

ΠΑΝΕΠΙΣΤΗΜΙΟ ΘΕΣΣΑΛΙΑΣ

ΣΧΟΛΗ ΕΠΙΣΤΗΜΩΝ ΥΓΕΙΑΣ

**Πρόγραμμα Μεταπτυχιακών Σπουδών του Τμήματος Βιοχημείας και
Βιοτεχνολογίας**

«ΒΙΟΤΕΧΝΟΛΟΓΙΑ – ΠΟΙΟΤΗΤΑ ΔΙΑΤΡΟΦΗΣ ΚΑΙ ΠΕΡΙΒΑΛΛΟΝΤΟΣ»

**“Επίδραση μυκορριζικού εμβολίου στην ανάπτυξη και
αζωτοδεσμευτική ικανότητα των ψυχανθών”**

Μεταπτυχιακή Διατριβή

Κούτρας Δ. Παναγιώτης

Γεωπόνος Α.Π.Θ

ΛΑΡΙΣΑ 2012

**“Επίδραση μυκορριζικού εμβολίου στην ανάπτυξη και
αζωτοδεσμευτική ικανότητα των ψυχανθών”**

Τριμελής Εξεταστική Επιτροπή

Επιβλέπουσα Καθηγήτρια

Παπαδοπούλου Καλλιόπη

Επίκουρος Καθηγήτρια Βιοτεχνολογίας Φυτών του Τμήματος Βιοχημείας & Βιοτεχνολογίας του Πανεπιστημίου Θεσσαλίας

Μέλος

Καρπούζας Δημήτριος

Επίκουρος Καθηγητής Περιβαλλοντικής Μικροβιολογίας & Βιοτεχνολογίας του Τμήματος Βιοχημείας & Βιοτεχνολογίας του Πανεπιστημίου Θεσσαλίας

Μέλος

Οιχαλιώτης Κωνσταντίνος

Επίκουρος Καθηγητής Γονιμότητας & Βιολογίας Εδάφους του Τμήματος Αξιοποίησης Φυσικών Πόρων & Γεωργικής Μηχανικής του Γεωπονικού Πανεπιστημίου Αθηνών

*Στην οικογένειά μου
&
την Κατερίνα*

ΠΡΟΛΟΓΟΣ

Θεωρώ υποχρέωσή μου να εκφράσω τις θερμότερες ευχαριστίες μου σε όλους όσους με οποιονδήποτε τρόπο συνέβαλαν στην ολοκλήρωση αυτής της μεταπτυχιακής διατριβής.

Αρχικά θα ήθελα να ευχαριστήσω την επιβλέπουσα καθηγήτρια της μεταπτυχιακής μου διατριβής, την Επίκουρο Καθηγήτρια Βιοτεχνολογίας Φυτών, κ. Καλλιόπη Παπαδοπούλου, για την υπόδειξη του θέματος, την αμέριστη επιστημονική και ηθική υποστήριξή της κατά τη διεξαγωγή, συγγραφή και παρουσίαση της εργασίας αυτής, καθώς και για τον πολύτιμο χρόνο που διέθεσε.

Επίσης θα ήθελα να εκφράσω τις βαθύτατες ευχαριστίες μου και στα άλλα δύο μέλη της Εξεταστικής Επιτροπής, τον Επίκουρο Καθηγητή Περιβαλλοντικής Μικροβιολογίας και Βιοτεχνολογίας κ. Δημήτριο Καρπούζα και τον Επίκουρο Καθηγητή Γονιμότητας και Βιολογίας Εδάφους κ. Κωνσταντίνο Οιχαλώτη για τις χρήσιμες υποδείξεις και παρατηρήσεις τους στην οργάνωση του πειράματος.

Τις ιδιαίτερες ευχαριστίες μου στο Λέκτορα Εδαφολογίας της Γεωπονικής Σχολής του Α.Π.Θ, κ. Ιωάννη Υψηλάντη και σε όλα τα μέλη του εργαστηρίου του Τμήματος Βιοχημείας και Βιοτεχνολογίας.

Ευχαριστώ ακόμη τους φίλους μου Ιωάννη Μηνά, Χαράλαμπο Μυρεσιώτη, Χρήστο Χαρδαλιά και Μαργαρίτα Χρυσανθοπούλου για την επιστημονική και ψυχολογική συμπαράστασή τους.

Τέλος θα ήθελα να εκφράσω την ευγνωμοσύνη μου στην οικογένεια μου και τη φίλη μου Κατερίνα Θεοχάρη, γιατί δίχως αυτούς δεν θα είχα κατορθώσει να ολοκληρώσω την μεταπτυχιακή μου εκπαίδευση. Με στήριξαν και με στηρίζουν σε κάθε μου επιλογή.

ΠΕΡΙΕΧΟΜΕΝΑ

	Σελ.
ΠΕΡΙΛΗΨΗ	7
ABSTRACT	8
ΕΙΣΑΓΩΓΗ.....	9
Τα ψυχανθή.....	9
Ο βίκος.....	9
Αζωτοδεσμευτικά Βακτήρια.....	11
Τα ριζόβια.....	12
Αζωτοδέσμευση.....	15
Μυκόρριζες.....	18
Ο ρόλος των μυκορριζών.....	18
Κατηγορίες μυκορριζών.....	20
Εκτομυκόρριζες.....	20
Ενδοτροφικές Μυκόρριζες ή Ενδομυκόρριζες.....	20
Θυσσανώδεις Μυκόρριζες.....	21
Ο θυσσανώδης μύκητας <i>Glomus intraradices</i>	23
Πρόσληψη φωσφόρου.....	23
Άλλες ωφέλειες των θυσσανωδών μυκορριζών.....	24
ΣΚΟΠΟΣ.....	26
ΥΛΙΚΑ & ΜΕΘΟΔΟΙ.....	27
Πείραμα αγρού.....	27
Καλλιέργεια και ανάπτυξη των φυτών.....	28
Δειγματοληψίες- Χειρισμός των δειγμάτων.....	30
Μέτρηση Φυτικής Βιομάζας ή Φυτομάζας.....	32

Χρώση των ριζών.....	33
Μέτρηση Φωσφόρου και Καλίου.....	35
ΑΠΟΤΕΛΕΣΜΑΤΑ.....	37
Υπολογισμός της φυτομάζας.....	37
Μέτρηση του ποσοστού αποικισμού των ριζών από τον μύκητα <i>Glomus intraradices</i>	38
Επίδραση των μυκορριζών στην ανάπτυξη φυματίων σε ρίζες φυτών βίκου.....	40
Μέτρηση επιπέδων ολικού φωσφόρου και καλίου στα φυτά.....	43
ΣΥΖΗΤΗΣΗ.....	46
ΒΙΒΛΙΟΓΡΑΦΙΑ.....	51

ΠΕΡΙΛΗΨΗ

Τα περισσότερα είδη χερσαίων φυτών συμβιώνουν με μύκητες και σχηματίζουν μυκόρριζες από τις οποίες ωφελούνται πολλαπλώς. Η κυριότερη ωφέλεια για το φυτό είναι η αποτελεσματικότερη χρησιμοποίηση των θρεπτικών στοιχείων. Ειδικά τα φυτά που συμβιώνουν με θυσσανώδεις (AMF) μυκόρριζες αξιοποιούν πιο αποτελεσματικά τον φώσφορο, ο οποίος συνήθως σχηματίζει δυσδιάλυτες ενώσεις στο έδαφος με διάφορα κατιόντα. Ταυτόχρονα, έχει αποδειχθεί ότι εμπλέκονται και στην πρόσληψη και μεταφορά ανόργανου αζώτου.

Σκοπός της εργασίας ήταν να ερευνηθεί εάν οι AMF μυκόρριζες επηρεάζουν την ανάπτυξη των φυτών βίκου σε σύγκριση με την αντίστοιχη προσθήκη ή μη λιπάσματος. Γι' αυτό το λόγο εξετάστηκε ο βαθμός αποικισμού των φυτών από το στέλεχος *Glomus intraradices* υπό συνθήκες παρουσίας ή απουσίας βασικής λίπανσης, ο βαθμός επίδρασης του μυκορριζικού εμβολίου στην ανάπτυξη των συμβιωτικών βακτηρίων των ψυχανθών (ριζόβια) καθώς και η επίδραση της προσθήκης μυκορριζικού εμβολίου στα επίπεδα συγκέντρωσης φωσφόρου και καλίου στο υπέργειο και στο ριζικό τμήμα του βίκου αντίστοιχα, σε σχέση με την προσθήκη ή μη λιπάσματος.

Σε πείραμα αγρού χρησιμοποιήθηκαν φυτά βίκου, τα οποία καλλιεργήθηκαν με τρεις διαφορετικές μεταχειρίσεις. Τα αποτελέσματα έδειξαν ότι τα μυκορριζικά φυτά αναπτύχθηκαν και απέδωσαν λιγότερη βιομάζα σε σχέση με τα φυτά που καλλιεργήθηκαν παρουσία λιπάσματος. Ο εμβολιασμός με το μυκορριζικό εμβόλιο αύξησε το μεγαλύτερο ποσοστό αποικισμού των φυτών, σε σχέση με τα φυτά-μάρτυρες και αυτών που αναπτύχθηκαν παρουσία λιπάσματος, ενώ ανέστειλε την ανάπτυξη φυματίων στο ριζικό σύστημα του βίκου. Αντιθέτως, η παρουσία μυκορριζών δε φαίνεται να επηρεάζει τη πρόσληψη και αφομοίωση του φωσφόρου τόσο στους βλαστούς όσο και στις ρίζες των φυτών, ενώ από την άλλη πλευρά το ριζικό σύστημα των φυτών που αναπτύχθηκαν σε φωσφορικό περιβάλλον αφομοίωσε περισσότερο φώσφορο σε σχέση με τις άλλες δύο κατηγορίες φυτών. Παρόμοια αύξηση παρατηρήθηκε και στη πρόσληψη καλίου στο ριζικό σύστημα των φυτών μετά από λίπανση, ενώ στα μυκορριζικά φυτά τελικά βρέθηκαν μειωμένα επίπεδα καλίου, τόσο στις ρίζες όσο και στους βλαστούς τους.

ABSTRACT

Most species of terrestrial plants live with fungi and form mycorrhizal associations, of which benefit the plant in various ways. The main benefit to the plant is more efficient use of nutrients. Especially plants that live with Arbuscular Mycorrhizal Fungi (AMF) utilize the phosphorus more efficiently, which is not readily available to the plant as it usually forms immobile compounds with various cations in soil. AMF have also been shown to be involved in the uptake and transport of inorganic nitrogen by the plant.

The purpose of this study was to investigate if AMF influence the plant growth of vetch, compared to the corresponding addition of common fertilizers. For this reason, we examined (a) the extent of colonization of plants by the strain *Glomus intraradices*, in the presence or absence of basic fertilization, (b) the degree of influence of mycorrhizal inoculum in the development of the symbiotic bacteria (rhzobia) of legumes, as expressed in nodule number, as well as (c) the effect of mycorrhizal inoculum in the concentration levels of phosphorus and potassium in the root and above-ground portion of the vetch, respectively.

In a field experiment, we used vetch plants, which were cultivated under three different treatments. As expected, inoculation with mycorrhiza increased the degree of plant colonization compared to the control plants and those grown in the presence of the fertilizer, indicating the inoculum was effective for vetch. Nevertheless, mycorrhizal plants yielded less biomass than plants grown in the presence of the fertilizer. More interestingly, increased mycorrhization led to inhibition of nodule development in vetch root system. By contrast, the presence of mycorrhiza does not seem to affect the uptake and assimilation of phosphorus in both leaves and roots of plants. Fertilization resulted in the expected phosphate assimilation. A similar increase was observed in potassium intake in the root system of plants following fertilization, while in mycorrhizal plants reduced levels of potassium in both roots and leaves were found.

ΕΙΣΑΓΩΓΗ

Τα ψυχανθή

Τα ψυχανθή ανήκουν στην οικογένεια *Fabaceae* (συνώνυμα *Leguminosae* ή *Papilionaceae*) και είναι δικοτυλήδονα ποώδη φυτά, ετήσια, διετή ή πολυετή. Ονομάζονται ψυχανθή λόγω της ειδικής μορφολογίας του άνθους τους που μοιάζει με ψυχή (πεταλούδα). Από πλευράς σπουδαιότητας, κατατάσσονται στη δεύτερη θέση μετά από τα σιτηρά και γενικότερα τα αγρωστωδή. Καλλιεργούνται: 1) για την παραγωγή καρπών που χρησιμοποιούνται στη διατροφή του ανθρώπου και των ζώων, 2) για την παραγωγή χονδροειδών ζωοτροφών και 3) ως φυτά χλωράς λίπανσης (Παπακώστα-Τασοπούλου 2005).

Η μεγάλη σπουδαιότητα των ψυχανθών έναντι των άλλων καλλιεργειών έγκειται στην ικανότητά τους να δεσμεύουν το άζωτο της ατμόσφαιρας και έτσι όχι μόνο να καλύπτουν σχεδόν εξ ολοκλήρου ή εν μέρει τις ανάγκες τους σε άζωτο, αλλά και να εμπλουτίζουν το έδαφος με άζωτο, το οποίο χρησιμοποιεί η καλλιέργεια που θα ακολουθήσει (Παπακώστα-Τασοπούλου 2005).

Ο βίκος

Με το όνομα βίκος είναι γνωστά περίπου 150 είδη φυτών, τα οποία ανήκουν στο γένος *Vicia*. Ο βίκος καλλιεργείται ευρέως σε περιοχές με εύκρατο κλίμα ως φυτό χλωράς λίπανσης και ως χορτοδοτικό και πολύ λιγότερο για την παραγωγή καρπού. Στην Ελλάδα το είδος που καλλιεργείται αποκλειστικά είναι το *V. sativa* για παραγωγή καρπού και σανού (Παπακώστα-Τασοπούλου 2005).



Ο κοινός βίκος είναι φυτό ποώδες, ετήσιο. Το ριζικό σύστημα αποτελείται από μία λεπτή πασσαλώδη ρίζα, η οποία φέρει πολυάριθμες διακλαδώσεις. Στις ρίζες του βίκου στη χώρα μας σχηματίζονται άφθονα φυμάτια, πράγμα που υποδηλώνει ότι υπάρχουν κατάλληλα ενδογενή ριζόβια. Η ανάπτυξη του βίκου είναι έρπουσα ή αναρριχώμενη. Οι βλαστοί εκφύονται από τη βάση των φυτών (ο κεντρικός βλαστός παύει να επιμηκύνεται), είναι κοίλοι εσωτερικά, με τετράγωνη διατομή και το ύψος τους κυμαίνεται από 30 έως 80 cm.

Εικόνα Ε.1: Φυτό βίκου. Διακρίνονται τα φύλλα, η διακλαδιζόμενη έλικα και οι λοβοί

Τα φύλλα είναι σύνθετα, αποτελούμενα από 5-8 ζεύγη αντίθετων φυλλαρίων και καταλήγουν σε διακλαδιζόμενη έλικα (Εικόνα Ε.1). Ο βίκος παρουσιάζει υπόγειο φύτρωμα. Οι σπόροι βλαστάνουν σε θερμοκρασία 2-6°C και τα αναπτυγμένα φυτά αντέχουν σε χαμηλές θερμοκρασίες μέχρι -10°C. Για την ανάπτυξη του φυτού πλέον κατάλληλες είναι οι μέτριες θερμοκρασίες. Στη χώρα μας ο βίκος δίνει τις μεγαλύτερες αποδόσεις με φθινοπωρινή σπορά. Οι ανάγκες του βίκου σε υγρασία εδάφους είναι σχετικά μεγάλες. Οι περιοχές όπου καλλιεργείται πρέπει να έχουν ετήσιο ύψος βροχής τουλάχιστον 400 mm (Παπακώστα-Τασοπούλου 2005).

Οι εδαφικές απαιτήσεις του βίκου είναι γενικά μικρές. Προτιμά όμως τα καλά στραγγιζόμενα, μέσης σύστασης εδάφη, μέτριας γονιμότητας, με pH 6,0-7,0. Υποφέρει πολύ από την υπερβολική υγρασία του εδάφους. Παρουσιάζει μεγαλύτερη αντοχή στην οξύτητα του εδάφους σε σύγκριση με τα περισσότερα ψυχανθή. Τα καλύτερα όμως αποτελέσματα επιτυγχάνονται σε εδάφη πλούσια σε ασβέστιο, τα οποία εφοδιάζονται με επαρκείς ποσότητες φωσφόρου, γιατί έχει σχετικά υψηλές απαιτήσεις σε φωσφόρο (Παπακώστα-Τασοπούλου 2005).

Συμπερασματικά αζωτούχος και καλιούχος λίπανση στη χώρα μας δεν συνιστάται για το βίκο, ενώ η λίπανση με φωσφόρο είναι απαραίτητη σε πτωχά σε

φωσφόρο εδάφη και σε ποσότητα μέχρι 6 kg P₂O /στρ (Παπακώστα-Τασοπούλου 2005).

Για τα περισσότερα οικολογικά περιβάλλοντα της Ελλάδας συνιστάται η φθινοπωρινή σπορά και η χρησιμοποιούμενη ποσότητα σπόρου εξαρτάται από την κατεύθυνση της καλλιέργειας (σανοδοτική ή καρποδοτική) και το μέγεθος των σπόρων (βάρους 1000 σπόρων 45-75 g). Καταλληλότερο βάθος σποράς είναι τα 3-5 cm και απαιτείται καλή κάλυψη του σπόρου (Παπακώστα-Τασοπούλου 2005).

Το στάδιο κοπής του βίκου για σανό πρέπει να συνδυάζει μεγάλη φυτομάζα και καλή ποιότητα χόρτου. Σ' αυτό το στάδιο ανάπτυξης η πλειονότητα των σπόρων βρίσκεται στο στάδιο της μαλακής ζύμης. Οι αποδόσεις επηρεάζονται σημαντικά από την καλλιεργούμενη ποικιλία, την εφαρμοζόμενη καλλιεργητική τεχνική και από εδαφοκλιματικούς παράγοντες όπως τη θερμοκρασία, το ύψος και την κατανομή των βροχοπτώσεων, τη γονιμότητα, τη μηχανική σύσταση και το pH του εδάφους (Παπακώστα-Τασοπούλου 2005).

Αζωτοδεσμευτικά Βακτήρια

Στα σημαντικότερα βακτήρια για τη γεωργία ανήκουν τα είδη *Rhizobium* και *Bradyrhizobium* και είναι αυτά που δείχνουν μεγάλη εξειδίκευση ως προς τα φυτικά είδη με τα οποία συμβιώνουν. Τα ψυχανθή μέσω της συμβίωσής τους με αζωτοδεσμευτικά βακτήρια (ριζόβια) δεσμεύουν το άζωτο της ατμόσφαιρας με αποτέλεσμα αφ' ενός να μπορούν να αναπτύσσονται ικανοποιητικά σε εδάφη με χαμηλή διαθεσιμότητα αζώτου και αφ' ετέρου να εμπλουτίζουν το έδαφος με άζωτο, το οποίο επωφελούνται οι επόμενες καλλιέργειες (Παπακώστα-Τασοπούλου 2005).

Η εγκατάσταση και λειτουργία μιας αποτελεσματικής συμβίωσης μεταξύ του φυτού και των αζωτοδεσμευτικών βακτηρίων είναι αρκετά πολύπλοκο φαινόμενο που υφίσταται επιδράσεις τόσο ενδογενείς (προερχόμενες από το φυτό και τα βακτήρια) όσο και εξωγενείς (προερχόμενες από το άμεσο περιβάλλον των ριζών). Αποτέλεσμα της συμβίωσης είναι η ανάπτυξη ενός διαφοροποιημένου ιστού στις ρίζες του φυτού, όπου δεσμεύεται το άζωτο της ατμόσφαιρας. Ο ιστός αυτός ονομάζεται φυμάτιο.

Τα ριζόβια

Τα ριζόβια παρουσιάζουν διαφορετικό βαθμό εξειδίκευσης. Ορισμένα έχουν μεγάλη εξειδίκευση και σχηματίζουν φυμάτια με τα είδη ενός και μόνο γένους ή με ορισμένα μόνον είδη ενός γένους, ενώ άλλα συμβιώνουν με τα είδη πολλών γενών. Διευκρινίζεται ότι η εξειδίκευση δεν αναφέρεται μόνο στο σχηματισμό φυματίων αλλά και στην ικανότητα αυτών να είναι ενεργά (να αζωτοδεσμεύουν). Επιπλέον μέσα σε κάθε είδος ριζοβίου τα διάφορα στελέχη παρουσιάζουν διαφορετική αποτελεσματικότητα αζωτοδέσμευσης και μάλιστα αυτή η αποτελεσματικότητα των στελεχών εξαρτάται και από την ποικιλία του φυτού-ξενιστή με το οποίο συμβιώνουν (Caldwell and Vest, 1970; Papakosta 1989; Embalomatis 1994).

Η συμβίωση μεταξύ ψυχανθών και ριζοβίων προκύπτει από μία πολύπλοκη αμοιβαία επίδραση, που συνεπάγεται ανατομικές, μορφολογικές και βιοχημικές αλληλεπιδράσεις, οι οποίες οδηγούν στο σχηματισμό των φυματίων, όπου γίνεται η δέσμευση του αζώτου (Παπακώστα-Τασοπούλου 2005) .

Τα ριζόβια είναι σαπροφυτικά βακτήρια που ζουν ελεύθερα στο έδαφος. Ο πληθυσμός τους παραλλάσσει σημαντικά και εξαρτάται από πολλούς παράγοντες όπως τη δομή του εδάφους, την περιεκτικότητα σε υγρασία. Παρουσία του φυτού-ξενιστή, τα ριζόβια πολλαπλασιάζονται, μετακινούνται προς τη ριζόσφαιρα και αποικίζουν τα ριζικά τριχίδια. Τα ερεθίσματα γι' αυτή τη μετακίνηση δίνονται από διάφορες ουσίες όπως ζάχαρα, αμινοξέα, οργανικά οξέα και φλαβονοειδή, οι οποίες παράγονται από ειδικά γονίδια NOD και ENOD. Συγκεκριμένα, στα φυτά εκφράζονται τα γονίδια ENOD και στα βακτήρια τα γονίδια NOD. Τα γονίδια NOD κωδικοποιούν ειδικές πρωτεΐνες των φυτών, που λέγονται φυματίνες (nodulins). Τα γονίδια NOD των βακτηρίων κωδικοποιούν για ένζυμα βιοσύνθεσης των λεγόμενων παραγόντων NOD. Οι παράγοντες αυτοί είναι βιομόρια που δρουν ως δευτερογενή σήματα για τη μορφογενετική τροποποίηση του φυτού στο σημείο προσβολής, δηλαδή για τη δημιουργία των φυματίων. Μερικά γονίδια NOD είναι τα ίδια σε όλα τα βακτήρια (π.χ. NOD_{ABC}), ενώ άλλα είναι διαφορετικά(π.χ. NOD_D).

Οι παράγοντες NOD είναι ειδικά μόρια σηματοδότησης που συμμετέχουν στην οργανογένεση των φυματίων. Έχουν δομή λιποσακχαριτών και αποτελούνται από ένα σκελετό 3-6 μορίων γλυκοζαμίνης με διάφορους υποκαταστάτες στο

αναγωγικό άκρο και μια ακυλομάδα στο μη αναγωγικό άκρο (Γαλάτης et al., 2003). Η ακριβής χημική δομή του παράγοντα NOD που αναγνωρίζεται από το φυτό ποικίλει μεταξύ των βακτηριακών ειδών και αποτελεί τη βάση για την εξειδίκευση συμβιώτη-ξενιστή. Οι παράγοντες NOD αναγνωρίζονται από ειδικούς υποδοχείς-κινάσες, οι οποίοι περιέχουν τις λεγόμενες LysM- περιοχές στην εξωκυττάρια περιοχή τους. Οι 2 LysM (lysine motif) υποδοχείς-κινάσες (NFR1 and NFR5), που φαίνεται να σχηματίζουν τον υποδοχέα των παραγόντων NOD, απομονώθηκαν για 1^η φορά στο μοντέλο του ψυχανθούς *Lotus japonicas* το 2003, ενώ σήμερα έχουν απομονωθεί από μοντέλο σόγιας καθώς και από το *Medicago truncatula*. Ο NFR5 στερείται της κλασσικής φουρκέτας ενεργοποίησης στη περιοχή της κινάσης, ενώ το αντίστοιχο γονίδιο δε περιέχει εσόνια.

Η έκφραση του γονιδίου NOD επάγεται από τη παρουσία συγκεκριμένων φλαβονοειδών και μεταϊνών του εδάφους, τα οποία εκκρίνονται από το φυτό ώστε να προσελκύσουν τα βακτήρια (Zuanazzi J.A.S. et al., 1998). Αρχικά αυτές οι ουσίες εκκρίνονται από το περίβλημα του σπόρου (Phillips et al., 1995) και στη συνέχεια από τις ρίζες των ψυχανθών (Long, 1989) και επάγουν το σχηματισμό του παράγοντα NOD_D, ο οποίος διαδοχικά ενεργοποιεί άλλα γονίδια που σχετίζονται με την έκφραση των παραγόντων NOD και με την έκκρισή τους στο έδαφος. Αυτό επιτυγχάνεται επειδή όλα τα υπόλοιπα γονίδια NOD έχουν στον υποκινητή τους μια πολύ συντηρημένη περιοχή, που ονομάζεται «κουτί NOD», στην οποία προσδένεται ο NOD_D και ακολουθεί η έκφραση αυτών των γονιδίων, με αποτέλεσμα τη σύνθεση των βακτηριακών πρωτεϊνών NOD (nodulation proteins), που είναι τα ένζυμα που καταλύουν τις αντιδράσεις για τη σύνθεση των παραγόντων NOD.

Λίγα λεπτά μετά την 1^η επαφή των βακτηρίων με την επιδερμίδα των ριζών, οι παράγοντες NOD επάγουν τη δημιουργία παραμόρφωσης (κύρτωση) της ρίζας και συγχρόνως τα βακτήρια εκκρίνουν ένζυμα, τα οποία υδρολύουν τμήμα του κυτταρικού τοιχώματος του ριζικού τριχιδίου, προκαλώντας την είσοδο βακτηρίων στον αποπλάστη των επιδερμικών κυττάρων του τριχιδίου αυτού. Έτσι, δημιουργείται μια επιμήκης κατασκευή, όπου εγκλωβίζονται τα βακτήρια (Εικόνα E.2). Αυτή η κατασκευή ονομάζεται «κλωστή μόλυνσης ή επέλασης» και επιτρέπει την είσοδο των βακτηρίων στα ριζικά τριχίδια (Gage D.J., 2004, Γαλάτης et al., 2003). Το τελικό αποτέλεσμα είναι ο σχηματισμός του φυματίου, όπου σχηματίζεται το άζωτο. Οι

παράγοντες NOD δρουν μέσω επαγωγικών αλλαγών στην έκφραση των γονιδίων που κωδικοποιούν τις φυματίνες, τα οποία είναι αναγκαία για το σχηματισμό του φυματίου (Govers F., 1986).



Εικόνα E.2: Μια υποθετική αλληλουχία γεγονότων στην εξέλιξη του ενδοκυτταρικού αποικισμού των φυτών από βακτήρια. **Αανθασμένη επιμόλυνση:** εξωκυτταρικός αποικισμός των ριζών από βακτήρια. **Ιδανική πρόσληψη βακτηρίων:** ενδοκυτταρικός αποικισμός των ριζών από βακτήρια μέσω μιας υποτιθέμενης πρόσληψης, παρόμοια με αυτή των φαγοκυττάρων. **IT-εξαρτώμενος αποικισμός από βακτήρια:** αν και απεικονίζεται η επιμόλυνση μέσω των ριζικών τριχιδίων, το μοντέλο αυτό ενσωματώνει άλλες μορφές του IT-εξαρτώμενου αποικισμού, όπως η εξωκυτταρική 'ρωγή-είσοδος', η οποία ακολουθείται από το σχηματισμό *trans*-κυτταρικών ITs μέσα στο φλοιό της ρίζας (Held M. et al., 2010)

Ο τρόπος με τον οποίο τα ριζόβια εισέρχονται στα κύτταρα του φυτού-ξενιστή και γίνεται η μόλυνση, δεν είναι πλήρως γνωστός. Υπάρχει ένδειξη ότι τα ριζόβια εκλύουν ένζυμα, όπως πεπτινάσες, αμυλάσες κ.ά. τα οποία αποικοδομούν τα κυτταρικά τοιχώματα και επιτρέπουν την είσοδο των ριζοβίων. Στα ριζικά τριχίδια δημιουργούνται ειδικοί δίοδοι με τη μορφή σωλήνων που ονομάζονται μολυσματικό νημάτιο και μέσω αυτών τα βακτήρια περνούν στο εσωτερικό της ρίζας. Από το πρωτογενές μερίστωμα του φυματίου το οποίο έχει ήδη δημιουργηθεί, κατόπιν επανειλημμένων κυτταροδιαιρέσεων δημιουργείται ο ιστός του φυματίου. Τα μολυσματικά νημάτια διακλαδίζονται ανάμεσα στα κύτταρα του φυματίου και αυτό έχει ως αποτέλεσμα τη μόλυνση όλο και περισσότερων κυττάρων. Το τελευταίο στάδιο είναι η απελευθέρωση των ριζοβίων από τα μολυσματικά νημάτια μέσα στα κύτταρα του φυτού. Η μεμβράνη των μολυσματικών νημάτων σπάει σε μικρά κομμάτια και δημιουργούνται μικρές κυψελίδες οι οποίες περιέχουν 1-2 ριζόβια και έτσι μετά την απελευθέρωσή τους αυτά εξακολουθούν να περιβάλλονται από μεμβράνη. Μέσα στη μεμβράνη συνεχίζεται για λίγο ο πολλαπλασιασμός των ριζοβίων, τα οποία στη συνέχεια μεταμορφώνονται σε βακτηριοειδή. Αυτά διαφέρουν μορφολογικά από τα κύτταρα των ελευθέρων ζώντων ριζοβίων και μόνον αυτά έχουν

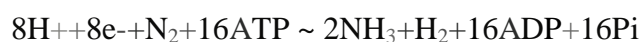
την ικανότητα να ανάγουν το ατμοσφαιρικό άζωτο σε αμμωνιακά ιόντα. Από το σύνολο των κυττάρων των φυματίων μόνο το 20-50% είναι μολυσμένα με ριζόβια και σ' αυτά γίνεται η αζωτοδέσμευση (Παπακώστα-Τασοπούλου 2005).

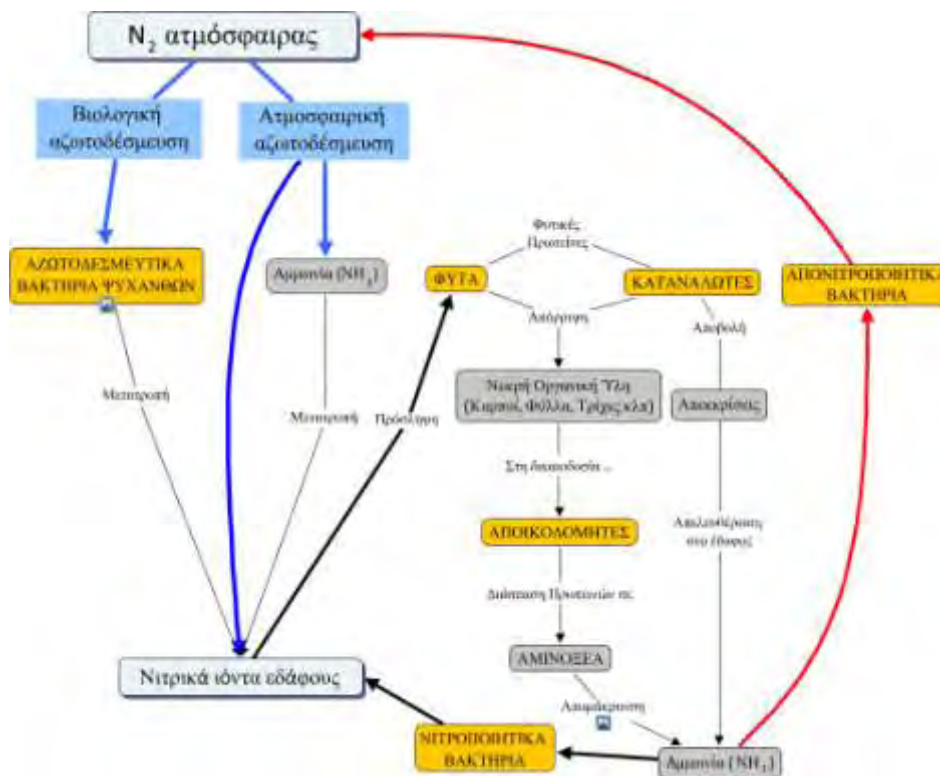
Στην πρωτεΐνη λεγγαιμογλοβίνη οφείλεται το κόκκινο χρώμα που παρουσιάζουν εσωτερικά τα φυμάτια. Εμφανίζεται από την αρχή σχεδόν της δημιουργίας των φυματίων και η παρουσία της είναι ένδειξη αζωτοδέσμευσης. Συνεπώς σε φυμάτια χωρίς κόκκινο χρώμα δε γίνεται αζωτοδέσμευση (Παπακώστα-Τασοπούλου 2005).

Αζωτοδέσμευση

Η αναγωγή του ατμοσφαιρικού αζώτου σε αμμωνία είναι μία πολύπλοκη βιοχημική διεργασία που απαιτεί την παρουσία ενός ισχυρού δότη ηλεκτρονίων και ένα σύστημα παραγωγής ενέργειας με τη μορφή του ATP. Απαραίτητη είναι δε η παρουσία του ενζύμου νιτρογενάση, το οποίο παράγεται στα βακτηριοειδή και καταλύει την αντίδραση της αζωτοδέσμευσης.

Η συνολική πορεία της αζωτοδέσμευσης παρουσιάζεται στην παρακάτω εξίσωση:





Εικόνα Ε.3: Ο κύκλος του αζώτου (<http://cmapspublic2.ihmc.us/rid=1GS85MQS0-JPCWBY-GPN/null>).

Η νιτρογενάση είναι ένα ενζυμικό σύμπλοκο που αποτελείται από δύο πρωτεϊνικά μόρια, η συνεργασία των οποίων είναι απαραίτητη για την αναγωγή του αζώτου. Είναι υπερευαίσθητη στο οξυγόνο και προστατεύεται στα φυμάτια από την λεγγαιμογλοβίνη που περιβάλλει τα βακτηριοειδή, όπως αναφέρθηκε προηγουμένως. Για τη σύνθεση της νιτρογενάσης είναι υπεύθυνα πολλά γονίδια, τα οποία βρίσκονται συγκεντρωμένα σε ένα μεγάλο πλασμίδιο του βακτηριοειδούς και εκφράζονται μόνο σε ειδικές συνθήκες.

Η ενέργεια που χρειάζεται για την αναγωγή εξασφαλίζεται από τα προϊόντα φωτοσύνθεσης του φυτού-ξενιστή μέρος των οποίων μεταφέρεται στις ρίζες και τα φυμάτια. Το ATP παράγεται μέσα στα βακτηριοειδή με την οξείδωση (λόγω αναπνοής των βακτηριοειδών) μέρους των μεταφερομένων στα φυμάτια προϊόντων φωτοσύνθεσης. Τα απαιτούμενα ηλεκτρόνια προέρχονται από ένα σύστημα παροχής ηλεκτρονίων στο οποίο συμμετέχει η φερρεδοξίνη, η οποία απαντάται στα βακτηριοειδή. Για τη σύνθεση της φερρεδοξίνης χρησιμοποιούνται προϊόντα φωτοσύνθεσης του φυτού-ξενιστή (Παπακώστα-Τασοπούλου 2005).

Τελικό αποτέλεσμα του συμβιωτικού συστήματος δέσμευσης του αζώτου είναι η δέσμευση του αζώτου από τα ριζόβια και η εξαγωγή των προϊόντων της δέσμευσης στο φυτό-ξενιστή και σε μικρότερη κλίμακα στο περιβάλλον. Το αναχθέν άζωτο στα βακτηριοειδή περνά στο κυτόπλασμα των κυττάρων και με τη βοήθεια διαφόρων ενζυματικών συστημάτων του φυτού-ξενιστή μετατρέπεται σε αζωτούχες ουσίες, οι οποίες από τα φυμάτια μεταφέρονται σε άλλα μέρη του φυτού. Σε αντάλλαγμα τα φυτά προσφέρουν υδατάνθρακες στα ριζόβια. Κατά την είσοδο των ριζοβίων στη ρίζα και πριν εγκατασταθεί το σύστημα της αζωτοδέσμευσης η σχέση του ριζοβίου με το φυτό είναι καθ' ολοκληρία παρασιτική και για το λόγο αυτό μερικές φορές παρατηρείται καθυστέρηση στην πρώτη ανάπτυξη των φυτών-ξενιστών και κάποια χλώρωση λόγω ανταγωνισμού για το άζωτο μεταξύ φυτού-ξενιστή και ριζοβίων (Παπακώστα-Τασοπούλου 2005) .

Διάφοροι μορφολογικοί τύποι και μεγέθη φυματίων έχουν καταγραφεί στα ψυχανθή και τοποθετούνται σε δύο κατηγορίες: τα καθορισμένα, τα οποία είναι σφαιρικά και έχουν πεπερασμένη ανάπτυξη και τα μη καθορισμένα, που είναι επιμήκη που παρουσιάζουν συνεχή ανάπτυξη (Εικόνα Ε.4).



Εικόνα Ε.4: Επιμήκη φυμάτια σε ρίζες ψυχανθούς
(http://biology.unm.edu/ccouncil/Biology_203/Summaries/Monera.htm)

Το είδος των φυματίων εξαρτάται από το είδος του μεριστώματος που τα δημιουργεί. Εάν στο μερίστωμα σταματήσει νωρίς η κυτταροδιαίρεση, τα φυμάτια παίρνουν σφαιρική μορφή, εάν όμως το μερίστωμα είναι ενεργό για μεγάλο χρονικό

διάστημα τα φυμάτια γίνονται επιμήκη.

Διαφορές μεταξύ των ειδών των ψυχανθών παρατηρούνται και ως προς την κατανομή των φυματίων στο ριζικό σύστημα. Μελέτες έχουν δείξει καθαρά ότι ο τύπος των παραγόμενων φυματίων καθορίζεται από το φυτό ξενιστή και όχι από τα ριζόβια. Στη σόγια για παράδειγμα τα φυμάτια έχουν σχήμα σφαιρικό και είναι μεγάλα, στην αραχίδα στρογγυλό σιαμαίο, στο βίκο επίμηκες, στη μηδική είναι διχαλωτά και μικρά.

Ο αριθμός των φυματίων που σχηματίζονται εξαρτάται τόσο από το γενότυπο του φυτού και του ριζοβίου όσο και από τις συνθήκες του περιβάλλοντος. Η ποσότητα του αζώτου που δεσμεύεται δεν είναι ανάλογη του αριθμού των σχηματιζόμενων φυματίων, γιατί σημαντικό ρόλο στην αζωτοδέσμευση παίζει και η δραστηριότητα των φυματίων. Πάντως ένας ελάχιστος αριθμός φυματίων, που είναι διαφορετικός για κάθε είδος φυτού, είναι απαραίτητος για τη μέγιστη αζωτοδέσμευση (Παπακώστα-Τασοπούλου 2005).

Μυκόρριζες

Ο όρος μυκόρριζα χαρακτηρίζει μία συμβίωση μεταξύ φυτών και μυκήτων και χρησιμοποιείται για να περιγράψει τις ιδιαίτερα αλληλοεξαρτώμενες σχέσεις, στις οποίες σε γενικές γραμμές ο μύκητας παρέχει στα φυτά-ξενιστές ανόργανα συστατικά (φώσφορο, άζωτο) καθώς και πιο πολύπλοκες οργανικές ενώσεις που συνθέτει ο ίδιος (φυτορμόνες) και σε αντάλλαγμα παίρνει από τα φυτά υδατάνθρακες (Harley and Smith, 1983). Στις συμβιώσεις αυτές, αλληλεπιδρούν τα φυτά- ξενιστές, οι συμβιωτικοί μύκητες και οι εδαφολογικοί παράγοντες. Ο μύκητας δηλαδή αποτελεί ένα είδος μεσάζοντα μεταξύ φυτού και εδάφους.

Ο ρόλος των μυκορριζών

Οι μυκόρριζες τροφοδοτούν τα φυτά με ανόργανες ύλες από το έδαφος, οι οποίες σε διαφορετική περίπτωση δε θα είχαν προσληφθεί. Η ευεργετική επίδραση των μυκορριζών στο φυτό, οφείλεται στην καλύτερη θρέψη του, κυρίως με θρεπτικά

στοιχεία που παρουσιάζουν την μικρότερη κινητικότητα στο έδαφος, όπως είναι ο φωσφόρος, ο ψευδάργυρος και ο χαλκός αλλά και εν μέρει το άζωτο (Fitter 1990; Marschner and Dell, 1994; Newsham *et al.*, 1995b; Mathur and Vyas, 2000; Chen *et al.*, 2003). Συγκεκριμένα οι μυκόρριζες καλύπτουν μέχρι και το 80 % των απαιτήσεων του φυτού σε φώσφορο (Marschner and Dell, 1994). Η αποτελεσματικότητα των μυκορριζών έγκειται στο ότι αυξάνεται κατά πολύ η απορροφητική επιφάνεια των ριζών με αποτέλεσμα την εκμετάλλευση πολύ μεγαλύτερου όγκου εδάφους σε σχέση με αυτόν που εκμεταλλεύονται μόνες τους οι ρίζες του φυτού. Με αυτόν τον τρόπο οι μυκόρριζες αυξάνουν την πρόσληψη θρεπτικών στοιχείων και νερού από το έδαφος βελτιώνοντας έτσι την αύξηση και ανάπτυξη του φυτού.

Με την χρησιμοποίηση των μυκορριζών, τα φυτά μπορούν να αναπτυχθούν σε συνθήκες χαμηλής υγρασίας του εδάφους, που διαφορετικά δεν θα ήταν δυνατόν να ανταπεξέλθουν στην ξηρασία (Chen *et al.*, 2003), καθώς το δίκτυο των ιστών του μύκητα συγκρατεί το έδαφος με τέτοιο τρόπο, ώστε να εξασφαλίζει περισσότερη υγρασία. Επιπλέον, οι μυκόρριζες βελτιώνουν τη δομή του εδάφους και το πορώδες του, δημιουργώντας έτσι ευνοϊκές συνθήκες για την ανάπτυξη του ριζικού συστήματος των φυτών (Smith and Read, 1997).

Η καλύτερη αποτελεσματικότητα του ριζικού συστήματος που έχει εμβολιασθεί με μυκόρριζα, σε σχέση με το ριζικό σύστημα που δεν έχει εμβολιασθεί, οφείλεται επίσης και στην καλύτερη σχέση ριζών : εναέρια μέρη του φυτού.

Έχει ερευνηθεί ότι σε ένα φυτό, η εγκατάσταση των μυκορριζών στις ρίζες δίνει την δυνατότητα στο φυτό αυτό να αυξήσει την ξηρά του ουσία κατά 3 έως 4 φορές και επομένως να βελτιώσει την αποτελεσματικότητα του ριζικού συστήματος με συνέπεια την μεγάλη ευρωστία των φυτών αλλά και τις αυξημένες αποδόσεις τους σε καρπούς (http://www.superfoods.gr/holistic_life/2010/08).

Τα φυτά από την πλευρά τους, ως ανταπόδοση όλων αυτών των απολαβών, δίνουν στις μυκόρριζες τις οργανικές ουσίες της φωτοσύνθεσης τις οποίες οι μύκητες δεν μπορούν να δημιουργήσουν και τις οποίες έχουν ανάγκη (Smith and Read, 1997). Δηλαδή παρέχουν στους μύκητες τις αναγκαίες ποσότητες φωτοσυνθετικά παραγόμενου άνθρακα. Η συμβίωση με τις μυκόρριζες παίζει επίσης σημαντικό ρόλο στη σύνθεση σύνθετων ουσιών όπως είναι οι βιταμίνες και οι αυξητικοί παράγοντες (φυτορμόνες).

Η αύξηση των μυκορριζών επηρεάζεται από τις επικρατούσες συνθήκες. Έτσι

μερικοί τύποι μυκορριζών προτιμούν pH 5-6, ενώ άλλα μυκόρριζες προτιμούν pH 7-8 (*Glomus mosseae*, *G.gerdemanni* και *G.macrocarpus*). Η άριστη θερμοκρασία για τις περισσότερες μυκόρριζες είναι μεταξύ 20-30°C. Συγκέντρωση CO₂ μεγαλύτερη από 1% και αλατότητα ανέστειλαν την ανάπτυξη των μυκορριζών. Επίσης υψηλή συγκέντρωση διαλυτού P ή NO₃ στο έδαφος, ή υψηλή εδαφική υγρασία αναστέλλουν την εξέλιξη και δραστηριότητα των μυκορριζών (Θερίος 2005).

Κατηγορίες μυκορριζών

Έχουν αναγνωριστεί διαφορετικοί τύποι μυκορριζικών αποικιών με βάση τη μορφολογία τους, στους οποίους περιλαμβάνονται διαφορετικές ομάδες μυκήτων και φυτών- ξενιστών (Smith and Read, 1997). Τελικώς, οι μυκόρριζες διακρίνονται σε *εκτομυκόρριζες* και *ενδομυκόρριζες* (Read 1991).

Εκτομυκόρριζες

Οι εκτομυκόρριζες απαντώνται σε δασικά είδη, από θάμνους μέχρι δένδρα και σχηματίζονται κυρίως από τη συμβίωση βασιδιομυκήτων ή ασκομυκήτων με τις ρίζες και τα ριζικά τριχίδια των φυτών. Πολλά από τα φυτά - ξενιστές ανήκουν στις οικογένειες *Pinaceae*, *Fagaceae*, *Betulaceae*, και *Myrtaceae*. Πάνω από 4000 είδη μυκήτων, που ανήκουν κυρίως στους βασιδιομύκητες, και λιγότερο στους ασκομύκητες, είναι γνωστό ότι σχηματίζουν εκτομυκόρριζες (Smith and Read, 1997). Ο μύκητας σχηματίζει ένα επιθήλιο γύρω από τη ρίζα, ένα δίκτυο υφών μεταξύ των κυττάρων του φλοιού της ρίζας και ένα εκτεταμένο μυκήλιο στο έδαφος. Το φυτό εξασφαλίζει από αυτή τη συμβίωση οργανικό άζωτο και οργανικό φώσφορο, ενώ είναι καθοριστικός ο ρόλος της εκτομυκόρριζας στην επιτυχημένη εγκατάσταση δενδρυλλίων (Wallander 2000).

Ενδοτροφικές Μυκόρριζες ή Ενδομυκόρριζες

Η ενδομυκόρριζα είναι ο πιο διαδεδομένος τύπος μυκόρριζας, αφού

απαντάται στα δύο τρίτα τουλάχιστον των χερσαίων φυτών. Σε αντίθεση με την εκτομυκόρριζα, η ενδομυκόρριζα δεν σχηματίζει τον τυπικό μανδύα γύρω από τα ριζίδια, αλλά οι υφές της εισέρχονται όχι μόνο μεταξύ των κυττάρων των ριζιδίων αλλά και μέσα σε αυτά και επιπλέον δεν προκαλεί σημαντική διόγκωση των κυττάρων των ριζικών τριχιδίων ή χαρακτηριστικές ανατομικές μεταβολές στις ρίζες. Οι ενδομυκόρριζες ταξινομούνται σε τρεις κατηγορίες:

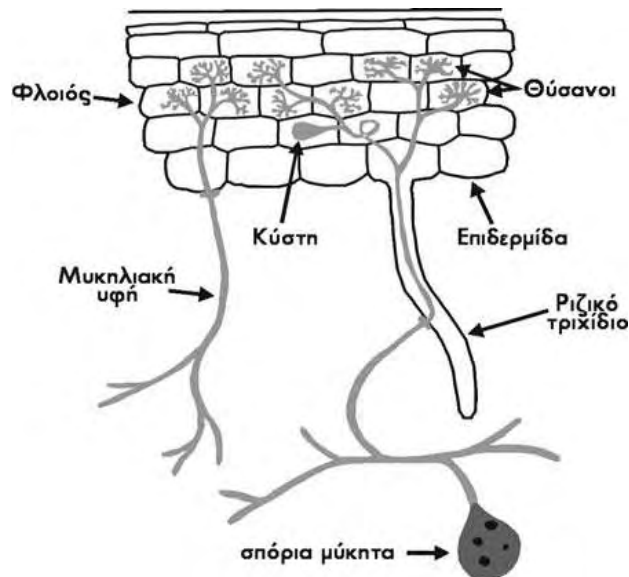
- ✓ Ενδομυκόρριζες που σχηματίζονται μεταξύ φυτικών ειδών της τάξης *Ericales* και βασιδιομύκητες ή ασκομύκητες και θεωρείται εξειδικευμένος τύπος μυκορριζών. Οι βασιδιομύκητες σχηματίζουν μυκόρριζες με φυτά της οικογένειας *Monotropaceae* ενώ οι ασκομύκητες με φυτά της οικογένειας *Ericaceae*.
- ✓ Ενδομυκόρριζες που σχηματίζονται μεταξύ φυτικών ειδών της οικογένειας *Orchidaceae* και βασιδιομυκήτων και αποτελούν έναν επίσης εξειδικευμένο μυκορριζικό τύπο και
- ✓ Τις κυστοειδείς - δένδροειδείς ή θυσσανώδεις μυκόρριζες που στη διεθνή βιβλιογραφία αναφέρονται ως Arbuscular Mycorrhizal Fungi (AMF) που είναι ο πλέον κοινός τύπος μυκορριζών.

Θυσσανώδεις Μυκόρριζες

Οι μύκητες που σχηματίζουν θυσσανώδεις μυκόρριζες ανήκουν στο φύλο *Glomeromycota* (Schüßler *et al.*, 2001; Walker and Schüßler, 2004). Το φύλο *Glomeromycota* έχει πολύ υψηλή γενετική ποικιλότητα και πλέον έχει γίνει γνωστό πως κάποια είδη μυκορριζών έχουν αναπτύξει εξειδικευμένες σχέσεις με φυτικά είδη. Μεταξύ των φυτών που σχηματίζουν θυσσανώδεις μυκόρριζες περιλαμβάνονται αγγειόσπερμα, γυμνόσπερμα και πτεριδόφυτα που έχουν όλα πραγματικές ρίζες και γαμετόφυτα τα οποία δεν έχουν. Λίγα φυτά δεν σχηματίζουν θυσσανώδεις μυκόρριζες, μεταξύ των οποίων φυτά των οικογενειών *Brassicaceae*, *Polygonaceae*, *Caryophyllaceae* και *Juncaceae* (Smith and Read, 1997).

Οι θυσσανώδεις μυκόρριζες (Ορφανουδάκης 2002), έχουν την ιδιότητα να σχηματίζουν θυσσάνους (arbuscules, Εικόνα Ε.3) μέσα στα κύτταρα του φυτού με το οποίο και συμβιώνουν. Ο θύσσανος είναι μια λεπτεπίλεπτη δομή με διακλαδιζόμενες υφές, που αναπτύσσονται στο τοίχωμα των κυττάρων του φλοιού της ρίζας. Έχει την ικανότητα να διαπερνά την πλασματική μεμβράνη

(πλασμαλήμμα) του κυττάρου, δημιουργώντας μια μεγάλης επιφάνεια επαφής μεταξύ φυτού και μύκητα. Είναι σχεδόν βέβαιο ότι τα φωσφορικά ιόντα κινούνται από τον μύκητα προς το φυτό δια μέσου αυτής της μεμβράνης, ενώ ο μύκητας προσπορίζεται υδατάνθρακες από το φυτό (Smith *et al.*, 2001).



Εικόνα E.3: Μορφή και δικτύωση της θυσσανώδους (AMF) μυκόρριζας (Lambers *et al.*, 1998).

Η συνεισφορά των θυσσανωδών μυκόρριζών στα φυτά – ξενιστές είναι πολυποίκιλη (Newsham *et al.*, 1995) και δεν περιορίζεται στην αποτελεσματικότερη πρόσληψη του φωσφόρου από το σύστημα φυτού – θυσσανώδους μυκόρριζας, και ως συνέπεια αυτού, στη μεγαλύτερη αύξηση των φυτών σε εδάφη με ανεπάρκεια διαθέσιμου φωσφόρου (Howeler *et al.*, 1983, 1987; Janos 1988). Οι θυσσανώδεις μυκόρριζες επίσης στερεοποιούν πιο αποτελεσματικά τις ρίζες στο έδαφος (Fitter 2005), συμβάλλουν στην αποτελεσματικότερη πρόσληψη και άλλων θρεπτικών στοιχείων πέραν του φωσφόρου (Hodge *et al.*, 2001), συμβάλλουν σε αποτελεσματικότερη χρησιμοποίηση του νερού από τα φυτά (Augé 2001), προστατεύουν τα φυτά από παθογόνα, παρεμποδίζουν τη απορρόφηση τοξικών στοιχείων από τα φυτά (Fitter 2005; Janouskova *et al.*, 2005). Εκτός από τις ωφέλειες που παρέχουν σε φυτά, οι θυσσανώδεις μυκόρριζες συμβάλλουν και στην αποσάθρωση μητρικών πετρωμάτων (Blum *et al.*, 2002; Fitter 2005; Hoffland *et al.*, 2004).

Υπολογίζεται ότι πάνω από τα 2/3 όλων των φυτικών ειδών, συμπεριλαμβανομένων και των μη ξυλωδών ειδών, αλλά και των τροπικών δέντρων, εμφανίζουν τη συμβίωση αυτή (Morton and Benny, 1990; Newsham *et al.*, 1995b). Είναι ο αρχαιότερος και ο πιο διαδεδομένος τύπος μυκόρριζας (Smith and Read, 1997).

Ο θυσσανώδης μύκητας *Glomus intraradices*

Ένας από τους πιο γνωστούς θυσσανώδεις μύκητες του γένους *Glomus* είναι ο *Glomus intraradices*. Ο συγκεκριμένος μύκητας, έχει χρησιμοποιηθεί ευρέως στην γεωργία και κηπουρική. Επίσης έχει χρησιμοποιηθεί σε πολλές επιστημονικές μελέτες λόγω της δημιουργίας μυκόρριζας που συμβάλλει στην βελτίωση του εδάφους. Ο *Glomus intraradices* αποικεί νωρίτερα το φυτό από τους άλλους μύκητες του γένους *Glomus*. Επίσης δημιουργεί μεγαλύτερο δίκτυο υφών και αλληλεπιδρά πιο έντονα με τα φυτά ξενιστές του. Σύμφωνα με μελέτες, ο μύκητας αυτός, λόγω του μεγάλου δικτύου υφών που δημιουργεί, φαίνεται να βοηθά στη βελτίωση του εδάφους καθώς και στη μεγαλύτερη πρόσληψη φωσφόρου από το φυτό. Συγκεκριμένα έχει αποδειχθεί ότι είναι από τους λίγους θυσσανώδεις μύκητες που μπορούν να ελέγξουν την πρόσληψη θρεπτικών και φωσφόρου ανάλογα με τις ποσότητες που υπάρχουν στο έδαφος.

Πρόσληψη φωσφόρου

Το μεγαλύτερο και πιο σημαντικό όφελος που αποκομίζουν τα φυτά από την συμβίωσή τους με τις μυκόρριζες είναι αυξημένη απορρόφηση φωσφόρου, ιδιαίτερα στις περιπτώσεις όπου ο αποικισμός από θυσσανώδεις μυκόρριζες είναι υψηλός και ο φώσφορος στο έδαφος αποτελεί περιοριστικό παράγοντα. (Harrier and Watson, 2003). Από την άλλη μεριά, η ύπαρξη ή προσθήκη σημαντικών ποσοτήτων διαθέσιμου φωσφόρου στα φυτά περιορίζει σημαντικά ή αναστέλλει πλήρως τον αποικισμό των φυτών από θυσσανώδεις μυκόρριζες (Toro *et al.*, 1997).

Πλήθος ερευνών έχουν δείξει ότι τα μυκορριζικά φυτά μπορούν να προσλάβουν περισσότερο φώσφορο συγκριτικά με τα μη μυκορριζικά φυτά, ιδιαίτερα στις περιπτώσεις όπου ο φώσφορος προστίθεται σε μορφή μη άμεσα διαθέσιμη, όπως

είναι ο φωσφορίτης (Joner 2000), σε εδάφη με μικρή διαθεσιμότητα φωσφόρου (Koide 1985) ή σε περιπτώσεις όπου η συγκέντρωση του διαθέσιμου φωσφόρου στο έδαφος δεν είναι απαγορευτικές για την ανάπτυξη των μυκορριζών (Schröder and Janos, 2004). Αυτό συμβαίνει επειδή οι μυκηλιακές υφές διεισδύουν σε μεγαλύτερα βάθη εδάφους από αυτά που μπορούν να φτάσουν οι ίδιες οι ρίζες του φυτού (Sanders and Tinker, 1971).

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

Αξίζει να τονισθεί, πως προσθήκες στο έδαφος αζώτου αναμένεται να καταστήσουν την αύξηση των φυτών περισσότερο εξαρτημένη από την περιοριστικότητα του φωσφόρου και να ευνοήσουν ακόμη περισσότερο τον αποικισμό με θυссανώδεις μυκορριζες. Ενδέχεται επίσης και η άρδευση του εδάφους να καθιστά πιο περιοριστικό τον φώσφορο του εδάφους, παρά το γεγονός ότι η αύξηση της υγρασίας του εδάφους συντελεί σε αύξηση της διαθεσιμότητας του φωσφόρου (Augé 2001).

Άλλες ωφέλειες των θυссανωδών μυκορριζών

Σήμερα, υπάρχουν όλο και περισσότερες μαρτυρίες ότι οι μυκορριζικοί μύκητες εμπλέκονται στην πρόσληψη και μεταφορά ανόργανου αζώτου. Έχει βρεθεί ότι οι θυссανώδεις μυκορριζες μπορούν να προσλαμβάνουν και να μεταφέρουν το άζωτο στο φυτό (Raven *et al.*, 1978; Ames *et al.*, 1983; Bago *et al.*, 1996; Mader *et al.*, 2000). Ο μηχανισμός που εμφανίζεται είναι ο ίδιος με αυτόν που εκδηλώνεται κατά την πρόσληψη του φωσφόρου και σχετίζεται με την μεταφορά των στοιχείων από το έδαφος στο φυτό, μέσω των υφών του μύκητα.

Έχει αποδειχτεί επίσης, ότι οι υφές των θυссανωδών μυκορριζών προσλαμβάνουν και μεταφέρουν αμμωνιακά ιόντα (Ames *et al.*, 1983; Johansen *et al.*,

1992; Frey and Schüepp, 1993; Johansen *et al.*, 1993), νιτρικά (Johansen *et al.*, 1993; Tobar *et al.*, 1994; Bago *et al.*, 1996), αλλά και οργανικές ενώσεις αζώτου (Ames *et al.*, 1983; Hawkins *et al.*, 2000; Hodge *et al.*, 2001).

Επιπλέον, έχει αποδειχθεί ότι η συμβίωση μπορεί να επηρεάσει και άμεσα τις υδατικές σχέσεις του φυτού - ξενιστή. Συγκεκριμένα, η συμβίωση φυτών με μυκορριζικούς μύκητες βρέθηκε να συμβάλλει στην πρόσληψη εδαφικού νερού - μέσω των υφών που αναπτύσσει ο μύκητας (Hardie and Leyton, 1981; Allen 1982; Augé 2001) και στο πιο αποτελεσματικό "φιλτράρισμα" του (Hardie and Leyton, 1981; Sieverding 1981). Επίσης, υπάρχουν διάφορες ενδείξεις ότι η μεταφορά νερού που πραγματοποιείται μέσω των υφών των μυκορριζών καθιστά τα φυτά πιο ανθεκτικά στην ξηρασία και καθυστερεί τον μαρασμό σε περίπτωση υδατικής καταπόνησης (Augé and Duan, 1991).

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

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

ΣΚΟΠΟΣ

Σκοπός της εργασίας αυτής ήταν να εξετασθεί σε πείραμα αγρού η επίδραση της προσθήκης δενδροειδών - θυσσανωδών μυκορριζικών στελεχών στην ανάπτυξη των φυτών βίκου σε σύγκριση με την αντίστοιχη προσθήκη λιπάσματος. Επειδή αναφερόμαστε σε χορτοδοτική καλλιέργεια, η ανάπτυξη ουσιαστικά αποδεικνύεται από την υψηλότερη παραγωγή φυτομάζας.

Στα πλαίσια της διερεύνησης των παραγόντων που πιθανώς να επιδρούν στην τελική παραγωγή φυτομάζας, μελετήθηκε:

(α) ο βαθμός αποικισμού των φυτών από το στέλεχος *Glomus intraradices*, το οποίο αποτέλεσε το μυκορριζικό εμβόλιο σε σχέση με τους ενδογενείς μύκητες, υπό συνθήκες παρουσίας ή απουσίας βασικής λίπανσης,

(β) ο βαθμός επίδρασης του μυκορριζικού εμβολίου στην ανάπτυξη των συμβιωτικών βακτηρίων των ψυχανθών (ριζόβια),

(γ) η επίδραση της προσθήκης μυκορριζικού εμβολίου στα επίπεδα συγκέντρωσης φωσφόρου και καλίου στο υπέργειο και στο ριζικό τμήμα του βίκου αντίστοιχα, σε σχέση με την προσθήκη ή μη λιπάσματος.

Συμπληρωματικά η επίδραση της βασικής λίπανσης και η απουσία λίπανσης στο μέγεθος του αποικισμού.

Αξίζει να σημειωθεί πως το αγροτεμάχιο που πραγματοποιήθηκε το πείραμα παρουσίαζε παραλλακτικότητα κατά το ήμισυ, εξαιτίας της προηγούμενης καλλιέργειας (μηδική) και του αναμενόμενου εμπλουτισμού του με *Rhizobium* (ριζόβια). Συνεπώς, η ενδεχομένως υψηλότερη συγκέντρωση του εδάφους σε άζωτο, θα επηρέαζε την ανάπτυξη του βίκου και έπρεπε να ληφθεί σοβαρά υπ όψιν αποτελώντας μια επιπλέον μεταχείριση.

ΥΛΙΚΑ & ΜΕΘΟΔΟΙ

Πείραμα αγρού

Το πείραμα έλαβε χώρα σε αγροτεμάχιο έκτασης περίπου 5,5 στρ, το οποίο βρίσκεται στην κοινότητα Λυγαριάς του Δήμου Λαμιέων, στο νομό Φθιώτιδος και είναι ιδιοκτησίας του μεταπτυχιακού φοιτητή Κούτρα Παναγιώτη.

Το αγροτεμάχιο έχει σχήμα ορθογωνίου παραλληλογράμμου, με μήκος 150 m και πλάτος 35 m περίπου (Εικόνα Μ.5). Ο συγκεκριμένος πειραματικός αγρός παρουσιάζει υψηλές κλίσεις και μεγάλες υψομετρικές διαφορές και γι' αυτό: 1) λόγω της πιθανής έκπλυσης του λιπάσματος σε γραμμές σποράς που η παρουσία του θα ήταν επιζήμια για το πείραμα και 2) λόγω του γεγονότος ότι η σπορά σε ένα έδαφος με κλίσεις έως 60 % και υψομετρικές διαφορές έως 2 m δεν θα μπορούσε να είναι ακριβής, με αποτέλεσμα να επικαλύπτονται σε κάποια σημεία οι γραμμές σποράς και να αλλοιώνεται το πείραμα, παρά τον καλύτερο δυνατό χειρισμό του γεωργικού ελκυστήρα, οι γραμμές σποράς (ζώνες) είχαν αρκετά μεγάλη απόσταση, περίπου 1.20 m.

Για τους παραπάνω λόγους, μετρήθηκαν (10 συνολικά) και οριοθετήθηκαν οι ζώνες σποράς ($150\text{ m} \cdot 2.20\text{ m} =$ μήκος αγροτεμαχίου-πλάτος σπαρτικής μηχανής) και οι αποστάσεις μεταξύ των ζωνών (1.20 m) κατά μήκος του χωραφιού και τοποθετήθηκαν πάσσαλοι στα αντίστοιχα σημεία [Εικόνα Μ.1(α)].



Εικόνα Μ.1: (α) Οριοθέτηση ζωνών σποράς (β) Σπαρτική μηχανή σιτηρών-ψυχανθών

Στις συνολικά δέκα (10) γραμμές σποράς (ζώνες), αντιστοιχούν: τέσσερις (4) γραμμές σποράς για σπορά βίκου που θα εμπλουτιζόταν με μυκορριζικό εμβόλιο,

επίσης τέσσερις (4) για σπορά βίκου χωρίς πρόσθετα (καθαρός σπόρος) και τέλος δύο (2) γραμμές σποράς για σπορά σπόρων βίκου μαζί με συγκεκριμένη ποσότητα λιπάσματος. Η διάταξη των ζωνών σποράς κατά μήκος του χωραφιού φαίνεται στην Εικόνα Μ.5 .

Η προηγούμενη καλλιέργεια σε όλη την έκταση του αγροτεμαχίου ήταν σκληρό σιτάρι (ποικιλίας SIMETO) που συγκομίστηκε το πρώτο δεκαήμερο του μηνός Ιουνίου. Για την προετοιμασία του εδάφους για σπορά ενσωματώθηκαν με βαθύ όργωμα τα φυτικά υπολείμματα της προηγούμενης καλλιέργειας στα μέσα Σεπτέμβρη και ακολούθησε κατεργασία του εδάφους με καλλιεργητές βαρέως και ελαφριού τύπου αντίστοιχα στο διάστημα που ακολούθησε. Το έδαφος με αυτόν τον τρόπο ψιλοχωματίστηκε όσο απαιτούνταν για τη σπορά του βίκου.

Όσον αφορά τις προηγούμενες καλλιέργειες, αξίζει να σημειωθεί ότι το μισό περίπου της έκτασης των 5.5 στρ, καλλιεργήθηκε προ τριετίας με ψυχανθές, συγκεκριμένα με μηδική, με αποτέλεσμα ο εμπλουτισμός του με τα βακτήρια του είδους *Rhizobium* (ριζόβια) να αποτελεί έναν επιπλέον υπολογίσιμο παράγοντα διερεύνησης με βάση όσα αναφέρονται στη διεθνή βιβλιογραφία για την αλληλεπίδραση μυκορριζών και ριζοβίων. Για να είναι τα αποτελέσματα του πειράματος πιο ακριβή, στο αγροτεμάχιο θα πραγματοποιούνταν κανονικά η σπορά κατά μήκος του χωραφιού και στη συνέχεια θα χωριζόταν κατά το πλάτος του (καθέτως) στη μέση (Εικόνα Μ.5). Έτσι ο αριθμός των δειγμάτων διπλασιάστηκε από δέκα (10) αρχικά σε είκοσι (20). Το υπόλοιπο τμήμα του αγροτεμαχίου (περίπου 2.8 στρ) καλλιεργούνταν με σιτηρά την τελευταία πενταετία και δε θα επηρέαζε την πορεία του πειράματος.

Καλλιέργεια και ανάπτυξη των φυτών

Η σπορά του πειραματικού αγρού πραγματοποιήθηκε στις 9 Δεκέμβρη 2010. Σπάρθηκαν συνολικά 3.3 στρ και χρησιμοποιήθηκαν 66 kg σπόρου, 20 kg σπόρου/στρ. Συγκεκριμένα σπάρθηκαν:

- ✓ $4 \times (150 \text{ m} \times 2.20 \text{ m}) = 4 \times 330 \text{ m}^2 = 1320 \text{ m}^2$ με 26,4 kg σπόρου βίκου που είχε εμπλουτιστεί με μυκορριζικό εμβόλιο,

- ✓ $4 \times (150 \text{ m} \times 2.20 \text{ m}) = 4 \times 330 \text{ m}^2 = 1320 \text{ m}^2$ με 26,4 kg καθαρό σπόρο βίκου χωρίς πρόσθετα,
- ✓ $2 \times (150 \text{ m} \times 2.20 \text{ m}) = 2 \times 330 \text{ m}^2 = 660 \text{ m}^2$ με 13,2 kg σπόρου αναμειγμένο με λίπασμα στην προβλεπόμενη αναλογία,
και το υπόλοιπο τμήμα του χωραφιού (2.2 στρ) έμεινε ως γυμνό έδαφος.

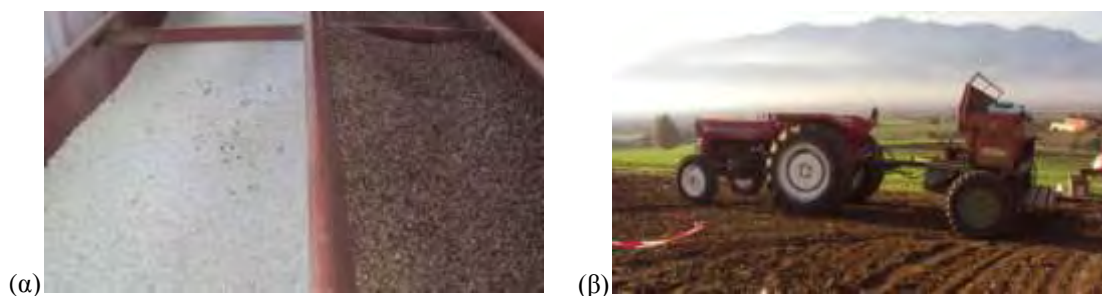
Αρχικά ζυγίστηκαν 26,4 kg σπόρου από τη συνολική ποσότητα των 66 kg, τοποθετήθηκαν στη σπαρτική μηχανή και έγινε σπορά των πρώτων τεσσάρων (4) ζωνών με καθαρό σπόρο βίκου, χωρίς να έχουμε προσθέσει ούτε μυκορριζικό εμβόλιο, αλλά ούτε και λίπασμα. Με την ολοκλήρωση της σποράς των συγκεκριμένων γραμμών, ακολούθησε η σπορά των τεσσάρων (4) γραμμών σποράς που θα εμπλουτιζόντουσαν με το μυκορριζικό εμβόλιο. Ο τύπος μυκορριζικού εμβολίου που χρησιμοποιήθηκε ήταν οι θυσσανώδεις μυκόρριζες (AMF) *Glomus intraradices* της εταιρίας MYCOSYM TRI-TON. Για τη σπορά των 1320 m² χρησιμοποιήθηκαν συνολικά 7.5 kg μυκορριζικού εμβολίου από 5 συσκευασίες σε μορφή τσάντας, των 1.5 kg η κάθε μια [Εικόνα Μ.2(α)]. Τα 7.5 kg μυκορριζικού εμβολίου μαζί με τα υπόλοιπα 26,4 kg του σπόρου (δηλαδή συνολικά 33.9 kg) τοποθετήθηκαν σε πλαστικό δοχείο (κουβά) και έγινε ανάμειξη με το χέρι [Εικόνα Μ.2(β)].



Εικόνα Μ.2: (α) Συσκευασία μυκορριζικού εμβολίου (β) Ανάμειξη μυκορριζών και σπόρων βίκου

Στη συνέχεια ολόκληρη η ποσότητα τοποθετήθηκε στη σπαρτική μηχανή και σπάρθηκαν συγκεκριμένες ζώνες κατά μήκος του αγροτεμαχίου (Εικόνα Μ.5).

Τέλος για τη σπορά των υπολειπόμενων δύο (2) γραμμών σποράς χρησιμοποιήθηκε η ποσότητα σπόρου που απέμεινε από τις προηγούμενες δυο σπορές, 13.2 kg ($66 \text{ kg} - 26.4 \text{ kg} - 26.4 \text{ kg} = 13.2 \text{ kg}$) και 6.6 kg λιπάσματος θειοφωσφορικής αμμωνίας, 20-10-0-(11) της εταιρίας ELFE. Λίπασμα και σπόροι στη συγκεκριμένη περίπτωση τοποθετήθηκαν σε ξεχωριστές θέσεις στην σπαρτική μηχανή χειμερινών σιτηρών όπως φαίνεται στην πιο κάτω [Εικόνα Μ.3(α)].



Εικόνα Μ.3: (α) Λίπασμα και σπόροι βίκου σε ξεχωριστές θέσεις (β) Σπαρτική χειμερινών σιτηρών

Δειγματοληψίες - Χειρισμός των δειγμάτων

Η πρώτη δειγματοληψία [Εικόνα Μ.4(α)] φυτών βίκου πραγματοποιήθηκε 40 μέρες μετά το φύτευμα των σπόρων (25 Δεκέμβρη 2010) και συγκεκριμένα στις 14 Φεβρουαρίου 2011 και η δεύτερη [Εικόνα Μ.4(β)] 90 ημέρες από το φύτευμα των φυτών, στις 6 Απριλίου 2011.

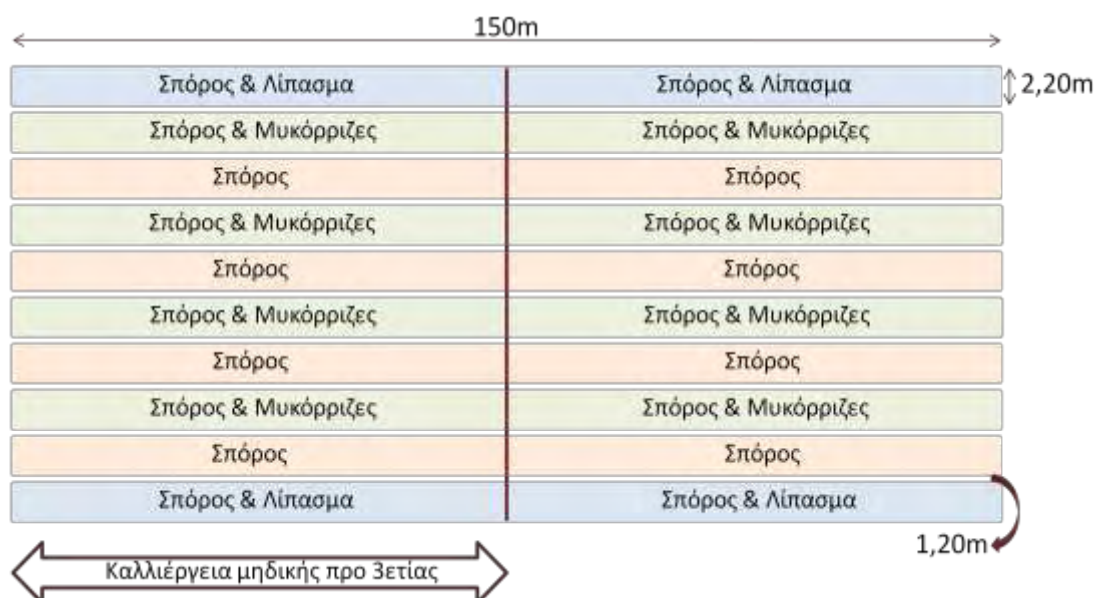


Εικόνα Μ.4: (α) Στάδιο ανάπτυξης φυτών κατά την πρώτη δειγματοληψία (β) Στάδιο ανάπτυξης φυτών κατά την δεύτερη δειγματοληψία

Και στις δύο δειγματοληψίες ακολουθήθηκε η ίδια διαδικασία, με κάθε δειγματοληψία να περιλαμβάνει είκοσι (20) δείγματα και κάθε δείγμα να αποτελείται από δεκαεφτά (17) φυτά βίκου, δηλαδή συνολικά 340 φυτά ανά δειγματοληψία.

Ειδικότερα σε κάθε δειγματοληψία πάρθηκαν (Εικόνα Μ.5):

- ✓ **8 δείγματα από τη σπορά σπόρων βίκου εμπλουτισμένα με μυκόρριζες (136 φυτά):** 4 δείγματα από το μισό του χωραφιού που προηγήθηκε καλλιέργεια μηδικής προ τριετίας & 4 δείγματα από το μισό του χωραφιού που προηγήθηκε καλλιέργεια σιτηρών
 - ✓ **8 δείγματα από τη σπορά σπόρων βίκου χωρίς να έχουν προσθεθεί ούτε μυκόρριζες ούτε λίπασμα (136 φυτά):** 4 δείγματα από το μισό του χωραφιού που προηγήθηκε καλλιέργεια μηδικής προ τριετίας & 4 δείγματα από το μισό του χωραφιού που προηγήθηκε καλλιέργεια σιτηρών
- και τέλος,
- ✓ **4 δείγματα από τη σπορά σπόρων βίκου με την αντίστοιχη ποσότητα λιπάσματος (68 φυτά):** 2 δείγματα από το μισό του χωραφιού που προηγήθηκε καλλιέργεια μηδικής προ τριετίας & 2 δείγματα από το μισό του χωραφιού που προηγήθηκε καλλιέργεια σιτηρών.



Εικόνα Μ.5: Σχεδιάγραμμα του χωραφιού όπου έγινε η σπορά των φυτών βίκου. Απεικονίζεται η διάταξη των ζωνών σποράς καθώς και ο τρόπος μεταχείρισης των φυτών.

Από τα δεκαεφτά (17) φυτά κάθε δείγματος :

1) στα πρώτα πέντε (5) φυτά έγινε κοπή του βλαστού στη βάση και συλλογή μόνο του ριζικού συστήματος. Η συλλογή των ριζών έγινε με πλύσιμο σε κόσκινα διαμέτρου οπών 200 μm και οι πιο λεπτές ρίζες χρησιμοποιήθηκαν για χρώση και προσδιορισμό μυκορριζικού αποικισμού,

2) σε δώδεκα (12) φυτά έγινε κοπή του βλαστού στη βάση και τοποθέτηση σε χάρτινα σακουλάκια (12 βλαστοί/σακουλάκι). Μετά από πλύσιμο σε κόσκινα, ακολούθησε καταμέτρηση του αριθμού των φυματίων του ριζικού τους συστήματος, και τοποθέτηση των ριζών αντίστοιχα σε χάρτινα σακουλάκια (12 ρίζες/σακουλάκι). Τέλος, το υπέργειο τμήμα του φυτού (φύλλα και βλαστοί) και οι ρίζες τοποθετήθηκαν σε φούρνο ξήρανσης για 60 ώρες στους 65 °C.

Μέτρηση Φυτικής Βιομάζας ή Φυτομάζας

Το στάδιο κοπής του βίκου για σανό πρέπει να συνδυάζει μεγάλη φυτομάζα και καλή ποιότητα χόρτου. Η καλύτερη ποιότητα λαμβάνεται στην άνθηση, τότε όμως η φυτομάζα είναι περιορισμένη. Κατά την ωρίμανση μειώνεται η φυτομάζα λόγω πτώσης του φυλλώματος και η ποιότητα υποβαθμίζεται. Οι Caballero *et al.*, (1996α) προτείνουν η κοπή του βίκου για σανό να γίνεται όταν η ξηρά ουσία των σπόρων είναι στο 45-55%. Σ' αυτό το στάδιο επιτυγχάνεται η μέγιστη συγκέντρωση θρεπτικών στοιχείων (Caballero *et al.*, 1996β).

Η κοπή της φυτομάζας πραγματοποιήθηκε τέλη Απριλίου, με χορτοκοπτική μηχανή σε συνθήκες υψηλής ηλιοφάνειας και σχετικά υψηλής θερμοκρασίας. Η φυτομάζα παρέμεινε στο έδαφος κατά γραμμές για περίπου μία εβδομάδα, μέχρι να ξηραθεί (ενδιάμεσα αναστρέφεται) και στη συνέχεια δεματοποιήθηκε (Εικόνα Μ.11). Τόσο η αναστροφή όσο και η δεματοποίηση πραγματοποιήθηκε τις πρωινές ώρες πριν χαθεί εντελώς η νυχτερινή υγρασία που επικάθεται στη φυτομάζα. Με αυτόν τον τρόπο μειώθηκαν κατά πολύ οι απώλειες σε φυτομάζα.



Εικόνα Μ.11: Δεματοποιημένη φυτομάζα βίκου

Στη συνέχεια έγινε συγκέντρωση και καταμέτρηση του αριθμού των δεμάτων βίκου για κάθε μεταχείριση, καθώς και ζύγιση κάθε δέματος χωριστά, έτσι ώστε να προσδιοριστεί ο Μ.Ο. της συνολικά παραγόμενης φυτομάζας ανά δέμα βίκου.

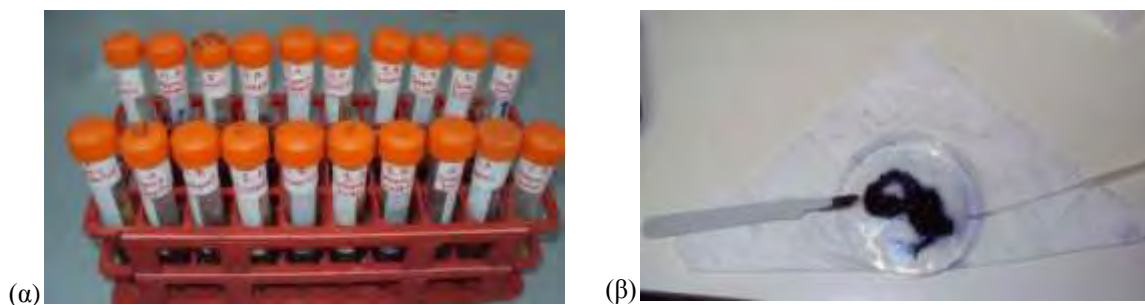
Χρώση των ριζών

Οι AMF μύκητες δε προκαλούν εμφανείς μορφολογικές αλλαγές στις ρίζες. Ωστόσο, παράγουν δενδροειδείς μορφές (arbuscules) και σε πολλές περιπτώσεις κύστεις (vesicles) στις ρίζες. Για τη παρατήρηση αυτών των δομών των AMF μυκορριζών μέσα στις ρίζες είναι απαραίτητο να καθαριστούν τα κύτταρα του φλοιού από το κυτόπλασμα και τα φαινολικά συστατικά και μετά να γίνει διαφορετική χρώση του μυκητολογικού ιστού (Sylvia 1994).

Οι Phillips και Hayman (1970) δημοσίευσαν την πλέον χρησιμοποιούμενη μέθοδο για τη παρατήρηση AMF μυκήτων στις ρίζες, χρησιμοποιώντας τη χρωστική trypan blue σε λακτοφαινόλη. Ως παράγων αποχρωματισμού χρησιμοποιείται γενικά το KOH, ενώ μπορούν επίσης να χρησιμοποιηθούν για σκούρες ρίζες: H₂O₂ (Phillips and Hayman, 1970) ή NaOCl. Εναλλακτικά, μπορούν να χρησιμοποιηθούν οι χρωστικές: chlorazol black E ή acid Fuchsin.

Συγκεκριμένα, από κάθε δείγμα επιλέχθηκαν οι πιο λεπτές ρίζες και στη συνέχεια τοποθετήθηκαν σε σωλήνα των 15 ml (falcon). Στα falcons [Εικόνα Μ.6(α)]

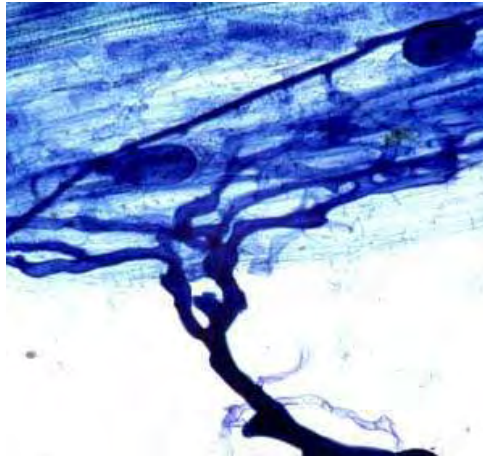
προστέθηκε για τον καθαρισμό των ριζών 10% KOH σε σημείο μέχρι να καλυφθούν και στη συνέχεια τοποθετήθηκαν σε υδατόλουτρο στους 80°C για 40 min. Αφού κρύωσαν, ακολούθησε ξέπλυμα 3 φορές με νερό και μετά τη προσθήκη 3 σταγόνων πυκνού HCl (2% διάλυμα υδατικό) επώαστηκαν για 15-20 min. Τέλος, έγινε αφαίρεση του διαλύματος χωρίς να ακολουθήσει ξέπλυμα.



Εικόνα Μ.6: (α) falcons με λεπτές ρίζες έτοιμες προς χρώση (β) Ρίζες βίκου σε τρυβλίο μετά από χρώση

Στη συνέχεια, έγινε χρώση των ριζών με εμβάπτιση σε χρωστική Trypan-Blue για περισσότερο από 12 ώρες. Για την παρασκευή 300 ml χρωστικής, χρησιμοποιήθηκαν 100 ml γλυκερίνης, 100 ml λακτικού οξέος, 100 ml απεσταγμένου νερού και 0,15 g Trypan-Blue (Sylvia 1994). Το διάλυμα φυλάχθηκε στο σκοτάδι λόγω ευαισθησίας στη φωτοξείδωση.

Μετά το πέρας των 12 ωρών οι ρίζες του κάθε δείγματος τοποθετήθηκαν σε τρυβλίο [Εικόνα Μ.6(β)] και έγινε προσθήκη 2-3 σταγόνων νερού, για να απομακρυνθεί η επιπλέον ποσότητα χρωστικής και για να διευκολυνθεί η διαδικασία. Τα ριζίδια τεμαχίζονται μέσα στο τρυβλίο με νυστέρι και από το σύνολο των χρωματισμένων ριζών, δέκα πέντε ρίζες περίπου μήκους 1.5-2 cm η κάθε μία τοποθετήθηκαν σε αντικειμενοφόρο πλάκα, όπου προστέθηκε PVLG (Polyvinyl-Lacto-Glycerol). Στη συνέχεια καλύπτονται προσεκτικά με τη καλυπτρίδα, για να μην εγκλωβιστεί αέρας. Ο προσδιορισμός του ποσοστού αποικισμού των ριζών από μύκητες, έγινε σαρώνοντας τις ρίζες στο μικροσκόπιο σε μεγέθυνση 40X και υπολογίζοντας την αναλογία των αποικισμένων από μύκητα ριζών προς το σύνολο των ριζών, σε συνολικά 100 διασταυρώσεις (Giovannetti and Mosse, 1980). Ο μύκητας εμφανίζεται με μπλε χρώμα ενώ ο φυτικός ιστός με καφέ- πράσινο χρώμα.



Εικόνα Μ.7: Εικόνα μικροσκοπίου που απεικονίζει τον αποικισμό από AMF μυκόρριζες, μετά από χρώση (<http://www.soilhealth.com/fungi/02.htm>).

Μέτρηση Φωσφόρου και Καλίου

Όπως αναφέρθηκε και παραπάνω, συλλέχθηκαν δώδεκα (12) φυτά από κάθε δείγμα (συνολικά 10 δείγματα) για κάθε δειγματοληψία (2 δειγματοληψίες), τα οποία χωρίστηκαν στο υπέργειο τμήμα του φυτού (φύλλα και βλαστοί) και στις ρίζες και τοποθετήθηκαν σε φούρνο



Εικόνα Μ.7: Φούρνος καύσης δειγμάτων

ξηρανσης για 60 ώρες στους 65 °C. Στη συνέχεια, το καθένα από τα 80 αυτά δείγματα ξεχωριστά, αλέστηκαν σε μίξερ. Από το κάθε δείγμα ζυγίστηκε 1 g σε αναλυτικό ζυγό ακριβείας ALS, τα οποία τοποθετήθηκαν σε κάψες και ακολούθησε καύση στους 500 °C για 11 ώρες (Εικόνα Μ.7).

Μετά την καύση προστέθηκαν 10 ml διαλύματος HCL 3,6N-HNO₃ 1,4 N σε κάθε κάψες και ακολούθησε διήθηση σε κωνικές φιάλες των 25 ml [Εικόνα Μ.8(α)]. Σε κάθε κωνική φιάλη προστέθηκε απεσταγμένο νερό μέχρι τα 25ml και όλο το διάλυμα μεταφέρθηκε σε



(α)

πλαστικούς περιέκτες και ακολούθως έγιναν διαδοχικές αραιώσεις ώστε να έχουμε δείγματα αραιωμένα 1/100 και 1/1000 [Εικόνα Μ.8(β)].



Η αραιώση 1/100 αφορά τη μέτρηση του P (υπέργειο τμήμα και ρίζα) και τη μέτρηση του K (ρίζα), ενώ η

*Εικόνα Μ.8: (α) Διήθηση δειγμάτων
(β) Αραιώση δειγμάτων*

αραιώση 1/1000 τη μέτρηση του K (μόνο υπέργειο τμήμα). Στη συνέχεια προστέθηκαν στο κάθε δείγμα 8ml διαλύματος ασκορβικού οξέος καθώς και απεσταγμένο νερό, ώστε το κάθε δείγμα να έχει τελικό όγκο 50ml (Εικόνα Μ.9).



Εικόνα Μ.9: Δείγματα μετά την προσθήκη διαλύματος ασκορβικού οξέος

Με αυτό τον τρόπο, το δείγμα χρωματίζεται μπλε ανάλογα με το ποσοστό του ορθοφωσφορικού που περιέχει το δείγμα. Η συγκέντρωση του P είναι ανάλογη της απορρόφησης, η οποία μετράτε με φασματοφωτόμετρο μέσα σε 10-30 min, σε μήκος κύματος 700-880 nm [Εικόνα Μ.10(α)]. Η συγκέντρωση του K βρέθηκε με τη χρήση χρωματόμετρου [Εικόνα Μ.10(β)].



(α)

Εικόνα Μ.10: (α) Χρωματόμετρο



(β)

(β) Φασματοφωτόμετρο

ΑΠΟΤΕΛΕΣΜΑΤΑ

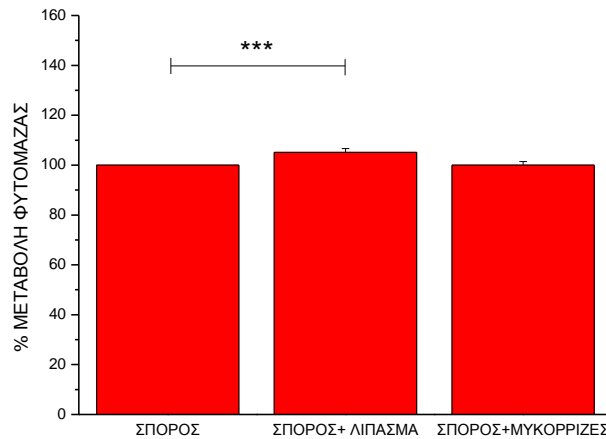
Υπολογισμός της φυτομάζας

Συγκεντρώθηκαν τα δέματα φυτομάζας πάνω στη γραμμή κάθε μεταχείρισης και ζυγίστηκε το καθένα ξεχωριστά. Συγκεκριμένα ζυγίστηκαν και προέκυψαν τα εξής αποτελέσματα:

Είδος Μεταχείρισης	Συνολικός Αριθμός Ζωνών σποράς	Συνολικός Αριθμός Δεμάτων	Μ.Ο. Βάρους Παραγόμενης Φυτομάζας/ Δέμα σε kg
Σπόρος & Λίπασμα	2	21	18.42
Σπόρος	4	40	17.50
Σπόρος & Μυκόρριζες	4	40	17.97

Πίνακας Α.1: Προσδιορισμός Μ.Ο. της παραγόμενης φυτομάζας ανά δέμα.

Όπως απεικονίζεται και στο παρακάτω σχήμα, τα φυτά με λίπανση παρουσίασαν μεγαλύτερη αύξηση της βιομάζας τους σε σχέση με τα φυτά μάρτυρες και τα μυκορριζικά φυτά.



Σχήμα Α.1: Τα φυτά που αναπτύχθηκαν παρουσία λιπάσματος εμφάνισαν περισσότερη φυτομάζα σε σχέση με τα μυκορριζικά και τα φυτά-μάρτυρες. Τα αποτελέσματα εκφράζονται ως μέση τιμή \pm σταθερό σφάλμα της % μεταβολής του αριθμού των μυκορριζών, σε σχέση με τα μη εμβολιασμένα κύτταρα. Οι αστερίσκοι υποδηλώνουν στατιστική διαφορά σε σχέση με το μάρτυρα (σπόρος). *** $P < 0,001$

Μέτρηση του ποσοστού αποικισμού των ριζών από τον μύκητα *Glomus intraradices*

Ο τύπος μυκορριζικού εμβολίου που χρησιμοποιήθηκε ήταν οι θυσσανώδεις μυκόρριζες (AMF) *Glomus intraradices* της εταιρίας MYCOSYM TRI-TON και ο εμβολιασμός έγινε κατά το στάδιο της σποράς σε αναλογία περίπου 1/3. Ταυτόχρονα έγινε σπορά μόνο με σπόρο βίκου αλλά και σπόρου μαζί με λίπασμα σε αναλογία 1/2. Πραγματοποιήθηκαν 2 δειγματοληψίες, 40 μέρες μετά το φύτεμα των σπόρων (14 Φεβρουαρίου 2011) και 90 ημέρες από το φύτεμα των φυτών (6 Απριλίου 2011) και προέκυψαν τα εξής δείγματα:

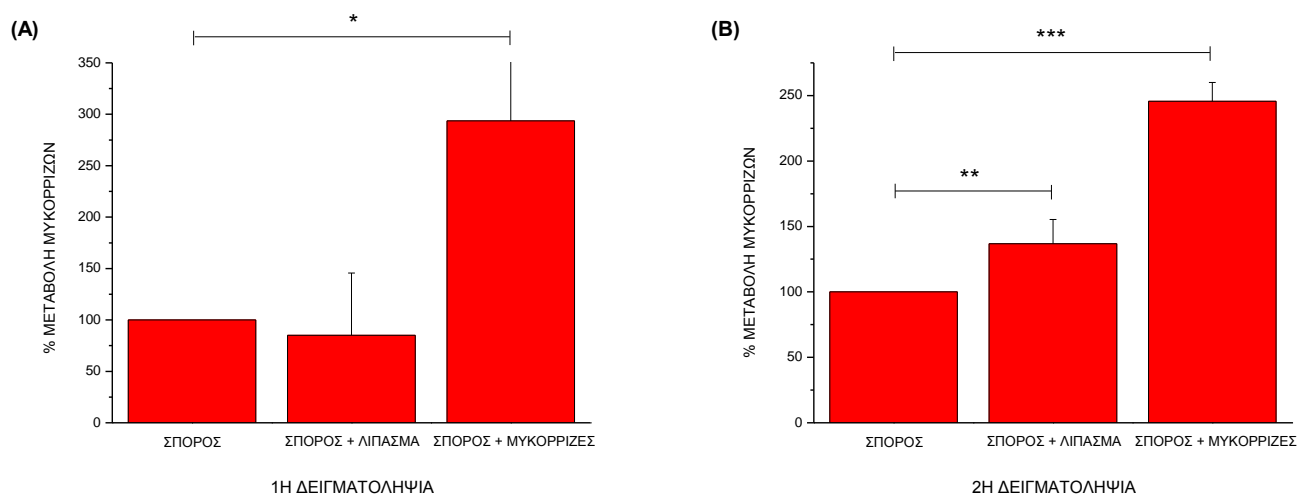
Σε κάθε δειγματοληψία	Αριθμός Δειγμάτων			Συνολικός Αριθμός Φυτών		
	Σπόρος + Μυκόρριζες	Σπόρος	Σπόρος + Λίπασμα	Σπόρος + Μυκόρριζες	Σπόρος	Σπόρος + Λίπασμα
Είδος Μεταχείρισης						
Καλλιέργεια μηδικής (Προ τριετίας)	4 (x17 φυτά)	4 (x17 φυτά)	2 (x17 φυτά)	78	78	34
Καλλιέργεια σιτηρών	4 (x17 φυτά)	4 (x17 φυτά)	2 (x17 φυτά)	78	78	34
Σύνολο	8	8	4	156	156	72

Πίνακας Α.2: Καταγραφή αριθμού δειγμάτων και φυτών ανά μεταχείριση και ανά δειγματοληψία.

Για τον έλεγχο της παρουσίας μυκορριζών και για τον προσδιορισμό του ποσοστού αποικισμού των μυκορριζών στο ριζικό σύστημα των εξεταζόντων φυτών ήταν αναγκαία η χρώση των μυκηλιακών υφών του ριζικού συστήματος των φυτών. Αρχικά απομονώθηκε μόνο το ριζικό σύστημα σε 5 φυτά ανά δείγμα για κάθε δειγματοληψία και αφού συλλέχτηκαν οι πιο λεπτές ρίζες, χρησιμοποιήθηκαν για χρώση. Πριν τη χρώση, έγινε καθαρισμός των ριζών προσθέτοντας 10% KOH μέχρι να καλυφθούν εν συνεχεία τοποθετήθηκαν σε υδατόλουτρο στους 80°C για 40 min. Ακολούθησε καλό ξέπλυμα με νερό, προσθήκη 3 σταγόνων πυκνού HCl (2% διάλυμα υδατικό) και επώαση για 15-20 min. Στη συνέχεια, αφαιρέθηκε το υπερκείμενο, οι ρίζες εμβαπτίστηκαν στη χρωστική για 12 ώρες. Τέλος, μετά την εμβάπτιση, από το σύνολο των χρωματισμένων ριζών, δέκα πέντε ρίζες περίπου μήκους 1.5-2 cm η κάθε μία τοποθετήθηκαν σε αντικειμενοφόρο πλάκα, όπου προστέθηκε PVLG (Polyvinyl-Lacto-Glycerol) και τα δείγματα εξετάζονται στο μικροσκόπιο. Ο αποικισμός εκφράζεται ως ποσοστό επί τοις εκατό % του αριθμού διασταυρώσεων με μυκηλιακή υφή ως προς το συνολικό αριθμό διασταυρώσεων του σταυρού του φακού με τις ρίζες.

Όπως φαίνεται και στο Σχήμα Α.2.(Α) & (Β), οι μυκόρριζες εντοπίζονται σε μεγαλύτερο ποσοστό στις ρίζες των φυτών που εμβολιάστηκαν σε σχέση με τα φυτά-μάρτυρες και αυτών που αναπτύχθηκαν παρουσία λιπάσματος. Η μεταβολή αυτή είναι

πιο αυξημένη στις 40 σε σχέση με τις 90 ημέρες. Επιπλέον, μυκόρριζες εμφανίζονται και στις άλλες 2 κατηγορίες δειγμάτων- φυτών, με το ποσοστό μυκορριζών αρχικά να μειώνεται στα φυτά που αναπτύχθηκαν παρουσία λιπάσματος σε σχέση με τα φυτά – μάρτυρες [Σχήμα A.2(A)], ενώ στη συνέχεια το φαινόμενο να αντιστρέφεται εμφανίζοντας αύξηση της τάξεως του 36% [Σχήμα A.2(B)].



Σχήμα A.2(A)&(B): Οι μυκόρριζες εντοπίζονται σε μεγαλύτερο ποσοστό στα φυτά που εμβολιάστηκαν με το μυκορριζικό εμβόλιο. Τα αποτελέσματα εκφράζονται ως μέση τιμή ± σταθερό σφάλμα της % μεταβολής του αριθμού των μυκορριζών, σε σχέση με τα μη εμβολιασμένα κύτταρα. Οι αστερίσκοι υποδηλώνουν στατιστική διαφορά σε σχέση με το μάρτυρα (σπόρος). * $P < 0,05$ ** $P < 0,01$ *** $P < 0,001$

Επίδραση των μυκορριζών στην ανάπτυξη φυματίων σε ρίζες φυτών βίκου

Στη παρούσα εργασία μελετήθηκε επίσης η επίδραση των μυκορριζών στην ανάπτυξη φυματίων στο ριζικό σύστημα του βίκου. Σε 12 φυτά από κάθε δείγμα έγινε διαχωρισμός του βλαστού από τη ρίζα και αφού πλύθηκαν, ακολούθησε καταμέτρηση του αριθμού των φυματίων του ριζικού τους συστήματος. Τα αποτελέσματα καταγράφονται στους παρακάτω πίνακες:

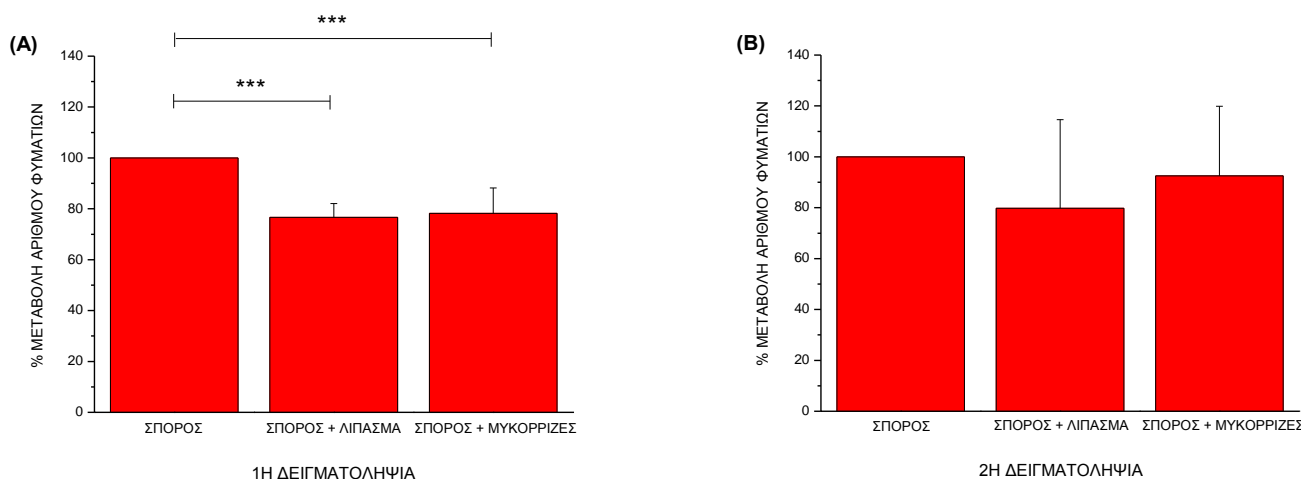
														ΑΡΙΘΜΟΣ ΦΥΜΑΤΙΩΝ													Μ.Ο.	Σ.Μ.Ο
1 ^η ΔΕΙΓΜΑΤΟΛΗΨΙΑ	1.Α (Σπόρος + Λίπασμα)	17	10	31	29	27	28	18	19	12	16	17	16	20	21,688													
	1.Β (Σπόρος + Λίπασμα)	19	16	20	24	25	18	11	19	37	27	21	20	21,41667														
	2.Α (Σπόρος + Λίπασμα)	27	18	18	20	21	30	23	25	17	18	12	30	21,58333														
	2.Β (Σπόρος + Λίπασμα)	30	36	10	32	19	20	32	22	23	28	11	22	23,75														
	1.Α (Σπόρος)	29	32	52	14	18	20	33	25	19	24	25	22	26,08333	28,302													
	1.Β (Σπόρος)	40	28	27	36	51	35	24	58	41	43	28	34	37,08333														
	2.Α (Σπόρος)	14	25	34	32	26	29	21	27	36	40	34	19	28,08333														
	2.Β (Σπόρος)	15	18	10	13	15	17	38	16	9	30	30	20	19,25														
	3.Α (Σπόρος)	33	27	34	22	42	29	20	43	28	33	22	41	31,16667														
	3.Β (Σπόρος)	39	18	45	33	12	21	30	25	56	40	35	23	31,41667														
	4.Α (Σπόρος)	32	28	31	15	42	44	40	23	14	36	30	34	30,75														
	4.Β (Σπόρος)	26	20	16	28	15	34	32	21	20	15	18	26	22,58333														
	1.Α (Σπόρος + Μυκόρριζες)	30	15	28	30	25	9	17	13	17	11	21	16	19,33333	22,135													
	1.Β (Σπόρος + Μυκόρριζες)	44	18	32	30	24	29	38	20	19	20	35	15	27														
	2.Α (Σπόρος + Μυκόρριζες)	20	16	29	26	25	16	17	17	12	16	32	26	21														
	2.Β (Σπόρος + Μυκόρριζες)	22	16	28	26	24	22	20	12	18	30	18	26	21,83333														
	3.Α (Σπόρος + Μυκόρριζες)	20	34	21	15	22	20	15	16	22	16	14	24	19,91667														
	3.Β (Σπόρος + Μυκόρριζες)	17	24	16	18	21	19	34	22	15	14	30	28	21,5														
	4.Α (Σπόρος + Μυκόρριζες)	34	28	25	36	18	27	18	8	12	15	13	12	20,5														
	4.Β (Σπόρος + Μυκόρριζες)	34	28	25	36	18	27	17	18	30	26	20	33	26														

Πίνακας Α.3: Καταγραφή αριθμού φυματίων ανά φυτό βίκου από την 1^η δειγματοληψία. Επίσης εκφράζεται ο Μ.Ο και ο Σ.Μ.Ο. ανά μεταχείριση.

														ΑΡΙΘΜΟΣ ΦΥΜΑΤΙΩΝ													Μ.Ο.	Σ.Μ.Ο
2 ^η ΔΕΙΓΜΑΤΟΛΗΨΙΑ	1.Α (Σπόρος + Λίπασμα)	67	38	27	57	66	45	35	62	40	38	27	25	43,91667	58,438													
	1.Β (Σπόρος + Λίπασμα)	60	72	58	65	54	61	76	38	33	58	65	32	56														
	2.Α (Σπόρος + Λίπασμα)	63	47	21	23	18	30	48	42	23	36	49	65	38,75														
	2.Β (Σπόρος + Λίπασμα)	86	98	68	125	65	139	128	99	72	104	54	103	95,08333														
	1.Α (Σπόρος)	49	74	66	72	81	57	42	110	38	45	26	56	59,66667	73,219													
	1.Β (Σπόρος)	117	79	95	40	35	41	112	52	76	68	52	79	70,5														
	2.Α (Σπόρος)	64	58	79	78	59	91	65	93	75	80	56	35	69,41667														
	2.Β (Σπόρος)	92	64	58	74	81	73	46	61	70	42	51	48	63,33333														
	3.Α (Σπόρος)	52	44	58	71	53	48	91	27	74	43	66	69	58														
	3.Β (Σπόρος)	120	142	98	80	93	81	25	103	81	85	90	74	89,33333														
	4.Α (Σπόρος)	40	53	79	56	73	44	105	59	115	98	42	27	65,91667														
	4.Β (Σπόρος)	73	94	86	175	148	94	55	105	77	159	98	151	109,5833														
	1.Α (Σπόρος + Μυκόρριζες)	24	71	37	66	54	58	43	48	88	25	48	32	49,5	67,729													
	1.Β (Σπόρος + Μυκόρριζες)	51	40	101	57	60	80	68	42	43	29	26	93	57,5														
	2.Α (Σπόρος + Μυκόρριζες)	31	36	28	24	75	69	55	41	69	33	42	65	47,33333														
	2.Β (Σπόρος + Μυκόρριζες)	85	75	112	97	61	92	73	74	74	99	67	68	81,41667														
	3.Α (Σπόρος + Μυκόρριζες)	58	75	52	93	89	54	57	124	72	46	130	68	76,5														
	3.Β (Σπόρος + Μυκόρριζες)	66	76	41	76	80	58	45	78	48	20	102	82	64,33333														
	4.Α (Σπόρος + Μυκόρριζες)	64	96	64	39	32	48	35	46	52	86	71	59	57,66667														
	4.Β (Σπόρος + Μυκόρριζες)	160	139	105	145	149	127	87	102	94	56	69	58	107,5833														

Πίνακας Α.4: Καταγραφή αριθμού φυματίων ανά φυτό βίκου από την 2^η δειγματοληψία. Επίσης εκφράζεται ο Μ.Ο και ο Σ.Μ.Ο. ανά μεταχείριση.

Όπως φαίνεται στο Σχήμα A.3(A), στις 40 ημέρες ο εμβολιασμός με μυκόρριζες ανέστειλε την ανάπτυξη φυματίων στο ριζικό σύστημα του βίκου, σε ανάλογο ποσοστό με αυτό μετά τη προσθήκη λιπάσματος (μείωση 6,6% και 6% αντίστοιχα). Παρόμοια μείωση του αριθμού των φυματίων μετά από εμβολιασμό με μυκόρριζες παρατηρήθηκε και στις 90 ημέρες [Σχήμα A.3(B)], καθώς και μετά τη προσθήκη λιπάσματος.



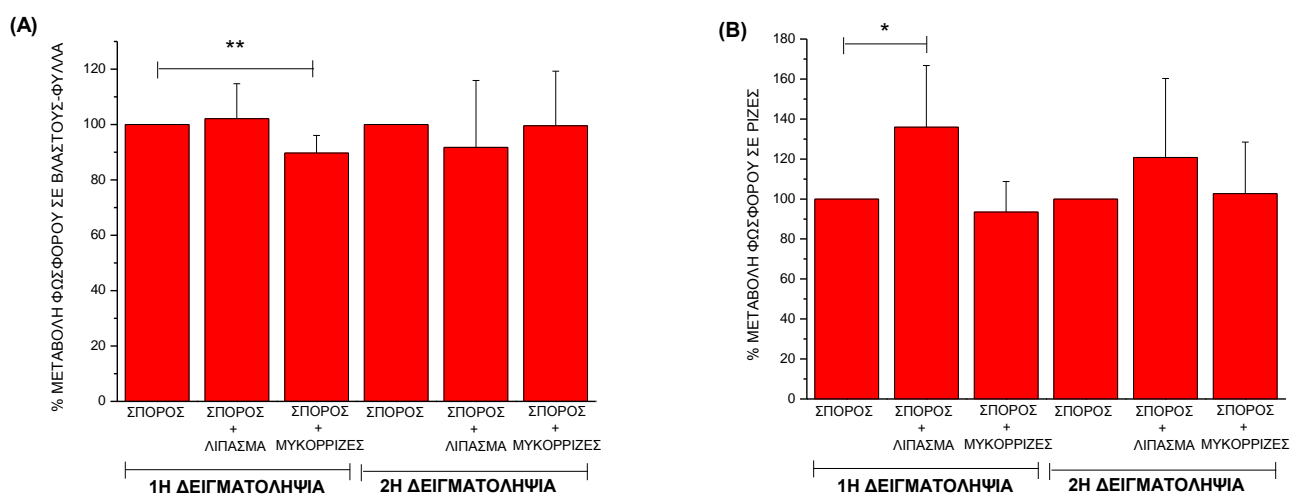
Σχήμα A.3(A)&(B): Οι μυκόρριζες αναστέλλουν την ανάπτυξη φυματίων στο ριζικό σύστημα των φυτών του βίκου, σε ανάλογο ποσοστό με αυτό μετά την προσθήκη λιπάσματος. Τα αποτελέσματα εκφράζονται ως μέση τιμή ± σταθερό σφάλμα του αριθμού των φυματίων. Οι αστερίσκοι υποδηλώνουν στατιστική διαφορά σε σχέση με το μάρτυρα (σπόρος). *** $P < 0,001$.

Μέτρηση επιπέδων ολικού φωσφόρου και καλίου στα φυτά

Ελέχθησαν τα επίπεδα τιμών του ολικού φωσφόρου, τόσο στο υπέργειο τμήμα όσο και στις ρίζες των φυτών. Αρχικά, αφού τα δείγματα τοποθετήθηκαν σε φούρνο ξήρανσης για 60 ώρες στους 65 °C, αλέστηκαν σε μίξερ και από το κάθε δείγμα ζυγίστηκε 1 g σε αναλυτικό ζυγό ακριβείας ALS. Στη συνέχεια τοποθετήθηκαν σε κάψες και ακολούθησε καύση στους 500 °C για 11 ώρες. Μετά την καύση προστέθηκαν 10 ml διαλύματος HCL 3,6N-HNO₃ 1,4 N σε κάθε κάψα, ακολούθησε διήθηση σε κωνικές φιάλες των 25 ml και προσθήκη απεσταγμένου νερού μέχρι τελικού όγκου 25ml. Έπειτα έγιναν οι απαραίτητες αραιώσεις ώστε να έχουμε δείγματα αραιωμένα 1/100 και 1/1000. Η αραιώση 1/100 αφορά τη μέτρηση του P (υπέργειο τμήμα και ρίζα) και τη μέτρηση του K (ρίζα), ενώ η αραιώση 1/1000 τη μέτρηση του K (μόνο υπέργειο τμήμα). Τέλος, προστέθηκαν στο κάθε δείγμα 8ml

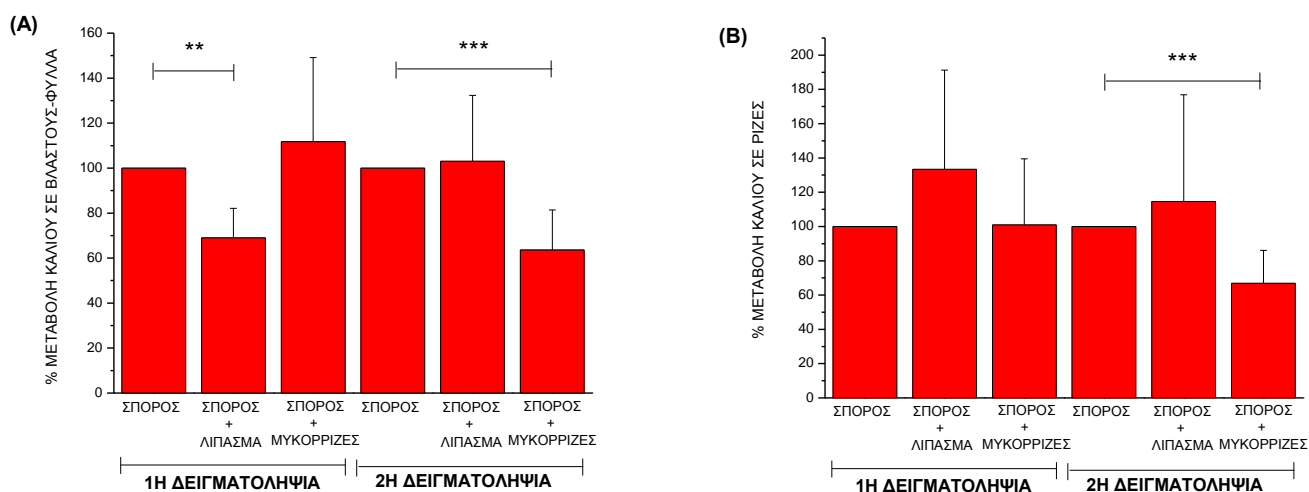
διαλύματος ασκορβικού οξέος καθώς και απεσταγμένο νερό, ώστε το κάθε δείγμα να έχει τελικό όγκο 50ml. Με αυτό τον τρόπο, το δείγμα χρωματίζεται μπλε ανάλογα με το ποσοστό του ορθοφωσφορικού που περιέχει το δείγμα. Η συγκέντρωση του P μετρήθηκε με φασματοφωτόμετρο μέσα σε 10-30 min, σε μήκος κύματος 700-880 nm και είναι ανάλογη της απορρόφησης. Η συγκέντρωση του K βρέθηκε με τη χρήση χρωματόμετρου.

Σύμφωνα με το Σχήμα A.4(A) στις 40 ημέρες παρατηρείται μία μικρή μείωση στα επίπεδα του αφομοιωμένου φωσφόρου, περίπου 10%, στους βλαστούς των φυτών που εμβολιάστηκαν με το μυκορριζικό εμβόλιο σε σχέση τόσο με των φυτών-μάρτυρες όσο και με των φυτών που αναπτύχθηκαν παρουσία λιπάσματος. Όμως η εικόνα αυτή αντιστρέφεται στις 90 ημέρες, με τα επίπεδα φωσφόρου στα φυτά με τις μυκορριζες να επανέρχονται στα ίδια επίπεδα με τα φυτά-μάρτυρες και τώρα να ελαττώνεται ο φώσφορος στα φυτά με το λίπασμα. Αντιθέτως το ριζικό σύστημα των φυτών που αναπτύχθηκαν σε φωσφορικό περιβάλλον αφομοίωσε περισσότερο φώσφορο σε σχέση με τα φυτά-μάρτυρες, τόσο στη 1^η (περίπου 36%) όσο και στη 2^η δειγματοληψία (περίπου 20%). Τα μυκορριζικά φυτά περιείχαν παρόμοια επίπεδα φωσφόρου με τα φυτά- μάρτυρες [Σχήμα A.4(B)].



Σχήμα A.4(A)&(B): Τα επίπεδα φωσφόρου είναι αυξημένα στο ριζικό σύστημα μόνο των φυτών που αναπτύχθηκαν παρουσία λιπάσματος, ενώ καμία αλλαγή δε παρατηρείται στα ποσοστά του φωσφόρου στις ρίζες και στους βλαστούς των μυκορριζικών φυτών σε σχέση με τα φυτά-μάρτυρες. Τα αποτελέσματα εκφράζονται ως μέση τιμή ± σταθερό σφάλμα της % μεταβολής των επιπέδων ολικού αφομοιωμένου φωσφόρου, σε σχέση με τα φυτά - μάρτυρες. Οι αστερίσκοι υποδηλώνουν στατιστική διαφορά σε σχέση με το μάρτυρα (σπόρος). * $P < 0,05$ ** $P < 0,01$.

Όσον αφορά τα επίπεδα καλίου στις ρίζες, παρατηρήθηκε ότι ήταν αυξημένα στα φυτά με λίπασμα σε σχέση με τα φυτά –μάρτυρες, σε ποσοστό περίπου 33% στη 1^η δειγματοληψία και 14% στη 2^η. Αντίθετα, τα μυκορριζικά φυτά δεν εμφάνισαν καμία μεταβολή στα επίπεδα καλίου στις 40 ημέρες σε σχέση με τα φυτά μάρτυρες, όμως καταγράφηκαν μειωμένες τιμές καλίου στις 90 ημέρες [Σχήμα A.5(B)]. Στο υπέργειο τμήμα των φυτών παρατηρήθηκε 32% μείωση των επιπέδων καλίου στα φυτά στις 40 ημέρες μετά τη προθήκη λιπάσματος, που όμως επέστρεψαν στα ίδια επίπεδα με αυτά των φυτών-μαρτύρων. Στα μυκορριζικά φυτά ενώ αρχικά εμφάνισαν 10% αύξηση στα επίπεδα καλίου, στις 90 ημέρες παρατηρήθηκε μείωση των επιπέδων της τάξεως του 37% σε σχέση με τα φυτά-μάρτυρες [Σχήμα A.5(A)].



Σχήμα A.5(A)&(B): Τα επίπεδα καλίου αρχικά αυξήθηκαν στις ρίζες των φυτών που αναπτύχθηκαν παρουσία λιπάσματος, αύξηση που διατηρήθηκε σε λιγότερο αυξημένα επίπεδα στη 2^η δειγματοληψία. Σε αντίθεση, μειωμένες ήταν οι τιμές καλίου στους βλαστούς τους στη 1^η δειγματοληψία, αλλά επανήλθαν στη συνέχεια στο ίδιο επίπεδο με αυτό των φυτών-μαρτύρων. Στο υπέργειο τμήμα των μυκορριζικών φυτών σημειώθηκαν λίγο αυξημένες τιμές καλίου στη 1^η δειγματοληψία, οι οποίες μειώθηκαν κατά πολύ στη συνέχεια. Μειωμένα βρέθηκαν και τα επίπεδα καλίου και στις ρίζες των μυκορριζικών φυτών στη 2^η δειγματοληψία, σε σχέση με τα φυτά-μάρτυρες. Τα αποτελέσματα εκφράζονται ως μέση τιμή ± σταθερό σφάλμα της % μεταβολής των επιπέδων καλίου, σε σχέση με τα φυτά - μάρτυρες. Οι αστερισκοί υποδηλώνουν στατιστική διαφορά σε σχέση με το μάρτυρα (σπόρος). ** $P < 0,01$ *** $P < 0,001$.

ΣΥΖΗΤΗΣΗ

Η συμβίωση των φυτών με μύκητες και η δημιουργία μυκορριζών ώστε να αναπτυχθούν και να επιβιώσουν κάτω από δύσκολες συνθήκες, έχει ερευνηθεί εκτενώς. Στην παρούσα εργασία εξετάζεται η υπόθεση κατά πόσο οι θυссανώδεις μυκορριζες ευνοούν την πρόσληψη P και K σε ψυχανθή φυτά του γένους *Vicia*, σε σύγκριση με φυτά που αναπτύσσονται σε περιβάλλον πλούσιο σε άζωτο και φώσφορο. Έχει αποδειχθεί ότι οι προσθήκες αζώτου και φωσφόρου επηρεάζουν την ποικιλότητα ειδών άμεσα και έμμεσα. Άμεσα γιατί αμφότερα τα στοιχεία είναι πόροι για τα φυτά και είναι τα συνηθέστερα περιοριστικά θρεπτικά στοιχεία σε χερσαία οικοσυστήματα. Οι προσθήκες τους τείνουν να ευνοήσουν αναλογικά περισσότερο τα είδη με τις υψηλότερες απαιτήσεις σε άζωτο και φώσφορο αντίστοιχα (Mamolos *et al.*, 1995α). Έμμεσα, γιατί επηρεάζουν τις συμβιώσεις φυτών με αζωτοδεσμευτικά βακτήρια ή με θυссανώδεις μυκορριζες. Η προσθήκη αζώτου περιορίζει την ανάπτυξη των αζωτοδεσμευτικών βακτηρίων (Caetano-Anolles and Gresshoff, 1991; Lang *et al.*, 1993; Rubio Arias *et al.*, 1999; Singleton and van Kessel, 1987; Thomas *et al.*, 2000), αλλά καθιστώντας περισσότερο περιοριστικό το φώσφορο, ευνοεί την ανάπτυξη θυссανωδών μυκορριζών. Αντίθετα, η προσθήκη φωσφόρου φαίνεται να ευνοεί την ανάπτυξη των αζωτοδεσμευτικών βακτηρίων (Mamolos *et al.*, 2005), αλλά περιορίζει την ανάπτυξη των μυκορριζών (Bobbink 1998; Jakobsen 1986; Thingstrup *et al.*, 1998).

Έτσι αρχικά, έγινε ποσοτικός προσδιορισμός του αριθμού των μυκορριζών μετά από εμβολισμό μίας κατηγορίας φυτών-δειγμάτων με μυκορριζικό εμβόλιο. Με αυτό το τρόπο βεβαιωθήκαμε για τη παρουσία των μυκορριζών στα φυτά που εμβολιάστηκαν, τα οποία παρουσίασαν 2,5 φορές μεγαλύτερο ποσοστό μυκορριζών σε σχέση με τα φυτά-μάρτυρες. Αξιοσημείωτο είναι το γεγονός ότι εμφανίζονται μυκορριζες και στις άλλες 2 κατηγορίες δειγμάτων-φυτών, με το ποσοστό μυκορριζών αρχικά να είναι μειωμένο στα φυτά που αναπτύχθηκαν παρουσία λιπάσματος σε σχέση με τα φυτά-μάρτυρες, ενώ στη συνέχεια το φαινόμενο να αντιστρέφεται εμφανίζοντας αύξηση της τάξεως του 36%. Αυτό μπορεί να οφείλεται στο γεγονός ότι αρχικά υπήρχε πλεόνασμα φωσφόρου και αζώτου, με αποτέλεσμα να μην είναι απαραίτητη αυτή η συμβίωση, ενώ στη συνέχεια λόγω περιορισμού

θρεπτικών υλικών να κατέστη αναγκαία αυτή η αλληλοεξαρτώμενη θέση. Η υπόθεση αυτή έρχεται σε συμφωνία με προηγούμενες μελέτες που ισχυρίζονται ότι εάν η διαθεσιμότητα του N ή του P του εδάφους είναι επαρκής ή αυξηθεί με την προσθήκη λιπασμάτων, τότε αναμένεται να μειωθεί η αφθονία των μυκορριζών, καθώς τα φυτά διαθέτουν το μεγαλύτερο μέρος των υδατανθράκων σε άλλες “δεξαμενές”, κυρίως στους βλαστούς και τα φύλλα τους (Chapin 1980; Tilman 1988; Tilman and Cowan, 1989; Read 1991; Marschner *et al.*, 1996). Γενικά, οι επιδράσεις που θα επιφέρει η προσθήκη N ή P στην ανάπτυξη των θυσσανοειδών μυκορριζών, θα εξαρτηθούν από τη διαθεσιμότητα του P ή του N αντίστοιχα στο έδαφος. Οι επιδράσεις αυτές είναι δυνατόν να εξαρτώνται και από τα φυτά ξενιστές. Πολλά πειράματα στο θερμοκήπιο έδειξαν ότι ο εμπλουτισμός με N αύξησε τον αποικισμό με μυκόρριζες όταν ο P ήταν περιοριστικός στο έδαφος και μείωσε τον αποικισμό όταν ο P ήταν επαρκής (Smith *et al.*, 1986; Bååth and Spokes 1989; Sylvia and Neal, 1990; Liu *et al.*, 2000).

Κάποια πειράματα που πραγματοποιήθηκαν έδειξαν ότι η προσθήκη αζωτούχου λίπανσης επηρεάζει αρνητικά τις θυσσανοειδείς μυκόρριζες, περιορίζοντας την αφθονία τους (Buwalda and Goh, 1982; Egerton-Warburton and Allen, 2000; Corkidi *et al.*, 2002). Μια πρόσφατη ανάλυση από 17 παλιότερες μελέτες (Treseder, 2006) έδειξε ότι οι προσθήκες N μείωσαν την αφθονία των μυκορριζών κατά ένα ποσοστό της τάξεως του 15%. Ωστόσο, κάποια άλλα πειράματα έδειξαν ότι ο εμπλουτισμός του εδάφους με N αύξησε τον αποικισμό των ριζών με θυσσανοειδείς μυκόρριζες. Για παράδειγμα οι Dhillion και Ampornpan (1992) βρήκαν τον αποικισμό με θυσσανοειδείς μυκόρριζες να είναι ιδιαίτερα αυξημένος σε εδάφη που εμπλουτίστηκαν με N. Τέλος αξίζει να σημειωθεί ότι έχουν παρατηρηθεί και περιπτώσεις στις οποίες η αζωτούχα λίπανση δεν επηρέασε καθόλου τον αποικισμό των μυκορριζών (Treseder and Vitousek, 2001). Με δεδομένο ότι η ποσότητα αζώτου μπορεί να επηρεάζει την ύπαρξη μυκορριζών, μελετήθηκε η ύπαρξη φυματίων στις ρίζες των ψυχανθών, τόσο αυτών με τις μυκόρριζες όσο και αυτών που λιπάνθηκαν. Βρέθηκε ότι στις 40 ημέρες ο εμβολιασμός με μυκόρριζες ανέστειλε σε μικρό βαθμό την ανάπτυξη φυματίων στο ριζικό σύστημα του βίκου, σε ανάλογο ποσοστό με αυτό μετά τη προσθήκη λιπάσματος. Παρόμοια μείωση του αριθμού των φυματίων μετά από εμβολιασμό με μυκόρριζες παρατηρήθηκε και στις 90 ημέρες, ενώ υπήρξε ακόμα μεγαλύτερη αναστολή ανάπτυξης φυματίων μετά τη προσθήκη λιπάσματος, περίπου σε ποσοστό 14,8%. Η μείωση του αριθμού των

φυματίων στα φυτά που είχαν λιπανθεί, μπορεί να προκαλείται από τη μεγάλη διαθεσιμότητα αζώτου που υπάρχει στο έδαφος λόγω προσθήκης του αζωτούχου λιπάσματος, όποτε και δεν ήταν απαραίτητη η αζωτοδέσμευση. Όσον αφορά τη μικρή αναστολή ανάπτυξης των φυματίων στα μυκορριζικά φυτά, έχει αποδειχθεί ότι οι μυκορριζικοί μύκητες εμπλέκονται στην πρόσληψη και μεταφορά N (Ames *et al.*, 1983; Johansen *et al.*, 1992; Frey and Schüepp, 1993; Johansen *et al.*, 1993; Tobar *et al.*, 1994; Bago *et al.*, 1996, Hawkins *et al.*, 2000; Hodge *et al.*; 2001).

Είναι βιβλιογραφικά γνωστό ότι οι AMF μυκορριζες προσλαμβάνουν αποτελεσματικά τα θρεπτικά στοιχεία όπως είναι ο P και το K, εκμεταλλεόμενες πηγές που δεν είναι προσιτές άμεσα στα φυτά (Smith και Read, 1997; Ryan *et al.*, 2001). Κάποιες αρχικές μελέτες είχαν δείξει ότι την αποίκηση με μυκορριζες καθόριζε η συγκέντρωση στους ιστούς των φυτών και όχι η περιεκτικότητα του P στο έδαφος (Menge *et al.*, 1978; Ratnayake *et al.*, 1978). Αργότερα ωστόσο, οι De Miranda *et al.*, (1989) και οι Thomson *et al.*, (1991) έδειξαν ότι τόσο η συγκέντρωση P στους ιστούς των φυτών, όσο και η περιεκτικότητα του P στο έδαφος, μπορούν να έχουν επιπτώσεις στον αποικισμό. Έτσι το επόμενο βήμα ήταν να διερευνησουμε κατά πόσο η παρουσία μυκορριζών εμπλέκεται στη πρόσληψη φωσφόρου και καλίου στα φυτά του γένους *Vicia*. Παρατηρήθηκε μία μικρή μείωση στα επίπεδα του αφομοιωμένου φωσφόρου, περίπου 10%, στους βλαστούς των φυτών που εμβολιάστηκαν με το μυκορριζικό εμβόλιο σε σχέση τόσο με των φυτών-μάρτυρες όσο και με των φυτών που αναπτύχθηκαν παρουσία λιπάσματος. Όμως η εικόνα αυτή αντιστρέφεται στις 90 ημέρες, με τα επίπεδα φωσφόρου στα φυτά με τις μυκορριζες να επανέρχονται στα ίδια επίπεδα με τα φυτά-μάρτυρες και να ελαττώνεται ο φώσφορος στα φυτά με το λίπασμα. Αντιθέτως το ριζικό σύστημα των φυτών που αναπτύχθηκαν σε φωσφορικό περιβάλλον αφομοίωσε περισσότερο φώσφορο σε σχέση με τα φυτά-μάρτυρες, καθ' όλη τη διάρκεια του πειράματος. Τα μυκορριζικά φυτά περιείχαν παρόμοια επίπεδα φωσφόρου με τα φυτά-μάρτυρες. Σχετικά με αποτελέσματα που προέκυψαν στα φυτά που λιπάνθηκαν, εικάζουμε ότι μετά τη προσθήκη λιπάσματος η διαθεσιμότητα φωσφόρου ήταν μεγαλύτερη, άρα αυξημένη ήταν και η πρόσληψή του από τις ρίζες. Όμως είναι γνωστό ότι ο φώσφορος είναι δυσδιάλυτο θρεπτικό στοιχείο, με αποτέλεσμα να μην είναι εύκολη η διακίνησή του μέσα στο φυτό και κατά συνέπεια ενώ προσλαμβάνεται να αργεί να φτάσει στους βλαστούς των φυτών. Μια πιθανή εξήγηση για το λόγο που τα επίπεδα φωσφόρου

στους βλαστούς και στις ρίζες των μυκορριζικών φυτών παραμένουν παρόμοια με τα επίπεδα των φυτών-μαρτύρων είναι ότι ο φωσφόρος του εδάφους είναι σε πλεόνασμα και δεν είναι αναγκαία η βοήθεια των μυκορριζών. Η παρατήρηση αυτή χρίζει περαιτέρω διερεύνησης και θα ήταν ενδιαφέρον να γίνει εδαφολογική ανάλυση ώστε να επιβεβαιωθεί αυτή η πιθανότητα.

Τέλος, μετά από μέτρηση των επιπέδων καλίου, τόσο στο υπέργειο όσο και στο ριζικό τμήμα και των τριών μεταχειρίσεων των φυτών, καταλήξαμε στα παρακάτω συμπεράσματα. Στις ρίζες, παρατηρήθηκε ότι ήταν αυξημένα τα επίπεδα K στα φυτά με λίπασμα, σε σχέση με τα φυτά -μάρτυρες, γύρω στο 33% στη 1^η δειγματοληψία και 14% στη 2^η αντίστοιχα. Αντίθετα, τα μυκορριζικά φυτά δεν εμφάνισαν καμία μεταβολή στα επίπεδα καλίου στις 40 ημέρες σε σχέση με τα φυτά μάρτυρες, όμως καταγράφηκαν μειωμένες τιμές καλίου στις 90 ημέρες. Στο υπέργειο τμήμα των φυτών παρατηρήθηκε 32% μείωση των επιπέδων καλίου στα φυτά στις 40 ημέρες μετά τη προθήκη λιπάσματος, που όμως επέστρεψαν στα ίδια επίπεδα με αυτά των φυτών -μαρτύρων. Στα μυκορριζικά φυτά ενώ αρχικά εμφάνισαν 10% αύξηση στα επίπεδα καλίου, στις 90 ημέρες παρατηρήθηκε μείωση των επιπέδων της τάξεως του 37% σε σχέση με τα φυτά-μάρτυρες.

Συμπερασματικά, η παρουσία των μυκορριζών στα ψυχανθή φυτά του γένους *Vicia* πιθανόν επηρεάζει αρνητικά το σχηματισμό φυματίων, γεγονός που με τη διεξαγωγή περαιτέρω εργασιών μπορεί να εξηγήσει τη σχετική συμμετοχή των μυκορριζών στη διαδικασία της αζωτοδέσμευσης. Επιπλέον, οι μυκορριζες δε φαίνεται να παίζουν σημαντικό ρόλο στη πρόσληψη φωσφόρου, όταν ο παράγοντας αυτός φαίνεται να είναι σε διαθεσιμότητα, ενώ μάλλον αρνητικός είναι ο ρόλος τους στη πρόσληψη K, αν και χρειάζεται επιπλέον διερεύνηση για να εξετάσουμε μέσω ποιών μονοπατιών και μηχανισμών επηρεάζεται η πρόσληψη των 2 αυτών θρεπτικών συστατικών. Η συνολικά παραγόμενη βιομάζα των φυτών που μεγάλωσαν παρουσία λιπάσματος ήταν ελαφρώς μεγαλύτερη σε σχέση με τις άλλες δύο μεταχειρίσεις. Κάτι που υποδεικνύει πως τα φυτά βίκου που καλλιεργήθηκαν παρουσία λιπάσματος παρουσίασαν σχετικά μεγαλύτερη ανάπτυξη σε σχέση με τα φυτά βίκου που εμπλουτίστηκαν με μυκορριζικό εμβόλιο. Πιθανόν, ο εμπλουτισμός με μυκορριζες των φυτών μια μονοετούς καλλιέργειας όπως είναι ο βίκος, να μην απέδωσε τα προσδοκώμενα αποτελέσματα, γιατί ίσως το χρονικό διάστημα από την προσθήκη μυκορριζών μέχρι τη συγκομιδή του βίκου να ήταν πολύ σύντομο. Από την άλλη η

προσθήκη λιπάσματος στην καλλιέργεια του βίκου φαίνεται να έχει πιο άμεσα αποτελέσματα στην ανάπτυξη των φυτών και στη συνολικά παραγόμενη φυτομάζα.

ΒΙΒΛΙΟΓΡΑΦΙΑ

ΒΙΒΛΙΑ

- Γαλάτης Β., Γανωτάκης Δ., Γκανή-Σπυροπούλου Κ., Καραμπουρνιώτης Γ., Κοτζαμπάσης Κ., Κωνσταντινίδου Ε.-Ι., Μανέτας Ι., Ρουμπελάκη-Αγγελάκη Κ.Α. 2003. Φυσιολογία Φυτών από το μόριο στο περιβάλλον. Πανεπιστημιακές Εκδόσεις Κρήτης. σελ. 266
- Θερίος 2005. Ο ρόλος των μυκορριζίων στην θρέψη των φυτών Ανόργανη θρέψη και λιπάσματα. Κεφάλαιο 12, σελ. 185.
- Ορφανουδάκης, Μ. 2002. Επίδραση του εμβολιασμού με μυκόρριζα (AMF) και ακτινομύκητα Φράνκια στην ανάπτυξη της *Alnus glutinosa*. Ελληνική Εδαφολογική Εταιρία 9ο Εδαφολογικό Συνέδριο, Αθήνα. Σεπ. 2002. σελ. 310-320.
- Παπακώστα – Τασοπούλου Δ. 2005. Ψυχανθή (Καρποδοτικά–Χορτοδοτικά), Ειδική Γεωργία Ι, Τεύχος Β. Θεσσαλονίκη: Εκδόσεις Σύγχρονη Παιδεία.

ΔΗΜΟΣΙΕΥΣΕΙΣ

- Allen, M. F. 1982. Influence of vesicular-arbuscular mycorrhizae on water movement through *Bouteloua gracilis*. *New Phytologist* **91**:191- 196.
- Ames, R. N. Reid C. P. P. Porter L. K, and Cambardella C. 1983. Hyphal uptake and transport of nitrogen from two ¹⁵N-labelled sources by *Glomus mosseae*, a vesicular-arbuscular mycorrhizal fungus. *New Phytologist* **95**:381-396.
- Augé R. and Duan. X. 1991. Mycorrhizal fungi and nonhydraulic root signals of soil drying. *Plant Physiology* **97**:821-824.
- Augé R. M. 2001. Water relations, drought and vesicular-arbuscular mycorrhizal symbiosis. *Mycorrhiza* **11**:3-42.
- Azcón-Aguilar C.M. Jaizme- Vega C. and Calvet C. 2002. The contribution of arbuscular mycorrhizal fungi to the control of soil- borne plant pathogens. Pages 187-197 in S. Gianinazzi, H. Schuepp, K. Haselwand ter, and J. M. Barea,

editors. Mycorrhizal Technology in Agriculture: From Genes to Bioproducts. Base1: ALS Birkhauser Verlag.

Bååth, E., and J.Spokes. 1989. The effect of added nitrogen and phosphorus on mycorrhizal growth response and infection in *Allium schoenoprasum*. Canadian Journal of Botany **67**:3227-3232.

Bago, B. Vierheilig H. Piché Y. and Azcón-Aguilar C. 1996. Nitrate depletion and pH changes induced by the extraradical mycelium of the arbuscular mycorrhizal fungus *Glomus intraradices* grown in monoxenic culture. New Phytologist **133**:273-280.

Blum, J. D., A. Klaue, C. A. Nezat, C. T. Driscoll, C. E. Johnson, T. G. Siccama, C. Eagar, T. J. Faheyk and G. E. Likens 2002. Mycorrhizal weathering of apatite as an important calcium source in base-poor forest ecosystems. Nature **417**:729-731.

Bobbink, R. 1998. Impacts of tropospheric ozone and airborne nitrogenous pollutants on natural and semi-natural ecosystems: a commentary. New Phytologist **139**:161-168.

Brunner I. and Frey B. 2000. Detection and localization of aluminum and heavy metals in ectomycorrhizal Norway spruce seedlings. Environmental Pollution **108**:121-128.

Burke, S. C., J. S. Angle, R. L. Chaney, and S. D. Cunningham. 2000. Arbuscular mycorrhizae effects on heavy metal uptake by corn. International Journal of Phytoremediation **2**:23-29.

Buwalda, J. G., and K. M. Goh. 1982. Host-fungus competition for carbon as a cause of growth depressions in vesicular-arbuscular mycorrhizal ryegrass. Soil Biology and Biochemistry **14**:103-106.

Caballero, R., C. Barro, A. Rebolé, M. Arauzo and P.J Hernaiz. 1996a. Yield components and forage quality of common vetch during pod filling. Agronomy Journal **88**:797-800.

- Caballero, R., M. Arauzo and P.J Hernaiz. 1996β. Accumulation and redistribution of mineral elements in common vetch during pod filling. *Agronomy Journal* **88**:801-805.
- Caetano-Anolles, G., and P. M. Gresshoff. 1991. Plant genetic control of nodulation. *Annual Review of Microbiology* **45**:345-382.
- Caldwell, B.E. and G. Vest. 1970. Effects of Rhizobium strains on soybean yields. *Crop Science* **10**: 19-21.
- Chapin, F. S. 1980. The mineral nutrition of wild plants. *Annual Review of Ecology and Systematics* **11**:233-260.
- Chen, D.M, K. Khalili, and J.W.G. Cairney. 2003. Influence of water stress on biomass production by isolates of an ericoid mycorrhizal endophyte of *Woollsia pungens* and *Epacris microphylla* (*Ericaceae*). *Mycorrhiza* **13**:173-176.
- Corkidi, L., D. L. Rowland , and N. C. Johnson. 2002. Nitrogen fertilization alters the functioning of arbuscular mycorrhizas at two semiarid grassland s. *Plant and Soil* **240**:299-310.
- Davies, F.T.Jr., Olalde-Portugal, Y., Aguilera-Gomez, L., Alvarado, M.J., Ferrera-Cerrato, R.C., Boutton, T.W., 2002. Alleviation of drought strees of Chile ancho pepper (*Capsicum annum* L. cv. San Luis) with arbuscular mycorrhiza indigenous to Mexico. *Scientia Horticulturae* **92**: 347-359.
- De Miranda, J. C. C., P. J. Harris, and A. Wild. 1989. Effects of soil and plant phosphorus concentrations on vesicular-arbuscular mycorrhiza in sorghum plants. *New Phytologist* **112**:405-410.
- Denny H. J. and Wilkins D. A. 1987. Zinc tolerance in *Betula spp.* IV The mechanism of ectomycorrhizal amelioration of zinc toxicity. *New Phytologist* **106**:545-553.
- Dhillion,S S., and L. Ampornpan. 1992. The influence of inorganic nutrient fertilization on the growth, nutrient composition and vesicular-arbuscular mycorrhizal colonization of pretrans-plantrice (*Oryza sativa* L.) plasnts. *Biology and Fertility of Soils* **13**:85-91.

- Egerton-Warburton, L. M., and E. B. Allen. 2000. Shifts in arbuscular mycorrhizal communities along an anthropogenic nitrogen deposition gradient. *Ecological Applications* **10**:484-496.
- Embalomatis, A., D.K. Papakosta and P. Katinakis. 1994. Evaluation of *Rhizobium meliloti* strains isolated from indigenous populations in Northern Greece. *Journal Agronomy and Crop Science* **172**: 73-80.
- Fitter, A. H. 2005. Darkness visible: reflections on underground ecology. *Journal of Ecology* **93**:231-243.
- Fitter, A.H. 1990. The role and ecological significance of vesicular-arbuscular mycorrhizas in temperate ecosystems. *Agriculture, Ecosystems and Environment* **29**: 137-151.
- Frey B. and Schüepp H. 1993. Acquisition of nitrogen by external hyphae of arbuscular mycorrhizal fungi associated with *Zea mays* L. *New Phytologist* **124**:221-230.
- Gage D.J. 2004. Infection and Invasion of Roots by Symbiotic, Nitrogen-Fixing *Rhizobia* during Nodulation of Temperate Legumes. *Microbiol Mol Biol Rev.* **68**:280–300.
- Giovannetti M. Mosse B.1980. An evaluation of techniques for measuring vesicular arbuscular mycorrhizal infection in roots. *New Phytologist*
- Govers F., Moerman M., Downie J. A., Hooykaas P., Franssen H.J., Louwerse J., Kammen A.V. and Bisseling T. (1986). *Rhizobium* nod genes are involved in inducing an early nodulin gene. *Nature* **323**:564-466.
- Graham J. H. Linderman R. G. and Menge J. A. 1982. Development of external hyphae by different isolates of mycorrhizal *Glomus spp.* in relation (o root colonization and growth of Troyer Cltrange. *New Phytologist* **91**:183-189.
- Hardie K. and Leyton L. 1981. The influence of vesicular-arbuscular mycorrhiza on growth and water relations of red clover in phosphate deficient soil. *New Phytologist* **89**:599-608.

- Harley, J.L., and S.E. Smith. 1983. *Mycorrhizal Symbiosis*. Academic Press, London, UK.
- Harrier L. A., Watson C. A. 2003. The role of arbuscular mycorrhizal fungi in sustainable cropping systems. *Advances in Agronomy*, **79**:185-225.
- Hawkins H.J. Johansen A. and George E. 2000. Uptake and transport of organic and inorganic nitrogen by arbuscular mycorrhizal fungi. *Plant and Soil* **226**:275-285.
- Held M., Hossain Md S., Yokota k., Bonfante P., Stougaard J. and Szczyglowski K. 2010. Common and not so common symbiotic entry. *Trends in Plant Science* **15**: 540-545.
- Hodge A. Campbell C. D. and Fitter A. H. 2001. An arbuscular mycorrhizal fungus accelerates decomposition and acquires nitrogen directly from organic material. *Nature* **413**:297-299.
- Hoffland , E., T. W. Kuyper, H. Wallander, C. Plassard, A. A Gorbushina, K. Haselwandter , S. Holmström, R. Landeweert, U.S. Lundström, A. Rosling, R. Sen, M. M. Smits, P.A.W. van Hees, and N. van Breemen. 2004. The role of fungi in weathering. *Frontiers in Ecology and Environment* **2**:258-264.
- Howeler, R. H., L. F. Cadavid, and E. Burckhardt, 1983. Response of cassava to VA mycorrhizal inoculation and phosphorus application in greenhouse and field experiments. *Plant and Soil* **69**:327-339.
- Jakobsen, I. 1986. Vesicular-arbuscular mycorrhizas in field-grown crops III. Mycorrhizal infection and rates of phosphorus inflow in pea plants. *New Phytologist* **104**:573-581.
- Janos, D. P. 1988. Trees and Mycorrhiza. Mycorrhiza application in tropical forestry: are temperate-zone approaches appropriate? Pages 133-188 in F.S.P Ng, editor, Kuala Lumpur: Forest Research Institute, Malaysia.
- Janouskova, M., D. Pavlicova, T. Macek, and M. Vosatka. 2005. Arbuscular mycorrhiza decreases cadmium phytoextraction by transgenic tobacco with inserted metallothionein. *Plant and Soil* **272**:29-40.

- Johansen A. Jakobsen I. and Jensen E. S. 1992. Hyphal transport of ¹⁵N-labelled nitrogen by a vesicular-arbuscular mycorrhizal fungus and its effect on depletion of inorganic soil N. *New Phytologist* **122**:281-288.
- Johansen A. Jakobsen I. and Jensen E. S. 1993. Hyphal transport by a vesicular-arbuscular mycorrhizal fungus of N applied to the soil as ammonium or nitrate. *Biology and Fertility of Soils* **16**:66-70.
- Johnson, N.C., Graham, J.H., Smith, F.A., 1997. Functioning of mycorrhizal associations along the mutualism-parasitism continuum. *New Phytology* **135**: 575-585.
- Joner E.J., 2000. The effect of long-term fertilization with organic or inorganic fertilizers on mycorrhiza-mediated phosphorus uptake in subterranean clover. *Biology and Fertility of Soils*, **32**: 435-440.
- Koide R. 1985. The nature of growth depressions in sunflower caused by vesicular - arbuscular mycorrhizal infection. *New Phytologist*, **99**: 449-462.
- Lambers, H., F. S. Chapin III, and T. L. Pons 1998. *Plant Physiological. Ecology.* Springer Verlag, New York.
- Lang, P., R. Martin, and M. P. Golvano. 1993. Effect of nitrate on carbon metabolism and nitrogen fixation in root nodules of *lupinus albus*. *Plant Physiology and Biochemistry* **31**:639-648.
- Liu, A., C. Hamel, R. I. Hamilton, and D. L. Smith. 2000. Mycorrhizae formation and nutrient uptake of new corn (*Zea mays* L.) hybrids with extreme canopy and leaf architecture as influenced by soil N and P levels. *Plant and Soil* **221**:157-166.
- Long, S.R. 1989. *Rhizobium*-legume nodulation: life together in the under-ground. *Cell* **56**:203-214.
- Mader P. Vierheilig H. Streitwolf-Engel R. et al. 2000. Transport of ¹⁵N from a soil compartment separated by a polytetra-fluoroethylene membrane to plant roots via the hyphae of arbuscular mycorrhizal fungi. *New Phytologist* **146**:155-161.

- Mamolos, A. P., G. K. Elisseou and D. S. Veresoglou. 1995. Depth of root activity of co-existing grassland species in relation to N and P additions, measured using non-radioactive tracers by the addition of the limiting N and P. *Journal of Ecology* **83**:643-652.
- Mamolos, A. P., G. K. Elisseou and D. S. Veresoglou. 2005. Vegetation in contrasting soil water sites of upland herbaceous grasslands and N:P ratios as indicators of nutrient limitation. *Plant and Soil* **270**:355-369.
- Marschner, H., and B. Dell. 1994. Nutrient uptake in mycorrhizal symbiosis. *Plant and Soil* **159**: 89-102.
- Marschner, H., E. Kirkby, and I. Cakmak. 1996. Effect of mineral nutritional status on shoot-root partitioning of photoassimilates and cycling of mineral nutrients. *Journal of Experimental Botany* **47**:1255-1263.
- Marschner, P., G. Jentschke, and D. L. Godbold. 1998. Cation exchange capacity and lead sorption in ectomycorrhizal fungi. *Plant and Soil* **205**:93-98.
- Mathur., N, and A. Vyas. 2000. Influence of arbuscular mycorrhiza on biomass production, nutrient uptake and physiological changes in *Ziziphus mauritiana* Lam. under water stress. *Journal of Arid Environments* **45**: 191-195.
- Matthews, J. W., and K. Clay. 2001. Influence of fungal endophyte infection on plant-soil feedback and community interactions. *Ecology* **82**: 500-509.
- Menge, J. A., D. Steirle, D. J. Bagyaraj, E. L. V. Johnson, and R. T. Leonard. 1978. Phosphorus concentrations in plant responsible for inhibition of mycorrhizal infection. *New Phytologist* **80**:575-578.
- Miller R. M. and Jastrow J. D. 2000. Mycorrhizal fungi influence soil structure. Pages 3-18 in Y. Kapulnik and D. D. J. Douds, editors. *Arbuscular mycorrhizas: physiology and junction*. Kluwer Academic, Dordrecht, The Netherlands.
- Morton, J. B., and G.L. Benny. 1990. Revised classification of arbuscular mycorrhizal fungi (*Zygomycetes*). *Mycotaxon* **37**: 471-491.

- Newsham, K. K., A. H. Fitter, and A. R. Watkinson. 1995. Multifunctionality and biodiversity in arbuscular mycorrhizas. *Trends in Ecology and Evolution* **10**:407–411.
- Newsham, K.K, A.H. Fitter, and A.R. Watkinson. 1995a. Arbuscular mycorrhiza protect an annual grass from root pathogenic fungi in field. *Trends in Ecology and Evolution* **83**: 991-1000.
- Norman, J. R. and J. E. Hooker 2000. Sporulation of *Phytophthora fragariae* shows greater stimulation by exudates of non-mycorrhizal than by mycorrhizal strawberry roots. *Mycological Research* **104**:1069-1073.
- Papakosta, D.K. 1989. Effects of combined nitrogen and cultivars on nodulation and nitrogen fixation by three *Bradyrhizobium japonicum* inoculants in soybeans. *Agricultura Mediterranea* **119**: 129-137.
- Phillips, D.A., J. Wery, C.M. Joseph, A.D. Jones and L.R. Tenber. 1995. Release of flavonoids and betaines from seeds of seven *Medicago* species. *Crop Science* **35**:805-808.
- Phillips, J.M., and D.S. Hayman. 1970. Improved procedures for clearing roots and staining parasitic and vesicular-arbuscular mycorrhizal fungi for rapid assessment of infection. *Transactions of the British Mycological Society* **55**: 158-160.
- Pozo M. J. Slezack-Deschaumes S. Dumas-Gaudot E. Gianinazzi S. and Azcón-Aguilar C. 2002. Plant defense responses induced by arbuscular mycorrhizal fungi. Pages 103-111 in S. Gianinazzi, H. Schuepp, K. Haselwandter and J. M. Barea, editors, *Mycorrhizal Technology in Agriculture: From Genes to Bioproducts*. Basel: ALS Birkhauser Verlag.
- Ratnayake, M., R. T. Leonard, and J. A. Menge. 1978. Root exudation in relation to supply of phosphorus and its possible relevance to mycorrhizal formation. *New Phytologist* **81**:543-552.
- Raven J. A. Smith S. E. and Smith F. A. 1978. Ammonium assimilation and the role of mycorrhizas in climax communities in Scotland. *Botanical Society of Edinburgh Transactions* **43**:27-35.

- Read, D. J. 1991. Mycorrhizas in ecosystems-nature's responses to the 'Law of the Minimum'. Pages 101-130 in D. L. Hacksworth, editor. *Frontiers in mycology*, CAB International, Wallingford, CT.
- Read, D. J. Mycorrhizas in ecosystems. *Experientia* **47**:376-391.
- Rubio Arias, H. O., L. de la Vega, O. Ruiz, and K. Wood. 1999. Differential nodulation response and biomass yield of Alexandria clover as affected by levels of inorganic nitrogen fertilizer. *Journal of Plant Nutrition* **22**:1233-1239.
- Ryan, P. R., E. Delhaize, and D. L. Jones. 2001. Function and mechanism of organic anion exudation from plant roots. *Annual Review of Plant Physiology and Molecular Biology* **52**:527-560.
- Ryan, M., Graham, J.H., 2002. Is there a role for arbuscular mycorrhizal fungi in production agriculture. *Plant and Soil* **244**: 263-271.
- Sanders F. E. and Tinker P. B. 1971. Mechanism of absorption of phosphate from soil by Endogone mycorrhizas. *Nature* **233**:278 -279.
- Sanders F.E. and Tinker P.B. 1971. Mechanism adsorption of phosphate from soil by Endogone mycorrhizas. *Nature* **233**:278-279.
- Schröder M. S., Janos D. P., 2004. Phosphorus and intraspecific density alter plant responses to arbuscular mycorrhizas. *Plant and Soil*, **264**:335-348.
- Schüßler, A., D. Schwarzott, and C. Walker. 2001. A new fungal phylum, the Glomeromycota: phylogeny and evolution. *Mycological Research* **105**: 1413-1421.
- Sieverding E. 1981. Influence of soil water regimes on VA mycorrhizae. Effect on plant growth, water utilization and development of mycorrhiza. *Journal of Agronomy and Crop Science* **150**:400--411.
- Singleton, P. W. and C. van Kessel. 1987. Effect of localized nitrogen availability to soybean half-root systems on photosynthate partitioning to roots and nodules. *Plant Physiology* **83**:552-556.

- Smith S.E. and Read D.J. 1997. Mycorrhizal Symbiosis. 2nd edition. Academic Press. London.
- Smith, S. E., B. J. St. John, and F. A. Smith. 1986. Effects of mycorrhizal infection on plant growth, nitrogen and phosphorus nutrition in glasshouse-grown *Allium cepa* L. *New Phytologist* **103**:359-373.
- Smith, S.E., and V. Gianinazzi-Pearson. 1988. Physiological interactions between symbioses in vesicular arbuscular mycorrhizal plants. *Annual Review of Plant Physiology and Molecular Biology* **39**: 221-244.
- Smith, S.E., Dickson, S. & Smith, F.A. (2001) Nutrient transfer in arbuscular mycorrhizas: how are fungal and plant processes integrated? *Australian Journal of Plant Physiology* **83**:683-694.
- Sylvia D. M. 1994. Vesicular – Arbuscular Mycorrhizal fungi. *Soil Science, Society of America* 351-377.
- Sylvia, D. M., and L. H. Neal. 1990. Nitrogen affects the phosphorus response of VA mycorrhiza. *New Phytologist* **115**:303-310.
- Thingstrup, I., G. Rubaek, E. Sibbesen, and I. Jakobsen. 1998. Flax (*Linum usitatissimum* L.) depends on arbuscular mycorrhizal fungi for growth and P uptake at intermediate but not high soil P levels in the field. *Plant and Soil* **203**:37-46.
- Thomas, R. B., M. A. Bashkin, and D. D. Richter. 2000. Nitrogen inhibition of nodulation and N₂ fixation of a tropical N₂-fixing tree (*Gliricidia sepium*) grown in elevated atmospheric CO₂. *New Phytologist* **145**:233-243.
- Tilman, D. 1988. Plant strategies and the dynamics and structure of plant communities. Princeton University Press, Princeton, New Jersey, USA.
- Tilman, D., and M. L. Cowan. 1989. Growth of old fields herbs on a nitrogen gradient. *Functional Ecology* **3**:425-438.
- Tobar R. Azcón R. and Barea J. M. 1994. Improved nitrogen uptake and transport .from 15Nlabelled nitrate by external hyphae of arbuscular mycorrhiza under water-stressed conditions. *New Phytologist* **126**: 119-122.

- Treseder, K. K. 2006. A meta-analysis of mycorrhizal responses to nitrogen, phosphorus, and atmospheric CO₂ in fields studies. *New Phytologist* **164**:347-355.
- Treseder, K. K., and P. M. Vitousek. 2001. Effects of soil nutrient availability on investment in acquisition of N and P in Hawaiian rain forests. *Ecology* **82**:946-954.
- Toro M, Azcón R., Barea J.M. 1997. Improvement of arbuscular mycorrhiza development by inoculation of soil with phosphate- solubilizing rhizobacteria to improve rock phosphate bioavailability (P-32) and nutrient cycling. *Applied and Environmental Microbiology*, **63**: 4408---4412.
- Walker, C., and A. Schüßler. 2004. Nomenclatural clarifications and new taxa in the *Glomeromycota*. *Mycological Research* **108**: 981-982.
- Wallander, H. 2000. Uptake of P from apatite by *Pinus sylvestris* seedlings colonized by different ectomycorrhizal fungi. *Plant and Soil* **218**:249-256.
- Wilkins D. A. 1991. The influence of sheathing (ecto-)mycorrhizas of trees on the uptake and toxicity of metals. *Agriculture Ecosystems & Environment* **35**:245-260.
- Zuanazzi J.A.S, Clergeot P.H., Quirion J.-C., Husson H.-P., Kondorosi A. and Ratet P. (1998). Production of *Sinorhizobium meliloti* nod Gene Activator and Repressor Flavonoids from *Medicago sativa* Roots. *Molecular Plant-Microbe Interactions* **11**:784-794