

**ΠΑΝΕΠΙΣΤΗΜΙΟ ΘΕΣΣΑΛΙΑΣ**  
**ΤΜΗΜΑ ΒΙΟΧΗΜΕΙΑΣ & ΒΙΟΤΕΧΝΟΛΟΓΙΑΣ**

**ΠΤΥΧΙΑΚΗ ΕΡΓΑΣΙΑ**

**Φαινοτυπική και μοριακή ανάλυση φυτικών σειρών  
υπερέκφρασης και καταστολής του *MIR171c* κατά τον αποικισμό  
με ενδομυκορριζικό μύκητα**

---

**Phenotypic and molecular analysis of *MIR171c* overexpression  
and knockout lines during colonization by arbuscular  
mycorrhizal fungi**

Επιβλέπουσα Καθηγήτρια: Τσίκου Δανιέλα, Επίκουρος Καθηγήτρια  
Μοριακής και Αναπτυξιακής Βιολογίας Φυτών

**Όνοματεπώνυμο: Γεωργιάδης Ηλίας**

**Πατρώνυμο: Στυλιανός**

Λάρισα, 2023

## **Τριμελής Εξεταστική Επιτροπή**

### **Τσίκου Δανιέλα (Επιβλέπουσα)**

Επίκουρος Καθηγήτρια Μοριακής και Αναπτυξιακής Βιολογίας Φυτών,  
Τμήμα Βιοχημείας και Βιοτεχνολογίας, Πανεπιστήμιο Θεσσαλίας

### **Παπαδοπούλου Καλλιόπη**

Καθηγήτρια Βιοτεχνολογίας Φυτών, Τμήμα Βιοχημείας και  
Βιοτεχνολογίας, Πανεπιστήμιο Θεσσαλίας

### **Γιακουντής Αντώνιος**

Επίκουρος Καθηγητής Μοριακής Βιολογίας-Γονιδιωματικής, Τμήμα  
Βιοχημείας και Βιοτεχνολογίας, Πανεπιστήμιο Θεσσαλίας

Λάρισα, 2023

## ΕΥΧΑΡΙΣΤΙΕΣ

Η παρούσα πτυχιακή εργασία εκπονήθηκε στο εργαστήριο Βιοτεχνολογίας Φυτών και Περιβάλλοντος του τμήματος Βιοχημείας και Βιοτεχνολογίας του Πανεπιστημίου Θεσσαλίας. Αρχικά θα ήθελα να ευχαριστήσω την επιβλέπουσα καθηγήτρια μου, κυρία Τσίκου Δανιέλα, για την αμέριστη βοήθεια, καθοδήγηση και συμπαράσταση που μου έδειξε όλο αυτόν τον καιρό που βρισκόμουν στο εργαστήριο υπό την επίβλεψη της. Οφείλω ένα τεράστιο ευχαριστώ στον υποψήφιο διδάκτορα, αλλά πάνω απ' όλα πολύ καλό μου φίλο, Μάριο Βαλμά, για την υποστήριξη και τις συμβουλές του, καθώς ήταν πάντα εκεί για να μου λύσει οποιαδήποτε απορία προέκυπτε κατά την διεξαγωγή των πειραμάτων. Το ευχάριστο κλίμα συνεργασίας με όλα τα άτομα του εργαστηρίου που ήταν πρόθυμα να συνεργαστούν οποιαδήποτε στιγμή, δε θα το ξεχάσω ποτέ.

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

Τέλος, το μεγαλύτερο ευχαριστώ το οφείλω στην οικογένεια μου που με στήριξε όλα αυτά τα χρόνια.

## Περιεχόμενα

ΕΥΧΑΡΙΣΤΙΕΣ.....	3
Περίληψη .....	6
Abstract .....	7
1. Εισαγωγή.....	8
1.1 Τα ψυχανθή φυτά .....	8
1.2 Αλληλεπιδράσεις μεταξύ φυτών και μικροοργανισμών .....	8
1.2.1 Συμβίωση μεταξύ ψυχανθών και ριζοβίων .....	9
1.2.2 Συμβίωση μεταξύ φυτών και μυκορριζικών μυκήτων.....	12
1.3 Σηματοδότηση στη συμβίωση και αυτορρύθμιση των συμβιωτικών σχέσεων .....	15
1.4 Ο ρόλος των miRNAs στα φυτά.....	18
1.5 Ο ρόλος του miR171 στα μονοπάτια συμβίωσης .....	20
1.6 Σκοπός της εργασίας .....	21
2. Υλικά και μέθοδοι .....	22
2.1 Βιολογικό υλικό .....	22
2.2 Απολύμανση και εκβλάστηση σπόρων <i>Lotus japonicus</i> .....	22
2.3 Μεταφύτευση φυτών σε δοχεία magenta και εμβολιασμός τους με μύκητα με την μέθοδο sandwich .....	23
2.4 Συγκομιδή των φυτών και χρώση των ριζών .....	25
2.5 Υπολογισμός αποικισμού με χρήση μικροσκοπίου .....	26
2.6 Απομόνωση ολικού RNA από τις ρίζες .....	26
2.7 Απομάκρυνση του γονιδιωματικού DNA με αντίδραση DNάσης .....	28
2.8 Αλυσιδωτή αντίδραση πολυμεράσης (PCR) και ηλεκτροφόρηση για έλεγχο απομάκρυνσης του DNA .....	28
2.9 Αντίστροφη μεταγραφή (RT-PCR) - Σύνθεση συμπληρωματικού DNA (cDNA) .....	29
2.10 Ποσοτική PCR πραγματικού χρόνου (qPCR).....	30
3. Αποτελέσματα .....	32
3.1 Έλεγχος των επιπέδων συσσώρευσης του miR171c και έκφρασης του γονιδίου <i>NSP2</i> κατά τον αποικισμό από ενδομυκορριζικό μύκητα ..	32
3.2 Φαινοτυπικός έλεγχος του αποικισμού των φυτικών σειρών 171C_KO, 171C_OX από ενδομυκορριζικό μύκητα .....	35

3.3 Μοριακός έλεγχος του αποικισμού των φυτικών σειρών 171C_KO και 171C_OX, από ενδομυκορριζικό μύκητα .....	36
4. Συζήτηση .....	39
Παράρτημα 1: Συγκέντρωση και καθαρότητα των δειγμάτων RNA.....	43
Παράρτημα 2: Αλληλουχίες εκκινητών .....	44
Παράρτημα 3: Εταιρείες αντιδραστηρίων .....	45
Βιβλιογραφία.....	46

## Περίληψη

Η πλειοψηφία των χερσαίων φυτών έχει την ικανότητα να αναπτύσσει συμβιωτικές σχέσεις με μικροοργανισμούς του εδάφους, με απώτερο σκοπό την πρόσβαση σε απαραίτητα θρεπτικά στοιχεία. Οι δύο πιο διαδεδομένες συμβιωτικές σχέσεις είναι η συμβίωση μεταξύ ψυχανθών φυτών και ριζοβίων, η οποία βοηθά τα φυτά στην πρόσληψη αζώτου, αλλά και η συμβίωση μεταξύ φυτών και δενδρόμορφων ενδομυκορριζικών μυκήτων (ΔΕΜ), η οποία βοηθά στην πρόσληψη φωσφόρου από τα φυτά. Για την έναρξη των δύο αυτών συμβιωτικών σχέσεων είναι απαραίτητη η έκκριση μορίων τόσο από τα φυτά όσο και από τους μικροοργανισμούς. Η αναγνώριση των μορίων αυτών από τα φυτά, εκκινεί σηματοδοτικά μονοπάτια για την έναρξη της συμβίωσης τόσο με μύκητες όσο και με ριζόβια. Ένα miRNA υψηλού ενδιαφέροντος που φαίνεται να επηρεάζει την συμβίωση είναι το miR171 που σε προηγούμενες μελέτες έχει δείξει ότι ρυθμίζει αρνητικά την συμβίωση με ΔΕΜ στο φυτό *Medicago truncatula*, αναστέλλοντας την έκφραση του γονιδίου *NSP2*, που κωδικοποιεί για έναν μεταγραφικό παράγοντα απαραίτητο για την ανάπτυξη συμβιωτικών σχέσεων τόσο με ΔΕΜ όσο και με ριζόβια. Στην παρούσα εργασία μελετήθηκε πώς η συσσώρευση του miR171c στο ψυχανθές φυτό-μοντέλο *Lotus japonicus* επηρεάζει τον αποικισμό από τον ΔΕΜ *Rhizophagus irregularis*, τόσο σε φυτά αγρίου τύπου όσο και σε φυτικές σειρές υπερέκφρασης και καταστολής του *MIR171c*.

## Abstract

The majority of land plants have the ability to engage into symbiotic relationships with soil microorganisms, with the ultimate goal of gaining access to essential nutrients. The two most well studied symbiotic relationships are the symbiosis between legumes and rhizobia, which help plants in nitrogen uptake, and the symbiosis between plants and arbuscular mycorrhizal fungi (AMF), which helps in the uptake of phosphorus by the plant. For the initiation of these two symbiotic relationships, the secretion of molecules by both plants and microorganisms is necessary. The recognition of these molecules by plants initiates a signaling pathway for the initiation of symbiosis with both fungi and rhizobia. A miRNA of high interest is miR171 which in previous studies has been shown to negatively regulate the symbiosis with AMF in *Medicago truncatula*, by inhibiting *NSP2* gene expression, which encodes for a transcription factor necessary for the development of symbiotic relationships with both AMF and rhizobia. In the present work, we studied how the accumulation of miR171c affects colonization by the AMF *Rhizophagus irregularis* in the model legume *Lotus japonicus*, both in wild-type plants and *MIR171c* overexpression and knock-out lines.

# 1. Εισαγωγή

## 1.1 Τα ψυχανθή φυτά

Τα ψυχανθή (*Leguminosae* ή *Fabaceae*) είναι μια εξαιρετικά επιτυχημένη οικογένεια φυτών που εντοπίζονται σε κάθε ήπειρο εκτός από την Ανταρκτική. Εμφανίζονται σε τροπικά δάση, υποτροπικές σαβάνες, σε ξηρά δάση και λιβάδια στη Μεσόγειο, και (ημι)άνυδρες περιοχές. Χαρακτηριστικά παραδείγματα ψυχανθών φυτών είναι τα όσπρια, η μηδική (*Medicago sativa*) και το τριφύλλι. Η ποικιλότητα και η ευρεία κατανομή της συγκεκριμένης οικογένειας αντικατοπτρίζεται και από την ποικιλία των διαφόρων προϊόντων που παράγονται από τα φυτά αυτά. Οι πλούσιοι σε πρωτεΐνες σπόροι τους αποτελούν σημαντική πηγή πρωτεϊνών για τον άνθρωπο, τα φύλλα τους παρέχουν βοσκότοπο για τα ζώα, χρησιμοποιούνται για την παραγωγή βιοκαυσίμων, μπαχαρικών, φαρμακευτικών ενώσεων και άλλα πολλά. Μια πιθανή αιτία για τον επιτυχημένο ανταγωνισμό των ψυχανθών με τα άλλα είδη είναι πως έχουν την ικανότητα να σχηματίζουν αποτελεσματικές συμβιωτικές σχέσεις με ριζόβια (Mathesius, 2022).

Μέχρι σήμερα έχουν ήδη αλληλουχηθεί σε μεγάλο βαθμό τα γονιδιώματα ορισμένων ψυχανθών, όπως για παράδειγμα του *Lotus japonicus* (Sato et al., 2008), του *Medicago truncatula* (Young et al., 2011), καθώς και του *Glycine max* (Schmutz et al., 2010) που μάλιστα αποτελούν και γονιδιώματα αναφοράς. Η αλληλούχηση των γονιδιωμάτων τους μας έχει αποκαλύψει γονίδια σημαντικά για την συμβίωση των ψυχανθών με ριζόβια, κάτι για το οποίο φαίνεται να οφείλεται και ο διπλασιασμός των γονιδιωμάτων των ψυχανθών που συνέβη πριν από περίπου 66 εκατομμύρια χρόνια (Young et al., 2011).

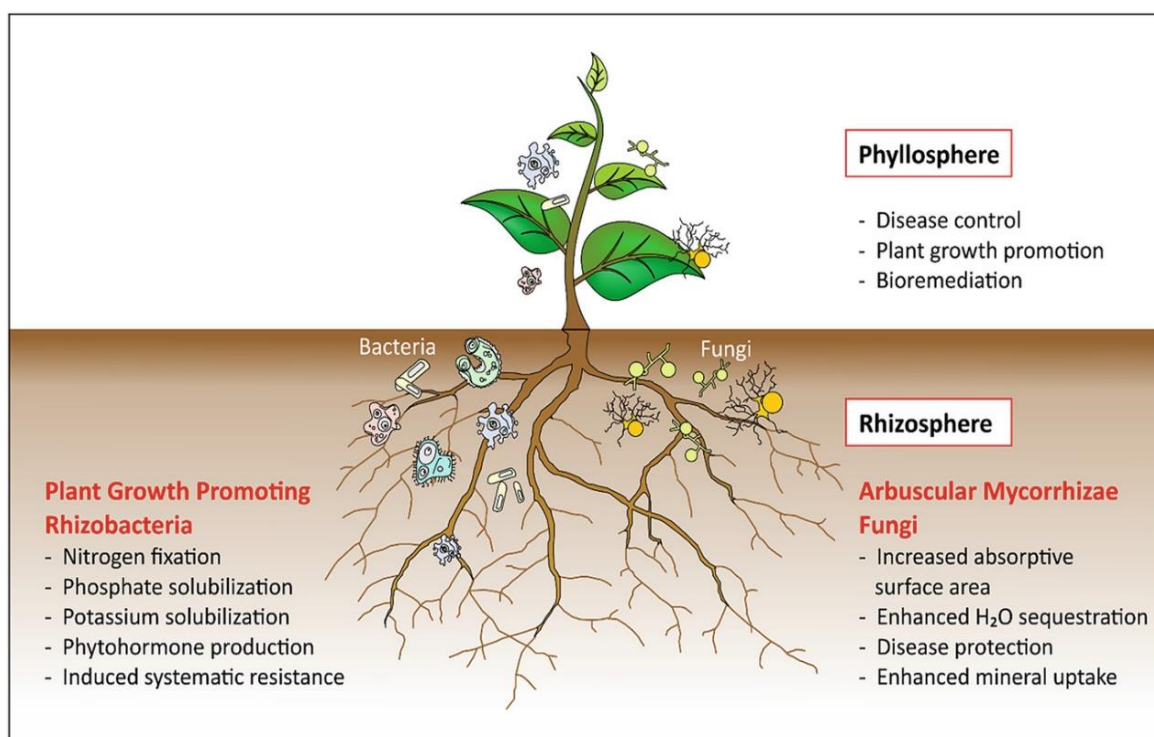
## 1.2 Αλληλεπιδράσεις μεταξύ φυτών και μικροοργανισμών

Η αλληλεπίδραση μεταξύ φυτών και μικροοργανισμών είναι μια πολύπλοκη, δυναμική και συνεχής διαδικασία που είναι τόσο παλιά όσο και ο αποικισμός του πλανήτη από τα φυτά. Τόσο σε φυσικά όσο και σε αγροτικά οικοσυστήματα, τα φυτά δέχονται εισβολή από παθογόνους αλλά και από ωφέλιμους



μικροοργανισμούς, κυρίως βακτήρια και μύκητες. Και στις δύο περιπτώσεις λαμβάνουν χώρα περίπλοκα σηματοδοτικά μονοπάτια τα οποία καθορίζουν και τον βαθμό εισόδου των μικροοργανισμών αυτών (MacLean et al., 2017).

Οι ωφέλιμες αλληλεπιδράσεις προσφέρουν οφέλη στα φυτά όπως η μεταφορά θρεπτικών στοιχείων, που πραγματοποιείται από μυκορριζικούς μύκητες και ριζόβια (που συνδέονται με τις ρίζες και παρέχουν στα φυτά διάφορα μεταλλικά αλλά και άλλα θρεπτικά συστατικά όπως το άζωτο), η προώθηση της ανάπτυξης μέσω φυτοορμονών, και η ενίσχυση του φυτού σε συνθήκες καταπόνησης (π.χ. αυξημένη αλατότητα, ψύχος, υψηλή θερμοκρασία), (εικόνα 1), (Adeleke et al., 2019).



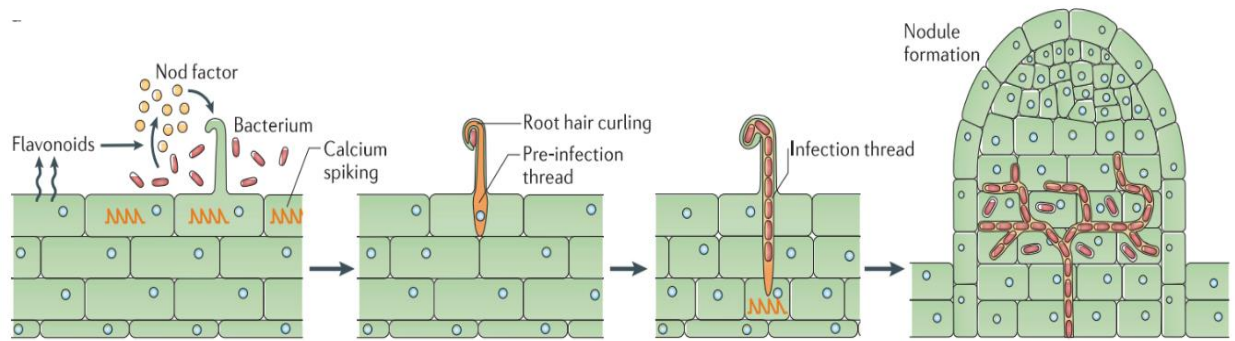
**Εικόνα 1:** Ωφέλιμες αλληλεπιδράσεις μεταξύ των φυτών και των μικροοργανισμών που μπορούν να αξιοποιηθούν σε αγροτικά οικοσυστήματα (Adeleke et al., 2019)

### 1.2.1 Συμβίωση μεταξύ ψυχανθών και ριζοβίων

Τα ψυχανθή έχουν εξελίξει την αξιοσημείωτη ικανότητα τους να φιλοξενούν στις ρίζες τους βακτήρια που δεσμεύουν το ατμοσφαιρικό N<sub>2</sub>, γνωστά ως ριζόβια, σε εξειδικευμένα όργανα που ονομάζονται φυμάτια (nodules). Η συμβιωτική αυτή

σχέση ξεκινάει με την ανταλλαγή χημικών σημάτων μεταξύ των δύο οργανισμών. Πρώτο βήμα για την έναρξη του αποικισμού των φυτών από τα ριζόβια είναι η παραγωγή φλαβονοειδών (flavonoids) από τα φυτά, η έκκριση τους στη ριζόσφαιρα και η εξειδικευμένη αναγνώριση τους από τον βακτηριακό υποδοχέα, *NodD*, που με την σειρά του επάγει την έκφραση των *Nod* γονιδίων στα βακτήρια (Haag et al., 2013). Τα γονίδια *Nod* κωδικοποιούν για ένζυμα που εμπλέκονται στην παραγωγή λιποχιτοολιγοσακχαριτών (lipochitooligosaccharides, LCOs), που ονομάζονται παράγοντες *Nod* (*Nod factors*, NFs), και είναι απαραίτητοι για την σηματοδότηση και την δημιουργία των φυματίων. Η βασική δομή των NFs είναι συντηρημένη στα περισσότερα ριζόβια. Αποτελούνται από έναν βασικό σκελετό χιτίνης (με 2 έως 6 κατάλοιπα β-1,4-N-ακέτυλο-D-γλυκοζαμίνης) συνδεδεμένο με ένα λιπαρό οξύ. Οι υποκαταστάτες στους σκελετούς των NFs καθώς και ο βαθμός κορεσμού των λιπαρών οξέων ποικίλουν μεταξύ των ριζοβίων και είναι βασικός καθοριστικός παράγοντας της συμβίωσης των ριζοβίων με συγκεκριμένα ψυχανθή (Oldroyd & Downie, 2008).

Αφού παραχθούν και εκκριθούν από τα βακτήρια οι NFs προσδένονται σε διαμεμβρανικούς υποδοχείς των επιδερμικών κυττάρων της ρίζας. Το αποτέλεσμα της αναγνώρισης αυτής και της σηματοδότησης που θα ακολουθήσει είναι να δημιουργηθούν ταλαντώσεις ασβεστίου στο κύτταρο, που θα ενεργοποιήσουν την κινάση CCaMK (calcium and calmodulin dependent-kinase) και αυτή με την σειρά της θα επάγει την έκφραση γονιδίων που ονομάζονται πρώιμες νοντουλίνες (ENODs) (Oldroyd & Downie, 2008), για να ξεκινήσει η μόλυνση των φυτών από τα ριζόβια. Αρχικά προκαλείται συστροφή (curling) των ριζικών τριχιδίων. Ακολουθεί υδρόλυση του κυτταρικού τοιχώματος των επιδερμικών κυττάρων και είσοδος των ριζοβίων στα κύτταρα μέσω των οπών που δημιούργησαν. Έπειτα δημιουργούνται δομές που ονομάζονται μολυσματικά νημάτια (Infection Threads, ITs) όπου τα ριζόβια πολλαπλασιάζονται. Τα νημάτια συνεχίζουν να αναπτύσσονται και προχωρούν μέχρι τον φλοιό της ρίζας. Στη συνέχεια τα ριζόβια εγκαταλείπουν τα νημάτια και εισέρχονται με ενδοκύτωση στα κύτταρα του φλοιού όπου θα επαχθούν μέσω των NFs κυτταροδιαιρέσεις των κυττάρων του φλοιού και κατά συνέπεια θα γίνει η φυματιογένεση (nodulation). Τα φυμάτια που δημιουργούνται φιλοξενούν τα ριζόβια και επιτελούν την αζωτοδέσμευση. Η διαδικασία φαίνεται συνοπτικά στην εικόνα 2 (Oldroyd, 2013).



**Εικόνα 2:** Σύνοψη του αποικισμού της ρίζας από τα ριζόβια (Oldroyd, 2013)

Εντός του φυματίου τα ριζόβια χάνουν το κυτταρικό τους τοίχωμα και μεταπίπτουν στη συμβιωτική τους μορφή, τα βακτηριοειδή. Στο κυτταρόπλασμα των φυτικών κυττάρων τα βακτηριοειδή περιβάλλονται από μια μεμβράνη φυτικής προέλευσης που ονομάζεται περιβακτηριακή μεμβράνη. Ο χώρος που δημιουργείται μεταξύ της περιβακτηριακής μεμβράνης και της μεμβράνης του βακτηριοειδούς ονομάζεται περιβακτηριακός χώρος και η νεοσχηματισμένη δομή που αποτελείται από τα βακτηριοειδή μαζί με την περιβακτηριακή μεμβράνη που τα περιβάλλει, ονομάζεται συμβιώσωμα (Coba de la Peña et al., 2018).

Τα φυμάτια (εικόνα 3) είναι τα όργανα εντός των οποίων λαμβάνει χώρα η αζωτοδέσμευση, δηλαδή η διαδικασία μετατροπής του ατμοσφαιρικού  $N_2$  σε  $NH_3$  με τη βοήθεια του ενζυμικού συμπλόκου της νιτρογενάσης. Το περιβάλλον που έχουν δημιουργήσει τα φυμάτια είναι ευνοϊκό για την αζωτοδέσμευση καθώς τα επίπεδα  $O_2$  είναι μειωμένα ώστε να μην απενεργοποιηθεί το ενζυμικό σύμπλοκο της νιτρογενάσης (Masson-Boivin & Sachs, 2018).

Η κινητήριος δύναμη της συμβίωσης των ριζοβίων με τα ψυχανθή είναι η ανταλλαγή θρεπτικών μεταξύ των δύο οργανισμών. Το φυτό προσλαμβάνει από τα ριζόβια άζωτο υπό τη μορφή αμμωνιακών ιόντων ( $NH_4^+$ ), και σε αντάλλαγμα τα ψυχανθή παρέχουν στα ριζόβια πηγές άνθρακα υπό την μορφή οργανικών οξέων (κυρίως μηλικού) (Prell et al., 2009).



**Εικόνα 3:** Φυμάτια που δημιουργήθηκαν στις ρίζες του φυτού *Lotus japonicus* κατά τη συμβίωση του με το ριζόβιο *Mesorhizobium loti* (Karas et al., 2021)

### 1.2.2 Συμβίωση μεταξύ φυτών και μυκορριζικών μυκήτων

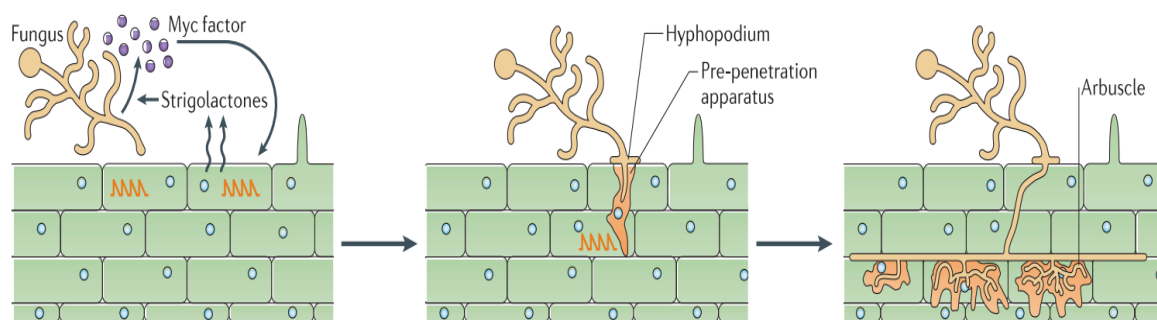
Οι μυκορριζικοί μύκητες εκτιμάται ότι αποικίζουν της ρίζες έως και του 80% των χερσαίων φυτικών ειδών στα οποία συμπεριλαμβάνονται τόσο κοινές όσο οικονομικά πολύτιμες καλλιέργειες. Υπάρχουν τέσσερις κατηγορίες μυκορριζικών σχέσεων βάσει κάποιων δομικών και λειτουργικών χαρακτηριστικών. Έτσι οι μυκορριζες χωρίζονται σε: 1) εκτομυκορριζες, 2) ενδομυκορριζες, 3) ερικοειδής μυκορριζες, και 4) ορχιδοειδής μυκορριζες. Στη φύση επικρατούν οι εκτομυκορριζες, που αναπτύσσονται εκτός των φυτικών κυττάρων, και οι ενδομυκορριζες που αναπτύσσονται εντός των φυτικών κυττάρων. Οι άλλες δύο κατηγορίες είναι πιο εξειδικευμένες ως προς τα είδη των φυτών και μυκήτων που θα τις σχηματίσουν (van der Heijden et al., 2015).

Αυτή η στενή και διαδεδομένη σχέση συμβίωσης των φυτών με τους μυκορριζικούς μύκητες παρέχει στα φυτά βελτιωμένη πρόσληψη θρεπτικών και νερού, καθώς και αντοχή τόσο σε βιοτικές καταπονήσεις (π.χ. παθογόνους μικροοργανισμούς), όσο και σε αβιοτικές (π.χ. αλατότητα, ξηρασία, παρουσία βαρέων μετάλλων) (Wipf et al., 2019).

Οι δενδρόμορφοι ενδομυκορριζικοί μύκητες (ΔΕΜ) (arbuscular mycorrhizal fungi, AMF) ανήκουν στο φύλο Glomeromycota και είναι μέλη 'κλειδιά' του εδαφικού οικοσυστήματος καθώς μπορούν να σχηματίζουν συμβιωτικές σχέσεις

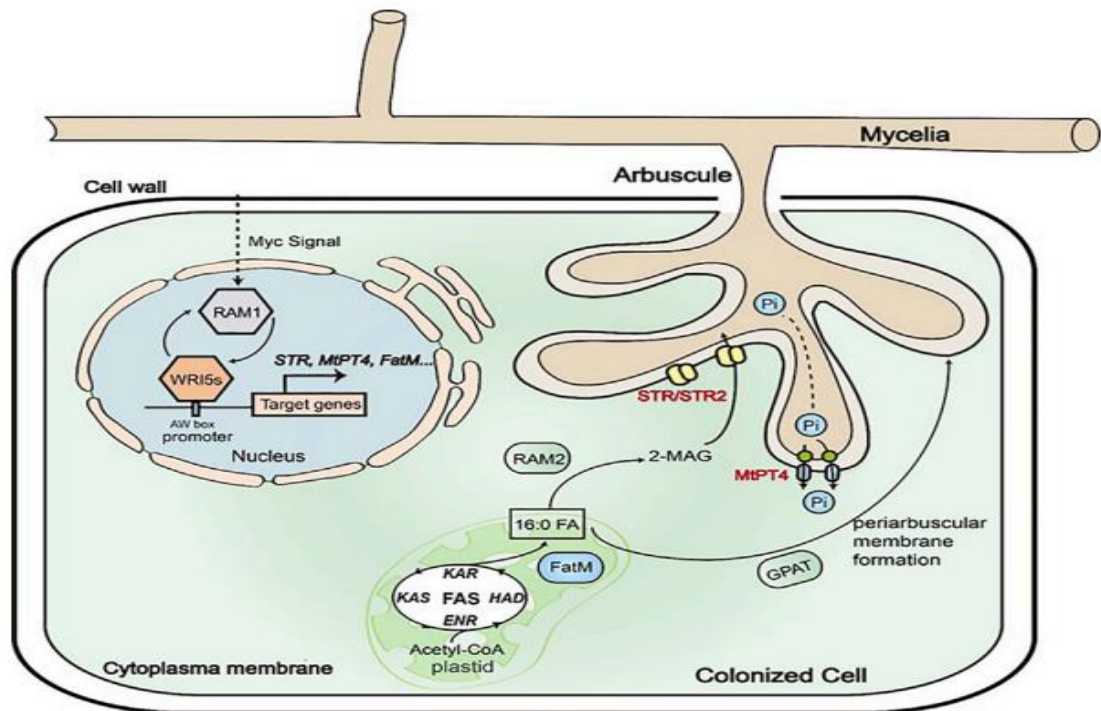
με περίπου 200.000 είδη φυτών (Sweeney et al., 2022). Έχουν την ικανότητα να εισέρχονται στις ρίζες των φυτών και να σχηματίζουν δενδροειδής δομές (θύσσανους) (arbuscules) στο εσωτερικό των κυττάρων του φλοιού της ρίζας. Ως υποχρεωτικοί συμβιώτες, παρέχουν στα φυτά θρεπτικά (κυρίως ανόργανο φώσφορο) και αντοχή στην ξηρασία, και σε αντάλλαγμα λαμβάνουν από το φυτό άνθρακα (Oldroyd, 2013).

Η συμβιωτική σχέση μεταξύ των φυτών και των ΔΕΜ ξεκινάει, όπως και με τα ριζόβια, με την έκκριση μορίων στη ριζόσφαιρα από τα φυτά. Πιο συγκεκριμένα εκκρίνονται στριγγολακτόνες και αναγνωρίζονται από τον μύκητα. Η αναγνώριση αυτή προωθεί την εκβλάστηση των σπόρων του μύκητα και την διακλάδωση των υφών του. Οι ΔΕΜ παράγουν παράγοντες Myc (mycorrhizal factors, MFs), που συμπεριλαμβάνουν λιποχιτολιγοσακχαρίτες (LCOs) και χιτολιγοσακχαρίτες (CO4/CO5) (He et al., 2019), μόρια που ενεργοποιούν το μονοπάτι της συμβίωσης, οδηγώντας σε ταλαντώσεις ασβεστίου και ενεργοποίηση, όπως και στην φυματογένεση, της CCaMK στο κύτταρο και την μεταγραφή γονιδίων που συμμετέχουν στην ενδομυκορριζική συμβίωση. Η είσοδος των ΔΕΜ συνεχίζεται με τον σχηματισμό του υποποδίου στα επιδερμικά κύτταρα της ρίζας. Η διαδρομή των ΔΕΜ στις ρίζες καθορίζεται από μια προ-δισδυτική δομή (Pre-Penetration Apparatus, PPA) που δημιουργείται από την μετακίνηση του ενδοπλασματικού δικτύου και του κυτταροσκελετού κάτω από το σημείο όπου ο μύκητας ήρθε σε επαφή με το φυτό (Genre et al., 2008). Οι ΔΕΜ συνεχίζουν να διακλαδίζονται περεταίρω και αποικίζουν τα κύτταρα του εσωτερικού φλοιού της ρίζας όπου δημιουργούνται και οι θύσσανοι. Η διαδικασία απεικονίζεται συνοπτικά στην εικόνα 4 (Oldroyd, 2013).



**Εικόνα 4:** Σύνοψη του αποικισμού της ρίζας από δενδρόμορφους ενδομυκορριζικούς μύκητες (Oldroyd, 2013)

Οι θύσσανοι περιβάλλονται από μία συνεχή μεμβράνη που προέρχεται από το φυτό (Periarbuscular membrane, PAM), η οποία διαχωρίζει τους θύσσανους από το φυτικό κυτταρόπλασμα (Parniske, 2008). Ο σχηματισμός των θυσσάνων απαιτεί την έκφραση γονιδίων και από τον ξενιστή, όπως το γονίδιο *Vapyrin* (Murray et al., 2011) και το γονίδιο *SbtM1*, που εκφράζεται στις ρίζες ήδη από τα αρχικά στάδια της συμβίωσης και κωδικοποιεί για μια πρωτεάση σερίνης (Takeda et al., 2009). Η διακλαδισμένη φύση των θυσσάνων προσφέρει μια αρκετά εκτεταμένη επιφάνεια για ανταλλαγή θρεπτικών, καθώς η PAM περιέχει μεταφορείς φωσφόρου, όπως ο *PT4* (Harrison et al., 2002), μεταφορείς λιπιδίων όπως οι *STR* (Keymer et al., 2017), και μεταφορείς αμμωνίου όπως ο *AMT2.2* (Guether et al., 2009). Τα προαναφερόμενα γονίδια που συμβάλλουν στην ανάπτυξη και τη λειτουργία των θυσσάνων, είναι γονίδια ενδεικτικά της ενδομυκορριζικής συμβίωσης και χρησιμοποιούνται ως γονίδια-δείκτες σε μοριακές αναλύσεις. Ωστόσο δεν παύουν να είναι ελάχιστα γνωστά για την προέλευση και την βιοσύνθεση της PAM. Παλαιότερες μελέτες έδειχναν πως η κύρια πηγή άνθρακα που μεταφέρονταν από τον μύκητα στο φυτό ήταν οι εξόζες (Shachar-Hill et al., 1995) όμως νεότερες μελέτες έδειξαν ότι λιπαρά οξέα μπορούν να μετακινούνται απευθείας από το φυτό στον μύκητα (Jiang et al., 2017). Ένας αριθμός μεταγραφικών παραγόντων είναι υπεύθυνος για την μεταγραφή των γονιδίων, προϊόντα των οποίων συμμετέχουν στην ανταλλαγή θρεπτικών, όπως ο μεταγραφικός παράγοντας *WR15S* που ενεργοποιεί την μεταγραφή των γονιδίων *PT4* και *STR*. Συνοπτικά ένα μικρό κομμάτι του μηχανισμού ανταλλαγής θρεπτικών απεικονίζεται στην εικόνα 5 (Jiang et al., 2018).

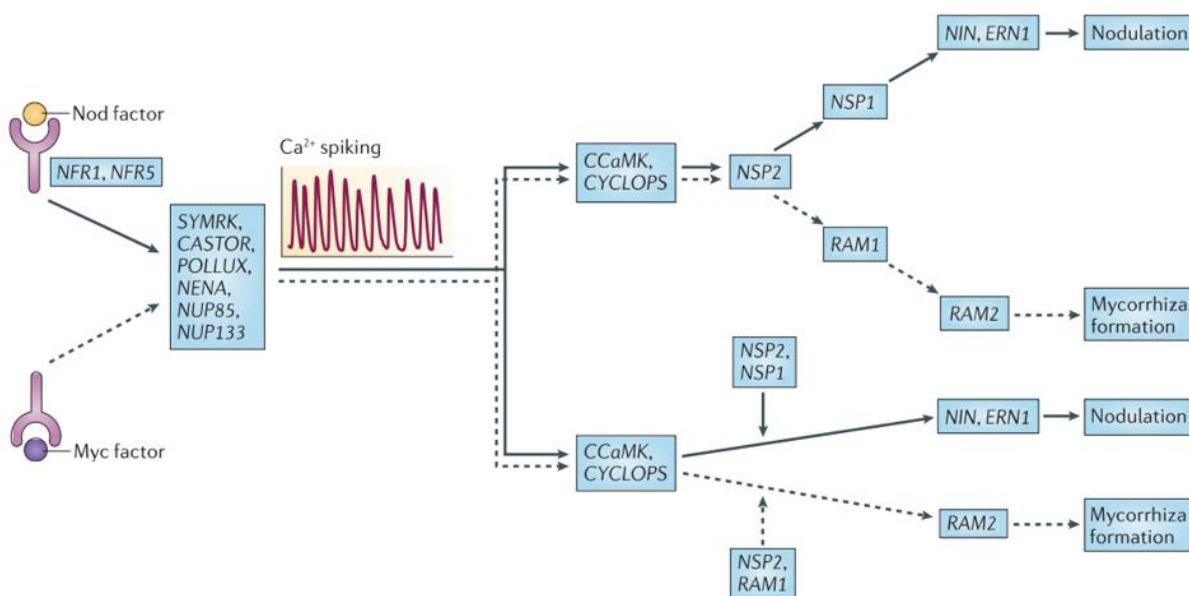


**Εικόνα 5:** Προτεινόμενο μοντέλο της ρύθμισης του σχηματισμού της PAM και της μεταφοράς θρεπτικών μέσω της PAM. Ο WRI5s ρυθμίζει την έκφραση απαραίτητων γονιδίων για την συμβίωση, την βιοσύνθεση λιπαρών οξέων και την μεταφορά λιπιδίων. RAM1/RAM2: μεταγραφικοί παράγοντες, STR/STR2: μεταφορείς λιπιδίων, MtPT4 (*Medicago truncatula* phosphate transporters), FAS (fatty acid synthase): συνθάση λιπαρών οξέων, FA (fatty acids): λιπαρά οξέα, 2-MAG: 2-μονοακυλογλυκερόλη, GPAT (glycerol-3- phosphate acyltransferase): ακυλοτρανφεράση της 3-φωσφορικής γλυκερόλης (Jiang et al., 2018)

### 1.3 Σηματοδότηση στη συμβίωση και αυτορρύθμιση των συμβιωτικών σχέσεων

Όπως προαναφέρθηκε η συμβίωση των φυτών τόσο με ριζόβια όσο και με ενδομυκορριζικούς μύκητες αρχίζει με την αναγνώριση μορίων και από τους δύο οργανισμούς. Η πρόσδεση των NFs και των MFs στους αντίστοιχους υποδοχείς εκκινεί τα μονοπάτια συμβίωσης που μοιράζονται αρκετά κοινά στοιχεία και αποτελούν το «κοινό συμβιωτικό μονοπάτι». Η πρόσδεση των NFs στους αντίστοιχους υποδοχείς (NFR1, NFR5 στο *L. japonicus*) που φέρουν εξωκυτταρικές επικράτειες μοτίβων λυσίνης (LysM) και κυτταροπλασματικές

επικράτειες με δράση κινάσης, ενεργοποιεί το κοινό συμβιωτικό μονοπάτι που περιλαμβάνει την ενεργοποίηση ιοντικών καναλιών (CASTOR, POLLUX) και μεταγραφικών παραγόντων (CYCLOPS) (Oldroyd, 2009). Έπειτα δημιουργούνται οι ταλαντώσεις ασβεστίου που θα ενεργοποιήσουν την CCaMK και αυτή με τη σειρά της θα επάγει την μεταγραφή μεταγραφικών παραγόντων (π.χ. NSP1/NSP2: Nodulation pathway 1, Nodulation pathway 2 και RAM 1: Required for arbuscular mycorrhization 1) που προωθούν την συμβίωση με ΔΕΜ και ριζόβια (Tian et al., 2020). Στην εικόνα 6 απεικονίζεται το κοινό συμβιωτικό μονοπάτι (Oldroyd, 2013; MacLean et al., 2017).



**Εικόνα 6:** Το κοινό συμβιωτικό μονοπάτι που επάγεται είτε από την αναγνώριση των παραγόντων Myc, είτε από την αναγνώριση των παραγόντων Nod με τελικό αποτέλεσμα της σηματοδότησης να είναι η ανάπτυξη συμβιωτικής σχέσης με δενδρόμορφους ενδομυκορριζικούς μύκητες και με ριζόβια αντίστοιχα (Oldroyd, 2013)

Τόσο η συμβίωση των ριζοβίων με τα ψυχανθή, όσο και η συμβίωση των φυτών με ενδομυκορριζικούς μύκητες, υπόκεινται συνεχώς σε έλεγχο για να καθοριστεί ο βαθμός που θα αποικιστούν τα φυτά από τους μικροοργανισμούς, μια διαδικασία που απαιτεί τη δαπάνη ενέργειας από το φυτό. Έτσι λοιπόν τα φυτά διαθέτουν μηχανισμούς που καθορίζουν τόσο την έκταση του αποικισμού τους από ριζόβια, όσο και από ΔΕΜ. Στην πρώτη περίπτωση αναφερόμαστε στον μηχανισμό αυτορρύθμισης της φυματογένεσης (Autoregulation of nodulation,

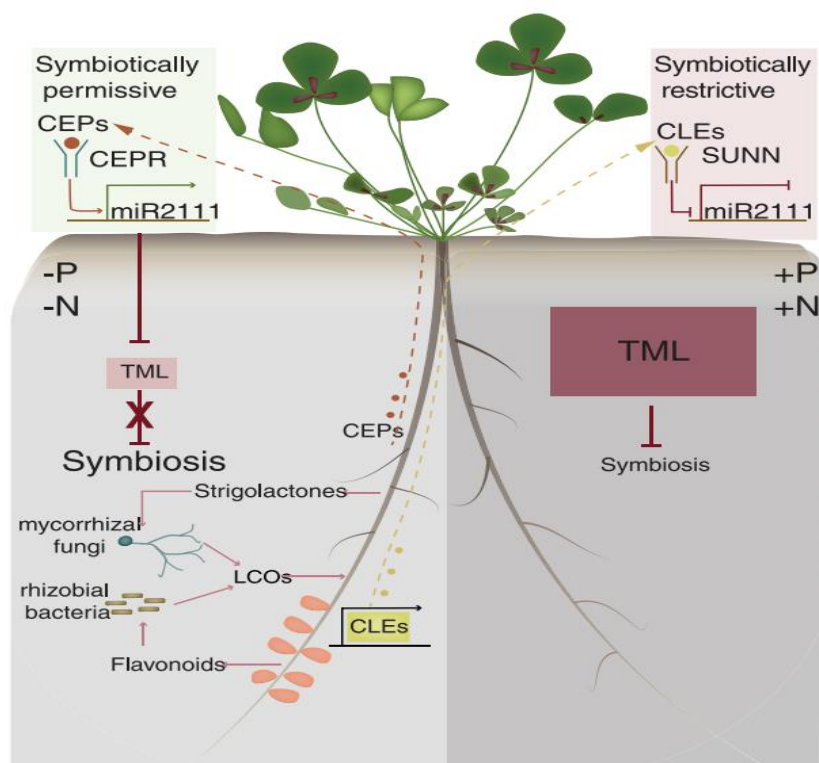


AON), και στη δεύτερη στον μηχανισμό αυτορρύθμισης της μυκκοριζικής συμβίωσης (Autoregulation of mycorrhization, AOM) (Wang et al., 2018).

Ο AON μέχρι σήμερα είναι γνωστό ότι απαρτίζεται από τέσσερα βασικά μέρη: 1) Τη σηματοδότηση από  $\text{NO}_3^-$  του εδάφους, 2) Την αρνητική ρύθμιση της συμβίωσης CLE-SUNN, 3) Την θετική ρύθμιση της συμβίωσης CEP-CRA2, 4) και το ζεύγος miR2111/TML. Προκειμένου να γίνει έλεγχος όλων αυτών των μονοπατιών, τα φυτά χρησιμοποιούν μια πληθώρα μορίων. Σε αυτά τα μόρια περιλαμβάνονται φυτοορμόνες, πολυπεπτίδια, υποδοχείς με δράση κινασών, μεταγραφικοί παράγοντες, και miRNAs για μεταγωγή σήματος και μετα-μεταγραφική ρύθμιση. Ο AON περιορίζει τόσο την μόλυνση από ριζόβια, όσο και τον αριθμό των φυματίων που δημιουργούνται. Τα CLE πεπτίδια (CLAVATA3/EMBRYO-SURROUNDING REGION RELATED) παράγονται στις ρίζες ως απόκριση στους μικροσυμβιώτες και στη διαθεσιμότητα θρεπτικών στοιχείων, μπορούν να μετακινούνται συστημικά μέσω του ξυλώματος στον βλαστό, και είναι σηματοδοτικά πεπτίδια με ρόλο τόσο στον AON, όσο και στον AOM (Takahara et al., 2013). Η αρνητική ρύθμιση της φυματιογένεσης από τη σηματοδότηση CLE-HAR1/SUNN (CLAVATA3/EMBRYO-SURROUNDING REGION RELATED–Hypernodulation and Aberrant Root 1 Super Numeric Nodules) στα φυτά *L. japonicus* και *M. truncatula*, έδειξε πως ο αριθμός των φυματίων είναι περιορισμένος όταν υπάρχει επαρκής ποσότητα αζώτου στο έδαφος (Okamoto et al., 2009). Μέχρι σήμερα έχουν βρεθεί αρκετά CLE πεπτίδια που ρυθμίζουν αρνητικά τη φυματιογένεση όπως τα CLE-RS1, και CLE-RS2 στο *L. japonicus* και τα CLE-13 και CLE-35 στο *M. truncatula* (Reid et al., 2011). Η έρευνα των Mohd-Radzman et al. (2016) στο *M. truncatula* έδειξε πως το πεπτίδιο MtCEP1 (*M. truncatula* polypeptide C-terminally Encoded Peptide) εκκρίνεται από τη ρίζα σε χαμηλές συγκεντρώσεις αζώτου και αναγνωρίζεται από τον υποδοχέα με δράση κινάσης MtCRA2 (COMPACT ROOT ARCHITECTURE 2) που βρίσκεται στο βλαστό και ρυθμίζει θετικά την φυματιογένεση. Τέλος το ζεύγος miR2111-TML που προαναφέρθηκε παίζει κομβικό ρόλο στον AON (Tsikou et al., 2018). Το γονίδιο TML εκφράζεται στη ρίζα και κωδικοποιεί για μια πρωτεΐνη που αναστέλλει την συμβίωση ψυχανθών-ριζοβίων. Το miR2111 παράγεται στον βλαστό και μεταφέρεται στη ρίζα όπου ως στόχο έχει το μετάγραφο του γονιδίου TML με τελικό αποτέλεσμα την επαγωγή της συμβίωσης. Η συσσώρευση ή μη

του miR2111 φαίνεται να ρυθμίζεται από την έκφραση των CEP ή των CLE πεπτιδίων αντίστοιχα. Η παραγωγή CLE πεπτιδίων κατά την συμβίωση αποτελεί το πρώτο βήμα ενός μηχανισμού αρνητικής ανάδρασης με τελικό στόχο το προϊόν του γονιδίου *TML* (εικόνα 7) (Oldroyd et al., 2020).

Όσον αφορά τον AOM λιγότερα είναι γνωστά. Ως απόκριση στον ΔΕΜ, CLE πεπτιδία που παράγονται στη ρίζα (*MtCLE53* και *MtCLE33* στο *M. truncatula*) μεταφέρονται στον βλαστό και συμμετέχουν στον μηχανισμό AOM ρυθμίζοντας τελικά τα επίπεδα των στριγγολακτονών στο έδαφος (Müller et al., 2019).

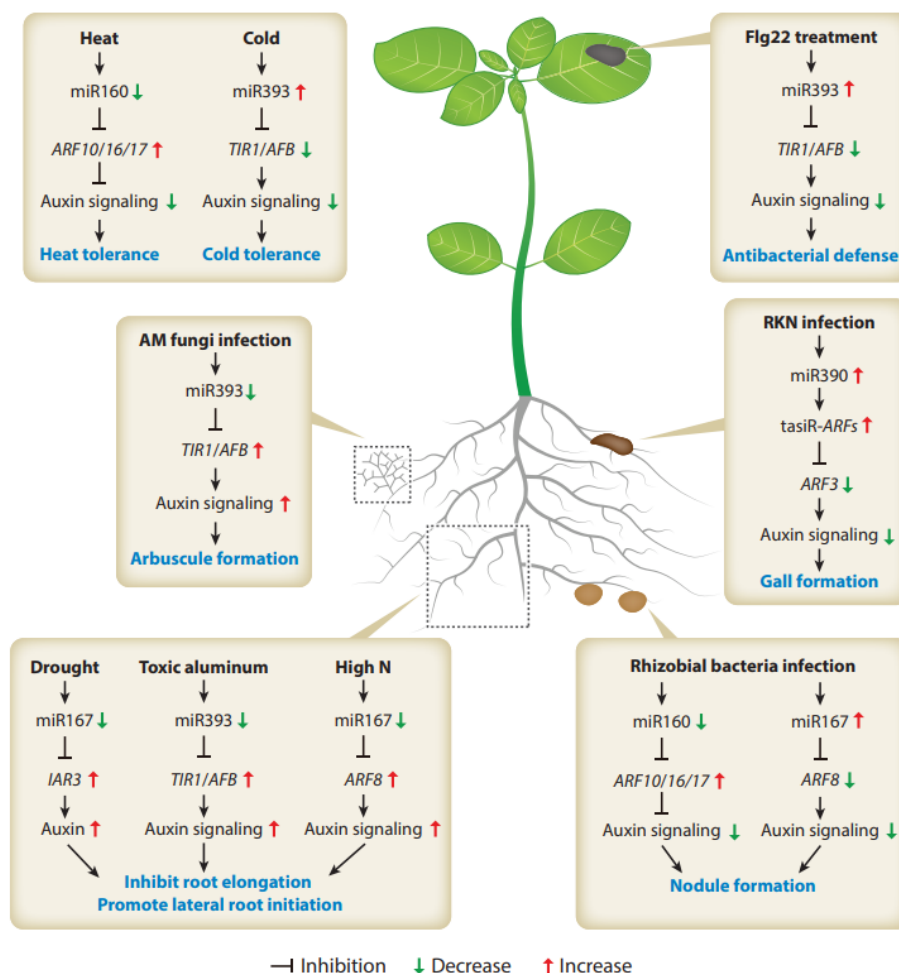


**Εικόνα 7:** Αυτορρύθμιση των συμβιωτικών σχέσεων παρουσία ή απουσία αζώτου και φωσφόρου στο έδαφος (Oldroyd et al., 2020)

## 1.4 Ο ρόλος των miRNAs στα φυτά

Τα MicroRNAs (miRNAs) είναι μη κωδικοποιητικά μόρια RNA, μήκους 20-24 νουκλεοτιδίων, και βρίσκονται σε αφθονία τόσο σε φυτικούς, όσο και σε ζωικούς οργανισμούς. Η βιογένεση των φυτικών miRNAs περιλαμβάνει την μεταγραφή των *MIR* γονιδίων, την επεξεργασία των πρώιμων pre-miRNA μεταγράφων από

τις DICER-LIKE πρωτεΐνες σε ώριμα miRNAs, και το φόρτωμα των ώριμων miRNAs σε πρωτεΐνες AGO (ARGONAUTE) για να σχηματίσουν το σύμπλοκο αποσιώπησης miRISC (miRNA-induced silencing complex). Στοχεύοντας συμπληρωματικές αλληλουχίες, το miRISC ρυθμίζει αρνητικά την γονιδιακή έκφραση αποικοδομώντας την αλληλουχία-στόχο, ελέγχοντας με αυτόν τον τρόπο αναπτυξιακές διαδικασίες του φυτού αλλά και αλληλεπιδράσεις με περιβαλλοντικούς παράγοντες όπως το φως, η θερμοκρασία, και η διαθεσιμότητα θρεπτικών. Στην εικόνα 8 απεικονίζονται μερικές αποκρίσεις των φυτών σε περιβαλλοντικά ερεθίσματα και αντίστοιχα μόρια miRNA που συμμετέχουν σε κάθε περίπτωση (Song et al, 2019).



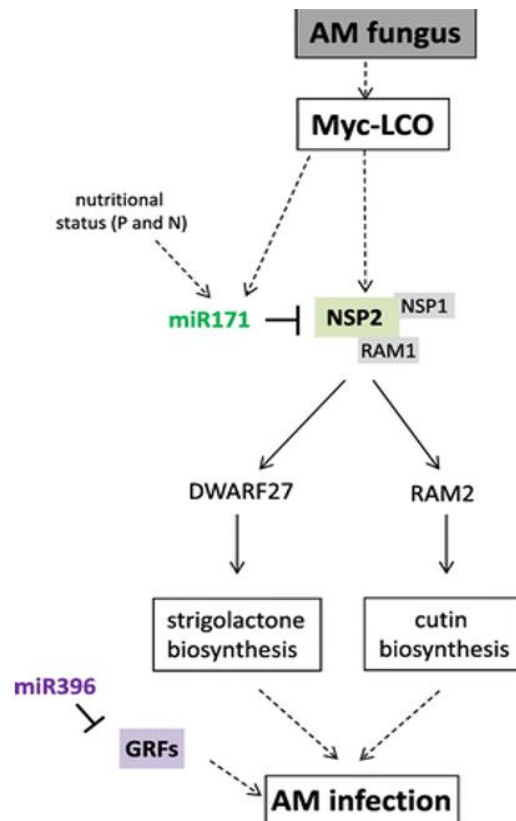
**Εικόνα 8:** Η παραγωγή των miR160, miR167, miR390, και miR393 ως απόκριση σε περιβαλλοντικά ερεθίσματα. Τα μόρια αυτά έχουν ως στόχους κυρίως μετάγραφα γονιδίων που συμμετέχουν στην σηματοδότηση της αυξίνης και έτσι σε κάθε περίπτωση μπορεί να έχουν ως αποτέλεσμα την ανθεκτικότητα στο ψύχος ή την υψηλή

θερμοκρασία, τον σχηματισμό θυσσάνων, την επιμήκυνση της ρίζας, την άμυνα έναντι βακτηρίων, τον σχηματισμό κάλλου και των σχηματισμό φυματίων. ARF:AUXIN RESPONSE FACTOR, IAR3:AA-ALA RESISTANT 3, miRNA: microRNA, N:nitrogen, RKN: root-knot nematode, tasiR: trans-acting small interfering RNA, TIR1/AFB: TRANSPORT INHIBITOR RESPONSE1/AUXIN SIGNALING F-BOX (Song et al., 2019)

## 1.5 Ο ρόλος του miR171 στα μονοπάτια συμβίωσης

Το συντηρημένο miRNA miR171 έχει ταυτοποιηθεί σε όλες τις ομάδες των φυτών, όπου φαίνεται να καταστέλλει την έκφραση γονιδίων που κωδικοποιούν για GRAS πρωτεΐνες, μια οικογένεια μεταγραφικών παραγόντων που εμπλέκονται στο πρότυπο ανάπτυξης των ριζών, στη σηματοδότηση της γιββεριλλίνης, και στην απόκριση στο φως (Hirsch & Oldroyd, 2009). Το 2011 χαρακτηρίστηκε μια ισομορφή του miR171, το miR171h, που είναι ικανό να συνδέεται στο μετάγραφο του *NSP2* (NODULE SIGNALING PATHWAY 2) γονιδίου, που κωδικοποιεί για έναν GRAS μεταγραφικό παράγοντα απαραίτητο για την ανάπτυξη συμβιωτικών σχέσεων τόσο με ριζόβια όσο και με ΔΕΜ, και να μειώνει την έκφραση του (Lauressergues et al. 2012). Επιπλέον ο NSP2 μαζί με άλλους μεταγραφικούς παράγοντες όπως ο RAM1, συμμετέχει στην βιοσύνθεση στριγγολακτονών και κηρωδών πολυμερών (εικόνα 9), που είναι συστατικά απαραίτητα για την ανάπτυξη συμβιωτικών σχέσεων με ΔΕΜ (Wang et al., 2012).

Ο ανασταλτικός ρόλος του miR171h στην συμβίωση με ΔΕΜ, μέσω της ρύθμισης του *NSP2*, έχει αναφερθεί σε δύο μελέτες που πραγματοποιήθηκαν στο φυτό *M. truncatula* (Hofferek et al. 2014; Lauressergues et al. 2012). Η συσσώρευση του *mtr-miR171h* (*Medicago truncatula*-miR171h) ήταν αυξημένη στις ρίζες (και πιο συγκεκριμένα στα επιδερμικά κύτταρα και τα κύτταρα του φλοιού), έπειτα από εμβολιασμό με τον ΔΕΜ *Rhizophagus irregularis*. Επιπλέον τα επίπεδα του miR171h ήταν αυξημένα σε συνθήκες ανάπτυξης όπου απουσίαζαν ο φώσφορος και το άζωτο (οι κινητήριοι παράγοντες για την ανάπτυξη συμβιωτικών σχέσεων με ΔΕΜ και ριζόβια αντίστοιχα) σε σύγκριση με συνθήκες ελέγχου, υπονοώντας την σημασία του miR171h τόσο στην θρέψη όσο και την συμβιωτική κατάσταση του φυτού (Lelandais-Brière κ.ά., 2016).



**Εικόνα 9:** Σχηματική απεικόνιση της αλληλεπίδρασης μεταξύ miRNAs και της σηματοδότησης των Myc-LCOs κατά την μυκορριζική συμβίωση. Παρουσιάζεται ο ανασταλτικός ρόλος των miR171 και miR396 στην ανάπτυξη συμβίωσης με ΔΕΜ καθώς ρυθμίζουν αρνητικά την έκφραση, κομβικών για την συμβίωση, γονιδίων. GRFs: Growth-regulating factors, RAM2:REQUIRED FOR ARBUSCULAR MYCORRHIZATION 2), (Lelandais-Brière et al., 2016)

## 1.6 Σκοπός της εργασίας

Η συμβιωτική σχέση μεταξύ φυτών και δενδρόμορφων ενδομυκορριζικών μυκήτων (ΔΕΜ) απoσκοπεύει στην ανταλλαγή θρεπτικών συστατικών μεταξύ των δύο οργανισμών. Σκοπός της παρούσας εργασίας ήταν να ελέγξουμε τα επίπεδα του miR171c σε φυτά *Lotus japonicus* που εμβολιάστηκαν και αποικίστηκαν από τον ΔΕΜ *Rhizophagus irregularis* (στέλεχος DAOM) καθώς και να αναλύσουμε τους φαινοτύπους των φυτών στα οποία το γονίδιο *MIR171c* είτε υπερεκφράζεται είτε βρίσκεται σε καταστολή, και να δούμε τον πιθανό ρόλο του miR171c στην εγκαθίδρυση της συμβίωσης με ΔΕΜ.

## 2. Υλικά και μέθοδοι

### 2.1 Βιολογικό υλικό

Για την διεξαγωγή των πειραμάτων χρησιμοποιήθηκε το ψυχανθές φυτό-μοντέλο *Lotus japonicus*. Πιο συγκεκριμένα χρησιμοποιήθηκαν φυτά αγρίου τύπου της ποικιλίας Gifu, γενετικά τροποποιημένες φυτικές σειρές 171C\_KO και 171C\_OX. Για τον εμβολιασμό των φυτών με μύκητα χρησιμοποιήθηκε το εμπορικό σκεύος του στελέχους DAOM, του δενδρόμορφου ενδομυκορριζικού μύκητα *Rhizophagus irregularis*.

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

Το πρώτο βήμα για την πραγματοποίηση του πειράματος είναι η απολύμανση των σπόρων. Με την απολύμανση των σπόρων αποφεύγουμε την επιμόλυνση των σπόρων από παθογόνους μικροοργανισμούς και επίσης εξασφαλίζεται ότι όλα τα φυτά θα βρίσκονται στο ίδιο αναπτυξιακό στάδιο. Η διαδικασία αυτή πραγματοποιείται σε δύο στάδια.

#### 1<sup>ο</sup> στάδιο :

1. Καταμέτρηση των σπόρων και τοποθέτηση τους σε σωληνάριο τύπου Eppendorf
2. Προσθήκη πυκνού H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> στα σωληνάρια με τους σπόρους και επώαση για 20-25min.
3. 5 πλύσεις με dH<sub>2</sub>O.
4. Προσθήκη διαλύματος χλωρίνης εμπορίου 20% και επώαση για 10min
5. 6 πλύσεις με dH<sub>2</sub>O οι οποίες πραγματοποιούνται σε θάλαμο καθέτου νηματικής ροής
6. Προσθήκη dH<sub>2</sub>O και επώαση στους -4°C για όλη τη νύχτα

**2<sup>ο</sup> στάδιο:** (πραγματοποιείται σε θάλαμο καθέτου νηματικής ροής)

1. Σε τρυβλία τοποθετούμε από 3 διηθητικά χαρτιά
2. Προσθήκη 3ml dH<sub>2</sub>O σε κάθε τρυβλίο
3. Τοποθέτηση των σπόρων στα τρυβλία σε απόσταση μεταξύ τους ώστε να μην έρχονται σε επαφή
4. Κλείσιμο των τρυβλίων με parafilm
5. Τοποθέτηση των τρυβλίων κάθετα στον θάλαμο ανάπτυξης φυτών
6. Αναμονή 10 μέρες μέχρι να εκβλαστήσουν οι σπόροι και τα νεαρά φυτάρια που θα προκύψουν να είναι έτοιμα για μεταφύτευση.

### **2.3 Μεταφύτευση φυτών σε δοχεία magenta και εμβολιασμός τους με μύκητα με την μέθοδο sandwich**

Αφού περάσουν 10 μέρες από την απολύμανση και την εκβλάστηση των σπόρων, τα φυτά είναι έτοιμα για μεταφύτευση σε δοχεία magenta που περιέχουν άμμο και υγρό θρεπτικό μέσο. Η άμμος που τοποθετείται στα δοχεία αποστειρώνεται στους 180°C για μία νύχτα. Το υγρό θρεπτικό μέσο που χρησιμοποιείται είναι το LAS (Long Ashton Solution) η σύσταση του οποίου αναγράφεται στον Πίνακα 1. Η όλη διαδικασία της μεταφύτευσης πραγματοποιείται σε θάλαμο καθέτου νηματικής ροής ώστε να μειωθούν οι πιθανότητες να υπάρξουν επιμολύνσεις. Τα δοχεία magenta εξασφαλίζουν την κατάλληλη υγρασία και τις στείρες συνθήκες όσο τα φυτά αναπτύσσονται και κάθε magenta αποτελεί και μία βιολογική επανάληψη του πειράματος.

**Πίνακας 1:** Σύσταση θρεπτικού μέσου LAS (500mL)

<b>Θρεπτικά</b>	<b>Συγκεντρώσεις</b>	<b>Ποσότητα</b>
MgSO <sub>4</sub>	0.375M	1mL
NaNO <sub>3</sub>	1mM	0.5mL
K <sub>2</sub> SO <sub>4</sub>	1mM	1mL
CaCl <sub>2</sub>	2mM	1mL
NaH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub>	3.2μM	16μL
FeNa EDTA	25μM	125μL
MnSO <sub>4</sub>	5μM	25μL
CuSO <sub>4</sub>	0.25μM	12.5μL
ZnSO <sub>4</sub>	0.5μM	25μL
H <sub>3</sub> BO <sub>3</sub>	25μM	125μL
Na <sub>2</sub> MoO <sub>4</sub>	0.1μM	2μL

Η διαδικασία μεταφύτευσης των φυτών που θα εμβολιαστούν με μύκητα γίνεται με την μέθοδο sandwich που έχει ως εξής:

1. Τοποθέτηση αποστειρωμένης άμμου στα δοχεία magenta (360gr για τα φυτά τεσσάρων και πέντε εβδομάδων)
2. Προσθήκη του θρεπτικού LAS σε κάθε magenta (60 ml για τα φυτά τεσσάρων και πέντε εβδομάδων)
3. Ανακάτεμα της άμμου
4. Ενυδάτωση δίσκων νιτροκυτταρίνης σε πηκτή αγαρόζης (water agar 1%)
5. Τοποθέτηση τριών φυταρίων σε κάθε ενυδατωμένο δίσκο νιτροκυτταρίνης με το υπέργειο τμήμα να εξέχει του δίσκου
6. Προσθήκη 300μL εμβολίου με συγκέντρωση 1000 σπόρια/ml. Κάθε δίσκος έχει περίπου 300 σπόρια άρα σε κάθε φυτό αντιστοιχούν περίπου 100 σπόρια
7. Κάλυψη του ενυδατωμένου δίσκου νιτροκυτταρίνης με έναν μη ενυδατωμένο δίσκο νιτροκυτταρίνης και κλείσιμο του sandwich
8. Δημιουργία μια σχισμής στην άμμο και τοποθέτηση του sandwich σε αυτή



9. Κλείσιμο των δοχείων magenta με ένα δεύτερο magenta-καπάκι και τοποθέτηση τους σε θάλαμο ανάπτυξης φυτών με φωτοπερίοδο 16ώρες φως/8 ώρες σκοτάδι στους 24 °C.

Επειδή το εμπορικό σκεύασμα του ενδομυκορριζικού μύκητα διατίθεται σε ανασταλτικό μέσο συγκέντρωσης 2000 σπόρια/ml, φυγοκεντρούμε στα 3000 rpm για 1min αφαιρούμε το ανασταλτικό μέσο και αντικαθιστούμε με dH<sub>2</sub>O ώστε ο μύκητας στο dH<sub>2</sub>O να έχει τελική συγκέντρωση 1000 σπόρια/ml. Στα φυτά που δεν έγινε εμβολιασμός με μύκητα απλά έγινε προσθήκη νερού αντί για μύκητα.

## 2.4 Συγκομιδή των φυτών και χρώση των ριζών

Αφού περάσει το χρονικό περιθώριο που έχει οριστεί για το κάθε πείραμα (2, 4 και 5 εβδομάδες) τα φυτά συλλέγονται. Η συγκομιδή τους πραγματοποιείται ως εξής:

1. Αφαιρείται η άμμος από κάθε magenta
2. Με μια λαβίδα λαμβάνονται τα φυτά από την άμμο ή από το sandwich
3. Τα φυτά τοποθετούνται σε σωληνάριο falcon με dH<sub>2</sub>O ώστε να παραμένουν ενυδατωμένα

Διαδικασία χρώσης των ριζών με μελάνι:

1. Από κάθε falcon παίρνουμε τα φυτά και με ένα κοπίδι κόβουμε το υπέργειο τμήμα και κρατάμε μόνο τις ρίζες
2. Οι ρίζες επωάζονται σε διάλυμα 10% KOH για 30min σε υδατόλουτρο στους 85°C
3. Απομάκρυνση του KOH
4. Προσθήκη διαλύματος 10% οξικού οξέος
5. Απομάκρυνση του οξικού οξέος και 2 πλύσεις με dH<sub>2</sub>O
6. Προσθήκη διαλύματος μελανιού 5%(σε διάλυμα 5% οξικού οξέος) και επώαση στο υδατόλουτρο στους 85°C για 30min
7. Απομάκρυνση του διαλύματος μελανιού
8. 2 πλύσεις με dH<sub>2</sub>O

9. Προσθήκη διαλύματος 5% οξικού οξέος και επώαση για 30min σε θερμοκρασία δωματίου
10. Απομάκρυνση του οξικού οξέος και 2 πλύσεις με dH<sub>2</sub>O
11. Προσθήκη dH<sub>2</sub>O και επώαση στους 4°C για όλη τη νύχτα

## 2.5 Υπολογισμός αποικισμού με χρήση μικροσκοπίου

Αφού πραγματοποιηθεί η χρώση των ριζών, οι ρίζες τεμαχίζονται σε κομμάτια μήκους 1-1,5cm και τοποθετούνται σε αντικειμενοφόρους πλάκες ώστε να παρατηρηθούν στο οπτικό μικροσκόπιο. Κάθε αντικειμενοφόρος πλάκα περιέχει ρίζες φυτών που αναπτύχθηκαν στο ίδιο magenta και αποτελούν μία βιολογική επανάληψη. Σε κάθε αντικειμενοφόρο παρατηρούνται 100 οπτικά πεδία με την χρήση του x40 φακού στο οπτικό μικροσκόπιο και σε κάθε πεδίο καταγράφεται αν υπάρχει η όχι αποικισμός. Το τελικό ποσοστό αποικισμού κάθε αντικειμενοφόρου πλάκας υπολογίζεται ως εξής:

$$\% \text{αποικισμός} = \frac{\text{Οπτικά πεδία που καταγράφηκε αποικισμός}}{\text{Σύνολο οπτικών πεδίων}} \times 100$$

## 2.6 Απομόνωση ολικού RNA από τις ρίζες

Τα φυτά συλλέγονται σε σωλήνες falcon με dH<sub>2</sub>O. Στη συνέχεια κόβεται το υπέργειο τμήμα και οι ρίζες συλλέγονται σε σωληνάρια τύπου Eppendorf, τοποθετούνται σε υγρό N<sub>2</sub> και αποθηκεύονται στους -80°C. Η διαδικασία απομόνωσης του ολικού RNA από τις ρίζες πραγματοποιείται σε πάγο και περιγράφεται στη συνέχεια:

1. Με χρήση εμβόλων γίνεται λειοτρίβηση των ριζών που βρίσκονται στα σωληνάρια Eppendorf
2. Προσθήκη 900μL Lysis buffer
3. Ανάδευση με Vortex για διάλυση του ιστού
4. Φυγοκέντρηση για 10min, στους -4°C, στα 13000rpm
5. Μεταφορά του υπερκείμενου σε σωληνάρια τύπου Eppendorf που περιέχουν 1000μL Trizol LS

6. Vortex κάθε Eppendorf για 30sec και επώαση σε θερμοκρασία δωματίου για 5min
7. Φυγοκέντρηση για 5min, στους -4°C, στα 13000rpm
8. Μεταφορά και των 2 φάσεων σε νέα σωληνάρια τύπου Eppendorf που περιέχουν 250μL χλωροφόρμιο
9. Vortex κάθε Eppendorf για 30sec και επώαση σε θερμοκρασία δωματίου για 2min
10. Φυγοκέντρηση για 10min, στους -4°C, στα 13000rpm
11. Προσεκτική μεταφορά της υδάτινης φάσης σε 2 νέα σωληνάρια τύπου Eppendorf από 420μL στο καθένα
12. Προσθήκη 42μL (0.1 vol) NaOAc συγκέντρωσης 3M
13. Προσθήκη 42μL (0.1 vol) οξικού οξέος
14. Προσθήκη 1050μL (2.5 vol.) 100% EtOH και απαλή ανάδευση
15. Αποθήκευση των Eppendorf στους -20 °C για όλη τη νύχτα
16. Φυγοκέντρηση για 1 ώρα, στους -4°C, στα 13300rpm
17. Απομάκρυνση του υπερκείμενου
18. Προσθήκη 1000μL 80% EtOH
19. Φυγοκέντρηση για 10min, στους -4°C, στα 13300rpm
20. Απομάκρυνση του υπερκειμένου
21. Φυγοκέντρηση 1min και πλήρη απομάκρυνση της EtOH
22. Στέγνωμα του ιζήματος σε θερμοκρασία δωματίου για περίπου 7min
23. Επαναδιαλυτοποίηση του ιζήματος σε 10μL LoTE buffer (επανένωση των δειγμάτων που χωρίστηκαν σε 2 Eppendorf)
24. Θέρμανση των δειγμάτων στους 65°C στο heatblock για 2min
25. Υπολογισμός της συγκέντρωσης του RNA σε κάθε δείγμα στο φασματοφωτόμετρο Nanodrop της Quawell (μηδενίζουμε με 1μL LoTE)
26. Αποθήκευση των δειγμάτων στους -20°C

**Πίνακας 2:** Σύσταση διαλυμάτων LoTE και Lysis buffer

	<b>Lysis buffer</b>	<b>LoTE</b>
<b>Συστατικά</b>	100mM Tris-HCl (pH 7.5)	2mM Tris-HCl (pH 7.5)
	10mM EDTA (pH 8)	0.2mM EDTA (pH 7.5)
	1% LiDS	
	50mM LiCl	
	5mM DTT	

## 2.7 Απομάκρυνση του γονιδιωματικού DNA με κατεργασία DNάσης

Στα δείγματα που έγινε απομόνωση του ολικού RNA, πραγματοποιείται απομάκρυνση του γονιδιωματικού DNA. Η αντίδραση αναγράφεται στον Πίνακα 3.

**Πίνακας 3:** Αντίδραση απομάκρυνσης γονιδιωματικού DNA

<b>Αντιδραστήρια</b>	<b>Ποσότητες</b>
Δείγμα RNA	500-600ng
RNase out (10U/μL)	0,25 μL
10x ρυθμιστικό διάλυμα (buffer)	1 μL
DNase I (1U/μL)	1 μL
ddH <sub>2</sub> O	Προσθήκη μέχρι τον τελικό όγκο
Τελικός όγκος	10 μL

Αφού προστεθούν όλα τα αντιδραστήρια, τα δείγματα επωάζονται στους 37°C για 50min. Αφού τελειώσει η επώαση τα δείγματα μεταφέρονται σε πάγο και γίνεται προσθήκη 1μL EDTA (25mM) σε αυτά. Αφού γίνει η προσθήκη του EDTA τα δείγματα επωάζονται για 10min στους 65°C ώστε να τερματιστεί η αντίδραση.

## 2.8 Αλυσιδωτή αντίδραση πολυμεράσης (PCR) και ηλεκτροφόρηση για έλεγχο απομάκρυνσης του DNA

Στα δείγματα που πραγματοποιήθηκε αντίδραση DNάσης, πραγματοποιείται και PCR για τον έλεγχο της επιτυχούς απομάκρυνσης του γονιδιωματικού DNA. Χρησιμοποιούνται εκκινητές για την ενίσχυση του ενδογενούς γονιδίου της ουβικιτίνης και τα προϊόντα της αντίδρασης ηλεκτροφορούνται σε πηκτή αγαρόζης 1% με EtBr.

**Πίνακας 4:** Αντίδραση PCR

<b>Αντιδραστήρια</b>	<b>Ποσότητες</b>
Δείγμα RNA από την αντίδραση DNάσης	1 μL
dNTPs	0.4 μL
Πρόσθιος εκκινητής (F) (10μM)	0.8 μL
Ανάστροφος εκκινητής (R) (10μM)	0.8 μL
10x ρυθμιστικό διάλυμα (buffer)	2 μL
Taq DNA πολυμεράση	0.08 μL

ddH <sub>2</sub> O	14.92 μL
Τελικός όγκος	20 μL

**Πίνακας 5:** 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	
∞	4 °C	

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

Τα δείγματα όπου απομακρύνθηκε το γονιδιωματικό DNA με την αντίδραση DNάσης χρησιμοποιούνται για τη σύνθεση cDNA. Η διαδικασία σύνθεσης cDNA έχει ως εξής:

Αρχικά χρησιμοποιείται μια ποσότητα από τα δείγματα που απομακρύνθηκε το γονιδιωματικό DNA. Γίνεται προσθήκη των εκκινητών oligodT και miR171c stem-loop, και γίνεται προσθήκη ddH<sub>2</sub>O μέχρι τελικό όγκο 17μL. Αφού γίνει η προσθήκη όλων αυτών ακολουθεί επώαση στους 72°C για 5 min. Έπειτα γίνεται η προσθήκη των υπολοίπων συστατικών, συμπεριλαμβανομένου και του ενζύμου της αντίστροφης μεταγραφάσης (με τελικό όγκο τα 25μL) και ακολουθεί το πρόγραμμα της PCR σύμφωνα με τον πίνακα 7.

**Πίνακας 6:** Η αντίδραση της RT-PCR

Αντιδραστήρια	Ποσότητες
Δείγμα RNA	250-300ng
miR171c stem-loop εκκινητής (0.5μM)	1 μL
oligodT εκκινητής (2μM)	1 μL
ddH <sub>2</sub> O	Μέχρι 17 μL
5x ρυθμιστικό διάλυμα (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 7:** Το πρόγραμμα της RT-PCR

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

} 60 κύκλοι

## 2.10 Ποσοτική PCR πραγματικού χρόνου (qPCR)

Τέλος, πραγματοποιείται ποσοτική PCR πραγματικού χρόνου για να γίνει ποσοτικός προσδιορισμός της έκφρασης των γονιδίων. Ως αρχικά δείγματα χρησιμοποιούνται τα δείγματα στα οποία έγινε προηγουμένως η σύνθεση cDNA. Τα γονίδια των οποίων ελέγχθηκε η έκφραση στην παρούσα εργασία είναι αυτά των miR171c και *NSP2*. Επίσης ελέγχεται η έκφραση των γονιδίων δεικτών της μυκορριζικής συμβίωσης *AMT2.2*, *PT4*, και *SbtM1*. Η έκφραση των παραπάνω γονιδίων κανονικοποιείται ως προς την έκφραση των γονιδίων αναφοράς ATP (ATP synthase) και PP2A (PROTEIN PHOSPHATASE 2A).


Οι αντιδράσεις πραγματοποιήθηκαν στο μηχάνημα CFX Connect Real-Time System της BIORAD, και ως φθορίζουσα χρωστική χρησιμοποιήθηκε η SYBR-GREEN. Για τον έλεγχο της εξειδίκευσης των εκκινητών του κάθε γονιδίου που ελέγχεται, στο τέλος κάθε αντίδρασης κατασκευάζεται καμπύλη τήξης (melting curve). Η αποδοτικότητα της qPCR ( $PCR_{eff}$ ) υπολογίζεται με τη βοήθεια του προγράμματος LinRegPCR (Ramakers κ.ά., 2003) Τα επίπεδα έκφρασης κάθε γονιδίου υπολογίζονται ως  $PCR_{eff}^{-\Delta Ct}$  (το  $\Delta Ct$  υπολογίζεται ως  $Ct^X - Ct^A$ , όπου X: η έκφραση των γονιδίων ενδιαφέροντος και όπου A: η έκφραση των γονιδίων αναφοράς). Οι αντιδράσεις και το πρόγραμμα της qPCR φαίνονται στους πίνακες 8 και 9 αντίστοιχα.

**Πίνακας 8:** Η αντίδραση της qPCR

<b>Αντιδραστήρια</b>	<b>Ποσότητες</b>
cDNA	2.5 $\mu$ L
Πρόσθιος εκκινητής (F)	0.2 $\mu$ L
Ανάστροφος εκκινητής (R)	0.2 $\mu$ L
ddH <sub>2</sub> O	2.1 $\mu$ L
2x διάλυμα SYBR GREEN	5 $\mu$ L
Τελικός όγκος	10 $\mu$ L

**Πίνακας 9:** Το πρόγραμμα της qPCR

<b>Χρόνος</b>	<b>Θερμοκρασία</b>
3 min	95 °C
10 sec	95 °C
20 sec	58 °C ή 60 °C (ανάλογα τα γονίδια)
11 sec	72 °C



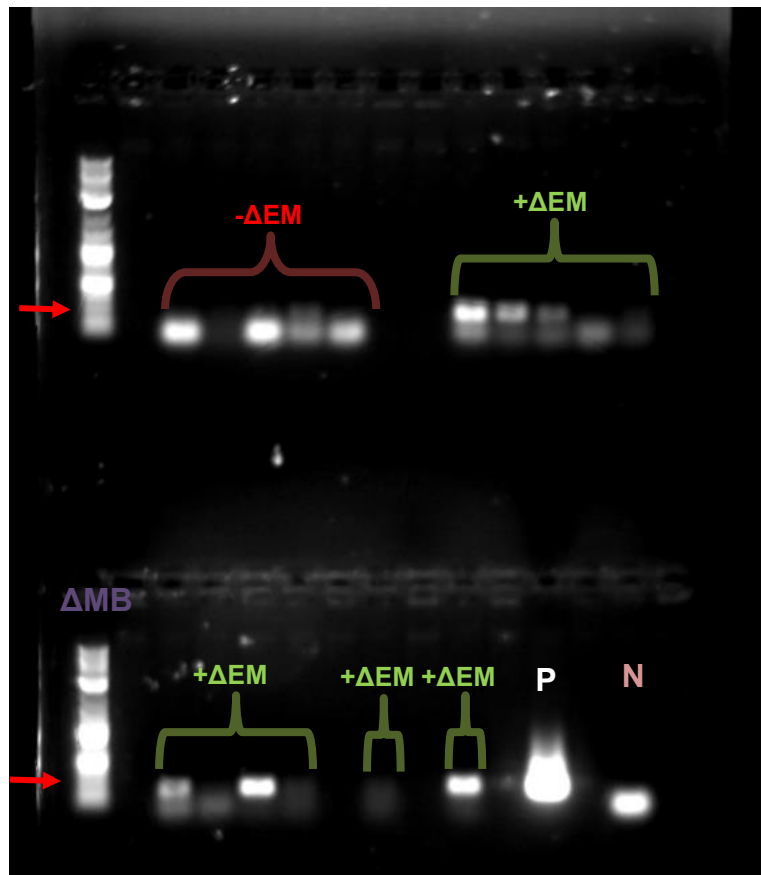
55 κύκλοι

### 3. Αποτελέσματα

#### 3.1 Έλεγχος των επιπέδων συσσώρευσης του miR171c και έκφρασης του γονιδίου *NSP2* κατά τον αποικισμό από ενδομυκορριζικό μύκητα

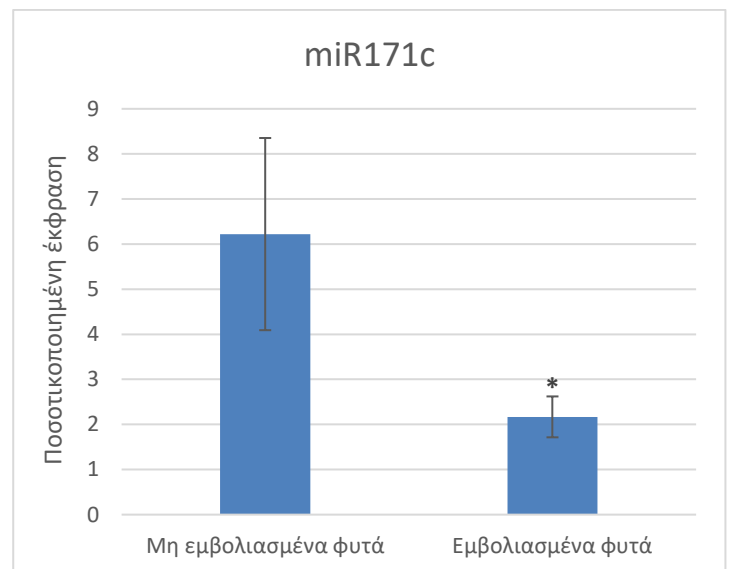
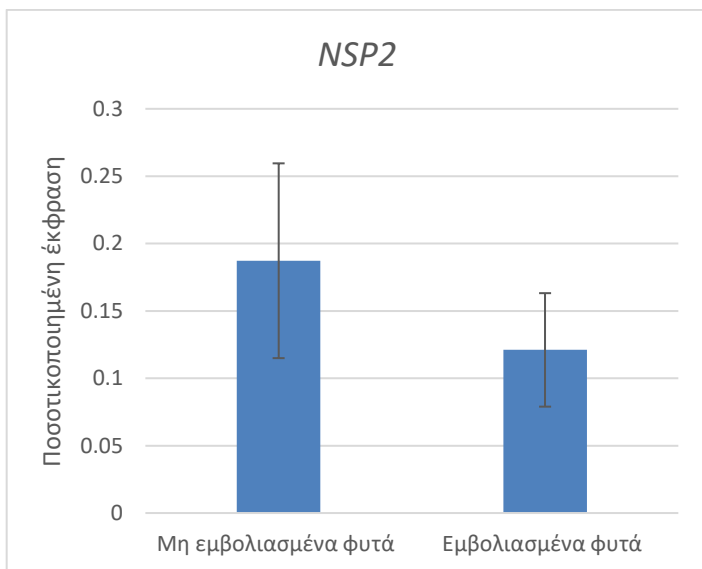
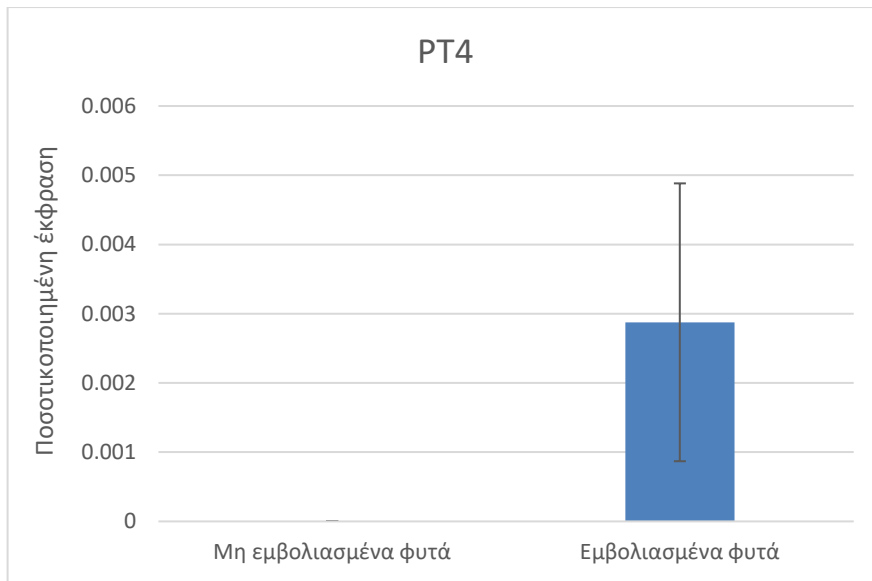
Αρχικά μελετήθηκε η απόκριση του miR171c και του πιθανού γονιδίου-στόχο του *NSP2* στον αποικισμό των φυτών από ενδομυκορριζικό μύκητα. Συγκεκριμένα, μελετήθηκαν με ποσοτική PCR πραγματικού χρόνου τα επίπεδα συσσώρευσης του miR171c και των *NSP2* μετάγραφων σε φυτά *Lotus japonicus* αγρίου τύπου και έγινε σύγκριση εμβολιασμένων φυτών, με τον δενδρόμορφο ενδομυκορριζικό μύκητα *Rhizophagus irregularis* (στέλεχος DAOM), και μη εμβολιασμένων φυτών. Η ανάλυση αυτή πραγματοποιήθηκε σε δύο χρονικά στάδια, στις δύο και στις τέσσερις εβδομάδες μετά τον εμβολιασμό των φυτών με τον μύκητα. Τα φυτά αναπτύχθηκαν για δύο ή τέσσερις εβδομάδες, έγινε η συγκομιδή τους και η αποκοπή των ριζών τους. Ακολούθησε η απομόνωση του ολικού RNA από τις ρίζες, και αφού υπολογίστηκαν οι συγκεντρώσεις του RNA και οι λόγος καθαρότητας ( $A_{260}/A_{280}$ ) (Παράρτημα 1) για κάθε δείγμα ακολούθησε αντίδραση DNάσης για την απομάκρυνση του γονιδιωματικού DNA και έλεγχος απομάκρυνσης του DNA με PCR. Οι εκκινητές που χρησιμοποιήθηκαν στην PCR ήταν ειδικοί για το ενδογενές γονίδιο της ουβικιίνης. Σε όσα δείγματα ήταν ορατή η αναμενόμενη ζώνη ενίσχυσης του γονιδίου της ουβικιίνης, έγινε επανάληψη της διαδικασίας για να απαλλαγούν από γονιδιωματικό DNA. Στην εικόνα 10 απεικονίζεται ενδεικτικά η ανάλυση των προϊόντων PCR σε πηκτή αγαρόζης, για τα δείγματα που προέκυψαν από φυτά που αναπτύχθηκαν για δύο εβδομάδες.





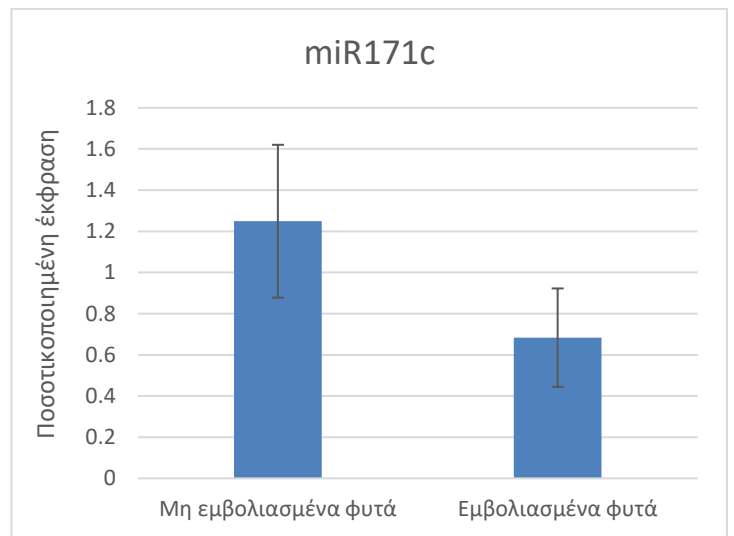
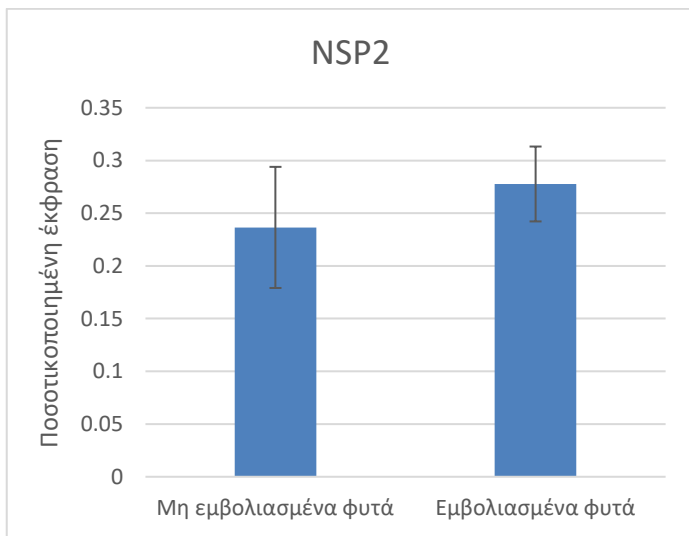
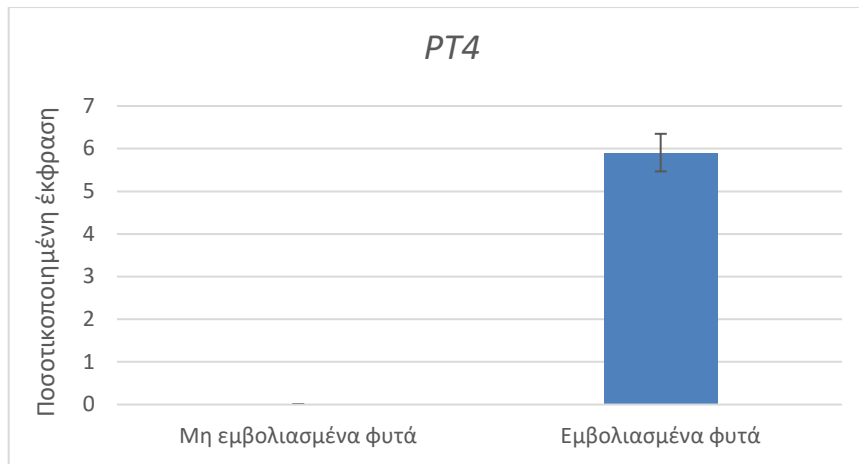
**Εικόνα 10:** Έλεγχος απομάκρυνσης του γονιδιωματικού DNA από τα δείγματα RNA των φυτών που αναπτύχθηκαν για 2 εβδομάδες. Τα προϊόντα της αντίδρασης PCR αναλύθηκαν σε πηκτή αгарόζης 1%. Τα κόκκινα βέλη δείχνουν τις αναμενόμενες ζώνες ενίσχυσης του ενδογενούς γονιδίου της ουβικιτίνης. -ΔEM: Δείγματα φυτών χωρίς ενδομυκορριζικό μύκητα, +ΔEM: Δείγματα φυτών εμβολιασμένα με ενδομυκορριζικό μύκητα, P: Θετικός μάρτυρας, N: Αρνητικός μάρτυρας, ΔMB: Δείκτης μοριακών βαρών.

Έπειτα ακολούθησε η σύνθεση του cDNA και τέλος η ποσοτική PCR (qPCR) ώστε να ελεγχθεί η έκφραση του *NSP2*, και των επιπέδων του ώριμου miR171c. Ως γονίδιο δείκτης της μυκορριζικής συμβίωσης χρησιμοποιήθηκε το *PT4* (που κωδικοποιεί για έναν μεταφορέα φωσφόρου στην PAM). Η έκφραση του *PT4* στα αποικισμένα από ΔEM φυτά ήταν αυξημένη (εικόνα 11), επιδεικνύοντας τον επιτυχημένο αποικισμό των φυτών. Στα φυτά που αναπτύχθηκαν για δύο εβδομάδες τα επίπεδα συσσώρευσης του miR171c ήταν σημαντικά μειωμένα ( $p=0,0486$ ) κατά 2,8 φορές στα φυτά που είχαν εμβολιαστεί με ΔEM σε σχέση με τα αντίστοιχα επίπεδα στα μη-εμβολιασμένα φυτά, αλλά τα επίπεδα έκφρασης του *NSP2* δεν παρουσίασαν στατιστικώς σημαντική αλλαγή (εικόνα 11).



**Εικόνα 11:** Στα γραφήματα απεικονίζονται τα επίπεδα συσσώρευσης του miR171c και τα επίπεδα έκφρασης του γονιδίου *NSP2*, σε σχέση με τα γονίδια αναφοράς *ATP* και *PP2* καθώς και του γονιδίου *PT4*. Ο εμβολιασμός των φυτών έγινε με τον ΔΕΜ *Rhizophagus irregularis*. Για την στατιστική ανάλυση πραγματοποιήθηκε unpaired t-test. \* $p < 0.05$  (μη εμβολιασμένα φυτά=4 βιολογικές επαναλήψεις, εμβολιασμένα φυτά=7 βιολογικές επαναλήψεις)

Όσον αφορά τα φυτά που αναπτύχθηκαν για τέσσερις εβδομάδες, τόσο τα επίπεδα συσσώρευσης του miR171c όσο και τα επίπεδα έκφρασης του γονιδίου *NSP2* δεν παρουσίασαν στατιστικώς σημαντική αλλαγή μεταξύ των εμβολιασμένων με ΔΕΜ και μη-εμβολιασμένων φυτών (εικόνα 12).

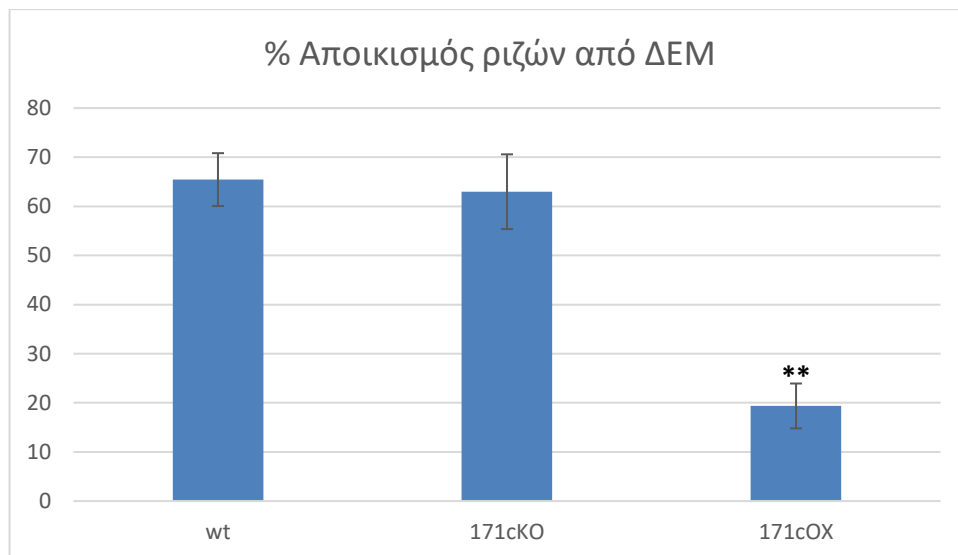


**Εικόνα 12:** Στα γραφήματα απεικονίζονται τα επίπεδα συσσώρευσης του miR171c και τα επίπεδα έκφρασης του γονιδίου *NSP2*, σε σχέση με τα γονίδια αναφοράς *ATP* και *PP2* ως προς τα οποία έγινε η κανονικοποίηση, καθώς και του γονιδίου *PT4*. Δεν παρατηρήθηκαν στατιστικώς σημαντικές διαφορές μεταξύ των εμβολιασμένων με τον ΔΕΜ *Rhizophagus irregularis* και μη εμβολιασμένων φυτών. Για την στατιστική ανάλυση πραγματοποιήθηκε unpaired t-test. (μη εμβολιασμένα φυτά=4, εμβολιασμένα φυτά=6 βιολογικές επαναλήψεις)

### 3.2 Φαινοτυπικός έλεγχος του αποικισμού των φυτικών σειρών 171C\_KO, 171C\_OX από ενδομυκορριζικό μύκητα

Επόμενο βήμα ήταν ο φαινοτυπικός έλεγχος του αποικισμού φυτικών σειρών υπερέκφρασης και καταστολής του *MIR171c*. Για τον σκοπό αυτό φυτεύτηκαν οι αντίστοιχες φυτικές σειρές, καθώς και φυτά αγρίου τύπου, έγινε εμβολιασμός όλων των φυτών με τον ΔΕΜ και τα φυτά μεγάλωσαν για πέντε εβδομάδες. Έγινε συγκομιδή τους, αποκοπή και συλλογή των ριζών, οι οποίες

βάφτηκαν με μελάνι για να υπολογιστεί ο αποικισμός των φυτών από τον ΔΕΜ με την χρήση μικροσκοπίου. Τα ποσοστά αποικισμού των φυτικών σειρών υπερέκφρασης και καταστολής του miR171c συγκρίθηκαν με τα αντίστοιχα ποσοστά αποικισμού των φυτών αγρίου τύπου και τα αποτελέσματα απεικονίζονται στην εικόνα 13. Τόσο στα φυτά αγρίου τύπου όσο και στα φυτά 171c\_KO καταμετρήθηκε ένα ποσοστό αποικισμού των ριζών από τον ΔΕΜ της τάξεως του 60-70%, ενώ στα φυτά 171c\_OX το αντίστοιχο ποσοστό αποικισμού ήταν μόλις στο 20%. Στατιστικώς σημαντικές διαφορές στον αποικισμό παρατηρήθηκαν μεταξύ των φυτών αγρίου τύπου (wild type, wt) και της φυτικής σειρά 171c\_OX ( $p=0,0011$ ), καθώς και μεταξύ των φυτικών σειρών 171c\_OX και 171c\_KO ( $p=0,0066$ ).

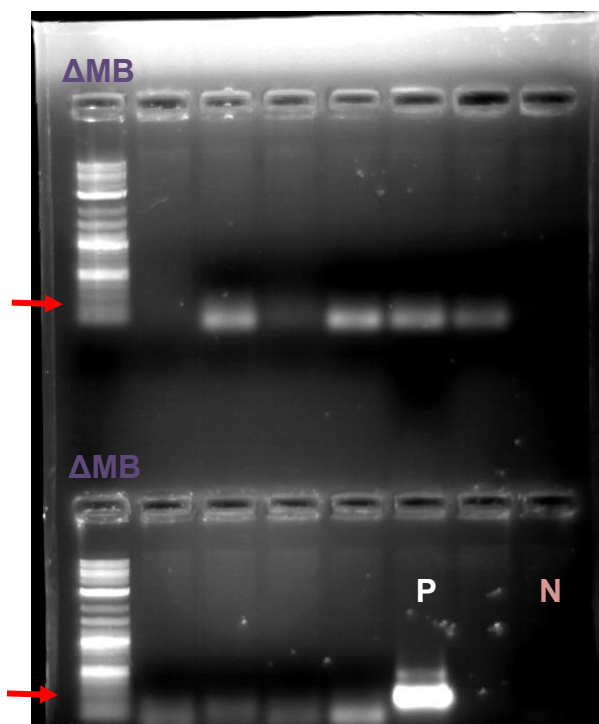


**Εικόνα 13:** Στο γράφημα απεικονίζεται το ποσοστό αποικισμού των φυτικών σειρών που εμβολιάστηκαν με τον ΔΕΜ *Rhizophagus irregularis*. Για την στατιστική ανάλυση πραγματοποιήθηκε unpaired t-test. \* $p<0.05$  (wt=5, 171cKO=4, 171cOX=3 βιολογικές επαναλήψεις)

### 3.3 Μοριακός έλεγχος του αποικισμού των φυτικών σειρών 171C\_KO και 171C\_OX, από ενδομυκορριζικό μύκητα

Για την περαιτέρω διερεύνηση του ρόλου του γονιδίου *MIR171c* στην συμβίωση με ΔΕΜ φυτεύτηκαν φυτικές σειρές υπερέκφρασης και καταστολής του *MIR171c* με σκοπό τη μοριακή ανάλυση των φαινοτύπων. Ύστερα από εμβολιασμό όλων των φυτών με ΔΕΜ και τέσσερις εβδομάδες ανάπτυξης πραγματοποιήθηκε

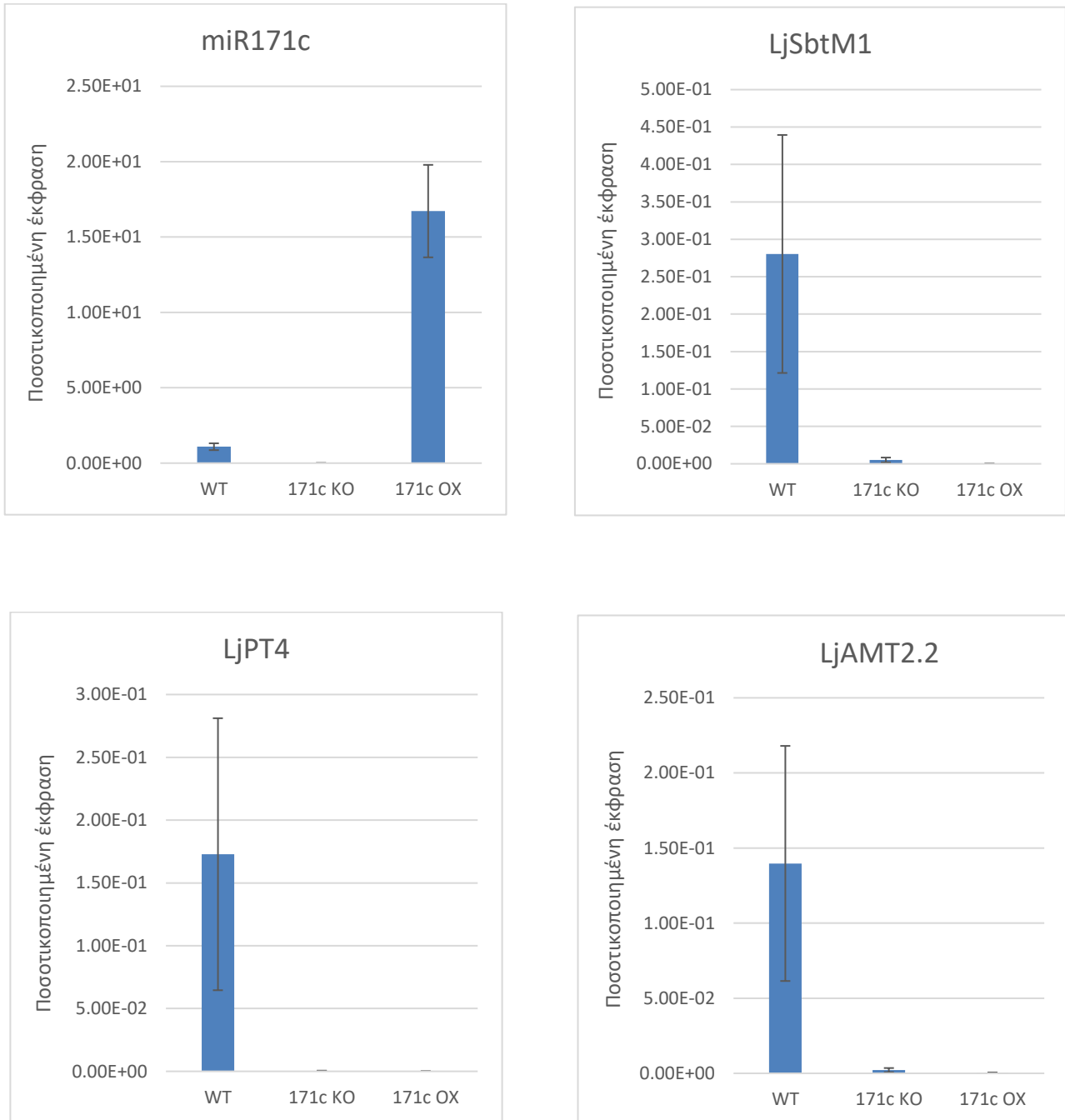
απομόνωση ολικού RNA από τις ρίζες (Παράρτημα 1), απομάκρυνση του γονιδιωματικού DNA, σύνθεση cDNA και τέλος qPCR για να υπολογιστούν τα επίπεδα έκφρασης γονιδίων δεικτών της μυκορριζικής συμβίωσης. Στην εικόνα 14 απεικονίζεται η ηλεκτροφόρηση των προϊόντων PCR μετά την αντίδραση DNάσης για τον έλεγχο απομάκρυνσης του γονιδιωματικού DNA από τα δείγματα RNA. Στα δείγματα όπου δεν είχε απομακρυνθεί το γονιδιωματικό DNA πραγματοποιήθηκε ξανά αντίδραση DNάσης.



**Εικόνα 14:** Ηλεκτροφόρηση προϊόντων PCR σε πηκτή αγαρόζης 1% μετά την αντίδραση DNάσης για να επιβεβαιωθεί η απομάκρυνση του γονιδιωματικού DNA από δείγματα RNA. Ενδεικτικά τα δείγματα της εικόνα προέρχονται από φυτικές σειρές αγρίου τύπου, καθώς και καταστολής του *MIR171c*. Με κόκκινα βέλη υποδεικνύεται η αναμενόμενη ζώνη ενίσχυσης του ενδογενούς γονιδίου της ουβικιτίνης. ΔMB: Δείκτης μοριακών βαρών

Ακολούθησαν οι αντιδράσεις ποσοτικής PCR (qPCR) για τον έλεγχο των επιπέδων του miR171c καθώς και της έκφρασης των γονιδίων δεικτών της μυκορριζικής συμβίωσης *SbtM1*, *AMT2.2* και *PT4*. Τα αποτελέσματα παρουσιάζονται στην εικόνα 15. Αρχικά ελέγχθηκαν τα επίπεδα του miR171c για να επιβεβαιωθεί η υπερέκφραση ή η καταστολή του *MIR171c* στις αντίστοιχες φυτικές σειρές υπερέκφρασης και καταστολής. Στη συνέχεια ελέγχθηκαν τα επίπεδα των τριών γονιδίων δεικτών. Η έκφραση όλων των γονιδίων-δεικτών

της μυκορριζικής συμβίωσης εμφανίζεται μειωμένη στις φυτικές σειρές miR171c\_OX και miR171c\_KO σε σχέση με τα φυτά αγρίου τύπου (εικόνα 15), που σημαίνει πως τα φυτά υπερέκφρασης και καταστολής του miR171c δεν αποικίστηκαν από τον ΔΕΜ το ίδιο καλά με τα φυτά αγρίου τύπου.



**Εικόνα 15:** Απεικονίζονται τα επίπεδα έκφρασης των γονιδίων-δεικτών της μυκορριζικής συμβίωσης *PT4*, *AMT2.2* και *SbtM1* καθώς και τα επίπεδα συσσώρευσης του miR171c σε εμβολιασμένες με ΔΕΜ φυτικές σειρές αγρίου τύπου, αλλά και φυτικές σειρές υπερέκφρασης και καταστολής του *MIR171c*. (Φυτά wt=5, φυτά MIR171c\_KO=4, φυτά MIR171c\_OX=4 βιολογικές επαναλήψεις)

## 4. Συζήτηση

Η πλειοψηφία των χερσαίων φυτών έχει την ικανότητα να συμβιώνει, με μικροοργανισμούς του εδάφους, με σκοπό την πρόσληψη θρεπτικών συστατικών. Οι δύο πιο διαδεδομένες συμβιωτικές σχέσεις μεταξύ φυτών και μικροοργανισμών, είναι αυτές που αναπτύσσονται μεταξύ των ψυχανθών φυτών και των ριζοβίων, και αυτές που αναπτύσσονται μεταξύ φυτών και δενδρόμορφων ενδομυκορριζικών μυκήτων (ΔΕΜ). Στο πρώτο είδος συμβιωτικής σχέσης τα ριζόβια παρέχουν στο φυτό άζωτο, ενώ στο δεύτερο είδος συμβίωσης οι μύκητες βοηθούν στη θρέψη του φυτού παρέχοντας του κυρίως ανόργανο φώσφορο αλλά και άλλα θρεπτικά στοιχεία και νερό. Σε αντάλλαγμα το φυτό τροφοδοτεί τους μικροοργανισμούς με προϊόντα της φωτοσύνθεσης, δηλαδή με μια πηγή άνθρακα (Adeleke et al., 2019).

Για να ξεκινήσει η εγκαθίδρυση και των δύο αυτών συμβιωτικών σχέσεων, τόσο τα φυτά, όσο και οι μικροοργανισμοί εκκρίνουν μόρια που αναγνωρίζονται και από τους δύο οργανισμούς για να ξεκινήσει η συμβίωση. Η αναγνώριση αυτών των μορίων από το φυτό, δηλαδή η πρόσδεση τους σε κατάλληλους μεμβρανικούς υποδοχείς ξεκινάει ένα καθοδικό σηματοδοτικό μονοπάτι που περιλαμβάνει αρκετά κοινά στοιχεία, είτε πρόκειται για συμβίωση με ριζόβια, είτε πρόκειται για συμβίωση με ΔΕΜ και ονομάζεται «κοινό συμβιωτικό μονοπάτι». Μερικά κοινά στοιχεία είναι η δημιουργία ταλαντώσεων ασβεστίου στα κύτταρα, και η έκφραση γονιδίων που κωδικοποιούν για μεταγραφικούς παράγοντες απαραίτητους για την συμβίωση, μεταξύ των οποίων εντοπίζεται και ο μεταγραφικός παράγοντας NSP2 (Oldroyd, 2013) που μελετήθηκε στην παρούσα εργασία. Ο βαθμός αποικισμού του φυτού, αλλά και η διατήρηση της συμβίωσης υπόκεινται σε έλεγχο από μηχανισμούς του φυτού που περιλαμβάνουν έναν μεγάλο αριθμό μορίων, μεταξύ των οποίων εντοπίζονται και μικρά RNA (MicroRNAs, miRNAs) (Song et al, 2019).

Προηγούμενη μελέτη που εστίασε στην διερεύνηση του ρόλου ενός miRNA και συγκεκριμένα του miR171h στο φυτό *Medicago truncatula*, έδειξε πως η υπερ-συσσώρευση του miR171h στη ρίζα του φυτού, επιδρά αρνητικά στη συμβίωση του φυτού τόσο με ριζόβια όσο και με ΔΕΜ, καθώς παρατηρήθηκε μείωση της

φυματογένεσης και του αποικισμού των ριζών από τον μύκητα, και επιπλέον επηρεάστηκε αρνητικά η έκφραση κάποιων γονιδίων-δεικτών της μυκορριζικής συμβίωσης (Lauressergues et al., 2012). Το πρότυπο συσσώρευσης του miR171h ήταν αντιστρόφως ανάλογο με τα επίπεδα των μεταγράφων του NSP2 μεταγραφικού παράγοντα καθιστώντας έτσι το NSP2 πιθανό στόχο του (Lauressergues et al., 2012).

Στα πλαίσια της συγκεκριμένης εργασίας πραγματοποιήθηκαν πειράματα που εστίαζαν στην διερεύνηση του ρόλου του miR171c στο ψυχανθές φυτό-μοντέλο *Lotus japonicus*, που είναι το ομόλογο του miR171h του *M. truncatula*, και συγκεκριμένα ελέγχθηκε αν το miR171c επηρεάζει τον αποικισμό των φυτών από τον ΔΕΜ *Rhizophagus irregularis*.

Αρχικά μελετήθηκε η απόκριση του miR171c σε πρώιμα στάδια της συμβίωσης του φυτού με τον μύκητα, δηλαδή σε φυτά που εμβολιάστηκαν με τον ΔΕΜ *Rhizophagus irregularis* και αναπτύχθηκαν για 2 εβδομάδες. Ανάλυση με ποσοτική PCR πραγματικού χρόνου (qPCR) έδειξε ότι τα επίπεδα του ώριμου miR171c, ήταν σημαντικά μειωμένα, κατά 2,8 φορές, στα εμβολιασμένα φυτά σε σχέση με τα μη-εμβολιασμένα φυτά (εικόνα 11). Η σημαντική μείωση στα επίπεδα του miR171c φαίνεται να συμβαίνει μόνο στα πρώιμα στάδια της μυκορριζικής συμβίωσης (στις 2 εβδομάδες), καθώς δεν παρατηρήθηκε αντίστοιχη σημαντική μείωση σε μεταγενέστερο στάδιο της μυκορριζικής συμβίωσης, δηλαδή σε φυτά που εμβολιάστηκαν με ΔΕΜ και αναπτύχθηκαν για 4 εβδομάδες (εικόνα 12). Στο φυτό *M. truncatula*, όπου είχε μελετηθεί η έκφραση του pre-miR171h σε προχωρημένα στάδια της μυκορριζικής συμβίωσης, από 5 ως 12 εβδομάδες, παρατηρήθηκε αυξημένη έκφραση σε εμβολιασμένα με ΔΕΜ φυτά σε σύγκριση με μη-εμβολιασμένα (Lauressergues et al., 2012). Επομένως, είναι πιθανό πως η συσσώρευση του miR171c διαφέρει στα διαφορετικά στάδια της μυκορριζικής συμβίωσης. Στην παρούσα εργασία, η αλλαγή που παρατηρήθηκε στα επίπεδα του miR171c μεταξύ εμβολιασμένων και μη-εμβολιασμένων φυτών, δεν συνοδεύτηκε από μια αντίστοιχη αλλαγή στα επίπεδα έκφρασης του NSP2 (εικόνα 11), επομένως, είναι πιθανό το NSP2 να μην αποτελεί γονίδιο-στόχο του miR171c στο φυτό *L. japonicus*.



Έπειτα ελέγχθηκε ο αποικισμός από ΔΕΜ φυτικών σειρών υπερέκφρασης και καταστολής του *MIR171c* (που δημιουργήθηκαν στα πλαίσια παλαιότερης εργασίας), μετά από χρώση των ριζών για την παρατήρηση των θυσσάνων στο μικροσκόπιο. Τα φυτά στα οποία είχε γίνει καταστολή του γονιδίου *MIR171c* (*MIR171c\_KO*) δεν παρουσίασαν καμία διαφορά στα επίπεδα αποικισμού από ΔΕΜ σε σχέση με τα φυτά αγρίου τύπου, ενώ τα φυτά υπερέκφρασης του *MIR171c* (*MIR171c\_OX*) παρουσίασαν στατιστικώς σημαντική μείωση στον αποικισμό ( $p=0,0011$ ) συγκριτικά με τα φυτά αγρίου τύπου, υποδεικνύοντας ότι υπερσυσσώρευση του miR171c στις ρίζες ίσως να έχει αρνητικά αποτελέσματα στον αποικισμό από τον ΔΕΜ. Το αποτέλεσμα αυτό έρχεται σε συμφωνία με τα αποτελέσματα που αναφέρθηκαν για το φυτό *M. truncatula*, όπου σε ρίζες που είχε υπερεκφραστεί το pri-miR171h είχε παρατηρηθεί σημαντικά μειωμένος αποικισμός από τον ΔΕΜ *R. irregularis*, σε σχέση με ρίζες που είχαν μετασχηματιστεί με τον «άδειο» φορέα (Hofferek et al., 2014).

Ακολούθησε ο μοριακός έλεγχος του αποικισμού των φυτικών σειρών 171C\_KO και 171C\_OX από ενδομυκορριζικό μύκητα, με ποσοτική PCR πραγματικού χρόνου, που αποτελεί μια πιο ευαίσθητη μέθοδο για τη μελέτη του αποικισμού των ριζών από ΔΕΜ σε σχέση με τη μικροσκοπία. Για τον σκοπό αυτό μελετήθηκαν τα επίπεδα έκφρασης γονιδίων δεικτών της μυκορριζικής συμβίωσης και συγκεκριμένα του *PT4* που κωδικοποιεί για έναν μεταφορέα φωσφόρου στην φυτική μεμβράνη που διαχωρίζει τον μύκητα από το φυτικό κυτταρόπλασμα (Harrison et al., 2002), του *SbtM1* που κωδικοποιεί για μια πρωτεάση σερίνης η οποία εμπλέκεται στην ανάπτυξη των θυσσάνων (Takeda et al., 2009), και του *AMT2.2* που κωδικοποιεί για έναν μεταφορέα αμμωνίου (Guether et al., 2009). Αρχικά ελέγχθηκαν τα επίπεδα συσσώρευσης του miR171c και επιβεβαιώθηκε ότι πρόκειται για φυτικές σειρές υπερέκφρασης και καταστολής του *MIR171c* καθώς τα επίπεδα του miR171c ήταν σημαντικά αυξημένα και μειωμένα, αντίστοιχα (εικόνα 15). Τα γονίδια-δείκτες της μυκορριζικής συμβίωσης τόσο στα φυτά υπερέκφρασης, όσο και στα φυτά καταστολής του *MIR171c* παρουσίασαν μειωμένη έκφραση σε σχέση με τα φυτά αγρίου τύπου (εικόνα 15). Ο μοριακός έλεγχος είναι συμπληρωματικός του φαινοτυπικού ελέγχου με μικροσκοπία και στην περίπτωση της φυτικής σειράς 171C\_OX η μειωμένη έκφραση των γονιδίων-δεικτών επιβεβαιώνει τον μειωμένο

αποικισμό που υπολογίστηκε από την παρατήρηση στο μικροσκόπιο. Στην φυτική σειρά 171C\_KO, που δεν παρατηρήθηκε μείωση του αποικισμού από την παρατήρηση στο μικροσκόπιο (εικόνα 13), ο μοριακός έλεγχος έδειξε μειωμένη έκφραση των γονιδίων-δεικτών (εικόνα 15). Είναι πιθανό, η μειωμένη έκφραση των γονιδίων-δεικτών στα φυτά 171C\_KO να είναι τυχαία, καθώς στο συγκεκριμένο πείραμα παρατηρήθηκε μεγάλη διακύμανση των τιμών στις διαφορετικές βιολογικές επαναλήψεις των φυτών αγρίου-τύπου. Εναλλακτικά, είναι πιθανό, οι θύσανοι που δημιουργήθηκαν και καταμετρήθηκαν στο μικροσκόπιο να μην είναι λειτουργικοί και να στερούνται απαραίτητους μεταφορείς θρεπτικών όπως οι PT4 και AMT2.2.

Συνολικά φαίνεται πως το miR171c του *L. japonicus* (όπως και το miR171h του *M. truncatula*) εμπλέκεται στη συμβίωση των φυτών με δενδρόμορφους ενδομυκορριζικούς μύκητες. Σύμφωνα με τα αποτελέσματα της παρούσας εργασίας που αφορούν το φυτό *L. japonicus*, και δημοσιευμένα αποτελέσματα από παρόμοιες μελέτες στο φυτό *M. truncatula*, το μόριο αυτό φαίνεται να έχει ένα ιδιαίτερο πρότυπο συσσώρευσης στην συμβίωση με ΔΕΜ, όπου η συσσώρευσή του εμφανίζεται μειωμένη σε πρώιμα στάδια της συμβίωσης και αυξημένη σε προχωρημένα. Τα αποτελέσματα της παρούσας εργασίας δεν μπορούν να συνδέσουν τη συσσώρευση του miR171c με την έκφραση του γονιδίου *NSP2*, επομένως είναι πιθανό πως στο φυτό *L. japonicus* κάποιο άλλο γονίδιο αποτελεί στόχο του miR171c. Περαιτέρω μελλοντικές αναλύσεις με τις φυτικές σειρές υπερέκφρασης και καταστολής του *MIR171c* είναι απαραίτητες για να διευκρινιστεί ο ρόλος του miR171c στη συμβιωτική σχέση του *L. japonicus* με ενδομυκορριζικούς μύκητες.

## Παράρτημα 1: Συγκέντρωση και καθαρότητα των δειγμάτων RNA

### Φυτά δύο εβδομάδων

Δείγμα	Συγκέντρωση (ng/μL)	Καθαρότητα ( $A_{260}/A_{280}$ )
Control 1	31	2,46
Control 2	26,1	2,55
Control 3	21,6	1,79
Control 4	20,3	2,88
Control 5	33,3	2,13
ΔΕΜ 1	70,9	1,94
ΔΕΜ 2	77,3	1,72
ΔΕΜ 3	41,2	2,18
ΔΕΜ 4	153,6	1,56
ΔΕΜ 5	80,7	1,7
ΔΕΜ 6	83,1	1,66
ΔΕΜ 7	160,7	1,66
ΔΕΜ 8	109,2	1,54
ΔΕΜ 9	106,5	1,65
ΔΕΜ 10	107,1	1,7

### Φυτά τεσσάρων εβδομάδων (wt, 171c\_KO, 171c\_OX)

Δείγμα	Συγκέντρωση (ng/μL)	Καθαρότητα ( $A_{260}/A_{280}$ )
wt 1	55,2	1,94
wt 2	100,5	1,56
wt 3	130,3	1,6
wt4	112,1	1,57
wt5	81,2	1,61
171c_KO 1	71,4	1,81
171c_KO 2	90,1	1,75
171c_KO 3	46,1	1,75
171c_KO 4	71,9	1,57
171c_OX 1	28,2	1,63
171c_OX 2	75,2	1,48
171c_OX 3	109,2	1,50
171c_OX 4	81,3	1,45

## Παράρτημα 2: Αλληλουχίες εκκινητών

Γονίδιο	Εκκινητής	Αλληλουχία	Πηγή
<i>LjUBQ</i>	Πρόσθιος	5'ATGCAGATCTTTTGTGAAGAC3'	(Delis κ.ά., 2011)
	Ανάστροφος	5'ACCACCACGGAAGACGGAG3'	
<i>LjPP2</i>	Πρόσθιος	5'CAATGTCGCCAAGGCCCATGGTG3'	Tsikou et al., 2018
	Ανάστροφος	5'AACACCACTCTCGATCATTCTCTG3'	
<i>LjATP</i>	Πρόσθιος	5'GTAATGCGTCTAAAGATAGGGTCC3'	Tsikou et al., 2018
	Ανάστροφος	5'ACTAGACTGTAGTGCTTGAGAGGC3'	
<i>LjSbtM1</i>	Πρόσθιος	5'CAGGTGAACCAGAAGGTTGCATAC3'	Rasmussen et al., 2016
	Ανάστροφος	5'AGCAGCACCCCTCTCTATCTTCATGC3'	
<i>LjAMT2.2</i>	Πρόσθιος	5'ACACATGCTTGCACTGCTACC3'	Guether et al., 2009
	Ανάστροφος	5'CTGCCCATCCTTGAACAACCC3'	
<i>LjPT4</i>	Πρόσθιος	5'CCAGAACCTCACACAGAAAGACATC3'	(Rasmussen κ.ά., 2016)
	Ανάστροφος	5'AACACGGTGAACCAGTACCCTGG3'	
<i>LjMIR171c</i>	Πρόσθιος	5'GGTGGCTGAGCCGAATCAATATC3'	Tsikou et al., 2018
	Ανάστροφος (Universal)	5'AGTGCAGGGTCCGAGGTATTTC3'	
<i>LjNSP2</i>	Πρόσθιος	5'GGAGGAGCTGGGTAGTAATAAG3'	
	Ανάστροφος	5'GAGATCTGAAGCGATTTAACAGC3'	
<i>LjMIR171c</i>	<i>Stemloop</i>	5'GTCGTATCCAGTGCAGGGTCCGAGGTATTGCACTGGATACGACGAGTGA3'	

### Παράρτημα 3: Εταιρείες αντιδραστηρίων

<b>Υλικά/αντιδραστήρια</b>	<b>Εταιρεία</b>
Trizol LS	Ambion
EDTA	Invitrogen
Εμβόλιο DAOM	Agronutrition
Διθειοθρεϊτόλη (DTT)	Invitrogen
LiCl	ROTH
Tris-HCl	AppliChem
LIDS	SIGMA Aldrich
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
Δείκτης μοριακών βαρών (Ladder)	Quick Load®

## Βιβλιογραφία

- Adeleke, R. A., Nunthkumar, B., Roopnarain, A., & Obi, L. (2019). Applications of Plant–Microbe Interactions in Agro-Ecosystems. Στο V. Kumar, R. Prasad, M. Kumar, & D. K. Choudhary (Επιμ.), *Microbiome in Plant Health and Disease: Challenges and Opportunities* (σσ. 1–34). Springer. [https://doi.org/10.1007/978-981-13-8495-0\\_1](https://doi.org/10.1007/978-981-13-8495-0_1)
- Coba de la Peña, T., Fedorova, E., Pueyo, J. J., & Lucas, M. M. (2018). The Symbiosome: Legume and Rhizobia Co-evolution toward a Nitrogen-Fixing Organelle? *Frontiers in Plant Science*, 8.  
<https://www.frontiersin.org/articles/10.3389/fpls.2017.02229>
- Delis, C., Krokida, A., Georgiou, S., Peña-Rodríguez, L. M., Kavroulakis, N., Ioannou, E., Roussis, V., Osbourn, A. E., & Papadopoulou, K. K. (2011). Role of lupeol synthase in *Lotus japonicus* nodule formation. *The New Phytologist*, 189(1), 335–346.  
<https://doi.org/10.1111/j.1469-8137.2010.03463.x>
- Genre, A., Chabaud, M., Faccio, A., Barker, D. G., & Bonfante, P. (2008). Prepenetration apparatus assembly precedes and predicts the colonization patterns of arbuscular mycorrhizal fungi within the root cortex of both *Medicago truncatula* and *Daucus carota*. *The Plant Cell*, 20(5), 1407–1420.  
<https://doi.org/10.1105/tpc.108.059014>
- Guether, M., Neuhäuser, B., Balestrini, R., Dynowski, M., Ludewig, U., & Bonfante, P. (2009). A mycorrhizal-specific ammonium transporter from *Lotus japonicus* acquires nitrogen released by arbuscular mycorrhizal fungi. *Plant Physiology*, 150(1), 73–83.  
<https://doi.org/10.1104/pp.109.136390>
- Haag, A. F., Arnold, M. F. F., Myka, K. K., Kerscher, B., Dall’Angelo, S., Zanda, M., Mergaert, P., & Ferguson, G. P. (2013). Molecular insights into bacteroid development during *Rhizobium*-legume symbiosis. *FEMS Microbiology Reviews*, 37(3), 364–383.  
<https://doi.org/10.1111/1574-6976.12003>
- Harrison, M. J., Dewbre, G. R., & Liu, J. (2002). A phosphate transporter from *Medicago truncatula* involved in the acquisition of phosphate released by arbuscular mycorrhizal fungi. *The Plant Cell*, 14(10), 2413–2429. <https://doi.org/10.1105/tpc.004861>
- He, J., Zhang, C., Dai, H., Liu, H., Zhang, X., Yang, J., Chen, X., Zhu, Y., Wang, D., Qi, X., Li, W., Wang, Z., An, G., Yu, N., He, Z., Wang, Y.-F., Xiao, Y., Zhang, P., & Wang, E. (2019). A LysM Receptor Heteromer Mediates Perception of Arbuscular Mycorrhizal Symbiotic Signal in Rice. *Molecular Plant*, 12(12), 1561–1576.  
<https://doi.org/10.1016/j.molp.2019.10.015>
- Hirsch, S., & Oldroyd, G. E. D. (2009). GRAS-domain transcription factors that regulate plant development. *Plant Signaling & Behavior*, 4(8), 698–700.  
<https://doi.org/10.4161/psb.4.8.9176>
- Hofferek, V., Mendrinna, A., Gaude, N., Krajinski, F., & Devers, E. A. (2014). MiR171h restricts root symbioses and shows like its target NSP2 a complex transcriptional

regulation in *Medicago truncatula*. *BMC Plant Biology*, *14*, 199.  
<https://doi.org/10.1186/s12870-014-0199-1>

Jiang, Y., Xie, Q., Wang, W., Yang, J., Zhang, X., Yu, N., Zhou, Y., & Wang, E. (2018). *Medicago* AP2-Domain Transcription Factor WRI5a Is a Master Regulator of Lipid Biosynthesis and Transfer during Mycorrhizal Symbiosis. *Molecular Plant*, *11*(11), 1344–1359. <https://doi.org/10.1016/j.molp.2018.09.006>

Karas, B. J., Ross, L., Novero, M., Amyot, L., Shrestha, A., Inada, S., Nakano, M., Sakai, T., Bonetta, D., Sato, S., Murray, J. D., Bonfante, P., & Szczyglowski, K. (2021). Intragenic complementation at the *Lotus japonicus* CELLULOSE SYNTHASE-LIKE D1 locus rescues root hair defects. *Plant Physiology*, *186*(4), 2037–2050.  
<https://doi.org/10.1093/plphys/kiab204>

Keymer, A., Pimprakar, P., Wewer, V., Huber, C., Brands, M., Bucerius, S. L., Delaux, P.-M., Klingl, V., von Röpenack-Lahaye, E., Wang, T. L., Eisenreich, W., Dörmann, P., Parniske, M., & Gutjahr, C. (χ.χ.). Lipid transfer from plants to arbuscular mycorrhiza fungi. *eLife*, *6*, e29107. <https://doi.org/10.7554/eLife.29107>

Lelandais-Brière, C., Moreau, J., Hartmann, C., & Crespi, M. (2016). Noncoding RNAs, Emerging Regulators in Root Endosymbioses. *Molecular Plant-Microbe Interactions*®, *29*(3), 170–180. <https://doi.org/10.1094/MPMI-10-15-0240-FI>

Liu, W., Kohlen, W., Lillo, A., Op den Camp, R., Ivanov, S., Hartog, M., Limpens, E., Jamil, M., Smaczniak, C., Kaufmann, K., Yang, W.-C., Hooiveld, G. J. E. J., Charnikhova, T., Bouwmeester, H. J., Bisseling, T., & Geurts, R. (2011). Strigolactone biosynthesis in *Medicago truncatula* and rice requires the symbiotic GRAS-type transcription factors NSP1 and NSP2. *The Plant Cell*, *23*(10), 3853–3865.  
<https://doi.org/10.1105/tpc.111.089771>

MacLean, A. M., Bravo, A., & Harrison, M. J. (2017a). Plant Signaling and Metabolic Pathways Enabling Arbuscular Mycorrhizal Symbiosis. *The Plant Cell*, *29*(10), 2319–2335. <https://doi.org/10.1105/tpc.17.00555>

MacLean, A. M., Bravo, A., & Harrison, M. J. (2017b). Plant Signaling and Metabolic Pathways Enabling Arbuscular Mycorrhizal Symbiosis. *The Plant Cell*, *29*(10), 2319–2335. <https://doi.org/10.1105/tpc.17.00555>

Masson-Boivin, C., & Sachs, J. L. (2018). Symbiotic nitrogen fixation by rhizobia—the roots of a success story. *Current Opinion in Plant Biology*, *44*, 7–15.  
<https://doi.org/10.1016/j.pbi.2017.12.001>

Müller, L. M., Flokova, K., Schnabel, E., Sun, X., Fei, Z., Frugoli, J., Bouwmeester, H. J., & Harrison, M. J. (2019). A CLE-SUNN module regulates strigolactone content and fungal colonization in arbuscular mycorrhiza. *Nature Plants*, *5*(9), 933–939.  
<https://doi.org/10.1038/s41477-019-0501-1>

Murray, J. D., Muni, R. R. D., Torres-Jerez, I., Tang, Y., Allen, S., Andriankaja, M., Li, G., Laxmi, A., Cheng, X., Wen, J., Vaughan, D., Schultze, M., Sun, J., Charpentier, M., Oldroyd, G., Tadege, M., Ratet, P., Mysore, K. S., Chen, R., & Udvardi, M. K. (2011). Vapyrin, a gene essential for intracellular progression of arbuscular mycorrhizal

- symbiosis, is also essential for infection by rhizobia in the nodule symbiosis of *Medicago truncatula*. *The Plant Journal: For Cell and Molecular Biology*, 65(2), 244–252. <https://doi.org/10.1111/j.1365-313X.2010.04415.x>
- 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 Physiology*, 50(1), 67–77. <https://doi.org/10.1093/pcp/pcn194>
- Oldroyd, G. E. D. (2013). Speak, friend, and enter: Signalling systems that promote beneficial symbiotic associations in plants. *Nature Reviews. Microbiology*, 11(4), 252–263. <https://doi.org/10.1038/nrmicro2990>
- Oldroyd, G. E. D., & Downie, J. A. (2008). Coordinating nodule morphogenesis with rhizobial infection in legumes. *Annual Review of Plant Biology*, 59, 519–546. <https://doi.org/10.1146/annurev.arplant.59.032607.092839>
- Parniske, M. (2008). Arbuscular mycorrhiza: The mother of plant root endosymbioses. *Nature Reviews. Microbiology*, 6(10), 763–775. <https://doi.org/10.1038/nrmicro1987>
- Prell, J., White, J. P., Bourdes, A., Bunnewell, S., Bongaerts, R. J., & Poole, P. S. (2009). Legumes regulate *Rhizobium* bacteroid development and persistence by the supply of branched-chain amino acids. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 106(30), 12477–12482. <https://doi.org/10.1073/pnas.0903653106>
- Ramakers, C., Ruijter, J. M., Deprez, R. H. L., & Moorman, A. F. M. (2003). Assumption-free analysis of quantitative real-time polymerase chain reaction (PCR) data. *Neuroscience Letters*, 339(1), 62–66. [https://doi.org/10.1016/s0304-3940\(02\)01423-4](https://doi.org/10.1016/s0304-3940(02)01423-4)
- Rasmussen, S. R., 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. *Scientific Reports*, 6, 29733. <https://doi.org/10.1038/srep29733>
- Reid, D. E., Ferguson, B. J., & Gresshoff, P. M. (2011). Inoculation- and nitrate-induced CLE peptides of soybean control NARK-dependent nodule formation. *Molecular Plant-Microbe Interactions: MPMI*, 24(5), 606–618. <https://doi.org/10.1094/MPMI-09-10-0207>
- Sato, S., Nakamura, Y., Kaneko, T., Asamizu, E., Kato, T., Nakao, M., Sasamoto, S., Watanabe, A., Ono, A., Kawashima, K., Fujishiro, T., Katoh, M., Kohara, M., Kishida, Y., Minami, C., Nakayama, S., Nakazaki, N., Shimizu, Y., Shinpo, S., ... Tabata, S. (2008). Genome structure of the legume, *Lotus japonicus*. *DNA Research: An International Journal for Rapid Publication of Reports on Genes and Genomes*, 15(4), 227–239. <https://doi.org/10.1093/dnares/dsn008>
- Schmutz, J., Cannon, S. B., Schlueter, J., Ma, J., Mitros, T., Nelson, W., Hyten, D. L., Song, Q., Thelen, J. J., Cheng, J., Xu, D., Hellsten, U., May, G. D., Yu, Y., Sakurai, T., Umezawa, T., Bhattacharyya, M. K., Sandhu, D., Valliyodan, B., ... Jackson, S. A. (2010). Genome sequence of the palaeopolyploid soybean. *Nature*, 463(7278), 178–183. <https://doi.org/10.1038/nature08670>



- Shachar-Hill, Y., Pfeffer, P. E., Douds, D., Osman, S. F., Doner, L. W., & Ratcliffe, R. G. (1995). Partitioning of Intermediary Carbon Metabolism in Vesicular-Arbuscular Mycorrhizal Leek. *Plant Physiology*, *108*(1), 7–15. <https://doi.org/10.1104/pp.108.1.7>
- Song, X., Li, Y., Cao, X., & Qi, Y. (2019). MicroRNAs and Their Regulatory Roles in Plant-Environment Interactions. *Annual Review of Plant Biology*, *70*, 489–525. <https://doi.org/10.1146/annurev-arplant-050718-100334>
- Sweeney, C. J., Bottoms, M., Ellis, S., Ernst, G., Kimmel, S., Loutseti, S., Schimera, A., Carniel, L. S. C., Sharples, A., Staab, F., & Marx, M. T. (2022). Arbuscular Mycorrhizal Fungi and the Need for a Meaningful Regulatory Plant Protection Product Testing Strategy. *Environmental Toxicology and Chemistry*, *41*(8), 1808–1823. <https://doi.org/10.1002/etc.5400>
- 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 Physiology*, *54*(4), 433–447. <https://doi.org/10.1093/pcp/pct022>
- Takeda, N., Sato, S., Asamizu, E., Tabata, S., & Parniske, M. (2009). Apoplastic plant subtilases support arbuscular mycorrhiza development in *Lotus japonicus*. *The Plant Journal: For Cell and Molecular Biology*, *58*(5), 766–777. <https://doi.org/10.1111/j.1365-313X.2009.03824.x>
- Tian, W., Wang, C., Gao, Q., Li, L., & Luan, S. (2020). Calcium spikes, waves and oscillations in plant development and biotic interactions. *Nature Plants*, *6*(7), 750–759. <https://doi.org/10.1038/s41477-020-0667-6>
- Tsikou, D., Yan, Z., Holt, D. B., Abel, N. B., Reid, D. E., Madsen, L. H., Bhasin, H., Sexauer, M., Stougaard, J., & Markmann, K. (2018). Systemic control of legume susceptibility to rhizobial infection by a mobile microRNA. *Science (New York, N.Y.)*, *362*(6411), 233–236. <https://doi.org/10.1126/science.aat6907>
- van der Heijden, M. G. A., Martin, F. M., Selosse, M.-A., & Sanders, I. R. (2015). Mycorrhizal ecology and evolution: The past, the present, and the future. *New Phytologist*, *205*(4), 1406–1423. <https://doi.org/10.1111/nph.13288>
- Wang, C., Reid, J. B., & Foo, E. (2018). The Art of Self-Control—Autoregulation of Plant-Microbe Symbioses. *Frontiers in Plant Science*, *9*, 988. <https://doi.org/10.3389/fpls.2018.00988>
- Wang, E., Schornack, S., Marsh, J. F., Gobbato, E., Schwessinger, B., Eastmond, P., Schultze, M., Kamoun, S., & Oldroyd, G. E. D. (2012). A common signaling process that promotes mycorrhizal and oomycete colonization of plants. *Current Biology: CB*, *22*(23), 2242–2246. <https://doi.org/10.1016/j.cub.2012.09.043>
- Wipf, D., Krajinski, F., van Tuinen, D., Recorbet, G., & Courty, P.-E. (2019). Trading on the arbuscular mycorrhiza market: From arbuscules to common mycorrhizal networks. *New Phytologist*, *223*(3), 1127–1142. <https://doi.org/10.1111/nph.15775>

Young, N. D., Debellé, F., Oldroyd, G. E. D., Geurts, R., Cannon, S. B., Udvardi, M. K., Benedito, V. A., Mayer, K. F. X., Gouzy, J., Schoof, H., Van de Peer, Y., Proost, S., Cook, D. R., Meyers, B. C., Spannagl, M., Cheung, F., De Mita, S., Krishnakumar, V., Gundlach, H., ... Roe, B. A. (2011). The Medicago genome provides insight into the evolution of rhizobial symbioses. *Nature*, 480(7378), 520–524.  
<https://doi.org/10.1038/nature10625>