



ΠΑΝΕΠΙΣΤΗΜΙΟ ΘΕΣΣΑΛΙΑΣ

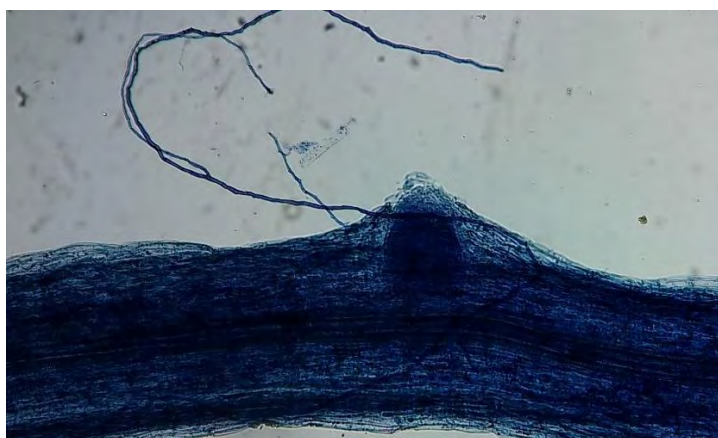


Τμήμα Γεωπονίας Φυτικής Παραγωγής και Αγροτικού
Περιβάλλοντος

Εργαστήριο Ζιζανιολογίας

Θέμα πτυχιακής εργασίας:

«Κυανοτοξίνες στο αρδευτικό νερό: πως επηρεάζεται η
μυκορριζική συμβίωση στο καρότο»



Φοιτητής: Παπαδημητρίου Νικόλαος

Επιβλέπουσα Καθηγήτρια: Ευθυμία Λεβίζου (Επίκουρη
Καθηγήτρια)

Βόλος 2018

Τριμελής Συμβουλευτική Επιτροπή

Λεβίζου Ευθυμία, Επιβλέπουσα, Επίκουρη Καθηγήτρια Φυσιολογίας
Φυτών

Αντωνιάδης Βασίλειος, Μέλος, Επίκουρος Καθηγητής Εφαρμοσμένης
Εδαφολογίας

Βέλλιος Ευάγγελος, Μέλος, Επίκουρος Καθηγητής Φυτοπαθολογίας –
Σύγχρονων Μεθόδων Διαγνωστικής

Ευχαριστίες

Η παρούσα πτυχιακή εργασία πραγματοποιήθηκε στα πλαίσια του προπτυχιακού προγράμματος σπουδών του Τμήματος Γεωπονίας Φυτικής Παραγωγής και Αγροτικού Περιβάλλοντος του Πανεπιστημίου Θεσσαλίας. Η επίβλεψη της εργασίας έγινε από την κα Λεβίζου Ευθυμία , Επίκουρη Καθηγήτρια της Φυσιολογίας Φυτών. Σ' αυτό το σημείο λοιπόν θα ήθελα να εκφράσω τις ευχαριστίες μου στην κα Λεβίζου για την πολύτιμη βοήθειά της , καθ' όλη τη διάρκεια της διεξαγωγής του πειράματος της εργασίας, όπως επίσης και για την ορθή και ουσιαστική καθοδήγησή της κατά την εκτέλεση των εργαστηριακών μετρήσεων και τη συγγραφή της εργασίας. Ακόμα θα ήθελα να ευχαριστήσω τα δύο μέλη της τριμελούς συμβουλευτικής επιτροπής, κ. Αντωνιάδη Βασίλειο, Επίκουρο Καθηγητή της Εφαρμοσμένης Εδαφολογίας και τον κ. Βέλλιο Ευάγγελο Επίκουρο Καθηγητή Φυτοπαθολογίας – Σύγχρονων Μεθόδων Διαγνωστικής , για την συμβολή τους στην ορθή περάτωση της εργασίας μου. Επίσης ευχαριστώ τον κ. Οιχαλιώτη Κωνσταντίνο, Αναπληρωτή καθηγητή στο Γεωπονικό Πανεπιστήμιο Αθηνών, Τμήμα Γεωργικής Μηχανικής και Αξιοποίησης Φυσικών Πόρων· και τον κ. Υψηλάντη Ιωάννη, Λέκτορα Εδαφολογίας – Μικροβιολογίας Εδάφους στη Γεωπονική σχολή του Αριστοτελείου Πανεπιστημίου Θεσσαλονίκης , για τις πολύτιμες συμβουλές τους που συνέβαλλαν στη βελτιστοποίηση της οργάνωσης και διεξαγωγής του πειράματος της παρούσας εργασίας. Τέλος ευχαριστώ για άλλη μία φορά τον κύριο Υψηλάντη Ιωάννη καθώς μου μετέδωσε τις γνώσεις του στον τομέα της παρατήρησης και καταμέτρησης των μυκόρριζων στο μικροσκόπιο.

Περιεχόμενα

Περίληψη.....	5
Εισαγωγή.....	7
1.1 Λίμνη Κάρλα.....	7
1.2 Κυανοβακτήρια και μικροκυστίνες.....	8
1.3 Επίδραση μικροκυστίνων στα φυτά.....	9
1.4 Μυκορριζικά συστήματα.....	11
1.5 Σκοπός της εργασίας.....	14
Υλικά και μέθοδοι.....	15
2.1 Οργάνωση του πειράματος.....	15
2.2 Αποστείρωση χώματος – σπορά – μεταφύτευση	16
2.3 Πότισμα – λίπανση	18
2.4 Συγκομιδή.....	18
2.5 Καταμέτρηση αποικισμού των μυκορριζών	19
2.6 Μέτρηση προλίνης.....	23
2.7 Μέτρηση ολικών φαινολικών.....	24
2.8 Στατιστική ανάλυση.....	25
Αποτελέσματα.....	26
3.1 Μορφολογικές μετρήσεις νωπού δείγματος.....	26
3.2 Μορφολογικές μετρήσεις ξηρού ιστού – βιομάζας.....	31
3.3 Βιοχημικές μετρήσεις.....	34
3.4 Μέτρηση αποικισμού του μυκορριζικού μύκητα.....	38
Συζήτηση.....	39
4.1 Μικροκυστίνες και μορφολογία των φυτών.....	39
4.2 Επίδραση μικροκυστινών στο μυκορριζικό σύστημα.....	40
4.3 Φαινολικά εναντίον αύξησης και ανάπτυξης.....	41
4.4 Συμπεράσματα.....	43
Βιβλιογραφία.....	44

Περίληψη

Η παρουσία κυανοβακτηρίων σε στάσιμα ή μικρής κινητικότητας εσωτερικά ύδατα (λίμνες, ταμιευτήρες νερού προς γεωργική χρήση κ.α.) σε συνδυασμό με πιθανές ευτροφικές συνθήκες σε αυτά και υψηλές θερμοκρασίες έχουν ως αποτέλεσμα την ανάπτυξη κυανοβακτηριακών ανθήσεων. Κατά τη διάρκεια αυτών απελευθερώνονται από τα κυανοβακτήρια, αναλόγως με το είδος τους, τοξικές ουσίες (κυανοτοξίνες) στο νερό. Η προαναφερθείσα κατάσταση λαμβάνει έντονα χώρα στον ανασυνταγμένο ταμιευτήρα της Λίμνης Κάρλας (Θεσσαλία), το νερό του οποίου προορίζεται για χρήση στην άρδευση των καλλιεργειών της γύρω περιοχής. Οι κύριες κυανοτοξίνες που απαντώνται στα ύδατα της Κάρλας είναι οι ηπατοτοξικές μικροκυστίνες. Εκτός από τις ηπατοτοξικές τους ιδιότητες μπορούν να αναστείλουν την ανάπτυξη κάποιων καλλιεργούμενων φυτών, ενώ συνήθως βιοσυσσωρεύονται στους βρώσιμους ιστούς. Παράλληλα ενδέχεται η ύπαρξη των μικροκυστινών στο αρδευτικό νερό να επηρεάζει συμβιωτικές σχέσεις των φυτών με μικροοργανισμούς, όπως τη μυκορριζική συμβίωση. Οι μυκορριζικές συμβιώσεις είναι ένα φαινόμενο που απαντάται στην πλειονότητα των φυτών και χαρακτηρίζεται από μύκητες που συμβιώνουν στις ρίζες των φυτών, βοηθώντας τα να προσλάβουν ευκολότερα τα ανόργανα στοιχεία. Στην παρούσα εργασία εκτιμήθηκε η επίδραση νερού άρδευσης πλούσιου σε μικροκυστίνες που προέρχονταν από τον ταμιευτήρα της Κάρλας στη μυκορριζική συμβίωση καρότου και στην ανάπτυξη του φυτού. Για τις ανάγκες του πειράματος δημιουργήθηκαν 4 μεταχειρίσεις φυτών καρότου: δύο που αρδεύονταν με νερό βρύσης και δύο που αρδεύονταν με νερό της λίμνης Κάρλας. Στην κάθε κατηγορία νερού η μία μεταχείριση εμβολιάστηκε με ενδομυκορριζικό μύκητα (AMF) ενώ η άλλη ήταν απαλλαγμένη μυκορριζών. Μετά τη συγκομιδή των καρότων πραγματοποιήθηκε καταγραφή μορφομετρικών χαρακτηριστικών των διάφορων φυτικών μερών, μετρήσεις βιομάζας, βιοχημικές μετρήσεις, καθώς και καταμέτρηση του ποσοστού αποικισμού από μύκητες των ριζών των πειραματόφυτων. Τα αποτελέσματα έδειξαν πως οι μικροκυστίνες επέδρασαν αρνητικά στην ανάπτυξη των καρότων και περιόρισαν την εξάπλωση του μυκορριζικού μύκητα, με τα φυτά της αντίστοιχης μεταχείρισης

να εμφανίζουν σημαντικά μειωμένη επιβίωση. Στη μεταχείριση των φυτών που λάμβαναν νερό βρύσης, οι μυκόρριζες επέδρασαν θετικά στην ανάπτυξη των φυτών, αλλά όχι σε σημαντικό βαθμό. Αξιοσημείωτο ήταν το αποτέλεσμα που αφορούσε τη συγκέντρωση των ολικών φαιολικών σε υπέργειο και υπόγειο τμήμα του φυτού, τα οποία μετρήθηκαν ως ένδειξη επαγωγής των αμυντικών μηχανισμών του φυτού έναντι της καταπόνησης. Η συγκέντρωσή των φαιολικών εμφάνισε μία στατιστικώς σημαντική αρνητική συσχέτιση με διάφορες αναπτυξιακές παραμέτρους, επιβεβαιώνοντας έτσι τη γνωστή τακτική των φυτών υπό καταπόνηση «άμυνα εις βάρος της ανάπτυξης».

Εισαγωγή

1.1 Λίμνη Κάρλα

Η λίμνη Κάρλα (αρχαία λίμνη Βοϊβιής) βρισκόταν στη Θεσσαλία και συγκεκριμένα στην ευρύτερη περιοχή ανάμεσα από τους νομούς της Λάρισας και της Μαγνησίας έως το 1962 που με απόφαση της Πολιτείας άρχισε η αποξήρανσή της (η αποξήρανση διήρκησε μέχρι το 1964). Με την αποξήρανση της λίμνης μοιράστηκαν χιλιάδες στρέμματα καλλιεργήσιμης γης στους αγρότες της περιοχής με σκοπό την ανάπτυξη της ελληνικής γεωργίας στον θεσσαλικό κάμπο και την τόνωση της ελληνικής οικονομίας. Όμως με την πάροδο των χρόνων προέκυψαν σοβαρά προβλήματα από τη διατάραξη του φυσικού οικοσυστήματος της περιοχής (τόσο περιβαλλοντικά όσο και οικονομικά) (Zalidis et al. 2004) και για αυτό το λόγο τέθηκε ως μείζον περιβαλλοντικό θέμα η ανασύσταση της λίμνης. Έτσι το 2010 υλοποιήθηκε η ανασύσταση μέρους της λίμνης Κάρλας με συνολική έκταση 38 km², ενώ το φυσικό μέγεθος της λίμνης κυμαίνονταν από 41 km² έως 180 km², ανάλογα τις ετήσιες κατακρημνίσεις (Νεβεσκιώτης 2010). Η ανασυσταθείσα Κάρλα θεωρείται ένα από τα μεγαλύτερα ευρωπαϊκά περιβαλλοντικά έργα. Σκοπός αυτού του προγράμματος ήταν η αποκατάσταση του φυσικού περιβάλλοντος, όπως και η αντικατάσταση του νερού άρδευσης από γεωτρήσεις με νερό του ταμιευτήρα για τις καλλιέργειες της περιοχής. Τελικό στόχο του έργου, αποτελεί η ενίσχυση της ύδρευσης της μείζονος περιοχής του Βόλου (Νεβεσκιώτης 2010). Ωστόσο, στον παρόντα χρόνο η λίμνη έχει σοβαρά προβλήματα ευτροφισμού καθώς μέρος του Πηνειού ποταμού που εκβάλλει σε αυτή έχει κακής ποιότητας νερό και επιπλέον υφίσταται αποθέσεις αγροτικών και αστικών λυμάτων (Papadimitriou et al. 2013). Έτσι είναι πολύ συχνές οι ανθίσεις των κυανοβακτηρίων στον ταμιευτήρα της Κάρλας (Οικονομου et al. 2012) με αποτέλεσμα το νερό να έχει εμπλουτιστεί με μικροκυστίνες και άλλες κυανοτοξίνες. Οι συγκεντρώσεις των μικροκυστινών διακυμαίνονται από 1.5 μg/L έως 33 μg/L (Papadimitriou et al. 2013).

1.2 Κυανοβακτήρια και μικροκυστίδες

Τα κυανοβακτήρια εκτιμάται πως πρωτοεμφανίστηκαν στη γη πριν 3,5 δισεκατομμύρια χρόνια (Whitton and Potts 2012). Αποτελούν αυτότροφους προκαριωτικούς οργανισμούς και μάλιστα είναι οι μοναδικοί προκαρυώτες που εκτελούν φωτοσύνθεση με πανομοιότυπο τρόπο με τα φυτά, καθώς διαθέτουν κι αυτά δύο φωτοσυστήματα (φωτοσύστημα I, φωτοσύστημα II) (Stal 1995). Τα φυσικά οικοσυστήματα των κυανοβακτηρίων αποτελούνται από ένα αρκετά ευρύ φάσμα χερσαίων και υδάτινων οικοσυστημάτων, καθώς εντοπίζονται σε διάφορα εδάφη, όπως και σε ωκεανούς, λίμνες, σε υφάλμυρα και υπεράλμυρα νερά (Stal 1995). Ωστόσο οι ανθήσεις των κυανοβακτηρίων είναι σύνηθες φαινόμενο κυρίως σε ευτροφικές λίμνες καθώς τα ύδατά τους είναι εμπλουτισμένα με θρεπτικά στοιχεία (Downing et al. 2001) που ευνοούν κατά πολύ την ανάπτυξη των κυανοβακτηρίων. Εκτός του φαινομένου του ευτροφισμού φαίνεται πως και οι κλιματικές αλλαγές, κυρίως η αύξηση της θερμοκρασίας σε όλο τον πλανήτη, προάγουν τον πολλαπλασιασμό των κυανοβακτηρίων (O'Neil et al. 2012).

Τα κυανοβακτήρια έχουν αποτελέσει αντικείμενο πολλών επιστημονικών μελετών διότι, μεταξύ άλλων, είναι υπεύθυνα για την παραγωγή πληθώρας τοξικών ουσιών. Αυτές οι τοξικές ουσίες χαρακτηρίζονται ως κυανοτοξίνες και απελευθερώνονται από τα κυανοβακτήρια στο εκάστοτε περιβάλλον τους. Στα υδάτινα οικοσυστήματα οι εναποθέσεις των κυανοτοξινών έχουν αρνητικές επιδράσεις σε πλαγκτονικούς οργανισμούς όπως και σε μακροφύκη ή μικροφύκη, ακόμα και σε ανώτερα υδρόβια φυτά ή σε άλλα κυανοβακτήρια. Επιπλέον, όταν το νερό αυτών των επιβαρυσμένων με κυανοβακτήρια υδάτινων πόρων χρησιμοποιείται για αρδεύσεις, τότε οι αρνητικές επιδράσεις των κυανοτοξινών παρουσιάζονται και στα καλλιεργούμενα φυτά (Levizou et al. 2017).

Οι τοξικές ουσίες των κυανοβακτηρίων (κυανοτοξίνες) κατατάσσονται σε τέσσερις κατηγορίες: τις νευροτοξίνες, τις ηπατοτοξίνες, τις κυτοτοξίνες και τις δερματοτοξίνες (Corbel et al. 2014). Η κύρια κατηγορία κυανοτοξινών που απαντάται συνήθως σε ύδατα με κυανοβακτηριακές ανθήσεις είναι οι ηπατοτοξίνες. Οι ηπατοτοξίνες συγκροτούνται από δύο υποομάδες τοξινών,

τις μικροκυστίνες και τις νοντουλαρίνες. Οι μικροκυστίνες (MCs) απαντώνται στο 75% των κυανοβακτηριακών ανθήσεων που έχουν καταγραφεί παγκοσμίως (Corbel et al. 2014). Είναι μικρά κυκλικά πεππίδια αποτελούμενα από 7 αμινοξέα: τρία κοινά D-αμινοξέα ή τα παράγωγά τους, δύο μεταβλητά L-αμινοξέα και δύο νέα D-αμινοξέα. Αυτά τα δύο D-αμινοξέα είναι τα 3S-αμινο-9S-μεθοξυ-2,6,8S-τριμεθυλ-10-φαινυλδεΐκα-4,6-διενοϊκό οξύ (Adda) και η μεθυλδεϋδροαλανίνη (Mdha) (Machado et al. 2017). Το αμινοξύ που ευθύνεται για την βιολογική δραστηριότητα των MCs είναι το Adda. Σχετικά με την ηπατοτοξικότητα, έχει βρεθεί πως οι μικροκυστίνες λειτουργούν αναστέλλοντας την πρωτεϊνική φωσφατάση 1 και 2A. Κάποιες μικροκυστίνες θεωρούνται πλέον καρκινογόνοι παράγοντες για τον άνθρωπο με όργανο-στόχο το ήπαρ (Machado et al. 2017). Σε αυτή την περίπτωση (καρκίνος του ήπατος) γίνεται λόγος για αποτελέσματα μιας χρόνιας τοξικότητας (έκθεση του ανθρώπου σε ελάχιστες συγκεντρώσεις μικροκυστικών για μεγάλο χρονικό διάστημα) (McElhiney and Lawton 2005). Παράλληλα, στο φυτικό κόσμο οι μικροκυστίνες είναι υπεύθυνες για μια σειρά αρνητικών αποτελεσμάτων στην αύξηση και ανάπτυξη καλλιεργούμενων φυτών αλλά και για τη βιοσυσσώρευσή τους στους φυτικούς ιστούς (Lee et al. 2017; Levizou et al. 2017). Έτσι οι εδώδιμες καλλιέργειες που αρδεύονται με νερό από ταμιευτήρες που φιλοξενούν κυανοβακτηριακές ανθήσεις, αποτελούν τη μολυσμένη βάση μιας τροφικής αλυσίδας που έχει ως κορυφαίο καταναλωτή τον άνθρωπο.

1.3 Επίδραση Μικροκυστινών στα φυτά

Η επίδραση των κυανοτοξινών στα χερσαία φυτά είναι ένα θέμα που έχει απασχολήσει μόλις την τελευταία εικοσαετία τους επιστήμονες. Εντατική έρευνα έχει γίνει σχετικά με την τοξικότητα των κυανοτοξινών στα θηλαστικά, ενώ η μελέτη για την φυτοτοξικότητα των συγκεκριμένων τοξινών ξεκίνησε πρώτα από υδρόβιους αυτότροφους οργανισμούς που είναι άμεσα εκτεθειμένοι στο τοξικό περιβάλλον. Έπειτα οι έρευνες επεκτάθηκαν στα χερσαία φυτά, καθώς πλέον είναι πολύ σύνηθες φαινόμενο οι καλλιέργειες να αρδεύονται με νερό που προέρχεται από ταμιευτήρες με κυανοβακτηριακές

ανθήσεις (Corbel et al. 2014). Με αυτό τον τρόπο έρχεται σε επαφή το φυτό με τις κυανοτοξίνες και ακολουθεί η βιοσυσσώρευση αυτών στα καλλιεργούμενα φυτά (Lee et al. 2017). Έτσι λοιπόν ξεκινάει η μόλυνση της ανθρώπινης τροφικής αλυσίδας, με δυσμενείς επιπτώσεις στην ανθρώπινη υγεία και οικονομία.

Οι επιδράσεις των κυανοτοξινών στους υδρόβιους αυτότροφους οργανισμούς αφορούν την αναστολή της φωτοσύνθεσης άλλων κυανοβακτηρίων (Corbel et al. 2014), της ανάπτυξης άλγεων όπως της *Chlorella pyrenoidosa* (Ikawa et al. 2001), αλλά και μικροφυκών και μακροφυκών. Σε μία μελέτη που διεξήχθη από τους Perron et al. το 2012, βρέθηκε πως οι μικροκυστίνες μειώνουν την φωτοσυνθετική ικανότητα των φυκών, παρεμβαίνοντας στο φωτοσύστημα II. Έτσι, έχει παρατηρηθεί πως σε εσωτερικά ύδατα όπου υπάρχουν κυανοβακτηριακές ανθήσεις μειώνεται σταδιακά η ποικιλότητα και η ποσότητα των μακροφυκών (Corbel et al. 2014). Παράλληλα, έχουν καταγραφεί αρνητικές επιδράσεις των μικροκυστινών σε ανώτερα υδρόβια φυτά. Η τοξική δράση αφορά την ανάπτυξη και τις φυσιολογικές διεργασίες των προαναφερθέντων οργανισμών, οι οποίες σχετίζονται κατά πάσα πιθανότητα με την αναστολή της πρωτεϊνικής φωσφατάσης (Corbel et al. 2014).

Όσον αναφορά την αρνητική επίδραση των κυανοτοξινών στα χερσαία φυτά και συγκεκριμένα των μικροκυστινών MCs, έχει αποδειχθεί ότι οι μικροκυστίνες δρουν μέσω δύο οδών: α) αναστέλλοντας την πρωτεϊνική φωσφατάση και β) επάγοντας την παραγωγή ενεργών ριζών οξυγόνου (ROS – reactive oxygen species). Για αυτό τον λόγο οι μικροκυστίνες μπορούν να επηρεάζουν πληθώρα μοριακών και φυσιολογικών διεργασιών στα χερσαία – καλλιεργούμενα φυτά όπως ανάπτυξη, φωτοσυνθετική ικανότητα κ.α. (Corbel et al. 2014; Pflugmacher 2002). Πιο συγκεκριμένα οι ROS δύνανται να υπεροξειδώνουν τα λιπίδια με αποτέλεσμα να δημιουργούν προβλήματα οξειδωσης των κυττάρων (Pflugmacher et al. 2007) των φυτών που αρδεύονται με νερό πλούσιο σε MCs. Ουσιαστικά οι μικροκυστίνες των κυανοβακτηρίων, όπως και οι υπόλοιπες τοξίνες τους, δημιουργούν οξειδωτικό στρες στα φυτά (Cordeiro-Araújo et al. 2015; Pflugmacher et al. 2007). Σε αυτή την κατάσταση του στρες τα φυτά προσπαθούν να ανταπεξέλθουν παράγοντας αντιοξειδωτικά ένζυμα όπως, η υπεροξειδική

δισμουτάση (SOD), η γλουταθειόνη S – τρανσφεράση (GST), η καταλάση (CAT) και η υπεροξειδάση (POD), τα οποία συμβάλλουν στην αντιμετώπιση των αρνητικών αποτελεσμάτων των ROS (Cordeiro-Araújo et al. 2015). Πολλά φυτά όμως δεν επιτυγχάνουν να «ξεφύγουν» από την κατάσταση του οξειδωτικού στρες, με αποτέλεσμα να είναι εμφανής η αρνητική επίδραση των μικροκυστινών στην ανάπτυξή τους. Άλλα φυτά πάλι είναι δυνατόν να διαθέτουν κάποια ανθεκτικότητα στις μικροκυστίνες και να μην παρουσιάζουν τα συμπτώματα του οξειδωτικού στρες. Παρ' όλα αυτά συσσωρεύουν στους ιστούς τους τις μικροκυστίνες. Επομένως η βιοσυσσώρευση των μικροκυστινών στα φυτά δεν σχετίζεται απαραίτητα με εμφάνιση οξειδωτικού στρες ή φυτοτοξικότητας, όπως προτάθηκε από τους Levizou et al. 2017. Στο συγκεκριμένο συμπέρασμα κατέληξαν οι Levizou et al. 2017 με πείραμα που πραγματοποίησαν με μαρούλι το οποίο αρδεύονταν με νερό πλούσιο σε μικροκυστίνες. Διαμόρφωσαν 4 ομάδες φυτών τις οποίες άρχισαν να ποτίζουν με το νερό που περιείχε μικροκυστίνες σε διαφορετικά αναπτυξιακά στάδια. Καμία ομάδα δεν είχε σημαντικές αναπτυξιακές ή βιοχημικές διαφορές από τους μάρτυρες που λάμβαναν καθαρό νερό. Ωστόσο όλες οι ομάδες είχαν συσσωρεύσει σημαντικές συγκεντρώσεις μικροκυστινών στους εδώδιμους ιστούς τους, ανάλογα μάλιστα με το αναπτυξιακό στάδιο των φυτών.

1.4 Μυκορριζικά συστήματα

Οι χερσαίοι μύκητες, εκτιμάται πως εμφανίστηκαν στη γη, την ίδια περίπου χρονική περίοδο με τους φυτικούς οργανισμούς (κοινά φυτά) της γης. Οι σχέσεις που αναπτύχθηκαν μεταξύ φυτών και μυκήτων κατηγοριοποιούνται ουσιαστικά σε δύο μεγάλες ομάδες : η πρώτη είναι η πλέον γνωστή, ζημιογόνα, παρασιτική σχέση και η δεύτερη είναι μια συμβιωτική σχέση φυτών – μυκήτων κατά την οποία και τα δύο μέλη ωφελούνται, άρα μία σχέση αμοιβαιότητας (Dighton 2009). Στην κατηγορία της σχέσης αμοιβαιότητας φυτών – μυκήτων ανήκουν τα μυκορριζικά συστήματα. Σε αυτά οι μύκητες συμβιώνουν με τις ρίζες των φυτών, τα υποβοηθούν στις ανάγκες τους για απορρόφηση ανόργανων θρεπτικών συστατικών από το έδαφος, ενώ ταυτοχρόνως λαμβάνουν φωτοσυνθετικό προϊόν από το φυτό για την

ανάπτυξή τους. Οι μυκόρριζες αποτελούνται από δύο κύριες ομάδες ανάλογα με τον τρόπο σύνδεσής τους με τα φυτά, τις Ενδομυκόρριζες και τις Εκτομυκόρριζες. Οι ενδομυκόρριζες έχουν τη δυνατότητα να εισχωρούν μέσω της επιδερμίδας στο εσωτερικό των ριζών όπου και εγκαθίστανται. Οι υφές των εκτομυκόρριζων δεν διεισδύουν στα κύτταρα της ρίζας, αλλά γεμίζουν τους μεσοκυττάριους χώρους σχηματίζοντας το δίκτυο Hartig και επίσης τυλίγονται γύρω από τις ρίζες σχηματίζοντας ένα παχύ στρώμα υφών που ονομάζεται μανδύας (Taiz and Zeiger 2010). Οι Ενδομυκόρριζες αποτελούνται από δύο μείζονες υποκατηγορίες, τις Δενδρώδεις – AMF (Arbuscular mycorrhizal fungi) και τις ερικοειδείς (ericoid mycorrhizae) (Dighton 2009). Η κατηγορία των AMF είναι η πιο διαδεδομένη, καθώς έχει βρεθεί στο 80% των χερσαίων φυτών (Rillig 2004).

Όπως αναφέρθηκε, η σχέση μύκητα – φυτού σε μια συμβίωση AMF είναι αμοιβαία ωφέλιμη: από τη μια ο μύκητας ωφελείται από το φυτό, καθώς ως ετερότροφος οργανισμός λαμβάνει τους απαραίτητους για αυτόν υδατάνθρακες από τα φωτοσυνθετικά προϊόντα του φυτού, ενώ από την άλλη το φυτό ωφελείται από την ικανότητα του μύκητα να συλλέγει θρεπτικά συστατικά με τις υφές του που εκτείνονται σε διάφορες αποστάσεις στο έδαφος και να τα αποδίδει στο φυτό. Έτσι, οι μυκόρριζες έχουν ως κύριο αποτέλεσμα την προώθηση της ανάπτυξης των φυτών. Πέρα όμως από την προσφορά στην ανάπτυξη, έχει διαπιστωθεί πως οι μυκόρριζες αυξάνουν την ανθεκτικότητα των ριζών των φυτών σε διάφορα παθογόνα βακτήρια, όπως και βαρέα μέταλλα (Dighton 2009). Επίσης οι μυκόρριζες φαίνεται ότι μπορούν να προσλαμβάνουν και ιχνοστοιχεία όπως ο ψευδάργυρος και ο χαλκός για στα φυτά (Taiz and Zeiger 2010).

Ακόμα μία διαπίστωση που έχει γίνει, είναι ότι οι μυκόρριζες βοηθούν το φυτό να ανταπεξέλθει καλύτερα σε ενδεχόμενη καταπόνηση ξηρασίας. Αυτό συμβαίνει καθώς οι μύκητες έχουν τη δυνατότητα να εισάγουν τις υφές τους σε μικρότερα κενά του πορώδους του εδάφους σε σύγκριση με τα τριχίδια των ριζών και έτσι ενισχύουν την πρόσληψη νερού στο φυτό. Με τον ίδιο μηχανισμό γίνεται και η απορρόφηση των ανόργανων θρεπτικών συστατικών που προαναφέρθηκε, με το φώσφορο να αποτελεί το κύριο στοιχείο που προσλαμβάνουν τα φυτά των μυκορριζικών συστημάτων (Li et al. 2014). Ακόμα ένας λόγος ο οποίος διευκολύνει τις μυκόρριζες να προσλαμβάνουν το

φώσφορο, είναι το γεγονός πως οι υφές των μυκόρριζων επεκτείνονται και πέρα από τη ζώνη εξάντλησης του φωσφόρου που υπάρχει γύρω από τις ρίζες του φυτού (Taiz and Zeiger 2010). Οι Davies et al. 1992 έρχονται να συσχετίσουν τους δύο παράγοντες ξηρασία – δέσμευση φωσφόρου, λέγοντας πως η αύξηση των επιπέδων φωσφόρου στα μυκορριζικά φυτά είναι αναγκαία για την αύξηση και ανάπτυξη των φυτών, η οποία είναι έμμεσα συσχετιζόμενη με την καλύτερη αντοχή των φυτών στην ξηρασία.

Έχει παρατηρηθεί ότι στην περίπτωση των καλά λιπασμένων εδαφών, οι συμβιωτικές σχέσεις των μυκόρριζων μετατρέπονται σε παρασιτικές. Ο λόγος αυτής της μετατροπής έγκειται στην αφθονία του εδάφους σε ανόργανα στοιχεία, τα οποία βρίσκονται σε μορφές άμεσα αφομοιώσιμες από τις ρίζες του φυτού. Έτσι ο μυκορριζικός μύκητας δεν προσφέρει κάποιο αντάλλαγμα στο φυτό για τους υδατάνθρακες που λαμβάνει από αυτό. Όταν μάλιστα η λίπανση – θρέψη του εδάφους είναι αρκετά υψηλή, το φυτό ενδέχεται να διαχειριστεί τους μυκορριζικούς μύκητες σαν κοινά παθογόνα (Taiz and Zeiger 2010).

1.5 Σκοπός της Εργασίας

Όπως αναφέρθηκε παραπάνω, έχουν γίνει πολλές μελέτες για την επίδραση των μικροκυστινών στα ζώα και τον άνθρωπο. Τις τελευταίες δεκαετίες μάλιστα αυτές οι μελέτες επεκτάθηκαν και στο φυτικό κόσμο, μιας που αποτελεί τον ενδιάμεσο κρίκο που συνδέει τις τοξίνες των κυανοβακτηρίων, με τα ζώα και τον άνθρωπο, μέσω της βιοσυσσώρευσής τους στους βρώσιμους ιστούς. Επίσης, όσον αναφορά τα καλλιεργούμενα φυτά οι επιπτώσεις των κυανοτοξινών, πέρα από τη δημόσια υγεία επηρεάζουν έμμεσα και την οικονομία. Η κύρια οδός «επαφής» των φυτών και ιδίως των καλλιεργούμενων, με τις κυανοτοξίνες είναι οι ανάγκες τους για άρδευση, οι οποίες συχνά εκπληρώνονται από ταμιευτήρες νερού που φιλοξενούν ανθήσεις κυανοβακτηρίων. Έτσι πραγματοποιήθηκαν αρκετές μελέτες τα τελευταία χρόνια για όλο αυτό το σύστημα : κυανοτοξίνες στο αρδευτικό νερό – επιπτώσεις στα καλλιεργούμενα φυτά. Ένα κομμάτι που δεν έχει ερευνηθεί ακόμα, είναι το πώς οι κυανοτοξίνες στο αρδευτικό νερό, επηρεάζουν τα μυκορριζικά συστήματα. Για αυτόν ακριβώς τον λόγο πραγματοποιήθηκε η συγκεκριμένη εργασία, με τους εξής στόχους: α) να εκτιμηθεί η επίδραση του πλούσιου σε μικροκυστίνες αρδευτικού νερού στο φυτό και στην μυκορριζική συμβίωση και β) να εκτιμηθεί η πιθανή προστασία που μπορεί η μυκόρριζα να προσφέρει στο φυτό έναντι της καταπόνησης από την παρουσία τοξινών. Για την πραγματοποίηση του πειράματος χρησιμοποιήθηκε ένα μυκορριζικό φυτό, το καρότο *Daucus carota subsp. sativus* και νερό άρδευσης με αυξημένη συγκέντρωση μικροκυστινών, προερχόμενο από τον ταμιευτήρα της Κάρλας.

Υλικά και Μέθοδοι

Daucus carota subsp. sativus

Το καρότο αποτελεί μέλος της οικογένειας των Σκιαδανθών (Ariaceae). Στο γένος *Daucus* ανήκουν περίπου 20 είδη με την πλειονότητα αυτών να αυτοφύονται ως άγρια στη Μεσόγειο όπως και στη δυτική Ασία. Το καλλιεργούμενο καρότο, *Daucus carota subsp. sativus*, είναι ουσιαστικά ένα υποείδος από τα πολλά του είδους *Daucus carota*. Πλέον το καρότο αποτελεί ένα λαχανικό που έχει εξαπλωθεί παγκοσμίως και καλλιεργείται για την σαρκώδη κυρίως κονδυλόριζα του, που είναι βρώσιμη και αποτελεί αξιόλογη πηγή βιταμίνης Α, όπως επίσης και πολλών ιχνοστοιχείων, αντιοξειδωτικών ουσιών, και φυτικών ινών (Ιμπραχίμ-Αβραάμ Χα και Σπύρος Πετρόπουλος 2014). Στο συγκεκριμένο πείραμα, η ποικιλία καρότου που χρησιμοποιήθηκε ήταν η Nantes.

2.1 Οργάνωση του Πειράματος

Το πείραμα πραγματοποιήθηκε στο θερμοκήπιο του Εργαστηρίου Γενετικής Βελτίωσης Φυτών, του Τμήματος Γεωπονίας Φυτικής Παραγωγής και Αγροτικού περιβάλλοντος του Πανεπιστημίου Θεσσαλίας. Η έναρξη του πειράματος έγινε στις 6 Οκτωβρίου του 2016 και αυτό διήρκησε μέχρι τα τέλη Μαΐου του 2017. Επειδή το πείραμα αφορούσε ένα μυκορριζικό σύστημα (μυκόρριζες – καρότο) ήταν αναγκαία η αποστείρωση του χώματος που χρησιμοποιήθηκε, για τη σπορά και τη μεταφύτευση των σπόρων και των φυτών καρότου αντίστοιχα (λεπτομέρειες στο επόμενο υποκεφάλαιο). Με αυτόν τον τρόπο υπήρχε διαθέσιμο χώμα απαλλαγμένο πλήρως από μυκορριζικούς οργανισμούς το οποίο χωρίστηκε σε δύο ίσα μέρη. Το πρώτο μέρος του αποστειρωμένου χώματος χρησιμοποιήθηκε αυτούσιο για τις ομάδες των άσηπτων συνθηκών. Το δεύτερο μέρος εμβολιάστηκε με συγκεκριμένο μόλυσμα μύκητα (*Rhizophagus intraradices*) και χρησιμοποιήθηκε για τις ομάδες των μυκόρριζων. Οι μεταχειρίσεις (treatments) που δημιουργήθηκαν ήταν 4, ως εξής :

- i. Απαλλαγμένη από μυκόρριζες που ποτίζονταν με νερό βρύσης (B-AMF)
- ii. Απαλλαγμένη από μυκόρριζες που ποτίζονταν με νερό από τη λίμνη Κάρλα (K-AMF)
- iii. Μυκορριζικά φυτά που ποτίζονταν με νερό βρύσης (B+AMF)
- iv. Μυκορριζικά φυτά που ποτίζονταν με νερό από τη λίμνη Κάρλα (K-AMF)

- Οι δύο μεταχειρίσεις που επιλέχθηκαν να αρδεύονται με νερό βρύσης (B-, B+) αποτελούσαν τις μεταχειρίσεις-μάρτυρες.
- Το νερό από τη λίμνη Κάρλα με το οποίο αρδεύονται οι άλλες δύο μεταχειρίσεις διέθετε μικροκυστίνες σε συγκέντρωση 3,8μg/L.

Στο θερμοκήπιο τα φυτά του συγκεκριμένου πειράματος τοποθετήθηκαν σε χώρο απομακρυσμένο από τα υπόλοιπα τρέχοντα πειράματα, για την διασφάλιση της διατήρησης των άσηπτων συνθηκών. Κάθε 15 με 20 ημέρες πραγματοποιούνταν εναλλαγή θέσεων στα φυτοδοχεία των μεταχειρίσεων, με σκοπό την αποφυγή ευνοϊκής ή μη επίδρασης του μικροκλίματος του θερμοκηπίου σε συγκεκριμένα μόνο φυτά καρότου.

2.2 Αποστείρωση χώματος – σπορά – μεταφύτευση

Το υπόστρωμα που χρησιμοποιήθηκε αρχικά για τη σπορά των σπόρων του καρότου στις πλάκες βλαστήσεως και έπειτα στις γλάστρες που έγινε η μεταφύτευση, ήταν ένα μείγμα χώματος – άμμου 1/1. Το χώμα συλλέχθηκε από το αγρόκτημα του Τμήματος Γεωπονίας Φυτικής Παραγωγής και Αγροτικού περιβάλλοντος του Πανεπιστημίου Θεσσαλίας που βρίσκεται στο Βελεστίνο Μαγνησίας. Η άμμος που χρησιμοποιήθηκε ήταν καθαρή πυριτική άμμος <0,25mm (SIBELCO BENELUX) και παραλήφθηκε συσκευασμένη. Έπειτα εφόσον κοσκινίστηκε το χώμα που χρειάζονταν για τη σπορά ξεκίνησε η διαδικασία αποστείρωσής του. Για την διασφάλιση της αποτελεσματικότητας της αποστείρωσης, το χώμα ήταν αναγκαίο να αποστειρωθεί δύο φορές με

ένα διάστημα τριών ημερών, ανάμεσα στην πρώτη και τη δεύτερη αποστείρωση. Η άμμος αποστειρώθηκε μία φορά. Όλες οι αποστειρώσεις χώματος και άμμου υλοποιήθηκαν με τη χρήση δύο κλιβάνων (autoclaves) του εργαστηρίου Γενετικής Βελτίωσης Φυτών. Πιο συγκεκριμένα το προς αποστείρωση υλικό τοποθετούνταν σε μικρούς υφασμάτινους σάκους και ψεκάζονταν ελαφρώς με νερό πριν μπουν στον κλίβανο. Οι συνθήκες αποστείρωσης στον κλίβανο ήταν 121 °C και πίεση 1 bar περίπου, για 30 min υπό αυτές τις συνθήκες ενώ ο συνολικός χρόνος από το σφράγισμα μέχρι το άνοιγμα του μηχανήματος ήταν περίπου 75 min. Η μεταφορά και αποθήκευση των αποστειρωμένων υλικών γινόταν με προσοχή για την όσο το δυνατόν λιγότερη επαφή τους με χώματα και ακάθαρτες επιφάνειες.

Όταν ολοκληρώθηκαν οι αποστειρώσεις χώματος και άμμου ακολούθησε η ανάμειξή τους. Στη συνέχεια έγινε η σπορά (3 – 5 σπόροι σε κάθε θήκη) των 2 μη μυκορριζικών ομάδων υπό ασηπτικές συνθήκες σε καινούργιες πλάκες βλαστήσεως και αφού σκεπάστηκαν με καθαρό νάιλον μεταφέρθηκαν στο θερμοκήπιο. Εκεί ποτίστηκαν με νερό βρύσης και νερό από τη λίμνη Κάρλα αντίστοιχα. Έπειτα έγινε η σπορά των ομάδων των μυκόρριζων με τη διαφορά ότι οι πλάκες βλαστήσεως πληρώθηκαν αρχικά μέχρι τη μέση με το μείγμα χώμα – άμμου, προστέθηκε μόλυσμα του μύκητα (*Rhizophagus intraradices*) σε κάθε θήκη και ξανά προσθήκη μείγματος χώμα – άμμου μέχρι το επιθυμητό ύψος. Η μεταφορά τους στο θερμοκήπιο, όπως και το πότισμά τους έγιναν με τον ίδιο τρόπο που προαναφέρθηκε για τις άσηπτες μεταχειρίσεις. Οι αναμειξεις του μείγματος χώμα – άμμου έγιναν προσεκτικά με τη χρήση γαντιών και καινούργιας σέσουλας για όσο το δυνατόν καλύτερη διατήρηση των άσηπτων συνθηκών. Η ημέρα της σποράς ήταν η 13^η του Οκτωβρίου του 2016.

Σε περίπου 25 ημέρες από τη σπορά και αφού προηγήθηκε αραίωμα των φυτών όπου κρατήθηκε το πιο εύρωστο φυτό καρότου στην κάθε θήκη έγινε η μεταφύτευση των φυτών καρότου στα φυτοδοχεία (2L). Η μεταφύτευση πραγματοποιήθηκε σε δύο μέρες 7 και 8 Νοεμβρίου του 2016 στο θερμοκήπιο. Οι αναμειξεις χώματος – άμμου (1/1) υλοποιήθηκαν με προσοχή στους πάγκους του θερμοκηπίου, αφού πρώτα είχαν πλυθεί και έπειτα στρώθηκε επάνω τους καινούργιο – καθαρό νάιλον. Τα φυτοδοχεία που χρησιμοποιήθηκαν ήταν καινούργια ενώ όλες οι διαδικασίες της μεταφύτευσης

συνοδεύονταν από τη χρήση γαντιών και καθαρής σέσουλας (ανάμειξη χώματος – άμμου και πλήρωση φυτοδοχείων). Το απόγευμα της πρώτης μέρας (7 Νοεμβρίου) μεταφυτεύθηκαν τα φυτά των μεταχειρίσεων των άσηπτων συνθηκών, ενώ το επόμενο πρωί μεταφυτεύθηκαν τα φυτά των μυκορριζικών μεταχειρίσεων. Στις ομάδες των μυκορριζών έγινε επιπλέον εμβολιασμός του υποστρώματος με το μόλυσμα του μύκητα *Rhizophagus intraradices*, με τη μέθοδο της πλήρωσης των δοχείων μέχρι τα 2/3 τους με το μείγμα χώμα – άμμου, στη συνέχεια προσθήκη του μολύσματος και τέλος συμπλήρωση με το μείγμα χώμα – άμμου μέχρι το επιθυμητό ύψος. Έτσι δημιουργήθηκαν 4 μεταχειρίσεις με 12 φυτά (ένα ανά γλάστρα) η κάθε μια. Τέλος, ποτίστηκαν όλα τα φυτά με 200 ml νερού βρύσης ή νερού της λίμνης Κάρλας, αναλόγως την ομάδα τους.

2.3 Πότισμα – Λίπανση

Η περιοδικότητα των ποτισμάτων ήταν από μία έως τρεις φορές την εβδομάδα καθώς το πείραμα διήρκεσε από το φθινόπωρο του 2016 μέχρι την άνοιξη του 2017, οπότε ανάλογα τις καιρικές συνθήκες της κάθε εποχής ήταν διαφορετικές οι απαιτήσεις των φυτών σε νερό. Από το Δεκέμβριο του 2016 μέχρι και το Μάρτιο του 2017 που συγκομίσθηκαν τα φυτά, κάθε δεύτερο πότισμα περιελάμβανε λίπανση. Το λίπασμα (BEST, Φυτοθρεπτική) που χρησιμοποιήθηκε ήταν υδατοδιαλυτό, με αναλογία στοιχείων 14 – 6 – 28 + 5(Mg) και διαλυόταν σε νερό βρύσης ή Κάρλας, αναλόγως της ομάδας φυτών. Η συγκέντρωση του λιπάσματος στο νερό ποτίσματος ήταν 1g λιπάσματος ανά 1L νερό. Το συγκεκριμένο λίπασμα επιλέχθηκε κυρίως για τη χαμηλή περιεκτικότητά του σε φώσφορο, καθώς υψηλή προσθήκη φωσφόρου στις μεταχειρίσεις των μυκορριζών θα αλλοίωνε την φυσιολογική λειτουργία του μυκορριζικού συστήματος.

2.4 Συγκομιδή

Η συγκομιδή των φυτών καρότου διεξήχθη σε δύο ημέρες, την 13^η και τη 14^η του Μαρτίου του 2017. Εκτός της μεταχείρισης B- που ποτίζονταν με νερό

βρύσης και στερούνταν μυκόρριζων, στις τρεις υπόλοιπες μεταχειρίσεις είχαμε απώλειες φυτών κατά τη διάρκεια διεξαγωγής του πειράματος. Συγκεκριμένα η μεταχείριση K- που ποτίζονταν με νερό της λίμνης Κάρλας και δεν περιελάμβανε μυκόρριζες, μέχρι τη συγκομιδή επέζησαν 8 από τα 12 φυτά. Η μεταχείριση B+ που λάμβανε νερό βρύσης και ήταν εμπλουτισμένη με μυκόρριζες, είχε μικρές απώλειες καθώς στερήθηκε μόνο 1 φυτό (11 στα 12 φυτά συγκομίσθηκαν). Τέλος η μεταχείριση K+ που δέχονταν νερό της λίμνης Κάρλας και περιείχε μυκόρριζες παρουσίασε τις μεγαλύτερες απώλειες, καθώς είχαν επιβιώσει μέχρι τη συγκομιδή μόνο 3 από τα 12 φυτά της.

Κατά τη συγκομιδή 5 φυτά που επιλέχθηκαν κατόπιν τυχαιοποίησης σε κάθε μεταχείριση από τις B-, K-, και B+, χρησιμοποιήθηκαν για τις μετρήσεις βιομάζας (νωπό και ξηρό βάρος). Τα υπόλοιπα φυτά των μεταχειρίσεων αυτών αφού μετρήθηκε το νωπό βάρος του υπέργειου τμήματος τοποθετήθηκαν στους -20°C για τις βιοχημικές μετρήσεις. Στην μεταχείριση K+, επειδή επέζησαν μόνο τρία φυτά, χωρίστηκαν τα υπέργεια τμήματα όλων στη μέση και ένα κομμάτι τους επιλέχθηκε για μετρήσεις βιομάζας ενώ το δεύτερο αποθηκεύτηκε στους -20°C.

Στη συνέχεια πραγματοποιήθηκε εξαγωγή της κονδυλόρριζας των καρότων και μέτρηση του νωπού βάρους της με ζυγαριά ακριβείας. Ακολούθησαν οι μετρήσεις των διαστάσεων (μήκους και πλάτους στο παχύτερο σημείο) του καρότου με ηλεκτρονικό παχύμετρο. Τόσο το υπέργειο όσο και το υπόγειο τμήμα των συλλεχθέντων φυτών που προορίζονταν για μέτρηση βιομάζας τοποθετήθηκαν στο φούρνο στους 80°C για 3 ημέρες. Το υπόγειο τμήμα των φυτών που προορίζονταν για βιοχημικές μετρήσεις και καταγραφή του αποικισμού από AMF τοποθετήθηκαν στους -20°C

2.5 Καταμέτρηση αποικισμού των μυκόρριζων

Η καταμέτρηση του αποικισμού των μυκόρριζων στα πλευρικά ριζίδια των φυτών καρότου, προϋπέθετε πρώτα μια επεξεργασία καθαρισμού των ριζιδίων και έπειτα βαφή αυτών. Σκοπός αυτού του καθαρισμού ήταν η απομάκρυνση του κυτταροπλασματικού περιεχομένου των κυττάρων (<https://invam.wvu.edu>) ώστε με αυτόν τον τρόπο να είναι δυνατή η

παρατήρηση του εσωτερικού των ριζιδίων. Η βαφή ήταν απαραίτητη για τη χρώση των υφών του μύκητα *Rhizophagus intraradices*, ώστε να καταστούν ορατές στο μικροσκόπιο.

Η επεξεργασία υλοποιήθηκε με τη συλλογή νεαρών κυρίως ριζών οι οποίες πλύθηκαν και βυθίστηκαν σε διάλυμα KOH 10 % w/v (μέσα σε δοκιμαστικούς σωλήνες). Στη συνέχεια οι δοκιμαστικοί σωλήνες τοποθετήθηκαν σε υδατόλουτρο στους 80°C για 40 λεπτά. Κατόπιν, το διάλυμα KOH απομακρύνθηκε από τους σωλήνες και οι ρίζες ξεπλύθηκαν καλά με νερό βρύσης 3 – 4 φορές. Τέλος, προστέθηκε νερό στους δοκιμαστικούς σωλήνες μαζί με 2 – 3 σταγόνες HCl και παρέμειναν εκεί οι ρίζες μέχρι το επόμενο πρωί που έγινε η χρώση τους ως εξής :

- Στραγγίστηκε το νερό από τους δοκιμαστικούς σωλήνες. Δεν ξεπλύθηκαν οι ρίζες.
- Προστέθηκε η χρωστική trypan blue 0,05% στους σωλήνες, σε μορφή διαλύματος 1:1:1 γλυκερόλη, λακτικό οξύ και νερό.
- Οι δοκιμαστικοί σωλήνες μπήκαν σε υδατόλουτρο στους 80°C για δεκαπέντε λεπτά.

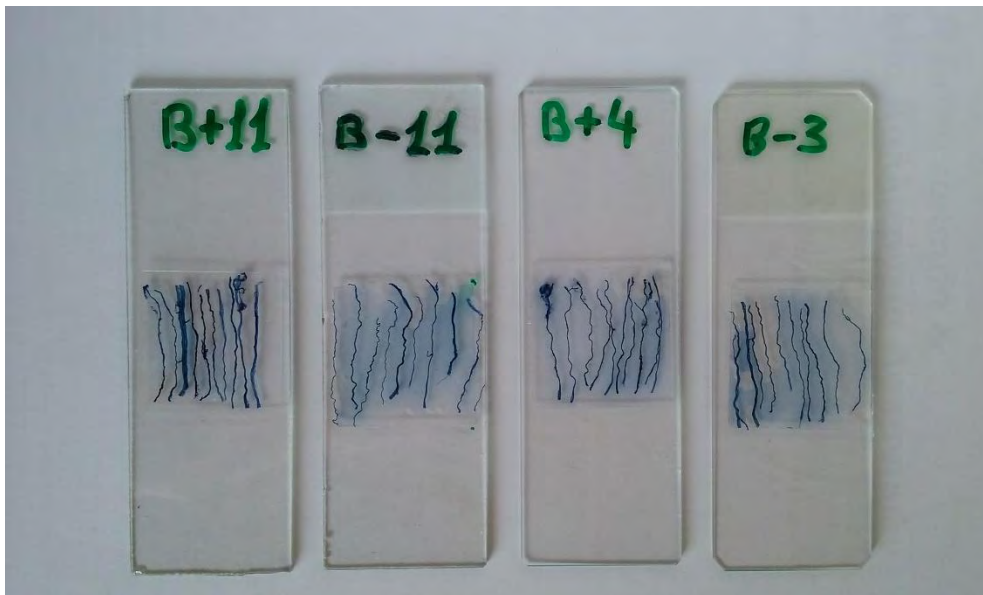
Η χρώση των ριζών θα μπορούσε να ολοκληρωθεί επίσης, χωρίς τη χρήση του υδατόλουτρου, αν παρέμεναν στη χρωστική για ένα βράδυ. Αφού τελείωσε η χρώση οι ρίζες παρέμειναν στη χρωστική (καθώς έτσι θα διατηρούνταν για μεγάλο χρονικό διάστημα ακόμα και εκτός ψυγείου) μέχρι που έγινε η καταμέτρηση του αποικισμού. Όλη η διαδικασία του καθαρισμού και της χρώσης των ριζών διεξήχθη σύμφωνα με τους Karpouzas et al. 2014.

Για την παρατήρηση των ριζιδίων στο μικροσκόπιο και την καταμέτρηση του ποσοστού αποικισμού παρασκευάστηκαν μόνιμα δείγματα μικροσκοπίου. Για την δημιουργία των μόνιμων δειγμάτων μικροσκοπίου, ως μέσο συγκράτησης των ριζών πάνω στις αντικειμενοφόρους, δεν χρησιμοποιήθηκε νερό, αλλά πολυβινυλο-λακτο-γλυκερόλη (PVLG). Το PVLG αποτελούνταν από 100 ml απεσταγμένο νερό, 100 ml γαλακτικό οξύ, 10 ml γλυκερόλη και 16 g πολυβινυλική αλκοόλη (PVA) (<https://invam.wvu.edu>).

Η παρασκευή των σλάιντς έγινε με τον εξής τρόπο :

- Παραλήφθηκαν τα ριζίδια του εκάστοτε δοκιμαστικού σωλήνα με λαβίδα για να παραμείνει η χρωστική.

- Τοποθετήθηκαν σε ένα τριβλίο petri και προστέθηκε απεσταγμένο νερό.
- Σε μία αντικειμενοφόρο απλώθηκε το μείγμα PVLG σε τέτοιες διαστάσεις όσο μιας καλυπτρίδας.
- Διαλέχθηκαν ανοιχτόχρωμα ριζίδια και κόπηκαν σε τέτοιο μήκος όσο το μήκος μιας καλυπτρίδας.
- Τοποθετήθηκαν τα κομμένα ριζίδια πάνω στο PVLG της αντικειμενοφόρου, σε παράλληλη διάταξη και σκεπάστηκαν με την καλυπτρίδα.
- Σε κάθε αντικειμενοφόρο τοποθετούνταν 10 ριζίδια.



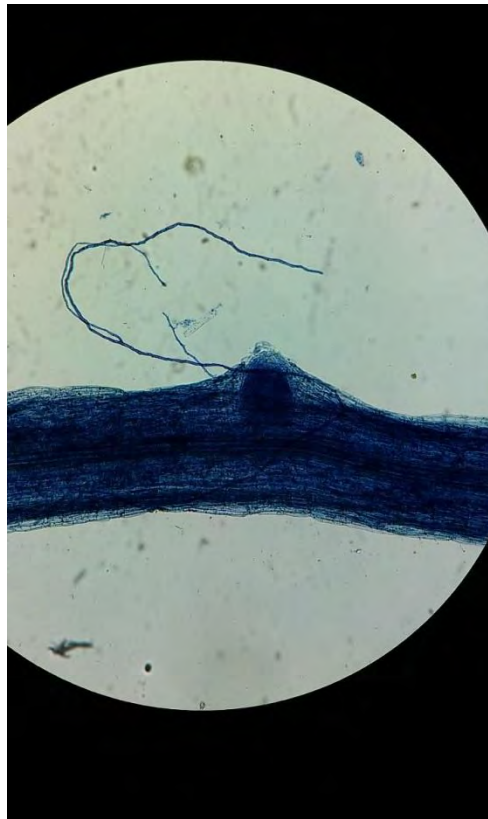
Εικόνα 1: Μόνιμα δείγματα ριζών για καταμέτρηση του ποσοστού αποικισμού του μύκητα στο μικροσκόπιο.

Η παρατήρηση των ριζιδίων στο μικροσκόπιο έγινε έπειτα από 2 – 3 ημέρες, καθώς αυτή η παραμονή τους στο PVLG ήταν απαραίτητη για μια πιο ξεκάθαρη εικόνα.

Η καταμέτρηση του αποικισμού στο μικροσκόπιο επιτεύχθηκε με τον παρακάτω τρόπο :

- Θεωρήθηκε ως γραμμή αναφοράς η νοητή διάμετρος του φακού που είχε τα άκρα της στις ώρες 12 και 6.

- Γίνονταν « σάρωση » των αντικειμενοφόρων από πάνω μέχρι κάτω και έπειτα μετακινούνταν η τράπεζα του μικροσκοπίου ελάχιστα δεξιά ή αριστερά και η παρατήρηση συνέχιζε από κάτω προς τα πάνω αυτή τη φορά. Ουσιαστικά η σάρωση της αντικειμενοφόρου ακολουθούσε ένα σχήμα μαιάνδρου.
- Ο έλεγχος της κάθε αντικειμενοφόρου ολοκληρωνόταν όταν η γραμμή αναφοράς είχε διασταυρωθεί 100 φορές με τις παράλληλα διατεταγμένες ρίζες. Αυτές οι 100 διασταυρώσεις ήταν σε 100 διαφορετικά σημεία, εξού και η κίνηση της τράπεζας στο σχήμα μαιάνδρου.
- Η κάθε διασταύρωση της γραμμής αναφοράς με τις ρίζες σημειώνονταν σε έναν μετρητή, ενώ σε έναν άλλο μετρητή σημειώνονταν σε πόσες από αυτές τις διασταυρώσεις υπήρχε υφή του μυκορριζικού μύκητα.



Εικόνα 2: Διασταύρωση της γραμμής αναφοράς του μικροσκοπίου με σημείο ρίζας στο οποίο υπάρχει υφή του μυκορριζικού μύκητα.

2.6 Μέτρηση Προλίνης

Η μέτρηση της προλίνης έγινε με τη μέθοδο της όξινης νινυδρίνης, σύμφωνα με τους Bates et al.1973. Τα μέσα που χρησιμοποιήθηκαν σε αυτή τη μέθοδο υπήρξαν τα παρακάτω :

- i. 3% σουλφοσαλυκιλικό οξύ : 10ml x αριθμό δειγμάτων
- ii. 6M ορθοφωσφορικό οξύ για το (iii), καθώς το μπουκάλι περιείχε 14,8 M ορθοφωσφορικό (MB=98) : για 1L χρειάστηκαν 405ml H_3PO_4 .
- iii. Διάλυμα όξινης νινυδρίνης : 1.25 g νινυδρίνη, 30ml οξικό οξύ, 20ml 6M ορθοφωσφορικό οξύ, ανάδευση και ελαφριά θέρμανση. Στη θέρμανση το σκεύος ήταν καλυμμένο με αλουμινόχαρτο για προστασία από το φως. Το διάλυμα είχε τη δυνατότητα διατήρησης στους 4°C για 24h.
- iv. Οξικό οξύ: 2ml x αριθμό δειγμάτων
- v. Τολουόλιο (τολουένη): 4ml x αριθμό δειγμάτων
- vi. Πάγος
- vii. Χωνιά – φίλτρο

Διαδικασία (το υδατόλουτρο ρυθμίστηκε στους 100°C)

- Για το εκχύλισμα : ζυγίστηκαν 250 mg νωπού δείγματος, από τα φύλλα των καρότων που είχαν αποθηκευτεί στην κατάψυξη. Εκχυλίστηκαν με 3% σουλφοσαλυκιλικό οξύ, με τελικό όγκο 10 ml και έπειτα τοποθετήθηκαν σε σωληνίσκους φυγοκέντρου με πώμα.
- Ακολούθησε φυγοκέντρηση στα 4000g για 10'.
- Σε άλλους σωληνίσκους με πώμα προστέθηκαν: 2ml εκχυλίσματος και 2 ml του αντιδραστηρίου της όξινης νινυδρίνης καθώς και 2ml οξικού οξέος.
- Οι σωληνίσκοι σφραγίστηκαν και επωάστηκαν σε υδατόλουτρο στους 100°C για 1h.
- Αμέσως μετά μεταφέρθηκαν οι σωλήνες σε πάγο.

- Το περιεχόμενο των σωληνίσκων μεταγγίστηκε σε μεγάλους δοκιμαστικούς σωλήνες και προστέθηκαν 4ml τολουολίου και πραγματοποιήθηκε ανάδευση για 15 sec.
- Τα δείγματα έπειτα αφέθηκαν να κρυώσουν.
- Διαχωρισμός φάσεων: η χρωμοφόρα φάση περιείχε τολουόλιο και έτσι διαχωρίζονταν από την υδατική φάση του διαλύματος.
- Τέλος παραλαμβάνονταν η υπερκείμενη φάση και μετρίονταν η απορρόφησή της σε φασματοφωτόμετρο στα 520nm, με τυφλό δείγμα τολουόλιο.

2.7 Μέτρηση ολικών φαινολικών

Η μέθοδος που χρησιμοποιήθηκε ήταν η Folin – Ciocalteu (Waterman and Mole 1994).

Αρχικά χρειάστηκαν:

- i. Μεθανόλη: 6ml / δείγμα.
- ii. Αντιδραστήριο Folin – Ciocalteu: 0,25ml / δείγμα.
- iii. Διάλυμα Na_2CO_3 : 20g σε 100ml νερού (παρασκευαζόταν φρέσκο, κάθε φορά πριν τη μέτρηση) – 0,75ml / δείγμα.

Εκχύλιση

- Ζυγίστηκαν 300mg κονιορτοποιημένου ξηρού δείγματος και τοποθετήθηκαν σε πλαστικούς σωληνίσκους με πώμα.
- Προστέθηκαν 6ml υδατικού διαλύματος μεθανόλης 50%.
- Οι σωληνίσκοι σφραγίστηκαν και επωάστηκαν σε υδατόλουτρο στους 40 °C για 1h, υπό ήπια ανάδευση.
- Έπειτα να δείγματα πέρασαν από χάρτινο φίλτρο με τη βοήθεια χωνιού και το διαυγές διάλυμα παραλήφθηκε σε μικρούς γυάλινους δοκιμαστικούς σωλήνες.

Αντίδραση

- Σε μεγαλύτερους δοκιμαστικούς σωλήνες προστέθηκαν:
 - ❖ 3,95ml απιονισμένου νερού
 - ❖ 0,05ml (50λ) εκχυλίσματος

- ❖ 0,25ml (250λ) αντιδραστηρίου Folin – Ciocalteu
(για το διάλυμα που θα χρησιμοποιούνταν ως τυφλό στο φασματοφωτόμετρο, αντί για 50λ εκχυλίσματος προστέθηκαν 50λ υδατικού διαλύματος μεθανόλης 50%)
- Ανάδευση των σωλήνων σε Vortex.
- Σε 1 – 8 min από το πέρας της ανάδευσης προστέθηκαν 0,75ml (750λ) διαλύματος Na₂CO₃.
- Ανάδευση σε Vortex.
- Ακολούθησε επώαση σε θερμοκρασία δωματίου για 2h με συχνές αναδεύσεις σε Vortex.
- Αμέσως μετά την επώαση, σε 1 – 8 min έγινε μέτρηση της απορρόφησης των δειγμάτων σε φασματοφωτόμετρο στα 760nm.

2.8 Στατιστική Ανάλυση

Η στατιστική ανάλυση των αποτελεσμάτων πραγματοποιήθηκε με την μέθοδο Two – Way Anova (SPSS Statistics 24 IBM Corp.), με τα α) παρουσία AMF και β) νερό άρδευσης (βρύσης ή Κάρλας) να αποτελούν τις δύο μεταβλητές. Η σημαντικότητα των διαφορών μεταξύ των μεταχειρίσεων ελέγχθηκε σε επίπεδο $p < 0.05$.

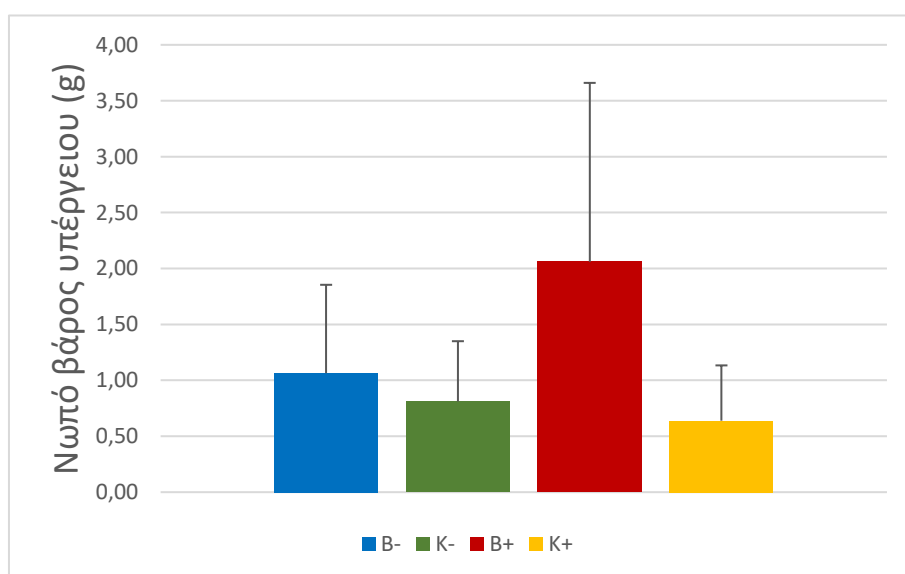
Αποτελέσματα

Ακολουθούν τα αποτελέσματα των μετρήσεων σε νωπό ιστό, βιομάζα, βιοχημικές παραμέτρους και του ποσοστού αποικισμού της ρίζας από τους μύκητες.

Το πινακάκι που συνοδεύει κάθε σχήμα αφορά τους παράγοντες που συντέλεσαν στις ενδεχόμενες στατιστικά σημαντικές διαφορές μεταξύ των μεταχειρίσεων. Αναφέρεται δηλαδή στους α) νερό άρδευσης, β) παρουσία AMF και γ) την αλληλεπίδραση των παραπάνω δύο (νερό*AMF).

3.1 Μορφομετρικές παράμετροι νωπού ιστού

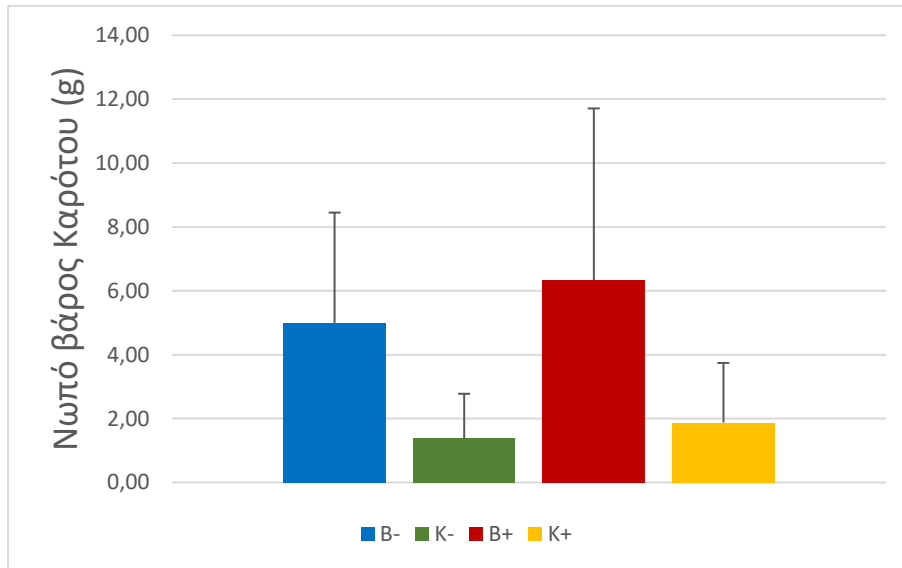
Στο σχήμα 1 απεικονίζεται το μέσο νωπό βάρος του υπέργειου τμήματος των φυτών κάθε μεταχείρισης. Τα φυτά των μεταχειρίσεων της βρύσης αποτελούνταν από πιο ανεπτυγμένο υπέργειο τμήμα φυτού από αυτά των μεταχειρίσεων της Κάρλας, με τα μυκορριζικά φυτά να υπερτερούν έναντι όλων. Εντούτοις, δεν παρατηρήθηκαν στατιστικά σημαντικές διαφορές μεταξύ των νωπών βαρών των φυτών.



	Sig
νερό	
AMF	
Νερό * AMF	

Σχήμα 1 : Υπέργειο νωπό βάρος φυτών σε g εκφρασμένο ως Μ.Ο. \pm SD. Δεν υπάρχουν στατιστικά σημαντικές διαφορές μεταξύ των μεταχειρίσεων.

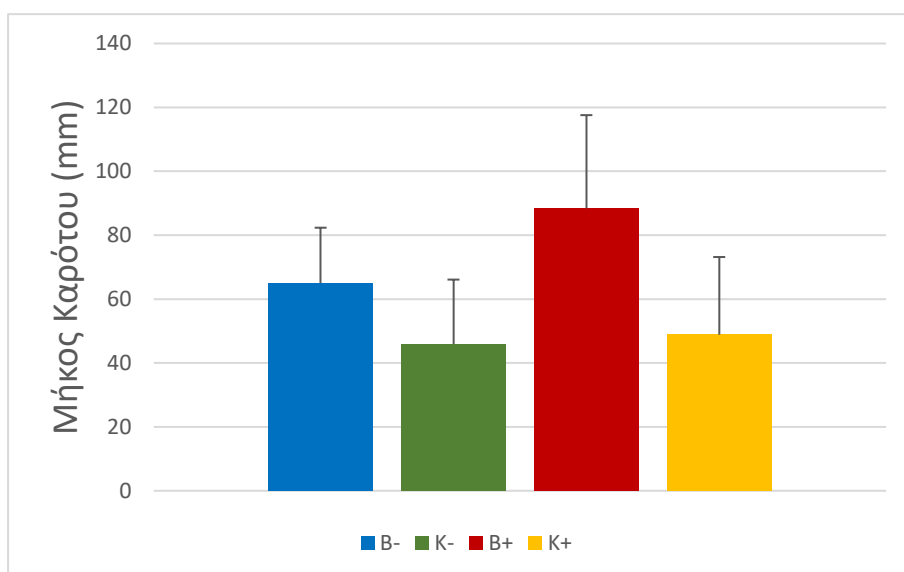
Στο σχήμα 2 φαίνεται το μέσο βάρος της νωπής κονδυλόρριζας των φυτών καρότου κάθε μεταχείρισης. Οι μεταχειρίσεις της βρύσης διέθεταν καρότα εμφανώς μεγαλύτερου νωπού βάρους από αυτές της Κάρλας, κάνοντας τις μεταχειρίσεις B- και B+ να διαφέρουν στατιστικά σημαντικά από τις K- και K+.



	Sig
Νερό	*
AMF	
Νερό * AMF	

Σχήμα 2 : Νωπό βάρος καρότου σε g (M.O. ± SD). Στον πίνακα δίπλα από το γράφημα, ο αστερίσκος (*) στην στήλη της σημαντικότητας εκφράζει ποιος παράγοντας έκανε τα αποτελέσματα να διαφέρουν στατιστικά σημαντικά σε επίπεδο σημαντικότητας $p < 0.05$.

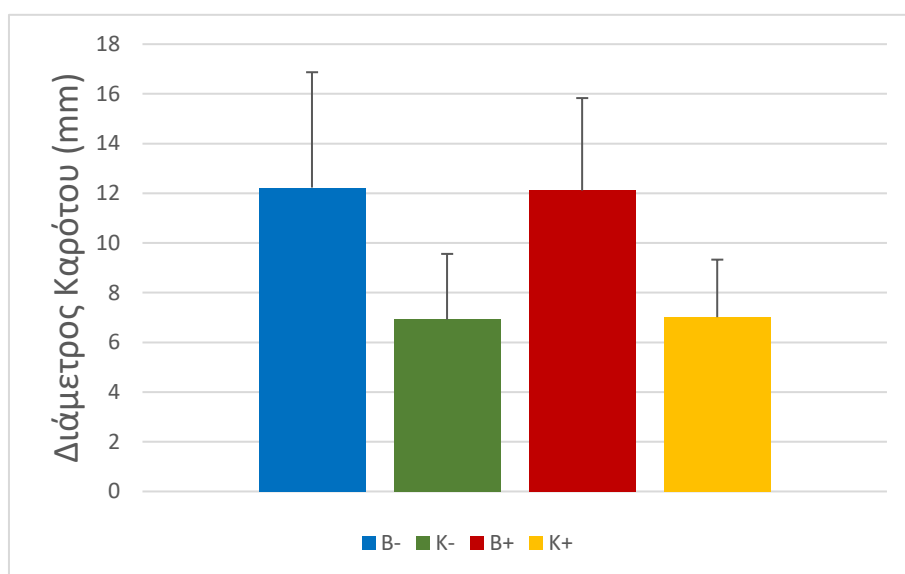
Στο σχήμα 3 παρουσιάζεται το μέσο μήκος που διέθεταν τα καρότα της κάθε μεταχείρισης. Οι μεταχειρίσεις της βρύσης B- και B+ χαρακτηρίζονταν με στατιστικώς σημαντικά μεγαλύτερου μήκους καρότα από τις μεταχειρίσεις της Κάρλας K- και K+. Τα μυκορριζικά φυτά που αρδεύονταν με νερό βρύσης για μία ακόμη φορά υπερτερούν.



	Sig
Νερό	*
AMF	
Νερό * AMF	

Σχήμα 3 : Μήκος καρότου σε mm (M.O. \pm SD). Στον πίνακα δίπλα από το γράφημα, ο αστερίσκος (*) στην στήλη της σημαντικότητας εκφράζει ποιος παράγοντας έκανε τα αποτελέσματα να διαφέρουν στατιστικά σημαντικά σε επίπεδο σημαντικότητας $p < 0.05$.

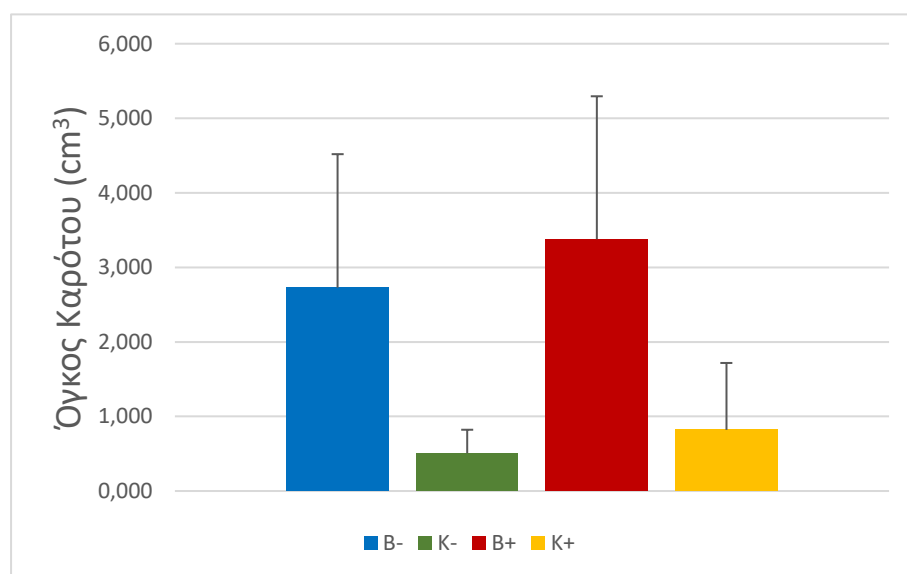
Στο σχήμα 4 φαίνεται το μέσο πλάτος (η διάμετρος στο παχύτερο σημείο) που είχαν οι κονδυλόρριζες των φυτών καρότου των μεταχειρίσεων. Τα καρότα στις μεταχειρίσεις της βρύσης είχαν παρόμοιο πλάτος μεταξύ τους, όπως επίσης και τα καρότα των μεταχειρίσεων της Κάρλας κυμαίνονται κι αυτά σχεδόν στα ίδια πλάτη μεταξύ τους. Ωστόσο οι μεταχειρίσεις της βρύσης (B-, B+) διέθεταν καρότα μεγαλύτερου πλάτους από αυτές τις Κάρλας (K-, K+) με στατιστικώς σημαντική διαφορά.



	Sig
Νερό	*
AMF	
Νερό * AMF	

Σχήμα 4: Διάμετρος καρότων σε mm (M.O. \pm SD). Στον πίνακα δίπλα από το γράφημα, ο αστερίσκος (*) στην στήλη της σημαντικότητας εκφράζει ποιος παράγοντας έκανε τα αποτελέσματα να διαφέρουν στατιστικά σημαντικά σε επίπεδο σημαντικότητας $p < 0.05$.

Στο σχήμα 5 απεικονίζεται ο μέσος όγκος των κονδυλόρριζων των φυτών καρότου όλων των μεταχειρίσεων. Τα καρότα των μεταχειρίσεων της βρύσης B-, B+ ,διέθεταν μεγαλύτερο όγκο, με στατιστικά σημαντική διαφορά, από αυτά των μεταχειρίσεων της Κάρλας K-, K+.

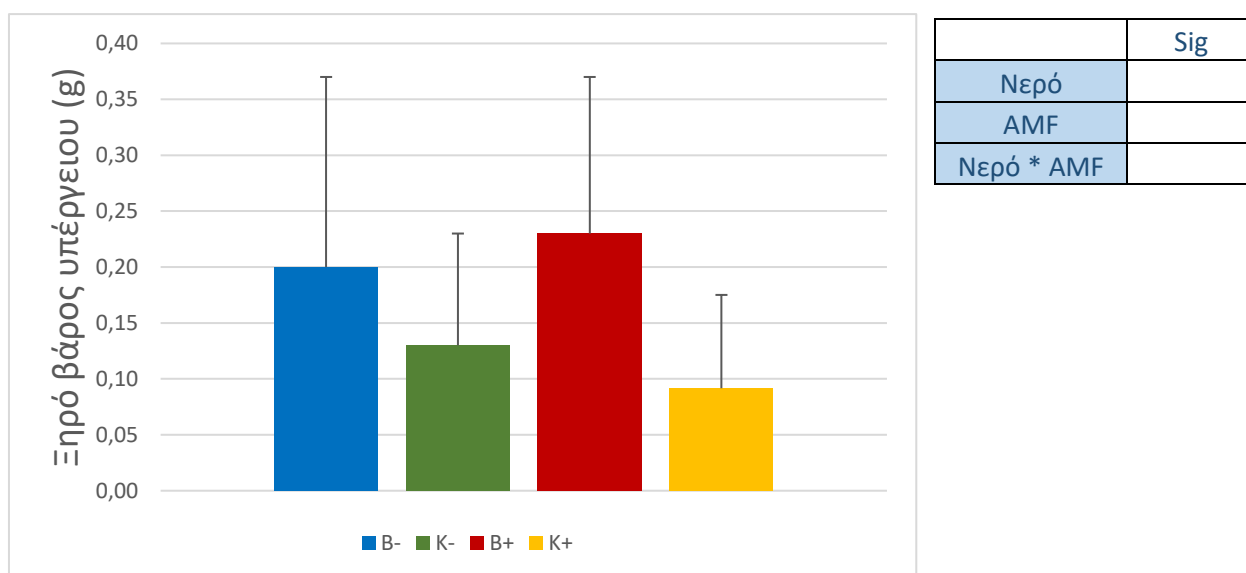


	Sig
Νερό	*
AMF	
Νερό * AMF	

Σχήμα 5: Όγκος καρότου σε cm³ (M.O. ± SD). Στον πίνακα δίπλα από το γράφημα, ο αστερίσκος (*) στην στήλη της σημαντικότητας εκφράζει ποιος παράγοντας έκανε τα αποτελέσματα να διαφέρουν στατιστικά σημαντικά σε επίπεδο σημαντικότητας $p < 0.05$.

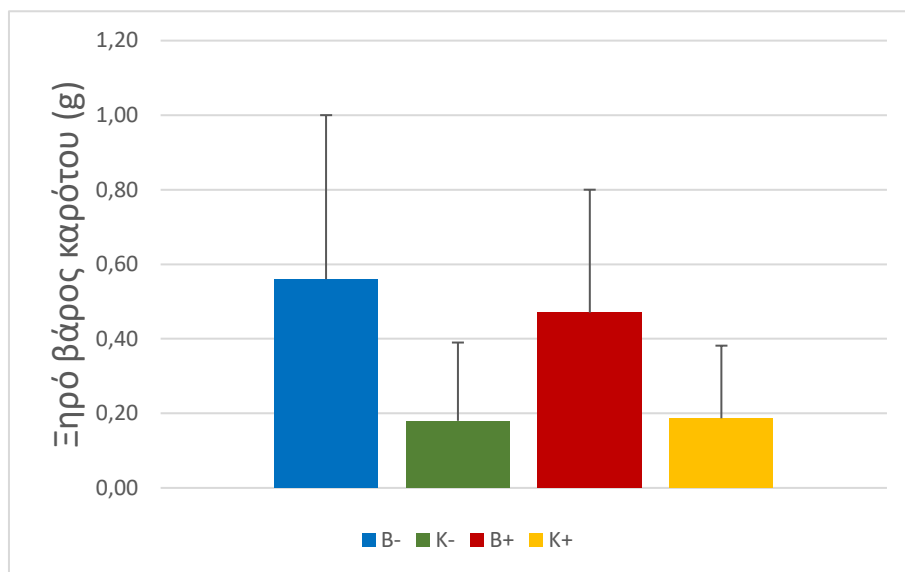
3.2 Μετρήσεις βιομάζας

Στο σχήμα 6 παρουσιάζεται το μέσο βάρος των αποξηραμένων υπέργειων ιστών των φυτών όλων των μεταχειρίσεων. Η εικόνα ήταν ανάλογη με τα αποτελέσματα του νωπού βάρους, καθώς οι μεταχειρίσεις της βρύσης (B-, B+) εμφάνισαν μεγαλύτερη βιομάζα από τις μεταχειρίσεις της Κάρλας (K-, K+), αλλά οι διαφορές δεν ήταν στατιστικά σημαντικές.



Σχήμα 6: Ξηρό υπέργειο βάρος σε g (M.O. \pm SD). Ο πίνακας δίπλα από το γράφημα είναι κενός καθώς δεν υπάρχουν στατιστικά σημαντικές διαφορές μεταξύ των μεταχειρίσεων, σε επίπεδο $p < 0.05$.

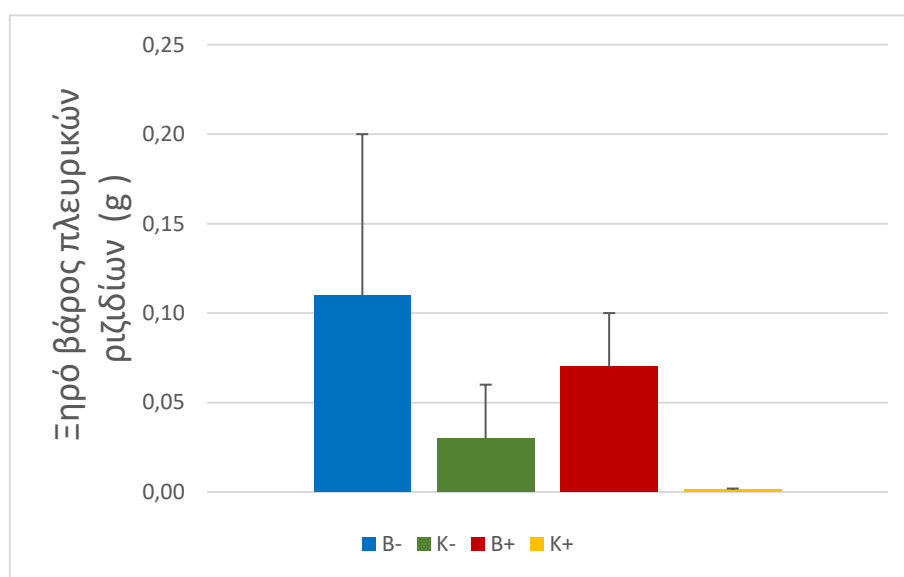
Στο σχήμα 7 φαίνεται το μέσο βάρος των αποξηραμένων κονδυλόρριζων των φυτών καρότου σε κάθε μεταχείριση. Οι μεταχειρίσεις B-, B+, υπερτερούσαν στατιστικώς σημαντικά σε ξηρό βάρος κονδυλόρριζας από τις μεταχειρίσεις K-, K+.



	Sig
Νερό	*
AMF	
Νερό * AMF	

Σχήμα 7: Ξηρό υπόγειο βάρος – βάρος ξηρών καρότων σε g (M.O. ± SD). Στον πίνακα δίπλα από το γράφημα, ο αστερίσκος (*) στην στήλη της σημαντικότητας εκφράζει ποιος παράγοντας έκανε τα αποτελέσματα να διαφέρουν στατιστικά σημαντικά σε επίπεδο σημαντικότητας $p < 0.05$.

Στο σχήμα 8 απεικονίζεται το μέσο βάρος των αποξηραμένων παράπλευρων ριζιδίων της κεντρικής ρίζας του καρότου. Οι μεταχειρίσεις της βρύσης είχαν εμφανώς περισσότερα ριζίδια από τις μεταχειρίσεις της Κάρλας, το οποίο επιβεβαίωσε και η μέτρηση ξηρού βάρους ριζιδίων· καθώς, τα ξηρά βάρη των ριζιδίων των μεταχειρίσεων B- και B+ ήταν μεγαλύτερα από τα ξηρά βάρη των μεταχειρίσεων K- και K+ με στατιστικά σημαντική διαφορά.



	Sig
Νερό	*
AMF	
Νερό * AMF	

Σχήμα 8: Ξηρό βάρος ριζιδίων σε g (M.O. \pm SD). Στον πίνακα δίπλα από το γράφημα, ο αστερίσκος (*) στην στήλη της σημαντικότητας εκφράζει ποιος παράγοντας έκανε τα αποτελέσματα να διαφέρουν στατιστικά σημαντικά σε επίπεδο σημαντικότητας $p < 0.05$.

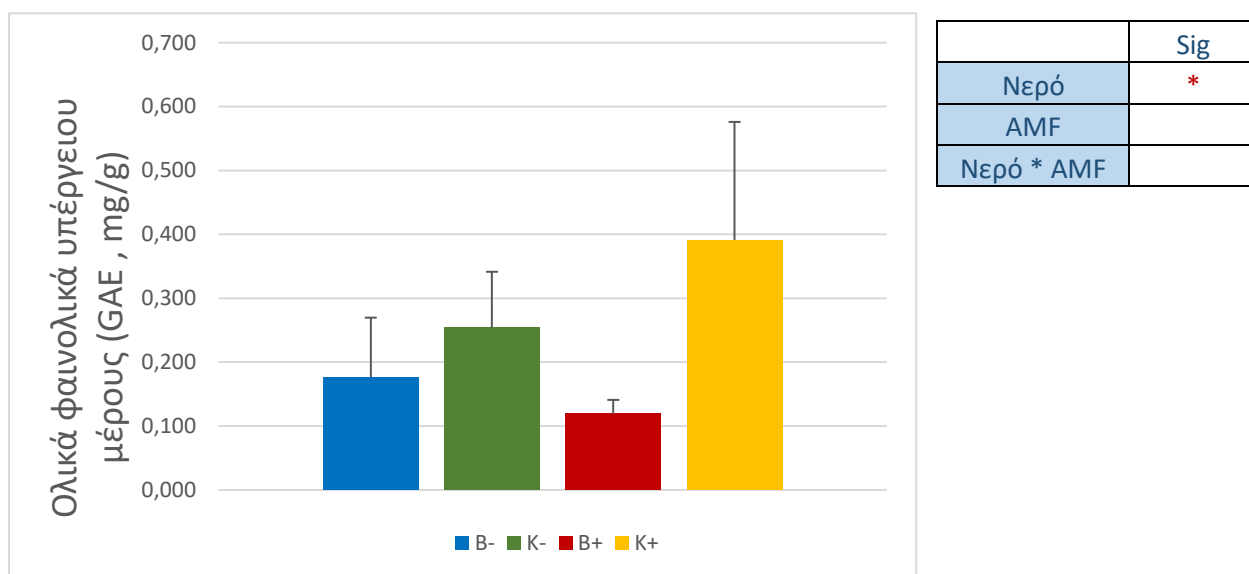
3.3 Βιοχημικές μετρήσεις

Προλίνη

Η μέτρηση της προλίνης έδειξε ότι τα φυτά καρότου του πειράματος αυτής της εργασίας δεν είχαν συγκεντρώσει προλίνη.

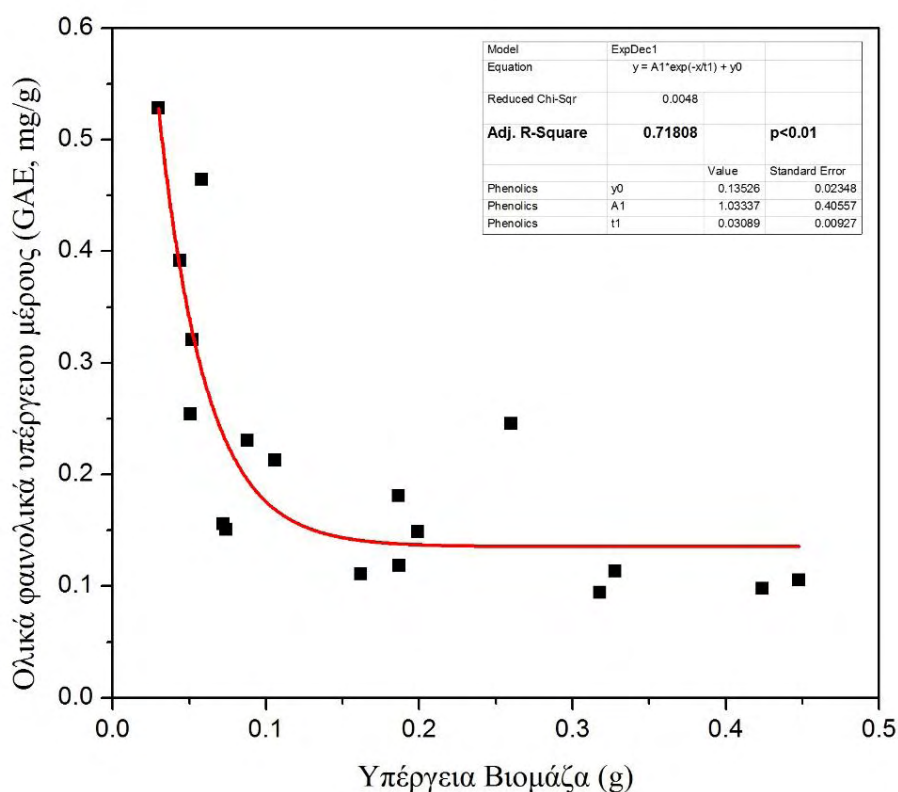
Φαινολικά

Στο σχήμα 9 παρουσιάζεται η μέση συγκέντρωση των φαινολικών οξέων που είχαν συγκεντρώσει τα φύλλα των φυτών καρότου όλων των μεταχειρίσεων. Τα λιγότερα φαινολικά στα φύλλα της διέθετε η μεταχείριση B+ και ακολουθούσαν με μια βαθμιαία αύξηση οι μεταχειρίσεις B-, K-, ενώ την κορυφή της συγκέντρωσης φαινολικών αποτέλεσε η μεταχείριση K+. Ωστόσο αυτές οι διαφορές κατηγοριοποιήθηκαν σε δύο ευρύτερες ομάδες καθώς, υπήρχαν στατιστικώς σημαντικές διαφορές μεταξύ των μεταχειρίσεων της βρύσης (B-, B+) σε σχέση με αυτές της Κάρλας (K-, K+).



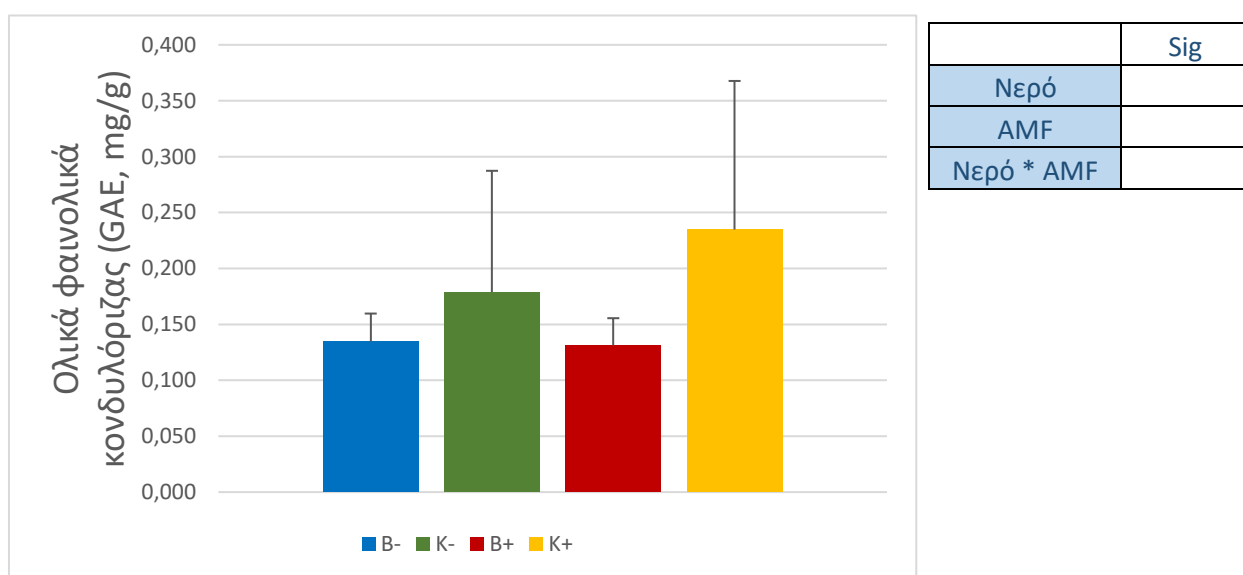
Σχήμα 9: Ολικά φαινολικά υπέργειου τμήματος εκφρασμένα ως ισοδύναμα mg γαλλικού οξέος προς τα g του ξηρού δείγματος (M.O. \pm SD). Στον πίνακα δίπλα από το γράφημα, ο αστερίσκος (*) στην στήλη της σημαντικότητας εκφράζει ποιος παράγοντας έκανε τα αποτελέσματα να διαφέρουν στατιστικά σημαντικά σε επίπεδο σημαντικότητας $p < 0.05$.

Στο σχήμα 10 απεικονίζεται η συσχέτιση των ολικών φαινολικών με την υπέργεια βιομάζα του φυτού με μία αρνητική εκθετική καμπύλη. Η καμπύλη αυτή αποτυπώνει το γεγονός ότι όσο μικρότερη ήταν η ανάπτυξη στο υπέργειο τμήμα τόσο μεγαλύτερη ήταν η συγκέντρωση των φαινολικών οξέων σε αυτό.



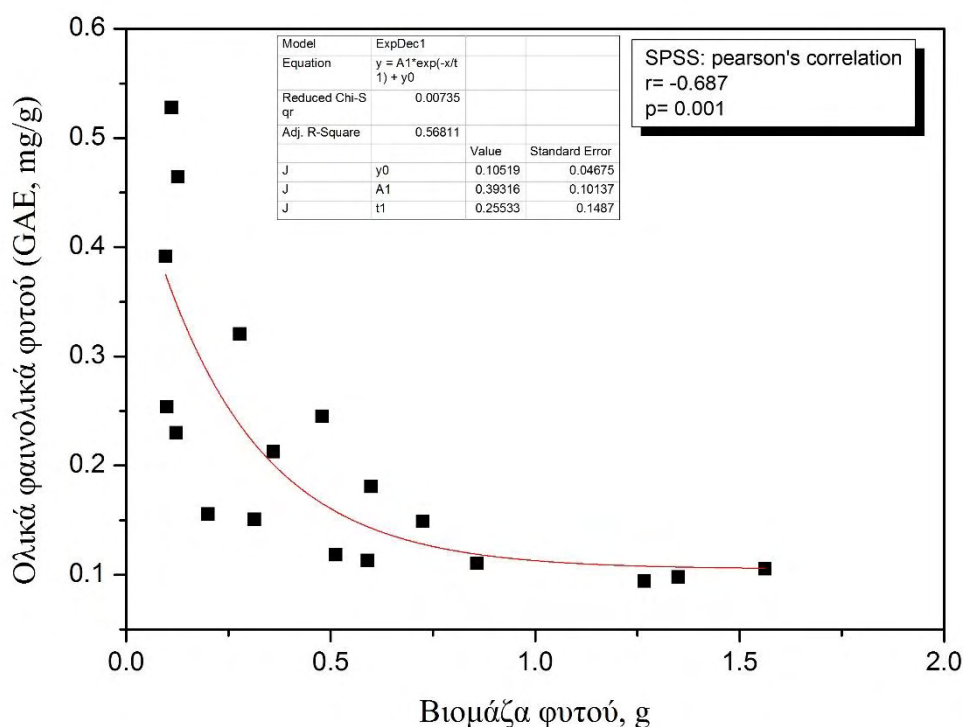
Σχήμα 10 : Η σχέση της συγκέντρωσης ολικών φαινολικών υπέργειου τμήματος του φυτού (σε ισοδύναμα γαλικού οξέος, GAE, mg/g) με την υπέργεια βιομάζα (g). Στο ένθετο πίνακάκι παρουσιάζονται τα στατιστικά χαρακτηριστικά της σχέσης: εξίσωση, παράμετροι αυτής και σημαντικότητά.

Στο σχήμα 11 φαίνεται η μέση συγκέντρωση των ολικών φαινολικών που καταγράφηκε στις κονδυλόρριζες των φυτών κάθε μεταχείρισης. Παρ όλο που οι μεταχειρίσεις της Κάρλας (K-, K+) βρέθηκαν με περισσότερα φαινολικά στις ρίζες τους από τις μεταχειρίσεις της Βρύσης (B-, B+), αυτές οι διαφορές δεν ήταν στατιστικώς σημαντικές.



Σχήμα 11: Ολικά φαινολικά κονδυλόρριζας εκφρασμένα ως ισοδύναμα mg γαλλικού οξέος προς τα g του ξηρού δείγματος (Μ.Ο. ± SD). Ο πίνακας δίπλα από το γράφημα είναι κενό καθώς δεν υπάρχουν στατιστικά σημαντικές διαφορές μεταξύ των μεταχειρίσεων, σε επίπεδο $p < 0.05$.

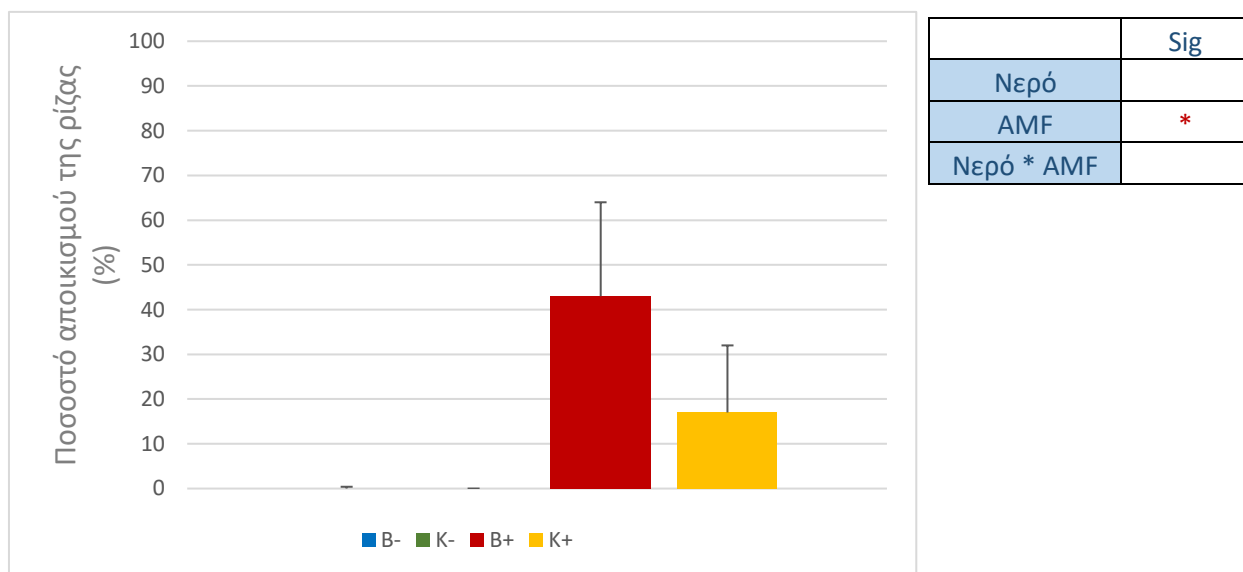
Στο σχήμα 12 απεικονίζεται η συσχέτιση των ολικών φαινολικών σε επίπεδο φυτού με την συνολική βιομάζα του φυτού με μία αρνητική εκθετική καμπύλη. Η καμπύλη αυτή αποτυπώνει το γεγονός ότι όσο μικρότερη ήταν η ανάπτυξη του φυτού, τόσο μεγαλύτερη ήταν η συγκέντρωση των ολικών φαινολικών στους ιστούς του.



Σχήμα 12: Η σχέση της συγκέντρωσης ολικών φαινολικών του φυτού (σε ισοδύναμα γαλικού οξέος, GAE, mg/g) με την συνολική βιομάζα αυτού (g). Στο ένθετο πίνακάκι παρουσιάζονται τα στατιστικά χαρακτηριστικά της σχέσης: εξίσωση, παράμετροι αυτής και σημαντικότητα.

3.4 Μέτρηση αποικισμού του μυκορριζικού μύκητα

Στο σχήμα 13 απεικονίζεται το ποσοστό αποικισμού του μυκορριζικού μύκητα, όπως αυτό μετρήθηκε στα πλευρικά ριζίδια των καρότων της κάθε μεταχείρισης. Η μεταχείριση B+ είχε μεγαλύτερο αποικισμό μυκόρριζων από τη μεταχείριση K+ χωρίς όμως αυτή η διαφορά να είναι στατιστικά σημαντική. Οι μεταχειρίσεις B- και K-, στερούνταν μυκόρριζων, συνεπώς διέφεραν στατιστικά σημαντικά από τις K+ και B+ στον συγκεκριμένο παράγοντα



Σχήμα 13: Αποικισμός μυκόρριζων % στις μεταχειρίσεις. Στον πίνακα δίπλα από το γράφημα, ο αστερίσκος (*) στην στήλη της σημαντικότητας εκφράζει ποιος παράγοντας έκανε τα αποτελέσματα να διαφέρουν στατιστικά σημαντικά σε επίπεδο σημαντικότητας $p < 0.05$

Συζήτηση

Η αύξηση και η ανάπτυξη των φυτών καρότου της συγκεκριμένης εργασίας, επηρεάστηκε κατά κύριο λόγο από δύο παράγοντες : από το νερό άρδευσης και την ύπαρξη ή όχι του μυκορριζικού μύκητα στις ρίζες των φυτών. Ο παράγοντας που διαμόρφωσε τις περισσότερες διαφορές μεταξύ των μεταχειρίσεων όπως φάνηκε στα αποτελέσματα, ήταν το νερό άρδευσης. Βέβαια είναι πολύ πιθανή και η συμβολή ενός τρίτου παράγοντα στην ανάπτυξη των φυτών, αυτού του χειμώνα του 2017 αφού ήταν ο πιο βαρύς χειμώνας της τελευταίας δεκαετίας. Η συμβολή του σκληρού χειμώνα με τις παρατεταμένες χαμηλές θερμοκρασίες, ίσως έγκειται περισσότερο στην καθυστερημένη ανάπτυξη που είχαν όλα τα φυτά και όχι τόσο στις διαφορές που υπήρξαν τελικά μεταξύ των ομάδων.

4.1 Μικροκυστίνες και ανάπτυξη των φυτών

Το πείραμα διήρκεσε 5 μήνες, από τον Οκτώβριο του 2016 έως τον Μάρτιο του 2017. Τα φυτά στις μεταχειρίσεις που ποτίζονταν με νερό της λίμνης Κάρλας, έλαβαν για μεγάλο διάστημα νερό επιβαρυμένο με μικροκυστίνες συγκέντρωσης 3,8μg/L. Αποτέλεσμα αυτού ήταν οι ομάδες K- και K+ να σημειώσουν μειωμένη ανάπτυξη και να διαφέρουν στατιστικώς σημαντικά από τις ομάδες των μαρτύρων B- και B+, όσον αφορά την πλειονότητα των μορφολογικών χαρακτηριστικών. Στο υπέργειο τμήμα του φυτού δεν καταγράφηκαν σημαντικές διαφορές στο νωπό και ξηρό βάρος μεταξύ των μεταχειρίσεων. Εντούτοις, όλοι οι υπόλοιποι παράγοντες, και πιο συγκεκριμένα το νωπό και ξηρό βάρος ρίζας, το μήκος και η διάμετρος του καρότου (επομένως και ο όγκος του) και το ξηρό βάρος ριζιδίων είχαν στατιστικά σημαντικές διαφορές (σχήματα 2,3,4,5,7,8). Οι διαφορές αυτές οφείλονταν αποκλειστικά στο είδος του νερού άρδευσης, επομένως στην παρουσία μικροκυστινών. Ανάλογα αποτελέσματα ως προς το βάρος της ρίζας και τη διάμετρό της παρατήρησαν και οι Lee et al. 2017 στη δική τους μελέτη. Η μόνη διαφορά έγκειται στο μήκος των καρότων, καθώς οι Lee et al. 2017 δε βρήκαν στατιστικά σημαντικές διαφορές μεταξύ των μεταχειρίσεων

που λάμβαναν νερό με μικροκυστίνες και των μαρτύρων. Τα αποτελέσματα των Lee et al. 2017 προέρχονται από πειράματα με άρδευση καρότων με διαφορετικές συγκεντρώσεις μικροκυστινών (1, 5, 10 µg/L) για 4 εβδομάδες. Ωστόσο οι μορφολογικοί παράγοντες που αναφέρθηκαν χαρακτηρίζουν και τις τρεις συγκεντρώσεις μικροκυστινών, καθώς σε όλες τις μεταχειρίσεις τα αποτελέσματα διέφεραν από τους μάρτυρες. Έπειτα, γυρίζοντας στην παρούσα εργασία, στις ομάδες της Κάρλας κατά την ανάπτυξη των φυτών υπήρξαν σταδιακά απώλειες. Τα φυτά που χάθηκαν εμφάνιζαν αρχικά χλωρωτικά φύλλα και έπειτα επέρχονταν μάρανση και τελικά ξήρανση του φυτού. Συμπερασματικά λοιπόν, είναι φανερό πως οι μικροκυστίνες επέδρασαν δυσμενώς στην ανάπτυξη των φυτών καρότου, αφού τα φαίνεται να αποτέλεσαν για αυτά καταπόνηση.

Τα παραπάνω αποτελέσματα έρχονται σε αντίθεση με τους Machado et al. 2017, οι οποίοι διαπίστωσαν ότι η έκθεση των φυτών καρότου σε χαμηλές συγκεντρώσεις μικροκυστινών για 28 ημέρες, δεν επηρέασε αρνητικά την ανάπτυξη τους. Βέβαια υπέθεσαν πως η παρατεταμένη έκθεση των φυτών καρότου σε υψηλότερες συγκεντρώσεις μικροκυστινών (π.χ. της τάξης των 50µg MC-LR /L) θα έχει πιθανώς δυσμενή επίδραση στην ανάπτυξη των ριζών.

4.2 Επίδραση μικροκυστινών στο μυκορριζικό σύστημα

Καταρχάς να τονιστεί ότι δεν καταγράφηκε παρουσία μύκητα στις ρίζες των φυτών που αναπτύχθηκαν απουσία μυκόρριζας, δεν υπήρξε δηλαδή καμία επιμόλυνση των φυτών αυτών, επομένως παρέμειναν έως τη συγκομιδή AMF-.

Σύμφωνα με τα αποτελέσματα της συγκεκριμένης εργασίας, φαίνεται πως οι ομάδες των μαρτύρων B- και B+, οι οποίες αρδεύονταν με νερό βρύσης, είχαν παρόμοια ανάπτυξη. Ελαφρώς καλύτερη ανάπτυξη διέθετε η ομάδα B+, δίνοντας έτσι το συμπέρασμα πως η συνεργασία των φυτών με το μυκορριζικό μύκητα ευνόησε την ανάπτυξή τους, αλλά όχι σε σημαντικό επίπεδο. Συνεπώς το συγκεκριμένο αποτέλεσμα έρχεται σε μερική συμφωνία

με τον Dighton 2009 που έχει αναφέρει πως το κύριο αποτέλεσμα της συνεργασίας των φυτών με τις μυκόρριζες είναι η διέγερση της αύξησης και της ανάπτυξης των προαναφερθέντων φυτών. Παρ' όλα αυτά, στην περίπτωση της μεταχείρισης K⁺ που δέχονταν νερό επιβαρυμένο με μικροκυστίνες, διαπιστώθηκε πως ο μυκορριζικός μύκητας όχι μόνο δε βοήθησε στην ανάπτυξη των φυτών, αλλά την επιδείνωσε οριακά. Επιπλέον, από την καταμέτρηση των μυκόρριζων φάνηκε πως οι μικροκυστίνες επηρέασαν δυσμενώς και την ανάπτυξη του μύκητα. Το συγκεκριμένο συμπέρασμα προκύπτει από το γεγονός ότι ομάδες B⁺ και K⁺ παρουσιάζουν μία διαφορά αποικισμού των ριζών τους της τάξεως του 26% (σχήμα 13).

Έχει διαπιστωθεί πως οι μυκόρριζες δύνανται να βοηθούν τα φυτά σε τοξικά περιβάλλοντα, τα οποία όμως αναφέρονται κυρίως σε τοξικότητες ορισμένων βαρέων μετάλλων (Dighton 2009). Επίσης μελέτες έχουν δείξει πως οι μυκόρριζες βοηθούν τα φυτά να ανταπεξέρχονται καλύτερα σε καταστάσεις ξηρασίας (Li et al. 2014). Ωστόσο δεν υπάρχουν έως τώρα μελέτες που να ασχολούνται με τη συμπεριφορά των μυκορριζικών συστημάτων τα οποία εκτίθενται σε κυανοτοξίνες.

4.3 Φαινολικά vs ανάπτυξη

Ανατρέχοντας στα αποτελέσματα των βιοχημικών μετρήσεων, φανερώνεται μία ιδιαίτερη συσχέτιση μεταξύ των ολικών φαινολικών και της ανάπτυξης της κάθε μεταχείρισης. Αυτή η συσχέτιση επιβεβαιώνεται και από τη σχέση φαινολικών ενώσεων στο υπέργειο τμήμα του φυτού – βιομάζα υπέργειου τμήματος καθώς και από τις φαινολικές ενώσεις σε όλο το φυτό – βιομάζα φυτού. Πιο συγκεκριμένα, παρατηρήθηκε πως οι μεταχειρίσεις B⁻ και B⁺ που κατείχαν τα πρωτεία στην αύξηση και την ανάπτυξη των φυτών μεταξύ των τεσσάρων μεταχειρίσεων, παρουσιάζουν τις μικρότερες συγκεντρώσεις ολικών φαινολικών από τις τέσσερις μεταχειρίσεις. Μεταξύ των B⁻ και B⁺, η μεταχείριση B⁺ είχε ελαφρώς καλύτερη ανάπτυξη και το υπέργειο τμήμα της όπως και τα καρότα της, είχαν ελαφρώς μικρότερες συγκεντρώσεις φαινολικών από αυτά της μεταχείρισης B⁻ (σχήματα 9, 11). Αντιθέτως, οι

μεταχειρίσεις K⁻ και K⁺ που ήταν καταπονημένες λόγω των μικροκυστινών και είχαν ελλιπή ανάπτυξη, παρουσίασαν αυξημένες συγκεντρώσεις ολικών φαινολικών στο υπέργειο μέρος των φυτών τους, όπως και στα καρότα τους. Η μεταχείριση K⁺ που παρουσίασε την χειρότερη ανάπτυξη όλων, βρέθηκε να έχει συσσωρεύσει στους ιστούς των φυτών της (φύλλα – καρότα) τις μεγαλύτερες συγκεντρώσεις φαινολικών ενώσεων (σχήματα 9, 11). Συμπερασματικά λοιπόν γίνεται αντιληπτό πως τα φυτά της συγκεκριμένης εργασίας όσο μικρότερη – ελλιπέστερη ανάπτυξη είχαν, τόσο περισσότερα φαινολικά συσώρευσαν στους ιστούς τους. Από την άλλη πλευρά όσο καλύτερα ανεπτυγμένα ήταν τα φυτά, τόσο χαμηλότερες ήταν οι συγκεντρώσεις των φαινολικών στους ιστούς τους (σχήματα 10, 12), άρα πρόκειται για μία αρνητική σχέση μεταξύ των δύο παραμέτρων. Το συγκεκριμένο συμπέρασμα συμφωνεί απόλυτα με τους Karabourniotis et al. 2014 οι οποίοι υποστηρίζουν πως η συγκέντρωση των φαινολικών ενώσεων αυξάνεται σε ένα φυτό ως πρόσθετος αμυντικός μηχανισμός σε καταστάσεις καταπόνησης του φυτού. Πέρα από τις καταπονήσεις των φυτών λόγω της υπερϊώδους ακτινοβολίας ή της ξηρασίας, ο «μηχανισμός» των φαινολικών ενώσεων «ενεργοποιείται» και υπό καταστάσεις οξειδωτικού στρες των φυτών, όπως πιθανώς συνέβη και στα φυτά των μεταχειρίσεων K⁻, K⁺ της παρούσας εργασίας. Πιο συγκεκριμένα οι Karabourniotis et al. 2014 βρήκαν πως η συγκέντρωση των φαινολικών στο φυτό έχει αρνητική συσχέτιση με τη φωτοσυνθετική ικανότητα. Η φωτοσυνθετική ικανότητα όμως είναι άμεσα συνδεδεμένη με την αύξηση και την ανάπτυξη του φυτού και έμμεσα με τη βιομάζα του φυτού. Έτσι λοιπόν όταν ένα φυτό βρίσκεται σε κατάσταση στρες, επιλέγει να αυξήσει τις φαινολικές του ενώσεις εις βάρος της αύξησης των αποθεμάτων του σε άνθρακα (και αντιστρόφως) (Karabourniotis et al. 2014), συνεπώς εις βάρος της ανάπτυξής του. Πρόκειται για την απόκριση του φυτού στο γνωστό «δίλημμα»: ανάπτυξη ή άμυνα. Με αυτή τη διαδικασία λοιπόν, γίνεται κατανοητό το γεγονός κατά το οποίο τα φυτά του πειράματος αυτής της διατριβής είχαν τα ανάλογα αποτελέσματα ανάπτυξης, βιομάζας – φαινολικών ενώσεων.

4.4 Συμπεράσματα

Εν κατακλείδι τα συμπεράσματα που απορρέουν από την παρούσα εργασία συνοψίζονται στα εξής:

- ❖ Οι μικροκυστίνες που περιείχε το νερό της λίμνης Κάρλας επηρέασαν δυσμενώς την ανάπτυξη των φυτών καρότου. Οι μυκόρριζες που συμβίωναν σε αυτά τα φυτά επιδείνωσαν περαιτέρω το πρόβλημα.
- ❖ Η ύπαρξη μυκόρριζων στα φυτά των μαρτύρων που ποτίστηκαν με νερό βρύσης βοήθησε την ανάπτυξή τους, αλλά όχι σε αξιόλογα επίπεδα.
- ❖ Η περιεκτικότητα του αρδευτικού νερού (από τη λίμνη Κάρλα) σε μικροκυστίνες περιόρισε την ανάπτυξη και εξάπλωση του μυκορριζικού μύκητα.
- ❖ Τα ολικά φαινορικά τα οποία αντικατοπτρίζουν το αμυντικό δυναμικό που αναπτύσσεται από τα φυτά σε καταστάσεις στρες, επιβεβαίωσαν τη γνωστή τακτική των φυτών υπό καταπόνηση, που επιλέγουν την άμυνα εις βάρος της ανάπτυξης.

Βιβλιογραφία

- Bates, L. S., Waldren, R & Teare, I .D. 1973. "Rapid Determination of Free Proline for Water Stress Studies." *Plant and Soil* 39: 205–7.
- Corbel, Sylvain., Christian Mouglin., and Noureddine Bouaïcha. 2014. "Cyanobacterial Toxins: Modes of Actions, Fate in Aquatic and Soil Ecosystems, Phytotoxicity and Bioaccumulation in Agricultural Crops." *Chemosphere* 96: 1–15.
- Cordeiro-Araújo, Micheline., Kézia Chia, Mathias., Ahii Hereman, Talita., Caroline Sasaki, Fabiana., Fumido Carmo Bittencourt-Oliveira, Maria. 2015. "Selective Membrane Permeability and Peroxidase Activity Response of Lettuce and Arugula Irrigated with Cyanobacterial-Contaminated Water." *Environmental Earth Sciences* 74: 1547–53.
- Davies, F. T., J. R. Potter, and R. G. Linderman. 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: 289–94.
- Dighton, J. 2009. "Mycorrhizae." *Encyclopedia of Microbiology*: 153–62.
- Downing, John., A, Watson., Susan, B., and Edward McCauley. 2001. "Predicting Cyanobacteria Dominance in Lakes." *Canadian Journal of Fisheries and Aquatic Sciences* 58(10): 1905–8.
<http://www.nrcresearchpress.com/doi/abs/10.1139/f01-143>
<https://invam.wvu.edu>
- Ikawa, M., J. J. Sasner, and J. F. Haney. 2001. "Activity of Cyanobacterial and Algal Odor Compounds Found in Lake Waters on Green Alga *Chlorella Pyrenoidosa* Growth." *Hydrobiologia* 443: 19–22.
- Karabourniotis, George., Liakopoulos, Georgios., Nikolopoulos, Dimosthenis., Bresta, Panagiota., Stavroulaki, Vassiliki., Sumbele, Sally. 2014. "‘Carbon Gain vs. Water Saving, Growth vs. Defence’: Two Dilemmas with Soluble Phenolics as a Joker." *Plant Science* 227: 21–27.
- Karpouzas, D. G., Papadopoulou, E., Ipsilantis, I., Friedel, I., Petric, I., Udikovic-Kolic, N., Djuric, S., Kandeler, E., Menkissoglu-Spiroudi, U., Martin-Laurent, F. 2014. "Effects of Nicosulfuron on the Abundance and

- Diversity of Arbuscular Mycorrhizal Fungi Used as Indicators of Pesticide Soil Microbial Toxicity." *Ecological Indicators* 39: 44–53.
- Lee, Seungjun., Jiang, Xuewen., Manubolu, Manjunath., Riedl, Ken., Ludsin, Stuart A., Martin, Jay F., Lee, Jiyoung. 2017. "Fresh Produce and Their Soils Accumulate Cyanotoxins from Irrigation Water: Implications for Public Health and Food Security." *Food Research International* 102: 234–45.
- Levizou, Efi., Statiris, George., Papadimitriou, Theodoti., Laspidou, Chrysi S., Kormas, Konstantinos Ar. 2017. "Lettuce Facing Microcystins-Rich Irrigation Water at Different Developmental Stages: Effects on Plant Performance and Microcystins Bioaccumulation." *Ecotoxicology and Environmental Safety* 143: 193–200.
- Li, Tao., Lin, Ge., Zhang, Xin., Chen, Yongliang., Zhang, Shubi., Chen, Baodong. 2014. "Relative Importance of an Arbuscular Mycorrhizal Fungus (*Rhizophagus intraradices*) and Root Hairs in Plant Drought Tolerance." *Mycorrhiza* 24: 595–602.
- Machado, J., Azevedo, J., Freitas, M., Pinto, E., Almeida, A., Vasconcelos, V., Campos, A. 2017. "Analysis of the Use of Microcystin-Contaminated Water in the Growth and Nutritional Quality of the Root-Vegetable, *Daucus Carota*." *Environmental Science and Pollution Research* 24(1): 752–64.
- McElhiney, Jacqui., and Linda A. Lawton. 2005. "Detection of the Cyanobacterial Hepatotoxins Microcystins." *Toxicology and Applied Pharmacology* 203(3 SPEC. ISS.): 219–30.
- O'Neil, J. M., T. W. Davis, M. A. Burford, and C. J. Gobler. 2012. "The Rise of Harmful Cyanobacteria Blooms: The Potential Roles of Eutrophication and Climate Change." *Harmful Algae* 14: 313–34.
- Oikonomou, Andreas., Katsiapi, Matina., Karayanni, Hera., Moustaka-Gouni, Maria., Kormas, Konstantinos Ar. 2012. "Plankton Microorganisms Coinciding with Two Consecutive Mass Fish Kills in a Newly Reconstructed Lake." *The Scientific World Journal* 2012: 1–14.
<http://www.hindawi.com/journals/tswj/2012/504135/>.
- Papadimitriou, Th., Katsiapi, M., Kormas, K. Ar., Moustaka-Gouni, M.,

- Kagalou I. 2013. "Artificially-Born 'Killer' Lake: Phytoplankton Based Water Quality and Microcystin Affected Fish in a Reconstructed Lake." *Science of the Total Environment* 452–453: 116–24.
- Perron, Marie Claude., Qiu, Baosheng., Boucher, Nathalie., Bellemare, François., Juneau, Philippe. 2012. "Use of Chlorophyll a Fluorescence to Detect the Effect of Microcystins on Photosynthesis and Photosystem II Energy Fluxes of Green Algae." *Toxicon* 59: 567–77.
- Pflugmacher, Stephan. 2002. "Possible Allelopathic Effects of Cyanotoxins, with Reference to Microcystin-LR, in Aquatic Ecosystems." *Environmental Toxicology* 17: 407–13.
- Pflugmacher, Stephan., Marika, Aulhorn., and Bernhard Grimm. 2007. "Influence of a Cyanobacterial Crude Extract Containing Microcystin-LR on the Physiology and Antioxidative Defence Systems of Different Spinach Variants." *New Phytologist* 175: 482–89.
- Rillig, Matthias C. 2004. "Arbuscular Mycorrhizae and Terrestrial Ecosystem Processes." *Ecology Letters* 7: 740–54.
- Stal Lucas J. 1995. "Physiological Ecology of Cyanobacteria in Microbial Mats and Other Communities." *New Phytologist* 131: 1–32.
- Taiz, Lincoln., and Eduardo Zeiger. 2010. 1 Sinauer Associates *Plant Physiology (Fifth Edition)*.
- Waterman, Peter G., and Simon Mole. 1994. "Analysis of Phenolic Plant Metabolites." *Methods in ecology*: 238.
- Whitton, Brian A., and Malcolm Potts. 2012. "Introduction to the Cyanobacteria." *Ecology of Cyanobacteria II: Their Diversity in Space and Time* 9789400738: 1–13.
- Zalidis, George C., Takavakoglou, Vasilios., Panoras, Athanasios., Bilas, George., Katsavouni, Sotiria. 2004. "Re-Establishing a Sustainable Wetland at Former Lake Karla, Greece, Using Ramsar Restoration Guidelines." *Environmental Management* 34: 875–86.
- Χα Ιμπραχίμ-Αβραάμ, Πετρόπουλος Σπύρος, 2014. Γενική Λαχανοκομία & Υπαίθρια Καλλιέργεια Λαχανικών. Πανεπιστημιακές Εκδόσεις Θεσσαλίας, Βόλος.

Νεβεσκιώτης Χαρίσιος Θ. 2010. Μελέτη της υπό ανασύσταση λίμνης Κάρλας με μεθόδους υπολογιστικής ρευστομηχανικής. Παραμετρική διερεύνηση και περιβαλλοντική αποτίμηση. Μεταπτυχιακή Διατριβή.