



ΠΑΝΕΠΙΣΤΗΜΙΟ ΘΕΣΣΑΛΙΑΣ

ΠΡΟΓΡΑΜΜΑ ΜΕΤΑΠΤΥΧΙΑΚΩΝ ΣΠΟΥΔΩΝ ΤΟΥ ΤΜΗΜΑΤΟΣ  
ΒΙΟΧΗΜΕΙΑΣ ΚΑΙ ΒΙΟΤΕΧΝΟΛΟΓΙΑΣ

ΑΝΤΩΝΙΑΔΗΣ ΚΩΝΣΤΑΝΤΙΝΟΣ

ΑΝΑΠΤΥΞΗ ΚΑΙ ΑΞΙΟΛΟΓΗΣΗ ΕΝΔΟΓΕΝΩΝ ΜΥΚΟΡΡΙΖΙΚΩΝ  
ΜΥΚΗΤΩΝ ΩΣ ΕΜΒΟΛΙΑ ΓΙΑ ΤΗΝ ΒΕΛΤΙΩΣΗ ΤΗΣ ΘΡΕΨΗΣ ΦΥΤΩΝ  
ΠΙΠΕΡΙΑΣ ΚΑΙ ΤΟΜΑΤΑΣ ΣΕ ΣΥΣΤΗΜΑΤΑ ΒΙΟΛΟΓΙΚΗΣ ΓΕΩΡΓΙΑΣ

ΛΑΡΙΣΑ 2009

Ανάπτυξη και αξιολόγηση ενδογενών μυκορριζικών μυκήτων ως εμβόλια για  
την βελτίωση της θρέψης φυτών πιπεριάς και τομάτας σε συστήματα  
βιολογικής γεωργίας

### **Τριμελής Επιτροπή**

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

*στην Αναστασία  
και στον Γιώργο*

## Ευχαριστίες

Καταρχάς, θα ήθελα να ευχαριστήσω τον Λέκτορα Βιοτεχνολογίας Αποικοδομητικών Μικροοργανισμών κ. Δ. Καρπούζα, ο οποίος επιφορτίστηκε την επίβλεψη αυτού του πονήματος, τόσο για την επιστημονική καθοδήγηση και την πολύτιμη βοήθειά του, όσο και για την εμπιστοσύνη με την οποία με περιέβαλε. Επίσης, ευχαριστώ και τα άλλα δύο μέλη της τριμελούς επιτροπής, την Επίκουρο Καθηγήτρια Βιοτεχνολογίας Φυτών κ. Κ. Παπαδοπούλου και τον Λέκτορα Βιοτεχνολογίας Μικροβίων κ. Δ. Μόσιαλο, για το χρόνο που μου αφιέρωσαν.

Τις ιδιαίτερες ευχαριστίες μου απευθύνω στον κ. Ι. Υψηλάντη, Μεταδιδακτορικό Ερευνητή του Τμήματος Βιοχημείας και Βιοτεχνολογίας για την καθοδήγηση και τις πολύτιμες επιστημονικές συμβουλές του, χωρίς τις οποίες η ολοκλήρωση της παρούσας εργασίας θα ήταν εξαιρετικά δύσκολη, αλλά και την υπομονή που επέδειξε καθ' όλη τη διάρκεια της συνεργασίας μας.. Επίσης, ευχαριστώ τα υπόλοιπα μέλη της ομάδας Βιοτεχνολογίας Φυτών και Περιβάλλοντος για την άριστη συνεργασία μας, για όσο χρόνο μοιραστήκαμε τον ίδιο χώρο, την Διοίκηση της εταιρείας Nature A.B.E.E. για την παραχώρηση του εργαστηρίου της για την υλοποίηση των αναλύσεων εδάφους και φυτικών ιστών, καθώς και το προσωπικό της ίδιας εταιρείας για την βοήθεια που μου πρόσφερε.

Τέλος, ευχαριστώ όσους με στήριξαν και με βοήθησαν στην προσπάθεια αυτή.

## ΠΕΡΙΕΧΟΜΕΝΑ

ΠΕΡΙΛΗΨΗ.....	7
A. ΕΙΣΑΓΩΓΗ.....	8
A.1. Οι μυκόρριζες και η κατάταξή τους.....	8
A.2. Ο ρόλος των μυκορριζών στην γεωργία.....	9
A.3. Ο στόχος του πειράματος.....	14
B. ΥΛΙΚΑ ΚΑΙ ΜΕΘΟΔΟΙ .....	15
B.1. Πειραματικός σχεδιασμός.....	15
B.2. Δειγματοληψία εδάφους.....	16
B.3. Πολλαπλασιασμός σπορίων (‘καλλιέργειες παγίδες’).....	19
B.3.1. Εξαγωγή των σπορίων.....	19
B.3.2. Ομαδοποίηση και καταμέτρηση σπορίων.....	20
B.3.3. Έλεγχος αποικισμού.....	21
B.4. Ανακαλλιέργειες σε φυτά αραβοσίτου.....	21
B.5. Μοριακός χαρακτηρισμός.....	22
B.6. Καλλιέργεια φυτών πιπεριάς και τομάτας.....	26
B.7. MIP test - Έλεγχος μολυσματικής ικανότητας μυκορριζικού εμβολίου.....	28
B.8. Αναλύσεις εδάφους και φυτικών ιστών.....	29
B.9. Στατιστική ανάλυση.....	29
Γ. ΑΠΟΤΕΛΕΣΜΑΤΑ.....	30
Γ.1. Απομόνωση μυκήτων.....	30
Γ.2. Μολυσματικότητα εμβολίου.....	32
Γ.3. Ταυτοποίηση των μυκήτων.....	33
Γ.4. Πείραμα πιπεριάς.....	35
Γ.5. Πείραμα τομάτας.....	43
Δ. ΣΥΖΗΤΗΣΗ.....	48
Ε. ΣΥΜΠΕΡΑΣΜΑΤΑ.....	53
ΒΙΒΛΙΟΓΡΑΦΙΑ.....	54
ΠΑΡΑΡΤΗΜΑ.....	63

## ΠΕΡΙΛΗΨΗ

Οι περιορισμοί στη χρήση συνθετικών λιπασμάτων στην βιολογική γεωργία, έχουν καταστήσει την χρήση των δενδροειδών μυκορριζικών (ΔΜ) μυκήτων μία προσιτή λύση για βελτίωση της θρέψης των φυτών. Στόχος της παρούσας εργασίας ήταν η απομόνωση, ταυτοποίηση και στην συνέχεια προκαταρκτική αξιολόγηση ενδογενών ΔΜ μυκήτων από αγροκτήματα βιολογικής γεωργίας ως προς την αποτελεσματικότητα και την μολυσματικότητά τους σε φυτά τομάτας και πιπεριάς. Χρησιμοποιήθηκε ως μυκορριζικό εμβόλιο ριζοσφαιρικό έδαφος και ρίζες από πιστοποιημένες καλλιέργειες κηπευτικών βιολογικής γεωργίας από περιοχές της Κεντρικής Μακεδονίας και Θεσσαλίας και αναπτύχθηκαν καλλιέργειες ΔΜ μυκήτων. Η αρχική επιλογή οδήγησε στην απομόνωση πέντε μορφολογικά αμιγών καλλιεργειών ΔΜ μυκήτων. Μοριακή ταυτοποίηση επιβεβαίωσε την αμιγότητα τεσσάρων από τις πέντε καλλιέργειες που αποτελούνταν από μύκητες των ειδών *G. intraradices* (MC3), *G. etunicatum* (MC4) και *G. mosseae* (MC10, MC22) ενώ η πέμπτη καλλιέργεια MC27 αποτελούσε μίγμα των μυκήτων *G. mosseae* και *G. etunicatum*. Τα ενδογενή μυκορριζικά εμβόλια αξιολογήθηκαν ως προς την μολυσματικότητά τους και την αποτελεσματικότητά τους να βελτιώνουν την θρέψη και την ανάπτυξη φυτών πιπεριάς και τομάτας. Έτσι πειράματα σε φυτοδοχεία έδειξαν ότι τα ενδογενή μυκορριζικά εμβόλια 1) αποίκισαν καλύτερα τα φυτά πιπεριάς από ότι τα φυτά τομάτας 2) οδήγησαν σε σημαντική αύξηση της πρόσληψης φωσφόρου (P) στα φυτά πιπεριάς η οποία παρουσίασε σημαντική θετική συσχέτιση με τα επίπεδα μυκορριζικού αποικισμού 3) δεν προκάλεσαν αύξηση της φυτικής ανάπτυξης τουλάχιστον στα πρώτα στάδια του βιολογικού τους κύκλου που εξετάστηκαν και 4) υπερέτρησαν του εμπορικού μυκορριζικού σκευάσματος TRI-TON στον αποικισμό των φυτών και στην πρόσληψη P καταδεικνύοντας την υπεροχή ενδογενών προσαρμοσμένων μυκορριζικών εμβολίων σε σχέση με εξωγενή εμβόλια. Τα παραπάνω αποτελέσματα θα αποτελέσουν την πλατφόρμα για την μελλοντική αξιολόγηση των ενδογενών μυκορριζικών εμβολίων σε συνθήκες αγρού αλλά και βελτιστοποίηση της εφαρμογής τους.

## A. ΕΙΣΑΓΩΓΗ

### A.1. ΟΙ ΜΥΚΟΡΡΙΖΕΣ ΚΑΙ Η ΚΑΤΑΤΑΞΗ ΤΟΥΣ

Οι μυκόρριζες αποτελούν την συμβίωση ανάμεσα σε φυτό και σε μύκητα. Στην αμοιβαία ωφέλιμη αυτή συμβιωτική σχέση, το φυτό τροφοδοτεί το μύκητα με υδατάνθρακες που παράγονται μέσω της φωτοσύνθεσης και ο μύκητας προμηθεύει τα φυτά με ανόργανα θρεπτικά συστατικά τα οποία παραλαμβάνει από το έδαφος (*Smith & Read 1997*). Περισσότερο από το 80% των χερσαίων φυτικών ειδών μπορούν να σχηματίσουν μυκόρριζες (*Ulrich et al., 2002*).

Οι πλέον κοινές κατηγορίες μυκορριζών είναι οι ενδομυκόρριζες και οι εκτομυκόρριζες (*Smith & Read 1997*). Οι εκτομυκόρριζες σχηματίζονται κυρίως από τη συμβίωση μεταξύ βασιδιομυκήτων ή ασκομυκήτων με τις ρίζες και τα ριζικά τριχίδια δασικών πολυετών φυτών. Στις εκτομυκόρριζες το όλο δομικό σύστημα αποτελείται από τα παρακάτω μέρη:

- I. Την ρίζα του φυτού
- II. Το μανδύα που σχηματίζει ο μύκητας γύρω από τη ρίζα του φυτού
- III. Ένα δίκτυο υφών του μύκητα που σχηματίζεται μεταξύ των κυττάρων του φλοιού της ρίζας (δίκτυο Hartig) και
- IV. Ενός εκτεταμένου μυκηλιακού σώματος που αναπτύσσεται στο έδαφος.

Οι ενδομυκόρριζες ταξινομούνται σε τρεις κατηγορίες

- I. 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*.
- II. Ενδομυκόρριζες που σχηματίζονται μεταξύ φυτικών ειδών της οικογένειας *Orchidaceae* και βασιδιομυκήτων και αποτελούν έναν επίσης εξειδικευμένο μυκορριζικό τύπο και
- III. Τις κυστοειδής – δενδροειδής ή θυσανώδεις μυκόρριζες (Arbuscular Mycorrhizae) (ΔΜ) που είναι ο πλέον κοινός τύπος μυκορριζών. Οι ΔΜ σχηματίζονται μεταξύ φυτών και Γλομερομυκήτων. Μεταξύ των φυτών που σχηματίζουν ΔΜ περιλαμβάνονται αγγειόσπερμα, γυμνόσπερμα και πτεριδόφυτα που έχουν όλα πραγματικές ρίζες και γαμετόφυτα τα οποία δεν έχουν. Λίγα φυτά δεν σχηματίζουν ΔΜ μυκόρριζες, μεταξύ των οποίων φυτά που ανήκουν στις οικογένειες *Brassicaceae*, *Polygonaceae*, *Caryophyllaceae* και *Juncaceae* (*Smith & Read 1997*).



Τα δομικά στοιχεία των ΔΜ μυκορριζών είναι:

- I. Η ρίζα του φυτού
- II. Οι μυκηλιακές υφές που διαπερνούν τα κύτταρα του φλοιού των ριζών. Οι μυκηλιακές υφές έχουν δενδρόμορφο ή θυσανώδες σχήμα (arbuscules) και ορισμένες φορές σχηματίζουν και κύστες (vesicles) (Smith & Read 1997). Μέσα από αυτές τις μυκηλιακές υφές, οι οποίες έδωσαν και το όνομά τους στον συγκεκριμένο τύπο μυκορριζών, γίνεται η μεταφορά των θρεπτικών στοιχείων από το έδαφος στα φυτά. (Smith and Gianinazzi-Pearson, 1988). Το 80% περίπου των μυκορριζικών φυτών σχηματίζουν δενδρόμορφες υφές και κύστες, ενώ το υπόλοιπο ποσοστό σχηματίζει μόνο δενδρόμορφες υφές (Brundrett, 2004).
- III. Το μυκήλιο το οποίο εκτείνεται στο έδαφος. Οι υφές αυτές στο σύνολό τους αναπτύσσουν επιφάνεια μεγαλύτερη από αυτή της ρίζας, με αποτέλεσμα το μυκήλιο να αξιοποιεί αποτελεσματικότερα μεγαλύτερο όγκο εδάφους και κατά συνέπεια να αποτελεί σημαντικό εργαλείο στην απορρόφηση θρεπτικών στοιχείων από το έδαφος. (Marschner and Dell, 2003· Cavagnaro et al., 2006).

## **A.2. Ο ΡΟΛΟΣ ΤΩΝ ΜΥΚΟΡΡΙΖΩΝ ΣΤΗΝ ΓΕΩΡΓΙΑ**

Η συνεισφορά των θυσανωδών μυκορριζών στην γεωργική πρακτική είναι πολλαπλή. Διάφορες έρευνες έχουν δείξει ότι οι μύκητες προστατεύουν τα φυτά από παθογόνους εδαφογενείς μύκητες (Caron et al., 1985) όπως για παράδειγμα ο περιορισμός της προσβολής της τομάτας από τους παθογόνους μύκητες *Alternaria solani* (Fritz et al., 2006) και *Verticillium dahliae* (Karagiannidis et al., 2002), προσβολές από νηματώδεις όπως η μειωμένη προσβολή μυκορριζικών φυτών τομάτας από τον ριζόκομβο νηματώδη *Meloidogyne incognita*, ενώ παράλληλα βελτιώνουν την υδατική κατάσταση των προσβεβλημένων φυτών (Siddiqui and Sayeed, 2007), συμβάλλουν στην βελτίωση της υδατικής κατάστασης των φυτών (Allen and Allen, 1986· Auge et al., 1986· Auge and Duan, 1991· Davis et al., 1992) και αυξάνουν την αντοχή των φυτών στην αλατότητα και άλλες αντίξοες περιβαλλοντικές συνθήκες (Al-Karaki et al., 2001· Harrier and Watson, 2003). Επίσης τα μυκορριζικά φυτά έχουν την ικανότητα να προσλαμβάνουν θρεπτικά συστατικά σε μεγάλο εύρος pH αξιοποιώντας έτσι τόσο όξινα όσο και αλκαλικά εδάφη. Το είδος των εδαφών που ευνοείται εξαρτάται από το είδος του μύκητα που έχει αποικίσει τα φυτά. (Clark and Zeto, 1996).

Ο σημαντικότερος όμως ρόλος των μυκορριζών είναι η συνεισφορά τους στην ανάπτυξη των φυτών και στην θρέψη τους. Η συσχέτιση του αποικισμού των φυτών από

μυκορριζικούς μύκητες και της αύξησης των φυτών παρατηρήθηκε για πρώτη φορά από τον Asai (1944), ενώ ακολούθησαν πολλές έρευνες σχετικά με την ανάπτυξη διάφορων φυτικών ειδών και μάλιστα σε συνάρτηση με τις εδαφικές συνθήκες και την πυκνότητα του μυκορριζικού πληθυσμού - μολύσματος (*Smith & Read 1997*). Αν και υπάρχουν και αναφορές ότι η αύξηση ορισμένων φυτικών ειδών δεν ανταποκρίνεται πάντα θετικά στον αποικισμό με μυκορριζικούς μύκητες (*Li et al., 2008*), γενικά οι ΔΜ αυξάνουν την πρόσληψη των θρεπτικών στοιχείων και ιδιαίτερα οι ενδογενείς ΔΜ μύκητες προσδίδουν συγκριτικό πλεονέκτημα στα μυκορριζικά φυτά (*Dhillion, 1992*). Ο αποικισμός των φυτών με μυκορριζικούς μύκητες δείχνει να είναι επωφέλης για την τροφοδοσία των φυτών με άζωτο (N) (*Frey and Schuepp H., 1993 · Johansen et al., 1993*) και άλλα ανόργανα θρεπτικά στοιχεία, συμπεριλαμβανομένων των Zn, Cu και K (*Marschner and Dell, 2003*).

Το μεγαλύτερο και πιο σημαντικό όφελος που αποκομίζουν τα φυτά από την συμβίωση τους με τις μυκόρριζες είναι αυξημένη απορρόφηση φωσφόρου (P), ιδιαίτερα στις περιπτώσεις όπου ο αποικισμός από ΔΜ μύκητες είναι υψηλός και ο P 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 ΔΜ μύκητες (*Toro et al., 1997*). Πλήθος ερευνών έχουν δείξει ότι τα μυκορριζικά φυτά μπορούν να προσλάβουν περισσότερο P συγκριτικά με τα μη μυκορριζικά φυτά, ιδιαίτερα στις περιπτώσεις όπου ο P 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*).

Οι επιδράσεις των μυκορριζών όπως προαναφέρθηκε, είναι σημαντικές σε γεωργικές εκμεταλλεύσεις όπου εφαρμόζονται συστήματα βιολογικής γεωργίας (*de Dye et al., 2001*), καθώς και σε περιπτώσεις όπου οι εισροές είναι μειωμένες (*Menge, 1983 · Hetrick, 1991 · Scullion et al., 1998*), ενώ δεν φαίνεται να παρουσιάζουν σημαντική συνεισφορά σε αγροκτήματα συμβατικής γεωργίας (*Galvez et al., 2001*), καθώς η χρήση γεωργικών φαρμάκων και ανόργανων λιπασμάτων από την μια περιορίζει σημαντικά την ανάπτυξη των μυκορριζικών μυκήτων (*Chellemi, 2000*), αλλά από την άλλη μεγιστοποιεί την παραγωγή. Αντίθετα, σε βιολογικά συστήματα γεωργίας, η προσπάθεια για την ανάπτυξη πληθυσμών μυκορριζικών μυκήτων, απαιτεί χειρισμούς όπως χρήση ήπιων καλλιεργητικών τεχνικών και μείωση των εισροών σε αγροχημικά, οπότε τίθεται σε κίνδυνο η παραγωγή και η οικονομία των παραγωγών (*Jasper et al., 1991*).

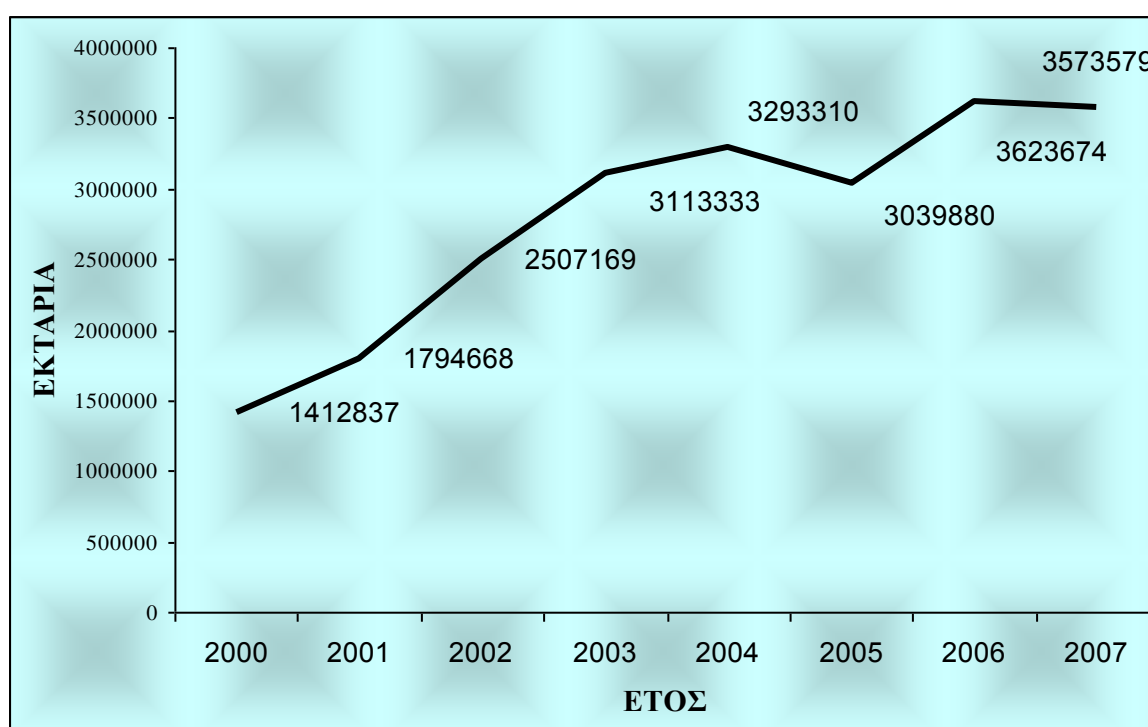
Τα τελευταία χρόνια, η γεωργική πρακτική των μειωμένων εισροών έχει κεντρίσει το ενδιαφέρον πολλών παραγωγών με απώτερο στόχο την αειφορική ανάπτυξη. Τα συστήματα αυτά διαχείρισης της γεωργικής παραγωγής ονομάστηκαν ‘συστήματα ολοκληρωμένης διαχείρισης’ (*Mäder et al., 2002*). Παράλληλα αναπτύχθηκε και το βιολογικό σύστημα παραγωγής το οποίο βασίζεται στην ελαχιστοποίηση των εισροών σε συνθετικά λιπάσματα και γεωργικά φάρμακα, καθώς στα συστήματα αυτή η φυτοπροστασία στηρίζεται κυρίως στην εφαρμογή φυσικών προϊόντων και φυτικών και ζωικών υπολειμμάτων. Στη Ευρωπαϊκή Ένωση οι επιτρεπόμενες εισροές καθορίζονται από τους κανονισμούς 834/07 και 889/08 της ΕΕ (<http://eur-lex.europa.eu>) περί του βιολογικού τρόπου παραγωγής γεωργικών προϊόντων και των σχετικών ενδείξεων στα γεωργικά προϊόντα και στα είδη διατροφής. Στην βιολογική όμως γεωργία είναι σύνηθες το φαινόμενο της εμφάνισης τροφопενιών στα φυτά λόγω της μειωμένης διαθεσιμότητας ανόργανων θρεπτικών στοιχείων. Το πρόβλημα αυτό είναι εντονότερο για το φώσφορο, καθώς οι διαθέσιμες πηγές φωσφόρου που επιτρέπεται να εφαρμοστούν όπως ορίζονται από την Ευρωπαϊκή Οδηγία είναι εξαιρετικά περιορισμένες (φωσφορίτης και γκουανό) (*Oehl et al., 2002*). Κάτω από αυτές τις συνθήκες τα φυτά γίνονται περισσότερο εξαρτώμενα από τις μυκόρριζες για την πρόσληψη φωσφόρου από το έδαφος (*Smith and Read, 1997*). Έτσι η χρήση ΔΜ μυκήτων για την βελτιστοποίηση της θρέψης των φυτών σε φώσφορο αποτελεί μια δεδομένη επιλογή για την αντιμετώπιση του προβλήματος έλλειψης φωσφόρου που παρουσιάζονται στα συστήματα βιολογικής καλλιέργειας.

Ωστόσο, η χρήση των μυκορριζών στα συστήματα βιολογικής γεωργίας, δεν είναι πάντα αποτελεσματική. Διάφορες αγροτικές πρακτικές όπως η ενσωμάτωση φυτικών υπολειμμάτων στο έδαφος καθώς και η προσθήκη κοπριάς για την λίπανση των αγρών, μπορεί να αποτελέσουν ανασταλτικό παράγοντα στην ανάπτυξη μυκορριζών. Τόσο τα φυτικά υπολείμματα όσο και η κοπριά, περιέχουν φώσφορο (P) σε ανόργανη (Pi) και οργανική (Po) μορφή (*Bromfield and Jones, 1972* · *Kirchmann and Witter, 1992*). Ο Pi επιφέρει μείωση στη βιωσιμότητα των μυκορριζών (*Christie and Kilpatrick, 1992*), ενώ η επίδραση του Po εξαρτάται από την ποσότητά του και την περίοδο απόδοσής του στα φυτά (*Joner and Jakobsen, 1995*). Έχει επίσης παρατηρηθεί ότι σε συστήματα βιολογικής γεωργίας μπορεί να υπάρχει συσσώρευση Pi από λιπάνσεις παρελθόντων ετών. Κατά συνέπεια η αναβάθμιση και ενίσχυση των μυκορριζών στην βιολογική γεωργία, θα πρέπει να συνοδεύεται από αγροτικές πρακτικές που δεν έχουν ανασταλτική δράση στην ανάπτυξη και δράση των ΔΜ μυκήτων όπως η αλόγιστη χρήση κοπριάς και υπολειμμάτων ή η καλλιέργεια σε προγράμματα αμειψισποράς μη μυκορριζικών φυτών – ξενιστών. Επιπροσθέτως, σε

περιπτώσεις όπου κρίνεται αναγκαίο, ο εμβολιασμός των εδαφών με αποτελεσματικούς μυκορριζικούς μύκητες αποτελεί μια ενδιαφέρουσα προοπτική (Lekberg and Koide, 2005).

**Ποιοι όμως μπορεί να είναι περισσότερο αποτελεσματικοί ΔΜ μύκητες;** Προηγούμενες μελέτες έχουν δείξει ότι ενδογενής ΔΜ μύκητες που προέρχονται από εδάφη και συστήματα καλλιέργειας ανάλογα με αυτά στα οποία θα εφαρμοστούν αποτελούν τα πιο αποτελεσματικά μυκορριζικά εμβόλια για την ενίσχυση της φυτικής ανάπτυξης (Porter et al., 1978 · Hayman, 1982). Συνεπώς, η χρήση ΔΜ μυκήτων που ενδημούν και έχουν απομονωθεί από εδάφη και αγροκτήματα βιολογικής καλλιέργειας είναι πιθανό να αποτελούν τα πιο αποτελεσματικά εμβόλια για εφαρμογή σε συστήματα βιολογικής γεωργίας για ενίσχυση της φυτικής ανάπτυξης.

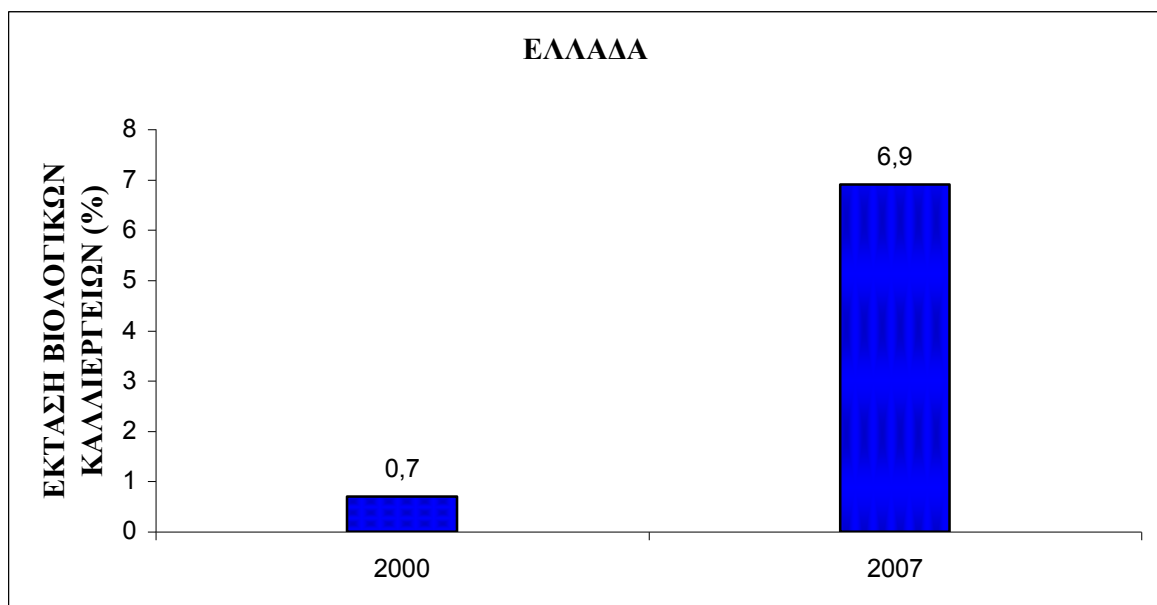
Σήμερα, σύμφωνα με πρόσφατα στοιχεία της EUROSTAT (<http://epp.eurostat.ec.europa.eu>), η βιολογική γεωργία στην Ευρώπη καταλαμβάνει 3.573.579 εκτάρια εκμεταλλεύσιμης γεωργικής γης, με την Ελλάδα να βρίσκεται στην 9<sup>η</sup> θέση με 174.724 εκτάρια (στοιχεία EUROSTAT 2007). Αντίθετα, στοιχεία του ίδιου Οργανισμού για το έτος 2000 έδειξαν ότι η συνολική καλλιεργήσιμη έκταση στην Ευρώπη που βρίσκονταν σε καθεστώς βιολογικής γεωργίας έφθανε στα 1.412.837 εκτάρια (αύξηση 273,36%) και η Ελλάδα βρίσκονταν στην 11<sup>η</sup> θέση με 10.309 εκτάρια (αύξηση 2.458,61%) **(Σχεδιαγράμματα A.2.1. και A.2.2)**. Επίσης το 2000 η Ελλάδα βρισκόταν στην 15<sup>η</sup> θέση αναφορικά με το ποσοστό την έκτασης που βρισκόταν υπό καθεστώς βιολογικής γεωργίας (0,6%) ενώ το 2007 ανέβηκε στην 6<sup>η</sup> θέση με το 6,9% της γεωργικής έκτασης να είναι ενταγμένο σε καθεστώς βιολογικής γεωργίας. **(Σχεδιάγραμμα A.2.3.)**.



**Σχεδιάγραμμα Α.2.1.** Η εξέλιξη της βιολογικής γεωργίας στην Ευρώπη από το 2000 μέχρι το 2007 σε εκτάρια. (Πηγή: EUROSTAT 2007).



**Σχεδιάγραμμα Α.2.2.** Η εξέλιξη της βιολογικής γεωργίας στην Ελλάδα από το 2000 μέχρι το 2007 σε εκτάρια. (Πηγή: EUROSTAT 2007). Για τα έτη 1998 και 2001 δεν υπάρχουν δεδομένα.



**Σχεδιάγραμμα Α.2.3.** Το ποσοστό της ενταγμένης έκτασης στην Ελλάδα σε καθεστώς βιολογικής γεωργίας κατά τα έτη 2000 και 2007. (Πηγή: EUROSTAT 2007).

### **A.3. Ο ΣΤΟΧΟΣ ΤΟΥ ΠΕΙΡΑΜΑΤΟΣ**

Η επιτυχημένη χρήση εμβολίου για την ανάπτυξη μυκορριζών απαιτεί την επιλογή ενδεδειγμένων μυκήτων (*Abbott and Robson, 1982· Menge, 1983*). Τα δύο κριτήρια για την καταλληλότητά τους αποτελούν η ικανότητα αποικισμού της ρίζας των φυτών (μολυσματικότητα) και η αποτελεσματικότητά τους στην προαγωγή της θρέψης και της ανάπτυξης των φυτών (*Haas and Krikun, 1985*). Στόχος της παρούσας εργασίας ήταν η απομόνωση, ταυτοποίηση και προκαταρκτική αξιολόγηση ενδογενών ΔΜ μυκορριζικών μυκήτων, από αγροκτήματα βιολογικής γεωργίας της περιοχής της Κεντρικής Μακεδονίας και Θεσσαλίας, ως προς την αποτελεσματικότητα και την μολυσματικότητά τους σε δύο λαχανοκομία είδη, τομάτα και πιπεριά, που αναπτύχθηκαν σε φυτοδοχεία.

## **B. ΥΛΙΚΑ ΚΑΙ ΜΕΘΟΔΟΙ**

### **B.1. ΠΕΙΡΑΜΑΤΙΚΟΣ ΣΧΕΔΙΑΣΜΟΣ**

Αναγκαίο βήμα για την υλοποίηση του σκοπού μας ήταν η δημιουργία αμιγών μυκορριζικών καλλιεργειών, ώστε να είναι εφικτή η αξιολόγηση της αποτελεσματικότητας τους, καθώς και η παραγωγή ικανής ποσότητας μολύσματος για την διεξαγωγή πειραμάτων. Η ανάπτυξη των αμιγών καλλιεργειών πραγματοποιήθηκε σύμφωνα με τους Jarstfer και Sylvia (1992). Για την ανάπτυξη των αμιγών καλλιεργειών ακολουθήθηκαν επιγραμματικά τα παρακάτω βήματα:

1. Λήψη δειγμάτων ριζών και ριζοσφαιρικού εδάφους από αγροκτήματα βιολογικής γεωργίας για τη συγκέντρωση εμβολίου.
2. Ανάπτυξη και πολλαπλασιασμός του εμβολίου από τα αρχικά δείγματα (δημιουργία ‘καλλιεργειών – παγίδων’).
3. Εξαγωγή και διαχωρισμός των σπορίων των ΑΜ μυκήτων με βάση μορφολογικά χαρακτηριστικά σπορίων και απομόνωση.
4. Ομαδοποίηση και καταμέτρηση σπορίων της ίδιας ομάδας.
5. Εμβολιασμός φυτών αραβοσίτου με τα συγκομισθέντα σπόρια για την ανάπτυξη αμιγών καλλιεργειών μυκορριζικών μυκήτων.
6. Απομόνωση των σπορίων από τις αμιγής καλλιέργειες και επανέλεγχος του αποικισμού και της αμιγότητας
7. Ταυτοποίηση της αμιγότητας των καλλιεργειών με την χρήση μοριακών τεχνικών

Μετά την ανάπτυξη μυκορριζικού εμβολίου έγινε εμβολιασμός φυτών τομάτας και πιπεριάς για την αξιολόγηση της αποτελεσματικότητας των εμβολίων.

## B.2. ΔΕΙΓΜΑΤΟΛΗΨΙΑ ΕΔΑΦΟΥΣ

Δείγματα εδάφους συλλέχθηκαν από είκοσι αγροκτήματα βιολογικής καλλιέργειας των περιοχών Ημαθίας, Πέλλας, Θεσσαλονίκης και Λάρισας (**Πίνακας B.2.1**), με στόχο την συγκέντρωση μυκορριζικού εμβολίου. Τα συγκεκριμένα αγροκτήματα βρίσκονταν σε καθεστώς βιολογικής γεωργίας περισσότερο από τέσσερα χρόνια, δηλαδή πέρα της παρέλευσης του χρονικού ορίου των δύο ετών που απαιτείται σύμφωνα με την Ευρωπαϊκή νομοθεσία (οδηγία 889/08 της ΕΕ) για την μετάβαση ενός αγροκτήματος από τη συμβατική στη βιολογική γεωργία. Στα αγροκτήματα αυτά καλλιεργούνταν διάφορα είδη κηπευτικών όπως τομάτες (*Solanum lycopersicum* Mill.), πιπεριές (*Capsicum annuum* L.), μελιτζάνες (*Solanum melongena* L.) και αγγουράκια (*Cucumis sativus* L.). Δείγματα εδάφους συλλέχθηκαν για κάθε αγρό από διαφορετικά σημεία με τομή εδάφους με φτυάρι από την επιφάνεια μέχρι βάθους περίπου 25 cm. Τα δείγματα κοσκινίστηκαν (2 mm mesh), οι ρίζες τεμαχίστηκαν σε τεμάχια διαμετρήματος < 1 cm, και διατηρήθηκαν στους 4°C μέχρι να χρησιμοποιηθούν περαιτέρω.



**Πίνακας Β.2.1.** Αναλυτικά στοιχεία για τους αγρούς βιολογικής γεωργίας από τους οποίους ελήφθησαν δείγματα για την απομόνωση μυκορριζικών μυκήτων.

#	Έδαφος/Αγρός	Καλλιέργεια	Προηγούμενη Καλλιέργεια	Περιοχή	Χρόνια σε ΒΓ*	Ημ/νια Δειγματοληψίας
MC 1	1	Τομάτες	Μαρούλια	Μαγνησία	2	1/11/7
MC 2		Πιπεριές	Ακαλλιέργητο, Κολοκύθια			
MC 3		Κολοκύθια	Πατάτες, μπρόκολα			
MC 4	2	Τομάτα	Λάχανο Κινέζικο	Μακεδονία		20/12/7
MC 5	3	Τομάτα, Αμπέλι	Καλαμπόκι, σιτάρι	Γέφυρα	4	22/12/7
MC 6	4	Ακαλλιέργητο				
MC 12		Τομάτα	Κηπευτικά		8 (+2)**	
MC 13		Πιπεριά				
MC 14		Μελιτζάνα				
MC 7	5	Βιομηχανική Τομάτα		Μακεδονία		20/12/7
MC 8	6	Τομάτα		Άσπρο Ημαθίας	1 (+2)	
MC 11	7	Τομάτα	Σπαράγγι	Άσπρο Ημαθίας	8	
MC 9	8	Τομάτα		Αγρόκτημα	5	
MC 10		Τομάτα		Βιοαγρός Α.Ε.	5	
MC 15	9	Τομάτα	Πιπεριά.	Πλατύκαμπος-Γλαύκη	7 (+2)	31/1/8
MC 16		Μαρούλι (νάιλον)	Τομάτα, πιπεριά			
MC 17		Πατάτα (οργωμένο)	Μαρούλι, τομάτα, πιπεριά			
MC 18		Πιπεριά				

MC 19	10	Σπανάκι και φράουλα (ανάμεσα και κάτω από αχλαδιές)	Μηλιές	Αγιά	2	
MC 20	11	Καρότα			4	
MC 21	12	Τομάτα Σαντορίνης	Μηλιές, φασόλια καλαμπόκι, τομάτες			
MC 22	13	Πιπεριά (Φ)	Σιτηρά, βίκος	Ελασσόνα	8	6/3/8
MC 23	14	Πατάτα	Κριθάρι, πατάτα, , μπρόκολα και	Ελασσόνα	2	
MC 24	15	Σιτάρι	Πατάτα, βίκος	Ελασσόνα	(2)	
MC 25	16	Τομάτα	Πράσο, βίκος	Ελασσόνα	7	6/3/8
MC 26	17	Τομάτα	Πράσο, βίκος		7	
MC 27	18	Σιτάρι	Τομάτα, πιπεριές	Ελασσόνα	8	
MC 29			Λάχανο, πιπεριές			
MC 28		Λάχανο	Τομάτα			
MC 30	19	Πιπεριές	Λάχανο, σιτηρά		8	
MC 31	20					

\* **ΒΓ**: Βιολογική γεωργία

\*\* (+2): Μεταβατικό στάδιο

### **B.3. ΠΟΛΛΑΠΛΑΣΙΑΣΜΟΣ ΣΠΟΡΙΩΝ (‘ΚΑΛΛΙΕΡΓΕΙΕΣ - ΠΑΓΙΔΕΣ’)**

Για την ανάπτυξη επαρκούς ποσότητας μολύσματος υγιών σπορίων από κάθε δείγμα ώστε να είναι εφικτή στη συνέχεια η δημιουργία αμιγών σειρών, ακολουθήσαμε την μέθοδο της ανάπτυξης καλλιιεργειών ‘παγίδων’.

Από το κάθε δείγμα εδάφους, τοποθετήθηκαν 500 g σε φυτοδοχείο 10 L όπου φυτεύτηκαν 10 σπόροι αραβοσίτου (*Zea mays*). Μετά από πάροδο 30 ημερών έγινε λήψη δείγματος ριζοσφαρικού εδάφους (50 g). Ακολούθησε, εξαγωγή και απομόνωση μυκορριζικών σπορίων από το έδαφος, καταμέτρηση, καθαρισμός και ομαδοποίησή τους με βάση τα μορφολογικά τους χαρακτηριστικά και ο έλεγχος του αποικισμού στις ρίζες των φυτών αραβοσίτου.

#### **B.3.1. ΕΞΑΓΩΓΗ ΤΩΝ ΣΠΟΡΙΩΝ**

Η εξαγωγή των σπορίων έγινε σύμφωνα με τον Sylvia (1994). Τα δείγματα τοποθετήθηκαν σε δοχείο 5,3 L και προστέθηκε νερό μέχρι την πλήρωση του μισού του όγκου και μια σταγόνα κοινού υγρού καθαριστικού για την διασπορά των εδαφικών συσσωματωμάτων. Ακολούθησε ανάδευση του περιεχομένου για 30 sec και ακολούθως το διάλυμα παρέμεινε για περίπου 15 sec ώστε να κατακαθίσει η άμμος. Το υπερκείμενο διάλυμα παροχετεύτηκε μέσα από τριπλή σειρά κόσκινων με πλέγματα των παρακάτω διαμέτρων:

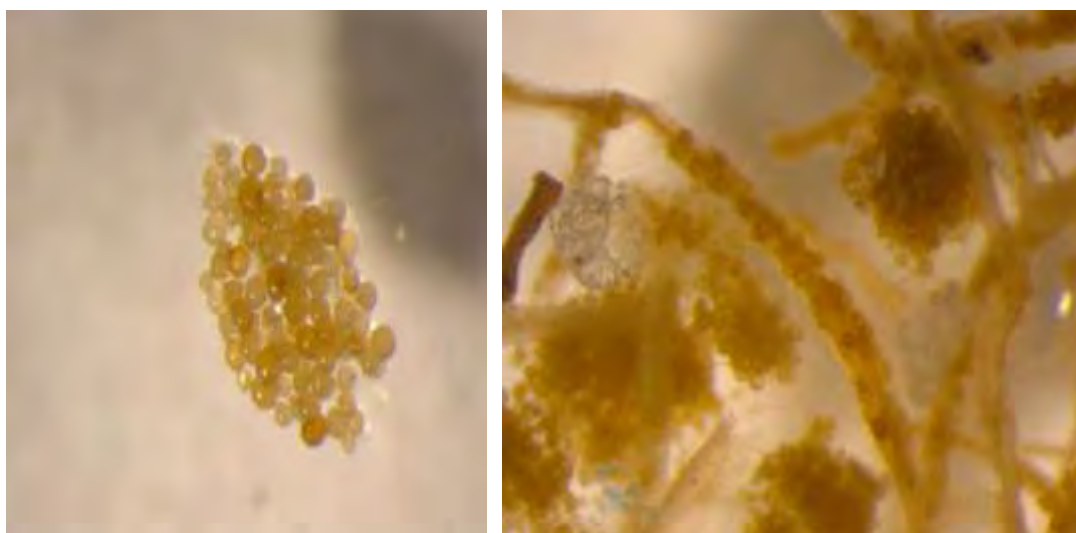
- i) Κόσκινο διαμέτρου 200  $\mu\text{m}$ : Σε αυτό το κόσκινο κατακρατήθηκαν συσσωματώματα σπορίων και σποροκάρπια, καθώς και τα μεγάλα σπόρια τα οποία συνήθως ανήκουν σε είδη του γένους *Gigaspora* sp., όπως για παράδειγμα τα σπόρια του είδους *Gigaspora gigantea* τα οποία έχουν μέσο μέγεθος 340  $\mu\text{m}$  (<http://invam.caf.wvu.edu>), καθώς και τεμάχια ρίζας από τα φυτά στα οποία γίνεται ποσοστιαίος έλεγχος αποικισμού. Επίσης στα κόσκινα διαμέτρου 200  $\mu\text{m}$  κατακρατούνται συνήθως και στη συνέχεια απομακρύνονται και η μεγαλύτερη ποσότητα ξένων υλών.
- ii) Κόσκινο διαμέτρου 100  $\mu\text{m}$ : Κατακρατούνται τα μεσαίου μεγέθους σπόρια, ενώ παράλληλα μειώνεται περαιτέρω η κατακράτηση ξένων υλικών.
- iii) Κόσκινο διαμέτρου 50  $\mu\text{m}$ : Κατακρατούνται τα πολύ μικρά μυκορριζικά σπόρια.

Το περιεχόμενο από το κόσκινο των 200  $\mu\text{m}$  τοποθετήθηκε σε τρυβλίο Petri ενώ το περιεχόμενο μετά τις πλύσεις στα κόσκινα των 100  $\mu\text{m}$  και 50  $\mu\text{m}$  τοποθετήθηκαν σε σωλήνες φυγοκέντρωσης (50 ml). Στη συνέχεια οι σωλήνες φυγοκέντρωσης πληρώθηκαν με νερό και ακολούθησε φυγοκέντρωση για 3 min στις

2800 rpm. Το υπερκείμενο διάλυμα συλλέχθηκε σε τρυβλίο και ο σωλήνας φυγοκέντρωσης πληρώθηκε με διάλυμα σουκρόζης 40% και αναδεύτηκε. Ακολούθησε φυγοκέντρωση για 2 min στις 2500 rpm. Το υπερκείμενο διάλυμα στην συνέχεια συλλέχθηκε σε κόσκινο διατομή 50  $\mu\text{m}$ , ξεπλύθηκε με άφθονο νερό για να απομακρυνθεί η σουκρόζη και τελικά τα σπόρια συλλέχθηκαν σε τρυβλίο Petri. Από τα τρυβλία αυτά ακολούθησε η ομαδοποίηση και συλλογή των μυκορριζικών σπορίων.

### **B.3.2. ΟΜΑΔΟΠΟΙΗΣΗ ΚΑΙ ΚΑΤΑΜΕΤΡΗΣΗ ΤΩΝ ΣΠΟΡΙΩΝ**

Μετά την εξαγωγή των σπορίων, ακολούθησε ομαδοποίηση με στόχο την δημιουργία αρχικά μορφολογικά αμιγών ομάδων. (*Φωτογραφία B.3.2.1*). Στη συνέχεια ακολούθησε η καταμέτρησή κατά ομάδα του προηγούμενου σταδίου. Η καταμέτρηση-ομαδοποίηση πραγματοποιήθηκε σε στερεοσκόπιο (LEICA MG6). Τα δείγματα με τον μεγαλύτερο αριθμό σπορίων επελέγησαν στη συνέχεια για δημιουργία αμιγών καλλιεργειών μυκορριζικών μυκήτων, και την ανάπτυξη μυκορριζικού εμβολίου για την αξιολόγησή του σε φυτά πιπεριάς και τομάτας. Συγκεκριμένα επελέγησαν τα δείγματα: MC3, MC4, MC10, MC22 και MC27. Η τελευταία ομάδα αυτή προέκυψε από την ενοποίηση των εδαφικών δειγμάτων MC27, MC28 και MC29 που προέρχονταν από τον ίδιο αγρό.



**Φωτογραφία B.3.2.1.** Ομάδα μυκορριζικών σπορίων όπως ομαδοποιήθηκαν μετά την απομόνωσή τους (αριστερά) και ρίζες φυτού-ξενιστή (καλαμποκιού) έντονα αποικισμένες από μυκορριζικά σπόρια (δεξιά) και με εμφανή μαζικά συσσωματώματα σπορίων.

### B.3.3. ΕΛΕΓΧΟΣ ΑΠΟΙΚΙΣΜΟΥ

Ο έλεγχος του αποικισμού έγινε σύμφωνα με τον Sylvia (1994). Αρχικά οι ρίζες τοποθετήθηκαν σε διάλυμα 10 % KOH, σε υδατόλουτρο στους 80°C για 40 min. Ακολούθως έγινε ξέπλυμα με νερό και οξύνιση για 15 min με HCl. Στη συνέχεια έγινε χρώση των ριζών με τη χρωστική trypan-blue. Για την προετοιμασία της χρωστικής, χρησιμοποιήθηκαν 800 ml γλυκερίνη, 800 ml λακτικού οξέος, 800 ml αποσταγμένου νερού και 1,2 g trypan-blue. Τριάντα ριζικά τεμάχια μήκους 1 cm τοποθετήθηκαν σε αντικειμενοφόρο πλάκα και καλύφθηκαν με PVLG (Polyvinyl alcohol-lactic acid-glycerol). Για τον υπολογισμό του ποσοστού αποικισμού έγινε σάρωση των ριζών σε μικροσκόπιο (LEICA DFC 490) σε μεγέθυνση 100X και 400X και υπολογίζοντας την αναλογία των αποικισμένων από μύκητα ριζών προς το σύνολο των ριζών, σε σύνολο 200 διασταυρώσεων (Giovannetti and Mosse, 1980· Clapp et al, 1996).

### B.4. ΑΝΑΚΑΛΛΙΕΡΓΕΙΕΣ ΣΕ ΦΥΤΑ ΑΡΑΒΟΣΙΤΟΥ

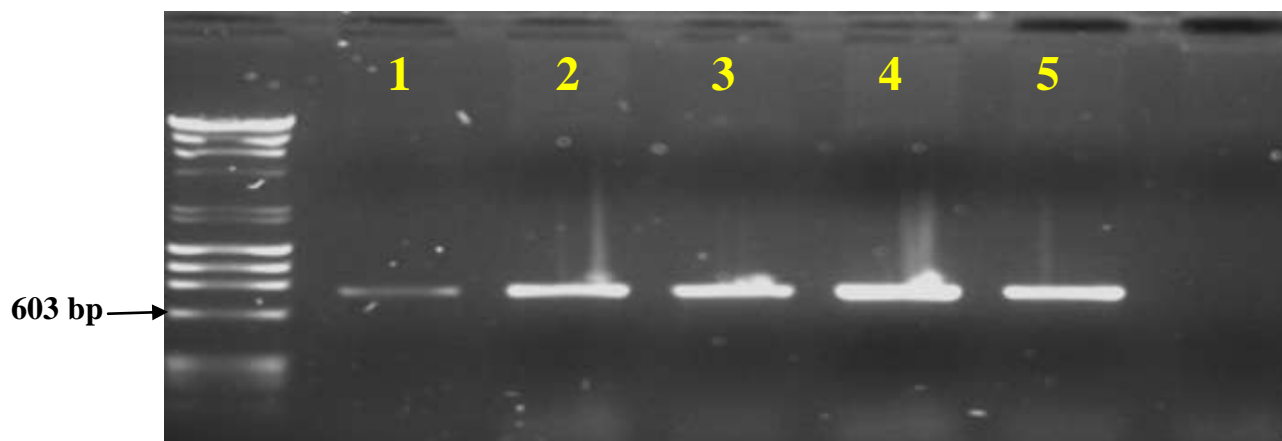
Στη φάση αυτή του πειράματος, αναπτύχθηκαν οι αμιγείς καλλιέργειες των ομάδων των σπορίων που απομονώθηκαν, με φυτό – ξενιστή και πάλι τον αραβόσιτο (*Zea mays*). Για κάθε ομάδα σπορίων χρησιμοποιήθηκαν έως 10 φυτοδοχεία των 250 cm<sup>3</sup>. Οι σπόροι του αραβόσιτου απολυμάνθηκαν για 5 min σε διάλυμα 10% χλωρίνης, ξεπλύθηκαν με αποστειρωμένο νερό και προ - φυτρώθηκαν υπό ασηπτικές συνθήκες σε τρυβλίο Petri επάνω σε εμποτισμένο με αποσταγμένο-αποστειρωμένο νερό διηθητικό χαρτί. Πριν τη φύτευση των σπόρων αραβόσιτου, έγινε αποστείρωση του υποστρώματος σε αυτόκαυστο στους 120°C για 30 min. Το υπόστρωμα αποτελούνταν από μίγμα άμμου: περλίτη : βερμικουλίτη σε αναλογία 1:1:1 κ.β.. Ακολούθησε εμβολιασμός των ριζών των προ-φυτρωμένων σπόρων αραβόσιτου με τα απομονωθέντα σπόρια με τη βοήθεια πιπέτας, περίπου 100 στον αριθμό σε κάθε ρίζα και για κάθε ομάδα σπορίων, όπως αυτά κατατάχθηκαν προηγουμένως. Μετά την πάροδο 30 ημερών, έγινε λήψη δείγματος ριζών από κάθε φυτοδοχείο για επιβεβαίωση επιτυχούς αποικισμού και αμιγότητας της καλλιέργειας (με την προϋπόθεση ότι οι μύκητες είχαν ήδη σποροποιήσει), και σε περίπτωση επιτυχίας χρησιμοποιήθηκε ολόκληρο το υπόλοιπο περιεχόμενο του φυτοδοχείου ως εμβόλιο σε νέα καλλιέργεια καλαμποκιού, σε γλάστρα 3 L και με το ίδιο υπόστρωμα.

Η ανάπτυξη των φυτών διάρκεσε 30 ημέρες οπότε και τερματίστηκε η καλλιέργεια. Το υπέργαιο μέρος των φυτών απομακρύνθηκε, ενώ το ριζικό σύστημα

τεμαχίστηκε. Ακολούθησε βαφή των ριζών και προσδιορισμός του % ποσοστού αποικισμού των ριζών, καθώς και απομόνωση και καταμέτρηση σπορίων από δείγματα 50 g. Ως εμβόλιο επιλέχτηκε το περιεχόμενο έδαφος και ρίζες από τις φυτοδοχεία κάθε ομάδας που παρουσίασαν τον υψηλότερο αποικισμό ριζών και αριθμό σπορίων, ενώ απορρίφθηκαν σε όλες τις περιπτώσεις εμβόλια από καλλιέργειες (φυτοδοχεία) αμφιβόλου αμιγότητας, είτε λόγω παρουσίας άλλων (μη μυκορριζικών) μυκήτων, είτε λόγω παρουσίας μη ομοιόμορφων σπορίων με διαφορετικά μορφολογικά χαρακτηριστικά.

## **B.5. ΜΟΡΙΑΚΟΣ ΧΑΡΑΚΤΗΡΙΣΜΟΣ**

Ο αρχικός έλεγχος της αμιγότητας των μυκορριζικών πληθυσμών με βάση την μορφολογική ομοιομορφία των σπορίων (αμιγότητα) συμπληρώθηκε με μοριακή ταυτοποίηση. Έτσι, η ταυτοποίηση των μυκορριζικών μυκήτων που περιέχονταν στις αμιγείς καλλιέργειες που επιλέχθηκαν πραγματοποιήθηκε με την χρήση μοριακών τεχνικών που βασίστηκαν στην αλληλούχιση της περισσότερο μεταβλητής περιοχής της 18S rRNA γονιδίου των μυκήτων. Η εξαγωγή του DNA των σπορίων, τα οποία είχαν αποθηκευτεί μετά την απομόνωσή τους στους -20°C σε καθαρή αιθανόλη, πραγματοποιήθηκε με σύνθλιψη των σπορίων με μικρο-γουδοχέρι, μέσα σε σωλήνες φυγοκέντρωσης 1,5 ml, και στη συνέχεια χρησιμοποιώντας το εμπορικό κιτ NucleoSpin® Plant (Macherey-Nagel, Düren, Γερμανία), ακολουθώντας το πρωτόκολλο του κατασκευαστή για εξαγωγή DNA από μύκητες. Το απομονωθέν DNA καθαρίστηκε περαιτέρω χρησιμοποιώντας το κιτ NucleoSpin® Extract II και ακολουθώντας τις οδηγίες του κατασκευαστή. Το συγκομισθέν DNA ελέγχθηκε με ηλεκτροφόρηση 5 µl DNA σε πηκτή αгарόζης 0.8% σε 1% TAE (20 min σε 100 Volt) και χρώση με βρωμιούχο αιθίδιο.



**Φωτογραφία B.5.1.** Προϊόν PCR με του εκκινητές AML1-AML2 από το DNA σπορίων των αμιγών ΔΜ μυκήτων που επιλέχθηκαν. 1: MC3, 2: MC4 , 3: MC10 , 4: MC22, 5: MC27

Μετά την εξαγωγή και καθαρισμό του DNA ακολούθησε ενίσχυση της μεταβλητής περιοχής του 18S rRNA γονιδίου των μυκήτων με PCR χρησιμοποιώντας τους εκκινητές AML1 - AML2 (Lee et al., 2008), που παρουσιάζουν υψηλή εξειδίκευση για τους περισσότερους μύκητες Glomeromycota όπου και ανήκουν οι ΔΜ μύκητες. Πραγματοποιήθηκαν αντιδράσεις PCR όγκου 20 μl που περιείχαν 2 μl ρυθμιστικού διαλύματος πολυμεράσης 10x, 10 pmol από κάθε εκκινητή, 200 μM από κάθε dNTP, 1 μl διαλύματος 10 mg ml<sup>-1</sup> BSA (acetylated bovine serum albumin) (New England Biolabs Inc, Ipswich, MA) που προστέθηκε για να περιορίσει την δράση αναστολέων της πολυμεράσης που περιέχονται συνήθως σε DNA από δείγματα εδάφους-ριζών, και 1 U πολυμεράσης (DyNAzyme EXT, Finnzymes, Finland). Οι θερμοκυκλοποιητικές συνθήκες της PCR αποτελούνταν από αρχική αποδιάταξη στους 94°C για 3 min, ακολουθούμενη από 30 κύκλους με αποδιάταξη στους 94°C για 1min - σύνδεση εκκινητών στους 50°C για 1min και επιμήκυνση στους 72°C για 1min, και ένα τελικό βήμα επιμήκυνσης στους 72°C για 10 min. Το μέγεθος και η ποσότητα του προϊόντος PCR ελέγχθηκε με ηλεκτροφόρηση 5 μl DNA σε πηκτή αгарόζης 1,2 % σε 1% TAE (20 min σε 100 Volt) και χρώση με βρωμιούχο αιθίδιο (**Φωτογραφία B.5.1.**).

Ακολούθησε καθαρισμός των προϊόντων PCR με την χρήση κατάλληλου εμπορικού κιτ (PCR clean-up, Macherey-Nagel, Düren, Γερμανία) και νέα ηλεκτροφόρηση για ποσοτικοποίηση του προϊόντος. Η κλωνοποίηση των καθαρισμένων προϊόντων στον φορέα pGEM-T (Promega, Madison, WI, USA)

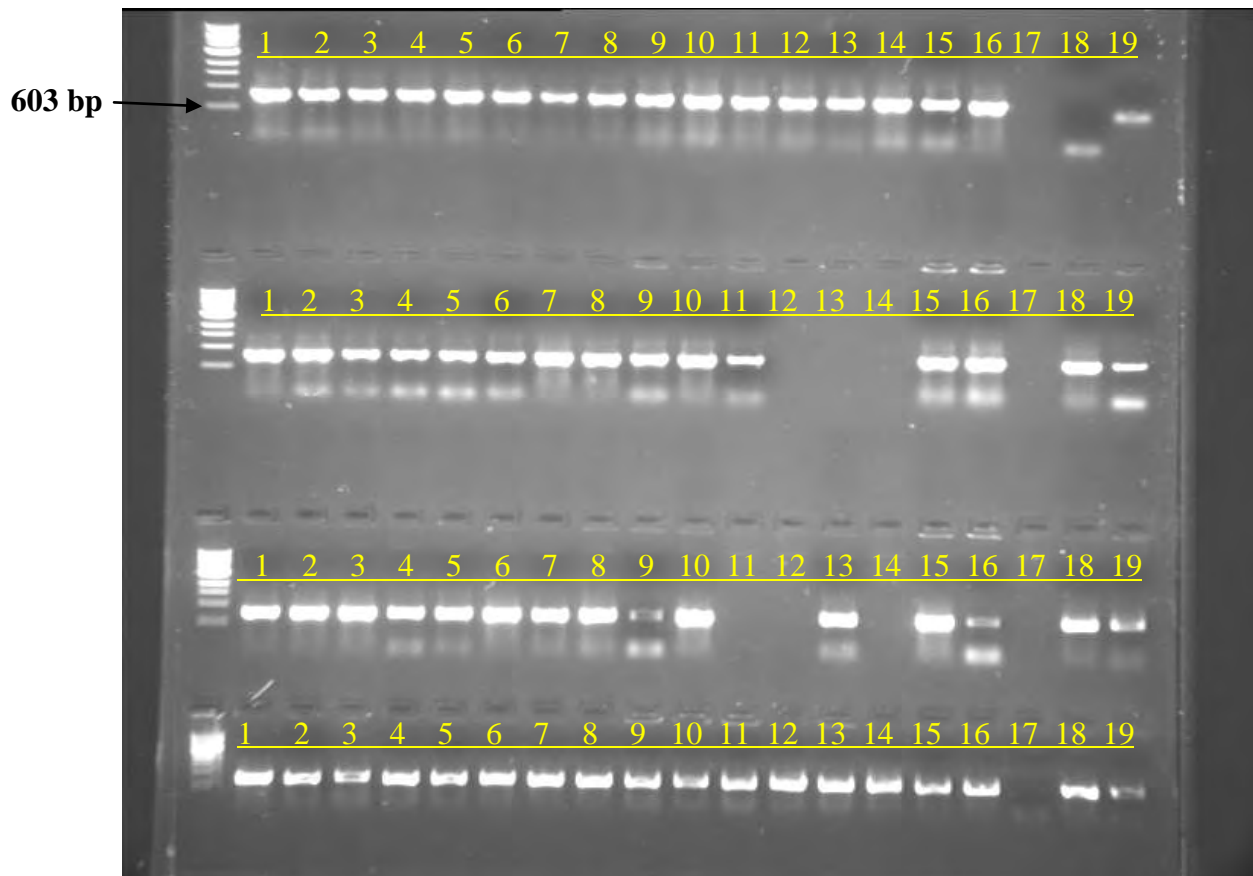
πραγματοποιήθηκε ακολουθώντας συνήθεις πρακτικές όπως περιγράφονται από τους *Sambrook et al.*, (1989). Αναλυτικά, σε σωλήνες φυγοκέντρησης 1,5 ml, προστέθηκαν 5 µl ρυθμιστικού διαλύματος, 0,5 µl pGEM-T και 1 µl λιγάση για κάθε δείγμα.. Στη συνέχεια προστέθηκε το μυκορριζικό DNA σε όγκο ανάλογο με την ποσότητα του προϊόντος PCR της όπως υπολογίστηκε κατά προσέγγιση από την εικόνα της ηλεκτροφόρησης. Συγκεκριμένα προστέθηκαν 4 µl από το δείγμα MC3, 3 µl από το δείγμα MC4, 4 µl από το δείγμα MC10, 2 µl από το δείγμα MC22 και 2 µl από το δείγμα MC(27 – 29). Τα διαλύματα αντίδρασης πληρώθηκαν μέχρι τον τελικό όγκο των 10 µl με νερό. Για την επιτυχή εισαγωγή του μυκορριζικού DNA στον πλασμιδικό φορέα κλωνοποίησης τα παραπάνω διαλύματα παρέμειναν στους 4°C για 12 h.

Ο μετασχηματισμός κυττάρων *Escherichia coli* (DH5a High Efficiency Competent Cells) έγινε σύμφωνα με τις οδηγίες του κατασκευαστή. Αναλυτικά, σε σωλήνες φυγοκέντρησης 1,5 ml τοποθετήθηκαν 2 µl από το προϊόν της απολίνωσης και προστέθηκαν 80 µl κυττάρων τα οποίοι ήταν διατηρημένα στους -80°C. Οι σωλήνες τοποθετήθηκαν σε πάγο για 30 min, αμέσως μετά στους 45°C για 45 sec και ξανά στον πάγο για 2 min. Ακολούθως προστέθηκαν 200 µl LB (Luria-Bertani) και τα δείγματα τοποθετήθηκαν για 50 min στους 37°C. Τα μετασχηματισμένα κύτταρα επιστρώθηκαν σε τρυβλία με LB άγαρ (10 g l<sup>-1</sup> NaCl, 10 g l<sup>-1</sup> καζεΐνη, 5 g l<sup>-1</sup> εκχύλισμα ζύμης, and 15 g l<sup>-1</sup> αγαρόζη) που περιείχαν αμικικιλίνη (100 µg ml<sup>-1</sup>), 50 µl από 2 % Xgal (5-βρωμο-4-χλωρο-3-ινδόνυλο-β-d-γαλακτο-πυρανοσιδίο) και 10 µl of 0.1 M IPTG (ισοπροπυλο-θειο-2-D- γαλακτο-πυρανοσίδίο). Τα τρυβλία τοποθετήθηκαν για επώαση στους 37°C για 16 h.

Στις καλλιέργειες των κυττάρων ακολούθησε επιλογή μπλε – λευκών για τον εντοπισμό αποικιών που είχαν μετασχηματιστεί επιτυχώς. Συνολικά επιλέχθηκαν, 16 αποικίες από κάθε ομάδα σπορίων, με εξαίρεση το δείγμα MC4, για το οποίο επιλέχθηκαν μόνο έξι ελλείψει περισσοτέρων. Ακολούθησε, colony-PCR, ώστε να επιβεβαιωθεί ότι στους επιλεγέντες κλώνους είχε πραγματικά ενσωματωθεί το επιθυμητό θραύσμα DNA(800-850 bp). Η αντίδραση PCR με τους εκκινητές AML1 και AML2 ήταν όγκου 10 µl που περιείχαν 1 µl από 10x ρυθμιστικό διάλυμα πολυμεράσης, 1.5 mM MgCl<sub>2</sub>, 10 pmol από κάθε εκκινητή, 1 µl από 10 mM dNTPs μίγμα και 0.2 U Taq πολυμεράση (KapaTaq, Kapa Biosystems Inc, Woburn, MA). Οι θερμοκυκλοποιητικές συνθήκες αποτελούνταν από αρχική αποδιάταξη στους 95°C για 5min, ακολουθούμενη από 35 κύκλους με αποδιάταξη στους 94°C για 1 min,



πρόσδεση εκκινητών στους 50°C για 1 min, επιμήκυνση στους 72°C για 1 min, και ένα τελικό βήμα επιμήκυνσης στους 72°C για 10 min. Το τελικό προϊόν ελέγχθηκε με ηλεκτροφόρηση 5 µl DNA σε πηκτική αгарόζης 1 % σε 1 % TAE (20 min σε 100 Volt) και χρώση με βρωμιούχο αιθίδιο (100 µg ml<sup>-1</sup>). (**Φωτογραφία B.5.2.**)



**Φωτογραφία B.5.2** Θετικοί κλώνοι των σπορίων

*A:* 1-16 κλώνοι MC3, 17 κενό, 18 μάρτυρας, 19 κλώνος 17

*B:* 1-16 κλώνοι MC10, 17 κενό, 18 και 19 κλώνοι MC4 #1 & 2

*C:* 1-16 κλώνοι MC22, 17 κενό, 18 και 19 κλώνοι MC4 #3 & 4

*D:* 1-16 κλώνοι MC27, 17 μάρτυρας, 18 και 19 κλώνοι MC4 #5 & 6

Τελικά ανά ομάδα σπορίων επιλέχθηκαν:

MC3: 7 κλώνοι

MC4: 6 κλώνοι

MC10: 8 κλώνοι

MC22: 9 κλώνοι

MC27: 11 κλώνοι

Οι κλώνοι αυτοί (3 μl) εμβολιάστηκαν σε LB με αμπικιλίνη (100 μg ml<sup>-1</sup>) και επώαστηκαν για 16 h στους 37°C και στις 200 rpm. Τα πλασμίδια από τα κύτταρα των καλλιιεργειών συλλέχθηκαν από τα κύτταρα και καθαρίστηκαν με το εμπορικό kit NucleoSpin Plasmid kit (Macharey-Nagel GmbH, Germany) ακολουθώντας τις οδηγίες του κατασκευαστή. Τα πλασμίδια στην συνέχεια αποστάληκαν για αλληλούχιση στην εταιρεία MacroGen.

Οι καλλιέργειες των κλώνων που επιλέχθηκαν για αλληλούχιση, διατηρήθηκαν σε stock γλυκερόλης. Σε 700 ml LB προστέθηκαν 5 μl καλλιέργειας και 100 μg ml<sup>-1</sup> αμπικιλίνη. Ακολούθησε επώαση για 16 h στους 37°C και στις 200 rpm. Με την ολοκλήρωση της επώασης προστέθηκαν στην καλλιέργεια 175 μl αποστειρωμένης γλυκερόλης (τελική συγκέντρωση γλυκερόλης 20%), και οι καλλιέργειες αποθηκεύτηκαν στους -80°C.

## **B.6. ΚΑΛΛΙΕΡΓΕΙΑ ΦΥΤΩΝ ΠΙΠΕΡΙΑΣ ΚΑΙ ΤΟΜΑΤΑΣ**

Για την αξιολόγηση της αποτελεσματικότητας των επιλεγέντων μυκορριζικών πληθυσμών ως ενισχυτές της φυτικής ανάπτυξης και θρέψης πραγματοποιήθηκε πείραμα σε φυτοδοχεία με ένα παράγοντα (μυκορριζικό εμβόλιο), οκτώ μεταχειρίσεις (5 απομονωθέντες ΔΜ μύκητες, μίγμα των ΔΜ μυκήτων, εμπορικό εμβόλιο, και μη μυκορριζικός μάρτυρας) και πέντε επαναλήψεις, για κάθε μεταχείριση. Το εμπορικό εμβόλιο TRI-TON μας προσφέρθηκε από την εταιρεία Hellafarm A.E. και περιέχει σπόρια στελέχους του μύκητα *G. intraradices*. Συνολικά, χρησιμοποιήθηκαν 40 φυτά τομάτας υπαίθρου (**AMELY (CLX 37208) F1 "Clause"**) και αντίστοιχα 40 φυτά πιπεριάς (**OSHO F1 "Clause"**). Το πείραμα για το κάθε φυτό αντιμετωπίστηκε ως ξεχωριστό πείραμα. Οι σπόροι φυτών τομάτας και πιπεριάς απολυμάνθηκαν σε διάλυμα υποχλωριώδους νατρίου 5 % και μετά από ξέπλυμα με αποστειρωμένο απιονισμένο νερό ακολούθησε προφύτρωση των σπόρων σε εμποτισμένο διηθητικό χαρτί σε τρυβλία Petri σε θερμοκρασία δωματίου στο σκοτάδι. Η σπορά τόσο για τις τομάτες όσο και για τις πιπεριές πραγματοποιήθηκε στις 16/09/2008. Για τη σπορά χρησιμοποιήθηκαν φυτοδοχεία των 100 cm<sup>3</sup> που περιείχαν αποστειρωμένο υπόστρωμα άμμου, τύρφης και περλίτη σε αναλογία 1:1:1 κ.β. Η αποστείρωση του υποστρώματος έγινε σε αυτόκαυστο, στους 130 °C για 20 min.

Οι πιπεριές μεταφυτεύτηκαν σε φυτοδοχεία χωρητικότητας 3 L στις 19/10/2008, ενώ οι τομάτες στις 25/10/2008. Το υπόστρωμα αποτελούνταν από απολυμασμένο μίγμα (30 min στους 120°C) άμμου και εδάφους από ακαλλιέργητο

αγρό του ΕΘ.Ι.ΑΓ.Ε. Λάρισας, σε αναλογία 1:1, αναμεμιγμένο και με 0,4 g φωσφορίτη για κάθε 3 Kg υποστρώματος. Η ποσότητα φωσφορίτη που προστέθηκε συνάδει με την συνήθη γεωργική πρακτική στην Ελλάδα σε καλλιέργειες βιολογικής γεωργίας. Το έδαφος που χρησιμοποιήθηκε ήταν αμμώδες, με pH 7.8, ηλεκτρική αγωγιμότητα 0.017 (mmhos/cm), οργανική ουσία 0.88%, περιεκτικότητα σε P, K και Mg 2, 215 και 265 ppm αντίστοιχα. Εφαρμόστηκαν 30 ml από το κάθε εμβόλιο των απομονωθέντων μυκήτων ή το μίγμα τους στην οπή μεταφύτευσης, ενώ για το εμπορικό σκεύασμα προστέθηκαν 1,5 g σκευάσματος σε κάθε γλάστρα, σύμφωνα με τις αναγραφόμενες οδηγίες.

Τα φυτοδοχεία τοποθετήθηκαν με τυχαιοποίηση σε θάλαμο με ελεγχόμενες συνθήκες θερμοκρασίας (22<sup>0</sup>C) και φωτοπεριόδου (16 h ημέρα και 8 ώρες σκοτάδι) (**Φωτογραφία Β.6.1.**). Οι λαμπτήρες που χρησιμοποιήθηκαν ήταν KOLORARC (KR<400/D/VBU/960) 400W (Hungary 0607). Τα φυτοδοχεία τυχαιοποιούνταν στο θάλαμο ανάπτυξης εβδομαδιαίως. Οι πιπεριές αναπτύχθηκαν συνολικά για 12 εβδομάδες (ημερομηνία κοπής 10/01/2009) και οι τομάτες για 15 εβδομάδες (ημερομηνία κοπής 07/02/2009).

Στο τέλος του πειράματος οι βλαστοί των φυτών κόπηκαν στο λαιμό και μετρήθηκαν τα παρακάτω φυτικά χαρακτηριστικά: ύψος των φυτών (από το λαιμό των φυτών μέχρι τον ακραίο οφθαλμό) και αριθμός καρπών. Από την άλλη μεριά το ριζικό σύστημα των φυτών απομακρύνθηκε προσεκτικά και ξεπλύθηκε με νερό σε κόσκινο (1 mm mesh) και πάρθηκε δείγμα τους για βαφή και καταμέτρηση του αποικισμού από τους μυκορριζικούς μύκητες, με τις μεθόδους που έχουν περιγραφεί παραπάνω. Επιπρόσθετα, δείγματα βλαστών και ριζών ξηράθηκαν σε φούρνο (60° C) και μετρήθηκε το βάρος της ξηράς τους ουσίας. Επίσης μετρήθηκε η % περιεκτικότητα φωσφόρου στις ρίζες και στους βλαστούς - φύλλα και η % περιεκτικότητα φωσφόρου στο σύνολο ρίζας και βλαστών - φύλλων στα φυτά πιπεριάς όπως περιγράφεται παρακάτω.



*Φωτογραφία Β.6.1. Η διάταξη των γλαστρών με τα φυτά πιπεριάς μέσα στον θάλαμο ανάπτυξης ελεγχόμενων συνθηκών.*

#### **B.7. MIP test - ΈΛΕΓΧΟΣ ΜΟΛΥΣΜΑΤΙΚΗΣ ΙΚΑΝΟΤΗΤΑΣ ΜΥΚΟΡΡΙΖΙΚΟΥ ΕΜΒΟΛΙΟΥ**

Ο έλεγχος μολυσματικής ικανότητας των μυκορριζικών εμβολίων πραγματοποιήθηκε σύμφωνα με τον Sylvia (1994). Σε φυτοδοχεία όγκου 250 ml προστέθηκε αποστειρωμένο υπόστρωμα άμμος : περλίτης : βερμικουλίτης (1:1:1), και ακολούθως εφαρμόστηκε μυκορριζικό εμβόλιο όγκου 15 ml σε συγκεκριμένη ζώνη η οποία επικαλύφθηκε με υπόστρωμα και στο οποίο φυτεύτηκε καλαμπόκι. Μετά από 28 μέρες τα φυτά καλαμποκιού συγκομίστηκαν, ξεπλύθηκαν και οι ρίζες τους βάφτηκαν με μπλε του Κογκό για να προσδιοριστεί το ποσοστό αποικισμού τους από μυκορριζικούς μύκητες.

## **B.8. ΑΝΑΛΥΣΕΙΣ ΕΔΑΦΟΥΣ ΚΑΙ ΦΥΤΙΚΩΝ ΙΣΤΩΝ**

Αναλύσεις πραγματοποιήθηκαν στα δείγματα εδάφους των αγροτεμαχίων τα οποία επιλέχθηκαν τελικά για την διεξαγωγή του πειράματος, όπως αναφέρθηκε ήδη στην παράγραφο B.3.2. αλλά και στα εδάφη που χρησιμοποιήθηκαν ως υπόστρωμα για την ανάπτυξη των καλλιεργειών της πιπεριάς και τομάτας. Ο χαρακτηρισμός της μηχανικής σύστασης έγινε με τη μέθοδο Βουγιούκου, το pH και η αγωγιμότητα μετρήθηκαν με ηλεκτρονικό pHμετρο - αγωγιμόμετρο (Crison micropH 2002), ενώ το ελεύθερο  $\text{CaCO}_3$  υπολογίστηκε με αντίδραση εξουδετέρωσης με HCl. Η οργανική ουσία μετρήθηκε με τη μέθοδο της υγρής καύσης, ο P μετρήθηκε με τη μέθοδο Olsen (Olsen et al., 1954) σε φασματοφωτόμετρο (Jasco V – 530), ενώ τα ανταλλάξιμα K και Mg με τη μέθοδο του οξικού αμμωνίου σε ατομική απορρόφηση (Perkin Elmer 4100).

Για την μέτρηση του P στους φυτικούς ιστούς της πιπεριάς (ρίζες – βλαστοί – φύλλα) έγινε πρώτα η άλεση των δειγμάτων σε μύλο άλεσης (pulverisette 6 – FRITSCH) και ακολούθησε ξηρή καύση στους  $600^\circ\text{C}$  για 6h. Στη συνέχεια για τον προσδιορισμό του P χρησιμοποιήθηκε η μέθοδος Olsen, σε φασματοφωτόμετρο (Jasco V – 530).

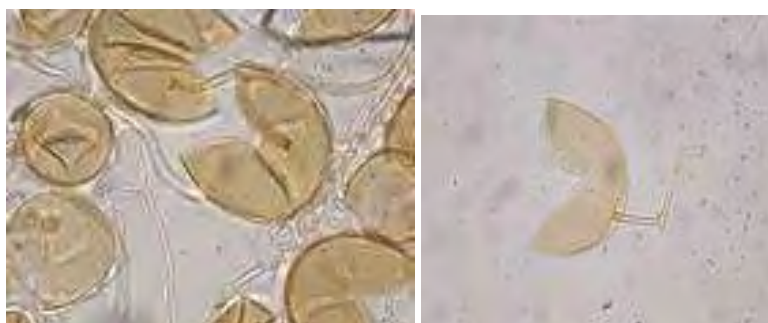
## **B.9. ΣΤΑΤΙΣΤΙΚΗ ΑΝΑΛΥΣΗ**

Τα δεδομένα που προέκυψαν επεξεργάστηκαν στατιστικά με ανάλυση παραλλακτικότητας (ANOVA) για να ελεγχθεί το κατά πόσο ο εμβολιασμός των φυτών με μυκορριζικούς μύκητες επέφερε σημαντικές μεταβολές στην ανάπτυξη των φυτών, την απορρόφηση του φωσφόρου (μόνο για την πιπεριά) και των αποικισμών των ριζών. Οι συγκρίσεις των μέσων έγιναν με τη μέθοδο Tukey-Kramer σε επίπεδο σημαντικότητας  $\alpha = 0.05$ . Επίσης υπολογίστηκε ο συντελεστής συσχέτισης Pearson μεταξύ της % περιεκτικότητας σε P στα φυτά πιπεριάς και των επιπέδων μυκορριζικού αποικισμού στα ίδια φυτά.

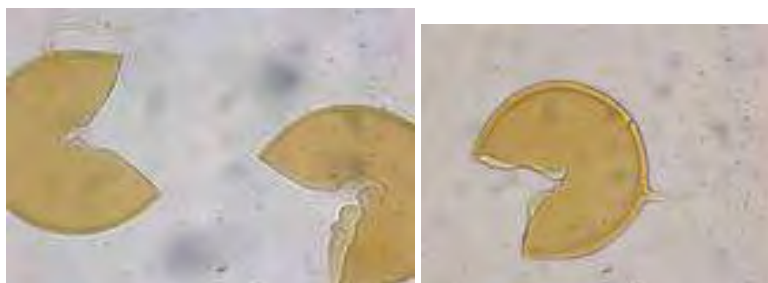
## Γ. ΑΠΟΤΕΛΕΣΜΑΤΑ

### Γ.1. ΑΠΟΜΟΝΩΣΗ ΜΥΚΗΤΩΝ

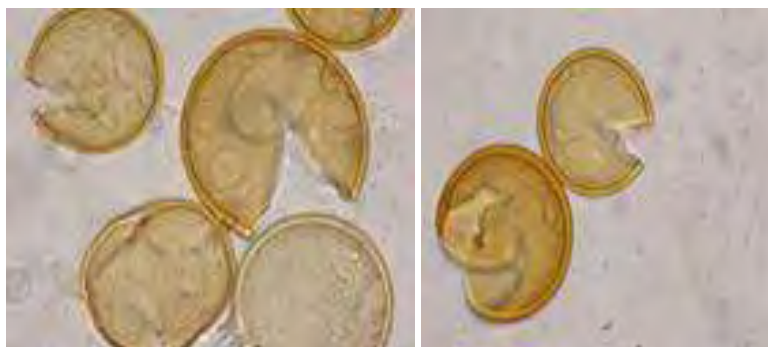
Ύστερα από σειρά απομονώσεων, παρατηρήσεων και ανακαλλιέργειας καταλήξαμε στην απομόνωση εμβολίου από πέντε φυτοδοχεία που αντιστοιχούν σε πέντε μορφολογικά αμιγείς καλλιέργειες: MC3i (*Φωτογραφία Γ.1.1.*), MC4i (*Φωτογραφία Γ.1.2.*), MC10i (*Φωτογραφία Γ.1.3.*), MC22i (*Φωτογραφία Γ.1.4.*) και MC27i (*Φωτογραφία Γ.1.5.*).



(*Φωτογραφία Γ.1.1.*). Σπόρια από την καλλιέργεια MC3.

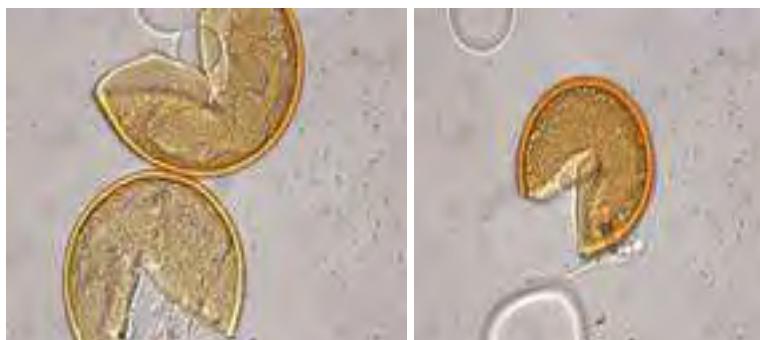


(*Φωτογραφία Γ.1.2.*). Σπόρια από την καλλιέργεια MC4.



(*Φωτογραφία Γ.1.3.*). Σπόρια από την καλλιέργεια MC10.





(Φωτογραφία Γ.1.4.). Σπόρια από την καλλιέργεια MC22.



(Φωτογραφία Γ.1.5.). Σπόρια από την καλλιέργεια MC27.

Η επιλογή έγινε με βάση τον αριθμό των αμιγών καλλιεργειών για κάθε δείγμα αλλά και την μορφολογική ομοιότητα των σπορίων της κάθε ομάδας (Πίνακας Γ.1.1).

**Πίνακας Γ.1.1.** Ομαδοποίηση και αριθμός αμιγών καλλιεργειών που προέκυψαν από 100 σπόρια της ίδιας ομάδας, και το αποτέλεσμα (επιτυχής ή μη αποικισμός και σποροποίηση)

Κωδικός δείγματος	Ομάδες	Καθαρές καλλιέργειες	Αποτέλεσμα
MC1	i	1	Αποτυχία αποικισμού
MC2	i	1	Αποτυχία αποικισμού
	ii	4	Σπόρια
	iii	1	Αποτυχία αποικισμού
	iv	10	Αποικισμός
MC3	i	10	Σπόρια
MC4	i	9	Αποικισμός
MC10	i	8	Αποικισμός
	ii	2	Σπόρια
	iii	1	Σπόρια
MC22	i	10	Αποτυχία αποικισμού
MC27	i	9	Σπόρια
	ii	3	Αποτυχία αποικισμού

Τα αποτελέσματα των αναλύσεων από τα εδάφη από τα οποία απομονώθηκαν τα σπόρια και επιλέχθηκαν ως εμβόλια δίνονται στον **Πίνακα Γ.1.2**.

**Πίνακας Γ.1.2** Ανάλυση των εδαφών των αγρών από τους οποίους επιλέχθηκαν τα μυκορριζικά εμβόλια

Δείγμα	Μηχανική σύσταση <sup>a</sup>	pH	Αγωγιμότητα (mmhos/cm)	Ελεύθερο CaCO <sub>3</sub> (%)	Οργανική ουσία (%)	P (ppm)	K (ppm)	Mg (ppm)
MC3	SL	7,8	1,2	4,4	1,7	21	375	490
MC4	SCL	7,5	2,1	7,7	4,3	5	270	466
MC10	SCL	7,9	1,9	6,8	2,1	3	120	1000
MC22	SL	8,1	1,5	0,66	0,9	2	105	253
MC27	SCL	6,5	1,1	0,44	0,4	6	288	515

SL και SCL: sandy loam (αμμοπηλώδες) και sandy clay loam (αργιλοπηλο-αμμώδες) αντίστοιχα

## Γ.2. ΜΟΛΥΣΜΑΤΙΚΟΤΗΤΑ ΕΜΒΟΛΙΟΥ

Από τον έλεγχο της μολυσματικής ικανότητας των εμβολίων (**MIP – test**), προέκυψαν τα αποτελέσματα όπως παρουσιάζονται στον **Πίνακα Γ.2.1**.

**Πίνακας Γ.2.1.** Η % μολυσματική ικανότητα των εμβολίων (**MIP – test**)

Μυκορριζικό Εμβόλιο	% Αποικισμός	Τυπική απόκλιση
<b>MC3</b>	6,0	5,0
<b>MC4</b>	16,6	4,1
<b>MC10</b>	53,7	21,0
<b>MC22</b>	56,2	7,0
<b>MC27</b>	10,3	5,1
<b>MIX</b>	20,8	5,6



### Γ.3. ΤΑΥΤΟΠΟΙΗΣΗ ΤΩΝ ΜΥΚΗΤΩΝ

Οι μυκορριζικές καλλιέργειες που απομονώθηκαν ταυτοποιήθηκαν με αλληλούχιση μεταβλητής περιοχής του 18S rRNA γονιδίου των μυκήτων. Έτσι, αλληλούχιση αριθμού κλώνων για κάθε εμβόλιο έδειξε ότι οι καλλιέργειες MC3, MC4, MC10 και MC22 ήταν μονοειδικές και αμιγείς, ενώ το δείγμα MC27 αποτελούσε μίγμα δύο ΔΜ μυκήτων του ιδίου γένους αλλά διαφορετικού είδους (**Πίνακας Γ.3.1**). Συγκεκριμένα, η αλληλουχία όλων των κλώνων της καλλιέργειας MC3 που ελέγχθηκαν παρουσίασαν υψηλή ομολογία με ριζότυπους του μύκητα *Glomus intraradices*. Αντίστοιχα, οι αλληλουχίες όλων των κλώνων της καλλιέργειας MC4 παρουσίασαν υψηλή ομολογία με ένα συγκεκριμένο στέλεχος του μύκητα *Glomus etunicatum*, ενώ για τις καλλιέργειες MC10 και MC22 όλοι οι κλώνοι που εξετάστηκαν παρουσίασαν υψηλή ομολογία με ένα συγκεκριμένο στέλεχος του μύκητα *G. mosseae*. Τέλος, αλληλούχιση κλώνων από την καλλιέργεια MC27 έδειξε ότι η συγκεκριμένη καλλιέργεια δεν ήταν αμιγής αλλά αποτελούνταν από δύο στελέχη των ειδών *G. mosseae* και *G. etunicatum* που περιέχονταν και στα υπόλοιπα εμβόλια σε αμιγής μορφή. Συνοψίζοντας, οι μυκορριζικές καλλιέργειες MC10, MC22 αποτελούνται από τον ΔΜ μύκητα *G. mosseae*, η MC3 αποτελείται από τον μύκητα *G. intraradices*, η MC4 από τον μύκητα *G. etunicatum* ενώ η MC27 αποτελεί μίγμα από σπόρια των μυκήτων *G. mosseae* και *G. etunicatum*.

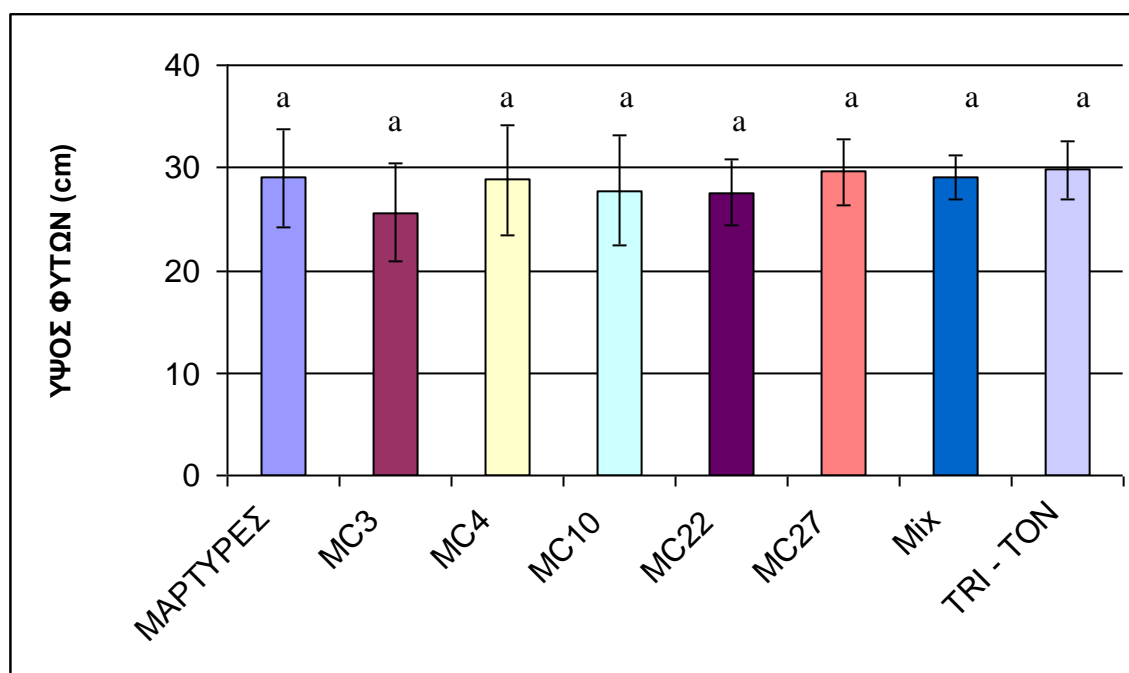
**Πίνακα Γ.3.1.** Ο μοριακός χαρακτηρισμός των δειγμάτων.

Δείγμα	Αριθμός κλώνου	Ζεύγη βάσεων	Ομοιότητα με τράπεζα γενετικού υλικού (% ομοιότητα αλληλουχίας με BLAST)	Κωδικός NCBI
MC3	1	799	<i>Glomus intraradices</i> isolate AFTOL 48 (98.3%)	AY635831
	2	792	<i>G. intraradices</i> isolate AFTOL 48 (97.3%)	
	3	796	<i>G. intraradices</i> isolate AFTOL 48 (97.5%)	
	4	799	<i>G. intraradices</i> isolate AFTOL 48 (98.3%)	
	5	799	<i>G. intraradices</i> isolate AFTOL 48 (98.3%)	
	6	799	<i>G. intraradices</i> isolate AFTOL 48 (98.3%)	
	7	799	<i>G. intraradices</i> isolate AFTOL 48 (98.3%)	
MC4	1	807	<i>Glomus etunicatum</i> UFGP06 isolate (99.0%)	AJ852598
	2	798	<i>G. etunicatum</i> UFGP06 isolate (99.5%)	
	3	801	<i>G. etunicatum</i> UFGP06 isolate (99.6%)	
	4	810	<i>G. etunicatum</i> UFGP06 isolate (98.3%)	
	5	812	<i>G. etunicatum</i> UFGP06 isolate (98.5%)	

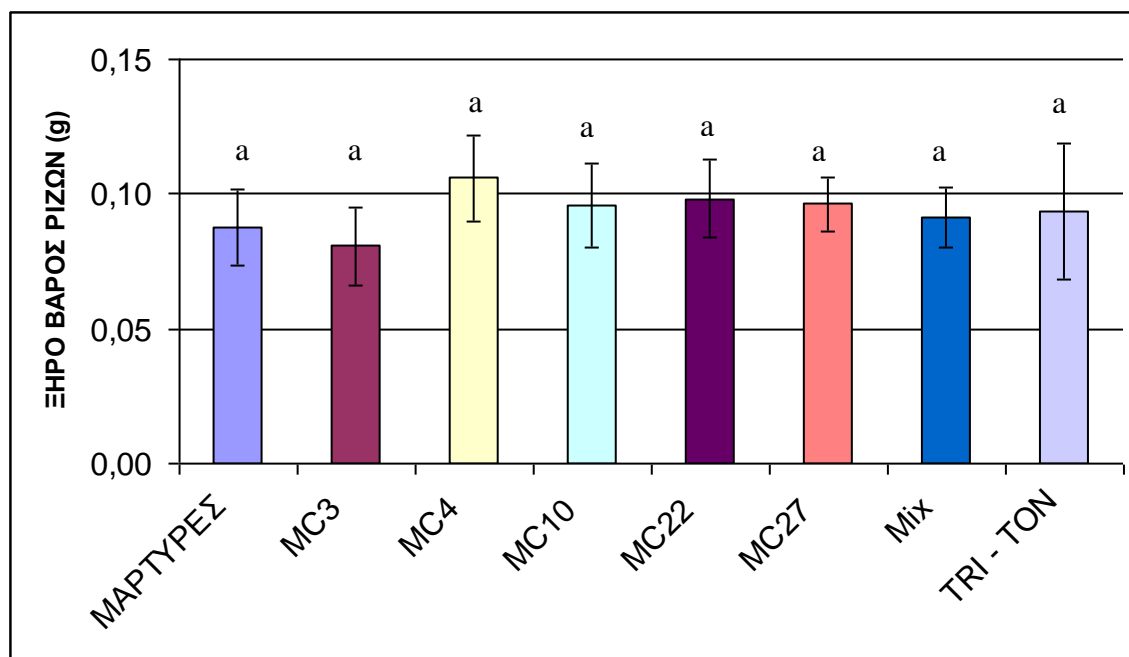
	6	807	<i>G. etunicatum</i> UFGP06 isolate (99.6%)	
MC10	1	802	<i>G. mosseae</i> isolate AFTOL 139 (99.3%)	AY635833
	2	801	<i>G. mosseae</i> isolate AFTOL 139 (99.9%)	
	3	789	<i>G. mosseae</i> isolate AFTOL 139 (98.3%)	
	7	800	<i>G. mosseae</i> isolate AFTOL 139 (100%)	
	8	801	<i>G. mosseae</i> isolate AFTOL 139 (100%)	
	9	801	<i>G. mosseae</i> isolate AFTOL 139 (100%)	
	10	801	<i>G. mosseae</i> isolate AFTOL 139 (100%)	
	11	801	<i>G. mosseae</i> isolate AFTOL 139 (99.9%)	
MC22	2	801	<i>G. mosseae</i> isolate AFTOL 139 (100%)	AY635833
	3	804	<i>G. mosseae</i> isolate AFTOL 139 (97.8%)	
	4	801	<i>G. mosseae</i> isolate AFTOL 139 (99.8%)	
	5	800	<i>G. mosseae</i> isolate AFTOL 139 (99.6%)	
	6	806	<i>G. mosseae</i> isolate AFTOL 139 (97.8%)	
	7	800	<i>G. mosseae</i> isolate AFTOL 139 (100%)	
	8	801	<i>G. mosseae</i> isolate AFTOL 139 (100%)	
	10	801	<i>G. mosseae</i> isolate AFTOL 139 (99.8%)	
	11	801	<i>G. mosseae</i> isolate AFTOL 139 (100%)	
MC27	1	800	<i>G. mosseae</i> isolate AFTOL 139 (99.0%)	AY635833
	2	802	<i>G. mosseae</i> isolate AFTOL 139 (99.9%)	
	3	808	<i>G. etunicatum</i> isolate UFGP06 (98.1%)	AJ852598
	5	801	<i>G. mosseae</i> isolate AFTOL 139 (99.8%)	AY635833
	6	806	<i>G. etunicatum</i> isolate UFGP06 (99.9%)	AJ852598
	7	806	<i>G. etunicatum</i> isolate UFGP06 (100%)	AJ852598
	8	806	<i>G. etunicatum</i> isolate UFGP06 (100%)	AJ852598
	9	801	<i>G. mosseae</i> isolate AFTOL 139 (99.9%)	AY635833
	10	801	<i>G. mosseae</i> isolate AFTOL 139 (99.9%)	AY635833
	11	806	<i>G. etunicatum</i> isolate UFGP06 (99.8%)	AJ852598
	12	806	<i>G. etunicatum</i> isolate UFGP06 (99.9%)	AJ852598

#### Γ.4. ΠΕΙΡΑΜΑ ΠΙΠΕΡΙΑΣ

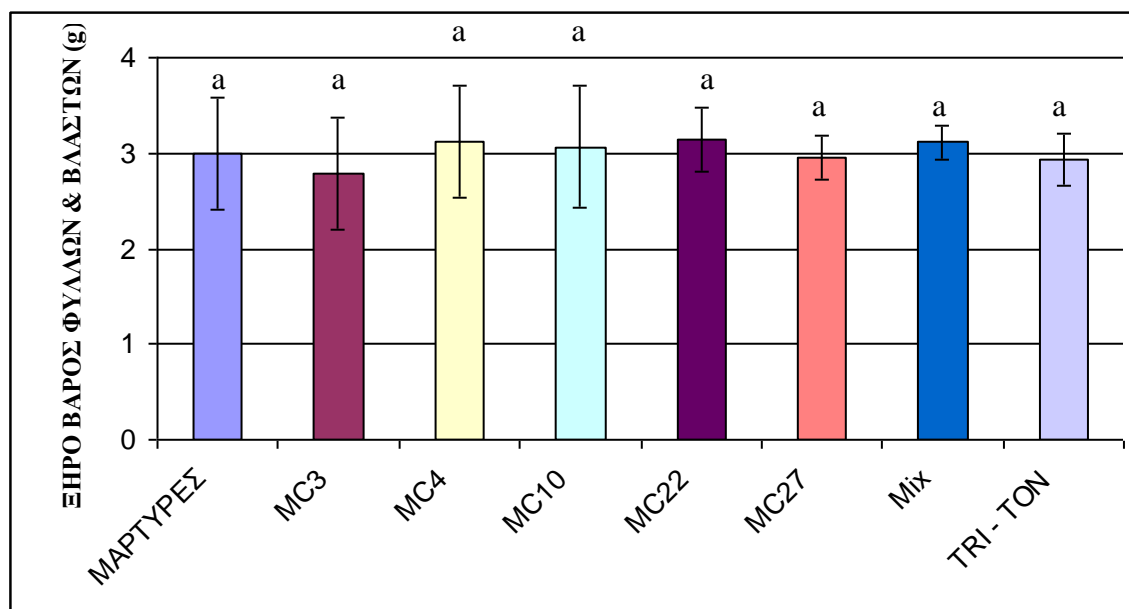
Στα αποτελέσματα των μετρήσεων φυτικής ανάπτυξης για την καλλιέργεια της πιπεριάς δεν καταγράφηκαν στατιστικά σημαντικές διαφορές ως προς το ύψος των φυτών, το ξηρό βάρος ριζών, το ξηρό βάρος βλαστών – φύλλων, το συνολικό ξηρό βάρος, την αναλογία ξηρού βάρους ριζών προς βλαστών – φύλλων, αριθμό καρπών και ξηρό βάρος καρπών. Τα αποτελέσματα από τις παραπάνω μετρήσεις παρουσιάζονται στα *Διαγράμματα (Γ.4.1. – Γ.4.7),*



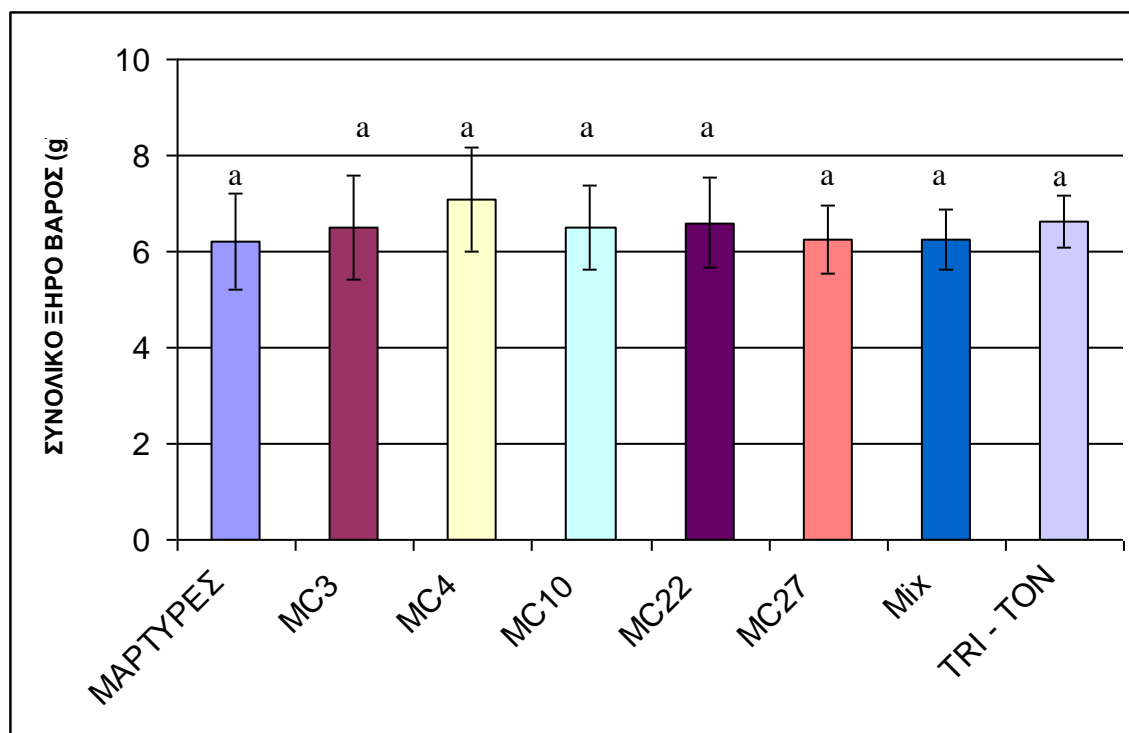
*Διάγραμμα Γ.4.1. Το ύψος (cm) των φυτών πιπεριάς για την κάθε μεταχείριση. Για κάθε μεταχείριση παρουσιάζεται ο μέσος όρος  $\pm$  τυπική απόκλιση (n=5).*



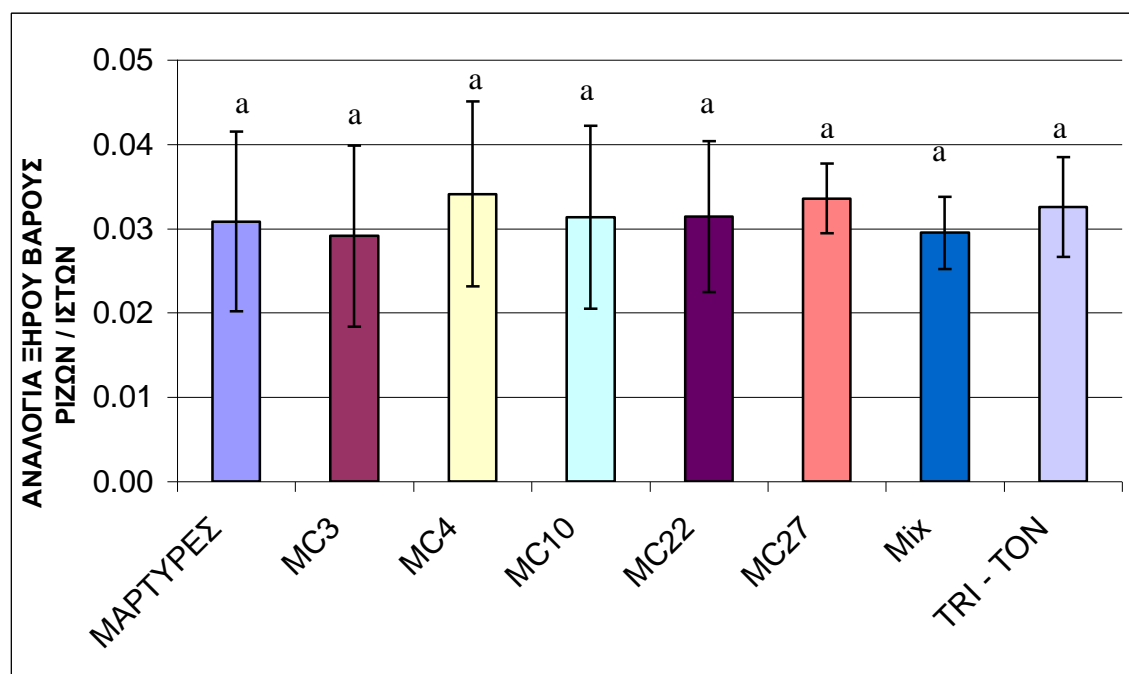
**Διάγραμμα Γ.4.2.** Το ξηρό βάρος (g) των ριζών φυτών πιπεριάς για την κάθε μεταχείριση. Για κάθε μεταχείριση παρουσιάζεται ο μέσος όρος  $\pm$  τυπική απόκλιση ( $n=5$ ).



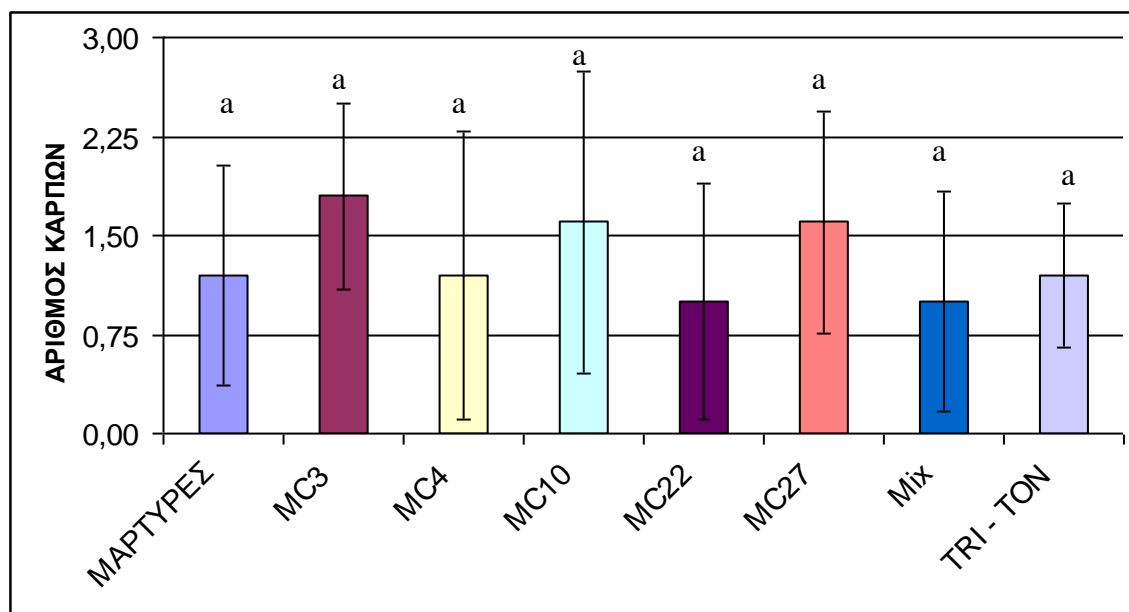
**Διάγραμμα Γ.4.3.** Το ξηρό βάρος (g) ιστών του υπέργειου τμήματος (βλαστοί και φύλλα) των φυτών πιπεριάς για την κάθε μεταχείριση. Για κάθε μεταχείριση παρουσιάζεται ο μέσος όρος  $\pm$  τυπική απόκλιση ( $n=5$ ).



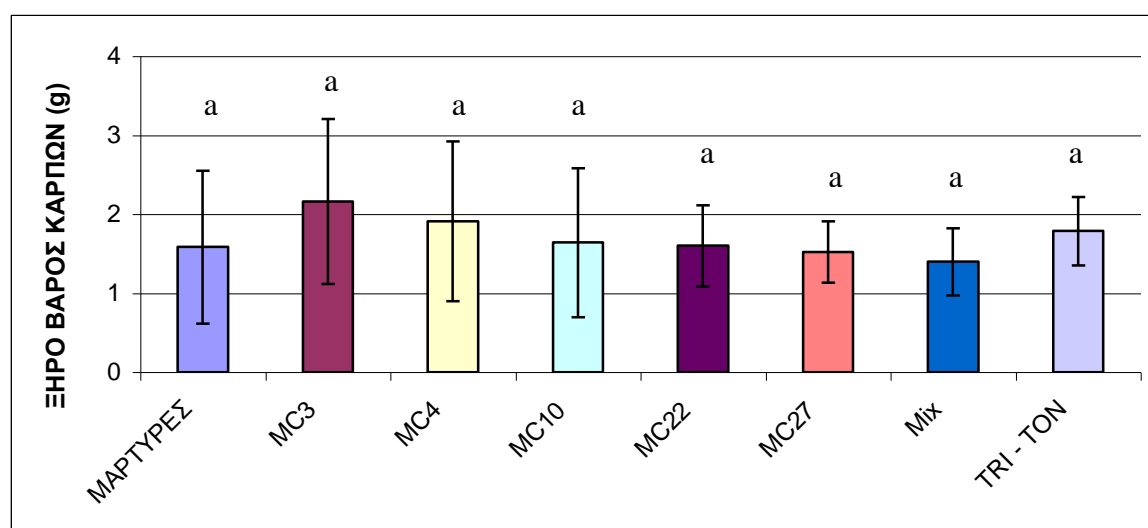
**Διάγραμμα Γ.4.4.** Το συνολικό ξηρό βάρος (g) των φυτών πιπεριάς για την κάθε μεταχείριση. Για κάθε μεταχείριση παρουσιάζεται ο μέσος όρος  $\pm$  τυπική απόκλιση ( $n=5$ ).



**Διάγραμμα Γ.4.5.** Η αναλογία ξηρού βάρους ριζών - ιστών του υπέργειου τμήματος των φυτών πιπεριάς (βλαστός – φύλλα) για την κάθε μεταχείριση. Για κάθε μεταχείριση παρουσιάζεται ο μέσος όρος  $\pm$  τυπική απόκλιση ( $n=5$ ).



**Διάγραμμα Γ.4.6.** Ο αριθμός των καρπών στα φυτά πιπεριάς για την κάθε μεταχείριση. Για κάθε μεταχείριση παρουσιάζεται ο μέσος όρος  $\pm$  τυπική απόκλιση ( $n=5$ ).

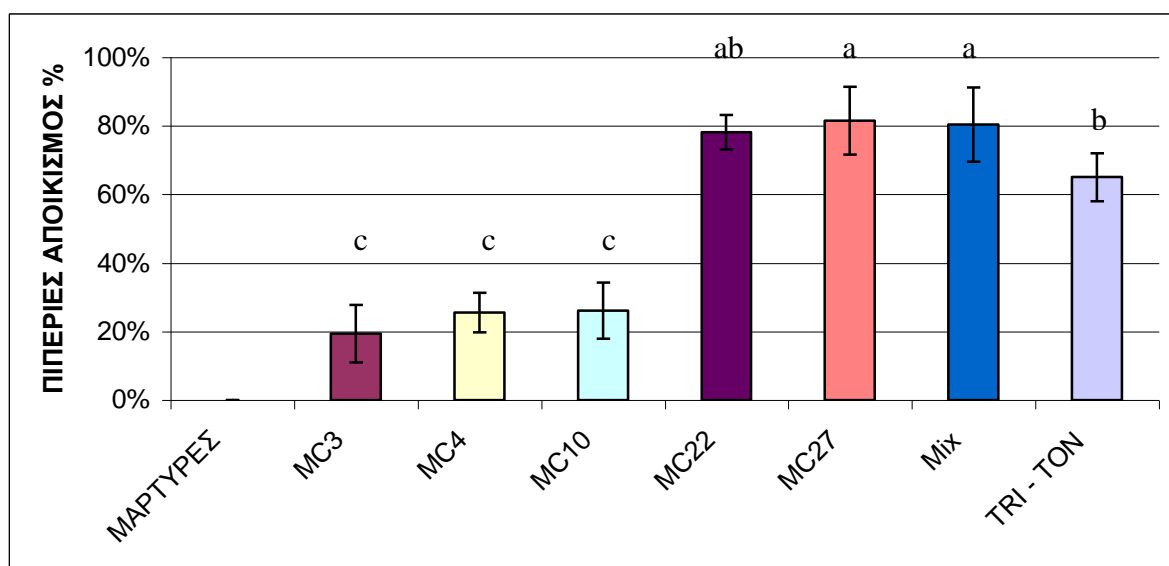


**Διάγραμμα Γ.4.7.** Το συνολικό ξηρό βάρος (g) των φυτών πιπεριάς για την κάθε μεταχείριση. Για κάθε μεταχείριση παρουσιάζεται ο μέσος όρος  $\pm$  τυπική απόκλιση ( $n=5$ ).

Σε αντίθεση με την ανάπτυξη του φυτού, ο μυκορριζικός αποικισμός παρουσιάζει σημαντικές στατιστικές διαφορές, με τα δείγματα MC22 (*G. mosseae*), MC27 (*G. mosseae*/*G. etunicatum*) και Mix, που προέκυψε από την ανάμιξη όλων των

μυκορριζικών εμβολίων, να παρουσιάζουν τα υψηλότερα ποσοστά αποικισμού ξεπερνώντας το 75%. Παραπλήσια αλλά χαμηλότερα επίπεδα αποικισμού παρατηρήθηκαν στα φυτά που εμβολιάστηκαν με το εμπορικό σκεύασμα (TRI-TON) (65%). Αντίθετα, τα φυτά που εμβολιάστηκαν με εμβόλια MC3 (*G. intraradices*), MC4 (*G. etunicatum*) και MC10 (*G. mosseae*) παρουσίασαν σημαντικά χαμηλότερα ποσοστά αποικισμού που δεν ξεπέρασαν το 25% (**Διάγραμμα Γ.4.8.**).

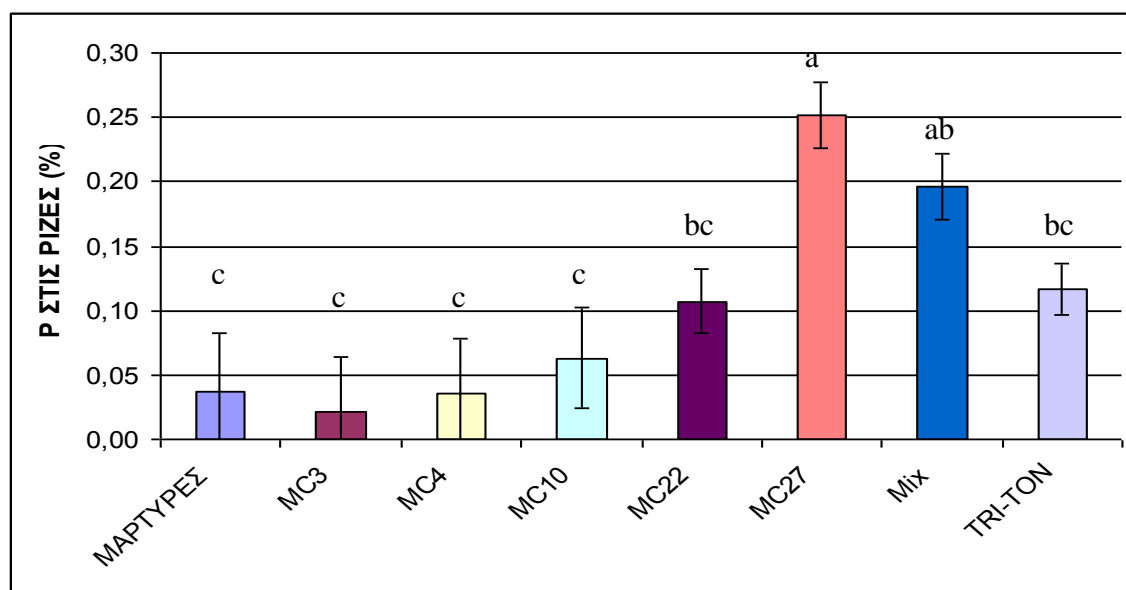
Από την παρατήρηση στο στερεοσκόπιο παρατηρήθηκε και περιορισμένος αποικισμός (5,1%) των ριζών των μη-μυκορριζικών φυτών του μάρτυρα. Ωστόσο, δεν παρατηρήθηκαν θύσανοι ή κύστεις στις ρίζες αλλά μόνο υφές, που πιθανότατα προέρχονται από μη μυκορριζικούς μύκητες.



**Διάγραμμα Γ.4.8.** Το % επίπεδο αποικισμού του μήκους των ριζών των φυτών πιπεριάς από διαφορετικούς μυκορριζικούς μύκητες (MC3,4,10,22 και 27), μίγμα τους (Mix) και εμπορικό σκεύασμα (TRI-TON). Για κάθε μεταχείριση παρουσιάζεται ο μέσος όρος  $\pm$  τυπική απόκλιση ( $n=5$ ).

Στα φυτά πιπεριάς έγιναν μετρήσεις της % περιεκτικότητας τους σε φώσφορο. Στατιστικά σημαντικές διαφορές παρατηρήθηκαν τόσο στην % περιεκτικότητα του φωσφόρου στις ρίζες όσο και σε τμήματα του υπέργειου τμήματος του φυτού (βλαστός – φύλλα). Στις ρίζες, τα φυτά πιπεριάς που εμβολιάστηκαν με τα εμβόλια MC27 (*G. mosseae*/*G. etunicatum*) και Mix παρουσίασαν την υψηλότερη % περιεκτικότητα σε P, με το εμπορικό σκεύασμα και το εμβόλιο MC22 (*G. mosseae*)

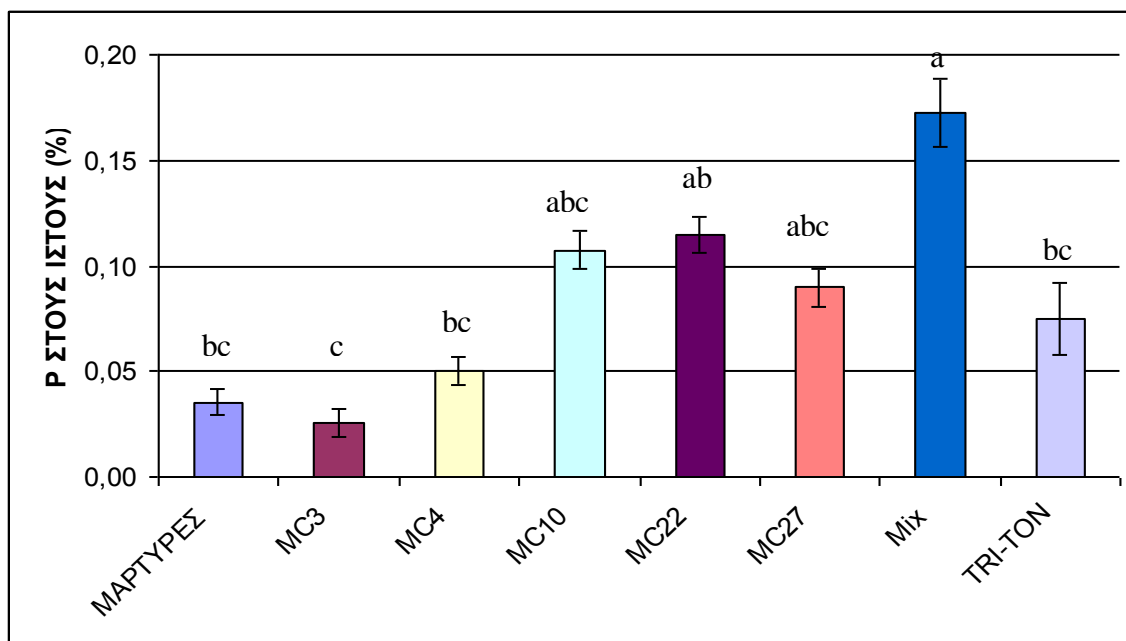
να ακολουθούν, ενώ την χαμηλότερη % περιεκτικότητα σε P παρουσίασαν τα φυτά που εμβολιάστηκαν με τις καλλιέργειες MC3 (*G. intraradices*), MC4 (*G. etunicatum*), MC10 (*G. mosseae*) που ήταν στα ίδια επίπεδα με τα μη μυκορριζικά φυτά μάρτυρες. (Διάγραμμα Γ.4.9.). Θα πρέπει να τονιστεί ότι η % περιεκτικότητα των φυτών που εμβολιάστηκαν με το MC27 (*G. mosseae/G. etunicatum*) ήταν περισσότερο από πέντε φορές υψηλότερη σε σχέση με τα μη μυκορριζικά φυτά μάρτυρες.



**Διάγραμμα Γ.4.9.** Η % περιεκτικότητα φωσφόρου (P) των ριζών των φυτών πιπεριάς για την κάθε μεταχείριση. Για κάθε μεταχείριση παρουσιάζεται ο μέσος όρος  $\pm$  τυπική απόκλιση ( $n=5$ ).

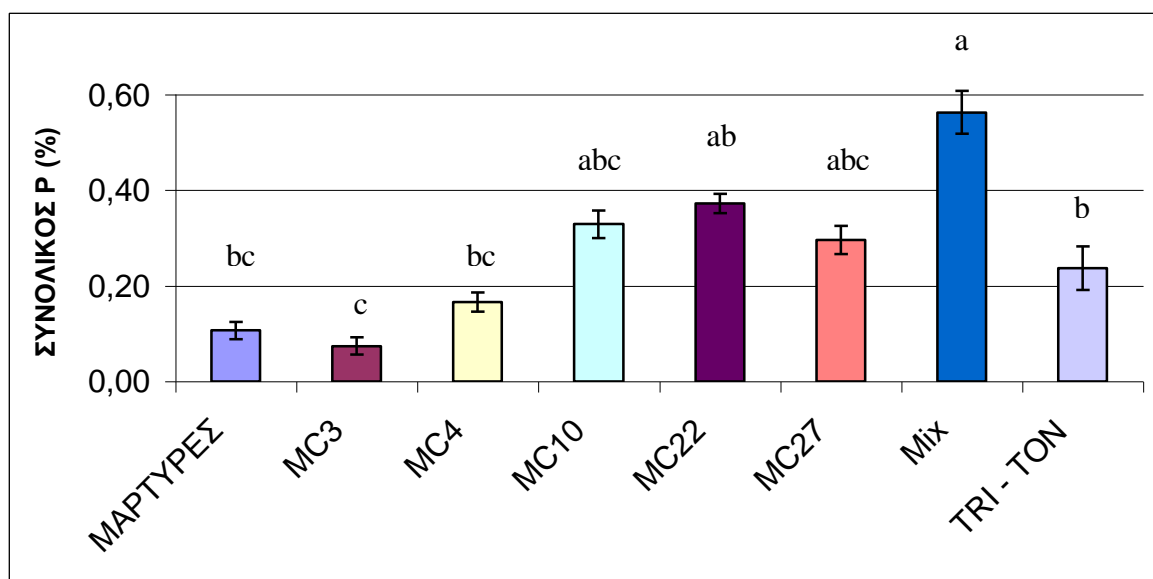
Στους βλαστούς και τα φύλλα των φυτών που εμβολιάστηκαν με το μίγμα μυκορριζικών εμβολίων (Mix) παρατηρήθηκε η υψηλότερη % περιεκτικότητα σε P, η οποία όμως δεν διέφερε σημαντικά από την % περιεκτικότητα P στα φυτά που εμβολιάστηκαν με τα MC22 (*G. mosseae*), MC10 (*G. mosseae*) και MC27 (*G. mosseae/G. etunicatum*). Αντίθετα, η % περιεκτικότητα P στους βλαστούς – φύλλα φυτών που εμβολιάστηκαν με τα TRI-TON, MC4 (*G. etunicatum*) και MC3 (*G. intraradices*) ήταν σημαντικά χαμηλότερη από τα φυτά που εμβολιάστηκαν με το Mix (Διάγραμμα Γ.4.10) αλλά στα ίδια επίπεδα με τον P στα μη-μυκορριζικά φυτά.





**Διάγραμμα Γ.4.10.** Η % περιεκτικότητα φωσφόρου (P) των ιστών (βλαστοί και φύλλα) των φυτών πιπεριάς για την κάθε μεταχείριση. Για κάθε μεταχείριση παρουσιάζεται ο μέσος όρος  $\pm$  τυπική απόκλιση ( $n=5$ ).

Ανάλογα ήταν και τα αποτελέσματα όταν υπολογίστηκε η συνολική % περιεκτικότητα σε P (Διάγραμμα Γ.4.11.). Συγκεκριμένα, τα φυτά που εμβολιάστηκαν με το μίγμα των μυκορριζικών μυκήτων (Mix) παρουσίαζαν τη υψηλότερη % περιεκτικότητα P. Ακολούθησαν τα φυτά που εμβολιάστηκαν με τα εμβόλια MC22 (*G. mosseae*), MC10 (*G. mosseae*) και MC27 (*G. mosseae*/*G. etunicatum*), χωρίς όμως οι διαφορές αυτές να είναι στατιστικά σημαντικές τόσο μεταξύ τους όσο και με τα φυτά που εμβολιάστηκαν με το Mix. Τα φυτά που εμβολιάστηκαν με το εμπορικό σκεύασμα TRI-TON παρουσίασαν σημαντικά χαμηλότερη % περιεκτικότητα σε P, σε σχέση με τα φυτά που εμβολιάστηκαν με το Mix. Την χαμηλότερη περιεκτικότητα σε P παρουσίασαν τα φυτά που εμβολιάστηκαν με τα MC3 (*G. intraradices*), MC4 (*G. etunicatum*) τα οποία δεν διέφεραν σημαντικά από τα μη μυκορριζικά φυτά μάρτυρες.



**Διάγραμμα Γ.4.11.** Η συνολική % περιεκτικότητα σε φώσφορο (P) των ιστών (ρίζες, βλαστοί και φύλλα) των φυτών πιπεριάς για την κάθε μεταχείριση. Για κάθε μεταχείριση παρουσιάζεται ο μέσος όρος  $\pm$  τυπική απόκλιση ( $n=5$ ).

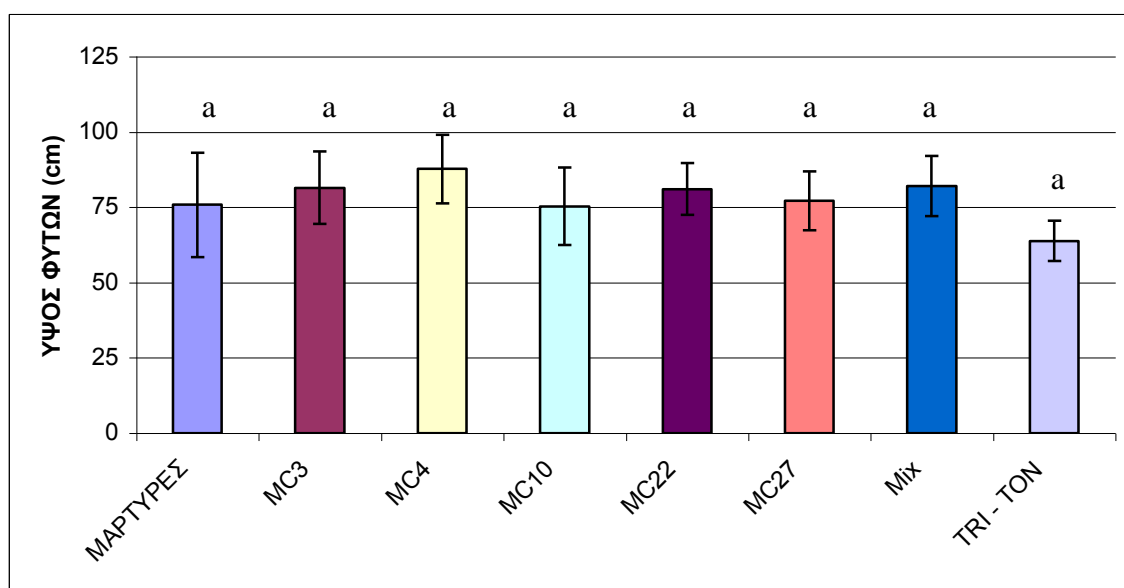
Τα επίπεδα P στα διάφορα φυτικά μέρη συσχετίστηκαν με τα επίπεδα αποικισμού από τα διάφορα μυκορριζικά εμβόλια ώστε να εξεταστεί η συμμετοχή των μυκορριζών στην βελτίωση της θρέψης των φυτών. Υπολογισμός του συντελεστή συσχέτισης Pearsons έδειξε την ύπαρξη στατιστικά σημαντικής θετικής συσχέτισης μεταξύ της % περιεκτικότητας σε P στους διάφορους φυτικούς ιστούς (ρίζες, υπέργειο τμήμα και συνολική) και των επιπέδων μυκορριζικού αποικισμού στα φυτά πιπεριάς (**Πίνακας Γ.4.1**).

**Πίνακας Γ.4.1.** Συσχέτιση μεταξύ % περιεκτικότητα σε P στους φυτικούς ιστούς των φυτών πιπεριάς και % μυκορριζικού αποικισμού.

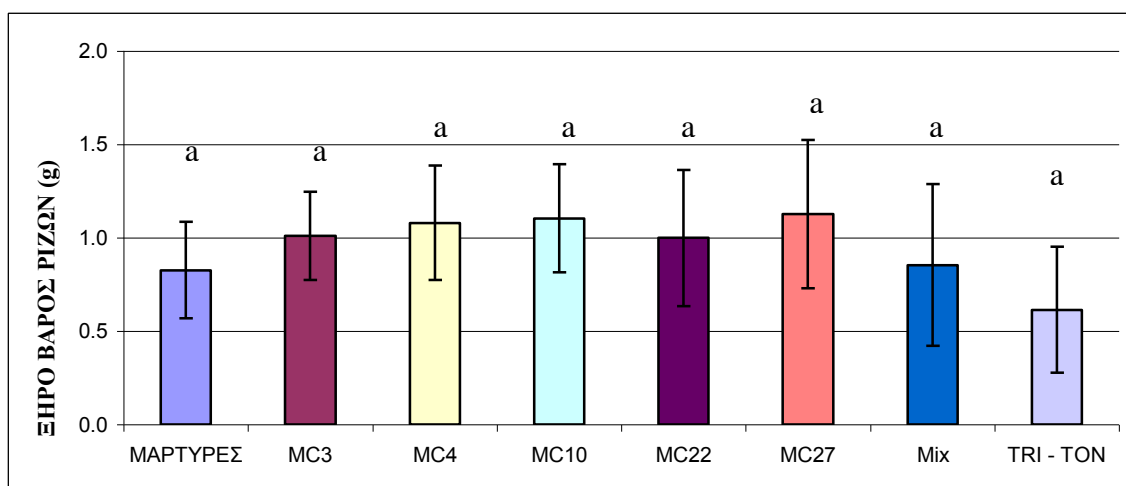
Παράμετροι	Συντελεστής συσχέτισης Pearsons		
% P ρίζα	<b>0.879</b>		
% P φύλλα-βλαστός	<b>0.719</b>	0.660	
% P συνολικός	<b>0.753</b>	0.689	0.995
Παράμετροι	% Αποικισμός	% P ρίζα	% P φύλλα-βλαστός

## Γ.5. ΠΕΙΡΑΜΑ ΤΟΜΑΤΑΣ

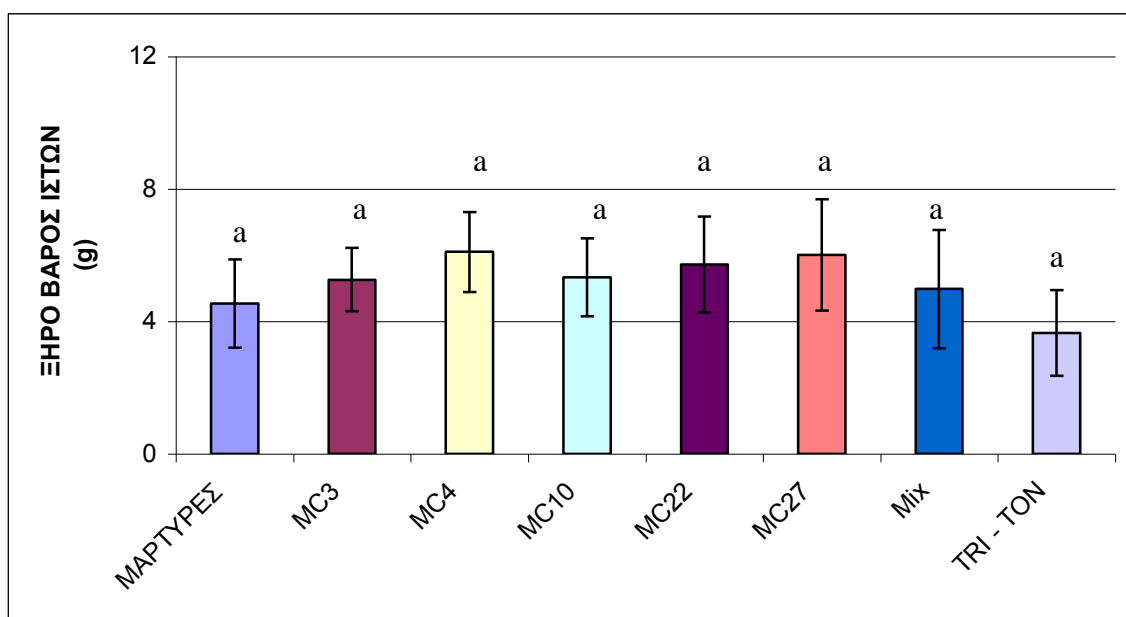
Στα αποτελέσματα των μετρήσεων ανάπτυξης των φυτών τομάτας δεν καταγράφηκαν στατιστικά σημαντικές διαφορές μεταξύ των διαφόρων μεταχειρίσεων ως προς το ύψος των φυτών, το ξηρό βάρος ριζών, βλαστών – φύλλων, της αναλογίας ξηρού βάρους ρίζας / ξηρό βάρος βλαστών – φύλλων, το συνολικό ξηρό βάρος, και τον αριθμό των ανθέων. Τα αποτελέσματα των μετρήσεων παρουσιάζονται συνοπτικά στα *Διαγράμματα (Γ.5.1. – Γ.5.6.)*.



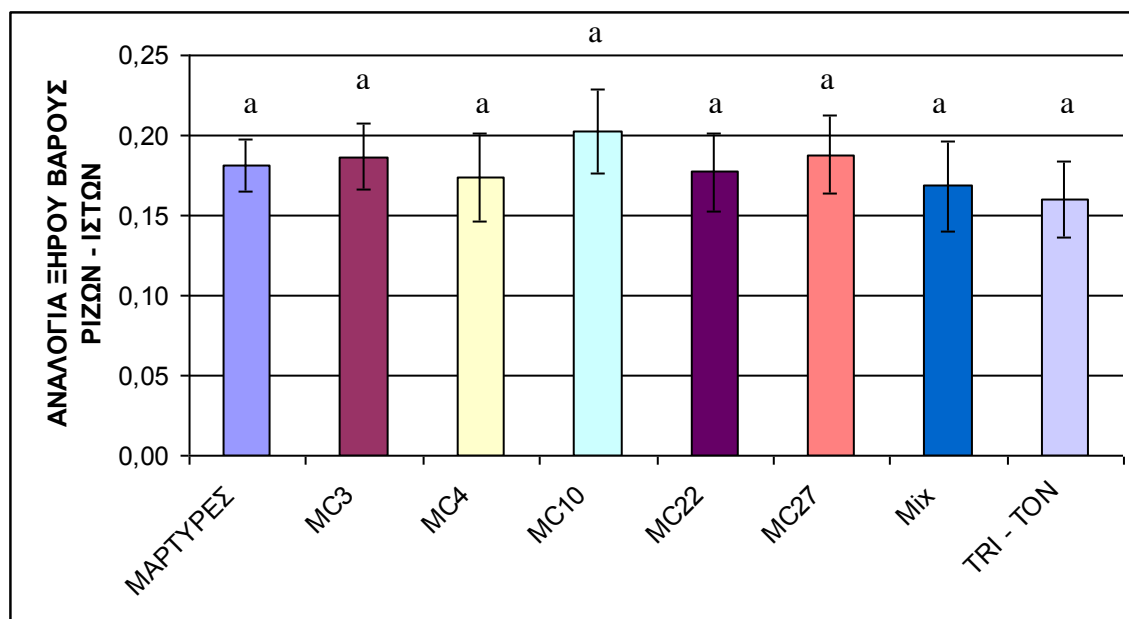
*Διάγραμμα Γ.5.1. Το ύψος των φυτών τομάτας για την κάθε μεταχείρισης μετρούμενο από το σημείο ένωσης του φυτού με το έδαφος μέχρι τον ακραίο οφθαλμό των φυτών. Για κάθε μεταχείριση παρουσιάζεται ο μέσος όρος  $\pm$  τυπική απόκλιση ( $n=5$ ).*



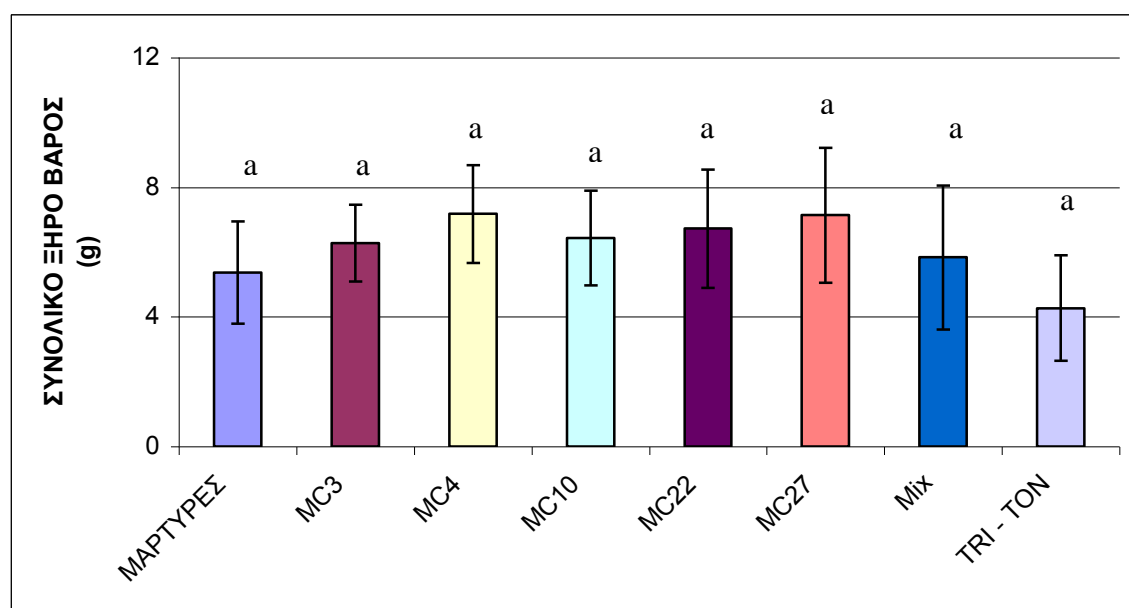
**Διάγραμμα Γ.5.2.** Το ξηρό βάρος των ριζών φυτών τομάτας για την κάθε μεταχείριση. Για κάθε μεταχείριση παρουσιάζεται ο μέσος όρος  $\pm$  τυπική απόκλιση ( $n=5$ ).



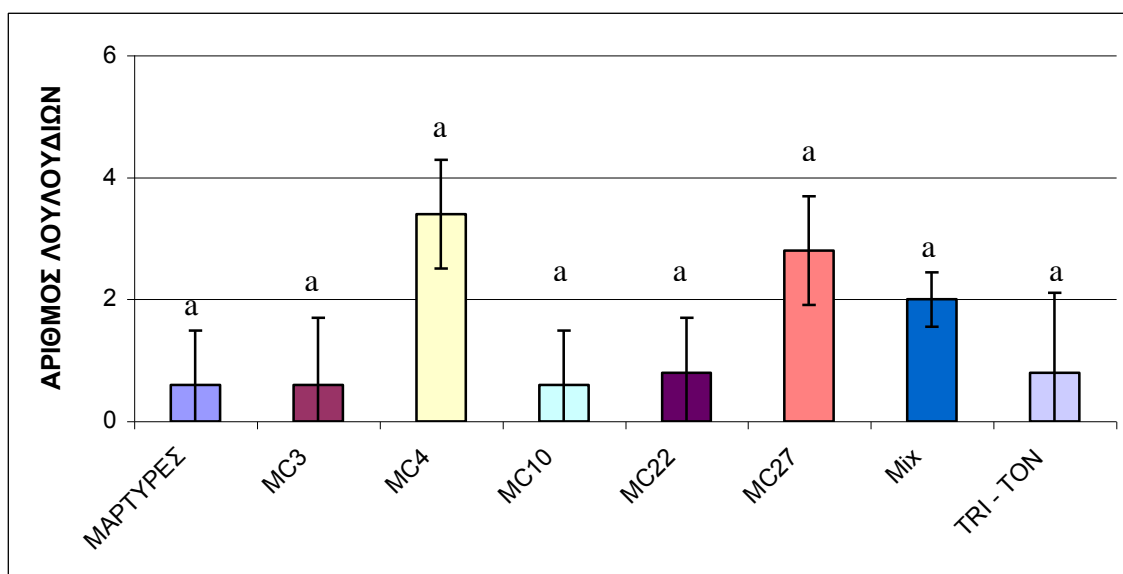
**Διάγραμμα Γ.5.3.** Το ξηρό βάρος ιστών του υπέργειου τμήματος (βλαστοί και φύλλα) των φυτών τομάτας για την κάθε μεταχείριση. Για κάθε μεταχείριση παρουσιάζεται ο μέσος όρος  $\pm$  τυπική απόκλιση ( $n=5$ ).



**Διάγραμμα Γ.5.4.** Οι τιμές του λόγου ξηρού βάρους ριζών - ιστών υπέργειου τμήματος των φυτών τομάτας για την κάθε μεταχείριση. Για κάθε μεταχείριση παρουσιάζεται ο μέσος όρος  $\pm$  τυπική απόκλιση ( $n=5$ ).

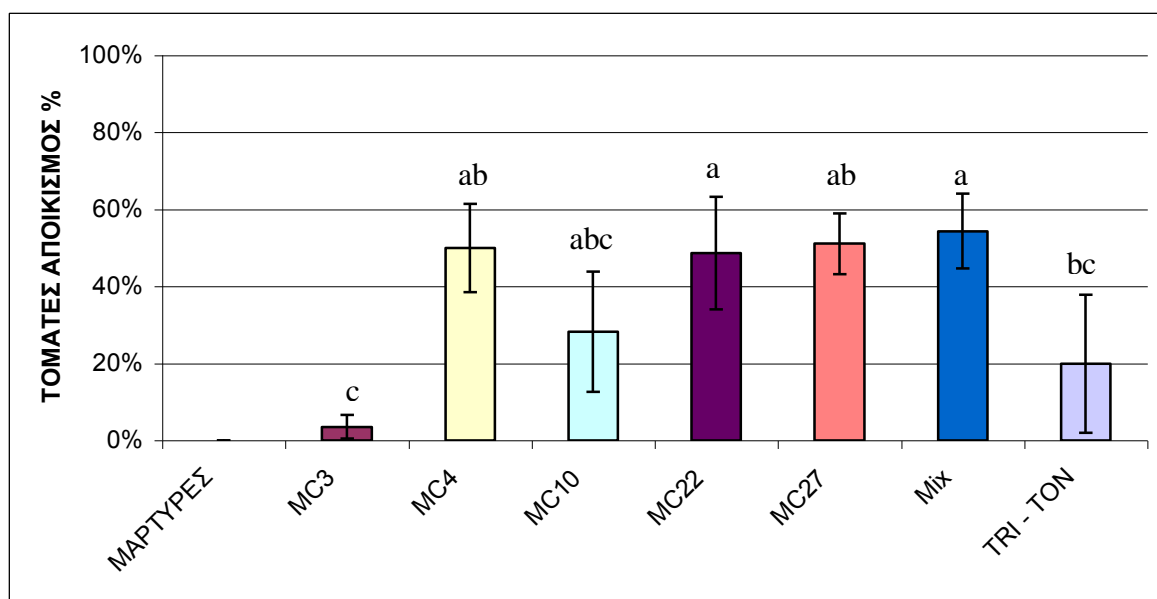


**Διάγραμμα Γ.5.5.** Το συνολικό ξηρό βάρος των φυτών τομάτας για την κάθε μεταχείριση. Για κάθε μεταχείριση παρουσιάζεται ο μέσος όρος  $\pm$  τυπική απόκλιση ( $n=5$ ).



**Διάγραμμα Γ.5.6.** Ο συνολικός αριθμός ανθέων στα φυτά τομάτας για την κάθε μεταχείριση. Για κάθε μεταχείριση παρουσιάζεται ο μέσος όρος  $\pm$  τυπική απόκλιση ( $n=5$ ).

Σε αντίθεση με τα αποτελέσματα των μετρήσεων φυτικής ανάπτυξης, τα επίπεδα μυκορριζικού αποικισμού (**Διάγραμμα Γ.5.7**) παρουσίασαν στατιστικά σημαντικές διαφορές. Τα φυτά που εμβολιάστηκαν με το μίγμα των μυκορριζικών εμβολίων (Mix) παρουσίασαν το υψηλότερο ποσοστό αποικισμού (54,4%), ακολουθούμενα από αυτά που εμβολιάστηκαν με τις καλλιέργειες MC27 (51,1%) (*G. mosseae*/*G. etunicatum*), MC4 (50,1%) (*G. etunicatum*) και MC22 (48,7%) (*G. mosseae*) που δεν διέφεραν σημαντικά με τις τιμές του Mix. Αντίθετα, στα φυτά που εμβολιάστηκαν με τις καλλιέργειες MC10 (28,2%) (*G. mosseae*) και ιδιαίτερα με το εμπορικό σκεύασμα TRI-TON (20,2%) παρατηρήθηκε σημαντικά χαμηλότερος αποικισμός. Σημαντικά χαμηλότερο ποσοστό αποικισμού σε σχέση με τα φυτά που εμβολιάστηκαν με τα MC4 (*G. etunicatum*), MC22 (*G. mosseae*) και MC27 (*G. mosseae*/*G. etunicatum*) καταγράφηκε στα φυτά που εμβολιάστηκαν με την καλλιέργεια MC3 (3,5%) (*G. intraradices*). Ποσοστό αποικισμού (5%) παρατηρήθηκε και στα μη εμβολιασμένα φυτά χωρίς όμως να είναι εφικτό να προσδιοριστεί αν οι υφές που παρατηρούνται στο στερεοσκόπιο είναι μυκορριζικές, καθώς δεν φαίνονται θύσανοι ή κύστες, και πιθανότατα οι υφές ανήκουν σε μη μυκορριζικούς μύκητες.



**Διάγραμμα Γ.5.7.** Το ποσοστό μυκορριζικού αποικισμού (%) στις ρίζες των φυτών τομάτας για την κάθε μεταχείριση. Για κάθε μεταχείριση παρουσιάζεται ο μέσος όρος  $\pm$  τυπική απόκλιση ( $n=5$ ).

## Δ. ΣΥΖΗΤΗΣΗ

Ο κύριος σκοπός της παρούσας εργασίας ήταν η απομόνωση, χαρακτηρισμός και προκαταρκτική αξιολόγηση αμιγών καλλιεργειών ΔΜ μυκήτων που ενδημούν σε αγρούς βιολογικής καλλιέργειας κηπευτικών από την περιοχή της Θεσσαλίας και Κεντρικής Μακεδονίας. Έτσι, απομονώθηκαν και πολλαπλασιάστηκαν πέντε μορφολογικά αμιγείς καλλιέργειες ΔΜ μυκήτων. Περαιτέρω μοριακή ταυτοποίηση με αλληλούχιση της περισσότερο μεταβλητής περιοχής του 18S rRNA γονιδίου των μυκήτων έδειξαν ότι οι τέσσερις από τις πέντε καλλιέργειες (MC3, 4, 10 και 22) ήταν αμιγείς και αποτελούνται από ΔΜ μύκητες του γένους *Glomus* (*G. intraradices*, *G. mosseae*, *G. etunicatum*), που είναι το κυρίαρχο γένος ΔΜ μυκήτων σε καλλιεργούμενα και μη καλλιεργούμενα εδάφη (Helgason *et al.*, 1998 · Oehl *et al.*, 2004 · Wang *et al.*, 2008). Αντίθετα, η καλλιέργεια MC27 ήταν μίγμα ΔΜ μυκήτων (*G. mosseae*/*G. etunicatum*) που περιέχονταν στις προηγούμενες αμιγείς μυκορριζικές καλλιέργειες. Δενδροειδείς μυκορριζικοί μύκητες που ανήκουν στα παραπάνω είδη έχουν απομονωθεί συχνά από εδάφη που καλλιεργούνται τόσο με βιολογικές όσο και με συμβατικές πρακτικές (Oehl *et al.*, 2004 · Hirji *et al.*, 2006 · Galvan *et al.*, 2009).

Ύστερα από την ταυτοποίηση των μυκορριζικών εμβολίων ακολούθησε προκαταρκτική αξιολόγηση τους ως προς την ικανότητα να βελτιώνουν την πρόσληψη P από το έδαφος είτε να ενισχύουν την φυτική ανάπτυξη. Η αύξηση της πρόσληψης P από μυκορριζικά φυτά έχει επιβεβαιωθεί σε πολλές καλλιέργειες σε πειράματα που έχουν πραγματοποιηθεί σε φυτοδοχεία, αν και τα αποτελέσματα παρουσίαζαν σημαντικές αποκλίσεις μεταξύ τους (Dunne and Fitter, 1989). Σε περιπτώσεις στις οποίες η περιεκτικότητα του εδάφους σε διαθέσιμο P ήταν ιδιαίτερα χαμηλή ή ο P είχε προστεθεί στο έδαφος σε μορφή που δεν είναι άμεσα διαθέσιμη στα φυτά, όπως με την μορφή φωσφορίτη, τα μυκορριζικά φυτά είχαν την δυνατότητα να παραλαμβάνουν περισσότερο P από ότι αντίστοιχα μη μυκορριζικά φυτά (Fabig *et al.*, 1989). Αντίθετα, η προσθήκη άμεσα διαθέσιμου P, έχει βρεθεί ότι συνήθως οδηγεί σε σημαντική μείωση του αποικισμού των ριζών από μυκορριζικούς μύκητες (Mosse, 1973a · Bolan, 1991). Τα αποτελέσματα του παρόντος πειράματος συμφωνούν με πληθώρα ερευνών που δείχνουν ότι ο αποικισμός των ριζών από ΔΜ μύκητες οδηγεί σε αύξηση της πρόσληψης P από τα φυτά. Έτσι σε όλες τις μεταχειρίσεις με ΔΜ μύκητες το % επίπεδο P στους φυτικούς ιστούς ήταν σημαντικά υψηλότερο σε σύγκριση με τα μη μυκορριζικά φυτά. Εξαίρεση αποτέλεσαν τα φυτά που εμβολιάστηκαν με τα μυκορριζικά εμβόλια MC3 και MC4, τα οποία



αποτελούνται από σπόρια των μυκήτων *G. intraradices* και *G. etunicatum* αντίστοιχα, όπου η % περιεκτικότητα P ήταν στα ίδια επίπεδα με τα μη μυκορριζικά φυτά. Αντίθετα, ο εμβολιασμός των φυτών πιπεριάς με την καλλιέργεια MC27, που περιείχε τον ΔΜ μύκητα *G. etunicatum* αλλά σε μίγμα με τον μύκητα *G. mosseae*, και του μίγματος *G. etunicatum/G. mosseae/G. intraradices* (Mix) οδήγησε σε αυξημένη πρόσληψη P από τα φυτά. Το παραπάνω πιθανό υποδηλώνει ότι από τους μύκητες που συμμετέχουν στις απομονωθέντες καλλιέργειες ο μύκητας *G. mosseae* πιθανότατα είναι ο πιο αποτελεσματικός ΔΜ στην πρόσληψη P από το έδαφος. Το συμπέρασμα αυτό ενισχύεται από την σχετικά αυξημένη % περιεκτικότητα P στα φυτά που εμβολιάστηκαν με τις καλλιέργειες MC10, MC22 που αποτελούν αμιγείς καλλιέργειες του ίδιου στελέχους *G. mosseae*. Από την άλλη μεριά, η υψηλότερη περιεκτικότητα P παρατηρήθηκε στα φυτά που είχαν εμβολιαστεί είτε με το μικτό εμβόλιο MC27 είτε με το μυκορριζικό εμβόλιο που δημιουργήθηκε από την ανάμιξη των πέντε καλλιεργειών (Mix). Αυτό πιθανόν να οφείλεται στη συμπληρωματική δράση μεταξύ των μυκορριζικών μυκήτων που χρησιμοποιήθηκαν με αποτέλεσμα το μίγμα των μυκήτων να είναι περισσότερο λειτουργικό για τα φυτά αναφορικά με την απορρόφηση του P (Thomson et al., 1996 . Jansa et al., 2008).

Η αυξημένη πρόσληψη P στην γεωργική πρακτική μεταφράζεται σε κάλυψη των αναγκών των φυτών με το στοιχείο αυτό σε κρίσιμα στάδια της ανάπτυξής τους, όπως κατά το σχηματισμό των ανθοφόρων οργάνων και των σπόρων (Li et al., 2006). Επίσης, η αυξημένη απορρόφηση P σηματοδοτεί την πιθανή εξεύρεση πηγής διαθέσιμου φωσφόρου για τα φυτά στα συστήματα βιολογικής γεωργίας, καθώς τα ορυκτά φωσφόρου τα οποία χρησιμοποιούνται σήμερα (φωσφορίτης) παρέχουν μέχρι το 25% της περιεκτικότητας τους άμεσα, ενώ το υπόλοιπο ποσοστό μετατρέπεται σε μορφές μη διαθέσιμες στα φυτά (Mosse, 1973β ).

Το γεγονός ότι, στις δύο από τις έξι μεταχειρίσεις στις οποίες τα φυτά εμβολιάστηκαν με ενδογενείς ΔΜ μύκητες (MC27 και Mix), η συγκέντρωση του P στις ρίζες ήταν υψηλότερη συγκριτικά με το εμπορικό σκεύασμα TRI-TON, συνάδει με έρευνες που υποστηρίζουν το συγκριτικό πλεονέκτημα των ενδογενών μυκορριζικών μυκήτων έναντι αντίστοιχων εξωγενών στην απορρόφηση του P (Sainz and Arines, 1988 · van der Heijden et al., 1998 · Klironomos, 2007 · Tahat et al., 2008 · Yao et al., 2008). Ως ενδογενείς μυκορριζικούς μύκητες χαρακτηρίζουμε μύκητες που έχουν απομονωθεί από εδάφη και συστήματα καλλιέργειας με ανάλογα

χαρακτηριστικά, και οι οποίες είναι περισσότερο προσαρμοσμένες στις συνθήκες χαμηλών εισροών.

Η προσθήκη των μυκορριζικών εμβολίων δεν προκάλεσε σημαντικές μεταβολές στην ανάπτυξη των φυτών τομάτας ή πιπεριάς συγκριτικά με τα μη μυκορριζικά φυτά, αν και η επίδραση των μυκορριζών στην ανάπτυξη των φυτών εξαρτάται άμεσα από το χρονικό διάστημα που μεσολαβεί μεταξύ του εμβολιασμού και της λήψης των μετρήσεων (Powell et al., 1982 · Haas and Krikun, 1985). Το γεγονός ότι το πείραμα πραγματοποιήθηκε σε φυτοδοχεία, περιόρισε ως ένα βαθμό τις παρατηρήσεις μας στα πρώτα βλαστικά στάδια των καλλιεργειών και δεν επέτρεψε την ολοκλήρωσή τους, καθώς ο περιορισμένος εδαφικός όγκος που παρείχαν τα συγκεκριμένα φυτοδοχεία θα αποτελούσε περιοριστικό παράγοντα για την ανάπτυξη των φυτών (Baath and Hayman, 1984). Γενικά ο αποικισμός των φυτών από μυκορριζικούς μύκητες ευνοεί την ανάπτυξη φυτών όπως τα κηπευτικά (*Lycopersicon esculentum*, *Capsicum annuum*, *Petroselinum crispum*, *Daucus carota*) (Regvar et al., 2003 · Cavagnaro et al., 2006) και τα οπωροφόρα δένδρα (*Malus x domestica* Borkh) (Miller et al., 1989). Ωστόσο, δεν παρουσιάζουν όλα τα μυκορριζικά φυτά θετική ανταπόκριση, ενώ κάποια εμφανίζουν ακόμα και μείωση της ανάπτυξης, τουλάχιστον κατά τα στάδια της φυτικής ανάπτυξης (Li et al., 2008). Αυτή η αρνητική επίδραση των μυκορριζών στην φυτική ανάπτυξη έχει αποδοθεί στον ανταγωνισμό μεταξύ της ρίζας και των συμβιωτικών μυκορριζικών μυκήτων για οργανικό άνθρακα ο οποίος παράγεται από τα φυτά μέσω της διαδικασίας της φωτοσύνθεσης, (Buwalda and Goh, 1982), καθώς οι μυκορριζικοί μύκητες καταναλώνουν από 4 – 17% του παραγόμενου από τα φυτά C (Koch and Johnson, 1984 · Harris et al., 1985). Ο αποικισμός των ριζών με μυκορριζικούς μύκητες συνεπάγεται μεγαλύτερη περιεκτικότητα σε λιπίδια. Αυτό σηματοδοτεί την μεγαλύτερη κατανάλωση C (Peng et al., 1993) με αποτέλεσμα το πλεονέκτημα από την αύξηση της απορρόφησης P να μειώνεται σε συγκεκριμένα στάδια ανάπτυξης των μυκορριζικών φυτών και κυρίως στο στάδιο της βλαστικής ανάπτυξης (Kiernan et al., 1983 · Li et al., 2008).

Ο αποικισμός των ριζών από μυκορριζικούς μύκητες παρουσίασε σημαντικές διαφορές τόσο μεταξύ των διαφορετικών μυκορριζικών εμβολίων όσο και μεταξύ των φυτών – ξενιστών. Γενικότερα, όλα τα μυκορριζικά εμβόλια που δοκιμάστηκαν παρουσίασαν υψηλότερα ποσοστά αποικισμού στα φυτά πιπεριάς σε σχέση με τα φυτά τομάτας. Μοναδική εξαίρεση αποτέλεσε το εμβόλιο MC4 (*G. etunicatum*) που

αποίκισε πιο αποτελεσματικά τα φυτά τομάτας. Το επίπεδο αποικισμού των ριζών από τα διάφορα μυκορριζικά εμβόλια παρουσίασε σημαντικές διαφορές. Έτσι ο αποικισμός των φυτών πιπεριάς και τομάτας από τους μύκητες των εμβολίων Mix (*G. mosseae*, *G. etunicatum*, *G. intraradices*), MC22 (*G. mosseae*) και MC27 (*G. mosseae*, *G. etunicatum*) ήταν σταθερά υψηλός σε αντίθεση με τα μυκορριζικά εμβόλια MC3 (*G. intraradices*) και MC10 (*G. mosseae*) που παρουσίασαν χαμηλά ποσοστά αποικισμού και στα δύο φυτά. Το εμπορικό εμβόλιο TRI-TON παρουσίασε χαμηλή ικανότητα αποικισμού σε σχέση με τα ενδογενή εμβόλια και στα δύο φυτά καταδεικνύοντας την υπεροχή των ενδογενών εμβολίων σε σχέση με εξωγενή μυκορριζικά εμβόλια. Θα πρέπει να τονιστεί ότι τα επίπεδα αποικισμού στα φυτά πιπεριάς συσχετίστηκε θετικά με την % περιεκτικότητα των φυτών σε φώσφορο. Αυτό το εύρημα επιβεβαιώνει τον ενεργό και ευεργετικό ρόλο των ενδογενών μυκορριζικών εμβολίων που δοκιμάστηκαν στην θρέψη του φυτού με P.

Οι διαφορές που παρατηρήθηκαν στα επίπεδα αποικισμού μεταξύ των φυτών-ξενιστών αλλά και μεταξύ των μυκορριζικών εμβολίων μπορούν να έχουν διαφορετικές αιτίες. Ένας βασικός λόγος είναι ότι υπάρχουν σημαντικές διαφορές στα φυτικά είδη όσο αφορά την δυνατότητά τους να λειτουργήσουν ως φυτά ξενιστές (Giovannetti and Hepper, 1985). Επίσης έχει παρατηρηθεί ότι σε διαφορετικές περιβαλλοντικές συνθήκες τα ίδια φυτικά είδη μπορεί να παρουσιάζουν απόκλιση στον βαθμό αποικισμού τους (Azcon and Ocampo, 1981 · Vierheilig and Ocampo, 1991) ή ακόμα και να μην είναι επιδεκτικά αποικισμού (Vare et al., 1992). Το ίδιο φυτικό είδος μπορεί επίσης να παρουσιάζει σημαντική απόκλιση στον βαθμό αποικισμό του από τον ίδιο μυκορριζικό μύκητα, ανάλογα με τον γενότυπο του φυτού (Sensoy et al. 2007), ή το ίδιο φυτικό είδος να αποικίζεται σε διαφορετικό βαθμό από διαφορετικά είδη μυκήτων (Ruiz – Lozano et al., 1995), ή όταν ταυτόχρονα αποικίζεται από περισσότερα είδη μυκήτων (Thomson et al., 1996). Σε πείραμα που έγινε σε φυτά τομάτας ο αποικισμός από τον μύκητα *G. mosseae* έφθασε το 93,5% ενώ ο αποικισμός από τον μύκητα *G. etunicatum* κυμάνθηκε από 39 - 73% 35 ημέρες μετά τον εμβολιασμό των φυτών (Bryla and Koide, 1990). Αντίθετα, σε πιπεριές ο αποικισμός των ριζών μετά τον εμβολιασμό με μυκορριζικούς μύκητες του γένους *Glomus* sp. έφθασε στο 45% (Kaya et al., 2009).

Η διαφορά στον βαθμό αποικισμού μπορεί να οφείλεται και στην διαφορετική μολυσματικότητα των μυκήτων (Buwalda et al., 1984· Walker and Smith, 1984),

λαμβάνοντας υπόψη και την ελάχιστη ποσότητα μολύσματος η οποία χρειάζεται για τον μέγιστο αποικισμό των ριζών (*Sylvia, 1989*), και την παραδοχή ότι γενικά υπάρχει θετική συσχέτιση μεταξύ της πυκνότητας του εμβολίου και του αποικισμού των ριζών (*Sylvia et al., 1993*). Ένας ακόμα λόγος ο οποίος μπορεί να καθορίζει σημαντικά τον βαθμό αποικισμού μυκορριζικών φυτών είναι το φυτικό στάδιο. Διαφορές στον βαθμό αποικισμού έχουν παρατηρηθεί ανάλογα με το στάδιο ανάπτυξης των φυτών (*Duc et al., 1989 · Bradbury et al., 1991*), ενώ κάποια φυτικά είδη σε συγκεκριμένα στάδια ανάπτυξης είναι μυκορριζικά και σε άλλα στάδια ανάπτυξης είναι μη μυκορριζικά (*Newman and Reddell, 1987*).

## Ε. ΣΥΜΠΕΡΑΣΜΑΤΑ

Συνοψίζοντας, στα πλαίσια της παρούσας εργασίας

- Απομονώθηκαν πέντε ενδογενείς μυκορριζικές καλλιέργειες που αποτελούνται από μύκητες των ειδών *G. intraradices*, *G. etunicatum*, *G. mosseae*
- Τα μυκορριζικά εμβόλια που αναπτύχθηκαν δεν οδήγησαν σε σημαντική αύξηση της φυτικής μάζας στα φυτά τομάτας και πιπεριά, τουλάχιστον κατά το βλαστικό στάδιο των καλλιεργειών, στο οποίο περιορίστηκε το πείραμα.
- Τα περισσότερα ενδογενή μυκορριζικά εμβόλια και ιδιαίτερα τα μικτά εμβόλια Mix και MC27 αποίκισαν αποτελεσματικά τα φυτά πιπεριάς και τομάτας, και βελτίωσαν σημαντικά την πρόσληψη P στα φυτά πιπεριάς.
- Τα μυκορριζικά εμβόλια παρουσίασαν υψηλότερη ικανότητα αποικισμού και βελτίωσαν σημαντικά την πρόσληψη φωσφόρου από τα φυτά πιπεριάς σε σχέση με το εμπορικό μυκορριζικό εμβόλιο TRI-TON καταδεικνύοντας την προοπτική για εμπορική εκμετάλλευσή τους στην αγροτική πρακτική.

Τα παραπάνω συμπεράσματα θα αποτελέσουν έναυσμα για την περαιτέρω διερεύνηση της αποδοτικότητας των μυκορριζικών εμβολίων σε συνθήκες αγρού, ώστε να ερευνηθεί η αποτελεσματικότητα των συγκεκριμένων μυκορριζικών καλλιεργειών στο σύνολο του κύκλου ζωής των φυτών αλλά και την βελτιστοποίηση του τρόπου εφαρμογής τους στον αγρό.

## ΒΙΒΛΙΟΓΡΑΦΙΑ

- Αλεξιάδης Κ.Α., 1977. Φυσική και Χημική Ανάλυση του Εδάφους. Πολυτεχνική Σχολή Πανεπιστημίου Θεσσαλονίκης. Θεσσαλονίκη 1977.
- Allen E. B., Allen M. F. 1986. Water relations of xeric grasses in the field: interactions of mycorrhizas and competition, *New Phytologist*, **104**, 559 – 571.
- Al-Karaki G., Hammad R., Rusan M., 2001. Response of two tomato cultivars differing in salt tolerance to inoculation with mycorrhizal fungi under salt stress. *Mycorrhiza*, **11**, 43-47.
- Auge R. M., Schekel K.A., Wample R. L., 1986. Greater leaf conductance of well-watered VA mycorrhizal plants is not related to phosphorus nutrition. *New Phytologist*, **103**, 107-116.
- Auge R. M., Duan X., 1991. Mycorrhizal fungi and non-hydraulic root signals of soil drying. *Plant Physiology*, **97**, 821-824.
- Azcon R., Ocampo J.A., 1981. Factors affecting the vesicular – arbuscular infection and mycorrhizal dependency of thirteen wheat cultivars. *New Phytologist*, **87**, 677 – 685
- Baath E., Hayman D.S., 1984. Effect of soil volume and plant density on mycorrhizal infection and growth response. *Plant and Soil*, **77**, 373 – 376.
- Bolan N.S., 1991. A critical review of the role of mycorrhizal fungi in the uptake of phosphorus by plants. *Plant and Soil*, **134**, 189 – 207.
- Bradbury S.M., Peterson R.L., Bowley S.R., 1991. Interactions between three alfalfa nodulation genotypes and two *Glomus* species. *New Phytologist*, **119**, 115 – 120.
- Bromfield S.M., Jones O.L., 1972. The initial leaching of hayed-off pasture plants in relation to the recycling of phosphorus. *Australian Journal of Agricultural Research*, **23**, 811–824.
- Brundrett M. C. 2004. Diversity and classification of mycorrhizal associations. *Biological Reviews*, **79**, 473-495.
- Bryla D.R., Koide R.T., 1990. Role of mycorrhizal infection in the growth and reproduction of wild vs. cultivated plants. II. Eight wild accessions and two cultivars of *Lycopersicon esculentum* Mill. *Oecologia*, **84**, 82-92.

- Buwalda J.G., Goh K.M., 1982. Host – fungus competition for carbon as a cause for growth depressions in vesicular – arbuscular mycorrhizal ryegrass. *Soil Biology and Biochemistry*, **14**, 103 – 106.
- Caron M., Fortin J. A., Richard C. 1985. Influence of substrate on the interaction of *Glomus intraradices* and *Fusarium oxysporum* F.sp. *radicis – lycopersici* on tomatoes. *Plant and Soil*, **87**, 233-239.
- Cavagnaro T. R., Jackson L. E., Six J., Ferris H., Goyal S., Asami D., Scow K.M., 2006. Arbuscular mycorrhizas, microbial communities, nutrient availability, and soil aggregates in organic tomato production. *Plant and Soil*, **282**, 209 – 225.
- Chellemi D.O., 2000. Adaptation of approaches to pest control in low input agriculture. *Crop Protection*, **19**, 855 – 858.
- Christie P., Kilpatrick D.J., 1992. Vesicular-arbuscular mycorrhiza infection in cut grassland following long-term slurry application. *Soil Biology and Biochemistry*, **24**, 325–330.
- Clapp, J.P., Fitter, A.H., Merryweather, J.W., 1996. Arbuscular Mycorrhizas, 145-161. In: Methods for the examination of organismal diversity in soils and sediments. G.S. Hall (Ed). *CAB International*, Wallingford, UK.
- Clark R. B., Zeto S. K, 1996. Mineral acquisition by mycorrhizal maize grown on acid and alkaline soil. *Soil Biology and Biochemistry*, **28**, 1495 -1503.
- Davis F.T., Potter J. R., Linderman R. G, 1992. Mycorrhiza and repeated drought exposure affect drought resistance and extraradical hyphae development of pepper plants independent of plant size and nutrient content. *Journal of Plant Physiology*, **139**, 289 – 294.
- de Dye G. B., Raaijmakers C. E., Zoomer H. R., Berg M. P., de Ruiter P. C., Verhoef H. A. Bezemer T. M., van der Putten W. H. 2001. Soil invertebrate fauna enhances grassland succession and diversity. *Nature*, **422**, 711 – 713.
- Dhillon S.S., 1992. Host – endophyte specificity of vesicular – arbuscular mycorrhizal colonization of *Oryza sativa* L. at the pre – transplant stage in low or high phosphorus soil. *Soil Biology and Biochemistry*, **24**, 405 – 411.
- Duc G., Trouvelot A., Gianinazzi-Pearson V., Gianinazzi S., 1989. First report of non – mycorrhizal plant mutants (myc-) obtained in pea (*Pisum sativum* L.) and faba bean (*Vicia faba* L.). *Plant Science*, **60**, 215 – 222.

- Dunne M.J., Fitter A.H., 1989. The phosphorus budget on a field grown strawberry (*Fragaria x ananass* cv. Hapil) crop: evidence for mycorrhizal contribution. *Annals of Applied Biology*, **114**, 185 – 193.
- Fabig B., Moawad A.M., Achtnich W., 1989. Effect of VA mycorrhiza on dry weight and phosphorus content in shoots of cereal crops fertilized with rock phosphates at different soil pH and temperature levels. *Z Pflanzenernähr Bodenkunde*, **152**, 255 – 259.
- Frey B., Schuepp H. 1993. Acquisition of nitrogen by external hypae of arbuscular mycorrhizal fungi associated with *Zea mays*. L. *New Phytologist*, **124**, 221 – 230.
- Fritz M., Jakobsen I., Lyngkjær M. F., Thordal-Christensen H., Pons-Kühnemann J., 2006. Arbuscular mycorrhiza reduces susceptibility of tomato to *Alternaria solani*. *Mycorrhiza*, **16**, 413–419.
- Galvan GA, Paradi I, Burger K., Baar J, Kuyper TW, Scholter OE, Kik C., 2009. Molecular diversity of arbuscular mycorrhizal fungi in onion roots from organic and conventional farming systems in the Netherlands. *Mycorrhiza* (in press DOI 10.1007/s00572-009-0237-2)
- Galvez L, Douds D.D., Drinkwater L.E., Wagoner P., 2001. Effect of tillage and farming system upon VAM fungus populations and mycorrhizas and nutrient uptake of maize. *Plant Soil*, **228**, 299–308.
- Giovannetti M., Hepper C.M. 1985. Vesicular – arbuscular mycorrhizal infection in *Hedysarum coronarium* and *Onobrychis viciifolia*: host – endophyte specificity. *Soil Biology and Biochemistry*, **17**, 899 – 900.
- Giovannetti M., Mosse B., 1980. An evaluation of techniques for measuring vesicular – arbuscular mycorrhizal infection in roots. *New Phytologist*, **84**, 489 – 500.
- Haas J.H., Krikun J. 1985. Efficacy of endomycorrhizal – fungus isolates and inoculum quantities required for growth response. *New Phytologist*, **100**, 613 – 621.
- Harrier L. A., Watson C. A. 2003. The role of arbuscular mycorrhizal fungi in sustainable cropping systems. *Advances in Agronomy*, **79**, 185-225.
- Harris D., Pacovsky R.S., Dolby R., 1985. Carbon economy of soybean – Rhizobium – Glomus associations. *New Phytologist*, **101**, 427 – 440.



- Hayman D.S., 1982. Influence of soils and fertility on activity and survival of vesicular-arbuscular mycorrhizal fungi. *Phytopathology*, **72**, 1119–1125
- van der Heijden M.G.A., Boller T., Wiemken A., Sanders I.R. 1998. Different arbuscular mycorrhizal fungal species are potential determinants of plant community structure. *Ecology*, **79**:2082–2091
- Helgason T, Daniell TJ, Husband R, Fitter AH, Young J.P.W., 1998 Ploughing up the woodwide web? *Nature*, **394**, 431.
- Hetrick B. A. D. 1991. Mycorrhizas and root architecture. *Experimentia*, **47**, 355 – 362.
- Hijri I., Sýkorová Z., Oehl F., Ineichen K., Mäder P., Wiemken A., Redecker D., 2006 Communities of arbuscular mycorrhizal fungi in arable soils are not necessarily low in diversity. *Molecular Ecology*, **15**:2277–2289.
- Jansa J., Smith F.A., Smith S.E., 2008. Are there benefits of simultaneous root colonization by different arbuscular mycorrhizal fungi? *New Phytologist*, **177**, 779 – 789.
- Jarstfer, A.G., Sylvia, D.M. (1992). Inoculum production and inoculation strategies for vesicular arbuscular mycorrhizal fungi. In: Blaine Meeting Jr., F. (ed.), *Soil Microbial Ecology. Application in Agricultural and Environmental Management*. Marcel Decker, New York, p.349-369.
- Jasper D.A., Abbott L.K., Robson A.D., 1991. The effect of soil disturbance on vesicular – arbuscular mycorrhizal fungi in soils of different vegetation types. *New Phytologist*, **118**, 471 – 476.
- Johansen A., Jakobsen I., Jensen E.S. 1993. External hyphae of vesicular – arbuscular mycorrhizal fungi associated with *Trifolium subterraneum*. 3. Hyphal transport of  $^{32}\text{P}$  and  $^{15}\text{N}$ . *New Phytologist*, **124**, 61 – 68.
- 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.
- Joner E.J., Jakobsen I., 1995. Uptake of  $^{32}\text{P}$  from labelled organic matter by mycorrhizal and non-mycorrhizal subterranean clover (*Trifolium subterraneum* L.). *Plant and Soil*, **172**, 221–227.
- Karagiannidis N., Bletsos F., Stavropoulos N., 2002. Effect of *Verticillium* wilt (*Verticillium dahliae* Kleb.) and mycorrhiza (*Glomus mosseae*) on root

colonization, growth and nutrient uptake in tomato and eggplant seedlings, *Scientia Horticulturae*, **94**, 145-156.

- Kaya C., Ashraf M., Sonmez O., Aydemir S., Tuna A. L., Cullu M. A., 2009. The influence of arbuscular mycorrhizal colonisation on key growth parameters and fruit yield of pepper plants grown at high salinity. *Scientia Horticulturae*, **121**, 1–6
- Kiernan J.M., Hendrix J.W., Maronek D.M., 1983. Fertilizer – induced pathogenicity of mycorrhizal fungi to sweetgum seedlings. *Soil Biology and Biochemistry*, **15**, 257 – 262.
- Kirchmann H., Witter E., 1992. Composition of fresh, aerobic and anaerobic farm animal dungs. *Bioresearch Technology*, **40**:137–142
- Klironomos J., 2007. Variation in plant response to native and exotic arbuscular mycorrhizal fungi. *Ecology*, **84**, 2292 – 2301.
- Koch K.E., Johnson C.R., 1984. Photosynthate partitioning in split – root seedlings with mycorrhizal and non – mycorrhizal root systems. *Plant Physiology*, **75**, 26 – 30.
- Koide R. 1985. The nature of growth depressions in sunflower caused by vesicular - arbuscular mycorrhizal infection. *New Phytologist*, **99**, 449 – 462.
- Lee J., Lee S., J. Peter W. Young, 2008. Improved PCR primers for the detection and identification of arbuscular mycorrhizal fungi FEMS. *Micobiology Ecology*, **65**, 339-349.
- Lekberg Y., Koide R.T., 2005. Is plant performance limited by abundance of arbuscular mycorrhizal fungi? A meta – analysis of studies published between 1988 and 2003. *New Phytologist*, **168**, 189 – 204.
- Li H., Smith F.A., Dickson S., Holloway R.E., Smith S.E. 2008. *New Phytologist*, **178**, 852 – 862.
- Li H.Y., Smith S.E., Holloway R.E., Zhu Y.G., Smith F.A., 2006. Arbuscular mycorrhizal (AM) fungi contribute to phosphorus uptake by wheat grown in a phosphorus – fixing soil even in the absence of positive growth responses. *New Phytologist*, **172**, 536 – 543.
- Mäder P, Fliessbach A, Dubois D, Gunst L, Fried P, Niggli U., 2002. Soil fertility and biodiversity in organic farming. *Science*, **296**, 1694–1697.

- Marschner H. and Dell B., 2003. Nutrient uptake in mycorrhizal symbiosis. *Plant and Soil*, **159**, 89 – 102.
- Miller D.D., Bodmer M., Schuepp H., 1989. Spread of endomycorrhizal colonization and effects on growth of apples seedlings. *New Phytologist*, **111**, 51 – 59.
- Mosse B., 1973α. Plant growth responses to vesicular – arbuscular mycorrhiza. IV. In soil given additional phosphate. *New Phytologist*, **72**, 127 – 136.
- Mosse B., 1973β. Advances in the study of vesicular – arbuscular mycorrhizae. *Annual Review of Phytopathology*, **11**, 171 – 196.
- Newman E.I. and Reddell P. 1987. The distribution of mycorrhizas among families of vascular plants. *New Phytologist*, **106**, 745 – 751.
- Oehl F., Tagmann H.U., Oberson A., Besson J.M., Dubois D., Mäder P., Roth H.R., Frossard E., 2002. Phosphorus budget and phosphorus availability in soils under organic and conventional farming. *Nutrient Cycling in Agroecosystems*, **62**, 25–35.
- Oehl F., Sieverding E., Mäder P., Dubois D., Ineichen K., Boller T., Wiemken A., 2004. Impact of long-term conventional and organic farming on the diversity of arbuscular mycorrhiza fungi. *Oecologia* **138**:574–583.
- Olsen S.R., Cole C.V., Watanabe F.S., Dean L.A., 1954. Estimation of available phosphorus in soils by extraction with sodium bicarbonate. US Department of Agriculture, circular no. 939. US Department of Agriculture, Washington D.C., pp 1–19.
- Peng S., Eissenstat D.M., Graham J., Williams K, Hodge N., 1993. Growth depression in mycorrhizal citrus at high – phosphorus supply. *Plant Physiology*, **101**, 1063 – 1071.
- Porter W.M., Abbott L.K., Robson A.D., 1978. Effect of rate of application of superphosphate on populations of vesicular arbuscular endophytes. *Australian Journal of Experimental Agriculture and Animal Husbandry*. **18**, 573–578.
- Powell C.L., Clark G.E., Verberne N.J., 1982. Growth response of four onion cultivars to several isolates of VA mycorrhizal fungi. *New Zealand Journal of Agricultural Research*, **25**, 465 – 470)

- Regvar M., Vogel-Mikus K., Severkar T., 2003. Effect of AMF inoculum from field isolates on the yield of green pepper, parsley, carrot and tomato. *Folia Geobotanica*, **38**, 223 – 234.
- Ruiz – Lozano J.M., Azcon R., Gomez M., 1995. Effects of Arbuscular – Mycorrhizal *Glomus* Species on drought tolerance: Physiological and Nutritional Plant Responses. *Applied and Environmental Microbiology*, **61**, No2, 456 – 460.
- Sainz M.J., Arines J., 1988. Effet of indigenus and introduced vesicular – arbuscular mycorrhizal fungi on growth and phosphorus uptake of *Trifolium pratense* and on inorganic phosphorus fractions in a cambisol. *Biology and Fertility of Soils* **6**, 55-60.
- Schröder M. S., Janos D. P., 2004. Phosphorus and intraspecific density alter plant responses to arbuscular mycorrhizas, *Plant and Soil*, **264**, 335–348.
- Scullion J. Eason W.R. and Scott E.P., 1998. The effectivity of arbuscular mycorrhizal fungi from high input conventional and organic grassland and grass – arable rotations. *Plant and Soil*, **204**, 243 – 254.
- Sensoy S., Demir S., Turkmen, O., Erdinc C., Savur O.B., 2007. Responses of some different pepper (*Capsicum annuum* L.) genotypes to inoculation with two different arbuscular mycorrhizal fungi. *Scientia Horticulturae*, **113**(1), 92-95.
- Siddiqui Z.A., Sayeed A. M., 2007. Effects of AM fungi and organic fertilizers on the reproduction of the nematode *Meloidogyne incognita* and on the growth and water loss of tomato. *Biology and Fertility of Soils*, **43**, 603–609.
- Smith S. E., V. Gianinazzi - Pearson 1988. Physiological interactions between symbionts in vesicular – arbuscular mycorrhizal plants. *Annual Review of Plant Physiology*, **39**, 221 – 244.
- Smith and Read, 1997. Mycorrhizal symbiosis, 2nd edn. *Academic Press*, London.
- Sylvia D.M., 1989. Nursery inoculation of sea oats with vesicular – arbuscular mycorrhizal fungi and outplanting performance of Florida beaches. *Journal of Coastal Research*, **5**, 747 – 754.
- Sylvia D.M., 1994. Vesicular-Arbuscular Mycorrhizal Fungi. Soil Science Society of America, 351-377.

- Sylvia D.M., Jarstfer A.G., Vosatka M., 1993. Comparisons of vesicular – arbuscular mycorrhizal species and inocula formulations in a commercial nursery and on diverse Florida beaches. *Biology and Fertility of Soils*, **16**, 139-144.
- Tahat M.M., Kamaruzaman S., Radziah O., Kadir J., Masdek H.N., 2008. Response of (*Lycopersicum esculentum* Mill.) to Different Arbuscular Mycorrhizal Fungal species. *Asian Journal of Plant Sciences*, **7**, 479 – 484.
- Thomson T.E., Manian S., Udaiyan K., 1996. Interaction of multiple VAM fungal species on root colonization, plant growth and nutrient status of tomato seedlings (*Lycopersicon esculentum* Mill.). *Agriculture, Ecosystems and Environment*, **59**, 63 – 68.
- Toro M, Azcon 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.
- Ulrich H., Katharina J., Hermann B., 2002. Towards growth of arbuscular mycorrhizal fungi independent of a plant host. *Applied and Environmental Microbiology*, **68**, 1919 – 1924.
- Vare H., Vestberg M., Eurola S., 1992. Mycorrhiza and root – associated fungi in Spitzbergen. *Mycorrhiza*, **1**, 93 – 104
- Wang Y.Y., Vestberg M., Walker C., Hurme T., Zhang X., Lindström K., 2008. Diversity and infectivity of arbuscular mycorrhizal fungi in agricultural soils of the Sichuan Province of mainland China. *Mycorrhiza* **18**:59–68.
- Vierheilig H., Ocampo G.A., 1991. Receptivity of various wheat cultivars to infection by VA – mycorrhizal fungus as influenced by inoculum potential and the relation of VAM – effectiveness to succinic dehydrogenase activity of the mycelium in the roots. *Plant and Soil*, **133**, 291 – 296.
- Yao Q., Z Zhu H.H., Hu Y.L., Li L. Q., 2008. Differential influence of native and introduced arbuscular mycorrhizal fungi on growth of dominant and subordinate plants. *Plant Ecology*, **196**, 261–268

## **ΗΛΕΚΤΡΟΝΙΚΕΣ ΠΗΓΕΣ**

- <http://epp.eurostat.ec.europa.eu>
- <http://invam.caf.wvu.edu>
- <http://eur-lex.europa.eu>

## ΠΑΡΑΡΤΗΜΑ

**Πίνακας Π.1.** Μέσος όρος της επί τοις εκατό συγκέντρωσης P στις ρίζες των φυτών πιπεριάς για κάθε μεταχείριση.

Μεταχείριση	% P
MARTYPEΣ	0,04
MC3	0,02
MC4	0,04
MC10	0,06
MC22	0,11
MC27	0,25
Mix	0,20
TRI-TON	0,12

**Πίνακας Π.2.** Μέσος όρος της επί τοις εκατό συγκέντρωσης P στους βλαστούς και τα φύλλα των φυτών πιπεριάς για κάθε μεταχείριση.

Μεταχείριση	% P
MARTYPEΣ	0,04
MC3	0,03
MC4	0,05
MC10	0,11
MC22	0,11
MC27	0,09
Mix	0,17
TRI-TON	0,08

**Πίνακας Π.3.** Μέσος όρος της επί τοις εκατό συγκέντρωσης P στο σύνολο των φυτών πιπεριάς για κάθε μεταχείριση.

Μεταχείριση	% P
MARTYPEΣ	0,11
MC3	0,07
MC4	0,17
MC10	0,33
MC22	0,37
MC27	0,30
Mix	0,56
TRI - TON	0,24

**Πίνακας Π.4.** Μέσος όρος του επί τοις εκατό ποσοστού αποικισμού των ριζών των φυτών πιπεριάς για κάθε μεταχείριση.

Μεταχείριση	% αποικισμός
MARTYPEΣ	9,10
MC3	19,40
MC4	25,60
MC10	26,10
MC22	78,20
MC27	81,50
Mix	80,40
TRI - TON	65,10

**Πίνακας Π.5.** Μέσος όρος του επί τοις εκατό ποσοστού αποικισμού των ριζών των φυτών τομάτας για κάθε μεταχείριση.

Μεταχείριση	% αποικισμός
MARTYPEΣ	5,0
MC3	3,5
MC4	50,1
MC10	28,2
MC22	48,7
MC27	51,1
Mix	54,4
TRI - TON	20,2