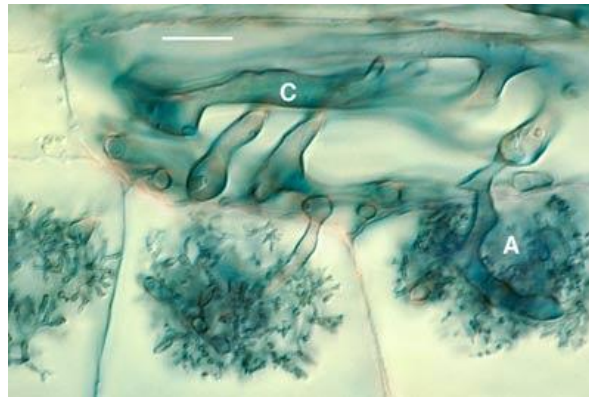


# Εργαστηριακές Ασκήσεις Περιβαλλοντικής Βιοτεχνολογίας

## Εργαστηριακή Άσκηση 6

### Μελέτη των δενδροειδών μυκορριζικών μυκήτων



### ARBUSCULAR MYCORRHIZAL SYMBIOSIS



Γιάννης Υψηλάντης  
Δημήτριος Καρπούζας

Λάρισα 2010

## Μυκορριζικές Συμβιώσεις

Ως μυκόρριζα αναφέρετε μια ποικιλία συμβιωτικών σχέσεων ανάμεσα σε φυτά και μύκητες οι οποίοι αποικίζουν τον φλοιό των ριζών κατά την περίοδο ενεργής ανάπτυξης των φυτών. Η σχέση χαρακτηρίζεται από την μεταφορά 1) παραγόμενου από το φυτό άνθρακα προς το μύκητα, και 2) προσληφθέντων από τον μύκητα θρεπτικών προς το φυτό. Ο όρος *μυκόρριζα* (μύκητας + ρίζα) χρησιμοποιήθηκε για πρώτη φορά για να περιγράψει σχέσεις ανάμεσα σε δένδρα και μύκητες το 1885 από τον Γερμανό δασικό παθολόγο A. D. Frank. Από τότε έχουμε πλέον μάθει ότι πάνω από 80% από όλα τα είδη φυτών της ξηράς σχηματίζουν συμβιωτικές σχέσεις με μύκητες. *Δηλαδή η μυκορριζική κατάσταση αποτελεί το κανόνα ανάμεσα στα φυτά και όχι την εξαίρεση!*

Τα οφέλη για το φυτό από τη συμβίωση χαρακτηρίζονται από γεωργικής πλευράς με αυξημένη ανάπτυξη και παραγωγή, ή από την οικολογική πλευρά με βελτιωμένη θρέψη και αναπαραγωγική ικανότητα. Σε κάθε περίπτωση, τα οφέλη προέρχονται πρωταρχικά από το ότι οι μυκόρριζες αποτελούν μια κρίσιμη γέφυρα ανάμεσα στις ρίζες των φυτών και το έδαφος. Οι μυκόρριζες συνήθως έχουν αναπτυγμένη μυκητιακή βιομάζα μέσα στη ρίζα, αλλά και στο έδαφος. Οι εδαφικές υφές – υφές εκτός της ρίζας (extramatrical hyphae) προσλαμβάνουν θρεπτικά στοιχεία από το εδαφικό διάλυμα και τα μεταφέρουν στη ρίζα. Με αυτόν τον τρόπο οι μυκόρριζες αυξάνουν την αποτελεσματική επιφάνεια προσρόφησης των φυτών. Αν φανταστούμε τις ρίζες σαν κυλίνδρους μέσα στο έδαφος, με τα τριχίδια τους ο κύλινδρος αυτός θα έχει μεγαλύτερη διάμετρο, και με τις υφές των μυκήτων ακόμη μεγαλύτερη. Ο όγκος - περιοχή του εδάφους που εκμεταλλεύεται το φυτό αυξάνεται σημαντικά. Σε φτωχά σε θρεπτικά στοιχεία εδάφη ή σε συνθήκες έλλειψης υγρασίας, τα θρεπτικά στοιχεία που προσλαμβάνονται από τις εδαφικές υφές οδηγούν σε βελτιωμένη ανάπτυξη και αναπαραγωγή των φυτών. Το αποτέλεσμα είναι ότι τα μυκορριζικά φυτά είναι συχνά πιο ανταγωνιστικά και πιο ικανά να επιβιώσουν και να αναπτυχθούν σε συνθήκες περιβαλλοντικής καταπόνησης σε σχέση με αντίστοιχα μη μυκορριζικά φυτά (Εικόνα 1).



**Εικόνα 1.** Το ριζικό σύστημα φυτών φράουλας που έχουν εμβολιαστεί με δενδροειδής μυκορριζικούς μύκητες (αριστερά) και μη μυκορριζικά φυτά (δεξιά)

Οι μυκορριζικές σχέσεις ποικίλουν ευρέως σε δομές και λειτουργία. Παρά τις πολλές εξαιρέσεις, είναι δυνατόν να γενικεύσουμε ως προς το γεωγραφικό πλάτος (ή και το υψόμετρο), τις ιδιότητες του εδάφους, και τη δομή και λειτουργία διάφορων τύπων μυκορριζας που αποικίζουν την επικρατούσα βλάστηση σε μία βαθμίδωση κλιματικών ζωνών. Στη βαθμίδωση αυτή στην μία μεριά βρίσκονται τα ερικοειδή φυτά, τα οποία κυριαρχούν στα οργανικά εδάφη της υπο-αρκτικής και υπο-αλπικής ζώνης, τα οποία αποικίζονται από μία ομάδα ασκομυκήτων που σχηματίζουν τον ερικοειδή τύπο μυκορριζας. Αυτός ο τύπος χαρακτηρίζεται από εκτεταμένη ανάπτυξη μέσα στα κύτταρα του φλοιού, αλλά λίγη επέκταση μέσα στο έδαφος. Προχωρώντας πιο κάτω στη περιβαλλοντική βαθμίδωση κωνοφόρα δένδρα αντικαταστούν τους ερικοειδής θάμνους στην κυριαρχία. Αυτά τα δένδρα αποικίζονται από μια μεγάλη ποικιλία κυρίως βασιδιομυκήτων, οι οποίοι αναπτύσσονται ανάμεσα στα κύτταρα του φλοιού της ρίζας σχηματίζοντας τον εκτομυκορριζικό τύπο μυκορριζας. Οι εκτομυκορριζικοί μύκητες μπορούν να παράγουν μεγάλες ποσότητες υφών πάνω στη ρίζα και μέσα στο έδαφος. Σε αυτές τις υφές οφείλεται η απορρόφηση και μεταφορά των ανόργανων θρεπτικών στοιχείων και του νερού, αλλά και η απελευθέρωση θρεπτικών στοιχείων από τα πεσμένα φύλλα με παραγωγή ενζύμων που σχετίζονται με την ανοργανοποίηση της οργανικής ουσίας. Στην θερμότερη και ξηρότερη πλευρά της περιβαλλοντικής βαθμίδωσης συχνά κυριαρχεί βλάστηση λιβαδικού τύπου. Σε αυτά τα οικοσυστήματα η χρήση των θρεπτικών είναι υψηλή και ο φώσφορος είναι συχνά το περιοριστικό στοιχείο της ανάπτυξης. Αγρωστώδη και μια μεγάλη ποικιλία άλλων φυτών αποικίζονται από μύκητες που σχηματίζουν θυσάνους (ή δενδρύλλια) – δομές με πάρα πολλές διακλαδώσεις που μοιάζουν με θυσάνους ή δενδρύλλια – μέσα στα κύτταρα της ρίζας, οπότε μιλάμε για τον θυσανοειδή ή δενδροειδή τύπο μυκορριζας. Αυτοί οι μύκητες μπορούν να παράγουν μεγάλου μήκους εδαφικές υφές και μπορούν να αυξήσουν σημαντικά την πρόληψη φωσφόρου των φυτών που αποικίζουν. Η ποικιλία των μυκορριζικών σχέσεων επιτρέπει στα φυτά διαφορετικές στρατηγικές για αποτελεσματική λειτουργία σε μια ποικιλία συστημάτων εδάφους-φυτού.

### Εκτομυκορριζες

Το διαγνωστικό στοιχείο των εκτομυκορριζών είναι η παρουσία υφών ανάμεσα στα κύτταρα της ρίζας, που δημιουργούν μια δομή που μοιάζει με δίχτυ που ονομάζεται δίχτυ Harting, από τον Robert Harting που θεωρείται ο ιδρυτής της δασικής βιολογίας (Εικόνα 2). Πολλές εκτομυκορριζες έχουν επίσης μια θήκη, ή μανδύα από μυκητιακό ιστό που μπορεί να καλύπτει τελείως την απορροφητική ρίζα (συνήθως τα λεπτά ριζίδια). Ο μανδύας διαφέρει πολύ σε πυκνότητα, χρώμα, και υφή, ανάλογα με τον ιδιαίτερο συνδυασμό μύκητα-φυτού. Ο μανδύας αυξάνει την απορροφητική επιφάνεια των ριζών και συχνά η μορφολογία των ριζιδίων επηρεάζεται, με

αποτέλεσμα το σχηματισμό διχάλας και συσσωμάτωσης. Σε συνέχεια του μανδύα υπάρχουν δέσμες υφών που επεκτείνονται στο έδαφος. Συχνά οι δέσμες υφών συγκεντρώνονται για να σχηματίσουν ριζόμορφα, τα οποία είναι φανερά δια γυμνού οφθαλμού. Το εσωτερικό μέρος των ριζόμορφων μπορεί να διαφοροποιηθεί σε σωληνόμορφες δομές που είναι εξειδικευμένες στη μεταφορά θρεπτικών και νερού.

Οι εκτομυκόρριζες απαντώνται σε δασικά είδη, από θάμνους μέχρι δένδρα. Πολλά από τα φυτά-ξενιστές ανήκουν στις οικογένειες Pinaceae, Fagaceae, Betulaceae, και Myrtaceae. Πάνω από 4000 είδη μυκήτων, που ανήκουν κυρίως στους βασιδιομύκητες, και λιγότερο στους ασκομύκητες, είναι γνωστό ότι σχηματίζουν εκτομυκόρριζες. Πολλοί από αυτούς τους μύκητες παράγουν μανιτάρια στα δάση. Μερικοί μύκητες έχουν περιορισμένο εύρος ξενιστών, όπως ο *Boletus betulicola* σε *Betula* spp., ενώ άλλοι έχουν μεγάλο εύρος ξενιστών, όπως ο *Pisolithus tinctorius*, που σχηματίζει εκτομυκόρριζα με πάνω από 46 είδη δένδρων που ανήκουν σε τουλάχιστον οκτώ γένη.

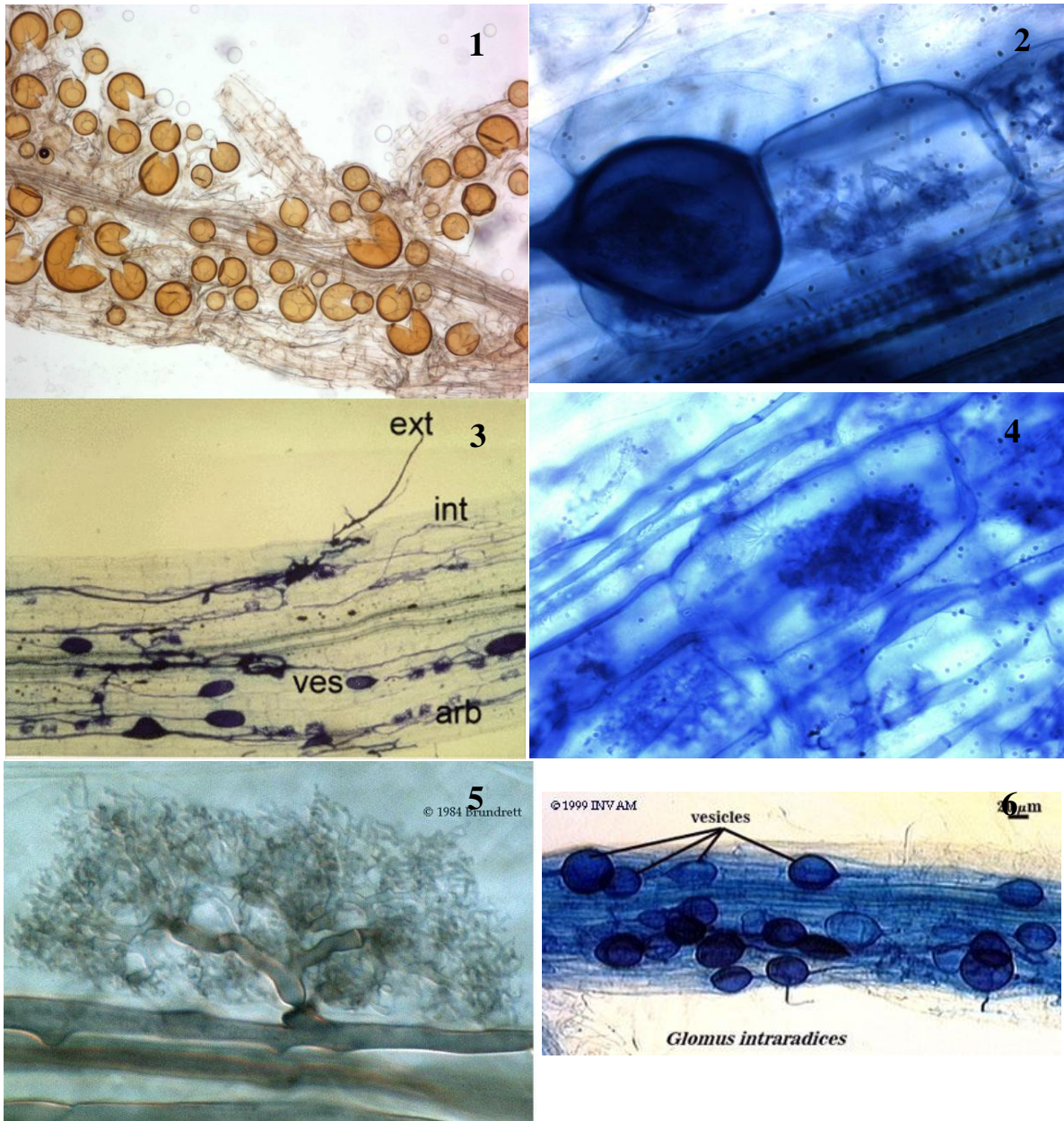


**Εικόνα 2.** Εκτομυκόρριζες: Συμβίωση *Eucalyptus maculata* και *Astraeus pteridis* υπό ελεγχόμενες συνθήκες όπου παρατηρούνται οι εκτομυκόρριζες και οι μυκηλιακές τους υφές (ΠΗΓΗ: Molina και Trappe 2002)

### Δενδροειδείς Μυκόρριζες

Το διαγνωστικό στοιχείο των δενδροειδών μυκορριζών είναι η δημιουργία ενός πολύ διακλαδισμένου δενδρυλλίου ή θυσάνου (arbuscule) μέσα στο ριζικό κύτταρο (Εικόνα 3). Ο μύκητας αρχικά μεγαλώνει ανάμεσα στα κύτταρα, αλλά σύντομα διαπερνά το κυτταρικό τοίχος του ξενιστή και αναπτύσσεται μέσα στο κύτταρο. Ο γενικός όρος για όλους του μυκορριζικούς τύπους όπου ο μύκητας μεγαλώνει μέσα στα κύτταρα είναι ενδομυκόρριζα. Σε αυτή τη σχέση ούτε το κυτταρικό τοίχωμα του μύκητα, ούτε του φυτού διαρρηγνύονται. Καθώς μεγαλώνει ο μύκητας, η κυτταρική μεμβράνη ενκολπώνεται και τυλίγει τον μύκητα, δημιουργώντας ένα νέο χώρο, όπου αποτίθεται υλικό μεγάλης μοριακής πολυπλοκότητας. Αυτός ο χώρος του αποπλάστη εμποδίζει απευθείας επαφή ανάμεσα στο φυτό και το κυτόπλασμα του μύκητα, και επιτρέπει την αποδοτική

μεταφορά θρεπτικών ανάμεσα στους συμβιωτές. Τα δενδρύλλια ή θύσανοι έχουν σχετικά μικρή διάρκεια ζωής, λιγότερο από 15 μέρες, και μπορεί να είναι δύσκολο να παρατηρηθούν σε δείγματα που έχουν ληφθεί από τη φύση.



**Εικόνα 3:** 1) Αγενή σπόρια δενδροειδών μυκορριζικών μυκήτων 2) Κύστεις 3) ext: υφές δενδροειδών μυκορριζικών μυκήτων που εκτείνονται εκτός της ρίζας, int: υφές δενδροειδών μυκορριζικών μυκήτων που εκτείνονται εντός της ρίζας, ves: κύστεις, arb: θύσανοι (arbuscules), 4) θύσανοι εντός κυττάρων της ρίζας και 5) θύσανοι και 6) κύστεις

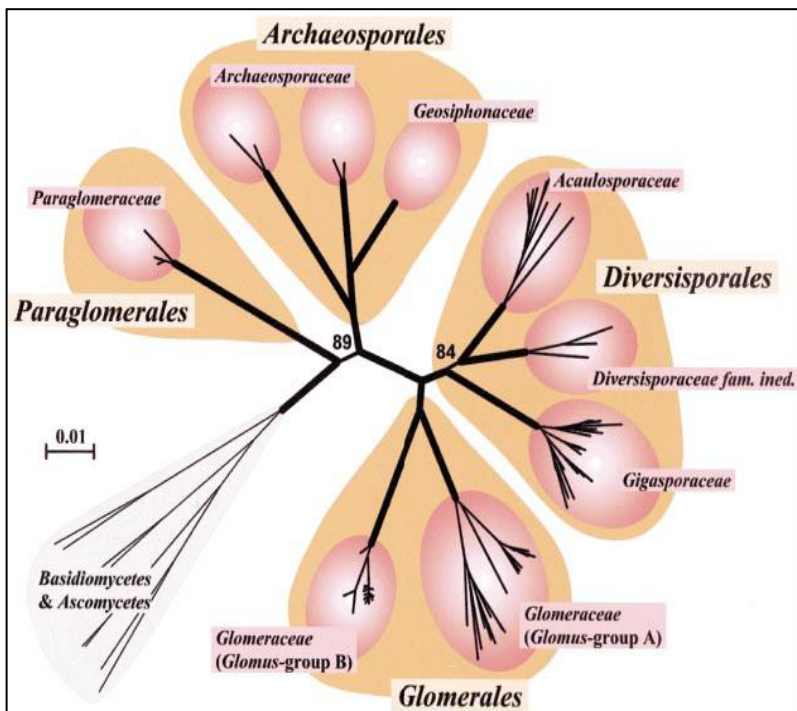
Άλλες δομές που δημιουργούνται από μερικούς δενδροειδείς μυκορριζικούς μύκητες περιλαμβάνουν κύστες, βοηθητικά κύτταρα, και αγενή σπόρια (Εικόνα 3). Οι κύστες είναι δομές με

λεπτά τοιχώματα, γεμάτες λίπη, που συνήθως σχηματίζονται στο χώρο ανάμεσα στα κύτταρα. Η κύρια λειτουργία τους εικάζεται ότι είναι αποθηκευτική. Παρόλα αυτά, οι κύστες μπορούν να χρησιμεύσουν και σαν αναπαραγωγικά οργανίδια του μύκητα. Τα βοηθητικά κύτταρα δημιουργούνται στο έδαφος και μπορεί να είναι σπειρωμένα ή σε κόμπους. Ο ρόλος αυτών των κυττάρων δεν είναι γνωστός. Αναπαραγωγικά σπόρια μπορούν να δημιουργηθούν είτε στη ρίζα, ή συνηθέστερα στο έδαφος. Τα σπόρια που παράγονται από τους μύκητες που σχηματίζουν δενδροειδείς μυκορριζικές σχέσεις είναι αγενή, και δημιουργούνται από τη διαφοροποίηση απλοειδών υφών. Για κάποιους μύκητες (πχ. *Glomus intraradices*) οι κύστες που δημιουργούνται μέσα στη ρίζα υπόκεινται σε δευτερογενή πάχυνση και δημιουργείται τοίχωμα (septum) κάθετο στην υφή σύνδεσης, οπότε δημιουργείται σπόριο, αλλά συνήθως τα σπόρια προέρχονται από διογκώσεις εδαφικών υφών.

Τα σπόρια των δενδροειδών μυκορριζικών μυκήτων είναι πολύ χαρακτηριστικά. Κυμαίνονται σε διάμετρο από 10 μm στον *Glomus tenue* έως πάνω από 1000 μm στη *Scutellospora* spp. Τα σπόρια ποικίλουν στο χρώμα, από υαλώδη (διαφανή) μέχρι μαύρα, και η υφή της επιφάνειας από λεία μέχρι πολύ διακοσμημένη (Εικόνα 4). Το γένος *Glomus* σχηματίζει σπόρια στο τέλος των υφών, το γένος *Acaulospora* σχηματίζει σπόρια κάθετα από το λαιμό διογκωμένης άκρης υφής, και το γένος *Entrophospora* σχηματίζει σπόρια μέσα από το λαιμό διογκωμένης άκρης υφής. Δύο άλλα γένη, *Gigaspora* και *Scutellospora*, ξεχωρίζουν από την παρουσία εσωτερικών μεμβρανών στα τοιχώματα, και από την φυτρωτική ασπίδα (δομή του τοιχώματος απ όπου μπορεί να ξεκινήσει φυτρωτικός σωλήνας στο γένος *Scutellospora*). Η εισαγωγή μοριακών τεχνικών προκάλεσε σημαντικές μεταβολές στην ταξινόμηση των δενδροειδών μυκορριζικών μυκήτων που πλέον βασίζεται στην αλληλούχιση της μικρής ριβοσωμικής υπομονάδας (18S rRNA γονιδίου) (Εικόνα 5). Οι δενδροειδείς μυκορριζικοί μύκητες ανήκουν στο φύλλο Glomeromycota. Παλαιότερα θεωρούνταν ότι όλοι οι μυκορριζικοί μύκητες ανήκαν στην Τάξη Glomerales που περιέχει το γένος *Glomus*. Πλέον στο φύλλο Glomeromycota περιέχονται και τρεις ακόμη τάξεις Paraglomerales, Archaesporales και Diversisporales. Συνολικά στο φύλλο Glomeromycota περιέχονται 4 Τάξεις, 10 Οικογένειες, 14 γένη και 225 είδη.



**Εικόνα 4.** Σπόρια διαφόρων δενδροειδών μυκορριζικών μυκήτων. Στην κεντρική εικόνα παρουσιάζεται ένα μίγμα σπορίων από εννέα διαφορετικούς μυκορριζικούς μύκητες ενώ ξεκινώντας από επάνω αριστερά *Scutellospora calospora*, *S. pellucida*, *S. heterogama*, *Archaeospora trappei*, *Gigaspora gigantea*, *Gi. rosea*, *Acaulospora colossica*, και *Ac .morrowiae* (Πηγή Bever et al. 2001)



**Εικόνα 5.** Φυλλογενετική ταξινόμηση των δενδροειδών μυκορριζικών μυκήτων όπως παρουσιάζεται από τους Schussler et al (2001) και η οποία βασίζεται σε ανάλυση της αλληλουχίας του 18S rRNA γονιδίου

Ο δενδροειδής μυκορριζικός τύπος συμβίωσης είναι πολύ κοινός, καθώς οι σχετικοί μύκητες αποικίζουν ένα τεράστιο ταξινομικό εύρος, τόσο ποωδών όσο και ξυλωδών φυτών, υποδεικνύοντας μια γενική έλλειψη εξειδίκευσης ξενιστή. Παρόλα αυτά είναι πολύ κρίσιμο να διακρίνει κανείς ανάμεσα σε εξειδίκευση (ικανότητα αποίκησης), μολυσματικότητα (ποσότητα αποικισμού), και αποτελεσματικότητα (ανταπόκριση του φυτού στον αποικισμό). Οι δενδροειδής μυκορριζικοί μύκητες διαφέρουν ευρέως στο επίπεδο αποικισμού που παράγουν σε ένα ριζικό σύστημα, και στην επίδρασή τους στην πρόσληψη θρεπτικών και στην ανάπτυξη του φυτού. Αυτό μπορεί να έχει πολύ σημαντικές επιπτώσεις για την δημιουργία φυτικών κοινοτήτων.

Οι δενδροειδής μυκορριζικοί μύκητες πλέον χρησιμοποιούνται ως εμβόλιο για την προώθηση της φυτικής ανάπτυξης και της γεωργική παραγωγής ιδιαίτερα σε καλλιεργητικά συστήματα χαμηλών εισροών ή στην βιολογική γεωργία. Μερικά από τα σκευάσματα που περιέχουν δενδροειδής μυκορριζικούς μύκητες παρουσιάζονται στην Εικόνα 6.

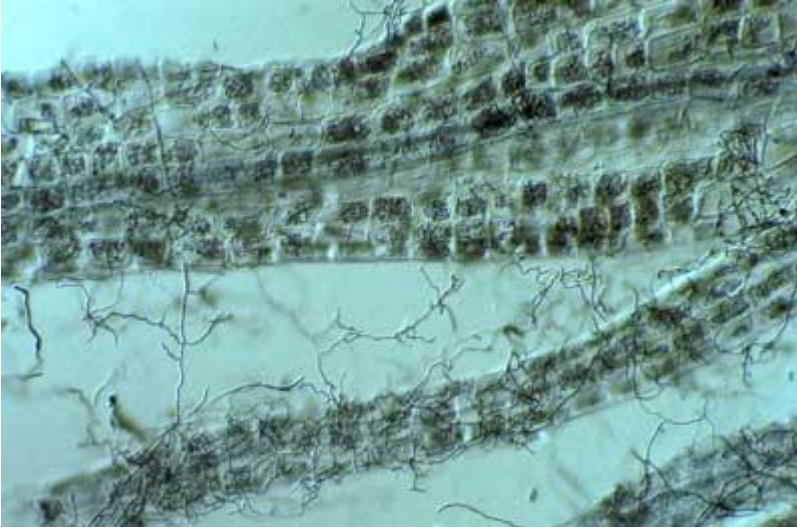




**Εικόνα 6.** Σκευάσματα που περιέχουν δενδροειδής μυκορριζικούς μύκητες και εφαρμόζονται ως προωθητικά ή ενισχυτικά φυτικής ανάπτυξης

### Ερικοειδής Μυκόρριζες

Ο όρος ερικοειδής χρησιμοποιείται σε μυκορριζικές σχέσεις που απαντώνται σε φυτά της τάξης Ericales. Οι υφές στη ρίζα διαπερνούν τα ριζικά κύτταρα (ενδομυκορριζική συμπεριφορά) (Εικόνα 7). Παρόλα αυτά δεν σχηματίζονται δενδρύλλια. Περιγράφονται τρεις κύριες μορφές ερικοειδών μυκορριζών.



**Εικόνα 7.** Ερικοειδής μυκορριζικοί μύκητες σε ριζικά τριχίδια του *Leucopogon verticulatus*

Ερικόμορφη – τα κύτταρα στον εσωτερικό γεμίζουν εντελώς με μυκητικές υφές. Μια λεπτή επιδερμίδα υφών αναπτύσσεται πάνω στην επιφάνεια της ρίζας, αλλά πραγματικός μανδύας δεν σχηματίζεται. Οι ερικοειδής μυκορριζες απαντώνται σε φυτά όπως *Calluna* (καλλωπιστικός θάμνος), *Rhododendron* (αζαλέες και άλλα καλλωπιστικά), και *Vaccinium* (μυρτιλλος) με λεπτεπίλεπτο ριζικό σύστημα που τυπικά φύονται σε εδάφη όξινα και οργανικά (φυλλόχωμα).

Αρβουτοειδής – με χαρακτηριστικά και εκτομυκορριζικά και ενδομυκορριζικά. Ενδοκυτταρική εισχώρηση είναι δυνατή, σχηματίζεται μανδύας, και υπάρχει και δίκτυο Harting. Τέτοιες μυκορριζικές σχέσεις απαντώνται στα *Arbutus* (κουμαριά), *Arctostaphylos* (γένος αιθαλών θάμνων), και αρκετά είδη των *Rybolaceae*. Οι σχετικοί μύκητες είναι βασιδιομύκητες και μπορεί να είναι οι ίδιοι μύκητες που αποικίζουν εκτομυκορριζικά δένδρα ξενιστές της ίδιας περιοχής.

Μονοτροποειδής – Οι μύκητες αποικίζουν αχλωρόφυλλα (χωρίς χλωροφύλλη) φυτά στα *Monotropaceae* (είδη *Monotropa*, σαπρόφυτα), παράγοντας δίκτυο Harting και μανδύα. Οι ίδιοι μύκητες σχηματίζουν επίσης εκτομυκορριζικές σχέσεις με δένδρα, δημιουργώντας έτσι μια σύνδεση, μέσω της οποίας άνθρακας και άλλα θρεπτικά μπορούν να ρέουν από το αυτότροφο φυτό-ξενιστή, στο παρασιτικό φυτό.

### Ορχιδοειδής Μυκορριζες

Οι μυκορριζικοί μύκητες παίζουν ένα μοναδικό ρόλο στον κύκλο της ζωής των ορχιδοειδών. Οι ορχιδέες τυπικά έχουν πολύ μικρό σπόρο με λίγες αποθηκευμένες θρεπτικές ουσίες. Το φυτό αποικίζεται σύντομα μετά τη φύτευση και ο μυκορριζικός μύκητας προμηθεύει άνθρακα και βιταμίνες στο αναπτυσσόμενο έμβρυο. Για φυτά χωρίς χλωροφύλλη, το φυτό εξαρτάται από το μύκητα-σύντροφο για προμήθεια άνθρακα σε όλη του τη ζωή. Ο μύκητας μεγαλώνει μέσα στο

φυτικό κύτταρο, εγκοιλώνοντας την κυτταρική μεμβράνη και σχηματίζοντας ελάσματα υφών μέσα στο κύτταρο. Αυτά τα ελάσματα είναι ενεργά για μόνο λίγες μέρες, μετά τις οποίες χάνουν την εσωτερική πίεση και εκφυλίζονται, και η αναπτυσσόμενη ορχιδέα απορροφά τα θρεπτικά περιεχόμενα (Εικόνα 8). Οι μύκητες που συμμετέχουν στη συμβίωση είναι βασιδιομύκητες παρόμοιοι με αυτούς που αποικοδομούν το ξύλο (πχ. *Coriolus*, *Fomes*, *Marasmius*) καθώς και παθογενείς (πχ. *Armillaria* και *Rhizoctonia*). Στις ώριμες ορχιδέες οι μυκόρριζες παίζουν επίσης ρόλο στη πρόσληψη θρεπτικών και τη μεταφορά τους.



**Εικόνα 8.** Ορχιδεοειδείς μύκητες παρατηρούνται τα κύτταρα της ρίζας να περιέχουν σπείρες μυκηλιακών υφών (ΠΗΓΗ: Anderson και Rasmussen, 1996)

### Μικτές Μολύνσεις

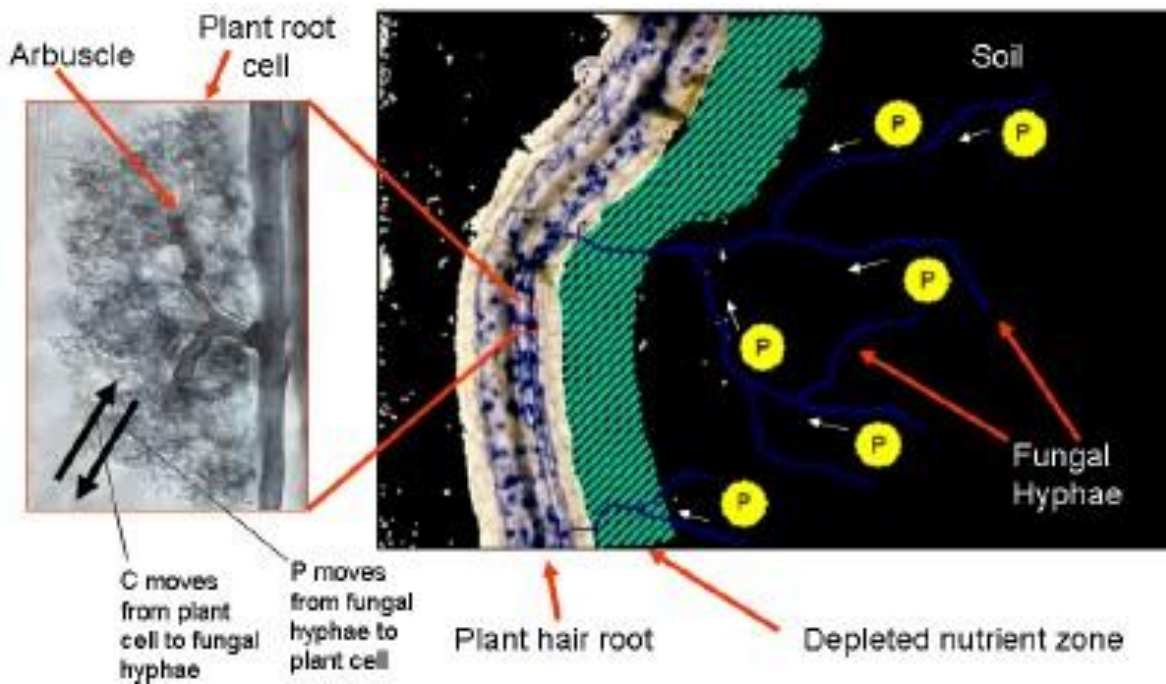
Αρκετοί μύκητες μπορούν να αποικίσουν τις ρίζες ενός συγκεκριμένου φυτού, αλλά ο τύπος της μυκόρριζας σχηματίζεται είναι συνήθως ομοιόμορφος για ένα ξενιστή. Παρόλα αυτά, σε μερικές περιπτώσεις ένας ξενιστής μπορεί να υποστηρίξει πάνω από ένα τύπο μυκορριζικής σχέσης. *Alnus* (σκήθρο), *Salix* (τιλιά), *Populus* (καβάκι) , *Eucalyptus* μπορεί να έχουν τόσο δενδροειδής, όσο και εκτομυκόρριζικές σχέσεις στο ίδιο φυτό. Για μερικά ερικοειδή φυτά έχει καταδειχτεί να έχουν μερικές φορές εκτομυκορριζικές και δενδροειδής μυκορριζικές σχέσεις.

Ένας ενδιάμεσος μυκορριζικός τύπος μπορεί να βρεθεί σε κωνοφόρους και φυλλοβόλους ξενιστές σε φυτώρια και σε περιοχές καμένων δασών. Ο εκτενδομυκορριζικός τύπος σχηματίζει τυπικές εκτομυκορριζικές δομές, εκτός του ότι ο μανδύας είναι λεπτός ή λείπει, και οι υφές στο δίχτυ Harting μπορεί να διαπερνούν το κύτταρο της ρίζας. Η εκτενδομυκόρριζα αντικαθίσταται από εκτομυκόρριζα καθώς το νεαρό σπορόφυτο ωριμάζει. Οι μύκητες που συμμετέχουν στη σχέση αρχικά περιγράφονταν ως «E-στέλεχος», αλλά αργότερα βρέθηκε ότι είναι ασκομύκητες που τοποθετήθηκαν στο γένος *Wilcoxina*.

### Πρόσληψη και Μεταφορά Θρεπτικών του Εδάφους

Όταν κάποιο θρεπτικό λείπει από το εδαφικό διάλυμα, η κύρια παράμετρος που ελέγχει την πρόσληψή του είναι η επιφάνεια. Οι υφές των μυκορριζικών μυκήτων έχουν τη δυνατότητα να μεγαλώσουν πού την απορροφητική επιφάνεια της ρίζας. Για παράδειγμα, οι Rousseau, Sylvia και Fox (1994) βρήκαν ότι παρόλο που οι εδαφικές υφές ήταν λιγότερες από 20% της συνολικής μάζας απορροφητικής επιφάνειας, συνεισέφεραν σχεδόν 80% από την απορροφητική επιφάνεια νεαρών σπορόφυτων κωνοφόρων. Είναι επίσης σημαντικό να αναλογιστούμε την κατανομή και λειτουργία των εδαφικών υφών. Για να είναι η μυκόρριζα αποτελεσματική στην πρόσληψη θρεπτικών, οι υφές θα πρέπει να κατανέμονται πέρα από τη στερητική ζώνη θρεπτικών που δημιουργείται γύρω από τη ρίζα. Η στερητική ζώνη θρεπτικών αναπτύσσεται όταν τα θρεπτικά αφαιρούνται από το εδαφικό διάλυμα γρηγορότερα απ' ό τι προστίθενται μέσω διάχυσης. Για ένα ιόν με μικρή κινητικότητα, όπως το φωσφορικό, μία οξεία και στενή στερητική ζώνη αναπτύσσεται γύρω και κοντά στη ρίζα. Οι υφές μπορούν άνετα να γεφυρώσουν αυτή τη στερητική ζώνη και αναπτύσσονται σε έδαφος με ικανοποιητικά αποθέματα φωσφόρου. Πρόσληψη μικροστοιχείων, όπως ψευδάργυρος και χαλκός, βελτιώνεται εξίσου από τις μυκόρριζες, γιατί για αυτά τα στοιχεία η πρόσληψη από τη ρίζα επίσης περιορίζεται λόγω περιορισμένης διάχυσης. Για στοιχεία με μεγαλύτερη κινητικότητα, όπως τα νιτρικά, η στερητική ζώνη είναι πλατιά, και είναι λιγότερο πιθανό οι υφές να αναπτυχθούν εκτενώς στη ζώνη που δεν επηρεάζεται από τη ρίζα μόνο. Ένας άλλος παράγοντας που συνεισφέρει στην αποτελεσματική πρόσληψη θρεπτικών από τις μυκόρριζες είναι η στενή τους διάμετρος, σε σχέση με αυτή των ριζών. Η απότομη πτώση στη βαθμίδωση της διάχυσης για κάποιο θρεπτικό είναι αντίστροφη της ακτίνας της μονάδας απορρόφησης. Έτσι, το εδαφικό διάλυμα θα είναι λιγότερο εξαντλημένο (σε θρεπτικά) στην επιφάνεια μιας λεπτής απορροφητικής μονάδας, όπως η υφή. Περαιτέρω, λεπτές υφές μπορούν να μεγαλώσουν μέσα σε μικρούς εδαφικούς πόρους, μη προσβάσιμους στις ρίζες, ή ακόμα και στα ριζικά τριχίδια.

Ένα άλλο προτέρημα που αποδίδεται στους μυκορριζικούς μύκητες είναι πρόσβαση σε δεξαμενές φωσφόρου που δεν είναι εύκολα διαθέσιμες στα φυτά (Miyasaka και Habte, 2001). Ένας μηχανισμός για αυτή την πρόσβαση είναι η φυσικοχημική απελευθέρωση ανόργανων και οργανικών μορφών φωσφόρου με οργανικά οξέα. Κάποιοι εκτομυκορριζικοί μύκητες έχουν βρεθεί να παράγουν μεγάλες ποσότητες οξαλικού οξέως και αυτό μπορεί τουλάχιστον μερικώς να εξηγήσει επαυξημένη πρόσληψη θρεπτικών από εκτομυκορριζικές ρίζες. Ένας δεύτερος μηχανισμός με τον οποίο οι μυκορριζικοί μύκητες απελευθερώνουν ανόργανο φώσφορο είναι μέσω ανοργανοποίησης της οργανικής ουσίας. Αυτό συμβαίνει με υδρόλυση μέσω φωσφατάσης των εστερικών δεσμών των οργανικών φωσφορικών (C-O-P).



**Εικόνα 9.** Ο μηχανισμός συμβίωσης μεταξύ δενδροειδούς μυκορριζικού μύκητα και φυτού

Οι ερικοειδής μυκόρριζες και οι εκτομυκόρριζες έχουν ένα ειδικό ρόλο στην ανοργανοποίηση του αζώτου (Martin, Cliquet, και Stewart, 2001). Τα περισσότερα φυτικά υπολείμματα όταν πέφτουν στο έδαφος έχουν υψηλή αναλογία C:N και είναι πλούσια σε λιγνίνη και τανίνη. Μόνο λίγοι μυκορριζικοί μύκητες μπορούν να κινήσουν θρεπτικά από αυτές τις πρωτογενής πηγές. Παρόλα αυτά, ένα μεγάλο εύρος ερικοειδών και εκτομυκορριζικών μυκήτων μπορούν να προσλάβουν άζωτο και άλλα θρεπτικά από δευτερογενής πηγές οργανικής ουσίας, όπως νεκρή μικροβιακή βιομάζα, γιατί παράγουν υδρολυτικά και οξειδωτικά ένζυμα ικανά για απο-πολυμερισμό οργανικών νιτρογενών πολυμερών, όπως οι πρωτεΐνες και η χιτίνη.

## Μέθοδοι-Δενδροειδείς Μυκόρριζες

### 1. Απομόνωση σπορίων δενδροειδών μυκορριζικών μυκήτων από το έδαφος

Τα σπόρια των δενδροειδών μυκορριζών διαχωρίζονται από το έδαφος με υγρό κοσκίνισμα, ακολουθούμενο από φυγοκέντρηση με σουκρόζη. Τοποθετούνται 100g εδάφους σε δοχείο ενός λίτρου και νερό βρύσης. Ακολουθεί καλή αναδεύση, αφήνοντας την άμμο να κατακαθίσει για 10-15 sec, και το υπερκείμενο περνάει από κόσκινα 500 μm και 50 μm. Οι ρίζες κατακρατούνται στο

κόσκινο 500  $\mu\text{m}$ , τα σπόρια στο λεπτό κόσκινο. Το κοσκίνισμα (σπόρια/έδαφος) μεταφέρεται σε σωλήνες φυγοκέντρωσης 50 ml με υδροβολέα και οι σωλήνες συμπληρώνονται μέχρι 2-3 cm από το χείλος με νερό. Το κοσκίνισμα δεν θα πρέπει να είναι βαθύτερο από το 2,5 cm από τον πάτο του σωλήνα, διαφορετικά χρησιμοποιούνται 2 σωλήνες. Οι σωλήνες ζυγίζονται για να ισορροπήσουν στην φυγόκεντρο και φυγοκεντρούνται για 3 min στις 3000 στροφές. Οι σωλήνες με απαλή κίνηση αδειάζονται από το νερό με προσοχή ώστε να μην φύγει και το κοσκίνισμα. Στη συνέχεια οι σωλήνες συμπληρώνονται με 40% σουκρόζη και φυγοκεντρούνται για 2 λεπτά στις 2800 στροφές. Το υπερκείμενο περνάει από κόσκινο 50  $\mu\text{m}$  και τα σπόρια ξεπλένονται καλά με νερό για να φύγει η σουκρόζη. Με υδροβολέα μεταφέρονται σε τριβλίο. Παρατηρήστε τα σπόρια με στερεοσκόπιο.

## 2. Εκτίμηση αποικισμού των ριζών από δενδροειδείς μυκορριζικούς μύκητες

Πλυμένες, καθαρές ρίζες τοποθετούνται σε 10% KOH, και παραμένουν για 10-15 min σε 90° C. Μην βράζετε τις ρίζες. Ξεπλένετε το KOH με νερό 5 φορές. Στη συνέχεια οι ρίζες μεταφέρονται σε διάλυμα 5% μελάνι (για διαφορετικά μελάνια: Vierheilig et al., 1998) με κοινό ξύδι για 3 λεπτά και ξεπλένονται με νερό. Για να παρατηρήσετε και να μετρήσετε τον αποικισμό τοποθετήστε μια σταγόνα PVLG (Polyvinyl-Lacto-Glycerol) στην αντικειμενοφόρο, απλώστε τις ρίζες παράλληλα με την πλάκα και καλύψτε με καλυπτρίδα. Παρατηρήστε/μετρήστε σε μικροσκόπιο με τον φακό x10 (40x για λεπτομέρειες). Σε κάθε τομή της ακίδας παρατήρησης με την ρίζα παρατηρήστε αν υπάρχει αποικισμός. Το ποσοστό αποικισμού προκύπτει διαιρώντας τον αριθμό των τομών της ακίδας με τις ρίζες όπου υπήρχε μύκητας με τον συνολικό αριθμό τομών.



**Εικόνα 9.** Προετοιμασία αντικειμενοφόρου πλάκας για έλεγχο του αποικισμού μυκορριζικών μυκήτων

### Περισσότερες πληροφορίες- Αναφορές

1. Bever JD, Schultz PA, Pringle A, Morton JB (2001) Arbuscular mycorrhizal fungi: More diverse than meets the eye, and the ecological tale of why. *Bioscience* 51: 923-931
2. Schubler A, Schwarzott D, Walker C. (2001) A new fungal phylum, the Glomeromycota: phylogeny and evolution. *Mycological Research* 12, 1413-1421.
3. Smith, SE. and D.J. Read. 1997. *Mycorrhizal symbiosis*. 2nd ed. Academic Press
4. Sylvia, D.M. 1994. Vesicular-arbuscular mycorrhizal fungi. p. 351-378. *In* R.W. Weaver et al. (ed.) *Methods of soil analysis, Part 2. Microbiological and biochemical properties*. Soil Science Society of America, Madison, WI.
5. Vierheilig H., Coughlan A.P., Wyss, U., Piche Y. 1998. Ink and vinegar, a simple staining technique for arbuscular-mycorrhizal fungi. *Applied and Environmental Microbiology*, 64:5004-5007.

### Χρήσιμες διευθύνσεις

[http://en.wikipedia.org/wiki/Arbuscular\\_mycorrhiza](http://en.wikipedia.org/wiki/Arbuscular_mycorrhiza)

<http://mycorrhizas.info/index.html>

<http://invam.caf.wvu.edu/>

<http://www.lrz.de/~schuessler/amphylo/>

<http://mycorrhiza.ag.utk.edu/>

<http://www.zut.edu.pl/index.php?id=6120>