



ΠΑΝΕΠΙΣΤΗΜΙΟ ΘΕΣΣΑΛΙΑΣ
ΤΜΗΜΑ ΒΙΟΧΗΜΕΙΑΣ ΚΑΙ ΒΙΟΤΕΧΝΟΛΟΓΙΑΣ



Πτυχιακή Εργασία
Απόκριση των miR2111 και miR171c στη θρέψη του
φυτού *Lotus japonicus* με άζωτο και φώσφορο

Πιπλίδου Στυλλιανή του Δημητρίου

Λάρισα 2022

Πτυχιακή Εργασία

Απόκριση των miR2111 και miR171c στη θρέψη του φυτού *Lotus japonicus* με άζωτο και φώσφορο

Response of miR2111 and miR171c to nitrogen and phosphorus nutrition in *Lotus japonicus*

Πιπλίδου Στυλλιανή του Δημητρίου

Τριμελής εξεταστική επιτροπή:

1. Τσίκου Δανιέλα, Επίκουρος Καθηγήτρια Μοριακής και Αναπτυξιακής Βιολογίας Φυτών (Επιβλέπουσα)
2. Παπαδοπούλου Καλλιόπη, Καθηγήτρια Βιοτεχνολογίας Φυτών
3. Γιακουντής Αντώνιος, Επίκουρος Καθηγητής Μοριακής Βιολογίας-Γονιδιωματικής

Περιεχόμενα

Περίληψη.....	5
Abstract	6
1. Εισαγωγή.....	7
1.1. Τα ψυχανθή φυτά	7
1.1.1. Το <i>Lotus japonicus</i>	7
1.2. Αφομοίωση θρεπτικών στοιχείων από τα φυτά.....	8
1.2.1. Δέσμευση αζώτου (N)	8
1.2.2. Δέσμευση φωσφόρου (P)	9
1.3. Συμβιωτικές σχέσεις.....	10
1.3.1. Συμβιωτική σχέση ριζοβίων-φυτού.....	10
1.3.2. Συμβιωτική σχέση ενδομυκορριζικών μυκήτων-φυτού	13
2. Υλικά και μέθοδοι	15
2.1 Βιολογικό υλικό και συνθήκες ανάπτυξης.....	15
2.2. Απολύμανση και εκβλάστηση των σπόρων	15
2.3. Δημιουργία θρεπτικών υλικών	16
2.3.1. Πείραμα πρώτο.....	16
2.3.2. Πείραμα δεύτερο	17
2.3.3. Πείραμα τρίτο.....	17
2.4. Μεταφύτευση	18
2.4.1. Απλή μεταφύτευση σε δοχεία magentas	18
2.4.2. Μεταφύτευση σε δοχεία magentas με τη μέθοδο sandwich.....	18

2.5. Απομόνωση ολικού RNA από ρίζες.....	19
2.6. Απομάκρυνση DNA από δείγματα RNA	20
2.7. PCR ελέγχου.....	21
2.8. Ηλεκτροφόρηση σε πηκτή αγαρόζης	22
2.9. Σύνθεση cDNA.....	23
2.10. PCR πραγματικού χρόνου (qPCR).....	24
2.11. Χρώση ριζών	26
2.12. Υπολογισμός ποσοστού αποικισμού των ριζών από ενδομυκορριζικό μύκητα.....	27
3. Αποτελέσματα.....	28
3.1. Προσδιορισμός του ρόλου του φωσφόρου (P) και του αζώτου (N) στην ρύθμιση των miR2111 και miR171c και των γονιδίων στόχων τους.....	28
3.2. Τα miR2111 και miR171c ρυθμίζονται από τον ενδομυκορριζικό μύκητα ή αποκλειστικά από τα θρεπτικά συστατικά που τους παρέχονται;	32
3.3. Έλεγχος του αποικισμού από τον ενδομυκορριζικό μύκητα παρουσία και απουσία αζώτου (N)	34
4. Συζήτηση.....	36
5. Παράρτημα.....	39
6. Βιβλιογραφία.....	40

Περίληψη

Τα φυτά προκειμένου να προσλάβουν απαραίτητα θρεπτικά συστατικά από το έδαφος, έχουν αναπτύξει περίπλοκα συστήματα επικοινωνίας, που τους επιτρέπουν να δημιουργούν συμβιωτικές σχέσεις με μικροοργανισμούς. Οι καλύτερα μελετημένες συμβιωτικές αλληλεπιδράσεις είναι αυτές μεταξύ ψυχανθών και ριζοβίων βακτηρίων και μεταξύ φυτών και μυκορριζικών μυκήτων. Προκειμένου οι σχέσεις αυτές να μην γίνουν παρασιτικές, το φυτό έχει μηχανισμούς αυτορρύθμισης για να ελέγχει τον αποικισμό του από τους μικροοργανισμούς. Στην αλληλεπίδραση με ριζόβια ο μηχανισμός αυτός ονομάζεται μηχανισμός αυτορρύθμισης της φυματιογένεσης, ρυθμίζεται από τη διαθεσιμότητα αζώτου και έχει μελετηθεί αρκετά. Εικάζεται ότι η συμβιωτική σχέση των φυτών με δενδρόμορφους ενδομυκορριζικούς μύκητες (ΔΜΜ) ρυθμίζεται από έναν αντίστοιχο μηχανισμό αυτορρύθμισης που ονομάζεται αυτορρύθμιση των μυκορριζών, ο οποίος ανταποκρίνεται στη διαθεσιμότητα φωσφόρου, με μελέτες να δείχνουν πως οι δύο μηχανισμοί μοιράζονται κοινά χαρακτηριστικά. Σημαντικό ρόλο στην εγκαθίδρυση των συμβιωτικών σχέσεων φαίνεται πως παίζουν μικρά RNAs, καθώς και τα γονίδια στόχοι τους, όπως το miR2111, που στοχεύει το *TML* και εμπλέκεται στον μηχανισμό αυτορρύθμισης της φυματιογένεσης και το miR171c που στοχεύει το *NSP2* και εμπλέκεται και στις δύο συμβιωτικές σχέσεις.. Στόχος αυτής της εργασίας είναι να διερευνηθεί η απόκριση των μικρών RNA miR2111 και miR171c στα βασικά θρεπτικά συστατικά των φυτών, το άζωτο και το φώσφορο.

Abstract

Plants have developed complex communication systems, which allow them to establish symbiotic relationships with microorganisms, in order to acquire the necessary nutrients from the soil. The best studied symbiotic interactions are those between legumes and rhizobia as well as between plants and arbuscular mycorrhizal fungi (AMF). In order for these relationships to not become parasitic, plants have developed autoregulatory mechanisms to control the root colonization by the microorganisms. When the plant interacts with rhizobia this mechanism is called autoregulation of nodulation (AON). This mechanism responds to nitrogen availability and has been studied extensively. It is speculated that the symbiotic relationship of plants with AMF is regulated by a corresponding autoregulatory mechanism called autoregulation of mycorrhization (AOM), which responds to phosphorus availability. Studies show that the AON and AOM mechanisms share common characteristics. It appears that small RNAs, as well as their target genes, play a significant role in the establishment of the symbiotic relationships: miR2111, that targets *TML*, is involved in the AON mechanism and miR171c that targets *NSP2* have roles at both the symbiotic relationships. The objective of this study is to investigate the response of the small RNAs miR2111 and miR171c to the essential plant nutrients, nitrogen and phosphorus.

1. Εισαγωγή

1.1. Τα ψυχανθή φυτά

Τα ψυχανθή φυτά ανήκουν στην οικογένεια *Leguminosae (Fabaceae)*, η οποία είναι η τρίτη μεγαλύτερη οικογένεια Αγγειόσπερμων. Τα φυτά αυτά είναι «πρωτοποριακά» φυτά, που μπορούν να αναπτυχθούν σε εδάφη φτωχά σε θρεπτικά συστατικά λόγω της ικανότητάς τους για τη δημιουργία συμβιωτικών σχέσεων με ριζόβια βακτήρια που δεσμεύουν το άζωτο, καθώς και με μύκητες του εδάφους, οι οποίοι παρέχουν στα φυτά φώσφορο και άλλα απαραίτητα θρεπτικά συστατικά. Αυτά τα φυσικά χαρακτηριστικά ευνόησαν την καλλιέργεια των ψυχανθών ήδη από την αρχαιότητα και παίζουν σημαντικό ρόλο στη γεωργική παραγωγή έως και σήμερα (Pajuelo & Stougaard, 2005). Μεταξύ των φυτικών οικογενειών, η ανάπτυξη συμβιωτικών αλληλεπιδράσεων με ριζόβια είναι μοναδική για τα ψυχανθή. Η μόνη γνωστή εξαίρεση είναι η *Parasponia* που ανήκει στην οικογένεια *Ulmaceae* (Noel, 2009).

Η συμβιωτική αλληλεπίδραση των ψυχανθών με μυκορριζικούς μύκητες, αν και δεν ανήκει αποκλειστικά σε αυτή την οικογένεια, είναι επίσης μια σημαντική αλληλεπίδραση, η οποία παρέχει φώσφορο και άλλα θρεπτικά συστατικά στο φυτό. Η λήψη επαρκών θρεπτικών ουσιών από το έδαφος είναι ένα κοινό πρόβλημα που αντιμετωπίζουν τα χερσαία φυτά με το 80% έως 90% να βοηθούνται στην εξόρυξη θρεπτικών ουσιών μέσω συμβιωτικών μυκήτων.

Επομένως, η αύξηση των γνώσεων μας για τη βιολογία και τη γενετική των ψυχανθών είναι πολύ σημαντική (Pajuelo & Stougaard, 2005).

1.1.1. Το *Lotus japonicus*

Ο κύριος ρόλος των «φυτών μοντέλων» είναι να παρέχουν γνώσεις και τεχνολογίες σε ερευνητές που μελετούν φυτά καλλιέργειας. Το *Lotus japonicus* επιλέχθηκε ως πρότυπο σύστημα, πρώτα για τη γενετική των ψυχανθών και στη συνέχεια για τη γονιδιωματική τους. Για το *Lotus japonicus* έχει δημιουργηθεί μεγάλος αριθμός μεταλλαγμάτων, που έχουν χαρακτηριστεί φαινοτυπικά. Πληροφορίες από βιβλιοθήκες DNA δείχνουν ότι το *L. japonicus* είναι ένα εξαιρετικό «φυτό μοντέλο» (Sato & Tabata, 2006). Εκτός από τον εκτεταμένο χαρακτηρισμό του, το *L. japonicus*

εμφανίζει πλεονεκτήματα όπως το μικρό του μέγεθος, τα άφθονα άνθη, η εύκολη επικονίαση και καλλιέργεια του, ο σύντομος χρόνος παραγωγής των σπόρων του και ο σχετικά μικρός κύκλος ζωής του (Pajuelo & Stougaard, 2005).

1.2. Αφομοίωση θρεπτικών στοιχείων από τα φυτά

Τα ανώτερα φυτά είναι οργανισμοί αυτότροφοι, δηλαδή, οργανισμοί ικανοί να συνθέτουν όλα τα οργανικά συστατικά των κυττάρων τους από ανόργανα στοιχεία, τα οποία προσλαμβάνουν από το περιβάλλον τους. Η διαδικασία αυτή περιλαμβάνει την απορρόφηση των ανόργανων θρεπτικών από το έδαφος μέσω των ριζών και την ενσωμάτωσή τους σε οργανικές ενώσεις, όπως τα λιπίδια, τα νουκλεϊκά οξέα και τα αμινοξέα, που είναι απαραίτητες για την αύξηση και την ανάπτυξη. Τα φυτά χρησιμεύουν ως η κύρια οδός μεταφοράς, μέσω της οποίας τα ανόργανα θρεπτικά στοιχεία περνούν από τα αδρανή γεωφυσικά στα δυναμικά βιολογικά πεδία. Συνεπώς, η αφομοίωση τους παίζει ζωτικό ρόλο στην ανθρώπινη ζωή (Zeiger & Taiz, 2016). Αν και τα φυτά εξαρτώνται από τη δέσμευση διάφορων θρεπτικών στοιχείων από το έδαφος, τα κύρια θρεπτικά που περιορίζουν την παραγωγικότητα των φυτών είναι το άζωτο (N) και ο φώσφορος (P). Τα φυτά βελτιστοποιούν την πρόσληψη του N και του P που είναι διαθέσιμο, με τροποποιήσεις στην ανάπτυξη τους και μέσω της συμβίωσης τους με μικροοργανισμούς. Όπου το N και το P είναι άφθονα, η αναλογία κατανομής βιομάζας ρίζας:βλαστών μπορεί να είναι χαμηλή, με ελάχιστα ριζικά συστήματα να δεσμεύουν επαρκή θρεπτικά συστατικά. Σε περιβάλλοντα όπου αυτά τα θρεπτικά συστατικά είναι περιορισμένα, η συνολική ανάπτυξη μειώνεται, αλλά τα ριζικά συστήματα επεκτείνονται και ο αποικισμός από μικροοργανισμούς ευνοείται, για να διευκολυνθεί η δέσμευση θρεπτικών συστατικών. Τα φυτά μπορούν να αναγνωρίσουν τη διαθεσιμότητα των θρεπτικών ουσιών και να ενεργοποιήσουν την ανάπτυξη ριζών για να βελτιστοποιήσουν τη δέσμευσή τους (Oldroyd & Leyser, 2020).

1.2.1. Δέσμευση αζώτου (N)

Το άζωτο είναι απαραίτητο συστατικό των αμινοξέων (πρωτεΐνες), των νουκλεϊκών οξέων (DNA και RNA), της τριφωσφορικής αδενοσίνης (ATP) και του νικοτιναμιδο-αδενονουκλεοτιδίου (NAD) σε όλα τα ζωντανά κύτταρα. Ακόμα, είναι κύριο

συστατικό της χλωροφύλλης, της πιο σημαντικής χρωστικής, που απαιτείται για τη φωτοσύνθεση και παίζει κρίσιμο ρόλο στην ανάπτυξη των φυτών (Lindström & Mousavi, 2019). Τα περισσότερα φυσικά και καλλιεργούμενα οικοσυστήματα εμφανίζουν θεαματική αύξηση της παραγωγικότητας τους μετά από λίπανση με άζωτο, γεγονός που επιβεβαιώνει τη σπουδαιότητα του συγκεκριμένου στοιχείου (Zeiger & Taiz, 2016). Η βιολογική δέσμευση αζώτου, δηλαδή, η ικανότητα μετατροπής του ατμοσφαιρικού N_2 σε μορφές αξιοποιήσιμες από το φυτό γίνεται από βακτήρια και αρχαία και είναι μια από τις σημαντικότερες οικολογικές υπηρεσίες που προσφέρουν τα μικρόβια στους ευκαρυώτες (Masson-Boivin & Sachs, 2018). Τα βακτήρια που συμβιώνουν με τα φυτά και συμμετέχουν στην αζωτοδέσμευση ανήκουν στο γένος *Rhizobium* ή ριζόβια. Κατά την βιολογική αζωτοδέσμευση διασπάται ο σταθερός τριπλός ομοιοπολικός δεσμός μεταξύ των δύο ατόμων N, ώστε να παραχθούν αμμωνία ή νιτρικά ιόντα (Zeiger & Taiz, 2016). Μετά τη δέσμευση του σε αμμωνία ή νιτρικό, το άζωτο εισέρχεται σε έναν βιογεωχημικό κύκλο και προσλαμβάνει αλληπάλληλες οργανικές ή ανόργανες μορφές, προτού τελικά μετατραπεί πάλι σε ατμοσφαιρικό άζωτο.

1.2.2. Δέσμευση φωσφόρου (P)

Ο φώσφορος (P) είναι απαραίτητος για τη ζωή στη Γη καθώς αποτελεί βασικό στοιχείο στη φωτοσύνθεση, την αναπνοή, τη βιοσύνθεση νουκλεϊκών οξέων και μεμβρανών, αλλά παίζει σημαντικό ρόλο και στη ρύθμιση πολλών ενζύμων. Η διαθεσιμότητα που θα έχει ένα φυτό στον P του εδάφους εξαρτάται σε μεγάλο βαθμό από τη στρατηγική απόκτησης του. Για μη-μυκορριζικά είδη φυτών χωρίς συγκεκριμένη στρατηγική, μόνο ο P που βρίσκεται κοντά στην επιφάνεια των ριζών ή των ριζικών τριχιδίων είναι προσβάσιμος. Αυτά τα φυτά εμφανίζονται συνήθως σε ενδιαιτήματα πλούσια σε θρεπτικά συστατικά με υψηλή συγκέντρωση P στο εδαφικό διάλυμα (Lambers, 2022). Ωστόσο, τα περισσότερα χερσαία φυτά έχουν την ικανότητα να σχηματίζουν συμβιωτικές σχέσεις με μυκορριζικούς μύκητες, οι οποίοι αυξάνουν την απόκτηση φωσφορικών (P_i) και έτσι παρέχουν ουσιαστικό όφελος στα φυτά που αναπτύσσονται σε περιβάλλοντα με περιορισμένη διαθεσιμότητα φωσφόρου.

1.3. Συμβιωτικές σχέσεις

Τα φυτά έρχονται σε επαφή με ένα ευρύ φάσμα μικροοργανισμών, είτε με επιζήμια είτε με ευεργετικά αποτελέσματα. Βασικό στοιχείο για την επιβίωση των φυτών είναι η ικανότητα αναγνώρισης των μικροοργανισμών και είτε περιορισμός της εισβολής τους, στην περίπτωση παθογόνων, είτε προώθηση της επικοινωνίας, στην περίπτωση συμβιώσεων. Για αυτό το λόγο έχουν δημιουργηθεί περίπλοκα συστήματα επικοινωνίας και αντιεπικοινωνίας που καθορίζουν τον βαθμό εισόδου του μικροοργανισμού στο φυτό-ξενιστή. Κατά τη διάρκεια των συμβιωτικών συσχετισμών οι μικροοργανισμοί συλλέγουν θρεπτικά συστατικά από το περιβάλλον και τα δίνουν στο φυτό με αντάλλαγμα άνθρακα, που προέρχεται από τη φωτοσύνθεση. Οι καλύτερα μελετημένες συμβιωτικές αλληλεπιδράσεις είναι αυτές μεταξύ μεταξύ ψυχανθών και ριζοβίων βακτηρίων και μεταξύ φυτών και μυκορριζικών μυκήτων. Η επικοινωνία μεταξύ των μικροοργανισμών και του φυτού γίνεται στη ριζόσφαιρα και στη ρίζα του φυτού-ξενιστή.

1.3.1. Συμβιωτική σχέση ριζοβίων-φυτού

Οι αλληλεπιδράσεις ψυχανθών-ριζοβίων συνήθως ξεκινούν σε εδάφη περιορισμένα σε N, με τα φυτά να εκκρίνουν μια κατηγορία μεταβολιτών που ονομάζονται φλαβονοειδή. Τα ριζόβια τα αναγνωρίζουν ως σήματα, τα οποία πυροδοτούν τη σύνθεση και την απελευθέρωση μιας κατηγορίας λιποχιτοολιγোসακχαριτών (Lipo-chito-oligosaccharides -LCOs), που ονομάζονται παράγοντες φυματογένεσης (Nod factors). Οι παράγοντες Nod χρησιμεύουν ως σήματα ενημέρωσης του φυτού για μια δυνητικά ωφέλιμη συμβίωση. Η επακόλουθη αναγνώριση των παραγόντων Nod από τους υποδοχείς των φυτών οδηγεί στην αναγνώριση των βακτηρίων, πυροδοτώντας μια σειρά φυτικών αποκρίσεων για την έναρξη της συμβιωτικής σχέσης (Roy et al., 2019).

Τα βακτήρια έχουν πρόσβαση στο φυτό είτε μέσω άμεσης εισβολής στα επιδερμικά κύτταρα (από ρωγμές στην επιδερμίδα που προκαλούνται από την εμφάνιση πλευρικών ριζών) ή μέσω της παραμόρφωσης των ριζικών τριχιδίων, των οποίων οι άκρες κουλουριάζονται παγιδεύοντας βακτήρια στο κέντρο (Oldroyd, 2001). Τα ριζόβια για να φτάσουν από την επιφάνεια της ρίζας στον εσωτερικό ιστό της όπου θα αρχίζουν να

πολλαπλασιάζονται, σχηματίζουν μια σωληνοειδή δομή που ονομάζεται μολυσματικό νημάτιο. Ταυτόχρονα τα κύτταρα του φλοιού αρχίζουν να διαιρούνται και σχηματίζεται το μερίστωμα του φυματίου. Μέσα στο νημάτιο τα ριζόβια αναπτύσσονται και διαιρούνται και τελικά εξέρχονται από αυτό και εισέρχονται στα φυμάτια. Εκεί, συνεχίζουν να διαφοροποιούνται και να συνθέτουν πρωτεΐνες που απαιτούνται για τη δέσμευση αζώτου και για τη διατήρηση της συμβίωσης (Gage, 2004).

Δύο είναι τα είδη των διαμεμβρανικών υποδοχέων, που αναγνωρίζουν τους παράγοντες Nod: ο NFR1 (Nod factor receptor 1) και ο NFR5 (Nod factor receptor 5), που παίζουν εξίσου σημαντικό ρόλο στον αποικισμό της ρίζας. Οι υποδοχείς αυτοί έχουν εξωκυττάρειες LysM περιοχές, που μπορούν να αναγνωρίζουν τους παράγοντες Nod, ενώ ο NFR1 έχει και δράση κινάσης, φωσφορυλιώνοντας τον εαυτό του και την κυτταροπλασματική περιοχή του NFR5, επάγοντας έτσι την σηματοδότηση (Oldroyd, 2013).

Από τις πρώτες αποκρίσεις που παρατηρούνται στο φυτό μετά την αναγνώριση των παραγόντων Nod είναι ιοντικές διακυμάνσεις της πυρηνικής μεμβράνης των επιδερμικών ριζικών κυττάρων. Συγκεκριμένα, η μεμβράνη υφίσταται μια παροδική εκπόλωση που είναι το αποτέλεσμα εισροής ιόντων ασβεστίου Ca^{2+} ακολουθούμενη από εκροή Cl^- και K^- που εξισορροπεί το φορτίο (Oldroyd, 2001). Ακόμη παρατηρείται η επαγωγή επαναλαμβανόμενων αυξομειώσεων ασβεστίου, που οφείλεται στην ενεργοποίηση της ασβεστιο- και καλμοδουλινο-εξαρτώμενης πρωτεϊνικής κινάσης σερίνης/θρεονίνης CCaMK (η οποία ενεργοποιείται απευθείας από το ασβέστιο). Αυτές οι αυξομειώσεις του ασβεστίου σε συνδυασμό με την κινάση CCaMK επάγουν την έκφραση γονιδίων που σχετίζονται με τη φυματιογένεση (Oldroyd, 2013). Κεντρικά γονίδια στην συμβίωση φυτού-ριζοβίων είναι τα *NSP2* (Nodulation Signaling Pathway Gene 2) και *NSP1*. Μεταλλάξεις σε αυτά τα γονίδια αποκαλύπτουν τον ουσιαστικό ρόλο τους στη σηματοδότηση, καθώς η πλειονότητα των αποκρίσεων στους παράγοντες Nod είτε δεν υπήρχε είτε ήταν επηρεασμένη (Kaló et al., 2005). Οι *NSP1* και *NSP2* μεταγραφικοί παράγοντες που κωδικοποιούνται, είναι απαραίτητοι για την έκφραση γονιδίων του μονοπατιού της φυματιογένεσης όπως το *NIN* και το *ERN1* (Oldroyd, 2013).

Εκτός όμως από τους μηχανισμούς της φυματιογένεσης και της επαγωγής της συμβίωσης, τα φυτά διαθέτουν και έναν σημαντικό μηχανισμό για την ρύθμιση της μικροβιακής μόλυνσης και του αποικισμού του φυτού-ξενιστή από τα βακτήρια. Προκειμένου να εξισορροπηθεί το ενεργειακό κόστος με το όφελος που αποκομίζουν,

τα φυτά χρησιμοποιούν έναν μηχανισμό αρνητικής ανατροφοδότησης για τον έλεγχο της συμβίωσης που είναι γνωστός ως αυτορρύθμιση της φυματιογένεσης ή Autoregulation of Nodulation (AON) (Wang et al., 2018). Ο μηχανισμός AON είναι υπεύθυνος για τη διατήρηση του βέλτιστου αριθμού φυματίων στη ρίζα.

Στο *Lotus japonicus*, το AON περιλαμβάνει το σύστημα CLE-HAR1-TML, που διαδραματίζει ουσιαστικό ρόλο στη μετάδοση σημάτων μεγάλων αποστάσεων από τη ρίζα στο βλαστό και ανάποδα (Nishida et al., 2020). Η παραγωγή πεπτιδίων CLE παίζει σημαντικό ρόλο στην έναρξη του AON. Στο *Lotus japonicus*, τρία πεπτίδια CLE (CLE-RS1/2/3) έχουν αποδειχθεί ότι επάγονται από την παρουσία ριζοβίων στις ρίζες των φυτών ξενιστών. Η ιδιόσυστατη έκφραση των γονιδίων CLE ρυθμίζει αρνητικά τον αριθμό των φυματίων (Nishida et al., 2020). Συγκεκριμένα, τα πεπτίδια CLE από τη ρίζα μετακινούνται στον βλαστό μέσω του ξυλώματος (Masahiro et al., 2013), όπου και συνδέονται με τον υποδοχέα-κινάση HAR1. Ως αποτέλεσμα παράγεται κυτοκινίνη σε βλαστούς (από την αύξηση της ρύθμισης ενός γονιδίου σύνθεσης κυτοκινίνης, του *IPT3*). Η κυτοκινίνη μεταφέρεται από το βλαστό στη ρίζα, όπου αναστέλλει τη δημιουργία των φυματίων (Nishida et al., 2020). με τη βοήθεια μιας πρωτεΐνης με F-box περιοχή, της TML, που εκφράζεται μόνο στα κύτταρα της ρίζας

Επίσης βασικό ρόλο στο AON παίζει το μικρό RNA miR2111, που στοχεύει το γονίδιο *TML*. Τα μικρά RNA (miRNAs) είναι βασικοί ρυθμιστές της γονιδιακής έκφρασης και δρουν με παρεμπόδιση της μεταγραφής του στόχου τους ή/και με μεταφραστική καταστολή. Αυτά τα μικρά μόρια RNA είναι κυρίως 21 nt σε μέγεθος και έχουν σημαντικό ρόλο στη ρύθμιση της ανάπτυξης, της ορμονικής σηματοδότησης και των αβιοτικών και βιοτικών καταπονήσεων του φυτού (Hofferek et al., 2014). Το miR2111 αποδείχτηκε ότι ενισχύει την φυματιογένεση, καθώς στοχεύει και παρεμποδίζει το *TML* (Tsikou et al. 2018). Το *TML* είναι μια πρωτεΐνη με F-box περιοχή που αποτελεί συστατικό του συμπλόκου της E3 λιγάσης της ουβικιτίνης και που εκφράζεται μόνο στα κύτταρα της ρίζας (Takahara et al. 2013). Επομένως, φαίνεται, ότι το σύστημα miR2111-TML παίζει σημαντικό ρόλο στο AON.

Ένας μηχανισμός παρόμοιος με τον AON θεωρείται ότι ρυθμίζει τον αποικισμό φυτών από μυκορριζικούς μύκητες και ονομάζεται μηχανισμός αυτορρύθμισης των μυκόρριζων ή Autoregulation of mycorrhization (AOM) (Wang et al., 2018).

1.3.2. Συμβιωτική σχέση ενδομυκορριζικών μυκήτων-φυτού

Η πιο συχνή συμβιωτική σχέση μεταξύ μικροοργανισμών και φυτού-ξενιστή είναι αυτή μυκήτων με φυτά. Οι συμβιώσεις μεταξύ φυτών και μυκήτων είναι ευρέως διαδεδομένες και αρχαίες, με στοιχεία από απολιθώματα να δείχνουν ότι τέτοιες αλληλεπιδράσεις εξελίχθηκαν κατά τον αποικισμό της γης από φυτά 450 με 475 εκατομμύρια χρόνια πριν (Wang et al., 2018). Φυλογενετικές αναλύσεις δείχνουν ότι τα γονίδια της συμβίωσης καθώς και η λειτουργία των κωδικοποιημένων πρωτεϊνών είναι συντηρημένα, γεγονός που υποδηλώνει ότι οι πρόγονοι των φυτών ήταν προσαρμοσμένοι για τη συμβίωση με μύκητες (MacLean et al., 2017).

Το 80-90% όλων των χερσαίων φυτών μπορούν να συμβιώσουν με μύκητες του φύλου *Glomeromycotina*. Οι μύκητες λαμβάνουν άνθρακα από το φυτό και σε αντάλλαγμα παρέχουν βελτιωμένη πρόσβαση σε θρεπτικά συστατικά του εδάφους και κυρίως σε φωσφορικά (Luginbuehl & Oldroyd, 2017). Οι πιο διαδεδομένες συμβιωτικές σχέσεις είναι αυτές των δενδρόμορφων ενδομυκορριζικών μυκήτων (ΔΜΜ) με φυτά. Αντίθετα με τα ριζόβια, η συμβίωση με ΔΜΜ δεν οδηγεί στο σχηματισμό φυματίων, αλλά στην ανάπτυξη δενδρόμορφων δομών στον εσωτερικό φλοιό της ρίζας (arbuscules), που συμμετέχουν στη μεταφορά των θρεπτικών συστατικών.

Προκειμένου να αρχίσει η συμβίωση, το φυτό εκκρίνει στριγγολακτόνες, τις οποίες αντιλαμβάνονται οι ΔΜΜ, που βρίσκονται στη ριζόσφαιρα. Η σύνθεση και έκκριση των στριγγολακτόνων προκαλείται από τον περιορισμό του P (Hofferek et al., 2014). Ως απόκριση, οι ΔΜΜ εκκρίνουν τους παράγοντες Myc, που περιλαμβάνουν λιποχιτοολιγосακχαρίτες (LCOs), οι οποίοι μοιάζουν με τους παράγοντες Nod και αναγνωρίζονται από το φυτό-ξενιστή ενεργοποιώντας το σηματοδοτικό μονοπάτι της συμβίωσης. Η εισχώρηση του μύκητα στα φυτικά κύτταρα περιλαμβάνει τη δημιουργία μιας δομής, του προδιεισδυτικού συστήματος (Prepenetration apparatus), απ' όπου ο μικροοργανισμός εισέρχεται στο φλοιό της ρίζας μέσω των υφών.

Το γεγονός ότι οι ΔΜΜ εκκρίνουν LCOs, που επάγουν απόκριση από το φυτό, δείχνει ότι κινάσες με περιοχές LysM σχετίζονται με την μυκορριζική συμβίωση (Oldroyd, 2013). Εκτός από τους Myc-LCOs εκκρίνονται και απλούστεροι χιτοολιγосακχαρίτες που ονομάζονται Myc-COs. Τόσο οι Myc-COs όσο και οι Myc-LCOs μπορούν να προκαλέσουν επαναλαμβανόμενες αυξομειώσεις ασβεστίου Ca^{2+} , το οποίο θεωρείται χαρακτηριστικό της συμβιωτικής σηματοδότησης στα ψυχανθή. Μέχρι στιγμής, η

βιολογική σημασία της παραγωγής τόσο των Myc-COs, όσο και των Myc-LCOs παραμένει ασαφής. Είναι πιθανό, ότι η ποικιλία μορίων σηματοδότησης συμβάλλει στην ικανότητα των ΔΜΜ να αλληλεπιδρούν με ένα ευρύ φάσμα φυτών ξενιστών ή στη συνολική ευρωστία του συστήματος (Lanfranco et al., 2018). Όπως και στα ριζόβια, οι αυξομειώσεις ασβεστίου Ca^{2+} οδηγούν σε ενεργοποίηση της κινάσης CCaMK και στην ενεργοποίηση των μεταγραφικών παραγόντων NSP2 και RAM1 (αντί για NSP1) (Oldroyd, 2013).

Υπολογίζεται, ότι κατά την συμβίωση μεταφέρεται στους μύκητες ΔΜΜ το 4 με 20% του άνθρακα, που φτιάχνεται από το φυτό (Wang et al., 2018). Για να αποτραπεί η ανάπτυξη μιας πιθανώς παρασιτικής σχέσης, τα φυτά ρυθμίζουν τον αποικισμό ΔΜΜ μέσω ενός μηχανισμού, που ονομάζεται μηχανισμός αυτορρύθμισης των μυκόρριζων ή Autoregulation of mycorrhization (AOM) (Wang et al., 2018). Στο AOM βρέθηκε ότι παίζουν ρόλο τα πεπτίδια CLE (διαφορετικά από αυτά στη συμβίωση φυτού-ριζοβίου). Συγκεκριμένα, τα πεπτίδια CLE ρυθμίζουν αρνητικά τα επίπεδα αποικισμού ΔΜΜ με το να αλλάζουν την περιεκτικότητα της ρίζας σε στριγγολακτόνες. Η λειτουργία των CLE απαιτεί μια κινάση-υποδοχέα, την SUNN. Έτσι, το σύστημα CLE-SUNN-στριγγολακτόνων είναι ένας τρόπος αυτορρύθμισης μέσω του οποίου το φυτό ρυθμίζει τα επίπεδα αποικισμού (Müller et al., 2019).

Ακόμα, φαίνεται ότι και οι δύο τύποι συμβίωσης (ριζόβια-φυτό, ΔΜΜ-φυτό) ρυθμίζονται από το NSP2, το οποίο αποδείχτηκε ότι είναι στόχος του μικρού RNA 171h (miR171h) στο *Medicago truncatula*. Το miR171h ρυθμίζει αρνητικά τη συμβίωση, αφού καταστέλλει τον μεταγραφικό παράγοντα NSP2, που είναι απαραίτητος και στην φυματογένεση και στη μόλυνση από μύκητα (Hofferek et al., 2014).

2. Υλικά και μέθοδοι

2.1 Βιολογικό υλικό και συνθήκες ανάπτυξης

Σε όλες τις πειραματικές διαδικασίες χρησιμοποιήθηκε το ψυχανθές φυτό *Lotus japonicus* αγρίου τύπου και συγκεκριμένα ο οικότυπος *Gifu*.

Ως ενδομυκορριζικός μύκητας χρησιμοποιήθηκε ο εμπορικά διαθέσιμος μύκητας *Rhizophagus irregularis* στέλεχος DAOM (της εταιρείας Agronutrition).

Όλα τα φυτά αναπτύχθηκαν μέσα σε αποστειρωμένα δοχεία magentas, με , ενώ για κάθε χειρισμό που πραγματοποιήθηκε χρησιμοποιήθηκαν 5 βιολογικές επαναλήψεις, με κάθε βιολογική επανάληψη (κάθε δοχείο magenta) να έχει 3 φυτά. Τα δοχεία magenta περιείχαν ψημμένη άμμο και θρεπτικό Long-Aston Solution (LAS: 0.75 mM MgSO₄, 1 mM NaNO₃, 1 mM K₂SO₄, 2 mM CaCl₂, 3.2 μM Na₂HPO₄, 25 μM FeNaEDTA, 5 μM MnSO₄, 0.25 μM CuSO₄, 0.5 μM ZnSO₄, 25 μM H₃BO₃, 0.1 μM Na₂MoO₄), με διάφορες τροποποιήσεις που εξυπηρετούσαν τα διαφορετικά πειράματα που πραγματοποιήθηκαν στην παρούσα εργασία.

Τα φυτά αναπτύχθηκαν σε θάλαμο ανάπτυξης φυτών με ρυθμιζόμενες συνθήκες, 25°C θερμοκρασία και φωτοπερίοδο 16 ώρες φως / 8 ώρες σκοτάδι.

2.2. Απολύμανση και εκβλάστηση των σπόρων

Ως πρώτο βήμα για κάθε πειραματική διαδικασία είναι η απολύμανση των σπόρων, για την αποφυγή ανάπτυξης ανεπιθύμητων μικροοργανισμών, αλλά και την διευκόλυνση της εκβλάστησης τους. Το πρωτόκολλο που ακολουθήθηκε είναι το εξής:

1. Αρχικά, γίνεται προσθήκη των σπόρων σε πυκνό H₂SO₄ για 20min. Με αυτόν τον τρόπο σπάει το σκληρό περίβλημα του σπόρου και σταματάει ο λήθαργος.
2. Ακολουθούν 5 πλύσεις με dH₂O. Οι δύο πρώτες γίνονται γρήγορα καθώς το H₂SO₄ αντιδρά με το H₂O και παράγεται θερμότητα που μπορεί να σκοτώσει τα έμβρυα.
3. Έπειτα, γίνεται επώαση των σπόρων σε διάλυμα χλωρίνης 20%, για 10min με ταυτόχρονη ανάδευση.
4. Η διαδικασία συνεχίζεται στο θάλαμο νηματικής ροής όπου γίνεται αφαίρεση της χλωρίνης και 6 πλύσεις με dH₂O.

5. Τέλος, πραγματοποιείται επώαση των σπόρων σε dH₂O στους 4°C κατά τη διάρκεια της νύχτας.

Η προετοιμασία εκβλάστησης των σπόρων πραγματοποιείται στο θάλαμο νηματικής ροής:

1. Πρώτα, τοποθετούνται 3 διηθητικά χαρτάκια σε κάθε τρυβλίο με τη χρήση αποστειρωμένης λαβίδας.
2. Έπειτα, προστίθενται 2,5ml dH₂O σε κάθε τρυβλίο και με τη λαβίδα τακτοποιούνται με τρόπο που να μην υπάρχει εγκλωβισμένος αέρας.
3. Ακολουθεί η τοποθέτηση των σπόρων στα τρυβλία έτσι ώστε να μην υπάρχει επαφή μεταξύ τους.
4. Τέλος, το τρυβλίο κλείνει με parafilm και τοποθετείται όρθιο στο θάλαμο ανάπτυξης φυτών.

Με το πέρας 7 ημερών ολοκληρώνεται η εκβλάστηση των σπόρων.

2.3. Δημιουργία θρεπτικών υλικών

2.3.1. Πείραμα πρώτο

Για τους χειρισμούς του πρώτου πειράματος, στο οποίο αλλάζουν οι συγκεντρώσεις του αζώτου και του φωσφόρου, έγινε τροποποίηση του θρεπτικού μέσου LAS, έτσι ώστε όλα τα φυτά να έχουν πρόσβαση σε ίδια συγκέντρωση μαγνησίου και ασβεστίου, ενώ για να υπάρχει ίδια συγκέντρωση καλίου (το οποίο αλλάζει λόγω της προσθήκης KNO₃ και KH₂PO₄) έγινε προσθήκη KCl. Έτσι τα θρεπτικά υλικά είναι τα εξής:

	-N-P	-N+P	+N-P	+N+P
MgSO ₄	0,75mM	0,75mM	0,75mM	0,75mM
KNO ₃	-	-	5mM	5mM
CaCl ₂	2mM	2mM	2mM	2mM
KH ₂ PO ₄	3,2μM	0,5mM	3,2μM	0,5mM
KCl	5,5mM	5mM	0,5mM	-

Κάθε βιολογική επανάληψη (δηλαδή κάθε δοχείο magenta) χρειάζεται 60mL θρεπτικού και για κάθε χειρισμό υπάρχουν 5 βιολογικές επαναλήψεις, άρα έπρεπε να φτιαχτούν 300mL θρεπτικό υλικό για κάθε χειρισμό. Οι ποσότητες που παρουσιάζονται στον παρακάτω πίνακα χρησιμοποιήθηκαν για την προετοιμασία 300ml θρεπτικού για τον κάθε χειρισμό.

	-N-P	-N+P	+N-P	+N+P
MgSO ₄	0,6mL	0,6mL	0,6mL	0,6mL
KNO ₃	-	-	3,75mL	3,75mL
CaCl ₂	0,6mL	0,6mL	0,6mL	0,6mL
KH ₂ PO ₄	3,2μL	0,5mL	3,2μL	0,5mL
KCl	5,5mL	5mL	0,5mL	-

Τα υπόλοιπα συστατικά των θρεπτικών (τα ιχνοστοιχεία) παραμένουν ίδια όπως στο LAS, δηλαδή για 300mL: FeNaEDTA 15μL, MnSO₄ 15μL, CuSO₄ 7,5μL, H₃BO₃ 75μL, Na₂MoO₄ 1,2μL. Το pH των διαλυμάτων ρυθμίστηκε στο 5,7. Ακολούθησε αποστείρωση.

2.3.2. Πείραμα δεύτερο

Στο δεύτερο πείραμα υπάρχει μόνο μία συνθήκη, αυτή χωρίς άζωτο. Επομένως, έγινε η δημιουργία ενός θρεπτικού (τροποποιημένο LAS), απουσία N. Συγκεκριμένα περιείχε: MgSO₄ 1mL, K₂SO₄ 1mL, CaCl₂ 1mL, Na₂HPO₄ 16mL, KCl 8,33 mL, FeNaEDTA 25μL, MnSO₄ 25μL, CuSO₄ 12,5μL, H₃BO₃: 125μL, Na₂MoO₄: 2μL. Οι ποσότητες αυτές χρησιμοποιήθηκαν για την προετοιμασία 500mL θρεπτικού μέσου.

2.3.3. Πείραμα τρίτο

Για τους 2 χειρισμούς του τρίτου πειράματος δημιουργήθηκαν 2 διαφορετικά θρεπτικά υλικά (και τα δύο τροποποιημένα LAS). Επειδή στο πείραμα αυτό τα φυτά θα αναπτύσσονται για 6 εβδομάδες χρησιμοποιούνται διπλά δοχεία magentas και 70mL θρεπτικού στο καθένα. Έτσι,

- για τη συνθήκη -N το θρεπτικό θα περιέχει: MgSO₄ 1,4mL, K₂SO₄ 1,4mL, CaCl₂ 1,4mL, Na₂HPO₄ 22,4mL, **KCl** 11,66 mL, FeNaEDTA 35μL, MnSO₄ 35μL, CuSO₄ 17,5μL, H₃BO₃: 175μL, Na₂MoO₄: 2,8μL.
- για τη συνθήκη +N το θρεπτικό θα περιέχει: MgSO₄ 1,4mL, K₂SO₄ 1,4mL, CaCl₂ 1,4mL, Na₂HPO₄ 22,4mL, **KNO₃** 8,75mL, FeNaEDTA 35μL, MnSO₄ 35μL, CuSO₄ 17,5μL, H₃BO₃: 175μL, Na₂MoO₄: 2,8μL.

Οι ποσότητες αυτές χρησιμοποιήθηκαν για την προετοιμασία 700mL θρεπτικού μέσου.

2.4. Μεταφύτευση

Για τη διαδικασία της μεταφύτευσης ακολουθήθηκαν δύο διαφορετικά πρωτόκολλα. Στο πρώτο πείραμα έγινε απλή τοποθέτηση των νεαρών φυτών σε δοχεία magentas, ενώ στο δεύτερο και στο τρίτο πείραμα έγινε μεταφύτευση σε δοχεία magentas με τη μέθοδο sandwich.

2.4.1. Απλή μεταφύτευση σε δοχεία magentas

Σε αποστειρωμένα δοχεία magenta προστίθεται χοντρή ψημμένη άμμος, έτσι ώστε να καλύπτει τα 2/3 του κάθε δοχείου. Η άμμος ψήνεται στους 180°C για τουλάχιστον 6 ώρες. Ακολουθεί η προσθήκη 60mL θρεπτικού υλικού σε κάθε δοχείο magenta.

Τέλος, γίνεται η τοποθέτηση των φυτών στα δοχεία (3 φυτά ανά δοχείο magenta) και η μεταφορά τους στο θάλαμο ανάπτυξης φυτών, στους 25°C, για 3 εβδομάδες.

2.4.2. Μεταφύτευση σε δοχεία magentas με τη μέθοδο sandwich

Η μέθοδος sandwich χρησιμοποιείται σε πειράματα που περιλαμβάνουν εμβολιασμό με ΔΜΜ και έχει στόχο να επιτευχθεί το μεγαλύτερο δυνατό ποσοστό αποικισμού. Το πρωτόκολλο που ακολουθείται είναι το εξής:

Σε αποστειρωμένα δοχεία magenta προστίθεται χοντρή αποστειρωμένη άμμος, έτσι ώστε να καλύπτει τα 2/3 του κάθε δοχείου. Έπειτα, γίνεται προσθήκη 70mL τροποποιημένου LAS σε κάθε magenta, ανάδευση της άμμου και σχηματισμός μιας διαγώνιας σχισμής. Ακολουθεί η ενυδάτωση δίσκων νιτροκυτταρίνης μέσω ενός τρυβλίου με άγαρ και νερό. Πάνω στον ένα δίσκο τοποθετούνται τρία φυτά με το

υπέργειο τμήμα τους να εξέχει αυτού. Πάνω στις ρίζες των φυτών τοποθετείται το εμβόλιο. Το εμβόλιο που χρησιμοποιήθηκε ήταν ο μύκητας *R. irregularis* στέλεχος DAOM συγκέντρωσης 2000 σπορίων ανά mL. Για τα πειράματα χρειάζονται 100 σπόρια ανά φυτό, δηλαδή 300 σπόρια ανά δοχείο magenta, άρα θα αραιωθεί η αρχική συγκέντρωση στο μισό και θα χρησιμοποιηθούν 300μL εμβολίου στο κάθε δοχείο magenta. Μετά τον εμβολιασμό τοποθετείται ένας δεύτερος δίσκος πάνω στον αρχικό και δημιουργείται το sandwich, το οποίο και τοποθετείται μέσα στη σχισμή της άμμου. Στα φυτά ελέγχου, δηλαδή σε αυτά που δεν πρέπει να υπάρχει μύκητας, προστίθεται ίση ποσότητα dH₂O (300μL).

Στη συνέχεια, τα φυτά μεταφέρονται στο θάλαμο ανάπτυξης φυτών.

2.5. Απομόνωση ολικού RNA από ρίζες

Το πρωτόκολλο που χρησιμοποιήθηκε ήταν κατάλληλο όχι μόνο για την απομόνωση του RNA αλλά και των miRNAs:

Διαλύματα

- Διάλυμα λύσης
 - 100mM Tris-HCl
 - 10mM EDTA (pH 8,0)
 - 500mM LiCl
 - 1% LiDS
 - 5mM DTT
- Trizol LS
- Chloroform
- Acetic acid 1M
- NaOAc 3M
- EtOH 80% και 100%
- LoTE (ρύθμιση του pH)
 - 3mM Tris-HCl pH 7,5
 - 0,2 mM EDTA pH 7,5

Μέθοδος

1. Τοποθέτηση των δειγμάτων σε σωληνάρια eppendorf και μετά σε υγρό N₂,
2. Λειοτρίβηση των ριζών με τη χρήση εμβόλου, ώστε να σπάσει το κυτταρικό τοίχωμα.
3. Προσθήκη 450μL διαλύματος λύσης στα σωληνάρια, και έντονη ανάδευση (vortex),
4. Φυγοκέντρηση 10min σε μέγιστη ταχύτητα στους 4°C
5. Προσθήκη του υπερκειμένου σε tube που περιέχει 500μL Trizol LS.
6. Vortex για 30sec και επώαση σε θερμοκρασία δωματίου για 5min.
8. Φυγοκέντρηση για 5min.
9. Προσθήκη του υπερκειμένου σε σωληνάριο eppendorf που περιέχει 125μL χλωροφόρμιο.
10. Ανάδευση (Vortex) για 30sec και επώαση σε θερμοκρασία δωματίου για 2min.
11. Φυγοκέντρηση για 10min στους 4°C.
12. Διαχωρισμός της υδάτινης φάσης
13. Προσθήκη 0.1 vol 3 M NaOAc, και σύντομη ανάδευση (vortex).
14. Προσθήκη 0.1 vol. οξικό οξύ και 2.5 vol. 100% EtOH, ήπια ανάδευση και διατήρηση στους -20°C για τη νύχτα.
16. Φυγοκέντρηση για 45min στους 4°C.
17. Απομάκρυνση υπερκειμένου.
18. Έκπλυση του ιζήματος με 500μL 80% EtOH, ήπια ανακίνηση, χωρίς να επαναιώρηση το ιζήματος.
19. Φυγοκέντρηση για 10min στους 4°C και απομάκρυνση του υπερκειμένου.
20. Φυγοκέντρηση για 30sec και απομάκρυνση της EtOH που έχει απομείνει.
21. Στέγνωμα του ιζήματος για περίπου 7min.
22. Επαναδιάλυση του σε 20μL LoTE buffer.
23. Θέρμανση των δειγμάτων στους 65°C για 2min.
24. Σύντομη ανάδευση (vortex) και τοποθέτηση στον πάγο.
25. Διατήρηση στους -80°C.

2.6. Απομάκρυνση DNA από δείγματα RNA

Επόμενο βήμα για την απομόνωση του RNA είναι ο καθαρισμός των δειγμάτων από DNA. Για το λόγο αυτό πραγματοποιείται χειρισμός με DNAση.

Αρχικά, πραγματοποιείται φωτομέτρηση στα 260 και στα 280nm (σε nanodrop) για την μέτρηση των συγκεντρώσεων του RNA των δειγμάτων και την εκτίμηση της καθαρότητάς του. Έπειτα, με βάση τα αποτελέσματα γίνεται υπολογισμός του όγκου που θα χρησιμοποιηθεί από το κάθε δείγμα στην αντίδραση DNAσης.

Η αντίδραση DNAσης ακολουθεί το παρακάτω πρωτόκολλο:

Αντιδραστήρια

10x διάλυμα DNase	1μL
Ένζυμο DNase (1U/μl)	1,1μL
RNase out (αναστολέας RNAσων) (40U/μl)	0,25μL
Δείγμα RNA	700 ng
ddH ₂ O	ως τον τελικό όγκο
Τελικός όγκος	10 μL

Μέθοδος

1. Επώαση για 45 λεπτά στους 37°C
2. Προσθήκη 1μL EDTA 50mM και επώαση για 10min στους 65°C, ώστε να σταματήσει η δράση της DNAσης.

2.7. PCR ελέγχου

Η αλυσιδωτή αντίδραση πολυμεράσης (polymerase chain reaction PCR) είναι μια *in vitro* διαδικασία που χρησιμοποιείται για την ενίσχυση αλληλουχιών DNA έχοντας ως εκμαγείο το ίδιο το DNA. Η PCR χρησιμοποιεί το ένζυμο DNA πολυμεράση. Ο πολυμερισμός ξεκινά με την υβριδοποίηση ειδικών ολιγονουκλεοτιδίων-εκκινητών, που έχουν συντεθεί τεχνητά και οι οποίοι καθορίζουν και τα άκρα της αλληλουχίας που πρόκειται να ενισχυθεί. Μέσω θερμοκρασιακών μεταβολών πραγματοποιούνται αποδιατάξεις και υβριδοποιήσεις που έχουν σαν αποτέλεσμα την εκθετική αύξηση του DNA. Ως εκκινητές στο συγκεκριμένο πείραμα χρησιμοποιούνται αλληλουχίες του γονιδίου της ουβικιτίνης, που εκφράζεται σε όλους τους ιστούς του φυτού.

Αντιδραστήρια

Δείγμα μετά την πέψη με DNAση	1 μL
Taq DNA πολυμεράση	0,08 μL
dNTPs (10mM)	0,4 μL
Εμπρόσθιος εκκινητής (10 μM)	0,8 μL
ανάστροφος εκκινητής (10 μM)	0,8 μL
10x Ρυθμιστικό διάλυμα	2 μL
ddH ₂ O	14,92 μL
Τελικός όγκος	20 μL

Πρόγραμμα αντίδρασης

Χρόνος	Θερμοκρασία	
5min	95 °C	έναρξη
30sec	95 °C	αποδιάταξη
30sec	55 °C	υβριδοποίηση
10sec	72 °C	επιμήκυνση
4min	72 °C	τέλος
∞	4 °C	διατήρηση

Πραγματοποιήθηκαν συνολικά 40 κύκλοι.

2.8. Ηλεκτροφόρηση σε πηκτή αγαρόζης

Μετά το πέρας των 40 κύκλων PCR ακολουθεί ο έλεγχος των δειγμάτων με ηλεκτροφόρηση. Όταν εφαρμόζεται ηλεκτρικό ρεύμα, τα μόρια νουκλεϊκών οξέων μπορούν να κινηθούν δια μέσου ενός πορώδους πηκτώματος του πολυσακχαρίτη αγαρόζη προς τον θετικό πόλο, λόγω των αρνητικά φορτισμένων φωσφορικών ομάδων. Όσο μεγαλύτερη είναι η συγκέντρωση αγαρόζης στο πήκτωμα, τόσο ισχυρότερη είναι η αντίσταση που προβάλλεται στην κίνηση των μεγαλύτερων μορίων (Madigan et al., 2018). Στο συγκεκριμένο πείραμα φτιάχτηκε πήκτωμα με 1% αγαρόζη. Στη συνέχεια έγινε προσθήκη βρωμιούχου αιθιδίου (EtBr). Το EtBr είναι μια φθορίζουσα ουσία που παρεμβάλλεται ανάμεσα στις βάσεις των δύο αλυσίδων του DNA και του προσδίνει την ιδιότητα να φθορίζει στο υπεριώδες φως. Σε ένα οριζόντιο εκμαγείο από πλεξιγκλάς τοποθετείται το διάλυμα και όσο είναι ακόμα υγρό τοποθετείται ένα

χτενάκι. Μόλις το διάλυμα πήξει, το χτενάκι αφαιρείται δημιουργώντας φρεάτια. Στη συνέχεια, το πήκτωμα τοποθετείται στην συσκευή ηλεκτροφόρησης και τα δείγματα «φορτώνονται» με πιπέτα στα φρεάτια της πηκτής. Η θέση της μετακίνησης του DNA μέσα στο πήκτωμα συγκρίνεται με ένα πρότυπο δείγμα που ονομάζεται κλίμακα DNA (DNA ladder). Τα δείγματα αφήνονται να «τρέξουν» για μισή ώρα και έπειτα αναλύονται κάτω από υπεριώδες φως.

2.9. Σύνθεση cDNA

Αφού έχει γίνει η απομόνωση του ολικού RNA των ιστών και έχει διασφαλιστεί ότι κανένα από τα δείγματα δεν περιέχει DNA, επόμενο βήμα είναι η σύνθεση cDNA. Τα ευκαρυωτικά mRNA έχουν την ιδιότητα να περιέχουν ουρές πολυ-A στα 3' άκρα τους, γεγονός που ευνοεί την εύκολη απομόνωση τους. Για τη σύνθεση του cDNA χρησιμοποιείται ένας εκκινητής αποτελούμενος από T νουκλεοτίδια (oligodT primer) ο οποίος υβριδίζει την πολυ-A ουρά των mRNA και ένας εκκινητής stemloop, ειδικός για τα μικρά RNA. Το ένζυμο που καταλύει τη αντίδραση σύνθεσης του cDNA με εκμαγείο RNA είναι η αντίστροφη μεταγραφάση.

Αντιδραστήρια

Δείγμα μετά την πέψη με DNάση	5μL
oligodT (2μM)	1μL
miR211 stemloop εκκινητής (0,5μM)	1μL
miR171c stemloop εκκινητής (0,5μM)	1μL
ddH ₂ O	έως τα 17μL

Επώαση στους 70 °C για 5min ώστε να γίνει η αποδιάταξη των RNA και των εκκινητών.

5x Ρυθμιστικό διάλυμα (Invitrogen)	5 μL
dNTPs (10mM)	1,5 μL
ένζυμο αντίστροφης μεταγραφάσης	
Superscript II (Invitrogen) (200U/μl)	1 μL
RNase out (40u/μL)	0,5 μL

Πρόγραμμα αντίδρασης

Χρόνος	Θερμοκρασία
30min	16 °C
30sec	30 °C
30sec	42 °C
1sec	50 °C
5min	85 °C
∞	4 °C

Πραγματοποιήθηκαν συνολικά 60 κύκλοι.

2.10. PCR πραγματικού χρόνου (qPCR)

Η ποσοτική αλυσιδωτή αντίδραση πολυμεράσης (qPCR) ή PCR πραγματικού χρόνου (Real-Time PCR) είναι μια τεχνική ενίσχυσης τμημάτων DNA που βασίζεται στην PCR. Σε αντίθεση με τη συμβατική PCR, η qPCR επιτρέπει τον ποσοτικό προσδιορισμό των αντιγράφων του DNA. Αυτό γίνεται με την μέτρηση του φθορισμού καθ' όλη τη διάρκεια της αντίδρασης, καθώς στα αντιδραστήρια έχει προστεθεί μια φθορίζουσα χρωστική. Σε αυτήν την εργασία ως χρωστική χρησιμοποιήθηκε η SYBR green (εταιρεία Kapa). Τα προϊόντα της αντίδρασης αυξάνονται εκθετικά σε κάθε κύκλο. Η μέτρηση του φθορισμού πραγματοποιείται κατά την εκθετική φάση της καμπύλης (log phase). Επίσης, για τον έλεγχο της παρουσίας διμερών και παραπροϊόντων δημιουργείται μια καμπύλης τήξης (melting curve).

Μέθοδος

Πρώτο βήμα είναι η εφαρμογή qPCR κανονικοποίησης. Με αυτήν την διαδικασία θα επιτευχθεί η ομοιομορφία των δειγμάτων και θα είναι πλέον συγκρίσιμα. Στην κανονικοποίηση χρησιμοποιήθηκε ως γονίδιο αναφοράς (housekeeping gene) το γονίδιο της ATP συνθάσης.

Τα cDNA-στόχοι ενισχύθηκαν με εξειδικευμένους εκκινητές.

Αντιδραστήρια

cDNA	1 μL
εκκινητής εμπρόσθιος	0,2 μL
εκκινητής ανάστροφος	0,2 μL
2x SYBR mix	5 μL
ddH ₂ O	έως τα 10 μL

Πρόγραμμα αντίδρασης

Χρόνος	Θερμοκρασία	
5min	95 °C	επώαση
10sec	95 °C	αρχική αποδιάταξη
20sec	60 °C	υβριδοποίηση εκκινητών
11sec	72 °C	επιμήκυνση αλυσίδας

Πραγματοποιήθηκαν συνολικά 40 κύκλοι.

65 °C

95 °C δημιουργία καμπύλης
αποδιάταξης

Για τις αντιδράσεις χρησιμοποιήθηκε το μηχάνημα CPX Connect Real-Time System (BIORAD).

Από την καμπύλη melt curve που δημιουργήθηκε ελέγχθηκε η εξειδίκευση των εκκινητών και ο σχηματισμός διμερών.

Στη συνέχεια πραγματοποιήθηκαν οι αντιδράσεις qPCR για τα σταθερά εκφραζόμενα γονίδια *ATP synthase* και *PP2* (housekeeping genes), καθώς και τα *miR211*, *miR171c*, *TML*, *NSP2*. Για κάθε γονίδιο πραγματοποιήθηκαν 2 τεχνικές επαναλήψεις.

Αντιδραστήρια για κάθε γονίδιο

cDNA	2,5 μL
εκκινητής εμπρόσθιος	0,2 μL
εκκινητής ανάστροφος	0,2 μL
2x SYBR mix	5 μL
ddH ₂ O	έως τα 10 μL

Το πρόγραμμα είναι ομοίως με πριν αλλά ο αριθμός των κυκλών αυξήθηκε στους 50. Τα αποτελέσματα των αντιδράσεων qPCR αναλύθηκαν στο Excel. Για να υπολογιστούν τα επίπεδα έκφρασης χρησιμοποιήθηκε ο τύπος $PCR_{eff}^{-\Delta Ct}$, όπου PCR_{eff} η αποδοτικότητα της αντίδρασης PCR και ΔCt η διαφορά $Ct_{\gammaονιδίου}-Ct_{\gammaονιδίου\ αναφοράς}$. Η αποδοτικότητα της αντίδρασης υπολογίστηκε με βάση τα δεδομένα απορροφήσεων από κάθε κύκλο της αντίδρασης (με τη χρήση του προγράμματος LinRegPCR). Οι στατιστικές αναλύσεις πραγματοποιήθηκαν με *t-test*.

2.11. Χρώση ριζών

Η μέθοδος αυτή χρησιμοποιείται για τον υπολογισμό του ποσοστού αποικισμού των ριζών από ενδομυκορριζικό μύκητα καθώς καθίσταται δυνατή η παρατήρηση της συμβιωτικής σχέσης του φυτού με τον ενδομυκορριζικό μύκητα στο οπτικό μικροσκόπιο, λόγω του ότι δομές του μύκητα όπως οι υφές, οι κύστες και τα δενδρόμορφα, χρωματίζονται με μπλε χρώμα.

Μέθοδος

1. Τα φυτά απομακρύνονται από τα δοχεία magenta και ξεπλένεται η άμμος από τις ρίζες
2. Γίνεται κοπή των ριζών με αποστειρωμένη λεπίδα.
3. Ακολουθεί επώαση των ριζών σε KOH 10% σε υδατόλουτρο, στους 80-90 °C για 30-35min.
4. Έπειτα απομακρύνεται το KOH.
5. Στον επαγωγό γίνεται προσθήκη οξικού οξέος 10%.
6. Ακολουθούν δύο πλύσεις με dH₂O.
7. Έπειτα, γίνεται προσθήκη διαλύματος μελανιού 15% v/v και επώαση σε υδατόλουτρο στους 80-90 °C για 30min.
8. Ακολουθούν ακόμα 2 πλύσεις με dH₂O.
9. Στη συνέχεια, γίνεται προσθήκη οξικού οξέος 5%
10. Ακολουθεί επώαση σε θερμοκρασία δωματίου για 30min.
11. Έπειτα, απομακρύνεται το οξικό οξύ.
12. Τέλος, προστίθεται dH₂O και οι ρίζες επωάζονται στους 4°C για το βράδυ.

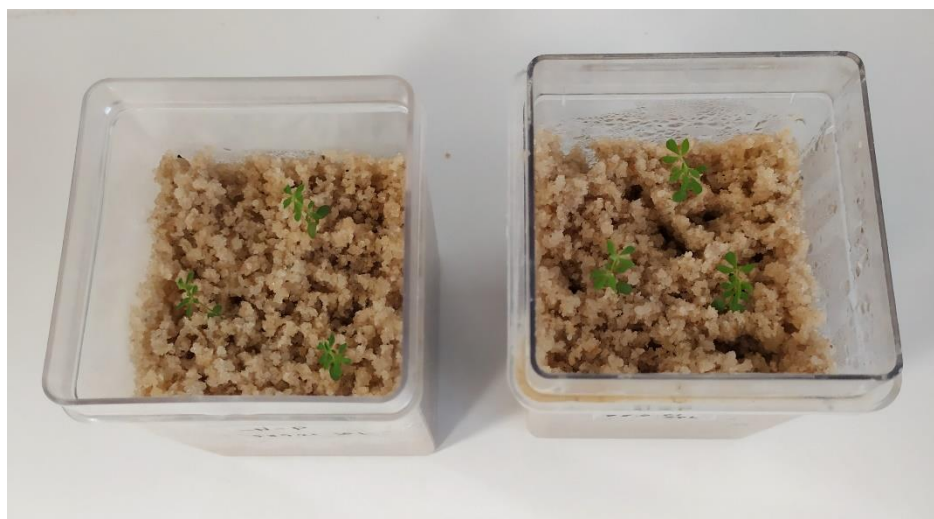
2.12. Υπολογισμός ποσοστού αποικισμού των ριζών από ενδομυκορριζικό μύκητα

Αφού έχει γίνει η διαδικασία της χρώσης ριζών, ακολουθεί η μελέτη τους στο οπτικό μικροσκόπιο. Για να γίνει αυτό, οι ρίζες από το κάθε φυτό κόβονται σε μήκος 1-2 εκατοστά και τοποθετούνται σε αντικειμενοφόρους πλάκες. Η κάθε αντικειμενοφόρος πλάκα περιέχει περίπου 20cm από τις ρίζες μιας βιολογικής επανάληψης. Ακολουθεί η παρατήρηση τους στο οπτικό μικροσκόπιο με φακό 40x και παρατήρηση 100 οπτικών πεδίων. Για κάθε οπτικό πεδίο σημειώνεται αν υπάρχει αποικισμός και τα αποτελέσματα ανάγονται σε ποσοστό επί τοις %.

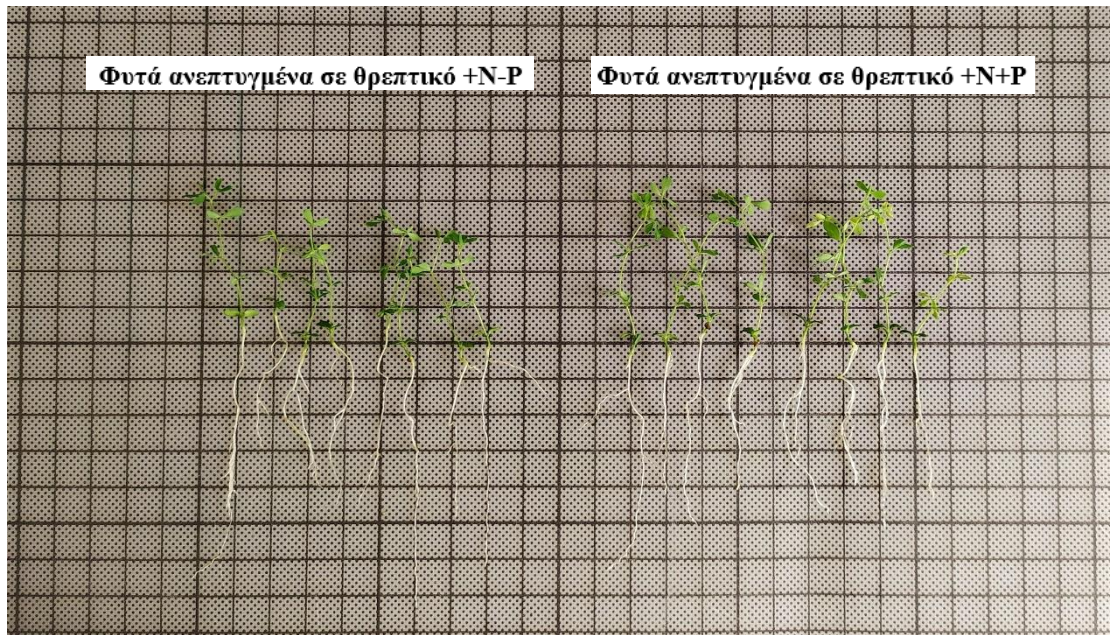
3. Αποτελέσματα

3.1. Προσδιορισμός του ρόλου του φωσφόρου (P) και του αζώτου (N) στην ρύθμιση των miR2111 και miR171c και των γονιδίων στόχων τους

Το πείραμα αυτό αφορούσε στον προσδιορισμό του ρόλου των δύο θρεπτικών στοιχείων, του φωσφόρου (P) και του αζώτου (N), στην ρύθμιση των *miR2111* και *miR171c* καθώς και των γονιδίων στόχων τους, δηλαδή, των *TML* και *NSP2* αντίστοιχα. Για να γίνει αυτό, μετρήθηκε η συσσώρευση των *miR2111*, *TML*, *miR171c* και *NSP2* σε φυτά αγρίου τύπου που έχουν αναπτυχθεί παρουσία διαφορετικών θρεπτικών υλικών, όπως περιεγράφηκε στην ενότητα 2.3.1. Συγκεκριμένα, οι χειρισμοί που έγιναν προκειμένου να προσδιοριστεί αν ο P και το N επηρεάζουν τα μικρά RNA και τους στόχους τους ήταν οι: -N-P, -N+P, +N-P, +N+P. Αρχικά, απολυμάνθηκαν σπόροι *L. japonicus*, οι οποίοι αφέθηκαν για 1 εβδομάδα σε τρυβλία προκειμένου να εκβλαστήσουν (ενότητα 2.1.,2.2.). Τα νεαρά φυτά, έπειτα, μεταφέρθηκαν σε δοχεία magenta, προστέθηκε διαφορετικό θρεπτικό υλικό για κάθε χειρισμό και αναπτύχθηκαν για 3 εβδομάδες σε θάλαμο ανάπτυξης φυτών (εικόνα 1). Συνολικά, το πείραμα περιλάμβανε 20 δοχεία magenta, με 5 βιολογικές επαναλήψεις για κάθε χειρισμό.

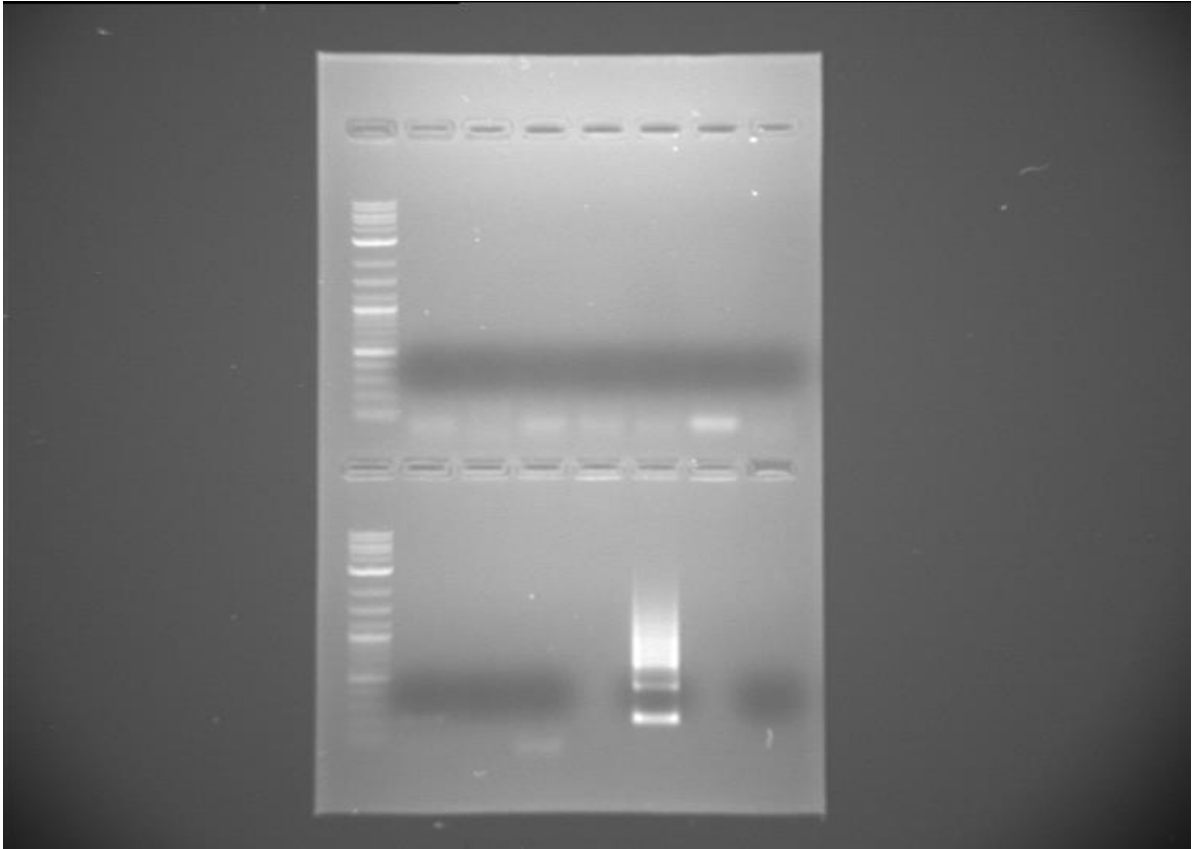


Εικόνα 1. Φυτά *L. japonicus* σε δοχεία magentas μετά από 3 εβδομάδες ανάπτυξης



Εικόνες 2, 3. Τα φυτά των τεσσάρων χειρισμών μετά από 3 εβδομάδες ανάπτυξης

Μετά το πέρας των 3 εβδομάδων, τα φυτά συλλέχθηκαν (εικόνες 2 και 3), οι ρίζες αποκόπηκαν από τους βλαστούς, και ακολούθησε η διαδικασία απομόνωσης του ολικού RNA από τις ρίζες των φυτών. Στη συνέχεια πραγματοποιήθηκε απομάκρυνση του DNA με DNAση, πραγματοποιήθηκε PCR ελέγχου για να επιβεβαιωθεί η απομάκρυνση του γονιδιωματικού DNA από τα δείγματα (εικόνα 4), ακολούθησε η σύνθεση cDNA και τέλος πραγματοποιήθηκαν αντιδράσεις PCR πραγματικού χρόνου (qPCR) για τα επιθυμητά μικρά RNA και τους στόχους τους.



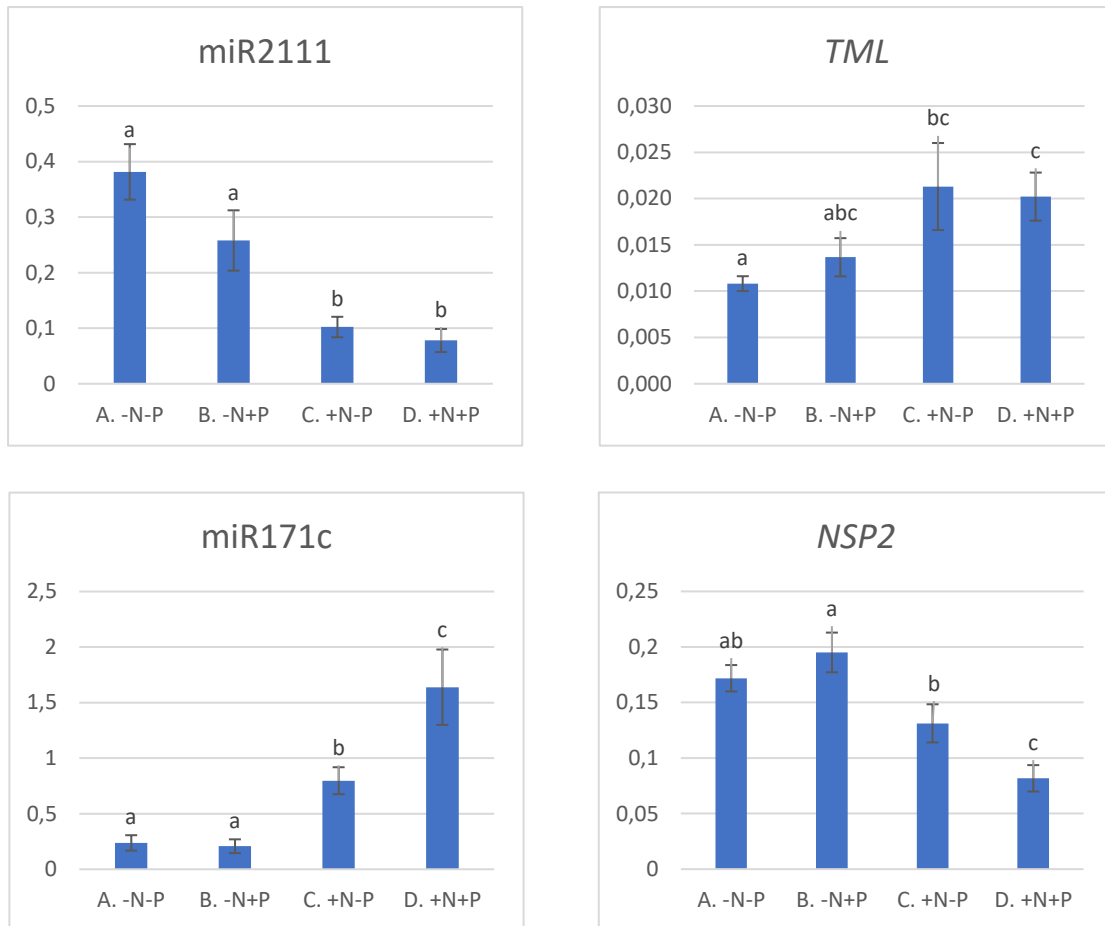
Εικόνα 4. Ηλεκτροφόρηση σε πηκτή αγαρόζης 1% για την επιβεβαίωση απομάκρυνσης του DNA από τα δείγματα μετά τον χειρισμό με DNAση. Πάνω από αριστερά προς τα δεξιά: φρεάτιο 1: μάρτυρας μοριακών βαρών, φρεάτια 2-6: δείγματα με τον χειρισμό -N-P, φρεάτια 7,8: δείγματα με τον χειρισμό -N+P. Κάτω από αριστερά προς τα δεξιά: φρεάτιο 1: μάρτυρας μοριακών βαρών, φρεάτια 2-4: υπόλοιπα δείγματα με τον χειρισμό -N-P, φρεάτιο 6: δείγμα θετικού ελέγχου, φρεάτιο 7: δείγμα αρνητικού ελέγχου.

Τα αποτελέσματα της ποσοτικής ανάλυσης με qPCR φαίνονται στην εικόνα 5.

Για το miR2111 φαίνεται, ότι στην συνθήκη +N η συσσώρευση του μειώνεται, επομένως, το miR2111 ρυθμίζεται από N. Ο P δεν φαίνεται να επηρεάζει το miR2111. Όσον αφορά το γονίδιο στόχο του, το *TML*, παρατηρήθηκε η τάση για αντίστροφη συμπεριφορά σε σχέση με το miR2111, κάτι που είναι αναμενόμενο, δεδομένου ότι το miR2111 καταστέλλει το *TML*.

Για το miR171c, φάνηκε ότι ρυθμίζεται και από το N και από το P. Τα επίπεδα του miR171c αυξάνονται στη συνθήκη +N και αυξάνονται ακόμη περισσότερο στη συνθήκη +N+P. Ενδιαφέρον έχει το γεγονός, ότι το miR171c ρυθμίζεται από P μόνο όταν υπάρχει διαθεσιμότητα N.

Αναμενόμενα, τέλος, όσον αφορά το γονίδιο στόχο του, το *NSP2*, παρατηρήθηκε η τάση για αντίστροφη συμπεριφορά, κάτι που είναι αναμενόμενο, δεδομένου ότι το miR171c το καταστέλλει.



Εικόνα 5: Σύγκριση επιπέδων συσσώρευσης των miR2111, *TML*, miR171c και *NSP2* σε φυτά *Lotus japonicus*, όταν αυτά έχουν αναπτυχθεί παρουσία και απουσία N και P. Η συνθήκη «-N» περιλαμβάνει καθόλου N, η συνθήκη «+N» περιλαμβάνει 5mM KNO₃, η συνθήκη «-P» περιλαμβάνει 3,2μM KH₂PO₄ η συνθήκη «+P» περιλαμβάνει 0,5 mM KH₂PO₄. Η στατιστική ανάλυση έγινε με *t-test* σε όλους τους συνδυασμούς των διαφορετικών χειρισμών ανά ζεύγος. Διαφορετικά γράμματα πάνω από τις μπάρες δηλώνουν στατιστικώς σημαντικές διαφορές μεταξύ των τιμών.

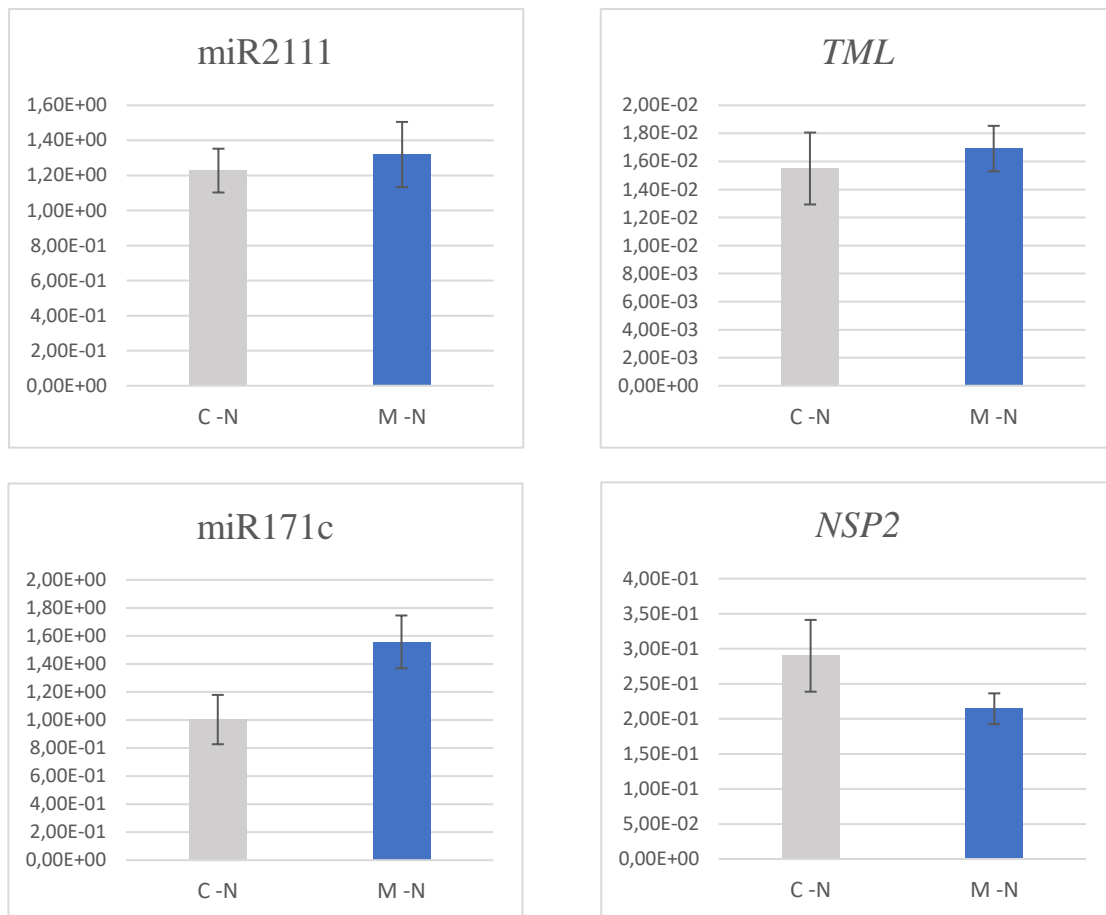
3.2. Τα miR2111 και miR171c ρυθμίζονται από τον ενδομυκορριζικό μύκητα ή αποκλειστικά από τα θρεπτικά συστατικά που τους παρέχονται;

Για να ελέγξουμε αν τα miR2111 και miR171c ρυθμίζονται από την παρουσία του ίδιου του μύκητα ή από τα θρεπτικά συστατικά που αυτός προσφέρει στο φυτό, ελέγχθηκε η συσσώρευση miR2111 και miR171c (και των γονιδίων στόχων τους) παρουσία ΔΜΜ όταν δεν υπάρχει διαθεσιμότητα Ν στο θρεπτικό υλικό.

Η διαδικασία που ακολουθήθηκε ήταν η απολύμανση των σπόρων *L. japonicus* και η εκβλάστηση τους για 1 εβδομάδα σε τρυβλία. Τα νεαρά φυτά, έπειτα, μεταφέρθηκαν σε δοχεία magenta, όπου στα μισά έγινε ο εμβολιασμός με μύκητα και στα υπόλοιπα όχι. Σε όλα προστέθηκε θρεπτικό υλικό απουσία Ν (ενότητα 2.3.2.) και τοποθετήθηκαν για 4 εβδομάδες σε θάλαμο ανάπτυξης φυτών. Μετά το πέρας των 4 εβδομάδων, τα φυτά συλλέχθηκαν και ακολούθησαν η διαδικασία απομόνωσης του ολικού RNA από τις ρίζες των φυτών, η απομάκρυνση του γονιδιωματικού DNA, η σύνθεση cDNA και οι αντιδράσεις ποσοτικής PCR πραγματικού χρόνου.

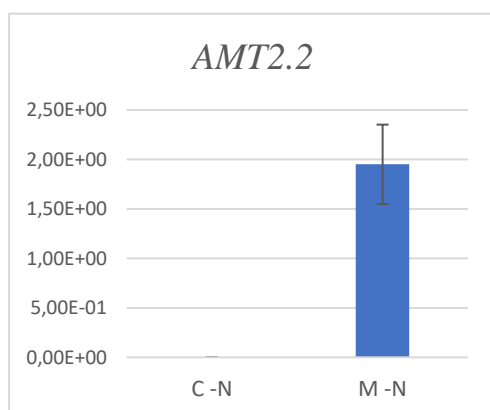
Τα αποτελέσματα της ποσοτικής ανάλυσης με qPCR φαίνονται στην Εικόνα 6.

Τα αποτελέσματα έδειξαν, ότι η συσσώρευση του miR2111 (και των μεταγράφων του γονιδίου στόχου του *TML*) δεν αλλάζει παρουσία του μύκητα (Εικόνα 6). Αυτό μπορεί να σημαίνει, ότι σε κανονικές συνθήκες διαθεσιμότητας Ν, το miR2111 δεν ανταποκρίνεται στον ίδιο τον μύκητα αλλά στο Ν που προσφέρεται. Σχετικά με το miR171c, φάνηκε ότι τα επίπεδα του miR171c, παρουσιάζουν μια τάση αύξησης στην παρουσία του μύκητα, και αντίστοιχα το γονίδιο-στόχος του *NSP2* παρουσιάζει μια τάση μείωσης. Οι διαφορές όμως αυτές δεν βρέθηκαν να είναι στατιστικώς σημαντικές (*t-test*: $P > 0,05$), επομένως δεν μπορούμε με ασφάλεια αν το miR171c ανταποκρίνεται στο προσφερόμενο Ν μόνο και όχι στον μύκητα.



Εικόνα 6: Σύγκριση επιπέδων συσσώρευσης των miR2111, *TML*, miR171c και *NSP2* σε φυτά *Lotus japonicus*, εμβολιασμένα (M) και μη εμβολιασμένα (C), όταν αυτά έχουν αναπτυχθεί απουσία N (-N), 4 βδομάδες μετά τον εμβολιασμό με τον μύκητα *R. irregularis*. t-test μεταξύ των χειρισμών C -N και M -N έδειξε p value > 0,05, άρα οι διαφορές που παρατηρούνται δεν είναι στατιστικώς σημαντικές.

Προκειμένου να επιβεβαιωθεί ότι ο αποικισμός με τον μύκητα επιτεύχθηκε, χρησιμοποιήθηκε ως δείκτης το γονίδιο *AMT2.2* (Εικόνα 7), που επάγεται ισχυρά μόνο σε αποικισμένα φυτά και κωδικοποιεί για έναν διαμεμβρανικό μεταφορέα που εντοπίζεται στις δενδρόμορφες δομές του μύκητα (Guether et al., 2009).

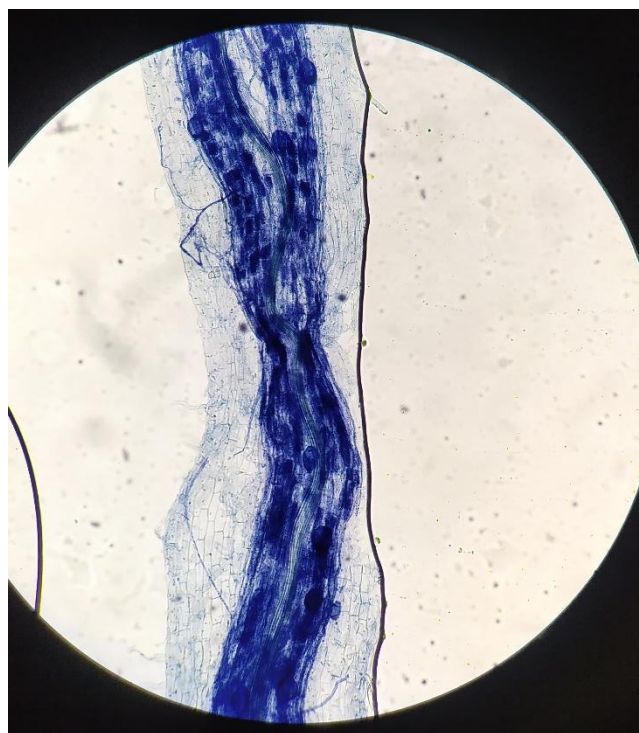


Εικόνα 7: Σύγκριση επιπέδων συσσώρευσης *AMT2.2* σε φυτά *Lotus japonicus*, εμβολιασμένα (M) και μη εμβολιασμένα (C), όταν αυτά έχουν αναπτυχθεί απουσία N (-N), 4 βδομάδες μετά τη μόλυνση.

3.3. Έλεγχος του αποικισμού από τον ενδομυκορριζικό μύκητα παρουσία και απουσία αζώτου (N)

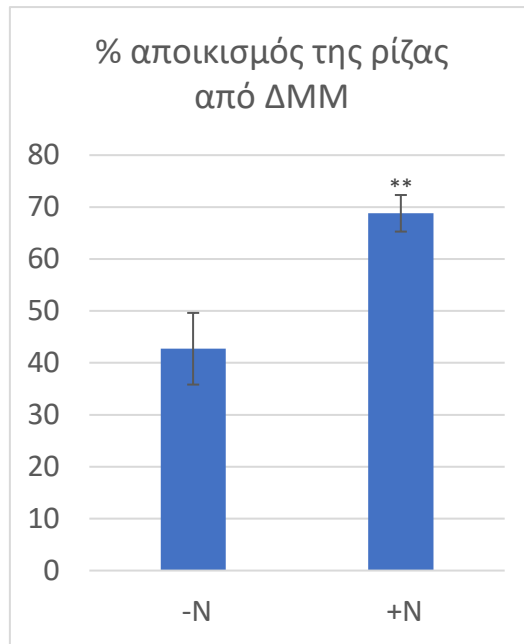
Για να διερευνηθεί αν το άζωτο παίζει ρόλο στον αποικισμό των φυτών από ενδομυκορριζικό μύκητα, φυτά αγρίου τύπου εμβολιάστηκαν με ΔΜΜ και αναπτύχθηκαν παρουσία και απουσία αζώτου. Μετά από 6 εβδομάδες έγινε η συγκομιδή των φυτών και ακολούθησε η χρώση των ριζών τους με μελάνι. Στη συνέχεια παρατηρήθηκαν οι ρίζες στο μικροσκόπιο, όπου είναι ορατές οι δομές που σχηματίζουν οι μύκητες, δηλαδή, οι υφές, οι κύστες και τα δενδρόμορφα (arbuscules) καθώς χρωματίζονται με μπλε χρώμα (Εικόνα 8). Στο συγκεκριμένο πείραμα αποφασίστηκε να μετρηθούν μόνο οι δενδρόμορφες δομές (arbuscules) για να αναχθούν τα συμπεράσματα.

Από τα αποτελέσματα φαίνεται, ότι σε συνθήκες έλλειψης N ο μύκητας μπορεί μεν να αποικίσει τη ρίζα του φυτού και να σχηματίσει δενδρόμορφες δομές, αλλά το ποσοστό του αποικισμού της ρίζας είναι χαμηλότερο (42,7%) από αυτό που παρατηρείται σε συνθήκες παρουσία N (68,8%) (Εικόνα 9).



Εικόνα 8. Φωτογραφίες από το οπτικό μικροσκόπιο (10x).

Χαρακτηριστικές δομές ΔΜΜ στο εσωτερικό της ρίζας των φυτών *Lotus japonicus*. Δεξιά διακρίνεται ρίζα με ανάπτυξη δενδρόμορφων δομών. Αριστερά είναι μια ρίζα που δεν έχει αποικιστεί.



Εικόνα 9: Ποσοστά αποικισμού ριζών *Lotus japonicus* από τον ΔΜΜ *Rhizophagus irregularis*, 6 εβδομάδες μετά τον εμβολιασμό των φυτών. Η στατιστική ανάλυση με *t-test* έδωσε p value = 0,0098, άρα η διαφορά που παρατηρείται είναι στατιστικώς σημαντική.

4. Συζήτηση

Έως και το 20% των προϊόντων φωτοσύνθεσης των χερσαίων φυτών (περίπου 5 δισεκατομμύρια τόνοι άνθρακα ετησίως) υπολογίζεται ότι καταναλώνονται από δενδρόμορφους μυκορριζικούς μύκητες (ΔΜΜ). Επομένως, η συμβίωση φυτών-ενδομυκορριζικών μυκήτων συμβάλλει σημαντικά στον κύκλο του άνθρακα και επηρεάζει την πρωτογενή παραγωγικότητα στα χερσαία οικοσυστήματα. Τα ευεργετικά αποτελέσματα της συμβίωσης αυτής είναι πιο εμφανή υπό συνθήκες περιορισμένης διαθεσιμότητας θρεπτικών συστατικών. Έχει παρατηρηθεί, ότι ο αποικισμός των ριζών με μύκητες οδηγεί σε αναστολή των παθογόνων βακτηρίων στα φύλλα. Ακόμη μια σημαντική προοπτική είναι η δυνατότητα χρήσης της μυκορριζικής συμβίωσης στη βιώσιμη γεωργία (Parniske, 2008). Ο στόχος είναι ο σχεδιασμός βελτιωμένων στρατηγικών για την αποτελεσματική και περιβαλλοντικά ορθή χρήση και διαχείριση των ωφέλιμων μικροβίων στα ψυχανθή και όχι μόνο (Tsiknia et al, 2020).

Επομένως, η μελέτη των συμβιωτικών σχέσεων και των μηχανισμών που τις ρυθμίζουν είναι πολύ σημαντική. Στην αλληλεπίδραση μικροβίων-φυτών ο μηχανισμός αυτορρύθμισης της φυματογένεσης έχει μελετηθεί αρκετά, ενώ εικάζεται ότι η συμβιωτική σχέση των φυτών με ΔΜΜ ρυθμίζεται από έναν αντίστοιχο μηχανισμό αυτορρύθμισης που ονομάζεται μηχανισμός αυτορρύθμισης των μυκορριζών. Οι μηχανισμοί αυτοί ανταποκρίνονται στη διαθεσιμότητα των θρεπτικών στοιχείων αζώτου και φωσφόρου και μελέτες δείχνουν πως οι δύο μηχανισμοί μοιράζονται κοινά χαρακτηριστικά (Wang et al., 2018). Σημαντικό ρόλο στην εγκαθίδρυση των συμβιωτικών σχέσεων φαίνεται πως παίζουν κάποια μικρά RNA, καθώς και τα γονίδια στόχοι τους: το miR2111, που στοχεύει το *TML* εμπλέκεται στον μηχανισμό αυτορρύθμισης της φυματογένεσης (Tsikou et al., 2018) και το miR171c, που στοχεύει το *NSP2*, εμπλέκεται στην επιτυχή εγκαθίδρυση και των δύο συμβιωτικών σχέσεων (De Luis et al., 2012; Hofferek et al., 2014). Στην παρούσα εργασία μελετήθηκαν οι σχέσεις αυτών των miRNAs με τα βασικά θρεπτικά συστατικά των φυτών, το άζωτο και το φώσφορο.

Αρχικά, λοιπόν, έγινε προσπάθεια να διευκρινιστεί αν τα μικρά RNAs (και τα γονίδια στόχοι τους) ρυθμίζονται από τα θρεπτικά άζωτο και φώσφορο. Για το λόγο αυτό μετρήθηκε η συσσώρευση miRNAs παρουσία και απουσία αυτών των στοιχείων στο

θρεπτικό μέσο ανάπτυξης των φυτών, με ποσοτική PCR πραγματικού χρόνου. Για το miR2111, φάνηκε ότι στην συνθήκη +N η συσσώρευση του μειώνεται, κάτι που είναι γνωστό από τη βιβλιογραφία (Tsikou et al., 2018). Επομένως το miR2111 ρυθμίζεται από N. Ο P δεν φαίνεται να επηρεάζει το miR2111 (Εικόνα 5). Όσον αφορά το γονίδιο στόχο του, το *TML*, παρατηρήθηκε η αντίστροφη συμπεριφορά, κάτι που είναι αναμενόμενο, δεδομένου ότι το miR2111 καταστέλλει το *TML*.

Για το miR171c, φάνηκε ότι ρυθμίζεται και από το N και από το P (Εικόνα 5). Αυτό το αποτέλεσμα έρχεται σε συμφωνία με το γεγονός ότι το miR171c έχει αναφερθεί να εμπλέκεται και στις δύο συμβιωτικές σχέσεις (De Luis et al., 2012; Hofferek et al., 2014). Ενδιαφέρον έχει το γεγονός ότι το miR171c ρυθμίζεται από P μόνο όταν υπάρχει διαθεσιμότητα N (Εικόνα 5). Επιπλέον, αξίζει να σημειωθεί ότι τα δύο μικρά RNA παρουσιάζουν αντίθετη τάση συσσώρευσης στην παρουσία αζώτου: τα επίπεδα του miR2111 μειώνονται, ενώ του miR171c αυξάνονται στην περίσσεια N (5mM KNO₃) (Εικόνα 5). Είναι γνωστό ότι το miR2111 ελέγχεται από ριζόβιο στο *Lotus japonicus* (Tsikou et al., 2018) και το miR171h ρυθμίζεται από ΔΜΜ στο *Medicago truncatula* (Hofferek, 2014). Δεν είναι γνωστό, όμως, αν αυτή η ρύθμιση προκύπτει άμεσα από τον μύκητα ή από τα θρεπτικά συστατικά, που αυτός προσφέρει στο φυτό. Έτσι, ελέγχθηκε η συσσώρευση των miR2111 και miR171c παρουσία και απουσία ΔΜΜ όταν δεν υπήρχε διαθεσιμότητα N. Τα αποτελέσματα έδειξαν, ότι η συσσώρευση του miR2111 (και των μεταγράφων του γονιδίου στόχου του) δεν αλλάζει παρουσία του μύκητα (Εικόνα 6) . Αυτό μπορεί να σημαίνει, ότι σε κανονικές συνθήκες διαθεσιμότητας N, το miR2111 δεν ανταποκρίνεται στον ίδιο τον μύκητα αλλά στο N που προσφέρεται. Σχετικά με το miR171c, ενώ παρατηρήθηκε μια τάση αύξησής του (και μια αντίστοιχη τάση μείωσης του γονιδίου-στόχου) στην παρουσία του μύκητα (Εικόνα 6), η διαφορά δεν βρέθηκε να είναι στατιστικώς σημαντική. Επομένως, τα miR2111 και miR171c δεν φαίνεται να ανταποκρίνονται άμεσα στην παρουσία του ενδομυκορριζικού μύκητα.

Τέλος, επιχειρήθηκε να διερευνηθεί, αν το άζωτο παίζει ρόλο στον αποικισμό από ενδομυκορριζικό μύκητα. Για αυτό, χρησιμοποιήθηκαν φυτά *L. japonicus* που μολύνθηκαν με τον ΔΜΜ *R. irregularis* και αναπτύχθηκαν παρουσία και απουσία αζώτου. Τα ποσοστά αποικισμού της ρίζας από τον ΔΜΜ υπολογίστηκαν κατόπιν χρώσης της ρίζας και παρατήρησης των δενδρόμορφων δομών του μύκητα στο μικροσκόπιο. Από τα αποτελέσματα φάνηκε, ότι σε συνθήκες έλλειψης N, ο μύκητας μπορεί μεν να αποικίσει τη ρίζα του φυτού και να σχηματίσει δενδρόμορφες δομές,

αλλά το ποσοστό του αποικισμού της ρίζας είναι χαμηλότερο από αυτό που παρατηρείται σε συνθήκες παρουσία N (Εικόνα 9). Επομένως, η διαθεσιμότητα αζώτου στο έδαφος είναι ένας σημαντικός παράγοντας που καθορίζει την έκταση του αποικισμού των ριζών από τους μυκορριζικούς μύκητες. Θα ήταν ενδιαφέρον να μελετηθεί στο μέλλον εάν το άζωτο έχει έναν άμεσο ρόλο στον μηχανισμό αυτορρύθμισης των μυκορριζών, και να διευκρινιστεί αν ο ρόλος αυτός είναι παράλληλος, αθροιστικός ή συμπληρωματικός με τον ρόλο του φωσφόρου. Επιπλέον, μελλοντικά πειράματα θα δείξουν αν τα miR2111 και miR171c έχουν κάποια άμεση εμπλοκή στον μηχανισμό αυτορρύθμισης των μυκορριζών καθώς στην παρούσα εργασία βρέθηκε να επηρεάζεται η συσσώρευσή τους από την παρουσία N και P στο θρεπτικό μέσο.

5. Παράρτημα

Γονίδιο	Εκκινητής	Αλληλουχία	Αναφορά
miR2111	fwd	GCGCGTAATCTGCATCCTGAG	Tsikou et al., 2018
universal	rev	AGTGCAGGGTCCGAGGTATTC	Tsikou et al., 2018
miR2111	RT stemloop	GTCGTATCCAGTGCAGGGTCCGAGGTATTCGCACTGGATACGACTACACC	
LjAMT2.2	fwd	ACACATGCTTGCCTGCTACC	Guether et al., 2009
LjAMT2.2	rev	CTGCCCATCCTTGAACAACCC	Guether et al., 2009
LjPP2a	fwd	GTAAATGCGTCTAAAGATAGGGTCC	Tsikou et al., 2018
LjPP2a	rev	ACTAGACTGTAGTGCTTGAGAGGC	Tsikou et al., 2018
LjATPs	fwd	CAATGTCGCCAAGGCCCATGGTG	Tsikou et al., 2018
LjATPs	rev	AACACCACTCTCGATCATTCTCTG	Tsikou et al., 2018
miR171c	RT stemloop	GTCGTATCCAGTGCAGGGTCCGAGGTATTCGCACTGGATACGACGAGTGA	
miR171c	fwd	ggtgcTGAGCCGAATCAATATC	
NSP2	fwd	GGAGGAGCTGGGTAGTAATAAG	
NSP2	rev	GAGATCTGAAGCGATTAAACAGC	
TML	fwd	ACAAACAGCTGGAGCCTAATTC	Takahara et al., 2013
TML	rev	AGAAGCATCAAGCGAGTAAAGC	Takahara et al., 2013

6. Βιβλιογραφία

1. Zeiger, E. & Taiz, L. (2016). *Φυσιολογία Φυτών*. Αθήνα: Utopia
2. Oldroyd, G. E. D., & Leyser, O. (2020). A plant's diet, surviving in a variable nutrient environment. *Science*, 368(6486). <https://doi.org/10.1126/science.aba0196>
3. Lindström, K., & Mousavi, S. A. (2019). Effectiveness of nitrogen fixation in rhizobia. *Microbial Biotechnology*, 13(5), 1314–1335. <https://doi.org/10.1111/1751-7915.13517>
4. Masson-Boivin, C., & Sachs, J. L. (2018). Symbiotic nitrogen fixation by rhizobia — the roots of a success story. *Current Opinion in Plant Biology*, 44, 7–15. <https://doi.org/10.1016/j.pbi.2017.12.001>
5. Sato, S., & Tabata, S. (2006). Lotus japonicus as a platform for legume research. *Current Opinion in Plant Biology*, 9(2), 128–132. <https://doi.org/10.1016/j.pbi.2006.01.008>
6. Eloísa Pajuelo and Jens Stougaard (2005) Lotus japonicus as a model system in *Lotus japonicus Handbook* (Marquez AJ ed.), pp 3-4. Amsterdam: Springer
7. Noel, K. D. (2009). Rhizobia in *Encyclopedia of Microbiology*. (3rd ed.), pp. 261–277. Academic Press
8. Roy, S., Liu, W., Nandety, R. S., Crook, A., Mysore, K. S., Pislariu, C. I., Frugoli, J., Dickstein, R., Udvardi, M. K. (2019). Celebrating 20 Years of Genetic Discoveries in Legume Nodulation and Symbiotic Nitrogen Fixation. *The Plant Cell*, 32(1), 15–41. <https://doi.org/10.1105/tpc.19.00279>
9. Oldroyd, G. E. D. (2013). Speak, friend, and enter: signalling systems that promote beneficial symbiotic associations in plants. *Nature Reviews Microbiology*, 11(4), 252–263. <https://doi.org/10.1038/nrmicro2990>
10. Gage, D. J. (2004). Infection and Invasion of Roots by Symbiotic, Nitrogen-Fixing Rhizobia during Nodulation of Temperate Legumes. *Microbiology and Molecular Biology Reviews*, 68(2), 280–300. <https://doi.org/10.1128/mubr.68.2.280-300.2004>
11. Oldroyd, G. (2001). Dissecting Symbiosis: Developments in Nod Factor Signal Transduction. *Annals of Botany*, 87(6), 709–718. <https://doi.org/10.1006/anbo.2001.1410>

12. Kaló, P., Gleason, C., Edwards, A., Marsh, J., Mitra, R. M., Hirsch, S., Jakab, J., Sims, S., Long, S.R., Rogers, J., Kiss, G.B., Downie, J.A., Oldroyd, G. E. D. (2005). Nodulation Signaling in Legumes Requires NSP2, a Member of the GRAS Family of Transcriptional Regulators. *Science*, 308(5729), 1786–1789. <https://doi.org/10.1126/science.1110951>
13. Wang, C., Reid, J. B., & Foo, E. (2018). The Art of Self-Control – Autoregulation of Plant–Microbe Symbioses. *Frontiers in Plant Science*, 9. <https://doi.org/10.3389/fpls.2018.00988>
14. Nishida, H., Ito, M., Miura, K., Kawaguchi, M., & Suzaki, T. (2020). Autoregulation of nodulation pathway is dispensable for nitrate-induced control of rhizobial infection. *Plant Signaling & Behavior*, 15(3), 1733814. <https://doi.org/10.1080/15592324.2020.1733814>
15. Müller, L. M., Flokova, K., Schnabel, E., Sun, X., Fei, Z., Frugoli, J., Bouwmeester, H.J. & Harrison, M. J. (2019). A CLE–SUNN module regulates strigolactone content and fungal colonization in arbuscular mycorrhiza. *Nature Plants*, 5(9), 933–939. <https://doi.org/10.1038/s41477-019-0501-1>
16. Lambers, H. (2022). Phosphorus Acquisition and Utilization in Plants. *Annual Review of Plant Biology*, 73(1), 17–42. <https://doi.org/10.1146/annurev-arplant-102720-125738>
17. Luginbuehl, L. H., & Oldroyd, G. E. D. (2017). Understanding the Arbuscule at the Heart of Endomycorrhizal Symbioses in Plants. *Current Biology*, 27(17), R952–R963. <https://doi.org/10.1016/j.cub.2017.06.042>
18. MacLean, A. M., Bravo, A., & Harrison, M. J. (2017). Plant Signaling and Metabolic Pathways Enabling Arbuscular Mycorrhizal Symbiosis. *The Plant Cell*, 29(10), 2319–2335. <https://doi.org/10.1105/tpc.17.00555>
19. Lanfranco, L., Fiorilli, V., & Gutjahr, C. (2018). Partner communication and role of nutrients in the arbuscular mycorrhizal symbiosis. *New Phytologist*, 220(4), 1031–1046. <https://doi.org/10.1111/nph.15230>
20. Hofferek, V., Mendrinna, A., Gaude, N., Krajinski, F., & Devers, E. A. (2014). MiR171h restricts root symbioses and shows like its target NSP2 a complex transcriptional regulation in *Medicago truncatula*. *BMC Plant Biology*, 14(1). <https://doi.org/10.1186/s12870-014-0199-1>

21. Madigan, M., Martinko, J., Bender, K., Buckley, D. & Stahl, D. (2018). *Brock Βιολογία των μικροοργανισμών*. Ηράκλειο: Πανεπιστημιακές Εκδόσεις Κρήτης.
22. Parniske, M. (2008). Arbuscular mycorrhiza: the mother of plant root endosymbioses. *Nature Reviews Microbiology*, 6(10), 763–775. <https://doi.org/10.1038/nrmicro1987>
23. Tsiknia, M., Tsikou, D., Papadopoulou, K. K., & Ehaliotis, C. (2020). Multi-species relationships in legume roots: From pairwise legume-symbiont interactions to the plant – microbiome – soil continuum. *FEMS Microbiology Ecology*, 97(2). <https://doi.org/10.1093/femsec/fiaa222>
24. Takahara, M., Magori, S., Soyano, T., Okamoto, S., Yoshida, C., Yano, K., Sato, S., Tabata, S., Yamaguchi, K., Shigenobu, S., Takeda, N., Suzaki, T. & Kawaguchi, M. (2013). TOO MUCH LOVE, a Novel Kelch Repeat-Containing F-box Protein, Functions in the Long-Distance Regulation of the Legume–Rhizobium Symbiosis. *Plant and Cell Physiology*, 54(4), 433–447. <https://doi.org/10.1093/pcp/pct022>
25. Guether, M., Neuhäuser B., Balestrini, R., Dynowski, M., Ludewig, U., & Bonfante, P. (2009). A Mycorrhizal-Specific Ammonium Transporter from *Lotus japonicus* Acquires Nitrogen Released by Arbuscular Mycorrhizal Fungi. *Plant Physiology*, 150(1), 73–83. <https://doi.org/10.1104/pp.109.136390>
26. De Luis, A., Markmann, K., Cognat, V., Holt, D. B., Charpentier, M., Parniske, M., Stougaard, J. & Voinnet, O. (2012). Two MicroRNAs Linked to Nodule Infection and Nitrogen-Fixing Ability in the Legume *Lotus japonicus*. *Plant Physiology*, 160(4), 2137–2154. <https://doi.org/10.1104/pp.112.204883>