

ΠΑΝΕΠΙΣΤΗΜΙΟ ΘΕΣΣΑΛΙΑΣ

**ΤΜΗΜΑ ΓΕΩΠΟΝΙΑΣ ΦΥΤΙΚΗΣ ΠΑΡΑΓΩΓΗΣ ΚΑΙ ΑΓΡΟΤΙΚΟΥ
ΠΕΡΙΒΑΛΛΟΝΤΟΣ**

ΕΡΓΑΣΤΗΡΙΟ ΖΙΖΑΝΙΟΛΟΓΙΑΣ

**«Συνδυασμός μικροκυστίνης LR και ενδομυκόρριζων στο σέλινο: επίδραση σε
φυσιολογικά και αναπτυξιακά χαρακτηριστικά»**

ΠΤΥΧΙΑΚΗ ΔΙΑΤΡΙΒΗ

ΚΟΚΚΑΛΗΣ ΚΩΝΣΤΑΝΤΙΝΟΣ



ΕΠΙΒΛΕΠΟΥΣΑ ΚΑΘΗΓΗΤΡΙΑ

ΕΥΘΥΜΙΑ ΛΕΒΙΖΟΥ, Επίκουρη Καθηγήτρια Φυσιολογίας Φυτών

Βόλος, 2019

«Συνδυασμός μικροκυστίνης LR και ενδομυκόρριζων στο σέλινο: επίδραση σε φυσιολογικά και αναπτυξιακά χαρακτηριστικά»

«Microcystin LR and endomycorrhizae combined effects on physiological and growth characteristics of celery»

Τριμελής Συμβουλευτική Επιτροπή

Λεβίζου Ευθυμία, (Επιβλέπουσα) Επίκουρη Καθηγήτρια Φυσιολογίας Φυτών, Τμήμα Γεωπονίας Φυτικής Παραγωγής και Αγροτικού Περιβάλλοντος, Πανεπιστήμιο Θεσσαλίας

Αντωνιάδης Βασίλειος (Μέλος) Αναπληρωτής Καθηγητής Εφαρμοσμένης Εδαφολογίας, Τμήμα Γεωπονίας Φυτικής Παραγωγής και Αγροτικού Περιβάλλοντος, Πανεπιστήμιο Θεσσαλίας

Βέλλιος Ευάγγελος, (Μέλος) Επίκουρος Καθηγητής Φυτοπαθολογίας και Σύγχρονων Μεθόδων Διαγνωστικής, Τμήμα Γεωπονίας Φυτικής Παραγωγής και Αγροτικού Περιβάλλοντος, Πανεπιστήμιο Θεσσαλίας

Βεβαιώνω ότι είμαι ο συγγραφέας αυτής της πτυχιακής εργασίας, η οποία εκπονήθηκε σύμφωνα με τον Κανονισμό Εκπόνησης Πτυχιακής Εργασίας του ΤΓΦΠΑΠ.

ΕΥΧΑΡΙΣΤΙΕΣ

Για την παρούσα διπλωματική εργασία που εκπονήθηκε στα πλαίσια του Προπτυχιακού Προγράμματος Σπουδών του ΤΓΦΠΑΠ του Πανεπιστημίου Θεσσαλίας θα ήθελα να ευχαριστήσω θερμά την επιβλέπουσα καθηγήτρια Λεβίζου Ευθυμία Επίκουρη Καθηγήτρια Φυσιολογίας Φυτών για την εμπιστοσύνη και την πολύτιμη βοήθεια της καθ' όλη την διάρκεια της διπλωματικής μου εργασίας. Επίσης θα ήθελα να ευχαριστήσω την Μπαράκη Αντωνία συμφοιτήτρια του ΤΓΦΠΑΠ του Πανεπιστημίου Θεσσαλίας, με την οποία εκπονήσαμε μαζί το πείραμα, για την πραγματικά μεγάλη βοήθεια και πολύτιμη συνεργασία που είχαμε. Ευχαριστώ επίσης και τα υπόλοιπα μέλη της τριμελούς επιτροπής τους κυρίους Αντωνιάδη Βασίλειο Αναπληρωτή Καθηγητή Εφαρμοσμένη Εδαφολογία στο Τμήμα Γεωπονίας Φυτικής Παραγωγής και Αγροτικού Περιβάλλοντος του Πανεπιστημίου Θεσσαλίας και Βέλλιο Ευάγγελο Επίκουρο Καθηγητή Φυτοπαθολογίας και Σύγχρονων Μεθόδων Διαγνωστικής στο Τμήμα Γεωπονίας Φυτικής Παραγωγής και Αγροτικού Περιβάλλοντος του Πανεπιστημίου Θεσσαλίας.

Τέλος θα ήθελα να ευχαριστήσω την οικογένεια και τους φίλους μου για την στήριξη των επιλογών μου, την αγάπη και την κατανόηση που μου πρόσφεραν καθώς και για την βοήθεια τους για το Πανεπιστήμιο και την ζωή έξω από αυτό.

ΠΕΡΙΕΧΟΜΕΝΑ

Περίληψη.....	7
Εισαγωγή.....	9
1.1. Κυανοβακτήρια και κυανοτοξίνες.....	9
1.2. Μικροκυστίνες MC-LR.....	12
1.3. Μυκόρριζες.....	14
1.4. Σέλινο.....	15
1.5. Σκοπός της εργασίας.....	15
Υλικά και Μέθοδοι.....	16
2.1. Φυτικό υλικό και μεταχειρίσεις.....	16
2.2. Υπόστρωμα.....	17
2.3. Στάδιο σπόρου και 1 ^η Μεταφύτευση.....	17
2.4. 2 ^η Μεταφύτευση.....	18
2.5. Λήξη του πειράματος και συλλογή.....	18
2.6. Μέτρηση φθορισμού.....	19
2.7. Μέτρηση χλωροφυλλών.....	19
2.8. Στατιστική ανάλυση.....	20
Αποτελέσματα.....	21
3.1. Μορφολογικές μετρήσεις.....	21
3.2. Μέτρηση παραμέτρων φθορισμού της χλωροφύλλης a in vivo	27
Συζήτηση.....	30
4.1. Επίδραση των μικροκυστινών στα μορφολογικά χαρακτηριστικά των φυτών σέλινο με ή χωρίς την παρουσία AMF.....	30
4.2. Επίδραση των μικροκυστινών στις βιοχημικές και φυσιολογικές παραμέτρους των φυτών	31

Συμπεράσματα.....	33
Βιβλιογραφία.....	34

Περίληψη

Οι μικροκυστίνες είναι μία ομάδα κυανοτοξινών που απελευθερώνονται σε υδάτινα συστήματα από τοξικά είδη κυανοβακτηρίων. Μέσω του αρδευτικού νερού φτάνουν στα φυτά και επηρεάζουν την ανάπτυξη και την φυσιολογική τους λειτουργία. Στην παρούσα μελέτη ερευνήθηκε η επίδραση της μικροκυστίνης MC-LR σε φυτά σέλινου με ή χωρίς την παρουσία ενδομυκόρριζας (AMF) με σκοπό την σκιαγράφηση των σχέσεων μεταξύ φυτού-μυκόρριζας-μικροκυστίνης. Τα φυτά ποτίστηκαν με δύο συγκεντρώσεις MC-LR (2 και 20 $\mu\text{g l}^{-1}$) από το στάδιο του σπόρου μέχρι τη συγκομιδή ενώ η προσθήκη της μυκόρριζας έγινε στην 1^η μεταφύτευση στο σπορείο. Μετά την δεύτερη μεταφύτευση δημιουργήθηκε και η μεταχείριση επανάκαμψης (R, recovery), όπου χορηγήθηκε νερό βρύσης σε φυτά που μέχρι τότε είχαν λάβει τις δύο συγκεντρώσεις MC-LR με ή χωρίς AMF ώστε να παρατηρηθεί η ανάκαμψη των φυτών μετά από την επίδραση της μικροκυστίνης. Ως υπόστρωμα χρησιμοποιήθηκε χώμα και περλίτης τα οποία είχαν αποστειρωθεί ώστε να εξασφαλιστεί η απουσία των AMF στις αντίστοιχες μεταχειρίσεις, ενώ στις υπόλοιπες προστέθηκε μόλυσμα του μυκορριζικού μύκητα (*Rhizophagus irregularis*). Το πείραμα διήρκεσε 4 μήνες και διεξήχθη στο θερμοκήπιο του Πανεπιστημίου Θεσσαλίας του τμήματος ΓΦΠΑΠ. Κατά την διάρκεια της αναπτυξιακής περιόδου έγιναν τακτικές μετρήσεις παραμέτρων του φθορισμού της χλωροφύλλης a *in vivo* και των ολικών χλωροφυλλών, ενώ κατά την τελική συλλογή μετρήθηκαν αναπτυξιακά χαρακτηριστικά των φυτών. Η παρουσία AMF βελτίωσε πολύ σημαντικά την εικόνα των φυτών σε σχέση με τα φυτά που αναπτύχθηκαν χωρίς μυκόρριζες. Τα AMF+ φυτά υπερετερούσαν σε όλες τις παραμέτρους ανάπτυξης, φωτοσυνθετικής απόδοσης και συγκέντρωσης χλωροφυλλών που μετρήθηκαν. Οι συγκεντρώσεις MC-LR επέδρασαν διαφορετικά στα φυτά ανάλογα με την παρουσία ή όχι AMF. Στα AMF+ φυτά, η μεγαλύτερη συγκέντρωση MC-LR οδήγησε σε καλύτερη ανάπτυξη και απόδοση από το μάρτυρα, ενώ η μικρότερη συγκέντρωση MC-LR έδωσε φυτά υποδεέστερα από το μάρτυρα. Απουσία AMF και οι δύο συγκεντρώσεις MC-LR εμφάνισαν παρόμοια εικόνα με το μάρτυρα, με πολύ μειωμένες τιμές σε όλες τις μετρηθείσες παραμέτρους και χωρίς σημαντικές διαφορές μεταξύ τους. Τέλος, οι μεταχειρίσεις R οδήγησαν τα AMF+ φυτά σε μεγαλύτερη ανάπτυξη από τις αντίστοιχες μεταχειρίσεις που λάμβαναν MC-LR μέχρι τη συγκομιδή, ενώ δεν είχαν

παρόμοια δράση στα AMF- φυτά τα οποία δεν φάνηκε να ανακάμπτουν. Η συνολική εικόνα υποδεικνύει ότι τα AMF είχαν καθοριστική επίδραση στα χαρακτηριστικά των φυτών ενώ τα αποτελέσματα της MC-LR εξαρτώνται από τη συγκέντρωσή της στο αρδευτικό νερό.

ΕΙΣΑΓΩΓΗ

1.1 Κυανοβακτήρια και κυανοτοξίνες

Τα κυανοβακτήρια είναι προκαρυωτικοί οργανισμοί, αρνητικοί κατά Gram, μονοκύτταροι αλλά συχνά σχηματίζουν αποικίες σε νηματώδεις σχηματισμούς. Εμφανίστηκαν πριν από περίπου 3 δισεκατομμύρια χρόνια. Είναι 1500 είδη από τα οποία η πλειονότητα είναι πράσινα και τα υπόλοιπα κίτρινα, χρυσά, κόκκινα, κυανά ιώδη, φαιά και κυανόμαυρα (Γούναρης 2012). Εκκρίνουν βλεννώδες κάλυμμα και είναι όλα αυτότροφα. Προήλθαν από τους πρώτους βακτηριόμορφους οργανισμούς που πολλαπλασιάστηκαν προκαλώντας μεγάλη ποικιλομορφία βακτηρίων από τα οποία κάποια είχαν την δυνατότητα της φωτοσύνθεσης. Από αυτά προέκυψαν τα κυανοβακτήρια που είχαν την δυνατότητα παραγωγής οξυγόνου. Τα κυανοβακτήρια είχαν επικρατήσει τόσο στην Γη ώστε να λέμε ότι υπάρχει «η εποχή των κυανοφυκών». Η εποχή αυτή καλύπτει τα 2/3 της ιστορίας της ζωής όπου τα βακτήρια και ειδικά τα κυανοβακτήρια κάλυψαν τους ωκεανούς της Γης για 1,5 έως και 2 δισεκατομμύρια χρόνια. Το απόγειο της κυριαρχίας τους ήταν πριν από 1 δισεκατομμύρια χρόνια όπου νηματοειδείς μορφές τους παρήγαγαν επιπλέουσες μάζες στην επιφάνεια των ωκεανών. Το πιο σημαντικό στοιχείο από την κυριαρχία των κυανοβακτηρίων είναι η αρχική παραγωγή οξυγόνου στην ατμόσφαιρα με την ικανότητα χρήσης του νερού για απόσπαση ηλεκτρονίων για φωτοσύνθεση αντί των αναγωγικών θειούχων, σιδηρούχων και άλλων ενώσεων που χρησιμοποιούσαν τα προγενέστερα φωτοσυνθετικά κύτταρα (Γούναρης 2012). Αυτό κατάφερε να αλλάξει την αναγωγική ατμόσφαιρα της Γης και ήταν το κλειδί για την εξέλιξη της ζωής στην Γη.

Τα κυανοβακτήρια έχουν απλό τρόπο θρέψης. Χρησιμοποιούν νιτρικά άλατα ή αμμωνία ως πηγή αζώτου ενώ άλλα έχουν την δυνατότητα αζωτοδέσμευσης (Madigan et al. 2014). Τα πιο σημαντικά γένη είναι τα *Synechococcus*, *Oscillatoria*, και *Nostoc* (Madigan et al. 2014), καθώς επίσης και τα γένη *Microcystis*, *Planktothrix* και *Anabaena*, τα οποία είναι παραγωγοί κυανοτοξινών (Ahhi et al. 2019). Τα κυανοβακτήρια είναι ο λόγος πολλές φορές που το νερό έχει δυσάρεστη οσμή και το γλυκό νερό αλλοιωμένη γεύση κάνοντάς το ακατάλληλο προς πόση (Madigan et al. 2014).

Η άνθιση είναι μία σημαντική αναπτυξιακή διαδικασία κατά την οποία τα κυανοβακτήρια αυξάνονται μαζικά, συσσωρεύονται στα επιφανειακά στρώματα του νερού και, εάν είναι τοξικά γένη, εκκρίνουν σημαντικές ποσότητες κυανοτοξινών. Η διάρκεια και η ένταση των ανθίσεων επηρεάζονται από τα αποθέματα θρεπτικών, την θερμοκρασία του νερού, την ένταση του φωτός καθώς και την στασιμότητα και αλατότητα του νερού (Machado et al. 2017). Για αυτούς τους λόγους, η υπερθέρμανση του πλανήτη και ο ευτροφισμός των υδάτινων οικοσυστημάτων θεωρείται ότι ευθύνονται σημαντικά για την αύξηση των κυανοβακτηριακών ανθίσεων σε παγκόσμιο επίπεδο -ιδιαίτερα σε λίμνες και ταμιευτήρες νερού (Ahhi et al. 2019). Η άνθιση των κυανοβακτηρίων είναι κυρίως υπεύθυνη για την απελευθέρωση κυανοτοξινών στο υδάτινο περιβάλλον, στο οποίο φαίνεται να παίζουν ένα αλληλοπαθητικό ρόλο έναντι άλλων υδρόβιων μικροοργανισμών. Απελευθέρωση τοξινών συμβαίνει επίσης κατά την γήρανση, τον θάνατο και την λύση των κυττάρων των κυανοβακτηρίων (Corbel et al. 2014). Η βέλτιστη θερμοκρασία νερού για την μέγιστη παραγωγή τοξινών από τα κυανοβακτήρια είναι από 20-25°C. Επίσης η παραγωγή τοξινών αυξάνεται σε φως έντασης από 40 $\mu\text{E m}^{-2}\text{sec}^{-1}$, επομένως μειώνεται όσο μεγαλώνει το βάθος του νερού (WHO, 2003).

Οι κυανοτοξίνες έχουν κατηγοριοποιηθεί ανάλογα με την δράση τους στους οργανισμούς-στόχους σε ηπατοτοξίνες, κυτοτοξίνες, νευροτοξίνες και δερματοξίνες. Κάθε μία κατηγορία στοχεύει σε συγκεκριμένα σημεία στους οργανισμούς-στόχους. Οι ηπατοτοξίνες στοχεύουν στο ήπαρ των οργανισμών, οι νευροτοξίνες στον νευρικό σύστημα, οι δερματοξίνες επιδρούν στο δέρμα των οργανισμών-στόχων και οι κυτοτοξίνες έχουν διάφορα όργανα στόχους (όπως ήπαρ, νεφροί, επινεφρίδια, λεπτό έντερο) εμποδίζοντας την πρωτεϊνική σύνθεση. Οι μηχανισμοί δράσης τους είναι, κατά περίπτωση, η αναστολή της δραστηριότητας της φωσφατάσης (ηπατοτοξίνες), της πρωτεϊνικής σύνθεσης (κυτοτοξίνες), της ακετυλοχολινεστεράσης (νευροτοξίνες) (Corbel et al. 2014) και ο σχηματισμός όγκων (Ahhi et al. 2019). Κύριοι εκπρόσωποι για κάθε ομάδα κυανοτοξινών είναι: στις νευροτοξίνες η anatoxin-a η οποία υποκαθιστά την ακετυλοχολίνη προκαλώντας μυϊκή παράλυση καθώς δεν λειτουργεί στην συνέχεια η ακετυλοχολινεστεράση (Corbel et al. 2014). Στις ηπατοτοξίνες υπάρχουν δύο υποκατηγορίες: οι μικροκυστίνες (MCs) με πάνω από 80 είδη αναγνωρισμένα και οι νοντουλαρίνες (nodularins). Είναι αναστολείς των πρωτεϊνικών

φωσφατασών 1 και 2A και επηρεάζουν τοξικά τόσο τα ζώα όσο και τα φυτά. Με τον τρόπο αυτό εμπλέκονται σε φυσιολογικές και μοριακές διεργασίες των ανώτερων φυτών (Corbel et al. 2014). Η αλκαλοειδής κυλινδροσπερμοψίνη (CYN) είναι η πιο γνωστή από τις κυτοτοξίνες καθώς εμποδίζει την σύνθεση των πρωτεϊνών στα θηλαστικά και στα φυτά (Corbel et al. 2014). Κατά την άνθιση των κυανοβακτηρίων έχει βρεθεί ότι το 50-75% των παραγόμενων τοξινών είναι ηπατοτοξίνες.

Οι κυανοτοξίνες είτε είναι ενδοκυτταρικές είτε εκκρίνονται εξωκυτταρικά, καταλήγουν να απελευθερώνονται στο νερό και, στην περίπτωση που αυτό χρησιμοποιείται για άρδευση, φτάνουν και στο έδαφος. Μπορούν να απομακρυνθούν από ένα οικοσύστημα είτε από το νερό είτε από το έδαφος με διάφορες διεργασίες όπως φωτοχημική αποικοδόμηση με υπεριώδη ακτινοβολία, προσρόφηση από σωματίδια ή ιζήματα καθώς και με βιοαποικοδόμηση. Αξίζει να σημειωθεί πως οι κυανοτοξίνες έχουν μεγάλες διαφορές μεταξύ τους ως προς τη σταθερότητα στο περιβάλλον. Οι ηπατοτοξίνες είναι εξαιρετικά σταθερές με ή χωρίς την παρουσία ηλιακού φωτός για αρκετές εβδομάδες σε υδάτινο περιβάλλον. Για την κυτοτοξίνη CYN και την νευροτοξίνη anatoxin-a έχει βρεθεί ότι είναι σταθερές απουσία ηλιακού φωτός ενώ αντίθετα αποικοδομούνται πολύ γρήγορα στην παρουσία του. Σε ότι αφορά την βιοαποικοδόμηση των κυανοτοξινών έχει βρεθεί ότι επιτελείται από βακτηριακές κοινότητες συγκεκριμένης σύνθεσης και ευνοείται από παρατεταμένη έκθεση των βακτηρίων στις κυανοτοξίνες καθώς έτσι επάγονται οι χαρακτήρες που οδηγούν στη συγκεκριμένη αποικοδομητική δράση (Corbel et al. 2014). Άλλοι παράγοντες που επηρεάζουν το ρυθμό βιοαποικοδόμησης είναι η αρχική συγκέντρωση, το είδος και την φύση των τοξινών, καθώς και η θερμοκρασία του νερού (Corbel et al. 2014).

Οι μικροκυστίνες εμφανίζουν σταθερότητα στην παρουσία τους στο έδαφος. Προσροφώνται στα σωματίδια του εδάφους, διαδικασία στην οποία η περιεκτικότητα και η ποιότητα της αργίλου παίζουν σημαντικό ρόλο. Επιπλέον, εξαιτίας των ατόμων αζώτου και οξυγόνου στις δομές της τοξίνης ευνοείται η δημιουργία χηλικών ενώσεων μεταξύ των MCs και των μεταλλικών ιόντων στην επιφάνεια των σωματιδίων αργίλου του εδάφους. Σε ότι αφορά την αποικοδόμηση των MCs στο έδαφος, φαίνεται να επηρεάζεται πολύ από την σύσταση του εδάφους. Πιο

συγκεκριμένα, σε εδάφη με υψηλή περιεκτικότητα σε άργιλο και οργανική ουσία βρέθηκε ότι η απομάκρυνση τους ήταν ταχύτερη σε σχέση με ένα αμμώδες και φτωχό σε οργανική ουσία έδαφος. Η αποικοδόμηση βασίζεται σε διεργασίες όπως η φωτόλυση, η υδρόλυση, αλλά είναι κυρίως η μικροβιακή κοινότητα του εδάφους με κατάλληλη σύνθεση και πυκνότητα που μπορεί να επιταχύνει πολύ την διαδικασία (Machado et al. 2017).

1.2 Μικροκυστίνες MC-LR

Οι μικροκυστίνες MC-LR ανήκουν στις ηπατοτοξίνες και είναι οι πιο γνωστές και μελετημένες καθώς εμφανίζονται πολύ συχνά σε πολλά υδάτινα οικοσυστήματα παγκοσμίως. Είναι κυκλικά επταπεπτίδια με μεγάλη δομική ποικιλία. Κατά κανόνα όμως όλες οι μικροκυστίνες έχουν κοινή βασική δομή: cyclo(D-Ala-X-D-β-MeisoAsp-Y-Adda-D-iso-Glu-Mdha). Το X και Y αντιπροσωπεύουν L-αμινοξέα καθώς και το μόριο Adda(3-amino-9-methoxy-2,6,8-trimethyl-10-phenyldeca-4,6-dienoic acid) προσδίδει την τοξική δράση (Παπαδημητρίου 2010; WHO, 2003). Η μικροκυστίνη MC-LR είναι η πιο τοξική της κατηγορίας των μικροκυστινών καθώς περιέχει τα αμινοξέα L-λευκίνη και L-αργινίνη (Παπαδημητρίου 2010).

Οι μικροκυστίνες επηρεάζουν αρνητικά την χλωρίδα και την πανίδα σε όλα τα μελετηθέντα έως τώρα οικοσυστήματα. Στους ζωικούς οργανισμούς έχει βρεθεί ότι μπορούν να επηρεάσουν την έκφραση των πρωτο-ογκογονιδίων, ογκογονιδίων και την νέκρωση του παράγοντα α (TNFα, Machado et al. 2017). Οι κυανοτοξίνες έχει αποδειχθεί ότι είναι επικίνδυνες για τον ανθρώπινο οργανισμό. Έχουν αναφερθεί ακόμη και θάνατοι εξαιτίας MCs που βρίσκονταν στο πόσιμο νερό, το οποίο δεν είχε υποστεί καμία επεξεργασία ή χλωρίωση (Bittencourt-Oliveira et al. 2016). Ο άνθρωπος εκτίθεται σε αυτές μέσω διαφόρων οδών: α) από την χρήση νερού για άρδευση και πόση από δεξαμενές τροφοδοσίας και άλλα επιφανειακά ύδατα που έχουν μολυνθεί από κυανοβακτήρια, αλλά και β) από την κατανάλωση φυτικών και ζωικών προϊόντων στα οποία έχουν βιοσυσσωρευθεί κυανοτοξίνες (Bittencourt-Oliveira et al., 2016). Για παράδειγμα, η κατανάλωση ψαριών που ήταν εκτεθειμένα σε εμπλουτισμένα με κυανοτοξίνες νερά θέτει σε κίνδυνο την υγεία των ανθρώπων και των ζώων-θηρευτών (πουλιά, θηλαστικά, Παπαδημητρίου 2010). Ακόμη σημαντικό είναι ότι η πόση νερού με χαμηλές δόσεις MCs μπορεί να προκαλέσει

μακροπρόθεσμα καρκίνο του ήπατος και του παχέος εντέρου (Machado et al. 2017). Ο Παγκόσμιος Οργανισμός Υγείας έχει θέσει ως όριο για τους ανθρώπους για ημερήσια κατανάλωση MC-LR τα 0,04 mg ανά κιλό σωματικού βάρους.

Εκτεταμένες έρευνες για τις επιδράσεις των MCs στα φυτά αναφέρουν προβλήματα στην βλάστηση, την περιεκτικότητα σε χλωροφύλλη, την φωτοσύνθεση καθώς και στη διαπερατότητα της πλασματικής μεμβράνης. Όλα αυτά έχουν αρνητικά αποτελέσματα στην ανάπτυξη και την απόδοση των φυτών (Machado et al. 2016; Bittencourt-Oliveira et al. 2016). Οι μικροκυστίνες δρουν ως αναστολείς της πρωτεϊνικής φωσφατάσης καθώς και επαγωγείς της παραγωγής ενεργών μορφών οξυγόνου (ROS) προκαλώντας οξειδωτικό στρες, με αποτέλεσμα να εμπλέκονται σε πολλές φυσιολογικές και μοριακές διαδικασίες στα φυτά (Machado 2017). Αυτό έχει ως συνέπεια, σύμφωνα με τα αντίστοιχα πειραματικά αποτελέσματα να επηρεάζεται η ανάπτυξη των ιστών, η ενεργοποίηση ενζύμων για την καθήλωση του CO₂, η αποθήκευση του αμύλου και ο μεταβολισμός του άνθρακα και του αζώτου (Corbel et al. 2014). Επιπλέον, η άρδευση με νερό πλούσιο σε MCs επηρεάζει τις συγκεντρώσεις κάποιων μακροστοιχείων και ιχνοστοιχείων στις ρίζες και στα φύλλα, όπως για παράδειγμα η μείωση P και Mo (Machado et al 2016; Machado et al. 2017). Ο βαθμός των αρνητικών επιπτώσεων των MCs σχετίζεται με το είδος του φυτού που εκτίθεται, το στάδιο ανάπτυξης (όσο πιο μικρό ηλικιακά τόσο και πιο ευαίσθητο), τον χρόνο έκθεσης καθώς και τη φύση -καθαρή ή ακατέργαστο νερό που την περιέχει- και την συγκέντρωση της τοξίνης (Levizou et al. 2017, Machado et al. 2017). Η βιοσυσσωρευση των MCs είναι συνήθως μεγαλύτερη στη ρίζα των φυτών σε σχέση με το υπέργειο μέρος (Gutierrez et al., 2014, Levizou et al. 2017). Ο τρόπος άρδευσης, εάν δηλαδή οι MCs ψεκάζονται πάνω στο φύλλωμα ή εισέρχονται στο φυτό από τις ρίζες, παίζει επίσης σημαντικό ρόλο στη συγκέντρωση των MCs που βιοσυσσωρεύεται (Corbel et al, 2014). Τέλος, η συγκέντρωση MCs που καταλήγει να απορροφά το φυτό επηρεάζεται από τη σύσταση του εδάφους και τα βακτήρια που συγκροτούν την εδαφόβια βιοκοινωνία -όπως π.χ. τα *Arthrobacter* sp., *Brevibacterium* sp., *Rhodococcus* sp., *Sphingomonas* sp.) που είναι ικανά να αποικοδομούν τις MCs (Machado 2016).

1.3 Μυκόρριζες

Οι μυκόρριζες είναι συμβιώσεις των ριζών των φυτών με συγκεκριμένα είδη μυκήτων που είναι υποχρεωτικά συμβιωτικοί οργανισμοί. Υπάρχουν πολλές κατηγορίες μυκορριζών, στις οποίες οι σχέσεις μπορεί να είναι αμοιβαίας ωφέλειας ή να καταλήγουν παρασιτικές από την πλευρά του μύκητα (Pfleger and Lindman 1994). Στη φύση το 95% των φυτών σε διάφορα οικοσυστήματα σχηματίζουν μυκόρριζες. Οι πιο σημαντικές για τα φυτά είναι οι ενδομυκόρριζες, ιδιαίτερα οι δενδοειδείς (arbuscular mycorrhizae, AMF, Zygomycota) και οι εκτομυκόρριζες (ectomycorrhizae, EMF, Basidiomycota and Ascomycota). Αξίζει να σημειωθεί ότι οι EMF μπορούν να επιβιώσουν και ως σαπροφυτικοί μύκητες ενώ οι AMF όχι. Επίσης ένα ριζικό σύστημα μπορεί να συμβιώνει με παραπάνω από ένα είδος μυκορριζικών μυκήτων την ίδια χρονική στιγμή (Pfleger and Lindman 1994).

Οι μυκόρριζες δημιουργούν μια κατάσταση στην οποία και οι δύο συμμετέχοντες επωφελούνται. Ο μύκητας παίρνει από το φυτό δεσμευμένο άνθρακα και το φυτό λαμβάνει από αυτόν θρεπτικά στοιχεία -κυρίως φώσφορο, αλλά και άζωτο σε ορισμένες περιπτώσεις (Podila and Douds 2000). Οι μυκόρριζες και πιο συγκεκριμένα οι AMF με τις υφές τους δημιουργούν ένα εκτεταμένο δίκτυο στην ριζόσφαιρα και γύρω από αυτήν, επεκτείνοντάς την και δημιουργώντας μια μυκορριζόσφαιρα. Έτσι προσφέρουν στο φυτό πρόσβαση σε μια «δεξαμενή» θρεπτικών κάποια από τα οποία είναι δυσκίνητα στο έδαφος (πχ. φώσφορος). Το δίκτυο αυτό δίνει ακόμα και την δυνατότητα να συνδέονται φυτά μεταξύ τους και να ανταλλάσσουν θρεπτικά μέσω των AMF. Επίσης μεταξύ των νεκρών ριζών και των ενεργών υπάρχει σύνδεση μέσω των AMF με μεταφορά των θρεπτικών από τις νεκρές στις ενεργές (Pfleger and Linderman 1994). Αξίζει να σημειωθεί ότι οι υφές των μυκορριζών έχουν την δυνατότητα να επηρεάζουν το pH του εδάφους με την παραγωγή οργανικών οξέων. Επίσης, έχει αποδειχθεί ότι η παρουσία μυκόρριζων παρέχει μία αυξημένη προστασία στα φυτά απέναντι σε διάφορους εχθρούς και ασθένειες (παθογόνα εδάφους, νηματώδεις κ.α.).

Συνοπτικά, οι AMF και γενικά οι μυκόρριζες έχουν πολλούς τρόπους να επηρεάζουν την ανάπτυξη των φυτών και την κατάσταση του εδάφους. Προσφέρουν στα φυτά θρεπτικά που είτε είναι δυσκίνητα στο έδαφος είτε είναι πιο μακριά από το ριζικό

σύστημα του φυτού, άμεση ανταλλαγή θρεπτικών με άλλα κοντινά φυτά καθώς και αυξημένη προστασία απέναντι σε εχθρούς και ασθένειες. Επίσης, οι μυκόρριζες μπορούν να μεταβάλλουν το pH του εδάφους, να αυξήσουν την οργανική ουσία και τα διαθέσιμα θρεπτικά και δευτερογενώς να συνεισφέρουν στη μείωση της διάβρωσης (Pfleger and Linderman 1994).

Με τον τρόπο αυτό οι μυκόρριζες μπορούν να δημιουργούν ένα παραγωγικό σύστημα με θετικά αποτελέσματα στην ανάπτυξη και την παραγωγή των φυτών που αποικίζουν.

1.4 Σέλινο

Το σέλινο (*Apium graveolens L.*) ανήκει στα Σκιαδανθή (οικογένεια Apiaceae) με περίπου 30 είδη. Το μόνο καλλιεργούμενο είδος είναι το *Apium graveolens* με δύο τύπους καλλιέργειας το stalk celery και το celeriac. Στην Ελλάδα καλλιεργείται κυρίως το stalk celery και η σελινόρριζα (Χα και Πετρόπουλος 2014). Το σέλινο καλλιεργείται για τα φύλλα και τα στελέχη του καθώς και για την ρίζα του, τα οποία χρησιμοποιούνται στην μαγειρική είτε ως νωπά, ως μαγειρεμένα είτε ως αποξηραμένα (Χα και Πετρόπουλος 2014). Καλλιεργείται και για τους σπόρους του και χρησιμοποιείται στην αρωματοποιία ή και ως μπαχαρικό. Έχει αντικαρκινικές ιδιότητες και οι σπόροι του περιέχουν λίπη, υδατάνθρακες, ιχνοστοιχεία και είναι πηγή βιταμινών B3 και B6 (Χα και Πετρόπουλος 2014).

1.5 Σκοπός της εργασίας

Υπάρχει πληθώρα ερευνητικών εργασιών που μελετούν τις επιδράσεις των μυκόρριζων στα φυτά, αλλά και τις επιδράσεις της παρουσίας MCs στο αρδευτικό νερό και το έδαφος. Εντούτοις παρουσιάζεται ένα κενό στην έρευνα της αλληλεπίδρασης και των συνδυαστικών επιπτώσεων μικροκυστινών και μυκόρριζων σε φυτά. Το παρόν πείραμα εκπονήθηκε με σκοπό την εκτίμηση των φυσιολογικών αποκρίσεων των φυτών σέλινου κατά την άρδευση με νερό όπου εμπεριέχονται μικροκυστίνες διαφόρων συγκεντρώσεων, με ή χωρίς την παρουσία μυκορριζών, από το στάδιο του σπόρου μέχρι την συλλογή.

ΥΛΙΚΑ ΚΑΙ ΜΕΘΟΔΟΙ

2.1 Φυτικό υλικό και μεταχειρίσεις

Το πειραματόφυτο ήταν το σέλινο, *Arium graveolens var. Dulce*. Το σέλινο είναι φυτό ψυχρής εποχής και φτάνει σε ύψος 40εκ-100εκ. (Χα και Πετρόπουλος 2014). Φτιάχνει κεντρική ρίζα και πολλές πλευρικές αλλά εάν κατά τη μεταφύτευση η κεντρική ρίζα τραυματιστεί σχηματίζεται επιφανειακό θυσσανώδες ριζικό σύστημα (Χα και Πετρόπουλος 2014). Τα φύλλα του είναι σύνθετα, έχουν έως 7 φυλλάρια με μακρύ, φαρδύ σαρκώδες μίσχο, σχηματίζουν ροζέτα και έχουν βαθύ σκούρο πράσινο χρώμα (εκτός κάποιων ποικιλιών) (Χα και Πετρόπουλος 2014).

Το πειραματικό σχέδιο περιελάμβανε 10 μεταχειρίσεις, στις οποίες περιλαμβάνονταν 3 παράγοντες: παρουσία ή όχι AMF, παρουσία 2 συγκεντρώσεων MC-LR (2 και 20 $\mu\text{g l}^{-1}$) και επαναφορά από την MC-LR (R). Όλος ο πειραματικός σχεδιασμός περιγράφεται αναλυτικά παρακάτω.

Μεταχειρίσεις

	AMF	MC2	MC20	κωδικοποίηση	
1	-	-	-	0-	Σχηματοποιήθηκαν κατά την 1η μεταφύτευση
2	-	+		2-	
3	-		+	20-	
4	+	+		0+	
5	+		+	2+	
6	+	-	-	20+	
7	-	+		2-R	Σχηματοποιήθηκαν κατά την 2η μεταφύτευση
8	-		+	20-R	
9	+	+		2+R	
10	+		+	20+R	

Πίνακας 1 Το πλάνο των πειραματικών μεταχειρίσεων (treatments).

- Τα 1 και 4 είναι οι μάρτυρες: πότισμα με νερό βρύσης.
- AMF: παρουσία ή μη μυκορριζών.

- MC2: πότισμα με καθαρή μικροκυστίνη MC-LR (Cayman Chemical, USA) συγκέντρωσης 2μg l⁻¹.
- MC20: πότισμα με καθαρή μικροκυστίνη MC-LR συγκέντρωσης 20μg l⁻¹

2.2 Υπόστρωμα

Ως υπόστρωμα χρησιμοποιήθηκε περλίτης και χώμα το οποίο πάρθηκε από το αγρόκτημα του Πανεπιστημίου στο Βελεστίνο. Έγινε άπλωμα του χώματος για απομάκρυνση της υγρασίας του και κοσκίνισμα χώματος (κόσκινο 4mm) για απομάκρυνση των σβόλων. Το χώμα (~100 λίτρα) αποστειρώθηκε 2 φορές (με μεταξύ τους διάστημα 3 ημερών) και ο περλίτης (100 λίτρα) 1 φορά. Η αποστείρωση έγινε σε αυτόκαυστο για μία ώρα στους 121°C και 2 atm.

2.3 Στάδιο σπόρου και 1^η μεταφύτευση

Σπόροι ποικιλίας σέλινου *Apium graveolens var. Dulce* 3275 CELERY VERDE DA TAGLIO τοποθετήθηκαν αρχικά σε τρυβλία. Τα σπέρματα τοποθετήθηκαν σε θάλαμο ανάπτυξης σε θερμοκρασία 20°C και φωτοπερίοδο 10 ώρες φως, 14 ώρες σκοτάδι. Τοποθετήθηκαν σε 9 τρυβλία, 3 τρυβλία ανά μεταχείριση, τα οποία ποτίζονταν με νερό, διάλυμα MC2 και MC20 αντίστοιχα. Όταν η βλαστικότητα των σπόρων έφτασε πάνω από το 80% (~ 20 ημέρες μετά) έγινε μεταφύτευση αρτίβλαστων από τα τρυβλία σε θήκες φυτωρίου που περιείχαν μείγμα (αποστειρωμένου) χώματος και περλίτη 2:1 και τοποθέτησή τους στο θερμοκήπιο του Εργαστηρίου Γενετικής του Τμήματος Γεωπονίας Φυτικής Παραγωγής και Αγροτικού Περιβάλλοντος του Πανεπιστημίου Θεσσαλίας. Στο σημείο αυτό έγινε ο πρώτος διαχωρισμός των AMF+ και AMF-. Πιο συγκεκριμένα για τα AMF+, όταν το υπόστρωμα κάλυπτε το 1/3 της θήκης, τοποθετούνταν εμβόλιο του μύκητα Φ3 (*Rhizophagus irregularis*) ψεκάζονταν με νερό και στη συνέχεια τοποθετούνταν το αρτίβλαστο. Αντίστοιχη ήταν η διαδικασία για τα AMF-, χωρίς φυσικά την προσθήκη εμβολίου. Υπήρχε καθημερινός έλεγχος του φυτωρίου με καθημερινή άρδευση των φυταρίων με 25 ml διαλύματος για κάθε treatment.

2.4 2^η Μεταφύτευση

Μετά από 26 ημέρες και αφότου τα φυτά είχαν αναπτυχθεί ικανοποιητικά για να επιδέχονται μεταφύτευση έγινε και 2^η μεταφύτευση. Έγινε επιλογή των 15 πιο μεγάλων και ανεπτυγμένων φυτών από κάθε μεταχείριση, τα οποία εγκαταστάθηκαν σε γλάστρες του 1 L που περιείχαν αποστειρωμένο χώμα και αποστειρωμένο περλίτη σε αναλογία 2:1. Για τις γλάστρες με μυκόρριζες (+) τοποθετήθηκε ξανά, με την ίδια ακριβώς διαδικασία με την 1^η μεταφύτευση, εμβόλιο του ίδιου μυκορριζικού μύκητα. Στο στάδιο αυτό έγινε ο τελικός διαχωρισμός των μεταχειρίσεων, καθώς 5 φυτά από κάθε ομάδα που ποτίζονταν έως εκείνη τη στιγμή με MC-LR, αμέσως μετά τη 2^η μεταφύτευση άρχισαν να ποτίζονται με νερό βρύσης. Δημιουργήθηκαν έτσι οι μεταχειρίσεις επαναφοράς (R), συγκεκριμένα τα 2-R, 2+R, 20-R, 20+R (Πιν. 1). Όλα τα φυτά ποτίστηκαν με 100 ml διαλύματος-αντίστοιχου κάθε μεταχείρισης.

Στην συνέχεια τα σπορόφυτα αρδεύονταν σύμφωνα με το πλάνο ανά 2 ημέρες αλλά η δόση υπολογίζονταν να είναι λιγότερη σε μέρες με βροχερό και συννεφιασμένο καιρό. Ανά εβδομάδα γινόταν rotation, αλλαγή δηλαδή των θέσεων των μεταξύ μεταχειρίσεων και γλαστρών στην ίδια μεταχείριση για αποφυγή της επίδρασης μικροθέσης. Επίσης, κατά τις πρώτες ημέρες της 2^{ης} μεταφύτευσης πραγματοποιήθηκε 2 φορές με διαφορά μίας εβδομάδας υδρολίπανση με διάλυμα Hoagland χωρίς P σε όλα τα φυτά (100ml ανά φυτό). Κάποιες αφίδες που πρόσβαλαν κάποια φυτά αφαιρέθηκαν με το χέρι. 9 ημέρες πριν την λήξη του πειράματος πραγματοποιήθηκαν 3 μετρήσεις με φθορισμόμετρο συνεχούς διέγερσης τύπου Handy- Pea και χλωροφύλλης.

2.5 Λήξη του πειράματος και συγκομιδή

Το πείραμα διήρκησε 84 ημέρες (16/3/2018-8/6/2018). Κατά την τελική συγκομιδή διαχωρίστηκε το υπέργειο από το υπόγειο μέρος των φυτών. Στο πρώτο μετρήθηκε αμέσως μετά την αποκοπή το νωπό βάρος και πραγματοποιήθηκε σκανάρισμα του επίγειου μέρους των φυτών για επεξεργασία του εμβαδού κάθε φυτού. Όσον αφορά υπόγειο μέρος των φυτών, το υπόστρωμα διαχωρίστηκε από τις ρίζες των φυτών με την χρήση κόσκινου 4 mm προκειμένου να συλλεχθεί η ρίζα. Τόσο το υπέργειο, όσο

και η ρίζα τοποθετήθηκαν σε ξηραντήρα για 2 ημέρες, μέχρις ότου κατέληξαν σε σταθερό ξηρό βάρος, το οποίο ζυγίστηκε σε ηλεκτρονικό ζυγό ακριβείας.

2.6 Μέτρηση φθορισμού

Στο πλαίσιο του πειράματος πραγματοποιήθηκαν μετρήσεις στα φύλλα των σπορόφυτων με το φθορισμόμετρο συνεχούς διέγερσης Handy-PEA (Hansatech Instruments, Germany). Μετρήθηκαν 48 φυτά από όλα τα treatments τρεις φορές, στις 31/5/2018, 2/6/2018 και 5/6/2018. Στις 5/6/2018 μετρήθηκαν 45 φυτά. Το όργανο αποτελείται από την κεντρική μονάδα και ένα καλώδιο που καταλήγει σε μια κεφαλή με τρεις λαμπτήρες τύπου LED. Η κεφαλή προσαρμόζεται στα φύλλα με την βοήθεια ειδικών μανταλακίων (leaf clips). Τα ειδικά μανταλάκια διαθέτουν ειδικό κλείστρο που αποτρέπει ή επιτρέπει την είσοδο του φωτός. Οι λαμπτήρες εκπέμπουν φως μέχρι $3000 \mu\text{mol photons m}^{-2} \text{ s}^{-1}$ με μέγιστο εκπομπής 650 nm. Ο φθορισμός των φύλλων εντοπίζεται από ειδικό ανιχνευτή που βρίσκεται στο κέντρο της κεφαλής και είναι προσαρμοσμένος για ανίχνευση φθορισμού στα 700 nm ενώ σε μικρότερα μήκη κύματος δεν επηρεάζεται λόγω ειδικού φίλτρου. Η αρχή λειτουργίας του οργάνου βασίζεται στην ικανότητα των λαμπτήρων LED να εκπέμπουν σταθερή ένταση φωτός περιορισμένου εύρους. Το όργανο χρησιμοποιείται σε προσκοτεινιασμένους ιστούς και γενικά ο ιστός που μετριέται να μην δέχεται φως από άλλη πηγή. Ο εκπεμπόμενος φθορισμός βασίζεται στο μήκος κύματος και συγκεκριμένα βρίσκεται σε μήκη κύματος μεγαλύτερα από της πηγής. Με τον τρόπο αυτό το φθορισμόμετρο συνεχούς διέγερσης καταφέρνει να πάρει μετρήσεις της ταχείας φάσης επαγωγής του φθορισμού της χλωροφύλλης ώστε να αρθούν πληροφορίες για τις αποδόσεις και ροές ενέργειας κατά μήκος της οξειδοαναγωγικής αλυσίδας των φωτεινών αντιδράσεων. Οι μετρήσεις πραγματοποιήθηκαν πολύ νωρίς το πρωί κατά την ανατολή του ηλίου. Τα φύλλα έμειναν στο σκοτάδι με τα ειδικά μανταλάκια για 20 λεπτά και κατόπιν ανοίχτηκαν τα ειδικά κλείστρα, εφαρμόστηκε η κεφαλή του φθορισμόμετρου σε καθένα από αυτά και έγιναν οι μετρήσεις.

2.7 Μέτρηση χλωροφυλλών

Η μέτρηση χλωροφυλλών έγινε με την χρήση χλωροφυλλόμετρου SPAD. Είναι ένα φορητό όργανο που δίνει τιμές ολικής χλωροφύλλης στο φύλλο. Το όργανο έχει ως

αρχή λειτουργίας την εξής: η χλωροφύλλη έχει σχεδόν μηδενική διαπερατότητα στην περιοχή κοντά στο υπέρυθρο και επίσης έχει δύο κορυφές διαπερατότητας, στην περιοχή 400-500nm και στα 600-700nm. Έτσι το όργανο μετρά την διαπερατότητα του φύλλου στην περιοχή του ερυθρού και του υπέρυθρου και υπολογίζει το ποσοστό παρουσίας της χλωροφύλλης. Πρακτικά γίνεται επιλογή 4-5 καλών φύλλων από κάθε μεταχείριση και τοποθετείται η ειδική υποδοχή σαν μανταλάκι που διαθέτει το όργανο και λαμβάνονται οι τιμές.

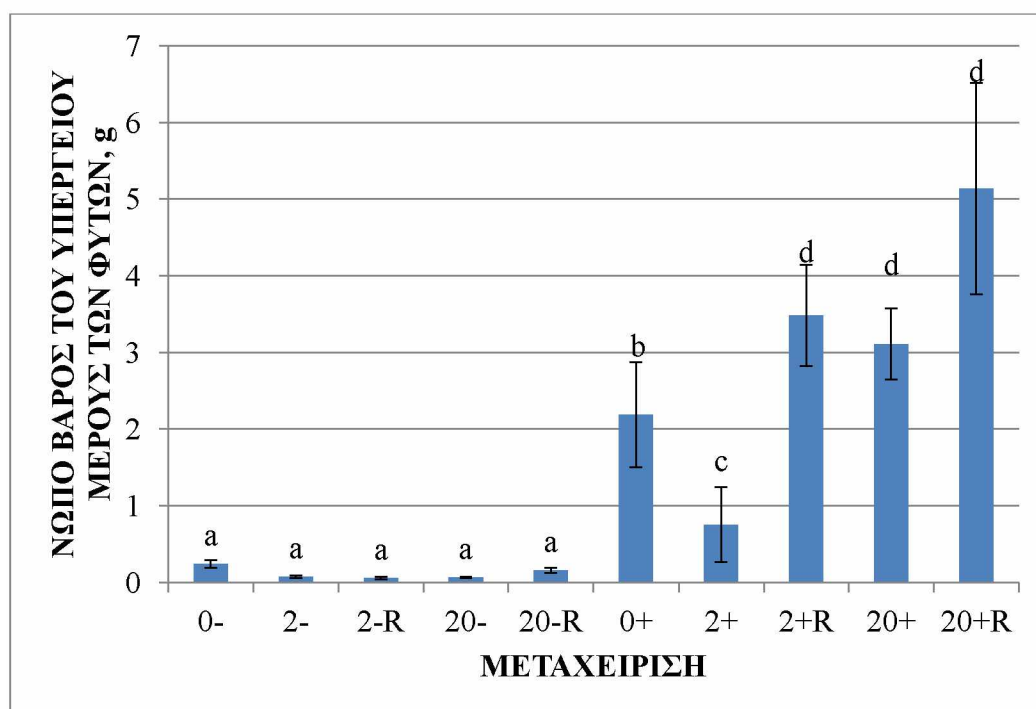
2.8 Στατιστική Ανάλυση

Ο έλεγχος των διαφορών μεταξύ των μεταχειρίσεων πραγματοποιήθηκε με Factorial ANOVA, στην οποία οι 3 παράγοντες ήταν οι MC (συγκέντρωση μικροκυστινών), AMF (παρουσία μυκορριζών) και R (περίοδος ανάκαμψης, recovery). Στις περιπτώσεις που εμφανίστηκαν στατιστικά σημαντικές διαφορές ($p < 0.05$), ακολούθησε νέα σειρά απλοποιημένων αναλύσεων και post-hoc tests (LSD). Το στατιστικό πρόγραμμα που χρησιμοποιήθηκε ήταν το SPSS (v24.0, IBM corp.)

Αποτελέσματα

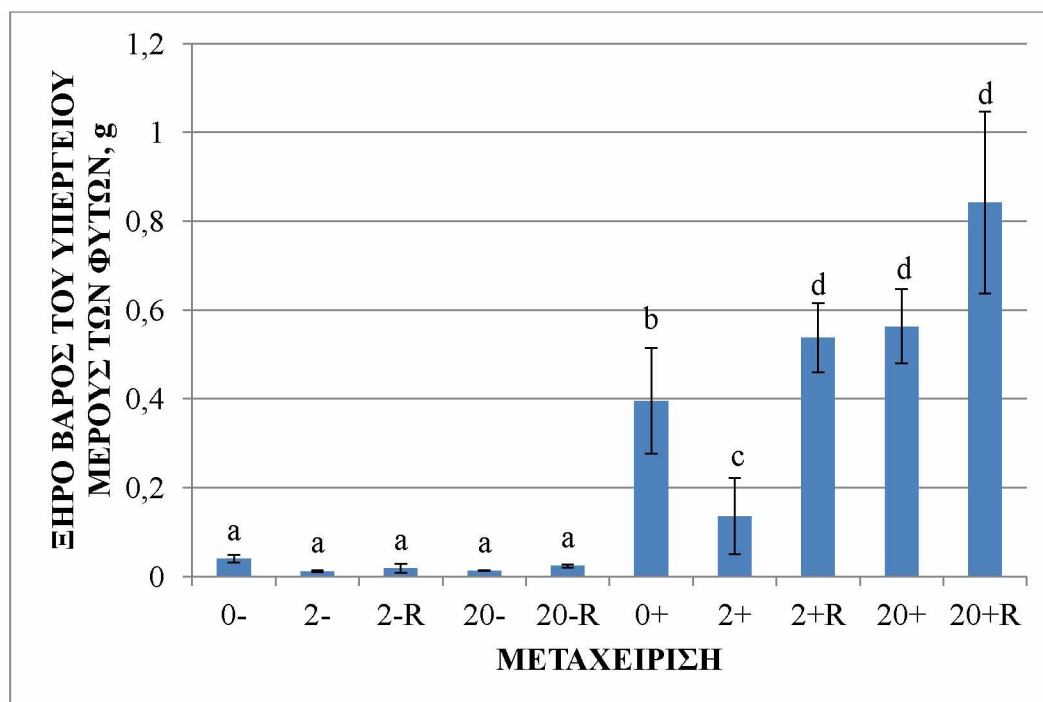
3.1 Μορφολογικές μετρήσεις

Στο γράφημα 1 παρουσιάζεται ο μέσος όρος του νωπού βάρους του υπέργειου τμήματος των φυτών για κάθε μεταχείριση. Οι μεταχειρίσεις με την παρουσία μυκορριζών διαφέρουν στατιστικά σημαντικά από αυτές χωρίς μυκορριζες με τις αυτές που έχουν μυκορριζες να έχουν μεγαλύτερο Μ.Ο. Επίσης υπάρχει μια διαφορά στις μεταχειρίσεις με μυκορριζες καθώς το 0+ διαφέρει από όλα τα άλλα όπως και το 2+. Οι δύο αυτές μεταχειρίσεις εμφανίζουν μικρότερο Μ.Ο νωπού βάρους από τα υπόλοιπα με μυκορριζες και μεγαλύτερο από τις μεταχειρίσεις χωρίς μυκορριζες. Μεταξύ τους το 0+ έχει μεγαλύτερο Μ.Ο από το 2+. Επομένως, καταγράφηκε στατιστική επίδραση των 3 παραγόντων χωριστά και αλληλεπίδραση MC*AMF και AMF*R, αλλά όχι και των 3 μαζί.



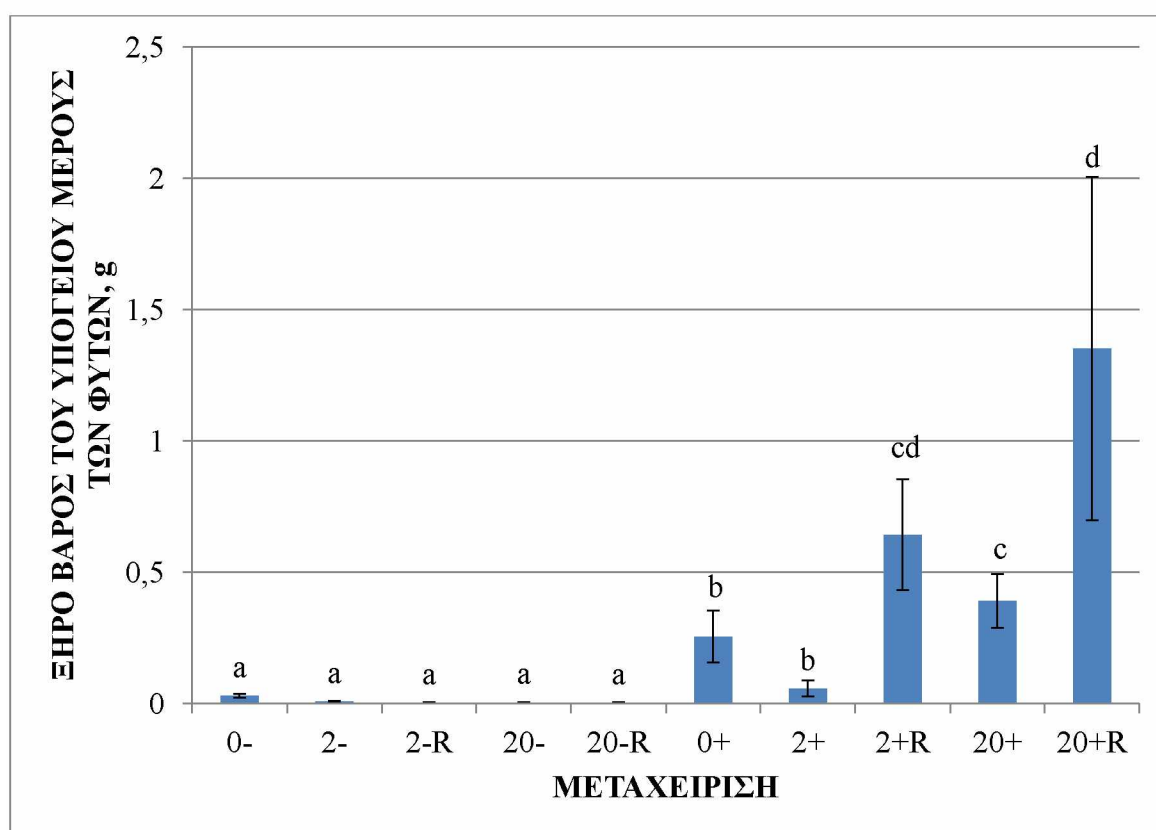
Γράφημα 1. Νωπό βάρος υπέργειου τμήματος των φυτών κάθε μεταχείρισης (Μ.Ο ±SD). Τα διαφορετικά γράμματα υποδεικνύουν στατιστικώς σημαντικές διαφορές ($p < 0,05$).

Στο γράφημα 2 παρουσιάζεται ο μέσος όρος του ξηρού βάρους του υπέργειου τμήματος των φυτών για κάθε μεταχείριση. Οι τιμές παρουσιάζουν την ίδια διακύμανση με το γράφημα 1 όπου οι μεταχειρίσεις χωρίς μυκόρριζες διαφέρουν σημαντικά από αυτές με μυκόρριζες και οι πρώτες έχουν μικρότερο Μ.Ο από τις δεύτερες. Επίσης το 0+ διαφέρει από όλα όπως και το 2+ καθώς επίσης και το 0+ έχει μεγαλύτερο Μ.Ο από το 2+. Αντίστοιχα με το νωπό βάρος, και εδώ καταγράφηκε στατιστική επίδραση των 3 παραγόντων χωριστά και αλληλεπίδραση MC*AMF και AMF*R, αλλά όχι και των 3 μαζί.



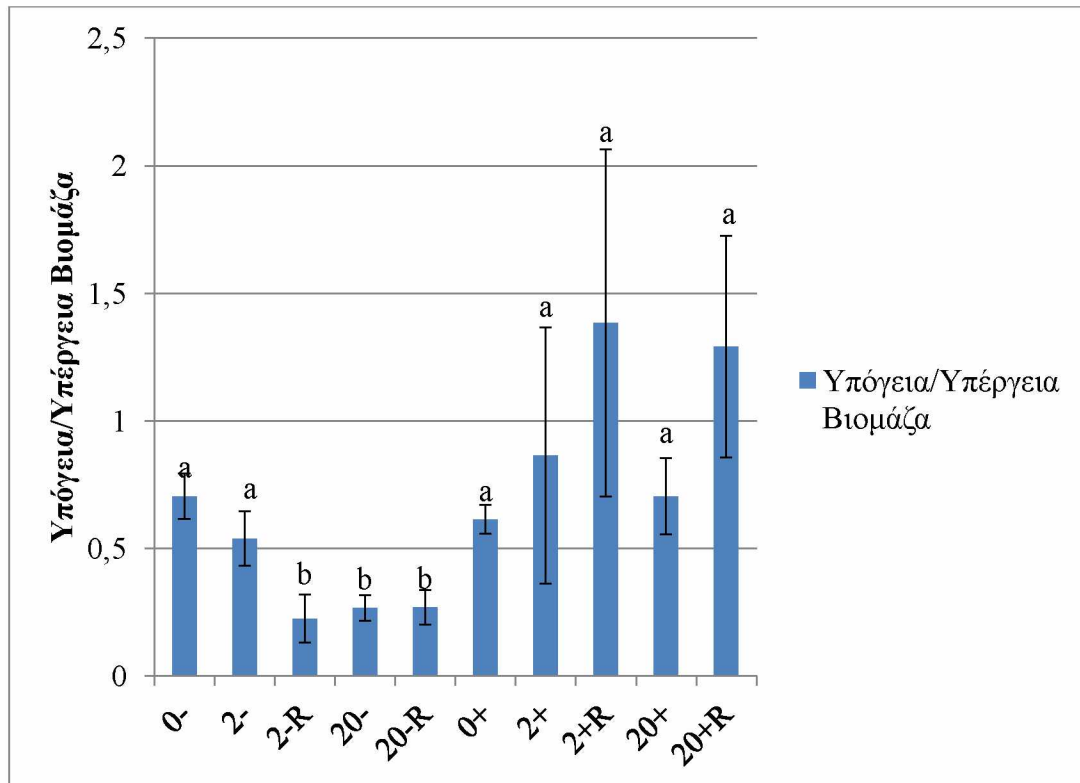
Γράφημα 2. Ξηρό βάρος υπέργειου τμήματος των φυτών κάθε μεταχείρισης (Μ.Ο ± SD). Τα διαφορετικά γράμματα υποδεικνύουν στατιστικώς σημαντικές διαφορές ($p < 0,05$).

Στο γράφημα 3 παρουσιάζεται ο Μ.Ο του ξηρού βάρους του ριζικού συστήματος των φυτών για κάθε μεταχείριση. Υπάρχει στατιστικά σημαντική διαφορά μεταξύ των μεταχειρίσεων AMF+ και AMF- με τις δεύτερες να έχουν πολύ μικρές τιμές σε σχέση με τις πρώτες. Καταγράφηκε στατιστική επίδραση μόνο των 2 παραγόντων χωριστά: AMF και R, αλλά και αλληλεπίδρασή τους (AMF*R), αλλά όχι και των 3 παραγόντων μαζί. Η εικόνα στα AMF+ φυτά είναι παρόμοια με τις αντίστοιχες του νωπού και ξηρού βάρους του υπέργειου μέρους. Συγκεκριμένα, τα 0+ και 2+ φυτά είχαν σημαντικά μικρότερη ρίζα από τις υπόλοιπες μεταχειρίσεις, ενώ τα R φυτά υπερείχαν σημαντικά από τις αντίστοιχες μεταχειρίσεις που συνέχισαν να δέχονται MCs (δηλ. τα 2+ και 20+).



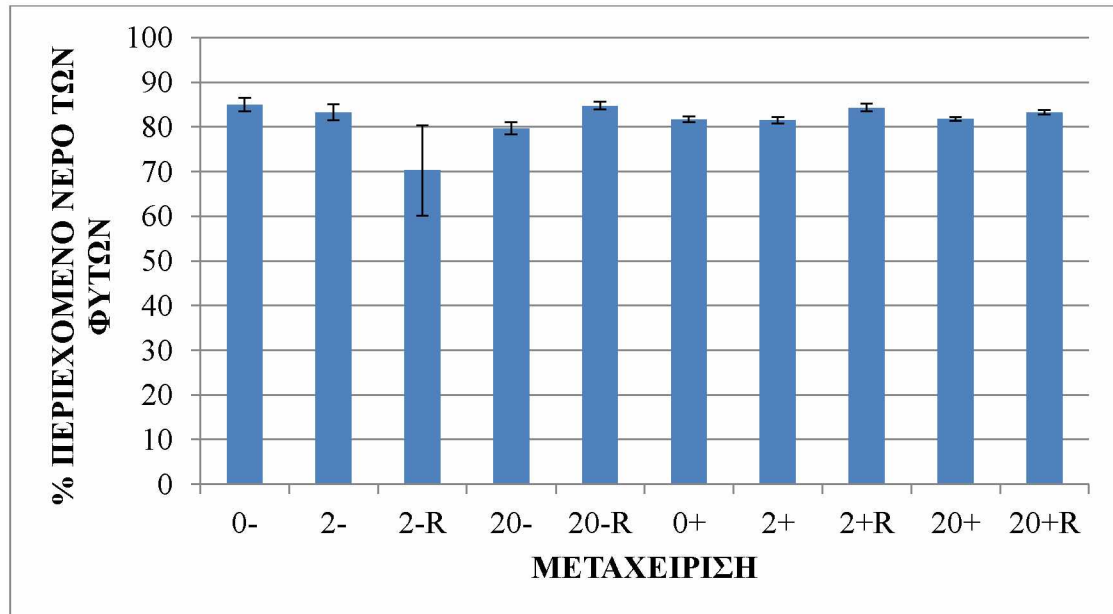
Γράφημα 3. Ξηρό βάρος του υπόγειου τμήματος των φυτών κάθε μεταχείρισης (Μ.Ο ± SD). Τα διαφορετικά γράμματα υποδεικνύουν στατιστικώς σημαντικές διαφορές ($p < 0,05$).

Στο γράφημα 4 παρουσιάζεται ο λόγος της υπόγειας προς την υπέργεια βιομάζα για κάθε μεταχείριση. Τα 2-R, 20- και 20-R διαφέρουν σημαντικά από όλα τα άλλα έχοντας τις μικρότερες τιμές.



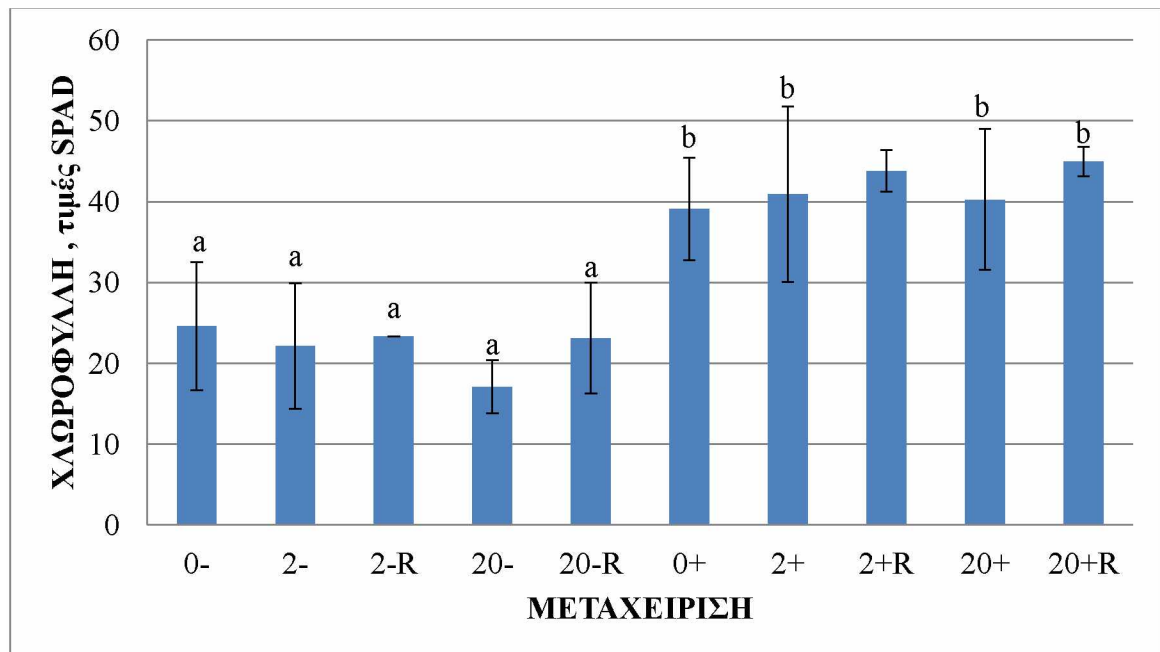
Γράφημα 4. Ο λόγος υπόγειας προς υπέργεια βιομάζα των φυτών κάθε μεταχείρισης (M.O ± SD). Τα διαφορετικά γράμματα υποδεικνύουν στατιστικώς σημαντικές διαφορές ($p < 0,05$).

Στο γράφημα 5 παρουσιάζεται το περιεχόμενο νερό για το υπέργειο μέρος των φυτών κάθε μεταχείρισης, εκφρασμένο ως % ποσοστό. Παρατηρείται ότι δεν υπάρχει σημαντική διαφορά μεταξύ των μεταχειρίσεων. Η χαμηλότερη τιμή καταγράφηκε στο 2-R.



Γράφημα 5. Το % ποσοστό του περιεχόμενου νερού του υπέργειου μέρους των φυτών κάθε μεταχείρισης (ΜΟ± SD).

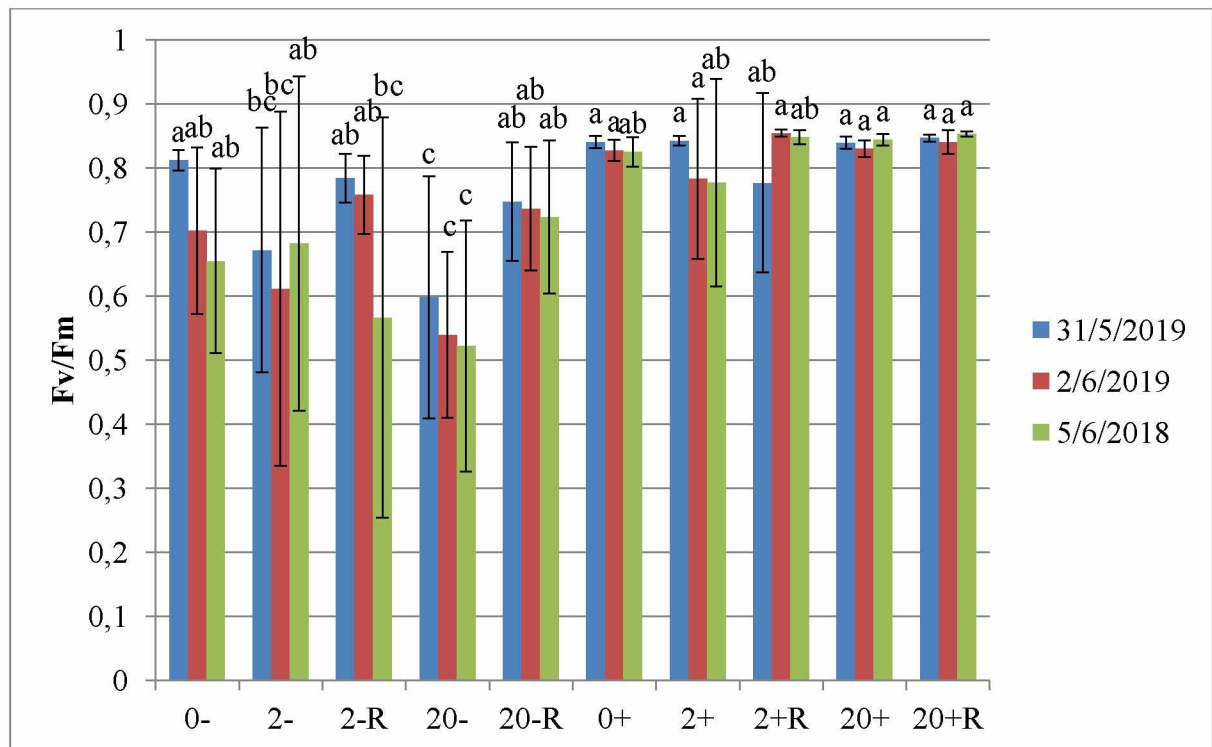
Στο γράφημα 6 παρουσιάζονται οι μέσοι όροι των τελικών τιμών SPAD της χλωροφύλλης των φυτών για κάθε μεταχείριση στις 5/6/2018 όπου λήφθηκε η τελευταία μέτρηση. Καταγράφηκε ότι διαφέρουν στατιστικώς σημαντικά οι μεταχειρίσεις χωρίς μυκόρριζες με αυτές με μυκόρριζες.



Γράφημα 6. Οι τιμές SPAD των φυτών κάθε μεταχείρισης κατά την τελική συλλογή (M.O \pm SD). Τα διαφορετικά γράμματα υποδεικνύουν στατιστικώς σημαντικές διαφορές ($p < 0,05$).

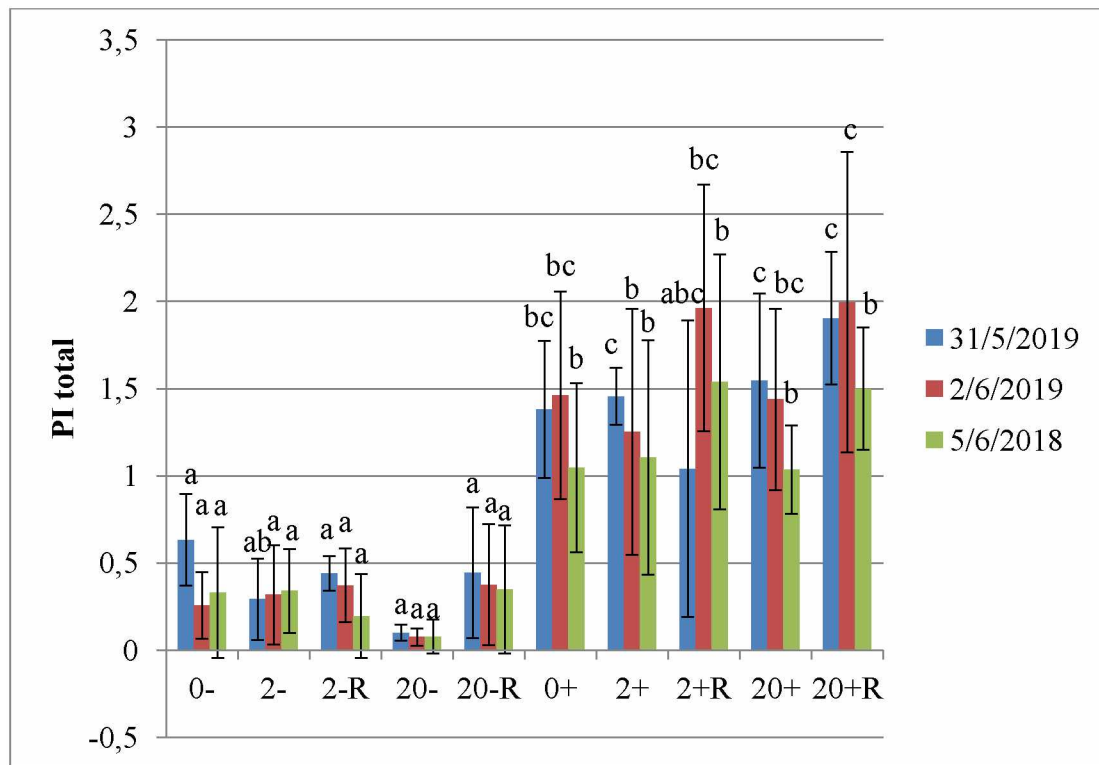
3.2 Μέτρηση παραμέτρων φθορισμού της χλωροφύλλης *a in vivo*

Στο γράφημα 7 παρουσιάζονται οι μέσες τιμές του δείκτη Fv/Fm για κάθε μεταχείριση για τις 31/5/2018, 2/6/2018 και 5/6/2018. Για τις 31/5/2018 οι τιμές φαίνονται να μην διαφέρουν σημαντικά εκτός του 20- που διέφερε από όλα τα άλλα εκτός του 2-. Το 2- ήταν παρόμοιο επίσης με το 2-R και το 20-R. Στις 2/6/2018 οι τιμές εμφάνισαν μια πτώση στις μεταχειρίσεις χωρίς μυκόρριζες παραμένοντας όμως η εικόνα σχετικά με τις διαφορές ίδια με τις 31/5/2018. Αλλαγή παρουσίασε μόνο το 0- όπου ήταν παρόμοιο με τις υπόλοιπες μεταχειρίσεις χωρίς μυκόρριζες εκτός του 20- από το οποίο διέφερε σημαντικά. Στις 5/6/2018 οι μεταχειρίσεις 0-, 2-R και 20- εμφάνισαν περαιτέρω πτώση. Οι μεταχειρίσεις είχαν παρόμοιες τιμές εκτός του 20- που διέφερε στατιστικώς σημαντικά από όλα εκτός του 2-R. Ακόμη το 20+ και το 20+R διαφέρει στατιστικώς σημαντικά από το 2-R και του 20-. Γενικά οι μεταχειρίσεις με παρουσία μυκόρριζας είχαν σταθερότητα στις τιμές με την πάροδο του χρόνου ενώ οι μεταχειρίσεις χωρίς μυκόρριζα είχαν μια σταδιακή πτώση εκτός του 2- που παρουσίασε μία μικρή πτώση στις 2/6/2018 και μετά επανήλθε στα επίπεδα στις 31/5/2018.



Γράφημα 7. Ο δείκτης Fv/Fm για κάθε μεταχείριση για τις 31/5/2018, 2/6/2018 και 5/6/2018 (M.O ± SD). Τα διαφορετικά γράμματα υποδεικνύουν στατιστικώς σημαντικές διαφορές μεταξύ των μεταχειρίσεων για την ίδια ημερομηνία ($p < 0,05$).

Στο γράφημα 8 παρουσιάζονται οι μέσες τιμές του δείκτη PI total για κάθε μεταχείριση στις 31/5/2018, 2/6/2018 και 5/6/2018. Στις 31/5/2018 οι μεταχειρίσεις χωρίς μυκόρριζα διαφέρουν στατιστικώς σημαντικά από αυτές με μυκόρριζα με εξαίρεση το 2+R που είναι παρόμοιο στατιστικά με όλα. Ακόμη το 2- είναι παρόμοιο με το 0+. Στις 2/6/2018 παρουσιάζεται μία πτώση στις τιμές των μεταχειρίσεων χωρίς μυκόρριζα και διαφέρουν στατιστικώς σημαντικά από όλες τις μεταχειρίσεις με την παρουσία μυκόρριζας. Στις 5/6/2018 υπάρχει μία πτώση του δείκτη σε όλες τις μεταχειρίσεις. Επίσης ισχύει για τις 5/6/2018 ότι οι μεταχειρίσεις χωρίς μυκόρριζα διαφέρουν στατιστικώς σημαντικά από τις μεταχειρίσεις με μυκόρριζα. Επίσης παρατηρείται μία αύξηση του δείκτη στις 2/6/2018 για τις μεταχειρίσεις 0+, 2+R και 20+R.



Γράφημα 8 Μέσες τιμές του δείκτη PI total για κάθε μεταχείριση για τις 31/5/2018, 2/6/2018, 5/6/2018 (M.O ± SD). Τα διαφορετικά γράμματα υποδεικνύουν στατιστικώς σημαντικές διαφορές μεταξύ των μεταχειρίσεων για την ίδια ημερομηνία ($p < 0,05$).

Συζήτηση

4.1 Επίδραση των μικροκυστινών στα μορφολογικά χαρακτηριστικά των φυτών σέλινου με ή χωρίς την παρουσία AMF

Στην παρούσα εργασία τα φυτά σέλινου ποτίστηκαν από το στάδιο του σπόρου σε τρυβλία με νερό βρύσης (control), νερό με διαλυμένη MC-LR συγκέντρωσης $2\mu\text{g l}^{-1}$ και νερό με διαλυμένη MC-LR συγκέντρωσης $20\mu\text{g l}^{-1}$. Κατά την 1^η μεταφύτευση εντάχθηκε και ο παράγοντας AMF, δημιουργώντας 6 μεταχειρίσεις: 0-0+, 2-, 2+, 20-, 20+. Στην 2^η μεταφύτευση εντάχθηκε και ο παράγοντας «Επαναφορά» (R, recovery) καθώς 5 φυτά από τις μεταχειρίσεις της MC-LR σταμάτησαν να λαμβάνουν νερό εμπλουτισμένο με μικροκυστίνη και αρδεύονταν έκτοτε με νερό βρύσης. Έτσι δημιουργήθηκαν τελικά οι εξής 10 μεταχειρίσεις: 0-, 2-, 20-, 0+, 2+, 20+, 2-R, 20-R, 2+R, 20+R. Αξίζει να σημειωθεί ότι δεν υπάρχει στην διεθνή βιβλιογραφία παρόμοιο πείραμα που να εξετάζει αυτές τις παραμέτρους που εξετάζονται στην παρούσα εργασία. Τα αποτελέσματα έδειξαν στο σύνολό τους ότι η ύπαρξη μυκόρριζας (AMF) διαδραμάτισε σημαντικό ρόλο καθώς επίσης και η συγκέντρωση των μικροκυστινών.

Τα φυτά που αναπτύχθηκαν παρουσία AMF εμφάνισαν σημαντικά υψηλότερο νωπό βάρος του υπέργειου τμήματος σε σχέση με αυτά που αναπτύχθηκαν απουσία AMF. Οι μεταχειρίσεις 2+/2- και στις δύο περιπτώσεις είχαν μικρότερο νωπό βάρος από ότι οι μάρτυρες (0+/0-) και τα φυτά των μεταχειρίσεων που έλαβαν υψηλότερες συγκεντρώσεις MC-LR (20+/20-). Επίσης, τα φυτά 20+ παρουσία AMF είχαν μεγαλύτερο νωπό βάρος από τον μάρτυρα με AMF, ενώ συνέβη το αντίθετο απουσία AMF. Οι μεταχειρίσεις R με AMF είχαν μεγαλύτερο νωπό βάρος από όλες τις άλλες αλλά απουσία AMF οι τιμές ήταν παρόμοιες. Αντίθετα σε πείραμα με πατάτα (*Solanum tuberosum*L., 'LadyRosetta' variety) σύμφωνα με τους McElhiney et al 2001 σε διάφορες συγκεντρώσεις MC-LR το νωπό βάρος μειώνονταν όσο αυξανόταν η συγκέντρωση (0-5 $\mu\text{g/ml}$). Σε πείραμα ποτίσματος με καθαρή MC-LR σε καρότα (*Daucus carota*, variety Soprano) το νωπό βάρος ήταν παρόμοιο για τις συγκεντρώσεις MC-LR που χρησιμοποιήθηκαν ($10\mu\text{g l}^{-1}$, $50\mu\text{g l}^{-1}$, Machado et al 2017).

Στο ξηρό βάρος τόσο του υπέργειου τμήματος όσο και του υπόγειου τμήματος η εικόνα ήταν παρόμοια με το νωπό βάρος που αναφέρθηκε παραπάνω. Στις μεταχειρίσεις απουσία μυκορριζών οι τιμές ήταν παρόμοιες μεταξύ τους και σημαντικά χαμηλότερες από τις αντίστοιχες μεταχειρίσεις παρουσία AMF. Ακόμη οι μεταχειρίσεις R με AMF είχαν μεγαλύτερο ξηρό βάρος από τις υπόλοιπες μεταχειρίσεις ενώ ο μάρτυρας με AMF είχε μικρότερο ξηρό βάρος μεταξύ των μεταχειρίσεων με AMF. Η μεταχείριση 2+ εμφάνισε το μικρότερο ξηρό βάρος συγκρινόμενη με όλες τις υπόλοιπες AMF+. Αντίθετα σύμφωνα με τους El Khallufi et al 2013 σε μηδική (*Medicago sativa*) το ξηρό βάρος και του υπόγειου και του υπέργειου τμήματος μειώνονταν όσο αυξανόταν η συγκέντρωση (0, 5, 10, 20 $\mu\text{g l}^{-1}$ MC-LR).

Η υπόγεια/υπέργεια βιομάζα των φυτών παρουσίασε επίσης τη γνωστή εικόνα όπου οι μεταχειρίσεις με AMF είχαν υψηλότερο λόγο από ότι αυτές όπου δεν είχαν μυκορριζα. Επίσης οι μεταχειρίσεις R με AMF είχαν τον υψηλότερο λόγο ενώ οι μεταχειρίσεις R χωρίς AMF είχαν τον μικρότερο λόγο. Οι μάρτυρες κυμάνθηκαν στα ίδια επίπεδα αλλά είχαν μικρότερο λόγο από τις υπόλοιπες μεταχειρίσεις με AMF. Απουσία λοιπόν AMF αλλά παρουσία MC-LR κατανομή της βιομάζας στο σύνολο του φυτού ευνοεί το υπέργειο μέρος σε βάρος της ρίζας, ενώ το αντίθετο συμβαίνει στις μεταχειρίσεις που περιλαμβάνουν AMF. Σε μαϊντανό (*Petroselinum crispum* L.) και κόλιανδρο (*Coriandrum sativum* L) που υποβλήθηκαν σε πείραμα με διάφορες συγκεντρώσεις μικροκυστίνης φάνηκε ότι η σχετική βιομάζα δεν εμφάνισε διαφορές (Perreira et al 2016).

Αξίζει να παρατηρηθεί ότι ενώ όλες οι μεταχειρίσεις κυμανθήκαν στα ίδια επίπεδα περιεχόμενου νερού, η μεταχείριση 2-R είχε ~10% κάτω από τα υπόλοιπα.

4.2 Επίδραση των μικροκυστινών στις βιοχημικές και φυσιολογικές παραμέτρους των φυτών

Στις τιμές SPAD που παραπέμπουν σε συγκέντρωση ολικών χλωροφυλλών φαίνεται ότι η απουσία AMF σε συνδυασμό με την παρουσία MC-LR είχε αρνητική επίδραση στις χλωροφύλλες. Παρατηρείται επίσης ότι οι τιμές στις μεταχειρίσεις με AMF ήταν μεγαλύτερες και κυμανθήκαν στα ίδια επίπεδα ενώ χωρίς AMF ήταν στατιστικώς

σημαντικά μικρότερες αλλά κυμανθήκαν μεταξύ τους στα ίδια. Το αντίθετο έχει αναφερθεί από τους El Khallufi et al. (2013) και McElhiney et al. (2001) για τη μηδική και την πατάτα αντίστοιχα, δηλαδή όσο μεγαλύτερη η συγκέντρωση MC-LR, τόσο χαμηλότερα τα επίπεδα χλωροφυλλών.

Ο δείκτης της μέγιστης φωτοχημικής απόδοσης του PSII (Fv/Fm) στις 31/5/2018 παρουσιάζει ομοιότητα σε όλες τις μεταχειρίσεις εκτός του 2- και του 20- όπου έχουν στατιστική σημαντική διαφορά έχοντας μικρότερες τιμές από τα άλλα. Οι υψηλές τιμές που παρουσιάζονται σε όλα εκτός των δύο αυτών μεταχειρίσεων δηλώνει πως η παρουσία MC-LR δεν επιβάλλει καταπόνηση στα φυτά και δεν επηρεάζει ιδιαίτερα την φωτοσυνθετική λειτουργία. Όμως στις επόμενες 2 μετρήσεις και προς το τέλος του πειράματος εμφανίζονται ενδείξεις σημαντικής καταπόνησης στις μεταχειρίσεις χωρίς AMF. Αντίθετα, παρουσία AMF τα φυτά δεν παρουσιάζουν σημάδια καταπόνησης και η φωτοχημική απόδοση του PSII παραμένει σταθερή σε υψηλά επίπεδα. Σύμφωνα με τους Gutierrez-Praena et al 2014 σε φυτά τομάτας (*Lycopersicon esculentum*) η καθαρή MC-LR δεν επηρέασε τον δείκτη Fv/Fm και άρα την φωτοσυνθετική αποτελεσματικότητα.

Παρόμοιο πρότυπο με το παραπάνω εμφανίζει και ο δείκτης συνολικής απόδοσης της φωτοσύνθεσης PI total. Παρατηρείται σημαντική υπεροχή των μεταχειρίσεων με AMF σε σχέση με αυτές χωρίς AMF, χωρίς όμως περαιτέρω διαχωρισμούς μεταξύ των μεταχειρίσεων που έλαβαν MC-LR. Αξίζει να σημειωθεί ότι προς το τέλος του πειράματος ο δείκτης μειώθηκε για όλες τις μεταχειρίσεις.

Συμπεράσματα

- Η ανάπτυξη του σέλινου φαίνεται να επηρεάζεται κυρίως από την ύπαρξη μυκορριζών.
- Οι μεταχειρίσεις R όπου από την δεύτερη μεταφύτευση και μετά αρδεύονταν με νερό βρύσης σε συνδυασμό με AMF έδωσαν τις υψηλότερες τιμές σε νωπό και ξηρό βάρος. Φαίνεται ότι ακόμη και στις μεταχειρίσεις με AMF η μικροκυστίνη επηρέασε την ανάπτυξη.
- Μεταξύ των μεταχειρίσεων με AMF, η 2+ είχε τις χαμηλότερες τιμές νωπού και ξηρού βάρους φαίνεται επομένως ότι η συγκέντρωση $2\mu\text{g l}^{-1}$ της MC-LR επηρέασε αρνητικά τα φυτά με AMF και χωρίς.
- Η συνολική εικόνα που εμφανίζεται είναι ότι η παρουσία AMF οδήγησε σε φυτά εύρωστα που δεν επηρεάστηκαν σημαντικά από την παρουσία MC-LR. Αντίθετα η έλλειψη μυκόρριζας σε συνδυασμό με την μικροκυστίνη έδωσε πολύ χαμηλά νωπά και ξηρά βάρη, χαμηλή χλωροφύλλη καθώς και μειωμένες τιμές των δεικτών φωτοσυνθετικής απόδοσης φωτοσύνθεση.
- Σύμφωνα με τα αποτελέσματα της παρούσας εργασίας μπορούμε να υποστηρίξουμε ότι η ύπαρξη μυκόρριζας προστατεύει τα φυτά σέλινου από τις αρνητικές επιπτώσεις της μικροκυστίνης.

Βιβλιογραφία

- Bittencourt-Oliveira, M. do C., Cordeiro-Araújo, M. K., Chia, M. A., Arruda-Neto, J. D. de T., Oliveira, Ê. T. de, & Santos, F. dos. (2016). Lettuce irrigated with contaminated water: Photosynthetic effects, antioxidative response and bioaccumulation of microcystin congeners. *Ecotoxicology and Environmental Safety*, 128:83–90.
- Castro P., Huber M.E., 2015. ΘΑΛΑΣΣΙΑ ΒΙΟΛΟΓΙΑ. Εκδόσεις Utopia, Αθήνα
- Chen, J., Song, L., Dai, J., Gan, N., & Liu, Z. (2004). Effects of microcystins on the growth and the activity of superoxide dismutase and peroxidase of rape (*Brassica napus* L .) and rice (*Oryza sativa* L .). *Toxicon*, 43:393–400.
- Chia, M. A., Kramer, B. J., Jankowiak, J. G., Bittencourt-Oliveira, M. D. C., & Gobler, C. J. (2019). The individual and combined effects of the cyanotoxins, anatoxin-a and microcystin-LR, on the growth, toxin production, and nitrogen fixation of prokaryotic and eukaryotic algae. *Toxins*, 11(1).
- Corbel, S., Mougin, C., & Bouaïcha, N. (2014). Cyanobacterial toxins: Modes of actions, fate in aquatic and soil ecosystems, phytotoxicity and bioaccumulation in agricultural crops. *Chemosphere*, 96:1–15.
- Cordeiro-Araújo, M. K., Chia, M. A., Arruda-Neto, J. D. de T., Tornisielo, V. L., Vilca, F. Z., & Bittencourt-Oliveira, M. do C. (2016). Microcystin-LR bioaccumulation and depuration kinetics in lettuce and arugula: Human health risk assessment. *Science of the Total Environment*, 566–567:1379–1386.
- El Khallouffi, F., Oufdou, K., Lahrouni, M., Faghire, M., Peix, A., Ramírez-bahena, M. H., & Vasconcelos, V. (2013). Physiological and antioxidant responses of *Medicago sativa* - rhizobia symbiosis to cyanobacterial toxins (Microcystins) exposure. *Toxicon* 76:167–177.
- El, F., El, I., Saqrane, S., Oufdou, K., Vasconcelos, V., & Oudra, B. (2012). *Ecotoxicology and Environmental Safety* Phytotoxic effects of a natural bloom

- extract containing microcystins on *Lycopersicon esculentum*. *Ecotoxicology and Environmental Safety*, 79:199–205.
- Gutiérrez-Praena, D., Campos, A., Azevedo, J., Neves, J., Freitas, M., Guzmán-Guillén, R., Vasconcelos, V. (2014). Exposure of *Lycopersicon Esculentum* to microcystin-LR: Effects in the leaf proteome and toxin translocation from water to leaves and fruits. *Toxins*, 6(6):1837–1854.
- Hickman C. P. Jr, Roberts L.S., Keen S.L., Larson A., Anson H.P, Eisenhour D.J., 2011. ΖΩΟΛΟΓΙΑ Ολοκληρωμένες Αρχές. Εκδόσεις Utopia, Αθήνα
- Machado, J., Azevedo, J., Freitas, M., Pinto, E., Almeida, A., Vasconcelos, V., & Campos, A. (2016). 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):752–764.
- Machado, J., Campos, A., Vasconcelos, V., & Freitas, M. (2017). Effects of microcystin-LR and cylindrospermopsin on plant-soil systems: A review of their relevance for agricultural plant quality and public health. *Environmental Research*, 153(September 2016):191–204.
- 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(0041):1411–1420.
- Michael T. Madigan, John M. Martinko, Jack Parker (2014). BROCK ΒΙΟΛΟΓΙΑ ΤΩΝ ΜΙΚΡΟΟΡΓΑΝΙΣΜΩΝ. Πανεπιστημιακές Εκδόσεις Κρήτης, Ηράκλειο
- Pereira, A. L., Azevedo, J., & Vasconcelos, V. (2017). Assessment of uptake and phytotoxicity of cyanobacterial extracts containing microcystins or cylindrospermopsin on parsley (*Petroselinum crispum* L.) and coriander (*Coriandrum sativum* L). *Environmental Science and Pollution Research*, 24(2):1999–2009.

Wikipedia, the free encyclopedia, 2019. Algaecide.
<https://en.wikipedia.org/wiki/Algaecide> (Πρόσβαση στις 17/6/2019)

World Health Organization, 2003. Cyanobacterial toxins: Microcystin-LR in Drinking-water Background document for development of WHO Guidelines for Drinking-water Quality
https://www.who.int/water_sanitation_health/dwq/chemicals/cyanobactoxins.pdf

Γκουντάρας Ι., 2012. Στοιχεία φυσιολογίας φύλλου και καρπού καστανιάς. Πτυχιακή Διατριβή. Πανεπιστήμιο Θεσσαλίας, Βόλος

Γούναρης Ι., 2012. Μοριακές δομές και βασικές διεργασίες κατά την εξέλιξη των οργανισμών. Πανεπιστημιακές Εκδόσεις Θεσσαλίας, Βόλος

Κυζερίδου Α. 2015. Χαρακτηριστικά της φωτοσύνθεσης των πράσινων καρπών: συσχέτιση με τις ιδιαιτερότητες του εσωτερικού μικροπεριβάλλοντος και των φωτοπροστατευτικών και μεταβολικών τους αναγκών. Διδακτορική Διατριβή. Πανεπιστήμιο Πατρών, Πάτρα

Παπαδημητρίου Θ. 2010. Επιπτώσεις των συγκεντρώσεων των μικροκυστινών σε υδρόβιους ζωικούς οργανισμούς. Διδακτορική Διατριβή. Πανεπιστήμιο Ιωαννίνων, Ιωάννινα

Χα Ι.-Α. και Πετρόπουλος Σ., 2014. Γενική Λαχανοκομία & Υπαίθρια Καλλιέργεια Λαχανικών. Πανεπιστημιακές Εκδόσεις Θεσσαλίας, Βόλος