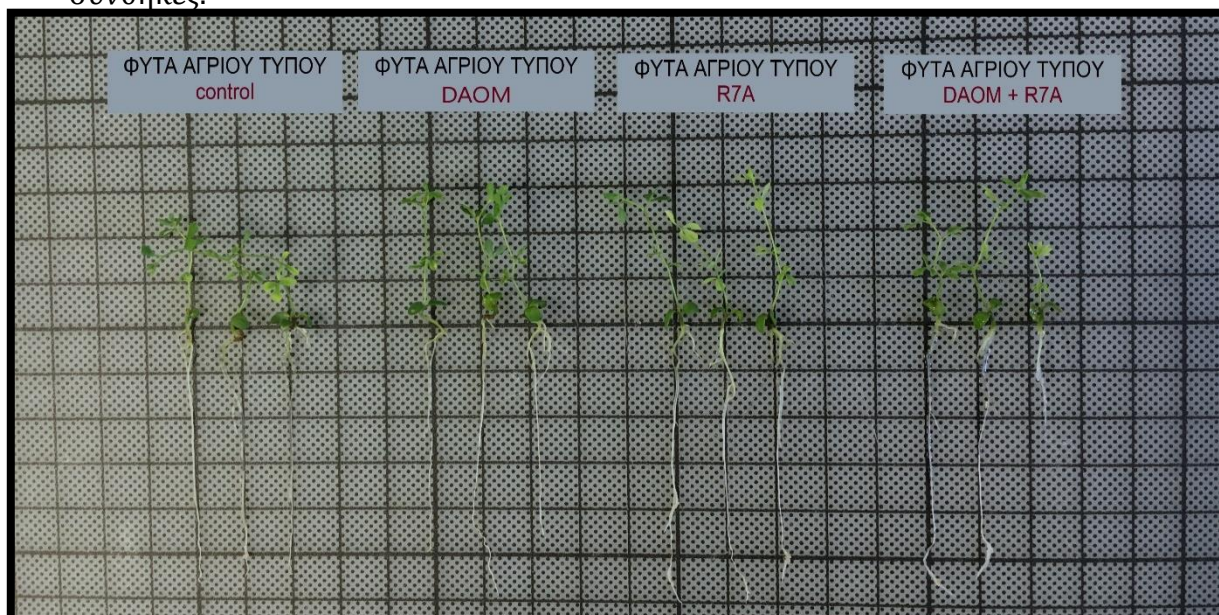
Νεαρά φυτάρια *Lotus japonicus* GIFU, ηλικίας 10 ημερών μεταφέρθηκαν σε δοχεία magentas και στη συνέχεια εμβολιάστηκαν με τους μικροοργανισμούς.

Το πείραμα αυτό περιλαμβάνει 4 συνθήκες:

1. φυτά αγρίου τύπου μη εμβολιασμένα
2. φυτά αγρίου τύπου εμβολιασμένα με ενδομυκορριζικό μύκητα
3. φυτά αγρίου τύπου εμβολιασμένα με ριζόβια
4. φυτά αγρίου τύπου εμβολιασμένα με ενδομυκορριζικό μύκητα και ριζόβια

Συνολικά το πείραμα περιλάμβανε 5 δοχεία magentas για κάθε συνθήκη, άρα 5 βιολογικές επαναλήψεις.

Τέσσερις μέρες μετά τον εμβολιασμό με ριζόβια και συνεπώς 18 ημέρες μετά τον εμβολιασμό με τον ενδομυκορριζικό μύκητα, πραγματοποιήθηκε η συγκομιδή των φυτών και η κοπή του υπέργειου τμήματος ώστε να απομείνουν μόνο οι ρίζες των φυτών και να αποθηκευτούν στους -80°C για μελλοντική χρήση. Όπως φαίνεται στην εικόνα 15, η ανάπτυξη των φυτών είναι σχετικά μειωμένη στα φυτά ελέγχου (control) αλλά δεν παρουσιάζει διαφορές στις υπόλοιπες 3 συνθήκες.



Εικόνα 15: Φυτά *L.japonicus* 18 ημέρες μετά τον εμβολιασμό με *R. irregularis* στέλεχος DAOM και 4 μέρες μετά τον εμβολιασμό με *M. loti* στέλεχος R7A.

Ακολούθησε η απομόνωση του RNA από τις ρίζες των φυτών ώστε να ελεγχθεί η έκφραση του γονιδίου *TML* και του μικρού RNA miR2111 με τη βοήθεια της αντίδρασης qPCR. Αρχικά πραγματοποιήθηκε η λειοτρίβηση των ριζών, ακολούθησε η εκχύλιση του RNA, η απομάκρυνση του DNA με τη χρήση DNάσης, η σύνθεση του cDNA και τέλος η αντίδραση PCR πραγματικού χρόνου (qPCR). Τα πρωτόκολλα των μεθόδων περιεγράφηκαν αναλυτικά στο κεφάλαιο «Υλικά και Μέθοδοι».

Στη συνέχεια πραγματοποιήθηκε απομόνωση RNA από τα δείγματα και οι συγκεντρώσεις RNA των δειγμάτων και ο λόγος (260/280) προσδιορίστηκαν με την συσκευή nanodrop και παρουσιάζονται στον παρακάτω πίνακα:

ΔΕΙΓΜΑΤΑ	ΣΥΓΚΕΝΤΡΩΣΗ(ng/μL)	ΛΟΓΟΣ (260/280)
Μη εμβολιασμένα 1	375	1.67
Μη εμβολιασμένα 2	162	1.77
Μη εμβολιασμένα 3	113	1.87
Μη εμβολιασμένα 4	262	1.80
Μη εμβολιασμένα 5	261	1.72
Ριζόβιο 1	96	1.78
Ριζόβιο 2	322	1.62
Ριζόβιο 3	133	1.80
Ριζόβιο 4	228	1.80
Ριζόβιο 5	137	1.57
Μύκητας 1	118	1.84
Μύκητας 2	195.5	1.78
Μύκητας 3	81.7	1.66
Μύκητας 4	333	1.81
Μύκητας 5	153	1.61
Μύκητας + ριζόβιο 1	113.2	1.89

Μύκητας + ριζόβιο 2	140.1	1.92
Μύκητας + ριζόβιο 3	154.6	1.90
Μύκητας + ριζόβιο 4	74	1.93
Μύκητας + ριζόβιο 5	85.8	1.74

*Το «ριζόβιο» αναφέρεται σε φυτά που έχουν εμβολιαστεί μόνο με το ριζόβιο *Mesorhizobium loti*. Ο «μύκητας» αναφέρεται σε φυτά που έχουν εμβολιαστεί μόνο με τον ενδομυκορριζικό μύκητα *Rhizophagus irregularis*. «Μύκητας και ριζόβιο» αναφέρεται σε φυτά που έχουν εμβολιαστεί και με τους δύο μικροοργανισμούς.

Βάσει των συγκεντρώσεων υπολογίστηκε η ποσότητα RNA από κάθε δείγμα που χρειάστηκε για την αντίδραση της DNάσης.

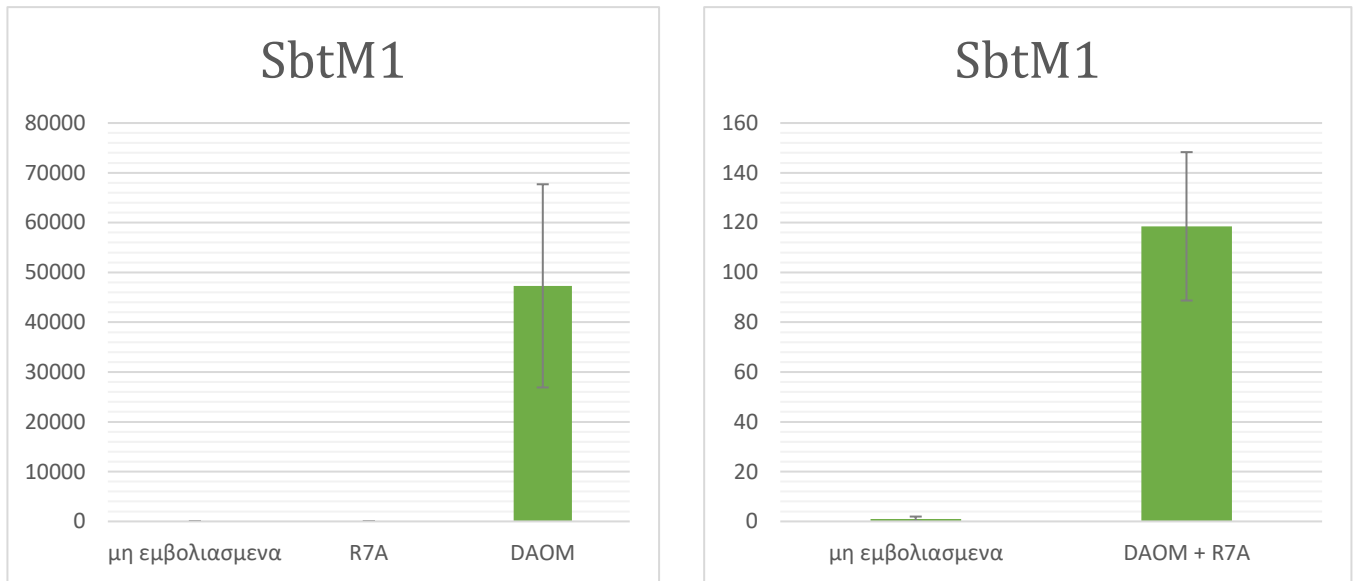
Στη συνέχεια για τον έλεγχο της επιτυχούς απομάκρυνσης του DNA από τα δείγματα ύστερα από τη δράση της DNάσης, πραγματοποιήθηκε αντίδραση PCR με εκκινητές για το ενδογενές γονίδιο της ουβικουιτίνης. Έπειτα τα δείγματα ηλεκτροφορήθηκαν σε πήκτωμα αγαρόζης και επιβεβαιώθηκε η απομάκρυνση του DNA από τα δείγματα. Στη συνέχεια, πραγματοποιήθηκε αντίδραση ποσοτικής PCR πραγματικού χρόνου (qPCR). Για την κανονικοποίηση των δειγμάτων cDNA χρησιμοποιήθηκε το γονίδιο αναφοράς ATP. Οι τιμές φαίνονται στον παρακάτω πίνακα:

ΔΕΙΓΜΑΤΑ	ΤΙΜΕΣ Ct
Μη εμβολιασμένα 1	23.3
Μη εμβολιασμένα 2	23.7
Μη εμβολιασμένα 3	24.1
Μη εμβολιασμένα 4	22.6
Μη εμβολιασμένα 5	23.6
Ριζόβιο 1	22.6
Ριζόβιο 2	29.4
Ριζόβιο 3	23.7
Ριζόβιο 4	22.8

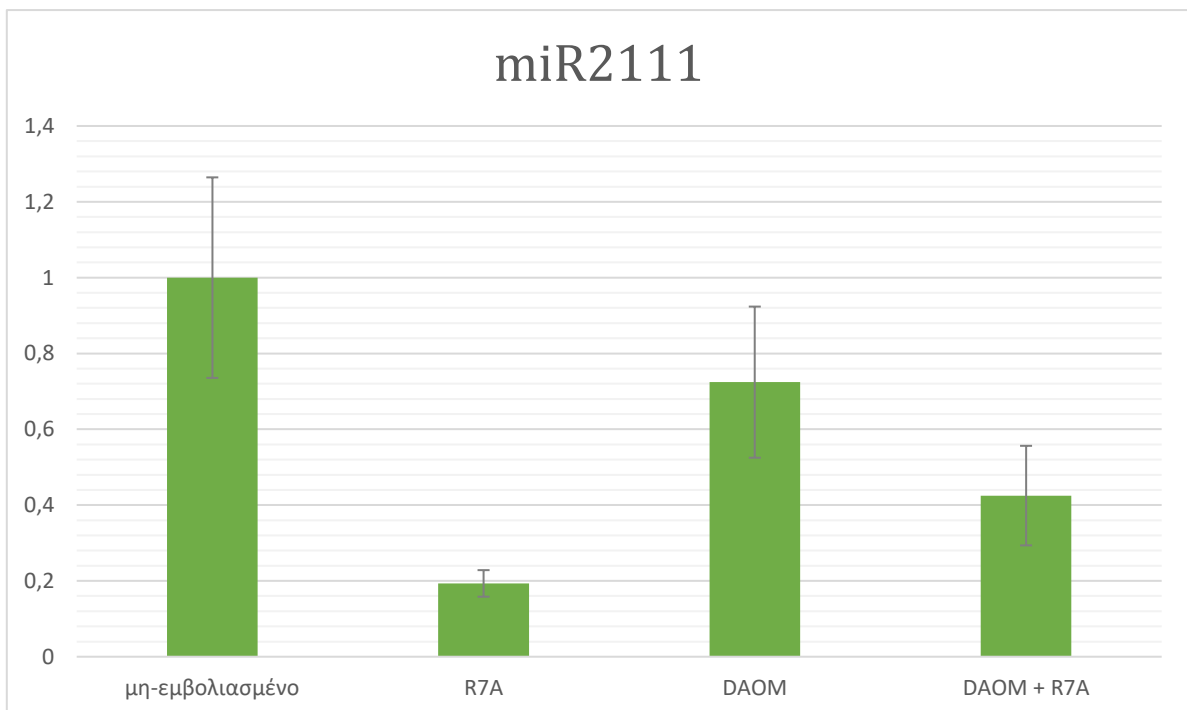
Ριζόβιο 5	24
Μύκητας 1	22.4
Μύκητας 2	24.8
Μύκητας 3	23.6
Μύκητας 4	21.8
Μύκητας 5	24.9
Μύκητας + ριζόβιο 1	22.45
Μύκητας + ριζόβιο 2	22.07
Μύκητας + ριζόβιο 3	22.96
Μύκητας + ριζόβιο 4	22.21
Μύκητας + ριζόβιο 5	22.53

Στη συνέχεια πραγματοποιήθηκε αντίδραση qPCR στην οποία ελέγχεται η έκφραση δύο ενδογενών γονιδίων αναφοράς: του *ATP* και του *PP2*, του μικρού RNA *miR2111* και του γονιδίου *TML*. Επιπλέον, για να επιβεβαιωθεί ο επιτυχής αποικισμός από τον ενδομυκορριζικό μύκητα και η επιτυχία της ανάπτυξης της συμβιωτικής σχέσης, χρησιμοποιήθηκε ειδικό γονίδιο μάρτυρας (marker gene) του οποίου η έκφραση αυξάνεται στα αρχικά στάδια του αποικισμού. Το γονίδιο αυτό είναι το *SbtM1* το οποίο κωδικοποιεί για μια πρωτεάση του φυτού, εντοπίζεται σε περιοχές γύρω από τον μύκητα (PAS: peri-arbuscular space) και η έκφραση του αρχίζει να αυξάνεται 3 μέρες μετά τον εμβολιασμό με ενδομυκορριζικό μύκητα. [76]

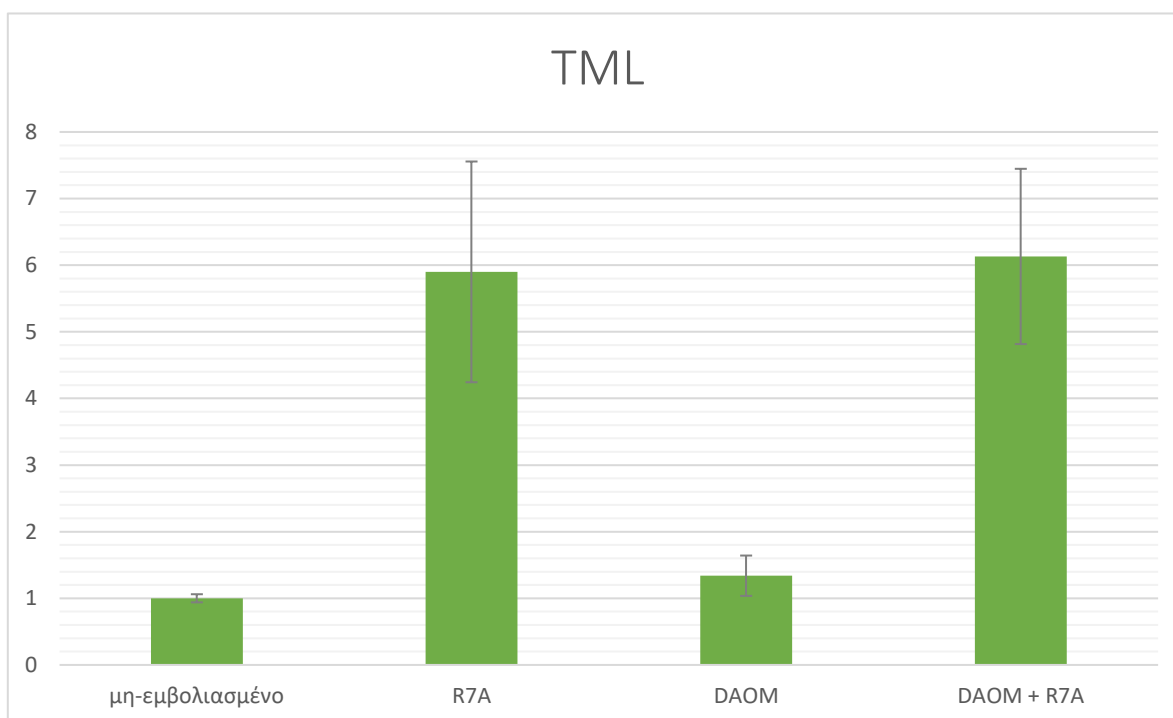
Τα αποτελέσματα από την qPCR παρουσιάζονται στα παρακάτω γραφήματα.



Εικόνα 16. Επίπεδα έκφρασης του γονιδίου-μάρτυρα *SbtM1*. (αριστερά) Σύγκριση μη-εμβολιασμένων και εμβολιασμένων με ριζόβια ή με ενδομυκορριζικό μύκητα φυτών. (δεξιά) Σύγκριση μη-εμβολιασμένων και εμβολιασμένων και με τους δύο μικροοργανισμούς φυτών.



Εικόνα 17: Σύγκριση των επιπέδων συσσώρευσης του μικρού *miR2111*, μετά από 18 ημέρες από τον εμβολιασμό με *R. irregularis* και 4 ημέρες από τον εμβολιασμό με *M.loti*.



Εικόνα 18: Σύγκριση των επιπέδων έκφρασης του γονιδίου TML, μετά από 18 ημέρες από τον εμβολιασμό με *R. irregularis* και 4 ημέρες από τον εμβολιασμό με *M.loti*.

Πραγματοποιήθηκε στατιστική ανάλυση των αποτελεσμάτων με το πρόγραμμα t-test calculator GraphPad.

miR2111

Ομάδα I	Ομάδα II	p- value	
μη εμβολιασμένα	R7A	0.0317	Αυτή η διαφορά θεωρείται στατιστικώς σημαντική. [*]
μη εμβολιασμένα	DAOM	0.4292	Αυτή η διαφορά δεν θεωρείται στατιστικώς σημαντική. [-]

μη εμβολιασμένα	DAOM + R7A	0.0821	Αυτή η διαφορά δεν θεωρείται αρκετά στατιστικώς σημαντική. [-]
R7A	DAOM	0.0529	Αυτή η διαφορά δεν θεωρείται αρκετά στατιστικώς σημαντική. [-]
DAOM	DAOM + R7A	0.0098	Αυτή η διαφορά θεωρείται πολύ στατιστικώς σημαντική. [**]

TML

Ομάδα I	Ομάδα II	p- value	
μη εμβολιασμένα	R7A	0.0120	Αυτή η διαφορά θεωρείται στατιστικώς σημαντική.. [*]
μη εμβολιασμένα	DAOM	0.3049	Αυτή η διαφορά δεν θεωρείται στατιστικώς σημαντική. [-]
μη εμβολιασμένα	DAOM + R7A	0.0024	Αυτή η διαφορά θεωρείται πολύ στατιστικώς σημαντική. [**]

* : αναφέρεται σε $p < 0.05$, ** : αναφέρεται σε $p < 0.01$, *** : αναφέρεται σε $p < 0.001$

Σύμφωνα με τα παραπάνω αποτελέσματα, παρατηρείται σημαντική μείωση στα επίπεδα του miR2111 και αντίστοιχα, αύξηση στα επίπεδα του TML στα φυτά που εμβολιάστηκαν μόνο με ριζόβιο σε σύγκριση με τα μη εμβολιασμένα φυτά, όπως ήταν αναμενόμενο σύμφωνα με προηγούμενη μελέτη^[53]. Τόσο στα φυτά που εμβολιάστηκαν μόνο με ενδομυκορριζικό μύκητα όσο και στην περίπτωση του συν-εμβολιασμού υπάρχει μια τάση μείωσης στα επίπεδα miR2111 σε σχέση με τα μη-εμβολιασμένα φυτά, αλλά η μείωση δεν είναι στατιστικώς σημαντική. Όσον αφορά τα επίπεδα έκφρασης του TML, σε σύγκριση με τα μη εμβολιασμένα φυτά, δεν παρατηρήθηκε αλλαγή της έκφρασης στα φυτά που εμβολιάστηκαν μόνο με

ενδομυκορριζικό μύκητα. Ενώ στα φυτά που εμβολιάστηκαν και με τους 2 μικροοργανισμούς, η έκφραση του *TML*, κυμαίνεται στα ίδια επίπεδα που παρατηρούνται στην περίπτωση με τον μονό εμβολιασμό με ριζόβιο.

4. ΣΥΖΗΤΗΣΗ

Τα φυτά έχουν την ικανότητα να προσλαμβάνουν πληθώρα θρεπτικών από το έδαφος, τα οποία είναι χρήσιμα για την ανάπτυξη τους. Ωστόσο, ορισμένες φορές δεν είναι ικανά να δεσμεύσουν τις απαραίτητες ποσότητες σε απαραίτητα θρεπτικά όπως το άζωτο και ο φώσφορος. Στη φύση τα φυτά αναπτύσσουν συμβιωτικές σχέσεις με μικροοργανισμούς οι οποίες τους εξασφαλίζουν την αναγκαία ποσότητα αζώτου και φωσφόρου που χρειάζονται. Οι κύριες συμβιωτικές σχέσεις είναι εκείνες των ψυχανθών με τα αζωτοδεσμευτικά βακτήρια και της πλειονότητας των φυτών (95%) με ενδομυκορριζικούς μύκητες. Μέσω αυτής της συμβίωσης τα φυτά παρέχουν στους μικροοργανισμούς άνθρακα και λαμβάνουν άζωτο και φώσφορο.^[7] Επιπλέον, επωφελούνται περαιτέρω καθώς μέσω αυτών των αλληλεπιδράσεων παρατηρείται αύξηση της αντοχής των φυτών, προστασία από παθογόνα και αύξηση της ανάπτυξης τους.^[8,9] Στη γεωργία, τα συγκεκριμένα θρεπτικά προστίθενται σε μεγάλες ποσότητες στις καλλιέργειες υπο την μορφή ανόργανων λιπασμάτων. Ο φώσφορος των λιπασμάτων προέρχεται από εξορύξεις γεγονός που τον καθιστά μη ανεξάντλητο πόρο, ενώ το άζωτο «κατασκευάζεται» μέσω ορυκτών καυσίμων με την διαδικασία Haber – Bosch^[77] (μέθοδος απευθείας σύνθεσης αμμωνίας από υδρογόνο και άζωτο). Η διαδικασία αυτή περιλαμβάνοντας την καύση αυτών των ορυκτών έχει ως αποτέλεσμα την απελευθέρωση διοξειδίου του άνθρακα και την ρύπανση της ατμόσφαιρας.^[78] Επίσης, η μακροχρόνια και εντατική χρήση τέτοιων ανόργανων λιπασμάτων οδηγεί στην διαταραχή του κύκλου του αζώτου στην φύση και στη ρύπανση των επιφανειακών και υπόγειων υδάτων.^[79]

Είναι επιτακτική η ανάγκη λοιπόν αντικατάστασης των ανόργανων λιπασμάτων με βιολογικά λιπάσματα, τα οποία είναι φιλικά προς το περιβάλλον και περισσότερο οικονομικά από τα πρώτα. Τα βιολογικά λιπάσματα περιέχουν ζωντανούς μικροοργανισμούς (συνήθως συμβιώτες) οι οποίοι θα παρέχουν στα φυτά τα απαραίτητα θρεπτικά για την ανάπτυξη τους.^[7] Για να καταστεί αποτελεσματική η χρήση τους, αλλά και λόγω ερευνητικού ενδιαφέροντος είναι χρήσιμη η περαιτέρω μελέτη σημαντικών μηχανισμών που ρυθμίζουν τις αλληλεπιδράσεις των φυτών με τους ωφέλιμους μικροοργανισμούς.

Ένας από τους σημαντικότερους μηχανισμούς που διαθέτουν τα φυτά για τον έλεγχο της εγκαθίδρυσης συμβιωτικών σχέσεων στις ρίζες τους, είναι ο μηχανισμός αυτορρύθμισης. Μέσω του μηχανισμού αυτού τα φυτά-ξενιστές έχουν την δυνατότητα να ελέγχουν την έναρξη και την έκταση της μόλυνσης από τους συμβιώτες τους. Έχει βρεθεί πως ο μηχανισμός αυτορρύθμισης της φυματογένεσης (AON) και ο μηχανισμός αυτορρύθμισης κατά των σχηματισμό των μυκορριζών (AOM) μοιράζονται ορισμένα κοινά στοιχεία, ωστόσο δεν έχει αποσαφηνιστεί πλήρως, καθώς ο δεύτερος δεν έχει μελετηθεί εκτενώς. Στην περίπτωση του

μηχανισμού αυτορρύθμισης της φυματιογένεσης έχει βρεθεί ότι σημαντικά στοιχεία του μονοπατιού είναι το μικρό RNA *miR2111* και το γονίδιο *TML*. Συγκεκριμένα, το *miR2111* μεταφέρεται από τον βλαστό στη ρίζα για να ρυθμίσει μετα-μεταγραφικά το γονίδιο στόχο του, το *TML*, περιορίζοντας τη συσσώρευση των μεταγράφων του^[53]. Όταν τα μετάγραφα *TML* διατηρούνται σε χαμηλά επίπεδα το φυτό μπορεί να αποικιστεί από ριζόβια, ενώ όταν είναι σε υψηλότερα επίπεδα παρεμποδίζεται ο αποικισμός. Αν και είναι γνωστό λοιπόν, ότι η απουσία του γονιδίου *TML* επιτρέπει τον αυξημένο αποικισμό των φυτών από τα ριζόβια, δεν γνωρίζουμε τι συμβαίνει στο αντίστοιχο μονοπάτι στην περίπτωση αποικισμού μόνο από ενδομυκορριζικούς μύκητες ή στον ταυτόχρονο αποικισμό.

Για να μελετήσουμε τον ρόλο του *miR2111* και του *TML* κατά τον ταυτόχρονο αποικισμό από ενδομυκορριζικούς μύκητες και ριζόβια χρησιμοποιήσαμε το ψυχανθές φυτό *Lotus japonicus* και πραγματοποιήσαμε μονούς ή διπλούς εμβολιασμούς με τον μύκητα *R. irregularis* και το ριζόβιο *M. loti*.

Αρχικά, για να μελετήσουμε τον πιθανό ρόλο του *TML* στον ταυτόχρονο αποικισμό των ψυχανθών από ενδομυκορριζικούς μύκητες και ριζόβια, χρησιμοποιήσαμε το μετάλλαγμα *tml-6*. Στο μετάλλαγμα αυτό, η έκφραση του γονιδίου *TML* παρεμποδίζεται εξαιτίας της παρουσίας ενός τρανσποζονίου στην κωδική του περιοχή. Συγκεκριμένα, όλα τα φυτά του πειράματος εμβολιάστηκαν αρχικά με τον ενδομυκορριζικό μύκητα *Rhizophagus irregularis* (στέλεχος DAOM) και στη συνέχεια, τα μισά από αυτά εμβολιάστηκαν και με το αζωτοδεσμευτικό βακτήριο *Mesorhizobium loti* (στέλεχος R7A), 2 εβδομάδες αργότερα. Ο εμβολιασμός με ριζόβια καθυστέρησε 2 εβδομάδες γιατί αυτό το χρονικό διάστημα έχει υπολογιστεί να απαιτείται μέχρις ότου οι υφές του μύκητα εισέλθουν στο εσωτερικό των κυττάρων στις ρίζες του *L. japonicus*, ενώ η είσοδος των ριζοβίων στα φυτά είναι πολύ πιο σύντομη (1-2 ημέρες). Επομένως, ο σχεδιασμός του διπλού εμβολιασμού έγινε με τέτοιο τρόπο ώστε να πραγματοποιηθεί η είσοδος των 2 μικροοργανισμών στο φυτό σχεδόν ταυτόχρονα. Τα φυτά αναπτύχθηκαν συνολικά για 5 εβδομάδες και στη συνέχεια υπολογίστηκαν τα ποσοστά αποικισμού των ριζών από τον ενδομυκορριζικό μύκητα στις διαφορετικές συνθήκες. Όπως φαίνεται και στην εικόνα 12, τα φυτά μεταλλάγματος *tml-6* παρουσιάζουν περιορισμένη ανάπτυξη σε σύγκριση με τα φυτά αγρίου τύπου. Το γεγονός αυτό ήταν αναμενόμενο βάσει της βιβλιογραφίας καθώς τα μεταλλάγματα φυτών *tml* σε πειράματα που πραγματοποιήθηκαν παρουσιάζουν περιορισμένη ανάπτυξη, αλλά πιο έντονη φυματιογένεση.^[81]

Η εμφάνιση των φυτών αγρίου τύπου στην παρουσία και απουσία ριζοβίου συνάδει με την μικροσκοπική παρατήρηση του αποικισμού των ριζών από τον ενδομυκορριζικό μύκητα, καθώς στις ρίζες των αγρίου τύπου φυτών που είχαν εμβολιαστεί μόνο με τον μύκητα παρατηρήθηκε αποικισμός της τάξεως του 55% περίπου, ενώ στα φυτά αγρίου τύπου με συν-εμβολιασμό παρατηρήθηκε μια στατιστικώς σημαντική μείωση, φτάνοντας ο αποικισμός περίπου στο 22%.

Όμως, ανάλογη μείωση δεν παρατηρήθηκε στα φυτά του μεταλλάγματος *tml-6*. Ίσως στα φυτά αυτά η παρουσία ριζοβίου δεν επηρεάζει σημαντικά τον αποικισμό με ενδομυκορριζικό μύκητα γιατί ο αποικισμός στο μετάλλαγμα *tml* είναι ήδη αρκετά μειωμένος (σε σύγκριση με τα φυτά αγρίου τύπου). Συγκεκριμένα, στα φυτά του μεταλλάγματος *tml-6*, το ποσοστό αποικισμού μειώθηκε στατιστικώς σημαντικά συγκριτικά με τα φυτά αγρίου τύπου και ανέρχεται στο 4% στην περίπτωση εμβολιασμού μόνο με τον ενδομυκορριζικό μύκητα. Βάσει αυτών των αποτελεσμάτων συμπεραίνουμε πως απουσία του γονιδίου *TML* δεν ευνοείται ο αποικισμός από τον ενδομυκορριζικό μύκητα. Το συμπέρασμα αυτό μας δείχνει ότι στην περίπτωση της συμβιωτικής σχέσης των φυτών με τον ενδομυκορριζικό μύκητα, το γονίδιο *TML* φαίνεται να έχει αντίστροφο ρόλο του ρόλου που διαδραματίζει στην περίπτωση της συμβιωτικής σχέσης με ριζόβια. Αυτό γιατί απουσία *TML*, ο αποικισμός από τον ενδομυκορριζικό μύκητα μειώνεται (παρούσα εργασία), ενώ ο αποικισμός από ριζόβια αυξάνεται [53,81]. Όσον αφορά τον συν-εμβολιασμό, αν και στην περίπτωση του μεταλλάγματος η παρουσία των ριζοβίων δεν φάνηκε να επηρεάζει τον αποικισμό των φυτών από τον ενδομυκορριζικό μύκητα, στα φυτά αγρίου τύπου παρατηρήθηκε μια σημαντική μείωση του αποικισμού, γεγονός που μας δείχνει ότι οι δύο συμβιωτικές αλληλεπιδράσεις πιθανόν να μην είναι καθ' όλα ανεξάρτητες ή μια από την άλλη. Αντίστοιχη παρατήρηση εξάλλου είχε γίνει και σε άλλα πειράματα όπου ο εμβολιασμός με ριζόβια μείωσε και σε εκείνη την περίπτωση, τον αποικισμό από ενδομυκορριζικό μύκητα στο φυτό *Atriplex canescens*.^[82]

Για την περαιτέρω μελέτη του ζεύγους *miR2111-TML* κατά τον αποικισμό των φυτών από ενδομυκορριζικούς μύκητες και ριζόβια, εξετάστηκαν τα επίπεδα συσσώρευσης του *miR2111* και των *TML* μετάγραφων σε αποικισμένες και μη-αποικισμένες ρίζες. Συγκεκριμένα, πραγματοποιήθηκαν μονοί εμβολιασμοί και διπλός εμβολιασμός φυτών αγρίου τύπου με τον ενδομυκορριζικό μύκητα *Rhizophagus irregularis* και με το αζωτοδεσμευτικό βακτήριο *Mesorhizobium loti*, 14 ημέρες αργότερα. Τα φυτά αναπτύχθηκαν για 18 ημέρες συνολικά, συλλέχθηκαν οι ρίζες τους και πραγματοποιήθηκε απομόνωση RNA από αυτές. Για τη μελέτη της έκφρασης γονιδίων στα δείγματα ριζών χρησιμοποιήθηκε η μέθοδος της ποσοτικής PCR πραγματικού χρόνου (qPCR). Χρησιμοποιήθηκαν δύο γονίδια αναφοράς, το *ATP* και το *PP2*, για την κανονικοποίηση των δειγμάτων και επίσης ένα γονίδιο-μάρτυρας, το *SbtM1*, το οποίο εκφράζεται ειδικά σε αποικισμένες με ενδομυκορριζικό μύκητα ρίζες [76] και η επαγωγή της έκφρασής του στα δείγματα του συγκεκριμένου πειράματος επιβεβαίωσε τον επιτυχή αποικισμό των φυτών από τον ενδομυκορριζικό μύκητα. Όσον αφορά τη συσσώρευση του *miR2111*, παρατηρήθηκε μια στατιστικώς σημαντική μείωση στα φυτά που εμβολιάστηκαν με ριζόβιο μόνο συγκριτικά με τα φυτά ελέγχου, κάτι το οποίο ήταν αναμενόμενο σύμφωνα με την βιβλιογραφία [53] και μια μείωση της τάξεως του 30% στην περίπτωση των φυτών που εμβολιάστηκαν με

μύκητα μόνο. Ωστόσο, η μείωση αυτή δεν ήταν στατιστικώς σημαντική. Στην περίπτωση του συν-εμβολιασμού, παρατηρούμε ότι η συσσώρευση του miR2111 είναι σχεδόν η διπλάσια συγκριτικά με εκείνη των φυτών που εμβολιάστηκαν με ριζόβια μόνο, χωρίς όμως κι αυτή η διαφορά να είναι στατιστικώς σημαντική. Σχετικά με την έκφραση του γονιδίου *TML*, παρατηρήθηκε 6 φορές υψηλότερη έκφραση στα φυτά που είχαν εμβολιαστεί με ριζόβια, συγκριτικά με τα φυτά ελέγχου, το οποίο ήταν κι αυτό αναμενόμενο βάση της βιβλιογραφίας ^[53] ενώ στην περίπτωση των φυτών εμβολιασμένων με ενδομυκορριζικό μύκητα μόνο η έκφραση ήταν 1,5 φορές μεγαλύτερη, χωρίς να είναι όμως στατιστικώς σημαντική διαφορά. Στην περίπτωση του συν-εμβολιασμού παρατηρήθηκε στατιστικώς σημαντική αύξηση της έκφρασης του γονιδίου, ανάλογη εκείνης στην περίπτωση του μονού εμβολιασμού με ριζόβιο. . Σύμφωνα με τα αποτελέσματα αυτά, η παρουσία του ενδομυκορριζικού μύκητα, τόσο σε μονό όσο και σε διπλό με ριζόβια εμβολιασμό, δεν φαίνεται να επηρεάζει την συσσώρευση του miR2111 και των *TML* μεταγράφων, στα αρχικά στάδια της μυκορριζικής συμβίωσης που μελετήσαμε στο συγκεκριμένο πείραμα. Δεν αποκλείεται ωστόσο, τα επίπεδα των miR2111-*TML* να επηρεάζονται από την παρουσία του ενδομυκορριζικού μύκητα σε πιο προχωρημένα στάδια της συμβιωτικής σχέσης.

Συμπερασματικά, φαίνεται ότι οι δύο συμβιωτικές αλληλεπιδράσεις επηρεάζουν η μια την άλλη όταν αναπτύσσονται ταυτόχρονα στις ρίζες του φυτού. Τα στοιχεία του μηχανισμού αυτορρύθμισης της φυματογένεσης (AON) miR2111 και *TML* φαίνεται να διαδραματίζουν κάποιο ρόλο και στην περίπτωση του συν-αποικισμού, όπως αποκάλυψε ο μειωμένος αποικισμός των φυτών του μεταλλάγματος *tml-6*, αν και τα επίπεδα των miR2111 και *TML* δεν φάνηκε να επηρεάζονται από την παρουσία του ενδομυκορριζικού μύκητα στα πρώιμα στάδια της συμβίωσης. Μελλοντικές μελέτες που θα περιλαμβάνουν μεταλλάγματα του miR2111 και θα εξετάσουν και μεταγενέστερα στάδια της μυκορριζικής συμβίωσης είναι απαραίτητες για να επιβεβαιωθεί και να αποσαφηνιστεί πλήρως ο ρόλος των δύο αυτών μορίων στους μηχανισμούς AON και AOM.

Βιβλιογραφία

- [1] Shi J. et al. (2008) Pollination by deceit in *Paphiopedilum barbigerrum* (Orchidaceae): a staminode exploits the innate colour preferences of hoverflies (Syrphidae). *Plant Biology*, 11, 17–28.
- [2] Teichert H., et al (2008) Perfume-collecting male euglossine bees as pollinators of a basal angiosperm: the case of *Unonopsis stipitata* (Annonaceae). *Plant Biology*, 11, 29–37
- [3] Begon M. et al. (2003) *Essentials of Ecology*, 2nd edition. Sinauer Ass. Publ., Sunderland, MS.
- [4] Pozo M.J., Azcon-Aguilar C. (2007) Unraveling mycorrhiza induced resistance. *Current Opinion in Plant Biology*, 10, 393–398
- [5] Fritz R.S., Simms E.L. (1992) *Plant Resistance to Herbivores and Pathogens*. University of Chicago Press, Chicago, IL: 590.
- [6] Oldroyd, G. E. (2013). Speak, friend, and enter: signalling systems that promote beneficial symbiotic associations in plants. *Nature Reviews Microbiology*, 11(4), 252–263. <https://doi.org/10.1038/nrmicro2990>
- [7] Oldroyd, G. E., & Leyser, O. (2020). A plant's diet, surviving in a variable nutrient environment. *Science*, 368(6486). <https://doi.org/10.1126/science.aba0196>
- [8] Haredim PR, et al. The hidden world within plants: ecological and evolutionary considerations for defining functioning of microbial endophytes. *Microbiol Mol Biol Rev MMBR* 2015; 79:293–320
- [9] Khare E, Mishra J, Arora NK. Multifaceted Interactions Between Endophytes and Plant: Developments and Prospects. *Front Microbiol* 2018; 9:2732.
- [10] Bernhard, A. (2010) The Nitrogen Cycle: Processes, Players, and Human Impact. *Nature Education Knowledge* 3(10):25
- [11] Molecule of the Month: Nitrogenase, PDB-101
- [12] Cegelski, L., Smith, C. L., & Hultgren, S. J. (2009). Adhesion, Microbial. *Encyclopedia of Microbiology*, 1–10. <https://doi.org/10.1016/b978-012373944-5.00265-0>
- [13] Sudhakar, P., Latha, P., & Reddy, P. V. (2016). Nitrogen compounds and related enzymes. *Phenotyping Crop Plants for Physiological and Biochemical Traits*, 103–114. <https://doi.org/10.1016/b978-0-12-804073-7.00013-2>
- [14] Oldroyd, G. E., et al (2011). The rules of engagement in the legume-rhizobial symbiosis. *Annu. Rev. Genet.* 45, 119–144. doi: 10.1146/annurev-genet-110410-132549

- [15] Long, S. R. (1996). Rhizobium symbiosis: nod factors in perspective. *Plant Cell* 8, 1885–1898. doi: 10.1105/tpc.8.10.1885
- [16] Peck, M. C., Fisher, R. F., and Long, S. R. (2006). Diverse flavonoids stimulate NodD1 binding to nod gene promoters in *Sinorhizobium meliloti*. *J. Bacteriol.* 188, 5417–5427. doi: 10.1128/JB.00376-06
- [17] Dénarié, J., Debelle, F. & Prome, J.-C. Rhizobium lipochitooligosaccharide nodulation factors: signaling molecules mediating recognition and morphogenesis. *Annu. Rev. Biochem.* 65, 503–535 (1996).
- [18] Miller, J. B. & Oldroyd, G. E. D. The role of diffusible signals in the establishment of rhizobial and mycorrhizal symbioses. *Signal. Commun. Plants* 10, 1–30 (2012)
- [19] Madsen, E. B. et al. A receptor kinase gene of the LysM type is involved in legume perception of rhizobial signals. *Nature* 425, 637–640 (2003).
- [20]. Radutoiu, S. et al. Plant recognition of symbiotic bacteria requires two LysM receptor-like kinases. *Nature* 425, 585–592 (2003).
- [21] Limpens, E. et al. LysM domain receptor kinases regulating rhizobial Nod factor-induced infection. *Science* 302, 630–633 (2003).
- [22] Zhang, X. C. et al. Molecular evolution of lysin motif type receptor-like kinases in plants. *Plant Physiol.* 144, 623–636 (2007)
- [23] Madsen, E. B. et al. Autophosphorylation is essential for the in vivo function of the *Lotus japonicus* Nod factor receptor 1 and receptor-mediated signalling in cooperation with Nod factor receptor 5. *Plant J.* 65, 404–417 (2011).
- [24] Endre, G. et al. A receptor kinase gene regulating symbiotic nodule development. *Nature* 417, 962–966 (2002).
- [25] Stracke, S. et al. A plant receptor-like kinase required for both bacterial and fungal symbiosis. *Nature* 417, 959–962 (2002).
- [26] Schüßler A, Schwarzott D, Walker C. A New fungal phylum, the Glomeromycota: phylogeny and evolution. *Mycol Res.* 2001;105: 1413-1297.
- [27] Brundrett MC. Coevolution of roots and mycorrhizas of land plants. *New Phytol.* 2002;154: 275-304.
- [28] Smith SE, Read DJ. *Mycorrhizal Symbiosis* (3rd edn.). London: Academic Press; 2008. 800 pp.
- [29] Endre G, et al. A receptor kinase gene regulating symbiotic nodule development. *Nature.* 2002;417(6892): 962-966.
- [30] Stracke S, et al. A plant receptor-like kinase required for both bacterial and fungal symbiosis. *Nature.* 2002;417(6892): 959-962.

- [31] Imaizumi-Anraku H et al. Plastid proteins crucial for symbiotic fungal and bacterial entry into plant Roots. *Nature*. 2005;433(7025): 527-531.
- [32] Edwards A, et al. Structural implications of mutations in the pea SYM8 symbiosis gene, the DMI1 ortholog, encoding a predicted ion channel. *Mol Plant Microbe Interact*. 2007;20(10): 1183-1191.
- [33] Riely BK, Loughon G, Ané JM, Cook DR. The symbiotic ion channel homolog DMI1 is localized in the nuclear membrane of *Medicago truncatula* roots. *Plant J*. 2007;49(2): 208-216.
- [34] Peiter E, et al. The *Medicago truncatula* DMI1 protein modulates cytosolic calcium signaling. *Plant Physiol*. 2007;145(1): 192-203.
- [35] Gleason C, Chaudhuri S, Yang T, Munoz A, Poovaiah BW, Oldroyd GE. Nodulation independent of rhizobia induced by a calcium-activated kinase lacking autoinhibition. *Nature*. 2006;441(7097): 1149-1152.
- [36] Parniske M. Arbuscular Mycorrhiza: the mother of plant root endosymbioses. *Nat Rev Microbiol*. 2008;6(10): 763-775.
- [37] Kaló P. et al. Nodulation signaling in legumes requires NSP2, a member of the GRAS family of transcriptional regulators. *Science*. 2005;308(5729): 1786-1789.
- [38] Smit P, et al. NSP1 of the GRAS protein family is essential for rhizobial Nod factor-induced transcription. *Science*. 2005;308(5729): 1789-1791.
- [39] Liu H, Zhang C, Yang J, Yu N, Wang E. 2018. Hormone modulation of legume-rhizobial symbiosis. *Journal of Integrative Plant Biology* 60, 632-648.
- [40] Soyano T, Shimoda Y, Kawaguchi M, Hayashi M. 2019. A shared gene drives lateral root development and root nodule symbiosis pathways in *Lotus*. *Science* 366, 1021-1023.
- [41] Wang, Q., Liu, J., & Zhu, H. (2018). Genetic and Molecular Mechanisms Underlying Symbiotic Specificity in Legume-Rhizobium Interactions. *Frontiers in Plant Science*, 9. <https://doi.org/10.3389/fpls.2018.00313>
- [42] M. Taleski, N. Imin, M. A. Djordjevic, CEP peptide hormones: Key players in orchestrating nitrogen-demand signalling, root nodulation, and lateral root development. *J. Exp. Bot.* 69, 1829–1836 (2018). doi: 10.1093/jxb/ery037; pmid: 29579226
- [43] R. Tabata et al., Perception of root-derived peptides by shoot LRR-RKs mediates systemic N-demand signaling. *Science* 346, 343–346 (2014). doi: 10.1126/science.1257800; pmid: 25324386
- [44] Y. Ohkubo, M. Tanaka, R. Tabata, M. Ogawa-Ohnishi, Y. Matsubayashi, Shoot-to-root mobile polypeptides involved in systemic regulation of nitrogen

acquisition. *Nat. Plants* 3, 17029 (2017). doi: 10.1038/nplants.2017.29; pmid: 28319056

[45] Okamoto, S., et al. (2009) Nod Factor/Nitrate-induced CLE genes that drive HAR1-Mediated systemic regulation of nodulation. *Plant Cell Physiol.* 50, 67–77

[46] Lim, C.W., Lee, Y.W. and Hwang, C.H. (2011) Soybean nodule-enhanced CLE peptides in roots act as signal in GmNARK-mediated nodulation suppression. *Plant Cell Physiol.* 52, 1613–1627.

[47] Yoro, E., Suzaki, T. and Kawaguchi, M. (2019b) CLE-HAR1 systemic signaling and NIN-mediated local signaling suppress the increased rhizobial infection in the daphne mutant of *Lotus japonicus*. *Mol. Plant Microbe Interact.* 33, 320–327.

[48] Schnabel, E.L. et al. (2011) The ROOT DETERMINED NODULATION1 gene regulates nodule number in roots of *Medicago truncatula* and defines a highly conserved, uncharacterized plant gene family. *Plant Physiol.* 157, 328–340.

[49] Krusell, L., Madsen, L.H., Sato, S. et al. (2002) Shoot control of root development and nodulation is mediated by a receptor-like kinase. *Nature*, 420, 422–426

[50] Nishimura, R., Hayashi, M., Wu, G.J. et al. (2002) HAR1 mediates systemic regulation of symbiotic organ development. *Nature*, 420, 426–429.

[51] Miyazawa, H., Oka-Kiwa, E., Sato, N. et al. (2010) The receptor-like kinase KLAVER mediates systemic regulation of nodulation and non-symbiotic shoot development in *Lotus japonicus*. *Development*, 137, 4317–4325.

[52] Takahara, M., Magori, S., Soyano, T. et al. (2013) Too Much Love, a novel Kelch repeat-containing F-box protein, functions in the long-distance regulation of the legume-Rhizobium symbiosis. *Plant Cell Physiol.* 54, 433–447.

[53] Tsikou, D., Yan, Z., Holt, D.B. et al. (2018) Systemic control of legume susceptibility to rhizobial infection by a mobile microRNA. *Science*, 362, 233–236.

[54] C. Wang, J. B. Reid, E. Foo, The art of self-control: Autoregulation of plant-microbe symbioses. *Front. Plant Sci.* 9, 988 (2018). doi: 10.3389/fpls.2018.00988; pmid: 30042780

[55] Zhu, X. C., Song, F. B., Xu, H. W. (2010a). Arbuscular mycorrhizae improve low temperature stress in maize via alterations in host water status and photosynthesis. *Plant Soil.* 331, 129–137. doi: 10.1007/s11104-009-0239-z

[56] Ahanger, M. A., Tyagi, S. R., Wani, M. R., Ahmad, P. (2014). “Drought tolerance: role of organic osmolytes, growth regulators, and mineral nutrients,” in *Physiological mechanisms and adaptation strategies in plants under changing environment*, vol. 1. Eds. Ahmad, P., Wani, MR (New York, NY: Springer), 25–55. doi: 10.1007/978-1-4614-8591-9_2

- [57] MacLean AM, Bravo A, Harrison MJ: Plant signaling and metabolic pathways enabling arbuscular mycorrhizal symbiosis. *Plant Cell* 2017, 29:2319-2335.
- [58] Roth R, et al.: A rice serine/threonine receptor-like kinase regulates arbuscular mycorrhizal symbiosis at the peri-arbuscular membrane. *Nat Commun* 2018, 9:4677.
- [59] Faizan, M. et al., 2020. Role of strigolactones: Signalling and crosstalk with other phytohormones. *Open Life Sciences*, 15(1), pp.217–228.
- [60] Müller, L.M. et al., 2019. A CLE–SUNN module regulates strigolactone content and fungal colonization in arbuscular mycorrhiza. *Nature Plants*, 5(9), pp.933–939.
- [61] Maillet F, et al. Fungal lipochitooligosaccharide symbiotic signals in arbuscular mycorrhiza. *Nature* 2011; 469:58–63
- [62] Carotenuto G, et al, *Genes* 2017 Jun; 8(6):1440-1446.
- [63] Zhang X, Dong W, Sun J, Feng F, Deng Y, He Z, Oldroyd GE, Wang E *Plant J*. 2015 Jan; 81(2):258-67.
- [64] Buendia L, Wang T, Girardin A, Lefebvre B *New Phytol*. 2016 Apr; 210(1):184-95.
- [65] Stracke S, et al, *Nature*. 2002 Jun 27; 417(6892):959-62.
- [66] Kevei Z et al, *Plant Cell*. 2007 Dec; 19(12):3974-89.
- [67] Miller JB, et al, *Cell*. 2013 Dec; 155(12):5053-66.
- [68] . Gobbato, E. et al. A GRAS-type transcription factor with a specific function in mycorrhizal signaling. *Curr. Biol.* 22, 2236–2241 (2012)
- [69] Wang, E. et al. A common signaling process that promotes mycorrhizal and oomycete colonization of plants. *Curr. Biol.* 22, 2242–2246 (2012)
- [70] Funayama-Noguchi S, et al, *MJ Plant Res*. 2011 Jan; 124(1):155-63.
- [71] 2. L. C. Hsieh et al., Uncovering small RNA-mediated responses to phosphate deficiency in *Arabidopsis* by deep sequencing. *Plant Physiol.* 151, 2120–2132 (2009). doi: 10.1104/pp.109.147280
- [72] Müller, L et al (2019). A CLE–SUNN module regulates strigolactone content and fungal colonization in arbuscular mycorrhiza. *Nature Plants*. doi:10.1038/s41477-019-0501-1
- [73] Afkhami ME, Stinchcombe JR. Multiple mutualist effects on genome wide expression in the tripartite association between *Medicago truncatula*, nitrogen-fixing bacteria and mycorrhizal fungi. *Mol Ecol* 2016;25:4946–62.
- [74] Abd-Alla MH, et al. Synergistic interaction of *Rhizobium legumin Sarum* bv. *viciae* and arbuscular mycorrhizal fungi as a plant growth promoting

biofertilizers for faba bean (*Vicia faba* L.) in alkaline soil. *Microbiol Res* 2014;169:49–58.

[75] Larimer AL, Clay K, Bever JD. Synergism and context dependency of interactions between arbuscular mycorrhizal fungi and rhizobia with a prairie legume. *Ecology* 2014;95:1045–54.

[76] Takeda, N. et al., 2009. Apoplastic plant subtilases support arbuscular mycorrhiza development in *Lotus japonicus*. *The Plant Journal*, 58(5), pp.766–777.

[77] W. F. Zhang et al., New technologies reduce greenhouse gas emissions from nitrogenous fertilizer in China. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 110, 8375–8380 (2013). doi: 10.1073/pnas.1210447110; pmid: 23671096

[78] Vitousek, P. M. et al. Human alteration of the global nitrogen cycle: sources and consequences. *Ecological Applications* 7, 737-750 (1997). doi:10.1890/1051-0761(1997)007[0737:HAOTGN]2.0.CO;2

[79] Wagner, S. C. (2011) Biological Nitrogen Fixation. *Nature Education Knowledge* 3(10):15

[80] He, J., Zhang, C., Dai, H., Liu, H., Zhang, X., Yang, J., Chen, X., Zhu, Y., Wang, D., Qi, X., Li, W., Wang, Z., An, G., Yu, N., He, Z., Wang, Y.-F., Xiao, Y., Zhang, P., & Wang, E. (2019). A LysM Receptor HETEROMER Mediates perception OF arbuscular Mycorrhizal Symbiotic signal in rice. *Molecular Plant*, 12(12), 1561–1576. <https://doi.org/10.1016/j.molp.2019.10.015>

[81] Magori, S., et al (2009). TOO much love, a Root Regulator associated with the Long-Distance control of Nodulation in *LOTUS JAPONICUS*. *Molecular Plant-Microbe Interactions*®, 22(3), 259–268. <https://doi.org/10.1094/mpmi-22-3-0259>

[82] Larimer AL, Clay K, Bever JD. Synergism and context dependency of interactions between arbuscular mycorrhizal fungi and rhizobia with a prairie legume. *Ecology* 2014;95:1045–54.

Εικόνες

[I] Dance A., 2019, Nitrogen-fixing bacteria talk to soybean roots via tiny RNAs, suggesting new avenue to improve yields, PNAS

[II] Smith S et al., Arbuscular Mycorrhizas – South Australia, soilquality.org.au