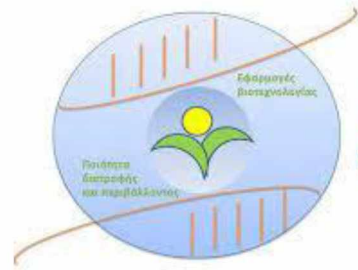




ΠΑΝΕΠΙΣΤΗΜΙΟ  
ΘΕΣΣΑΛΙΑΣ



# ΠΑΝΕΠΙΣΤΗΜΙΟ ΘΕΣΣΑΛΙΑΣ

## ΤΜΗΜΑ ΒΙΟΧΗΜΕΙΑΣ ΚΑΙ ΒΙΟΤΕΧΝΟΛΟΓΙΑΣ

### ΠΡΟΓΡΑΜΜΑ ΜΕΤΑΠΤΥΧΙΑΚΩΝ ΣΠΟΥΔΩΝ: ΒΙΟΤΕΧΝΟΛΟΓΙΑ ΚΑΙ ΠΟΙΟΤΗΤΑ ΔΙΑΤΡΟΦΗΣ ΚΑΙ ΠΕΡΙΒΑΛΛΟΝΤΟΣ

«Απόκριση του miR171c και του γονιδίου-στόχου  
του στον εμβολιασμό των φυτών με  
ενδομυκορριζικό μύκητα»

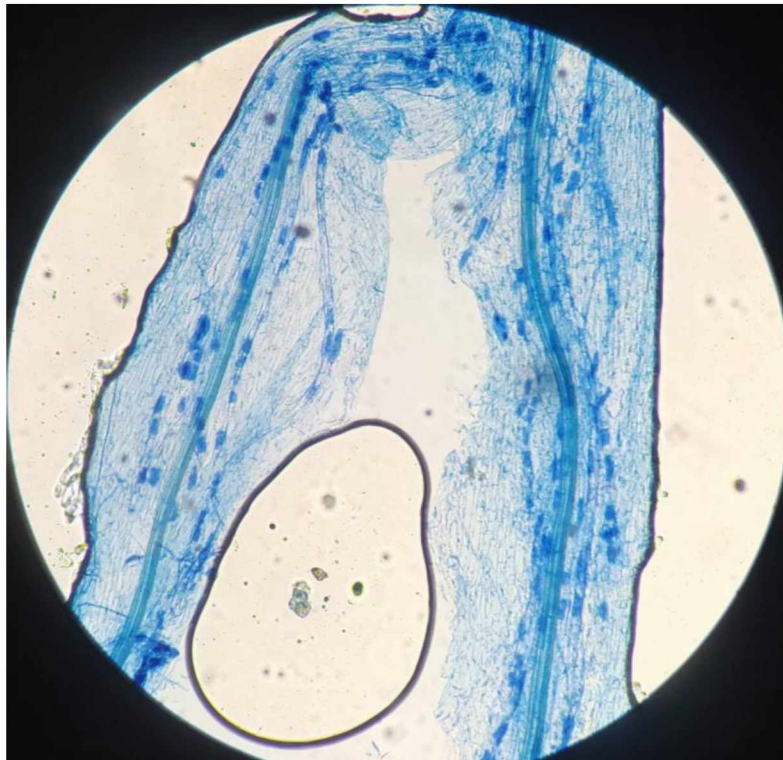
ΜΕΤΑΠΤΥΧΙΑΚΗ ΔΙΠΛΩΜΑΤΙΚΗ ΕΡΓΑΣΙΑ

Μεταπτυχιακή φοιτήτρια:

Πιστόλα Γεωργία

ΛΑΡΙΣΑ, ΣΕΠΤΕΜΒΡΙΟΣ 2022

«Απόκριση του miR171c και του γονιδίου-στόχου  
του στον εμβολιασμό των φυτών με  
ενδομυκορριζικό μύκητα»



“miR171c and target-gene response to plant  
inoculation with arbuscular mycorrhizal fungi”

## Τριμελής επιτροπή:

1) Τσίκου Δανιέλα, Επίκουρος Καθηγήτρια Μοριακής και Αναπτυξιακής Βιολογίας Φυτών, Πανεπιστήμιο Θεσσαλίας, Τμήμα Βιοχημείας και Βιοτεχνολογίας (Επιβλέπουσα)

2) Παπαδοπούλου Καλλιόπη, Καθηγήτρια Βιοτεχνολογίας Φυτών, Πανεπιστήμιο Θεσσαλίας, Τμήμα Βιοχημείας και Βιοτεχνολογίας

3) Γιακουντής Αντώνιος, Επίκουρος Καθηγητής Μοριακής Βιολογίας και Γονιδιωματικής, Πανεπιστήμιο Θεσσαλίας, Τμήμα Βιοχημείας και Βιοτεχνολογίας

## Ευχαριστίες

Αρχικά θα ήθελα να ευχαριστήσω την καθηγήτρια και υπεύθυνη της διατριβής μου Τσίκου Δανιέλα που μου έδωσε την ευκαιρία να ασχοληθώ με το αντικείμενο αλλά και για όλες τις γνώσεις που μου χάρισε με ανιδιοτέλεια και υπομονή. Στην συνέχεια θα ήθελα να ευχαριστήσω τις συμφοιτήτριες μου μεταπτυχιακές και προπτυχιακή Γκιμπριζή Ελένη, Λάμπρου Ελένη και Μπασδέκη Νικολέτα για την άριστη συνεργασία μας στο εργαστήριο κατά την διάρκεια διεξαγωγής των πειραμάτων, καθώς και όλα τα μέλη του εργαστηρίου ΒΦΠ που με βοήθησαν κατά την διάρκεια της παραμονής μου εκεί. Ακόμη θα ήθελα να ευχαριστήσω θερμά την μέντορα μου και ερευνήτρια του ΕΛΓΟ ΔΗΜΗΤΡΑ Κατερίνα Γρηγοριάδου που μου μετέδωσε το πάθος για έρευνα και μάθηση δίνοντας μου την ευκαιρία να δουλέψω δίπλα της κατά τα προπτυχιακά μου έτη και ως σήμερα συνεχίζει να με συμβουλεύει και στηρίζει. Τέλος, θα ήθελα να ευχαριστήσω μου την οικογένεια μου για όλη την αγάπη, και την ηθική στήριξη που μου παρείχαν καθ' όλη την διάρκεια των μεταπτυχιακών σπουδών μου καθώς και τους φίλους μου που συνεχίζουν να πιστεύουν σε εμένα και με στηρίζουν.

Ευχαριστίες.....	4
Περίληψη.....	7
Abstract.....	8
1. Εισαγωγή.....	9
1.1. Βιοτικές αλληλεπιδράσεις φυτών-Συμβιωτικές σχέσεις.....	10
1.2. Ψυχανθή.....	12
1.3. Το φυτό <i>Lotus japonicus</i> ως φυτό μοντέλο.....	12
1.4. Κύκλος Αζώτου και η σημαντικότητα της αζωτοδέσμευσης.....	14
1.5. Αζωτοδεσμευτικά βακτήρια-ριζόβια.....	15
1.5.1. Σηματοδότηση και Αυτορρύθμιση της φυματιογένεσης AON.....	15
1.6. Ενδομυκορριζικοί μύκητες.....	16
1.6.1.Σηματοδότηση και αυτορρύθμιση κατά την συμβίωση φυτών με ενδομυκορριζικούς μύκητες.....	17
1.7. Το miR171c και το γονίδιο-στόχος του NSP2.....	18
1.8. Σκοπός της μελέτης.....	19
2. Υλικά και μέθοδοι.....	20
2.1. Βιολογικό υλικό και συνθήκες ανάπτυξης.....	20
2.2. Απολύμανση και εκβλάστηση των σπόρων του φυτού <i>Lotus japonicus</i> .....	20
2.3. Μεταφύτευση των φυτών <i>Lotus japonicus</i> σε δοχεία magentas με την μέθοδο sandwich.....	22
2.4. Χρώση με μελάνι ριζών αποικισμένων με ενδομυκορριζικό μύκητα.....	23
2.5. Υπολογισμός του ποσοστού αποικισμού των ριζών από τον ενδομυκορριζικό μύκητα.....	24
2.6. Απομόνωση ολικού RNA από τις ρίζες του φυτού.....	24
2.7. Απομάκρυνση DNA από τα δείγματα RNA με την βοήθεια του ενζύμου DNAάση.....	25
2.8. Αλυσιδωτή Αντίδραση Πολυμεράσης PCR.....	26
2.9. Σύνθεση συμπληρωματικού DNA (cDNA).....	28
2.10. Αλυσιδωτή αντίδραση πολυμεράσης πραγματικού χρόνου (real time PCR) ...	29
3. Αποτελέσματα.....	31
3.1. Έλεγχος του αποικισμού φυτών αγρίου τύπου και μεταλλαγμάτων <i>nsp2</i> , miR171cOX και miR171cKO με ενδομυκορριζικό μύκητα.....	31
3.2. Διερεύνηση των επιπέδων συσσώρευσης του μικρού RNA miR171c και των μεταγράφων του γονιδίου στόχου του μετά των εμβολιασμό φυτών με τον ενδομυκορριζικό μύκητα.....	35
4. Συμπεράσματα-Συζήτηση.....	40

Βιβλιογραφία..... 43

## Περίληψη

Εδώ και δισεκατομμύρια χρόνια τα φυτά έχουν αναπτύξει την ικανότητα να συμβιώνουν με μικροοργανισμούς του εδάφους για να εξασφαλίσουν ή αποκαταστήσουν τις ελλείψεις θρεπτικών ουσιών που αντιμετωπίζουν. Δύο γνωστές και καλά μελετημένες συμβιωτικές σχέσεις είναι αυτή των αζωτοδεσμευτικών ριζοβίων με ψυχανθή φυτά που παρέχει στο φυτό άζωτο, και αυτή των δενδρόμορφων ενδομυκορριζικών μυκήτων (ΔΕΜ) με το περίπου το 90% των φυτών στον πλανήτη, που παρέχει στο φυτό, κυρίως, φώσφορο. Οι συμβιωτικές αυτές σχέσεις μοιράζονται αρκετά κοινά στοιχεία όσον αφορά τα μονοπάτια σηματοδότησης που ακολουθούν και τους μηχανισμούς ρύθμισης τους (όπως τους μηχανισμούς αυτορρύθμισης).

Το μικρό RNA miR171, έχει ως στόχο δράσης το γονίδιο *NSP2* ( Nodulation Signalling Pathway) που είναι μεταγραφικός παράγοντας και έχει εξειδικευμένη δράση στο σχηματισμό φυματίων κατά την αζωτοδέσμευση. Επίσης, το γονίδιο *NSP2* απαιτείται για την σηματοδότηση κατά την συμβίωση των φυτών με ΔΕΜ.

Στην παρούσα διατριβή χρησιμοποιήθηκε το ψυχανθές φυτό-μοντέλο *Lotus japonicus* και μεταλλάγματα υπερσυσώρευσης ή καταστολής του miR171 και του *NSP2*, με σκοπό να διερευνηθεί η πιθανή εμπλοκή του miR171 και του γονιδίου στόχου του κατά τον ενδομυκορριζικό αποικισμό.

Λέξεις κλειδιά: ψυχανθή, ενδομυκορριζικός μύκητας, συμβίωση, miR171c, NSP2, NSP3

## Abstract

For billions years, plants have developed the ability to coexist with soil microorganisms in order to control or restore the nutrient deficiencies they face. Two well-known and well-studied symbiotic relationships are that of nitrogen-fixing rhizobia with leguminous plants, which provide the plant with nitrogen, and that between most plants with arbuscular mycorrhizal fungi (AMF), which provide the plants with mainly phosphorus. These symbiotic relationships share several common elements in terms of the signaling pathways and their regulation mechanisms (like autoregulation).

The micro RNA miR171, targets the *NSP2* (Nodulation Signaling Pathway) gene, which is a transcription factor, and has a specialized effect on the formation of nodules during nitrogen fixation. Also, the *NSP2* gene is required for signaling during symbiosis with AMF.

In this thesis, the legume model plant *Lotus japonicus* and overexpression or knockout mutants of miR171 and *NSP2* were used in order to investigate the putative involvement of miR171 and its target gene in the symbiotic relationship of plants with AMF.

Key words: legumes, Arbuscular Mycorrhizal Fungi (AMF), symbioses, miR171c,NSP2,NSP3



# Κεφάλαιο 1ο

---

## 1. Εισαγωγή

Από τα τέλη του 20ου αιώνα άρχισε να παρατηρείται εκθετική αύξηση του πληθυσμού της γης. Το πιο άμεσο αποτέλεσμα αυτής της αύξησης είναι η έντονη ανάγκη για εξασφάλιση επαρκών ποσοτήτων τροφής για να καλυφθούν οι ανάγκες του πληθυσμού. Το απότοκο αυτής της ανάγκης είναι η υπερεντατικοποίηση της γεωργίας με σκοπό της εξασφάλιση μεγαλύτερης σοδειάς. Για να επιτευχθεί αυτό ανά τις τελευταίες δεκαετίες αυξήθηκε η χρήση νέων ποικιλιών υψηλότερης απόδοσης, αλλά και η χρήση εισροών στην γεωργία όπως χημικά λιπάσματα και φυτοφάρμακα που έχουν ως στόχο της αύξηση της παραγωγικότητας. Τα πρώτα λιπάσματα χρησιμοποιήθηκαν στις αρχές του 17ου αιώνα κατά την Αγροτική Βρετανική Επανάσταση, παρόλ' αυτά η χρήση τους έγινε εντονότερη την περίοδο της Βιομηχανικής Επανάστασης. Πρόσφατες επιστημονικές μελέτες καταλήγουν πως ο ρυθμός εφαρμογής αζωτούχων (N) και φωσφορικών (P) λιπασμάτων έχουν αυξηθεί κατά 8 και κατά 3 φορές αντίστοιχα συγκριτικά με το 1961 (1). Το αποτέλεσμα αυτό ήταν θετικό αλλά οι επιπτώσεις της μακροχρόνιας χρήσης ήταν δυσμενείς και θα ο κόσμος θα τις αντιμετώπιζε αργότερα. Το λίπασμα ως ευδιάλυτο προϊόν απορροφάται εύκολα από το ριζικό σύστημα των φυτών ή την φυλλική τους επιφάνεια ανάλογα με τον τρόπο εφαρμογής του. Οι καταχρήσεις όμως, έχουν οδηγήσει στο στάδιο που το φυτό αδυνατεί να απορροφήσει την συνολική χορηγούμενη ποσότητα με αποτέλεσμα η περίσσεια της να αποδίδεται στον υδροφόρο ορίζοντα και στο έδαφος μολύνοντας τα, πράξη που «κοστίζει» και στον άνθρωπο (δηλητηριάσεις, μη πόσιμο νερό) αλλά και στο περιβάλλον (φαινόμενο ευτροφισμού) (2). Εκτός από τις σημαντικές περιβαλλοντικές επιπτώσεις η αλόγιστη χρήση λιπασμάτων επηρεάζει άμεσα και τον ίδιο τον παραγωγό. Το κόστος αγοράς τους συνεχώς αυξάνεται –ιδιαίτερα στις μέρες μας με την εμπόλεμη κατάσταση στην Ουκρανία που αποτελεί κύριο παραγωγό-. Μια ακόμη επίπτωση της συνεχούς χρήσης εισροών είναι η κόπωση των εδαφών με αποτέλεσμα τα εδάφη να κρίνονται ακατάλληλα για παραγωγή μετά από ένα

χρονικό διάστημα εντατικής καλλιέργειας με απαραίτητη την εφαρμογή αγρανάπαυσης, μέτρο οικονομικά ασύμφορο για τους περισσότερους παραγωγούς. Για τους παραπάνω λόγους όλο και πιο επιτακτική είναι η ανάγκη για στροφή σε πιο φιλικές προς τις καλλιέργειες και το περιβάλλον τεχνικές οι οποίες να είναι εξίσου αποτελεσματικές. Για δισεκατομμύρια χρόνια οι φυτικοί οργανισμοί συμβιών με μικροοργανισμούς αναπτύσσοντας με αυτούς σχέσεις αμοιβαίες και επωφελείς ως προς της εξασφάλιση θρεπτικών στοιχείων αλλά και της συνέχισης της διαβίωσης τους. Οι πιο ευρέως γνωστές συμβιωτικές σχέσεις είναι αυτές των ψυχανθών με τα αζωτοδεσμευτικά βακτήρια στις ρίζες τους. Μια σχέση που εξασφαλίζει άζωτο στο φυτό και πηγές άνθρακα στα ριζόβια. Ένας ακόμη εξίσου σημαντικός τύπος συμβιωτικής σχέσης είναι αυτός των φυτών με τους ενδομυκορριζικούς μύκητες (3). Οι ενδομυκορριζικοί μύκητες βελτιώνουν την θρέψη των φυτών που αποικίζουν, παρέχοντας στο φυτό κυρίως φώσφορο και ενισχύουν την αντοχή του φυτού σε αβιοτικές καταπονήσεις όπως αλατότητα και υδατική καταπόνηση (3) (4). Αντίστοιχα, η συμβίωση των ψυχανθών με αζωτοδεσμευτικά ριζόβια εφοδιάζει το φυτό με άζωτο (3), (5).

Τέλος τα φυτά που αναπτύσσουν συμβιωτικές σχέσεις χρησιμοποιούνται συχνά και ως χλωρά λίπανση (3).

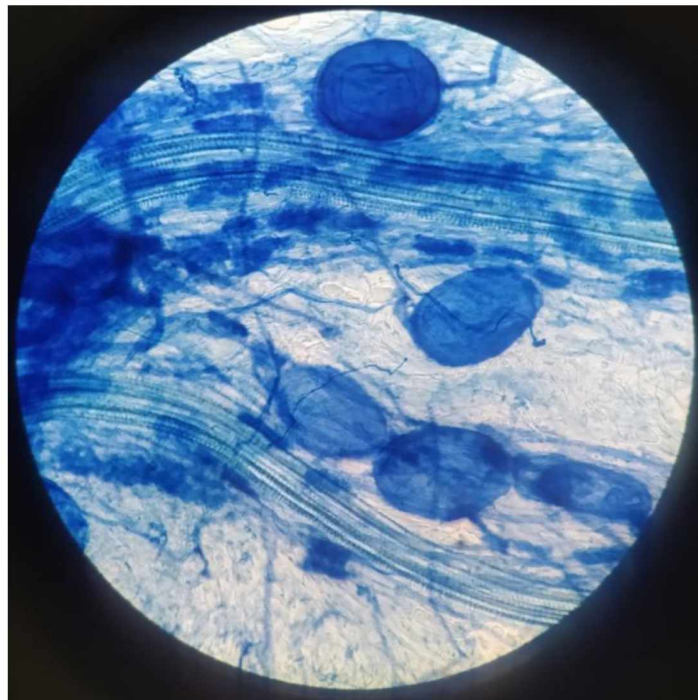
Στα πλαίσια της εφαρμογής μια αειφόρου και βιώσιμης γεωργίας ο στόχος είναι να μειωθεί το οικονομικό κόστος και η προστασία του περιβάλλοντος να αποτελεί πρωταρχική απαίτηση και ανάγκη. Μια λύση είναι η χρήση μικροβιακών λιπασμάτων που όπως φαίνεται και από την ετυμολογία, μικροβιακά στελέχη επιλέγονται ,κυρίως μέσα από την μελέτη των σχέσεων των φυτών με ωφέλιμους μικροοργανισμούς, βακτήρια ή μύκητες και εφαρμόζονται (6) (7) (8) (2) (3).

---

## **1.1. Βιοτικές αλληλεπιδράσεις φυτών-Συμβιωτικές σχέσεις**

Τα φυτά ως μέλη των φυσικών οικοσυστημάτων ζουν και αλληλοεπιδρούν με αυτά και το σύνολο των οργανισμών που περιλαμβάνονται σε αυτά. Οι

αλληλεπιδράσεις που αναπτύσσονται χωρίζονται σε βιοτικές και αβιοτικές και επηρεάζουν άμεσα την ανάπτυξη και επιβίωση τους ανάλογα με το πρόσημο τους, δηλαδή αν αυτές είναι ευεργετικές ή επιβλαβείς. Κάποια παραδείγματα βιοτικών αλληλεπιδράσεων είναι οι αμοιβαίες επωφελείς σχέσεις όπως η αλληλεπίδραση φυτού-επικονιαστή (9), (10) νιτροποιητικού βακτηρίου-ψυχανθούς και οι ενδομυκορριζικοί μύκητες της ριζόσφαιρας (11), (12). Αντίθετα, μερικά παραδείγματα επιβλαβών αλληλεπιδράσεων είναι οι προσβολές από παθογόνους μικροοργανισμούς και η αλληλοπάθεια (13). Τα φυτά μπορούν και αναγνωρίζουν οτιδήποτε «ξένο» εισέρχεται στο εσωτερικό τους. Το ίδιο συμβαίνει και όταν το φυτό εισβάλλεται από παθογόνους μικροοργανισμούς είτε από ωφέλιμους που λειτουργούν ως συμβιώτες. Οι συμβιωτικές σχέσεις κάθε φύσης έχουν ένα κοινό. Υπάρχει η ικανότητα των μικροοργανισμών να δεσμεύουν θρεπτικά που είναι απαραίτητα για το φυτό και ως αντάλλαγμα να λαμβάνουν από το φυτό άλλα θρεπτικά που είναι απαραίτητα για την δική τους επιβίωση και ανάπτυξη (7).



Εικόνα 1: συμβίωση ριζοβίων και ΔΕΜ σε ρίζα του φυτού *L.japonicus* έτσι όπως φαίνεται μετά από χρώση των ριζών στο οπτικό μικροσκόπιο

Κυρίως οι συμβιωτικές σχέσεις των φυτών με μικροοργανισμούς συμβαίνουν λόγω της αδυναμίας των πρώτων να δεσμεύσουν το απαραίτητο για την

ανάπτυξη τους άζωτο και φωσφόρο. Τα αζωτοδεσμευτικά βακτήρια δεσμεύουν το άζωτο της ατμόσφαιρας και οι ενδομυκορριζικοί μύκητες κυρίως το φώσφορο από σημεία του εδάφους που δεν είναι προσβάσιμα στις ρίζες των φυτών (14). Τέλος, αξίζει να αναφερθεί πως η σημαντικότητα των συμβιωτικών σχέσεων δεν έγκειται μονάχα στις ιδιότητες που προαναφέρθηκαν αλλά και σε άλλες ιδιότητες όπως αντοχή στις βιοτικές και αβιοτικές καταπονήσεις (15), (16)

## 1.2. Ψυχανθή

Τα ψυχανθή φυτά ανήκουν στην οικογένεια Fabaceae και στο είδος Fabales. Τα ψυχανθή καλλιεργούνται από τον άνθρωπο από την αρχαιότητα και η σημαντικότητά τους αντικατοπτρίζεται στο ποσοστό συμμετοχής τους στην διατροφή του. Με την πάροδο των χρόνων ανακαλύφθηκαν οι συμβιωτικές σχέσεις τους με βακτήρια του εδάφους τα οποία αζωτοδεσμεύουν.

Η οικογένεια των ψυχανθών περιλαμβάνει πολλά γένη και είδη, τα οποία μπορεί να διαφέρουν μεταξύ τους τόσο στην διάρκεια του βιολογικού τους κύκλου (ετήσια ή πολυετή) όσο και στον τρόπο ανάπτυξης τους (πωώδη, θαμνώδη ή δενδρώδη, έρποντα ή αναρριχώμενα). Τα ψυχανθή είναι δικοτυλήδονα με ισχυρό πασσαλώδες ριζικό σύστημα στο οποίο αναπτύσσονται πολλές πλάγιες διακλαδώσεις (3). Στις ρίζες τους σχηματίζονται χαρακτηριστικά εξογκώματα που ονομάζονται φυμάτια και είναι αποτέλεσμα της συμβίωσης των ψυχανθών με βακτήρια του εδάφους. Τα φύλλα τους είναι φύλλα και τα σπέρματά ωριμάζουν μέσα σε λοβούς. Επίσης εκτός απ την χρήση τους στην διατροφή του ανθρώπου, χρησιμοποιούνται ως ζωοτροφές και ως φυτά χλωρής λίπανσης. Ορισμένα παραδείγματα ψυχανθών φυτών είναι τα ρεβίθια ,το τριφύλλι, τα φασόλια και τα μπιζέλια. (3)

## 1.3. Το φυτό *Lotus japonicus* ως φυτό μοντέλο

Υπάρχουν περίπου 18.000 είδη οσπρίων με ποικιλία χαρακτηριστικών, πολλά από τα οποία είναι αγρονομικής σημασίας. Αυτά τα χαρακτηριστικά ήταν από καιρό οι στόχοι των προγραμμάτων βελτίωσης, και από αυτή την άποψη η γονιδιωματική θα μπορούσε να είναι ευεργετική.

Το *Lotus japonicus* ανήκει στην τάξη Leguminosae ή Fabales και την οικογένεια Fabaceae (οικ. Ψυχανθών). Το γένος *Lotus* απαριθμεί περισσότερα από 200 είδη και τα τελευταία χρόνια το είδος *L. japonicus* χρησιμοποιείται ευρύτατα σαν φυτικό υλικό για την μελέτη της συμβιωτικής σχέσης ψυχανθών και ριζοβίων. Το *L. japonicus* είναι ένα φυτικό είδος της εύκρατης ζώνης και είναι στενά συγγενικό με το είδος *Lotus corniculatus* L. Το *Lotus japonicus* επιλέχθηκε ως φυτό μοντέλο αρχικά για την μελέτη της γενετικής βελτίωσης των ψυχανθών και στη συνέχεια για μελέτη της γονιδιωματικής. Ένας μεγάλος αριθμός μεταλλαγμάτων *L. japonicus* έχουν δημιουργηθεί πλέον σήμερα για την μελέτη τόσο φαινοτυπικών όσο και γονιδιακών χαρακτηριστικών. Σημαντικοί πόροι πληροφοριών και πειραματικών υλικών, συμπεριλαμβανομένων των γονιδιωματικών αλληλουχιών και cDNA βιβλιοθηκών, αποδεικνύουν ότι το *L. japonicus* είναι ένα εξαιρετικό σύστημα μοντέλο. Μεταφορά γνώσεων από το *L. japonicus* σε άλλα ψυχανθή, ιδιαίτερα τα όσπρια, είναι ένα θέμα που εξετάζεται ήδη. Τα καθοριστικά χαρακτηριστικά του που το καθιστούν κατάλληλο για φυτό μοντέλο είναι ο σύντομος κύκλος ζωής του (2–3 μήνες), το γεγονός πως είναι αυτογονιμοποιούμενο, ο βαθμός πλοειδίας του (διπλοειδές, n=6) και το μικρό μέγεθος του γονιδιώματος του (472,1 Mb). Αυτά τα χαρακτηριστικά του καθιστούν τις μελέτες σε επίπεδο γονιδιώματος πιο εύκολες (17) και στη σχετικά εύκολη δημιουργία δια-γονιδιακών φυτών. Τέλος, διαθέτει μεγάλα άνθη, μεγάλη παραγωγή σπόρων και είναι εύκολα καλλιεργήσιμο και δεκτικό σε πρωτόκολλα μετασχηματισμού (17) (18)

Δεν υπάρχει αμφιβολία ότι οι επιστημονικές γνώσεις γύρω από το γονιδίωμα του φυτού αυξάνονται ραγδαίως διευκολύνοντας τη μοριακή γενετική του *L. japonicus*, και οδηγώντας τελικά στην κατανόηση των γενετικών συστημάτων (18).

Γενικότερα ως προς την χρήση φυτών μοντέλων, η σύγκριση των δομών των γονιδιωμάτων τους παρέχουν καλύτερη κατανόηση τους. Η συγκριτική γονιδιωματική είναι ένας από τους πιο πολλά υποσχόμενους τρόπους για να μεταφερθεί αυτή η γνώση των φυτών-μοντέλων σε φυτά καλλιέργειας με στόχο την βελτίωση τους (18).

## 1.4. Κύκλος Αζώτου και η σημαντικότητα της αζωτοδέσμευσης

Το άζωτο είναι ένα από τα κύρια θρεπτικά συστατικά που χρειάζονται οι οργανισμοί για να επιβιώσουν και είναι απαραίτητο συστατικό πολλών βιομορίων όπως οι πρωτεΐνες, το γενετικό υλικό και η χλωροφύλλη. Αν και βρίσκεται σε αφθονία στην φύση με την μορφή αέριου αζώτου ( $N_2$ ), χρειάζεται να μετατραπεί σε αμμωνία ( $NH_3$ ) για να είναι βιοδιαθέσιμο. Οι μετασχηματισμοί που υπόκειται ένα στοιχείο με σκοπό να γίνει διαθέσιμο, να αλλάξει μορφές και να ανακυκλωθεί καλούνται κύκλος του στοιχείου (2), (3). Η αζωτοδέσμευση διακρίνεται σε ατμοσφαιρική και βιολογική. Κατά την ατμοσφαιρική αζωτοδέσμευση το άζωτο της ατμόσφαιρας αντιδρά είτε με τους υδρατμούς, σχηματίζοντας αμμωνία, είτε με το ατμοσφαιρικό οξυγόνο, σχηματίζοντας νιτρικά ιόντα. Η απαραίτητη ενέργεια για την ολοκλήρωση των αντιδράσεων αυτών, προσφέρεται από τις ηλεκτρικές εκκενώσεις δηλαδή από τις αστραπές και τους κεραυνούς της ατμόσφαιρας. Στην συνέχεια, η παραγόμενη αμμωνία και τα νιτρικά ιόντα που σχηματίστηκαν μεταφέρονται με τη βροχή στο έδαφος όπου προσλαμβάνονται από τα φυτά. Η συνεισφορά όμως των διεργασιών αυτών είναι πολύ μικρή για να στηρίξει τις ανάγκες των οικοσυστημάτων σε αφομοιώσιμο άζωτο, αποφέροντας μόλις το 10% της συνολικής αζωτοδέσμευσης. Η βιολογική αζωτοδέσμευση από την άλλη πλευρά, καταλύεται κυρίως από προκαριωτικούς οργανισμούς που ανήκουν στα ευβακτήρια και στα αρχαιοβακτήρια (19). Έτσι, καταληκτικά θα λέγαμε ότι η βιολογική αζωτοδέσμευση πραγματοποιείται από ελεύθερους ή συμβιωτικούς μικροοργανισμούς που ζουν στο έδαφος ή στο εσωτερικό των ριζών. Κυριότερα αζωτοδεσμευτικά βακτήρια είναι τα βακτήρια που ζουν συμβιωτικά στις ρίζες των ψυχανθών σχηματίζοντας ειδικά εξογκώματα πάνω σ' αυτές, τα φυμάτια. Τα συγκεκριμένα βακτήρια έχουν την ικανότητα να δεσμεύουν το ατμοσφαιρικό άζωτο και να το μετατρέπουν σε νιτρικά ιόντα, τα οποία μπορούν να αφομοιωθούν από τα ψυχανθή. Η βιολογική αζωτοδέσμευση κατέχει το 90% της συνολικής αζωτοδέσμευσης που πραγματοποιείται (20). Τα φυτά χρησιμοποιούν τα νιτρικά ιόντα που προσλαμβάνουν από το έδαφος (είτε με τη διαδικασία της ατμοσφαιρικής είτε με αυτήν της βιολογικής αζωτοδέσμευσης) προκειμένου να συνθέσουν τις

αζωτούχες ενώσεις τους όπως τις πρωτεΐνες και τα νουκλεϊκά οξέα (14), (11). Στον κύκλο του αζώτου οι βασικές μετατροπές είναι η αζωτοδέσμευση, η νιτροποίηση, η απονιτροποίηση και η αμμωνιοποίηση. Βασικό στοιχείο για την πραγματοποίηση τους αποτελούν οι μικροοργανισμοί όπως αυτοί αναφέρθηκαν παραπάνω (8), (3), (2).

## **1.5. Αζωτοδεσμευτικά βακτήρια-ριζόβια**

Η βιολογική αζωτοδέσμευση είναι μια ενεργειακά κοστοβόρα διαδικασία (απαιτεί 8 ηλεκτρόνια και 12 μόρια ATP) και πραγματοποιείται από μικροοργανισμούς που είτε βρίσκονται ελεύθεροι στο έδαφος (*Azotobacter* και *Azospirillum*) είτε συμβιώνουν με κάποιο φυτό (*Rhizobium*, *Bradyrhizobium* και ακτινοβακτήρια του γένους *Frankia*). Το κοινό αυτών των μικροοργανισμών είναι ότι διαθέτουν το ενζυμικό σύμπλοκο της νιτρογενάσης, το οποίο καταλύει τη διάσπαση του τριπλού ομοιοπολικού δεσμού, που συνδέει τα άτομα αζώτου και την προσθήκη τριών ατόμων υδρογόνου σε κάθε άτομο αζώτου. Η δράση της μπορεί να ανασταλεί από το οξυγόνο.

### **1.5.1. Σηματοδότηση και Αυτορρύθμιση της φυματογένεσης AON**

Παρόλο που η αζωτοδέσμευση θεωρείται ως μια διαδικασία που ευνοεί το φυτό στην πραγματικότητα είναι ευεργετική μόνο σε συνθήκες έλλειψης αζώτου και περίσσειας άνθρακα. Σε αντίθετη περίπτωση κρίνεται ως υπερβολικά κοστοβόρα και μπορεί να μετατραπεί σε παρασιτική σχέση μεταξύ ριζοβίου-ψυχανθούς. Το φυτό προκειμένου να ελέγξει την διαδικασία της συμβίωσης, ελέγχει τόσο τον αριθμό των μολύνσεων από βακτήρια όσο και κατά συνέπεια τον αριθμό των σχηματισμένων φυματίων. Για να διατηρηθεί ο αριθμός τους σε ένα επίπεδο υγιές και ανεκτό απ το φυτό, αυτό έχει αναπτύξει έναν μηχανισμό που ονομάζεται «αυτορρύθμιση της φυματογένεσης» (Autoregulation of nodulation ή AON). Η φυματογένεση ενεργοποιείται από τους λιποσακχαρίτες που εκκρίνονται από αυτά, λειτουργούν ως σηματοδοτικά μόρια και ονομάζονται Nod παράγοντες (21) (22) (5). Ένας ακόμη πολύ ενδιαφέρον και χρήσιμος μηχανισμός είναι αυτός της ικανότητας ανίχνευσης των επιπέδων  $\text{NO}_3^-$ . Κύριο συστατικό αυτού του μηχανισμού είναι τα πεπτιδία CEP που παράγονται στις ρίζες που αντιμετωπίζουν έλλειψη αζώτου. Με το που λάβουν το αντίστοιχο ερέθισμα,



μετακινούνται στον βλαστό του φυτού μέσω του αγωγού συστήματος. Εκεί προσδένονται σε CEP υποδοχείς και παράγουν τα CEPD πεπτιδία. Αυτά με την σειρά τους ρυθμίζουν θετικά την έκφραση μεταφορέων των νιτρικών ιόντων στην ρίζα του φυτού που εντοπίζεται το πρόβλημα. (23) (24) (25)

Ο μηχανισμός αυτορρύθμισης της φυματογένεσης AON ξεκινά από την παραγωγή πεπτιδίων CLE (LjCLE-RS1-RS2 και -RS3 στο *L. japonicus*) στην αρχή της διαίρεσης των κυττάρων του φλοιού της ρίζας η οποία επάγεται από τα ριζόβια. Για να ενεργοποιηθούν τα γονίδια των πεπτιδίων θα πρέπει οι μεταγραφικοί παράγοντες NIN και NNC1 να έχουν αλληλοεπιδράσει και να υπάρχει το μικρό RNA miR172c (26), (27), (28). Τα πεπτιδία CLE αναγνωρίζονται και συνδέονται στον υποδοχέα πρωτεϊνικής φύσης του βρίσκεται στο βλαστό και ονομάζεται HAR1 (HYPER NODULATION ABERRANT ROOT FORMATION 1). Αυτά αποτελούν το εναρκτήριο μήνυμα της ρύθμιση του γονιδίου *TML* που είναι υπεύθυνο για την καταστολή της φυματογένεσης της ρίζας (29) και η δράση του καταστέλλεται από το μικρό RNA miR2111 (30) του οποίου η έκφραση ενισχύεται από τα πεπτιδία CEP (31). Όταν τα επίπεδα αζώτου είναι χαμηλά, απουσιάζουν πεπτιδία CEP1 και επάγεται η παραγωγή του.

## 1.6. Ενδομυκορριζικοί μύκητες

Οι ενδομυκορριζικοί μύκητες είναι στενά συνυφασμένοι με την έννοια των συμβιωτικών σχέσεων. Υπάρχουν σχεδόν όσο και τα φυτά και είναι γνωστοί για την προσφορά τους στην ανάπτυξη και άμυνα των φυτών (6) (32). Περίπου το 80% των γνωστών σήμερα φυτών διαβιεί στις ρίζες του με κάποιο μύκητα αλλά αυτή η σχέση φαίνεται από παλαιοντολογικά ευρήματα της αρχαιοβοτανικής πως ήταν ανεπτυγμένη ακόμη και στα πρώτα φυτικά είδη (31).

Οι μυκορριζικοί μύκητες αλληλεπιδρούν με τα φυτά και η σχέση τους είναι αμοιβαία και επωφελής. Το φυτό εξασφαλίζει στο μύκητα τις απαραίτητες πηγές άνθρακα για την ανάπτυξη του και ο μύκητας στο φυτό προσφέρει φωσφόρο (14) (7). Ανάλογα με την μορφολογία και την φυσιολογία τους οι μυκορριζες χωρίζονται σε δύο κύριες ομάδες, στις εκτομυκορριζες και στις ενδομυκορριζες (7) (2).



Οι Εκτομυκόρριζες (ECM, ectomycorrhizae) είναι βασιδιομύκητες και ασκομύκητες που συναντώνται συνήθως σε δασικά είδη Pinaceae, Fagaceae, Betulaceae και Myrtaceae (2). Οφείλουν το όνομα τους στο ότι δημιουργούν τις υφές τους εκτός φυτικού κυττάρου (4).

Οι ενδομυκορριζικοί μύκητες οφείλουν το όνομα τους στο γεγονός πως η υφή του μύκητα εισέρχεται εντός του φυτικού κυττάρου. Οι υφές τους είναι κοινοκύτταρες και στερούνται septa ενώ σαν μύκητες είναι υποχρεωτικά βιοτροφικοί και χωρίζονται σε 3 τύπους.

Στην παρούσα διατριβή θα απασχοληθούμε με τους δενδροειδείς ενδομυκορριζικούς μύκητες. (6) (33). Οι δενδροειδής ενδομυκορριζικοί μύκητες (ΔΕΜ) (Arbuscular Mycorrhizal Fungi ή AMF) ανήκουν στο φύλο Glomeromycota, Οι ΔΕΜ είναι λιγότερο εξειδικευμένοι αλλά οι πιο διαδεδομένοι μεταξύ των σπερματοφύτων (34).

Κατά τον αποικισμό του φυτού από τους μύκητες σχηματίζονται δενδρόμορφες δομές στο εσωτερικό του φυτικού κυττάρου που ονομάζονται θύσσανοι (arbuscules). Ο μύκητας διαπερνά τα κυτταρικά τοιχώματα του φυτικού κυττάρου και η φυτική κυτταρική μεμβράνη τυλίγει τον μύκητα και δημιουργεί τη λεγόμενη περιοδενδροειδή μεμβράνη, η οποία λειτουργεί ως τροφοδότης θρεπτικών συστατικών. Οι δενδρόμορφες δομές έχουν συνήθως μικρή διάρκεια ζωής και οι μύκητες αυτού του είδους παρουσιάζουν μικρό βαθμό εξειδίκευσης ως τους τον ξενιστή τους (4), (35), (36).

### **1.6.1.Σηματοδότηση και αυτορύθμιση κατά την συμβίωση φυτών με ενδομυκορριζικούς μύκητες**

Όπως προαναφέρθηκε, η αμοιβαία και επωφελής αυτή σχέση που αναπτύσσεται μεταξύ φυτού και ΔΕΜ αποσκοπεί κυρίως στην καλύτερη εκμετάλλευση των θρεπτικών πόρων του εδάφους. Σε συνθήκες έλλειψης φωσφόρου (Pi) οι συμβιώτες επικοινωνούν με χημικά σήματα. Τα φυτά εκκρίνουν στο έδαφος στριγγολακτόνες, δηλαδή ορμόνες που συντίθενται από καροτενοειδή και επάγουν την εγκαθίδρυση της συμβίωσης. Η αναγνώριση του σήματος από τους μύκητες μεταφράζεται ως αύξηση του μεταβολικού ρυθμού των μυκήτων και εντονότερη διακλάδωση των υφών με σκοπό το

δίκτυο να μεγαλώσει και να μπορεί να λειτουργεί καλύτερα και αποτελεσματικότερα (31) (7) (4). Επίσης, καθώς οι μύκητες αναγνωρίζουν τις στριγγολακτόνες απαντούν με την απελευθέρωση παραγόντων (παραγόντες *Myc*). Αυτοί αποτελούνται από μίγματα μορίων παρόμοια με αυτά των *Nod*. Οι *Myc* παράγοντες είναι χιτοολιγοσακχαρίτες (COs) και λιποχιτοολιγοσακχαρίτες (LCOs) (61). Προσδένονται σε φυτικούς υποδοχείς οι οποίοι βρίσκονται στα επιδερμικά κύτταρα της ρίζας και ξεκινά η μοριακή σηματοδότηση που τελικά οδηγεί στην εγκαθίδρυση της συμβιωτικής σχέσης. Οι φυτικοί υποδοχείς αποτελούνται από εξωκυτταρικές επικράτειες μοτίβων λυσίνης (*LysM*) και κυτταροπλασματικές επικράτειες με δράση κινάσης. Στη συνέχεια το μήνυμα αναγνωρίζεται από την πρωτεΐνη υποδοχέα *SYMRK* (στο *Lotus japonicus*), στην πλασματική μεμβράνη, η οποία συσχετίζεται με το ένζυμο *HMGR* το οποίο θεωρείται απαραίτητο για την παραγωγή ταλαντώσεων ασβεστίου που απαιτούνται για να ξεκινήσει μια μεταγενέστερη μεταγραφική απόκριση (37). Η πρωτεΐνη κινάση που εξαρτάται από το ασβέστιο και την καλμοδουλίνη *CCaMK* λειτουργεί ως κύριος αποκωδικοποιητής των ταλαντώσεων ασβεστίου με τελικό αποτέλεσμα την μεταγραφική απόκριση φωσφορυλιώνοντας αρχικά την πρωτεΐνη στόχο *CYCLOP* (38). Η *CCaMK* μαζί με την *CYCLOPS* σχηματίζουν ένα σύμπλοκο και ενεργοποιούν πρωτεΐνες με σημαντικότερη από αυτές στην συμβίωση με ενδομυκορριζικούς μύκητες την *RAM1* (πρωτεΐνη με τομέα *GRAS*). Η *RAM1* εμπλέκεται στην ρύθμιση της έκφρασης του γονιδίου *RAM2* σημαντικό για τον σχηματισμό των υφοποδίων (*hyphopodia*). Τα υφοπόδια είναι εξειδικευμένες μυκητιακές υφές και χρησιμεύουν στην προσκόλληση των μυκήτων και στην απορρόφηση της τροφής. Ενδιαφέρον παρουσιάζει το γεγονός ότι η *RAM1* φαίνεται να αλληλεπιδρά με το *NSP2* κάτι το οποίο δείχνει ότι η απόφαση ενεργοποίησης αποκρίσεων είτε για ριζόβια είτε για ενδομυκορριζικούς μύκητες έγκειται στο αν θα σχηματιστεί το σύμπλοκο *NSP1-NSP2* ή το *RAM1-NSP2* (39) (40) (7).

### **1.7. Το miR171c και το γονίδιο-στόχος του NSP2**

Το γονίδιο *NSP2* εκφράζει έναν μεταγραφικό παράγοντα της οικογένειας *GRAS*. Εμπλέκεται στο μονοπάτι σηματοδότησης των παραγόντων *Nod* και οδηγεί στην δημιουργία των χαρακτηριστικών για την ριζοβιακή ανάπτυξη

φυματίων (41). Το NSP2 συμμετέχει στο «κοινό μονοπάτι σηματοδότησης» που μοιράζονται οι διαδικασίες συμβίωσης με μύκητες και ριζόβια (42). Τα μεταλλάγματα *nsp2* δεν αντιδρούν σε *Myc* παράγοντες και LCOs και είναι λιγότερο αποικισμένα σε σχέση με τα φυτά αγρίου τύπου (43). Το γονίδιο *NSP2* έχει βρεθεί να είναι το γονίδιο στόχος του μικρού RNA miR171h (44) (45) αλλά τα αποτελέσματα για την αρνητική ρύθμιση και τις συνέπειες της για την συμβίωση με ΔΕΜ δεν έχουν ακόμη ερευνηθεί επαρκώς.

Ο μεταγραφικός παράγοντας NSP2 παίζει σημαντικό ρόλο στη συμβίωση με ΔΕΜ και ρυθμίζει τον ριζικό αποικισμό από τον μύκητα. Σε αποικισμένες ρίζες, τα αυξημένα επίπεδα του miR171h, μειώνουν τα μετάγραφα του *NSP2*, συγκεκριμένα στο ακραίο μερίστωμα των φυτών. Η μετα-μεταγραφική καταστολή του NSP2 εμποδίζει τον μύκητα να αποικίσει στην περιοχή του ακραίου μεριστώματος της ρίζας πιθανόν μειώνοντας το περιεχόμενο της περιοχής σε μόρια-σήματα που είναι οι στριγγολακτόνες (46).

Η χωροχρονική έκφραση των miR171h και *NSP2* είναι στενά συνδεδεμένη με το θρεπτικό στάδιο στο οποίο βρίσκεται το φυτό, δείχνοντας πως μια σημαντική λειτουργία του miR171h είναι να ανταποκρίνεται στη θρεπτική ομοίωση με σκοπό να ρυθμίσει την έκφραση του NSP2 κατά της διάρκεια των διαδικασιών συμβίωσης με ριζόβια και μύκητες (47)

## 1.8. Σκοπός της μελέτης

Στην παρούσα μεταπτυχιακή διπλωματική έρευνα, μελετήθηκε η συμβιωτική σχέση των ψυχανθών φυτών με ενδομυκορριζικούς μύκητες. Συγκεκριμένα, σκοπός της ήταν να μελετηθεί η απόκριση του μικρού RNA miR171c και του γονιδίου-στόχου του *NSP2*, στον αποικισμό του φυτού-μοντέλου *Lotus japonicus* από τον δενδρόμορφο ενδομυκορριζικό μύκητα (ΔΕΜ) *Rhizophagus irregularis*. Με τη χρήση φυτικών μεταλλαγμάτων υπερέκφρασης ή καταστολής των miR171c και *NSP2* μελετάται κατά πόσο τα επίπεδα συσσώρευσης του miR171c μέσα στο φυτό επηρεάζουν τον αποικισμό του φυτού από τον ΔΕΜ.

# ΚΕΦΑΛΑΙΟ 2ο

## 2. Υλικά και μέθοδοι

### 2.1. Βιολογικό υλικό και συνθήκες ανάπτυξης

Στη παρούσα μελέτη χρησιμοποιήθηκε το φυτό *Lotus japonicus* και συγκεκριμένα ο οικότυπος αγρίου τύπου Gifu. Επίσης χρησιμοποιήθηκαν τα μεταλλάγματα *nsp2*, *miR171cOE* και *miR171cKO*. Για τους εμβολιασμούς χρησιμοποιήθηκε ο εμπορικά διαθέσιμος ενδομυκοριζικός μύκητας *Rhizophagus irregularis*, στέλεχος DAOM.

Το θρεπτικό μέσο που χρησιμοποιήθηκε για την ανάπτυξη των φυτών είναι το Long Aston Solution ή LAS (Πίνακας 1). Για ανάπτυξη των φυτών, χρησιμοποιήθηκε ειδικός θάλαμος ανάπτυξης με φωτοπερίοδο 16 ώρες φως / 8 ώρες σκοτάδι, στους 24-25 °C.

Πίνακας 1: Σύσταση θρεπτικού διαλύματος LAS

Χημική Ένωση	Ποσότητα
MgSO <sub>4</sub>	0.75mM
NaNO <sub>3</sub>	1 mM
K <sub>2</sub> SO <sub>4</sub>	1 mM
CaCl <sub>2</sub>	2 mM
Na <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub>	3.2 μM
FeNa EDTA	25 μM
MnSO <sub>4</sub>	5 μM
CuSO <sub>4</sub>	0.25 μM
H <sub>3</sub> BO <sub>3</sub>	25 μM
Na <sub>2</sub> MoO <sub>4</sub> in H <sub>2</sub> O	0.1 μM

### 2.2. Απολύμανση και εκβλάστηση των σπόρων του φυτού *Lotus japonicus*

Πρώτο βήμα για την σωστή εκκίνηση της πειραματικής διαδικασίας αποτελεί η απολύμανση των σπερμάτων του φυτού. Η απολύμανση των σπερμάτων σε

πειράματα τέτοιου τύπου αποτελεί το πρώτο και καίριο βήμα για την έκβαση τους καθώς αν αυτή γίνει σωστά εξασφαλίζει πως ο σπόρος θα είναι απαλλαγμένος από ξένες ύλες και παθογόνους μικροοργανισμούς. Με την προβλάστηση των σπόρων σε τριβλίο επιτυγχάνεται ο στόχος όλα τα φυτά να βρίσκονται στο ίδιο στάδιο ανάπτυξης. Συνεπώς, ακολουθείται ένα συγκεκριμένο πρωτόκολλο απολύμανσης και προεκβλάστησης. Μετά από τη διαδικασία της απολύμανσης τα σπέρματα είναι έτοιμα να τοποθετηθούν υπο τις κατάλληλες συνθήκες για εκβλάστηση.

Η διαδικασία της απολύμανσης αποτελείται από δύο στάδια.

Κατά το 1ο στάδιο γίνεται προσθήκη πυκνού  $H_2SO_4$  σε σωληνάριο Eppendorf που περιέχει τα σποράκια και αυτό επωάζεται για 25 λεπτά. Με το πέρας αυτού του διαστήματος γίνονται 5 πλύσεις με νερό. Στην συνέχεια, γίνεται προσθήκη διαλύματος 20% χλωρίνης του εμπορίου και ακολουθεί ξανά επώαση. Σε αυτό το σημείο είναι σημαντικό να ελέγχονται κατά πόσο οι σπόροι διαβρέχονται απ το διάλυμα χλωρίνης με σκοπό η απολύμανση να είναι ομοιόμορφη. Αφού επωαστούν για 10 λεπτά το διάλυμα χλωρίνης απομακρύνεται από το σωληνάριο Eppendorf και ακολουθούν 6 πλύσεις με νερό στο θάλαμο καθέτου νηματικής ροής. Σε αυτό το σημείο το πρώτο βήμα ολοκληρώνεται και οι σπόροι παραμένουν στο νερό στους  $4^{\circ}C$  καθ όλη την διάρκεια της νύχτας.

Το δεύτερο στάδιο λαμβάνει χώρα στην τράπεζα νηματικής ροής για να εξασφαλιστούν ασηπτικές συνθήκες εργασίας. Όλα τα αντικείμενα που χρησιμοποιούνται είναι αποστειρωμένα. Ακολουθεί η κατά σειρά τοποθέτηση των σπόρων στην επιφάνεια διηθητικών χαρτιών που βρίσκονται μέσα στο τριβλίο. 3 απολυμασμένα διηθητικά χαρτιά, διαβρέχονται με 2,5 ml  $dH_2O$  και στην επιφάνεια τους τοποθετούνται κατά σειρά και με απόσταση μεταξύ τους οι σπόροι. Σημαντικός είναι ο τρόπος τοποθέτησης των σπόρων στην επιφάνεια του χαρτιού. Θα πρέπει να τοποθετούνται σε απόσταση ώστε να υπάρχει ο χώρος για τον κάθε σπόρο να βλαστήσει. Μετά την τοποθέτηση ακολουθεί ερμητικό κλείσιμο του τριβλίου με parafilm και στην συνέχεια αυτά τοποθετούνται καθέτως μέσα στον θάλαμο ανάπτυξης φυτών για 10 ημέρες μετά το πέρας των οποίων παρατηρείται εκβλάστηση των σπόρων.

### **2.3. Μεταφύτευση των φυτών *Lotus japonicus* σε δοχεία magentas με την μέθοδο sandwich**

Αφού οι σπόροι έχουν βλαστήσει μετά από 10 ημέρες απ την αρχική τοποθέτηση τους σε τριβλία τα σπορόφυτα που προέκυψαν είναι έτοιμα για μεταφύτευση σε δοχεία magentas όπου και θα παραμείνουν για όλη την διάρκεια των πειραμάτων. Για την μεταφύτευση αυτών των φυτών απαιτείται αποστειρωμένη άμμος που έχει ψηθεί (bake) στους 180°C για τουλάχιστον 6 ώρες. Επίσης, η ποταμίσις άμμος διαβρέχεται με θρεπτικό διάλυμα LSA (η σύσταση του φαίνεται στον Πίνακα 1) που περιέχει μακροστοιχεία και ιχνοστοιχεία για την σωστή θρέψη των φυτών. Η διαδικασία αυτή πραγματοποιείται σε θάλαμο νηματικής ροής για να εξασφαλιστούν ασηπτικές συνθήκες.

Αναλυτικότερα, η αποστειρωμένη άμμος τοποθετείται στα δοχεία με τέτοιο τρόπο ώστε να καταλαμβάνει τα 2/3 του συνολικού τους όγκου. Γίνεται προσθήκη 50-70 ml θρεπτικού διαλύματος LSA/magenta και η άμμος αναδευεται με την βοήθεια αποστειρωμένου κουταλιού με σκοπό το θρεπτικό διάλυμα να κατανεμηθεί σε όλο τον όγκο της άμμου. Τελευταίο βήμα για την προετοιμασία της άμμου είναι η διάνοιξη μιας διαγώνιας σχισμής. Αφού το υπόστρωμα έχει ετοιμαστεί ακολουθεί η προετοιμασία του εμβολίου του ενδομυκορριζικού μύκητα.

Για την εγκατάσταση των φυτών χρησιμοποιείται η «μέθοδος Sandwich». Σκοπός αυτής, είναι να εξασφαλιστεί το μεγαλύτερο δυνατό ποσοστό αποικισμού καθώς μέσω της χρήσης μεμβρανών νιτροκυτταρίνης είναι αποτελεσματικότερος ο εμβολιασμός των ριζών των φυτών με το εναιώρημα του μύκητα διότι συγκρατείται ανάμεσα σε αυτούς και έρχεται σε άμεση επαφή το εμβόλιο με τις ρίζες. Πρώτο βήμα της μεθόδου είναι η ενυδάτωση ενός δίσκου νιτροκυτταρίνης σε τριβλίο με 0,9 % άγαρ-νερό. Ακολουθεί η τοποθέτηση τριών φυτών με το βλαστικό μέρος τους να προεξέχει του δίσκου. Έπειτα, προστίθενται 300μL εμβολίου (ή 300μL νερού στα φυτά ελέγχου) πάνω στις ρίζες των φυτών και προς το κέντρο του δίσκου όπου η τελική συγκέντρωση σπορίων είναι 100 σπόρια μύκητα/φυτό. Με σκοπό την ολοκλήρωση της διαδικασίας, τοποθετείται ο δεύτερος δίσκος πάνω από τον

πρώτο και το φυτό. Τέλος, το «Sandwich» τοποθετείται στην σχισμή άμμου που έχει δημιουργηθεί κατά το προηγούμενο στάδιο, με σκοπό να βρίσκεται σε άμεση επαφή με το υπόστρωμα για να υπάρχει πρόσβαση του ριζικού συστήματος του σπορόφυτου στα θρεπτικά στοιχεία του υποστρώματος. Τέλος, τα δοχεία magentas κλείνονται ερμητικά και τοποθετούνται για 4 ή 5 εβδομάδες σε θάλαμο ανάπτυξης στους 24-25°C. Κάθε δοχείο magenta αποτελεί μία βιολογική επανάληψη για κάθε συνθήκη και περιλαμβάνει 3 φυτά.

## **2.4. Χρώση με μελάνι ριζών αποικισμένων με ενδομυκορριζικό μύκητα**

Σκοπός της χρώσης των ριζών των φυτών με μελάνι είναι η μικροσκοπική παρατήρηση τους για την ύπαρξη χαρακτηριστικών δομών των ενδομυκορριζικών μυκήτων. Συγκεκριμένα, δομές του μύκητα (υφές, δενδρόμορφα, κύστες) βάφονται με έντονο μπλε χρώμα ενώ η υπόλοιπη ρίζα παραμένει αχρωμάτιστη

Για τον υπολογισμό, τα φυτά απομακρύνονται από το περιβάλλον ανάπτυξής τους και ξεπλένεται η περίσσεια άμμου από τις ρίζες. Στην συνέχεια με την βοήθεια λεπίδας κόβεται το υπέργειο μέρος του φυτού με αποτέλεσμα να παραμείνουν μόνο οι ρίζες. Γίνεται επώαση των ριζών σε 10% ΚΟΗ σε υδατόλουτρο ρυθμισμένο και προθερμασμένο στους 80-90 °C για 30—35 λεπτά. Στην συνέχεια, με ένα σουρωτήρι οι ρίζες συγκρατούνται και απομακρύνεται το ΚΟΗ. Ακολουθεί η προσθήκη οξικού οξέος 10% στον επαγωγό. Αφού οι ρίζες έρθουν σε επαφή με το οξικό γίνονται 2 πλύσεις με dH<sub>2</sub>O και αμέσως μετά προστίθεται διάλυμα μελανιού (5% μελάνι σε 5% οξικό οξύ) και αυτό επωάζεται στο υδατόλουτρο για 30 λεπτά. Αφού έχει περάσει το ημίωρο, γίνονται 2 πλύσεις με dH<sub>2</sub>O και αφού στραγγιστεί προστίθεται αυτή τη φορά διάλυμα οξικού οξέος 5% και τα δείγματα επωάζονται σε θερμοκρασία δωματίου για 30 λεπτά. Τα τελευταία βήματα είναι να απομακρυνθεί το οξικό οξύ, να προστεθεί dH<sub>2</sub>O και έπειτα οι ρίζες που είναι εμβαπτισμένες στο νερό τοποθετούνται στους 4°C για τουλάχιστον 12 ώρες. Μετά και απ αυτό το βήμα, οι ρίζες είναι έτοιμες για επεξεργασία και παρατήρηση.

## **2.5. Υπολογισμός του ποσοστού αποικισμού των ριζών από τον ενδομυκορριζικό μύκητα**

Μετά την χρώση των ριζών με μελάνι, ακολουθεί η τελική τους επεξεργασία για την παρατήρηση τους στο οπτικό μικροσκόπιο. Οι ρίζες διαχωρίζονται και τεμαχίζονται σε κομμάτια μήκους 1-1.5 εκατοστού. Στη συνέχεια, 15-16 τυχαία τεμάχια τοποθετούνται σε αντικειμενοφόρους πλάκες. Οι πλάκες αυτές παρατηρούνται στο οπτικό μικροσκόπιο. Κάθε αντικειμενοφόρος πλάκα έχει προέλθει από φυτά που αναπτυσσόταν στο ίδιο δοχείο magenta και αντιστοιχεί σε μία βιολογική επανάληψη του πειράματος. Ο υπολογισμός του ποσοστού αποικισμού γίνεται μέσω της παρακολούθησης οπτικών πεδίων σε κάθε αντικειμενοφόρο πλάκα με φακό 40x. Για κάθε οπτικό πεδίο σημειώνεται αν υπάρχει αποικισμός ή όχι και στη συνέχεια γίνεται καταμέτρηση αυτών με τα αποτελέσματα να υπολογίζονται σε επί τοις εκατό ποσοστό %.

## **2.6. Απομόνωση ολικού RNA από τις ρίζες του φυτού**

Αρχικά, απομακρύνονται τα φυτά από το θάλαμο ανάπτυξης, και ξεπλένεται η περίσσια άμμου από τις ρίζες των φυτών. Οι ρίζες κόβονται και τοποθετούνται σε δοχεία συλλογής erpendorfs των 1,5ml. Αυτά διατηρούνται σε υγρό N για μικρό χρονικό διάστημα και στους -80 °C για πιο μακροχρόνια αποθήκευση.

Το επόμενο βήμα είναι η τήρηση του πρωτόκολλου για την εξαγωγή του RNA. Το πρωτόκολλο έχει ως εξής: Ξεκινά η λειοτρίβηση των ριζών σε παρουσία υγρού αζώτου με την βοήθεια εμβόλου. Αφού προστεθούν 450μl διαλύματος λύσης/δέσμευσης διαλύματος (100mM Tris-HCl (pH 7.5), 500mM LiCl, 10mM EDTA (pH 8.0), 1% LiDS, 5mM DTT (διθειοθρεϊτόλη)) σε κάθε erpendorf, αναμιγνύονται και αναδεύονται ισχυρώς (vortex). Ακολουθεί φυγοκέντρηση για 10 λεπτά στους 4°C ρυθμισμένη στα 13000 rpm. Αφού γίνει μεταφορά του υπερκείμενου σε νέο σωληνάριο erpendorf που περιέχει 500μl Trizol LS, ξαναγίνεται ισχυρή ανάδευση (vortex) για 30 δεύτερα και το διάλυμα επωάζεται σε θερμοκρασία δωματίου για 5 λεπτά. Μετά το πέρας τους, επαναλαμβάνεται μια φυγοκέντρηση για 5 λεπτά και ξανά το υπερκείμενο μεταφέρεται σε νέο σωληνάριο erpendorf που περιέχει 125μl χλωροφόρμιο. Το νέο διάλυμα αναδεύεται ξανά (vortex) για 30 δεύτερα και επωάζεται σε



θερμοκρασία δωματίου για 2 λεπτά . Ακολουθεί μια φυγοκέντρηση για 10 λεπτά στους 4°C και 13000 rpm. Το επόμενο στάδιο απαιτεί προσοχή καθώς πρέπει να γίνει απομόνωση της υπερκείμενης υδάτινης φάσης, χωρίς τη λήψη της μεσαίας, και να μεταφερθούν 420μl (=1 vol.) αυτής σε νέο σωληνάριο erpendorf . Έπειτα γίνεται προσθήκη 0.1 του όγκου 3 M NaOAc και ανάδευση. Μια ακόμη προσθήκη , αυτή τη φορά, 0.1 του όγκου ακετοξικό οξύ πραγματοποιείται και 2.5 του όγκου 100% EtOH. Το νέο μίγμα αναδεύεται και επωάζεται σε θερμοκρασία δωματίου για 30 λεπτά. Μετά το πέρα του ημιώρου επαναλαμβάνεται επώαση στους -80°C για 30 λεπτά ή διατήρηση στους -20°C για τουλάχιστον 12 ώρες. Μετά το στάδιο αυτό, το δείγμα φυγοκεντρείται για 1 ώρα στους 4°C με ταχύτητα 13000 rpm. Μετά την φυγοκέντρηση το υπερκείμενο αφαιρείται και το ίζημα ξεπλένεται με 1000μl 80% EtOH. Ξαναγίνεται φυγοκέντρηση για 10 λεπτά στους 4°C, 13000 rpm και αφαιρείται το υπερκείμενο. Αφού το ίζημα αφεθεί να στεγνώσει για 7 λεπτά επαναιωρείται με προσθήκη 20μl διαλύματος LoTE (3mM Tris-HCl pH 7.5, 0.2 mM EDTA pH 7.5). Αφού έχουν θερμανθεί οι σωλήνες erpendorf για 2 λεπτά στους 65°C, γίνεται σύντομη ανάδευση (vortex) και απευθείας τοποθέτηση στον πάγο. Τα δείγματα RNA διατηρούνται στους -80°C για μεγάλης διάρκειας αποθήκευση ή στους -20 °C για σύντομο χρονικό διάστημα.

## 2.7. Απομάκρυνση DNA από τα δείγματα RNA με την βοήθεια του ενζύμου DNAάση

Αφού προσδιοριστεί η ποσότητα και η ποιότητα του υπάρχοντος RNA είναι έτοιμη να λάβει χώρα η απομακρυνση του DNA από τα δείγματα RNA με την βοήθεια του ενζύμου DNAάση. Κατά την αντίδραση χρησιμοποιούνται τα αντιδραστήρια με τις ανάλογες ποσότητες που φαίνονται στο παρακάτω πίνακα.

Πίνακας 2: Αντίδραση DNAάσης

RNA	700 ng
10X Buffer	1 μL
RNAase out	0,25 μL

DNAase	1 $\mu$ L (1U)
H <sub>2</sub> O	Ως τον τελικό όγκο
Τελικός όγκος	10 $\mu$ L

Η ποσότητα του RNA που προστίθεται, υπολογίζεται από τις τιμές ng/ $\mu$ L που βρέθηκαν κατά την μέτρηση των δειγμάτων σε φασματοφωτόμετρο μικροόγκων. Αρχικά γίνεται επώαση του μίγματος στους 37°C για 50 λεπτά. Στην συνέχεια προστίθεται 1  $\mu$ L EDTA και επωάζεται εκ νέου για 10 λεπτά στους 65°C. Το πρόγραμμα των διαδοχικών αυτών θερμοκρασιών στοχεύει στο να εξασφαλιστούν οι καλύτερες συνθήκες για να δράσει το ένζυμο της DNAase ( 37°C ).

Αφού ολοκληρωθεί αυτή η προετοιμασία πραγματοποιείται μια αλυσιδωτή αντίδραση πολυμεράσης (PCR) με σκοπό να ελεγχθεί αν η απομάκρυνση του DNA από τα δείγματα ήταν αποτελεσματική. Σε αντίθετη περίπτωση, η διαδικασία επαναλαμβάνεται μόνο για τα δείγματα στα οποία υπάρχει ακόμη ποσότητα DNA.

## 2.8. Αλυσιδωτή Αντίδραση Πολυμεράσης PCR

Η αλυσιδωτή αντίδραση πολυμεράσης χρησιμοποιείται για την ενίσχυση αλληλουχιών DNA με εκμαγείο το ίδιο το DNA. Ο πολυμερισμός των κλώνων γίνεται με την υβριδοποίηση ειδικά σχεδιασμένων εκκινητών, οι οποίοι καθορίζουν τα άκρα του τμήματος DNA που πρόκειται να ενισχυθεί. Η αντίδραση περιλαμβάνει μία σειρά αποδιατάξεων και υβριδοποιήσεων που πραγματοποιούνται λόγω θερμοκρασιακών μεταβολών. Οι συνθήκες της αντίδρασης προσαρμόζονται κάθε φορά στις απαιτήσεις του πειράματος. Αρχικά, η ποσότητα του γενωμικού DNA που προστίθεται εξαρτάται από την συγκέντρωση αυτού και καθορίζεται βάσει των οδηγιών της εταιρίας του ενζύμου της πολυμεράσης που χρησιμοποιείται. Επίσης, η θερμοκρασία αποδιάταξης των κλώνων εξαρτάται από το %κυτοσίνης-γουανίνης G-C που υπάρχουν στο τμήμα DNA που πρόκειται να ενισχυθεί. Το ίδιο ισχύει και για τη θερμοκρασία υβριδοποίησης των εκκινητών. Αυτή εξαρτάται από τη θερμοκρασία τήξεως τους, δηλαδή τη θερμοκρασία όπου το 50% των μορίων

DNA βρίσκονται σε μονόκλωνη μορφή. Τέλος, το στάδιο της τελικής επιμήκυνσης πραγματοποιείται, έτσι ώστε η πολυμεράση να ενισχύσει εναπομείναντες κλώνους. Οι εκκινητές που χρησιμοποιήθηκαν υβριδίζουν στο ενδογενές γονίδιο της ουβικιτίνης του φυτού.

Πίνακας 3: Αντίδραση PCR

Εκμαγείο	1 $\mu$ L
10x buffer	2 $\mu$ L
dNTPs (10mM)	0,4 $\mu$ L
LiUbiF (10 $\mu$ M)	0,8 $\mu$ L
LiUbiR (10 $\mu$ M)	0,8 $\mu$ L
Taq πολυμεράση (5U/ $\mu$ L)	0,08 $\mu$ L
Νερό	14,92 $\mu$ L
Συνολικός όγκος	20 $\mu$ L

Πίνακας 4: Πρόγραμμα αντίδρασης

	Χρόνος	Θερμοκρασία
Αρχική αποδιάταξη	5min	95 °C x1 κύκλος
Αποδιάταξη	30sec	95 °C x 39 κύκλοι
Υβριδοποίηση	30sec	55 °C x 39 κύκλοι
Επιμήκυνση	10sec	72 °C x 39 κύκλοι
Τελική επιμήκυνση	4min	72 °C x 1 κύκλος
Διατήρηση	+∞	4 °C

Τέλος για να γίνει έλεγχος πραγματοποιείται ηλεκτροφόρηση των προϊόντων της αντίδρασης σε πήκτωμα αγαρόζης και έλεγχος με ύπαρξη θετικού και αρνητικού μάρτυρα. Ως θετικός μάρτυρας χρησιμοποιείται γονιδιωματικό DNA απομονωμένο από φύλλα του φυτού *Lotus japonicus*.

## 2.9. Σύνθεση συμπληρωματικού DNA (cDNA)

Αφού το DNA έχει απομακρυνθεί απ όλα τα δείγματα RNA ακολουθεί η δημιουργία συμπληρωματικού DNA χρησιμοποιώντας το RNA ως μήτρα για την σύνθεση του νέου μορίου. Δείγμα από την αντίδραση DNάσης λαμβάνεται σε ποσότητα 250-300ng. Στην συνέχεια προστίθενται 1μL oligodT (2μL), 1μL miR2111-stemloop εκκινητή (0.5μM), 1μL miR171c-stemloop εκκινητή (0.5μM) (Πίνακας 7) και τέλος ddH<sub>2</sub>O μέχρι τον τελικό όγκο της αντίδρασης, που είναι 17μL. Αυτό αποτελεί το πρώτο στάδιο της αντίδρασης το οποίο ολοκληρώνεται με την επώαση του μίγματος για 5 λεπτά στους 70 βαθμούς Κελσίου.

Το δεύτερο και τελευταίο στάδιο περιλαμβάνει την προσθήκη των υλικών του παρακάτω πίνακα

Πίνακας 5: Μίγμα Β' σταδίου

5x buffer Invitrogen	5 μL
dNTPs (10 nm)	1.5 μL
RNAase OUT (40U/ μL)	0,5 μL
Superscript II Invitrogen (200U/μL)	1 μL
Τελικός όγκος	25 μl

Στην συνέχεια γίνεται ήπια ανάμιξη του μίγματος και του αρχικού δείγματος και το μίγμα τους υπόκειται την αντίδραση της οποίας το πρόγραμμα φαίνεται στον παρακάτω πίνακα.

Πίνακας 6: Πρόγραμμα RT PCR

ΧΡΟΝΟΣ	ΘΕΡΜΟΚΡΑΣΙΑ
30min	16 x 1 κύκλος
30sec	30 x 59 κύκλοι
30sec	42 x 59 κύκλοι
1sec	50 x 59 κύκλοι
5min	85 x 1 κύκλος
∞	4

## **2.10. Αλυσιδωτή αντίδραση πολυμεράσης πραγματικού χρόνου (real time PCR )**

Η αλυσιδωτή αντίδραση πολυμεράσης πραγματικού χρόνου (Real-Time PCR) ή ποσοτική αλυσιδωτή αντίδραση πολυμεράσης (qPCR) είναι μια αρκετά ευαίσθητη τεχνική με την οποία ενισχύονται τμήματα του DNA και βασίζεται στην PCR. Η qPCR πλεονεκτεί έναντι της συμβατικής PCR στην πραγματοποίηση ποσοτικού προσδιορισμού των αντιγράφων του DNA της αντίδρασης καθ' όλη τη διάρκεια της με την παρακολούθηση της αύξησης φθορίζοντος σήματος εκπομπής από κάποια χρωστική. Τα προϊόντα της αντίδρασης αυξάνονται εκθετικά σε κάθε κύκλο. Στην παρούσα έρευνα χρησιμοποιήθηκε το μίγμα χρωστικής SYBR Green της Kapa. Η SYBR Green προσδένεται ασθενώς σε μονόκλινα τμήματα DNA, ενώ παρατηρείται ισχυρή πρόσδεση σε δίκλινα μόρια DNA. Η χρωστική φθορίζει στο πράσινο φάσμα (520nm) και η ανίχνευση του φθορίζοντος σήματος εκπομπής γίνεται με τη χρήση δέσμης laser. Ακόμη, η ένταση του φθορισμού είναι ανάλογη της ποσότητας του προϊόντος της αντίδρασης. Η μέτρηση του φθορισμού πραγματοποιείται κατά την εκθετική φάση της καμπύλης (log phase), κατά την οποία ενισχύονται τα τμήματα DNA μετά την υβριδοποίηση των εκκινητών. Επίσης, η παρουσία διμερών και παραπροϊόντων ανιχνεύεται με την κατασκευή μιας καμπύλης τήξης (melting curve), η οποία στηρίζεται στην απώλεια φθορισμού λόγω της θερμοεπαγώμενης αποδιάταξης των κλώνων DNA που ενισχύθηκαν. Η qPCR για τον ακριβή ποσοτικό προσδιορισμό του προϊόντος της αντίδρασης συνδέει τον αρχικό αριθμό των αντιγράφων του δείγματος (DNA) με τον πρώτο κύκλο της αντίδρασης, όπου το προϊόν της αντίδρασης είναι ανιχνεύσιμο (threshold cycle- Ct). Αυτό το κατώφλι (threshold) ορίζεται από το μηχάνημα της qPCR και στο Ct ο ανιχνεύσιμος φθορισμός του προϊόντος το έχει ξεπεράσει.

Η διαδικασία που ακολουθείται είναι η εξής. Τα cDNA-στόχοι ενισχύονται με εξειδικευμένους εκκινητές. Η αντίδραση PCR περιλάμβανε το μίγμα της SYBR Green (Kapa), τους εξειδικευμένους εκκινητές σε τελική συγκέντρωση 0.2μM ο καθένας και 1μl της μήτρας cDNA. Στην συνέχεια, οι αντιδράσεις του ποσοτικού RT-PCR πραγματοποιούνται στο μηχάνημα CPX Connect Real-Time System . Το πρόγραμμα της αντίδρασης περιλάμβανε 5 λεπτά

επώασης στους 95<sup>0</sup>C και ακολούθησαν 40 κύκλοι με 95<sup>0</sup>C για 15 δευτερόλεπτα, 60<sup>0</sup>C για 15 δευτερόλεπτα και 72<sup>0</sup>C για 10 δευτερόλεπτα. Η εξειδίκευση των εκκινητών και ο σχηματισμός διμερών των εκκινητών ελέγχθηκε για κάθε ζεύγος χωριστά από την ανάλυση της καμπύλης αποδιάταξης στο τέλος της αντίδρασης. Τα επίπεδα έκφρασης των γονιδίων του *L. jaronicus* που κωδικοποιούν για ATP και PP2 (Πίνακας 7) χρησιμοποιήθηκαν ως εσωτερικός έλεγχος για να γίνει κανονικοποίηση στις μικρές διαφορές που παρουσιαζόταν στις ποσότητες του cDNA. Τα επίπεδα έκφρασης του κάθε γονιδίου (X) υπολογίστηκαν σε αναλογία προς τα επίπεδα έκφρασης των γονιδίων αναφοράς (A). Τα σχετικά επίπεδα έκφρασης υπολογίστηκαν από τον τύπο (1+E)<sup>-ΔCt</sup>, όπου ΔCt είναι η διαφορά Ct X -Ct A και E είναι η αποδοτικότητα της αντίδρασης PCR. Η αποδοτικότητα της αντίδρασης PCR (E) για κάθε γονίδιο υπολογίστηκε από την γραμμική συνάρτηση του λογαρίθμου της απορρόφησης ανά κύκλο αντίδρασης, χρησιμοποιώντας το λογισμικό LinRegPCR (Ramakers et al., 2003). Όλες οι αντιδράσεις qPCR πραγματικού χρόνου πραγματοποιήθηκαν σε 4 βιολογικές επαναλήψεις.

Πίνακας 7: Αλληλουχίες εκκινητών που χρησιμοποιήθηκαν στην παρούσα εργασία

Γονίδια	Πρόσθιος εκκινητής	Οπίσθιος εκκινητής
<u>LjATPs</u>	CAATGTCGCCAAGGCCCA TGGTG	AACACCACTCTCGATCATTCT CTG
<u>LjPP2a</u>	GTAATGCGT CTAAAGATAGGGTCC	ACTAGACTGTAGTGCTTGAGAG GC
NSP2	GGAGGAGCTGGGTAGTAATAAG	GAGATCTGAAGCGATTTAACAG C
NSP3	GAAGTGGAGAGGAAGATGAGGA	TCCTCCACCCTATACCCATCAT
miR171c	ggtgcTGAGCCGAATCAATATC	
universal	AGTGCAGGGTCCGAGGTATTC	
miR171c RT stemloop	GTCGTATCCAGTGCAGGGTCCG AGGTATTCGCACTGGATACGAC GAGTGA	

# Κεφάλαιο 3ο

---

## 3. Αποτελέσματα

### 3.1. Έλεγχος του αποικισμού φυτών αγρίου τύπου και μεταλλαγμάτων *nsp2*, *miR171cOX* και *miR171cKO* με ενδομυκορριζικό μύκητα.

Σκοπός του πειράματος ήταν να μελετηθεί η εμπλοκή των *miR171c* και *NSP2* στον αποικισμό των ριζών από τον ενδομυκορριζικό μύκητα *Rhizorhagus irregularis*. Για το σκοπό αυτό, μελετήθηκαν φυτικά μεταλλάγματα υπερέκφρασης ή καταστολής των *miR171c* και *NSP2*. Τα μεταλλάγματα που χρησιμοποιήθηκαν ήταν :

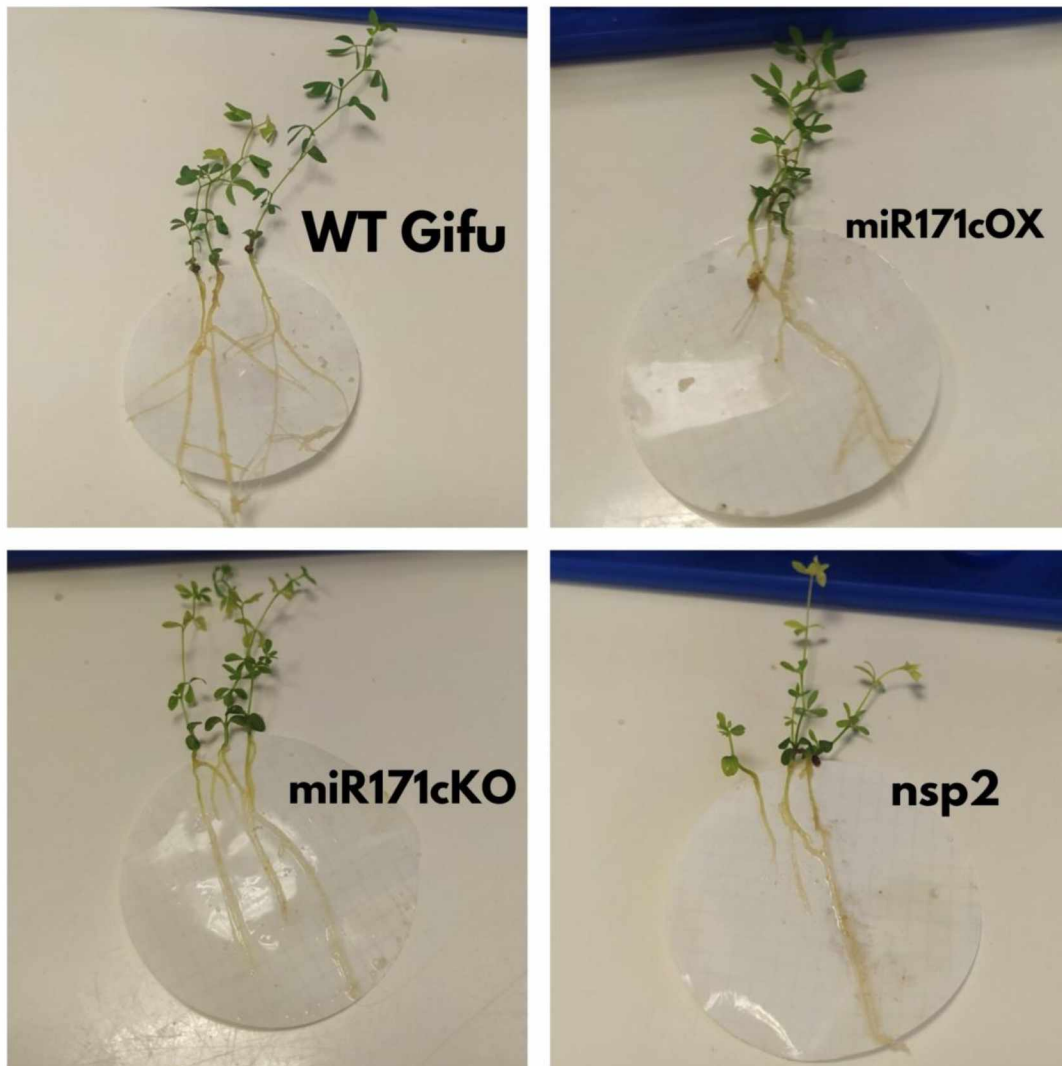
- *miR171c* σε υπερέκφραση (*miR171c OX*) (overexpression=*OX*)
- *miR171c* σε καταστολή (*miR171c KO*) (knockout=*KO*)
- *NSP2* αποσιωπημένο (*nsp2*)

Πραγματοποιήθηκε εμβολιασμός όλων των φυτών με τον ενδομυκορριζικό μύκητα *Rhizorhagus irregularis*. Νεαρά σπορόφυτα 10 ημερών μεταφέρθηκαν σε δοχεία magenta όπου και παρέμειναν καθ' όλη την διάρκεια του πειράματος. Συνολικά χρησιμοποιήθηκαν 20 διπλά δοχεία magentas (5 magentas με φυτά αγρίου τύπου, 5 με magentas με φυτά του μεταλλάγματος *miR171cOX*, 5 magentas με φυτά του μεταλλάγματος *miR171cKO* και 5 magentas με φυτά του μεταλλάγματος *nsp2*) που το καθένα περιείχε 3 φυτά *L. japonicus*.

Η συγκομιδή των φυτών έγινε 5 εβδομάδες μετά τον εμβολιασμό με τον ενδομυκορριζικό μύκητα οπότε λήφθηκαν οι ρίζες τους, χρωματιστήκαν, ακολούθησε παρατήρηση στο μικροσκόπιο και υπολογίστηκε το ποσοστό αποικισμού των ριζών από τον ΔΕΜ με τις διαδικασίες που αναφέρονται στις υποενότητες 2.4. και 2.5. του κεφαλαίου ΥΛΙΚΑ-ΜΕΘΟΔΟΙ.

Όπως φαίνεται στην εικόνα 2, η ανάπτυξη των φυτών των μεταλλαγμάτων είναι περιορισμένη σε σχέση με τα φυτά αγρίου τύπου. Τα φυτά του μεταλλάγματος *miR171cOX* παρουσιάζουν την μεγαλύτερη ριζική και

βλαστική ανάπτυξη σε σχέση με τα υπόλοιπα μεταλλάγματα και ακολουθούν κατά σειρά το *miR171cKO* και το *nsp2*.

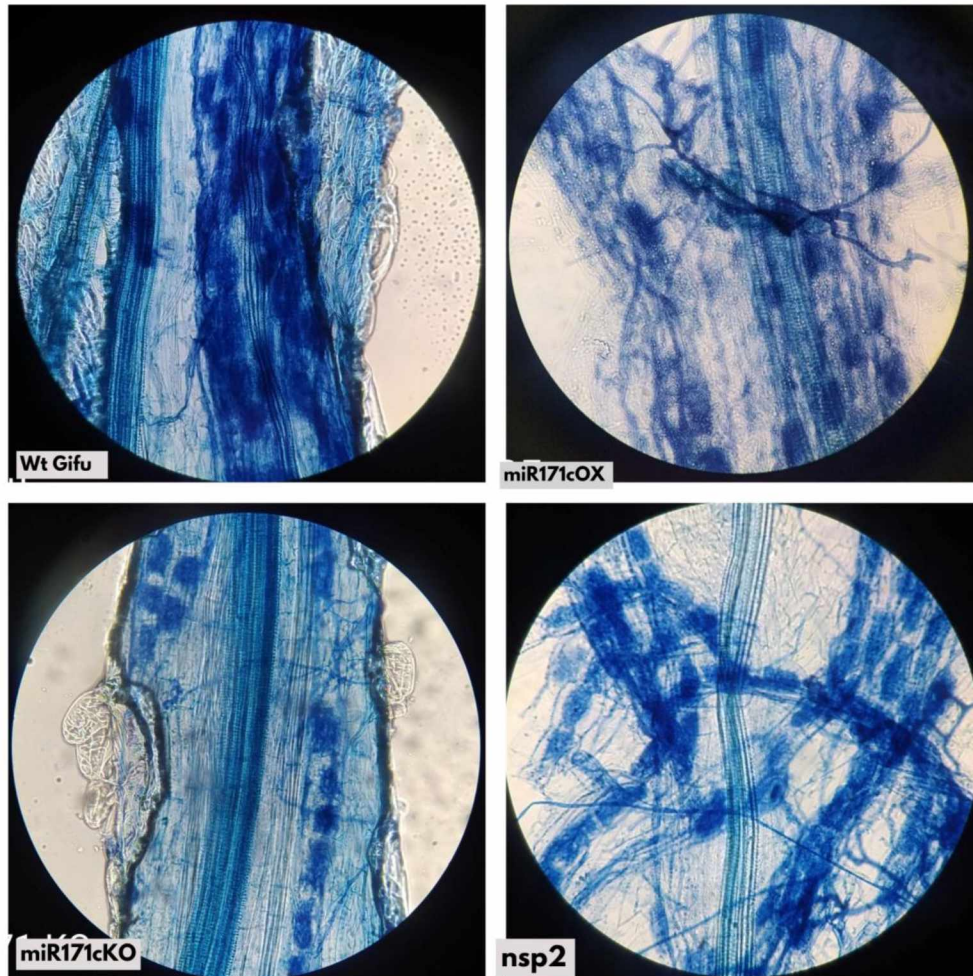


Εικόνα 2: βλαστική και ριζική ανάπτυξη των φυτών αγρίου τύπου και των μεταλλαγμάτων

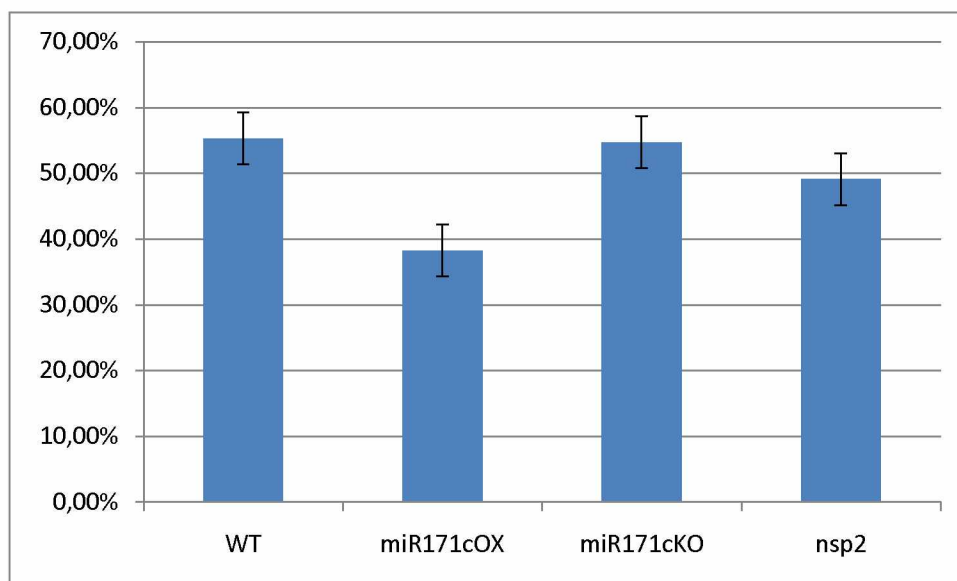
Στην Εικόνα 3 παρουσιάζονται ρίζες αποικισμένες από τον ΔΕΜ όπου φαίνονται οι χαρακτηριστικές δομές που σχηματίζει ο ΔΕΜ όταν αποικίζει τα φυτά.



Εικόνα 3: Βαμμένες ρίζες από φυτά *L. japonicus*, 5 εβδομάδες μετά τον εμφολιασμό με *R. irregularis* (στέλεχος DAOM), όπου φαίνονται οι χαρακτηριστικές δομές του μύκητα (έντονο μπλε χρώμα) με τη βοήθεια οπτικού μικροσκοπίου.



Οι μέσοι όροι από τα ποσοστά αποικισμού των ριζών από τον ενδομυκορριζικό μύκητα φαίνονται στον Πίνακα 8 και στο Γράφημα 1.



Γράφημα 1: ποσοστά αποικισμού από τον ΔΕΜ σε φυτά WT Gifu, miR171cOX, miR171cKO και nsp2 μετά το πέρας 5 εβδομάδων μετά τον εμβολιασμό των φυτών με τον ΔΕΜ.

Πίνακας 8. Μέσοι όροι (από 5 βιολογικές επαναλήψεις) των ποσοστών αποικισμού των φυτών από τον ΔΕΜ

	Ποσοστό αποικισμού %
WT Gifu	55,32
miR171cOX	38,23
mirR171cKO	54,73
nsp2	49,1

Είναι εμφανές ότι ο αποικισμός των ριζών στα φυτά του αγρίου τύπου και στα φυτά του μεταλλάγματος miR171cKO είναι ο πιο αυξημένος ενώ τα φυτά του μεταλλάγματος miR171cOX παρουσιάζουν το μικρότερο ποσοστό αποικισμού. Συγκεκριμένα, στα φυτά αγρίου τύπου, στο μετάλλαγμα miR171cKO και το μετάλλαγμα nsp2 τα ποσοστά αποικισμού ήταν κοντά στο 50%. Αντιθέτως, ο αποικισμός στα φυτά που υπερσυσώρευαν το miR171 ήταν αισθητά μειωμένος στο 38,23%. Η τάση αυτή ίσως δείχνει ότι η υπερσυσώρευση του miR171c έχει αρνητική επίπτωση στον αποικισμό των φυτών από τον ενδομυκορριζικό μύκητα, παρόλα αυτά, η στατιστική ανάλυση δεν εντόπισε στατιστικώς σημαντικές διαφορές μεταξύ των διαφορετικών συνθηκών.

### **3.2. Διερεύνηση των επιπέδων συσσώρευσης του μικρού RNA miR171c και των μεταγράφων του γονιδίου στόχου του μετά των εμβολιασμό φυτών με τον ενδομυκορριζικό μύκητα**

Για να μελετηθεί η απόκριση του μικρού RNA miR171c και των γονιδίων *NSP2* και *NSP3* κατά τον αποικισμό των φυτών από ενδομυκορριζικούς μύκητες έγινε σύγκριση των επιπέδων έκφρασης αυτών μεταξύ μη εμβολιασμένων και εμβολιασμένων με ΔΕΜ φυτών. Τα αγρίου τύπου φυτά (GIFU) που χρησιμοποιήθηκαν εμβολιάστηκαν με τον ενδομυκορριζικό μύκητα *Rhizophagus irregularis* (στέλεχος DAOM). Τα σπορόφυτα *Lotus japonicus* GIFU, ηλικίας 10 ημερών μεταφέρθηκαν σε δοχεία magentas και εμβολιάστηκαν με τον ΔΕΜ. Το πείραμα αυτό περιλαμβάνει 2 συνθήκες:

- φυτά αγρίου τύπου εμβολιασμένα με ενδομυκορριζικό μύκητα
- φυτά αγρίου τύπου μη εμβολιασμένα

Το πείραμα περιλάμβανε συνολικά 12 διπλά δοχεία magentas, άρα 6 βιολογικές επαναλήψεις για την κάθε συνθήκη. Πέντε εβδομάδες μετά τον εμβολιασμό με τον ενδομυκορριζικό μύκητα, τα φυτά συγκομίσθηκαν, αποχωρίστηκε το υπέργειο τμήμα τους από τις ρίζες και οι ρίζες αποθηκεύτηκαν στους -80°C μέχρι να χρησιμοποιηθούν.

Ακολούθησε η απομόνωση του RNA από τις ρίζες των φυτών ώστε να ελεγχθεί η απόκριση του μικρού RNA miR171c και των γονιδίων *NSP2*, *NSP3* με τη βοήθεια της αντίδρασης ποσοτικής PCR πραγματικού χρόνου (qPCR). Αρχικά οι ρίζες λειοτριβήθηκαν και το RNA εκχυλίστηκε. Στην συνέχεια, απομακρύνθηκε το DNA με τη χρήση DNάσης, έγινε η σύνθεση του cDNA και τέλος η αντίδραση PCR πραγματικού χρόνου (qPCR). Τα πρωτόκολλα των μεθόδων περιεγράφηκαν αναλυτικά στο κεφάλαιο «Υλικά και Μέθοδοι». Οι συγκεντρώσεις των δειγμάτων RNA προσδιορίστηκαν με το φασματοφωτόμετρο μικρών όγκων και τα αποτελέσματα τους φαίνονται στον παρακάτω πίνακα.

Πίνακας 9: Συγκεντρωτικός πίνακας ενδείξεων ποσοτήτων και καθαρότητας δειγμάτων από το φασματοφωτόμετρο μικρών όγκων

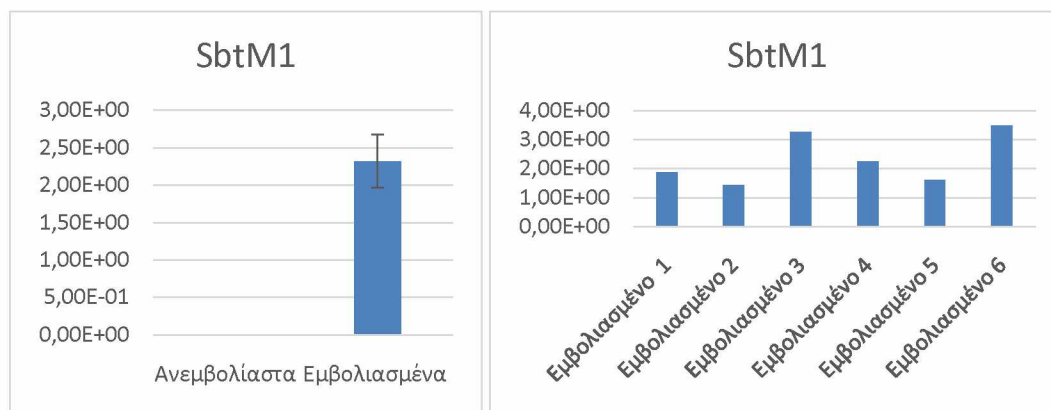
Κωδικός δείγματος	Ποσότητα δείγματος	A <sub>260/280</sub>
Μη εμβολιασμένο -1	259,6 ng/μl	1,83
Μη εμβολιασμένο -2	178,8 ng/μl	1,74
Μη εμβολιασμένο -3	265,7 ng/μl	1,79
Μη εμβολιασμένο -4	170,2 ng/μl	1,89
Μη εμβολιασμένο -5	340,4 ng/μl	1,73
Μη εμβολιασμένο -6	196,5 ng/μl	1,84
Εμβολιασμένο -1	198 ng/μl	1,87
Εμβολιασμένο -2	357,4 ng/μl	1,97
Εμβολιασμένο -3	293,5 ng/μl	1,68
Εμβολιασμένο -4	442,6 ng/μl	1,77
Εμβολιασμένο -5	398 ng/μl	1,81
Εμβολιασμένο -6	109,9 ng/μl	1,75

Βάσει των συγκεντρώσεων υπολογίστηκε η ποσότητα RNA από κάθε δείγμα που χρειάστηκε για την αντίδραση της DNάσης. Στη συνέχεια για τον έλεγχο της επιτυχούς απομάκρυνσης του DNA από τα δείγματα ύστερα από τη δράση της DNάσης, πραγματοποιήθηκε αντίδραση PCR με εκκινητές για το ενδογενές γονίδιο της ουβικουΐνης. Έπειτα τα δείγματα ηλεκτροφορήθηκαν σε πήκτωμα αγαρόζης και επιβεβαιώθηκε η απομάκρυνση του DNA από αυτά. Στη συνέχεια, πραγματοποιήθηκε αντίδραση ποσοτικής PCR πραγματικού χρόνου (qPCR) για την κανονικοποίηση των δειγμάτων cDNA, όπου χρησιμοποιήθηκε το γονίδιο αναφοράς *ATP*.

Στη συνέχεια πραγματοποιήθηκαν αντιδράσεις qPCR για τα γονίδια που μας ενδιαφέρουν καθώς και για δύο σταθερά εκφραζόμενα γονίδια, τα *ATP* και *PP2*. Για να επιβεβαιωθεί ο επιτυχής αποικισμός των φυτών από τον ενδομυκορριζικό μύκητα και η επιτυχία της ανάπτυξης της συμβιωτικής σχέσης, χρησιμοποιήθηκε ειδικό γονίδιο μάρτυρας (marker gene) του οποίου η έκφραση αυξάνεται στα αρχικά στάδια του αποικισμού. Το γονίδιο αυτό είναι το *SbtM1* το οποίο κωδικοποιεί για μια πρωτεάση του φυτού, εντοπίζεται σε περιοχές γύρω από τον μύκητα (κυρίως στον περιδενδροειδή χώρο) και η

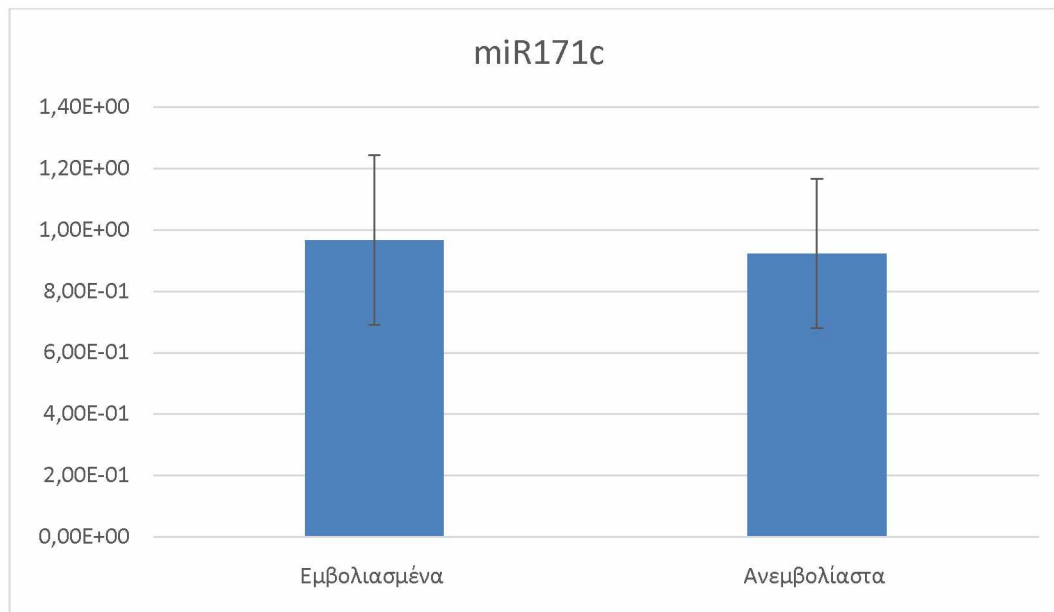
έκφραση του αρχίζει να αυξάνεται 3 μέρες μετά τον εμβολιασμό με ενδομυκορριζικό μύκητα (35).

Τα αποτελέσματα από την qPCR παρουσιάζονται στα γραφήματα 1 και 2.

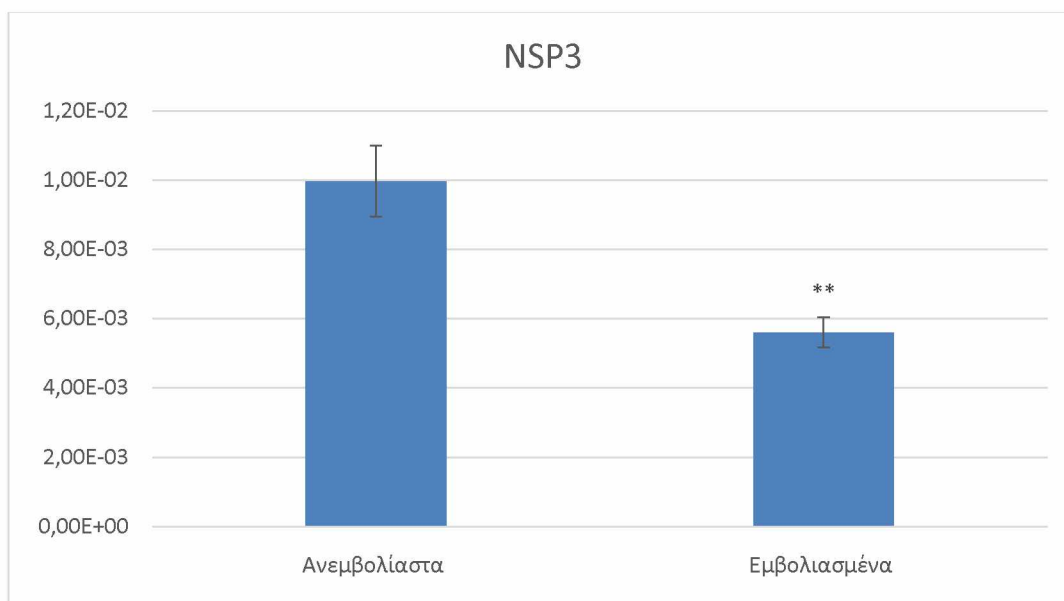


Γράφημα 2 και 3: Μέσος όρος των επιπέδων έκφρασης του γονιδίου-μάρτυρα *SbtM1* σε εμβολιασμένα και μη-εμβολιασμένα φυτά (αριστερά). Τα επίπεδα έκφρασης του *SbtM1* αναλυτικά στα διαφορετικά δείγματα των εμβολιασμών φυτών (δεξιά).

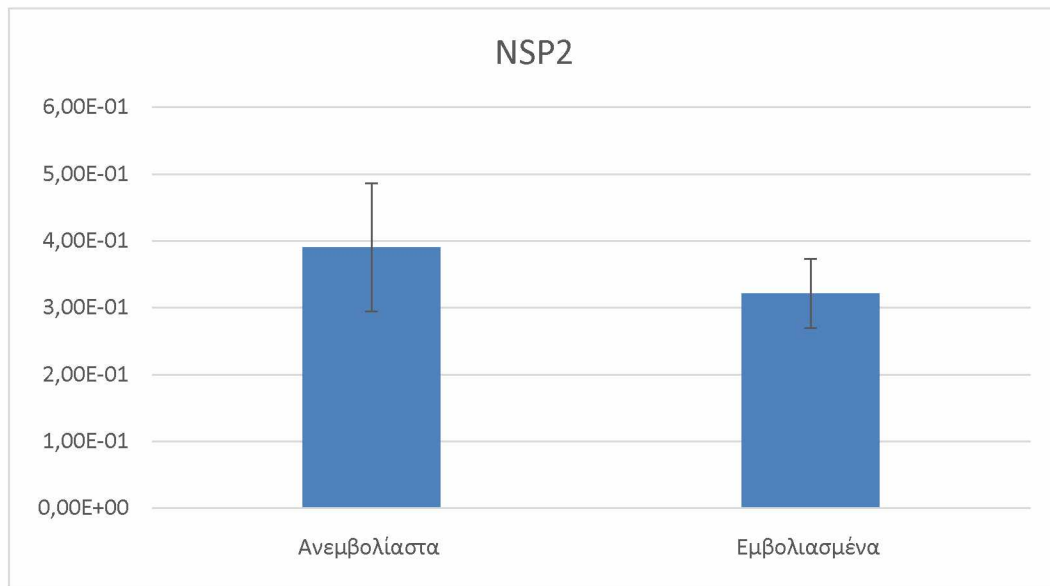
Σύμφωνα με τα παραπάνω αποτελέσματα, εντοπίζεται πως όλα τα εμβολιασμένα φυτά έχουν αποικιστεί επαρκώς. Αυτό γίνεται αντιληπτό μετά την παρατήρηση των γραφημάτων 1 και 2 όπου το γονίδιο *SbtM1* έχει εκφραστεί στα εμβολιασμένα φυτά όπως ήταν αναμενόμενο. Εφόσον επιβεβαιώθηκε ο επιτυχής αποικισμός των εμβολιασμένων φυτών από τον ΔΕΜ, ακολούθησαν οι αντιδράσεις qPCR για τα *miR171c* (Γράφημα 3), *NSP2* (Γράφημα 3) και *NSP3* (Γράφημα 4).



Γράφημα 4: Σύγκριση των επιπέδων συσσώρευσης του μικρού miR171c σε φυτά μη-εμβολιασμένα και εμβολιασμένα με τον μύκητα *R. irregularis*.



Γράφημα 5: Σύγκριση των επιπέδων έκφρασης του γονιδίου *NSP3* σε φυτά μη-εμβολιασμένα και εμβολιασμένα με τον μύκητα *R. irregularis*. (η στατιστική ανάλυση έγινε με *t*-test, \*\* $P < 0,01$ )



Γράφημα 6: Σύγκριση των επιπέδων έκφρασης του γονιδίου *NSP2* σε φυτά μη-εμβολιασμένα και εμβολιασμένα με τον μύκητα *R. irregularis*.

Στα παραπάνω γραφήματα, παρατηρείται πως τα επίπεδα των *NSP2* και *miR171c* δεν επηρεάζονται από τον εμβολιασμό. Αντιθέτως, τα επίπεδα έκφρασης του γονιδίου *NSP3* φάνηκε να επηρεάζονται σημαντικά από την παρουσία του μύκητα στις ρίζες των φυτών, και συγκεκριμένα παρατηρήθηκε μείωση των επιπέδων του *NSP3* στα εμβολιασμένα με ΔΕΜ φυτά.



# Κεφάλαιο 4ο

---

## 4. Συμπεράσματα-Συζήτηση

Με τα σημερινά δεδομένα στην γεωργία κρίνεται απαραίτητη όσο ποτέ η αξιοποίηση των συμβιωτικών σχέσεων μεταξύ φυτών και μικροοργανισμών. Αυτή η ανάγκη προέκυψε από το γεγονός πως η φυτική παραγωγή σήμερα όπως την ξέραμε, με εντατικές καλλιέργειες και αλόγιστη χρήση λιπασμάτων και φυτοφαρμάκων, έχει δείξει πως είναι μη βιώσιμη. Όλο και περισσότερα εδάφη κοπώνονται και έχουν αποθησαυρωθεί από παλαιότερες χρήσεις, η βιοποικιλότητα έχει μειωθεί, η ρύπανση του περιβάλλοντος έχει αλλάξει τα δεδομένα και το υπέρογκο κόστος αγοράς των εισροών αποτελούν μόνο λιγιστούς από τους λόγους που η γεωργία σήμερα ακολουθεί πτωτική τάση. Όλα αυτά σε συνδυασμό με την ταχεία αύξηση του πληθυσμού και τις επισιτιστικές κρίσεις προ των πυλών κρούουν το κώδωνα του κινδύνου και επιτάσσουν να γίνει μια ριζική αλλαγή στο τρόπο καλλιέργειας και παραγωγής. Μια ελπιδοφόρα λύση θα ήταν η χρήση μικροβιακών σκευασμάτων που θα αντικαθιστούν τα συνθετικά, θα είναι φθηνότερα και πιο φιλικά προς το περιβάλλον. Η επιστημονική κοινότητα αυτή την στιγμή «έχει στρέψει το βλέμμα της προς την μελέτη των συμβιωτικών σχέσεων φυτών-μικροοργανισμών με σκοπό να τις μελετήσουν, να αντιληφθούν τον πλήρη τρόπο λειτουργίας και προσφορά τους και αργότερα να μπορέσουν να τις χρησιμοποιήσουν για να παράξουν σκευάσματα. Αρχικά θα πρέπει να μελετηθούν εκτενέστερα οι βασικοί μοριακοί παράγοντες που εμπλέκονται στην εγκαθίδρυση των συμβιωτικών σχέσεων και συγκεκριμένα ο τελικός στόχος που είναι ο εντοπισμός και ο σχεδιασμός συνδυασμών φυτών και συμβιωτικών μικροοργανισμών.

Οι δύο περισσότερο μελετημένες συμβιωτικές σχέσεις των φυτών είναι αυτή μεταξύ ψυχανθών και ριζοβίων, και μεταξύ φυτών και δενδρόμορφων ενδομυκορριζικών μυκήτων (ΔΕΜ). Η συμβίωση με αζωτοδεσμευτικά ριζόβια προσφέρει άζωτο στα ψυχανθή, ενώ η συμβίωση με ΔΕΜ προσφέρει στο φυτό πρόσβαση σε απαραίτητα θρεπτικά στοιχεία όπως ο φώσφορος, αλλά επίσης, προσφέρει σε αυτό αντοχή σε βιοτικές και αβιοτικές καταπονήσεις.



Μελέτες που έχουν γίνει σε ψυχανθή φυτά-μοντέλα, έδειξαν πως το μικρό RNA miR171 εμπλέκεται τόσο στη συμβιωτική σχέση των φυτών με ριζόβια, όσο και στη συμβιωτική σχέση με ΔΕΜ (46) (47) (48). Η εμπλοκή του miR171 στις συμβιωτικές σχέσεις συμβαίνει μέσω της ρύθμισης του γονιδίου στόχου του *NSP2* (46). Μέχρι στιγμής, έχει μελετηθεί η εμπλοκή του miR171 στη μόλυνση των φυτών από ριζόβια και στη φυματογένεση τόσο στο *L. japonicus* (48) όσο και στο *M. truncatula* (47), αλλά η εμπλοκή του στη σχέση με ΔΕΜ έχει μελετηθεί μόνο στο *M. truncatula* (46) (47). Σκοπός της παρούσας εργασίας ήταν να ελεγχθεί εάν το ζεύγος miR171c-NSP2 έχει κάποιον ρόλο στον αποικισμό των φυτών *L. japonicus* από τον ενδομυκορριζικό μύκητα *R. irregularis*.

Για το σκοπό αυτό, αρχικά πραγματοποιήθηκαν πειράματα αποικισμού από ενδομυκορριζικό μύκητα σε φυτικά μεταλλάγματα υπερσυσσώρευσης (miR171cOE) ή καταστολής (miR171cKO) του miR171c καθώς και ένα μετάλλαγμα αποσιώπησης του *NSP2* (*nsp2*). Φυτά *L. japonicus* αγρίου τύπου και των μεταλλαγμάτων εμβολιάστηκαν με τον μύκητα *R. irregularis* και πραγματοποιήθηκαν δειγματοληψίες 5 εβδομάδες μετά τον εμβολιασμό. Τα δείγματα ριζών που συλλέχθηκαν, βάφτηκαν και καθορίστηκε το ποσοστό αποικισμού τους με την βοήθεια του οπτικού μικροσκοπίου. Σε σύγκριση με τα φυτά αγρίου τύπου, παρατηρήθηκε μια τάση μείωσης στα επίπεδα αποικισμού στα φυτά των μεταλλαγμάτων miR171cOE και *nsp2* (Γράφημα 4). Όταν το miR171c υπερεκφράζεται, αναμένεται να καταστέλλει ισχυρά το *NSP2* (49), και αυτή η καταστολή φαίνεται να ρυθμίζει αρνητικά τον αποικισμό των φυτών από ΔΕΜ. Το συμπέρασμα αυτό ενισχύεται από την παρατήρηση ότι και στο μετάλλαγμα *nsp2*, η καταστολή του γονιδίου *NSP2* επίσης επέφερε μειωμένα επίπεδα αποικισμού σε σχέση με τα φυτά αγρίου τύπου (Γράφημα 4). Παρόλα αυτά, στις συνθήκες του πειράματός μας οι διαφορές αυτές δεν βρέθηκε να είναι στατιστικώς σημαντικές. Παρόμοιες παρατηρήσεις έγιναν και στο φυτό *M. truncatula*, καθώς αναφέρεται ότι ένα μετάλλαγμα υπερσυσσώρευσης του miR171 και ένα μετάλλαγμα *nsp2* παρουσίασαν μειωμένα επίπεδα αποικισμού από τον ΔΕΜ, σε σχέση με τα φυτά αγρίου τύπου (36). Είναι λοιπόν πιθανό πως το miR171 ρυθμίζει αρνητικά τον αποικισμό των φυτών από ΔΕΜ.

Στη συνέχεια, μελετήσαμε αν υπάρχουν διαφορές στα επίπεδα συσσώρευσης του miR171 και των *NSP2* μεταγραφών ανάμεσα σε εμβολιασμένα και μη-εμβολιασμένα φυτά. Φυτά *L. jaronicus* εμβολιάστηκαν με τον μύκητα *R. irregularis* και πραγματοποιήθηκαν δειγματοληψίες 4 εβδομάδες μετά τον εμβολιασμό. Τα επίπεδα των miR171 και *NSP2* και υπολογίστηκαν σε δείγματα ριζών με τη μέθοδο της ποσοτικής PCR πραγματικού χρόνου. Τέσσερις εβδομάδες μετά τον εμβολιασμό, τα επίπεδα miR171 σε εμβολιασμένα και μη φυτά δεν άλλαξαν ριζικά. Παρατηρήθηκε μια πολύ μικρή πτώση του miR171c στα ανεμβολίαστα απ ότι στα εμβολιασμένα φυτά αλλά δεν είναι στατιστικώς σημαντική (Γράφημα 4). Όσον αφορά τα επίπεδα του *NSP2*, ούτε και σε αυτά παρατηρήθηκε κάποια αξιόλογη μεταβολή (Γράφημα 6). Τα αποτελέσματα αυτά δεν ταυτίζονται με τα αντίστοιχα αποτελέσματα που παρουσιάζονται στην βιβλιογραφία για το φυτό *M. truncatula*. Συγκεκριμένα, στο *Medicago truncatula* τα επίπεδα του miR171 αυξάνονται, και αντίστοιχα τα επίπεδα του *NSP2* μειώνονται, σε εμβολιασμένα με ΔΕΜ φυτά, σε σχέση με μη-εμβολιασμένα φυτά (47) (49). Ίσως λοιπόν, η απόκριση των miR171c και *NSP2* είναι διαφορετική στα δύο φυτά. Στην ανάλυση qPCR, ελέγξαμε και τα επίπεδα του γονιδίου *NSP3* που είναι αρκετά όμοιο με το *NSP2* και υπάρχουν υποψίες ότι μπορεί να αποτελεί στόχο του miR171c στο *L. jaronicus*. Τα αποτελέσματα έδειξαν πως το γονίδιο *NSP3* παρουσίασε σημαντική μείωση των επιπέδων έκφρασης στα εμβολιασμένα φυτά, σε σύγκριση με τα μη-εμβολιασμένα φυτά (Γράφημα 5). Το αποτέλεσμα αυτό είναι ιδιαίτερα ενδιαφέρον και χρήζει περαιτέρω μελέτης, καθώς το γονίδιο αυτό έχει μελετηθεί ελάχιστα ως σήμερα και δεν υπάρχει κάποια αναφορά στη βιβλιογραφία που να συσχετίζει το *NSP3* με τον αποικισμό των φυτών από ενδομυκορριζικούς μύκητες.

Για την περαιτέρω μελέτη του ρόλου των miR171c και *NSP2* στον αποικισμό των φυτών με ΔΕΜ, μελλοντικές μελέτες είναι απαραίτητες για να διαλευκανθεί ο ρόλος και η δράση του ζεύγους *NSP2* και miR171c, αλλά επίσης και του γονιδίου *NSP3*, στην συμβιωτική σχέση των φυτών με τους ΔΕΜ.

## Βιβλιογραφία

1. **Lu C, Tian H.** Global nitrogen and phosphorus fertilizer use for agriculture production in the past half century: shifted hot spots and nutrient imbalance. *EarthSyst. Sci. Data.* 2017, 9, σσ. 181-219.
2. **Βερεσόγλου, Δ. Σ.** *Οικολογία*. Λάρισα : "ελλα", 2002.
3. **Δ., Παπακώστα-Τασσπούλου.** *Σιτηρα και Ψυχανθή*. s.l. : Σύγχρονη Παιδεία , 2012.
4. **μ., Parniske.** Arbuscular mycorrhiza: the mother of plant root endosymbioses. *Nature Reviews-Microbiology.* 2008, Τόμ. 6, σσ. 763-775.
5. **Stacey, G., Libault, M., Brechenmacher, L., Wan, J., and May, G. D.** Genetics and functional genomics of legume nodulation. *Curr. Opin. Plant Biol.* 2006, 9, σσ. 110-121.
6. **L.e. Luginbuehl, G.E.D Oldroyd.** Understanding the Arbuscule at the Heart of Endomycorrhizal Symbiosis in Plants. *Current Biology.* September 2017. 27, σσ. 952-963.
7. **Oldroyd, G.E.D.** Speak, friend and enter: Signalling systems that promote beneficial symbiotic associations in plants. *Nature Reviews-Microbiology.* April 2013. Τόμ. Vol II, σσ. 253-263.
8. **Δεληβόπουλος, Σ. Γ.** *Μορφολογία και Ανατομία φυτών*. Θεσσαλονίκη : s.n., 1994.
9. **J., Shi.** Pollination by deceit in *Paphiopedilum barbiggerum* (Orchidaceae): a staminode exploits the innate colour preferences of hoverflies (Syrphidae). *Plant Biology.* 2008, 11, σσ. 17-28.
10. **H., Teichert.** Perfume-collecting male euglossine bees as pollinators of a basal angiosperm: the case of *Unonopsis stipitata* (Annonaceae). *Plant Biology.* 2008, 11, σσ. 29-37.
11. **M., Begon.** *Essentials of Ecology.* 2nd edition. s.l. : Sinauer Ass. Publ, 2003.
12. **Pozo M.J., Azcon-Aguilar C.** Unraveling mycorrhiza induced resistance. *Current Opinion in Plant Biology.* 2007, 10, σσ. 393-398.
13. **Fritz R.S., Simms E.L.** *Plant Resistance to Herbivores and Pathogens.* Chicago : University of Chicago Press, 1992.
14. **Oldroyd, G. E., & Leyser, O.** A plant's diet, surviving in a variable nutrient environment. *Science*. 2020, 368.
15. **PR, Haredim.** The hidden world within plants: ecological and evolutionary considerations for defining functioning of microbial endophytes. *Microbiol Mol Biol Rev MMBR.* 2015, 79, σσ. 293-320.
16. **Khare E, Mishra J, Arora NK.** Multifaceted Interactions Between Endophytes and Plant: Developments and Prospects. *Front Microbiol.* 2018, 9, σ. 2732.

17. **Pajuelo E., Stougaard J.** Lotus japonicus as a model system. 2005, σσ. 3-24.
18. **Tabata, Shusei Sato and Satoshi.** Lotus japonicus as a platform for legume research. *ELSEVIER*. 2006, 9, σσ. 128–132.
19. **Stephens N., Kevin J., Gallon R. F. and J.** Blackwell Publishing Ltd. Interrelationships between the pathways of inorganic nitrogen assimilation in the cyanobacterium Gloeotheca can be described using a mechanistic mathematical model. *New Phytologist*. 2003, 160, σσ. 545-555.
20. **Bernhard, A.** The Nitrogen Cycle: Processes, Players, and Human Impact. *Nature Education Knowledge*. 2010, Τόμ. 3, 10.
21. **Riely, B. K., Ané, J. M., Penmetza, R. V., and Cook, D. R.** Genetic and genomic analysis in model legumes bring Nod-factor signaling to center stage. *Curr. Opin. Plant Biol.* . 2004, 7, σσ. 408-413.
22. **Geurts, R., Fedorova, E., and Bisseling, T.** Nod factor signaling genes and their function in the early stages of Rhizobium infection. *Curr. Opin. Plant Biol.* 2005, 8, σσ. 346-352.
23. **M. Taleski, N. Imin, M. A. Djordjevic.** CEP peptide hormones: Key players in orchestrating nitrogen-demand signalling, root nodulation, and lateral root development. *J. Exp. Bot.* 2018, 69, σσ. 1829-1836.
24. **Tabata, R.** Perception of root-derived peptides by shoot LRR-RKs mediates systemic N-demand signaling. *Science*. 2014, 346, σσ. 343-346.
25. **Y. Ohkubo, M. Tanaka, R. Tabata, M. Ogawa-Ohnishi, Y. Matsubayashi.** Shoot-to-root mobile polypeptides involved in systemic regulation of nitrogen acquisition. *Nat. Plants* 3, 3, 17029.
26. **Okamoto, S.,.** Nod Factor/Nitrate-induced CLE genes that drive HAR1-Mediated systemic regulation of nodulation. *Plant Cell Physiol.* 2009, 50, σσ. 67-77.
27. **Yoro, E., Suzuki, T. and Kawaguchi, M.** CLE-HAR1 systemic signaling and NIN-mediated local signaling suppress the increased rhizobial infection in the daphne mutant of Lotus japonicus. *Mol. Plant Microbe Interact.* 2019, 33, σσ. 320-327.
28. **Schnabel, E.L.** The ROOT DETERMINED NODULATION1 gene regulates nodule number in roots of Medicago truncatula and defines a highly conserved, uncharacterized plant gene family. *Plant Physiol.* 2011, 157, σσ. 328-340.
29. **Minamisawa, Masayoshi Kawaguchi and Kiwamu.** Plant–Microbe Communications for Symbiosis. *Plant and cell Physiology*. 2010, Τόμ. 9, 51, σσ. 1377-80.
30. **Tsikou D., Yan Z , Holt D.B., Abel N.B., Reid D.E., Madsen L.H. , Bhasin H., Sexauer M., Stougaard J, Markmann K.** Systemic control of legume susceptibility to rhizobial infection by a mobile microRNA. *Science*. 2018, Τόμ. 6411, 642, σσ. 233-236.

31. **C. Wang, J.B. Reid, E. Foo.** The Art of Self-Control-Autoregulation of Olant--Microbe Symbioses. *Frontiers in Plant Science*. July 2018. 9.
32. **P. Bonfante, A. Genre.** Mechanism underlying beneficial plant-fungus interactions in mycorrhizal symbiosis. *Nature Communications*. July 2010.
33. **Parniske, M.** Arbuscular mycorrhiza: the mother of plant root endosymbioses. *Nature Reviews Microbiology*. October 2008. Τόμ. 6, σσ. 763-775.
34. **J., Trappe.** Phylogenetic and ecologic aspects of mycotrophy in the angiosperms from an evolutionary standpoint. *Ecophysiology of VA Mycorrhizal Plants*. 1987, σσ. 5-25.
35. **N. Takeda, S. Sato, E. Asamizu, S. Tabata, M. Parniske.** Apoplastic plant subtilases support arbuscular mycorrhiza development in *Lotus japonicus*. *The Plant Journal*. 2009. Τόμ. 58, σσ. 766-777.
36. **S.R. Rasmussen, W. Fuchtbauer, M. Novero, V. Volpe, N. Malkov, A. Genre, P. Bonfante, J. Stougaard, S. Radutoiu.** Intraradical colonization by arbuscular mycorrhizal fungi triggers introduction of lipochitooligosaccharide receptor. *Scientific Reports*. 2016. 6.
37. **Stracke, Kistner, Yoshida, Mulder, Sato, Kaneko, Tabata, Sandal, Stougaard, Szczyglowski , Parniske.** A plant receptor-like kinase required for both bacterial and fungal symbiosis. *Nature*. 2002, σσ. 959–962.
38. **J. Benjamin Miller, Amitesh Pratap, Akira Miyahara, Liang Zhou, Stephen Bornemann, Richard J. Morris, Giles E.D. Oldroyd.** 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, 2013, 12, σσ. 5053-5060.
39. **Gobbato, E. et al.** . A GRAS-type transcription factor with a specific function in mycorrhizal signaling. *Curr. Biol*. 2012, 22, σσ. 2236–2241.
40. **Wang, E. et al.** A common signaling process that promotes mycorrhizal and oomycete colonization of plants. *Curr. Biol*. 2012, 22, σσ. 2242–2246.
41. **Kalo´, P., Gleason, C., Edwards, A. et al.** Nodulation signaling in legumes requires NSP2, a member of the GRAS family of transcriptional regulators. *Science*. 308, σσ. 1786-1789.
42. **Oldroyd, G.E., Harrison, M.J. and Paszkowski, U.** Reprogramming plant cells for endosymbiosis. *Science*. 2009, 324, σσ. 753-754.
43. **Maillet, F., Poinso, V., Andre, O.** Fungal lipochitooligosaccharide symbiotic signals in arbuscular mycorrhiza. *Nature*. 2011, 469, σσ. 58-63.
44. **Branscheid, A., Devers, E.A., May, P. and Krajinski, F.** Distribution pattern of small RNA and degradome reads provides information on miRNA gene structure and regulation. . *Plant Signal. Behav*. 2011, 6, σσ. 1609-1611.

45. **Devers, E.A., Branscheid, A., May, P. and Krajinski, F.** Stars and symbiosis: microRNA- and microRNA\*-mediated transcript cleavage involved in arbuscular mycorrhizal symbiosis. *Plant Physiology* . 2011, 156, σσ. 1990-2010.
46. **D. Laressergues, P-M Delaux, D. Formey, C. Lelandais-Briere, S. Fort, S. Cottaz, G. Becard, A. Niebel, C. Roux, J-P. Combier.** The microRNA miR171h modulates arbuscular mycorrhizal colonization of *Medicago truncatula* by targeting *nsp2*. August 2012. Τόμ. 72, σσ. 512-522.
47. **Hofferek V., Mendrinna A., Gaude N., Krajinski F., Devers E.A.** MiR171h restricts root symbioses and shows like its target NSP2 a complex transcriptional regulation in *Medicago truncatula*. *BMC Plant Biology*. 2014, σσ. 1471-2229.
48. **De Luis a., Markmann K., Cognat V., Holtt DB., Charpentier M., Parniske M., Stougaard J., Voinnet O.** Two microRNAs linked to nodule infection and nitrogen-fixing ability in the legume *L. japonicus*. *Plant Physiology*. 2012, Τόμ. 4, 160, σσ. 2137-2154.
49. **Dominique Laressergues, Pierre-Marc Delaux, Damien Formey, Christine Lelandais-Briere.** The microRNA miR171h modulates arbuscular mycorrhizal colonization of *Medicago truncatula* by targeting NSP2. *Plant Journal*. 2012, σσ. 512-22.
50. **V. Hofferek, A. Mendrinna, N. Gaude, F. Krajinski, E.A. Devers.** MiR171h restricts root symbioses and shows like its target NSP2 a complex transcriptional regulation in *Medicago truncatula*. *BMC Plant Biology*. 2014. 14.
52. **L.M. Müller, K. Flokova, E. Schnabel, X. Sun, Z. Fei, J. Frugoli, H.J. Bouwmeester, M.J. Harrison.** A CLE-SUNN module regulates strigolactone content and fungal colonization in arbuscular mycorrhiza. *Nature Plants*. September 2019.
53. **M. Guether, B. Neuhauser, R. Balestrini, M. Dynowski, U. Ludewig, P. Bonfante.** A Mycorrhizal-Specific Ammonium Transporter from *Lotus japonicus* Acquires Nitrogen Released by Arbuscular Mycorrhizal Fungi. *Plant Physiology*. May 2009. Τόμ. 150, σσ. 73-83.
54. **D. Tsikou, Z. Yan, D.B. Holt, N.B. Abel, D.E. Reid, L.H. Madsen, H. Bashin, M. Sexauer, J. Stoygaard, K. Markmann.** Systemic control of legume susceptibility to rhizobial infection by a mobile microRNA. *Science* . 2018. Τόμ. 362, σσ. 233-236.