



ΠΑΝΕΠΙΣΤΗΜΙΟ ΘΕΣΣΑΛΙΑΣ
ΣΧΟΛΗ ΕΠΙΣΤΗΜΩΝ ΥΓΕΙΑΣ
ΤΜΗΜΑ ΒΙΟΧΗΜΕΙΑΣ ΚΑΙ ΒΙΟΤΕΧΝΟΛΟΓΙΑΣ

**ΠΡΟΓΡΑΜΜΑ ΜΕΤΑΠΤΥΧΙΑΚΩΝ ΣΠΟΥΔΩΝ
'ΒΙΟΤΕΧΝΟΛΟΓΙΑ-ΠΟΙΟΤΗΤΑ ΔΙΑΤΡΟΦΗΣ ΚΑΙ
ΠΕΡΙΒΑΛΛΟΝΤΟΣ'**

Μεταπτυχιακή Διατριβή

**ΑΞΙΟΛΟΓΗΣΗ ΤΩΝ ΕΠΙΔΡΑΣΕΩΝ
ΦΥΤΟΠΡΟΣΤΑΤΕΥΤΙΚΩΝ ΠΡΟΪΟΝΤΩΝ ΒΟΤΑΝΙΚΗΣ
ΠΡΟΕΛΕΥΣΗΣ ΣΕ ΘΥΣΑΝΩΔΕΙΣ ΜΥΚΟΡΡΙΖΙΚΟΥΣ
ΜΥΚΗΤΕΣ**

ΣΑΜΟΥΡΕΛΗΣ ΚΩΝΣΤΑΝΤΙΝΟΣ

ΛΑΡΙΣΑ 2009



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

Αριθ. Εισ.: 7342/1

Ημερ. Εισ.: 03-08-2009

Δωρεά: Π.Θ.

Ταξιθετικός Κωδικός: Δ

579.5

ΣΑΜ

ΠΑΝΕΠΙΣΤΗΜΙΟ
ΘΕΣΣΑΛΙΑΣ



004000087204

**‘Αξιολόγηση των επιδράσεων φυτοπροστατευτικών προϊόντων βοτανικής
προέλευσης σε θυσανώδεις μυκορριζικούς μύκητες’**

Υπεύθυνος Καθηγητής

Καρπούζας Δημήτριος, Λέκτορας Βιοτεχνολογίας Αποικοδομητικών
Μικροοργανισμών

Τριμελής Επιτροπή

- Καρπούζας Δημήτριος, Λέκτορας Βιοτεχνολογίας Αποικοδομητικών
Μικροοργανισμών
- Παπαδοπούλου Καλλιόπη, Επίκουρος Καθηγήτρια Βιοτεχνολογίας Φυτών
- Μόσιαλος Δημήτριος, Λέκτορας Βιοτεχνολογίας Μικροβίων

Ευχαριστίες

Καταρχήν, θα ήθελα να ευχαριστήσω τον κ. Δ. Καρπούζα, υπό την επίβλεψη του οποίου πραγματοποιήθηκε η παρούσα εργασία, για την επιστημονική καθοδήγηση και τη βοήθειά του καθ' όλη τη διάρκεια των πειραματικών διαδικασιών και της συγγραφής της εργασίας, καθώς και για την ηθική υποστήριξη που μου προσέφερε. Επίσης, ευχαριστώ και τα άλλα δύο μέλη της τριμελούς επιτροπής, κ. Κ. Παπαδοπούλου και κ. Δ. Μόσιαλο, για το χρόνο που μου αφιέρωσαν.

Ιδιαίτερες ευχαριστίες θα ήθελα να αποδώσω στον κ. Ι. Υψηλάντη, Μεταδιδακτορικό Ερευνητή του Τμήματος Βιοχημείας και Βιοτεχνολογίας για την καθοδήγησή του κατά την εκτέλεση του πειράματος και τις πολύτιμες συμβουλές του, τόσο στο χώρο του εργαστηρίου όσο και κατά τη διάρκεια συγγραφής της παρούσας εργασίας. Ευχαριστώ ακόμα τα υπόλοιπα μέλη του εργαστηρίου για την αγαστή συνεργασία σε όλη τη διάρκεια της συνύπαρξής μας.

Τέλος, οφείλω να ευχαριστήσω όλους εκείνους που με στήριξαν με το δικό τους μοναδικό τρόπο σ' αυτή μου την προσπάθεια.

ΠΕΡΙΕΧΟΜΕΝΑ

ΠΕΡΙΛΗΨΗ.....	6
1. ΕΙΣΑΓΩΓΗ.....	8
1.1. Τι είναι οι μυκόρριζες;.....	8
1.2. Χρήσεις μυκορριζών.....	11
1.3. Η πιπεριά.....	13
1.4. Βιολογική γεωργία.....	14
1.5. Φυτοπροστασία στη Βιολογική Γεωργία.....	15
1.6. Επίδραση διαφόρων άλλων φυτοπροστατευτικών ουσιών σε μυκόρριζες.....	18
1.7. Τεχνικές μέτρησης των επιδράσεων των αγροτικών πρακτικών στη μικροβιακή κοινότητα του εδάφους.....	20
1.8. Αλυσιδωτή Αντίδραση Πολυμεράσης (Polymerase Chain Reaction-PCR).....	21
1.9. Αλυσιδωτή Αντίδραση Πολυμεράσης Εσωτερικής Ένθεσης (Nested PCR).....	24
1.10. Μέθοδος Ηλεκτροφόρησης σε Πηκτή με Βαθμίδωση Αποδιατακτικών Ουσιών (Denaturing Gradient Gel Electrophoresis-DGGE).....	25
1.11. Στόχος της εργασίας.....	26
2. ΥΛΙΚΑ ΚΑΙ ΜΕΘΟΔΟΙ.....	27
2.1. Μυκορριζικό εμβόλιο.....	27
2.2. Εγκατάσταση, ανάπτυξη και χειρισμός φυτών πιπεριάς.....	28
2.3. Δειγματοληψίες-Χειρισμός δειγμάτων.....	31
2.4. Χρώση ριζών.....	31
2.5. Μοριακές βιολογικές τεχνικές.....	32
2.5.1. Εξαγωγή DNA από σπόρια ΘΜ μυκήτων.....	32
2.5.2. Εξαγωγή DNA από ρίζες φυτών πιπεριάς.....	34
2.5.3. PCR δειγμάτων DNA από ρίζες φυτών πιπεριάς.....	35
2.5.4. Ηλεκτροφόρηση σε πηκτή με βαθμίδωση αποδιατακτικών ουσιών.....	37
2.6. Στατιστική ανάλυση αποτελεσμάτων.....	42
3. ΑΠΟΤΕΛΕΣΜΑΤΑ.....	43
3.1. Ανάπτυξη των φυτών.....	43
3.2. Χαρακτηρισμός της κοινότητας των ΘΜ μυκήτων στις ρίζες με την χρήση μοριακών μεθόδων.....	52

3.2.1	Αποτελέσματα PCR.....	52
3.2.2	Αποτελέσματα PCR εσωτερικής ένθεσης.....	54
3.2.3	Αποτελέσματα DGGE.....	55
4.	ΣΥΖΗΤΗΣΗ.....	59
5.	ΣΥΜΠΕΡΑΣΜΑΤΑ.....	63
6.	ΠΑΡΑΡΤΗΜΑ.....	64
7.	ΒΙΒΛΙΟΓΡΑΦΙΑ.....	73

ΠΕΡΙΛΗΨΗ

Οι θυσανώδεις μυκορριζικοί (ΘΜ) μύκητες διαδραματίζουν σημαντικό ρόλο στην ανάπτυξη των φυτών, παρέχοντας σ' αυτά μία σειρά από οφέλη μέσω της συμβιωτικής σχέσης που αναπτύσσουν. Κυριότερο από τα οφέλη αυτά είναι η παροχή στα φυτά μη εύκολα αφομοιώσιμων, αλλά απαραίτητων, θρεπτικών στοιχείων του εδάφους, με κυριότερο το φώσφορο. Όμως, η ιδέα της χρήσης των ΘΜ μυκήτων στην καλλιέργεια διαφόρων φυτών συναντά δυσκολίες, μία από τις οποίες είναι η αρνητική επίδραση των διαφόρων χρησιμοποιούμενων χημικών φυτοπροστατευτικών προϊόντων (ΦΠ) στους ΘΜ μύκητες, στα πλαίσια της φυτοπροστασίας των καλλιεργειών.

Η στροφή προς τη βιολογική γεωργία που παρατηρείται ολοένα και πιο έντονα τα τελευταία χρόνια, τόσο σε εθνικό όσο και σε παγκόσμιο επίπεδο, οδηγεί σε περαιτέρω έρευνα στον τομέα της φυτοπροστασίας. Στόχος της παρούσας εργασίας είναι η αξιολόγηση των επιδράσεων των ΦΠ βοτανικής προέλευσης αζαντιραχτίνη, πύρεθρο, spinosad, τερπένια, που χρησιμοποιούνται στην βιολογική γεωργία, καθώς και του συνθετικού ΦΠ carbendazim στη λειτουργία και ποικιλότητα των ΘΜ μυκήτων, χρησιμοποιώντας φυτά πιπεριάς. Για το σκοπό αυτό, σε πείραμα σε φυτοδοχεία εφαρμόστηκαν τα ανωτέρω ΦΠ στο έδαφος και στη συνέχεια προστέθηκε μυκορριζικό εμβόλιο, αποτελούμενο από τέσσερις ΘΜ μύκητες του γένους *Glomus* και φυτεύτηκαν φυτά πιπεριάς. Μετά από 20 και 40 ημέρες μετρήθηκαν το ύψος, το βάρος ξηράς ουσίας βλαστών και ριζών φυτών πιπεριάς και το ποσοστό αποικισμού του μήκους της ρίζας. Ταυτόχρονα, εκτιμήθηκε η επίδραση των ΦΠ στην ποικιλότητα των ΘΜ μυκήτων χρησιμοποιώντας την τεχνική της ηλεκτροφόρησης σε πηκτή με βαθμίδωση αποδιατακτικών ουσιών (DGGE, Denaturing Gradient Gel Electrophoresis).

Βρέθηκε ότι τα τερπένια ευνόησαν αρχικά την ανάπτυξη των φυτών πιπεριάς, ενώ η αρχική αρνητική επίδραση τους στον μυκορριζικό αποικισμό των ριζών περιορίστηκε με την ολοκλήρωση του πειράματος (40 ημέρες). Η εφαρμογή αζαντιραχτίνης δεν προκάλεσε σημαντικές μεταβολές στην ανάπτυξη των φυτών, σε αντίθεση με το ποσοστό αποικισμού των ριζών των φυτών πιπεριάς που παρουσίασε τις υψηλότερες τιμές από όλες τις μεταχειρίσεις κατά τη δεύτερη δειγματοληψία. Η εφαρμογή spinosad οδήγησε σε προσωρινή αύξηση της φυτικής ανάπτυξης, αλλά αντίθετα μείωσε το ποσοστό μυκορριζικού αποικισμού. Το πύρεθρο περιόρισε την

ανάπτυξη του υπέργειου τμήματος των φυτών και διευκόλυνε την ανάπτυξη του ριζικού τους συστήματος, ενώ η εφαρμογή του οδήγησε σε σημαντική μείωση του αποικισμού στο ριζικό σύστημα των φυτών. Τέλος, το carbendazim οδήγησε σε πλήρη ανασχεση του μυκορριζικού αποικισμού των ριζών, χωρίς αυτό όμως να συνεπάγεται και μείωση στην ανάπτυξη του φυτού.

Από την ανάλυση DGGE παρουσιάζεται η σύσταση της κοινότητας των ΘΜ μυκήτων, τόσο στους δύο χρόνους δειγματοληψίας, όσο και μεταξύ των μεταχειρίσεων που εφαρμόστηκαν. Έτσι, στις 20 ημέρες από τη μεταφύτευση των φυτών πιπεριάς παρατηρήθηκε μόνο ένας ΘΜ μύκητας (*Glomus mosseae*) από το χρησιμοποιούμενο εμβόλιο να έχει αποικίσει τις ρίζες των φυτών, στο σύνολο των μεταχειρίσεων, ενώ 40 ημέρες μετά τη μεταφύτευση οι ρίζες αποικίστηκαν και από δεύτερο ΘΜ μύκητα (*Glomus etunicatum*). Όμως, στα φυτά που δέχτηκαν εφαρμογή αζαντιραχτίνης και δευτερευόντως τερπενίων η ζώνη που αντιστοιχεί στον μύκητα *G. etunicatum* ήταν εμφανώς ασθενέστερη σε ένταση σε σχέση με την ένταση της ίδιας ζώνης στις υπόλοιπες μεταχειρίσεις. Αντίθετα, το spinosad και το πύρεθρο δε φαίνεται να προκαλούν μεταβολές στην σύσταση της κοινότητας των ΘΜ μυκήτων που αποικίζουν τις ρίζες των φυτών παρά το ότι οδήγησαν σε μείωση του συνολικού μυκορριζικού αποικισμού όπως αναφέρθηκε παραπάνω. Τέλος, οι υπόλοιποι δύο ΘΜ μύκητες (*G. intraradices* και *Glomus* sp.) που περιέχονταν στο αρχικό εμβόλιο δεν κατάφεραν να αποικίσουν τις ρίζες στο χρονικό διάστημα που διήρκησε το πείραμα. Συμπερασματικά, η εφαρμογή των βοτανικών ΦΠ προκάλεσε μεταβολές τόσο στον αποικισμό όσο και στην σύσταση της κοινότητας των ΘΜ μυκήτων στις ρίζες, που δεν φαίνεται όμως να συσχετίζονται με μεταβολές στην φυτική ανάπτυξη.

1. ΕΙΣΑΓΩΓΗ

1.1. Τι είναι οι μυκόρριζες;

Ο όρος μυκόρριζα αναφέρεται στη συμβίωση φυτού και μύκητα και χρησιμοποιήθηκε πρώτη φορά το 1885 από τον Frank, στον οποίο ο βασιλιάς της Πρωσίας είχε αναθέσει τη μελέτη της πιθανής αύξησης της παραγωγής τρούφας. Ο στόχος δεν επιτεύχθηκε ποτέ, αλλά ο Frank περιέγραψε τις δομές που αναπτύσσονταν στις ρίζες των δένδρων, ενώ ήταν ο πρώτος που διέκρινε τις μυκόρριζες σε εκτοτροφικές ή εκτομυκόρριζες και ενδοτροφικές ή ενδομυκόρριζες (Cripps, 2001).

Από την ανάπτυξη συμβιωτικών σχέσεων προκύπτουν αμοιβαία οφέλη και για τα δύο μέρη: από την μία μεριά τα φυτά παρέχουν ποσότητες φωτοσυνθετικά παραγόμενου άνθρακα στους μύκητες και οι μύκητες παρέχουν στα φυτά διάφορα προϊόντα που προέρχονται από την πρόσληψη θρεπτικών στοιχείων του εδάφους και τα οποία επιδρούν θετικά στην αύξηση και ανάπτυξη των φυτών. Έτσι, οι μυκορριζικοί μύκητες παίζουν σημαντικό ρόλο στην αυξημένη λήψη από τα φυτά θρεπτικών στοιχείων του εδάφους όπως είναι ο φώσφορος και άλλα λιγότερο άμεσα διαθέσιμα στοιχεία. Υπολογίζεται ότι οι μυκορριζικοί μύκητες καλύπτουν μέχρι και το 80% των απαιτήσεων των φυτών σε φώσφορο (Marschner & Dell, 1994).

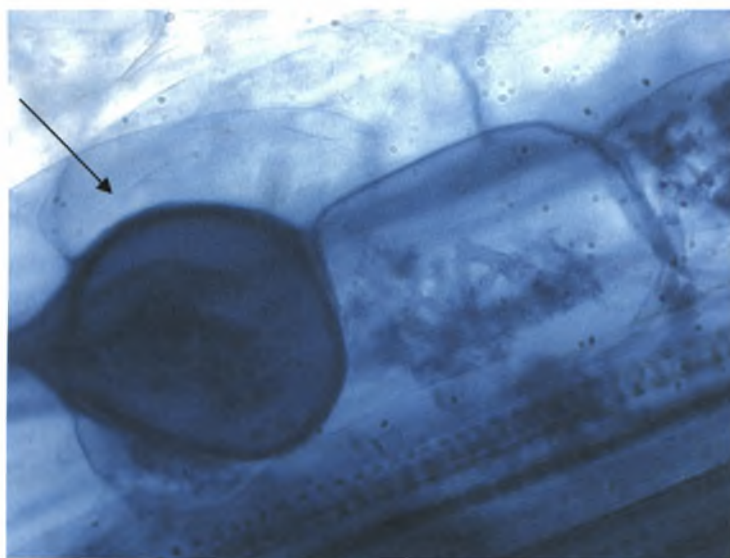
Εκτός της ανωτέρω θετικής επίδρασης των μυκορριζών στα φυτά, η ανάπτυξη τέτοιων συμβιωτικών σχέσεων τα ωφελεί ποικιλοτρόπως, προστατεύοντας τα από πιθανές αρνητικές επιδράσεις εξαιτίας της έλλειψης θρεπτικών στοιχείων και νερού (Davies et al, 2002), της υψηλής οξύτητας και της παρουσίας βαρέων μετάλλων στο έδαφος, καθώς και της ανάπτυξης διαφόρων παθογόνων (Ryan & Graham, 2002). Επιπλέον, οι μυκόρριζες βελτιώνουν τη δομή του εδάφους και το πορώδες του, δημιουργώντας έτσι ευνοϊκές συνθήκες για την ανάπτυξη του ριζικού συστήματος των φυτών (Smith & Read, 1997).

Πέρα όμως από τα οφέλη που αναπτύσσονται από τη συμβίωση των φυτών με τους μυκορριζικούς μύκητες, υπάρχουν και κάποιες περιπτώσεις που η σχέση αυτή μπορεί να εξελιχθεί σε παρασιτική για τον ξενιστή, όταν το κόστος της συμβίωσης ξεπερνά τα οφέλη. Σε μια τέτοια περίπτωση οι οργανισμοί που συμβιώνουν δεν δημιουργούν μία σχέση αμοιβαίων κερδών (Johnson et al, 1997).

Μία από τις κατηγορίες μυκορριζών είναι οι θυσανώδεις μυκορριζικοί (TM) μύκητες, οι οποίες είναι ενδομυκόρριζες και αποτελούν τον πιο κοινό τύπο αφού συναντιόνται σε πάνω από το 70% των φυτών (Wang & Qiu, 2006). Υπολογίζεται ότι περίπου 250.000 είδη φυτών, συμπεριλαμβανομένων πολλών καλλιεργούμενων

ειδών, είναι σε θέση να αναπτύξουν συμβιωτικές σχέσεις αυτής της μορφής, με μύκητες που ανήκουν στο φύλο Glomeromycota. Τα φυτά-ξενιστές μπορούν να είναι αγγειόσπερμα, γυμνόσπερμα και πτεριδόφυτα. Από την άλλη, περίπου 160 μυκητιακά είδη του φύλου Glomeromycota έχουν περιγραφεί βάσει της μορφολογίας των σπορίων τους, αν και πρόσφατες μελέτες με την χρήση μοριακών μεθόδων ταυτοποίησης αποδεικνύουν ότι ο πραγματικός αριθμός ειδών ΘΜ μυκήτων μπορεί να είναι κατά πολύ υψηλότερος.

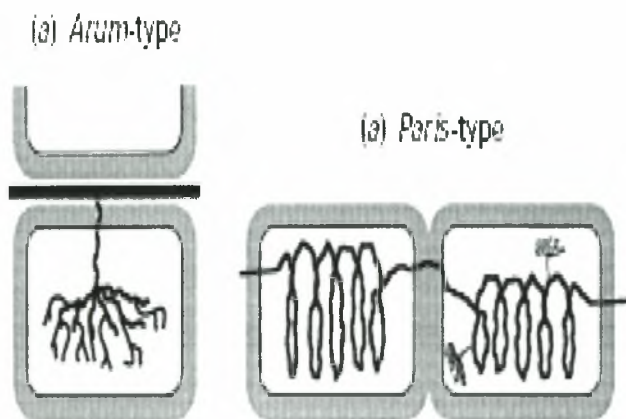
Κατά τη διάρκεια σχηματισμού της συμβίωσης ο μύκητας δημιουργεί στις ρίζες διάφορες δομές, όπως θυσάνους, κύστες ή σπείρες, που συνδέονται με το κυτόπλασμα των φυτών-ξενιστών (Εικ. 1). Αυτές οι μυκητιακές δομές παρέχουν μια αυξανόμενη περιοχή επιφάνειας για τις μεταβολικές ανταλλαγές μεταξύ των φυτών και του μύκητα (INVAM). Στις κύστες αποθηκεύονται οι υδατάνθρακες που μεταφέρονται από τα φυτά, ενώ ο φώσφορος από το έδαφος μεταφέρεται μέσω του μυκηλίου στα κύτταρα της ρίζας (Smith & Read, 1997).



Εικ. 1 Κύστη μυκορριζικού μύκητα.

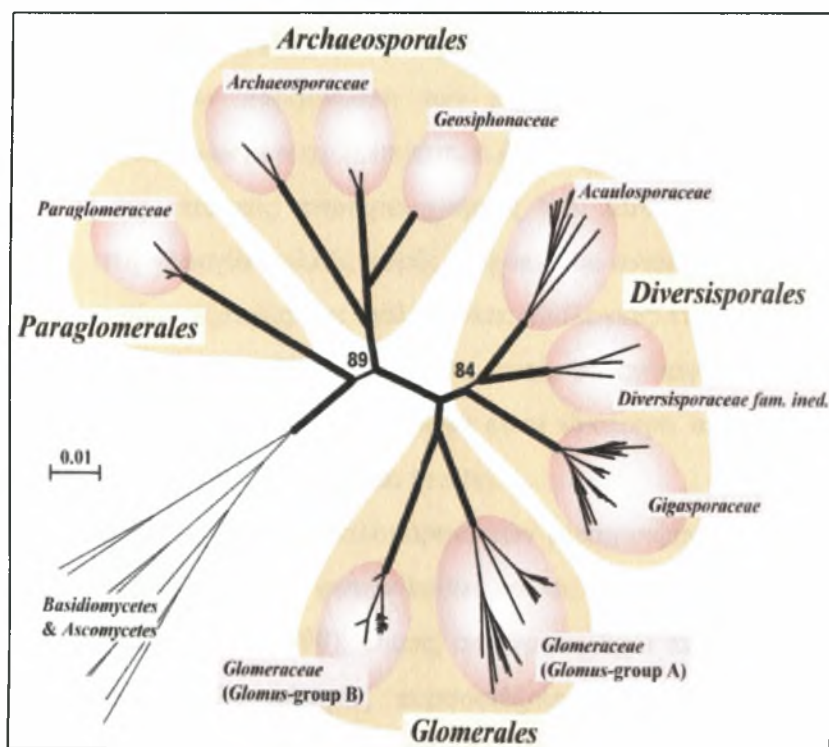
Οι υφές είναι χαρακτηριστικές, χωριζόμενες πολύ αραιά με διαφράγματα. Η αναπαραγωγή είναι αγενής, από τα χλαμυδόσπορα ή γλομεροσπόρια και συνδέεται άμεσα με τις υφές. Τέλος, οι ΘΜ μύκητες διακρίνονται σε τύπου Arum, που έχουν μία φάση μεσοκυττάριας ανάπτυξης των υφών τους στο φλοιό της ρίζας και οι θύσανοι σχηματίζονται στους ενδοκυττάριους βραχίονες των υφών και σε τύπου

Paris, όπου απουσιάζει η μεσοκυττάρια φάση και σχηματίζονται εκτενείς ενδοκυττάρια σπειροειδής υφές (Εικ. 2).



Εικ. 2 Θυσανώδεις μυκόρριζες τύπου Arum και Paris.

Ταξινομικά, όπως αναφέρθηκε και παραπάνω, οι ΘΜ μύκητες ανήκουν στο φύλο Glomeromycota, το οποίο φυλογενετικά έχει διευκρινιστεί πρόσφατα όπως περιγράφεται στην παρακάτω εικόνα (Schussler et al, 2001) (Εικ. 3):



Εικ. 3 Πρόσφατη φυλογενετική ταξινόμηση των ΘΜ μυκήτων όπως παρουσιάζεται από τους Schussler et al (2001).

1.2. Χρήσεις μυκορριζών

Οι ευεργετικές ιδιότητες των μυκορριζών οδήγησαν στην εφαρμογή τους κυρίως στη γεωργία, αλλά και στη δασονομία, στη δενδροκηποκομία, στην αποκατάσταση εδαφών και στο βιοέλεγχο. Σύμφωνα με πρόσφατους υπολογισμούς, οι μυκορριζες αποτελούν το 5-50% της βιομάζας των εδαφικών μικροοργανισμών (Ryan & Graham, 2002). Στο υπόλοιπο 10% ανήκουν μη μυκορριζικά είδη φυτών των οικογενειών Caryophyllaceae, Cruciferae, Chenopodiaceae, Polygonaceae, Portulacaceae, Urticaceae και πολλά είδη Juncaceae και Cyperaceae.

Μια από τις αποτελεσματικότερες εφαρμογές των ΘΜ μυκήτων και των εκτομυκορριζών, είναι η χρήση τους στην αποκατάσταση εδαφών. Εμβολιασμένα φυτώρια και αγροτεμάχια, με ρίζες και έδαφος που περιείχε μυκορριζικό εμβόλιο, μεταφέρθηκαν με επιτυχία σε διαταραγμένες και υποβαθμισμένες περιοχές και οδήγησαν στην ταχεία σταθεροποίηση της δομής του εδάφους και στην γρήγορη επαναβλάστηση αυτών, ενώ βελτίωσαν και την υδατική κατάσταση της υποβαθμισμένης περιοχής (Miller & Jastrow, 1992).

Η χρήση των μυκορριζικών μυκήτων για βιοέλεγχο των φυτοπαθογόνων είναι σχετικά νέα τεχνική. Υπάρχουν στοιχεία που δείχνουν ότι οι μυκορριζες είναι αποτελεσματικές εναντίον εδαφογενών φυτικών εχθρών, όπως νηματώδεις (Hussey & Roncadori, 1982; Ingham, 1988) και μύκητες. Το είδος *Paxillus involutus* παρέχει προστασία ενάντια στην αποσύνθεση των ριζών στο κόκκινο πεύκο από το εδαφογενές παθογόνο *Fusarium sp.* (Linderman & Pflieger, 1994).

Παρ' όλες τις επιτυχίες ανωτέρω χρήσεις των μυκορριζών στην πράξη, η εφαρμογή τους στη γεωργία πολλές φορές οδήγησε σε ανεπιτυχή ή αντικρουόμενα αποτελέσματα, κυρίως εξαιτίας της πολύπλοκης βιολογίας της συμβίωσης φυτών-μυκήτων (Jeffries & Dodd, 1991). Παρ' όλα αυτά, το ενδιαφέρον για μελέτη της φυσιολογίας και οικολογίας των μυκορριζών είναι ιδιαίτερα αυξημένο και πολλές έρευνες εξελίσσονται *in vivo*, *in vitro* και *in situ*.

Υπάρχουν ενδείξεις ότι η ποικιλομορφία των μυκορριζών μπορεί να οδηγήσει σε αυξημένη βιοποικιλότητα των φυτών καθώς και σε αύξηση της παραγωγικότητας τους (van der Heijden et al., 1998). Όμως, σε αγροτεμάχια που καλλιεργούνται με συμβατικό τρόπο οι ΘΜ μύκητες παρουσιάζουν μειωμένη ποικιλότητα και αποτελεσματικότητα καθώς τα υψηλά επίπεδα φωσφόρου στο έδαφος, τα οποία συνήθως προέρχονται από τη χρήση διαλυτών φωσφορικών λιπασμάτων, καθώς και οι συχνές εφαρμογές συνθετικών φυτοπροστατευτικών προϊόντων (ΦΠ), περιορίζουν

την ανάπτυξη τέτοιων συμβιωτικών σχέσεων. Επομένως, σε εντατικά γεωργικά συστήματα όπου υπάρχει υψηλό απόθεμα λιπασμάτων και ΦΠ εξαλείφονται τα όποια πιθανά οφέλη των ΘΜ μυκήτων στα φυτά (Ryan & Graham, 2002). Η παραπάνω ανάσχεση των ΘΜ μυκήτων δεν έχει παρατηρηθεί σε αγροτεμάχια βιολογικής γεωργίας όπου δεν επιτρέπεται η χρήση συνθετικών ΦΠ καθώς και σε αυτά που ακολουθούνται οι αρχές της ολοκληρωμένης διαχείρισης όπου οι εισροές συνθετικών λιπασμάτων και ΦΠ είναι μειωμένες.

Άλλες πρακτικές όπως η υπερκατεργασία του εδάφους καθώς η συμπίεσή του από την χρήση βαρέων μετάλλων σε ιδιαίτερα υγρά εδάφη έχει βρεθεί ότι οδηγούν σε μείωση των ΘΜ μυκήτων (Gosling et al., 2006). Επιπλέον, η συσσώρευση αζώτου στο έδαφος, μέσω της χρήσης συνθετικών λιπασμάτων, καταστέλλει τη μυκορριζική δραστηριότητα (INVAM). Συνεπώς, παράγοντες όπως η γονιμότητα του εδάφους, το φως, η θερμοκρασία, το pH, η υγρασία και ο αερισμός επηρεάζουν σημαντικά τη μυκορριζική δραστηριότητα, με όλες τις συνακόλουθες επιπτώσεις στην ανάπτυξη των φυτών.

Η έρευνα σχετικά με τη χρήση των ΘΜ στη γεωργία είναι συνεχώς αυξανόμενη τα τελευταία χρόνια, με κατεύθυνση κυρίως προς τις θερμοκηπιακές καλλιέργειες και συστήματα γεωργίας μειωμένων εισροών, όπως η ολοκληρωμένη και η βιολογική γεωργία. Πρόσφατα δεδομένα δείχνουν ότι σε αυτά τα συστήματα καλλιέργειας υπάρχει υψηλότερος πληθυσμός (Galvan et al., 2009) και ποικιλομορφία ΘΜ μυκήτων (Oehl et al., 2004; Gosling et al., 2006).

Εδάφη μειωμένων εισροών χαρακτηρίζονται γενικά φτωχά σε θρεπτικά στοιχεία, υποβαθμισμένης ποιότητας και μειωμένης παραγωγικότητας. Ο ρόλος των ΘΜ μυκήτων σε αυτά τα εδάφη είναι ιδιαίτερα σημαντικός, αφού μπορούν να οδηγήσουν στην αποκατάστασή τους. Από την άλλη, η χρήση συνθετικών ΦΠ μπορεί να προκαλέσουν μεταβολές στους πληθυσμούς των μυκήτων στο έδαφος, καταστολή της αύξησης και της δραστηριότητας των μικροοργανισμών και μεταβολές στη δομή της μικροβιακής κοινότητας. Αυτές οι αλλαγές μπορούν τελικά να συμβάλουν στη μείωση της ποικιλομορφίας και σε ορισμένες περιπτώσεις σε αναστολή βασικών λειτουργιών του εδαφικού οικοσυστήματος (Girvan et al., 2004).

Ένα από τα κύρια καλλιεργούμενα με βιολογικό τρόπο είδη στην Ελλάδα είναι η πιπεριά, η οποία σχηματίζει συμβιωτικές σχέσεις μόνο με ΘΜ μύκητες (Wang & Qiu, 2006). Η χρήση ΘΜ πιθανόν να μπορεί να βρει πρόσφορο έδαφος στην καλλιέργεια της πιπεριάς λόγω της υψηλής προσόδου της συγκεκριμένης

καλλιέργειας, δεδομένου του υψηλού κόστους που απαιτείται για την παραγωγή μυκορριζικού εμβολίου. Επίσης, η μη εύρεση αποτελεσματικών στελεχών μυκήτων καθώς και η μη γνώση του συνδυασμού συγκεκριμένων μυκήτων με συγκεκριμένα φυτά-ξενιστές αποτέλεσε αποτρεπτικό παράγοντα για την χρήση των ΘΜ μυκήτων στη γεωργία ως τώρα.

1.3. Η πιπεριά

Η πιπεριά ανήκει στο γένος *Capsicum sp.* της οικογένειας Solanaceae. Στην Ελλάδα καλλιεργείται σ' όλη την επικράτεια, αλλά οι κύριες περιοχές καλλιέργειας της είναι η Κρήτη, η Ημαθία, η Ηλεία, η Ξάνθη, τα Τρίκαλα και η Θεσσαλονίκη. Η καλλιέργειά της είναι κυρίως θερμοκηπιακή, ενώ σημαντικές είναι και οι υπαίθριες εκτάσεις. Οι κύριες καλλιεργούμενες ποικιλίες ή υβρίδια ανήκουν στο είδος *Capsicum annuum* και είναι: Cleopatra No 4 F1, Cleopatra No 1 F1, Lamuyo F1, Π 13 (Κέρατο), Π 14 (Μακεδονίας), Φλωρίνης, California Wonder, Yolo Wonder, Gedeon F1, Maor και άλλες.

Το φυτό καλλιεργείται για τους καρπούς του, οι οποίοι χρησιμοποιούνται στην καθημερινή διατροφή του ανθρώπου. Έτσι, οι απαιτήσεις του σε θρεπτικά στοιχεία είναι μεγάλες και καλύπτονται κυρίως με επιφανειακές λιπάνσεις. Μελέτες έδειξαν ότι φυτά πιπεριάς εμβολιασμένα με ΘΜ μύκητες έδωσαν καρπούς μεγαλύτερου βάρους απ' ότι τα μη εμβολιασμένα (Olsen et al, 1999), ενώ και παράμετροι όπως η ξηρά ουσία, οι συγκεντρώσεις χλωροφύλλης α και β και τα σάκχαρά τους παρουσίαζαν υψηλότερες τιμές στα εμβολιασμένα φυτά (Demir, 2004).

Ο έλεγχος των εχθρών και ασθενειών των φυτών στην συμβατική γεωργία βασίζεται ακόμη στη χρήση συνθετικών ΦΠ, αν και αυξάνεται ολοένα και περισσότερο τα τελευταία χρόνια η υιοθέτηση βιολογικών φυτοπροστατευτικών μεθόδων. Τέτοια μέτρα είναι η χρήση ανθεκτικών ποικιλιών και υβριδίων, η εξασφάλιση και ενίσχυση της γονιμότητας του εδάφους και της βιοποικιλότητας, η χρήση παγίδων, η προσέλκυση και διατήρηση των φυσικών αρπακτικών, η ήλιο- ή βιο-απολύμανση του εδάφους και η χρήση βιολογικών σκευασμάτων. Η χρήση των ΘΜ μυκήτων στη φυτοπροστασία της πιπεριάς έχει δώσει ενθαρρυντικά αποτελέσματα. Έτσι, όταν το είδος *Glomus etunicatum* εμβολιάστηκε σε φυτά πιπεριάς αντιμετώπισε ικανοποιητικά το μύκητα *Phytophthora infestans*, αφού τα εμβολιασμένα φυτά παρουσίαζαν μεγαλύτερο ύψος, φύλλωμα, ανθοφορία και καρποφορία σε σχέση με τα μη εμβολιασμένα φυτά (Salami, 2002).

1.4. Βιολογική γεωργία

Η βιολογική γεωργία μαζί με τη συμβατική (όπου γίνεται ανεξέλεγκτη χρήση συνθετικών ΦΠ), την ολοκληρωμένη (όπου η χρήση συνθετικών ΦΠ είναι η έσχατη λύση φυτοπροστασίας μετά την υιοθέτηση άλλων μέτρων ενώ η εφαρμογή τους γίνεται κατόπιν εντολής επιβλέποντα γεωπόνου) και τη βιοδυναμική γεωργία (όπου λαμβάνονται υπόψιν πέραν των φυσικών παραγόντων και αφανείς δυνάμεις της φύσης που παίζουν σημαντικό ρόλο στις λειτουργίες της ζωής, την υγεία και ευρωστία των φυτών) αποτελούν τους τέσσερις δυνατούς τρόπους γεωργικής παραγωγής. Τι εννοούμε όμως με τον όρο βιολογική παραγωγή;

Σύμφωνα με τον κανονισμό 834/2007 (ΕΚ), ο οποίος αντικατέστησε από τις 1/1/2009 τον κανονισμό 2092/91 (ΕΟΚ), περί του βιολογικού τρόπου παραγωγής, με τον όρο βιολογική παραγωγή εννοούμε ένα συνολικό σύστημα διαχείρισης των γεωργικών εκμεταλλεύσεων και παραγωγής τροφίμων, το οποίο συνδυάζει βέλτιστες περιβαλλοντικές πρακτικές, υψηλό βαθμό βιοποικιλότητας, διατήρηση των φυσικών πόρων και παραγωγή που ανταποκρίνεται στην προτίμηση ορισμένων καταναλωτών σε προϊόντα που παράγονται με φυσικές ουσίες και διεργασίες. Ως εκ τούτου, οι βιολογικές μέθοδοι παραγωγής επιτελούν διττό κοινωνικό ρόλο, αφενός τροφοδοτώντας μια ειδική αγορά που καλύπτει την καταναλωτική ζήτηση βιολογικών προϊόντων και αφετέρου, προσφέροντας δημόσια αγαθά που συμβάλλουν στην προστασία του περιβάλλοντος καθώς και στην αγροτική ανάπτυξη.

Η βιολογική γεωργία θα πρέπει να στηρίζεται πρωτίστως σε ανανεώσιμους πόρους εντός οργανωμένων σε τοπική κλίμακα γεωργικών συστημάτων. Για να ελαχιστοποιηθεί η χρήση μη ανανεώσιμων πόρων, τα κατάλοιπα και τα υποπροϊόντα φυτικής και ζωικής προέλευσης θα πρέπει να ανακυκλώνονται με στόχο την επαναφορά θρεπτικών στοιχείων στο έδαφος. Η βιολογική φυτική παραγωγή θα πρέπει να συμβάλλει στη διατήρηση και την ενίσχυση της γονιμότητας των εδαφών, καθώς και στην πρόληψη της διάβρωσής τους. Τα φυτά θα πρέπει να τρέφονται κατά προτίμηση μέσω του εδαφικού οικοσυστήματος και όχι με την προσθήκη διαλυτών συνθετικών λιπασμάτων στο έδαφος (Κανονισμός ΕΚ 834/2007).

Τα μερίδιο της βιολογικής γεωργίας αυξάνεται ολοένα και περισσότερο, τόσο παγκοσμίως όσο και σε πανελλαδικό επίπεδο όπου το ποσοστό της ανέρχεται στο 3,1% και φτάνει στο 7% συμπεριλαμβανομένων και των βοσκοτόπων. Η συνεχής ανοδική της πορεία, μεταξύ άλλων, αποδίδεται στα διάφορα διατροφικά σκάνδαλα

που έχουν ξεσπάσει τα τελευταία χρόνια, στην άνοδο του βιοτικού επιπέδου των ανθρώπων και στην αυξημένη πια ευαισθητοποίησή τους σε θέματα περιβάλλοντος.

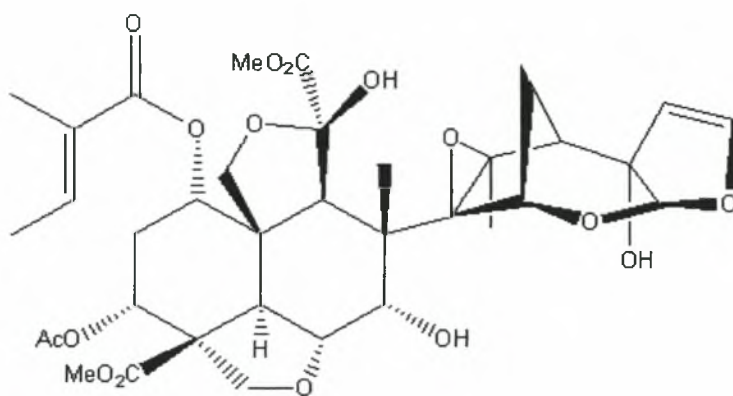
Το αυξημένο τα τελευταία χρόνια ενδιαφέρον για τη βιολογική γεωργία, οδηγεί στη μελέτη της πιθανής άμεσης χρήσης των ΘΜ μυκήτων σ' αυτό το σύστημα παραγωγής, ως φυσικοί παράγοντες προώθησης και ενίσχυσης της φυτικής ανάπτυξης και παραγωγής. Κύριος αποτρεπτικός παράγοντας στην πιθανή ακόμα μεγαλύτερη αύξηση του ποσοστού των καλλιεργούμενων βιολογικώς εκτάσεων είναι το αυξημένο κόστος παραγωγής που κατά μεγάλο ποσοστό αναφέρεται στην φυτοπροστασία.

1.5. Φυτοπροστασία στη Βιολογική Γεωργία

Τα βασικά στοιχεία του βιολογικού συστήματος διαχείρισης της φυτικής παραγωγής είναι η διαχείριση της γονιμότητας του εδάφους, η επιλογή ειδών και ποικιλιών, η πολυετής αμειψισπορά, η ανακύκλωση οργανικών υλών και οι καλλιεργητικές τεχνικές. Πρόσθετα λιπάσματα, βελτιωτικά εδάφους και ΦΠ θα πρέπει να χρησιμοποιούνται μόνον εάν συνάδουν με τους στόχους και τις αρχές της βιολογικής παραγωγής. Τέτοια σκευάσματα είναι μόνο τα φυσικώς παραγόμενα, ενώ οποιοδήποτε χημικό πρόσθετο απαγορεύεται για χρήση στη βιολογική γεωργία (Κανονισμός ΕΚ 834/2007). Εξαιρέση αποτελεί η περίπτωση κατά την οποία υπάρχει άμεσος κίνδυνος καταστροφής της καλλιέργειας και μόνο εφόσον η ανάγκη χρήσης χημικών σκευασμάτων αναγνωρίζεται από επίσημο οργανισμό ή αρχή ελέγχου.

Πέρα όμως από την υιοθέτηση των ανωτέρω καλλιεργητικών μέτρων αντιμετώπισης των κινδύνων των καλλιεργειών, προκειμένου να επιτευχθεί μείωση του κόστους παραγωγής βιολογικών προϊόντων, συχνή είναι η χρήση διαφόρων φυσικών ΦΠ. Από τα διάφορα χρησιμοποιούμενα ΦΠ, κύρια είναι αυτά που βασίζονται στην αζαντιραχτίνη και στο πύρεθρο, ενώ πρόσφατα δόθηκε έγκριση χρήσης στη βιολογική γεωργία ΦΠ που βασίζονται στην δραστική ουσία spinosad.

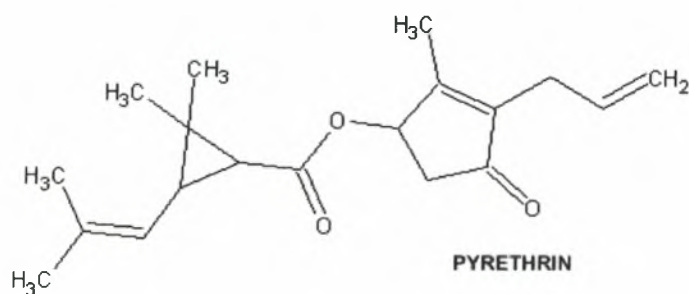
Η αζαντιραχτίνη (azadirachtin) είναι εντομοκτόνο βοτανικής προέλευσης, επαφής και στομάχου με διασυστηματική δράση. Η δραστική του ουσία, η οποία έχει μοριακό βάρος 721 και σημείο τήξεως 165 °C, προέρχεται από εκχύλιση από τους σπόρους του τροπικού φυτού *Azadirachta indica* (Neem) (Schmutterer, 1990; Isman, 2006). Η χημική της δομή παρουσιάζεται στην παρακάτω εικόνα (Εικ.4):



Εικ. 4 Χημική δομή αζαντιραχτίνης.

Η αζαντιραχτίνη, η οποία εφαρμόζεται τόσο στο έδαφος όσο και στο φύλλωμα των φυτών, χρησιμοποιείται για την καταπολέμηση αφίδων, θριπών, λιριόμυζας, αγρότιδων και άλλων εντόμων μέχρι και τρεις ημέρες πριν από τη συγκομιδή της πιπεριάς. Δρα με επαφή και με κατάποση ως ρυθμιστής ανάπτυξης, παρεμβαίνοντας στην εξέλιξη των εντόμων στα ατελή στάδια. Παράλληλα, παρεμποδίζει την σύνθεση εκδυσόνης, της ορμόνης που ελέγχει την έκδυση. Επίσης, προκαλεί αναστολή διατροφής του εντόμου και παρουσιάζει απωθητικές ιδιότητες. Η αζαντιραχτίνη έχει αποδειχθεί ότι προκαλεί χαμηλή βραχυπρόθεσμη τοξικότητα σε ΘΜ μύκητες (Wan & Rae, 1998).

Το πύρεθρο είναι φυσικό συστατικό που απομονώνεται με εκχύλιση από το φυτό *Tanacetum cinerariaefolium* (Trevisan) Schultz-Bip (Copping & Duke, 2007). Η χημική δομή του παρουσιάζεται στην παρακάτω εικόνα (Εικ. 5):

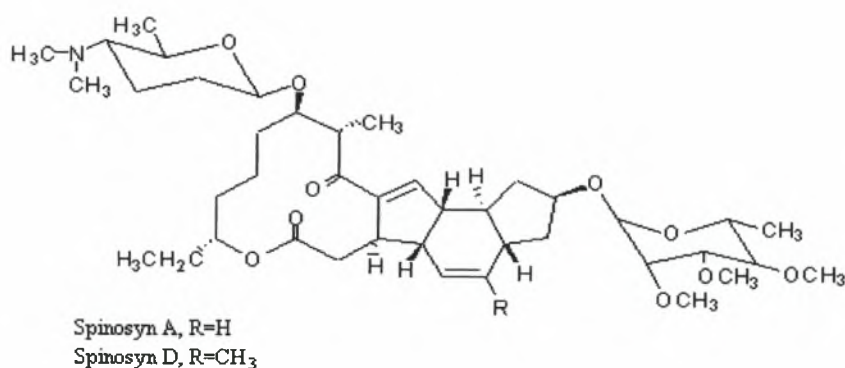


Εικ. 5 Χημική δομή πύρεθρου.

Το πύρεθρο χρησιμοποιείται ως εντομοκτόνο επαφής εναντίον αφίδων και του αλευρώδη, μέχρι και δύο ημέρες πριν τη συγκομιδή. Εφαρμόζεται με ψεκασμούς

καλύψεως του φυλλώματος και δρα στο νευρικό σύστημα των εντόμων, προκαλώντας αναστολή της λειτουργίας του νευρικού συστήματος των εντόμων και στη συνέχεια το θάνατό τους, φαινόμενο γνωστό ως knock down. Τα πυρεθροειδή εντομοκτόνα δρουν λίγο μετά την εφαρμογή τους, σε αντίθεση με την αργή δράση άλλων ανάλογων ομάδων (Wickham et al, 1974).

Το spinosad είναι προϊόν του δευτερογενούς μεταβολισμού του ακτινομύκητα εδάφους *Saccharopolyspora spinosa* και είναι η πρώτη δραστική ουσία που προτάθηκε για μια καινούρια κατηγορία εντομοκτόνων, τα Naturalites (Νατουραλίτες) (Copping & Duke, 2007). Είναι διασυστηματικό εντομοκτόνο επαφής και στομάχου με προληπτική και θεραπευτική δράση και χρησιμοποιείται εναντίον της λιριόμυζας και του θρίπα της Καλιφόρνιας μέχρι και τρεις ημέρες πριν τη συγκομιδή καρπών πιπεριάς. Σε άλλες καλλιέργειες χρησιμοποιείται εναντίον εντόμων των τάξεων Lepidoptera, Diptera, Thysanoptera και κάποια Coleoptera και δευτερευόντως για μυζητικά έντομα και ακάρεα. Η χημική του δομή παρουσιάζεται παρακάτω (Εικ. 6):



Εικ. 6 Χημική δομή spinosad.

Εφαρμόζεται με ψεκασμούς καλύψεως του φυλλώματος και δρα στο κεντρικό νευρικό σύστημα των εντόμων δεσμεύοντας τους υποδοχείς της ακετυλοχολίνης και προκαλεί παρατεταμένη ενεργοποίηση τους, εξαιτίας της οποίας το έντομο παραλύει λόγω νευρομυϊκής κόπωσης. Η παράλυση είναι μη αναστρέψιμη και ο θάνατος των εντόμων επέρχεται μέσα σε διάστημα τριών ημερών.

Ο όρος τερπένια αναφέρεται σε μία ομάδα ενώσεων που απαντούν στη φύση και έχουν ως δομικό συστατικό μόριο ισοπρένιο (C₅H₈). Είναι δηλαδή υδρογονάνθρακες που παράγονται ως αποτέλεσμα συνδυασμού διαφόρων

ισοπρενοειδών μονάδων και ο μοριακός τους τύπος είναι $(C_5H_8)_n$, όπου n είναι ο αριθμός των συνδυασμένων ισοπρενοειδών μονάδων. Ανάλογα με τον αριθμό των μονάδων αυτών διαχωρίζονται σε μονοτερπένια, σεσκιτερπένια, διτερπένια, τριτερπένια και πολυτερπένια. Κάθε μία από τις τάξεις αυτές είναι σημαντική για την αύξηση και την οικολογία των φυτών και παράγονται από πλήθος φυτών. Η χρήση τους όμως στη γεωργική πρακτική είναι εξαιρετικά περιορισμένη ως σήμερα και έχουν χρησιμοποιηθεί ελάχιστα ως απωθητικά εντόμων καθώς και για την καταπολέμηση μυκητιακών ασθενειών αφού έχει βρεθεί ότι προκαλούν λύση των μυκητιακών μεμβρανών σχηματίζοντας σύμπλοκα με τις στερόλες τους (Gershenzon & Dudareva, 2007).

Φυτά *Arabidopsis thaliana* τα οποία μετασχηματίστηκαν ώστε να υπερεκφράζουν τη σύνθεση τερπενίων παρουσίασαν ιδιαίτερα απωθητικές ιδιότητες έναντι αφίδων του είδους *Myzus persicae*. Επίσης, τέσσερα διτερπενοειδή, τα οποία απομονώθηκαν από το φυτό *Ajuga reptans cv Catlins Giant*, είχαν σημαντική δράση έναντι των προνυμφών έκτου σταδίου του εντόμου *Spodoptera littoralis* (Bremner et al, 1998).

1.6. Επίδραση διαφόρων άλλων φυτοπροστατευτικών ουσιών σε μυκόρριζες

Εξαιτίας του μικρού ποσοστού που κατέχει η βιολογική γεωργία παγκοσμίως αλλά και τις γενικότερης αλλά αυθαίρετης παραδοχής ότι τα βιολογικά ΦΠ λόγω της προέλευσής τους δεν παρουσιάζουν επιδράσεις σε οργανισμούς μη-στόχους, η έρευνα σχετικά με βιολογικά ΦΠ είναι περιορισμένη. Κατά συνέπεια, ελάχιστες μελέτες μέχρι σήμερα έχουν ασχοληθεί με την επίδραση των βιολογικών ΦΠ στους μικροοργανισμούς του εδάφους και ειδικότερα στους ΘΜ μύκητες. Αντίθετα, πλήθος ερευνών έχουν ασχοληθεί με την επίδραση διαφόρων συνθετικών ΦΠ σε ΘΜ μύκητες, αλλά τα αποτελέσματά τους είναι αντικρουόμενα και διαφέρουν ανάλογα με το χρησιμοποιούμενο κάθε φορά ΦΠ, το είδος του φυτού και το είδος του ΘΜ μύκητα που μελετήθηκε (Nemec, 1980; Dodd & Jeffries, 1989; Carrenho et al., 2000; Zhang et al., 2006).

Οι περισσότερες μελέτες αποδίδουν την ανασταλτική επίδραση που έχουν ορισμένα ΦΠ στην ανάπτυξη των φυτών ή στην καταστολή υποκινητών της αύξησης παραγομένων από μικροοργανισμούς της ριζόσφαιρας. Ο μειωμένος αποικισμός των ριζών από ΘΜ μύκητες έχει αποδοθεί, εκτός από την αδυναμία βλάστησης των

σπορίων, στη μη έκκριση από τις ρίζες ενζύμων που είναι απαραίτητα για τη δημιουργία συμβιωτικών σχέσεων με ΘΜ μύκητες (de Bertoldi et al, 1978).

Μειωμένη φυτική ανάπτυξη από την εφαρμογή διαφόρων ΦΠ έχει αποδοθεί σε αρνητικές επιδράσεις των ΦΠ στους ΘΜ μύκητες. Έτσι, εφαρμογή του ζιζανιοκτόνου 4-(2,4-DB) στο έδαφος οδήγησε σε μείωση της μηδικής σε δύο τύπους αποστειρωμένου εδάφους (MacRae & Alexander, 1965). Ακόμη, παρατηρήθηκε μείωση στην ανάπτυξη των φυτών κρεμμυδιών εξαιτίας της χρήσης πέντε διαφορετικών μυκητοκτόνων (Manjunath & Bagyaraj, 1984). Το trifluralin και το metribuzin μείωσαν την ξηρά ουσία φασολιών, ενώ η ξηρά ουσία βλαστών και ρίζας φασολιών μειώθηκε επίσης με την εφαρμογή στο έδαφος των bromoxynil και paraquat (Bertholet & Clark, 1985).

Εφαρμογή των μυκητοκτόνων benomyl, prochloraz και iprodione οδήγησε σε σημαντική ανάσχεση των πληθυσμών του μυκορριζικού είδους *Vulpia ciliata*, χωρίς όμως αυτή η ανάσχεση να συνεπάγεται και αντίστοιχη μείωση στην αύξηση και ανάπτυξη των φυτών (West et al., 1993). Επίσης, βρέθηκε ότι ουσίες όπως είναι ορμόνες, φλαβονοειδή, φαινολικές ενώσεις και άλλες που παράγονται από τα φυτά επηρεάζουν τον αποικισμό των ριζών με μυκόρριζες (Lum & Hirsch, 2003). Τα χρησιμοποιούμενα σε μελέτες ΦΠ carbofuran και copper-oxychloride ήταν τοξικά σε ΘΜ ακόμα και όταν αυτά χρησιμοποιήθηκαν στις συνιστώμενες δόσεις (Sreenivasa & Bagyaraj, 1989). Η τοξικότητα αυτή είχε ως αποτέλεσμα τη μη βλάστηση των σπορίων των μυκήτων και την αδυναμία αποικισμού των ριζών των φυτών. Τα συνθετικά ΦΠ pyrazophos, bromoxynil, paraquat, profenofos και diniconazole όταν εφαρμόστηκαν σε φυτά της οικογένειας *Leguminosae* (λούπινα και διάφορα είδη φασολιών) επέφεραν μείωση στην ανάπτυξη των φυτών και στον αποικισμό των ριζών τους με ΘΜ. Οι μεταβολές αυτές ποίκιλαν ανάλογα με το είδος του φυτού και το χρησιμοποιούμενο ΦΠ (Abd-Alla et al, 2000).

Η εφαρμογή μυκητοκτόνων και ζιζανιοκτόνων δε προκάλεσε σημαντικές μεταβολές στην ποικιλότητα της μυκητιακής κοινότητας του εδάφους και μύκητες Glomerales ανιχνεύτηκαν και σε εδάφη όπου εφαρμόστηκαν αντίστοιχα ΦΠ, ενώ η εφαρμογή μυκητοκτόνων φυλλώματος δεν είχε καμία επίδραση στην μυκητιακή κοινότητα στο έδαφος (Girvan et al, 2004). Αύξηση στην ανάπτυξη των φυτών και στο ποσοστό αποικισμού των ριζών τους από εκτομυκόρριζες, μετά την εφαρμογή του ζιζανιοκτόνου simazine, παρατηρήθηκε όταν αυτά εφαρμόστηκαν σε δύο είδη πεύκων (Smith & Ferry, 1979). Επίσης, η εφαρμογή των συνθετικών ΦΠ captan και

carbofuran σε φυτοδοχεία γρασιδιού του είδους *Chloris gayana*, εμβολιασμένα με το μύκητα *Glomus fasciculatum*, οδήγησε σε αύξηση όλων των μυκορριζικών παραμέτρων όπως ο αριθμός σπορίων και το ποσοστό αποικισμού των ριζών (Sreenivasa & Bagyaraj, 1989). Η εφαρμογή copper oxychloride σε φυτά αραχίδας είχε ιδιαίτερα θετικά αποτελέσματα αφού καταπολέμησε μύκητες επιβλαβείς για το φυτό και ταυτόχρονα αύξησε τον αριθμό των σπορίων ΘΜ μυκήτων και την απόδοση των φυτών (Sugavanam et al., 1994). Τέλος, το metalaxyl όταν εφαρμόστηκε σε βαμβάκι, κρεμμύδι και πιπεριά αύξησε σημαντικά τον αποικισμό των ριζών τους με ΘΜ μύκητες αλλά δεν είχε μεγάλη επίδραση στο μήκος αυτών (Afek et al., 1990).

1.7. Τεχνικές μέτρησης των επιδράσεων των αγροτικών πρακτικών στη μικροβιακή κοινότητα του εδάφους

Διάφορες μέθοδοι έχουν χρησιμοποιηθεί ως σήμερα για τη εκτίμηση των επιδράσεων των αγροτικών πρακτικών, μεταξύ των οποίων και φυτοπροστατευτικές πρακτικές, στη μικροβιακή κοινότητα του εδάφους. Αυτές μπορούν να ταξινομηθούν στις μεθόδους που βασίζονται στη καλλιέργεια των μικροοργανισμών (culture-dependant) και στις μη εξαρτώμενες από την καλλιέργεια μεθόδους (culture-independent).

Στο παρελθόν, η ανάλυση των μικροοργανισμών του εδάφους βασιζόταν σχεδόν αποκλειστικά στην καλλιέργεια και στην απομόνωση τους (van Elsas et al., 1998). Μια μεγάλη ποικιλία θρεπτικών μέσων καλλιέργειας έχει αναπτυχθεί για να μεγιστοποιήσει την ανίχνευση ποικίλων μικροβιακών ομάδων (Balestra & Misaghi, 1997; Sait et al., 2002; Janssen et al., 2002; Joseph et al., 2003).

Μια μέθοδος που στηρίζεται στη καλλιέργεια μικροοργανισμών είναι το σύστημα BIOLOG (Garland & Mills, 1991). Η μέθοδος αυτή χρησιμοποιείται για την εκτίμηση της μικροβιακής λειτουργικής ποικιλότητας και έχει εφαρμοστεί με επιτυχία σε ρυπασμένα εδάφη (Konopka et al., 1998), στη ριζόσφαιρα των φυτών (Ellis et al., 1995) και σε εδάφη στα οποία έχει γίνει χρήση ζιζανιοκτόνων (el Fantrousi et al., 1999). Το κυριότερο μειονέκτημα των μεθόδων που στηρίζονται στη καλλιέργεια σε θρεπτικά υποστρώματα, είναι το γεγονός πλέον ότι μόνο 1-5% των μικροοργανισμών στο έδαφος μπορούν να καλλιεργηθούν στα ως σήμερα γνωστά θρεπτικά υποστρώματα (Prosser, 2002). Όπως πολλοί άλλοι μύκητες, έτσι και οι ΘΜ μύκητες είναι μέχρι στιγμής αδύνατο να καλλιεργηθούν (van Elsas et al., 2000). Για το λόγο αυτό, η χρήση βιοχημικών ή μοριακών βιολογικών μεθόδων που δεν στηρίζονται στη

καλλιέργεια σε θρεπτικά υποστρώματα βελτίωσε σημαντικά τις γνώσεις σε σχέση με την οικολογία των ΘΜ μυκήτων και γενικότερα των μικροοργανισμών στη ριζόσφαιρα και στις ρίζες των φυτών (Ma et al., 2005; Liang et al., 2008) Οι τεχνικές αυτές βασίζονται είτε στη ανάλυση των λιπαρών οξέων των φωσφολιπιδίων των κυτταρικών μεμβρανών των μικροοργανισμών (PLFA), είτε στη χρήση της αλυσιδωτής αντίδρασης πολυμεράσης (PCR) επί εκχυλισμένου περιβαλλοντικού DNA σε συνδυασμό με τεχνικές μοριακής αποτύπωσης (π.χ. DGGE, TRFLP, RISA, ARISA).

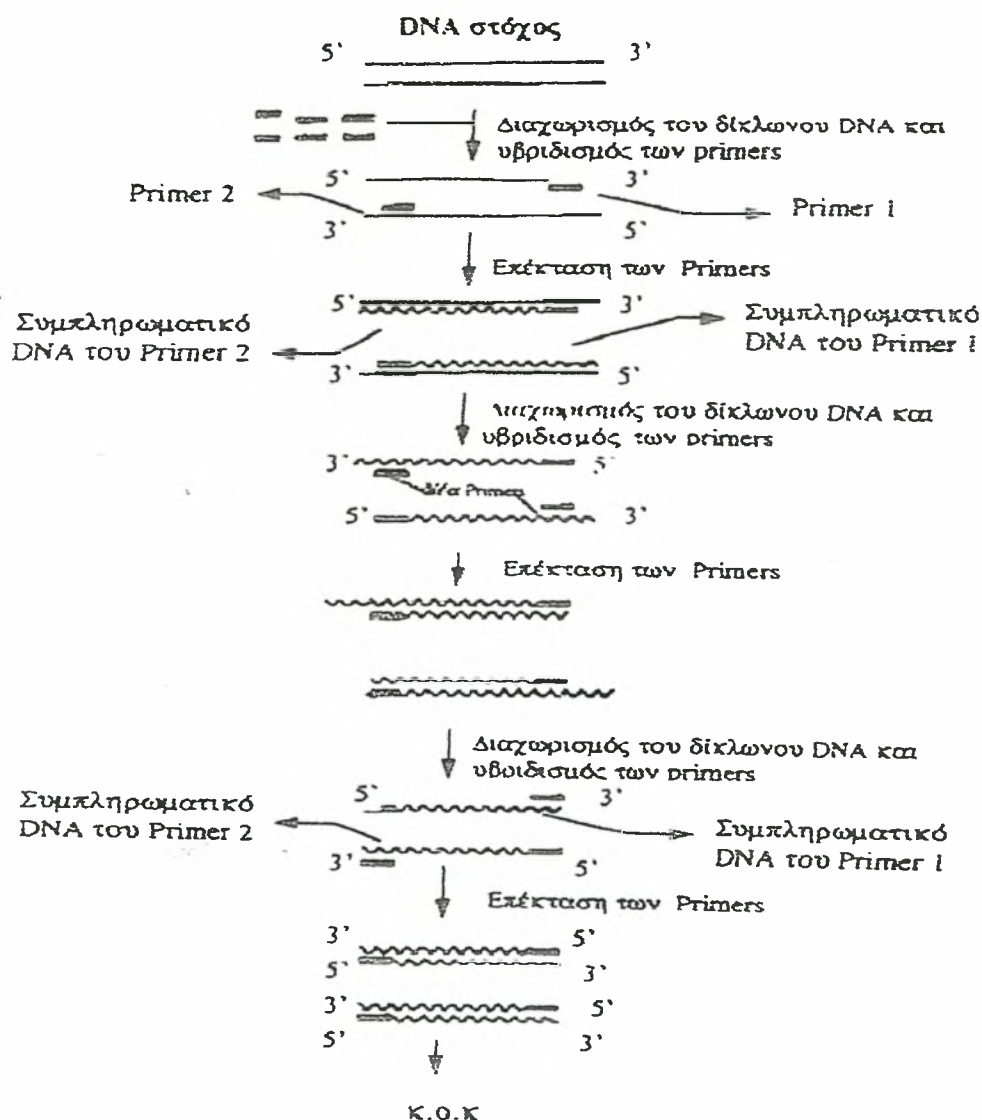
1.8. Αλυσιδωτή Αντίδραση Πολυμεράσης (Polymerase Chain Reaction-PCR)

Η τεχνική της PCR ή Αλυσιδωτή Αντίδραση της Πολυμεράσης πρωτοεφαρμόστηκε από την ομάδα των ερευνητών Mullis, Fallona και Saiki και επιτρέπει τον ενζυμικό πολλαπλασιασμό *in vitro* επιλεγμένων αλληλουχιών DNA, ανεξαρτήτου προελεύσεως, από ελάχιστες αρχικές ποσότητες δείγματος (Μαρκουλάτος, 2007).

Η αρχή λειτουργίας της μεθόδου στηρίζεται στη χρήση μικρής ποσότητας DNA που παίζει το ρόλο του μορίου-μήτρας, ειδικής DNA πολυμεράσης η οποία είναι θερμοανθεκτική και διατηρεί τη δραστηριότητά της σε θερμοκρασίες έως και 95 °C (Taq DNA πολυμεράση), ενός ζεύγους συνθετικών ολιγονουκλεοτιδίων, συνήθως 15-30 βάσεων, τα οποία ονομάζονται εκκινητές (primers) και έχουν δομή συμπληρωματική προς τις πλευρικές αλληλουχίες του DNA-στόχου, το καθένα αντίστοιχα προς τον ένα κλώνο του στόχου και με αντίθετη κατεύθυνση, κατάλληλου διαλύματος ελεύθερων 5' τριφωσφορικών δεοξυριβονουκλεοτιδίων (dNTPs), κατάλληλης συγκέντρωσης διαλύματος MgCl₂ από το οποίο ιόντα Mg⁺⁺ είναι απαραίτητα για τη δράση του ενζύμου και ειδικού ρυθμιστικού διαλύματος για τη δράση της πολυμεράσης (pH≅8.2).

Η τεχνική της PCR πραγματοποιείται σε κύκλους. Κάθε κύκλος πραγματοποιείται σε τρία στάδια και επιτυγχάνεται εκθετικός πολλαπλασιασμός του DNA στόχου. Στο πρώτο στάδιο της PCR, το δίκλωνο DNA αποδιατάσσεται με θέρμανση στους 92-95 °C και μετατρέπεται σε μονόκλωνο. Στο δεύτερο στάδιο, οι εκκινητές που βρίσκονται σε μεγάλη περίσσεια υβριδίζονται με τις συμπληρωματικές προς αυτούς αλληλουχίες στους δύο κλώνους του DNA-στόχου, στους 50-65 °C. Κατά το τρίτο στάδιο, το οποίο πραγματοποιείται στους 70-78 °C, συντίθεται DNA

αρχίζοντας από τους δύο εκκινητές, στους οποίους με τη δράση του ενζύμου *Taq DNA* πολυμεράσης προστίθενται συμπληρωματικές βάσεις δεοξυριβονουκλεοτιδίων στο 3' άκρο του κάθε εκκινητή και η αλυσίδα επεκτείνεται. Έτσι σχηματίζονται δύο καινούργιες αλυσίδες ή κλώνοι DNA συμπληρωματικές προς αυτές των δύο κλώνων του προτύπου DNA, με αποτέλεσμα το διπλασιασμό του DNA-στόχου. Ο άριστος αριθμός κύκλων εξαρτάται από την συγκέντρωση του DNA-στόχου και την απόδοση της PCR σε κάθε κύκλο. Μετά από μερικούς κύκλους το προϊόν είναι δίκλωνο DNA, τα 5' άκρα του οποίου καθορίζονται από τους εκκινητές (Εικ. 7).



Εικ. 7 Στάδια τεχνικής PCR (Μαρκουλάτος, 2007).

Οι συσκευές με τις οποίες πραγματοποιείται η PCR ονομάζονται θερμικοί κυκλοποιητές (Thermal cyclers) και έχουν αυτοματοποιήσει πλήρως την εκτέλεσή της. Στις συσκευές αυτές ένα ειδικό λογισμικό πρόγραμμα ελέγχει το σύστημα ψύξης/θέρμανσης, που είναι υπεύθυνο για τις αλλαγές της θερμοκρασίας, ανάλογα με το βήμα της αντίδρασης.

Η ειδικότητα του προϊόντος της αντίδρασης PCR σε βέλτιστες συνθήκες επιβεβαιώνεται σε ηλεκτροφόρηση πηκτής αγαρόζης, το μέγεθος του οποίου ταυτίζεται με το μέγεθος του DNA-στόχου, παρουσία βρωμιούχου αιθιδίου (Εικ.8).

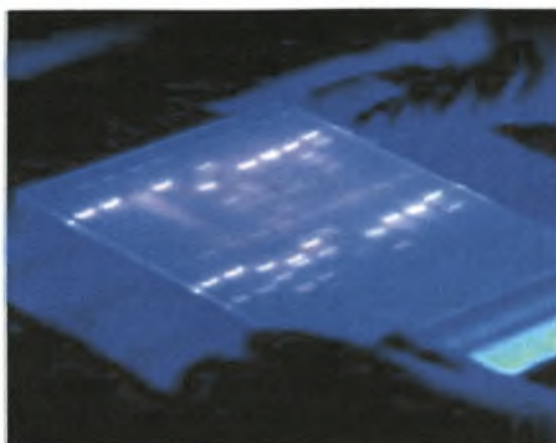


Εικ. 8 Ηλεκτροφόρηση δειγμάτων DNA

Τα δείγματα PCR τα οποία πρόκειται να υποβληθούν σε ηλεκτροφόρηση αναμειγνύονται προηγουμένως με 2-5 μl ρυθμιστικού διαλύματος “Gel loading buffer” το οποίο περιέχει 0.25% μπλε της βρωμοφαινόλης και 0.25% ξυλένιο κυανόλης, χρωστικές οι οποίες βοηθούν την παρακολούθηση της εξέλιξης της ηλεκτροφόρησης, αφού κινούνται μαζί με τον αντίστοιχο αριθμό ζευγών βάσεων του προϊόντος της PCR.

Οι φωσφορικές ομάδες των δεσοξυριβονουκλεοτιδίων προσδίδουν αρνητικό φορτίο στο DNA, το οποίο παρουσία του διαλύματος ηλεκτροφόρησης TAE 1X θα κινηθεί από τον αρνητικό προς τον θετικό πόλο. Όσο πιο μεγάλο είναι το προϊόν της PCR τόσο πιο δύσκολα κινείται μέσα στο πήκτωμα της αγαρόζης. Έτσι, χρησιμοποιώντας πηκτώματα διαφορετικής συγκέντρωσης αγαρόζης επιτυγχάνεται ο επιθυμητός διαχωρισμός, ανάλογα με το εύρος των βάσεων που θέλουμε να διαχωρίσουμε.

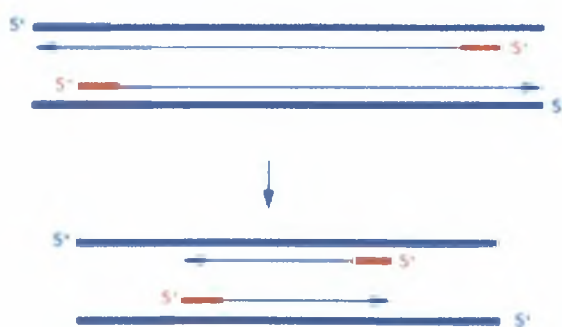
Το βρωμιούχο αιθίδιο παρεμβάλλεται μεταξύ των βάσεων των νουκλεοτιδίων και φθορίζει παρουσία υπερϊόδους ακτινοβολίας αποκαλύπτοντας το προϊόν της PCR (Εικ.9).



Εικ. 9 Παρατήρηση πηκτής ηλεκτροφόρησης σε συσκευή UV (Μαρκουλάτος, 2007).

1.9. Αλυσιδωτή Αντίδραση Πολυμεράσης Εσωτερικής Ένθεσης (Nested PCR)

Μια τροποποιημένη μέθοδος PCR είναι η PCR εσωτερικής ένθεσης (Nested PCR). Η μέθοδος αυτή χρησιμοποιεί δύο διαδοχικές αντιδράσεις PCR, όπου το προϊόν της πρώτης αντίδρασης χρησιμοποιείται ως μήτρα για τη δεύτερη. Η πρώτη αντίδραση PCR χρησιμοποιεί ένα εξωτερικό ζευγάρι εκκινητών (outer primers) ενώ η δεύτερη ένα νέο ζευγάρι εκκινητών, εσωτερικό των αρχικών (inner primers) (Εικ. 10):



Εικ. 10 PCR εσωτερικής ένθεσης (Μαρκουλάτος, 2007).

Ορισμένα από τα πλεονεκτήματα της PCR εσωτερικής ένθεσης είναι ότι έχει μεγαλύτερη ευαισθησία από την απλή αντίδραση PCR και μεγαλύτερη εξειδίκευση, αφού στη PCR εσωτερικής ένθεσης εάν μια λάθος αλληλουχία ενισχυθεί στη πρώτη

PCR αντίδραση η πιθανότητα να ενισχυθεί στη δεύτερη αντίδραση είναι μικρή, ενώ παράγονται και τμήματα DNA κατάλληλα για ανάλυση με DGGE. Παρόλα αυτά, με τη μέθοδο της PCR εσωτερικής ένθεσης οι κύκλοι της PCR αντίδρασης αυξάνονται με συνέπεια να αυξάνεται και η πιθανότητα σχηματισμού χημικών μορφών και λαθών στην αλληλουχία του DNA.

1.10. Μέθοδος Ηλεκτροφόρησης σε Πηκτή με Βαθμίδωση Αποδιατακτικών Ουσιών (Denaturing Gradient Gel Electrophoresis-DGGE)

Όπως αναφέρθηκε και παραπάνω, ένα από τα πλεονεκτήματα της PCR εσωτερικής ένθεσης είναι η παραγωγή τμημάτων DNA που είναι κατάλληλα για ανάλυση με DGGE. Τι είναι όμως η μέθοδος DGGE;

Μια από τις πρώτες μεθόδους αποτύπωσης DNA που εφαρμόστηκε με επιτυχία στη μικροβιακή οικολογία ήταν η ηλεκτροφόρηση σε πηκτή με βαθμίδωση αποδιατακτικών ουσιών ή μέθοδος DGGE (Liesac et al., 1991). Η μέθοδος DGGE έχει την ικανότητα να διαχωρίζει μικρά μόρια DNA (περίπου 200-600 bp) που έχουν το ίδιο μέγεθος, αλλά διαφέρουν τουλάχιστον σε ένα νουκλεοτίδιο, κατά την ηλεκτροφόρηση σε πηκτή πολυακρυλαμίδης, με αυξημένη βαθμίδωση αποδιατακτικών ουσιών. Ο διαχωρισμός αυτός βασίζεται στη μειωμένη ηλεκτροφορητική κινητικότητα ενός μερικώς αποδιαταγμένου μορίου DNA σε πηκτή, σε σύγκριση με τη κινητικότητα της πλήρως δίκλωνης μορφής του μορίου. Οι δύο αλυσίδες ενός DNA τμήματος αποδιατάσσονται σε συγκεκριμένη θερμοκρασία, η οποία εξαρτάται από τους δεσμούς υδρογόνου που σχηματίζονται μεταξύ των συμπληρωματικών βάσεων (αλληλουχίες πλούσιες σε γουανίνη (G) και κυτοσίνη (C) αποδιατάσσονται σε υψηλότερες θερμοκρασίες) και από το στίβγμα μεταξύ των γειτονικών βάσεων στην ίδια αλυσίδα (base stacking).

Κατά τη διάρκεια της ηλεκτροφόρησης σε πηκτή πολυακρυλαμίδης, η κινητικότητα ενός μορίου επιβραδύνεται όταν μια περιοχή του αποδιαταχθεί και τελικά σταματάει να κινείται. Το σημείο στο οποίο ένα μόριο DNA αποδιατάσσεται και χάνει την ηλεκτροφορητική κινητικότητά του εξαρτάται από τη νουκλεοτιδική αλληλουχία του μορίου. Διαφορετικές αλληλουχίες DNA αποδιατάσσονται σε διαφορετικές συγκεντρώσεις αποδιατακτικών ουσιών και σταματάνε σε διαφορετικά σημεία στην πηκτή και έτσι διαχωρίζονται. Η ολική αποδιάταξη των δίκλωνων τμημάτων DNA κατά τη διάρκεια του DGGE αποτρέπεται από τη παρουσία μιας αλληλουχίας πλούσιας σε GC (GC clamp) στο ένα άκρο του. Αυτό επιτυγχάνεται με

τη χρήση ενός PCR εκκινητή που φέρει στο 5' άκρο ένα GC clamp. Το αποτύπωμα των ζωνών που προκύπτει από την ηλεκτροφόρηση ενός δείγματος αντανακλά άμεσα τη γενετική του ποικιλότητα και ο αριθμός των ζωνών αντιπροσωπεύει τον αριθμό των κυρίαρχων ειδών.

Αρχικά το DGGE χρησιμοποιήθηκε για το καθορισμό της γενετικής ποικιλότητας βακτηριακών πληθυσμών (Muzyer et al., 1993). Ωστόσο, το DGGE χρησιμοποιείται και για άλλους σκοπούς στη μικροβιακή οικολογία, όπως είναι η μελέτη μεταβολών που συμβαίνουν σε μια μικροβιακή κοινότητα εξαιτίας περιβαλλοντικών αλλαγών (Donner et al., 1996) και η σύγκριση διαφορετικών μεθόδων εκχύλισης DNA (Kozdrój & van Elsas., 2000). Τέλος, η μέθοδος DGGE χρησιμοποιήθηκε με επιτυχία στην ανίχνευση ΘΜ μυκήτων σε δείγματα εδάφους που απομονώθηκαν από καλλιεργούμενα αγροτεμάχια (Ma et al, 2005).

1.11. Στόχος της εργασίας

Η ευρεία και ανεξέλεγκτη χρήση των συνθετικών ΦΠ τις προηγούμενες δεκαετίες είχε ως αποτέλεσμα την εμφάνιση μίας σειράς αρνητικών επιδράσεων στο περιβάλλον και στους χρήστες τους. Το γεγονός αυτό σε συνδυασμό με την αυξανόμενη ευαισθητοποίηση των ανθρώπων σε θέματα υγείας, διατροφής και περιβάλλοντος, οδήγησε σε ταχεία αύξηση του ποσοστού της βιολογικής γεωργίας, τόσο παγκοσμίως όσο και σε εθνικό επίπεδο. Στο σύστημα αυτό της γεωργικής παραγωγής, οι ΘΜ μύκητες θα μπορούσαν να διαδραματίσουν σημαντικό ρόλο μέσω των άμεσων ή έμμεσων ωφελειών τους στα φυτά, ιδιαίτερα σε καλλιέργειες με υψηλή πρόσοδο όπως είναι η πιπεριά. Σε αντίθεση με τα συνθετικά ΦΠ, η επίδραση των ΦΠ βοτανικής προέλευσης, που χρησιμοποιούνται στη βιολογική γεωργία, σε ΘΜ μύκητες δεν έχει ως τώρα μελετηθεί.

Στόχος της παρούσας εργασίας είναι η αξιολόγηση των επιδράσεων των ΦΠ βοτανικής προέλευσης αζαντιραχτίνη, πύρεθρο, spinosad, τερπένια και του συνθετικού μυκητοκτόνου carbendazim στην λειτουργικότητα και ποικιλότητα των ΘΜ μυκήτων, χρησιμοποιώντας ως ξενιστές φυτά πιπεριάς. Για το πρώτο σκοπό πραγματοποιήθηκαν μετρήσεις μορφολογικών χαρακτηριστικών των φυτών πιπεριάς, ενώ χρησιμοποιήθηκαν μοριακές μέθοδοι αποτύπωσης για την διερεύνηση της επίδρασης των παραπάνω ΦΠ στην σύσταση της κοινότητας των ΘΜ μυκήτων στις ρίζες φυτών πιπεριάς.

2. ΥΛΙΚΑ ΚΑΙ ΜΕΘΟΔΟΙ

2.1. Μυκορριζικό εμβόλιο

Από πιστοποιημένα βιολογικά αγροτεμάχια της ευρύτερης περιοχής του Νομού Λάρισας και της Βόρειας Ελλάδας, όπου καλλιεργούνταν για σειρά ετών διάφορα είδη λαχανικών, συλλέχθηκαν ριζοσφαιρικά δείγματα εδάφους και ριζών για να χρησιμοποιηθούν ως υλικό για την ανάπτυξη μυκορριζικού εμβολίου. Το εμβόλιο αναμίχθηκε σε γλάστρες με υπόστρωμα μίγματος περλίτη, άμμου και βερμικουλίτη αναλογίας 1:1:1 για την ανάπτυξη φυτών αραβοσίτου (*Zea mays* L.). Ο περλίτης και ο βερμικουλίτης χρησιμοποιήθηκαν προκειμένου να επιτευχθούν καλύτερες συνθήκες αερισμού του μίγματος και για να διευκολύνουν την απομόνωση των σπορίων. Η επιλογή του αραβοσίτου ως φυτό-ξενιστή έγινε διότι είναι δεκτικό και μη επιλεκτικό στον αποικισμό από ΘΜ μύκητες και παράγει γρήγορα ένα αυξημένο ινώδες ριζικό σύστημα. (Sylvia, 1994). Μετά από τριάντα ημέρες απομονώθηκαν υγιή σπόρια ΘΜ μυκήτων, τα οποία ομαδοποιήθηκαν σε εκατοντάδες με όμοια μορφολογικά χαρακτηριστικά (μέγεθος και χρώμα) και χρησιμοποιήθηκαν ως εμβόλιο σε φυτά αραβοσίτου σε γλάστρες χωρητικότητας 250 ml. Για κάθε ομάδα σπορίων απομονώθηκαν μέχρι 10 εκατοντάδες για να αυξηθούν οι πιθανότητες εμβολιασμού τουλάχιστον ενός φυτού αραβοσίτου. Μετά από τριάντα ημέρες ανάπτυξης τα φυτά ελέγχθηκαν για επιτυχή μυκορριζικό αποικισμό και σε περίπτωση σποροποίησης των μυκήτων, για αμιγότητα του μολύσματος, αν δηλαδή όντως η αρχική ομάδα αποτελούνταν πραγματικά από μόνο ένα μυκορριζικό μύκητα. Επιτυχείς γλάστρες χρησιμοποιήθηκαν για τον πολλαπλασιασμό μολύσματος σε νέα φυτά αραβοσίτου σε γλάστρες χωρητικότητας 1.5 L. Μετά από 30 ημέρες απομονώθηκαν σπόρια μυκήτων και επιλέχθηκαν συγκεκριμένες γλάστρες βάση ποσότητας και καθαρότητας σπορίων. Η τελική αμιγότητα των διαφόρων πληθυσμών ΘΜ μυκήτων που επιλέχθηκαν ταυτοποιήθηκαν με βάση μορφολογικά χαρακτηριστικά και μοριακή ταυτοποίηση (18S rRNA περιοχή). Οι τελικά πέντε επιλεγέντες πληθυσμοί (τέσσερις αμιγείς και μια μικτή καλλιέργεια) αναμίχθηκαν και χρησιμοποιήθηκαν ως μικτό εμβόλιο ΘΜ μυκήτων στα παρακάτω πειράματα. Λεπτομερείς χειρισμοί που πραγματοποιήθηκαν για την παραγωγή του μολύσματος και την μοριακή του ταυτοποίηση αποτέλεσαν μέρος της μεταπτυχιακής διατριβής τους κ. Κωνσταντίνου Αντωνιάδη όπου και παρουσιάζονται.

Τα πρώτα φυτά αραβοσίτου αναπτύχθηκαν σε φυσικό φωτισμό, στο πάρκινγκ του Τμήματος Βιοχημείας και Βιοτεχνολογίας, ενώ όλα τα άλλα αναπτύχθηκαν σε

θάλαμο ανάπτυξης φυτών με φωτισμό 16 ωρών ημέρας και θερμοκρασία 22°C. Τα φυτά ποτίζονταν μετά την πρώτη εβδομάδα με διάλυμα Hoagland 10 %.

Η απομόνωση των σπορίων μυκήτων κάθε φορά γινόταν ακολουθώντας τη μέθοδο που περιγράφεται από τον Sylvia (1994). Δείγμα εδάφους 50 g τοποθετήθηκε σε κατάλληλο δοχείο, προστέθηκε νερό και ακολούθησε ανάδευση του μίγματος. Το μίγμα παρέμεινε ακίνητο για 1 min προκειμένου να κατακαθίσει το έδαφος και στη συνέχεια μεταγγίστηκε σε τρία εν σειρά τοποθετημένα κόσκινα, διαμέτρου οπών 200, 100 και 50 μm αντίστοιχα. Η διαδικασία επαναλήφθηκε τρεις τουλάχιστον φορές. Τα δείγματα που συλλέχθηκαν στο πρώτο κόσκινο μεταφέρθηκαν σε τριβλίο και παρατηρήθηκαν με στερεοσκόπιο. Τα συλλεχθέντα από τα δύο τελευταία κόσκινα δείγματα τοποθετήθηκαν σε σωλήνες φυγοκέντρωσης, προστέθηκε νερό προκειμένου να γίνουν ισοβαρή και φυγοκεντρήθηκαν για 3 min στις 2800 rpm. Ακολούθως, απομακρύνθηκε το νερό και στους σωλήνες φυγοκέντρωσης προστέθηκε διάλυμα ζάχαρης 40%, έγινε φυγοκέντρωση για 2 min στις 2500 rpm και στη συνέχεια τα σπόρια συγκεντρώθηκαν σε κόσκινο διαμέτρου οπών 50 μm, όπου η ζάχαρη απομακρύνθηκε με υδροβολέα. Τελικά, το συλλεχθέν από το κόσκινο δείγμα συγκεντρώθηκε σε τριβλίο Petri, για να παρατηρηθεί κάτω από στερεοσκόπιο.

2.2. Εγκατάσταση, ανάπτυξη και χειρισμός φυτών πιπεριάς

Σπόροι πιπεριάς (*Capsicum annuum* L., οικ. Solanaceae, ποικιλία Osho) απολυμάνθηκαν με διάλυμα χλωρίνης 5% για 5 min, ξεπλύθηκαν με αποστειρωμένο νερό και προφυτρώθηκαν σε τριβλία Petri. Οι σπόροι σπάρθηκαν σε γλάστρες χωρητικότητας 100 ml με αποστειρωμένο υπόστρωμα άμμου, τύρφης και περλίτη σε αναλογία 1:1:1. Η αποστείρωση έγινε σε αυτόκαυστο, στους 130 °C για 20 min. Η βλάστηση των σπόρων και ανάπτυξη των φυταρίων έγινε σε θάλαμο με φωτισμό 16 ωρών ημέρας και θερμοκρασία 22°C. Τα φυτάρια πιπεριάς αναπτύχθηκαν για τριάντα ημέρες και ποτίζονταν όσο χρειαζόταν με 10% Hoagland μετά τη δεύτερη εβδομάδα.

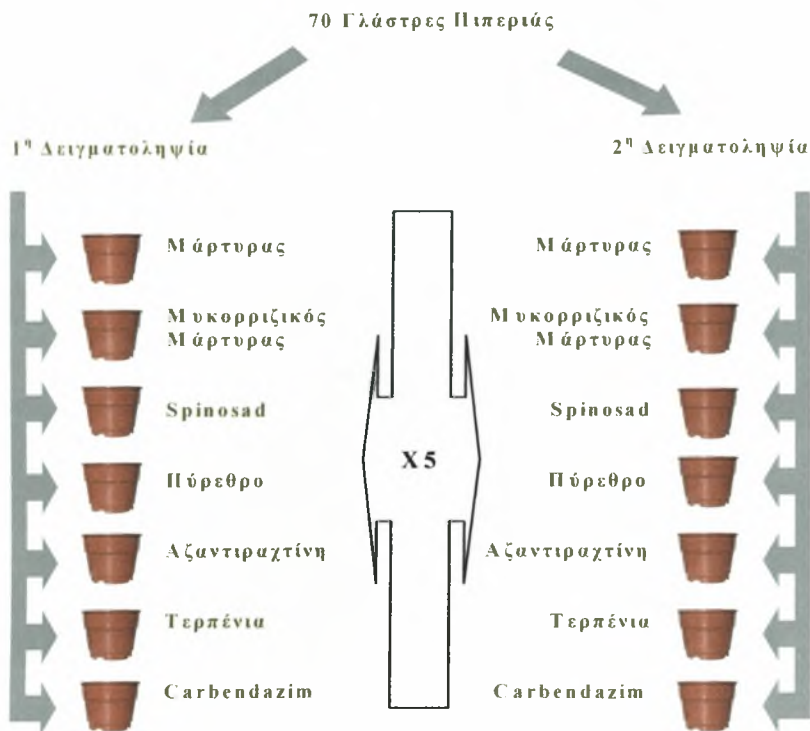
Με την πάροδο των 3 εβδομάδων ακολούθησε η μεταφύτευση των φυταρίων της πιπεριάς σε γλάστρες των 3 L. Ως υπόστρωμα χρησιμοποιήθηκε αποστειρωμένο μίγμα εδάφους και άμμου σε αναλογία 1:1. Υπολογίστηκε η υδατοϊκανότητα του μίγματος και προσαρμόστηκε με την προσθήκη νερού ώστε η υγρασία του μίγματος να φτάσει στο 50% της υδατοϊκανότητας. Στη συνέχεια, το υπόστρωμα αναμίχθηκε με 50 ml διαλύματος που παρασκευάστηκε από τα σκευάσματα των ΦΠ (Πιν. 1). Το δείγμα μάρτυρας (μυκορριζικός και μη-μυκορριζικός) έλαβε την ίδια ποσότητα νερού

χωρίς ΦΠ. Τα δείγματα στην συνέχεια αποθηκεύτηκαν σε πλαστικές σακούλες στους 4°C για να μην αποδομηθούν τα χρησιμοποιούμενα ΦΠ και με την πάροδο 24 ωρών έγινε ανάμιξη με 400 g ανά 35 Kg υποστρώματος μικτού μυκορριζικού εμβολίου και το μίγμα στην συνέχεια διαμοιράστηκε σε γλάστρες.

Δραστική ουσία	Σκεύασμα	Συγκέντρωση (mgr/L)
spinosad	LASER 480 SC, 48% β/ο με καθαρότητα 85%	1200
πύρεθρο	PIRESAN EC, 1.86% β/ο με καθαρότητα 50%	630
αζαντραχίνη	NEEMAZAL EC, 1% β/ο με καθαρότητα 34%	700
τερπένια	2BY31-2, 30% β/ο	4890
carbendazim	OCCIDOR 50 SC, 50% β/ο με καθαρότητα 98%	700

Πιν. 1 Σκευάσματα των ΦΠ που χρησιμοποιήθηκαν και οι συγκεντρώσεις των διαλυμάτων που εφαρμόστηκαν στο έδαφος. Σε όλες τις περιπτώσεις εφαρμόστηκαν 50 ml διαλύματος ώστε να έχουμε την συνιστώμενη δόση στο έδαφος.

Για καθένα από τα ανωτέρω ΦΠ χρησιμοποιήθηκαν δέκα γλάστρες (5 επαναλήψεις X 2 χρόνους δειγματοληψίας). Στο μη μυκορριζικό μάρτυρα δεν προστέθηκε εμβόλιο. Έτσι, συνολικά εγκαταστάθηκαν εβδομήντα γλάστρες (Σχ. 1) και το πείραμα έγινε δι-παραγοντικό, έχοντας ως ανεξάρτητες μεταβλητές - παράγοντες το χρόνο δειγματοληψίας (20 και 40 ημέρες μετά τη μεταφύτευση) και το είδος του ΦΠ που εφαρμόστηκε (Μάρτυρας, Μυκορριζικός Μάρτυρας, Spinosad, Πύρεθρο, Αζαντραχίνη, Τερπένια, Carbendazim).



X5: 5 επαναλήψεις ανά επέμβαση, ανά δειγματοληψία

Σχ. 1 Σχηματική περιγραφή πειράματος.

Ακολούθησε η μεταφύτευση φυτών πιπεριάς 3 εβδομάδων. Καθ' όλη την περίοδο ανάπτυξης των φυτών δεν έγινε καμία επέμβαση σ' αυτά εκτός από ποτίσματα με νερό, όσο χρειαζόταν. Για την εξασφάλιση ομοιόμορφων συνθηκών ανάπτυξης έγινε αρίθμηση των γλαστρών και εβδομαδιαία τυχαιοποίηση στο θάλαμο ανάπτυξης (Εικ. 11).



Εικ. 11 Θάλαμος ανάπτυξης φυτών πιπεριάς.

2.3. Δειγματοληψίες-Χειρισμός δειγμάτων

Με την πάροδο είκοσι και σαράντα ημερών από την ημερομηνία μεταφύτευσης στις γλάστρες, πραγματοποιήθηκε συγκομιδή των φυτών. Σε κάθε δειγματοληψία, κατά τη συγκομιδή γινόταν κοπή του βλαστού τους στη βάση τους και ακολούθως μέτρηση του ύψους τους και του νωπού βάρους (Εικ. 12).



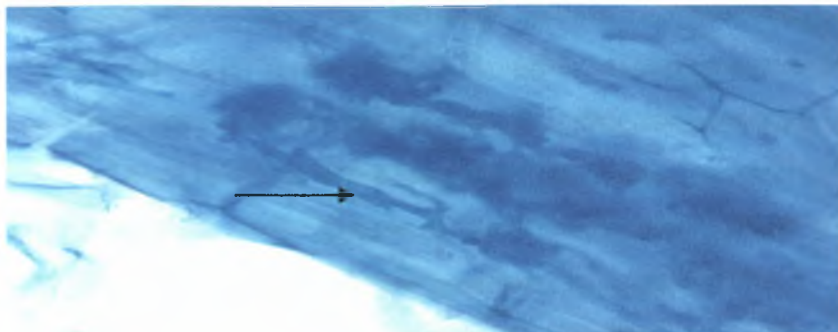
Εικ. 12 Μέτρηση ύψους φυτών κατά την πρώτη και δεύτερη δειγματοληψία.

Επιπλέον, συλλέχθηκε το ριζικό σύστημα. Η συλλογή των ριζών έγινε με πλύσιμο σε κόσκινα διαμέτρου οπών 200 και 100 μm . Οι ρίζες ζυγίστηκαν και ελήφθη το νωπό βάρος αυτών. Ένα τμήμα των ριζών χρησιμοποιήθηκε για χρώση και προσδιορισμό του μυκορριζικού αποικισμού και ένα άλλο τμήμα διατηρήθηκε στους -20°C ώστε να χρησιμοποιηθεί για εξαγωγή DNA και για τη μέτρηση του ξηρού βάρους των ριζών. Οι βλαστοί και οι ρίζες τοποθετήθηκαν σε φούρνο για 24 ώρες στους 60°C και μετρήθηκε το βάρος ξηράς ουσίας τους με τις κατάλληλες προσαρμογές για να συμπεριληφθούν και τα δύο τμήματα των ριζών που χρησιμοποιήθηκαν για τις παραπάνω αναλύσεις.

2.4. Χρώση ριζών

Για τη χρώση των ριζών χρησιμοποιήθηκε η χρωστική Trypan-Blue. Οι ρίζες τοποθετήθηκαν σε υδατόλουτρο στους 80°C για 40 min, ακολούθησε ξέπλυμα με νερό, οξίνιση για 15 min σε HCl και στη συνέχεια προσθήκη της χρωστικής. Για την προετοιμασία της χρωστικής χρησιμοποιήθηκαν 800 ml γλυκερίνη, 800 ml λακτικού οξέος, 800 ml απεσταγμένου νερού και 1,2 g Trypan-Blue (Sylvia, 1994). Από το σύνολο των χρωματισμένων ριζών, τριάντα ρίζες μήκους 1.5-2 cm η καθεμία τοποθετήθηκαν σε αντικειμενοφόρο πλάκα η οποία περιείχε PVLG (Polyvinyl alcohol-lactic acid-glycerol). Ο προσδιορισμός του ποσοστού αποικισμού έγινε

σαρώνοντας τις ρίζες σε μικροσκόπιο σε μεγένθηση 100X και 400X και υπολογίζοντας την αναλογία των αποικισμένων από μύκητα ριζών προς το σύνολο των ριζών, σε σύνολο 200 διασταυρώσεων (Giovannetti & Mosse, 1980; Clapp et al, 1996) (Εικ. 13).



Εικ. 13 Παράδειγμα αποικισμένης ρίζας φυτών πιπεριάς μετά τη χρώση της.

2.5. Μοριακές βιολογικές τεχνικές

2.5.1 Εξαγωγή DNA από σπόρια ΘΜ μυκήτων

Η ταυτοποίηση των μυκήτων που χρησιμοποιήθηκαν ως μυκορριζικό εμβόλιο στα φυτά της πιπεριάς έγινε μετά από απομόνωση DNA από συλλεχθέντα σπόρια μυκήτων. Έτσι, τα υγιή σπόρια που απομονώθηκαν από το έδαφος συλλέχτηκαν κάτω από στερεοσκόπιο και μεταφέρθηκαν σε μικρο-σωλήνες φυγοκέντρωσης 1.5 ml σε ομάδες των 60-100 ομοίων μορφολογικά σπορίων, καθαρίστηκαν και αποθηκεύτηκαν σε καθαρή αιθανόλη στους $-20\text{ }^{\circ}\text{C}$. Ακολούθησε η εξαγωγή του DNA χρησιμοποιώντας το κιτ NucleoSpin[®] Plant (Macherey-Nagel, Düren, Germany). Το απομονωθέν DNA καθαρίστηκε περαιτέρω χρησιμοποιώντας το κιτ NucleoSpin[®] Extract II και η ποιότητα και η ποσότητά του ελέγχθηκε με ηλεκτροφόρηση 5 μl DNA σε πηκτή αгарόζης 0.8% σε 1% TAE για 20 min σε 100 Volt και χρώση με βρωμιούχο αιθίδιο.

Το DNA χρησιμοποιήθηκε ως μήτρα σε PCR με τους εκκινητές AML1 και AML2 που ενισχύουν μια περιοχή 800-900 bp του 18S rRNA γονιδίου των μυκήτων και η οποία χρησιμοποιείται για την ταυτοποίηση μυκορριζικών μυκήτων (Lee et al., 2008). Τα χρησιμοποιούμενα υλικά, οι αναλογίες τους και οι συνθήκες της PCR, καθώς και η ηλεκτροφόρηση των προϊόντων της PCR που ακολούθησε, αποτέλεσαν μέρος της μεταπτυχιακής διατριβής του κ. Κωνσταντίνου Αντωνιάδη όπου και παρουσιάζονται.

Η κλωνοποίηση των προϊόντων της PCR του DNA των спорίων στον φορέα pGEM-T (Promega, Madison, WI, USA) έγινε με βάση τις συνήθειες πρακτικές (Sambrook et al., 1989) ενώ ο μετασχηματισμός δεκτικών κυττάρων *Escherichia coli* (DH5a High Efficiency Competent Cells) έγινε σύμφωνα με τις οδηγίες του κατασκευαστή. Στις καλλιέργειες των κυττάρων ακολούθησε επιλογή λευκών/μπλέ αποικιών για τον εντοπισμό αποικιών που περιέχουν πλασμίδιο με ένθεμα ή όχι. Συλλέχθηκαν 16 αποικίες από κάθε ομάδα спорίων, εκτός από το δείγμα MC4, όπου συλλέχθηκαν 6 κλώνοι ελλείψει περισσοτέρων. Ακολούθησε η αντίδραση PCR με τους εκκινητές AML1 και AML2 (Lee et al., 2008), ώστε να επιβεβαιωθεί ότι στους εν λόγω κλώνους είχε πραγματικά ενσωματωθεί το σωστό ένθεμα. Αναλυτική παρουσίαση του μετασχηματισμού των κυττάρων, των χρησιμοποιούμενων υλικών, των αναλογιών τους και των συνθηκών της PCR, καθώς και της ηλεκτροφόρησης των προϊόντων της PCR που ακολούθησε, γίνεται στη μεταπτυχιακή διατριβή του κ. Κωνσταντίνου Αντωνιάδη.

Σε τελικό στάδιο ανά ομάδα спорίων ελήφθησαν οι παρακάτω κλώνοι:

MC3: 7 κλώνοι

MC4: 6 κλώνοι

MC10: 7 κλώνοι

MC22: 7 κλώνοι

MC(27-29): 6 κλώνοι

Οι κλώνοι αυτοί (3 μl) εμβολιάστηκαν σε LB και επώαστηκαν για 16 h στους 37°C και στις 210 rpm. Τα πλασμίδια από τα κύτταρα των καλλιεργειών απομονώθηκαν με το kit NucleoSpin Plasmid kit (Macharey-Nagel GmbH, Germany) ακολουθώντας τις οδηγίες του κατασκευαστή. Οι αντιδράσεις αλληλούχισης έγιναν σύμφωνα με τις οδηγίες του κατασκευαστή, χρησιμοποιώντας το PRISM BigDye Terminator Cycle Sequence reaction kit (Applied Biosystems, Warrington, United Kingdom).

Επίσης, οι καλλιέργειες των κλώνων από τις οποίες στάλθηκαν δείγματα για αλληλούχιση, διατηρήθηκαν σε διάλυμα γλυκερόλης 20%. Σε 700 μl LB προστέθηκαν 5 μl καλλιέργειας και αμπικιλίνη για τελική συγκέντρωση 100 μg ml⁻¹. Ακολούθησε επώαση για 16 h στους 37°C και στις 210 rpm, προστέθηκαν και αναδεύτηκαν 175 μl αποστειρωμένης γλυκερόλης (τελική συγκέντρωση γλυκερόλης 20%) και ακολούθησε αποθήκευση στους -80 °C.

2.5.2. Εξαγωγή DNA από ρίζες φυτών πιπεριάς

Από το σύνολο των δειγμάτων των ριζών επελέγησαν τρία δείγματα ανά μεταχείριση, με βάση τον υψηλότερο αποικισμό. Από τις μεταχειρίσεις μάρτυρα και carbendazim επελέγησαν επίσης τρία δείγματα παρά το ότι τα ποσοστά αποικισμού ήταν μηδενικά και στις δύο αυτές μεταχειρίσεις. Έτσι, συνολικά χρησιμοποιήθηκαν 42δείγματα (2 δειγματοληψίες X 7 μεταχειρίσεις X 3 δείγματα ανά μεταχείριση).

Από τα ανωτέρω δείγματα πραγματοποιήθηκε εξαγωγή DNA με τη μέθοδο της άμεσης λύσης. Αρχικά έγινε ομογενοποίηση περίπου 100 mg νεπού βάρους ρίζας κάθε δείγματος χωριστά σε γουδί με γουδοχέρι και υγρό άζωτο και μετά χρησιμοποιήθηκε το κιτ Nucleospin® Plant (Macherey-Nagel, Düren, Germany) σύμφωνα με τις οδηγίες του κατασκευαστή, για να εκχειλιστεί το DNA των δειγμάτων. Έτσι, για τη λύση των κυττάρων, το προϊόν από τα 100 mg του δείγματος μεταφέρθηκε σε ένα σωλήνα 1.5 ml και προστέθηκαν 400 μl buffer C0, το οποίο είχε προθερμανθεί για 10 min στους 45 °C, καθώς και 10 μl RNase A. Το μίγμα αναμίχθηκε με τη βοήθεια vortex, οδηγήθηκε προς θέρμανση για 30 min στους 60 °C και ακολούθως φυγοκεντρήθηκε για 5 min στις 13200 rpm προκειμένου να κατακαθίσει το ίζημα. Από το υπερκείμενο, 300 μl μεταφέρθηκαν σε νέο σωλήνα όγκου 1.5 ml και προστέθηκαν 300 μl buffer C4 και 200 μl αιθανόλη. Το μίγμα ανακινήθηκε αργά 2-4 φορές και μεταφέρθηκε σε μία στήλη NucleoSpin Plant η οποία ήταν τοποθετημένη μέσα σε σωλήνα συλλογής. Το μίγμα φυγοκεντρήθηκε για 1 min στις 13200 rpm και το έκλουμα απομακρύνθηκε. Ακολούθησε πλύσιμο της στήλης NucleoSpin Plant με 400 μl buffer CW, φυγοκέντρηση για 1 min στις 13200 rpm και το έκλουμα απομακρύνθηκε ξανά. Ακολούθησε δεύτερο πλύσιμο της μεμβράνης με την προσθήκη 700 μl buffer C5 στη στήλη NucleoSpin Plant, φυγοκέντρηση για 1 min στις 13200 rpm και απόρριψη του εκλούματος. Στη συνέχεια προστέθηκαν 200 μl buffer C5 στη στήλη NucleoSpin Plant, ακολούθησε φυγοκέντρηση για 2 min στις 13200 rpm προκειμένου να απομακρυνθούν υπολείμματα από το buffer C5 και να ξηραθεί το υλικό της στήλης. Τελικά, το DNA που είχε κατακρατηθεί στο υλικό της στήλης παραλήφθηκε με 100 μl buffer CE, το οποίο είχε προθερμανθεί στους 70 °C. Η στήλη διατηρήθηκε για 5 min σε θερμοκρασία δωματίου και ακολούθησε φυγοκέντρηση για 1 min στις 13200 rpm. Το DNA που παραλήφθηκε αποθηκεύτηκε στους -80 °C μέχρι να χρησιμοποιηθεί περαιτέρω.

2.5.3. PCR δειγμάτων DNA από ρίζες φυτών πιπεριάς

Το DNA από τα δείγματα ριζών των διαφόρων μεταχειρίσεων χρησιμοποιήθηκε ως μήτρα για την ενίσχυση συντηρημένων περιοχών του γονιδιώματος των ΘΜ μυκήτων μέσω της μεθόδου της PCR. Για το σκοπό αυτό, δοκιμάστηκαν τα ζεύγη των εκκινητών AML1 και AML2 (Lee et al, 2008) και AM1 (Helgason et al, 1998) και NS31 (Simon et al., 1992). Τα συγκεκριμένα ζεύγη εκκινητών αποτελούν τα πιο ευρέως χρησιμοποιούμενα ζεύγη εκκινητών για ΘΜ μύκητες και μπορούν να ενισχύσουν τμήμα του 18S rRNA γονιδίου μυκορριζικών μυκήτων που ανήκουν στις πιο ευρέως απαντούμενες οικογένειες του φύλου Glomeromycota.

Σειρά δοκιμών με επιλεγμένα δείγματα DNA ριζών, εκκινητών και συνθηκών θερμοκυκλοποίησης έδειξαν ότι η χρήση του ζεύγους εκκινητών AML1-AML2 έδωσε συστηματικά τα καλύτερα αποτελέσματα και χρησιμοποιήθηκε περαιτέρω. Αντίθετα, δοκιμές με το ζεύγος εκκινητών NS31 – AM1 δεν παρουσίασαν υψηλή αποτελεσματικότητα για όλα τα δείγματα και οδήγησαν σε ενίσχυση και αλληλουχιών μη-μυκορριζικών. Το φαινόμενο αυτό έχει αναφερθεί και από άλλους ερευνητές στο παρελθόν ((Ma et al., 2005; Liang et al., 2008). Οι αναλογίες των υλικών στην αντίδραση PCR με μήτρα το DNA από τις ρίζες των φυτών πιπεριάς και το ζεύγος εκκινητών AML1-AML2 περιγράφονται στον παρακάτω πίνακα (Πιν. 2):

Αντιδραστήρια	Όγκος (μl)
Buffer	2 μl
dNTP's	0.5 μl
Primer AML1 (5'-ATC AAC TTT CGA TGG TAG GAT AGA-3')	1 μl
Primer AML2 (5'-GAA CCC AAA CAC TTT GGT TTC C-3')	1 μl
Πολυμεράση	1 μl
BSA	1 μl
Νερό	10.5 μl
DNA	3 μl
Συνολικός όγκος	20 μl

Πιν. 2 Χρησιμοποιούμενα αντιδραστήρια και ποσότητες αυτών κατά την εφαρμογή PCR με εκκινητές τους AML1 και AML2.

Οι συνθήκες της PCR ήταν οι εξής (Πιν. 3):

Αρχική αποδιάταξη	94 °C	3 min	
Αποδιάταξη	94 °C	1 min	X 30 κύκλους
Υβριδοποίηση	50 °C	1 min	
Επιμήκυνση	72 °C	1 min	
Τελική επιμήκυνση	72 °C	10 min	

Πίν. 3 Πρόγραμμα θερμοκυκλοποίησης PCR με τους εκκινητές AML1-AML2.

Από τα προϊόντα της PCR, 10 µl DNA αναμίχθηκαν σε 2 µl loading buffer, φορτώθηκαν σε πηκτή αгарόζης 1.2% (1.2 gr αгарόζης σε 100 ml TAE 1%, με 2.5 µl βρωμιούχου αιθιδίου 1%), ηλεκτροφορήθηκαν στα 100 Volt και ακολούθησε παρατήρηση της πηκτής σε UV.

Το προϊόν PCR που παραλήφθηκε με τους εκκινητές AML1 και AML2 χρησιμοποιήθηκε ως μήτρα για PCR εσωτερικής ένθεσης με την χρήση εσωτερικών εκκινητών NS31 + GC (Kowalchuck et al, 2002) και Glo1 (Cornejo et al, 2004), ώστε να παραληφθεί προϊόν (300 bp) κατάλληλου μεγέθους για ανάλυση με την μέθοδο αποτύπωσης DGGE. Ο εκκινητής NS31 + GC κατείχε στο 5' άκρο του αλληλουχία 40 νουκλεοτιδίων πλούσια σε G και C, ώστε να αποφευχθεί η πλήρης αποδιάταξη των προϊόντων κατά την ηλεκτροφόρηση σε αυξανόμενη βαθμίδωση αποδιατακτικών ουσιών. Στη PCR εσωτερικής ένθεσης χρησιμοποιήθηκαν τα παρακάτω αντιδραστήρια και οι αναλογίες αυτών (Πιν. 4):

Αντιδραστήρια	Όγκος (µl)
Buffer	5 µl
dNTP's	1 µl
Primer NS31+GC (5'-CGC CCG GGG CGC GCC CCG GGC GGG GCG GGG GCA CGG GGG TTG GAG GGC AAG TCT GGT GCC-3')	1 µl
Primer Glo1 (5'-GCC TGC TTT AAA CAC TCT A-3')	1 µl
Πολυμεράση	1 µl
Νερό	40 µl
DNA	1 µl
Συνολικός όγκος	50 µl

Πιν. 4 Χρησιμοποιούμενα αντιδραστήρια και ποσότητες αυτών κατά την εφαρμογή PCR εσωτερικής ένθεσης με εκκινητές τους NS31 + GC και Glo1.

Οι συνθήκες της PCR ήταν οι εξής (Πιν. 5):

95 °C	5 min	
94 °C	45 sec	X 35 κύκλους
52 °C	45 sec	
72 °C	1 min	
72 °C	10 min	

Πιν. 5 Πρόγραμμα θερμοκυκλοποίησης PCR εσωτερικής ένθεσης με τους εκκινητές NS31+GC και Glo1.

Από τα προϊόντα της PCR εσωτερικής ένθεσης, 10 µl DNA αναμίχθηκαν με 2 µl loading buffer, φορτώθηκαν σε πηκτή αραρόζης 1.2% (1.2 gr αραρόζης σε 100 ml TAE 1%, με 2.5 µl βρωμιούχου αιθιδίου 1%), ηλεκτροφορήθηκαν στα 100 Volt και παρατηρήθηκαν σε UV.

2.5.4. Ηλεκτροφόρηση σε πηκτή με βαθμίδωση αποδιατακτικών ουσιών

Η μέθοδος DGGE χρησιμοποιήθηκε για το διαχωρισμό των προϊόντων που προέκυψαν από την PCR εσωτερικής ένθεσης. Χρησιμοποιήθηκε πηκτή πολυακρυλαμίδης 8% (w/v) με βαθμίδωση αποδιατακτικών ουσιών που κυμάνθηκε από 38 μέχρι 50%. Τα υλικά που χρησιμοποιήθηκαν κατά την ηλεκτροφόρηση των προϊόντων της PCR εσωτερικής ένθεσης ήταν τα παρακάτω:

1. Πλήρες σύστημα DGGE-INGENYphorU-2x2 (Εικ. 14)
2. Αντλία ανάμειξης διαλυμάτων αποδιατακτικών ουσιών
3. Γράσο σιλικόνης
4. TEMED (N,N,N',N' – tetramethylenediamine)
5. 10% Ammonium Persulphate Solution (APS, 100mg σε 1ml ddH₂O)
6. Διαλύματα 0% και 100% αποδιατακτικών ουσιών.



Εικ. 14 INGENYphorU-2x2 σύστημα.

Για την παρασκευή των διαλυμάτων αποδιατακτικών ουσιών 0% και 100% χρησιμοποιήθηκαν οι παρακάτω αναλογίες υλικών (Πιν. 6):

Υλικά	0%	100%
Ακρυλαμίδη (Acrylamide-Bisacrylamide 40% solution 37.5:1)	20 ml	20 ml
Φορμαμίδη (Deionized formamide)	-	40 ml
Ουρία	-	42 gr
50X TAE	2 ml	2 ml
Tris base 242g/L		
Glacial acetic acid 57.1ml/L		
0.5M EDTA (pH 8) 100ml/L		
	στα 100 ml	στα 100 ml

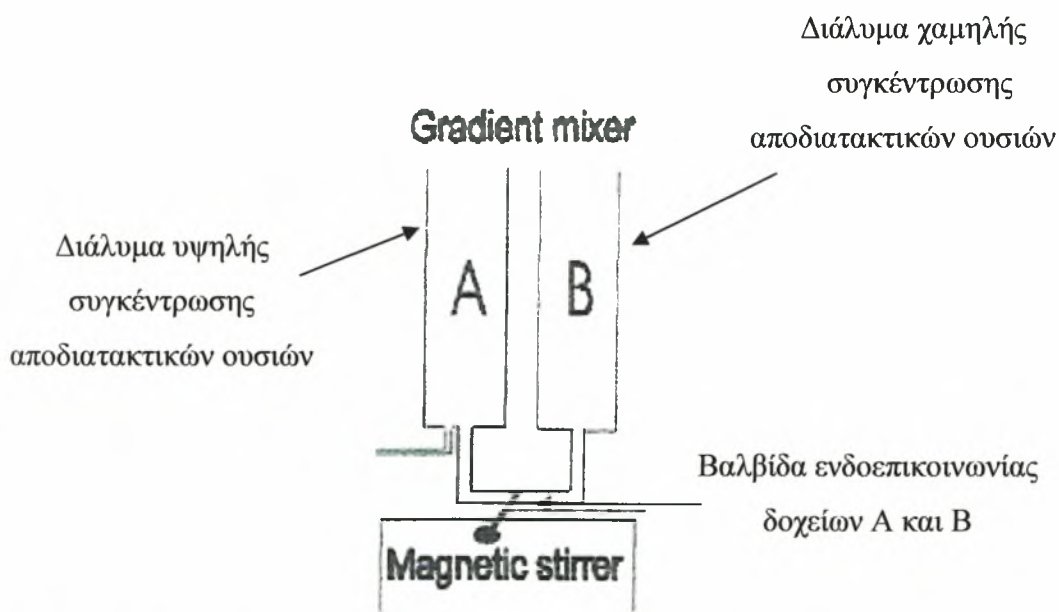
Πιν. 6 Υλικά και αναλογίες των αντιδραστηρίων που χρησιμοποιούνται για την παρασκευή των διαλυμάτων αποδιατακτικών ουσιών 0% και 100%.

Τα δύο διαλύματα τοποθετήθηκαν σε δοχεία Duran των 100 ml, τα οποία καλύφθηκαν με αλουμινόχαρτο διότι είναι φωτοευαίσθητα. Μετά την παρασκευή των διαλυμάτων των αποδιατακτικών ουσιών 0% και 100% έγινε ανάμιξή τους σε κατάλληλες αναλογίες για προετοιμασία διαλυμάτων με υψηλή και χαμηλή συγκέντρωση αποδιατακτικών ουσιών στο επιθυμητό εύρος (Πιν. 7):

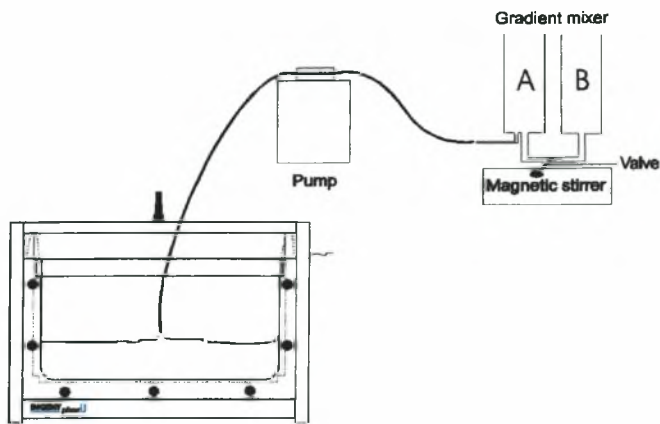
Συγκέντρωση αποδιατακτικών ουσιών	100 % (ml)	0 % (ml)
38%	19	31
50%	25	25

Πίν. 7 Αναλογία όγκων των διαλυμάτων 0 και 100% αποδιατακτικών που πρέπει να αναμειχθούν για να πάρουμε διαλύματα (50ml) με τις επιθυμητές συγκεντρώσεις αποδιατακτικών ουσιών.

Τα διαλύματα υψηλής (A) και χαμηλής (B) συγκέντρωσης αποδιατακτικών ουσιών τοποθετήθηκαν σε σωλήνες των 50 ml και σε πάγο, ενώ οι στήλες του συστήματος ανάμιξης ξεπλύθηκαν με απιονισμένο νερό. Ακολούθησε ανάμιξη των διαλυμάτων με τοποθέτηση του διαλύματος A στο αριστερό δοχείο του συστήματος ανάμιξης και το διάλυμα B στο δεξί δοχείο, ενώ η βαλβίδα ενδοεπικοινωνίας μεταξύ των δύο δοχείων ήταν κλειστή (Εικ. 15). Τοποθετήθηκαν μαγνητάκια σε κάθε δοχείο και ξεκίνησε βραδεία ανάδευση, προστέθηκαν 100 ml APS (10%) και 10 ml TEMED στα δύο διαλύματα, τα οποία βοηθούν την εκκίνηση του πολυμερισμού της ακρυλαμίδης σε πολυακρυλαμίδα. Ακολούθως, ανοίχτηκε ταυτόχρονα η αντλία και η βαλβίδα επικοινωνίας μεταξύ των δύο δοχείων και το διάλυμα άρχισε να φτάνει μέσω του σωλήνα της αντλίας στο εσωτερικό μεταξύ των δύο γυάλινων πλακών (Εικ. 16).



Εικ. 15 Σύστημα ανάμιξης διαλυμάτων αποδιατακτικών ουσιών.



Εικ. 16 Παρασκευή της πηκτής με βαθμίδωση αποδιατακτικών ουσιών.

Όταν το επίπεδο της ακρυλαμίδης εντός των σάντουιτς ηλεκτροφόρησης έφτασε λίγο χαμηλότερα από τις «χτένες» σχηματισμού των πηγαδιών σταμάτησε η ροή ακρυλαμίδης και αφέθηκε η πηκτή να πολυμεριστεί για περίπου 30 min. Ακολούθως, προετοιμάστηκαν 4 ml διαλύματος 0% στα οποία προστέθηκαν 40 μl APS και 4 μl TEMED ώστε να ξεκινήσει ο πολυμερισμός της ακρυλαμίδης. Το διάλυμα αυτό με τη βοήθεια πιπέτας προστέθηκε στην κορυφή κάθε πηκτής ώστε να καλυφθούν τα χτενάκια χωρίς να σχηματιστούν φυσαλίδες για τον σχηματισμό των πηγαδιών ηλεκτροφόρησης. Κατά τη διάρκεια αυτού του χρονικού διαστήματος ρυθμίστηκε η θέρμανση στην δεξαμενή του συστήματος με το ρυθμιστικό διάλυμα 1XTAE στους 60°C.

Αφού ολοκληρώθηκε ο σχηματισμός της πηκτής ακολούθησε η ηλεκτροφόρησή της. Για το σκοπό αυτό, μόλις ολοκληρώθηκε ο πολυμερισμός της ακρυλαμίδης, η κασέτα ηλεκτροφόρησης τοποθετήθηκε εντός της δεξαμενής ηλεκτροφόρησης που περιείχε 17 L 1XTAE. Με τη χρήση ρυγχών με μακριά και λεπτή διατομή φορτώθηκαν τα δείγματα (1 μl/γραμμή με 6μl loading buffer). Για τη δημιουργία marker για το DGGE αναμίχθηκαν 5 μl προϊόντων των PCR εσωτερικής ένθεσης πέντε κλώνων μυκορριζικών σπορίων που διαχωρίζονται στην πηκτή και 1 μl από κάθε κλώνο χωριστά, με 6μl loading buffer (1-2-3-4-5-MIX). Στη συνέχεια, συνδέθηκε η συσκευή INGENY με εξωτερική πηγή ισχύος και η ηλεκτροφόρηση πραγματοποιήθηκε στα 75V για 16 ώρες.

Όταν ολοκληρώθηκε η ηλεκτροφόρηση απομακρύνθηκε η κασέτα ηλεκτροφόρησης από την δεξαμενή και τοποθετήθηκε σε πλαστικό δίσκο. Ακολούθησε απομάκρυνση των πηκτών ακρυλαμίδης και χρώση με την μέθοδο του

νιτρικού αργύρου. Έτσι, η πηκτή ξεπλύθηκε ελαφρώς με νερό, τοποθετήθηκε σε πλαστικό δοχείο που περιείχε 500 ml Fixing Solution I (10% αιθανόλης, 0.5% οξικού οξέος) και ακολούθησε ανακίνηση σε περιστροφικό αναδευτήρα για 2 ώρες. Ακολούθως, απομακρύνθηκε το Fixing Solution I, ξεπλύθηκε η πηκτή με νερό και προστέθηκαν στο ίδιο δοχείο 500 ml Staining Solution (1 g AgNO₃ σε 1 L νερού). Ακολούθησε ανακίνηση σε περιστροφικό αναδευτήρα για 20 min, απομακρύνθηκε το Staining Solution και η πηκτή ξεπλύθηκε με νερό. Η πηκτή στην συνέχεια αναδευτήκε για διάστημα 20 min σε 500 ml Developing Solution (0.1 gr NaBH₄ σε 1 L NaOH 1.5% και 4 ml φορμαλδεϋδης).

Όταν ολοκληρώθηκε η χρώση της πηκτής και οι ζώνες ήταν ευδιάκριτες, απομακρύνθηκε το Developing Solution και η πηκτή μεταφέρθηκε σε 500 ml Fixing Solution II (0.75% Na₂CO₃). Ακολούθησε ανάδευση για 10 min και στη συνέχεια η πηκτή φωτογραφήθηκε με ψηφιακή φωτογραφική μηχανή σε φωτεινή τράπεζα.

Η μέθοδος DGGE επαναλήφθηκε για το τυχαίο δείγμα B κάθε μεταχείρισης (CAM:Μυκορριζικός μάρτυρας, SPIN:Spinosad, PYR:Πύρεθρο, TER:Τερπένια, AZA:Αζαντιραχτίνη), ανά δειγματοληψία (1:1ⁿ Δειγματοληψία, 2:2ⁿ Δειγματοληψία). Χρησιμοποιήθηκε πηκτή πολυακρυλαμίδης 8% (w/v) με βαθμίδωση αποδιατακτικών ουσιών που κυμάνθηκε από 35 μέχρι 45%. Η επιλογή αυτού του εύρους βαθμίδωσης αποδιατακτικών ουσιών έγινε ώστε να επιτευχθεί καλύτερος διαχωρισμός των ζωνών που περιέχονται στο μυκορριζικό εμβόλιο. Παράλληλα, στην πηκτή DGGE έγινε ηλεκτροφόρηση και των επιμέρους προϊόντων PCR εσωτερικής ένθεσης (1 μl) για κάθε μια από τις αμιγής καλλιέργειες ΘΜ μυκήτων που αποτέλεσαν το μικτό εμβόλιο. Για την παρασκευή των διαλυμάτων των αποδιατακτικών ουσιών, με υψηλή και χαμηλή συγκέντρωση αποδιατακτικών ουσιών στο επιθυμητό εύρος, έγινε ανάμιξη των αρχικών διαλυμάτων 0% και 100% σε κατάλληλες αναλογίες (Πιν. 8):

Συγκέντρωση αποδιατακτικών ουσιών	100 % (ml)	0 % (ml)
35%	8.75	16.25
45%	11.25	13.75

Πίν. 8 Αναλογία όγκων των διαλυμάτων 0 και 100% αποδιατακτικών που πρέπει να αναμειχθούν για να πάρουμε διαλύματα με τις επιθυμητές συγκεντρώσεις αποδιατακτικών ουσιών.

Μετά την εφαρμογή όλων των βημάτων της μεθόδου DGGE, πραγματοποιήθηκε φωτογράφιση της πηκτής με ψηφιακή φωτογραφική μηχανή σε φωτεινή τράπεζα.

2.6. Στατιστική ανάλυση αποτελεσμάτων

Για τη στατιστική ανάλυση των αποτελεσμάτων έγινε ανάλυση παραλλακτικότητας δύο επιπέδων (two-ways ANOVA). Η μέθοδος αυτή χρησιμοποιήθηκε για να εξεταστεί εάν η εφαρμογή των ΦΠ, ο χρόνος συγκομιδής και οι αλληλεπιδράσεις αυτών των δύο παραγόντων προκάλεσαν σημαντικές μεταβολές στον μυκορριζικό αποικισμό των ριζών καθώς και στη λειτουργία των μυκορριζικών πληθυσμών, όπως αυτή εκφράζεται διαμέσου της φυτικής ανάπτυξης. Οι συγκρίσεις των μέσων έγιναν με χρήση της μεθόδου Tukey-Kramer με επίπεδο σημαντικότητας $\alpha=0.05$.

3. ΑΠΟΤΕΛΕΣΜΑΤΑ

3.1. Ανάπτυξη των φυτών

Τα ανεπεξέργαστα αποτελέσματα των μετρήσεων παρατίθενται στο παράρτημα της παρούσας εργασίας (Πιν. 11-19), ενώ από τη στατιστική τους ανάλυση προέκυψαν τα παρακάτω αποτελέσματα (Πιν. 9-10):

Δειγματοληψίες Α και Β						
	Ύψος φυτών	Ξηρό βάρος ριζών	Ξηρό βάρος βλαστών	ΞΒ Ριζών/ ΞΒ Βλαστών	Νωπό βάρος βλαστών	Ποσοστό αποικισμού
Ημέρες	<.0001	<.0001	<.0001	<.0001	<.0001	<.0001
Φυτοπροστατευτικό Προϊόν	0,010	0,005	<.0001	0,224	0,001	<.0001
Αλληλεπίδραση (Ημέρες Χ ΦΠ)	0,031	0,186	<.0001	0,221	0,009	<.0001

Πιν. 9 Ανάλυση παραλλακτικότητας δύο επιπέδων για το σύνολο των δεδομένων ανά μετρούμενο χαρακτηριστικό. Οι αριθμοί είναι τιμές πιθανοτήτων (P).

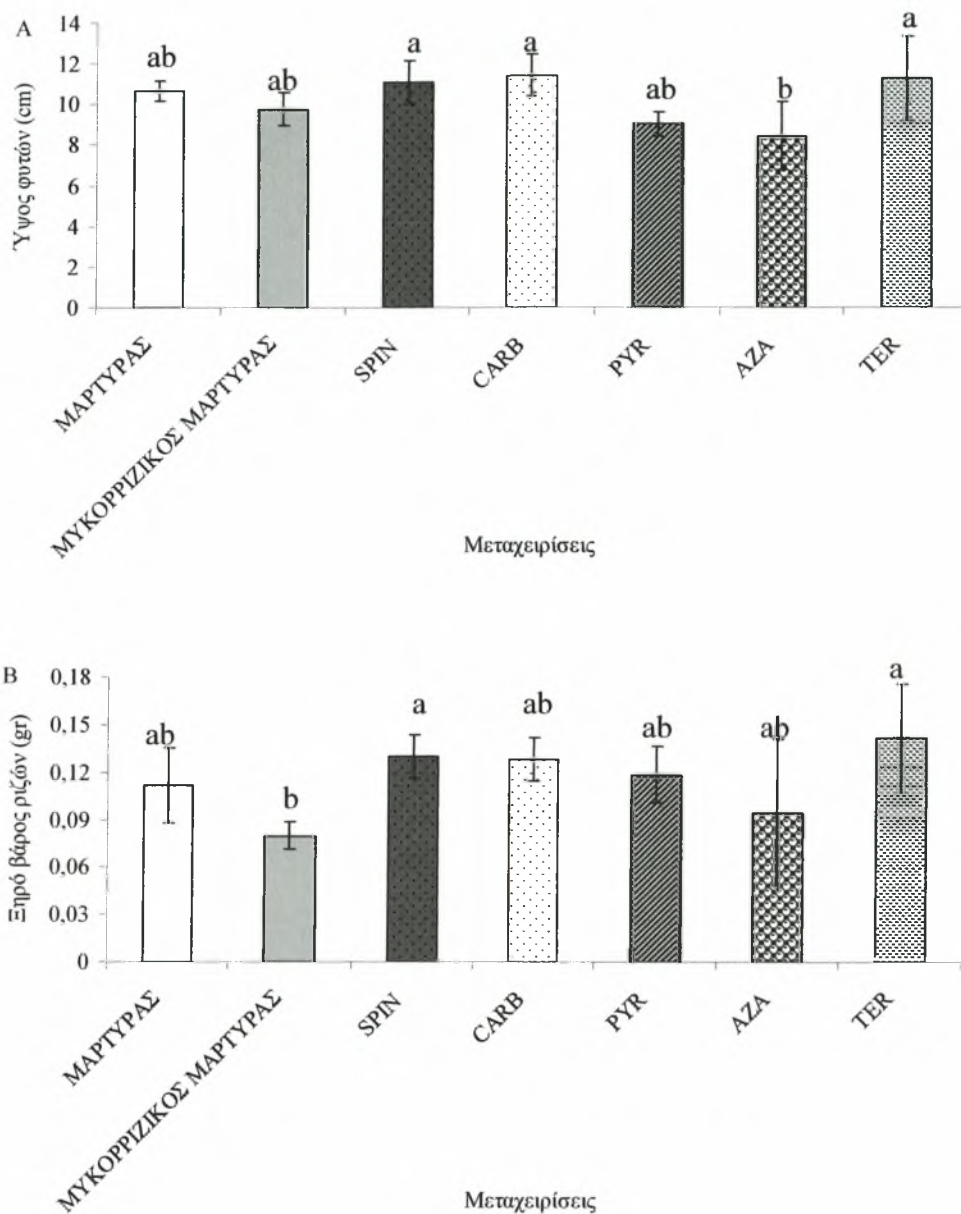
	Ύψος φυτών	Ξηρό βάρος ριζών	Ξηρό βάρος βλαστών	ΞΒ Ριζών/ ΞΒ Βλαστών	Νωπό βάρος βλαστών	Ποσοστό αποικισμού
Α δειγματοληψία (20 ημέρες)	0,027	0,009	0,005	0,242	0,005	<.0001
Β δειγματοληψία (40 ημέρες)	0,533	0,051	<0,001	0,013	0,003	<.0001

Πιν. 10 Ανάλυση παραλλακτικότητας δύο επιπέδων για τα δεδομένα των μετρούμενων χαρακτηριστικών ανά δειγματοληψία φυτών. Οι αριθμοί είναι τιμές πιθανοτήτων (P).

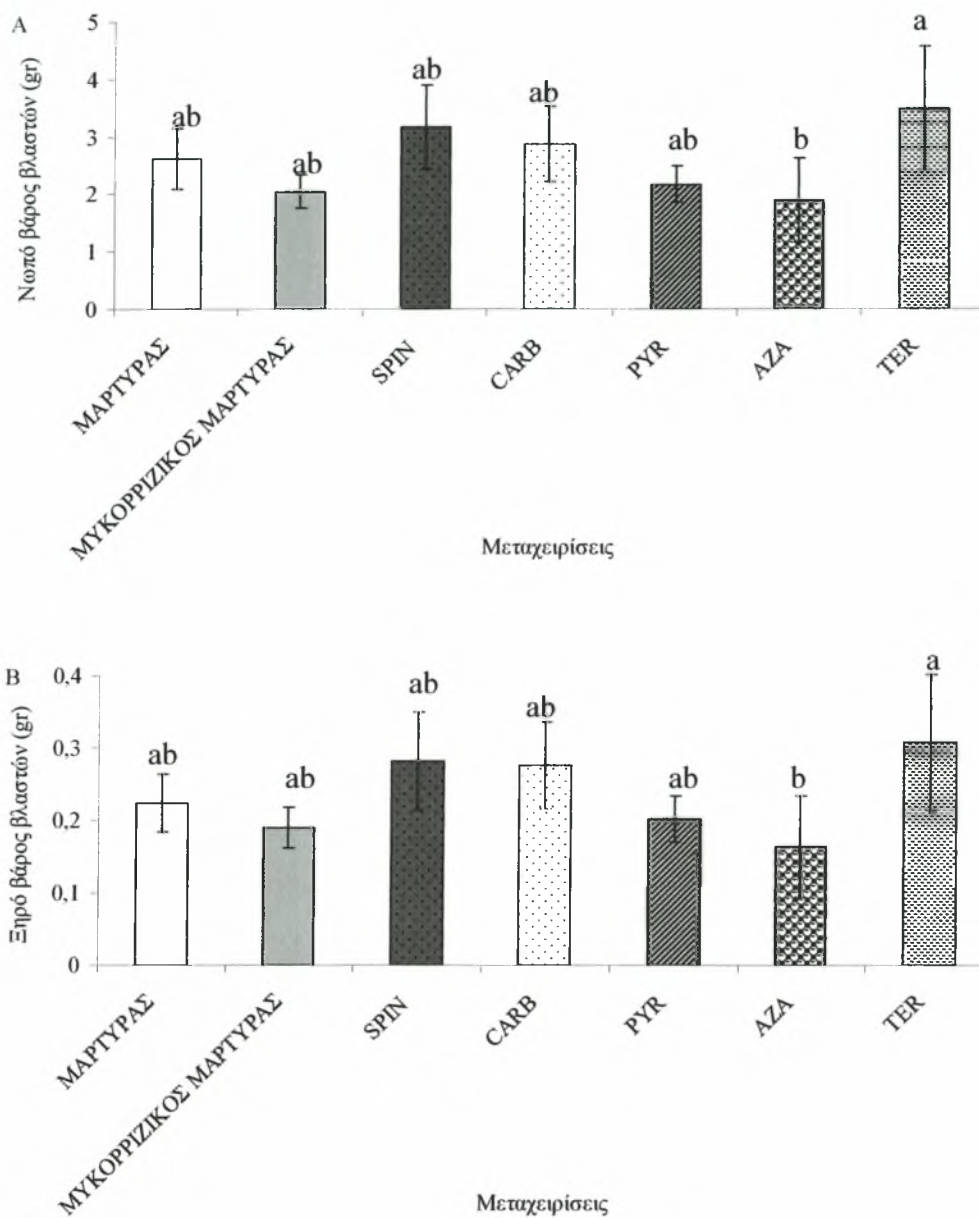
Η ανάλυση παραλλακτικότητας (Πιν. 9) έδειξε ότι για τα όλα τα μετρούμενα χαρακτηριστικά υπάρχουν στατιστικά σημαντικές διαφορές ανάμεσα στους δύο χρόνους δειγματοληψίας. Επίσης, για όλα τα μετρούμενα χαρακτηριστικά, εκτός από τον λόγο ξηρού βάρους ρίζας προς βλαστό, υπάρχουν στατιστικά σημαντικές διαφορές μεταξύ των ΦΠ που εφαρμόστηκαν.

Όταν τα δεδομένα αναλύθηκαν για κάθε δειγματοληψία ξεχωριστά, βρέθηκε ότι οι εφαρμογές των διαφόρων ΦΠ δεν είχαν επίδραση στο λόγο ξηρού βάρους ριζών - βλαστών στις 20 ημέρες και στο ύψος φυτών και ξηρό βάρος ριζών 40 ημέρες μετά την εφαρμογή τους (Πιν. 10).

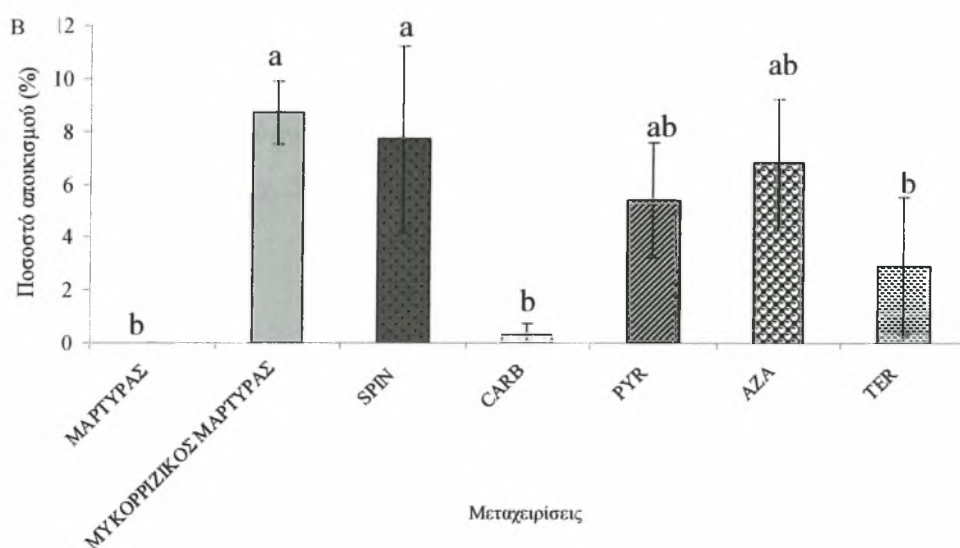
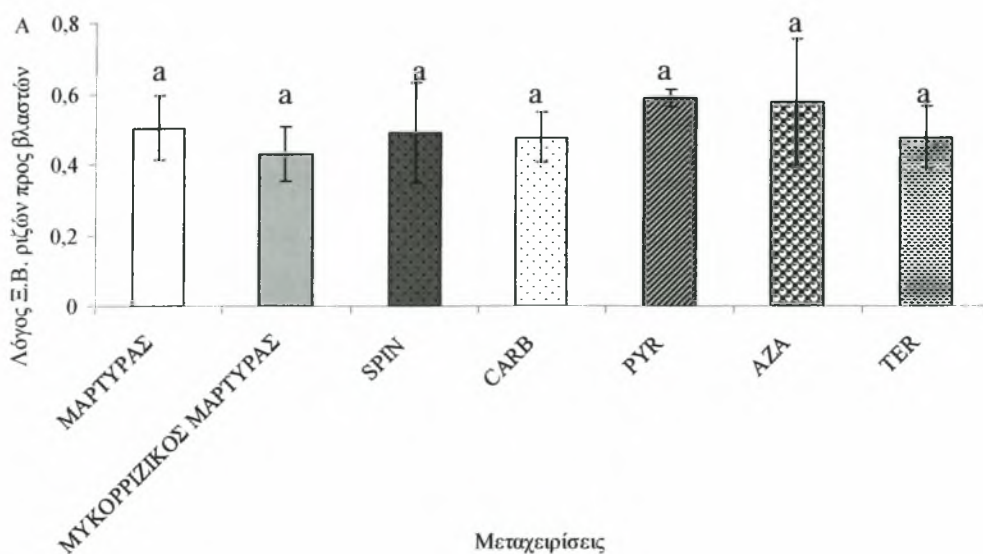
Τα δεδομένα που προέκυψαν από μετρήσεις στην ανάπτυξη των φυτών που συγκομίστηκαν στην πρώτη δειγματοληψία παρουσιάζονται στα παρακάτω διαγράμματα (Σχ. 2-4):



Σχ. 2 Επίδραση των ΦΠ (Α) στο ύψος και (Β) στο ξηρό βάρος των ριζών φυτών πιπεριάς που δέχτηκαν τις παρακάτω μεταχειρίσεις: Μάρτυρα, Μυκορριζικό Μάρτυρα, SPIN: Spinosad, CARB: Carbendazim, PYR: Πύρεθρο, AZA: Αζαντιραχτίνη, TER: Τερπένια, 20 ημέρες μετά την μεταφύτευση τους (n=5, ράβδοι που συνοδεύονται από διαφορετικά γράμματα παρουσιάζουν στατιστικά σημαντικές διαφορές σε επίπεδο σημαντικότητας 5%, οι μπάρες δείχνουν την τυπική απόκλιση του μέσου όρου).



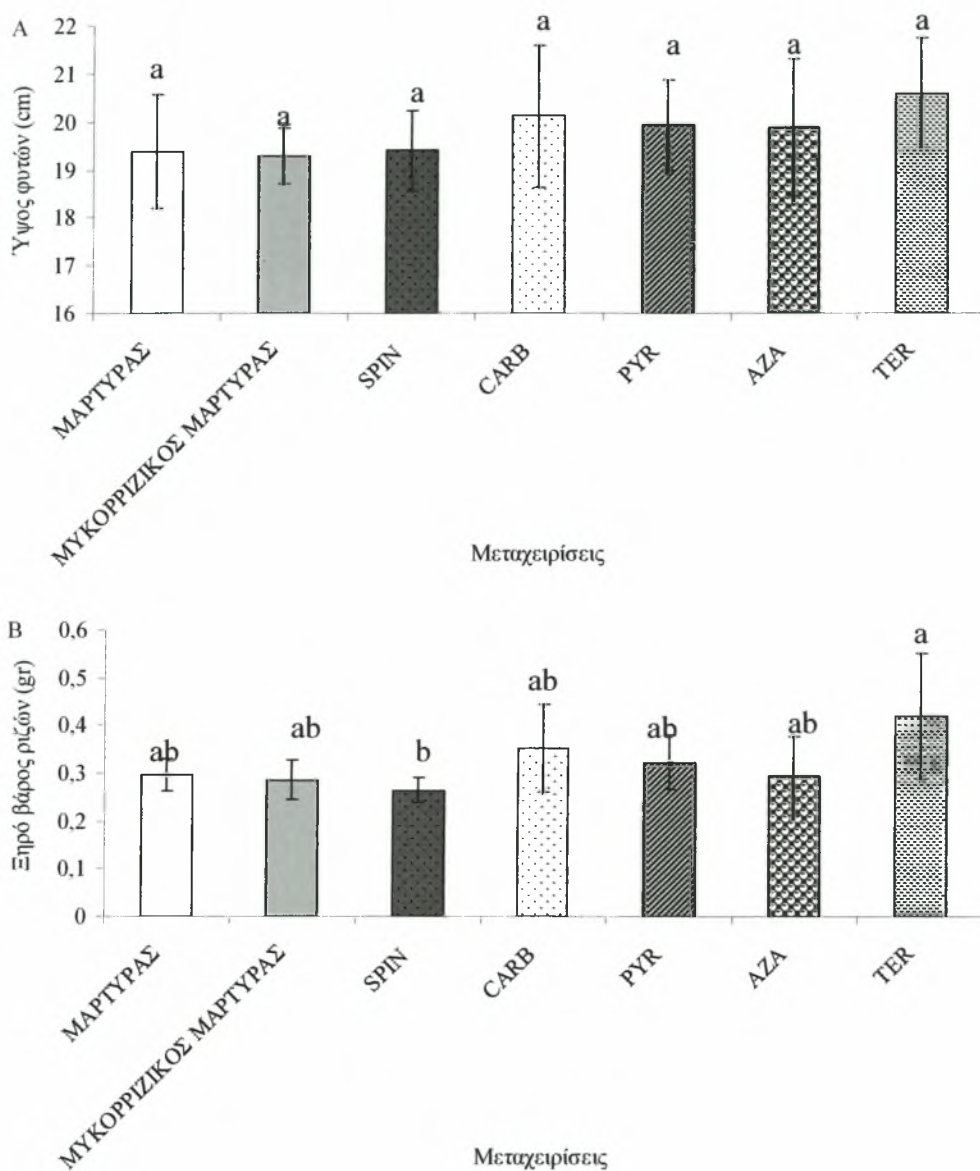
Σχ. 3 Επίδραση των ΦΠ (Α) στο νωπό και (Β) στο ξηρό βάρος των βλαστών φυτών πιπεριάς που δέχτηκαν τις παρακάτω μεταχειρίσεις: Μάρτυρα, Μυκορριζικό Μάρτυρα, SPIN: Spinosad, CARB: Carbendazim, PYR: Πύρεθρο, AZA: Αζαντιραχτίνη, TER: Τερπένια, 20 ημέρες μετά την μεταφύτευσή τους (n=5, ράβδοι που συνοδεύονται από διαφορετικά γράμματα παρουσιάζουν στατιστικά σημαντικές διαφορές σε επίπεδο σημαντικότητας 5%, οι μπάρες παρουσιάζουν την τυπική απόκλιση του μέσου όρου).



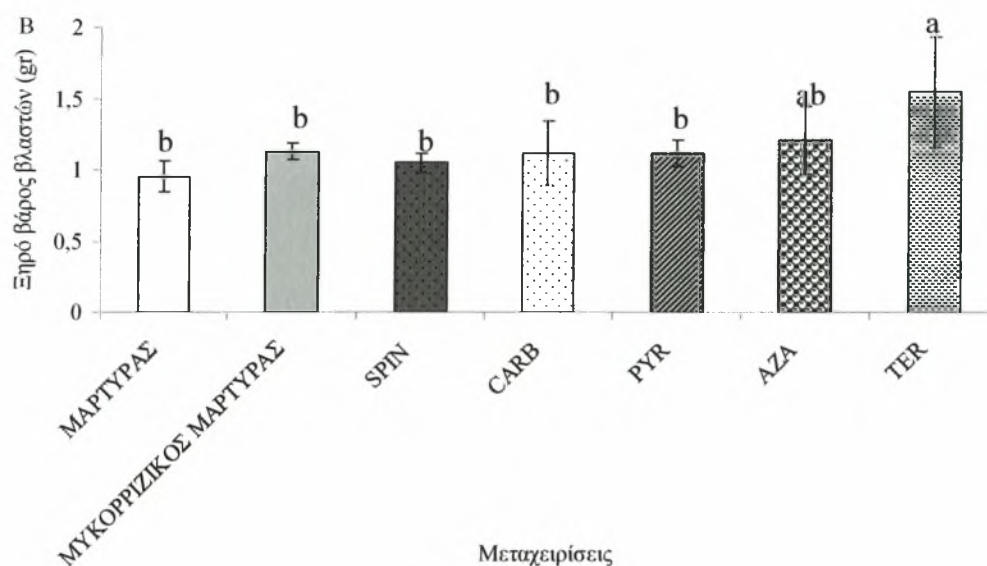
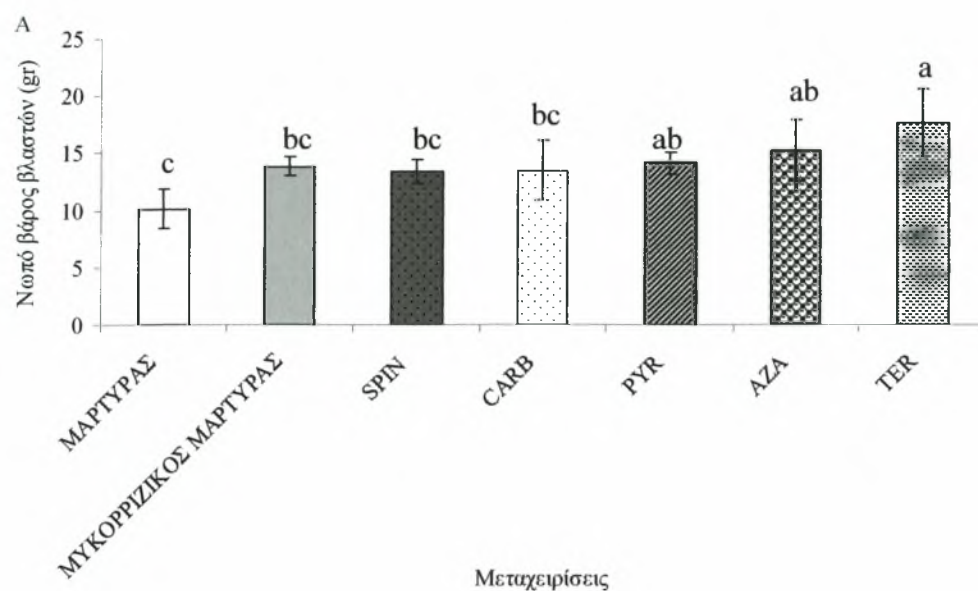
Σχ. 4 Επίδραση των ΦΠ (Α) στο λόγο του ξηρού βάρους των ριζών προς των βλαστών και (Β) στο ποσοστό αποικισμού των φυτών πιπεριάς που δέχτηκαν τις παρακάτω μεταχειρίσεις: Μάρτυρα, Μυκορριζικό Μάρτυρα, SPIN: Spinosad, CARB: Carbendazim, PYR: Πύρεθρο, AZA: Αζαντιραχτίνη, TER: Τερπένια, 20 ημέρες μετά τη μεταφύτευσή τους (n=5, ράβδοι που συνοδεύονται από διαφορετικά γράμματα παρουσιάζουν στατιστικά σημαντικές διαφορές σε επίπεδο σημαντικότητας 5%, οι μπάρες παρουσιάζουν την τυπική απόκλιση του μέσου όρου).

Κατά την πρώτη δειγματοληψία, τα φυτά όπου εφαρμόστηκε αζαντιραχτίνη παρουσίαζαν σημαντικά χαμηλότερο ύψος σε σχέση με φυτά που δέχτηκαν εφαρμογή carbendazim, spinosad και τερπενίων καθώς και χαμηλότερο νωπό και ξηρό βάρος βλαστών σε σχέση με τα φυτά που δέχτηκαν εφαρμογή τερπενίων, ενώ ανάμεσα στις υπόλοιπες μεταχειρίσεις δεν παρατηρήθηκαν άλλες σημαντικές διαφορές. Γενικά η ανάπτυξη των φυτών στα οποία εφαρμόστηκε αζαντιραχτίνη ήταν σχετικά περιορισμένη στις πρώτες 20 ημέρες, ενώ αντίθετα τα φυτά που δέχτηκαν εφαρμογή τερπενίων και spinosad είχαν μια τάση υψηλότερης ανάπτυξης. Από την άλλη μεριά, δεν αναπτύχθηκαν ΘΜ μύκητες στον μη μυκορριζικό μάρτυρα, ενώ και στα φυτά που δέχτηκαν την εφαρμογή του συνθετικού μυκητοκτόνου carbendazim τα επίπεδα αποικισμού ήταν σχεδόν μηδενικά. Τέλος, τα φυτά που δέχτηκαν εφαρμογή τερπενίων παρά την υψηλή ανάπτυξη παρουσίασαν σημαντικά χαμηλότερο μυκορριζικό αποικισμό σε σχέση με το μυκορριζικό μάρτυρα και τη μεταχείριση με spinosad.

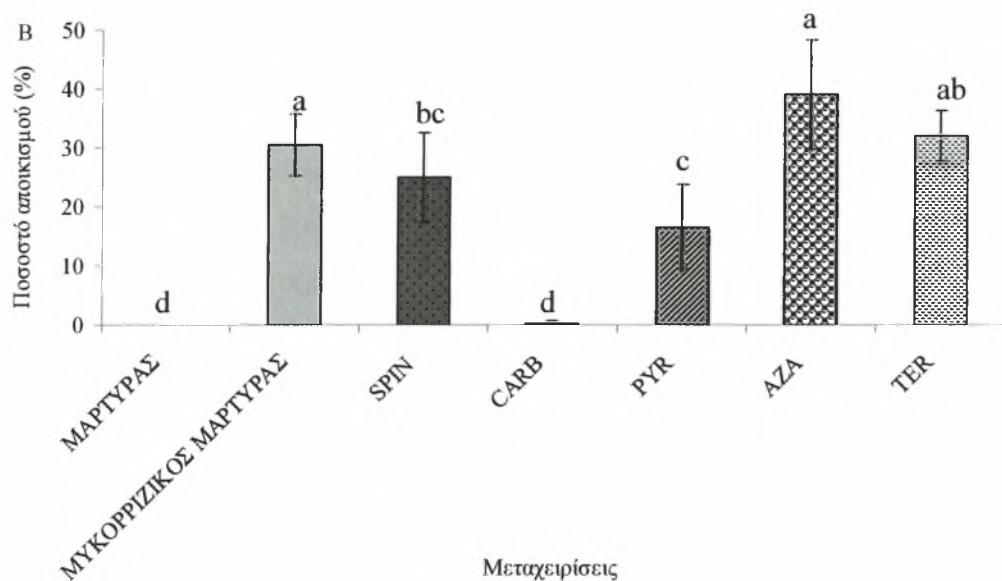
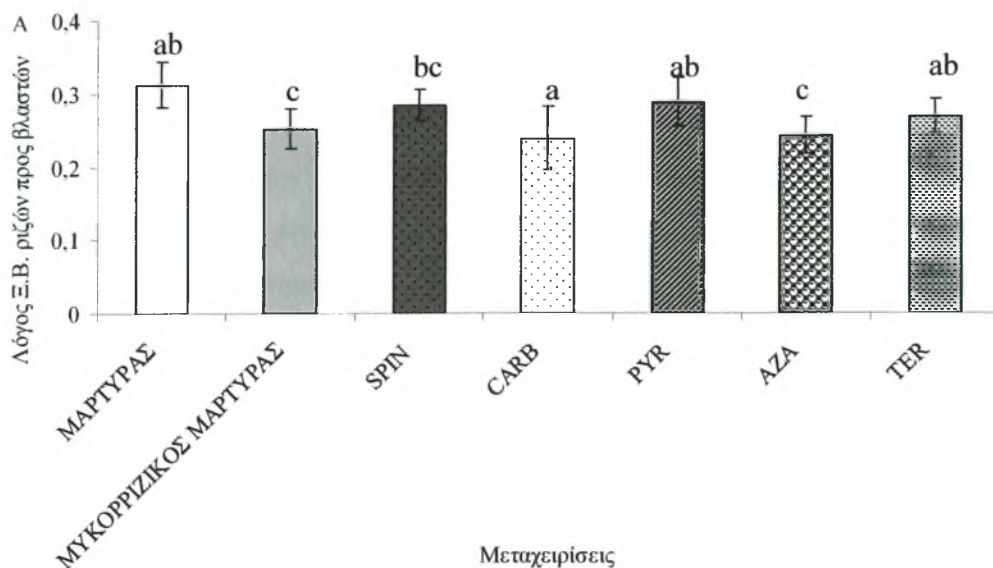
Τα δεδομένα που προέκυψαν από μετρήσεις στην ανάπτυξη των φυτών που συγκομίστηκαν στην δεύτερη και τελική δειγματοληψία παρουσιάζονται στα παρακάτω διαγράμματα (Σχ. 5-7):



Σχ. 5 Επίδραση των ΦΠ (A) στο ύψος και (B) στο ξηρό βάρος των ριζών φυτών πιπεριάς που δέχτηκαν τις παρακάτω μεταχειρίσεις: Μάρτυρα, Μυκορριζικό Μάρτυρα, SPIN: Spinosad, CARB: Carbendazim, PYR: Πύρεθρο, AZA: Αζαντραχτίνη, TER:Τερπένια, 40 ημέρες μετά τη μεταφύτευσή τους (n=5, ράβδοι που συνοδεύονται από διαφορετικά γράμματα παρουσιάζουν στατιστικά σημαντικές διαφορές σε επίπεδο σημαντικότητας 5%, οι μπάρες παρουσιάζουν την τυπική απόκλιση του μέσου όρου).



Σχ. 6 Επίδραση των ΦΠ (A) στο νωπό και (B) στο ξηρό βάρος των βλαστών φυτών πιπεριάς που δέχτηκαν τις παρακάτω μεταχειρίσεις: Μάρτυρα, Μυκορριζικό Μάρτυρα, SPIN: Spinosad, CARB: Carbendazim, PYR: Πύρεθρο, AZA: Αζαντιραχτίνη, TER: Τερπένια, 40 ημέρες μετά τη μεταφύτευσή τους (n=5, ράβδοι που συνοδεύονται από διαφορετικά γράμματα παρουσιάζουν στατιστικά σημαντικές διαφορές σε επίπεδο σημαντικότητας 5%, οι μπάρες παρουσιάζουν την τυπική απόκλιση του μέσου όρου).



Σχ. 7 Επίδραση των ΦΠ (Α) στο λόγο του ξηρού βάρους των ριζών προς των βλαστών και (Β) στο ποσοστό αποικισμού των ριζών φυτών πιπεριάς που δέχθηκαν τις παρακάτω μεταχειρίσεις: Μάρτυρα, Μυκορριζικό Μάρτυρα, SPIN: Spinosad, CARB: Carbendazim, PYR: Πύρεθρο, AZA: Αζαντιραχίνη, TER: Τερπένια, 40 ημέρες μετά τη μεταφύτευσή τους (n=5, ράβδοι που συνοδεύονται από διαφορετικά γράμματα παρουσιάζουν στατιστικά σημαντικές διαφορές σε επίπεδο σημαντικότητας 5%, οι μπάρες παρουσιάζουν την τυπική απόκλιση του μέσου όρου).

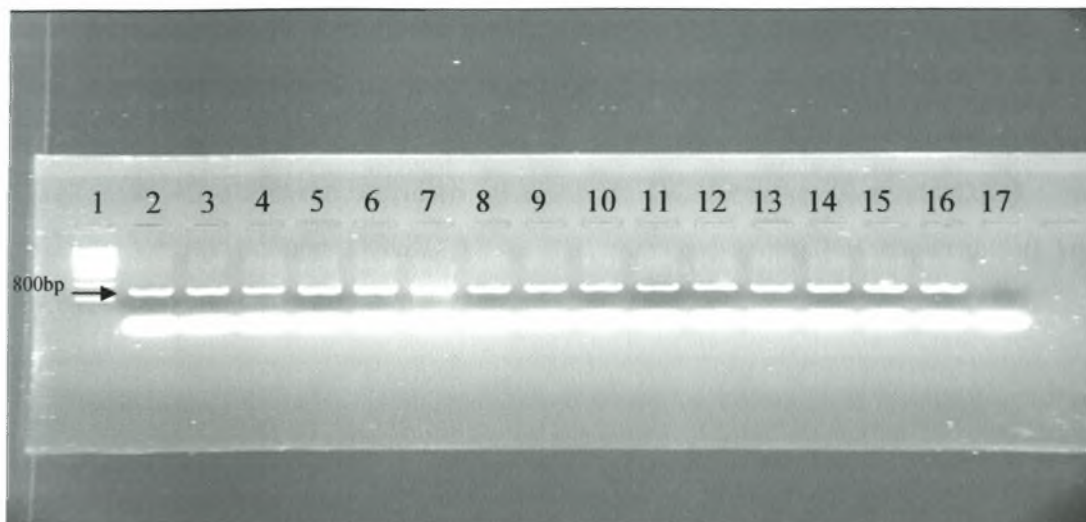
Από την ανάλυση των αποτελεσμάτων της δεύτερης δειγματοληψίας προέκυψε ότι το ύψος των φυτών σε όλες τις μεταχειρίσεις ήταν σχεδόν στο ίδιο επίπεδο, χωρίς να παρατηρούνται στατιστικά σημαντικές διαφορές. Τα φυτά που δέχθηκαν τερπένια παρουσίασαν τη μεγαλύτερη ανάπτυξη στο ριζικό τους σύστημα, ενώ αυτά που δέχθηκαν το spinosad τη μικρότερη, χωρίς όμως οι δύο αυτές μεταχειρίσεις να παρουσιάζουν στατιστικά σημαντικές διαφορές με το μυκορριζικό μάρτυρα. Ανάμεσα στις υπόλοιπες μεταχειρίσεις δεν παρατηρήθηκαν σημαντικές διαφορές. Επίσης, τα φυτά που δέχθηκαν την εφαρμογή τερπενίων παρουσίασαν και τη μεγαλύτερη ανάπτυξη στο υπέργειο τμήμα τους με τιμές νωπού και ξηρού βάρους βλαστού σημαντικά υψηλότερες από τις αντίστοιχες τιμές στο μυκορριζικό και μη-μυκορριζικό μάρτυρα. Τέλος, δεν παρατηρήθηκε αποικισμός από ΘΜ μύκητες στο μη μυκορριζικό μάρτυρα, ενώ και στα φυτά που δέχτηκαν εφαρμογή carbendazim ο αποικισμός ήταν σχεδόν μηδενικός. Αντίθετα, στα φυτά που δέχτηκαν εφαρμογή αζαντιραχτίνης ή τερπενίων το επίπεδο μυκορριζικού αποικισμού δεν διέφερε σημαντικά από το μυκορριζικό μάρτυρα, ενώ σημαντικά χαμηλότερα επίπεδα αποικισμού πάντα σε σχέση με το μυκορριζικό μάρτυρα καταγράφηκαν στα φυτά που δέχτηκαν εφαρμογή των εντομοκτόνων spinosad και πύρεθρου. Στα φυτά αυτά το επίπεδο αποικισμού ήταν 16%, σε σύγκριση με 30-40% αποικισμό που παρατηρήθηκε στις μεταχειρίσεις του μυκορριζικού μάρτυρα, αζαντιραχτίνης και τερπενίων.

Μεταξύ των δύο χρόνων δειγματοληψίας παρατηρήθηκε ότι το αρχικό στρες που προκλήθηκε στην ανάπτυξη των φυτών από την εφαρμογή της αζαντιραχτίνης ξεπεράστηκε, αφού το ύψος τους έφτασε στο επίπεδο των φυτών στις υπόλοιπες μεταχειρίσεις και ιδιαίτερα του μυκορριζικού μάρτυρα. Αντίθετα, η εφαρμογή τερπενίων οδήγησε σε σταθερά υψηλές τιμές σ' όλα τα μετρούμενα μορφολογικά χαρακτηριστικά τόσο του υπέργειου όσο και του υπόγειου τμήματος των φυτών. Μεταξύ των φυτών που δέχθηκαν spinosad, carbendazim και πύρεθρο δεν παρατηρήθηκαν σημαντικές διαφορές στα μετρούμενα χαρακτηριστικά. Γενικότερα, υπήρξε αναμενόμενη αύξηση του μυκορριζικού αποικισμού των ριζών με την πάροδο του χρόνου και είναι πιθανόν η αύξηση αυτή να συνεχιζόταν με παραπέρα ανάπτυξη των φυτών. Η επιλογή για συγκομιδή των φυτών στις 40 ημέρες έγινε με βάση την λογική ότι παραπέρα ανάπτυξη των φυτών στα φυτοδοχεία θα οδηγούσε σε καταπόνηση των φυτών λόγω περιορισμένου χώρου ανάπτυξης των ριζών τους.

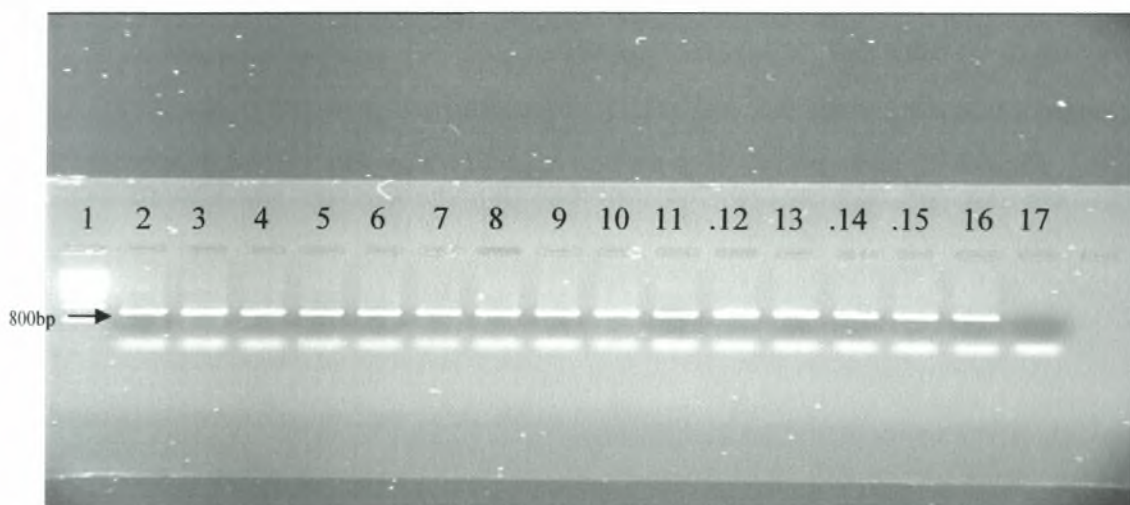
3.2 Χαρακτηρισμός της κοινότητας των ΘΜ μυκήτων στις ρίζες με την χρήση μοριακών μεθόδων

3.2.1 Αποτελέσματα PCR

Προκαταρκτικές δοκιμές έδειξαν ότι το ζεύγος εκκινητών AML1-AML2 παρουσίαζαν συστηματικά θετικά αποτελέσματα όταν σαν μήτρα χρησιμοποιήθηκε DNA από ρίζες μυκορριζικών φυτών. Αντίθετα, όπως ήταν αναμενόμενο δεν ελήφθη προϊόν στις περιπτώσεις που χρησιμοποιήθηκε ως μήτρα DNA από φυτά μη μυκορριζικού μάρτυρα και φυτά που δέχτηκαν εφαρμογή carbendazim. Κατά συνέπεια, ακολούθησε ενίσχυση της 18S rRNA περιοχής των μυκορριζικών μυκήτων που είχαν αποικίσει τις ρίζες των φυτών στις διάφορες μεταχειρίσεις. Έτσι, μετά την εφαρμογή PCR, την ηλεκτροφόρηση και παρατήρηση της πηκτής σε UV, το αποτέλεσμα ήταν θετικό (Εικ. 17-18).



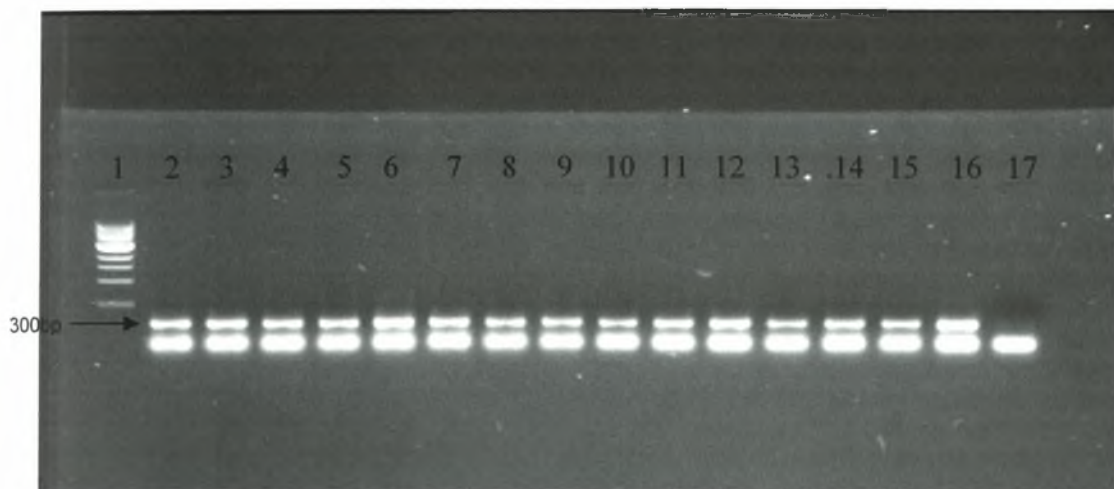
Εικ. 17 Ενδεικτική εικόνα ηλεκτροφόρησης σε πηκτή αγαρόζης 1.2% προϊόντων PCR με το ζεύγος εκκινητών AML1 και AML2 όλων των μεταχειρίσεων από την πρώτη δειγματοληψία (1:Ladder, 2-4:Μυκορριζικός Μάρτυρας, 5-7:Spinosad, 8-10:Πύρεθρο, 11-13:Αζαντιραχτίνη, 14-16:Τερπένια, 17:Blank).



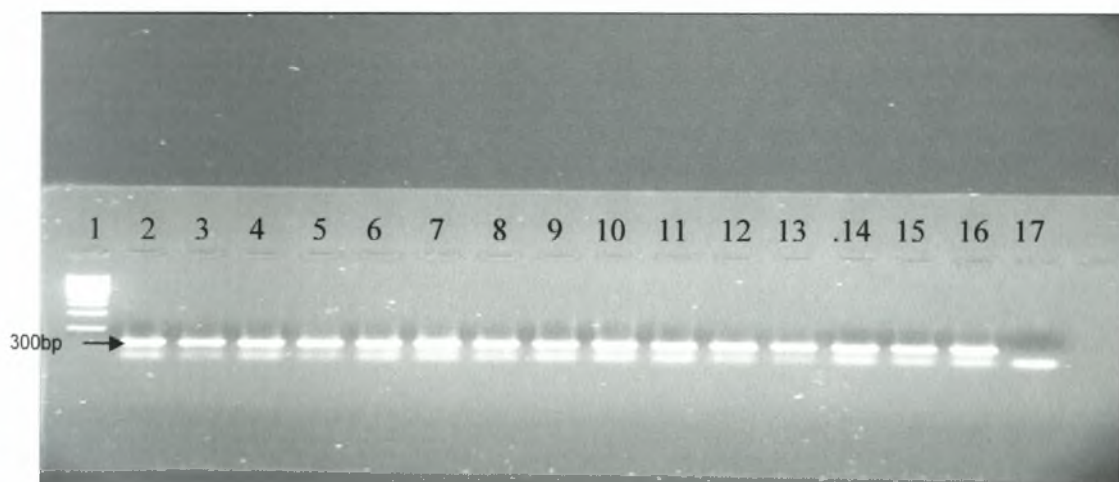
Εικ. 18 Ενδεικτική εικόνα ηλεκτροφόρησης σε πηκτή αγαρόζης 1.2% προϊόντων PCR με το ζεύγος εκκινητών AML1 και AML2 όλων των μεταχειρίσεων από τη δεύτερη δειγματοληψία (1:Ladder, 2-4:Μυκορριζικός Μάρτυρας, 5-7:Spinosad, 8-10:Πύρεθρο, 11-13:Αζαντιραχτίνη, 14-16:Τερπένια, 17:Blank).

3.2.2. Αποτελέσματα PCR εσωτερικής ένθεσης

Τα παραπάνω PCR προϊόντα που προέκυψαν χρησιμοποιήθηκαν ως μήτρα για PCR εσωτερικής ένθεσης με τους εκκινητές NS31+GC και Glo1. Το προϊόν που προέκυψε ήταν μεγέθους 300 bp, στο 5' άκρο του οποίου είχε προστεθεί μια αλληλουχία 40 ολιγονουκλεοτιδίων πλούσια σε GC ώστε να είναι κατάλληλο για ανάλυση με την μέθοδο DGGE. Μετά την ηλεκτροφόρηση και παρατήρηση της πηκτής σε UV, το αποτέλεσμα ήταν θετικό (Εικ. 19-20).



Εικ. 19 Ενδεικτική εικόνα ηλεκτροφόρησης σε πηκτή αγαρόζης 1.2% προϊόντων PCR εσωτερικής ένθεσης με τους εκκινητές NS31+GC και Glo 1, όλων των μεταχειρίσεων της πρώτης δειγματοληψίας (1:Ladder, 2-4:Μυκορριζικός Μάρτυρας, 5-7:Spinosad, 8-10:Πύρεθρο, 11-13:Αζαντιραχτίνη, 14-16:Τερπένια, 17:Blank).



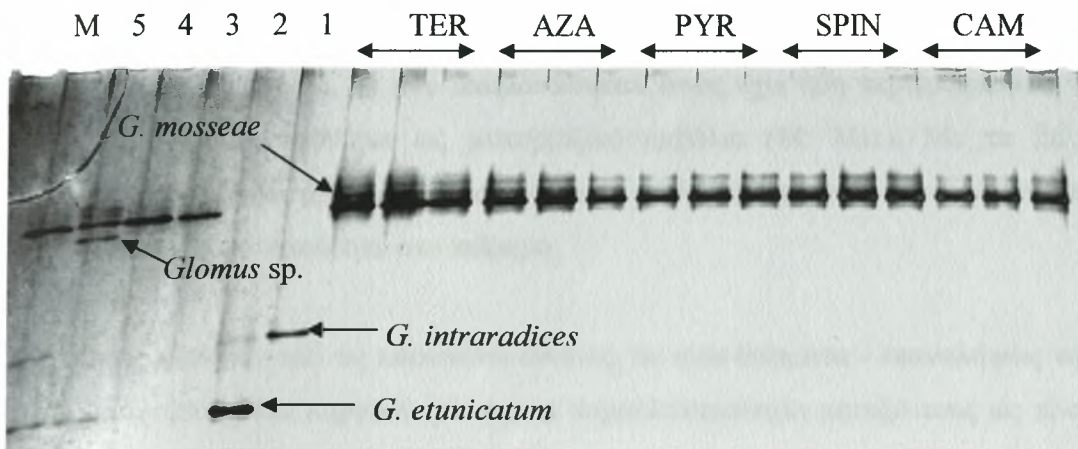
Εικ. 20 Ενδεικτική εικόνα ηλεκτροφόρησης σε πηκτή αγαρόζης 1.2% προϊόντων PCR εσωτερικής ένθεσης με τους εκκινητές NS31+GC και Glo 1, όλων των μεταχειρίσεων της δεύτερης δειγματοληψίας (1:Ladder, 2-4:Μυκορριζικός Μάρτυρας, 5-7:Spinosad, 8-10:Πύρεθρο, 11-13:Αζαντιραχτίνη, 14-16:Τερπένια, 17:Blank).

Η μοριακή ταυτοποίηση των αμιγών μυκορριζικών πληθυσμών που αναμίχθηκαν έδειξε ότι το μικό εμβόλιο ΘΜ μυκήτων που χρησιμοποιήθηκε αποτελούνταν από τέσσερις διαφορετικούς μύκητες (*G. mosseae*, *G. etunicatum*, *G. intraradices*, *Glomus sp.*), οι οποίοι ανήκουν όλοι στο γένος *Glomus* που αποτελεί και το πλέον συχνά απαντώμενο γένος σε καλλιεργούμενα και μη καλλιεργούμενα εδάφη. Περισσότερες λεπτομέρειες για την μοριακή ταυτοποίηση και την φυλογενετική των ΘΜ μυκήτων που χρησιμοποιήθηκαν ως εμβόλιο παρατίθενται στην μεταπτυχιακή εργασία του κ. Κωνσταντίνου Αντωνιάδη καθώς δεν αποτέλεσε στόχο της παρούσας εργασίας.

3.2.3 Αποτελέσματα DGGE

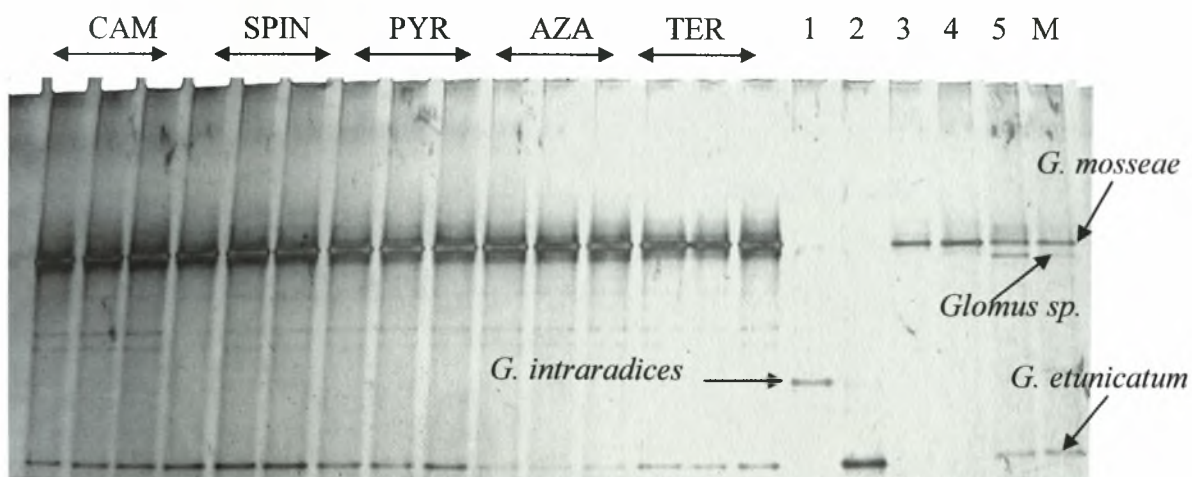
Τα προϊόντα από την PCR εσωτερικής ένθεσης χρησιμοποιήθηκαν για ανάλυση σε πηκτή πολυακρυλαμίδης με την μέθοδο DGGE. Οι πηκτές φωτογραφήθηκαν και τα αποτελέσματα παρουσιάζονται στις παρακάτω εικόνες (Εικ. 21-22):

Χρόνος 20 ημερών:



Εικ. 21 Εικόνα πηκτής DGGE σε βαθμίδωση αποδιατακτικών ουσιών 38-50% όπου αναλύθηκαν τα προϊόντα της PCR εσωτερικής ένθεσης των δειγμάτων της δειγματοληψίας 20 ημερών μετά τη μεταφύτευση των φυταρίων πιπεριάς που είχαν δεχτεί εφαρμογή τερπενίων (TER), αζαντιραχτίνης (AZA), πύρεθρου (PYR), spinosad (SPIN) και μυκορριζικού μάρτυρα (CAM). Ως marker χρησιμοποιήθηκαν προϊόντα PCR με του ίδιους εκκινητές από πέντε διαφορετικές αμιγείς καλλιέργειες ΘΜ μυκήτων (1, 2, 3, 4, 5) που απομονώθηκαν όπως έχει ήδη περιγραφεί και το μίγμα τους χρησιμοποιήθηκε ως μυκορριζικό εμβόλιο (M: Mix). Με τα βέλη παρουσιάζονται οι ζώνες που αντιστοιχούν στους ΘΜ μύκητες που περιείχονταν στο αρχικό εμβόλιο που χρησιμοποιήθηκε στο πείραμα.

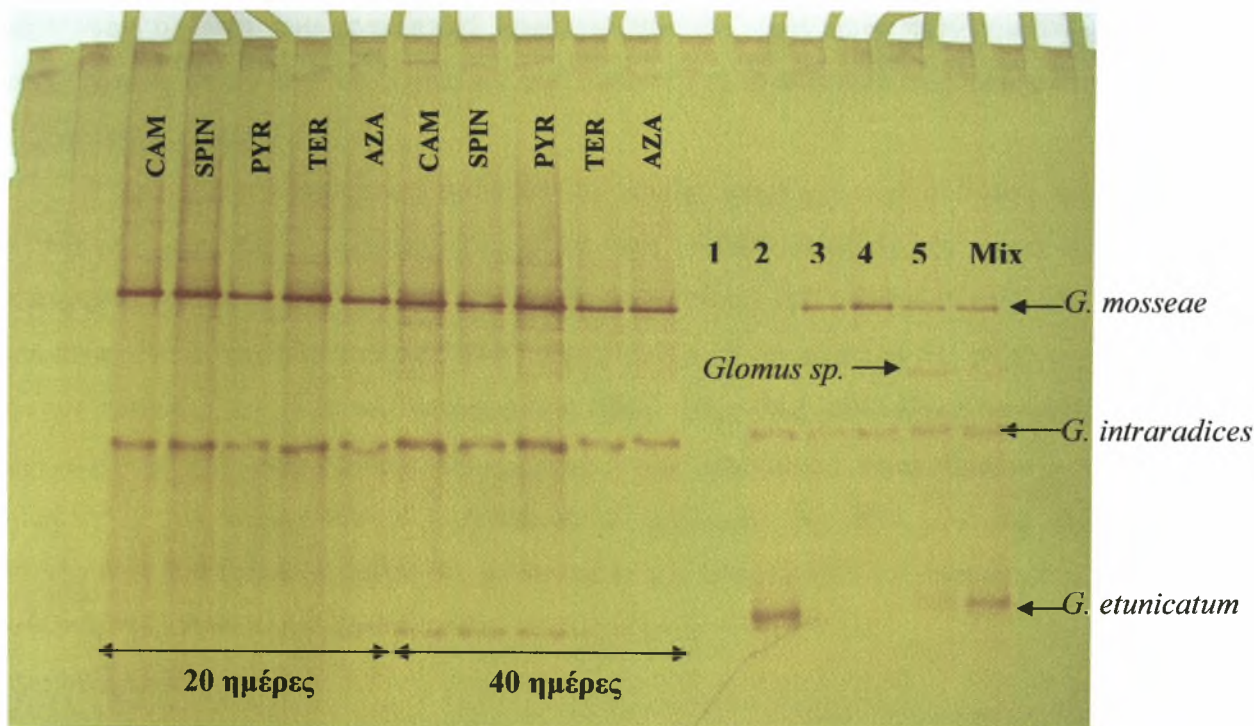
Χρόνος 40 ημερών:



Εικ. 22 Εικόνα πηκτής DGGE σε βαθμίδωση αποδιατακτικών ουσιών 38-50% όπου αναλύθηκαν τα προϊόντα της PCR εσωτερικής ένθεσης των δειγμάτων της δειγματοληψίας 40 ημερών μετά τη μεταφύτευση των φυταρίων πιπεριάς που είχαν δεχτεί εφαρμογή τερπενίων (TER), αζαντιραχτίνης (AZA), πύρεθρου (PYR),

spinosad (SPIN) και μυκορριζικού μάρτυρα (CAM). Ως marker χρησιμοποιήθηκαν προϊόντα PCR με του ίδιους εκκινήτες από πέντε διαφορετικές αμιγείς καλλιέργειες ΘΜ μυκήτων (1, 2, 3, 4, 5) που απομονώθηκαν όπως έχει ήδη περιγραφεί και το μίγμα τους χρησιμοποιήθηκε ως μυκορριζικό εμβόλιο (M: Mix). Με τα βέλη παρουσιάζονται οι ζώνες που αντιστοιχούν στους ΘΜ μύκητες που περιέχονταν στο εμβόλιο που χρησιμοποιήθηκε στο πείραμα.

Όπως φαίνεται από τις παραπάνω εικόνες, τα τρία δείγματα - επαναλήψεις της κάθε μεταχείρισης δεν παρουσίαζαν καμία παραλλακτικότητα μεταξύ τους ως προς το μοριακό τους αποτύπωμα. Κατά συνέπεια, αποφασίστηκε να γίνει επαναληπτική ηλεκτροφόρηση DGGE όπου χρησιμοποιήθηκε μόνο ένα από τα τρία δείγματα για κάθε μεταχείριση και δειγματοληψία, ώστε να συγκριθούν όλες οι μεταχειρίσεις στην ίδια πηκτή, καθώς έχουν αναφερθεί προβλήματα παραλλακτικότητας μεταξύ πηκτών DGGE. Έτσι, ηλεκτροφόρηση DGGE του δεύτερου δείγματος όλων των μεταχειρίσεων και για τους δύο χρόνους δειγματοληψίας επιβεβαίωσε τα αποτελέσματα των προηγούμενων πηκτών, όπως παρουσιάζεται στην παρακάτω εικόνα που προέκυψε μετά από φωτογράφιση της πηκτής (Εικ. 23):



Εικ. 23 Εικόνα πηκτής DGGE σε βαθμίδωση αποδιατακτικών ουσιών 35-45% όπου αναλύθηκαν τα προϊόντα των PCR εσωτερικής ένθεσης ενός δείγματος για κάθε

μεταχείριση και δειγματοληψία, που ελήφθησαν κατά τις δύο δειγματοληψίες, στις 20 και 40 ημέρες μετά τη μεταφύτευση των φυταρίων πιπεριάς και είχαν δεχτεί εφαρμογή τερπενίων (TER), αζαντιραχτίνης (AZA), πύρεθρου (PYR), spinosad (SPIN) και μυκορριζικού μάρτυρα (CAM). Με τα βέλη παρουσιάζονται οι ζώνες που αντιστοιχούν στους ΘΜ μύκητες που περιέχονταν στο αρχικό εμβόλιο που χρησιμοποιήθηκε στο πείραμα.

Η εφαρμογή των ΦΠ αλλά και του χρόνου δειγματοληψίας παρουσίασαν σημαντική επίδραση στην σύσταση της κοινότητας των ΘΜ μυκήτων στις ρίζες των φυτών πιπεριάς. Έτσι, 20 ημέρες μετά την εφαρμογή των ΦΠ οι ρίζες των φυτών πιπεριάς σε όλες τις μεταχειρίσεις (και στον μυκορριζικό μάρτυρα) είχαν αποικιστεί από ένα μόνο ΘΜ μύκητα που περιέχονταν στο αρχικό εμβόλιο (Εικ. 21), που από τη μοριακή ταυτοποίηση παρουσιάζει υψηλή ομολογία (98-100%) με στελέχη του είδους *Glomus mosseae*. Στη δειγματοληψία των 40 ημερών οι ρίζες των φυτών πιπεριάς είχαν αποικιστεί και από δεύτερο ΘΜ μύκητα που περιέχονταν στο αρχικό μόλυσμα (Εικ. 22). Μοριακή ταυτοποίηση έδειξε υψηλή ομολογία του συγκεκριμένου ΘΜ μύκητα με στελέχη του είδους *G. etunicatum* (99%). Παρόλαυτα, παρατηρήθηκε ότι στις ρίζες των φυτών που δέχτηκαν εφαρμογή αζαντιραχτίνης και δευτερευόντως τερπενίων η ζώνη που αντιστοιχεί στον μύκητα *G. etunicatum* ήταν εμφανώς ασθενέστερη σε ένταση σε σχέση με την ένταση της ίδια ζώνης στις υπόλοιπες μεταχειρίσεις (Εικ. 22).

Ο χρόνος δειγματοληψίας φαίνεται ότι επίσης επηρέασε την σύσταση της κοινότητας των ΘΜ μυκήτων στις ρίζες των φυτών πιπεριάς σε όλες τις μεταχειρίσεις. Έτσι, στις πρώτες 20 ημέρες μόνο ένας (*G. mosseae*) από τους τέσσερις ΘΜ μύκητες που περιέχονταν στο αρχικό εμβόλιο αποίκισε τις ρίζες των φυτών πιπεριάς σε όλες τις μεταχειρίσεις (Εικ. 21). Στις 40 ημέρες οι ρίζες αποικίστηκαν και από δεύτερο ΘΜ μύκητα, που πιθανότατα είναι βραδύτερος αποικιστής των ριζών (Εικ. 22). Αντίθετα, οι υπόλοιποι δύο ΘΜ μύκητες που περιέχονταν στο αρχικό εμβόλιο (*G. intraradices* και *Glomus* sp.) δεν αποίκισαν τις ρίζες των φυτών πιπεριάς στην διάρκεια του πειράματος (Εικ. 21-22).

4. ΣΥΖΗΤΗΣΗ

Ο στόχος της παρούσας μελέτης ήταν η αξιολόγηση των επιδράσεων των ΦΠ βοτανικής προέλευσης αζαντιραχτίνη, πύρεθρο, spinosad και μίγματος τερπενίων, καθώς και του συνθετικού μυκητοκτόνου carbendazim στους ΘΜ μύκητες, χρησιμοποιώντας ως ξενιστές φυτά πιπεριάς. Από τα αποτελέσματα της παρούσας μελέτης διαπιστώθηκε η ποικιλότητα των επιδράσεων ανάλογα με το χρησιμοποιούμενο ΦΠ, επιβεβαιώνοντας τα μέχρι σήμερα δεδομένα που αναφέρουν ότι τα διάφορα ΦΠ επηρεάζουν ποικιλοτρόπως χαρακτηριστικά τόσο των ΘΜ μυκήτων όσο και των φυτών στα οποία εφαρμόζονται (MacRae & Alexander, 1965; Smith & Ferry, 1979; Nemeč, 1980; Manjunath & Bagyaraj, 1984; Bertholet & Clark, 1985; Dodd & Jeffries, 1989; Sreenivasa & Bagyaraj, 1989; Afek et al, 1990; West et al., 1993; Sugavanam et al, 1994; Carrenho et al., 2000; Abd-Alla et al, 2000; Girvan et al, 2004; Zhang et al., 2006).

Διαπιστώθηκε ότι τόσο ο χρόνος δειγματοληψίας όσο και τα ΦΠ επηρέασαν τόσο την ανάπτυξη των φυτών όσο και το χρησιμοποιούμενο μυκορριζικό εμβόλιο. Η εφαρμογή του μυκορριζικού εμβολίου οδήγησε σε οριακή αύξηση του υπέργειου τμήματος των φυτών πιπεριάς σε σύγκριση με τα μη μυκορριζικά φυτά με την ολοκλήρωση του πειράματος. Η περιορισμένη θετική επίδραση των μυκορριζών στην φυτική ανάπτυξη έχει καταγραφεί και σε άλλες ανάλογες εργασίες (Afek et al, 1990; Sugavanam et al, 1994). Το επίπεδο αποικισμού των φυτών 40 ημέρες μετά τον εμβολιασμό με μυκορριζικό εμβόλιο κυμάνθηκε σε επίπεδα ανάλογα με άλλες εργασίες που περιγράφουν πειράματα με φυτά πιπεριάς σε φυτοδοχεία (Kaya et al., 2009). Η αύξηση του ποσοστού αποικισμού των ριζών με το χρόνο ήταν αναμενόμενη και μπορεί να αποδοθεί στη σταδιακή εγκατάσταση και ανάπτυξη των ΘΜ μυκήτων.

Ο χρόνος δειγματοληψίας είχε σημαντική επίδραση στην ικανότητα αποικισμού των ριζών από τους διάφορους μύκητες που περιέχονταν στο εμβόλιο και κατά συνέπεια στη σύσταση της κοινότητας των ΘΜ μυκήτων στις ρίζες των φυτών. Έτσι, ο μύκητας *G. mosseae*, που αποτέλεσε και τον πιο πολυπληθή στο εμβόλιο ΘΜ μύκητα, αποίκισε ταχύτατα τις ρίζες των φυτών πιπεριάς ενώ ο μύκητας *G. etunicatum* εμφανίστηκε μόνο στις ρίζες των φυτών που συλλέχτηκαν 40 ημέρες μετά τον εμβολιασμό, καταδεικνύοντας ότι πρόκειται για αργό αποικιστή. Στελέχη του είδους *G. mosseae* έχουν χαρακτηριστεί ως ταχείς αποικιστές σε διάφορα καλλιεργούμενα φυτά (Sykorova et al., 2007). Προηγούμενες μελέτες έχουν δείξει

την ύπαρξη άμεσης σχέσης ανάμεσα στο φυσιολογικό στάδιο ανάπτυξης των φυτών και στους ΘΜ μύκητες που το αποικίζουν (Daniell et al., 2001; Husband et al., 2002). Αντίθετα, οι υπόλοιποι δύο μυκορριζικοί μύκητες που περιέχονταν στο αρχικό εμβόλιο δεν κατάφεραν να αποικίσουν τις ρίζες στο χρονικό διάστημα που διήρκησε το πείραμα. Είναι πιθανό, ο χρόνος που διήρκησε το πείραμα να μην επέτρεψε τον αποικισμό από τους συγκεκριμένους μύκητες, λαμβάνοντας υπόψη επίσης ότι περιέχονταν σε χαμηλότερες πυκνότητες πληθυσμού στο αρχικό μόλυσμα.

Από τα ΦΠ που εφαρμόστηκαν, τα τερπένια οδήγησαν σε συστηματική αύξηση της φυτικής ανάπτυξης. Η δράση αυτή των τερπενίων οφείλεται πιθανότατα στην ικανότητα τους να δρουν βοηθητικά ως λίπασμα ή προκαλώντας επιδράσεις ορμονικής φύσεως στα φυτά. Από την άλλη μεριά, τα τερπένια οδήγησαν σε παροδική μείωση του μυκορριζικού αποικισμού των ριζών 20 ημέρες μετά τον εμβολιασμό, ο οποίος αποκαταστάθηκε σε επίπεδα ελαφρώς υψηλότερα από το μυκορριζικό μάρτυρα 40 ημέρες μετά τον εμβολιασμό. Η παροδική αυτή ανασχετική δράση των τερπενίων στον αποικισμό των ριζών από τους ΘΜ μύκητες είναι πιθανό να οφείλεται στην αποδόμηση τους στο έδαφος μετά την παρέλευση των πρώτων 20 ημερών. Τα παραπάνω αποτελέσματα είναι σύμφωνα με προηγούμενες μελέτες, όπου μετασηματισμένα φυτά βρώμης (*Avena strigosa*), τα οποία δεν παρήγαγαν μεγάλες ποσότητες σαπωνινών (τριτερπενοειδή), παρουσίασαν μειωμένη αντίσταση στην προσβολή τους από διάφορους μύκητες (Gershenson & Dudareva, 2007).

Η εφαρμογή αζαντιραχτίνης προκάλεσε μια παροδική και μη στατιστικά σημαντική ανασχεση της φυτικής ανάπτυξης στις πρώτες 20 ημέρες μετά την εφαρμογή της. Από την άλλη μεριά η αζαντιραχτίνη οδήγησε σε σημαντική αύξηση του μυκορριζικού αποικισμού στα φυτά πιπεριάς 40 ημέρες μετά τον εμβολιασμό.

Η αύξηση του μυκορριζικού αποικισμού με την εφαρμογή αζαντιραχτίνης και δευτερευόντως με την εφαρμογή των τερπενίων οδήγησε σε μεταβολές στη σύσταση της κοινότητας των ΘΜ μυκήτων στις ριζές των φυτών, όπως φαίνεται από την ανάλυση DGGE. Έτσι, η αζαντιραχτίνη κυρίως και δευτερευόντως τα τερπένια περιόρισαν σε σημαντικό βαθμό το αποικισμό της ρίζας από τον μύκητα *G. etunicatum* σε αντίθεση με τον μυκορριζικό μάρτυρα και τις άλλες μεταχειρίσεις όπου δεν παρατηρήθηκε ανάλογη ανασχεση. Η επιλεκτική ανασχεση του μύκητα *G. etunicatum*, που συμμετείχε στο μυκορριζικό εμβόλιο, από τα παραπάνω ΦΠ βοτανικής προέλευσης πιθανότατα οδήγησε σε περιορισμό του ανταγωνισμού με άλλους ΘΜ μύκητες που περιέχονταν στο εμβόλιο και αποίκιζαν τις ρίζες, όπως ο *G.*

mosseae, και κατά συνέπεια σε αυξημένο αποικισμό από τον επικρατέστερο ΘΜ μύκητα του εμβολίου (*G. mosseae*). Προηγούμενες μελέτες έδειξαν ότι η αζαντιραχτίνη μειώνει τη λειτουργική μικροβιακή ποικιλομορφία του εδάφους, με τους μύκητες να είναι η πιο ευαίσθητη κατηγορία (Sreenivasa & Bagyaraj, 1989, Gopal et al., 2006). Από την άλλη, η αζαντιραχτίνη παρουσίασε περιορισμένη και βραχυπρόθεσμη τοξικότητα σε ΘΜ συγκρινόμενη με ΦΠ όπως τα benomyl, chlorothalonil, copper sulfate, dimethoate και glyphosate (Wan & Rae, 1998).

Το spinosad δεν προκάλεσε σημαντικές μεταβολές στην ανάπτυξη των φυτών σε σχέση με το μυκορριζικό μάρτυρα. Αντίθετα, η εφαρμογή spinosad προκάλεσε μείωση του αποικισμού των φυτών από ΘΜ μύκητες 40 ημέρες μετά τον εμβολιασμό, χωρίς αυτή η ανασταλτική δράση να συνοδεύεται από ανάλογη μείωση της φυτικής ανάπτυξης. Η εφαρμογή πύρεθρου δεν προκάλεσε σημαντικές μεταβολές στην αύξηση και ανάπτυξη των φυτών πιπεριάς σε σχέση με το μυκορριζικό μάρτυρα. Αντίθετα, το συγκεκριμένο βοτανικό εντομοκτόνο προκάλεσε μια συστηματική μείωση στο μυκορριζικό αποικισμό των ριζών που εμβολιάστηκαν στο έδαφος, χωρίς αυτό όμως να συσχετίζεται με κάποια επίδραση στην ανάπτυξη των φυτών πιπεριάς. Η ανασταλτική επίδραση των spinosad και πύρεθρου στο μυκορριζικό αποικισμό των φυτών πιπεριάς δεν φαίνεται να προκαλεί μεταβολές στην σύσταση της κοινότητας των ΘΜ μυκήτων που αποικίζουν τις ρίζες των φυτών, σύμφωνα με τα αποτελέσματα της μοριακής αποτύπωσης DGGE.

Ως συνθετικό μυκητοκτόνο, το carbendazim ανέστειλε πλήρως το μυκορριζικό αποικισμό στις ρίζες των φυτών πιπεριάς συμφωνώντας με προηγούμενες μελέτες. Έτσι, όταν το carbendazim χρησιμοποιήθηκε σε γρασίδι προκάλεσε μείωση στον αποικισμό των ριζών του από ΘΜ μύκητες (Bary et al, 2005), ενώ παρεμπόδισε τη βλάστηση σπορίων ειδών του γένους *Glomus*, καθώς και τη μόλυνση ριζών χειμερινού σίτου που αναπτύχθηκε σε έδαφος φτωχό σε φώσφορο, ακόμα και όταν εφαρμόστηκε στο φύλλωμα των φυτών (Dodd & Jeffries, 1989). Τέλος, carbendazim που εφαρμόστηκε σε κριθάρι επέδρασε αρνητικά στην ανάπτυξη των ΘΜ (von Alten et al, 1993). Η ανασταλτική δράση του carbendazim στο ΘΜ εμβόλιο δεν συνοδεύτηκε από μειωμένη φυτική ανάπτυξη, καθώς σε όλες τις μετρήσεις τα φυτά που δέχτηκαν εφαρμογή carbendazim δεν διέφεραν από το μυκορριζικό μάρτυρα.

Η αρνητική επίδραση στο ποσοστό αποικισμού που προκάλεσαν κάποια από τα ανωτέρω ΦΠ είναι πιθανό να οφείλεται στη μη έκκριση από τις ρίζες ενζύμων που είναι απαραίτητα για τη δημιουργία συμβιωτικών σχέσεων με τους ΘΜ μύκητες του

χρησιμοποιούμενου εμβολίου, όπως έχει καταδειχτεί και στο παρελθόν, αν και αυτό δεν εξετάστηκε στην παρούσα εργασία. (de Bertoldi et al, 1978).

Γενικότερα, η εφαρμογή των διαφόρων ΦΠ βοτανικής προέλευσης προκάλεσε μεταβολές τόσο στη σύσταση της κοινότητας των ΘΜ μυκήτων στις ρίζες των φυτών όσο και στα επίπεδα αποικισμού. Έτσι, η αζαντραχίνη και τα τερπένια προκάλεσαν αύξηση του επιπέδου αποικισμού και παράλληλα ανέστειλαν μερικώς ή πλήρως τον αποικισμό των φυτών από συγκεκριμένο μυκορριζικό μύκητα του εμβολίου. Αντίθετα, τα *spinosad* και *πύρεθρο* προκάλεσαν σημαντική μείωση του αποικισμού, χωρίς όμως καμία επίδραση στη σύσταση της κοινότητας των ΘΜ μυκήτων που αποίκισαν τις ρίζες. Όλες οι παραπάνω ποιοτικές και ποσοτικές μεταβολές που παρατηρήθηκαν στην κοινότητα των ΘΜ μυκήτων δεν συνοδεύτηκαν από ανάλογες επιδράσεις, θετικές ή αρνητικές, στην ανάπτυξη των φυτών. Η παρατήρηση αυτή δείχνει ότι οι μεταβολές που προκλήθηκαν από τα ΦΠ δεν οδήγησαν σε μεταβολές στην λειτουργία της μυκορριζικής κοινότητας στις ρίζες των φυτών.

5. ΣΥΜΠΕΡΑΣΜΑΤΑ

Από τα παραπάνω αποτελέσματα μπορούμε να συμπεράνουμε ότι:

1. Ο εμβολιασμός των φυτών πιπεριάς με ΘΜ μύκητες προκάλεσε μικρή αύξηση στην ανάπτυξη των φυτών πιπεριάς σε σχέση με τα μη μυκορριζικά φυτά.
2. Τόσο ο χρόνος δειγματοληψίας όσο και το ΦΠ που εφαρμόστηκε επέδρασαν σημαντικά στα ποιοτικά και ποσοτικά χαρακτηριστικά της κοινότητας των ΘΜ μυκήτων στις ρίζες των φυτών.
3. Η εφαρμογή ΦΠ βοτανικής προέλευσης προκάλεσε ποιοτικές και ποσοτικές μεταβολές στην κοινότητα των ΘΜ μυκήτων στις ρίζες των φυτών πιπεριάς, χωρίς όμως αυτές οι μεταβολές να συνδέονται με ανάλογες μεταβολές στην λειτουργία των μυκορριζών και κατ' επέκταση στην φυτική ανάπτυξη του φυτού-ξενιστή.
4. Η επιλεκτική ανασταλτική δράση της αζαντιραχτίνης και των τερπενίων στο μύκητα *G. etunicatum*, που αποτέλεσε μέλος του μυκορριζικού εμβολίου, οδήγησε στον αποικισμό των φυτών από τον κυρίαρχο μύκητα στο εμβόλιο, *G. mosseae* και σε αυξημένο ποσοτικά αποικισμό των ριζών λόγω μειωμένου ανταγωνισμού μεταξύ των διαφόρων μελών του μυκορριζικού εμβολίου.

Τα αποτελέσματα από την παρούσα εργασία αποτελούν την πρώτη και μοναδική ως σήμερα αναφορά επιδράσεων βοτανικών ΦΠ στους ΘΜ μύκητες. Περαιτέρω πειράματα σε επίπεδο αγρού βασιζόμενα σε αυτά τα ευρήματα θα προσφέρουν μια πιο πλήρη εικόνα αυτών των επιδράσεων στους ΘΜ μύκητες και στην λειτουργικότητά τους.

ΠΑΡΑΡΤΗΜΑ

ΔΕΙΓΜΑ	ΥΨΟΣ ΦΥΤΟΥ (cm)	ΔΕΙΓΜΑ	ΥΨΟΣ ΦΥΤΟΥ (cm)
CONTROL 1	11	PYRETHRUM 41	8,7
CONTROL 2	10,2	PYRETHRUM 42	8,8
CONTROL 3	11,4	PYRETHRUM 43	8,5
CONTROL 4	10,5	PYRETHRUM 44	9
CONTROL 5	10,2	PYRETHRUM 45	10
CONTROL AM 11	8,9	AZADIRACHTIN 51	5,8
CONTROL AM 12	10,3	AZADIRACHTIN 52	9,5
CONTROL AM 13	8,8	AZADIRACHTIN 53	9,6
CONTROL AM 14	10,4	AZADIRACHTIN 54	7,6
CONTROL AM 15	10,4	AZADIRACHTIN 55	9,6
SPINOSAD 21	11,8	ΤΕΡΠΗΝΙΑ 61	7,7
SPINOSAD 22	11,7	ΤΕΡΠΗΝΙΑ 62	12,4
SPINOSAD 23	10,8	ΤΕΡΠΗΝΙΑ 63	12,6
SPINOSAD 24	9,3	ΤΕΡΠΗΝΙΑ 64	12,3
SPINOSAD 25	11,8	ΤΕΡΠΗΝΙΑ 65	11
CARBENDAZIM 31	10,7		
CARBENDAZIM 32	10		
CARBENDAZIM 33	12,6		
CARBENDAZIM 34	11,6		
CARBENDAZIM 35	12		

Πιν. 11 Ύψος φυτών πιπεριάς πρώτης δειγματοληψίας.

ΔΕΙΓΜΑ	ΥΨΟΣ ΦΥΤΟΥ (cm)	ΔΕΙΓΜΑ	ΥΨΟΣ ΦΥΤΟΥ (cm)
CONTROL 6	19,8	PYRETHRUM 46	20,4
CONTROL 7	21,1	PYRETHRUM 47	19,4
CONTROL 8	19,4	PYRETHRUM 48	21
CONTROL 9	18,5	PYRETHRUM 49	20,3
CONTROL 10	18,1	PYRETHRUM 50	18,6
CONTROL AM 16	20,2	AZADIRACHTIN 56	21,3
CONTROL AM 17	18,8	AZADIRACHTIN 57	21,1
CONTROL AM 18	19,4	AZADIRACHTIN 58	20
CONTROL AM 19	18,8	AZADIRACHTIN 59	17,9
CONTROL AM 20	19,3	AZADIRACHTIN 60	19
SPINOSAD 26	19	TEPIHENIA 66	22
SPINOSAD 27	18,2	TEPIHENIA 67	20,6
SPINOSAD 28	20,4	TEPIHENIA 68	20,8
SPINOSAD 29	19,7	TEPIHENIA 69	18,8
SPINOSAD 30	19,7	TEPIHENIA 70	20,7
CARBENDAZIM 36	20,4		
CARBENDAZIM 37	19,4		
CARBENDAZIM 38	22,3		
CARBENDAZIM 39	20,1		
CARBENDAZIM 40	18,3		

Πιν. 12 Ύψος φυτών πιπεριάς δεύτερης δειγματοληψίας.

ΔΕΙΓΜΑ	ΝΩΠΙΟ ΒΑΡΟΣ ΦΥΤΟΥ (gr)	ΞΗΡΟ ΒΑΡΟΣ ΦΥΤΟΥ (gr)
CONTROL 1	2,646	0,23
CONTROL 2	2,258	0,2
CONTROL 3	3,5	0,29
CONTROL 4	2,176	0,2
CONTROL 5	2,462	0,2
CONTROL AM 11	1,899	0,16
CONTROL AM 12	2,264	0,22
CONTROL AM 13	1,63	0,16
CONTROL AM 14	2,087	0,2
CONTROL AM 15	2,344	0,21
SPINOSAD 21	3,581	0,31
SPINOSAD 22	3,397	0,32
SPINOSAD 23	3,322	0,3
SPINOSAD 24	1,874	0,16
SPINOSAD 25	3,615	0,32
CARBENDAZIM 31	2,291	0,23
CARBENDAZIM 32	2,305	0,23
CARBENDAZIM 33	3,818	0,36
CARBENDAZIM 34	3,254	0,32
CARBENDAZIM 35	2,643	0,24
PYRETHRUM 41	2,025	0,2
PYRETHRUM 42	2,226	0,21
PYRETHRUM 43	1,803	0,16
PYRETHRUM 44	2,123	0,19
PYRETHRUM 45	2,653	0,25
AZADIRACHTIN 51	0,838	0,06
AZADIRACHTIN 52	2,503	0,21
AZADIRACHTIN 53	2,08	0,17
AZADIRACHTIN 54	1,426	0,14
AZADIRACHTIN 55	2,536	0,24
ΤΕΡΠΙΝΙΑ 61	1,747	0,15
ΤΕΡΠΙΝΙΑ 62	4,332	0,38
ΤΕΡΠΙΝΙΑ 63	3,692	0,32
ΤΕΡΠΙΝΙΑ 64	4,358	0,38
ΤΕΡΠΙΝΙΑ 65	3,248	0,31

Πιν. 13 Νωπό και ξηρό βάρος υπέργειου τμήματος φυτών πιπεριάς πρώτης δειγματοληψίας.

ΔΕΙΓΜΑ	ΝΩΠΟ ΒΑΡΟΣ ΦΥΤΟΥ (gr)	ΞΗΡΟ ΒΑΡΟΣ ΦΥΤΟΥ (gr)
CONTROL 6	11,53	1,02
CONTROL 7	12,14	1,09
CONTROL 8	9,5	0,96
CONTROL 9	9,36	0,86
CONTROL 10	8	0,83
CONTROL AM 16	13,21	1,11
CONTROL AM 17	12,68	1,04
CONTROL AM 18	14,6	1,19
CONTROL AM 19	14,36	1,17
CONTROL AM 20	14,31	1,13
SPINOSAD 26	12,85	1
SPINOSAD 27	11,78	0,96
SPINOSAD 28	13,71	1,08
SPINOSAD 29	14,27	1,14
SPINOSAD 30	14,17	1,06
CARBENDAZIM 36	14,16	1,18
CARBENDAZIM 37	11,43	0,92
CARBENDAZIM 38	16,42	1,35
CARBENDAZIM 39	15,14	1,27
CARBENDAZIM 40	10,06	0,83
PYRETHRUM 46	14,28	1,1
PYRETHRUM 47	15,46	1,22
PYRETHRUM 48	14,38	1,11
PYRETHRUM 49	13,83	1,16
PYRETHRUM 50	12,8	0,98
AZADIRACHTIN 56	17,94	1,48
AZADIRACHTIN 57	16,52	1,31
AZADIRACHTIN 58	16,02	1,24
AZADIRACHTIN 59	10,85	0,83
AZADIRACHTIN 60	14,73	1,17
ΤΕΡΠΙΝΙΑ 66	21,03	1,76
ΤΕΡΠΙΝΙΑ 67	16,45	1,35
ΤΕΡΠΙΝΙΑ 68	16,78	1,42
ΤΕΡΠΙΝΙΑ 69	13,77	1,1
ΤΕΡΠΙΝΙΑ 70	20,01	2,09

Πιν. 14 Νωπό και ξηρό βάρος υπέργειου τμήματος φυτών πιπεριάς δεύτερης δειγματοληψίας.

ΔΕΙΓΜΑ	ΝΩΠΙΟ ΒΑΡΟΣ ΡΙΖΩΝ (gr)	ΞΗΡΟ ΒΑΡΟΣ ΡΙΖΩΝ (gr)
CONTROL 1	1,14	0,06
CONTROL 2	0,96	0,05
CONTROL 3	1,62	0,1
CONTROL 4	1,47	0,08
CONTROL 5	1,2	0,08
CONTROL AM 11	0,61	0,04
CONTROL AM 12	0,98	0,04
CONTROL AM 13	0,83	0,04
CONTROL AM 14	1,05	0,05
CONTROL AM 15	0,87	0,05
SPINOSAD 21	1,99	0,11
SPINOSAD 22	1,42	0,08
SPINOSAD 23	1,27	0,09
SPINOSAD 24	1,05	0,07
SPINOSAD 25	1,58	0,09
CARBENDAZIM 31	1,07	0,07
CARBENDAZIM 32	1,12	0,08
CARBENDAZIM 33	1,93	0,11
CARBENDAZIM 34	1,13	0,08
CARBENDAZIM 35	1,21	0,08
PYRETHRUM 41	0,77	0,06
PYRETHRUM 42	1,24	0,08
PYRETHRUM 43	0,66	0,05
PYRETHRUM 44	1	0,07
PYRETHRUM 45	1,18	0,09
AZADIRACHTIN 51	0,34	0,01
AZADIRACHTIN 52	0,92	0,06
AZADIRACHTIN 53	0,88	0,04
AZADIRACHTIN 54	0,6	0,06
AZADIRACHTIN 55	1,14	0,09
ΤΕΡΠΙΝΙΑ 61	0,56	0,04
ΤΕΡΠΙΝΙΑ 62	2,05	0,12
ΤΕΡΠΙΝΙΑ 63	2,04	0,12
ΤΕΡΠΙΝΙΑ 64	1,95	0,1
ΤΕΡΠΙΝΙΑ 65	1,84	0,12

Πιν. 15 Νωπό και ξηρό βάρος υπόγειου τμήματος φυτών πιπεριάς πρώτης δειγματοληψίας.

ΔΕΙΓΜΑ	ΝΩΠΟ ΒΑΡΟΣ ΡΙΖΩΝ (gr)	ΞΗΡΟ ΒΑΡΟΣ ΡΙΖΩΝ (gr)
CONTROL 6	4,55	0,3
CONTROL 7	5,36	0,25
CONTROL 8	4,84	0,27
CONTROL 9	4,05	0,22
CONTROL 10	3,6	0,23
CONTROL AM 16	4,48	0,26
CONTROL AM 17	4,16	0,21
CONTROL AM 18	5,94	0,28
CONTROL AM 19	4,92	0,29
CONTROL AM 20	4,25	0,2
SPINOSAD 26	3,48	0,2
SPINOSAD 27	3,55	0,2
SPINOSAD 28	4,86	0,25
SPINOSAD 29	4,35	0,22
SPINOSAD 30	4,2	0,25
CARBENDAZIM 36	5,93	0,4
CARBENDAZIM 37	3,98	0,24
CARBENDAZIM 38	7,48	0,37
CARBENDAZIM 39	7,2	0,34
CARBENDAZIM 40	2,86	0,18
PYRETHRUM 46	4,47	0,26
PYRETHRUM 47	6,31	0,32
PYRETHRUM 48	5,35	0,28
PYRETHRUM 49	5,75	0,35
PYRETHRUM 50	3,4	0,2
AZADIRACHTIN 56	6,81	0,37
AZADIRACHTIN 57	5,67	0,26
AZADIRACHTIN 58	5,47	0,27
AZADIRACHTIN 59	3,02	0,14
AZADIRACHTIN 60	4,12	0,24
TEPIENIA 66	7,97	0,39
TEPIENIA 67	6,18	0,34
TEPIENIA 68	6,95	0,33
TEPIENIA 69	5,06	0,25
TEPIENIA 70	9,84	0,59

Πιν. 16 Νωπό και ξηρό βάρος υπόγειου τμήματος φυτών πιπεριάς δεύτερης δειγματοληψίας.

ΔΕΙΓΜΑ	ΠΟΣΟΣΤΟ ΑΠΟΙΚΙΣΜΟΥ ΡΙΖΩΝ %
CONTROL 1	0
CONTROL 2	0
CONTROL 3	0
CONTROL 4	0
CONTROL 5	0
CONTROL AM 11	10
CONTROL AM 12	8
CONTROL AM 13	7,5
CONTROL AM 14	10
CONTROL AM 15	8
SPINOSAD 21	8,5
SPINOSAD 22	6
SPINOSAD 23	13,5
SPINOSAD 24	5,5
SPINOSAD 25	5
CARBENDAZIM 31	1
CARBENDAZIM 32	0
CARBENDAZIM 33	0
CARBENDAZIM 34	0,5
CARBENDAZIM 35	0
PYRETHRUM 41	8
PYRETHRUM 42	7
PYRETHRUM 43	5
PYRETHRUM 44	4,5
PYRETHRUM 45	2,5
AZADIRACHTIN 51	9,5
AZADIRACHTIN 52	5,5
AZADIRACHTIN 53	3,5
AZADIRACHTIN 54	8,5
AZADIRACHTIN 55	7
ΤΕΡΠΕΝΙΑ 61	1,5
ΤΕΡΠΕΝΙΑ 62	7,5
ΤΕΡΠΕΝΙΑ 63	2
ΤΕΡΠΕΝΙΑ 64	2
ΤΕΡΠΕΝΙΑ 65	1,5

Πιν. 17 Ποσοστό αποικισμού υπόγειου τμήματος φυτών πιπεριάς πρώτης δειγματοληψίας.

ΔΕΙΓΜΑ	ΠΟΣΟΣΤΟ ΑΠΟΙΚΙΣΜΟΥ %
CONTROL 6	0
CONTROL 7	0
CONTROL 8	0
CONTROL 9	0
CONTROL 10	0
CONTROL AM 16	39,5
CONTROL AM 17	27,5
CONTROL AM 18	26,5
CONTROL AM 19	28
CONTROL AM 20	31
SPINOSAD 26	17,5
SPINOSAD 27	19
SPINOSAD 28	36
SPINOSAD 29	23,5
SPINOSAD 30	28,5
CARBENDAZIM 36	0
CARBENDAZIM 37	1
CARBENDAZIM 38	0
CARBENDAZIM 39	0
CARBENDAZIM 40	0,5
PYRETHRUM 46	10
PYRETHRUM 47	12
PYRETHRUM 48	14,5
PYRETHRUM 49	28
PYRETHRUM 50	18,5
AZADIRACHTIN 56	38
AZADIRACHTIN 57	52
AZADIRACHTIN 58	40,5
AZADIRACHTIN 59	26
AZADIRACHTIN 60	38
ΤΕΡΠΙΕΝΙΑ 66	25
ΤΕΡΠΙΕΝΙΑ 67	33,5
ΤΕΡΠΙΕΝΙΑ 68	31
ΤΕΡΠΙΕΝΙΑ 69	34
ΤΕΡΠΙΕΝΙΑ 70	36,5

Πιν. 18 Ποσοστό αποικισμού υπόγειου τμήματος φυτών πιπεριάς δεύτερης δειγματοληψίας.

ΔΕΙΓΜΑ	ΡΙΖΑ / ΒΛΑΣΤΟΣ	ΔΕΙΓΜΑ	ΡΙΖΑ / ΒΛΑΣΤΟΣ
CONTROL 1	0,41	CONTROL 6	0,34
CONTROL 2	0,42	CONTROL 7	0,26
CONTROL 3	0,49	CONTROL 8	0,32
CONTROL 4	0,58	CONTROL 9	0,31
CONTROL 5	0,61	CONTROL 10	0,33
CONTROL AM 11	0,53	CONTROL AM 16	0,27
CONTROL AM 12	0,32	CONTROL AM 17	0,24
CONTROL AM 13	0,45	CONTROL AM 18	0,26
CONTROL AM 14	0,4	CONTROL AM 19	0,28
CONTROL AM 15	0,44	CONTROL AM 20	0,21
SPINOSAD 21	0,48	SPINOSAD 26	0,24
SPINOSAD 22	0,37	SPINOSAD 27	0,25
SPINOSAD 23	0,47	SPINOSAD 28	0,27
SPINOSAD 24	0,73	SPINOSAD 29	0,23
SPINOSAD 25	0,4	SPINOSAD 30	0,28
CARBENDAZIM 31	0,49	CARBENDAZIM 36	0,39
CARBENDAZIM 32	0,57	CARBENDAZIM 37	0,31
CARBENDAZIM 33	0,41	CARBENDAZIM 38	0,30
CARBENDAZIM 34	0,4	CARBENDAZIM 39	0,30
CARBENDAZIM 35	0,5	CARBENDAZIM 40	0,28
PYRETHRUM 41	0,55	PYRETHRUM 46	0,28
PYRETHRUM 42	0,6	PYRETHRUM 47	0,29
PYRETHRUM 43	0,6	PYRETHRUM 48	0,28
PYRETHRUM 44	0,61	PYRETHRUM 49	0,34
PYRETHRUM 45	0,57	PYRETHRUM 50	0,25
AZADIRACHTIN 51	0,48	AZADIRACHTIN 56	0,28
AZADIRACHTIN 52	0,49	AZADIRACHTIN 57	0,23
AZADIRACHTIN 53	0,42	AZADIRACHTIN 58	0,25
AZADIRACHTIN 54	0,87	AZADIRACHTIN 59	0,21
AZADIRACHTIN 55	0,61	AZADIRACHTIN 60	0,24
TEPIENIA 61	0,56	TEPIENIA 66	0,24
TEPIENIA 62	0,42	TEPIENIA 67	0,28
TEPIENIA 63	0,5	TEPIENIA 68	0,26
TEPIENIA 64	0,35	TEPIENIA 69	0,26
TEPIENIA 65	0,54	TEPIENIA 70	0,30

Πιν. 19 Αποτελέσματα του λόγου του ξηρού βάρους της ρίζας προς το ξηρό βάρος του βλαστού φυτών πιπεριάς.

ΒΙΒΛΙΟΓΡΑΦΙΑ

- Abd-Allaa, M.H., Omara, S.A., 2000. The impact of pesticides on arbuscular mycorrhizal and nitrogen-fixing symbioses in legumes. *Applied Soil Ecology* 14, 191-200.
- Afek, U., Menge, J.A., Johnson, E.L.V., 1990. The effect of *Pythium ultimum* and metalaxyl treatments on root length and mycorrhizal colonization of cotton, onion, and pepper. *Plant Disease* 74, 117-120.
- Balestra, G.M., Misaghi, I.J., 1997. Increasing the efficiency of the plate counting method for estimating bacterial diversity. *Journal of Microbiological Methods* 30, 111-117.
- Bary, Fr., Gange, A.C., Crane, M., Hagley, K.J., 2005. Fungicide levels and arbuscular mycorrhizal fungi in golf putting greens. *Journal of Applied Ecology* 42, 171-180.
- Bertholet, J., Clark, K.W., 1985. Effect of trifluralin and metribuzin on faba bean growth, development, and symbiotic nitrogen fixation. *Canadian Journal of Plant Science* 65, 9-21.
- Bertoldi, M.de; Rambelli, A.; Giovannetti, M.; Griselli, M., 1978. Effects of benomyl and captan on rhizosphere fungi and the growth of *Allium cepa*. *Soil Biology & Biochemistry* 10, 265-268.
- Bremner, P.D., Simmonds, M.S.J., Blaney, W.M., Veitch, N.C., 1998. Neoclerodane diterpenoid insect antifeedants from *Ajuga reptans cv catlins* giant. *Phytochemistry* 47, 1227-1232.
- Carrenho, R., Bononin, V.L.R., Graciolli, L.A., 2000. Effect of fungicides fosetyl-Al and metalaxyl on arbuscular mycorrhizal colonization of seedlings of *Citrus sinensis* (L.) Osbeck grafted onto *C. limon* (L.) Burmf. *Acta Scientiarum* 22, 305-310.
- Clapp, J.P., Fitter, A.H., Merryweather, J.W., 1996. Arbuscular Mycorrhizas, 145-161. In: *Methods for the examination of organismal diversity in soils and sediments*. G.S. Hall (Ed). CAB International, Wallingford, UK.
- Copping, L.G., Duke, S.O., 2007. Review-Natural products that have been used commercially as crop protection agents. *Pest Management Science* 63, 524-554.

- Cornejo, P., Azcon-Aguilar, C., Barea, J.M., Ferrol, N., 2004. Temporal temperature gradient gel electrophoresis (TTGE) as a tool for the characterization of arbuscular mycorrhizal fungi. *FEMS Microbiology Letters* 241, 265-270.
- Cripps, C., Maloy, O.C., Murray, T.D., 2001. Mycorrhiza. *Encyclopedia of Plant Pathology* 2, Place and Publisher.
- Daniell, T.J., Husband, R., Fitter, A.H., Young, J.P.W., 2001. Molecular diversity of arbuscular mycorrhizal fungi colonizing arable crops. *FEMS Microbiology Ecology* 36, 203-209.
- Davies, F.T.Jr., Olalde-Portugal, V., Aguilera-Gomez, L., Alvarado, M.J., Ferrera-Cerrato, R.C., Boutton, T.W., 2002. Alleviation of drought stresses of Chile ancho pepper (*Capsicum annum* L. cv. San Luis) with arbuscular mycorrhiza indigenous to Mexico. *Scientia Horticulturae* 92, 347-359.
- Demir, S., 2004. Influence of arbuscular mycorrhiza on some physiological growth parameters of pepper. *Turkish Journal of Biology* 28, 85-90.
- Dodd, J.C., Jeffries, P., 1989. Effect of fungicides on three vesicular-arbuscular mycorrhizal fungi associated with winter wheat (*Triticum aestivum* L.). *Biology and Fertility of Soils* 7, 120-128.
- Donner, G., Schwarz, K., Hoppe, H.G., Muyzer, G., 1996. Profiling the succession of bacterial populations in pelagic chemoclines. *Archives of Hydrobiology. Special Issues Advanced Limnology* 48, 7-14.
- el Fantroussi, S., Verschuere, L., Verstraete, W., Top, E.M., 1999. Effect of phenylurea herbicides on soil microbial communities estimated by analysis of 16S rRNA gene fingerprints and community-level physiological profiles. *Applied and Environmental Microbiology* 65, 982-988.
- Ellis, R.J., Thompson, I.P., Bailey, M.J., 1995. Metabolic profiling as a means of characterizing plant-associated microbial communities. *FEMS Microbiology Ecology* 16, 9-18.
- Galvan, G.A., Paradi, I., Burger, K., Baar, J., Kuyper, T.W., Scholten, O.E., Kik, C., 2009. Molecular diversity of arbuscular mycorrhizal fungi in onion roots from organic and conventional farming systems in the Netherlands. *Mycorrhiza* (on line published doi 10.1007/s00572-009-0237-2).

- Garland, J.L., Mills, A.L., 1991. Classification and characterization of heterotrophic microbial communities on the basis of patterns of community level sole carbon source utilization. *Applied and Environmental Microbiology* 57, 2351-2359.
- Gershenzon, J., Dudareva, N., 2007. The function of terpene natural products in the natural world. *Natural Chemical Biology* 3, 408-414.
- Giovannetti, M., Mosse, B., 1980. An evaluation of techniques for measuring vesicular arbuscular mycorrhizal infection in roots. *New Phytologist* 84, 489-500.
- Girvan, M.S., Bullimore, J., Ball, A.S., Pretty, J.N., Osborn, A.M., 2004. Responses of active bacterial and fungal communities in soils under winter wheat to different fertilizer and pesticide regimens. *Applied and Environmental Microbiology* 70, 2692-2701.
- Gopal, M., Gupta, A., Arunachalam, V., Magu, S.P., 2007. Impact of azadirachtin, an insecticidal allelochemical from neem on soil microflora, enzyme and respiratory activities. *Bioresource Technology* 98, 3154-3158.
- Gosling, P., Hodge, A., Goodlass, G., Bending, G.D., 2006. Arbuscular mycorrhizal fungi and organic farming – A review. *Agriculture Ecosystems and Environment* 113, 17-35.
- Helgason, T., Daniell, T.J., Husband, R., Fitter, A.H., Young, J.P.W., 1998. Ploughing up the wood-wide web. *Nature* 394, 431.
- Husband, R., Herre, E.A., Young, J.P., 2002. Temporal variation in the arbuscular mycorrhizal communities colonizing seedlings in a tropical forest. *FEMS Microbiology Ecology* 42, 131-136.
- Hussey, R.S., Roncadori, R.W., 1982. Vesicular-arbuscular mycorrhizae may limit nematode activity and improve plant growth. *Plant Disease* 66, 9-14.
- Ingham, R.E., 1988. Interactions between nematodes and vesicular-arbuscular mycorrhizae. *Agriculture, Ecosystems and Environment* 24, 169-182.
- INVAM
- Isman, M., 2006. Botanical insecticides, deterrents, and repellents in modern agriculture and an increasingly regulated world. *Annual Review of Entomology* 51, 45-66.

- Janssen, P.H., Yates, P.S., Grinton, B.E., Taylor, P.M., Sait, M., 2002. Improved culturability of soil bacteria and isolation in pure culture of novel members of the divisions acidobacteria, actinobacteria, proteobacteria, and verrucomicrobia. *Applied and Environmental Microbiology* 68, 2391-2396.
- Jeffries, P., Dodd, J.C., 1991. The use of mycorrhizal inoculants in forestry and agriculture. *Handbook of applied mycology. Soil and Plants* 1, 155-185.
- Johnson, N.C., Graham, J.H., Smith, F.A., 1997. Functioning of mycorrhizal associations along the mutualism-parasitism continuum. *New Phytology* 135, 575-585.
- Joseph, S.J., Hugenholtz, P., Sangwan, P., Osborne, C.A., Janssen, P.H., 2003. Laboratory cultivation of widespread and previously uncultured soil bacteria. *Applied and Environmental Microbiology* 69, 7210-7215.
- Kaya, C., Ashraf, M., Sonmez, O., Aydemir, S., Tuna, A.L., Cullu, M.A., 2009. The influence of arbuscular mycorrhizal colonization on key growth parameters and fruit yield of pepper plants grown at high salinity. *Scientia Horticulturae* 121, 1-6.
- Kojdrój, J., van Elsas, J.D., 2000. Application of polymerase chain reaction-denaturing gradient gel electrophoresis for comparison of direct and indirect extractions methods of soil DNA used for microbial community fingerprinting. *Biology and Fertility of Soils* 31, 372-378.
- Konopka, A., Oliver, J., Turco, R.F., 1998. The use of carbon source utilization patterns in environmental and ecological microbiology. *Microbial Ecology* 35, 103-115.
- Kowalchuk, G.A., de Souza, F.A., van Veen, J.A., 2002. Community analysis of arbuscular mycorrhizal fungi associated with *Ammophila arenaria* in Dutch coastal sand dunes. *Molecular Ecology* 11, 571-581.
- Lee, J., Lee, S., Young, J.P.W., 2008. Improved PCR primers for the detection and identification of arbuscular mycorrhizal fungi. *FEMS Microbiology Ecology* 65, 339-349.
- Liang, Z., Drijber, R.A., Lee, D.J., Dwiekat, I.M., Harris, S.D., Wedin, D.A., 2008. A DGGE-cloning method to characterize arbuscular mycorrhizal community structure in soil. *Soil Biology and Biochemistry* 40, 956-966.

- Liesac, W., Weyland, H., Stackebrandt, E., 1991. Potential risks of gene amplification by PCR as determined by 16S rRNA analysis of a mixed-culture of strict barophilic bacteria. *Microbial Ecology* 21, 191-198.
- Linderman, R.G., Pflieger, F.L., 1994. *Mycorrhizae and plant health*. American Phytopathological Society Press, St. Paul (US), 1-26.
- Ludley, K.E., Robinson, C.H., Jickells, S., Chamberlain, P.M., Whitaker, J., 2009. Potential for monoterpenes to affect ectomycorrhizal and saprotrophic fungal activity in coniferous forests is revealed by novel experimental system. *Soil Biology & Biochemistry* 41, 117-124.
- Lum, M.R., Hirsch, A.M., 2003. Roots and their symbiotic microbes: Strategies to obtain nitrogen and phosphorus in a nutrient-limiting environment. *Journal of Plant Growth Regulation* 21, 368-382.
- Ma, W.K., Siciliano, S.D., Germida, J.J., 2005. A PCR-DGGE method for detecting arbuscular mycorrhizal fungi in cultivated soils. *Soil Biology and Biochemistry* 37, 1589-1597.
- MacRae, I.C., Alexander, M., 1965. Microbial degradation of selected herbicides in soil. *Journal of Agricultural and Food Chemistry* 13, 72-75.
- Manjunath, A., Bagyaraj, D.J., 1984. Effect of fungicides on mycorrhizal colonization and growth of onion. *Plant and Soil* 80, 147-150.
- Marschner, H., Dell, B., 1994. Nutrient uptake in mycorrhizal symbiosis. *Plant and Soil* 159, 89-102.
- Miller, R.M., Jastrow, J.D., 1992. *Mycorrhizal Functioning: an integrative plant-fungal process*. Chapman and Hall, 438-467.
- Muyzer, G., de Waal, C., Uitterlinden, A.G., 1993. Profiling of complex microbial populations by denaturing gradient gel electrophoresis analysis of polymerase chain reaction-amplified genes encoding for 16S rRNA. *Applied and Environmental Microbiology* 59, 695-700.
- Nemeč, S., 1980. Effect of 11 fungicides on endomycorrhizal development in sour orange. *Canadian Journal of Botany* 58, 522-526.
- Oehl, F., Sieverding, E., Mäder, P., Dubois, D., Ineichen, K., Boller, T., Wiemken, A., 2004. Impact of long-term conventional and organic farming on the diversity of arbuscular mycorrhizal fungi. *Oecologia* 138, 574-583.

- Olsen, J.K., Schaefer, J.T., Edwards, D.G., Hunter, M.N., Galea, V.J., Muller, L.M., 1999. Effects of a network of mycorrhizae on capsicum (*Capsicum annuum* L.) grown in the field with five rates of applied phosphorus. *Australian Journal of Agricultural Research* 50, 239-252.
- Prosser, J.I., 2002. Molecular and functional diversity in soil microorganisms. *Plant and Soil* 244, 9-17.
- Ryan, M., Graham, J.H., 2002. Is there a role for arbuscular mycorrhizal fungi in production agriculture. *Plant and Soil* 244, 263-271.
- Sait, M., Hugenholtz, P., Janssen, H.P., 2002. Cultivation of globally distributed soil bacteria from phylogenetic lineages previously only detected in cultivation in dependent surveys. *Environmental Microbiology* 4, 654-666.
- Salami, A.O., 2002. Influence of mycorrhizal inoculation on disease severity and growth of pepper (*Capsicum annuum* L.). *Archives of Agronomy and Soil Science* 48, 257-262.
- Sambrook, J., Fritsch, E.F., Maniatis, T., 1989. *Molecular cloning: a laboratory manual*. Second edition, Cold Spring Harbor Laboratory Press, Cold Spring Harbor, New York, USA, 1659 p.
- Schmutterer, H., 1990. Properties and potential of natural pesticides from Neem tree. *Annual Review of Entomology* 35, 271-297.
- Schussler, A., Schwarzott, D., Walker, C., 2001. A new fungal phylum, the Glomeromycota: phylogeny and evolution. *Mycological Research*. 105, 1413-1421.
- Simon, L., Lalonde, M., Bruns, T.D., 1992. Specific amplification of 18S fungal ribosomal genes from vesicular-arbuscular endomycorrhizal fungi colonizing roots. *Applied and Environmental Microbiology* 58, 291-295.
- Smith, J.R., Ferry, B.W., 1979. The effects of simazine, applied for weed control, on the mycorrhizal development of pinus seedlings. *Annals of Botany* 43, 93-99.
- Smith, S.E., Read, D.J., 1997. *Mycorrhizal symbiosis*. Academic Press.
- Sreenivasa, M.N., Bagyaraj, D.J., 1989. Use of pesticides for mass production of vesicular-arbuscular mycorrhizal inoculum. *Plant and Soil* 119, 127-132.

- Sugavanam, V., Udaiyan, K., Martian, S., 1994. Effect of fungicides on vesicular-arbuscular mycorrhizal infection and nodulation in groundnut (*Arachis hypogea* L.). *Agriculture, Ecosystems and Environment* 48, 285-293.
- Sykorova, Z., Ineichen, K., Wiemken, A., Redecker, D., 2007. The cultivation bias: different communities of arbuscular mycorrhizal fungi detected in roots from the field, from bait plants transplanted to the field, and from a greenhouse trap experiment. *Mycorrhiza* 18, 1-14.
- Sylvia, D.M., 1994. Vesicular-Arbuscular Mycorrhizal Fungi. *Soil Science Society of America*, 351-377.
- van der Heijden, M.G.A., Klironomos, J.N., Ursic, M., Moutoglis, P., Streitwolf-Engel, R., Boller, T., Wiemken, A., Sanders, I.R., 1998. Mycorrhizal fungal diversity determines plant biodiversity, ecosystem variability and productivity. *Nature* 396, 69-72.
- van Elsas, J.D., Duarte, G.E., Rosado, A.S., Smalla, K., 1998. Microbiological and molecular methods for monitoring microbial inoculants and their effects in the environment. *Journal of Microbiological Methods* 32, 133-154.
- van Elsas, J.D., Frois-Duarte, G., Keijzer-Wolters, A., Smit, E., 2000. Analysis of the dynamics of fungal communities in soil via fungal-specific PCR of soil DNA followed by denaturing gradient gel electrophoresis. *Journal of Microbiological Methods* 43, 133-151.
- von Alten, H., Lindemann, A., Schenbeck, F., 1993. Stimulation of vesicular-arbuscular mycorrhiza by fungicides or rhizosphere bacteria. *Mycorrhiza* 2, 167-173.
- Wan, M.T., Rahe, J.E., 1998. Impact of azadirachtin on *Glomus intraradices* and vesicular-arbuscular mycorrhiza in root inducing transferred DNA transformed roots of *Daucus carota*. *Environmental Toxicology and Chemistry* 17, 2041-2050.
- Wang, B.Y., Qiu, L., 2006. Phylogenetic distribution and evolution of mycorrhizas in land plants. *Mycorrhiza* 16, 299-363.
- West, H.M., Fitter, A.H., Watkinson, A.R., 1993. Response of *Vulpia ciliata* spp. *ambigua* to removal of mycorrhizal infection and to phosphate application under natural conditions. *Journal of Ecology* 81, 351-358.

- Wickham, J.C., Chadwick, P.R., Stewart, D.C., 1974. Factors which influence the knockdown effect of insecticide products. *Pest Management Science* 5, 657-664.
- Zhang, X.H., Zhu, Y.G., Lin, A.J., Chen, B.D., Smith, S.E., Smith, F.A., 2006. Arbuscular mycorrhizal fungi can alleviate the adverse effects of chlorothalonil on *Oryza sativa* L.. *Chemosphere* 64, 1627-1632.
- Γεωργία & Κτηνοτροφία, 2005. Αγρότυπος, Τεύχος 9.
- Κανονισμός ΕΚ 834/2007
- Μαρκουλάτος, Π., 2007. Σημειώσεις μαθήματος Ποιοτικές και Ποσοτικές Μέθοδοι Ανάλυσης. ΜΤΠ Βιοχημείας-Βιοτεχνολογίας.

