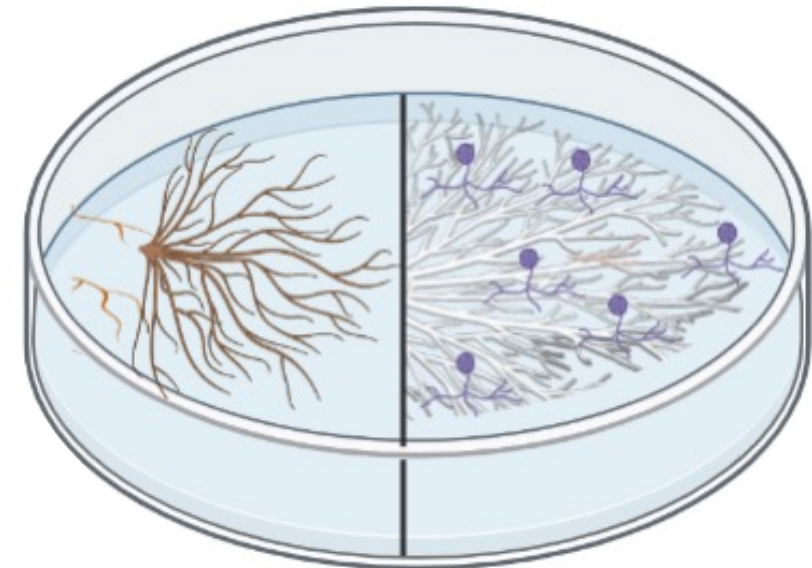
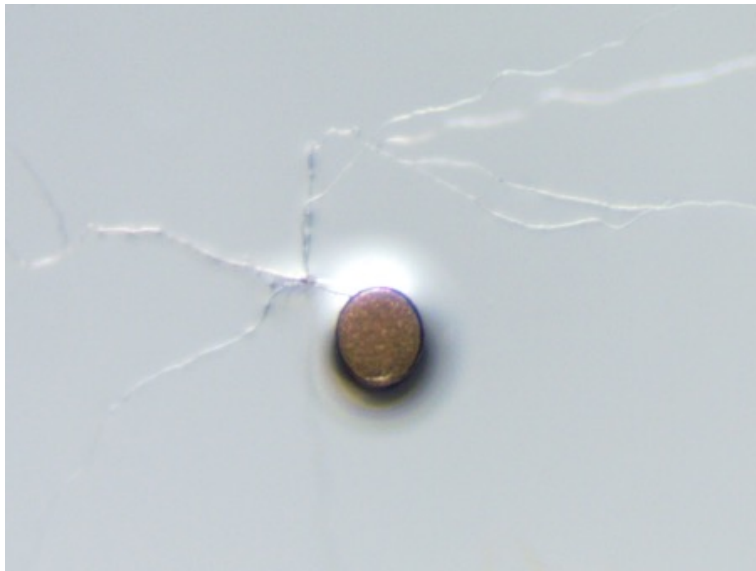


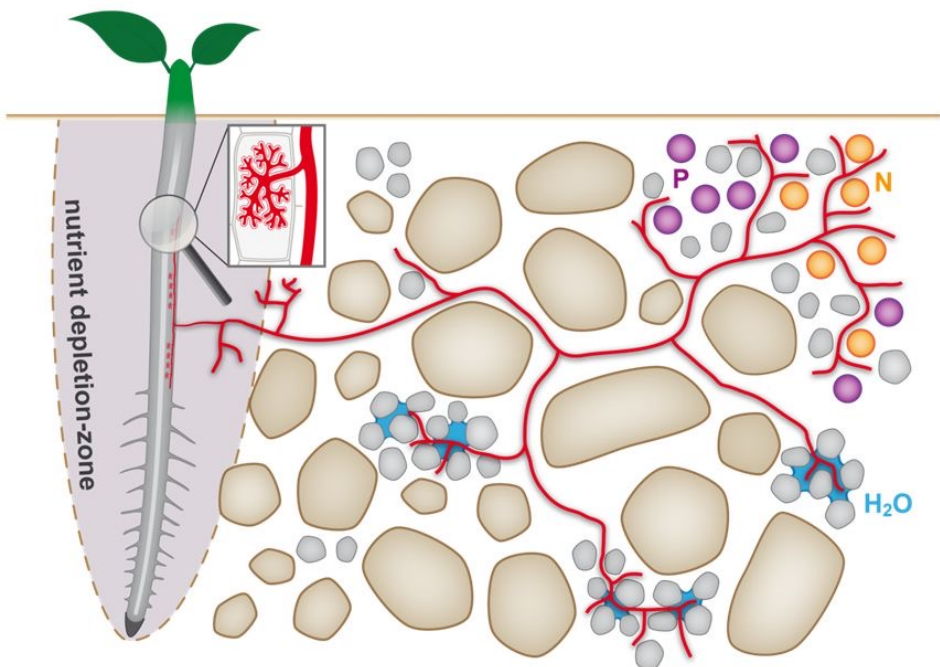
Εργαστήριο Περιβαλλοντικής Βιοτεχνολογίας

Δενδρόμορφοι Μυκορριζικοί Μύκητες

Arbuscular Mycorrhizal Fungi (AMF)

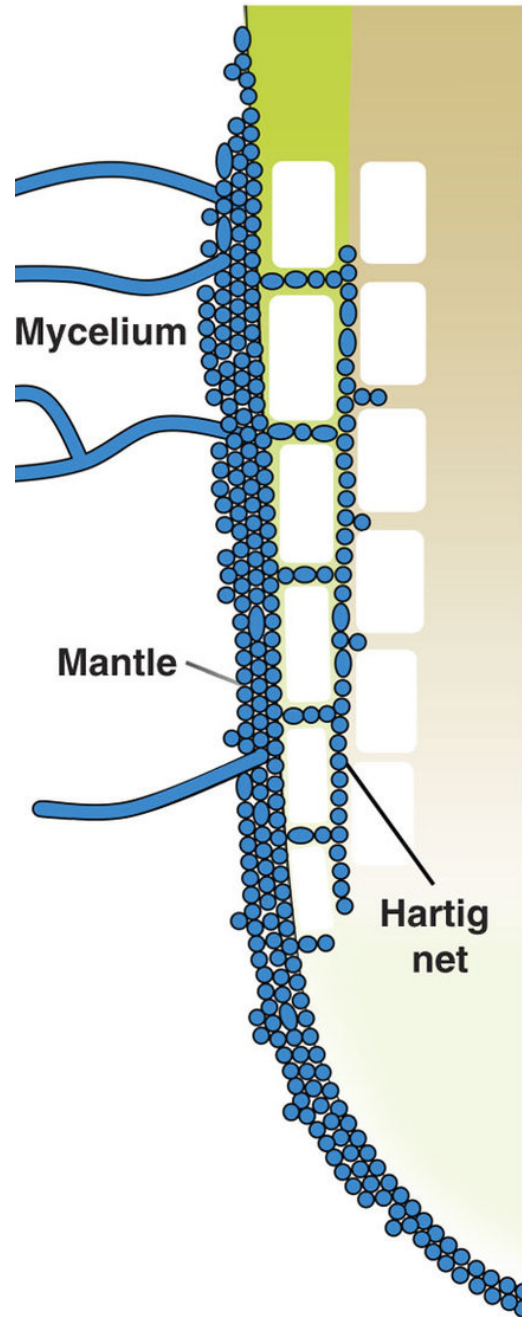


Δενδρόμορφοι Μυκορριζικοί Μύκητες (ΔΜΜ)

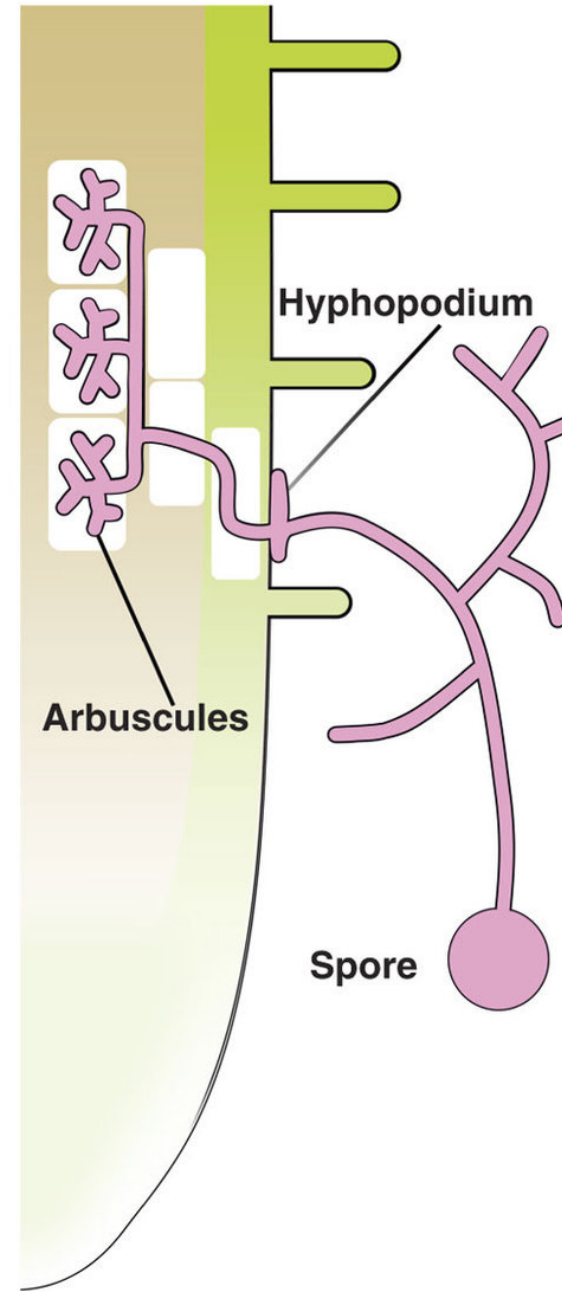


- Πάνω από το 90% των φυτών συμβιώνουν με ΔΜΜ
- Οι ΔΜΜ είναι υποχρεωτικά συμβιωτικοί οργανισμοί και η συμβίωση τους με τα φυτά είναι προς όφελος των φυτών και του μύκητα.
- Οι ΔΜΜ λαμβάνουν από τα φυτά τα προϊόντα της φωτοσύνθεσης (ενώσεις άνθρακα-σάκχαρα) και προσφέρουν στο φυτό Φώσφορο (P), ενώσεις αζώτου (N) και άλλα χημικά συστατικά.
- Οι ΔΜΜ δεν μπορούν να ολοκληρώσουν τον βιολογικό τους κύκλο απουσία του ξενιστή.

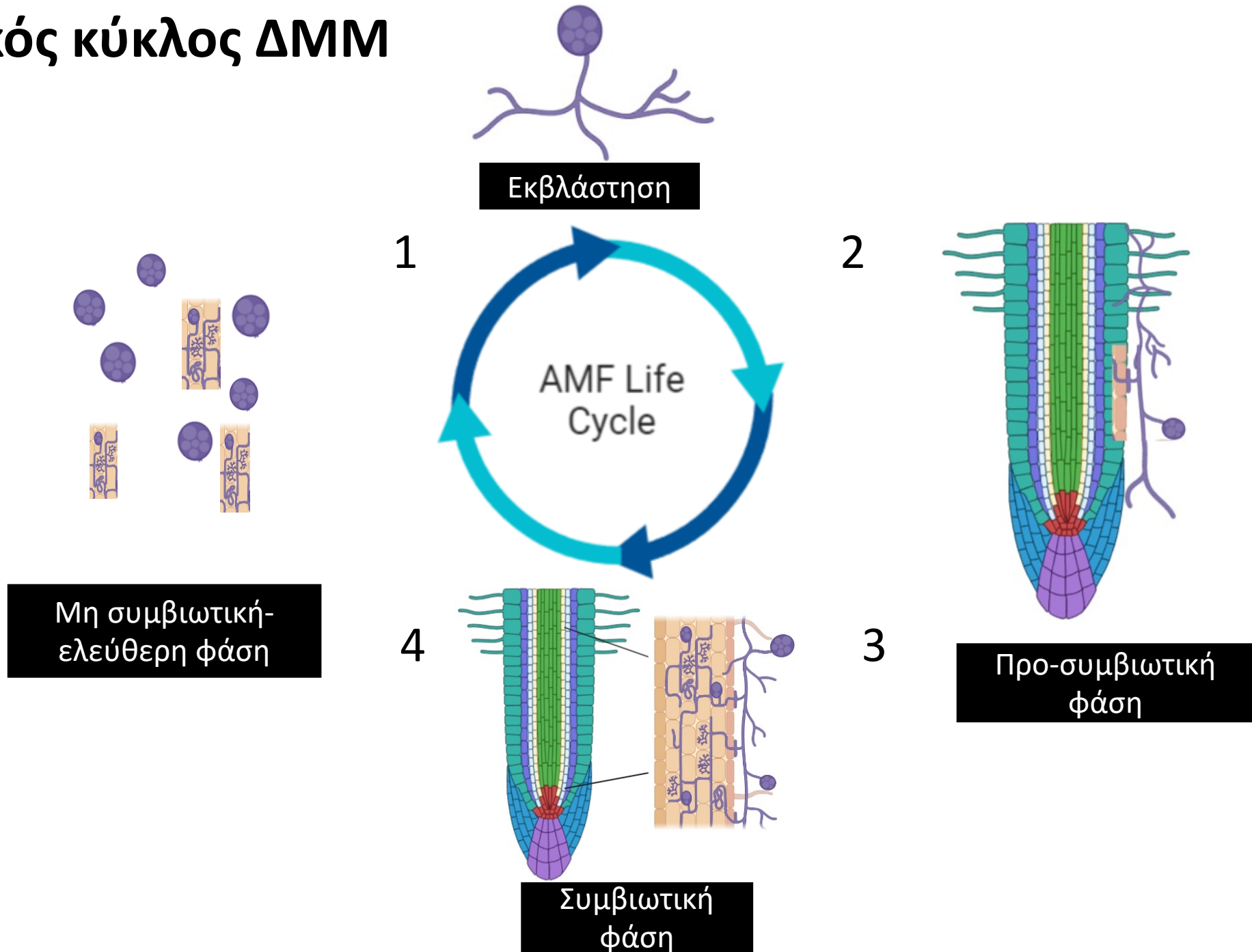
Ectomycorrhiza



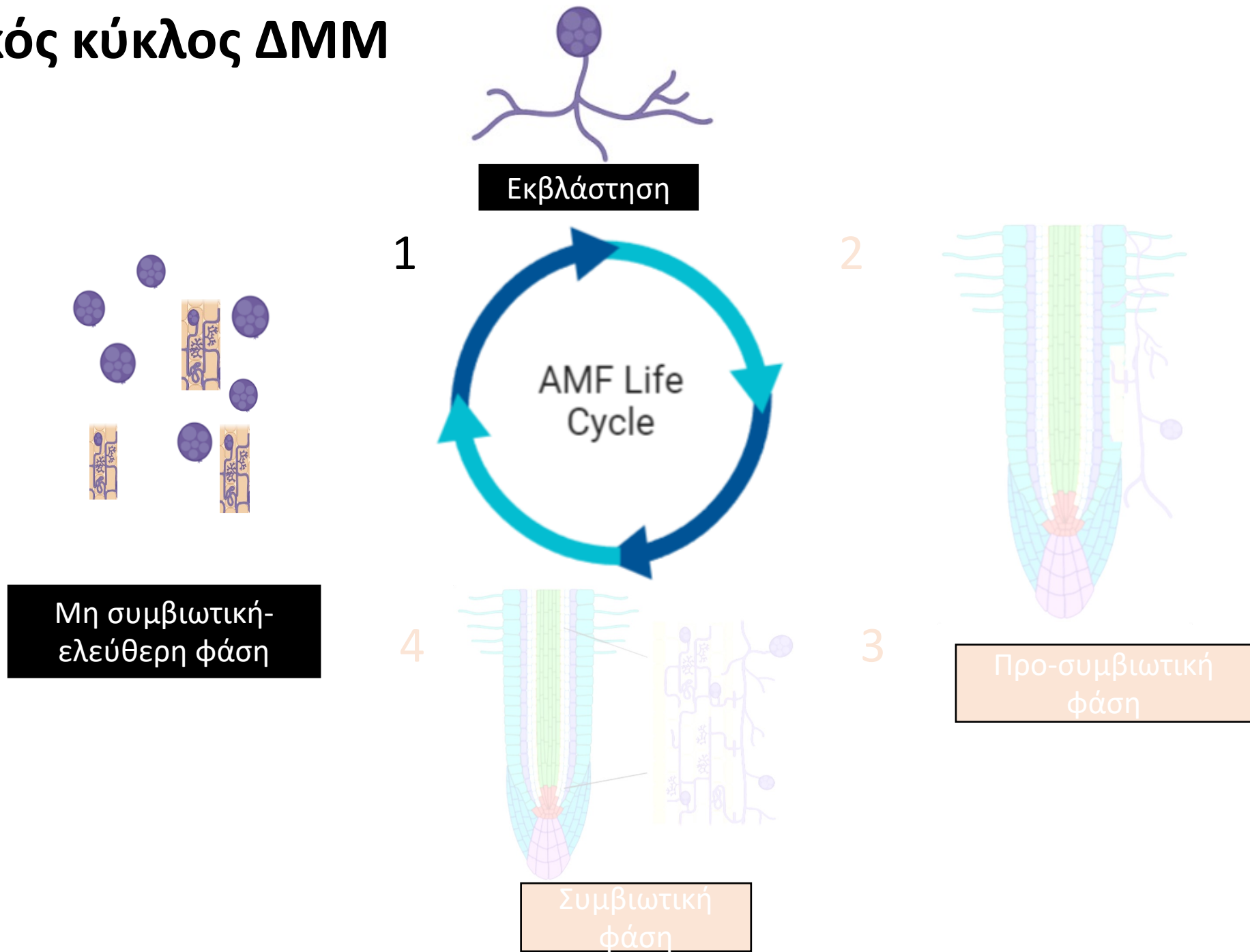
Arbuscular mycorrhiza



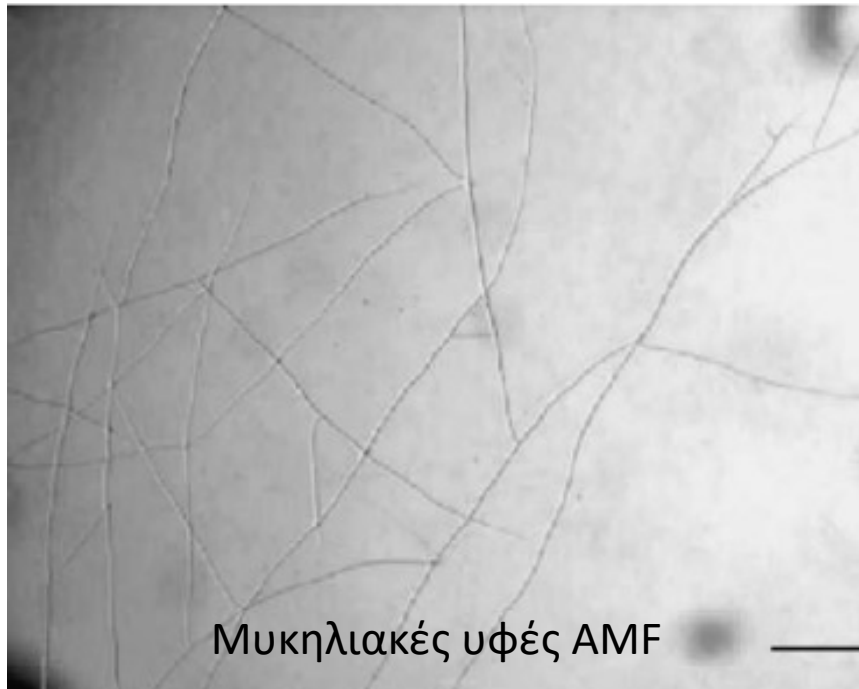
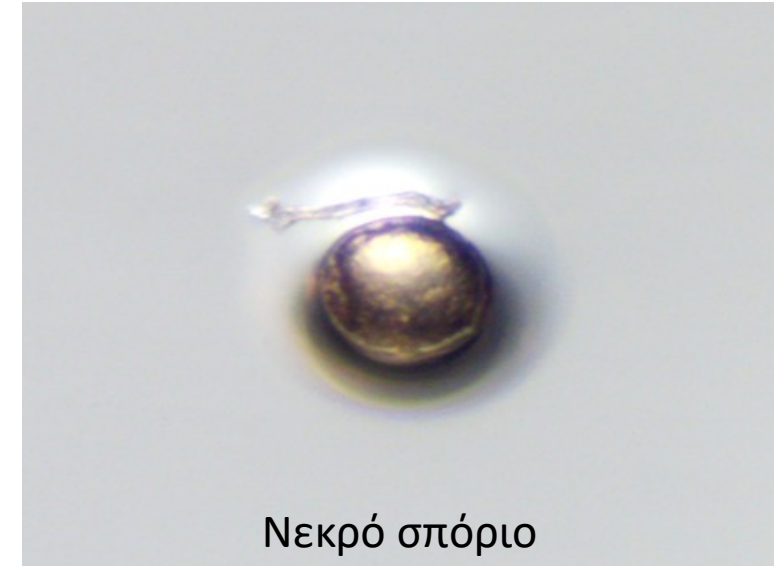
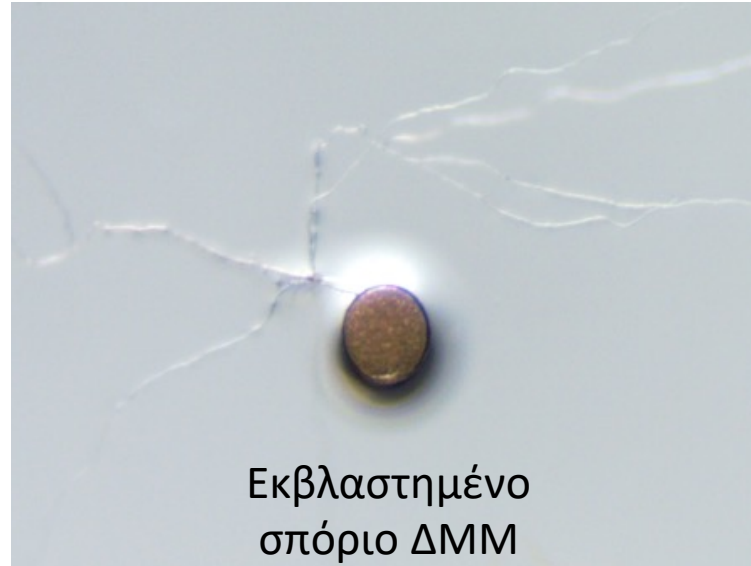
Βιολογικός κύκλος ΔΜΜ



Βιολογικός κύκλος ΔΜΜ

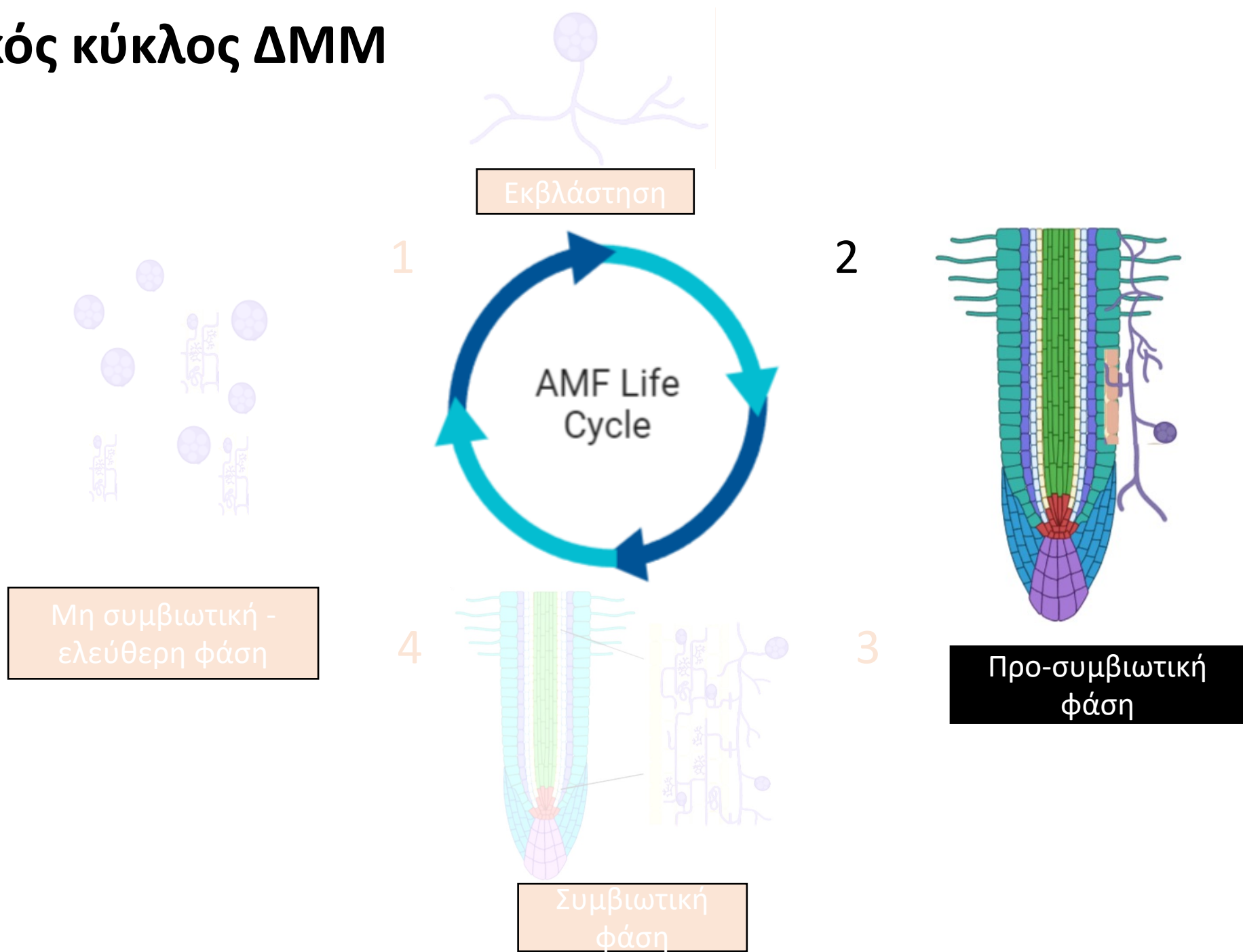


2. Μη συμβιωτική φάση και φάση εκβλάστησης

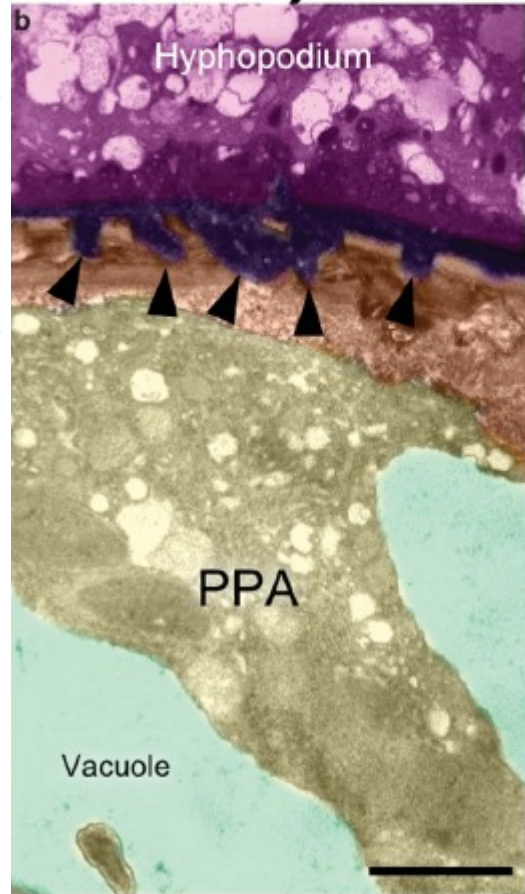
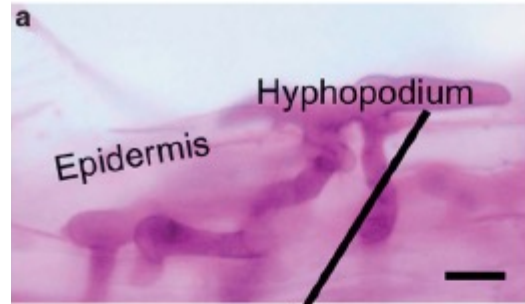
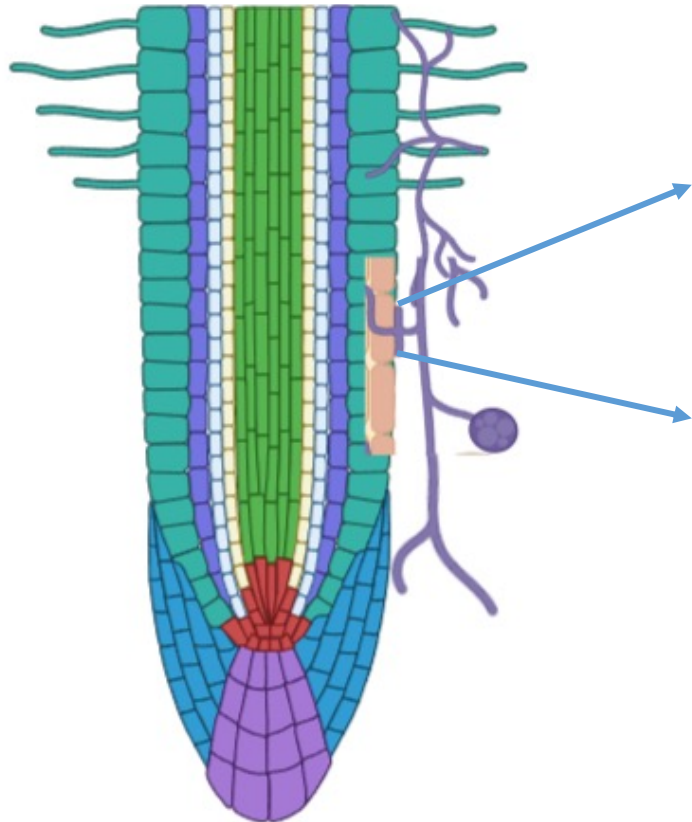


- Τα σπόρια των AMF μπορούν να εκβλαστήσουν κάτω από ευνοϊκές συνθήκες υγρασίας, θερμοκρασίας και pH.
- Δεν απαιτείται η παρουσία ξενιστή για την εκβλάστηση.
- Η παρουσία του φυτού μπορεί να διεγείρει την εκβλάστηση μέσω της έκκρισης δευτερογενών μεταβολιτών
- Σε περίπτωση που οι υφές δεν έρθουν σε επαφή με φυτό, επανέρχονται στο σπόριο και μεταβαίνουν σε φάση λήθαργου.

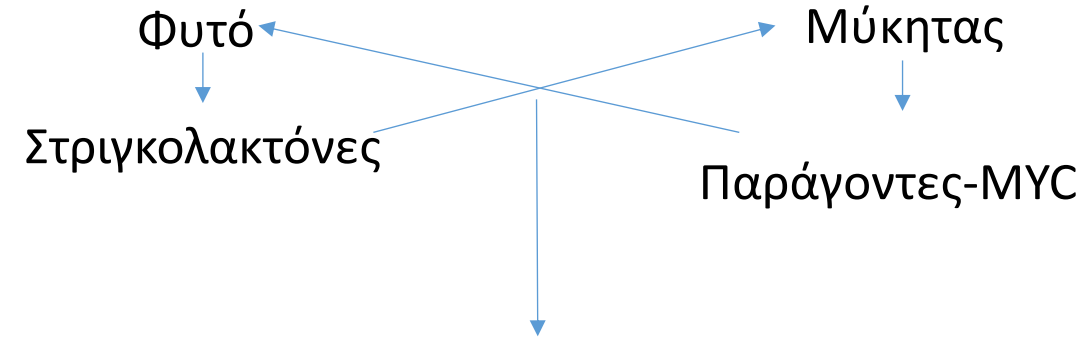
Βιολογικός κύκλος ΔΜΜ



3. Προ-συμβιωτική φάση

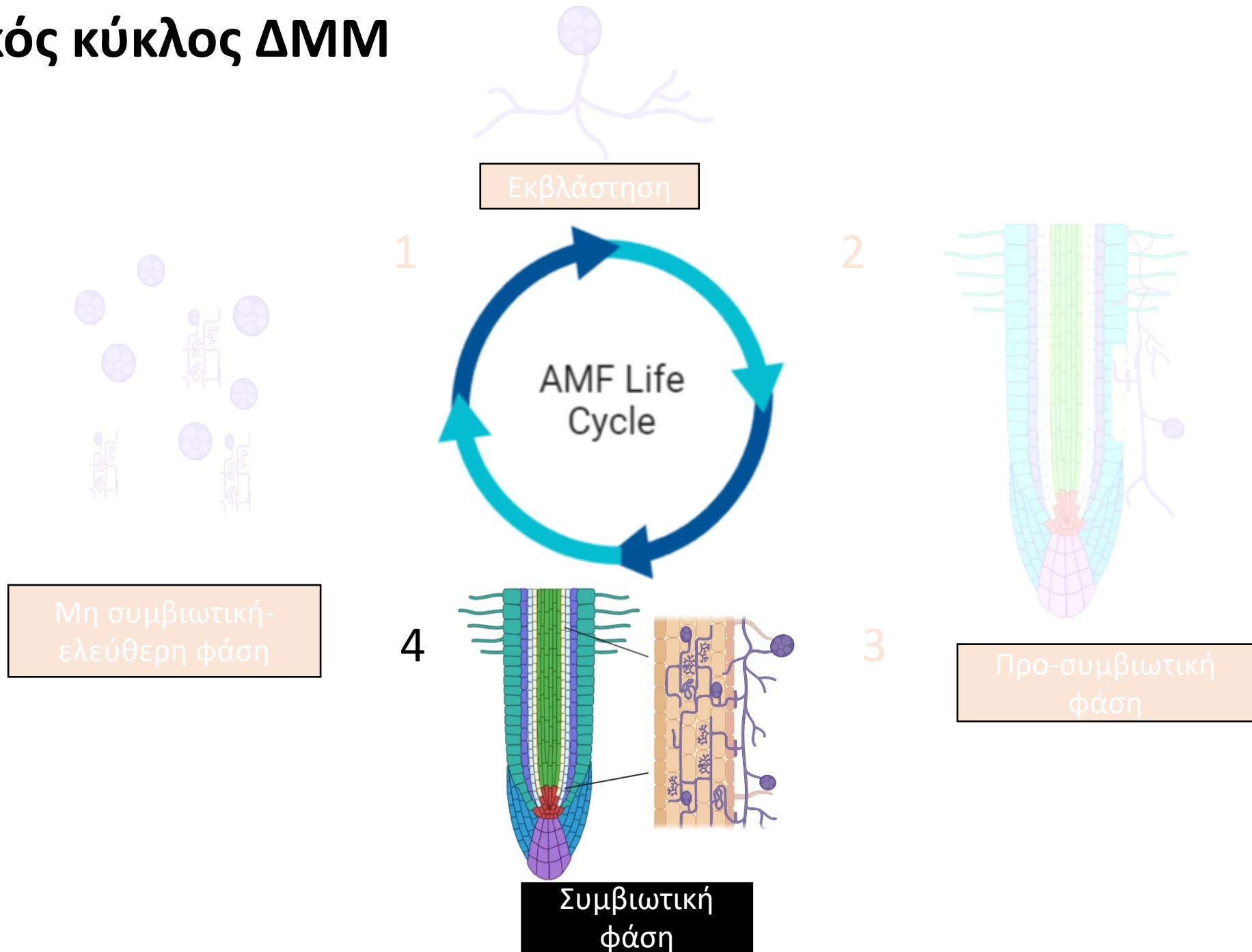


Fungal cytoplasm
Fungal wall
Plant wall
Plant cytoplasm

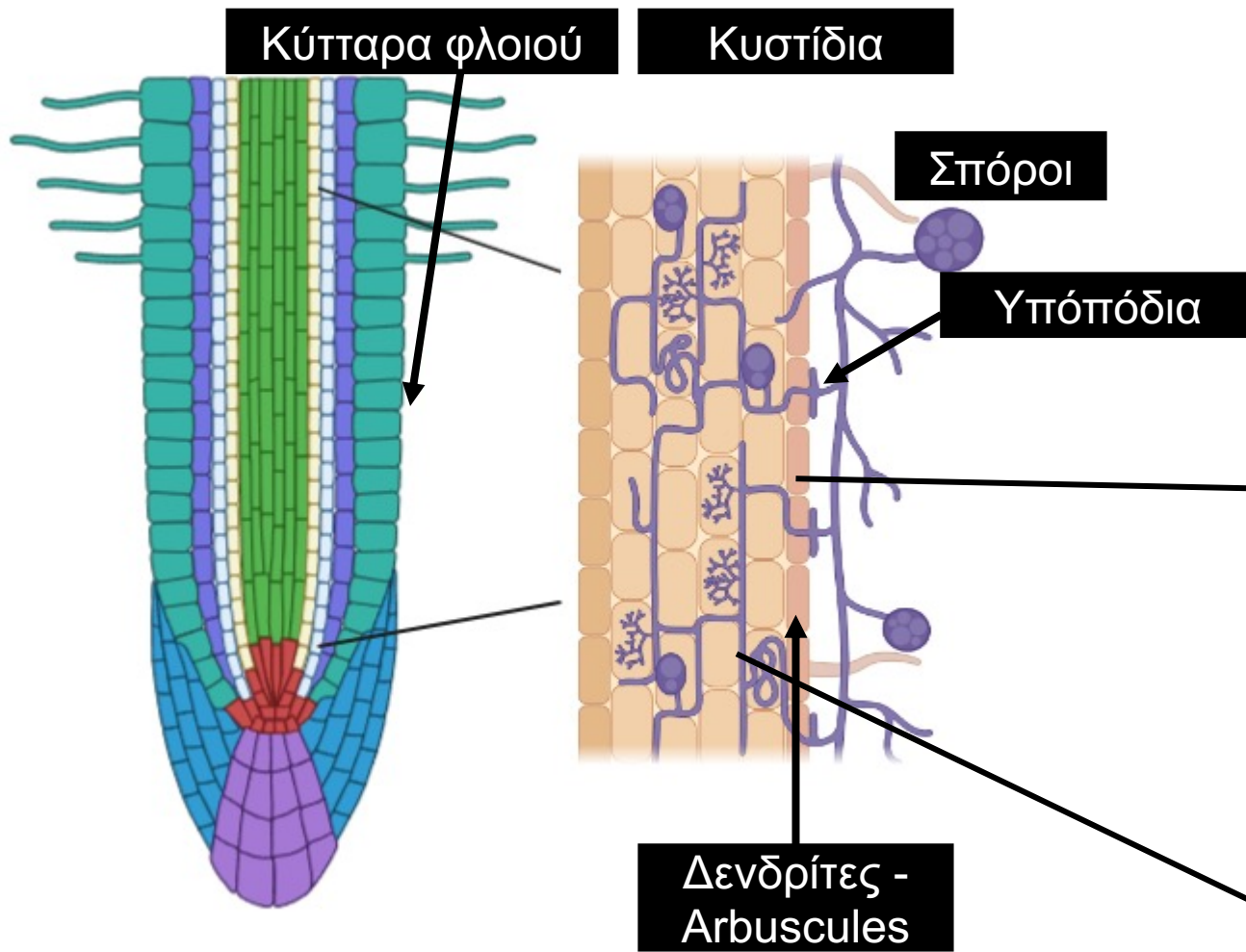


Πυροδότηση σηματοδοτικών μονοπατιών για την επίτευξη της συμβίωσης

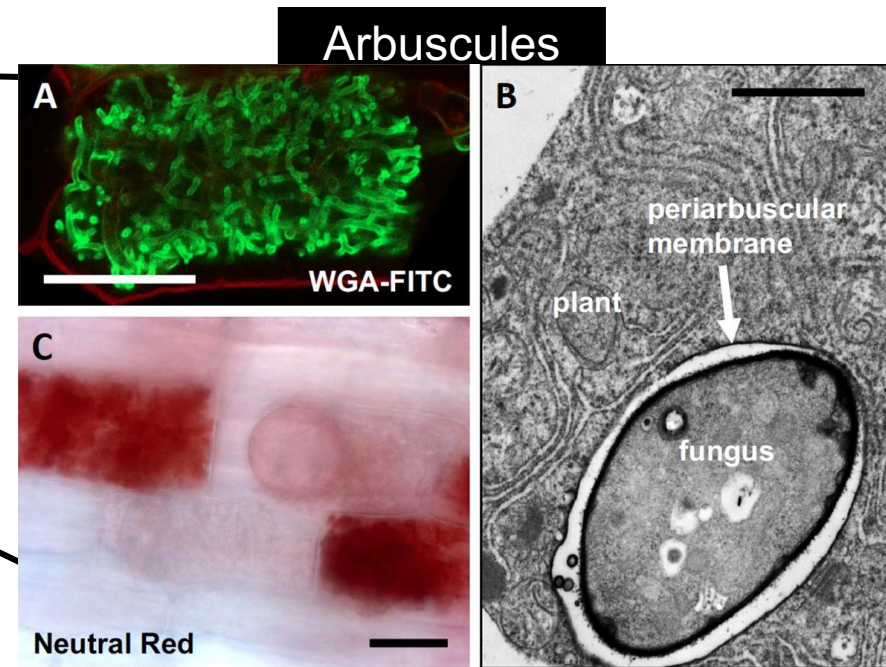
Βιολογικός κύκλος ΔΜΜ



4. Συμβιωτική φάση



- Κατά την φάση της συμβίωσης λαμβάνουν χώρα οι διαδικασίες μεταφοράς θρεπτικών μεταξύ του φυτού και του μύκητα.
- Τα λειτουργικά όργανα που διαδραματίζουν αυτό τον ρόλο είναι από την μεριά του μύκητα, οι δενδρίτες και από την πλευρά του φυτού, η περιδενδριτική μεμβράνη (periarbuscular membrane) που περιβάλλει τους δενδρίτες.



- Κατά την συμβιωτική φάση οι ΔΜΜ ολοκληρώνουν τον βιολογικό τους κύκλο και παράγουν νέα σπόρια.

1^η εργαστηριακή άσκηση

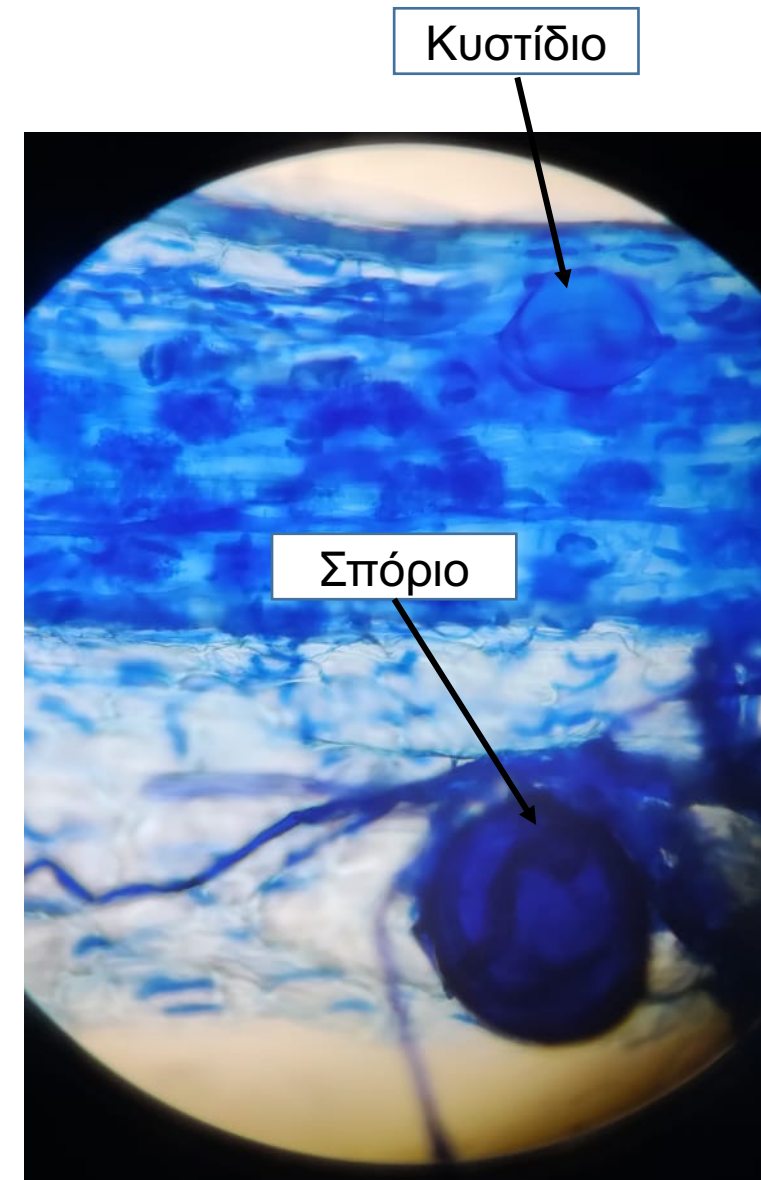
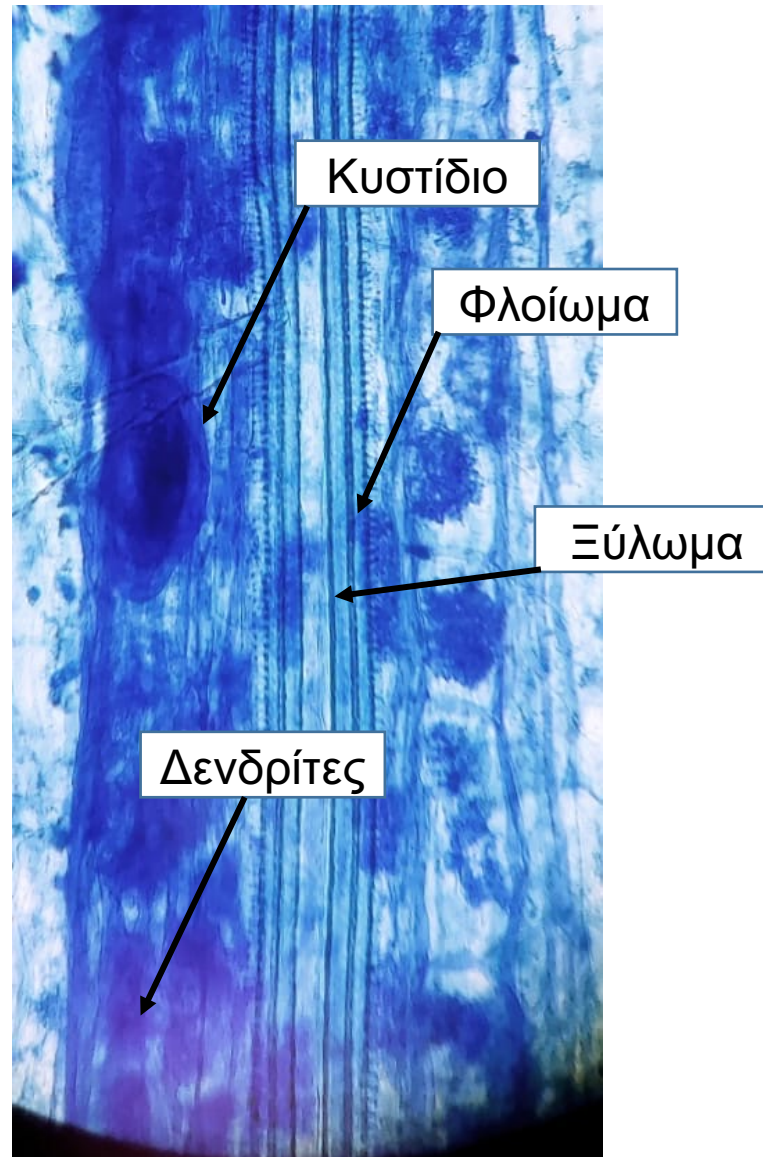
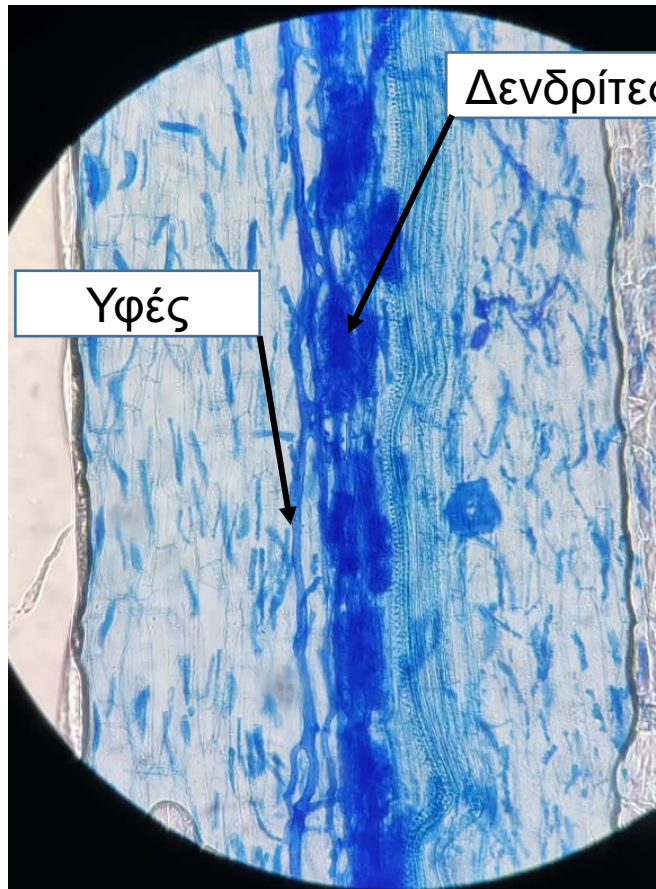
Παρατήρηση δομών ΔΜΜ σε ρίζες που έχουν υποστεί χρώση στο οπτικό μικροσκόπιο

Χρώση των ριζών για τον προσδιορισμό του αποικισμού των ΔΜΜ.

Πρωτόκολλο ink/vinegar

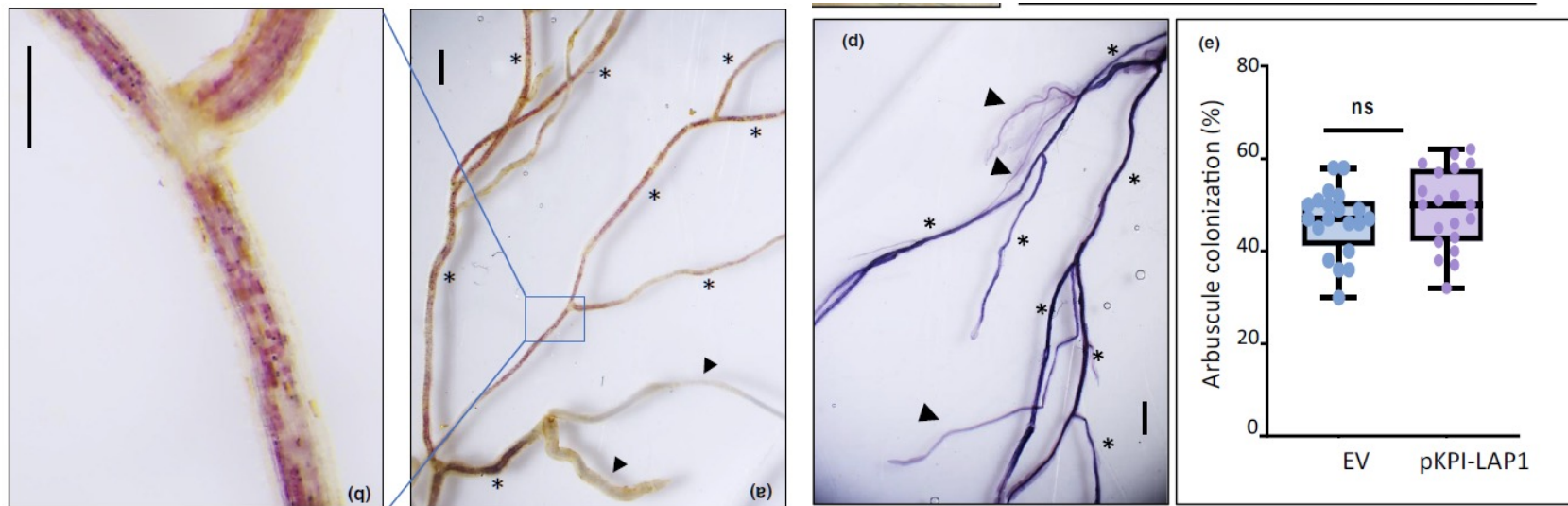
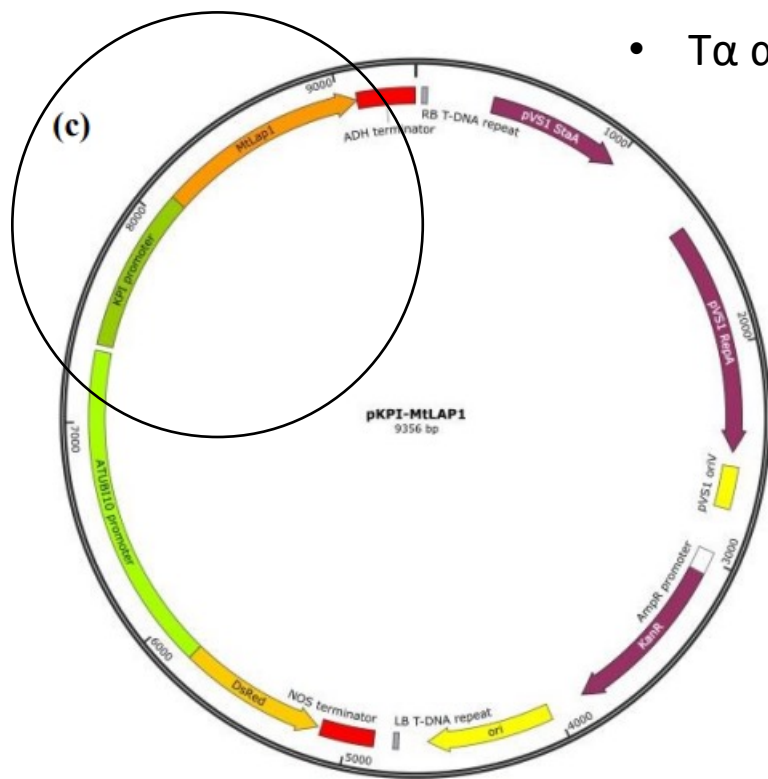
1. Επώαση για 40 λεπτά σε διάλυμα 10% ΚΟΗ στους 95°C. **(Διάυγαση)**
2. Ξέπλυμα ριζών με διάλυμα οξικού οξέος 10%. **(Διακοπή διάυγασης)**
3. Ξέπλυμα ριζών με dH₂O (απιονισμένο), δύο φορές. **(Ξέπλυμα οξικού οξέος).**
4. Επώαση για 30 λεπτά σε διάλυμα μελάνης (5% μελάνι σε 5% οξικό οξύ) στους 95°C. **(Χρώση)**
5. Ξέπλυμα ριζών με dH₂O (απιονισμένο), δύο φορές. **(Απομάκρυνση χρωστικής από το εξωτερικό των ριζών)**
6. Επώαση σε διάλυμα οξικού οξέος 5% για 40λεπτά σε θερμοκρασία δωματίου. **(Απομάκρυνση χρωστικής από το εσωτερικό των κυτάρων)**
7. Επώαση Ο/Ν (12-16ώρες) σε dH₂O (απιονισμένο) στους 4°C. **(Απομάκρυνση περίσσιας χρωστικής και οξικού οξέος)**
8. Προετοιμασία αντικειμενοφόρων πλακών.

Δομές της συμβίωσης ΔΜΜ-φυτού στο οπτικό μικροσκόπιο

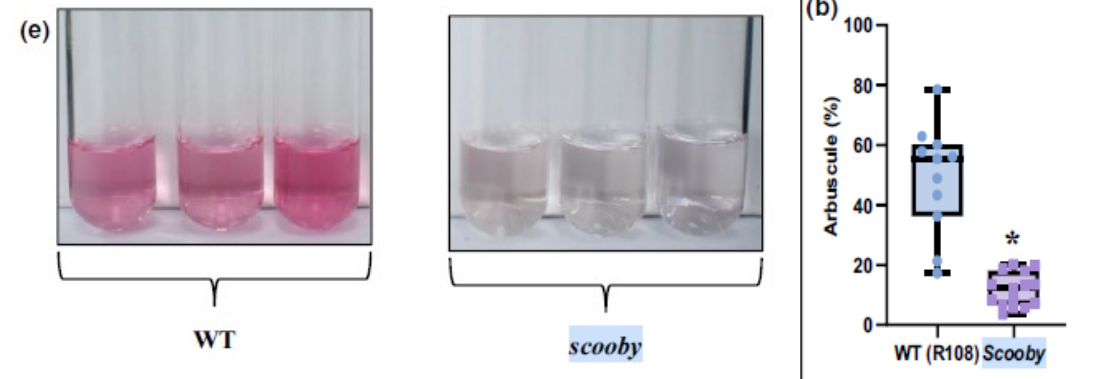


Εκτίμηση του αποικισμού με την χρήση μετασηματισμένων φυτών.

- Έκφραση γονιδίων του μεταγραφικού παράγοντα MtLAP1 (βιοσύνθεση της ανθοκυανίνης) μέσω του υποδοχέα (LAP1) που εκφράζεται μόνο κατά τη συμβίωση.
- Τα αποικισμένα κύτταρα της ρίζας βάφονται μόνα τους.



Ποσοτικοποίηση του αποικισμού μέσω εκχύλισης της ανθοκυανίνης.

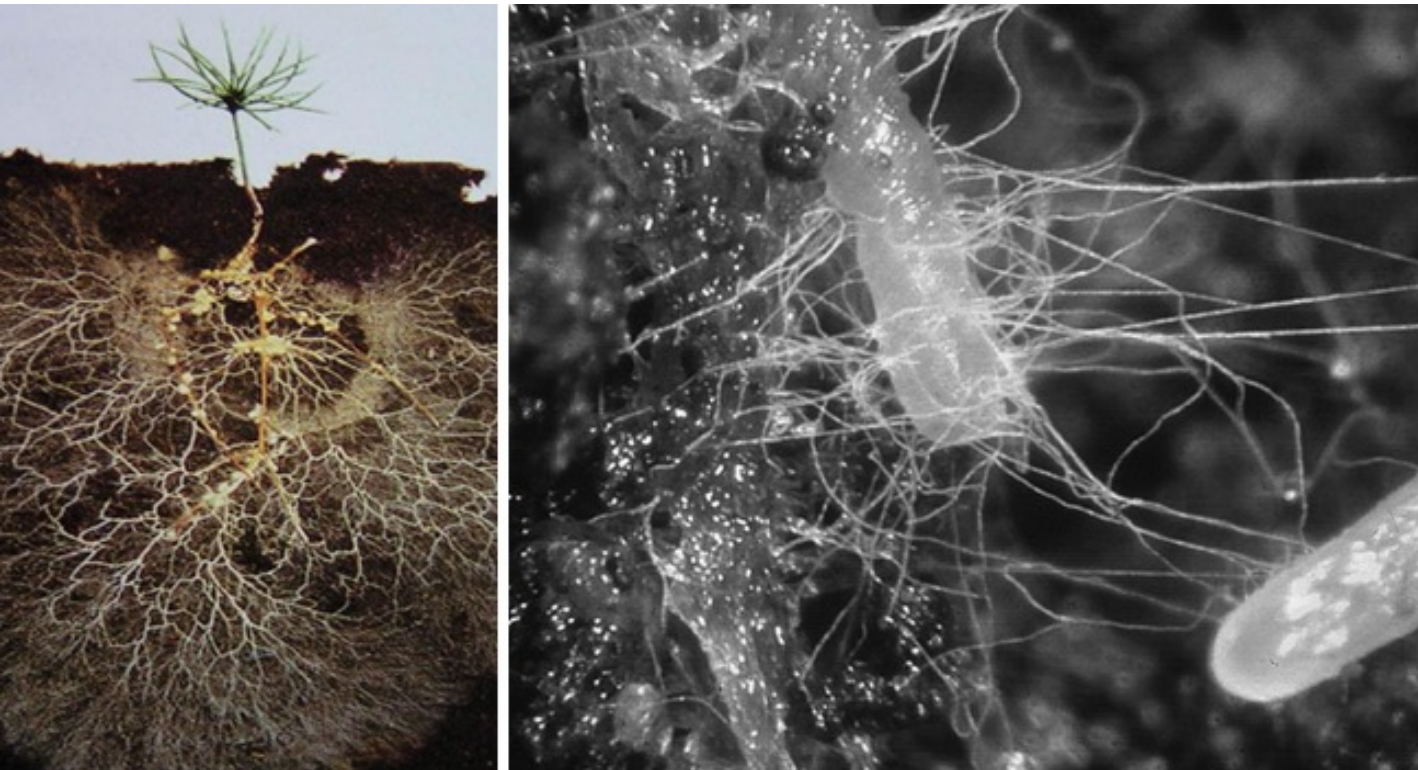


Μελέτη των AMF ως οργανισμό-μοντέλο

Για την μελέτη των ΔΜΜ σε εργαστηριακό επίπεδο είναι απαραίτητη:

- Η τυποποίηση του βιολογικού κύκλου σε ελεγχόμενες συνθήκες.
- Η ταυτοποίηση και χαρακτηρισμός των ειδών που μελετώνται.
- Η επαναληψιμότητα των παρατηρήσεων.

Ιδανικό σενάριο.



Πραγματικότητα



Ιδιαιτερότητες και δυσκολίες στην μελέτη και χρήση των ΔΜΜ

- Υποχρεωτική η παρουσία του φυτού ξενιστή.
- Σε δείγματα εδαφών συναντάται μεγάλη ποικιλία μικροοργανισμών, καθιστώντας ιδιαίτερα δύσκολη την μελέτη των AMF.
- Με την χρήση κλασικών τεχνικών (μικροσκοπία) η ταυτοποίηση των ειδών AMF είναι σχεδόν αδύνατη
- Παρατηρείται διαφορετική συμπεριφορά του ίδιου είδους AMF όταν συμβιώνει με διαφορετικά είδη ξενιστών.

Δημιουργία καλλιεργείων ενός είδους AMF από το έδαφος

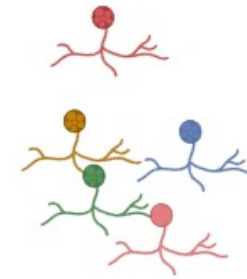
1. Δειγματοληψία
εδάφους και ριζών



2. Αρχική καλλιέργεια
εδάφους με φυτό
καλό ξενιστή των
AMF σε
αποστειρωμένο
αδρανές υπόστρωμα



3. Απομόνωση
διαφορετικών
σπορίων AMF



4. Καλλιέργεια ενός
σπορίου AMF σε
αποστειρωμένο
αδρανές υλικό
παρουσία φυτού
ξενιστή (Trap cultures)

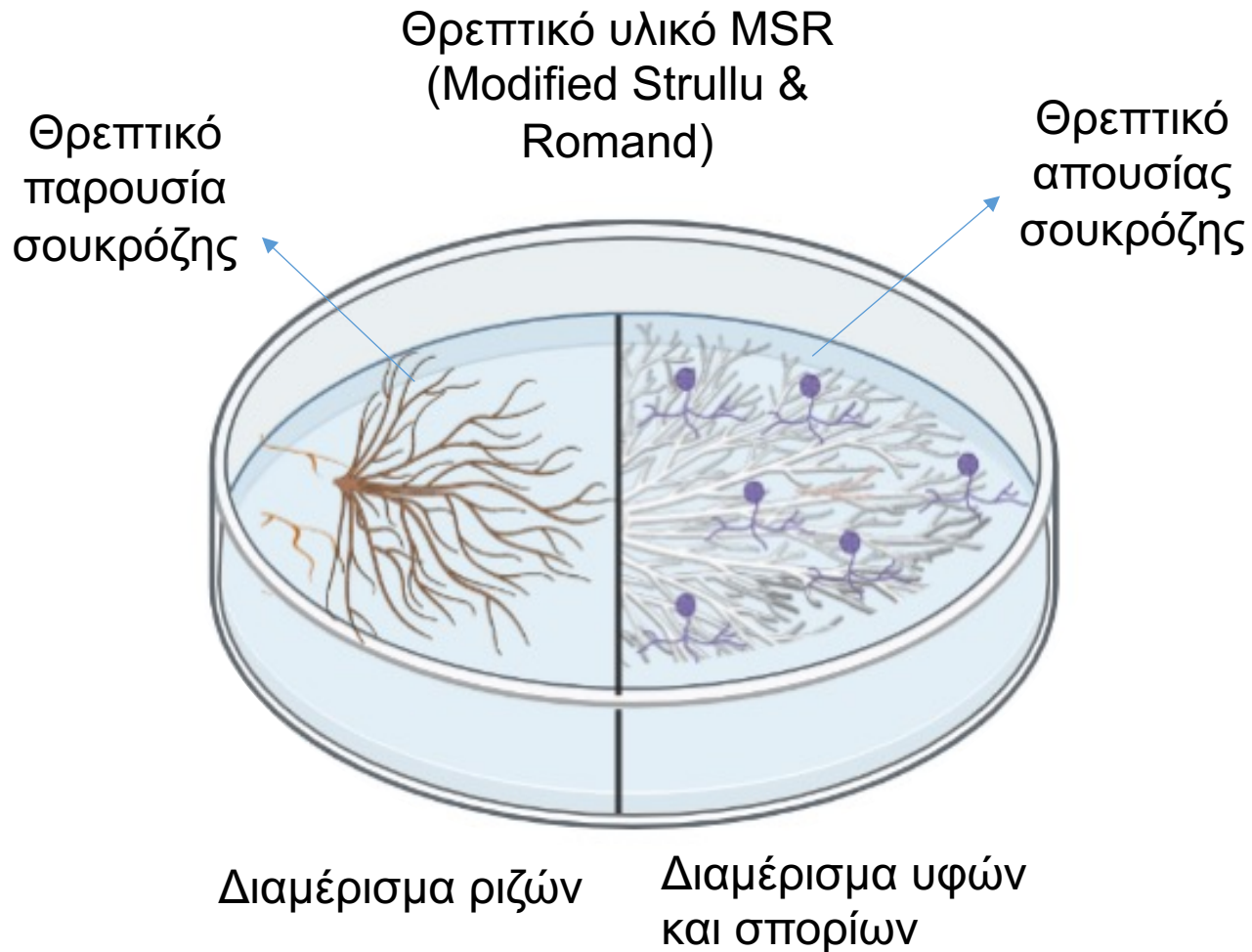


2^η εργαστηριακή πράξη

- Δημιουργία *in vitro* καλλιεργειών ΔΜΜ: από *trap cultures* σε αυξοτροφικά συστήματα
- Παρατήρηση των συστημάτων *in vitro* (AMF και *hairy root*) με στερεοσκόπιο

Διάρκεια 20 λεπτά

AMF *in vitro* καλλιέργειες



Καλλιέργεια AMF δύο διαμερισμάτων.

- Επιτυγχάνεται ο διαχωρισμός ανάμεσα στον μύκητα και το φυτό.
- Για την θρέψη της ρίζας απαιτείται η παρουσία πηγής άνθρακα (σουκρόζη). Στο διαμέρισμα που δεν περιέχει σουκρόζη, οι ρίζες αδυνατούν να αναπτυχθούν και να δημιουργήσουν διακλαδώσεις.
- Οι AMF δεν απαιτούν κάποια πηγή άνθρακα στο θρεπτικό. Έτσι μπορούν να αναπτυχθούν στο διαμέρισμα που δεν υπάρχει σουκρόζη.
- Οι AMF προσλαμβάνουν τα σάκχαρα από τις ρίζες μέσω της συμβίωσης και καταλαμβάνει το διαμέρισμα το οποίο δεν περιέχει σουκρόζη.
- Το σύστημα δυο διαμερισμάτων με την χρήση μετασχηματισμένων ριζών δεν είναι αυτόνομο και απαιτεί τροφοδότηση με πηγή άνθρακα.

REVIEW / SYNTHÈSE

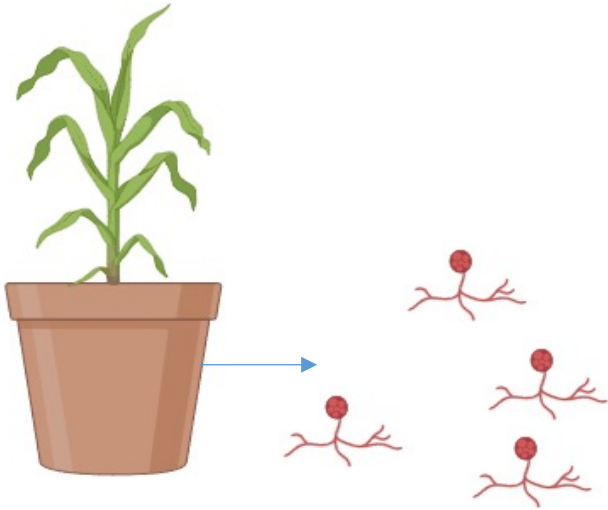
Arbuscular mycorrhiza on root-organ cultures¹

J. André Fortin, Guillaume Bécard, Stéphane Declerck, Yolande Dalpé, Marc St-Arnaud, Andrew P. Coughlan, and Yves Piché

2001

Δημιουργία *in vitro* καλλιεργείων AMF από trap cultures

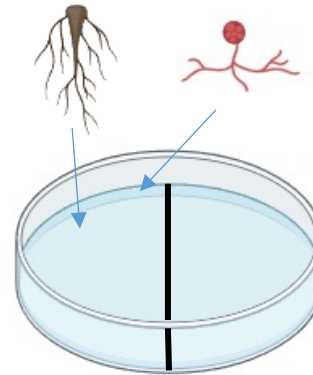
1. Απομόνωση
σπορίων από
καλλιέργειες trap



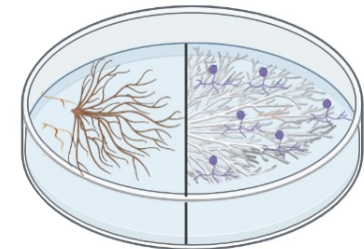
2. Απολύμανση
σπορίων AMF



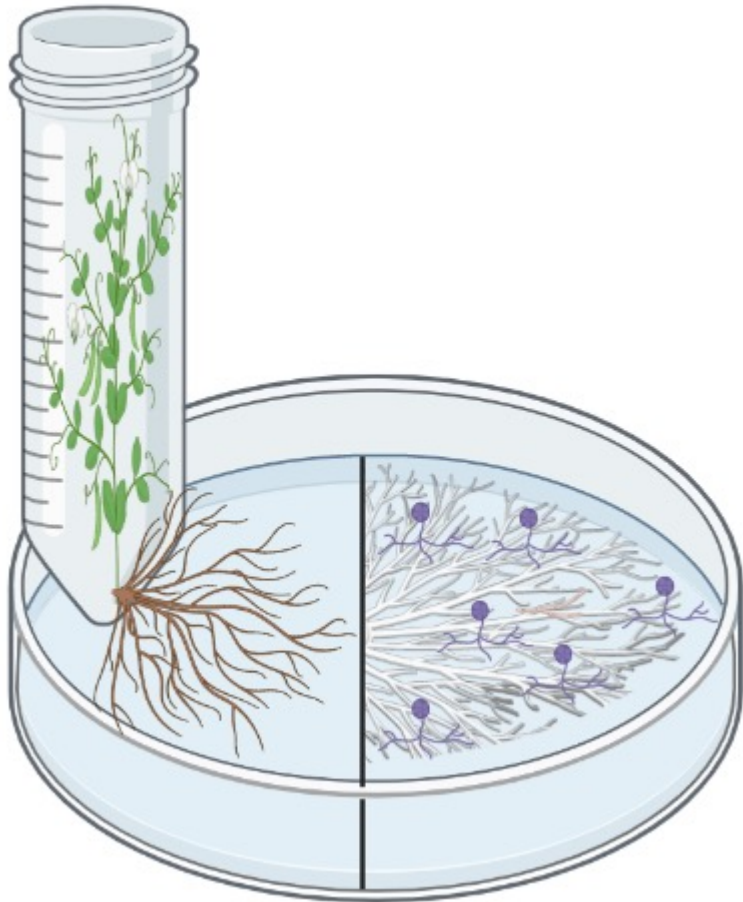
3. Δημιουργία *in vitro*
συμβίωσης με
μετασχηματισμένα Ri
Ti-DNA τριχοειδούς
ρίζας καρότου



4. Επώαση για 2-6
μήνες.



Αυτοτροφικά συστήματα ΔΜΜ *in vitro*



- Στο σύστημα αυτό δεν απαιτείται η προσθήκη πηγής άνθρακα επειδή το φυτό φωτοσυνθέτει.
- Περισσότερο ρεαλιστικό σύστημα.
- Δίνει δυνατότητα μελέτης της κινητικότητας χημικών μορίων διαμέσων της συμβίωσης.

2^η εργαστηριακή άσκηση

Παρατήρηση των συστημάτων *in vitro*
(*AMF* και hairy root) με στερεοσκόπιο.

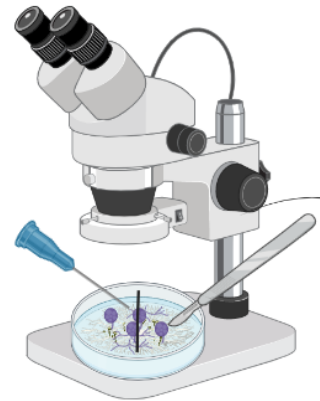
Διάρκεια 20 λεπτά

Παραδείγματα εφαρμογών συστημάτων ΔΜΜ *in vitro*

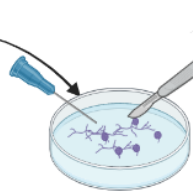
Μελέτη της επίδρασης των γεωργικών φαρμάκων στην εκβλάστηση των σπορίων

Επώαση των σπορίων
παρουσία ή απουσία
γεωργικών φαρμάκων.

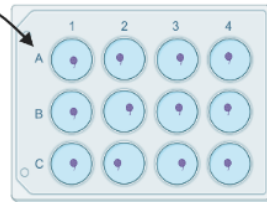
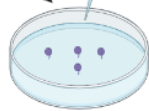
Μελέτη της ικανότητας
εκβλάστησης



Bi-compartmental
monoxenic AMF
culture



Liquid MSR
negative

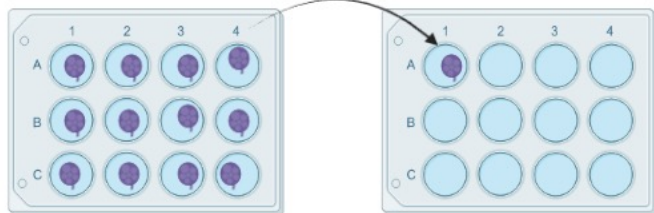


Ungerminated

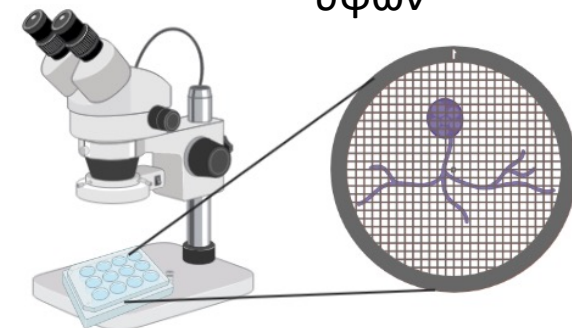
Dead

Germinated

Διερεύνηση αν η επίδραση είναι
μυκοτοξική ή μυκοστατική

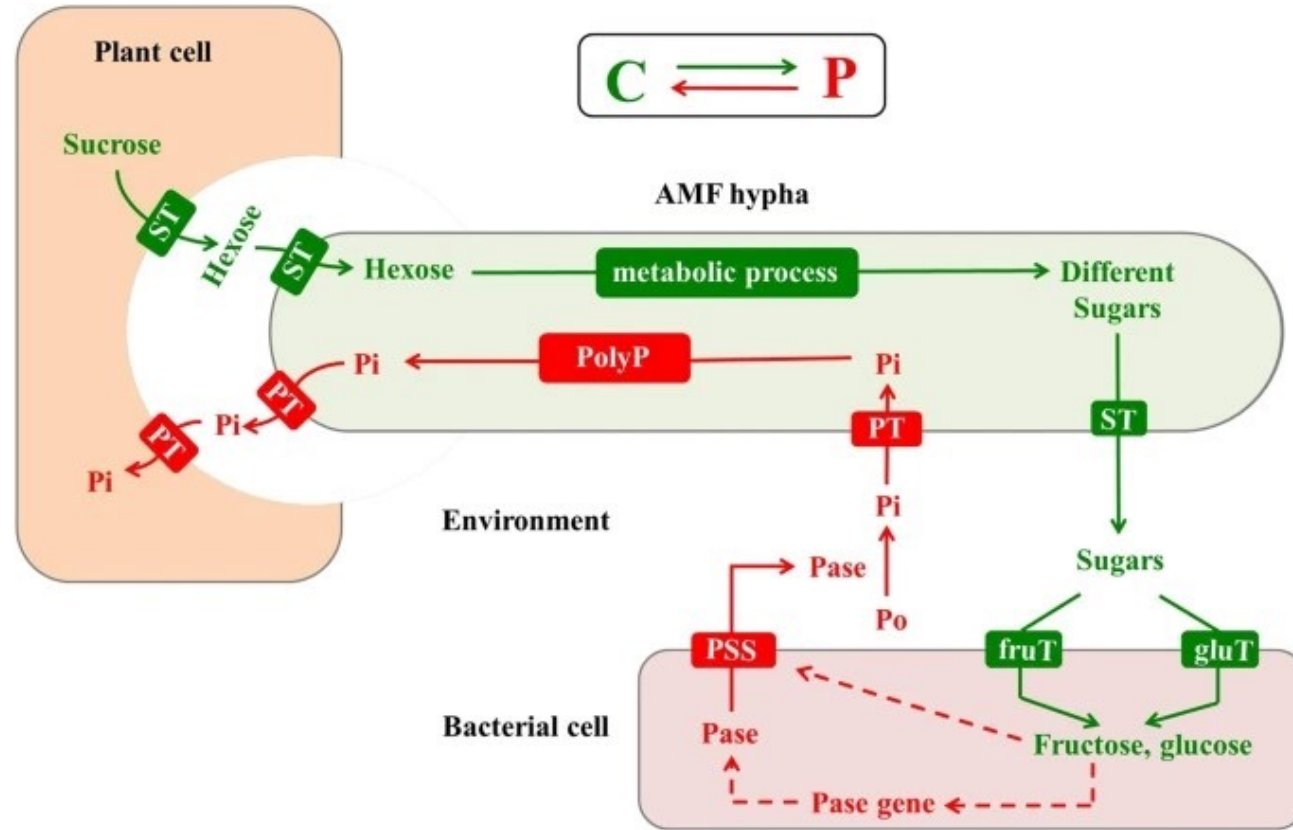


Μέτρηση του μήκους των
υφών



Παραδείγματα εφαρμογών συστημάτων ΔΜΜ *in vitro*

Χρήση των συστημάτων *in vitro* για την μελέτη της σηματοδότησης ανάμεσα στο φυτό, τον μύκητα και τα βακτήρια που διαλυτοποιούν τον φώσφορο.



- Οι AMF λαμβάνουν σάκχαρα από το φυτό.
- Μεταφέρουν και εκκρίνουν μέσω των υφών σάκχαρα στα σημεία που υπάρχουν βακτήρια που διαλυτοποιούν τον φώσφορο.
- Τα βακτήρια τροφοδοτούνται από τα σάκχαρα (φρουκτόζη και γλυκόζη).
- Μετατρέπουν τον οργανικό φώσφορο σε ανόργανο.
- Ο ανόργανος φώσφορος προσλαμβάνεται από τις υφές των AMF.
- Ο φώσφορος προσφέρεται στο φυτό με αντάλλαγμα νέα σάκχαρα.

Δουλειά για το σπίτι.....

1. Περιγραφή των μεθόδων και τεχνικών εργαστηριακής μελέτης των AMF (100-200 λέξεις).
2. Περιγράψτε τουλάχιστον 2 ερευνητικές εφαρμογές (τελευταία 10ετια, με βιβλιογραφία) των *in vitro* συστημάτων (100-200 λέξεις).