

**ΠΑΝΕΠΙΣΤΗΜΙΟ ΘΕΣΣΑΛΙΑΣ
ΠΡΟΓΡΑΜΜΑ ΜΕΤΑΠΤΥΧΙΑΚΩΝ ΣΠΟΥΔΩΝ
ΤΟΥ ΤΜΗΜΑΤΟΣ
ΒΙΟΧΗΜΕΙΑΣ ΚΑΙ ΒΙΟΤΕΧΝΟΛΟΓΙΑΣ**

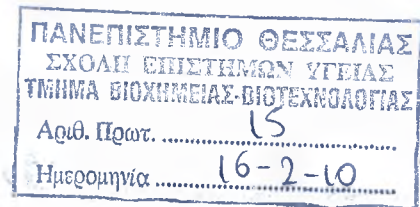
**«ΒΙΟΤΕΧΝΟΛΟΓΙΑ – ΠΟΙΟΤΗΤΑ ΔΙΑΤΡΟΦΗΣ &
ΠΕΡΙΒΑΛΛΟΝΤΟΣ»**

ΠΟΥΛΙΟΣ ΣΩΚΡΑΤΗΣ

**ΑΛΛΗΛΕΠΙΔΡΑΣΗ ΔΕΝΔΡΟΜΟΡΦΩΝ ΜΥΚΟΡΡΙΖΙΚΩΝ
ΣΤΕΛΕΧΩΝ ΜΕ ΤΟΝ ΕΝΔΟΣΥΜΒΙΩΤΙΚΟ ΜΥΚΗΤΑ
Fusarium solani ΣΤΕΛΕΧΟΣ F_sK ΣΕ ΡΙΖΕΣ ΤΟΜΑΤΑΣ**

**ΕΠΙΒΛΕΠΩΝ ΚΑΘΗΓΗΤΡΙΑ
ΠΑΠΑΔΟΠΟΥΛΟΥ ΚΑΛΛΙΟΠΗ**

**ΛΑΡΙΣΑ
2010**



**ΑΛΛΗΛΕΠΙΔΡΑΣΗ ΔΕΝΔΡΟΜΟΡΦΩΝ ΜΥΚΟΡΡΙΖΙΚΩΝ ΣΤΕΛΕΧΩΝ ΜΕ
ΤΟΝ ΕΝΔΟΣΥΜΒΙΩΤΙΚΟ ΜΥΚΗΤΑ *Fusarium solani* ΣΤΕΛΕΧΟΣ Fsk ΣΕ
ΡΙΖΕΣ ΤΟΜΑΤΑΣ**



ΠΑΝΕΠΙΣΤΗΜΙΟ ΘΕΣΣΑΛΙΑΣ
ΥΠΗΡΕΣΙΑ ΒΙΒΛΙΟΘΗΚΗΣ & ΠΛΗΡΟΦΟΡΗΣΗΣ
ΕΙΔΙΚΗ ΣΥΛΛΟΓΗ «ΓΚΡΙΖΑ ΒΙΒΛΙΟΓΡΑΦΙΑ»

Αριθ. Εισ.: 8106/1

Ημερ. Εισ.: 08-03-2010

Δωρεά: _____

Ταξιθετικός Κωδικός: Δ

579.5

ΠΟΥ

ΠΑΝΕΠΙΣΤΗΜΙΟ
ΘΕΣΣΑΛΙΑΣ



004000087134

ΤΡΙΜΕΛΗΣ ΕΞΕΤΑΣΤΙΚΗ ΕΠΙΤΡΟΠΗ

Παπαδοπούλου Καλλιόπη

Επίκουρος Καθηγήτρια Βιοτεχνολογίας Φυτών

Τμήμα Βιοχημείας και Βιοτεχνολογίας, Πανεπιστήμιο Θεσσαλίας

Καρπούζας Δημήτριος

Λέκτορας Βιοτεχνολογίας Αποικοδομητικών Μικροοργανισμών

Τμήμα Βιοχημείας και Βιοτεχνολογίας, Πανεπιστήμιο Θεσσαλίας

Ουγαλιώτης Κωνσταντίνος

Επίκουρος Καθηγητής του τμήματος Αξιοποίησης Φυσικών Πόρων
και Γεωργικής Μηχανική

Γεωπονικό Πανεπιστήμιο Αθηνών

ΕΥΧΑΡΙΣΤΙΕΣ

Καταρχήν θα ήθελα να εκφράσω τις θερμές ευχαριστίες μου στην Επίκουρο καθηγήτρια του τμήματος Βιοχημείας και Βιοτεχνολογίας του Πανεπιστημίου Θεσσαλίας, κ. Καλλιόπη Παπαδοπούλου για την πολύτιμη παροχή επιστημονικής γνώσης καθώς για την ανεκτίμητη και πολύπλευρη συμβολή της στην εκπόνηση αυτής της εργασίας.

Επίσης θα ήθελα να ευχαριστήσω θερμά την μεταπτυχιακή φοιτήτρια και συνάδελφο Δάφνη Γεωργιάδου για την άψογη συνεργασία της και την αμέριστη βοήθεια που μου προσέφερε για την ολοκλήρωση του πειράματος καθώς και την στήριξη της στην δημιουργία της εργασίας

Τις ιδιαίτερες ευχαριστίες μου απευθύνω στον Μεταδιδακτορικό ερευνητή Γιάννη Υψηλάντη για την καθοδήγηση και τις πολύτιμες ερευνητικές συμβουλές του, καθώς και ένα μεγάλο ευχαριστώ στην υποψήφια Διδάκτωρ Γιάννα Μύρτζιου και στον προπτυχιακό φοιτητή Γκαραγκούνη Κωνσταντίνο για την σημαντική βοήθεια που μου προσέφεραν.

Τέλος ευχαριστώ την οικογένεια μου διότι χωρίς αυτούς δεν θα μπορούσα να ολοκληρώσω την μεταπτυχιακή μου εκπαίδευση. Ιδιαίτερα την αρραβωνιαστικιά μου Γεωργία για την αμέριστη συμπαράσταση της αυτά τα δύο χρόνια.

ΠΕΡΙΕΧΟΜΕΝΑ	Σελ
ΠΕΡΙΛΗΨΗ	6
A. ΕΙΣΑΓΩΓΗ	7
1. ΓΕΝΙΚΑ ΠΕΡΙ ΜΥΚΗΤΩΝ	8
1.1. ΑΝΤΑΓΩΝΙΣΤΙΚΟΙ ΜΥΚΗΤΕΣ – ΜΗ ΠΑΘΟΓΟΝΑ ΣΤΕΛΕΧΗ	12
1.1.1. <i>Trichoderma spp</i>	12
1.1.2. <i>Pythium oligandrum</i>	14
1.1.3. <i>Piriformospora indica</i>	14
1.1.4. <i>Fusarium oxysporum</i>	15
1.1.5. <i>Fusarium solani K</i>	16
2. ΓΕΝΙΚΑ ΠΕΡΙ ΜΥΚΟΡΡΙΖΩΝ	17
2.1. Ο ΡΟΛΟΣ ΤΩΝ ΜΥΚΟΡΡΙΖΩΝ	17
2.2. ΤΥΠΟΙ ΜΥΚΟΡΡΙΖΩΝ	19
2.2.1. Εκτομυκκόριζες	19
2.2.2. Ενδομυκκόριζες	20
2.2.3. Δενδροειδείς Μυκόριζες	20
2.3. ΔΟΜΗ ΚΑΙ ΣΤΑΔΙΑ ΑΝΑΠΤΥΞΗΣ	22
2.3.1. Υφές του Εδάφους	22
2.3.2. Επαφή και Διείσδυση Ρίζας	23
2.3.3. Πολλαπλασιασμός των Υφών στο Φλοιό	23
2.3.3.1. Arbuscules	24
2.3.3.2. Κύστεις	24
2.3.3.3. Σπόρια	25
2.4. Ο ΡΟΛΟΣ ΤΩΝ ΔΕΝΔΡΟΕΙΔΩΝ ΜΥΚΟΡΡΙΖΩΝ	26
2.4.1. Πρόσληψη Φωσφόρου	26
2.4.2. Άλλες Ωφέλειες Δενδροειδών Μυκορριζών	27
2.4.3. Ο Δενδροειδής Μύκητας <i>Glomus intraradices</i>	28
3. ΑΛΛΗΛΕΠΙΔΡΑΣΕΙΣ ΜΥΚΗΤΩΝ	29
ΣΚΟΠΟΣ ΤΗΣ ΕΡΓΑΣΙΑΣ	34
B. ΜΕΘΟΔΟΙ ΚΑΙ ΥΛΙΚΑ	35
1. ΠΕΙΡΑΜΑΤΙΚΟΣ ΣΧΕΔΙΑΣΜΟΣ	36
1.1. ΦΥΤΙΚΟ ΥΛΙΚΟ ΚΑΙ ΧΕΙΡΙΣΜΟΙ ΠΡΙΝ ΤΗ ΣΠΟΡΑ ΠΡΟΕΤΟΙΜΑΣΙΑ ΕΔΑΦΙΚΟΥ ΥΠΟΣΤΡΩΜΑΤΟΣ	36

1.2. ΘΡΕΠΤΙΚΟ ΥΛΙΚΟ ΑΝΑΠΤΥΞΗΣ ΤΟΥ ΜΥΚΗΤΑ	38
1.3. ΚΑΛΛΙΕΡΓΕΙΑ ΚΑΙ ΣΥΝΘΗΚΕΣ ΑΝΑΠΤΥΞΗΣ ΜΥΚΗΤΩΝ	38
1.4. ΕΦΑΡΜΟΓΗ ΕΜΒΟΛΙΑΣΜΟΥ ΤΩΝ ΦΥΤΩΝ ΜΕ ΤΟ ΜΕΤΑΣΧΗΜΑΤΙΣΜΕΝΟ ΣΤΕΛΕΧΟΣ ΤΟΥ <i>Fusarium solani</i> K- <i>gfp</i> ΚΑΙ ΜΕ ΤΟ ΜΥΚΟΡΡΙΖΙΚΟ ΜΥΚΗΤΑ <i>Glomus intraradices</i>	39
2. ΔΕΙΓΜΑΤΟΛΗΨΙΑ- ΕΞΕΤΑΣΗ ΔΕΙΓΜΑΤΩΝ	40
2.1. ΔΕΙΓΜΑΤΟΛΗΨΙΑ ΚΑΙ ΠΡΟΕΤΟΙΜΑΣΙΑ ΓΙΑ ΜΙΚΡΟΣΚΟΠΙΚΗ ΠΑΡΑΤΗΡΗΣΗ ΤΟΥ FSK	40
2.2. ΔΕΙΓΜΑΤΟΛΗΨΙΑ ΚΑΙ ΜΕΛΕΤΗ ΒΑΘΜΟΥ ΑΠΟΙΚΙΣΜΟΥ ΤΟΥ ΜΥΚΟΡΡΙΖΙΚΟΥ ΜΥΚΗΤΑ	40
2.3. ΜΕΛΕΤΗ ΤΟΥ ΒΑΘΜΟΥ ΑΠΟΙΚΙΣΜΟΥ ΤΟΥ FSK ΜΕΣΩ ΤΗΣ ΔΙΑΔΙΚΑΣΙΑΣ REAL TIME PCR	41
2.3.1. Διαδικασία Δειγματοληψίας και Εξαγωγής DNA	41
2.3.2. Προσδιορισμός Συγκέντρωσης και Καθαρότητας του DNA	41
2.3.3. Ενίσχυση Ακολουθιών DNA με τη Χρήση της Τεχνικής PCR (Real Time PCR)	42
2.3.4. Επιλογή των Εκκινητών	43
2.3.5. Αντίδραση της qRT-PCR	43
Γ. ΑΠΟΤΕΛΕΣΜΑΤΑ – ΣΥΖΗΤΗΣΗ	45
1. ΑΠΟΤΕΛΕΣΜΑΤΑ	46
1.1. ΑΠΟΤΕΛΕΣΜΑΤΑ 1^{ου} ΠΕΙΡΑΜΑΤΟΣ	46
1.1.1. Μικροσκοπία Φθορισμού	46
1.1.2. Μελέτη του Βαθμού Αποικισμού του <i>FsK</i> Μέσω της Διαδικασίας Real Time PCR	48
1.1.3. Μελέτη Βαθμού Αποικισμού του Μυκορριζικού Μύκητα	50
1.2. ΑΠΟΤΕΛΕΣΜΑΤΑ 2^{ου} ΠΕΙΡΑΜΑΤΟΣ	52
1.2.1. Μικροσκοπία Φθορισμού	52
1.2.2. Μελέτη του Βαθμού Αποικισμού του <i>FsK</i> Μέσω της Διαδικασίας Real Time PCR	54
1.2.3. Μελέτη Βαθμού Αποικισμού του Μυκορριζικού Μύκητα	55
2. ΣΥΖΗΤΗΣΗ	56
ΒΙΒΛΙΟΓΡΑΦΙΑ	60

ΠΕΡΙΛΗΨΗ

Η κοινή επιφάνεια ανάμεσα στο έδαφος και τις ρίζες ή εναλλακτικά ο χώρος που περιβάλλει τις ρίζες και επηρεάζεται από αυτές είναι η ριζόσφαιρα. Ένας χώρος υψηλών μικροβιακών πληθυσμών, έντονης μικροβιολογικής δραστηριότητας και ταχύτατων αλλαγών. Οι μικροοργανισμοί που βρίσκονται στη ριζόσφαιρα βασίζουν την ύπαρξη τους κατά κόρον στον ανταγωνισμό για την διάθεση τροφής, με σημαντικές επιδράσεις στην ανάπτυξη και παραγωγή των φυτών, στην ανακύκλωση των θρεπτικών στοιχείων και την διαθεσιμότητα τους στα φυτά.

Εκτός από τον ανταγωνισμό των μικροοργανισμών, στη ριζόσφαιρα έχει παρατηρηθεί και το φαινόμενο της αλληλεπίδρασης των διαφόρων μικροοργανισμών που έχει σαν αποτέλεσμα πολλές φορές την προστασία του φυτού έναντι άλλων παθογόνων. Μελέτες έχουν δείξει ότι μη παθογόνα στελέχη καθώς και μύκητες που δημιουργούν συμβιωτική σχέση με τα φυτά (μυκόρριζες), ανεξάρτητα από την μεμονωμένη δράση τους, όταν βρεθούν στο ίδιο περιβάλλον με ανταγωνιστή ή συμβιώτη τότε παρατηρείται διαφορετική εξέλιξη στην ανάπτυξη των φυτών. Η εξέλιξη αυτή ποικίλλει ανάλογα τους μικροοργανισμούς που συμμετέχουν. Η αποτελεσματικότητα της συνδυασμένης δράσης μυκορριζικών και ωφέλιμων ανταγωνιστικών μυκήτων προϋποθέτει την ομαλή αλληλεπίδρασή τους εντός του φυτικού οργανισμού.

Ένα ενδοφυτικό στέλεχος μύκητα, *Fusarium solani* στέλεχος *FsK*, είναι ικανό να ενισχύει την αύξηση της βιομάζας των φυτών και να επάγει αμυντικούς μηχανισμούς ενάντια των παθογόνων του ριζικού συστήματος και του φυλλώματος φυτών τομάτας (Kavroulakis κ.α. 2007 και μη δημοσιευμένα αποτελέσματα). Η ομόχρονη ανάπτυξη του στο ριζικό σύστημα φυτών τομάτας με έναν δενδροειδή μυκορριζικό μύκητα του γένους *Glomus*, ικανού να βελτιώνει τη θρεπτική και υδατική κατάσταση του φυτού, ενδέχεται να επιδρά στην ικανότητα εξάπλωσης αμφοτέρων των μυκήτων

Σκοπός της παρούσας εργασίας είναι η μελέτη της επίδρασης δύο μυκήτων, ενός ενδοφυτικού (*Fusarium solani* στέλεχος *FsK-gfp*) και ενός μυκορριζικού (*Glomus intraradices*), στον αμοιβαίο αποικισμό του ριζικού συστήματος φυτών τομάτας καθώς και στην ανάπτυξη των διαφόρων μορφολογικών μυκορριζικών δομών.

A.
ΕΙΣΑΓΩΓΗ

1. ΓΕΝΙΚΑ ΠΕΡΙ ΜΥΚΗΤΩΝ

Οι μύκητες αποτελούν μια ομάδα μικροοργανισμών που η ύπαρξη τους στο πλανήτη γη χρονολογείται περίπου 400 εκατομμύρια χρόνια (www.jstor.org). Αποτελούν ένα είδος με μεγάλη ικανότητα προσαρμογής στο περιβάλλον και μπορούν, επιτελώντας διάφορες λειτουργίες και μηχανισμούς να εξασφαλίσουν τη διαβίωση (συνήθως εις βάρος κάποιου ξενιστή) καθώς και την αναπαραγωγή τους. Εκτός από τους παθογόνους και τους σαπροφυτικούς μύκητες, υπάρχουν και πολλοί φυτοπροστατευτικοί, αλλά η αναγνώριση τους και η σημασία τους για τα φυτά καθυστέρησε να γίνει αντιληπτή κυρίως λόγω της έμφασης που δόθηκε από τους ερευνητές προς τους παθογόνους. Τα τελευταία χρόνια όμως, το πεδίο για τους φυτοπροστατευτικούς μύκητες είναι πιο ενεργό με πολλές νέες ερευνητικές μελέτες (Benhamou N. et al, 2001 , Chandanie W.A et al, 2005).

Οι μύκητες είναι το τρίτο από τα πέντε βασίλεια του Whittacker και περιλαμβάνει 6 φύλα (Μαργαρίτης Λ.Χ). Επειδή όμως δεν φωτοσυνθέτουν κατατάσσονται στους ετερότροφους οργανισμούς και για να επιβιώσουν παρασιτούν σε ζωντανούς οργανισμούς ή σαπροφυτούν πάνω σε νεκρούς (π.χ. σάπιο ξύλο) απορροφώντας μόρια τροφής από τον ξενιστή ή το περιβάλλον (Μαργαρίτης Λ.Χ).

Οι μύκητες είναι μονοκύτταροι ή πολυκύτταροι οργανισμοί. Οι πολυκύτταροι αποτελούνται από νηματοειδείς μίσχους, που ονομάζονται υφές και τα συμπλέγματα των υφών σχηματίζουν τα μυκήλια, που πρακτικά αντιπροσωπεύουν το «σώμα» ενός μύκητα. Σε μερικούς από αυτούς, οι υφές δεν αποτελούνται από διακριτά μεταξύ τους κύτταρα, αλλά δημιουργούνται με αλληπάλληλες κυτταρικές διαιρέσεις. Τα κυτταρικά τοιχώματα των περισσότερων μυκήτων είναι κατασκευασμένα από χιτίνη ή υδατανθρακικές ενώσεις, ενώ σε ορισμένες περιπτώσεις, τα παχιά τοιχώματα των υφών και των σπόρων είναι προσαρμογές που τους επιτρέπουν να ζουν σε περιόδους ξηρασίας (Μαργαρίτης Λ.Χ).

Η αναπαραγωγή των μυκήτων είναι φυλετική ή αφυλετική. Η αφυλετική αναπαραγωγή γίνεται είτε με τη διαίρεση ενός μητρικού κυττάρου σε δύο θυγατρικά είτε με την εκβλάστηση βλαστικών κυττάρων. Επίσης, κοινός τρόπος αφυλετικής αναπαραγωγής είναι η αναπαραγωγή σπορίων διαμέσου της μίτωσης κατά την οποία στη συνέχεια ακολουθεί κυτταρική διαίρεση. Υπάρχουν πολλοί τύποι αφυλετικών σπορίων:

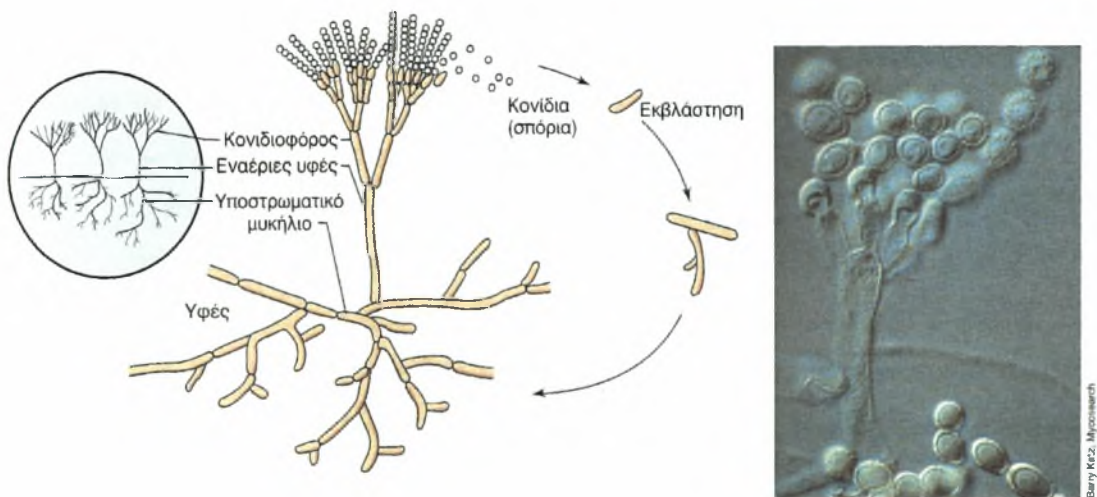
α) Οι υφές τεμαχίζονται και σχηματίζουν κύτταρα που συμπεριφέρονται ως σπόρια. Αυτά καλούνται αρθροκονίδια ή αρθροσπόρια

β) Τα κύτταρα περιβάλλονται από ένα παχύ τοίχωμα πριν το διαχωρισμό και καλούνται γλαμυδοσπόρια

γ) Τα σπόρια αναπτύσσονται εντός ενός σάκου που καλείται σποριάγγειο πάνω σε μια υφή που καλείται σποριοαγγειοφορέας .

δ) Οι υφές από το μυκήλιο αναπτύσσονται προς τα πάνω και παράγουν σπόρια που ονομάζονται κονίδια. Τα κονίδια είναι ανθεκτικά στην ξηρασία και η λειτουργία τους έγκειται στο να διασπείρουν τους μύκητες σε νέα ενδιατήματα

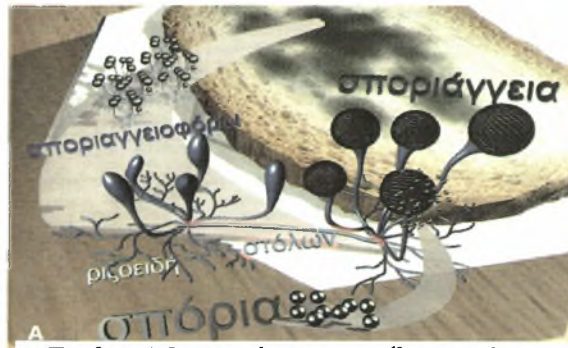
ε) Τέλος, τα σπόρια παράγονται από το βλαστικό μητρικό κύτταρο με εκβλάστηση και καλούνται βλαστοσπόρια (M.T. Madigan et al).



Εικόνα Α.1: Σχηματική αναπαράσταση δημιουργίας κονιδίων.
(Πηγή: Καραγκούνη – Κύρτσιου Α. 1999)

Κατά τη φυλετική αναπαραγωγή μερικοί μύκητες αυτοαναπαράγουν φυλετικά, γαμέτες στο ίδιο μυκήλιο, ενώ άλλα είδη μυκήτων απαιτούν διασταύρωση μεταξύ διαφορετικών φυλετικών μυκηλίων. Φυλετική σύντηξη μπορεί να συμβεί ανάμεσα σε απλοειδείς γαμέτες ή υφές. Μερικές φορές το κυτόπλασμα του απλοειδούς πυρήνα συντήκεται για την παραγωγή διπλοειδούς ζυγώτη. Συνήθως υπάρχει καθυστέρηση μεταξύ κυτοπλασματικής και πυρηνικής σύντηξης. Αποτέλεσμα είναι ένα δικαρυωτικό στάδιο κατά το οποίο τα κύτταρα περιέχουν δυο ξεχωριστούς απλοειδείς πυρήνες (Καραγκούνη – Κύρτσιου Α. 1999).

Μερικές φορές οι μύκητες κατά την φυλετική αναπαραγωγή αναπτύσσουν σπόρια τα οποία είναι πολύ σημαντικά για την επιβίωση τους. Το μέγεθος, το χρώμα, το σχήμα και ο αριθμός των σπορίων είναι χρήσιμα για την αναγνώριση των μυκητιακών ειδών. Συνήθως, τα



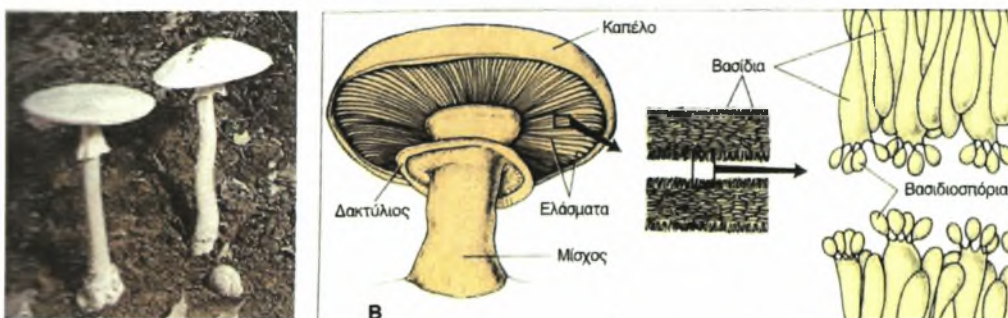
Εικόνα Α.2 σποριάγγελια των ζυγομυκήτων

(Πηγή: Μαργαρίτης Λ.Χ.)

σπόρια είναι μικρά και ελαφριά και μπορούν να αιωρούνται στον αέρα για μεγάλες χρονικές περιόδους. Αυτό εξηγεί τη μεγάλη διασπορά των μυκήτων στο περιβάλλον. Με βάση τη δομή των σπορίων που παράγουν, οι μύκητες κατατάσσονται σε ομάδες, μερικές από τις πιο γνωστές είναι, οι ζυγομύκητες, οι βασιδιομύκητες και οι ασκομύκητες. (Καραγκούνη – Κύρτσου Α. 1999)

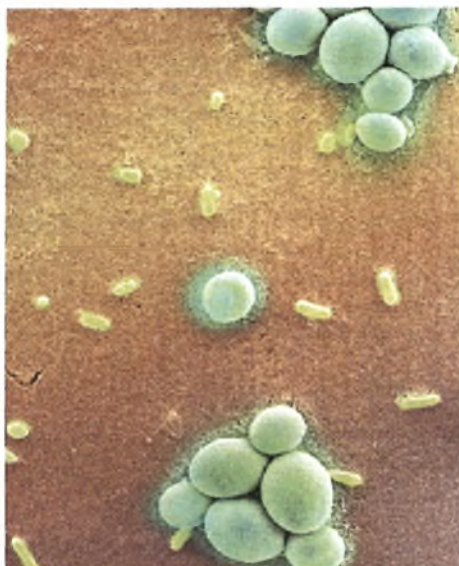
Οι ζυγομύκητες, (όπως η κοινή μούχλα του ψωμιού) χαρακτηρίζονται από τα σπόρια, που παράγονται από σποριάγγελια που βρίσκονται στα άκρα ορισμένων υφών. Οι υφές αυτές είτε αναπτύσσονται πάνω από την πηγή της τροφής, είτε παράλληλα προς την επιφάνεια, είτε εισχωρούν εντός της τροφής και ονομάζονται ριζοειδή. Τα ριζοειδή παίζουν σημαντικό ρόλο στη θρέψη του μύκητα διότι εισέρχονται στο υπόστρωμα και εκκρίνουν ένζυμα που διασπούν τα μόρια της τροφής σε απλούστερα. Στη συνέχεια αυτά τα μόρια απορροφούνται από τα ριζοειδή και από εκεί προωθούνται σε όλο το σώμα του μύκητα (Μαργαρίτης Λ.Χ.).

Οι βασιδιομύκητες, αποτελούν την ομάδα στην οποία ανήκουν τα κοινά μανιτάρια. Οι υφές τέτοιων μυκήτων δεν είναι εμφανείς, βρίσκονται μέσα στο θρεπτικό μέσο - χώμα, αλλά είναι εύκολα ορατό το αναπαραγωγικό μέρος του οργανισμού τους, το βασίδιο, το οποίο παράγει τα σπόρια μέσα σε ειδικές δομές και αποτελεί και το βρώσιμο τμήμα του μύκητα. Η θρέψη των βασιδιομυκήτων, όπως και στη μούχλα του ψωμιού, πραγματοποιείται μέσω συστήματος διακλαδιζόμενων υφών (Μαργαρίτης Λ.Χ.).



Εικόνα Α.3 Σχηματική αναπαράσταση του κοινού μανιταριού. Στο εσωτερικό του καπέλου εμφανίζονται τα βασίδια που παράγουν τα βασιδιοσπόρια. (Πηγή: Μαργαρίτης Λ.Χ.)

Στην τρίτη από τις βασικές κατηγορίες μυκήτων, τους ασκομύκητες, ανήκουν οι ζύμες (π.χ. ο ζυμομύκητας, *Saccharomyces cerevisiae*), όπως και μορφές που παρασιτούν σε φυτά με πιο γνωστό αντιπρόσωπο το γένος *Penicillium*. Ο ζυγώτης των οργανισμών αυτών, αναπτύσσεται σε μια δομή, που ονομάζεται ασκός, στο εσωτερικό του οποίου παράγονται τα σπόρια. Οι ζύμες είναι μονοκύτταροι μύκητες και ο κύκλος της ζωής τους περιλαμβάνει τόσο αμφιγονική όσο και μονογονική αναπαραγωγή.



Εικόνα Α.4: οι ζύμες ανήκουν στους ασκομύκητες (Πηγή: Μαργαρίτης Α.Χ.)

Οι ασκομύκητες, έχουν μεγάλη οικονομική σημασία στην βιομηχανία της αρτοποιίας, του κρασιού της μύρας κ.λ.π., αλλά είναι και πολύ σημαντικοί για την έρευνα που αποσκοπεί στην κατανόηση βασικών βιολογικών μηχανισμών, κυρίως λόγω του γεγονότος ότι αποτελούν απλές εκδοχές ευκαρυωτικών οργανισμών. Επίσης, ο ασκομύκητας *Penicillium* έχει ιδιαίτερη σημασία για τον άνθρωπο, όχι μόνο γιατί αποτελεί την πηγή παραγωγής της πενικιλίνης, αλλά και γιατί κάποια είδη του μύκητα αυτού χρησιμοποιούνται για την παραγωγή τυριών, όπου τα ένζυμα που παράγονται από την μούχλα δίνουν ένα χαρακτηριστικό άρωμα (Μαργαρίτης Α.Χ.).

Στους μύκητες, ανήκει το σημαντικότερο και πολυπληθέστερο άθροισμα φυτοπαθογόνων μικροοργανισμών. Περισσότερα από 8.000 είδη μυκήτων έχουν προσδιοριστεί ως φυτοπαθογόνα. Τα φυτά προσβάλλονται από διαφορετικά είδη μυκήτων. Ορισμένοι φυτοπαθογόνοι μύκητες μπορούν να προσβάλλουν πολλά είδη φυτών, άλλοι μόνο λίγα είδη, ενώ μερικοί, προσβάλλουν μόνο ένα είδος φυτού. Ως σαπρόφυτα, οι μύκητες μπορούν να συμβάλλουν μαζί με τα βακτήρια και άλλους μικροοργανισμούς στη χουμοποίηση και διατήρηση της γονιμότητας του εδάφους. Σχεδόν όλοι οι μύκητες έχουν την ικανότητα αποσύνθεσης πολύπλοκων οργανικών ουσιών, τις οποίες χρησιμοποιούν ως πηγές ενέργειας. Άλλοι παρασιτούν σε ανώτερα φυτά με την ατελή μορφή τους, π.χ *Fusicladium dendriticum* (Φουζικλάδιο μηλιάς) και ζουν σαπροφυτικά με την τέλεια μορφή τους π.χ *Venturia inaequalis* ως ασκομύκητας. (Μπεκρής Φ. 2009)

Η επιβίωση και ανάπτυξη των μυκήτων, εξαρτάται σε πολύ μεγάλο βαθμό από τις συνθήκες περιβάλλοντος, όπως την υγρασία, τη θερμοκρασία, τη διαθεσιμότητα τροφής, τα οποία αποτελούν παράγοντες που καθορίζουν τη δυνατότητα πρόσληψης των θρεπτικών στοιχείων. Πολλοί μύκητες κυρίως φυτοπαθογόνοι, μπορούν να αναστείλουν την φυτική ανάπτυξη. Επίσης αναστολή στην ανάπτυξη του φυτού μπορεί να συμβεί και από μη παθογόνους μύκητες, οι οποίοι κάτω από ορισμένες συνθήκες, έχουν την συμπεριφορά παθογόνων. Όμως, ο ρόλος των μυκήτων εκτός από επιζήμιος μπορεί να αποδειχθεί και ευεργετικός, διότι μπορούν να ενισχύουν την άμυνα του φυτού. Σύμφωνα με μελέτες, μύκητες του γένους *Trichoderma spp.* που παράγουν κυτταρίνη (cellulose) καθώς και ξυλανάσες μπορούν να επάγουν άμυνες στα φυτά (Rotblat et al, 2002). Πρόσφατα αποδείχτηκε ότι η hydrophobin-like elicitor Sml του φυτοπροστατευτικού μύκητα εδάφους *Trichoderma virens* επάγει διασυστηματική ανθεκτικότητα στο ρύζι (Djonovic et al, 2007). Φυτά ρυζιού με αποσιώπηση του Sml γονιδίου έδειξαν μειωμένη επαγωγή του φαινομένου, γεγονός που καταδεικνύει την σημαντικότητα του στη σηματοδότηση της άμυνας του ξενιστή.

1.1. ΑΝΤΑΓΩΝΙΣΤΙΚΟΙ ΜΥΚΗΤΕΣ – ΜΗ ΠΑΘΟΓΟΝΑ ΣΤΕΛΕΧΗ

Όπως φαίνεται, το έδαφος και ειδικά η ριζόσφαιρα αποτελεί πεδίο σκληρών αντιπαραθέσεων και υπέρμετρου ανταγωνισμού. Οι οργανισμοί που ζουν στη ριζόσφαιρα ανταγωνίζονται σχεδόν το σύνολο των άλλων οργανισμών. Για παράδειγμα, τα ακάρεα τρέφονται με μύκητες ενώ οι μύκητες και τα βακτήρια με την σειρά τους μπορούν να προσβάλουν ακάρεα. Επίσης, αλληλεπιδράσεις και ανταγωνισμός υπάρχει και μεταξύ ωφέλιμων μικροοργανισμών. Βακτήρια που συγκαταλέγονται στους ανταγωνιστές, ανταγωνίζονται μεταξύ τους ή ακόμα και με άλλους μύκητες καθώς και οι μύκητες που συγκαταλέγονται στους ανταγωνιστές, ανταγωνίζονται μεταξύ τους ή με άλλους μικροοργανισμούς. Μερικούς από τους πιο σημαντικούς ανταγωνιστικούς μύκητες είναι:

1.1.1. *Trichoderma spp.*

Το γένος *Trichoderma* περιλαμβάνει είδη μη μολυσματικών συμβιωτών των ανώτερων φυτών, είδη που παρασιτούν σε άλλους μύκητες και είδη που είναι περιστασιακά παθογόνα. Αποτελούν το πιο συχνά απομονωμένο γένος μυκήτων από

το έδαφος και οι περισσότεροι, από τα ανταγωνιστικά στελέχη, αναπαράγονται αγενώς.

Μελέτες δείχνουν, πως η δράση των μυκήτων του γένους *Trichoderma* κατά των παθογόνων μυκήτων μπορεί να εμπλέκει έμμεσους μηχανισμούς που μοιάζουν στην επίκτητη διασυστηματική ανθεκτικότητα και την επαγόμενη από ριζοβακτήρια διασυστηματική αντοχή. Το 1997, ο Bigirimana et al, έδειξε πως η εφαρμογή του στελέχους *Trichoderma harzianum* T-39 στο έδαφος οδήγησε στην αντίσταση των φύλλων του φασολιού στην ασθένεια που προκαλούν οι μύκητες *B. cinerea* και *C. lindemuthianum*.



Εικόνα Α.5.

Ο μύκητας *Trichoderma harzianum*

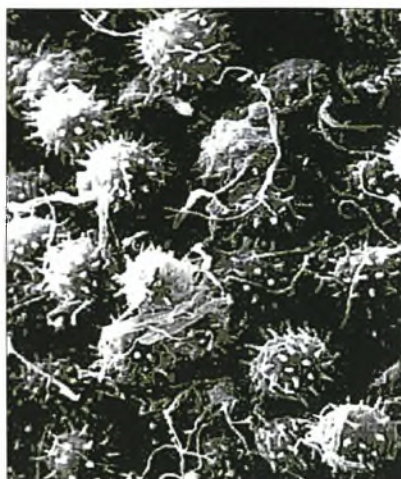
Πηγή: www.mycology.adelaide.edu.au/.../Trichoderma/

Παράλληλα, σύμφωνα με μελέτες, υπάρχουν τρεις κατηγορίες μορίων που παράγονται από τα είδη *Trichoderma*, όπως πρωτεΐνες με ενζυματική δράση που διεγείρουν τη βιοσύνθεση αιθυλενίου (Fuchs et al. 1989), πρωτεΐνες που δραστηριοποιούν τους μηχανισμούς αντοχής και αφορούν κυρίως την αντίδραση υπερευαισθησίας (Woo et al. 2003), καθώς και διάφορα ολιγοσακχαρίδια που λειτουργούν ως διεγέρτες (elicitors) και επάγουν μηχανισμούς αντοχής στα φυτά (Kubicek et al. 2001). Ακόμη, υπάρχουν μύκητες που παρασιτούν σε άλλους παθογόνους μύκητες και παράγοντας ένζυμα αποικοδομούν το κυτταρικό του τοίχωμα, θανατώνοντάς τα.

Τέλος εκτός της προστατευτικής του δράσης, ο αποικισμός του ριζικού συστήματος από είδη αυτού του γένους, συχνά ενισχύει την ανάπτυξη των ριζών, την παραγωγικότητα της καλλιέργειας, την αντοχή στην αβιοτική καταπόνηση και την πρόσληψη θρεπτικών στοιχείων.

1.1.2. *Pythium oligandrum*

Το είδος *Pythium oligandrum* αφορά έναν σαπροφυτικό ωομύκητα που αποτελεί συγχρόνως και παράσιτο πολλών άλλων μυκήτων οι οποίοι ανήκουν κυρίως στα γένη *Botrytis*, *Fusarium* και *Phytophthora*. Για να τραφεί, χρησιμοποιεί το περιεχόμενο των υφών του φυτού στις οποίες και διεισδύει, και τα εκκρίματα των ριζών στις οποίες προσκολλάται. Αναφέρεται πως η παραγωγή κυτταρινολυτικών ενζύμων από το μύκητα αυτό είναι τόσο αυξημένη που είναι ικανή να αποδιοργανώσει το πλέον ενισχυμένο με κυτταρίνη



Εικόνα Α.6 Σπόρια του ωομύκητα *Pythium oligandrum*

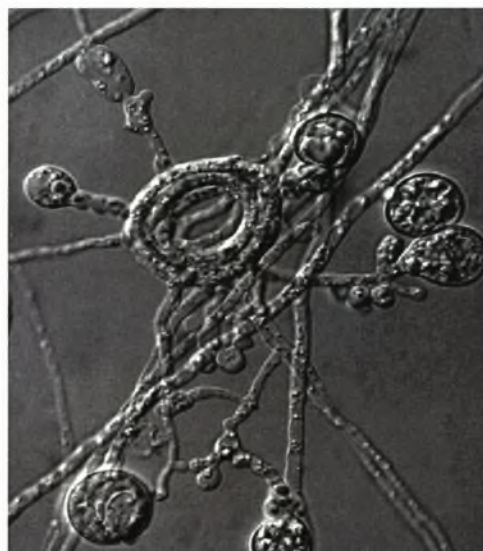
Πηγή: www.radio.cz/en/article/56186

κυτταρικό τοίχωμα του παθογόνου *Phytophthora parasitica* κατά την προσπάθεια διείσδυσής του στο κυτόπλασμα του ξενιστή του (Picard *et al.* 2000).

Ο ανταγωνιστικός αυτός μύκητας προάγει την ανάπτυξη των φυτών, μέσω του άμεσου ελέγχου που ασκεί στην περιοχή της ριζόσφαιρας ή και με έμμεσο τρόπο επάγοντας μηχανισμούς διασυστηματικής προστασίας των φυτών. Οι Le Floch *et al.* το 2003, διαπίστωσαν ότι το είδος αυτό, είναι ικανό να μεταβολίζει παράγωγα της ινδόλης, όπως τρυπτοφάνη και ινδολο-3-ακεταλδεΐδη για να συνθέσει μια τρυπταμίνη (TNH₂) μέσω του βιοσυνθετικού μονοπατιού της τρυπταμίνης. Η απορρόφηση αυτής της ουσίας, που φέρει ομοιότητες με την αυξίνη, από τις ρίζες των φυτών, σε κατάλληλες συγκεντρώσεις συσχετίστηκε με την αυξημένη ανάπτυξη των φυτών.

1.1.3. *Piriformospora indica*

Ο *Piriformospora indica*, μπορεί να αναπτυχθεί σε αμιγείς καλλιέργειες και φέρει παρόμοια λειτουργικά και φυσιολογικά χαρακτηριστικά με τους μύκητες που αναπτύσσουν δενδροειδείς μυκόρριζες, όπως είναι η μεταφορά θρεπτικών στοιχείων και νερού μέσω των υφών στις ρίζες των φυτών (Singh *et al.* 2000, Varma *et al.* 1999).



Εικόνα Α.7: Μικροφωτογραφία μικροσκοπίου του *Piriformospora indica*

Πηγή: www.amity.edu/AIMS/Research.htm

Επίσης, έχει διαπιστωθεί ότι ο εμβολιασμός φυτών μεγάλης καλλιέργειας με το μύκητα αυτό, όπως ο καπνός και το καλαμπόκι, προκάλεσε αύξηση της βιομάζας τους κατά 50% (Varma *et al.*, 1999). Φαίνεται πως η αυξητική δράση που ασκεί ο μύκητας οφείλεται στην ικανότητά του να διαλυτοποιεί και να μεταφέρει φωσφορικά ιόντα (Sudha *et al.* 1998, Varma *et al.* 2001).

Επιπλέον, η έρευνα πάνω σε δύο φαρμακευτικά φυτά, το *Spilanthes calva* και το *Withania somnifera* έδειξε αυξημένη ανάπτυξη της ολικής βιομάζας, αυξημένο αριθμό ανθοταξιών και σπερμάτων και βελτιωμένη αντοχή σε συνθήκες ξηρασίας (Rai *et al.* 2001).

Οι Peškan-Berghöfer *et al.*, το 2004, μελέτησαν μια διαφορετική πτυχή του μύκητα όσον αφορά την αλληλεπίδραση του με φυτά τα οποία δεν αναπτύσσουν μυκορριζικές σχέσεις, όπως το *Arabidopsis thaliana* και πως αυτό το γεγονός προάγει την ανάπτυξή τους. Η προσέγγισή τους ήταν να μελετήσουν τα πεπτίδια που παράγονται ως απόκριση στη συνύπαρξη φυτού και μύκητα και σχετίζονται με την αυξημένη ανάπτυξη του φυτού. Επίσης, ανιχνεύτηκε μια τροποποιημένη μορφή της β-γλυκοσιδάσης PYK 10, της πιο άφθονης πρωτεΐνης των ριζών, που σχετίζεται με την αυξημένη αντοχή σε συνθήκες καταπόνησης. Τέλος, η αυξημένη σύνθεση της συνθετάσης της μεθειονίνης, υποδεικνύει την εμπλοκή του μύκητα στη βιοσύνθεση του αιθυλενίου και των πολυαμινών καθώς η S-αδενοσυλ-μεθειονίνη που παράγεται από το ένζυμο αυτό παίζει σημαντικό ρόλο στη βιοσύνθεση αυτών των μορίων.

1.1.4. *Fusarium oxysporum*

Τα περισσότερα στελέχη του *Fusarium oxysporum* έχουν παθογόνο δράση. Εντούτοις έχει ανακαλυφθεί ένα μη παθογόνο στέλεχος το Fo 47 το οποίο δρα ενάντια σε ασθένειες που προκαλούνται από φουσάρια και αποδίδεται κυρίως στον ανταγωνισμό τους για θρεπτικά στοιχεία (Fuchs *et al.* 1997, Duijff *et al.* 1998).



Εικόνα Α.8 Ο μύκητας *Fusarium oxysporum*
Πηγή: www.doctorfungus.org/.../Fusarium_oxysporum.htm

Ο εμβολιασμός ριζών φασολιού με το στέλεχος αυτό περιορίσε την ανάπτυξη του παθογόνου μύκητα *Fusarium oxysporum* f. sp. *pisi*, στην επιδερμίδα και τον εξωτερικό φλοιό της ρίζας (Benhamou and Garand, 2001). Ο αποικισμός της ρίζας

από το ανταγωνιστικό στέλεχος φουζαρίου προκάλεσε την απόθεση ενός αδιαπέραστου υλικού, που περικύκλωνε τις υφές του παθογόνου μύκητα και το οποίο συσσωρευόταν στα απρόσβλητα αγγεία του ξύλου. Το γεγονός αυτό μαρτυρά, ότι οι ρίζες του ξενιστή σηματοδοτήθηκαν ώστε να αντισταθούν στην εισβολή μέσω της άμεσης διέγερσης μιας αλληλουχίας μη εξειδικευμένων αμυντικών αντιδράσεων.

1.1.5. *Fusarium solani* K

Το 2005, οι Kanroulakis *et al.*, παρατήρησαν την ικανότητα ενός οργανικού φυτικού υποστρώματος προϊόν θερμόφιλης βιοαποικοδόμησης στέμφυλων οινοποιίας και στερεών αποβλήτων ελαιουργίας, να περιορίζει την εξάπλωση του παθογόνου μύκητα *Fusarium oxysporum* f.sp. *radicis-lycopersici* στις ρίζες φυτών τομάτας



Εικόνα Α.9. Μικροσκοπική φωτογραφία του μύκητα *Fusarium solani*

Πηγή:

www.gametec.com/.../mycoherbicides.html

σε σχέση με φυτά που είχαν αναπτυχθεί σε υπόστρωμα τύρφης. Δύο χρόνια αργότερα, το 2007, οι ίδιοι ερευνητές, με ημιεκλεκτικά υποστρώματα, απομόνωσαν ένα στέλεχος του γένους *Fusarium* από ρίζες φυτών τομάτας που είχαν αναπτυχθεί στο ίδιο κομποστοποιημένο υλικό αναμεμιγμένο με τύρφη. Το στέλεχος αυτό που αναφέρεται ως *Fusarium solani* K (Fs-K) ήταν ικανό να επάγει διασυστηματική ανθεκτικότητα (ISR) ενάντια στον παθογόνο μύκητα *Septoria lycopersici* που προσβάλλει τα φύλλα της τομάτας και δρα ανταγωνιστικά ως προς τον παθογόνο μύκητα του εδάφους *Fusarium oxysporum* f.sp. *radicis-lycopersici* (FORL).

Είναι πιθανό, ο μύκητας *FsK* να αποτελεί ένα στέλεχος το οποίο ανταγωνίζεται το παθογόνο FORL διεκδικώντας το ίδιο διαθέσιμο υπόστρωμα. Ίσως πάλι να ασκεί επίδραση στη βιωσιμότητα του παθογόνου και την ικανότητα βλάστησης των σπορίων του εξαιτίας της σύνθεσης μυκητοκτόνων ενώσεων.

Ο μύκητας *FsK* είναι ικανός να διεισδύει στις ρίζες του φυτού και να αναπτύσσεται στο φλοιό της ρίζας 15 ημέρες μετά τον εμβολιασμό του όπως και να εισχωρεί στους ηθμαγγειώδεις σωλήνες διαβιώντας ως ενδόφυτο. Η ικανότητα αποικισμού των ηθμαγγειωδών σωλήνων ωστόσο, είναι κάτι που χαρακτηρίζει τους μύκητες που αποτελούν παθογόνα των ριζών και για το λόγο αυτό, η δυνατότητα ενός

ωφέλιμου στελέχους να αναπτύσσεται άφθονα και χωρίς να προκαλεί συμπτώματα ασθένειας στο φυτό δηλώνει μια ασυνήθιστη αλληλεπίδραση μεταξύ μικροβίου και φυτού.

2. ΓΕΝΙΚΑ ΠΕΡΙ ΜΥΚΟΡΡΙΖΩΝ

Ο όρος μυκόρριζα διατυπώθηκε για πρώτη φορά από τον Γερμανό Βοτανικό Frank το 1885 και χαρακτηρίζει μια συμβίωση μεταξύ φυτών και μυκήτων. Ο όρος "μυκόρριζα" χρησιμοποιείται για να περιγράψει τις ιδιαίτερα αλληλοεξαρτώμενες σχέσεις, στις οποίες σε γενικές γραμμές ο μύκητας παρέχει στα φυτά – ξενιστές, ανόργανα συστατικά (π.χ. φώσφορο, άζωτο) καθώς και πιο πολύπλοκες οργανικές ενώσεις που συνθέτει ο ίδιος (π.χ. φυτορμόνες) και σε αντάλλαγμα παίρνει από αυτά υδατάνθρακες (Harley & Smith, 1983). Στις συμβιώσεις αυτές, αλληλεπιδρούν τα φυτά - ξενιστές, οι συμβιωτικοί μύκητες και οι εδαφολογικοί παράγοντες. Ο μύκητας αποτελεί δηλαδή ένα είδος μεσάζοντα μεταξύ φυτού και εδάφους.

Ο σχηματισμός μυκορριζών είναι φαινόμενο πολύ διαδεδομένο σε όλες τις φυτοκοινότητες της γης και δημιουργείται στις ρίζες πάνω σε ποσοστό πάνω από τα δύο τρίτα των φυτικών ειδών (Fitter & Moyersoen 1996). Παλαιοντολογικά ευρήματα δείχνουν ότι μυκόρριζες σχημάτιζαν και τα πρώτα φυτικά είδη τα οποία εμφανίστηκαν στην γη. Τέλος, πολλά είδη αυτότροφων οργανισμών, που δεν σχηματίζουν ριζικά τριχίδια ή και ρίζες, μπορούν να υπάρχουν σε ορισμένες περιοχές λόγω της ικανότητας δημιουργίας μυκορριζών (Fitter 2005).

2.1. Ο ΡΟΛΟΣ ΤΩΝ ΜΥΚΟΡΡΙΖΩΝ

Οι μυκόρριζες τροφοδοτούν τα φυτά με ανόργανες ύλες από το έδαφος, οι οποίες σε διαφορετική περίπτωση δεν θα είχαν προσληφθεί. Οι υφές των μυκορριζικών μυκήτων έχουν τη δυνατότητα να αυξάνουν την απορροφητική επιφάνεια της ρίζας. Για παράδειγμα, οι Rousseau, Sylvia και Fox (1994) βρήκαν ότι παρόλο που οι εδαφικές υφές ήταν λιγότερες από το 20% της συνολικής μάζας της απορροφητικής επιφάνειας, συνεισφέρανε σχεδόν 80% στην απορροφητική επιφάνεια των νεαρών σπορόφυτων κωνοφόρων. Όμως, για να είναι η μυκόρριζα αποτελεσματική στην πρόσληψη θρεπτικών, οι υφές θα πρέπει να κατανέμονται πέρα από τη στερητική ζώνη θρεπτικών που δημιουργείται γύρω από τη ρίζα. Η στερητική ζώνη θρεπτικών αναπτύσσεται όταν τα θρεπτικά συστατικά αφαιρούνται από το εδαφικό διάλυμα

γρηγορότερα απ' ότι προστίθενται στο μέσο διάχυσης. Για ένα ιόν με μικρή κινητικότητα, όπως το φωσφορικό, μία οξεία και στενή στερητική ζώνη αναπτύσσεται γύρω και κοντά στη ρίζα. Οι υφές μπορούν να γεφυρώσουν αυτή τη στερητική ζώνη και να αναπτύσσονται σε έδαφος με ικανοποιητικά αποθέματα φωσφόρου.

Το δίκτυο των ιστών του μύκητα συγκρατεί με τέτοιο τρόπο το έδαφος, ώστε να εξασφαλίζεται περισσότερη υγρασία, ενώ εμποδίζει την διάβρωση του εδάφους και την ερημοποίηση του σε ξηρά κλίματα. Επίσης, στα οφέλη των μυκορριζών μπορούν να συμπεριληφθούν η αύξηση της παραγωγής καθώς και η βελτίωση της ικανότητας συσσώρευσης θρεπτικών στοιχείων στην περιοχή της ρίζας. Η πρόσληψη μικροστοιχείων, όπως ο ψευδάργυρος και ο χαλκός, βελτιώνεται από την παρουσία των μυκορριζών, διότι για αυτά τα στοιχεία η πρόσληψη από τη ρίζα επίσης περιορίζεται λόγω περιορισμένης διάχυσης. Για στοιχεία με μεγαλύτερη κινητικότητα, όπως τα νιτρικά, η στερητική ζώνη είναι πλατιά και είναι λιγότερο πιθανό οι υφές να αναπτυχθούν εκτενώς στη ζώνη που δεν επηρεάζεται μόνο από τη ρίζα.

Ένα άλλο προτέρημα που αποδίδεται στους μυκορριζικούς μύκητες είναι πρόσβαση σε δεξαμενές φωσφόρου που δεν είναι εύκολα διαθέσιμες στα φυτά (Miyasaka και Habte, 2001). Ένας μηχανισμός για αυτή την πρόσβαση είναι η φυσικοχημική απελευθέρωση ή δέσμευση ανόργανων και οργανικών μορφών φωσφόρου μέσω οργανικών οξέων. Κάποιοι εκτομυκορριζικοί μύκητες έχουν βρεθεί ότι παράγουν μεγάλες ποσότητες οξαλικού οξέως και αυτό μπορεί τουλάχιστον μερικώς να εξηγήσει την επαυξημένη πρόσληψη των θρεπτικών συστατικών από εκτομυκορριζικές ρίζες. Ένας δεύτερος μηχανισμός με τον οποίο οι μυκορριζικοί μύκητες απελευθερώνουν ανόργανο φώσφορο, είναι μέσω ανοργανοποίησης της οργανικής ουσίας. Αυτό συμβαίνει με υδρόλυση μέσω φωσφατάσης των εστερικών δεσμών των οργανικών φωσφορικών (C-O-P).

Οι μυκορριζικοί μύκητες, επίσης, συμβάλλουν στην αποθήκευση του άνθρακα στο έδαφος, ενώ οι υφές τους αποτελούν αγωγούς, μέσω των οποίων ο άνθρακας μεταφέρεται από τις ρίζες των φυτών στους μικροοργανισμούς του εδάφους που είναι υπεύθυνοι για την αποσύνθεση.

Τέλος οι μυκορριζες μπορούν να συμβάλλουν στην αναδάσωση περιοχών που είναι εχθρικές στα φυτά, όπως εδάφη που έχουν διαβρωθεί σοβαρά ή έχουν υψηλό επίπεδο αλατότητας, λόγω της ικανότητας πρόσληψης θρεπτικών στοιχείων.

2.2. ΤΥΠΟΙ ΜΥΚΟΡΡΙΖΩΝ

Έχουν αναγνωρισθεί διαφορετικοί τύποι μυκορριζικών αποικιών με βάση τη μορφολογία τους, στους οποίους περιλαμβάνονται διαφορετικές ομάδες μυκήτων και φυτών ξενιστών. Σύμφωνα με τον Read (1998) οι μυκόρριζες διακρίνονται σε:

2.2.1. Εκτομυκκόριζες

Οι εκτομυκκόριζες απαντούν σε μικρό σχετικά αριθμό φυτών, κυρίως δασικών και σχηματίζονται στις ρίζες δέντρων από έναν βασιδιομύκητα ή ασκομύκητα. Η ύπαρξή τους είναι απαραίτητη για την εγκατάσταση και την επιβίωση δασικών δενδρυλλίων, ιδιαίτερα των κωνοφόρων. Αρχικά, ο μύκητας που υποβοηθείται από τις εκκρίσεις των ριζών, σχηματίζει ένα είδος μανδύα ο οποίος περιβάλλει τα λεπτά ριζίδια. Ο μανδύας διαφέρει πολύ σε πυκνότητα, χρώμα, και υφή, ανάλογα με τον ιδιαίτερο συνδυασμό μύκητα-φυτού. Ο μανδύας αυξάνει την απορροφητική επιφάνεια των ριζών και συχνά η μορφολογία των ριζιδίων επηρεάζεται, με αποτέλεσμα το σχηματισμό διχάλας και συσσωμάτωσης. Σε συνέχεια του μανδύα υπάρχουν δέσμες υφών που επεκτείνονται στο έδαφος. Συχνά, οι δέσμες υφών συγκεντρώνονται για να σχηματίσουν ριζόμορφα, τα οποία είναι φανερά δια γυμνού οφθαλμού. Οι υφές ενζυματικά εισέρχονται μέσα στους μεσοκυττάριους χώρους και σχηματίζουν γύρω από τα κύτταρα της επιδερμίδας και του φλοιού ένα είδος πλέγματος, που είναι γνωστό ως πλέγμα του Hartig από τον Robert Hartig που θεωρείται ο ιδρυτής της δασικής βιολογίας. Το πλέγμα αυτό είναι και το κύριο γνώρισμα αυτού του είδους της μυκόρριζας. Οι αυξίνες που παράγονται από τις ρίζες και το μύκητα προκαλούν αύξηση του μεγέθους των κυττάρων των ριζιδίων.

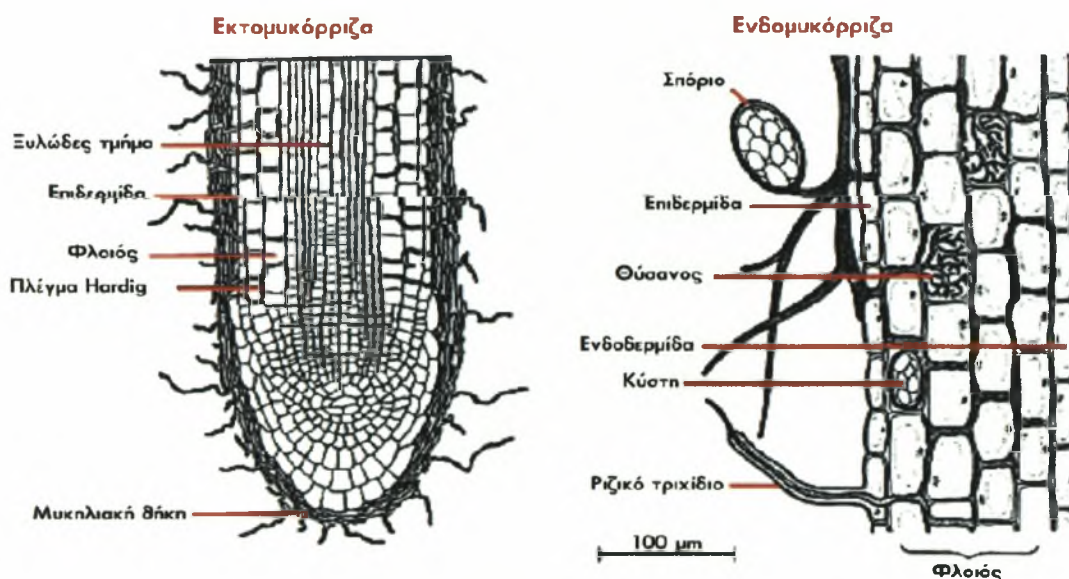
Οι εκτομυκκόριζες απαντώνται σε δασικά είδη, από θάμνους μέχρι δένδρα. Πολλά από τα φυτά - ξενιστές ανήκουν στις οικογένειες Pinaceae, Fagaceae, Betulaceae, και Myrtaceae. Πάνω από 4000 είδη μυκήτων, που ανήκουν κυρίως στους βασιδιομύκητες, και λιγότερο στους ασκομύκητες, είναι γνωστό ότι σχηματίζουν εκτομυκκόριζες. Πολλοί από αυτούς τους μύκητες παράγουν μανιτάρια στα δάση. Μερικοί μύκητες έχουν περιορισμένο εύρος ξενιστών, όπως ο *Boletus betulicola* σε *Betula* spp., ενώ άλλοι έχουν μεγάλο εύρος ξενιστών, όπως ο *Pisolithus tinctorius*, που σχηματίζει εκτομυκκόριζα με πάνω από 46 είδη δένδρων που ανήκουν σε τουλάχιστον οκτώ γένη.

2.2.2. Ενδομυκόρριζες

Η ενδομυκόρριζα είναι ο πιο διαδεδομένος τύπος μυκόρριζας, αφού απαντά στα δύο τρίτα τουλάχιστον των χερσαίων φυτών και φαίνεται ότι αυτή η συμβίωση είναι η πλέον άφθονη και διαδεδομένη σε χερσαία οικοσυστήματα. Σε αντιδιαστολή με την εκτομυκόρριζα, η ενδομυκόρριζα δεν σχηματίζει τον τυπικό μανδύα γύρω από τα ριζίδια, αλλά οι υφές της εισέρχονται όχι μόνο μεταξύ των κυττάρων των ριζιδίων αλλά και μέσα σε αυτά. Αντίθετα από ότι συμβαίνει με την εκτομυκόρριζα, η ενδομυκόρριζα δεν προκαλεί σημαντική διόγκωση των κυττάρων των ριζικών τριχιδίων ή χαρακτηριστικές ανατομικές μεταβολές στις ρίζες.

Οι ενδομυκόρριζες περιλαμβάνουν τρεις κύριους τύπους. Οι δύο είναι πολύ εξειδικευμένοι: ο ένας τύπος απαντά στα φυτικά είδη της τάξης Ericales και είναι ασκομύκητας, ο δε άλλος είναι βασιδιομύκητας και απαντά σε φυτά της οικογένειας Orchidaceae. Και στους δύο αυτούς εξειδικευμένους τύπους μυκορριζών, ο μύκητας εφοδιάζει το φυτό με άζωτο (N) και φώσφορο (P) και με κάποια ιχνοστοιχεία.

Ο τρίτος τύπος ενδομυκόρριζα και ο πλέον διαδεδομένος είναι ο θυσανοειδής-δενδροειδής (arbuscular) και στη διεθνή βιβλιογραφία αναφέρεται ως Arbuscular Mycorrhizal Fungi (AMF).



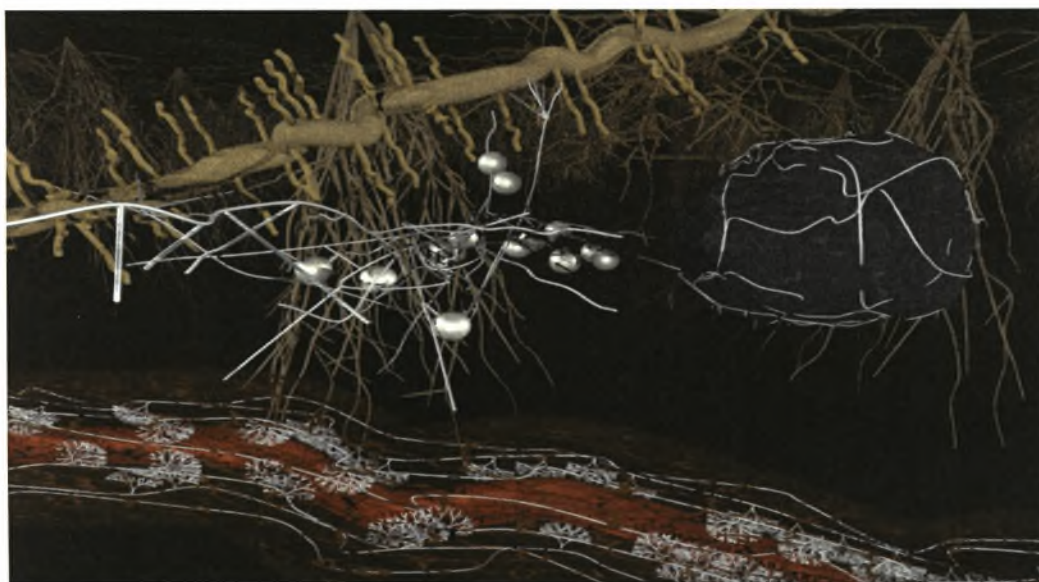
Εικόνα Α.10 Σχηματική απεικόνιση της δομής (α) της εκτομυκόρριζας και (β) της ενδομυκόρριζας (Πηγή: biology.uwsp.edu/.../symbioses/endomyco.htm).

2.2.3. Δενδροειδείς Μυκόρριζες

Ο δενδροειδής τύπος ενδομυκόρριζας απαντά στις περισσότερες οικογένειες των σπερμοφύτων (με την οικογένεια Cruciferae να αποτελεί μια από τις ελάχιστες

εξαιρέσεις), όπως επίσης σε πτερίδες και σε βρυόφυτα. Πάνω από 150 είδη ζυγομύκητων που ανήκουν στην τάξη Glomales σχηματίζουν θυσάνους (arbuscules) εντός των ριζών (Morton & Benny 1990). Οι ειδικοί σχηματισμοί, από τους οποίους προέκυψε και η ονομασία του μύκητα, αποτελούν τα σημεία όπου τα θρεπτικά στοιχεία ανταλλάσσονται με υδατάνθρακες μεταξύ μύκητα και φυτού (Smith & Cianinazzi-Pearson 1988).

Τα θρεπτικά στοιχεία προσλαμβάνονται από τις μυκηλιακές υφές που αναπτύσσονται στο έδαφος. Ενίοτε στις δενδροειδείς ενδομυκόρριζες σχηματίζονται και κύστεις (vesicles), συνήθως στους μεσοκυττάριους χώρους της ρίζας, οι οποίες πρέπει να λειτουργούν ως αποθηκευτικοί χώροι, αλλά και ως αναπαραγωγικά όργανα για τους μύκητες. Παλαιότερα, θεωρείτο ότι όλες οι δενδροειδείς μυκóρριζες σχηματίζουν και κύστεις. Τελευταία, ωστόσο έχει διαπιστωθεί ότι η πλειοψηφία (περίπου το 80%) των ειδών σχηματίζουν τόσο θυσάνους, όσο και κύστες, ενώ τα υπόλοιπα είδη δεν σχηματίζουν κύστεις (Smith & Read 1997).

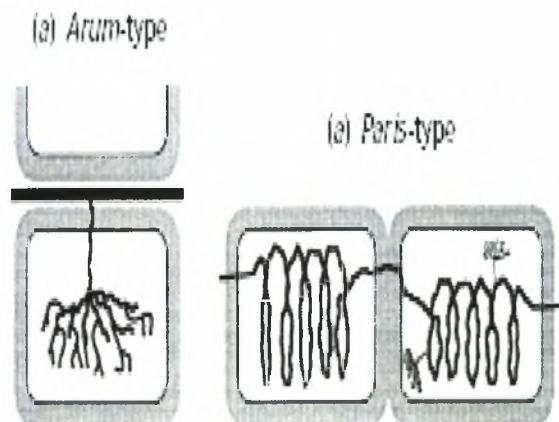


Εικόνα A.11 Σχηματική αναπαράσταση ενός ολοκληρωμένου μοντέλου συμβίωσης του δενδροειδούς μυκóρριζικού μύκητα με το φυτό. Ο σχηματισμός μυκóρριζας επιτρέπει στην ανταλλαγή θρεπτικών συστατικών και υδατανθρακών. Ο μύκητας χρησιμοποιεί τους υδατάνθρακες για την δημιουργία στρογγυλόμορφων σπορίων που χρησιμεύουν για την αναπαραγωγή του σε περιόδους δυσμενών συνθηκών.

Πηγή: www.ufz.de/index.php?en=17029

2.3. ΔΟΜΗ ΚΑΙ ΣΤΑΔΙΑ ΑΝΑΠΤΥΞΗΣ

Το διαγνωστικό στοιχείο των δενδροειδών μυκορριζών είναι η δημιουργία ενός πολύ διακλαδισμένου δενδρυλλίου μέσα στο ριζικό κύτταρο. Ο μύκητας αρχικά μεγαλώνει ανάμεσα στα κύτταρα, αλλά σύντομα διαπερνά το κυτταρικό τοίχος του ξενιστή και αναπτύσσεται μέσα στο κύτταρο. Σε αυτή τη σχέση, ούτε το κυτταρικό τοίχωμα του μύκητα ούτε του φυτού διαρρηγνύονται. Καθώς μεγαλώνει ο μύκητας, η κυτταρική μεμβράνη εγκολλώνεται και τυλίγει τον μύκητα, δημιουργώντας ένα νέο χώρο, όπου



Εικόνα Α.12 Σχηματική αναπαράσταση των δύο τύπων υφών που δημιουργούν οι δενδροειδής μύκητες στα κύτταρα. Χαρακτηριστικό του Arum τύπου είναι η εμφάνιση των υφών ανάμεσα στα κύτταρα και οι διακλαδώσεις του σχηματίζονται εντός του κυττάρου. Στον τύπο Paris οι υφές και οι δομές του μύκητες αναπτύσσονται εντός του κυττάρου

Πηγή: Παπαδάκη Ε. & Συντρίκου Ι. 2005

αποτίθεται υλικό μεγάλης μοριακής πολυπλοκότητας. Αυτός ο χώρος του αποπλάστη εμποδίζει την απευθείας επαφή ανάμεσα στο φυτό και το κυτόπλασμα του μύκητα και επιτρέπει αποδοτική μεταφορά θρεπτικών ανάμεσα στους συμβίους. Τα δενδρύλλια έχουν σχετικά μικρή διάρκεια ζωής, λιγότερο από 15 μέρες, και μπορεί να είναι δύσκολο να παρατηρηθούν σε δείγματα που έχουν ληφθεί από τη φύση.

2.3.1. Υφές Του Εδάφους

Οι μυκορριζικές αποικίες μπορούν να αρχίσουν από τη βλάστηση των σπορίων. Οι υφές μπορεί επίσης να προέλθουν από τεμάχια των ριζών. Σε μερικές περιπτώσεις υπάρχει ήδη ένα δίκτυο υφών ως αποτέλεσμα προηγούμενης δραστηριότητας της ρίζας. Οι υφές που προκύπτουν από τη βλάστηση σπορίων έχουν μια περιορισμένη ικανότητα να αναπτύσσονται και δεν εισβάλλουν σε μια ευπαθή ρίζα με αποτέλεσμα σε διάστημα περίπου μίας εβδομάδας να "πεθαίνουν". Οι εδαφικές υφές, που είναι επίσης γνωστές ως εξωριζικές, είναι ινώδεις μυκητιακές δομές που διακλαδίζονται μέσα στο έδαφος. Είναι υπεύθυνες για την πρόσληψη και αξιοποίηση των θρεπτικών ουσιών, την εξάπλωση της αποικίας, το σχηματισμό σπορίων κ.λ.π.. Οι δενδροειδείς μύκητες επάγουν διαφορετικούς τύπους εδαφολογικών υφών και περιλαμβάνουν τις πυκνές ή "διανεμητικές" υφές καθώς

επίσης και τις λεπτές "απορροφητικές". Έχει παρατηρηθεί ότι οι υφές αυτών των μυκήτων πολλαπλασιάζονται σε μικροπεριοχές του εδάφους όπου συγκεντρώνονται θρεπτικές ουσίες (St John et al, 1983)

2.3.2. Επαφή Και Διείσδυση Ρίζας

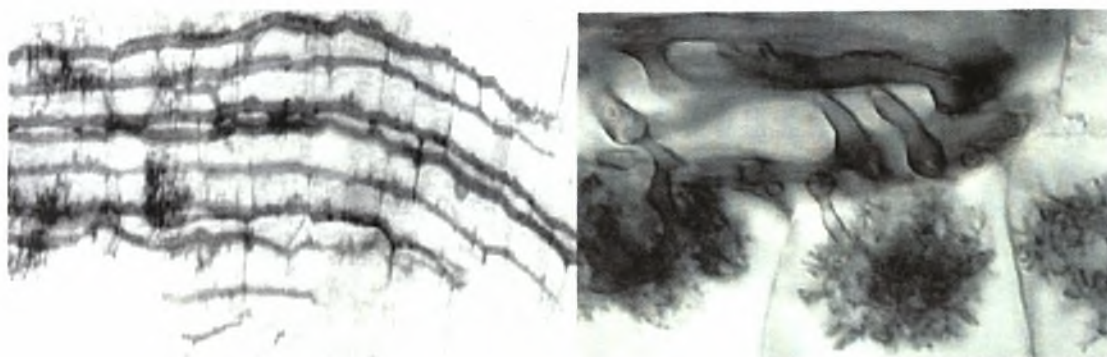
Οι μυκορριζικές αποικίες αρχίζουν να σχηματίζονται όταν τα σπόρια του μύκητα, που βρίσκονται στο έδαφος σε λήθαργο, έρχονται σε επαφή με τη ρίζα του φυτού - ξενιστή. Στην συνέχεια, μια ή περισσότερες υφές παράγουν διογκώσεις μεταξύ των επιδερμικών κυττάρων, που καλούνται πλάκες συγκράτησης ή προσκόλλησης (appressoria). Η διείσδυση γίνεται όταν οι υφές από τα appressoria διαπερνούν τα επιδερμικά ή φλοιώδη κύτταρα για να εισέλθουν στη ρίζα. Αυτές οι υφές διασχίζουν την υποδερμίδα (μέσω διαπερατών κυττάρων, εάν αυτά υπάρχουν στην εξωδερμίδα) και αρχίζουν να διακλαδίζονται στον εξωτερικό φλοιό.

2.3.3. Πολλαπλασιασμός Των Υφών Στο Φλοιό

Οι υφές χωρίς σέπτα εξαπλώνονται κατά μήκος του φλοιού και στις δύο κατευθύνσεις από το σημείο εισόδου για να διαμορφώσουν μια αποικία. Οι υφές μέσα στη ρίζα είναι αρχικά χωρίς εγκάρσια τοιχώματα, αλλά αυτά μπορούν να εμφανιστούν στις παλαιότερες ρίζες. Ο Gallaud (1905) παρατήρησε ότι οι αποικίες των δενδροειδών μυκήτων στα διάφορα είδη, διαμόρφωσαν δύο ευδιάκριτους τύπους μορφολογίας, τους οποίους ονόμασε σειρά Arum και σειρά Paris.

Στις ρίζες με τις αποικίες της σειράς Arum, οι υφές πολλαπλασιάζονται στο φλοιό αυξανόμενες κατά μήκος μεταξύ των κυττάρων - ξενιστών. Αυτό γίνεται επειδή αυξάνονται κατά μήκος των μεσοκυττάρων χώρων, μεταξύ των τοιχωμάτων των κυττάρων της ρίζας. Οι προκύπτουσες αποικίες των μυκήτων αυτών παρουσιάζουν μια γραμμική εμφάνιση (Brundrett et al, 1984).

Στη σειρά Paris οι υφές διαδίδονται σχηματίζοντας έλικες μέσα στα κύτταρα, επειδή δεν υπάρχουν συνεχείς μεσοκυττάριοι χώροι. Σε αυτές τις αποικίες η εξάπλωση των υφών γίνεται πρωτίστως με ενδοκυτταρική αύξηση, Αφού ακολουθήσουν μια πολύπλοκη πορεία μέσω των κυττάρων του φλοιού. Οι προκύπτουσες αποικίες των μυκήτων έχουν γενικά μια συσπειρωμένη εμφάνιση (Gallaud, 1905), αλλά μπορούν να έχουν πιο διακλαδισμένη μορφή (Widden, 1996).



Εικόνα Α.13: Μικροσκοπική παρατήρηση αποικιών τύπου Arum και Paris
Πηγή: Παπαδάκη Ε. & Συντρίκου Ι. 2005

2.3.3.1. Arbuscules

Τα arbuscules είναι περίπλοκα διακλαδισμένοι μυζητήρες που σχηματίζονται μέσα στα κύτταρα του φλοιού της ρίζας. Ονομάστηκαν έτσι από τον Gallaud (1905), επειδή μοιάζουν με μικρά δέντρα. Σχηματίζονται από τις επαναλαμβανόμενες διχοτομήσεις των διακλαδώσεων των υφών και τις μειώσεις του πλάτους τους.

Τα arbuscules αρχίζουν να σχηματίζονται περίπου 2 ημέρες μετά από τη διεύδυση της ρίζας. Αυξάνονται μέσα σε συγκεκριμένα κύτταρα του φλοιού, αλλά παραμένουν έξω από το κυτταρόπλασμα τους, κυρίως λόγω του ότι περιβάλλονται από κυτοπλασματική μεμβράνη. Θεωρούνται ως η βασικότερη περιοχή της ανταλλαγής μεταξύ του μύκητα και του ξενιστή. Ο σχηματισμός τους ακολουθεί την αύξηση των υφών, αναπτυσσόμενος εξωτερικά από το σημείο εισόδου. Έχουν μικρή διάρκεια ζωής και αρχίζουν να «καταρρέουν» μετά από μερικές ημέρες, αλλά οι υφές και οι κύστεις μπορούν να παραμείνουν στις ρίζες για μήνες ή και χρόνια.



Εικόνα Α.14 μικροφωτογραφία μικροσκοπίου δομής arbuscules στα κύτταρα της ρίζας
Πηγή: Παπαδάκη Ε. & Συντρίκου Ι. 2005

2.3.3.2. Κύστεις

Άλλες δομές που δημιουργούνται από μερικούς δενδροειδείς μυκορριζικούς μύκητες περιλαμβάνουν κύστεις, βοηθητικά κύτταρα, και αγενή σπόρια. Οι κύστεις είναι δομές με λεπτά τοιχώματα, γεμάτες λίπη, που συνήθως σχηματίζονται στο χώρο

ανάμεσα στα κύτταρα. Η κύρια λειτουργία τους εικάζεται ότι είναι αποθηκευτική. Παρόλα αυτά, οι κύστες μπορούν να χρησιμεύσουν και σαν αναπαραγωγικά οργανίδια του μύκητα.

Τα βοηθητικά κύτταρα δημιουργούνται στο έδαφος και μπορεί να είναι σπειρωμένα ή σε κόμπους. Ο ρόλος αυτών των κυττάρων δεν είναι γνωστός. Αναπαραγωγικά σπόρια μπορούν να δημιουργηθούν είτε στη ρίζα, ή στο έδαφος. Τα σπόρια που παράγονται από τους μύκητες οι



Εικόνα Α.15 μικροφωτογραφία μικροσκοπίου κύστεων σε κύτταρα ριζικού συστήματος
Πηγή: Παπαδάκη Ε. & Συντρίκου Ι. 2005

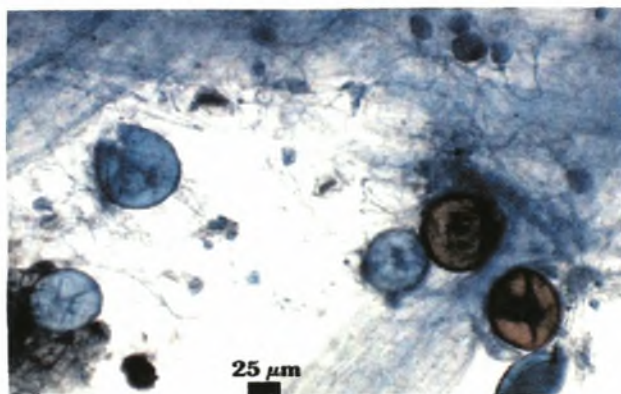
οποίοι σχηματίζουν δενδροειδείς μυκορριζικές σχέσεις είναι αγενή, και δημιουργούνται από τη διαφοροποίηση απλοειδών υφών. Για κάποιους μύκητες (πχ. *Glomus intraradices*), οι κύστες μέσα στη ρίζα υπόκεινται σε δευτερογενή πάχυνση και δημιουργείται τοίχωμα (septum) κάθετο στην υφή σύνδεσης, οπότε δημιουργείται σπόριο, αλλά συνήθως τα σπόρια προέρχονται από διογκώσεις εδαφικών υφών.

Οι κύστες χρησιμεύουν για τη συσσώρευση των προϊόντων που παράγονται από τη φωτοσύνθεση των φυτών – ξενιστών (υδατάνθρακες) και είναι απαραίτητα για την επιβίωση του μύκητα. Εμφανίζονται αμέσως μετά τα πρώτα *arbuscules*, αλλά συνεχίζουν να αναπτύσσονται και όταν αυτά έχουν ωριμάσει. Είναι διογκώσεις στο φλοιό της ρίζας που περιέχουν τα λιπίδια και το κυτταρόπλασμα και μπορούν να είναι μεσοκυττάρια ή ενδοκυττάρια. Οι κύστες μπορούν να αναπτύξουν παχιά τοιχώματα στις παλαιότερες ρίζες και να λειτουργήσουν ως propagules (έμφυλα ή άφυλα σπόρια). (Biermann & Linderman, 1983).

2.3.3.3. Σπόρια

Τα σπόρια των δενδροειδών μυκορριζικών μυκήτων είναι πολύ χαρακτηριστικά. Κυμαίνονται σε διάμετρο από 10 μm στον *Glomus tenue* έως πάνω από 1000 μm στη *Scutellospora* spp. Τα σπόρια ποικίλουν στο χρώμα, από υαλώδη (διαφανή) μέχρι μαύρα και η υφή της επιφάνειας εμφανίζεται από λεία μέχρι πολύ διακοσμημένη. Το γένος *Glomus* σχηματίζει σπόρια στο τέλος των υφών, το γένος *Acaulospora* σχηματίζει σπόρια κάθετα από το λαιμό διογκωμένης άκρης υφής, και

και το γένος *Entrophospora* σχηματίζει σπόρια μέσα από το λαϊμό της διογκωμένης άκρης υφής. Δύο άλλα γένη, *Gigaspora* και *Scutellospora*, ξεχωρίζουν από την παρουσία εσωτερικών μεμβρανών στα τοιχώματα και από την φυτρωτική ασπίδα (δομή του τοιχώματος όπου μπορεί να ξεκινήσει φυτρωτικός σωλήνας στο γένος *Scutellospora*). Με βάση μοριακά δεδομένα, δύο καινούργιες οικογένειες (*Archaeosporaceae* και *Parglomis*) έχουν προστεθεί, πράγμα που φανερώνει ότι η ταξινόμια αυτών των μυκήτων είναι ακόμη ρευστή.



Εικόνα Α.16 φωτογραφία μικροσκοπίου σπορίων του δενδροειδούς μυκορριζικού μύκητα

Πηγή: Παπαδάκη Ε. & Συντρίκου Ι. 2005

Τα σπόρια σχηματίζονται σαν διογκώσεις σε μια ή περισσότερες υφές στο έδαφος ή στις ρίζες. Περιέχουν τα λιπίδια, το κυτταρόπλασμα και πολλούς πυρήνες. Συνήθως αναπτύσσουν τοιχώματα με περισσότερα από ένα στρώματα και μπορούν να λειτουργήσουν ως propagules. Τα σπόρια περιέχονται σε εξειδικευμένα όργανα που καλούνται καρποφορίες και λειτουργούν σαν αποθήκες θρεπτικών στοιχείων.

2.4. Ο ΡΟΛΟΣ ΤΩΝ ΔΕΝΔΡΟΕΙΔΩΝ ΜΥΚΟΡΡΙΖΩΝ

2.4.1. Πρόσληψη Φωσφόρου

Η συνεισφορά των δενδροειδών μυκορριζών στα φυτά-ξενιστές είναι πολυποίκιλη. Η κυριότερη ίσως συνεισφορά τους είναι η αποτελεσματική πρόσληψη του φωσφόρου (P). Τα μυκορριζικά φυτά βρέθηκε να περιέχουν υψηλότερες συγκεντρώσεις P στους ιστούς τους σε σχέση με τα φυτά μάρτυρες (Sanders & Tinker 1971). Κάτι τέτοιο συμβαίνει επειδή οι μυκηλιακές υφές διεισδύουν σε μεγαλύτερα βάθη εδάφους από αυτά που μπορούν να φτάσουν οι ίδιες οι ρίζες του φυτού (Sanders & Tinker 1971, Jakobsen κ.ά., 1992α) και έτσι έχουν την ικανότητα να προσλαμβάνουν τα φωσφορικά ιόντα και να τα μεταφέρουν στο φυτό-ξενιστή (Jakobsen κ.ά. 1992β) πολύ πιο γρήγορα από ότι στην περίπτωση της διάχυσης μέσω του εδάφους. Επιπρόσθετα, οι δενδροειδείς μυκορριζες έχουν μικρότερη διάμετρο (Smith & Read 1997), γεγονός που τις επιτρέπει να μπορούν να διαπερνούν εδαφικούς πόρους μικρότερης διαμέτρου από ότι οι ρίζες και τα ριζικά τριχίδια

(O'Keefe & Sylvia 1992), αυξάνοντας έτσι, πιο αποτελεσματικά, τον όγκο του χρησιμοποιήσιμου εδάφους.

Επίσης, η αυξημένη ικανότητα πρόσληψης P αποδίδεται στο γεγονός ότι οι μύκητες που συμβιώνουν στις ρίζες των φυτών έχουν το πλεονέκτημα ότι προμηθεύονται άνθρακα (C) από το φυτό-ξενιστή τους. Αυτό το γεγονός τους καθιστά πιο ισχυρούς ανταγωνιστές έναντι των άλλων μικροοργανισμών του εδάφους, ιδιαίτερα σε εδάφη που ο C είναι περιοριστικό στοιχείο (Smith & Read 1997). Έτσι, έχουν την δυνατότητα να απορροφούν μεγαλύτερη ποσότητα P από το εδαφικό διάλυμα και να την αποδίδουν στα φυτά που συμβιώνουν μαζί τους.

2.4.2. Άλλες Ωφέλειες Δενδροειδών Μυκορριζών

Η συνεισφορά των δενδροειδών μυκορριζών στα φυτά-ξενιστές δεν περιορίζεται στην αποτελεσματική πρόσληψη P από το σύστημα φυτού – δενδροειδούς μυκόρριζας, αλλά παράλληλα εντοπίζεται και σε πολλούς τομείς, τόσο σε επίπεδο ατομικού φυτού, όσο και σε επίπεδο φυτοκοινότητας.

Αρχικά, έχει βρεθεί ότι οι δενδροειδείς μυκόρριζες μπορούν να προσλαμβάνουν και να μεταφέρουν το N στο φυτό (Raven κ.ά. 1978, Smith 1980, Ames κ.ά. 1983, Bago κ.ά. 1996, Mader κ.ά. 2000). Ο μηχανισμός που εμφανίζεται είναι ο ίδιος με αυτόν που εκδηλώνεται κατά την πρόσληψη του P και σχετίζεται με την μεταφορά των στοιχείων από το έδαφος στο φυτό, μέσω των υφών του μύκητα.

Σήμερα, υπάρχουν όλο και περισσότερες μαρτυρίες ότι οι μυκορριζικοί μύκητες εμπλέκονται στην πρόσληψη και μεταφορά ανόργανου N. Έχει αποδειχτεί επίσης, ότι οι υφές των δενδροειδών μυκορριζών προσλαμβάνουν και μεταφέρουν αμμωνιακά ιόντα (Ames κ.ά. 1983, Johansen κ.ά. 1992, Frey & Schüepp 1993, Johansen κ.ά. 1993), νιτρικά (Johansen κ.ά. 1993, Tobar κ.ά. 1994, Bago κ.ά. 1996), αλλά και οργανικές ενώσεις N (Ames κ.ά. 1983, Hawkins κ.ά. 2000, Hodge κ.ά. 2001).

Επιπλέον, έχει αποδειχθεί ότι συμβίωση μπορεί να επηρεάσει και άμεσα τις υδατικές σχέσεις του φυτού-ξενιστή. Συγκεκριμένα, η συμβίωση φυτών με μυκορριζικούς μύκητες βρέθηκε να συμβάλλει στην πρόσληψη εδαφικού νερού - μέσω των υφών που αναπτύσσει ο μύκητας (Hardie & Leyton 1981, Allen 1982, Augé 2001) και στο πιο αποτελεσματικό “φιλτράρισμα” του (Hardie & Leyton 1981, Sieverding, 1981). Επίσης, υπάρχουν διάφορες ενδείξεις ότι η μεταφορά νερού που

πραγματοποιείται μέσω των υφών των μυκορριζών καθιστά τα φυτά πιο ανθεκτικά στην ξηρασία και καθυστερεί τον μαρασμό σε περίπτωση υδατικής καταπόνησης (Allen κ.ά. 1981, Augé & Duan 1991)

Οι δενδροειδείς μυκορριζες παίζουν σπουδαίο ρόλο σε ρυπασμένα με βαρέα μέταλλα εδάφη διότι προστατεύουν τα φυτά από την τοξικότητα που μπορεί να προκαλέσει η συγκέντρωση βαρέων μετάλλων στο έδαφος, όπως παράδειγμα, ο ψευδάργυρος και το κάδμιο (Wilkins 1991). Αυτό μπορεί να συμβεί είτε δεσμεύοντας τα μέταλλα μέσα στις υφές τους (Denny & Wilkins 1987, Marschner κ.ά. 1998, Brunner & Frey 2000), είτε μειώνοντας την μεταφορά των μετάλλων στα ανώτερα σημεία του φυτού (Burke κ.ά. 2000)

Οι μυκορριζικοί μύκητες έχουν την ιδιότητα να βελτιώνουν τη συσσωμάτωση των εδαφικών τεμαχιδίων, επομένως και τη δομή του εδάφους (Miller & Jastrow 2000). Οι υφές των μυκορριζών παράγουν χημικές ενώσεις οι οποίες ενώνουν τα συσσωματώματα του εδάφους (Graham κ.ά. 1982) και βελτιώνουν το πορώδες του. Έτσι, επιτυγχάνεται η ευκολότερη κίνηση του νερού μέσα στο έδαφος, ο καλύτερος αερισμός των ριζών και η αποτελεσματικότερη στερεοποίηση τους στο έδαφος (Fitter 2005), η μεγαλύτερη ανάπτυξη της ρίζας και κατ' επέκταση του ίδιου του φυτού.

Η ύπαρξη δενδροειδών μυκορριζών αυξάνει την αντίσταση των φυτών στα παθογόνα και ιδιαίτερα στους μύκητες που προσβάλλουν το ριζικό σύστημα (Norman & Hooker 2000). Αυτό συμβαίνει διότι βελτιώνονται οι παράγοντες που συντελούν στον έλεγχο των παθογόνων από τις μυκορριζες όπως, η βελτίωση της θρεπτικής κατάστασης του φυτού και η αλλαγή στην ανατομία και στην αρχιτεκτονική του ριζικού του συστήματος σε συνεργασία με την ενεργοποίηση των μηχανισμών άμυνας του ίδιου του φυτού (Azcón-Aguilar κ.ά. 2002, Pozo κ.ά. 2002). Η συνεισφορά αυτή των δενδροειδών μυκορριζών είναι ιδιαίτερης σημασίας για τα φυτά που αναπτύσσουν πλούσιο διακλαδισμένο ριζικό σύστημα, καθώς ο κίνδυνος προσβολής τους από παθογόνους οργανισμούς είναι αυξημένος.

2.4.3. Ο Δενδροειδής Μύκητας *Glomus intraradices*

Ένας από τους πιο γνωστούς δενδροειδείς μύκητες του γένους *Glomus* είναι ο *Glomus intraradices*. Ο συγκεκριμένος μύκητας, έχει χρησιμοποιηθεί ευρέως στην γεωργία και κηπουρική. Επίσης έχει χρησιμοποιηθεί σε πολλές επιστημονικές μελέτες λόγω της δημιουργίας μυκορριζας που συμβάλλει στην βελτίωση του εδάφους. Ο

λόγω της δημιουργίας μυκόρριζας που συμβάλλει στην βελτίωση του εδάφους. Ο *Glomus intraradices* αποικίζει νωρίτερα το φυτό από τους άλλους μύκητες του γένους *Glomus*. Επίσης δημιουργεί μεγαλύτερο δίκτυο υφών και αλληλεπιδρά πιο έντονα με τα φυτά ξενιστές του. Σύμφωνα με μελέτες, ο μύκητας αυτός, λόγω του μεγάλου δικτύου υφών που δημιουργεί, φαίνεται να βοηθά στην βελτίωση του εδάφους καθώς και στην μεγαλύτερη πρόσληψη φωσφόρου από το φυτό. Συγκεκριμένα, έχει φανεί ότι είναι από τους λίγους δενδροειδείς μύκητες που μπορούν να ελέγξουν την πρόσληψη θρεπτικών και φωσφόρου ανάλογα με τις ποσότητες που υπάρχουν στο έδαφος.

3. ΑΛΛΗΛΕΠΙΔΡΑΣΕΙΣ ΜΥΚΗΤΩΝ

Η κοινή επιφάνεια ανάμεσα στο έδαφος και τις ρίζες ή εναλλακτικά ο χώρος που περιβάλλει τις ρίζες και επηρεάζεται από αυτές, είναι η ριζόσφαιρα. Ένας χώρος υψηλών μικροβιακών πληθυσμών, έντονης μικροβιολογικής δραστηριότητας και ταχύτατων αλλαγών. Οι μικροοργανισμοί της ριζόσφαιρας ζουν πάνω σε νέκτρα επιδερμικά κύτταρα, εκκρίματα των ριζών και νεκρή οργανική ουσία (Bonkowski et al 2000).

Εκτός από τον ανταγωνισμό των μικροοργανισμών, στη ριζόσφαιρα έχει παρατηρηθεί και το φαινόμενο της αλληλεπίδρασης των διαφόρων μικροοργανισμών που έχει σαν αποτέλεσμα την προστασία του φυτού έναντι άλλων παθογόνων. Μελέτες έχουν δείξει ότι βακτήρια, ενδοφυτικοί και μυκορριζικοί μύκητες, ανεξάρτητα από την μεμονωμένη δράση τους στα φυτά, όταν βρεθούν στο ίδιο περιβάλλον με ανταγωνιστή ή συμβιώτη, τότε παρατηρείται διαφορετική εξέλιξη στην ανάπτυξη των φυτών. Η εξέλιξη αυτή ποικίλλει ανάλογα με τους μικροοργανισμούς που συμμετέχουν στην αλληλεπίδραση και είτε φαίνεται αύξηση στην ανάπτυξη των φυτών και προφύλαξη από άλλα παθογόνα αίτια, είτε μείωση της ανάπτυξης ή ακόμα και καμία αλληλεπίδραση μεταξύ τους. Σύμφωνα με μελέτες έχει παρατηρηθεί ότι:

Υπάρχουν μύκητες που όταν βρεθούν με άλλους επηρεάζουν την επίδραση των τελευταίων στο φυτό ανάλογα πάντα και το υπόστρωμα στο οποίο βρίσκονται. Ένας κοινός σαπροφυτικός μύκητας, ο *Clonostachys rosea*, όταν εμβολιασθεί σε ρίζα τομάτας σε απλό υπόστρωμα τότε ο μύκητας αυτός αυξάνει την ανάπτυξη του φυτού καθώς και την πρόσληψη φωσφόρου, όμως μειώνει την πρόσληψη αζώτου. Στην ίδια

μελέτη μια μυκόρριζα του γένους *Glomus* ο *Glomus intraradices* όταν εμβολιασθεί στις ρίζες τομάτας δεν προκαλεί καμία επίδραση στην ανάπτυξη του φυτού παρά μόνο αυξάνει την συγκέντρωση φωσφόρου. Όταν όμως υπήρξε ταυτόχρονος εμβολιασμός, τότε εμφανίσθηκαν τα αποτελέσματα της δράσης του μύκητα *C. rosea* δηλαδή αύξηση της ανάπτυξης του φυτού και της πρόσληψης φωσφόρου (Ravnskov et al 2006).

Στην ίδια μελέτη προστέθηκαν στο υπόστρωμα και πίτουρα σιταριού. Τα συγκεκριμένα χρησιμοποιούνται ως θρεπτικό μέσο και έχει παρατηρηθεί σε διάφορα άλλα πειράματα ότι παρουσία τους υπάρχει θετική αλληλεπίδραση μεταξύ μυκήτων και μυκορριζών και συγκεκριμένα πληθυσμιακή αύξηση του AMF σε φυτά αγγουριού (Ravnskov et al 1999).

Στο συγκεκριμένο πείραμα αποδείχθηκε ότι, η παρουσία πίτουρου στο υπόστρωμα παρόντος του *C. rosea* προκάλεσε μεν αύξηση στον πληθυσμό του μύκητα, στη ρίζα όμως μειώθηκε ο αποικισμός της από τον μυκορριζικό μύκητα. Ο *C.rosea* και ο *G.intraradices* ανεξάρτητα από την παρουσία ή όχι του πίτουρου αναστέλλουν τον μεταξύ τους αποικισμό στη ρίζα. Επίσης και οι δύο επιδρούν στη μικροβιακή κοινότητα του φυτού. Συγκεκριμένα ο *Glomus intraradices* μπορεί να επιδράσει ανεξάρτητα από την παρουσία του πίτουρου, ενώ στον *Clonostachys rosea* η παρουσία πίτουρου έχει σαν αποτέλεσμα να μειώνεται ο μικροβιακός πληθυσμός, ενώ απουσία πίτουρου να αυξάνεται. (Ravnskov et al 2006) Σαν αποτέλεσμα φαίνεται ότι υπάρχει αλληλεπίδραση μεταξύ ενδοφυτικού μύκητα και μυκόρριζας και συγκεκριμένα η δράση τους σε φυτά τομάτας είναι συνεργιστική και δρουν στην κατεύθυνση της επίδρασης του μύκητα *C. rosea*

Θετική αλληλεπίδραση μεταξύ βακτηρίων και μυκορριζικών μυκήτων έχει αποδειχθεί και σε όξινα εδάφη. Ο J. Widada το 2002 τοποθέτησε σόργο σε όξινο έδαφος. Στην συνέχεια, χρησιμοποίησε κατηγορίες ριζοβακτηρίων όπως βακτήρια που διαλύουν το φώσφορο (PSB) και συγκεκριμένα το *Pseudomonas sp.*, βακτήρια που καθορίζουν το άζωτο (NFB) όπου χρησιμοποιήθηκε το *Azospirillum lipoferum* και σιδηροφόρα βακτήρια (SPB) όπως το *Pseudomonas fluorescens*. Επίσης χρησιμοποιήθηκαν οι μυκορριζικοί μύκητες *Glomus manihotis* και ο *Entrophospora colombiana*. Κατά τον αποικισμό μόνο βακτηρίων στα φυτά διαπιστώθηκε αύξηση της βιομάζας του φυτού καθώς και περαιτέρω πρόσληψη θρεπτικών όπως N, P, Fe και Zn. Παρόμοια αποτελέσματα υπήρξαν και με τον αποικισμό των μυκορριζικών μυκήτων. Όταν εμβολιάστηκαν ταυτόχρονα οι μύκητες και τα βακτήρια

παρουσιάστηκε περαιτέρω αύξηση της βιομάζας του φυτού και πρόσληψης θρεπτικών στοιχείων. Συγκεκριμένα, με τον συνδυασμό του μύκητα και του PSB υπήρξε αύξηση κατά 112 φορές, ενώ μύκητας και NFB προκάλεσε αύξηση κατά 64 φορές και τέλος ο συνδυασμός μύκητα με SPB κατά 60 φορές.

Αλληλεπίδραση έχει παρατηρηθεί και μεταξύ βακτηρίων και μυκορριζών παρουσία παθογόνου μύκητα. Δύο ριζοβακτήρια ο *Pseudomonas fluorescens* SBW25 και ο *Paenibacillus brasilensis* PB177 έχουν διαφορετική προστατευτική δράση όταν προστεθούν ξεχωριστά σε χειμερινό σιτάρι το οποίο είναι προηγουμένως εμβολιασμένο με το παθογόνο μύκητα *Microdochium nivale*. Ο συγκεκριμένος μύκητας, προκαλεί τη ροζ μούχλα στα φυτά σιταριού και ιδιαίτερα το χειμώνα. Στο συγκεκριμένο πείραμα φάνηκε ότι η προσθήκη δύο διαφορετικών μυκορριζών του *G. intraradices* στο σιτάρι δίνει διαφορετικά αποτελέσματα στην συμβίωση τους με τα βακτήρια. Ο *G. intraradices* αυξάνει τη φυτική μάζα των, εμβολιασμένων με το παθογόνο, φυτών και έχει προστατευτική δράση. Παρουσία του βακτηρίου *Paenibacillus brasilensis* PB177 η προστατευτική δράση της μυκόρριζας φαίνεται να αναστέλλεται. Επίσης, παρουσία του βακτηρίου *Pseudomonas fluorescens* SBW25 φαίνεται ότι η μυκόρριζα διατηρεί τη προστατευτική δράση της έναντι του μύκητα. (Jaderlund et al, 2008). Σαν αποτέλεσμα φάνηκε ότι η αλληλεπίδραση μεταξύ μύκητα και μυκόρριζας σε φυτά σιταριού έχουν διαφορετική εξέλιξη παρουσία διαφορετικών βακτηρίων.

Στη ριζόσφαιρα υπάρχει μεγάλος αριθμός διαφορετικών μικροοργανισμών που μπορούν να αποικίσουν τα φυτά επηρεάζοντας θετικά ή αρνητικά το φυτό. Ο ανταγωνισμός μεταξύ των μικροοργανισμών στον αποικισμό ενός φυτού φαίνεται και στο παρακάτω πείραμα. Ένα μη παθογόνο στέλεχος του *Fusarium oxysporum*, το Fo 162, είναι γνωστό ότι εμποδίζει τον αποικισμό του φυτού τομάτας από παρασιτικούς νηματώδεις (Hallmann and Sikora 1994). Επίσης, ένας μυκορριζικός μύκητας ο *Glomus coronatum* όταν προστεθεί σε φυτά τομάτας έχει προστατευτική δράση έναντι του νηματώδη *Meloidogyne incognita*. Σε πείραμα που έγινε, παρατηρήθηκε ότι ο ξεχωριστός εμβολιασμός του μύκητα και της μυκόρριζας σε φυτά τομάτας παρουσία του νηματώδη *Meloidogyne incognita* έχουν προστατευτική δράση έναντι του νηματώδη και συγκεκριμένα αναστέλλουν την ανάπτυξη του. Όμως, όταν το στέλεχος του μύκητα και ο μυκορριζικός μύκητας εισέλθουν ταυτόχρονα, όχι μόνο δεν αναστέλλουν την δράση του νηματώδη αλλά ταυτόχρονα αυξάνουν τον αποικισμό του στο φυτό. Σαν αποτέλεσμα δηλαδή φαίνεται ότι η αλληλεπίδραση του

μύκητα και της μυκόρριζας στο φυτό δρα ανασταλτικά για το φυτό και συγκεκριμένα μπορεί να βοηθήσει τη δράση άλλου παθογόνου οργανισμού (Diedhiou et al, 2002).

Η αλληλεπίδραση μυκήτων με μυκόρριζες ποικίλλουν ανάλογα με τα είδη των μυκήτων καθώς και με τα φυτά στα οποία αποικίζουν. Ο S. Fracchia το 1999 δοκίμασε διαφορετικά είδη μυκορριζικών μυκήτων του γένους *Glomus* σε συνδυασμό με διαφορετικά στελέχη του μύκητα *Fusarium oxysporum* σε φυτά όπως αραβόσιτο, σόργο, μαρούλι, ντομάτα, σιτάρι, φακή και μπιζέλι. Από τα αποτελέσματα φάνηκε ότι προσθέτοντας το μυκορριζικό μύκητα, εμφάνισε θετικά αποτελέσματα το μπιζέλι, ενισχύοντας περισσότερο την αύξηση του φυτού και τον εποικισμό του από τη μυκόρριζα. Στο ίδιο συμπέρασμα οδηγήθηκαν και στον ταυτόχρονο εμβολιασμό του φυτού με το *Fusarium oxysporum* σε συνδυασμό με τον μυκορριζικό μύκητα. Συγκεκριμένα, προσθέτοντας τον μύκητα, ενισχύθηκε η επιβίωση του φυτού του μπιζελιού ενδεχομένως δρώντας θετικά παρουσία των μυκορριζικών μυκήτων. Η αλληλεπίδραση του ενδοφυτικού και μυκορριζικού μύκητα στο μπιζέλι είχε ως αποτέλεσμα να αυξηθούν το ξηρό βάρος των υπέργειων τμημάτων του φυτού και η συγκέντρωση αζώτου και φωσφόρου καθώς και το επίπεδο αποικισμού τόσο των ενδογενών όσο και των προστιθέμενων μυκορριζικών μυκήτων.

Οι μύκητες ποικίλλουν ανάλογα με τη δράση τους στο φυτό. Υπάρχουν παθογόνοι (τα περισσότερα στελέχη του *Fusarium oxysporum*) και ανταγωνιστικοί μύκητες που άλλοτε δρουν θετικά και άλλοτε αρνητικά για το φυτό. Υπάρχει όμως και μια κατηγορία μυκήτων που προάγουν την ανάπτυξη του φυτού. Αυτή η κατηγορία γνωστή και ως PGPF (plant growth promoting fungi) απαρτίζεται από μη παθογόνους μύκητες, η παρουσία των οποίων στα φυτά προάγει την ανάπτυξη τους και την προστασία τους από διάφορες ασθένειες (Hyakumachi et al 1994). Επίσης, οι μύκητες όπως ο *Phoma sp.* και *Penicillium simplicissimum* που ανήκουν σε αυτή τη κατηγορία, δρουν θετικά έναντι του *Colletotrichum orbiculare* που δρα κυρίως στα φυτά αγγουριού (Meera et al 1994). Φυτά αγγουριού παρουσία του παθογόνου *Colletotrichum orbiculare* εμβολιάστηκαν ταυτόχρονα με PGPF μύκητες (*Phoma sp.* και *Penicillium simplicissimum*) και του μυκορριζικό μύκητα, συγκεκριμένα τον *Glomus mosseae*. Από το πείραμα φάνηκε ότι ενώ οι μύκητες ξεχωριστά έχουν θετική επίδραση έναντι του παθογόνου, σε συνδυασμό με τον μυκορριζικό μύκητα όχι μόνο δεν αύξησαν την θετική τους επίδραση στο φυτό αλλά αντιθέτως μείωσαν την προστασία τους έναντι στο παθογόνο (Chandanie et al 2005).

Γενικά, τα αποτελέσματα της αλληλεπίδρασης μυκορριζικών μυκήτων με

παθογόνους μύκητες ποικίλουν ανάλογα το είδος των μυκήτων, το φυτό ξενιστή καθώς και το έδαφος στο οποίο επιβιώνουν. Η αλληλεπίδραση των μυκήτων αυτών πολλές φορές είναι θετική. Ο *Phoma terrestris* που προσβάλλει το κρεμμύδι, όταν αλληλεπιδράσει με μυκορριζικό μύκητα μειώνεται η προσβολή του στο φυτό (Becker, 1976). Παρόμοιο αποτέλεσμα φαίνεται και στην αλληλεπίδραση του *Fusarium oxysporum cucumerinum* με μυκορριζικό μύκητα σε φυτά αγγουριού (Dehne, 1977). Επίσης, ο παθογόνος μύκητας του καπνού, *Thielaviopsis basicola* όταν βρεθεί σε περιβάλλον μυκορριζας παρατηρήθηκε εκτός της μείωσης της ζημιάς που προκαλεί στο φυτό και μείωση της αναπαραγωγής του (Baltruschat, 1972).

Η αλληλεπίδραση του παθογόνου με το μυκορριζικό μύκητα πολλές φορές είναι αρνητική για το φυτό. Αυτό διέπεται από έναν κανόνα: «ότι είναι καλό για το φυτό είναι καλό και για τον μύκητα». Έτσι, φυτά που δημιουργούν μυκορριζες είναι πιο πιθανόν να προσβληθούν από παθογόνους μύκητες λόγω της αυξημένης πρόσληψης θρεπτικών στοιχείων και της περαιτέρω ανάπτυξης τους. Το φυτό αβοκάντο όταν δημιουργεί μυκορριζικές σχέσεις, σε τυχόν προσβολή του από το παθογόνο μύκητα *Phytophthora cinnamomi*, παρατηρείται αυξημένη προσβολή καθώς και προκαλείται μεγαλύτερη ζημιά στο φυτό (Davis et al 1978). Παρόμοιο αποτέλεσμα έχει φανεί και στην επίδραση του *P. parasitica* όταν προσβάλλει εσπεριδοειδή παρουσία μυκορριζικού μύκητα. (Davis et al 1978).

Υπάρχουν και περιπτώσεις όπου ο παθογόνος και ο μυκορριζικός μύκητας δεν αλληλεπιδρούν μεταξύ τους και δεν επηρεάζεται η δράση τους στο φυτό. Οι Zambolin και Schenck το 1981 ερεύνησαν την αλληλεπίδραση των μυκήτων *Rhizoctonia solani* και *Fusarium solani* με μυκορριζικούς μύκητες σε φυτά σόγιας. Το συμπέρασμα τους ήταν ότι δεν υπήρξε καμία αλληλεπίδραση μεταξύ των μυκήτων καθώς δεν παρατηρήθηκε προσβολή και ζημιά στο φυτό.

ΣΚΟΠΟΣ ΤΗΣ ΕΡΓΑΣΙΑΣ

Ο φυτικός οργανισμός που επιλέχθηκε για να μελετηθεί αυτή η αλληλεπίδραση μεταξύ ενός μη παθογόνου και ενός μυκορριζικού μύκητα είναι η τομάτα *Lycopersicon esculentum* της ποικιλίας ACE. Η καλλιεργούμενη τομάτα (tomato) ταξινομείται στο γένος *Lycopersicon* της οικογένειας Solanaceae (Tigchelaar 1991). Η καλλιέργεια της τομάτας αποτελεί μία από τις πιο διαδεδομένες καλλιέργειες στον ελλαδικό χώρο και οι καρποί της αποτελούν ένα υψηλό διατροφικό προϊόν. Λόγω της ευρείας παραγωγής της είναι λογικό ότι έχει μελετηθεί αρκετές φορές για την ανεύρεση εναλλακτικών μορφών αντιμετώπισης διαφόρων προσβολών της από παθογόνους μικροοργανισμούς.

Μια από τις εναλλακτικές μορφές αντιμετώπισης είναι και η βιολογική καταπολέμηση. Ως βιολογική καταπολέμηση συνήθως αναφέρεται η με οικολογικό τρόπο αντιμετώπιση των εχθρών των καλλιεργούμενων φυτών στηριζόμενη σε άλλα έντομα και μικροοργανισμούς. Επίσης, σύμφωνα με τον Burpee (1990), βιολογική καταπολέμηση είναι η μείωση της επιβίωσης ή της δραστηριότητας ενός εχθρού ή παθογόνου σαν αποτέλεσμα της αλληλεπίδρασης μεταξύ ζωντανών οργανισμών.

Σε αυτή την διπλωματική εργασία πραγματοποιήθηκαν πειράματα μικροσκοπίας φθορισμού με ένα γενετικά μετασχηματισμένο με την πράσινη φθορίζουσα πρωτεΐνη (gfp) στέλεχος του Fs-K, έτσι ώστε να παρακολουθηθεί (monitoring) η πορεία των μυκήτων και η αλληλεπίδραση τους εντός του φυτικού ιστού. Επίσης, για την παρακολούθηση της πορείας του μυκορριζικού μύκητα στις ρίζες του φυτού, έγινε χρώση των ριζών με trypan blue. Τέλος, χρησιμοποιήθηκε η τεχνική της Real Time PCR για τον ποσοτικό έλεγχο του αποικισμού του μύκητα στα φυτά της τομάτας

Σκοπός της εργασίας ήταν να φανεί ποια είναι η πορεία αποικισμού του κάθε μύκητα στο φυτό τομάτας καθώς και ποια είναι η αλληλεπίδραση αυτών των δύο όταν συνυπάρχουν στη ρίζα του φυτού.

B.
ΜΕΘΟΔΟΙ ΚΑΙ ΥΛΙΚΑ

1. ΠΕΙΡΑΜΑΤΙΚΟΣ ΣΧΕΔΙΑΣΜΟΣ

Όπως αναφέρθηκε και προηγουμένως η πειραματική προσέγγιση που επιχειρήθηκε στα πλαίσια της διπλωματικής εργασίας ήταν η εξής:

1. πειράματα ηλεκτρονικής μικροσκοπίας φθορισμού με το μετασχηματισμένο στέλεχος Fsk-gfp με την πράσινη φθορίζουσα πρωτεΐνη (gfp) με σκοπό τη λεπτομερή περιγραφή του προτύπου αποικισμού της ρίζας φυτών τομάτας από τον ενδοφυτικό μύκητα
2. Χρώση με trypan blue για την περιγραφή του αποικισμού της ρίζας από το μυκορριζικό μύκητα καθώς και μελέτη των δομών του μύκητα στα κύτταρα των ριζών
3. Real Time PCR για την εξέταση του αποικισμού και της αλληλεπίδρασης των δύο μυκήτων στις ρίζες τομάτας.

Συνοπτικά, ακολουθήθηκε ο εξής πειραματικός σχεδιασμός: φύτευση φυτών τομάτας και χάραξη πειραματικών τεμαχίων, εμβολιασμός φυτών με τον *Fusarium solani* και τον *Glomus intraradices*, συλλογή ιστών και απομόνωση RNA για την χρησιμοποίησή τους στη διαδικασία της Real time PCR. Επίσης πραγματοποιήθηκαν δυο (2) πειράματα σε διαφορετικές ημερομηνίες, με διαφορετική μολυσματική μονάδα του στελέχους του μυκορριζικού μύκητα καθώς και τροποποίηση στους χειρισμούς.

1.1. ΦΥΤΙΚΟ ΥΛΙΚΟ ΚΑΙ ΧΕΙΡΙΣΜΟΙ ΠΡΙΝ ΤΗ ΣΠΟΡΑ-ΠΡΟΕΤΟΙΜΑΣΙΑ ΕΔΑΦΙΚΟΥ ΥΠΟΣΤΡΩΜΑΤΟΣ

Οι σπόροι τομάτας που χρησιμοποιήθηκαν και στα δύο πειράματα ήταν ποικιλίας ACE. Πριν την φύτευση τους απολυμάνθηκαν για πέντε λεπτά σε υποχλωριώδες νάτριο και στη συνέχεια ξεπλύθηκαν σχολαστικά με αποστειρωμένο νερό, αφέθηκαν να στεγνώσουν για δέκα λεπτά πάνω σε διηθητικό χαρτί και στη συνέχεια τοποθετήθηκαν σε τριβλία petri με διηθητικό χαρτί όπου αφέθηκαν στο σκοτάδι για 2 ημέρες για προβλάστηση.

Στα πειράματα, ως υπόστρωμα χρησιμοποιήθηκαν άμμος, περλίτης και βερμικουλίτης σε αναλογία 1:1:1. Η άμμος χρησιμοποιήθηκε έτσι ώστε να γίνεται εύκολα ο διαχωρισμός των ριζών από το υπόστρωμα κατά την διαδικασία της δειγματοληψίας. Ο περλίτης παρέχει στη ιδανική αναλογία αέρα και νερού και

παρουσιάζει τις ιδανικότερες συνθήκες στράγγισης. Επίσης, αποτελεί ένα ομοιόμορφο μέσο ανάπτυξης καθιστώντας τις ρίζες πυκνότερες με ομοιόμορφη κατανομή στο υπόστρωμα. Ο βερμικουλίτης έχει την ιδιότητα να συγκρατεί αρκετές φορές το ίδιο του το βάρος σε νερό και δίνει στο υπόστρωμα μια ευάερη δομή. Το υπόστρωμα αποστειρώθηκε με υγρή αποστείρωση στους 121 °C για 30 λεπτά.

Τα προβλαστημένα σπόρια τοποθετήθηκαν σε φυτοδοχεία διαμέτρου 8-10 εκατοστών καθένα από τα οποία περιείχε περίπου 150 cm³ από το υπόστρωμα. Το κάθε φυτοδοχείο περιείχε 4 σπέρματα για την κάλυψη τυχόν απωλειών βλάστησης.

Στο πρώτο πείραμα, μετά τη σπορά τα φυτοδοχεία χωρίστηκαν σε 6 χειρισμούς όπου ο κάθε ένας αποτελείτο από 6 επαναλήψεις:

- A. εμβολιασμός μόνο με FSK
- B. εμβολιασμός μόνο με AMF
- Γ. ταυτόχρονος εμβολιασμός με FSK και AMF
- Δ. αρχικός εμβολιασμός με FSK και μετά από 7 ημέρες με AMF
- Ε. αρχικός εμβολιασμός με AMF και μετά από 7 ημέρες με FSK
- Στ Control

Στο δεύτερο πείραμα τα φυτοδοχεία χωρίστηκαν σε 4 χειρισμούς όπου ο κάθε ένας αποτελείτο από 6 επαναλήψεις:

- A. εμβολιασμός μόνο με FSK
- B. εμβολιασμός μόνο με AMF
- Γ. ταυτόχρονος εμβολιασμός με FSK και AMF
- Δ. Control

Μετά την σπορά, τα φυτοδοχεία τοποθετήθηκαν σε θάλαμο ανάπτυξης φυτών σε θερμοκρασία 20-22 °C, σχετικής υγρασίας 65% και φωτοπερίοδο 16 ωρών. Τα φυτά ποτίζονταν με απιονισμένο νερό κάθε 2 ημέρες και με θρεπτικό διάλυμα 25% μία φορά την εβδομάδα. Αξίζει να σημειωθεί ότι το συγκεκριμένο διάλυμα χρησιμοποιήθηκε λόγω της μειωμένης περιεκτικότητας του σε φώσφορο (P). Η σύσταση του θρεπτικού διαλύματος παρουσιάζεται στο παρακάτω πίνακα.

STOCK	C(συγκέντρωση)	ml/lt (25% θρεπτ. δ/μα)
MgSO ₄	1M	0.5 ml
KH ₂ PO ₄	1M	0.25 ml
FeEDTA	1/10 M	0.25ml
Microelements*		0.25ml
CaCL ₂	0.5M	2.5ml
KCL	1M	1.25 ml
KNO ₃	20gr/100ml	1.25 ml
Ca(NO ₃) ₂ *4H ₂ O	2,36gr/100ml	1.25 ml

*Τα Microelements που χρησιμοποιήθηκαν έχουν την εξής σύσταση:

MICROELEMENTS	Gr/Lt stock solution
H ₃ BO ₃	2.86
MnCl ₂ *4H ₂ O	1.81
ZnCl ₂	0.11
CuCl ₂ *H ₂ O	
H ₂ MoO ₄	0.5M

1.2. ΘΡΕΠΤΙΚΟ ΥΛΙΚΟ ΑΝΑΠΤΥΞΗΣ ΤΟΥ ΜΥΚΗΤΑ

Η σύνθεση των θρεπτικών υλικών τα οποία χρησιμοποιήθηκαν στην παρούσα εργασία, ήταν η ακόλουθη:

PDB (Potato Dextrose Broth)	Potato Dextrose Broth (ScharlauMicrobiology) 24 gr/lt,
PDA (Potato Dextrose Agar)	Potato Dextrose Broth (Scharlau Microbiology) 24 gr/lt., Agar 1,7 % κ.β.

1.3. ΚΑΛΛΙΕΡΓΕΙΑ ΚΑΙ ΣΥΝΘΗΚΕΣ ΑΝΑΠΤΥΞΗΣ ΤΩΝ ΜΥΚΗΤΩΝ

Το μη παθογόνο, μετασχηματισμένο με GFP, στέλεχος του μύκητα *Fusarium solani* **K-gfp** που χρησιμοποιήθηκε στην παρούσα εργασία διατηρείται στους 4°C σε τριβλία με θρεπτικό υλικό PDA (Potato Dextrose Agar) (Kavroulakis et al, 2007). Για την παραγωγή κονιδίων χρησιμοποιήθηκαν υγρές καλλιέργειες του μύκητα σε

θρεπτικό υλικό PDB (Potato Dextrose Broth). Οι φιάλες με τον μη παθογόνο μύκητα επωάζονταν στους 25 °C για πέντε (5) ημέρες με ανάδευση (150 στρ/min). Η απομόνωση των κονιδίων του μύκητα έγινε μετά από διήθηση της καλλιέργειας μέσα από τουλουπάνι και φυγοκέντρωση στις 4000 στρ/λεπτό για τέσσερα (4) λεπτά. Τα κονίδια επανααιωρήθηκαν σε φυσιολογικό ορό (0,9% NaCl) προκειμένου να μην έχουμε φαινόμενα σπαργής. Η συγκέντρωση των κονιδίων προσδιορίστηκε με την χρήση του αιματοκυτόμετρου και με την κατάλληλη αραιώση επετεύχθη η επιθυμητή συγκέντρωση του μολύσματος (10^5 κονίδια/ml υποστρώματος).

Ο μυκορριζικός μύκητας που χρησιμοποιήθηκε, έχει ταυτοποιηθεί ως ένα στέλεχος (MC3**i**R₅) του μύκητα *Glomus intraradices* (Αντωνιάδης Κ. 2009). Στο πρώτο πείραμα η μολυσματική μονάδα του μύκητα που χρησιμοποιήθηκε, συλλέχθηκε στις 28/10/08 (Αντωνιάδης Κ. 2009). Στο δεύτερο πείραμα, το μολυσματικό υλικό (σπόρια και υφές μαζί με ρίζες του φυτού-παγίδα *Zea mays*), δημιουργήθηκε στις 27/09/2009 ως εξής: από το εμβολιασμένο, με το μυκορριζικό μύκητα, ανεπτυγμένο φυτό *Zea mays*, συλλέχθηκε αρχικά όλο το ριζικό του σύστημα. Στην συνέχεια, τεμαχίστηκε σε πολύ μικρά κομμάτια και τοποθετήθηκε σε σακούλα μαζί με μέρος του υποστρώματος του.

1.4. ΕΦΑΡΜΟΓΗ ΕΜΒΟΛΙΑΣΜΟΥ ΤΩΝ ΦΥΤΩΝ ΜΕ ΤΟ

ΜΕΤΑΣΧΗΜΑΤΙΣΜΕΝΟ ΣΤΕΛΕΧΟΣ ΤΟΥ ΜΥΚΗΤΑ *F. solani K-gfp*

ΚΑΘΩΣ ΚΑΙ ΜΕ ΤΟ ΜΥΚΟΡΡΙΖΙΚΟ ΜΥΚΗΤΑ *G. intraradices*

Ο εμβολιασμός των φυτών με τον ανταγωνιστικό μύκητα *Fusarium solani K* εφαρμόστηκε ανά περιόδους ανάλογα με τους χειρισμούς που προαναφέρθηκαν, δηλαδή όσον αφορά για το πρώτο πείραμα, στον πρώτο, τρίτο και τέταρτο χειρισμό αμέσως μετά τη σπορά, ενώ στον πέμπτο χειρισμό 7 ημέρες μετά τη φύτευση των σπερμάτων. Επίσης στο δεύτερο πείραμα και σύμφωνα με τους χειρισμούς, εφαρμόστηκε αμέσως μετά την σπορά. Κατόπιν, τα φυτά αφέθηκαν απότιστα για 2 ημέρες. Τα φυτά μάρτυρες δέχθηκαν ίσο όγκο νερού αντί για μόλυσμα.

Η ίδια διαδικασία ακολουθήθηκε για τον εμβολιασμό με τις δύο μολυσματικές μονάδες του μυκορριζικού μύκητα *Glomus intraradices*, δηλαδή για το πρώτο πείραμα, εμβολιασμός την ημέρα της σποράς στον δεύτερο, τρίτο και πέμπτο χειρισμό ενώ 7 ημέρες μετά την εφαρμογή του μύκητα *FsK-gfp*, για τον τέταρτο χειρισμό. Η δεύτερη μολυσματική μονάδα εφαρμόστηκε στο επόμενο πείραμα κατά

την διαδικασία σποράς, σύμφωνα πάντα με τους χειρισμούς. Αξίζει να σημειωθεί ότι χρησιμοποιήθηκαν 20gr υποστρώματος με μόλυσμα του μυκορριζικού μύκητα και στα δύο πειράματα. Τα φυτά-μάρτυρες, κατ' αντιστοιχία, δέχθηκαν μόνο νερό.

2. ΔΕΙΓΜΑΤΟΛΗΨΙΑ- ΕΞΕΤΑΣΗ ΔΕΙΓΜΑΤΩΝ

2.1. ΔΕΙΓΜΑΤΟΛΗΨΙΑ ΚΑΙ ΠΡΟΕΤΟΙΜΑΣΙΑ ΓΙΑ ΜΙΚΡΟΣΚΟΠΙΚΗ ΠΑΡΑΤΗΡΗΣΗ ΤΟΥ FSK

Οι χρόνοι που επιλέχθηκαν για τις δειγματοληψίες ήταν στις 15 και 30 ημέρες μετά την σπορά των φυτών. Για κάθε χειρισμό που περιλάμβανε τον μύκητα *FsK-gfp*, συλλέχθηκαν 6 φυτά στα οποία αποκόπηκε το υπέργειο τμήμα και σχολαστικά ξεπλένονταν οι ρίζες από το υπόστρωμα με όσο το δυνατόν μικρότερη απώλεια ριζικού ιστού μπορούσε να επιτευχθεί. Κατόπιν οι ρίζες που είχαν τον *FsK-gfp* τοποθετήθηκαν παράλληλα σε αντικειμενοφόρες πλάκες και σκεπάστηκαν με καλυπτρίδες, και ακολούθησε η παρατήρηση τους σε μικροσκόπιο φθορισμού (Leica 5500).

Η καταγραφή των αποτελεσμάτων αφορά τον τρόπο διείσδυσης του μύκητα *FsK-gfp* στο ριζικό σύστημα του φυτού, όταν αναπτύσσεται μαζί με το φυτό, όταν αναπτύσσεται ταυτόχρονα με το μυκορριζικό μύκητα και όταν αναπτύσσεται 7 ημέρες μετά την προσθήκη του μυκορριζικού μύκητα.. Για τη μελέτη του αποικισμού μετρήθηκε στο μικροσκόπιο, σε μεγέθυνση 40X και υπό UV Light, η αναλογία των αποικισμένων, από μύκητα, ριζών προς το σύνολο των ριζών, σε σύνολο 100 διασταυρώσεων (Mc Gonigle et al, 1990). Το UV Light χρησιμοποιήθηκε για τον λόγο ότι το μετασχηματισμένο με *gfp* στέλεχος του μύκητα *FsK* φθορίζει υπό το φως της UV και συγκεκριμένα εκπέμπει πράσινο φως και έτσι φαίνονται ευκολότερα οι υφές του μύκητα.

2.2. ΔΕΙΓΜΑΤΟΛΗΨΙΑ ΚΑΙ ΜΕΛΕΤΗ ΒΑΘΜΟΥ ΑΠΟΙΚΙΣΜΟΥ ΤΟΥ ΜΥΚΟΡΡΙΖΙΚΟΥ ΜΥΚΗΤΑ

Η παραπάνω διαδικασία δειγματοληψίας πραγματοποιήθηκε και για τους χειρισμούς που περιλάμβαναν τον μυκορριζικό μύκητα *Glomus intraradices*. Ο έλεγχος του αποικισμού έγινε σύμφωνα με τον Sylvia (1994). Οι ρίζες που χρησιμοποιήθηκαν είχαν συλλεχθεί όπως παραπάνω από τους χειρισμούς που είχαν εμβολιασθεί με το μυκορριζικό μύκητα. Αρχικά οι ρίζες τοποθετήθηκαν σε διάλυμα

10 % KOH, εν συνεχεία σε υδατόλουτρο στους 80°C για 40 min. Ακολούθως έγινε ξέπλυμα με νερό και οξύνιση για 15 min με HCl. Στη συνέχεια έγινε χρώση των ριζών με τη χρωστική trypan-blue. Για την προετοιμασία της χρωστικής, χρησιμοποιήθηκαν 800 ml γλυκερίνη, 800 ml λακτικού οξέος, 800 ml απεσταγμένου νερού και 1,2 g trypan-blue. Τα ριζικά τεμάχια τοποθετήθηκαν σε αντικειμενοφόρο πλάκα και καλύφθηκαν με PVLG (Polyvinyl alcohol-lactic acid-glycerol). Για τον υπολογισμό του ποσοστού αποικισμού έγινε σάρωση των ριζών σε μικροσκόπιο (LEICA DFC 490) σε μεγέθυνση 100X και 400X υπολογίζοντας την αναλογία των αποικισμένων από μύκητα ριζών προς το σύνολο των ριζών, σε σύνολο 200 διασταυρώσεων (Giovannetti and Mosse, 1980 Clapp et al, 1996).

2.3. ΜΕΛΕΤΗ ΤΟΥ ΒΑΘΜΟΥ ΑΠΟΙΚΙΣΜΟΥ ΤΟΥ FSK ΜΕΣΩ ΤΗΣ ΔΙΑΔΙΚΑΣΙΑΣ REAL TIME PCR

2.3.1. Διαδικασία Δειγματοληψίας Και Εξαγωγής DNA

Για τη μελέτη του επιπέδου αποικισμού του *FsK-gfp* χρησιμοποιήθηκαν φυτά από τους παραπάνω χειρισμούς. Κατά τη δειγματοληψία 15 και 30 ημέρες μετά τη σπορά συλλέχθηκαν και επιπλέον ρίζες από κάθε χειρισμό για την χρησιμοποίηση τους στην Real Time PCR. Για το πάγωμα των ριζών χρησιμοποιήθηκε υγρό άζωτο και η αποθήκευσή τους έγινε στους -80°C. Η εξαγωγή του DNA έγινε με το Plant DNA extraction kit Macherey-Nagel. Κατά τη μέθοδο αυτή έγιναν με βάση το πρωτόκολλο οι εξής διεργασίες: ομογενοποίηση του δείγματος, λύση των κυττάρων με κατάλληλο buffer, φιλτράρισμα, προσαρμογή, πλύσιμο και εξαγωγή του DNA από το δείγμα.

2.3.2. Προσδιορισμός Συγκέντρωσης Και Καθαρότητας Του DNA

Ο προσδιορισμός της συγκέντρωσης και της καθαρότητας των νουκλεϊνικών οξέων σε υδατικό διάλυμα πραγματοποιήθηκε με τη φωτομετρική μέθοδο. Από κάθε δείγμα μεταφέρθηκε 1 μl σε σωλήνα erpendorf, όπου και αραιώθηκε με αποσταγμένο νερό (dH₂O) σε αναλογία 1:50. Το δείγμα που προκύπτει τοποθετήθηκε σε ειδική κυβέτα και προσδιορίστηκε το φάσμα απορρόφησης από τα 240 έως τα 300 nm. Σε υδατικά διαλύματα νουκλεϊνικών οξέων χωρίς την παρουσία άλλων προσμίξεων, όπως πρωτεΐνες και πολυσακχαρίδια, η συγκέντρωση των νουκλεϊνικών οξέων δίδεται από την εξίσωση:

$D = O.D._{260} \times \text{συντελεστής αραίωσης}$

όπου: $O.D._{260}$, η οπτική πυκνότητα του δείγματος στα 260 nm και D η σταθερά που εξαρτάται από το είδος του νουκλεϊνικού οξέος του περιέχεται στο δείγμα. Σε καθαρά διαλύματα DNA, η σταθερά D ισούται με 50 mg/ml. Για την εκτίμηση της καθαρότητας ενός δείγματος νουκλεϊνικών οξέων υπολογίστηκε ο λόγος $O.D._{260}/O.D._{280}$ και $O.D._{240}/O.D._{260}$. Για τιμές μεταξύ 1,8-2,0 και 0,5, αντιστοίχως, το δείγμα θεωρήθηκε ικανοποιητικής καθαρότητας.

2.3.3. Ενίσχυση Ακολουθιών DNA Με Τη Χρήση Της Τεχνικής PCR (Real Time-PCR)

Η αλυσιδωτή αντίδραση πολυμεράσης πραγματικού χρόνου (real-time PCR) ή αλλιώς και ποσοτική αλυσιδωτή αντίδραση πολυμεράσης (qPCR) είναι μια μέθοδος που βασίζεται στην PCR και χρησιμοποιείται για να ενισχύσει τμήματα DNA με την ταυτόχρονη ποσοτικοποίηση του αριθμού των αντιγράφων που προκύπτουν. Επιτρέπει την ανίχνευση και ποσοτικοποίηση πολλαπλών τμημάτων DNA σε απόλυτο αριθμό με τη χρήση προτύπων διαφόρων συγκεντρώσεων DNA. Εναλλακτικά ανιχνεύει την σχετική ποσότητα αντιπροσώπων ενός τμήματος DNA με σημείο αναφοράς την ποσότητα DNA που χρησιμοποιήθηκε ή την ποσότητα ενός άλλου σταθερής συγκέντρωσης τμήματος DNA.

Η διαδικασία ακολουθεί τις γενικές αρχές της PCR δίνοντας τη δυνατότητα να παρακολουθείται σε πραγματικό χρόνο ο πολλαπλασιασμός των αντιγράφων σε αντίθεση με την απλή PCR, όπου το προϊόν της αντίδρασης είναι ανιχνεύσιμο μόνο μετά την ολοκλήρωσή της. Δύο είναι οι πιο κοινές μέθοδοι ανίχνευσης των προϊόντων στην real-time PCR: (1) φθορίζουσες χρωστικές που δεσμεύονται σε νέοσυντιθέμενα δίκλινα τμήματα DNA και γίνονται αντιληπτές από τους ανιχνευτές των ειδικών μηχανημάτων real-time PCR και (2) αλληλουχίες-ανιχνευτές, ολιγονουκλεοτίδια σχεδιασμένα με βάση την ακριβή αλληλουχία των επιθυμητών τμημάτων DNA προς ποσοτικοποίηση, τα οποία φέρουν φθορίζουσες ομάδες και αυτές με τη σειρά τους γίνονται αντιληπτές αφού απελευθερώνονται από τα μόρια των συμπληρωματικών ανιχνευτών που δεσμεύονται στον στόχο τους κατά την διαδικασία της τεχνητής αντιγραφής του DNA.

Πολλές φορές η Real-Time PCR συνδυάζεται με την πρότερη μετατροπή μιας ποσότητας RNA σε DNA, χρησιμοποιώντας τη μέθοδο της αντίστροφης μεταγραφής, με σκοπό κυρίως την μελέτη των επιπέδων έκφρασης γονιδίων. Χρησιμοποιείται

γενικά ως διαγνωστικό εργαλείο για την ανίχνευση ενδογενών παθολογικών γονιδίων ή τμημάτων DNA παθογόνων μικροοργανισμών-εισβολέων. Στη βασική έρευνα χρησιμοποιείται για την ποσοτικοποίηση και παρακολούθηση της διαφορικής έκφρασης γονιδίων-στόχων μετά από μεταχειρίσεις ή για την αναπτυξιακή μελέτη των επιπέδων έκφρασης γονιδίων-στόχων. Στην παρούσα εργασία η μέθοδος χρησιμοποιήθηκε για τη μελέτη της συσσώρευσης κυττάρων μύκητα σε φυτικά όργανα.

2.3.4. Επιλογή Των Εκκινητών

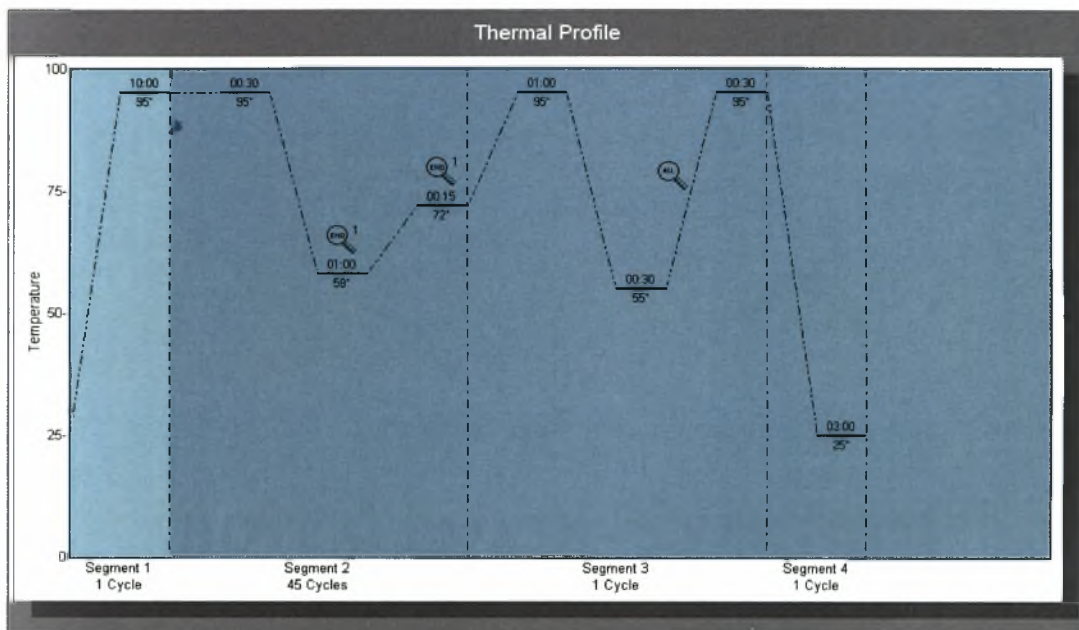
Η επιλογή των εκκινητών πραγματοποιήθηκε με τη χρήση του εξειδικευμένου προγράμματος επιλογής εκκινητών Beacon designer v7.0. Το μέγεθος των ενισχυόμενων τμημάτων ήταν περίπου 150 ζεύγη βάσεων. Οι εκκινητές επιλέχθηκαν με τέτοιο τρόπο ώστε να αποφευχθεί ο σχηματισμός ομοδιμερών ή ετεροδιμερών. Η δημιουργία ομο- και ετεροδιμερών από τους εκκινητές έχει ως αποτέλεσμα την εκπομπή μη εξειδικευμένου φθορισμού κατά την αντίδραση της PCR πραγματικού χρόνου. Οι εκκινητές που χρησιμοποιήθηκαν για την παρούσα εργασία φαίνονται στον παρακάτω πίνακα:

Σύμβολο εκκινητή	Νουκλεοτιδική Αλληλουχία Ορθόδρομου Εκκινητή 5'→3'	Σύμβολο εκκινητή	Νουκλεοτιδική Αλληλουχία Οπισθόδρομου Εκκινητή 5'→3'
LeUbiF	AAAG ATG GAA GGA CTC TGG CG	LeUbiR	TCA CAA CAC ATC ACA AGG TC

2.3.5. Αντίδραση Της qRT-PCR

Η αντίδραση πραγματοποιήθηκε σε συσκευή Mx3005P (ABI). Το θερμοκρασιακό πρόγραμμα που χρησιμοποιήθηκε απεικονίζεται στην Εικόνα Β1. Όλες οι αντιδράσεις πραγματοποιήθηκαν με το ίδιο θερμοκρασιακό πρόγραμμα και καταγράφονταν για 45 κύκλους. Στο τέλος κάθε αντίδρασης ακολουθούσε η παρακολούθηση της καμπύλης αποδιάταξης βάση της οποίας επιβεβαιώθηκε η ύπαρξη ενός μόνο προϊόντος στην κάθε αντίδραση. Σε όλες τις περιπτώσεις το μίγμα της αντίδρασης προετοιμάζονταν σύμφωνα με τις οδηγίες της κατασκευάστριας εταιρίας (Stratagene), ενώ στην τελική αντίδραση χρησιμοποιήθηκε η χρωστική αναφοράς ROX. Μετά το τέλος των αντιδράσεων τα δεδομένα εξήχθησαν με τη μορφή πινάκων και επεξεργάστηκαν με τη χρήση του προγράμματος LinRegPCR

προκειμένου να προσδιοριστούν η αποτελεσματικότητα των εκκινήτων (efficiency) της κάθε αντίδρασης αλλά και ο αριθμός των κύκλων ορίου (Ct), ο οποίος αντιπροσωπεύει τον αριθμό των κύκλων της αντίδρασης πάνω από τους οποίους είναι δυνατή η ανίχνευση φοροισμού. Για κάθε χειρισμό πραγματοποιήθηκαν τρεις βιολογικές επαναλήψεις. Στη συνέχεια πραγματοποιήθηκε στατιστική επεξεργασία των αποτελεσμάτων (Livak and Schmittgen, 2001).



Εικόνα Β.1. : Θερμοκρασιακό πρόγραμμα της αλυσιδωτής αντίδρασης πολυμεράσης πραγματικού χρόνου.

Γ.
ΑΠΟΤΕΛΕΣΜΑΤΑ - ΣΥΖΗΤΗΣΗ

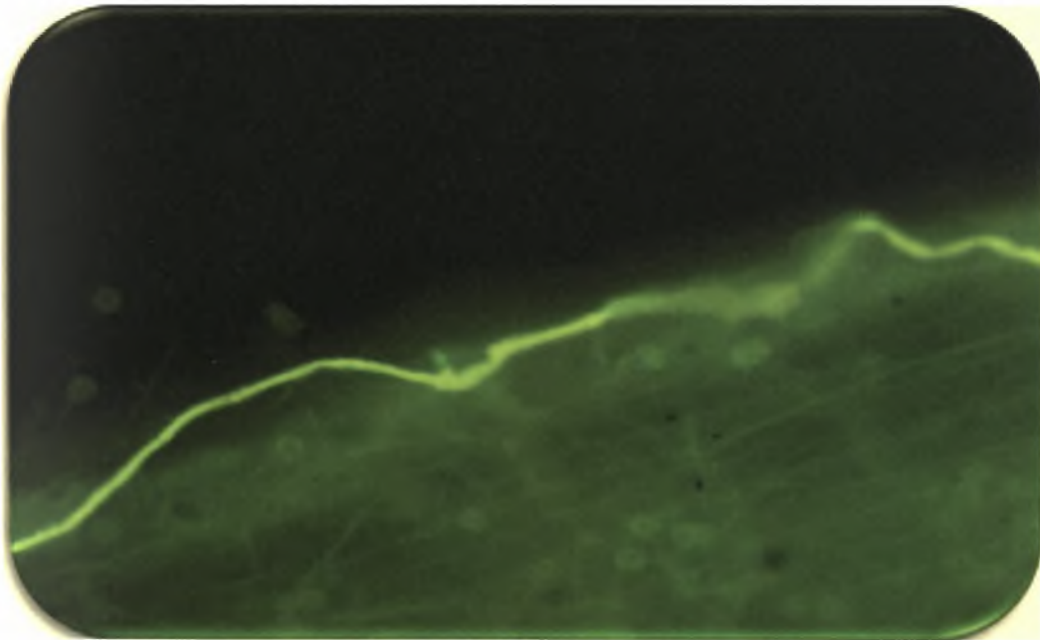
1. ΑΠΟΤΕΛΕΣΜΑΤΑ

Κατά την διάρκεια των μικροσκοπικών παρατηρήσεων αποκομίσθηκαν σημαντικές πληροφορίες για τον τρόπο που αποικίζει το φυτό ο μύκητας *FsK-gfp* καθώς και ποια είναι η συμπεριφορά του στη ρίζα του όταν εμβολιάζεται είτε μόνος του είτε με την παρουσία του μυκορριζικού μύκητα *Glomus intraradices*. Επίσης, συλλέχθηκαν πληροφορίες για τον αποικισμό του μυκορριζικού μύκητα και τις δομές που δημιουργεί κατά τον αποικισμό στο ριζικό σύστημα του φυτού.

1.1. ΑΠΟΤΕΛΕΣΜΑΤΑ 1^{ου} ΠΕΙΡΑΜΑΤΟΣ

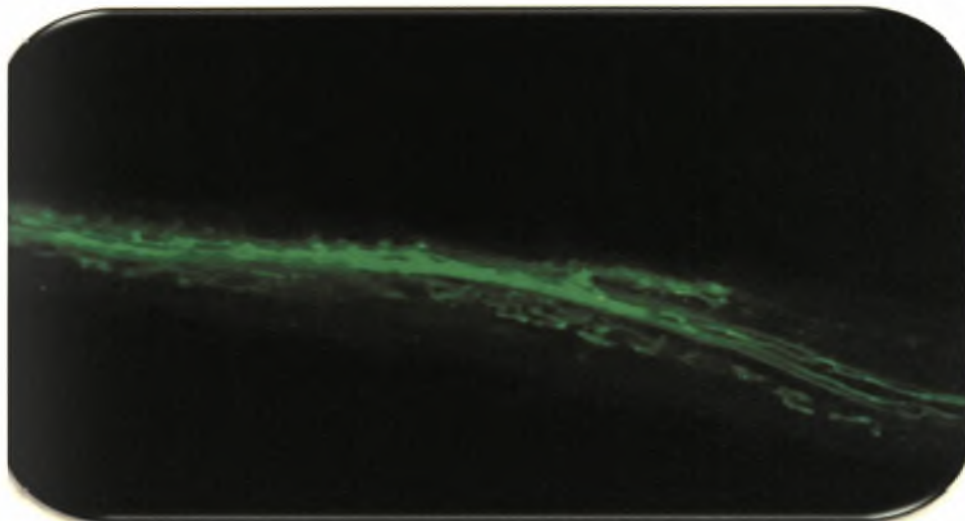
1.1.1. Μικροσκοπία Φθορισμού

Κατά τη μικροσκοπία με τη διαδικασία φθορισμού συλλέχθηκαν οι παρακάτω πληροφορίες. Στην δειγματοληψία των 15 ημερών, οι υφές του μύκητα *FsK-gfp* εμφανίσθηκαν σε όλους τους χειρισμούς. Στις περισσότερες των περιπτώσεων, φάνηκε ο μύκητας να προσπαθεί να εισέλθει στο ριζικό σύστημα, ενώ ξεκάθαρα καταλάμβανε μέρος του χώρου γύρω από το φυτό.



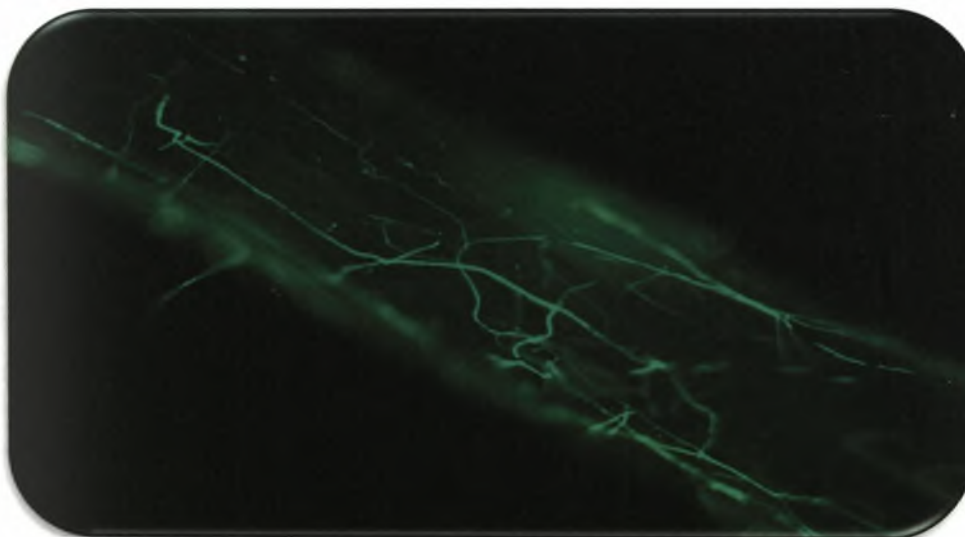
Εικόνα Γ.1 Μικροφωτογραφία μικροσκοπίου φθορισμού της ανάπτυξης του μύκητα *FsK-gfp* στο ριζικό σύστημα φυτών τομάτας. Στη δειγματοληψία των 15 ημερών ο μύκητας *FsK-gfp* έχει προσεγγίσει το ριζικό σύστημα του φυτού και προσπαθεί να εισέρθει εντός αυτού.

Από τις μικροσκοπικές παρατηρήσεις και τις μετρήσεις του βαθμού αποικισμού που έγιναν με τη μέθοδο Mc Gonigle, προκύπτει ότι, ο μύκητας *FsK-gfp* αποικίζει το ριζικό σύστημα σε όλους τους χειρισμούς, στο ίδιο βαθμό, είτε όταν εμβολιασθεί μόνος του είτε όταν εμβολιασθεί μαζί με τον *Glomus intraradices*. Η σειρά του εμβολιασμού των φυτών με τους δύο μύκητες επίσης, δεν φαίνεται να επηρεάζει σημαντικά το βαθμό αποικισμού.



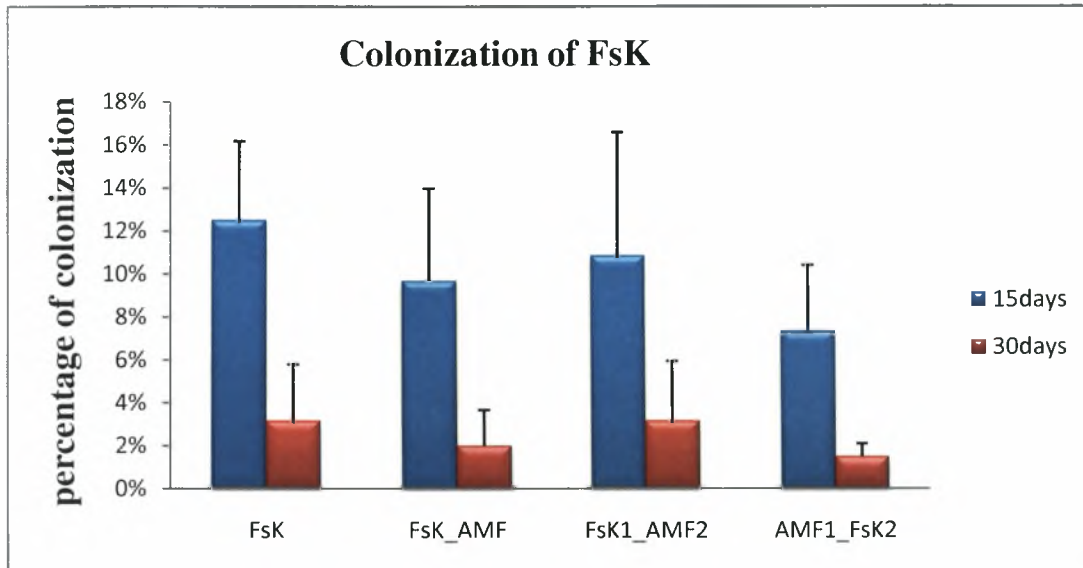
Εικόνα Γ.2 Μικροφωτογραφία μικροσκοπίου φθορισμού της ανάπτυξης του μύκητα *FsK - gfp* στο ριζικό σύστημα φυτών τομάτας Κατά τη δειγματοληψία των 15 ημερών στον ταυτόχρονο εμβολιασμό του μύκητα *FsK-gfp* με τον μυκορριζικό μύκητα φαίνεται ότι ο μύκητας έχει εισέλθει ήδη στο αγωγό σύστημα του φυτού

Κατά την δειγματοληψία των 30 ημερών ο μύκητας *FsK-gfp* εμφανίσθηκε στην ρίζα αλλά και στο χώρο γύρω από το φυτό, σε μικρότερο ποσοστό από την δειγματοληψία των 15 ημερών, χωρίς όμως να παρατηρούνται στατιστικά σημαντικές διαφορές.



Εικόνα Γ.3. Μικροφωτογραφία μικροσκοπίου φθορισμού της ανάπτυξης του μύκητα *FsK - gfp* στο ριζικό σύστημα φυτών τομάτας Στη δειγματοληψία των 30 ημερών ο *FsK-gfp* παρουσίασε μείωση του αποικισμού του σε σύγκριση με το βαθμό αποικισμού στις 15 ημέρες μετά τον εμβολιασμό των φυτών σε όλες τις μεταχειρίσεις

Οι μετρήσεις των δύο δειγματοληψιών χρησιμοποιήθηκαν για τη δημιουργία του διαγράμματος Γ1, στο οποίο εμφανίζονται τα μειωμένα ποσοστά αποικισμού του μύκητα στις 30 ημέρες σε σύγκριση με την δειγματοληψία των 15 ημερών



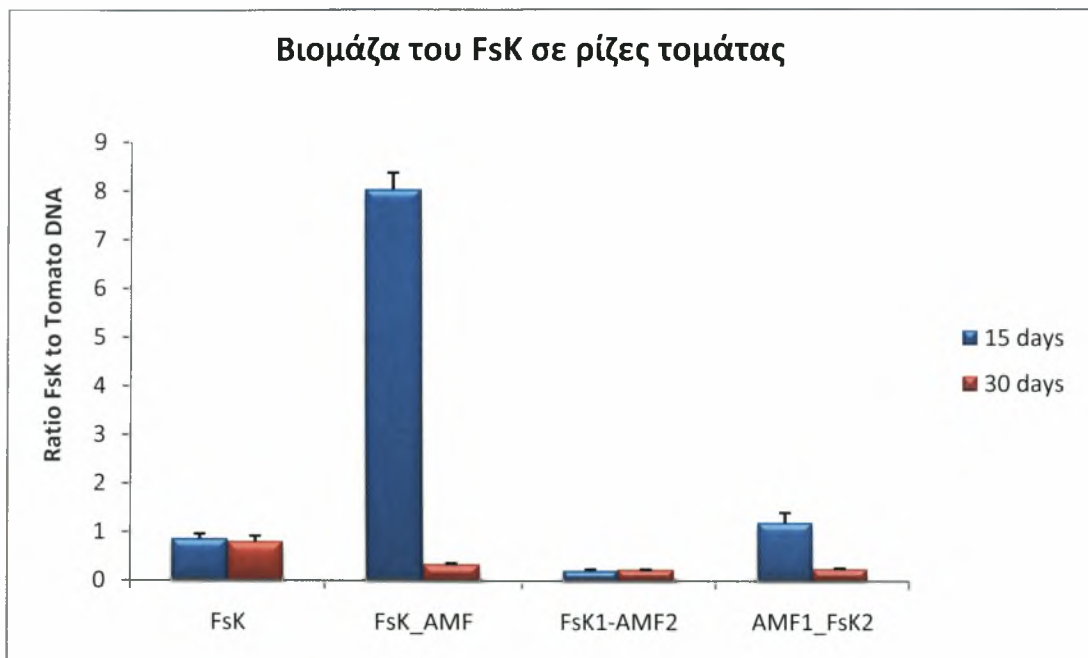
Διάγραμμα Γ.1. Ποσοστά αποικισμού του μύκητα *FsK-gfp* με τη μέθοδο *Mc Gonigle* - εκτίμηση μικροσκοπίας- για όλες τις μεταχειρίσεις και στις δυο δειγματοληψίες (15- και 30- ημέρες μετά τον εμβολιασμό των φυτών). Οι μπάρες απεικονίζουν τα ποσοστά αποικισμού του *FsK-gfp* όταν εμβολιάστηκε μόνος του (*FsK*), στην επέμβαση του ταυτόχρονου εμβολιασμού των δύο μυκήτων (*FsK-AMF*), όταν εμβολιάστηκε πρώτος ο *FsK-gfp* και στη συνέχεια ο μυκορριζικός μύκητας (*FsK1-AMF2*) καθώς και όταν ο *FsK-gfp* εμβολιάστηκε μετά τον μυκορριζικό μύκητα (*AMF1- FsK2*). Επίσης, παρουσιάζεται ο μέσος όρος και η τυπική απόκλιση κάθε χειρισμού. ($n=6$)

1.1.2. Μελέτη Του Βαθμού Αποικισμού Του *FsK* Μέσω Της Διαδικασίας

Real Time PCR

Κατά τη ποσοτική μελέτη με την μέθοδο της Real Time PCR του βαθμού αποικισμού του ριζικού συστήματος της τομάτας από τον *FsK-gfp*, εμφανίζεται αυξημένο ποσοστό του αποικισμού κατά τον ταυτόχρονο εμβολιασμό με τον *G. intraradices* στην δειγματοληψία των 15 ημερών. Στις 30 ημέρες, υπήρξε μείωση της εμφάνισης του στους περισσότερους χειρισμούς, εκτός της περίπτωσης όπου εμβολιάζεται μόνος του, όπου το ποσοστό του εμφανίζεται να είναι στάσιμο.

Τέλος, αξίζει να αναφερθεί ότι, εκτός της επέμβασης με τον ταυτόχρονο εμβολιασμό των δύο μυκήτων, στις υπόλοιπες επεμβάσεις, οι μικρές αποκλίσεις των τιμών δεν συνάδουν για εξαγωγή ασφαλών συμπερασμάτων.



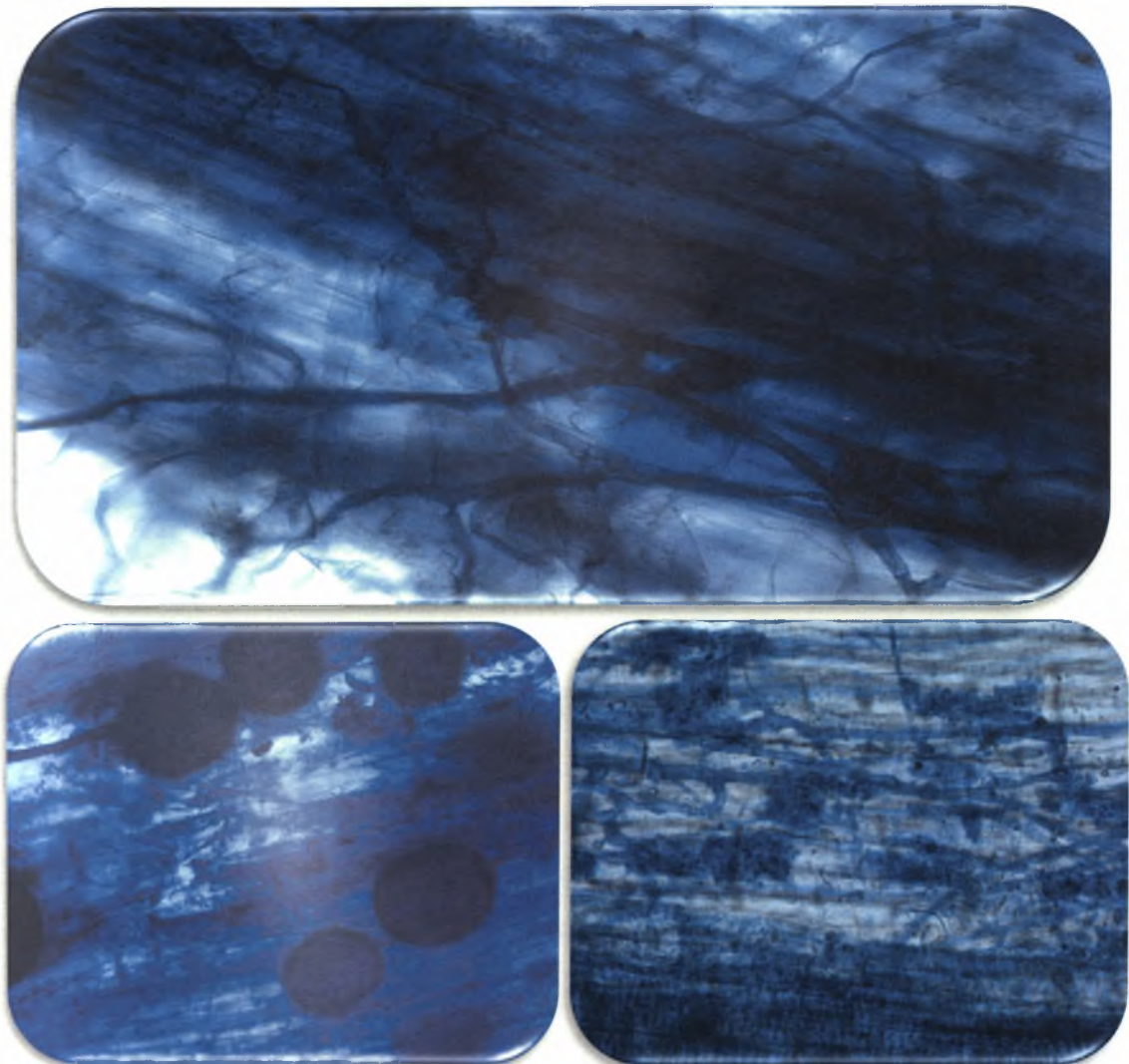
Διάγραμμα Γ.2. Ποσοτική *Real-time PCR* εκτίμηση της βιομάζας του *F_sK* στο ριζικό σύστημα φυτών τομάτας 15 (15d) και 30 ημέρες (30d) μετά τη μόλυνση των φυτών με τους μύκητες *F_sK-gfp* και *G. intraradices*. Οι επεμβάσεις που έγιναν ήταν εμβολιασμός με τον μύκητα *F_sK-gfp* (*F_sK*), ταυτόχρονος εμβολιασμός του *F_sK-gfp* με τον *G. intraradices* (*F_sK-AMF*), εμβολιασμός πρώτα με το μυκορριζικό μύκητα και μετά με το *F_sK-gfp* (*AMF1-F_sK2*) καθώς εμβολιασμός πρώτα με το *F_sK-gfp* και μετά με το μυκορριζικό μύκητα (*F_sK1-AMF2*). Εμφανίζεται μη στατιστικώς σημαντική διαφορά στο βαθμό αποικισμού του μύκητα *F_sK-gfp*. Οι μπάρες απεικονίζουν το μέσο όρο των μετρήσεων. Τέλος αποτυπώνεται και η τυπική απόκλιση των αποτελεσμάτων σε όλες τις μεταχειρίσεις (n=3)

Συγκριτικά, η ποσοτική μέθοδος ανάλυσης του μύκητα, παρουσιάζει διαφορές με τα αποτελέσματα της μικροσκοπίας. Στη *Real Time PCR*, στη δειγματοληψία των 15 ημερών, εμφανίζεται ένα αυξημένο ποσοστό του *F_sK-gfp* στον ταυτόχρονο εμβολιασμό με τον *Glomus intraradices* στην ρίζα του φυτού. Επίσης, δεν επιβεβαιώνεται συνολικά η μείωση του ποσοστού αποικισμού στην δειγματοληψία των 30 ημερών. Όμως, οι μετρήσεις και των δύο μεθόδων απέδειξαν ότι ο μύκητας *F_sK-gfp* μετά την πάροδο των 30 ημερών δεν εμφανίζει περαιτέρω ανάπτυξη στο ριζικό σύστημα.

1.1.3. Μελέτη Του Βαθμού Αποικισμού του Μυκορριζικού Μύκητα *Glomus intraradices*

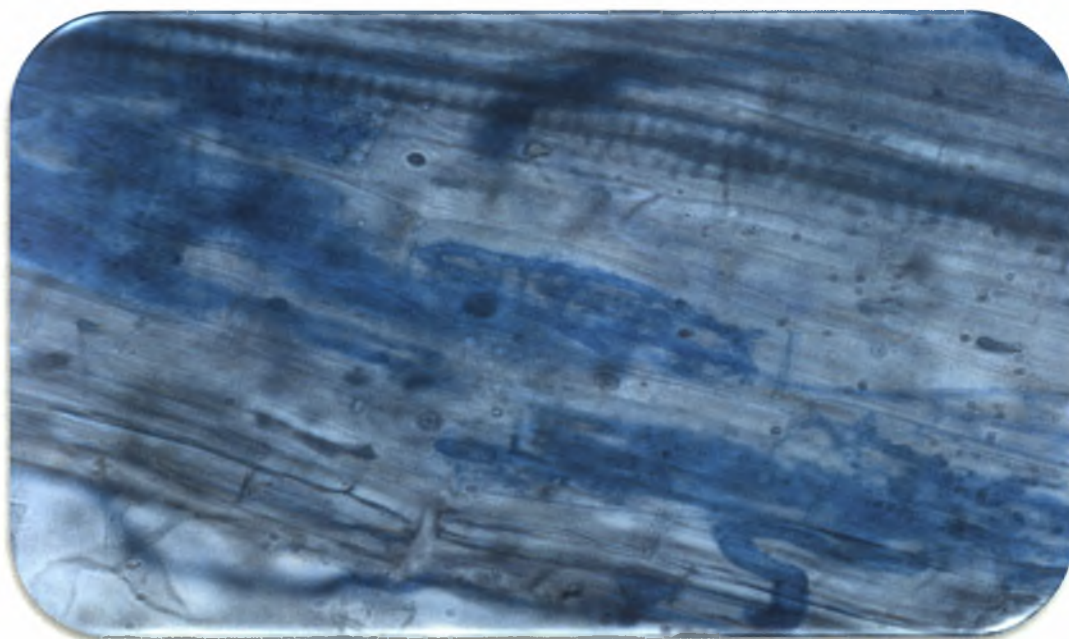
Μετά την χρώση των ριζών που περιείχαν τον μυκορριζικό μύκητα *Glomus intraradices*, τα slides που δημιουργήθηκαν εξετάστηκαν στο μικροσκόπιο σε μεγέθυνση 40X. Μετρήθηκε ο αποικισμός του μυκορριζικού μύκητα με τη μέθοδο Mc Gonigle καθώς και οι δομές που δημιουργούνται κατά τον αποικισμό του.

Στη δειγματοληψία που πραγματοποιήθηκε μετά το διάστημα των 15 ημερών, ο μύκητας εμφάνισε να αποικίζει την ρίζα του φυτού. Επίσης, εμφανείς ήταν όλες οι δομές που μπορεί να δημιουργήσει στα κύτταρα όπως arbuscules, κύστεις (vesicles) και σπόρια. Κατά τον έλεγχο των χειρισμών, φάνηκε ότι ο *Glomus intraradices* όταν εμβολιασθεί ταυτόχρονα με τον *FsK-gfp* αποικίζει σε μεγαλύτερα ποσοστά από τους άλλους χειρισμούς, ακόμη και σε σύγκριση με τα ποσοστά αποικισμού που μετρήθηκαν κατά τον εμβολιασμό του φυτού μόνο από το μυκορριζικό μύκητα.



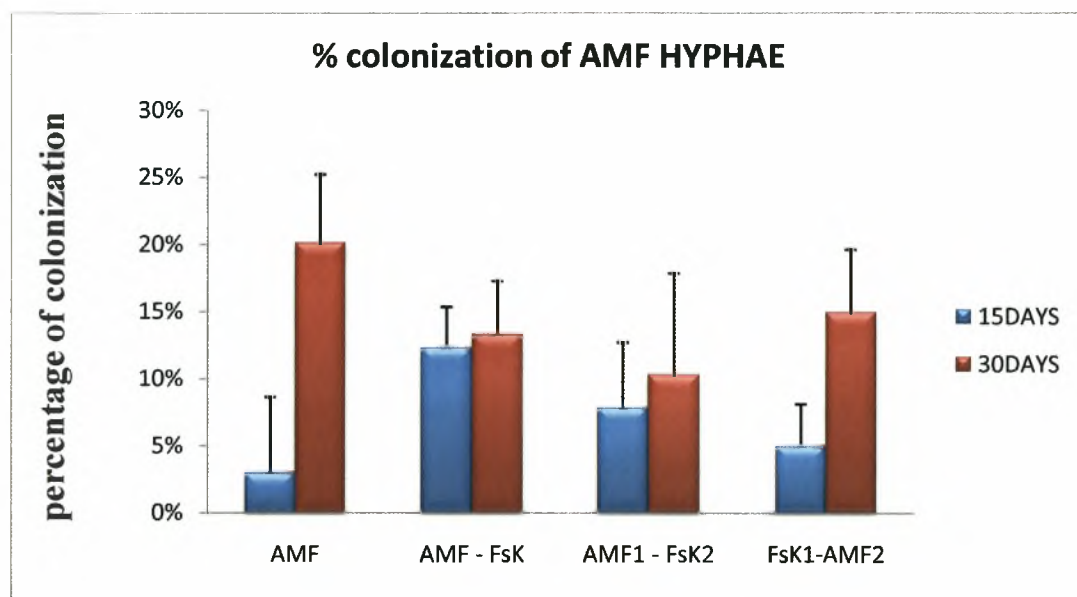
Εικόνες Γ 4-6 : Μικροφωτογραφία μικροσκοπίου φθορισμού της ανάπτυξης του μύκητα *G. Intraradices* στο ριζικό σύστημα φυτών τομάτας. Κατά την μικροσκοπική ανάλυση των 15 ημερών, ο μυκορριζικός μύκητας φαίνεται να αποικίζει τη ρίζα και να δημιουργεί δομές όπως σπόρια και arbuscules

Κατά τις μετρήσεις στη δειγματοληψία μετά την πάροδο των 30 ημερών, ο μύκητας εμφανίσθηκε να αποικίζει το φυτό σε μεγαλύτερα ποσοστά σε σύγκριση με το διάστημα των 15 ημερών. Επίσης οι δομές του ήταν πιο ξεκάθαρες. Αξίζει να σημειωθεί ότι στον ταυτόχρονο εμβολιασμό των δύο μυκήτων στο φυτό, δεν αυξήθηκαν πολύ τα ποσοστά αποικισμού του *Glomus intraradices*, ενώ γενικά μεγαλύτερη ανάπτυξη στη ρίζα είχε ο χειρισμός με τον εμβολιασμό του φυτού μόνο από το μυκορριζικό μύκητα χωρίς όμως να καταγραφούν στατιστικά σημαντικές διαφορές.



Εικόνα Γ.7. Μικροφωτογραφία μικροσκοπίου φθορισμού της ανάπτυξης του μύκητα *G. Intraradices* στο ριζικό σύστημα φυτών τομάτας Οι δομές του *Glomus intraradices* στις 30 ημέρες εμφανίζουν να καταλαμβάνουν μεγαλύτερο χώρο στην ρίζα του φυτού

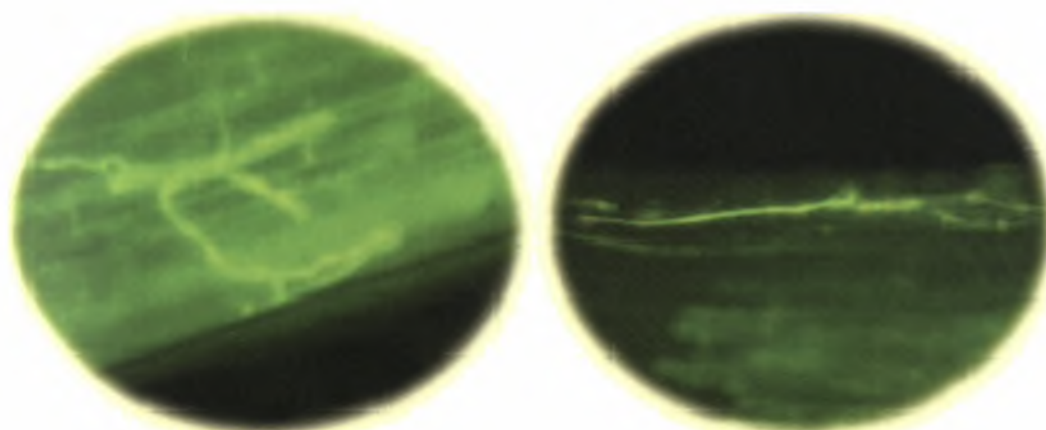
Οι μετρήσεις που έγιναν στο πρώτο πείραμα αποτυπώνονται στο παρακάτω διάγραμμα, στο οποίο είναι εμφανής η αύξηση του βαθμού αποικισμού του μυκορριζικού μύκητα στις 30 ημέρες. Επίσης διακρίνονται τα αυξημένα ποσοστά του όταν εμβολιάζεται ταυτόχρονα με τον *FsK-gfp* στη δειγματοληψία των 15 ημερών. Η μεγαλύτερη τάση αύξησης του αποικισμού του *Glomus intraradices* με την πάροδο του χρόνου εμφανίζεται στον χειρισμό με τον εμβολιασμό μόνο με το μυκορριζικό μύκητα στο φυτό. Όμως, ο βαθμός αποικισμού, που παρατηρείται στις 30 ημέρες, οδηγεί στο συμπέρασμα ότι η ανάπτυξη του δεν φαίνεται να επηρεάζεται από την ύπαρξη του *FsK-gfp*.



Διάγραμμα Γ.3 : Ποσοστά αποικισμού του μυκορριζικού μύκητα *Glomus intraradices* με τη μέθοδο Mc Gonigle- εκτίμηση μικροσκοπίας- για όλες τις μεταχειρίσεις και στις δύο δειγματοληψίες (15- και 30- ημέρες μετά τον εμβολιασμό των φυτών). Οι μπάρες απεικονίζουν τα ποσοστά του *Glomus intraradices* όταν εμβολιάσθηκε μόνος του (AMF), στην επέμβαση του ταυτόχρονου εμβολιασμού των δύο μυκήτων (AMF-FsK), όταν εισήλθε πρώτος ο *G.intraradices* και στη συνέχεια ο *FsK-gfp* (AMF1-FsK2) καθώς και όταν ο μυκορριζικός μύκητας εμβολιάσθηκε μετά τον *FsK-gfp* (FsK1-AMF2). Επίσης, παρουσιάζεται ο μέσος όρος και η τυπική απόκλιση κάθε χειρισμού. (n=6)

1.2. ΑΠΟΤΕΛΕΣΜΑΤΑ 2^{ου} ΠΕΙΡΑΜΑΤΟΣ

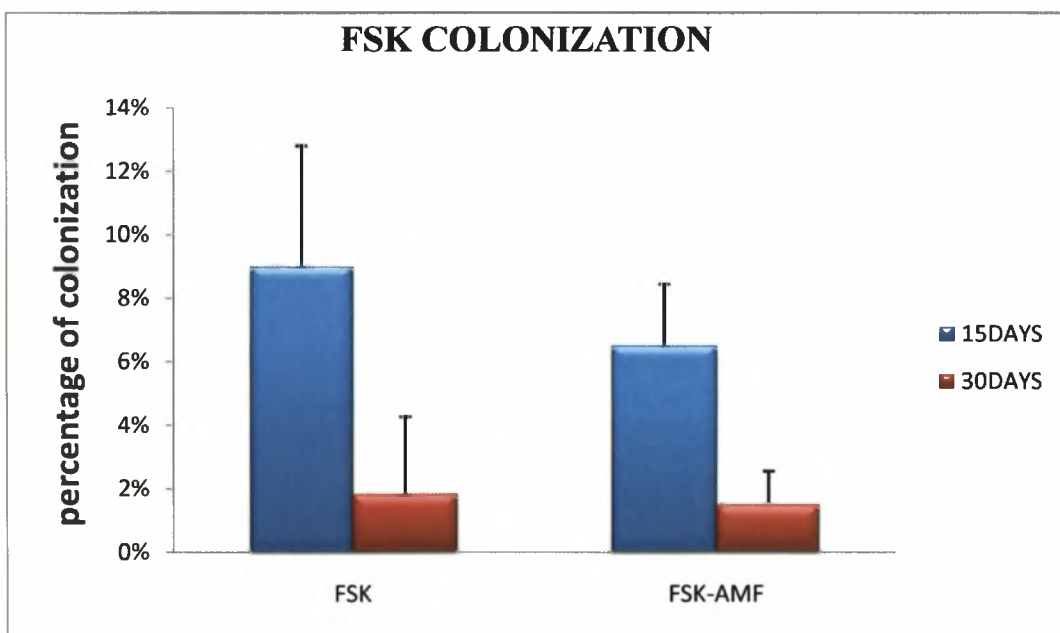
1.2.1. Μικροσκοπία Φθορισμού



Εικόνα Γ.8. ο μύκητας *Fsk-gfp* στις 15 ημέρες αποικίζει το ριζικό σύστημα του φυτού ενώ στις 30 ημέρες η εμφάνιση στο μικροσκόπιο είναι σπάνια

Κατά τη μελέτη αποικισμού με τη μικροσκοπία φθορισμού στο δεύτερο πείραμα (με την διαφορετική μολυσματική μονάδα του *Glomus intraradices*), ο μύκητας *FsK-gfp* εμφανίσθηκε σε μειωμένα ποσοστά σε σχέση με το πρώτο πείραμα. Επίσης, καταλάμβανε το χώρο περιμετρικά του φυτού στην προσπάθεια του να

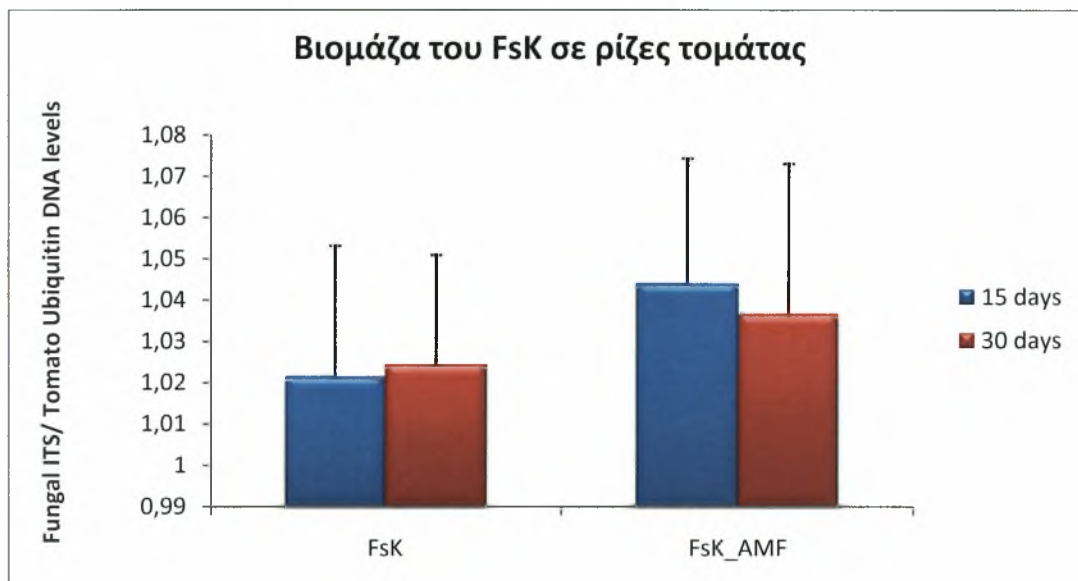
εισέρθει στο ριζικό σύστημα. Από τις μικροσκοπικές παρατηρήσεις και τις μετρήσεις του βαθμού αποικισμού που έγιναν με την μέθοδο Mc Gonigle, προκύπτει ότι, ο μύκητας *FsK-gfp* αποικίζει το ριζικό σύστημα σε όλους τους χειρισμούς, στο ίδιο βαθμό, είτε όταν εμβολιασθεί μόνος του είτε όταν εμβολιασθεί μαζί με τον *Glomus intraradices*. Οι μετρήσεις και των δύο δειγματοληψιών (15- και 30- ημερών) παρουσιάζονται στο διάγραμμα Γ4, όπου στις 30 ημέρες φαίνεται η μείωση του βαθμού αποικισμού του μύκητα *FsK-gfp*. Αξίζει να αναφερθεί ότι, εφαρμόζοντας τη μέθοδο της μικροσκοπίας, τα αποτελέσματα που προέκυψαν από το πρώτο πείραμα επιβεβαιώθηκαν και κατά την διεξαγωγή του δευτέρου, τόσο όσον αφορά την απουσία αλληλεπίδρασης των δύο μυκήτων στην ικανότητα αποικισμού και εξάπλωσής του *FsK-gfp* στο ριζικό σύστημα του φυτού, όσο και στην παρατηρούμενη μείωση αποικισμού του μύκητα μετά την πάροδο των 30 ημερών. Στη δειγματοληψία αυτή, η μικροσκοπική παρατήρηση των δειγμάτων έδειξε μικρότερη συχνότητα εμφάνισης του *FsK-gfp*.



Διάγραμμα Γ.4. Ποσοστά αποικισμού του μύκητα *FsK* με τη μέθοδο *Mc Gonigle*- εκτίμηση μικροσκοπίας- για όλες τις μεταχειρίσεις και στις δυο δειγματοληψίες (15- και 30- ημέρες μετά τον εμβολιασμό των φυτών). Στο διάγραμμα παρουσιάζονται τα αποτελέσματα των επεμβάσεων που έγιναν, η πρώτη με τον εμβολιασμό μόνο του *FsK-gfp* (*FsK*) και η δεύτερη με τον ταυτόχρονο εμβολιασμό των δύο μυκήτων (*FsK-AMF*). Επίσης, εμφανίζεται και η τυπική απόκλιση των αποτελεσμάτων ($n=6$). Φαίνεται η μείωση του βαθμού αποικισμού του μύκητα *FsK-gfp* στο ριζικό σύστημα στις 30 ημέρες.

1.2.2 Μελέτη Του Βαθμού Αποικισμού Του FsK Μέσω Της Διαδικασίας Real Time PCR

Στη δειγματοληψία των 15 ημερών, σε αντίθεση με τις μετρήσεις που έγιναν στο πρώτο πείραμα, εμφανίζεται αυξημένος αποικισμός του μύκητα κατά τον ταυτόχρονο εμβολιασμό σε πολύ μικρότερα και μη στατιστικά σημαντικά ποσοστά. Επίσης, στη δειγματοληψία των 30 ημερών, δεν παρατηρείται μείωση του ποσοστού αποικισμού.

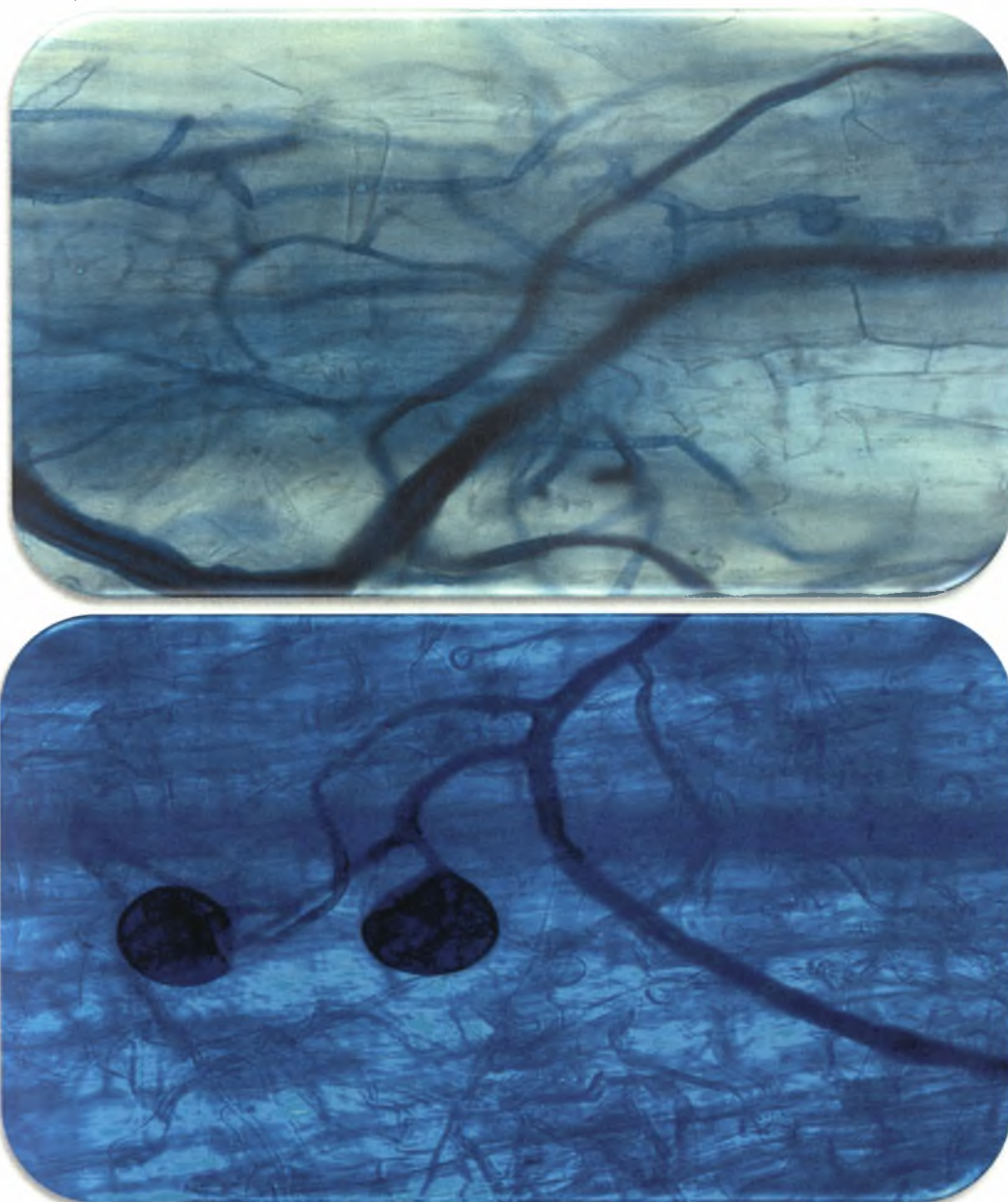


Διάγραμμα Γ.5 Ποσοτική Real-time PCR εκτίμηση της βιομάζας του FsK στο ριζικό σύστημα φυτών τομάτας 15 (15d) και 30 ημέρες (30d) μετά τη μόλυνση των φυτών με τους μύκητες *FsK-gfp* και *G. intraradices*. Οι επεμβάσεις που έγιναν ήταν εμβολιασμός με τον μύκητα *FsK-gfp* (*FsK*) καθώς και ταυτόχρονος εμβολιασμός του *FsK-gfp* με τον *G. intraradices* (*FsK-AMF*). Εμφανίζεται μη στατιστικώς σημαντική διαφορά στο βαθμό αποικισμού του μύκητα *FsK-gfp*. Οι μπάρες απεικονίζουν το μέσο όρο των μετρήσεων. Τέλος αποτυπώνεται και η τυπική απόκλιση των αποτελεσμάτων σε όλες τις μεταχειρίσεις (n=3)

Συμπερασματικά, η μείωση που παρατηρείται στα αποτελέσματα της μεθόδου Mc Gonigle δεν μπορούν να επιβεβαιωθούν με την μέθοδο της Real Time PCR. Γενικά τα ποσοστά που εμφανίζονται στην ποσοτική μέθοδο ανάλυσης, οδηγούν στο συμπέρασμα ότι πιθανόν δεν υπάρχει αλληλεπίδραση μεταξύ των δύο μυκήτων.

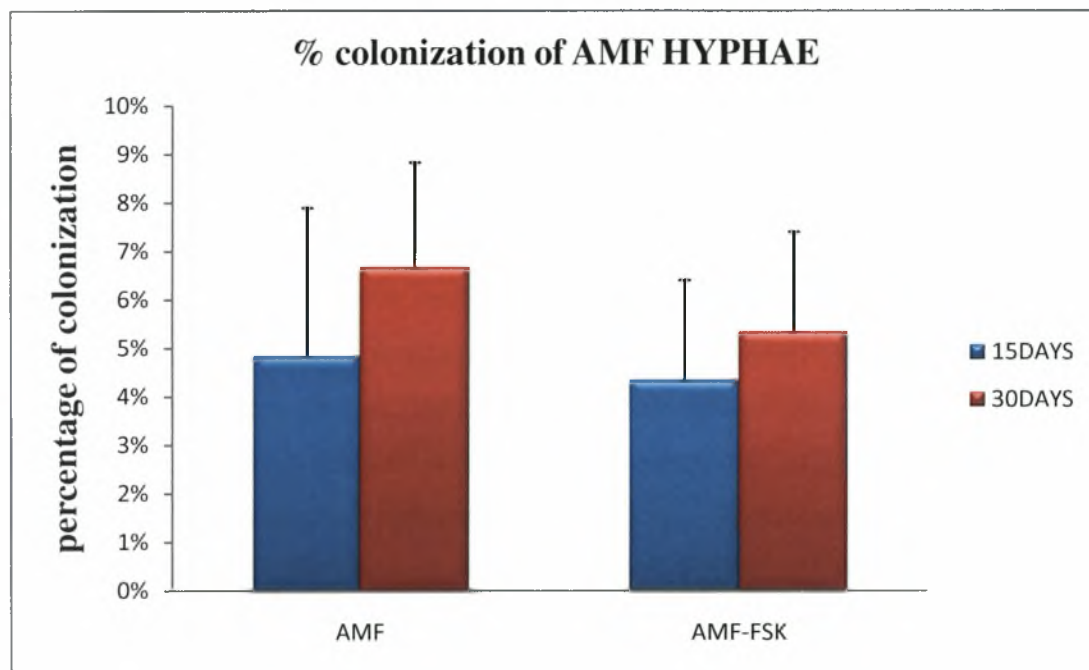
1.2.3. Μελέτη Του Βαθμού Αποικισμού του Μυκορριζικού Μύκητα *Glomus intraradices*

Κατά τις μετρήσεις του δεύτερου πειράματος στη δειγματοληψία των 15 ημερών, ο μυκορριζικός μύκητας εμφανίσθηκε να αποικίζει το φυτό και να δημιουργεί δομές ανεξάρτητα από την παρουσία ή απουσία του *FsK-gfp* κατά το χρόνο εμβολιασμού των φυτών. Στις 30 ημέρες δεν υπήρξε αξιοσημείωτη αύξηση του αποικισμού και στους δύο χειρισμούς



Εικόνες Γ 9-10: Μικροφωτογραφία μικροσκοπίου φθορισμού της ανάπτυξης του μύκητα *G.intraradices* στο ριζικό σύστημα φυτών τομάτας Στην μικροσκοπική παρατήρηση των δειγμάτων 15 (α) και 30 (β) ημερών διακρίνεται ξεκάθαρα η ανάπτυξη του μυκορριζικού μύκητα και η δημιουργία δομών του στο ριζικό σύστημα του φυτού

Η διαφορά που εμφανίστηκε στις μετρήσεις του συγκεκριμένου πειράματος σε σύγκριση με το πρώτο, ήταν ότι, δεν παρατηρήθηκε αύξηση στο βαθμό αποικισμού του φυτού από τον *G. Intraradices* κατά τον ταυτόχρονο εμβολιασμό του με τον *FsK*. Επίσης, η ανάπτυξη του μύκητα στο διάστημα μεταξύ 15 και 30 ημερών, δεν εμφάνισε ιδιαίτερη αύξηση, γεγονός που μπορεί να οφείλεται στη χρησιμοποίηση του διαφορετικού μολυσματικού υλικού. (Διάγραμμα Γ.6)



Διάγραμμα Γ.6 Ποσοστά αποικισμού του μυκορριζικού μύκητα *Glomus intraradices* με τη μέθοδο Mc Gonigle- εκτίμηση μικροσκοπίας- για όλες τις μεταχειρίσεις και στις δυο δειγματοληψίες (15- και 30- ημέρες μετά τον εμβολιασμό των φυτών. Στο διάγραμμα απεικονίζονται οι επεμβάσεις που έγιναν (εμβολιασμός με τον μύκητα *G. intraradices* (AMF) καθώς και ταυτόχρονος εμβολιασμός του με τον *FsK* (AMF-*FsK*). Τέλος αποτυπώνεται και η τυπική απόκλιση των αποτελεσμάτων σε όλες τις μεταχειρίσεις (n=6).

2. ΣΥΖΗΤΗΣΗ

Η αλληλεπίδραση μυκορριζικών μυκήτων με διάφορα στελέχη άλλων μυκήτων είναι πολύπλοκη και καθορίζεται βάση διαφόρων παραγόντων όπως το είδος των μυκήτων που συμμετέχουν, το είδος του φυτού – ξενιστή ή την ύπαρξη άλλων μικροοργανισμών στο ριζικό σύστημα.

Σε φυτά τομάτας, το συγκεκριμένο είδος μυκορριζικού μύκητα *Glomus intraradices*, έχει αποδειχθεί από διάφορες έρευνες ότι δρα θετικά σε συνθήκες αλληλεπίδρασης με άλλους μικροοργανισμούς και βοηθάει την ανάπτυξη του φυτού

(Graham J. 1982). Επίσης, σύμφωνα με μελέτες, (Kavroulakis et al, 2007), ο ενδοφυτικός μύκητας *Fusarium solani* στέλεχος K, σε συνθήκες αλληλεπίδρασης με παθογόνους μύκητες όπως *Fusarium oxysporum* και *Septoria lycopersici*, περιορίζει την εμφάνιση της ασθένειας.

Κατά την επεξεργασία των αποτελεσμάτων της παρούσας εργασίας, δε διακρίνεται αλληλεπίδραση των δύο μυκήτων. Εξαίρεση αποτελεί η μέτρηση των δειγμάτων στη δειγματοληψία των 15 ημερών και αποτυπώνεται στο γεγονός του αυξημένου βαθμού αποικισμού των φυτών από τον *Fsk-gfp* όταν εμβολιάζονται ταυτόχρονα οι δύο μύκητες, αλλά και μιας παρόμοιας αυξητικής τάσης που παρατηρείται στον αποικισμό των φυτών από το μυκορριζικό μύκητα υπό τις ίδιες συνθήκες. Ο μηχανισμός της αλληλεπίδρασης που γίνεται μεταξύ των δύο μυκήτων δεν είναι γνωστός. Πιθανώς να οφείλεται σε δύο εκ διαμέτρου αντίθετες παραδοχές: (α) η σχέση που συνάπτει ο μυκορριζικός μύκητας ή ο ενδοφυτικός μύκητας FsK με το φυτό μπορεί να αναστέλλει τυχόν αρνητικές επιδράσεις άλλων μυκήτων στο χώρο δράσης του και (β) η αύξηση θρεπτικών στοιχείων στο φυτό, ως απόρροια της δημιουργίας μυκόρριζας, μπορεί επίσης να προσελκύσει και άλλους μικροοργανισμούς σε μη μυκορριζικά μέρη του φυτού (Dehne H.W., 1982)

Η εγκατάσταση του μυκορριζικού μύκητα βοηθάει το φυτό στην καλύτερη απορρόφηση θρεπτικών συστατικών καθώς και στην ανάπτυξη του. Η αυξημένη πρόσληψη θρεπτικών συστατικών πιθανόν να διεγείρει και άλλους μικροοργανισμούς με αποτέλεσμα να προσπαθήσουν να αποικίσουν και αυτοί το φυτό (Dehne H.W, 1982). Τα μυκορριζικά φυτά είναι δυνατόν να προσελκύουν διάφορους μικροοργανισμούς της ριζόσφαιρας, λόγω της αλλαγής στο πρότυπο σύνθεσης των ριζικών εκκρινμάτων (Bansal and Mukerji 1994). Τα φυτά αυτά φαίνεται να αναγνωρίζουν τους ωφέλιμους συμβιώτες διευκολύνοντας την είσοδό τους και προάγοντας την ανάπτυξή τους. Αντίστοιχα, έχει παρατηρηθεί πως κάποια ωφέλιμα στελέχη φουζαρίων επιδρούν θετικά στον αποικισμό των ριζών από μυκόρριζες, πιθανώς αλλάζοντας τη φυσιολογία της ρίζας και διεγείροντας τη βλάστηση των μυκορριζικών σπορίων (Scheffknecht et al,2006). Επίσης, η ανάπτυξη συμβιωτικών σχέσεων μεταξύ μυκορριζών και φυτών μπορεί να οδηγήσει σε μεταβολή των φυσιολογικών και βιοχημικών ιδιοτήτων του ξενιστή. Μεταξύ αυτών, είναι και η καταστολή αμυντικών μηχανισμών κατά το αρχικό στάδιο αποικισμού των ριζών από τις μυκόρριζες, η οποία επιτρέπει τη διαμόρφωση της μεταξύ τους συμβιωτικής σχέσης. Ενδεχομένως αυτή η παρεμπόδιση της αμυντικής απόκρισης του φυτού να

διευκολύνει και την εγκατάσταση του ωφέλιμου ενδοφυτικού μύκητα *Fsk-gfp*. (Linderman, 1992). Στην παρούσα μελέτη η ταυτόχρονη επίδραση των δύο μυκήτων πιθανόν να δημιουργεί την αίσθηση στο φυτό ότι δεν απειλείται και να διευκολύνεται και η διόδος του μύκητα *Fsk-gfp*, κυρίως λόγω ότι ο μύκητας αυτός δεν δημιουργεί αρνητικές επιδράσεις στο φυτό.

Θα πρέπει να αναφερθεί ότι, τα αποτελέσματα που προέκυψαν μετά την εφαρμογή όλων των μεθόδων μέτρησης του δεύτερου πειράματος, δεν μπορούν να επιβεβαιώσουν την αλληλεπίδραση των δύο μυκήτων κατά τον ταυτόχρονο εμβολιασμό τους στο φυτό, διότι τα ποσοστά αύξησης του μυκορριζικού μύκητα δεν ήταν σημαντικά στο δεύτερο πείραμα. Το γεγονός αυτό μπορεί να οφείλεται σε αρκετούς παράγοντες, σημαντικότεροι από τους οποίους είναι η χρήση διαφορετικής μολυσματικής μονάδας του μύκητα *G. Intraradices*.

Ο μύκητας *Fsk-gfp* παρόλο που εμφανίστηκε μετά το διάστημα των 15 ημερών να αποικίζει σε ικανοποιητικά ποσοστά το φυτό, στο διάστημα μετά την έλευση των 30 ημερών, ο βαθμός αποικισμού των ριζών μειώθηκε σε σημαντικά ποσοστά. Αυτό μπορεί να εξηγηθεί από τη σύσταση του θρεπτικού διαλύματος που χρησιμοποιήθηκε κατά την διαδικασία ποτίσματος. Στο θρεπτικό διάλυμα που χρησιμοποιήθηκε δεν υπήρχαν συγκεκριμένα συστατικά που μπορεί να βοηθούν την ανάπτυξη μυκήτων και συγκεκριμένα ο φώσφορος.

Μελέτες έχουν αποδείξει, ότι η απουσία φωσφόρου, επάγει την ανάπτυξη μόνο μυκήτων που δημιουργούν μυκορριζικές σχέσεις (Mosse&Phillips, 1971). Όμως παλαιότερες μελέτες έχουν δείξει ότι ο φώσφορος στο υπόστρωμα που αναπτύσσονται μη μυκορριζικοί μύκητες έχει διαφορετική επίδραση ανάλογα το είδος του μύκητα που μελετήθηκε (Caron M, 1986). Έτσι, μελέτες που έγιναν στους *Macrophomina phaseoli* και *Fusarium solani* με διαδοχικές απουσίες διαφόρων ανόργανων συστατικών στο υπόστρωμα, έδειξαν ότι απουσία φωσφόρου είχε σαν αποτέλεσμα την παρεμπόδιση της ανάπτυξης των μυκήτων (Bhargava S. & Tandon R, 1963). Τέλος σύμφωνα με μη δημοσιευμένα αποτελέσματα, σε συνθήκες έλλειψης φωσφόρου, ο μύκητας *Fsk-gfp* δείχνει να μην εισχωρεί στο αγωγό σύστημα των ριζών και να μην αποικίζει επαρκώς το ριζικό σύστημα του φυτού. (Γεωργιάδου Δ. & Παπαδοπούλου Κ., μη δημοσιευμένα αποτελέσματα)

Ένα άλλο γεγονός που θα μπορούσε να εξηγηθεί με βάση της χρήσης του θρεπτικού διαλύματος για την πραγματοποίηση του ποτίσματος των φυτών, είναι και τα ικανοποιητικά ποσοστά αποικισμού του μυκορριζικού μύκητα σε όλα τα δείγματα

μετά το διάστημα των 15 και 30 ημερών τουλάχιστον στο πρώτο πείραμα. Αρχικά οι μύκητες που σχηματίζουν μυκόρριζες απαιτούν, όπως όλοι οι οργανισμοί, N, P, και C, γι' αυτό και η διαθεσιμότητα καθενός από αυτά τα θρεπτικά στοιχεία θα μπορούσε να ελέγξει την αφθονία των μυκορριζών. Τα φυτά παρέχουν τον C διοχετεύοντας υδατάνθρακες στις ρίζες και στους μύκητες, ενώ μέσω των ριζών και των μυκήτων προσλαμβάνουν τα θρεπτικά στοιχεία από το έδαφος. Τα φυτά αποθέτουν το μεγαλύτερο μέρος των προϊόντων της φωτοσύνθεσής τους στις ρίζες και στους μύκητες που σχηματίζουν μυκόρριζες, όταν ο P είναι περιοριστικό στοιχείο για την αύξησή τους, δεδομένου ότι οι μυκόρριζες συμβάλλουν στη θρέψη των φυτών (Mosse & Phillips 1971).

Στην μελέτη των αποτελεσμάτων του δεύτερου πειράματος, οι μετρήσεις αποικισμού του *Fsk-gfp* που πάρθηκαν με την μέθοδο Mc Gonigle επιβεβαίωσαν τις μετρήσεις του πρώτου πειράματος όσον αφορά στην ελάττωση του βαθμού αποικισμού του μύκητα κατά τη διάρκεια των 30 ημερών. Ωστόσο, τα αποτελέσματα δεν επιβεβαιώθηκαν με τις ποσοτικές μετρήσεις της βιομάζας του μύκητα με την μέθοδο της Real-Time PCR

Γενικά μετά το πέρας των δύο πειραμάτων μπορεί να αναφερθεί ότι υπάρχει αποικισμός των δύο μυκήτων στη ρίζα του φυτού και ότι μπορεί να θεωρηθεί ότι υπάρχει αλληλεπίδραση αλλά για την εξαγωγή ασφαλών συμπερασμάτων η συγκεκριμένη σχέση των δύο μυκήτων χρίζει περαιτέρω διερεύνησης.

ΒΙΒΛΙΟΓΡΑΦΙΑ

ΒΙΒΛΙΑ

- Δημητράκης Κ.Γ. Λαχανοκομία 1998 Αθήνα. Εκδόσεις Αγρότυπος
- Καραγκούνη – Κύρτου Α.Δ., Μικροβιολογία, Εκδόσεις Αθ. Σταμούλη, 1999, Αθήνα
- Madigan M.I., Βιολογία Μικροοργανισμών, Πανεπιστημιακές Εκδόσεις Κρήτης, 2005, Ηράκλειο
- Μαργαρίτης Λ.Χ., Βιολογία Κυττάρου, Ιατρικές εκδόσεις Λίτσας, 2004, Αθήνα

ΔΗΜΟΣΙΕΥΣΕΙΣ

- Ames, R. N. Reid C. P. P. Porter L. K, and Cambardella C. 1983. *Hyphal uptake and transport of nitrogen from two ¹⁵N-labelled sources by Glomus mosseae, a vesicular–arbuscular mycorrhizal fungus*. New Phytologist **95**:381–396.
- Allen, M. F. 1982. *Influence of vesicular-arbuscular mycorrhizae on water movement through Bouteloua gracilis*. New Phytologist **91**:191-196.
- Augé R. and Duan. X. 1991. *Mycorrhizal fungi and nonhydraulic root signals of soil drying*. Plant Physiology **97**:821-824.
- Augé R.M. 2001. *Water relations, drought and vesicular-arbuscular mycorrhizal symbiosis*. Mycorrhiza **11**:3-42.
- Azcón-Aguilar C.M. Jaizme-Vega C. and Calvet C. 2002. *The contribution of arbuscular mycorrhizal fungi to the control of soil-borne plant pathogens*. Pages 187-197 in S. Gianinazzi, H. Schuepp, K. Haselwandter, and J. M. Barea, editors. Mycorrhizal Technology in Agriculture: From Genes to Bioproducts. Basel: ALS Birkhauser Verlag.
- Bago, B. Vierheilig H. Piché Y. and Azcón-Aguilar C. 1996. *Nitrate depletion and pH changes induced by the extraradical mycelium of the arbuscular mycorrhizal fungus Glomus intraradices grown in monoxenic culture*. New Phytologist **133**:273–280

- Baltruschat H. and Schonbeck F 1972. *The influence of endotrophic mycorrhiza on the infestation of tobacco by Thielaviopsis basicola*. Phytopathol Z. 84:172-188
- Bansal M. & Mukerji K. G. 1994. *Positive correlation between induced changes in root exudation and mycorrhizosphere mycoflora*. Department of Botany, University of Delhi. 5:39-44
- Becker W.N 1976 *Quantification of onion vesicular-arbuscular mycorrhizae and their resistance to Pyrenochaeta terrestris*. Ph.D dissertation, Univ Illinois, Urbana 72 pp
- Benhamou N and Garand C.,2001, *Cytological Analysis of Defense-Related Mechanisms Induced in Pea Root Tissues in Response to Colonization by Nonpathogenic Fusarium oxysporum Fo47*. The American Phytopathological Society. 91:730-740
- Bhardava S.N. & Tandon R.N, 1963, *Sulphur and Phosphorus Requirements Of Three Fungi Causing Diseases In Storage*, Department of Botany, University Of Allahabad, India
- Biermann B. & Linderman R.G. 1983. *Use of vesicular – arbuscular mycorrhizal roots, intraradical vesicles and extraradical vesicles as inoculums*. New Phytologist. 95:97-105
- Bigirimana J. Meyer G D.Poppe J. Elad Y. Höfte M. *Induction of systemic resistance on bean (Phaseolus vulgaris) by Trichoderma harzianum* Agriculture and Food Sciences 62: 1373-7503
- Brundrett M.C. Piche Y. & Peterson R.L. 1984. *A new method for observing the morphology of vesicular – arbuscular mycorrhizae*, Canadian Journal of Botany. 62: 2128-2134
- Brunner I. and Frey B. 2000. *Detection and localization of aluminum and heavy metals in ectomycorrhizal Norway spruce seedlings*. Environmental Pollution 108:121–128
- Caron M, Fortin A. and Richard C, 1986, *Effect Of Phosphorus Concentration and Glomus intraradices on Fusarium Crown and Root Rot Of Tomatoes*, Ecology and Epidemiology, The American Phytopathological Department

- Chandanie W.A. Kubota M. Hyakumachi M. 2005. *Interaction between plant growth promoting fungi and arbuscular mycorrhizal fungus Glomus mosseae and induction of systemic resistance to anthracnose disease in cucumber*. Plant Soil **286**:209-217
- Chapin, F. S. 1980. *The mineral nutrition of wild plants*. Annual Review of Ecology and Systematics **11**:233–260.
- Davis R.M. Menge J.A. and Zentmyer G.A. 1978. *Influence of vesicular-arbuscular mycorrhizae on Phytophthora root rot of three crop plants*. Phytopathology **68**:1614-1617
- Dehne H.W. 1982. *Interaction Between Vesicular-Arbuscular Mycorrhizal Fungi and Plant Pathogens*, Institut für Pflanzenkrankheiten and Pflanzenschutz, University of Hannover **72**:1115
- Denny H. J. and Wilkins D. A. 1987. *Zinc tolerance in Betula spp. IV. The mechanism of ectomycorrhizal amelioration of zinc toxicity*. New Phytologist **106**:545–553
- Djonovic S. Vargas W.A. Kolomiets M.V. Hordesk M. Wiest A. Kenerley C.M. 2007. *A Proteinaceous elicitor Sml from the beneficial fungus Trichoderma virens is required for induced systemic resistance in maize*. Plant Physiology. **145**:875-876
- Diedhiou P.M. Hallmann J. Oerke E.C. Dehne H.W. 2002. *Effects of arbuscular mycorrhizal fungi and non-pathogenic Fusarium Oxysporum on Meloidogyne incognita infestation of tomato*, **13**:199-204
- Duijff B.J. Pouhair D. Olivain C. Alabouvette C. and Lemanceau P. *Implication of systemic induced resistance in the suppression of fusarium wilt of tomato by Pseudomonas fluorescens WCS417r and by nonpathogenic Fusarium oxysporum Fo47*, Eur J. Plant Pathol **104**:903-910
- Fitter A. H. 2005. *Darkness visible: reflections on underground ecology*. Journal of Ecology **93**:231-243.

- Fitter A. H. and Moyersoen B. 1996. *Evolutionary trends in root-microbe symbioses. Philosophical Transactions of the Royal Society of London. Biological Sciences* **351**:1367–1375.
- Fracchia S. Romera G. I. Godeas A. and Ocampo J.A. 1999. *Effect of saprophytic fungus Fusarium oxysporum on arbuscular mycorrhizal colonization and growth of plants in greenhouse and field trials. Plants and Soil* **223**:175-184
- Frey B. and Schüepp H. 1993. *Acquisition of nitrogen by external hyphae of arbuscular mycorrhizal fungi associated with Zea mays L. New Phytologist* **124**:221–230.
- Gallaud I. 1905 *Etudes sur les mycorrhizes endofytes. Revue General de Botanique* **17**:5-48, 66-83, 123-136
- Graham J. H. Linderman R. G. and Menge J. A. 1982. *Development of external hyphae by different isolates of mycorrhizal Glomus spp. in relation to root colonization and growth of Troyer Citrange. New Phytologist* **91**:183-189.
- Giovannetti M. Mosse B. 1980 *An evaluation of techniques for measuring vesicular arbuscular mycorrhizal infection in roots. New Phytologist* **84**:489-500
- Hallmann J. Sikora R.A. 1994 *influence of fusarium, a mutualistic fungal endophyte, on Meloidogyne incognita infection of tomato. Plant Dis Protect* **101**:475-481
- Harley J.L. and Smith S.E. 1983. *Mycorrhizal Symbiosis. Academic Press. London*
- Hardie K. and Leyton L. 1981. *The influence of vesicular-arbuscular mycorrhiza on growth and water relations of red clover in phosphate deficient soil. New Phytologist* **89**:599–608
- Hawkins H.J. Johansen A. and George E. 2000. *Uptake and transport of organic and inorganic nitrogen by arbuscular mycorrhizal fungi. Plant and Soil* **226**:275–285.
- Hodge A. Campbell C. D. and Fitter A. H. 2001. *An arbuscular mycorrhizal fungus accelerates decomposition and acquires nitrogen directly from organic material. Nature* **413**:297–299.

- Hyakumachi M 1994 *Plant growth promoting fungi from Turfgrass rhizosphere with potential for disease suppression*. Soil Microotg **44**:53-68
- Jaderlund L. Arthurson V. Granhall U. and Jansson J K. 2008. *Spesific interactions between arbuscular mycorrhizal fungi and plant growth – promoting bacteria as revealed by different combinations*. Lawrence Berkeley National Laboratory
- Johansen A. Jakobsen I. and Jensen E. S. 1992. *Hyphal transport of ¹⁵N-labelled nitrogen by a vesicular–arbuscular mycorrhizal fungus and its effect on depletion of inorganic soil N*. New Phytologist **122**:281–288.
- Johansen A. Jakobsen I. and Jensen E. S. 1993. *Hyphal transport by a vesicular–arbuscular mycorrhizal fungus of N applied to the soil as ammonium or nitrate*. Biology and Fertility of Soils **16**:66 –70.
- Kavroulakis N. Ehaliotis C. Ntougias S. Zervakis GI. Papadopoulou K. 2005. *Local and systemic resistance against fungal pathogens of tomato plant elicited by a compost deriving from agricultural residues*. *Physiology and Molecular Plant Pathology*. **66**: 163-174.
- Kavroulakis N. Ntougias S. Zervakis G. Ehaliotis C. Haralampidis K. and Papadopoulou K. 2007. *Role of ethylene in the protection of tomato plants against soil-borne fungal pathogens conferred by an endophytic Fusarium solani strain*. *Journal of Experimental Botany*. **58**: 3853-3864.
- Le Floch. G. Rey P. Benizri E. Benhamou N. Tirilly Y. 2003. *impact of auxincompounds produced by the antagonistic fungus Pythium oligandrum or the minor pathogen Pythium group F on plant growth*. Plant Soil. **257**:459-470
- Le Floch S. Guyomarch J. Merlin F. Borseth J.F. Le Corre P. Lee K. 2003. *Effects of oil and bioremediation on mussel (Mytilus edulis L.)*. Environmental Technology **24**: 1212-1219
- Mader P. Vierheilig H. Streitwolf-Engel R.et al. 2000. *Transport of ¹⁵N from a soil compartment separated by a polytetra-fluoroethylene*

- membrane to plant roots via the hyphae of arbuscular mycorrhizal fungi.* *New Phytologist* **146**:155–161.
- Marschner P. Jentschke G. and Godbold D. L. 1998. *Cation exchange capacity and lead sorption in ectomycorrhizal fungi.* *Plant and Soil* **205**:93–98.
 - Miller R. M. and Jastrow J. D. 2000. *Mycorrhizal fungi influence soil structure. Pages 3–18 in Y. Kapulnik and D. D. J. Douds, editors. Arbuscular mycorrhizas: physiology and function.* Kluwer Academic, Dordrecht, The Netherlands.
 - Morton J. B. and Benny G. L. 1990. *Revised classification of arbuscular mycorrhizal fungi (Zygomycetes) – a new order, Glomales, 2 new suborders, Glomineae and Gigasporineae, and 2 new families, Acaulosporaceae and Gigasporaceae, with an emendation of Glomaceae.* *Mycotaxon* **37**:471–491.
 - Mosse, B, and J. M. Phillips. 1971. *The influence of phosphate and other nutrients on the development of vesicular-arbuscular mycorrhiza in culture.* *Journal of General Microbiology* **1971**:157–166.
 - Μπεκρής Φ. 2009. *Γονιδιακή Έκφραση κατά την Αλληλεπίδραση Φυτών Τομάτας με ένα μη παθογόνο στέλεχος Fusarium solani,* Πανεπιστήμιο Θεσσαλίας. Λάρισα
 - Norman, J. R., and J. E. Hooker. 2000. *Sporulation of Phytophthora fragariae shows greater stimulation by exudates of non-mycorrhizal than by mycorrhizal strawberry roots.* *Mycological Research* **104**:1069–1073.
 - O’Keefe D. M. and Sylvia D. M. 1992. *Chronology and mechanisms of P-uptake by mycorrhizal sweet potato plants.* *New Phytologist* **122**:651-659.
 - Παπαδάκη Ελένη & Συντρίκου Ιωάννα, 2005, *Ανίχνευση Πιθανών Ενδομυκορριζικών Στελεχών Και Συμβιωτικών Αζωτοβακτηρίων Και Επίδραση Τους Στην Ανάπτυξη Των Παρακάτω Λαχανοκομικών Φυτών: Φασόλι Συγκαλλιεργούμενο Με Αραβόσιτο & Μελιτζάνα Συγκαλλιεργούμενη Με Κατηφε,* Τμήμα Θερμοκηπιακών Καλλιεργειών & Ανθοκομίας, ΤΕΙ Καλαμάτας.

- Peskan- Berghofer T. Shahollari B. Huong Giong P. Hehl S. Markert C. Banke V. Kost G. Varma A. Ostemuller R. 2004. *Association of Piriformospora indica with Arabidopsis thaliana roots represents a novel system to study beneficial plant- microbe interactions and involves early plant protein modifications in the endoplasmic reticulum and at the plasma membrane*. *Physiologia Plantarum* **122**:465-477
- Picard K. Tirilly Y. Benhamou N. 2000. *Cytological effects of cellulases in the Parasitism of Phytophthora parasitica by Pythium oligandrum*. *Applied and Environmental Microbiology* **66**:4305-4314
- Pozo M. J. Slezack-Deschaumes S. Dumas-Gaudot E. Gianinazzi S. and Azcón-Aguilar C. 2002. *Plant defense responses induced by arbuscular mycorrhizal fungi*. Pages 103-111 in S. Gianinazzi, H. Schuepp, K. Haselwandter, and J. M. Barea, editors, *Mycorrhizal Technology in Agriculture: From Genes to Bioproducts*. Basel: ALS Birkhauser Verlag.
- Raven J. A. Smith S. E. and Smith F. A. 1978. *Ammonium assimilation and the role of mycorrhizas in climax communities in Scotland*. *Botanical Society of Edinburgh Transactions* **43**:27–35.
- Ravnsokv S. Larsen J. Olsson P.A. Jakobsen I. 1999. *Effect of various compounds on growth and phosphorus uptake of an arbuscular mycorrhizal fungus*. *New Phytologist* **141**:517-524
- Ravnskov S. Jensen B. Knudsen M.B. Bodker L. Jensen D.F. Karlinski L. Larsen J. 2006. *Soil inoculation with the biocontrol agent Clonostachys rosea and the mycorrhizal fungus Glomus intraradices result in mutual inhibition, plant growth promotion and alteration of soil microbial communities*. *Soil Biology & Biochemistry* **38**:3453-3462
- Read D. J. 1998. *Mycorrhiza – the state of the art*. Pages 3-34 in A. Varma and B. Hock, editors. *Micorrhiza: Structure, Function, Molecular Biology and Biotechnology* (second edition).Springer, Berlin
- Sanders F. E. and Tinker P. B. 1971. *Mechanism of absorption of phosphate from soil by Endogone mycorrhizas*. *Nature* **233**:278 –279.

- Scheffknecht S. St-Arnaud M. Khaosaad T. Steinkellner S. and Vierheilig H. 2007. *An altered root exudation pattern through mycorrhization affecting microconidia germination of the highly specialized tomato pathogen Fusarium oxysporum f. sp. Lycopersici (Fol) is not tomato specific but also occurs in Fol nonhost plants.* NRC Research Press. **85**: 347–351
- Sieverding E. 1981. *Influence of soil water regimes on VA mycorrhizae. Effect on plant growth, water utilization and development of mycorrhiza.* Journal of Agronomy and Crop Science **150**:400–411.
- Smith S. E. and Read D. J. 1997. *Mycorrhizal Symbiosis.* 2nd edition. Academic Press
- St John T.V & Hunt H.W. 1983 *Statistical treatment of VAM infection data.* Plant and Soil **73**: 307-313
- Sylvia D. M. 1994. *Vesicular – Arbuscular Mycorrhizal fungi.* Soil Science, Society of America, 351-377
- Tigchelaar E.C. culture Jones J.B, Jones JP. Stall R.E Zitter T.A 1991. *Tomato : Botany and Compendium of tomato Diseases* **105**:2-4
- Tobar R. Azcón R. and Barea J. M. 1994. *Improved nitrogen uptake and transport from ¹⁵Nlabelled nitrate by external hyphae of arbuscular mycorrhiza under water-stressed conditions.* New Phytologist **126**:119–122.
- Varma A. Verma S. Sudha Saxay N. Butehorn B. and Franken P. 1999. *Piriformospora indica a Cultivable Plant – growth- promoting root Endophyte.* Applied and Environmental Microbiology **65**:2741-2744
- Widden P. 1996. *The morphology of vesicular – arbuscular mycorrhizae in Clintonia borealis and Medeola Virginia.* Canadian Journal of Botany **74**: 679-685
- Wilkins D. A. 1991. *The influence of sheathing (ecto-)mycorrhizas of trees on the uptake and toxicity of metals.* Agriculture Ecosystems & Environment **35**:245–260.
- Zambolin L. and Schenck N.C. 1981. *Interaction between a vesicular-arbuscular mycorrhiza and root infecting fungi on soybean.* Phytopathology **71**:267