

**ΠΑΝΕΠΙΣΤΗΜΙΟ ΘΕΣΣΑΛΙΑΣ**

**ΤΜΗΜΑ ΒΙΟΧΗΜΕΙΑΣ ΚΑΙ ΒΙΟΤΕΧΝΟΛΟΓΙΑΣ**

**ΠΡΟΓΡΑΜΜΑ ΜΕΤΑΠΤΥΧΙΑΚΩΝ ΣΠΟΥΔΩΝ**

**Μάριος Βαλμάς**



**Λάρισα, 2023**

***«Μελέτη της εμπλοκής του miR2111 στον μηχανισμό  
αυτορρύθμισης της ενδομυκορριζικής συμβίωσης»***

***«Study of the miR2111 involvement in the  
autoregulation of arbuscular mycorrhizal symbiosis»***

Η παρούσα διπλωματική εργασία εκπονήθηκε στο τμήμα Βιοχημείας και Βιοτεχνολογίας, του Πανεπιστημίου Θεσσαλίας, στο εργαστήριο Βιοτεχνολογίας Φυτών και Περιβάλλοντος.

Υπεύθυνη καθηγήτρια: Τσίκου Δανιέλα

#### **Τριμελής συμβουλευτική επιτροπή**

- ❖ Τσίκου Δανιέλα, Επίκουρος Καθηγήτρια Μοριακής και Αναπτυξιακής Βιολογίας Φυτών, Τμήμα Βιοχημείας και Βιοτεχνολογίας, Πανεπιστήμιο Θεσσαλίας (επιβλέπουσα)
- ❖ Παπαδοπούλου Καλλιόπη, Καθηγήτρια Βιοτεχνολογίας Φυτών, Τμήμα Βιοχημείας και Βιοτεχνολογίας, Πανεπιστήμιο Θεσσαλίας
- ❖ Γιακουντής Αντώνιος, Επίκουρος Καθηγητής Μοριακής Βιολογίας–Γονιδιωματικής, Τμήμα Βιοχημείας και Βιοτεχνολογίας, Πανεπιστήμιο Θεσσαλίας

## Ευχαριστίες

Αρχικά, θα ήθελα να ευχαριστήσω την Επίκουρο Καθηγήτρια, Δανιέλα Τσίκου, για την εμπιστοσύνη που μου έδειξε στην ανάθεση της συγκεκριμένης διπλωματικής εργασίας, καθώς και για την πολύτιμη καθοδήγηση και βοήθειά της στην διεξαγωγή των πειραματικών διαδικασιών και τη συγγραφή της διατριβής.

Επίσης, θα ήθελα να ευχαριστήσω την Καθηγήτρια, Καλλιόπη Παπαδοπούλου και τον Επίκουρο Καθηγητή, Αντώνιο Γιακουντή, όντας μέλη της τριμελούς εξεταστικής επιτροπής.

Ακόμη, να ευχαριστήσω τα μέλη του εργαστηρίου Βιοτεχνολογίας Φυτών και Περιβάλλοντος για τη συνεργασία τους.

Τέλος, να ευχαριστήσω την οικογένειά μου για τη στήριξή τους καθ' όλη τη διάρκεια των σπουδών μου.

## Περιεχόμενα

<b>Ευχαριστίες</b> .....	4
<b>Περιεχόμενα</b> .....	5
<b>Περίληψη</b> .....	7
<b>Abstract</b> .....	8
<b>1. Εισαγωγή</b> .....	9
1.1 Αλληλεπιδράσεις μεταξύ φυτών και μικροοργανισμών .....	9
1.2 Αλληλεπίδραση μεταξύ ψυχανθών και ριζοβίων .....	9
1.2.1 Ψυχανθή φυτά .....	9
1.2.2 Συμβίωση ριζοβίων και ψυχανθών .....	10
1.2.3 Συμβιωτική αζωτοδέσμευση και ανταλλαγή θρεπτικών .....	11
1.3 Αλληλεπίδραση μεταξύ φυτών και ενδομυκορριζικών μυκήτων .....	12
1.3.1 Μυκορριζική συμβίωση .....	12
1.3.2 Συμβίωση ενδομυκορριζικών μυκήτων και φυτών .....	12
1.3.3 Πρόσληψη και ανταλλαγή θρεπτικών συστατικών .....	13
1.4 Σηματοδότηση στη συμβίωση .....	14
1.5 Αυτορρύθμιση των συμβιωτικών σχέσεων .....	15
1.6 Δεκτικότητα των φυτών στη συμβίωση .....	16
1.7 Ρόλος των miRNAs στη συμβίωση .....	17
1.8 Η σημασία του ζεύγους miR2111-TML .....	19
1.9 Σκοπός .....	20
<b>2. Υλικά και μέθοδοι</b> .....	21
2.1 Βιολογικό υλικό και συνθήκες ανάπτυξης .....	21
2.2 Απολύμανση και εκβλάστηση σπόρων .....	21
2.3 Μεταφύτευση σε δοχεία magenta .....	22
2.3.1 Φύτεμα μη εμβολιασμένων φυτών .....	22
2.3.2 Φύτεμα και εμβολιασμός με ενδομυκορριζικό μύκητα (μέθοδος sandwich) .....	22
2.3.3 Προετοιμασία εμβολίου ενδομυκορριζικού μύκητα .....	23
2.4 Φαινοτυπική ανάλυση .....	23
2.4.1 Χρώση ριζών με μελάνι .....	24
2.4.2 Υπολογισμός αποικισμού από ενδομυκορριζικό μύκητα .....	24
2.5 Μοριακή ανάλυση .....	24
2.5.1 Απομόνωση ολικού RNA από ρίζες .....	25
2.5.2 Απομάκρυνση γενωμικού DNA (DNase treatment) .....	26
2.5.3 Αλυσιδωτή αντίδραση πολυμεράσης (PCR) .....	27
2.5.4 Αντίστροφη μεταγραφή (RT-PCR) – Σύνθεση συμπληρωματικού DNA (cDNA) .....	27
2.5.5 Ποσοτική PCR πραγματικού χρόνου (qPCR) .....	28

2.6 Στατιστική ανάλυση.....	29
<b>3. Αποτελέσματα.....</b>	<b>30</b>
3.1 Έλεγχος απόκρισης του miR2111 και του γονιδίου <i>TML</i> στη συμβίωση με ενδομυκορριζικό μύκητα .....	30
3.2 Έλεγχος του αποικισμού των φυτών από ενδομυκορριζικό μύκητα, κατά την υπερσυσσώρευση του miR2111 .....	32
3.2.1 Έλεγχος επιπέδων υπερσυσσώρευσης του <i>miR2111</i> .....	32
3.2.2 Μοριακός έλεγχος του αποικισμού με ενδομυκορριζικό μύκητα στη φυτική σειρά 2111_OX_2 .....	34
3.3 Διερεύνηση του ρόλου του γονιδίου <i>TML</i> στη συμβίωση με ενδομυκορριζικό μύκητα .....	37
3.3.1 Φαινοτυπικός έλεγχος του αποικισμού στα μεταλλάγματα <i>tml-5</i> και <i>tml-6</i> .	37
3.3.2 Μοριακός έλεγχος του αποικισμού στα μεταλλάγματα <i>tml-5</i> και <i>tml-6</i> .....	37
3.4 Έλεγχος του αποικισμού των φυτών με ενδομυκορριζικό μύκητα, κατά την μειωμένη συσσώρευση του miR2111 .....	40
3.4.1 Έλεγχος καταστολής έκφρασης του <i>MIR2111-3</i> .....	40
3.4.2 Μοριακός έλεγχος του αποικισμού στο μετάλλαγμα 2111_KO .....	41
<b>4. Συζήτηση .....</b>	<b>43</b>
<b>Παράρτημα 1: γενετικά τροποποιημένες φυτικές σειρές που χρησιμοποιήθηκαν στην εργασία.....</b>	<b>47</b>
<b>Παράρτημα 2: αλληλουχίες εκκινήτων .....</b>	<b>48</b>
<b>Παράρτημα 3: εταιρίες αντιδραστηρίων/υλικών.....</b>	<b>49</b>
<b>Βιβλιογραφία .....</b>	<b>50</b>

## Περίληψη

Τα φυτά αναπτύσσουν συμβιωτικές σχέσεις με μικροοργανισμούς, με στόχο την πρόσληψη θρεπτικών συστατικών. Δύο διαδεδομένες συμβιωτικές σχέσεις είναι μεταξύ της πλειοψηφίας των χερσαίων φυτών και δενδρόμορφων ενδομυκορριζικών μυκήτων (ΔΕΜ), η οποία βοηθά κυρίως στην πρόσληψη φωσφόρου, αλλά και μεταξύ ψυχανθών και ριζοβίων, η οποία βοηθά στην πρόσληψη αζώτου. Τα δύο είδη συμβίωσης υπόκεινται σε μηχανισμούς αυτορρύθμισης, με σκοπό να ρυθμιστεί η είσοδος των μικροοργανισμών στα φυτά και η έκταση του αποικισμού της ρίζας. Στη συμβιωτική σχέση με ριζόβια ενεργοποιείται ο μηχανισμός αυτορρύθμισης της φυματογένεσης ή AON, και στη συμβίωση με ΔΕΜ ενεργοποιείται ο μηχανισμός αυτορρύθμισης της μυκορριζικής συμβίωσης ή AOM. Αν και ο AOM είναι λιγότερο μελετημένος, οι δύο αυτοί μηχανισμοί μοιράζονται κοινά στοιχεία. Ένα σημαντικό μόριο του AON αποτελεί το μικρό RNA miR2111 (microRNA 2111). Το miR2111 προωθεί τη συμβίωση με ριζόβια, αναστέλλοντας την έκφραση του γονιδίου *TML* (*TOO MUCH LOVE*), το οποίο είναι αναστολέας της συμβίωσης. Το ζεύγος miR2111-*TML* είναι καλά μελετημένο και διαδραματίζει κεντρικό ρόλο στον AON. Στην παρούσα εργασία μελετήθηκε εάν το miR2111 και κατ' επέκταση το ζεύγος miR2111-*TML*, διαδραματίζει ρόλο στον AOM και τη συμβίωση με ΔΕΜ, στο ψυχανθές-μοντέλο *Lotus japonicus*.

Λέξεις-κλειδιά: συμβίωση φυτών-μικροοργανισμών, ριζόβια, δενδρόμορφοι ενδομυκορριζικοί μύκητες, μηχανισμοί ρύθμισης, miR2111, *TML*

## Abstract

Plants develop symbiotic relationships with microorganisms, with the aim of nutrient uptake. Two widespread symbiotic relationships are those between the majority of land plants and arbuscular mycorrhizal fungi (AMF), which mainly helps in phosphorus uptake, and between legumes and rhizobia, which helps in nitrogen uptake. Both types of symbiosis are subjected to autoregulation mechanisms, for the regulation of the microorganisms' entry into the root and the extent of symbiosis, called autoregulation of nodulation (AON), for rhizobia and autoregulation of mycorrhization (AOM), for AMF. Although AOM is least studied, these two mechanisms share common elements. An important molecule of AON is the small RNA miR2111 (microRNA 2111). miR2111 promotes rhizobial symbiosis, by inhibiting the expression of *TML* (*TOO MUCH LOVE*) gene, which is a symbiosis inhibitor. The miR2111-TML pair is well studied and plays a central role in AON. In the present work, it was studied if miR2111 and by extension the miR2111-TML pair, plays a role in AOM and in symbiosis with AMF, in the legume-model *Lotus japonicus*.

**Keywords:** *plant-microorganism symbiosis, rhizobia, arbuscular mycorrhizal fungi, regulation mechanisms, miR2111, TML*



## 1. Εισαγωγή

### 1.1 Αλληλεπιδράσεις μεταξύ φυτών και μικροοργανισμών

Πολλά είδη φυτών έχουν την ικανότητα να αλληλεπιδρούν με ένα εύρος μικροοργανισμών. Οι μικροοργανισμοί αυτοί μπορεί να είναι παθογόνοι ή συμβιωτικοί. Στην πρώτη περίπτωση, τα φυτά προσπαθούν να περιορίσουν την είσοδο των παθογόνων μικροοργανισμών. Στην δεύτερη περίπτωση, τα φυτά προωθούν την είσοδο και συμβίωση με τους συμβιωτικούς μικροοργανισμούς. Ωστόσο, και στις δύο περιπτώσεις, η ύπαρξη περίπλοκων σηματοδοτικών μονοπατιών είναι απαραίτητη, για να καθοριστεί ο βαθμός εισόδου των μικροοργανισμών (Oldroyd, 2013).

Η εγκαθίδρυση των συμβιωτικών σχέσεων αποσκοπεί κυρίως στη βελτίωση της πρόσληψης θρεπτικών στοιχείων, σε συνθήκες έλλειψής τους. Οι πιο διαδεδομένες συμβιωτικές σχέσεις είναι μεταξύ ψυχανθών και ριζοβίων (αζωτοδεσμευτικών βακτηρίων) και μεταξύ φυτών και ενδομυκορριζικών μυκήτων. Συγκεκριμένα, τα ριζόβια μετατρέπουν το άζωτο ( $N_2$ ) σε αμμωνία ( $NH_3$ ), ενώ οι ενδομυκορριζικοί μύκητες αυξάνουν την πρόσληψη φωσφορικών ( $PO_4^-$ ) και νιτρικών ( $NO_3^-$ ) ιόντων (Oldroyd and Leyser, 2020).

### 1.2 Αλληλεπίδραση μεταξύ ψυχανθών και ριζοβίων

#### 1.2.1 Ψυχανθή φυτά

Η οικογένεια των ψυχανθών φυτών (Leguminosae ή Fabaceae) εμφανίστηκε πριν από περίπου 60 εκατομμύρια χρόνια και χωρίζεται σε τρεις υποοικογένειες, τις Papilionoideae, Mimosoideae και Caesalpinioideae (Cannon, 2013; Lavin et al., 2005). Τα ψυχανθή έχουν μεγάλη σημασία στη γεωργία, καθώς έχουν μεγάλη θρεπτική αξία και αποτελούν το ένα τρίτο της παγκόσμιας παραγωγής. Επίσης, λόγω της συμβίωσης με ριζόβια και της συμβιωτικής βιολογικής αζωτοδέσμευσης που επιτελείται, παίζουν ρόλο τόσο στη γεωργία, όσο και στην οικολογία, οδηγώντας στην αντικατάσταση των αζωτούχων λιπασμάτων (Graham and Vance, 2003).

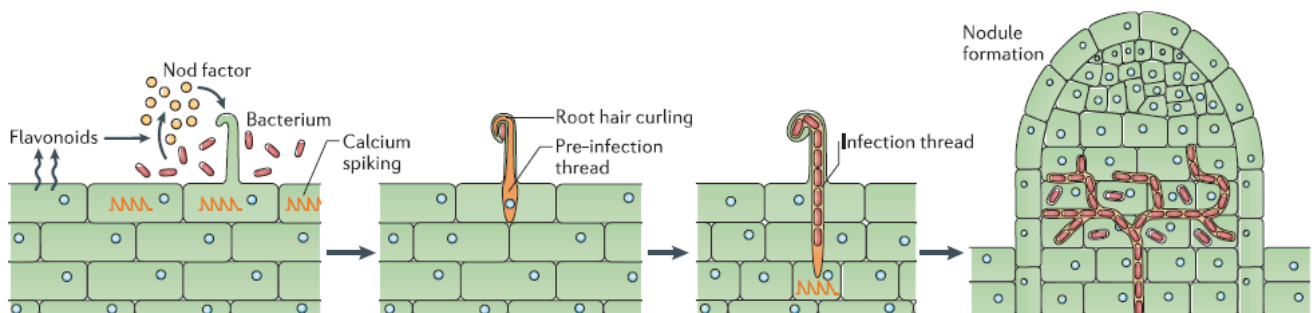
Τα γονιδιώματα ορισμένων ψυχανθών έχουν ήδη αλληλουχηθεί σε μεγάλο βαθμό, όπως του *Lotus japonicus* (Sato et al., 2008), του *Medicago truncatula* (Young et al., 2011) και του *Glycine max* (Schmutz et al., 2010), τα οποία αποτελούν γονιδιώματα αναφοράς. Η ανάλυση των γονιδιωμάτων τους έχει αποκαλύψει γονίδια και δίνει πληροφορίες για την εξέλιξη της συμβίωσης των ψυχανθών με ριζόβια, στην οποία έπαιξε ρόλο ο διπλασιασμός των γονιδιωμάτων των ψυχανθών (Young and Bharti, 2012).

### 1.2.2 Συμβίωση ριζοβίων και ψυχανθών

Η συμβίωση μεταξύ των ψυχανθών και των ριζοβίων ξεκινά με τη χημική επικοινωνία των δύο οργανισμών. Αρχικά, παράγονται φλαβονοειδή (flavonoids) και εκκρίνονται από τις ρίζες των ψυχανθών (Long and Staskawicz, 1993; Maxwell et al., 1989). Τα φλαβονοειδή είναι δευτερογενείς φυτικοί μεταβολίτες και συμμετέχουν σε διαδικασίες όπως ο χρωματισμός των ανθών, η ανάπτυξη των φυτών και η προστασία από ακτινοβολία UV (Mathesius, 2018). Με την απελευθέρωση των φλαβονοειδών επάγεται η έκφραση των γονιδίων *Nod* στα ριζόβια (Long and Staskawicz, 1993; Maxwell et al., 1989).

Τα γονίδια *Nod* κωδικοποιούν για τους παράγοντες Nod (Nod Factors, NFs), οι οποίοι απελευθερώνονται από τα ριζόβια, καθώς και για παράγοντες απαραίτητους για την απελευθέρωσή τους. Οι NFs είναι λιποχιτοολιγοσακχαρίτες (lipochitooligosaccharides, LCOs) και η χημική τους δομή φέρει μικρές διαφορές μεταξύ των ριζοβίων, ώστε να αναγνωρίζονται από συγκεκριμένα ψυχανθή, καθώς συγκεκριμένα είδη ριζοβίων συμβιώνουν με συγκεκριμένα είδη ψυχανθών (Dénarié et al., 1996). Οι NFs προσδένονται σε διαμεμβρανικούς υποδοχείς των επιδερμικών κυττάρων της ρίζας, ενεργοποιώντας ένα σηματοδοτικό μονοπάτι, ώστε να προκύψει η συμβίωση με ριζόβια (**ενότητα 1.4**) (Oldroyd, 2013).

Ένα αποτέλεσμα της σύνδεσης των NFs είναι η μόλυνση των ψυχανθών από τα ριζόβια. Τα ριζόβια εισέρχονται στα ριζικά τριχίδια των ψυχανθών κατόπιν κύρτωσης (curling) του άκρου του ριζικού τριχιδίου και υδρόλυσης του κυτταρικού τοιχώματος. Στη συνέχεια, δημιουργούνται τα νημάτια μόλυνσης (Infection Threads, ITs), μέσα στα οποία τα ριζόβια αναπτύσσονται. Τα ITs εξελίσσονται και προχωρούν μέχρι το φλοιό της ρίζας, όπου αναπτύσσονται τα φυμάτια. Τα φυμάτια είναι τα φυτικά όργανα που «φιλοξενούν» τα ριζόβια. Η ανάπτυξή τους είναι το δεύτερο αποτέλεσμα της σύνδεσης των NFs και συμβαίνει παράλληλα με τη μόλυνση. Συγκεκριμένα, οι NFs επάγουν τη διαίρεση των κυττάρων του φλοιού της ρίζας, με σκοπό τη δημιουργία των φυματίων ή φυματογένεση (nodule formation/nodulation). Να σημειωθεί πως η είσοδος των ριζοβίων μπορεί να συμβεί, εναλλακτικά, μέσω ρωγμών της ρίζας και να φτάσουν στα φυμάτια με ή χωρίς τη δημιουργία των ITs, σε ορισμένα είδη ψυχανθών (Oldroyd et al., 2011). Όλα τα παραπάνω συντελούν στον αποικισμό της ρίζας των ψυχανθών από ριζόβια (*Εικόνα 1*).

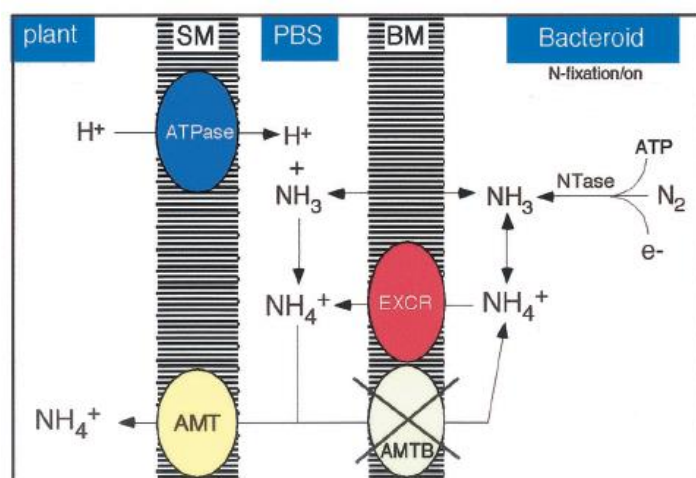


**Εικόνα 1.** Διαδικασία αποικισμού της ρίζας ψυχανθών από ριζόβια (Oldroyd, 2013).

### 1.2.3 Συμβιωτική αζωτοδέσμευση και ανταλλαγή θρεπτικών

Τα ριζόβια, στα φυμάτια, μετατρέπονται σε βακτηριοειδή, τα οποία καλύπτονται από μία μεμβράνη, προερχόμενη από το φυτό (μεμβράνη συμβιωσώματος). Η δομή αυτή ονομάζεται συμβίωση (Oldroyd et al., 2011). Τα φυμάτια είναι τα όργανα όπου τα βακτηριοειδή θα επιτελέσουν τη διαδικασία της αζωτοδέσμευσης, δηλαδή τη μετατροπή του ατμοσφαιρικού  $N_2$  σε  $NH_3$ , μέσω του ενζυμικού συμπλόκου νιτρογενάσης. Τα φυμάτια δημιουργούν τις κατάλληλες συνθήκες για αυτή τη διαδικασία, κυρίως μέσω της μείωσης παροχής οξυγόνου (Udvardi and Poole, 2013). Η  $NH_3$  θα εξέλθει από τη μεμβράνη των βακτηριοειδών, πιθανώς μέσω παθητικής διάχυσης, σε έναν ενδιάμεσο χώρο και θα μετατραπεί σε αμμώνιο ( $NH_4^+$ ), το οποίο θα εξέλθει στο φυτικό κυτοσόλιο, μέσω μεταφορέων (Patriarca et al., 2002) (Εικόνα 2). Μεταφορείς  $NH_4^+$  έχουν ανακαλυφθεί στα φυμάτια ψυχανθών, όπως στο *L. japonicus* (Salvemini et al., 2001), αλλά και πάνω στη μεμβράνη των βακτηριοειδών, όπως στο *G. max* (Kaiser et al., 1998), υπονοώντας την άμεση έξοδο του  $NH_4^+$  και από τα βακτήρια (Εικόνα 2).

Ως αντάλλαγμα, τα ψυχανθή παρέχουν στα ριζόβια διακλαδισμένα αμινοξέα, τα οποία είναι απαραίτητα για την ανάπτυξη των βακτηρίων. Η παροχή δικαρβοξυλικών οξέων (κυρίως μηλικού) προς τα ριζόβια, είναι επίσης απαραίτητη για να πραγματοποιηθεί η αζωτοδέσμευση (Udvardi and Poole, 2013).



**Εικόνα 2.** Η διαδικασία της αζωτοδέσμευσης (N-fixation) και η μεταφορά του  $NH_3$ / $NH_4^+$  προς το φυτικό κυτοσόλιο (από δεξιά προς τα αριστερά). Bacteroid: βακτηριοειδή, BM (bacteroid membrane): μεμβράνη βακτηριοειδών, PBS (peribacteroid space): ενδιάμεσος χώρος, SM (symbiosome membrane): μεμβράνη συμβιωσώματος, plant: φυτικό κυτοσόλιο, AMT/EXCR: μεταφορείς  $NH_4^+$ , Nifase: νιτρογενάση (Patriarca et al., 2002).

### 1.3 Αλληλεπίδραση μεταξύ φυτών και ενδομυκορριζικών μυκήτων

#### 1.3.1 Μυκορριζική συμβίωση

Η μυκορριζική συμβίωση αφορά την αλληλεπίδραση μεταξύ μυκήτων και της ρίζας των φυτών, η οποία ονομάζεται μυκόρριζα. Οι μυκορριζικοί μύκητες χωρίζονται σε δύο κατηγορίες, τους εκτομυκορριζικούς και τους ενδομυκορριζικούς. Οι εκτομυκόρριζες σχηματίζονται εκτός των φυτικών κυττάρων, ενώ οι ενδομυκόρριζες σχηματίζονται εντός των φυτικών κυττάρων (Parniske, 2008).

Οι δενδρόμορφοι ενδομυκορριζικοί μύκητες (ΔΕΜ) (arbuscular mycorrhizal fungi, AMF) ανήκουν στο φύλο Glomeromycota. Η ενδομυκορριζική συμβίωση είναι η πιο διαδεδομένη, καθώς σχηματίζεται στο 70-90% των χερσαίων φυτών (Parniske, 2008). Παράλληλα, θεωρείται μία αρχέγονη συμβίωση που συνέβη με την εμφάνιση των πρώτων χερσαίων φυτών (Wang et al., 2010).

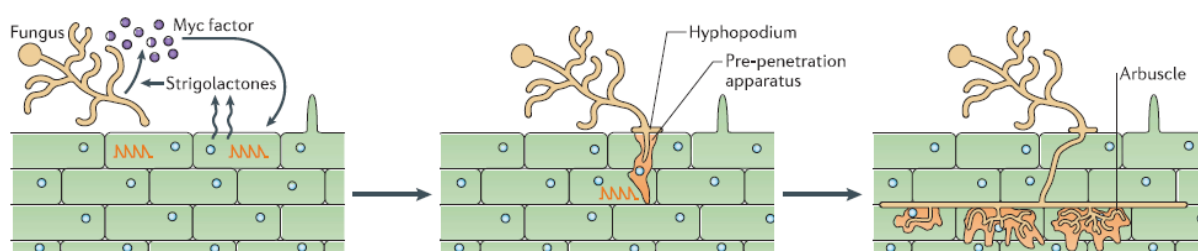
Οι ΔΕΜ μπορούν να παίξουν σημαντικό ρόλο στη γεωργία, καθώς η συμβίωσή τους με καλλιεργήσιμα φυτά βελτιώνει την ανάπτυξη των φυτών αυτών, αλλά και τη θρεπτική τους αξία. Πέρα από τη γεωργία, οι ΔΕΜ μπορούν να παίξουν ρόλο και στα οικοσυστήματα, λόγω της προσφοράς θρεπτικών προς τα φυτά, οδηγώντας στην αντικατάσταση λιπασμάτων (Kuila and Ghosh, 2022).

#### 1.3.2 Συμβίωση ενδομυκορριζικών μυκήτων και φυτών

Η συμβίωση μεταξύ των φυτών και των ΔΕΜ απαιτεί επίσης τη χημική επικοινωνία των δύο οργανισμών. Αρχικά, στριγγολακτόνες (strigolactones) παράγονται και εκκρίνονται από τις ρίζες των φυτών (Akiyama et al., 2005; MacLean et al., 2017). Οι στριγγολακτόνες είναι φυτικές ορμόνες που συμμετέχουν σε διάφορες αναπτυξιακές διαδικασίες, όπως η διακλάδωση του βλαστού και η αντοχή στην αβιοτική καταπόνηση (Lopez-Obando et al., 2015). Αποτέλεσμα της απελευθέρωσης των στριγγολακτονών είναι η ανάπτυξη και διακλάδωση των υφών των ΔΕΜ, με σκοπό την εξασφάλιση της επαφής και της συμβίωσης με τις ρίζες των φυτών (Akiyama et al., 2005; MacLean et al., 2017).

Ως απόκριση στις στριγγολακτόνες, οι ΔΕΜ παράγουν τους παράγοντες Myc (Myc factors, MFs). Οι MFs είναι ένα μίγμα από λιποχιτοολιγοσακχαρίτες (lipochitooligosaccharides, Myc-LCOs) (Maillet et al., 2011; MacLean et al., 2017) και χιτοολιγοσακχαρίτες (chitooligosaccharides, Myc-COs) (Genre et al., 2013; MacLean et al., 2017). Οι δύο αυτές ομάδες μορίων, δρουν σε συνέργεια, ώστε να συμβεί η ενδομυκορριζική συμβίωση (Feng et al., 2019). Οι Myc-LCOs/Myc-COs προσδένονται σε αντίστοιχους διαμεμβρανικούς υποδοχείς, ενεργοποιώντας ένα σηματοδοτικό μονοπάτι, ώστε να προκύψει η ενδομυκορριζική συμβίωση (**ενότητα 1.4**) (MacLean et al., 2017).

Μετά την πρόσδεση των MFs ξεκινά ο αποικισμός. Αρχικά, οι υφές του μύκητα σχηματίζουν το υποπόδιο (hyphopodium), πάνω στην επιφάνεια των επιδερμικών κυττάρων της ρίζας. Λίγο μετά, στο εσωτερικό των επιδερμικών κυττάρων σχηματίζεται μία δομή διείσδυσης (Pre-Penetration Apparatus, PPA), η οποία καθορίζει το μονοπάτι ανάπτυξης του μύκητα. Κατά τη δημιουργία της PPA, ο πυρήνας του φυτικού κυττάρου μετακινείται στη θέση εισόδου του μύκητα. Στη συνέχεια, το υποπόδιο εκτείνεται και ο μύκητας εισέρχεται στα επιδερμικά κύτταρα, μέσω της PPA. Από εκεί, ο μύκητας ταξιδεύει έως τον εσωτερικό φλοιό της ρίζας, όπου εισέρχεται μέσα στα κύτταρα και σχηματίζει δενδρόμορφες δομές, που ονομάζονται θύσσανοι (arbuscules) (Parniske, 2008). Αποτέλεσμα των παραπάνω είναι ο αποικισμός της ρίζας των φυτών από ΔΕΜ (Εικόνα 3).



**Εικόνα 3.** Διαδικασία αποικισμού της ρίζας φυτών από δενδρόμορφους ενδομυκορριζικούς μύκητες (Oldroyd, 2013).

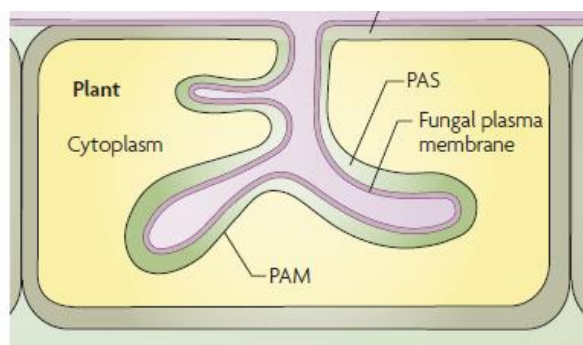
### 1.3.3 Πρόσληψη και ανταλλαγή θρεπτικών συστατικών

Οι θύσσανοι (arbuscules) καλύπτονται από μία μεμβράνη προερχόμενη από το φυτό (Periarbuscular Membrane, PAM). Η PAM αποτελεί μέρος της συμβιωτικής διεπαφής (Εικόνα 4), μέσω της οποίας συμβαίνει η ανταλλαγή των θρεπτικών συστατικών. Οι ΔΕΜ βοηθάνε στην πρόσληψη κυρίως φωσφόρου, αλλά και αζώτου (Parniske, 2008). Έχει βρεθεί πως κατέχουν μεταφορείς ανόργανου φωσφόρου (Harrison and Van Buuren, 1995), αλλά και γονίδια που συμμετέχουν στη μεταφορά  $\text{NH}_4^+$  και αμινοξέων (Cappellazzo et al., 2008; Lopez-Pedrosa et al., 2006). Στη μεταφορά αυτή συμμετέχουν και ενδογενή γονίδια των φυτών. Το γονίδιο *PT4* (*PHOSPHATE TRANSPORTER 4*) του *M. truncatula* (*MtPT4*) εκφράζεται στις ρίζες κατά τη συμβίωση, ενώ κωδικοποιεί για έναν μεταφορέα φωσφόρου, ο οποίος εντοπίζεται στην PAM και συμμετέχει στη μεταφορά φωσφόρου (Harrison et al., 2002). Το ορθόλογο γονίδιο στο *L. japonicus* (*LjPT4*), επίσης εκφράζεται στις ρίζες κατά τη συμβίωση (Volpe et al., 2013). Το γονίδιο *AMT2.2* (*AMMONIUM TRANSPORTER 2.2*) του *L. japonicus* (*LjAMT2.2*) εκφράζεται στις ρίζες κατά τη συμβίωση, ενώ κωδικοποιεί για έναν μεταφορέα αμμωνίου, που εντοπίζεται στην PAM και συμμετέχει στη μεταφορά αμμωνίου (Guether et al., 2009). Γονίδια όπως τα *PT4* και *AMT2.2* χρησιμοποιούνται ως γονίδια-δείκτες της μυκορριζικής συμβίωσης καθώς εκφράζονται ειδικά στις αποικισμένες ρίζες. Παρομοίως και το γονίδιο *SbtM1* (*Mycorrhizal Subtilase 1*), το οποίο εκφράζεται στις ρίζες σε αρχικά στάδια της συμβίωσης και κωδικοποιεί για



μία πρωτεάση σερίνης, η οποία συμμετέχει στην ανάπτυξη των θυσσάνων (Takeda et al., 2009).

Ακόμη, οι ΔΕΜ βοηθάνε στην πρόσληψη νερού. Επίσης, προσφέρουν στο φυτό αντοχή σε αβιοτικές καταπονήσεις, όπως η υψηλή αλατότητα και σε βιοτικές καταπονήσεις, όπως η αντίσταση σε φυτοπαθογόνα (Kuila and Ghosh, 2022). Ως αντάλλαγμα, τα φυτά παρέχουν στους ΔΕΜ φωτοσυνθετικό άνθρακα, σε μορφή λιπαρών οξέων και σακχάρων, τα οποία είναι απαραίτητα για την ανάπτυξή του. Μάλιστα, οι ΔΕΜ προσλαμβάνουν έως και το 20% του φωτοσυνθετικού άνθρακα (MacLean et al., 2017).



**Εικόνα 4.** Η δομή της συμβιωτικής διεπαφής. Μωβ: θύσσανος (*arbuscule*), κίτρινο: φυτικό κυτοσόλιο, PAM: περιδεσμοειδής μεμβράνη (*periarbuscular membrane*), PAS (*periarbuscular space*): ενδιάμεσος χώρος, *Fungal plasma membrane*: μεμβράνη του μύκητα (Parniske, 2008).

#### 1.4 Σηματοδότηση στη συμβίωση

Πρώτο βήμα της συμβίωσης είναι η αναγνώριση των NFs και των Myc-LCOs/Myc-COs από διαμεμβρανικούς υποδοχείς των επιδερμικών κυττάρων της ρίζας. Οι υποδοχείς αυτοί έχουν δραστικότητα κινάσης και εξωκυτταρικές περιοχές μοτίβων λυσίνης (*lysine motif receptor-like kinases*, LysM-RLKs) (MacLean et al., 2017; Oldroyd, 2013). Οι LysM-RLKs των NFs δρουν ως διμερή για την αναγνώρισή τους (Oldroyd, 2013), γεγονός το οποίο δείχθηκε πρόσφατα και για τους Myc-COs (He et al., 2019). Η πρόσδεση των συμβιωτικών σημάτων ενεργοποιεί ένα κοινό σηματοδοτικό μονοπάτι, στο οποίο συμμετέχουν και συν-υποδοχείς των LysM-RLKs, οι οποίοι έχουν δραστικότητα κινάσης και περιέχουν επαναλήψεις λευκίνης (*leucine-rich repeat receptor-like kinases*, LRR-RLKs) (MacLean et al., 2017; Oldroyd, 2013).

Αποτέλεσμα της παραπάνω σύνδεσης είναι η ενεργοποίηση καναλιών καλίου ( $K^+$ ) και ασβεστίου ( $Ca^{2+}$ ), τα οποία εντοπίζονται στη μεμβράνη του πυρήνα του φυτικού κυττάρου, οδηγώντας στην αύξηση του  $Ca^{2+}$  μέσα στον πυρήνα. Οι αλλαγές στη συγκέντρωση του  $Ca^{2+}$  οδηγούν στην ενεργοποίηση της κινάσης CCaMK (*calcium and calmodulin-dependent kinase*), η οποία αποκωδικοποιεί το σήμα. Η CCaMK,

τέλος, θα οδηγήσει στην ενεργοποίηση διαφορετικών συνδυασμών μεταγραφικών παραγόντων, ώστε να προκύψει η συμβίωση με ριζόβια, ή η ενδομυκορριζική συμβίωση (MacLean et al., 2017; Oldroyd, 2013). Γονίδια του σηματοδοτικού αυτού μονοπατιού συμμετέχουν και στα δύο είδη συμβίωσης (Banda et al., 2008; Markmann et al., 2008).

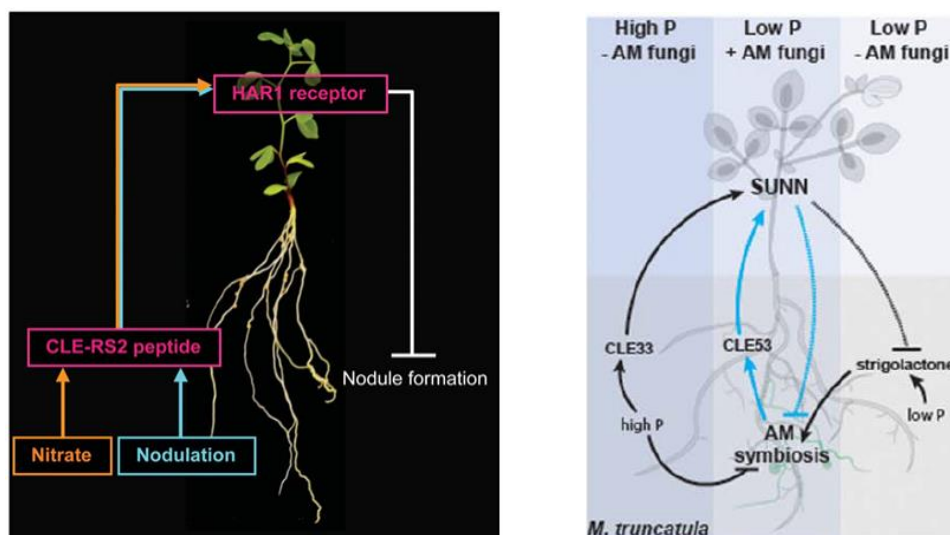
### 1.5 Αυτορρύθμιση των συμβιωτικών σχέσεων

Οι συμβιωτικές σχέσεις υπόκεινται σε συστημικούς μηχανισμούς αυτορρύθμισης, ώστε να ελεγχθεί ο βαθμός εισόδου των μικροοργανισμών και η έκταση του αποικισμού της ρίζας. Αυτοί είναι ο μηχανισμός αυτορρύθμισης της φυματογένεσης ή AON, για τη ρύθμιση του σχηματισμού φυματίων και ο μηχανισμός αυτορρύθμισης της μυκορριζικής συμβίωσης ή AOM, για τη ρύθμιση της συμβίωσης με ΔΕΜ. Οι δύο αυτοί μηχανισμοί μοιράζονται κοινά στοιχεία (Wang et al., 2018). Μόρια των μηχανισμών αυτών αποτελούν τα πεπτιδία CLE (CLAVATA3/EMBRYO SURROUNDING RELATED), τα οποία παράγονται στις ρίζες (Roy and Müller, 2022). Τα CLE πεπτιδία ανήκουν στην οικογένεια των μικρών σηματοδοτικών πεπτιδίων (small signaling peptides, SSPs) και αποκρίνονται στη διαθεσιμότητα των θρεπτικών (de Bang et al., 2017).

Στην περίπτωση του AON, CLE πεπτιδία παράγονται ως απόκριση σε ριζόβια, όπως τα CLE-RS1 και CLE-RS2 στο *L. japonicus* (Okamoto et al., 2009), τα CLE12, CLE13 και CLE35 στο *M. truncatula* (Lebedeva et al., 2020; Mortier et al., 2010) και τα RIC1 και RIC2 στο *G. max* (Reid et al., 2011). Τα *Lj*CLE-RS2 και *Mt*CLE35 παράγονται και ως απόκριση στην παρουσία αζώτου (Lebedeva et al., 2020; Okamoto et al., 2009). Τα CLE πεπτιδία είναι αρνητικοί ρυθμιστές της συμβίωσης, καθώς αναστέλλουν τον σχηματισμό φυματίων (Lebedeva et al., 2020; Mortier et al., 2010; Okamoto et al., 2009; Reid et al., 2011). (Εικόνα 5). Παράλληλα, έχειδειχθεί πως το *Mt*CLE35 επηρεάζει καθοδικά μονοπάτια, που ρυθμίζουν τη συμβίωση, μέσω του υποδοχέα *Mt*SUNN (ενότητα 1.5) (Moreau et al., 2021).

Στην περίπτωση του AOM, CLE πεπτιδία παράγονται ως απόκριση σε ΔΕΜ, όπως το CLE53 στο *M. truncatula* (Karlo et al., 2020; Müller et al., 2019), ενώ παράγονται και ως απόκριση στην παρουσία φωσφόρου, όπως το CLE33 στο *M. truncatula* (Müller et al., 2019). Και σε αυτή την περίπτωση, τα *Mt*CLE53 και *Mt*CLE33 εμποδίζουν την είσοδο των ΔΕΜ στη ρίζα, δρώντας ως αρνητικοί ρυθμιστές της συμβίωσης (Karlo et al., 2020; Müller et al., 2019). Όσον αφορά τη ρύθμιση καθοδικών μονοπατιών, δεν υπάρχουν πληροφορίες. Ωστόσο, έχειδειχθεί πως τα *Mt*CL33 και *Mt*CL53 οδηγούν σε μείωση των στριγγολακτονών, μέσω μείωσης του βιοσυνθετικού ενζύμου *Mt*D27 (DWARF27). Έτσι, εμποδίζουν τη συμβίωση με ΔΕΜ, καθώς οι στριγγολακτόνες είναι απαραίτητες για αυτήν (Müller et al., 2019) (Εικόνα 5).

Παρά τους διαφορετικούς παράγοντες επαγωγής των CLE πεπτιδίων, η δράση όλων εξαρτάται από υποδοχείς με δραστικότητα κινάσης και επαναλήψεις λευκίνης (LRR-RLKs), όπως οι *LjHAR1/MtSUNN/GmNARK*, οι οποίοι εντοπίζονται στο βλαστό (Karlo et al., 2020; Lebedeva et al., 2020; Mortier et al., 2010; Müller et al., 2019; Okamoto et al., 2009; Okamoto and Kawaguchi, 2015; Reid et al., 2011; Roy and Müller, 2022) (Εικόνα 5).



**Εικόνα 5.** Η δράση CLE πεπτιδίων στους AON, AOM και στη διαθεσιμότητα θρεπτικών. Αριστερά: Η δράση του *LjCLE-RS2* στο *L. japonicus*, ως παράδειγμα του AON και της αναστολής από άζωτο, μέσω του υποδοχέα *HAR1* (Okamoto and Kawaguchi, 2015). Δεξιά: Η δράση των *MtCLE33* και *MtCLE53* στο *M. truncatula*, ως μέρος του AOM και της αναστολής από φώσφορο, μέσω του υποδοχέα *SUNN* και της μείωσης των σιγγολακτονών (Roy and Müller, 2022). Nitrate: νιτρικά ιόντα, P: φώσφορος, AM symbiosis: συμβίωση με ΔΕΜ (AM fungi).

## 1.6 Δεκτικότητα των φυτών στη συμβίωση

Τα φυτά έχουν και μηχανισμούς ρύθμισης, ώστε να είναι δεκτικά για να πραγματοποιηθεί η συμβίωση με ωφέλιμους μικροοργανισμούς. Μόρια της ρύθμισης αυτής αποτελούν τα πεπτίδια CEP (C-TERMINALLY ENCODED PEPTIDE), τα οποία παράγονται στις ρίζες (Roy and Müller, 2022). Και τα CEP πεπτίδια ανήκουν στην οικογένεια των SSPs και αποκρίνονται στη διαθεσιμότητα των θρεπτικών (de Bang et al., 2017).

Όσον αφορά τη συμβίωση με ριζόβια, CEP πεπτίδια παράγονται ως απόκριση σε αυτή, όπως τα CEP1, CEP2, CEP7 και CEP12 στο *M. truncatula*, ενώ και τα τέσσερα αυτά πεπτίδια παράγονται ως απόκριση στην έλλειψη αζώτου. Τα πεπτίδια CEP δρουν ως θετικοί ρυθμιστές της συμβίωσης, καθώς προωθούν τον σχηματισμό φυματίων. Και η δράση των CEP πεπτιδίων εξαρτάται από έναν LRR-RLK υποδοχέα, τον CRA2 (COMPACT ROOT ARCHITECTURE 2) (Laffont et al., 2020; Zhu et al., 2021). Παράλληλα, έχει δείχθει πως το *MtCEP1* επηρεάζει καθοδικά μονοπάτια, που



ρυθμίζουν τη συμβίωση, μέσω του CRA2 (**ενότητα 1.5**) (Gautrat et al., 2020). Μάλιστα, και τα CEP πεπτίδια δρουν συστημικά, μετακινούμενα από τη ρίζα προς το βλαστό, για να ρυθμίσουν τη συμβίωση, όπως έχει δείχθει για τα *MtCEP1* (Huault et al., 2014) και *MtCEP7* (Laffont et al., 2020).

Όσον αφορά τη συμβίωση με ΔΕΜ, παρότι CEP πεπτίδια επάγονται ως απόκριση στην έλλειψη φωσφόρου (de Bang et al., 2017), ο ρόλος τους δεν έχει διευκρινιστεί ακόμα. Πρόσφατα, δείχθηκε πως η έκφραση του CEP2 μειωνόταν κατά τη συμβίωση με ΔΕΜ στην ντομάτα (*Solanum lycopersicum*). Ωστόσο, το *SlCEP2* δεν φάνηκε να επηρεάζει τον αποικισμό από ΔΕΜ (Hsieh et al., 2022).

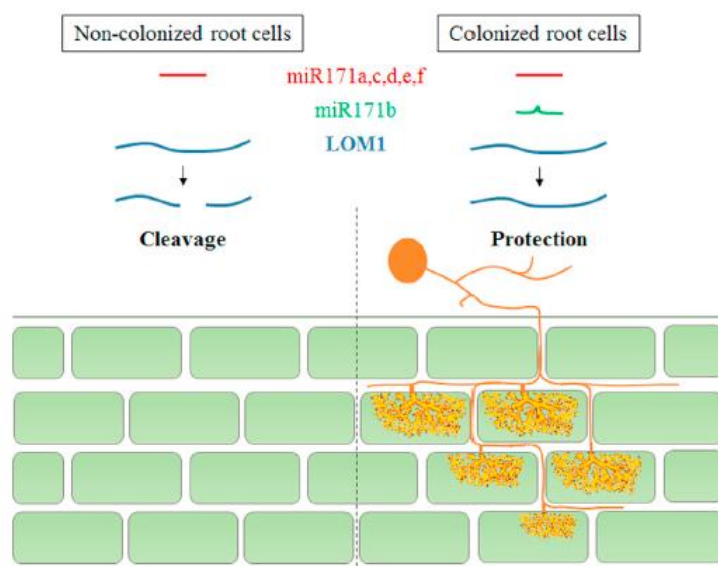
## 1.7 Ρόλος των miRNAs στη συμβίωση

Τα miRNAs (microRNAs) είναι μικρά μη κωδικοποιητικά RNA και παράγονται από μετάγραφα μακρών πρώιμων RNA (primary miRNAs, pri-miRNAs). Τα miRNAs ελέγχουν την έκφραση γονιδίων μετα-μεταγραφικά, μέσω πρόσδεσης και διάσπασης μεταγράφων των γονιδίων-στόχων τους (ή μέσω παρεμπόδισης της μετάφρασής τους) (Bologna and Voinnet, 2014). Πολλά miRNAs συμμετέχουν στη ρύθμιση των συμβιωτικών σχέσεων (Hoang et al., 2020; Müller and Harrison, 2019).

Στη συμβίωση με ριζόβια, miRNAs αποκρίνονται στη συμβίωση, με σκοπό τη ρύθμισή της, αλλά και την ανάπτυξή της (Hoang et al., 2020). Παραδείγματα αποτελούν τα miR172c και miR156b στο *G. max*. Το miR172c επάγεται από ριζόβια και δρα ως θετικός ρυθμιστής της συμβίωσης. Στόχος του miR172c είναι ο μεταγραφικός καταστολέας NNC1 (NODULE NUMBER CONTROL 1), ένας αρνητικός ρυθμιστής της συμβίωσης, του οποίου η έκφραση μειώνεται από ριζόβια. Το miR172c ρυθμίζεται αρνητικά, ενώ ο NNC1 θετικά από τον υποδοχέα *GmNARK* (NODULE AUTOREGULATION RECEPTOR KINASE) του βλαστού, συνδέοντας το ζεύγος miR172c-NNC1 με τον AON (Wang et al., 2014; Wang et al., 2019). Αντίθετα, το miR156b μειώνεται κατά την μόλυνση με ριζόβια και δρα ως αρνητικός ρυθμιστής της συμβίωσης. Στόχος του miR156b είναι ο μεταγραφικός παράγοντας SPL9d (SQUAMOSA PROMOTER-BINDING LIKE 9d), ένας θετικός ρυθμιστής της συμβίωσης, του οποίου η έκφραση αυξάνεται από ριζόβια. Παράλληλα, παρατηρήθηκε πως το ζεύγος miR156b-SPL9d επηρεάζει το μονοπάτι του ζεύγους miR172c-NNC1 (Yun et al., 2022).

Εκτός των ριζοβίων, τα miRNAs αποκρίνονται και στο άζωτο. Παράδειγμα αποτελεί το miR2111 στο *L. japonicus*, του οποίου η έκφραση μειώνεται από ριζόβια και από το άζωτο (Moreau et al., 2021; Tsikou et al., 2018). Το miR2111 είναι ένας θετικός ρυθμιστής της συμβίωσης και στόχος του αποτελεί το γονίδιο *TML* (Tsikou et al., 2018), που αποτελεί αρνητικός ρυθμιστής της συμβίωσης (Magori et al., 2009; Takahara et al., 2013). Το ζεύγος miR2111-TML είναι σημαντικό συστατικό του AON (Tsikou et al., 2018), του οποίου η σημασία περιγράφεται στην **ενότητα 1.5**.

Στη συμβίωση με ΔΕΜ, επίσης miRNAs αποκρίνονται στη συμβίωση ή στη διαθεσιμότητα φωσφόρου, αλλά έχουν συνδεθεί μόνο με επιμέρους στάδια ανάπτυξης της συμβίωσης (Müller and Harrison, 2019). Παραδείγματα αποτελούν τα miR171b και miR393 στο *M. truncatula*. Το miR171b εκφράζεται αποκλειστικά σε αποικισμένα κύτταρα που περιέχουν θυσσάνους και προσδένεται σε μετάγραφα του μεταγραφικού παράγοντα LOM1 (LOST MERISTEMS 1). Λόγω ασυμφωνίας που υπάρχει στην αλληλουχία του miR171b, τα μετάγραφα LOM1 δεν αποικοδομούνται, προστατεύοντάς τα με αυτό τον τρόπο από τα υπόλοιπα μέλη της οικογένειας miR171, προωθώντας έτσι τη δημιουργία των θυσσάνων (Couzigou et al., 2017) (Εικόνα 6). Το miR393 επάγεται από χαμηλές συγκεντρώσεις φωσφόρου, ενώ μειώνεται κατά τον εμβολιασμό με ΔΕΜ. Το miR393 είναι ένας αρνητικός ρυθμιστής της συμβίωσης, στοχεύοντας μετάγραφα γονιδίων υποδοχέων αυξίνης, μία ορμόνη απαραίτητη για την ανάπτυξη των θυσσάνων (Etemadi et al., 2014).



**Εικόνα 6.** Η επαγωγή του miR171b (πράσινο) σε αποικισμένα κύτταρα (*colonized root cells*) από ΔΕΜ και η προστασία μεταγράφων του LOM1 (μπλε), σε αντίθεση με μη αποικισμένα κύτταρα (*non-colonized root cells*) και τη διάσπαση μεταγράφων του LOM1 από τα άλλα μέλη της οικογένειας miR171 (κόκκινο) (Couzigou et al., 2017).

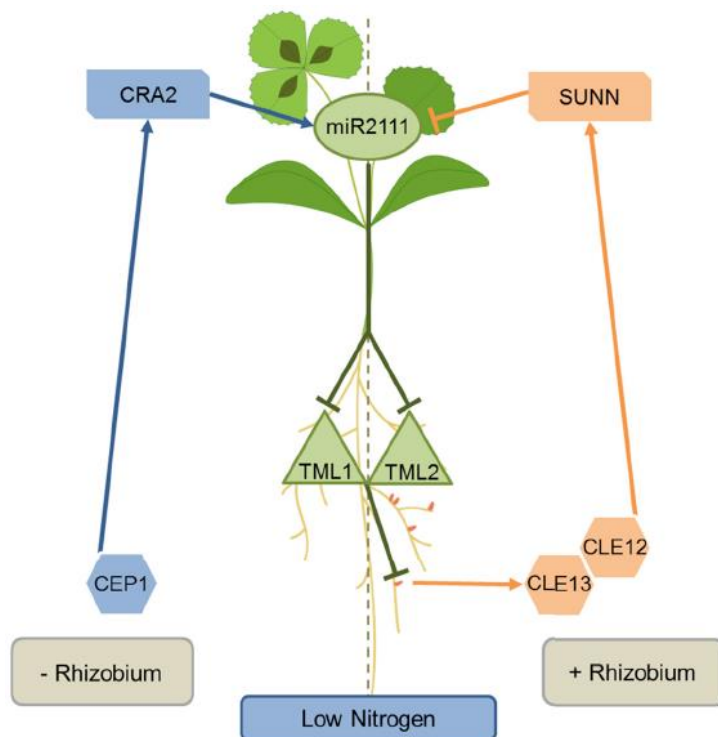
## 1.8 Η σημασία του ζεύγους miR2111-TML

Στον ΑΟΝ, η μόλυνση από ριζόβια και ο σχηματισμός φυματίων ελέγχεται συστημικά. Η ρύθμιση περιλαμβάνει CLE και CEP πεπτιδία, ως σήματα προερχόμενα από τη ρίζα και το miR2111, ως σήμα προερχόμενο από το βλαστό (Gautrat et al., 2020; Okuma et al., 2020; Tsikou et al, 2018). Το miR2111 εκφράζεται κυρίως στο βλαστό, συγκεκριμένα στα φύλλα και μεταφέρεται στη ρίζα (Okuma et al., 2020; Tsikou et al, 2018), όπου εκεί στοχεύει τα μετάγραφα του γονιδίου *TML* (Tsikou et al, 2018). Το γονίδιο *TML* κωδικοποιεί για μία υπομονάδα ενός συμπλόκου E3 λιγάσης ουβικιτίνης και είναι αναστολέας της συμβίωσης (Magori et al., 2009; Takahara et al., 2013).

Το ζεύγος miR2111-TML ρυθμίζεται από τα ριζόβια και το άζωτο. Απουσία ριζοβίων ή αζώτου τα επίπεδα του miR2111 είναι αυξημένα, ενώ του *TML* μειωμένα, με σκοπό να συμβεί η συμβίωση. Αντίθετα, παρουσία ριζοβίων ή αζώτου τα επίπεδα του miR2111 μειώνονται, ενώ του *TML* αυξάνονται, ώστε να παρεμποδιστεί η συμβίωση (Gautrat et al., 2020; Moreau et al., 2021; Okuma et al., 2020; Tsikou et al, 2018).

Η έκφραση του miR2111 ελέγχεται από τους υποδοχείς *LjHAR1* (HYPERNODULATION ABBERAND ROOT FORMATION 1) / *MtSUNN* (SUPER NUMERIC NODULES) και *CRA2* (Gautrat et al., 2020; Moreau et al., 2021; Okuma et al., 2020; Tsikou et al, 2018). Μάλιστα, η δράση των παραπάνω υποδοχέων στον ΑΟΝ είναι συστημική. Οι *LjHAR1/MtSUNN* είναι αρνητικοί ρυθμιστές της συμβίωσης, καθώς οδηγούν σε μειωμένα επίπεδα του miR2111 και αυξημένα επίπεδα του *TML*, εμποδίζοντας τη συμβίωση (Gautrat et al., 2020; Okuma et al., 2020; Tsikou et al, 2018). Αντίθετα, ο *CRA2* είναι θετικός ρυθμιστής της συμβίωσης, καθώς οδηγεί σε αυξημένα επίπεδα του miR2111 και μειωμένα επίπεδα του *TML*, προωθώντας τη συμβίωση (Gautrat et al., 2020).

Η ρύθμιση του miR2111 περιλαμβάνει CLE και CEP πεπτιδία. Οι *LjHAR1/MtSUNN* ρυθμίζουν το miR2111 μέσω της δράσης CLE πεπτιδίων (Moreau et al., 2021; Tsikou et al, 2018). Για παράδειγμα, το επαγόμενο από άζωτο *MtCLE35* οδηγεί σε μείωση των επιπέδων του miR2111 (αυξάνοντας του *TML*), μέσω του *MtSUNN* (Moreau et al., 2021). Αντίστοιχα, ο *CRA2* ρυθμίζει το miR2111 μέσω της δράσης CEP πεπτιδίων. Για παράδειγμα, η έκφραση του *MtCEP1* οδηγεί σε αύξηση των επιπέδων του miR2111 (μειώνοντας του *TML*), μέσω του *CRA2* (Gautrat et al., 2020). Όλη η παραπάνω ρύθμιση απεικονίζεται στην *Εικόνα 7*.



**Εικόνα 7.** Η συστημική ρύθμιση της συμβίωσης στον AON (δεξιά) και στη δεκτικότητα της συμβίωσης με ριζόβια (αριστερά) (Gautrat et al., 2020). *Rhizobium*: ριζόβια, *Low nitrogen*: χαμηλή ποσότητα αζώτου. Το *M. truncatula* έχει δύο γονίδια *TML* (*TML1*, *TML2*).

## 1.9 Σκοπός

Οι ΔΕΜ βοηθούν στην ανάπτυξη των φυτών, κυρίως μέσω της πρόσληψης φωσφόρου, ενώ διαδραματίζουν σημαντικό ρόλο στη γεωργία και την οικολογία. Συνεπώς, η μελέτη μοριακών μηχανισμών της συμβίωσης αποτελεί σημαντικό εργαλείο για την κατανόησή της.

Η συμβίωση με ΔΕΜ μοιράζεται κοινά στοιχεία της συμβίωσης με ριζόβια, ενώ το ζεύγος *miR2111-TML* αποτελεί σημαντικό συστατικό του AON και της ρύθμισης της συμβίωσης με ριζόβια. Στόχος της συγκεκριμένης εργασίας, λοιπόν, είναι να μελετήσει εάν το *miR2111*, αλλά και το γονίδιο *TML*, εμπλέκονται και στη ρύθμιση της συμβίωσης με ΔΕΜ, ως μέρος του AOM, στο ψυχανθές *L. japonicus*.

## 2. Υλικά και μέθοδοι

### 2.1 Βιολογικό υλικό και συνθήκες ανάπτυξης

Χρησιμοποιήθηκε το ψυχανθές-μοντέλο *Lotus japonicus*. Τα φυτά ήταν αγρίου τύπου (ποικιλία Gifu), φυτά των μεταλλαγμάτων *tml-5*, *tml-6*, αλλά και φυτά των φυτικών σειρών 2111\_OX\_1/ 2111\_OX\_2 και 2111\_KO (Παράρτημα 1). Ως μικροσυμβιώτης χρησιμοποιήθηκε το εμπορικό σκεύος του στελέχους DAOM, του ΔΕΜ *Rhizophagus irregularis*.

Τα φυτά αναπτύχθηκαν σε δοχεία magenta με άμμο και το θρεπτικό μέσο που χρησιμοποιήθηκε ήταν το Long-Aston solution (LAS: 0.75mM MgSO<sub>4</sub>, 1mM NaNO<sub>3</sub>, 1mM K<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>, 2mM CaCl<sub>2</sub>, 3.2μM NaH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>, 25μM FeNaEDTA, 5μM MnSO<sub>4</sub>, 0.25μM CuSO<sub>4</sub>, 0.5μM ZnSO<sub>4</sub>, 25μM H<sub>3</sub>BO<sub>3</sub>, 0.1μM Na<sub>2</sub>MoO<sub>4</sub> σε dH<sub>2</sub>O) για τα εμβολιασμένα με μύκητα φυτά ή το Broughton & Dilworth medium (B&D: 0.25mM CaCl<sub>2</sub>, 0.125mM KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>, 2.5μM Fe-Citrate, 62.5μM MgSO<sub>4</sub>, 0.375mM K<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>, 0.25μM MnSO<sub>4</sub>, 0.5μM H<sub>3</sub>BO<sub>3</sub>, 0.125μM ZnSO<sub>4</sub>, 0.05μM CuSO<sub>4</sub>, 0.025μM CoSO<sub>4</sub>, 0.025μM Na<sub>2</sub>MoO<sub>4</sub>, 2mM KNO<sub>3</sub>) για τα μη-εμβολιασμένα φυτά. Τα φυτά αναπτύχθηκαν σε θαλάμους ανάπτυξης φυτών σε θερμοκρασίες 21°C (τα μη-εμβολιασμένα φυτά) ή 25°C (τα εμβολιασμένα φυτά) και φωτοπερίοδο 16 ώρες φως και 8 ώρες σκοτάδι.

### 2.2 Απολύμανση και εκβλάστηση σπόρων

Η απολύμανση είναι απαραίτητη για την αποφυγή ανάπτυξης ανεπιθύμητων μικροοργανισμών και την εύρεση των σπόρων στο ίδιο αναπτυξιακό στάδιο. Η απολύμανση πραγματοποιείται σε δύο στάδια.

#### 1<sup>ο</sup> στάδιο

- Προσθήκη πυκνού H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> και επώαση σπόρων για περίπου 30 min
- 5 φορές πλύση με dH<sub>2</sub>O
- Προσθήκη διαλύματος χλωρίνης 20% και επώαση σπόρων για 5-10 min
- 6 φορές πλύση με dH<sub>2</sub>O (σε θάλαμο καθέτου νηματικής ροής)
- Προσθήκη dH<sub>2</sub>O και επώαση σπόρων στους 4°C για τουλάχιστον 12 ώρες

#### 2<sup>ο</sup> στάδιο (σε θάλαμο καθέτου νηματικής ροής)

- Τοποθέτηση 3 διηθητικών χαρτιών σε τρυβλία
- Προσθήκη 3mL dH<sub>2</sub>O σε κάθε τρυβλίο
- Τοποθέτηση σπόρων χωρίς να έρχονται σε επαφή

- Κλείσιμο τρυβλίων με parafilm
- Τοποθέτηση τρυβλίων κάθετα σε θάλαμο ανάπτυξης φυτών στους 21°C για 10 μέρες, με στόχο την εκβλάστηση των σπόρων

## 2.3 Μεταφύτευση σε δοχεία magenta

Τα νεαρά φυτά μεταφυτεύονται σε αποστειρωμένα δοχεία magenta, που περιέχουν άμμο και υγρό θρεπτικό μέσο. Η άμμος ψήνεται και αποστειρώνεται στους 180°C για τουλάχιστον 6 ώρες. Η διαδικασία της μεταφύτευσης συμβαίνει σε θάλαμο καθετού νηματικής ροής. Το κλειστό περιβάλλον των δοχείων magenta προσφέρει άσηπτες συνθήκες και εξασφαλίζει την κατάλληλη υγρασία, καταργώντας την ανάγκη για πότισμα. Τα φυτά που αναπτύσσονται στο ίδιο δοχείο magenta αποτελούν μία βιολογική επανάληψη του πειράματος.

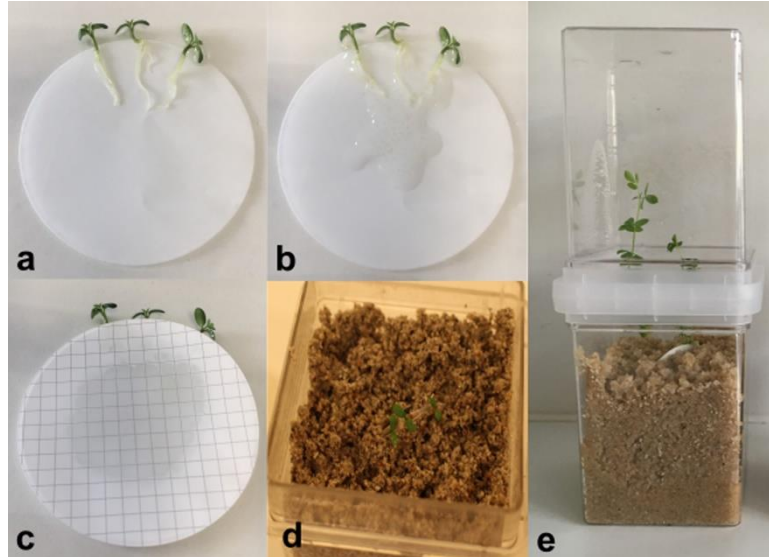
### 2.3.1 Φύτεμα μη εμβολιασμένων φυτών

- Προσθήκη 300gr άμμου και 50mL B&D σε κάθε δοχείο magenta
- Ανακάτεμα άμμου
- Τοποθέτηση φυταρίων (3 ή 4 φυτά/ δοχείο magenta) σε θέσεις σποράς
- Τοποθέτηση των δοχείων magenta σε θάλαμο ανάπτυξης φυτών στους 21°C για 4 εβδομάδες

### 2.3.2 Φύτεμα και εμβολιασμός με ενδομυκορριζικό μύκητα (μέθοδος sandwich)

- Προσθήκη 300gr άμμου και 50mL LAS (για πειράματα διάρκειας 4 εβδομάδων) ή 360gr άμμου και 60mL LAS (για πειράματα διάρκειας 6 εβδομάδων) σε κάθε δοχείο magenta
- Ανακάτεμα άμμου
- Ενυδάτωση δίσκων νιτροκυτταρίνης σε πηκτή αγαρόζης (συγκέντρωσης 1%)
- Τοποθέτηση 3 φυταρίων σε κάθε ενυδατωμένο δίσκο νιτροκυτταρίνης
- Προσθήκη 300μL εμβολίου συγκέντρωσης 1000 σπόρια/mL (άρα 300 σπόρια/δίσκο, που αντιστοιχεί σε περίπου 100 σπόρια του μύκητα ανά φυτό)
- Κάλυψη ενυδατωμένου δίσκου με στεγνό δίσκο νιτροκυτταρίνης (sandwich)

- Δημιουργία σχισμής στην άμμο και τοποθέτηση του «sandwich» σε κάθε δοχείο magenta (άρα 3 φυτά/ δοχείο magenta) (Εικόνα 8)
- Τοποθέτηση των δοχείων magenta σε θάλαμο ανάπτυξης 25°C για 4 ή 6 εβδομάδες



**Εικόνα 8.** Μέθοδος sandwich. a: τοποθέτηση φυτών στο δίσκο νιτροκυτταρίνης (οι ρίζες τοποθετούνται εντός και το υπέργειο τμήμα εκτός του δίσκου), b: προσθήκη εμβολίου DAOM στις ρίζες, c: δημιουργία του sandwich, d: τοποθέτηση του sandwich σε δοχείο magenta, e: ανάπτυξη των φυτών στο δοχείο magenta.

### 2.3.3 Προετοιμασία εμβολίου ενδομυκορριζικού μύκητα

Το σκεύασμα του ενδομυκορριζικού εμβολίου (στέλεχος DAOM) περιέχεται σε μέσο αναστολής ανάπτυξης του μύκητα, συγκέντρωσης 2000 σπόρια/mL. Η ποσότητα του μύκητα φυγοκεντρείται στα 3000 rpm για 1 min. Το ανασταλτικό μέσο απομακρύνεται και ο μύκητας αραιώνεται με dH<sub>2</sub>O και τελική συγκέντρωση 1000 σπόρια/mL.

## 2.4 Φαινοτυπική ανάλυση

Εμβολιασμένα φυτά, που αναπτύχθηκαν στους 25°C για 6 εβδομάδες, χρησιμοποιήθηκαν για φαινοτυπική ανάλυση. Αρχικά, πραγματοποιείται συγκομιδή των φυτών και συλλογή των ριζών σε dH<sub>2</sub>O. Έπειτα, γίνεται χρώση των ριζών, ώστε να βαφτούν οι δομές του μύκητα με μπλε χρώμα και να υπολογιστεί ο αποικισμός της ρίζας από μύκητα.



### 2.4.1 Χρώση ριζών με μελάνι

- Επώαση σε διάλυμα 10% KOH για 30 min, στους 85°C
- Απομάκρυνση του KOH
- Προσθήκη διαλύματος 10% οξικού οξέος
- Απομάκρυνση οξικού οξέος και πλύση με dH<sub>2</sub>O 2 φορές
- Προσθήκη διαλύματος 15% μελανιού (διαλυμένο σε διάλυμα 5% οξικού οξέος) και επώαση για 30 min, στους 85°C
- Απομάκρυνση μελανιού και πλύση με dH<sub>2</sub>O 2 φορές
- Προσθήκη διαλύματος 5% οξικού οξέος και επώαση για 30 min, σε θερμοκρασία δωματίου
- Απομάκρυνση οξικού οξέος και πλύση με dH<sub>2</sub>O 2 φορές
- Προσθήκη dH<sub>2</sub>O και επώαση στους 4°C, για τουλάχιστον 12 ώρες

### 2.4.2 Υπολογισμός αποικισμού από ενδομυκορριζικό μύκητα

Μετά την χρώση, οι ρίζες τεμαχίζονται σε κομμάτια 1-1.5 εκατοστών. Ακολούθως, 15 από αυτά τα κομμάτια απλώνονται σε αντικειμενοφόρους πλάκες. Κάθε πλάκα περιέχει ρίζες φυτών από ένα δοχείο magenta. Έπειτα, οι ρίζες παρατηρούνται σε οπτικό μικροσκόπιο σε φακό 40× και καταγράφεται η ύπαρξη (θετική καταγραφή, +) ή μη (αρνητική καταγραφή, -) αποικισμού. Καταγράφονται περίπου 100 οπτικά πεδία για κάθε πλάκα. Τέλος, το ποσοστό του αποικισμού μετρίεται σε ποσοστό %, σύμφωνα με τον τύπο:

$$\% \text{αποικισμός} = \frac{\text{Θετικές καταγραφές}}{\text{Συνολικές καταγραφές}} \times 100$$

## 2.5 Μοριακή ανάλυση

Εμβολιασμένα ή μη εμβολιασμένα φυτά, που αναπτύχθηκαν για 4 εβδομάδες, χρησιμοποιήθηκαν για μοριακή ανάλυση. Αρχικά, πραγματοποιείται συγκομιδή των φυτών και συλλογή των ριζών σε σωληνάρια, τα οποία τοποθετούνται σε υγρό N<sub>2</sub> και αποθηκεύονται στους -80°C. Έπειτα, ακολουθούν οι παρακάτω διαδικασίες. Κάθε δοχείο magenta αποτελεί μία βιολογική επανάληψη του πειράματος.



### 2.5.1 Απομόνωση ολικού RNA από ρίζες

- Λειοτριβήση ριζών παρουσία υγρού N<sub>2</sub>
- Προσθήκη 450μL ή 900μL Lysis/Binding buffer
- Έντονη ανάδευση (Vortex) για διάλυση του ιστού
- Φυγοκέντρωση για 10 min, στους 4°C, στα 14000 rpm
- Μεταφορά υπερκείμενου σε σωληνάρια eppendorf που περιέχουν 500μL ή 1000μL Trizol LS
- Έντονη ανάδευση (Vortex) για 30 sec και επώαση σε θερμοκρασία δωματίου για 5 min
- Φυγοκέντρωση για 5 min, στους 4°C, στα 14000 rpm
- Μεταφορά και των δύο φάσεων σε σωληνάρια eppendorf που περιέχουν 125μL ή 250μL χλωροφόρμιο
- Έντονη ανάδευση (Vortex) για 30 sec και επώαση σε θερμοκρασία δωματίου για 2 min
- Φυγοκέντρωση για 10 min, στους 4°C, στα 14000 rpm
- Μεταφορά 420μL (1 vol.) υδάτινης φάσης σε νέα σωληνάρια eppendorf ή διαχωρισμός 420μL υδάτινης φάσης σε δύο νέα σωληνάρια eppendorf
- Προσθήκη 42μL (0.1 vol.) NaOAc συγκέντρωσης 3M και απαλή ανάδευση
- Προσθήκη 42μL (0.1 vol.) ακετοξικού οξέος και 1050μL (2.5 vol.) 100% EtOH
- Απαλή ανάδευση και επώαση στους -20°C για τουλάχιστον 12 ώρες
- Φυγοκέντρωση για 1 ώρα, στους 4°C, στα 14000 rpm
- Απομάκρυνση υπερκείμενου
- Προσθήκη 1000μL 80% EtOH
- Φυγοκέντρωση για 10 min, στους 4°C, στα 14000 rpm
- Απομάκρυνση υπερκείμενου
- Φυγοκέντρωση 30 sec για πλήρη απομάκρυνση για πλήρη απομάκρυνση της 80% EtOH
- Στέγνωμα ιζήματος για 7 min
- Επαναδιάλυση ιζήματος σε 10μL LoTE buffer (αν υπήρξε διαχωρισμός τα διαλυμένα δείγματα ενώνονται, άρα διάλυση σε 20μL LoTE)
- Μέτρηση της συγκέντρωσης του RNA στο φασματοφωτόμετρο μικροόγκων της Quawell (τυφλό: 1μL LoTE)

- Προσωρινή αποθήκευση δειγμάτων στους  $-20^{\circ}\text{C}$  (στους  $-80^{\circ}\text{C}$  για μακροπρόθεσμη αποθήκευση)

! Οι ποσότητες των αντιδραστηρίων αποφασίζονται βάσει της ποσότητας του ιστού, ενώ η διαδικασία πραγματοποιείται σε πάγο.

! vol. = όγκος βάσει της υδάτινης φάσης (1 vol.)

**Πίνακας 1.** Σύσταση των ρυθμιστικών διαλυμάτων για απομόνωση RNA.

	<i>Lysis/Binding buffer</i>	<i>LoTE buffer</i>
<b>Συστατικά</b>	100mM Tris-HCl (pH 7.5)	3mM Tris-HCl (pH 7.5)
	500mM LiCl	0.2mM EDTA (pH 7.5)
	10mM EDTA (pH 8)	
	1% LiDS	
	5mM DTT	

### 2.5.2 Απομάκρυνση γενωμικού DNA (*DNase treatment*)

Στα δείγματα που απομονώθηκε RNA, πραγματοποιείται απομάκρυνση του DNA, σύμφωνα με την αντίδραση του Πίνακα 2. Τα δείγματα επώάζονται στους  $37^{\circ}\text{C}$  για 50 min. Με το πέρας της επώασης τα δείγματα μεταφέρονται σε πάγο. Ακολουθεί προσθήκη 1μL EDTA (25mM) και επώαση στους  $65^{\circ}\text{C}$  για 10 min, ώστε να τερματιστεί η αντίδραση.

**Πίνακας 2.** Η αντίδραση απομάκρυνσης γενωμικού DNA από δείγματα RNA.

<b>Αντιδραστήρια</b>	<b>Ποσότητες</b>
Δείγμα RNA	500-600 ng
10× ρυθμιστικό διάλυμα (reaction buffer)	1 μL
DNase I (1 U/μL)	1 μL
RNase out (10 U/μL)	0.25 μL
ddH <sub>2</sub> O	προσθήκη μέχρι τελικό όγκο
Τελικός όγκος	10 μL

### 2.5.3 Αλυσιδωτή αντίδραση πολυμεράσης (PCR)

Στα δείγματα RNA που έγινε αντίδραση απομάκρυνσης του DNA, πραγματοποιείται PCR σύμφωνα με την αντίδραση του Πίνακα 3 και το πρόγραμμα του Πίνακα 4, για τον έλεγχο της επιτυχούς απομάκρυνσης του DNA. Οι εκκινητές που χρησιμοποιούνται είναι για την ενίσχυση του ενδογενούς γονιδίου της ουβικιτίνης (Παράρτημα 2). Στο τέλος, τα προϊόντα ηλεκτροφορούνται σε πηκτή αгарόζης 1%, με βρωμιούχο αιθίδιο (EtBr).

Πίνακας 3. Η αντίδραση της PCR.

Αντιδραστήρια	Ποσότητες
Δείγμα RNA έπειτα από αντίδραση DNase	1 $\mu$ L
dNTPs (10mM)	0.4 $\mu$ L
Πρόσθιος εκκινητής (Forward primer) (10 $\mu$ M)	0.8 $\mu$ L
Ανάστροφος εκκινητής (Reverse primer) (10 $\mu$ M)	0.8 $\mu$ L
10 $\times$ ρυθμιστικό διάλυμα (reaction buffer)	2 $\mu$ L
Taq DNA πολυμεράση (5 U/ $\mu$ L)	0.08 $\mu$ L
ddH <sub>2</sub> O	14.92 $\mu$ L
Τελικός όγκος	20 $\mu$ L

Πίνακας 4. Το πρόγραμμα της PCR.

Χρόνος	Θερμοκρασία	} 39 κύκλοι
5 min	95 °C	
30 sec	95 °C	
30 sec	55 °C	
10 sec	72 °C	
4 min	72 °C	
$\infty$	4 °C	

### 2.5.4 Αντίστροφη μεταγραφή (RT-PCR) – Σύνθεση συμπληρωματικού DNA (cDNA)

Τα δείγματα RNA από τα οποία έχει απομακρυνθεί το DNA χρησιμοποιούνται για σύνθεση cDNA. Αρχικά, προστίθενται τα δείγματα μαζί με τους εκκινητές oligodT και miR2111 stem-loop (Παράρτημα 2), ενώ προστίθεται ddH<sub>2</sub>O μέχρι η αντίδραση να φτάσει τα 17 $\mu$ L (Πίνακας 5). Ακολουθεί επώαση στους 72°C για 5 min, για την αποδιάταξη του RNA. Έπειτα, ακολουθεί η προσθήκη των υπόλοιπων συστατικών (Πίνακας 5) και η αντίστροφη μεταγραφή σύμφωνα με το πρόγραμμα του Πίνακα 6.

**Πίνακας 5.** Η αντίδραση της RT-PCR.

Αντιδραστήρια	Ποσότητες
Δείγμα RNA	250-300 ng
oligodT εκκινητής (2μM)	1 μL
miR2111 stem-loop εκκινητής (0.5μM)	1 μL
ddH <sub>2</sub> O	μέχρι 17 μL
5× ρυθμιστικό διάλυμα (reaction buffer)	5 μL
dNTPs (20mM)	1.5 μL
RNase out (20 U/μL)	0.5 μL
Αντίστροφη μεταγραφάση (200 U/μL)	1 μL
Τελικός όγκος	25 μL

**Πίνακας 6.** Το πρόγραμμα της RT-PCR.

Χρόνος	Θερμοκρασία	} 60 κύκλοι
30 min	16 °C	
30 sec	30 °C	
30 sec	42 °C	
1 sec	50 °C	
5 min	85 °C	
∞	4 °C	

### 2.5.5 Ποσοτική PCR πραγματικού χρόνου (qPCR)

Τα δείγματα στα οποία συντέθηκε cDNA, χρησιμοποιούνται για την ανάλυση επιπέδων έκφρασης γονιδίων, μέσω qPCR. Το μηχάνημα της qPCR που χρησιμοποιήθηκε είναι το CPX Connect Real-Time System, της BIORAD. Τα γονίδια που ελέγχθηκαν είναι αυτά των miR2111, *TML*, καθώς και των γονιδίων-δεικτών της μυοκορριζικής συμβίωσης *PT4*, *AMT2.2* και *SbtM1* (Guether et al., 2009; Harrison et al., 2002; Takeda et al., 2009; Volpe et al., 2013), σύμφωνα με την αντίδραση του Πίνακα 7 και το πρόγραμμα του Πίνακα 8. Ως φθορίζουσα χρωστική χρησιμοποιείται η SYBR Green. Η έκφραση των παραπάνω γονιδίων κανονικοποιείται ως προς την έκφραση των γονιδίων αναφοράς *ATP* (*ATP συνθάση*, *ATP synthase*) και *PP2A* (*PROTEIN PHOSPHATASE 2A*). Οι εκκινητές των γονιδίων φαίνονται στο Παράρτημα 2. Για όλα τα δείγματα πραγματοποιήθηκαν διπλές τεχνικές επαναλήψεις.

Στο τέλος των αντιδράσεων qPCR κατασκευάζεται καμπύλη τήξης για την ανίχνευση της εξειδικευμένης ενίσχυσης των προϊόντων. Η αποδοτικότητα της qPCR ( $PCR_{eff}$ ) υπολογίζεται με το πρόγραμμα LinRegPCR (Ramakers et al., 2003). Συγκεκριμένα, η έκφραση κάθε γονιδίου υπολογίζεται ως  $PCR_{eff}^{-\Delta Ct}$ , ενώ το  $\Delta Ct$  ισούται με  $Ct^X - Ct^A$  (όπου X: η έκφραση των γονιδίων ενδιαφέροντος, ενώ A: η έκφραση των γονιδίων αναφοράς).

*Πίνακας 7. Η αντίδραση της qPCR.*

Αντιδραστήρια	Ποσότητες
cDNA	2.5 $\mu$ L
Πρόσθιος εκκινητής	0.2 $\mu$ L
Ανάστροφος εκκινητής	0.2 $\mu$ L
ddH <sub>2</sub> O	2.1 $\mu$ L
2× διάλυμα SYBR Green	5 $\mu$ L
Τελικός όγκος	10 $\mu$ L

*Πίνακας 8. Το πρόγραμμα της qPCR.*

Χρόνος	Θερμοκρασία	} 45 κύκλοι
3 min	95 °C	
10 sec	95 °C	
20 sec	58 ή 60 °C	
11 sec	72 °C	

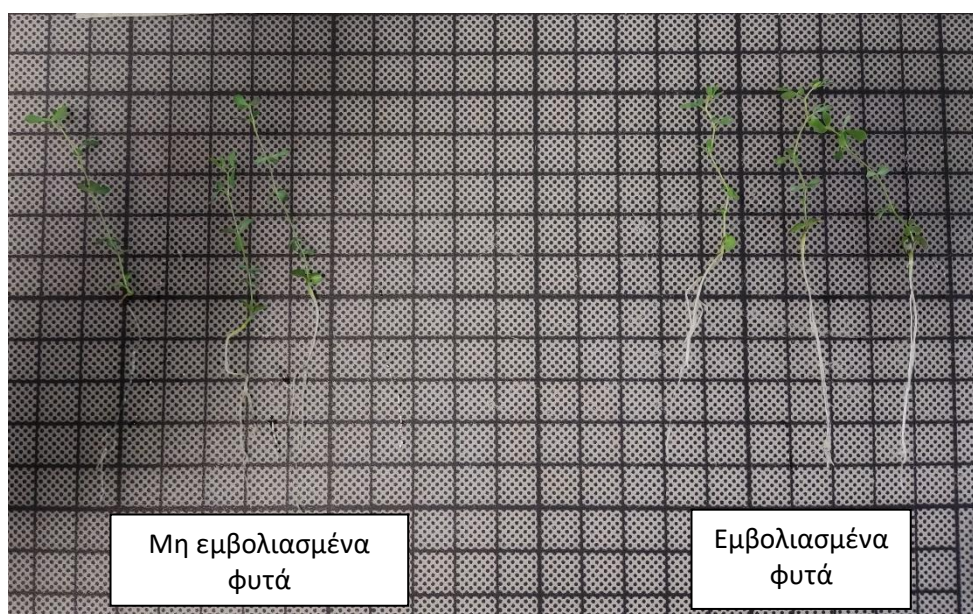
## 2.6 Στατιστική ανάλυση

Για τη στατιστική ανάλυση των αποτελεσμάτων πραγματοποιήθηκαν αναλύσεις unpaired t-test (<https://www.graphpad.com/>), ή One-Way ANOVA (<https://www.statskingdom.com/index.html>) σε επίπεδο σημαντικότητας 5% ( $P < 0,05$ ).

### 3. Αποτελέσματα

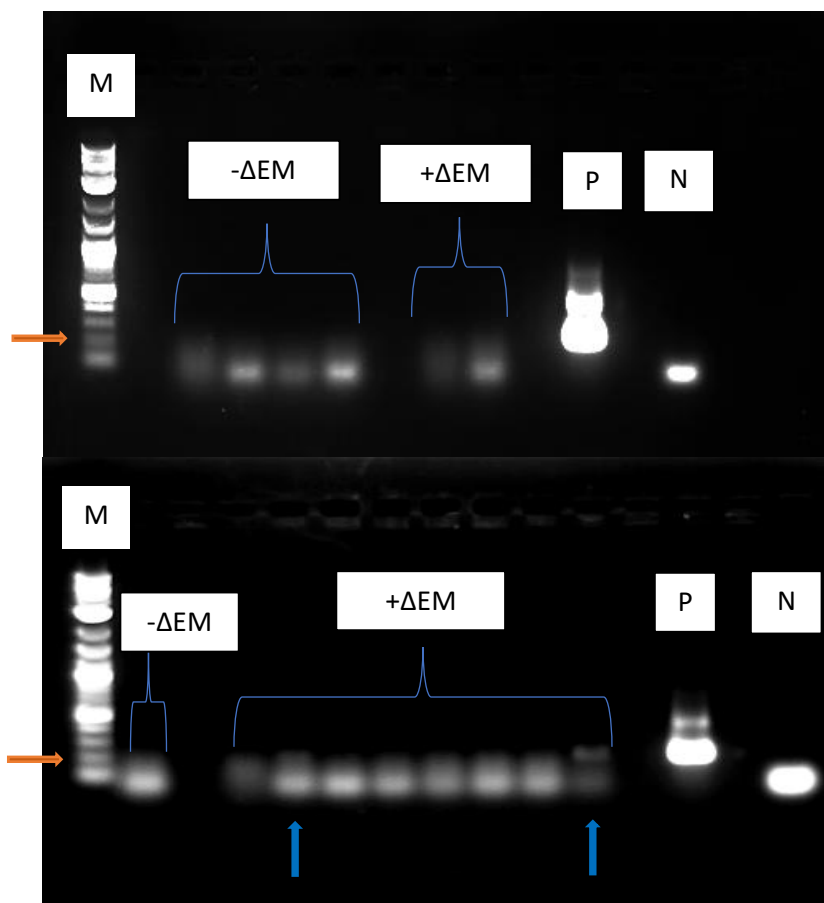
#### 3.1 Έλεγχος απόκρισης του miR2111 και του γονιδίου *TML* στη συμβίωση με ενδομυκορριζικό μύκητα

Για τον έλεγχο της απόκρισης του miR2111 και του γονιδίου *TML* κατά τη συμβίωση με δενδρόμορφο ενδομυκορριζικό μύκητα (ΔΕΜ), συγκρίθηκαν μη εμβολιασμένα φυτά ελέγχου με φυτά που εμβολιάστηκαν με τον ενδομυκορριζικό μύκητα (*R. irregularis*, στέλεχος DAOM). Όλα τα φυτά ήταν αγρίου τύπου και αναπτύχθηκαν για 4 εβδομάδες. Η ανάπτυξη των φυτών απεικονίζεται στην *Εικόνα 9*.



**Εικόνα 9.** Ανάπτυξη εμβολιασμένων φυτών (με τον *R. irregularis*) και μη εμβολιασμένων φυτών ελέγχου αγρίου τύπου, 4 εβδομάδες μετά το φύτεμα.

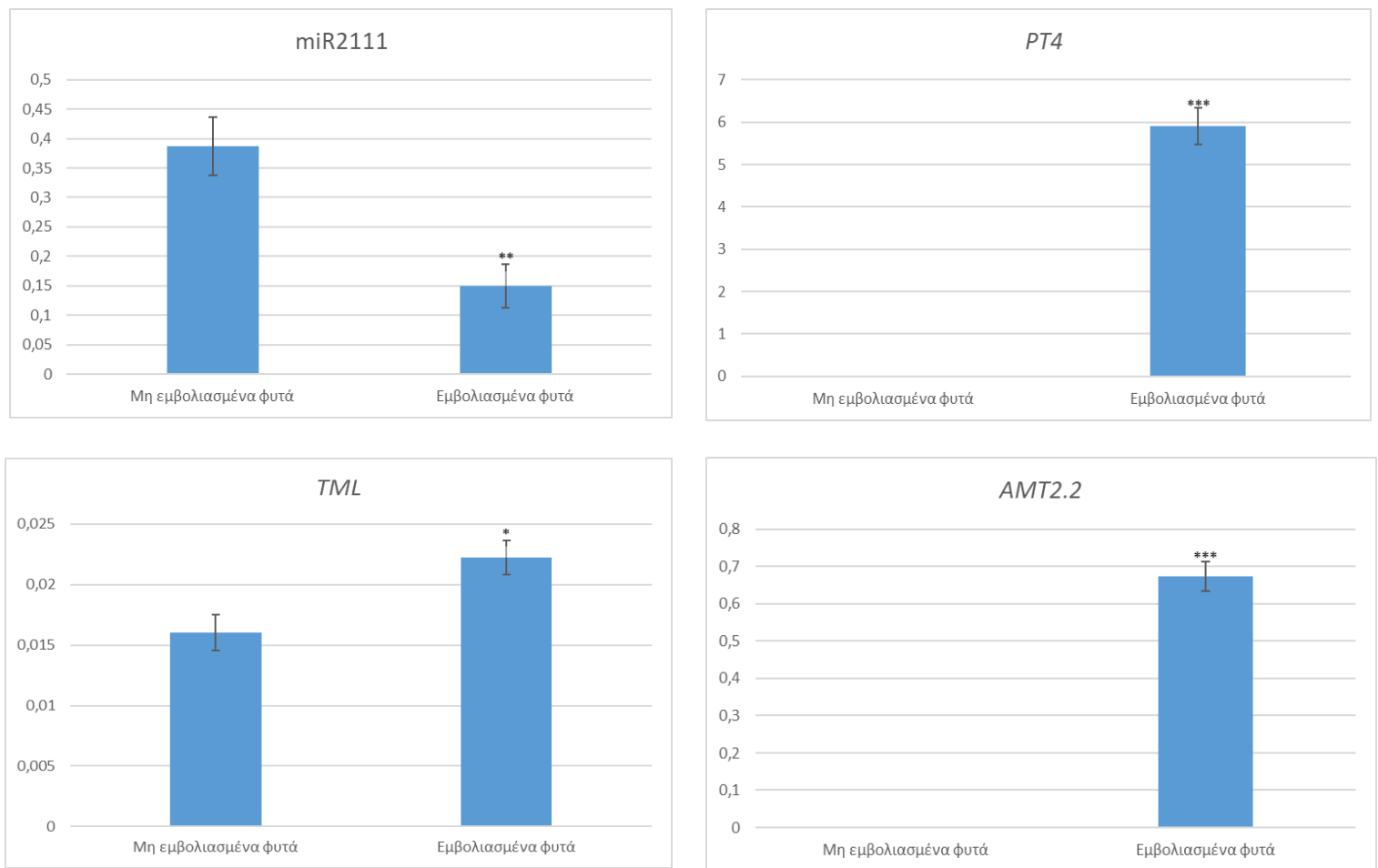
Ακολούθησε η συλλογή των ριζών και η απομόνωση του ολικού RNA, ενώ μετρήθηκαν η συγκέντρωση του RNA (ng/μL) και ο λόγος καθαρότητας ( $A_{260}/A_{280}$ ). Έπειτα, πραγματοποιήθηκε η διαδικασία απομάκρυνσης του γενωμικού DNA και PCR για τον έλεγχο της απομάκρυνσής του, με εκκινητές του ενδογενούς γονιδίου της ουβικιτίνης. Όπως φαίνεται στην *Εικόνα 10*, εκτός δύο δειγμάτων, τα υπόλοιπα είναι απαλλαγμένα από γενωμικό DNA. Για τα δείγματα στα οποία δεν απομακρύνθηκε το γενωμικό DNA (μπλε βέλη, *Εικόνα 10*) η διαδικασία επαναλήφθηκε, ώστε τα δείγματα να απαλλαγούν από γενωμικό DNA.



**Εικόνα 10.** Έλεγχος απομάκρυνσης του γενωμικού DNA. Ανάλυση προϊόντων PCR με ηλεκτροφόρηση σε πηκτή αгарόζης 1%, M (marker): δείκτης μοριακών βαρών (Ladder), -ΔΕΜ: δείγματα μη εμβολιασμένων φυτών ελέγχου, +ΔΕΜ: δείγματα εμβολιασμένων φυτών με τον *R. irregularis*, P (positive): θετικός μάρτυρας, N (negative): αρνητικός μάρτυρας. Τα πορτοκαλί βέλη υποδεικνύουν τις αναμενόμενες ζώνες ενίσχυσης του γονιδίου της σουβικιτίνης. Τα μπλε βέλη υποδεικνύουν τα δείγματα που δεν απαλλάχθηκαν από γενωμικό DNA.

Τέλος, πραγματοποιήθηκε σύνθεση cDNA και qPCR για το ώριμο miR2111 και το γονίδιο *TML*, ώστε να ελεγχθεί η έκφρασή τους κατά τον αποικισμό των φυτών, καθώς και για τα γονίδια-δείκτες της μυκορριζικής συμβίωσης *PT4* και *AMT2.2*. Η έκφραση των *PT4* και *AMT2.2* είναι σημαντικά αυξημένη στα εμβολιασμένα φυτά, σε σχέση με τα μη εμβολιασμένα (Εικόνα 11), το οποίο δείχνει τον επιτυχή αποικισμό των εμβολιασμένων φυτών. Όπως φαίνεται από τα αποτελέσματα, τα επίπεδα του miR2111 μειώνονται σημαντικά, ενώ τα επίπεδα έκφρασης του *TML* αυξάνονται σημαντικά στα εμβολιασμένα φυτά, σε σχέση με τα μη εμβολιασμένα φυτά ελέγχου (Εικόνα 11), το οποίο δείχνει την απόκριση του ζεύγους miR2111-TML στη συμβίωση του φυτού *L. japonicus* με ΔΕΜ.





**Εικόνα 11.** Τα επίπεδα του ώριμου miR2111 και τα επίπεδα έκφρασης των γονιδίων TML, PT4 και AMT2.2 (άξονας ψ), ως προς τα γονίδια αναφοράς ATP και PP2A, σε ρίζες εμβολιασμένων (με τον *R. irregularis*) και μη εμβολιασμένων φυτών αγρίου τύπου. Για τη στατιστική ανάλυση πραγματοποιήθηκε unpaired t-test. \* $p < 0.05$ , \*\* $p < 0.01$ , \*\*\* $p < 0.001$  (Εμβολιασμένα φυτά:  $n=4$ , Μη εμβολιασμένα φυτά:  $n=6$ ).

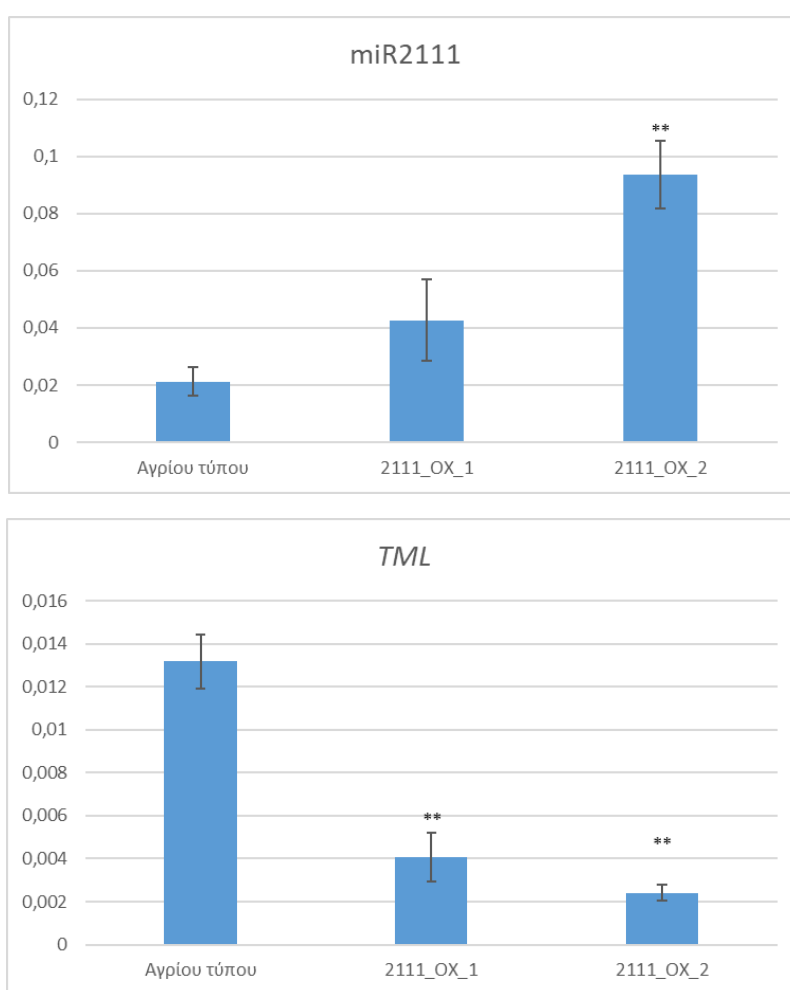
## 3.2 Έλεγχος του αποικισμού των φυτών από ενδομυκορριζικό μύκητα, κατά την υπερσυσσώρευση του miR2111

### 3.2.1 Έλεγχος επιπέδων υπερσυσσώρευσης του miR2111

Για τη διερεύνηση του ρόλου του miR2111, κατασκευάστηκαν φυτά *L. jarroicus* που υπερεκφράζουν το γονίδιο *MIR2111-3*, στα πλαίσια προηγούμενης εργασίας. Στην παρούσα εργασία, ελέγχθηκαν τα επίπεδά του ώριμου miR2111 στα φυτά των φυτικών σειρών υπερέκφρασης 2111\_OX\_1 και 2111\_OX\_2 (Παράρτημα 1), σε σχέση με φυτά αγρίου τύπου.



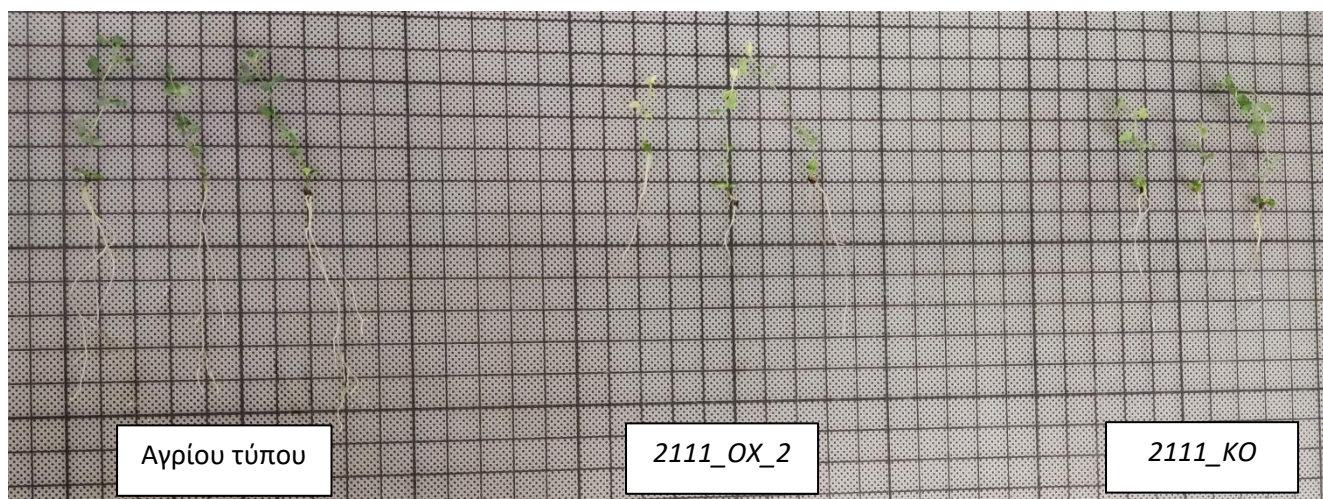
Τα φυτά αναπτύχθηκαν για 4 εβδομάδες. Ακολούθησε η συλλογή των ριζών και η απομόνωση του ολικού RNA, ενώ μετρήθηκαν η συγκέντρωση του RNA (ng/μL) και ο λόγος καθαρότητας ( $A_{260}/A_{280}$ ). Έπειτα, πραγματοποιήθηκε σύνθεση cDNA και qPCR για το ώριμο miR2111, αλλά και του γονιδίου *TML*. Όπως φαίνεται από τα αποτελέσματα, στα φυτά 2111\_OX\_1 η συσσώρευση του miR2111 είναι σχεδόν διπλάσια και στα φυτά 2111\_OX\_2 παρατηρείται σημαντική αύξηση του miR2111, περίπου 4.4 φορές πάνω, σε σχέση με τα φυτά αγρίου τύπου (Εικόνα 12). Τα επίπεδα έκφρασης του *TML* είναι σημαντικά μειωμένα στα φυτά 2111\_OX\_1, περίπου 3.2 φορές κάτω, αλλά και στα φυτά 2111\_OX\_2, περίπου 5.4 φορές κάτω, σε σχέση με τα φυτά αγρίου τύπου (Εικόνα 12). Για περεταίρω ανάλυση (υποενότητα 3.2.2) επιλέχθηκε η φυτική σειρά 2111\_OX\_2.



**Εικόνα 12.** Τα επίπεδα του ώριμου miR2111 και του γονιδίου *TML* (άξονας ψ), ως προς τα γονίδια αναφοράς *ATP* και *PP2A*, σε ρίζες φυτών. Για τη στατιστική ανάλυση πραγματοποιήθηκε unpaired t-test. \*\* $p < 0.01$  ( $n=3$ ).

### 3.2.2 Μοριακός έλεγχος του αποικισμού με ενδομυκορριζικό μύκητα στη φυτική σειρά 2111\_OX\_2

Για τη διερεύνηση του ρόλου του miR2111 στη συμβίωση με ΔΕΜ, μετρήθηκαν τα επίπεδα έκφρασης των γονιδίων-δεικτών της μυκορριζικής συμβίωσης *PT4*, *AMT2.2* και *SbtM1* σε φυτά αγρίου τύπου και φυτά 2111\_OX\_2. Όλα τα φυτά είχαν εμβολιαστεί με τον ενδομυκορριζικό μύκητα και αναπτύχθηκαν για 4 εβδομάδες. Η ανάπτυξη των φυτών απεικονίζεται στο *Εικόνα 13*.



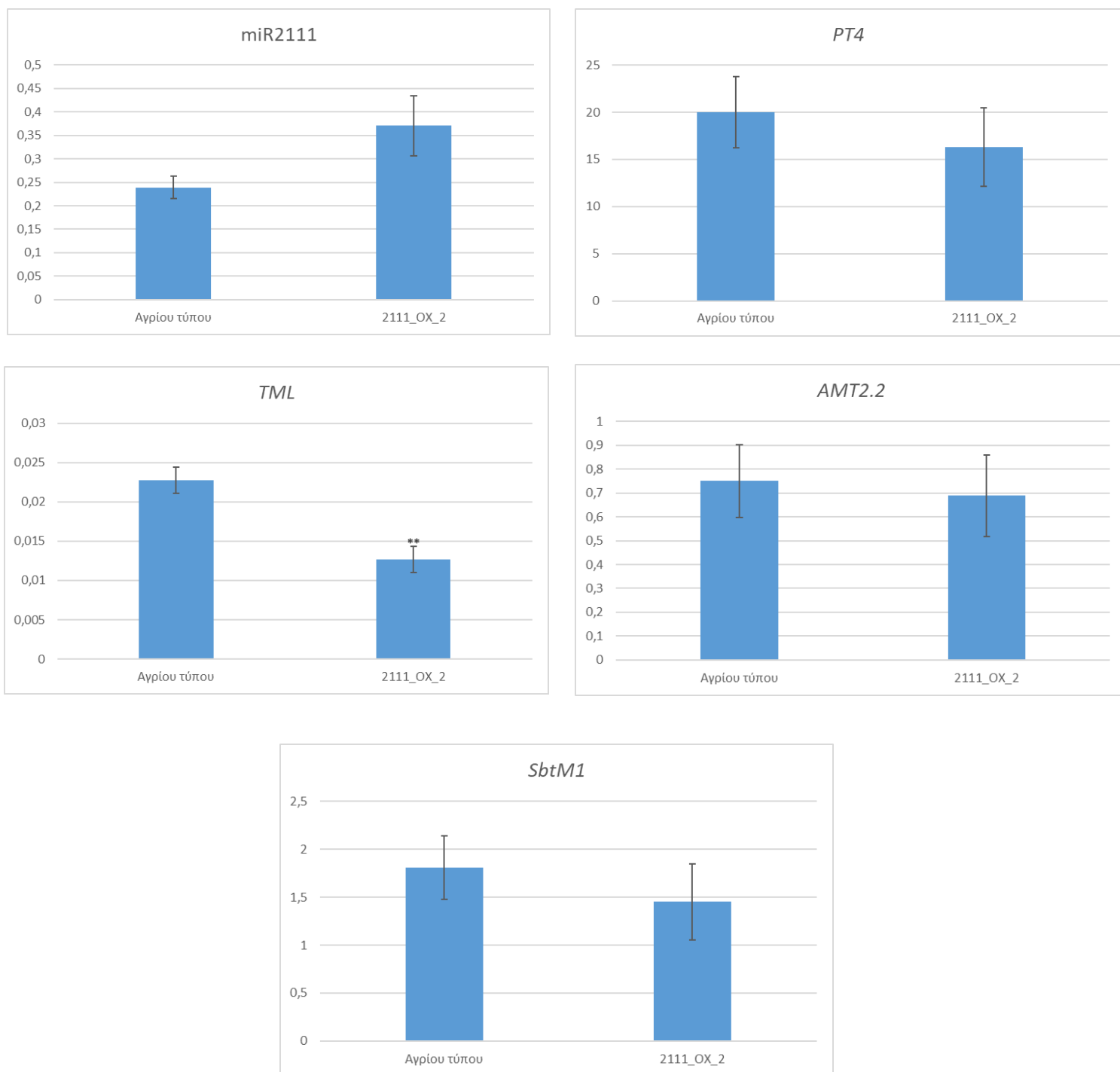
**Εικόνα 13.** Η ανάπτυξη φυτών αγρίου τύπου και φυτών των φυτικών σειρών 2111\_OX\_2 και 2111\_KO, 4 εβδομάδες μετά το φύτεμα. Τα φυτά είναι εμβολιασμένα με τον *R. irregularis*.

Ακολούθησε η συλλογή των ριζών και η απομόνωση του ολικού RNA, ενώ μετρήθηκαν η συγκέντρωση του RNA (ng/μL) και ο λόγος καθαρότητας ( $A_{260}/A_{280}$ ). Έπειτα, πραγματοποιήθηκε η διαδικασία απομάκρυνσης του γενωμικού DNA και PCR για τον έλεγχο της απομάκρυνσής του, με εκκινητές του ενδογενούς γονιδίου της ουβικιτίνης. Όπως φαίνεται στην *Εικόνα 14*, ορισμένα δείγματα δεν έχουν απαλλαγεί από γενωμικό DNA (μπλε βέλη). Για τα δείγματα αυτά η διαδικασία επαναλήφθηκε, ώστε τα δείγματα να απαλλαχθούν από γενωμικό DNA.



**Εικόνα 14.** Έλεγχος απομάκρυνσης του γενωμικού DNA. Ανάλυση προϊόντων PCR με ηλεκτροφόρηση σε πηκτική αгарόζης 1%,. M (marker): δείκτης μοριακών βαρών (Ladder), P (positive): θετικός μάρτυρας, N (negative): αρνητικός μάρτυρας. Τα πορτοκαλί βέλη υποδεικνύουν τις αναμενόμενες ζώνες ενίσχυσης του γονιδίου της ουβικιτίνης. Τα μπλε βέλη υποδεικνύουν τα δείγματα που δεν απαλλάχθηκαν από γενωμικό DNA.

Τέλος, πραγματοποιήθηκε σύνθεση cDNA και qPCR για το ώριμο miR2111, αλλά και για τα γονίδια *TML*, *PT4*, *AMT2.2* και *SbtM1*. Όσον αφορά τα γονίδια-δείκτες *PT4*, *AMT2.2* και *SbtM1*, η έκφρασή τους δείχνει τάση μείωσης στα φυτά 2111\_OX\_2, σε σχέση με τα φυτά αγρίου τύπου, η οποία, όμως, δεν είναι σημαντική (Εικόνα 15), το οποίο σημαίνει πως η υπερέκφραση του *MIR2111-3* δεν επηρεάζει ιδιαίτερα τον αποικισμό των φυτών από ΔΕΜ. Το αποτέλεσμα αυτό δικαιολογείται από το γεγονός ότι δεν παρατηρούνται μεγάλες διαφορές στη συσσώρευση του miR2111 και των *TML* μεταγράφων μεταξύ των εμβολιασμένων αγρίου-τύπου και 2111\_OX\_2 φυτών. Συγκεκριμένα, τα επίπεδα του miR2111 είναι μόλις 1.55 φορές αυξημένα στα φυτά 2111\_OX\_2, και αντίστοιχα, τα επίπεδα του *TML* είναι 1.8 φορές μειωμένα, σε σχέση με τα φυτά αγρίου τύπου (Εικόνα 15).



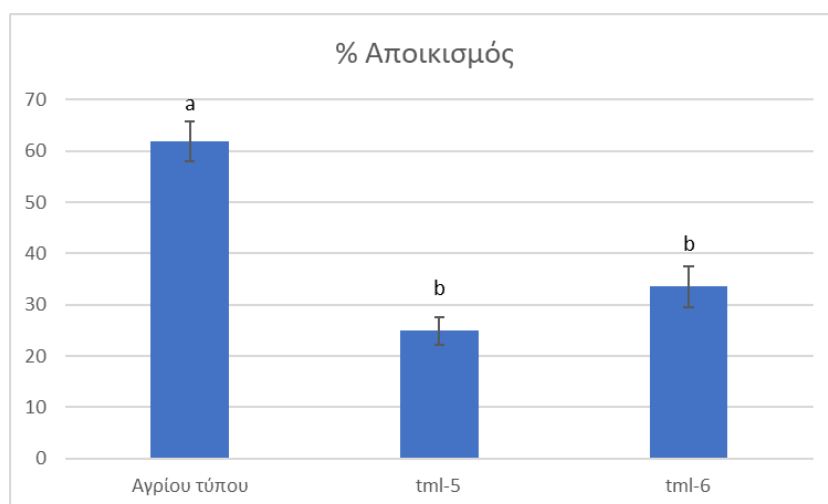
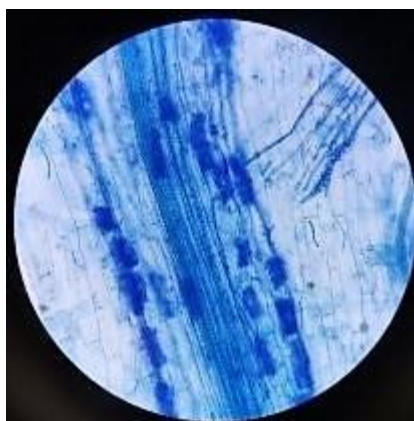
**Εικόνα 15.** Τα επίπεδα του ώριμου *miR2111* και τα επίπεδα έκφρασης των γονιδίων *TML*, *PT4*, *AMT2.2* και *SbtM1* (άξονας ψ), ως προς τα γονίδια αναφοράς *ATP* και *PP2A*, σε ρίζες φυτών. Τα φυτά είναι εμβολιασμένα με τον *R. irregularis*. Για τη στατιστική ανάλυση πραγματοποιήθηκε unpaired *t*-test. \*\* $p < 0.01$  (Αγρίου τύπου:  $n=6$ , 2111\_OX\_2:  $n=8$ ).

### 3.3 Διερεύνηση του ρόλου του γονιδίου *TML* στη συμβίωση με ενδομυκορριζικό μύκητα

#### 3.3.1 Φαινοτυπικός έλεγχος του αποικισμού στα μεταλλάγματα *tml-5* και *tml-6*

Για τη διερεύνηση του ρόλου του γονιδίου *TML* στη συμβίωση με ΔΕΜ, μετρήθηκε ο αποικισμός φυτών αγρίου τύπου και φυτών των μεταλλαγμάτων *tml-5* και *tml-6* (Παράρτημα 1). Όλα τα φυτά είχαν εμβολιαστεί με τον μύκητα και αναπτύχθηκαν για 6 εβδομάδες.

Ύστερα, οι ρίζες των φυτών συλλέχθηκαν και πραγματοποιήθηκε χρώση τους, ώστε να μετρηθούν τα ποσοστά αποικισμού. Για τον υπολογισμό των ποσοστών αποικισμού καταμετρήθηκαν οπτικά πεδία όπου παρατηρούνταν ανάπτυξη θυσσάνων (Εικόνα 16). Όπως παρατηρείται στα αποτελέσματα, ο αποικισμός των φυτών των μεταλλαγμάτων *tml-5* και *tml-6* είναι σημαντικά μειωμένος (24.9% και 33.6%, αντίστοιχα), σε σχέση με τα φυτά αγρίου τύπου (61.9%) (Εικόνα 16), δείχνοντας την εμπλοκή του γονιδίου *TML* στη συμβίωση.



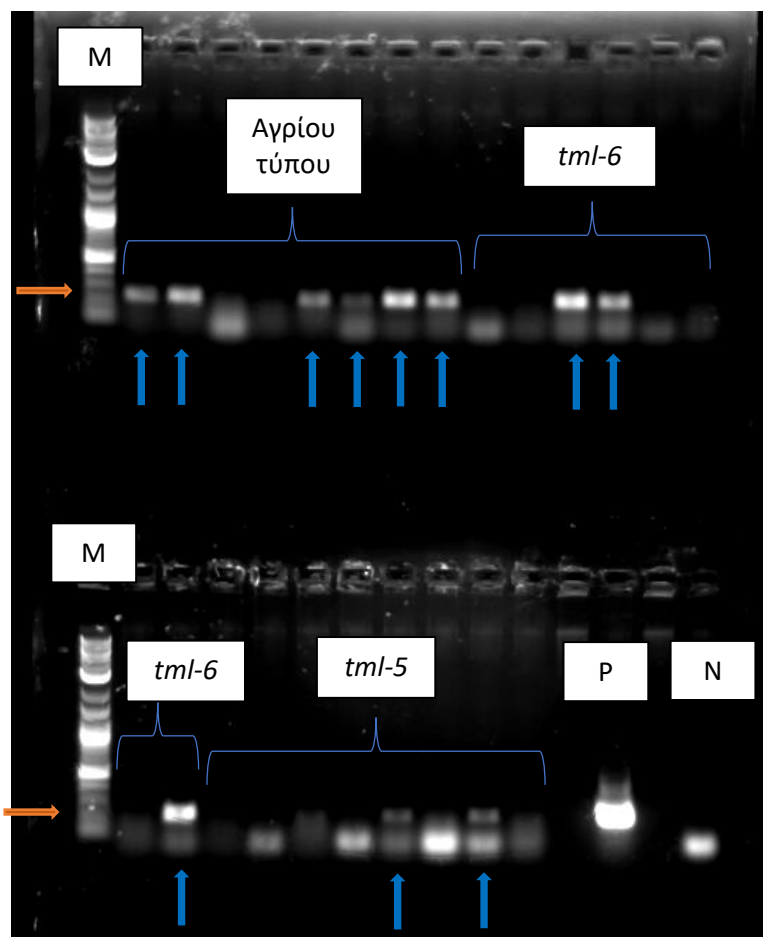
**Εικόνα 16.** Αριστερά: Η δομή αποικιοποιημένων κυττάρων που περιέχουν θυσσάνους (σκούρα μπλε ορθογώνια) σε φακό 40×. Δεξιά: Το ποσοστό αποικισμού (άξονας ψ) σε ρίζες φυτών. Τα φυτά είναι εμβολιασμένα με τον *R. irregularis*. Για τη στατιστική ανάλυση πραγματοποιήθηκε One-Way ANOVA. a, b: στατιστικώς σημαντική διαφορά ( $p < 0.05$ ) ( $n=6$ ).

#### 3.3.2 Μοριακός έλεγχος του αποικισμού στα μεταλλάγματα *tml-5* και *tml-6*

Για την περεταίρω διερεύνηση του ρόλου του γονιδίου *TML* στη συμβίωση με ΔΕΜ, μετρήθηκαν τα επίπεδα έκφρασης των γονιδίων *PT4*, *AMT2.2* και *SbtM1* σε φυτά αγρίου τύπου και φυτά των μεταλλαγμάτων *tml-5* και *tml-6*. Όλα τα φυτά είχαν εμβολιαστεί με τον ενδομυκορριζικό μύκητα και αναπτύχθηκαν για 4 εβδομάδες.

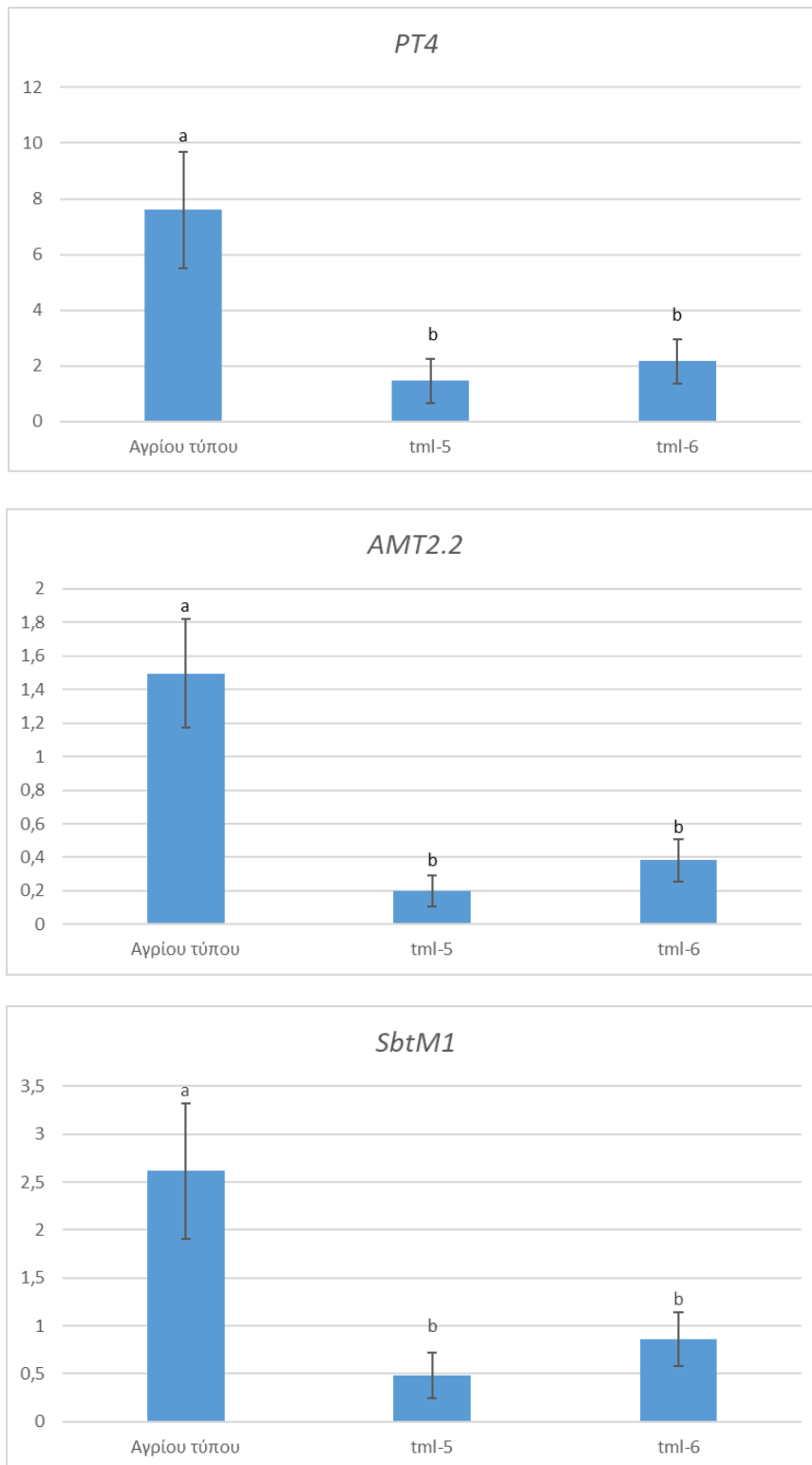
Ακολούθησε η συλλογή των ριζών και η απομόνωση του ολικού RNA, ενώ μετρήθηκαν η συγκέντρωση του RNA (ng/μL) και ο λόγος καθαρότητας ( $A_{260}/A_{280}$ ).

Έπειτα, πραγματοποιήθηκε η διαδικασία απομάκρυνσης του γενωμικού DNA και PCR για τον έλεγχο της απομάκρυνσής του, με εκκινητές του ενδογενούς γονιδίου της ουβικιτίνης. Όπως φαίνεται στην *Εικόνα 17*, αρκετά δείγματα δεν έχουν απαλλαγεί από γενωμικό DNA (μπλε βέλη). Για τα δείγματα αυτά η διαδικασία επαναλήφθηκε, ώστε τα δείγματα να απαλλαχθούν από γενωμικό DNA.



**Εικόνα 17.** Έλεγχος απομάκρυνσης του γενωμικού DNA. Ανάλυση προϊόντων PCR με ηλεκτροφόρηση σε πηκτή αгарόζης 1%,. M (marker): δείκτης μοριακών βαρών (Ladder), P (positive): θετικός μάρτυρας, N (negative): αρνητικός μάρτυρας. Τα πορτοκαλί βέλη υποδεικνύουν τις αναμενόμενες ζώνες ενίσχυσης του γονιδίου της ουβικιτίνης. Τα μπλε βέλη υποδεικνύουν τα δείγματα που δεν απαλλάχθηκαν από γενωμικό DNA.

Τέλος, πραγματοποιήθηκε σύνθεση cDNA και qPCR για τα γονίδια *PT4*, *AMT2.2* και *SbtM1*. Όπως φαίνεται από τα αποτελέσματα, η έκφραση και των τριών γονιδίων-δεικτών της μυκορριζικής συμβίωσης μειώνεται σημαντικά στα φυτά των μεταλλαγμάτων *tml-5* και *tml-6*, σε σχέση με τα φυτά αγρίου τύπου (*Εικόνα 18*), το οποίο δείχνει τον μειωμένο αποικισμό των φυτών των μεταλλαγμάτων *tml* και επιβεβαιώνει την εμπλοκή του γονιδίου *TML* στη συμβίωση.



**Εικόνα 18.** Τα επίπεδα έκφρασης των γονιδίων *PT4*, *AMT2.2* και *SbtM1* (άξονας ψ), ως προς τα γονίδια αναφοράς *ATP* και *PP2A*, σε ρίζες φυτών. Τα φυτά είναι εμβολιασμένα με τον *R. irregularis*. Για τη στατιστική ανάλυση πραγματοποιήθηκε One-Way ANOVA. α, β: στατιστικώς σημαντική διαφορά ( $p < 0.05$ ) (Αγρίου τύπου:  $n=4$ , *tml-5*/*tml-6*:  $n=7$ ).

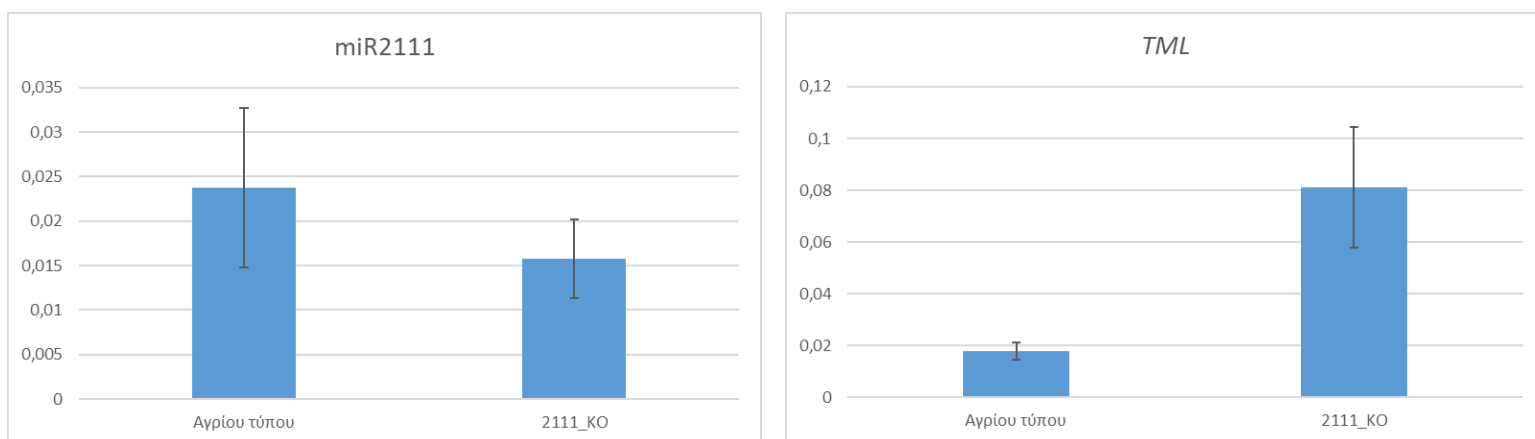


### 3.4 Έλεγχος του αποικισμού των φυτών με ενδομυκορριζικό μύκητα, κατά την μειωμένη συσσώρευση του miR2111

#### 3.4.1 Έλεγχος καταστολής έκφρασης του MIR2111-3

Για τη διερεύνηση του ρόλου του miR2111, κατασκευάστηκαν φυτά *L. jaronicus*, στα οποία καταστέλλεται η έκφραση του γονιδίου *MIR2111-3*, στα πλαίσια προηγούμενης εργασίας. Στην παρούσα εργασία, ελέγχθηκαν τα επίπεδα του ώριμου miR2111 στα φυτά της φυτικής σειράς 2111\_KO (Παράρτημα 1), σε σχέση με φυτά αγρίου τύπου.

Η ανάπτυξή τους διήρκησε 4 εβδομάδες. Ακολούθησε η συλλογή των ριζών και η απομόνωση του ολικού RNA, ενώ μετρήθηκαν η συγκέντρωση του RNA (ng/μL) και ο λόγος καθαρότητας ( $A_{260}/A_{280}$ ). Έπειτα, πραγματοποιήθηκε σύνθεση cDNA και qPCR για το ώριμο miR2111, αλλά και του γονιδίου *TML*. Από τα αποτελέσματα φαίνεται πως τα φυτά 2111\_KO παρουσιάζουν μειωμένα επίπεδα του miR2111, περίπου 1.5 φορές κάτω, σε σχέση με τα φυτά αγρίου τύπου (Εικόνα 19). Αντίστοιχα, τα επίπεδα έκφρασης του *TML* είναι αυξημένα στα φυτά 2111\_KO, περίπου 4.5 φορές πάνω (Εικόνα 19). Η φυτική σειρά 2111\_KO χρησιμοποιήθηκε για περαιτέρω ανάλυση (υποενότητα 3.4.2).



**Εικόνα 19.** Τα επίπεδα του ώριμου miR2111 και τα επίπεδα έκφρασης του γονιδίου *TML* (άξονας ψ), ως προς τα γονίδια αναφοράς *ATP* και *PP2A*, σε ρίζες φυτών. Για τη στατιστική ανάλυση πραγματοποιήθηκε *unpaired t-test* ( $n=3$ ). Τα αποτελέσματα δεν βρέθηκαν στατιστικώς σημαντικά.

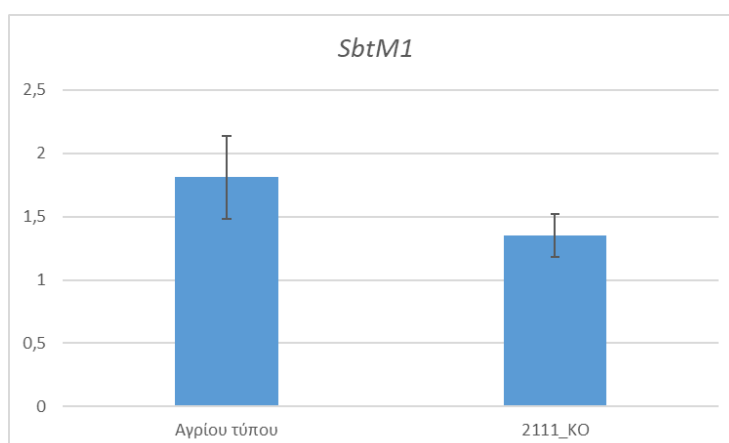
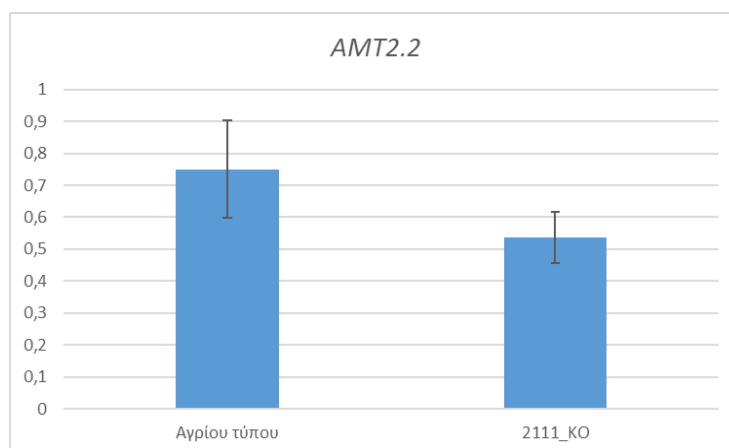
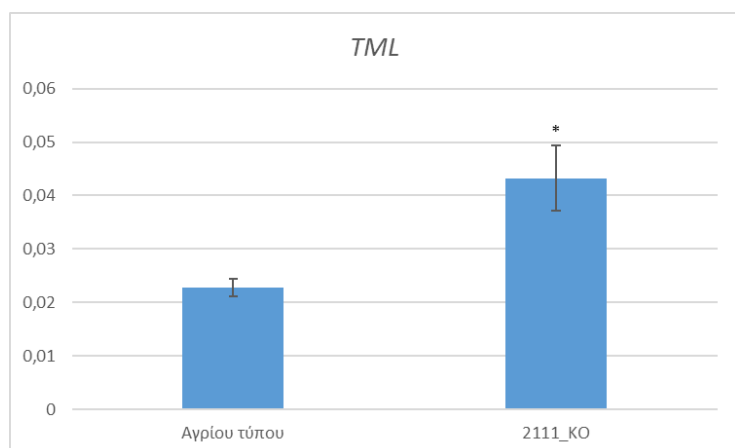
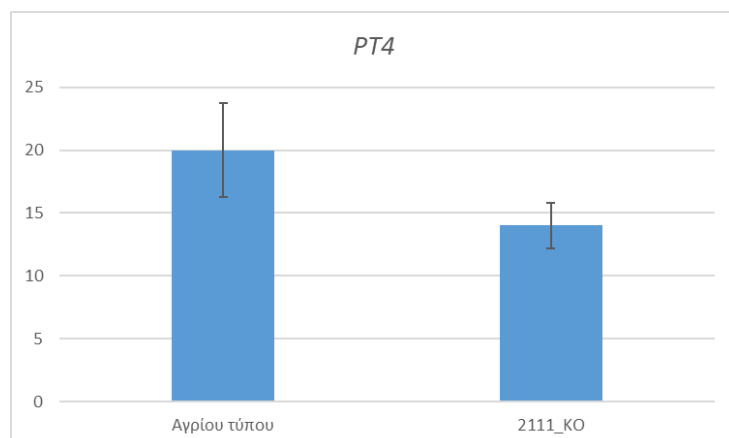
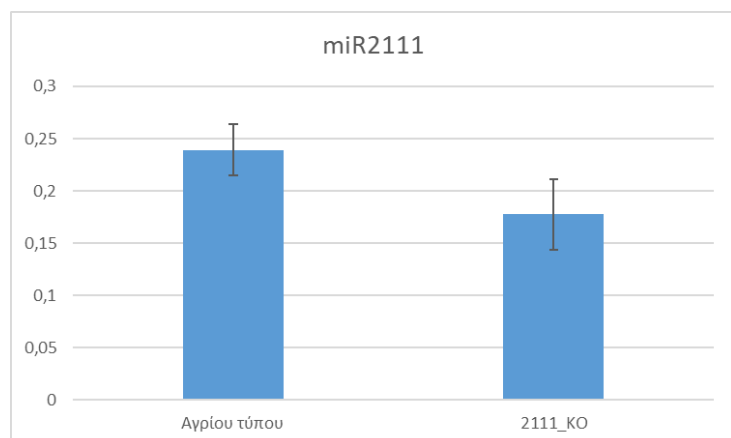


### 3.4.2 Μοριακός έλεγχος του αποικισμού στο μετάλλαγμα 2111\_KO

Για τη διερεύνηση του ρόλου του miR2111 στη συμβίωση με ΔΕΜ, μετρήθηκαν τα επίπεδα έκφρασης των γονιδίων *PT4*, *AMT2.2* και *SbtM1* σε φυτά αγρίου τύπου και φυτά της φυτικής σειράς 2111\_KO. Όλα τα φυτά είχαν εμβολιαστεί με ΔΕΜ και αναπτύχθηκαν για 4 εβδομάδες. Η ανάπτυξη των φυτών απεικονίζεται στο *Εικόνα 13*.

Ακολούθησε η συλλογή των ριζών και η απομόνωση του ολικού RNA, ενώ μετρήθηκαν η συγκέντρωση του RNA (ng/μL) και ο λόγος καθαρότητας ( $A_{260}/A_{280}$ ). Έπειτα, πραγματοποιήθηκε η διαδικασία απομάκρυνσης του γενωμικού DNA και PCR για τον έλεγχο της απομάκρυνσής του, με εκκινητές του ενδογενούς γονιδίου της ουβικιτίνης. Όπως φαίνεται στην *Εικόνα 14*, ορισμένα δείγματα δεν έχουν απαλλαγεί από γενωμικό DNA (μπλε βέλη). Για τα δείγματα αυτά η διαδικασία επαναλήφθηκε, ώστε τα δείγματα να απαλλαχθούν από γενωμικό DNA.

Τέλος, πραγματοποιήθηκε σύνθεση cDNA και qPCR για το ώριμο miR2111, αλλά και για τα γονίδια *TML*, *PT4*, *AMT2.2* και *SbtM1*. Όσον αφορά τα γονίδια-δείκτες *PT4*, *AMT2.2* και *SbtM1*, η έκφρασή τους δεν παρουσίασε διαφορές στα φυτά 2111\_KO, σε σχέση με τα φυτά αγρίου τύπου (*Εικόνα 20*), το οποίο σημαίνει πως η καταστολή έκφρασης του *MIR2111-3* δεν επηρεάζει ιδιαιτέρως τον αποικισμό των φυτών από ΔΕΜ. Το αποτέλεσμα μπορεί να δικαιολογηθεί από το γεγονός ότι δεν παρατηρούνται μεγάλες διαφορές στη συσσώρευση του miR2111 και των *TML* μεταγράφων μεταξύ των εμβολιασμένων αγρίου-τύπου και 2111\_KO φυτών. Συγκεκριμένα, τα επίπεδα του miR2111 είναι 1.34 φορές μειωμένα στα φυτά 2111\_KO, και αντίστοιχα, τα επίπεδα του *TML* είναι περίπου 1.9 φορές αυξημένα, σε σχέση με τα φυτά αγρίου τύπου (*Εικόνα 20*).



**Εικόνα 20.** Τα επίπεδα του ώριμου *miR2111* και τα επίπεδα έκφρασης των γονιδίων *TML*, *PT4*, *AMT2.2* και *SbtM1* (άξονας ψ), ως προς τα γονίδια αναφοράς *ATP* και *PP2A*, σε ρίζες φυτών. Τα φυτά είναι εμβολιασμένα με τον *R. irregularis*. Για τη στατιστική ανάλυση πραγματοποιήθηκε *unpaired t-test*. \* $p < 0.05$  (Αγρίου τύπου:  $n=6$ , 2111\_KO:  $n=8$ ).

## 4. Συζήτηση

Τα φυτά αναπτύσσουν συμβιωτικές σχέσεις με μικροοργανισμούς του εδάφους για την πρόσληψη θρεπτικών συστατικών. Δύο διαδεδομένες συμβιωτικές σχέσεις είναι μεταξύ ψυχανθών και ριζοβίων, καθώς και μεταξύ χερσαίων φυτών και δενδρόμορφων ενδομυκορριζικών μυκήτων (ΔΕΜ) (Oldroyd and Leyser, 2020). Τα ριζόβια εισέρχονται στα κύτταρα της ρίζας και σχηματίζουν τα φυμάτια, στα οποία θα συμβεί αζωτοδέσμευση, βοηθώντας στην πρόσληψη αζώτου (Udvardi and Poole, 2013). Οι ΔΕΜ εισέρχονται στα κύτταρα της ρίζας και σχηματίζουν δενδρόμορφες δομές, τους θυσσάνους (arbuscules), βοηθώντας στην πρόσληψη κυρίως φωσφόρου, αλλά και αζώτου (Parniske, 2008). Βέβαια, οι ΔΕΜ βοηθάνε στην πρόσληψη και άλλων θρεπτικών, καθώς και νερού, αλλά προσφέρουν και αντίσταση σε βιοτικές και αβιοτικές καταπονήσεις (Kuila and Ghosh, 2022). Συνεπώς, η συμβίωση με ριζόβια και ΔΕΜ έχει οφέλη για τη γεωργία και την οικολογία (Graham and Vance, 2003; Kuila and Ghosh, 2022), οπότε η μελέτη των μοριακών μηχανισμών τους είναι απαραίτητη.

Και τα δύο είδη συμβίωσης υπόκεινται σε μηχανισμούς αυτορρύθμισης, τους «αυτορρύθμιση της φυματογένεσης» (ή ΑΟΝ) και «αυτορρύθμιση της μυκορριζικής συμβίωσης» (ή ΑΟΜ), οι οποίοι φέρουν ομοιότητες. Πρόκειται για συστημικά μονοπάτια που ρυθμίζουν το βαθμό εισόδου των μικροοργανισμών στη ρίζα και την έκταση του αποικισμού (Wang et al., 2018). Στη ρύθμιση των συμβιωτικών σχέσεων συμμετέχουν και miRNAs (Hoang et al., 2020; Müller and Harrison, 2019). Όσον αφορά τον μηχανισμό ΑΟΜ, δεν έχουν βρεθεί miRNAs που να συμμετέχουν σε αυτόν, αλλά μόνο σε επιμέρους στάδια της συμβίωσης, όπως η ανάπτυξη των θυσσάνων (Couzigou et al., 2017; Etemadi et al., 2014). Αντίθετα, στον μηχανισμό ΑΟΝ έχουν βρεθεί miRNAs που αποτελούν μόρια-κλειδιά (Wang et al., 2014; Tsikou et al., 2018). Καλά μελετημένο παράδειγμα και βασικό μέρος του ΑΟΝ αποτελεί το miR2111 (Gautrat et al., 2020; Tsikou et al., 2018). Το miR2111 προωθεί τη συμβίωση με ριζόβια. Γονίδιο-στόχος του miR2111 αποτελεί το *TML* (Tsikou et al., 2018), το οποίο είναι αναστολέας της συμβίωσης με ριζόβια (Magori et al., 2009; Takahara et al., 2013). Στόχος της παρούσας εργασίας είναι ο έλεγχος της εμπλοκής του miR2111, αλλά και του γονιδίου *TML*, στη συμβίωση με ΔΕΜ ως μέρος του ΑΟΜ, στο ψυχανθές *L. japonicus*, κατά τη συμβίωση με τον μύκητα *R. irregularis* (στέλεχος DAOM).

Αρχικά, ελέγχθηκε η απόκριση του ζεύγους miR2111-TML σε ρίζες φυτών, κατά τη συμβίωση με ΔΕΜ. Από τα αποτελέσματα φαίνεται πως τα επίπεδα του ώριμου miR2111 μειώνονται σημαντικά, ενώ τα επίπεδα έκφρασης του *TML* αυξάνονται σημαντικά στα εμβολιασμένα φυτά, σε σχέση με τα φυτά ελέγχου (Εικόνα 11). Από τα αποτελέσματα αυτά συμπεραίνεται πως η συμβίωση με ΔΕΜ οδηγεί σε μείωση του ώριμου miR2111 και αύξηση του *TML*, όπως συμβαίνει και στη συμβίωση με ριζόβια (Gautrat et al., 2020; Okuma et al., 2020; Tsikou et al., 2018), πράγμα που υποδεικνύει την πιθανή εμπλοκή του ζεύγους miR2111-TML στη συμβίωση με ΔΕΜ, ως μέρος του ΑΟΜ.

Εφόσον το ζεύγος miR2111-TML αποκρίνεται στη συμβίωση, στη συνέχεια, διερευνήθηκε ο ρόλος του miR2111 στη συμβίωση με ΔΕΜ, χρησιμοποιώντας φυτικές

σειρές υπερσυσσώρευσης του miR2111, που είχαν κατασκευαστεί στα πλαίσια προηγούμενης εργασίας. Να σημειωθεί πως η υπερσυσσώρευση του miR2111 στα φυτά αυτά, προέρχεται μόνο από την υπερέκφραση του γενετικού τόπου *MIR2111-3*, ένα από τους επτά γενετικούς τόπους έκφρασής του (Okuma et al., 2020). Στη φυτική σειρά που χρησιμοποιήθηκε, τα επίπεδα του miR2111 βρέθηκαν 4.4 φορές αυξημένα (ενώ αντίστοιχα τα επίπεδα του *TML* ήταν 5.4 φορές μειωμένα) σε σχέση με τα αντίστοιχα επίπεδα που παρατηρούνται στα φυτά αγρίου-τύπου (Εικόνα 12).

Από αποτελέσματα της έκφρασης των γονιδίων *PT4*, *AMT2.2* και *SbtM1* στις ρίζες των φυτών, φαίνεται πως και τα τρία γονίδια-δείκτες της μυκορριζικής συμβίωσης παρουσιάζουν μία τάση μείωσης στα φυτά *2111\_OX\_2*, σε σχέση με τα φυτά αγρίου τύπου (Εικόνα 15), παρόλα αυτά η μείωση της έκφρασης δεν βρέθηκε να είναι στατιστικώς σημαντική. Από τα παραπάνω, βγαίνει το συμπέρασμα πως τα αυξημένα επίπεδα του miR2111 στη φυτική σειρά υπερέκφρασης *2111\_OX\_2* επηρεάζουν ίσως μερικώς, αλλά όχι σημαντικά τον αποικισμό των φυτών από τον ΔΕΜ.

Το αποτέλεσμα αυτό μπορεί να εξηγηθεί από το γεγονός ότι κατά τη συμβίωση με τον *R. irregularis*, τα επίπεδα του ώριμου miR2111 δε βρέθηκαν σημαντικά αυξημένα στα φυτά *2111\_OX\_2*, σε σχέση με τα φυτά αγρίου τύπου (Εικόνα 15), καθώς η παρουσία του μύκητα επιφέρει τη μείωση των επιπέδων miR2111 (Εικόνα 11). Επομένως, η ρύθμιση αυτή φαίνεται να ισχύει και στην περίπτωση που το miR2111 υπερεκφράζεται.

Στη συνέχεια, διερευνήθηκε ο ρόλος του γονιδίου *TML* στη συμβίωση με ΔΕΜ, χρησιμοποιώντας δύο LORE1 φυτικά μεταλλάγματα *tml* (Παράρτημα 1). Μικροσκοπική παρατήρηση των θυσσάνων σε αποικισμένες με ΔΕΜ ρίζες, έδειξε ότι τα φυτά των μεταλλαγμάτων *tml-5* και *tml-6* έχουν σημαντικά μειωμένα ποσοστά αποικισμού, σε σύγκριση με τα φυτά αγρίου τύπου (Εικόνα 16). Η παρατήρηση αυτή έρχεται σε αντίθεση με τον αποικισμό από ριζόβια, καθώς σε μεταλλάγματα του γονιδίου *TML* παρατηρείται αύξηση των φυματίων στις ρίζες (Magori et al., 2009; Takahara et al., 2013). Ακολούθησε μοριακός έλεγχος, που επιβεβαίωσε τα αποτελέσματα της μικροσκοπικής ανάλυσης, καθώς έδειξε πως στα φυτά των μεταλλαγμάτων *tml-5* και *tml-6* η έκφραση των γονιδίων-δεικτών *PT4*, *AMT2.2* και *SbtM1* είναι σημαντικά μειωμένη, σε σχέση με τα φυτά αγρίου τύπου (Εικόνα 18), πράγμα που δείχνει τον μειωμένο αποικισμό των φυτών αυτών. Από τα παραπάνω φαίνεται πως το γονίδιο *TML* συμμετέχει στη συμβίωση με ΔΕΜ, ενισχύοντας την υπόθεση συμμετοχής του ζεύγους miR2111-TML στη συμβίωση. Μάλιστα, η μείωση του αποικισμού στα μεταλλάγματα *tml-5* και *tml-6*, δείχνει πως το γονίδιο *TML* προωθεί τη συμβίωση με ΔΕΜ, ενώ η τάση μείωσης του αποικισμού στα φυτά *2111\_OX\_2*, δείχνει πως το miR2111 πιθανώς αναστέλλει τη συμβίωση με ΔΕΜ, έναν ρόλο αντίθετο αυτού της συμβίωσης με ριζόβια (Magori et al., 2009; Takahara et al., 2013; Okuma et al., 2020; Tsikou et al., 2018).

Εφόσον το γονίδιο *TML* φάνηκε πως συμμετέχει στη συμβίωση, διερευνήθηκε περαιτέρω ο ρόλος του miR2111, χρησιμοποιώντας μια φυτική σειρά μειωμένης συσσώρευσης του miR2111, που είχε κατασκευαστεί στα πλαίσια προηγούμενης

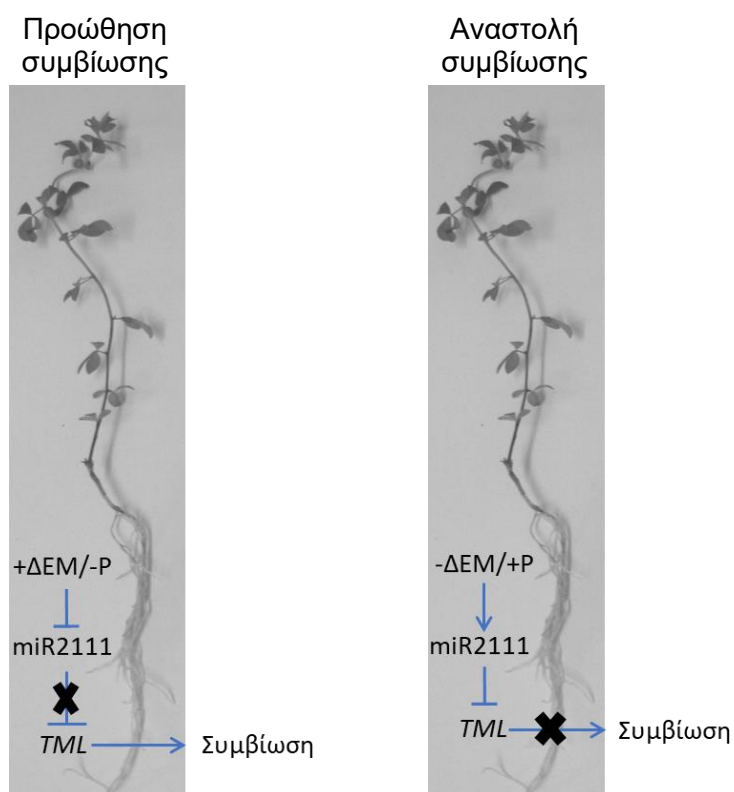
εργασίας. Να σημειωθεί πως στα φυτά αυτά καταστέλλεται μόνο η έκφραση του γενετικού τόπου *MIR2111-3*. Στη φυτική σειρά *2111\_KO* που χρησιμοποιήθηκε, τα επίπεδα του miR2111 βρέθηκαν 1.5 φορές μειωμένα, ενώ του TML 4.5 φορές αυξημένα, σε σχέση με τα αντίστοιχα επίπεδα σε φυτά αγρίου τύπου (*Εικόνα 19*).

Από αποτελέσματα της έκφρασης των γονιδίων *PT4*, *AMT2.2* και *SbtM1* στις ρίζες των φυτών, φαίνεται πως και τα τρία γονίδια-δείκτες της μυκορριζικής συμβίωσης δεν παρουσιάζουν διαφορετική έκφραση μεταξύ των φυτών *2111\_KO*, και των φυτών αγρίου τύπου (*Εικόνα 20*). Αυτό μάλλον οφείλεται στο γεγονός ότι στα εμβολιασμένα με ΔΕΜ φυτά, δεν παρατηρούνται μεγάλες διαφορές στα επίπεδα των miR2111 και TML μεταξύ των φυτών *2111\_KO* και φυτών αγρίου τύπου (*Εικόνα 20*). Επιπλέον, είναι πιθανό πως το γονίδιο *MIR2111-3* δεν έχει κυρίαρχο ρόλο στην έκφραση του miR2111, σε αντίθεση με το γονίδιο *MIR2111-5*, του οποίου η καταστολή έκφρασης οδηγεί σε σημαντικά μειωμένα επίπεδα του ώριμου miR2111 (Okuma et al., 2020).

Ίσως το γονίδιο *MIR2111-3* δεν έχει μοναδικό ρόλο στη συμβίωση με ΔΕΜ, αλλά απαιτείται η δράση και των άλλων γενετικών τόπων *MIR2111*. Αντίθετα, στη συμβίωση με ριζόβια, φάνηκε πως μεμονωμένα οι γενετικοί τόποι *MIR2111-2*, *MIR2111-3* ή *MIR2111-5* έχουν την ικανότητα να ρυθμίσουν τη συμβίωση, καθώς επιδρούν στο σχηματισμό φυματίων (Okuma et al., 2020; Tsikou et al., 2018). Μάλιστα, το γονίδιο *MIR2111-5* επηρεάζει σημαντικά τα επίπεδα του ώριμου miR2111 ακόμα και κατά τη συμβίωση με ριζόβια (Okuma et al., 2020).

Συνολικά, η απόκριση του ζεύγους miR2111-TML κατά τη συμβίωση με ΔΕΜ, υποδεικνύει τη συμμετοχή του στη ρύθμιση της συγκεκριμένης συμβίωσης. Η υπόθεση αυτή ενισχύεται και από τη δράση του γονιδίου TML, ως θετικός ρυθμιστής της συμβίωσης. Παρόλα αυτά, περισσότερα πειράματα πρέπει να διεξαχθούν, με σκοπό να εξακριβωθεί ο ρόλος του miR2111 στη συμβίωση με ΔΕΜ.

Βέβαια, η εμπλοκή του ζεύγους miR2111-TML στη συμβίωση με ΔΕΜ ενισχύεται και από το ότι, σε συνθήκες έλλειψης φωσφόρου, τα επίπεδα του miR2111 μειώνονται (Li et al., 2018), ενώ του TML αυξάνονται (Isidra-Arellano et al., 2020). Αυτό συμβαίνει πιθανώς για την προώθηση της συμβίωσης, καθώς σε συνθήκες έλλειψης θρεπτικών η συμβίωση προωθείται, για την πρόσληψή τους (Oldroyd and Leyser, 2020). Η πιθανή εμπλοκή του ζεύγους miR2111-TML στη συμβίωση με ΔΕΜ, σε συνδυασμό με τη διαθεσιμότητα φωσφόρου (P), απεικονίζεται στην *Εικόνα 21*.



**Εικόνα 21.** Η πιθανή ρύθμιση της συμβίωσης με ΔΕΜ, από το ζεύγος miR2111-TML, στις ρίζες του *L. jaronicus*. Αριστερά: Η έλλειψη φωσφόρου (-P), ή η παρουσία ΔΕΜ (+ΔΕΜ), οδηγεί στη μείωση των επιπέδων του miR2111, οδηγώντας στην αύξηση του TML, ώστε να προωθηθεί η συμβίωση. Δεξιά: Η επάρκεια φωσφόρου (+P), ή η απουσία ΔΕΜ (-ΔΕΜ), οδηγεί στην αύξηση των επιπέδων του miR2111, οδηγώντας στη μείωση του TML, ώστε να παρεμποδιστεί η συμβίωση.

**Παράρτημα 1: γενετικά τροποποιημένες φυτικές σειρές που χρησιμοποιήθηκαν στην εργασία**

Σπόρος	Κατασκευή	Αποτέλεσμα	Αναφορά
2111_OX_1 2111_OX_2 (overexpression)	Δημιουργία σε προηγούμενη εργασία με τεχνολογία τυχαίας ενσωμάτωσης μέσω Αγροβακτηρίου	Υπερέκφραση του γονιδίου <i>MIR2111-3</i>	Δεν έχει δημοσιευτεί
2111_KO (knockout)	Δημιουργία σε προηγούμενη εργασία με τεχνολογία CRISPR/Cas9	Καταστολή έκφρασης του γονιδίου <i>MIR2111-3</i>	Δεν έχει δημοσιευτεί
<i>tml-5</i>	Ένθεση τρανσποζονίου LORE1	Καταστολή έκφρασης του γονιδίου <i>TML</i>	Lotus Base <a href="https://lotus.au.dk/">https://lotus.au.dk/</a>
<i>tml-6</i>	Ένθεση τρανσποζονίου LORE1	Καταστολή έκφρασης του γονιδίου <i>TML</i>	Lotus Base <a href="https://lotus.au.dk/">https://lotus.au.dk/</a>



## Παράρτημα 2: αλληλουχίες εκκινητών

Γονίδιο	Εκκινητής	Αλληλουχία	Χρήση	Αναφορά
<i>miR2111</i>	RT stem-loop	GTCGTATCCAGTGCAGGGTCCGAGGTATT CGCACTGGATACGACTACACC	Σύνθεση cDNA	Tsikou et al., 2018
<i>miR2111</i>	Πρόσθιος	GCGCGTAATCTGCATCCTGAG	qPCR	Tsikou et al., 2018
	Ανάστροφος (universal)	AGTGCAGGGTCCGAGGTATTC	qPCR	
<i>LjTML</i>	Πρόσθιος	GC CAACAATTGCCTGAAACCAGATG	qPCR	Tsikou et al., 2018
	Ανάστροφος	CTTTATGGTGTTTCTCTCTATGAATGCTG	qPCR	
<i>LjPT4</i>	Πρόσθιος	CCAGAACCTCACACAGAAAGACATC	qPCR	Rasmussen et al., 2016
	Ανάστροφος	AACACGGTGAACCAGTACCCTGG	qPCR	
<i>LjAMT2.2</i>	Πρόσθιος	ACACATGCTTGCACTGCTACC	qPCR	Guether et al., 2009
	Ανάστροφος	CTGCCCATCCTTGAACAACCC	qPCR	
<i>LjSbtM1</i>	Πρόσθιος	CAGGTGAACCAGAAGGTTGCATAC	qPCR	Rasmussen et al., 2016
	Ανάστροφος	AGCAGCACCTCTCTATCTTCATGC	qPCR	
<i>LjATP</i>	Πρόσθιος	GTAAATGCGTCTAAAGATAGGGTCC	Γονίδιο αναφοράς qPCR	Tsikou et al., 2018
	Ανάστροφος	ACTAGACTGTAGTGCTTGAGAGGC	Γονίδιο αναφοράς qPCR	
<i>LjPP2a</i>	Πρόσθιος	CAATGTCGCCAAGGCCCATGGTG	Γονίδιο αναφοράς qPCR	Tsikou et al., 2018
	Ανάστροφος	AACACCACTCTCGATCATTTCTCTG	Γονίδιο αναφοράς qPCR	
<i>LjUBQ</i>	Πρόσθιος	ATGCAGATCTTTTGTGAAGAC	Γονίδιο αναφοράς PCR	Delis et al., 2011
	Ανάστροφος	ACCACCACGGAAGACGGAG	Γονίδιο αναφοράς PCR	

### Παράρτημα 3: εταιρίες αντιδραστηρίων/υλικών

Αντιδραστήρια/Υλικά	Εταιρία
Εμβόλιο DAOM	Agronutrition
Trizol LS	Ambion
EDTA	Invitrogen
DTT (διθειοθρεϊτόλη)	Invitrogen
LiDS (Lithium Dodecyl Sulphate)	SIGMA Aldrich
LiCl	ROTH
Tris-HCl	AppliChem
Ρυθμιστικό διάλυμα DNase I	Thermo Scientific
DNase I	Thermo Scientific
RNase out	Invitrogen
Ρυθμιστικό διάλυμα Taq πολυμεράσης	Kapa
Taq πολυμεράση	Kapa
dNTPs	Invitrogen
Ρυθμιστικό διάλυμα αντίστροφης μεταγραφάσης	Invitrogen
Αντίστροφη μεταγραφάση	Superscript II, Invitrogen
Διάλυμα SYBR Green	Kapa
Ladder	Quick-Load® Purple 1 kb Plus DNA Ladder

## Βιβλιογραφία

- Akiyama K, Matsuzaki K, Hayashi H (2005).** Plant sesquiterpenes induce hyphal branching in arbuscular mycorrhizal fungi. *Nature*, 435(7043):824-7
- Banba M, Gutjahr C, Miyao A, Hirochika H, Paszkowski U, Kouchi H, Imaizumi-Anraku H (2008).** Divergence of evolutionary ways among common sym genes: CASTOR and CCaMK show functional conservation between two symbiosis systems and constitute the root of a common signaling pathway. *Plant Cell Physiol*, 49(11):1659-71
- Bologna NG, Voinnet O (2014).** The diversity, biogenesis, and activities of endogenous silencing small RNAs in Arabidopsis. *Annu Rev Plant Biol*, 65:473-503
- Cannon SB (2013).** The model legume genomes. *Methods Mol Biol*, 1069:1-14
- Cappellazzo G, Lanfranco L, Fitz M, Wipf D, Bonfante P (2008).** Characterization of an amino acid permease from the endomycorrhizal fungus *Glomus mosseae*. *Plant Physiol*, 147(1):429-37
- Couzigou JM, Lauressergues D, André O, Gutjahr C, Guillotin B, Bécard G, Combier JP (2017).** Positive Gene Regulation by a Natural Protective miRNA Enables Arbuscular Mycorrhizal Symbiosis. *Cell Host Microbe*, 21(1):106-112
- Delis C, Krokida A, Georgiou S, Peña-Rodríguez LM, Kavroulakis N, Ioannou E, Roussis V, Osbourn AE, Papadopoulou KK (2011).** Role of lupeol synthase in *Lotus japonicus* nodule formation. *New Phytol*, 189(1):335-46
- Dénarié J, Debellé F, Promé JC (1996).** Rhizobium lipo-chitooligosaccharide nodulation factors: signaling molecules mediating recognition and morphogenesis. *Annu Rev Biochem*, 65:503-35
- de Bang TC, Lundquist PK, Dai X, Boschiero C, Zhuang Z, Pant P, Torres-Jerez I, Roy S, Nogales J, Veerappan V, Dickstein R, Udvardi MK, Zhao PX, Scheible WR (2017).** Genome-Wide Identification of Medicago Peptides Involved in Macronutrient Responses and Nodulation. *Plant Physiol*, 175(4):1669-1689
- Etemadi M, Gutjahr C, Couzigou JM, Zouine M, Lauressergues D, Timmers A, Audran C, Bouzayen M, Bécard G, Combier JP (2014).** Auxin perception is required for arbuscule development in arbuscular mycorrhizal symbiosis. *Plant Physiol*, 166(1):281-92
- Feng F, Sun J, Radhakrishnan GV, Lee T et al. (2019).** A combination of chitooligosaccharide and lipochitooligosaccharide recognition promotes arbuscular mycorrhizal associations in *Medicago truncatula*. *Nat Commun*, 10(1):5047
- Gautrat P, Laffont C, Frugier F (2020).** Compact Root Architecture 2 Promotes Root Competence for Nodulation through the miR2111 Systemic Effector. *Curr Biol*, 30(7):1339-1345.e3
- Genre A, Chabaud M, Balzergue C et al. (2013).** Short-chain chitin oligomers from arbuscular mycorrhizal fungi trigger nuclear Ca<sup>2+</sup> spiking in *Medicago truncatula* roots and their production is enhanced by strigolactone. *New Phytol*, 198(1):190-202
- Graham PH, Vance CP (2003).** Legumes: importance and constraints to greater use. *Plant Physiol*, 131(3):872-7
- Guether M, Neuhäuser B, Balestrini R, Dynowski M, Ludewig U, Bonfante P (2009).** A mycorrhizal-specific ammonium transporter from *Lotus japonicus* acquires nitrogen released by arbuscular mycorrhizal fungi. *Plant Physiol*, 150(1):73-83

- Harrison MJ, Dewbre GR, Liu J (2002).** A phosphate transporter from *Medicago truncatula* involved in the acquisition of phosphate released by arbuscular mycorrhizal fungi. *Plant Cell*, 14(10):2413-29
- Harrison MJ, van Buuren ML (1995).** A phosphate transporter from the mycorrhizal fungus *Glomus versiforme*. *Nature*, 378(6557):626-9
- He J, Zhang C, Dai H et al. (2019).** A LysM Receptor Heteromer Mediates Perception of Arbuscular Mycorrhizal Symbiotic Signal in Rice. *Mol Plant*, 12(12):1561-1576
- Hoang NT, Tóth K, Stacey G (2020).** The role of microRNAs in the legume-Rhizobium nitrogen-fixing symbiosis. *J Exp Bot*, 71(5):1668-1680
- Hsieh YH, Wei YH, Lo JC, Pan HY, Yang SY (2022).** Arbuscular mycorrhizal symbiosis enhances tomato lateral root formation by modulating CEP2 peptide expression. *New Phytol*, 235(1):292-305
- Huault E, Laffont C, Wen J, Mysore KS, Ratet P, Duc G, Frugier F (2014).** Local and systemic regulation of plant root system architecture and symbiotic nodulation by a receptor-like kinase. *PLoS Genet*, 10(12):e1004891
- Isidra-Arellano MC, Pozas-Rodríguez EA, Del Rocío Reyero-Saavedra M, Arroyo-Canales J, Ferrer-Orgaz S, Del Socorro Sánchez-Correa M, Cardenas L, Covarrubias AA, Valdés-López O (2020).** Inhibition of legume nodulation by Pi deficiency is dependent on the autoregulation of nodulation (AON) pathway. *Plant J*, 103(3):1125-1139
- Kaiser BN, Finnegan PM, Tyerman SD, Whitehead LF, Bergersen FJ, Day DA, Udvardi MK (1998).** Characterization of an ammonium transport protein from the peribacteroid membrane of soybean nodules. *Science*, 281(5380):1202-6
- Karlo M, Boschiero C, Landerslev KG, Blanco GS, Wen J, Mysore KS, Dai X, Zhao PX, de Bang TC (2020).** The CLE53-SUNN genetic pathway negatively regulates arbuscular mycorrhiza root colonization in *Medicago truncatula*. *J Exp Bot*, 71(16):4972-4984
- Kuila D, Ghosh S (2022).** Aspects, problems and utilization of Arbuscular Mycorrhizal (AM) application as bio-fertilizer in sustainable agriculture. *Curr Res Microb Sci*, 3:100107
- Laffont C, Ivanovici A, Gautrat P, Brault M, Djordjevic MA, Frugier F (2020).** The NIN transcription factor coordinates CEP and CLE signaling peptides that regulate nodulation antagonistically. *Nat Commun*, 11(1):3167
- Lavin M, Herendeen PS, Wojciechowski MF (2005).** Evolutionary rates analysis of Leguminosae implicates a rapid diversification of lineages during the tertiary. *Syst Biol*, 54(4):575-94
- Lebedeva M, Azarakhsh M, Yashenkova Y, Lutova L (2020).** Nitrate-Induced CLE Peptide Systemically Inhibits Nodulation in *Medicago truncatula*. *Plants (Basel)*, 9(11):1456
- Li Z, Xu H, Li Y, Wan X, Ma Z, Cao J, Li Z, He F, Wang Y, Wan L, Tong Z, Li X (2018).** Analysis of physiological and miRNA responses to Pi deficiency in alfalfa (*Medicago sativa* L.). *Plant Mol Biol*, 96(4-5):473-492
- Lodwig EM, Hosie AH, Bourdès A, Findlay K, Allaway D, Karunakaran R, Downie JA, Poole PS (2003).** Amino-acid cycling drives nitrogen fixation in the legume-Rhizobium symbiosis. *Nature*, 422(6933):722-6
- Long SR, Staskawicz BJ (1993).** Prokaryotic plant parasites. *Cell*, 73(5):921-35

- Lopez-Obando M, Ligerot Y, Bonhomme S, Boyer FD, Rameau C (2015).** Strigolactone biosynthesis and signaling in plant development. *Development*, 142(21):3615-9
- López-Pedrosa A, González-Guerrero M, Valderas A, Azcón-Aguilar C, Ferrol N (2006).** GintAMT1 encodes a functional high-affinity ammonium transporter that is expressed in the extraradical mycelium of *Glomus intraradices*. *Fungal Genet Biol*, 43(2):102-10
- MacLean AM, Bravo A, Harrison MJ (2017).** Plant Signaling and Metabolic Pathways Enabling Arbuscular Mycorrhizal Symbiosis. *Plant Cell*, 29(10):2319-2335
- Magori S, Oka-Kira E, Shibata S, Umehara Y, Kouchi H, Hase Y, Tanaka A, Sato S, Tabata S, Kawaguchi M (2009).** Too much love, a root regulator associated with the long-distance control of nodulation in *Lotus japonicus*. *Mol Plant Microbe Interact*, 22(3):259-68
- Maillet F, Poinot V, André O, Puech-Pagès V, Haouy A, Gueunier M, Cromer L, Giraudet D, Formey D, Niebel A, Martinez EA, Driguez H, Bécard G, Dénarié J (2011).** Fungal lipochitooligosaccharide symbiotic signals in arbuscular mycorrhiza. *Nature*, 469(7328):58-63
- Markmann K, Giczey G, Parniske M (2008).** Functional adaptation of a plant receptor-kinase paved the way for the evolution of intracellular root symbioses with bacteria. *PLoS Biol*, 6(3):e68
- Mathesius U (2018).** Flavonoid Functions in Plants and Their Interactions with Other Organisms. *Plants (Basel)*, 7(2):30.
- Maxwell CA, Hartwig UA, Joseph CM, Phillips DA (1989).** A Chalcone and Two Related Flavonoids Released from Alfalfa Roots Induce nod Genes of *Rhizobium meliloti*. *Plant Physiol*, 91(3):842-7
- Moreau C, Gautrat P, Frugier F (2021).** Nitrate-induced CLE35 signaling peptides inhibit nodulation through the SUNN receptor and miR2111 repression. *Plant Physiol*, 185(3):1216-1228
- Mortier V, Den Herder G, Whitford R, Van de Velde W, Rombauts S, D'Haeseleer K, Holsters M, Goormachtig S (2010).** CLE peptides control *Medicago truncatula* nodulation locally and systemically. *Plant Physiol*, 153(1):222-37
- Müller LM, Flokova K, Schnabel E, Sun X, Fei Z, Frugoli J, Bouwmeester HJ, Harrison MJ (2019).** A CLE-SUNN module regulates strigolactone content and fungal colonization in arbuscular mycorrhiza. *Nat Plants*, 5(9):933-939
- Müller LM, Harrison MJ (2019).** Phytohormones, miRNAs, and peptide signals integrate plant phosphorus status with arbuscular mycorrhizal symbiosis. *Curr Opin Plant Biol*, 50:132-139
- Okamoto S, Kawaguchi M (2015).** Shoot HAR1 mediates nitrate inhibition of nodulation in *Lotus japonicus*. *Plant Signal Behav*, 10(5):e1000138
- Okamoto S, Ohnishi E, Sato S, Takahashi H, Nakazono M, Tabata S, Kawaguchi M (2009).** Nod factor/nitrate-induced CLE genes that drive HAR1-mediated systemic regulation of nodulation. *Plant Cell Physiol*, 50(1):67-77
- Okuma N, Soyano T, Suzaki T, Kawaguchi M (2020).** MIR2111-5 locus and shoot-accumulated mature miR2111 systemically enhance nodulation depending on HAR1 in *Lotus japonicus*. *Nat Commun*, 11(1):5192
- Oldroyd GE (2013).** Speak, friend, and enter: signalling systems that promote beneficial symbiotic associations in plants. *Nat Rev Microbiol*, 11(4):252-63

- Oldroyd GE, Murray JD, Poole PS, Downie JA (2011).** The rules of engagement in the legume-rhizobial symbiosis. *Annu Rev Genet*, 45:119-44
- Oldroyd GED, Leyser O (2020).** A plant's diet, surviving in a variable nutrient environment. *Science*, 368(6486):eaba0196
- Parniske M (2008).** Arbuscular mycorrhiza: the mother of plant root endosymbioses. *Nat Rev Microbiol*, 6(10):763-75
- Patriarca EJ, Tatè R, Iaccarino M (2002).** Key role of bacterial NH<sub>4</sub>(+) metabolism in Rhizobium-plant symbiosis. *Microbiol Mol Biol Rev*, 66(2):203-22
- Ramakers C, Ruijter JM, Deprez RH, Moorman AF (2003).** Assumption-free analysis of quantitative real-time polymerase chain reaction (PCR) data. *Neurosci Lett*, 339(1):62-6
- Rasmussen SR, Füchtbauer W, Novero M, Volpe V, Malkov N, Genre A, Bonfante P, Stougaard J, Radutoiu S (2016).** Intraradical colonization by arbuscular mycorrhizal fungi triggers induction of a lipochitooligosaccharide receptor. *Sci Rep*, 6:29733
- Reid DE, Ferguson BJ, Gresshoff PM (2011).** Inoculation- and nitrate-induced CLE peptides of soybean control NARK-dependent nodule formation. *Mol Plant Microbe Interact*, 24(5):606-18
- Roy S, Müller LM (2022).** A rulebook for peptide control of legume-microbe endosymbioses. *Trends Plant Sci*, 27(9):870-889
- Salvemini F, Marini A, Riccio A, Patriarca EJ, Chiurazzi M (2001).** Functional characterization of an ammonium transporter gene from *Lotus japonicus*. *Gene*, 270(1-2):237-43
- Sato S, Nakamura Y, Kaneko T et al. (2008).** Genome structure of the legume, *Lotus japonicus*. *DNA Res*, 15(4):227-39
- Schmutz J, Cannon SB, Schlueter J et al. (2010).** Genome sequence of the palaeopolyploid soybean. *Nature*, 463(7278):178-83
- Takahara M, Magori S, Soyano T, Okamoto S, Yoshida C, Yano K, Sato S, Tabata S, Yamaguchi K, Shigenobu S, Takeda N, Suzuki T, Kawaguchi M (2013).** Too much love, a novel Kelch repeat-containing F-box protein, functions in the long-distance regulation of the legume-Rhizobium symbiosis. *Plant Cell Physiol*, 54(4):433-47
- Takeda N, Sato S, Asamizu E, Tabata S, Parniske M (2009).** Apoplastic plant subtilases support arbuscular mycorrhiza development in *Lotus japonicus*. *Plant J*, 58(5):766-77
- Tsikou D, Yan Z, Holt DB, Abel NB, Reid DE, Madsen LH, Bhasin H, Sexauer M, Stougaard J, Markmann K (2018).** Systemic control of legume susceptibility to rhizobial infection by a mobile microRNA. *Science*, 362(6411):233-236
- Udvardi M, Poole PS (2013).** Transport and metabolism in legume-rhizobia symbioses. *Annu Rev Plant Biol*, 64:781-805
- Volpe V, Dell'Aglio E, Giovannetti M, Ruberti C, Costa A, Genre A, Guether M, Bonfante P (2013).** An AM-induced, MYB-family gene of *Lotus japonicus* (LjMAMI) affects root growth in an AM-independent manner. *Plant J*, 73(3):442-55
- Wang B, Yeun LH, Xue JY, Liu Y, Ané JM, Qiu YL (2010).** Presence of three mycorrhizal genes in the common ancestor of land plants suggests a key role of mycorrhizas in the colonization of land by plants. *New Phytol*, 186(2):514-25

**Wang C, Reid JB, Foo E (2018).** The Art of Self-Control - Autoregulation of Plant-Microbe Symbioses. *Front Plant Sci*, 9:988

**Wang L, Sun Z, Su C, Wang Y, Yan Q, Chen J, Ott T, Li X (2019).** A GmNINa-miR172c-NNC1 Regulatory Network Coordinates the Nodulation and Autoregulation of Nodulation Pathways in Soybean. *Mol Plant*, 12(9):1211-1226

**Wang Y, Wang L, Zou Y, Chen L, Cai Z, Zhang S, Zhao F, Tian Y, Jiang Q, Ferguson BJ, Gresshoff PM, Li X (2014).** Soybean miR172c targets the repressive AP2 transcription factor NNC1 to activate ENOD40 expression and regulate nodule initiation. *Plant Cell*, 26(12):4782-801

**Young ND, Bharti AK (2012).** Genome-enabled insights into legume biology. *Annu Rev Plant Biol*, 63:283-305

**Young ND, Debelle F, Oldroyd GE et al. (2011).** The Medicago genome provides insight into the evolution of rhizobial symbioses. *Nature*, 480(7378):520-4

**Yun J, Sun Z, Jiang Q, Wang Y, Wang C, Luo Y, Zhang F, Li X (2022).** The miR156b-GmSPL9d module modulates nodulation by targeting multiple core nodulation genes in soybean. *New Phytol*, 233(4):1881-1899

**Zhu F, Ye Q, Chen H, Dong J, Wang T (2021).** Multigene editing reveals that MtCEP1/2/12 redundantly control lateral root and nodule number in Medicago truncatula. *J Exp Bot*, 72(10):3661-3676