



ΠΑΝΕΠΙΣΤΗΜΙΟ ΘΕΣΣΑΛΙΑΣ  
ΤΜΗΜΑ ΒΙΟΧΗΜΕΙΑΣ ΚΑΙ ΒΙΟΤΕΧΝΟΛΟΓΙΑΣ

ΠΤΥΧΙΑΚΗ ΕΡΓΑΣΙΑ

Νικολέτα Μπασδέκη, του Ζήση



**«Φαινοτυπική και μοριακή ανάλυση ενός φυτικού μεταλλάγματος υπερέκφρασης του *MIR2111* κατά τον αποικισμό με ενδομυκορριζικό μύκητα.»**

Λάρισα, 2022

# ΠΤΥΧΙΑΚΗ ΕΡΓΑΣΙΑ

Μπασδέκη Νικολέτα, του Ζήση

**«Φαινοτυπική και μοριακή ανάλυση ενός φυτικού μεταλλάγματος υπερέκφρασης του *MIR2111* κατά τον αποικισμό με ενδομυκορριζικό μύκητα.»**

**«Phenotypic and molecular analysis of a plant *MIR2111*-overexpression mutant during colonization by arbuscular mycorrhizal fungi. »**

## **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 και Γονιδιωματικής

## Ευχαριστίες

Η παρούσα πτυχιακή εργασία πραγματοποιήθηκε στο εργαστήριο Βιοτεχνολογίας Φυτών & Περιβάλλοντος του τμήματος Βιοχημείας και Βιοτεχνολογίας του Πανεπιστημίου Θεσσαλίας. Στο σημείο αυτό, θα ήθελα να εκφράσω τις θερμές μου ευχαριστίες σε όσους στάθηκαν στο πλευρό μου κατά την υλοποίηση αυτής της προσπάθειας. Αρχικά θα ήθελα να ευχαριστήσω την επβλέπουσα καθηγήτρια της πτυχιακής μου εργασίας, Επίκουρο Καθηγήτρια Μοριακής και Αναπτυξιακής Βιολογίας Φυτών στο Τμήμα Βιοχημείας και Βιοτεχνολογίας, κυρία Τσίκου Δανιέλα. Οι πολύτιμες συμβουλές, η συμπαράσταση και η καθοδήγησή της σε κάθε βήμα συνέβαλαν στην επιτυχή εκπόνηση αυτής της πτυχιακής εργασίας. Επιπλέον, θα ήθελα να ευχαριστήσω τα μέλη της τριμελούς εξεταστικής επιτροπής, την κυρία Παπαδοπούλου και τον κύριο Γιακουντή καθώς και όλα τα μέλη του εργαστηρίου, για το φιλικό και συνεργατικό τους πνεύμα καθ'όλη τη διάρκεια της παρουσίας μου στο εργαστήριο και για την προθυμία τους να λύσουν οποιαδήποτε απορία μου. Τέλος, θα ήθελα να ευχαριστήσω την οικογένεια και τους φίλους μου για την υποστήριξη και την συμπαράσταση τους κατά την διάρκεια των σπουδών μου.

## Περιεχόμενα

Περίληψη.....	6
Abstract .....	7
1. ΕΙΣΑΓΩΓΗ .....	8
1.1 Σχέσεις φυτών- μικροοργανισμών .....	8
1.1.1 Παρασιτικές και παθογόνες σχέσεις .....	8
1.1.2 Συμβιωτικές Σχέσεις .....	9
1.2 Τα ψυχανθή φυτά - <i>Lotus japonicus</i> .....	10
1.3 Συμβιωτική Αζωτοδέσμευση .....	11
1.3.1 Σηματοδότηση («μοριακός διάλογος») κατά τη συμβίωση ριζοβίων-ψυχανθών ..	12
1.3.2 Μηχανισμός Αυτορρύθμισης της φυματιογένεσης (AON) .....	15
1.4 Μυκορριζική συμβίωση .....	16
1.4.1 Δενδρόμορφοι ενδομυκορριζικοί μύκητες (ΔΕΜ)- Arbuscular mycorrhizal fungi (AMF) .....	17
1.4.2 Σηματοδότηση .....	20
1.4.3 Μηχανισμός αυτορρύθμισης των μυκορριζών (AOM) .....	21
1.5 Σκοπός της παρούσας πειραματικής μελέτης .....	23
2. ΥΛΙΚΑ ΚΑΙ ΜΕΘΟΔΟΙ .....	24
2.1 Βιολογικό υλικό και συνθήκες ανάπτυξης .....	24
2.2 Απολύμανση και εκβλάστηση σπόρων <i>Lotus japonicus</i> σε τριβλία .....	25
2.3 Μεταφύτευση φυτών <i>Lotus japonicus</i> από τριβλία σε δοχεία magentas .....	25
2.3.1 Παρασκευή θρεπτικού LAS και εμβολίου μύκητα <i>Rhizophagus irregularis</i> .....	25
2.3.2 Φύτεμα σε δοχεία magentas .....	26
2.3.3 Φύτεμα σε δοχεία magentas με τη μέθοδο Sandwich .....	26
2.4 Μεταφύτευση φυτών <i>Lotus japonicus</i> από δοχεία magentas σε γλαστράκια .....	27
2.5 Συγκομιδή των φυτών και χρώση των ριζών με μελάνι .....	27
2.5.1 Χρώση των ριζών .....	29
2.5.2 Υπολογισμός ποσοστού αποικισμού από ενδομυκορριζικούς μύκητες .....	29
2.6 Συγκομιδή των φυτών και απομόνωση του ολικού RNA από τις ρίζες των φυτών .....	29

2.6.1 Απομόνωση ολικού RNA από ρίζες με τη χρήση Trizol (RNA extraction) .....	30
2.6.2 Απομάκρυνση του DNA με αντίδραση DNάσης .....	31
2.6.3 Αλυσιδωτή αντίδραση πολυμεράσης (PCR) .....	32
2.7 Σύνθεση συμπληρωματικού DNA (cDNA- Complementary DNA) .....	34
2.8 Ποσοτική αλυσιδωτή αντίδραση πολυμεράσης (qPCR) .....	35
2.8.1 Αντίδραση qPCR για την κανονικοποίηση .....	35
2.8.2 Αντίδραση qPCR .....	36
2.9 Γονοτύπηση (Genotyping) .....	37
2.9.1 Απομόνωση DNA (DNA extraction) .....	37
2.9.2 Αλυσιδωτή αντίδραση πολυμεράσης (PCR) για γονοτύπηση .....	38
2.9.3 Ηλεκτροφόρηση σε πήκτωμα αγαρόζης .....	39
2.10 Στατιστική ανάλυση .....	39
3. ΑΠΟΤΕΛΕΣΜΑΤΑ .....	40
3.1 Γονοτύπηση (Genotyping )- Εύρεση φυτών που υπερεκφράζουν το γονίδιο <i>MIR2111-3</i> .....	40
3.2 Έλεγχος του αποικισμού φυτών αγρίου τύπου και του φυτικού μεταλλάγματος υπερέκφρασης του <i>MIR2111-3</i> από τον ενδομυκορριζικό μύκητα <i>Rhizophagus irregularis</i> .....	42
3.3 Έλεγχος του αποικισμού φυτών αγρίου τύπου και του φυτικού μεταλλάγματος υπερέκφρασης του <i>MIR2111-3</i> από τον ενδομυκορριζικό μύκητα <i>Rhizophagus irregularis</i> με qPCR χρησιμοποιώντας γονίδια-δείκτες .....	44
4. ΣΥΖΗΤΗΣΗ .....	49
5. ΒΙΒΛΙΟΓΡΑΦΙΑ .....	51

## ΠΕΡΙΛΗΨΗ

Πολλά είδη φυτών έχουν την ικανότητα να αλληλεπιδρούν με ποικίλους μικροοργανισμούς του εδάφους. Τέτοιες αλληλεπιδράσεις είναι οι συμβιωτικές σχέσεις που συμβάλουν στην ανταλλαγή θρεπτικών και είναι ευεργετικές τόσο για τον μικροοργανισμό όσο και για το φυτό-ξενιστή. Οι πιο γνωστές και καλύτερα μελετημένες συμβιωτικές σχέσεις είναι μεταξύ ψυχανθών και αζωτοδεσμευτικών βακτηρίων (ριζοβίων), που προσφέρει στα φυτά άζωτο, και μεταξύ φυτών και των μυκορριζικών μυκήτων, που προσφέρουν στα φυτά κυρίως φώσφορο. Αυτές οι δυο συμβιωτικές σχέσεις παρουσιάζουν αρκετές ομοιότητες στις διαδικασίες εγκαθίδρυσης της συμβίωσης αλλά και στους μηχανισμούς αυτορρύθμισης που ελέγχουν την έκταση του αποικισμού. Στον μηχανισμό αυτορρύθμισης της φυματιογένεσης (AON), βασικό μόριο του μονοπατιού είναι το μικρό RNA miR2111, το οποίο μεταφέρεται από το βλαστό στη ρίζα του φυτού ρυθμίζοντας μετα-μεταγραφικά το γονίδιο *TML*. Η πρωτεΐνη *TML* είναι ένας παρεμποδιστής της συμβίωσης φυτού-ριζοβίου. Ένας παρόμοιος μηχανισμός αυτορρύθμισης έχει αναφερθεί και για τη συμβιωτική σχέση των φυτών με ενδομυκορριζικούς μύκητες (μηχανισμός AOM) αλλά δεν έχει μελετηθεί εκτενώς. Η συγκεκριμένη εργασία διερευνά την πιθανή συμμετοχή του miR2111 στον αποικισμό του φυτού-μοντέλου *Lotus japonicus* από τον ενδομυκορριζικό μύκητα *R. irregularis*, μελετώντας ένα μετάλλαγμα υπερέκφρασης του γονιδίου *MIR2111-3*.

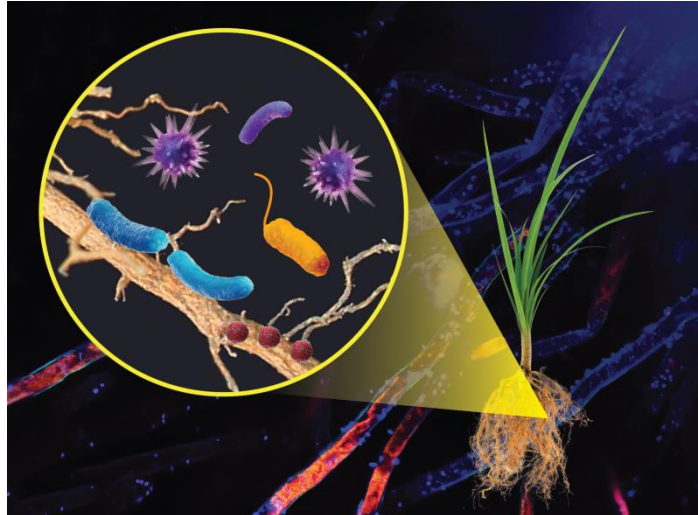
## ABSTRACT

Many plant species have the ability to associate with a range of soil microorganisms. Such interactions are the symbiotic associations that contribute to the exchange of nutrients and are beneficial to both the microorganism and the host plant. The well-known and best-studied symbiotic associations are between legumes and nitrogen-fixing bacteria (rhizobia), which provide plants with nitrogen, and between plants and mycorrhizal fungi, which provide plants with mainly phosphorus. These two symbiotic associations share similarities in the processes that regulate the establishment of the symbiosis and also, in the autoregulation mechanisms that control the extent of root colonization. In the autoregulation of nodulation (AON) mechanism, miR2111 was reported as a key molecule, which is transferred from the shoot to the root to regulate the *TML* gene posttranscriptionally. The TML protein is an inhibitor of the legume-rhizobium symbiosis. A similar autoregulation mechanism has been reported for the symbiotic association of plants with arbuscular mycorrhizal fungi (AOM mechanism) but has not been extensively studied. The present study investigates the putative involvement of miR2111 in the colonization of the model plant *Lotus japonicus* by the arbuscular mycorrhizal fungi *R. irregularis* by studying an overexpression mutant of the *MIR2111-3* gene.

# 1.ΕΙΣΑΓΩΓΗ

## 1.1 Σχέσεις φυτών- μικροοργανισμών

Τα χερσαία φυτά, που εξελίχθηκαν πριν από περίπου 400 εκατομμύρια χρόνια από τους θαλάσσιους προγόνους τους χωρίς ρίζες μέσω μιας σημαντικής εξελικτικής προσαρμογής που περιλαμβάνει την ανάπτυξη των ριζών (1), συνδέονται με ένα ευρύ φάσμα μικροοργανισμών που κυμαίνονται από αρνητικά κατά Gram (*Rhizobium*, *Nostoc*) και θετικά κατά Gram βακτήρια (*Frankia*), έως ωομύκητες (*Phytophthora*), χυτριομύκητες, ζυγομύκητες και μύκητες (ασκομύκητας, βασιδιομύκητας) και συμμετέχουν σε αμοιβαίες ή παρασιτικές ενδοσυμβιώσεις (2) (Εικόνα 1). Προκειμένου να επιβιώσουν, τα φυτά έχουν αναπτύξει την ικανότητα να αναγνωρίσουν τους μικροοργανισμούς



εισβολής και εάν αυτοί είναι παθογόνοι να τους περιορίσουν ή εάν η συμβίωση είναι ευεργετική να την προωθήσουν (3). Οι φυτικές ενδοσυμβιώσεις χαρακτηρίζονται από τη είσοδο του μικροοργανισμού σε ζωντανά φυτικά κύτταρα, που ακολουθείται από μια περίοδο κατά την οποία ο συμβιώτης ζει εν μέρει ή εξ ολοκλήρου μέσα στα φυτικά κύτταρα. Οι ενδοσυμβιωτικές αλληλεπιδράσεις παίζουν σημαντικό ρόλο στη γεωργία και στα φυσικά οικοσυστήματα.

Εικόνα 1: Αλληλεπιδράσεις φυτών- μικροοργανισμών. (Illustration by Cortland Johnson and Natalie Sadler | Pacific Northwest National Laboratory)

### 1.1.1 Παρασιτικές και παθογόνες σχέσεις

Τα φυτά στη πλειονότητα των περιπτώσεων είναι σε θέση να εμποδίσουν τη μόλυνση από παθογόνους μικροοργανισμούς, καθιστώντας την παθογένεια την εξαίρεση και όχι τον κανόνα. Στην περίπτωση των μυκήτων, λιγότερο από το 2% από τα 100.000 είδη μυκήτων που είναι γνωστό ότι προκαλούν παθογένεια σε ζωντανά φυτά (4). Τα περισσότερα είναι σαπρόφυτα που αποσυνθέτουν φυτικό υλικό που είναι ήδη νεκρό. Επιπλέον, αυτοί οι μικροοργανισμοί που είναι παθογόνοι το φάσμα ξενιστών τους είναι περιορισμένο. Παρόλο που η αντίσταση στη μικροβιακή επίθεση έχει εξελιχθεί στα περισσότερα φυτά, οι ίδιες εξελικτικές δυνάμεις έχουν δημιουργήσει παθογόνα ικανά να υπερνικήσουν την άμυνα των φυτών, με πολλές φορές καταστροφικά αποτελέσματα (5).

Οι μύκητες και οι ωομύκητες είναι δύο κύριες ομάδες ευκαρυωτικών παθογόνων φυτών. Μοιράζονται πολλές μορφολογικές ομοιότητες που είναι πιθανό να έχουν προκύψει μέσω της συγκλίνουσας εξέλιξης ως αποτελεσματικών μηχανισμών ανάπτυξης και αναπαραγωγής (6). Τα παθογόνα των φυτών (μύκητες, ωομύκητες, βακτήρια) έχουν δύο κύριους τρόπους ζωής. Νεκροτροφικά παθογόνα μολύνουν τα ζωντανά φυτά αλλά γρήγορα σκοτώνουν τους φυτικούς



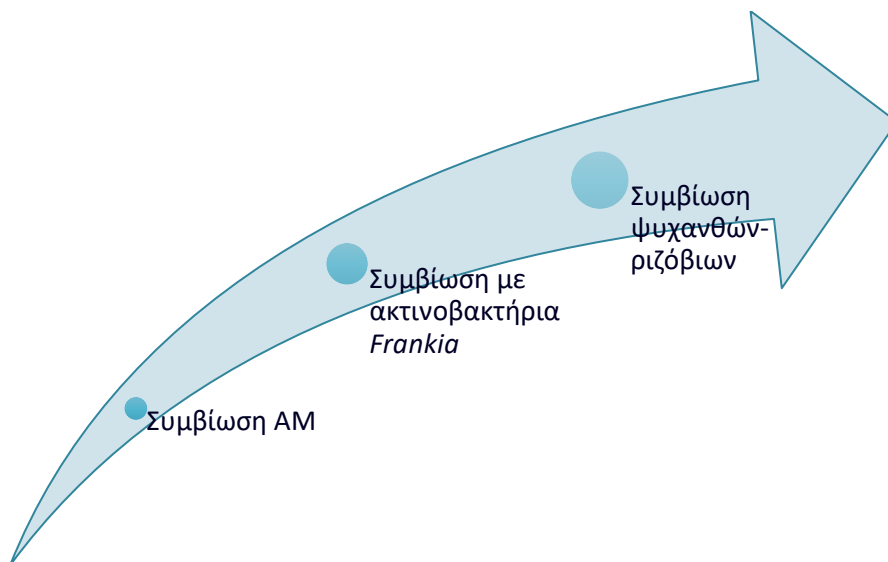
ιστούς, λαμβάνοντας θρεπτικά συστατικά από νεκρά ή πεθαμένα κύτταρα. Τα βιοτροφικά παθογόνα, από την άλλη πλευρά, δημιουργούν μια σταθερή σχέση με τα ζωντανά φυτικά κύτταρα, λαμβάνοντας θρεπτικά συστατικά με το χειρισμό του μεταβολισμού των κυττάρων του ξενιστή (7). Σύμφωνα με αρχεία απολιθωμάτων, μερικά από τα πρώτα φυτά της ξηράς σχημάτισαν επίσης ενδοκυτταρικές αλληλεπιδράσεις με παρασιτικούς μύκητες που μοιάζουν με τους υπάρχοντες χυτριομύκητες (8).

Το παράσιτο, είναι ένας μικροοργανισμός ή ιός, που ζει μέσα σε έναν ζωντανό φυτικό οργανισμό ή σε στενότερη σχέση με αυτόν και από τους λειτουργικούς ιστούς του λαμβάνει μέρος ή το σύνολο των απαραίτητων θρεπτικών στοιχείων, χωρίς να προσφέρει όφελος ή αντάλλαγμα στον ξενιστή. Τα παράσιτα και τα παθογόνα είναι δύο τύποι οργανισμών που μπορεί να είναι επιβλαβείς για τους οικοδεσπότες. Ένα παράσιτο μεγαλώνει, τροφοδοτεί και προστατεύεται μέσα ή πάνω στον οργανισμό του ξενιστή χωρίς να συμβάλλει στην επιβίωση του ξενιστή. Ένα παθογόνο είναι ένας οργανισμός που προκαλεί μια ασθένεια στον ξενιστή. Ωστόσο, δεν είναι όλα τα παράσιτα παθογόνα (9).

### **1.1.2 Συμβιωτικές Σχέσεις**

Στις συμβιωτικές σχέσεις, οι μικροοργανισμοί έχουν αναπτύξει μια σχέση αμοιβαίας ωφέλειας. Το φυτό ξενιστής (το μακροσύμβιον) συνήθως προμηθεύει το ενδόφυτο (το μικροσύμβιον) με φωτοσυνθετικά συστατικά, ενώ το όφελος αυτών των αλληλεπιδράσεων για το φυτό είναι η βελτίωση της πρόσβασης σε σημαντικά ανόργανα θρεπτικά συστατικά των οποίων η έλλειψη θα περιόριζε την ανάπτυξη (10). Οι ρίζες των περισσότερων χερσαίων φυτών είναι σε θέση να εμπλακούν σε συμβιωτικές σχέσεις με μυκορριζικούς μύκητες. Η πιο διαδεδομένη από αυτές τις συσχετίσεις είναι η δενδρόμορφη μυκόρριζα (arbuscular mycorrhiza: AM), η οποία σχηματίζεται από τουλάχιστον το 80% όλων των αγγειόσπερμων με μύκητες που ανήκουν στο φύλο *Glomeromycota* (11) προκειμένου να αντλήσουν μακρο- και μικροθρεπτικά συστατικά από το περιβάλλον, κυρίως φώσφορο (12). Οι ρίζες ορισμένων φυτών-ξενιστών σχηματίζουν επίσης μια μοναδική συμβίωση με βακτήρια προκειμένου να παράγουν άζωτο σε αφομοιώσιμη μορφή (13). Οι συμβιώσεις των φυτών με αζωτοδεσμευτικά βακτήρια (RNS) εμφανίζονται σε δύο κύριες μορφές - συμβίωση με ακτινοβακτήρια και ψυχανθούς-ριζοβίου οι οποίες διαφέρουν ως προς τον βακτηριακό συμβιώτη, το πρότυπο ενδοκυτταρικής μόλυνσης και τη μορφογένεση. Πιο συγκεκριμένα, περιλαμβάνει την αλληλεπίδραση των ψυχανθών με τα ριζόβια και την πιο διαδεδομένη συμβίωση κυρίως ξυλωδών φυτών με ακτινοβακτήρια του γένους *Frankia* (14).

Το αρχείο απολιθωμάτων δείχνει ότι η συμβίωση με δενδρόμορφο ενδομυκορριζικό μύκητα συνέβη πριν από περίπου 400 εκατομμύρια χρόνια (15) ενώ η συμβίωση ψυχανθών-ριζοβίων χρονολογείται πολύ αργότερα πριν από περίπου 55 εκατομμύρια χρόνια (16). Επιπλέον, η συμβίωση με ακτινοβακτήρια *Frankia* είναι πιθανόν να είχε εμφανιστεί νωρίτερα, αν και είναι δύσκολο να χρονολογηθεί με ακρίβεια. Πιο πρόσφατα, τοποθετήθηκε περίπου πριν από 69 έως 71 εκατομμύρια χρόνια (17) (Εικόνα 2).



Εικόνα 2: Εξέλιξη συμβιωτικών σχέσεων στον χρόνο.

## **1.2 Τα ψυχανθή φυτά - *Lotus japonicus***

Η οικογένεια *Fabaceae* (*Leguminosae*) είναι η τρίτη μεγαλύτερη οικογένεια Αγγειόσπερμων και περιέχει πάνω από 18.000 είδη που κατανέμονται σε όλο τον κόσμο σε πολλά οικοσυστήματα με τεράστια βιοποικιλότητα, από τα τροπικά δάση έως τις ερήμους και χωρίζονται σε 3 υποοικογένειες *Caesalpinioideae*, *Mimosoideae* και *Papilionoideae*. Τα ψυχανθή έχουν μεγάλη γεωργική, οικολογική και οικονομική σημασία (18). Τα ψυχανθή περιλαμβάνουν πολλά είδη από φυτά έως και ξυλώδη δέντρα που παράγουν πρωτεΐνες, υδατάνθρακες και έλαια για ανθρώπινη κατανάλωση και ζωοτροφές (19). Τέλος, τα ψυχανθή μπορούν να αναπτυχθούν σε εδάφη φτωχά σε θρεπτικά συστατικά καθώς μπορούν να αναπτύσσουν συμβιωτικές σχέσεις με αζωτοδεσμευτικά βακτήρια και με μύκητες που παρέχουν στα φυτά κυρίως φώσφορο αλλά και άλλα θρεπτικά συστατικά (20). Τα πιο γνωστά ψυχανθή είναι το μπιζέλι (*Pisum sativum*) και η σόγια (*Glycine max*) καθώς και τα φυτά-μοντέλα όπως *Medicago truncatula* και *Lotus japonicus* (21).

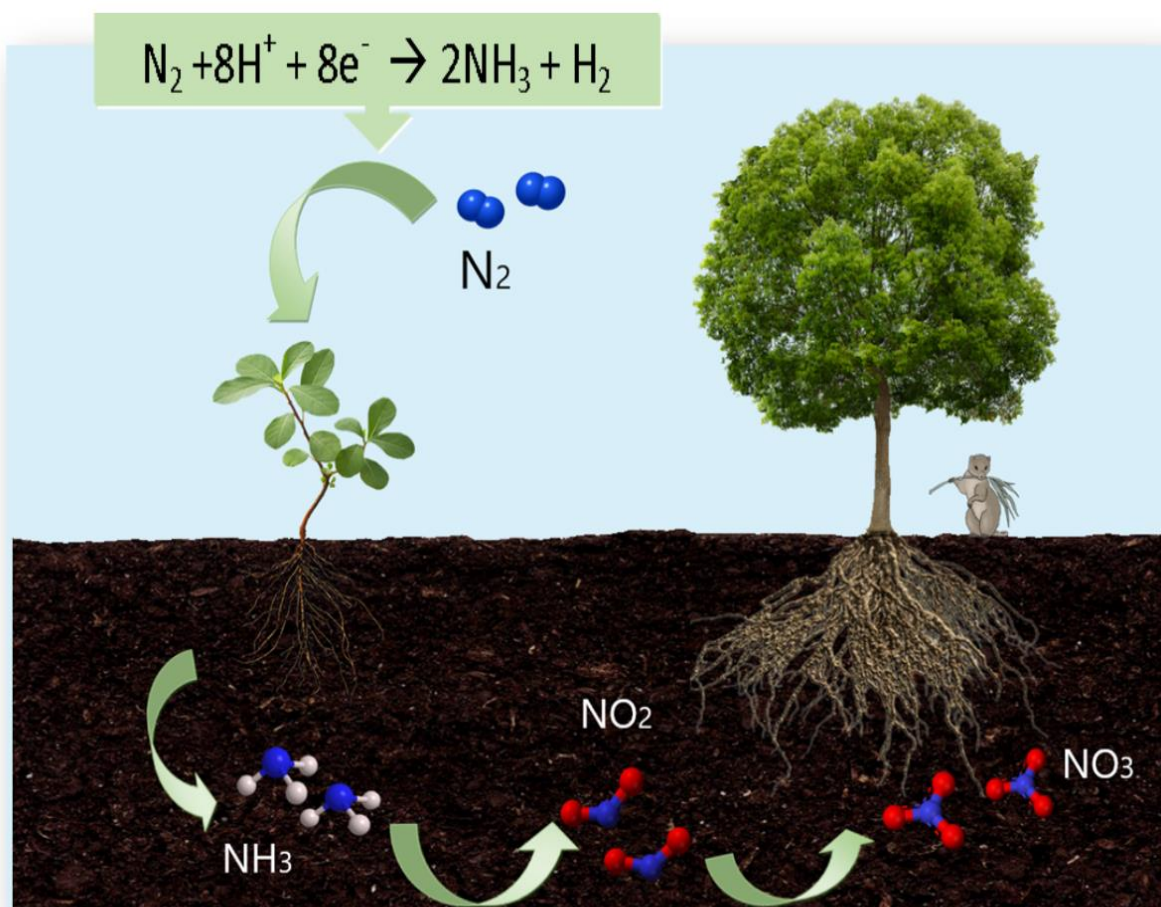


Εικόνα 3: Το φυτό *Lotus japonicus* (πηγή: Hines, P. J. (2018). Keeping the doors open for symbiosis. *Science*, 362(6411), 194.1–194)

Το φυτό *Lotus japonicus* έχει μικρό κύκλο ζωής (3-4 μηνών), είναι αυτογονιμοποιούμενο, διπλοειδές και διαθέτει μικρό γονιδίωμα (~ 450 MB), το οποίο διευκολύνει τις μελέτες σε επίπεδο γονιδιώματος. Ορισμένα άλλα χαρακτηριστικά που το καθιστούν ιδανικό φυτό-μοντέλο είναι το μικρό μέγεθος, τα πολλά και μεγάλα άνθη, υψηλή παραγωγή σπόρων, σύντομος χρόνος ανάπτυξης καθώς και εύκολος μετασχηματισμός. Τα άνθη του είναι κίτρινα και σχετικά μεγάλα και συνήθως 2 ανά μίσχο και οι ιδανικές συνθήκες καλλιέργειας είναι θερμοκρασία 18- 22 °C και υγρασία 70%. Το *L. japonicus* διαθέτει πολλούς οικοτύπους με πιο καλά μελετημένους, τους MG20 (*Miyakojima*) και Gifu (20).

### 1.3 Συμβιωτική Αζωτοδέσμευση

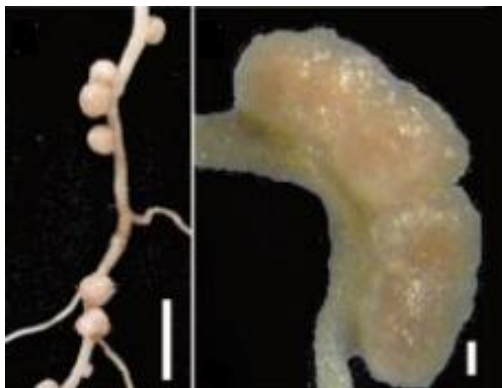
Το άζωτο αποτελεί συστατικό των πρωτεϊνών, των νουκλεϊνικών οξέων και άλλων βιομορίων γι αυτό είναι ένα από τα κύρια θρεπτικά συστατικά κρίσιμα για την επιβίωση όλων των ζωντανών οργανισμών. Αν και το μοριακό άζωτο ( $N_2$ ) βρίσκεται σε αφθονία στην ατμόσφαιρα είναι σε μεγάλο βαθμό απρόσιτο με αυτή τη μορφή στους περισσότερους οργανισμούς. Γι αυτό και πρέπει να μετατραπεί από αέριο αζώτου σε αμμωνία ( $NH_3$ ) για να μπορέσει να χρησιμοποιηθεί από όλους τους οργανισμούς συμπεριλαμβανομένων και των φυτών. Αυτή η μετατροπή γίνεται μέσω του κύκλου του αζώτου με διαδικασίες όπως η αζωτοδέσμευση, η νιτροποίηση, η απονιτροποίηση και η αμμωνιοποίηση που πραγματοποιούνται κυρίως από μικροοργανισμούς (22) (Εικόνα 4). Η συμβίωση ψυχανθών-ριζοβίων παίζει σημαντικό ρόλο στον κύκλο του αζώτου μέσω της μετατροπής του ατμοσφαιρικού διαζώτου σε αμμωνία.



Εικόνα 4: Ο κύκλος του αζώτου.

Πιο συγκεκριμένα, οι οργανισμοί που δεσμεύουν το άζωτο ζουν είτε ελεύθεροι, είτε αναπτύσσουν συμβιωτικές σχέσεις με ξενιστές (22). Οι δύο οργανισμοί διαφοροποιούνται ώστε να υπάρξει μια μεταβολική αλληλεπίδραση: τα βακτήρια μετατρέπουν το ατμοσφαιρικό άζωτο σε αμμωνία και το φυτό αφομοιώνει τα αμμωνιακά ιόντα σε αμινοξέα και σε αντάλλαγμα προμηθεύει τα βακτήρια με υδατάνθρακες που παράγει από την φωτοσύνθεση (23). Τα βακτήρια των γενών *Rhizobium*, *Bradyrhizobium*, *Azorhizobium*, *Sinorhizobium* και *Mesorhizobium* (συλλογικά γνωστά ως rhizobia) έχουν την ικανότητα να συμμετάσχουν σε μια εξαιρετικά οργανωμένη συμβίωση με ένα φυτό ξενιστή. Η αναγνώριση των ριζοβίων από τον

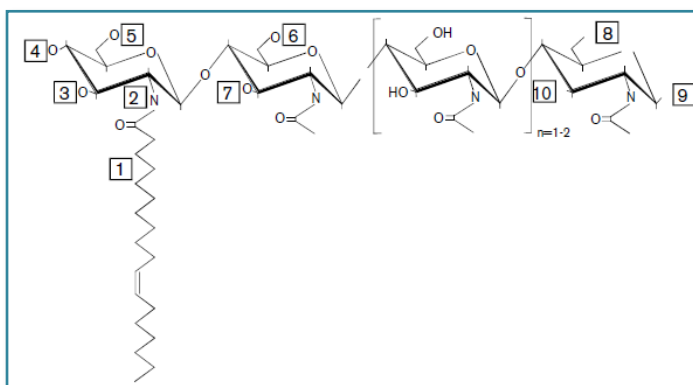
αντίστοιχο ξενιστή- ψυχανθές προκαλεί το σχηματισμό μιας μοναδικής δομής, του φυματίου, στη ρίζα του φυτού (Εικόνα 5). Εντός του φυματίου, τα ριζόβια βρίσκονται στη συμβιωτική τους μορφή και εκεί πραγματοποιείται η συμβιωτική αζωτοδέσμευση. Οι μικροαερόβιες συνθήκες διατηρούνται εντός του φυματίου για να επιτραπεί η δραστηριότητα του βακτηριακού ενζύμου νιτρογενάση που είναι υπεύθυνο για τη δέσμευση του αζώτου (24). Η δέσμευση  $N_2$  από συμβιωτικά συστήματα μεταξύ φυτών και μικροοργανισμών είναι η σημαντικότερη μορφή φυσικού εμπλουτισμού των εδαφών με άζωτο.



Εικόνα 5:Φυμάτια δέσμευσης αζώτου (35)

### 1.3.1 Σηματοδότηση («μοριακός διάλογος») κατά τη συμβίωση ριζοβίων-ψυχανθών

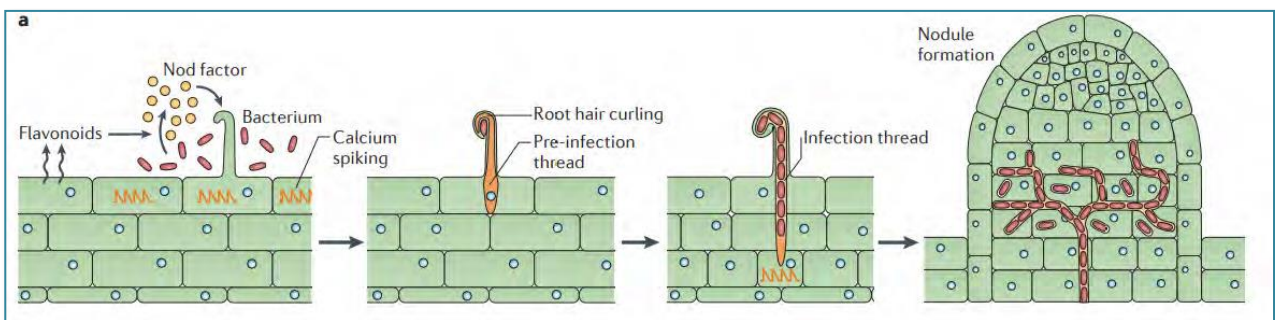
Για την εγκαθίδρυση της συμβιωτικής σχέσης ριζοβίων-ψυχανθών είναι απαραίτητη η επικοινωνία μεταξύ των ριζών των ψυχανθών και των ριζοβίων (25). Αρχικά, οι ρίζες των φυτών απελευθερώνουν φλαβονοειδή τα οποία γίνονται αντιληπτά από τα ριζόβια βακτήρια. Τα φλαβονοειδή είναι πολυαρωματικοί δευτερογενείς μεταβολίτες που αποτελούνται από έναν άνθρακικό σκελετό με 15 άτομα άνθρακα και σχηματίζονται από έναν κλάδο της διαδρομής του φαινυλοπροπανοειδούς. Δύο διακριτοί ρόλοι για τα φλαβονοειδή και τα σχετικά μόριά τους έχουν προταθεί στο πλαίσιο της πρώιμης επικοινωνίας κατά τη διάρκεια της συμβίωσης ψυχανθών-ριζοβίου: 1. εμπλέκονται στις αποκρίσεις χημειοταξίας των ριζοβίων, 2. ρυθμίζουν την έκφραση των γονιδίων *nod* των ριζοβίων (28). Η αντίληψη των φλαβονοειδών οδηγεί στην επαγωγή των ριζοβιακών γονιδίων *nod* που κωδικοποιούν τις πρωτεΐνες που απαιτούνται για τη σύνθεση των παραγόντων Nod (NF). Οι παράγοντες Nod εκκρίνονται από τα ριζόβια και μετά την αναγνώριση τους από το φυτό, λειτουργούν ως μόρια σηματοδότησης προς το φυτό-ξενιστή (26, 27). Η αντίληψη των παραγόντων Nod ενεργοποιεί τις ροές ιόντων και τις ταλαντώσεις του ασβεστίου στο κυτταρόπλασμα, ρυθμίζει τον κυτταροσκελετό και επάγει πρώιμα γονίδια δημιουργίας φυματίων στα επιδερμικά κύτταρα της ρίζας. Ο παράγοντας Nod προκαλεί επίσης



Εικόνα 6: Δομή παράγοντα Nod (30)

παραμορφώσεις των ριζικών τριχιδίων, διαιρέσεις φλοιωδών κυττάρων και σχηματισμό δομών προμόλυνσης (29). Οι παράγοντες Nod, αποτελούνται από ολιγομερή λιπο-χιτίνης (λιποχιτοολιγοσακχαρίτες –LCOs) που συνήθως περιλαμβάνουν τέσσερα ή πέντε β-1,4 συνδεδεμένα κατάλοιπα N-ακετυλογλυκοζαμίνης, στα οποία η N-ακετυλομάδα του τερματικού (μη αναγωγικού) σακχάρου αντικαθίσταται από μια ακυλική αλυσίδα (Εικόνα 6). Η εξειδίκευσή τους καθορίζεται, τουλάχιστον εν μέρει, από τη χημική τροποποίηση των παραγόντων Nod. Αυτές οι τροποποιήσεις περιλαμβάνουν τη σύνδεσηθειικών, οξικών, καρβαμυλ ομάδων, προσθήκη άλλων σακχάρων όπως αραβινόζη, μαννόζη ή φουκόζη (και υποκατεστημένα παράγωγα της φουκόζης), αλλαγές στην ακυλική αλυσίδα, και αλλαγή του μήκους ολιγομερούς χιτίνης (30).

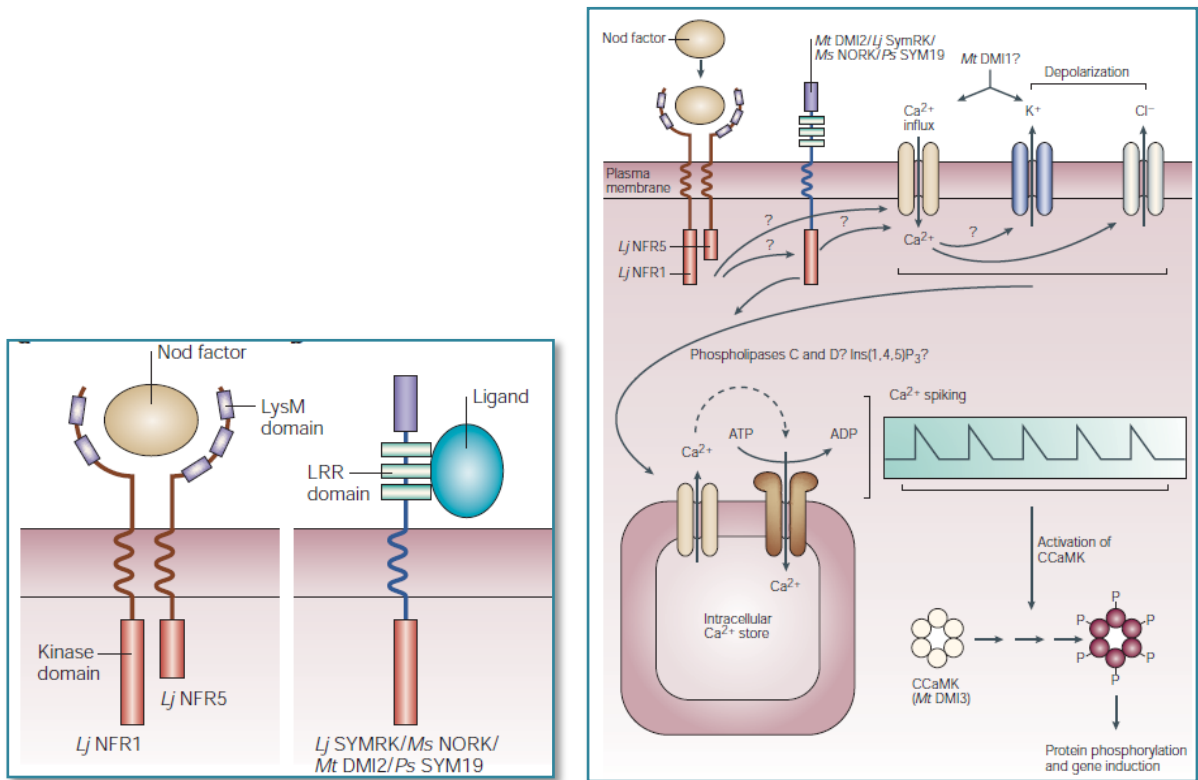
Κατά την μόλυνση των ριζών από ριζόβια προκαλείται μια κύρτωση στο άκρο των ριζικών τριχιδίων του φυτού. Αρχικά παρατηρείται συγκέντρωση και πολλαπλασιασμός ενός πληθυσμού *Rhizobium*, κοντά και γύρω στην επιφάνεια των ριζικών τριχιδίων, στη ριζόσφαιρα. Στη συνέχεια ο πυρήνας μετατοπίζεται στο σημείο της μόλυνσης και σχηματίζεται το νήμα προμόλυνσης μέσω ευθυγράμμισης του ενδοπλασματικού δικτύου και του κυτταροσκελετού. Τα ριζόβια εγκλωβίζονται μέσα στις εγκολπώσεις που δημιουργούνται με την κύρτωση και το επόμενο βήμα είναι μια τοπική αποδιοργάνωση των ριζικών τριχιδίων και ο σχηματισμός του μολυσματικού νηματίου (Infection Thread, IT). Το μολυσματικό νηματίο επιμηκύνεται συνεχώς και ουσιαστικά αποτελεί μια προέκταση της πλασματικής μεμβράνης καθώς συγχωνεύεται με την πλασματική μεμβράνη εξειδικευμένων κυττάρων του φυματίου. Η ταχεία επιμήκυνση του μολυσματικού νηματίου επιτυγχάνεται μέσω της σύντηξης των κυστιδίων Golgi και μέσα από εκεί τα ριζόβια μεταφέρονται και πολλαπλασιάζονται μέχρι να απελευθερωθούν στα κύτταρα του φλοιού της ρίζας προς σχηματισμό φυματίων (26, 31) (Εικόνα 7). Όταν τα ριζόβια εγκαταλείπουν το μολυσματικό νηματίο και εισέρχονται στα κύτταρα του φλοιού της ρίζας αρχίζει η διαδικασία διαφοροποίησής τους. Συγκεκριμένα, τα βακτήρια σταματούν να διαιρούνται, μεγεθύνονται και μετατρέπονται σε μεγαλύτερες μορφές (3-7 φορές μεγαλύτερο μέγεθος από το αρχικό). Τελικά, αποκτούν ένα περίπλοκο σχήμα και καταλήγουν να είναι ενδοσυμβιωτικά οργανίδια αζωτοδέσμευσης που χαρακτηρίζονται ως βακτηριοειδή (bacteroids). Μέσα στα βακτηριοειδή υπάρχει το ένζυμο της νιτρογενάσης (nitrogenase) καθώς και άλλες πρωτεΐνες που συμμετέχουν στην διαδικασία της αζωτοδέσμευσης (31, 3).



Εικόνα 7: Σχηματισμός φυματίου (3)

Η αντίληψη και η μεταγωγή των παραγόντων Nod διαμεσολαβεί από τις κινάσες που μοιάζουν με υποδοχείς της οικογένειας LysM. Οι υποδοχείς αυτοί επάγουν την απελευθέρωση ιόντων ασβεστίου μέσω μιας οδού σηματοδότησης που περιλαμβάνει μια πλούσια σε

επαναλήψεις λευκίνης κινάση που μοιάζει με υποδοχέα και ένα κανάλι ιόντων. Το ασβέστιο φαίνεται να ελέγχει τη δραστηριότητα μιας εξαρτώμενης από ασβέστιο/καλμοδουλίνη πρωτεϊνικής κινάσης (CCaMK ) και δύο μεταγραφικών παραγόντων της οικογένειας GRAS, οι οποίοι επάγουν την έκφραση γονιδίων που είναι υπεύθυνα για τη φυματογένεση (3).

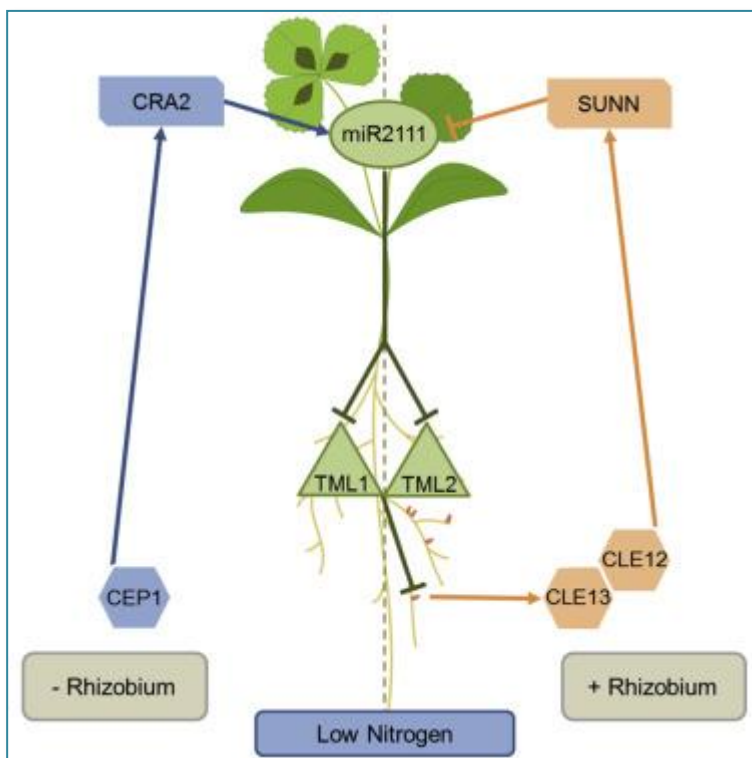


Εικόνα 8: Οδός σηματοδότησης στα φυτικά κύτταρα που επάγεται από την αναγνώριση του παράγοντα Nod. (27)

Στο μοντέλο-ψυχανθές *Lotus jaronicus*, οι δύο κινάσες υποδοχείς που αντιλαμβάνονται το σήμα του παράγοντα Nod , NFR1 και NFR5, προβλέπεται ότι έχουν εξωκυτταρικά περιοχές που περιέχουν LysM και ενδοκυτταρικά κινάσες πρωτεΐνης σερίνης/θρεονίνης (32, 33). Η αναπτυξιακή διαδικασία του φυματίου κωδικοποιείται από μια οδό σηματοδότησης που αποτελείται από επτά γονίδια τα *SYMRK* , *CASTOR* , *POLLUX* , *NUP185K* , *NUP185K* , και *CYCLOPS* (34) και κατάντη αυτής της οδού απαιτούνται μεταγραφικοί παράγοντες που κωδικοποιούνται από τα *LjNIN* (35), *LjNSP1* και *LjNSP2* (36) για την έναρξη της οργανογένεσης των φυματίων (Εικόνα 8).

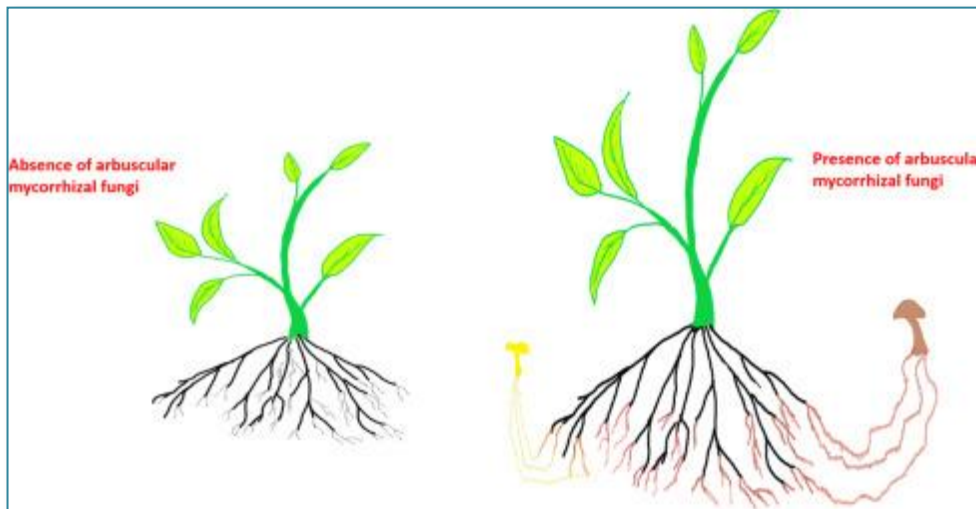
### 1.3.2 Μηχανισμός Αυτορρύθμισης της φυματιογένεσης (AON)

Τα φυτά προκειμένου να εξασφαλίσουν μια ισορροπία μεταξύ της συμβίωσης και της ανάπτυξης τους έχουν αναπτύξει μηχανισμούς αυτορρύθμισης. Επειδή, ο σχηματισμός φυματίων και η δέσμευση αζώτου είναι διαδικασίες υψηλής κατανάλωσης ενέργειας, τα ψυχανθή περιορίζουν τον σχηματισμό φυματίων στον ελάχιστο αριθμό που απαιτείται για τη βέλτιστη παροχή αζώτου μέσω ενός μηχανισμού αρνητικής ανάδρασης που ονομάζεται αυτορρύθμιση της φυματιογένεσης (autoregulation of nodulation: AON). Η ριζοβιακή μόλυνση πυροδοτεί την παραγωγή κινητών πεπτιδίων CLE-ROOT SIGNAL 1/2/3 (CLE-RS1/2/3) στις ρίζες του *Lotus japonicus* και τη μεταφορά τους στο βλαστό (37). Η αντίληψη του σήματος στο βλαστό από δύο κινάσες που μοιάζουν με υποδοχείς πλούσιες σε επαναλήψεις λευκίνης, HYPERNODULATION ABERRANT ROOT FORMATION 1 (HAR1) και KLAVER προκαλεί την ενεργοποίηση μιας οδού σηματοδότησης (38). Η σηματοδότηση CLE-RS1/2-HAR1 ενεργοποιεί την παραγωγή κυτοκινίνης (CK) στους βλαστούς η οποία αναστέλλει τη δημιουργία φυματίων (40). Ένα σημαντικό συστατικό του μονοπατιού AON είναι η πρωτεΐνη TML (TOO MUCH LOVE), η οποία δρα στις ρίζες (41). Το TML κωδικοποιεί για μία Kelch repeat-containing F-box πρωτεΐνη που εντοπίζεται στον πυρήνα. Συγκεκριμένα, αποτελεί μία Skp1 Cullin F-box (SCF) πρωτεΐνη, τμήμα του συμπλόκου της E3 λιγάσης της ουβικιτίνης (41). Το TML ρυθμίζεται μεταμεταγραφικά από το μικρό RNA miR2111. Το miR2111 συντίθεται στο βλαστό, μεταφέρεται μέσω του φλοιώματος στη ρίζα και συμβάλλει στη ρύθμιση των επιπέδων TML της ρίζας. Το miR2111 είναι ένας συστημικός ενεργοποιητής της συμβίωσης που καταστέλλει το AON σε μη μολυσμένες ρίζες, διατηρώντας έτσι την ευαισθησία στη ριζοβιακή μόλυνση (42) (Εικόνα 9).



Εικόνα 9: Σχηματικό μοντέλο για τον μηχανισμό AON (43)

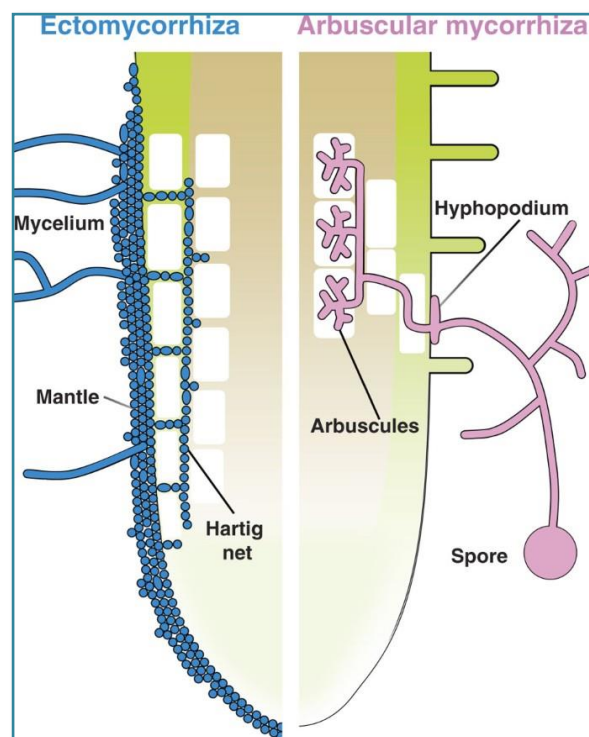
## 1.4 Μυκορριζική συμβίωση



Εικόνα 10: Η συμβιωτική συσχέτιση των ενδομυκορριζικών μυκήτων με το φυτό ξενιστή και ο ρόλος τους στην ανάπτυξη των φυτών (50)

Οι μυκορριζικοί μύκητες (από το ελληνικό «mycos», που σημαίνει μύκητας και «rhiza», που σημαίνει ρίζα), αν και μπορούν να περάσουν μέρος του κύκλου ζωής τους ως ελεύθεροι ζωντανοί οργανισμοί, συνδέονται πάντα με τις ρίζες των ανώτερων φυτών, και μάλιστα πάνω από το 90% των φυτικών ειδών, συμπεριλαμβανομένων των δασικών δέντρων, των άγριων χόρτων και πολλών καλλιεργήσιμων φυτών. Και οι δύο συμβιώτες επωφελούνται από τη σχέση:

οι μυκορριζικοί μύκητες βελτιώνουν τη θρεπτική κατάσταση των φυτών-ξενιστών, επηρεάζοντας τη πρόσληψη των θρεπτικών στοιχείων, την απορρόφηση νερού, την ανάπτυξη και την αντοχή στις ασθένειες, ενώ σε αντάλλαγμα, το φυτό-ξενιστής είναι απαραίτητο για την ανάπτυξη και την αναπαραγωγή των μυκήτων (Εικόνα 10). Οι μυκορριζικοί μύκητες αναπτύσσουν εξειδικευμένες δομές, που ονομάζονται συμβιωτικές υφές, για να αλληλεπιδρούν με το φυτό ξενιστή. Οι μυκορριζικοί μύκητες μπορούν να χωριστούν σε δύο μεγάλες ομάδες: ασηπτικά ενδόφυτα όπως το *Glomeromycota* ή διαφραγματικά όπως οι Ασκομύκητες (*Ascomycota*) και βασιδιομύκητες (*Basidiomycota*) (41). Οι ταξινομήσεις της μυκορριζίας αντικατοπτρίζουν ανατομικές πτυχές και προσδιορίζουν δύο ευρείες κατηγορίες, που αναφέρονται ως



Εικόνα 11: Απεικόνιση δομών αποικισμού ριζών σε εκτομυκορριζικές (μπλε) και δενδροειδής ενδομυκορριζικές (ροζ) αλληλεπιδράσεις. (44)



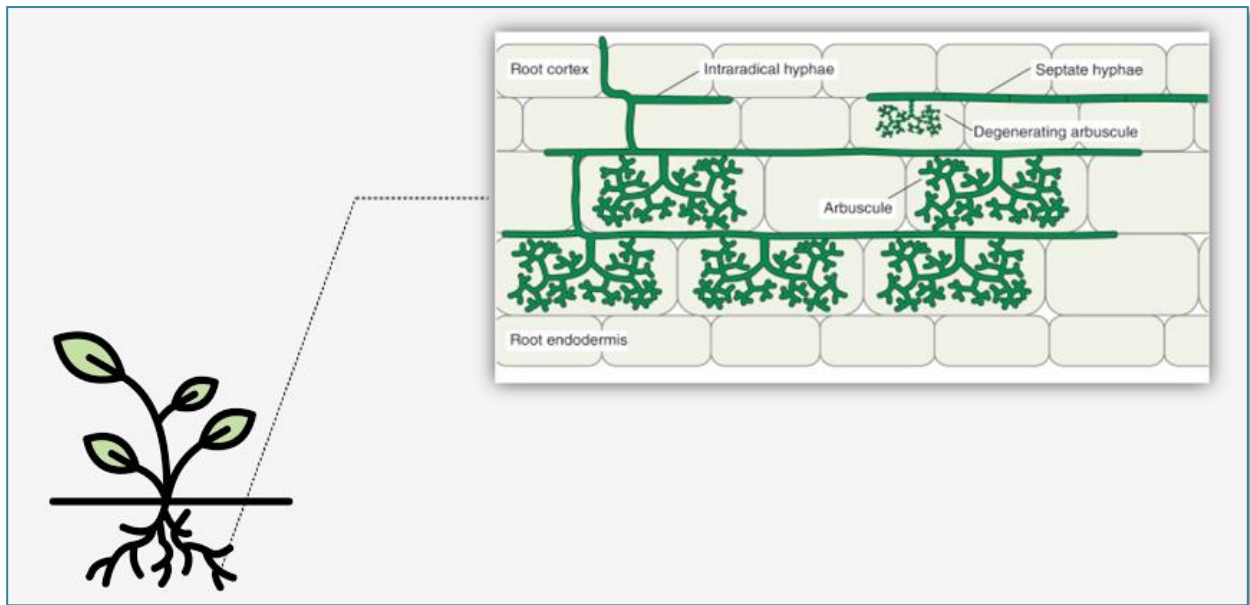
εκτομυκόρριζες (EM-*ectomycorrhizae*) και ενδομυκόρριζες, ανάλογα με το αν ο μύκητας αποικίζει τους γύρω από τα επιδερμικά κύτταρα χώρους της ρίζας ή αναπτύσσεται μέσα στα κύτταρα (Εικόνα 11). Οι ενδομυκόρριζες διακρίνονται περαιτέρω σε μυκόρριζες ερικοειδών (*Ericoid*), μυκόρριζες ορχεοειδών (*Orchidaceous*), μυκόρριζες αρμπουτοειδών (*Arbutoid*), μυκόρριζες μονοτροποειδών (*Monotropoid*) και Δενδρόμορφες Μυκόρριζες (*Arbuscular*). Οι Δενδρόμορφες Μυκόρριζες (AM) είναι ίσως η πιο διαδεδομένη χερσαία συμβίωση και σχηματίζεται σε περίπου το 70% των ειδών φυτών της ξηράς με μύκητες που ανήκουν σε ένα μονοφυλετικό φύλο, το *Glomeromycota* (42).

#### **1.4.1 Δενδρόμορφοι ενδομυκορριζικοί μύκητες (ΔΕΜ)- Arbuscular mycorrhizal fungi (AMF)**

Οι ενδομυκορριζικοί μύκητες (EM) παρουσιάζουν ιδιόμορφα χαρακτηριστικά: σχηματίζουν συμβιωτικές σχέσεις με φυτά της ξηράς, είναι υποχρεωτικά βιοτροφικοί (δεν μπορούν να ολοκληρώσουν τον φυσικό κύκλο ζωής τους χωρίς ξενιστή), χαρακτηρίζονται από ομοιοκυτταρικές υφές και πολυπύρρηνα σπόρια (44). Οι ενδομυκορριζικοί μύκητες (EM) δημιουργούν μια πολύ στενή σχέση με τις ρίζες των φυτών, οδηγώντας στο σχηματισμό μιας αμοιβαίας αλληλεπίδρασης που ονομάζεται δενδρόμορφη μυκορριζική συμβίωση (41). Η ενδομυκορριζική συμβίωση είναι μια από τις πιο αρχαίες και διαδεδομένες συμβιώσεις στη φύση (44). Μετά από εκτενή φυλογονιδιωματική μελέτη που βασίστηκε σε δειγματοληψία μυκητιακών ειδών σε όλο το βασίλειο και σε δειγματοληψία κλίμακας γονιδιωματικών τόπων, οι ενδομυκορριζικοί μύκητες (EM) τοποθετήθηκαν στο υποφύλο *Glomeromycota* που έχει στενή σχέση με τη *Mortierellomycota* (46).

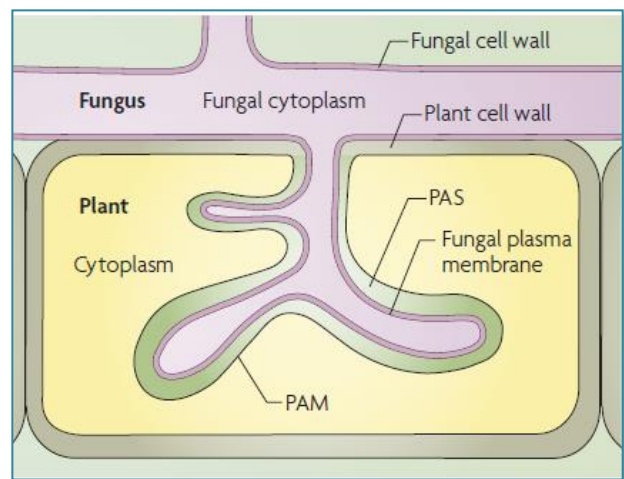
Τα χερσαία φυτά παρέχουν έως και το 20% των φωτοσυνθετικών προϊόντων (περίπου 5 δισεκατομμύρια τόνοι άνθρακα ετησίως) στον ενδομυκορριζικό μύκητα (EM) (47), ενώ ο EM συμβάλλει στην απόκτηση θρεπτικών ουσιών καθώς παρέχουν πρόσβαση στον φώσφορο, ο οποίος είναι ελάχιστα ευκίνητος στο έδαφος και επίσης, σε μικρότερο βαθμό, σε άζωτο και άλλα μεταλλικά θρεπτικά συστατικά (45). Επομένως, η συμβίωση με EM συμβάλλει σημαντικά στον παγκόσμιο κύκλο φωσφορικών αλάτων και άνθρακα και επηρεάζει την πρωτογενή παραγωγικότητα στα χερσαία οικοσυστήματα. Τα ευεργετικά αποτελέσματα της συμβίωσης με EM είναι πιο εμφανή υπό συνθήκες περιορισμένης διαθεσιμότητας θρεπτικών συστατικών. Τα φυτά που αποικίζονται από EM συχνά δείχνουν υψηλότερη ανοχή σε βιοτικές και αβιοτικές καταπονήσεις σε σύγκριση με τα μη μυκορριζικά φυτά. Είναι ενδιαφέρον ότι ο αποικισμός των ριζών με EM έχει παρατηρηθεί ότι οδηγεί σε αναστολή των βακτηριακών παθογόνων φύλλων (48). Σε επίπεδο οικοσυστήματος, η συμβίωση με EM βελτιώνει την ποιότητα του εδάφους και αυξάνει τη βιοποικιλότητα των φυτών (49).

Η εγκαθίδρυση της συμβίωσης έχει ως αποτέλεσμα το σχηματισμό δενδρόμορφων υποκυτταρικών δομών μέσα στα φυτικά κύτταρα. Αυτές οι δομές, οι οποίες είναι γνωστές ως θύσσανοι ή arbuscules (από το λατινικό «*arbusculum*», που σημαίνει θάμνος ή μικρό δέντρο) πιστεύεται ότι είναι το κύριο μέρος ανταλλαγής θρεπτικών ουσιών μεταξύ των συμβιωτικών εταίρων μυκήτων και φυτών (48) (Εικόνα 12).



Εικόνα 12: Σχηματική απεικόνιση των δενδρόμορφων δομών του μύκητα εντός των φυτικών κυττάρων (51)

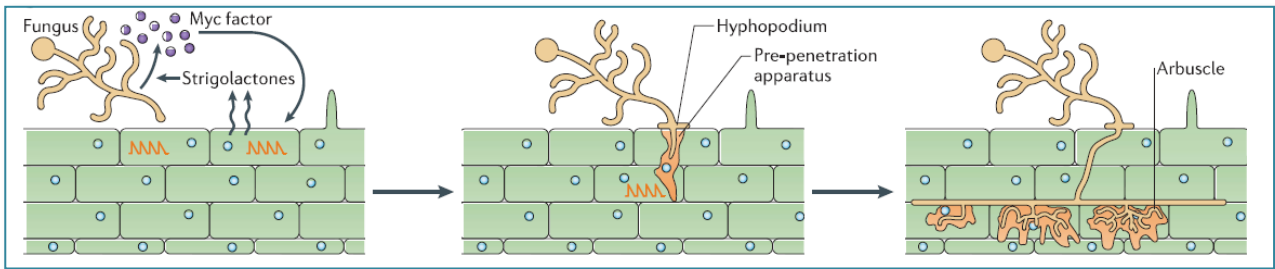
Η ανάπτυξη της συμβίωσης ξεκινά με την ανταλλαγή μορίων σηματοδότησης μεταξύ των δύο συμβιωτών, ακολουθούμενη από ανάπτυξη μυκητιακών υφών προς τη ρίζα, σχηματισμό υποποδίου στην επιφάνεια της ρίζας και είσοδο μέσω του στρώματος των επιδερμικών κυττάρων στον φλοιό της ρίζας. Μόλις η υφή του μύκητα εισχωρήσει στη ρίζα, υπάρχουν δύο διαφορετικοί τύποι στρατηγικών αποικισμού μυκήτων, αν και συχνά εμφανίζονται ενδιάμεσες μορφές αυτών των στρατηγικών. Ο αποικισμός τύπου *Arum* περιλαμβάνει την εξάπλωση των υφών μεταξύ των κυττάρων του φλοιού προτού διεισδύσουν σε ένα εσωτερικό φλοιώδες κύτταρο για να σχηματίσουν δενδρόμορφες δομές (arbuscules) (Εικόνα 13). Στον αποικισμό τύπου *Paris*, οι υφές εξαπλώνονται μέσω της ενδοκυτταρικής διόδου των φλοιωδών κυττάρων, όπου σχηματίζονται υφικές σπείρες ή δενδρόμορφες δομές (arbuscules).



Εικόνα 13: Απεικόνιση της δενδρόμορφη δομής του μύκητα εντός του φυτικού κυττάρου. (48)

Πιο συγκεκριμένα, πραγματοποιείται η προσκόλληση των μυκητιακών υφών στα επιδερμικά κύτταρα της ρίζας, όπου οι άκρες των υφών διαφοροποιούνται για να σχηματίσουν υποπόδια, πριν από την είσοδο των υφών στη ρίζα. Επίσης, κατά την διείσδυση των μυκήτων στα ριζικά κύτταρα παρατηρούνται αναδιατάξεις του κυτταροσκελετού του ξενιστή και αναδιαμόρφωση των οργανιδίων. Κατά την προσκόλληση του μύκητα σε ένα επιδερμικό κύτταρο, ο πυρήνας του φυτικού κυττάρου μετακινείται στη θέση επαφής των υφών προτού μεταναστεύσει κατά μήκος του κυττάρου στην αντίθετη πλευρά. Ταυτόχρονα με την πυρηνική κίνηση μακριά από τη θέση προσκόλλησης του μύκητα, σχηματίζεται μια εξειδικευμένη δομή που μοιάζει με τούνελ που

ονομάζεται συσκευή προ-διείσδυσης (PPA). Αυτή η συσκευή προέρχεται από μια συσσώρευση ενός πυκνού ενδοπλασματικού δικτύου, νημάτων ακτίνης και μικροσωληνίσκων. Μόλις η συσκευή προ-διείσδυσης (PPA) έχει συναρμολογηθεί και εκτείνεται σε όλο το πλάτος του κυττάρου, η μυκητιακή υφή εισέρχεται στον αυλό του κυττάρου μέσω αυτής της προδιαμορφωμένης κυτταροπλασματικής γέφυρας και καθοδηγείται κατά μήκος του κυττάρου σε αυτήν την προκαθορισμένη διαδρομή (52). Η συσκευή προ-διείσδυσης (PPA) σχετίζεται όχι μόνο με την είσοδο μυκήτων στα επιδερμικά κύτταρα, αλλά και με τον αποικισμό του φλοιού της ρίζας κατά τον σχηματισμό των δενδρόμορφων δομών (Εικόνα 14).



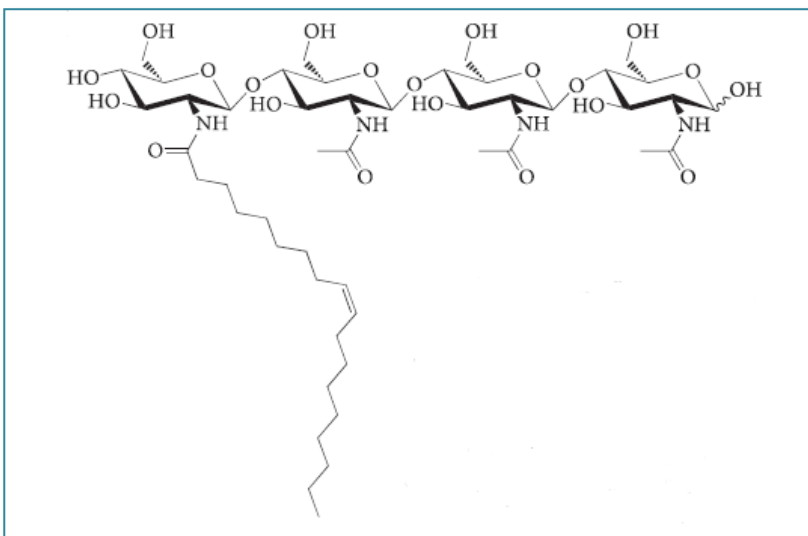
Εικόνα 14: Διείσδυση των υφών του μύκητα στα επιδερμικά κύτταρα και σχηματισμός δενδρόμορφων δομών στα κύτταρα του φλοιού της ρίζας (3)

Μετά την επιτυχή είσοδο των μυκητιακών υφών μέσω της στιβάδας των επιδερμικών κυττάρων, οι υφές εξαπλώνονται μέσα στη ρίζα του φυτού, κυρίως διακυτταρικά, μέχρι να φτάσουν στον εσωτερικό φλοιό όπου σχηματίζονται οι δενδρόμορφες δομές (arbuscules). Αν και ο μύκητας διεισδύει στο κυτταρικό τοίχωμα για να εισέλθει στα κύτταρα του φλοιού, η πλασματική μεμβράνη του ξενιστή δεν σπάει αλλά διαστέλλεται για να περιβάλλει τους υφικούς κλάδους και σχηματίζει τη λεγόμενη περιδενδροειδή μεμβράνη (PAM), η οποία διαχωρίζει τις μυκητιακές υφές από το κυτταρόπλασμα του ξενιστή. Η περιοχή του κορμού σχηματίζει τη βάση της δενδρόμορφης δομής και περιέχει πρωτεΐνες που υπάρχουν επίσης στη πλασματική μεμβράνη, ενώ η περιοχή διακλάδωσης περιβάλλει τους λεπτούς κλάδους υφών της δενδρόμορφης δομής και φιλοξενεί ένα εξειδικευμένο σύνολο πρωτεϊνών που μεσολαβούν στην ανταλλαγή θρεπτικών ουσιών μεταξύ του φυτού και του μύκητα, συμπεριλαμβανομένων των μεταφορέων φωσφορικών αλάτων και αμμωνίου, όπως PT4 και AMT2 αντίστοιχα (53) και μιας πρεωτεάσης σερίνης που κωδικοποιείται από το *LjSbtM1* (54). Η περιοχή μεταξύ της περιδενδροειδούς μεμβράνης και των μυκητιακών υφών έχει ονομαστεί περιδενδροειδικός χώρος και περιέχει άμορφα δομημένο υλικό φυτικού κυτταρικού τοιχώματος, το οποίο βρίσκεται σε άμεση επαφή με τα κυτταρικά τοιχώματα των μυκήτων που περιβάλλουν τις υφές (55) (Εικόνα 13).

Οι δενδρόμορφες δομές έχουν συνήθως σχετικά σύντομη διάρκεια ζωής περίπου δύο έως οκτώ ημέρες πριν καταρρεύσουν γρήγορα. Αυτός ο εκφυλισμός τους μπορεί να ακολουθηθεί από επαναποικισμό της ρίζας και το σχηματισμό νέων δενδρόμορφων δομών, μερικές φορές στα ίδια κύτταρα που προηγουμένως φιλοξενούσαν άλλες, με αποτέλεσμα ταυτόχρονους κύκλους σχηματισμού και αποικοδόμησης δενδρόμορφων δομών (51, 56).

### 1.4.2 Σηματοδότηση

Η ανάπτυξη της συμβιωτικής σχέσης με ΕΜ συνοδεύεται από ανταλλαγή μορίων σηματοδότησης μεταξύ των συμβιωτών. Ο μοριακός διάλογος ξεκινά από τις στριγγολακτόνες, μια ομάδα φυτοορμονών με βάση τα καροτενοειδή που παράγονται από το φυτό, και ρυθμίζουν επίσης πολλές πτυχές της ανάπτυξης των φυτών. Σε συνθήκες έλλειψης φωσφορικών, οι στριγγολακτόνες εκκρίνονται στη ριζόσφαιρα, όπου αυτά τα χημικά ασταθή μόρια χρησιμεύουν ως σήματα μέσω των οποίων οι μύκητες μπορούν να αναγνωρίσουν έναν δεκτικό ξενιστή στην περιοχή τους. Με την ανίχνευση των στριγγολακτονών, οι μύκητες ενεργοποιούν τον οξειδωτικό μεταβολισμό, ο οποίος οδηγεί σε αυξήσεις στην ανάπτυξη και διακλάδωση των υφών, ενισχύοντας την πιθανότητα φυσικής επαφής με τη ρίζα του ξενιστή αλλά και δεσμεύοντάς τους σε συμβίωση (57). Οι ΕΜ παράγουν επίσης διάχυτα σήματα που ενεργοποιούν ειδικές για τη συμβίωση αποκρίσεις στη ρίζα του ξενιστή (που ονομάζονται συλλογικά παράγοντες Μγc) και με βάση τις γενετικές απαιτήσεις του φυτού ξενιστή που είναι απαραίτητες για την αναγνώρισή τους, φαίνεται πιθανό ότι παράγουν τουλάχιστον δύο διαφορετικά φυτικά σήματα λιποχιτοολιγοσακχαρίτες (Μγc-LCOs) και ολιγοσακχαρίτες χιτίνης βραχείας αλυσίδας (Μγc-COs) (τετραμερή και πενταμερή σκελετό χιτίνης αλλά με ακυλικές ομάδες C16:0 ή C18:1) (58) (Εικόνα 15).



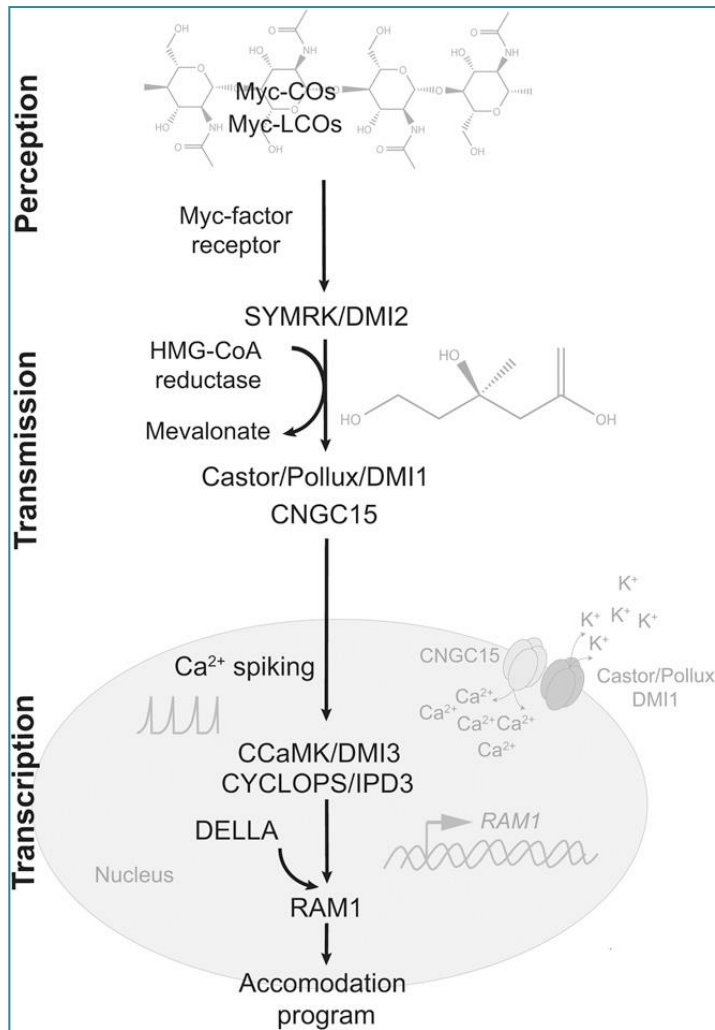
Εικόνα 15: Δομή παράγοντα Μγc. (3)

Τα γεγονότα που εκτυλίσσονται μέσα στα ριζικά κύτταρα ενός φυτού ξενιστή μπορούν να οργανωθούν εννοιολογικά σε μια ιεραρχία τριών επιπέδων: 1) αντίληψη μικροσυμβιώτη, 2) μετάδοση σήματος και 3) μεταγραφή γονιδίων (Εικόνα 16).

1) Αντίληψη → Το φυτό ξενιστής αντιλαμβάνεται την παρουσία των ΕΜ μέσω της ανίχνευσης λιποχιτοολιγοσακχαριτών (Μγc-LCOs) και ολιγοσακχαριτών χιτίνης βραχείας αλυσίδας (Μγc-COs) από κινάσες που μοιάζουν με υποδοχείς LysM όπως ο LjNFR1 και την κινάση που μοιάζει με υποδοχέα SYMRK/DMI2 (59).

2) Μετάδοση → Το ένζυμο αναγωγή του HMG-CoA αλληλεπιδρά με την κινάση DMI2 και είναι απαραίτητο για τη δημιουργία ροής  $Ca^{2+}$  για την έναρξη της μεταγραφικής απόκρισης. Προτάθηκε ένα μοντέλο σύμφωνα με το οποίο η αναγωγή του HMG-CoA μετά την αντίληψη των EM από την SYMRK/DMI2 παράγει μεβαλονικό οξύ (60). Το μεβαλονικό δρα ως δεύτερος διαβιβαστής που μεταδίδει την αντίληψη των μυκήτων από την πλασματική μεμβράνη του φυτικού κυττάρου στον πυρήνα μέσω αλληλεπίδρασης με τα κανάλια πυρηνικών κατιόντων ( $K^+$ ) CASTOR και POLLUX/DMI1. Αυτά τα κανάλια  $K^+$  επιτρέπουν την εκροή  $K^+$  να αντισταθμίσει την εισροή  $Ca^{2+}$ , η οποία μεσολαβείται από τα κανάλια κυκλικών νουκλεοτιδίων CNGC15 (59).

3) Μεταγραφή → Μια κινάση εξαρτώμενη από το ασβέστιο και τη καλμοδουλίνη (CCaMK) πιθανόν λειτουργεί ως ρυθμιστική κινάση, αποκρυπτογραφώντας τις ταλαντώσεις του πυρηνικού  $Ca^{2+}$  ενεργοποιώντας την κατάλληλη μεταγραφική απόκριση. Παρουσία ασβεστίου,  $Ca^{2+}$  η καλμοδουλίνη συνδέεται με την CCaMK, αλλάζοντας διαμόρφωση και φωσφορυλιώνοντας τη πρωτεΐνη CYCLOPS (61). Η φωσφορυλιωμένη CYCLOPS σχηματίζει ένα σύμπλοκο με τη κινάση CCaMK, το οποίο δρα σε συνεννόηση με μεταγραφικούς παράγοντες GRAS, για την έναρξη της έκφρασης γονιδίων όπως τα RAM1/RAM2 που είναι απαραίτητα για τον αποικισμό από τους ΔΕΜ (62).

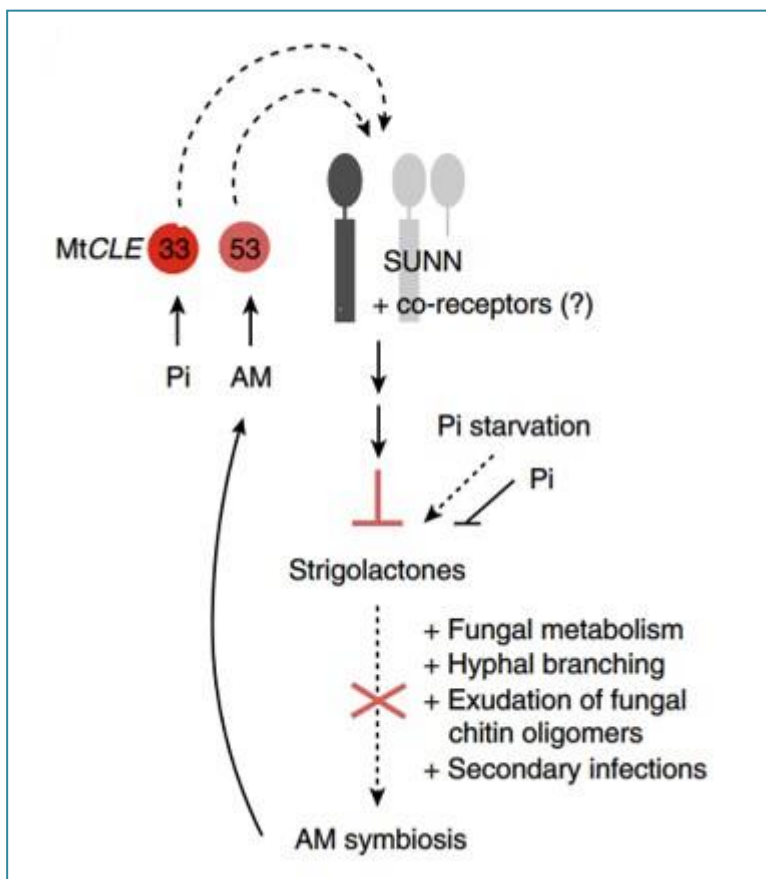


Εικόνα 16: Σηματοδοτικό μονοπάτι που οδηγεί στην εγκαθίδρυση της συμβιωτικής σχέσης των ριζών με ΔΕΜ (59)

### 1.4.3 Μηχανισμός αυτορρύθμισης των μυκορριζών (AOM)

Η οδός αυτορρύθμισης κατά το σχηματισμό μυκορριζών (Autoregulation of mycorrhization-AOM) που είναι ένα σύστημα ανάδρασης ρίζας-βλαστού, μοιράζεται ορισμένα στοιχεία με την AON, αλλά υπάρχουν ορισμένες σημαντικές διαφορές. Ο μηχανισμός αυτορρύθμισης των μυκορριζών (AOM) είναι λιγότερο μελετημένος συγκριτικά με εκείνον κατά την φυματογένεση (AON) και δεν έχουν αναγνωριστεί όλα τα στοιχεία που συμμετέχουν. Αυτός ο μηχανισμός ελέγχει την έκταση της μικροβιακής μόλυνσης και του αποικισμού βάσει των αναγκών του φυτού, ώστε να περιορίζεται το ενεργειακό κόστος και να αποφευχθεί κάποια δυνητική παρασιτική σχέση (63).

Στο μηχανισμό AOM, μετά την είσοδο του συμβιώτη στο φυτό-ξενιστή, στη ρίζα του φυτού παράγονται πεπτίδια CLE (έκφραση διαφορετικών γονιδίων CLE στη συμβίωση φυτού-EM από τη συμβίωση φυτού-ριζοβίου) και μετακινούνται στο βλαστό μέσω του ξηλώματος. Τα πεπτίδια CLE θα συνδεθούν στον βλαστό με τον υποδοχέα τους που θα ενεργοποιήσει ένα σηματοδοτικό μονοπάτι, το οποίο δεν είναι ακόμη πλήρως γνωστό (64). Τα πεπτίδια συνδέονται σε έναν υποδοχέα τύπου CLAVATA (65). Τα στοιχεία που βρίσκονται κατάντη του υποδοχέα στο σηματοδοτικό μονοπάτι δεν είναι γνωστά (Εικόνα 17). Αλλά, έχει βρεθεί ότι το miR2111 επάγεται σε συνθήκες έλλειψης φωσφόρου, χωρίς να έχει μελετηθεί ο πιθανός ρόλος του στο μηχανισμό αυτορρύθμισης AOM. Μένει να αποδειχθεί αν το miR2111 και η TML έχουν κάποιο ρόλο στον μηχανισμό AOM (66). Επίσης, πρόσφατα βρέθηκε πως τα πεπτίδια CLE και συγκεκριμένα το MtCLE53 μειώνει τα επίπεδα των στριγγολακτονών, επηρεάζοντας έτσι αρνητικά τον αποικισμό. Επομένως, είναι πιθανό πως τα φυτά ελέγχουν τον αποικισμό από ΔΕΜ μέσω της ρύθμισης της παραγωγής στριγγολακτονών (64).



Εικόνα 17: Σχηματικό μοντέλο για τον μηχανισμό AOM (64).

## **1.5 Σκοπός της παρούσας πειραματικής μελέτης**

Σκοπός της παρούσας διπλωματικής εργασίας είναι να μελετηθεί ο μηχανισμός αυτορρύθμισης των μυκορριζών (ΑΟΜ) στο φυτό-μοντέλο *Lotus japonicus* και να διαπιστωθεί αν το miR2111, το οποίο έχει σημαντικό ρόλο στον μηχανισμό ΑΟΝ, έχει επίσης κάποιο ρόλο στον μηχανισμό ΑΟΜ. Για τον σκοπό αυτό, φυτά *Lotus japonicus* εμβολιάστηκαν με τον ενδομυκορριζικό μύκητα *Rhizophagus irregularis*. Η εργασία αυτή εστίασε στη φαινοτυπική και μοριακή μελέτη ενός φυτικού μεταλλάγματος υπερέκφρασης του γονιδίου *MIR2111-3* που παράγει το μικρό RNA miR2111.

## 2. ΥΛΙΚΑ ΚΑΙ ΜΕΘΟΔΟΙ

### 2.1 Βιολογικό υλικό και συνθήκες ανάπτυξης

Στη παρούσα πειραματική μελέτη χρησιμοποιήθηκε το φυτό *Lotus japonicus* και συγκεκριμένα η ποικιλία αγρίου τύπου Gifu και το μετάλλαγμα miR2111OX, στο οποίο υπερεκφράζεται το miR2111. Ο συμβιώτης που χρησιμοποιήθηκε είναι ο *Rhizophagus irregularis* και συγκεκριμένα το στέλεχος DAOM.

Τα φυτά αναπτύχθηκαν μέσα σε δοχεία magentas με ψημένη άμμο και θρεπτικό διάλυμα LAS (Long Aston Solution) και τοποθετήθηκαν σε θάλαμο ανάπτυξης με φωτοπερίοδο 16 ώρες φως / 8 ώρες σκοτάδι, στους 23 °C.

### 2.2 Απολύμανση και εκβλάστηση σπόρων *Lotus japonicus*

Η απολύμανση και η εκβλάστηση των σπόρων του φυτού *L. japonicus* απαιτείται στη συγκεκριμένη πειραματική διαδικασία προκειμένου όλοι οι σπόροι να βρίσκονται ταυτόχρονα στο ίδιο αναπτυξιακό στάδιο και να αποφευχθεί η ανάπτυξη ανεπιθύμητων μικροοργανισμών. Η διαδικασία αυτή πραγματοποιείται σε 2 στάδια.

#### Διαδικασία:

##### ➤ 1<sup>ο</sup> Στάδιο

1. Στον επαγωγό → Προσθήκη πυκνού H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> και επώαση των σπόρων για 15 min.
2. 5 πλύσεις με dH<sub>2</sub>O.
3. Προσθήκη διαλύματος 20% χλωρίνης και επώαση για 10 λεπτά ( ανάδευση κάθε ~ 2 min).
4. Συνέχεια στο θάλαμο καθέτου νηματικής ροής (laminair) → 6 πλύσεις με dH<sub>2</sub>O.
5. Διατήρηση στους 4°C → Επώαση των σπόρων σε dH<sub>2</sub>O ολονύκτια.

##### ➤ 2<sup>ο</sup> Στάδιο

Στο θάλαμο καθέτου νηματικής ροής (laminair):

1. Τοποθέτηση σε τριβλίο 3 φύλλα διηθητικό χαρτί (το ένα πάνω από το άλλο).
2. Προσθήκη 2,5ml dH<sub>2</sub>O στο τριβλίο. (απομάκρυνση των φυσαλίδων με λαβίδα)
3. Τοποθέτηση των σπόρων σε σειρά χωρίς να έρχονται σε επαφή.
4. Κλείσιμο των τριβλίων με parafilm.
5. Τοποθέτηση των τριβλίων κάθετα στο θάλαμο ανάπτυξης φυτών ώστε η γωνία των διηθητικών χαρτιών να είναι βυθισμένη στο dH<sub>2</sub>O.
6. Αναμονή ~ 10 μέρες για την εκβλάστηση των σπόρων.



## 2.3 Μεταφύτευση φυτών *Lotus japonicus* από τριβλία σε δοχεία magentas

Όταν οι σπόροι έχουν εκβλαστήσει (μετά από ~10 ημέρες), τα φυτά μεταφέρονται σε δοχεία magentas με άμμο και θρεπτικό διάλυμα LAS. Για να μην υπάρξει μόλυνση τα δοχεία είναι αποστειρωμένα και για να αποφευχθεί η υγρασία η άμμος τοποθετήθηκε ολονύκτια σε ξηραντήρα (180°C).

### 2.3.1 Παρασκευή θρεπτικού LAS και εμβολίου μύκητα *Rhizophaqus irregularis*

#### Διαδικασία:

- Για το LAS:

Θρεπτικό διάλυμα LAS (Long Aston Solution)	
<u>MgSO<sub>4</sub></u>	0.75 mM
<u>NaNO<sub>3</sub></u>	1 mM
<u>K<sub>2</sub>SO<sub>4</sub></u>	1 mM
<u>CaCl<sub>2</sub></u>	2 mM
<u>Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub></u>	3.2 μM
<u>FeNa EDTA</u>	25 μM
<u>MnSO<sub>4</sub></u>	5 μM
<u>CuSO<sub>4</sub></u>	0.25 μM
<u>H<sub>3</sub>BO<sub>3</sub></u>	25 μM
<u>Na<sub>2</sub>MoO<sub>4</sub></u>	0.1 μM
σε H <sub>2</sub> O	

- Για το μυκορριζικό εμβόλιο (Στον θάλαμο καθέτου νηματικής ροής (laminar)):

Αρχικά το εμβόλιο (stock) διατηρείται σε συντηρητικό και υπάρχουν 2000 σπόρια ανά 1ml.

1. Προσθήκη 2ml από το πυκνό εμβόλιο σε σωληνάριο erpendorf.
2. Φυγοκέντριση σε 3000 rpm για 1min.
3. Απόρριψη του υπερκείμενου και επαναδιάλυση του ιζήματος σε dH<sub>2</sub>O ή σε θρεπτικό διάλυμα LAS μέχρι τελικής συγκέντρωσης 1000 σπόρια / ml.

### **2.3.2 Φύτεμα σε δοχεία magentas**

#### **Διαδικασία:**

- Στο θάλαμο καθέτου νηματικής ροής (laminar) → σε αποστειρωμένο δοχείο magenta:
  1. Προσθήκη χοντρόκοκκης ψημένης άμμου (3/4 του δοχείου).
  2. Προσθήκη 60ml LAS.
  3. Ανάμειξη άμμου και θρεπτικού και σχηματισμός θέσεων για την τοποθέτηση των φυτών (σπόροι που έχουν εκβλαστήσει).
  4. Τοποθέτηση των φυτών (3 φυτά).
- ! Τα δοχεία magentas τοποθετήθηκαν στο θάλαμο ανάπτυξης φυτών στους 21°C για 3-4 εβδομάδες.

### **2.3.3 Φύτεμα σε δοχεία magentas με τη μέθοδο Sandwich**

Με τη μέθοδο Sandwich είναι πιο αποτελεσματικός ο εμβολιασμός των ριζών με το μύκητα καθώς το εμβόλιο προστίθεται στις ρίζες των φυτών που είναι τοποθετημένες ανάμεσα σε δίσκους νιτροκυτταρίνης. Έτσι το εμβόλιο έρχεται σε άμεση επαφή με τις ρίζες και η πιθανότητα αποικισμού αυξάνεται.

#### **Διαδικασία:**

- Στο θάλαμο καθέτου νηματικής ροής (laminar) → σε αποστειρωμένο δοχείο magenta:
  1. Προσθήκη χοντρόκοκκης ψημένης άμμου (3/4 του δοχείου magenta).
  2. Προσθήκη 60ml LAS.
  3. Ανάμειξη άμμου και θρεπτικού και σχηματισμός μια σχισμής στην οποία θα τοποθετηθεί το sandwich.
  4. Ενυδάτωση των δίσκων νιτροκυτταρίνης σε τριβλίο που περιέχει νερό-άγαρ.
  5. Σε κάθε δίσκο τοποθετούνται τρία φυτά με το υπέργειο τους τμήμα να προεξέχει.
  6. Προσθήκη 300μL εμβολίου *R. irregularis* (με συγκέντρωση 1000 σπόριο ανά ml) στις ρίζες των φυτών (300 σπόρια/magenta).
  7. Τοποθέτηση του δεύτερου μη ενυδατωμένου δίσκου νιτροκυτταρίνης.
  8. Τοποθέτηση του sandwich στη σχισμή και κάλυψη της με άμμο, ώστε το sandwich να βρίσκεται σε άμεση επαφή με το θρεπτικό διάλυμα.
- Τα δοχεία magentas τοποθετήθηκαν στο θάλαμο ανάπτυξης φυτών στους 23°C για 4-6 εβδομάδες.

## 2.4 Μεταφύτευση φυτών *Lotus japonicus* από δοχεία magentas σε γλαστράκια

- Παρασκευή θρεπτικού Hoagland  
Για το Hoagland:

Θρεπτικό διάλυμα Hoagland (1L)	
<u>MgSO<sub>4</sub></u>	0.5 ml
<u>KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub></u>	0.25 ml
<u>Fe EDTA</u>	0.25 ml
<u>Microelements</u>	0.25 ml
<u>KNO<sub>3</sub></u>	1.25 ml
<u>Ca(NO<sub>3</sub>)<sub>2</sub></u>	1,25 ml
dH <sub>2</sub> O έως το 1L	

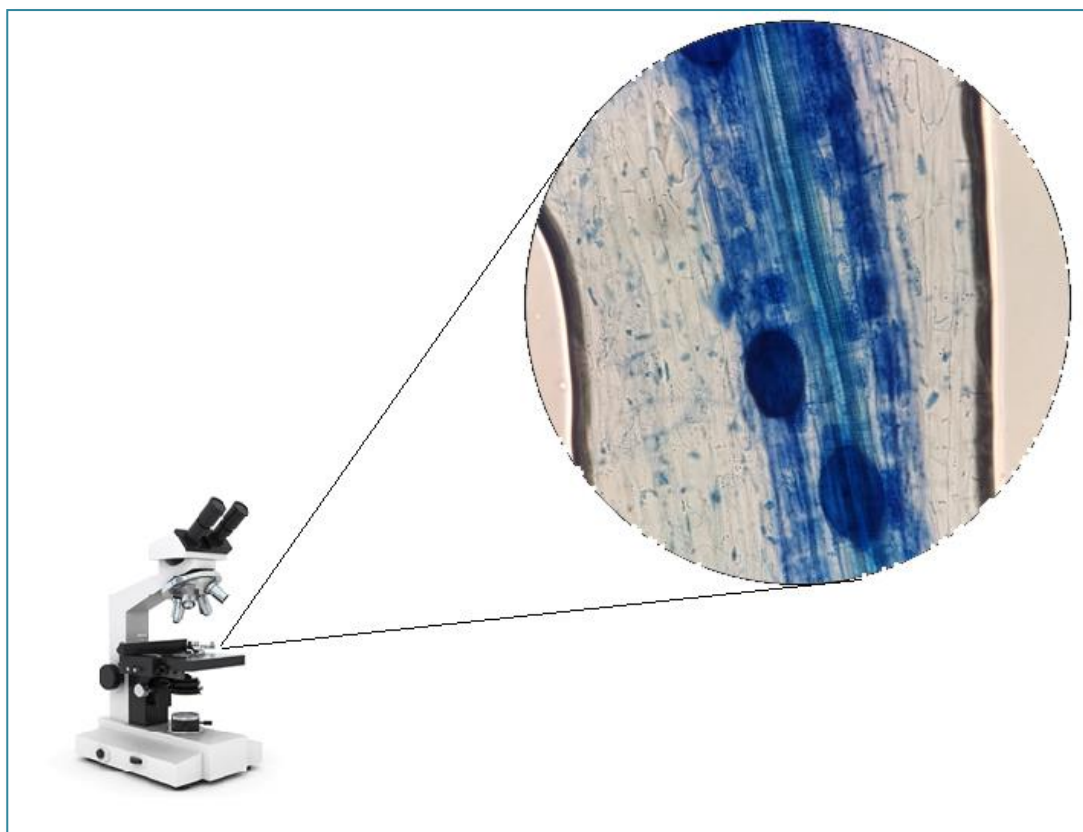
- Φύτεμα φυτών από τα δοχεία magentas σε γλαστράκια:
  1. Προσθήκη μείγματος άμμου και βερμικουλίτη (3/4 της γλάστρας).
  2. Προσθήκη 50ml θρεπτικού διαλύματος Hoagland.
  3. Ανάμειξη μείγματος άμμου και βερμικουλίτη με το θρεπτικό και σχηματισμός θέσεων για την τοποθέτηση των φυτών.
  4. Τοποθέτηση των φυτών. (2 φυτά/ γλαστράκι)
- Τα γλαστράκια τοποθετήθηκαν στον θάλαμο ανάπτυξης φυτών στους 21°C όπου ποτίζονταν ανά 2-3 ημέρες με dH<sub>2</sub>O εναλλάξ με θρεπτικό Hoagland.

## 2.5 Συγκομιδή των φυτών και χρώση των ριζών με μελάνι

### Διαδικασία:

- Μετά από 6 εβδομάδες από τη μεταφύτευση των φυτών (Για τον υπολογισμό του αποικισμού των ριζών από ενδομυκορριζικούς μύκητες.):
  1. Απομάκρυνση των φυτών από τα δοχεία magenta μέσα στα οποία αναπτύσσονται.
  2. Ξέπλυμα των ριζών σε νερό ώστε να απομακρυνθεί η άμμος.
  3. Κοπή και απόρριψη του υπέργειου τμήματος.

Στη συνέχεια, οι ρίζες βάφονται με μελάνι με σκοπό τη μικροσκοπική παρατήρηση τόσο της συμβίωσης όσο και των δομών του μύκητα (κύστες, εσωτερικές υφές, δενδρόμορφα) που βάφονται με έντονο μπλε χρώμα και είναι ορατές με το οπτικό μικροσκόπιο (Εικόνα 18).



Εικόνα 18: Ενδεικτική εικόνα από μικροσκόπιο της συμβίωσης

### **2.5.1 Χρώση των ριζών**

#### **Διαδικασία:**

1. Τοποθέτηση των ριζών μέσα σε σωλήνες falcon.
2. Προσθήκη ΚΟΗ 10% και επώαση για 30 min στο υδατόλουτρο στους 80-90 °C.
3. Απομάκρυνση του ΚΟΗ.
4. Στον επαγωγό → προσθήκη οξικού οξέος 10%.
5. Στον επαγωγό → 2 πλύσεις με dH<sub>2</sub>O.
6. Προσθήκη διαλύματος με μελάνι 5% και επώαση για 30 min στο υδατόλουτρο στους 80-90 °C.
7. Απομάκρυνση του διαλύματος με το μελάνι.
8. Στον επαγωγό → 2 πλύσεις με dH<sub>2</sub>O.
9. Στον επαγωγό → προσθήκη οξικού οξέος 5% και επώαση σε θερμοκρασία δωματίου για 30 min.
10. Στον επαγωγό → απομάκρυνση του οξικού οξέος και προσθήκη dH<sub>2</sub>O.
11. Επώαση στους 4°C ολονύχτια.

## 2.5.2 Υπολογισμός ποσοτού αποικισμού από ενδομυκορριζικούς μύκητες

### Διαδικασία:

- Παρασκευή δειγμάτων σε αντικειμενοφόρες πλάκες (slides) (Εικόνα 19):
  1. Τεμαχισμός της ρίζας σε ~ 15 κομμάτια μήκους 1-1.5cm.
  2. Τοποθέτηση σε αντικειμενοφόρο πλάκα.
  3. Παρατήρηση στο οπτικό μικροσκόπιο.



Εικόνα 19: Βαμμένες ρίζες τοποθετημένες σε αντικειμενοφόρους πλάκες για παρατήρηση στο οπτικό μικροσκόπιο

- Για κάθε βιολογική επανάληψη(αντικειμενοφόρο πλάκα):
  1. Με φακό 40x → παρακολούθηση 100 οπτικών πεδίων.
  2. Σημείωση των πεδίων ύπαρξης ή όχι αποικισμού.
  3. Καταμέτρηση αυτών των οπτικών πεδίων.
  4. Αναγωγή του αποτελέσματος σε ποσοστό %.

## 2.6 Συγκομιδή των φυτών και απομόνωση του ολικού RNA από τις ρίζες των φυτών

- Για το διάλυμα Lysis/binding buffer:

Lysis/binding buffer	
<u>Tris-HCl</u> (pH=7.5)	100 mM
<u>LiCl</u>	500 mM
<u>EDTA</u> (pH=8)	10 mM
<u>LiDS</u>	1%
<u>DTT</u>	5 mM

### Διαδικασία:

- Μετά από περίπου 4 εβδομάδες από τη μεταφύτευση των φυτών:
  1. Απομάκρυνση των φυτών από τα δοχεία magenta μέσα στα οποία αναπτύσσονται.
  2. Ξέπλυμα των ριζών σε νερό ώστε να απομακρυνθεί η άμμος.
  3. Κοπή του υπέργειου τμήματος.
  4. Τοποθέτηση της ρίζας σε σωληνάρια erpendorf.
  5. Ψύξη σε υγρό N<sub>2</sub>.
  6. Αποθήκευση στους -80 °C.

### 2.6.1 Απομόνωση ολικού RNA από ρίζες με τη χρήση Trizol (RNA extraction)

#### Διαδικασία:

- Η πειραματική διαδικασία πραγματοποιείται στον πάγο:
  1. Σπάσιμο των κυτταρικών τοιχωμάτων με λειοτρίβηση (με τη χρήση εμβόλων) του ιστού των ριζών (παγωμένων σε υγρό N<sub>2</sub> και διατηρημένων στους -80 °C).
  2. Μεταφορά του ιστού μέσα σε σωληνάριο erpendorf των 1,5ml που περιέχουν 450 μl Lysis/binding buffer. (Γρήγορη ανάδευση (vortex) → Αποδιάταξη μεμβρανών)
  3. Φυγοκέντρηση για 10 min στους 4 °C και στις 13.000 στροφές.
  4. Μεταφορά του υπερκείμενου από κάθε σωληνάριο erpendorf σε νέα σωληνάρια erpendorf που περιέχουν 500μL Trizol (απομάκρυνση πρωτεϊνών – μεταβολιτών)
  5. Ανάδευση (vortex) για τουλάχιστον 30 sec και επώαση σε θερμοκρασία δωματίου (RT) για 5 min.
  6. Φυγοκέντρηση για 5 min στους 4 °C και στις 13.000 στροφές.
  7. Μεταφορά και των 2 φάσεων σε νέα σωληνάρια erpendorf.
  8. Φυγοκέντρηση για 5 min στους 4 °C και στις 13.000 στροφές.
  9. Αφαίρεση με προσοχή του υπερκείμενου από κάθε σωληνάριο erpendorf για αποφυγή διαταραχής της ενδιάμεσης φάσης και μεταφορά σε νέα σωληνάρια erpendorf που περιέχουν 125μl χλωροφόρμιο (το χλωροφόρμιο → απομακρύνει πρωτεΐνες και το Trizol).
  10. Ανάδευση (vortex) για τουλάχιστον 30 sec και επώαση σε θερμοκρασία δωματίου (RT) για 2 λεπτά.
  11. Φυγοκέντρηση για 10 min στους 4 °C και στις 13.000 στροφές.
  12. Απομόνωση της υπερκείμενης (υδάτινης) φάσης (420μl) και μεταφορά σε νέα σωληνάρια erpendorf.
  13. Προσθήκη 0.1 vol 3 M NaOAc (42μl) και ανάδευση (vortex).
  14. Προσθήκη 0.1 vol. οξικό οξύ (42μl) και 2.5 vol. 100% EtOH (1050 μl)
  15. Ανάδευση (vortex) και επώαση σε θερμοκρασία δωματίου (RT) για 30 min.
  16. Αποθήκευση στους -20 °C ολονύχτια.
  17. Φυγοκέντρηση για 1h στους 4 °C και στις 14.000 στροφές.
  18. Απόρριψη του υπερκείμενου.
  19. Πλύση του ιζήματος με 1000μl 80% EtOH.
  20. Φυγοκέντρηση για 10 min στους 4 °C και στις 14.000 στροφές.
  21. Απόρριψη όλου του υπερκείμενου.

22. Φυγοκέντρηση για 1 min σε θερμοκρασία δωματίου (RT) σε μέγιστες στροφές.
23. Απομάκρυνση του εναπομένου υπερκείμενου και στέγνωμα του ιζήματος σε θερμοκρασία δωματίου για 7 λεπτά.
24. Επαναδιαλύουμε το ίζημα (pellet) σε 15  $\mu\text{l}$   $\text{dH}_2\text{O}$ .
25. Θέρμανση των δειγμάτων στους  $65^\circ\text{C}$  για 2 λεπτά και σύντομη ανάδευση (vortex).
26. Αποθήκευση στους  $-20^\circ\text{C}$ .

## **2.6.2 Απομάκρυνση του DNA με αντίδραση DNάσης**

- Για τον καθαρισμό δειγμάτων RNA από DNA:

<b>Αντίδραση με DNάση</b>	
<u>Δείγμα RNA</u>	<u>700ng</u>
<u>10x DNase Buffer</u>	<u>1 <math>\mu\text{l}</math></u>
<u>RNaseOUT (40U/<math>\mu\text{l}</math>)</u>	<u>0.25 <math>\mu\text{l}</math></u>
<u>DNase (1U/<math>\mu\text{l}</math>)</u>	<u>1 <math>\mu\text{l}</math></u>
<u>ddH<sub>2</sub>O</u>	<u>ως τα 10 <math>\mu\text{l}</math></u>
<b>Συνολικός Όγκος</b>	<b>10 <math>\mu\text{l}</math></b>

- Η ποσότητα του RNA υπολογίζεται από τις τιμές της συγκέντρωσης (ng/ $\mu\text{L}$ ) που βρέθηκαν με φασματοφωτόμετρο μικροόγκων.

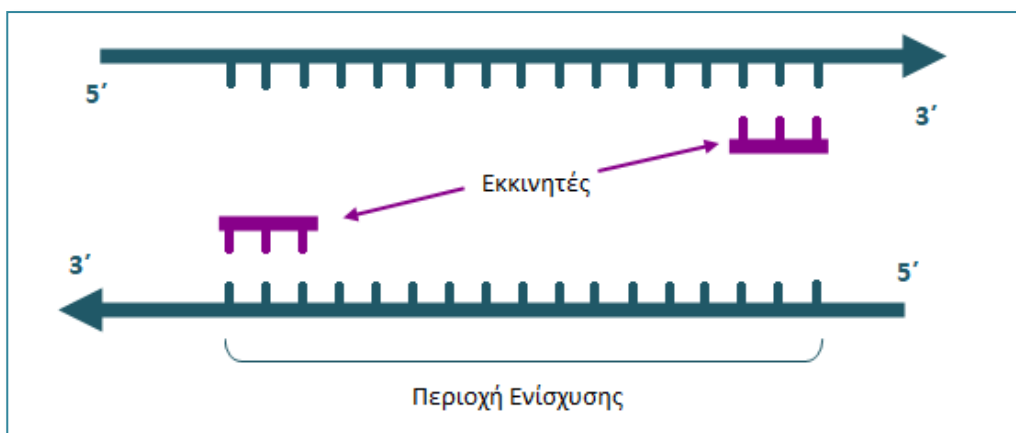
### **Διαδικασία:**

1. Επώαση για 50 στους  $37^\circ\text{C}$
2. Προσθήκη  $1\mu\text{l}$  EDTA 25mM (περιέχει χηλικούς παράγοντες που δεσμεύουν το Mg και έτσι το ένζυμο απενεργοποιείται).
3. Στο heatblock → επώαση για 10min στους  $65^\circ\text{C}$ .
4. Για τον έλεγχο της καθαρότητας των δειγμάτων (πλήρης απομάκρυνση του DNA) πραγματοποιείται αλυσιδωτή αντίδραση πολυμεράσης (PCR).

### 2.6.3 Αλυσιδωτή αντίδραση πολυμεράσης (PCR)

➤ Αρχή της μεθόδου

Η αλυσιδωτή αντίδραση της πολυμεράσης (Polymerase Chain Reaction, PCR) είναι μια μέθοδος για την *in vitro* ενίσχυση συγκεκριμένης αλληλουχίας DNA. Η PCR δίνει τη δυνατότητα παραγωγής τεράστιου αριθμού πιστών αντιγράφων μιας συγκεκριμένης αλληλουχίας DNA με σχετικά απλό τρόπο. Σημαντικό χαρακτηριστικό της αντίδρασης PCR είναι ότι μέσω των κατάλληλων εκκινητών η DNA πολυμεράση μπορεί συνθέσει μια συγκεκριμένη περιοχή του DNA. Ο πολυμερισμός των κλώνων γίνεται με την υβριδοποίηση των εκκινητών (Εικόνα 20), οι οποίοι καθορίζουν τα άκρα του τμήματος DNA που πρόκειται να ενισχυθεί. Η αντίδραση περιλαμβάνει μία σειρά αποδιάταξεων και υβριδοποιήσεων που πραγματοποιούνται λόγω θερμοκρασιακών μεταβολών.



Εικόνα 20: Υβριδισμός εκκινητών

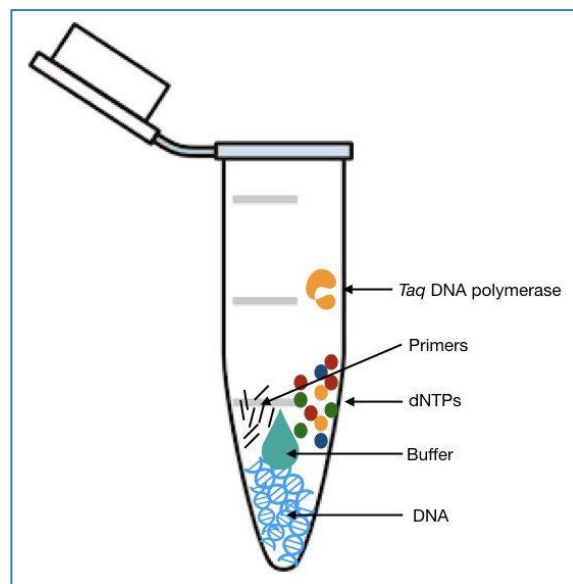
- Οι συνθήκες της αντίδρασης PCR διαφέρουν κάθε φορά ανάλογα με τις απαιτήσεις του πειράματος:
1. Η ποσότητα του γενωμικού DNA που προστίθεται εξαρτάται από την συγκέντρωση του και καθορίζεται από την εταιρία του ενζύμου της πολυμεράσης που χρησιμοποιείται.
  2. Η θερμοκρασία αποδιάταξης των κλώνων εξαρτάται από το ποσοστό % των βάσεων G-C του τμήματος DNA που ενισχύεται.
  3. Η θερμοκρασία υβριδοποίησης των εκκινητών, εξαρτάται από το  $T_m$  (θερμοκρασία τήξεως) τους, δηλαδή τη θερμοκρασία όπου το 50% των μορίων DNA βρίσκονται σε μονόκλωνη μορφή.
  4. Στο στάδιο της τελικής επιμήκυνσης η DNA πολυμεράση ενισχύει τους εναπομείναντες κλώνους.
- Οι εκκινητές που χρησιμοποιήθηκαν υβριδίζουν στο ενδογενές γονίδιο ουβικιτίνης του φυτού.



## Διαδικασία:

- Για την αντίδραση PCR (Εικόνα 21):

<u>Δείγμα RNA (μετά από την αντίδραση DNAσης)</u>	<u>1 μl</u>
<u>dNTPs (10μM)</u>	<u>0.4 μl</u>
<u>10x Buffer</u>	<u>2 μl</u>
<u>Πρόσθιος εκκινητής (LjUbi F) (10μM)</u>	<u>0.8 μl</u>
<u>Ανάστροφος εκκινητής (LjUbi R) (10μM)</u>	<u>0.8 μl</u>
<u>Ένζυμο Taq DNA πολυμεράση (5U/μL)</u>	<u>0.08 μl</u>
<u>ddH<sub>2</sub>O</u>	<u>14.92 μl</u>
<b>Συνολικός Όγκος</b>	<b>20 μl</b>



Εικόνα 21: Συστατικά PCR © Genetic Education Inc

- Για το πρόγραμμα της αντίδρασης:

	<u>Χρόνος</u>	<u>Θερμοκρασία</u>	
<u>Αρχική Αποδιάταξη</u>	<u>5 min</u>	<u>95°C</u>	} <u>40 Κύκλοι</u>
<u>Αποδιάταξη</u>	<u>30 sec</u>	<u>95°C</u>	
<u>Υβριδοποίηση</u>	<u>30 sec</u>	<u>55°C</u>	
<u>Επιμήκυνση</u>	<u>10 sec</u>	<u>72°C</u>	
<u>Τελική επιμήκυνση</u>	<u>4 min</u>	<u>72°C</u>	
<u>Διατήρηση</u>	<u>∞</u>	<u>4°C</u>	

- Στη συνέχεια, πραγματοποίηση ηλεκτροφόρησης σε πήκτωμα αγαρόζης (1% πυκνότητα), ώστε να ελεγχθεί αν όντως απομακρύνθηκε το DNA από τα δείγματα μας. Εάν τα δείγματα δεν έχουν καθαρίσει επαναλαμβάνεται η αντίδραση DNAσης.

## 2.7 Σύνθεση συμπληρωματικού DNA (cDNA- Complementary DNA)

### Διαδικασία:

<u>Δείγμα RNA μετά από την αντίδραση DNάσης</u>	<u>300ng</u>
<u>oligodT (2μM)</u>	<u>1 μl</u>
<u>miR2111-stemloop εκκινητής (0,5μM)</u>	<u>1 μl</u>
<u>ddH<sub>2</sub>O</u>	<u>ως τα 17 μl</u>
<b>Συνολικός Όγκος</b>	<b>17 μl</b>

- Επώαση στους 70°C για 5 min.
- Για την ετοιμασία του μίγματος (Master Mix):

<u>5x Buffer (Invitrogen)</u>	<u>5 μl</u>
<u>dNTPs (10μM)</u>	<u>1.5 μl</u>
<u>RNaseOUT (40U/μL)</u>	<u>0.5 μl</u>
<u>Superscript II (200U/μL) (Invitrogen)</u>	<u>1 μl</u>

- Ήπια ανάμιξη του Master Mix και του δείγματος RNA με τους εκκινητές.
- Για το πρόγραμμα αντίστροφης μεταγραφάσης (RT – PCR):

	<u>Χρόνος</u>	<u>Θερμοκρασία</u>	
<u>Αρχική Αποδιάταξη</u>	<u>30 min</u>	<u>16°C</u>	} <u>60 Κύκλοι</u>
<u>Αποδιάταξη</u>	<u>30 sec</u>	<u>30°C</u>	
<u>Υβριδοποίηση</u>	<u>30 sec</u>	<u>42°C</u>	
<u>Επιμήκυνση</u>	<u>1 sec</u>	<u>50°C</u>	
<u>Τελική επιμήκυνση</u>	<u>5 min</u>	<u>95°C</u>	
<u>Διατήρηση</u>	<u>∞</u>	<u>4°C</u>	

- Πρόγραμμα ειδικό για τα miRNA.

## 2.8 Ποσοτική αλυσιδωτή αντίδραση πολυμεράσης (qPCR)

### ➤ Αρχή της μεθόδου

1. Η ποσοτική PCR στηρίζεται στην παρακολούθηση της αντιγραφής του DNA σε πραγματικό χρόνο με την παρακολούθηση της αύξησης φθορίζοντος σήματος εκπομπής από κάποια φθορίζουσα χρωστική. Τα προϊόντα της αντίδρασης αυξάνονται εκθετικά σε κάθε κύκλο.
2. Στην παρούσα εργασία χρησιμοποιήθηκε το μίγμα χρωστικής SYBRGreen της Kara.

Φθορισμός **SYBRGREEN** α ποσότητας δίκλωνου DNA στο δείγμα

- ✗ Δεν αλληλεπιδρά με μονόκλωνο DNA
- ✓ Δεσμεύεται σε δίκλωνο DNA και αλλάζει διαμόρφωση ↑ εκπομπή φθορισμού κατά 200 φορές

3. Η χρωστική φθορίζει στο πράσινο φάσμα (520nm) και η ανίχνευση του φθορίζοντος σήματος εκπομπής γίνεται με τη χρήση δέσμης laser.

### ➤ Μέτρηση του φθορισμού:

1. Πραγματοποίηση κατά την εκθετική φάση της καμπύλης (log phase), κατά την οποία ενισχύονται τα τμήματα DNA μετά την υβριδοποίηση των εκκινητών.
2. Σύνδεση του αρχικού αριθμού των αντιγράφων του δείγματος (DNA) με τον πρώτο κύκλο της αντίδρασης, όπου το προϊόν της αντίδρασης είναι ανιχνεύσιμο → threshold cycle- Ct.
3. Το μηχάνημα της qPCR ορίζει ένα κατώφλι,
4. Στο Ct ο ανιχνεύσιμος φθορισμός του προϊόντος το έχει ξεπεράσει.

### 2.8.1 Αντίδραση qPCR για την κανονικοποίηση των δειγμάτων

#### Διαδικασία:

### ➤ Γονίδια Αναφοράς-Housekeeping genes

1. *LjATP* → γονίδιο αναφοράς για την κανονικοποίηση των δειγμάτων cDNA.
2. *LjPP2* → γονίδιο αναφοράς για την κανονικοποίηση των δειγμάτων cDNA.

<u>cDNA</u>	<u>1 μl</u>
<u>Πρόσθιος εκκινητής (F) 10μM</u>	<u>0.2 μl</u>
<u>Ανάστροφος εκκινητής (R) 10μM</u>	<u>0.2 μl</u>
<u>ddH<sub>2</sub>O</u>	<u>3.6 μl</u>
<u>2x Mix SYBRGreen</u>	<u>5 μl</u>
<b>Συνολικός Όγκος</b>	<b>10 μl</b>

- Το Mix SYBRGreen περιέχει το ρυθμιστικό διάλυμα και τα dNTPs.
- Πρόγραμμα για qPCR κανονικοποίησης:
- ! Αντιδράσεις της ποσοτικής RT-PCR → στο μηχάνημα CPX Connect Real-Time System (BIORAD).

Χρόνος	Θερμοκρασία
<u>3 min</u>	<u>95°C</u>
<u>6 sec</u>	<u>95°C</u>
<u>12 sec</u>	<u>60°C</u>
<u>6,6 sec</u>	<u>72°C</u>
<u>3 sec</u>	<u>65°C</u>
<u>30 sec</u>	<u>95 °C</u>

} 50 Κύκλοι

- ! Θερμοκρασία υβριδοποίησης → 60 °C.

### 2.8.2 Αντίδραση qPCR

- Αντίδραση:

<u>cDNA</u>	<u>2.5 μl</u>
<u>Πρόσθιος εκκινητής (F) 10μM</u>	<u>0.2 μl</u>
<u>Ανάστροφος εκκινητής (R) 10μM</u>	<u>0.2 μl</u>
<u>ddH<sub>2</sub>O</u>	<u>2.1 μl</u>
<u>2x Mix SYBRGreen</u>	<u>5 μl</u>
<b>Συνολικός Όγκος</b>	<b>10 μl</b>

- Η αντίδραση της qPCR είναι η ίδια με αυτή της κανονικοποίησης με θερμοκρασία υβριδοποίησης → 58 °C.
- Τα σχετικά επίπεδα έκφρασης των γονιδίων αναφοράς (housekeeping) και η αποδοτικότητα της αντίδρασης PCR για κάθε γονίδιο υπολογίστηκαν από τον τύπο  $PCReff^{-\Delta Ct}$ , όπου  $\Delta Ct$  είναι η διαφορά  $Ct_{gene} - Ct_{housekeeping}$  και  $PCReff$  είναι η αποδοτικότητα της αντίδρασης PCR.

## 2.9 Γονοτύπηση (Genotyping)

### 2.9.1 Απομόνωση DNA (DNA extraction)

- Για το διάλυμα CTAB:

CTAB buffer	
<u>Tris-HCl (pH=7.5)</u>	100 mM
<u>NaCl</u>	1.4 M
<u>EDTA (pH=8)</u>	20 mM
<u>CTAB (cetyl trimethylammonium bromide)</u>	2% w/v
<u>PVP 40000 (polyvinylpyrrolidone)</u>	1% w/v

- Στον επαγωγό ➔ για το διάλυμα SEVAG:

SEVAG	
<u>Χλωροφόρμιο</u>	960 μl
<u>Ισοαμυλική αλκοόλη</u>	40 μl

#### **Διαδικασία:**

- Για την απομόνωση DNA:
1. Μεταφορά μικρών ποσοτήτων φυτικού ιστού (μια τριπλέτα φύλλων) σε ξεχωριστούς σωληνάρια erpendorf 1.5 ml.
  2. Σπάσιμο των κυτταρικών τοιχωμάτων με λειοτρίβηση (με τη χρήση εμβόλου) του ιστού των ριζών (παγωμένων σε υγρό N<sub>2</sub> και διατηρημένων στους - 80 °C).
  3. Θέρμανση του διαλύματος CTAB στους 65°C στο υδατόλουτρο.
  4. Προσθήκη 200μl CTAB σε κάθε δείγμα ➔ λύση μεμβρανών.
  5. Ανάδευση (vortex) και τοποθέτηση δειγμάτων στους 65°C στο υδατόλουτρο για 10-30 λεπτά.
  6. Στον επαγωγό ➔ προσθήκη 200μl διαλύματος χλωροφορμίου-ισοαμυλικής αλκοόλης. SEVAG (οργανικός διαλύτης) ➔ παγιδεύει τις πρωτεΐνες και τους μεταβολίτες.
  7. Ανάδευση (vortex) αυστηρά για 30 sec.
  8. Φυγοκέντρηση για 2 λεπτά στις μέγιστες στροφές.
  9. Μεταφορά υπερκείμενου (υδάτινη φάση ) σε νέα σωληνάρια erpendorf.
  10. Προσθήκη 140μl ισοπροπανόλης ➔ κατακρημνίζει τα νουκλεϊκά οξέα.
  11. Επάωση για 10 min σε θερμοκρασία δωματίου (RT).
  12. Φυγοκέντρηση για 10 min στις μέγιστες στροφές.
  13. Απομάκρυνση υπερκείμενου.

14. Ξέπλυμα του DNA με 0.5ml παγωμένης 70% αιθανόλης → απομάκρυνση αλάτων.
  15. Φυγοκέντρηση για 5 min στις μέγιστες στροφές.
  16. Απομάκρυνση υπερκείμενου και μια γρήγορη φυγοκέντρηση (short spin).
  17. Ξήρανση του DNA, τοποθετώντας τα σωληνάρια erpendorf ανοιχτά για 8 min σε θερμοκρασία δωματίου (RT).
  18. Επαναδιάλυση του DNA σε 20μl ddH<sub>2</sub>O με RNase.
  19. Διατήρηση στους 20°C.
- ! Η συγκέντρωση και η καθαρότητα του DNA προσδιορίστηκαν με φασματοφωτόμετρο μικροόγκων.

## 2.9.2 Αλυσιδωτή αντίδραση πολυμεράσης (PCR) για γονοτύπιση

### Διαδικασία:

- Για την αντίδραση PCR:

<u>Δείγμα DNA</u>	<u>1 μl</u>
<u>DNTPs (10 mM)</u>	<u>0.4 μl</u>
<u>5x Buffer</u>	<u>2 μl</u>
<u>Πρόσθιος εκκινητής F (OKM 286) 10μM</u>	<u>0.8 μl</u>
<u>Ανάστροφος εκκινητής R (OKM 476) 10μM</u>	<u>0.8 μl</u>
<u>Ένζυμο Taq DNA πολυμεράση (5U/μL)</u>	<u>0.08 μl</u>
<u>ddH<sub>2</sub>O</u>	<u>14.92 μl</u>
<b>Συνολικός Όγκος</b>	<b>20 μl</b>

- Για το πρόγραμμα της αντίδρασης:

	<u>Χρόνος</u>	<u>Θερμοκρασία</u>	
<u>Αρχική Αποδιάταξη</u>	<u>2 min</u>	<u>92°C</u>	} <u>35 Κύκλοι</u>
<u>Αποδιάταξη</u>	<u>30 sec</u>	<u>94°C</u>	
<u>Υβριδοποίηση</u>	<u>30 sec</u>	<u>50°C</u>	
<u>Επιμήκυνση</u>	<u>30 sec</u>	<u>72°C</u>	
<u>Τελική επιμήκυνση</u>	<u>5 min</u>	<u>72°C</u>	
<u>Διατήρηση</u>	<u>∞</u>	<u>4°C</u>	

- ! Για τον προσδιορισμό του γονοτύπου → ηλεκτροφόρηση σε πήκτωμα αγαρόζης.

### 2.9.3 Ηλεκτροφόρηση σε πήκτωμα αγαρόζης

#### Διαδικασία:

- Για το πήκτωμα (gel) αγαρόζης 1%:
  1. Πυκνότητα 1% → 0.6 gr αγαρόζης σε 60 ml TAE buffer.
  2. Διάλυση της αγαρόζης στο TAE( 2 min φούρνο μικροκυμάτων)
  3. Προσθήκη 2,16 μl EtBr.
- ! Στην ηλεκτροφόρηση χρησιμοποιήθηκε δείκτης μοριακών βαρών.

### 2.10 Στατιστική ανάλυση

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

#### Εκκινητές

- Για την qPCR:

Γονίδια	Πρόσθιος εκκινητής	Οπίσθιος εκκινητής
<u>LjATPs</u>	CAATGTCGCCAAGGCCCA TGGTG	AACACCACTCTCGATCATTCTCTG
<u>LjPP2a</u>	GTAAATGCGT CTAAAGATAGGGTCC	ACTAGACTGTAGTGCTTGAGAGGC
<u>LjSbtM1</u>	CAGGTGAACCAGAAGGTTGCATAC	AGCAGCACCCCTCTCTATCTTCATGC
<u>LjPT4</u>	CCAGAACCTCACACAGAAAGACATC	AACACGGTGAACCAGTACCCTGG
<u>LjAMT2.2</u>	ACACATGCTTGCACTGCTACC	CTGCCATCCTTGAACAACCC

- Για τη Γονοτύπηση:

<u>OKM 286</u>	GCCGCTTTTCTGGATTCA
<u>OKM 476</u>	AACATAGATGACACCGC

### 3. ΑΠΟΤΕΛΕΣΜΑΤΑ

#### **3.1 Γονοτύπηση (Genotyping )- Εύρεση φυτών που υπερέκφραζουν το γονίδιο *MIR2111-3***

Σε φυτά *Lotus japonicus* που είχαν μετασηματιστεί (στα πλαίσια προηγούμενης εργασίας) με μια κατασκευή υπερέκφρασης του γονιδίου *MIR2111-3*, με σκοπό την υπερπαραγωγή του miR2111, πραγματοποιήθηκε έλεγχος της εισαγωγής της κατασκευής υπερέκφρασης στο φυτικό γονιδίωμα με γονοτύπηση. Τα φυτά υποβλήθηκαν σε έλεγχο με τη μέθοδο της PCR. Συνολικά, το πείραμα περιλάμβανε 6 φυτά που αναπτύχθηκαν σε δοχεία magenta.

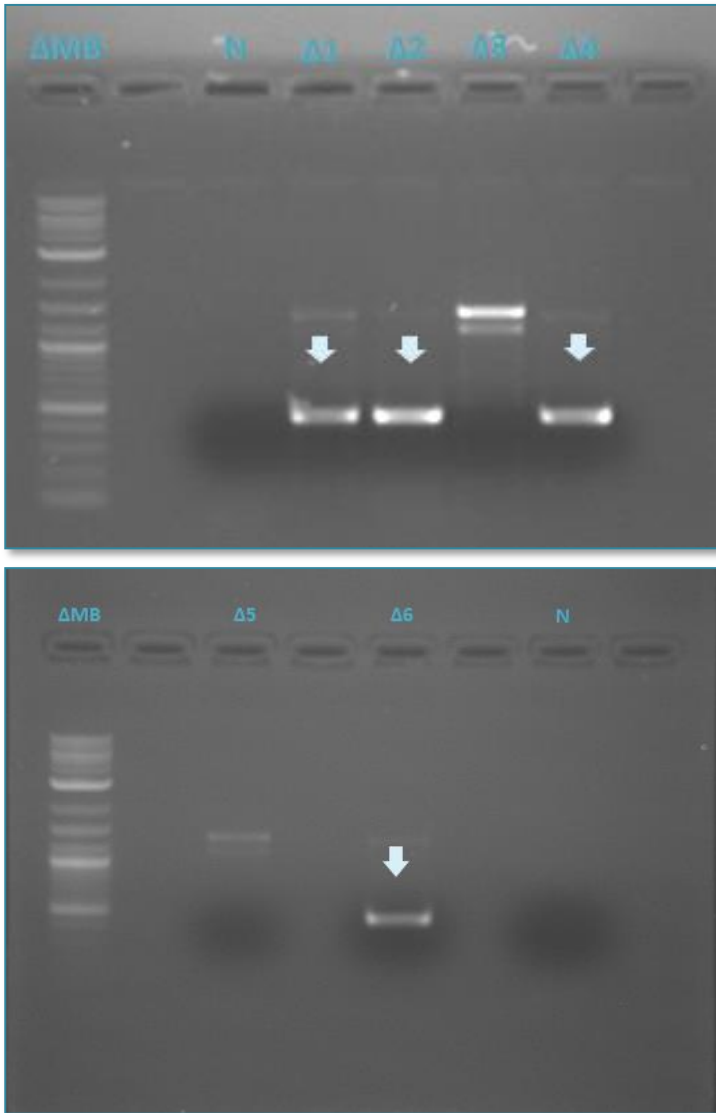
Σε φυτά 4 εβδομάδων πραγματοποιήθηκε δειγματοληψία και απομόνωση DNA. Οι συγκεντρώσεις των δειγμάτων σε DNA προσδιορίστηκαν με φασματοφωτόμετρο μικροόγκων (Πίνακας 1).

Πίνακας 1: Οι συγκεντρώσεις των δειγμάτων σε DNA

<b>Δείγματα</b>	<b>Συγκεντρώσεις (ng/ul)</b>	<b>Λόγος (A<sub>260</sub>/A<sub>280</sub>)</b>
<u>Δ1 - Φυτό (1)</u>	<u>575.1</u>	<u>1.84</u>
<u>Δ2 - Φυτό (2)</u>	<u>604</u>	<u>1.82</u>
<u>Δ3 - Φυτό (3)</u>	<u>681</u>	<u>1.89</u>
<u>Δ4 - Φυτό (4)</u>	<u>868</u>	<u>1.90</u>
<u>Δ5 - Φυτό (5)</u>	<u>244,6</u>	<u>1.12</u>
<u>Δ6 - Φυτό (6)</u>	<u>155.1</u>	<u>1.95</u>



Ακολούθησε αντίδραση PCR (εκκινητές OKM286 και OKM476 ) και ηλεκτροφόρηση σε πήκτωμα αγαρόζης (Εικόνα 22). Στα δείγματα από τα φυτά που φέρουν την κασέτα υπερέκφρασης του *MIR2111-3* αναμένεται να παρατηρηθεί μια ζώνη στις 464bp.



Εικόνα 22: Ηλεκτροφόρηση προϊόντων PCR για την εύρεση φυτικών μεταλλαγμάτων που φέρουν την κασέτα υπερέκφρασης του *MIR2111-3*. (ΔBM= μάρτυρας μοριακών βαρών και N= δείγμα αρνητικού ελέγχου)

Τα προϊόντα PCR από τα δείγματα Δ1, Δ2, Δ4, Δ6 παρουσιάζουν ζώνη στο αναμενόμενο μέγεθος (Εικόνα 22) επομένως τα δείγματα αυτά αντιστοιχούν σε φυτικά μεταλλάγματα που πιθανότατα υπερεκφράζουν το *MIR2111-3*. Οπότε τα αντίστοιχα φυτά μεταφτεύτηκαν σε μεγαλύτερα γλαστράκια για να συλλεχθούν σποράκια.

### 3.2 Έλεγχος του αποικισμού φυτών αγρίου τύπου και του φυτικού μεταλλάγματος υπερέκφρασης του *MIR2111-3* από τον ενδομυκορριζικό μύκητα *Rhizophagus irregularis*

Για να διευκρινιστεί ο πιθανός ρόλος του μικρού RNA στον αποικισμό των φυτών από ενδομυκορριζικούς μύκητες (EM), έγινε σύγκριση της ικανότητας αποικισμού από EM ριζών του ψυχανθούς *Lotus japonicus*, σε φυτά αγρίου τύπου και φυτά του μεταλλάγματος υπερέκφρασης του *MIR2111-3* (miR2111OX). Στο μονοπάτι αυτορρύθμισης AOM, που ενεργοποιείται κατά τη συμβιωτική σχέση μεταξύ EM και φυτών δεν είναι γνωστό αν η υπερσυσσώρευση του miR2111 και συνεπώς η καταστολή του TML οδηγεί σε αλλαγές στον αποικισμό των ριζών από τον μύκητα. Σκοπός αυτού του πειράματος είναι η διερεύνηση των επιπτώσεων της υπερσυσσώρευσης του μικρού RNA miR2111 στον αποικισμό του *Lotus japonicus*.

Πιο συγκεκριμένα, στο πείραμα αυτό χρησιμοποιήθηκαν φυτά αγρίου τύπου (οικότυπος Gifu) και φυτά από το μετάλλαγμα miR2111OX, τα οποία εμβολιάστηκαν με τον ενδομυκορριζικό μύκητα (EM) *Rhizophagus irregularis* (στέλεχος DAOM). Η μόλυνση των φυτών με το ενδομυκορριζικό εμβόλιο έγινε με την εφαρμογή της μεθόδου Sandwich (Παράγραφος 2.3.3). Συνολικά, το πείραμα περιλάμβανε 10 δοχεία magenta. Συγκεκριμένα 5 magentas με φυτά αγρίου τύπου (WT Gifu) και 5 με φυτά miR2111OX. Τα φυτά σε κάθε δοχείο magenta αποτελούν μία βιολογική επανάληψη.

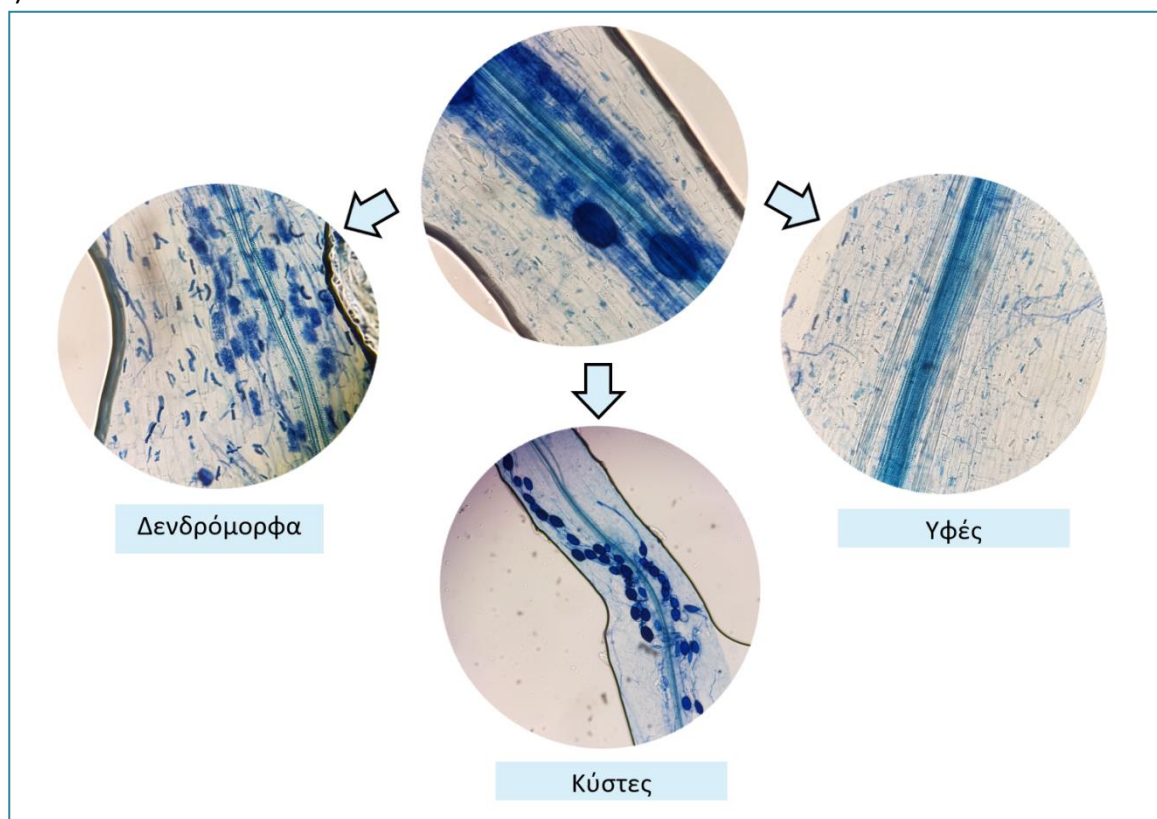
Η συγκομιδή των φυτών πραγματοποιήθηκε 6 εβδομάδες μετά τον εμβολιασμό τους με τον EM.



Εικόνα 23: Ανάπτυξη φυτών *Lotus japonicus* 6 εβδομάδες μετά τον εμβολιασμό των ριζών με τον *Rhizophagus irregularis* (στέλεχος DAOM). Αριστερά στην εικόνα είναι τα φυτά αγρίου τύπου (WT Gifu) και δεξιά τα φυτά που φέρουν την κασσέτα υπερέκφρασης του miR2111 (OX miR2111).

Τα φυτά στα οποία υπερσυσσωρεύεται το μικρό RNA miR21111 παρατηρείται πιο κοντή ρίζα από τα φυτά ελέγχου (Εικόνα 23). Αυτή η παρατήρηση είναι σε συμφωνία με προηγούμενα αποτελέσματα στη διεθνή βιβλιογραφία, καθώς στα φυτά αυτά αναμένεται να είναι χαμηλά τα επίπεδα του *TML*, και η απουσία του *TML* προκαλεί τον φαινότυπο της κοντής ρίζας (64).

Στη συνέχεια, τα υπέργεια μέρη απομακρύνθηκαν από τα φυτά και ακολούθησε χρώση των ριζών με μελάνι και παρατήρηση στο μικροσκόπιο του αποικισμού των ριζών από τον ενδομυκορριζικό μύκητα (EM). Το μπλε χρώμα κάνει ορατές τις χαρακτηριστικές δομές του μύκητα (υφές, κύστες και δενδρόμορφα) (Εικόνα 24). Στη συνέχεια υπολογίστηκαν τα ποσοστά αποικισμού των ριζών από τον μύκητα σε κάθε βιολογική επανάληψη του πειράματος (Πίνακας 2).

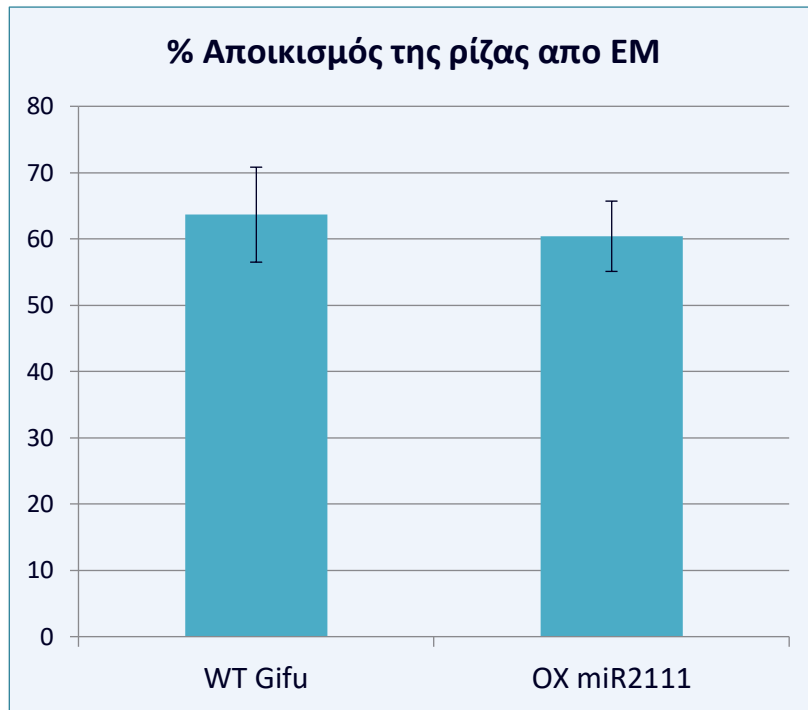


Εικόνα 24: Εικόνες από οπτικό μικροσκόπιο όπου φαίνονται οι χαρακτηριστικές δομές του μύκητα.

Πίνακας 2: Ποσοστά αποικισμού των ριζών από τον *Rhizophagus irregularis* 6 εβδομάδες μετά τον εμβολιασμό των φυτών.

	Φυτά αγρίου τύπου	φυτά μεταλλάγματος υπερέκφρασης <i>MIR2111-3</i>
<u>Βιολογική επανάληψη 1</u>	<u>49.4 %</u>	<u>66.7 %</u>
<u>Βιολογική επανάληψη 2</u>	<u>62.7 %</u>	<u>40 %</u>
<u>Βιολογική επανάληψη 3</u>	<u>73.5 %</u>	<u>65.5 %</u>
<u>Βιολογική επανάληψη 4</u>	<u>47.5 %</u>	<u>60.4%</u>
<u>Βιολογική επανάληψη 5</u>	<u>85.2 %</u>	<u>69.4 %</u>

Ο υπολογισμός των μέσων όρων των τιμών στους δύο χειρισμούς δείχνει πως δεν παρατηρείται κάποια διάφορα στα επίπεδα αποικισμού ανάμεσα στα φυτά αγρίου τύπου και στα φυτά που υπερπαράγουν το miR2111 (Εικόνα 25). Ωστόσο τα αποτελέσματα δεν είναι στατιστικώς σημαντικά ( $t$ -test:  $p = 0.7240$ ).



Εικόνα 25: Ποσοστά αποικισμού ριζών φυτών *Lotus japonicus*, αγρίου τύπου (WT Gifu) και που υπερπαράγουν το miR2111 (miR2111 OX), από τον EM *Rhizophagus irregularis*, 6 εβδομάδες μετά τον εμβολιασμό των φυτών.

### **3.3 Έλεγχος του αποικισμού φυτών αγρίου τύπου και του φυτικού μεταλλάγματος υπερέκφρασης του *MIR2111-3* από τον ενδομυκορριζικό μύκητα *Rhizophagus irregularis* με qPCR χρησιμοποιώντας γονίδια-δείκτες**

Για να μελετήσουμε με περισσότερη ακρίβεια το ενδεχόμενο να επηρεάζει η υπερσυσσώρευση του miR2111 τον αποικισμό των φυτών από τον ενδομυκορριζικό μύκητα, χρησιμοποιήσαμε την τεχνική της ποσοτικής PCR πραγματικού χρόνου (qPCR) που είναι περισσότερο ευαίσθητη από τη μικροσκοπία. Και για το πείραμα αυτό τόσο τα φυτά αγρίου τύπου (WT Gifu) όσο και τα φυτά του μεταλλάγματος miR2111OX εμβολιάστηκαν με τον ενδομυκορριζικό μύκητα *Rhizophagus irregularis* (στέλεχος DAOM). Συνολικά, το πείραμα περιλάμβανε 9 δοχεία magenta. Συγκεκριμένα, 5 δοχεία magentas με φυτά αγρίου τύπου (WT Gifu) και 4 με φυτά miR2111OX. Η συγκομιδή των φυτών πραγματοποιήθηκε 4 εβδομάδες μετά τον εμβολιασμό τους με τον EM (Εικόνα 26).



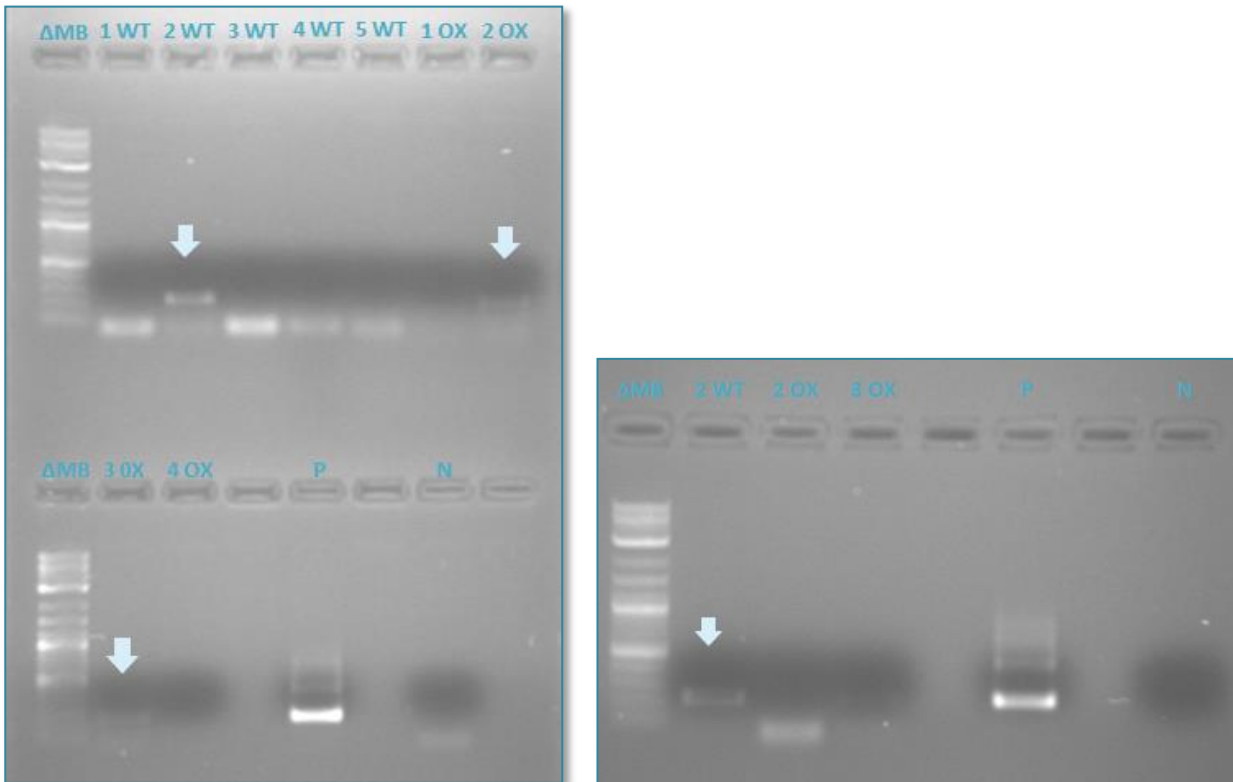
Εικόνα 26: Ανάπτυξη φυτών *Lotus japonicus* 4 εβδομάδες μετά τον εμβολιασμό των ριζών με τον *Rhizorhagus irregularis*. Αριστερά στην εικόνα είναι τα φυτά αγρίου τύπου (WT Gifu) και δεξιά τα φυτά που φέρουν την κασσέτα υπερέκφρασης του *MIR2111-3* (OX miR2111).

Ακολούθησε απομόνωση ολικού RNA από τις ρίζες των φυτών (Παράγραφος 2.6.1) και προσδιορισμός των συγκεντρώσεων των δειγμάτων σε RNA με φασματοφωτόμετρο μικροόγκων (Πίνακας 3).

Πίνακας 3: Οι συγκεντρώσεις των δειγμάτων σε RNA

Δείγματα	Συγκεντρώσεις (ng/ul)	Λόγος ( $A_{260}/A_{280}$ )
<u>Φυτό αγρίου τύπου (1)</u>	<u>153.8</u>	<u>1.81</u>
<u>Φυτό αγρίου τύπου (2)</u>	<u>220.9</u>	<u>1.76</u>
<u>Φυτό αγρίου τύπου (3)</u>	<u>246</u>	<u>1.74</u>
<u>Φυτό αγρίου τύπου (4)</u>	<u>126.7</u>	<u>1.86</u>
<u>Φυτό αγρίου τύπου (5)</u>	<u>84</u>	<u>1.78</u>
<u>Φυτό μεταλλάγματος υπερέκφρασης miR2111 (1)</u>	<u>155.9</u>	<u>1.81</u>
<u>Φυτό μεταλλάγματος υπερέκφρασης miR2111 (2)</u>	<u>318.3</u>	<u>1.80</u>
<u>Φυτό μεταλλάγματος υπερέκφρασης miR2111 (3)</u>	<u>237</u>	<u>1.80</u>
<u>Φυτό μεταλλάγματος υπερέκφρασης miR2111 (4)</u>	<u>172.9</u>	<u>1.70</u>

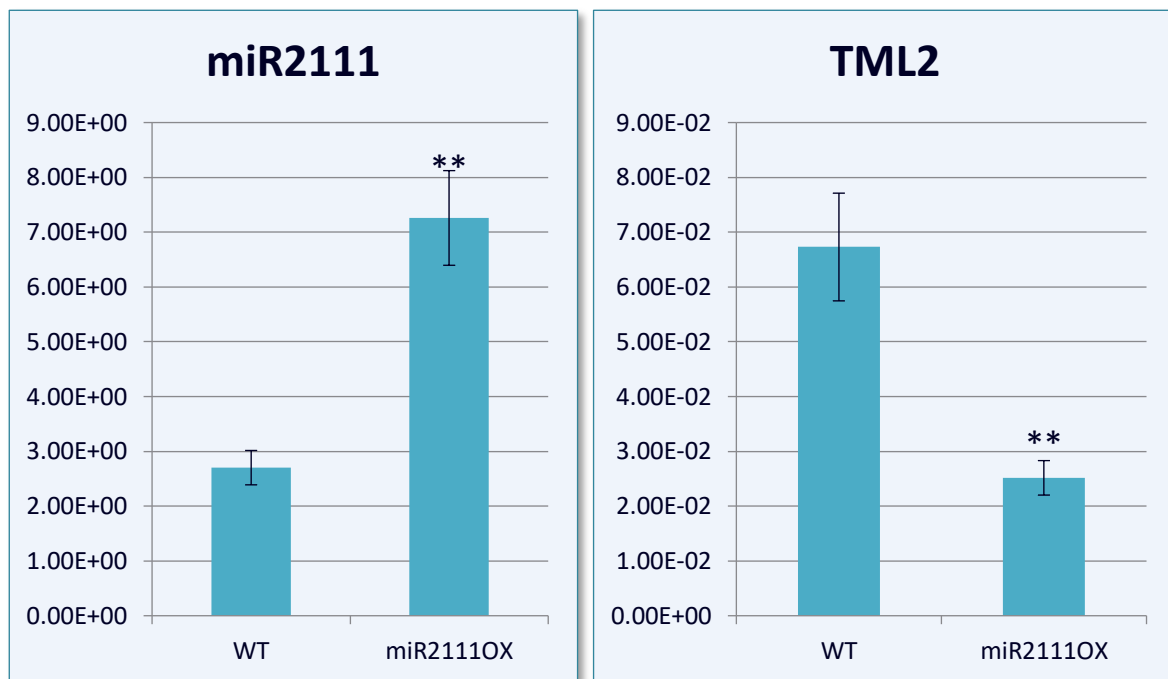
Στη συνέχεια, πραγματοποιήθηκε αντίδραση απομάκρυνσης του γονιδιωματικού DNA από τα δείγματα RNA με τη χρήση DNάσης, και ακολούθησε αντίδραση PCR για τον έλεγχο της ολικής απομάκρυνσης του γονιδιωματικού DNA. Για την αντίδραση PCR χρησιμοποιήθηκαν εκκινητές για το γονίδιο της ουβικιτίνης του φυτού *Lotus japonicus* και ακολούθησε ηλεκτροφόρηση των προϊόντων PCR σε πήκτωμα αγαρόζης ( Εικόνα 27).



Εικόνα 27: Ηλεκτροφόρηση μετά από αντίδραση PCR για την επιβεβαίωση πλήρους απομάκρυνσης του DNA από δείγματα RNA με τη χρήση DNάσης. Η εικόνα αριστερά δείχνει τα αποτελέσματα από την 1<sup>η</sup> προσπάθεια απομάκρυνσης του DNA, ενώ η εικόνα δεξιά παρουσιάζει τα αποτελέσματα επαναληπτικής αντίδρασης DNάσης. (ΔBM= μάρτυρας μοριακών βαρών, P= δείγμα θετικού ελέγχου και N= δείγμα αρνητικού ελέγχου). Τα βελάκια δείχνουν ζώνες που υποδηλώνουν την ύπαρξη υπολειμμάτων DNA στα δείγματα.

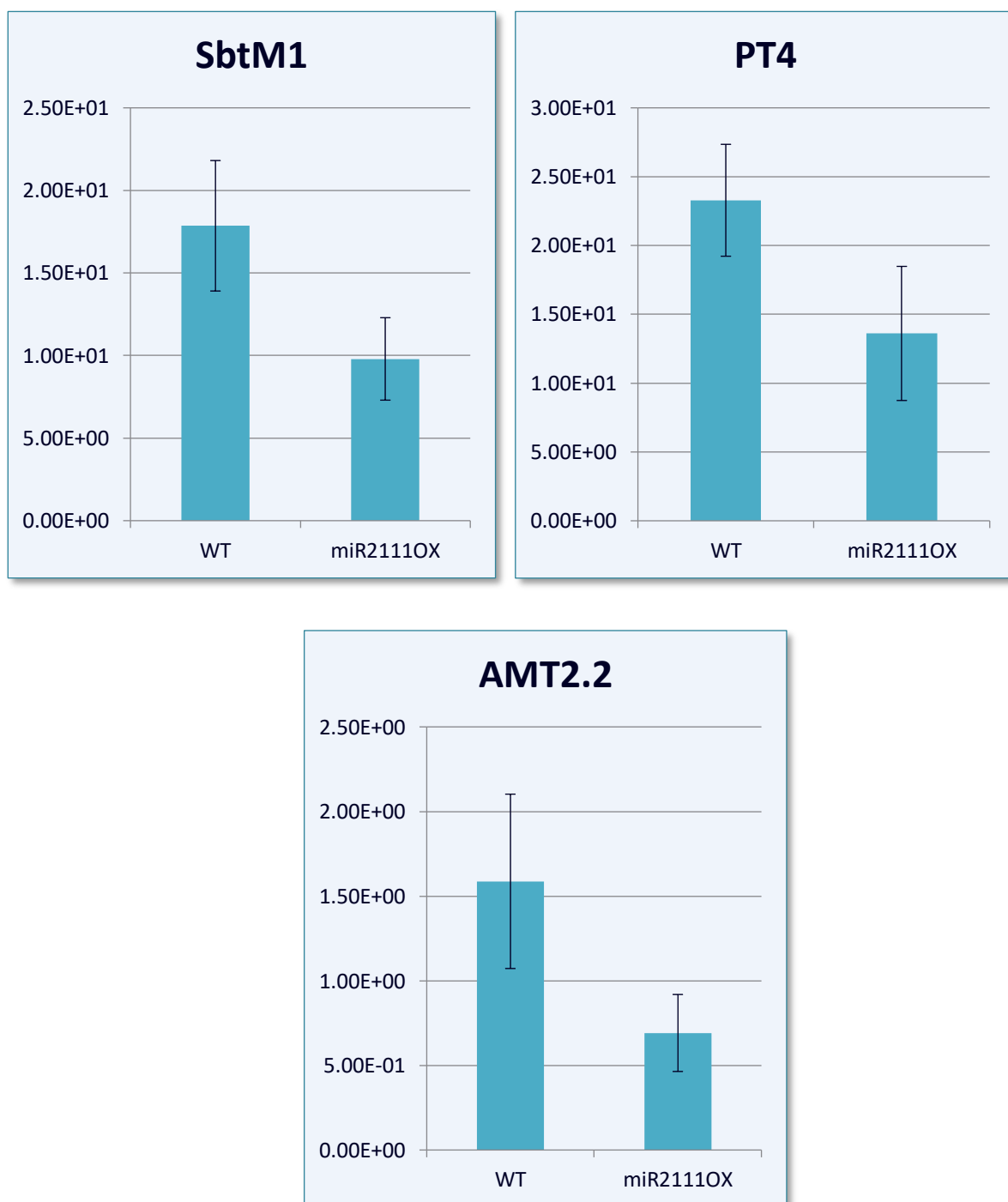
Μετά την επιβεβαίωση της απομάκρυνσης του γονιδιωματικού DNA από τα δείγματα RNA, ακολούθησε σύνθεση cDNA και αντιδράσεις qPCR.

Αρχικά, για να επιβεβαιωθεί ότι τα φυτά του μεταλλάγματος miR2111OX, υπερπαράγουν το miR2111, και συνεπώς σε αυτά τα φυτά τα επίπεδα του *TML* είναι μειωμένα, πραγματοποιήθηκαν αντιδράσεις qPCR με υποκινητές για τα miR2111 και *TML*. Η ανάλυση qPCR έδειξε πως τα επίπεδα συσσώρευσης του miR2111 είναι αυξημένα στα φυτά του μεταλλάγματος υπερέκφρασης σε σχέση με τα φυτά αγρίου τύπου. Συγκεκριμένα η συσσώρευση του miR2111 είναι κατά 2 φορές περίπου αυξημένη. Ενώ στα ίδια φυτά τα επίπεδα έκφρασης του γονιδίου *TML* εμφανίζονται μειωμένα κατά περίπου 2,5 φορές (Εικόνα 28).



Εικόνα 28: Επίπεδα συσσώρευσης του miR2111 και του γονιδίου-στόχου *TML* σε φυτά αγρίου τύπου (WT) και φυτά miR2111 OX που έχουν εμβολιαστεί με EM *R. irregularis*. (Στατιστική ανάλυση με *t-test* έδειξε τιμές  $p=0.0079$  για το miR2111 και  $p= 0.0091$  για το *TML*)

Αφού επιβεβαιώθηκε η υπερσυσσώρευση του miR2111 στα φυτά του μεταλλάγματος, ακολούθησαν αντιδράσεις qRT-PCR για γονίδια-δείκτες της μυκορριζικής συμβίωσης. Συγκεκριμένα, ελέγχθηκαν τα επίπεδα έκφρασης των γονιδίων *LjSbtM1*, *LjPT4* και *LjAMT2.2* που αποτελούν δείκτες της σωστής ανάπτυξης και της λειτουργίας των δενδρόμορφων δομών του μύκητα.



Εικόνα 29: Επίπεδα έκφρασης των ενδογενών γονιδίων του *Lotus japonicus* *LjSbtM1*, *LjPT4* και *LjAMT2.2* σε φυτά WT και miR2111 OX που έχουν εμβολιαστεί με EM *R. irregularis*. (Στατιστική ανάλυση με *t-test* έδειξε τιμές  $p=0.1541$  για το *LjSbtM1*,  $p=0.2230$  για το *LjPT4* και  $p=0.1733$  για το *LjAMT2.2*)



Τα επίπεδα έκφρασης των γονιδίων-δεικτών παρουσιάζουν μια τάση μείωσης στα φυτά που υπερπαραγάγουν το μικρό RNA miR2111, σε σχέση με τα φυτά αγρίου τύπου (Εικόνα 27). Έτσι, οι αλλαγές στα επίπεδα των miR2111 και *TML* πιθανόν να επηρεάζουν τον αποικισμό από ενδομυκορριζικούς μύκητες (EM). Ωστόσο, οι διαφορές που παρατηρήθηκαν στο πείραμα αυτό δεν είναι στατιστικώς σημαντικές (Εικόνα 29).

## 4. ΣΥΖΗΤΗΣΗ

Τα φυτά, παρόλο που προσλαμβάνουν τα περισσότερα θρεπτικά συστατικά από το έδαφος μέσω του ριζικού τους συστήματος, ορισμένα από αυτά όπως το άζωτο και ο φώσφορος δεν μπορούν να εξασφαλιστούν στις απαραίτητες ποσότητες. Για το λόγο αυτό, τα φυτά αναπτύσσουν συμβιωτικές σχέσεις με μικροοργανισμούς. Οι πιο διαδεδομένες συμβιωτικές σχέσεις είναι μεταξύ φυτών και ενδομυκορριζικών μυκήτων (EM) καθώς και μεταξύ ψυχανθών και αζωτοδεσμευτικών βακτηρίων που συμβάλλουν στη πρόσληψη φωσφόρου και αζώτου, αντίστοιχα (11). Έτσι, οι μικροοργανισμοί αυτοί χρησιμοποιούνται στην γεωργία ως βιολογικά λιπάσματα.

Τα φυτά προκειμένου να ελέγξουν την έκταση των συμβιωτικών σχέσεων έχουν αναπτύξει μηχανισμούς αυτορρύθμισης. Τόσο ο μηχανισμός αυτορρύθμισης της φυματιογένεσης (AON) όσο και ο μηχανισμός αυτορρύθμισης κατά των σχηματισμό των μυκορριζών (AOM) εμφανίζουν ορισμένα κοινά στοιχεία, παρόλο που ο δεύτερος δεν έχει κατανοηθεί πλήρως (64). Όσον αναφορά το μηχανισμό που ενεργοποιείται κατά τη συμβιωτική σχέση μεταξύ ριζοβίων και ψυχανθών φυτών (AON), είναι γνωστό ότι, το μικρό RNA miR2111 μεταφέρεται από τον βλαστό στη ρίζα του φυτού μέσω του φλοιώματος και ρυθμίζει το γονίδιο *TML* μετά-μεταγραφικά (40). Το *TML* δρα ως αρνητικός ρυθμιστής της μόλυνσης του φυτού από τα ριζόβια και επάγεται δύο μέρες μετά την μόλυνση των φυτών από αυτά και έτσι εμποδίζει τον υπερβολικό αποικισμό που μπορεί να οδηγήσει σε παρασιτισμό (40).

Για να διερευνηθεί η πιθανή εμπλοκή του miR2111 και κατεπέκταση του *TML* στον μηχανισμό αυτορρύθμισης των μυκορριζών (AOM), στην παρούσα εργασία μελετήθηκε η επίδραση της υπερσυσσώρευσης του miR2111 στον αποικισμό του φυτού μοντέλου *L. japonicus* με τον ενδομυκορριζικό μύκητα *R. Irregularis*. Αρχικά, πραγματοποιήθηκε έλεγχος της εισαγωγής της κασέτας υπερέκφρασης του γονιδίου *MIR2111-3* σε φυτά που είχαν μετασχηματιστεί μέσω του *Agrobacterium tumefascience*, σε προηγούμενη εργασία. Ανάλυση με PCR έδειξε ότι σε 4 από τα 6 φυτά που μελετήθηκαν είχε γίνει ενσωμάτωση της κασέτας υπερέκφρασης στο φυτικό γονιδίωμα (Εικόνα 22). Σπόρια από φυτά που έφεραν την κασέτα υπερέκφρασης χρησιμοποιήθηκαν στα επόμενα πειράματα της παρούσας εργασίας.

Η πιθανή επίδραση της υπερσυσσώρευσης του miR2111 στον αποικισμό των φυτών από δενδρόμορφους ενδομυκορριζικού μύκητες (ΔEM), μελετήθηκε αρχικά με παρατήρηση των δομών του μύκητα στο μικροσκόπιο. Συγκεκριμένα, φυτά αγρίου τύπου και του μεταλλάγματος υπερέκφρασης εμβολιάστηκαν με ΔEM και 6 εβδομάδες αργότερα πραγματοποιήθηκε παρατήρηση των ριζών στο μικροσκόπιο και υπολογισμός των ποσοστών αποικισμού της ρίζας

από τον ΔΕΜ. Σύμφωνα με τα αποτελέσματα του πειράματος αυτού δεν παρατηρήθηκε κάποια διάφορα στα επίπεδα αποικισμού ανάμεσα στα φυτά αγρίου τύπου και στα φυτά που υπερπαράγουν το miR2111 (Εικόνα 25). Επομένως, η μικροσκοπική ανάλυση δεν εντόπισε κάποια σημαντική επίδραση της υπερσυσσώρευσης του miR2111 στον αποικισμό των φυτών από ΔΕΜ.

Στη συνέχεια ακολούθησε μοριακή ανάλυση, με ποσοτική PCR πραγματικού χρόνου (qPCR), που είναι μια πιο ευαίσθητη μέθοδος συγκριτικά με την ανάλυση στο μικροσκόπιο. Στην ανάλυση με qPCR μελετήθηκαν τα επίπεδα έκφρασης τριών γονιδίων-δεικτών της ενδομυκορριζικής συμβίωσης. Το γονίδιο *SbtM1* (54) αποτελεί δείκτη της σωστής ανάπτυξης των δενδρόμορφων δομών του μύκητα, ενώ τα γονίδια *PT4* (53) και *AMT2.2* (53) αποτελούν δείκτες της μεταφοράς φωσφόρου και αζώτου από τον μύκητα προς το φυτό. Η μελέτη των μεταγραφικών επιπέδων των γονιδίων αυτών έδειξε ότι όλα τα γονίδια δείκτες παρουσιάζουν μια τάση μείωσης στα φυτά που υπερπαράγουν το miR2111, σε σύγκριση με τα φυτά αγρίου τύπου (Εικόνα 29). Παρόλο που η μείωση των μεταγραφημάτων των γονιδίων δεν βρέθηκε να είναι στατιστικώς σημαντική, το γεγονός ότι η τάση μείωσης παρατηρείται και στα τρία γονίδια-δείκτες ίσως υποδηλώνει πως κάποιες από τις δενδρόμορφες δομές του μύκητα (arbuscules) που σχηματίζονται στις ρίζες δεν έχουν φυσιολογική ανάπτυξη και συνεπώς δεν είναι πλήρως λειτουργικές. Μελλοντικά πειράματα που θα περιλαμβάνουν τόσο μεταλλάγματα υπερσυσσώρευσης όσο και μεταλλάγματα καταστολής του miR2111, ίσως διευκρινήσουν την πιθανή συμμετοχή του miR2111 στο μηχανισμό αυτορρύθμιση των μυκορριζών (AOM).

## BIBΛΙΟΓΡΑΦΙΑ

- 1) Hocher, V. et al. Transcriptomics of actinorhizal symbioses reveals homologs of the whole common symbiotic signaling cascade. *Plant Physiol.* 156, 700–711 (2011). 'H Simon, L., Bousquet, J., Lévesque, R. C., & Lalonde, M. (1993). Origin and diversification of endomycorrhizal fungi and coincidence with vascular land plants. *Nature*, 363(6424), 67–69.
- 2) Parniske, M. (2000). Intracellular accommodation of microbes by plants: a common developmental program for symbiosis and disease? *Current Opinion in Plant Biology*, 3(4), 320–328. doi:10.1016/s1369-5266(00)00088-1
- 3) 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. doi:10.1038/nrmicro2990
- 4) Agrios, G.N. (1997) Control of Plant Diseases. In: *Plant Pathology*, 4th Edition, Academic Press, San Diego, 200-216.
- 5) Perotto, S., & Baluška, F. (Eds.). (2012). Signaling and Communication in Plant Symbiosis. *Signaling and Communication in Plants*. doi:10.1007/978-3-642-20966-6.
- 6) Latijnhouwers, M., de Wit, P. J. G. M., & Govers, F. (2003). Oomycetes and fungi: similar weaponry to attack plants. *Trends in Microbiology*, 11(10), 462–469. doi:10.1016/j.tim.2003.08.002.
- 7) Pamela H.P. Gan, Peter N. Dodds, and Adrienne R. Hardham Plant Infection by Biotrophic Fungal and Oomycete Pathogens
- 8) Taylor, T. N., & Taylor, E. L. (1997). The distribution and interactions of some Paleozoic fungi. *Review of Palaeobotany and Palynology*, 95(1-4), 83–94. doi:10.1016/s0034-6667(96)00029-2
- 9) Long, S. R. & Staskawicz, B. J. Prokaryotic plant parasites. *Cell* 73, 921–935 (1993).
- 10) Pawlowski, K., & Bisseling, T. (1996). Rhizobial and Actinorhizal Symbioses: What Are the Shared Features? *The Plant Cell*, 8(10), 1899. doi:10.2307/3870238
- 11) Gherbi, H. et al. SymRK defines a common genetic basis for plant root endosymbioses with arbuscular mycorrhiza fungi, rhizobia, and Frankia bacteria. *Proc. Natl Acad. Sci. USA* 105, 4928–4932 (2008)
- 12) Brachmann, A., & Parniske, M. (2006). The Most Widespread Symbiosis on Earth. *PLoS Biology*, 4(7), e239. doi:10.1371/journal.pbio.0040239
- 13) Miller, J. B., & Oldroyd, G. E. D. (2011). The Role of Diffusible Signals in the Establishment of Rhizobial and Mycorrhizal Symbioses. *Signaling and Communication in Plants*, 1–30. doi:10.1007/978-3-642-20966-6\_1
- 14) Markmann, K., Giczey, G., & Parniske, M. (2008). Functional Adaptation of a Plant Receptor-Kinase Paved the Way for the Evolution of Intracellular Root Symbioses with Bacteria. *PLoS Biology*, 6(3), e68. doi:10.1371/journal.pbio.0060068
- 15) Remy W Taylor TN Hass H Kerp H Four hundred million year old vesicular arbuscular mycorrhizae. *Proc Natl Acad Sci USA* 91 1994 11841 11843 doi: 10.2307/2366232
- 16) Matt Lavin, Patrick S Herendeen, Martin F Wojciechowski, Evolutionary Rates Analysis of Leguminosae Implicates a Rapid Diversification of Lineages during the Tertiary, *Systematic Biology*, Volume 54, Issue 4, August 2005, Pages 575–594 doi: 10.2307/20061262
- 17) Bell CD, Soltis ED, Soltis PS. (2010) The age and diversification of the angiosperms re-revisited. *Am J Bot* 97: 1296–1303
- 18) Lewis G., Schrire B., Mackinder B., Lock M.. 2005. Legumes of the world Kew. Royal Botanic Gardens, 592
- 19) Sprent J. I.. 2001. Nodulation in legumes Kew, UK. Royal Botanic Gardens.
- 20) Pajuelo, E., & Stougaard, J. (n.d.). Lotus japonicus's a model system. *Lotus Japonicus Handbook*, 3–24. doi:10.1007/1-4020-3735-x\_1

- 21) Doyle, J. J., and M. A. Luckow. 2003. The rest of the iceberg. Legume diversity and evolution in a phylogenetic context. *Plant Physiology* 131:900–910.
- 22) Bernhard, A. (2010) The Nitrogen Cycle: Processes, Players, and Human Impact. *Nature Education Knowledge* 3(10):25
- 23) Werner, D. (1992). Physiology of nitrogen fixing legume nodules: compartments and functions. In *Biological Nitrogen Fixation*, G. Stacey, R. H. Burris, and H. J. Evans, eds. (New York: Chapman and Hall), pp. 399-431.
- 24) Middleton, P. H., Jakab, J., Penmetsa, R. V., Starker, C. G., Doll, J., Kalo, P., ... Oldroyd, G. E. D. (2007). An ERF Transcription Factor in *Medicago truncatula* That Is Essential for Nod Factor Signal Transduction. *THE PLANT CELL ONLINE*, 19(4), 1221–1234. doi:10.1105/tpc.106.048264
- 25) Denarie, J., Debelle, F., Truchet, G., & Prome, J.-C. (1993). Rhizobium and Legume Nodulation: A Molecular Dialogue. *Current Plant Science and Biotechnology in Agriculture*, 19–30. doi:10.1007/978-94-017-2416-6\_3
- 26) Oldroyd, G. E. D., & Downie, J. A. (2004). Calcium, kinases and nodulation signalling in legumes. *Nature Reviews Molecular Cell Biology*, 5(7), 566–576. doi:10.1038/nrm1424
- 27) Oldroyd, G. E., & Downie, J. A. (2006). Nuclear calcium changes at the core of symbiosis signalling. *Current Opinion in Plant Biology*, 9(4), 351–357. doi:10.1016/j.pbi.2006.05.003
- 28) Shaw, L. J., Morris, P., & Hooker, J. E. (2006). Perception and modification of plant flavonoid signals by rhizosphere microorganisms. *Environmental Microbiology*, 8(11), 1867–1880. doi:10.1111/j.1462-2920.2006.01141.x
- 29) Oldroyd, G. E. D., & Downie, J. A. (2008). Coordinating Nodule Morphogenesis with Rhizobial Infection in Legumes. *Annual Review of Plant Biology*, 59(1), 519–546. doi:10.1146/annurev.arplant.59.032607.092839
- 30) Downie, J. A., & Walker, S. A. (1999). Plant responses to nodulation factors. *Current Opinion in Plant Biology*, 2(6), 483–489. doi:10.1016/s1369-5266(99)00018-7
- 31) Andrews M, Andrews ME. Specificity in Legume-Rhizobia Symbioses. *Int J Mol Sci*. 2017 Mar 26;18(4):705
- 32) Madsen EB, Madsen LH, Radutoiu S, Olbryt M, Rakwalska M, Szczyglowski K, Sato S, Kaneko T, Tabata S, Sandal N, Stougaard J (2003) A receptor kinase gene of the LysM type is involved in legume perception of rhizobial signals. *Nature* 425:637–640
- 33) Radutoiu, S., Madsen, L. H., Madsen, E. B., Felle, H. H., Umehara, Y., Grønlund, M., ... Stougaard, J. (2003). Plant recognition of symbiotic bacteria requires two LysM receptor-like kinases. *Nature*, 425(6958), 585–592. doi:10.1038/nature02039
- 34) Kistner C, Winzer T, Pitzschke A, Mulder L, Sato S, Kaneko T, Tabata S, Sandal N, Stougaard J, Webb KJ, Szczyglowski K, Parniske M (2005) Seven *Lotus japonicus* genes required for transcriptional reprogramming of the root during fungal and bacterial symbiosis. *The Plant Cell* 17: 2217–2229 doi: 10.2307/4130950
- 35) Schauser, L., Roussis, A., Stiller, J., & Stougaard, J. (1999). A plant regulator controlling development of symbiotic root nodules. *Nature*, 402(6758), 191–195. doi:10.1038/46058
- 36) Heckmann, A. B., Lombardo, F., Miwa, H., Perry, J. A., Bunnewell, S., Parniske, M., ... Downie, J. A. (2006). *Lotus japonicus* Nodulation Requires Two GRAS Domain Regulators, One of Which Is Functionally Conserved in a Non-Legume. *PLANT PHYSIOLOGY*, 142(4), 1739–1750. doi:10.1104/pp.106.089508
- 37) Okamoto, S., Shinohara, H., Mori, T., Matsubayashi, Y., & Kawaguchi, M. (2013). Root-derived CLE glycopeptides control nodulation by direct binding to HAR1 receptor kinase. *Nature Communications*, 4(1). doi:10.1038/ncomms3191

- 38) Krusell, L., Madsen, L. H., Sato, S., Aubert, G., Genua, A., Szczyglowski, K., ... Stougaard, J. (2002). Shoot control of root development and nodulation is mediated by a receptor-like kinase. *Nature*, 420(6914), 422–426. doi:10.1038/nature01207
- 39) Sasaki, T., Suzaki, T., Soyano, T., Kojima, M., Sakakibara, H., & Kawaguchi, M. (2014). Shoot-derived cytokinins systemically regulate root nodulation. *Nature Communications*, 5(1). doi:10.1038/ncomms5983
- 40) Tsikou, D., Yan, Z., Holt, D. B., Abel, N. B., Reid, D. E., Madsen, L. H., ... Markmann, K. (2018). Systemic control of legume susceptibility to rhizobial infection by a mobile microRNA. *Science*, eaat6907. doi:10.1126/science.aat6907
- 41) Smith, S. E. & Read, D. J. *Mycorrhizal Symbiosis* Academic Press, 2008
- 42) Bonfante, P., & Genre, A. (2010). Mechanisms underlying beneficial plant–fungus interactions in mycorrhizal symbiosis. *Nature Communications*, 1(4), 1–11. doi:10.1038/ncomms1046
- 43) Gautrat, Pierre; Laffont, Carole; Frugier, Florian (2020). Compact Root Architecture 2 Promotes Root Competence for Nodulation through the miR2111 Systemic Effector. *Current Biology*, (), S09609822220301640–. doi:10.1016/j.cub.2020.01.084
- 44) Lanfranco, L., Bonfante, P., and Genre, A. (2016). The mutualistic interaction between plants and arbuscular mycorrhizal fungi. *The Fungal Kingdom*, 727–747. doi:10.1128/microbiolspec.funk-0012-2016
- 45) Smith, S. E., Jakobsen, I., Gronlund, M., & Smith, F. A. (2011). Roles of Arbuscular Mycorrhizas in Plant Phosphorus Nutrition: Interactions between Pathways of Phosphorus Uptake in Arbuscular Mycorrhizal Roots Have Important Implications for Understanding and Manipulating Plant Phosphorus Acquisition. *PLANT PHYSIOLOGY*, 156(3), 1050–1057. doi:10.1104/pp.111.174581
- 46) Spatafora JW, Chang Y, Benny GL, Lazarus K, Smith ME, Berbee ML, Bonito G, Corradi N, Grigoriev I, Gryganskyi A et al. 2016. A phylum-level phylogenetic classification of zygomycete fungi based on genomescale data. *Mycologia* 108: 1028–1046.
- 47) Bago, B., Pfeffer, P. E., & Shachar-Hill, Y. (2000). Carbon Metabolism and Transport in Arbuscular Mycorrhizas. *Plant Physiology*, 124(3), 949–958. doi:10.1104/pp.124.3.949
- 48) Parniske, M. (2008). Arbuscular mycorrhiza: the mother of plant root endosymbioses. *Nature Reviews Microbiology*, 6(10), 763–775. doi:10.1038/nrmicro1987
- 49) Van der Heijden, M. G. A., Klironomos, J. N., Ursic, M., Moutoglis, P., Streitwolf-Engel, R., Boller, T. Sanders, I. R. (1998). Mycorrhizal fungal diversity determines plant biodiversity, ecosystem variability and productivity. *Nature*, 396(6706), 69–72. doi:10.1038/23932
- 50) Puja Kumari, Arti Singh, Ravindra Nath Kharwar, Chapter 18 - Phytostimulation and ISR responses of fungi, Editor(s): Vijay Kumar Sharma, Maulin P. Shah, Shobhika Parmar, Ajay Kumar, *Fungi Bio-Prospect in Sustainable Agriculture, Environment and Nano-Technology*, Academic Press, 2021, Pages 459-473
- 51) 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. doi:10.1016/j.cub.2017.06.042
- 52) A. Genre, M. Chabaud, T. Timmers, P. Bonfante, D.G. Barker Arbuscular mycorrhizal fungi elicit a novel intracellular apparatus in *Medicago truncatula* root epidermal cells before infection *Plant Cell*, 17 (2005), pp. 3489-3499, doi: 10.2307/3872462
- 53) Pumplin, N., & Harrison, M. J. (2009). Live-Cell Imaging Reveals Periarbuscular Membrane Domains and Organelle Location in *Medicago truncatula* Roots during Arbuscular Mycorrhizal Symbiosis. *PLANT PHYSIOLOGY*, 151(2), 809–819. doi:10.1104/pp.109.141879
- 54) Takeda N, Handa Y, Tsuzuki S, Kojima M, Sakakibara H, Kawaguchi M. Gibberellins interfere with symbiosis signaling and gene expression and alter colonization by arbuscular mycorrhizal fungi in *Lotus japonicus*. *Plant Physiol.* 2015;167(2):545-557. doi:10.1104/pp.114.247700

- 55) Balestrini, R., & Bonfante, P. (2014). Cell wall remodeling in mycorrhizal symbiosis: a way towards biotrophism. *Frontiers in Plant Science*, 5. doi:10.3389/fpls.2014.00237
- 56) Javot, H., Penmetsa, R. V., Terzaghi, N., Cook, D. R. & Harrison, M. J. A *Medicago truncatula* phosphate transporter indispensable for the arbuscular mycorrhizal symbiosis. *Proc. Natl Acad. Sci. USA* 104, 1720–1725 (2007).
- 57) Akiyama, K., Matsuzaki, K., & Hayashi, H. (2005). Plant sesquiterpenes induce hyphal branching in arbuscular mycorrhizal fungi. *Nature*, 435(7043), 824–827. doi:10.1038/nature03608
- 58) Maillet, F., Poinso, V., André, O., Puech-Pagès, V., Haouy, A., Gueunier, M., ... Dénarié, J. (2011). Fungal lipochitooligosaccharide symbiotic signals in arbuscular mycorrhiza. *Nature*, 469(7328), 58–63. doi:10.1038/nature09622
- 59) 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. doi:10.1105/tpc.17.00555
- 60) Venkateshwaran, M., Jayaraman, D., Chabaud, M., Genre, A., Balloon, A. J., Maeda, J., ... Ané, J.-M. (2015). A role for the mevalonate pathway in early plant symbiotic signaling. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 112(31), 9781–9786. doi:10.1073/pnas.1413762112
- 61) Miller, J. B., Pratap, A., Miyahara, A., Zhou, L., Bornemann, S., Morris, R. J., & Oldroyd, G. E. D. (2013). Calcium/Calmodulin-Dependent Protein Kinase Is Negatively and Positively Regulated by Calcium, Providing a Mechanism for Decoding Calcium Responses during Symbiosis Signaling. *The Plant Cell*, 25(12), 5053–5066. doi:10.1105/tpc.113.116921
- 62) Wang, E., Schornack, S., Marsh, J. F., Gobbato, E., Schwessinger, B., Eastmond, P., ... Oldroyd, G. E. D. (2012). A Common Signaling Process that Promotes Mycorrhizal and Oomycete Colonization of Plants. *Current Biology*, 22(23), 2242–2246. doi:10.1016/j.cub.2012.09.043
- 63) Wang, C., Reid, J. B., & Foo, E. (2018). The Art of Self-Control – Autoregulation of Plant–Microbe Symbioses. *Frontiers in Plant Science*, 9. doi:10.3389/fpls.2018.00988
- 64) Müller, L. M., Flokova, K., Schnabel, E., Sun, X., Fei, Z., Frugoli, J., ... Harrison, M. J. (2019). A CLE–SUNN module regulates strigolactone content and fungal colonization in arbuscular mycorrhiza. *Nature Plants*. doi:10.1038/s41477-019-0501-1
- 65) Magori, S., Oka-Kira, E., Shibata, S., Umehara, Y., Kouchi, H., Hase, Y., ... Kawaguchi, M. (2009). TOO MUCH LOVE, a Root Regulator Associated with the Long-Distance Control of Nodulation in *Lotus japonicus*. *Molecular Plant-Microbe Interactions*, 22(3), 259–268. doi:10.1094/mpmi-22-3-0259
- 66) L. C. Hsieh et al., Uncovering small RNA-mediated responses to phosphate deficiency in *Arabidopsis* by deep sequencing. *Plant Physiol.* 151, 2120–2132 (2009). doi: 10.1104/pp.109.147280