



ΠΑΝΕΠΙΣΤΗΜΙΟ ΘΕΣΣΑΛΙΑΣ
ΣΧΟΛΗ ΓΕΩΠΟΝΙΚΩΝ ΕΠΙΣΤΗΜΩΝ
ΤΜΗΜΑ ΓΕΩΠΟΝΙΑΣ ΦΥΤΙΚΗΣ ΠΑΡΑΓΩΓΗΣ ΚΑΙ ΑΓΡΟΤΙΚΟΥ
ΠΕΡΙΒΑΛΛΟΝΤΟΣ
ΕΡΓΑΣΤΗΡΙΟ ΖΙΖΑΝΙΟΛΟΓΙΑΣ

ΠΤΥΧΙΑΚΗ ΔΙΑΤΡΙΒΗ

“Το σύστημα: καλαμπόκι- μυκόρριζες- μικροκυστίνες”



Μαρμαρά Μητροπούλου Χριστίνα Ειρήνη

Επιβλέπουσα καθηγήτρια: Λεβίζου Ευθυμία

-ΒΟΛΟΣ 2018-

<<Το σύστημα: καλαμπόκι- μυκόρριζες- μικροκυστίνες>>

ΜΑΡΜΑΡΑ ΜΗΤΡΟΠΟΥΛΟΥ ΧΡΙΣΤΙΝΑ ΕΙΡΗΝΗ

Μέλη Τριμελούς Εξεταστικής Επιτροπής

ΕΥΘΥΜΙΑ ΛΕΒΙΖΟΥ (Επιβλέπουσα)

Επίκουρη Καθηγήτρια, Τμήμα Γεωπονίας Φυτικής Παραγωγής και Αγροτικού Περιβάλλοντος, Πανεπιστήμιο Θεσσαλίας

ΝΙΚΟΛΑΟΣ ΔΑΝΑΛΑΤΟΣ

Καθηγητής, Τμήμα Γεωπονίας Φυτικής Παραγωγής και Αγροτικού Περιβάλλοντος, Πανεπιστήμιο Θεσσαλίας

ΚΩΝΣΤΑΝΤΙΝΟΣ ΚΟΡΜΑΣ

Καθηγητής, Τμήμα Γεωπονίας Ιχθυολογίας και Υδάτινου Περιβάλλοντος, Πανεπιστήμιο Θεσσαλίας

Ευχαριστίες

Θα θελα να ευχαριστήσω θερμά την καθηγήτρια κα. Έφη Λεβίζου κυρίως για την εμπιστοσύνη και την υπομονή της, όπως επίσης και για την πολύτιμη βοήθεια και καθοδήγηση της κατά την εκτέλεση του πειράματος και συγγραφή της παρούσας πτυχιακής διατριβής.

Επίσης, θα ήθελα να εκφράσω τις ευχαριστίες μου στον καθηγητή κ. Κωνσταντίνο Κορμά για την σημαντική βοήθειά και τις συμβουλές του κατά την εκτέλεση του πειράματος.

Τέλος, θερμές ευχαριστίες απευθύνω στον καθηγητή κ. Νικόλαο Δαναλάτο ως μέλος της τριμελούς επιτροπής, καθώς και σε όλους του καθηγητές του πανεπιστημίου για τις πολύτιμες γνώσεις που μου προσέφεραν όλα αυτά τα χρόνια.

Περίληψη

Οι μικροκυστίνες είναι μία ομάδα κυανοτοξινών που εμφανίζονται σε σχετικά στάσιμα νερά με έντονη παρουσία ορισμένων ειδών τοξικών κυανοβακτηρίων. Σύμφωνα με τη σχετική βιβλιογραφία επηρεάζουν αρνητικά την ανάπτυξη και τις φυσιολογικές διεργασίες των φυτών όταν εισέρχονται στους φυτικούς ιστούς μέσω του αρδευτικού νερού. Τα μυκορριζικά συστήματα από την άλλη ενισχύουν την ανάπτυξη των φυτών, μέσω κυρίως της αυξημένης πρόσληψης θρεπτικών. Μέχρι τώρα δεν υπάρχουν εργασίες που να συνδυάζουν τους δύο αυτούς παράγοντες. Σκοπός της παρούσας πτυχιακής διατριβής είναι η αξιολόγηση της επίδρασης των μικροκυστινών (MC) στο καλαμπόκι (*Zea mays*), σε συνδυασμό με τις μυκόρριζες. Τα φυτά εκτέθηκαν σε διάλυμα μικροκυστινών συγκέντρωσης 30μg/l, ξεκινώντας από το στάδιο του σπέρματος και για 8 εβδομάδες. Κατά την τελική συλλογή έγιναν μετρήσεις αναπτυξιακών και βιοχημικών παραμέτρων. Από την απουσία διαφορών μεταξύ των δύο μεταχειρίσεων (MC+ και MC-), συμπεραίνουμε ότι οι μικροκυστίνες δεν επέδρασαν αρνητικά στην ανάπτυξη του καλαμποκιού, στην συγκέντρωση που χρησιμοποιήσαμε και μέχρι το στάδιο ολοκλήρωσης της παρακολούθησης του.

Summary

Microcystins are a group of cyanotoxins found in water bodies with increased abundance of certain toxic species of cyanobacteria. According to the relevant literature microcystins have a negative effect on the growth and physiological processes of the plant when entering the plant tissues with the irrigation water. Mycorrhizal fungi on the other hand promote plant growth, mainly through increased nutrient uptake. Until now there are not any studies combining these two factors. The aim of the present dissertation was the assessment of the effects of microcystins on maize (*Zea mays*), while mycorrhizal symbiosis is present. The plants were exposed to microcystins (30μg/l) from the stage of seeds and for a period of 8 weeks. After the final harvest a number of growth and biochemical measurements were performed.

No statistically significant differences between the various treatments were recorded. Therefore, we conclude that microcystins did not have a negative effect on maize growth at the concentration used and for the specific time period that maize growth was followed.

Περιεχόμενα

1. Εισαγωγή	8
1.1. Μικροκυστίνες	8
1.1.1. Τι είναι οι μικροκυστίνες.....	8
1.1.2. Δομή μικροκυστινών	8
1.1.3. Επιπτώσεις των μικροκυστινών στους οργανισμούς.....	9
1.1.4. Μικροκυστίνες στο αρδευτικό νερό	10
1.1.5. Επιδράσεις των μικροκυστινών στα φυτά.....	10
1.1.6. Ανθεκτικότητα των μικροκυστινών.....	12
1.1.7. Μελλοντικές κατευθύνσεις	12
1.2. Μυκόρριζες.....	13
1.2.1. Τι είναι και ποιος ο ρόλος των μυκορριζών	13
1.2.2. Η ρύπανση του περιβάλλοντος και οι μικόρριζες	13
1.2.3. Ταξινόμηση των μικορριζών.....	13
1.2.4. Ενδομυκόρριζες, δομή και ρόλος	14
1.3. Σκοπός του πειράματος	15
2. Υλικά και Μέθοδοι.....	16
2.1. Εγκατάσταση και σχεδιασμός του πειράματος	16
2.2. Μετρήσεις κατά την τελική συλλογή	18
2.3. Μέτρηση χλωροφυλλών	18
2.4. Μέτρηση προλίνης	19
2.5. Στατιστική επεξεργασία.....	20
3. Αποτελέσματα	21
3.1. Μορφολογικά χαρακτηριστικά	21
3.2. Βιοχημικά χαρακτηριστικά	27
4. Συζήτηση	29

5. Συμπεράσματα	33
6. Βιβλιογραφία.....	34

Κεφάλαιο 1 – Εισαγωγή

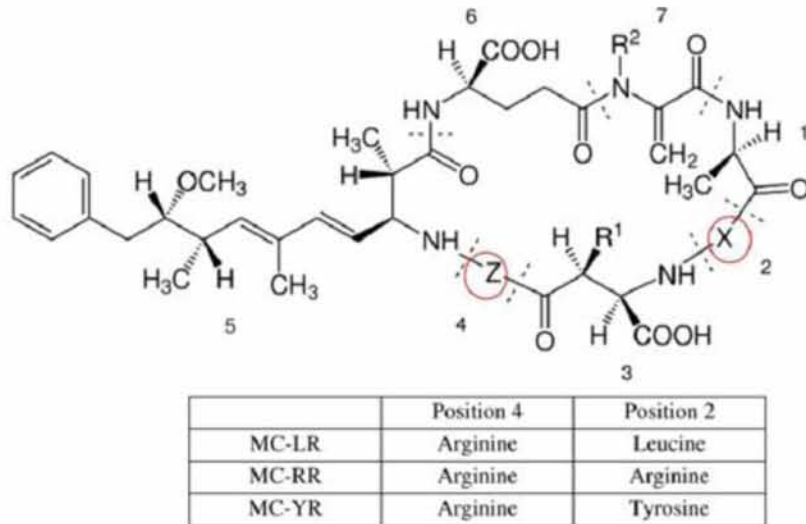
1.1.Μικροκυστίνες

1.1.1 Τι είναι οι μικροκυστίνες

Τα κυανοβακτήρια είναι φωτοσυνθετικοί οργανισμοί και αποικίζουν υδάτινα σώματα με χαμηλή ή μηδενική ρευμάτωση όπως λίμνες και δεξαμενές. Η αύξηση των αποικιών τους ευνοείται ιδιαίτερα όταν το νερό είναι ζεστό και πλούσιο σε θρεπτικά συστατικά και εμφανίζουν εποχιακές κυανοβακτηριακές ανθίσεις. Πολλά είδη κυανοβακτηρίων παράγουν τοξίνες. Οι κυανοτοξίνες ουσιαστικά είναι ενδοτοξίνες που περιέχονται στα ζωντανά κύτταρα, οι οποίες μπορούν να απελευθερωθούν στο υδάτινο περιβάλλον κατά τη γήρανση, τον θάνατο και τη λύση των κυττάρων. Οι κυανοτοξίνες μπορούν να ταξινομηθούν σε τέσσερις οικογένειες σύμφωνα με τα όργανα στα οποία ενεργούν: Νευροτοξίνες (νευρικό σύστημα), ηπατοτοξίνες (συκώτι), κυτοτοξίνες (διάφορα όργανα: ήπαρ, νεφρά, επινεφρίδια, λεπτό έντερο) και δερματοτοξίνες (ερεθιστικές τοξίνες). Οι ηπατοτοξίνες χωρίζονται σε δύο ομάδες: τις νοντουλαρίνες (NOD) και τις μικροκυστίνες (MCs) (Corbel et al. 2014).

1.1.2. Δομή μικροκυστινών

Οι μικροκυστίνες είναι κυκλικά πεπτιδία, που περιέχουν επτά αμινοξέα με μοριακό βάρος από 900 έως 1200. Πρόκειται για την πιο άφθονη ομάδα κυανοτοξινών καθώς παρουσιάζεται στο 50-75% των κυανοβακτηριακών ανθίσεων παγκοσμίως. Η *Εικόνα 1*. δείχνει τη γενική δομή που μοιράζονται όλες οι μικροκυστίνες. Τα επτά αμινοξέα αριθμούνται με μεταβλητά τμήματα που απεικονίζονται ως X, Z, R1 και R2. Συνολικά έχουν καταγραφεί πάνω από 80 ανάλογα (Butler et al. 2009).



Εικόνα 1. Γενική δομή μικροκυστινών (Gutiérrez-Praena et al., 2013)

Για την ονομασία των μικροκυστινών χρησιμοποιούνται για συντομογραφία δύο γράμματα που αντιστοιχούν στα δύο αμινοξέα που υποκαθίστανται στις θέσεις X και Z (Butler et al. 2009).

1.1.3. Επιπτώσεις των μικροκυστινών στους οργανισμούς

Σε ότι αφορά τα έως τώρα εξετασθέντα ζωικά είδη, έχει αναφερθεί ηπατοτοξική δράση σε ψάρια, πουλιά και οικόσιτα ζώα. Ο μηχανισμός δράσης στους οργανισμούς είναι ο ίδιος, καθώς οι μικροκυστίνες αναστέλλουν την πρωτεϊνική φωσφατάση, η οποία προκαλεί κυρίως ηπατική βλάβη, αλλά επηρεάζει και άλλα όργανα. Οι μικροκυστίνες μπορούν να προκαλέσουν επίσης αύξηση των καρκινικών κυττάρων (Butler et al. 2009).

Αποδείχθηκε ότι οι MCs έχουν αλληλοπαθητική δράση στους υδάτινους μικροοργανισμούς, όπως επίσης στα μακροφύκη και τα ανώτερα υδρόβια φυτά. Για παράδειγμα ο *Microcystis* sp., ο οποίος παράγει MCs, ανέστειλε σημαντικά την ανάπτυξη του *Peridinium gatunense*, μικροοργανισμού του γλυκού νερού, αυτό αποδίδεται στην απέκκριση αλληλοπαθητικών ουσιών και όχι στον επιτυχή ανταγωνισμό για τα θρεπτικά συστατικά (Hu et al. 2005). Οι MCs έχουν τη δυνατότητα να ασκούν τοξικές επιδράσεις στην ανάπτυξη και

τις φυσιολογικές διεργασίες, οι οποίες όλες θα μπορούσαν να σχετίζονται με την αναστολή της δραστηριότητας της πρωτεϊνικής φωσφατάσης ή του οξειδωτικού στρες σε υφάλμυρα βρύα και σε ανώτερα υδρόβια φυτά (Corbel et al. 2014).

1.1.4. Μικροκυστίνες στο αρδευτικό νερό

Η χρήση νερού από πηγές που περιέχουν κυανοβακτήρια και τοξίνες για την άρδευση των φυτών προκαλεί αρνητικές επιδράσεις στην ανάπτυξη τους (Corbel et al. 2014). Ταυτοχρόνως εγκυμονεί πιθανούς κινδύνους για την υγεία άλλων οργανισμών μέσω διαφόρων οδών έκθεσης, λόγω της βιοσυσσώρευσης των τοξινών και της εισόδου τους έτσι στην τροφική αλυσίδα. Έχουν αναφερθεί σε διάφορες περιοχές (συμπεριλαμβανομένης της Τουρκίας, της Ινδίας, Τυνησίας, Φιλανδίας και άλλες) στα επιφανειακά ύδατα που χρησιμοποιούνται ως πηγή άρδευσης, συνολικές συγκεντρώσεις MC από 4-50 $\mu\text{g L}^{-1}$, μέχρι 6500 $\mu\text{g L}^{-1}$. Αυτές οι πολύ υψηλές συγκεντρώσεις κυανοτοξινών συσχετίζονται συνήθως με κυανοβακτηριακές ανθήσεις που οδηγούν σε πολύ πυκνή κυανοβακτηριακή βιομάζα (Corbel et al. 2014).

Το πλούσιο σε κυανοτοξίνες αρδευτικό νερό φαίνεται να είναι η κύρια πηγή τοξινών για το φυτικό σώμα. Η είσοδος γίνεται από τις ρίζες και μέσω αυτών η τοξίνη μεταφέρεται στα υψηλότερα μέρη του φυτού και στα φύλλα. Μπορεί επίσης να γίνει απευθείας πρόσληψη μέσω των φύλλων με άμεση επαφή των μικρών φυτών ή των χαμηλότερων φύλλων ενός φυτού με τα επιφανειακά μολυσμένα ύδατα και των ανώτερων φύλλων με επιφανειακό ψεκασμό (Corbel et al. 2014).

1.1.5 Επιδράσεις των μικροκυστινών στα φυτά

Στους φυτικούς οργανισμούς, οι μικροκυστίνες έχουν αποδειχθεί ισχυροί και ειδικοί αναστολείς πρωτεϊνικών φωσφατασών τύπου 1 και 2A. Οι πρωτεΐνες αυτές εμπλέκονται σε αρκετές φυσιολογικές και μοριακές διεργασίες στα ανώτερα φυτά. Πράγματι μελέτες έδειξαν ότι οι μικροκυστίνες

έχουν πολλές επιζήμιες επιδράσεις στη φυσιολογία και τον μεταβολισμό των φυτών όταν εισάγονται επαρκή επίπεδα τοξινών (Corbel et al. 2014, Saqrane et al. 2008). Η τοξικότητά τους στα φυτά φαίνεται να συνδέεται επίσης με την επαγωγή οξειδωτικού στρες που εκδηλώνεται με την αυξημένη παραγωγή ενεργών ριζών οξυγόνου (reactive oxygen species, ROS) (Corbel et al. 2014).

Οι MCs είναι γνωστό ότι επιδρούν σε μία σειρά φυτικών διεργασιών (φύτρωση σπέρματος, ανάπτυξη ρίζας, ρύθμιση του κυτταρικού κύκλου, φωτοσύνθεση) και έχουν, επομένως, σημαντική επίδραση στην ανάπτυξη και την απόδοση των καλλιεργούμενων φυτών (Corbel et al. 2014). Έχουν καταγραφεί φυτοτοξικές επιδράσεις των μικροκυστινών στην ανάπτυξη της πατάτας (*Solanum tuberosum* L.) του φασολιού (*Phaseolus vulgaris* L.) (McElhiney et al. 2001) και αρκετών άλλων σημαντικών καλλιεργούμενων φυτών (Saqrane et al. 2008).

Μελέτη της επίδρασης των μικροκυστινών στο φυτό όταν λαμβάνονται σε διάφορα αναπτυξιακά στάδια στο μαρούλι (*Lactuca sativa*) έδειξε μεγαλύτερα επίπεδα συσσώρευσης μικροκυστινών όταν ποτίζονται με μολυσμένο νερό από το στάδιο του σπέρματος (Levizou et al. 2017). Τόσο σε αυτή την περίπτωση όσο και όταν το λαμβάνουν αργότερα κατά την ανάπτυξή τους (μέχρι το στάδιο των 4 πρώτων φύλλων) η συσσώρευση των τοξινών στους ιστούς υπερβαίνει την ανεκτή ημερήσια πρόσληψη των 0,04 μg ανά kg σωματικού βάρους ανά ημέρα που συνιστά ο Παγκόσμιος Οργανισμός Υγείας. Σε άλλη μελέτη έχει αναφερθεί ότι η συσσώρευση MC-LR στους κόκκους ρυζιού βρισκόταν σε πολύ χαμηλά επίπεδα μη ικανά να προκαλέσουν προβλήματα στην υγεία του καταναλωτή (Chen et al. 2012). Οι κυανοτοξίνες πιθανό να μεταβολίζονται μερικώς κατά τη μεταφορά τους από τις ρίζες στους σπόρους ή τα φρούτα, γεγονός που μπορεί να έχει ως αποτέλεσμα το χαμηλότερο επίπεδο ανιχνεύσιμης μικροκυστίνης στους κόκκους ρυζιού (Corbel et al. 2014).

Να σημειωθεί εδώ ότι οι περισσότερες έρευνες έχουν γίνει με υδροπονικά συστήματα όπου οι ρίζες είναι σε άμεση επαφή με το διάλυμα της τοξίνης και έτσι μπορεί να υπερεκτιμάται το ποσοστό της βιοσυσσώρευσης. Πέρα από την εσωτερική συσσώρευση μικροκυστινών, η άρδευση μπορεί να οδηγήσει και στην συγκέντρωση τοξινών στην εξωτερική επιφάνεια των βρώσιμων

φυτικών υλικών όταν το μολυσμένο νερό στεγνώσει πάνω στις φυτικές επιφάνειες ή όταν παγιδευτεί στο εσωτερικό, όπως αναφέρθηκε για το μαρούλι (Codd et al. 1999).

1.1.6. Ανθεκτικότητα των μικροκυστινών

Οι μικροκυστίνες είναι εξαιρετικά σταθερές ενώσεις και μπορεί να παραμείνουν στο υδάτινο σύστημα για εβδομάδες μετά την απελευθέρωσή τους από τα κύτταρα. Σε φυσικές συνθήκες θα μπορούσαν να παραμείνουν για αρκετούς μήνες ή χρόνια. Αντιστέκονται στην κοινή χημική διάσπαση, όπως η υδρόλυση ή η οξειδωση κάτω από συνθήκες που βρίσκονται στα περισσότερα φυσικά υδατικά συστήματα. Οι μικροκυστίνες μπορούν ακόμη να παραμείνουν μετά το βρασμό, υποδεικνύοντας ότι το μαγείρεμα δεν είναι αρκετό για να τις καταστρέψει (Butler et al. 2009). Σε τυπικές συνθήκες περιβάλλοντος η ημιζωή αυτών είναι 10 εβδομάδες. Επίσης, παραμένουν στο έδαφος για σχετικά μεγάλες χρονικές περιόδους, με χρόνο ημίσειας ζωής που κυμαίνεται από 6 έως 17,8 ημέρες (Chen et al. 2012).

1.1.7. Μελλοντικές κατευθύνσεις

Καθώς η πρόσληψη και η αντίδραση στην μικροκυστίνες είναι ειδο-ειδική, απαιτούνται περαιτέρω έρευνες σχετικά με την απορρόφηση από τα φυτά και την συσσώρευση αυτών των τοξινών στους βρώσιμους φυτικούς ιστούς. Ομοίως εξακολουθούν να υπάρχουν κενά στη γνώση μας σχετικά με τη δράση των κυανοτοξινών στο έδαφος όσον αφορά τη συσσώρευση/προσρόφηση, την ανθεκτικότητα και τον τρόπο υποβάθμισης του, όπως και τον αντίκτυπο στη βιολογική ζωή του εδάφους (Corbel et al. 2014).

1.2.Μυκόρριζες

1.2.1 Τι είναι και ποιος ο ρόλος των μυκορριζών

Οι μυκόρριζες είναι μια συμβιωτική σχέση, αμοιβαίας συνεργασίας μεταξύ των ριζών των φυτών και των μυκήτων. Ο κύριος ρόλος τους είναι να αυξήσουν την πρόσληψη θρεπτικών ουσιών για το φυτό ξενιστή εκμεταλλευόμενοι έναν μεγαλύτερο όγκο εδάφους από ό, τι οι ρίζες θα μπορούσαν από μόνες τους να εκμεταλλευτούν, με αντάλλαγμα φωτοσυνθετικά προϊόντα (Dighton 2009).

Οι μυκόρριζες υπάρχουν σε διάφορες μορφές. Η κατανομή αυτών των μορφών στα οικοσυστήματα σχετίζεται με τη κατανομή των φυτών-ξενιστών και τις κλιματικές συνθήκες και τις συνθήκες του εδάφους. Η ικανότητα των μυκορριζών να βελτιώσουν την πρόσληψη θρεπτικών ουσιών και νερού στα φυτά ξενιστές και να βοηθούν στην άμυνα εναντίον των παθογόνων των ριζών μπορεί να μεταβάλει την απόδοση του φυτού ξενιστή. Με διαφοροποιημένη μεταβολή της απόδοσης των επιμέρους ειδών μέσα στην κοινότητα, οι μυκόρριζες μπορούν να επηρεάσουν τη σύνθεση της φυτικής κοινότητας, να ενισχύσουν τον ανταγωνισμό και να δημιουργήσουν συνεργασία μέσω της κατανομής των πόρων μεταξύ των ειδών (Dighton 2009).

1.2.2. Η ρύπανση του περιβάλλοντος και οι μικόρριζες

Οι μυκόρριζες χρησιμοποιούνται στη γεωργία και τη δασοκομία για την βελτίωση της απόδοσης και την απαλλαγή από μερικούς ρύπους σε διαταραγμένες περιοχές. Η ικανότητα μυκορριζικών μυκήτων να συσσωρεύουν βαρέα μέταλλα τους καθιστούν πιθανά μέσα για τη βελτίωση και την αποκατάσταση μολυσμένων εδαφών (Dighton 2009).

1.2.3. Ταξινόμηση των μικορριζών

Οι μυκόρριζες διακρίνονται σε δύο κύριες ομάδες, τις εκτομυκόρριζες (ectomycorrhizal mycorrhizal, EM) και τις ενδομυκόρριζες (arbuscular mycorrhizal fungi, AMF).

Οι εκτομυκόρριζες είναι μύκητες που σχηματίζουν μυκήλια γύρω από τις ρίζες των ξενιστών τους, χωρίς να διαρρηγνύουν το κυτταρικό τοίχωμα και συνδέονται κυρίως με δέντρα εύκρατης ζώνης όπως πεύκα, λεύκες και ιτιές. Οι περισσότερες εκτομυκόρριζες μπορούν να αναπτυχθούν σε καθαρή καλλιέργεια.

Οι ενδομυκόρριζες σχηματίζουν ενώσεις με τα περισσότερα φυτά (περίπου το 80% όλων των φυτικών ειδών) αναπτύσσοντας τα μυκήλια τόσο εντός όσο και εκτός των ριζών του φυτού. Αυτοί οι μύκητες δεν μπορούν να καλλιεργηθούν σε καθαρή καλλιέργεια αλλά πρέπει να αναπτυχθούν σε συνδυασμό με τις ρίζες των φυτών (Miyasaka et al, 2003).

1.2.4. Ενδομυκόρριζες, δομή και ρόλος

Ταξινομικά, όλοι οι δενδροειδείς ενδομυκορριζικοί μύκητες (AMF) έχουν συνδεθεί με μια μονοφυλετική ομάδα μυκήτων, τη *Glomeromycota*. Θεωρούνται ζωντανά απολιθώματα, καθώς υπάρχουν ενδείξεις ότι η παρουσία τους στον πλανήτη μας χρονολογείται πριν από 460 εκατομμύρια χρόνια (Berruti et al. 2014).

Η πιο τυπική δομή των AMF, η οποία δίνει το όνομα σε αυτή την ομάδα μυκήτων, είναι το δενδροειδές σώμα (arbuscule). Αυτή η δομή, της οποίας το σχήμα θυμίζει αυτό ενός μικρού δέντρου, σχηματίζεται μέσα στα ριζικά κύτταρα, με το εξής πρότυπο: ο μύκητας διαρρηγνύει το κυτταρικό τοίχωμα αλλά όχι την κυτταροπλασματική μεμβράνη των φυτικών κυττάρων. Μέσω της

τελευταίας συμβαίνουν οι διατροφικές ανταλλαγές μεταξύ του φυτού και του μύκητα. Οι υφές αναπτύσσονται επίσης έξω από τις ρίζες των φυτών και δημιουργούν ένα δίκτυο που εκτείνεται σε μεγάλες αποστάσεις. Στο τέλος του κύκλου ζωής τους, ή σε απόκριση συγκεκριμένων περιβαλλοντικών συνθηκών, παράγονται σπόρια (Berruti et al. 2014).

Οι AMF ευνοούν τα φυτά που αποικίζουν επηρεάζοντας θετικά την πρόσληψη και μεταφορά των θρεπτικών συστατικών κάτω από συνθήκες χαμηλής εδαφικής υγρασίας ή γονιμότητας (Berruti et al. 2014). Ιδιαίτερα ευεργετικά είναι στην περίπτωση των ακίνητων θρεπτικών ουσιών με χαμηλά ποσοστά διάχυσης ή των προσκολλημένων σε σωματίδια εδάφους (φώσφορος, P) (Egerton-Warburton et al. 2005).

Οι AMF μπορεί να εξελιχθούν σε παρασιτικούς μύκητες και όχι ευεργετικούς όταν οι συνθήκες του περιβάλλοντος είναι τέτοιες που περιορίζουν σημαντικά τη φωτοσύνθεση, ή υπάρχει παροχή θρεπτικών μέσω λίπανσης στα φυτά (Miyasaka et al, 2003).

1.3. Σκοπός του πειράματος

Έχουν γίνει πολλές μελέτες σχετικά με την ωφέλιμη συμβιωτική σχέση των φυτών με τις μυκόρριζες και αρκετές ακόμα σχετικά με τις επιπτώσεις της παρουσίας των μικροκυστινών στο αρδευτικό νερό των καλλιεργειών. Σκοπός αυτού του πειράματος είναι η προσπάθεια εκτίμησης των αποκρίσεων των φυτών στην περίπτωση που αυτοί οι δύο παράγοντες συνυπάρχουν.

Κεφάλαιο 2 – Υλικά και Μέθοδοι

2.1. Εγκατάσταση και σχεδιασμός του πειράματος

Το πείραμα πραγματοποιήθηκε σε θερμοκήπιο στον χώρο της Σχολής του Τμήματος Γεωπονίας Φυτικής Παραγωγής και Αγροτικού Περιβάλλοντος του Πανεπιστημίου Θεσσαλίας. Για την εκτέλεση του πειράματος χρησιμοποιήθηκαν σπόροι καλαμποκιού (*Zea mays*). Η επιλογή αυτή έγινε χάρη στο ότι το καλαμπόκι είναι ένα γνωστό μυκορριζικό φυτό και το ότι το περιβάλλον της περιοχής είναι ευνοϊκό για την ανάπτυξη του.

Το καλαμπόκι είναι φυτό με μεταβολισμό C4. Χαρακτηριστικό αυτών των φυτών είναι ο αποδοτικότερος φωτοσυνθετικός μηχανισμός και ρυθμός καθαρής φωτοσύνθεσης των φύλλων. Ο ρυθμός καθαρής φωτοσύνθεσης πραγματοποιείται σχεδόν σε διπλάσιο βαθμό από ότι στα σιτηρά τύπου C3. Ακόμα ο κύκλος C4 ελαττώνει τη φωτοαναπνοή, ενώ σε συνθήκες υδατικής και θερμοκρασιακής κακουχίας ή και υψηλής έντασης φωτισμού συνεχίζουν να λειτουργούν αποδοτικά. Έτσι ο ρυθμός αύξησης του καλαμποκιού είναι πολύ μεγάλος.

Το μόλυσμα των μυκορριζών μας δόθηκε από το εργαστήριο Εδαφολογίας και Γεωργικής Χημείας του Τμήματος Αξιοποίησης Φυσικών Πόρων και Γεωργικής Μηχανικής (ΓΠΑ). Επρόκειτο για θραύσματα αποικισμένων (μολυσμένων) ριζών και σπόρια μυκήτων του γένους *Rhizophagus intraradices*.

Χρησιμοποιήθηκαν μικροκυστίνες (Microcystin-LR) ως καθαρές ουσίες από την εταιρία CAYMAN CHEMICAL (ΗΠΑ), με τις οποίες παρασκευάστηκε διάλυμα συγκέντρωσης 30μg/l. Το νερό πριν την ετοιμασία του διαλύματος αφηνόταν για λίγες μέρες σε ανοιχτούς κουβάδες ώστε να απομακρυνθεί το χλώριο που πιθανόν να είχε επίδραση στις MCs. Τα δοχεία που περιείχαν το διάλυμα διατηρούνταν στο ψυγείο καλυμμένα με μαύρη σακούλα για να αποφεύγεται η άμεση έκθεση στο φως.

Το χώμα που χρησιμοποιήθηκε ελήφθη από οργωμένο χωράφι από το Αγρόκτημα του Τμήματος Γεωπονίας Φυτικής Παραγωγής και Αγροτικού

Περιβάλλοντος του Πανεπιστημίου Θεσσαλίας που βρίσκεται στο Βελεστίνο Μαγνησίας. Ακολούθησε κοσκίνισμα και παστερίωση του χώματος, μέσα σε σακούλες αποστείρωσης, σε φούρνο στους 60°C για 2 ώρες.

Το καλαμπόκι σπάρθηκε 4 Απριλίου σε πλάκες φυτωρίου και ποτίζονταν καθημερινά με νερό βρύσης. Ο σπόρος ήταν διαβρεγμένος χωρίς προσθήκη εντομοκτόνου για να μην επηρεαστούν οι μυκόρριζες. Η ανάπτυξη των φυτών διήρκεσε 10 εβδομάδες και αυτή ήταν η συνολική διάρκεια του πειράματος.

Δέκα ημέρες μετά την σπορά, 24 από τα νεαρά φυτά μεταφυτεύθηκαν σε γλάστρες 3L, στις 12 από τις οποίες προστέθηκε και αναμίχθηκε ελαφρώς μικρή ποσότητα μίγματος του μολύσματος μυκορριζών με το χώμα της καθεμιάς από τις γλάστρες στις οποίες θα γινόταν η μεταφύτευση.

Από τις 28 Απριλίου οι γλάστρες χωρίστηκαν στις εξής τέσσερις ομάδες:

1. Με μυκόρριζες, χωρίς μικροκυστίνες (AMF+, MC-)
2. Με μυκόρριζες και μικροκυστίνες (AMF+, MC+)
3. Χωρίς μυκόρριζες, χωρίς μικροκυστίνες (AMF-, MC-)
4. Χωρίς μυκόρριζες, με μικροκυστίνες (AMF-, MC+)

Ανά κάθε 2^η μέρα, οι ομάδες 1 και 3 συνέχιζαν να ποτίζονται με 200 ml νερού βρύσης, ενώ οι ομάδες 2 και 4 ποτίζονταν με 200ml του διαλύματος νερού βρύσης με μικροκυστίνες σε κάθε γλάστρα.

Από τις 9 Μαΐου το πότισμα των μικροκυστινών γινόταν κάθε τέσσερις μέρες και στο ενδιάμεσο διάστημα τα φυτά ποτίζονταν με υδροδιαλυτό λίπασμα NPK με ιχνοστοιχεία και ενεργοποιητές (16-8-24+ 3, BEST, της Φυτοθεραπευτικής).

2.2. Μετρήσεις κατά την τελική συλλογή

Η πειραματική διαδικασία ολοκληρώθηκε στις 10 Ιουνίου με την σταδιακή κοπή των υπέργειων τμημάτων των φυτών και ακολούθησε η λήψη των μετρήσεων. Αρχικά έγινε διαχωρισμός των φύλλων από τον βλαστό, καθώς και μέτρηση του ύψους και του βάρους αυτού με ζυγαριά ακριβείας. Στη συνέχεια, τα φύλλα και οι βλαστοί αποξηράνθηκαν στον φούρνο (60°C) για 2 ημέρες και ζυγίστηκε το ξηρό τους βάρος. Επιπλέον μετρήθηκε η επιφάνεια των φύλλων με πρόγραμμα ανάλυσης εικόνας και το βάρος τους.

Για να διαχωριστεί το χώμα από την ρίζα τοποθετήθηκε σακούλα μεταξύ της γλάστρας και της μπάλας χώματος. Ακολούθησε η εξαγωγή και ο καθαρισμός των ριζών. Μετά την αποξήρανση των ριζών στον φούρνο έγινε η ζύγιση του ξηρού τους βάρους.

2.3. Μέτρηση χλωροφυλλών

Με φελλοτρυπητήρα (No 4) έγινε η κοπή τεσσάρων δισκίων, επιφανείας 2,008 cm², από τα δείγματα των φύλλων κάθε φυτού (από το μέσον των ώριμων φύλλων) που βρισκόντουσαν στην κατάψυξη. Με ένα γουδί έγινε η διάλυση των δισκίων αυτών, με παρουσία μικρής ποσότητας άμμου, ανθρακικού οξέος (για την ρύθμιση του PH) και 0,5 ml ακετόνης 80%. Με σταδιακή προσθήκη ακετόνης 80% συνολικού όγκου 5 ml, μεταφέρθηκε όλο το υλικό από το γουδί σε δοκιμαστικό σωλήνα ο οποίος καλύφθηκε με παραφίλμ για να αποφευχθεί η εξάτμιση του διαλύματος. Μετά την ολοκλήρωση των 24 εκχυλίσεων ακολουθούσε η φυγοκέντρηση των διαλυμάτων (10' στις 4,000στρ/λεπτό) και η μέτρηση του τελικού όγκου. Η μέτρηση των χλωροφυλλών ολοκληρώθηκε με την χρήση του φασματοφωτόμετρου και των εξισώσεων των Licenthaler and Welburn (1983). Τα αποτελέσματα των μετρήσεων ήταν για τέσσερα μήκη κύματος (720 λ, 663 λ, 646λ και 470λ), ξεχωριστά για καθένα από τα 24 δείγματα.

$$c_a = 12.21A_{663} - 2.81A_{646}$$

$$c_b = 20.13A_{646} - 5.03A_{663}$$

$$c_{x+c} = \frac{1000A_{470} - 3.27c_a - 104c_b}{229}$$

όπου

A_λ , η απορρόφηση σε μήκος κύματος λ

c_a , η συγκέντρωση της χλωροφύλλης a, $\mu\text{g/ml}$ διαλύματος

c_b , η συγκέντρωση της χλωροφύλλης b, $\mu\text{g/ml}$ διαλύματος

c_{x+c} , η συγκέντρωση των συνολικών καροτενοειδών (ξανθοφύλλες + καροτένια), $\mu\text{g/ml}$ διαλύματος.

2.4. Μέτρηση προλίνης

Για την μέτρηση της προλίνης εφαρμόστηκε η μέθοδος όξινης νινυδρίνης (Bates 1973). Αρχικά έγινε η εκχύλιση 220 gr νωπού δείγματος, με 3% σουλφοσαλικυλικού οξέος, σε μικρό σωλήνα φυγόκεντρου με πώμα, τελικού όγκου 10 ml. Η διαδικασία επαναλήφθηκε για κάθε ένα από τα 24 δείγματα. Οι σωλήνες αυτοί εισήχθησαν σε λουτρό νερού 60°C με ταυτόχρονη ανακίνηση για 30 λεπτά. Για την ετοιμασία του διαλύματος όξινης νινυδρίνης αναδεύτηκαν με ελαφρά θέρμανση 0,63 gr νινυδρίνης, 15 ml οξικού οξέος και 10 ml 6M ορθοφωσφορικού οξέος. Για την προστασία της νινυδρίνης από το φώς το διάλυμα ήταν καλυμμένο με φύλλο αλουμινίου. Σε άλλους όμοιους σωλήνες προστέθηκαν 2 ml του εκχυλίσματος, 2 ml του αντιδραστηρίου της όξινης νινυδρίνης και 2 ml οξικού οξέος. Μετά την σφράγιση τους επωάστηκαν σε υδατόλουτρο στους 100°C για μία ώρα και στην συνέχεια μεταφέρθηκαν σε πάγο. Το περιεχόμενο των σωλήνων μεταγγίστηκε σε μεγάλους δοκιμαστικούς σωλήνες και προστέθηκε 4ml τολουολίου με ανάδευση για 15 δευτερόλεπτα. Κατά αυτή την διαδικασία επιτεύχθηκε διαχωρισμός φάσεων. Από την υδατική φάση που παρέμεινε στην βάση του σωλήνα διαχωρίστηκε το ελαφρώς χρωματιστό διάλυμα το οποίο περιείχε τολουόλιο. Αυτό το υπερκείμενο υγρό παρελήφθη ώστε να μετρηθεί η απορρόφηση με φασματοφωτόμετρο στα 520 nm, με τυφλό τολουόλιο.

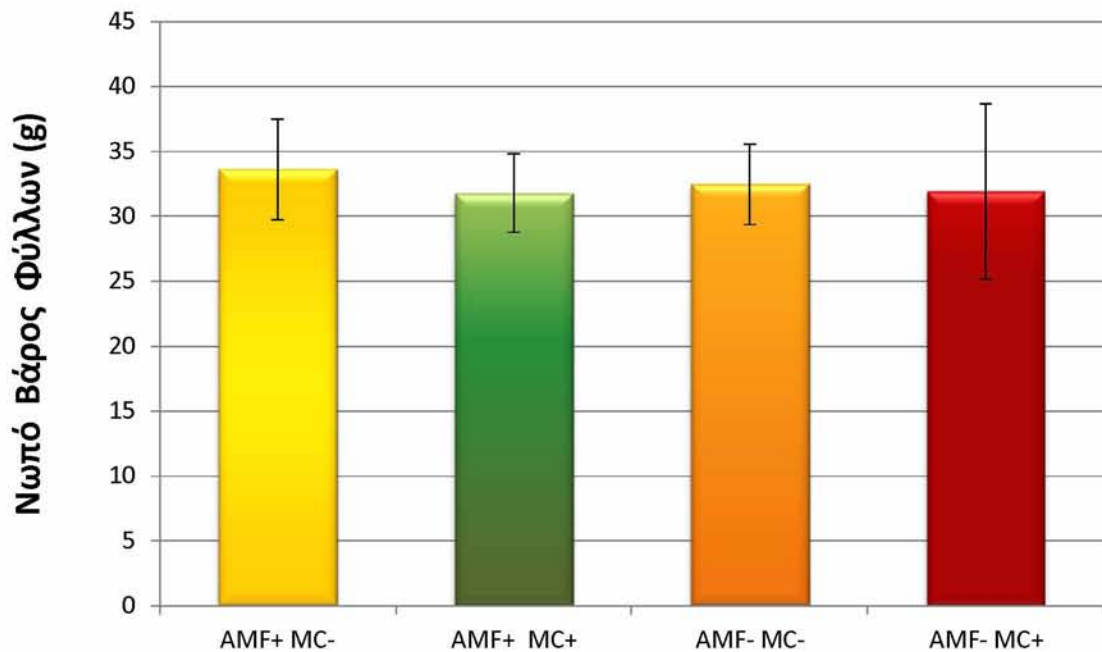
2.5. Στατιστική επεξεργασία

Για τη στατιστική ανάλυση χρησιμοποιήθηκε το στατιστικό πακέτο IBM SPSS Statistics version 21.0 for Windows (IBM Corp). Ο έλεγχος των στατιστικώς σημαντικών διαφορών, με σκοπό να προσδιοριστούν οι διαφορές μεταξύ των μεταχειρίσεων, έγινε με Two-way ANOVA.

Κεφάλαιο 3 – Αποτελέσματα

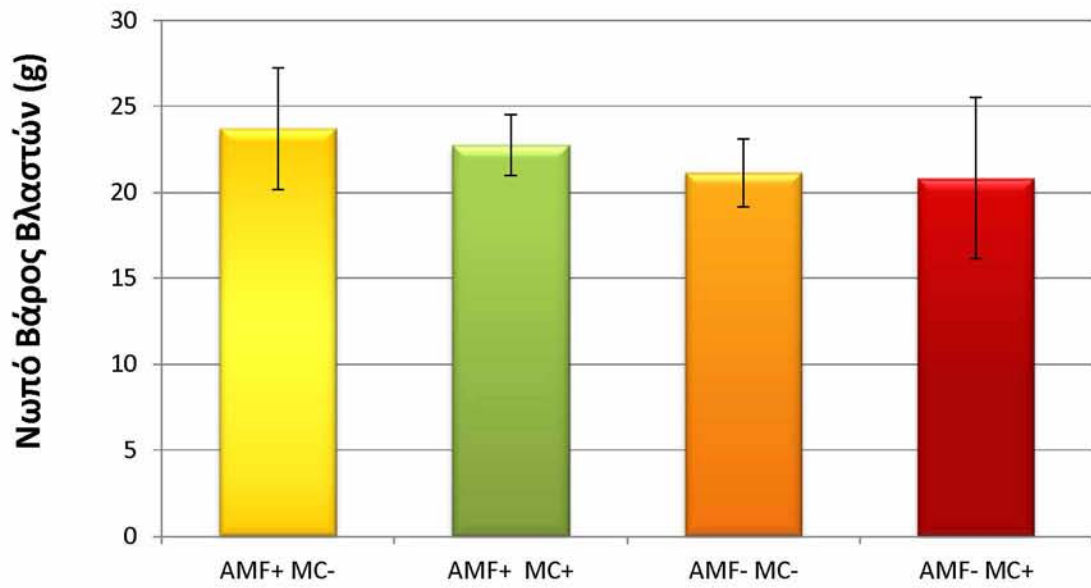
Σε αυτό το κεφάλαιο παρουσιάζονται τα αποτελέσματα που προέκυψαν από τις μετρήσεις διαφόρων αναπτυξιακών χαρακτηριστικών των φυτών που αναπτύχθηκαν με ή χωρίς την παρουσία μυκορριζών και μικροκυστινών.

3.1. Μορφολογικά χαρακτηριστικά



Σχήμα 1: Νωπό βάρος φύλλων των διαφόρων μεταχειρίσεων (Μ.Ο. ± SD).

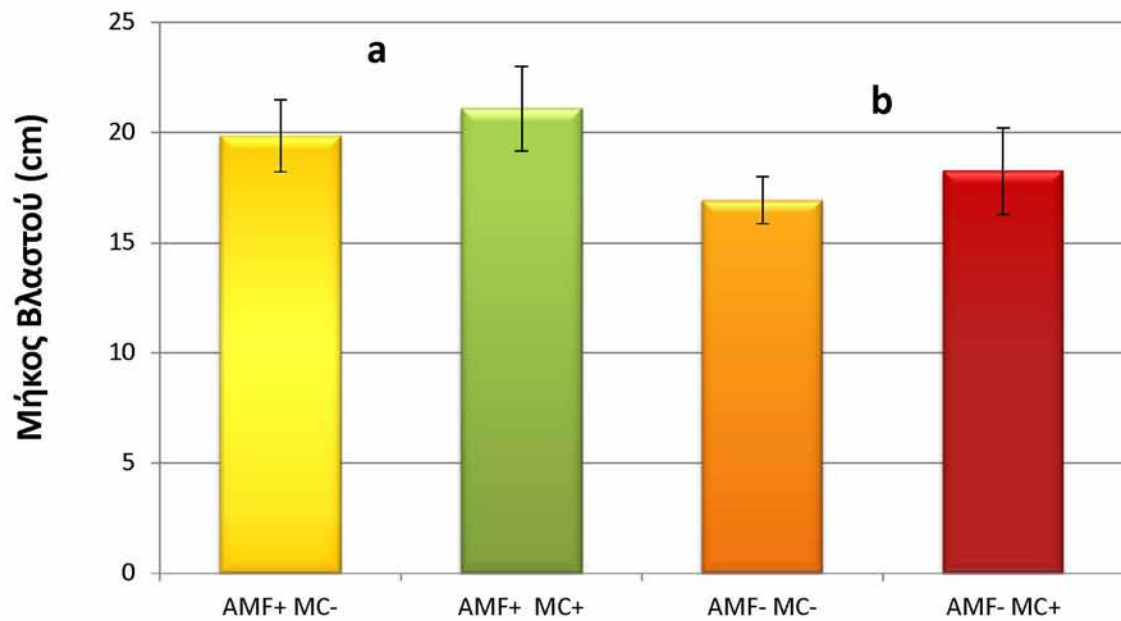
Κατά την τελική συλλογή η μέτρηση του νωπού βάρους των φύλλων του καλαμποκιού δεν έδειξε στατιστικά σημαντική διαφορά μεταξύ των διαφορετικών μεταχειρίσεων (Σχήμα 1).



Σχήμα 2: Νωπό βάρος βλαστών των διαφόρων μεταχειρίσεων (Μ.Ο. \pm SD).

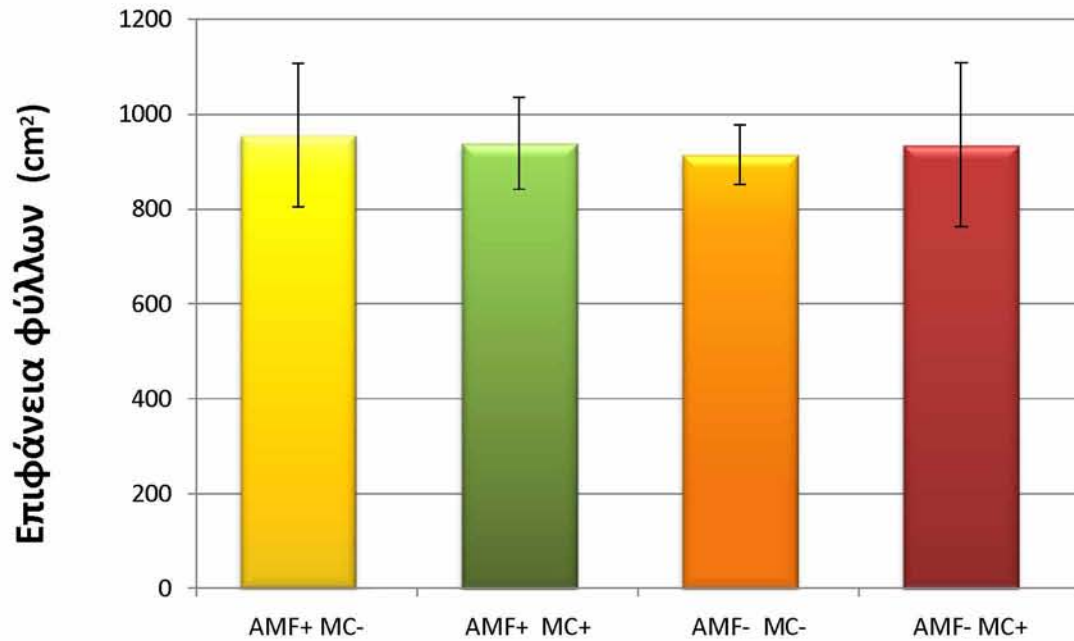
Αντίστοιχα το νωπό βάρος των βλαστών μεταξύ των μεταχειρίσεων δεν διέφερε στατιστικώς σημαντικά. Τα φυτά AMF+MC- τα οποία αναπτύχθηκαν μόνο με μυκόρριζες εμφάνισαν μία τάση για μεγαλύτερο νωπό βάρος (Σχήμα 2).

Το Σχήμα 3 αφορά το μήκος των βλαστών και όπως προέκυψε από την ανάλυση Two-way ANOVA υπάρχουν στατιστικά σημαντικές διαφορές μεταξύ των φυτών που αναπτύχθηκαν με παρουσία μυκορριζών και των φυτών που αναπτύχθηκαν χωρίς την παρουσία αυτών στο ριζικό τους σύστημα (AMF+, AMF-). Οι ομάδες AMF+ εμφάνισαν μεγαλύτερο μήκος βλαστών, ανεξαρτήτως της παρουσίας MC, σε σχέση με τις ομάδες AMF-.



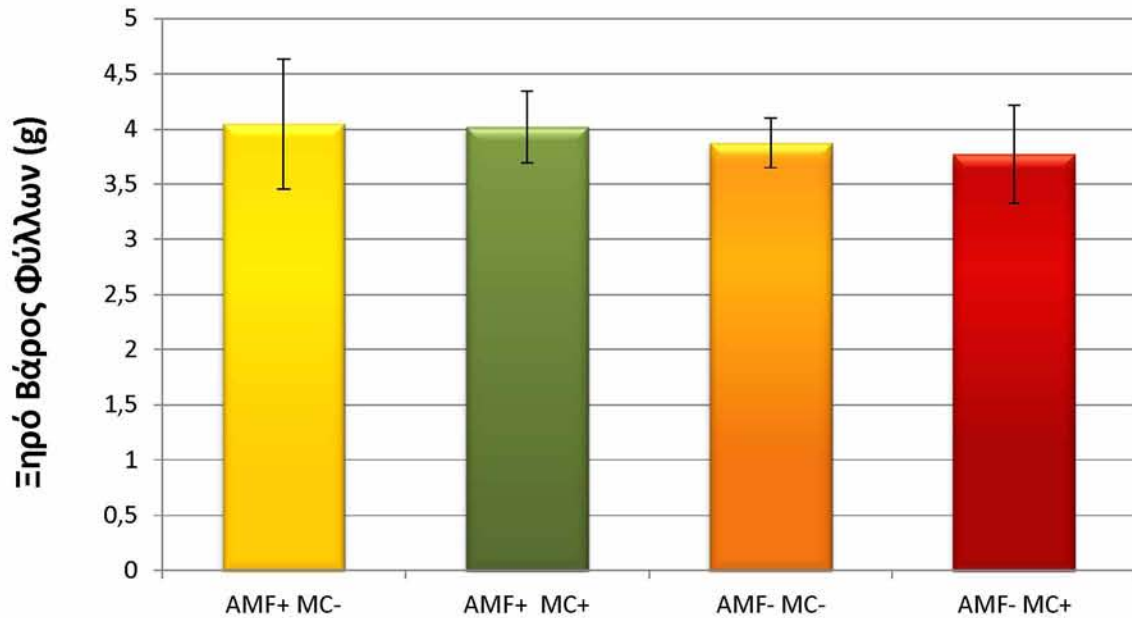
Σχήμα 3: Μήκος βλαστών των διαφόρων μεταχειρίσεων (M.O. ± SD). Τα διαφορετικά γράμματα υποδεικνύουν στατιστικώς σημαντικές διαφορές σε επίπεδο $p < 0.05$.

Δεν παρατηρήθηκαν στατιστικά σημαντικές διαφορές στη συνολική επιφάνεια των φύλλων μεταξύ των φυτών των διάφορων μεταχειρίσεων (Σχήμα 4).

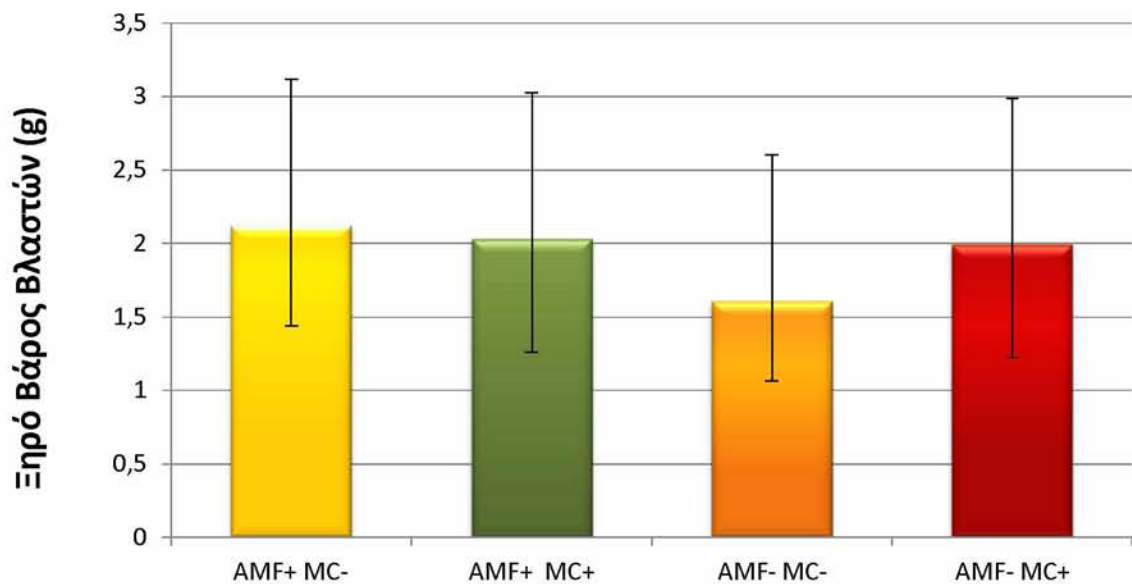


Σχήμα 4: Συνολική επιφάνεια φύλλων των φυτών διάφορων μεταχειρίσεων (Μ.Ο.± SD).

Η συσσώρευση βιομάζας δεν φαίνεται να επηρεάστηκε από κανέναν από τους δύο παράγοντες του πειράματος, την παρουσία μικροκυστινών και μυκορριζικών συστημάτων, όπως αποτυπώνεται στο Σχήμα 5.

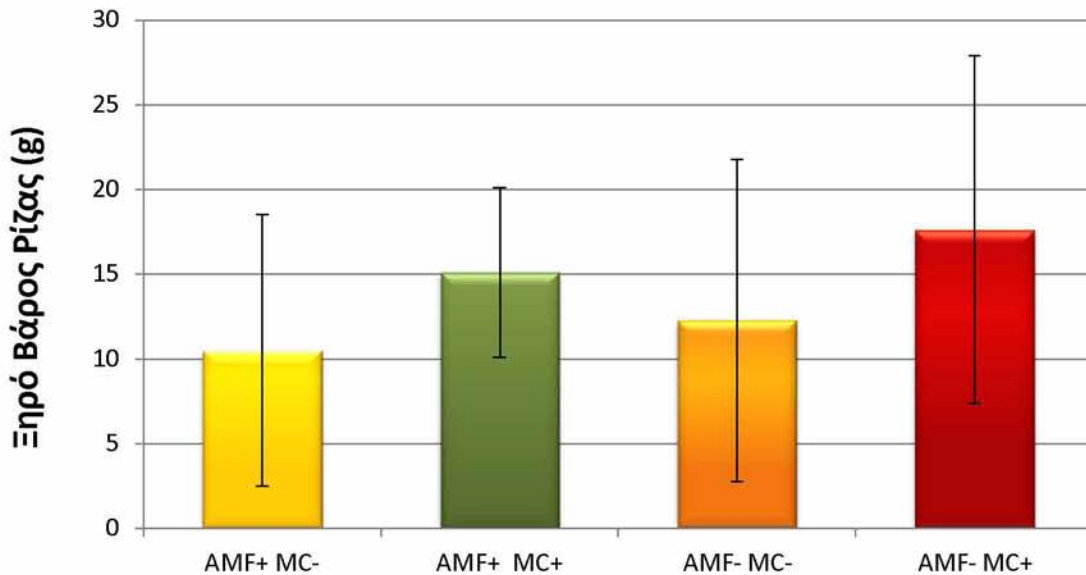


Σχήμα 5: Ξηρό βάρος φύλλων στις διάφορες μεταχειρίσεις (Μ.Ο. ± SD).



Σχήμα 6: Ξηρό βάρος βλαστών στις διάφορες μεταχειρίσεις (Μ.Ο. ± SD).

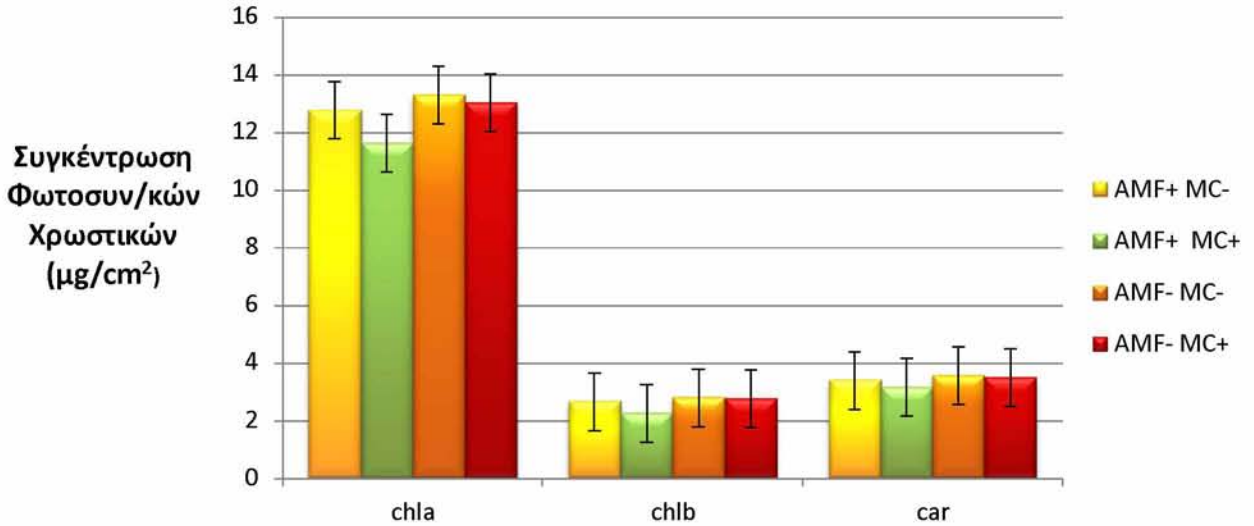
Από τις μετρήσεις του ξηρού βάρους των βλαστών των διάφορων μεταχειρίσεων, δεν προέκυψαν στατιστικά σημαντικές διαφορές. Μια τάση για αυξημένο βάρος παρουσιάζουν τα φυτά της ομάδας AMF+MC-, ενώ το χαμηλότερο ξηρό βάρος είναι αυτό της ομάδας AMF-MC- (Σχήμα 6).



Σχήμα 7: Ξηρό βάρος ρίζας στις διάφορες μεταχειρίσεις (Μ.Ο. ± SD).

Σε ότι αφορά την ανάπτυξη των ριζών παρατηρήθηκε μία τάση τα φυτά με μικροκυστίνη (MC+) να έχουν μεγαλύτερη βιομάζα στη ρίζα, ανεξαρτήτως της παρουσίας AMF. Εντούτοις, δεν προέκυψαν στατιστικά σημαντικές διαφορές μεταξύ των μεταχειρίσεων. Τα φυτά που αναπτύχθηκαν με μικροκυστίνες και χωρίς μυκόρριζες είχαν αυξημένη ανάπτυξη των ριζών, σε αντίθεση με τα φυτά που στο ριζικό τους σύστημα υπήρχαν, από τα πρώτα στάδια ανάπτυξης τους, αποικίες μυκορριζών.

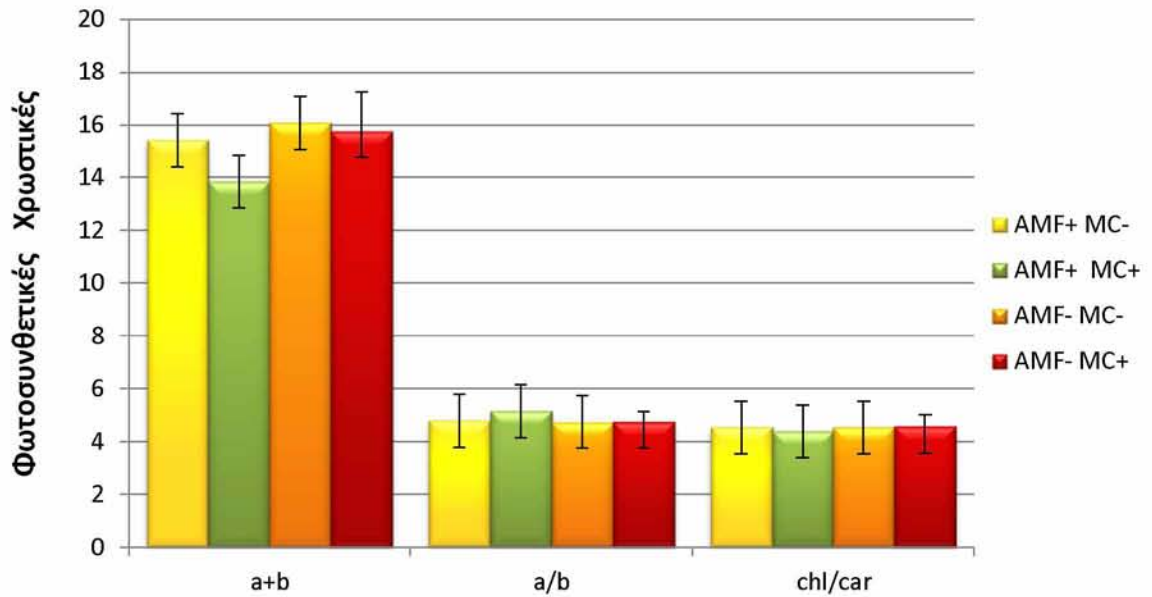
3.2. Βιοχημικά χαρακτηριστικά



Σχήμα 8: Συγκέντρωση φωτοσυνθετικών χρωστικών των φύλλων: χλωροφυλλών a, b και καροτενοειδών, εκφραζόμενες σε $\mu\text{g}/\text{cm}^2$, στις διάφορες μεταχειρίσεις (Μ.Ο. \pm SD).

Όσον αφορά τη συγκέντρωση των φωτοσυνθετικών χρωστικών στα φύλλα, δεν παρατηρήθηκαν στατιστικά σημαντικές διαφορές. Μια πτωτική τάση στις συγκεντρώσεις παρουσιάζεται στα φυτά της ομάδας AMF+MC+ , τα οποία αναπτύχθηκαν με παρουσία μυκορριζών και μικροκυστινών.

Επίσης, παρόμοια εικόνα εμφανίζουν τα φυτά των διαφόρων μεταχειρίσεων σε ότι αφορά τις αναλογίες και τις σχέσεις μεταξύ των διαφόρων ομάδων φωτοσυνθετικών χρωστικών και συγκεκριμένα τη συνολική ποσότητα χλωροφύλλης (χλωροφύλλης a+b), το λόγο χλωροφύλλης a/b και το λόγο χλωροφυλλών/καροτενοειδή (Σχήμα 9).



Σχήμα 9: Σχέσεις μεταξύ συγκεντρώσεων φωτοσυνθετικών χρωστικών των φύλλων: το άθροισμα των χλωροφυλλών (a+b), εκφραζόμενες σε $\mu\text{g}/\text{cm}^2$, ο λόγος των χλωροφυλλών (a/b) και ο λόγος των συγκεντρώσεων των χλωροφυλλών προς αυτή των καροτενοειδών (chl/car) στις διάφορες μεταχειρίσεις (M.O. \pm SD).

Τέλος, να σημειωθεί ότι δεν ανιχνεύθηκε προλίνη στα φύλλα των φυτών των διαφόρων μεταχειρίσεων.

Κεφάλαιο 4 – Συζήτηση

Οι επιπτώσεις των μικροκυστινών στην ανάπτυξη των φυτών έχουν απασχολήσει πολλούς ερευνητές. Τέτοιες μελέτες έχουν γίνει σε διάφορα καλλιεργούμενα φυτά, ελάχιστες όμως για το καλαμπόκι (Dhawi et al., 2015). Υπάρχουν μόνο δύο αναφορές για επίδραση των μικροκυστινών παρουσία συμβιώσεων της ρίζας με αζωτοδεσμευτικά βακτήρια (El Khalloufi et al., 2011; Lahrouni et al., 2016). Όμως, δεν έχει δημοσιευτεί κάποια έρευνα που να συνδυάζει τις μικροκυστίνες με τις μυκόρριζες.

Στην συνέχεια θα παρουσιαστούν αναλυτικότερα τα αποτελέσματα της παρούσας μελέτης, καθώς και η σύγκριση τους με αυτά άλλων ερευνών, που σχετίζονται με την επίδραση των μικροκυστινών ή των μυκορριζών στην ανάπτυξη των φυτών.

Οι μετρήσεις του **νωπού βάρους των φύλλων** του καλαμποκιού δεν έδειξαν στατιστικά σημαντικές διαφορές μεταξύ των διαφορετικών μεταχειρίσεων. Ίσως θα αναμέναμε περισσότερο εμφανείς διαφορές καθώς πολλές μελέτες έχουν δείξει ότι οι μικροκυστίνες, ως παράγοντας καταπόνησης, καταστέλλουν την ανάπτυξη διάφορων φυτικών ειδών συμπεριλαμβανομένου του καλαμποκιού (McElhiney et al., 2001; Saqrane et al. 2009). Αντιθέτως, είναι ευρέως γνωστό ότι οι μυκόρριζες ενισχύουν την θρέψη και ανάπτυξη των φυτών. Παρόλα αυτά οι τιμές κυμαίνονται στα ίδια σχεδόν επίπεδα σε όλες τις μεταχειρίσεις.

Ομοίως, αν και τα φυτά τα οποία αναπτύχθηκαν με μυκόρριζες εμφάνισαν μια τάση για μεγαλύτερο **νωπό βάρος των βλαστών**, δεν υπήρξε στατιστικώς σημαντική διαφορά. Η μικρή αυτή αύξηση συμφωνεί σε μικρό βαθμό με τους Dhawi et al., 2015, οι οποίοι βρήκαν ότι το νωπό βάρος του αραβόσιτου που αναπτύχθηκε με μυκόρριζες ήταν σχεδόν τρεις φορές μεγαλύτερο σε σχέση με τον μάρτυρα. Σε μια άλλη μελέτη, των McElhiney et al., (2001) φάνηκε πως οι μικροκυστίνες προκαλούν σημαντική μείωση του νωπού βάρους του βλαστού της πατάτας. Αυτό το αποτέλεσμα δεν φαίνεται

να συμφωνεί με τις μετρήσεις της παρούσας μελέτης. Οι Saqrane et al. 2009, απέδειξαν ότι το συνολικό νωπό βάρος διάφορων φυτών, όπως το σκληρό σιτάρι (*Triticum durum*), ο αραβόσιτος (*Zea mays*), ο αρακάς (*Pisum sativum*) και η φακή (*Lens esculenta*), μειώθηκε σημαντικά με την παρουσία των μικροκυστινών.

Στατιστικά σημαντικές διαφορές παρουσιάστηκαν στο **μήκος των βλαστών**, μεταξύ των φυτών που αναπτύχθηκαν με παρουσία μυκορριζών και των φυτών που αναπτύχθηκαν χωρίς την παρουσία αυτών στο ριζικό τους σύστημα. Σημαντική μείωση προκύπτει στις μεταχειρίσεις AMF-, σε αντίθεση με τις AMF+, οι οποίες εμφάνισαν μεγαλύτερο μήκος βλαστών, ανεξαρτήτως της παρουσίας MC. Αυτό δικαιολογείται από το γεγονός ότι οι μυκόρριζες ενισχύουν την ανάπτυξη των φυτών, αλλά από την άλλη έρχεται σε αντίθεση με τα αποτελέσματα πολλών ερευνών που δείχνουν πως υπάρχει σημαντική μείωση στο ύψος των φυτών του καλαμποκιού, όπως και του αρακά, φακής και σκληρού σιταριού (Saqrane et al. 2009), στο ύψος του βλαστού της πατάτας (McElhiney et al. 2001) και του ρυζιού (Cao et al. 2017), όταν αυτά αναπτύσσονται με MCs. Η τελευταία μελέτη δείχνει πως οι υψηλές συγκεντρώσεις MC (50 και 500 $\mu\text{g L}^{-1}$) ανέστειλαν σημαντικά την ανάπτυξη του ρυζιού και ότι το ύψος των φυτών μειώθηκε κατά 9% και 13% στις τιμές T50 και T500 αντίστοιχα, σε σύγκριση με τον μάρτυρα.

Σε ότι αφορά τις τιμές της **επιφάνειας των φύλλων** του αραβόσιτου των διαφορετικών μεταχειρίσεων, ανεξαρτήτως της παρουσίας ή όχι των μυκορριζών και μικροκυστινών, δεν παρατηρήθηκε σημαντική διαφορά. Αντίστοιχα με το νωπό βάρος των φύλλων οι τιμές κυμαίνονται στα ίδια επίπεδα σε όλες τις μεταχειρίσεις. Ομοίως, σε πείραμα με φυτά μαρουλιού, δεν καταγράφηκαν σημαντικές μειώσεις στην επιφάνεια των φύλλων όταν αυτά αναπτύχθηκαν με MCs (Levizou et al., 2017).

Οι μετρήσεις της **βιομάζας των φύλλων** δεν έδειξαν σημαντική διαφορά. Αυτό σημαίνει πως η συσσώρευση της βιομάζας δεν επηρεάστηκε από κανέναν από τους δύο παράγοντες του πειράματος. Αντιθέτως, στην μελέτη

των Saqrane et al. 2009, όπου τα φυτά εκτέθηκαν για 30 μέρες σε διάλυμα μικροκυστινών, παρατηρήθηκε σημαντική διαφορά του ξηρού τους βάρους σε σχέση με αυτό των μαρτύρων.

Από τις μετρήσεις του **ξηρού βάρους των βλαστών** των διάφορων μεταχειρίσεων, δεν προέκυψαν στατιστικά σημαντικές διαφορές. Μια πολύ μικρή τάση για αυξημένο βάρος παρουσιάζουν τα φυτά της ομάδας AMF+MC- ενώ το χαμηλότερο ξηρό βάρος είναι αυτό του μάρτυρα. Αυτό θα μπορούσε να οφείλεται στην ενισχυτική δράση των μυκορριζών, όπως φαίνεται και σε μια πρόσφατη μελέτη, όπου οι μυκόρριζες προκάλεσαν σημαντική αύξηση της βιομάζας, δηλαδή του ξηρού βάρους του βλαστού του καλαμποκιού (Dhawi et al., 2015). Οι διακυμάνσεις του νωπού και του ξηρού βάρους των βλαστών, μεταξύ των μεταχειρίσεων, είναι αρκετά όμοιες. Μόνο τα φυτά του αραβόσιτου, στα οποία δεν είχαν προστεθεί μυκόρριζες και μικροκυστίνες (AMF-MC-), φαίνεται να έχουν μειωμένη συσσώρευση βιομάζας στους βλαστούς (σε σύγκριση με το νωπό τους βάρος). Μελέτη έδειξε πως κουκιά (*Vicia faba*) που αναπτύχθηκαν με μικροκυστίνες, εμφάνισαν μειωμένο ξηρό βάρος των βλαστών τους κατά 15% (Lahrouni et al. 2016). Το αποτέλεσμα όμως αυτό, δεν φαίνεται να συμφωνεί με τις μετρήσεις της παρούσας μελέτης.

Μεταξύ των μεταχειρίσεων φαίνεται να υπάρχουν διαφορές στην ανάπτυξη των ριζών αλλά όχι στατιστικώς σημαντικές. Τα φυτά με μικροκυστίνη (MC+) δείχνουν πως έχουν αυξημένη βιομάζα στη ρίζα, ανεξαρτήτως της παρουσίας AMF. Οι αραβόσιτοι που αναπτύχθηκαν με μικροκυστίνες και χωρίς μυκόρριζες, είχαν μεγαλύτερο **ξηρό βάρος ρίζας** από αυτούς που είχαν μυκόρριζες στο ριζικό τους σύστημα. Αντιθέτως, έρευνες έχουν δείξει πως οι μικροκυστίνες επηρέασε αρνητικά την ανάπτυξη των ριζών σε κουκιά (*Vicia faba*) (Lahrouni et al., 2016), ρύζι (*Oryza sativa*) (Cao et al., 2017) και φασόλια (*Phaseolus vulgaris* L.) (McElhiney et al., 2001). Ενώ η έρευνα των Dhawi et al., 2015, δείχνει πως υπάρχει αρκετή αύξηση της βιομάζας (ξηρού βάρους) των ριζών του αραβόσιτου που αναπτύχθηκε με μυκόρριζες.

Οι McElhiney et al., 2001, έδειξαν πως η MC-LR είχε αρνητική επίδραση στην **συγκέντρωση της χλωροφύλλης** σε φυτά πατάτας. Στατιστική ανάλυση έδειξε ότι ενώ οι συγκεντρώσεις τοξίνης 0,001-0,01 $\mu\text{g ml}^{-1}$ δεν είχαν σημαντική επίδραση επί της συνολικής περιεκτικότητας σε χλωροφύλλη, τα φυτά όμως που εκτέθηκαν σε επίπεδα τοξίνης 0,05-5 $\mu\text{g ml}^{-1}$ για 16 ημέρες, είχαν σημαντικά χαμηλότερη περιεκτικότητα στην συνολική χλωροφύλλη. Ομοίως, η μελέτη των Saqrane et al., 2009, έδειξε πως δεν υπήρξαν σημαντικές διαφορές στην συγκέντρωση χλωροφύλλης στα φυτά σκληρού σιταριού, αρακά, φακής και καλαμποκιού που εκτέθηκαν σε διάλυμα MC, παρά μόνο όταν τα φυτά καλαμποκιού και φακής εκτέθηκαν σε μεγάλες συγκεντρώσεις μικροκυστινών 4,2 $\mu\text{g MC-LR/ml}$ και 2,1-4,2 $\mu\text{g MC-LR/ml}$ αντίστοιχα, για διάστημα 30 ημερών. Οι μετρήσεις που προέκυψαν από τα φυτά του αραβόσιτου, συμφωνούν με τις προαναφερθέντες μελέτες, καθώς δεν παρατηρήθηκαν στατιστικά σημαντικές διαφορές στη συγκέντρωση των φωτοσυνθετικών χρωστικών στα φύλλα. Μια πτωτική τάση στις συγκεντρώσεις παρουσιάζεται στα φυτά της ομάδας **AMF+MC+**, τα οποία αναπτύχθηκαν με παρουσία μυκορριζών και μικροκυστινών, παρόλο το ότι οι Dhawi et al., 2015, έδειξαν πως οι μυκόρριζες στον αραβόσιτο μπορεί να συμβάλουν στη αύξηση την συγκέντρωση της χλωροφύλλης σε μικρό βαθμό.

Στη βιβλιογραφία έχει καταγραφεί μία θετική συσχέτιση μεταξύ της συσσώρευσης **προλίνης** και της καταπόνησης των φυτών. Η προλίνη, ως ένας εξαιρετικός οσμολύτης και λόγω της αντιοξειδωτικής της δράσης παίζει ωφέλιμο ρόλο σε φυτά που εκτίθενται σε διάφορες καταστάσεις καταπόνησης. Παρόλα αυτά, δεν ανιχνεύθηκε προλίνη στα φύλλα του αραβόσιτου των διάφορων μεταχειρίσεων. Σε άλλη μελέτη, σε φύλλα μαρουλιού, ενώ ανιχνεύθηκε προλίνη, δεν σημειώθηκε σημαντική διαφορά στις συγκεντρώσεις μεταξύ των φυτών που αναπτύχθηκαν με μικροκυστίνες και του μάρτυρα (Levizou et al., 2017). Πιθανόν, θα αναμέναμε κάποια αύξηση στην συγκέντρωσης της, από την στιγμή που οι μικροκυστίνες αποτελούν παράγοντα καταπόνησης στα φυτά. Επομένως, το γεγονός ότι δεν υπάρχει προλίνη στα φύλλα, σε καμία από τις μεταχειρίσεις, δείχνει πως τα φυτά του αραβόσιτου δεν αντιμετώπιζαν κατάσταση στρες.

Κεφάλαιο 5— Συμπεράσματα

Μετά την ολοκλήρωση του πειράματος πραγματοποιήθηκε εκτίμηση του ποσοστού αποικισμού των ριζών των πειραματόφυτων μας από συνεργάτες του εργαστηρίου. Φάνηκε πως ακόμα και στις μεταχειρίσεις AMF- υπήρχε παρουσία μυκορριζών. Συμπεραίνουμε πως η παστερίωση του χώματος δεν ήταν επαρκής και έτσι τα σπόρια ή άλλες δομές των μυκήτων που υπήρχαν στο χώμα του Βελεστίνου που χρησιμοποιήσαμε, αποίκισαν το καλαμπόκι που στο πείραμα υπολογίζαμε ότι είναι απαλλαγμένο από μυκόρριζες. Επομένως, πρακτικά τα αποτελέσματα του πειράματος αφορούν τις δυο ομάδες των φυτών, με ή χωρίς μικροκυστίνες (MC+ και MC-).

Μετά την πειραματική διαδικασία, κατά την οποία τα φυτά του αραβοσίτου αναπτύχθηκαν σε συνθήκες όσο το δυνατόν πιο κοντά στις πραγματικές, όταν αυτά εκτίθενται σε διάλυμα μικροκυστινών συμπεραίνουμε πως δεν υπάρχουν στατιστικά σημαντικές διαφορές μεταξύ των ομάδων MC+ και MC-. Σε αντίθεση με τις περισσότερες μελέτες έως τώρα, οι οποίες συνήθως αφορούσαν υδροπονικά συστήματα, τεράστιες συγκεντρώσεις μικροκυστινών και με έκθεση των φυτών σε αυτές για μικρό χρονικό διάστημα, τα φυτά της παρούσας μελέτης αναπτύχθηκαν σε χώμα, με λογικές συγκεντρώσεις μικροκυστινών και για αρκετά μεγάλη αναπτυξιακή περίοδο. Για τον λόγο αυτό, τα αποτελέσματα σε σύγκριση με τις υπόλοιπες έρευνες διαφέρουν αισθητά αλλά θεωρούμε πως είναι πιο κοντά στην πραγματικότητα.

Καταλήγοντας, από την απουσία διαφορών μεταξύ των δύο μεταχειρίσεων (MC+ και MC-), συμπεραίνουμε ότι οι μικροκυστίνες στην συγκέντρωση που χρησιμοποιήσαμε δεν επέδρασαν αρνητικά στην ανάπτυξη του καλαμποκιού μέχρι το στάδιο ολοκλήρωσης της παρακολούθησης του.

Κεφάλαιο 6— Βιβλιογραφία

- Berruti A., Borriello R., Orgiazzi A., Barbera A. C., Lumini E., & Bianciotto V., 2014. Arbuscular mycorrhizal fungi and their value for ecosystem management. *Biodiversity - The dynamic balance of the planet*, pp. 159-191.
- Butler N., Carlisle J. C., Linville R., & Washburn B., 2009. *Microcystins: A brief overview of their toxicity and effects, with special reference to fish, wildlife, and livestock*. Office of Environmental Health Hazard Assessment.
- Dighton J., 2009. *Encyclopedia of Microbiology (Third Edition): Mycorrhizae*. Massachusetts: Academic Press.
- Cao Q., Rediske R. R., Yao L., & Xie L., 2018. Effect of microcystins on root growth, oxidative response, and exudation of rice (*Oryza sativa*). *Ecotoxicology and Environmental Safety*, 149, pp. 143-149
- Chen J., Han F.X., Wang F., Zhang H., & Shi Z., 2012. Accumulation and phytotoxicity of microcystin-LR in rice (*Oryza sativa*). *Ecotox. Environ. Safe.*, 76, pp. 193-199
- Codd G.A., Metcalf J.S., & Beattie K.A., 1999. Retention of *Microcystis aeruginosa* and microcystin by salad lettuce (*Lactuca sativa*) after spray irrigation with water containing cyanobacteria. *Toxicon*, 37 , pp. 1181-1185
- Corbel S., Mougou C & Bouaïcha N., 2014. Cyanobacterial toxins: Modes of actions, fate in aquatic and soil ecosystems, phytotoxicity and bioaccumulation in agricultural crops. *Chemosphere*, 96: pp. 1-15.

- Dhawi F., Datta R., & Ramakrishna W., 2015. Mycorrhiza and PGPB modulate maize biomass, nutrient uptake and metabolic pathways in maize grown in mining-impacted soil. *Plant Physiology and Biochemistry*, 97, pp. 390-399
- Egerton-Warburton L.M., Querejeta J.I., Allen M.F & Finkelman S.L., 2005. Mycorrhizal Fungi. *Ecology*, pp. 533-542.
- El Khalloufi F., Oufdou K., Lahrouni M., El Ghazali I., Saqrane S., Vasconcelos V., & Oudra B., 2011. Allelopathic effects of cyanobacteria extracts containing microcystins on *Medicago sativa*–*Rhizobia* symbiosis. *Ecotoxicology and Environmental Safety*, 74, pp. 431-438
- Gutiérrez-Praena D., Jos Á., Pichardo S., Moreno I. M., & Cameán A. M., 2013. Presence and bioaccumulation of microcystins and cylindrospermopsin in food and the effectiveness of some cooking techniques at decreasing their concentrations: A review. *Food and Chemical Toxicology*, 53, pp. 139-152
- Hu Z., Liu Y., Li D., & Dauta A., 2005. Growth and antioxidant system of the cyanobacterium *Synechococcus elongatus* in response to microcystin-RR. *Hydrobiologia*, 534 , pp. 23-29
- Lahrouni M., Oufdou K., El Khalloufi F., Benidire L., Albert S., Göttfert M, Caviedes M. A., Rodriguez-Llorente I. D., Oudra B., & Pajuelo E., 2016. Microcystin-tolerant *Rhizobium* protects plants and improves nitrogen assimilation in *Vicia faba* irrigated with microcystin-containing waters. *Environmental Science and Pollution Research*, 23(10):10037-49
- Levizou E., Stataris G., Papadimitriou T., Laspidou C. S., & Kormas K. Ar., 2017. Lettuce facing microcystins-rich irrigation water at different developmental stages: Effects on plant performance and microcystins

bioaccumulation. *Ecotoxicology and Environmental Safety*, 143, pp. 193-200

Miyasaka S.C., Habte M., Friday J.B., & Johnson E.V., 2003. Manual on arbuscular mycorrhizal fungus production and inoculation techniques. *Soil and Crop Management*, 5, pp. 1-4.

McElhiney J., Lawton L.A., & Leifert C., 2001. Investigations into the inhibitory effects of microcystins on plant growth, and the toxicity of plant tissues following exposure. *Toxicon*, 39, pp. 1411-1420

Saqrane S., Ouahid Y., El Ghazali I., Oudra B., Bouarab L., & del Campo F. F., 2009. Physiological changes in *Triticum durum*, *Zea mays*, *Pisum sativum* and *Lens esculenta* cultivars, caused by irrigation with water contaminated with microcystins: A laboratory experimental approach. *Toxicon*, 53, pp. 786-796