



**ΠΑΝΕΠΙΣΤΗΜΙΟ ΘΕΣΣΑΛΙΑΣ
ΤΜΗΜΑ ΒΙΟΧΗΜΕΙΑΣ ΒΙΟΤΕΧΝΟΛΟΓΙΑΣ**

ΔΙΠΛΩΜΑΤΙΚΗ ΕΡΓΑΣΙΑ

**ΣΥΝΕΧΙΣΗ ΤΗΣ ΜΕΛΕΤΗΣ ΕΠΙΔΡΑΣΗΣ
ΔΙΑΣΥΣΤΗΜΑΤΙΚΩΝ ΓΕΩΡΓΙΚΩΝ ΦΑΡΜΑΚΩΝ
ΣΤΗ ΣΥΣΤΑΣΗ ΤΗΣ ΚΟΙΝΟΤΗΤΑΣ
ΕΠΙΦΥΤΩΝ ΜΥΚΗΤΩΝ**

ΜΟΥΛΑΣ ΚΩΝΣΤΑΝΤΙΝΟΣ

ΛΑΡΙΣΑ 2011

ΤΡΙΜΕΛΗΣ ΕΠΙΤΡΟΠΗ:

1. Καρπούζας Δημήτριος, Επίκουρος Καθηγητής Περιβαλλοντικής Μικροβιολογίας και Βιοτεχνολογίας, του Τμήματος Βιοχημείας και Βιοτεχνολογίας, του Πανεπιστημίου Θεσσαλίας
2. Παπαδοπούλου Καλλιόπη, Επίκουρος Καθηγήτρια Βιοτεχνολογίας Φυτών, του Τμήματος Βιοχημείας και Βιοτεχνολογίας, του Πανεπιστημίου Θεσσαλίας
3. Κωνσταντίνος Οιχαλιώτης, Επίκουρος Καθηγητής Γονιμότητας και Βιολογίας Εδάφους, του Τμήματος Αξιοποίησης Φυσικών Πόρων και Γεωργικής Μηχανικής, Εργαστήριο Γεωργικής Χημείας και Εδαφολογίας.

Ευχαριστίες

Πρωτίστως, θα ήθελα να εκφράσω τις βαθύτατες μου ευχαριστίες στον κ. Δ. Καρπούζα, Επίκουρο Καθηγητή Περιβαλλοντικής Μικροβιολογίας και Βιοτεχνολογίας υπό την επίβλεψη του οποίου πραγματοποιήθηκε η παρούσα εργασία, για την πολύτιμη παροχή επιστημονικής γνώσης, την καθοδήγηση και τη διδακτική του στήριξη καθώς και για την ηθική υποστήριξη που μου προσέφερε.

Τις θερμές μου ευχαριστίες στην Επίκουρη Καθηγήτρια του τμήματος Βιοχημείας και Βιοτεχνολογίας του Πανεπιστημίου Θεσσαλίας κ. Καλλιόπη Παπαδοπούλου για την ανεκτίμητη συμβολή της στην εκπόνηση της πτυχιακής αυτής μελέτης. Ακόμη, εκφράζω τις ευχαριστίες μου στον κ.

Κωνσταντίνο Οιχαλιώτη, Επίκουρο Καθηγητή του τμήματος Αξιοποίησης Φυσικών Πόρων και Γεωργικής Μηχανικής του Γεωπονικού Πανεπιστημίου Αθηνών για τη συμμετοχή του στην τριμελή εξεταστική επιτροπή.

Ένα μεγάλο ευχαριστώ στην υποψήφια διδάκτορα Κωνσταντίνα Ρουσίδου για την ανυπολόγιστη βοήθεια και συμβολή της στην εκπόνηση της πτυχιακής μου μελέτης, καθώς βρισκόταν δίπλα μου όποτε τη χρειαζόμουν.

Ένα ακόμα ευχαριστώ στον συνάδελφο και μεταπτυχιακό φοιτητή Χρήστο Πετσούλα για την παροχή των αρχικών μου δειγμάτων και τη συμβολή του στην ολοκλήρωση του πειράματος μου. Επίσης, ευχαριστώ τα υπόλοιπα μέλη του εργαστηρίου για την καλή συνεργασία σε όλη τη διάρκεια της συνύπαρξής μας.

Τέλος οφείλω να ευχαριστήσω την οικογένειά μου για την αμέριστη συμπαράσταση και υποστήριξη που μου έδειξαν όλο αυτό το διάστημα.

*Στη Κατερίνα
και τον Μιχάλη*

ΠΕΡΙΕΧΟΜΕΝΑ

ΤΡΙΜΕΛΗΣ ΕΠΙΤΡΟΠΗ.....	2
Ευχαριστίες.....	2
ΠΕΡΙΕΧΟΜΕΝΑ.....	5
ΕΙΣΑΓΩΓΗ.....	6
Η Φυλλόσφαιρα.....	6
Οι Επίφυτοι Μύκητες.....	7
Γεωργικά Φάρμακα: επιδράσεις στην μικροβιακή κοινότητα.....	9
<i>Imidachloprid</i>	11
<i>Metaxyl-M</i>	11
ΣΚΟΠΟΣ ΤΗΣ ΜΕΛΕΤΗΣ.....	13
ΥΛΙΚΑ ΚΑΙ ΜΕΘΟΔΟΙ.....	14
Πειραματικό μέρος.....	15
Αλυσιδωτή αντίδραση πολυμεράσης (PCR).....	17
Κλωνοποίηση των προϊόντων της PCR και αλληλούχιση.....	17
Προσθήκη αδενίνης στα προϊόντα PCR.....	18
Καθαρισμός προϊόντων PCR.....	18
Ηλεκτροφόρηση DNA σε πηκτή αγαρόζης.....	18
Ένθεση.....	19
Μετασχηματισμός (Transformation).....	20
Επιλογή Αποικιών.....	20
Colony PCR.....	21
Ηλεκτροφόρηση σε πηκτή αγαρόζης του προϊόντος cPCR.....	23
Ηλεκτροφόρηση σε πηκτή με βαθμίδωση αποδιατακτικών ουσιών - DGGE (Denaturing Gradient Gel Electrophoresis).....	25
Εξαγωγή και καθαρισμός πλασμιδίων και αλληλούχιση.....	29
ΑΠΟΤΕΛΕΣΜΑΤΑ ΚΑΙ ΣΥΖΗΤΗΣΗ.....	30
Ασκομύκητες (ASCOMYCOTA).....	33
Βασιδιομύκητες (BASIDIOMYCOTA).....	33
Ανάλυση των ζωνών.....	34
ΤΕΛΙΚΑ ΣΥΜΠΕΡΑΣΜΑΤΑ.....	46
ΒΙΒΛΙΟΓΡΑΦΙΑ.....	50

ΕΙΣΑΓΩΓΗ

Η Φυλλόσφαιρα

Ως φυλλόσφαιρα ορίζεται το οικοσύστημα που περιλαμβάνει το σύνολο των υπέργειων - εναέριων μερών των φυτών συμπεριλαμβανομένων των φύλλων, των βλαστών, των ανθέων και των καρπών (Carroll et al., 1977, Whipps et al., 2007, Jumpponen et al., 2009). Η φυλλόσφαιρα ως οικοσύστημα παρέχει καταφύγιο αλλά και θρεπτικά συστατικά σε εύρος μικροοργανισμών όπως βακτήρια, μύκητες, αρχαία, άλγη, ζύμες και λιγότερο συχνά πρωτόζωα και νηματώδεις (Lindow et al., 2003, Saito et al., 2007). Οι μικροοργανισμοί αυτοί συναντώνται είτε πάνω στην επιφάνεια των φυτικών ιστών οπότε και χαρακτηρίζονται ως επίφυτοι, είτε μέσα στους φυτικούς ιστούς καλούμενοι ως ενδοφυτικοί (Arnold et al., 2000, Whipps et al., 2007).

Το οικοσύστημα της φυλλόσφαιρας είναι δυναμικό και εφήμερο αφού το μικροπεριβάλλον της μεταβάλλεται συνεχώς υπό την επίδραση της θερμοκρασίας, της ακτινοβολίας, της σχετικής υγρασίας, της έντασης του ανέμου και της υγρασίας των φύλλων (Gu et al., 2009). Η σύσταση της μικροβιακής κοινότητας της φυλλόσφαιρας επηρεάζεται και από τα γειτνιάζοντα περιβάλλοντα καθώς είναι ένα ανοιχτό σύστημα. Εξωγενής μικροοργανισμοί εισέρχονται στη φυλλόσφαιρα μέσω εντόμων, ανθρώπων, βιολογικών φυτοπροστατευτικών σκευασμάτων κ.λ.π. όπως και μικροοργανισμοί της φυλλόσφαιρας αποικίζουν άλλα οικοσυστήματα όπως το έδαφος (Gu et al., 2009).

Οι αλληλεπιδράσεις τόσο στο εσωτερικό της μικροβιακής κοινότητας της φυλλόσφαιρας όσο και με τα ίδια τα φυτά, μπορούν να επηρεάσουν την φυσιολογία των φυτών, την παραγωγικότητα τους (φυτά με γεωργικό και οικονομικό ενδιαφέρον), αλλά και την ασφάλεια της κατανάλωσης τους από τους ανθρώπους (Whipps et al., 2007).

Κάποιοι από τους μικροοργανισμούς της φυλλόσφαιρας είναι παθογόνοι για τα φυτά, οι περισσότεροι όμως είναι μη-παθογόνοι και παίζουν σημαντικό ρόλο στην μεταβολή των ιδιοτήτων της επιφάνειας των φυτών, προωθώντας την ανάπτυξη των φυτών, ελέγχοντας την ανάπτυξη παθογόνων και αποδομώντας οργανικούς ρύπους (Zhang et al., 2008).

Οι Επίφυτοι Μύκητες

Οι επίφυτοι μύκητες συναντώνται στην επιφάνεια των φύλλων κατά κύριο λόγο με τη μορφή σπορίων παρά με τη μυκηλιακή τους μορφή εκτός από κάποια είδη που σποριώνουν ταχύτατα αλλά και τις ζύμες που αποικίζουν τη φυλλόσφαιρα πιο εύκολα και αποτελεσματικά (Lindow et al., 2003, Whipps et al., 2007).

Ο πληθυσμός των καλλιεργήσιμων ζυμών στην επιφάνεια των φύλλων μπορεί να κυμανθεί μεταξύ 10 και 10^{10} CFU g^{-1} φύλλο (Whipps et al., 2007). Η ποικιλότητα των καλλιεργήσιμων ζυμών στην φυλλόσφαιρα κυρίως περιορίζεται στα γένη *Cryptococcus*, *Sporobolomyces*, και *Rhodotorula* αν και τα διαφορετικά είδη αυτών των γενών μπορεί να φτάνουν τα 40 με τα περισσότερα από αυτά να συνυπάρχουν με άλλα γένη που συναντώνται

σπανιότερα (Thompson et al., 1993).

Το μέγεθος του πληθυσμού των μυκήτων μπορεί να κυμανθεί μεταξύ 10^2 και 10^8 CFU g^{-1} φύλλου. Είδη των γενών *Cladosporium* και *Alternaria* μπορούν να θεωρηθούν τα πιο άφθονα στην επιφάνεια των φύλλων αν και άλλα γένη όπως τα *Penicillium*, *Acremonium*, *Mucor* και *Aspergillus* συναντώνται συχνά (Thompson et al., 1993, Inacio et al., 2002). Πάνω από 340 γενετικά διακριτά είδη επίφυτων μυκήτων ανιχνεύθηκαν σε δύο διαφορετικά είδη τροπικών φυτών και δυο σημεία με μεθόδους καλλιέργειας σε θρεπτικά μέσα (Arnold et al., 2000).

Σε άλλη έρευνα βρέθηκε ότι στη φυλλόσφαιρα δέντρων βελανιδιάς η κοινότητα των επίφυτων μυκήτων παρουσίαζε πολύ μεγάλη ποικιλομορφία με τους ασκομύκητες να αποτελούν τους κυρίαρχους μύκητες και ειδικότερα τα γένη: *Microsphaeropsis*, *Alternaria*, *Epicoccum* και *Erysiphe* (Jumpponen et al., 2009).

Οι επίφυτοι μύκητες αλληλεπιδρούν με τα φυτά στη φυλλόσφαιρα των οποίων διαβιούν. Μύκητες που δεν είναι οι ίδιοι φυτοπαθογόνοι πιστεύεται ότι μπορεί να προστατεύουν τα φυτά από άλλα παθογόνα, έντομα – φυσικούς εχθρούς αλλά και ότι μπορεί να ρυθμίζουν την αντοχή των φυτών στην ξηρασία (Arnold et al., 2000, Schweitzer et al., 2006). Η επίδραση των επίφυτων (μη παθογόνων) μυκήτων στα φυτά ερευνάται και φαίνεται ότι παρουσιάζει μεγάλο ενδιαφέρον επιστημονικό, γεωργικό και οικονομικό.

Γεωργικά Φάρμακα: επιδράσεις στην μικροβιακή κοινότητα

Τα γεωργικά φάρμακα αποτελούν σημαντικό κομμάτι της σύγχρονης γεωργικής πρακτικής. Ένας μεγάλος αριθμός αυτών, κυρίως εντομοκτόνα και μυκητοκτόνα, εφαρμόζονται στο φύλλωμα για την καταπολέμηση εντόμων και μυκήτων που προσβάλουν τα καλλιεργούμενα φυτά (Ζιώγας και Μάρκογλου 2007). Εναλλακτικά, κάποια εντομοκτόνα και μυκητοκτόνα εφαρμόζονται στο έδαφος και αφού παραληφθούν από το ριζικό σύστημα των φυτών μεταφέρονται αποπλαστικά ή και συμπλαστικά στο υπέργειο σύστημα του φυτού προστατεύοντας το από προσβολές εντόμων και μυκήτων. Τα τελευταία ονομάζονται και διασυστηματικά γεωργικά φάρμακα και μπορούν να εφαρμοστούν και για την ανάσχεση ήδη εγκατεστημένων προσβολών από φυτικούς εχθρούς.

Η εφαρμογή διασυστηματικών γεωργικών φαρμάκων είτε διαφυλλικά είτε στο έδαφος οδηγεί στην έκθεση της φυλλόσφαιρας σε υψηλές συγκεντρώσεις αυτών με πιθανόν αρνητικές συνέπειες τόσο για την λειτουργία όσο και για την ποικιλότητα της μικροβιακής κοινότητας. Ιδιαίτερα, η χρήση μυκητοκτόνων αναμένεται να έχει σημαντική επίδραση στην ποικιλότητα των μυκήτων στην φυλλόσφαιρα καθώς στοχεύουν στην εξόντωση φυτοπαθογόνων μυκήτων που διαβιούν στην φυλλόσφαιρα. Παρόλα αυτά λίγα είναι γνωστά για την επίδραση των γεωργικών φαρμάκων σε μικροοργανισμούς μη-στόχους που διαβιούν στην φυλλόσφαιρα.

Μέχρι σήμερα πλήθος μελετών έχει ασχοληθεί με την επίδραση των γεωργικών φαρμάκων στην σύσταση, δομή και λειτουργία της μικροβιακής κοινότητας του εδάφους (Dungan et al., 2003; Devare et al., 2004, Bending et

al., 2007, Spyrou et al., 2009; Omirou et al., 2011). Αντίθετα λίγα είναι γνωστά για την επίδραση των γεωργικών φαρμάκων στην ποικιλότητα της μικροβιακής κοινότητας της φυλλόσφαιρας. Έτσι οι Zhang et al., (2008) πρώτοι μελέτησαν την επίδραση του εντομοκτόνου cypermethrin στην μικροβιακή κοινότητα της φυλλόσφαιρας φυτών αγγουριού χρησιμοποιώντας βιοχημικές (PLFAs) και μοριακές τεχνικές (T-RFLP) και παρατήρησαν ότι η εφαρμογή του εντομοκτόνου προκάλεσε μια αύξηση των αρνητικών κατά gram βακτηρίων έναντι των θετικών κατά gram βακτηρίων αλλά και μείωση των μυκήτων. Παρόμοιες μελέτες σε φυτά πιπεριάς έδειξαν ότι η εφαρμογή του cypermethrin προκάλεσε μια μεταβολή της σύνθεσης της βακτηριακής κοινότητας στην φυλλόσφαιρα με επικράτηση των γ-πρωτεοβακτηρίων έναντι των φύλλων Bacteroidetes και Firmicutes (Zhang et al., 2009). Αντίστοιχη μελέτη με το μυκητοκτόνο enostroburin έδειξε ότι η εφαρμογή στο φύλλωμα φυτών σιταριού προκάλεσε σημαντικές μεταβολές στην σύσταση της μικροβιακής κοινότητας των βακτηρίων στην φυλλόσφαιρα (Gu et al., 2010). Όλες οι παραπάνω μελέτες επικεντρώθηκαν στην επίδραση διαφόρων γεωργικών φαρμάκων που εφαρμόστηκαν στο φύλλωμα στην σύσταση της γενικότερης μικροβιακής κοινότητας, με την χρήση PLFAs, ή στην σύσταση της κοινότητας των βακτηρίων, με την χρήση της μοριακής μεθόδου DGGE, ή TRFLP. Μέχρι σήμερα δεν είναι τίποτα γνωστό για την επίδραση των γεωργικών φαρμάκων στην κοινότητα των μυκήτων στην φυλλόσφαιρα καλλιεργούμενων φυτών που εκτίθενται σε αυτά είτε μέσω άμεσης διαφυλλικής εφαρμογής είτε διασυστηματικά μέσω της εφαρμογής στο έδαφος.

Τα δυο γεωργικά φάρμακα που χρησιμοποιήθηκαν στην παρούσα

εργασία ήταν τα metalaxyl-M και imidachloprid. Θα πρέπει να τονιστεί ότι και τα δύο γεωργικά φάρμακα που μελετήθηκαν είναι διασυστηματικά.

Metalaxyl-M (Ridomil®)

Το metalaxyl-M είναι μυκητοκτόνο που χρησιμοποιείται κατά του περονόσπορου σε αμπέλι, πατάτα, τομάτα, αγγούρι, πεπόνι, πιπεριά. Το metalaxyl-M (ομάδα φαινυλαμιδίων) είναι εκλεκτικό κατά των ωομυκήτων διασυστηματικό μυκητοκτόνο με αποπλαστική κυρίως κίνηση, που παρεμποδίζει την ανάπτυξη του παθογόνου μέσα στους φυτικούς ιστούς. Σε βιοχημικό επίπεδο παρεμποδίζει τη βιοσύνθεση του ριβοσωμικού RNA μέσω αναστολής της rRNA πολυμεράσης.

Imidachloprid (Confidor®)

Το imidachloprid είναι διασυστηματικό εντομοκτόνο επαφής και στομάχου. Αποτελεί το πιο ευρέως χρησιμοποιούμενο εντομοκτόνο της νέας ομάδας των νεονικοτινοειδών. Το imidachloprid δρα παρεμποδίζοντας την μετάδοση των νευρικών σημάτων στα έντομα, καταλαμβάνοντας την θέση της ακετυλοχολίνης στους νικοτινικούς υποδοχείς. Μιμείται τη δράση του φυσικού φορέα στις χολινεργικές συνάψεις του κεντρικού νευρικού συστήματος των εντόμων, την ακετυλοχολίνη. Σε αντίθεση με την ακετυλοχολίνη, ο δεσμός της οποίας στο ενεργό κέντρο των υποδοχέων της υδρολύεται ταχύτατα από το ένζυμο ακετυλοχολινεστεράση, το imidachloprid παραμένει δεσμευμένο στους νικοτινικούς υποδοχείς και ο δεσμός αυτός υδρολύεται εξαιρετικά αργά με αποτέλεσμα το μπλοκάρισμα του νευρικού συστήματος του εντόμου και τον

θάνατο του.

Είναι εντομοκτόνο στομάχου κυρίως και δευτερευόντως επαφής. Στις συνιστώμενες δόσεις στα έντομα εμφανίζονται τα συμπτώματα της νευροτοξικότητας, ενώ σε χαμηλές συγκεντρώσεις εμφανίζει αντιτροφική δράση και προκαλεί γενικά αλλαγή στη συμπεριφορά των εντόμων.

Εφαρμόζεται κατά μυζητικών και μασητικών εντόμων στις καλλιέργειες: αγγούρι , αχλαδιά , βαμβάκι , γκρέϊπ φρουτ , καπνός , λεμονιά , μανταρινιά , πατάτα , πορτοκαλιά , ροδακινιά , τομάτα , πιπεριά.

ΣΚΟΠΟΣ ΤΗΣ ΜΕΛΕΤΗΣ

Σκοπός της παρούσας εργασίας ήταν καταρχήν η ταυτοποίηση των επίφυτων μυκήτων που ελήφθησαν από τη φυλλόσφαιρα των φυτών πιπεριάς. Αν και η παρουσία της κοινότητας των μυκήτων στα φύλλα μπορούσε εύκολα να διαπιστωθεί, η σύσταση της κοινότητας αυτής ήταν κάτι άγνωστο που θα είχε ενδιαφέρον να διερευνηθεί. Αυτό επιχειρείται σε αυτή την εργασία. Επιπλέον στόχος της εργασίας είναι ο εντοπισμός και η αναγνώριση επίφυτων μυκήτων που φαίνεται να επηρεάζονται, θετικά ή αρνητικά από την έκθεση τους στα γεωργικά φάρμακα imidachlorpid και metalaxyl καθώς και από τον τρόπο εφαρμογής αυτών των δύο γεωργικών φαρμάκων αφού ο διαφυλλικός ψεκασμός αναμένεται να οδηγήσει σε αυξημένη έκθεση της φυλλόσφαιρας στα γεωργικά φάρμακα σε σχέση με την εφαρμογή από εδάφους.

ΥΛΙΚΑ ΚΑΙ ΜΕΘΟΔΟΙ



Πειραματικό μέρος

Το πείραμα πάνω στο οποίο βασίστηκε και η παρούσα διπλωματική εργασία πραγματοποιήθηκε από τον μεταπτυχιακό φοιτητή Χρήστο Πετσούλα και περιγράφεται περιληπτικά παρακάτω.

Συγκεκριμένα, σε φυτά πιπεριάς (*Capsicum annuum*) εφαρμόστηκαν δυο γεωργικά φάρμακα, το *Confidor* (δραστ. Ουσία: *imidachlorid*) το οποίο είναι διασυστηματικό εντομοκτόνο και το *Ridomil* (δραστ. Ουσία: *metalaxyl – M*) το οποίο είναι διασυστηματικό μυκητοκτόνο.

Η εφαρμογή των γεωργικών φαρμάκων έγινε με δυο τρόπους: διαφυλλικά και με ριζοπότισμα από εδάφους. Και οι δύο αυτοί μέθοδοι εφαρμογής χρησιμοποιούνται στην πράξη για τα δύο αυτά γεωργικά φάρμακα.

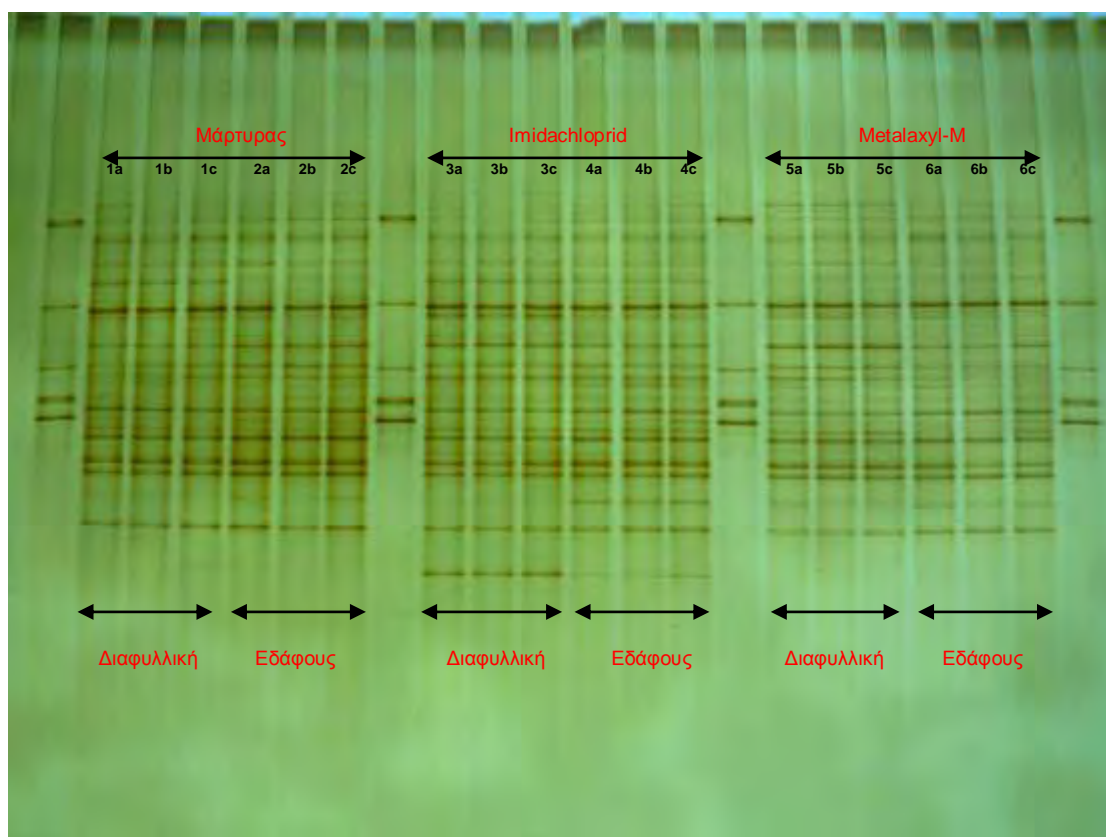
Από τα εν λόγω φυτά ελήφθησαν φύλλα πέντε (5) ημέρες μετά τις εφαρμογές των γεωργικών φαρμάκων.

Έτσι από τρεις μεταχειρίσεις, (*imidachlorid*, *metalaxyl – M*, και μάρτυρας) δυο τρόπους εφαρμογής και τρεις επαναλήψεις προέκυψαν 18 δείγματα.

Στη συνέχεια ελήφθησαν φύλλα, έγινε εκχύλιση του DNA, ακολούθησε PCR για βακτήρια και μύκητες και με εφαρμογή τεχνικής DGGE προέκυψαν τα περιβαλλοντικά δείγματα που απεικονίζονται παρακάτω (εικόνα 1: απεικόνιση για τους μύκητες 5 ημέρες μετά την εφαρμογή).

Από τις ζώνες που ελήφθησαν με την εφαρμογή DGGE, φάνηκε ότι η κοινότητα των μυκήτων της φυλλόσφαιρας των φυτών πιπεριάς επηρεάστηκε

από τις μεταχειρίσεις με τα φυτοφάρμακα και τους τρόπους εφαρμογής (Πτυχιακή Χρήστος Πετσούλας).



Εικόνα 1: Απεικόνιση για τους μύκητες 5 ημέρες μετά την εφαρμογή

Υπάρχουν ζώνες που εμφανίζονται ή εξαφανίζονται ανάλογα με το εφαρμοζόμενο γεωργικό φάρμακο αλλά και τον τρόπο εφαρμογής του.

Η ταυτοποίηση των μυκήτων που βρέθηκαν στη φυλλόσφαιρα και ειδικότερα αυτών που επηρεάζονται από τις μεταχειρίσεις αποτελεί τον σκοπό αυτής της διπλωματικής εργασίας.

Αλυσιδωτή αντίδραση πολυμεράσης (PCR)

Για την μελέτη της κοινότητας των μυκήτων, ενισχύθηκε η ITS περιοχή του ριβοσωμικού RNA των μυκήτων με την μέθοδο PCR χρησιμοποιώντας εξειδικευμένους εκκινητές. Οι αλληλουχίες των εκκινητικών μορίων που χρησιμοποιήθηκαν παρουσιάζονται στο Πίνακα 1.

Εκκινητής	Αλληλουχία	T _m
ITS1F	5'-CTT GGT CAT TTA GAG GAA GTAA-3'	45.4°C
ITS4	5'-TCC TCC GCT TAT TGA TAT GC -3'	49.6°C

Πίνακας 1. Η αλληλουχία των εκκινητών που χρησιμοποιήθηκαν για την ενίσχυση της ITS περιοχής του γονιδιώματος των μυκήτων.

Κλωνοποίηση των προϊόντων της PCR και αλληλούχιση

Από τα περιβαλλοντικά δείγματα της πρώτης PCR που ελήφθησαν, επιλέχθηκαν για την δημιουργία βιβλιοθήκης κλώνων τα: 3α (Imidachlorid - διαφυλλική εφαρμογή), 4α (Imidachlorid - εδαφική εφαρμογή) και 6α (Metalaxyl - εδαφική εφαρμογή) όπως φαίνονται στην εικόνα 1, μιας και σε αυτά παρατηρήθηκαν οι περισσότερες και πιο έντονες μεταβολές της κοινότητας των επίφυτων μυκήτων και βρέθηκαν μύκητες που να αντιδρούν, θετικά ή αρνητικά, στην προσθήκη των γεωργικών φαρμάκων. Για κάθε ένα από τα δείγματα, ξεχωριστά, ακολουθήθηκε η διαδικασία που περιγράφεται παρακάτω.

Προσθήκη αδενίνης στα προϊόντα PCR

Πραγματοποιήθηκε προσθήκη αδενίνης στα άκρα των προϊόντων PCR με στόχο την διευκόλυνση της κλωνοποίησης σε κατάλληλο πλασμιδιακό φορέα. Προστέθηκαν 0,4 μL dATP (νουκλεοτίδιο αδενίνη) και 0,1 μL KaraTaq σε 20 μL προϊόντος PCR και το μίγμα επωάστηκε στους 72 °C για 15 min.

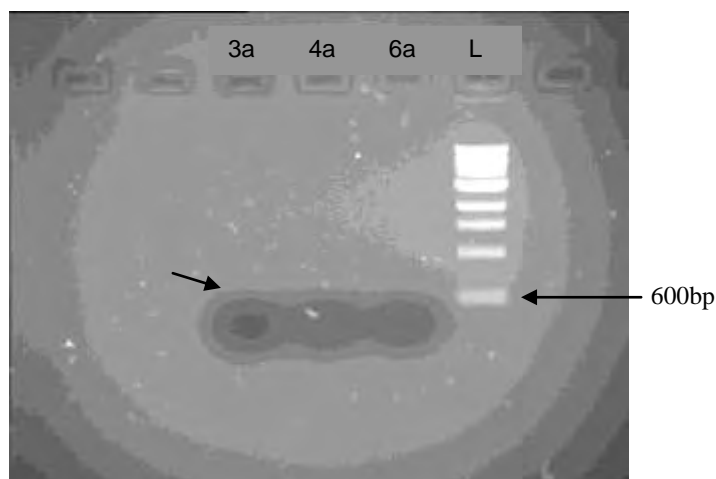
Καθαρισμός προϊόντων PCR

Τα προϊόντα της PCR, μεγέθους 600 – 700 bp (το μέγεθος της ITS περιοχής παραλλάσει μεταξύ μυκήτων), καθαρίστηκαν χρησιμοποιώντας το **Purelink PCR Purification kit (Invitrogen)** σύμφωνα με το πρωτόκολλο του κατασκευαστή. Η έκλουση έγινε με 30 μL ddH₂O.

Ηλεκτροφόρηση DNA σε πηκτή αγαρόζης

Η ηλεκτροφόρηση σε πηκτή αγαρόζης είναι μία μέθοδος που χρησιμοποιείται για το διαχωρισμό, την αναγνώριση και τον καθαρισμό τμημάτων DNA. Στην εργασία αυτή πραγματοποιήθηκε ηλεκτροφόρηση στα προϊόντα PCR που είχαν προηγουμένως καθαριστεί για τον έλεγχο της παρουσίας του επιθυμητού προϊόντος.

Χρησιμοποιήθηκε πηκτή αγαρόζης 1% για την ηλεκτροφόρηση των προϊόντων της πρώτης PCR, φορτώθηκαν 10 μl από κάθε δείγμα και 2 μl loading buffer 6x. Η ηλεκτροφόρηση πραγματοποιήθηκε στα 90V.



Εικόνα 2 Ενδεικτική εικόνα ηλεκτροφόρησης σε πηκτή αγαρόζης 1% προϊόντων PCR clean up. Στις γραμμές φορτώθηκαν 10μl προϊόντος PCR clean up.

Ένθεση

Το καθαρισμένο πλέον προϊόν PCR κλωνοποιήθηκε σε φορέα pGEM-T (Promega, Madison, USA) με την διαδικασία της ένθεσης. Βάση του τύπου [25 ng vector x 1,5 kb (μήκος DNA) / 3] x (3 / 1) υπολογίστηκαν τα μ L DNA κάθε δείγματος που χρησιμοποιήθηκαν στην αντίδραση ένθεσης σε κατάλληλο πλασμιδιακό φορέα pGEM®-T. Τα υλικά που χρησιμοποιήθηκαν για την αντίδραση ένθεσης παρουσιάζονται στον πίνακα 2. Μετά την ανάμιξη των αντιδραστηρίων τα δείγματα επωάστηκαν στους 4°C για 16 h (overnight).

Αντιδραστήρια	Όγκος
Buffer 2x	5 μ l
pGEM (50ng/μl)	0,5 μ l
PCR product	3,5 μ l
Ligase (3 Weiss units/μl)	1 μ l
Συνολικός όγκος	50 μ l
Παραμονή στους 4 °C για 16h (overnight)	

Πίνακας 2. Αντιδραστήρια και συνθήκες με τις οποίες πραγματοποιήθηκε η ένθεση των προϊόντων PCR σε πλασμιδιακό φορέα pGEM – T.

Μετασχηματισμός (Transformation)

Ο μετασχηματισμός έγινε σε δεκτικά κύτταρα E.coli DH5α. Σε 80μl δεκτικών κυττάρων προστέθηκαν 2μl λιγάσης και το μίγμα ανακινήθηκε ελαφρά. Ακολούθησε επώαση στον πάγο για 30min και στη συνέχεια προκλήθηκε θερμικό σοκ στους 42°C για 50sec. Τα κύτταρα επανατοποθετήθηκαν στον πάγο για 2min και προστέθηκαν 200μl LB. Έγινε επώαση στους 37°C για 60min. Στη συνέχεια, σε θάλαμο νηματικής ροής και ασηπτικά προστέθηκαν στα κύτταρα 50μl X-GAL (2%) και 10μl IPTG (0,1M) και όλος ο όγκος της καλλιέργειας επιστρώθηκε σε τριβλία LB με αμπικιλίνη (100μg/ml). Τα τριβλία επώαστηκαν στους 37°C για 16 ώρες.

Αντιδραστήρια	Όγκος
Δεκτικά κύτταρα	80 μl
Προιον ligation	2 μl
Θρεπτικό διάλυμα LB	200 μl
X – gal 2%	50 μl
IPTG 0,1M	10 μl

Πίνακας 3. Αντιδραστήρια και συνθήκες του μετασχηματισμού σε δεκτικά κύτταρα

Ο μπλε χρωματισμός των αποικιών , προκαλούμενος από τη διάσπαση του X – gal από το ένζυμο β – γαλακτοσιδάση χρησιμοποιείται ως κριτήριο επιτυχίας της ένθεσης. Αν έχει γίνει η ένθεση δεν παράγεται β – γαλακτοσιδάση και οι αποικίες αποκτούν λευκό χρώμα.

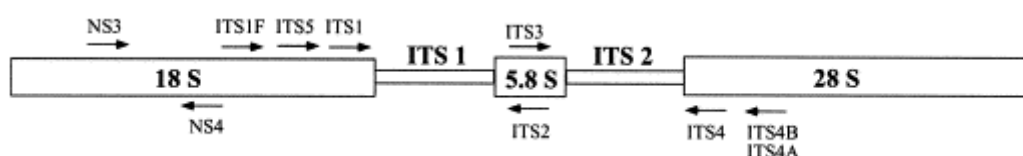
Επιλογή Αποικιών

Την επόμενη μέρα, πραγματοποιήθηκε επιλογή λευκών αποικιών από κάθε τριβλίο με τη χρήση αποστειρωμένων οδοντογλυφίδων ακίδων και τοποθετήθηκαν σε αποστειρωμένα μπουκάλια (25 mL) που περιείχαν 1 mL

LB + Ampicillin. Ακολούθως, τα μπουκάλια τοποθετήθηκαν σε επωαστικό θάλαμο με ανάδευση στους 37 °C στις 200 στροφές/min για 16 h. Συνολικά επιλέχθηκαν 93 αποικίες που προέκυψαν από το περιβαλλοντικό δείγμα 3α, 42 αποικίες του περιβαλλοντικού 4α, και 51 αποικίες του περιβαλλοντικού 6α.

Colony PCR

Παράλληλα με την επώαση των επιλεγμένων αποικιών πραγματοποιήθηκε με τον ίδιο τρόπο (εμβάπτιση του ακροφυσίου της πιπέτας στην υγρή καλλιέργεια) και colony PCR στις ίδιες αποικίες ώστε 1) να επιβεβαιωθεί η επιτυχής ένθεση του κατάλληλου ενθέματος και 2) να παραληφθεί προϊόν PCR για την αξιολόγηση της ηλεκτροφορητικής του κινητικότητας σε σύστημα DGGE. Στη αντίδραση colony PCR, το προϊόν της πρώτης αντίδρασης ενισχύεται με τους εκκινητές ITS1F-GC και ITS2. Ο ITS1F-GC εκκινητής είναι ίδιος με τον ITS1F με τη διαφορά ότι έχει μια αλληλουχία 40 νουκλεοτιδίων πλούσια σε GC (GC clamp) στο 5' άκρο του. Με τη δεύτερη αυτή αντίδραση PCR παράγονται μικρότερα ITS τμήματα (300 bp) τα οποία φέρουν GC-clamp. Το GC-clamp είναι απαραίτητο για να αποφευχθεί η ολική αποδιάταξη των δίκλωνων τμημάτων DNA κατά την διάρκεια του DGGE.



Οι αλληλουχίες των εκκινητικών μορίων που χρησιμοποιήθηκαν στην αντίδραση cPCR παρουσιάζονται στο Πίνακα 4.

Εκκινητής	Αλληλουχία	Tm
ITS1F-GC	5' – CGC CCG CCG CGC GCG GCG GGC GGG GCG GGG GCA CGG GGG GCT TGG TCA TTT AGA GGA AGT AA – 3'	99.0°C
ITS2	5' – GCT GCG TTC TTC ATC GAT GC – 3'	55.7°C

Πίνακας 4. Η αλληλουχία των εκκινητών που χρησιμοποιήθηκαν για την colony PCR.

Τα αντιδραστήρια και οι όγκοι που χρησιμοποιήθηκαν στις αντιδράσεις colony PCR παρουσιάζονται στο πίνακα 5.

Αντιδραστήρια	Όγκος
Buffer for cPCR 10x	1,5 µl
dNTPs (10 mM each)	0,3 µl
Primer ITS1F – GC (20 pmol)	0,3 µl
Primer ITS2 (20 pmol)	0,3 µl
KapaTaq Polymerase	0,06 µl
MgCl ₂	0,9 µl
ddH ₂ O	11,64 µl
Συνολικός όγκος	15 µl

Πίνακας 5. Αντιδραστήρια της colony PCR

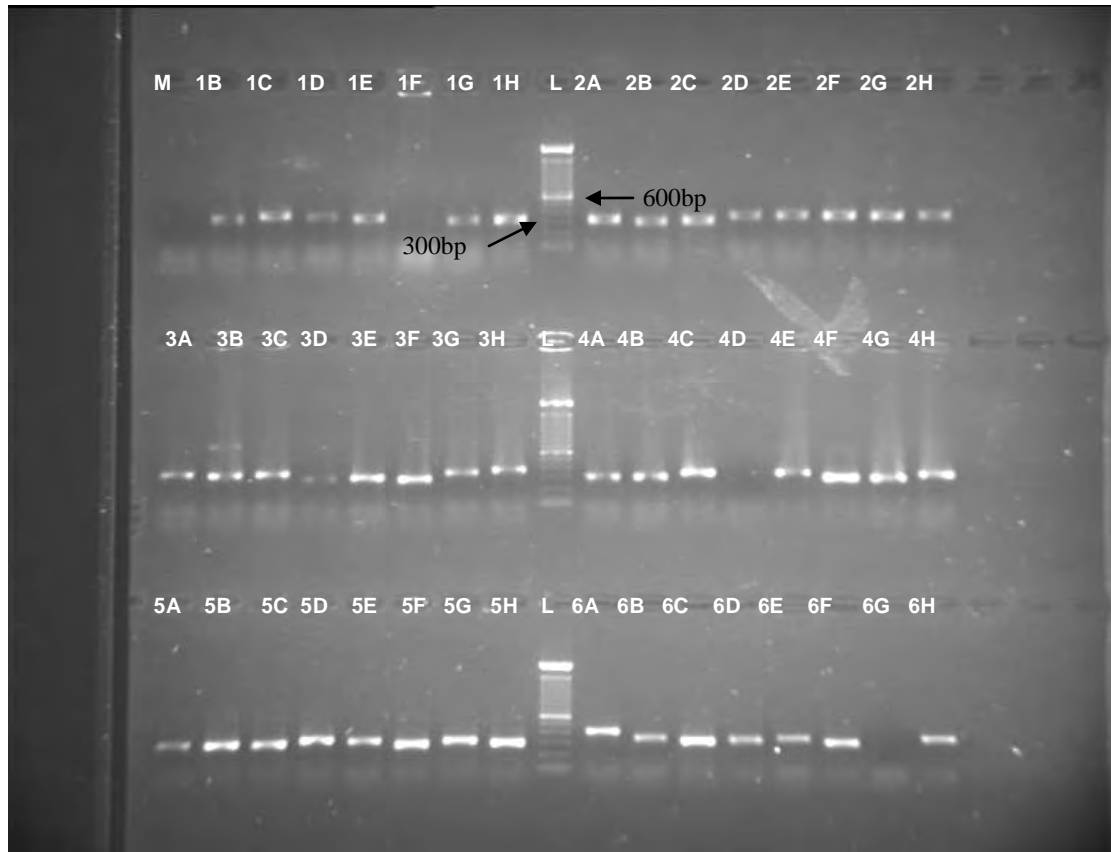
Οι θερμοκυκλοποιητικές συνθήκες που εφαρμόστηκαν μετά από δοκιμές για την colony PCR παρουσιάζονται στον Πίνακα 6.

Συνθήκες colony PCR			
Αρχική αποδιάταξη	95°C	5min	
Αποδιάταξη	95 °C	30sec	
Υβριδοποίηση	55°C	30sec	25 κύκλοι
Επιμήκυνση	72°C	25sec	
Τελική επιμήκυνση	72°C	5min	

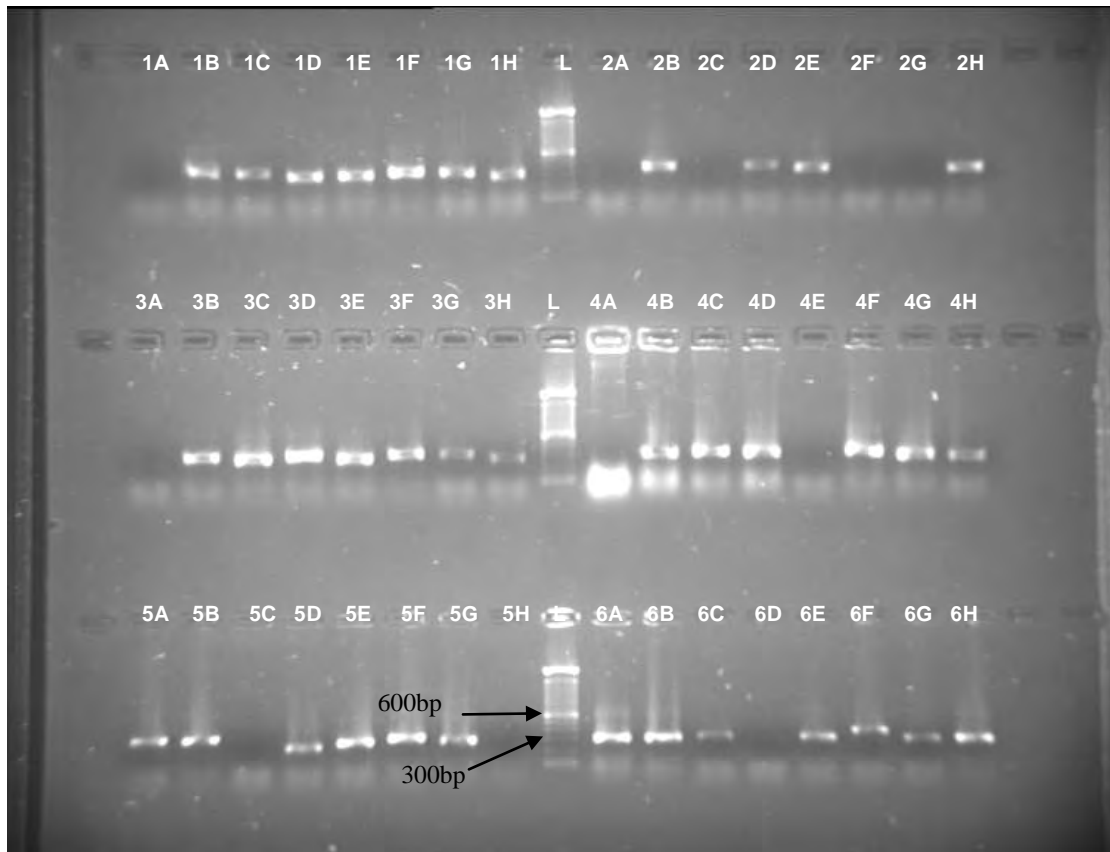
Πίνακας 6. Θερμοκυκλοποιητικές συνθήκες της colony PCR

Ηλεκτροφόρηση σε πηκτή αγαρόζης του προϊόντος cPCR

Για την ηλεκτροφόρηση των προϊόντων της colony PCR χρησιμοποιήθηκε πηκτή αγαρόζης 1,5%. Φορτώθηκαν 5μl από κάθε κλώνο με 1μl loading buffer 6x. Η ηλεκτροφόρηση πραγματοποιήθηκε στα 90V.



Εικόνα 3 Ενδεικτική εικόνα ηλεκτροφόρησης σε πηκτή αγαρόζης 1,5% προϊόντων colony PCR . Στην κάθε γραμμή φορτώθηκαν 5μl προϊόντος cPCR κλώνων του περ/κου 3α . Όπου: L (Ladder) και M (Μάρτυρας).



Εικόνα 4 Ενδεικτική εικόνα ηλεκτροφόρησης σε πηκτή αгарόζης 1,5% προϊόντων colony PCR. Στην κάθε γραμμή φορτώθηκαν 5μl προϊόντος cPCR κλώνων του περ/κου 4α . Όπου: L (Ladder).

Ηλεκτροφόρηση σε πηκτή με βαθμίδωση αποδιατακτικών ουσιών
- DGGE (Denaturing Gradient Gel Electrophoresis)

Τα προϊόντα PCR των κλώνων, αξιολογήθηκαν ως προς την κινητικότητα τους σε πηκτή DGGE σε αντιπαραβολή με το μοριακό αποτύπωμα του περιβαλλοντικού δείγματος από το οποίο προήλθαν.

Η DGGE ανάλυση πραγματοποιήθηκε με το INGENYphorU-2x2 σύστημα (Ingeny International BV, Ολλανδία). Χρησιμοποιήθηκε πηκτή πολυακρυλαμίδης 8% σε ρυθμιστικό διάλυμα 1x TAE. Σε κάθε 'διαδρομή' φορτώθηκαν 1μl ή 0,8μl προϊόντος της colony PCR. Για την ηλεκτροφόρηση και ανάλυση της κοινότητας των μυκήτων χρησιμοποιήθηκε βαθμίδωση αποδιατακτικών ουσιών από 30 έως 55% (Αποδιατακτικός παράγοντας 100% περιέχει 7M ουρία και 40% φορμαμίδη).

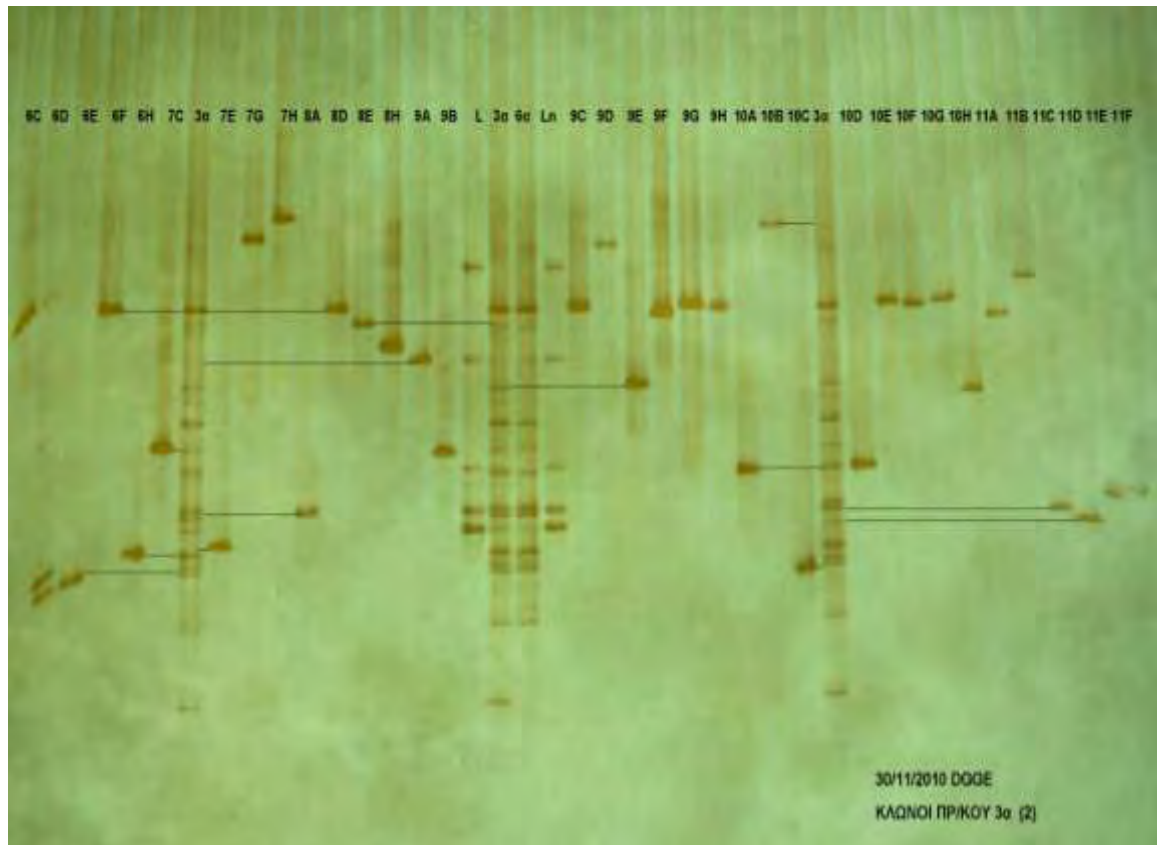


Εικόνα 5. INGENYphorU-2x2 σύστημα

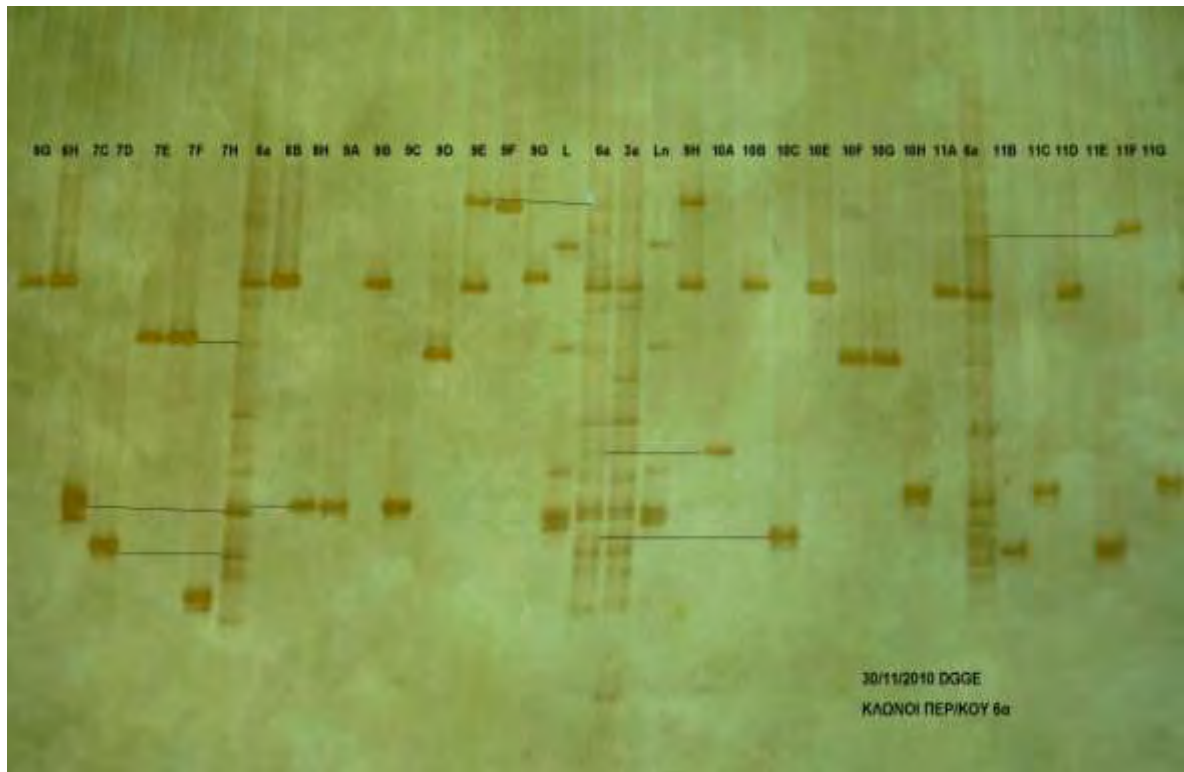
Η ηλεκτροφόρηση πραγματοποιήθηκε στα 75 V για 16 ώρες στους 60°C. Με την ολοκλήρωση της ηλεκτροφόρησης ακολούθησε βαφή της πηκτής με νιτρικό άργυρο όπως περιγράφεται από τον McCaig et al (2001). Η εικόνα της πηκτής μετά την βαφή φωτογραφήθηκε με ψηφιακή κάμερα και

ακολούθησε ανάλυση των εικόνων των πηκτωμάτων DGGE.

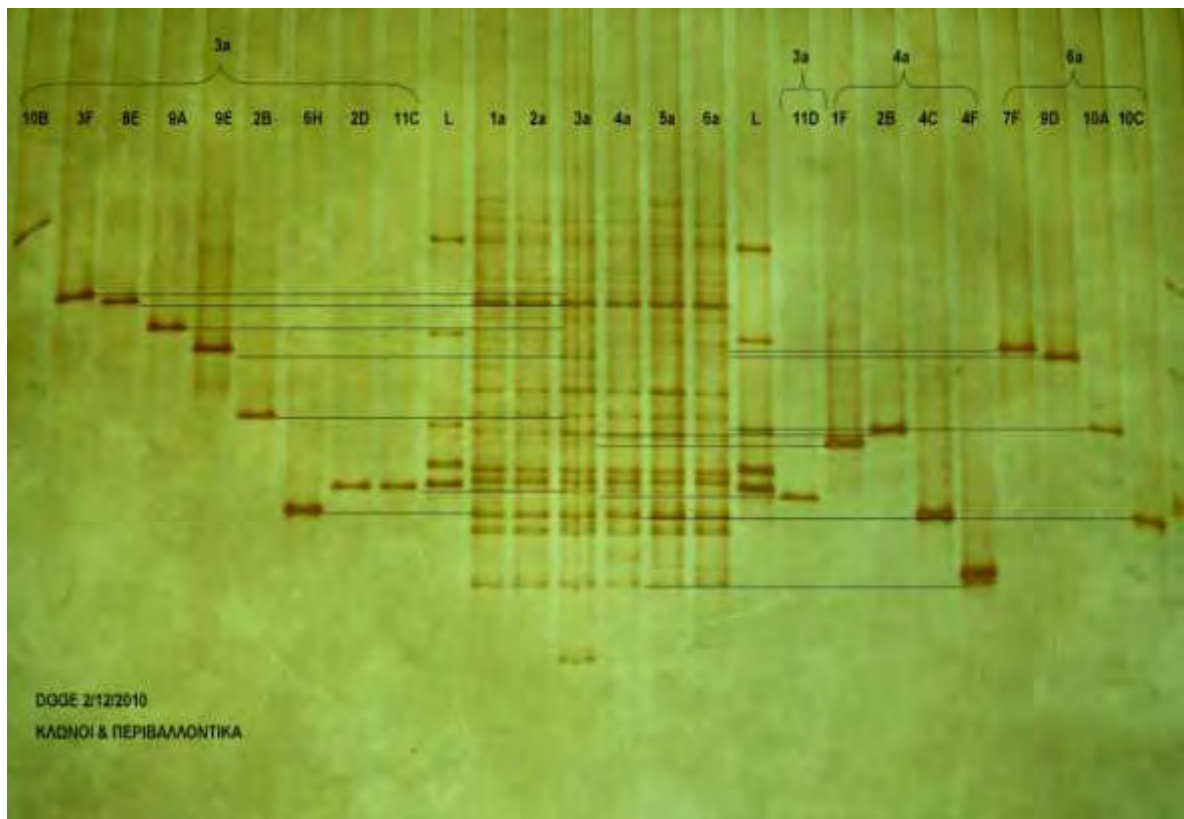
Συνολικά πραγματοποιήθηκαν 4 ζεύγη DGGE αναλύσεων όπως αποτυπώθηκαν ψηφιακά και ενδεικτικά φαίνονται παρακάτω.



Εικόνες 6, 7 & 8. Εικόνα πηκτής DGGE σε βαθμίδωση αποδιατακτικών ουσιών 30-55%, όπου παρουσιάζεται ενδεικτικά πως έγινε η αξιολόγηση των κλώνων με βάση την κινητικότητα τους σε αντιπαραβολή με τα περιβαλλοντικά δείγματα από τα οποία προήλθαν (3a, 6a, 4a: περιβαλλοντικό δείγμα, L: Ladder μυκήτων). Στις αντίστοιχες διαδρομές φορτώθηκαν: 1μl κλώνων, 1μl από τα περιβαλλοντικά δείγματα, 4 μl Ladder για μύκητες, μαζί με 5 μl loading buffer.

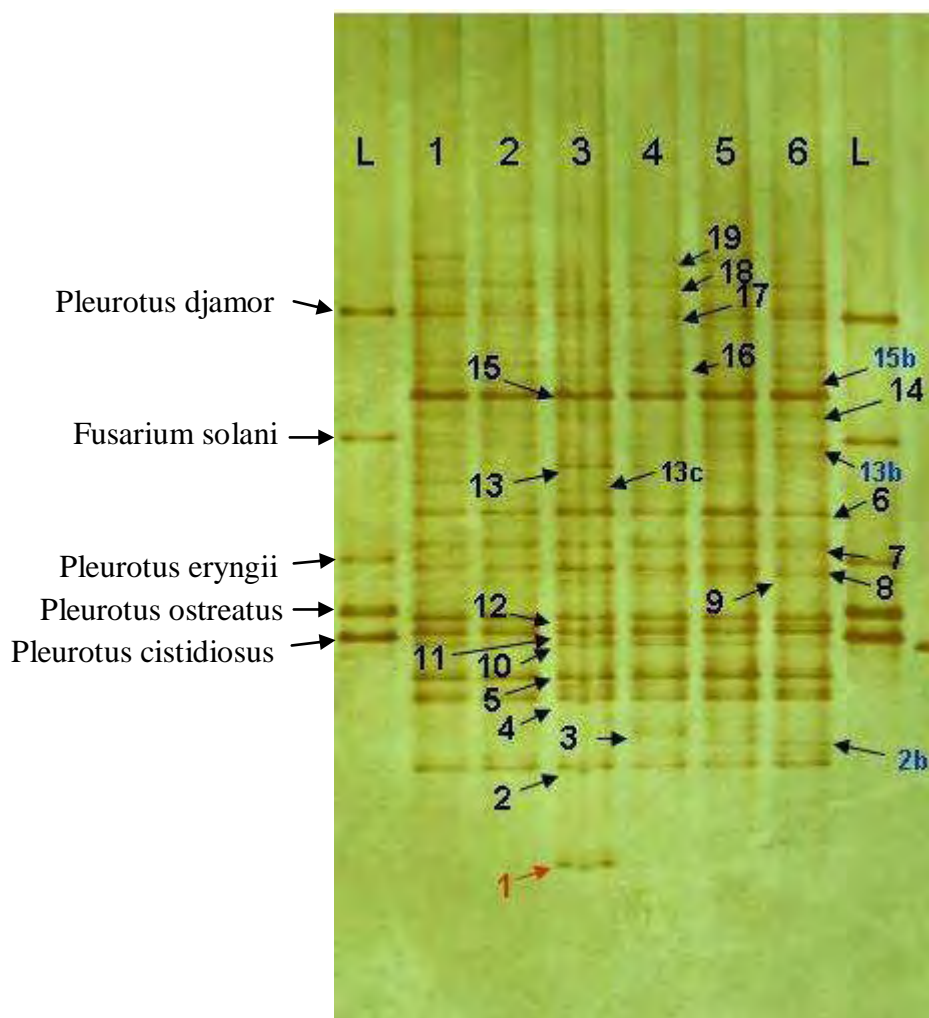


Εικόνα 7.



Εικόνα 8.

Αντιπροσωπευτικοί κλώνοι που εμφάνισαν πανομοιότυπη κινητικότητα σε σχέση με ζώνες των περιβαλλοντικών δειγμάτων επιλέχθηκαν και αλληλουχήθηκαν. Για αυτό το λόγο οι ζώνες των περιβαλλοντικών δειγμάτων αριθμήθηκαν όπως φαίνεται στην Εικόνα 9.



Εικόνα 9. Εικόνα πηκτής DGGE σε βαθμίδωση αποδιατακτικών ουσιών όπου παρουσιάζεται πως έγινε η αριθμηση των ζωνών στα περιβαλλοντικά δείγματα. Όπου: lane 1 - διαφυλλική εφαρμογή μάρτυρα, lane 2 – εδαφική εφαρμογή μάρτυρα, lane 3 – διαφυλλική εφαρμογή Imidachlorpid, lane 4 – εδαφική εφαρμογή Imidachlorpid, lane 5 – διαφυλλική εφαρμογή metalaxyl M, lane 6 – εδαφική εφαρμογή metalaxyl M και όπου L: Ladder που αποτελείται από ανάμιξη προϊόντων PCR από την περιοχή ITS γνωστών μυκήτων που φαίνονται στην εικόνα.

Γενικότερα, για κάθε ζώνη αλληλουχήθηκαν κλώνοι και των τριών περιβαλλοντικών δειγμάτων (3α, 4α, 6α) ώστε να επιβεβαιώσουμε ότι οι κλώνοι που παρουσιάζουν την ίδια κινητικότητα στις πηκτές DGGE παρουσιάζουν και ταυτόσημες αλληλουχίες. Επιλέχθηκαν συνολικά 90 κλώνοι και πραγματοποιήθηκε αλληλούχιση τους.

Εξαγωγή και καθαρισμός πλασμιδίων και αλληλούχιση

Προκειμένου να γίνει η αλληλούχιση, πραγματοποιήθηκε απομόνωση και καθαρισμός του πλασμιδιακού DNA από τους 90 επιλεγμένους κλώνους χρησιμοποιώντας το NucleoSpin Plasmid kit (Macharey-Nagel GmbH, Germany) σύμφωνα με τις οδηγίες του κατασκευαστή.

Ακολούθως τα πλασμίδια απεστάλησαν στη μονάδα αλληλούχισης του ***Τμήματος Ανοσολογίας και Ιστοσυμβατότητας της Ιατρικής Σχολής του Πανεπιστημίου Θεσσαλίας*** για ανάλυση της αλληλουχίας του ενθέματος.

Για την ταυτοποίηση των κλώνων που αλληλουχήθηκαν πραγματοποιήθηκε ομοπαράθεση της αλληλουχίας τους με τις καταχωρημένες αλληλουχίες της ηλεκτρονικής βάσης δεδομένων του NCBI (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov>) με την βοήθεια του εργαλείου BLAST (Basic Local Alignment Search Tool).

ΑΠΟΤΕΛΕΣΜΑΤΑ ΚΑΙ ΣΥΖΗΤΗΣΗ

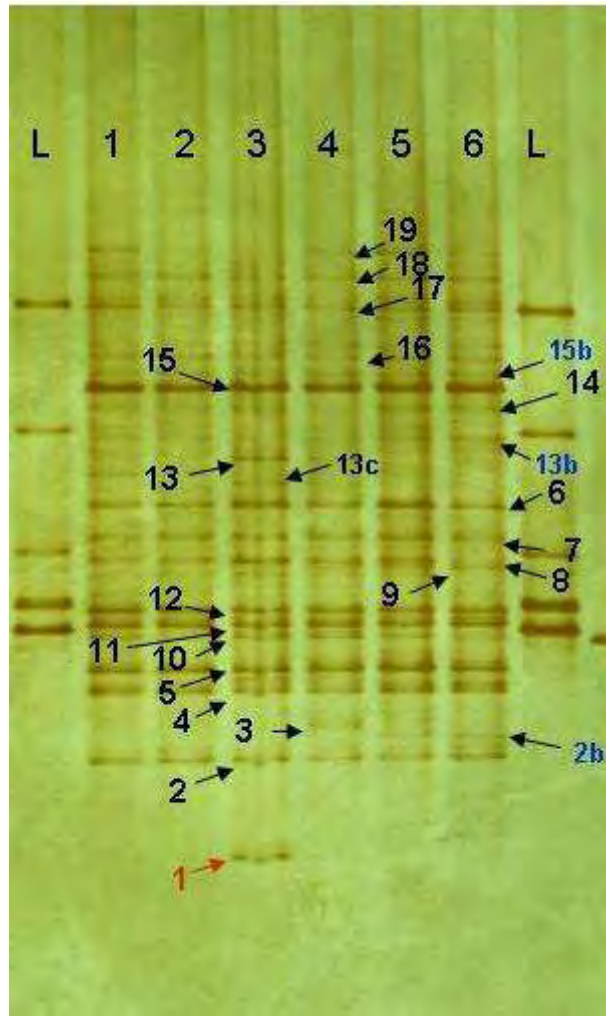
Οπτική παρατήρηση των πηκτών DGGE έδειξε ότι ορισμένες ζώνες εμφανίζονταν ή εξαφανίζονταν στο αποτύπωμα συγκεκριμένων μεταχειρίσεων ανάλογα με το γεωργικό φάρμακο (metalaxyl ή imidachlorid) που εφαρμόστηκε και τον τρόπο με τον οποίο έγινε ή εφαρμογή (διαφυλλικά ή από εδάφους). Κατά συνέπεια δημιουργήθηκαν βιβλιοθήκες κλώνων για τον φυλογενετικό προσδιορισμό αυτών των μυκήτων. Συνολικά, οι σημαντικότερες ζώνες στο μοριακό αποτύπωμα DGGE περιλαμβάνονται στη βιβλιοθήκη κλώνων.

Μετά την αλληλούχιση όλων των κλώνων και την ομοπαράθεση της αλληλουχίας τους με τις καταχωρημένες αλληλουχίες της ηλεκτρονικής βάσης δεδομένων του NCBI με την χρήση του εργαλείου BLAST, επιλέχθηκαν οι μύκητες με τους οποίους οι κλώνοι μας παρουσίαζαν την υψηλότερη ομολογία και παρουσιάζονται στο Πίνακα 7.

Πίνακας 7. Ταυτότητα των επιλεγμένων ζωνών DGGE από την κοινότητα των μυκήτων. Στη δεύτερη στήλη φαίνεται ο αριθμός των κλώνων για κάθε ζώνη που αλληλουχήθηκαν. Στην τέταρτη στήλη εκτός από το % ποσοστό ομολογίας, φαίνεται και ο αριθμός των κλώνων με την ίδια ταυτότητα σε μια ζώνη (1), (2), (3) κ.λ.π.

Ζώνες	Αριθμός κλώνων	Στελέχη με τη μεγαλύτερη ομολογία σύμφωνα με την GenBank (% ομολογία αλληλουχίας από το BLAST)	GenBank Accession no.
1	1	<i>Cryptococcus adeliensis</i>	95.6% FN400760.1
2	4	<i>Golovinomyces cichoracearum</i>	(3) 99.6% AB077656.1
		<i>Podosphaera fusca</i>	(1) 100% AB525915.1
2b	1	<i>Golovinomyces cichoracearum</i>	96.5% AY739111.2
3	2	<i>Golovinomyces cichoracearum</i>	(1) 96.5% AB077656.1
		Uncultured fungal clone	(1) 99.4% AY843157.1

4	5	<i>Golovinomyces cichoracearum</i> isolate UMSG1	(2) 99.8%	HM449077.1
		Uncultured Sordariales clone 9A6S46N	(2) 93.7%	HQ389517.1
		Uncultured fungus clone	(1) 99.4%	GQ999388.1
5	7	<i>Erysiphe cichoracearum</i>	(2) 99.6%	AF031282.1
		<i>Lewia infectoria</i>	(5) 100%	AY154692.1
6	2	<i>Alternaria</i> sp.	(2) 100%	HQ674662.1
7	1	<i>Pleospora</i> sp.	99.5%	GQ120976.1
8	3	<i>Pyrenophora avenae</i> isolate 94-1b	(1) 99.8%	EF452453.1
		<i>Drechslera avenae</i> isolate DA16	(1) 99.8%	AF260328.1
		<i>Podospora communis</i> strain NZ206	(1) 99.5%	EU621831.1
9	3	<i>Periconia macrospinosa</i> strain KS00113	(2) 99.8%	FJ536208.1
		<i>Erysiphe betae</i> isolate EB1-1	(1) 99.3%	DQ164432.1
10	5	<i>Neoerysiphe galeopsidis</i>	(2) 99.8%	AB498949.1
		<i>Cryptococcus adeliensis</i>	(1) 99.8%	FN400760.1
		Uncultured fungus clone Alb_O_MayH10	(1) 99.8%	GU174374.1
		<i>Erysiphe betae</i> isolate EB1-1	(1) 99.0%	DQ164432.1
11	2	<i>Erysiphe cruciferarum</i>	(1) 100%	EU140958.1
		<i>Neoerysiphe galeopsidis</i>	(1) 99.3%	AB498949.1
12	4	<i>Erysiphe cruciferarum</i>	(3) 99.7%	EU140958.1
		<i>Cryptococcus adeliensis</i> strain hp10	(1) 98.2%	HQ541608.1
13	2	Uncultured root-associated fungus	(1) 94.0%	FJ362298.1
		Uncultured endophytic fungus	(1) 72.7%	EF504362.1
13b	4	Uncultured Saccharomyceta clone	(2) 99.6%	HQ211899.1
		<i>Cryptococcus</i> sp. YKS 2004	(2) 99.3%	AY749434.1
13c	1	Uncultured Ascomycota clone	100%	HM162191.1
14	2	<i>Cladosporium</i> sp. TMS-2011	(1) 99.4%	HQ631003.1
		<i>Penicillium brevicompactum</i> strain P1.19	(1) 99.3%	EU833211.1
15	11	<i>Davidiella tassiana</i> strain G20	(11) 100%	GU566258.1
15b	2	Uncultured fungus clone	(1) 100%	GQ999388.1
		<i>Pleosporales</i> sp. MU-2009-2	(1) 100%	FN548155.1
16	2	<i>Pleosporales</i> sp. MU-2009-2	(1) 100%	FN548155.1
		Uncultured Sclerotiniaceae clone	(1) 99.8%	HQ211718.1
17	1	<i>Sporidiobolus</i> sp.	99.8%	AY015435.1
18	2	<i>Sporidiobolus</i> sp.	(2) 99.6%	AY015435.1
19	3	Uncultured fungus clone	100%	GU054188.1
		<i>Cryptococcus adeliensis</i>	99.8%	FN400760.1
		<i>Cystofilobasidium macerans</i>	99.6%	AF444329.1



Εικόνα 9 (επανάληψη). Εικόνα πηκτής DGGE σε βαθμίδωση αποδιατακτικών ουσιών όπου παρουσιάζεται πως έγινε η αρίθμηση των ζωνών στα περιβαλλοντικά δείγματα. Όπου: lane 1 - διαφυλλική εφαρμογή μάρτυρα, lane 2 – εδαφική εφαρμογή μάρτυρα, lane 3 – διαφυλλική εφαρμογή Imidachlorpid, lane 4 – εδαφική εφαρμογή Imidachlorpid, lane 5 – διαφυλλική εφαρμογή metalaxyl M, lane 6 – εδαφική εφαρμογή metalaxyl M και όπου L: Ladder που αποτελείται από ανάμιξη προϊόντων PCR από την περιοχή ITS γνωστών μυκήτων.

Όπως φαίνεται στον πιο πάνω πίνακα κάποιες ζώνες φαίνεται να υποκρύπτουν περισσότερους από ένα διαφορετικούς ριβότυπους μυκήτων. Αυτό δικαιολογείται καθώς δύο ή και περισσότεροι διαφορετικοί ριβότυποι μυκήτων, μπορεί και μη συγγενικοί φυλογενετικά, να παρουσιάζουν διαφορετική αλληλουχία αλλά την ίδια αναλογία GC στην αλληλουχία τους με

αποτέλεσμα να μην διαχωρίζονται επαρκώς στο εύρος διαβάθμισης αποδιατακτικών ουσιών που χρησιμοποιήθηκε στην παρούσα εργασία (Muyzer and Smalla 1998).

Από τη ταυτοποίηση των μυκήτων όπως παρουσιάζεται και στο πίνακα 7, φαίνεται ότι η κοινότητα των επίφυτων μυκήτων μετά τις μεταχειρίσεις κυριαρχείται από Ασκομύκητες και Βασιδιομύκητες.

Ασκομύκητες (ASCOMYCOTA)

Στους Ασκομύκητες περιλαμβάνονται τα σημαντικότερα παθογόνα που προκαλούν σοβαρές ασθένειες στα καλλιεργούμενα φυτά, όπως εξώασκους (*Taphrina* sp.), φουζικλάδια (*Fusicladium* sp.), μονίλιες (*Monilinia* sp.), ωΐδια (*Erysiphe* sp.) κ.α. καθώς βέβαια και μη παθογόνοι μύκητες. Διακρίνονται από την ιδιομορφία τους να παρουσιάζονται στη φύση με δυο συνήθως μορφές, την τέλεια, που μπορεί να πολλαπλασιάσει τον μύκητα εγγενώς, και την ατελή που ανήκει στους Αδηλομύκητες και που απαντά συχνότερα και κατά το μεγαλύτερο χρονικό διάστημα της διάρκειας του βιολογικού κύκλου τους. Οι ασκομύκητες είναι ανώτεροι μύκητες που έχουν κοινό χαρακτηριστικό την παραγωγή ασκοσπορίων μέσα σε ασκούς.

Βασιδιομύκητες (BASIDIOMYCOTA)

Οι Βασιδιομύκητες είναι ανώτεροι μύκητες που παράγουν πάνω σε μια ροπαλοειδή κατασκευή το βασίδιο, τέσσερα συνήθως σπόρια εγγενούς αναπαραγωγής που ονομάζονται βασιδιοσπόρια. Εκτός της τέλειας μορφής μερικοί από τους βασιδιομύκητες σχηματίζουν και ατελείς μορφές. Οι

βασιδιομύκητες παίζουν σημαντικό ρόλο στην αποσύνθεση της οργανικής ύλης (Bergauer et al., 2005), στην αποδόμηση οργανικών ρυπαντών (Sayadi and Ellouz, 2007) ενώ κάποιοι από αυτούς αποτελούν και σημαντικά φυτοπαθογόνα όπως οι *Puccinia* και *Ustilago* που προκαλούν τις σκωριάσεις και τις ανθρακώσεις στα δημητριακά αντίστοιχα. Τέλος στους βασιδιομύκητες ανήκουν και τα κοινά μανιτάρια διαφόρων γενών.

Ανάλυση των ζωνών

Οι κυριότερες ζώνες των μοριακών αποτυπωμάτων της κοινότητας των μυκήτων στην φυλλόσφαιρα περιγράφονται αναλυτικά παρακάτω.

Ζώνη 1

Η ζώνη 1 όπως φαίνεται στις Εικόνες 1 και 9 εμφανίζεται μόνο στα δείγματα που δέχτηκαν διαφυλλική εφαρμογή imidachlorpid (Μεταχείριση 3). Ο κλώνος που παρουσίασε ταυτόσημη ηλεκτροφορητική κινητική με την συγκεκριμένη ζώνη παρουσίασε μέγιστη ομολογία με την αλληλουχία της ITS περιοχής βασιδιομυκήτων του είδους *Cryptococcus adeliensis* (95.6%). Το είδος *Cryptococcus adeliensis* έχει ταυτοποιηθεί ως επίφυτο σε σταφύλια (Cadez, et al., 2010), ενώ το γένος *Cryptococcus* έχει βρεθεί ως επίφυτο σε άνθη Υβίσκου (*Hibiscus* sp.), καθώς και σε άνθη φυτών των οικογενειών *Convolvulaceae* και *Cactaceae* (Lanchance et al., 2001). Επιπλέον το γένος *Cryptococcus* εντοπίστηκε και στα 315 δείγματα φυτικών ιστών που ελήφθησαν από 8 διαφορετικές τοποθεσίες της Ινδονησίας σε έρευνα που πραγματοποιήθηκε σε τέσσερα έτη (Sjamsuridjal et al., 2010). Ζύμες του

γένους *Cryptococcus* αποτελούν κοινούς αποικιστές του εδάφους και έχει βρεθεί ότι εμπλέκονται στην αποδόμηση διαφόρων οργανικών οξέων, σακχάρων, γλυκοσιδίων και αμινοξέων (Thormann et al., 2007). Διάφορα είδη του γένους *Cryptococcus* (*C. phenolicus*, *C. aerius*) έχει βρεθεί ότι έχουν την ικανότητα να διασπούν αποτελεσματικά διάφορα φαινολικά (Bergauer et al., 2005).

Ζώνη 2

Η ζώνη 2 είναι παρούσα σε όλες τις μεταχειρίσεις και φαίνεται να μην επηρεάζεται από αυτές. Από τους 4 κλώνους που αλληλουχήθηκαν οι τρεις παρουσιάζουν ομολογία με το είδος *Golovinomyces cichoracearum* (99.6%) και ο τέταρτος με το είδος *Podosphaera fusca* (100%). Αμφότερα τα δυο είδη είναι ασκομύκητες και ανήκουν στην οικογένεια *Erysiphaceae*

Μύκητες της οικογένειας *Erysiphaceae* προκαλούν ασθένειες γνωστές ως «ωΐδια» και χαρακτηρίζονται από το σχηματισμό κλειστής εγγενούς καρποφορίας γνωστής ως κλειστοθήκιο. Όλα τα γένη των *Erysiphaceae* είναι υποχρεωτικά παράσιτα, αναπτύσσονται δηλαδή σε ζωντανά φυτικά κύτταρα. Το μυκήλιο τους αναπτύσσεται πάνω στα φυτά και τρέφεται με μυζητήρες από τα κύτταρα της επιδερμίδας των ξενιστών. Τα ωΐδια σχηματίζουν στην επιφάνεια των φυτών λευκή, αλευρώδη εξάνθηση από μυκήλιο και καρποφορίες της αγενούς τους μορφής. Πολλές φορές πάνω στην εξάνθηση σχηματίζονται τα σκούρα καστανά ή μαύρα κλειστοθήκια. Η ατελείς μορφές των ωιδίων ταξινομούνται κυρίως στο γένος *Oidium* των *Moniliales* (Τζάμος, 2007).

Το είδος *Golovinomyces cichoracearum* (συν. *Eryshiphe*

cichoracearum) προκαλεί τα «ωΐδια» πολλών ποωδών ξενιστών μεταξύ των οποίων τα κολοκυνθοειδή: πεπόνι, αγγούρι και κολοκύθι (Cornell Cooperative Extension Fact Sheet, 2011). Επίσης έχει βρεθεί ως επίφυτο παθογόνο σε ηλίανθο (*Helianthus annuus*) , σόγια (*Glycine max*) καθώς και στα αυτοφυή: ζωχό (*Sonchus Oleraceous*), *Ambrosia trifida*, *Aster subulatus*, *Eupatorium japonicum* (Almeida et al., 2008), φασολιά (μαυρομάτικο) (Almeida et al., 2004).

Το είδος *Podosphaera fusca* (syn. *Podosphaera xanthii*) έχει βρεθεί ως επίφυτο παθογόνο σε πολλά αυτοφυή: *Taraxacum officinale* (ραδίκι), *Calendula officinalis*, *Euryops pectinatus* (Almeida et al., 2008). Προκαλεί «ωΐδια» στα κολοκυνθοειδή (Perez – Garcia et al., 2009).

Ζώνη 2b

Η ζώνη 2b εμφανίζεται μόνο στο μοριακό αποτύπωμα των δειγμάτων που δέχτηκαν εφαρμογή του μυκητοκτόνου metalaxyl-M ανεξάρτητα της μεθόδου εφαρμογής (Μεταχειρίσεις 5 και 6). Ο κλώνος που παρουσίασε ταυτόσημη ηλεκτροφορητική κινητική με την ζώνη 2b παρουσίασε υψηλότερη ομολογία στην ITS περιοχή τους γονιδιώματος με στέλεχος του είδους *Golovinomyces cichoracearum* (96.5%).

Ζώνη 3

Η ζώνη 3 εμφανίζεται μόνο στα μοριακά αποτυπώματα των δειγμάτων που δέχτηκαν εφαρμογή του εντομοκτόνου imidachlorpid δια ριζοποτίσματος (Μεταχείριση 4). Οι δύο κλώνοι που παρουσίασαν ταυτόσημη

ηλεκτροφορητική κινητική με την συγκεκριμένη ζώνη παρουσίασαν υψηλότερη ομολογία στην αλληλουχία της ITS περιοχής με στέλεχος του είδους *Golovinomyces cichoracearum* (96.5%) και με στέλεχος μύκητα που δεν έχει ταξινομηθεί ως σήμερα (99.4%).

Ζώνη 4

Η ζώνη 4 είναι παρούσα σε όλες τις μεταχειρίσεις. Οι κλώνοι που παρουσίασαν ταυτόσημη ηλεκτροφορητική κινητική με την ζώνη αυτή παρουσίασαν υψηλότερη ομολογία στην αλληλουχία της ITS περιοχής με στελέχη του είδους *Golovinomyces cichoracearum* (99.8%) και με δύο μη καλλιεργήσιμους ως σήμερα περιβαλλοντικούς κλώνους.

Ζώνη 5

Και η ζώνη 5 παρουσιάζεται σε όλες τις μεταχειρίσεις. Πέντε από τους επτά κλώνους που έδειξαν ταυτόσημη ηλεκτροφορητική κινητική με την ζώνη 5 παρουσίασαν υψηλότερη ομολογία στην αλληλουχία της ITS περιοχής με ένα στέλεχος του είδους *Lewia infectoria* (100%), ενώ αντίστοιχα οι υπόλοιποι δύο κλώνοι έδειξαν υψηλή ομολογία με στέλεχος του είδους *Erysiphe cichoracearum* (99.6%).

Το είδος *Lewia infectoria* ανήκει στην τάξη *Pleosporales* των Ασκοστρωματομυκήτων (*Loguloascomycetes*) η οποία περιλαμβάνει πολλούς φυτοπαθογόνους μύκητες. Το *Lewia infectoria* αποτελεί το τελεόμορφο του μύκητα *Alternaria infectoria* το οποίο έχει βρεθεί ως επίφυτο παθογόνο στο σιτάρι (Pounder et al., 2006).

Ζώνη 6

Η ζώνη 6 υπάρχει σε όλες τις μεταχειρίσεις. Οι σχετιζόμενοι με την ζώνη έξι κλώνοι παρουσίασαν μέγιστη ομολογία της αλληλουχίας της ITS περιοχής με στέλεχος του γένους *Alternaria* sp. (100%). Το γένος *Alternaria* είναι ατελής μορφή και περιλαμβάνει σημαντικούς φυτοπαθογόνους μύκητες με τεράστιο εύρος ξενιστών. Στο γένος *Alternaria* έχουν ταυτοποιηθεί 299 διαφορετικά είδη (Kirk et al., 2008). Θεωρείται ότι το 20% των απωλειών στην αγροτική παραγωγή παγκοσμίως οφείλεται σε φυτοπαθογόνα είδη του γένους *Alternaria*.

Ζώνη 7

Η ζώνη 7 βρίσκεται σε όλες τις μεταχειρίσεις. Οι κλώνοι που παρουσιάζουν ταυτόσημη ηλεκτροφορητική κινητική με την ζώνη αυτή παρουσίασαν υψηλότερη ομολογία στην αλληλουχία της ITS περιοχής με στέλεχος του γένους *Pleospora*. Αντιπροσωπευτικά είδη του γένους αυτού είναι το *Pleospora betae* (ατελής μορφή: το είδος *Phoma betae*) που προσβάλλει τα τεύτλα και *Pleospora herbarum* (ατελής μορφή: το είδος *Stemphylium botryosum* f.sp. *lyopersici*), που προκαλεί τη σήψη των καρπών της τομάτας (Τζάμος, 2007). Το είδος *Pleospora eucalypti* sp. nov. εντοπίστηκε ως επίφυτο σε δένδρα ευκαλύπτου (Mehrotra et al., 2009).

Ζώνη 8

Η ζώνη 8 εμφανίζεται σε όλες τις μεταχειρίσεις. Οι σχετιζόμενοι με την

ζώνη 8 κλώνοι παρουσίασαν υψηλότερη ομολογία στην αλληλουχία της ITS περιοχής με στελέχη των ειδών *Pyrenophora avenae* (99.8%), *Drechslera avenae* (99.8%) και *Podospora communis* (99.5%).

Το *Pyrenophora avenae* αποτελεί την ατελή μορφή του *Drechslera avenae* και είναι επίφυτο και σοβαρό παθογόνο της βρώμης (*Avena sativa* L.) αλλά και άλλων αγροστωδών προκαλώντας τη μυκητολογική ασθένεια ελμινθοσπορίωση (Langaro et al., 2001). Το είδος *Podospora communis*, κλάση Sordariales, είναι ασκομύκητας που συγκαταλέγεται στους κοπρόφιλους μύκητες (Che et al., 2004, Weber et al., 2004,

Ζώνη 9

Η ζώνη 9 εμφανίζεται κυρίως στις μεταχειρίσεις που δέχτηκαν εφαρμογή metalaxyl-M. Οι σχετιζόμενοι με την ζώνη κλώνοι (εννέα στο σύνολο) παρουσίασαν υψηλότερη ομολογία στην αλληλουχία της ITS περιοχής με στελέχη των ειδών *Periconia macrospinoso* (99.8%) και *Erysiphe betae* (99.3%).

Το είδος *Periconia macrospinoso* είναι ασκομύκητας της τάξης Pleosporales και έχει αναφερθεί ως ενδόφυτο των ριζών αγροστωδών φυτών (Skipp et al., 1989, Mandyam et al., 2010). Από την άλλη μεριά μύκητες του είδους *Erysiphe betae* ανήκουν στη τάξη *Erysiphales* (ωΐδια) και αναφέρονται ως σημαντικά επίφυτα παθογόνα του ζαχαρότευτλου και άλλων βολβωδών όπως το παντζάρι (Rongai et al., 2009, Fernández et al., 2009).

Ζώνη 10

Η ζώνη 10 υπάρχει σε όλες τις μεταχειρίσεις. Οι σχετιζόμενοι με την συγκεκριμένη ζώνη κλώνοι παρουσίασαν υψηλότερη στην αλληλουχία της ITS περιοχής με στελέχη των ειδών *Neoerysiphe galeopsidis* (99.8%), *Cryptococcus adeliensis* (99.8%) και *Eryshphe betae* (99.0%).

Το είδος *Neoerysiphe galeopsidis* της τάξης *Erysiphales* (ωΐδια) αναφέρεται σαν επίφυτο παράσιτο πολλών ειδών του γένους *Stachys* των αγροστωδών (Pastirčakova et al., 2008), αλλά και άλλων φυτών όπως *Althaea rosea* (νερομολόχα) (Liu et al., 2005), *Acanthus spinosis* (Cook et al., 2006) και *Catalpa bignonioides* (Cook et al., 2004)

Ζώνη 11

Η ζώνη 11 εμφανίζεται σε όλες τις μεταχειρίσεις. Οι σχετιζόμενοι με την συγκεκριμένη ζώνη κλώνοι παρουσίασαν υψηλότερη ομολογία στην αλληλουχία της ITS περιοχής με στελέχη των ειδών *Erysiphe cruciferarum* (100%) και *Neoerysiphe galeopsidis* (99.3%).

Ο μύκητας *Erysiphe cruciferarum* συγκαταλέγεται στα «ωΐδια» και αναφέρεται ως σοβαρό επίφυτο παθογόνο πολλών ειδών της οικογένειας Brassica (λάχανο, κουνουπίδι, λαχανάκι Βρυξελλών, ραπανάκι κ.α) (Gilardi et al., 2007).

Ζώνη 12

Η ζώνη 12 εμφανίζεται σε όλες τις μεταχειρίσεις. Τρεις από τους τέσσερις κλώνους που έδειξαν ταυτόσημη ηλεκτροφορητική κινητική με την

συγκεκριμένη ζώνη είχαν υψηλότερη ομολογία στην αλληλουχία της ITS περιοχής με στέλεχος του είδους *Erysiphe cruciferarum* (99.7%).

Ζώνη 13

Η ζώνη 13 εμφανίζεται αποκλειστικά στο μοριακό αποτύπωμα των δειγμάτων που δέχτηκαν διαφυλλική εφαρμογή imidachlorid (Μεταχείριση 3). Οι σχετικοί κλώνοι παρουσίασαν υψηλότερη ομολογία στην αλληλουχία της ITS περιοχής με δύο μη καλλιεργήσιμους ως σήμερα περιβαλλοντικούς κλώνους μυκήτων.

Ζώνη 13b

Η ζώνη 13b εμφανίζεται μόνο στο μοριακό αποτύπωμα των δειγμάτων που δέχτηκαν εφαρμογή του μυκητοκτόνου metalaxyl-M ανεξαρτήτως του τρόπου εφαρμογής (Μεταχειρίσεις 5 και 6). Οι κλώνοι που αντιστοιχούν στη ζώνη 13b παρουσίασαν υψηλότερη ομολογία στην αλληλουχία της ITS περιοχής με στελέχη τους γένους *Cryptococcus* sp. (99.3%) και με ένα περιβαλλοντικό κλώνο *Saccharomycetes*.

Στην κλάση των *Saccharomycetes* ανήκουν ζύμες. Πρόκειται για μονοκύτταρους ως επί το πλείστον μύκητες που αναπαράγονται με αποβλάστηση. Οι ζύμες υπό κανονικές συνθήκες δεν είναι φυτοπαθογόνα, αν και συχνά αναπτύσσονται δευτερογενώς σε αποσυντιθέμενους φυτικούς ιστούς (Τζάμος, 2007).

Ζώνη 13c

Η ζώνη 13c εμφανίζεται μόνο στο μοριακό αποτύπωμα των δειγμάτων που δέχτηκαν διαφυλλική εφαρμογή του εντομοκτόνου imidachlorpid (Μεταχείριση 3). Ο σχετικός κλώνος που αλληλουχήθηκε παρουσίασε υψηλότερη ομολογία στην αλληλουχία της ITS περιοχής με ένα μη καλλιεργήσιμο ως σήμερα Ασκομύκητα.

Ζώνη 14

Η ζώνη 14 εμφανίζεται αποκλειστικά στα δείγματα που δέχτηκαν εφαρμογή με το μυκητοκτόνο metalaxyl-M είτε διαφυλλικά είτε με ριζοπότισμα (Μεταχειρίσεις 5 και 6). Οι σχετικοί κλώνοι παρουσίασαν μέγιστη ομολογία στην αλληλουχία της ITS περιοχής με στελέχη του γένους *Cladosporium sp.* (99.4%) και του είδους *Penicillium brevicompactum* (99.3%).

Το γένος *Cladosporium* (Davidiellaceae, Carpodiales) περιλαμβάνει πολλά είδη κάποια από τα οποία έχουν αναφερθεί ως σοβαρά φυτοπαθογόνα όπως το *Cladosporium cucumerinum* που προσβάλλει την αγγουριά και άλλα κολοκυνθοειδή, το *Cladosporium carophilum*, που προκαλεί το φουζικλάδιο των πυρηνοκάρπων (ροδακινιά και αμυγδαλιά) (Τζάμος, 2007, Schubert et al., 2007), και το *Cladosporium fulvum*, που προσβάλλει φυτά τομάτας (Rivas & Thomas, 2005).

Το γένος *Penicillium* περιλαμβάνει πολλά είδη, κάποια από τα οποία είναι γνωστά φυτοπαθογόνα προκαλώντας μετασυλλεκτικές σήψεις σε καρπούς εσπεριδοειδών και μηλοειδών. Το είδος *Penicillium brevicompactum* έχει αναφερθεί ως ενδόφυτο σε φυτά του καφέ (*Coffea arabica*, *C. congensis*,

C. dewevrei and *C. Liberica*) χωρίς παθογόνο δράση (Vega et Posada, 2006).

Ζώνη 15

Η ζώνη 15 υπάρχει σε όλες τις μεταχειρίσεις και αποτελεί την πιο έντονη ζώνη στα μοριακά αποτυπώματα όλων των μεταχειρίσεων. Για το λόγο αυτό για την ζώνη αυτή αναλύθηκαν δια αλληλούχισης και οι περισσότεροι κλώνοι (11). Οι αντίστοιχοι κλώνοι της ζώνης 15 παρουσίασαν υψηλότερη ομολογία με την αλληλουχία της ITS περιοχής ενός στελέχους του μύκητα *Davidiella tassiana* (100%).

Το είδος *Davidiella tassiana* (συν. *Mycosphaerella tassiana*, *Davidiellaceae*, *Carphodiales*) αποτελεί την τέλεια μορφή του *Cladosporium herbarum* (Schubert et al. 2007). Το *Mycosphaerella tassiana* έχει αναφερθεί ως επίφυτο παθογόνο που προκαλεί κηλιδώσεις των φύλλων σε πολλά καλλιεργούμενα φυτά (οικ. Brassicace) (Petrie & Vanterpool, 1978) ενώ η ατελής μορφή *Cladosporium herbarum* αναφέρεται τόσο σαν ενδοφυτικός μύκητας (Brown et al. 1998) όσο και σαν επίφυτος (Schubert 2005).

Ζώνη 15b

Η ζώνη 15b αποτελεί μια ασθενή ζώνη που ήταν παρούσα σε όλες τις μεταχειρίσεις. Οι κλώνοι που αντιστοιχούν στην ζώνη 15b παρουσίασαν υψηλότερη ομολογία με την αλληλουχία της ITS περιοχής ενός μη καλλιεργήσιμου περιβαλλοντικού κλώνου και ενός μη ταξινομημένου στελέχους της τάξης Pleosporales (100%).

Ζώνη 16

Η ζώνη 16 εμφανίζεται σε όλες τις μεταχειρίσεις. Οι σχετιζόμενη με αυτή κλώνοι παρουσίασαν υψηλότερη ομολογία με την αλληλουχία της ITS περιοχής ενός στελέχους του γένους *Pleosporales sp.* (100%) και με ένα περιβαλλοντικό κλώνο της οικογένειας *Sclerotiniaceae* (99.8%).

Ζώνη 17

Η ζώνη 17 υπάρχει σε όλες τις μεταχειρίσεις. Οι σχετικοί κλώνοι παρουσίασαν υψηλότερη ομολογία με την αλληλουχία της ITS περιοχής ενός στελέχους του γένους *Sporidiobolus sp.* (99.7%). Είδη του γένους *Sporidiobolus* (*Sporidiobolales*) έχουν αναφερθεί ως επίφυτα, όπως το *Sporidiobolus pararoseus* που έχει βρεθεί ως επίφυτο σε νεκταρίνια με παρουσιάζοντας μάλιστα και δράση βιολογικού παράγοντα έναντι του παθογόνου *Monilinia fructicola* (Janisiewicz WJ, 2010).

Ζώνη 18

Η ζώνη 18 αποτελεί μια ασθενή ζώνη που ήταν παρούσα στο μοριακό αποτύπωμα όλων των μεταχειρίσεων και οι αντίστοιχοι κλώνοι παρουσίασαν υψηλότερη ομολογία με την αλληλουχία της ITS περιοχής ενός στελέχους του γένους *Sporidiobolus* (99.6%).

Ζώνη 19

Η ζώνη 19 εμφανίζεται σε όλες τις μεταχειρίσεις αλλά παρουσιάζει χαμηλότερη ένταση στο μοριακό αποτύπωμα των δειγμάτων που δέχτηκαν

εφαρμογή imidachlorpid διαφυλλικά. Οι κλώνοι που παρουσιάζουν ταυτόσημη ηλεκτροφορητική κινητική με τη ζώνη 19 παρουσίασαν υψηλότερη ομολογία στην αλληλουχία της ITS περιοχής με έναν περιβαλλοντικό κλώνο, ένα στέλεχος του είδους *Cryptococcus adeliensis* (99.8%) και ένα στέλεχος του είδους *Cystofilobasidium macerans* (99.6%).

Το είδος *Cystofilobasidium macerans* (syn. *Cryptococcus macerans*, Cystofilobasidiales) έχει αναφερθεί ως ενδοφυτικός μύκητας στο αμπέλι (Schweigkofler & Prillinger, 1999)

ΤΕΛΙΚΑ ΣΥΜΠΕΡΑΣΜΑΤΑ

Η παρούσα εργασία αποτελεί συνέχιση προηγούμενης μεταπτυχιακής εργασίας (Χρήστος Πετσούλας) όπου μελετήθηκε η επίδραση δυο γεωργικών φαρμάκων, του imidachlorpid το οποίο είναι διασυστηματικό εντομοκτόνο και του metalaxyl – M το οποίο είναι διασυστηματικό μυκητοκτόνο στην σύσταση της κοινότητας βακτηρίων και μυκήτων στην φυλλόσφαιρα φυτών πιπεριάς, καθώς και η επιμέρους επίδραση της μεθόδου εφαρμογής, διαφυλλικής ή από εδάφους στην μικροβιακή κοινότητα. Αφού διαπιστώθηκαν στην προηγούμενη εργασία σημαντικές μεταβολές στην σύσταση της μυκητιακής κοινότητας από την εφαρμογή των δύο γεωργικών φαρμάκων, η παρούσα εργασία είχε ως στόχο την ταυτοποίηση των μυκήτων που αποτελούν την κοινότητα των μυκήτων στην φυλλόσφαιρα των φυτών πιπεριάς και ιδιαίτερα την ταυτοποίηση μελών της κοινότητας αυτής που επηρεάστηκαν, θετικά ή αρνητικά, από την εφαρμογή των δύο γεωργικών φαρμάκων. Για τον λόγο αυτό δημιουργήθηκαν βιβλιοθήκες κλώνων για τρεις μεταχειρίσεις που παρουσίασαν μεταβολές στην μυκητιακή κοινότητα τους όπως τα δείγματα που δέχτηκαν διαφυλλική (3A) ή από εδάφους (4A) εφαρμογή imidachlorpid καθώς και δείγματα που δέχθηκαν από εδάφους εφαρμογή metalaxyl-M (6A)

Από τη ταυτοποίηση των μυκήτων και τη διερεύνηση της οικοφυσιολογίας τους φάνηκε ότι συνολικά, στη φυλλόσφαιρα της πιπεριάς ανεξάρτητα από μεταχειρίσεις επικράτησαν κυρίως Ασκομύκητες και σε μικρότερο βαθμό ζύμες που ανήκουν στους Βασιδιομύκητες.

Ειδικότερα οι περιοχές των μοριακών αποτυπωμάτων με υψηλή συγκέντρωση αποδιατακτικών ουσιών (κάτω) περιλαμβάνει αποκλειστικά

ασκομύκητες της Τάξης *Erysiphales* (ζώνες 2, 2b, 3, 4, 5, 10, 11, 12) που περιλαμβάνει σημαντικούς φυτοπαθογόνους μύκητες που προκαλούν την ασθένεια ωίδιο σε διάφορα καλλιεργούμενα φυτά. Το κεντρικό τμήμα των μοριακών αποτυπωμάτων περιλαμβάνει κυρίως Ασκομύκητες από διάφορα γένη και είδη (ζώνες 6, 7, 8, 9). Τέλος οι περιοχές των μοριακών αποτυπωμάτων με χαμηλή συγκέντρωση αποδιατακτικών ουσιών (άνω τμήμα) περιλαμβάνει διάφορους ασκομύκητες (ζώνες 14, 15, 15b, 16) και ζύμες που ανήκουν στους βασιδιομύκητες (ζώνες 13b, 17, 18, 19).

Οι μύκητες που ταυτοποιήθηκαν σε όλες τις μεταχειρίσεις δεν αποτελούν στόχους για το μυκητοκτόνο *metalaxyl – M* που εφαρμόστηκε ενώ το εντομοκτόνο *imidachlorid* θα περίμενε κανείς να μην έχει επίδραση στη κοινότητα των μυκήτων. Παρ' όλα αυτά όπως αναφέρθηκε και στην εισαγωγή, το οικοσύστημα της φυλλόσφαιρας είναι ασταθές και εφήμερο με τις κοινότητες των μικροοργανισμών που το αποικίζουν να επηρεάζονται τόσο από τις μεταξύ τους αλληλεπιδράσεις όσο και από την επίδραση εξωτερικών παραγόντων καιρικές συνθήκες (Jackson et al., 2006) , ακτινοβολία (Kadivar & Stapleton, 2003), ανθρώπινες επεμβάσεις (Green et al., 2006), φυτοπροστατευτικά προϊόντα κ.α.

Γενικότερα παρατηρήθηκε απουσία ωομυκήτων από τη φυλλόσφαιρα. Αυτή η απουσία ωομυκήτων θα μπορούσε να αποδοθεί στα δείγματα που δέχτηκαν εφαρμογή του μυκητοκτόνου *metalaxyl – M* καθώς αυτό παρουσιάζει εκλεκτική δράση κατά των ωομυκήτων. Από την άλλη μεριά, η απουσία ωομυκήτων και από τις υπόλοιπες μεταχειρίσεις (*imidachlorid* και μάρτυρας) οδηγεί στο συμπέρασμα ότι η περιορισμένη παρουσία ωομυκήτων στην φυλλόσφαιρα των φυτών πιπεριάς ήταν γενικότερη και δεν οφείλεται

στην εφαρμογή των φυτοφαρμάκων.

Συνολικά επιλέχθηκαν, διερευνήθηκαν και ταυτοποιήθηκαν 23 ζώνες σε όλα τα δείγματα. Οι 17 από τις 23 ζώνες που αλληλουχήθηκαν (ζώνες 2, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11, 12, 14, 14, 15b, 16, 17, 18, 19) ήταν παρούσες σε όλες τις μεταχειρίσεις και φαίνονται να μην επηρεάζονται από την εφαρμογή των δύο γεωργικών φαρμάκων. Από την άλλη μεριά, οι ζώνες 1, 13, και 13c φαίνεται να ευνοούνται από την διαφυλλική εφαρμογή imidachlorid ενώ η ζώνη 3 φαίνεται να ευνοείται από την από εδάφους εφαρμογή του ίδιου εντομοκτόνου. Ομοίως, η εφαρμογή metalaxyl-M, ανεξαρτήτου του τρόπου εφαρμογής, φαίνεται ότι ευνοεί τις ζώνες 2b, 13b και 14. Είναι πιθανό οι συγκεκριμένοι μύκητες να εμπλέκονται στην αποδόμηση των δύο γεωργικών φαρμάκων. Αυτό πιθανό να ισχύει στην περίπτωση των μυκήτων που αντιπροσωπεύονται από τις ζώνες 1 και 13b που ανήκουν σε ζύμες του γένους *Cryptococcus*. Το συγκεκριμένο γένος περιλαμβάνει στελέχη που έχει βρεθεί ότι έχουν την ικανότητα να διασπούν διάφορες οργανικές ενώσεις και ιδιαίτερα φαινολικές ουσίες ανάμεσα σε αυτές και ρυπαντές (Middelhoven 1993, Fonseca et al., 2000). Εναλλακτικά, η εμφάνιση των συγκεκριμένων μυκήτων στην φυλλόσφαιρα φυτών πιπεριάς πέντε μέρες μετά από την εφαρμογή των δύο γεωργικών φαρμάκων είναι πιθανό να σχετίζεται με έμμεσες επιδράσεις των δύο γεωργικών φαρμάκων στην ευρύτερη μικροβιακή κοινότητα. Υπάρχουν έρευνες που δείχνουν ότι η εφαρμογή εντομοκτόνων σε φυτά επηρεάζει την μικροβιακή κοινότητα της φυλλόσφαιρας τους. Η εφαρμογή του εντομοκτόνου *cypermethrin* σε φυτά πιπεριάς είχε σαν αποτέλεσμα την ποσοτική και ποιοτική μεταβολή της κοινότητας των βακτηρίων της φυλλόσφαιρας των φυτών (Zhang et al., 2008). Η αύξηση της

βιομάζας της κοινότητας των βακτηρίων μετά την εφαρμογή του *cypermethrin* μπορεί να οφείλεται στην αρνητική επίδραση του εντομοκτόνου στην κοινότητα των μυκήτων που μείωσε τον ανταγωνισμό για θρεπτικά συστατικά και ευνόησε τα βακτήρια (Zhang et al., 2008, Digrak & Kazanici, 2001). Επίσης σε φυτά πιπεριάς, η εφαρμογή *Bacillus thuringiensis* ως βιολογικού εντομοκτόνου επέδρασε στη σύσταση της ενδογενούς μικροβιακής κοινότητας της φυλλόσφαιρας των φυτών (Zhang et al., 2008). Η εφαρμογή τόσο των εντομοκτόνων *tebufenozide* και *lufenuron*, όσο και των μυκητοκτόνων *metiram*, *captan* και *nitrothal – isopropyl* σε μηλιές, επηρέασε την ενδογενή μικροβιακή κοινότητα της φυλλόσφαιρας, πιθανώς μεταβάλλοντας τις λεπτές ισορροπίες ανταγωνισμού μεταξύ βακτηρίων, μυκήτων και ζυμών (Walter et al., 2006). Έρευνα έδειξε την άμεση εξάρτηση μεταξύ μυκήτων, επίφυτων - σε είδη του γένους *Hibiscus* και των οικογενειών *Convolvulaceae* και *Cactaceae* - και εντόμων (κυρίως κολεοπτέρων) που τρέφονται από τους μύκητες αυτούς (Lachance et al., 2001).

Από τα παραπάνω συμπεραίνουμε ότι λόγω της πολυπλοκότητας της δομής της μικροβιακής κοινότητας της φυλλόσφαιρας, είναι δυνατό η εφαρμογή γεωργικών φαρμάκων να επηρεάζει την κοινότητα των επίφυτων μυκήτων σε βαθμό και τρόπο που επιβάλλει περαιτέρω διερεύνηση.

BIBΛΙΟΓΡΑΦΙΑ

- Almeida Á.M.R., Binneck E., Piugal F.F., Marin S.R.R., Ribeiro P.R.Z. & Silveiral C.A., (2008) Characterization of powdery mildews strains from soybean, bean, sunflower, and weeds in Brazil using rDNA-ITS sequences, *Trop. plant pathol.* vol.33 no.1

- Bai F.Y., Zhao J.H., Takashima M., Jia J.H., Boekhout T. and Nakase T. Reclassification of the *Sporobolomyces roseus* and *Sporidiobolus pararoseus* complexes, with the description of *Sporobolomyces phaffii* sp. Nov. (2008) *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology*, Vol 52, 2309-2314

- Bending G.D., Rodriguez M.S. & Lincoln S.D. (2007) Fungicide impacts on microbial communities in soils with contrasting management histories. *Chemosphere* 69: 82-88

- Bergauer P., Fonteyne P., Nolard N., Schinner F. & Margesin R. (2005) Biodegradation of phenol and phenol-related compounds by psychrophilic and cold-tolerant alpine yeasts. *Chemosphere* 59: 909–918.

- Brown K.B., Hyde K.D., Guest D.I. (1998). Preliminary studies on endophytic fungal communities of *Musa acuminata* species complex in Hong Kong and Australia. *Fungal Diversity* 1: 27-51.

- Cadez N., Zupan J. & Raspor P. (2010) The effect of fungicides on yeast communities associated with grape berries. *FEMS Yeast Res.* 10: 619-630

- Cook R.T.A, Henricot B. and Kiss L. (2004). First record of *Erysiphe elevata* on *Catalpa bignonioides* in the UK. *Plant Pathology* 53, 807.
- Cook R.T.A, Henricot B., Henrici A. and Beales P. (2006) Morphological and phylogenetic comparisons amongst powdery mildews on *Catalpa* in UK. *Mycological Research* 110, 672-685.
- Cook R.T.A., Henricot B. and Beales P. (2006). First record of *Neoerysiphe galeopsidis* on *Acanthus spinosis* in the UK. *Plant Pathology* 55, 575
- Devare M.H., Jones C.M., Thies J.E. (2004) Effect of Cry3B transgenic corn and tefluthrin on the soil microbial community: Biomass, activity and diversity. *J Environ Qual* 33: 837-843.
- Dungan R.S., Ibekwe A.M., Yates S.R. (2003) Effects of propargyl bromide and 1,3-dichloropropene on microbial communities in an organically amended soil. *FEMS Microb Ecol* 43: 75-87.
- Fernando A. Fernández, Andrew N. Miller, Sabine M. Huhndorf, Molecular systematics of the Sordariales: the order and the family Lasiosphaeriaceae redefined. (2004) *Mycologia* 96: 368-387
- Fell J.W., Roeijmans H. and Boekhout T. (1999) Cystofilobasidiales, a new order of basidiomycetous yeasts. *International Journal of Systematic Bacteriology*, 49, 907–913 Printed in Great Britain
- Fernández M., Prats E., Emeran A. A., and Rubiales D., (2009)

Characterization of Resistance Mechanisms to Powdery Mildew (*Erysiphe betae*) in Beet (*Beta vulgaris*), Genetics and Resistance, Volume 99, Number 4 Pages 385-389

- Fonseca A, Scorzetti G & Fell JW (2000) Diversity in the yeasts *Cryptococcus albidus* and related species as revealed by ribosomal DNA sequence analysis. *Can J Microbiol* 46: 7–27

- Gu L, Bai Z, Jin B, Hu Q, Wang H, Zhuang G, Zhang H (2010) Assessing the impact of fungicide enostroburin application on bacterial community in wheat phyllosphere. *Journal of Environmental Sciences* 22(1): 134-141

- Janisiewicz WJ, Kurtzman CP, Buyer JS. Yeasts associated with nectarines and their potential for biological control of brown rot. *Yeast*. 2010 Jul;27(7):389-98

- Jumponnen A. & Jones K.L. (2009) Massively parallel 454 sequencing indicates hyperdiverse fungal communities in temperate *Quercus macrocarpa* phyllosphere. *New Phytologist* 184:438-448

- Kirk P.M., Cannon P.F., Minter D.W., Stalpers J.A. (2008). *Dictionary of the Fungi*. 10th ed. Wallingford: CABI. p. 22. ISBN 0-85199-826-7.

- Lachance M.A., Starmer W.T., Rosa C.A., Bowles J.M., Barker J.S., Janzen D.H. Biogeography of the yeasts of ephemeral flowers and their insects. *FEMS Yeast Res.* 2001 Apr;1(1):1-8.

- LÂNGARO N.C., REIS E.M. & FLOSS E.L., (2001) Detection of *Drechslera avenae* in oat seeds, *Fitopatol. bras.* vol.26 no.4

- Lindow S.E. & Brandl M.T. (2003) Microbiology of the Phyllosphere. Applied and Environmental Microbiology. Vol 69: 1875-1883
- Lindow S.E. & Leveau J. JH (2002) Phyllosphere microbiology. Current Opinion in Biotechnology 13:238-243
- Liu S.Y, Takamatsu S., Yang L.L., Wang X.M., Lu D. and Luo L. (2005) First Report of *Neoverysiphe galeopsidis* on *Althaea rosea*. New Disease Reports 11, 44.
- Mandyam K., Loughin T., & Jumpponen A. (2010) Isolation and morphological and metabolic characterization of common endophytes in annually burned tallgrass prairie, Mycologia, 102(4), pp. 813-821
- Mehrotra A., Kulshreshtha M., Mehrotra, M. D., Sarbhoy, A. K. (2001) *Pleospora* sp. nov. causing canker in *Dalbergia sissoo*, Journal of Mycopathological Research Vol. 39 No. 2 pp. 107-108
- Middelhoven W.J. (1993) Catabolism of benzene compounds by ascomycetous and basidiomycetous yeasts and yeastlike fungi. A literature review and an experimental approach. Antonie van Leeuwenhoek 63: 125–144.
- Muyzer G., Smalla K. (1998) Application of denaturing gradient gel electrophoresis (DGGE) and temperature gradient gel electrophoresis (TGGE) in microbial ecology. Antonie Leeuwenhoek 73: 127-141
- M. Omirou, C. Rousidou, F. Bekris, K.K. Papadopoulou, C. Ehaliotis, U.

- Menkissoglu-Spiroudi, D.G. Karpouzas. (2011) The impact of biofumigation and chemical fumigation methods on the structure and function of the soil microbial community. *Microbial Ecology* 61: 201-213
- Pérez-García, A.; Romero, D. Fernández-Ortuño, D. (2009). The powdery mildew fungus *Podosphaera fusca* (synonym *Podosphaera xanthii*), a constant threat to cucurbits: Pathogen profile. Blackwell Publishing Ltd.
 - Pastirčakova K., Ivanova H. and Bernadovičova S. (2008): *Neoerysiphe galeopsidis* on *Stachys* species in Slovakia and the Czech Republic based on a re-examination of herbarium collections. – *Czech. Mycol.* 60(2): 251–264.
 - Petrie G.A. and Vanterpool T.C., (1978) *Mycosphaerella tassiana* on *Cruciferae* in western Canada, *Canadian Plant Disease Survey* 58:4
 - Piasai O. & Manoch L., (2006) Some Noteworthy of *Coprophilus* Ascomycetes from Khao Yai National Park and Phu Luang Wildlife Sanctuary, *Journal of Microscopy Society of Thailand* 21(1): 158 – 160
 - Pounder J.I., Simmon K.E., Barton C.A., Hohmann S.L., Brandt M.E. & Petti C.A. (2007) Discovering Potential Pathogens among Fungi Identified as Nonsorulating Molds. *Journal of Clinical Microbiology* 45:568-571
 - Rivas, S. & Thomas C.M., 2005. Molecular interactions between tomato and the leaf mold pathogen: *Cladosporium fulvum*. *Annual Review of Phytopathology* 43: 395-436.

- Russell D., Chard J. & McKinlay R. (1999) Effect of *Bacillus thuringiensis* and a pyrethroid insecticide on the leaf microflora of *Brassica oleracea*. Letters in Applied Microbiology 28 :359 – 362

- Sayadi S. & Ellouz R. (2007) Screening of white-rot fungi for the treatment of olive mill waste-waters. J Chem Technol Biot 57: 141–146.

- Saito A., Ikeda S., Ezura H. & Minamisawa K. (2007) Microbial Community Analysis of the Phytosphere Using Culture - Independent Methodologies. Microbes Environ. 22:93-105

- K. Schubert, J. Z. Groenewald, U. Braun, J. Dijksterhuis, M. Starink, C.F. Hill, P. Zalar, G.S. de Hoog, and P.W. Crous. (2007) Biodiversity in the *Cladosporium herbarum* complex (Davidiellaceae, Capnodiales), with standardisation of methods for *Cladosporium* taxonomy and diagnostics. Stud Mycol.; 58: 105–156.

- Schubert K (2005). Morphotaxonomic revision of foliicolous *Cladosporium* species (hyphomycetes). Ph.D. dissertation. Martin-Luther-University Halle-Wittenberg, Germany.

- SCHWEIGKOFER W. & PRILLINGER H. (1999) Molecular identification and phylogenetic analyses of endophytic and latent pathogenic fungi from grapevine. Mitteilungen Klosterneuburg Rebe und Wein, Obstbau und Früchteverwertung, vol. 49, no3, pp. 65-78 (46 ref.)

- Sjamsuridzal W., Oetari A., Kanti A., Saraswati R., Nakashima C.,

Widyastuti Y., and Katsuhiko A. (2010) Ecological and Taxonomical Perspective of Yeasts in Indonesia. *Microbiology Indonesia* v.4, n.2, p60-68

- Spyrou I.M., Karpouzas D.G., Menkissoglu-Spiroudi, U., (2009). Do botanical pesticides alter the structure of the soil microbial community. *Microbial Ecology* 58(4): 715-727
- Suh S., McHugh J., Pollock D., Blackwell M. (2005) The beetle gut: a hyperdiverse source of novel yeasts. *Mycol. Res.* 109(3): 261 - 265
- Thormann M.N., Rice A.V. & Beilman D.W. (2007) Yeasts in peatlands a review of richness and role in peat decomposition. *Wetlands* 27: 761–773.
- Vega F.E., Posada F., Peterson S.W., Gianfagna T. J. & Chaves F. (2006) *Penicillium* species endophytic in coffee plants and ochratoxin A production. *Mycologia*, 98(1),pp. 31-42.
- Walter M., Frampton C., Wilson K., Virgin P. & Waipara N. (2007) Agrichemical impact on growth and survival of non-target apple phyllosphere microorganisms. *Can. J. Microbiol.* 53: 45-55
- Whipps J.M., Hand P., Pink D. & Bending G.D. (2008) Phyllosphere microbiology with special reference to diversity and plant genotype. *Journal of Applied Microbiology* 105: 1744-1755
- Yang C.H., Crowley D.E., Borneman J. & Keen N.T.(2001) Microbial phyllosphere populations are more complex than previously realized. *PNAS* 98:3889-3894

- Zhang B, Bai Z, Hoefel D, Tang L, Yang Z, Zhuang G, Zhang H. (2009) The impacts of cypermethrin pesticide application on the non-target microbial community of the pepper plant phyllosphere. *The Science of the Total Environment* 407:1915-1922
- Zhang B, Zhang H, Jin B, Tang L, Yang J, Li B, Zhuang G, Bai Z. (2008) Effect of cypermethrin insecticide on the microbial community in cucumber Phyllosphere. *Journal of Environmental Sciences* 20:1356-1362.
- Zhang B., Bai Z., Hoefel D., Tang L., Yang Z., Zhuang G., Yang J. & Zhang H. (2008) Assessing the impact of the biological control agent *Bacillus thuringiensis* on the indigenous microbial community within the pepper plant phyllosphere. *FEMS Microbiol. Lett.*284: 102-108
- ΓΕΩΡΓΙΚΗ ΦΑΡΜΑΚΟΛΟΓΙΑ, Βιοχημεία, Φυσιολογία, Μηχανισμοί Δράσης και Χρήσεις των Φυτοπροστατευτικών Προϊόντων», Β. Ν. Ζιώγας / Α. Ν. Μαρκόγλου, Αθήνα, Απρίλιος 2007
- ΦΥΤΟΠΑΘΟΛΟΓΙΑ.Τζάμος Ε. Κ. Εκδ.: ΣΤΑΜΟΥΛΗ 12/2007