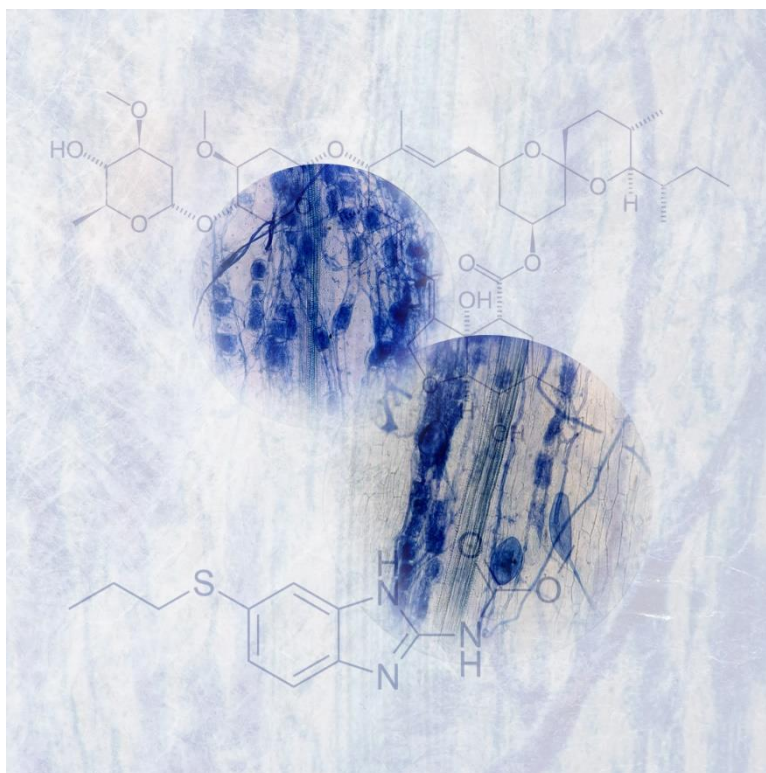




Πανεπιστήμιο Θεσσαλίας
Τμήμα Βιοχημείας και Βιοτεχνολογίας
Πρόγραμμα Μεταπτυχιακών Σπουδών: <<Τοξικολογία>>

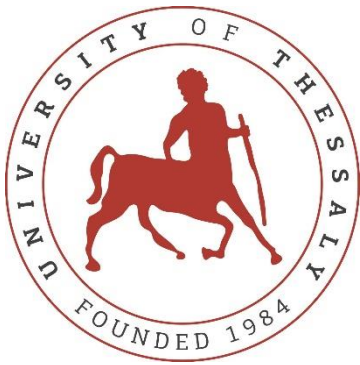
Μεταπτυχιακή Διατριβή

<<ΕΛΕΓΧΟΣ ΤΗΣ ΠΙΘΑΝΗΣ ΤΟΞΙΚΗΣ ΔΡΑΣΗΣ ΑΝΘΕΛΜΙΝΘΙΚΩΝ ΠΑΡΑΣΙΤΟΚΤΟΝΩΝ ΣΤΗ ΣΥΝΑΨΗ ΣΥΜΒΙΩΤΙΚΩΝ ΣΧΕΣΕΩΝ ΤΩΝ ΦΥΤΩΝ ΜΕ ΔΕΝΔΡΟΜΟΡΦΟΥΣ ΜΥΚΟΡΡΙΖΙΚΟΥΣ ΜΥΚΗΤΕΣ>>



Γκιμπριξή Ελένη

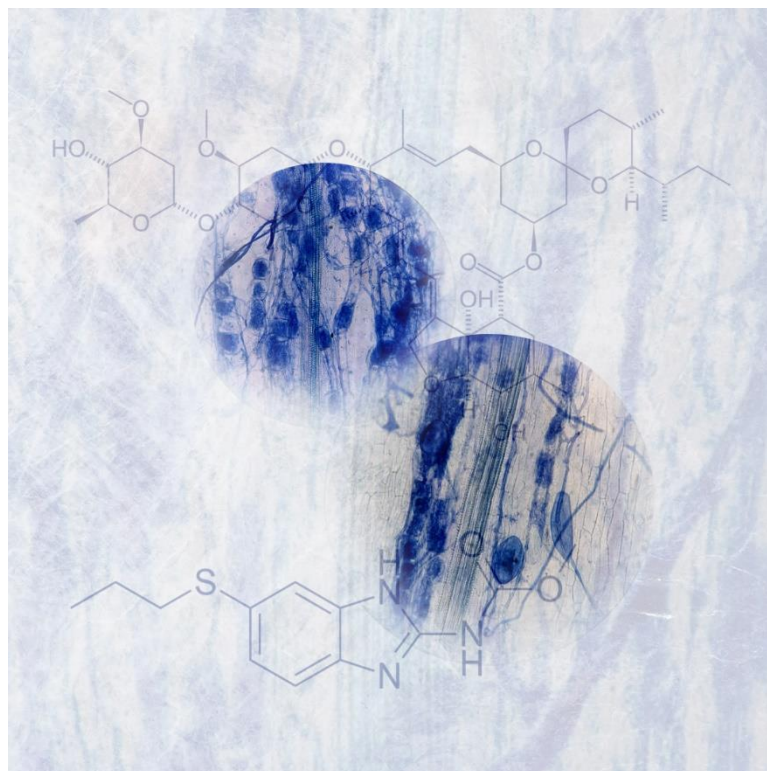
Λάρισα 2022



University of Thessaly
Department of Biochemistry and Biotechnology
Master of Science program: "Toxicology"

MSc Thesis

"ASSESSMENT OF THE PUTATIVE TOXIC EFFECT OF ANTHELMINTIC DRUGS ON THE SYMBIOTIC RELATIONSHIP BETWEEN PLANTS AND ARBUSCULAR MYCORRHIZAL FUNGI"



Gkimprxi Eleni

Larisa 2022

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

Τριμελής επιτροπή:

1. Τσίκου Δανιέλα, Επίκουρος Καθηγήτρια Μοριακής και Αναπτυξιακής Βιολογίας Φυτών
2. Καρπούζας Δημήτριος, Καθηγητής Περιβαλλοντικής Μικροβιολογίας και Βιοτεχνολογίας
3. Βασιλειάδης Σωτήριος: Επίκουρος Καθηγητής Μοριακής Μικροβιακής Οικολογίας-Γονιδιωματικής

Ευχαριστίες

Αρχικά, θα ήθελα να ευχαριστήσω θερμά την υπεύθυνη καθηγήτρια μου κα. Τσίκου Δανιέλα που μου έδωσε τη δυνατότητα να εκπονήσω την διπλωματική μου εργασία συμμετέχοντας σε αυτή την ενδιαφέρουσα μελέτη. Την ευχαριστώ καθώς, υπό την καθοδήγηση και την επίβλεψη της με ενέπνευσε και με βοήθησε να βελτιωθώ.

Ένα ευχαριστώ οφείλω και στον καθηγητή κ. Καρπούζα Δημήτριο για την συνεργασία και την βοήθεια του κατά τη διάρκεια της εργασίας.

Ακόμα, θα ήθελα να ευχαριστήσω τον υποψήφιο διδάκτορα Λαγό Στάθη για την βοήθεια του στην πραγματοποίηση πειραματικών αναλύσεων.

Επιπλέον, θα ήθελα να ευχαριστήσω τους φίλους μου για την συμπαράσταση και την υποστήριξη που μου έδειξαν σε όλη την διάρκεια των σπουδών μου.

Τέλος, ένα μεγάλο ευχαριστώ στα αδέρφια και τους γονείς μου που μου έδειξαν εμπιστοσύνη και με στήριξαν στην πραγματοποίηση των στόχων μου όλα αυτά τα χρόνια.

Περιεχόμενα

Περίληψη.....	7
Abstract.....	8
1.Εισαγωγή.....	9
1.1 Δενδρόμορφοι ενδομυκορριζικοί μύκητες.....	9
1.1.1 Σχηματισμός δενδρόμορφων ενδομυκορριζών	9
1.1.2 Σηματοδότηση κατά τον σχηματισμό δενδρόμορφων δομών.....	11
1.1.3 Εκφυλισμός των δενδρόμορφων δομών.....	15
1.1.4 Προσφορά δενδρόμορφων μυκορριζών στο φυτό.....	16
1.1.4.1 Πρόσληψη θρεπτικών.....	16
1.1.4.2 Αντίσταση στα παθογόνα.....	17
1.1.4.3 Προστασία από αβιοτική καταπόνηση.....	18
1.1.5 Προσφορά φυτού στις δενδρόμορφες μυκορριζές.....	18
1.2 Ανθελμινθικά φάρμακα.....	19
1.2.1 Αλβενδαζόλη.....	20
1.2.2 Ιβερμεκτίνη.....	22
1.3 Γεωργικά φάρμακα που επηρεάζουν τους δενδρόμορφους μυκορριζικούς μύκητες.....	27
1.3.1 Άλλοι παράγοντες που επηρεάζουν τους δενδρόμορφους μυκορριζικούς μύκητες	30
2. Υλικά και Μέθοδοι.....	31
2.1 Βιολογικό υλικό, εφαρμογή φαρμάκων, εμβολιασμός και ανάπτυξη φυτών.....	31
2.1.1 Απολύμανση και εκβλάστηση σπόρων.....	31
2.1.2 Προετοιμασία φαρμάκων.....	31
2.1.3 Εφαρμογή φαρμάκων και εμβολιασμός των φυτών με τη μέθοδο sandwich.....	31
2.2 Συγκομιδή φυτών-Χρώση ριζών.....	33

2.3 Παρατήρηση δειγμάτων σε οπτικό μικροσκόπιο.....	34
2.4 Υπολογισμός συγκεντρώσεων φαρμάκων με υγρή χρωματογραφία υψηλής απόδοσης (HPLC).....	34
2.4.1 Προσδιορισμός πρότυπης καμπύλης.....	34
2.4.2 Εκχύλιση φαρμάκων από το θρεπτικό μέσο.....	35
2.5 Μοριακή ανάλυση.....	35
2.5.1 Απομόνωση ριβονουκλεϊκού οξέος (RNA).....	35
2.5.2 Απομάκρυνση DNA από δείγματα RNA.....	36
2.5.3 PCR- Ηλεκτροφόρηση.....	36
2.5.4 Σύνθεση συμπληρωματικού DNA (cDNA).....	37
2.5.5 Ποσοτική PCR πραγματικού χρόνου (qPCR).....	37
2.6 Στατιστική ανάλυση.....	39
3. Αποτελέσματα.....	40
3.1 Έλεγχος επίδρασης της ιβερμεκτίνης στον αποικισμό των φυτών από δενδρόμορφους μυκορριζικούς μύκητες (ΔΜΜ).....	40
3.2 Έλεγχος επίδρασης της αλβενδαζόλης στον αποικισμό των φυτών από δενδρόμορφους μυκορριζικούς μύκητες (ΔΜΜ).....	43
3.3 Έλεγχος επίδρασης αλβενδαζόλης στην ανάπτυξη και την λειτουργικότητα των δενδρόμορφων δομών.....	49
4. Συζήτηση.....	54
5. Βιβλιογραφία.....	57

Περίληψη

Τα φυτά δημιουργούν συμβιωτικές σχέσεις με διάφορους μικροοργανισμούς του εδάφους. Μία ευρέως γνωστή κατηγορία τέτοιων μικροοργανισμών είναι οι δενδρόμορφοι μυκορριζικοί μύκητες (ΔΜΜ). Είναι αρκετά διαδεδομένοι συμβιώτες των φυτών και μπορούν να αποικίσουν το 80% αυτών. Από αυτή τη συμβίωση τα φυτά επωφελούνται καθώς έχουν καλύτερη πρόσβαση σε απαραίτητα θρεπτικά, νερό, ενισχυμένη αντίσταση σε παθογόνα και προστασία από αβιοτικές καταπονήσεις. Ως αντάλλαγμα το φυτό αποτελεί για το μύκητα πηγή άνθρακα, απαραίτητο στοιχείο για την ολοκλήρωση του κύκλου ζωής του. Η αποτελεσματική λειτουργία αυτής της συμβιωτικής σχέσης έχει μεγάλη σημασία για την αειφορική γεωργία καθώς η χρήση των ΔΜΜ ως βιολίπασμα μειώνει σημαντικά την χρήση συνθετικών λιπασμάτων και άλλων χημικών προϊόντων. Ωστόσο, υπάρχουν παράγοντες που απειλούν την διατήρηση των ΔΜΜ. Ένας τέτοιος παράγοντας είναι τα γεωργικά φάρμακα. Έχουν αναφερθεί αρνητικές επιπτώσεις κάποιων φυτοπροστατευτικών φαρμάκων στους ΔΜΜ, ωστόσο παρατηρείται μεγάλη ετερογένεια στα αποτελέσματα των ερευνών που οφείλεται στο είδος του ξενιστή, στις κοινότητες μυκήτων, στις ιδιότητες και τον τρόπο δράσης του φαρμάκου, τον τρόπο εφαρμογής του και στο περιβάλλον ανάπτυξης. Πέρα από τα φυτοπροστατευτικά φάρμακα, στο περιβάλλον καταλήγουν και κτηνιατρικά φάρμακα που μπορούν να επηρεάσουν αρνητικά οργανισμούς μη στόχους. Μία τέτοια κατηγορία φαρμάκων είναι τα ανθελμινθικά φάρμακα που χορηγούνται σε ένα ευρύ φάσμα ζώων. Πιθανή επίδραση των φαρμάκων αυτών σε ΔΜΜ δεν έχει μελετηθεί. Σκοπός της παρούσας μελέτης ήταν η αξιολόγηση της πιθανής τοξικής δράσης δύο τέτοιων φαρμάκων, της ιβερμεκτίνης και της αλβενδαζόλης, στους ΔΜΜ. Σε πρώτο στάδιο μελετήθηκε η επίδραση ενός εύρους συγκεντρώσεων των φαρμάκων, στο ποσοστό αποικισμού φυτών *Lotus japonicus* από τον ΔΜΜ *Rhizophagus irregularis*. Μικροσκοπική παρατήρηση των δενδρόμορφων δομών του μύκητα στις ρίζες έδειξε πως η ιβερμεκτίνη σε συγκεντρώσεις 0,06-58mg/L δεν προκαλεί κάποια παρεμπόδιση στον αποικισμό των ριζών από ΔΜΜ. Αντίθετα, η αλβενδαζόλη φαίνεται να επηρεάζει αρνητικά τον αποικισμό ήδη από τα 5mg/L, ενώ από τα 8mg/L η παρεμπόδιση του αποικισμού αρχίζει να είναι πολύ σημαντική. Μοριακή ανάλυση σε συγκέντρωση 5mg/L αλβενδαζόλης έδειξε πως παρόλο που σχηματίζεται ικανοποιητικός αριθμός δενδρόμορφων δομών του μύκητα στις ρίζες στη συγκέντρωση αυτή, η λειτουργικότητά τους απουσιάζει ή δεν είναι πλήρης. Συγκεκριμένα, ανάλυση με ποσοτική PCR πραγματικού χρόνου έδειξε δραματική μείωση στα επίπεδα έκφρασης των γονιδίων *LjSbtM1*, *LjPT4* και *LjAMT2.2* που αποτελούν σημαντικά γονίδια-δείκτες του σχηματισμού και της λειτουργίας των δενδρόμορφων δομών του μύκητα.

Abstract

Plants engage into symbiotic relationships with different soil microorganisms. A widely known category of such microorganisms is the arbuscular mycorrhizal fungi (AMF). It has been noticed that they can be found in 80% of land plant species. In this symbiotic relationship, fungi contribute to plant growth by providing better access to nutrients and water, while at the same time they improve the resistance to pathogens and tolerance to abiotic stress. On the other hand, AM fungi, as obligate biotrophs, obtain fixed carbon from plants that is necessary for completing their reproductive cycle. Functionality of this symbiotic relationship is important, since it contributes towards a sustainable agriculture, because AMF can be used as biofertilizers replacing synthetic fertilizers and other chemical products. However, there are some factors, like pesticides, that threaten this symbiosis between plants and AMF. Many reports have highlighted the adverse effect that some pesticides have on AMF, however significant variation is noticed among these studies. The effects of pesticides depend on the host plant, the AMF species, the mode of action of drugs, the application methods, as well as the environment. Except for the pesticides, non-target organisms can also be exposed to veterinary drugs, like anthelmintic drugs. Currently, there is no research on the effect of veterinary medicines on AMF. The aim of this study was to assess the potential toxic effect that two anthelmintic drugs, albendazole and ivermectin, may have on the establishment of a symbiotic relationship between plants and AMF. Initially, a range of concentrations of the two drugs was tested for putative effects on the colonization of *Lotus japonicus* plants by the AMF *Rhizophagus irregularis*. Based on the microscopical observation of arbuscules on the plant's roots, it appeared that the presence of ivermectin on concentration ranging from 0,06 to 58mg/L does not have any effect on root's colonization by AMF. On the other hand, it was noticed that 5 mg/L of albendazole negatively affect the root's colonization by AMF, while this negative effect became stronger and very significant at 8 mg/L albendazole or higher. Although a sufficient number of arbuscules is formed in the presence of 5 mg/L albendazole, a molecular analysis showed that these arbuscules are either not well formed or not fully functional. In particular, quantitative polymerase chain reaction (qPCR) showed a dramatic reduction in the expression levels of the AMF-specific genes *LjSbtM1*, *LjPT4* και *LjAMT2.2*. that are used as marker-genes for the study of the arbuscule development and functionality.

1. Εισαγωγή

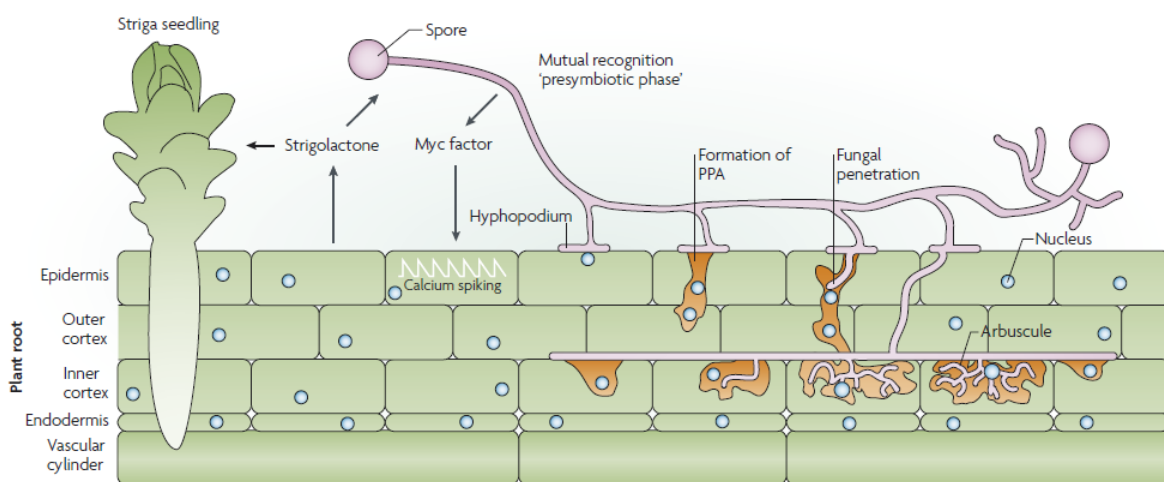
1.1 Δενδρόμορφοι ενδομυκορριζικοί μύκητες

Ο όρος μυκόρριζα αναφέρεται στις διάφορες μορφές συμβίωσης μεταξύ ριζών ενός φυτού και μυκήτων. Υπάρχουν οι μυκόρριζες στις οποίες ο μύκητας παραμένει έξω από τα φυτικά κύτταρα και ονομάζονται εκτομυκόρριζες και άλλες στις οποίες μυκητιακές υφές εισέρχονται στα κύτταρα της ρίζας και ονομάζονται ενδομυκόρριζες (**Parniske 2008**). Περίπου το 90% των φυτικών ειδών μπορούν να αποικιστούν από μυκορριζικούς μύκητες. Από αυτήν την σχέση επωφελούνται και οι δύο οργανισμοί. Από τη μία, ο μύκητας παρέχει στο φυτό καλύτερη πρόσβαση σε απαραίτητα για την ανάπτυξη του ανόργανα θρεπτικά συστατικά (κυρίως φωσφορικά) και στο νερό, ενισχύει την ανάπτυξη του καθώς και την αντίσταση σε καταπονήσεις και στα παθογόνα. Από την άλλη, το φυτό παρέχει στον μύκητα τις απαραίτητες οργανικές ουσίες για την ολοκλήρωση του κύκλου ζωής του και την παραγωγή νέων σπορίων (**Parniske 2008; Bonfante & Genre, 2010**). Αν και τα σπόρια του μύκητα μπορούν να εκβλαστήσουν απουσία ξενιστή, για να ολοκληρωθεί ο κύκλος ζωής του μύκητα είναι απαραίτητη η παρουσία φωτοαυτότροφου ξενιστή από τον οποίο είναι απόλυτα εξαρτημένος. Αυτή η ενδοσυμβιωτική σχέση φαίνεται ότι συμβάλλει στον κύκλο κάποιων θρεπτικών όπως του φωσφόρου και του άνθρακα και επηρεάζει την πρωτογενή παραγωγή μέσω της ικανότητας των μυκήτων να προσλαμβάνουν αυτά τα θρεπτικά από το έδαφος και να τα παρέχουν στο φυτό (**Parniske 2008**). Οι ενδομυκόρριζες μπορούν να χωριστούν σε τρεις κατηγορίες: τα ορχιδοειδή, τα ερικοειδή και τις δενδρόμορφες μυκόρριζες (ΔΜ). Οι δενδρόμορφοι μυκορριζικοί μύκητες (ΔΜΜ) είναι οι πιο διαδεδομένοι μυκητιακοί συμβιώτες των φυτών και μπορούν να εντοπιστούν στο 80% των φυτών. Οι ΔΜΜ ανήκουν στο φύλο *Glomeromycota* (**Bonfante & Genre, 2010**). Οι μύκητες αυτοί σχηματίζουν κύστες, υφές και θυσσάνους (δενδρόμορφες δομές) στη ρίζα καθώς επίσης και σπόρους και υφές στην ριζόσφαιρα. Ακόμα, οι υφές σχηματίζουν ένα δίκτυο ενισχύοντας την πρόσβαση του φυτού σε θρεπτικά του εδάφους και νερό (**Begum et al., 2019**). Κατά την συμβίωση οι υφές του μύκητα διακλαδίζονται στο εσωτερικό του φυτικού κυττάρου της ρίζας σχηματίζοντας δομές που μοιάζουν με δέντρα για αυτό και λέγονται δενδρόμορφες (arbuscular) μυκόρριζες. Αυτές οι δομές είναι βασικές για την ανταλλαγή θρεπτικών συστατικών μεταξύ του μύκητα και του φυτού. Συνδέουν το φυτό στο δίκτυο υφών των μυκήτων το οποίο μπορεί να ξεπεράσει τα 100 μέτρα υφών ανά κυβικό εκατοστό εδάφους και συνδέει ολόκληρες κοινότητες φυτών προφέροντας αποτελεσματική οριζόντια μεταφορά θρεπτικών (**Parniske 2008; Bonfante & Genre, 2010**). Ένα ιδιαίτερο στοιχείο των ΔΜΜ είναι ότι θεωρούνται ζωντανά απολιθώματα, καθώς παρέμειναν αναλλοίωτοι περισσότερο από 400 εκατομμύρια χρόνια (**Parniske 2008**). Από εξελικτική σκοπιά φαίνεται ότι η εξάρτησή τους από το φυτό και η απώλεια της ικανότητας να λαμβάνουν θρεπτικά από νεκρή οργανική ύλη, δεν εμπόδισε αυτούς τους οργανισμούς να επιβιώσουν (**Bonfante & Genre, 2010**).

1.1.1 Σχηματισμός δενδρόμορφων ενδομυκορριζών

Η διαδικασία συμβίωσης μπορεί να χωριστεί σε στάδια. Το πρώτο στάδιο ονομάζεται προσυμβιωτικό και είναι το στάδιο όπου το φυτό στέλνει συγκεκριμένα σήματα στον μύκητα δηλώνοντας την παρουσία του ως ξενιστής. Ακολουθεί το στάδιο πριν την επαφή όπου γίνεται ανταλλαγή σημάτων μεταξύ φυτού-μύκητα. Έπειτα είναι το στάδιο του αποικισμού

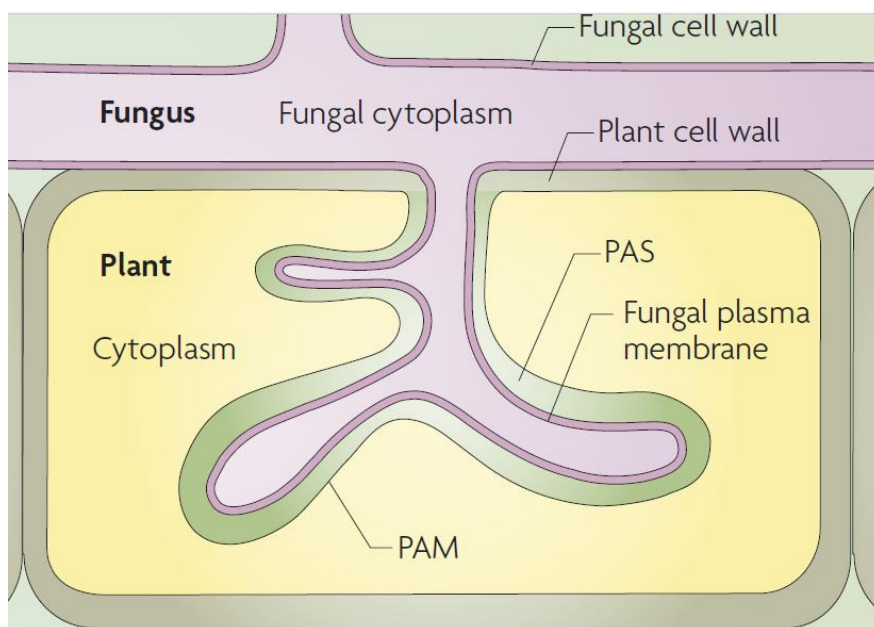
όπου γίνεται η επαφή και η διείσδυση του μύκητα στο φυτικό κύτταρο. Τέλος, υπάρχει το στάδιο της ανταλλαγής θρεπτικών (ανασκόπηση στο άρθρο **Banasiak et al., 2021**). Επομένως, ο σχηματισμός των ΔΜ ξεκινάει με την ανταλλαγή σηματοδοτικών μορίων μεταξύ του φυτού και του μύκητα. Ακολουθεί η ανάπτυξη της υφής προς την ρίζα η οποία μπορεί να κινείται στην επιφάνεια της ρίζας για αρκετά εκατοστά μέχρι τελικά να σταθεί σε ορισμένα επιδερμικά κύτταρα. Εκεί αυξάνεται και διακλαδίζεται σχηματίζοντας το λεγόμενο υφοπόδιο (hyphopodium). Τα υφοπόδια αρχίζουν να αναπτύσσουν δομές προς το φυτικό κυτταρικό τοίχωμα. Ακολουθεί η είσοδος μέσω των επιδερμικών κυττάρων της ρίζας στον φλοιό της (ανασκόπηση στα άρθρα **Bonfante & Genre, 2010; Luginbuehl & Oldroyd, 2017**). Είναι ενδιαφέρον το γεγονός ότι ο ξενιστής προετοιμάζει την είσοδο της υφής. Συγκεκριμένα, το κύτταρο στο οποίο ετοιμάζεται να διεισδύσει η υφή του μύκητα υφίσταται κυτταροσκελετικές αλλαγές και αναδιοργάνωση των οργανιδίων του. Πιο ειδικά, μόλις το φυτικό κύτταρο αντιληφθεί την ύπαρξη μύκητα αρχίζει να δημιουργεί έναν προ-διεισδυτικό μηχανισμό (prepenetration apparatus-PPA) που καθορίζει την ενδοκυτταρική πορεία της υφής. Ο προ-διεισδυτικός μηχανισμός αποτελείται από συστατικά του κυτταροσκελετού όπως μικροσωληνίσκους και μικροϊνίδια καθώς και από τμήμα ενδοπλασματικού δικτύου. Με αυτόν τον τρόπο δημιουργείται ένα σωληνοειδές μονοπάτι για την υφή. Μόλις η υφή αγγίξει το επιδερμικό κύτταρο της ρίζας ο πυρήνας του αρχικά μετακινείται προς το σημείο επαφής και έπειτα κατά μήκος του προ-διεισδυτικού μηχανισμού καθορίζοντας το μονοπάτι. Έπειτα η υφή επεκτείνεται από το υφοπόδιο και συνεχίζει την πορεία της προς τον φλοιό της ρίζας όπου και αρχίζει να εκτείνεται κατά μήκος της (**Genre 2005; Parniske 2008**). Όταν οι υφές καταφέρουν να διεισδύσουν ενεργοποιούν την δημιουργία προ-διεισδυτικού μηχανισμού στα κύτταρα του εσωτερικού φλοιού της ρίζας όπου αρχίζουν να σχηματίζονται διακλαδώσεις και δενδρόμορφες δομές (arbuscules) (**Genre et al., 2008; Parniske 2008**).



Εικόνα 1: Διαδικασία διείσδυσης υφών στην ρίζα και σχηματισμού δενδρόμορφων δομών (*Parniske 2008*)

Αν και η υφή του μύκητα εισέρχεται στο φυτικό κύτταρο, η πλασματική μεμβράνη του δεν υφίσταται ρήξη. Ανταυτού, οι δενδρόμορφες δομές του μύκητα διαχωρίζονται από το κυτταρόπλασμα του ξενιστή μέσω μιας μεμβράνης που τις περιβάλλει (περιδενδροειδής

μεμβράνη: periarbuscular membrane-PAM) και αποτελεί συνέχεια της πλασματικής μεμβράνης του φυτικού κυττάρου όπως φαίνεται στην **Εικόνα 2 (Parniske 2008; Luginbuehl & Oldroyd, 2017)**. Έχουν βρεθεί δύο διαφορετικά τμήματα της μεμβράνης που διαχωρίζονται τόσο λόγω της τοποθεσίας τους όσο και της πρωτεϊνικής τους σύστασης. Το ένα τμήμα είναι ο κορμός της δενδρόμορφης δομής (trunk), αποτελεί την βάση της και περιέχει πρωτεΐνες που υπάρχουν στην πλασματική μεμβράνη. Από την άλλη το δεύτερο τμήμα περιλαμβάνει τα κλαδιά (branch), περικλείει τις διακλαδώσεις των υφών και περιλαμβάνει ένα σύνολο πρωτεϊνών που μεσολαβούν στην ανταλλαγή θρεπτικών μεταξύ φυτού και μύκητα, όπως είναι οι μεταφορείς φωσφόρου (**Pumplin & Harrison, 2009; Luginbuehl & Oldroyd, 2017**). Ανάμεσα στην πλασματική μεμβράνη του μύκητα και στην περιδενδροειδή μεμβράνη υπάρχει ένας ενδιάμεσος περιδενδροειδής χώρος (periarbuscular space-PAS). Η ανταλλαγή θρεπτικών και μοριακών σημάτων γίνεται σε αυτό το περιβάλλον διασύνδεσης μύκητα-φυτού που περιλαμβάνει την περιδενδροειδή μεμβράνη, την μεμβράνη του μύκητα και τον ενδιάμεσο χώρο (**Parniske 2008; Luginbuehl & Oldroyd, 2017**).



Εικόνα 2: Δομή θυσσάνου (*arbuscule*) (Parniske 2008)

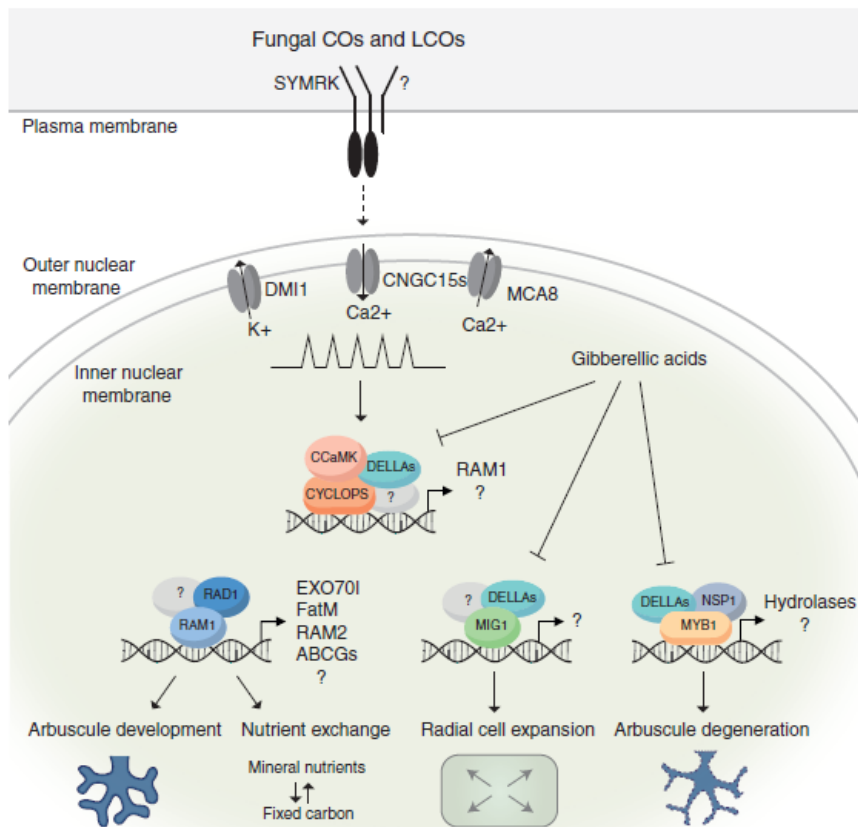
1.1.2 Σηματοδότηση κατά τον σχηματισμό δενδρόμορφων δομών

Όπως αναφέρεται και πιο πάνω κατά την έναρξη σχηματισμού των ΔΜ υπάρχει ένα στάδιο που ονομάζεται προσυμβιωτικό. Κατά το στάδιο αυτό, πριν πραγματοποιηθεί φυσική επαφή των συμβιωτών, το φυτό γίνεται αντιληπτό από τον μύκητα εκκρίνοντας φυτοορμόνες, τις στριγγολακτονες (SLs). Στην μεταφορά των ορμονών αυτών συμμετέχει ένας ABCG μεταφορέας που λέγεται PLEIOTROPIC DRUG RESISTANCE 1 (PDR1) που ενεργοποιείται κυρίως σε συνθήκες έλλειψης φωσφόρου (**Kretzschmar et al., 2012**). Η δημιουργία διαβαθμισμένης συγκέντρωσης αυτών των ορμονών αποτελεί δείκτη εγγύτητας στην ρίζα (**Parniske 2008**). Πέρα από τις στριγγολακτόνες το φυτό γίνεται αντιληπτό και μέσω άλλων

μορίων όπως είναι τα φλαβονοειδή, τα παράγωγα N-ακετυλογλυκοζαμίνης και τα υδροξυλιπαρά οξέα (ανασκόπηση στο άρθρο **Chiu & Paszkowski, 2020**). Συγκεκριμένα, έχει βρεθεί ότι η πρωτεΐνη NOPE1 πιθανότατα να μεσολαβεί στην έκκριση στοιχείων όμοιων με N-ακετυλογλυκοζαμίνης, επηρεάζοντας τις προσυμβιωτικές διαδικασίες, ωστόσο ακόμα δεν έχει εξακριβωθεί η λειτουργία της (**Banasiak et al., 2021**). Ο μύκητας σε αυτό το στάδιο αρχίζει να αυξάνει και να αναπτύσσει τις υφές του και να δημιουργεί διακλαδώσεις. Από την μεριά του και ο μύκητας εκκρίνει κάποια σηματοδοτικά μόρια τα οποία συνδέονται με υποδοχείς στα επιδερμικά κύτταρα της ρίζας και ενεργοποιούν την μεταγραφή γονιδίων που σχετίζονται με την συμβίωση (**Parniske 2008**). Συγκεκριμένα χιτοολιγοσακχαρίτες (CO4 και CO5), και λιποχιτοολιγοσακχαρίτες LCOs ενεργοποιούν το σηματοδοτικό μονοπάτι συμβίωσης στο φυτό (common symbiosis signaling pathway-CSSP), απαραίτητο για την συμβίωση. Ακόμα, υπάρχουν και μεγαλύτερα μόρια από αυτά, όπως το CO8 και η πεπτιδογλυκάνη (PGN) που ενεργοποιούν το μονοπάτι. Αν και η φύση των σηματοδοτικών μορίων δεν έχει ταυτοποιηθεί, είναι ξεκάθαρο ότι οι παραπάνω υδατάνθρακες- COs και LCOs - που αναγνωρίζονται από κινάσες LysM-RLKs ενεργοποιούν την σηματοδότηση για την έναρξη της συμβίωσης (**Luginbuehl & Oldroyd 2017 ; Chiu & Paszkowski, 2020**). Στο ρύζι ο RLK (receptor-like kinase) υποδοχέας CHITIN-ELICITOR PROTEIN KINASE 1 (OsCERK1) συμμετέχει στην αναγνώριση χιτοολιγοσακχαριτών του μύκητα. Ομόλογο του OsCERK1 σε φυτά *Lotus japonicus* είναι ο LjLYS6 που συμβάλλει τόσο στην ΔΜ συμβίωση όσο και στην άμυνα του φυτού (**Nasir et al., 2021**). Ένας RLK υποδοχέας που παίζει βασικό ρόλο στην έναρξη του σηματοδοτικού μονοπατιού είναι ο SYMRK (*L. japonicus*). Οι υποδοχείς αυτοί αντιλαμβάνονται την ύπαρξη συμβιώτη στο εξωκυτταρικό τμήμα του φυτού και μεταφέρουν το σήμα αυτό ενδοκυτταρικά. Η σηματοδότηση που ενεργοποιείται περιλαμβάνει εναλλαγές συγκέντρωσης Ca²⁺ γύρω από τον πυρήνα (**Parniske 2008; Chiu & Paszkowski, 2020**). Έχει αναφερθεί ότι ο SYMRK σχετίζεται με την αναγωγή 3-hydroxy-3-methylglutaryl-CoA (HMGR1) που συμμετέχει στην σύνθεση ισοπρενίου (mevalonate-MVA). Ακόμα, το ισοπρένιο φαίνεται να είναι ικανό να ενεργοποιήσει τις ταλαντώσεις συγκέντρωσης Ca²⁺ γύρω από τον πυρήνα και την έκφραση γονιδίων σχετικών με την συμβίωση, πιθανότατα μέσω αλληλεπίδρασης με κανάλια ιόντων όπως τα CASTOR και POLLUX (*L. japonicus*) (**Nasir et al., 2021**). Ακόμα, για την αύξηση συγκέντρωσης Ca²⁺ στον πυρήνα απαραίτητη είναι η παρουσία Ca²⁺ ATPase MCA8, όπως επίσης και το σύμπλοκο NUCLEAR PORE COMPLEX PROTEIN 85 (NUP85), NUP133, και NENA (**Parniske 2008; Chiu & Paszkowski, 2020; Nasir et al., 2021**). Η εντόπιση αλλαγών στην συγκέντρωση Ca²⁺ γίνεται από την εξαρτώμενη από το ασβέστιο και την καλμοδουλίνη πρωτεϊνική κινάση CCaMK (*L. japonicus*). Τα κανάλια που εμπλέκονται στην απελευθέρωση ασβεστίου γύρω από την πυρηνική μεμβράνη φαίνεται να ανήκουν στην οικογένεια καναλιών που εξαρτώνται από κυκλικά νουκλεοτίδια (CNGC). Αυτές οι απότομες αλλαγές στη συγκέντρωση ασβεστίου γύρω από τον πυρήνα συνεχίζονται καθόλη την διάρκεια του αποικισμού της ρίζας από τον μύκητα. Επομένως, και η σηματοδότηση μεταξύ φυτού και μύκητα διατηρείται (**Luginbuehl & Oldroyd, 2017**). Η κινάση CCaMK με την σειρά της φωσφορυλιώνει τον μεταγραφικό παράγοντα CYCLOPS (*L. japonicus*) ο οποίος ρυθμίζει την ενεργοποίηση πρωτεϊνών που ανήκουν στην οικογένεια των GRAS-πρωτεϊνών (RAM1, DELLA, NSP1, NSP2 κ.α) (**Parniske 2008; Chiu & Paszkowski, 2020; Nasir et al., 2021**). Μία τέτοια πρωτεΐνη είναι η RAM1 (REQUIRED FOR ARBUSCULAR MYCORRHIZATION 1), που είναι ένας άλλος μεταγραφικός ρυθμιστής που

εμπλέκεται στην ανάπτυξη ΔΜ. Συγκεκριμένα, συμμετέχει στην ρύθμιση αρκετών γονιδίων που σχετίζονται με τον σχηματισμό της περιδενδροειδούς μεμβράνης όπως το EXO70I. Επιπλέον, ρυθμίζει γονίδια που εμπλέκονται στην μεταφορά θρεπτικών συμπεριλαμβανομένων γονιδίων βιοσύνθεσης λιπιδίων και έκκρισης όπως είναι τα FatM, RAM2, και STR (Luginbuehl & Oldroyd, 2017). Έχει αναφερθεί ότι η RAM2 είναι απαραίτητη τόσο για τον σχηματισμό των υφοποδίων όσο και των θυσσάνων (Banasiak et al., 2021).

Μία άλλη κατηγορία πρωτεϊνών σημαντικών για τον σχηματισμό δενδρόμορφων δομών είναι οι πρωτεΐνες DELLA, που επίσης ανήκουν στην οικογένεια των GRAS-πρωτεϊνών και καταστέλλουν το σηματοδοτικό μονοπάτι του γιββερελλικού οξέος. Υπάρχουν στοιχεία ότι οι πρωτεΐνες αυτές οδηγούν στην αύξηση παραγωγής RAM1 πρωτεϊνών. Ακόμα, έχει βρεθεί ότι οι DELLA δημιουργούν ένα σύμπλοκο με τις CCaMK και CYCLOPS που οδηγεί σε ενεργοποίηση έκφρασης RAM1 πρωτεΐνης. Επομένως, η έκφραση της RAM1 ελέγχεται από το συμβιωτικό σηματοδοτικό μονοπάτι μέσω των CCaMK/CYCLOPS, του σηματοδοτικού μονοπατιού γιββερελλικού οξέος, των DELLA πρωτεϊνών και ίσως μέσω άλλων μεταγραφικών παραγόντων. Άλλη μία GRAS-πρωτεΐνη που παίζει ρόλο στην δημιουργία ΔΜ είναι η RAD1 (REQUIRED FOR ARBUSCULE DEVELOPMENT 1), η οποία βρέθηκε σε *in vivo* μελέτες ότι αλληλεπιδρά με τις RAM1 και DELLAs όπως και η DIP1 (DELLA INTERACTING PROTEIN 1), γεγονός που οδηγεί στην υπόθεση ότι υπάρχει ένα σύμπλοκο GRAS-πρωτεϊνών που ρυθμίζει γονίδια που εμπλέκονται στον σχηματισμό ΔΜ. Ακόμα, η MIG1 (MYCORRHIZA-INDUCED GRAS 1) φαίνεται να αλληλεπιδρά με την DELLA1 δημιουργώντας ένα σύμπλοκο που ρυθμίζει την προετοιμασία της ρίζας για να δεχτεί τον ΔΜΜ. Τα δεδομένα αυτά αποτελούν μία ένδειξη ότι οι GRAS-πρωτεΐνες παίζουν σημαντικό ρόλο στην ρύθμιση έκφρασης γονιδίων που εμπλέκονται στην ανάπτυξη και την λειτουργία των δενδρόμορφων δομών και πιθανότατα να δρουν ως GRAS-σύμπλοκα. Επιπλέον, παρατηρήθηκε σε ορισμένα είδη ότι το σύμπλοκο μεταγραφικών παραγόντων MYB1/DELLA/NSP1 παίζει ρόλο στον εκφυλισμό των δενδρόμορφων. Επομένως, από τα παραπάνω φαίνεται ότι είναι πιθανό διάφορα σύμπλοκα GRAS-πρωτεϊνών ή άλλων μεταγραφικών παραγόντων να ρυθμίζουν διαφορετικά γονίδια σε διαφορετικούς χρόνους και διαφορετικούς κυτταρικούς τύπους που έχουν αποικιστεί από τον ΔΜΜ (Luginbuehl & Oldroyd 2017).



Εικόνα 3: Ρύθμιση σχηματισμού θυσσάνου (Luginbuehl & Oldroyd 2017)

Πέρα από τους υποδοχείς RLK που αναφέρονται παραπάνω, έχει βρεθεί άλλος ένας τύπος υποδοχών που φαίνεται να παίζει σημαντικό ρόλο στην επιτυχημένη δημιουργία δενδρόμορφων δομών. Οι υποδοχείς αυτοί λέγονται KAR. Συγκεκριμένα, σε μελέτη που έγινε στο ρύζι βρέθηκε ότι η αλληλεπίδραση ενός KAR υποδοχέα OsD14L με την πρωτεΐνη OsD3 οδηγεί στον εκφυλισμό ενός καταστολέα ΔΜ συμβίωσης και παραγωγής στριγγολακτονών, του OsSMAX1. Επομένως, αυτός ο KAR υποδοχέα φαίνεται να είναι απαραίτητος για την ΔΜ συμβίωση και την παραγωγή στριγγολακτονών (Nasir et al., 2021).

Παρατηρήθηκε ότι για τον σχηματισμό των ΔΜ απαιτείται η παρουσία ορισμένων πρωτεασών (subtilases). Συγκεκριμένα, οι SbtM1, SbtM3, SbtM4 και SbtS αυξάνονται σημαντικά κατά την ανάπτυξη ΔΜ. Σε φυτά *L. japonicus* που έγινε αποσιώπηση έκφρασης των *SbtM1* και *SbtM3* και εμβολιάστηκαν με *Glomus intraradices*, παρατηρήθηκε μείωση στο ποσοστό εσωτερικών υφών και θυσσάνων στις ρίζες. Οι πρωτεάσες αυτές εντοπίστηκαν στον αποπλαστικό χώρο και συγκεκριμένα στον περιδενδροειδή χώρο. Στην συγκεκριμένη περιοχή γίνονται οι ανταλλαγές μεταξύ των συμβιωτών. Επομένως, είναι πιθανό η παρουσία των πρωτεασών εκεί να παίζει σημαντικό ρόλο στην ανάπτυξη και την αποδοτικότητα των δενδρόμορφων δομών. Ωστόσο, αν και η ακριβής δράση τους δεν έχει αποκαλυφθεί, υπάρχουν ορισμένες υποθέσεις. Είναι πιθανό, οι πρωτεάσες αυτές να συμμετέχουν στον σχηματισμό πεπτιδίων που παίζουν ρόλο σε κάποιο σηματοδοτικό μονοπάτι κατά την συμβίωση. Μία άλλη πιθανή λειτουργία των πρωτεασών αυτών είναι η συνεισφορά τους στην διάσπαση δομικών

πρωτεϊνών του φυτικού κυτταρικού τοιχώματος με αποτέλεσμα την διευκόλυνση της επιμήκυνσης των υφών μεταξύ των κυττάρων και της διείσδυσης τους στα κύτταρα. Αν και δεν έχει εξακριβωθεί η δράση τους, είναι αδιαμφισβήτητο ότι παίζουν κάποιο σπουδαίο ρόλο κατά τον σχηματισμό ΔΜ και η παρουσία τους είναι απαραίτητη (**Takeda et al., 2009**).

Επιπλέον, μία άλλη πρωτεΐνη που εκφράζεται από το φυτό, η VAPYRIN φαίνεται να είναι απαραίτητη για την ενδοκυτταρική προσαρμογή του μύκητα. Ακόμα, υπάρχει πιθανότητα η πρωτεΐνη αυτή να συμμετέχει στο σχηματισμό της περιδενδροειδούς μεμβράνης (**Luginbuehl & Oldroyd 2017**). Σε κύτταρα όπου έγινε αποσιώπηση του γονιδίου της VAPYRIN παρατηρήθηκε μείωση στην επιδερμική διείσδυση των υφών και αποτυχία σχηματισμού δενδρόμορφων δομών (**Bonfante & Genre, 2010**).

Στο σχηματισμό των δενδρόμορφων δομών και της περιδενδροειδούς μεμβράνης σημαντικό ρόλο φαίνεται να παίζει το εκκριτικό μονοπάτι καθώς γύρω από τις δενδρόμορφες μορφές των υφών συγκεντρώνονται τμήματα ενδοπλασματικού δικτύου, στίβες Golgi, δίκτυα trans-Golgi και πολυκυστικά σωματίδια. Επιπλέον, πρωτεΐνες όπως οι VAMP721d, VAMP721e, SYP132A (t-SNARE πρωτεΐνη) και EXO70I (καθώς και άλλες EXO70 υπομονάδες) που ως γνωστόν συμμετέχουν σε διαδικασίες εξωκύτωσης παρατηρήθηκε ότι είναι απαραίτητες για την σωστή ανάπτυξη των δενδρόμορφων δομών (**Luginbuehl & Oldroyd, 2017**).

1.1.3 Εκφυλισμός των δενδρόμορφων δομών

Παρατηρήθηκε ότι οι δενδρόμορφες δομές έχουν μικρό χρόνο ζωής, περίπου δύο με οκτώ μέρες. Ωστόσο, μόλις γίνει ο εκφυλισμός τους το ίδιο φυτικό κύτταρο μπορεί να αποικιστεί από άλλη δενδρόμορφη δομή. Επομένως, δημιουργείται ένας συνεχής κύκλος σχηματισμού και εκφυλισμού δενδρόμορφων δομών. Φαίνεται ότι αυτό συμβαίνει ώστε το φυτό να μπορεί να επιβλέπει την συμβίωση. Ο εκφυλισμός αυτός είναι μία ελεγχόμενη διαδικασία που με κάποιον τρόπο ωφελεί το φυτό (**Luginbuehl & Oldroyd, 2017**). Συγκεκριμένα, παρατηρήθηκε ότι το φυτό με αυτόν τον τρόπο απομακρύνει μη αποτελεσματικές δενδρόμορφες δομές ώστε στη θέση τους να διεισδύσουν αποτελεσματικές που θα μπορούν να παρέχουν θρεπτικά στο φυτό. Ταυτόχρονα, με αυτόν τον τρόπο το φυτό διασφαλίζει ότι ένας δυνητικά καλός μύκητας δεν θα παραμείνει σε σημείο όπου δεν υπάρχει καλή ροή θρεπτικών. Έτσι επιτυγχάνεται μία γενικότερη ανανέωση του δικτύου μυκήτων (**Parniske 2008**). Παρατηρήθηκε ότι το φυτό με την χρήση ειδικών μεταφορέων θρεπτικών όπως ο μεταφορέας φωσφόρου PT13 και ο μεταφορέας αμμωνιακών ιόντων AMT2-3 μπορεί να υπολογίσει το επίπεδο των θρεπτικών που του παρέχονται από τον μύκητα και αναλόγως να διατηρήσει την ΔΜ συμβίωση ή να αποικοδομήσει την δενδρόμορφη δομή (**Luginbuehl & Oldroyd, 2017**).

1.1.4 Προσφορά δενδρόμορφων μυκορριζών στο φυτό

1.1.4.1 Πρόσληψη θρεπτικών

Η παρουσία ΔΜΜ ωφελεί με ποικίλους τρόπους το φυτό. Αρχικά, οι ΔΜΜ ενισχύουν σημαντικά την συγκέντρωση μακρο- και μικρο- θρεπτικών στο φυτό οδηγώντας σε αύξηση της φωτοσύνθεσης και επομένως καλύτερη ανάπτυξη του φυτού και αύξηση της βιομάζας (**Chen et al., 2017; Begum et al., 2019**). Ακόμα και σε συνθήκες ανεπάρκειας σε κάποιο θρεπτικό, οι μύκητες βελτιώνουν την πρόσβαση του φυτού σε αυτό (**Begum et al., 2019**). Πιο ειδικά, οι ΔΜΜ συμβάλλουν σημαντικά στην πρόσληψη φωσφόρου. Συγκεκριμένα, στο εξωριζικό τμήμα του μυκηλίου υπάρχουν μεταφορείς φωσφόρου. Έτσι ο φώσφορος εισέρχεται στο μυκήλιο από το έδαφος. Έπειτα, στο μυκητιακό κυτταρόπλασμα και στο ενδοριζικό μυκήλιο μεταφέρεται με την μορφή πολυφωσφορικών κόκκων. Ο φώσφορος απελευθερώνεται στο ενδοριζικό μυκήλιο και μέσω μεταφορέων προερχόμενων από τον ΔΜΜ περνάει στον ενδιάμεσο περιδενδροειδή χώρο. Τέλος, μεταφορείς φωσφόρου προερχόμενοι από το φυτό μεταφέρουν στον φώσφορο στο φυτικό κύτταρο (**Parniske 2008; Luginbuehl & Oldroyd, 2017**). Γενικότερα αυτοί οι μεταφορείς φωσφόρου ανήκουν στην οικογένεια Phosphate Transporter 1 (PHT1). Κατά τον αποικισμό από ΔΜΜ, αυξάνεται η έκφραση συγκεκριμένων μεταφορέων φωσφόρου (PT4 στα *Medicago truncatula* και PT11 στα *Oryza sativa*) αποκλειστικά σε κύτταρα με δενδρόμορφες δομές. Οι μεταφορείς αυτοί βρίσκονται στην μεμβράνη γύρω από τις δενδρόμορφες δομές. Αποτελούν βασικούς παράγοντες για τον επιτυχημένο αποικισμό καθώς μελέτες όπου είτε έγινε αποσιώπηση του γονιδίου του MtPT4 ή μειώθηκε η λειτουργικότητά του μεταφορέα φάνηκε ότι στην πρώτη περίπτωση μειώθηκε το ποσοστό αποικισμού και η ικανότητα δημιουργίας δενδρόμορφων δομών και στην δεύτερη παρατηρήθηκε πρόωρος εκφυλισμός τους. Ταυτόχρονα, υπάρχουν και μεταφορείς φωσφόρου όπως ο PT3 στα φυτά *L. japonicus* που παρόλο που η έκφρασή τους αυξάνεται κατά την δημιουργία δενδρόμορφων δομών δεν είναι απαραίτητοι για την πρόσληψη φωσφόρου κατά την συμβίωση. Οι μεταφορείς φωσφόρου που βρίσκονται στην περιδενδροειδή μεμβράνη για να λειτουργήσουν χρειάζονται ηλεκτροχημική βαθμίδωση πρωτονίων που δημιουργείται από μία H⁺-ATPάση της πλασματικής μεμβράνης. Έχουν βρεθεί συγκεκριμένες H⁺-ATPάσες σε διάφορους φυτικούς οργανισμούς που παράγονται ειδικά σε αποικισμένα από δενδρόμορφες δομές κύτταρα και είναι απαραίτητες για την σωστή ανταλλαγή θρεπτικών (**Banasiak et al., 2021**).

Επίσης, οι ΔΜΜ συνεισφέρουν στην καλύτερη και αποτελεσματικότερη πρόσληψη αζώτου. Το άζωτο μεταφέρεται στο εξωριζικό μυκήλιο μέσω μεταφορέων αμινοξέων, αμμωνιακών και νιτρικών (AMTs και NPF). Μέσα στο κυτταρόπλασμα του μύκητα μεταφέρεται ως αργινίνη, η οποία είναι πιθανό να μεταφέρεται στο ενδοριζικό μυκήλιο μέσω των πολυφωσφορικών κοκκίων που αναφέρονται παραπάνω. Εκεί, το άζωτο απελευθερώνεται από την αργινίνη με την μορφή ουρίας (**Parniske 2008; Luginbuehl & Oldroyd 2017**). Το άζωτο μεταφέρεται στο φυτό σε ανόργανη μορφή. Έχει βρεθεί στο φυτό *L. japonicus* ένας μεταφορέας αζώτου που παράγεται από το φυτό κατά τον αποικισμό του από μυκορριζικούς μύκητες, κυρίως σε κύτταρα όπου σχηματίζονται δενδρόμορφες δομές. Ο μεταφορέας αυτός ονομάζεται AMT2;2 και φαίνεται ότι έχει την ικανότητα να προσλαμβάνει NH₄⁺, να το αποπρωτονιώνει και να το

απελευθερώνει στο κυτταρόπλασμα του φυτικού κυττάρου σε μορφή NH₃ (Guether et al., 2009). Επιπλέον, έχουν βρεθεί αντίστοιχοι μεταφορείς και σε άλλους φυτικούς οργανισμούς όπως ο AMT3;1 στα *Oryza sativa* και *Sorghum bicolor*.

Πέρα από την πρόσληψη αζώτου και φωσφόρου, οι ΔΜΜ συμβάλλουν και στην καλύτερη πρόσληψη άλλων θρεπτικών. Για παράδειγμα, στο φυτό *L. japonicus* παρατηρήθηκε συσσώρευση του μεταφορέα Sultr1;2 σε αποικισμένα κύτταρα σε συνθήκες ανεπάρκειας σε θειικά, διευκολύνοντας έτσι την πρόσληψη θειικών από το έδαφος. Ακόμα, σε φυτά *Solanum lycopersicum* βρέθηκε ότι ο μεταφορέας καλίου Potassium Transporter 10 (SIHAK10), εκφράζεται αποκλειστικά σε κύτταρα με δενδρόμορφες δομές και συμμετέχει στην πρόσληψη καλίου από τις μυκόρριζες. Ομοίως σε φυτά *L. japonicus* βρέθηκε ο μεταφορέας καλίου LjHAK, η έκφραση του οποίου επάγεται από τις ΔΜ. Επιπλέον, μέταλλα όπως ψευδάργυρος (Zn), χαλκός (Cu), μαγγάνιο (Mn), και σίδηρος (Fe) φαίνεται να παρέχονται στο φυτό μέσω μυκορριζικών μονοπατιών (Banasiak et al., 2021).

Η μεταφορά των θρεπτικών στοιχείων από την πλασματική μεμβράνη του φυτού απαιτεί ενέργεια που παρέχεται από την ηλεκτροχημική βαθμιδωση πρωτονίων. Επομένως, για την αποτελεσματική μεταφορά των θρεπτικών από την μεμβράνη απαραίτητη είναι η λειτουργία μιας ΑΤΡάσης (Luginbuehl & Oldroyd, 2017). Είναι πιθανό ότι κατά την αποπρωτονίωση του NH₄⁺ που αναφέρεται παραπάνω τα πρωτόνια να παραμένουν στον ενδιάμεσο χώρο και να ενισχύουν την βαθμιδωση H⁺ για την μεταφορά θρεπτικών (Guether et al., 2009).

1.1.4.2 Αντίσταση στα παθογόνα

Οι ΔΜΜ πέρα από το γεγονός ότι συμβάλλουν στην καλύτερη απορρόφηση απαραίτητων θρεπτικών, ιδιαίτερα φωσφόρου, για την ανάπτυξη του φυτού, προσφέρουν και με άλλους τρόπους στο φυτό. Πιο ειδικά, ενισχύουν την αντίσταση του ενάντια σε κάποια παθογόνα. Για παράδειγμα, βρέθηκε ότι ο ΔΜΜ *Glomus mosseae* μειώνει σημαντικά την δράση του *Spiroplasma citri* σε φυτά *Madagascar periwinkle* (Tahat et al., 2014). Επιπλέον, έχει μελετηθεί η επίδραση διαφόρων ΔΜΜ στους πληθυσμούς νηματωδών παρασίτων όπου φάνηκε ότι παρουσία μυκήτων μειώνεται ο ερεθισμός που προκαλούν τα παράσιτα στα φυτά (ανασκόπηση στο άρθρο Akhtar et al., 2015). Επιπλέον, η δράση πολλών παθογόνων που οδηγούν κυρίως σε σήψη ή μαρασμό των ριζών όπως είναι τα *Rhizoctonia*, *Fusarium*, *Verticillium*, *Phytophthora*, *Pythium*, και *Aphanomyces* φαίνεται να μειώνεται παρουσία ΔΜΜ (ανασκόπηση στο άρθρο Whipps 2004). Όσον αφορά την επίδραση των ΔΜΜ σε ιούς που προσβάλλουν είτε το φύλλωμα, το βλαστό ή τη ρίζα του φυτού, υπάρχουν περιπτώσεις που η παρουσία ΔΜΜ ενισχύει τα αρνητικά συμπτώματα της ασθένειας. Ωστόσο, υπάρχουν και άλλες περιπτώσεις που ο ΔΜΜ φαίνεται να προστατεύει το φυτό από κάποιον ιό. Αυτή η αστάθεια στην δράση τους εξαρτάται από τον ιό, το φυτό, τον μύκητα και τις συνθήκες του περιβάλλοντος (ανασκόπηση στο άρθρο Hao et al., 2019). Αν και οι περισσότερες μελέτες αναφέρονται σε παθογόνα του εδάφους που επηρεάζουν την ανάπτυξη της ρίζας του φυτού, υπάρχουν και ορισμένες αναφορές στην αντίσταση που προσφέρουν οι ΔΜΜ σε παθογόνα του βλαστού. Συγκεκριμένα, σε φυτά *M. truncatula* αποδείχθηκε ότι η παρουσία ΔΜΜ βελτιώνει την αντίσταση τους στο παθογόνο *Xanthomonas campestris* (Liu et al., 2007). Ακόμα, οι ΔΜΜ επηρεάζουν την ανάπτυξη και την επιβίωση παθογόνων εντόμων αν και αυτό

εξαρτάται σε μεγάλο βαθμό από το είδος του εντόμου (ανασκόπηση στο άρθρο **Pozo & Azcón-Aguilar, 2007**).

1.1.4.3 Προστασία από αβιοτική καταπόνηση

Η παρουσία ΔΜΜ προστατεύει το φυτό και από παράγοντες που προκαλούν αβιοτική καταπόνηση, όπως οι ακραίες θερμοκρασίες, η ξηρασία, η αλατότητα και η παρουσία μετάλλων (ανασκόπηση στο άρθρο **Begum et al. 2019**). Κάποιες από τις στρατηγικές που χρησιμοποιούν οι ΔΜΜ για το σκοπό αυτό είναι οι εξής: μορφολογικές προσαρμογές, προστατευτικά μόρια, μεταφορά ρυπαντών, αλλαγές στην γονιδιακή έκφραση, κ.α (ανασκόπηση στο άρθρο **Hage-Ahmed et al., 2019**). Υπάρχουν ενδείξεις ότι οι ΔΜΜ αυξάνουν την αντοχή σε ξηρασία, ίσως μέσω της πρόσβασης σε μεγάλο εδαφικό όγκο λόγω των εκτεταμένων υφών, της συσσώρευσης ουσιών που αυξάνουν την ώσμωση και την καλύτερη απορρόφηση νερού ή την ενίσχυση αντιοξειδωτικών ενζύμων (**Abbaspour et al., 2012; Begum et al., 2019**). Επίσης, η παρουσία ΔΜΜ φαίνεται να οδηγεί στην ενίσχυση στοματικής αγωγιμότητας, ρυθμού διαπνοής και ανταλλαγής αερίων (**Morte et al., 2000**). Ακόμα, παρατηρήθηκε ότι οι ΔΜΜ βοηθούν στην αντοχή σε αυξημένη αλατότητα του εδάφους που αποτελεί ένα σημαντικό πρόβλημα για τις καλλιέργειες καθώς καταστέλλει την ανάπτυξη των φυτών και αυξάνει τις ενεργές ρίζες οξυγόνου. Συγκεκριμένα, ενισχύουν την αντοχή των φυτών στην αλατότητα αυξάνοντας την πρόσληψη νερού, τη σταθερότητα των κυτταρικών μεμβρανών, την φωτοσυνθετική ικανότητα, την σύνθεση πρωτεϊνών, την συσσώρευση ουσιών που οδηγούν σε καλύτερη ώσμωση, την απορρόφηση θρεπτικών και την αντίσταση στην οξειδωτική καταπόνηση (**Talaat & Shawky 2014; Begum et al., 2019**). Επιπροσθέτως, τα φυτά μπορούν να διατηρηθούν και να αναπτυχθούν υπό την παρουσία βαρέων μετάλλων στο έδαφος όταν συμβιώνουν με ΔΜΜ. Έχει αναφερθεί ότι μειώνουν την τοξικότητα των βαρέων μετάλλων συγκρατώντας τα στις υφές και μεταφέροντας τα είτε σε κενοτόπια ή στο κυτταρόπλασμα. Ακόμα, φυτά εμβολιασμένα με ΔΜΜ παρουσίασαν καλύτερη ανάπτυξη υπό συνθήκες τόσο υψηλής όσο και χαμηλής θερμοκρασίας σε σχέση με μη εμβολιασμένα φυτά. Τέλος, υπάρχουν αναφορές ότι η παρουσία ΔΜΜ βελτιώνει την ποιότητα των καλλιεργειών. Για παράδειγμα, βελτιώνουν τις αντιοξειδωτικές ιδιότητες κάποιων φυτών, ενισχύουν την διατροφική τους αξία μέσω αυξημένης παραγωγής καροτενοειδών, σακχάρων, βιταμινών, φλαβονοειδών κ.α. (**Begum et al., 2019**).

1.1.5 Προσφορά φυτού στις δενδρόμορφες μυκόρριζες

Ως αντάλλαγμα στην προσφορά θρεπτικών, το φυτό αποτελεί πηγή άνθρακα για τον μύκητα ο οποίος εξαρτάται απόλυτα από αυτό. Στην ρίζα που έχει αποικιστεί από τον μύκητα παρατηρείται συσσώρευση τόσο σακχάρων όσο και λιπιδίων, ενώ η μεταγραφή γονιδίων που εκφράζουν ένζυμα όπως η συνθάση και οι ινβερτάσες της σακχαρόζης αυξάνεται κατά την ΔΜ συμβίωση (**Wright et al., 1998**). Όσον αφορά την μεταφορά άνθρακα από το φυτό στον μύκητα παρατηρήθηκε ότι εισέρχεται αρχικά στον ενδιάμεσο περιδενδροειδή χώρο με την μορφή σακχαρόζης. Έπειτα, η σακχαρόζη διασπάται σε εξόζες που λαμβάνονται από τους ΔΜΜ. Μέσα στο κυτταρόπλασμα του μύκητα, οι εξόζες μετατρέπονται σε γλυκογόνο και λιπίδια (TAGs) τα οποία μεταφέρονται μέσω του δικτύου υφών σε μακρινές αποστάσεις (**Parniske 2008**). Πιθανοί μεταφορείς γλυκόζης που βρίσκονται στην περιδενδροειδή

μεμβράνη είναι πρωτεΐνες της οικογένειας SWEET. Μία άλλη κατηγορία μεταφορέων σακχάρων ανήκουν στην οικογένεια SUT και φαίνεται να παίζουν ρόλο στην μεταφορά σακχαρόζης προς τον ΔΜΜ. Τέλος, σε φυτά *M. truncatula* ο μεταφορέας Monosaccharide Transporter 1 (Mtst1/MST1) βρέθηκε να συγκεντρώνεται σε αποικισμένα κύτταρα του φλοιού (Banasiak et al., 2021). Όσον αφορά τα λιπίδια που αναφέρονται παραπάνω είναι πολύ σημαντικά για τον μύκητα καθώς αποτελούν δομικά συστατικά των δενδρόμορφων δομών, των υφών, των κυστών και των σπορίων. Ταυτόχρονα, είναι απαραίτητα για την βλάστηση και την ανάπτυξη των υφών (Luginbuehl & Oldroyd, 2017). Πρωτεΐνες όπως οι FatM και RAM2/GPAT φαίνεται ότι παίζουν σημαντικό ρόλο στην ΔΜ συμβίωση συμμετέχοντας στην βιοσύνθεση λιπαρών οξέων (FA) και μονοακετυλογλυκερόλης (MAG). Επίσης, υπάρχουν ενδείξεις σχετικά με την συμβολή ορισμένων ABCG πρωτεϊνών στην εξαγωγή λιπιδίων στον χώρο διεπαφής μύκητα-φυτού. Σε φυτά *M. truncatula* και *O. sativa* βρέθηκε ότι οι πρωτεΐνες STR (Stunted Arbuscule) και STR2, που εκφράζονται σε μυκορριζικά φυτά και βρίσκονται στην περιδενδροειδή μεμβράνη, είναι σημαντικές για τον σχηματισμό δενδρόμορφων δομών. Άλλος ένας πιθανός μεταφορέας λιπιδίων είναι ο ABCG3/WBC5 σε φυτά *M. truncatula* που πιθανόν να αποτελεί μέρος του μονοπατιού που ρυθμίζεται από την RAM1 που αναφέρεται πιο πάνω. Επιπλέον, έχουν βρεθεί μεταγραφικοί παράγοντες που συμμετέχουν στο μεταβολισμό λιπιδίων κατά την ΔΜ συμβίωση όπως ο CBX1 στα φυτά *L. japonicus* (Banasiak et al., 2021).

1.2 Ανθελμινθικά φάρμακα

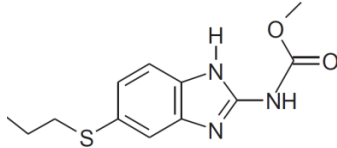
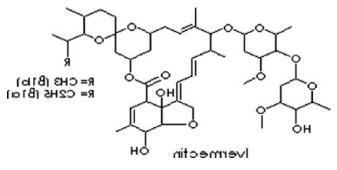
Τα ανθελμινθικά είναι φάρμακα που δρουν ενάντια σε ελμινθικές λοιμώξεις που προκαλούνται από παρασιτικούς σκώληκες. Χορηγούνται σε ένα ευρύ φάσμα ζώων σημαντικών για την γεωργία και τις υδατοκαλλιέργειες. Χωρίζονται σε οκτώ ομάδες ανάλογα με τον τρόπο δράσης τους αλλά κυρίως με την μοριακή τους δομή. Συγκεκριμένα οι κατηγορίες είναι οι παρακάτω: 1) βενζιμιδαζόλες, 2) διφαινυλοσουλφίδια, 3) ιμιδαζοθειαζόλες, 4) εξαϋδροπυραζίνες, 5) μακροκυκλικές λακτόνες, 6) σαλικυλανιλίδια, 7) τετραϋδροπυριμιδίνες και 8) τα υπόλοιπα που δεν μοιράζονται κοινά χαρακτηριστικά (ανασκόπηση στο άρθρο Horvat et al., 2012). Όταν χορηγούνται μέσω της στοματικής οδού ή ενδοφλέβια τα φάρμακα καταλήγουν στο χύμα ή σε επιφανειακά ύδατα μέσω των ούρων και των περιττωμάτων των ζώων (www.environment-agency.gov.uk, Science Report SC030183/SR). Πέρα από τον άμεσο αυτό τρόπο μπορούν να καταλήξουν στο περιβάλλον έμμεσα είτε με την χρήση των περιττωμάτων ως λίπασμα ή συμπαρασυρόμενα από το νερό σε περίπτωση τοπικά εφαρμόσιμων προϊόντων. Λόγω της ευρείας χρήσης τους, αναμένεται να έχουν επίδραση τόσο σε χερσαία όσο και σε υδάτινα περιβάλλοντα ωστόσο τα διαθέσιμα στοιχεία είναι περιορισμένα. Στο περιβάλλον μπορεί να καταλήξουν τόσο οι ίδιες οι ουσίες όσο και οι μεταβολίτες τους, που ορισμένες φορές είναι πιο δραστικοί από την αρχική ουσία. Η ακριβής ποσότητα που καταλήγει και παραμένει στο περιβάλλον εξαρτάται από διάφορους παράγοντες όπως είναι τα συστήματα εκτροφής και ο αριθμός των εκτρεφόμενων ζώων σε συνδυασμό με τον χρόνο και την συχνότητα χορήγησης καθώς και τα χαρακτηριστικά του φαρμάκου. Ένα χαρακτηριστικό των περισσότερων ανθελμινθικών φαρμάκων είναι ότι είναι αδιάλυτα ή ελαφρώς διαλυτά στο νερό και έχουν υψηλό συντελεστή κατανομής οκτανόλης/νερού (logKow). Αυτό έχει σαν αποτέλεσμα οι ενώσεις αυτές να προσροφώνται

ισχυρά στο έδαφος. Όταν οι ενώσεις αυτές εισέρθουν στο περιβάλλον αποικοδομούνται και συχνά δημιουργούνται ενώσεις όμοιες με τους μεταβολίτες που σχηματίζονται στον οργανισμό του ζώου. Τις περισσότερες φορές οι μεταβολίτες που προκύπτουν από οξειδωση, αναγωγή και υδρόλυση είναι πιο δραστικοί και τοξικοί από τις πρόδρομες ουσίες. Αυτές οι ουσίες μπορεί να έχουν αρνητική επίδραση σε οργανισμούς μη στόχους μέσω της έκθεσης τους είτε σε περιπτώματα ζώων που έχουν λάβει το φάρμακο ή σε μολυσμένο χώμα ή νερό. Όσον αφορά τον τρόπο δράσης των ανθελμινθικών φαρμάκων, υπάρχει ένα ευρύ φάσμα που περιλαμβάνει την αύξηση διαπερατότητας ασβεστίου, τη σύνδεση με την β-τουμπουλίνη, την ενίσχυση καναλιών GluCl, την δράση ως αγωνιστής νικοτίνης ή Γ-αμινοβουτυρικού οξέος και την δράση ως αναστολέας ακετυλοχολινεστεράσης (Horvat et al., 2012).

1.2.1 Αλβενδαζόλη

Η αλβενδαζόλη (ABZ) ανήκει στην ομάδα των βενζιμιδαζολών (Πίνακας 1) και αποτελεί ένα ανθελμινθικό φάρμακο που χρησιμοποιείται τόσο στην κτηνιατρική όσο και στην ανθρώπινη ιατρική. Η βασική οδός χορήγησης είναι η στοματική είτε σε μορφή υγρού ή σε χάπι. Ως κτηνιατρικό φάρμακο αρχικά χορηγούνταν σε βοοειδή και πρόβατα και στη συνέχεια η χρήση της επεκτάθηκε σε όλα τα μηρυκαστικά ζώα (<https://www.ema.europa.eu>). Η αλβενδαζόλη σχηματίζεται από ένα πρόδρομο φάρμακο, παράγωγο φαινυλγουανιδίνης, που ονομάζεται νετομπιμίνη (NETO). Το γεγονός ότι φέρει ένα σουλφίδιο, την καθιστά ευαίσθητη στις οξειδώσεις. Έτσι από την οξειδωση της αλβενδαζόλης προκύπτει ο κύριος ενεργός μεταβολίτης της, το σουλφοξειδίο της αλβενδαζόλης (ABZ-SO), γνωστό και ως ρικοβενδαζόλη (RBZ). Φαίνεται ότι η αντιπαρασιτική δράση της αλβενδαζόλης οφείλεται σε αυτόν τον μεταβολίτη (Horvat et al., 2012). Πέρα από την χρήση της ως κτηνιατρικό φάρμακο, η αλβενδαζόλη χορηγείται τα τελευταία 20 χρόνια στον άνθρωπο για την καταπολέμηση διάφορων λοιμώξεων. Αρχικά, χρησιμοποιούνταν ενάντια σε νηματοειδείς που προσβάλλουν το εντερικό σύστημα. Ωστόσο, στην συνέχεια που έγινε αντιληπτή η δράση της ρικοβενδαζόλης, άρχισε να χρησιμοποιείται και για άλλες ασθένειες όπως η εχينوκοκκίαση και η κυστικέρκωση. Για την καταπολέμηση της εχينوκοκκίασης χορηγείται είτε ως αποκλειστική θεραπευτική αγωγή ή ως συμπληρωματική αγωγή σε συνδυασμό με τις χειρουργικές επεμβάσεις. Ακόμα, φαίνεται ότι είναι αποτελεσματική στην διαχείριση της κυστικέρκωσης βοηθώντας στην αποφυγή χειρουργικής επέμβασης ή προφυλάσσοντας τον οργανισμό μετά την χειρουργική επέμβαση. Η αλβενδαζόλη θα μπορούσε να έχει ωφέλιμα αποτελέσματα ενάντια στην στρογγυλοειδίαση, καθώς και στην φιλαρίαση σε συνδυασμό με την ιβερμεκτίνη ή την διαιθυλοκαρβαμαζίνη. Επιπλέον, φαίνεται ότι αποτελεί μια καλή επιλογή για την θεραπεία της μόλυνσης από δερματική μεταναστευτική προνύμφη. Η χορήγηση αλβενδαζόλης θα μπορούσε να φανεί χρήσιμη και σε άλλες ασθένειες όπως στην τοξοκαρίαση σε συνδυασμό με στεροειδή, στο γογγυλόνημα μετά από επέμβαση και στην μόλυνση με *Oesophagostomum*. Επιπλέον, θεωρείται αποτελεσματική ενάντια στην μικροσποριδίαση από *Encephalitozoon* αλλά όχι από *Enterocytozoon* (ανασκόπηση στο άρθρο Horton 2002). Τέλος, η αλβενδαζόλη βοηθά ασθενείς με AIDS στην αντιμετώπιση συμπτωμάτων, όπως η διάρροια, που προκαλούνται από παρασιτικές μολύνσεις, ενώ

ταυτόχρονα μειώνει την δράση των παρασίτων και ενισχύει την ανάρρωση των ασθενών (Zulu et al., 2002).

Ανθελμινθικό Φάρμακο	Χημική οικογένεια	IUPAC ονομασία	Μοριακή δομή	Αριθμός CAS
Αλβενδαζόλη	Βενζιμιδαζόλες	Μεθυλ-N-(5-προπυλσουλφανυλ-1H-βενζοϊμιδαζολ-2-υλ) καρβαμικό		54965-21-8
Ιβερμεκτίνη	Μακροκυκλικές λακτόνες	22,23-Διυδροαβερμεκτίνη		70288-86-7 (ιβερμεκτίνη B1) 70161-11-4 (ιβερμεκτίνη B1a) 70209-81-3 (ιβερμεκτίνη B1b)

Πίνακας 1: Γενικές πληροφορίες για τα ανθελμινθικά φάρμακα αλβενδαζόλη και ιβερμεκτίνη (Horvat et al., 2012)

Όσον αφορά τον τρόπο δράσης της, προκαλεί αλλοιώσεις σε κύτταρα παρασιτικών σκωληκών, καθώς συνδέεται στην β-τουμπουλίνη αναστέλλοντας την συναρμολόγηση μικροσωληνίσκων. Η εξειδικευμένη δράση της ενάντια σε παρασιτικά κύτταρα και όχι κύτταρα θηλασικών οφείλεται στην προτίμηση του φαρμάκου να συνδέεται με την β-τουμπουλίνη των παρασιτικών κυττάρων. Επιπλέον, οδηγεί σε μειωμένη πρόσληψη γλυκόζης και συνεπώς σε εξάντληση του γλυκογόνου με αποτέλεσμα την δημιουργία σημαντικού ενεργειακού ελλείμματος και τελικά τον θάνατο των παρασίτων. Σε υψηλές συγκεντρώσεις, επηρεάζει μεταβολικά μονοπάτια αναστέλλοντας την δράση μεταβολικών ενζύμων, όπως αυτών που συμμετέχουν στον κύκλο του κιτρικού οξέος. Ένας άλλος τρόπος δράσης της αλβενδαζόλης είναι η παρεμπόδιση σχηματισμού των ινών της ατράκτου με αποτέλεσμα την αναστολή της κυτταρικής διαίρεσης, της παραγωγής, ανάπτυξης και εκκόλαψης αυγών, την μείωση ενδοκυτταρικών μεταφορών και κυτταρικής κινητικότητας γενικότερα (www.usp-pqm.org).

Όσον αφορά την περιβαλλοντική τύχη του φαρμάκου, έχει βρεθεί ότι όπως και τα περισσότερα ανθελμινθικά φάρμακα προσροφάται σχετικά ισχυρά στο έδαφος. Η προσρόφηση αυτή εξαρτάται από διάφορους παράγοντες, όπως οι φυσικοχημικές ιδιότητες του φαρμάκου και του υποστρώματος. Βρέθηκε ότι η προσρόφηση αυτή μειώνεται όσο αυξάνεται το pH του εδάφους (Pavlović et al., 2018). Σχετικά με τις συγκεντρώσεις αλβενδαζόλης που καταλήγουν στο περιβάλλον υπάρχουν τα παρακάτω δεδομένα. Σε περιοχή με μεγάλη χρήση αλβενδαζόλης (ανατολική Αφρική) η προβλεπόμενη συγκέντρωση της σε επιφανειακά ύδατα είναι 19.600 ± 150 ng/L, ενώ σε άλλες περιοχές είναι 7430 ± 35 ng/L. Ακόμα, στην ανατολική Αφρική προβλέπεται ότι η συγκέντρωσή της στην κοπριά είναι 128-206 μg/kg, ενώ σε άλλες περιοχές είναι 143-188 μg/kg. Στο χώμα η προβλεπόμενη συγκέντρωση αλβενδαζόλης σε περιοχές την Αφρικής υπολογίστηκε στα 0,022 μg/kg και σε

άλλες περιοχές 0,057 µg/kg. Τέλος, διάφορες μελέτες αναφέρονται σε συγκεντρώσεις αλβενδαζόλης σε υδατικά δείγματα έως 1.330.000 ng/L (**Belew et al., 2021**).

Σχετικά με την δράση της σε διάφορους οργανισμούς, φαίνεται ότι οι ενώσεις της ομάδας των βενζιμιδαζολών είναι λιγότερο τοξικές για ασπόνδυλα που συναντώνται σε οργανικά λιπάσματα (κοπριά). Ωστόσο, από την χημική τους δομή φαίνεται ότι είναι πιθανό να επιδρούν σε μύκητες κοπριάς (**Horvat et al., 2012**). Ακόμα, υπάρχουν μελέτες που οδηγούν στο συμπέρασμα ότι η αλβενδαζόλη παρουσιάζει τοξική δράση και σε διάφορους άλλους οργανισμούς μη στόχους (**Πίνακας 2**) (**Belew et al., 2021**). Όσον αφορά τα ζώα, υπάρχουν ενδείξεις ότι η βασική παρενέργεια είναι η τερατογένεση. Παρατηρήθηκαν δυσπλασίες σε πρόβατα έπειτα από την χορήγηση κάποιων βενζιμιδαζολών κατά την κύηση (**Horvat et al., 2012**). Στον άνθρωπο μπορεί να προκαλέσει ηπατοτοξικότητα, σε μικρό ποσοστό λευκοπενία, ουδετεροπενία, πανκυτταροπενία και θρομβοπενία, ενώ μπορεί να είναι βλαβερή για το έμβρυο σε περίπτωση χορήγησης κατά την κύηση (<https://pubchem.ncbi.nlm.nih.gov>).

Οργανισμός	Συγκέντρωση	Δράση
<i>Eisenia fetida</i>	3-12 mg/kg ξηρό βάρος χώματος	Αναπαραγωγική τοξικότητα
<i>Saccharomyces cerevisiae</i>	20-30 µg/mL	Γενοτοξικότητα
<i>Vibrio fischeri</i>	714-830 µg/L	Αναστολή μεταβολικών διεργασιών
<i>Daphnia magna</i>	63-73 µg/L	Επίδραση στην επιβίωση
<i>Danio rerio</i>	≥0.002 mg/L	Αναπτυξιακή τοξικότητα

Πίνακας 2: Αρνητικές επιδράσεις αλβενδαζόλης σε οργανισμούς μη στόχους (*Belew et al., 2021*)

1.2.2 Ιβερμεκτίνη

Η ιβερμεκτίνη είναι ένα ανθελμινθικό φάρμακο που ανήκει στην ομάδα των μακροκυκλικών λακτονών (**Πίνακας 1**). Ένα παράγωγο των μακροκυκλικών λακτονών είναι η αβερμεκτίνη. Ένας συνδυασμός δύο ομόλογων ενώσεων αβερμεκτίνης B1a και B1b σχηματίζουν την αμπαμεκτίνη (ABA), ένα εντομοκτόνο που χρησιμοποιείται για την προστασία καλλιεργειών.

Η ιβερμεκτίνη είναι ημι-συνθετικό 22,23-διυδρο-ανάλογο της αμπαμεκτίνης (Horvat et al., 2012). Χορηγείται ως κτηνιατρικό φάρμακο σε βοοειδή, πρόβατα, χοίρους και άλογα (www.environment-agency.gov.uk, Science Report SC030183/SR). Επιπλέον, μπορεί να χορηγηθεί σε κατοικίδια ζώα, σε ψάρια στις ιχθυοκαλλιέργειες και στον άνθρωπο (ανασκόπηση στο άρθρο Adler et al., 2016). Χορηγείται για την καταπολέμηση ογκοκερκίασης, λεμφικής φιλαρίασης, στρογγυλοειδίασης, τριχουρίασης, ασκαρίασης, αγκυλοστομίας και ψώρας (https://list.essentialmeds.org).

Όσον αφορά τον τρόπο δράσης της ιβερμεκτίνης, μπορεί να συνδεθεί με μεγάλη συγγένεια σε κανάλια ιόντων χλωρίου που υπάρχουν σε νευρικά και μυϊκά κύτταρα ασπονδύλων και να τα διατηρήσει ανοιχτά. Ακόμα, επηρεάζει τους διαύλους ιόντων χλωρίου που σχετίζονται με το Γ-αμινοβουτυρικό οξύ και υπάρχουν στο περιφερικό νευρικό σύστημα στα ασπόνδυλα και στο κεντρικό νευρικό σύστημα στα σπονδυλωτά (Liebig et al.,2010).

Το 98% των μακροκυκλικών λακτονών καταλήγει στο περιβάλλον μέσω περιττωμάτων είτε απaráλλακτο ή σε μορφή ενεργών μεταβολιτών. Όταν καταλήξει στο περιβάλλον, προσροφάται από το ίζημα-έδαφος όπου και μετατρέπεται σε παράγωγα προϊόντα όπως είναι ο μονοσακχαρίτης της ιβερμεκτίνης και η αγλυκόνη της ιβερμεκτίνης. Αν και ο χρόνος ημιζωής του φαρμάκου στο νερό υπολογίστηκε στις 3-5 μέρες, σε συγκεντρώσεις 20-30 ng/kg διατηρείται σταθερή στο ίζημα. Επιπλέον, σε άλλη μελέτη αναφέρεται ότι η παρουσία της στην κοπριά και στο χώμα διατηρείται από 7 μέρες έως μήνες (Horvat et al.,2012) Στον Πίνακα 3 αναφέρονται οι τιμές DT50 της Ιβερμεκτίνης σε διάφορους τύπους υποστρώματος. Με τον όρο DT50 αναφερόμαστε στον χρόνο που χρειάστηκε για να υποβαθμιστεί η συγκέντρωση μιας χημικής ουσίας στο 50% της αρχικής της συγκέντρωσης. Οι τιμές DT50 του φαρμάκου στο έδαφος εξαρτώνται από διάφορους παράγοντες όπως είναι ο τύπος του εδάφους, η ικανότητα προσρόφησης, η θερμοκρασία και η διαθεσιμότητα σε οξυγόνο (Liebig et al.,2010).

Υπόστρωμα	DT50 (μέρες)
μίγμα χώματος/κοπριάς (καλοκαίρι)	7–14
μίγμα χώματος/κοπριάς (χειμώνας)	91–217
αμμώδες και αργιλώδες έδαφος	14–28
αργιλώδες έδαφος	28–56
αμμώδες έδαφος	56
κοπριά	περιορισμένη αποικοδόμηση μετά από 45 μέρες

Πίνακας 3: Προσρόφηση Ιβερμεκτίνης σε κοπριά και χώμα (www.environment-agency.gov.uk, Science Report SC030183/SR)

Σχετικά με τις συγκεντρώσεις ιβερμεκτίνης που καταλήγουν στο περιβάλλον υπάρχουν κάποιες προβλεπόμενες συγκεντρώσεις (Predicted Environmental Concentration: PEC) που μπορούν να υπολογιστούν με διάφορες μεθόδους. Οι τιμές αυτές διαφέρουν ανάλογα το δείγμα που μελετήθηκε (επιφανειακά ύδατα, ίζημα, χώμα, κοπριά), τη μέθοδο ή τον οδηγό και το σενάριο που χρησιμοποιήθηκαν (ζώα σε βοσκότοπο ή εκτρεφόμενα ζώα) και τα δεδομένα που λήφθηκαν υπόψη για τον προσδιορισμό των τιμών αυτών (καλύτερη ή χειρότερη περίπτωση) (Liebig et al.,2010). Στον Πίνακα 4 παρουσιάζονται κάποια δεδομένα αναλυτικότερα. Σχετικά με τις πραγματικές συγκεντρώσεις ιβερμεκτίνης στο περιβάλλον, σε μελέτη των Boxall et al (www.environment-agency.gov.uk, Science Report SC030183/SR) αναφέρονται δοκιμές που πραγματοποιήθηκαν σε δύο διαφορετικές τοποθεσίες στην Βρετανία: (α) σε χοίρους σε εξωτερική μονάδα και (β) σε βοοειδή βοσκότοπου. Οι μέγιστες συγκεντρώσεις ιβερμεκτίνης που μετρήθηκαν στο περιβάλλον παρουσιάζονται στον Πίνακα 5.

Τμήμα	Σενάριο και Οδηγία/Μέθοδος	Μονάδες	Καλύτερη περίπτωση	Χειρότερη Περίπτωση
Επιφανειακά ύδατα	PEC _{sw} (E)-FOCUS (α)	ng/L	0.77	
	PEC _{sw} (E)-VetCalc	ng/L		34.7
Ίζημα	PEC _{sed} (B)-EMEA	μg/kg υγρό βάρος (μg/kg ξηρό βάρος)	0.32 (0.83)	0.84 (2.17)
Χώμα	PEC _{soil} (B)-VetCalc	μg/kg ξηρό βάρος	1.14	
	PEC _{soil} (E)	μg/kg ξηρό βάρος		11.4
Περιπτώματα	PEC _{dung} (B)-EMEA	μg/kg φρέσκο βάρος κοπριάς (μg/kg ξηρό βάρος)	159 (894)	420 (2365)

Πίνακας 4: Μέγιστες προβλεπόμενες συγκεντρώσεις (PEC) ιβερμεκτίνης στο περιβάλλον

B: Βοσκότοπος,

E: Εκτρεφόμενα

α: μέγιστη ετήσια συγκέντρωση

sw: επιφανειακά ύδατα, sed: ίζημα, soil: χώμα, dung: κοπριά

FOCUS, EMEA, VetCalc: οδηγοί που χρησιμοποιήθηκαν για τον υπολογισμό PEC (Liebig et al.,2010)

Φάρμακο/Συνθήκη	Περιπτώματα	Χώμα	Νερό	Ίζημα
Ιβερμεκτίνη σε χοίρους	-	46 µg/kg ^α (1.985 ^β)	-	
Ιβερμεκτίνη σε βοοειδή	1.850µg/kg	-	-	4,91µg/kg

Πίνακας 5: Μέγιστες συγκεντρώσεις ιβερμεκτίνης στο περιβάλλον έπειτα από χορήγηση σε χοίρους και βοοειδή

α: Η δοσολογία και η διάρκεια χορήγησης στην συγκεκριμένη πειραματική μελέτη ήταν σημαντικά υψηλότερες συγκριτικά με τις συνιστώμενες, επομένως οι πραγματικές συγκεντρώσεις στο περιβάλλον είναι πιθανό να είναι πολύ πιο χαμηλές από αυτές

β: Μέτρηση συγκέντρωσης από δείγματα γύρω από το σημείο σίτισης (www.environment-agency.gov.uk, Science Report SC030183/SR)

Σχετικά με τις αρνητικές επιδράσεις της ιβερμεκτίνης, έχει αναφερθεί ότι επηρεάζει χερσαίους και υδάτινους οργανισμούς μη στόχους μειώνοντας την αναπαραγωγή τους, τον ρυθμό ανάπτυξής τους και την επιβίωσή τους σε συγκεντρώσεις τόσο χαμηλές όσο η 0,001 ng/L. Συγκεκριμένα, βρέθηκε ότι έχει υψηλή οξεία τοξικότητα σε καρκινοειδή όπως: *Neomysis integer*, *Gammarus sp.* και *Daphnia magna*. Επίσης, οικοτοξολογικές μελέτες που αφορούσαν γενικά τις μακροκυκλικές λακτόνες έδειξαν ότι επηρεάζουν την θνησιμότητα προνυμφών ασπόνδυλων στην κοπριά με τιμή LC50 χαμηλότερη από 0,036 mg/kg (**Horvat et al., 2012**). Ακόμα, σε άλλη μελέτη αποδείχθηκε ότι η ιβερμεκτίνη αποτελεί παράγοντα κινδύνου για διάφορα ψάρια και οργανισμούς όπως η *Daphnia* όταν εντοπίζεται σε επιφανειακά ύδατα, για χειρονομίδες και βενθικές κοινότητες όταν φτάνει σε ιζήματα και για σκαθάρια και μύγες όταν βρίσκεται στην κοπριά (**Liebig et al., 2010**). Παραδείγματα σχετικά με την οικοτοξικότητα της ιβερμεκτίνης σε χερσαίους και υδάτινους οργανισμούς παρουσιάζονται στους **Πίνακες 6-7**.

Οργανισμός/Τελικό σημείο	Μονάδες	Τιμές
Γαιοσκώληκας NOEC	mg/kg	12
<i>Eisenia foetida</i> 28 μέρες LC50	mg/kg	315
Φυτά NOEC	mg/kg	0,56
<i>Neomyia cornicina</i> 7 μέρες LC50	mg/kg	0,139
<i>Scatophagia stercoraria</i> (προνύμφες) 24 h EC50	mg/kg	0,051

<i>Scatophagia stercoraria</i> (ενήλικα) αναπτυξιακές ανωμαλίες	mg/kg	0,0005
---	-------	--------

Πίνακας 6: Οικοτοξικότητα Ιβερμεκτίνης σε χερσαίους οργανισμούς

NOEC: υψηλότερη συγκέντρωση μη παρατηρούμενης επίδρασης, LC50: συγκέντρωση που προκαλεί θάνατο στο 50% του εξεταζόμενου πληθυσμού, EC50: συγκέντρωση που επιδρά στο 50% του εξεταζόμενου πληθυσμού (www.environment-agency.gov.uk, Science Report SC030183/SR)

Οργανισμός/Τελικό σημείο	Μονάδες	Τιμές
<i>Biomphalaria glabrata</i> 24 ώρες LC50	mg/l	0,03
<i>Daphnia magna</i> 48 ώρες EC50	mg/l	0,000025
<i>Chlorella pyrenoidosa</i> 14 ημέρες NOEC	mg/l	<0,001
<i>Nereis diversicolor</i> 96 ώρες LC50	mg/l	0,0075
<i>Tapes semidecassata</i> (προνύμφες) 96 ώρες LC50	mg/l	0,38
<i>Palaemonectes varians</i> 96 ώρες LC50	mg/l	0,054
<i>Artemia salina</i> 24 ώρες LC50	mg/l	>0,3
<i>Sphaeroma rugicauda</i> 96 ώρες LC50	mg/l	0,348
<i>Lepomis macrochirus</i> 96 ώρες LC50	mg/l	0,0048
<i>Neomysis integer</i> 48 ώρες LC50	mg/l	0,000026

Πίνακας 7: Οικοτοξικότητα Ιβερμεκτίνης σε υδάτινους οργανισμούς

NOEC: υψηλότερη συγκέντρωση μη παρατηρούμενης επίδρασης, LC50: συγκέντρωση που προκαλεί θάνατο στο 50% του εξεταζόμενου πληθυσμού, EC50: συγκέντρωση που επιδρά στο 50% του εξεταζόμενου πληθυσμού (www.environment-agency.gov.uk, Science Report SC030183/SR)

1.3 Γεωργικά φάρμακα που επηρεάζουν τους δενδρόμορφους μυκορριζικούς μύκητες

Η μυκορριζική συμβίωση μπορεί να επηρεαστεί από διάφορους παράγοντες, ένας βασικός είναι η έκθεση σε γεωργικά φάρμακα. Όσον αφορά την δράση φυτοφαρμάκων στους ΔΜΜ μπορεί να είναι άμεση ή έμμεση. Στην πρώτη περίπτωση εξωρριζικές μυκητιακές δομές μπορούν να έρθουν σε επαφή με την δραστική ουσία και με αυτόν τον τρόπο να επηρεαστεί η συμβιωτική σχέση. Ακόμα, τα ενδορριζικά τμήματα του μύκητα μπορεί να έρθουν σε επαφή με την δραστική ουσία είτε μέσω απορρόφησης από την ρίζα, είτε μέσω πρόσληψης από της υφές ή μέσω μεταφοράς από τα υπέργεια τμήματα του φυτού στην ρίζα. Όταν η έκθεση σε κάποιο φυτοφάρμακο οδηγήσει σε μορφολογικές και μεταβολικές αλλαγές στο φυτό-ξενιστή, τότε ο ΔΜΜ μπορεί να επηρεαστεί έμμεσα από αυτό. Βιβλιογραφικά υπάρχουν αναφορές για μία πληθώρα γεωργικών φαρμάκων που ανήκουν στα μυκητοκτόνα, ζιζανιοκτόνα, εντομοκτόνα και νηματωδοκτόνα. Από τις υπάρχουσες μελέτες, παρατηρείται μια γενικότερη ετερογένεια στην επίδραση των φυτοφαρμάκων που φαίνεται να εξαρτάται από το είδος του ξενιστή, τις κοινότητες μυκήτων, τις ιδιότητες και τον τρόπο δράσης του φαρμάκου, τον τρόπο εφαρμογής του και το περιβάλλον ανάπτυξης (**Hage-Ahmed et al., 2019**). Όπως φαίνεται και στον **Πίνακα 8** η πλειοψηφία των μυκητοκτόνων φαρμάκων που έχουν μελετηθεί φαίνεται να επιδρά αρνητικά στους ΔΜΜ ενώ ορισμένα από αυτά δεν προκαλούν κάποια αλλαγή. Μόνο σε μία περίπτωση έχει αναφερθεί θετική επίδραση στον αποικισμό των φυτών από ΔΜΜ, σε αυτή του captan. Ωστόσο, μυκητοκτόνα με βάση το captan φαίνεται να επιδρούν με ποικίλους τρόπους σε διαφορετικούς ξενιστές και ΔΜΜ (**Jin et al., 2013**). Όσον αφορά τα ζιζανιοκτόνα, υπάρχουν αρνητικές αλλά και ουδέτερες επιδράσεις στους ΔΜΜ. Επίσης, έχει αναφερθεί ένα ζιζανιοκτόνο που περιείχε mecorprop, ioxyphil και clorpyralid το οποίο προκάλεσε αύξηση στον αποικισμό φυτών από *G. geosporum* (**Dodd & Jeffries 1989**). Τέλος, σχετικά με τα εντομοκτόνα και τα νηματωδοκτόνα που έχουν μελετηθεί δεν φαίνεται να υπάρχει σε καμία περίπτωση θετική επίδραση στους ΔΜΜ. Οι υπάρχουσες μελέτες αναφέρουν τόσο αρνητικές όσο και ουδέτερες επιδράσεις στους ΔΜΜ (**Πίνακας 8**).

Φάρμακο	Επίδραση	Αναφορά
Μυκητοκτόνα		
διάφορα μυκητοκτόνα	μείωση του αποικισμού φυτών από ΔΜΜ και του αριθμού των σπορίων τους	Sreenivasa & Bagyaraj 1989
captan	αύξηση του αποικισμού φυτών από ΔΜΜ και του αριθμού των σπορίων τους ¹	Sreenivasa & Bagyaraj 1989

διάφορα μυκητοκτόνα	μείωση του αποικισμού φυτών από ΔΜΜ και ετερογένεια επίδραση στην ποικιλομορφία ΔΜΜ	Jin et al., 2013
pyrazophos	μείωση του αποικισμού φυτών από ΔΜΜ	Abd-Alla et al., 2000
fludioxonil	μείωση του αποικισμού φυτών από ΔΜΜ	Castelli et al., 2014
fludioxonil	σταθερός αποικισμός φυτών από ΔΜΜ	Cameron et al., 2017
fosetyl-al και propamocarb	σταθερός αποικισμός φυτών από ΔΜΜ	Marin et al., 2002
Ζιζανιοκτόνα		
bromoxynil και paraquat	μείωση του αποικισμού φυτών από ΔΜΜ	Abd-Alla et al., 2000
nicosulfuron	μείωση του αποικισμού φυτών από ΔΜΜ και της ποικιλομορφίας τους ²	Karpouzas et al., 2014
nicosulfuron	σταθερός αποικισμός φυτών από ΔΜΜ ³	Karpouzas et al., 2014
prometryn και acetochlor	αναστολή στην ανάπτυξη των υφών, μείωση του αποικισμού φυτών από ΔΜΜ και του αριθμού των σπορίων τους	Li et al., 2013
sulfentrazone	μείωση του αποικισμού φυτών από ΔΜΜ	Vieira et al., 2007
fluazifop-p-butyl και fomesafen	ετερογένεια στην επίδραση στον αποικισμό φυτών από ΔΜΜ	Santos et al., 2006

isoxaflutole	σταθερός αποικισμός φυτών από ΔΜΜ	Stoklosa et al., 2011
διάφορα ζιζανιοκτόνα	ετερογένεια στην επίδραση στην εκβλάστηση των σπορίων και σταθερός αποικισμός φυτών από ΔΜΜ	Dodd & Jeffries 1989
mecoprop, ioxynil και clopyralid	αύξηση του αποικισμού φυτών από ΔΜΜ	Dodd & Jeffries 1989
διάφορα ζιζανιοκτόνα	σταθερός αποικισμός φυτών από ΔΜΜ και αριθμού σπορίων	Smith et al., 1981
chlorsulfuron και glyphosate	μείωση του αποικισμού φυτών από ΔΜΜ ⁴	Mujica et al., 1999
Εντομοκτόνα		
profenfos, sumi oil	μείωση του αποικισμού φυτών από ΔΜΜ και του αριθμού των σπορίων τους	Abd-Alla et al., 2000
spinosad, pyrethrum και terpenes	σταθερός αποικισμός φυτών από ΔΜΜ	Ipsilantis et al., 2012
azadirachtin	επιλεκτική αναστολή ενός είδους ΔΜΜ	Ipsilantis et al., 2012
folpet	σταθερός αποικισμός φυτών από ΔΜΜ	Marin et al., 2002
isofenphos	μείωση του αποικισμού φυτών από ΔΜΜ	Marin et al., 2002
oxamyl	ετερογένεια στην επίδραση στον αποικισμό φυτών από ΔΜΜ	Marin et al., 2002
διάφορα εντομοκτόνα	μείωση του αποικισμού φυτών από ΔΜΜ και του αριθμού των σπορίων	Sreenivasa & Bagyaraj 1989

	τους στη συνιστώμενη δόση	
Νηματωδοκτόνα		
prophos, aldicarb και carbofuran	μείωση του αποικισμού φυτών από ΔΜΜ και του αριθμού των σπορίων τους στη συνιστώμενη δόση	Sreenivasa & Bagyaraj 1989

Πίνακας 8: Γεωργικά φάρμακα και ο τρόπος δράσης τους στους δενδρόμορφους μυκορριζικούς μύκητες (ΔΜΜ)

1: μισή της συνιστώμενης δόσης, 2:συγκεντρώσεις $\geq x100$ της συνιστώμενης δόσης, 3: συγκεντρώσεις $\leq x10$ της συνιστώμενης δόσης, 4:σε δόσεις υψηλότερες της συνιστώμενης

1.3.1 Άλλοι παράγοντες που επηρεάζουν τους δενδρόμορφους μυκορριζικούς μύκητες

Εκτός από την εφαρμογή γεωργικών φαρμάκων, άλλοι παράγοντας που επηρεάζουν την ποικιλομορφία και την αφθονία των ΔΜΜ είναι η αυξημένη εναπόθεση θρεπτικών στο έδαφος που οφείλεται στην ανεξέλεγκτη χρήση λιπασμάτων, καθώς και γεωργικές πρακτικές όπως το όργωμα του εδάφους. Αρχικά, η αυξημένη διαθεσιμότητα θρεπτικών μειώνει την ανάγκη του φυτού για υπόγειες πηγές θρεπτικών με αποτέλεσμα να μειώνεται και η διανομή άνθρακα (C) στους ΔΜΜ. Ο περιορισμός αυτός αυξάνει τον ανταγωνισμό μεταξύ των διαφόρων ειδών ΔΜΜ με αποτέλεσμα την απώλεια ορισμένων ειδών. Γενικότερα, με την προσθήκη θρεπτικών στο έδαφος διαταράσσεται η στοιχειομετρία μεταξύ άνθρακα, αζώτου και φωσφόρου, με αποτέλεσμα, αναλόγως τις αναλογίες μεταξύ αυτών των στοιχείων, να ωφελείται ή να επιβαρύνεται η συμβίωση ΔΜΜ και φυτών. Το κόστος αυτό εξαρτάται από διάφορους άλλους παράγοντες σε συνδυασμό με τον εμπλουτισμό εδάφους σε θρεπτικά. Συγκεκριμένα, εξαρτάται από το pH του εδάφους, από τον τύπο του οικοσυστήματος και από κλιματικούς παράγοντες όπως η μέση ετήσια θερμοκρασία και οι μέσες ετήσιες κατακρημνίσεις (**Ma et al., 2021**) Όσον αφορά το όργωμα του εδάφους, υπάρχουν στοιχεία που υποστηρίζουν ότι το όργωμα μπορεί να επηρεάσει αρνητικά τους ΔΜΜ καταστρέφοντας το εξωριζικό δίκτυο των μυκήτων. Αντίθετα, μη οργωμένα εδάφη ευνοούν τους ΔΜΜ και ωφελούν το φυτό-ξενιστή με καλύτερη απορρόφηση φωσφόρου και σταθερότητα εδάφους (**Hage-Ahmed et al., 2019**).

2. Υλικά και Μέθοδοι

2.1 Βιολογικό υλικό, εφαρμογή φαρμάκων, εμβολιασμός και ανάπτυξη φυτών

2.1.1 Απολύμανση και εκβλάστηση σπόρων

Στη συγκεκριμένη μελέτη χρησιμοποιήθηκαν φυτά αγρίου τύπου *Lotus japonicus* οικότυπος Gifu. Αρχικά, έγινε αποστείρωση των σπόρων με την εξής διαδικασία. Πρώτα έγινε επώαση των σπόρων σε θειικό οξύ (H_2SO_4), τόσο ώστε να εμβαπτιστούν καλά οι σπόροι, για 25-30 λεπτά. Έπειτα, έγιναν 5 πλύσεις με dH_2O . Ακολούθησε επώαση με 20% χλωρίνη εμπορίου για περίπου 10-12 λεπτά. Η διαδικασία συνεχίστηκε σε θάλαμο νηματικής ροής όπου έγιναν επτά πλύσεις με αποστειρωμένο dH_2O . Στη συνέχεια οι σπόροι διατηρήθηκαν στους $4^{\circ}C$ καθ' όλη τη διάρκεια της νύχτας. Την επόμενη ημέρα, στον θάλαμο νηματικής ροής, οι σπόροι τοποθετήθηκαν σε τρυβλία petri, πάνω σε υγρά διηθητικά χαρτιά. Η διάταξη των σπόρων ήταν τέτοια ώστε να μην έρχονται σε επαφή και να έχουν χώρο να εκβλαστήσουν. Τα τρυβλία κλείστηκαν με parafilm και τοποθετήθηκαν στον θάλαμο ανάπτυξης φυτών για 10 μέρες σε κάθετη θέση ώστε το διηθητικό χαρτί να έρχεται σε επαφή με το dH_2O και να παραμένει υγρό.

2.1.2 Προετοιμασία φαρμάκων

Στη συγκεκριμένη πειραματική μελέτη χρησιμοποιήθηκαν τα ανθελμινθικά φάρμακα αλβενδαζόλη και ιβερμεκτίνη ώστε να γίνει έλεγχος της δράσης τους στους ΔΜΜ. Αρχικά, ζυγίστηκαν οι κατάλληλες ποσότητες αλβενδαζόλης και ιβερμεκτίνης από σκεύασμα καθαρότητας <98% της εταιρίας Tokyo Chemical Industry® (TCI) και Merck, Sigma-Aldrich® αντίστοιχα. Στη συνέχεια, διαλύθηκαν σε διμεθυλοσουλφοξείδιο (DMSO) ώστε να παρασκευαστεί το αρχικό πυκνό διάλυμα. Για την καλύτερη διάλυση του φαρμάκου έγινε επώαση ≈ 30 λεπτών σε υδατόλουτρο υπερήχων. Έπειτα, η αλβενδαζόλη αποστειρώθηκε με την χρήση φίλτρου σε θάλαμο νηματικής ροής. Στη συνέχεια, έγιναν οι απαραίτητες αραιώσεις με διαλύτη το DMSO ώστε να παρασκευαστούν τα υπόλοιπα διαλύματα που χρησιμοποιήθηκαν στη συνέχεια για την παρασκευή των επιθυμητών συγκεντρώσεων στο θρεπτικό διάλυμα των φυτών.

2.1.3 Εφαρμογή φαρμάκων και εμβολιασμός των φυτών με τη μέθοδο sandwich

Σπορόφυτα ηλικίας 10 ημερών φυτεύτηκαν σε ψημένη, χοντρή άμμο με θρεπτικό Long Ashton solution (SLA) ($0.75mM MgSO_4$, $1mM NaNO_3$, $1mM K_2SO_4$, $2mM CaCl_2$, $3,2\mu M NaHPO_4$, $25\mu M FeNa-EDTA$, $5\mu M MnSO_4$, $0,25\mu M CuSO_4$, $0,5\mu M ZnSO_4$, $25\mu M H_3BO_3$, $0,1\mu M Na_2MoO_4/σε H_2O$) και την κατάλληλη ποσότητα φαρμάκου ανάλογα την μεταχείριση. Το φύτεμα έγινε σε ειδικά αποστειρωμένα δοχεία magentas ώστε να επιτυγχάνεται η ανάπτυξη των φυτών σε στείρες συνθήκες και ο ταυτόχρονος αερισμός τους. Για κάθε μεταχείριση έγιναν 5 βιολογικές επαναλήψεις και σε κάθε magenta φυτεύτηκαν τρία ή τέσσερα φυτά. Σε κάθε δοχείο magenta έγινε εμβολιασμός των φυτών με $300\mu L$ ή $400\mu L$ εναιωρήματος με μυκορριζικό μύκητα *Rhizophagus irregularis* στέλεχος DAOM (1000

σπόροι/ml). Ακόμα, ως δείγματα αρνητικού ελέγχου χρησιμοποιήθηκαν φυτά στα οποία δεν χορηγήθηκε κάποιο ανθελμινθικό φάρμακο και προστέθηκε η ίδια συγκέντρωση διαλύτη DMSO με τα προς μελέτη δείγματα. Για να διασφαλιστεί η συνεχής και καλή επαφή της ρίζας με τον μύκητα χρησιμοποιήθηκε η τεχνική sandwich. Το σύστημα που χρησιμοποιήθηκε για την ανάπτυξη των φυτών φαίνεται στην **Εικόνα 4**.



*Εικόνα 4: Σύστημα ανάπτυξης φυτών
L. japonicus με τη μέθοδο sandwich*

Μέθοδος Sandwich

Η διαδικασία πραγματοποιήθηκε σε θάλαμο νηματικής ροής και είχε ως εξής:

- Προσθήκη άμμου ψημένη στους 180°C καθ' όλη τη διάρκεια της νύχτας ($\approx 350\text{gr}$ άμμου) στα $\frac{3}{4}$ του magenta
- Προσθήκη 60ml θρεπτικού διαλύματος SLA με κατάλληλη ποσότητα φαρμάκου (ή DMSO στην περίπτωση των δειγμάτων αρνητικού ελέγχου)
- Ανάδευση της άμμου με το SLA και σχηματισμός μιας διαγώνιας σχισμής στην άμμο ώστε να σχηματιστεί ο χώρος που τοποθετείται το sandwich
- Ενυδάτωση των μεμβρανών νιτροκυτταρίνης σε τρυβλίο με 1% αγαρ σε dH₂O
- Τοποθέτηση 3 ή 4 φυτών σε μία ενυδατωμένη μεμβράνη με τέτοιο τρόπο ώστε οι ρίζες να ακουμπάνε καλά στη μεμβράνη και ο βλαστός να είναι έξω από αυτή

- Εμβολιασμός με 300μL ή 400μL από το διάλυμα σπόρων συγκέντρωσης 1000 σπόροι/ml (επειδή το διάλυμα συντήρησης έχει μία παρεμποδιστική ουσία, πρώτα έγινε φυγοκέντρηση του διαλύματος στις 3000 στροφές για 1 λεπτό, συλλέχθηκε το ίζημα και διαλύθηκε με dH₂O σε διπλάσιο όγκο ώστε να αραιωθεί το αρχικό διάλυμα συγκέντρωσης 2000 σπόροι/ml και να χρησιμοποιηθεί τελική συγκέντρωση 1000 σπόροι/ml)
- Τοποθέτηση δεύτερης μεμβράνης δημιουργώντας ένα σύστημα sandwich
- Τοποθέτηση του sandwich στην άμμο με τέτοιο τρόπο ώστε να καλύπτονται πλήρως οι μεμβράνες από την άμμο
- Τοποθέτηση σε θάλαμο ανάπτυξης με φωτοπερίοδο 16 ώρες φως / 8 ώρες σκοτάδι, στους 23°C για 4 ή 5 εβδομάδες

2.2 Συγκομιδή φυτών-Χρώση ριζών

Μετά το πέρας πέντε εβδομάδων έγινε η συγκομιδή των φυτών, ο καθαρισμός των ριζών από την άμμο, η απομόνωση των υπέργειων τμημάτων και η χρώση των ριζών ώστε να είναι ορατές οι δομές του μύκητα (κύστες, εσωτερικές υφές, δενδρόμορφες δομές) στο οπτικό μικροσκόπιο.

Η διαδικασία είχε ως εξής:

- Συλλογή φυτών από κάθε βιολογική επανάληψη σε σωλήνες falcons με dH₂O ώστε να ενυδατώνονται οι ρίζες
- Διαχωρισμός των ριζών από τα υπέργεια μέρη και τοποθέτησή τους στα falcons με dH₂O
- Επώαση των ριζών σε 10% καυστικό κάλιο (KOH) σε υδατόλουτρο στους 85°C για 30 λεπτά
- Αφαίρεση του KOH
- Προσθήκη 10% οξικό οξύ (CH₃COOH) – (στον επαγωγό)
- 2 πλύσεις με dH₂O (στον επαγωγό)
- Επώαση σε διάλυμα με 5% μελάνι διαλυμένο σε 5% CH₃COOH στο υδατόλουτρο στους 85°C για 30 λεπτά
- Αφαίρεση διαλύματος μελανιού
- 2 πλύσεις με dH₂O
- Επώαση σε 5% CH₃COOH για 30 λεπτά σε θερμοκρασία δωματίου
- Αφαίρεση CH₃COOH και προσθήκη dH₂O
- Αποθήκευση στους 4°C για όλη τη διάρκεια της νύχτας.

Την επόμενη μέρα δείγματα ρίζας από κάθε βιολογική επανάληψη τοποθετήθηκαν σε αντικειμενοφόρους πλάκες. Κάθε πλάκα αντιστοιχούσε σε μία βιολογική επανάληψη και περιείχε 15 κομμάτια ρίζας μήκους ≈ 1,5cm. Τα δείγματα καλύφθηκαν με καλυπτρίδες και φυλάχθηκαν σε θερμοκρασία δωματίου.

Για την μέτρηση του ξηρού βάρους των υπέργειων τμημάτων έγινε ξήρανση των δειγμάτων στους 65°C στο φούρνο για ≈ 24 ώρες.

2.3 Παρατήρηση δειγμάτων σε οπτικό μικροσκόπιο

Έγινε παρατήρηση των αντικειμενοφόρων πλακών σε οπτικό μικροσκόπιο με την χρήση 40x φακού και υπολογισμός των ποσοστών αποικισμού των ριζών από ΔΜΜ. Στην συγκεκριμένη πειραματική εργασία για την ποσοτικοποίηση του αποικισμού λήφθηκε υπόψη η παρουσία ή μη δενδρόμορφων δομών σε 100 διαφορετικά οπτικά πεδία ανά αντικειμενοφόρο πλάκα. Στη συνέχεια από τις μετρήσεις αυτές υπολογίστηκε το ποσοστό παρουσίας δενδρόμορφων δομών επί τοις εκατό.

2.4 Υπολογισμός συγκεντρώσεων φαρμάκων με υγρή χρωματογραφία υψηλής απόδοσης (HPLC)

Για να προσδιοριστούν οι ακριβείς συγκεντρώσεις των φαρμάκων που χορηγήθηκαν στα φυτά χρησιμοποιήθηκε η μέθοδος υγρής χρωματογραφίας υψηλής απόδοσης. Συγκεκριμένα, έγινε ανάλυση δειγμάτων φαρμάκων διαλυμένα σε θρεπτικό μέσο. Για την ανάλυση χρησιμοποιήθηκε το μοντέλο της εταιρείας UFLC SHIMADZU με ανιχνευτή φωτοδιόδων. Ως στατική φάση χρησιμοποιήθηκε η στήλη Athena C18, 120A, (4,6 mm x 150mm, 5μm). Οι συνθήκες ανάλυσης κάθε φαρμάκου παρουσιάζονται στον **Πίνακα 9**

Φάρμακο	Κινητή φάση	Αναλογία διαλυτών κινητής φάσης	Μήκος κύματος (nm)	Χρόνος έκλουσης	Ροή κινητής φάσης
Αλβενδαζόλη	ACN: ddH ₂ O+H ₃ PO ₄ (0,1%) ¹	15:85	205	23,5 min	1 ml/min
Ιβερμεκτίνη	MeOH :ddH ₂ O	90:10	245	8,85 min	1,4 ml/min

Πίνακας 9: Συνθήκες ανάλυσης δειγμάτων σε σύστημα HPLC

¹:βαθμιδωτή έκλυση, από 85:15 σε 70:30 και πάλι στο αρχικό

2.4.1 Προσδιορισμός πρότυπης καμπύλης

Για να γίνει ο ακριβής υπολογισμός των συγκεντρώσεων φαρμάκου μέσω του συστήματος HPLC προηγήθηκε η δημιουργία πρότυπης καμπύλης. Για τον σκοπό αυτό, χρησιμοποιήθηκε αρχικό διάλυμα αλβενδαζόλης ή ιβερμεκτίνης 1000mg/L σε ακετονιτρίλιο (ACN) ή μεθανόλη (MeOH) αντίστοιχα. Στη συνέχεια, έγιναν διαδοχικές αραιώσεις με ACN και MeOH για την παρασκευή διαλυμάτων των ακόλουθων συγκεντρώσεων: 100mg/L, 10 mg/L, 5 mg/L, 2 mg/L, 1 mg/L, 0,5 mg/L, 0,1 mg/L, 0,05 mg/L και 0,025 mg/L. Τα διαλύματα

αυτά αναλύθηκαν στην HPLC από όπου προέκυψαν οι πρότυπες καμπύλες για την αλβενδαζόλη και την ιβερμεκτίνη.

2.4.2 Εκχύλιση φαρμάκων από το θρεπτικό μέσο

Για να ανακτηθεί το φάρμακο από το θρεπτικό έγινε αραίωση 1:1 με τον διαλύτη μεθανόλη (MeOH) ή ακετονιτρίλιο (ACN) για την ιβερμεκτίνη και την αλβενδαζόλη αντίστοιχα. Ακολούθησε ανάδευση για 30 δευτερόλεπτα και ανάλυση των δειγμάτων στο σύστημα HPLC.

2.5 Μοριακή ανάλυση

2.5.1 Απομόνωση ριβονουκλεϊκού οξέος (RNA)

Μετά το πέρας τεσσάρων εβδομάδων από το φύτεμα και τον εμβολιασμό των φυτών με ενδομυκορριζικό μύκητα, έγινε η συγκομιδή των φυτών, ο καθαρισμός των ριζών από την άμμο και ο διαχωρισμός των ριζών κόβοντας με νυστέρι στο υποκοτύλιο. Οι ρίζες τοποθετήθηκαν σε σωληνάρια erpendorf, πάγωσαν σε υγρό άζωτο, και αποθηκεύτηκαν στους -80°C.

Ακολούθησε ομογενοποίηση του ιστού (σε υγρό άζωτο) με μηχανική πίεση με τη χρήση εμβόλου. Το δείγμα σε μορφή σκόνης προστέθηκε σε 450 μ L διαλύματος λύσης (100mM Tris (pH=7,5), 10mM EDTA (pH=8), 500mM LiCl, 1% LiDs, 5mM DTT, ddH₂O). Ακολούθησε ανάδευση (Vortex) και μεταφορά σε πάγο. Τα δείγματα φυγοκεντρήθηκαν στους 4°C για 10 λεπτά στις 13000 στροφές. Στη συνέχεια, έγινε η μεταφορά του υπερκείμενου σε 500 μ L διάλυμα φαινόλης και ισοθειοκυανικής γουανιδίνης (TRIzol) και ισχυρή ανάδευση για 30 δευτερόλεπτα. Αφού έγινε επώαση 5 λεπτών σε θερμοκρασία δωματίου ακολούθησε φυγοκέντρηση στους 4°C για 5 λεπτά στις 13000 στροφές. Κατόπιν, το υπερκείμενο μεταφέρθηκε σε 125 μ L χλωροφόρμιο, αναδεύτηκε 30 δευτερόλεπτα, επώαστηκε 2 λεπτά σε θερμοκρασία δωματίου και φυγοκεντρήθηκε στους 4°C για 10 λεπτά στις 13000 στροφές. Αφού συλλέχθηκε το υπερκείμενο σε νέα σωληνάρια erpendorf προστέθηκε 0,1 του όγκου του 3 M NaOAc, έγινε γρήγορη ανάδευση και έπειτα προστέθηκε 0,1 του όγκου του οξικό οξύ και 2,5 του όγκου του 100% αιθανόλη (EtOH). Ακολούθησε επώαση για \approx 15 λεπτά σε θερμοκρασία δωματίου και φύλαξη στους -20°C για όλη τη διάρκεια της νύχτας.

Την επόμενη μέρα, έγινε φυγοκέντρηση των δειγμάτων στους 4°C για 1 ώρα στις 13000 στροφές. Προστέθηκε 1 ml 80% αιθανόλης στο ίζημα και ακολούθησε φυγοκέντρηση στους 4°C για 10 λεπτά και 13000 στροφές. Αφαιρέθηκε όλο το υπερκείμενο και τα σωληνάρια παρέμειναν ανοιχτά για 7 λεπτά ώστε να εξατμιστεί όλη η αιθανόλη σε θερμοκρασία δωματίου. Στη συνέχεια το ίζημα διαλύθηκε με διάλυμα LoTE (3mM Tris-HCL (pH 7,5), 0.2 mM EDTA (pH 7,5), dH₂O), έγινε επώαση 2 λεπτών στους 65°C και αναδεύτηκε σύντομα (Vortex).

Έπειτα, για να προσδιοριστεί η συγκέντρωση RNA που απομονώθηκε και η καθαρότητα του, χρησιμοποιήθηκε το φασματοφωτόμετρο NanoDrop. Ως τυφλό δείγμα χρησιμοποιήθηκε 1 μL διάλυμα LoTE. Κατόπιν, τοποθετήθηκαν 1 μL από κάθε δείγμα στο φασματοφωτόμετρο και προσδιορίστηκε η συγκέντρωση των RNA (ng/μL) και η αναλογία απορρόφηση στα 260 nm/ απορρόφηση στα 280 nm. Η αναλογία αυτή αντιστοιχούσε στην καθαρότητα του δείγματος και ιδανικά αναμένεται να είναι 1,8-2.

2.5.2 Απομάκρυνση DNA από δείγματα RNA

Για να απομονωθεί όσο το δυνατόν πιο καθαρό δείγμα RNA, ήταν απαραίτητο να αφαιρεθεί το δεοξυριβονουκλεϊκό οξύ (DNA) από τα δείγματά. Για τον σκοπό αυτό, χρησιμοποιήθηκε η DNase, ένα ένζυμο που διασπά και αφαιρεί το ανεπιθύμητο DNA από τα δείγματα. Σε σωληνάρια eppendorf τοποθετήθηκαν 700ng RNA, 1 μL 10X ρυθμιστικό διάλυμα κατάλληλο για το ένζυμο της DNase, 0,25 μL (10 units) ενζύμου RNaseOUT που αναστέλλει την δράση RNAσων, 1μL DNase (1 unit) και ddH₂O ώστε να συμπληρωθεί ο όγκος των 10 μL. Ακολούθησε επώαση για 50 λεπτά σε σταθερή θερμοκρασία 37°C. Στη συνέχεια, αφού έγινε μία σύντομη φυγοκέντρηση προστέθηκε 1μL EDTA 25mM σε κάθε δείγμα και έγινε επώαση 10 λεπτών στους 65°C. Ακολούθως έγινε σύντομη φυγοκέντρηση.

2.5.3 PCR- Ηλεκτροφόρηση

Για τον έλεγχο της δράσης της DNase σε κάθε δείγμα πραγματοποιήθηκε αλυσιδωτή αντίδραση πολυμεράσης (PCR) χρησιμοποιώντας εκκινητές για το ενδογενές γονίδιο (housekeeping gene) της ουβικουιλίνης. Σε κάθε σωληνάριο προστέθηκε 1μL δείγματος RNA (μετά τον χειρισμό με DNase), 2μL 10X ρυθμιστικό διάλυμα κατάλληλο για το ένζυμο της Taq πολυμεράσης, 0,4μL τριφωσφορικά δεοξυριβονουκλεοτίδια συγκέντρωσης 10mM (dNTPs), 0,8μL πρόσθιου και 0,8μL ανάστροφου εκκινητή (συγκέντρωσης 10μM), 0,08μL Taq πολυμεράσης και ddH₂O μέχρι να συμπληρωθεί ο όγκος των 20μL. Υπήρχαν δύο δείγματα ελέγχου, ένα θετικό και ένα αρνητικό. Στο δείγμα θετικού ελέγχου χρησιμοποιήθηκε 1μL γονιδιωματικού DNA που είχε απομονωθεί από φυτό *L.jaronicus* και στο δείγμα αρνητικού ελέγχου 1μL ddH₂O. Το πρόγραμμα που χρησιμοποιήθηκε φαίνεται αναλυτικά στον **Πίνακα 10**.

Θερμοκρασία (°C)	Χρόνος (λεπτά)	Κύκλοι
95	5	1
95	30	39
55	30	39
72	10	39
72	4	1

4	∞	
---	----------	--

Πίνακας 10: Πρόγραμμα αλυσιδωτής αντίδρασης πολυμεράσης (PCR)

Μετά το πέρας της αντίδρασης PCR, ακολούθησε ηλεκτροφόρηση σε πήκτωμα αγαρόζης 1% σε διάλυμα TAE (Tris, οξικό οξύ, EDTA). Στην περίπτωση που εντοπίστηκαν υπολείμματα DNA σε δείγματα RNA η διαδικασία απομάκρυνσης DNA επαναλήφθηκε.

2.5.4 Σύνθεση συμπληρωματικού DNA (cDNA)

Για την παρασκευή συμπληρωματικού DNA από το RNA που απομονώθηκε εφαρμόστηκε η παρακάτω διαδικασία.

- Προσθήκη σε κάθε σωληνάριο 350ng RNA μετά από επίδραση DNase, 1μL εκκινητές oligodT (2μM), 1μL dNTPs (10mM) και ddH₂O μέχρι τελικό όγκο 14,5μL
- Επώαση στους 65^oC για 5 λεπτά και άμεση μεταφορά στον πάγο
- Προετοιμασία μίγματος (Master Mix) ώστε σε κάθε δείγμα να προστεθούν 4μL 5× ρυθμιστικό διάλυμα και 0,5μL RNaseOUT (20 units)
- Επώαση στους 42^oC για 2 λεπτά
- Προσθήκη 1μL ενζύμου αντίστροφης μεταγραφάσης Superscript II (200U/μL)
- Ήπια ανάμιξη
- Πρόγραμμα αντίδρασης (RT – PCR) (**Πίνακας 11**)

Θερμοκρασία (°C)	Χρόνος (λεπτά)
42	50
70	15
4	∞

Πίνακας 11: Πρόγραμμα αντίστροφης μεταγραφάσης (RT – PCR)

2.5.5 Ποσοτική PCR πραγματικού χρόνου (qPCR)

Για να προσδιοριστεί η έκφραση συγκεκριμένων γονιδίων χρησιμοποιήθηκε η ποσοτική PCR πραγματικού χρόνου (qPCR). Η συγκεκριμένη τεχνική δίνει την δυνατότητα παρακολούθησης, σε πραγματικό χρόνο, της διαδικασίας αύξησης αντιγράφων επιθυμητών τμημάτων DNA. Αυτό καθίσταται εφικτό με την ανίχνευση φθορίζοντων σημάτων που εκπέμπονται από μία χρωστική. Στην συγκεκριμένη μελέτη χρησιμοποιήθηκε η χρωστική SYBR Green, η οποία προσδένεται στα δίκλινα μόρια του DNA και φθορίζει στα 520nm. Επομένως, όσο πιο πολύ DNA υπάρχει στο αντίστοιχο δείγμα τόσο μεγαλύτερη είναι η ένταση του φθορισμού. Για την σύγκριση των δειγμάτων χρησιμοποιείται μία τιμή που λέγεται

Ct (threshold cycle) που αντιπροσωπεύει τον αριθμό κύκλων αντίδρασης που απαιτείται από κάθε δείγμα για να ξεπεράσει ένα συγκεκριμένο κατώφλι έντασης φθορισμού που έχει οριστεί από πριν. Όσο πιο πολλοί κύκλοι χρειάζονται τόσο πιο μικρή είναι η ποσότητα του DNA στο αντίστοιχο δείγμα. Επίσης, για τον έλεγχο παραπροϊόντων χρησιμοποιείται η καμπύλης τήξης (melting curve) η οποία είναι συγκεκριμένη για κάθε αλληλουχία που μελετάται.

Αρχικά, έγινε η κανονικοποίηση των δειγμάτων έτσι ώστε οι ποσότητες cDNA να είναι ίδιες για να είναι συγκρίσιμα τα αποτελέσματα. Αυτό επιτεύχθηκε με την πραγματοποίηση qPCR για ένα ενδογενές γονίδιο του *L.jaronicus* και συγκεκριμένα, αυτό της ATP συνθάσης με την παρακάτω διαδικασία.

- cDNA 1μL
- πρόσθιος εκκινητής (F) (10μM) 0.2μL
- οπίσθιος εκκινητής (R) (10μM) 0.2μL
- ddH₂O 3.6μL
- Μίγμα (2x) SYBR green 5μL

Η αντίδραση πραγματοποιήθηκε στο μηχάνημα CPX Connect Real-Time System (BIORAD) και το πρόγραμμα παρουσιάζεται στον **Πίνακα 12**

Στη συνέχεια, έγιναν οι αραιώσεις των πιο πυκνών δειγμάτων με ddH₂O. Ακολούθησαν οι αντιδράσεις qPCR για τα επιθυμητά γονίδια σύμφωνα με την ακόλουθη αντίδραση και το πρόγραμμα που παρουσιάζεται στον **Πίνακα 12**

- cDNA 2.5μL
- πρόσθιος εκκινητής (F) (10μM) 0.2μL
- οπίσθιος εκκινητής (R) (10μM) 0.2μL
- ddH₂O 2.1μL
- SYBR green 5μL

Θερμοκρασία (°C)	Χρόνος (λεπτά)	Κύκλοι
95	5	1
95	15	39
60	15	39
72	10	39

Πίνακας 12: Πρόγραμμα ποσοτικής PCR

Τα γονίδια που μελετήθηκαν στη συγκεκριμένη εργασία ήταν τα *LjSbtM1*, *LjPT4* και *LjAMT2.2* και οι εκκινητές τους φαίνονται στον **Πίνακα 13**.

Γονίδια	Πρόσθιος εκκινητής	Οπίσθιος εκκινητής
LjATPs	CAATGTCGCCAAG GCCCA TGGTG	AACACCACTCTCG ATCATTCTCTG
LjPP2a	GTAAATGCGT CTAAAGATAGGGT CC	ACTAGACTGTAGT GCTTGAGAGGC
LjSbtM1	CAGGTGAACCAGA AGGTTGCATAC	AGCAGCACCCCTCT CTATCTTCATGC
LjPT4	CCAGAACCTCACA CAGAAAGACATC	AACACGGTGAACC AGTACCCTGG
LjAMT2.2	ACACATGCTTGCA CTGCTACC	CTGCCCATCCTTG AACCAACC

Πίνακας 13: Εκκινητές γονιδίων που χρησιμοποιήθηκαν στην qPCR

Για κάθε μεταχείριση έγιναν 5 βιολογικές επαναλήψεις και για κάθε γονίδιο 2 τεχνικές επαναλήψεις. Τα επίπεδα έκφρασης των γονιδίων που ελέγχθηκαν υπολογίστηκαν σε αναλογία με τα επίπεδα έκφρασης γονιδίων αναφοράς. Τα γονίδια αναφοράς που χρησιμοποιήθηκαν ήταν τα ATP και PP2. Για να υπολογιστούν τα επίπεδα έκφρασης χρησιμοποιήθηκε ο τύπος $PCR_{eff}^{-\Delta Ct}$, όπου PCR_{eff} η αποδοτικότητα της αντίδρασης PCR και ΔCt η διαφορά $Ct_{\text{γονιδίου}} - Ct_{\text{γονιδίου αναφοράς}}$. Η αποδοτικότητα της αντίδρασης υπολογίστηκε με βάση τα δεδομένα απορροφήσεων από κάθε κύκλο της αντίδρασης (με τη χρήση του προγράμματος LinRegPCR).

2.6 Στατιστική ανάλυση

Για τον έλεγχο στατιστικά σημαντικών διαφορών μεταξύ διάφορων τιμών χρησιμοποιήθηκε *t-test* ανεξάρτητων μεταβλητών με την χρήση του GraphPad. Για τον στατιστικό έλεγχο χρησιμοποιήθηκαν οι μέσοι όροι των προς σύγκριση δειγμάτων, οι τυπικές αποκλίσεις και ο αριθμός των επαναλήψεων.

3. Αποτελέσματα

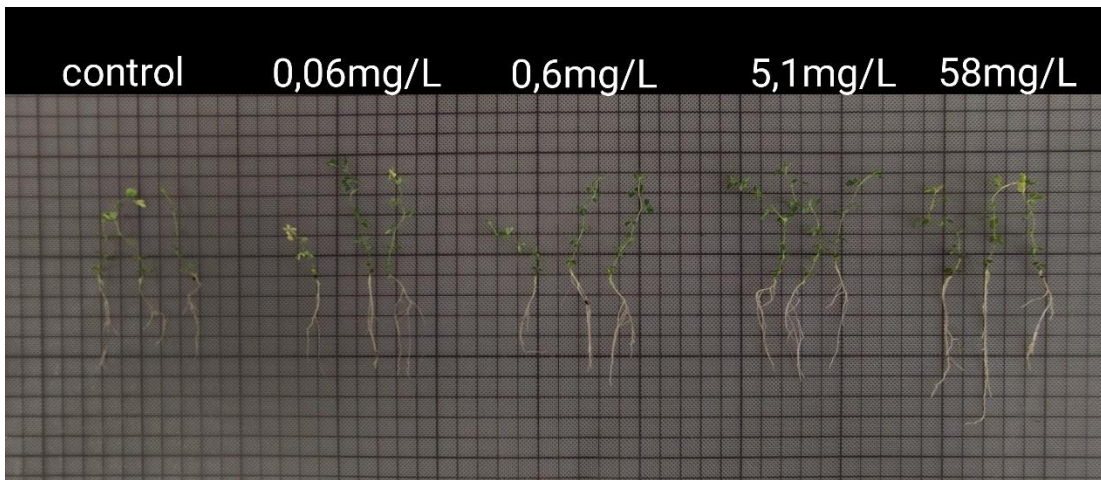
3.1 Έλεγχος επίδρασης της ιβερμεκτίνης στον αποικισμό των φυτών από δενδρόμορφους μυκορριζικούς μύκητες (ΔΜΜ)

Για να μελετηθεί η πιθανή επίδραση της ιβερμεκτίνης στον αποικισμό των φυτών από τον μύκητα *R. irregularis* (στέλεχος DAOM), έγινε σύγκριση των ποσοστών αποικισμού μεταξύ των εμβολιασμένων φυτών *L. jaronicus* που αναπτύχθηκαν σε απουσία και παρουσία του φαρμάκου. Μελετήθηκαν τέσσερις συγκεντρώσεις ιβερμεκτίνης (φάρμακο διαλυμένο σε DMSO) που επιλέχθηκαν με βάση τα βιβλιογραφικά δεδομένα. Συγκεκριμένα, οι συγκεντρώσεις ήταν 0,05mg/L, 0,5mg/L, 5mg/L, 50mg/L. Οι ακριβείς συγκεντρώσεις του φαρμάκου που βρέθηκε διαλυμένο στο θρεπτικό μέσο ανάπτυξης των φυτών προσδιορίστηκαν έπειτα από ανάλυση HPLC και φαίνονται στον **Πίνακα 14**. Η συγκέντρωση του διαλύτη DMSO ήταν 0,1% σε όλες τις μεταχειρίσεις.

Φάρμακο	Αναμενόμενες συγκεντρώσεις	Ακριβείς συγκεντρώσεις
Ιβερμεκτίνη	0,05mg/L	0,06mg/L
	0,5mg/L	0,6mg/L
	5mg/L	5,1mg/L
	50mg/L	58mg/L

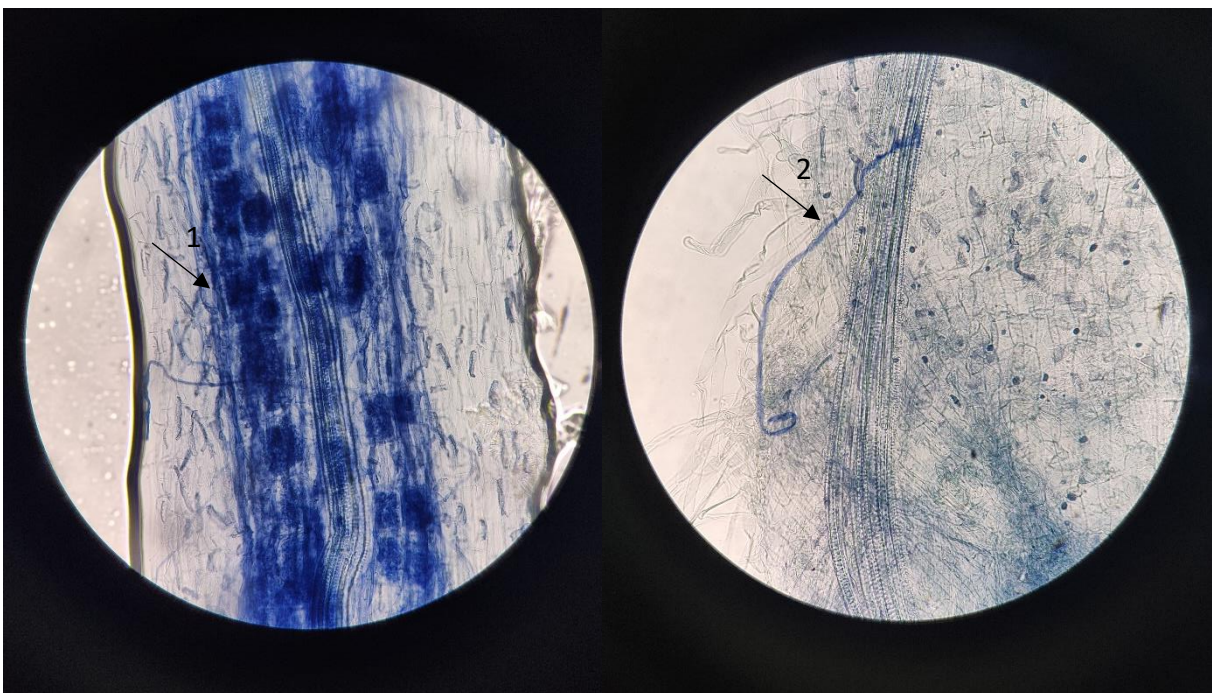
Πίνακας 14: Αναμενόμενες και ακριβείς συγκεντρώσεις ιβερμεκτίνης στο θρεπτικό μέσο ανάπτυξης των φυτών

Σε κάθε δοχείο magenta που περιείχε αποστειρωμένη άμμο φυτεύτηκαν 3 φυτά με τη μέθοδο sandwich, προστέθηκε θρεπτικό SLA που περιείχε αντίστοιχη ποσότητα φαρμάκου (ή σκέτο DMSO στην περίπτωση των δειγμάτων αρνητικού ελέγχου) και οι ρίζες εμβολιάστηκαν με 300 σπόρια του μύκητα *R. irregularis* (δηλαδή 100 σπόρια ανά φυτό). Ακόμα, για κάθε μεταχείριση φυτεύτηκαν φυτά σε πέντε δοχεία magenta ώστε να υπάρχουν πέντε βιολογικές επαναλήψεις. Τα φυτά αναπτύχθηκαν για 5 εβδομάδες και έπειτα ακολούθησε η συγκομιδή τους. Στην **Εικόνα 5** φαίνεται η ανάπτυξη των φυτών κάθε μεταχείρισης.



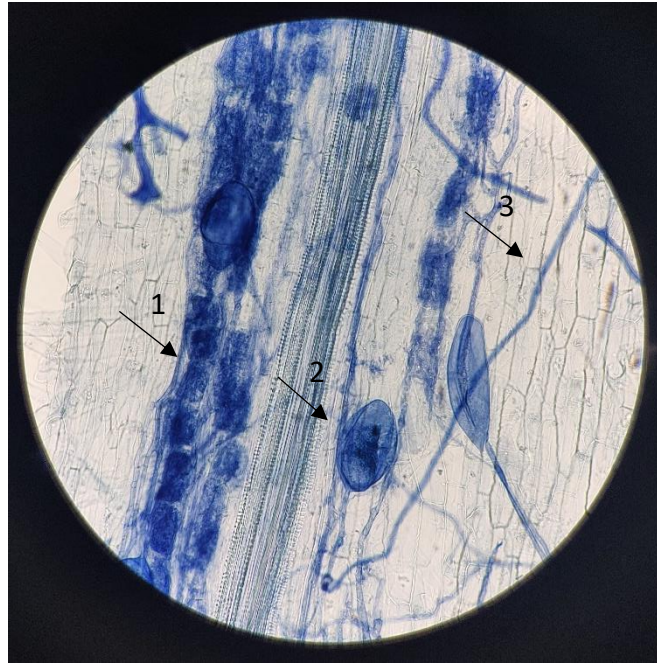
Εικόνα 5: Φυτά *L. jaronicus*, 5 εβδομάδες μετά τον εμβολιασμό με *R. irregularis* στέλεχος DAOM και επίδραση ιβερμεκτίνης συγκεντρώσεων 0,46mg/L, 5,14 mg/L, 8,06 mg/L, 15,23 mg/L

Όσον αφορά την ανάπτυξη των φυτών δεν φαίνεται να υπάρχει σημαντική επίδραση της ιβερμεκτίνης σε αυτή. Ακολούθησε η χρώση των ριζών, η μικροσκοπική παρατήρηση και η ανάλυση των δεδομένων. Στην **Εικόνα 6** παρουσιάζεται τμήμα της ρίζας που έχει αποικιστεί από ΔΜΜ και τμήμα ρίζας που δεν έχει αποικιστεί, ενώ στην **Εικόνα 7** φαίνονται οι διάφορες δομές του μύκητα.



Εικόνα 6: α) Τμήμα ρίζας *L. jaronicus* αποικισμένο και β) μη αποικισμένο από δενδρόμορφο μυκορριζικό μύκητα.

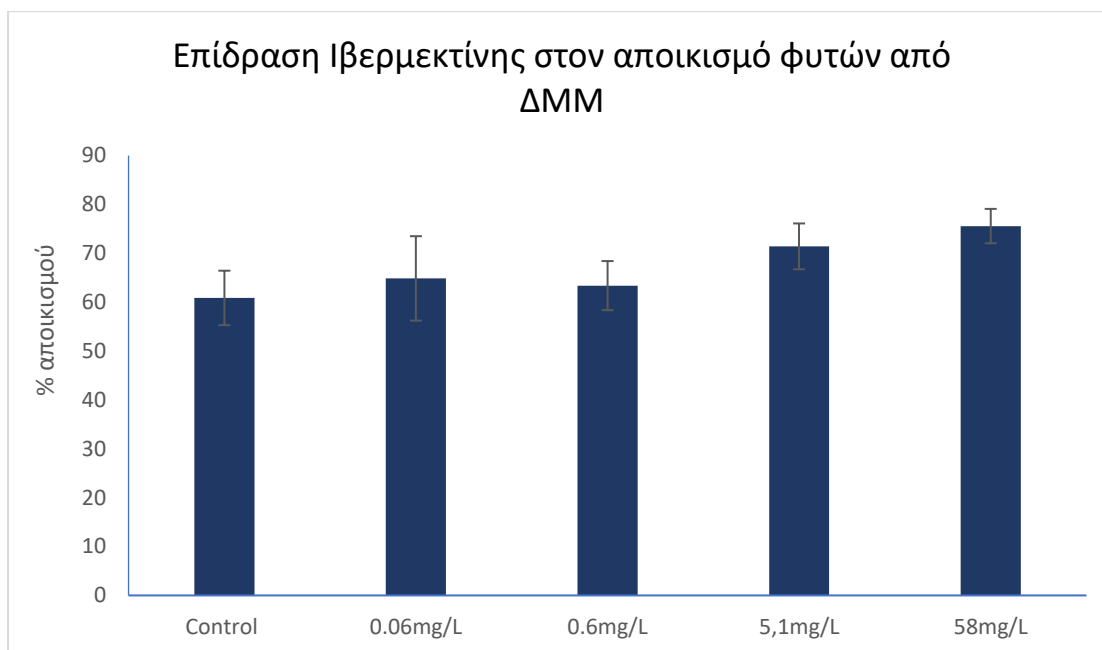
1: δενδρόμορφη δομή
2: υφή



Εικόνα 7: Δομές δενδρόμορφου μυκορριζικού μύκητα

1: δενδρόμορφη δομή, 2: κύστη, 3: υφή

Έπειτα από την μικροσκοπική παρατήρηση, για κάθε μεταχείριση υπολογίστηκε ο μέσος όρος των ποσοστών αποικισμού που βρέθηκαν σε κάθε βιολογική επανάληψη. Από το **Γράφημα 1** είναι φανερό ότι δεν υπάρχει παρεμπόδιση ή ενίσχυση του αποικισμού των ριζών από ΔΜΜ όσον αφορά την παρουσία δενδρόμορφων δομών καθώς τα ποσοστά αποικισμού σε κάθε μεταχείριση δεν έχουν στατιστικώς σημαντική διαφορά με το ποσοστό αποικισμού στα φυτά αρνητικού ελέγχου (control).



Γράφημα 1: Ποσοστό αποικισμού ριζών *L. jaronicus* από δενδρόμορφο μυκορριζικό μύκητα (ΔΜΜ) σε φυτά αρνητικού ελέγχου και σε φυτά που αναπτύχθηκαν υπό την επίδραση διαφορετικών συγκεντρώσεων ιβερμεκτίνης (0,06mg/L, 0,6mg/L, 5,1mg/L, 58mg/L) Παρουσιάζεται ο μέσος όρος των ποσοστών αποικισμού από πέντε βιολογικές επαναλήψεις για κάθε μεταχείριση. Δεν παρατηρήθηκαν στατιστικώς σημαντικές διαφορές μεταξύ των μεταχειρίσεων. (control=αρνητικός έλεγχος)

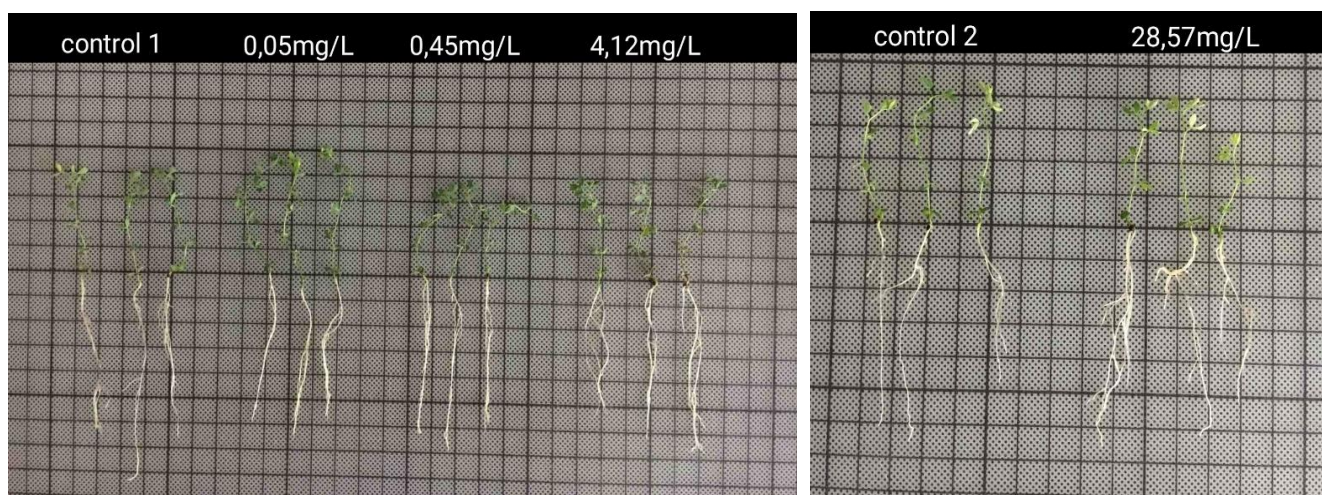
3.2 Έλεγχος επίδρασης της αλβενδαζόλης στον αποικισμό των φυτών από δενδρόμορφους μυκορριζικούς μύκητες (ΔΜΜ)

Για τον έλεγχο επίδρασης της αλβενδαζόλης στον αποικισμό των φυτών από τον μύκητα *R. irregularis* (στέλεχος DAOM), έγινε σύγκριση των ποσοστών αποικισμού μεταξύ φυτών *L. jaronicus* που αναπτύχθηκαν απουσία και παρουσία φαρμάκου. Αρχικά, μελετήθηκαν τέσσερις συγκεντρώσεις αλβενδαζόλης (φάρμακο διαλυμένο σε DMSO) που επιλέχθηκαν με βάση τα βιβλιογραφικά δεδομένα. Συγκεκριμένα, οι συγκεντρώσεις ήταν 0,05mg/L, 0,5mg/L, 5mg/L, 50mg/L. Οι ακριβείς συγκεντρώσεις που προσδιορίστηκαν στο θρεπτικό μέσο ανάπτυξης των φυτών έπειτα από ανάλυση HPLC φαίνονται στον Πίνακα 15. Η συγκέντρωση του διαλύτη DMSO ήταν 0,1% στις μεταχειρίσεις 0,05mg/L, 0,5mg/L και 5mg/L, ενώ στη μεγαλύτερη συγκέντρωση αλβενδαζόλης ήταν 0,5%. Αυτό, οφείλεται στο γεγονός ότι η αλβενδαζόλη έχει χαμηλή διαλυτότητα και στη μεγάλη συγκέντρωση χρειάστηκε να προστεθεί μεγάλη ποσότητα φαρμάκου και συνεπώς μεγάλη ποσότητα του διαλύτη του DMSO. Επομένως, χρησιμοποιήθηκαν δύο δείγματα αρνητικού ελέγχου με αντίστοιχες συγκεντρώσεις DMSO.

Φάρμακο	Αναμενόμενες συγκεντρώσεις	Ακριβείς συγκεντρώσεις
Αλβενδαζόλη	0,05mg/L	0,05mg/L
	0,5mg/L	0,45mg/L
	5mg/L	4,12mg/L
	50mg/L	28,57mg/L

Πίνακας 15: Αναμενόμενες και ακριβείς συγκεντρώσεις αλβενδαζόλης στο θρεπτικό μέσο ανάπτυξης των φυτών

Σε κάθε δοχείο magenta που περιείχε αποστειρωμένη άμμο φυτεύτηκαν 3 φυτά με τη μέθοδο sandwich, προστέθηκε θρεπτικό SLA που περιείχε αντίστοιχη ποσότητα φαρμάκου (ή σκέτο DMSO στην περίπτωση των δειγμάτων αρνητικού ελέγχου) και οι ρίζες εμβολιάστηκαν με 300 σπόρια του μύκητα *R. irregularis* (δηλαδή 100 σπόρια ανά φυτό). Ακόμα, για κάθε μεταχείριση φυτεύτηκαν φυτά σε πέντε δοχεία magenta ώστε να υπάρχουν πέντε βιολογικές επαναλήψεις. Τα φυτά αναπτύχθηκαν για 5 εβδομάδες και έπειτα ακολούθησε η συγκομιδή τους.



Εικόνα 8: Φυτά *L. jaronicus*, 5 εβδομάδες μετά τον εμβολιασμό με *R. irregularis* στέλεχος DAOM και επίδραση αλβενδαζόλης συγκεντρώσεων 0,05mg/L, 0,45 mg/L, 4,12 mg/L, 28,57 mg/L

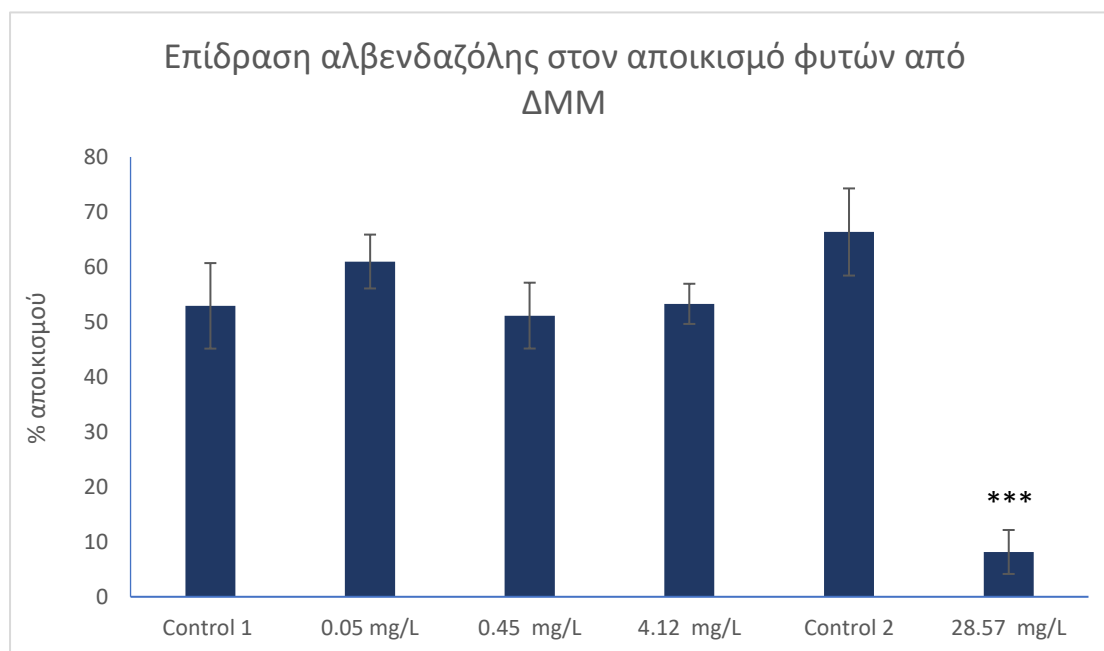
Αρνητικός έλεγχος 1 (Control 1): 0,1% DMSO

Αρνητικός έλεγχος 2 (Control 2): 0,5% DMSO

Όπως φαίνεται και στην **Εικόνα 8** δεν παρατηρήθηκε αλλαγή στην ανάπτυξη των φυτών έπειτα από τη χορήγηση αλβενδαζόλης σε όλες τις συγκεντρώσεις φαρμάκου σε σύγκριση με τα δείγματα αρνητικού ελέγχου.

Ακολούθησε η χρώση των ριζών, η μικροσκοπική παρατήρηση και η ανάλυση των αποτελεσμάτων. Ο μέσος όρος των ποσοστών παρουσίας δενδρόμορφων δομών σε κάθε μεταχείριση φαίνεται στο **Γράφημα 2**. Είναι φανερό ότι στην μέγιστη συγκέντρωση αλβενδαζόλης, δηλαδή στα 28,57 mg/L, υπήρξε παρεμπόδιση του αποικισμού των ριζών από τον ΔΜΜ. Πιο ειδικά, το ποσοστό αποικισμού που μετρήθηκε στα δείγματα αρνητικού

ελέγχου ήταν 66,4% ενώ το ποσοστό αποικισμού έπειτα από επίδραση με 28,57mg/L αλβενδαζόλης ήταν 8,2%.



Γράφημα 2: Ποσοστό αποικισμού ριζών *L. jaronicus* από δενδρόμορφο μυκορριζικό μύκητα (ΔΜΜ) σε δείγματα αρνητικού ελέγχου και σε δείγματα υπό την επίδραση διάφορων συγκεντρώσεων αλβενδαζόλης (0,05mg/L, 0,45mg/L, 4,12mg/L, 28,57mg/L)

Παρουσιάζεται ο μέσος όρος των ποσοστών αποικισμού από πέντε βιολογικές επαναλήψεις για κάθε μεταχείριση.

Αρνητικός έλεγχος 1 (Control 1): 0,1% DMSO

Αρνητικός έλεγχος 2 (Control 2): 0,5% DMSO

***: $p\text{-value} \leq 0,001$ (t-test)

Έπειτα από στατιστικό έλεγχο μεταξύ του δείγματος αρνητικού ελέγχου 2 και του δείγματος επίδρασης αλβενδαζόλης συγκέντρωσης 28,57mg/L υπολογίστηκε η τιμή $p\text{-value}$ ίση με 0,0006, που συνεπάγεται εξαιρετικά στατιστικά σημαντική διαφορά καθώς είναι $<0,001$.

Στη συνέχεια, ακολούθησε δεύτερο πείραμα ελέγχου της δράσης της αλβενδαζόλης όπου δοκιμάστηκαν περισσότερες συγκεντρώσεις μεταξύ των τιμών 4,12mg/L (που δεν παρουσίασε παρεμπόδιση της συμβιωτικής σχέσης) και 28,57mg/L (που παρουσίασε ισχυρή παρεμπόδιση). Συγκεκριμένα, οι συγκεντρώσεις που επιλέχθηκαν να εξεταστούν ήταν 0,5mg/L, 5mg/L, 10mg/L και 20mg/L. Αφού έγινε υπολογισμός των πραγματικών συγκεντρώσεων του φαρμάκου (με HPLC) κατόπιν προσθήκης του στο θρεπτικό μέσο ανάπτυξης των φυτών (Πίνακας 16), φυτεύτηκαν νέα φυτά *L. jaronicus*. Σε κάθε δοχείο magenta φυτεύτηκαν 4 φυτά με τη μέθοδο sandwich, προστέθηκε θρεπτικό SLA που περιείχε αντίστοιχη ποσότητα φαρμάκου (ή σκέτο DMSO στην περίπτωση των δειγμάτων αρνητικού ελέγχου) και έγινε εμβολιασμός με 400 σπόρια του μύκητα *R. irregularis*.

Φάρμακο	Αναμενόμενες συγκεντρώσεις	Πραγματικές συγκεντρώσεις
Αλβενδαζόλη	0,5mg/L	0,46mg/L
	5mg/L	5,14mg/L
	10mg/L	8,06mg/L
	20mg/L	15,23mg/L

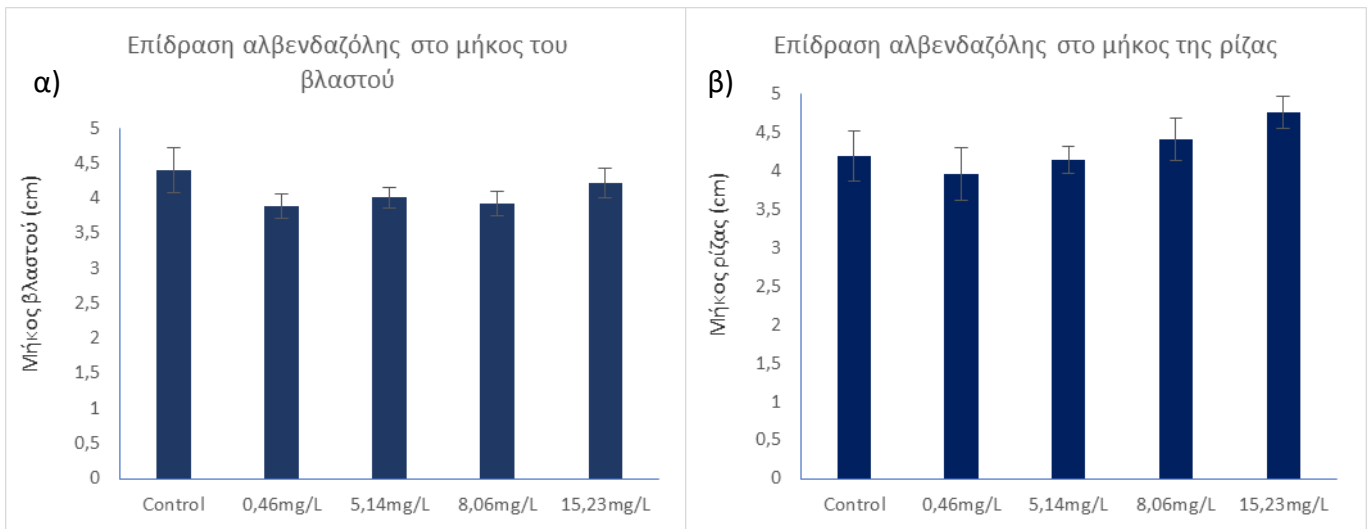
Πίνακας 16: Αναμενόμενες και πραγματικές συγκεντρώσεις αλβενδαζόλης στο θρεπτικό μέσο ανάπτυξης των φυτών

Έπειτα από 5 εβδομάδες έγινε η συγκομιδή τους. Στην **Εικόνα 9** παρουσιάζονται τα φυτά κάθε μεταχείρισης. Παρατηρείται ότι η ανάπτυξη τους δεν επηρεάστηκε από την αλβενδαζόλη.



Εικόνα 9: Φυτά *L.jaronicus*, 5 εβδομάδες μετά τον εμβολιασμό με *R. irregularis* στέλεχος DAOM και επίδραση αλβενδαζόλης συγκεντρώσεων 0,46mg/L, 5,14 mg/L, 8,06 mg/L, 15,23 mg/L

Για καλύτερη αξιολόγηση της ανάπτυξης των φυτών και σύγκρισης της με αυτή των φυτών αρνητικού ελέγχου μετρήθηκε το μήκος του βλαστού και της ρίζας κάθε φυτού. Αφού υπολογίστηκε ο μέσος όρος μήκους βλαστού και ρίζας για κάθε βιολογική επανάληψη, ακολούθησε ο υπολογισμός του μέσου όρου κάθε μεταχείρισης. Τα αποτελέσματα παρουσιάζονται στο **Γράφημα 3**.

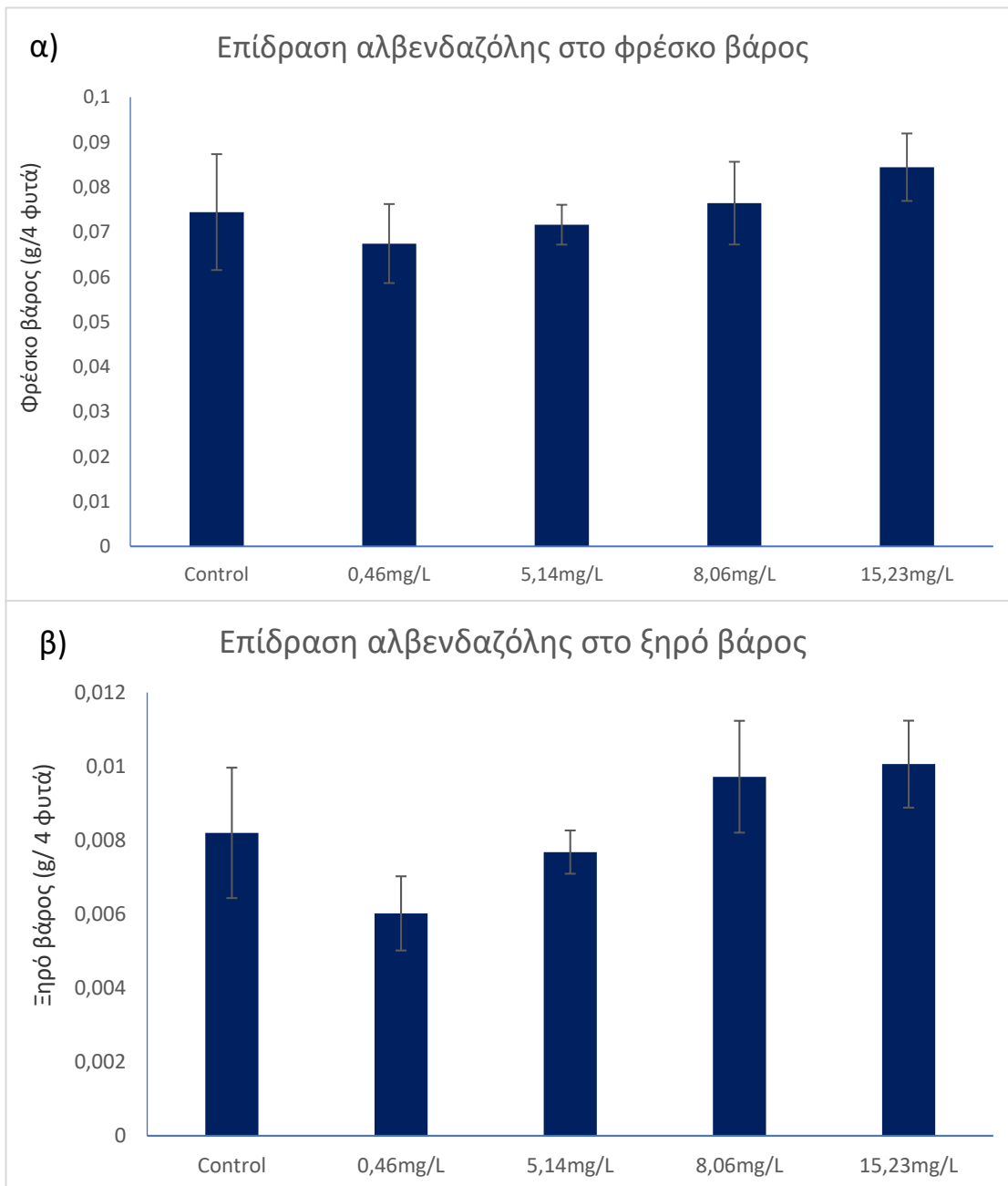


Γράφημα 3: Επίδραση της αλβενδαζόλης στην ανάπτυξη των φυτών *L.jaronicus*.

α) Επίδραση στο μήκος του βλαστού και β) επίδραση στο μήκος της ρίζας. Παρουσιάζεται ο μέσος όρος μήκους βλαστού και ρίζας που υπολογίστηκε από πέντε βιολογικές επαναλήψεις/μεταχείριση και τέσσερα φυτά/βιολογική επανάληψη σε δείγματα αρνητικού ελέγχου (control) και δείγματα που αναπτύχθηκαν υπό τη παρουσία διαφόρων συγκεντρώσεων αλβενδαζόλης (0,46mg/L 5,14 mg/L, 8,0 mg/L 6,15,23 mg/L). Δεν παρατηρήθηκαν στατιστικώς σημαντικές διαφορές μεταξύ των μεταχειρίσεων

Όπως φαίνεται και στο **Γράφημα 3**, η παρουσία αλβενδαζόλης στο θρεπτικό δεν επηρέασε την ανάπτυξη των φυτών. Με τον στατιστικό έλεγχο επιβεβαιώθηκε ότι οποιαδήποτε ορατή διαφορά δεν είναι στατιστικώς σημαντική.

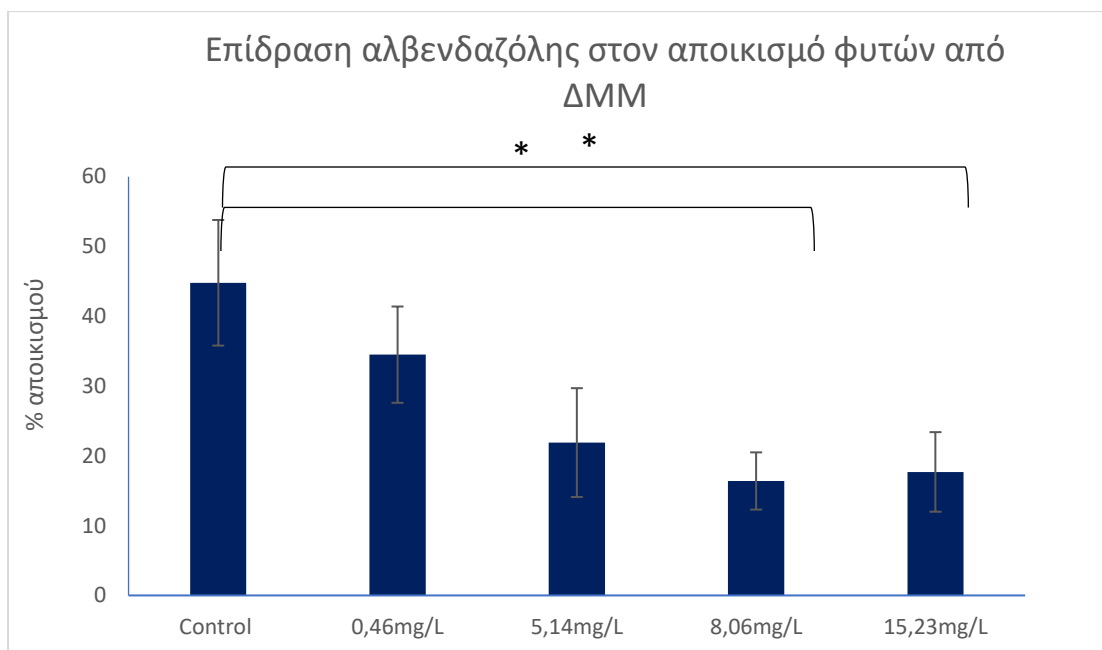
Έπειτα, για να εξεταστεί η δράση αλβενδαζόλης στην υπέργεια βιομάζα των φυτών, απομονώθηκε το υπέργειο τμήμα κάθε φυτού και υπολογίστηκε τόσο το φρέσκο όσο και το ξηρό βάρος του. Δεν παρατηρήθηκε στατιστικώς σημαντική διαφορά στο βάρος των υπέργειων τμημάτων με την χορήγηση φαρμάκου (**Γράφημα 4**).



Γράφημα 4: Επίδραση της αλβενδαζόλης στην υπέργεια βιομάζα φυτών *L.jaronicus*.

Παρουσιάζεται ο μέσος όρος α) φρέσκου και β) ξηρού βάρους 4 φυτών που υπολογίστηκε από πέντε βιολογικές επαναλήψεις/μεταχείριση σε δείγματα ελέγχου και δείγματα που αναπτύχθηκαν υπό τη παρουσία διαφόρων συγκεντρώσεων αλβενδαζόλης (0,46mg/L, 5,14 mg/L, 8,06 mg/L, 15,23 mg/L). Δεν παρατηρήθηκαν στατιστικώς σημαντικές διαφορές μεταξύ των μεταχειρίσεων.

Στη συνέχεια, ακολούθησε η χρώση της ρίζας, η μικροσκοπική παρατήρηση και η ανάλυση των δεδομένων. Ο μέσος όρος των ποσοστών παρουσίας δενδρόμορφων δομών σε κάθε μεταχείριση φαίνεται στο **Γράφημα 5**.



Γράφημα 5: Ποσοστό αποικισμού των ριζών από δενδρόμορφο μυκορριζικό μύκητα (ΔΜΜ) σε δείγματα αρνητικού ελέγχου (control) και σε δείγματα φυτών υπό την επίδραση διάφορων συγκεντρώσεων αλβενδαζόλης (0,46mg/L, 5,14mg/L, 8,06mg/L, 15,23mg/L).

Παρουσιάζεται ο μέσος όρος των ποσοστών που υπολογίστηκαν/μεταχείριση

*: $p\text{-value} \leq 0,05$ (*t-test*)

Αρχικά, παρατηρείται μία τάση μείωσης αποικισμού ήδη από τα 5,14mg/L καθώς το ποσοστό αποικισμού από 45% που υπολογίστηκε στα δείγματα αρνητικού ελέγχου έπεσε στα 22%. Ωστόσο, αυτή η μείωση δεν είναι στατιστικά σημαντική. Αντίθετα, στις συγκεντρώσεις 8,06mg/L και 15,23mg/L τα ποσοστά που βρέθηκαν ήταν 16% και 18% αντίστοιχα. Η μείωση αυτή του αποικισμού είναι στατιστικώς σημαντική. Συγκεκριμένα, από το *t-test* που έγινε βρέθηκαν οι τιμές $p\text{-value}$ 0.0211 και 0.0347 για τα 8,06mg/L και τα 15,23mg/L αντίστοιχα, επομένως, οι διαφορές είναι στατιστικώς σημαντικές με $p\text{-value} < 0,05$.

3.3 Έλεγχος επίδρασης αλβενδαζόλης στην ανάπτυξη και την λειτουργικότητα των δενδρόμορφων δομών

Για να προσδιοριστεί με μεγαλύτερη ευαισθησία η επίδραση της αλβενδαζόλης στη συμβιωτική σχέση των φυτών με ΔΜΜ, χρησιμοποιήθηκε η μέθοδος της ποσοτικής PCR πραγματικού χρόνου και μελετήθηκε η έκφραση συγκεκριμένων γονιδίων-δεικτών που είναι γνωστό ότι επάγονται ειδικά κατά τη δημιουργία ή τη λειτουργία των δενδρόμορφων δομών του μύκητα. Τα γονίδια που επιλέχθηκαν ήταν ένα γονίδιο που εκφράζει την πρωτεάση LjSbtM1 που όπως αναφέρεται και στο κεφάλαιο «Εισαγωγή» (Παράγραφος 1.1.2) επάγεται ισχυρά με την παρουσία ΔΜΜ και φαίνεται να παίζει ρόλο στην ανάπτυξη των δενδρόμορφων δομών (Takeda et al., 2009). Τα άλλα δύο γονίδια που επιλέχθηκαν αντικατοπτρίζουν την λειτουργικότητα των σχηματιζόμενων δενδρόμορφων δομών καθώς το ένα κωδικοποιεί για έναν μεταφορέα φωσφόρου και το δεύτερο για έναν μεταφορέα αζώτου. Ο μεταφορέας φωσφόρου LjPT4 όπως αναφέρεται και στο κεφάλαιο «Εισαγωγή» (Παράγραφος 1.1.4) επάγεται αποκλειστικά σε φυτικά κύτταρα αποικισμένα με ΔΜΜ και η έκφρασή του αυξάνεται

όσο προχωράει ο αποικισμός του μύκητα στο φυτό. Αποτελεί βασικό παράγοντα για έναν επιτυχημένα αποικισμό (**Banasiak et al., 2021**). Ο δεύτερος μεταφορέας ήταν ο LjAMT 2.2, που είναι μεταφορέας αζώτου και παράγεται όπως ο LjPT4 από το φυτό κατά τον αποικισμό του από ΔΜΜ, κυρίως σε κύτταρα όπου σχηματίζονται δενδρόμορφες δομές (Παράγραφος 1.1.4) (**Guether et al., 2009**).

Η μοριακή ανάλυση πραγματοποιήθηκε σε φυτά στα οποία εφαρμόστηκε αλβενδαζόλη συγκέντρωσης 5 mg/L. Σε αυτή τη συγκέντρωση αλβενδαζόλης φαίνεται να μην επηρεάζεται σημαντικά η δημιουργία δενδρόμορφων δομών στις ρίζες (σύμφωνα με τη μικροσκοπική παρατήρηση: **Γράφημα 5**), επομένως η μοριακή ανάλυση εξετάζει εάν οι δενδρόμορφες δομές που σχηματίζονται είναι πλήρως λειτουργικές.

Για τον σκοπό αυτό, σε κάθε δοχείο magenta φυτεύτηκαν 3 φυτά *L. japonicus*, προστέθηκε θρεπτικό SLA που περιείχε 4,9mg/L αλβενδαζόλης (ή 0,1% σκέτο DMSO στην περίπτωση των δειγμάτων αρνητικού ελέγχου) και οι ρίζες εμβολιάστηκαν με 300 σπόρια του μύκητα *R. irregularis*. Ακόμα, για κάθε μεταχείριση φυτεύτηκαν φυτά σε πέντε δοχεία magentas ώστε να υπάρχουν πέντε βιολογικές επαναλήψεις. Τα φυτά αναπτύχθηκαν για 4 εβδομάδες και έπειτα ακολούθησε η συγκομιδή τους. Σύμφωνα με αποτελέσματα προηγούμενων εργασιών οι 4 εβδομάδες είναι αρκετές για να επαχθούν τα γονίδια-δείκτες και ταυτόχρονα να μην παραχθούν πολλοί μεταβολίτες στις ρίζες που θα μείωναν την ποιότητα του εξαγόμενου RNA.

Στη συνέχεια, έγινε η απομόνωση του RNA από τις ρίζες των φυτών ώστε να γίνει έλεγχος της επίδρασης αλβενδαζόλης στην έκφραση των γονιδίων *LjSbtM1*, *LjPT4* και *LjAMT 2.2*. Έπειτα έγινε η απομάκρυνση του DNA, η παρασκευή του cDNA και η qPCR με τις μεθόδους που περιγράφονται αναλυτικά στην Παράγραφο 2.5.

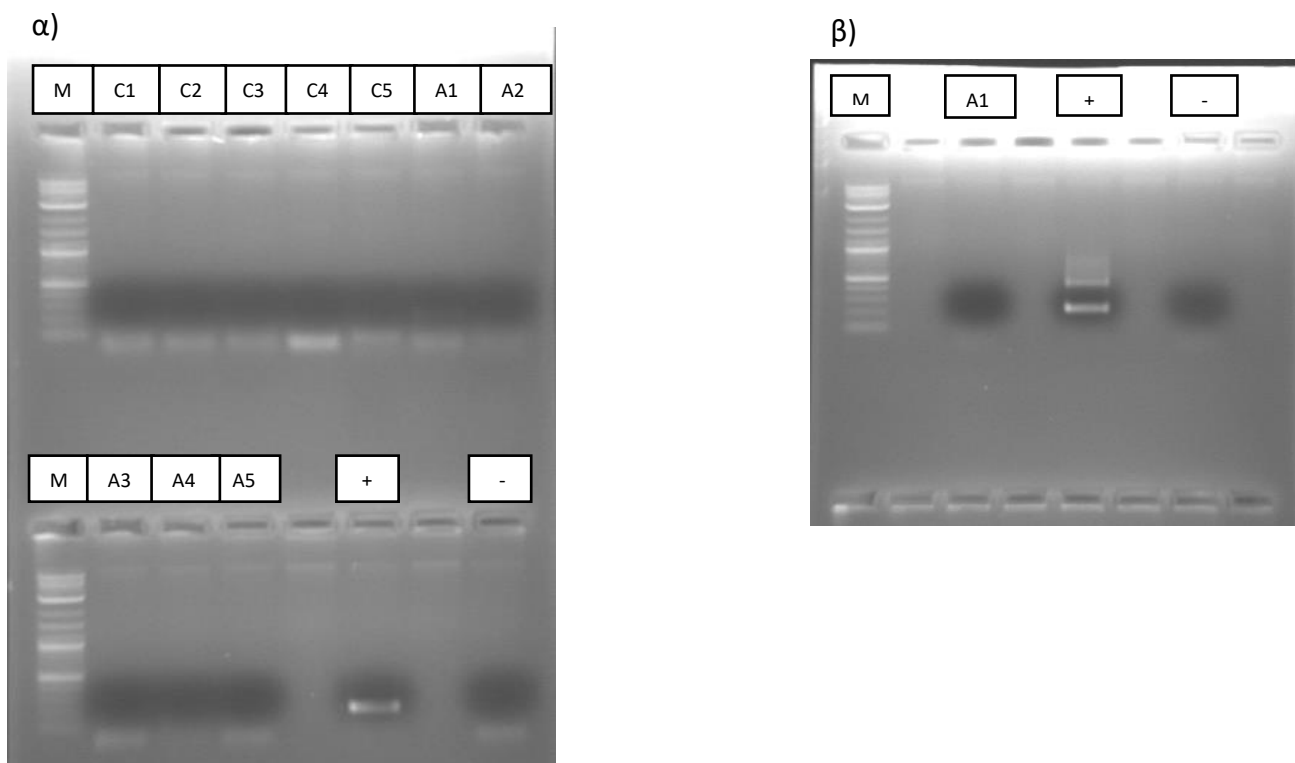
Με την χρήση NanoDrop προσδιορίστηκε η συγκέντρωση των δειγμάτων RNA (ng/μL) και η αναλογία απορρόφηση στα 260 nm/ απορρόφηση στα 280 nm όπως φαίνονται στον **Πίνακα 17**.

Δείγματα RNA	Συγκέντρωση(ng/μL)	Λόγος 260/280
Control 1	254	1,87
Control 2	313	1,78
Control 3	437	1,82
Control 4	296	1,72
Control 5	289	1,81
ABZ 1	214	1,87
ABZ 2	348	1,81
ABZ 3	342	1,84
ABZ 4	244	1,76
ABZ 5	127	1,73

Πίνακας 17: Συγκέντρωση RNA και καθαρότητα του δείγματος (λόγος 260/280) που απομονώθηκε από δείγματα αρνητικού ελέγχου (control) και δείγματα όπου εφαρμόστηκαν 4,9mg/L αλβενδαζόλης (ABZ).

Κάθε δείγμα αντιστοιχεί σε ένα δοχείο magenta-μια βιολογική επανάληψη

Έπειτα, για την απομάκρυνση του ανεπιθύμητου DNA ακολούθησε χειρισμός των δειγμάτων με DNase. Για να επιβεβαιωθεί η πλήρης απομάκρυνση του DNA από τα δείγματα έγινε PCR με εκκινήτες για το ενδογενές γονίδιο ουβικιίνης του φυτού *L. jaronicus* και ηλεκτροφόρηση σε πήκτωμα αγαρόζης 1% παρουσία βρωμιούχου αιθιδίου ώστε να είναι ορατές οι πιθανές ζώνες των προϊόντων της αντίδρασης PCR. Σε ένα δείγμα εμφανίστηκε ζώνη (**Εικόνα 10**), επομένως υπήρχαν υπολείμματα γονιδιωματικού DNA, για αυτό η διαδικασία απομάκρυνσης DNA με DNase επαναλήφθηκε για το συγκεκριμένο δείγμα.



Εικόνα 10: Ηλεκτροφόρηση σε πηκτή αγαρόζης 1%, α) προϊόντα αντίδρασης PCR σε όλα τα δείγματα μετά από χειρισμό με DNase, β) προϊόντα αντίδρασης PCR στο δείγμα A1 μετά από επανάληψη χειρισμού με DNase

M: δείκτες μοριακού βάρους

C: δείγματα ελέγχου

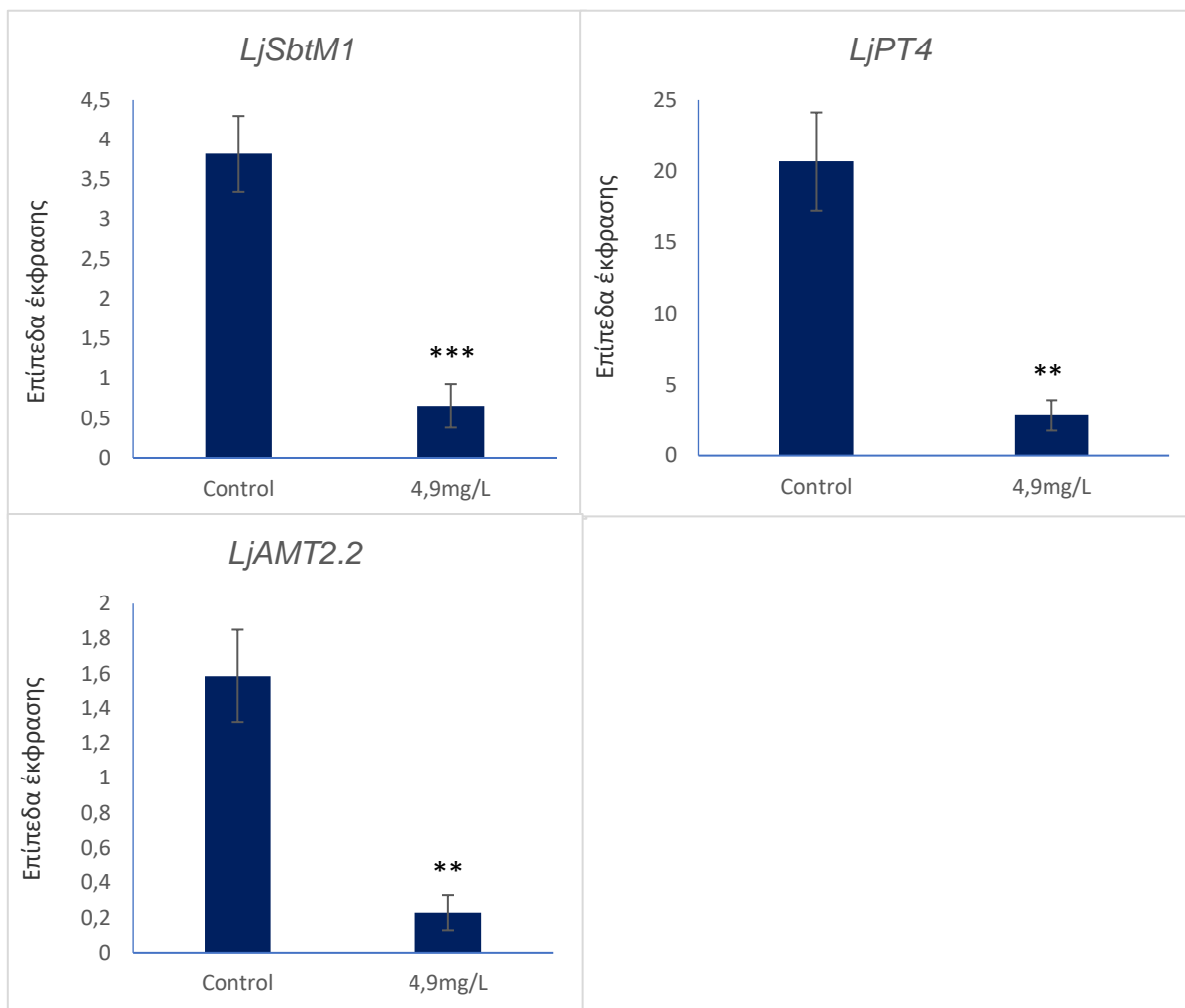
A: δείγματα με εφαρμογή αλβενδαζόλης 4,9mg/L

1-5: βιολογικές επαναλήψεις

+: δείγμα θετικού ελέγχου (γονιδιωματικό DNA)

-: δείγμα αρνητικού ελέγχου (ddH₂O)

Εφόσον τα δείγματα ήταν πλήρως καθαρά, ακολούθησε η διαδικασία της παραγωγής cDNA με μήτρα το RNA έπειτα από επίδραση DNase. Ακολούθησε αντίδραση qPCR για την κανονικοποίηση των δειγμάτων cDNA χρησιμοποιώντας το σταθερά εκφραζόμενο γονίδιο (housekeeping gene) της ATP συνθάσης. Από τα αποτελέσματα της qPCR κανονικοποίησης υπολογίστηκαν οι αραιώσεις που έπρεπε να γίνουν στα πιο πυκνά δείγματα ώστε όλα να περιέχουν την ίδια ποσότητα cDNA. Έπειτα έγιναν αντιδράσεις qPCR για τα γονίδια αναφοράς (ATP και PP2) και για τα γονίδια-δείκτες *LjSbtM1*, *LjPT4* και *LjAMT2.2*. Από την ανάλυση των αποτελεσμάτων και χρησιμοποιώντας τους μέσους όρους των τιμών των τεχνικών και βιολογικών επαναλήψεων προέκυψε το **Γράφημα 6**.



Γράφημα 6: Επίπεδα έκφρασης των γονιδίων α. *LjSbtM1*, β. *LjPT4* και γ. *LjAMT2.2* σε φυτά *L.jaronicus* σε δείγματα αρνητικού ελέγχου και δείγματα όπου εφαρμόστηκαν 4,9mg/L αλβενδαζόλης.

** : $p\text{-value} \leq 0.01$ (t-test)

*** : $p\text{-value} \leq 0.001$ (t-test)

Όπως είναι φανερό από το **Γράφημα 6** η παρουσία αλβενδαζόλης συγκέντρωσης 4,9mg/L στο θρεπτικό ανάπτυξης των φυτών επηρεάζει σημαντικά την έκφραση των γονιδίων που ελέγχθηκαν. Συγκεκριμένα, βρέθηκε ότι τα επίπεδα έκφρασης του *LjSbtM1* στα δείγματα με την αλβενδαζόλη είναι περίπου 6 φορές χαμηλότερα σε σχέση με τα επίπεδα έκφρασης του στα δείγματα αρνητικού ελέγχου. Αντίστοιχα, όσον αφορά τα γονίδια *LjPT4* και *LjAMT2.2* τα επίπεδα έκφρασης στα δείγματα με την αλβενδαζόλη μειώθηκαν περίπου 7 φορές σε σχέση με τα δείγματα ελέγχου. Οι διαφορές αυτές είναι στατιστικώς σημαντικές όπως φαίνεται και από τα p-value που υπολογίστηκαν έπειτα από το t test (**Πίνακας 18**).

	<i>LjSbtM1</i>	<i>LjPT4</i>	<i>LjAMT 2.2</i>
p-value	0,0004 (***)	0.0011 (**)	0.0014 (**)

Πίνακας 18: αποτελέσματα t test που έγινε για τον έλεγχο διαφορών στα επίπεδα έκφρασης των γονιδίων *LjSbtM1*, *LjPT4* και *LjAMT2.2* υπό την παρουσία και απουσία αλβενδαζόλης

** : $p\text{-value} \leq 0.01$, *** : $p\text{-value} \leq 0.001$

4. Συζήτηση

Στη συγκεκριμένη πειραματική μελέτη έγινε έλεγχος της πιθανής τοξικής δράσης δύο κτηνιατρικών φαρμάκων, της αλβενδαζόλης και της ιβερμεκτίνης, στον αποικισμό των φυτών από τον δενδρόμορφο μυκορριζικό μύκητα (ΔΜΜ) *Rhizophagus irregularis*. Τα φάρμακα αυτά είναι παρασιτοκτόνα και χορηγούνται για την καταπολέμηση ελμινθικών λοιμώξεων και μπορούν να καταλήξουν στο περιβάλλον επηρεάζοντας οργανισμούς μη στόχους όπως είναι οι μυκορριζικοί μύκητες. Αυτό έχει σημαντικό αντίκτυπο στη γεωργική παραγωγή καθώς οι ΔΜΜ συμβιώνοντας με τα φυτά τους παρέχουν καλύτερη πρόσβαση σε απαραίτητα θρεπτικά και ταυτόχρονα ενισχύουν την αντίστασή τους σε παθογόνα και στην αβιοτική καταπόνηση (ανασκόπηση στο άρθρο **Bonfante & Genre, 2010**). Επομένως, η μελέτη και ο έλεγχος παραγόντων που επηρεάζουν αρνητικά μικροοργανισμούς του εδάφους όπως οι ΔΜΜ θα ενίσχυε ποσοτικά και ποιοτικά την γεωργική παραγωγή.

Στη συγκεκριμένη μελέτη, φυτά *Lotus japonicus* εμβολιάστηκαν με τον μύκητα *R. irregularis* και αναπτύχθηκαν υπό την παρουσία είτε αλβενδαζόλης ή ιβερμεκτίνης, και μελετήθηκε η επίδραση των δύο φαρμάκων στον αποικισμό του φυτού από ΔΜΜ. Χρησιμοποιήθηκε ένα εύρος συγκεντρώσεων από 0,05mg/L-50mg/L, που επιλέχθηκε με βάση τα βιβλιογραφικά δεδομένα καθώς και τα κατώτερα όρια ανίχνευσης με βάση την διακριτική ικανότητα του συστήματος υγρής χρωματογραφίας υψηλής απόδοσης που χρησιμοποιήθηκε στην παρούσα μελέτη. Για τον προσδιορισμό του αποικισμού της ρίζας από τον μύκητα, έπειτα από μικροσκοπική παρατήρηση των ριζών μετρήθηκε το ποσοστό παρουσίας δενδρόμορφων δομών που είναι οι βασικές δομές του μύκητα όπου γίνονται οι ανταλλαγές θρεπτικών.

Από την πειραματική αυτή διαδικασία φάνηκε ότι κανένα από τα δύο φάρμακα σε όλες τις συγκεντρώσεις που μελετήθηκαν δεν επηρέασε την ανάπτυξη των φυτών 35 μέρες μετά την εφαρμογή τους (**Εικόνες 5, 8, 9**). Αντίστοιχα, σε μελέτη όπου μελετήθηκαν τα φυτοφάρμακα paraquat, proflufenos και sumi oil η ανάπτυξη των βλαστών των φυτών *Lupinus albus* δεν επηρεάστηκε τις πρώτες 40 μέρες μετά την εφαρμογή των φαρμάκων, αλλά η μείωση της ξηρής μάζας του βλαστού παρατηρήθηκε 60 μέρες μετά (**Abd-Alla et al., 2000**). Ομοίως σε παρόμοια μελέτη δεν παρατηρήθηκε αλλαγή της βιομάζας των φυτών *Pisum sativum* και *Cicer arietinum* υπό την παρουσία μυκητοκτόνου που περιείχε captan ενώ παρατηρήθηκε μείωση υπό την παρουσία μυκητοκτόνων που περιείχαν metalaxyl, carbathiin, thiabendazole και trifloxystrobin (**Jin et al., 2013**). Επίσης έπειτα από εφαρμογή του ζιζανιοκτόνου nicosulfuron παρατηρήθηκε μείωση της φυτικής βιομάζας (**Karpouzas et al., 2014**).

Σε μελέτη όπου χορηγήθηκαν μυκητοκτόνα φάρμακα που περιείχαν pyraclostrobin, fludioxonil, mefenoxam, metalaxyl, penflufen κ.α σε φυτά με στόχο την μελέτη επίδρασής τους στον αποικισμό τους από ΔΜΜ (όπως και στην παρούσα μελέτη) δεν παρατηρήθηκε αλλαγή στην ανάπτυξη των φυτών. Ωστόσο, ταυτόχρονα δεν επηρεάστηκε και ο αποικισμός από ΔΜΜ (**Cameron et al., 2017**). Αντίθετα, στην παρούσα μελέτη φάνηκε ότι στην περίπτωση του φαρμάκου αλβενδαζόλη, παρόλο που δεν υπήρχε ορατή επίδραση στην ανάπτυξη των φυτών, τουλάχιστον τις πρώτες 35 μέρες εφαρμογής, υπήρξε παρεμπόδιση του αποικισμού των φυτών από ΔΜΜ (**Γραφήματα 2 και 5**). Το ίδιο παρατηρήθηκε και σε μια μελέτη όπου δοκιμάστηκαν το εντομοκτόνο azadirachtin και το μυκητοκτόνο

carbendazim, και δεν επηρέασαν την ανάπτυξη των φυτών, αλλά προκάλεσαν παρεμπόδιση του αποικισμού των ριζών από ΔΜΜ (**Ipsilantis et al., 2012**).

Πιο ειδικά, στην παρούσα μελέτη, η αλβενδαζόλη από συγκεντρώσεις 8mg/L και πάνω οδήγησε σε στατιστικά σημαντική μείωση του αποικισμού των φυτών *L. japonicus* από τον *R. irregularis*. Από την άλλη, η ιβερμεκτίνη στις συγκεντρώσεις που μελετήθηκαν δεν επηρέασε τον αποικισμό τους. Βιβλιογραφικά δεν υπάρχει κάποια αντίστοιχη μελέτη δράσης κτηνιατρικών ανθελμινθικών φαρμάκων στους ΔΜΜ. Οι υπάρχουσες μελέτες εστιάζουν στα γεωργικά φάρμακα, όπου έχουν βρεθεί κάποια που επηρεάζουν αρνητικά τον αποικισμό των ΔΜΜ. Οι **Sreenivasa & Bagyaraj το 1989** παρατήρησαν μείωση στον αποικισμό των φυτών από τον ΔΜΜ *Glomus fasciculatum* και του αριθμού των σπορίων του, υπό την παρουσία συνιστώμενης δόσης νηματωδοκτόνων που περιείχαν furadan, mocap κ.α. και εντομοκτόνων που περιείχαν malathion, endosulfan κ.α. Αντίστοιχα βρέθηκε ότι τα συστηματικά μυκητοκτόνα που περιείχαν metalaxyl, fludioxonil, carbathiin, thiram, thiabendazole και trifloxystrobin προκάλεσαν μείωση στον αποικισμό από ΔΜΜ, στην ανάπτυξη του φυτού-ξενιστή και στην πρόσληψη φωσφόρου (**Jin et al., 2013**). Επιπλέον, το ζιζανιοκτόνο picloram βρέθηκε ότι επηρεάζει τους ΔΜΜ έμμεσα, αλλάζοντας την ποιότητα και την ποσότητα των ξενιστών (**Lekberg et al., 2017**). Από την άλλη, όπως στην παρούσα μελέτη βρέθηκε ότι η ιβερμεκτίνη, σε ένα μεγάλο εύρος συγκεντρώσεων, δεν προκάλεσε παρεμπόδιση του αποικισμού των φυτών από ΔΜΜ έτσι και σε προηγούμενες μελέτες άλλα φάρμακα δεν επηρέασαν τον αποικισμό των μυκήτων που μελετήθηκαν. Για παράδειγμα σε μελέτη των **Cameron et al το 2017** παρατηρήθηκε ότι διάφορα μυκητοκτόνα που περιείχαν pyraclostrobin, azoxystrobin, sedaxane, mefenoxam, prothioconazole, tebuconazole, triticonazole, prothioconazole, fludioxonil, κ.α δεν προκάλεσαν ιδιαίτερες αρνητικές επιπτώσεις στον αποικισμό των φυτών από ΔΜΜ στις συνιστώμενες δόσεις. Αντίστοιχα, σε άλλη μελέτη ελέγχθηκαν ζιζανιοκτόνα που περιείχαν di-allate, diuron, tri-allate και trifluralin και φάνηκε ότι στις δόσεις που εφαρμόζονταν δεν επηρέασαν τον αποικισμό φυτών από ΔΜΜ (**Smith et al., 1981**).

Στην βιβλιογραφία, όσον αφορά την δράση των φυτοφαρμάκων που έχουν μελετηθεί συνολικά παρατηρείται μία ετερογένεια. Για παράδειγμα, σε μελέτη των **Ramos-Zapata et al το 2012** το ζιζανιοκτόνο paraquat προκάλεσε μείωση του αποικισμού μυκορριζικών μυκήτων ενώ σε παλαιότερη μελέτη των **Smith et al το 1981** το ίδιο φάρμακο δεν φάνηκε να επηρεάζει σημαντικά τον αποικισμό των ριζών από ΔΜΜ. Μία άλλη περίπτωση όπου παρατηρήθηκε ετερογένεια είναι η περίπτωση του εντομοκτόνου oxamyl που σε συνιστώμενη δόση μείωσε τον αποικισμό από εμπορικό στέλεχος *Funneliformis mosseae* αλλά δεν φάνηκε να επηρεάζει τον αποικισμό από τοπικά στέλεχη *Glomus* (ανασκόπηση στο άρθρο **Hage-Ahmed et al., 2019**) Ακόμα, σε μελέτη των **Seymour et al. το 1994** μυκητοκτόνα με βάση το metalaxyl δεν προκάλεσαν αλλαγή στον αποικισμό των *Citrus aurantium* και ενίσχυσαν τον αποικισμό των *Glycine max* από ΔΜΜ, ενώ σε μελέτη των **Jin et al. το 2013** μείωσαν τον αποικισμό των *P. sativum* και *C. arietinum* από ΔΜΜ. Επομένως, και στην περίπτωση των ανθελμινθικών φαρμάκων είναι σημαντικό να γίνει εκτεταμένος έλεγχος σε διάφορους οργανισμούς ώστε να βγουν συμπεράσματα. Για παράδειγμα η ιβερμεκτίνη που φαίνεται να είναι ασφαλής στις συγκεντρώσεις που μελετήθηκαν για το φυτό *L. japonicus* και τον μύκητα *R. irregularis*, όπως φαίνεται από την συμπεριφορά των παραπάνω γεωργικών φαρμάκων, είναι πιθανό να εμφανίσει τοξικότητα σε άλλους οργανισμούς. Επιπλέον, σημαντικό ρόλο παίζει η δοσολογία

του φαρμάκου. Για παράδειγμα το nicosulfuron σε συγκεντρώσεις 100 και 1000 φορές μεγαλύτερες από την συνιστώμενη δόση προκάλεσε μείωση του αποικισμού, ενώ σε συγκεντρώσεις από 10 φορές μεγαλύτερες της συνιστώμενης δόσης και κάτω δεν φάνηκε να προκαλεί σημαντικές αλλαγές (**Karpouzas et al., 2014**). Αντίστοιχα και τα glyphosate και chlorsulfuron προκάλεσαν μείωση του αποικισμού μόνο σε υψηλότερες της συνιστώμενης δόσεις (**Mujica et al., 1999**). Στις μελέτες που αναφέρονται παραπάνω έχουν μελετηθεί κυρίως οι συνιστώμενες δόσεις. Ωστόσο, στην περίπτωση των κτηνιατρικών φαρμάκων που μελετώνται στην παρούσα εργασία δεν είναι εύκολος ο προσδιορισμός των δόσεων που καταλήγουν στο περιβάλλον καθώς δεν είναι συγκεκριμένες ποσότητες που εφαρμόζονται απευθείας στα φυτά. Από τα λίγα βιβλιογραφικά δεδομένα, καταλήξαμε στον έλεγχο των συγκεντρώσεων που αναφέρονται παραπάνω ώστε να καλυφθεί ένα μεγάλο εύρος.

Όσον αφορά την αλβενδαζόλη παρατηρήθηκε μία τάση μείωσης του αποικισμού με την αύξηση συγκέντρωσης του φαρμάκου. Ωστόσο αυτή η μείωση ήταν στατιστικά σημαντική για συγκεντρώσεις από 8mg/L και υψηλότερες. Βασιζόμενοι μόνο στην μικροσκοπική παρατήρηση των δομών του μύκητα στις ρίζες (**Γραφήματα 2 και 5**) βγαίνει το συμπέρασμα ότι τα 5mg/L αλβενδαζόλης είναι η μεγαλύτερη συγκέντρωση που δεν προκαλεί σημαντική παρεμπόδιση του αποικισμού και επομένως της συμβιωτικής σχέσης φυτού-μύκητα. Παρόλα αυτά, η μοριακή ανάλυση, που είναι μια πολύ περισσότερο ευαίσθητη μέθοδος, έδειξε πως ακόμη και σε αυτή τη συγκέντρωση (5mg/L αλβενδαζόλης) η εγκαθίδρυση της συμβιωτικής σχέσης δεν είναι πλήρως επιτυχής. Συγκεκριμένα ελέγξαμε την έκφραση τριών γονιδίων, των *LjSbtM1*, *LjPT4* και *LjAMT2.2*, που αποτελούν γονίδια-δείκτες της συμβιωτικής σχέσης καθώς επάγονται ισχυρά στα αποικισμένα με ΔΜΜ φυτικά κύτταρα. Το πρώτο γονίδιο που κωδικοποιεί για μία πρωτεάση δείχνει την ανάπτυξη και την πορεία των δενδρόμορφων δομών του μύκητα και τα άλλα δύο που κωδικοποιούν για μεταφορέα φωσφόρου και μεταφορέα αζώτου αντίστοιχα δείχνουν την λειτουργικότητά τους. Όπως φάνηκε από τα αποτελέσματα, τα 5mg/L αλβενδαζόλης προκάλεσαν σημαντική μείωση στην έκφραση των παραπάνω γονιδίων δηλώνοντας την απουσία ενός επιτυχημένου αποικισμού των φυτών από τον μύκητα. Επομένως, σύμφωνα με τα αποτελέσματα της παρούσας μελέτης φαίνεται ότι η ευαίσθητη μοριακή ανάλυση είναι απαραίτητη για την ασφαλή εξαγωγή συμπερασμάτων και συστήνεται να γίνεται παράλληλα με τη μικροσκοπική παρατήρηση των δομών του μύκητα κατόπιν της χρώσης των ριζών. Συμπερασματικά, είναι σημαντικό να γίνουν περαιτέρω τοξικολογικές μελέτες σχετικά με την επίδραση κτηνιατρικών φαρμάκων που καταλήγουν στο περιβάλλον καθώς κάποια από αυτά φαίνεται να επιδρούν σε οργανισμούς μη-στόχους εξίσου σημαντικά με κάποια γεωργικά φάρμακα.

5. Βιβλιογραφία

1. **Abbaspour**, H., Saeidi-Sar, S., Afshari, H., & Abdel-Wahhab, M. A. (2012). Tolerance of Mycorrhiza infected Pistachio (*Pistacia vera* L.) seedling to drought stress under glasshouse conditions. *Journal of Plant Physiology*, 169(7), 704–709. doi:10.1016/j.jplph.2012.01.014
2. **Abd-Alla**, M. H., Omar, S. A., & Karanxha, S. (2000). The impact of pesticides on arbuscular mycorrhizal and nitrogen-fixing symbioses in legumes. *Applied Soil Ecology*, 14(3), 191–200. doi:10.1016/s0929-1393(00)00056-1
3. **Adler** N, Bachmann J, Blanckenhorn WU, Floate KD, Jensen J, Römcke J. Effects of ivermectin application on the diversity and function of dung and soil fauna: Regulatory and scientific background information. *Environ Toxicol Chem.* 2016 Aug;35(8):1914-23. doi: 10.1002/etc.3308.
4. M. S. **Akhtar**, J. Panwar, S. N. A. Abdullah, Y. Siddiqui, M. K. Swamy, and S. Ashkani, "Biocontrol of plant parasitic nematodes by fungi: efficacy and control strategies," in *Organic Amendments and Soil Suppressiveness in Plant Disease Management*, M. K. Meghvansi and A. Varma, Eds., vol. 46, pp. 219–247, 2015
5. **Banasiak** J, Jamruszka T, Murray JD, Jasiński M. A roadmap of plant membrane transporters in arbuscular mycorrhizal and legume-rhizobium symbioses. *Plant Physiol.* 2021 Dec 4;187(4):2071-2091. doi: 10.1093/plphys/kiab280.
6. **Begum** N, Qin C, Ahanger MA, Raza S, Khan MI, Ashraf M, Ahmed N, Zhang L. Role of Arbuscular Mycorrhizal Fungi in Plant Growth Regulation: Implications in Abiotic Stress Tolerance. *Front Plant Sci.* 2019 Sep 19;10:1068. doi: 10.3389/fpls.2019.01068
7. **Belew** S, Suleman S, Wynendaele E, Duchateau L, De Spiegeleer B. Environmental risk assessment of the anthelmintic albendazole in Eastern Africa, based on a systematic review. *Environ Pollut.* 2021 Jan 15;269:116106. doi: 10.1016/j.envpol.2020.116106. Epub 2020 Nov 23
8. **Bonfante** P, **Genre** A. Mechanisms underlying beneficial plant-fungus interactions in mycorrhizal symbiosis. *Nat Commun.* 2010 Jul 27;1:48. doi: 10.1038/ncomms1046.
9. Alistair B A **Boxall**, Lindsay A Fogg, Donald J Baird, Chris Lewis, Trevor C Telfer, Dana Kolpin, Anthony Gravell, Emma Pemberton, Tatiana Boucard. Targeted monitoring study for veterinary medicines in the environment (Science Report: SC030183/SR) Environment Agency, Rio House, Waterside Drive, Aztec West, Almondsbury, Bristol, BS32 4UD. SC030183 www.environment-agency.gov.uk
10. **Cameron**, J. C., Lehman, R. M., Sexton, P., Osborne, S. L., & Taheri, W. I. (2017). Fungicidal Seed Coatings Exert Minor Effects on Arbuscular Mycorrhizal Fungi and Plant Nutrient Content. *Agronomy Journal*, 109(3), 1005. doi:10.2134/agronj2016.10.0597
11. **Castelli**, Murilo, et al. "Arbuscular mycorrhizal fungi diversity in maize under different soil managements and seed treatment with fungicide." *Journal of Food, Agriculture, and Environment* 12 (2014): 486-491.

12. **Chen, S., Zhao, H., Zou, C., Li, Y., Chen, Y., Wang, Z., Ahammed, G. J. (2017).** Combined Inoculation with Multiple Arbuscular Mycorrhizal Fungi Improves Growth, Nutrient Uptake and Photosynthesis in Cucumber Seedlings. *Frontiers in Microbiology*, 8. doi:10.3389/fmicb.2017.02516
13. **Chiu CH, Paszkowski U.** Receptor-Like Kinases Sustain Symbiotic Scrutiny. *Plant Physiol.* **2020** Apr;182(4):1597-1612. doi: 10.1104/pp.19.01341. Epub 2020 Feb 13. PMID: 32054781;
14. **Dodd, J. C., & Jeffries, P. (1989).** Effects of herbicides on three vesicular-arbuscular fungi associated with winter wheat (*Riticum aestivum* L.). *Biology and Fertility of Soils*, 7(2), 113–119. doi:10.1007/bf00292568
15. **Genre, A. (2005).** Arbuscular Mycorrhizal Fungi Elicit a Novel Intracellular Apparatus in *Medicago truncatula* Root Epidermal Cells before Infection. *THE PLANT CELL ONLINE*, 17(12), 3489–3499. doi:10.1105/tpc.105.035410
16. **Genre, A., Chabaud, M., Faccio, A., Barker, D. G., & Bonfante, P. (2008).** Prepenetration Apparatus Assembly Precedes and Predicts the Colonization Patterns of Arbuscular Mycorrhizal Fungi within the Root Cortex of Both *Medicago truncatula* and *Daucus carota*. *THE PLANT CELL ONLINE*, 20(5), 1407–1420. doi:10.1105/tpc.108.059014
17. **Guether M, Neuhäuser B, Balestrini R, Dynowski M, Ludewig U, Bonfante P.** A mycorrhizal-specific ammonium transporter from *Lotus japonicus* acquires nitrogen released by arbuscular mycorrhizal fungi. *Plant Physiol.* **2009** May;150(1):73-83. doi: 10.1104/pp.109.136390. Epub 2009 Mar 27. PMID: 19329566;
18. **Hage-Ahmed K, Rosner K, Steinkellner S.** Arbuscular mycorrhizal fungi and their response to pesticides. *Pest Manag Sci.* **2019** Mar;75(3):583-590. doi: 10.1002/ps.5220. Epub 2018 Oct 29. PMID: 30255557; PMCID: PMC6587947
19. **Hao Z, Xie W, Chen B.** Arbuscular Mycorrhizal Symbiosis Affects Plant Immunity to Viral Infection and Accumulation. *Viruses.* **2019** Jun 8;11(6):534. doi: 10.3390/v11060534. PMID: 31181739;
20. **Horton J.** Albendazole: a broad spectrum anthelmintic for treatment of individuals and populations. *Curr Opin Infect Dis.* **2002** Dec;15(6):599-608. doi: 10.1097/00001432-200212000-00008.
21. **A.J.M. Horvat, S. Babić, D.M. Pavlović, D. Ašperger, S. Pelko, M. Kaštelan-Macan, M. Petrović, A.D. Mance.** Analysis, occurrence and fate of anthelmintics and their transformation products in the environment. *TrAC Trends in Analytical Chemistry*, Volume 31, **2012**, Pages 61-84, ISSN 0165-9936, <https://doi.org/10.1016/j.trac.2011.06.023>.
22. **Ipsilantis, I., Samourelis, C., & Karpouzas, D. G. (2012).** The impact of biological pesticides on arbuscular mycorrhizal fungi. *Soil Biology and Biochemistry*, 45, 147–155. doi:10.1016/j.soilbio.2011.08.007
23. **Jin, H., Germida, J. J., & Walley, F. L. (2013).** Suppressive effects of seed-applied fungicides on arbuscular mycorrhizal fungi (AMF) differ with fungicide mode of action and AMF species. *Applied Soil Ecology*, 72, 22–30. doi:10.1016/j.apsoil.2013.05.013

24. **Karpouzas** DG, Papadopoulou E, Ipsilantis I, Friedel I, Petric I, Udikovic-Kolic N et al., Effects of nicosulfuron on the abundance and diversity of arbuscular mycorrhizal fungi used as indicators of pesticide soil microbial toxicity. *Ecol Indic* 39:44–53 (2014)
25. **Kretzschmar** T, Kohlen W, Sasse J, Borghi L, Schlegel M, Bachelier JB, Reinhardt D, Bours R, Bouwmeester HJ, Martinoia E. A petunia ABC protein controls strigolactone-dependent symbiotic signalling and branching. *Nature*. 2012 Mar 7;483(7389):341-4. doi: 10.1038/nature10873.
26. **Lekberg**, Y., Wagner, V., Rummel, A., McLeod, M., & Ramsey, P. W. (2017). Strong indirect herbicide effects on mycorrhizal associations through plant community shifts and secondary invasions. *Ecological Applications*, 27(8), 2359–2368. doi:10.1002/eap.1613
27. **Liebig** M, Fernandez AA, Blübaum-Gronau E, Boxall A, Brinke M, Carbonell G, Egeler P, Fenner K, Fernandez C, Fink G, Garric J, Halling-Sørensen B, Knacker T, Krogh KA, Küster A, Löffler D, Cots MA, Pope L, Prasse C, Römbke J, Rönnefahrt I, Schneider MK, Schweitzer N, Tarazona JV, Ternes TA, Traunspurger W, Wehrhan A, Duis K. Environmental risk assessment of ivermectin: A case study. *Integr Environ Assess Manag*. 2010 Jul;6 Suppl:567-87. doi: 10.1002/ieam.96. Erratum in: *Integr Environ Assess Manag*. 2010 Oct;6(4):790.
28. **Li** X, Miao W, Gong C, Jiang H, Ma W, Zhu S. Effects of prometryn and acetochlor on arbuscular mycorrhizal fungi and symbiotic system. *Lett Appl Microbiol*. 2013 Aug;57(2):122-8. doi: 10.1111/lam.12084. Epub 2013 May 16
29. **Liu** J, Maldonado-Mendoza I, Lopez-Meyer M, Cheung F, Town CD, Harrison MJ. Arbuscular mycorrhizal symbiosis is accompanied by local and systemic alterations in gene expression and an increase in disease resistance in the shoots. *Plant J*. 2007 May;50(3):529-44. doi: 10.1111/j.1365-313X.2007.03069.x.
30. **Luginbuehl** LH, **Oldroyd** GED. Understanding the Arbuscule at the Heart of Endomycorrhizal Symbioses in Plants. *Curr Biol*. 2017 Sep 11;27(17):R952-R963. doi: 10.1016/j.cub.2017.06.042
31. **Ma** X, Geng Q, Zhang H, Bian C, Chen HYH, Jiang D, Xu X. Global negative effects of nutrient enrichment on arbuscular mycorrhizal fungi, plant diversity and ecosystem multifunctionality. *New Phytol*. 2021 Mar;229(5):2957-2969. doi: 10.1111/nph.17077
32. **Marin** M, Ybarra M, Fé A and García-Férriz L, Effect of arbuscular mycorrhizal fungi and pesticides on *Cynara cardunculus* growth. *Agric Food Sci Finland* 11:245–251 (2002)
33. **Mujica**, M., Fracchia, S., Ocampo, J.A., Godeas, A., 1999. Influence of the herbicides chlorsulfuron and glyphosate on mycorrhizal soybean intercropped with the weeds *Brassica campestris* or *Sorghum halepensis*. *Symbiosis* 27, 73–81.
34. **Morte**, A., Lovisolo, C., & Schubert, A. (2000). Effect of drought stress on growth and water relations of the mycorrhizal association *Helianthemum almeriense*-*Terfezia clavaryi*. *Mycorrhiza*, 10(3), 115–119. doi:10.1007/s005720000066
35. **Nasir** F, Bahadur A, Lin X, Gao Y, Tian C. Novel insights into host receptors and receptor-mediated signaling that regulate arbuscular mycorrhizal symbiosis. *J Exp Bot*. 2021 Feb 27;72(5):1546-1557. doi: 10.1093/jxb/eraa538.

36. **Parniske M.** Arbuscular mycorrhiza: the mother of plant root endosymbioses. *Nat Rev Microbiol.* **2008** Oct;6(10):763-75. doi: 10.1038/nrmicro1987.
37. **María J Pozo**, Concepción **Azcón-Aguilar**, Unraveling mycorrhiza-induced resistance, *Current Opinion in Plant Biology*, Volume 10, Issue 4, **2007**, Pages 393-398, ISSN 1369-5266, <https://doi.org/10.1016/j.pbi.2007.05.004>.
38. **Mutavdžić Pavlović, D.**, Glavač, A., Gluhak, M., & Runje, M. (**2018**). Sorption of albendazole in sediments and soils: Isotherms and kinetics. *Chemosphere*, 193, 635–644. doi:10.1016/j.chemosphere.2017.11.025
39. **Pumplin, N.**, & **Harrison, M. J.** (**2009**). Live-Cell Imaging Reveals Periarbuscular Membrane Domains and Organelle Location in *Medicago truncatula* Roots during Arbuscular Mycorrhizal Symbiosis. *PLANT PHYSIOLOGY*, 151(2), 809–819. doi:10.1104/pp.109.141879
40. **SANTOS, J. B.**, JAKELAITIS, A., SILVA, A. A., COSTA, M. D., MANABE, A., & SILVA, M. C. S. (**2006**). *Action of two herbicides on the microbial activity of soil cultivated with common bean (Phaseolus vulgaris) in conventional-till and no-till systems.* *Weed Research*, 46(4), 284–289. doi:10.1111/j.1365-3180.2006.00510.x
41. **Seymour, N.P.**, Thompson, J.P., Fiske, M.L., **1994**. Phytotoxicity of fosetyl-AL and phosphonic acid to maize during production of vesicular-arbuscular mycorrhizal inoculum. *Plant Dis.* 78, 441–446.
42. **Smith, T.F.**, Noack, A.J., Cosh, S.M., **1981**. The effect of some herbicides on vesicular–arbuscular endophyte abundance in the soil and on infection of host roots. *Pesticide Science* 12, 91–97.
43. **Sreenivasa, M. N.**, & **Bagyaraj, D. J.** (**1989**). Use of pesticides for mass production of vesicular-arbuscular mycorrhizal inoculum. *Plant and Soil*, 119(1), 127–132. doi:10.1007/bf02370276
44. **Stokłosa, A.**, Nandanavanam, R., Puczel, U., & Upadhyaya, M. (**2011**). Influence of isoxaflutole on colonization of corn (*Zea mays* L.) roots with arbuscular mycorrhizal fungus *Glomus intraradices*. *Canadian Journal of Plant Science*, 91(1), 143–145. doi:10.4141/cjps10077
45. **M. M. Tahat**, N. Nejat, and K. Sijam, “*Glomus mosseae* bioprotection against aster yellows phytoplasma (16srl-B) and *Spiroplasma citri* infection in Madagascar periwinkle,” *Physiological and Molecular Plant Pathology*, vol. 88, pp. 1–9, **2014**.
46. **Takeda N**, Sato S, Asamizu E, Tabata S, Parniske M. Apoplastic plant subtilases support arbuscular mycorrhiza development in *Lotus japonicus*. *Plant J.* **2009** Jun;58(5):766-77. doi: 10.1111/j.1365-313X.2009.03824.x. Epub 2009 Feb 10.
47. **Talaat, N. B.**, & **Shawky, B. T.** (**2014**). Protective effects of arbuscular mycorrhizal fungi on wheat (*Triticum aestivum* L.) plants exposed to salinity. *Environmental and Experimental Botany*, 98, 20–31. doi:10.1016/j.envexpbot.2013.10.005
48. **Vieira, R. F.**, Silva, C. M. M. S., & Silveira, A. P. D. (**2007**). Soil microbial biomass C and symbiotic processes associated with soybean after sulfentrazone herbicide application. *Plant and Soil*, 300(1-2), 95–103. doi:10.1007/s11104-007-9392-4
49. **Whipps, John M.** "Prospects and limitations for mycorrhizas in biocontrol of root pathogens." *Canadian journal of botany* 82.8 (**2004**): 1198-1227.

50. **Wright**, D. P., Read, D. J., & Scholes, J. D. (1998). Mycorrhizal sink strength influences whole plant carbon balance of *Trifolium repens* L. *Plant, Cell and Environment*, 21(9), 881–891. doi:10.1046/j.1365-3040.1998.00351.x
51. **Zulu** I, Veitch A, Sianongo S, McPhail G, Feakins R, Farthing MJ, Kelly P. Albendazole chemotherapy for AIDS-related diarrhoea in Zambia--clinical, parasitological and mucosal responses. *Aliment Pharmacol Ther.* **2002** Mar;16(3):595-601. doi: 10.1046/j.1365-2036.2002.01182.x.
52. <https://www.ema.europa.eu>
53. <https://list.essentialmeds.org>
54. <https://pubchem.ncbi.nlm.nih.gov>
55. www.usp-pqm.org