

ΠΑΝΕΠΙΣΤΗΜΙΟ ΘΕΣΣΑΛΙΑΣ
ΤΜΗΜΑ ΒΙΟΧΗΜΕΙΑΣ & ΒΙΟΤΕΧΝΟΛΟΓΙΑΣ

ΠΤΥΧΙΑΚΗ ΕΡΓΑΣΙΑ

Διαφορικά εκφρασμένα γονίδια που εμπλέκονται στην ομοιόσταση
& μεταβολισμό του σιδήρου κατά την αλληλεπίδραση του *Lotus*
japonicus-Fusarium solani στέλεχος K

Differentially expressed genes involved in iron metabolism &
homeostasis in the *Lotus japonicus-Fusarium solani* strain K
interaction



Του φοιτητή
Βασίλειου Α. Μπαλακτσή

Επιβλέπουσα καθηγήτρια
Παπαδοπούλου Καλλιόπη

Τριμελής και συμβουλευτική επιτροπή:

- Παπαδοπούλου Καλλιόπη (Πανεπιστήμιο Θεσσαλίας)
- Γιακουντής Αντώνιος (Πανεπιστήμιο Θεσσαλίας)
- Βασιλειάδης Σωτήριος (Πανεπιστήμιο Θεσσαλίας)

Ευχαριστίες

Κατ' αρχάς, θα ήθελα να ευχαριστήσω την επιβλέπουσα καθηγήτριά μου Παπαδοπούλου Καλλιόπη, που μου έδωσε την ευκαιρία να είμαι μέλος της ομάδας της για την εκπόνηση της πτυχιακής μου διατριβής στο εργαστήριο Βιοτεχνολογίας Φυτών & Περιβάλλοντος του Πανεπιστημίου Θεσσαλίας. Οι συμβουλές της και οι οδηγίες της αποτέλεσαν κατευθυντήριο δύναμη για την εργασία μου.

Ένα πολύ μεγάλο ευχαριστώ στις Αβραμίδου Μαριάννα και Τσιούρη Όλγα, καθώς παράλληλα με την εκπόνηση των διδακτορικών τους διατριβών είχαν τον χρόνο να με καθοδηγήσουν στα πρώτα μου ερευνητικά βήματα, μεταλαμπαδεύοντας το πνεύμα του επιστήμονα-ερευνητή και βοηθώντας με σε όλη την πορεία της πτυχιακής, τόσο στον σχεδιασμό όσο και στην εκτέλεση των πειραμάτων μου.

Επίσης, να ευχαριστήσω την προπτυχιακή συμφοιτήτριά μου Κοροζενίδου Μαγδαληνή για την εθελοντική βοήθεια της σε μέρος των πειραμάτων, καθώς και όλο το εργαστηριακό προσωπικό για τις γνώσεις και συμβουλές που μου προσέφεραν, αλλά και για το κλίμα συνεργασίας και ομαδικότητας που έφεραν σε όλο αυτό το διάστημα παραμονής μου στο εργαστήριο.

Τέλος, θα ήθελα να ευχαριστήσω την οικογένειά μου για την οικονομική και συναισθηματική υποστήριξή τους κατά την πορεία των σπουδών μου, αλλά και τους φίλους που στάθηκαν στο πλευρό μου αυτό το διάστημα.

Στην περίοδο κρίσης που βιώνουμε, λόγω της πανδημίας του COVID-19, η άμεση και έμμεση βοήθεια όλων σας ήταν πολύτιμη.

Περίληψη

Ο ασκομύκητας *Fusarium solani* στέλεχος K (FsK) είναι ένα ενδόφυτο που αρχικά απομονώθηκε από ρίζες ντομάτας, και σύντομα αποτέλεσε αντικείμενο μελέτης, χάρις την ικανότητά του να αυξάνει την αντίσταση των φυτών, τόσο σε βιοτική καταπόνηση, για παράδειγμα από το παθογόνο του φυλλώματος *Septoria lycopersici*, όσο και σε αβιοτική καταπόνηση, λόγω έλλειψης νερού. Σε πρόσφατες μελέτες υπάρχουν ενδείξεις ότι ο μύκητας μπορεί να βοηθήσει το φυτό-μοντέλο για τα όσπρια, *Lotus japonicus*, να ανταπεξέλθει σε καταπόνηση λόγω έλλειψης σιδήρου (Fe) στο έδαφος, όπου το φυτό αναπτύσσεται. Η έλλειψη του ιχνοστοιχείου στο έδαφος αποτελεί ένα σοβαρό πρόβλημα για τη γεωργία και την οικονομία και η μελέτη των μηχανισμών, στους οποίους το ενδόφυτο μπορεί να προσφέρει αντοχή στα φυτά, αποτελεί σημείο ενδιαφέροντος. Τόσο η έλλειψη Fe στα φυτά, όσο και ο αποικισμός των φυτών από το ενδόφυτο παρουσιάζουν κάποια κοινά σημεία σύγκλισης, ενεργοποιώντας και οι δύο καταστάσεις μονοπάτια της Επαγόμενης Συστηματικής Αντίστασης (ISR) των φυτών, αλλά μέχρι στιγμής ένα ολοκληρωμένο μοντέλο απουσιάζει. Στην παρούσα πτυχιακή, μελετάται η έκφραση γονιδίων που σχετίζονται με τον μεταβολισμό και την ομοιοστάση σιδήρου στο *L. japonicus* στα πλαίσια της αλληλεπίδρασης του φυτού με τον μύκητα. Η μελέτη αυτή διεξάγεται σε δύο φάσεις: αρχικά μέσω RNA-Seq ανάλυσης και μετέπειτα μέσω σχετικής σύγκρισης αφθονίας μεταγράφων χρησιμοποιώντας την αντίδραση RT-qPCR. Από τα αποτελέσματα διαπιστώθηκε ότι ο FsK προωθεί αλλαγές σε προφίλ έκφρασης γονιδίων που σχετίζονται με τον Fe με τρόπο που εξαρτάται από τον βαθμό αποικισμού και τις μέρες μετά τον αποικισμό του στις ρίζες του φυτού.

Λέξεις κλειδιά: *Fusarium solani*, *Lotus japonicus*, ενδόφυτο, σίδηρος, αλληλεπίδραση, γονιδιακή έκφραση

Abstract

The ascomycete *Fusarium solani* strain K (FsK) is an endophytic fungus first-isolated from tomato roots, which soon became a subject of study due to its ability to confer resistance to plants from both biotic stress, for example from the leaf pathogen *Septoria lycopersici*, and also abiotic stress, due to lack of water. Recent studies have suggested that the fungus may help the model legume plant, *Lotus japonicus*, to cope with iron (Fe) deficiency in the growing medium. The lack of this micro-nutrient in the soil is a serious problem for both agriculture and economy and thus the study of the mechanisms that the endophyte uses to confer resistance to plants is of great interest. Both the lack of Fe in plants and the colonization of plants from the endophyte share some points of convergence, as they both can activate pathways of Induced Systemic Resistance (ISR) in plants, but so far, a complete model is missing. In the present thesis, the expression of genes related to iron metabolism and homeostasis in *L. japonicus*, in the context of the plant interaction with the fungus, is studied. This study is done in two phases: first by RNA-Seq analysis and then by comparison of transcript relative abundance using the RT-qPCR reaction. The results showed that FsK promotes changes in the expression profiles of Fe-related genes in a way that depends on the level of colonization and the days post colonization of the plant's roots.

Keywords: *Fusarium solani*, *Lotus japonicus*, endophyte, iron, interaction, gene expression

Περιεχόμενα

1. Εισαγωγή.....	10
1.1. Φυτά	10
1.1.1. Το φυτό μοντέλο <i>Lotus japonicus</i>	10
1.1.2. Φυτική άμυνα.....	10
1.2. Μύκητες	11
1.2.1. Μύκητες: Ενδοφυτισμός και <i>Fusarium</i>	11
1.2.2. <i>Fusarium solani</i> στέλεχος K.....	11
1.2.3. Αλληλεπίδραση <i>L. japonicus</i> με τον ενδοφυτικό μύκητα <i>FsK</i>	12
1.3. Σίδηρος.....	13
1.3.1. Καταπόνηση φυτών λόγω έλλειψης Fe.....	13
1.3.2. Συσχέτιση αποικισμού του <i>FsK</i> με έλλειψη Fe	14
1.4. RNA-seq.....	15
1.4.1. Ανάλυση μεταγραφωμικής	15
1.4.2. Ανάλυση των δεδομένων του RNA-Seq.....	16
1.5. Σκοπός.....	17
2. Υλικά και μέθοδοι.....	18
2.1. In silico ανάλυση: RNA-Seq.....	18
2.1.1. Πειραματικές συνθήκες ανάπτυξης των φυτών για το πείραμα του RNA-Seq	18
2.1.2. Προεργασία Αναγνωσμάτων	18
2.1.3. Χαρτογράφηση αλληλουχιών, μέτρηση αναγνωσμάτων και ανάλυση	19
διαφορικής έκφρασης.....	19
2.1.4. Μετα-ανάλυση και αναζήτηση με βάση την οντολογία	21
2.1.5. Βιβλιογραφική αναζήτηση πρωτεϊνών και BLASTP	21
2.2. Wet lab: προετοιμασία βιολογικών δειγμάτων και φαινοτυπικές αναλύσεις	22

2.2.1.	Προετοιμασία εδάφους	22
2.2.2.	Προετοιμασία θρεπτικού διαλύματος ανάπτυξης	22
2.2.3.	Προετοιμασία σπόρων και φυτών.....	22
2.2.4.	Προετοιμασία υγρής καλλιέργειας του FsK	23
2.2.5.	Συλλογή και μέτρηση κονίδια του FsK και προετοιμασία του εμβολίου....	23
2.2.6.	Εμβολιασμός των φυτών με FsK	24
2.2.7.	Συνθήκες ανάπτυξης των φυτών.....	24
2.2.8.	Δειγματοληψία και μέτρηση φρέσκου βάρους ρίζας και βλαστού.....	25
2.2.9.	Στατιστική ανάλυση φρέσκων βαρών.....	25
2.2.10.	Προσδιορισμός pH εδάφους.....	25
2.3.	Μοριακές αναλύσεις δειγμάτων.....	25
2.3.1.	Εξαγωγή συνολικού RNA.....	25
2.3.2.	Ποσοτικοποίηση συνολικού RNA	26
2.3.3.	Ανίχνευση αποικισμού του FsK στις ρίζες και σχετική ποσοτικοποίηση των γονιδίων που σχετίζονται με τον σίδηρο μέσω RT-qPCR.....	26
2.3.4.	Στατιστική ανάλυση αποτελεσμάτων RT-qPCR	26
2.3.5.	Κατασκευή εκκινητών για RT-qPCR	26
3.	Αποτελέσματα.....	28
3.1.	Αποτελέσματα RNA-Seq και μετααναλύσεων	28
3.1.1.	Πειραματικός σχεδιασμός RNA-Seq	28
3.1.2.	Ο FsK αλλάζει τα προφίλ έκφρασης γονιδίων σχετικών με Fe στις 3 dpi	28
3.2.	Αποτελέσματα wet lab	31
3.2.1.	Φαινοτυπικές διαφορές και διαφορές στο pH.....	31
3.2.2.	Ο FsK αλλάζει τα προφίλ έκφρασης γονιδίων σχετικών με Fe στις 14 και 40 dpi	35
4.	Συζήτηση.....	43
4.1.	Σύνοψη θεωρητικού υποβάθρου	43

4.2.	Ανασκόπηση αποτελεσμάτων, συμπεράσματα και θεωρίες ερμηνείας.....	43
4.3.	Επιπλέον σχόλια και παρατηρήσεις	44
4.4.	Προοπτικές.....	45
5.	Βιβλιογραφικές παραπομπές.....	46

Κατάλογος Εικόνων

ΕΙΚΟΝΑ 1.	ΑΠΕΙΚΟΝΙΣΗ ΣΕ ΜΙΚΡΟΣΚΟΠΙΟ ΡΙΖΙΚΟΥ ΙΣΤΟΥ ΝΤΟΜΑΤΑΣ 15 DPI ΜΕ ΤΟΝ FSK ΧΡΗΣΙΜΟΠΟΙΩΝΤΑΣ ΧΡΩΣΗ CHLORAZOL BLACK. (Α) Ο ΜΥΚΗΤΑΣ ΜΠΟΡΕΙ ΝΑ ΔΙΕΙΣΔΥΣΕΙ ΣΤΑ ΚΥΤΤΑΡΑ ΤΗΣ ΡΙΖΑΣ ΣΧΗΜΑΤΙΖΟΝΤΑΣ ΕΜΦΑΝΗ ΣΤΡΟΓΓΥΛΑ ΣΩΜΑΤΑ (ΒΕΛΗ) ΚΑΙ (Β) ΕΜΦΑΝΕΙΣ ΑΠΟΙΚΙΕΣ ΣΤΙΣ ΑΓΓΕΙΑΚΕΣ ΔΕΣΜΕΣ (ΒΕΛΗ). ΟΙ ΜΠΑΡΕΣ ΑΝΤΙΠΡΟΣΩΠΕΥΟΥΝ 50 ΜΜ (ΚΑΒΡΟΥΛΑΚΙΣ ΕΤ ΑΛ., 2007).	12
ΕΙΚΟΝΑ 2.	ΣΧΗΜΑΤΙΚΗ ΑΝΑΠΑΡΑΣΤΑΣΗ ΤΩΝ ΒΑΣΙΚΩΝ ΧΑΡΑΚΤΗΡΙΣΤΙΚΩΝ ΤΟΥ ΑΠΟΙΚΙΣΜΟΥ ΤΟΥ FSK ΣΤΙΣ ΡΙΖΕΣ ΤΟΥ <i>LOTUS JAPONICUS</i> . ΟΙ ΔΟΜΕΣ ΑΝΤΙΠΡΟΣΩΠΕΥΟΝΤΑΙ ΜΕ ΤΑ ΑΚΟΛΟΥΘΑ ΧΡΩΜΑΤΑ: ΓΚΡΙ-ΜΥΚΗΤΑΣ, ΠΡΑΣΙΝΟ-ΠΥΡΗΝΑΣ, ΡΟΖ-ΚΥΤΟΠΛΑΣΜΑΤΙΚΗ ΣΥΣΣΩΡΕΥΣΗ, ΚΟΚΚΙΝΟ-ΘΗΛΗ, ΜΠΛΕ-ΧΡΩΣΤΙΚΗ FM4-64. (Α) ΣΧΗΜΑΤΙΖΕΤΑΙ ΕΝΑ ΥΠΟΠΟΔΙΟ ΣΤΗ ΡΙΖΙΚΗ ΕΠΙΔΕΡΜΙΔΑ. ΑΥΤΟ ΕΝΕΡΓΟΠΟΙΕΙ ΤΗΝ ΚΥΤΟΠΛΑΣΜΑΤΙΚΗ ΣΥΣΣΩΜΑΤΩΣΗ (ΡΟΖ) ΠΟΥ ΣΧΕΤΙΖΕΤΑΙ ΜΕ ΤΗ ΣΥΣΣΩΡΕΥΣΗ ΕΔ (ΔΕΝ ΑΠΕΙΚΟΝΙΖΕΤΑΙ) ΚΑΙ ΤΗΝ ΠΥΡΗΝΙΚΗ ΜΕΤΑΤΟΠΙΣΗ ΚΑΤΩ ΑΠΟ ΤΗ ΘΕΣΗ ΕΠΑΦΗΣ ΤΟΥ ΥΠΟΠΟΔΙΟΥ. (Β) ΑΥΤΗ Η ΑΝΤΙΔΡΑΣΗ ΕΜΦΑΝΙΖΕΤΑΙ ΣΕ ΟΛΑ ΤΑ ΚΥΤΤΑΡΑ ΠΟΥ ΕΡΧΟΝΤΑΙ ΣΕ ΕΠΑΦΗ ΜΕ ΤΟΝ ΜΥΚΗΤΑ, ΑΚΟΜΗ ΚΑΙ ΟΤΑΝ Ο ΜΥΚΗΤΑΣ ΠΡΟΧΩΡΑ ΜΕΣΟΚΥΤΤΑΡΙΑ ΠΡΟΣ ΤΟΝ ΑΝΩ ΦΛΟΙΟ ΤΗΣ ΡΙΖΑΣ. (C) ΤΟ ΦΥΤΙΚΟ ΚΥΤΤΑΡΟ ΑΝΤΙΔΡΑ ΠΕΡΙΣΤΑΣΙΑΚΑ ΜΕ ΣΧΗΜΑΤΙΣΜΟ ΘΗΛΩΜΑΤΟΣ ΚΑΤΩ ΑΠΟ ΤΟ ΣΗΜΕΙΟ ΤΗΣ ΔΙΕΙΣΔΥΣΗΣ. Ο ΦΥΤΙΚΟΣ ΠΥΡΗΝΑΣ ΒΡΙΣΚΕΤΑΙ ΚΑΤΩ ΑΠΟ ΤΟ ΣΗΜΕΙΟ ΕΠΑΦΗΣ. (D) ΤΟΠΙΚΗ ΣΥΣΣΩΡΕΥΣΗ FM4-64 ΣΕ ΠΕΡΙΟΧΕΣ ΔΙΕΙΣΔΥΣΗΣ. (Ε ΚΑΙ F) Ο FSK ΔΙΕΙΣΔΥΕΙ ΣΤΟ ΚΥΤΤΑΡΟ ΕΙΤΕ ΜΕ ΜΟΝΟ ΕΝΑΝ (Ε), ΕΙΤΕ ΜΕ ΠΟΛΛΟΥΣ ΛΟΒΟΥΣ (F). ΑΠΑΙΤΕΙΤΑΙ ΣΤΕΝΩΣΗ ΓΙΑ ΝΑ ΔΙΑΣΧΙΣΕΙ ΤΟ ΚΥΤΤΑΡΙΚΟ ΤΟΙΧΩΜΑ ΚΑΙ ΣΤΙΣ ΔΥΟ ΠΕΡΙΠΤΩΣΕΙΣ. Ο FSK ΕΜΦΑΝΙΖΕΙ ΠΛΑΣΤΙΚΟΤΗΤΑ ΜΕΣΑ ΣΤΟ ΦΥΤΙΚΟ ΚΥΤΤΑΡΟ. ΜΙΑ ΜΕΜΟΝΩΜΕΝΗ ΜΥΚΗΛΙΑΚΗ ΥΦΗ ΜΠΟΡΕΙ ΝΑ ΔΙΑΣΧΙΣΕΙ ΤΟ ΚΥΤΤΑΡΟ (G) Η ΟΙ ΥΦΕΣ ΜΠΟΡΕΙ ΝΑ ΠΡΟΕΞΕΧΟΥΝ ΕΝΔΟΚΥΤΤΑΡΙΚΑ ΚΑΙ ΝΑ ΓΕΜΙΣΟΥΝ ΟΛΟΚΛΗΡΟ ΤΟ ΚΥΤΤΑΡΟ (H). ΔΕΝ ΠΑΡΑΜΕΝΟΥΝ ΖΩΝΤΑΝΑ ΟΛΑ ΤΑ ΑΠΟΙΚΙΣΜΕΝΑ ΚΥΤΤΑΡΑ (SKIADA ΕΤ ΑΛ., 2019).	13
ΕΙΚΟΝΑ 3.	ΠΕΡΙΛΗΨΗ ΤΩΝ ΒΗΜΑΤΩΝ ΤΟΥ RNA-SEQ (LOWE ΕΤ ΑΛ., 2017).	16
ΕΙΚΟΝΑ 4.	ΑΠΕΙΚΟΝΙΣΗ ΠΛΑΚΑΣ NEUBAUER. ΟΙ ΜΕΤΡΗΣΕΙΣ ΓΙΝΟΝΤΑΙ ΣΤΑ 16 ΜΙΚΡΑ ΤΕΤΡΑΓΩΝΑ ΤΩΝ 4 ΕΞΩΤΕΡΙΚΩΝ ΤΕΤΡΑΓΩΝΩΝ.....	24

Κατάλογος Πινάκων

ΠΙΝΑΚΑΣ 1. PHRED QUALITY SCORES ΚΑΙ ΑΚΡΙΒΕΙΑ ΤΑΥΤΟΠΟΙΗΣΗΣ ΒΑΣΗΣ.....	19
ΠΙΝΑΚΑΣ 2. ΥΛΙΚΑ ΠΑΡΑΣΚΕΥΗΣ ΓΙΑ ΔΙΑΛΥΜΑ ΘΡΕΠΤΙΚΩΝ HOAGLAND 100%.....	22
ΠΙΝΑΚΑΣ 3. ΟΙ ΤΕΣΣΕΡΙΣ ΔΙΑΦΟΡΕΤΙΚΕΣ ΣΥΝΘΗΚΕΣ ΑΝΑΠΤΥΞΗΣ ΤΩΝ ΦΥΤΩΝ. Η ΔΙΑΦΟΡΟΠΟΙΗΣΗ ΕΓΚΕΙΤΑΙ ΣΤΗΝ ΠΑΡΟΥΣΙΑ Η ΜΗ FE ΚΑΙ FSK.....	24
ΠΙΝΑΚΑΣ 4. ΟΙ ΕΚΚΙΝΗΤΕΣ ΓΙΑ ΤΑ ΜΕΤΑΓΡΑΦΑ ΠΟΥ ΒΡΕΘΗΚΑΝ ΑΠΟ ΤΗΝ ΑΝΑΛΥΣΗ ΤΟΥ RNA-SEQ ΚΑΙ ΧΡΗΣΙΜΟΠΟΙΗΘΗΚΑΝ ΓΙΑ ΣΧΕΤΙΚΗ ΠΟΣΟΤΙΚΟΠΟΙΗΣΗ ΣΤΙΣ ΡΙΖΕΣ ΤΟΥ <i>L. JAPONICUS</i>	26
ΠΙΝΑΚΑΣ 5. ΟΙ ΕΚΚΙΝΗΤΕΣ ΤΩΝ ΓΟΝΙΔΙΩΝ ΠΟΥ ΕΠΙΛΕΧΘΗΚΑΝ ΒΙΒΛΙΟΓΡΑΦΙΚΑ ΓΙΑ ΣΧΕΤΙΚΗ ΠΟΣΟΤΙΚΟΠΟΙΗΣΗ ΣΤΙΣ ΡΙΖΕΣ ΤΟΥ <i>L. JAPONICUS</i>	27
ΠΙΝΑΚΑΣ 6. ΜΕΤΑΓΡΑΦΑ ΠΟΥ ΣΧΕΤΙΖΟΝΤΑΙ ΜΕ ΣΙΔΗΡΟ ΜΕΤΑ ΑΠΟ ΣΥΓΚΡΙΣΕΙΣ ΓΟΝΙΔΙΑΚΗΣ ΟΝΤΟΛΟΓΙΑΣ ΜΕ ΔΕΔΟΜΕΝΑ ΤΗΣ ΒΑΣΗΣ LJAPONICUSCYS.	28
ΠΙΝΑΚΑΣ 7. ΜΕΤΑΓΡΑΦΑ ΠΟΥ ΣΧΕΤΙΖΟΝΤΑΙ ΜΕ ΤΟΝ ΣΙΔΗΡΟ ΑΠΟ ΣΥΓΚΡΙΣΕΙΣ ΓΟΝΙΔΙΑΚΗΣ ΟΝΤΟΛΟΓΙΑΣ ΜΕ ΔΕΔΟΜΕΝΑ ΤΗΣ ΒΑΣΗΣ GENE ONTOLOGY RESOURCE.	29
ΠΙΝΑΚΑΣ 8. ΓΟΝΙΔΙΑ ΣΙΔΗΡΟΥ ΤΟΥ <i>A. THALIANA</i> ΚΑΙ Η ΑΝΤΙΣΤΟΙΧΙΣΗ ΤΟΥΣ ΜΕ ΜΕΤΑΓΡΑΦΑ ΤΟΥ <i>L. JAPONICUS</i>	30

Κατάλογος Διαγραμμάτων

ΔΙΑΓΡΑΜΜΑ 1. ΔΙΑΓΡΑΜΜΑ ΡΟΗΣ ΕΡΓΑΣΙΑΣ ΠΟΥ ΑΠΟΣΚΟΠΕΙ ΣΤΗΝ ΕΥΡΕΣΗ ΤΩΝ ΜΕΤΑΓΡΑΦΩΝ ΣΧΕΤΙΚΩΝ ΜΕ ΣΙΔΗΡΟ ΠΟΥ ΠΑΡΑΓΟΝΤΑΙ ΣΕ ΔΙΑΦΟΡΕΤΙΚΗ ΑΦΘΟΝΙΑ ΣΤΟ <i>L. JAPONICUS</i> ΠΑΡΟΥΣΙΑ ΤΟΥ FSK.	18
ΔΙΑΓΡΑΜΜΑ 2. ΑΠΕΙΚΟΝΙΣΗ ΣΕ BOX PLOTS ΤΟΥ ΒΑΡΟΥΣ ΤΗΣ ΡΙΖΑΣ ΣΕ ΣΧΕΣΗ ΜΕ ΤΗΝ ΠΑΡΟΥΣΙΑ FE ΚΑΙ FSK ΣΤΙΣ 14 DPI. ΣΤΟΝ ΑΞΟΝΑ ΤΩΝ X ΑΠΕΙΚΟΝΙΖΕΤΑΙ Η ΠΑΡΟΥΣΙΑ Η ΜΗ ΤΟΥ FE ΣΕ ΣΥΝΑΡΤΗΣΗ ΜΕ ΤΙΣ ΜΕΣΕΣ ΤΙΜΕΣ ΤΩΝ ΒΑΡΩΝ ΣΕ G ΣΤΟΝ ΑΞΟΝΑ ΤΩΝ Y. Η ΠΑΡΟΥΣΙΑ Η ΜΗ ΤΟΥ FSK ΑΠΟΤΥΠΩΝΕΤΑΙ ΑΠΟ ΤΑ ΧΡΩΜΑΤΑ ΤΩΝ BOX PLOTS (ΠΟΡΤΟΚΑΛΙ-ΑΠΟΥΣΙΑ, ΜΠΛΕ-ΠΑΡΟΥΣΙΑ ΤΟΥ FSK). ΚΑΤΩ ΣΤΟ ΔΙΑΓΡΑΜΜΑ ΦΑΙΝΕΤΑΙ Η ΣΤΑΤΙΣΤΙΚΗ ΣΗΜΑΝΤΙΚΟΤΗΤΑ ΤΗΣ ANOVA ΚΑΙ ΟΙ ΜΕΣΕΣ ΤΙΜΕΣ ΚΑΙ ΟΙ ΤΙΜΕΣ ΤΩΝ ΤΥΠΙΚΩΝ ΑΠΟΚΛΙΣΕΩΝ. (+FE / -FSK ; N=3, +FE / +FSK ; N=3, - FE / - FSK ; N=4, -FE / +FSK ; N=3). ΣΤΑΤΙΣΤΙΚΑ ΣΗΜΑΝΤΙΚΗ ΕΠΙΔΡΑΣΗ ΤΗΣ ΠΑΡΟΥΣΙΑΣ ΤΟΥ FSK ΣΤΑ ΒΑΡΗ ΤΩΝ ΡΙΖΩΝ (P=0,0305).	32
ΔΙΑΓΡΑΜΜΑ 3. ΑΠΕΙΚΟΝΙΣΗ ΣΕ BOX PLOTS ΤΟΥ ΒΑΡΟΥΣ ΤΟΥ ΒΛΑΣΤΟΥ ΣΕ ΣΧΕΣΗ ΜΕ ΤΗΝ ΠΑΡΟΥΣΙΑ FE ΚΑΙ FSK ΣΤΙΣ 14 DPI. ΣΤΟΝ ΑΞΟΝΑ ΤΩΝ X ΑΠΕΙΚΟΝΙΖΕΤΑΙ Η ΠΑΡΟΥΣΙΑ Η ΜΗ ΤΟΥ FE ΣΕ ΣΥΝΑΡΤΗΣΗ ΜΕ ΤΙΣ ΜΕΣΕΣ ΤΙΜΕΣ ΤΩΝ ΒΑΡΩΝ ΣΕ G ΣΤΟΝ ΑΞΟΝΑ ΤΩΝ Y. Η ΠΑΡΟΥΣΙΑ Η ΜΗ ΤΟΥ FSK ΑΠΟΤΥΠΩΝΕΤΑΙ ΑΠΟ ΤΑ ΧΡΩΜΑΤΑ ΤΩΝ BOX PLOTS (ΠΟΡΤΟΚΑΛΙ-ΑΠΟΥΣΙΑ, ΜΠΛΕ-ΠΑΡΟΥΣΙΑ ΤΟΥ FSK). ΚΑΤΩ ΣΤΟ ΔΙΑΓΡΑΜΜΑ ΦΑΙΝΕΤΑΙ Η ΣΤΑΤΙΣΤΙΚΗ ΣΗΜΑΝΤΙΚΟΤΗΤΑ ΤΗΣ ANOVA ΚΑΙ ΟΙ ΜΕΣΕΣ ΤΙΜΕΣ ΚΑΙ ΟΙ ΤΙΜΕΣ ΤΩΝ ΤΥΠΙΚΩΝ ΑΠΟΚΛΙΣΕΩΝ. (+FE / -FSK ; N=4, +FE / + FSK ; N=3, - FE / - FSK ; N=4, -FE / +FSK ; N=4). ΜΗ ΣΤΑΤΙΣΤΙΚΑ ΣΗΜΑΝΤΙΚΑ ΑΠΟΤΕΛΕΣΜΑΤΑ.....	33

ΔΙΑΓΡΑΜΜΑ 4. ΑΠΕΙΚΟΝΙΣΗ ΣΕ BOX PLOTS ΤΟΥ ΒΑΡΟΥΣ ΤΗΣ ΡΙΖΑΣ ΣΕ ΣΧΕΣΗ ΜΕ ΤΗΝ ΠΑΡΟΥΣΙΑ FE ΚΑΙ FSK ΣΤΙΣ 40 DPI. ΣΤΟΝ ΑΞΟΝΑ ΤΩΝ Χ ΑΠΕΙΚΟΝΙΖΕΤΑΙ Η ΠΑΡΟΥΣΙΑ Η ΜΗ ΤΟΥ FE ΣΕ ΣΥΝΑΡΤΗΣΗ ΜΕ ΤΙΣ ΜΕΣΕΣ ΤΙΜΕΣ ΤΩΝ ΒΑΡΩΝ ΣΕ G ΣΤΟΝ ΑΞΟΝΑ ΤΩΝ Υ. Η ΠΑΡΟΥΣΙΑ Η ΜΗ ΤΟΥ FSK ΑΠΟΤΥΠΩΝΕΤΑΙ ΑΠΟ ΤΑ ΧΡΩΜΑΤΑ ΤΩΝ BOX PLOTS (ΠΟΡΤΟΚΑΛΙ-ΑΠΟΥΣΙΑ, ΜΠΛΕ-ΠΑΡΟΥΣΙΑ ΤΟΥ FSK). ΚΑΤΩ ΣΤΟ ΔΙΑΓΡΑΜΜΑ ΦΑΙΝΕΤΑΙ Η ΣΤΑΤΙΣΤΙΚΗ ΣΗΜΑΝΤΙΚΟΤΗΤΑ ΤΗΣ ΑΝΟΝΑ ΚΑΙ ΟΙ ΜΕΣΕΣ ΤΙΜΕΣ ΚΑΙ ΟΙ ΤΙΜΕΣ ΤΩΝ ΤΥΠΙΚΩΝ ΑΠΟΚΛΙΣΕΩΝ. (+FE / -FSK ; N=4, +FE / + FSK ; N=3, - FE / - FSK ; N=3, -FE / +FSK ; N=2). ΣΤΑΤΙΣΤΙΚΑ ΣΗΜΑΝΤΙΚΗ ΕΠΙΔΡΑΣΗ ΤΟΥ FSK ΣΤΑ ΒΑΡΗ ΤΩΝ ΡΙΖΩΝ (P=0,036).....	33
ΔΙΑΓΡΑΜΜΑ 5. ΑΠΕΙΚΟΝΙΣΗ ΣΕ BOX PLOTS ΤΟΥ ΒΑΡΟΥΣ ΤΟΥ ΒΛΑΣΤΟΥ ΣΕ ΣΧΕΣΗ ΜΕ ΤΗΝ ΠΑΡΟΥΣΙΑ FE ΚΑΙ FSK ΣΤΙΣ 40 DPI. ΣΤΟΝ ΑΞΟΝΑ ΤΩΝ Χ ΑΠΕΙΚΟΝΙΖΕΤΑΙ Η ΠΑΡΟΥΣΙΑ Η ΜΗ ΤΟΥ FE ΣΕ ΣΥΝΑΡΤΗΣΗ ΜΕ ΤΙΣ ΜΕΣΕΣ ΤΙΜΕΣ ΤΩΝ ΒΑΡΩΝ ΣΕ G ΣΤΟΝ ΑΞΟΝΑ ΤΩΝ Υ. Η ΠΑΡΟΥΣΙΑ Η ΜΗ ΤΟΥ FSK ΑΠΟΤΥΠΩΝΕΤΑΙ ΑΠΟ ΤΑ ΧΡΩΜΑΤΑ ΤΩΝ BOX PLOTS (ΠΟΡΤΟΚΑΛΙ-ΑΠΟΥΣΙΑ, ΜΠΛΕ-ΠΑΡΟΥΣΙΑ ΤΟΥ FSK). ΚΑΤΩ ΣΤΟ ΔΙΑΓΡΑΜΜΑ ΦΑΙΝΕΤΑΙ Η ΣΤΑΤΙΣΤΙΚΗ ΣΗΜΑΝΤΙΚΟΤΗΤΑ ΤΗΣ ΑΝΟΝΑ ΚΑΙ ΟΙ ΜΕΣΕΣ ΤΙΜΕΣ ΚΑΙ ΟΙ ΤΙΜΕΣ ΤΩΝ ΤΥΠΙΚΩΝ ΑΠΟΚΛΙΣΕΩΝ. (+FE / -FSK ; N=3, +FE / + FSK ; N=3, - FE / - FSK ; N=3, -FE / +FSK ; N=2). ΜΗ ΣΤΑΤΙΣΤΙΚΑ ΣΗΜΑΝΤΙΚΑ ΑΠΟΤΕΛΕΣΜΑΤΑ.....	34
ΔΙΑΓΡΑΜΜΑ 6. ΑΠΕΙΚΟΝΙΣΗ ΣΕ ΙΣΤΟΓΡΑΜΜΑ ΤΩΝ ΤΙΜΩΝ PH ΣΕ ΣΧΕΣΗ ΜΕ ΤΗΝ ΠΑΡΟΥΣΙΑ FE ΚΑΙ FSK ΣΤΙΣ 14 DPI. ΜΗ ΣΤΑΤΙΣΤΙΚΑ ΣΗΜΑΝΤΙΚΑ ΑΠΟΤΕΛΕΣΜΑΤΑ. .	34
ΔΙΑΓΡΑΜΜΑ 7. ΑΠΕΙΚΟΝΙΣΗ ΣΕ ΙΣΤΟΓΡΑΜΜΑ ΤΩΝ ΤΙΜΩΝ PH ΣΕ ΣΧΕΣΗ ΜΕ ΤΗΝ ΠΑΡΟΥΣΙΑ FE ΚΑΙ FSK ΣΤΙΣ 40 DPI. ΜΗ ΣΤΑΤΙΣΤΙΚΑ ΣΗΜΑΝΤΙΚΑ ΑΠΟΤΕΛΕΣΜΑΤΑ. .	35
ΔΙΑΓΡΑΜΜΑ 8. ΣΧΕΤΙΚΗ ΑΦΘΟΝΙΑ ΤΟΥ ΜΕΤΑΓΡΑΦΟΥ ΤΗΣ ΔΙΥΔΡΟΛΙΠΟΨΛΟ-ΑΦΥΔΡΟΓΟΝΑΣΗΣ ΣΤΙΣ 14 DPI, ΟΠΩΣ ΠΡΟΣΔΙΟΡΙΣΤΗΚΕ ΜΕΣΩ RT-QPCR.....	36
ΔΙΑΓΡΑΜΜΑ 9. ΣΧΕΤΙΚΗ ΑΦΘΟΝΙΑ ΤΟΥ ΜΕΤΑΓΡΑΦΟΥ ΤΗΣ ΔΙΥΔΡΟΛΙΠΟΨΛΟ-ΑΦΥΔΡΟΓΟΝΑΣΗΣ ΣΤΙΣ 40 DPI, ΟΠΩΣ ΠΡΟΣΔΙΟΡΙΣΤΗΚΕ ΜΕΣΩ RT-QPCR.....	36
ΔΙΑΓΡΑΜΜΑ 10. ΣΧΕΤΙΚΗ ΑΦΘΟΝΙΑ ΤΟΥ ΜΕΤΑΓΡΑΦΟΥ ΤΗΣ 6B-1-LIKE ΥΠΟΜΟΝΑΔΑΣ ΤΗΣ ΟΞΕΙΔΑΣΗΣ ΤΟΥ ΚΥΤΟΧΡΩΜΑΤΟΣ C ΣΤΙΣ 14 DPI, ΟΠΩΣ ΠΡΟΣΔΙΟΡΙΣΤΗΚΕ ΜΕΣΩ RT-QPCR.....	37
ΔΙΑΓΡΑΜΜΑ 11. ΣΧΕΤΙΚΗ ΑΦΘΟΝΙΑ ΤΟΥ ΜΕΤΑΓΡΑΦΟΥ ΤΗΣ 6B-1-LIKE ΥΠΟΜΟΝΑΔΑΣ ΤΗΣ ΟΞΕΙΔΑΣΗΣ ΤΟΥ ΚΥΤΟΧΡΩΜΑΤΟΣ C ΣΤΙΣ 40 DPI, ΟΠΩΣ ΠΡΟΣΔΙΟΡΙΣΤΗΚΕ ΜΕΣΩ RT-QPC.....	38
ΔΙΑΓΡΑΜΜΑ 12. ΣΧΕΤΙΚΗ ΑΦΘΟΝΙΑ ΤΟΥ ΜΕΤΑΓΡΑΦΟΥ ΤΗΣ CASPARIAN STRIP MEMBRANE PROTEIN 1-LIKE ΣΤΙΣ 14 DPI, ΟΠΩΣ ΠΡΟΣΔΙΟΡΙΣΤΗΚΕ ΜΕΣΩ RT-QPCR.....	38
ΔΙΑΓΡΑΜΜΑ 13. ΣΧΕΤΙΚΗ ΑΦΘΟΝΙΑ ΤΟΥ ΜΕΤΑΓΡΑΦΟΥ ΤΗΣ CASPARIAN STRIP MEMBRANE PROTEIN 1-LIKE ΣΤΙΣ 40 DPI, ΟΠΩΣ ΠΡΟΣΔΙΟΡΙΣΤΗΚΕ ΜΕΣΩ RT-QPCR.	39
ΔΙΑΓΡΑΜΜΑ 14. ΣΧΕΤΙΚΗ ΑΦΘΟΝΙΑ ΤΟΥ ΜΕΤΑΓΡΑΦΟΥ ΤΟΥ <i>FROI</i> ΣΤΙΣ 14 DPI, ΟΠΩΣ ΠΡΟΣΔΙΟΡΙΣΤΗΚΕ ΜΕΣΩ RT-QPCR.	40
ΔΙΑΓΡΑΜΜΑ 15. ΣΧΕΤΙΚΗ ΑΦΘΟΝΙΑ ΤΟΥ ΜΕΤΑΓΡΑΦΟΥ ΤΟΥ <i>FROI</i> ΣΤΙΣ 40 DPI, ΟΠΩΣ ΠΡΟΣΔΙΟΡΙΣΤΗΚΕ ΜΕΣΩ RT-QPCR.	40

ΔΙΑΓΡΑΜΜΑ 16. ΣΧΕΤΙΚΗ ΑΦΘΟΝΙΑ ΤΟΥ ΜΕΤΑΓΡΑΦΟΥ ΤΟΥ <i>MYB10</i> ΣΤΙΣ 14 DPI, ΟΠΩΣ ΠΡΟΣΔΙΟΡΙΣΤΗΚΕ ΜΕΣΩ RT-QPCR	41
ΔΙΑΓΡΑΜΜΑ 17. ΣΧΕΤΙΚΗ ΑΦΘΟΝΙΑ ΤΟΥ ΜΕΤΑΓΡΑΦΟΥ ΤΟΥ <i>MYB10</i> ΣΤΙΣ 40 DPI, ΟΠΩΣ ΠΡΟΣΔΙΟΡΙΣΤΗΚΕ ΜΕΣΩ RT-QPCR	41
ΔΙΑΓΡΑΜΜΑ 18. ΣΧΕΤΙΚΗ ΑΦΘΟΝΙΑ ΤΟΥ ΜΕΤΑΓΡΑΦΟΥ ΤΟΥ <i>FIT</i> ΣΤΙΣ 14 DPI, ΟΠΩΣ ΠΡΟΣΔΙΟΡΙΣΤΗΚΕ ΜΕΣΩ RT-QPCR	42
ΔΙΑΓΡΑΜΜΑ 19. ΣΧΕΤΙΚΗ ΑΦΘΟΝΙΑ ΤΟΥ ΜΕΤΑΓΡΑΦΟΥ ΤΟΥ <i>FIT</i> ΣΤΙΣ 40 DPI, ΟΠΩΣ ΠΡΟΣΔΙΟΡΙΣΤΗΚΕ ΜΕΣΩ RT-QPCR	42

1. Εισαγωγή

1.1. Φυτά

1.1.1. Το φυτό μοντέλο *Lotus japonicus*

Τα πειράματα που περιγράφονται στην παρούσα πτυχιακή πραγματοποιήθηκαν στο φυτικό είδος *Lotus japonicus*. Το *L. japonicus* είναι ένα πολύ διαδεδομένο φυτό-μοντέλο για τη μελέτη των οσπρίων (legumes). Οι δυο οικότυποι του που χρησιμοποιούνται συχνά στο εργαστήριο είναι ο Gifu B-129 (Gifu) και ο Miyakojima (MG-20).

Το *L. japonicus* ανήκει στην οικογένεια των Κυμαοειδών (Ψυχανθών) (Fabaceae) η οποία είναι η 3^η μεγαλύτερη οικογένεια των αγγειόσπερμων. Είναι ένα πολυετές φυτό που παράγει μεγάλο αριθμό μεγάλων, κίτρινων ανθών και άφθονο αριθμών σπόρων. Αν και το ώριμο φυτό παρουσιάζει θαμνώδη ανάπτυξη με πολλά κλαδιά που φτάνουν ακόμα και 30 εκατοστά, η ανάπτυξη του τις πρώτες εβδομάδες μετά την βλάστηση είναι αργή. Οι ιδανικές συνθήκες για την ανάπτυξη του φυτού είναι θερμοκρασία 18-22° C, επίπεδα υγρασίας γύρω στο 70% και φωτοπερίοδος 16 h φως και 8 h σκοτάδι, ενώ δεν απαιτείται πότισμα σε μεγάλη συχνότητα και ποσότητα (Rajuelo & Stougaard, 2005).

Πολλά όσπρια όπως το φασόλι, ο αρακάς, η σόγια, κ.α. είναι ευρέως διαδεδομένα στην υφήλιο, παίζοντας σημαντικό ρόλο στη γεωργία και στην οικονομία. Ωστόσο, η περίπλοκη γενετική σύσταση αυτών των φυτών τα καθιστά δύσκολα στο να μελετηθούν. Αντιθέτως, το *L. japonicus* είναι ένας διπλοειδής οργανισμός που διαθέτει ένα μικρού μεγέθους γονιδίωμα (450 Mb), οργανωμένο σε έξι ζεύγη χρωμοσωμάτων. Κάποια ακόμα χαρακτηριστικά που το καθιστούν τόσο καλό φυτό-μοντέλο είναι η δυνατότητα αυτο-αναπαραγωγής, η μικρή περίοδο γενεάς, η δυνατότητα μετασχηματισμού με *Agrobacterium tumefaciens* ή *Agrobacterium rhizogenes* και ο σχηματισμός πετυχημένων συμβιωτικών σχέσεων με βακτήρια και μύκητες συμβιώτες (Rajuelo & Stougaard, 2005; Stougaard, 2017). Το *L. japonicus* είναι κατάλληλο για μελέτες γενετικής, φυσιολογίας και μελέτες διερεύνησης των μηχανισμών που σχετίζονται με συνθήκες καταπόνησης/στρες (Campestre et al., 2016).

Με το άρθρο του Sato (Sato et al., 2008) δημοσιεύτηκε για πρώτη φορά το γονιδίωμα του φυτού, αποτελώντας το πρώτο ολοκληρωτικά αναγνωσμένο γονιδίωμα για τα όσπρια. Το «Lotus Base» (<https://lotus.au.dk/>) αποτελεί σήμερα την πιο διαδεδομένη βάση δεδομένων σχετικά με το γονιδίωμα του φυτού. Κάποιες από τις δυνατότητες που έχουν οι χρήστες της βάσης είναι ότι μπορούν να έχουν πρόσβαση σε πληροφορίες αλληλουχίας, να βρουν γονδιακές λειτουργίες, να απεικονίσουν και ευθυγραμμίσουν δίκτυα γονιδιακής συν-έκφρασης και να διερευνήσουν γονιδιακές αρχιτεκτονικές δομές. Η βάση περιλαμβάνει 2 εκδοχές (versions) του γονιδιώματος, τη v2.5 και v3 αντίστοιχα (Mun et al., 2016) και περιέχει τις αλληλουχίες και για τους 2 οικότυπους του φυτού.

1.1.2. Φυτική άμυνα

Η αλληλεπίδραση των φυτών με μικροοργανισμούς, παθογόνους ή μη, είναι δυνατόν να επάγει αντίσταση για πιθανή μελλοντική προσβολή από τα ίδια ή άλλα παθογόνα. Αυτή η επαγόμενη αντίσταση στα παθογόνα μπορεί να χωριστεί σε δύο κατηγορίες, τη Συστηματική Επικτητη Αντίσταση (SAR) και την Επαγόμενη Συστηματική Αντίσταση (ISR). Στο φυτό μοντέλο *Arabidopsis*, η SAR χαρακτηρίζεται από έντονη σηματοδότηση σαλικυλικού οξέος (SA) και παραγωγή πρωτεϊνών που σχετίζονται με παθογένεια (PR) και είναι αποτελεσματική σε πλήθος παθογόνων τοπικά ή συστηματικά. Η ISR αναπτύσσεται συστηματικά και επάγεται από συγκεκριμένα περιβαλλοντικά ερεθίσματα όπως από ριζοβακτήρια που αποικίζουν τη ρίζα και προωθούν την ανάπτυξη των φυτών (PGPRs) (Choudhary et al., 2007; Romera et al., 2019).

Χαρακτηρίζεται από σηματοδότηση γιασμονικού οξέος (JA) και αιθυλενίου (ET) και μέσω αυτής ενισχύεται η έμφυτη άμυνα των φυτών. Εκτός από τα PGPRs έχει βρεθεί και ότι και κάποιοι μύκητες που προωθούν τη φυτική ανάπτυξη (PGPFs) είναι δυνατόν να επάγουν την ISR. Ο μύκητας *Fusarium solani* στέλεχος K, ο οποίος είναι αντικείμενο αυτής της πτυχιακής είναι ένας τέτοιος μύκητας (Kavroulakis et al., 2007).

1.2. Μύκητες

1.2.1. Μύκητες: Ενδοφυτισμός και *Fusarium*

Ως ενδοφυτισμός ορίζεται η κατάσταση κατά την οποία μέσα σε ζωντανούς φυτικούς ιστούς ζούνε και αναπτύσσονται άλλοι ζωντανοί οργανισμοί με ασυμπτωματικό για το φυτό φαινότυπο. Οι ενδοφυτικοί οργανισμοί μπορεί να σχηματίσουν σχέσεις αμοιβαιότητας (mutualism), ομοσιτισμού (commensalism), ή λανθάνουσας παθογένειας/σαπροτροφισμός (latent pathogens/saprotrophs). Μέσω μιας συνέχειας, η σχέση αμοιβαιότητας μπορεί να περάσει σε σχέση κομενσαλισμού και ακόμα και παθογένειας κάτω από ορισμένες προϋποθέσεις (Kogel et al., 2006). Στο βασίλειο των μυκήτων, ενδοφυτικές σχέσεις σχηματίζουν κυρίως ασκομύκητες και πιο σπάνια βασιδιομύκητες (Skiada et al., 2019). Οι ενδοφυτικοί μύκητες φαίνεται να μοιράζονται με άλλους παθογόνους μύκητες κοινά σημεία αναγνώρισης και μονοπάτια κυτταρικής απόκρισης από τα φυτά ξενιστές τους (Nieva et al., 2019; Skiada et al., 2019).

Οι ενδοφυτικοί μύκητες είναι δυνατόν να προωθήσουν τη φυτική ανάπτυξη και να αυξήσουν την αντοχή των φυτών σε βιοτικές και αβιοτικές καταπονήσεις (Kavroulakis et al., 2018; Kogel et al., 2006; Nieva et al., 2019). Για παράδειγμα, το ριζικό ενδόφυτο *Piriformospora indica* ενισχύει την αντίσταση των φυτών σε νεκροτροφικά παράσιτα της ρίζας και παθογόνα των φύλλων στο κριθάρι. Από την άλλη, ενδοφυτικά μυκητιακά είδη των *Curvularia*, που αποικίζουν τα φύλλα του γρασιδιού *Dichanthelium*, βοηθάνε στην αντίσταση σε πολύ υψηλές θερμοκρασίες (Kogel et al., 2006). Μια κατηγορία ενδοφυτικών μυκήτων που παρουσιάζουν εξαιρετικά μεγάλο ενδιαφέρον είναι τα ενδόφυτα που προσδίδουν αντοχή στην ξηρασία. Πιθανοί τρόποι δράσης σε μια τέτοια καταπόνηση αποτελεί η επαγωγή φωτοσύνθεσης, η οσμωρύθμιση, η ρύθμιση της διαπερατότητας των στομάτων των φύλλων, η αύξηση παραγωγής αντιοξειδωτικών μορίων και η επαγωγή γονιδίων που σχετίζονται με το στρες (Kavroulakis et al., 2018).

Τα μέλη του γένους *Fusarium* των ασκομυκήτων αλληλοεπιδρούν με πλήθος φυτών-ξενιστών σε ένα μεγάλο γεωγραφικό και κλιματικό εύρος. Παρόλο που το γένος περιλαμβάνει πλήθος παθογόνων ειδών, κάποια είδη έχουν την ικανότητα να αναπτύσσονται ως ενδόφυτα, τα οποία υποβοηθούν τη φυτική ανάπτυξη και αυξάνουν την αντοχή των φυτών σε βιοτικές και αβιοτικές καταπονήσεις (Nieva et al., 2019).

1.2.2. *Fusarium solani* στέλεχος K

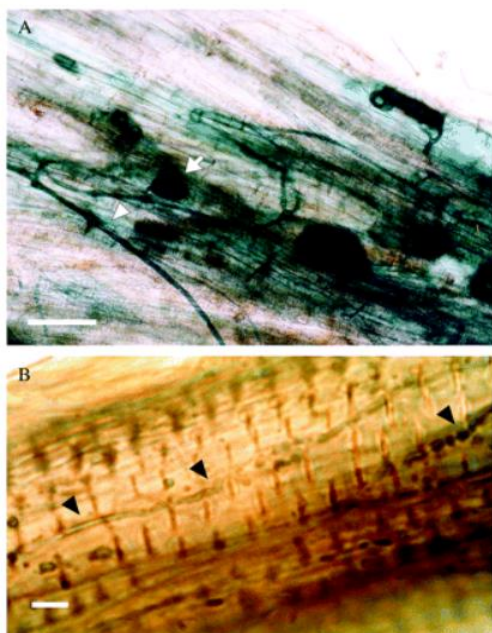
Ο ασκομύκητας *Fusarium solani* στέλεχος K (FsK) είναι ένας ενδοφυτικός μύκητας που απομονώθηκε από ρίζες ντομάτας που αναπτύσσονταν σε κομπόστ (οργανικό υπόστρωμα ανάπτυξης) (Kavroulakis et al., 2007). Είναι μέλος του κλάδου των *Fusarium solani* species complex (FSSC), ο οποίος περιλαμβάνει τουλάχιστον 60 φυλογενετικά διακριτά είδη. Ανάμεσα σε αυτά απαντώνται σημαντικά παθογόνα ανθρώπων και φυτών, ενδόφυτα και σαπρότροφα (Skiada et al., 2019). Έχει την ικανότητα να αναπτύσσεται σε πλήθος πηγών άνθρακα, με βέλτιστο pH ~ 5 και βέλτιστη θερμοκρασία 24° C (Σκιαδά, 2019). Ο FsK σχηματίζει σχέσεις αμοιβαιότητας με το φυτό της ντομάτας, *Solanum lycopersicum*, προσδίδοντάς του αντοχή τόσο σε βιοτική (Garantonakis et al., 2018; Kavroulakis et al., 2007; Pappas et al., 2018), όσο και σε αβιοτική καταπόνηση (Kavroulakis et al., 2018).

Ο FsK μπορεί να διεισδύσει στη ρίζα του *S. lycopersicum* και να αναπτυχθεί στον ριζικό φλοιό στις 15 ημέρες μετά τον εμβολιασμό (dpi), σχηματίζοντας κυκλικά σώματα (Εικόνα 1). Ο μύκητας

εξαπλώνεται στο αγγειακό σύστημα του φυτού, φτάνοντας ως το στέμμα της ρίζας (crown), χωρίς να περνάει ωστόσο στο στέλεχος (stem) και στα φύλλα. Η ικανότητα αποικισμού των ηθμαγγειώδων σωλήνων είναι γενικά κάτι που χαρακτηρίζει παθογόνους μύκητες των ριζών, γι' αυτό και η δυνατότητα ενός ωφέλιμου στελέχους μύκητα να πολλαπλασιάζεται εκεί, χωρίς την πρόκληση συμπτωμάτων ασθένειας, δηλώνει μια ασυνήθιστη αλληλεπίδραση μεταξύ μικροβίου και φυτού (Kavroulakis et al., 2007).

Το ενδόφυτο προσδίδει αντοχή στα φυτά ντομάτας σε ασθένεια προκαλούμενη από τον παθογόνο μύκητα της ρίζας *F. oxysporum* f. sp. *radicis-lycopersici* (FORL) και το παθογόνο των φύλλων *Septoria lycopersici*. Η αντοχή επιτυγχάνεται μέσω μονοπατιών σηματοδότησης αιθυλενίου (ET), κάτι που υποστηρίχθηκε με πειράματα, όπου έγινε χρήση φυτικών σειρών μεταλλαγμάτων απευαισθητοποιημένων στο ET Never ripe (Nr) και υπερπαραγωγών ET *epinastic* (*epi*) (Kavroulakis et al., 2007). Παράλληλα, ο FsK προσδίδει αντοχή στο φυτοφάγο έντομο των φύλλων *Nesidiocoris tenuis* μέσω σηματοδότησης ET, αλλά και JA (Garantonakis et al., 2018).

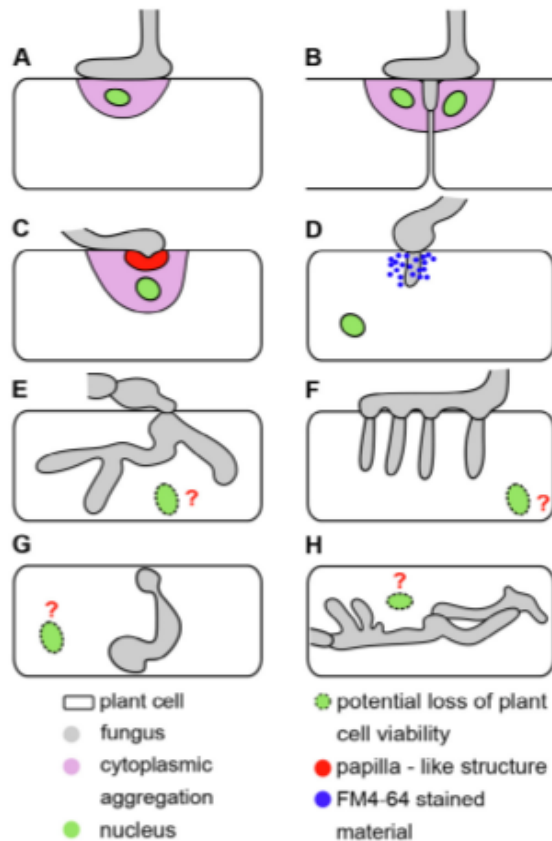
Η συμβίωση με τον FsK προστατεύει το *S. lycopersicum* από καταπόνηση λόγω ξηρασίας. Σε πειράματα *in vitro*, σποριόφυτα, που είχαν έλλειψη νερού προκαλούμενη από ελλίπες πότισμα, ήταν ικανά με παρουσία του FsK να φωτοσυνθέσουν φυσιολογικά. Σε πειράματα *in planta* φάνηκε ότι ο μύκητας μπορεί να αυξήσει την απορρόφηση νερού από τις ρίζες και να μειώσει το κλείσιμο των στομάτων στα φύλλα, με αποτέλεσμα να μη μειώνεται ο ρυθμός φωτοσύνθεσης και ταυτόχρονα να ελαχιστοποιείται η απώλεια νερού (Kavroulakis et al., 2018).



Εικόνα 1. Απεικόνιση σε μικροσκόπιο ριζικού ιστού ντομάτας 15 dpi με τον FsK χρησιμοποιώντας χρώση Chlorazol Black. (A) Ο μύκητας μπορεί να διεισδύσει στα κύτταρα της ρίζας σχηματίζοντας εμφανή στρογγυλά σώματα (βέλη) και (B) εμφανείς αποικίες στις αγγειακές δέσμες (βέλη). Οι μπάρες αντιπροσωπεύουν 50 μm (Kavroulakis et al., 2007).

1.2.3. Αλληλεπίδραση *L. jaronicus* με τον ενδοφυτικό μύκητα *FsK*

Πέρα από τις σχέσεις του *L. jaronicus* με ριζόβια βακτήρια και μυκορριζικούς μύκητες που έχουν καλά μελετηθεί, το φυτό μπορεί να σχηματίσει συμβιωτικές σχέσεις και με ενδόφυτα του γένους *Fusarium*. Όπως φαίνεται και στη δημοσίευση της Skiada (Skiada et al., 2019), κονίδια του FsK μπορούν να μολύνουν αποτελεσματικά το *L. jaronicus*. Αυτή η μόλυνση δεν επηρεάζει αρνητικά την ανάπτυξη του φυτού επιτρέποντάς του να ολοκληρώσει κανονικά τον κύκλο ζωής του, με τον μύκητα να διεισδύει στο ριζικό σύστημα των φυτών και σταδιακά στο στέλεχος. Τα βασικά χαρακτηριστικά του αποικισμού απεικονίζονται συνοπτικά στην Εικόνα 2.



Εικόνα 2. Σχηματική αναπαράσταση των βασικών χαρακτηριστικών του αποικισμού του FSK στις ρίζες του *Lotus japonicus*. Οι δομές αντιπροσωπεύονται με τα ακόλουθα χρώματα: γκρι-μύκητας, πράσινο-πυρήνας, ροζ-κυτοπλασματική συσσώρευση, κόκκινο-θηλή, μπλε-χρωστική FM4-64. (Α) Σχηματίζεται ένα υποπόδιο στη ριζική επιδερμίδα. Αυτό ενεργοποιεί την κυτοπλασματική συσσωμάτωση (ροζ) που σχετίζεται με τη συσσώρευση ΕΔ (δεν απεικονίζεται) και την πυρηνική μετατόπιση κάτω από τη θέση επαφής του υποποδίου. (Β) Αυτή η αντίδραση εμφανίζεται σε όλα τα κύτταρα που έρχονται σε επαφή με τον μύκητα, ακόμη και όταν ο μύκητας προχωρά μεσοκυττάρια προς τον άνω φλοιό της ρίζας. (C) Το φυτικό κύτταρο αντιδρά περιστασιακά με σχηματισμό θηλώματος κάτω από το σημείο της διείσδυσης. Ο φυτικός πυρήνας βρίσκεται κάτω από το σημείο επαφής. (D) Τοπική συσσώρευση FM4-64 σε περιοχές διείσδυσης. (E και F) Ο FSK διεισδύει στο κύτταρο είτε με μονό έναν (E), είτε με πολλούς λοβούς (F). Απαιτείται στένωση για να διασχίσει το κυτταρικό τοίχωμα και στις δυο περιπτώσεις. Ο FSK εμφανίζει πλαστικότητα μέσα στο φυτικό κύτταρο. Μια μεμονωμένη μυκηλιακή υφή μπορεί να διασχίσει το κύτταρο (G) ή οι υφές μπορεί να προεξέχουν ενδοκυτταρικά και να γεμίσουν ολόκληρο το κύτταρο (H). Δεν παραμένουν ζωντανά όλα τα αποικισμένα κύτταρα (Skiada et al., 2019).

1.3. Σίδηρος

1.3.1. Καταπόνηση φυτών λόγω έλλειψης Fe

Ο σίδηρος (Fe) είναι ένα απαραίτητο ιχνοστοιχείο για την ανάπτυξη των φυτών, αλλά και των οργανισμών γενικότερα. Λόγω των οξειδοαναγωγικών ιδιοτήτων που κατέχει και της δράσης του ως συμπαραγοντας σε πλήθος ενζύμων (Briat et al., 1995; Connorton et al., 2017) παίζει σημαντικό ρόλο σε ποικίλες κυτταρικές διεργασίες, όπως η αναπνοή, η βιοσύνθεση χλωροφύλλης και η φωτοσύνθεση (Briat et al., 1995; Connorton et al., 2017; Liang et al., 2014). Τα φυτά στερούνται ικανότητα κίνησης, οπότε η απόκτηση Fe εξαρτάται από την παρουσία του ιχνοστοιχείου στο έδαφος στο οποίο αυτά αναπτύσσονται. Ωστόσο, στο έδαφος ο Fe δε βρίσκεται πάντα σε μεγάλη ποσότητα, ενώ ταυτόχρονα απαντάται κυρίως στη τρισθενή μορφή του $[Fe(III)]$, η οποία είναι σχετικά αδιάλυτη κάτω από φυσιολογικές τιμές εύρους pH, υπό αερόβιες συνθήκες. Επομένως, ένα

συχνό πρόβλημα στη γεωργία είναι το αβιοτικό στρες των φυτών που προκαλείται από τη μειωμένη απορρόφηση Fe (Briat et al., 1995).

Γονίδια που σχετίζονται με την πρόσληψη και ομοιοστάση του Fe έχουν βρεθεί να αυξορρυθμίζονται κάτω από συνθήκες έλλειψης του ιχνοστοιχείου (Lucena et al., 2019). Τα ανώτερα φυτά έχουν αναπτύξει δύο κύριους μηχανισμούς για την καλύτερη πρόσληψη του Fe. Δικότυλα, μη σιτηρά φυτά, όπως το *L. japonicus*, χρησιμοποιούν έναν μηχανισμό που βασίζεται στην αναγωγή του τρισθενές Fe(III) σε δισθενές Fe(II) (Στρατηγική I), ο οποίος είναι πιο διαλυτός. Ο Fe(II) απορροφάται μέσω μεταφορέων που βρίσκονται στις κυτταρικές μεμβράνες της ρίζας. Τα σιτηρά φυτά, από την άλλη, χρησιμοποιούν κυρίως έναν μηχανισμό που βασίζεται στη χηλίωση (Στρατηγική II) μέσω απελευθέρωσης φυτοσιδηροφόρων που δεσμεύουν τον Fe(III). Στη συνέχεια, το σιδηροφόρο προσλαμβάνεται από ειδικούς μεταφορείς (Alam et al., 2001; Connorton et al., 2017; Kobayashi et al., 2019). Επιπλέον, διάφορες μελέτες έχουν δείξει ότι η εφαρμογή ωφέλιμων μικροοργανισμών στο έδαφος μπορεί να βελτιώσει την πρόσληψη Fe από τα φυτά (Romera et al., 2019).

1.3.2. Συσχέτιση αποικισμού του *FsK* με έλλειψη Fe

Τα τελευταία χρόνια έχουν αρχίσει να γίνονται έρευνες για την εφαρμογή ωφέλιμων μικροοργανισμών στο έδαφος που έχουν δείξει ότι αυξάνουν την απορρόφηση σιδήρου στα φυτά (Romera et al., 2019). Ο *FsK* φαίνεται να είναι ένας από αυτούς τους μικροοργανισμούς που προωθούν την αντίσταση των φυτών *L. japonicus* σε συνθήκες έλλειψης Fe. Ο μύκητας είναι δυνατόν να αποικίσει τις ρίζες των φυτών που αναπτύσσονται σε θρεπτικό με έλλειψη Fe σε μεγαλύτερο βαθμό σε σχέση με ρίζες μη εμβολιασμένων φυτών-control, στις 14 dpi. Στις 44 dpi τα φυτά που ήταν υπό έλλειψη Fe και είχαν αποικηθεί από τον μύκητα είχαν αυξημένο βάρος φρέσκου βλαστού σε σχέση με τα μη-αποικισμένα, ενώ τα γονίδια *FRO1* και *IRT*, που σχετίζονται με την πρόσληψη Fe στο φυτό, εκφράζονταν σε μεγαλύτερο βαθμό, υποδεικνύοντας την αντίσταση που προσφέρει ο μύκητας κάτω από αυτήν την αβιοτική καταπόνηση (Avramidou M, Papadopoulou K et al, unpublished results). Επίσης, στις 14 dpi βρέθηκε ότι σε συνθήκες έλλειψης Fe υπάρχει αυξορρύθμιση γονιδίων που σχετίζονται με μονοπάτια ET, όταν υπάρχει αποικισμός με *FsK*.

Τόσο η έλλειψη Fe στα φυτά, όσο και ο αποτελεσματικός αποικισμός του *FsK* σε φυτά ντομάτας μοιράζονται κάποια κοινά μονοπάτια φυτικής κυτταρικής απόκρισης. Σε συνθήκες έλλειψης Fe επάγεται από τις ρίζες των φυτών η παραγωγή ET, ακόμα και πριν την εμφάνιση του ασθενικού φαινοτύπου που προκαλεί η έλλειψη του ιχνοστοιχείου. Πιο συγκεκριμένα, γονίδια που κωδικοποιούν για ένζυμα που εμπλέκονται στη σύνθεση του ET από μεθειονίνη, όπως και γονίδια που εμπλέκονται στην κυτταρική απόκριση στο αιθυλένιο αυξορρυθμίζονται σε αυτές τις συνθήκες (García et al., 2015). Η ορμόνη προκαλεί με τη σειρά της αυξορρύθμιση σε γονίδια που εμπλέκονται με την πρόσληψη και ομοιοστάση του Fe (García et al., 2015; Lucena et al., 2019), καθώς και σε διεργασίες όπως η αναστολή παραγωγής φελλίνης, ή, αλλιώς σουμπερίνης, σε κύτταρα του ενδοδέρματος επηρεάζοντας την αποπλαστική και διακυτταρική μεταφορά του Fe στη ρίζα (Curie & Mari, 2017). Από την άλλη, ο *FsK* έχει δείχθει ότι μέσα από μονοπάτια ET είναι ικανός να προσφέρει αντίσταση στα φυτά ντομάτας έναντι σε συνθήκες καταπόνησης (Garantonakis et al., 2018; Kanroulakis et al., 2007). Η άμυνα ISR και οι διεργασίες απόκρισης στην έλλειψη Fe ίσως να συνδέονται στενά, κάτι που φαίνεται και από άλλες μελέτες συμβίωσης φυτών-μικροοργανισμών, ωστόσο απουσιάζει ένα μοντέλο που να περιέχει τα σημεία σύγκλισης αυτών των δύο διαδικασιών (Romera et al., 2019).

Επίσης, πιθανή συσχέτιση ενδέχεται να υπάρχει και μέσω του pH. Οι περισσότεροι μύκητες αναπτύσσονται καλύτερα σε εύρος pH 5-7, ενώ *Fusarium* είναι δυνατόν να αποικίσουν και σε πιο αλκαλικά περιβάλλοντα με τιμές pH κοντά στο 10, διατηρώντας ταυτόχρονα εσωτερικό pH κυττοσολίου ουδέτερο. Οι μύκητες είναι ικανοί να τροποποιήσουν το pH γύρω τους δημιουργώντας

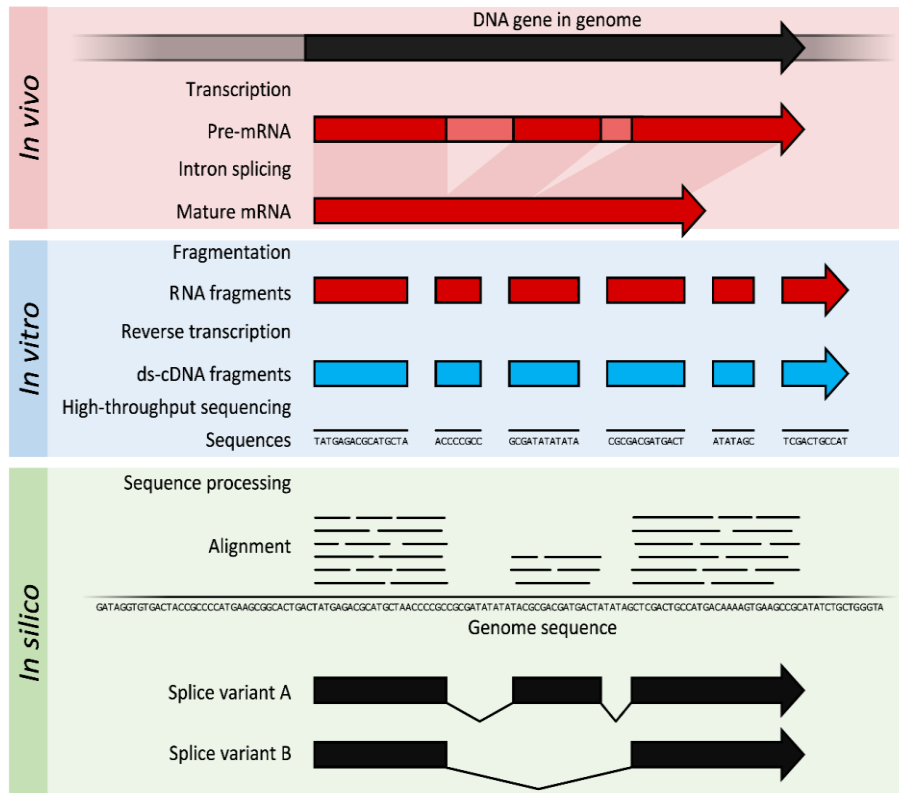
το δικό τους μικροπεριβάλλον, για παράδειγμα μέσω απελευθέρωσης οργανικών οξέων είναι δυνατόν να μειώσουν το pH γύρω τους ως την τιμή 4 (Deacon, 2006). Ο FsK έχει βέλτιστο pH ανάπτυξης ~ 5 (Kavroulakis et al., 2007), ενώ παράλληλα ο Fe απορροφάται καλύτερα σε όξινα pH, εμφανίζοντας δυσκολία απορρόφησης σε τιμές pH μεγαλύτερες του 7,4. Επομένως, θα είχε ενδιαφέρον η μελέτη της υπόθεσης για το αν ο FsK είναι ικανός να μειώσει το pH του εδάφους για την καλύτερη επιβίωση των φυτών σε συνθήκες έλλειψης Fe.

1.4. RNA-seq

1.4.1. Ανάλυση μεταγραφωμικής

Στο DNA του γονιδιώματος ενός οργανισμού περιέχονται οι πληροφορίες για τις ιδιότητές του. Η έκφραση αυτών των πληροφοριών γίνεται σε πρώτη φάση μέσω της μεταγραφής. Το mRNA λειτουργεί ως ενδιάμεσο μόριο στο δίκτυο πληροφοριών, ενώ μη κωδικοποιητικά RNAs εκτελούν επιπλέον λειτουργίες (Lowe et al., 2017). Ως μεταγράφομα ορίζουμε το σύνολο των μεταγράφων σε ένα κύτταρο και τον αριθμό των αντιγράφων τους κάτω από κάποιο συγκεκριμένο αναπτυξιακό στάδιο ή συνθήκη. Με άλλα λόγια, το μεταγράφομα αποτελεί ένα στιγμιότυπο των συνολικών RNAs που υπάρχουν σε έναν κύτταρο κάποια δεδομένη στιγμή. Μέσω αυτού παίρνουμε λειτουργικές πληροφορίες για το γονιδίωμα και κατανοούμε καλύτερα καταστάσεις όπως η ανάπτυξη ή η ασθένεια, αλλά και τη δομή και τη λειτουργία κυττάρων και ιστών. Με τον όρο μεταγραφωμική ανάλυση (transcriptomics) εννοούμε τις τεχνικές που χρησιμοποιούμε για τη μελέτη του μεταγραφώματος ενός οργανισμού. Σκοπός της μεταγραφωμικής ανάλυσης είναι ανάλογα με την περίπτωση: η καταγραφή όλων των ειδών των μεταγράφων, η εύρεση των 5' και 3' άκρων, των πρότυπων ματίσματος, των μετα-μεταγραφικών τροποποιήσεων και η ποσοτικοποίηση των μεταβαλλόμενων επιπέδων γονιδιακής έκφρασης κάτω από διαφορετικές συνθήκες (Wang et al., 2009).

Η ανάπτυξη νέων μεθόδων υψηλής απόδοσης για την αλληλούχηση του DNA έκανε εφικτή την αλληλούχηση του RNA (RNA-Seq) που περιλαμβάνει τη χαρτογράφηση και ποσοτικοποίηση των RNA μεταγράφων. Το RNA-Seq χρησιμοποιεί νέες τεχνολογίες βαθιάς αλληλούχησης που συνδυάζονται με υπολογιστικές μεθόδους (Εικόνα 3). Οι γενικές αρχές του RNA-Seq περιλαμβάνουν την απομόνωση του RNA, την αντίστροφη μεταγραφή του σε cDNA, τη δημιουργία βιβλιοθήκης με τα θραύσματα cDNA που έχουν προσκολλημένα στο ένα ή και στα δυο άκρα τους προσαρμογείς (adaptors) και τέλος, την αλληλούχηση κάθε μορίου από το ένα άκρο (single-end sequencing) ή και από τα δυο άκρα του (pair-end sequencing) (Wang et al., 2009). Τα αναγνώσματα έχουν μέγεθος που διαφέρει ανάλογα με την τεχνολογία που χρησιμοποιήθηκε ανάμεσα σε 30 με 10.000 bp (Lowe et al., 2017). Πλεονεκτήματα του RNA-Seq σε σχέση με άλλες τεχνολογίες που βασίζονται στον υβριδισμό (hybridization-based approaches) είναι η δυνατότητα: α) αλληλούχησης σε οργανισμούς μη-μοντέλα, που δε διαθέτουν καλά χαρακτηρισμένο γονιδίωμα, β) παροχής πληροφοριών για τον τρόπο σύνδεσης των εξονίων και γ) αποκάλυψης πιθανών παραλλαγών στην αλληλουχία των μεταγραφόμενων περιοχών (π.χ. SNPs). Άλλα προτερήματα για το RNA-Seq είναι ότι είναι ευαίσθητο τόσο για γονίδια που εμφανίζουν εξαιρετικά χαμηλά, αλλά και για γονίδια που εμφανίζουν εξαιρετικά υψηλά επίπεδα έκφρασης, όπως και το ότι υπάρχει μεγάλη αναπαραγωγικότητα των αποτελεσμάτων και για τεχνικές και για βιολογικές επαναλήψεις, ενώ για την όλη διαδικασία απαιτείται μικρή ποσότητα δείγματος RNA. (Lowe et al., 2017; Oshlack et al., 2010; Wang et al., 2009).



Εικόνα 3. Περίληψη των βημάτων του RNA-Seq (Lowe et al., 2017).

1.4.2. Ανάλυση των δεδομένων του RNA-Seq

Από το RNA-Seq παίρνουμε ακατέργαστα δεδομένα τα οποία χρήζουν επεξεργασίας, ώστε να παραχθεί χρήσιμη βιολογική πληροφορία. Η επεξεργασία γίνεται μέσω ενός συνδυασμού βιοπληροφορικών εργαλείων και περιλαμβάνει: τον έλεγχο ποιότητας, την ευθυγράμμιση, την ποσοτικοποίηση και την ανάλυση διαφορικής έκφρασης. Τα πιο διαδεδομένα προγράμματα για αυτούς τους σκοπούς εκτελούνται συνήθως σε περιβάλλον Unix ή R/Bioconductor. Ακολουθούν συνοπτικά οι διεργασίες επεξεργασίας:

Έλεγχος ποιότητας: τα αναγνώσματα των αλληλουχιών που προκύπτουν από το RNA-Seq δεν είναι πάντα αξιόπιστα και θα πρέπει να περάσουν από ποιοτικό έλεγχο για την εκτίμηση της ακρίβειας στην ανάγνωση της κάθε βάσης. Όποιες αλληλουχίες δεν τηρούν τα κριτήρια που θέτονται και τη βαθμολογία ποιότητας που επιλέγεται, μετά από φιλτράρισμα απομακρύνονται. Επίσης, σε αυτό το βήμα είναι δυνατόν να αφαιρεθούν οι αλληλουχίες των προσαρμογών.

Ευθυγράμμιση: τα μετάγραφα θα πρέπει να ευθυγραμμιστούν σε ένα γονιδίωμα αναφοράς με σκοπό τη μετέπειτα συσχέτιση του αριθμού των αναγνωσμάτων με τη γονιδιακή έκφραση. Σε χειρισμό mRNA ευκαρυωτικών κυττάρων θα πρέπει να λαμβάνεται υπόψιν κατά την ευθυγράμμιση ότι από το ώριμο mRNA απουσιάζουν οι αλληλουχίες ιντρονίων. Προγράμματα ευθυγράμμισης για μικρά αναγνώσματα πραγματοποιούν έναν συμπληρωματικό βήμα ευθυγραμμίσεων ειδικά σχεδιασμένο για εύρεση συνδέσεων ματίσματος (splice junctions) εμποδίζοντας τη λάθος ευθυγράμμιση των αναγνωσμάτων ή την απόρριψή τους. Επειδή η γονιδιακή ρύθμιση μπορεί να συμβεί και μέσω παραγωγής mRNA ισομόρφων, ευθυγραμμίσεις ευαίσθητες στο μάτισμα επιτρέπουν την εύρεση αλλαγών στην ποσότητα των ισομόρφων.

Ποσοτικοποίηση: η ποσοτικοποίηση των αλληλουχιών που έχουν ευθυγραμμιστεί μπορεί να γίνει σε επίπεδο γονιδίων, εξονίων ή μεταγράφων. Αρχείο εξόδου (output) μπορεί να είναι ένας πίνακας με τους αριθμούς των αναγνωσμάτων.

Ανάλυση διαφορικής έκφρασης: η ανάλυση διαφορικής έκφρασης των γονιδίων υπολογίζεται μέσω κανονικοποίησης, μοντελοποίησης και στατιστικής ανάλυσης. Η κανονικοποίηση αφορά διαφορές που υπάρχουν λόγω του αριθμού των αναγνωσμάτων από γονίδια, τα οποία διαφέρουν στο μήκος τους, όπως και διαφορές που οφείλονται στο βάθος της αλληλούχησης μεταξύ των βιβλιοθηκών. Μέσω της στατιστικής ανάλυσης εντοπίζονται τα γονίδια τα οποία εμφανίζουν μεγάλη και στατιστικά σημαντική αλλαγή στην αφθονία τους, κάτω από τις πειραματικές συνθήκες (αυξορ- και μειο- ρυθμιζόμενα γονίδια). Ως αρχείο εισόδου (input) εισάγεται πίνακας των δεδομένων ποσοτικοποίησης της κάθε βιβλιοθήκης και ακολουθεί διεξαγωγή στατιστικών τεστ μεταξύ των δειγμάτων του ενδιαφέροντος (Lowe et al., 2017).

1.5. Σκοπός

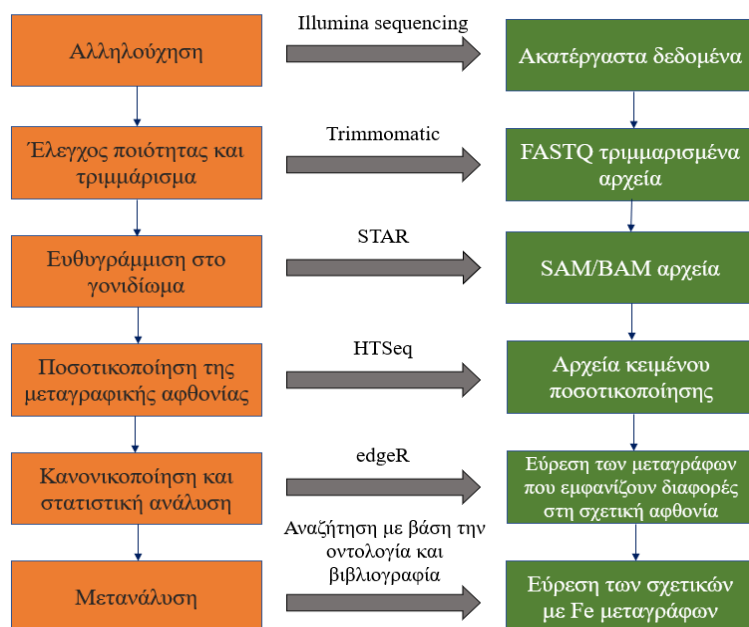
Σκοπός της παρούσας πτυχιακής είναι η διερεύνηση της συσχέτισης του αποικισμού του ενδοφυτικού μύκητα FsK στο φυτό-μοντέλο *L. japonicus* με την ομοιόσταση και μεταβολισμό του σιδήρου, όσον αφορά τα γονίδια του σιδήρου που εκφράζονται διαφορετικά σε αυτήν την αλληλεπίδραση. Η μελέτη αυτή έγινε σε δύο φάσεις: αρχικά μέσω RNA-Seq ανάλυσης βρέθηκαν γονίδια που σχετίζονται με τον σίδηρο και έπειτα ακολούθησε σύγκριση σχετικής αφθονίας μεταγράφων γονιδίων του σιδήρου χρησιμοποιώντας αντίδραση RT-qPCR.

2. Υλικά και μέθοδοι

2.1. In silico ανάλυση: RNA-Seq

2.1.1. Πειραματικές συνθήκες ανάπτυξης των φυτών για το πείραμα του RNA-Seq

Για την επίτευξη του σκοπού της παρούσας πτυχιακής, ως 1^ο βήμα αποφασίστηκε ο έλεγχος της επίπτωσης του αποικισμού του FsK στο *L. japonicus* όσον αφορά τα γονίδια του φυτού που σχετίζονται με τον σίδηρο, σε κανονικές συνθήκες παρουσίας του ιχνοστοιχείου. Για την εύρεση των γονιδίων αυτών χρησιμοποιήθηκαν δεδομένα από δείγματα RNA προηγούμενων πειραμάτων του εργαστηρίου που είχαν σταλεί για αλληλούχηση (Papadopoulou et al, unpublished results). Τα δείγματα αφορούσαν τρεις διαφορετικές συνθήκες: α) φυτά *L. japonicus* μη εμβολιασμένα με FsK (συνθήκη control), β) φυτά *L. japonicus* με χαμηλό ποσοστό αποικισμού FsK στις ρίζες τους και γ) φυτά *L. japonicus* με υψηλό ποσοστό αποικισμού FsK στις ρίζες τους. Συνοπτικά: όλα τα φυτά είχαν μεγαλώσει σε δοχεία ανάπτυξης φυτών τύπου magenta boxes (τέσσερα φυτά σε κάθε magenta) με υπόστρωμα μίγμα βερμικουλίτη-άμμου, ποτισμένα με M medium liquid (μίγμα από Macroelements, Ca(NO₃)₂, NaFeEDTA, Vitamins, Microelements, NaI). Για τις συνθήκες συμβίωσης με τον μύκητα είχε γίνει εμβολιασμός του κάθε φυτού με 20 μL διαλύματος εμβολίου που περιείχε σύνολο 10² κονίδια του μύκητα. Τα φυτά είχαν αναπτυχθεί σε θάλαμο ανάπτυξης (16 h φως, 8 h σκοτάδι, 22° C). Η δειγματοληψία έγινε στις 3 dpi. Το RNA που εκμιαεύτηκε στάλθηκε για Illumina RNA-Seq. Τα ακατέργαστα αποτελέσματα της αλληλούχησης εξάχθηκαν σε αρχεία της μορφής FASTQ τα οποία χρησιμοποιήθηκαν για επεξεργασία και μετέπειτα ανάλυση. Συνοπτικά, στήθηκε πειραματικός σχεδιασμός όπου τα κύρια σημεία του απεικονίζονται στο Διάγραμμα 1.



Διάγραμμα 1. Διάγραμμα ροής εργασίας που αποσκοπεί στην εύρεση των μεταγράφων σχετικών με σίδηρο που παράγονται σε διαφορετική αφθονία στο *L. japonicus* παρουσία του FsK.

2.1.2. Προεργασία Αναγνωσμάτων

Για την προεργασία των αναγνωσμάτων, ή αλλιώς θραυσμάτων, (reads) έγινε χρήση του Trimmomatic (Williams et al., 2016). Συγκεκριμένα, οι αλληλουχίες υπέστησαν φιλτράρισμα και έγινε τριμμάρισμα των χαμηλής ποιότητας βάσεων, καθώς και αφαίρεση των αλληλουχιών των προσαρμογών μέσα από τις γραμμές εντολών του Trimmomatic v0.36. Χρησιμοποιήθηκε η

λειτουργία ζεύγους τερματισμού (paired end mode) του προγράμματος, διότι τα θραύσματα είχαν αλληλουχηθεί και από τα δύο άκρα τους, δημιουργώντας υψηλής ποιότητας ευθυγραμμισμένα δεδομένα αλληλούχησης. Στο Trimmomatic, μέσω αυτής της λειτουργίας, διατηρείται η αντιστοιχία των ζευγών ανάγνωσης και εντοπίζονται ευκολότερα θραύσματα προσαρμογών ή εκκινητών της PCR, τα οποία εισήχθησαν κατά τη διαδικασία της αλληλούχησης. Η βαθμολογία ποιότητας που επιλέχθηκε ήταν phred + 33, σύμφωνη με τον αγωγό Illumina που χρησιμοποιήθηκε. Η βαθμολογία ποιότητας Phred (Q score) είναι ένα μέτρο της ποιότητας της ταυτοποίησης των νουκλεοτιδικών βάσεων, όπως προκύπτουν από την αλληλούχηση. Αυτές οι βαθμολογίες συνδέονται λογαριθμικά με πιθανότητες σφάλματος ($Q = -10 \log_{10} P$), με μεγάλες τιμές να συνεπάγονται μειωμένες πιθανότητες σφάλματος και άρα καλύτερη ποιότητα αλληλούχησης. Για παράδειγμα $Q=30$ για μία βάση συνεπάγεται πιθανότητα σφάλματος ταυτοποίησης της βάσης 1/1000 (Πίνακας 1) (*Quality Scores for Next-Generation Sequencing*, n.d.). Στη μορφή FASTQ των αρχείων, η βαθμολογία ποιότητας Phred κωδικοποιείται ως χαρακτήρας ASCII παράλληλα με τις ακολουθίες των αναγνωσμάτων.

Σε πρώτο βήμα, οι αλληλουχίες των προσαρμογών απομακρύνθηκαν με την παράμετρο ILLUMINACLIP και καταχώρηση του adapter file (φάκελος που περιέχει τις αλληλουχίες τους). Στη συνέχεια του προγράμματος, οι πρώτες και οι τελευταίες βάσεις των αλληλουχιών που ήταν κάτω από ποιότητα 3 απομακρύνθηκαν με τις παραμέτρους LEADING:3, TRAILING:3, ενώ χρησιμοποιήθηκε και συρόμενο παράθυρο μήκους 10 βάσεων για σκανάρισμα των αλληλουχιών, κόβοντας όταν ο μέσος όρος ποιότητας ανά βάση έπεφτε κάτω από 28, SLIDINGWINDOW:10:20. Τα αναγνώσματα που προέκυπταν με το πέρας αυτών των βημάτων απομακρύνονταν αν το μήκος τους ήταν μικρότερο από 150 νουκλεοτίδια, MINLEN:150.

Πίνακας 1. Phred Quality Scores και ακρίβεια ταυτοποίησης βάσης.

<i>Phred Quality Score</i>	<i>Πιθανότητα Ταυτοποίησης Λάθος Βάσης</i>	<i>Ακρίβεια Ταυτοποίησης Βάσης</i>
10	1/10	90%
20	1/100	99%
30	1/1.000	99,9%
40	1/10.000	99,99%
50	1/100.000	99,999%

2.1.3. Χαρτογράφηση αλληλουχιών, μέτρηση αναγνωσμάτων και ανάλυση διαφορικής έκφρασης

Για τη χαρτογράφηση των αναγνωσμάτων (read mapping) χρησιμοποιήθηκε το λογισμικό STAR v2.7 (Dobin & Gingeras, 2015). Αρχικά, δημιουργήθηκαν δείκτες του γονιδιώματος αναφοράς (indexing of the reference genome). Ως γονιδίωμα αναφοράς χρησιμοποιήθηκε το γονιδίωμα του *L. japonicus* οικότυπος MG20 που προήλθε από τη βάση δεδομένων του Kazusa (Shirasawa et al., 2014). Αναφορικά με τις παραμέτρους, ο αριθμός των νημάτων που έτρεξαν στο STAR ήταν 8, --runThreadN 8, κάτι που προέκυψε με βάση τον αριθμό των διαθέσιμων επεξεργαστών CPU, ενώ το πρόγραμμα δημιούργησε δείκτες γονιδιώματος (genome indices) καθορίζοντας τη σωστή διαδρομή προς το αρχείο FASTA του γονιδιώματος και του αρχείου GFF3 των ευθυγραμμίσεων (annotations), --runMode genomeGenerate. Λόγω του GFF3 αρχείου χρησιμοποιήθηκε η παράμετρος --sjdbGTFtagExonParentTranscript Parent, ώστε τα εξόνια να εκχωρούνται στα μετάγραφα με βάση τη σχέση γονέα-παιδιού (parent-child relationship). Αρχεία εισαγωγής για τη χαρτογράφηση αποτελέσαν τα FASTQ αρχεία που εκμιαιεύτηκαν μετά το Trimmomatic. Επειδή τα αρχεία ήταν συμπιεσμένα χρησιμοποιήθηκε η παράμετρος --readFilesCommand zcat. Μετά το

τέλος του STAR, χρησιμοποιήθηκε το πρόγραμμα SAMtools (Li et al., 2009), το οποίο αποτελεί ένα πακέτο βιβλιοθήκης και λογισμικού για ανάλυση και χειρισμό ευθυγραμμίσεων που βρίσκονται σε μορφή SAM/BAM. Συγκεκριμένα, το πρόγραμμα είναι κατάλληλο για ανάγνωση, συγγραφή, επεξεργασία, ευρετηρίαση και προβολή τέτοιου τύπου αρχείων. Επομένως, οι ευθυγραμμίσεις των αναγνωσμάτων πάνω στο γονιδίωμα (read alignments) πέρασαν σε αρχείο εξαγωγής τύπου SAM, που στη συνέχεια συμπιέστηκε σε αρχείο BAM, τακτοποιήθηκε και έγινε η ευρετηρίαση. Αυτή η διαδικασία έγινε προγραμματιστικά και για τις τρεις συνθήκες.

Τα αναγνώσματα των μεταγράφων των γονιδίων των αρχείων που περιείχαν τα μεταγραφικά IDs μετρήθηκαν με το HTSeq v0.11.1 (Anders et al., 2014). Ως αρχεία εισαγωγής ορίστηκαν τα αρχεία BAM του προηγούμενου βήματος, οπότε επιλέχθηκε η παράμετρος `-f bam`, ενώ με τη παράμετρο `-s yes` ορίστηκε ότι για τα αναγνώσματα ζεύγους τερματισμού το πρώτο ανάγνωσμα θα πρέπει να ανήκει στον πρώτο κλώνο, ενώ το δεύτερο στον αντίθετο κλώνο. Ο τύπος χαρακτηριστικού (feature type) από το αρχείο GFF3 που αξιοποιήθηκε για μέτρηση ήταν το mRNA, `-t mRNA`, και η μεταβλητή id (id attribute) του GFF3 ορίστηκε ως το ID, `-i ID`, έτσι ώστε το πρόγραμμα να αποθηκεύει και να εξάγει το όνομα του μεταγράφου, δηλαδή το ID του. Το χαρακτηριστικό του ID χρησιμοποιήθηκε για ταυτοποίηση των μετρήσεων των mRNAs σε πίνακα εξόδου. Με αυτόν τον τρόπο, προέκυψαν τρία αρχεία txt, ένα για την κάθε συνθήκη.

Τα δεδομένα της ποσοτικοποίησης που προέκυψαν χρησιμοποιήθηκαν για ανάλυση διαφορικής έκφρασης που έγινε με το edgeR v3.34.0 (Robinson et al., 2010), ένα πακέτο λογισμικού Bioconductor που χρησιμοποιείται για μελέτες διαφορικής έκφρασης από επαναλαμβανόμενα δεδομένα μετρήσεων. Με το edgeR είναι δυνατόν να βρεθούν τα διαφορικά εκφρασμένα γονίδια (differentially expressed genes, DEGs). Για τον εντοπισμό διαφορικής έκφρασης το πακέτο χρησιμοποιεί αρνητικά διωνυμικά μοντέλα δουλεύοντας με μήτρες που περιέχουν τα δεδομένα ποσοτικοποίησης (count matrices).

Για το edgeR, αρχικά, δημιουργήθηκαν οι μήτρες που περιείχαν τα ακατέργαστα δεδομένα ποσοτικοποίησης. Έπειτα, δημιουργήθηκε η DGEList, μια λίστα που περιέχει τα αποθηκευμένα δεδομένα και είναι εύκολη στη χρήση, καθώς μπορεί να χειραγωγηθεί όπως οποιαδήποτε λίστα σε περιβάλλον R. Με την εντολή `calcNormFactors` έγινε η κανονικοποίηση των βιβλιοθηκών. Κάποια βασικά βήματα που εκτελούνται από το πρόγραμμα κατά την κανονικοποίηση είναι τα εξής: α) απομακρύνονται τα γονίδια με μηδενικά αναγνώσματα σε όλα τα δείγματα, β) επιλέγεται ένα δείγμα να γίνει το δείγμα αναφοράς και μέσω αυτού κανονικοποιούνται τα υπόλοιπα δείγματα, γ) επιλέγονται τα γονίδια για υπολογισμό παραγόντων κλιμάκωσης, δ) απομακρύνονται τα γονίδια με ακραία προφίλ έκφρασης, ε) μετατρέπεται ο μέσος των τιμών \log_2 των γονιδίων που κρατήθηκαν σε κανονικούς αριθμούς, στ) οι παράγοντες κλιμάκωσης κεντράρονται κοντά στο 1 μετά από διαίρεση του κάθε παράγοντα με τον γεωμετρικό του μέσο. Ακολούθως, με την εντολή `model.matrix` έγινε μοντελοποίηση κατασκευάζοντας το design matrix για τις επακόλουθες στατιστικές αναλύσεις. Ο βιολογικός συντελεστής διακύμανσης (bcv) είναι ο συντελεστής της διακύμανσης της απόλυτης αφθονίας των μεταγράφων ανάμεσα στις επαναλήψεις των RNA δειγμάτων και χρησιμοποιείται για κανονικοποίηση σχετική με το βάθος της αλληλούχησης ανάμεσα στις βιολογικές επαναλήψεις. Επειδή δεν υπήρχαν οι απαραίτητες βιολογικές επαναλήψεις (αν και σε κάθε βιολογική επανάληψη υπήρχε μεγάλο πλήθος τεχνικών επαναλήψεων), η μέθοδος τεστ που επιλέχθηκε ήταν ο έλεγχος λόγου πιθανοτήτων (likelihood ratio tests), καθώς αυτή η μέθοδος ενδείκνυται για χρήση σε απουσία επαναλήψεων, και στο πρόγραμμα ορίστηκε αυθαίρετως μια λογική τιμή διασποράς ίση με 0.2, `bcv <- 0.2`, όπως προτείνεται στις οδηγίες χρήσης του πακέτου για τέτοιες περιπτώσεις. Τα likelihood ratio tests διεξήχθησαν χρησιμοποιώντας τις λειτουργίες: α) `glmFit` (εφαρμογή ενός αρνητικού διωνυμικού γενικευμένου log-γραμμικού μοντέλου στις μετρήσεις των αναγνωσμάτων για κάθε μετάγραφο/γονίδιο), β) `glmLRT` (εκτέλεση τεστ) και γ) `topTags` (δημιουργία λίστας με τα στατιστικώς σημαντικά

διαφορικά σε αφθονία μετάγραφα). Η λίστα των στατιστικά σημαντικών διαφορικών σε αφθονία μεταγράφων επιλέχθηκε με βάση την q-value, η οποία εκφράζει την πιθανότητα η τιμή της p (η οποία τέθηκε: $p\text{-value} \leq 0.05$) να οφείλεται σε τυχαίο γεγονός. Μέσω της q-value υπολογίζεται η διόρθωση ποσοστού ψευδούς ανακάλυψης, ή αλλιώς FDR (False Discovery rate correction), η οποία είναι μια προσαρμοσμένη μορφή της ακατέργαστης p-value και με αυτόν τον τρόπο λαμβάνεται υπόψιν το γεγονός ότι κάθε φορά υπάρχει ένα ποσοστό (5%) το εύρημα να προκύπτει με τυχαίο τρόπο. Με αυτόν τον τρόπο, περικλύονται τα ψευδώς θετικά αποτελέσματα, όπως προκύπτουν τυχαία από τον ορισμό της p-value. Ακολούθησε επιλογή με βάση τον δυαδικό λογάριθμο του εύρους αλλαγής, $\log_2\text{-fold-change}$ (logFC), το οποίο αντιπροσωπεύει τη διαφορά αφθονίας των μεταγράφων στις υπό διερεύνηση συνθήκες σε σχέση με τη συνθήκη control. Επιλέχθηκε $\logFC \leq -1$ και $\logFC \geq 1$, δηλαδή κρατήθηκαν μετάγραφα που η αφθονία τους βρέθηκε τουλάχιστον να υποδιπλασιάζεται ή να διπλασιάζεται αντίστοιχα.

2.1.4. Μετα-ανάλυση και αναζήτηση με βάση την οντολογία

Τα εξαγόμενα από το edgeR αρχεία αξιοποιήθηκαν για συγκρίσεις γονιδιακής οντολογίας με σκοπό να βρεθούν τα μετάγραφα εκείνα που σχετίζονται με μεταβολισμό και ομοιόσταση σιδήρου (iron-related genes). Σε πρώτο βήμα, δημιουργήθηκαν αρχεία που περιείχαν μόνο τα μεταγραφικά IDs από τα εξαγόμενα αρχεία του edgeR. Από αυτά για να επιλεγούν μόνο τα IDs που αντιστοιχούν σε πρωτεΐνες, έγινε σύγκριση με το προβλεπόμενο πρωτέωμα (το σύνολο όλων των πρωτεϊνών) του *L. japonicus* οικότυπος MG20 v3 που προήλθε από τη βάση δεδομένων του Lotus Base (Mun et al., 2016). Τα εξαγόμενα αρχεία FASTA εισήχθησαν στο εργαλείο eggNOG-mapper v2 για λειτουργική αντιστοίχιση ορθολογίας στηριζόμενη στη βάση eggNOG v5.0 (Huerta-Cepas et al., 2019) και χρησιμοποιήθηκαν οι προεπιλεγμένες παράμετροι. Το αρχείο εξαγωγής του eggNOG συγκρίθηκε αρχικά με μεταγραφικά IDs του *L. japonicus* από τη βάση δεδομένων μεταβολικών μονοπατιών για το φυτό LJAPONICUSCYC 3.0.1 (Caspi et al., 2018). Ως λέξεις κλειδιά (keywords) για την εύρεση των οντολογιών που σχετίζονται με τον Fe χρησιμοποιήθηκαν οι λέξεις: iron, ferric, ferrous. Σύγκριση των οντολογιών του eggNOG έγινε και με τις οντολογίες του *L. japonicus* σχετικές με Fe προερχόμενες από τη βάση του Gene Ontology Resource (The Gene Ontology Consortium, 2019), με τελικό σκοπό να απομονωθούν μόνο οι οντολογίες του ενδιαφέροντος. Τα αποτελέσματα από αυτές τις συγκρίσεις αξιοποιήθηκαν για αναζήτηση στο αρχικό αρχείο που προήλθε από το edgeR, με στόχο να ταυτοποιηθούν τα μεταγραφικά IDs που εμφάνισαν διαφορική έκφραση τόσο για τα φυτά με μικρή, όσο και για τα φυτά με μεγάλη μόλυνση από τον FsK, ως είχαν οι πειραματικές συνθήκες. Κάποια μετάγραφα γονιδίων από αυτά που βρέθηκαν επιλέχθηκαν και για τη 2^η φάση των πειραμάτων στο wet lab για να γίνει σύγκριση μέσω σχετικής ποσοτικοποίησης ανάμεσα στις διαφορετικές συνθήκες.

2.1.5. Βιβλιογραφική αναζήτηση πρωτεϊνών και BLASTP

Για την εύρεση των γονιδίων σχετικών με τον σίδηρο που δεν καλύπτονται από τις βάσεις δεδομένων των προηγούμενων βημάτων έγινε βιβλιογραφική αναζήτηση αντίστοιχων γονιδίων-πρωτεϊνών. Από την αναζήτηση βρέθηκαν 52 υποψήφιες πρωτεΐνες του φυτού μοντέλου *Arabidopsis thaliana* (Bashir et al., 2016; Connorton et al., 2017; Liang et al., 2014; Molina et al., 2009; Morrissey et al., 2009). Η αμινοξική αλληλουχία των πρωτεϊνών εκμαιεύτηκε από τη βάση του ncbi και ακολούθησε πρωτεϊνικό BLAST (BLASTP) για το *L. japonicus* οικότυπος MG20 στο Lotus Base, με τις προκαθορισμένες παραμέτρους. Τα μεταγραφικά IDs του φυτού αξιοποιήθηκαν για σύγκριση με το αρχικό αρχείο εξαγωγής του edgeR.

2.2. Wet lab: προετοιμασία βιολογικών δειγμάτων και φαινοτυπικές αναλύσεις

2.2.1. Προετοιμασία εδάφους

Για τα πειράματα στο wet lab, για το έδαφος ανάπτυξης των φυτών δημιουργήθηκε μίγμα χοντρόκοκκης (MIT 2000) και λεπτόκοκκης (yellow silica) άμμου σε αναλογία 3:1. Το μίγμα, αρχικά, πλύθηκε με άπλετο νερό και, έπειτα, τοποθετήθηκε σε φούρνο ξήρανσης στους 100° C για 24 h. Ακολούθησε αποστείρωση στους 121° C για 30 min, για τις ανάγκες της οποίας το ξηρό μίγμα μεταφέρθηκε σε διπλή, ειδική σακούλα. Με το τέλος της αποστείρωσης 280 g εδάφους τοποθετούνταν σε magenta βάρους 270 g.

2.2.2. Προετοιμασία θρεπτικού διαλύματος ανάπτυξης

Για την ανάπτυξη των φυτών παρασκευάστηκε διάλυμα θρεπτικών Hoagland 0,075%. Η σύσταση του διαλύματος φαίνεται στον Πίνακα 2. Για να επιτευχθεί η συνθήκη έλλειψης Fe, με βάση τις ανάγκες του πειράματος, παρασκευάστηκε με την ίδια διαδικασία διάλυμα Hoagland, χωρίς όμως την προσθήκη FeEDTA. Από το εκάστοτε διάλυμα χρησιμοποιήθηκαν 35 ml για το πότισμα του εδάφους σε κάθε magenta box που επρόκειτο να μεγαλώσουν τα φυτά, παρέχοντάς σε αυτά τα απαραίτητα θρεπτικά για την ανάπτυξή τους.

Πίνακας 2. Υλικά παρασκευής για διάλυμα θρεπτικών Hoagland 100%.

Θρεπτικό Hoagland 100%

Διάλυμα	Συγκέντρωση (M)	Όγκος (ml)
MgSO ₄	1	2
KH ₂ PO ₄	1	1
FeEDTA	0.1	1
Microelements	1	1
KNO ₃	5	5
Ca(NO ₃) ₂	5	5
Τελικός όγκος		15

2.2.3. Προετοιμασία σπόρων και φυτών

Σπόροι *L. japonicus*, οικότυπος Gifu, τοποθετήθηκαν σε erpendorfs tubes και μεταφέρθηκαν σε θάλαμο κάθετης νηματικής ροής, ώστε να ελαχιστοποιηθούν οι πιθανές επιμολύνσεις από το γύρω περιβάλλον, όπου έγινε έκχυση 1 ml διαλύματος πυκνού H₂SO₄ σε κάθε erpendorf, με σκοπό τη διάσπαση του εξωτερικού περιβλήματος των σπόρων. Τα erpendorfors τοποθετήθηκαν σε mini shaker για επώαση διάρκειας 15 min. Έγιναν τρεις διαδοχικές εκπλύσεις με ddH₂O και στη συνέχεια, έγινε έκχυση διαλύματος BUF 1, το οποίο αποτελεί μίγμα NaOCl 20% και Tween 20 0,1%. Ακολούθησε συνεχής ανάδευση σε mini shaker για 20 min με σκοπό την απολύμανση των σπόρων. Έπειτα, έγιναν τέσσερις διαδοχικές εκπλύσεις με ddH₂O. Τέλος, έγινε προσθήκη 1 ml ddH₂O στα erpendorfs, επικάλυψη με αλουμινοχαρτο και τοποθέτηση στους 4° C για 48 h. Μετά την επώαση οι σπόροι μεταφέρθηκαν σε θάλαμο κάθετης νηματικής ροής, όπου τοποθετήθηκαν σε τρυβλία με 0,8% water agar για γονιμοποίηση. Τα τρυβλία σφραγίστηκαν με parafilm, καλύφθηκαν με αλουμινοχαρτο, αναποδογυρίστηκαν και τοποθετήθηκαν στους 4° C για 24 h. Με το πέρας αυτών των ωρών, τα τρυβλία μεταφέρθηκαν σε θάλαμο ανάπτυξης (25° C), όπου έμειναν στο σκοτάδι, λόγω κάλυψης από το αλουμινοχαρτο για 72 h. Η μέρα ξεσκεπάσματος των τρυβλίων

ορίστηκε ως την 1^η μέρα ανάπτυξης για τα φυτά. Τα τρυβλία αφέθηκαν στο θάλαμο ανάπτυξης (16 h φως, 8 h σκοτάδι, 22° C) για 8 ημέρες.

2.2.4. Προετοιμασία υγρής καλλιέργειας του *FsK*

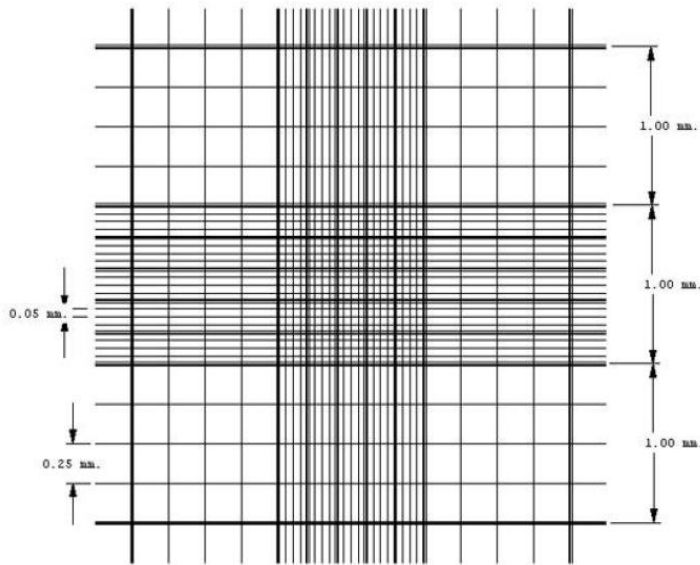
Για την παρασκευή του εμβολίου του *FsK*, κομμάτι από έτοιμες στερεές καλλιέργειες του μύκητα σε Potato Dextrose Agar (PDA) αποσπάστηκε με τη χρήση νυστεριού σε θάλαμο κάθετης νηματικής ροής. Το κομμάτι διαλύθηκε μέσα σε γυάλινη, κωνική φιάλη που περιείχε 100 ml προπαρασκευασμένου Potato Dextrose Broth (PDB). Η φιάλη καλύφθηκε με αλουμινοχαρτο και σφραγίστηκε με parafilm. Για τον πολλαπλασιασμό του μύκητα έγινε επώαση στο σκοτάδι σε επωαστήρα (25° C, 160 rpm) για 4 μέρες.

2.2.5. Συλλογή και μέτρηση κονίδια του *FsK* και προετοιμασία του εμβολίου

Για τη συλλογή των κονίδια του μύκητα ανακτήθηκε η κωνική φιάλη μετά την επώαση των 4 ημερών και σε θάλαμο κάθετης νηματικής ροής έγινε διήθηση του υγρού της καλλιέργειας σε πλαστικό falcon, με τη βοήθεια διηθητικών γαζών. Το διηθητικό μέσο κράτησε τα ογκώδη μέρη της καλλιέργειας του μύκητα, τα μυκήλια, επιτρέποντας τα μικρότερα, και πιο διαλυτά, κονίδια να το διαπεράσουν. Ακολούθησε φυγοκέντρηση του falcon (65.000 rpm, 16° C, 5 min) και απόρριψη του υπερκειμένου. Στο ίζημα, όπου αναμένονταν να βρίσκονται και τα κονίδια, έγινε προσθήκη 5 ml διαλύματος NaCl 0,85% και ξανά φυγοκέντρηση (65.000 rpm, 16° C, 5 min). Τέλος, έγινε άλλη μια προσθήκη 5 ml διαλύματος NaCl 0,85% και το διάλυμα των κονίδια ήταν έτοιμο.

Για την καταμέτρηση των κονίδια του *FsK* αντλήθηκαν 0,5 ml του διαλύματος σε erppendorf σε θάλαμο κάθετης νηματικής ροής. Στο διάλυμα αυτό έγιναν διαδοχικές αραιώσεις 1/10, 1/100, 1/500 σε διάλυμα NaCl 0,85%. Τα κονίδια μετρήθηκαν με τη βοήθεια αιμοκυτταρόμετρου ή, αλλιώς, πλάκας Neubauer (Εικόνα 4) και οπτικού μικροσκοπίου. Με παρατήρηση της πλάκας μετριοούνται τα κονίδια κάθε τετραγώνου και υπολογίζεται ο μέσος όρος αυτών, $\{(68+80+66+73)/4 = 72$ κονίδια, στο πείραμα}. Επίσης, υπολογίζεται ο όγκος των τετραγώνων ($1 \text{ mm} * 1 \text{ mm} * 0,1 \text{ mm} = 0,1 \text{ mm}^3$ ή 10^{-4} ml) και γίνεται αναγωγή του αριθμού των κονίδια από τον όγκο του ενός τετραγώνου (10^{-4} ml) στο 1 ml ($72 * 10^4$ κονίδια/ ml). Έπειτα, η συνολική συγκέντρωση των κονίδια στο συμπυκνωμένο, αρχικό διάλυμα υπολογίζεται πολλαπλασιάζοντας τον αριθμό των κονίδια στο 1 ml με τον συντελεστή αραιώσης Df (500). Έτσι, βρέθηκε ότι η συγκέντρωση των κονίδια για το πείραμα ήταν ίση με $36 * 10^7$ κονίδια / ml.

Η απαιτούμενη συγκέντρωση των κονίδια για τον εμβολιασμό των φυτών του πειράματος ήταν $5 * 10^3$ κονίδια / ml για κάθε φυτό. Με διαδοχικές αραιώσεις του αρχικού, συμπυκνωμένου διαλύματος σε διάλυμα NaCl 0,85%, η συγκέντρωση των κονίδια έγινε ίση με $36 * 10^3$ κονίδια / ml. Ο απαιτούμενος, τελικός όγκος του διαλύματος του εμβολίου για το σύνολο των φυτών ήταν ίσος με 3 ml για τα φυτά του πειράματος που ήταν υπό τη συνθήκη +*FsK*. Επομένως, με βάση τον νόμο της αραιώσης ($C_{\text{αρχικό}} * V_{\text{αρχικό}} = C_{\text{τελικό}} * V_{\text{τελικό}}$) υπολογίστηκε ότι ο όγκος του διαλύματος με τη συγκέντρωση $36 * 10^3$ κονίδια / ml, που έπρεπε να χρησιμοποιηθεί, ήταν ίσος με 0,410 ml. Τα 3 ml συμπληρώθηκαν με την προσθήκη 2,540 ml διαλύματος NaCl 0,85% και το διάλυμα του εμβολίου ήταν έτοιμο.



Εικόνα 4. Απεικόνιση πλάκας Neubauer. Οι μετρήσεις γίνονται στα 16 μικρά τετράγωνα των 4 εξωτερικών τετραγώνων.

2.2.6. Εμβολιασμός των φυτών με *FsK*

Ο εμβολιασμός των φυτών με το διάλυμα των κονίδια του *FsK* πραγματοποιήθηκε τη 10^η μέρα για τα φυτά, 2 μέρες μετά το φύτεμά τους στα magenta boxes. Κάθε φυτό εμβολιάστηκε με 20 μl εμβολίου που περιείχε $5 \cdot 10^3$ κονίδια / ml, δηλαδή κάθε φυτό έλαβε 10^2 κονίδια του *FsK*. Για την άμεση επαφή του μύκητα με τη φυτική ρίζα, το χόμα γύρω από το υπόγειο τμήμα του κάθε φυτού σκαλίζονταν ελαφρώς και ακολουθούσε τοπική έγχυση του εμβολίου.

2.2.7. Συνθήκες ανάπτυξης των φυτών

Οι γονιμοποιημένοι σπόροι λήφθηκαν την 8^η για τα φυτά μέρα από τα τρυβλία και φυτεύτηκαν στα magenta boxes, τα οποία ήταν γεμάτα με το εμπλουτισμένο έδαφος που είχε ετοιμαστεί με το κατάλληλο διάλυμα θρεπτικών (Hoagland +FeEDTA / Hoagland-FeEDTA). Σε κάθε magenta φυτεύονταν τρεις γονιμοποιημένοι σπόροι, δηλαδή τρεις τεχνικές επαναλήψεις, με τη χρήση λαβίδας, καθιστώντας κάθε magenta μία βιολογική επανάληψη. Για κάθε συνθήκη του πειράματος υπήρχαν τέσσερις βιολογικές επαναλήψεις. Οι συνθήκες του πειράματος αποτυπώνονται στον Πίνακα 3. Ο εμβολιασμός των φυτών με τα κονίδια του *FsK* πραγματοποιήθηκε τη 10^η μέρα για τα φυτά, 2 μέρες μετά τη φύτευσή τους στα magenta boxes. Τα φυτά, καθ' όλη τη διάρκεια της ανάπτυξής τους, μεγάλωναν σε θάλαμο ανάπτυξης (16 h φως, 8 h σκοτάδι, 22° C) με κλειστά τα καπάκια των magenta boxes έως τη μέρα της δειγματοληψίας (14 και 40 dpi).

Πίνακας 3. Οι τέσσερις διαφορετικές συνθήκες ανάπτυξης των φυτών. Η διαφοροποίηση έγκειται στην παρουσία ή μη Fe και *FsK*.

<i>Compound</i>	<i>Presence</i>			
Fe	+	+	-	-
<i>FsK</i>	+	-	+	-

2.2.8. Δειγματοληψία και μέτρηση φρέσκου βάρους ρίζας και βλαστού

Οι μέρες δειγματοληψίας ορίστηκαν στις 14 dpi και 40 dpi με πανομοιότυπες διαδικασίες. Αρχικά, γινόταν προσεκτικό σκάλισμα του εδάφους και αφαίρεση των φυτών από τα magenta boxes με τη χρήση λαβίδας. Τα φυτά τοποθετούνταν σε πλαστικά αριθμημένα falcons γεμάτα με dH₂O, (όλα τα φυτά του κάθε magenta, της κάθε βιολογικής επανάληψης, στο δικό τους κοινό falcon, αποτελώντας κοινό δείγμα). Στη συνέχεια, γινόταν προσεκτικό ξέπλυμα των φυτών, και ιδιαιτέρως των περιοχών της ρίζας, σε ποτήρι ζέσεως dH₂O και σε ποτήρι ζέσεως διαλύματος χλωρίνης για 1 min, ώστε να καθαριστεί η άμμος και να αποστειρωθεί η εξωτερική επιφάνεια της ρίζας, αντίστοιχα. Ακολούθως, γινόταν τομή με νυστέρι στο επίπεδο του υποκοτυλίου, ώστε να διαχωρίζονται το υπόγειο (ρίζα) από το υπέργειο τμήμα (βλαστός) του φυτού. Τα δείγματα τοποθετούνταν σε αριθμημένα erpendorfs tubes.

Σε κάθε βιολογική επανάληψη γινόταν ζύγισμα του φρέσκου βάρους ρίζας και βλαστού σε ζυγαριά ακριβείας. Τα φυτικά δείγματα μεταφέρονταν μετά το ζύγισμα σε υγρό N₂ και από εκεί σε σακούλες αποθήκευσης για τους -80° C, για την καλύτερη διατήρησή τους και αξιοποίηση σε μετέπειτα μελέτες.

2.2.9. Στατιστική ανάλυση φρέσκων βαρών

Τα αποτελέσματα των μετρήσεων των βαρών υποβλήθηκαν σε διπλή ανάλυση διακύμανσης ANOVA (two-way ANOVA), ώστε να βρεθεί η επίδραση του Fe συνδυαστικά με τον FsK στην ανάπτυξη των φυτών, με μηδενική υπόθεση ότι όλα τα δείγματα προέρχονται από πληθυσμούς με την ίδια μέση τιμή στις μετρήσεις των βαρών και με την εξαρτημένη μεταβλητή να ακολουθεί κανονική κατανομή. Η ανάλυση και τα διαγράμματα έγιναν σε περιβάλλον R. Στα δείγματα των 40 dpi, χάθηκε μία βιολογική επανάληψη στη συνθήκη -Fe / -FsK, αλλά και δύο επαναλήψεις στη συνθήκη -Fe / +FsK, καθώς τα φυτά εκείνων των δειγμάτων δεν επιβίωσαν. Τα εναπομείναντα φυτά, ωστόσο, αυτών των συνθηκών χρησιμοποιήθηκαν για τις μετρήσεις. Κατά την ανάλυση κάποιες ακραίες τιμές μέτρησης απομακρύνθηκαν, όπου ήταν δυνατόν λόγω της ύπαρξης επιπλέον βιολογικών επαναλήψεων. Όλα τα αποτελέσματα εκφράστηκαν ως τη μέση τιμή ± τυπική απόκλιση, ενώ η τιμή $p \leq 0,05$ θεωρήθηκε στατιστικά σημαντική. Δεν ακολουθήθηκαν Tukey's post hoc tests, με σκοπό την πολλαπλή ένα προς ένα σύγκριση των διαγραμμάτων, καθώς η ANOVA δεν ήταν στατιστικά σημαντική.

2.2.10. Προσδιορισμός pH εδάφους

Για τον προσδιορισμό του pH του εδάφους που αντιστοιχούσε σε κάθε δείγμα έγινε λήψη 5 g άμμου από το κάθε magenta και μεταφορά σε αριθμημένο falcon. Ακολούθησε ολονύκτια ξήρανση της άμμου στους 37° C και προσθήκη ddH₂O μετά την ξήρανση, έως ότου ο συνολικός όγκος να γίνει ίσος με 25 ml. Το δείγμα εδάφους δεχόταν ανακίνηση από shaker για 30 min και, αμέσως μετά, γινόταν η μέτρηση του pH με ειδικό πεχάμετρο.

2.3. Μοριακές αναλύσεις δειγμάτων

2.3.1. Εξαγωγή συνολικού RNA

Για να εξαχθεί το συνολικό RNA από τα δείγματα ριζών των φυτών (RNA extraction) ακολουθήθηκε το πρωτόκολλο των Brusslan και Tobin για το *A. thaliana* (Brusslan & Tobin, 1992).

2.3.2. Ποσοτικοποίηση συνολικού RNA

Η ποσοτικοποίηση του συνολικού RNA των δειγμάτων της ρίζας γινόταν με τη μέθοδο του NanoDrop Microvolume Quantitation of Nucleic Acids (Desjardins & Conklin, 2010), σύμφωνα με τις οδηγίες του παρασκευαστή.

2.3.3. Ανίχνευση αποικισμού του *FsK* στις ρίζες και σχετική ποσοτικοποίηση των γονιδίων που σχετίζονται με τον σίδηρο μέσω RT-qPCR

Για την επιβεβαίωση αποικισμού του *FsK* στις ρίζες των μολυσμένων από το εμβόλιο φυτών, αλλά και για σχετική σύγκριση των επιπέδων έκφρασης των επιλεγμένων γονιδίων που σχετίζονται με τον σίδηρο μεταξύ των δειγμάτων πραγματοποιήθηκε One Step RT-qPCR. Το ολικό RNA που είχε προηγουμένως απομονωθεί υποβλήθηκε σε επεξεργασία με DNase προκειμένου να απομακρυνθούν τυχόν υπολείμματα γενωμικού DNA και να αποκτηθεί όσο το δυνατόν καθαρότερο RNA. Η κατεργασία έγινε με το kit DNase I, RNase-free της Thermo Fisher Scientific, σύμφωνα με τις οδηγίες του παρασκευαστή. Η One Step RT-qPCR έγινε με το kit της Luna Universal One-Step RT-qPCR της Thermo Fisher Scientific, σύμφωνα και πάλι με τις οδηγίες του παρασκευαστή. Η ποσότητα RNA που χρησιμοποιήθηκε ήταν 10 ng δείγματος και ο τελικός όγκος για την αντίδραση ανάγονταν στα 10 μl. Οι παράμετροι της αντίδρασης αποτελούνταν από επώαση στους 55°C για 10 min για αντίστροφη μεταγραφή (σύνθεση cDNA), 95°C για 1 min και εν συνεχεία από κύκλους των 95°C για 10 sec και 60°C για 30 sec (ενίσχυση). Η ανάλυση έγινε όπως περιγράφεται στο (Delis et al., 2011) χρησιμοποιώντας το μετάγραφο του γονιδίου της ουβικιτίνης ως γονίδιο αναφοράς.

2.3.4. Στατιστική ανάλυση αποτελεσμάτων RT-qPCR

Τα αποτελέσματα της RT-qPCR για τα γονίδια που σχετίζονται με τον σίδηρο υποβλήθηκαν σε two-way ANOVA μέσω του πακέτου λογισμικού SPSS, ακολουθούμενη από Tukey's post-hoc test. Η εξαρτημένη μεταβλητή ακολουθεί κανονική κατανομή. Όλα τα αποτελέσματα εκφράστηκαν ως τη μέση τιμή ± τυπική απόκλιση, ενώ η τιμή $p \leq 0,05$ θεωρήθηκε στατιστικά σημαντική.

2.3.5. Κατασκευή εκκινητών για RT-qPCR

Για την επιβεβαίωση αποικισμού του *FsK* χρησιμοποιήθηκαν εκκινητές που στοχεύουν στην συντηρημένη ITS αλληλουχία του μύκητα. Οι αλληλουχίες αυτών, αλλά και των εκκινητών που κατασκευάστηκαν για τα μετάγραφα που σχετίζονται με τον σίδηρο, εκείνα που βρέθηκαν από την ανάλυση RNA-seq, και θα εξετάζονταν μέσω RT-qPCR, φαίνονται στον Πίνακα 4.

Πίνακας 4. Οι εκκινητές για τα μετάγραφα που βρέθηκαν από την ανάλυση του RNA-Seq και χρησιμοποιήθηκαν για σχετική ποσοτικοποίηση στις ρίζες του *L. japonicus*.

Transcript ID	Forward primer (5'→3')	Reverse primer (5'→3')
ITS	TAGGGTAGCTGGGTCTGACT	ACCAAGTCTAACCCGCCTAC
Lj4g3v2251430.1	CTGGAGATGGTGTGAAGCTAACC	CCTACCAGCAGATACAAGGACAAC
Lj1g3v0250170.1	CCTCGCATTCAGAGTTTCGC	GAAGGAAGAGGCGGCTACAAC
Lj0g3v0217659.1	AATCAGGACACCAACTGGATAGC	AGAACGAGAGCAGACATGACAATC

Για επιπλέον αναζήτηση γονιδίων που σχετίζονται με σίδηρο που ανήκουν στα DEGs μεταξύ των συνθηκών του πειράματος, επιλέχθηκαν από τη βιβλιογραφία τα μετάγραφα *FRO1* (Camprestre et al., 2016), *MYB10* (Palmer et al., 2013) και *FIT* (Wu & Ling, 2019). Οι αλληλουχίες των εκκινητών τους φαίνονται στον παρακάτω πίνακα:

Πίνακας 5. Οι εκκινητές των γονιδίων που επιλέχθηκαν βιβλιογραφικά για σχετική ποσοτικοποίηση στις ρίζες του *L. japonicus*.

<i>Gene's transcript</i>	<i>Forward primer (5'→3')</i>	<i>Reverse primer (5'→3')</i>
FRO1	TGGTGAGTGGAGGAAGTG	TAGCATTGACAGAGATGAAGA
MYB10	CAATGACAGACAAAATTGAGC	GCTTGAGTTCAAGATACTTGA
FIT	AACAGAATCAGAATCTAGCG	CCATTCAAAATGTCAGAATTG

3. Αποτελέσματα

3.1. Αποτελέσματα RNA-Seq και μετααναλύσεων

3.1.1. Πειραματικός σχεδιασμός RNA-Seq

Για να βρεθούν τα γονίδια σιδήρου του *L. jaronicus* που παρουσιάζουν μεταβαλλόμενα προφίλ έκφρασης παρουσία του FsK (σε φυσιολογικά επίπεδα Fe στο έδαφος), αξιοποιήθηκαν ακατέργαστα δεδομένα από RNA-Seq, προηγούμενων πειραμάτων του εργαστηρίου. Τα δείγματα RNA αφορούσαν τρεις διαφορετικές συνθήκες: φυτά *L. jaronicus* χωρίς παρουσία του μύκητα (control συνθήκη), φυτά *L. jaronicus* στις 3 dpi με χαμηλά ποσοστά αποικισμού του FsK στις ρίζες και φυτά *L. jaronicus* 3 dpi με υψηλά ποσοστά αποικισμού του FsK στις ρίζες. Τα ακατέργαστα δεδομένα που προέκυψαν από την αλληλούχηση πέρασαν από επεξεργασία προκειμένου να εξαχθεί βιολογική πληροφορία. Τα κύρια σημεία της ροής του πειράματος περιγράφονται συνοπτικά στο Διάγραμμα 1, της προηγούμενης ενότητας.

3.1.2. Ο FsK αλλάζει τα προφίλ έκφρασης γονιδίων σχετικών με Fe στις 3 dpi

Για την επεξεργασία των ακατέργαστων δεδομένων της αλληλούχησης πραγματοποιήθηκε αρχικά έλεγχος ποιότητας και απομάκρυνση των χαμηλής ποιότητας βάσεων, όπως και απομάκρυνση των αλληλουχιών των εκκινητών με χρήση του Trimmomatic. Στη συνέχεια, με το λογισμικό STAR έγινε ευθυγράμμιση των αλληλουχιών των μεταγράφων πάνω στο γονιδίωμα του *L. jaronicus*, οικότυπος MG20, και ακολούθησε ποσοτικοποίηση της γονιδιακής έκφρασης με το λογισμικό του HTSeq. Τα δεδομένα της ποσοτικοποίησης υπέστησαν κανονικοποίηση και στατιστική ανάλυση μέσω του edgeR, ώστε να προκύψει η λίστα με τα διαφορικά σε αφθονία μετάγραφα για τις συνθήκες με τα υψηλά και χαμηλά επίπεδα αποικισμού του μύκητα.

Με αυτόν τον τρόπο, βρέθηκαν 109 στατιστικώς σημαντικά μετάγραφα, για τα οποία η αφθονία τους τουλάχιστον υποδιπλασιάζεται ή διπλασιάζεται σε συνθήκες υψηλού αποικισμού του FsK σε σχέση με τη συνθήκη control, όπως επίσης 97 μετάγραφα για τα οποία η αφθονία τους τουλάχιστον υποδιπλασιάζεται ή διπλασιάζεται σε συνθήκες χαμηλού αποικισμού του FsK. Τα IDs των μεταγράφων που εντοπίστηκαν μέσω του edgeR συγκρίθηκαν με το προβλεπόμενο πρωτέωμα του *L. jaronicus*, οικότυπος MG20, με σκοπό την επιλογή των IDs που αντιστοιχούν σε πρωτεΐνες και ακολούθησε λειτουργική αντιστοίχιση αυτών με οντολογίες στο eggNOG-mapper.

Για να βρεθούν από την λίστα των IDs τα μετάγραφα που σχετίζονται με τον σίδηρο που παράγονται διαφορικά, έγιναν σε πρώτο βήμα συγκρίσεις με βάση την οντολογία του φυτού (επιλέχθηκαν οντολογίες σχετικές με τον σίδηρο, keywords: iron, ferric, ferrous). Σύγκριση με δεδομένα της βάσης LJAPONICUSCYC έδωσαν ως αποτέλεσμα ένα μετάγραφο, έναν μεταφορέα ψευδαργύρου που μειορρυθμίζεται και στις δύο συνθήκες αποικισμού του FsK (Πίνακας 6). Μια ακόμα σύγκριση οντολογίας, με δεδομένα της βάσης Gene Ontology Resource έδωσαν ως αποτέλεσμα έξι μεταγραφικά IDs (Πίνακας 7).

Πίνακας 6. Μετάγραφα που σχετίζονται με σίδηρο μετά από συγκρίσεις γονιδιακής οντολογίας με δεδομένα της βάσης LJAPONICUSCYC.

Transcript ID	Annotation	logFC in high levels of FsK colonization	logFC in low levels of FsK colonization
Lj1g3v1785980.1	Zinc transporter 4	-1.4	-2.1

Πίνακας 7. Μετάγραφα που σχετίζονται με τον σίδηρο από συγκρίσεις γονιδιακής οντολογίας με δεδομένα της βάσης Gene Ontology Resource.

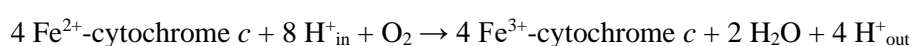
Transcript ID	Annotation	logFC high levels of FsK colonization	logFC low levels of FsK colonization
Lj1g3v1785980.1	Zinc transporter 4	-1.4	-2.1
Lj4g3v2251430.1	Dihydrolipoyl dehydrogenase	-2.7	1.3
Lj3g3v0840550.1	ADP,ATP carrier protein 1, mitochondrial-like	-2.9	-
Lj1g3v0250170.1	Cytochrome c oxidase subunit 6b-1-like	-6.0	1.4
Lj0g3v0217659.1	Casparian strip membrane protein 1-like	-6.4	-6.4

Στα αποτελέσματα και δεύτερης σύγκρισης περιέχεται ξανά ο ίδιος μεταφορέας ψευδαργύρου. Μεταφορείς ψευδαργύρου συχνά είναι ικανοί να μεταφέρουν σίδηρο και η γονιδιακή τους έκφραση είναι δυνατόν να επαχθεί κάτω από συνθήκες έλλειψης Fe (Guerinot, 2000; Lee et al., 2010).

Ένα άλλο mRNA που βρέθηκε, αντιστοιχεί σε μετάγραφο για την διυδρολιποϋλο-αφυδρογονάση, η οποία αποτελεί συστατικό του συμπλόκου της πλαστιδικής πυροσταφυλικής αφυδρογονάσης (PDC). Το PDC είναι ένα πολυενζυμικό σύμπλοκο που καταλύει την οξειδωτική αποκαρβοξυλίωση του πυροσταφυλικού οξέος για να δώσει ακετυλο-CoA και NADH (Tovar-Méndez et al., 2003). Η διυδρολιποϋλο-αφυδρογονάση, μεταξύ άλλων, βρίσκεται στα μιτοχόνδρια της ρίζας και έχει δείξει ότι σε συνθήκες έλλειψης Fe είναι δυνατόν να υπάρξει αύξηση της έκφρασής της, σε μελέτες που έγιναν στο φυτό του αγγουριού (Vigani et al., 2017). Σε χαμηλά επίπεδα αποικισμού του FsK η αφυδρογονάση εμφανίζει αυξημένη έκφραση, ενώ σε υψηλά επίπεδα μειωμένη.

Ένα άλλο μετάγραφο, και κατ' επέκταση γονίδιο που βρέθηκε μειορυθμιζόμενο μόνο σε παρουσία υψηλού βαθμού αποικισμού του FsK ήταν ένα γονίδιο που κωδικοποιεί για πρωτεΐνη μέλος της οικογένειας των μιτοχονδριακών μεταφορέων TC 2.A.29, η ADP, ATP carrier protein 1, mitochondrial-like. Στην οικογένεια μιτοχονδριακών μεταφορέων (mitochondrial carrier family, MCF) ανήκουν πρωτεΐνες που καταλύουν την ειδική μεταφορά διαφόρων υποστρωμάτων, όπως νουκλεοτίδια, αμινοξέα, δικαρβοξυλικά, συμπάραγοντες, φωσφορικά ή H⁺, ενώ κάποιες από αυτές σχετίζονται με την μεταφορά σιδήρου σε πλαστίδια και μιτοχόνδρια (Haferkamp & Schmitz-Esser, 2012).

Το μετάγραφο για την 6B-1-like υπομονάδα της οξειδάσης του κυτοχρώματος c βρέθηκε σε μειωμένη αφθονία παρουσία υψηλού αποικισμού του FsK και σε μεγάλη αφθονία παρουσία χαμηλού αποικισμού. Η οξειδάση του κυτοχρώματος c είναι ένα ολιγομερές ενζυμικό σύμπλοκο που βρίσκεται στην εσωτερική μεμβράνη των μιτοχονδρίων. Το ένζυμο είναι ο τελευταίος δέκτης ηλεκτρονίων στην αναπνευστική αλυσίδα και εμπλέκεται στην αναγωγή του O₂ σε H₂O (Mansilla et al., 2018). Για αυτήν την αναγωγή αξιοποιεί τον ανηγμένο σίδηρο σύμφωνα με την αντίδραση που φαίνεται παρακάτω (Voet, 2013):



Το τελευταίο μετάγραφο είναι μιας πρωτεΐνης της λωρίδας Casparian, της Casparian strip membrane protein 1-like (CASPL). Οι λωρίδες Casparian βρίσκονται στην ενδοδερμίδα της ρίζας και αποτελούν τροποποίηση του κυτταρικού τοιχώματος δημιουργώντας έναν αποπλαστικό φραγμό που εμποδίζει την πλευρική διάχυση. Αυτός ο φραγμός ο οποίος συνίσταται από ένα

αδιάβροχο στρώμα λιγνίνης, μεταξύ άλλων αναγκάζει όλο τον σίδηρο να περάσει στον συμπλάστη (Connorton et al., 2017). Οι CASPLs απαιτούνται για την εγκαθίδρυση της μεμβρανικής επικράτειας της λωρίδας Casparian και τον επακόλουθο σχηματισμό των λωρίδων. Μη φυσιολογικός σχηματισμός των λωρίδων μπορεί να οδηγήσει σε έλλειψη Fe στους βλαστούς (Wang et al., 2019). Επίσης, κάποιες CASPLs είναι σιδηρο-θειο-πρωτεΐνες, περιέχοντας ένα σύμπλοκο 4Fe-4S (Gaudet et al., 2011). Το μετάγραφο αυτού του γονιδίου είναι μειωμένο σε αφθονία και στις δυο συνθήκες.

Από τα αποτελέσματα των αναλύσεων φαίνεται ότι ο αποικισμός με FsK προκαλεί αλλαγές στη γονιδιακή ρύθμιση του *L. japonicus* στις 3 dpi, αλλάζοντας, μεταξύ άλλων, τα προφίλ έκφρασης πέντε γονιδίων που σχετίζονται με σίδηρο και μάλιστα τα επίπεδα του αποικισμού επάγουν και διαφορετικά πρότυπα έκφρασης.

Πέρα από τα γονίδια που βρέθηκαν μέσω του RNA-Seq, έγινε επιπλέον αναζήτηση με βάση τη βιβλιογραφία για να βρεθούν επιπλέον γονίδια σχετικά με τον σίδηρο που πιθανώς να υπάρχουν στη λίστα αποτελεσμάτων των IDs από τις αναλύσεις του RNA-Seq. Από την αναζήτηση επιλέχθηκαν 52 υποψήφιες πρωτεΐνες του φυτού-μοντέλου *A. thaliana*, οι οποίες παρατίθενται στον Πίνακα 8. Με βάση την αμινοξική τους αλληλουχία έγινε BLASTP για αντιστοίχιση με το πρωτέωμα του *L. japonicus*. Ωστόσο, από την τελική σύγκριση με τα IDs που προέκυψαν από το RNA-Seq, δεν εντοπίστηκε κανένα μετάγραφο που να εμφανίζει διαφορές στην αφθονία του μεταξύ των συνθηκών.

Πίνακας 8. Γονίδια σιδήρου του *A. thaliana* και η αντιστοίχισή τους με μετάγραφο του *L. japonicus*.

Gene from <i>A. thaliana</i>	Publication	Transcript ID in <i>L. japonicus</i>
<i>IRT2</i>	(Bashir et al., 2016)	Lj4g3v1428550.1
<i>FRO3</i>	(Bashir et al., 2016)	Lj0g3v0268429.1
<i>ATM3</i>	(Bashir et al., 2016)	Lj0g3v0068559.2
<i>FIT</i>	(Bashir et al., 2016)	Lj3g3v1113460.1
<i>IRT1</i>	(Bashir et al., 2016)	Lj4g3v1428550.1
<i>MTP3</i>	(Bashir et al., 2016)	Lj1g3v5060700.1
<i>MTP8</i>	(Bashir et al., 2016)	Lj2g3v2448190.1
<i>CAX2</i>	(Bashir et al., 2016)	Lj6g3v0658950.1
<i>ZIF1</i>	(Bashir et al., 2016)	Lj6g3v1052420.2
<i>YSL4</i>	(Bashir et al., 2016)	Lj1g3v3847260.1
<i>YSL6</i>	(Bashir et al., 2016)	Lj1g3v3847260.1
<i>NRAMP3</i>	(Bashir et al., 2016)	Lj2g3v1925820.1
<i>NRAMP4</i>	(Bashir et al., 2016)	Lj2g3v1925820.1
<i>VTL1</i>	(Bashir et al., 2016)	Lj0g3v0329079.1
<i>VTL2</i>	(Bashir et al., 2016)	Lj5g3v1954050.1
<i>VTL5</i>	(Bashir et al., 2016)	Lj4g3v0336390.1
<i>FPN2</i>	(Bashir et al., 2016)	Lj3g3v1393700.3
<i>IREG1</i>	(Morrissey et al., 2009)	Lj3g3v1393700.3
<i>NAS3</i>	(Connorton et al., 2017)	Lj1g3v4790630.1
<i>NRAMP1</i>	(Connorton et al., 2017)	Lj0g3v0120889.1
<i>YSL2</i>	(Connorton et al., 2017)	Lj5g3v1249840.1
<i>FRO2</i>	(Connorton et al., 2017)	Lj0g3v0268429.1

<i>YSL15</i>	(Connorton et al., 2017)	Lj5g3v1249840.1
<i>TOM1</i>	(Connorton et al., 2017)	Lj6g3v1879850.1
<i>P450 CYP86B1</i>	(Molina et al., 2009)	Lj3g3v3513760.1
<i>NFS1</i>	(Liang et al., 2014)	Lj2g3v1984080.1
<i>ISU1</i>	(Liang et al., 2014)	Lj0g3v0033799.1
<i>ISU2</i>	(Liang et al., 2014)	Lj4g3v1477220.1
<i>ISU3</i>	(Liang et al., 2014)	Lj4g3v1477220.1
<i>ISA1</i>	(Liang et al., 2014)	Lj4g3v3015110.2
<i>ISA2</i>	(Liang et al., 2014)	Lj0g3v0304069.1
<i>ISA3</i>	(Liang et al., 2014)	Lj1g3v1525840.1
<i>NFU4</i>	(Liang et al., 2014)	Lj5g3v2289000.1
<i>NFU5</i>	(Liang et al., 2014)	Lj5g3v2289000.1
<i>ADX1</i>	(Liang et al., 2014)	Lj4g3v3096070.1
<i>ADX2</i>	(Liang et al., 2014)	Lj4g3v3096070.1
<i>ADXR</i>	(Liang et al., 2014)	Lj4g3v3060470.2
<i>FH</i>	(Liang et al., 2014)	Lj1g3v4012760.2
<i>HSCA1</i>	(Liang et al., 2014)	Lj6g3v2192100.1
<i>HSCA2</i>	(Liang et al., 2014)	Lj6g3v2192100.1
<i>HSCB</i>	(Liang et al., 2014)	Lj1g3v2184160.2
<i>INDL</i>	(Liang et al., 2014)	Lj5g3v1037130.1
<i>IBA57</i>	(Liang et al., 2014)	Lj2g3v2002580.1
<i>GRXS15</i>	(Liang et al., 2014)	Lj3g3v2225750.3
<i>ERV1</i>	(Liang et al., 2014)	Lj4g3v1614530.1
<i>NARI</i>	(Liang et al., 2014)	Lj4g3v0119750.1
<i>NBP35</i>	(Liang et al., 2014)	Lj2g3v2256360.1
<i>TAH18</i>	(Liang et al., 2014)	Lj1g3v3328750.2
<i>DRE2</i>	(Liang et al., 2014)	Lj1g3v2546350.1
<i>CIA1</i>	(Liang et al., 2014)	Lj1g3v4717280.1
<i>CIA2</i>	(Liang et al., 2014)	Lj2g3v1757320.1
<i>MMS19</i>	(Liang et al., 2014)	Lj0g3v0257549.2

3.2. Πειραματικά αποτελέσματα

3.2.1. Φαινοτυπικές διαφορές και διαφορές στο pH

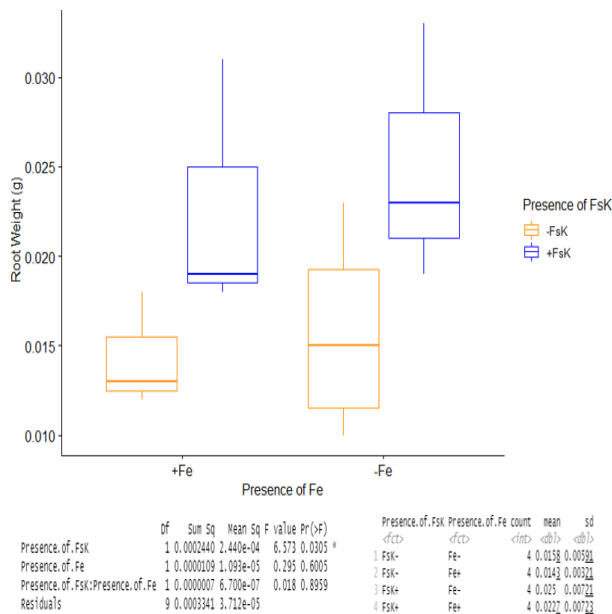
Στο εργαστηριακό κομμάτι, στήθηκαν τέσσερις διαφορετικές πειραματικές συνθήκες ανάπτυξης των φυτών *L. japonicus*, όπου διέφερε μεταξύ τους η παρουσία/απουσία του Fe και του FsK (Πίνακας 2). Μετρήθηκε και το βάρος ρίζας και βλαστού των φυτών, αλλά και το pH του εδάφους. Σκοπός ήταν η πιο γενικευμένη μελέτη τη επίδρασης του FsK σε παρουσία και έλλειψη Fe.

Σε πρώτο βήμα, έγινε μέτρηση του φρέσκου βάρους ρίζας και βλαστού των φυτών μετά από δειγματοληψία στις 14 dpi και 40 dpi και ακολούθησε στατιστική επεξεργασία των τιμών βλαστητικής ανάπτυξης (two-way ANOVA). Κάποια φυτά κατά την πειραματική διαδικασία νεκρώθηκαν (απουσία μίας βιολογικής επανάληψης στη συνθήκη -Fe / -FsK και δύο στη συνθήκη -Fe / +FsK), ενώ από τα εναπομείναντα δεδομένα ακραίες τιμές απομακρύνθηκαν, όπου ήταν δυνατόν. Τα διαγράμματα με τις μετρήσεις και τα αποτελέσματα παρατίθενται παρακάτω (Διαγράμματα 2-5). Δεν προέκυψε στατιστική σημαντικότητα στην αλληλεπίδραση του FsK με τον Fe ($p > 0,05$). Ο αποκρισμός του FsK στα φυτικά δείγματα των 14 και των 40 dpi φάνηκε να έχει

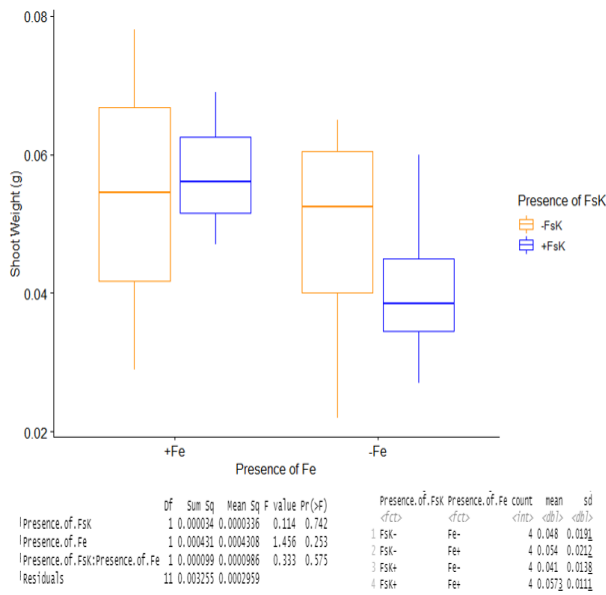
στατιστικά σημαντική επίδραση στο βάρος της ρίζας ($p=0,0305$ και $p=0,036$ αντίστοιχα), αυξάνοντας το σε σχέση με φυτά που αναπτύχθηκαν απουσία του ενδοφυτικού μύκητα (-FsK).

Σε δεύτερο βήμα, έγινε μέτρηση του pH του εδάφους ανάπτυξης των φυτών μετά τις δειγματοληψίες των 14 και 40 dpi για να ερευνηθεί κατά πόσο ο FsK είναι ικανός να τροποποιήσει το pH του εδάφους στις συνθήκες έλλειψης του Fe, προωθώντας την καλύτερη απορρόφηση του στοιχείου (Διαγράμματα 6-7).

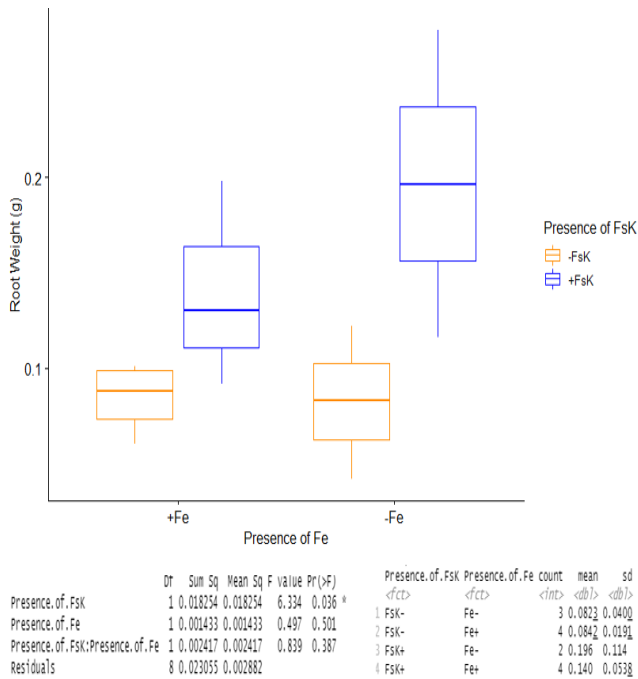
Από τις μετρήσεις του pH δεν προκύπτει ότι υπάρχουν στατιστικά σημαντικές διαφορές με την παρουσία / απουσία του FsK στο pH του εδάφους. Επίσης, κατά τις 40 dpi σημειώνεται σε όλες τις συνθήκες αύξηση του pH σε σχέση με τις 14 dpi.



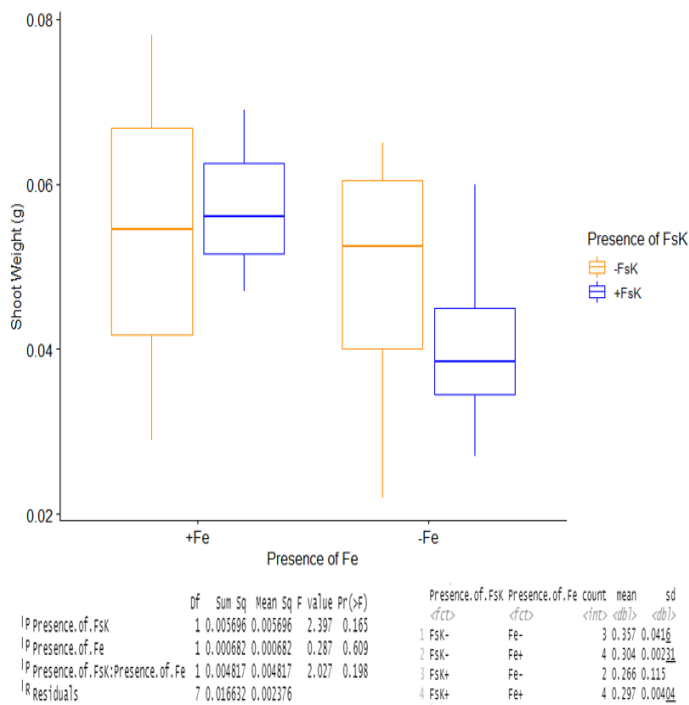
Διάγραμμα 2. Απεικόνιση σε box plots του βάρους της ρίζας σε σχέση με την παρουσία Fe και FsK στις 14 dpi. Στον άξονα των x απεικονίζεται η παρουσία ή μη του Fe σε συνάρτηση με τις μέσες τιμές των βαρών σε g στον άξονα των y. Η παρουσία ή μη του FsK αποτυπώνεται από τα χρώματα των box plots (πορτοκαλί-απουσία, μπλε-παρουσία του FsK). Κάτω στο διάγραμμα φαίνεται η στατιστική σημαντικότητα της ANOVA και οι μέσες τιμές και οι τιμές των τυπικών αποκλίσεων. (+Fe / -FsK ; n=3, +Fe / +FsK ; n=3, - Fe / - FsK ; n=4, -Fe / +FsK ; n=3). **Στατιστικά σημαντική επίδραση της παρουσίας του FsK στα βάρη των ριζών ($p=0,0305$).**



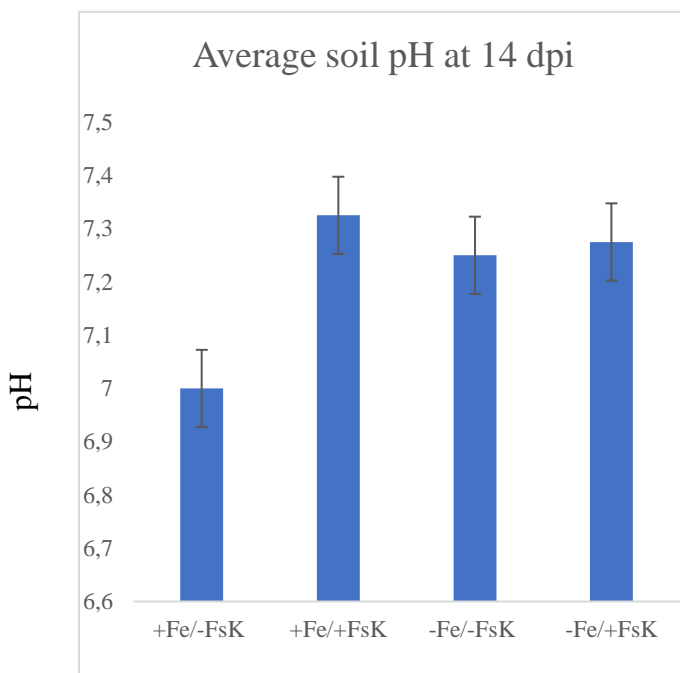
Διάγραμμα 3. Απεικόνιση σε box plots του βάρους του βλαστού σε σχέση με την παρουσία Fe και FsK στις 14 dpi. Στον άξονα των x απεικονίζεται η παρουσία ή μη του Fe σε συνάρτηση με τις μέσες τιμές των βαρών σε g στον άξονα των y. Η παρουσία ή μη του FsK αποτυπώνεται από τα χρώματα των box plots (πορτοκαλί-απουσία, μπλε-παρουσία του FsK). Κάτω στο διάγραμμα φαίνεται η στατιστική σημαντικότητα της ANOVA και οι μέσες τιμές και οι τιμές των τυπικών αποκλίσεων. (+Fe / -FsK ; n=4, +Fe / +FsK ; n=3, - Fe / - FsK ; n=4, -Fe / +FsK ; n=4). **Μη στατιστικά σημαντικά αποτελέσματα.**



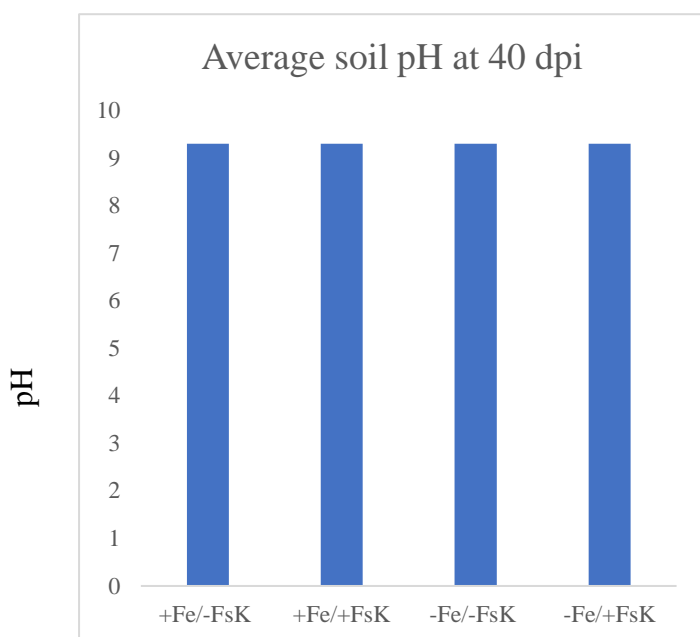
Διάγραμμα 4. Απεικόνιση σε box plots του βάρους της ρίζας σε σχέση με την παρουσία Fe και FsK στις 40 dpi. Στον άξονα των x απεικονίζεται η παρουσία ή μη του Fe σε συνάρτηση με τις μέσες τιμές των βαρών σε g στον άξονα των y. Η παρουσία ή μη του FsK αποτυπώνεται από τα χρώματα των box plots (πορτοκαλί-απουσία, μπλε-παρουσία του FsK). Κάτω στο διάγραμμα φαίνεται η στατιστική σημαντικότητα της ANOVA και οι μέσες τιμές και οι τιμές των τυπικών αποκλίσεων. (+Fe / -FsK ; n=4, +Fe / +FsK ; n=3, - Fe / - FsK ; n=3, -Fe / +FsK ; n=2). **Στατιστικά σημαντική επίδραση του FsK στα βάρη των ριζών (p=0,036).**



Διάγραμμα 5. Απεικόνιση σε box plots του βάρους του βλαστού σε σχέση με την παρουσία Fe και FsK στις 40 dpi. Στον άξονα των x απεικονίζεται η παρουσία ή μη του Fe σε συνάρτηση με τις μέσες τιμές των βαρών σε g στον άξονα των y. Η παρουσία ή μη του FsK αποτυπώνεται από τα χρώματα των box plots (πορτοκαλί-απουσία, μπλε-παρουσία του FsK). Κάτω στο διάγραμμα φαίνεται η στατιστική σημαντικότητα της ANOVA και οι μέσες τιμές και οι τιμές των τυπικών αποκλίσεων. (+Fe / -FsK ; n=3, +Fe / +FsK ; n=3, -Fe / -FsK ; n=3, -Fe / +FsK ; n=2). **Μη στατιστικά σημαντικά αποτελέσματα.**



Διάγραμμα 6. Απεικόνιση σε ιστόγραμμα των τιμών pH σε σχέση με την παρουσία Fe και FsK στις 14 dpi. **Μη στατιστικά σημαντικά αποτελέσματα.**



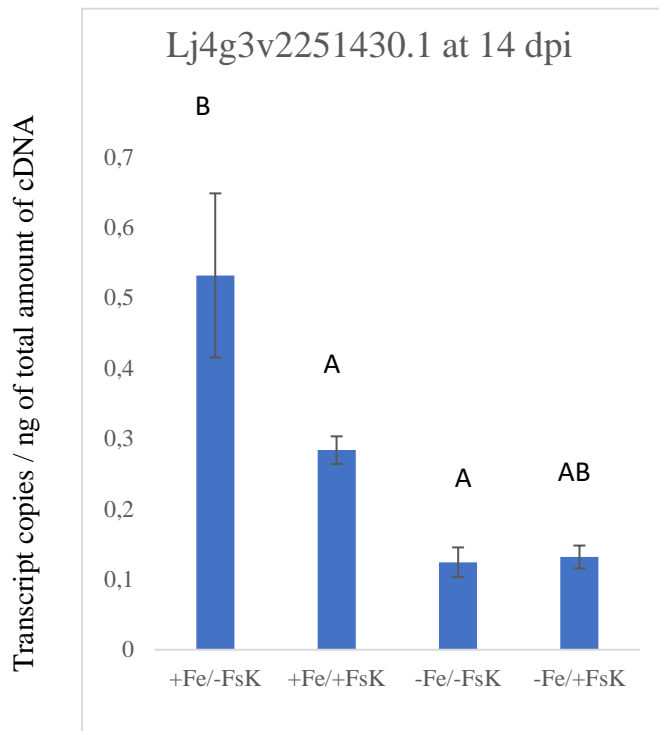
Διάγραμμα 7. Απεικόνιση σε ιστόγραμμα των τιμών pH σε σχέση με την παρουσία Fe και FsK στις 40 dpi. **Μη στατιστικά σημαντικά αποτελέσματα.**

3.2.2. Ο FsK αλλάζει τα προφίλ έκφρασης γονιδίων σχετικών με Fe στις 14 και 40 dpi

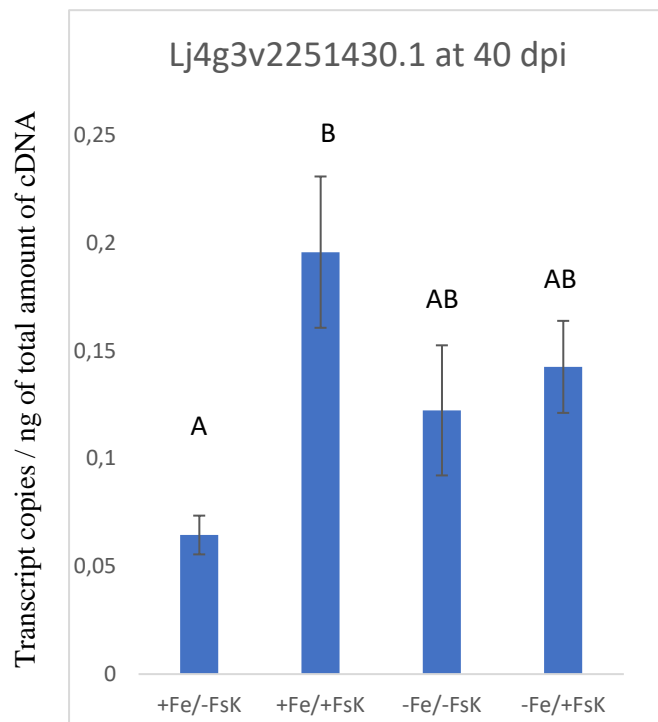
Τρία γονίδια από τα γονίδια του σιδήρου που βρέθηκαν από την *in silico* ανάλυση του RNA-Seq επιλέχθηκαν για να ελεγχθεί η σχετική έκφρασή τους μέσω RT-qPCR, αφού πρώτα είχε προηγηθεί εξαγωγή του RNA, μετά τη δειγματοληψία, και ποσοτικοποίηση του, ενώ μέσω RT-qPCR επιβεβαιώθηκε και ο αποικισμός των ριζών από τον μύκητα στις συνθήκες +FsK. Τα γονίδια που επιλέχθηκαν για να ελεγχθεί η αφθονία των μεταγράφων τους ήταν αυτά: της διυδρολιποϋλο-αφυδρογονάσης, της Casparian strip membrane protein 1-like και της 6B-1-like υπομονάδας της οξειδάσης του κυτοχρώματος c. Η αφθονία των μεταγράφων τους στις 14 dpi και στις 40 dpi φαίνεται στα παρακάτω διαγράμματα (Διαγράμματα 8-13).

Από τα αποτελέσματα βλέπουμε ότι η παρουσία έλλειψη του Fe, όπως και του FsK, έχουν επίπτωση στα πρότυπα έκφρασης των γονιδίων και μάλιστα με διαφορετικό τρόπο ανάμεσα στις διαφορετικές dpi. Σχετικά με το γονίδιο της διυδρολιποϋλο-αφυδρογονάσης, στις 14 dpi εμφανίζει τη μέγιστη έκφραση στη συνθήκη control (+Fe / -FsK), ενώ με προσθήκη του FsK, το γονίδιο μειορρυθμίζεται. Σε απουσία Fe η παρουσία του FsK δεν επιδρά με σημαντικό τρόπο στην έκφρασή του. Στις 40 dpi, ωστόσο, αντιστρέφεται το προφίλ έκφρασης σε σχέση με τη συνθήκη control και το γονίδιο φαίνεται να παρουσιάζει αυξημένη έκφραση παρουσία του μύκητα. Και πάλι, σε συνθήκες έλλειψης Fe η παρουσία του FsK δεν επιδρά με σημαντικό τρόπο στην έκφρασή του.

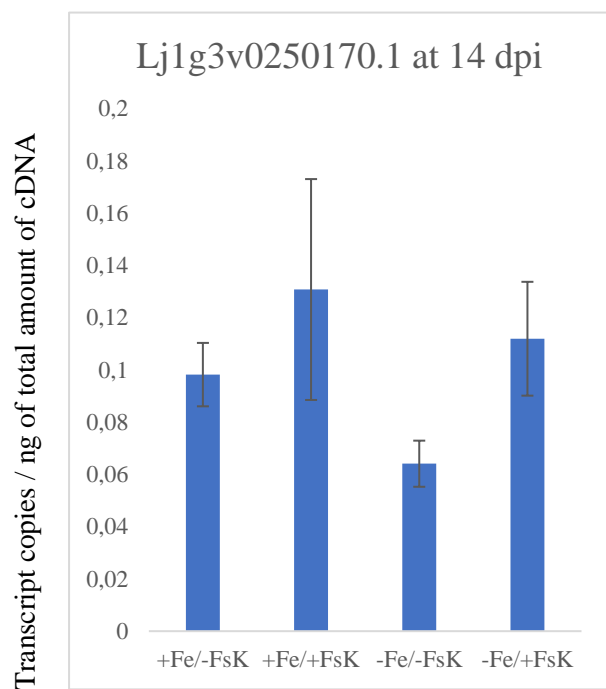
Το γονίδιο για την 6B-1-like υπομονάδα της οξειδάσης του κυτοχρώματος c στις 14 dpi δεν εμφανίζει σημαντική διαφορά στην έκφραση του ανάμεσα στις συνθήκες, ενώ στις 40 dpi παρατηρείται αυξορρύθμιση στη συνθήκη -Fe / -FsK. Τέλος, το γονίδιο της Casparian strip membrane protein 1-like στις 14 dpi και στις 40 dpi εμφανίζεται αυξορρυθμιζόμενο στη συνθήκη +Fe / +FsK σε σχέση με τη συνθήκη control, ενώ σε έλλειψη Fe η προσθήκη του μύκητα προκαλεί μείωση στην έκφρασή του στις 14 dpi και μη σημαντική διαφορά στις 40 dpi.



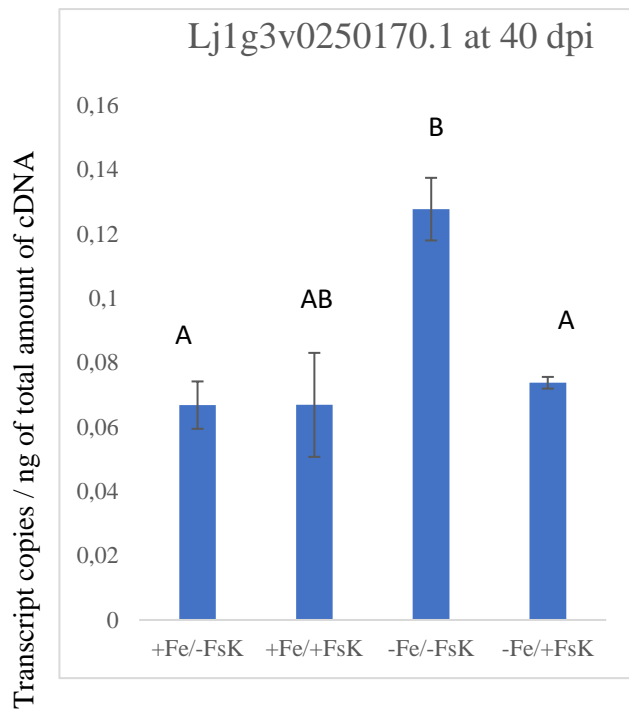
Διάγραμμα 8. Σχετική αφθονία του μεταγράφου της διυδρολιποϋλο-αφυδρογονάσης στις 14 dpi, όπως προσδιορίστηκε μέσω RT-qPCR.



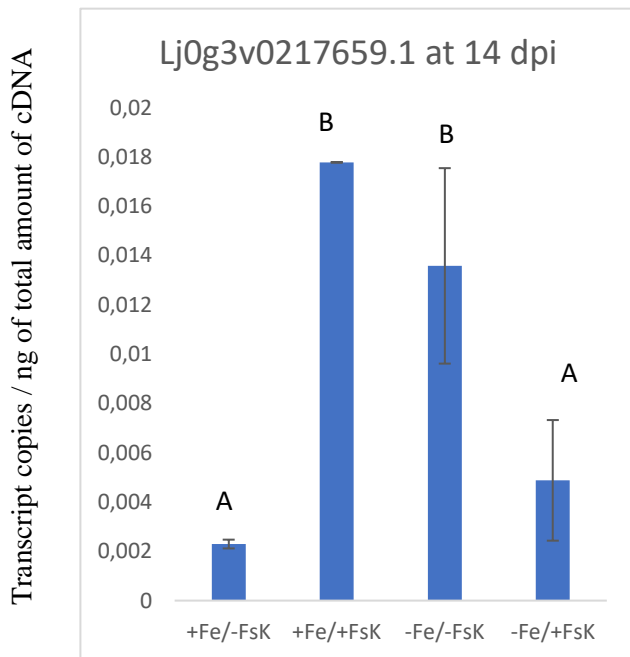
Διάγραμμα 9. Σχετική αφθονία του μεταγράφου της διυδρολιποϋλο-αφυδρογονάσης στις 40 dpi, όπως προσδιορίστηκε μέσω RT-qPCR.



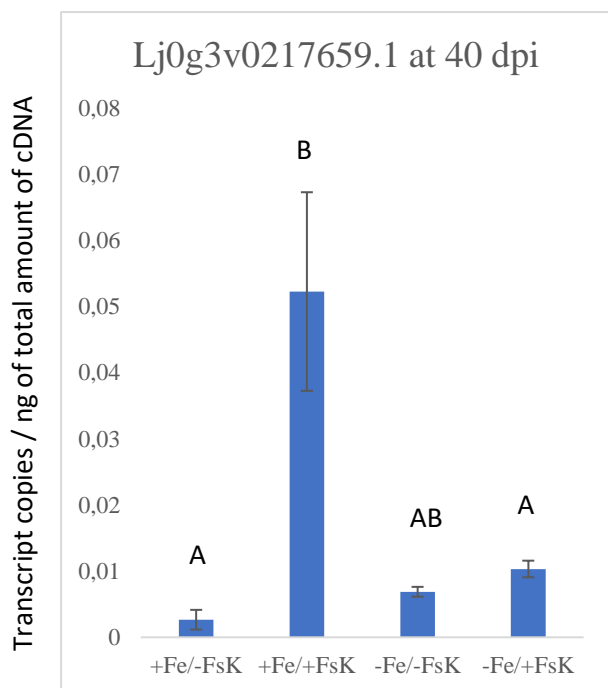
Διάγραμμα 10. Σχετική αφθονία του μεταγράφου της 6B-1-like υπομονάδας της οξειδάσης του κυτοχρώματος c στις 14 dpi, όπως προσδιορίστηκε μέσω RT-qPCR.



Διάγραμμα 11. Σχετική αφθονία του μεταγράφου της 6B-1-like υπομονάδας της οξειδάσης του κυτοχρώματος c στις 40 dpi, όπως προσδιορίστηκε μέσω RT-qPC.



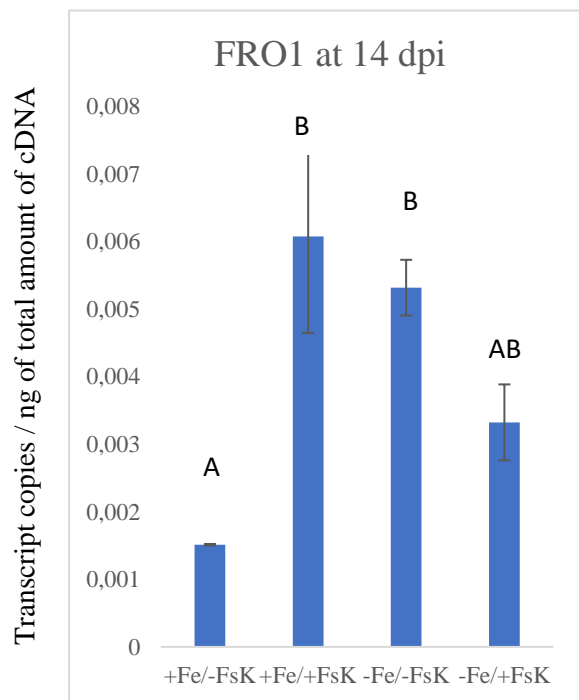
Διάγραμμα 12. Σχετική αφθονία του μεταγράφου της Casparian strip membrane protein 1-like στις 14 dpi, όπως προσδιορίστηκε μέσω RT-qPCR



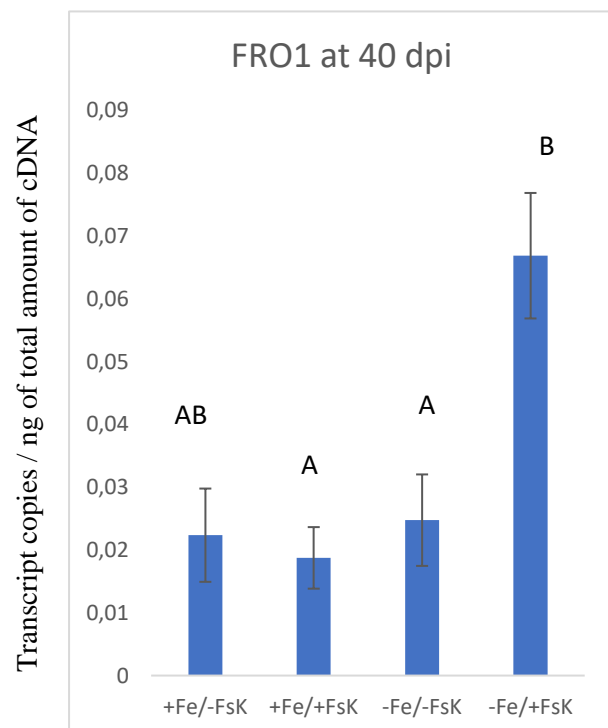
Διάγραμμα 13. Σχετική αφθονία του μεταγράφου της Casparian strip membrane protein 1-like στις 40 dpi, όπως προσδιορίστηκε μέσω RT-qPCR.

Πέρα από γονίδια που είχαν βρεθεί αρχικά στην *in silico* ανάλυση, μετρήθηκε και η έκφραση τριών σημαντικών γονιδίων του σιδήρου γνωστών από τη βιβλιογραφία. Αυτά ήταν το γονίδιο για την FRO1, μια πρωτεΐνη που εμπλέκεται στην αναγωγή του Fe στις ρίζες (Campestre et al., 2016), το γονίδιο για τον μεταγραφικό παράγοντα MYB10 που συμμετέχει στην ομοιοστάση μετάλλων και στην απόκτηση ιόντων Fe, ρυθμίζοντας την έκφραση των γονιδίων των πρωτεϊνών NAS (Palmer et al., 2013) και το γονίδιο FIT (Wu & Ling, 2019) που κωδικοποιεί επίσης για μεταγραφικό παράγοντα, σημαντικό για την πρόσληψη σιδήρου. Και τα 3 γονίδια θεωρούνται αυξορρυθμιζόμενα σε συνθήκες έλλειψης Fe (Campestre et al., 2016; Palmer et al., 2013; Wu & Ling, 2019). Η σχετική αφθονία των μεταγράφων αποτυπώνεται στα Διαγράμματα 14-19.

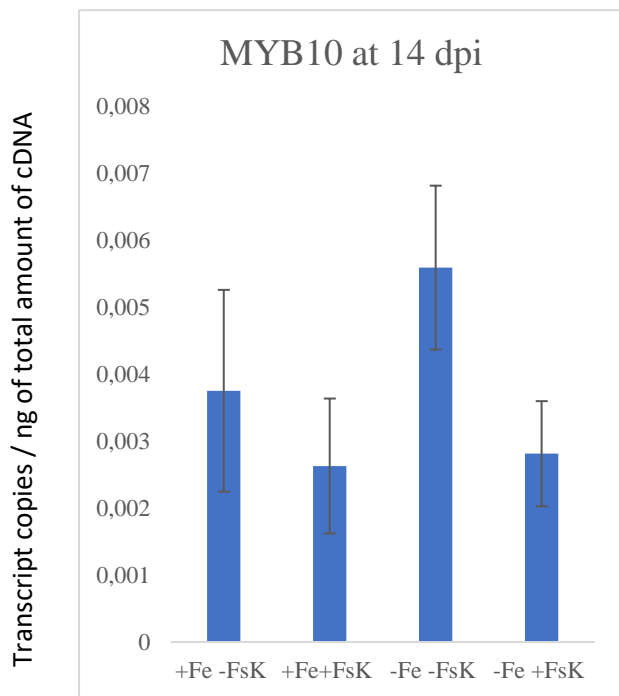
Από τα αποτελέσματα φαίνεται ότι το FRO1 αυξάνει την έκφραση του σε αποικισμό του FsK και σε έλλειψη Fe στις 14 dpi, ενώ στις 40 dpi δεν υπάρχει στατιστικά σημαντική διαφορά ανάμεσα σε κάποια συνθήκη σε σύγκριση με τη συνθήκη control, υπάρχει ωστόσο αυξημένη έκφραση όσον αφορά την έλλειψη Fe, όταν υπάρχει αποικισμός του FsK σε σχέση με την απουσία του. Το MYB10 δεν φαίνεται να έχει κάποια στατιστικά σημαντική διαφορά έκφρασης ανάμεσα στις διαφορετικές συνθήκες και για τις δύο χρονικές στιγμές του πειράματος. Το FIT αν και στις 14 dpi εμφανίζει παρόμοιο προφίλ έκφρασης ανάμεσα στις συνθήκες, στις 40 dpi παρατηρείται ελαφρώς αυξημένη έκφραση και σε αποικισμό του FsK και σε έλλειψη Fe, με μεγάλη διαφορά στη συνθήκη -Fe/ -FsK σε σχέση με τον αρνητικό μάρτυρα.



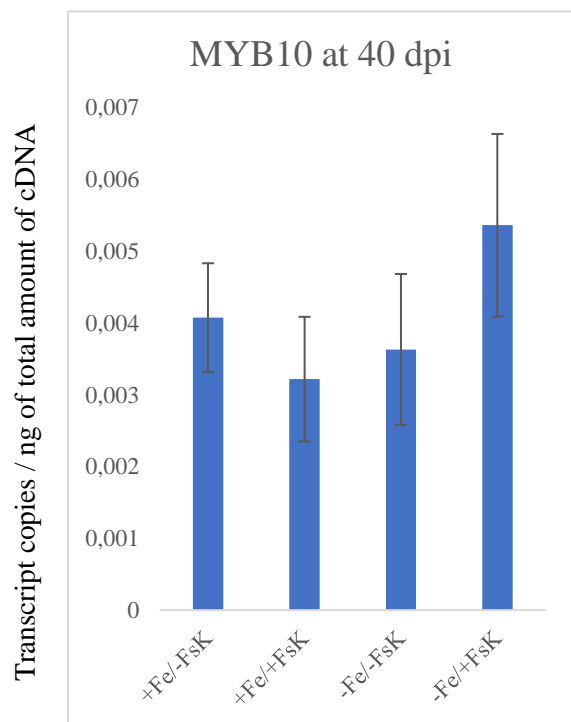
Διάγραμμα 14. Σχετική αφθονία του μεταγράφου του *FRO1* στις 14 dpi, όπως προσδιορίστηκε μέσω RT-qPCR.



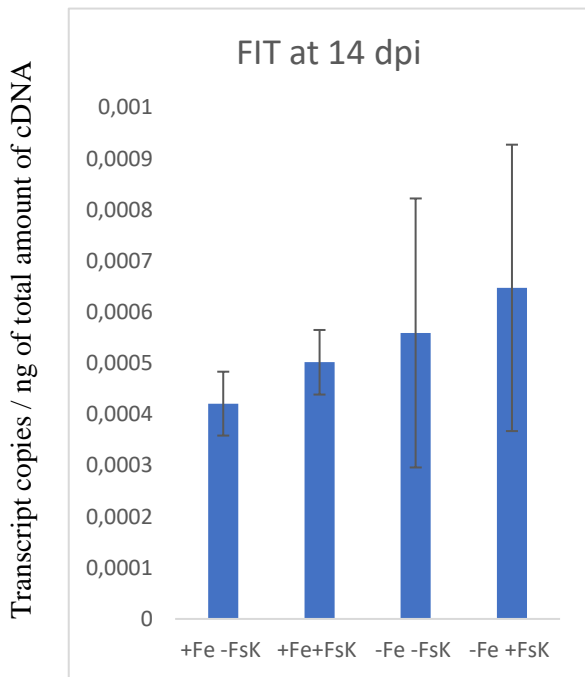
Διάγραμμα 15. Σχετική αφθονία του μεταγράφου του *FRO1* στις 40 dpi, όπως προσδιορίστηκε μέσω RT-qPCR.



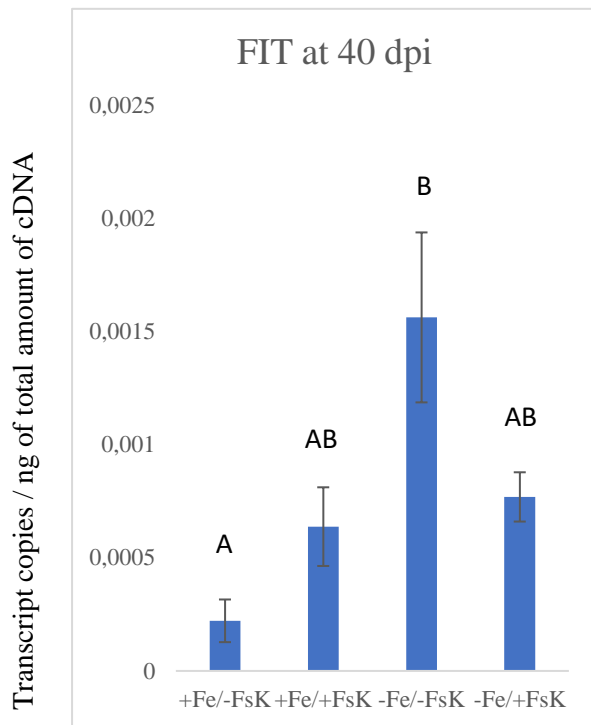
Διάγραμμα 16. Σχετική αφθονία του μεταγράφου του *MYB10* στις 14 dpi, όπως προσδιορίστηκε μέσω RT-qPCR.



Διάγραμμα 17. Σχετική αφθονία του μεταγράφου του *MYB10* στις 40 dpi, όπως προσδιορίστηκε μέσω RT-qPCR.



Διάγραμμα 18. Σχετική αφθονία του μεταγράφου του *FIT* στις 14 dpi, όπως προσδιορίστηκε μέσω RT-qPCR.



Διάγραμμα 19. Σχετική αφθονία του μεταγράφου του *FIT* στις 40 dpi, όπως προσδιορίστηκε μέσω RT-qPCR.

4. Συζήτηση

4.1. Σύνοψη θεωρητικού υποβάθρου

Ο σίδηρος είναι ένα ιχνοστοιχείο απαραίτητο για την ανάπτυξη των φυτών και η ανεπάρκειά του σε πολλά εδάφη (περίπου το 1/3 των καλλιεργούμενων εδαφών) προκαλεί σοβαρά προβλήματα στη γεωργία και στην οικονομία. Τα φυτά για να ανταπεξέλθουν σε αυτή την έλλειψη, έχουν αναπτύξει διάφορους μηχανισμούς, κυρίως στις ρίζες τους, στοχεύοντας στην καλύτερη δυνατή απορρόφηση του σιδήρου, χωρίς πάντα ωστόσο αυτό να είναι αρκετό. Τα τελευταία χρόνια έχουν αρχίσει να γίνονται έρευνες για την εφαρμογή ωφέλιμων μικροοργανισμών στο έδαφος που έχουν δείξει ότι αυξάνουν την απόκτηση σιδήρου. Η ανεπάρκεια Fe και η άμυνα ISR, που επάγεται από ωφέλιμους μικροοργανισμούς στα φυτά, είναι διαδικασίες που συνδέονται στενά και η διαλεύκανση των μηχανισμών συσχετίσής τους ανοίγει νέες δυνατότητες στον καλύτερο χειρισμό της ριζόσφαιρας, με σκοπό την καλύτερη ανάπτυξη και υγεία των φυτών (Romera et al., 2019). Πρόσφατα, αποδείχτηκε ότι ο ενδοφυτικός μύκητας FsK, ο οποίος αποτελεί αντικείμενο μελέτης χάρις την ιδιότητα του να αυξάνει την αντοχή φυτών ντομάτας σε βιοτική (Garantonakis et al., 2018; Kavroulakis et al., 2007; Pappas et al., 2018), αλλά και σε αβιοτική καταπόνηση (Kavroulakis et al., 2018) λόγω ξηρασίας, μπορεί να αποικίσει αποτελεσματικά το *L. japonicus*, χωρίς να επηρεάζει αρνητικά την ανάπτυξη του φυτού (Skiada et al., 2019). Επιπλέον, από μη δημοσιευμένες μελέτες του εργαστηρίου (Papadopoulou et al, unpublished results) έχει βρεθεί ότι ο FsK σε συνθήκες έλλειψης Fe είναι ικανός να αυξήσει την αντίσταση των *L. japonicus* σε αυτήν την καταπόνηση.

Στην παρούσα πτυχιακή, σκοπός ήταν η μελέτη της επίδρασης που έχει ο αποικισμός του FsK στον μεταβολισμό και ομοιόσταση του σιδήρου στο φυτό *L. japonicus* σε γονιδιακό επίπεδο. Σε μελέτες έχει δειχθεί ότι υπάρχουν μικρόβια ενεργοποιητές της ISR άμυνας που προωθούν την έκφραση γονιδίων του σιδήρου στους ξενιστές τους όπως είναι τα γονίδια *FIT*, *bHLH38*, *bHLH39*, *MYB72*, *MYB10*, *FRO2*, *IRT1* και άλλα (Romera et al., 2019).

4.2. Ανασκόπηση αποτελεσμάτων, συμπεράσματα και θεωρίες ερμηνείας

Από τις *in silico* αναλύσεις που περιγράφονται στις παραπάνω ενότητες βρέθηκε ότι ο αποικισμός του FsK στις 3 dpi προκαλεί αλλαγές στην αφθονία 5 γονιδιακών μεταγράφων που σχετίζονται σύμφωνα με βάσεις δεδομένων με μονοπάτια σιδήρου. Αυτά ήταν μετάγραφα για α) τον μεταφορέα Zn 4, β) την διυδρολιπούλο-αφυδρογονάση, γ) την ADP, ATP carrier protein 1, mitochondrial-like, δ) την υπομονάδα 6B-1-like της οξειδάσης του κυτοχρώματος c και ε) τη μεμβρανική πρωτεΐνη Casparian strip 1-like. Και τα 5 μετάγραφα ανήκουν σε γονίδια που δεν σχετίζονται άμεσα με την πρόσληψη σιδήρου, όπως είναι γονίδια που ανάγουν τον τρισθενές σίδηρο ή μεταφορείς σιδήρου. Ωστόσο, συνδέονται με διαφορετικό τρόπο το καθένα με το ιχνοστοιχείο. Ο διαφορετικός βαθμός αποικισμού του FsK, επιδρά με διαφορετικό τρόπο στην έκφραση αυτών των γονιδίων, με τον υψηλό αποικισμό του μύκητα, ωστόσο, να προκαλεί σε όλα τα γονίδια τη μειωμένη έκφρασή τους κάτω από φυσιολογικές συνθήκες Fe στο έδαφος, για λόγους που δεν είναι ξεκάθαροι. Έχει βρεθεί ότι συμβιώτες που επάγουν την ISR σε φυτά, όπως το *A. thaliana*, είναι δυνατόν να προκαλέσουν αυξορρύθμιση σε γονίδια μεταφορέων ψευδαργύρου (Muyanga, 2007; Singh & Prasanna, 2020), όπως και ότι γονίδια που σχετίζονται με εγκαθίδρυση της λωρίδας Casparian, όπως πιθανόν είναι το γονίδιο για τη μεμβρανική πρωτεΐνη Casparian strip 1-like, είναι δυνατόν να αυξορρυθμιστούν σε φυτά κάτω από αβιοτική καταπόνηση άλατος (Kaashyap et al., 2018). Αντίθετα, και τα 2 αυτά γονίδια φαίνονται μειορρυθμισμένα και σε χαμηλό και σε υψηλό βαθμό αποικισμού του FsK. Πέραν

αυτών των δεδομένων, περαιτέρω μελέτες που να συσχετίζουν αυτά τα 5 γονίδια του πειράματος με την ISR άμυνα, πόσο μάλιστα σε σχέση και με τα επίπεδα σιδήρου, απουσιάζουν.

Στις μετέπειτα εργαστηριακές αναλύσεις επιλέχθηκαν τα μετάγραφα για τα γονίδια της διυδρολιπούλο-αφυδρογονάση, της υπομονάδα 6B-1-like της οξειδάσης του κυτοχρώματος c και της μεμβρανικής πρωτεΐνης Casparian strip 1-like, όπως και μετάγραφα των γονιδίων του σιδήρου *FRO1*, *FIT* και *MYB10* για να ελεγχθεί η σχετική αφθονία τους. Η διυδρολιπούλο-αφυδρογονάση και η υπομονάδα 6B-1-like της οξειδάσης του κυτοχρώματος c είναι γονίδια που σχετίζονται πρωτίστως με τον κυτταρικό μεταβολισμό, η μεμβρανική πρωτεΐνη Casparian strip 1-like σχετίζεται με την εγκαθίδρυση της λωρίδας Casparian και τα γονίδια *FRO1*, *FIT* και *MYB10* αποτελούν βασικά γονίδια για την απορρόφηση σιδήρου. Κάτω από φυσιολογική παρουσία Fe στο έδαφος, τα μετάγραφα για τη μεμβρανική πρωτεΐνη Casparian strip 1-like στις 14 και 40 dpi εμφανίζεται σε αυξημένη αφθονία σε παρουσία του μύκητα, κάτι που πιθανόν να υποδηλώνει την αυξημένη μεταφορά Fe εσωτερικά του φυτού, και άρα την αυξημένη πρόσληψή του. Επίσης, υπήρχε και αύξηση της αφθονίας των μεταγράφων του *FRO1*, παρουσία του FsK, στις 14 dpi. Το γονίδιο αυτό κωδικοποιεί για αναγωγή του Fe, όπως και προαναφέρθηκε, και είναι πολύ μεγάλης σημασίας για την πρόσληψη του ιχνοστοιχείου από το φυτό, αφού το *L. japonicus* ανήκει στα φυτά που χρησιμοποιούν την Στρατηγική I για την πρόσληψη του Fe (Alam et al., 2001; Connorton et al., 2017; Kobayashi et al., 2019).

Ο αποικισμός με τον FsK οδήγησε σε αυξημένο βάρος ρίζας των φυτών σε όλες τις περιπτώσεις, κάτι που έμμεσα μπορεί να οδηγεί σε μεγαλύτερο εύρος αναζήτησης του φυτού για Fe, ιδίως σε συνθήκες έλλειψης του ιχνοστοιχείου. Κάτω από αυτές τις συνθήκες έλλειψης, στις 40 dpi βρέθηκε αυξημένη έκφραση του γονιδίου *FRO1*, επαληθεύοντας και τα προηγούμενα αποτελέσματα του εργαστηρίου. Ενδιαφέρον παρουσιάζει και η μειωμένη έκφραση της υπομονάδας 6B-1-like της οξειδάσης του κυτοχρώματος c στις 40 dpi στις συνθήκες έλλειψης, καθώς η οξειδάση του κυτοχρώματος c είναι ένα ένζυμο που συνδέεται με την οξειδωτική βλάβη και παραγωγή δραστικών ριζών οξυγόνου (ROS) (Srinivasan & Avadhani, 2012) και έχει βρεθεί ότι εμφανίζει αυξημένη δράση σε συνθήκες έλλειψης Fe σε ζωικούς οργανισμούς (Bahadir et al., 2018). Οπότε, κάτω από αυτή την αβιοτική καταπόνηση η μειωμένη έκφραση του ενζύμου, ίσως να αποτελεί ένδειξη μειωμένης παραγωγής ROS και αυξημένης απορρόφησης σιδήρου, αλλά αυτό είναι κάτι που πρέπει να μελετηθεί περαιτέρω. Επίσης, να αναφερθεί ότι το pH του εδάφους δεν μεταβάλλεται με σημαντικό τρόπο παρουσία του μύκητα.

Τα αποτελέσματα της παρούσας πτυχιακής δηλώνουν ότι ο FsK προωθεί αλλαγές σε προφίλ έκφρασης κάποιων γονιδίων που σχετίζονται με τον Fe και με αυτόν τρόπο πιθανόν να βοηθάει στην καταπόνηση των φυτών υπό έλλειψη Fe. Η παρουσία/απουσία του Fe, ο βαθμός αποικισμού και οι μέρες μετά τον αποικισμό του μύκητα παίζουν σημαντικό ρόλο, αφού επιφέρουν διαφορετικά αποτελέσματα στην έκφραση αυτών των γονιδίων.

4.3. Επιπλέον σχόλια και παρατηρήσεις

Τα αποτελέσματα των πειραμάτων της παρούσας πτυχιακής δεν επαληθεύουν πλήρως τα αποτελέσματα των προηγούμενων μελετών του εργαστηρίου (Papadopoulou et al, unpublished results). Συγκεκριμένα, υπάρχουν διαφορές στις μετρήσεις των φαινοτυπικών χαρακτηριστικών των βαρών. Δύο πιθανοί λόγοι που μπορεί να συμβαίνει αυτό είναι: α) ο διαφορετικός αριθμός βιολογικών επαναλήψεων και, β) η διαφορετική σύσταση του χώματος (παρουσία βερμικουλίτη στα προηγούμενα πειράματα). Να αναφερθεί επίσης, ότι διαφορετική σύσταση του εδάφους, αλλά και θρεπτικού υποστρώματος υπήρξε και για το βιολογικό υλικό που εκμειεύτηκε και χρησιμοποιήθηκε για το RNA-Seq και τις *in silico* αναλύσεις της 1^{ης} πειραματικής φάσης.

Στα παρόντα πειράματα, η μη χρήση κοινού φυτικού οικοτύπου για όλα τα πειραματικά στάδια (χρήση MG20 για τα πειράματα του RNA-Seq και Gifu για το wet lab) ίσως έπαιξε αρνητικό ρόλο στην εκτενέστερη διαλεύκανση αυτής της αλληλεπίδρασης μειώνοντας την αξιοπιστία των αποτελεσμάτων. Επιπροσθέτως, η απουσία μέτρησης της συγκέντρωσης του Fe στο έδαφος και στα φυτά δε μας επιτρέπει να γνωρίζουμε τον βαθμό που επιτευχθήκαν οι συνθήκες έλλειψης του Fe. Τέλος, πρέπει να ληφθεί υπόψιν ότι υπάρχουν περιπτώσεις γονιδίων που σχετίζονται με την απόκτηση σιδήρου, τα οποία επάγονται από μικρόβια που προωθούν την ISR, αλλά η έκφρασή τους είναι παροδική και σταματάει όταν το φυτό αποκτήσει αρκετό σίδηρο, έτσι ώστε να αποφευχθεί η άσκοπη σπατάλη ενέργειας και η τοξικότητα (Romera et al., 2019). Αυτό είναι κάτι που ανοίγει παράθυρο για την ύπαρξη παροδικών αυξορρυθμισμένων, σε παρουσία του μύκητα, γονιδίων, τα οποία δεν αποκαλύφθηκαν μέσω των παραπάνω πειραμάτων, λόγω της χρονικής στιγμής της δειγματοληψίας.

4.4. Προοπτικές

Κλείνοντας, αυτή η πτυχιακή ρίχνει λίγο φως στην ερευνητική μελέτη ενός μη καλά μελετημένου πεδίου μεγάλου ενδιαφέροντος και μπορεί να αποτελέσει έναυσμα για περαιτέρω έρευνες. Με γνώμονα τα παραπάνω αποτελέσματα, σχόλια και συμπεράσματα, σε επόμενα βήματα για τη βαθύτερη κατανόηση αυτής της αλληλεπίδρασης φυτού-ενδοφύτου, θα μπορούσαν να γίνουν πειράματα για την επίδραση του FsK κάτω από ευρύτερο πλήθος διαφορετικών συγκεντρώσεων σιδήρου και ακόμη, πειράματα για την εύρεση του βαθμού αποικισμού του FsK, που φέρει τα μέγιστα ωφέλιμα αποτελέσματα για το φυτό στις συνθήκες έλλειψης Fe. Τέλος, με πειράματα γονιδιακής σίγησης των φυτών για γονίδια του σιδήρου, όπως το *FROI*, αλλά και γονιδίων της ISR, θα καταστεί σαφέστερη η άμεση ή έμμεση επίδραση του μύκητα στην έκφραση αυτών των γονιδίων και στην ανάπτυξη των φυτών.

5. Βιβλιογραφικές παραπομπές

1. Alam, S., Kamei, S., & Kawai, S. (2001). Metal micronutrients in xylem sap of iron-deficient barley as affected by plant-borne, microbial, and synthetic metal chelators. *Soil Science and Plant Nutrition*, 47(1), 149–156. <https://doi.org/10.1080/00380768.2001.10408377>
2. Anders, S., Pyl, P. T., & Huber, W. (2014). *HTSeq—A Python framework to work with high-throughput sequencing data* [Preprint]. Bioinformatics. <https://doi.org/10.1101/002824>
3. Bahadir, A., Erduran, E., Değer, O., Birinci, Y., & Ayar, A. (2018). Augmented mitochondrial cytochrome c oxidase activity in children with iron deficiency: A tandem between iron and copper? *Archives of Medical Science : AMS*, 14(1), 151–156. <https://doi.org/10.5114/aoms.2016.59602>
4. Briat, J.-F., Fobis-Loisy, I., Grignon, N., Lobréaux, S., Pascal, N., Savino, G., Thoiron, S., Wirén, N., & Wuytswinkel, O. (1995). Cellular and molecular aspects of iron metabolism in plants. *Biology of the Cell*, 84(1–2), 69–81. [https://doi.org/10.1016/0248-4900\(96\)81320-7](https://doi.org/10.1016/0248-4900(96)81320-7)
5. Brusslan, J. A., & Tobin, E. M. (1992). Light-independent developmental regulation of cab gene expression in *Arabidopsis thaliana* seedlings. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 89(16), 7791–7795. <https://doi.org/10.1073/pnas.89.16.7791>
6. Campestre, M. P., Castagno, L. N., Estrella, M. J., & Ruiz, O. A. (2016). Lotus japonicus plants of the Gifu B-129 ecotype subjected to alkaline stress improve their Fe²⁺ bio-availability through inoculation with *Pantoea eucalypti* M91. *Journal of Plant Physiology*, 192, 47–55. <https://doi.org/10.1016/j.jplph.2016.01.001>
7. Caspi, R., Billington, R., Fulcher, C. A., Keseler, I. M., Kothari, A., Krummenacker, M., Latendresse, M., Midford, P. E., Ong, Q., Ong, W. K., Paley, S., Subhraveti, P., & Karp, P. D. (2018). The MetaCyc database of metabolic pathways and enzymes. *Nucleic Acids Research*, 46(D1), D633–D639. <https://doi.org/10.1093/nar/gkx935>

8. Choudhary, D. K., Prakash, A., & Johri, B. N. (2007). Induced systemic resistance (ISR) in plants: Mechanism of action. *Indian Journal of Microbiology*, 47(4), 289–297. <https://doi.org/10.1007/s12088-007-0054-2>
9. Connorton, J. M., Balk, J., & Rodríguez-Celma, J. (2017). Iron homeostasis in plants – a brief overview. *Metallomics*, 9(7), 813–823. <https://doi.org/10.1039/c7mt00136c>
10. Curie, C., & Mari, S. (2017). New routes for plant iron mining. *New Phytologist*, 214(2), 521–525. <https://doi.org/10.1111/nph.14364>
11. Deacon. (2006). *Deacon, J.W. (2006) Fungal Biology, 4th edition. Blackwell Publishing, Oxford, UK.*
12. Delis, C., Krokida, A., Georgiou, S., Peña-Rodríguez, L. M., Kavroulakis, N., Ioannou, E., Roussis, V., Osbourn, A. E., & Papadopoulou, K. K. (2011). Role of lupeol synthase in *Lotus japonicus* nodule formation. *New Phytologist*, 189(1), 335–346. <https://doi.org/10.1111/j.1469-8137.2010.03463.x>
13. Desjardins, P., & Conklin, D. (2010). NanoDrop Microvolume Quantitation of Nucleic Acids. *Journal of Visualized Experiments: JoVE*, 45, 2565. <https://doi.org/10.3791/2565>
14. Dobin, A., & Gingeras, T. R. (2015). Mapping RNA-seq Reads with STAR. *Current Protocols in Bioinformatics*, 51, 11.14.1-11.14.19. <https://doi.org/10.1002/0471250953.bi1114s51>
15. Garantonakis, N., Pappas, M. L., Varikou, K., Skiada, V., Broufas, G. D., Kavroulakis, N., & Papadopoulou, K. K. (2018). Tomato Inoculation With the Endophytic Strain *Fusarium solani* K Results in Reduced Feeding Damage by the Zoophytophagous Predator *Nesidiocoris tenuis*. *Frontiers in Ecology and Evolution*, 6, 126. <https://doi.org/10.3389/fevo.2018.00126>
16. García, M. J., Romera, F. J., Lucena, C., Alcántara, E., & Pérez-Vicente, R. (2015). Ethylene and the Regulation of Physiological and Morphological Responses to Nutrient Deficiencies. *Plant Physiology*, 169(1), 51–60. <https://doi.org/10.1104/pp.15.00708>

17. Gaudet, P., Livstone, M. S., Lewis, S. E., & Thomas, P. D. (2011). Phylogenetic-based propagation of functional annotations within the Gene Ontology consortium. *Briefings in Bioinformatics*, *12*(5), 449–462. <https://doi.org/10.1093/bib/bbr042>
18. The Gene Ontology Consortium. (2019). The Gene Ontology Resource: 20 years and still GOing strong. *Nucleic Acids Research*, *47*(D1), D330–D338. <https://doi.org/10.1093/nar/gky1055>
19. Guerinot, M. L. (2000). The ZIP family of metal transporters. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Biomembranes*, *1465*(1), 190–198. [https://doi.org/10.1016/S0005-2736\(00\)00138-3](https://doi.org/10.1016/S0005-2736(00)00138-3)
20. Haferkamp, I., & Schmitz-Esser, S. (2012). The Plant Mitochondrial Carrier Family: Functional and Evolutionary Aspects. *Frontiers in Plant Science*, *3*, 2. <https://doi.org/10.3389/fpls.2012.00002>
21. Huerta-Cepas, J., Szklarczyk, D., Heller, D., Hernández-Plaza, A., Forslund, S. K., Cook, H., Mende, D. R., Letunic, I., Rattei, T., Jensen, L. J., von Mering, C., & Bork, P. (2019). eggNOG 5.0: A hierarchical, functionally and phylogenetically annotated orthology resource based on 5090 organisms and 2502 viruses. *Nucleic Acids Research*, *47*(D1), D309–D314. <https://doi.org/10.1093/nar/gky1085>
22. Kaashyap, M., Ford, R., Kudapa, H., Jain, M., Edwards, D., Varshney, R., & Mantri, N. (2018). Differential Regulation of Genes Involved in Root Morphogenesis and Cell Wall Modification is Associated with Salinity Tolerance in Chickpea. *Scientific Reports*, *8*(1), 4855. <https://doi.org/10.1038/s41598-018-23116-9>
23. Kavroulakis, N., Doupis, G., Papadakis, I. E., Ehaliotis, C., & Papadopoulou, K. K. (2018). Tolerance of tomato plants to water stress is improved by the root endophyte *Fusarium solani* FsK. *Rhizosphere*, *6*, 77–85. <https://doi.org/10.1016/j.rhisph.2018.04.003>
24. Kavroulakis, N., Ntougias, S., Zervakis, G. I., Ehaliotis, C., Haralampidis, K., & Papadopoulou, K. K. (2007). Role of ethylene in the protection of tomato plants against soil-borne fungal pathogens conferred by an endophytic *Fusarium solani* strain*. *Journal of Experimental Botany*, *58*(14), 3853–3864. <https://doi.org/10.1093/jxb/erm230>

25. Kobayashi, T., Nozoye, T., & Nishizawa, N. K. (2019). Iron transport and its regulation in plants. *Free Radical Biology and Medicine*, *133*, 11–20. <https://doi.org/10.1016/j.freeradbiomed.2018.10.439>
26. Kogel, K.-H., Franken, P., & Hückelhoven, R. (2006). Endophyte or parasite – what decides? *Current Opinion in Plant Biology*, *9*(4), 358–363. <https://doi.org/10.1016/j.pbi.2006.05.001>
27. Lee, S., Jeong, H. J., Kim, S. A., Lee, J., Guerinot, M. L., & An, G. (2010). OsZIP5 is a plasma membrane zinc transporter in rice. *Plant Molecular Biology*, *73*(4–5), 507–517. <https://doi.org/10.1007/s11103-010-9637-0>
28. Li, H., Handsaker, B., Wysoker, A., Fennell, T., Ruan, J., Homer, N., Marth, G., Abecasis, G., Durbin, R., & 1000 Genome Project Data Processing Subgroup. (2009). The Sequence Alignment/Map format and SAMtools. *Bioinformatics*, *25*(16), 2078–2079. <https://doi.org/10.1093/bioinformatics/btp352>
29. Liang, X., Qin, L., Liu, P., Wang, M., & Ye, H. (2014). Genes for iron–sulphur cluster assembly are targets of abiotic stress in rice, *Oryza sativa*. *Plant, Cell & Environment*, *37*(3), 780–794. <https://doi.org/10.1111/pce.12198>
30. Lowe, R., Shirley, N., Bleackley, M., Dolan, S., & Shafee, T. (2017). Transcriptomics technologies. *PLOS Computational Biology*, *13*(5), e1005457. <https://doi.org/10.1371/journal.pcbi.1005457>
31. Lucena, C., Porras, R., García, M. J., Alcántara, E., Pérez-Vicente, R., Zamarreño, Á. M., Bacaicoa, E., García-Mina, J. M., Smith, A. P., & Romera, F. J. (2019). Ethylene and Phloem Signals Are Involved in the Regulation of Responses to Fe and P Deficiencies in Roots of Strategy I Plants. *Frontiers in Plant Science*, *10*, 1237. <https://doi.org/10.3389/fpls.2019.01237>
32. Mansilla, N., Racca, S., Gras, D. E., Gonzalez, D. H., & Welchen, E. (2018). The Complexity of Mitochondrial Complex IV: An Update of Cytochrome c Oxidase Biogenesis in Plants. *International Journal of Molecular Sciences*, *19*(3), 662. <https://doi.org/10.3390/ijms19030662>

33. Mun, T., Bachmann, A., Gupta, V., Stougaard, J., & Andersen, S. U. (2016). Lotus Base: An integrated information portal for the model legume *Lotus japonicus*. *Scientific Reports*, *6*(1), 39447. <https://doi.org/10.1038/srep39447>
34. Muyanga. (2007). *ISR-mediated gene expression provides insight into the molecular regulation of systemic plant protection by non-pathogenic bacteria*. Proceedings of the First Southern African Bioinformatics Workshop. <http://citeseerx.ist.psu.edu/viewdoc/download?doi=10.1.1.105.3975&rep=rep1&type=pdf#page=75>
35. Nieva, A. S., Vilas, J. M., Gárriz, A., Maiale, S. J., Menéndez, A. B., Erban, A., Kopka, J., & Ruiz, O. A. (2019). The fungal endophyte *Fusarium solani* provokes differential effects on the fitness of two *Lotus* species. *Plant Physiology and Biochemistry*, *144*, 100–109. <https://doi.org/10.1016/j.plaphy.2019.09.022>
36. Oshlack, A., Robinson, M. D., & Young, M. D. (2010). From RNA-seq reads to differential expression results. *Genome Biology*, *11*(12), 220. <https://doi.org/10.1186/gb-2010-11-12-220>
37. Pajuelo, E., & Stougaard, J. (2005). *Lotus japonicus's a model system*. In A. J. Márquez (Ed.), *Lotus japonicus Handbook* (pp. 3–24). Springer-Verlag. https://doi.org/10.1007/1-4020-3735-X_1
38. Palmer, C. M., Hindt, M. N., Schmidt, H., Clemens, S., & Guerinot, M. L. (2013). MYB10 and MYB72 Are Required for Growth under Iron-Limiting Conditions. *PLoS Genetics*, *9*(11), e1003953. <https://doi.org/10.1371/journal.pgen.1003953>
39. Pappas, M. L., Liapoura, M., Papantoniou, D., Avramidou, M., Kavroulakis, N., Weinhold, A., Broufas, G. D., & Papadopoulou, K. K. (2018). The Beneficial Endophytic Fungus *Fusarium solani* Strain K Alters Tomato Responses Against Spider Mites to the Benefit of the Plant. *Frontiers in Plant Science*, *9*, 1603. <https://doi.org/10.3389/fpls.2018.01603>
40. *Quality Scores for Next-Generation Sequencing*. (n.d.). 2.
41. Robinson, M. D., McCarthy, D. J., & Smyth, G. K. (2010). edgeR: A Bioconductor package for differential expression analysis of digital gene expression data. *Bioinformatics*, *26*(1), 139–140. <https://doi.org/10.1093/bioinformatics/btp616>

42. Romera, F. J., García, M. J., Lucena, C., Martínez-Medina, A., Aparicio, M. A., Ramos, J., Alcántara, E., Angulo, M., & Pérez-Vicente, R. (2019). Induced Systemic Resistance (ISR) and Fe Deficiency Responses in Dicot Plants. *Frontiers in Plant Science*, *10*, 287. <https://doi.org/10.3389/fpls.2019.00287>
43. Sato, S., Nakamura, Y., Kaneko, T., Asamizu, E., Kato, T., Nakao, M., Sasamoto, S., Watanabe, A., Ono, A., Kawashima, K., Fujishiro, T., Katoh, M., Kohara, M., Kishida, Y., Minami, C., Nakayama, S., Nakazaki, N., Shimizu, Y., Shinpo, S., ... Tabata, S. (2008). Genome Structure of the Legume, *Lotus japonicus*. *DNA Research*, *15*(4), 227–239. <https://doi.org/10.1093/dnares/dsn008>
44. Shirasawa, K., Isobe, S., Tabata, S., & Hirakawa, H. (2014). Kazusa Marker DataBase: A database for genomics, genetics, and molecular breeding in plants. *Breeding Science*, *64*(3), 264–271. <https://doi.org/10.1270/jsbbs.64.264>
45. Singh, D., & Prasanna, R. (2020). Potential of microbes in the biofortification of Zn and Fe in dietary food grains. A review. *Agronomy for Sustainable Development*, *40*(2), 15. <https://doi.org/10.1007/s13593-020-00619-2>
46. Skiada, V., Faccio, A., Kavroulakis, N., Genre, A., Bonfante, P., & Papadopoulou, K. K. (2019). Colonization of legumes by an endophytic *Fusarium solani* strain FsK reveals common features to symbionts or pathogens. *Fungal Genetics and Biology*, *127*, 60–74. <https://doi.org/10.1016/j.fgb.2019.03.003>
47. Srinivasan, S., & Avadhani, N. G. (2012). Cytochrome c oxidase dysfunction in oxidative stress. *Free Radical Biology and Medicine*, *53*(6), 1252–1263. <https://doi.org/10.1016/j.freeradbiomed.2012.07.021>
48. Stougaard, J. (2017). *Lotus japonicus*: A Model Plant for the Legume Family ☆. In *Reference Module in Life Sciences* (p. B9780128096338067000). Elsevier. <https://doi.org/10.1016/B978-0-12-809633-8.06661-9>
49. Tovar-Méndez, A., Miernyk, J. A., & Randall, D. D. (2003). Regulation of pyruvate dehydrogenase complex activity in plant cells. *European Journal of Biochemistry*, *270*(6), 1043–1049. <https://doi.org/10.1046/j.1432-1033.2003.03469.x>
50. Vigani, G., Di Silvestre, D., Agresta, A. M., Donnini, S., Mauri, P., Gehl, C., Bittner, F., & Murgia, I. (2017). Molybdenum and iron mutually impact their

- homeostasis in cucumber (*Cucumis sativus*) plants. *New Phytologist*, 213(3), 1222–1241. <https://doi.org/10.1111/nph.14214>
51. Voet, D. (2013). *Fundamentals of biochemistry: Life at the molecular level* (4th ed.). Wiley.
52. Wang, Z., Gerstein, M., & Snyder, M. (2009). RNA-Seq: A revolutionary tool for transcriptomics. *Nature Reviews Genetics*, 10(1), 57–63. <https://doi.org/10.1038/nrg2484>
53. Wang, Z., Yamaji, N., Huang, S., Zhang, X., Shi, M., Fu, S., Yang, G., Ma, J. F., & Xia, J. (2019). OsCASPI Is Required for Casparian Strip Formation at Endodermal Cells of Rice Roots for Selective Uptake of Mineral Elements. *The Plant Cell*, 31(11), 2636–2648. <https://doi.org/10.1105/tpc.19.00296>
54. Williams, C. R., Baccarella, A., Parrish, J. Z., & Kim, C. C. (2016). Trimming of sequence reads alters RNA-Seq gene expression estimates. *BMC Bioinformatics*, 17(1), 103. <https://doi.org/10.1186/s12859-016-0956-2>
55. Wu, H., & Ling, H.-Q. (2019). FIT-Binding Proteins and Their Functions in the Regulation of Fe Homeostasis. *Frontiers in Plant Science*, 10, 844. <https://doi.org/10.3389/fpls.2019.00844>
56. Σκιαδά, Β. (2019). *Πρότυπα αποικισμού ψυχανθών από τον ενδοφυτικό μύκητα Fusarium solani στέλεχος K: Μοριακή σηματοδότηση και υπο-κυτταρικές αποκρίσεις στα πρώιμα στάδια της αλληλεπίδρασης*. Πανεπιστήμιο Θεσσαλίας.