ΠΑΝΕΠΙΣΤΗΜΙΟ ΘΕΣΣΑΛΙΑΣ

ΤΜΗΜΑ ΒΙΟΧΗΜΕΙΑΣ ΚΑΙ ΒΙΟΤΕΧΝΟΛΟΓΙΑΣ

ΠΡΟΓΡΑΜΜΑ ΜΕΤΑΠΤΥΧΙΑΚΩΝ ΣΠΟΥΔΩΝ

«ΜΟΡΙΑΚΗ ΒΙΟΛΟΓΙΑ-ΜΟΡΙΑΚΗ ΓΕΝΕΤΙΚΗ-ΔΙΑΓΝΩΣΤΙΚΟΙ ΔΕΙΚΤΕΣ»

ΕΛΕΝΗ ΡΑΦΑΗΛΑ ΛΑΜΠΡΟΥ

«Μελέτη του miR171c και του γονιδίου-στόχου του κατά τον ταυτόχρονο εμβολιασμό των φυτών από ενδομυκορριζικούς μύκητες και ριζόβια»

ΛΑΡΙΣΑ 2022

Institutional Repository - Library & Information Centre - University of Thessaly
10/02/2026 02:04:33 EET - 18.97.9.171

«Μελέτη του miR171c και του γονιδίου-στόχου του κατά τον ταυτόχρονο εμβολιασμό των φυτών από ενδομυκορριζικούς μύκητες και ριζόβια»

«Study of the miR171c and its target gene during the simultaneous inoculation of *Lotus japonicus* plants with arbuscular mycorrhizal fungi and rhizobia»

Institutional Repository - Library & Information Centre - University of Thessaly
10/02/2026 02:04:33 EET - 18.97.9.171

ΤΡΙΜΕΛΗΣ ΣΥΜΒΟΥΛΕΥΤΙΚΗ ΕΠΙΤΡΟΠΗ

1. Τσίκου Δανιέλα, Επίκουρος Καθηγήτρια Μοριακής και Αναπτυξιακής Βιολογίας Φυτών, Τμήμα Βιοχημείας και Βιοτεχνολογίας, Πανεπιστήμιο Θεσσαλίας (Επιβλέπουσα)
2. Παπαδοπούλου Καλλιόπη, Καθηγήτρια Βιοτεχνολογίας Φυτών στο Τμήμα Βιοχημείας και Βιοτεχνολογίας, Πανεπιστήμιο Θεσσαλίας
3. Γιακουντής Αντώνης, Επίκουρος Καθηγητής Μοριακής Βιολογίας και Γενετικής, Πανεπιστήμιο Θεσσαλίας

Institutional Repository - Library & Information Centre - University of Thessaly
10/02/2026 02:04:33 EET - 18.97.9.171

ΠΕΡΙΕΧΟΜΕΝΑ

Institutional Repository - Library & Information Centre - University of Thessaly
10/02/2026 02:04:33 EET - 18.97.9.171

Institutional Repository - Library & Information Centre - University of Thessaly
10/02/2026 02:04:33 EET - 18.97.9.171

ΕΥΧΑΡΙΣΤΙΕΣ

Με την ολοκλήρωση της μεταπτυχιακής μου διπλωματικής εργασίας, θα ήθελα να εκφράσω τις θερμές μου ευχαριστίες σε όλους όσους συνέβαλαν στην εκπόνησή της.

Πιο συγκεκριμένα, θα ήθελα να ευχαριστήσω θερμά την Επίκουρο Καθηγήτρια Μοριακής και Αναπτυξιακής Βιολογίας Φυτών, Δανιέλα Τσίκου αναθέτοντάς μου το συγκεκριμένο θέμα, καθώς επίσης και για την επιστημονική της καθοδήγηση, την εμπιστοσύνη που μου έδειξε, την καθοριστική συμβολή της στον σχεδιασμό και την διεξαγωγή των πειραμάτων, την επεξεργασία των αποτελεσμάτων, τη συγγραφή και διόρθωση του κειμένου της μεταπτυχιακής διατριβής. Επιπλέον, για την υποστήριξη και το αμείωτο ενδιαφέρον που έδειξε από την αρχή μέχρι το τέλος.

Θα ήθελα, επίσης να ευχαριστήσω όλα τα μέλη του εργαστηρίου Βιοτεχνολογίας Φυτών και Περιβάλλοντος για την αρμονική συνεργασία κατά τη διάρκεια της παραμονής μου σ’ αυτό, καθώς και την υποστήριξή μου όποτε χρειαζόταν.

Τέλος, θα ήθελα να εκφράσω την ευγνωμοσύνη μου στην οικογένειά μου και τους φίλους μου για όλη την στήριξη, την συμπαράσταση και την κατανόησή τους, καθ΄ όλη τη διάρκεια των σπουδών μου.

Institutional Repository - Library & Information Centre - University of Thessaly
10/02/2026 02:04:33 EET - 18.97.9.171

ΠΕΡΙΛΗΨΗ

Τα ψυχανθή φυτά έχουν την μοναδική ικανότητα να αναπτύσσουν ταυτόχρονες σχέσεις με δενδρόμορφους μυκορριζικούς μύκητες και ριζόβια, και να επωφελούνται και από τους δύο μικροοργανισμούς που τους προσφέρουν απαραίτητα θρεπτικά στοιχεία όπως άζωτο και φώσφορο.

Στα πλαίσια της παρούσας εργασίας μελετήθηκε η απόκριση του μικρού RNA miR171c και του γονιδίου-στόχου του *NSP2*, κατά τον ταυτόχρονο εμβολιασμό των ριζών του φυτού μοντέλου *Lotus japonicus* με το ριζόβιο *Mesorhizobium loti* (στέλεχος R7A) και του δενδρόμορφου ενδομυκορριζικού μύκητα *Rhizophagus irregularis* (στέλεχος DAOM). Για τη μελέτη της πιθανής εμπλοκής των miR171c και του γονιδίου-στόχου στις συμβιωτικές σχέσεις του φυτού χρησιμοποιήθηκαν σπόροι αγρίου τύπου του οικότυπου Gifu, καθώς και τα εξής μεταλλάγματα: μετάλλαγμα καταστολής του γονιδίου *NSP2*, μετάλλαγμα υπερ-έκφρασης του miR171c και μετάλλαγμα καταστολής του miR171c.

Τα αποτελέσματα της έρευνας έδειξαν πως το miR171c όταν υπερεκφράζεται, επηρεάζει σημαντικά την φυματιογένεση καταστέλλοντας ισχυρά το *NSP2*. Αντιθέτως, στην περίπτωση του αποικισμού από ΔΕΜ όταν το miR171c καταστέλλεται, επιφέρει δραματική μείωση στον αποικισμό των ριζών από τον μύκητα. Η απουσία της δράσης του miR171c επηρεάζει αρνητικά τη φυματιογένεση, σε κάποιο βαθμό, ενώ επίσης επηρεάζει αρνητικά τον αποικισμό από ΔΕΜ, σε αρκετά μεγάλο βαθμό, όταν οι δύο συμβιωτικές σχέσεις συμβαίνουν ταυτόχρονα στο ίδιο φυτό-ξενιστή.

Για την μελέτη της πιθανής μεταβολής στα επίπεδα συσσώρευσης του miR171c και των *NSP2*, *NSP3* μετάγραφων στις ρίζες μετά τον εμβολιασμό με τους μικροοργανισμούς, χρησιμοποιήσαμε την τεχνική της ποσοτικής PCR πραγματικού χρόνου (qRT-PCR).

Σύμφωνα με τα αποτελέσματα της μοριακής ανάλυσης, τα επίπεδα των miR171c και *NSP2* δεν φαίνεται να επηρεάζονται από κανέναν από τους διαφορετικούς χειρισμούς που μελετήθηκαν. Αντιθέτως, τα επίπεδα έκφρασης του *NSP3* βρέθηκαν σημαντικά αυξημένα στα διπλά εμβολιασμένα φυτά, σε σχέση με τα μονά εμβολιασμένα ή μη-εμβολιασμένα φυτά.

Λέξεις-Κλειδιά: ψυχανθή, *Lotus japonicus*, ενδομυκορριζικοί μύκητες, ριζόβια, miR171c, NSP2, NSP3

Institutional Repository - Library & Information Centre - University of Thessaly
10/02/2026 02:04:33 EET - 18.97.9.171

ABSTRACT

Legumes have the unique capability to undergo root nodule and arbuscular mycorrhizal symbioses, simultaneously, thus, the microsymbionts provide the plants with essential nutrients like nitrogen and phosphorus.

In the present work, the response of the small RNA miR171c and the target gene *NSP2* was studied, during the inoculation of the roots of the model plant *Lotus japonicus* with the rhizobium *Mesorhizobium loti* (strain R7A) and the arbuscular mycorrhizal fungus *Rhizophagus irregularis* (strain DAOM). To study the putative involvement of miR171c and NSP2 in the symbiotic relationships, we used wild-type seeds of the Gifu ecotype and the following mutants: a knock-out mutant of the *NSP2* gene, an over-expression mutant of miR171c and a knock-out mutant of miR171c.

The results showed that miR171c overexpression affects the nodulation significantly by strongly suppressing *NSP2*. In contrast, in the case of AMF colonization, miR171c suppression results in a dramatic reduction in root colonization by the fungus. Absence of miR171c activity negatively affects nodulation, to some extent, and also negatively affects AMF colonization, to a considerable extent , when the two symbiotic relationships occur simultaneously in the same host plant.

To study the possible change in the accumulation levels of miR171c and *NSP2*, NSP3 transcripts in roots after inoculation with the microorganisms, were used the quantitative real-time PCR (qRT-PCR) technique.

According to the results of the molecular analysis, the levels of miR171c and *NSP2* do not seem to be affected by any of the different manipulations studied. In contrast, *NSP3* expression levels were found to be significantly increased in double inoculated plants, compared to single inoculated or non-inoculated plants.

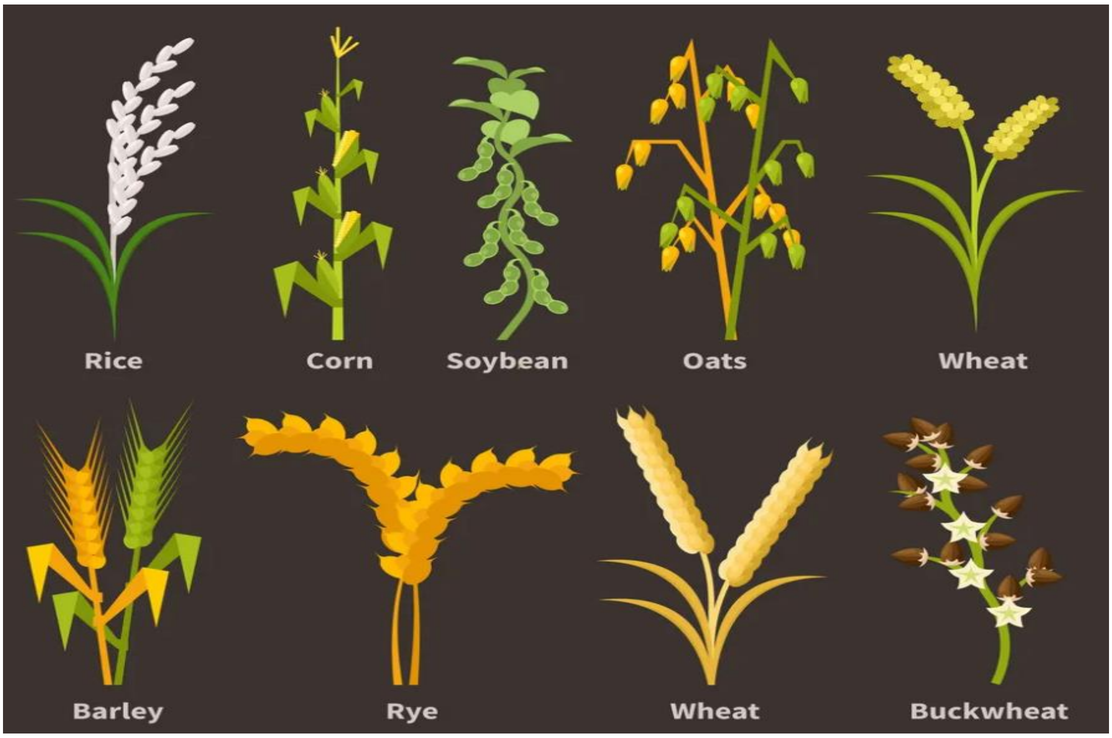
Keywords: Legumes, Lotus japonicus, Arbuscular mycorrhizal fungi, rhizobia, miR171c,NSP2,NSP3

Institutional Repository - Library & Information Centre - University of Thessaly
10/02/2026 02:04:33 EET - 18.97.9.171

1.ΕΙΣΑΓΩΓΗ

1.1 ΨΥΧΑΝΘΗ ΦΥΤΑ

Τα ψυχανθή είναι μια κατηγορία φυτών της οικογένειας Fabaceae (Leguminosae) και ανήκει στο είδος *Fabale*. Το όνομα τους προέρχεται από την χαρακτηριστική μορφολογία του άνθους τους (Εικόνα 1.1), που μοιάζει με ψυχή (πεταλούδα) και είναι η τρίτη μεγαλύτερη οικογένεια ανθοφόρων φυτών συμπεριλαμβάνοντας περίπου 20.000 είδη. Τα ψυχανθή χωρίζονται σε τρεις υπο-οικογένειες: Papilionoideae, Caesalpinioideae και Mimosoideae. Τα μέλη της οικογένειας αυτής παρουσιάζουν ποικιλία στη μορφολογία τους, όπου κυμαίνονται, από κυρίαρχα τροπικά δέντρα ως μικρά αλπικά βότανα, καθώς επίσης μπορούν να είναι ετήσια ή πολυετή. Το ριζικό σύστημα των ψυχανθών συνήθως είναι πασσαλώδες και διεισδύει σε μεγάλο βάθος της γης, προσδίδοντας στα φυτά μεγαλύτερη στηρικτική ικανότητα. Τα φύλλα των ψυχανθών είναι εναλλασσόμενα, με τις περισσότερες φορές να εμφανίζονται ως σύνθετα. Αποτελούνται από τρία φυλλάρια και τα σπέρματά τους ωριμάζουν μέσα σε λοβούς.



Εικόνα 1.1: Είδη ψυχανθών φυτών και μορφολογία των ανθών τους

Institutional Repository - Library & Information Centre - University of Thessaly
10/02/2026 02:04:33 EET - 18.97.9.171

Τα ψυχανθή κατέχουν σημαντικό ρόλο στην διατροφή των ανθρώπων και των ζώων. Η περιεκτικότητά τους σε πρωτεΐνες, υδατάνθρακες και έλαια είναι από τα βασικά στοιχεία για την αυξημένη κατανάλωση τους. Συγκεκριμένα, περιέχουν δύο φορές περισσότερη πρωτεΐνη από αυτή του καλαμποκιού και τρεις φορές περισσότερη από το ρύζι. Κάποια ενδεικτικά παραδείγματα ψυχανθών που καταναλώνονται ευρέως είτε από τον άνθρωπο είτε είναι κατάλληλα για ζωοτροφές αποτελούν ο αρακάς, τα φασόλια, η φακή, τα ρεβίθια, η μηδική, το τριφύλλι, η σόγια. Τα ψυχανθή φυτά κατέχουν το ένα τρίτο της παγκόσμιας πρωτογενούς παραγωγής, αφού εκτός από διατροφικούς σκοπούς, μπορούν να χρησιμεύσουν και ως καυσόξυλα. (Graham and Vance, 2003). Ωστόσο, εκτός από την τεράστια συμβολή τους στην διατροφή και κατά συνέπεια στην οικονομία, έχουν μεγάλη γεωργική, επιστημονική και οικολογική σημασία.

Τα ψυχανθή είναι «πρωτοποριακά» φυτά, καθώς μπορούν να αναπτυχθούν σε εδάφη φτωχά σε θρεπτικά συστατικά. Αυτό βασίζεται στο γεγονός πως τα ψυχανθή έχουν την μοναδική ικανότητα να συνεργάζονται και συμβιώνουν με τα αζωτοδεσμευτικά βακτήρια του εδάφους, τα ριζόβια (*Rhizobium*), σχηματίζοντας πάνω στις ρίζες δομές που ονομάζονται φυμάτια. Οι δομές αυτές βοηθούν στη δέσμευση του ατμοσφαιρικού αζώτου, δίνοντας στο φυτό μια ανανεώσιμη πηγή αζώτου (Doyle, 1994). Επίσης, μπορεί και συμβιώνει με δενδρόμορφους μυκορριζικούς μύκητες, οι οποίοι παρέχουν στα φυτά φώσφορο και άλλα απαραίτητα θρεπτικά συστατικά. Αυτά τα χαρακτηριστικά ευνόησαν την υιοθέτηση των οσπρίων προς καλλιέργεια στην αρχαιότητα και έως και σήμερα καταλαμβάνουν σημαντικό μέρος των βιώσιμων γεωργικών συστημάτων. Αυτή η δυνατότητα των ψυχανθών έχει δημιουργήσει την ανάγκη για την αποσαφήνιση των μοριακών μηχανισμών που εμπλέκονται στη συμβιωτική σχέση μεταξύ του φυτού και του ριζοβίου. Η αποκωδικοποίηση αυτών των μηχανισμών μπορεί να βοηθήσει στην ανάπτυξη μιας πιο εκτεταμένης και βιώσιμης καλλιέργειάς αυτής της τόσο σημαντικής οικογένειας φυτών (Márquez and Stougaard, 2005).

Όσον αφορά την εργαστηριακή μελέτη των φυτών αυτών, τα περισσότερα ψυχανθή εμφανίζουν δυσκολίες στον μετασχηματισμό τους, διότι στην πλειοψηφία τους, έχουν μεγάλα γονιδιώματα, μεγάλους σπόρους ή είναι δύσκολα στην αναγέννησή τους. Παραδείγματα εξ' αυτών αποτελούν ο αρακάς ή η σόγια, τα οποία έχουν αρκετά περίπλοκα γονιδιώματα και δεν επιδέχονται τις σύγχρονες μοριακές και γενετικές μεθόδους. Για το λόγο αυτό, η έρευνα έχει εστιάσει στη μελέτη συγκεκριμένων φυτών-μοντέλων.

1.2 ΤΟ *Lotus japonicus* ΩΣ ΦΥΤΟ-ΜΟΝΤΕΛΟ

Δύο ψυχανθή φυτά που χρησιμοποιούνται ευρέως και χαρακτηρίζονται ως μοντέλα, είναι το *Lotus japonicus* και το *Medicago truncatula*. Το *L. japonicus* προέρχεται από την Ανατολική Ασία και τα είδη του διακινήθηκαν έως τα νησιά της Ιαπωνίας, όπου πήρε το όνομα Miyakogusa. Έχει βρεθεί στην Κορεάτικη χερσόνησο, τα ανατολικά και τα κεντρικά τμήματα της Κίνας, ενώ έχει γίνει αναφορά και για την βόρεια Ινδία, το Πακιστάν και το Αφγανιστάν. Το *L. japonicus* χαρακτηρίζεται ως αγγειόσπερμο και ανήκει στην οικογένεια *Fabaceae,* του γένους *Lotus.* Προτάθηκε ως φυτό-μοντέλο πριν από περίπου 30 χρόνια, λόγω των πολλών χαρακτηριστικών του που κατατάσσουν το

Institutional Repository - Library & Information Centre - University of Thessaly
10/02/2026 02:04:33 EET - 18.97.9.171

φυτό επιδεκτικό προς έρευνα. Αυτά τα γνωρίσματα είναι το μικρό του γονιδίωμα της τάξεως των περίπου 450 Mb, όπου κάνει πιο εύκολο τον χειρισμό του, ο διπλοειδής γενότυπος, η δυνατότητα δημιουργίας διαγονιδιακών φυτών, η ταχεία ανάπτυξή του, οι μικροί του σπόροι και ο εύκολη καλλιέργεια του. Με την πάροδο των χρόνων η έρευνα στο *Lotus japonicus* έχει συμβάλλει σημαντικά στην κατανόηση των συμβιωτικών σχέσεων με τα ριζόβια και τις μυκόρριζες, καθιστώντας δυνατή την κλωνοποίηση πολλών γονιδίων-κλειδιά που εμπλέκονται και στις δύο συμβιώσεις. Για το λόγο αυτό το L. japonicus θεωρείται ένα από τα πιο χρήσιμα φυτά για την μελέτη των οσπρίων, την μελέτη της φυματιογένεσης και του αποικισμού της ρίζας από δενδρόμορφους ενδομυκορριζικούς μύκητες και χρησιμοποιείται ευρέως ως εργαλείο για τη βιολογία. Το ριζόβιο που παρουσιάζει συμβατότητα με το *Lotus japonicus* είναι το *Mesorhizobium loti* καθώς μπορεί και σχηματίζει καθορισμένα φυμάτια. Ωστόσο, είναι άξιο να τονιστεί πως η ταυτόχρονη συμβίωση στις ρίζες δεν είναι μια συνθήκη που επιδέχονται όλα τα ψυχανθή φυτά, με παράδειγμα φυτικά μοντέλα όπως το *Arabidopsis thaliana* (Stougaard, 2017).

1.3 ΣΥΜΒΙΩΤΙΚΕΣ ΣΧΕΣΕΙΣ ΜΕΤΑΞΥ ΦΥΤΩΝ ΚΑΙ ΜΙΚΡΟΟΡΓΑΝΙΣΜΩΝ

Τα φυτά ως ζωντανοί οργανισμοί, εξαρτώνται από θρεπτικά συστατικά όπως ο φώσφορος, το άζωτο, το θείο, τα οποία είναι απαραίτητο να βρίσκονται στη βιοδιαθέσιμη μορφή τους, ώστε να μπορεί με ευκολία να τα απορροφήσει το ριζικό σύστημα των φυτών. Για να διευκολυνθεί, λοιπόν, η πρόσληψη θρεπτικών συστατικών, έχουν αναπτυχθεί αμοιβαίες συμβιώσεις μεταξύ φυτών και μικροοργανισμών του εδάφους. Ως συμβίωση ορίζεται η αλληλεπίδραση δύο οργανισμών που ανήκουν σε διαφορετικό είδος και ονομάζονται συμβιώτες. Οι συμβιώτες προσαρμόζονται σε συγκεκριμένες οικολογικές συνθήκες ώστε να αποκτήσουν αμοιβαίο όφελος. Ένα χαρακτηριστικό παράδειγμα συμβιωτικών σχέσεων αποτελεί η σχέση μεταξύ φυτών και μικροοργανισμών του εδάφους. (Ledermann, Schulte and Poole, 2021) .

Οι μικροοργανισμοί του εδάφους παίζουν βασικό ρόλο στην βλάστηση, την ανάπτυξη και την υγεία των φυτών. Μέσω της συμβίωσή τους, έχουν τη δυνατότητα να τους παρέχουν χρήσιμα θρεπτικά στοιχεία του εδάφους, αυξάνοντας παράλληλα την ανεκτικότητά τους τόσο σε βιοτικούς όσο και αβιοτικούς παράγοντες καταπόνησης. Ακόμη, η αλληλεπίδραση των φυτών με τους μικροοργανισμούς του εδάφους είναι καθοριστικής σημασίας για την υγεία και την αποδοτικότητα των φυτών και μπορεί να ενισχύσει και να προωθήσει, την φυτική αύξηση, την αντοχή σε ξηρασία, την άμυνα έναντι των παθογόνων και την περιβαλλοντική αποκατάσταση. Αξίζει βέβαια να σημειωθεί ότι η σχέση αυτή είναι αμφίδρομη και όχι παρασιτική, αφού οι μικροοργανισμοί λαμβάνουν σε αντάλλαγμα πηγές άνθρακα, που το φυτό παράγει κατά τη φωτοσύνθεση (Daisuke Yamamoto, 2014).

Παρότι έχουν μελετηθεί αρκετές συμβιωτικές σχέσεις στη φύση, η πιο δημοφιλής είναι αυτή μεταξύ των αζωτοδεσμευτικών βακτηρίων (ριζόβια) και των ψυχανθών καθώς και μεταξύ των ενδομυκορριζικών μυκήτων και των φυτών. Στη συμβιωτική αζωτοδέσμευση τα ριζόβια μετατρέπουν το μοριακό ατμοσφαιρικό άζωτο σε

Institutional Repository - Library & Information Centre - University of Thessaly
10/02/2026 02:04:33 EET - 18.97.9.171

αμμωνιακά ιόντα και στην ενδομυκορριζική συμβίωση αυξάνεται η πρόσληψη φωσφορικών και νιτρικών ιόντων (Parniske, 2008) .

Υπογραμμίζεται, πως οι συμβιωτικές σχέσεις σε επίπεδο πολύπλοκων οργανισμών είναι πλέον ο κανόνας και δεν αποτελεί εξαίρεση (Bago and Shachar-Hill, 2000).

1.4 ΣΥΜΒΙΩΣΗ ΜΕΤΑΞΥ ΡΙΖΟΒΙΩΝ ΚΑΙ ΨΥΧΑΝΘΩΝ

Το άζωτο (N) είναι ένα από τα πιο σημαντικά θρεπτικά στοιχεία που προσλαμβάνει ένα φυτό, διότι καθορίζει την ανάπτυξή του. Το φυτό προμηθεύεται το άζωτο από το έδαφος, το οποίο χρησιμοποιεί σε ποικίλα μεταβολικά μονοπάτια, όπως η παραγωγή νουκλεϊκών οξέων, πρωτεϊνών, συμπαραγόντων, καθώς επίσης λαμβάνει μέρος και σε διάφορα σηματοδοτικά μονοπάτια. Ωστόσο, ένα μεγάλο ποσοστό του αζώτου που προστίθεται στις καλλιέργειες υπό την μορφή λιπάσματος δεν απορροφάται από τα φυτά και διαρρέει στο περιβάλλον. Τα ποσοστά αζώτου που προσλαμβάνονται από τις ρίζες των φυτών κυμαίνεται σε μόλις το 30%-50% (Mcallister, Beatty and Good, 2012).

Τα τελευταία 40 χρόνια τα ποσοστά αζώτου (N) που χρησιμοποιούνται στις καλλιέργειες ως λιπάσματα, έχουν αυξηθεί δραματικά, σημειώνοντας μεν αύξηση της παραγωγικότητας, επιβαρύνοντας δε σε μεγάλο βαθμό το περιβάλλον. Αυτό, σε συνδυασμό με την αύξηση του κόστους των λιπασμάτων, έχει δημιουργήσει την ανάγκη για την χρήση του αζώτου με πιο αποτελεσματικό και βιώσιμο τρόπο. Είναι, δηλαδή, σημαντικό να αναπτυχθούν καλλιέργειες που είναι σε θέση να προσλαμβάνουν, να χρησιμοποιούν και να επανακινητοποιούν το άζωτο που τους διατίθεται (Υψηλάντης και Καρπούζας, 2010a).

Οι επιπτώσεις της περίσσειας αζώτου στο περιβάλλον λόγω υπερβολικής λίπανσης γίνονται όλο και πιο εμφανείς. Παραδείγματα αυτών αποτελεί το φαινόμενο του ευτροφισμού κατά το οποίο η περίσσεια νιτρικών αλάτων που καταλήγει στο γλυκό νερό, οδηγεί στην υπέρμετρη άνθηση φυκιών, γεγονός που επηρεάζει την πανίδα του υδάτινου περιβάλλοντος. Επιπλέον, η παραγωγή και η υπερβολική χρήση των λιπασμάτων αζώτου, διαδραματίζει σημαντικό ρόλο στη μείωση του όζοντος της στρατόσφαιρας και κατά συνέπεια στην υπερθέρμανση του πλανήτη (Mcallister, Beatty and Good, 2012).

Ένας τρόπος για χρησιμοποιείται το άζωτο και να επανακινητοποιείται, επιτυγχάνεται στη φύση μέσω των ψυχανθών φυτών. Τα περισσότερα ψυχανθή, συμβιώνουν με μικροοργανισμούς του εδάφους. Μια ομάδα αυτών αποτελούν τα αζωτοδεσμευτικά βακτήρια, που ονομάζονται ριζόβια και έχουν την ικανότητα να αναπτύσσουν φυμάτια στις ρίζες τους. Η συμβιωτική αυτή σχέση, προσδίδει στο φυτό την δυνατότητα να χρησιμοποιεί το ατμοσφαιρικό στοιχειακό άζωτο (N_2), όπου μετατρέπεται από τα αζωτοδεσμευτικά βακτήρια σε αμμωνία, νιτρικά ιόντα και άλλες αζωτούχες ενώσεις, οι οποίες ενισχύουν τον μεταβολισμό του φυτού. Το φυτό σε αντάλλαγμα προσφέρει στα ριζόβια τα προϊόντα της φωτοσύνθεσης (Suzaki and Nishida, 2019). Η εγκαθίδρυση μιας επιτυχημένης συμβίωσης απαιτεί την συμβατότητα των δύο οργανισμών, καθώς η συμβιωτική σχέση παρουσιάζει υψηλή εξειδίκευση. Κάθε είδος ριζοβίου δεν είναι ικανό να αναπτύξει συμβιωτικές σχέσεις με όλα τα ψυχανθή. Αφού, λοιπόν, υπάρχουν

Institutional Repository - Library & Information Centre - University of Thessaly
10/02/2026 02:04:33 EET - 18.97.9.171

τα κατάλληλα αζωτοδεσμευτικά βακτήρια για κάθε φυτό, η αλληλεπίδραση τους αφορά μια σειρά παραμέτρων που περιλαμβάνει τον γονότυπο του φυτού, το περιβάλλον, τα μικροβιώματα των φυτών και του εδάφους. Ο σχηματισμός των φυματίων και επομένως η ανταγωνιστικότητα μεταξύ των ριζοβίων, επηρεάζεται από τον τύπο του εδάφους και τις φυσικοχημικές του ιδιότητές του (θερμοκρασία, pH, υγρασία), την διαθεσιμότητα των θρεπτικών συστατικών και την ικανότητα των μικροοργανισμών να τα χρησιμοποιούν, τον πληθυσμό των ριζοβίων που αυτοφυούν στην περιοχή, καθώς επίσης και το μικροβίωμα του εδάφους. Βέβαια, ο βαθμός με τον οποίο τα στελέχη ριζοβίων προσαρμόζονται στις τοπικές εδαφικές συνθήκες, επηρεάζει έντονα τον ανταγωνισμό μεταξύ των στελεχών (Mendoza-Suárez et al., 2021).

Ένα αζωτοδεσμευτικό βακτήριο που χρησιμοποιείται εκτενώς σε πειράματα είναι το ριζόβιο *Mesorhizobium loti* (στέλεχος R7A). Το *Mesorhizobium loti* αποτελεί μικροσυμβιώτη του φυτού-μοντέλου *Lotus japonicus* και το στέλεχος R7A έχει χρησιμοποιηθεί εκτεταμένα σε μελέτες της συμβιωτικής σχέσης του φυτού με τον μικροοργανισμό. Το βακτήριο απομονώθηκε από φυμάτια που είχαν σχηματιστεί στις ρίζες του φυτού *Lotus corniculatus* στην Νέα Ζηλανδία το 1993. Το στέλεχος R7A είναι αερόβιο, Gram-αρνητικό βακτήριο, ενώ δεν σχηματίζει σπόρια (Miklos et al., 2011).

1.5 ΣΗΜΑΤΟΔΟΤΙΚΑ ΜΟΝΟΠΑΤΙΑ ΣΤΗ ΣΥΜΒΙΩΤΙΚΗ ΣΧΕΣΗ ΨΥΧΑΝΘΟΥΣ-ΡΙΖΟΒΙΟΥ

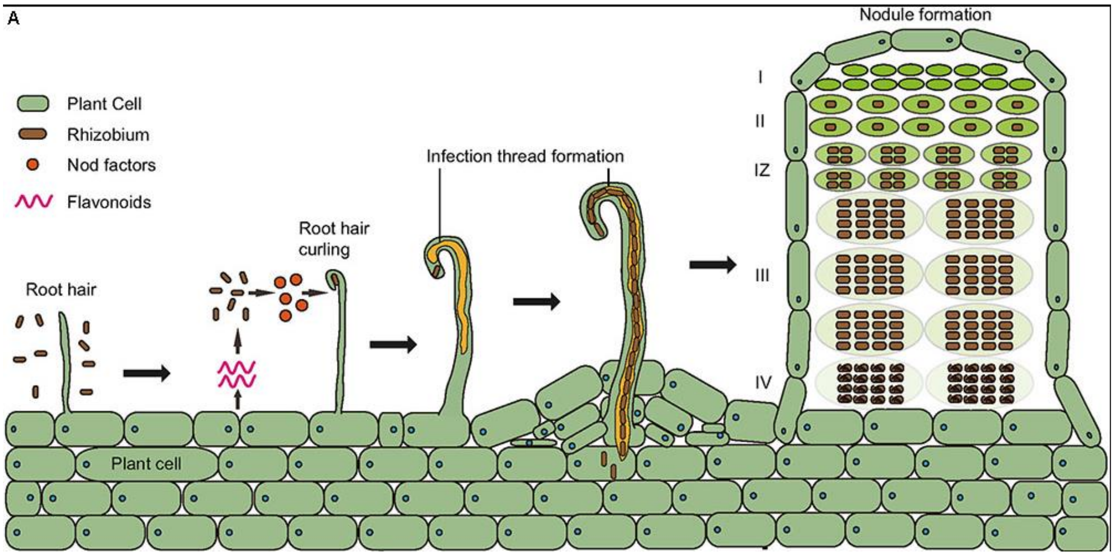
Στην εγκαθίδρυση της συμβιωτικής σχέσης ριζοβίου-ψυχανθούς, βασικό ρόλο παίζουν οι χημικοί παράγοντες που εκκρίνονται μεταξύ του φυτού και των μικροοργανισμών που βρίσκονται στη ριζόσφαιρα. Πιο συγκεκριμένα, φλαβονοειδή απελευθερώνονται από τις ρίζες του φυτού, ως σηματοδοτικοί παράγοντες. Τα ριζόβια ανταποκρίνονται σε αυτές τις ενώσεις, και απαντούν με παράγοντες που σχετίζονται με την φυματιογένεση (Nod factors). Οι παράγοντες Nod αναγνωρίζονται από το φυτό μέσω υποδοχέων που βρίσκονται στα επιδερμικά κύτταρα της ρίζας και ενεργοποιείται το σηματοδοτικό μονοπάτι που οδηγεί στη συμβίωση (Geurts, Fedorova and Bisseling, 2005). Οι παράγοντες Nod ή λιπο-χιτο-ολιγοσακχαριτες είναι το εναρκτήριο λάκτισμα για μια σειρά αλληλεπιδράσεων και ενεργοποιούν τη διαδικασία της μόλυνσης.

Η διαδικασία της μόλυνσης ξεκινά όταν τα συμβατά ριζόβια προκαλούν αλλαγές στη μορφολογία των ριζικών τριχιδίων (Εικόνα 1.5). Παρουσία ριζοβίων παρατηρείται συστροφή στο άκρο των ριζικών τριχιδίων σε σχήμα φουρκέτας με σκοπό να παγιδευτούν τα βακτήρια στο εσωτερικό τους. Η εισβολή των ριζοβίων στο εσωτερικό της ρίζας πραγματοποιείται μέσω ενδοκυτταρικών νηματίων μόλυνσης. (Wang, Liu and Zhu, 2018). Αμέσως μετά την εισβολή των ριζοβίων στη ρίζα, τα βακτήρια εισέρχονται στα επιδερμικά κύτταρα και έπειτα οδηγούνται πιο βαθιά, στα κύτταρα του φλοιού. Εκεί διαχέονται στο κυτταρόπλασμα των κυττάρων και περιβάλλονται από μια φυτική μεμβράνη, σχηματίζοντας τα συμβιοσώματα. Παράλληλα με την μόλυνση από τα ριζόβια, λαμβάνει χώρα και η οργανογένεση του φυματίου, Τα φυμάτια είναι οργανίδια που σχηματίζονται στις ρίζες και στο εσωτερικό τους λαμβάνει χώρα η αζωτοδέσμευση. Η ιδιαίτερη αυτή λειτουργία τους, να φιλοξενούν ενδοκυτταρικά βακτήρια που αζωτοδεσμεύουν, δημιουργεί συνθήκες εντός του φυματίου που είναι μοναδικές (Mendoza-Suárez et al., 2021). Η διαδικασία της μόλυνσης μπορεί να συμβεί και μέσω ρωγμών που ενδέχεται να υπάρχουν στη ρίζα. Ωστόσο, η διαδικασία

Institutional Repository - Library & Information Centre - University of Thessaly
10/02/2026 02:04:33 EET - 18.97.9.171

αυτή θεωρείται πιο πρωτόγονη, επειδή το φυτό δεν χρησιμοποιεί την εξελιγμένη κυτταρική διαφοροποίηση των τριχιδίων της ρίζας.

Όσον αφορά τη μορφολογία των φυματίων, τα κύρια είδη σχήματος και δομής είναι τα καθορισμένα και τα ακαθόριστα φυμάτια. Τα καθορισμένα είναι σφαιρικά ενώ τα ακαθόριστα επιμήκεις (Mendoza-Suárez et al., 2021).



Εικόνα 1.5: Η διαδικασία της μόλυνσης της ρίζας από το ριζόβιο και η ανάπτυξη του φυματίου. Ένα ακαθόριστο φυμάτιο περιλαμβάνεται από την ζώνη μεριστώματος (I), την ζώνη μόλυνσης (II), μια ενδιάμεση ζώνη (IZ), την ζώνη αζωτοδέσμευσης (III) και την ζώνη γήρανσης (IV).(Wang, Liu and Zhu, 2018)

1.6 Η ΑΥΤΟΡΡΥΘΜΙΣΗ ΤΗΣ ΦΥΜΑΤΙΟΓΕΝΕΣΗΣ

Όπως έχει προαναφερθεί, η φυματιογένεση προκύπτει από την συμβίωση ενός ψυχανθούς με ένα ριζόβιο, με το φυτό να επωφελείται, έχοντας πρόσβαση σε ατμοσφαιρικό άζωτο. Παρόλα αυτά η φυματιογένεση και η αζωτοδέσμευση είναι δύο ενεργειακά δαπανηρές διαδικασίες. Προκειμένου λοιπόν το φυτό να επωφελείται από τη συμβιωτική σχέση ενεργοποιεί ένα μηχανισμό καλά συντηρημένο, που ονομάζεται αυτορρύθμιση της φυματιογένεσης (autoregulation of nodulation ή AON). Ο μηχανισμός αυτός επιτρέπει στο φυτό να ελέγχει αυστηρά τον αριθμό των φυματίων που σχηματίζονται και κατ’ επέκταση να ελέγχει και τις ενεργειακές δαπάνες (Suzaki and Nishida, 2019). Έχει παρατηρηθεί πως σε μεταλλάγματα φυτών, όπου απενεργοποιούνται γονίδια που σχετίζονται με την αυτορρύθμιση της φυματιογένεσης σχηματίζονται υπεράριθμα φυμάτια, με αποτέλεσμα την μείωση της ανάπτυξης των φυτών. Αυτό συμβαίνει διότι κατά τον σχηματισμό φυματίων καταναλώνεται άνθρακας, που λαμβάνεται ως πηγή ενέργειας από τα βακτήρια και έτσι ο υπερβολικός αριθμός

Institutional Repository - Library & Information Centre - University of Thessaly
10/02/2026 02:04:33 EET - 18.97.9.171

τους στερεί από το φυτό ένα από τα σημαντικά θρεπτικά στοιχεία που συμβάλλουν στην ανάπτυξή του. Θεωρείται λοιπόν, ότι ο μηχανισμός αυτός συνδέεται με τη διατήρηση μιας ισορροπίας μεταξύ της εισροής του αζώτου και της εκροής των ενώσεων του άνθρακα (Nishida et al., 2020).

Στο φυτό-μοντέλο *Lotus japonicus*, η έναρξη του μηχανισμού της αυτορρύθμισης σχετίζεται με την παραγωγή των πεπτιδίων CLE-RS1 (CLEROOTSIGNAL 1) και CLE-RS2 (CLEROOTSIGNAL 2) , τα οποία παράγονται στη ρίζα και σχετίζονται με την παραγωγή σημάτων που οδηγεί στην αναστολή της φυματιογένεσης. Ρόλος τους είναι να μεταφέρουν σήματα από την ρίζα στους βλαστούς και εκεί αναγνωρίζονται από ειδικούς πρωτεϊνικούς υποδοχείς HAR1 (HYPER NODULATION ABERRANT ROOT FORMATION 1). Στη συνέχεια, αυτοί οι υποδοχείς προκαλούν δευτερεύοντα σήματα, τα οποία μεταφέρονται από τους βλαστούς, πίσω στις ρίζες , τα οποία έχουν τελικό στόχο την ρύθμιση της έκφρασης του γονιδίου *TML* (TOO MUCH LOVE), που βρίσκεται στην ρίζα του φυτού. Το TML εντοπίζεται στα κύτταρα της ρίζας και είναι μια F-box πρωτεΐνη, που σχετίζεται με την καταστολή της φυματιογένεσης (Takahara et al., 2013).

Επίσης, μελέτες έχουν δείξει τον ρόλο που διαδραματίζει το μικρό RNA miR2111 στην αυτορρύθμιση της φυματιογένεσης. Πιο συγκεκριμένα, φαίνεται να υφίσταται μετατόπιση από το βλαστό στη ρίζα, με σκοπό τον έλεγχο των βακτηριακών μολύνσεων (από τα ριζόβια), μέσω μεταμεταγραφικής ρύθμισης του καταστολέα συμβίωσης TML. Το miR2111, παραμένει σε ουδέτερη κατάσταση σε μη μολυσμένα φυτά και συμβάλλει στην ενεργοποίηση της συμβίωσης. Η δράση του συμπλόκου miR2111-TML, εξασφαλίζει την ισορροπία στη φυματιογένεση εμποδίζοντας τις περαιτέρω μολύνσεις από τα ριζόβια (Tsikou et al., 2018).

Ωστόσο, αν και υπάρχουν πολλά δεδομένα για τη λειτουργία του μηχανισμού της αυτορρύθμισης της φυματιογένεσης, χρειάζονται περαιτέρω μοριακές αναλύσεις για να κατανοηθεί σε βάθος.

1.7 ΣΥΜΒΙΩΤΙΚΕΣ ΣΧΕΣΕΙΣ ΜΕΤΑΞΥ ΜΥΚΟΡΡΙΖΙΚΩΝ ΜΥΚΗΤΩΝ ΚΑΙ ΦΥΤΩΝ

Μια μορφή συμβίωσης που συναντάται στο περιβάλλον και είναι ευρέως διαδεδομένη είναι αυτή ανάμεσα στους μυκορριζικούς μύκητες και τα φυτά. Ο αποικισμός της Γης από τα φυτά υπολογίζεται πριν από περίπου 450 εκατομμύρια χρόνια και συνδέεται με τον αποικισμό των ριζών τους από νηματοειδείς μύκητες του εδάφους, στην Δεβόνια εποχή, όπου στοιχεία της συμβιωτικής αυτής σχέσης έχουν ταυτοποιηθεί σε απολιθώματα που έχουν βρεθεί (Chenglei Wang et al, 2018).

Η ονομασία “μυκόρριζα” (=μύκητας+ρίζα), χρησιμοποιήθηκε για πρώτη φορά το 1885 από τον Γερμανό δασικό παθολόγο A.D Frank, για να περιγράψει τις σχέσεις ανάμεσα σε δέντρα και μύκητες (Trappe, 2005). Σήμερα ως μυκόρριζες, αναφέρεται μια ποικιλία συμβιωτικών σχέσεων μεταξύ φυτών και μυκήτων, οι οποίοι έχουν την ικανότητα να αποικίζουν τον φλοιό των ριζών κατά την ενεργή ανάπτυξη των φυτών. Το 90%-95% των χερσαίων φυτών εξακολουθούν να διατηρούν κάποιο είδος μυκορριζικού συσχετισμού. Συνεπώς, οι μυκόρριζες, και όχι οι ρίζες, φαίνεται να είναι από τα κύρια

Institutional Repository - Library & Information Centre - University of Thessaly
10/02/2026 02:04:33 EET - 18.97.9.171

όργανα πρόσληψης των θρεπτικών συστατικών των φυτών από την γη (Εικόνα 1.7) (Bago and Shachar-Hill, 2000).

Μεταξύ των διαφόρων ειδών μυκορριζικών μυκήτων, οι δενδροειδής μυκορριζικοί μύκητες αποτελούν πλειοψηφία, καθώς σχηματίζονται σε μεγάλη ποικιλία φυτών. Η ύπαρξή τους είναι τόσο διαδεδομένη στη φύση και αναπτύσσει συμβιωτικές σχέσεις, με περίπου το 80% των φυτών. Οι μυκορριζικοί μύκητες αλληλοεπιδρούν με τα φυτά, έχοντας όμως αμοιβαία οφέλη. Οι μυκόρριζες προσλαμβάνουν θρεπτικά στοιχεία από το έδαφος και τα μεταφέρουν στη ρίζα. Σε αντάλλαγμα τα φυτά, παρέχουν στους μύκητες οργανικές ενώσεις, κυρίως σάκχαρα. Ως γενική συνέπεια, οι μυκόρριζες είναι καθοριστικοί παράγοντες της φυτικής βιοποικιλότητας, της μεταβλητότητας των οικοσυστημάτων και της παραγωγικότητας των φυτικών κοινοτήτων καθώς έχουν την ικανότητα να επεκτείνουν το ριζικό σύστημα των φυτών και να το καθιστούν πιο ανθεκτικό (Marcel G. A. van der Heijden , 1998).

Εικόνα 1.7: Η ικανότητα των μυκορριζικών μυκήτων να επεκτείνονται πέρα από το ριζικό σύστημα των φυτών.

1.8 ΕΙΔΗ ΜΥΚΟΡΡΙΖΙΚΩΝ ΜΥΚΗΤΩΝ

Οι μυκορριζικοί μύκητες, απαντώνται γύρω από την περιοχή της ρίζας (ριζόσφαιρα) και διακρίνονται σε δύο κύριες ομάδες, ανάλογα με την μορφολογία και την φυσιολογία τους.

Institutional Repository - Library & Information Centre - University of Thessaly
10/02/2026 02:04:33 EET - 18.97.9.171

Στις εκτομυκόρριζες, όπου παρατηρούνται κατά κανόνα εκτός των κυττάρων της ρίζας. Σε αυτή την περίπτωση, οι μύκητες διευρύνουν τη ζώνη απορρόφησης θρεπτικών στοιχείων γύρω από αυτή, αυξάνοντας το σημείο επαφής των φυτών με τα θρεπτικά στοιχεία του εδάφους. Οι εκτομυκκόριζες είναι πολύπλοκες και δυναμικές συνιστώσες της συμβιωτικής σχέσης, αλλά και εξαιρετικά ευαίσθητες σε διαταραχές και σε αλλαγές στις ιδιότητες του εδάφους, όπως το pH και η σύσταση, όπου προκαλούνται συνήθως από τη ρύπανση, τη συμβατική γεωργία και τη δασική διαχείριση. Το βασικό χαρακτηριστικό των εκτομυκορριζών, είναι η παρουσία υφών ανάμεσα στα κύτταρα της ρίζας, όπου δημιουργούν μια δομή που μοιάζει με δίχτυ και ονομάζεται δίχτυ Harting, από το όνομα του ιδρυτή της δασικής βιολογίας, Robert Harting (Chenglei Wang et al, 2018). Οι εκτομυκόρριζες απαντώνται σε δασικά είδη, δηλαδή από θάμνους μέχρι δέντρα. Πολλά από τα φυτά που εντοπίζεται συμβιωτική σχέση ανήκουν στις οικογένειες Pinaceae, Fagaceae, Betulaceae, και Myrtaceae (Grubisha et al., 2002).

Η άλλη κατηγορία των μυκορριζικών μυκήτων ανήκει στις ενδομυκόρριζες. Αποτελεί την πιο διαδεδομένη κατηγορία μυκόρριζων, καθώς έχουν την δυνατότητα να επεκτείνονται σε μεγαλύτερο βαθμό και να συμβιώνουν με περισσότερα είδη φυτών. Στις ενδομυκόρριζες περιλαμβάνονται τρεις τύποι. Οι δύο εμφανίζουν μεγαλύτερη εξειδίκευση και συναντώνται στα φυτικά είδη της τάξης των *Ericales* (*Ericoidmycorrhizae*) ενώ ο τρίτος τύπος είναι υποχρεωτικά συμβιωτικοί μύκητες οι δενδροειδής του φύλου *Glomeromycota* (Chenglei Wang et al, 2018).

1.8.1 ΔΕΝΡΟΜΟΡΦΟΙ ΕΝΔΟΜΥΚΟΡΡΙΖΟΙ ΜΥΚΗΤΕΣ

Από όλες τις συμβιωτικές σχέσεις μυκήτων, αυτές που αφορούν τους δενδρόμορφους μυκορριζικούς μύκητες είναι οι πιο κοινές στη φύση και φαίνεται να βοήθησαν στην αποίκιση της ξηράς από τα ανώτερα φυτά. Οι μύκητες αυτοί ανήκουν στο γένος *Glomeromycota,* και ζουν στο έδαφος. Το γένος αυτό είναι μονοφυλετικό και οι μικροοργανισμοί που συγκαταλέγονται σε αυτό, θεωρούνται ανάμεσα στους πιο σημαντικούς του πλανήτη, αν και παρουσιάζουν μικρότερη εξειδίκευση. Είναι επίσης, άξιο αναφοράς, πως ο κύκλος ζωής τους θεωρείται πως έχει ολοκληρωθεί όταν έχουν επιτύχει μια συμβιωτική σχέση (Willis, Rodrigues and Harris, 2013).

Το χαρακτηριστικό γνώρισμα το δενδροειδών μυκόρριζων είναι η δημιουργία ενός πολύ διακλαδισμένου δενδρυλλίου ή θυσάνου (arbuscule) μέσα στο ριζικό κύτταρο. Τα δενδρύλλια ή θύσανοι έχουν σχετικά μικρή διάρκεια ζωής, λιγότερο από 15 ημέρες, γεγονός που μπορεί να τους καταστήσει δύσκολους ως προς παρατήρηση σε δείγματα που έχουν ληφθεί από την φύση. Ο μύκητας αρχικά αναπτύσσεται ανάμεσα στα κύτταρα, αλλά εν συνεχεία διαπερνά το κυτταρικό τοίχωμα και εισβάλλει στα κύτταρα της ρίζας. Ωστόσο, δεν προκαλείται καμία φθορά ούτε στο κυτταρικό τοίχωμα του μύκητα, ούτε του φυτού. Καθώς ο μύκητας αναπτύσσεται και μεγαλώνει, η κυτταρική μεμβράνη εγκολπώνεται και τυλίγει τον μύκητα, δημιουργώντας ένα νέο χώρο, όπου αποτίθεται υλικό μεγάλης μοριακής πολυπλοκότητας. Έτσι εμποδίζεται η απευθείας επαφή μεταξύ του φυτού και του κυτταροπλάσματος του μύκητα, επιτρέποντας την αποδοτική μεταφορά θρεπτικών συστατικών ανάμεσα στους συμβιώτες (Υψηλάντης και Καρπούζας, 2010b). Μερικές από τις δομές που δημιουργεί ο δενδροειδής μυκορριζικός μύκητας είναι οι κύστες, τα βοηθητικά κύτταρα και τα αγενή σπόρια.

Institutional Repository - Library & Information Centre - University of Thessaly
10/02/2026 02:04:33 EET - 18.97.9.171

Ο δενδρόμορφος ενδομυκορριζικός μύκητας *Rhizophagus irregularis* ανήκει στην οικογένεια *Glomeraceae* και έχει τη δυνατότητα να δημιουργεί δενδρύλλια και χρησιμοποιείται ευρέως ως εμβόλιο εδάφους στη γεωργία και στην κηπουρική, καθώς δρα ως μέσω βελτίωσης του εδάφους, αφού πολλές μελέτες έχουν δείξει πως βοηθάει στην αύξηση της πρόσληψης φωσφόρου από το έδαφος, μέσω των υφών και το μεταφέρει στις ρίζες των φυτών. Πρόσφατα στοιχεία έδειξαν πως ο *Rhizophagus irregularis* είναι ο μόνος δενδρόμορφος μυκορριζικός μύκητας που είναι σε θέση να ελέγχει τις ποσότητες πρόσληψης θρεπτικών συστατικών από τις υφές του, ξεχωριστά, και ανάλογα με τα διαφορετικά επίπεδα του φωσφόρου στο περιβάλλον που βρίσκεται. Έχει, επίσης, την ικανότητα να αποικίζει πιο γρήγορα σε σχέση με άλλους μύκητες του γένους *Glomus* (Cavagnaro et al., 2005).

1.9 ΣΗΜΑΤΟΔΟΤΙΚΑ ΜΟΝΟΠΑΤΙΑ ΜΕΤΑΞΥ ΦΥΤΩΝ-ΜΥΚΟΡΡΙΖΙΚΩΝ ΜΥΚΗΤΩΝ

Η διαδικασία αναγνώρισης του φυτού και του μύκητα οφείλεται σε διάφορα σήματα που απελευθερώνονται στη ριζόσφαιρα και γίνονται αντιληπτά από τους δύο συμβιώτες. Εναρκτήριο ερέθισμα για την ανάπτυξη της συμβιωτικής σχέσης φυτού-μυκορριζικού μύκητα είναι η απελευθέρωση χημικών ουσιών από τα φυτά. Συγκεκριμένα, εκκρίνονται στριγγολακτόνες που δρουν ως φυτορμόνες και διεγείρουν τη μεταβολική δραστηριότητα των μυκήτων. Οι στριγγολακτόνες είναι φυτικοί μεταβολίτες που ανήκουν στην οικογένεια των τερπενοειδών. Η αναγνώριση των στριγγολακτών από τους μύκητες προκαλεί την βλάστηση των σπορίων του μύκητα και την ανάπτυξη των υφών στο έδαφος, δημιουργώντας ένα λεπτό και ευρέως διακλαδισμένο μυκηλιακό δίκτυο υφών εξωτερικά της ρίζας. Οι υφές των μυκήτων, έχουν την δυνατότητα να εκκρίνουν ουσίες που διαχέονται και σηματοδοτούν μηχανισμούς των φυτών, όπως η έκφραση γονιδίων που επάγουν τη συμβίωση (Myc factors) (Lauressergues et al., 2012).

Στα αρχικά στάδια το σπόριο του μύκητα αναπτύσσεται επιδερμικά της ρίζας, εκκινεί την μεσοκυττάρια υφή, η οποία συνήθως χωρίζει δύο γειτονικά επιδερμικά κύτταρα και διεισδύει ανάμεσα από αυτά, χωρίς να προκαλεί βλάβη. Μόλις η υφή του μύκητα φτάσει στο εσωτερικό τοίχωμα των κυττάρων του φλοιού, μεγαλώνει και διαφοροποιείται σε μεσοκυττάριες και ενδοκυττάριες υφές. Όταν τελικά οι υφές φτάνουν στο εσωτερικό των κυττάρων του φλοιού σχηματίζονται δενδροειδή ή θύσανοι (arbuscules) (Genre and Bonfante, 2005). Το μεγαλύτερο ποσοστό ανταλλαγής θρεπτικών συστατικών ανάμεσα στους δύο συμβιώτες, θεωρείται πως οφείλεται στην ύπαρξη των θυσάνων στη ρίζα των φυτών (Okamoto, Tabata and Matsubayashi, 2016).

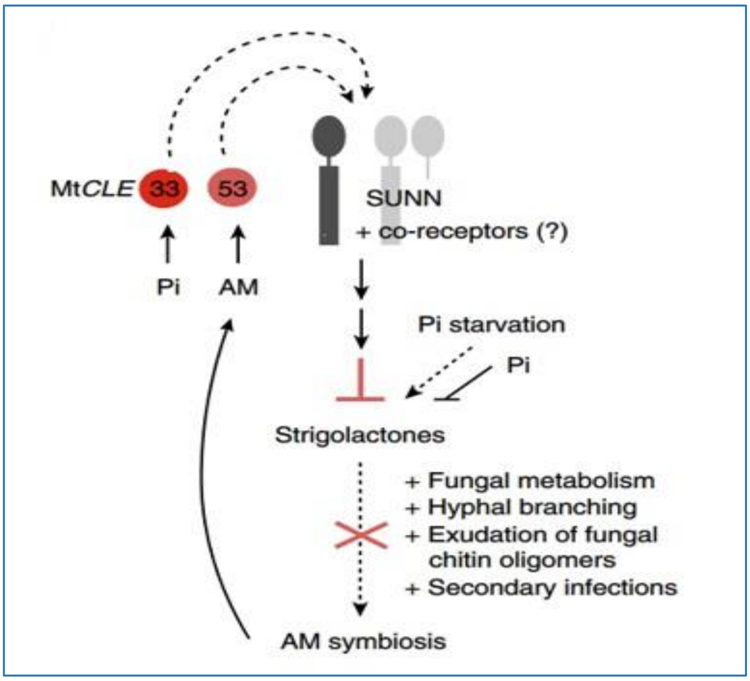
Η εκτεταμένη διακλάδωση των μυκηλιακών υφών στους δενδροειδής σχηματισμούς του μύκητα σε συνδυασμό με την επέκταση της μεμβράνης του ξενιστή, αυξάνουν σημαντικά την επιφάνεια επαφής μεταξύ του φυτού και του μύκητα, διευκολύνοντας την αποτελεσματική ανταλλαγή θρεπτικών ουσιών. Επιπλέον, η συμβιωτική σχέση επιδρά θετικά στην ανοχή των φυτών σε συνθήκες ξηρασίας και αλατότητας, στην ενίσχυση της προσαρμοστικότητας των φυτών σε εδάφη με υψηλές συγκεντρώσεις βαρέων μετάλλων και εντομοκτόνων (Leake et al., 2004).

Institutional Repository - Library & Information Centre - University of Thessaly
10/02/2026 02:04:33 EET - 18.97.9.171

1.10 ΜΗΧΑΝΙΣΜΟΣ ΑΥΤΟΡΡΥΘΜΙΣΗΣ ΤΩΝ ΜΥΚΟΡΡΙΖΩΝ

Οι δενδροειδείς ενδομυκορριζικοί μύκητες (ΔΕΜ) εισβάλλουν και επεκτείνονται στο ριζικό σύστημα του φυτού, επιτρέποντας και παρέχοντας στο φυτό μια ενισχυμένη πρόσληψη θρεπτικών συστατικών σε ανταλλαγή με άνθρακα. Όπως έχει ήδη αναφερθεί, η σχέση αυτή είναι μια από τις πιο διαδεδομένες στη φύση και χαρακτηριστικό ρόλο παίζει η παρουσία της μονάδας ανταλλαγής θρεπτικών συστατικών, το δενδρύλλιο (arbuscule). Έχει εκτιμηθεί πως μια σημαντική ποσότητα άνθρακα παρέχεται από το φυτό στον μύκητα, της τάξεως 4%-20% (‘Chenglei et al’, 2018). Τα τελευταία χρόνια όλο και περισσότερα δεδομένα έχουν δείξει πώς όταν το φυτό αποικιστεί από τους ΔΕΜ, προκειμένου να περιοριστεί το ενεργειακό κόστος της συμβίωσης, ενεργοποιείται η καταστολή του υπερβολικού αποικισμού. Ο μηχανισμός αυτός ονομάζεται αυτορρύθμιση των μυκορριζών (Vierheilig, 2004). Ωστόσο, αν και δεν υπάρχουν σαφή στοιχεία για τον ακριβή μηχανισμό της αυτορρύθμισης, αποτελεί σημαντικό στοιχείο στην εξέλιξη της αμοιβαίας επωφελούμενης αλληλεπίδρασης των φυτών με τους ΔΕΜ, καθώς αποτελεί πρόληψη για την αποφυγή ανάπτυξης μιας δυνητικά παρασιτικής σχέσης.

Ο μηχανισμός αυτορρύθμισης των μυκορριζών (autoregulation of mycorrhization ή AOM) μοιράζεται αρκετά κοινά μονοπάτια με τον μηχανισμό αυτορρύθμισης της φυματιογένεσης. Πεπτίδια CLE έχουν αναφερθεί να δρούν και στο μονοπάτι στης αυτορρύθμισης την ενδομυκορριζικής συμβίωσης. Στα φυτά *Medicago truncatula* και *Lotus japonicus* η αποσιώπηση των γονιδίων τύπου CLV1, *SUNN* και *HAR1*, τα οποία κωδικοποιούν για τους υποδοχείς που αναγνωρίζουν τα πεπτίδια CLE στο βλαστό, οδήγησε σε αύξηση του αποικισμού της ρίζας από ΔΕΜ σε σχέση με τα φυτά αγρίου τύπου. Πρόσφατες μελέτες δείχνουν πως η δράση των πεπτιδίων CLE μειώνει τα επίπεδα των στριγγολακτονών, επηρεάζοντας αρνητικά τον αποικισμό (Εικόνα 1.10). Επομένως, είναι πιθανό πως τα φυτά ελέγχουν τον αποικισμό από ΔΕΜ μέσω της ρύθμισης της παραγωγής στριγγολακτονών (Müller et al., 2019). Παρόλα αυτά, ο μηχανισμός παραμένει φτωχά χαρακτηρισμένος και χρειάζονται περαιτέρω μελέτες για την πλήρη κατανόησή του.



Institutional Repository - Library & Information Centre - University of Thessaly
10/02/2026 02:04:33 EET - 18.97.9.171

Εικόνα 1.10: Σχηματικό μοντέλο των πεπτιδίων CLE στο μονοπάτι ρύθμισης της συμβίωσης των δενδρόμορφων ενδομυκορριζικών μυκήτων (Müller et al., 2019).

1.11 ΤΑΥΤΟΧΡΟΝΗ ΣΥΜΒΙΩΣΗ ΨΥΧΑΝΘΩΝ ΦΥΤΩΝ ΜΕ ΜΥΚΗΤΕΣ ΚΑΙ ΡΙΖΟΒΙΑ

Οι βιοτικές αλληλεπιδράσεις παίζουν πρωταρχικούς ρόλους στις θεωρίες για την κατανομή και την αφθονία των ειδών στη γη. Ωστόσο, η φύση αυτών των βιοτικών αλληλεπιδράσεων εξαρτάται από μια μεγαλύτερη οικολογική κοινότητα. Ενώ υπάρχει πλέον αρκετή γνώση για τις συμβιωτικές σχέσεις φυτών-μικροοργανισμών, συνήθως οι αλληλεπιδράσεις μελετώνται μεμονωμένα. Υπάρχει πληθώρα εργασιών που εμβαθύνουν στη μελέτη φυτών που συμβιώνουν με δενδρόμορφους μυκορριζικούς μύκητες είτε ψυχανθών που συμβιώνουν με αζωτοδεσμευτικά βακτήρια. Στη φύση όμως, οι σχέσεις αυτές μπορεί να συνυπάρχουν, είτε ωφέλιμα, είτε ουδέτερα αλλά και αρνητικά ως προς το φυτό. Μελέτες αναφέρουν πως ο τρόπος επίδρασης των συμβιωτικών σχέσεων στο φυτό εξαρτάται από το φυτικό είδος, τους μικροοργανισμούς και τις συνθήκες ανάπτυξης (Larimer, Clay and Bever, 2014).

Τα ψυχανθή φυτά, έχουν την ικανότητα να συμβιώνουν παράλληλα με ριζόβια και ενδομυκορριζικούς μύκητες, ώστε να ενισχύσουν την απόδοση και την ανάπτυξή τους, λαμβάνοντας ταυτόχρονα άζωτο και φώσφορο. Έχουν γίνει μελέτες όπου πραγματοποιήθηκε ταυτόχρονος εμβολιασμός ψυχανθών με τους δύο μικροσυμβιώτες. Για παράδειγμα, διπλός εμβολιασμός στη σόγια (soybean), έδειξε πως ο αποικισμός από τον δενδρόμορφο μυκορριζικό μύκητα αυξήθηκε όταν το φυτό εμβολιάστηκε με ριζόβια(Vierheilig and Piche, 2002). Επίσης, σε μία άλλη μελέτη, ο ταυτόχρονος εμβολιασμός του μπιζελιού (cowpea) με δενδρόμορφο μυκορριζικό μύκητα και το ριζόβιο *S.meliloti,* ενίσχυσε τη θρέψη του φυτού (Kavadia *et al.*, 2021). Παρόμοιο αποτέλεσμα έδειξε και μια μελέτη στο *C. tomentosum*, όπου το φυτό ευνοήθηκε από τον ταυτόχρονο εμβολιασμό και η οποία πραγματοποιήθηκε σε συνθήκες πεδίου (Marques, Pagano and Scotti, 2001). Αντιθέτως, σε πειράματα που χρησιμοποιήθηκε το φυτό *A. canescens,* παρατηρήθηκε πως οι ενδομυκορριζικοί μύκητες και τα ριζόβια δεν έδρασαν συνεργιστικά προς όφελος του φυτού. Συγκεκριμένα, ο εμβολιασμός του φυτού με τον μύκητα αύξησε τον αριθμό των φυματίων, ενώ ο εμβολιασμός με τα ριζόβια, μείωσε το ποσοστό αποικισμού του μύκητα στις ρίζες του (Larimer, Clay and Bever, 2014). Συνεπώς, φαίνεται πως οι συμβιωτικές σχέσεις είναι πολύπλοκες και εξαρτώνται από πολλούς παράγοντες.

1.12 ΡΟΛΟΣ ΤΩΝ ΜΙΚΡΩΝ RNA-miRNA

Τα MicroRNAs (miRNAs) είναι μικρά, μονόκλωνα, μη-κωδικά μόρια RNA, τα οποία αποτελούνται από 20-24 νουκλεοτίδια και δεν κωδικοποιούν πρωτεΐνες. Γονίδια *MIR* (από τα οποία παράγονται τα μικρά RNA) εντοπίζονται στο γονιδίωμα φυτών και ζώων και παίζουν ρόλο στην καταστολή της έκφρασης κάποιων mRNA, αλλά και γενικά στη

Institutional Repository - Library & Information Centre - University of Thessaly
10/02/2026 02:04:33 EET - 18.97.9.171

ρύθμιση της γονιδιακής έκφρασης. Πιο συγκεκριμένα, μπορούν να επιφέρουν γονιδιακή σίγηση σε μετα-μεταγραφικό επίπεδο, στοχεύοντας το mRNA. Ρυθμίζουν αρνητικά τους στόχους τους με δύο διαφορετικούς τρόπους. Είτε προκαλούν την αποδόμηση του mRNA-στόχου, είτε αναστέλλουν τη μετάφραση του mRNA-στόχου. Στα φυτά είναι περισσότερο διαδεδομένος ο πρώτος μηχανισμός, ενώ στους ζωικούς οργανισμούς ο δεύτερος (Bologna and Voinnet, 2014).

Τα microRNAs ταυτοποιήθηκαν πρώτη φορά το 1990, τα miRNAs lin-4 και let-7, τα οποία ελέγχουν τον χρόνο ανάπτυξης των προνυμφών στον νηματοειδή οργανισμό *Caenorhabditis elegans* (Han and Zhou, 2022). Μέχρι στιγμής, περισσότερα από 2500 χιλιάδες ώριμα microRNAs έχουν ταυτοποιηθεί στο ανθρώπινο γονιδίωμα και χιλιάδες για πολλά είδη φυτών (Λογοθέτη et al., 2006).

1.12.1 ΤΑ ΜΙΚΡΑ RNA (miRNAs) ΣΤΑ ΦΥΤΑ

Τα microRNAs έχουν πλέον συνδεθεί με πολλές πτυχές της βιολογίας των φυτών. Εντοπίστηκαν για πρώτη φορά σε φυτά πριν από λιγότερο από 20 χρόνια, αλλά έχουν αποδειχθεί ότι είναι κρίσιμοι ρυθμιστές της αναπτυξιακής διαδικασίας, όπως η μορφογένεση των φύλλων, η αλλαγή της βλαστικής φάσης, ο χρόνος άνθησης και η απόκριση στα περιβαλλοντικά ερεθίσματα.

Τα miRNAs παίζουν βασικό ρόλο στην ανάπτυξη των φυτών. Έχει βρεθεί πώς πολλά miRNAs, έχουν την δυνατότητα να ρυθμίζουν εξαιρετικά συντηρημένους μεταγραφικούς παράγοντες ή άλλα ρυθμιστικά γονίδια που είναι θεμελιώδη για την ανάπτυξη των χερσαίων φυτών. Επιπλέον, έχουν γίνει μελέτες για την απόκριση των miRNA σε αβιοτικούς και βιοτικούς παράγοντες. Για παράδειγμα, σε ένα πείραμα που έγινε στο *Arabidopsis thaliana* υπό συνθήκες ξηρασίας, ζέστης και υψηλής αλατότητας, εντοπίστηκαν πολλές αλλαγές στα miRNA που σχετίζονται με λειτουργικούς παράγοντες του φυτού (Pegler *et al.*, 2019). Επίσης, πολλά συντηρημένα miRNAs, έδειξαν αλλαγές στην συμπεριφορά τους στο φυτό *Tripogon lolliformis*, όταν αυτό εκτέθηκε σε συνθήκες έντονης αφυδάτωσης. Τα miRNAs, έδειξαν να συσσωρεύονται διαφορετικά στις ρίζες και στους βλαστούς κατά τη διάρκεια της αφυδάτωση, αντανακλώντας πιθανότατα τις ευρείες αλλαγές στο μεταβολισμό και στη φυσιολογία του φυτού κατά τη διάρκεια της συνθήκης καταπόνησής του (Njaci et al., 2018).

Φαίνεται, λοιπόν, πως η συμμετοχή των μικρών RNA στις διαδικασίες προσαρμογής του φυτού είναι ζωτικής σημασίας και η επίτευξη του χειρισμού τους μπορεί να επιφέρει ελπιδοφόρα αποτελέσματα για την δημιουργία πιο βιώσιμων και ανθεκτικών καλλιεργειών.

1.12.2 Ο ΡΟΛΟΣ ΤΟΥ miR171

Το microRNA171 (miR171), αποτελείται από 21 νουκλεοτίδια και είναι ένα από τα πιο αρχαία και καλά συντηρημένα miRNAs των χερσαίων φυτών. Ο αριθμός των γονιδίων

Institutional Repository - Library & Information Centre - University of Thessaly
10/02/2026 02:04:33 EET - 18.97.9.171

MIR171 ποικίλλει μεταξύ των διάφορων ειδών των φυτών. Για παράδειγμα, το Arabidopsis έχει 3 αντίγραφα (*MIR171*a,b και c), η σόγια 21 ενώ 3 έχουν αναφερθεί και για το φυτό-μοντέλο *Lotus japonicus*. Το miR171 είναι από τα πιο γνωστά μόρια που ρυθμίζουν διάφορες διαδικασίες ανάπτυξης στα φυτά στοχεύοντας σε μέλη της οικογένειας μεταγραφικών παραγόντων GRAS (GAI, RGA, SCR). Οι πρωτεΐνες της οικογένειας GRAS είναι γνωστές για τον βασικό τους ρόλο στα μονοπάτια σηματοδότησης, τα οποία ρυθμίζουν πολλούς παράγοντες για την ανάπτυξη του φυτού. Για παράδειγμα, μεταλλάξεις στο γονίδιο SCARECROW (SCR), έχουν ως αποτέλεσμα δραματικές διαταραχές στη δομή της ρίζας (Bolle, Koncz and Chua, 2000). Βασικά μόρια στα οποία φαίνεται να στοχεύει το miR171, είναι το SCARECROW-LIKE (SCL) και το NODULATION SIGNALING PATHWAY 2 (NSP2).

Έχει βρεθεί πως ο παράγοντας μεταγραφής των πρωτεϊνών GRAS, ο NSP2 αποτελεί στόχο του μικρού RNA miR171 (Lauressergues et al., 2012). Το γονίδιο NSP2 είναι απαραίτητο για τον σχηματισμό φυματίων στις ρίζες των φυτών κατά την συμβίωση με αζωτοδεσμευτικά βακτήρια, για την βιοσύνθεση των στριγγολακτονών, καθώς επίσης και για την συμμετοχή του στο σηματοδοτικό μονοπάτι που ενεργοποιείται κατά τον αποικισμό της ρίζας από τους δενδρόμορφους ενδομυκορριζικούς μύκητες. Τα στοιχεία αυτά καταδεικνύουν πως το NSP2 είναι αναπόσπαστο κομμάτι του κοινού σηματοδοτικού μονοπατιού.

Σε μελέτες που έγιναν στο φυτό *Medicago truncatula*, ύστερα από εμβολιασμό με δενδρόμορφο μυκορριζικό μύκητα, το γονίδιο *NSP2* έδειξε να επηρεάζεται αρνητικά από τον μύκητα *R. irregularis*, όταν αυτός κατάφερε να αποικίσει τις ρίζες του. Συγκεκριμένα, η έκφραση του γονιδίου NSP2 μειώθηκε, γεγονός που σχετίζεται αντίστροφα με την αυξημένη συσσώρευση του miR171h στις ρίζες του φυτού (Lauressergues et al., 2012). Επίσης, έχει προταθεί πως το miR171 επάγεται υπό συνθήκες αυξημένης συγκέντρωσης φωσφόρου και ρυθμίζεται με βάση την διαθεσιμότητα θρεπτικών συστατικών στο έδαφος. Τα φυτά μεταλλάγματα με αποσιωπημένο το γονίδιο *NSP2*, δεν ανταποκρίθηκαν στους παράγοντες αποικισμού (Myc factors) και ήταν λιγότερο αποικισμένα σε σχέση με τα φυτά αγρίου τύπου. Το miR171h, επομένως, έχει άμεση συνάρτηση με την ομοιόσταση του φυτού και συμβάλλει στην ελεγχόμενη έκφραση του γονιδίου *NSP2* τόσο κατά την διάρκεια της συμβιωτικής σχέσης ριζοβίου-φυτού όσο και της αλληλεπίδρασης ενδομυκορριζικού μύκητα-φυτού (Miklos et al., 2011).

Μια άλλη μελέτη έχει δείξει πως τα miR171a και miR171c ήταν σε αφθονία στα ώριμα φυμάτια, με το miR171c να εκφράζεται σε μεγάλο βαθμό στα φυμάτια. Επίσης φάνηκε πως η βακτηριακή μόλυνση ήταν απαραίτητη για να προκληθεί η έκφραση του miR171c στα φυμάτια (Hossain et al., 2019).

Τέλος, το miR171c έχει βρεθεί να στοχεύει απευθείας το γονίδιο *NSP2* και στο *Lotus japonicus*. Σε φυτά τα οποία είχαν εμβολιαστεί με το ριζόβιο *M.loti,* το NSP2, έδειξε να έχει μειωμένη έκφραση, ενώ τα επίπεδα του miR171c έδειξαν μεγαλύτερη συσσώρευση (de Luis *et al.*, 2012). Ωστόσο, δεν έχει ακόμη ελεγχθεί τι συμβαίνει στην περίπτωση της συμβίωσης με τον δενδρόμορφο ενδομυκορριζικό μύκητα, όπως επίσης και στην περίπτωση της τριπλής συμβίωσης (ριζόβιο, φυτό, δενδρόμορφος ενδομυκορριζικός μύκητας).

Institutional Repository - Library & Information Centre - University of Thessaly
10/02/2026 02:04:33 EET - 18.97.9.171

1.13 ΣΚΟΠΟΣ

Σκοπός της παρούσας διατριβής είναι να μελετηθεί η πιθανή εμπλοκή του μικρού RNA miR171c και του γονιδίου-στόχου του *NSP2* στην ταυτόχρονη ανάπτυξη συμβιωτικών σχέσεων μεταξύ φυτού και ωφέλιμων μικροοργανισμών. Για το λόγο αυτό πραγματοποιήθηκε ταυτόχρονος διπλός εμβολιασμός του φυτού-μοντέλου *Lotus japonicus* με τον δενδρόμορφο ενδομυκορριζικό μύκητα (ΔΕΜ) *Rhizophagus irregularis* (στέλεχος DAOM) και το αζωτοδεσμευτικό βακτήριο *Mesorhizobium Loti* (στέλεχος R7A). Μελετήθηκε η απόκριση των miR171c και *NSP2* σε μονούς και διπλούς εμβολιασμούς του φυτού με ποσοτική PCR πραγματικού χρόνου, και επίσης, ελέγχθηκαν ο αποικισμός των φυτών από τον ΔΕΜ και η φυματιογένεση σε φυτά αγρίου τύπου, καθώς και σε μεταλλάγματα υπερέκφρασης ή καταστολής του miR171c και του *NSP2*.

2. ΥΛΙΚΑ ΚΑΙ ΜΕΘΟΔΟΙ

2.1 ΒΙΟΛΟΓΙΚΟ ΥΛΙΚΟ ΚΑΙ ΣΥΝΘΗΚΕΣ ΑΝΑΠΤΥΞΗΣ

Για τα πειράματα χρησιμοποιήθηκε το φυτό-μοντέλο *Lotus japonicus*. Συγκεκριμένα χρησιμοποιήθηκαν σπόροι αγρίου τύπου του οικότυπου Gifu, καθώς και τα εξής μεταλλάγματα: μετάλλαγμα καταστολής (knockout) του γονιδίου *NSP2* (*nsp2*), μετάλλαγμα υπερ-έκφρασης του miR171c (miR171cOX) και μετάλλαγμα καταστολής (knockout) του miR171c (miR171cKO). Τα φυτά εμβολιάστηκαν με το στέλεχος DAOM του δενδρόμορφου μυκορριζικού μύκητα *Rhizophagus irregularis,* το οποίο διατίθεται εμπορικά. Επίσης χρησιμοποιήθηκε το συμβιωτικό αζωτοδεσμευτικό βακτήριο *Mesorhizobium loti*, το στέλεχος R7A.

Για τα πειράματα που έγιναν με σκοπό την παρατήρηση των δειγμάτων στο μικροσκόπιο, τα φυτά αναπτύχθηκαν για 5 εβδομάδες και χρησιμοποιήθηκαν διπλά δοχεία magenta, που προσφέρουν αρκετό χώρο για την ανάπτυξη του φυτού. Στα πειράματα που τα φυτά χρησιμοποιήθηκαν για μοριακή ανάλυση, τα φυτά αναπτύχθηκαν σε μονά δοχεία magenta, για 2 εβδομάδες.

Κατά τη διάρκεια της πειραματικής διαδικασίας τα φυτά αναπτύσσονταν σε θάλαμο ανάπτυξης με σταθερή θερμοκρασία στους 25^{o}C και φωτοπερίοδο 16 ώρες φως και 8 ώρες σκοτάδι.

Institutional Repository - Library & Information Centre - University of Thessaly
10/02/2026 02:04:33 EET - 18.97.9.171

2.2 ΑΠΟΛΥΜΑΝΣΗ ΣΠΟΡΩΝ

Η απολύμανση των σπόρων είναι απαραίτητη, καθώς εξασφαλίζει πως όλοι οι σπόροι του φυτού είναι απαλλαγμένοι από παθογόνους μικροοργανισμούς. Επίσης προετοιμάζει τους σπόρους προς εκβλάστηση, αφού κατά την χημική αυτή επεξεργασία σπάει ο περίβλημά τους.

Η διαδικασία είναι η εξής:

1. Καταμέτρηση των σπόρων και μεταφορά τους σε σωληνάριο eppendorf.
2. Προσθήκη πυκνού H_2SO_4, μέχρι να καλυφθούν οι σπόροι και επώαση για 25 min σε πλάγια θέση.
3. Ανάδευση των σπόρων με γυάλινη πιπέτα κάθε 5 min, ώστε να μην δημιουργούν συσσωμάτωση.
4. Ακολουθούν 5 πλύσεις με H_2O, οι πρώτες δύο πλύσεις των σπόρων πρέπει να γίνονται γρήγορα, διότι δημιουργείται εξώθερμη αντίδραση με το H_2SO_4 και υπάρχει περίπτωση να καταστραφούν οι σπόροι.
5. Προσθήκη διαλύματος εμπορικής χλωρίνης 20% για 10 min
6. Ακολουθούν 6 πλύσεις με H_2O σε θάλαμο κάθετης νηματικής ροής (laminair)
7. Αποθήκευση των σπόρων σε dH_2O και επώαση για 12 ώρες στους 4^oC

Στους σπόρους από τις μεταλλαγμένες φυτικές σειρές κατά τη διαδικασία της απολύμανσης απαιτείται λιγότερος χρόνος επώασης με το πυκνό H_2SO_4 (περίπου 15 min) και με την χλωρίνη (περίπου 9 min), καθώς είναι πιο ευαίσθητοι στη μεταχείρισή τους.

2.3 ΕΓΚΑΤΑΣΤΑΣΗ ΣΠΟΡΩΝ ΣΕ ΤΡΥΒΛΙΑ ΓΙΑ ΕΚΒΛΑΣΤΗΣΗ

Μετά την επώαση των σπόρων για 12 ώρες στους 4 ^oC, για να βλαστήσουν οι σπόροι και να εξασφαλιστεί πως όλοι βρίσκονται στο ίδιο στάδιο ανάπτυξης, οι σπόροι τοποθετούνται σε τρυβλία με την παρακάτω διαδικασία, η οποία πραγματοποιείται υπό ασηπτικές συνθήκες, σε θάλαμο κάθετης νηματικής ροής:

1. Επίστρωση του τρυβλίου με 3 διηθητικά χαρτιά, αποστειρωμένα και κομμένα σε τετράγωνο σχήμα.
2. Προσθήκη 3mL dH_2O στο τρυβλίο.
3. Αφαίρεση τυχόν αέρα που έχει παγιδευτεί ανάμεσα στα διηθητικά χαρτιά.
4. Τοποθέτηση των απολυμασμένων σπόρων σε σειρά με αποστάσεις μεταξύ τους, για να μπορεί να αναπτυχθεί η ρίζα.
5. Κλείσιμο των τρυβλίων με parafilm.
6. Τοποθέτηση του τρυβλίου στο θάλαμο ανάπτυξης φυτών σε κάθετη θέση, έτσι ώστε να διαβρέχεται το διηθητικό χαρτί και να μην ξεραθούν οι σπόροι.
7. Αναμονή 10 ημερών για εκβλάστηση των σπόρων.

Institutional Repository - Library & Information Centre - University of Thessaly
10/02/2026 02:04:33 EET - 18.97.9.171

2.4 ΜΕΤΑΦΥΤΕΥΣΗ ΦΥΤΩΝ *Lotus japonicus* ΣΕ ΔΟΧΕΙΑ MAGENTA ΜΕ ΤΗ ΜΕΘΟΔΟ SANDWICH

Μετά την εκβλάστηση των σπόρων στα τρυβλία στον θάλαμο ανάπτυξης φυτών για 10 ημέρες, τα φυτά είναι έτοιμα να μεταφυτευτούν σε δοχεία magenta. Η διαδικασία που ακολουθεί πραγματοποιείται σε θάλαμο νηματικής ροής.

Τα νεαρά φυτάρια τοποθετούνται σε αποστειρωμένη άμμο με τη μέθοδο Sandwich. Η μέθοδος αυτή εξασφαλίζει όσο το δυνατό μεγαλύτερο ποσοστό αποικισμού, καθώς μέσω της χρήσης δισκίων νιτροκυτταρίνης είναι αποτελεσματικότερος ο εμβολιασμός των ριζών των φυτών, λόγω της άμεσης επαφής του εμβολίου με τις ρίζες. Τα δισκία νιτροκυτταρίνης ενυδατώνονται πριν από την χρήση τους σε τρυβλίο με 1% άγαρ σε νερό.

Η διαδικασία έχει ως εξής:

1. Προσθήκη ψημένης και απολυμασμένης άμμου (180^{o}C για τουλάχιστον 6 ώρες) σε αποστειρωμένα δοχεία magenta, μέχρι τα 2/3.
2. Προσθήκη 60mL θρεπτικού διαλύματος SLA(παράγραφος 2.4.1).
3. Ανάμιξη της άμμου και σχηματισμός διαγώνιας γραμμής ώστε να χωρούν τα δισκία νιτροκυτταρίνης.
4. Τοποθέτηση τριών φυτών στο ενυδατωμένο δισκίο νιτροκυτταρίνης, με τον βλαστό να προεξέχει.
5. Προσθήκη 300μL εμβολίου DAOM πάνω στις ρίζες των φυτών και προς το κέντρο του δισκίου. Το εμβόλιο του μύκητα είναι σε αρχική συγκέντρωση 2000 σπόρια/mL, και πραγματοποιείται αραίωση σε τελική συγκέντρωση 1000 σπόρια/mL, οπότε τα 300 μL εμβολίου περιέχουν περίπου 300 σπόρια (δηλαδή εφαρμόζουμε 100 σπόρια περίπου ανά φυτό)
6. Τοποθέτηση του δεύτερου και μη ενυδατωμένου δισκίου νιτροκυτταρίνης έτσι ώστε να εφαρμόζει στο πρώτο και να είναι τα φυτά ενδιάμεσα.
7. Τοποθέτηση του Sandwich στη σχισμή της άμμου.
8. Η άμμος βρίσκεται σε άμεση επαφή με το Sandwich, ώστε τα φυτά να έχουν άμεση επαφή με το θρεπτικό διάλυμα.

Ακολουθεί η τοποθέτηση των magenta σε θάλαμο ανάπτυξης στους ~25^{o}C για όσο χρονικό διάστημα απαιτεί κάθε πειραματική διαδικασία.

Να σημειωθεί πως το κάθε δοχείο magenta, με τα τρία φυτά, αποτελεί μια βιολογική επανάληψη.

2.4.1 ΠΑΡΑΣΚΕΥΗ ΘΡΕΠΤΙΚΟΥ ΔΙΑΛΥΜΑΤΟΣ SLA (Long ASTON SOLUTION)

Το διάλυμα SLA (Long Ashton ή Hewitt solution), χρησιμοποιείται ευρέως και θεωρείται κατάλληλο για την υποστήριξη της κανονικής ανάπτυξης μιας σειράς διαφορετικών ειδών φυτών. Για την παρασκευή του θρεπτικού αυτού διαλύματος ακολουθήθηκε η εξής διαδικασία, όπως περιγράφεται στον παρακάτω πίνακα.

Institutional Repository - Library & Information Centre - University of Thessaly
10/02/2026 02:04:33 EET - 18.97.9.171

Οι ποσότητες αφορούν την αναλογία σε 1 L H_2O.

ΘΡΕΠΤΙΚΑ	ΣΥΓΚΕΝΤΡΩΣΗ (M)	ΓΙΑ ΠΑΡΑΣΚΕΥΗ 1L ΔΙΑΛΥΜΑΤΟΣ
$MgSO_4$	0,375 M	2 mL
Na_2NO_3	1 M	1 mL
K_2NO_3	0,5 M	2 mL
$CaCl_2$	1 M	2 mL
Na_2HPO_4	0,1 M	32 μl
FeNa EDTA	0,5 M	50 μl
$MnSO_4$	0,1 M	50 μl
$CuSO_4$	0,01 M	25 μl
M_3Bo_3	0,1 M	250 μl
Na_2MoO_4	0,025 M	2 μl

2.5 ΣΤΕΡΕΗ ΚΑΙ ΥΓΡΗ ΚΑΛΛΙΕΡΓΕΙΑ ΡΙΖΟΒΙΟΥ

Για την ανάπτυξη του ριζοβίου που χρησιμοποιήθηκε, λήφθηκε μια ποσότητα από καλλιέργεια σε stock γλυκερόλης, που φυλάσσεται στους -80^{o}C με την βοήθεια πλαστικού αποστειρωμένου ρύγχους και απλώθηκε πάνω σε τρυβλίο που περιείχε στερεό θρεπτικό υλικό YMB. Το τρυβλίο επωάστηκε για 72 ώρες στους 28^{o}C και αποθηκεύτηκε στους 4^{o}C.

Για τον εμβολιασμό των φυτών με ριζόβια όμως, απαιτείται η ανάπτυξή τους σε υγρή καλλιέργεια. Συνεπώς, έγινε λήψη μιας ποσότητας από την στερεή καλλιέργεια με την βοήθεια πλαστικού ρύγχους και πιπέτας και τοποθετήθηκε μέσα με αποστειρωμένη φλάσκα με το θρεπτικό υπόστρωμα. Το ριζόβιο *Mesorhizobium loti* (στέλεχος R7A) επωάστηκε στους 28^{o}C, για δύο ημέρες υπό ανάδευση. Η ανάδευση είναι απαραίτητη, καθώς δημιουργεί αερόβιες συνθήκες στη φλάσκα, γεγονός που είναι απαραίτητο για την ανάπτυξη αερόβιων βακτηρίων.

Για την παρασκευή του θρεπτικού YMB με pH=6,8, χρειάστηκαν τα παρακάτω:

<u>Για 250mL YMB:</u>

Mannital	0,5 gr
Yeast extract	0,1 gr
K_2HPO_4	0,124 gr
$MgSO_4$ * $7H_2O$	0,05 gr
NaCl	0,025 gr

Institutional Repository - Library & Information Centre - University of Thessaly
10/02/2026 02:04:33 EET - 18.97.9.171

2.6 ΕΜΒΟΛΙΑΣΜΟΣ ΤΩΝ ΦΥΤΩΝ ΜΕ ΡΙΖΟΒΙΟ

Η διαδικασία πραγματοποιήθηκε σε ασηπτικές συνθήκες στον θάλαμο κάθετης νηματικής ροής ως εξής:

1. Απομάκρυνση της άμμου από τα τοιχώματα του Sandwich
2. Αφαίρεση ενός δισκίου νιτροκυτταρίνης
3. Εμβολιασμός των ριζών με 1 mL καλλιέργειας ριζοβίου συγκέντρωσης OD_{600}=0,02
4. Τοποθέτηση της άμμου για να έρχεται σε άμεση επαφή με τις ρίζες των φυτών

- Προετοιμασία αραιωμένης καλλιέργειας ριζοβίου:

Για να βρεθεί η κατάλληλη αραίωση που έπρεπε να γίνει στην καλλιέργεια του ριζοβίου, πραγματοποιήθηκε φωτομέτρηση της αρχικής υγρής καλλιέργειας στο ορατό φως και σε μήκος κύματος 600nm.

Η αρχική συγκέντρωση του ριζοβίου στην υγρή καλλιέργεια ήταν OD_{600}=0,272, επομένως ακολούθησε αραίωση με νερό με στόχο την τελική επιθυμητή συγκέντρωση OD_{600}=0,02

Στην παρούσα εργασία, ο εμβολιασμός των φυτών με την καλλιέργεια ριζοβίου πραγματοποιήθηκε 10 μέρες μετά τον εμβολιασμό τους με τον μύκητα *R. irregularis*

2.7 ΣΥΓΚΟΜΙΔΗ ΤΩΝ ΦΥΤΩΝ

Μετά το χρονικό διάστημα που έχει οριστεί για την ολοκλήρωση του πειράματος γίνεται η συγκομιδή φυτών.

1. Αρχικά τα φυτά απομακρύνονται από την άμμο μέσα σε ένα περιέκτη χωρίς να τραυματιστεί η ρίζα
2. Οι ρίζες πλένονται με H_2O, βυθίζοντας τες σε ένα περιέκτη ώστε να απαλλαχθούν από την άμμο
3. Τέλος, τοποθετούνται σε σωληνάριο falcon με H_2O, έτσι ώστε οι ρίζες να ενυδατώνονται

Για τα πειράματα μικροσκοπίας, η συγκομιδή των φυτών πραγματοποιήθηκε 5 εβδομάδες μετά την τοποθέτηση των φυτών στα δοχεία magenta, ενώ για τα πειράματα μοριακής ανάλυσης η συγκομιδή έγινε μετά από δύο εβδομάδες.

Institutional Repository - Library & Information Centre - University of Thessaly
10/02/2026 02:04:33 EET - 18.97.9.171

2.8 ΜΕΤΡΗΣΗ ΤΟΥ ΑΡΙΘΜΟΥ ΤΩΝ ΦΥΜΑΤΙΩΝ

Στα πλαίσια των πειραμάτων, μελετήθηκε ο αριθμός των φυματίων που σχηματίστηκαν στα φυτά, ύστερα από τον εμβολιασμό με το αζωτοδεσμευτικό βακτήριο. Οι ρίζες των φυτών που συλλέχθηκαν, παρατηρήθηκαν στο στερεοσκόπιο. Κατά την καταμέτρηση των φυματίων, παρατηρήθηκαν και καταγράφηκαν ώριμα φυμάτια καθώς και ανώριμα φυμάτια. Ως ώριμα καταμετρούνταν τα ροζ ή κόκκινα φυμάτια, ενώ ως ανώριμα τα άσπρα και μικρά φυμάτια.

2.9 ΥΠΟΛΟΓΙΣΜΟΣ ΤΟΥ ΠΟΣΟΣΤΟΥ ΑΠΟΚΙΣΜΟΥ ΑΠΟ ΕΝΔΟΜΥΚΟΡΡΙΖΙΚΟ ΜΥΚΗΤΑ

Για τη μελέτη του ποσοστού αποικισμού των ριζών του φυτού από ενδομυκορριζικούς μύκητες, πραγματοποιήθηκε αποκοπή του βλαστού από τις ρίζες, στη συνέχεια χρώση των ριζών (παράγραφος 2.9.1) και τέλος τεμαχισμός των ριζών σε ισομεγέθη τμήματα και τοποθέτησή τους σε αντικειμενοφόρους πλάκες για την παρατήρησή τους σε οπτικό μικροσκόπιο. Κάθε αντικειμενοφόρος πλάκα έχει προέλθει από φυτά που αναπτύχθηκαν στο ίδιο δοχείο magenta και αντιστοιχεί σε μία βιολογική επανάληψη. Ο υπολογισμός του ποσοστού του αποικισμού γίνεται μέσω της παρακολούθησης 100 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. Τα αποτελέσματα υπολογίζονται σε ποσοστό %.

2.9.1 ΧΡΩΣΗ ΡΙΖΩΝ ΜΕ ΜΕΛΑΝΙ

Η διαδικασία της χρώσης των ριζών περιλαμβάνει τα εξής βήματα:

1. Διαχωρισμός της ρίζας από το βλαστό με νυστέρι και επανατοποθέτηση της ρίζας σε σωληνάριο falcon με H_2O
2. Αφαίρεση του H_2O και προσθήκη KOH 10%, τόσο ώστε οι ρίζες να εμβαπτίζονται (~5 mL). Το KOH έχει τη δυνατότητα να αποχρωματίζει την ρίζα και να την προετοιμάζει προς χρώση
3. Επώαση στο υδατόλουτρο για 30 min, στους 85^{o}C
4. Αφαίρεση του KOH
5. Προσθήκη οξικού οξέος 10% (~5 mL), για εξουδετέρωση του KOH
6. Πραγματοποίηση δύο πλύσεων με dH_2O
7. Προσθήκη διαλύματος μελανιού (~5 mL) (5% μελάνι σε 5% οξικό οξύ)
8. Επώαση στο υδατόλουτρο για 30min, στους 85^{o}C
9. Προσθήκη οξικού οξέος 5% (~5mL)
10. Επώαση 30 min σε θερμοκρασία δωματίου
11. Αφαίρεση οξικού οξέος 5%
12. Προσθήκη dH_2O και επώαση στους 4^{o}C O/N

Institutional Repository - Library & Information Centre - University of Thessaly
10/02/2026 02:04:33 EET - 18.97.9.171

2.10 ΑΠΟΜΟΝΩΣΗ ΟΛΙΚΟΥ RNA ΑΠΟ ΤΙΣ ΡΙΖΕΣ

Για την απομόνωση του ολικού RNA από τις ρίζες των φυτών :

→ Τα φυτά απομακρύνονται από τον θάλαμο ανάπτυξης
→ Οι ρίζες ξεπλένονται σε νερό
→ Απομακρύνονται οι ρίζες από το βλαστό και τοποθετούνται σε αποστειρωμένα σωληνάρια eppendorfs των 1,5 mL
→ Γρήγορη ψύξη σε υγρό άζωτο και μεταφορά τους στους -80^oC για αποθήκευση.

Στη συνέχεια ακολουθεί το παρακάτω πρωτόκολλο:

1. Μεταφορά των δειγμάτων από τους -80^oC μέσα σε υγρό άζωτο.
2. Με την βοήθεια εμβόλου, που έχει τοποθετηθεί στο υγρό άζωτο για να παγώσει, πραγματοποιείται λειοτρίβηση των ριζών με συνεχή παρουσία υγρού αζώτου
3. Προσθήκη 450μl διαλύματος Lysis buffer/binding buffer (100mM Tris-HCl (pH 7.5), 500mM LiCl, 10mMM EDTA (pH 8.0), 1% LiDS, 5mM DTT)
4. Ανάμειξη (vortex) .
5. Φυγοκέντρηση για 10 min στους 4^oC, 13000 rpm.
6. Μεταφορά υπερκειμένου σε νέα σωληνάρια eppendorfs τα οποία έχουν ήδη προετοιμαστεί με 500μl LS Trizol LS.
7. Ισχυρή ανάδευση για ~30sec.
8. Επώαση σε θερμοκρασία δωματίου για 5 min .
9. Φυγοκέντρηση για 5 min στους 4^oC.
10. Μεταφορά υπερκειμένου σε νέα σωληνάρια eppendorfs, που περιέχουν 125μl χλωροφόρμιο.
11. Ισχυρή ανάδευση για ~30 sec.
12. Επώαση σε θερμοκρασία δωματίου για 2 min.
13. Φυγοκέντρηση για 10 min στους 4^oC, 13000 rpm.
14. Μεταφορά 420μl της υπερκείμενης φάσης, χωρίς τη μεσαία φάση, σε νέο καθαρό σωληνάριο eppendorfs.
15. Προσθήκη 420μl NaOAC (3M 0,1 του όγκου) και 42μl Acitic acid (0,1 του όγκου).
16. Προσθήκη 1050μl (2.5 του όγκου) 100% κρύας EtOH.
17. Επώαση για 30 min σε θερμοκρασία δωματίου.
18. Αποθήκευση στους -20^oC για τουλάχιστον 12 ώρες.
19. Φυγοκέντρηση για 1 ώρα στους 4^oC, 13000 rpm.
20. Αφαίρεση υπερκειμένου, που περιέχει την EtOH.
21. Έκπλυση του ιζήματος με 1000μl 80% EtOH.
22. Φυγοκέντρηση για 10 min στους 4^oC, 13000 rpm.
23. Απομάκρυνση υπερκειμένου.
24. Τοποθέτηση των σωληναρίων eppendorfs ανοιχτών σε πλάγια θέση, για εξάτμιση της εναπομένουσας EtOH για 7 min.
25. Επαναιώρηση του ιζήματος με προσθήκη 20μl διαλύματος LoTE (3mM Tris-HCl pH 7.5, 0,2 mM EDTA pH 7,5).
26. Τοποθέτηση για 2 min στους 65^oC, σύντομη ανάδευση και τοποθέτηση στον πάγο.

Institutional Repository - Library & Information Centre - University of Thessaly
10/02/2026 02:04:33 EET - 18.97.9.171

27. Διατήρηση στους -80°C για μεγάλης διάρκειας αποθήκευση ή στους -20°C για σύντομο χρονικό διάστημα.

Ακολουθεί η μέτρηση συγκέντρωσης του RNA (ng/μl) των δειγμάτων με φασματοφωτόμετρο μικροόγκων.

2.11 ΑΝΤΙΔΡΑΣΗ DNase ΓΙΑ ΑΠΟΜΑΚΡΥΝΣΗ DNA ΑΠΟ ΤΑ ΔΕΙΓΜΑΤΑ

Για την απομάκρυνση του DNA από τα δείγματα RNA ακολουθείται η παρακάτω διαδικασία:

1. Προσθήκη 1μl 10x DNase I Reaction Buffer, 1μl (1U) DNase I (Thermo Scientific), 0,25μl (10U) RNAse out (Invitrogen), μέχρι 1 μg RNA/δείγμα και ddH2O ως τον τελικό όγκο των 10 μl.
2. Επώαση για 50 min στους 37°C.
3. Προσθήκη 1μl EDTA 25mM (Invitrogen) και επώαση για 10 min στους 65°C,
4. Ακολουθεί αλυσιδωτή αντίδραση πολυμεράσης PCR, για να ελεγχθεί εάν είναι επιτυχής η απομάκρυνση του DNA από τα δείγματα.

Αν τα δείγματα δεν είναι καθαρά από DNA, επαναλαμβάνεται η διαδικασία της αντίδρασης DNase.

2.12 ΑΛΥΣΙΔΩΤΗ ΑΝΤΙΔΡΑΣΗ ΠΟΛΥΜΕΡΑΣΗΣ (PCR)

Η αλυσιδωτή αντίδραση πολυμεράσης ενισχύει αλληλουχίες DNA με εκμαγείο το ίδιο το DNA. Ο πολυμερισμός των κλώνων DNA γίνεται με την υβριδοποίηση ειδικά σχεδιασμένων εκκινητών, όπου καθορίζουν τα άκρα του τμήματος DNA που θα ενισχυθεί. Η αντίδραση περιλαμβάνει αποδιατάξεις και υβριδοποιήσεις που πραγματοποιούνται λόγω θερμοκρασιακών μεταβολών. Οι εκκινητές που χρησιμοποιήθηκαν υβριδίζουν στο ενδογενές γονίδιο ουβικιτίνης του φυτού. Τα αντιδραστήρια και οι ποσότητες που χρησιμοποιήθηκαν με τελικό όγκο αντίδρασης 20 μl είναι τα εξής:

→ 1μl δείγμα μετά από αντίδραση DNάσης,
→ 0.4μl dNTPs (10mM),
→ 0.8μl πρόσθιος εκκινητής (10μM),
→ 0.8 μl ανάστροφος εκκινητής (10μM),
→ 2 μl 10x Ρυθμιστικό διάλυμα,
→ 0.08 μl ένζυμο KAPA Taq DNA πολυμεράση (5U/μl),
→ 14.92μl ddH2O

Institutional Repository - Library & Information Centre - University of Thessaly
10/02/2026 02:04:33 EET - 18.97.9.171

Το πρόγραμμα αντίδρασης της αντίδρασης είναι το εξής:

	Θερμοκρασία (°C)	Χρόνος (min)
Αρχική αποδιάταξη	95 °C	5 min
Αποδιάταξη	95 °C	30 min
Υβριδοποίηση	55 °C	30 min
Επιμήκυνση	72 °C	10 min
Τελική Επιμήκυνση	72 °C	4 min
Διατήρηση	4 °C	∞

Το στάδιο της αποδιάταξης και της υβριδοποίησης επαναλαμβάνονται για 40 κύκλους.

2.13 ΗΛΕΚΤΡΟΦΟΡΗΣΗ ΣΕ ΠΗΚΤΗ ΑΓΑΡΟΖΗΣ

Για να ελεγχθεί αν τα δείγματα έχουν καθαρίσει από το DNA, πραγματοποιείται ηλεκτροφόρηση των προϊόντων PCR σε πηκτή αγαρόζης. Η μέθοδος αυτή βασίζεται στον διαχωρισμό των φορτισμένων μορίων (DNA) κατά την κίνησή τους μέσα σε στερεό πορώδες υπόστρωμα της αγαρόζης, στα άκρα του οποίου εφαρμόζεται ηλεκτρική τάση. Όταν τα μόρια βρεθούν σε ένα ηλεκτρικό πεδίο τότε μετακινούνται τα ανιόντα προς το θετικό πόλο και τα κατιόντα προς τον αρνητικό πόλο.

Η διαδικασία περιλαμβάνει:

1. Προσθήκη 1g αγαρόζης σε 100mL διαλύματος TAE μέσα σε κωνική φιάλη
2. Θέρμανση στο φούρνο μικροκυμάτων για ~3 min
3. Αναμονή μέχρι να γίνει χλιαρό
4. Προσθήκη 1μl βρωμιούχου αιθιδίου EtBr (φθορίζει στο υπεριώδες όταν είναι ενσωματωμένο σε νουκλεϊκό οξύ)
5. Τοποθέτηση του διαλύματος σε ειδική συσκευή για πήξη

- Προσθήκη 1μl 6x loading dye στα δείγματα
- Φόρτωση των δειγμάτων (~18μl) και του μάρτυρα μοριακών βαρών (2,5μl) στα πηγαδάκια της πηκτής
- Ηλεκτροφόρηση στα 75-200V για 20-30min

2.14 ΣΥΝΘΕΣΗ ΣΥΜΠΛΗΡΩΜΑΤΙΚΟΥ DNA (cDNA- Complementary DNA)

Η σύνθεση συμπληρωματικού DNA πραγματοποιήθηκε σε δύο στάδια:

Στάδιο 1ο:

Institutional Repository - Library & Information Centre - University of Thessaly
10/02/2026 02:04:33 EET - 18.97.9.171

1. Σε σωληνάρια eppendorf τοποθετούνται 5 μl RNA δείγματος (~350-300ng) μετά από αντίδραση DNάσης
2. Προστίθενται οι εκκινητές: 1μl oligodT (2μM), 1μl miR2111-stemloop rev (0,5μM) και 1μl miR171-stemloop rev(0,5μM)
3. Προσθήκη 9μl ddH2O (έως 17μl)
4. Επώαση στους 70^{o}C για 5 min

Στάδιο 2ο:

1. Προσθήκη στα δείγματα 5 μl 5x ρυθμιστικό διάλυμα (Invitrogen)
2. Προσθήκη 1,5 μl μίγμα dNTP (10 mM)
3. 0.5 μl (20U) RNAse out (Invitrogen)
4. 1 μl (200U) αντίστροφης μεταγραφάσης (Superscript II, Invitrogen)
5. Τοποθέτηση δειγμάτων στη συσκεύη PCR για 2 ώρες

Το πρόγραμμα της αντίδρασης αντίστροφης μεταγραφάσης (RT-PCR) με επανάληψη 60 κύκλων:

Χρόνος	Θερμοκρασία (^{o}C)
30 min	16 ^{o}C
30 sec	30 ^{o}C
30 sec	42 ^{o}C
1 sec	50 ^{o}C
5 min	85 ^{o}C
∞	4 ^{o}C

2.15 ΑΛΥΣΙΔΩΤΗ ΑΝΤΙΔΡΑΣΗ ΠΟΛΥΜΕΡΑΣΗΣ ΠΡΑΓΜΑΤΙΚΟΥ ΧΡΟΝΟΥ (real-time PCR)

Στην αλυσιδωτή αντίδραση πολυμεράσης πραγματικού χρόνου (Real-Time PCR) γίνεται ποσοτικός προσδιορισμός των αντιγράφων του DNA-στόχου καθ' όλη τη διάρκεια της αντίδρασης με την παρακολούθηση της αύξησης φθορίζοντος σήματος εκπομπής από κάποια φθορίζουσα χρωστική.

Τα προϊόντα της αντίδρασης αυξάνονται εκθετικά σε κάθε κύκλο. Η ποσοτική PCR πραγματικού χρόνου (qRT-PCR) για τον ακριβή ποσοτικό προσδιορισμό του προϊόντος της αντίδρασης συνδέει τον αρχικό αριθμό των αντιγράφων του DNA στόχου με τον πρώτο κύκλο της αντίδρασης, όπου το προϊόν της αντίδρασης είναι ανιχνεύσιμο (threshold cycle- Ct). Το κατώφλι (threshold) ορίζεται από το μηχάνημα της qRT-PCR και στο Ct ο ανιχνεύσιμος φθορισμός του προϊόντος το έχει ξεπεράσει.

Institutional Repository - Library & Information Centre - University of Thessaly
10/02/2026 02:04:33 EET - 18.97.9.171

Η αντίδραση είναι η εξής:

1. 0.2μl εξειδικευμένοι εκκινητές
2. 5μl SYBR Green (Kapa) μίγμα φθορίζουσας χρωστικής
3. 2.1μl ddH20
4. 2.5μl cDNA

Οι αντιδράσεις της qRT-PCR πραγματοποιήθηκαν στο μηχάνημα CPX Connect Real-Time System (BIORAD). Το πρόγραμμα του PCR περιλάμβανε 5 λεπτά επώαση στους 95^0C και ακολούθησαν 40 κύκλοι με 95^0C για 15 δευτερόλεπτα, 60^0C (ή 58^0C για κάποια γονίδια) για 15 δευτερόλεπτα και 72^0C 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. Το επίπεδο έκφρασης του γονιδίου που κωδικοποιεί για ATP χρησιμοποιήθηκε για να γίνει κανονικοποίηση στις μικρές διαφορές που παρουσιαζόταν στις ποσότητες του cDNA. Η αποδοτικότητα της αντίδρασης PCReff για κάθε γονίδιο υπολογίστηκε χρησιμοποιώντας το λογισμικό LinRegPCR. 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 $(PCReff)^{-\Delta Ct}$, όπου ΔCt είναι η διαφορά Ctx – Cta.

Οι αντιδράσεις πραγματοποιήθηκαν σε 2 τεχνικές επαναλήψεις.

2.16 ΠΙΝΑΚΕΣ ΕΚΚΙΝΗΤΩΝ

Για την σύνθεση του συμπληρωματικού DNA καθώς και για την αλυσιδωτή αντίδραση πολυμεράσης χρησιμοποιήθηκαν εξειδικευμένοι εκκινητές (Πίνακας 2.16).

Εκκινητές	Αλληλουχία
Σύνθεση cDNA miR171	GTCGTATCCAGTGCAGGGTCCGAGGTATTCGCACTGGATACGACGAGTGA
Πρόσθιος miR171	GGTGCTGAGCCGAATCAATATC
Ανάστροφος miR171	AGTGCAGGGTCCGAGGTATTC
Πρόσθιος SbtM1	CAGGTGAACCAGAAGGTTGCATAC
Ανάστροφος SbtM1	AGCAGCACCCTCTCTATCTTCATGC
Πρόσθιος ATP	CAATGTCGCCAAGGCCCA TGGTG
Ανάστροφος ATP	AACACCACTCTCGATCATTTCTCTG
Πρόσθιος PP2	GTAAATGCGCTAAAGATAGGGTCC
Ανάστροφος PP2	ACTAGACTGTAGTGCTTG

Institutional Repository - Library & Information Centre - University of Thessaly
10/02/2026 02:04:33 EET - 18.97.9.171

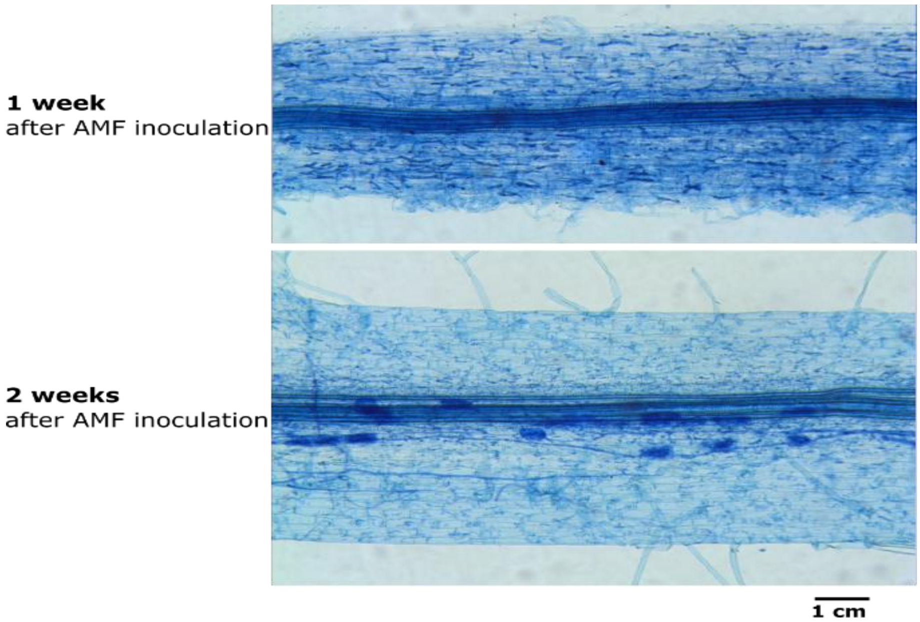
Πίνακας 2.16: Αναγράφονται οι εκκινητές που χρησιμοποιήθηκαν για την σύνθεση του συμπληρωματικού DNA (Ανάστροφος miR211 και Ανάστροφος miR171) και οι εκκινητές που χρησιμοποιήθηκαν για την αλυσιδωτή αντίδραση πολυμεράσης (Πρόσθιος SbtM1,Ανάστροφος SbtM1, Πρόσθιος ATP, Ανάστροφος ATP, Πρόσθιος PP2, Ανάστροφος PP2.

3.ΑΠΟΤΕΛΕΣΜΑΤΑ

3.1 ΕΛΕΓΧΟΣ ΤΟΥ ΑΠΟΙΚΙΣΜΟΥ ΤΟΥ *LOTUS JAPONICUS* ΑΠΟ ΤΟΝ ΔΕΜ *R. IRREGULARIS*

Με σκοπό να επιλέξουμε το σωστό χρονικό στάδιο για την πραγματοποίηση των εμβολιασμών του φυτού με τους δύο μικροσυμβιώτες, επιδιώξαμε αρχικά να εντοπίσουμε τη χρονική στιγμή που ο ΔΕΜ *R. irregularis* εισέρχεται στα κύτταρα των ριζών του φυτού *L. japonicus*, καθώς αυτή η πληροφορία δεν υπάρχει στη βιβλιογραφία.

Εμβολιάσαμε φυτά *L. japonicus* αγρίου τύπου με τον ΔΕΜ *R. irregularis* και ελέγξαμε τον αποικισμό των ριζών από μύκητα 1, 2 και 3 εβδομάδες αργότερα. Η παρατήρηση στο μικροσκόπιο έδειξε πως ο μύκητας έχει εισέλθει στη ρίζα και έχει αποικίσει τα κύτταρά της ήδη στις 2 εβδομάδες μετά τον εμβολιασμό. Στη 1 εβδομάδα μετά τον εμβολιασμό η ρίζα δεν δείχνει αποικισμένη, ενώ στις 2 εβδομάδες μετά τον εμβολιασμό είναι ορατός ο σχηματισμός των χαρακτηριστικών δομών του μύκητα, όπως υφές και θύσανοι (arbuscules) (Εικόνα 3.1).



Institutional Repository - Library & Information Centre - University of Thessaly
10/02/2026 02:04:33 EET - 18.97.9.171

Εικόνα 3.1: Στην πάνω φωτογραφία φαίνεται ρίζα του φυτού Lotus japonicus μια εβδομάδα μετά τον εμβολιασμό με μύκητα και στην κάτω φωτογραφία η ρίζα δύο εβδομάδες μετά τον εμβολιασμό, όπου έχει αποικιστεί από τον ενδομυκορριζικό μύκητα σχηματίζοντας θυσάνους.

3.2 ΕΛΕΓΧΟΣ ΤΩΝ ΕΠΙΠΕΔΩΝ ΣΥΣΣΩΡΕΥΣΗΣ ΤΟΥ miR171c, ΚΑΙ ΤΩΝ *NSP2* ΚΑΙ *NSP3* ΜΕΤΑΓΡΑΦΩΝ ΥΠΟ ΣΥΝΘΗΚΕΣ ΜΟΝΟΥ ΚΑΙ ΔΙΠΛΟΥ ΕΜΒΟΛΙΑΣΜΟΥ

Για αυτό το πείραμα χρησιμοποιήθηκαν φυτά *Lotus japonicus* αγρίου τύπου στα οποία μελετήθηκε η συσσώρευση του miR171c, και των *NSP2* και *NSP3* μετάγραφων σε διαφορετικές συνθήκες εμβολιασμού των φυτών με τους δύο μικροσυμβιώτες. Συγκεκριμένα, το πείραμα περιλάμβανε τους εξής χειρισμούς:

- Φυτά μη-εμβολιασμένα
- Φυτά που εμβολιάστηκαν μόνο με το ριζόβιο *M.loti*
- Φυτά που εμβολιάστηκαν μόνο με τον μύκητα *R.irregularis*
- Φυτά στα οποία πραγματοποιήθηκε διπλός εμβολιασμός με *M.loti* και *R.irregularis*

Για κάθε χειρισμό πραγματοποιήθηκαν 5 βιολογικές επαναλήψεις.

Με σκοπό να επιτύχουμε σχεδόν ταυτόχρονη εισβολή των δύο μικροσυμβιωτών στη ρίζα (στην περίπτωση του διπλού αποικισμού) εμβολιάσαμε τα φυτά πρώτα με τον ΔΕΜ και 10 μέρες αργότερα πραγματοποιήσαμε τον 2^{ο} εμβολιασμό με το ριζόβιο. Η επιλογή του μεσοδιαστήματος των 10 ημερών έγινε σύμφωνα με τα αποτελέσματα του πειράματος που περιγράφεται στην παράγραφο 3.1. Είχαμε δει πως 7 ημέρες μετά τον εμβολιασμό των φυτών, ο μύκητας δεν έχει αποικίσει το φυτό, ενώ στις 14 ημέρες (2 εβδομάδες) η ρίζα είναι ήδη αποικισμένη (Εικόνα 3.1). Επομένως επιλέχθηκε η περίοδος των 10 ημερών ως πιθανό μέσο διάστημα που ο μύκητας εισέρχεται στη ρίζα. Όλα τα φυτά του πειράματος αυτού συλλέχθηκαν δύο εβδομάδες μετά την τοποθέτηση των νεαρών φυταρίων στα δοχεία magenta. Συνεπώς η ημέρα της συγκομιδής αντιστοιχεί σε δύο εβδομάδες μετά από εμβολιασμό με ΔΕΜ και 4 ημέρες μετά από εμβολιασμό με ριζόβιο.

Μετά την περίοδο ανάπτυξής τους, τα φυτά συλλέχθηκαν και απομονώθηκαν οι ρίζες από τον βλαστό. Κάθε βιολογική επανάληψη των δειγμάτων προετοιμάστηκε για την διαδικασία απομόνωσης του ολικού RNA (βλ. Κεφάλαιο 2.10).

Το ολικό RNA των ριζών απομονώθηκε και η συγκέντρωσή τους (ng/μl) καταγράφηκε με την βοήθεια του φασματοφωτόμετρου μικροόγκων όπως παρουσιάζεται στον πίνακα 3.2.

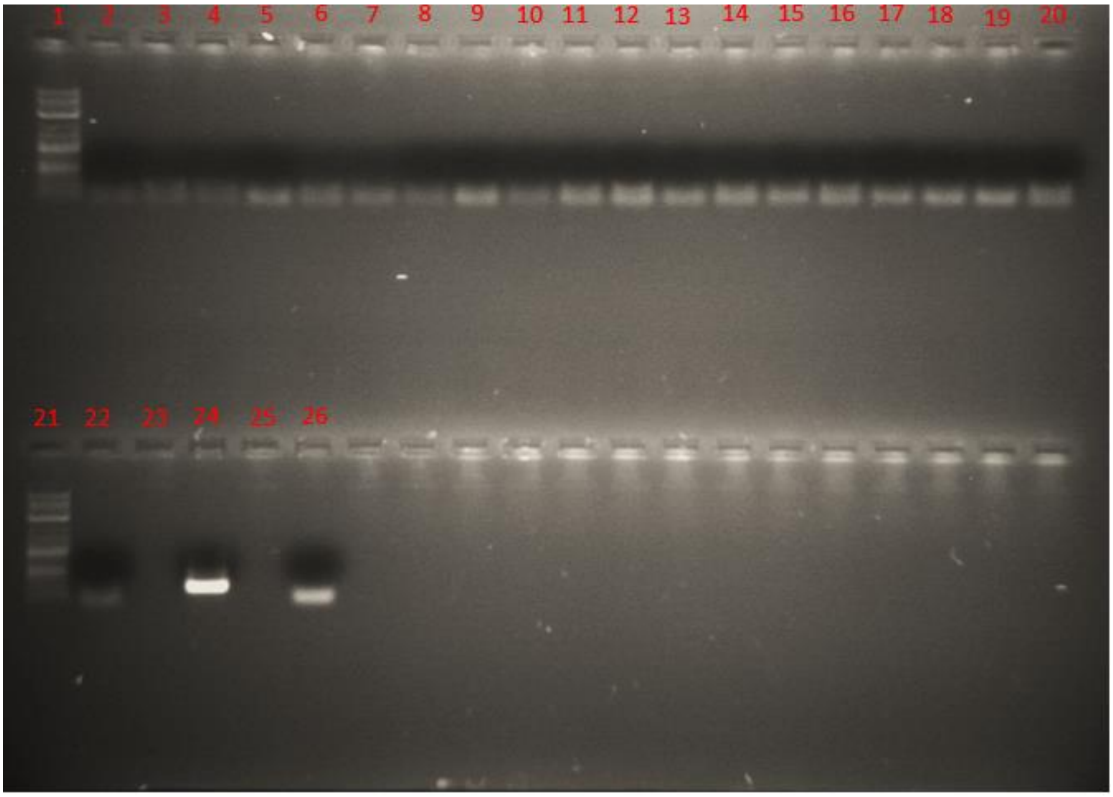
Institutional Repository - Library & Information Centre - University of Thessaly
10/02/2026 02:04:33 EET - 18.97.9.171

Δείγματα	Συγκέντρωση RNA (ng/μl)	Λόγος A_{260}/A_{280}
Μη-εμβολιασμένα 1	117,1	1,83
Μη-εμβολιασμένα 2	189,4	1,73
Μη-εμβολιασμένα 3	157,7	1,77
Μη-εμβολιασμένα 4	120,1	1,71
Μη-εμβολιασμένα 5	228,1	1,79
R7A 1	173,1	1,86
R7A 2	166	1,81
R7A 3	184,3	1,88
R7A 4	147,8	1,77
R7A 5	152,4	1,94
DAOM 1	195,3	1,79
DAOM 2	188,2	1,71
DAOM 3	205,7	1,88
DAOM 4	255,3	1,82
DAOM 5	203,3	1,89
DAOM+R7A 1	241,8	1,82
DAOM+R7A 2	177,7	1,78
DAOM+R7A 3	291,4	1,85
DAOM+R7A 4	211	1,68
DAOM+R7A 5	189,4	1,71

Πίνακας 3.2: Στον πίνακα αναγράφεται η συγκέντρωση του ολικού RNA σε (ng/μl) των δειγμάτων με τις 5 βιολογικές τους επαναλήψεις. Ο πίνακας αναφέρεται στα δείγματα φυτών μη-εμβολιασμένων, στα φυτά που εμβολιάστηκαν μόνο με το ριζόβιο M. Loti (R7A), στα φυτά που εμβολιάστηκαν με τον ΔΕΜ Rhizophagus irregularis (DAOM) και στα φυτά με τον διπλό εμβολιασμό (R7A+DAOM). Επίσης φαίνεται και ο λόγος απορρόφησης των νουκλεϊκών οξέων προς την απορρόφηση των πρωτεϊνών. Ο λόγος δείχνει την καθαρότητα του δείγματος, με ικανοποιητικές τις τιμές 1,7-2.

Ακολούθησε χειρισμός των δειγμάτων με το ένζυμο DNάσης, ώστε να απομακρυνθεί το DNA. Για τον έλεγχο της απομάκρυνσης του DNA από τα δείγματα RNA πραγματοποιήθηκε αντίδραση PCR και ηλεκτροφόρηση σε πηκτή αγαρόζης. Όπως παρατηρείται στην Εικόνα 3.2, η απομάκρυνση του γονιδιωματικού DNA ήταν επιτυχής για όλα τα δείγματα (θέσεις 2-20 και 22). Το δείγμα αρνητικού ελέγχου βρίσκεται στη θέση «26», ενώ το δείγμα ο θετικού ελέγχου βρίσκεται στη θέση «24».

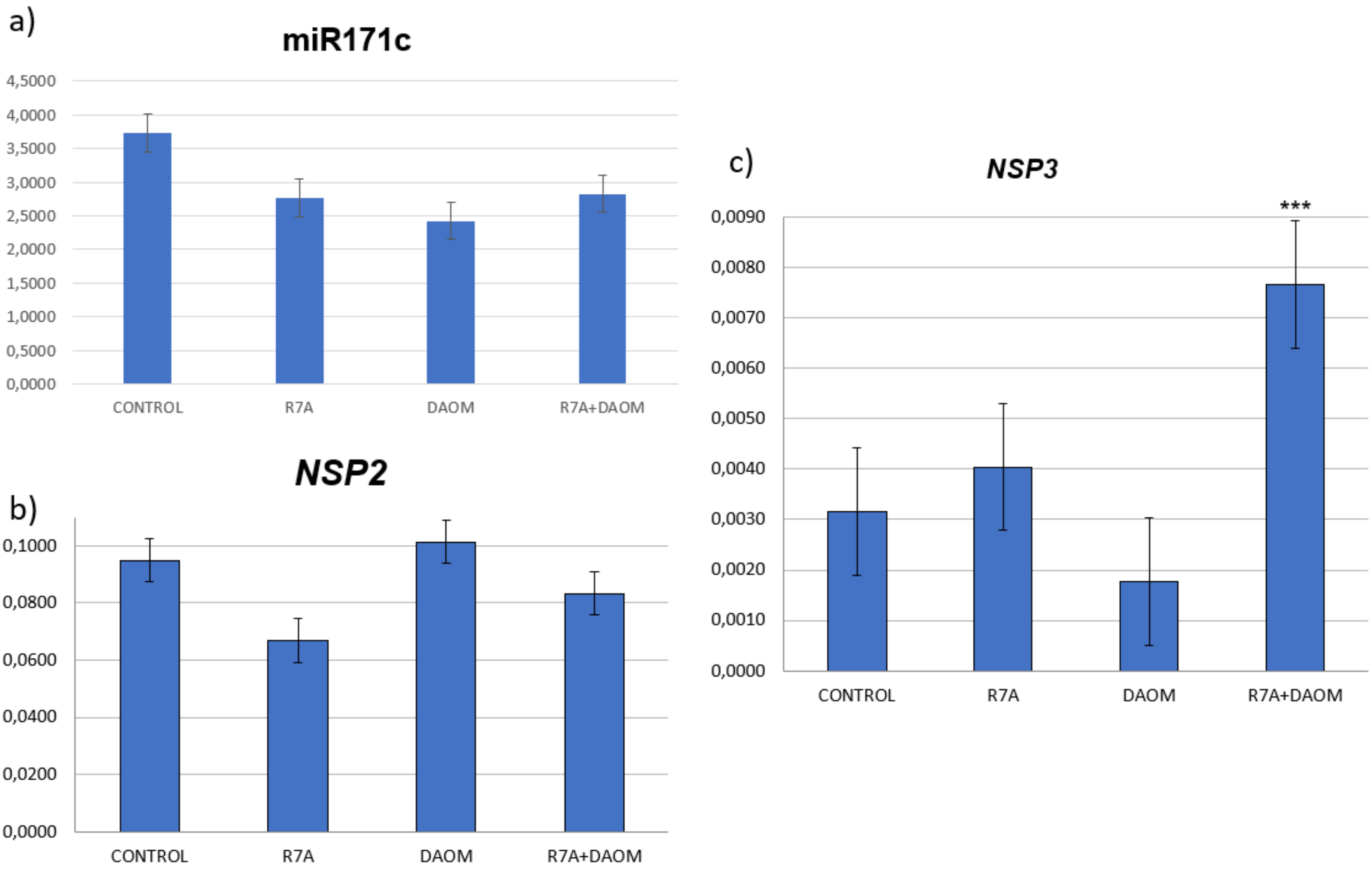
Institutional Repository - Library & Information Centre - University of Thessaly
10/02/2026 02:04:33 EET - 18.97.9.171



Εικόνα 3.2: Ηλεκτροφόρηση σε πηκτή αγαρόζης των προϊόντων PCR για την επιβεβαίωση πλήρους απομάκρυνσης του DNA μετά από με τη δράση της DNασης. Από πάνω αριστερά προς τα δεξία διακρίνονται: Πηγαδάκια 1 και 21: μάρτυρας μοριακών βαρών (Quick Load Purple 1kb Plus DNA Ladder), Πηγαδάκια 2-6: Δείγματα από μη-εμβολιασμένα φυτά, Πηγαδάκια 7-11: Δείγματα R7A, Πηγαδάκια 12-16: Δείγματα DAOM, Πηγαδάκια 17-22: Δείγματα DAOM+R7A, Πηγαδάκι 24: Θετικός μάρτυρας, Πηγαδάκι 26: Αρνητικός μάρτυρας.

Ακολούθησε σύνθεση cDNA στη συνέχεια πραγματοποιήθηκαν αντιδράσεις ποσοτικής PCR πραγματικού χρόνου (qPCR) για την διερεύνηση των επιπέδων του miR171c και των δύο πιθανών γονιδίων στόχων *NSP2* και *NSP3*. Τα αποτελέσματα της ποσοτικής PCR παρατίθενται στο Γράφημα 3. Για το miR171c παρατηρείται πως τα επίπεδα συσσώρευσής του δεν διαφέρουν σημαντικά στις διάφορες συνθήκες του εμβολιασμού, παράλληλα το ίδιο παρατηρείται και στο γονίδιο *NSP2.* Αντιθέτως, η έκφραση του γονιδίου *NSP3*, παρατηρήθηκε σημαντικά αυξημένη στην περίπτωση του διπλού εμβολιασμού του φυτού με τον ΔΕΜ και το ριζόβιο.

Institutional Repository - Library & Information Centre - University of Thessaly
10/02/2026 02:04:33 EET - 18.97.9.171



*Γράφημα 3.2: Στα γραφήματα φαίνεται η έκφραση των γονιδίων NSP2, NSP3 και του miR171c. Στα δείγματα ελέγχου (control), είναι τα φυτά αγρίου τύπου Lotus japonicus Gifu, στα R7A είναι τα φυτά που εμβολιάστηκαν μόνο με το ριζόβιο Mesorhizobium loti (στέλεχος R7A), στα δείγματα DAOM είναι τα δείγματα που εμβολιάστηκαν μόνο με τον μύκητα Rhizophagus irregularis (στέλεχος DAOM) και στα δείγματα R7A+DAOM τα δείγματα με τον διπλό εμβολιασμό. Στα γραφήματα a) και b) δεν εμφανίζονται στατιστικώς σημαντικές διακυμάνσεις στην έκφραση των γονιδίων, συγκριτικά με τα φυτά αγρίου τύπου. Στην εικόνα c) ο διπλός εμβολιασμός επηρέασε την έκφραση του NSP3 γονιδίου. Η στατιστική ανάλυση έγινε με t-test (***P<0,001) σε σύγκριση με τη συνθήκη «μη-εμβολιασμένα»*

3.3 ΕΛΕΓΧΟΣ ΤΗΣ ΕΜΠΛΟΚΗΣ ΤΩΝ miR171c ΚΑΙ *NSP2* ΣΤΟΝ ΑΠΟΙΚΙΣΜΟ ΤΩΝ ΦΥΤΩΝ ΑΠΟ ΔΕΜ ΚΑΙ ΣΤΗ ΦΥΜΑΤΙΟΓΕΝΕΣΗ ΜΕΤΑ ΑΠΟ ΔΙΠΛΟ ΕΜΒΟΛΙΑΣΜΟ

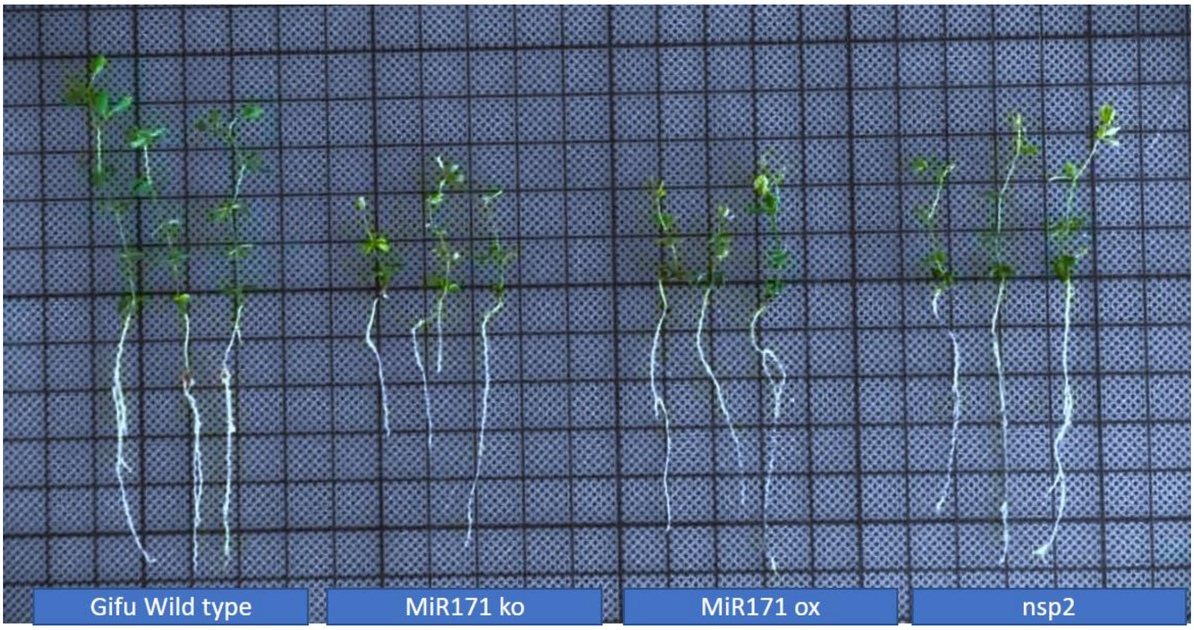
Σκοπός του πειράματος ήταν να μελετηθεί η εμπλοκή των miR171c και NSP2 τόσο στη διαδικασία της φυματιογένεσης όσο και στον αποικισμό των ριζών, στην περίπτωση διπλού εμβολιασμού των φυτών από τον ενδομυκκοριζικό μύκητα *Rhizophagus irregularis* και το αζωτοδεσμευτικό βακτήριο *Mesorhizobium loti*. Για το σκοπό αυτό, μελετήθηκαν φυτικά μεταλλάγματα υπερέκφρασης ή καταστολής των miR171c και *NSP2*. Τα μεταλλάγματα που χρησιμοποιήθηκαν ήταν :

Institutional Repository - Library & Information Centre - University of Thessaly
10/02/2026 02:04:33 EET - 18.97.9.171

→ miR171, σε υπερέκφραση (miR171c ox) (overexpression=ox)
→ miR171, αποσιωπημένο (miR171c ko) (knockout=ko)
→ *NSP2*, αποσιωπημένο (*nsp2*)

Ο εμβολιασμός με το ριζόβιο πραγματοποιήθηκε 10 ημέρες μετά τον εμβολιασμό των φυτών με τον ΔΕΜ (επεξήγηση στην παράγραφο 3.2). Τα φυτά αναπτύχθηκαν για 5 εβδομάδες και συλλέχθηκαν 35 μέρες μετά τον εμβολιασμό με τον ΔΕΜ και 25 ημέρες μετά τον εμβολιασμό με ριζόβια.

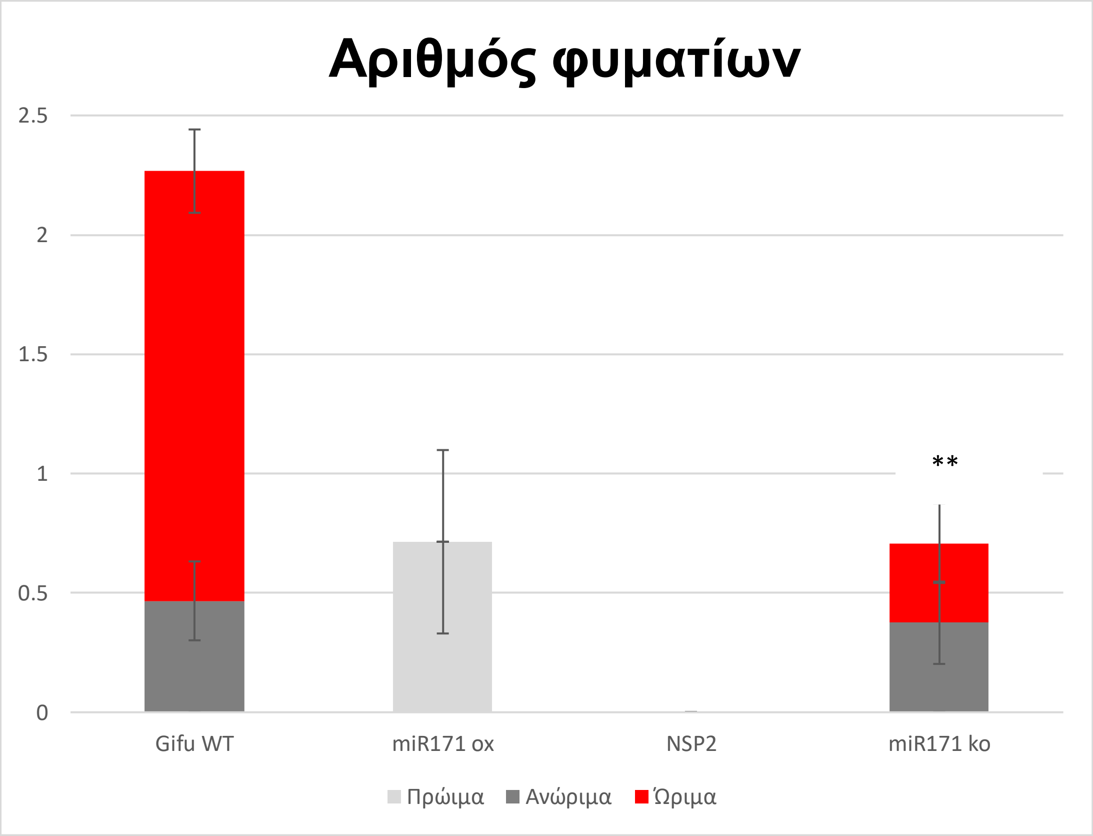
Στην Εικόνα 3.3, φαίνεται η ανάπτυξη των φυτών από τα μεταλλάγματα που χρησιμοποιήθηκαν καθώς και των φυτών αγρίου τύπου.



Εικόνα 3.3: Φυτά Lotus japonicus 34 ημέρες μετά τον εμβολιασμό με R. Irregularis και 25 ημέρες μετά τον εμβολιασμό με το M. Loti. Παρουσιάζεται η ανάπτυξη των φυτών αγρίου τύπου, καθώς και των μεταλλαγμάτων miR171 ko, τα miR171 ox και nsp2.

Αμέσως μετά την συγκομιδή, τα φυτά τοποθετήθηκαν σε σωληνάρια falcon με νερό για να διατηρούνται ενυδατωμένες οι ρίζες τους. Ακολούθησε η παρατήρηση των ριζών, με την βοήθεια του στερεοσκοπίου για την καταγραφή του αριθμού των ώριμων και ανώριμων φυματίων που σχηματίστηκαν στις ρίζες. Όπως φαίνεται στο Γράφημα 3.3.1, στα φυτά αγρίου τύπου σχηματίστηκαν τόσο ώριμα όσο και ανώριμα φυμάτια, όπως επίσης και στις ρίζες των φυτών του μεταλλάγματος miR171 ko. Ο αριθμός όμως των φυματίων που σχηματίστηκαν στις ρίζες των φυτών του μεταλλάγματος miR171 ko είναι σημαντικά μειωμένος, σε σχέση με τα φυτά αγρίου τύπου. Στα φυτά του μεταλλάγματος miR171 ox παρατηρήθηκαν μόνο κάποια πρώιμα φυμάτια (στάδιο πριν τα ανώριμα φυμάτια), ενώ στα φυτά του μεταλλάγματος *nsp2* δεν παρατηρήθηκε κανένα φυμάτιο (Γράφημα 3.3.1).

Institutional Repository - Library & Information Centre - University of Thessaly
10/02/2026 02:04:33 EET - 18.97.9.171



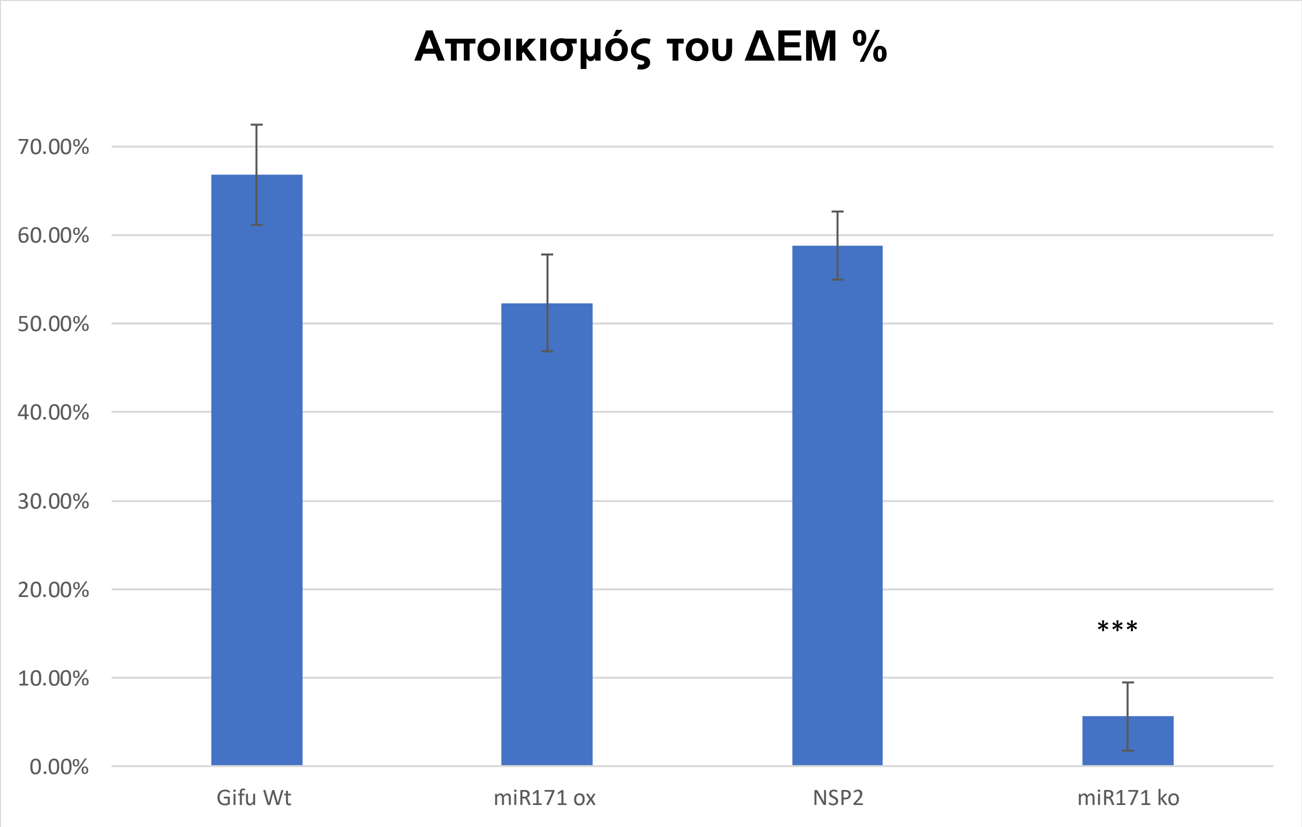
*Γράφημα 3.3.1: Αριθμός φυματίων σε φυτά L. japonicus αγρίου τύπου (WT) και σε φυτά των μεταλλαγμάτων miR171 ox, nsp2 και miR171 ko. Στο γράφημα εμφανίζεται ο αριθμός των ώριμων, ανώριμων και πρώιμων φυματίων που παρατηρήθηκαν στο στερεοσκόπιο. Πραγματοποιήθηκε στατιστική ανάλυση με "t-test" ανάμεσα στα φυτά αγρίου τύπου και των φυτών miR171 ko, όπου χρησιμοποιήθηκε ο αριθμός των ολικών φυματίων που σχηματίστηκαν και παρατηρήθηκε στατιστικώς σημαντική διαφορά (**P<0,01)*

Στη συνέχεια, για την μελέτη του ποσοστού του αποικισμού των ριζών από τον ενδομυκορριζικό μύκητα *Rhizophagus irregularis*, τα φυτά προετοιμάστηκαν για την παρατήρησή του στο μικροσκόπιο, κατόπιν χρώσης των ριζών με μελάνι. Ο αποικισμός των ριζών υπολογίζεται όπως περιγράφεται στη Παράγραφο 2.9 Στον Πίνακα 3.3 αναγράφονται τα ποσοστά αποικισμού κατά μέσο όρο, με τα φυτά αγρίου τύπου να παρουσιάζουν 66,82% αποικισμό, τα miR171 ox 52,34%, τα *nsp2* 58,82% και τα miR171 ko μόλις 5,6%. Τα ποσοστά αυτά παρουσιάζονται στο Γράφημα 3.3.2.

Institutional Repository - Library & Information Centre - University of Thessaly
10/02/2026 02:04:33 EET - 18.97.9.171

Φυτό	Ποσοστό αποικισμού από ΔΕΜ
Αγρίου τύπου	66,82%
miR171 ox	52,34%
nsp2	58,82%
miR171 ko	5,60%

Πίνακας 3.3. Ποσοστά αποικισμού των φυτών αγρίου τύπου, miR171 ox, miR171 ko και nsp2 από τον ΔΕΜ.



*Γράφημα 3.3.2: Με βάση τα ποσοστά του αποικισμού που παρατηρήθηκε στις ρίζες, εμφανίζεται στο γράφημα ο αποικισμός μετά από διπλό εμβολιασμό των φυτών με ενδομυκορριζικό μύκητα και το ριζόβιο σε φυτά αγρίου τύπου (WT), miR171 ox, nsp2 και miR171 ko. Πραγματοποιήθηκε στατιστική ανάλυση με "t-test", με τα ποσοστά του miR171 ko, να εμφανίζουν στατιστικώς σημαντική διαφορά συγκριτικά με τα φυτά αγρίου τύπου (***P<0,001).*

Institutional Repository - Library & Information Centre - University of Thessaly
10/02/2026 02:04:33 EET - 18.97.9.171

4.ΣΥΜΠΕΡΑΣΜΑ-ΣΥΖΗΤΗΣΗ

Τα φυτά μπορούν και αλληλοεπιδρούν με διάφορους μικροοργανισμούς του εδάφους, γεγονός που επωφελεί και τους δύο οργανισμούς. Ένα χαρακτηριστικό αυτών των συμβιωτικών σχέσεων είναι η ικανότητα των μικροοργανισμών να δεσμεύουν θρεπτικά συστατικά, τα οποία παρέχουν στο φυτό και βοηθούν στην ανάπτυξή του. Από την άλλη πλευρά τα φυτά ανταποδίδουν στους μικροοργανισμούς άνθρακα, που προέρχεται από την φωτοσύνθεση. Οι πιο σημαντικές και πιο καλά μελετημένες συμβιωτικές σχέσεις, είναι εκείνες μεταξύ των φυτών και των δενδρόμορφων μυκορριζικών μυκήτων και εκείνες ανάμεσα στα αζωτοδεσμευτικά βακτήρια και τα ψυχανθή φυτά (‘Oldroyd’, 2013). Ωστόσο, τα ψυχανθή φυτά έχουν την μοναδική ικανότητα να αναπτύσσουν ταυτόχρονα και τις δύο συμβιωτικές σχέσεις (Miklos et al., 2011).

Παρόλο που οι συμβιωτικές σχέσεις που αναπτύσσονται μεταξύ φυτών και μικροσυμβιωτών είναι ωφέλιμες για το φυτό, σε περίπτωση υπερβολικού αποικισμού των ριζών οι σχέσεις αυτές μπορούν να μετατραπούν σε παρασιτικές. Ωστόσο τα φυτά, διαθέτουν μηχανισμούς ώστε να προστατεύονται από τις πιθανές υπεράριθμες μολύνσεις της ρίζας από τους μικροοργανισμούς του εδάφους. Οι μηχανισμοί αυτοί αφορούν την «αυτορρύθμιση της φυματιογένεσης» (autoregulation of nodulation ή AON) κατά την οποία καθορίζεται η έκταση των μολύνσεων από τα ριζόβια και κατ’ επέκταση ο περιορισμός του αριθμού των φυματίων που σχηματίζονται στις ρίζες των ψυχανθών και την «αυτορρύθμιση των μυκορριζών» (autoregulation of mycorrhization ή AOM), κατά την οποία καθορίζεται η έκταση του αποικισμού των ριζών από τους ΔΕΜ. Δεδομένα έχουν δείξει πως αυτοί οι δύο μηχανισμοί μοιράζονται αρκετά κοινά στοιχεία (Muller et al., 2019)

Βέβαια, οι δύο συμβιωτικές σχέσεις παρουσιάζουν κοινά χαρακτηριστικά και στον τρόπο επικοινωνίας μεταξύ του φυτού και του κάθε μικροοργανισμού. Πιο αναλυτικά, τα φυτά και στις δύο περιπτώσεις εκκρίνουν ουσίες ώστε να παρακινήσουν την επικοινωνία με τους μικροοργανισμούς. Για την συμβιωτική σχέση με τα ριζόβια βακτήρια, τα φυτά εκκρίνουν φλαβονοειδή, ενώ για την αλληλεπίδραση με δενδρόμορφους ενδομυκορριζικούς μύκητες, τα φυτά εκκρίνουν στριγγολακτόνες. Σε απάντηση, οι μικροοργανισμοί εκκρίνουν λιπο-χιτ-ολιγοσακχαρίτες και ξεκινούν τα μονοπάτια σηματοδότησης για την εγκαθίδρυση των συμβιωτικών σχέσεων. Τα μονοπάτια αυτά, περιλαμβάνουν πολλά κοινά στοιχεία (γονίδια), ενώ έχει προταθεί πως υπάρχει και ένα κοινό συμβιωτικό μονοπάτι (Kistner et al., 2005). Εξάλλου έχει προταθεί ότι η μια συμβιωτική σχέση έχει εξελιχθεί από την άλλη (Parniske 2008).

Στην παρούσα διατριβή μελετήθηκε ο ταυτόχρονος αποικισμός των ψυχανθών φυτών με δενδρόμορφους ενδομυκορριζικούς μύκητες (ΔΕΜ) και ριζόβια. Για το σκοπό αυτό, χρησιμοποιήθηκε το φυτό *Lotus japonicus,* που διαθέτει όλα τα επιθυμητά χαρακτηριστικά ενός φυτού-μοντέλου, ο δενδρόμορφος ενδομυκορριζικός μύκητας (ΔΕΜ) *Rhizophagus irregularis*, που χρησιμοποιείται ευρέως ως εμβόλιο στις καλλιέργειες, αφού πολλές μελέτες έχουν δείξει πως βοηθάει στην πρόσληψη φωσφόρου, και το ριζόβιο *Mesorhizobium loti* που εμφανίζει συμβατότητα με το *Lotus japonicus.* Συγκεκριμένα, σκοπός της παρούσας εργασίας ήταν η μελέτη του miR171c και του γονιδίου-στόχου του *NSP2*, στην περίπτωση του ταυτόχρονου αποικισμού των φυτών από ριζόβια και ΔΕΜ.

Institutional Repository - Library & Information Centre - University of Thessaly
10/02/2026 02:04:33 EET - 18.97.9.171

Όπως έχει ήδη μελετηθεί, στο φυτό *Medicago truncatula* κατά την συμβίωση του με ριζόβια και ενδομυκορριζικούς μύκητες, η σχέση miR171h-NSP2 είναι αντίστροφη. Δηλαδή, κατά τη συμβίωση τα επίπεδα έκφρασης του NSP2 πέφτουν, ενώ η συσσώρευση του miR171h, αυξάνει (Miklos et al., 2011). Επίσης, από δεδομένα της βιβλιογραφίας για το φυτό *Lotus japonicus* σε συμβίωση του με το ριζόβιο *M.loti* έδειξαν πως η έκφραση του γονιδίου NSP2 μειώνεται, ενώ επάγεται η συσσώρευση του μικρού RNA miR171c (de Luis et al., 2012).

Στην παρούσα εργασία, ο εμβολιασμός των φυτών με ριζόβια πραγματοποιήθηκε 10 ημέρες μετά τον εμβολιασμό με ΔΕΜ. Το χρονικό αυτό διάστημα επιλέχθηκε σύμφωνα με παρατηρήσεις που έγιναν στο μικροσκόπιο και έδειξαν πως ο μύκητας *R. irregularis* εισέρχεται στις ρίζες του *L. japonicus* περίπου 10 ημέρες μετά την εφαρμογή του στις ρίζες (Εικόνα 3.1). Επομένως, ο πειραματικός αυτός σχεδιασμός στόχευε στην ταυτόχρονη είσοδο των δύο μικροοργανισμών στη ρίζα.

Για να μελετήσουμε την πιθανή μεταβολή στα επίπεδα συσσώρευσης του miR171c και των *NSP2* μετάγραφων στις ρίζες μετά τον εμβολιασμό με τους μικροοργανισμούς, χρησιμοποιήσαμε την τεχνική της ποσοτικής PCR πραγματικού χρόνου (qRT-PCR). Οι χειρισμοί περιλάμβαναν α) μη-μολυσμένα φυτά, β) φυτά εμβολιασμένα με ριζόβια μόνο, γ) φυτά εμβολιασμένα με ΔΕΜ μόνο και δ) φυτά διπλά εμβολιασμένα. Στην ανάλυση αυτή 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. japonicus*. Σύμφωνα με τα αποτελέσματα της μοριακής ανάλυσης, τα επίπεδα των miR171c και *NSP2* δεν φαίνεται να επηρεάζονται από κανέναν από τους διαφορετικούς χειρισμούς που μελετήθηκαν. Αντιθέτως, τα επίπεδα έκφρασης του *NSP3* βρέθηκαν σημαντικά αυξημένα στα διπλά εμβολιασμένα φυτά, σε σχέση με τα μονά εμβολιασμένα ή μη-εμβολιασμένα φυτά (Γράφημα 3.2). Μελλοντικά πειράματα αναμένεται να αναδείξουν τον ρόλο του NSP3 στις συμβιωτικές σχέσεις, καθώς μέχρι σήμερα δεν υπάρχουν διαθέσιμα δεδομένα.

Για να ελεγχθεί η πιθανή εμπλοκή των miR171c και *NSP2* στις διαδικασίες της φυματιογένεσης και του αποικισμού των φυτών από ΔΕΜ, μελετήθηκαν φυτικά μεταλλάγματα υπερέκφρασης ή καταστολής του miR171c καθώς και ένα μετάλλαγμα καταστολής του *NSP2*. Φυτά αγρίου τύπου και φυτά από τις μεταλλαγμένες φυτικές σειρές εμβολιάστηκαν με ριζόβιο και δενδρόμορφο μυκορριζικό μύκητα και η παρατήρηση των φαινοτύπων έγινε 35 ημέρες μετά τον εμβολιασμό των φυτών με τον ΔΕΜ και 25 ημέρες μετά τον εμβολιασμό με ριζόβιο.

Όσον αφορά τη φυματιογένεση, τα φυτά αγρίου τύπου ανέπτυξαν αρκετά ώριμα και ανώριμα φυμάτια, όπως ήταν αναμενόμενο. Η υπερέκφραση του miR171c είχε σαν αποτέλεσμα να μην σχηματιστούν ούτε ώριμα ούτε ανώριμα φυμάτια, και παρατηρήθηκε μόνο η ανάπτυξη πολύ πρώιμων δομών του φυματίου. Αντιθέτως, στην περίπτωση καταστολής του miR171c τα φυτά κατάφεραν να δημιουργήσουν ώριμα και ανώριμα φυμάτια, αλλά ο συνολικός αριθμός των φυματίων βρέθηκε να είναι σημαντικά μειωμένος, σε σχέση με τα φυτά αγρίου τύπου (Γράφημα 3.3.1.). Τον περισσότερο δραματικό φαινότυπο παρουσίασαν τα φυτά του μεταλλάγματος *nsp2*, όπου δεν καταμετρήθηκε ούτε ένα φυμάτιο στις ρίζες, ούτε παρατηρήθηκαν κάποιες πρώιμες δομές φυματίου (Γραφημα 3.3.1).

Φαίνεται, επομένως, πως το miR171c, μέσω της ρύθμισης του γονιδίου στόχου του, επηρεάζει σημαντικά τη φυματιογένεση. Όταν το miR171c υπερεκφράζεται, αναμένεται να καταστέλλει ισχυρά το NSP2, και αυτή η καταστολή βρέθηκε να ρυθμίζει αρνητικά

Institutional Repository - Library & Information Centre - University of Thessaly
10/02/2026 02:04:33 EET - 18.97.9.171

τη φυματιογένεση. Το συμπέρασμα αυτό επιβεβαιώνεται και από τον φαινότυπο του μεταλλάγματος *nsp2*, όπου η καταστολή του γονιδίου *NSP2* επίσης επέφερε ανικανότητα των φυτών να σχηματίσουν φυμάτια (Γράφημα 3.3.1). Αυτό σημαίνει πως το NSP2 είναι απαραίτητο για τη δημιουργία φυματίων. Σύμφωνα με τη βιβλιογραφία, σε εργασίες που έχουν γίνει στο φυτό *Medicago truncatula*, όταν το miR171 υπερεκφράζεται, δημιουργείται μια καταστολή του γονιδίου NSP2 στατιστικώς σημαντική και ρυθμίζει αρνητικά τη φυματιογένεση. Στην περίπτωση του μεταλλάγματος *nsp2*, βρέθηκε πως επηρεάζει σε ένα βαθμό την φυματιογένεση, αλλά όχι τόσο ισχυρά όπως στην περίπτωση του *Lotus japonicus* (Miklos *et al.*, 2011b).

Η μελέτη του αποικισμού των φυτών αγρίου και των μεταλλαγμάτων από τον ΔΕΜ, έδειξε πως η υπερέκφραση του miR171c, και συνεπώς η καταστολή του NSP2, δεν επηρεάζουν σημαντικά τον αποικισμό των ριζών από τον ΔΕΜ. Αυτό επιβεβαιώνεται και από τον φαινότυπο του μεταλλάγματος *nsp2*, όπου η απουσία της δράσης του γονιδίου *NSP2* επίσης δεν επηρέασε τον αποικισμό από ΔΕΜ (Γράφημα 3.3.2). Σε αντίθεση με το *L. japonicus*, στο *Medicago truncatula* η υπερέκφραση του miR171c, και η καταστολή του NSP2 οδήγησαν σε μείωση του αποικισμού της ρίζας από τον ΔΕΜ (Hofferek et al., 2014). Όσον αφορά την καταστολή του miR171c, επέφερε δραματική μείωση στα επίπεδα αποικισμού των ριζών από τον ΔΕΜ. Ο ΔΕΜ αποίκησε την ρίζα σε ποσοστό μόλις ~6%, δηλαδή ο αποικισμός ήταν περίπου 10 φορές μειωμένος σε σχέση με τον αποικισμό που υπολογίστηκε για τα φυτά αγρίου τύπου (67%) (Πίνακας 3.3). Αυτό σημαίνει πως το miR171c είναι απαραίτητο για τον αποικισμό των ριζών από ΔΕΜ. Ωστόσο, η συνθήκη καταστολή του miR171c δεν ελέγχθηκε στο *Medicago truncatula*.

Φαίνεται λοιπόν πως η απουσία της δράσης του miR171c επηρεάζει αρνητικά τη φυματιογένεση, σε κάποιο βαθμό, ενώ επίσης επηρεάζει αρνητικά τον αποικισμό από ΔΕΜ, σε αρκετά μεγάλο βαθμό, όταν οι δύο συμβιωτικές σχέσεις συμβαίνουν ταυτόχρονα στο ίδιο φυτό-ξενιστή. Είναι πιθανό η δράση του miR171c να σχετίζεται με τη ρύθμιση της έκτασης του αποικισμού της ρίζας. Είναι αξιοσημείωτο το γεγονός ότι στην περίπτωση υπερέκφρασης του miR171c τα φυτά είναι καλά αποικισμένα από τον ΔΕΜ αλλά δεν καταφέρνουν να φτιάξουν φυμάτια, ενώ στην περίπτωση καταστολής του miR171c τα φυτά καταφέρνουν να φτιάξουν φυμάτια αλλά αποικίζονται ελάχιστα από τον ΔΕΜ. Μελλοντικά πειράματα που θα εμβαθύνουν στη μελέτη του miR171c ίσως αναδείξουν κάποιο ρόλο του στην ισορροπία της ταυτόχρονης εγκαθίδρυσης των δύο συμβιωτικών σχέσεων στην ίδια ρίζα.

Institutional Repository - Library & Information Centre - University of Thessaly
10/02/2026 02:04:33 EET - 18.97.9.171

ΒΙΒΛΙΟΓΡΑΦΙΑ

Bago, B. and Shachar-Hill, Y. (2000) *Carbon Metabolism and Transport in Arbuscular Mycorrhizas*. Available at: www.mycorrhiza.ag.utk.edu.

Bolle, C., Koncz, C. and Chua, N.-H. (2000) *PAT1, a new member of the GRAS family, is involved in phytochrome A signal transduction*. Available at: www.genesdev.org.

Bologna, N.G. and Voinnet, O. (2014) 'The diversity, biogenesis, and activities of endogenous silencing small RNAs in Arabidopsis', *Annual Review of Plant Biology*. Annual Reviews Inc., pp. 473–503. Available at: https://doi.org/10.1146/annurev-arplant-050213-035728.

Cavagnaro, T.R. *et al.* (2005) *Functional diversity in arbuscular mycorrhizas: exploitation of soil patches with different phosphate enrichment differs among fungal species*, *Plant, Cell and Environment*.

de Luis, A. *et al.* (2012) 'Two MicroRNAs linked to nodule infection and nitrogen-fixing ability in the legume Lotus japonicus', *Plant Physiology*, 160(4), pp. 2137–2154. Available at: https://doi.org/10.1104/pp.112.204883.

Doyle, J.J. (1994) *PHYLOGENY OF THE LEGUME FAMILY: An Approach to Understanding the Origins of Nodulation*, *Annu. Rev. Ecol. Syst*. Available at: www.annualreviews.org.

Fr´, F., Fréd´, F. and Debelí, F. (2020) *The common symbiotic signaling pathway*.

Genre, A. and Bonfante, P. (2005) 'Building a mycorrhizal cell: How to reach compatibility between plants and arbuscular mycorrhizal fungi', *Journal of Plant Interactions*, pp. 3–13. Available at: https://doi.org/10.1080/17429140500318986.

Geurts, R., Fedorova, E. and Bisseling, T. (2005) 'Nod factor signaling genes and their function in the early stages of Rhizobium infection', *Current Opinion in Plant Biology*, pp. 346–352. Available at: https://doi.org/10.1016/j.pbi.2005.05.013.

Graham, P.H. and Vance, C.P. (2003) 'Legumes: Importance and constraints to greater use', *Plant Physiology*. American Society of Plant Biologists, pp. 872–877. Available at: https://doi.org/10.1104/pp.017004.

Grubisha, L.C. *et al.* (2002) 'Biology of the ectomycorrhizal genus Rhizopogon. VI. Re-examination of infrageneric relationships inferred from phylogenetic analyses of ITS sequences', *Mycologia*, 94(4), pp. 607–619. Available at: https://doi.org/10.1080/15572536.2003.11833189.

Han, H. and Zhou, Y. (2022) 'Function and Regulation of microRNA171 in Plant Stem Cell Homeostasis and Developmental Programing', *International Journal of Molecular Sciences*. MDPI. Available at: https://doi.org/10.3390/ijms23052544.

Hossain, M.S. *et al.* (2019) 'Characterization of the spatial and temporal expression of two soybean mirnas identifies SCL6 as a novel regulator of soybean nodulation', *Frontiers in Plant Science*, 10. Available at: https://doi.org/10.3389/fpls.2019.00475.

Institutional Repository - Library & Information Centre - University of Thessaly
10/02/2026 02:04:33 EET - 18.97.9.171

Kavadia, A. *et al.* (2021) 'Co-inoculations with rhizobia and arbuscular mycorrhizal fungi alters mycorrhizal composition and lead to synergistic growth effects in cowpea that are fungal combination-dependent', *Applied Soil Ecology*, 167. Available at: https://doi.org/10.1016/j.apsoil.2021.104013.

Larimer, A.L., Clay, K. and Bever, J.D. (2014) *Synergism and context dependency of interactions between arbuscular mycorrhizal fungi and rhizobia with a prairie legume*, *Ecology*.

Lauressergues, D. *et al.* (2012) 'The microRNA miR171h modulates arbuscular mycorrhizal colonization of Medicago truncatula by targeting NSP2', *Plant Journal*, 72(3), pp. 512–522. Available at: https://doi.org/10.1111/j.1365-313X.2012.05099.x.

Leake, J. *et al.* (2004) 'Networks of power and influence: The role of mycorrhizal mycelium in controlling plant communities and agroecosystem functioning', in *Canadian Journal of Botany*, pp. 1016–1045. Available at: https://doi.org/10.1139/B04-060.

Ledermann, R., Schulte, C.C.M. and Poole, P.S. (2021) 'How rhizobia adapt to the nodule environment', *Journal of Bacteriology*. American Society for Microbiology. Available at: https://doi.org/10.1128/JB.00539-20.

Marques, M.S., Pagano, M. and Scotti, M.R.M.M.L. (2001) 'Dual inoculation of a woody legume (Centrolobium tomentosum) with rhizobia and mycorrhizal fungi in south-eastern Brazil', *Agroforestry Systems*, 50(2), pp. 107–117. Available at: https://doi.org/10.1023/A:1010637401475.

Mcallister, C.H., Beatty, P.H. and Good, A.G. (2012) 'Engineering nitrogen use efficient crop plants: The current status', *Plant Biotechnology Journal*, pp. 1011–1025. Available at: https://doi.org/10.1111/j.1467-7652.2012.00700.x.

Mendoza-Suárez, M. *et al.* (2021) 'Competition, Nodule Occupancy, and Persistence of Inoculant Strains: Key Factors in the Rhizobium-Legume Symbioses', *Frontiers in Plant Science*. Frontiers Media S.A. Available at: https://doi.org/10.3389/fpls.2021.690567.

Márquez, A.J. (Antonio J.) and Stougaard, J. (2005) *Lotus japonicus handbook*. Springer.

Miklos, A.C. *et al.* (2011) 'An upper limit for macromolecular crowding effects', *BMC Biophysics*, 4(1). Available at: https://doi.org/10.1186/2046-1682-4-13.

Miklos, A.C. *et al.* (2011a) 'An upper limit for macromolecular crowding effects', *BMC Biophysics*, 4(1). Available at: https://doi.org/10.1186/2046-1682-4-13.

Miklos, A.C. *et al.* (2011b) 'An upper limit for macromolecular crowding effects', *BMC Biophysics*, 4(1). Available at: https://doi.org/10.1186/2046-1682-4-13.

Müller, L.M. *et al.* (2019) 'A CLE–SUNN module regulates strigolactone content and fungal colonization in arbuscular mycorrhiza', *Nature Plants*, 5(9), pp. 933–939. Available at: https://doi.org/10.1038/s41477-019-0501-1.

'Mycorrhizal fungal diversity' (no date).

Nishida, H. *et al.* (2020) 'Autoregulation of nodulation pathway is dispensable for nitrate-induced control of rhizobial infection', *Plant Signaling and Behavior*, 15(3). Available at: https://doi.org/10.1080/15592324.2020.1733814.

Institutional Repository - Library & Information Centre - University of Thessaly
10/02/2026 02:04:33 EET - 18.97.9.171

Njaci, I. *et al.* (2018) 'Genome-wide investigation of the role of micrornas in desiccation tolerance in the resurrection grass tripogon loliiformis', *Plants*, 7(3). Available at: https://doi.org/10.3390/plants7030068.

Okamoto, S., Tabata, R. and Matsubayashi, Y. (2016) 'Long-distance peptide signaling essential for nutrient homeostasis in plants', *Current Opinion in Plant Biology*. Elsevier Ltd, pp. 35–40. Available at: https://doi.org/10.1016/j.pbi.2016.07.009.

Parniske, M. (2008) 'Arbuscular mycorrhiza: The mother of plant root endosymbioses', *Nature Reviews Microbiology*, pp. 763–775. Available at: https://doi.org/10.1038/nrmicro1987.

Pegler, J.L. *et al.* (2019) 'Profiling the abiotic stress responsive microRNA landscape of arabidopsis thaliana', *Plants*, 8(3). Available at: https://doi.org/10.3390/plants8030058.

Plant Symbionts Epigenetic Shaping of Sociosexual In-teractions 3 Plant-Symbiont Associations (no date).

Stougaard, J. (2017) 'Lotus japonicus : A Model Plant for the Legume Family ☆', in *Reference Module in Life Sciences*. Elsevier. Available at: https://doi.org/10.1016/b978-0-12-809633-8.06661-9.

Suzaki, T. and Nishida, H. (2019) 'Autoregulation of Legume Nodulation by Sophisticated Transcriptional Regulatory Networks', *Molecular Plant*. Cell Press, pp. 1179–1181. Available at: https://doi.org/10.1016/j.molp.2019.07.008.

'The art of Self control_autoregulation of plant_microbe symbioses' (no date).

Trappe, J.M. (2005) 'A.B. Frank and mycorrhizae: The challenge to evolutionary and ecologic theory', *Mycorrhiza*, 15(4), pp. 277–281. Available at: https://doi.org/10.1007/s00572-004-0330-5.

Tsikou, D. *et al.* (2018) 'Systemic control of legume susceptibility to rhizobial infection by a mobile microRNA', *Science*, 362(6411), pp. 233–236. Available at: https://doi.org/10.1126/science.aat6907.

Vierheilig, H. (2004) 'Regulatory mechanisms during the plant - Arbuscular mycorrhizal fungus interaction', in *Canadian Journal of Botany*, pp. 1166–1176. Available at: https://doi.org/10.1139/B04-015.

Vierheilig, H. and Piche, Y. (no date) *SIGNALLING IN ARBUSCULAR MYCORRHIZA: FACTS AND HYPOTHESES*.

Wang, Q., Liu, J. and Zhu, H. (2018) 'Genetic and molecular mechanisms underlying symbiotic specificity in legume-rhizobium interactions', *Frontiers in Plant Science*. Frontiers Media S.A. Available at: https://doi.org/10.3389/fpls.2018.00313.

Willis, A., Rodrigues, B.F. and Harris, P.J.C. (2013) 'The Ecology of Arbuscular Mycorrhizal Fungi', *Critical Reviews in Plant Sciences*, 32(1), pp. 1–20. Available at: https://doi.org/10.1080/07352689.2012.683375.

Λογοθέτη, Σ. *et al.* (no date) *Ογκογόνα Μικρό-RNAs (oncomirs): microRNAs με Ρόλο σιον Καρκίνο*.

Institutional Repository - Library & Information Centre - University of Thessaly
10/02/2026 02:04:33 EET - 18.97.9.171

Υψηλάντης, Γ. and Καρπούζας, Δ. (2010a) *Εργαστηριακές Ασκήσεις Περιβαλλοντικής Βιοτεχνολογίας Εργαστηριακή Άσκηση 6 Μελέτη των δενδροειδών μυκορριζικών μυκήτων*.

Υψηλάντης, Γ. and Καρπούζας, Δ. (2010b) *Εργαστηριακές Ασκήσεις Περιβαλλοντικής Βιοτεχνολογίας Εργαστηριακή Άσκηση 6 Μελέτη των δενδροειδών μυκορριζικών μυκήτων*.

Institutional Repository - Library & Information Centre - University of Thessaly
10/02/2026 02:04:33 EET - 18.97.9.171