



ΓΕΩΠΟΝΙΚΟ ΠΑΝΕΠΙΣΤΗΜΙΟ ΑΘΗΝΩΝ
ΤΜΗΜΑ ΕΠΙΣΤΗΜΗΣ ΦΥΤΙΚΗΣ ΠΑΡΑΓΩΓΗΣ

ΕΡΓΑΣΤΗΡΙΟ ΚΗΠΕΥΤΙΚΩΝ ΚΑΛΛΙΕΡΓΕΙΩΝ

ΔΙΔΑΚΤΟΡΙΚΗ ΔΙΑΤΡΙΒΗ

ΘΕΜΑ

«Εφαρμογή αζωτοδεσμευτικών βακτηρίων σε συμβατικό, βιολογικό και υδροπονικό σύστημα καλλιέργειας νωπού φασολιού (*Phaseolus vulgaris* L.) και επιπτώσεις της στην παραγωγή, τη βιολογική αζωτοδέσμευση και τις εκπομπές αερίων του θερμοκηπίου».

Κοντοπούλου Δ. Χάρις - Κωνσταντίνα

ΑΘΗΝΑ, 2015

ΔΙΔΑΚΤΟΡΙΚΗ ΔΙΑΤΡΙΒΗ

ΘΕΜΑ

«Εφαρμογή αζωτοδεσμευτικών βακτηρίων σε συμβατικό, βιολογικό και υδροπονικό σύστημα καλλιέργειας νωπού φασολιού (*Phaseolus vulgaris* L.) και επιπτώσεις της στην παραγωγή, τη βιολογική αζωτοδέσμευση και τις εκπομπές αερίων του θερμοκηπίου».

Τριμελής συμβουλευτική επιτροπή

Επιβλέπων: Σάββας Δημήτριος, Καθηγητής Γ.Π.Α

Μέλη: Μπιλάλης Δημήτριος, Αναπληρωτής Καθηγητής Γ.Π.Α

Πάσσαμ Χάρολντ, Καθηγητής Γ.Π.Α

Επταμελής συμβουλευτική επιτροπή

Σάββας Δημήτριος, Καθηγητής Γ.Π.Α

Μπιλάλης Δημήτριος, Αναπληρωτής Καθηγητής Γ.Π.Α

Πάσσαμ Χάρολντ, Καθηγητής Γ.Π.Α

Ακουμιανάκης Κωνσταντίνος, Καθηγητής Γ.Π.Α

Σιώμος Αναστάσιος, Καθηγητής Α.Π.Θ

Ταμπακάκη Αναστασία, Επίκουρος Καθηγήτρια Γ.Π.Α

Καραπάνος Ιωάννης, Επίκουρος Καθηγητής Γ.Π.Α

Κοντοπούλου Δ. Χάρις - Κωνσταντίνα

ΑΘΗΝΑ, 2015

Στον πατέρα μου

Κοντόπουλο Κ. Δημήτριο

Η παρούσα διδακτορική διατριβή χρηματοδοτήθηκε από την Ευρωπαϊκή Επιτροπή κατά την διεξαγωγή του Ευρωπαϊκού Ερευνητικού Προγράμματος “LEGUMES FUTURES” grant agreement no: 245216 CP-FP), το οποίο πραγματοποιήθηκε στο πλαίσιο του ΕFP7 ‘Food, Fisheries and Biotechnologies’.

Ευχαριστίες

Στο σημείο αυτό θα ήθελα να ευχαριστήσω όλους όσους συντέλεσαν με τον δικό τους τρόπο στην διεξαγωγή της παρούσας διδακτορικής διατριβής. Πρώτα από όλα θα ήθελα να εκφράσω τις ειλικρινείς μου ευχαριστίες στον Καθηγητή κ. Σάββα Δημήτριο για την σημαντική καθοδήγηση και υποστήριξη του σε όλη την διάρκεια της διδακτορικής μου μελέτης, τόσο κατά τη διεξαγωγή των πειραμάτων, όσο και κατά τη συγγραφή της διατριβής. Οι συμβολές του και οι εύστοχες παρατηρήσεις του όχι μόνο σε επιστημονικό αλλά και σε ανθρώπινο επίπεδο ήταν καθοριστικές για την ολοκλήρωση της ερευνητικής μου προσπάθειας.

Έπειτα, θα ήθελα να ευχαριστήσω ιδιαίτερα τον Αναπληρωτή Καθηγητή του Εργαστηρίου Γεωργίας Μπιλάλη Δημήτριο για το αμέριστο ενδιαφέρον, καθώς και την συνεχή του υποστήριξη και εμπιστοσύνη κατά την διάρκεια της εκπόνησης της διατριβής μου. Εν συνεχεία, θα ήθελα να ευχαριστήσω τον Καθηγητή Πάσσαμ Χάρολντ για τα κριτικά του σχόλια αλλά και την ουσιαστική βοήθεια του κατά την διάρκεια της διδακτορικής διατριβής μου. Δεν θα μπορούσα να παραλείψω τον Καθηγητή και Διευθυντή του Εργαστηρίου Κηπευτικών Καλλιιεργειών Ακουμιανάκη Κωνσταντίνο για τα εποικοδομητικά του σχόλια, καθώς και την σημαντική ενθάρρυνση του όλα τα χρόνια της προσπάθειας αυτής.

Εν συνεχεία, θα ήθελα επίσης να ευχαριστήσω θερμά τα υπόλοιπα μέλη της εφταμελούς εξεταστικής επιτροπής μου, Καθηγητή Σιώμο Αναστάσιο, Επίκουρο Καθηγήτρια Ταμπακάκη Αναστασία και Επίκουρο Καθηγητή Καραπάνο Ιωάννη για την συμμετοχή τους και τον χρόνο τους στην διεξαγωγή της παρούσας διατριβής. Συγκεκριμένα, ιδιαίτερες ευχαριστίες στην Επίκουρο Καθηγήτρια Ταμπακάκη Αναστασία για την ουσιαστική συμβολή της και επιστημονική καθοδήγηση της στην παραγωγή μολυσμάτων αζωτοβακτηρίων, καθώς και τον υποψήφιο διδάκτορα Χρήστο Φωτιάδη. Επιπλέον, θα ήθελα να ευχαριστήσω και τον Επίκουρο Καθηγητή Καραπάνο Ιωάννη για τη συνεργασία του και τη συμμετοχή του στην εφταμελή επιτροπή.

Ξεχωριστά, θα ήθελα να ευχαριστήσω την Δρ. Βαλεντίνη Παππά για την σημαντική συμμετοχή και καθοδήγηση της κατά την διεξαγωγή των πειραμάτων, την άριστη συνεργασία μας, αλλά και την ζεστή φιλοξενία της στο αντίστοιχο εργαστήριο του Πανεπιστημίου SRUC της Σκωτίας. Επίσης, θερμές ευχαριστίες θα ήθελα να εκφράσω στον Αναπληρωτή Καθηγητή Pietro Iannetta του James Hutton Institute της

Σκωτίας για την συνεργασία του στον προσδιορισμό της βιολογικής αζωτοδέσμευσης και την ταυτοποίηση αζωτοβακτηρίων, καθώς και την φιλοξενία του στο αντίστοιχο εργαστήριο. Χωρίς αυτόν δε θα μπορούσε να ολοκληρωθεί ένα σημαντικό τμήμα της παρούσας διατριβής.

Επίσης, θα ήθελα να ευχαριστήσω τον κ. Κακαμπούκη Παναγιώτη (τοπικό παραγωγό της περιοχής Αγρινίου) για την ουσιαστική βοήθεια του κατά την διεξαγωγή των πειραμάτων αγρού, η ευρηματικότητα του και η αστείρευτη όρεξη του για δουλειά βοηθούσαν στο να κυλάει ο χρόνος πιο εύκολα στον αγρό.

Δεν θα μπορούσα να μην ευχαριστήσω όλους τους συναδέλφους μου στο Εργαστήριο Κηπευτικών Καλλιεργειών για την άριστη συνεργασία κατά την διάρκεια της διδακτορικής μου μελέτης. Θα ήθελα να αναφερθώ ιδιαίτερος στις συναδέλφους μου (Καρανίσα Θεοδώρα, Μακρογιάννη Δέσποινα) που μοιραζόμασταν τόσα χρόνια εκτός από το ίδιο γραφείο τις ίδιες χαρές και αγωνίες, καθώς και τις φίλες και συναδέλφους Χάνδρα Μάρα, Παπανδρέου Αναστασία και Δρόντζα Χρύσα για την υποστήριξη τους. Θα ήταν παράλειψη να μην ευχαριστήσω θερμά τους συνάδελφους και φίλους Δρ. Πατσιαλή Σωτηρία και Πανταλέων Κωνσταντίνο για την ηθική συμπαράσταση σε όλη τη διάρκεια αυτής της προσπάθειας.

Το μεγαλύτερο ευχαριστώ το οφείλω στην οικογένεια μου και στον σύζυγο μου Χανή Δημήτριο για την υπομονή τους, την ενθάρρυνση τους αλλά και γιατί υποστήριξαν αβίαστα την κάθε μου επιλογή πιστεύοντας σε μένα. Χωρίς αυτούς δεν θα μπορούσα να καταφέρω τίποτα! Η παρούσα διδακτορική διατριβή είναι αφιερωμένη στον πατέρα μου για όλα όσα μου προσέφερε τόσο απλόχερα.

Αθήνα, 9 Νοεμβρίου 2015

Κοντοπούλου Δ. Χάρις-Κωνσταντίνα

Περιεχόμενα

Περιεχόμενα.....	7
Περιεχόμενα Εικόνων.....	11
Περιεχόμενα Σχημάτων.....	12
Περιεχόμενα Πινάκων	15
Περίληψη	18
Abstract.....	20
Κεφάλαιο 1	22
1.1 Καλλιεργητικά Συστήματα	22
1.1.1 Σχεδιασμός βιώσιμων καλλιεργητικών συστημάτων	22
1.1.2. Βιολογικό σύστημα καλλιέργειας.....	23
1.1.3 Συμβατικό σύστημα καλλιέργειας.....	25
1.1.4 Υδροπονικά συστήματα καλλιέργειας	26
1.1.5 Χρήση ψυχανθών σε καλλιεργητικά συστήματα.....	27
1.2 Βιολογική Αζωτοδέσμευση.....	29
1.2.1 Συνεισφορά της βιολογικής αζωτοδέσμευσης στην παραγωγικότητα των καλλιεργητικών συστημάτων	29
1.3 Εμβολιασμός ψυχανθών με ριζόβια	30
1.3.1 Παράγοντες που επηρεάζουν την επιτυχία του εμβολιασμού.....	31
1.3.2 Επίδραση του εμβολιασμού με ριζόβια σε καλλιεργητικά συστήματα εκτός εδάφους	32
1.3.3 Παραγωγή αποτελεσματικών μολυσμάτων.....	33
1.4 Επίδραση της αλατότητας σε καλλιέργειες ψυχανθών.....	34
1. 5 Εκπομπές αερίων θερμοκηπίου	36
1.5.1 Φαινόμενο του θερμοκηπίου.....	36
1.5.2 Πηγές αερίων θερμοκηπίου γεωργικής προέλευσης	37
1.5.3 Καλλιεργητικές πρακτικές μείωσης των αερίων θερμοκηπίου	39
1.5.4 Ο ρόλος των ψυχανθών στις εκπομπές αερίων θερμοκηπίου.....	41
1.6 Σκοπιμότητα της μελέτης	43
Κεφάλαιο 2	46
2.1 Πείραμα Αγρού (1 ^ο).....	46
2.1.1 Κλιματολογικές συνθήκες	46
2.1.2 Πειραματικό σχέδιο.....	47
2.1.3 Εγκατάσταση πειράματος.....	49
2.1.4 Άρδευση καλλιέργειας	50

2.1.5	Λήψη πειραματικού υλικού και αναλυτικές μέθοδοι.....	52
2.1.6	Στατιστική επεξεργασία αποτελεσμάτων.....	53
2.2	Πείραμα Αγρού (2 ^ο).....	54
2.2.1	Περιγραφή του πειραματικού αγρού	54
2.2.2	Κλιματολογικές συνθήκες	54
2.2.3	Πειραματικό σχέδιο.....	55
2.2.4	Εγκατάσταση πειράματος.....	57
2.2.5	Άρδευση καλλιέργειας	58
2.2.6	Λήψη πειραματικού υλικού και αναλυτικές μέθοδοι.....	58
2.2.7	Στατιστική επεξεργασία αποτελεσμάτων.....	60
2.3	Πείραμα θερμοκηπίου (3 ^ο)	61
2.3.1	Πειραματικό σχέδιο.....	61
2.3.2	Εγκατάσταση πειράματος.....	64
2.3.3	Λήψη πειραματικού υλικού και αναλυτικές μέθοδοι.....	65
2.3.4	Στατιστική επεξεργασία αποτελεσμάτων.....	66
2.4	Πείραμα θερμοκηπίου (4 ^ο)	67
2.4.1	Πειραματικό σχέδιο.....	67
2.4.2	Εγκατάσταση πειράματος.....	69
2.4.3	Λήψη πειραματικού υλικού και αναλυτικές μέθοδοι.....	71
2.4.4	Στατιστική επεξεργασία αποτελεσμάτων.....	72
2.5	Μεθοδολογίες Εργαστηριακών Αναλύσεων.....	73
2.5.1	Μεθοδολογία δειγματοληψίας και προσδιορισμού εκπομπής αερίων θερμοκηπίου (N ₂ O, CO ₂ , CH ₄).....	73
2.5.2	Προσδιορισμός της βιολογικής αζωτοδέσμευσης φασολιού με την μέθοδο της φυσικής αφθονίας του ισότοπου ¹⁵ N (¹⁵ N natural abundance)	78
2.5.3	Προσδιορισμός θρεπτικών στοιχείων (K, P, Na, Mn, Zn, Fe Cu) σε φυτικούς ιστούς	80
2.5.4	Προσδιορισμός αζώτου (N) και άνθρακα (C) σε φυτικούς ιστούς και έδαφος	81
2.5.5	Προσδιορισμός διαθέσιμου νιτρικού (NO ₃ -N) και αμμωνιακού αζώτου (NH ₄ -N) στο έδαφος.....	82
2.5.6	Προσδιορισμός νιτρικού (NO ₃ -N) και αμμωνιακού αζώτου (NH ₄ -N) σε υδατικά διαλύματα.....	82
2.5.7	Απομόνωση και ταυτοποίηση ριζοβίων από φυμάτια ριζών.....	83
Κεφάλαιο 3	88
3.1	Πείραμα Αγρού (1 ^ο).....	88
3.1.1	Σχηματισμός φυματίων	88

3.1.2	Ολικό άζωτο (N) και άνθρακας (C) των φυτικών ιστών	89
3.1.3	Συγκεντρώσεις καλίου (K) και νατρίου (Na) σε φυτικούς ιστούς νάνου φασολιού.....	90
3.1.4	Ολική βιομάζα και παραγωγή	91
3.1.5	Εδαφικό ολικό άζωτο (N) και άνθρακας (C)	93
3.1.6	Εδαφικό ανόργανο άζωτο.....	94
3.1.7	Εκπομπές αερίων θερμοκηπίου (N ₂ O, CO ₂ , CH ₄).....	96
3.2	Πείραμα Αγρού (2 ^ο).....	101
3.2.1	Σχηματισμός φυματίων	101
3.2.2	Ολικό άζωτο (N) και άνθρακας (C) των φυτικών ιστών	103
3.2.3	Ποσοστό αζώτου προερχόμενο από την ατμόσφαιρα (υπέργειο μέρος και λοβοί φυτών φασολιού).....	106
3.2.4	Συγκεντρώσεις καλίου (K), νατρίου (Na) και φωσφόρου (P) σε φυτικούς ιστούς φασολιού.....	110
3.2.5	Ολική βιομάζα και παραγωγή	110
3.2.6	Εδαφικό ολικό άζωτο (N) και άνθρακας (C)	113
3.2.7	Εδαφικό ανόργανο άζωτο.....	115
3.2.8	Εκπομπές αερίων θερμοκηπίου (N ₂ O, CO ₂ , CH ₄).....	117
3.3	Πείραμα Θερμοκηπίου (3 ^ο).....	122
3.3.1	Σχηματισμός ριζικών φυματίων	122
3.3.2	Αποτελέσματα αλυσιδωτής αντίδρασης πολυμεράσης (PCR).....	123
3.3.3	Θρεπτική κατάσταση αζώτου στους φυτικούς ιστούς.....	124
3.3.4	Ολική βιομάζα και παραγωγή	125
3.3.5	Θρεπτική κατάσταση φυτικών ιστών.....	127
3.4	Πείραμα Θερμοκηπίου (4 ^ο).....	129
3.4.1	Σχηματισμός ριζικών φυματίων	129
3.4.2	Θρεπτική κατάσταση αζώτου στους φυτικούς ιστούς.....	130
3.4.3	Ποσοστό αζώτου προερχόμενο από την ατμόσφαιρα.....	131
3.4.4	Συγκέντρωση νιτρικών (NO ₃ -N) και αμμωνιακών (NH ₄ -N) σε θρεπτικά διαλύματα ανακύκλωσης.....	133
3.4.5	Ολική βιομάζα και παραγωγή	134
3.4.6	Σχετικός Ρυθμός Ανάπτυξης.....	137
3.4.7	Θρεπτική κατάσταση φυτικών ιστών.....	138
Κεφάλαιο 4	142
4.1	Συζήτηση Πειραμάτων Αγρού	142
4.1.1	Σχηματισμός ριζικών φυματίων	142
4.1.2	Ολικό άζωτο (N) και άνθρακας (C) των φυτικών ιστών	144

4.1.3 Συγκεντρώσεις καλίου (K), νατρίου (Na) και φωσφόρου (P) σε φυτικούς ιστούς φασολιού	147
4.1.4 Ολική βιομάζα και παραγωγή	149
4.1.5 Εδαφικό ολικό άζωτο (N), ανόργανο άζωτο (NO ₃ -N & NH ₄ -N) και άνθρακας (C).....	152
4.1.6 Εκπομπές αερίων θερμοκηπίου (N ₂ O, CO ₂ , CH ₄) υπαίθριας καλλιέργειας νάνου φασολιού	154
4.2 Συζήτηση Πειραμάτων Θερμοκηπίου	160
4.2.1 Σχηματισμός ριζικών φυματίων σε φυτά φασολιού (νάνα & αναρριχώμενη ποικιλία)	160
4.2.2 Θρεπτική κατάσταση αζώτου (N) στους φυτικούς ιστούς φασολιού	162
4.2.3 Βιολογικά δεσμευμένο άζωτο από την ατμόσφαιρα	163
4.2.4 Συγκέντρωση νιτρικών (NO ₃ -N) και αμμωνιακών (NH ₄ -N) στο θρεπτικό διάλυμα ανακύκλωσης.....	165
4.2.5 Παράμετροι απόδοσης φυτών φασολιού	166
4.2.6 Θρεπτική κατάσταση φυτών σε ανόργανα στοιχεία.....	168
4.4 Πρωτοτυπία της διδακτορικής διατριβής	174
Βιβλιογραφία	175

Περιεχόμενα Εικόνων

Εικόνα 1: Πειραματικός αγρός καλλιέργειας φασολιού (Άνοιξη-Καλοκαίρι 2011). ...	50
Εικόνες 2 & 3: Αρδευτικό σύστημα τύπου στάγδην που εγκαταστάθηκε στον πειραματικό αγρό καλλιέργειας φασολιού (Άνοιξη-Καλοκαίρι 2011).....	51
Εικόνα 4: Πειραματικός αγρός καλλιέργειας φασολιού (Άνοιξη –Καλοκαίρι 2012)...	58
Εικόνα 5: Θερμοκηπιακή καλλιέργεια νάνου φασολιού σε κλειστό υδροπονικό σύστημα (Νοέμβριος-Ιανουάριος 2011).	64
Εικόνες 6 & 7: Θερμοκηπιακή καλλιέργεια αναρριχώμενου φασολιού σε κλειστό σύστημα υδροπονίας με χρήση ελαφρόπετρας (Άνοιξη –Καλοκαίρι 2013).	70
Εικόνα 8 & 9: Δειγματολήπτης αερίων θερμοκηπίου (N_2O , CO_2 , CH_4) που χρησιμοποιήθηκε κατά την διάρκεια των πειραμάτων αγρού σε καλλιέργεια καθιστού φασολιού.	75
Εικόνα 10: Αναπτυσσόμενες υγιείς αποικίες σε θρεπτικό υπόστρωμα μαννιτόλης και άγαρ.	84
Εικόνα 11: Ανάπτυξη απομονωμένων βακτηρίων από φυμάτια σε γυάλινα φιαλίδια με τρυπτόνη ως θρεπτικό μέσο ανάπτυξης.....	85

Περιεχόμενα Σχημάτων

Σχήμα 1: Σχηματική απεικόνιση του φαινομένου του θερμοκηπίου.	36
Σχήμα 2: Διάγραμμα ροής παγκόσμιων εκπομπών αερίων θερμοκηπίου.	39
Σχήμα 3: Μέση μηνιαία θερμοκρασία (ανοιχτοί κύκλοι) και αθροιστική μηνιαία βροχόπτωση (μπάρες) στην περιοχή του Αγρινίου κατά την διάρκεια της πειραματικής χρονιάς (2011).	47
Σχήμα 4: Σχηματική απεικόνιση πειραματικού σχεδίου υποδιαιρεμένων τεμαχίων που ακολουθήθηκε σε πείραμα αγρού (Άνοιξη –Καλοκαίρι 2011).	48
Σχήμα 5: Μέση μηνιαία θερμοκρασία (ανοιχτοί κύκλοι) και αθροιστική μηνιαία βροχόπτωση (μπάρες) στην περιοχή του Αγρινίου κατά την διάρκεια της πειραματικής χρονιάς (2012).	54
Σχήμα 6: Σχηματική απεικόνιση πειραματικού σχεδίου υπο διαιρεμένων τεμαχίων που ακολουθήθηκε σε πείραμα αγρού (Άνοιξη –Καλοκαίρι 2012).	56
Σχήμα 7: Σχηματική απεικόνιση πειραματικού σχεδίου τυχαιοποιημένων πλήρων ομάδων που ακολουθήθηκε σε πείραμα θερμοκηπίου (Οκτώβριος 2011-Ιανουάριος 2012).	63
Σχήμα 8: Σχηματική απεικόνιση πειραματικού σχεδίου τυχαιοποιημένων πλήρων ομάδων που ακολουθήθηκε σε πείραμα θερμοκηπίου (Μάρτιος 2013- Ιούλιος 2013).	68
Σχήμα 9 α,β: Επίδραση του καλλιεργητικού συστήματος (ΚΣ) (συμβατικό: Σ; βιολογικό: Β) και της αλατότητας του νερού άρδευσης (χαμηλή αλατότητα: Χ.Α; υψηλή αλατότητα: Υ.Α) στον συνολικό αριθμό ριζικών φυματίων ανά λίτρο (L) εδάφους και στο μέσο βάρος φυματίου (mg) 60 ημέρες μετά την σπορά, σε καλλιέργεια φασολιού (άνοιξη - καλοκαίρι 2011).	88
Σχήμα 10 α,β,γ: Επίδραση του καλλιεργητικού συστήματος (ΚΣ) (συμβατικό: Σ; βιολογικό: Β) και της αλατότητας του νερού άρδευσης (χαμηλή αλατότητα: Χ.Α; υψηλή αλατότητα: Υ.Α) στις ολικές συγκεντρώσεις N και C καθώς και στον λόγο C/N στους φυτικούς ιστούς υπέργειου τμήματος φυτών φασολιού (άνοιξη - καλοκαίρι 2011).	89
Σχήμα 11: Επίδραση του καλλιεργητικού συστήματος (ΚΣ) (συμβατικό: Σ; βιολογικό: Β) και της αλατότητας του νερού άρδευσης (χαμηλή αλατότητα: Χ.Α; υψηλή αλατότητα: Υ.Α) στην ολική συγκέντρωση N στο εδάφος σε καλλιέργεια φασολιού (άνοιξη - καλοκαίρι 2011).	93
Σχήμα 12 α,β: Επίδραση του καλλιεργητικού συστήματος (ΚΣ) (συμβατικό: Σ; βιολογικό: Β) και της αλατότητας του νερού άρδευσης (χαμηλή αλατότητα: Χ.Α; υψηλή αλατότητα: Υ.Α) στην ολική συγκέντρωση C και στον λόγο C/N του εδάφους σε καλλιέργεια φασολιού (άνοιξη- καλοκαίρι 2011).	94
Σχήμα 13 α,β: Επίδραση του καλλιεργητικού συστήματος (ΚΣ) (συμβατικό: Σ; βιολογικό: Β) και της αλατότητας του νερού άρδευσης (χαμηλή αλατότητα: Χ.Α; υψηλή αλατότητα: Υ.Α) στις συγκεντρώσεις (α) NO ₃ -N και (β) NH ₄ -N του εδάφους σε καλλιέργεια φασολιού (άνοιξη- καλοκαίρι 2011).	95
Σχήμα 14 α, β, γ: Επίδραση του καλλιεργητικού συστήματος (ΚΣ) (συμβατικό: Σ; βιολογικό: Β) και της αλατότητας του νερού άρδευσης (χαμηλή αλατότητα: Χ.Α.; υψηλή αλατότητα: Υ.Α) στις εκπομπές αερίων θερμοκηπίου ανά μονάδα νωπού βάρους παραγόμενου προϊόντος σε καλλιέργεια φασολιού (άνοιξη- καλοκαίρι 2011).	100

Σχήμα 15 α, β: Επίδραση του καλλιεργητικού συστήματος (ΚΣ) (συμβατικό: Σ; βιολογικό: Β), της αλατότητας του νερού άρδευσης (χαμηλή αλατότητα: Χ.Α; υψηλή αλατότητα: Υ.Α) και της εφαρμογής εμβολιασμού με CIAT899 (+CIAT899) ή μη (-CIAT899) στο συνολικό αριθμό ριζικών φυματίων ανά λίτρο (L) εδάφους (α.) και στο μέσο βάρος φυματίου (mg) (β.), 65 ημέρες μετά την σπορά, σε καλλιέργεια φασολιού (άνοιξη - καλοκαίρι 2012).	102
Σχήμα 16: Επίδραση του καλλιεργητικού συστήματος (ΚΣ) (συμβατικό: Σ; βιολογικό: Β), της αλατότητας του νερού άρδευσης (χαμηλή αλατότητα: Χ.Α; υψηλή αλατότητα: Υ.Α) και του εμβολιασμού με CIAT899 (+CIAT899) ή μη (-CIAT899) στην ολική συγκέντρωση N στο εδάφος σε καλλιέργεια φασολιού (άνοιξη - καλοκαίρι 2012).	114
Σχήμα 17: Επίδραση του καλλιεργητικού συστήματος (ΚΣ) (συμβατικό: Σ; βιολογικό: Β), της αλατότητας του νερού άρδευσης (χαμηλή αλατότητα: Χ.Α; υψηλή αλατότητα: Υ.Α) και του εμβολιασμού με CIAT899 (+CIAT899) ή μη (-CIAT899) στο λόγο C/N του εδάφους σε καλλιέργεια φασολιού (άνοιξη - καλοκαίρι 2012).	114
Σχήμα 18 α, β, γ: Επίδραση του καλλιεργητικού συστήματος (ΚΣ) (συμβατικό: Σ; βιολογικό: Β), της αλατότητας του νερού άρδευσης (χαμηλή αλατότητα: Χ.Α; υψηλή αλατότητα: Υ.Α) και του εμβολιασμού με CIAT899 ή χωρίς (-CIAT899) στις εκπομπές αερίων θερμοκηπίου ανά μονάδα νωπού βάρους παραγόμενου προϊόντος σε καλλιέργεια φασολιού (άνοιξη- καλοκαίρι 2012).	121
Σχήμα 19: Ο σχηματισμός ριζικών φυματίων σε φυτά υδροπονικής καλλιέργειας φασολιού, εμβολιαζόμενα είτε με το στέλεχος <i>R. tropici</i> CIAT899 ή με ένα εμπορικό μείγμα (εμπ. μείγμα) που περιέχει είδη <i>Rhizobium</i> και <i>Azotobacter</i> ή μη εμβολιασμένα.	122
Σχήμα 20: Συγκέντρωση ολικού αζώτου (N) στο υπέργειο τμήμα φυτών φασολιού που καλλιεργήθηκαν υδροπονικά και εμβολιάστηκαν είτε με το στέλεχος <i>R. tropici</i> CIAT899 ή με ένα εμπορικό μείγμα (εμπ. μείγμα) που περιέχει είδη <i>Rhizobium</i> και <i>Azotobacter</i> ή δεν εμβολιάστηκαν με αζωτοβακτήρια.	124
Σχήμα 21 α, β: Ολική βιομάζα (νωπό και ξηρό βάρος) υπέργειου τμήματος φυτών φασολιού που καλλιεργήθηκαν υδροπονικά και εμβολιάστηκαν είτε με το στέλεχος <i>R. tropici</i> CIAT899 ή με ένα εμπορικό μείγμα (εμπ. μείγμα) που περιέχει είδη <i>Rhizobium</i> και <i>Azotobacter</i> ή δεν εμβολιάστηκαν με αζωτοβακτήρια.	125
Σχήμα 22 α, β, γ, δ: Συγκεντρώσεις μαγνησίου (Mg), καλίου (K), ψευδαργύρου (Zn) και φωσφόρου (P) στο υπέργειο μέρος φυτών φασολιού που καλλιεργήθηκαν υδροπονικά και είτε εμβολιάστηκαν με <i>R. tropici</i> CIAT899 ή με εμπορικό μείγμα που περιέχει διάφορα είδη <i>Rhizobium</i> και <i>Azotobacter</i> , ή δεν εμβολιάστηκαν με αζωτοβακτήρια.	128
Σχήμα 23 α, β: Συνολικός αριθμός ριζικών φυματίων (α) και μέσο βάρος φυματίου (β) σε φυτά υδροπονικής καλλιέργειας αναρριχώμενου φασολιού, εμβολιασμένου με <i>R. tropici</i> CIAT899 ή μη εμβολιασμένου με αζωτοβακτήρια.	129
Σχήμα 24 α, β: Συγκέντρωση ολικού αζώτου (N) στο υπέργειο τμήμα (α) και τη ρίζα (β) φυτών αναρριχώμενου φασολιού υδροπονικής καλλιέργειας, εμβολιασμένου με <i>R. tropici</i> CIAT899 ή μη εμβολιασμένου με αζωτοβακτήρια.	131
Σχήμα 25 α, β: Συγκέντρωση νιτρικών ($\text{NO}_3 - \text{N}$) και αμμωνιακών ($\text{NH}_4 - \text{N}$) στο ανακυκλωμένο Θ.Δ. κλειστού υδροπονικού συστήματος καλλιέργειας αναρριχώμενου φασολιού, εμβολιασμένου με <i>R. tropici</i> CIAT899 ή μη εμβολιασμένου με αζωτοβακτήρια.	133

Σχήμα 26 α, β: Ολική βιομάζα (νωπό και ξηρό βάρος) υπέργειου τμήματος φυτών υδροπονικής καλλιέργειας αναρριχώμενου φασολιού, εμβολιασμένου με <i>R. tropici</i> CIAT899 ή μη εμβολιασμένου με αζωτοβακτήρια	135
Σχήμα 27 α, β, γ, δ: Συγκεντρώσεις, καλίου (K), ασβεστίου (Ca), μαγνησίου (Mg), φωσφόρου (P) σε φύλλα φυτών υδροπονικής καλλιέργειας αναρριχώμενου φασολιού, εμβολιασμένου με <i>R. tropici</i> CIAT899 ή μη εμβολιασμένου με αζωτοβακτήρια.....	139
Σχήμα 28 α, β, γ, δ : Συγκεντρώσεις μαγγανίου (Mn), σιδήρου (Fe), χαλκού (Cu) και ψευδαργύρου (Zn) σε φύλλα φυτών υδροπονικής καλλιέργειας αναρριχώμενου φασολιού, εμβολιασμένου με <i>R. tropici</i> CIAT899 ή μη εμβολιασμένου με αζωτοβακτήρια.....	141

Περιεχόμενα Πινάκων

Πίνακας 1: Προτεινόμενα μέτρα για τον μετριασμό των εκπομπών αερίων του θερμοκηπίου από γεωργικά οικοσυστήματα και οι φαινομενικές τους επιδράσεις στην μείωση των εκπομπών κάθε αερίου ξεχωριστά (επίδραση άμβλυσης) και εκτίμηση της επίδρασης των προτεινόμενων αυτών πρακτικών στην συνολική μείωση των καθαρών εκπομπών στην περιοχή που υιοθετήθηκαν (καθαρή επίπτωση άμβλυσης) (Smith et al., 2008).....	41
Πίνακας 2 : Σύνθεση θρεπτικών διαλυμάτων (ΘΔ) για δύο διαφορετικές μεταχειρίσεις ανόργανου αζώτου που συμπεριλαμβάνουν: 'πρότυπο ΘΔ' (100% N) και 'χωρίς άζωτο ΘΔ' (0% N).	65
Πίνακας 3: Σύνθεση θρεπτικών διαλυμάτων (ΘΔ) για τρεις διαφορετικές μεταχειρίσεις ανόργανου αζώτου που συμπεριλαμβάνουν: 'πρότυπο ΘΔ' (100% N), 'χαμηλό ΘΔ' (33% N) και 'χωρίς άζωτο ΘΔ' (0% N).....	70
Πίνακας 4: Βαθμονόμηση αποδεκτών πρακτικών δειγματοληψίας και προσδιορισμού συμφώνα με τους Rochette and Eriksen-Hamel, 2008.	74
Πίνακας 5: Αλληλουχίες των εκκινήτων που χρησιμοποιήθηκαν για την αλυσιδωτή αντίδραση της πολυμεράσης.	87
Πίνακας 6: Επίδραση του καλλιεργητικού συστήματος (ΚΣ) (συμβατικό: Σ; βιολογικό: Β) και αλατότητας του νερού άρδευσης (χαμηλή: Χ.Α.; υψηλή: Υ.Α) στην ολική νωπή και ξηρή βιομάζα υπέργειου μέρους φυτών φασολιού που καλλιεργήθηκαν άνοιξη – καλοκαίρι του 2011.....	91
Πίνακας 7: Επίδραση του καλλιεργητικού συστήματος (ΚΣ) (συμβατικό: Σ; βιολογικό: Β) και της αλατότητας του νερού άρδευσης (χαμηλή: Χ.Α.; υψηλή: Υ.Α) στις παραμέτρους απόδοσης καλλιέργειας φασολιού (άνοιξη – καλοκαίρι 2011). Παρουσιάζονται δεδομένα για την απόδοση σε νωπό βάρος λοβών (NB, $tn\ ha^{-1}$) και ξηρό βάρος λοβών ($\Xi B, tn\ ha^{-1}$), συνολικό αριθμό λοβών (λοβοί m^{-2}), μέσο βάρος νωπού λοβού (M.B. λοβού, g) και ποσοστό ξηράς ουσίας στο λοβό (% $\Xi.O.$).	92
Πίνακας 8: Επίδραση του καλλιεργητικού συστήματος (ΚΣ) (συμβατικό: Σ; βιολογικό: Β) και της αλατότητας του νερού άρδευσης (χαμηλή αλατότητα: Χ.Α.; υψηλή αλατότητα: Υ.Α) στις αθροιστικές εκπομπές N_2O-N ($g\ ha^{-1}$) σε καλλιέργεια φασολιού (άνοιξη - καλοκαίρι 2011).	97
Πίνακας 9: Επίδραση του καλλιεργητικού συστήματος (ΚΣ) (συμβατικό: Σ; βιολογικό: Β) και της αλατότητας του νερού άρδευσης (χαμηλή αλατότητα: Χ.Α.; υψηλή αλατότητα: Υ.Α) στις αθροιστικές εκπομπές CO_2-C ($g\ ha^{-1}$) σε καλλιέργεια φασολιού (άνοιξη - καλοκαίρι 2011).	98
Πίνακας 10: Επίδραση του καλλιεργητικού συστήματος (ΚΣ) (συμβατικό: Σ; βιολογικό: Β) και της αλατότητας του νερού άρδευσης (χαμηλή αλατότητα: Χ.Α.; υψηλή αλατότητα: Υ.Α) στις αθροιστικές εκπομπές CH_4-C ($g\ ha^{-1}$) σε καλλιέργεια φασολιού (άνοιξη - καλοκαίρι 2011).....	99
Πίνακας 11: Επίδραση του καλλιεργητικού συστήματος (ΚΣ) (συμβατικό: Σ; βιολογικό: Β) και της αλατότητας του νερού άρδευσης (χαμηλή αλατότητα: Χ.Α.; υψηλή αλατότητα: Υ.Α) στις ολικές συγκεντρώσεις N και C, στον λόγο C/N στους φυτικούς ιστούς υπέργειου τμήματος φυτών φασολιού (άνοιξη - καλοκαίρι 2012).	105
Πίνακας 12: Επίδραση του καλλιεργητικού συστήματος, βιολογικό ή συμβατικό (B.ΚΣ ή Σ.ΚΣ) και του επιπέδου αλατότητας στο νερό άρδευσης (χαμηλή αλατότητα: Χ.Α. ή υψηλή αλατότητα: Υ.Α.) στη φυσική αφθονία ^{15}N φυτών αναφοράς (βλήτο) και	

φασολιού σε σχέση με το ατμοσφαιρικό άζωτο N_2 ($\delta^{15}N$ ‰), στο ποσοστό του αζώτου που προέρχεται από την ατμόσφαιρα (Ndfa ‰) και στη συνολική ποσότητα δεσμευμένου N βλαστικού τμήματος φυτών φασολιού από την ατμόσφαιρα ($kg\ N\ ha^{-1}$), στο πρώιμο στάδιο γεμίσματος των λοβών (65 ΗΜΣ) και στο τέλος της καλλιέργειας (85 ΗΜΣ). 107

Πίνακας 13: Επίδραση του καλλιεργητικού συστήματος (ΚΣ) (συμβατικό: Σ; βιολογικό: Β) και της αλατότητας του νερού άρδευσης (χαμηλή αλατότητα: Χ.Α; υψηλή αλατότητα: Υ.Α) στις ολικές συγκεντρώσεις N και C, στον λόγο C/N στους λοβούς φυτών φασολιού. 109

Πίνακας 14: Επίδραση του καλλιεργητικού συστήματος (ΚΣ) (συμβατικό: Σ; βιολογικό: Β) και αλατότητας του νερού άρδευσης (χαμηλή: Χ.Α.; υψηλή: Υ.Α) στην ολική νωπή και ξηρή βιομάζα υπέργειου μέρους φυτών φασολιού που καλλιεργήθηκαν άνοιξη –καλοκαίρι του 2012. 111

Πίνακας 15: Επίδραση του καλλιεργητικού συστήματος (ΚΣ) (συμβατικό: Σ; βιολογικό: Β) και της αλατότητας του νερού άρδευσης (χαμηλή: Χ.Α.; υψηλή: Υ.Α) στις παραμέτρους απόδοσης καλλιέργειας φασολιού (άνοιξη – καλοκαίρι 2011). Παρουσιάζονται δεδομένα για την απόδοση σε νωπό βάρος λοβών (NB, $tn\ ha^{-1}$) και ξηρό βάρος λοβών (ΞB , $tn\ ha^{-1}$), συνολικό αριθμό λοβών (λοβοί m^{-2}), μέσο βάρος νωπού λοβού (M.B. λοβού, g) και ποσοστό ξηράς ουσίας στο λοβό (% $\Xi.O.$). 112

Πίνακας 16: Επίδραση του καλλιεργητικού συστήματος (ΚΣ) (συμβατικό: Σ; βιολογικό: Β) και της αλατότητας του νερού άρδευσης (χαμηλή αλατότητα: Χ.Α.; υψηλή αλατότητα: Υ.Α) εμβολιασμένων φυτών καθιστού φασολιού με *Rhizobium tropici* CIAT899 (+CIAT899) ή μη (-CIAT899) στις συγκεντρώσεις NO_3-N και NH_4-N του εδάφους, 30, 60 και 85 ημέρες μετά την σπορά (ΗΜΣ) σε καλλιέργεια φασολιού (άνοιξη- καλοκαίρι 2012). 116

Πίνακας 17: Επίδραση του καλλιεργητικού συστήματος (ΚΣ) (συμβατικό: Σ; βιολογικό: Β) και της αλατότητας του νερού άρδευσης (χαμηλή αλατότητα: Χ.Α.; υψηλή αλατότητα: Υ.Α) εμβολιασμένων φυτών καθιστού φασολιού με *Rhizobium tropici* CIAT899 (+CIAT899) ή μη (-CIAT899) στις αθροιστικές εκπομπές N_2O-N ($g\ ha^{-1}$) (άνοιξη- καλοκαίρι 2012). 118

Πίνακας 18: Επίδραση του καλλιεργητικού συστήματος (ΚΣ) (συμβατικό: Σ; βιολογικό: Β) και της αλατότητας του νερού άρδευσης (χαμηλή αλατότητα: Χ.Α.; υψηλή αλατότητα: Υ.Α) εμβολιασμένων ή όχι φυτών καθιστού φασολιού με *Rhizobium tropici* CIAT899 (+CIAT899) ή μη (-CIAT899) στις αθροιστικές εκπομπές CO_2-C ($kg\ ha^{-1}$) (άνοιξη- καλοκαίρι 2012). 119

Πίνακας 19: Επίδραση του καλλιεργητικού συστήματος (ΚΣ) (συμβατικό: Σ; βιολογικό: Β) και της αλατότητας του νερού άρδευσης (χαμηλή αλατότητα: Χ.Α.; υψηλή αλατότητα: Υ.Α) εμβολιασμένων φυτών καθιστού φασολιού με *Rhizobium tropici* CIAT899 (+CIAT899) ή μη (-CIAT899) στις αθροιστικές εκπομπές CH_4-C ($g\ ha^{-1}$) (άνοιξη-καλοκαίρι 2012). 120

Πίνακας 20: PCR ανάλυση αλληλουχίας των βακτηρίων που έχουν απομονωθεί από βακτήρια ριζικών φυματίων υδροπονικής καλλιέργειας φασολιού, εμβολιασμένα είτε με *R. tropici* CIAT899 ή με εμπορικό μείγμα (*Rhizobium* και *Azotobacter* sp.) ή μη-εμβολιασμένα. 123

Πίνακας 21: Απόδοση σε νωπό βάρος (N.B, $φυτό^{-1}$), ξηρό βάρος ($\Xi.B$, $φυτό^{-1}$), συνολικό αριθμό λοβών (λοβοί $φυτό^{-1}$), μέσο βάρος λοβού (M.B, g) και στο ποσοστό ξηράς ουσίας ($\Xi.O.$, %) σε υδροπονική καλλιέργεια φασολιού, εμβολιασμένου είτε με

<i>R. tropici</i> CIAT899 ή με εμπορικό μείγμα που περιέχει διάφορα είδη <i>Rhizobium</i> και <i>Azotobacter</i> , ή μη-εμβολιασμένου με αζωτοβακτήρια.....	126
Πίνακας 22: Επίδραση του εμβολιασμού με <i>R. tropici</i> (στέλεχος CIAT899) σε υδροπονική καλλιέργεια αναρριχώμενου φασολιού τροφοδοτούμενου με διαφορετικά επίπεδα αζώτου στο διάλυμα θρέψης στη φυσική αφθονία ¹⁵ N φυτών φασολιού σε σχέση με το ατμοσφαιρικό άζωτο N ₂ (δ ¹⁵ N ‰), στο ποσοστό του αζώτου που προέρχεται από την ατμόσφαιρα (Ndfa %), στη συνολική ποσότητα αζώτου φυτών φασολιού (kg N ha ⁻¹) και στη ποσότητα δεσμευμένου N από την ατμόσφαιρα.....	132
Πίνακας 23: Απόδοση σε νωπό βάρος (N.B, φυτό ⁻¹), ξηρό βάρος (Ξ.Β, φυτό ⁻¹), συνολικό αριθμό λοβών (λοβοί φυτό ⁻¹), μέσο βάρος λοβού (M.B, g) και στο ποσοστό ξηράς ουσίας (Ξ.Ο., %) σε φυτά υδροπονικής καλλιέργειας αναρριχώμενου φασολιού, εμβολιασμένου με <i>R. tropici</i> CIAT899 ή μη εμβολιασμένου με αζωτοβακτήρια.....	136
Πίνακας 24: Επίδραση του εμβολιασμού με <i>R. tropici</i> (στέλεχος CIAT899) σε υδροπονική καλλιέργεια αναρριχώμενου φασολιού τροφοδοτούμενου με διαφορετικά επίπεδα αζώτου στο διάλυμα θρέψης στον σχετικό ρυθμό ανάπτυξης των φυτών κατά την διάρκεια της καλλιέργειας.....	137

Περίληψη

Η παρούσα διδακτορική διατριβή αποσκοπεί στην διερεύνηση βιώσιμων συστημάτων καλλιέργειας νωπού φασολιού στοχεύοντας κυρίως στις εκπομπές αερίων θερμοκηπίου, την θρέψη των φυτών με άζωτο, αλλά και τη σωστή αξιοποίηση της συμβιωτικής αζωτοδέσμευσης. Κατά τη διεξαγωγή της μελέτης πραγματοποιήθηκαν τέσσερα πειράματα, στα οποία μελετήθηκαν δύο εναλλακτικά καλλιεργητικά συστήματα, βιολογικό σύστημα υπαίθριας καλλιέργειας νωπού φασολιού (*Phaseolus vulgaris* L.) και υδροπονικό σύστημα θερμοκηπίου.

Στα δύο πειράματα αγρού που διεξήχθησαν έγινε σύγκριση της επίδρασης των γεωργικών πρακτικών του βιολογικού καλλιεργητικού συστήματος με αυτές του συμβατικού σε συνθήκες χαμηλής ή υψηλής αλατότητας του νερού άρδευσης. Η πρακτική του εμβολιασμού με αζωτοβακτήρια στις ρίζες των φυτών φασολιού εφαρμόστηκε και στις δύο υπαίθριες καλλιέργειες. Την πρώτη χρονιά εφαρμόστηκε εμπορικό μείγμα αζωτοβακτηρίων μόνο στα βιολογικά υποτεμάχια, το οποίο αξιολογήθηκε ως αναποτελεσματικό, ενώ την δεύτερη χρονιά χρησιμοποιήθηκε μόλυσμα του στελέχους *Rt* CIAT899, το οποίο ενίσχυσε τον σχηματισμό φυματίων. Το βιολογικό σύστημα καλλιέργειας παρουσίασε τις χαμηλότερες αποδόσεις σε ολική βιομάζα και νωπούς λοβούς φασολιού σε σύγκριση με το συμβατικό σύστημα, λόγω της μειωμένης διαθεσιμότητας N στα αρχικά στάδια ανάπτυξης των φυτών. Παρ' όλα αυτά, το βιολογικό σύστημα εμφάνισε μεγαλύτερη συμβιωτική αζωτοδέσμευση και στις δύο υπαίθριες καλλιέργειες φασολιού. Το συμπέρασμα αυτό προκύπτει από τον υψηλότερο σχηματιζόμενο αριθμό ριζικών φυματίων στο βιολογικό σύστημα και πιθανότατα από τα παρόμοια επίπεδα ολικού εδαφικού N στο πρώιμο στάδιο γεμίσματος των λοβών στα βιολογικά και συμβατικά συστήματα, παρόλο που τα πρώτα υστερούσαν ως προς την ολική συγκέντρωση εδάφους στην αρχική δειγματοληψία εδάφους και επαληθεύεται με τον προσδιορισμό της βιολογικής αζωτοδέσμευσης (biological nitrogen fixation- BNF) με τη μέθοδο της φυσικής αφθονίας. Και τα δύο συστήματα καλλιέργειας παρουσίασαν θετικό ισοζύγιο N (βιολογικό +45 kg ha⁻¹ και συμβατικό +6 kg ha⁻¹) με το βιολογικό σύστημα καλλιέργειας να υπερτερεί αντισταθμίζοντας την ποσότητα N που αφαιρέθηκε με την συγκομιδή των λοβών και βελτιώνοντας την παροχή N στο έδαφος. Όσον αφορά τις εκπομπές αερίων θερμοκηπίου η βιολογική γεωργία είχε σημαντικά χαμηλότερες εκπομπές N₂O από τη συμβατική γεωργία λόγω της μη παροχής ανόργανων λιπασμάτων. Ωστόσο, οι εκπομπές N₂O ανά μονάδα νωπού βάρους παραγόμενου προϊόντος δεν διέφεραν σημαντικά μεταξύ βιολογικού και συμβατικού συστήματος

τονίζοντας την ανάγκη της μεγιστοποίησης της απόδοσης στα βιολογικά συστήματα. Οι εκπομπές CO₂ παρουσιάστηκαν μεγαλύτερες στο βιολογικό σύστημα καλλιέργειας σε σύγκριση με το συμβατικό λόγω της αυξημένης μικροβιακής δραστηριότητας από την εφαρμογή οργανικού λιπάσματος (κομπόστ) και τις δύο χρονιές. Βέβαια, θα πρέπει να σημειωθεί ότι το βιολογικό καλλιεργητικό σύστημα περιορίζει έμμεσα σε σημαντικό βαθμό τις εκπομπές αερίων θερμοκηπίου μέσω της μη χρήσης ανόργανων λιπασμάτων N τα οποία έχουν υψηλό αποτύπωμα άνθρακα. Οι εκπομπές CH₄ τον πρώτο χρόνο καλλιέργειας ήταν ελάχιστες, ενώ τον δεύτερο φαίνεται ότι λειτούργησαν σαν καταβόθρες CH₄ και όχι σαν πηγές.

Η εφαρμογή εμβολιασμού με ριζόβια σε υδροπονική καλλιέργεια φασολιού επιτρέπει την ακριβή ποσοτικοποίηση της βιολογικής αζωτοδέσμευσης και παρέχει πληροφορίες σχετικά με τις δυνατότητες μείωσης της χρήσης ανόργανων αζωτούχων λιπασμάτων. Στα πειράματα θερμοκηπίου της παρούσας διατριβής καλλιέργεια νάνου και αναρριχώμενου φασολιού αναπτύχθηκε σε αδρανές υπόστρωμα ελαφρόπετρας και εμβολιάστηκε είτε με εμπορικό σκεύασμα αζωτοβακτηρίων ή με μόλυσμα του στελέχους *Rt* CIAT899. Και στα δύο πειράματα υπήρχαν μεταχειρίσεις στις οποίες τα φυτά τροφοδοτούνταν είτε με πλήρες πρότυπο θρεπτικό διάλυμα (ΘΔ) αζώτου με συγκέντρωση ολικού αζώτου ή με θρεπτικό διάλυμα χωρίς άζωτο (0% N + CIAT899). Ενώ στο δεύτερο πείραμα θερμοκηπίου τα φυτά τροφοδοτήθηκαν και με θρεπτικό διάλυμα που περιείχε το 1/3 αζώτου του πρότυπου ΘΔ (33% N+ CIAT899). Και στις δύο υδροπονικές καλλιέργειες φασολιού ο εμβολιασμός με CIAT899 ευνόησε τον σχηματισμό ριζικών φυματίων στις μεταχειρίσεις με μειωμένο ή μηδενικό N, ενώ το εμπορικό σκεύασμα που εφαρμόστηκε στην καλλιέργεια νάνου φασολιού κρίθηκε πάλι αναποτελεσματικό. Τα φυτά που εμβολιάστηκαν με CIAT899 της μεταχείρισης με μειωμένη παροχή N κατάφεραν να καλύψουν περισσότερο από το ήμισυ των συνολικών αναγκών τους από την συμβιωτική βιολογική αζωτοδέσμευση (Ndfa=58%). Η μειωμένη παραγωγή και ολική βιομάζα που παρατηρήθηκε στις μεταχειρίσεις με περιορισμένη ή μηδενική παροχή N οφείλεται στην καθυστερημένη ανάπτυξη των φυτών στην αρχική φάση ανάπτυξης τους λόγω έλλειψης N, διότι σε αυτή την φάση ανάπτυξης δεν είχε ξεκινήσει ακόμη η βιολογική αζωτοδέσμευση και δευτερευόντως στον δραστικό περιορισμό του K⁺.

Abstract

The aim of this thesis was to explore sustainable farming systems in common bean (*Phaseolus vulgaris* L.) cultivation focusing mainly in nitrogen plant nutrition, greenhouse gas emissions, as well as the proper use of biological nitrogen fixation (BNF). During the conduct of the study were performed four different experiments, which examined two alternative farming systems, organic farming system and hydroponic system. Two field experiments were conducted to compare the impacts of organic vs. conventional farming practices on yield, N nutrition and greenhouse gas emissions in common bean. In both farming systems, irrigation water containing 0.5 or 10 mM NaCl was used. The conventionally treated plots were fertilized with an inorganic fertilizer, whereas the organically treated plots received organic compost. Conventional farming resulted in significantly higher fresh weight of green bean pods than organic farming in both years. However, the cropping system had no impact on dry pod biomass, because the dry matter content of the organically produced bean pods was higher than that of pods originating from conventional farming. The presence of 10 mM NaCl in the irrigation water restricted significantly the total plant biomass and fresh pod yield, without any interaction with the farming system. The decrease in fresh pod yield by organic farming was due to a shortage in soil mineral N (NO_3^- and NH_4^+) at the early growth stage, which reduced the tissue N levels. Organic farming increased significantly the number of root nodules at the stage of early pod filling in comparison with conventional farming. However, at both systems the total soil N increased appreciably at this developmental stage, although no N was supplied to the crop, thereby pointing to intensive symbiotic N_2 -fixation by bean. This hypothesis was confirmed in the second year experiment whereas the BNF was determined using the natural abundance ^{15}N method. Organic farming resulted in significantly lower N_2O emissions than conventional farming in terms of the overall Global Warming Potential of the treatments in both years. However, the N_2O emission intensities did not differ significantly between organic and conventional systems, highlighting the importance of maximizing yield within organic systems in order to reduce their environmental impact.

As far as the greenhouse experiments concerned, to date few attempts have been made to assess the impact of *Rhizobium* inoculation on N_2 fixation and plant yield in soilless cultivations of common bean. In the present study, common bean grown on an inert medium (pumice) was inoculated with either *Rhizobium tropici* CIAT899 or a commercial product containing a mix of N_2 -fixing bacteria, specifically

rhizobia, and *Azotobacter* sp. In the first experiment plants treated with both inoculants were supplied with nitrogen (N)-free (0% N) nutrient solution (NS) throughout the cropping period, whereas a third treatment with non-inoculated plants, which were supplied with a standard (100% N) NS was applied as a control. However, in the second greenhouse experiment plants were also supplied with 1/3 of full-N NS and inoculated with *Rt* CIAT899. In both experiments inoculation with *R. tropici* significantly increased the total number of root nodules in comparison with the other treatments, while the commercial mixture that was used in the first experiment was ineffective. The supply of N-free NS restricted markedly both total plant biomass and pod yield, whereas the inoculation with *Rt* mitigated this effect. Restriction (1/3 of full-N) or omission of inorganic N resulted in successful nodulation and BNF corresponding to 58% and 100% of the total plant-N content, respectively. However, the shoot total N concentration 45, 65, and 90 days after transplanting (DAT) was not reduced by the supply of N-free NS when the plants were inoculated with CIAT899, whereas in the second experiment total N was significantly reduced 25 DAT in the N-free treatment NS. This finding indicate that the growth of bean plants fed with reduced or zero N was limited only on initial plant growth stage due to lack of N, because in this phase of development had not yet started the biological nitrogen fixation and this is proved by the reduced relative growth rate presented by plants at this stage. The supply of N-free NS restricted appreciably the potassium (K), magnesium (Mg), and zinc (Zn) levels in the aboveground plant biomass, regardless of inoculation treatment. *Rt* inoculation of hydroponic bean provides no advantage when full-N NS is supplied, while 1/3 of full-N, or N-free NS suppresses plant biomass and yield, partly because the restricted NO_3^- supply impairs cation uptake.

Κεφάλαιο 1

Βιβλιογραφική Ανασκόπηση

1.1 Καλλιεργητικά Συστήματα

1.1.1 Σχεδιασμός βιώσιμων καλλιεργητικών συστημάτων

Τα τελευταία χρόνια, η γεωργική ανάπτυξη και οι πρακτικές που ακολουθούνται επικεντρώθηκαν στις εξωτερικές εισροές (όπως συνθετικά λιπάσματα και φυτοφάρμακα) για την αύξηση της παραγωγής τροφίμων. Αυτές οι εντατικές πρακτικές καλλιέργειας και η συνεχής χρήση των χημικών προϊόντων έχουν δημιουργήσει ποικίλα οικονομικά, περιβαλλοντικά και οικολογικά προβλήματα. Η εφαρμογή καλλιεργητικών συστημάτων υψηλών εισροών (συμβατικό σύστημα καλλιέργειας) οδήγησε σε δραματική αύξηση της χρήσης αζώτου. Συγκεκριμένα, σύμφωνα με τον Tilman (1999) τα τελευταία 30 χρόνια, παρόλο που η παγκόσμια παραγωγή τροφίμων διπλασιάστηκε, η χρήση των λιπασμάτων αζώτου στη γεωργία επταπλασιάστηκε. Τα κύρια περιβαλλοντικά προβλήματα που προκύπτουν σχετίζονται με την διαχείριση του εδάφους (διάβρωση, γονιμότητα του εδάφους), τη διατήρηση των θρεπτικών στοιχείων (ευτροφισμός, έκπλυση νιτρικών), τη διαχείριση νερού (αποτελεσματική χρήση νερού, υπεράρδευση και αλατότητα) και τη διατήρηση της βιοποικιλότητας.

Η υιοθέτηση ολοκληρωμένων συστημάτων γεωργικής παραγωγής στα οποία εμπλέκονται καλλιέργειες χαμηλών εισροών με μειωμένη χρήση λιπασμάτων και φυτοφαρμάκων, μπορεί να ελαφρύνει αυτά τα οικονομικά και οικολογικά προβλήματα. Συνεπώς, η αειφόρος χρήση της γεωργικής γης απαιτεί την ανάπτυξη συστημάτων γεωργικής παραγωγής, τα οποία εκτός από τους οικονομικούς στόχους συμβάλλουν στην επίτευξη των στόχων σε τομείς όπως το περιβάλλον, η υγεία και η ευημερία, το αγροτικό τοπίο και η φύση (Rossing et al., 1997).

Ωστόσο, η εφαρμογή οικολογικών αρχών και πρακτικών στη γεωργία γίνεται ολοένα και πιο διαδεδομένη. Σε ορισμένους τομείς της γεωργικής διαχείρισης μάλιστα, όπως η καταπολέμηση εχθρών και ζιζανίων, η εφαρμογή οικολογικών προσεγγίσεων στον τομέα της έρευνας έχει γίνει κοινός τόπος, καταλήγοντας σε επιλογές διαχείρισης που συνδέουν βιολογικές και χημικές διεργασίες (Liebman και Gallandt 1997). Η βιολογική γεωργία, σύστημα χαμηλών εισροών, είναι ένα παράδειγμα μιας τέτοιας προσέγγισης που στηρίζεται σε μεγάλο βαθμό σε αυτό το πλαίσιο (Drinkwater, 2005). Οι βιοκαλλιεργητές προσπαθούν να διαχειριστούν τα

φυτά, την οργανική ύλη του εδάφους καθώς και τους μικροοργανισμούς του διατηρώντας την εσωτερική τους ικανότητα ανατροφοδότησης (Howard 2010). Η άποψη αυτή είναι η βάση για την επινόηση και ανάπτυξη πρακτικών διαχείρισης της γονιμότητας του εδάφους που είναι συμβατές με τη βιολογική γεωργία.

Από την άλλη πλευρά, λόγοι όπως η υπερντατική εκμετάλλευση του εδάφους, η άρδευση με νερό υψηλής περιεκτικότητας σε άλατα, η έλλειψη υδάτινων πόρων και η δυσκολία για ριζική αντιμετώπιση παθογόνων εδάφους οδήγησαν στην διεύρυνση της χρήσης καλλιεργητικών συστημάτων εκτός εδάφους (υδροπονικές καλλιέργειες). Παράλληλα, η ανάπτυξη αυτών των συστημάτων ενισχύθηκε από την αύξηση του παγκόσμιου πληθυσμού και τη βελτίωση του βιοτικού επιπέδου, οι οποίες δημιούργησαν μια ισχυρή ζήτηση για τρόφιμα υψηλής αξίας και ιδιαίτερα για προϊόντα υψηλής ποιότητας εκτός εποχής. Τελευταία, μάλιστα έχει παρατηρηθεί σημαντική πρόοδος στην ανάπτυξη οικονομικά βιώσιμων υδροπονικών συστημάτων και υπάρχει ευρεία εμπορική εφαρμογή σε πολλές χώρες.

Συμπερασματικά, προκειμένου να σχεδιάσουμε βιώσιμα καλλιεργητικά συστήματα που στοχεύουν στη διατήρηση των φυσικών πόρων, την προστασία του περιβάλλοντος, την υψηλή παραγωγή, την ανταγωνιστικότητα και τη βελτίωση της ποιότητας ζωής για τους αγρότες και την κοινωνία συνολικά (Ikerd, 1993) θα πρέπει να έχουμε υπ' όψιν μας ότι ένα σύστημα καλλιέργειας δεν είναι μόνο ένα απλό άθροισμα όλων των συνιστωσών του, αλλά ένα σύνθετο σύστημα με περίπλοκες αλληλεπιδράσεις (Edwards, 1989).

1.1.2. Βιολογικό σύστημα καλλιέργειας

Με τον πληθυσμό της γης να αυξάνεται κατά 1,4% σε ετήσια βάση και να αναμένεται να φθάσει 8,3 δισεκατομμύρια μέχρι το 2025 (Mannion, 1998), η αύξηση στην παραγωγή των καλλιεργειών θεωρείται απαραίτητη. Αυτή η αυξημένη παραγωγή θα χρειαστεί να επιτευχθεί παρά τη συνεχιζόμενη υποβάθμιση και την απώλεια πρωταρχικής γεωργικής γης, αλλά και την στασιμότητα ή ακόμα και μείωση που παρουσιάζουν οι αποδόσεις σε πολλούς τομείς της φυτικής παραγωγής (Huang και Rozelle, 1995; Bramley et al., 1996). Από την άλλη πλευρά, η συνεχόμενη αύξηση του πληθυσμού, σε συνδυασμό με την αυξανόμενη ανησυχία του για την υγεία και την προστασία του περιβάλλοντος, έχουν ως αποτέλεσμα το δημόσιο ενδιαφέρον να επικεντρώνεται όλο και περισσότερο στην ποιότητα των τροφίμων (Woese et al., 1997) και τον τρόπο παραγωγής τους. Λαμβάνοντας υπόψη τα παραπάνω εξηγείται και η αύξηση της βιολογικής γεωργίας που παρουσιάζεται τα τελευταία χρόνια σε πολλά μέρη του κόσμου. Ωστόσο, παρά την ανάπτυξη και την

αύξηση της έρευνας, της πολιτικής, των μέσων ενημέρωσης, και την προσοχή του κοινού, μόνο ένα μικρό μερίδιο της συνολικής γεωργικής γης καλλιεργείται στην βιολογική γεωργία (4% στην Ευρώπη, Eurostat, 2007).

Η βιολογική γεωργία αναγνωρίζεται πλέον ως έγκυρη εναλλακτική λύση για την συμβατική γεωργία και αποτελεί πηγή ιδεών και προσεγγίσεων τις οποίες η συμβατική γεωργία μπορεί να υιοθετήσει για να γίνει πιο βιώσιμη (Kristiansen and Merfied, 2006). Τα βιολογικά συστήματα καλλιέργειας βασίζονται σε οικολογικές πρακτικές, όπως βιολογική καταπολέμηση εχθρών, κομποστοποίηση, βελτίωση της γονιμότητας του εδάφους μέσα από βιολογικές διεργασίες και αμειψισπορά, ενώ αποκλείεται η χρήση συνθετικών λιπασμάτων για την παραγωγή. Ως εκ τούτου, η απαγόρευση της χρήσης των ανόργανων λιπασμάτων, στα βιολογικά συστήματα καλλιέργειας, μειώνει τόσο την απαίτηση ενέργειας για την παραγωγή λιπασμάτων όσο και τις εκπομπές υποξειδίου του αζώτου από την εφαρμογή λιπασμάτων, το οποίο θα μπορούσε να μειώσει τις άμεσες παγκόσμιες εκπομπές αερίων του θερμοκηπίου που προέρχονται από την γεωργία κατά περίπου 20%.

Εντούτοις, ένα σημαντικό ερώτημα παραμένει όσον αφορά την παραγωγικότητα της σε σχέση με την συμβατική γεωργία αλλά και την δυναμική της συμβολή στην σίτιση του πληθυσμού. Πολυάριθμες μελέτες δείχνουν μειωμένες αποδόσεις στα βιολογικά συστήματα καλλιέργειας σε σύγκριση με τα συμβατικά (Nieberg & Schulze Pals 1996; Halberg and Kristensen 1997). Το άζωτο συχνά θεωρείται ως ένας από τους βασικούς περιοριστικούς παράγοντες υπεύθυνους για τη χαμηλότερη παραγωγικότητα που εμφανίζεται στα βιολογικά συστήματα (Eltun 1996; Berensten et al. 1998; Torstensson 1998; Clarke et al., 1999). Οι Watson et al. (2002b) μελέτησαν ισοζύγια θρέψης για 88 βιολογικές γεωργικές εκμεταλλεύσεις σε εύκρατα κλίματα και διαπίστωσαν ότι αν και όλα τα ισοζύγια του αζώτου εμφάνισαν πλεόνασμα, η αποτελεσματική χρήση του αζώτου ήταν χαμηλή (κατά μέσο όρο 0,3). Ωστόσο, θετικά ισοζύγια αζώτου έχουν παρουσιάσει και άλλοι ερευνητές για βιολογικές γεωργικές εκμεταλλεύσεις (Kaffka & Koepf 1989; Nolte & Werner 1994). Τα ισοζύγια θρεπτικών στοιχείων χρησιμοποιούνται συχνά για να καθορίσουν την αποτελεσματική χρήση των θρεπτικών στοιχείων. Από την άλλη πλευρά όμως, οι εκτιμήσεις τους μπορεί να είναι ανακριβείς εξαιτίας της δυσκολίας του προσδιορισμού των θρεπτικών στοιχείων που περιέχονται σε κοπριάς ζώων και κομπόστ καθώς και τα ποσοστά εφαρμογής τους, αλλά και της άμεσης αζωτοδέσμευσης των ψυχανθών και έκπλυσης σε εμπορικές γεωργικές εκμεταλλεύσεις (Watson et al., 2002b).

Τα βιολογικά συστήματα καλλιέργειας χαρακτηρίζονται ως συστήματα χαμηλών εισροών, ενώ οι πηγές αζώτου που παρέχονται σε αυτά παρουσιάζουν χαμηλή περιεκτικότητα σε διαθέσιμο για τα φυτά άζωτο και αργή ανοργανοποίηση

(Berry et al., 2002). Το άζωτο που παρέχεται μέσω της βιολογικής γεωργίας είναι οργανικό, με αποτέλεσμα η διαθεσιμότητα του στα φυτά να εξαρτάται από την ανοργανοποίηση της οργανικής ουσίας του εδάφους, η οποία είναι πολύ δύσκολο να προβλεφθεί εξαρχής σε συνθήκες αγρού (Stockdale & Rees 1995). Φαίνεται πιθανό ότι η ανοργανοποίηση σε βιολογικά καλλιεργούμενα εδάφη θα διαφέρει από εκείνη των συμβατικών εδαφών λόγω διαφορών στη φύση των αζωτούχων εισροών (Berry et al., 2002), τη διαχείριση πρακτικών (Watson et al., 2002), και ενδεχομένως τη βιολογική δραστηριότητα των εδαφών (Shannon et al., 2002). Συγκεκριμένα, οι Drinkwater et al. (1995) διαπίστωσαν ότι σε βιολογικές γεωργικές εκμεταλλεύσεις, παρόλο που το εδαφικό ανόργανο άζωτο ήταν το ένα τέταρτο των συμβατικών εκμεταλλεύσεων, το δυναμικό της ανοργανοποίησης του οργανικού αζώτου ήταν τρεις φορές μεγαλύτερο.

Συνεπώς, ο μη έγκαιρος εφοδιασμός των φυτών με διαθέσιμες για αυτά μορφές αζώτου και σε επαρκή ποσότητα θα μπορούσε να αποτελέσει πρόβλημα στην βιολογική γεωργία και να οδηγήσει σε μειωμένη τελική παραγωγή (Seufert et al., 2012). Οι Berry et al., (2002) καταλήγουν στο ίδιο συμπέρασμα θεωρώντας ότι το πρόβλημα έγκειται στον χρόνο παροχής διαθέσιμου αζώτου στα φυτά και όχι στην ποσότητα, υπολογίζοντας ότι το μέγεθος των εισροών αζώτου σε πολλά καλλιεργούμενα βιολογικά φυτά (δημητριακά, ψυχανθή και σανοδοτικά) είναι παρόμοια με εκείνα που καλλιεργούνται συμβατικά και κυμαίνονται από 150 έως 300 kg N ha⁻¹.

1.1.3 Συμβατικό σύστημα καλλιέργειας

Τα συμβατικά συστήματα καλλιέργειας και οι πρακτικές διαχείρισής τους έχει αποδειχθεί ότι παράγουν υψηλές αποδόσεις, ωστόσο, η αειφορία της γονιμότητας των εδαφών όπως και η περιβαλλοντική επίδραση αυτών των συστημάτων παραγωγής είναι αμφίβολη. Υπάρχουν πολλές οικολογικές συνέπειες που συνδέονται με τις ανθρώπινες δραστηριότητες οι οποίες διπλασιάζουν την ποσότητα του αζώτου που ανακυκλώνεται στα χερσαία οικοσυστήματα. Τα συνθετικά λιπάσματα αζώτου συχνά χαρακτηρίζονται ως η κύρια αιτία αυτών των οικολογικών επιπτώσεων, αλλά αυτό συμβαίνει κυρίως επειδή τα αζωτούχα λιπάσματα αποτελούν τη μεγαλύτερη και τη πιο πρόσφατη ανθρωπογενή επίδραση στον συνολικό κύκλο του αζώτου (Crews and People, 2004). Πολλές μελέτες αποδίδουν περιβαλλοντικά προβλήματα όπως έκπλυση νιτρικών και ρύπανση των υπόγειων υδάτων (Foster et al., 1986), υποβάθμιση της δομής του εδάφους (Jordahl και Karlen, 1993) και μόλυνση με φυτοφάρμακα στα συμβατικά συστήματα καλλιέργειας. Επιπλέον, αυτά

τα συστήματα καλλιέργειας συνδέονται με μειωμένα επίπεδα συνολικού αζώτου (Drinkwater et al., 1998 και Wander et al., 1994) και άνθρακα (Wander et al., 1994) στο έδαφος, με την πάροδο του χρόνου.

Πολύ σημαντική εμφανίζεται η επίδραση των συμβατικών συστημάτων καλλιέργειας και στις παγκόσμιες εκπομπές αερίων του θερμοκηπίου που σχετίζονται με την γεωργία. Συγκεκριμένα, το άζωτο απομακρύνεται από τα οικοσυστήματα μέσω της έκπλυσης των ανόργανων νιτρικών ή διαλυτών μορφών οργανικού αζώτου, ή ακόμα και μέσω εκπομπών αζωτούχων αερίων στην ατμόσφαιρα με τις μορφές της αμμωνίας, οξειδίων του αζώτου, υποξειδίου του αζώτου, ή διαζώτου (N_2). Όλοι αυτοί οι τρόποι διαφυγής, με τη σημαντική εξαίρεση του N_2 , συνδέονται με μία ή και περισσότερες τοπικές, περιφερειακές ή παγκόσμιες περιβαλλοντικές απειλές (Peoples et al., 1995a). Πολλαπλές δραστηριότητες συνέβαλαν στην ανθρωπογενή αύξηση των εκπομπών του υποξειδίου του αζώτου (Vitousek et al., 1997). Ωστόσο, η γεωργία λόγω της ευρύτατης χρήσης αζωτούχων λιπασμάτων, φαίνεται να αποτελεί γενικά την μεγαλύτερη πηγή ανθρωπογενών εκπομπών NO_2 , αντιπροσωπεύοντας το 70% της αύξησης (Matson et al., 1998).

Παρ' όλα αυτά, υπάρχουν πολλά συμβατικά συστήματα καλλιέργειας που αντιμετωπίζουν αποτελεσματικά τα θέματα που σχετίζονται με την αειφορία όπως η αποτελεσματική χρήση των θρεπτικών στοιχείων, η καταλληλότητα των αμειψισπορών στην διαμόρφωση του εδάφους και τον τύπο του εδάφους, η βιοποικιλότητα και η χρήση των ψυχανθών (Stork and Jerie 2003, Ridley et al., 2004). Η απάντηση στα προβλήματα που σχετίζονται με τα συμβατικά καλλιεργητικά συστήματα είναι η εισαγωγή εναλλακτικών συστημάτων καλλιέργειας. Σε αυτά συμπεριλαμβάνονται τα βιολογικά συστήματα (χωρίς χρήση συνθετικών λιπασμάτων και φυτοφαρμάκων) και τα συστήματα χαμηλών εισροών (μειωμένη χρήση συνθετικών λιπασμάτων και φυτοφαρμάκων) (Poudeh et al., 2002) τα οποία έχουν την δυνατότητα να αυξάνουν το άζωτο και τον άνθρακα του εδάφους και παράλληλα να μειώνουν την έκπλυση αζώτου από το έδαφος.

1.1.4 Υδροπονικά συστήματα καλλιέργειας

Υδροπονία μπορεί να οριστεί ως «οποιαδήποτε μέθοδος καλλιέργειας φυτών χωρίς τη χρήση του εδάφους ως μέσο ανάπτυξης ριζών, η οποία περιλαμβάνει παροχή όλων των ανόργανων θρεπτικών ουσιών αποκλειστικά μέσω του νερού άρδευσης» (Savvas, 2003). Αρχικά, οι επιστήμονες χρησιμοποίησαν την υδροπονία κυρίως ως ερευνητικό εργαλείο για τη μελέτη συγκεκριμένων πτυχών της θρέψης των φυτών (Savvas, 2003) και τη λειτουργία της ρίζας (Raviv and Lieth, 2008), αφού ο

έλεγχος της θρέψης μπορεί να πραγματοποιηθεί μέσω του θρεπτικού διαλύματος που παρέχεται στα φυτά. Η πρόοδος στον τομέα της μεταποίησης των πλαστικών, του αυτοματισμού, της παραγωγής υδατοδιαλυτών λιπασμάτων και ιδίως η ανάπτυξη πολλών τύπων υποστρωμάτων κατέστησαν την καλλιέργεια εκτός εδάφους ένα επιχειρηματικά βιώσιμο στάδιο καλλιέργειας (Ravin and Lieth, 2008). Παράλληλα, οι λόγοι για την στροφή προς την υδροπονία σχετίζονται και με τις περιβαλλοντικές πολιτικές. Ειδικότερα, η ανακύκλωση των απορροών που προκύπτουν μετά την εφαρμογή υδρολίπνωσης σε κλειστά υδροπονικά συστήματα επιτρέπει σημαντική μείωση της κατανάλωσης λιπασμάτων και δραστικό περιορισμό ή ακόμη και πλήρη εξάλειψη της έκπλυσης νιτρικών και άλλων θρεπτικών συστατικών από τα θερμοκήπια προς το περιβάλλον (Savvas, 2003).

Θα πρέπει να αναφερθεί ότι κατά κανόνα, τα θρεπτικά διαλύματα που παρέχονται στις καλλιέργειες εκτός εδάφους παρασκευάζονται με την χρήση ανόργανων λιπασμάτων (Sonneveld and Voogt, 2009; Savvas et al., 2013). Λίγες απόπειρες έχουν γίνει να εισαχθούν οργανικά λιπάσματα σε υδροπονικά συστήματα καλλιέργειας (Atkin and Nichols, 2004; Shinohara et al., 2011), αλλά δεν υιοθετήθηκαν στην καλλιεργητική πράξη, αφού η απευθείας χρήση οργανικών λιπασμάτων σε καλλιέργειες εκτός εδάφους μπορεί να αποβεί τοξική για την ανάπτυξη των φυτών (Garland et al., 1997).

1.1.5 Χρήση ψυχανθών σε καλλιεργητικά συστήματα

Η διαχείριση της γονιμότητας στη βιολογική γεωργία στηρίζεται σε μια μακροπρόθεσμη ολοκληρωμένη προσέγγιση και όχι σε βραχυπρόθεσμες και στοχευόμενες κοινές λύσεις όπως στη συμβατική γεωργία (Watson et al., 2002). Η αυξημένη χρήση των ψυχανθών συμβάλει μακροπρόθεσμα στην βελτίωση της γονιμότητας του εδάφους και γι' αυτό συνιστούν ένα θεμελιώδες στοιχείο των συστημάτων βιολογικής γεωργίας, επειδή μειώνουν ή εξαλείφουν την ανάγκη για εξωτερική παροχή αζωτούχων λιπασμάτων (Stockdale et al. 2001), λόγω της βιολογικής αζωτοδέσμευσης. Οι Berry et al. (2002) κατέληξαν στο συμπέρασμα ότι, αν και τα ψυχανθή είχαν τη δυνατότητα να προμηθεύσουν επαρκείς ποσότητες αζώτου στις καλλιέργειες, υπήρχε συνήθως ένα έλλειμμα. Ακόμα και για τα ψυχανθή η έγκαιρη μεταφορά αζώτου σε διαθέσιμες μορφές για τα φυτά θα μπορούσε να αποτελέσει πρόβλημα, αφού στα αρχικά στάδια ανάπτυξης των φυτών ο γρήγορος πολλαπλασιασμός των αζωτοβακτηρίων οδηγεί σε ακινητοποίηση, παρά σε απελευθέρωση διαθέσιμων μορφών για τα φυτά ανόργανου αζώτου (Oberson et al., 2013).

Η βιωσιμότητα της χρήσης ψυχανθών για την παροχή αζώτου σε φυτά που καλλιεργούνται σε συστήματα είτε βιολογικής είτε συμβατικής γεωργίας εξαρτάται από: i) τη δέσμευση επαρκούς αζώτου στη βιομάζα των ψυχανθών, ii) την ικανότητα του εδάφους να αυξήσει την ανοργανοποίηση του οργανικού αζώτου και iii) την ικανότητα των γεωργικών πρακτικών να μεγιστοποιήσει την γονιμότητα του εδάφους και τις δυνητικές περιβαλλοντικές επιδράσεις των ψυχανθών, αλλά και να ελαχιστοποιήσει τις αρνητικές επιπτώσεις τους (π.χ. αυξημένη οξύτητα και έκπλυσης αζώτου) (Davis and Abbott, 2006). Η βελτίωση της διαθεσιμότητας αζώτου προερχόμενου από τα ψυχανθή σε επόμενες καλλιέργειες θα μπορούσε να επιτευχθεί μετά από ενσωμάτωση οργανικών υπολειμμάτων σε κατάλληλο χρόνο, εφαρμογή πρακτικών που βελτιώνουν την ποιότητα των ψυχανθών ως μικροβιακά υποστρώματα και κατάλληλη επιλογή της επόμενης καλλιέργειας σε σχέση με την διαθεσιμότητα του αζώτου (Berry et al., 2002).

Τα ψυχανθή έχουν την μοναδική ιδιότητα μεταξύ όλων των καλλιεργούμενων φυτών να συμβιώνουν με αζωτοδεσμευτικά βακτήρια τα οποία μετατρέπουν το στοιχειακό άζωτο της ατμόσφαιρας σε μορφές που είναι αφωμοιώσιμες από τα φυτά. Για τον λόγο αυτό, η επέκταση της καλλιέργειας ψυχανθών και η αξιοποίησή τους σε προγράμματα αμειψισποράς συμβάλλει στον φυσικό εμπλουτισμό του εδάφους με άζωτο με συνέπεια την δραστική μείωση της χρήσης αζωτούχων χημικών λιπασμάτων. Η μειωμένη χρήση χημικών λιπασμάτων N μπορεί μεταξύ άλλων να μειώσει δραστικά τις εκπομπές αερίων θερμοκηπίου (ΑΘ) και κυρίως του N_2O . Οι εκπομπές ΑΘ μπορούν επιλέον να επηρεαστούν και από τις καλλιεργητικές επεμβάσεις που εφαρμόζονται σε κάθε περίπτωση, όπως π.χ. οι τρόποι λίπανσης και κατεργασίας του εδάφους, καθώς και διαχείρισης των υπολειμμάτων των καλλιεργειών. Η βιολογική καλλιέργεια συνδέεται με την εφαρμογή πολύ διαφορετικών καλλιεργητικών πρακτικών από αυτές που εφαρμόζονται στις αντίστοιχες συμβατικές καλλιέργειες και συνεπώς μπορεί να συνδέεται και με πολύ διαφορετικά επίπεδα εκπομπών ΑΘ.

Όσον αφορά, την καλλιέργεια των ψυχανθών σε υδροπονικά συστήματα μέχρι στιγμής υπάρχουν μελέτες στις οποίες τα συστήματα αυτά εξυπηρετούν ερευνητικές ανάγκες για την καλύτερη κατανόηση της ευαισθησίας των αζωτοδεσμευτικών συστημάτων υπό την επίδραση διαφορετικών περιβαλλοντικών και διατροφικών μεταβλητών, καθώς και για την εξοικείωση με τις μεθοδολογίες προσδιορισμού της βιολογικής αζωτοδέσμευσης.

1.2 Βιολογική Αζωτοδέσμευση

Ένα βασικό στοιχείο της γεωργικής αειφορίας είναι η αποτελεσματική διαχείριση του αζώτου στο περιβάλλον περιλαμβάνοντας τουλάχιστον κάποια χρήση του βιολογικά δεσμευμένου αζώτου, αφού το άζωτο από αυτή την πηγή χρησιμοποιείται απ' ευθείας από το φυτό, με αποτέλεσμα να είναι λιγότερο ευαίσθητο στην πτητικότητα, απονιτροποίηση και έκπλυση. Η βιολογική αζωτοδέσμευση αποτελεί μία μικροβιολογική διαδικασία στη βίοςφαιρα, η οποία μετατρέπει το στοιχειακό ατμοσφαιρικό άζωτο (N_2) σε αφομοιώσιμη για το φυτό μορφή, μέσω ενός ενζύμου της νιτρογενάσης. Με τον τρόπο αυτό, αδρανές N_2 εισέρχεται στο βιολογικά ενεργό μέρος του παγκόσμιου κύκλου N (Unkovich et al., 2008). Μετά τη φωτοσύνθεση, η αζωτοδέσμευση είναι ίσως η πιο σημαντική βιολογική διαδικασία στη γη (Vance, 1998; Unkovich et al., 2008). Πολλές διαφορετικές βιολογικές σχέσεις συμβάλλουν στη δέσμευση N_2 , τόσο στο έδαφος όσο και σε υδάτινα συστήματα (Sprent, 1984). Ωστόσο, στα περισσότερα γεωργικά συστήματα, η πρωταρχική πηγή βιολογικά δεσμευμένου αζώτου (περίπου 80 %) λαμβάνει χώρα μέσω της συμβιωτικής αλληλεπίδρασης των ψυχανθών και των βακτηρίων του εδάφους που ανήκουν στα γένη *Rhizobium*, *Bradyrhizobium*, *Sinorhizobium*, *Allorhizobium*, *Mesorhizobium* και *Azorhizobium* (Sadowsky και Graham, 1998; Vance, 1998).

1.2.1 Συνεισφορά της βιολογικής αζωτοδέσμευσης στην παραγωγικότητα των καλλιεργητικών συστημάτων

Εκτιμάται ότι η βιολογική αζωτοδέσμευση παρέχει σε όλο τον κόσμο 200 με 300 εκατομμύρια τόνους βιολογικά χρησιμοποιήσιμου αζώτου ανά έτος (Hurek and Reinhold-Hurek, 1998). Οι εισροές από βιολογικά δεσμευμένο άζωτο κυμαίνονται από 90 έως 130 Tg N ετησίως στα επίγεια οικοσυστήματα (Galloway et al., 1995), και μεταξύ 100-200 Tg N ανά έτος στα θαλάσσια οικοσυστήματα (Karl et al., 2002). Παρόλο που η ακρίβεια των στοιχείων αυτών θα μπορούσε να αμφισβητηθεί, τα μεγέθη τους απεικονίζουν τη σημασία της βιολογικής αζωτοδέσμευσης, καθώς και την αναγκαιότητα που προκύπτει να βελτιωθεί η βιολογική αζωτοδέσμευση και να αντικαταστήσει ένα μέρος από τις υψηλές ποσότητες αζωτούχων λιπασμάτων που εφαρμόζονται ετησίως στην γεωργική γη.

Το άζωτο απαιτείται σε σημαντικά ποσά, προκειμένου να υποστηρίξει την ανάπτυξη των καλλιεργειών και να θρέψει τον αυξανόμενο παγκόσμιο πληθυσμό. Τα αζωτούχα λιπάσματα αποτελούν για τους αγρότες μία βολική και σχετικά φθηνή πηγή αζώτου για την ανάπτυξη των καλλιεργειών, το οποίο διατίθεται σε άμεσα

αφομοιώσιμη μορφή στα φυτά (Peoples et al., 1995). Εκτός από τη διαθεσιμότητα φθηνών λιπασμάτων αζώτου υπάρχουν και άλλοι παράγοντες που αποτρέπουν την παροχή αζώτου μέσω των ψυχανθών από τους αγρότες. Οι σημαντικότεροι από αυτούς είναι, η ραγδαία αύξηση του πληθυσμού η οποία περιορίζει τη χρήση γης για χαμηλών αποδόσεων καλλιέργειες (ψυχανθή) και χλωρές λιπάνσεις, αλλά και η ανάγκη της ενσωμάτωσης κοπριάς ζώων σε γεωργικές εκτάσεις (Graham and Vance, 2003). Άλλο ένας λόγος για τον οποίο οι παραγωγοί δεν ενθαρύνονται να καλλιεργήσουν ψυχανθή είναι και η απώλεια εισοδήματος χρησιμοποιώντας τα ψυχανθή σε συστήματα αμειψισποράς (Vance 2001).

Γιατί όμως η ανθρωπογενής προσθήκη του αζώτου παίζει τόσο σημαντικό ρόλο; Δεδομένα από μελέτες πρόσληψης N δείχνουν ότι σε περιπτώσεις που η ποσότητα λίπανσης ήταν κάτω από 150 kg N ha^{-1} , η αποτελεσματικότητα πρόσληψης κυμαινόταν γύρω στο 60-65% αλλά με προσθήκη υψηλότερων ποσοτήτων τα ποσοστά ανάκτησης του παρεχόμενου N μειώθηκαν στο 50% (Smil, 1999). Αυτή η μεγάλη υπολειμματική ποσότητα N παραμένει στο έδαφος λόγω ανεπαρκούς αξιοποίησης από τις καλλιέργειες και έχει ενοχοποιηθεί για έναν αριθμό περιβαλλοντικών επιπτώσεων αλλά και προβλημάτων υγείας (Galloway et al., 1995). Συνεπώς, το θέμα της βιολογικής αζωτοδέσμευσης έχει μεγάλη πρακτική σημασία αφού η χρήση των ανόργανων αζωτούχων λιπασμάτων οδήγησε σε απaráδεκτα υψηλά επίπεδα ρύπανσης των υδάτων (αυξανόμενες συγκεντρώσεις τοξικών νιτρικών στις παροχές πόσιμου νερού) και ευτροφισμό σε λίμνες και ποτάμια.

1.3 Εμβολιασμός ψυχανθών με ριζόβια

Ο εμβολιασμός ψυχανθών με μικροοργανισμούς που δεσμεύουν το ατμοσφαιρικό άζωτο αποτελεί μία από τις παλαιότερες πρακτικές στην γεωργία, αφού μολύσματα του γένους *Rhizobium* χρησιμοποιούνται ήδη από τον 19^ο αιώνα (Catroux et al., 2001; Stephens and Rask, 2000). Πολλοί ερευνητές έχουν αποδείξει ότι ο εμβολιασμός της ρίζας των ψυχανθών με βακτήρια του γένους *Rhizobium*, τα οποία έχουν την ικανότητα να σχηματίζουν φυμάτια είναι ένας τρόπος να ενισχυθεί η βιολογική αζωτοδέσμευση και να παρουσιάσει αύξηση η τελική παραγωγή (Graham 1981; Thies et al., 1991; Hardarson, 1993). Ο στόχος του εμβολιασμού είναι να παρέχει επαρκή αριθμό ζωντανών και αποτελεσματικών ριζοβίων για να προκαλέσει γρήγορα αποικισμό στη ριζόσφαιρα, επιτρέποντας το σχηματισμό φυματίων μετά τη βλάστηση των φυτών, όσο το δυνατόν συντομότερα και καταλήγοντας σε υψηλές αποδόσεις (Thompson, 1988; Catroux, 1991).

1.3.1 Παράγοντες που επηρεάζουν την επιτυχία του εμβολιασμού

Παρόλο που ο εμβολιασμός των ψυχανθών θα μπορούσε να οδηγήσει σε αύξηση της παραγωγής, πολλοί παράγοντες περιορίζουν την πλήρη έκφραση του. Παλαιότερες μελέτες (Singleton and Tavares, 1986) υποδεικνύουν παράγοντες, οι οποίοι πιθανόν να παρεμποδίζουν την αποτελεσματικότητα του εμβολιασμού με ριζόβια, με σημαντικότερον από όλους την παρουσία ανταγωνιστικών γηγενών *Rhizobium* πληθυσμών στο έδαφος (Johnson et al., 1965; Boonkerd et al., 1978; Segovia et al., 1991; Thies et al., 1991). Υποστηρίζεται ότι η μεγαλύτερη ικανότητα σχηματισμού φυματίων που εντοπίζεται στα γηγενή στελέχη προέρχεται από αριθμητικό πλεονέκτημα στις περιοχές μόλυνσης της ρίζας και σχηματισμού φυματίων, παρά στο πλεονέκτημα της ανταγωνιστικότητας (Brockwell et al. 1988; Triplett and Sadowsky 1992; Vargas et al., 2000). Ωστόσο, σύμφωνα με σύγχρονες μελέτες για να αποφευχθεί η αποτυχία που οφείλεται στην ανταγωνιστικότητα της εγχώριας μικροχλωρίδας, θα πρέπει να αποκτηθούν απομονώσεις ριζοβίων που να μπορούν να επιβιώσουν, αλλά και να ανταγωνιστούν τα γηγενή στελέχη που ήδη υπάρχουν στο έδαφος (Sanjuan and Olivares, 1991; Thies et al., 1991; Martinez-Romero, 2003). Βέβαια, η ολική παραγωγή των φυτών είναι δυνατόν να περιοριστεί και από το περιβάλλον, με αποτέλεσμα οι απαιτήσεις των φυτών σε άζωτο να ικανοποιηθούν από το διαθέσιμο άζωτο του εδάφους ή μέσω της αζωτοδέσμευσης από άλλα λιγότερο αποτελεσματικά ριζόβια του εδάφους (Singleton et al., 1986). Η αποτυχία του εμβολιασμού σε ορισμένες περιπτώσεις θα μπορούσε να αποδοθεί στην παρουσία επαρκούς πληθυσμού ριζοβίων στο έδαφος, ο οποίος είναι ικανός να εξυπηρετήσει τις ανάγκες του ξενιστή για συμβιωτική αζωτοδέσμευση κάτω από μη περιοριστικές συνθήκες ανάπτυξης για το φυτό ξενιστή (Singleton and Tavares, 1986). Άλλοι ερευνητές αποδίδουν την μειωμένη βιωσιμότητα του μολύσματος και συνεπώς την μειωμένη αποτελεσματικότητα αποικισμού σε συνθηκές καταπόνησης, όπως η θερμοκρασία (Marshall 1964) και η ξηρασία (Vincent et al., 1962).

Όσον αφορά το φασόλι (*P. vulgaris* L.), έχει παρατηρηθεί ότι η βιολογική αζωτοδέσμευση σε μελέτες αγρού είναι συχνά μειωμένη σε σύγκριση με αυτή των υπολοίπων ψυχανθών και ο σχηματισμός ριζικών φυματίων που παρουσιάζει είναι φτωχός (Vincent, 1974; Graham, 1981; Graham and Temple, 1984; Wolff et al., 1991; Burdman et al., 1997; Camacho et al., 2001; Remans et al., 2008). Αυτό έχει σαν αποτέλεσμα η πρακτική του εμβολιασμού με ριζόβια με στόχο τη βελτίωση της αζωτοδεσμευτικής ικανότητας να παρουσιάζει ακόμη μεγαλύτερο οικονομικό ενδιαφέρον για την συγκεκριμένη καλλιέργεια.

Θα πρέπει να αναφερθεί ότι πολλοί ερευνητές παρατηρούν αστάθεια στην παραγωγή κατά την καλλιέργεια του φασολιού, ακόμα και εάν έχει προηγηθεί εμβολιασμός με ριζόβια, η οποία φαίνεται να σχετίζεται κυρίως με τύπο του εδάφους, τα προηγούμενα καλλιεργούμενα είδη και την αζωτούχο λίπανση (Graham, 1981; Amarger et al., 1994; Vargas et al., 2000). Η ευαισθησία που εμφανίζει η συμβίωση φασολιού-ριζοβίων σε παράγοντες που προκαλούν περιβαλλοντικό στρες, όπως υψηλή θερμοκρασία και η ξηρότητα του εδάφους θεωρείται άλλος ένας λόγος αποτυχίας της πρακτικής του εμβολιασμού και κατά συνέπεια της χαμηλής αζωτοδεσμευτικής ικανότητας (Graham 1981; Hungria et al. 1997; Hungria and Vargas 2000).

Οι παραπάνω λόγοι έχουν σαν αποτέλεσμα, η πλειοψηφία των αγροτών να μην έχει πειστεί για την αποτελεσματικότητα της πρακτικής εφαρμογής του εμβολιασμού με αζωτοβακτήρια και ταυτόχρονα της βιολογικής αζωτοδέσμευσης στην αύξηση της παραγωγής, και είτε να μην εφαρμόζουν καθόλου την πρακτική του εμβολιασμού ή να την συνδυάζουν με την χρήση ανόργανων αζωτούχων λιπασμάτων.

Πολλές μελέτες επίσης αποδίδουν την αναποτελεσματικότητα του εμβολιασμού με ριζόβια στην εξειδικευμένη σχέση που παρουσιάζεται ανάμεσα στο στέλεχος του βακτηρίου και το ψυχανθές- ξενιστή. Άλλωστε οι Graham and Halliday (1977), Graham and Rosas (1977) και Graham (1978) είχαν από πολύ νωρίς αποτυπώσει τις διαφορές που παρουσιάζονται στις ποικιλίες φασολιού, αλλά και σε στελέχη του γένους *Rhizobium* όσον αφορά την αζωτοδεσμευτική τους ικανότητα. Στην παρούσα διατριβή, επιλέχθηκε να διερευνηθεί η συμπεριφορά του στελέχους *Rhizobium tropici* CIAT899, τόσο σε συνθήκες αγρού όσο σε καλλιέργειες φασολιού εκτός εδάφους. Το στέλεχος *Rhizobium tropici* CIAT899 έχει αποδειχθεί ικανό να συμβιώνει αποτελεσματικά με το φασόλι (Martinez-Romero et al., 1991).

1.3.2 Επίδραση του εμβολιασμού με ριζόβια σε καλλιεργητικά συστήματα εκτός εδάφους

Τα καλλιεργητικά συστήματα εκτός εδάφους χαρακτηρίζονται από έλλειψη μικροοργανισμών και ανταγωνιστικής μικροχλωρίδας κατά την έναρξη της καλλιέργειας (Postma et al., 2008), με αποτέλεσμα να μην αναμένεται ανταγωνιστικότητα από γηγενής μικροοργανισμούς όταν εφαρμοσθεί εμβολιασμός με ριζόβια σε καλλιέργεια φασολιού εκτός εδάφους. Συνεπώς, ο εμβολιασμός με ριζόβια σε συστήματα καλλιέργειας εκτός εδάφους θα μπορούσε να είναι πιο αποτελεσματικός σε σύγκριση με τον εμβολιασμό ριζοβίων σε καλλιέργειες εδάφους,

όσον αφορά την εγκατάσταση του μολύσματος, το σχηματισμό φυματίων και την αύξηση της παραγωγής. Εντούτοις, πολύ λίγη έρευνα έχει γίνει πάνω στην επίδραση του εμβολιασμού με βακτήρια του γένους *Rhizobium* στην αζωτοδέσμευση, αλλά και στην ολική παραγωγή φασολιού σε καλλιέργειες εκτός εδάφους.

Οι Jebara et al. (2001) εμβολίασαν 5 σειρές φασολιού καλλιεργούμενες σε δύο διαφορετικά υδροπονικά συστήματα (χαλίκι τοποθετημένο σε γλάστρες και αεροπονικό σύστημα σε δοχεία) χρησιμοποιώντας ως μόλυσμα είτε το *Rhizobium tropici* με στέλεχος CIAT899 ή γηγενή ριζόβια από την Τυνησία. Το θρεπτικό διάλυμα τροφοδοσίας ήταν υψηλής και χαμηλής αλατότητας. Η συγκεκριμένη έρευνα αποκάλυψε ότι οι αλληλεπιδράσεις μεταξύ στελεχών και σειρών που χρησιμοποιήθηκαν θα πρέπει να λαμβάνονται υπ' όψιν για την επιλογή της πιο καλά προσαρμοσμένης σειράς φασολιού στην αλατότητα, καθώς και ότι το αεροπονικό σύστημα κρίθηκε αποτελεσματικό για την επιλογή υψηλών αποδόσεων συμβιώσεων με ριζόβια. Σε μία άλλη έρευνα των Zaman-Allah et al. (2007) μελετήθηκε η επίδραση φωσφόρου αλλά και διαφορετικών στελεχών ριζοβίων, σε υδροπονική καλλιέργεια φασολιού. Τα αποτελέσματα της έρευνας αυτής οδήγησαν στο συμπέρασμα ότι η παροχή πρόσθετου φωσφόρου κατά την καλλιέργεια φασολιού συνδυαζόμενη με τον εμβολιασμό κατάλληλου στελέχους μπορούν να βελτιώσουν την συμβιωτική αζωτοδέσμευση και την παραγωγή φασολιού.

Από την άλλη πλευρά, έχει αναφερθεί ότι παροχή υψηλών ποσοτήτων ανόργανου αζώτου σε διάφορα ψυχανθή, παρεμποδίζει το σχηματισμό ριζικών φυματίων (Silva et al. 1993; Vargas et al., 2000). Συνεπώς, ο σχηματισμός φυματίων, έπειτα από εμβολιασμό με ριζόβια σε υδροπονική καλλιέργεια φασολιού μπορεί να επηρεαστεί έντονα από το επίπεδο παροχής ανόργανου αζώτου δια μέσου του θρεπτικού διαλύματος. Η συνδυασμένη επίδραση του εμβολιασμού με ριζόβια και του επιπέδου παροχής αζώτου στην απόδοση και στην βιολογική αζωτοδέσμευση, σε καλλιέργειες φασολιού εκτός εδάφους, δεν έχει αναφερθεί μέχρι στιγμής στην διεθνή επιστημονική βιβλιογραφία.

1.3.3 Παραγωγή αποτελεσματικών μολυσμάτων

Ο αγρότης, ο οποίος είναι και ο τελικός χρήστης σκευασμάτων για τον εμβολιασμό ψυχανθών με συμβιωτικά αζωτοβακτήρια, ενδιαφέρεται πρωτίστως για την αποδοτικότητα της καλλιέργειας και όχι για την φυσιολογία και την οικολογία του βακτηρίου που χρησιμοποιήθηκε για την παραγωγή του μολύσματος (Stephens and Rask, 2000). Εφόσον η ανταπόκριση της καλλιέργειας στην εφαρμογή του μολύσματος, στις περισσότερες περιπτώσεις, είναι αποτέλεσμα της επιλογής

κατάλληλου στελέχους και του πληθυσμού που στοχεύει στον εκάστοτε οργανισμό (Muldoon et al., 1980; Amarger, 1981; Brockwell et al., 1988; Hume and Blair, 1992; Fesenko et al., 1995), για την παραγωγή ενός επιτυχημένου μολύσματος θα πρέπει να λαμβάνονται υπ' όψιν αυτοί οι δύο παράγοντες.

Οι ερευνητές έχουν διαπιστώσει ότι υπάρχει πολύ πιο συγκεκριμένη σχέση μεταξύ των στελεχών βακτηρίων και ψυχανθών-ξενιστών σε ότι αφορά την μολυσματικότητα (η ικανότητα να σχηματίζουν φυμάτια) και την αποτελεσματικότητα (η ικανότητα να δεσμεύουν N_2). Παρόλο λοιπόν που η πρακτική του εμβολιασμού εφαρμόζεται εδώ και έναν αιώνα, η πλειοψηφία των μολυσμάτων που παράγονται στον κόσμο είναι ακόμα χαμηλής ποιότητας (FAO, 1991; Olsen et al., 1994; 1996; Brockwell and Bottomley 1995; Lurwayi et al., 2000; Stephens and Rask, 2000) με αποτέλεσμα τα δυνητικά οφέλη του εμβολιασμού να περιορίζονται σημαντικά.

Ένας μικροοργανισμός μπορεί να λειτουργεί βέλτιστα κάτω από εργαστηριακές συνθήκες, αλλά η μετατροπή αυτού του οργανισμού σε προσιτό τελικό προϊόν, το οποίο είναι ικανό να επιφέρει ισοδύναμα αποτελέσματα σε συνθήκες αγρού, σταθερά αποτελεί ένα δύσκολο βήμα. Για αυτόν τον λόγο, υπάρχει η ανάγκη για εμβολιασμό με έναν υψηλό αριθμό αποτελεσματικών ριζοβίων που να μπορούν να ανταγωνιστούν τον αναποτελεσματικό πληθυσμό των γηγενών ριζοβίων ή να είναι σε θέση να δημιουργήσουν μεγάλους πληθυσμούς. Συμπερασματικά, η ποιότητα των μολυσμάτων που χρησιμοποιούνται παραμένει χαμηλή αλλά υπάρχει διαθέσιμη η απαραίτητη τεχνολογία για την παραγωγή βελτιωμένων και αποτελεσματικών σκευασμάτων (Catroux et al., 2001).

1.4 Επίδραση της αλατότητας σε καλλιέργειες ψυχανθών

Ένα σημαντικό πρόβλημα των μεσογειακών χωρών είναι ότι το νερό άρδευσης τους συχνά παρουσιάζει επίπεδα αλατότητας υψηλότερα από τα όρια εκείνα που επιτρέπουν την επίτευξη της δυνητικά μέγιστης παραγωγής. Τα ψυχανθή εμφανίζουν μεγάλη διακύμανση μεταξύ τους όσον αφορά την ανεκτικότητα τους στην αλατότητα (Zahran, 1991; Cordovilla et al., 1999). Ωστόσο η καλλιέργεια φασολιού θεωρείται ιδιαίτερα ευαίσθητη στην αλατότητα (Wignarajah, 1990; Scholberg and Locascio, 1999). Παρόλο λοιπόν που το φασόλι χαρακτηρίζεται από υψηλή ικανότητα αποκλεισμού του Na από τα φωτοσυνθετικά ενεργά φύλλα (Bayuelo-Jiménez et al., 2003), η αποτελεσματικότητά του μειώνεται απότομα όταν η εξωτερική συγκέντρωση $NaCl$ αυξάνεται (Savvas et al., 2007), ενώ η αποτελεσματικότητά του όσον αφορά τον αποκλεισμό του Cl^- είναι χαμηλή (Seemann and Critchley, 1985). Αυτό έχει σαν

αποτέλεσμα, η αλατότητα να επηρεάζει δραστικά την φωτοσύνθεση, τις υδατικές σχέσεις και τον μεταβολισμό του άνθρακα, ενώ διαταράσσει και την θρεπτική ισορροπία των φυτών φασολιού (Bayuelo-Jiménez et al., 2003).

Σύμφωνα με τους Faghire et al. (2011), μετά από μελέτη σε καλλιέργεια φασολιού, η αλατότητα εξασθενεί την εγκατάσταση της συμβιωτικής σχέσης *Rhizobium*- ψυχανθές. Η επίδραση της αλατότητας στην δημιουργία συμβιωτικών σχέσεων εξαρτάται βέβαια και από το συνδυασμό στελέχους-ξενιστή. Ωστόσο η αλατότητα αναφορικά με την συμβίωση ριζοβίων-ψυχανθών μπορεί να επιδράσει είτε έμμεσα μειώνοντας την ανάπτυξη του φυτού και τα διαθέσιμα προϊόντα φωτοσύνθεσης (Seeman and Critchley, 1985; Brugnoli and Lauteri, 1991) είτε άμεσα μειώνοντας τον σχηματισμό των φυματίων και συνεπώς επηρεάζοντας την ικανότητα αζωτοδέσμευσης (Hafeez et al., 1988; Elsheikh and Wood, 1990). Βέβαια, εκτός από τις παραπάνω φυσιολογικές επιπτώσεις η αλατότητα επιταχύνει “το πρασίνισμα” των φυματίων και μειώνει την περιεκτικότητά τους σε αιμογλοβίνη, τα οποία θεωρούνται δείκτες γήρανσης των φυματίων (Tejera et al., 2005).

Συγκεκριμένα, η αλατότητα φαίνεται να επηρεάζει την δραστηριότητα των αζωτοδεσμευτικών μικροοργανισμών, η δράση των οποίων είναι ιδιαίτερα σημαντική στα βιολογικά συστήματα καλλιέργειας (Manchanda and Garg, 2008). Ερευνητές αναφέρουν ότι η ανεπιτυχής συμβίωση σε συνθήκες αλατότητας πιθανότατα να οφείλεται σε αποτυχία στα αρχικά στάδια της συμβίωσης ριζοβίων-ξενιστή (Zahran 1999), δηλαδή κατά την διαδικασία της μόλυνσης, εξαιτίας της επίδρασης της αλατότητας στην εγκατάσταση των ριζοβίων (Singleton and Bohlool, 1984). Η αλατότητα επηρεάζει την διαδικασία μόλυνσης παρεμποδίζοντας την ανάπτυξη των ριζικών τριχιδίων και μειώνοντας τον αριθμό των φυματίων ανά φυτό, αλλά και της ποσότητας του δεσμευόμενου αζώτου ανά μονάδα βάρους των φυματίων (Manchanda and Garg, 2008).

Συμπεραίνεται λοιπόν, ότι η συμβιωτική σχέση ριζοβίων-ψυχανθών, ο σχηματισμός των ριζικών φυματίων αλλά και ο ίδιος ο ξενιστής (ψυχανθές) παρουσιάζουν μεγαλύτερη ευαισθησία στην αλατότητα ή στην ωσμωτική καταπόνηση σε σχέση με τα ζωντανά ριζόβια που ζουν ελεύθερα (Velagaleti et al., 1990; Zahran 1999). Παρά το γεγονός ότι τα ριζόβια που προκαλούν τον σχηματισμό των ριζικών φυματίων είναι πιο ανεκτικά στην αλατότητα σε σχέση με τον ξενιστή τους εμφανίζουν και αυτά σημαντική διακύμανση μεταξύ τους, όσον αφορά την ανεκτικότητα τους στην αλατότητα. Από τα αποτελέσματα της βιβλιογραφίας προτείνεται η ανάγκη επιλογής ανεκτικών στην αλατότητα γενοτύπων φασολιού και το ταίριασμα τους με αποτελεσματικά και ανεκτικά στην αλατότητα ριζόβια. Άλλωστε, τα καλύτερα αποτελέσματα για την συμβιωτική αζωτοδέσμευση κάτω από συνθήκες

αλατότητας έχουν προκύψει όταν και οι δύο συμβιωτικοί εταίροι καθώς και όλα τα διαφορετικά βήματα κατά την διάρκεια της αλληλεπίδρασης τους (όπως σχηματισμός φυματίων, δραστηριότητα, κ.α.) παρουσιάζουν αυξημένη αντίσταση σε αυτή την καταπόνηση (Beecher, 1993; Georgiev and Atkias, 1993). Στην παρούσα διατριβή, όπως αναφέρθηκε και προηγουμένως, επιλέχθηκε για τον εμβολιασμό των φυτών φασολιού σε πείραμα αγρού το στέλεχος *Rhizobium tropici* CIAT899, το οποίο χαρακτηρίζεται ως ανεκτικό στην αλατότητα (Tejera et al., 2005).

1. 5 Εκπομπές αερίων θερμοκηπίου

1.5.1 Φαινόμενο του θερμοκηπίου

Μία άλλη ερώτηση που γεννιέται σχετικά με την καλλιέργεια ψυχανθών είναι η επίπτωση τους στις εκπομπές αερίων θερμοκηπίου από το έδαφος, τα οποία θεωρούνται μείζονος σημασίας, αφού συνεισφέρουν στην κλιματική αλλαγή (Forster et al., 2007). Με τον όρο αέρια του θερμοκηπίου αναφερόμαστε στα αέρια τα οποία απορροφούν την υπέρυθη ακτινοβολία της ατμόσφαιρας, παγιδεύοντας θερμότητα και ζέστη στην επιφάνεια της γης. Με την αύξηση της θερμότητας στην ατμόσφαιρα, τα αέρια του θερμοκηπίου είναι υπεύθυνα για το λεγόμενο φαινόμενο του θερμοκηπίου, το οποίο τελικά οδηγεί στην παγκόσμια υπερθέρμανση του πλανήτη (Σχήμα 1).



Σχήμα 1: Σχηματική απεικόνιση του φαινομένου του θερμοκηπίου.

1.5.2 Πηγές αερίων θερμοκηπίου γεωργικής προέλευσης

Τα τρία αέρια του θερμοκηπίου που σχετίζονται με την γεωργία είναι το διοξείδιο του άνθρακα (CO_2), το υποξείδιο του αζώτου (N_2O) και το μεθάνιο (CH_4). Βέβαια, υπάρχουν και άλλα σημαντικά αέρια του θερμοκηπίου όπως υδρατμοί και πολλές ενώσεις αλογονοανθράκων, αλλά οι εκπομπές τους δεν θεωρούνται ότι σχετίζονται με την γεωργία (Snyder et al., 2009).

Τα τρία αυτά αέρια (CO_2 , N_2O , CH_4) διαφέρουν ως προς την αποτελεσματικότητα τους να παγιδεύουν την θερμότητα και να επανεκπέμπουν θερμική ακτινοβολία στην ατμόσφαιρα. Για να εξηγηθούν οι διαφορές απορρόφησης που παρατηρούνται στα αέρια του θερμοκηπίου γίνεται χρήση του όρου του δυναμικού παγκόσμιας θέρμανσης (global warming potential-GWP). Με τον όρο αυτό συγκρίνεται η ικανότητα κάθε αερίου του θερμοκηπίου σε σχέση με την ικανότητα του CO_2 να απορροφήσει την ακτινοβολία στην ατμόσφαιρα και τελικά να συμβάλει στην υπερθέρμανση του πλανήτη. Σ' αυτό το σημείο θα πρέπει να τονισθεί ότι για τον υπολογισμό του δυναμικού υπερθέρμανσης του πλανήτη που προκαλούν τα αέρια του θερμοκηπίου, θα πρέπει να ορίζεται συγκεκριμένη χρονική περίοδος, διότι η ατμοσφαιρική διάρκεια ζωής τους παρουσιάζει σημαντικές αποκλίσεις. Συνεπώς, για μία περίοδο 100 χρόνων το δυναμικό παγκόσμιας θέρμανσης του CO_2 έχει οριστεί ίσο με 1, ενώ το CH_4 και το N_2O είναι 23 και 296 φορές αντίστοιχα δραστηρότερα από το CO_2 (IPCC, 2001).

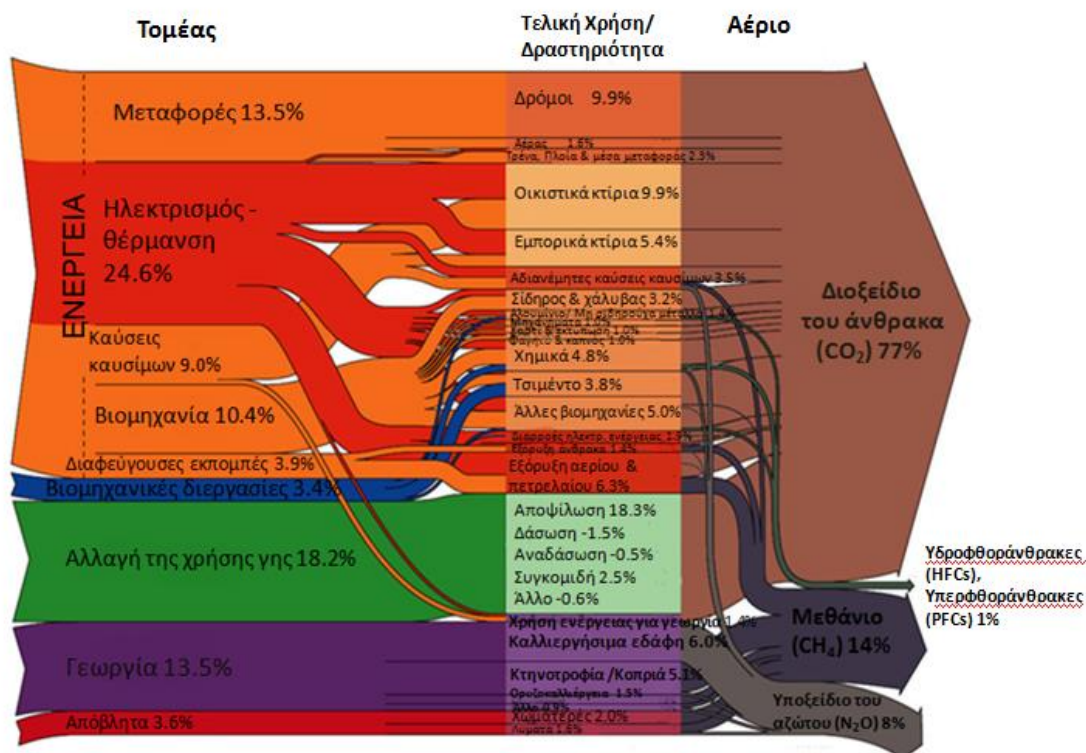
Παρόλο, που το διοξείδιο του άνθρακα αποτελεί το βασικό ζήτημα του φαινόμενου του θερμοκηπίου για το σύνολο της οικονομίας ως το κύριο ανθρωπογενές αέριο θερμοκηπίου, οι εκπομπές αερίων που κυριαρχούν στον γεωργικό τομέα είναι του υποξείδιου του αζώτου αλλά και του μεθανίου (Σχήμα 2). Μάλιστα, η ζωική και φυτική παραγωγή ευθύνεται για το 70% των ετήσιων ανθρωπογενών εκπομπών N_2O παγκοσμίως και περίπου για το 33% των παγκόσμιων εκπομπών CH_4 (Mosier et al., 1998; Mosier, 2001). Σύμφωνα με τους Cole et al. (1997) σχεδόν το 25% των εκπομπών του CO_2 που προκύπτουν από ανθρωπογενείς δραστηριότητες αποδίδονται στην γεωργία σε παγκόσμιο επίπεδο. Το CO_2 , σε σύγκριση με το CH_4 και το N_2O , ανακυκλώνεται σε πολύ μεγαλύτερα ποσά μέσω των γεωργικών συστημάτων καλλιέργειας. Τα φυτά καταναλώνουν μεγάλα ποσά CO_2 μέσω της φωτοσύνθεσης για να παράγουν τροφή για ανθρώπινη αλλά και ζωική κατανάλωση, ίνες και καύσιμο. Όλα αυτά τα παράγωγα των φυτών τελικά μετατρέπονται σε CO_2 όταν καταναλωθούν ή αποσυντεθούν. Η καθαρή εκπομπή CO_2 είναι μικρή σε σχέση με την συνολική του ανακύκλωση στη γεωργία και προέρχεται κυρίως από την χρήση ενέργειας κατά την διάρκεια της καλλιέργειας

και της παρασκευής των τελικών προϊόντων καθώς και της μεταφοράς των γεωργικών προϊόντων.

Όσον αφορά το CH₄ οι βασικές πηγές εκπομπής του στο τομέα της γεωργίας είναι οι ορυζώνες (Yan et al., 2003), η εντερική ζύμωση μηρυκαστικών (Johnson et al., 1993) και η αναερόβια επεξεργασία ζωικών απόβλητων (Mosier et al., 1998). Η κύρια δεξαμενή για το CH₄ είναι η οξειδωση με ρίζες υδροξυλίου στην τροπόσφαιρα (Fung et al., 1991; Crutzen, 1981).

Από την άλλη, το NO₂ παράλληλα με τον ρόλο του ως αέριο θερμοκηπίου, θεωρείται και η πιο σημαντική ουσία, η οποία εξασθενεί τη στοιβάδα του όζοντος τον 21^ο αιώνα (Ravishankara et al., 2009). Συνολικά οι γεωργικές δραστηριότητες συντελούν στο 10-12% των συνολικών αερίων θερμοκηπίου παγκοσμίως (Smith et al., 2007) και ενώ το υποξείδιο του αζώτου καταλαμβάνει ένα μικρό μέρος από το συνολικό πρόβλημα των αερίων του θερμοκηπίου, συγκεντρώνει μεγάλο ενδιαφέρον στο τομέα της γεωργίας, η οποία θεωρείται και η βασική πηγή των εκπομπών του. Το υποξείδιο του αζώτου παράγεται κυρίως από μικροβιακές δραστηριότητες του εδάφους (Bouwman, 1990): την νιτροποίηση και την απονιτροποίηση. Κατά την νιτροποίηση η αμμωνία (NH₄⁺) μετατρέπεται σε νιτρικά (NO₃⁻), ενώ στην απονιτροποίηση τα NO₃⁻ μειώνονται σε N₂O και N₂.

Οι δύο αυτές πηγές N₂O (νιτροποίηση και απονιτροποίηση) απελευθερώνουν μικρά ποσά σε σύγκριση με τις ανθρωπογενείς εκπομπές που προέρχονται από την παροχή άζωτου στο έδαφος (Snyder et al., 2009). Κατά συνέπεια, οι εκπομπές N₂O στο τομέα της γεωργίας προκύπτουν από την λίπανση των εδαφών με ανόργανο άζωτο και ζωικές κοπριάς, από άζωτο προερχόμενο από την βιολογική αζωτοδέσμευση (ψυχανθή και ελεύθεροι αζωτοδεσμευτικοί μικροοργανισμοί) και από αυξημένους ρυθμούς ανοργανοποίησης της οργανικής ουσίας του εδάφους (Duxbury and Mosier, 1993). Σύμφωνα μάλιστα με τον FAO (2003) οι προερχόμενες από τη γεωργία εκπομπές N₂O προερχόμενες από τη γεωργία αναμένεται να παρουσιάσουν 35-60% αύξηση μέχρι το 2030 εξαιτίας της αυξημένης χρήσης αζωτούχων λιπασμάτων και της αυξημένης παραγωγής κοπριάς ζώων.



Σχήμα 2: Διάγραμμα ροής παγκόσμιων εκπομπών αερίων θερμοκηπίου. Το διάγραμμα είναι βασισμένο σε αντίστοιχο διάγραμμα του Παγκόσμιου Ινστιτούτου Πόρων (World Resources Institute). Όλα τα δεδομένα που παρουσιάζονται είναι του έτους 2000. Όλοι οι υπολογισμοί είναι βασισμένοι σε ισοδύναμα του CO₂, χρησιμοποιώντας τα δυναμικά παγκόσμιας θέρμανσης για μια περίοδο 100 χρόνων που ορίζονται από τον IPCC (1996). Ο τομέας “Αλλαγή της χρήσης γης” περιλαμβάνει και εκπομπές και απορροφήσεις.

1.5.3 Καλλιερητικές πρακτικές μείωσης των αερίων θερμοκηπίου

Τα αέρια του θερμοκηπίου που αποδίδονται στην γεωργία θεωρούνται σύνθετα και ετερογενή, όμως η κατάλληλη διαχείριση των καλλιερητικών συστημάτων είναι ικανή να συμβάλει στην μείωση τους (IPCC, 2001). Τις επόμενες δεκαετίες οι ετήσιες εκπομπές αερίων θερμοκηπίου από την γεωργία αναμένεται να αυξηθούν εξαιτίας της αυξανόμενης ζήτησης για τροφή και τις αλλαγές στις διατροφικές συνήθειες του πλανήτη. Παρ’ όλα αυτά, η εφαρμογή βελτιωμένων πρακτικών διαχείρισης και αναπτυσσόμενων τεχνολογιών θα μπορούσαν να συμβάλουν σε μείωση των εκπομπών ανά μονάδα παραγόμενου προϊόντος. Ωστόσο, μία πρακτική που θεωρείται αποτελεσματική στην μείωση των εκπομπών αερίων θερμοκηπίου σε μία περιοχή μπορεί να είναι λιγότερο αποτελεσματική ή ακόμα και αντιπαραγωγική για κάποια άλλη περιοχή. Συνεπώς, δεν θα μπορούσαμε να ισχυριστούμε ότι υπάρχει μία λίστα εφαρμόσιμων πρακτικών παγκοσμίως που θα μπορούσαν να οδηγήσουν σε μείωση των εκπομπών αερίων του θερμοκηπίου. Οι

πρακτικές θα πρέπει να αξιολογούνται μεμονωμένα για κάθε γεωργικό σύστημα καλλιέργειας με βάση το κλίμα, το έδαφος, ιστορικά δεδομένα χρήσης της περιοχής, αλλά και διαχείρισης του εδάφους. Παράλληλα, μία πρακτική μείωσης των αερίων θερμοκηπίου είναι ικανή να επηρεάσει περισσότερα από ένα αέριο και μάλιστα μερικές φορές προς την αντίθετη από την επιθυμητή κατεύθυνση, με αποτέλεσμα το καθαρό όφελος της να εξαρτάται από τον συνδυασμό των επιδράσεων σε όλα τα αέρια θερμοκηπίου (Schils et al., 2005). Θα πρέπει να αναφερθεί βέβαια ότι όταν γίνεται προσπάθεια να αποτιμηθεί η επίδραση που έχει η γεωργική παραγωγή στο περιβάλλον, οι εκπομπές αερίων θερμοκηπίου ανά επιφάνεια και μονάδα παραγωγής αποτελούν τις δύο βασικές παραμέτρους που οφείλουμε να προσδιορίσουμε. Ως εκ τούτου λοιπόν, όταν γίνεται εκτίμηση της επίδρασης μιας καλλιεργητικής πρακτικής στις εκπομπές αερίων θερμοκηπίου είναι εξίσου σημαντικό να αποτιμάται και η επίδραση της στην τελική παραγωγή (Pandeya et al., 2012). Οι επιδράσεις διαφόρων πρακτικών άμβλυνσης των εκπομπών αερίων του θερμοκηπίου που μπορούν να εφαρμοστούν στον τομέα της γεωργίας συνοψίζονται στον Πίνακα 1.

Η σωστή διαχείριση των καλλιεργητικών συστημάτων θα μπορούσε να αποτελέσει ένα σημαντικό εργαλείο για την μείωση των εκπομπών αερίων θερμοκηπίου στην γεωργία (Zhong et al., 2009; Rees et al., 2012; Sainju et al., 2012). Πράγματι, οι μειωμένες ποσότητες αζωτούχων λιπασμάτων που παρέχονται στα βιολογικά συστήματα καλλιέργειας, σε σύγκριση με τα συμβατικά θα μπορούσαν να οδηγήσουν σε μειωμένες εκπομπές N_2O όπως συμβαίνει στη βιολογική γεωργία (Flessa et al. 2002; Burger et al. 2005; Petersen et al. 2006; Phillips, 2007). Από την άλλη μεριά, τα οργανικά λιπάσματα που χρησιμοποιούνται στα βιολογικά συστήματα καλλιέργειας συσχετίζονται συχνά με αυξημένα ποσοστά αποσύνθεσης της οργανικής ουσίας, γεγονός που μπορεί να ενισχύσει τις εκπομπές οξειδίου του αζώτου και μεθανίου, σε σχέση με τα συμβατικά καλλιεργητικά συστήματα.

Επίσης, σημαντική επίδραση στην μείωση των εκπομπών N_2O που οφείλονται στην παραγωγή αζωτούχων λιπασμάτων θα μπορούσε να έχει και η βελτίωση της αποτελεσματικότητας της χρήσης του αζώτου (Schlesinger, 1999). Αυτό θα μπορούσε να συμβεί γιατί το άζωτο που παρέχεται μέσω λιπασμάτων, κοπριάς ή και άλλων αζωτούχων πηγών δεν χρησιμοποιείται πάντα αποτελεσματικά από τα φυτά (Galloway et al., 2003; Cassman et al., 2002), ενώ το πλεονάζον άζωτο είναι ιδιαίτερα επιρρεπές στην εκπομπή N_2O (McSwiney and Robertson, 2005). Όσον αφορά τις εκπομπές μεθανίου, τα εδάφη στα οποία έχει γίνει εφαρμογή κοπριάς ή άλλων οργανικών υλικών μπορεί να αποτελέσουν μικρές πηγές μεθανίου (Johnson et al., 2007; Dendooven et al., 2012).

Πίνακας 1: Προτεινόμενα μέτρα για τον μετριασμό των εκπομπών αερίων του θερμοκηπίου από γεωργικά οικοσυστήματα και οι φαινομενικές τους επιδράσεις στην μείωση των εκπομπών κάθε αερίου ξεχωριστά (επίδραση άμβλυσης) και εκτίμηση της επίδρασης των προτεινόμενων αυτών πρακτικών στην συνολική μείωση των καθαρών εκπομπών στην περιοχή που υιοθετήθηκαν (καθαρή επίπτωση άμβλυσης) (Smith et al., 2008).

Μέτρα	Παραδείγματα	Επιδράσεις Άμβλυσης ¹			Καθαρή επίπτωση άμβλυσης ²	
		CO ₂	CH ₄	N ₂ O	Συμφωνία	Απόδειξη
Διαχείριση καλλιεργήσιμων εκτάσεων	Γεωπονία	+		+/-	---	**
	Διαχείριση θρέψης	+		+	---	**
	Κατεργασία/Διαχείριση υπολειμμάτων	+		+/-	**	**
	Διαχείριση νερού	+/-		+	*	*
	Διαχείριση ορυζώνων	+/-	+	+/-	**	**
	Γεωργό-δασοκομία	+		+/-	---	*
	Αγροάπαυση, αλλαγή στις χρήσεις γης	+	+	+	---	---
Διαχείριση βοσκοτόπων/ Βελτίωση βοσκής	Ένταση βόσκησης	+/-	+/-	+/-	*	*
	Αύξηση της παραγωγικότητας (π.χ. λίπανση)	+		+/-	**	*
	Διαχείριση θρέψης	+		+/-	**	**
	Διαχείριση φωτιάς	+	+	+/-	*	*
	Εισαγωγή διαφορετικών ειδών (π.χ. ψυχανθή)	+		+/-	*	**
Διαχείριση βιολογικών εδαφών	Αποφυγή αποστράγγισης υγροτόπων	+	-	+/-	**	**
Αποκατάσταση υποβαθμισμένων εδαφών	Έλεγχος διάβρωσης, οργανικά βελτιωτικά	+		+/-	---	**
Διαχείριση κτηνοτροφίας	Βελτιωμένες πρακτικές σίτισης		+	+	---	---
	Διαιτητικά πρόσθετα		+		**	---
	Μακροπρόθεσμες και διαρθρωτικές αλλαγές στην αναπαραγωγή των ζώων		+	+	**	*
Διαχείριση κοπριάς	Βελτιωμένη αποθήκευση & χειρισμός		+	+/-	---	**
	Αναερόβια χώνεψη		+	+/-	---	*
	Αποτελεσματική χρήση ως πηγή θρεπτ. στοιχείων	+		+	---	**
Βιοενέργεια	Ενεργειακά φυτά, στερεά, υγρά, βιοαέριο	+	+/-	+/-	---	**

¹ Το σύμβολο “+” ορίζει τις μειωμένες εκπομπές ή την αυξημένη απομάκρυνση τους (θετική επίδραση άμβλυσης), το σύμβολο “-” ορίζει τις αυξημένες εκπομπές ή την μειωμένη απομάκρυνση τους (αρνητική επίδραση άμβλυσης) και το σύμβολο “+/-” ορίζει αβέβαιη ή μεταβλητή επίδραση.

² Η ποιοτική εκτίμηση της καθαρής επίπτωσης των προτεινόμενων μέτρων άμβλυσης για τις εκπομπές αερίων θερμοκηπίου εκφράζεται σαν ισοδύναμα του CO₂. Η συμφωνία αναφέρεται στο συγκριτικό βαθμό της συναίνεσης με την βιβλιογραφία (όσο περισσότεροι αστερίσκοι τόσο μεγαλύτερη είναι και η συμφωνία). Η απόδειξη αναφέρεται στο σχετικό ποσό των δεδομένων που υπάρχουν για να υποστηρίξουν τις προτεινόμενες πρακτικές (όσο περισσότεροι οι αστερίσκοι τόσο πιο πολύ αποδεικνύεται η επίδραση της κάθε πρακτικής).

1.5.4 Ο ρόλος των ψυχανθών στις εκπομπές αερίων θερμοκηπίου

Υπολογίζεται ότι κάθε χρόνο δεσμεύονται από βακτήρια που συμβιώνουν με ψυχανθή 30-40 εκατομμύρια τόνοι ατμοσφαιρικού N₂ (Jenkinson 2001; Smil 2002a, b; Galloway et al., 2003). Σύμφωνα με την ισχύουσα μεθοδολογία της Διακυβερνητικής Επιτροπής για την Αλλαγή του Κλίματος (Intergovernmental Panel on Climate Change, IPCC) το άζωτο αυτό είναι ικανό να παράγει N₂O με δύο τρόπους: είτε μέσω της βιολογικής αζωτοδέσμευσης ή/και με την ενσωμάτωση φυτικών υπολειμμάτων από καλλιέργειες ψυχανθών στο έδαφος. Ο δεύτερος τρόπος παραγωγής N₂O έχει ήδη ερευνηθεί σε πολλές επιστημονικές μελέτες καταλήγοντας

στο συμπέρασμα ότι όταν πλούσια υπολείμματα σε N (χαμηλός λόγος C:N) αποσυντίθενται στο έδαφος, απελευθερώνουν μεγάλα ποσά ανόργανου αζώτου, το οποίο μπορεί εύκολα να χαθεί σε N₂O μέσω της νιτροποίησης και στη συνέχεια της απονιτροποίησης (Aoyama and Nozawa 1993; Larsson et al., 1998; Yang et al., 2002; Huang et al. 2004; Rochette et al., 2004). Συνεπώς, η ενσωμάτωση υπολειμμάτων από ψυχανθή μπορεί να καταλήξει σε μεγαλύτερες απώλειες N₂O–N από ότι υπολείμματα άλλων καλλιεργειών (Millar et al., 2004).

Η επίδραση του καλλιεργητικού συστήματος (βιολογικό ή συμβατικό) στις εκπομπές αερίων θερμοκηπίου, αλλά και στην παραγωγή νωπών λοβών φασολιού κάτω από Μεσογειακές κλιματικές συνθήκες δεν έχει ακόμα διερευνηθεί. Συγκεκριμένα δε για την Ελλάδα, δεν υπάρχει καμία μελέτη προσδιορισμού των εκπομπών αερίων θερμοκηπίου που σχετίζονται με την γεωργική παραγωγή. Εντούτοις έχει μελετηθεί από τους Fernández-Luqueño et al. (2009) η επίδραση καλλιεργητικών μεταχειρίσεων στις εκπομπές αερίων διοξειδίου του άνθρακα και υποξειδίου του αζώτου σε θερμοκηπιακή, συμβατική καλλιέργεια φασολιού. Παρ' όλα αυτά, η επίδραση του καλλιεργητικού συστήματος (συμβατικό ή βιολογικό) στις εκπομπές αερίων θερμοκηπίου σε υπαίθρια καλλιέργεια φασολιού δεν έχει μελετηθεί ακόμα.

1.6 Σκοπιμότητα της μελέτης

Το N παίζει πρωταρχικό ρόλο στην ανάπτυξη των φυτών και είναι αναγκαίο για την επίτευξη υψηλών αποδόσεων στα καλλιεργητικά συστήματα. Η χρήση συνθετικών αζωτούχων λιπασμάτων τις τελευταίες δεκαετίες έχει αυξηθεί, με συνέπεια την αύξηση της ρύπανσης του περιβάλλοντος με νιτρικά. Ένα βασικό στοιχείο των αειφορικών γεωργικών συστημάτων είναι η αποτελεσματική διαχείριση του N η οποία μπορεί να επιτευχθεί με εξισορρόπηση των επιπτώσεων του στην καλλιέργεια και στο περιβάλλον σε ένα άριστο σημείο. Στην κατεύθυνση αυτή μπορεί να συμβάλει η μερική υποκατάσταση ανόργανων λιπασμάτων N με βιολογικά δεσμευμένο N από την ατμόσφαιρα, αφού το N₂ μετατρέπεται σε αφομοιώσιμη μορφή για τα φυτά χωρίς να επιβαρύνεται το περιβάλλον από την κατανάλωση ορυκτών καυσίμων και τις συνεπακόλουθες εκπομπές CO₂. Όπως έχει ήδη εκτεθεί στην Ενότητα 1.5, η μειωμένη χρήση χημικών λιπασμάτων αζώτου μπορεί να μειώσει δραστικά όχι μόνο τις εκπομπές CO₂ που προκύπτουν από την βιομηχανική παρασκευή τους, αλλά και τις εκπομπές υποξειδίου (πρωτοξειδίου) του αζώτου (N₂O), που επίσης συμβάλλει στο φαινόμενο του θερμοκηπίου. Επιπλέον, λόγω βαθμιαίας απόδοσής του στην καλλιέργεια, το βιολογικά δεσμευμένο N είναι λιγότερο ευαίσθητο στην εξαέρωση, απονιτροποίηση και έκπλυση. Στην γεωργία, υπολογίζεται ότι περίπου το 80% της βιολογικής αζωτοδέσμευσης προέρχεται από συμβίωση ψυχανθών με μικροοργανισμούς που ανήκουν στα είδη *Rhizobium*, *Bradyrhizobium*, *Sinorhizobium*, *Azorhizobium*, *Mesorhizobium* και *Allorhizobium* (Vance, 1998). Συνεπώς, τα καλλιεργούμενα φυτά που συμβιώνουν με αζωτοδεσμευτικά βακτήρια μπορούν να συμβάλλουν σημαντικά στην παροχή N με χαμηλό περιβαλλοντικό αποτύπωμα και να διατηρήσουν την γονιμότητα του εδάφους (Stockdale et al., 2001). Η σημασία των ψυχανθών και της αζωτοδέσμευσης είναι ακόμη μεγαλύτερη στις βιολογικές καλλιέργειες, στις οποίες συχνά το άζωτο είναι το πιο περιοριστικό θρεπτικό στοιχείο για την ανάπτυξη των φυτών και το ύψος της παραγωγής. Αυτό συμβαίνει επειδή στα βιολογικά συστήματα καλλιέργειας, σε αντίθεση με τα συμβατικά συστήματα καλλιέργειας, οι ανάγκες των φυτών σε N δεν μπορούν να καλυφθούν με την προσθήκη ανόργανων χημικών λιπασμάτων.

Στις περισσότερες μεσογειακές χώρες, το κοινό φασόλι (*Phaseolus vulgaris*) θεωρείται ένα προσοδοφόρο ψυχανθές που μπορεί να συμπεριληφθεί σε συστήματα αμειψισποράς, ιδιαίτερα από καλλιεργητές που παράγουν βιολογικά κηπευτικά. Η αύξηση της αζωτοδεσμευτικής ικανότητας του φασολιού θα μπορούσε να βελτιώσει τις αποδόσεις όχι μόνο του ίδιου του φασολιού αλλά και των φυτών που συμμετέχουν σε ένα σύστημα αμειψισποράς με βιολογικές καλλιέργειες. Επιπλέον, το

φασόλι καλλιεργείται ως κηπευτικό όχι μόνο στην ύπαιθρο, αλλά και στο θερμοκήπιο για εκτός εποχής παραγωγή νωπών λοβών και μάλιστα όχι μόνο σε καλλιέργειες εδάφους αλλά και σε υδροπονικά συστήματα καλλιέργειας (van Os et al., 2008). Η υποκατάσταση μέρους του αζώτου που χορηγείται σε ανόργανη μορφή στις υδροπονικές καλλιέργειες φασολιού με συμβιωτικά δεσμευμένο άζωτο προερχόμενο από την ατμόσφαιρα θα μπορούσε να μειώσει σημαντικά τόσο το περιβαλλοντικό αποτύπωμα όσο και το κόστος των παραγόμενων νωπών λοβών.

Λαμβάνοντας υπόψη τα παραπάνω, η παρούσα μελέτη σχεδιάστηκε με σκοπό να συμβάλει στην αύξηση της βιωσιμότητας των συστημάτων καλλιέργειας νωπού φασολιού, επικεντρώνοντας στις εκπομπές αερίων του θερμοκηπίου, την θρέψη των φυτών με άζωτο και την συμβιωτική δέσμευση N_2 . Σε τέσσερα διαφορετικά πειράματα μελετήθηκαν δύο εναλλακτικά συστήματα καλλιέργειας νωπού φασολιού, το βιολογικό σύστημα στην ύπαιθρο και το υδροπονικό σύστημα στο θερμοκήπιο. Αυτά τα δύο καλλιεργητικά συστήματα επιλέχθηκαν επειδή αντιστοιχούν σε δύο εναλλακτικούς τρόπους εφαρμογής φιλικών προς το περιβάλλον τεχνικών καλλιέργειας και ως εκ τούτου συγκεντρώνουν ιδιαίτερο ενδιαφέρον τις τρεις τελευταίες δεκαετίες. Οι ειδικότεροι ερευνητικοί στόχοι εντός αυτού του πλαισίου αναφέρονται συνοπτικά παρακάτω.

Ένα βασικό ερώτημα που εξετάζεται στην παρούσα διατριβή είναι οι πιθανές επιδράσεις του συστήματος υπαίθριας καλλιέργειας φασολιού (βιολογικό ή συμβατικό), καθώς και της αλατότητας του νερού άρδευσης, στις εκπομπές αερίων του θερμοκηπίου (CO_2 , N_2O , CH_4). Σημειώνεται ότι η επίδραση του συστήματος καλλιέργειας του νωπού φασολιού (βιολογικό ή συμβατικό) στις εκπομπές αερίων θερμοκηπίου κάτω από μεσογειακές κλιματικές συνθήκες δεν έχει ακόμα διερευνηθεί, ενώ για την Ελλάδα δεν υπάρχει ακόμη κάποια μελέτη σχετικά με τις εκπομπές αερίων θερμοκηπίου που σχετίζονται με την φυτική παραγωγή.

Ένας δεύτερος στόχος της παρούσας διατριβής είναι να εκτιμηθεί το ποσοστό του ατμοσφαιρικού αζώτου (N_2) που συνεισφέρει η συμβιωτική αζωτοδέσμευση στο σύνολο του N που προσλαμβάνει το φασόλι (%Ndfa) όταν εμβολιάζεται ή δεν εμβολιάζεται με αζωτοβακτήρια σε διαφορετικά καλλιεργητικά συστήματα (συμβατικό, βιολογικό και υδροπονικό). Η εκτίμηση πραγματοποιήθηκε με την μέθοδο της φυσικής αφθονίας (natural abundance) του ισότοπου ^{15}N . Ταυτόχρονα, αξιολογήθηκε η ικανότητα συγκεκριμένων αζωτοβακτηρίων (εμπορικό σκεύασμα μίγματος αζωτοβακτηρίων Azoriz και το στέλεχος *Rhizobium. tropici* CIAT899) να αποικίζουν τις ρίζες του φασολιού σε καλλιέργεια στο έδαφος (πειράματα αγρού) αλλά και σε υδροπονική καλλιέργεια με χημικά αδρανές υπόστρωμα ελαφρόπετρας (πειράματα θερμοκηπίου). Η αξιολόγηση βασίστηκε στην διερεύνηση της επίδρασης

που ασκεί ο εμβολιασμός των ριζών φασολιού με αζωτοβακτήρια, όταν συνδυάζεται με διάφορα επίπεδα αζωτούχου λίπανσης, στο σχηματισμό φυματίων και την ανάπτυξη των φυτών. Μέσω δεδομένων που προέκυψαν εξετάστηκε εάν μέσω του εμβολιασμού με αζωτοβακτήρια μπορεί να περιοριστεί η χρήση αζωτούχων λιπασμάτων στις καλλιέργειες φασολιού και εάν τελικά υπάρχει πιθανό πλεονέκτημα στην απόδοση.

Στα πειράματα αγρού που πραγματοποιήθηκαν στην παρούσα μελέτη διερευνήθηκε επίσης η επίδραση των δύο διαφορετικών συστημάτων υπαίθριας καλλιέργειας (συμβατικό και βιολογικό) στη διαθεσιμότητα του N στο έδαφος, τη θρεπτική κατάσταση του φυτού και την ολική απόδοση καλλιέργειας νωπού φασολιού σε συνθήκες χαμηλής ή υψηλής αλατότητας του νερού άρδευσης.

Κεφάλαιο 2

Υλικά και Μέθοδοι

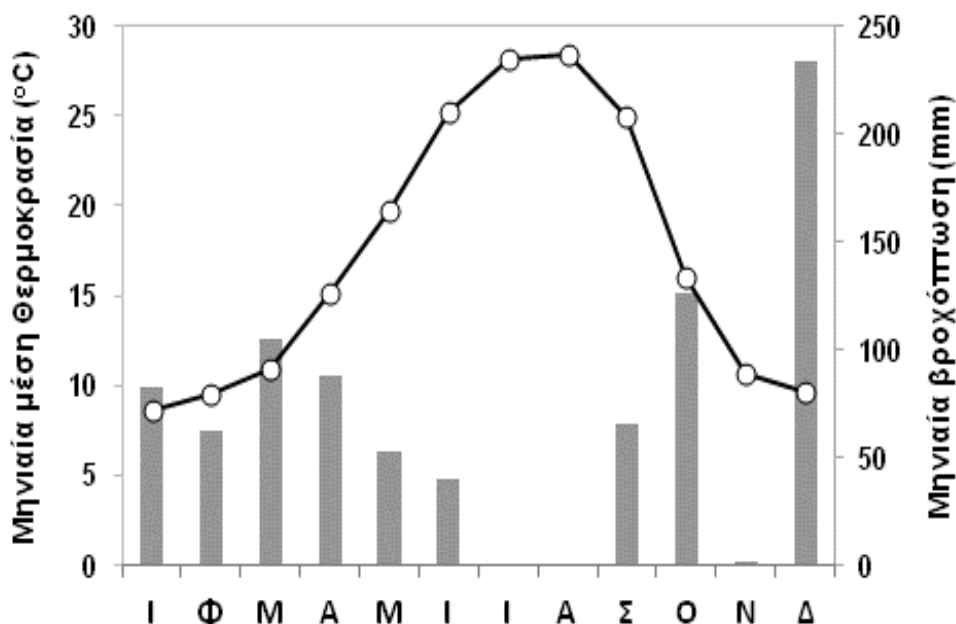
2.1 Πείραμα Αγρού (1^ο)

Σε επιλεγμένο αγρό στην περιοχή του Αγρινίου Δυτικής Ελλάδος (38°35'15.41"N, 21°25'38.47"E) πραγματοποιήθηκε πείραμα από τον Απρίλιο μέχρι και τον Ιούλιο του 2011, με καλλιέργεια νάνου (καθιστού) νωπού φασολιού, τύπου τσαουλί (*Phaseolus vulgaris* cv. 'Contender'). Ο αγρός που καλλιεργήθηκε πιστοποιείται ως βιολογικός από το έτος 2003, αναγκαίο χαρακτηριστικό για την διεξαγωγή του συγκεκριμένου πειράματος, αφού ως κύριος παράγοντας προς μελέτη είχε ορισθεί το καλλιεργητικό σύστημα (συμβατικό ή βιολογικό).

Το έδαφος του πειραματικού αγρού, όπως προέκυψε από σχετικές εργαστηριακές αναλύσεις, χαρακτηρίζεται ως αργιλλοπηλώδες, με 2.05% οργανική ουσία, 0,082% ολικό N, 175 ppm P, 632 ppm K, pH 7.4 (1:1 εκχύλισμα νερού) και EC 0.63 dS m⁻¹.

2.1.1 Κλιματολογικές συνθήκες

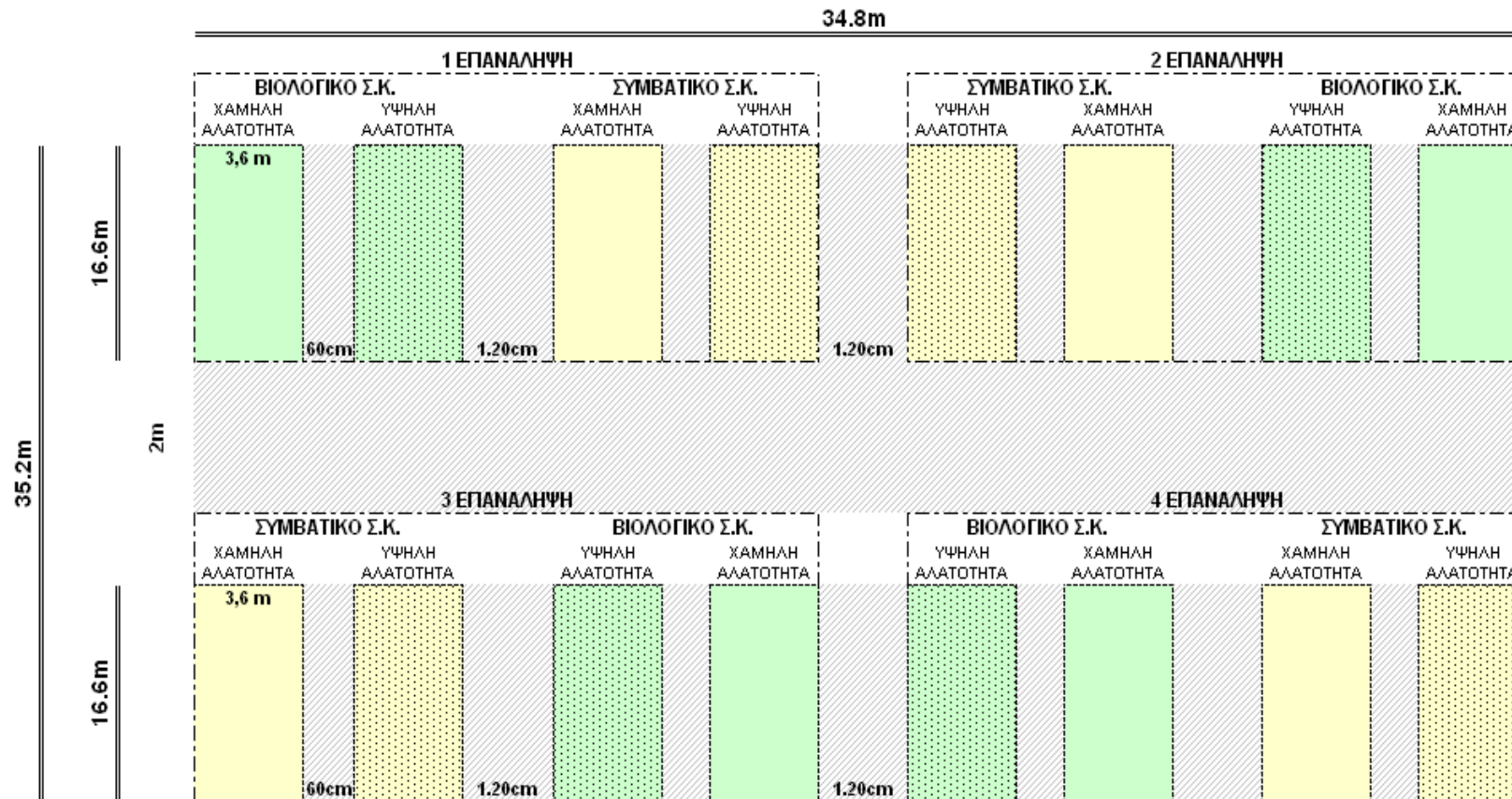
Η συνολική ετήσια βροχόπτωση στην περιοχή διεξαγωγής του πειράματος ήταν 850 mm, ενώ η μέση μηνιαία θερμοκρασία ανερχόταν στους 17 °C κατά την διάρκεια της χρονιάς που έλαβε χώρα το πείραμα. Οι διακυμάνσεις της μέσης μηνιαίας θερμοκρασίας του αέρα, καθώς και η αθροιστική μηνιαία βροχόπτωση κατά την διάρκεια του έτους 2011, παρουσιάζονται στο Σχήμα 3.



Σχήμα 3: Μέση μηνιαία θερμοκρασία (ανοιχτοί κύκλοι) και αθροιστική μηνιαία βροχόπτωση (μπάρες) στην περιοχή του Αγρινίου κατά την διάρκεια της πειραματικής χρονιάς (2011).

2.1.2 Πειραματικό σχέδιο

Ακολουθήθηκε το πειραματικό σχέδιο των υποδιαιρεμένων τεμαχίων (split-plot design) με 4 επαναλήψεις, 2 κύρια τεμάχια ανά επανάληψη με κύριο παράγοντα τη λίπανση (συμβατική ή βιολογική) και 2 υποτεμάχια ανά κύριο τεμάχιο με δευτερεύοντα παράγοντα το επίπεδο αλατότητας στο νερό άρδευσης (0.5 ή 10 mM NaCl). Η συνολική έκταση του πειραματικού αγρού ήταν 1.225 m², με 16 υποτεμάχια στο σύνολο, έκτασης 60 m² το καθένα (Σχήμα 4).



Σχήμα 4: Σχηματική απεικόνιση πειραματικού σχεδίου υποδιαιρεμένων τεμαχίων που ακολουθήθηκε σε πείραμα αγρού (Ανοιξη –Καλοκαίρι 2011).

2.1.3 Εγκατάσταση πειράματος

Κατά την προετοιμασία του εδάφους του πειραματικού αγρού εφαρμόστηκαν οι τοπικές πρακτικές εδαφοκατεργασίας. Αρχικά, πραγματοποιήθηκε άροση σε βάθος 20-25 cm και ακολούθησαν δύο φρεζαρίσματα για την δημιουργία κατάλληλης σποροκλίνης. Από τις αρχές Νοέμβριου 2011 έως τις αρχές Μαρτίου 2011 ο πειραματικός αγρός καλλιεργήθηκε με βίκο (*Vicia sativa* L. cv. Alexander). Η ολική βιομάζα του βίκου ενσωματώθηκε στο έδαφος με την βοήθεια φρέζας σε όλα τα πειραματικά τεμάχια του αγρού πριν την σπορά του φασολιού, όταν τα φυτά βρίσκονταν στο στάδιο της άνθησης, για να λειτουργήσει ως χλωρή λίπανση. Μία ημέρα πριν την σπορά πραγματοποιήθηκε η τελική χάραξη των πειραματικών τεμαχίων και στη συνέχεια ακολούθησε η ενσωμάτωση των λιπασμάτων (βιολογικών ή συμβατικών) στα αντίστοιχα τεμάχια, με βάση το πειραματικό σχέδιο που είχε σχεδιαστεί.

Η μεταχείριση των βιολογικών πειραματικών υποτεμαχίων έγινε με γνώμονα τις αρχές της βιολογικής γεωργίας και συγκεκριμένα την ελαχιστοποίηση των εξωτερικών εισροών, συμπεριλαμβανομένων των αζωτούχων λιπασμάτων, καθώς και την αποφυγή της χρήσης συνθετικών λιπασμάτων (Scialabba and Hattam, 2002). Η σωστή αξιολόγηση ενός καλλιεργητικού συστήματος μπορεί να επιτευχθεί, εάν μεταβληθεί ολόκληρο το σύστημα και όχι μόνο οι επιμέρους παράμετροι που το αποτελούν ξεχωριστά, κρίνοντας την συνδυασμένη επίδραση αυτής της αλλαγής. Αναλόγως λοιπόν, διαφοροποιούνται και οι πρακτικές λίπανσης του εν λόγω πειράματος ως προς το επίπεδο αλλά και το είδος των λιπασμάτων που παρείχαμε στα βιολογικά και συμβατικά υποτεμάχια. Συνεπώς, στα συμβατικά υποτεμάχια εφαρμόστηκε συνθετικό ανόργανο λίπασμα με ενσωμάτωση πριν την σπορά ($120 \text{ kg ha}^{-1} \text{ N}$, $160 \text{ kg ha}^{-1} \text{ P}_2\text{O}_5$, και $160 \text{ kg ha}^{-1} \text{ K}_2\text{O}$) ακολουθώντας καθιερωμένες υποδείξεις για συμβατική καλλιέργεια φασολιού. Στα βιολογικά υποτεμάχια, εφαρμόστηκε οργανικό λίπασμα (κομπόστ) προερχόμενο από φυτικά υπολείμματα (Αφοί Π. Βασιλόπουλοι Α.Ε.Β.Ε), επίσης πριν την σπορά και σύμφωνα με τις κοινές πρακτικές που ακολουθούν οι εγχώριοι βιοκαλλιεργητές σε βιολογικές καλλιέργειες φασολιού ($25 \text{ kg ha}^{-1} \text{ N}$, $175 \text{ kg ha}^{-1} \text{ P}_2\text{O}_5$, και $250 \text{ kg ha}^{-1} \text{ K}_2\text{O}$). Ακολούθησε η χάραξη των γραμμών σποράς καθώς και η τοποθέτηση των σωλήνων στάγδην άρδευσης. Η σπορά φασολιού πραγματοποιήθηκε στις 30 Απριλίου 2011 χειρωνακτικά και η καλλιέργεια τερματίστηκε στις 30 Ιουλίου 2011. Προτού σπαρθούν οι σπόροι φασολιού στα βιολογικά υποτεμάχια εμβαπτίστηκαν σε εμπορικό σκεύασμα που περιείχε πληθυσμούς αζωτοδεσμευτικών βακτηρίων με την ονομασία Azoriz (προϊόν της εταιρείας Humofert). Οι σπόροι φασολιού σπάρθηκαν

σε βάθος 3 cm, ενώ οι αποστάσεις φύτευσης μεταξύ και επί των γραμμών ήταν 50 cm με την πυκνότητα φύτευσης να ανέρχεται στα 80.000 φυτά ανά εκτάριο. Θα πρέπει να επισημανθεί ότι δεν χρησιμοποιήθηκαν συνθετικά εντομοκτόνα ή μυκητοκτόνα ή ζιζανιοκτόνα σε κανένα από τα δύο καλλιεργητικά συστήματα (βιολογικό ή συμβατικό), καθ' όλη την καλλιεργητική περίοδο.



Εικόνα 1: Πειραματικός αγρός καλλιέργειας φασολιού (Άνοιξη-Καλοκαίρι 2011).

2.1.4 Άρδευση καλλιέργειας

Οι ανάγκες της καλλιέργειας σε νερό καλύφθηκαν με την εγκατάσταση αρδευτικού συστήματος τύπου στάγδην, το οποίο ήταν κατάλληλα σχεδιασμένο και εξοπλισμένο, ώστε να εφαρμοστούν οι δύο διαφορετικές συγκεντρώσεις αλατότητας στο νερό άρδευσης (0.5 ή 10 mM NaCl). Συγκεκριμένα, το σύστημα (Εικόνες 2 & 3) αποτελούνταν από: i) μία κύρια δεξαμενή όγκου 3 m³ για την αποθήκευση νερού άρδευσης, ii) μία μικρότερου όγκου δεξαμενή (0.3 m³) συμπληρωμένη με πυκνό διάλυμα NaCl (1 M), iii) έναν εγχυτή τύπου venturi για την αυτόματη μίξη του αρδευτικού νερού με το διάλυμα NaCl σε κατάλληλη αναλογία, ώστε να προκύπτει συγκέντρωση NaCl ίση με 10 mM στο νερό άρδευσης για την μεταχείριση της υψηλής αλατότητας, iv) μία αντλία άρδευσης, v) δύο κύριους σωλήνες που εξυπηρετούν την παροχή αρδευτικού νερού στις δύο διαφορετικές μεταχειρίσεις αλατότητας και vi) πλευρικούς σωλήνες με σταλάκτες ανά 10 cm επί του κάθε πλευρικού σωλήνα.

Η επέμβαση του παράγοντα της αλατότητας στο νερό άρδευσης εφαρμόστηκε 35 ΗΜΣ, για να αποφευχθεί τυχόν καθυστέρηση στην βλάστηση και ανάπτυξη των φυτών στα πρώτα τους στάδια. Η άρδευση πραγματοποιούνταν κατά τις απογευματινές ώρες της ημέρας με μέση διάρκεια 2 ώρες. Συνολικά πραγματοποιήθηκαν 20 διαδοχικές αρδεύσεις σε όλη την καλλιεργητική περίοδο (χωρίς να περιλαμβάνεται το ύψος της βροχόπτωσης).



Εικόνες 2 & 3: Αρδευτικό σύστημα τύπου στάγδην που εγκαταστάθηκε στον πειραματικό αγρό καλλιέργειας φασολιού (Άνοιξη-Καλοκαίρι 2011).

2.1.5 Λήψη πειραματικού υλικού και αναλυτικές μέθοδοι

Κατά την διάρκεια του πειράματος πραγματοποιήθηκαν τρεις δειγματοληψίες εδάφους 45, 65 και 85 ημέρες μετά την σπορά (ΗΜΣ), από όλα τα πειραματικά υποτεμάχια, με την χρήση ειδικού μεταλλικού δειγματολήπτη εδάφους σε βάθος 0-30 cm. Συγκεκριμένα, από το κάθε υποτεμάχιο λαμβάνονταν δύο δείγματα εδάφους, με συνολικό αριθμό δειγμάτων 32, τα οποία μετά την συλλογή τους αναμιγνύονταν προσεχτικά, για να ληφθεί ένα αντιπροσωπευτικό δείγμα ανά πειραματικό υποτεμάχιο. Έπειτα, τα δείγματα χωρίζονταν, έτσι ώστε να προκύψουν δύο εδαφικά αντιδείγματα, από τα οποία το ένα προοριζόταν για τον προσδιορισμό των συγκεντρώσεων νιτρικών ($\text{NO}_3\text{-N}$) και αμμωνιακών ($\text{NH}_4\text{-N}$) στο έδαφος (η περιγραφή των αναλυτικών μεθόδων παρατίθεται στην Ενότητα 2.5.5). Σε περίπτωση που η άμεση ανάλυση των αντιδειγμάτων δεν ήταν δυνατή φυλάσσονταν σε θερμοκρασία $-20\text{ }^\circ\text{C}$. Το δεύτερο εδαφικό αντιδείγμα χρησιμοποιήθηκε για τον προσδιορισμό ολικού αζώτου (N) και άνθρακα (C). Η αναλυτική μέθοδος που ακολουθήθηκε περιγράφεται στην Ενότητα 2.5.4.

Κατά τις ίδιες ημερομηνίες (45, 65 και 85 ΗΜΣ) πραγματοποιήθηκαν επίσης δειγματοληψίες φυτικού υλικού. Σε κάθε δειγματοληψία γινόταν τυχαία λήψη 6 φυτών από κάθε υποτεμάχιο. Τα δείγματα αυτά χρησιμοποιήθηκαν για τον προσδιορισμό νωπής και ξηρής βιομάζας, καθώς και ολικού αζώτου και άνθρακα για τις δεδομένες χρονικές στιγμές (η αναλυτική μεθοδολογία που ακολουθήθηκε περιγράφεται στο ίδιο κεφάλαιο στην Ενότητα 2.5.4).

Παράλληλα με την λήψη δειγμάτων υπέργειας φυτικής βιομάζας, συλλέγονταν από τα ίδια φυτά και δείγματα ριζών, με την χρήση μεταλλικού κυλίνδρου, διαστάσεων 25 cm ύψος και 10 cm διάμετρο. Τα δείγματα αυτά χρησιμοποιήθηκαν για τον ποσοτικό προσδιορισμό της ριζικής βιομάζας και την καταμέτρηση των σχηματισθέντων φυματίων στις ρίζες των φυτών λόγω του αποικισμού τους από αζωτοβακτήρια. Ο συνολικός αριθμός των ριζικών φυματίων καταμετρήθηκε και στις τρεις δειγματοληψίες (45, 65 και 85 ΗΜΣ), ενώ το μέσο βάρος των φυματίων καταγράφηκε μόνο στο στάδιο γεμίσματος των λοβών (65 ΗΜΣ) σε όλες τις μεταχειρίσεις.

Η επίδραση των πειραματικών μεταχειρίσεων στην τελική παραγωγή (νωποί λοβοί φασολιού) αξιολογήθηκε μετά από χειρωνακτική συγκομιδή των εμπορικά ώριμων πράσινων λοβών (μήκος λοβού $\approx 20\text{ cm}$), η οποία πραγματοποιούνταν τουλάχιστον 2 φορές την εβδομάδα, σε όλα τα υποτεμάχια, από την ίδια κάθε φορά ορισμένη περιοχή των υποτεμαχίων.

Σε κάθε υποτεμάχιο τοποθετήθηκαν δύο στατικοί θάλαμοι (δειγματολήπτες), με την βοήθεια των οποίων λήφθηκαν δείγματα αέρα με στόχο να προσδιορισθούν οι εκπομπές των τριών σημαντικότερων από τα αέρια που συμβάλουν στο φαινόμενο του θερμοκηπίου, και ειδικότερα του υποξειδίου του αζώτου (N_2O), του διοξειδίου του άνθρακα (CO_2) και του μεθανίου (CH_4). Δείγματα αέρα για τον προσδιορισμό των εκπομπών αερίων του θερμοκηπίου από το έδαφος ελήφθησαν συνολικά 6 φορές κατά την διάρκεια της καλλιεργητικής περιόδου (20, 35, 45, 60, 70 και 85 ΗΜΣ). Η αναλυτική μέθοδος που ακολουθήθηκε περιγράφεται αναλυτικά στο ίδιο κεφάλαιο, Ενότητα 2.5.1.

2.1.6 Στατιστική επεξεργασία αποτελεσμάτων

Για την στατιστική επεξεργασία των αποτελεσμάτων έγινε ανάλυση διακύμανσης (ANOVA) χρησιμοποιώντας το στατιστικό πρόγραμμα PlotIT3.2, με κύριο παράγοντα το καλλιεργητικό σύστημα (βιολογικό ή συμβατικό) και δευτερεύοντα παράγοντα την αλατότητα του νερού άρδευσης (χαμηλή ή υψηλή). Στις περιπτώσεις που τόσο οι δύο κύριοι παράγοντες όσο και η μεταξύ τους αλληλεπίδραση είχαν στατιστικά σημαντική επίπτωση στα αποτελέσματα, οι πολλαπλές συγκρίσεις των μέσων όρων για στατιστικά σημαντικές διαφορές πραγματοποιήθηκαν σύμφωνα με τη δοκιμασία Duncan.

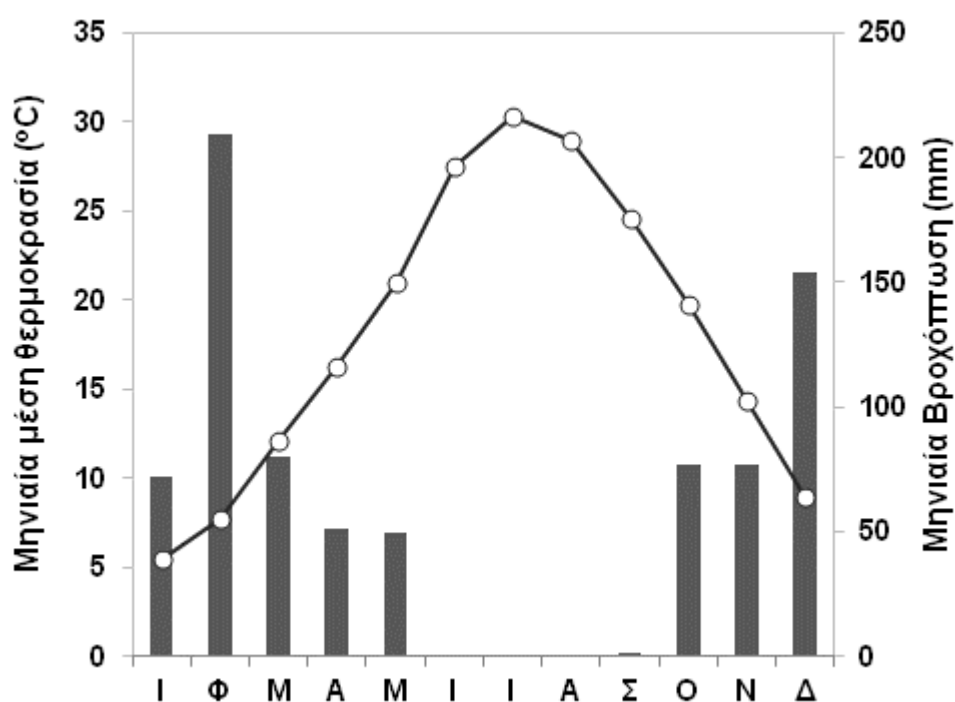
2.2 Πείραμα Αγρού (2^ο)

2.2.1 Περιγραφή του πειραματικού αγρού

Σε πιστοποιημένο βιολογικό αγρό του Αγρινίου πραγματοποιήθηκε πείραμα καλλιέργειας νάνου (καθιστού) νωπού φασολιού (*Phaseolus vulgaris* cv. 'Contender') από τον Απρίλιο μέχρι και τον Ιούλιο του 2012. Ο πειραματικός αγρός που χρησιμοποιήθηκε ήταν ίδιος με αυτόν του προηγούμενου πειράματος (έτος 2011). Αναλυτική περιγραφή του πειραματικού αγρού παρατίθεται στην Ενότητα 2.1.

2.2.2 Κλιματολογικές συνθήκες

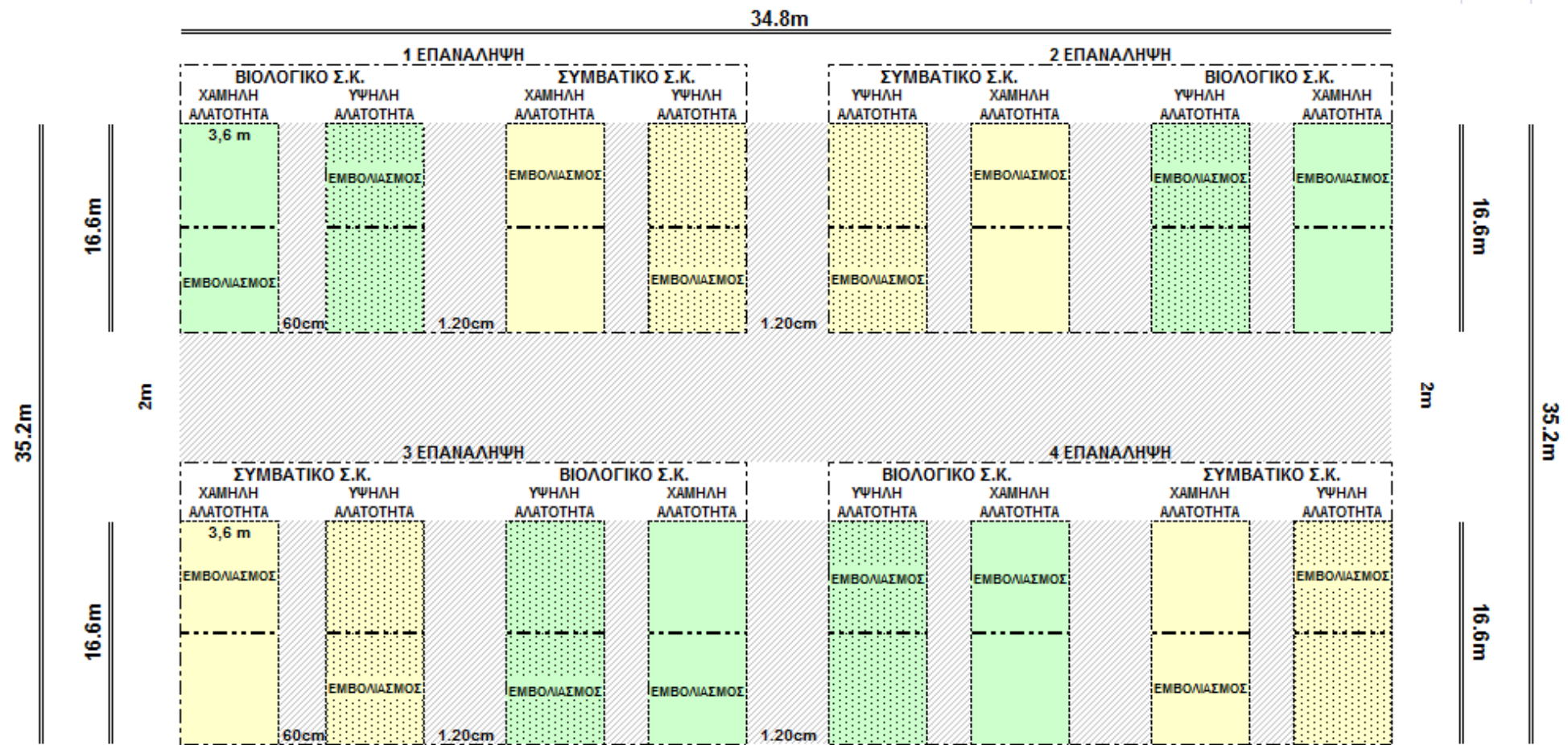
Η συνολική ετήσια βροχόπτωση στην περιοχή διεξαγωγής του πειράματος ήταν 775 mm, ενώ η μέση μηνιαία θερμοκρασία ανερχόταν στους 18,1 °C κατά την διάρκεια της χρονιάς που έλαβε χώρα το πείραμα. Οι διακυμάνσεις της μέσης μηνιαίας θερμοκρασίας του αέρα, καθώς και η αθροιστική μηνιαία βροχόπτωση, κατά την διάρκεια του έτους 2012, παρουσιάζονται στο Σχήμα 5.



Σχήμα 5: Μέση μηνιαία θερμοκρασία (ανοιχτοί κύκλοι) και αθροιστική μηνιαία βροχόπτωση (μπάρες) στην περιοχή του Αγρινίου κατά την διάρκεια της πειραματικής χρονιάς (2012).

2.2.3 Πειραματικό σχέδιο

Ακολουθήθηκε το πειραματικό σχέδιο των υπό-υποδιαιρεμένων τεμαχίων (split split- plot design) με 4 επαναλήψεις και το καλλιεργητικό σύστημα (συμβατικό ή βιολογικό) να εφαρμόζεται τυχαία στα κύρια τεμάχια. Ο παράγοντας αλατότητα στο νερό άρδευσης (0,5 ή 10 mM NaCl) εφαρμόσθηκε επίσης τυχαία στα υποδιαιρεμένα τεμάχια εντός των κύριων τεμαχίων και η επέμβαση του εμβολιασμού με ριζόβια στα υπο-υποδιαιρεμένα τεμάχια. Η συνολική έκταση του πειραματικού αγρού ήταν 1.225 m², με 32 υποτεμάχια στο σύνολο, έκτασης 30 m² το καθένα (Σχήμα 6).



Σχήμα 6: Σχηματική απεικόνιση πειραματικού σχεδίου υπο υποδιαιρεμένων τεμαχίων που ακολουθήθηκε σε πείραμα αγρού (Άνοιξη –Καλοκαίρι 2012).

2.2.4 Εγκατάσταση πειράματος

Από τις αρχές Νοεμβρίου έως και τις αρχές Μαρτίου 2012 ο πειραματικός αγρός καλλιεργούνταν με βίκο (*Vicia sativa* L. cv. Alexander). Ομοίως με το προηγούμενο πείραμα (Πείραμα αγρού 1^ο) ο βίκος χρησιμοποιήθηκε σαν χλωρή λίπανση, ενσωματώνοντας την βιομάζα του με την βοήθεια φρέζας, σε όλα τα πειραματικά τεμάχια του αγρού, στο στάδιο της άνθησης. Η προετοιμασία του αγρού για την εγκατάσταση του πειράματος (εδαφοκατεργασία, χάραξη πειραματικών τεμαχίων, ενσωμάτωση λιπασμάτων) πραγματοποιήθηκε όπως αυτή περιγράφεται στην Ενότητα 2.1.3 (εγκατάσταση πειράματος αγρού 1^ο). Το πειραματικό σχέδιο που ακολουθήθηκε παρουσιάζεται στο Σχήμα 6.

Η λίπανση που ακολουθήθηκε για την μεταχείριση των βιολογικών και συμβατικών πειραματικών υποτεμαχίων ήταν όμοια με αυτή που εφαρμόστηκε κατά την διάρκεια του προηγούμενου πειράματος (Ενότητα 2.1.3). Η σπορά φασολιού πραγματοποιήθηκε στις 25 Απριλίου 2012 χειρωνακτικά, και η καλλιέργεια του φασολιού τερματίστηκε στις 31 Ιουλίου 2011. Οι αποστάσεις φύτευσης σπόρων φασολιού μεταξύ και επί των γραμμών (50 cm), το βάθος σποράς (3 cm), καθώς και η πυκνότητα φύτευσης (80.000 φυτά ανά εκτάριο) που ακολουθήθηκαν ήταν ίδιες με αυτές που εφαρμόστηκαν στο προηγούμενο πείραμα. Η έκπτυξη των κοτυληδόνων ξεκίνησε περίπου 10 ημέρες μετά την σπορά (ΗΜΣ). Ο εμβολιασμός των φυτών με αζωτοβακτήρια εφαρμόστηκε στα αντίστοιχα υπό-υποτεμάχια του πειραματικού σχεδίου, όταν παρουσιάστηκε το μεγαλύτερο ποσοστό φυτρώματος των φυτών φασολιού στον πειραματικό αγρό (25 ΗΜΣ). Κάθε φυτό εμβολιάστηκε με 10 mL υγρής καλλιέργειας του αζωτοβακτηρίου *Rhizobium tropici* στελέχους CIAT899 (10^9 cfu mL⁻¹) στο έδαφος γύρω από τον λαιμό του.

Η επέμβαση της υψηλής αλατότητας στο νερό άρδευσης στα αντίστοιχα υποτεμάχια εφαρμόστηκε 35 ΗΜΣ, για να αποφευχθεί τυχόν καθυστέρηση στην βλάστηση και ανάπτυξη των φυτών στα πρώτα τους στάδια. Θα πρέπει να σημειωθεί ότι ομοίως με το προηγούμενο πείραμα, κατά την διάρκεια της καλλιεργητικής περιόδου δεν χρησιμοποιήθηκαν συνθετικά εντομοκτόνα ή μυκητοκτόνα σε κανένα από τα δύο καλλιεργητικά συστήματα (βιολογικό ή συμβατικό), ενώ σε τακτά χρονικά διαστήματα διενεργούνταν σκαλίσματα για τον έλεγχο των ζιζανίων.



Εικόνα 4: Πειραματικός αγρός καλλιέργειας φασολιού (Άνοιξη –Καλοκαίρι 2012).

2.2.5 Άρδευση καλλιέργειας

Η άρδευση της καλλιέργειας φασολιού πραγματοποιούνταν με την χρήση αρδευτικού συστήματος στάγδην άρδευσης. Το στάγδην σύστημα άρδευσης ήταν κατάλληλα σχεδιασμένο ώστε να επιτρέπει την εφαρμογή δύο διαφορετικών συγκεντρώσεων αλατότητας (0,5 ή 10 mM NaCl) στο νερό άρδευσης ανά πειραματικό υποτεμάχιο. Αναλυτική περιγραφή του συστήματος παρατίθεται στην Ενότητα 2.1.5. Ομοίως με το προηγούμενο πείραμα αγρού, η άρδευση της καλλιέργειας πραγματοποιούνταν κατά τις απογευματινές ώρες της ημέρας με μέση διάρκεια 2 ώρες. Ο συνολικός αριθμός των αρδεύσεων κατά την διάρκεια της καλλιέργειας ήταν 20, ενώ τα φυτά έλαβαν επιπλέον ποσότητες νερού και από τις βροχοπτώσεις.

2.2.6 Λήψη πειραματικού υλικού και αναλυτικές μέθοδοι

Κατά την διάρκεια του πειράματος πραγματοποιήθηκαν τρεις δειγματοληψίες εδάφους 30, 60 και 90 ημέρες μετά την σπορά (ΗΜΣ), από όλα τα πειραματικά υπο υποδιαιρεμένα τεμάχια, με συνολικό αριθμό δειγμάτων 32. Η δειγματοληψία εδάφους πραγματοποιούνταν με την χρήση ειδικού μεταλλικού δειγματολήπτη εδάφους σε βάθος 0-30 cm. Τα δείγματα εδάφους χρησιμοποιήθηκαν για τον προσδιορισμό ολικού αζώτου (N) και άνθρακα (C), καθώς και νιτρικών ($\text{NO}_3\text{-N}$) και αμμωνιακών

(NH₄-N) (οι μέθοδοι που ακολουθήθηκαν περιγράφονται στις Ενότητες 2.5.4 και 2.5.5 αντίστοιχα).

Στο αρχικό στάδιο γεμίσματος των λοβών (65 ΗΜΣ) πραγματοποιήθηκε δειγματοληψία φυτικού υλικού με τυχαία λήψη 3 φυτών φασολιού από κάθε υπο υποτεμάχιο. Μαζί με τα δείγματα φυτών φασολιού συλλέγονταν από κάθε υπο υποτεμάχιο και 3 ζιζάνια του είδους *Amaranthus* sp. (Amaranthaceae), με κοινό όνομα βλήτο, ως φυτά αναφοράς. Τα δείγματα των ζιζανίων χρησιμοποιήθηκαν για τον προσδιορισμό της βιολογικής αζωτοδέσμευσης φασολιού για όλες τις μεταχειρίσεις στο συγκεκριμένο στάδιο καλλιέργειας (περιγραφή της μεθόδου του προσδιορισμού της βιολογικής αζωτοδέσμευσης παρατίθεται στο ίδιο κεφάλαιο, Ενότητα 2.5.2). Η επόμενη δειγματοληψία φυτικού υλικού πραγματοποιήθηκε 85 ΗΜΣ. Σε αυτήν την δειγματοληψία συλλέχθηκαν μόνο δείγματα φυτών φασολιού από κάθε υπο υποτεμάχιο. Και στις δύο δειγματοληψίες τα δείγματα αυτά χρησιμοποιήθηκαν για τον προσδιορισμό νωπής και ξηρής βιομάζας, καθώς και ολικού αζώτου και άνθρακα για τις δεδομένες χρονικές στιγμές (περιγραφή της μεθόδου που ακολουθήθηκε Ενότητα 2.5.3.1 και 2.5.4).

Παράλληλα, με το φυτικό υλικό συλλέγονταν από τα ίδια φυτά και δείγματα ριζών, με την χρήση μεταλλικού κυλίνδρου, διαστάσεων 25 cm ύψος και 10 cm διάμετρο. Τα δείγματα αυτά χρησιμοποιήθηκαν για τον προσδιορισμό σχηματισμένων φυματίων στις ρίζες των φυτών από αζωτοβακτήρια. Ο συνολικός αριθμός των ριζικών φυματίων καταμετρήθηκε και στις δύο δειγματοληψίες (65 και 85 ΗΜΣ), ενώ το μέσο βάρος των φυματίων καταγράφηκε μόνο στο αρχικό στάδιο γεμίσματος των λοβών (65 ΗΜΣ) σε όλες τις μεταχειρίσεις.

Οι εκπομπές αερίων θερμοκηπίου, υποξείδιο του αζώτου (N₂O), διοξείδιο του άνθρακα (CO₂) και μεθανίου (CH₄), προσδιορίστηκαν και σε αυτό το πείραμα αγρού τοποθετώντας σε κάθε υποτεμάχιο δύο στατικούς θαλάμους (δειγματολήπτες). Συγκεκριμένα, πραγματοποιήθηκαν 6 δειγματοληψίες κατά την διάρκεια της καλλιεργητικής περιόδου (25, 40, 55, 70 και 85 ΗΜΣ). Η μέθοδος που ακολουθήθηκε περιγράφεται αναλυτικά στις Μεθοδολογίες Εργαστηριακών Αναλύσεων, Ενότητα 2.5.1.

Ομοίως με το προηγούμενο πείραμα αγρού, προσδιορίστηκε με χειρωνακτική συγκομιδή των εμπορικά ώριμων πράσινων λοβών η συνολική παραγωγή σε νωπό βάρος ανά στρέμμα (kg/στρ.), ο συνολικός αριθμός λοβών ανά φυτό και η ολική απόδοση λοβών σε ξηρό βάρος.

2.2.7 Στατιστική επεξεργασία αποτελεσμάτων

Για την στατιστική επεξεργασία των αποτελεσμάτων έγινε τριπαραγοντική ανάλυση διακύμανσης (ANOVA) χρησιμοποιώντας το στατιστικό πρόγραμμα PlotIT3.2, με κύριο παράγοντα το καλλιεργητικό σύστημα (βιολογικό ή συμβατικό) και δευτερεύοντες παράγοντες την αλατότητα του νερού άρδευσης (χαμηλή ή υψηλή) και την εφαρμογή του εμβολιασμού με ριζόβια (ναι ή όχι). Στις περιπτώσεις που η ανάλυση της διαφοράς έδειξε την ύπαρξη αλληλεπιδράσεων μεταξύ των παραγόντων του πειράματος, οι πολλαπλές συγκρίσεις των μέσων όρων για στατιστικά σημαντικές διαφορές πραγματοποιήθηκαν σύμφωνα με τη δοκιμασία Duncan.

2.3 Πείραμα θερμοκηπίου (3^ο)

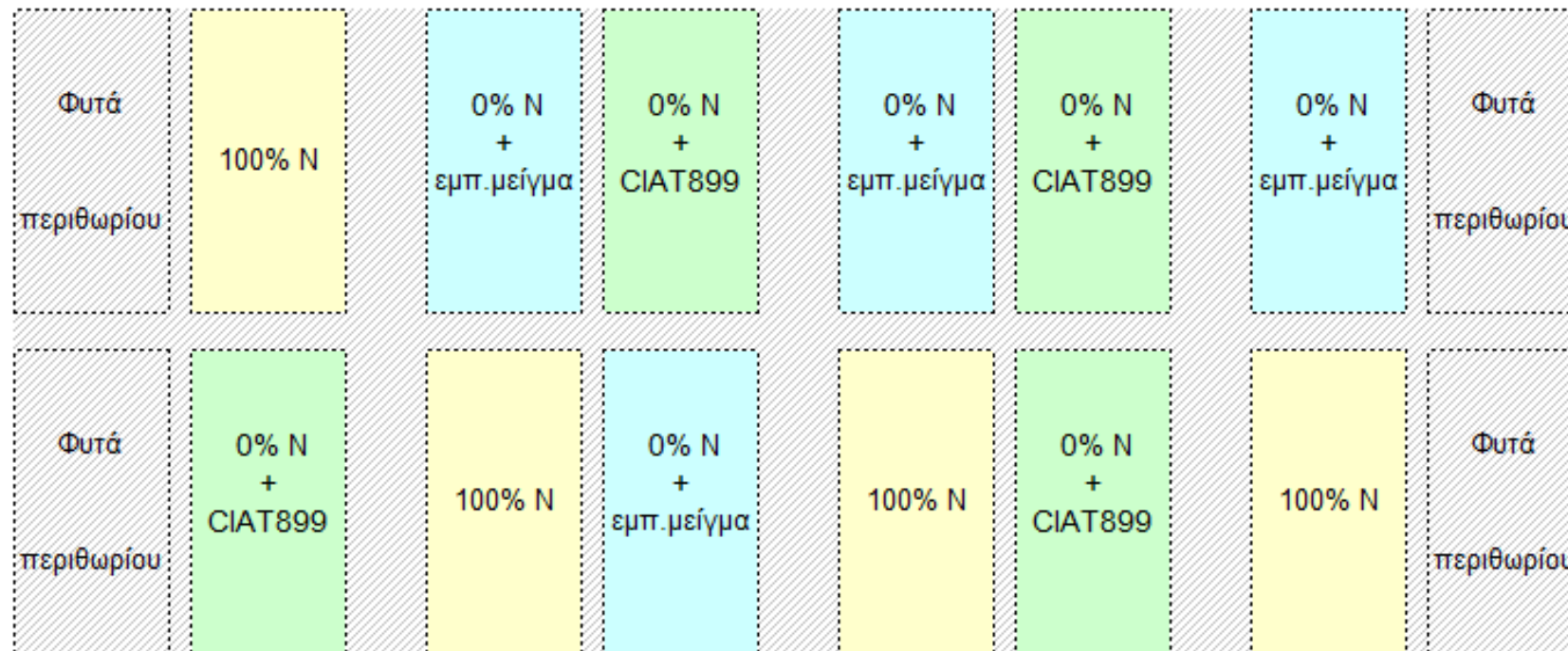
Στο υαλόφρακτο θερμοκήπιο του Εργαστηρίου Κηπευτικών Καλλιεργειών του Γεωπονικού Πανεπιστημίου Αθηνών (ΓΠΑ) διεξήχθη πείραμα υδροπονικής καλλιέργειας καθιστού φασολιού. Το πείραμα διήρκεσε από τις 18 Οκτωβρίου 2011 έως τις 27 Ιανουαρίου 2012. Η ποικιλία που χρησιμοποιήθηκε ήταν ίδια με αυτή των δύο προηγούμενων πειραμάτων (*Phaseolus vulgaris* L., cv. Contender).

Ο θάλαμος θερμοκηπίου στον οποίο πραγματοποιήθηκε το συγκεκριμένο πείραμα αποτελούνταν από 12 κανάλια (πειραματικές μονάδες) κλειστού τύπου, σε παράλληλη διάταξη (διαστάσεων 3.0 x 0.2 x 0.3 m, μήκος x πλάτος x ύψος). Κάθε κανάλι είχε τη δυνατότητα να παρέχει διαφορετικό θρεπτικό διάλυμα στα φυτά, διότι διέθετε ξεχωριστή αντλία παροχής θρεπτικού διαλύματος, καθώς και δύο ογκομετρικά δοχεία τα οποία λειτουργούσαν ως δεξαμενές τροφοδοσίας-ανακύκλωσης και συμπλήρωσης. Οι δύο αυτές δεξαμενές συνδέονταν με έναν πλωτήρα (floater), που ρύθμιζε αυτόματα την συμπλήρωση του διαλύματος που απορροφούνταν από τα φυτά. Μέσω του πλωτήρα, η στάθμη του θρεπτικού διαλύματος στο δοχείο θρεπτικού διαλύματος τροφοδοσίας διατηρούταν συνεχώς σε ένα προκαθορισμένο σταθερό επίπεδο. Η διανομή του θρεπτικού διαλύματος στα φυτά γινόταν με σταλάκτες που φέρονταν πάνω στους πλευρικούς αγωγούς των καναλιών. Κάθε φυτό διέθετε τον δικό του σταλάκτη. Οι πλευρικοί αγωγοί των καναλιών συνέλεγαν σε όλη την διάρκεια του πειράματος το διάλυμα απορροής, το οποίο κατέληγε στη δεξαμενή τροφοδοσίας και με αυτόν τον τρόπο πραγματοποιούνταν η ανακύκλωσή του στο κλειστό υδροπονικό σύστημα. Η συχνότητα άρδευσης των φυτών καθορίζονταν με βάση την εισερχόμενη ηλιακή ακτινοβολία (kWh), μέσω αυτοματοποιημένου συστήματος άρδευσης.

2.3.1 Πειραματικό σχέδιο

Το πειραματικό σχέδιο το οποίο ακολουθήθηκε ήταν τυχαιοποιημένων πλήρων ομάδων με 4 επαναλήψεις ανά μεταχείριση (Σχήμα 7). Οι μεταχειρίσεις που εφαρμόστηκαν κατά την διάρκεια του πειράματος ήταν 3. Στις δύο από τις τρεις μεταχειρίσεις, τα σπορόφυτα εφοδιάζονταν με θρεπτικό διάλυμα του οποίου η συγκέντρωση ολικού αζώτου ήταν μηδέν και εφαρμοζόταν ο εμβολιασμός των ριζών τους είτε με αζωτοβακτήρια του *Rhizobium tropici* στελέχους CIAT899, είτε με εμπορικό σκεύασμα το οποίο περιείχε μείγμα *Rhizobium* και *Azotobacter* sp. Ο συμβολισμός των μεταχειρίσεων αυτών ορίστηκε ως 0% N + CIAT899 και 0% N + εμπ. μείγμα, αντίστοιχα. Αντίθετα, τα σπορόφυτα που αναπτύσσονταν με βάση την

τρίτη μεταχείριση δεν ήταν εμβολιασμένα και η συγκέντρωση του ολικού αζώτου στο θρεπτικό διάλυμα ήταν προσαρμοσμένη στο πρότυπο επίπεδο για υδροπονική καλλιέργεια φασολιού. Ο συμβολισμός του πρότυπου θρεπτικού διαλύματος ορίζεται ως 100% N ή μάρτυρας.



Σχήμα 7: Σχηματική απεικόνιση πειραματικού σχεδίου τυχαιοποιημένων πλήρων ομάδων που ακολουθήθηκε σε πείραμα θερμοκηπίου (Οκτώβριος 2011-Ιανουάριος 2012).

2.3.2 Εγκατάσταση πειράματος

Για την δημιουργία σποροφύτων φασολιού χρησιμοποιήθηκαν δίσκοι σποράς με υπόστρωμα ελαφρόπετρας διαμέτρου 0-8 mm. Για την βλάστηση των σπόρων φασολιού οι δίσκοι σποράς τοποθετήθηκαν σε θάλαμο ελεγχόμενης θερμοκρασίας (23-26 °C). Τα σπορόφυτα φασολιού μεταφυτεύτηκαν 15 ημέρες μετά την σπορά, στο στάδιο των δύο κοτυληδόνων, σε υδροπονικούς σάκους ελαφρόπετρας. Κάθε κανάλι περιείχε τρεις σάκους ελαφρόπετρας, διαστάσεων 1 x 0.2 x 0.2 m (μήκος x πλάτος x ύψος). Στον κάθε σάκο μεταφυτεύτηκαν 4 σπορόφυτα φασολιού, καταλήγοντας σε 12 φυτά ανά κανάλι.

Αμέσως μετά τη μεταφύτευση, τα σπορόφυτα φασολιού σε δύο από τις τρεις μεταχειρίσεις εμβολιάστηκαν με υγρή καλλιέργεια (10 mL ανά φυτό) του αζωτοβακτηρίου *Rhizobium tropici* στελέχους CIAT899 (10^9 cfu mL⁻¹), ή με το εμπορικό σκεύασμα (AzoRiz). Σύμφωνα με τις πληροφορίες που παρέχονται από την κατασκευάστρια εταιρεία (Humofert) το εμπορικό σκεύασμα περιείχε ένα μείγμα από αζωτοβακτήρια, των γενών *Rhizobia* και *Azotobacter*. Η εφαρμογή του εμβολιασμού και στις δύο μεταχειρίσεις επαναλήφθηκε 6 ημέρες μετά.

Η σύνθεση του τυπικού θρεπτικού διαλύματος (100% N) βασίζεται σε συνταγή που έχει ήδη δημοσιευτεί για την υδροπονική καλλιέργεια φασολιού σε θερμοκήπια της Μεσογείου (Savvas et al., 2013). Οι συγκεντρώσεις των μακροστοιχείων και των ιχνοστοιχείων των δύο διαφορετικών συνταγών θρέψης παρουσιάζονται στον Πίνακα 2. Σε όλες τις μεταχειρίσεις, το pH των θρεπτικών διαλυμάτων ελεγχόταν και προσαρμοζόταν καθημερινά στα επίπεδα των 5.6-5.7 προσθέτοντας την κατάλληλη ποσότητα φωσφορικού οξέως.



Εικόνα 5: Θερμοκηπιακή καλλιέργεια νάνου φασολιού σε κλειστό υδροπονικό σύστημα (Νοέμβριος-Ιανουάριος 2011).

Πίνακας 2 : Σύνθεση θρεπτικών διαλυμάτων (ΘΔ) για δύο διαφορετικές μεταχειρίσεις ανόργανου αζώτου που συμπεριλαμβάνουν: 'πρότυπο ΘΔ' (100% N) και 'χωρίς άζωτο ΘΔ' (0% N).

Παράμετρος	Πρότυπο ΘΔ ¹ (100%N)	Χωρίς άζωτο ΘΔ ² (0% N)
Ηλεκτρική Αγωγιμότητα (dS m ⁻¹)	1.61	1.44
K ⁺ (mM)	5.00	5.00
Ca ²⁺ (mM)	2.50	2.50
Mg ²⁺ (mM)	1.20	1.20
NO ₃ ⁻ (mM)	10.00	0.00
NH ₄ ⁺ (mM)	1.50	0.00
SO ₄ ²⁻ (mM)	2.60	7.20
H ₂ PO ₄ ⁻	1.20	1.80

Οι συγκεντρώσεις των ιχνοστοιχείων Fe, Mn, Zn, Cu, B, Mo ήταν 12, 6, 4, 0.5, 20, 0.5 μM, αντίστοιχα, σε όλα τα θρεπτικά διαλύματα (ΘΔ), τα οποία παρέχονταν στα φυτά κατά την διάρκεια του πειράματος, ανεξάρτητα των μεταχειρίσεων.

¹ Πρότυπο ΘΔ (100% N): Πρότυπο θρεπτικό διάλυμα για υδροπονική καλλιέργεια φασολιού.

² Χωρίς άζωτο ΘΔ (0% N): Τυπικό θρεπτικό διάλυμα για υδροπονική καλλιέργεια φασολιού χωρίς την προσθήκη αζώτου.

2.3.3 Λήψη πειραματικού υλικού και αναλυτικές μέθοδοι

Κατά την διάρκεια του πειράματος πραγματοποιήθηκαν τρεις δειγματοληψίες φυτικού υλικού 45, 65 και 90 ημέρες μετά την μεταφύτευση (HMM). Σε κάθε δειγματοληψία γινόταν τυχαία συλλογή 2 φυτών από κάθε πειραματικό τεμάχιο, προκειμένου να προσδιοριστεί η νωπή και ξηρή βιομάζα του υπέργειου τμήματος των φυτών στις δεδομένες χρονικές στιγμές. Οι ξηροί φυτικοί ιστοί χρησιμοποιήθηκαν για τον προσδιορισμό ολικού αζώτου και άνθρακα, καθώς και άλλων θρεπτικών στοιχείων (K, P, Mg, Zn). Οι αναλυτικές μέθοδοι που ακολουθήθηκαν περιγράφονται στις Μεθοδολογίες Εργαστηριακών Αναλύσεων, Ενότητα 2.5.3.

Εκτός από το υπέργειο μέρος των φυτών παράλληλα συλλέγονταν και οι ρίζες των φυτών. Ο συνολικός αριθμός των ριζικών φυματίων ανά φυτό καταμετρούνταν σε κάθε δειγματοληψία, αφού προηγουμένως οι ρίζες των φυτών είχαν πλυθεί διεξοδικά με νερό και τοποθετούνταν για στέγνωμα σε διηθητικό χαρτί. Έπειτα, επιλεγμένα υγιή φυμάτια χρησιμοποιήθηκαν για την απομόνωση και ταυτοποίηση ριζοβίων σε κάθε μεταχείριση, ανεξάρτητα εάν έχει εφαρμοστεί εμβολιασμός με

αζωτοβακτήρια στις ρίζες των φυτών ή όχι (η αναλυτική μέθοδος που ακολουθήθηκε περιγράφεται στις Μεθοδολογίες Εργαστηριακών Αναλύσεων, Ενότητα 2.5.7).

Η ολική απόδοση λοβών φασολιού (νωπή και ξηρή), καθώς και ο συνολικός αριθμός λοβών ανά φυτό προσδιορίστηκαν μετά από χειρωνακτική συγκομιδή των εμπορικά ώριμων πράσινων λοβών (μήκος λοβού ≈ 20 cm) από όλα τα πειραματικά τεμάχια.

2.3.4 Στατιστική επεξεργασία αποτελεσμάτων

Για την στατιστική επεξεργασία των αποτελεσμάτων έγινε ανάλυση διακύμανσης (ANOVA) χρησιμοποιώντας το στατιστικό πρόγραμμα STATISTICA version 9.0 software package (StatSoft Inc. 2010, Tulsa, OK, USA). Οι πολλαπλές συγκρίσεις των μέσων όρων για στατιστικά σημαντικές διαφορές πραγματοποιήθηκαν σύμφωνα με το κριτήριο Duncan. Τα τυπικά σφάλματα που τοποθετήθηκαν στις γραφικές παραστάσεις απεικονίζουν τις στατιστικά σημαντικά διαφορές μεταξύ των μέσων όρων των μεταχειρίσεων.

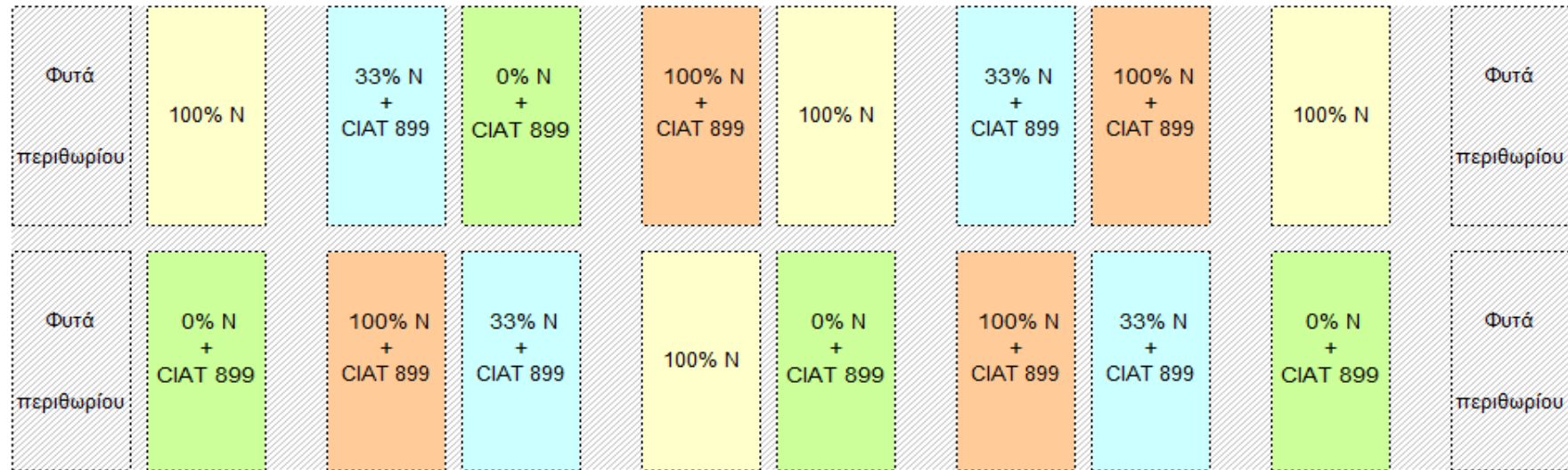
2.4 Πείραμα θερμοκηπίου (4^ο)

Στο υαλόφρακτο θερμοκήπιο του Εργαστηρίου Κηπευτικών Καλλιεργειών του Γεωπονικού Πανεπιστημίου Αθηνών (ΓΠΑ) διεξήχθη πείραμα υδροπονικής καλλιέργειας αναρριχώμενου φασολιού (*Phaseolus vulgaris* L., cv. Helda). Το πείραμα διήρκεσε από τον Φεβρουάριο 2013 έως τον Ιούλιο 2013. Ο θάλαμος θερμοκηπίου στον οποίο πραγματοποιήθηκε το συγκεκριμένο πείραμα ήταν ο ίδιος που χρησιμοποιήθηκε και στο τρίτο πείραμα θερμοκηπίου και περιγράφεται στην Ενότητα 2.3.

2.4.1 Πειραματικό σχέδιο

Το πειραματικό σχέδιο το οποίο ακολουθήθηκε ήταν τυχαιοποιημένων πλήρων ομάδων με 4 επαναλήψεις ανά μεταχείριση (Σχήμα 8). Οι μεταχειρίσεις που εφαρμόστηκαν κατά την διάρκεια του πειράματος ήταν 4, οπότε συνολικά υπήρχαν 16 ανεξάρτητες πειραματικές μονάδες. Στις τρεις από τις τέσσερις μεταχειρίσεις τα σπορόφυτα εμβολιάστηκαν με υγρή καλλιέργεια του στελέχους *Rhizobium tropici* CIAT899. Τα φυτά των μεταχειρίσεων που είχαν εμβολιαστεί με ριζόβια τροφοδοτήθηκαν με τρία διαφορετικά θρεπτικά διαλύματα, τα οποία διέφεραν ως προς την συγκέντρωση του ολικού αζώτου.

Συγκεκριμένα, η συγκέντρωση του ολικού αζώτου ήταν ίση με αυτή της “πρότυπης” σύνθεσης που παρατίθεται στον Πίνακα 3 (100% N + CIAT899), είτε με το 1/3 της συγκέντρωσης N στην πρότυπη σύνθεση (33% N ή 1/3 N + CIAT899) είτε μηδενική (0% N + CIAT899), όπως αυτή περιγράφεται στον Πίνακα 3. Στην τέταρτη μεταχείριση, τα σπορόφυτα δεν εμβολιάστηκαν με κάποιο ριζόβιο ή άλλο μικροοργανισμό και η συγκέντρωση του ολικού αζώτου στο θρεπτικό διάλυμα (καθώς και των υπόλοιπων θρεπτικών στοιχείων) αντιστοιχούσε στην πρότυπη σύνθεση του Πίνακα 3 (μάρτυρας ή 100% N).



Σχήμα 8: Σχηματική απεικόνιση πειραματικού σχεδίου τυχαιοποιημένων πλήρων ομάδων που ακολουθήθηκε σε πείραμα θερμοκηπίου (Μάρτιος 2013- Ιούλιος 2013).

2.4.2 Εγκατάσταση πειράματος

Σπόροι αναρριχώμενου φασολιού (*Phaseolus vulgaris* cv. Helda) σπάρθηκε σε δίσκους σποράς γεμισμένους με υπόστρωμα ελαφρόπετρας κοκκομετρίας 0-8 mm, για την δημιουργία σποροφύτων. Ομοίως, δημιουργήθηκαν και σπορόφυτα αγγουριού (*Cucumis sativus* cv. Green Baboo). Οι δίσκοι σποράς τοποθετήθηκαν σε θάλαμο ελεγχόμενης θερμοκρασίας (23-26 °C) για την εκβλάστηση των σπόρων. Μετά την έκπτυξη των δύο κοτυληδόνων, 15 ημέρες μετά την σπορά, τα σπορόφυτα μεταφυτεύτηκαν σε 16 ανεξάρτητες υδροπονικές μονάδες (πειραματικές μονάδες). Πριν την μεταφύτευση των σποροφύτων, οι σάκοι των πειραματικών μονάδων διαβρέχτηκαν με το αντίστοιχο θρεπτικό διάλυμα που θα τροφοδοτούσε τα φυτά κατά την διάρκεια του πειράματος.

Κάθε πειραματική μονάδα (κανάλι) περιείχε τρεις υδροπονικούς σάκους ελαφρόπετρας, διαστάσεων 1 x 0.2 x 0.2 m (μήκος x πλάτος x ύψος). Στον κάθε σάκο μεταφυτεύτηκαν 4 σπορόφυτα φασολιού, με συνέπεια να προκύψουν 12 φυτά ανά κανάλι. Μαζί με τις 16 πειραματικές μονάδες που φιλοξενούσαν φυτά φασολιού χρησιμοποιήθηκαν και άλλες 4 παρόμοιες μονάδες, η κάθε μία από τις οποίες φιλοξενούσε τρεις υδροπονικούς σάκους ελαφρόπετρας. Σε αυτές τις πειραματικές μονάδες φυτεύτηκαν και αναπτύχθηκαν τα σπορόφυτα αγγουριού, τα οποία χρησιμοποιήθηκαν ως φυτά αναφοράς για τον προσδιορισμό της βιολογικής αζωτοδέσμευσης. Σε κάθε σάκο μεταφυτεύτηκαν 2 σπορόφυτα αγγουριού. Οι δύο από τις τέσσερις πειραματικές μονάδες εφοδίαζαν τα φυτά με πρότυπο θρεπτικό διάλυμα (100% N), ενώ οι άλλες δύο με θρεπτικό διάλυμα με συγκέντρωση N ίση με το 1/3 του πρότυπου διαλύματος (33% N).

Αμέσως μετά τη μεταφύτευση, τα σπορόφυτα φασολιού σε τρεις από τις τέσσερις μεταχειρίσεις εμβολιάστηκαν με υγρή καλλιέργεια (10 mL ανά φυτό) του αζωτοβακτηρίου *Rhizobium tropici* στελέχους CIAT899 (10^9 cfu mL⁻¹). Η εφαρμογή του εμβολιασμού και στις δύο μεταχειρίσεις επαναλήφθηκε 6 ημέρες μετά.

Η σύνθεση του πρότυπου θρεπτικού διαλύματος (100% N) είναι παρόμοια με αυτή που εφαρμόστηκε στο 1^ο πείραμα θερμοκηπίου και περιγράφεται στην παράγραφο στην Ενότητα 2.3.2, αλλά με μικρές τροποποιήσεις για να διευκολυνθεί βασίζεται σε συνταγή που έχει ήδη δημοσιευτεί για την υδροπονική καλλιέργεια φασολιού σε θερμοκήπια της Μεσογείου (Σάββας et al., 2013). Οι συγκεντρώσεις των μακροστοιχείων και των ιχνοστοιχείων των τριών διαφορετικών συνταγών θρέψης παρουσιάζονται στον Πίνακα 3. Σε όλες τις μεταχειρίσεις, το pH των θρεπτικών διαλυμάτων ελεγχόταν και προσαρμοζόταν καθημερινά στα επίπεδα των 5.6-5.7 προσθέτοντας την κατάλληλη ποσότητα φωσφορικού οξέως.



Εικόνες 6 & 7: Θερμοκηπιακή καλλιέργεια αναρριχώμενου φασολιού σε κλειστό σύστημα υδροπονίας με χρήση ελαφρόπετρας (Άνοιξη –Καλοκαίρι 2013).

Πίνακας 3: Σύνθεση θρεπτικών διαλυμάτων (ΘΔ) για τρεις διαφορετικές μεταχειρίσεις ανόργανου αζώτου που συμπεριλαμβάνουν: 'πρότυπο ΘΔ' (100% N), 'χαμηλό ΘΔ' (33% N) και 'χωρίς άζωτο ΘΔ' (0% N).

Παράμετρος	Πρότυπο ΘΔ ¹ 100% N	Χαμηλό ΘΔ ² 33% N	Χωρίς Άζωτο ΘΔ ³ 0% N
EC (dS m ⁻¹)*	1.61	1.60	1.45
K ⁺ (mM)	5.00	5.00	5.00
Ca ²⁺ (mM)	2.50	2.50	2.50
Mg ²⁺ (mM)	1.20	1.20	1.20
NO ₃ ⁻ (mM)	9.60	3.45	0.00
NH ₄ ⁺ (mM)	1.60	0.30	0.00
SO ₄ ²⁻ (mM)	1.10	3.50	3.60
H ₂ PO ₄ ⁻	1.80	1.80	1.80

Οι συγκεντρώσεις των ιχνοστοιχείων Fe, Mn, Zn, Cu, B, Mo ήταν 12, 6, 4, 0.5, 20, 0.5 μM, αντίστοιχα, σε όλα τα θρεπτικά διαλύματα (ΘΔ), τα οποία παρέχονταν στα φυτά κατά την διάρκεια του πειράματος, ανεξάρτητα των μεταχειρίσεων.

*EC: Ηλεκτρική αγωγιμότητα

¹ Πρότυπο ΘΔ (100% N): Πρότυπο θρεπτικό διάλυμα για υδροπονική καλλιέργεια φασολιού.

² Χαμηλό ΘΔ (33% N): Θρεπτικό διάλυμα για υδροπονική καλλιέργεια φασολιού με την προσθήκη 33% του N που περιείχε το πρότυπο θρεπτικό διάλυμα.

³ Χωρίς άζωτο ΘΔ (0% N): Τροποποιημένο πρότυπο θρεπτικό διάλυμα για υδροπονική καλλιέργεια φασολιού χωρίς την προσθήκη αζώτου.

2.4.3 Λήψη πειραματικού υλικού και αναλυτικές μέθοδοι

Κατά την διάρκεια του πειράματος πραγματοποιήθηκαν τρεις δειγματοληψίες φυτικού υλικού 25, 45 και 65 ημέρες μετά την μεταφύτευση (HMM). Σε κάθε δειγματοληψία γινόταν τυχαία συλλογή ενός φυτού από κάθε πειραματικό τεμάχιο. Το κάθε δείγμα χωρίζονταν σε φύλλα, βλαστό, λοβούς και ρίζες. Έπειτα, το νωπό βάρος κάθε φυτικού τμήματος καταγραφόταν. Οι ξηροί φυτικοί ιστοί χρησιμοποιήθηκαν για τον προσδιορισμό των συγκεντρώσεων ολικού αζώτου και άνθρακα, καθώς και άλλων θρεπτικών στοιχείων και ειδικότερα K, P, Ca, Mg, Fe, Mn, Zn, Cu για τις δεδομένες χρονικές στιγμές, κατά την διάρκεια του πειράματος. Οι μέθοδοι προσδιορισμού των παραπάνω στοιχείων περιγράφονται αναλυτικά στις Μεθοδολογίες Εργαστηριακών Αναλύσεων, Ενότητες 2.5.3 και 2.5.4. Η βιολογική αζωτοδέσμευση προσδιορίστηκε σε φυτικούς ιστούς υπέργειου τμήματος που είχαν συλλεχθεί στο αρχικό στάδιο γεμίσματος των λοβών (45 HMM), εφαρμόζοντας την μέθοδο της φυσικής αφθονίας του ισότοπου ^{15}N , σύμφωνα με τους Unkovich et al. (2008). Η μέθοδος αυτή περιγράφεται αναλυτικά στην Ενότητα 2.5.2.

Παράλληλα, στις 15, 30, 45, και 75 HMM προσδιορίστηκαν και οι συγκεντρώσεις νιτρικών (NO_3^-) και αμμωνιακών (NH_4^+) στο ανακυκλούμενο θρεπτικό διάλυμα όλων των πειραματικών τεμαχίων. Ο προσδιορισμός των NO_3^- πραγματοποιήθηκε με την μέθοδο των Illosvay- Cries, ενώ των NH_4^+ ακολουθώντας τη μέθοδο του μπλε της ινδοφαινόλης (περιγραφή μεθόδων στην Ενότητα 2.5.6).

Οι ρίζες των φυτών πλύθηκαν με απεσταγμένο νερό και τοποθετήθηκαν σε διηθητικό χαρτί, προκειμένου να στεγνώσουν. Ομοίως με τα προηγούμενα πειράματα, ο συνολικός αριθμός των ριζικών φυματίων ανά φυτό καταμετρήθηκε σε κάθε δειγματοληψία, ενώ παράλληλα προσδιορίστηκε και το μέσο βάρος φυματίου ανά φυτό. Επιλεγμένα υγιή φυμάτια συλλέχθηκαν από κάθε μεταχείριση, ανεξάρτητα εάν είχε εφαρμοστεί εμβολιασμός με αζωτοβακτήρια ή όχι και χρησιμοποιήθηκαν για την απομόνωση και ταυτοποίηση ριζοβίων με τη μέθοδο της αλυσιδωτής αντίδρασης πολυμεράσης (PCR) (Ενότητα 2.5.7).

Η ολική απόδοση νωπών λοβών φασολιού (συνολικός αριθμός και συνολικό βάρος λοβών ανά φυτό) προσδιορίστηκε μετά από χειρωνακτική συγκομιδή των εμπορικά ώριμων πράσινων λοβών (μήκος λοβού ≤ 23 cm) σε όλα τα πειραματικά τεμάχια. Επίσης, η ολική απόδοση λοβών ανά φυτό σε ξηρό βάρος προσδιορίστηκε μετά από ξήρανση αντιπροσωπευτικού δείγματος των λοβών σε θερμοκρασία 65°C μέχρις ότου το βάρος τους να σταθεροποιηθεί.

2.4.4 Στατιστική επεξεργασία αποτελεσμάτων

Για την στατιστική επεξεργασία των αποτελεσμάτων έγινε ανάλυση διακύμανσης (ANOVA) χρησιμοποιώντας το στατιστικό πρόγραμμα STATISTICA version 9.0 software package (StatSoft Inc. 2010, Tulsa, OK, USA). Οι πολλαπλές συγκρίσεις των μέσων όρων για στατιστικά σημαντικές διαφορές πραγματοποιήθηκαν σύμφωνα με τη δοκιμασία Duncan. Οι κάθετες ράβδοι που εμφανίζονται στις γραφικές παραστάσεις απεικονίζουν τυπικά σφάλματα τα οποία υποδηλώνουν την διακύμανση των μέσων όρων. Τα τυπικά σφάλματα απεικονίζονται για να καταδειχτεί οπτικά σε ποιες περιπτώσεις υπάρχουν στατιστικά σημαντικές διαφορές μεταξύ των μέσων όρων των μεταχειρίσεων.

2.5 Μεθοδολογίες Εργαστηριακών Αναλύσεων

2.5.1 Μεθοδολογία δειγματοληψίας και προσδιορισμού εκπομπής αερίων

θερμοκηπίου (N₂O, CO₂, CH₄)

Η πλειοψηφία αναλύσεων για τον προσδιορισμό των εκπομπών αερίων θερμοκηπίου που αναφέρονται στη διεθνή βιβλιογραφία πραγματοποιήθηκαν με τη χρήση στατικών θαλάμων που έχουν εισχωρήσει στο έδαφος. Χαρακτηριστικά δε, κατονομάζονται με τον αγγλικό όρο “non-flow-through, non-steady state chambers (NFT-NSS chambers)”. Παρόλο, που δεν υπάρχει αποδεκτό μόνο ένα σχέδιο δειγματολήπτη αερίων θερμοκηπίου ή πρωτόκολλο αναλύσεων αντίστοιχα, πρόσφατες αξιολογήσεις καθιέρωσαν κριτήρια ποιοτικού έλεγχου σχετικά με την πειραματική διαδικασία (Rochette and Hutchinson, 2005; Rochette and Bertrand, 2007; Rochette and Eriksen-Hamel, 2008). Τα κριτήρια αυτά παρουσιάζονται περιληπτικά στον παρακάτω πίνακα (Πίνακας 4) στον οποίο επισημαίνονταν οι αποδεκτές καλές πρακτικές, όπως προσαρμόστηκε από τους Rochette and Eriksen-Hamel (2008).

Σύμφωνα με τη μεθοδολογία που ακολουθήθηκε στα πειράματα αγρού για την πραγματοποίηση αξιόπιστων δειγματοληψιών και αναλύσεων για τον προσδιορισμό των εκπομπών αερίων του θερμοκηπίου, χρησιμοποιώντας δειγματολήπτες τύπου NFT-NSS εφαρμόστηκαν τα παρακάτω κριτήρια:

- Οι δειγματολήπτες ήταν μονωμένοι και εξερωμένοι με προ-εγκατεστημένα κολάρα, έτσι ώστε να αποφεύγονται τυχόν αλλαγές λόγω ανάπτυξης πίεσης.
- Το ύψος του δειγματολήπτη ήταν μεγαλύτερο από 10 cm.
- Το κολάρο του δειγματολήπτη είχε ελάχιστο βάθος εισαγωγής 5 cm.
- Για την αποθήκευση του δείγματος αέρα χρησιμοποιήθηκαν κατάλληλα φιαλίδια συμπιεσμένου σταθερού όγκου.
- Κατά τη διάρκεια της δειγματοληψίας λαμβάνονταν τουλάχιστον τρία διακριτά δείγματα αέρα από δύο δειγματολήπτες, συμπεριλαμβάνοντας το πρώτο δείγμα που λαμβανόταν σε χρόνο μηδέν.

Πίνακας 4: Βαθμονόμηση αποδεκτών πρακτικών δειγματοληψίας και προσδιορισμού σύμφωνα με τους Rochette and Eriksen-Hamel, 2008.

ΒΑΘΜΟΝΟΜΗΣΗ ΑΠΟΔΕΚΤΩΝ ΠΡΑΚΤΙΚΩΝ				
	ΠΟΛΥ ΦΤΩΧΗ	ΦΤΩΧΗ	ΚΑΛΗ	ΠΟΛΥ ΚΑΛΗ
Σχέδιο δειγματολήπτη				
Τύπος δειγματολήπτη		Με πίεση (push-in)		Θάλαμος με βάση
Μόνωση		ΟΧΙ		ΝΑΙ
Εξαερισμός		ΟΧΙ		ΝΑΙ
Ύψος δειγματολήπτη	<10cm	10 έως <20cm	20 έως <40cm	≥40cm
Βάθος εισαγωγής βάσης θαλάμου	<5cm	5 έως <8cm	8 έως <12cm	≥12cm
Λόγος επιφάνειας/περίμετρος	<2.5	2.6 έως <6.25	6.26 έως <10	≥10
Διάρκεια ανάπτυξης αερίου	>60 λεπτά	>40 έως 60 λεπτά	>20 έως 40 λεπτά	≤20 λεπτά
Πρωτόκολλο δειγματοληψίας				
Τύπος φιαλιδίου αποθήκευσης δείγματος	Πλαστική σύριγγα	Γυάλινη σύριγγα	Άλλα φιαλίδια	Γυάλινα φιαλίδια με αεροστεγές πώμα
Συμπιεσμένο δείγμα (μόνο συγκεκριμένος όγκος δοχείου)		ΟΧΙ		ΝΑΙ
Ποιοτικός έλεγχος δειγμάτων	ΟΧΙ			ΝΑΙ
Δείγμα στο χρόνο μηδέν		ΟΧΙ		ΝΑΙ
Αριθμός δειγμάτων	1	2	3	>3
Διάρκεια αποθήκευσης δείγματος (ημέρες)				
• πλαστική σύριγγα	>2	1-2	<1	
• γυάλινη σύριγγα	>4	>2-4	1-2	<1
• άλλο	>90	>45 - 90	>15 - 45	≤15
Υπολογισμός αερίου				
Μη-γραμμικό μοντέλο	ΟΧΙ			ΝΑΙ
Διορθώσεις θερμοκρασίας		ΟΧΙ		ΝΑΙ

2.5.1.1 Σχεδιασμός δειγματολήπτη

Οι θάλαμοι συλλογής αερίων που χρησιμοποιήθηκαν ως δειγματολήπτες στα πειράματα αγρού, κατά τα έτη 2011 και 2012, ήταν προκαθορισμένων διαστάσεων, ύψους 15 cm και διαμέτρου 20 cm. Οι δειγματολήπτες κατασκευάστηκαν με τη χρήση πλαστικού κυλινδρικού σωλήνα για το κύριο μέρος τους, ενώ πλαστικοί στρογγυλοί δίσκοι με την ίδια διάμετρο χρησιμοποιήθηκαν ως καπάκια (Εικόνες 8 & 9). Το καπάκι έπρεπε να εφαρμόζει απόλυτα στο σωλήνα, έτσι ώστε ο τελευταίος να σφραγίζεται και να μην υπάρχουν τυχόν διαρροές. Ανάμεσα στο καπάκι και τον σωλήνα χρησιμοποιήθηκε αυτοκόλλητη, μονωτική ταινία, καθώς και κόλλα σιλικόνης. Στο κέντρο του στρογγυλού δίσκου τοποθετήθηκε μία πλαστική σύριγγα με ενσωματωμένη πλαστική βαλβίδα.



Εικόνα 8 & 9: Δειγματολήπτης αερίων θερμοκηπίου (N_2O , CO_2 , CH_4) που χρησιμοποιήθηκε κατά την διάρκεια των πειραμάτων αγρού σε καλλιέργεια καθιστού φασολιού.

2.5.1.2 Δειγματοληψία αερίων και αποθήκευση δειγμάτων

Ο αριθμός των θαλάμων συλλογής αερίων που θα πρέπει να τοποθετηθούν στο έδαφος εξαρτάται κάθε φορά από την επιφάνεια εδάφους που καταλαμβάνει ο θάλαμος αερίων, αλλά και από τη συνολική επιφάνεια του εκάστοτε πειραματικού υποπεμαχίου. Στη δική μας περίπτωση, κατά τη διεξαγωγή των δύο πειραμάτων αγρού τοποθετήθηκαν δύο θάλαμοι αερίων σε κάθε πειραματικό υποπεμαχίο, με συνολικό αριθμό 32 θαλάμους αερίων.

Τα δείγματα αερίων στα πειράματα αγρού λαμβάνονταν χρησιμοποιώντας μία πλαστική σύριγγα των 50ml. Με την βοήθεια ειδικού υποδοχέα που είχε τοποθετηθεί και στη σύριγγα αλλά και στο στατικό θάλαμο αερίων εκτελούνταν η δειγματοληψία

αερίου. Το δείγμα αερίου μεταφέρεται από την πλαστική σύριγγα στο κατάλληλο φιαλίδιο αποθήκευσης μέσω μίας βελόνας. Ακολουθώντας τις καλές πρακτικές της συγκεκριμένης μεθοδολογίας για τη συλλογή αλλά και αποθήκευση των δειγμάτων αερίων επιλέχθηκε η χρήση αεροστεγών γυάλινων φιαλιδίων, τα οποία στο άνω μέρος τους διέθεταν ένα ελαστικό κάλυμμα από βουτύλιο που καλυπτόταν από αλουμινένιο καπάκι σφιχτά τοποθετημένο. Δυστυχώς, έχει παρατηρηθεί ότι όλα τα μέσα τα οποία χρησιμοποιούνται για αποθήκευση αερίων (είτε είναι πλαστικές σύριγγες, είτε γυάλινα φιαλίδια) παρουσιάζουν διαρροή. Ακριβώς για αυτόν τον λόγο είναι πολύ σημαντικό να μειώνεται ο χρόνος από το στάδιο της συλλογής των δειγμάτων μέχρι την αποθήκευση και τελικά την ανάλυση τους στον χρωματογράφο αερίων. Λαμβάνοντας υπόψη αυτό το δεδομένο, η διάρκεια αποθήκευσης των δειγμάτων αερίων που αναλύθηκαν στο πλαίσιο της παρούσας διατριβής δεν ξεπερνούσε τις 45 ημέρες από την ημέρα συλλογής μέχρι την ανάλυση, με ιδανική διάρκεια λιγότερο από 15 ημέρες.

Σε κάθε δειγματοληψία γινόταν καταγραφή της μέσης εξωτερικής θερμοκρασίας του αέρα. Η δειγματοληψία αερίων πραγματοποιούνταν συγκεκριμένη ώρα της ημέρας, μεταξύ 10-12 π.μ., για να προσδιοριστεί η ημερήσια μεταβολή των εκπομπών αερίων θερμοκηπίου (Clayton and Smith, 1994). Ο χρόνος που δινόταν σε κάθε δειγματοληψία προκειμένου η αύξηση της συγκέντρωσης των αερίων να είναι γραμμική ήταν 60 λεπτά. Συνεπώς, προτού ξεκινήσει η δειγματοληψία όλοι οι θάλαμοι αερίων έκλειναν ο ένας μετά τον άλλον μέσω των βαλβίδων που ήταν τοποθετημένες πάνω τους, με αποτέλεσμα να σφραγίζονται και εσωτερικά των θαλάμων να αυξάνονται οι συγκεντρώσεις των αερίων. Παράλληλα, κατά την διάρκεια των 60 λεπτών, που ήταν κλειστοί οι θάλαμοι, λαμβάνονταν κάθε 15 λεπτά δείγματα από δύο θαλάμους αερίων, οι οποίοι βρισκόνταν σε διαφορετικά υποτεμάχια, για να είμαστε σε θέση να προσδιορίσουμε την κατανομή των αερίων κατά τη διάρκεια που αναπτυσσότουσαν μέσα στο θάλαμο, με συνολικό αριθμό 4 δείγματα από κάθε θάλαμο. Θα πρέπει να επισημανθεί ότι το πρώτο δείγμα αερίων λαμβανόταν στον χρόνο μηδέν.

Ο προσδιορισμός των N_2O , CH_4 και CO_2 πραγματοποιήθηκε με τη χρήση ηλεκτρονικού χρωματογράφου αερίων (GC, electron gas chromatography, series 5890 II) τύπου Agilent 6890 GC προσαρμοσμένος σε στήλη 1.8 m Propak-N και ηλεκτρονικό ανιχνευτή στο εργαστήριο του τμήματος "Crop & Soils Systems" του πανεπιστημίου SRUC της Σκωτίας. Πιστοποιημένα standards γνωστών συγκεντρώσεων χρησιμοποιήθηκαν προτού γίνει ανάλυση δειγμάτων για τη ρύθμιση του μηχανήματος. Ο χρωματογράφος αερίων αναγνωρίζει τις κορυφές αερίων (ppm), οι οποίες μετατρέπονται σε καθημερινές εκπομπές αερίων ανά εκτάριο βασισμένο στο ύψος του θαλάμου αερίων αλλά και στην εξωτερική θερμοκρασία αέρα.

2.5.1.3 Υπολογισμός ροής αερίων

Για τον υπολογισμό της ροής του αερίου N₂O, χρησιμοποιώντας θαλάμους συλλογής αερίων τύπου NFT-NSS, εφαρμόστηκε η παρακάτω εξίσωση, με πιο σημαντικές τις μεταβλητές του ολικού όγκου του θαλάμου, της επιφάνειας που καλύπτεται από τον θάλαμο, καθώς και τον όγκο 1 mole N₂O σε θερμοκρασία αέρα εντός του θαλάμου. Αντίστοιχα, με τον ίδιο τρόπο υπολογίστηκαν και τα υπόλοιπα αέρια θερμοκηπίου CO₂ και CH₄.

$$\text{N}_2\text{O flux (gN}_2\text{O-N ha}^{-1} \text{ d}^{-1}) = (\delta C/\delta t) \times (VM_{\text{mol}}/AV_{\text{mol}}) \times (1.44 \times 10^7)$$

Όπου:

$\delta C/\delta t$ είναι το ποσοστό αύξησης της συγκέντρωσης N₂O μέσα στο θάλαμο (ppm)

V είναι ο τελικός όγκος του θαλάμου (m³)

M_{mol} είναι η μοριακή μάζα N₂O (28 g mol⁻¹)

V_{mol} είναι ο όγκος που απασχολείται από 1 mol N₂O σε θερμοκρασία αέρα κατά τη διάρκεια της δειγματοληψίας

A είναι η συνολική επιφάνεια που καλύπτεται από το θάλαμο (m²)

2.5.2 Προσδιορισμός της βιολογικής αζωτοδέσμευσης φασολιού με την μέθοδο της φυσικής αφθονίας του ισότοπου ^{15}N (^{15}N natural abundance)

Η μέθοδος της φυσικής αφθονίας του ισότοπου ^{15}N μπορεί να εφαρμοσθεί σε πειράματα αγρού και θερμοκηπίου. Η συγκεκριμένη μέθοδος επιτρέπει τον προσδιορισμό της αζωτοδέσμευσης ψυχανθών, με την βοήθεια φυτών (μη ψυχανθή) που αναπτύσσονται στην ίδια περιοχή άλλα δεν έχουν την ικανότητα να αζωτοδεσμεύουν και ονομάζονται φυτά αναφοράς (reference plants).

2.5.2.1 Αρχές της μεθόδου

Στην φύση, το άζωτο (N), όπως και άλλα χημικά στοιχεία, παρουσιάζουν περισσότερα από ένα σταθερά ισότοπα. Από τα δύο σταθερά ισότοπα του N, ^{14}N και ^{15}N , το πρώτο είναι και το πιο άφθονο. Στην βίοςφαιρα ο λόγος μεταξύ των δύο σταθερών ισωτόπων ποικίλει με αποτέλεσμα να δημιουργείται κλασμάτωση σε φυσικές, χημικές αλλά και βιολογικές διαδικασίες. Η μεγαλύτερη πηγή N στο περιβάλλον είναι το ατμοσφαιρικό N_2 με φυσική αφθονία 0.3663% ^{15}N . Οι αναλογίες που συναντώνται στη φύση μεταξύ του βαρύτερου και του ελαφρύτερου ισότοπου είναι πολύ μικρές.

Όταν ένα ψυχανθές, το οποίο έχει σχηματίσει επιτυχώς φυμάτια, αναπτύσσεται σε ένα υπόστρωμα χωρίς την παρουσία αζώτου (ανόργανο ή/ και οργανικό άζωτο) και κατά συνέπεια εξαρτάται απόλυτα για την ανάπτυξη του από τη συμβιωτική αζωτοδέσμευση, η ισοτοπική σύνθεση του αναμένεται να είναι παρόμοια με αυτή του ατμοσφαιρικού αζώτου (N_2) ($\delta^{15}\text{N}$ 0‰). Αντίθετα, εάν ένα φυτό ανίκανο να αζωτοδεσμεύσει, αναπτύσσεται σε έδαφος το οποίο περιέχει ανόργανο άζωτο, η τιμή του $\delta^{15}\text{N}$ θα πρέπει να είναι παρόμοια με αυτή του εδαφικού ανόργανου αζώτου, που προσλήφθηκε από το φυτό.

Από την άλλη πλευρά, σε περίπτωση που ένα ψυχανθές, με σχηματιζόμενα φυμάτια, χρησιμοποιεί για να αναπτυχθεί τον συνδυασμό του ατμοσφαιρικού N_2 , μαζί με το ανόργανο εδαφικό άζωτο, η τιμή του $\delta^{15}\text{N}$ αναμένεται να είναι ανάμεσα στις τιμές των δύο πηγών του αζώτου (έδαφος και ατμοσφαιρικό N_2). Για να αποφευχθούν τεχνικές δυσκολίες που προκύπτουν κατά τον προσδιορισμό του $\delta^{15}\text{N}$ σε δείγματα εδάφους, αντί για το $\delta^{15}\text{N}$ του εδαφικού N προσδιορίζεται το $\delta^{15}\text{N}$ στο N των φυτών αναφοράς, θεωρώντας ότι το $\delta^{15}\text{N}$ στο έδαφος και το φυτό είναι ταυτόσημο αφού το φυτό τρέφεται μόνο με εδαφικό N. Τα φυτά αναφοράς θα πρέπει να έχουν πάντα παρόμοιο βιολογικό κύκλο με το υπό μελέτη ψυχανθές. Συχνά μάλιστα, επιλέγονται να χρησιμοποιηθούν ως φυτά αναφοράς αυτοφυή ζιζάνια που αναπτύσσονται στα πειραματικά υποτεμάχια, όπως στην περίπτωση του 2^{ου} πειράματος αγρού (έτος 2012), που χρησιμοποιήθηκαν βλήτα ως φυτά αναφοράς. Αντίθετα, στο πείραμα θερμοκηπίου αναρριχώμενου

φασολιού επιλέχθηκε το αγγούρι ως φυτό αναφοράς. Τα φυτά αναφοράς πρέπει να συλλέγονται πάντα στο ίδιο στάδιο που συλλέγονται και τα ψυχανθή.

Σ' αυτήν την περίπτωση, το ποσοστό αζώτου που προέρχεται από την ατμόσφαιρα (%Ndfa) υπολογίζεται από την παρακάτω εξίσωση **(1)**. Στην εξίσωση αυτή, ο παράγοντας 'B' είναι το $\delta^{15}\text{N}$ που παρουσιάζει το υπέργειο τμήμα ψυχανθών, η ανάπτυξη των οποίων εξαρτάται μόνο από την αζωτοδέσμευση, χωρίς καμία πρόσθετη πηγή αζώτου.

Για τον προσδιορισμό της τιμής 'B' θα πρέπει να διεξαχθεί μία πειραματική δοκιμή σε θερμοκήπιο, όπου τα φυτά αναπτύσσονται σε αδρανές υπόστρωμα, χωρίς αζωτούχα λίπανση. Εκτός από την εγκατάσταση υδροπονικού συστήματος με χρήση αδρανών υποστρωμάτων, όπως ελαφρόπετρας και περλίτη, συχνά χρησιμοποιούνται γλάστρες με αποστειρωμένη άμμο. Σε κάθε περίπτωση το υπόστρωμα δεν πρέπει να περιέχει καμία πηγή αζώτου. Τα φυτά θα πρέπει να εμβολιαστούν με το ίδιο στέλεχος που δοκιμάζεται και στο πείραμα αγρού. Σε περίπτωση που η τιμή 'B' που προκύπτει από την πειραματική δοκιμή του θερμοκηπίου δεν είναι λογική για να χρησιμοποιηθεί στο πείραμα του αγρού, θα μπορούσε να γίνει χρήση μίας τιμής 'B' από την βιβλιογραφία.

$$\%Ndfa = \frac{\delta^{15}\text{N φυτού αναφοράς} - \delta^{15}\text{N of } N_2\text{-ψυχανθές}}{\delta^{15}\text{N φυτού αναφοράς} - B} \times 100 \quad (1)$$

Οι τιμές $\delta^{15}\text{N}$ για τα ψυχανθή και φυτά αναφοράς προκύπτουν με την χρήση φασματοφωτομετρίας μάζας, όπως αυτή περιγράφεται στην Ενότητα 2.5.4.

2.5.3 Προσδιορισμός θρεπτικών στοιχείων (K, P, Na, Mn, Zn, Fe Cu) σε φυτικούς ιστούς

2.5.3.1 Προετοιμασία δειγμάτων φυτικών ιστών προς ανάλυση

Για τον προσδιορισμό θρεπτικών στοιχείων σε φυτικούς ιστούς φασολιού λαμβάνονταν δείγματα του υπέργειου μέρους των φυτών φασολιού σε διαφορετικές χρονικές στιγμές, κατά τη διάρκεια των πειραμάτων. Τα δείγματα του υπέργειου μέρους φυτών φασολιού αποτελούνταν από φύλλα, βλαστούς, καθώς και πράσινους λοβούς ανάλογα το στάδιο ανάπτυξης τους. Η προετοιμασία στην οποία υποβλήθηκαν τα δείγματα φυτικών ιστών προς ανάλυση για τον προσδιορισμό θρεπτικών στοιχείων ήταν για όλα η ίδια ανεξαρτήτως του θρεπτικού στοιχείου που επιθυμούσαμε να προσδιορίσουμε.

Συγκεκριμένα, μετά τη συλλογή των δειγμάτων, ακολούθησε ο προσδιορισμός και η καταγραφή του νωπού τους βάρους, σε ζυγαριά ακριβείας. Έπειτα, από ξήρανση των δειγμάτων στους 65 °C και μέχρι να αποκτήσουν σταθερό βάρος προσδιορίστηκε και το ξηρό βάρος τους. Εν συνεχεία, τα αποξηραμένα πλέον δείγματα των φυτικών ιστών αλέθονταν σε μύλο άλεσης (Wiley). Μετά την άλεση τους τα κονιοποιημένα δείγματα φυτικών ιστών αποθηκεύονταν σε ξηρό περιβάλλον μέχρι να πραγματοποιηθεί η χημική ανάλυση. Πριν την ανάλυση, τα δείγματα τοποθετούνταν ξανά στο φούρνο ξήρανσης στους 65 °C για 24 ώρες ώστε να απομακρυνθεί, τυχόν, υγρασία. Κατόπιν, λαμβανόταν ποσότητα 0,5 g. κονιορτοποιημένου ιστού από κάθε δείγμα, σε κάψες πορσελάνης, για αποτέφρωση σε κλίβανο στους 550 °C για 5 ώρες. Τα δείγματα αφήνονταν να κρυώσουν και μετά την προσθήκη διαλύματος πυκνού υδροχλωρικού οξέος (HCl 1N) ακολούθησε η διήθηση του διαλύματος χρησιμοποιώντας διηθητικό χαρτί (Whatman No 1) με προσθήκη απιονισμένου νερού μέχρι όγκου 100 mL. Το τελικό διάλυμα όγκου 100 mL που προέκυπτε χρησιμοποιήθηκε για τον προσδιορισμό των συγκεντρώσεων όλων των θρεπτικών στοιχείων που αναφέρονται παραπάνω (P και μεταλλικά κατιόντα).

2.5.3.2 Εργαστηριακή ανάλυση δειγμάτων

Ο προσδιορισμός των κατιόντων K και Na πραγματοποιήθηκε με την χρήση φλογοφωτόμετρου (Sherwood, Flame Photometer 410). Για τον προσδιορισμό της συγκέντρωσης K στους φυτικούς ιστούς απαιτήθηκε αραίωση των δειγμάτων σε αναλογία 1:100. Όσον αφορά τον χρωματομετρικό προσδιορισμό του ολικού φωσφόρου (P) σε φυτικούς ιστούς εφαρμόστηκε η μέθοδος του κυανού φωσφομολυβδαινικού συμπλόκου κατά Eaton et al. (1995) με χρήση φασματοφωτόμετρου (Perkin-Elmer Lambda 1A) σε μήκος κύματος 880 nm. Ο

προσδιορισμός των μακροστοιχείων Ca, Mg αλλά και των ιχνοστοιχείων Mn, Zn, Fe και Cu πραγματοποιήθηκε με την χρήση φασματοφωτόμετρου ατομικής απορρόφησης (Perkin Elmer 1100B). Για τις συγκεντρώσεις Ca και Mg απαιτήθηκε αραίωση των αρχικών δειγμάτων σε αναλογία 1:100.

2.5.4 Προσδιορισμός αζώτου (N) και άνθρακα (C) σε φυτικούς ιστούς και έδαφος

2.5.4.1 Προετοιμασία δειγμάτων φυτικών ιστών και εδάφους προς εργαστηριακή ανάλυση

Η διαδικασία προετοιμασίας των δειγμάτων φυτικών ιστών για τον προσδιορισμό αζώτου και άνθρακα που ακολουθήθηκε είναι ίδια με την διαδικασία που περιγράφηκε στην ενότητα 2.5.3.1 μέχρι το στάδιο από το οποίο λαμβάνουμε τον κονιοτοποιημένο ιστό που έχει ομογενοποιηθεί.

Όσον αφορά τα δείγματα εδάφους, λαμβάνονταν κατά την διάρκεια των πειραμάτων αγρού και σε βάθος 0-30 cm χρησιμοποιώντας ένα μεταλλικό δειγματολήπτη εδάφους. Μετά τη συλλογή τους τα εδαφικά δείγματα αναμίχθηκαν προσεκτικά και με τη χρήση κόσκινου διαμέτρου 2 mm ελήφθησαν αντιπροσωπευτικά αντιδείγματα εδάφους, απομακρύνοντας τυχόν πέτρες και φυτικούς ιστούς. Τα αντιδείγματα αυτά υπέστησαν ξήρανση στους 65 °C μέχρις ότου να αποκτήσουν σταθερό βάρος.

Σε επόμενο βήμα τα δείγματα (φυτικών ιστών και εδάφους) τοποθετούνταν μέσα σε ειδικές κάψουλες τύπου (#SC0010 (x500) SerCon Ltd, Crewe UK; www.swercongroup.com). Η κάθε κάψουλα διπλωνόταν με τέτοιο τρόπο ώστε να σχηματιστεί ένα σωληνοειδές ρολό και εξασφαλίζοντας ότι το ρολό αυτό δεν έχει καμία αιχμηρή άκρη, η οποία θα μπορούσε να πιαστεί στο μηχανισμό παράδοσης και να εμποδίσει την ανάλυση του δείγματος. Το βάρος κάθε δείγματος αλεσμένου φυτικού ιστού κυμαινόταν από 0.3 - 0.4 mg, ενώ για τα δείγματα εδάφους το βάρος θα έπρεπε να κυμαίνεται από 0.5 - 0.8 mg δείγματος σε ζυγαριά ακριβείας με 4 ή και περισσότερα δεκαδικά ψηφία. Ακολούθησε η καταγραφή του βάρους των δειγμάτων και έπειτα τα δείγματα τοποθετήθηκαν για ανάλυση ακολουθώντας την μέθοδο Dumas σύμφωνα με τους Nelson and Sommers (1996) σε φασματογράφο μάζας (Carbo Erba NA 1500 elemental analyzer, Erba Science, UK).

2.5.5 Προσδιορισμός διαθέσιμου νιτρικού (NO₃-N) και αμμωνιακού αζώτου (NH₄-N) στο έδαφος

Για τον προσδιορισμό εδαφικών συγκεντρώσεων NO₃-N και NH₄-N 10 g κοσκινισμένου δείγματος εδάφους προστίθεντο σε κωνικές φιάλες των 250 mL μαζί με 50 mL KCl συγκέντρωσης 1M, επαναλαμβανόμενο δύο φορές για κάθε δείγμα. Έπειτα οι φιάλες τοποθετούνταν σε έναν ανακινητήρα για 1 ώρα. Μετά την ανακίνηση, ένα μέρος του διαλύματος μεταφερόταν σε σωλήνες μικροφυγοκέντρωσης και φυγοκεντρούνταν σε 4300 RPM για 10 min. Τα τελικά εκχυλίσματα τοποθετούνταν σε φιαλίδια σπινθηρισμού και πριν την ανάλυση τους αποθηκεύονταν στους -20°C. Οι συγκεντρώσεις NH₄-N και NO₃-N στα εκχυλίσματα των εδαφικών δειγμάτων αναλύθηκαν φωτομετρικά στα 640 nm με την μέθοδο της φαινόλης και στα 540 nm μετά την αναγωγή των νιτρικών σε νιτρώδη με χρήση στήλης καδμίου και τον σχηματισμό διαζωνιακής ένωσης, αντίστοιχα, χρησιμοποιώντας αυτόματο χημικό αναλυτή (SKALAR San++, BV, The Netherlands), όπως περιγράφεται από τους Eaton et al. (1995). Οι παραπάνω αναλύσεις πραγματοποιήθηκαν κατά την διάρκεια των δύο πειραμάτων αγρού τα έτη 2011 και 2012.

2.5.6 Προσδιορισμός νιτρικού (NO₃-N) και αμμωνιακού αζώτου (NH₄-N) σε υδατικά διαλύματα

Ο προσδιορισμός νιτρικού και αμμωνιακού αζώτου πραγματοποιήθηκε σε υδατικά διαλύματα ανακύκλωσης, κατά την διάρκεια του 2ου πειράματος θερμοκηπίου που διεξήχθη τον Μάρτιο 2013. Συγκεκριμένα, ο προσδιορισμός της συγκέντρωσης νιτρικού αζώτου (NO₃-N) στα θρεπτικά διαλύματα υδροπονίας πραγματοποιήθηκε μετά από αναγωγή των νιτρικών σε νιτρώδη με χρήση στήλης καδμίου, ενώ των αμμωνιακών (NH₄-N) με την μέθοδο της ινδοφαινόλης (Indophenol blue method).

2.5.6.1 Προσδιορισμός νιτρικού αζώτου (NO₃-N) σε θρεπτικά διαλύματα

Η μέθοδος που χρησιμοποιήθηκε για τον προσδιορισμό του NO₃⁻N είναι η μέθοδος των Illosvay- Cries, όπως αυτή περιγράφεται από τους Page et al. (1982). Η μέθοδος αυτή πραγματοποιήθηκε στα υδροπονικά διαλύματα ανακύκλωσης χωρίς προηγουμένως να χρειάζονται να υποστούν κάποια πρόσθετη προετοιμασία. Σύμφωνα με την μέθοδο, τα NO₃⁻ του διαλύματος προσδιορίζονται μετά την αναγωγή τους σε NO₂⁻ που πραγματοποιείται με την διέλευση τους από στήλη επιχαλκωμένου καδμίου παρουσία NH₄Cl. Στη συνέχεια προσδιορίζονται χρωματομετρικά, χρησιμοποιώντας ένα φασματοφωτόμετρο (Perkin-Elmer Lambda 1A) σε μήκος κύματος 540 nm.

2.5.6.2 Προσδιορισμός αμμωνιακού αζώτου (NH₄-N) σε θρεπτικά διαλύματα

Όπως ήδη αναφέρθηκε ο χρωματομετρικός προσδιορισμός του αμμωνιακού αζώτου (NH₄-N) σε υδροπονικά διαλύματα ανακύκλωσης προσδιορίστηκε με την μέθοδο του μπλε της ινδοφαινόλης, όπως αυτή περιγράφεται από τους Page et al. (1982). Η μέθοδος αυτή στηρίζεται στο γεγονός ότι η φαινόλη αντιδρά με το NH₃ παρουσία ενός οξειδωτικού μέσου και σχηματίζει χρωματισμένο σύμπλοκο κάτω από αλκαλικό pH. Η μέθοδος αυτή εφαρμόστηκε στα ίδια υδροπονικά διαλύματα ανακύκλωσης τα οποία χρησιμοποιήθηκαν και για τον προσδιορισμό του νιτρικού αζώτου. Ο προσδιορισμός της απορρόφησης έγινε με την χρήση φασματοφωτόμετρου (Perkin-Elmer Lambda 1A) σε μήκος κύματος 636 nm.

2.5.7 Απομόνωση και ταυτοποίηση ριζοβίων από φυμάτια ριζών

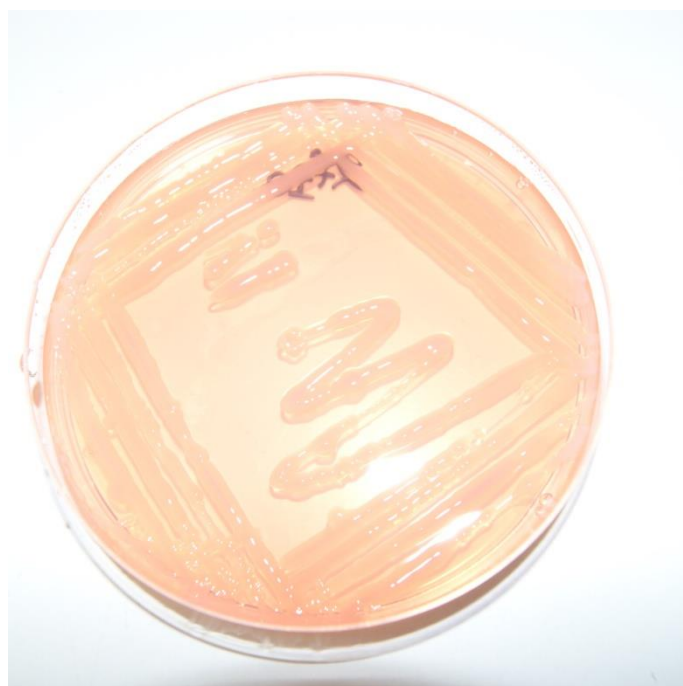
2.5.7.1 Συνθήκες καλλιέργειας

Κατά τη διάρκεια των πειραμάτων αγρού αλλά και θερμοκηπίου πραγματοποιήθηκε συλλογή φυματίων από τις ρίζες φυτών φασολιού. Τα φυμάτια, τα οποία επιλέχθηκαν και απομακρύνθηκαν από νωπές και καλά πλυμένες ρίζες φυτών, ήταν όλα υγιή και χρώματος ροζ. Τα επιλεγμένα φυμάτια τοποθετήθηκαν σε σωλήνες μικροφυγοκέντρωσης, προτού παγώσουν σε υγρό άζωτο και αποθηκευτούν σε θάλαμο θερμοκρασίας -80 °C, μέχρις ότου να αναλυθούν. Θα πρέπει να επισημανθεί ότι όλοι οι χειρισμοί πραγματοποιήθηκαν κάτω από ασηπτικές συνθήκες, σε αποστειρωμένο θάλαμο νηματικής ροής. Η απομόνωση και ταυτοποίηση ριζοβίων από φυμάτια ριζών πραγματοποιήθηκε στο εργαστήριο Ecological Sciences του James Hutton Institute της Σκωτίας.

Προτού ξεκινήσει η διαδικασία απομόνωσης ριζοβίων, από παγωμένα πλέον φυμάτια, τα φυμάτια αποστειρωθήκαν εξωτερικά με την εμβάπτιση τους αρχικά σε υποχλωριώδες νάτριο (2.5% [v/v] NaClO) για 30 δευτερόλεπτα και έπειτα με 3 φορές ξέπλυμα σε αποστειρωμένο και απεσταγμένο νερό. Το κάθε φυμάτιο τοποθετήθηκε σε τρυβλίο Petri, το οποίο περιείχε αποστειρωμένο θρεπτικό υπόστρωμα ζύμης με μαννιτόλη, άγαρ (YM; 54.89 mM μαννιτόλη; 2.87 mM K₂HPO₄; 0.81 mM MgSO₄; 1.71 mM NaCl; εκχύλισμα ζύμης, 0.5 g L⁻¹; Vincent, 1970) και ερυθρή χρωστική του Κονγκό σε τελική συγκέντρωση 0.0025% (w/v). Έπειτα, το φυμάτιο συνθλίφθηκε χρησιμοποιώντας μια αποστειρωμένη λαβίδα και το υγρό του φυματίου που ξεχύθηκε διασκορπίστηκε πάνω στο θρεπτικό υλικό με τη βοήθεια μίας γυάλινης αποστειρωμένης σπάτουλας (τεχνική της επιφανειακής επίστρωσης). Τα τρυβλία τοποθετήθηκαν προς

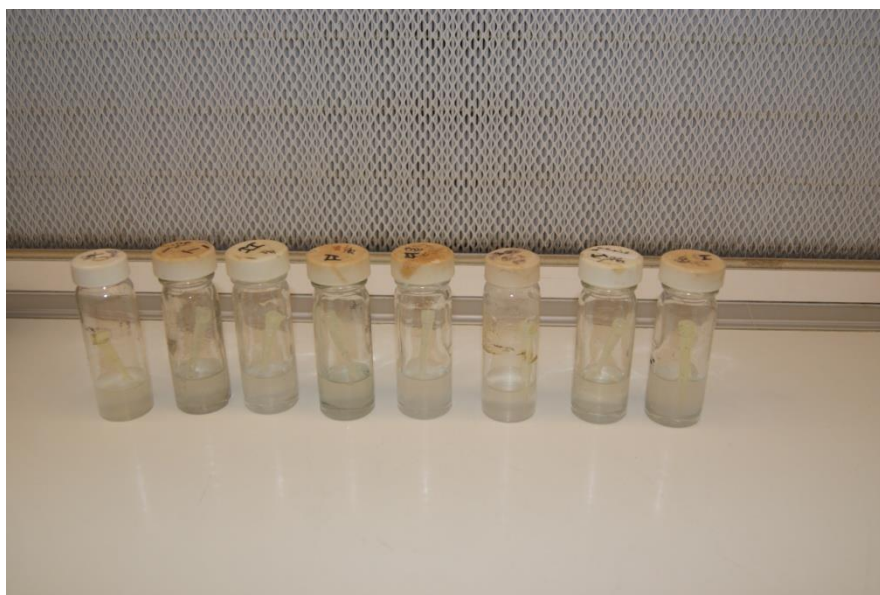
επώαση αναποδογυρισμένα (η πλευρά με το άγαρ προς τα πάνω) στους 28 °C για 24-48 ώρες ή μέχρις ότου οι αναπτυσσόμενες αποικίες να είναι ορατές.

Για να επιτευχθεί η καθαρότητα των αποικιών, αφού προηγουμένως ελέγχθηκε η ανάπτυξη τους, επιλέχθηκαν μεμονωμένες αποικίες και απομονώθηκαν ξανά πραγματοποιώντας γραμμική επίστρωση πάνω σε τρυβλίο με θρεπτικό υπόστρωμα ζύμης μαννιτόλης και άγαρ και τοποθετήθηκαν ανεστραμμένα για επώαση 24-48 ώρες, στους 28 °C. Αποφεύχθηκαν αποικίες σκούρου κόκκινου χρώματος και αυτές που εμφανίζονταν να είναι ξηρές και μολυσμένες, αλλά προτιμήθηκαν αποικίες άσπρες/χλωμές και κολλώδεις για περαιτέρω ανάπτυξη (Εικόνα 10).



Εικόνα 10: Αναπτυσσόμενες υγιείς αποικίες σε θρεπτικό υπόστρωμα μαννιτόλης και άγαρ.

Τα απομονωμένα βακτήρια φυματίων αναπτύχθηκαν σε γυάλινα φιαλίδια των 25 mL που περιείχαν 3 mL θρεπτικού μέσου ανάπτυξης τρυπτόνης- ζύμης (TY; τρυπτόνη, 5 g L⁻¹; εκχύλισμα ζύμης, 3 g L⁻¹; 6.05 mM CaCl₂·2H₂O; pH 6.8; (Beringer, 1974) (Εικόνα 11). Για να μπορέσουν να αποθηκευτούν για μεγάλο χρονικό διάστημα τα απομονωμένα βακτήρια φυματίων αναμίχθηκαν σε ίσο όγκο (0.75 ml) με 50% (v/v) αποστειρωμένη γλυκερόλη σε αποστειρωμένους σωλήνες μικροφυγοκέντρησης. Έπειτα, προτού αποθηκευτούν στους -80 °C τοποθετήθηκαν σε υγρό άζωτο για να ψυχθούν στιγμιαία.



Εικόνα 11: Ανάπτυξη απομονωμένων βακτηρίων από φυμάτια σε γυάλινα φιαλίδια με τρυπτόνη ως θρεπτικό μέσο ανάπτυξης.

Για να μπορέσουμε να ανακαλλιέργησουμε τα απομονωμένα βακτήρια, μεταφέρθηκαν από τους $-80\text{ }^{\circ}\text{C}$ αποθήκευσης σε πάγο. Έπειτα, ζύνοντας προσεκτικά το παγωμένο απόθεμα καταφέραμε να αφαιρέσουμε μικρό όγκο του, ο οποίος χρησιμοποιήθηκε για να μολύνει τρυβλίο με θρεπτικό μέσο ανάπτυξης YMB-CR άγαρ. Μετά από 24-48 ώρες επώαση, μεμονωμένη αποικία επιλέχθηκε για να μολύνει υγρή καλλιέργεια TY ή YMB broth, ή οποία τοποθετήθηκε για επώαση σε περιστροφικό αναδευτήρα όχι για παραπάνω από 24 ώρες. Συνολικά συλλέχθηκαν από τα 4 mL των υγρών καλλιεργειών, οι οποίες βρίσκονταν σε λογαριθμική φάση, 2 mL με φυγοκέντρηση και τοποθετήθηκαν σε σωλήνα μικροφυγοκέντρησης χωρητικότητας 2 mL, με το υπερκείμενο υγρό να αφαιρείται έπειτα από κάθε φυγοκέντρηση. Τα ιζήματα των βακτηρίων αποθηκεύτηκαν σε θερμοκρασία -20°C μέχρι να γίνει η εκχύλιση του DNA.

2.5.7.2 Απομόνωση DNA

Τα ιζήματα επαναδιαλύονται σε 0.4 mL αποστειρωμένου ρυθμιστικού διαλύματος (10 mM Tris-Cl pH 8,1 mM EDTA). Κατόπιν, προστίθεται διάλυμα λύσης κυττάρων 20 % w/v θειικού δωδεκυλικού νατρίου (SDS; τελικής συγκέντρωσης 0.5 % w/v.). Ακολουθεί καλή ανάδευση των δειγμάτων και προσθήκη πρωτεϊνάσης K ($>800\text{ u mL}^{-1}$) (Sigma #P4850). Τα δείγματα τοποθετήθηκαν για επώαση στους $37\text{ }^{\circ}\text{C}$ για 1 ώρα. Έπειτα προστέθηκε διάλυμα φενόλης: χλωροφορμίου: ισοαμυλικής αλκοόλης (25:24:1 % w/v; Sigma #P2069) και αφού τα δείγματα ανακινήθηκαν για 1 λεπτό, τοποθετήθηκαν στη φυγόκεντρο. Η υγρή φάση (200 μL) αφαιρέθηκε και τοποθετήθηκε σε αποστειρωμένο σωλήνα μικροφυγοκέντρησης χωρητικότητας 1.5 mL μαζί με 10% w/v

3M οξικό νάτριο (NaOAc; pH 5.2) και ισοπροπανόλη (Sigma #I9030). Η καθίζηση του DNA πραγματοποιήθηκε με επώαση στους -80 °C για 15 λεπτά ή στους -20°C κατά την διάρκεια της νύχτας.

Το DNA φυγοκεντρήθηκε ξανά και δημιουργήθηκε ίζημα, έπειτα ξεπλύθηκε με 200 μl 70% w/v αιθανόλης και φυγοκεντρήθηκε για 2 λεπτά. Το υπερκείμενο αφαιρέθηκε με εισπνοή και οι σωλήνες τοποθετήθηκαν σε φούρνο ξήρανσης θερμοκρασίας 37 °C για 15 λεπτά, προκειμένου να αφαιρεθεί και το υπόλοιπο υγρό. Τα ιζήματα του DNA επαναδιαλύθηκαν σε 27 mL ρυθμιστικού διαλύματος TE. Μετά την εκχύλιση του DNA, απομακρύνθηκαν 2 μL DNA για να προσδιοριστεί η συγκέντρωση και η καθαρότητα του χρησιμοποιώντας σπεκτροφωτόμετρο ND-1000 (NanoDrop Technologies, Inc., Wilmington, US). Όλες οι φυγοκεντρήσεις πραγματοποιήθηκαν στις 14,000 στροφές/λεπτό και σε θερμοκρασία 4°C.

2.5.7.3 Αλυσιδωτή Αντίδραση της Πολυμεράσης (Polymerase Chain Reaction, PCR)

Για την αντίδραση αυτή χρησιμοποιήθηκαν μόρια εκκινητές που θεωρούνται ότι παρέχουν εξειδίκευση σε επίπεδο γένους για τα ριζόβια. Για κάθε απομονωμένο βακτήριο φυματίου χρησιμοποιήθηκε ο εκκινητής ευθείας κατεύθυνσης (forward) Bac27F, καθώς και ο εκκινητής αντίστροφης κατεύθυνσης (reverse) Univ1492R για να επιτύχουμε την αναδίπλωση του 16S ριβοσωμικού RNA (rRNA) γονιδίου. Ο συνολικός όγκος του μείγματος κάθε αντίδρασης ήταν 50 μl και προετοιμάστηκε σύμφωνα με τις οδηγίες των κατασκευαστών (5x ρυθμιστικό διάλυμα που περιείχε MgCl₂ τελικής συγκέντρωσης 7.5 mM, 25 mM από κάθε τριφωσφορικό δεοξυριβονουκλεοτίδιο (dNTP's), 10μM από κάθε εκκινητή που χρησιμοποιήθηκε και 1.25 U GoTaq DNA πολυμεράση, Promega #M3175).

Στις θέσεις των DNA δειγμάτων τοποθετήθηκαν αρνητικοί μάρτυρες, οι οποίοι περιείχαν αποστειρωμένο και απεσταγμένο νερό, αλλά και θετικοί μάρτυρες με DNA, το οποίο είχε απομονωθεί από το στέλεχος ριζοβίου 3841 (*Rhizobium leguminosarum* bv. *viciae*, *Rlv*, strain 3841) (Beringer, 1974; Glenn et al., 1980; Johnston and Beringer, 1975; Young et al., 2006). Οι θερμοκυκλοποιητικές συνθήκες εκτέλεσης της αλυσιδωτής αντίδρασης ήταν αρχικά αποδιάταξη στους 95°C για 2 λεπτά και έπειτα ακολούθησαν 35 κύκλοι με τις εξής συνθήκες: α) 94 °C 30 sec, β) 52 °C 1 λεπτό, γ) 72 °C 1 λεπτό και δ) επιμήκυνση στους 72 °C για 5 λεπτά. Η αλυσιδωτή αντίδραση της πολυμεράσης πραγματοποιήθηκε σε θερμικό κυκλοποιητή G-Storm GS1 (GRI Ltd, Braintree, UK).

Πίνακας 5: Αλληλουχίες των εκκινητών που χρησιμοποιήθηκαν για την αλυσιδωτή αντίδραση της πολυμεράσης.

<i>Αλληλουχία Εκκινητών</i>		
Bac27F (Forward primer)	5'-AGAGTTTGGATCMTGGCTCAG-3'	Lane, 1991
Univ1492R (Reverse primer)	5'-CGGTTACCTTGTTACGACTT-3'	Jiang et al., 2006

2.5.7.4 Ηλεκτροφόρηση DNA σε πηκτική αγαρόζης

Τα προϊόντα της αλυσιδωτής αντίδρασης της πολυμεράσης (5 µL δείγματος) διαχωρίστηκαν με ηλεκτροφόρηση (80 mV, 30 λεπτά #E844 Consort Electrophoresis Power Supply; Sigma-Aldrich) σε πήκτωμα αγαρόζης 2% (w/v) και έγιναν ορατά κάτω από υπεριώδη ακτινοβολία (FluorChem® Imager, Alpha Innotech) μετά από χρώση με SYBR-Green. Ο υπολογισμός του μεγέθους των προϊόντων ενίσχυσης πραγματοποιήθηκε μετά από σύγκριση με μάρτυρες της κλίμακας 100 bp και 1 kb. Ο καθαρισμός των προϊόντων ενίσχυσης (~1,400bp) έγινε με τη χρήση στηλών φυγοκέντρησης (QIAquick Spin columns, Qiagen, Inc., Chatsworth, Calif.) σύμφωνα με τις οδηγίες της κατασκευάστριας εταιρείας και η αλληλούχιση πραγματοποιήθηκε με την χρήση ABI3730 DNA αναλυτή. Ο εκκινητής αλληλουχίας που χρησιμοποιήθηκε ήταν 519R (5'- GWATTACCGCGGCKGCTG -3') (Lane et al., 1985). Τα αποτελέσματα της αλληλούχισης αναλύθηκαν με το λογισμικό BioEdit Sequence Alignment Editor έκδοσης 7.2 και συγκρίθηκαν με διαθέσιμες ακολουθίες της βάσης δεδομένων του NCBI χρησιμοποιώντας την μηχανή αναζήτησης BLASTN (Basic Local Alignment Tool, Altschul et al., 1997).

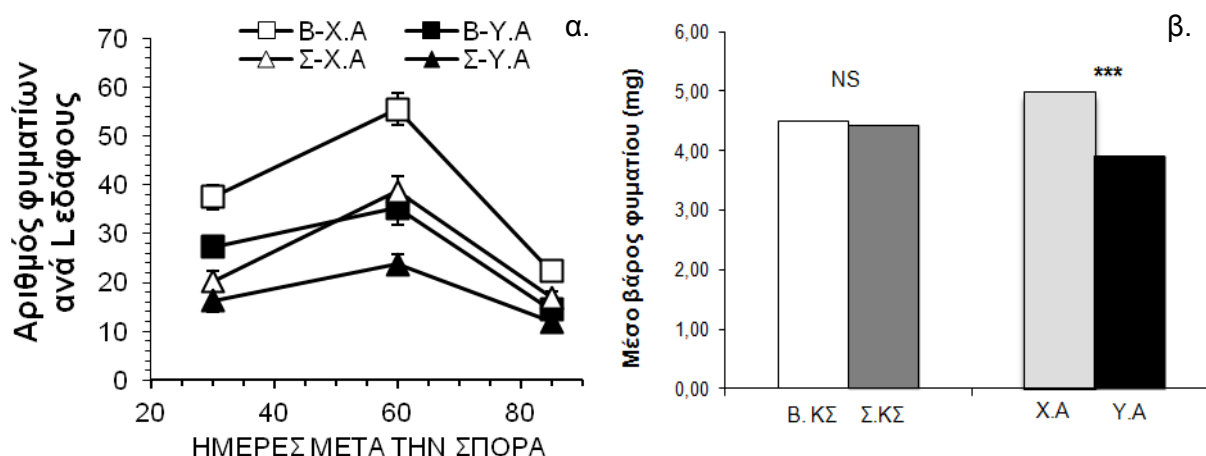
Κεφάλαιο 3

Αποτελέσματα

3.1 Πείραμα Αγρού (1^ο)

3.1.1 Σχηματισμός φυματίων

Στο Σχήμα 9α παρατηρείται ότι τόσο το συμβατικό σύστημα καλλιέργειας όσο και η αλατότητα του νερού άρδευσης μείωσαν σημαντικά τον αριθμό των φυματίων στις ρίζες των φυτών φασολιού σε όλες τις δειγματοληψίες. Οι διαφορές όμως ήταν εντονότερες ($P=0,001$) στα δείγματα που συλλέχθηκαν στο πρώιμο στάδιο γεμίσματος λοβών (65 ΗΜΣ). Στις 65 ΗΜΣ υπήρχαν κατά μέσο όρο 45 ριζικά φυμάτια ανά λίτρο εδάφους στο βιολογικό σύστημα καλλιέργειας το οποίο είχε εμβολιασθεί με εμπορικό σκεύασμα αζωτοβακτηρίων, σε σύγκριση με 31 φυμάτια ανά λίτρο εδάφους στο συμβατικό σύστημα.



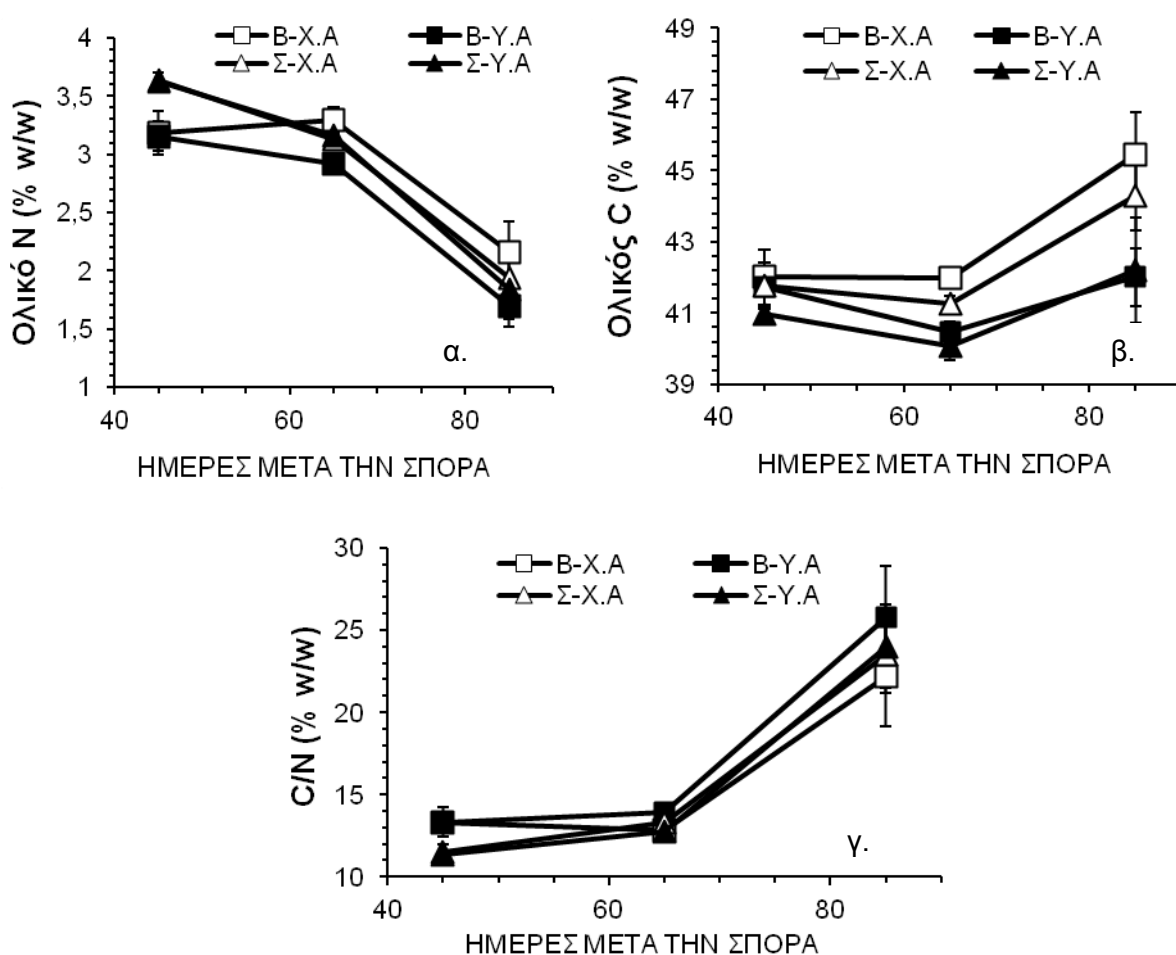
Σχήμα 9 α,β: Επίδραση του καλλιεργητικού συστήματος (ΚΣ) (συμβατικό: Σ; βιολογικό: Β) και της αλατότητας του νερού άρδευσης (χαμηλή αλατότητα: Χ.Α; υψηλή αλατότητα: Υ.Α) στον συνολικό αριθμό ριζικών φυματίων ανά λίτρο (L) εδάφους και στο μέσο βάρος φυματίου (mg) 60 ημέρες μετά την σπορά, σε καλλιέργεια φασολιού (άνοιξη - καλοκαίρι 2011). Οι κάθετες μπάρες απεικονίζουν τα τυπικά σφάλματα των μέσων ($n=4$). Τα επίπεδα σημαντικότητας παρουσιάζονται με (*) για $P \leq 0,05$ και (***) για $P \leq 0,001$; NS υποδηλώνει μη σημαντικές διαφορές.

Όσον αφορά τον παράγοντα της αλατότητας, η επίδρασή του στο συνολικό αριθμό των ριζικών φυματίων ήταν σημαντική σε όλες τις δειγματοληψίες, με πιο έντονη επίδραση στις 65 ΗΜΣ (47 φυμάτια ανά λίτρο εδάφους, όταν το νερό άρδευσης περιείχε 0,5 mM NaCl σε σύγκριση με 29 φυμάτια ανά λίτρο εδάφους σε 10 mM NaCl ($P=0,0001$). Δεν βρέθηκε αλληλεπίδραση μεταξύ του καλλιεργητικού συστήματος και της αλατότητας σε καμία δειγματοληψία. Το μέσο βάρος φυματίου, που προσδιορίστηκε

στην δεύτερη δειγματοληψία, δεν επηρεάστηκε από το καλλιεργητικό σύστημα αλλά μειώθηκε σημαντικά από την αλατότητα του νερού άρδευσης (5,0 mg όταν το νερό άρδευσης περιείχε 0,5 mM NaCl έναντι 3,9 mg στις επεμβάσεις με 10 mM NaCl, $P=0,0004$), χωρίς καμία αλληλεπίδραση μεταξύ των δύο παραγόντων του πειράματος (Σχ. 9β).

3.1.2 Ολικό άζωτο (N) και άνθρακας (C) των φυτικών ιστών

Η συγκέντρωση ολικού N στο υπέργειο τμήμα των φυτών φασολιού που καλλιεργούνταν συμβατικά ήταν σημαντικά υψηλότερη ($P=0,005$) 45 ΗΜΣ, σε σύγκριση με αυτή που μετρήθηκε στο υπέργειο τμήμα φυτών της βιολογικής καλλιέργειας (3,63% έναντι 3,17% σε ξηρό βάρος, αντίστοιχα). Αντίθετα, η συγκέντρωση ολικού C δεν επηρεάστηκε από το σύστημα καλλιέργειας (Σχ.10β).



Σχήμα 10 α,β,γ: Επίδραση του καλλιεργητικού συστήματος (ΚΣ) (συμβατικό: Σ; βιολογικό: Β) και της αλατότητας του νερού άρδευσης (χαμηλή αλατότητα: Χ.Α; υψηλή αλατότητα: Υ.Α) στις ολικές συγκεντρώσεις N και C καθώς και στον λόγο C/N στους φυτικούς ιστούς υπέργειο τμήματος φυτών φασολιού (άνοιξη - καλοκαίρι 2011). Οι κάθετες μπάρες απεικονίζουν τα τυπικά σφάλματα των μέσων ($n=4$).

Ως αποτέλεσμα, ο λόγος C/N στο υπέργειο τμήμα των φυτών ήταν σημαντικά υψηλότερος ($P=0,006$), όταν εφαρμόστηκαν πρακτικές βιολογικής καλλιέργειας (13,3 έναντι 11,4 σε ξηρό βάρος, αντίστοιχα). Ωστόσο, στο πρώιμο στάδιο γεμίσματος των λοβών (65 ΗΜΣ) και μέχρι το τέλος της καλλιεργητικής περιόδου (85 ΗΜΣ), οι συγκεντρώσεις του N και C, καθώς και ο λόγος C/N στο υπέργειο τμήμα των φυτών ήταν παρόμοια και για τα δύο καλλιεργητικά συστήματα.

Η αλατότητα του νερού άρδευσης μείωσε σημαντικά ($P=0,039$) την συγκέντρωση ολικού N στο υπέργειο τμήμα των φυτών από 3,21% σε 3,04% σε ξηρό βάρος στη δεύτερη δειγματοληψία (65 ΗΜΣ). Επιπλέον, η αλατότητα μείωσε σημαντικά τη συγκέντρωση ολικού C στο υπέργειο τμήμα των φυτών από 41,62% σε 40,27% ($P=0,0001$) στο ξηρό βάρος 65 ΗΜΣ και από 44,86% σε 42,11% ($P=0,024$) στο ξηρό βάρος 85 ΗΜΣ, χωρίς καμία αλληλεπίδραση με το καλλιεργητικό σύστημα. Επίσης, η αλατότητα δεν παρουσίασε καμία επίδραση στο λόγο C/N.

3.1.3 Συγκεντρώσεις καλίου (K) και νατρίου (Na) σε φυτικούς ιστούς νάνου φασολιού

Οι ξηροί φυτικοί ιστοί υπέργειου τμήματος δεν παρουσίασαν καμία διαφορά στις συγκεντρώσεις του K, ανάμεσα στα καλλιεργητικά συστήματα, την αλατότητα του νερού άρδευσης (21 mg g⁻¹, 16 mg g⁻¹ και 13 mg g⁻¹ μέσοι όροι όλων των μεταχειρίσεων στις τρεις δειγματοληψίες), σε καμία από τις τρεις δειγματοληψίες που προσδιορίστηκαν (45, 65 και 85 ΗΜΣ). Ομοίως η συγκέντρωση Na στους ξηρούς φυτικούς ιστούς που ανήκαν στην μεταχείριση της υψηλής αλατότητας του νερού άρδευσης δεν διέφεραν σε σύγκριση με αυτούς της χαμηλής αλατότητας (0,38 mg g⁻¹, 0,41 mg g⁻¹ και 0,71 mg g⁻¹ μέσοι όροι όλων των μεταχειρίσεων στις τρεις δειγματοληψίες).

3.1.4 Ολική βιομάζα και παραγωγή

Οι συμβατικές καλλιεργητικές πρακτικές οδήγησαν σε σημαντικά υψηλότερη ($P=0,013$) νωπή βιομάζα υπέργειου μέρους ($21,20 \text{ ton ha}^{-1}$) σε σχέση με το βιολογικό καλλιεργητικό σύστημα ($16,47 \text{ ton ha}^{-1}$) 45 ημέρες μετά τη σπορά (ΗΜΣ). Παρόμοια αποτελέσματα βρέθηκαν επίσης 65 ΗΜΣ, ενώ στην τελευταία δειγματοληψία (85 ΗΜΣ) δεν βρέθηκε καμία σημαντική διαφορά (Πίνακας 6). Η παρουσία 10 mM NaCl στο νερό άρδευσης μειώνει σημαντικά τη νωπή βιομάζα του υπέργειου μέρους στην 2^η και 3^η δειγματοληψία, σε σύγκριση με 0,50 mM NaCl ($21,09 \text{ ton ha}^{-1}$ έναντι $28,90 \text{ ton ha}^{-1}$ και $24,20 \text{ ton ha}^{-1}$ έναντι $31,92 \text{ ton ha}^{-1}$ 65 και 85 ΗΜΣ, αντίστοιχα). Δεν βρέθηκε καμία αλληλεπίδραση μεταξύ του καλλιεργητικού συστήματος και της αλατότητας του νερού άρδευσης. Όταν η βιομάζα υπέργειου τμήματος εκφράστηκε σε ξηρό βάρος, οι διαφορές μεταξύ των επεμβάσεων ήταν πολύ μικρότερες και μόνο το συμβατικό σύστημα καλλιέργειας παρουσίασε σημαντική αύξηση ($P=0,046$) στην πρώτη δειγματοληψία.

Πίνακας 6: Επίδραση του καλλιεργητικού συστήματος (ΚΣ) (συμβατικό: Σ; βιολογικό: Β) και αλατότητας του νερού άρδευσης (χαμηλή: Χ.Α.; υψηλή: Υ.Α) στην ολική νωπή και ξηρή βιομάζα υπέργειου μέρους φυτών φασολιού που καλλιεργήθηκαν άνοιξη – καλοκαίρι του 2011.

ΗΜΣ	Νωπή Βιομάζα (ton ha^{-1})			Ξηρή Βιομάζα (ton ha^{-1})		
	45	65	85	45	65	85
Σ-Χ.Α.	21,8±1,3	25,8±1,8	32,8±1,3	2,7±0,3	3,5±0,2	6,1±0,5
Σ-Υ.Α.	20,6±1,7	23,1±1,2	29,9±0,6	2,7±0,2	3,0±0,1	5,5±0,6
Β-Χ.Α.	17,7±1,7	22,6±0,8	31,1±2,6	2,4±0,2	3,6±0,6	5,9±0,4
Β-Υ.Α.	15,2±1,7	19,1±1,1	27,9±0,8	2,0±0,2	2,8±0,5	4,9±0,1
Στατιστική σημαντικότητα						
ΚΣ	*	*	NS	NS	NS	NS
A	NS	*	*	*	NS	NS
ΚΣ × A	NS	NS	NS	NS	NS	NS

^a Οι τιμές είναι μέσοι όροι τεσσάρων επαναλήψεων ± τυπικά σφάλματα.

^b Τα επίπεδα σημαντικότητας παρουσιάζονται με (*) για $P \leq 0,05$ και το NS υποδηλώνει μη σημαντικές διαφορές.

Η νωπή παραγωγή των πράσινων λοβών που συγκομίστηκαν σε όλη τη διάρκεια της καλλιεργητικής περιόδου μειώθηκε σημαντικά και από το βιολογικό σύστημα καλλιέργειας (-33,3%) αλλά και από το υψηλό επίπεδο αλατότητας στο νερό άρδευσης (-22,8%), χωρίς καμία αλληλεπίδραση μεταξύ του συστήματος καλλιέργειας και της αλατότητας (Πίνακας 7). Η μείωση της νωπής βιομάζας λοβών που παρατηρείται τόσο στο βιολογικό σύστημα καλλιέργειας όσο και στην αλατότητα οφείλεται σε χαμηλότερο αριθμό των λοβών ανά m², ενώ το μέσο βάρος λοβών δεν επηρεάστηκε ούτε από το σύστημα καλλιέργειας, ούτε από την αλατότητα (Πίνακας 7). Παρ' όλα αυτά, η περιεκτικότητα σε ξηρά ουσία (%) στους βιολογικούς πράσινους λοβούς φασολιών ήταν σημαντικά υψηλότερη (P=0,016) σε σχέση με τους λοβούς από το συμβατικό σύστημα καλλιέργειας (9,88% έναντι 7,20%, αντίστοιχα).

Πίνακας 7: Επίδραση του καλλιεργητικού συστήματος (ΚΣ) (συμβατικό: Σ; βιολογικό: Β) και της αλατότητας του νερού άρδευσης (χαμηλή: Χ.Α.; υψηλή: Υ.Α) στις παραμέτρους απόδοσης καλλιέργειας φασολιού (άνοιξη – καλοκαίρι 2011). Παρουσιάζονται δεδομένα για την απόδοση σε νωπό βάρος λοβών (NB, tn ha⁻¹) και ξηρό βάρος λοβών (ΞΒ, tn ha⁻¹), συνολικό αριθμό λοβών (λοβοί m⁻²), μέσο βάρος νωπού λοβού (Μ.Β. λοβού, g) και ποσοστό ξηράς ουσίας στο λοβό (% Ξ.Ο.).

Παράμετροι Απόδοσης					
Επέμβαση	Απόδοση (NB) (tn ha ⁻¹)	Απόδοση (ΞΒ) (tn ha ⁻¹)	Λοβοί (m ²)	Μ.Β. λοβού (g)	Ξ.Ο. %
Σ-Χ.Α.	61,05±6,67	4,15±0,4	865,4±83,3	7,03±0,2	6,82±0,2
Σ-Υ.Α.	48,89±3,59	3,68±0,2	763,4±58,5	6,41±0,2	7,57±0,2
Β-Χ.Α.	42,39±5,95	4,57±1,1	664,0±81,4	6,38±0,4	10,40±1,1
Β-Υ.Α.	30,99±3,35	2,97±0,5	450,1±35,4	6,88±0,6	9,35±0,5
Στατιστική σημαντικότητα					
ΚΣ	*	NS	*	NS	*
A	**	*	**	NS	NS
ΚΣ × A	NS	NS	NS	NS	NS

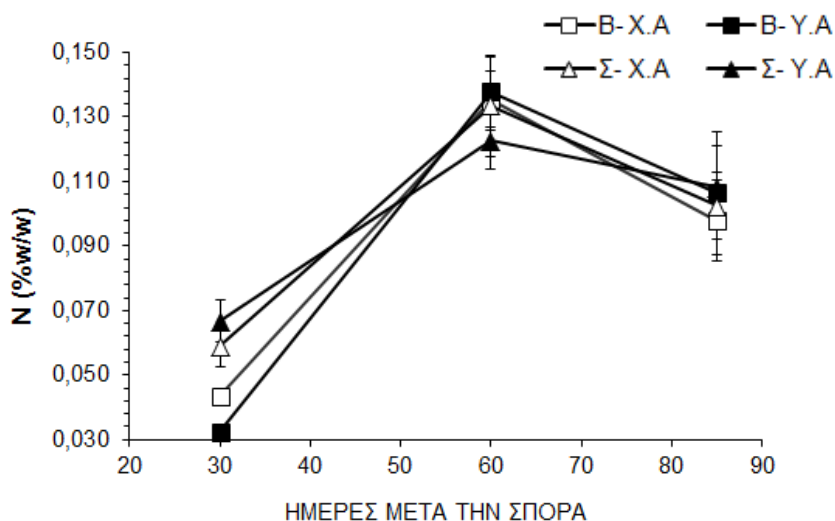
^a Οι τιμές είναι μέσοι όροι τεσσάρων επαναλήψεων ± τυπικά σφάλματα.

^b Τα επίπεδα σημαντικότητας παρουσιάζονται με (*) για P ≤ 0,05, (**) για P ≤ 0,01 και το NS υποδηλώνει μη σημαντικές διαφορές.

Ως αποτέλεσμα της αυξημένης περιεκτικότητας των λοβών από το βιολογικό σύστημα καλλιέργειας σε ξηρή ουσία, η συνολική ξηρή βιομάζα λοβών που συγκομίσθηκε ανά μονάδα καλλιεργούμενης επιφάνειας ήταν παρόμοια και στα δύο συστήματα καλλιέργειας. Η αλατότητα δεν είχε σημαντικό αντίκτυπο στην ξηρά ουσία των λοβών και επομένως και η συνολική ξηρή βιομάζα λοβών ήταν σημαντικά χαμηλότερη ($P=0,04$) όταν το νερό άρδευσης περιείχε 10 mM NaCl σε σύγκριση με 0,50 mM ($0,436 \text{ kg m}^{-2}$ έναντι $0,333 \text{ kg m}^{-2}$, αντίστοιχα) (Πίνακας 7).

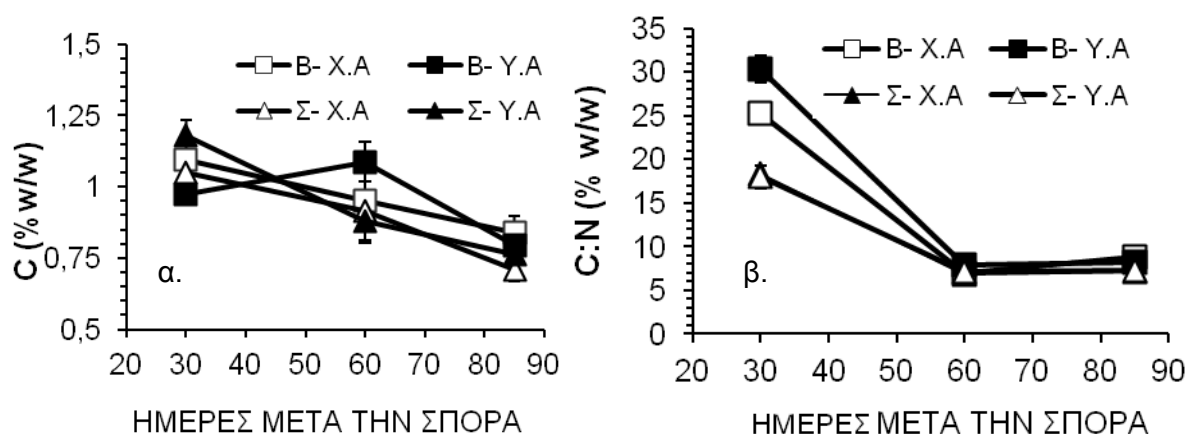
3.1.5 Εδαφικό ολικό άζωτο (N) και άνθρακας (C)

Κατά την πρώτη δειγματοληψία (30 ΗΜΣ), η συγκέντρωση του εδάφους σε ολικό N ήταν σημαντικά υψηλότερη ($P=0,010$) στα συμβατικά καλλιεργούμενα υποτεμάχια (0,063%), σε σχέση με εκείνα που εφαρμόστηκαν οι πρακτικές της βιολογικής γεωργίας (0,038%), ενώ 60 και 85 ΗΜΣ αυτές οι διαφορές εξαφανίστηκαν (Σχ. 11). Συνολικά, η συγκέντρωση του εδάφους σε ολικό N αυξήθηκε απότομα κατά το διάστημα μεταξύ 30 και 60 ΗΜΣ, αλλά έτεινε να μειωθεί ελαφρώς προς το τέλος της περιόδου συγκομιδής.



Σχήμα 11: Επίδραση του καλλιεργητικού συστήματος (ΚΣ) (συμβατικό: Σ; βιολογικό: Β) και της αλατότητας του νερού άρδευσης (χαμηλή αλατότητα: Χ.Α; υψηλή αλατότητα: Υ.Α) στην ολική συγκέντρωση N στο εδάφος σε καλλιέργεια φασολιού (άνοιξη - καλοκαίρι 2011). Οι κάθετες μπάρες απεικονίζουν τα τυπικά σφάλματα των μέσων ($n=4$).

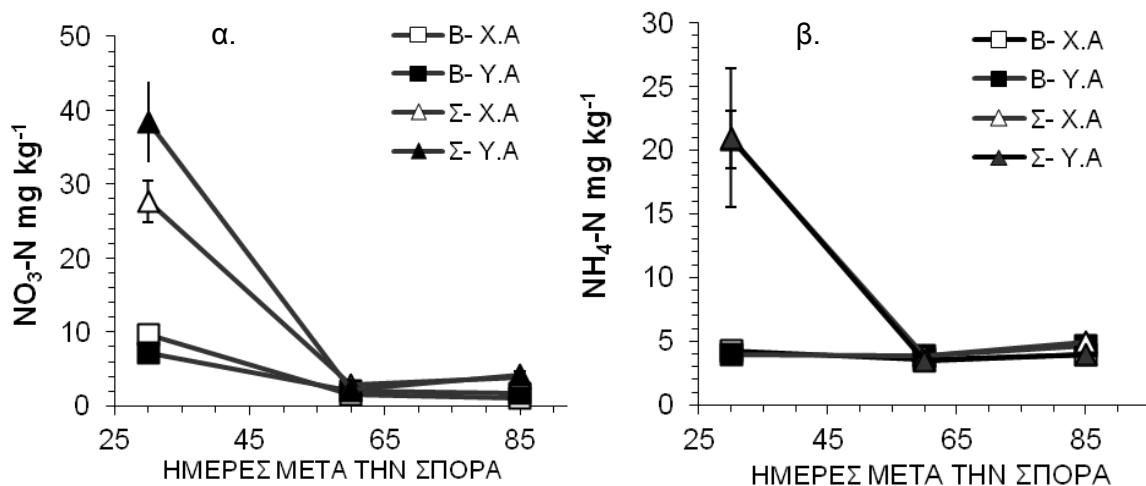
Η συγκέντρωση του εδάφους σε C ακολούθησε φθίνουσα πορεία κατά τη διάρκεια της καλλιεργητικής περιόδου σε όλες τις επεμβάσεις, αλλά δεν επηρεάστηκε σημαντικά είτε από το σύστημα καλλιέργειας είτε από την αλατότητα του νερού άρδευσης (Σχ. 12α). Ο λόγος C/N ήταν σημαντικά υψηλότερος στα βιολογικά υποτεμάχια σε σύγκριση με εκείνα στα οποία εφαρμόστηκε συμβατικό σύστημα καλλιέργειας, αλλά μόνο κατά την πρώτη (27,78 έναντι 18,21, αντίστοιχα; $P=0,003$) και την τρίτη δειγματοληψία (8,52 έναντι 7,23, αντίστοιχα; $P=0,033$). Επιπλέον, ο λόγος C/N μειώθηκε απότομα από την 30^η ημέρα έως την 60^η ημέρα μετά τη σπορά, αλλά έπειτα από 60 ημέρες μετά τη σπορά και έως το τέλος της καλλιεργητικής περιόδου παρέμεινε στα ίδια χαμηλά επίπεδα (Σχ. 12β). Η αλατότητα δεν είχε σημαντική επίπτωση στη συγκέντρωση εδαφικού ολικού N και C, ανεξάρτητα από το σύστημα καλλιέργειας. Ο λόγος C/N στο έδαφος δεν επηρεάστηκε από την αλατότητα στη δεύτερη και την τρίτη δειγματοληψία, ανεξάρτητα από το σύστημα καλλιέργειας. Αντίθετα, αυξήθηκε σημαντικά από την αλατότητα κατά την πρώτη δειγματοληψία, αλλά μόνο στο βιολογικό σύστημα καλλιέργειας (21,85 έως 24,65, $P=0,019$).



Σχήμα 12 α,β: Επίδραση του καλλιεργητικού συστήματος (ΚΣ) (συμβατικό: Σ; βιολογικό: Β) και της αλατότητας του νερού άρδευσης (χαμηλή αλατότητα: Χ.Α; υψηλή αλατότητα: Υ.Α) στην ολική συγκέντρωση C και στον λόγο C/N του εδάφους σε καλλιέργεια φασολιού (άνοιξη- καλοκαίρι 2011). Οι κάθετες μπάρες απεικονίζουν τα τυπικά σφάλματα των μέσων ($n=4$).

3.1.6 Εδαφικό ανόργανο άζωτο

Την 30^η ημέρα μετά τη σπορά, οι συγκεντρώσεις $\text{NH}_4\text{-N}$ στο έδαφος ήταν σημαντικά υψηλότερες ($P=0,0007$) στα υποτεμάχια του συμβατικού καλλιεργητικού συστήματος ($20,88 \text{ mg kg}^{-1}$) σε σχέση με αυτά που καλλιεργήθηκαν ακολουθώντας τις πρακτικές της βιολογικής γεωργίας ($4,10 \text{ mg kg}^{-1}$), χωρίς καμία αλληλεπίδραση μεταξύ του συστήματος καλλιέργειας και της αλατότητας (Σχ. 13β).



Σχήμα 13 α,β: Επίδραση του καλλιεργητικού συστήματος (ΚΣ) (συμβατικό: Σ; βιολογικό: Β) και της αλατότητας του νερού άρδευσης (χαμηλή αλατότητα: Χ.Α; υψηλή αλατότητα: Υ.Α) στις συγκεντρώσεις (α) NO₃-N και (β) NH₄-N του εδάφους σε καλλιέργεια φασολιού (άνοιξη- καλοκαίρι 2011). Οι κάθετες μπάρες απεικονίζουν τα τυπικά σφάλματα των μέσων (n=4).

Στην ίδια δειγματοληψία (30 ΗΜΣ), οι συγκεντρώσεις NO₃-N στο έδαφος ήταν επίσης πολύ υψηλότερες όταν εφαρμόστηκε το συμβατικό σύστημα καλλιέργειας, σε σχέση με το βιολογικό (P=0,0009). Ωστόσο, ενώ στα υποτεμάχια βιολογικής καλλιέργειας οι συγκεντρώσεις NO₃-N στο έδαφος ήταν παρόμοιες και στα δύο επίπεδα αλατότητας (8,36 mg kg⁻¹ κατά μέσο όρο), στα συμβατικά υποτεμάχια η υψηλή αλατότητα στο νερό άρδευσης οδήγησε σε σημαντικά υψηλότερα επίπεδα NO₃-N σε σύγκριση με αυτά που μετρήθηκαν στη χαμηλή αλατότητα (38,37 έναντι 27,64 mg kg⁻¹, αντίστοιχα; P=0,011). Κατά την επόμενη δειγματοληψία όμως που πραγματοποιήθηκε στο πρώιμο στάδιο γεμίσματος των λοβών (65 ΗΜΣ), οι συγκεντρώσεις τόσο του NO₃-N όσο και του NH₄-N στο έδαφος μειώθηκαν δραστικά στα υποτεμάχια συμβατικής καλλιέργειας με συνέπεια να εξισωθούν με αυτές που μετρήθηκαν στα βιολογικά καλλιεργούμενα υποτεμάχια. Οι εδαφικές συγκεντρώσεις NO₃-N και NH₄-N δεν άλλαξαν μετά το πρώιμο στάδιο του γεμίσματος λοβών σε όλες τις επεμβάσεις, με αποτέλεσμα 85 ΗΜΣ να είναι τόσο χαμηλές όσο και στη προηγούμενη δειγματοληψία. Στην επέμβαση του βιολογικού καλλιεργητικού συστήματος, τα επίπεδα NO₃-N 35 ΗΜΣ ήταν αισθητά υψηλότερα (8,36 mg kg⁻¹) από αυτά που μετρήθηκαν 65 ΗΜΣ (1,75 mg kg⁻¹) και στα δύο επίπεδα αλατότητας, ενώ εκείνα του NH₄-N δεν άλλαξαν κατά τη διάρκεια ολόκληρης της καλλιεργητικής περιόδου.

3.1.7 Εκπομπές αερίων θερμοκηπίου (N₂O, CO₂, CH₄)

Οι αθροιστικές εκπομπές N₂O κατά τη διάρκεια της καλλιεργητικής περιόδου ήταν σταθερά σημαντικά υψηλότερες (P=0,001) μετά την 7^η εβδομάδα από την ημερομηνία της σποράς, όταν εφαρμόστηκε συμβατικό σύστημα καλλιέργειας σε σύγκριση με το βιολογικό σύστημα καλλιέργειας (455 g ha⁻¹ σε σύγκριση με 363 g ha⁻¹, αντίστοιχα, στο τέλος της καλλιέργειας), ενώ η αλατότητα δεν είχε σημαντική επίδραση στις εκπομπές N₂O (Πίνακας 8). Αντίθετα, οι εκπομπές των CO₂ ήταν σημαντικά υψηλότερες (P=0,014) στο βιολογικό σύστημα καλλιέργειας (2645 kg ha⁻¹ έναντι 2199 kg ha⁻¹ συνολικά στο τέλος της καλλιέργειας), ανεξάρτητα από την επέμβαση της αλατότητας (Πίνακας 9). Σε αντίθεση με τις εκπομπές N₂O και CO₂ ανά καλλιεργούμενη μονάδα επιφάνειας, οι εκπομπές CH₄ παρέμειναν σταθερά χαμηλές και δεν επηρεάστηκαν από το σύστημα καλλιέργειας. Η αλατότητα του νερού άρδευσης δεν είχε επίσης επίπτωση στις εκπομπές CH₄ στην καλλιέργεια φασολιού (Πίνακας 10).

Πίνακας 8: Επίδραση του καλλιεργητικού συστήματος (ΚΣ) (συμβατικό: Σ; βιολογικό: Β) και της αλατότητας του νερού άρδευσης (χαμηλή αλατότητα: Χ.Α.; υψηλή αλατότητα: Υ.Α) στις αθροιστικές εκπομπές N₂O-N (g ha⁻¹) σε καλλιέργεια φασολιού (άνοιξη - καλοκαίρι 2011).

		N ₂ O-N (g ha ⁻¹)					
ΗΜΣ		19	38	49	59	68	84
Σ-Χ.Α.		1,5±1,8	80±15	231±26	310±28	366±29	472±18
Σ-Υ.Α.		1,6±2,3	59±19	211±41	285±48	327±49	438±47
Β-Χ.Α.		2,1±2,0	49±25	144±32	219±26	260±16	341±17
Β-Υ.Α.		1,1±1,5	61±24	172±42	237±37	280±34	385±39
		Στατιστική σημαντικότητα					
ΚΣ		NS	NS	NS	*	*	**
A		NS	NS	NS	NS	NS	NS
ΚΣ × A		NS	NS	NS	NS	NS	NS

^α Οι τιμές είναι μέσοι όροι τεσσάρων επαναλήψεων ± τυπικά σφάλματα.

^β Τα επίπεδα σημαντικότητας παρουσιάζονται με (*) για P ≤ 0,05 και (**) για P ≤ 0,01; NS υποδηλώνει μη σημαντικές διαφορές.

Πίνακας 9: Επίδραση του καλλιεργητικού συστήματος (ΚΣ) (συμβατικό: Σ; βιολογικό: Β) και της αλατότητας του νερού άρδευσης (χαμηλή αλατότητα: Χ.Α.; υψηλή αλατότητα: Υ.Α) στις αθροιστικές εκπομπές CO₂-C (g ha⁻¹) σε καλλιέργεια φασολιού (άνοιξη - καλοκαίρι 2011).

		CO ₂ -C (kg ha ⁻¹)					
ΗΜΣ		19	38	49	59	68	84
Σ-Χ.Α.		5,6±2,7	132±27	618±52	1090±70	1522±88	2294±128
Σ-Υ.Α.		5,4±1,8	182±36	626±91	1074±117	1539±167	2105±194
Β-Χ.Α.		10,3±4,7	282±53	1030±125	1594±154	2007±147	2819±192
Β-Υ.Α.		11,1±5,0	260±53	820±114	1310±139	1709±126	2471±162
		Στατιστική σημαντικότητα					
ΚΣ		NS	*	**	**	*	*
A		NS	NS	NS	NS	NS	NS
ΚΣ × A		NS	NS	NS	NS	NS	NS

^α Οι τιμές είναι μέσοι όροι τεσσάρων επαναλήψεων ± τυπικά σφάλματα.

^β Τα επίπεδα σημαντικότητας παρουσιάζονται με (*) για P ≤ 0,05 και (**) για P ≤ 0,01; NS υποδηλώνει μη σημαντικές διαφορές.

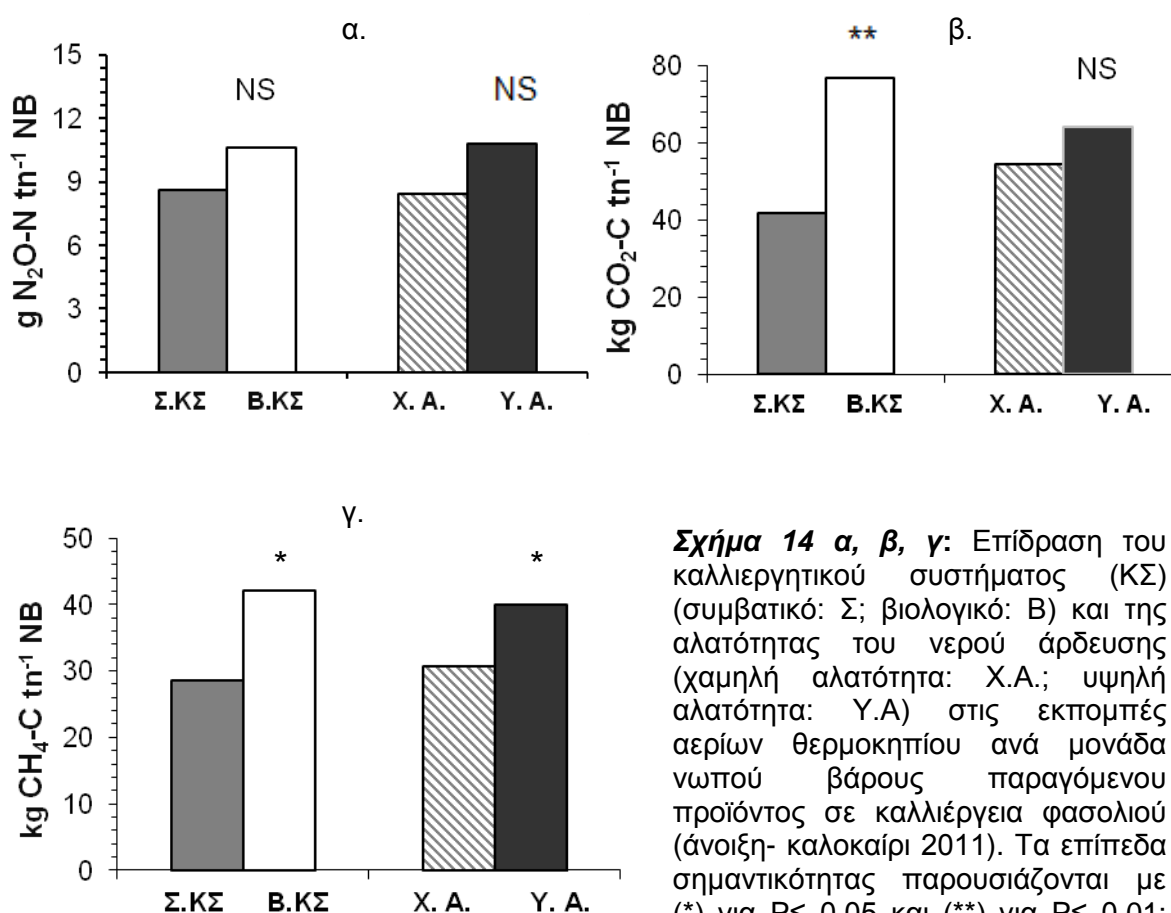
Πίνακας 10: Επίδραση του καλλιεργητικού συστήματος (ΚΣ) (συμβατικό: Σ; βιολογικό: Β) και της αλατότητας του νερού άρδευσης (χαμηλή αλατότητα: Χ.Α.; υψηλή αλατότητα: Υ.Α) στις αθροιστικές εκπομπές CH₄-C (g ha⁻¹) σε καλλιέργεια φασολιού (άνοιξη - καλοκαίρι 2011).

		CH ₄ -C (g ha ⁻¹)					
ΗΜΣ		19	38	49	59	68	84
Σ-Χ.Α.		76±11	1013±97	1440±106	1482±104	1508±130	1477±184
Σ-Υ.Α.		71±11	981±87	1438±82	1484±93	1539±137	1581±203
Β-Χ.Α.		67±13	1007±96	1423±110	1430±114	1470±88	1500±71
Β-Υ.Α.		62±10	900±92	1299±105	1357±98	1442±97	1459±126
		Στατιστική σημαντικότητα					
ΚΣ		NS	NS	NS	NS	NS	NS
A		NS	NS	NS	NS	NS	NS
ΚΣ × A		NS	NS	NS	NS	NS	NS

^α Οι τιμές είναι μέσοι όροι τεσσάρων επαναλήψεων ± τυπικά σφάλματα.

^β Τα επίπεδα σημαντικότητας παρουσιάζονται με (*) για P ≤ 0,05 και (**) για P ≤ 0,01; NS υποδηλώνει μη σημαντικές διαφορές.

Όταν όμως οι εκπομπές αερίων του θερμοκηπίου εκφράστηκαν ανά μονάδα νωπού βάρους παραγόμενου φασολιού, οι εκπομπές N₂O αποδείχθηκαν παρόμοιες και στα δύο καλλιεργητικά συστήματα, ενώ εκείνες του CO₂ και του CH₄ ήταν σημαντικά υψηλότερες (P=0,011 και P=0,036, αντίστοιχα) στο βιολογικό σύστημα καλλιέργειας (Σχ.14 α, β, γ). Η αλατότητα δεν είχε καμία επίδραση στις εκπομπές N₂O και CO₂ ανά μονάδα νωπού βάρους παραγόμενου φασολιού αλλά αυξήθηκαν σημαντικά (P=0,025) αυτές του CH₄ στα υποτεμάχια που εφαρμόστηκε άρδευση με αυξημένο επίπεδο αλατότητας (10 mM NaCl), σε σύγκριση με αυτά που δέχθηκαν άρδευση με νερό αλατότητας 0,5 mM (39,89 kg tn⁻¹ έναντι 30,75 kg tn⁻¹, αντίστοιχα). Δεν βρέθηκε αλληλεπίδραση μεταξύ καλλιεργητικού συστήματος και αλατότητας όσον αφορά τις εκπομπές αερίων του θερμοκηπίου, όταν αυτές εκφράζονται είτε ανά καλλιεργούμενη μονάδα επιφάνειας είτε ανά μονάδα νωπού βάρους παραγόμενου φασολιού.



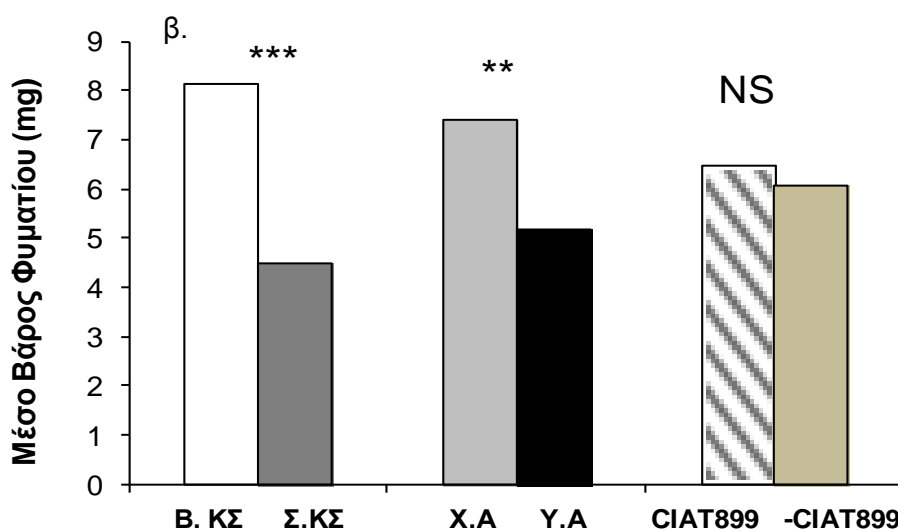
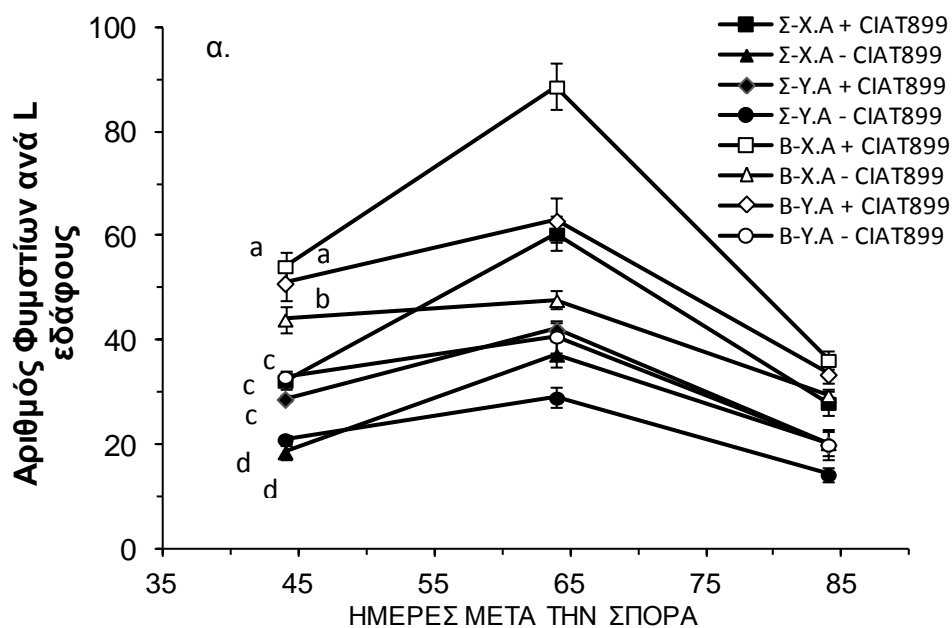
Σχήμα 14 α, β, γ: Επίδραση του καλλιεργητικού συστήματος (ΚΣ) (συμβατικό: Σ; βιολογικό: Β) και της αλατότητας του νερού άρδευσης (χαμηλή αλατότητα: Χ.Α.; υψηλή αλατότητα: Υ.Α) στις εκπομπές αερίων θερμοκηπίου ανά μονάδα νωπού βάρους παραγόμενου προϊόντος σε καλλιέργεια φασολιού (άνοιξη- καλοκαίρι 2011). Τα επίπεδα σημαντικότητας παρουσιάζονται με (*) για P ≤ 0,05 και (**) για P ≤ 0,01; NS υποδηλώνει μη σημαντικές διαφορές.

3.2 Πείραμα Αγρού (2^ο)

3.2.1 Σχηματισμός φυματίων

Στο Σχήμα 15α παρατηρείται ότι ο συνολικός αριθμός ριζικών φυματίων φασολιού μειώθηκε στα φυτά που εφαρμόστηκε το συμβατικό σύστημα καλλιέργειας και το υψηλό επίπεδο αλατότητας του νερού άρδευσης, καθώς και σε αυτά τα οποία δεν πραγματοποιήθηκε εμβολιασμός των ριζών τους με το στέλεχος *Rt* CIAT899, σε όλες τις δειγματοληψίες (45, 65, 85 ΗΜΣ). Συγκεκριμένα, και στις τρεις δειγματοληψίες που πραγματοποιήθηκαν το βιολογικό σύστημα καλλιέργειας, σχημάτισε τον μεγαλύτερο αριθμό ριζικών φυματίων ($P=0,000$) σε σύγκριση με το συμβατικό (45,15 έναντι 29,25 φυμάτια ανά λίτρο εδάφους, μέσος όρος των τριών δειγματοληψιών). Παρόμοια αποτελέσματα παρουσίασαν και οι άλλοι δύο παράγοντες, με την χαμηλή αλατότητα του νερού άρδευσης και τον εμβολιασμό των φυτών με CIAT899 να σχηματίζουν τον μεγαλύτερο αριθμό φυματίων ($P=0,000$) σε σύγκριση με την υψηλή αλατότητα του νερού άρδευσης και τη μη εφαρμογή του εμβολιασμού με CIAT899 (41,44 και 44,85 έναντι 32,95 και 29,54 φυμάτια ανά λίτρο εδάφους, αντίστοιχα, μέσος όρος των τριών δειγματοληψιών). Ο υψηλότερος αριθμός φυματίων (89 φυμάτια ανά λίτρο εδάφους) εμφανίστηκε 65 ΗΜΣ στη μεταχείριση βιολογικού συστήματος καλλιέργειας με χαμηλή αλατότητα και εμβολιασμό των ριζών με CIAT899 (B-X.A. +CIAT899), ενώ ο χαμηλότερος αριθμός (29 φυμάτια ανά λίτρο εδάφους) παρουσιάστηκε στη μεταχείριση του συμβατικού συστήματος καλλιέργειας με υψηλή αλατότητα και χωρίς εμβολιασμό με CIAT899 (Σ-Y.A- CIAT899).

Όσον αφορά τον συνολικό αριθμό φυματίων ανά λίτρο εδάφους, στην πρώτη δειγματοληψία (45 ΗΜΣ) βρέθηκε αλληλεπίδραση ($P=0,0215$) μεταξύ των τριών παραγόντων του πειράματος (σύστημα καλλιέργειας, αλατότητα και εμβολιασμός με CIAT899), καθώς και μεταξύ των παραγόντων του συστήματος καλλιέργειας και της αλατότητας ($P=0,0262$). Αντίθετα, στη δεύτερη δειγματοληψία (65 ΗΜΣ) ο παράγοντας του εμβολιασμού με CIAT899 βρέθηκε να αλληλεπιδρά με το καλλιεργητικό σύστημα ($P=0,0047$), αλλά και με την αλατότητα του νερού άρδευσης ($P=0,0027$).



Σχήμα 15 α, β: Επίδραση του καλλιεργητικού συστήματος (ΚΣ) (συμβατικό: Σ; βιολογικό: Β), της αλατότητας του νερού άρδευσης (χαμηλή αλατότητα: Χ.Α; υψηλή αλατότητα: Υ.Α) και της εφαρμογής εμβολιασμού με CIAT899 (+CIAT899) ή μη (-CIAT899) στον συνολικό αριθμό ριζικών φυματίων ανά λίτρο (L) εδάφους (α.) και στο μέσο βάρος φυματίου (mg) (β.), 65 ημέρες μετά την σπορά, σε καλλιέργεια φασολιού (άνοιξη - καλοκαίρι 2012). Οι μέσοι όροι που ακολουθούνται από διαφορετικά γράμματα διαφέρουν στατιστικά σημαντικά μεταξύ τους, σε επίπεδο σημαντικότητας $P= 0.05$ ($n=4$, Duncan's multiple range test). Οι κάθετες μπάρες απεικονίζουν τα τυπικά σφάλματα των μέσων. Τα επίπεδα σημαντικότητας παρουσιάζονται με (**) για $P \leq 0,01$ και (***) για $P \leq 0,001$; NS υποδηλώνει μη σημαντικές διαφορές.

Το μέσο βάρος φυματίου (mg) μειώθηκε σημαντικά ($P=0,000$) στα φυμάτια φυτών που εφαρμόστηκε το συμβατικό σύστημα καλλιέργειας σε σύγκριση με αυτά της βιολογικής καλλιέργειας (4,47 mg έναντι 8,12 mg, αντίστοιχα) 65 ΗΜΣ, στο πρώιμο στάδιο γεμίσματος των λοβών (Σχ. 15β). Ομοίως, ο παράγοντας της αλατότητας στο νερό άρδευσης μείωσε επίσης σημαντικά ($P=0,0008$) το μέσο βάρος φυματίου (5,18 mg όταν το νερό άρδευσης περιείχε 10 mM NaCl έναντι 7,40 mg στις επεμβάσεις με 0,5 mM NaCl). Η εφαρμογή του εμβολιασμού με CIAT899 παρουσίασε μία μικρή αύξηση στο μέσο βάρος του φυματίου (6,51 mg έναντι 6,08 mg), παρ' όλα αυτά η διαφορά αυτή δεν ήταν σημαντική. Δεν βρέθηκε καμία αλληλεπίδραση μεταξύ των τριών παραγόντων για το μέσο βάρος φυματίου.

3.2.2 Ολικό άζωτο (N) και άνθρακας (C) των φυτικών ιστών

Ο εμβολιασμός των φυτών με το στέλεχος CIAT899 δεν είχε καμία επίδραση στην ολική συγκέντρωση του N και C, αλλά ούτε και στο λόγο C/N. Η συγκέντρωση ολικού N στο υπέργειο τμήμα των φυτών φασολιού δεν βρέθηκε να διαφέρει όσον αφορά το καλλιεργητικό σύστημα που εφαρμόστηκε (βιολογικό ή συμβατικό) και στις δύο δειγματοληψίες που πραγματοποιήθηκαν (65 και 85 ΗΜΣ). Αντίθετα, η αλατότητα του νερού άρδευσης μείωσε σημαντικά ($P=0,0280$) την συγκέντρωση ολικού N, στο τέλος της καλλιέργειας (85 ΗΜΣ) (2,79% σε ξηρό βάρος στα φυτά που δέχθηκαν νερό άρδευσης 0,5 mM NaOH έναντι 2,45% σε ξηρό βάρος στα φυτά που δέχθηκαν νερό άρδευσης 10mM NaOH) (Πίνακας 11). Επιπλέον, η αλατότητα του νερού άρδευσης μείωσε σημαντικά τη συγκέντρωση ολικού C στο υπέργειο τμήμα των φυτών και στις δύο δειγματοληψίες (65 και 85 ΗΜΣ), από 37,54% σε 36,68% σε ξηρό βάρος και από 44,10% σε 43,29% σε ξηρό βάρος, αντίστοιχα. Ο λόγος C/N στο υπέργειο τμήμα των φυτών ήταν παρόμοιος και για τα δύο καλλιεργητικά συστήματα αλλά και για τις δύο μεταχειρίσεις της αλατότητας, 65 και 85 ΗΜΣ. Επίσης, η αλατότητα δεν παρουσίασε καμία επίδραση στο λόγο C/N σε καμία από τις δύο δειγματοληψίες.

Η συνολική ποσότητα N (kg ha^{-1}) που συσσωρεύτηκε στο υπέργειο τμήμα των φυτών ήταν παρόμοια και στα δύο καλλιεργητικά συστήματα που εφαρμόστηκαν (βιολογικό και συμβατικό) στις δύο δειγματοληψίες (65 και 85 ΗΜΣ). Η τελική ποσότητα N που συσσωρεύτηκε από το υπέργειο τμήμα των φυτών φασολιού στο τέλος της καλλιέργειας (85 ΗΜΣ) ήταν $175,37 \text{ kg ha}^{-1}$ για το συμβατικό σύστημα καλλιέργειας και $139,13 \text{ kg ha}^{-1}$ για το βιολογικό. Η αλατότητα από την άλλη πλευρά μείωσε σημαντικά τη συνολική ποσότητα N στο τέλος της καλλιέργειας από $191,34 \text{ kg ha}^{-1}$ σε $123,16 \text{ kg ha}^{-1}$. Δεν παρουσιάστηκε καμία αλληλεπίδραση μεταξύ των

τριών παραγόντων του πειράματος (καλλιεργητικό σύστημα, αλατότητα και εμβολιασμός).

Πίνακας 11: Επίδραση του καλλιεργητικού συστήματος (ΚΣ) (συμβατικό: Σ; βιολογικό: Β) και της αλατότητας του νερού άρδευσης (χαμηλή αλατότητα: Χ.Α; υψηλή αλατότητα: Υ.Α) στις ολικές συγκεντρώσεις Ν και C, στον λόγο C/N στους φυτικούς ιστούς υπέργειου τμήματος φυτών φασολιού (άνοιξη - καλοκαίρι 2012).

Επέμβαση	65 ΗΜΣ				85 ΗΜΣ			
	N%	C%	C/N	N(kg ha ⁻¹)	N%	C%	C/N	N(kg ha ⁻¹)
Σ-Χ.Α.	1,83±0,08	37,47±0,49	20,91±1,22	51,81±5,48	2,81±0,15	43,76±0,23	17,15±0,90	216,65±24,47
Σ-Υ.Α.	1,47±0,08	36,58±0,48	25,50±1,72	46,92±6,85	2,33±0,10	42,82±0,62	18,50±1,02	134,09±26,01
Β-Χ.Α.	1,59±0,13	37,61±0,30	25,15±2,55	43,67±7,17	2,76±0,14	44,22±0,42	16,20±0,82	166,03±18,03
Β-Υ.Α.	1,54±0,14	36,78±0,45	25,42±2,60	40,53±5,74	2,57±0,12	43,98±0,19	15,89±0,80	112,22±28,96
Σ. ΚΣ	1,65	37,03	85,25	49,37	2,57	43,40	17,20	175,37
Β. ΚΣ	1,56	37,19	103,88	42,10	2,67	43,99	16,68	139,13
Χ.Α	1,71	37,54	92,44	47,74	2,79	44,10	16,05	191,34
Υ.Α	1,50	36,68	96,69	43,73	2,45	43,29	17,83	123,16
Στατιστική σημαντικότητα								
ΚΣ	NS	NS	NS	NS	NS	NS	NS	NS
A	NS	*	NS	NS	*	*	NS	**
ΚΣ × A	NS	NS	NS	NS	NS	NS	NS	NS

^α Οι τιμές είναι μέσοι όροι τεσσάρων επαναλήψεων ± τυπικά σφάλματα

^β Τα επίπεδα σημαντικότητας παρουσιάζονται με (*) για P ≤ 0.05 και (**) για P ≤ 0.01; NS συμβολίζει τις μη σημαντικές διαφορές.

3.2.3 Ποσοστό αζώτου προερχόμενο από την ατμόσφαιρα (υπέργειο μέρος και λοβοί φυτών φασολιού)

Ο εμβολιασμός των ριζών φασολιού με το στέλεχος *Rt* CIAT899 δεν παρουσίασε καμία επίδραση ούτε στο ποσοστό του N που προέρχεται από την ατμόσφαιρα, αλλά ούτε και στη συνολική ποσότητα δεσμευμένου βιολογικά N. Στον Πίνακα 12 παρουσιάζονται οι τιμές $\delta^{15}\text{N}$ (‰) που προσδιορίστηκαν για φυτά καθιστού φασολιού που καλλιεργήθηκαν είτε με το συμβατικό (Σ.ΚΣ) ή με το βιολογικό σύστημα καλλιέργειας (Β.ΚΣ) σε συνθήκες χαμηλής ή υψηλής αλατότητας (Χ.Α. ή Υ.Α.), καθώς και οι αντίστοιχες τιμές για τα φυτά αναφοράς των ίδιων μεταχειρίσεων, στο πρώιμο στάδιο γεμίσματος των λοβών (65 ΗΜΣ). Τη μεγαλύτερη βιολογική δέσμευση του αζώτου της ατμόσφαιρας (%Ndfa) την παρουσίασαν τα φυτά που καλλιεργήθηκαν βιολογικά (65,08%), σε σύγκριση με τα φυτά στα οποία εφαρμόστηκε το συμβατικό σύστημα καλλιέργειας (27,56%). Ωστόσο, ο παράγοντας της αλατότητας του νερού άρδευσης, χαμηλή ή υψηλή, δεν παρουσίασε καμία επίδραση στη βιολογική αζωτοδέσμευση των φυτών (46,41% και 46,22%, αντίστοιχα) στο πρόωρο στάδιο γεμίσματος των λοβών. Η συνολική ποσότητα N που δέσμευσαν τα φυτά φασολιού βιολογικής καλλιέργειας στο υπέργειο βλαστικό μέρος τους, ήταν σημαντικά μεγαλύτερη, σε σύγκριση με τα φυτά του συμβατικού συστήματος καλλιέργειας και στα δύο στάδια της καλλιέργειας (65 και 85 ΗΜΣ), με μέγιστες τιμές στο τέλος της καλλιέργειας $51,02 \text{ kg ha}^{-1}$ και $28,00 \text{ kg ha}^{-1}$, αντίστοιχα. Η υψηλή αλατότητα μείωσε σημαντικά τη συνολική ποσότητα δεσμευμένου N στο βλαστικό μέρος των φυτών στο τέλος της καλλιεργητικής περιόδου λόγω της μειωμένης ολικής συγκέντρωσης N των φυτικών ιστών ($25,42 \text{ kg ha}^{-1}$ έναντι $53,61 \text{ kg ha}^{-1}$). Δεν βρέθηκε αλληλεπίδραση μεταξύ των τριών παραγόντων (καλλιεργητικό σύστημα, αλατότητα και εμβολιασμός με CIAT899).

Παράλληλα, προσδιορίστηκε και το ποσοστό ατμοσφαιρικού N που δεσμεύτηκε βιολογικά από τους λοβούς φυτών φασολιού στο πρώιμο στάδιο γεμίσματος των λοβών (65 ΗΜΣ). Συγκεκριμένα, ο παράγοντας του εμβολιασμού των ριζών φασολιού με CIAT899 δεν παρουσίασε καμία επίδραση στο ποσοστό βιολογικά δεσμευμένου N (Ndfa%) από τους λοβούς, αλλά ούτε και στη συνολική ποσότητα N που δέσμευσαν οι λοβοί των φυτών στο πρόωρο στάδιο γεμίσματος των λοβών. Ομοίως, ο ίδιος παράγοντας δεν επίδρασε ούτε στην ολική συγκέντρωση των λοβών σε N%, C% και το λόγο C/N. Οι λοβοί των φυτών που καλλιεργήθηκαν βιολογικά εμφάνισαν σημαντικά μεγαλύτερη ολική συγκέντρωση N σε σύγκριση με αυτούς των φυτών που εφαρμόστηκε το συμβατικό σύστημα καλλιέργειας (2,45% έναντι 1,89%, αντίστοιχα), 65 ΗΜΣ (Πίνακας 13). Αντίθετα, η αλατότητα δεν είχε καμία επίδραση στην ολική συγκέντρωση

N των λοβών. Όσον αφορά την ολική συγκέντρωση C% των λοβών δεν επηρεάστηκε ούτε από το σύστημα καλλιέργειας αλλά ούτε από το επίπεδο αλατότητας του νερού άρδευσης. Αντίθετα, οι λοβοί των φυτών που καλλιεργήθηκαν συμβατικά εμφάνισαν υψηλότερο λόγο C/N σε σύγκριση με αυτούς των φυτών που εφαρμόστηκε βιολογικό σύστημα καλλιέργειας (24,63 έναντι 17,02, αντίστοιχα).

Πίνακας 12: Επίδραση του καλλιεργητικού συστήματος, βιολογικό ή συμβατικό (B.ΚΣ ή Σ.ΚΣ) και του επιπέδου αλατότητας στο νερό άρδευσης (χαμηλή αλατότητα: Χ.Α. ή υψηλή αλατότητα: Υ.Α.) στη φυσική αφθονία ^{15}N φυτών αναφοράς (βλήτο) και φασολιού σε σχέση με το ατμοσφαιρικό άζωτο N_2 ($\delta^{15}\text{N}$ ‰), στο ποσοστό του αζώτου που προέρχεται από την ατμόσφαιρα (Ndfa %) και στη συνολική ποσότητα δεσμευμένου N βλαστικού τμήματος φυτών φασολιού από την ατμόσφαιρα (kg N ha^{-1}), στο πρώιμο στάδιο γεμίσματος των λοβών (65 ΗΜΣ) και στο τέλος της καλλιέργειας (85 ΗΜΣ).

Επέμβαση	$\delta^{15}\text{N}$ (‰) Φυτό αναφοράς	$\delta^{15}\text{N}$ (‰) Φασόλι	Ndfa (%)	Δεσμευμένο-N 65 ΗΜΣ(kg ha^{-1})	Δεσμευμένο-N 85ΗΜΣ(kg ha^{-1})
Σ-Χ.Α.	3,92	44 - 3,62	23,29±5,31	11,28±2,82	34,81±9,84
Σ-Υ.Α.	4,39	1,62 -3,78	31,83±4,91	16,38±4,39	21,21±6,33
B-Χ.Α.	4,57	(-1,16) -1,61	69,54±6,36	29,30±3,95	72,41±10,14
B-Υ.Α.	4,45	0,44 -2,05	60,62±3,21	24,34±3,36	29,62±9,24
Σ. ΚΣ.			27,56	16,83	28,00
B. ΚΣ.			65,08	26,82	51,02
Χ.Α.			46,41	20,36	53,61
Υ.Α.			46,22	20,29	25,42
Στατιστική σημαντικότητα					
ΚΣ			***	**	*
A			NS	NS	*
ΚΣ x A			NS	NS	NS

^a Οι τιμές είναι μέσοι όροι τεσσάρων επαναλήψεων ± τυπικά σφάλματα.

^b Τα επίπεδα σημαντικότητας παρουσιάζονται με (*),(**) και (***) για $P \leq 0,05$, $0,01$, $0,001$ αντίστοιχα, NS υποδηλώνει μη σημαντικές διαφορές.

Η συνολική ποσότητα N που συγκέντρωσαν οι λοβοί των φυτών, 65 ΗΜΣ, δεν διέφερε μεταξύ των καλλιεργητικών συστημάτων (βιολογικό: 72,56 kg ha⁻¹, συμβατικό 72,98 kg ha⁻¹), αλλά ούτε και μεταξύ των δύο επιπέδων αλατότητας του νερού άρδευσης (χαμηλή αλατότητα: 77,19 kg ha⁻¹, υψηλή αλατότητα: 68,36 kg ha⁻¹). Αντίθετα, οι βιολογικοί λοβοί των φυτών δέσμευσαν σημαντικά μεγαλύτερο ποσοστό N (P=0,000) από την ατμόσφαιρα σε σύγκριση με τους συμβατικούς (91,65% έναντι 69,87%, αντίστοιχα). Ομοίως, όταν το ποσοστό αζώτου που δεσμεύτηκε από την ατμόσφαιρα εκφράστηκε σε kg ha⁻¹, οι λοβοί των φυτών του βιολογικού καλλιεργητικού συστήματος υπερέιχαν σε σύγκριση με τους συμβατικούς (66,45 kg N ha⁻¹ έναντι 50,66 kg N ha⁻¹, αντίστοιχα), ενώ η αλατότητα δεν είχε σημαντική επίπτωση (58,55 kg N ha⁻¹, μέσος όρος των δύο επεμβάσεων).

Πίνακας 13: Επίδραση του καλλιεργητικού συστήματος (ΚΣ) (συμβατικό: Σ; βιολογικό: Β) και της αλατότητας του νερού άρδευσης (χαμηλή αλατότητα: Χ.Α; υψηλή αλατότητα: Υ.Α) στις ολικές συγκεντρώσεις Ν και C, στον λόγο C/N στους λοβούς φυτών φασολιού.

Επέμβαση	N%	C%	C/N	N(kg ha ⁻¹)	Ndfa%	Δεσμευμένο N (kg ha ⁻¹)
Σ-Χ.Α.	1,87±0,32	39,55±0,32	26,38±4,94	80,14±9,80	72,51±4,82	57,93±8,44
Σ-Υ.Α.	1,92±0,23	38,91±0,24	22,89±3,21	65,84±4,00	67,23±6,11	43,39±3,36
Β-Χ.Α.	2,28±0,24	39,48±0,61	19,07±2,41	74,24±8,68	96,68±3,25	72,19±9,17
Β-Υ.Α.	2,62±0,13	38,51±0,47	14,96±0,86	70,88±8,28	86,61±3,30	60,71±6,53
Συμβατικό ΚΣ	1,89	39,23	24,63	72,98	69,87	50,66
Βιολογικό ΚΣ	2,45	38,99	17,02	72,56	91,65	66,45
Χαμηλή αλατότητα	2,08	39,51	22,72	77,19	84,59	65,06
Υψηλή αλατότητα	2,27	38,71	18,93	68,36	76,92	52,05
Στατιστική σημαντικότητα						
Καλλιεργητικό Σύστημα (ΚΣ)	*	NS	*	NS	***	*
Αλατότητα (Α)	NS	NS	NS	NS	NS	NS
ΚΣ × Α	NS	NS	NS	NS	NS	NS

^α Οι τιμές είναι μέσοι όροι τεσσάρων επαναλήψεων ± τυπικά σφάλματα.

^β Τα επίπεδα σημαντικότητας παρουσιάζονται με (*) για P ≤ 0,05 και (***) για P ≤ 0,001; NS συμβολίζει τις μη σημαντικές διαφορές.

3.2.4 Συγκεντρώσεις καλίου (K), νατρίου (Na) και φωσφόρου (P) σε φυτικούς ιστούς φασολιού

Οι ξηροί φυτικοί ιστοί υπέργειου τμήματος δεν παρουσίασαν καμία διαφορά στις συγκεντρώσεις του K και του P, ανάμεσα στα καλλιεργητικά συστήματα, την αλατότητα του νερού άρδευσης και την εφαρμογή στελέχους CIAT899 (25,31 mg g⁻¹ και 1,52 mg g⁻¹, αντίστοιχά; μέση τιμή όλων των μεταχειρίσεων), στο πρώιμο στάδιο γεμίσματος των λοβών που προσδιορίστηκαν 60 (ΗΜΣ). Ομοίως η συγκέντρωση Na στους ξηρούς φυτικούς ιστούς που ανήκαν στη μεταχείριση της υψηλής αλατότητας του νερού άρδευσης δε διέφεραν σε σύγκριση με αυτούς της χαμηλής αλατότητας (1,05 mg g⁻¹ και 1,04 mg g⁻¹, αντίστοιχα; μέση τιμή των δειγματοληψιών).

3.2.5 Ολική βιομάζα και παραγωγή

Ο εμβολιασμός του ριζικού συστήματος των φυτών με CIAT899 δεν είχε καμία επίδραση στην ολική βιομάζα (νωπή και ξηρή) αλλά και στους παραμέτρους απόδοσης. Αντίθετα, οι συμβατικές καλλιεργητικές πρακτικές οδήγησαν σε σημαντικά υψηλότερη (P=0,0397) νωπή βιομάζα υπέργειου μέρους (23,29 ton ha⁻¹) σε σχέση με το βιολογικό καλλιεργητικό σύστημα (18,14 ton ha⁻¹) 64 ημέρες μετά τη σπορά (ΗΜΣ). Παρόμοια αποτελέσματα βρέθηκαν επίσης προς το τέλος της καλλιεργητικής περιόδου (84 ΗΜΣ) με ολική νωπή βιομάζα 34,96 ton ha⁻¹ στο συμβατικό σύστημα έναντι 26,17 στο βιολογικό (Πίνακας 14). Η παρουσία 10 mM NaCl στο νερό άρδευσης μειώνει σημαντικά (P=0,0303) τη νωπή βιομάζα του υπέργειου μέρους στην τελική δειγματοληψία (84 ΗΜΣ), σε σύγκριση με 0,50 mM NaCl (26,82 ton ha⁻¹ έναντι 34,96 ton ha⁻¹). Όταν η βιομάζα υπέργειου τμήματος εκφράστηκε σε ξηρό βάρος, το συμβατικό καλλιεργητικό σύστημα υπερείχε πάλι σε σύγκριση με το βιολογικό χωρίς όμως οι διαφορές αυτές να είναι σημαντικές, ενώ η υψηλότερη αλατότητα στο νερό άρδευσης μείωσε σημαντικά (P=0,0046) την ολική ξηρή βιομάζα (5,13 ton ha⁻¹ έναντι 7,28 ton ha⁻¹) 84 ΗΜΣ. Δεν βρέθηκε καμία αλληλεπίδραση μεταξύ του καλλιεργητικού συστήματος, της αλατότητας του νερού άρδευσης και του εμβολιασμού με CIAT899.

Η νωπή παραγωγή των πράσινων λοβών που συγκομίστηκαν καθ' όλη τη διάρκεια της καλλιεργητικής περιόδου μειώθηκε σημαντικά και από το βιολογικό σύστημα καλλιέργειας (24,25 ton ha⁻¹ έναντι 29,12 ton ha⁻¹) αλλά και από το υψηλό επίπεδο αλατότητας στο νερό άρδευσης (23,65 ton ha⁻¹ έναντι 29,72 ton ha⁻¹), χωρίς καμία αλληλεπίδραση μεταξύ του συστήματος καλλιέργειας και της αλατότητας (Πίνακας 15). Η μείωση της νωπής βιομάζας λοβών που παρατηρείται τόσο στο βιολογικό σύστημα καλλιέργειας όσο και στην αλατότητα οφείλεται σε χαμηλότερο αριθμό των

λοβών ανά m², ενώ το μέσο βάρος λοβών δεν επηρεάστηκε ούτε από το σύστημα καλλιέργειας, ούτε από την αλατότητα. Τέλος, η περιεκτικότητα σε ξηρά ουσία (%) παρουσίασε αύξηση στους βιολογικούς λοβούς φασολιού (Πίνακας 15). Η συνολική ξηρή βιομάζα λοβών που συγκομίσθηκε ανά μονάδα καλλιεργούμενης επιφάνειας ήταν παρόμοια και στα δύο συστήματα καλλιέργειας. Η αλατότητα δεν είχε σημαντικό αντίκτυπο στην συνολική ξηρή βιομάζα λοβών (Πίνακας 15.).

Πίνακας 14: Επίδραση του καλλιεργητικού συστήματος (ΚΣ) (συμβατικό: Σ; βιολογικό: Β) και αλατότητας του νερού άρδευσης (χαμηλή: Χ.Α.; υψηλή: Υ.Α) στην ολική νωπή και ξηρή βιομάζα υπέργειου μέρους φυτών φασολιού που καλλιεργήθηκαν άνοιξη – καλοκαίρι του 2012.

ΗΜΣ	Νωπή Βιομάζα (ton ha ⁻¹)		Ξηρή Βιομάζα (ton ha ⁻¹)	
	64	84	64	84
Σ-Χ.Α.	22,41±2,4	40,01±3,0	2,85±0,3	8,14±0,7
Σ-Υ.Α.	24,16±3,0	29,90±2,6	3,18±0,4	5,52±0,7
Β-Χ.Α.	17,09±2,0	28,59±2,5	2,76±0,3	6,43±0,7
Β-Υ.Α.	19,20±2,0	23,73±5,3	2,42±0,3	4,73±0,8
Συμβατικό ΚΣ	23,29	34,96	3,01	6,83
Βιολογικό ΚΣ	18,14	26,17	2,59	5,58
Χαμηλή αλατότητα	19,75	34,31	2,81	7,28
Υψηλή αλατότητα	21,68	26,82	2,80	5,13
	Στατιστική σημαντικότητα			
Καλλιεργητικό Σύστημα(ΚΣ)	*	**	NS	NS
Αλατότητα (Α)	NS	*	NS	**
ΚΣ × Α	NS	NS	NS	NS

^α Οι τιμές είναι μέσοι όροι τεσσάρων επαναλήψεων ± τυπικά σφάλματα.

^β Τα επίπεδα σημαντικότητας παρουσιάζονται με (*) για P ≤ 0,05 και το NS συμβολίζει τις μη σημαντικές διαφορές.

Πίνακας 15: Επίδραση του καλλιεργητικού συστήματος (ΚΣ) (συμβατικό: Σ; βιολογικό: Β) και της αλατότητας του νερού άρδευσης (χαμηλή: Χ.Α.; υψηλή: Υ.Α) στις παραμέτρους απόδοσης καλλιέργειας φασολιού (άνοιξη – καλοκαίρι 2011). Παρουσιάζονται δεδομένα για την απόδοση σε νωπό βάρος λοβών (NB, tn ha^{-1}) και ξηρό βάρος λοβών (ΞB , tn ha^{-1}), συνολικό αριθμό λοβών (λοβοί m^{-2}), μέσο βάρος νωπού λοβού (M.B. λοβού, g) και ποσοστό ξηράς ουσίας στο λοβό (% ΞO).

<i>Παράμετροι Απόδοσης</i>					
Επέμβαση	Απόδοση (NB) (tn ha^{-1})	Απόδοση (ΞB) (tn ha^{-1})	Λοβοί (m^2)	M.B. λοβών (g)	% ΞO .
Σ-Χ.Α.	32,79±2,26	4,84±0,68	459,4±9,8	7,12±0,41	14,59±1,4
Σ-Υ.Α.	25,43±2,25	3,79±0,47	356,1±36,5	7,24±0,18	14,87±1,2
Β-Χ.Α.	26,64±2,76	3,68±0,74	365,6±36,2	7,26±0,15	13,14±1,3
Β-Υ.Α.	21,86±1,52	2,69±0,27	325,6±21,7	6,71±0,11	12,52±1,3
Σ. ΚΣ	29,12	4,32	407,75	7,18	14,73
Β. ΚΣ	24,25	3,18	345,62	6,98	12,83
Χ. Α	29,72	4,26	412,50	7,19	13,86
Υ. Α	23,65	3,24	340,87	6,98	13,69
<i>Στατιστική σημαντικότητα</i>					
ΚΣ	*	NS	*	NS	*
Α	**	NS	**	NS	NS
ΚΣ × Α	NS	NS	NS	NS	NS

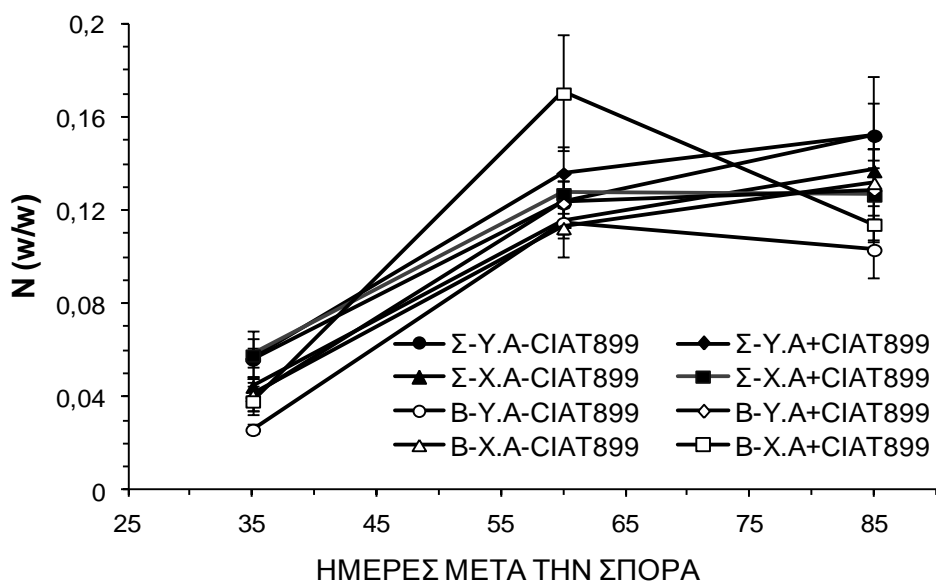
^α Οι τιμές είναι μέσοι όροι τεσσάρων επαναλήψεων ± τυπικά σφάλματα.

^β Τα επίπεδα σημαντικότητας παρουσιάζονται με (*) για $P \leq 0,05$, (**) για $P \leq 0,01$ και το NS συμβολίζει τις μη σημαντικές διαφορές.

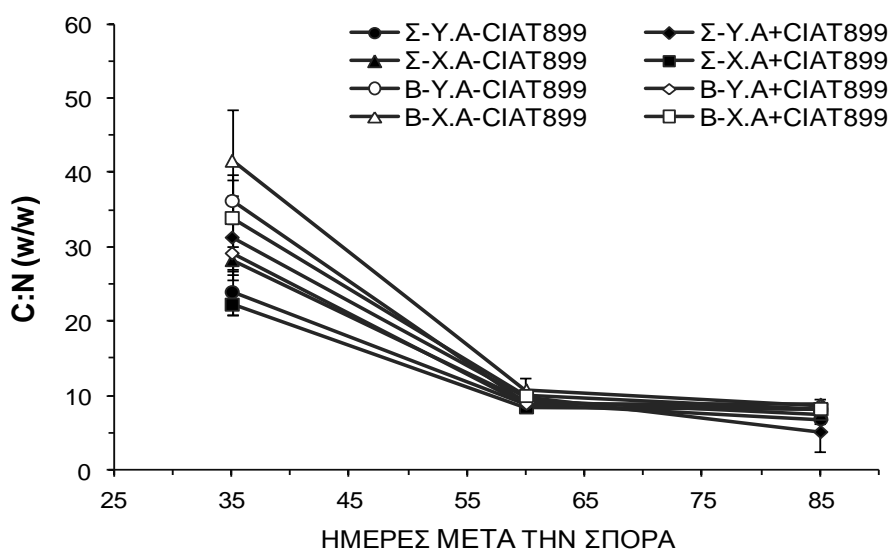
3.2.6 Εδαφικό ολικό άζωτο (N) και άνθρακας (C)

Κατά την πρώτη δειγματοληψία (35 ΗΜΣ), η συγκέντρωση του εδάφους σε ολικό N ήταν σημαντικά υψηλότερη ($P=0,0007$) στα υποτεμάχια που καλλιεργήθηκαν συμβατικά (0,054%), σε σύγκριση με εκείνα που εφαρμόστηκαν οι πρακτικές της βιολογικής γεωργίας (0,037%), ενώ 60 και 85 ΗΜΣ οι διαφορές αυτές εξαφανίστηκαν (Σχ. 16). Ομοίως, με το προηγούμενο πείραμα αγρού, παρατηρείται ότι η συγκέντρωση του εδάφους σε ολικό N αυξάνεται απότομα μεταξύ 30 και 60 ΗΜΣ. Στη μέση της καλλιεργητικής περιόδου (60 ΗΜΣ), παρατηρείται ότι ο εμβολιασμός στις ρίζες των φυτών με CIAT899 αύξησε σημαντικά ($P=0,0452$) τη συγκέντρωση του εδάφους σε ολικό N στα υπό υποτεμάχια σε σύγκριση με εκείνα που δεν εφαρμόστηκε (0,14% έναντι 0,11%, αντίστοιχα). Η αλατότητα δεν είχε καμία επίδραση στη συγκέντρωση του εδάφους σε ολικό N και στις τρεις δειγματοληψίες που πραγματοποιήθηκαν κατά τη διάρκεια της καλλιέργειας. Δεν βρέθηκε καμία αλληλεπίδραση μεταξύ των τριών παραγόντων του πειράματος (καλλιεργητικό σύστημα, αλατότητα και εμβολιασμός).

Η συγκέντρωση του εδάφους σε C ακολούθησε φθίνουσα πορεία κατά τη διάρκεια της καλλιεργητικής περιόδου σε όλες τις επεμβάσεις, αλλά δεν επηρεάστηκε σημαντικά από κανέναν από τους τρεις παράγοντες του πειράματος, σύστημα καλλιέργειας, αλατότητα του νερού άρδευσης και εμβολιασμός με CIAT899 (1,30%, 1,21%, 0,98%; μέσος όρος όλων των μεταχειρίσεων, 30, 60 και 85 ΗΜΣ, αντίστοιχα). Ομοίως με το πρώτο πείραμα αγρού, ο λόγος C/N ήταν σημαντικά υψηλότερος στα βιολογικά υποτεμάχια σε σύγκριση με εκείνα στα οποία εφαρμόστηκε συμβατικό σύστημα καλλιέργειας, κατά την πρώτη (35,17 έναντι 26,38 αντίστοιχα; $P=0,0138$) και την τρίτη δειγματοληψία (8,42 έναντι 6,86 αντίστοιχα; $P=0,0144$). Από την 30^η ημέρα έως την 60^η ημέρα μετά τη σπορά παρατηρήθηκε απότομη μείωση του λόγου C/N, αλλά έπειτα από 60 ημέρες μετά τη σπορά και έως το τέλος της καλλιεργητικής περιόδου παρέμεινε στα ίδια χαμηλά επίπεδα (Σχ. 17). Ο λόγος C/N στο έδαφος δεν επηρεάστηκε είτε από την αλατότητα, είτε από τον εμβολιασμό με CIAT899 κατά τη διάρκεια της καλλιέργειας.



Σχήμα 16: Επίδραση του καλλιεργητικού συστήματος (ΚΣ) (συμβατικό: Σ; βιολογικό: Β), της αλατότητας του νερού άρδευσης (χαμηλή αλατότητα: Χ.Α; υψηλή αλατότητα: Υ.Α) και του εμβολιασμού με CIAT899 (+CIAT899) ή μη (-CIAT899) στην ολική συγκέντρωση N στο εδάφος σε καλλιέργεια φασολιού (άνοιξη - καλοκαίρι 2012). Οι κάθετες μπάρες απεικονίζουν τα τυπικά σφάλματα των μέσων (n=4).



Σχήμα 17: Επίδραση του καλλιεργητικού συστήματος (ΚΣ) (συμβατικό: Σ; βιολογικό: Β), της αλατότητας του νερού άρδευσης (χαμηλή αλατότητα: Χ.Α; υψηλή αλατότητα: Υ.Α) και του εμβολιασμού με CIAT899 (+CIAT899) ή μη (-CIAT899) στο λόγο C/N του εδάφους σε καλλιέργεια φασολιού (άνοιξη - καλοκαίρι 2012). Οι κάθετες μπάρες απεικονίζουν τα τυπικά σφάλματα των μέσων (n=4).

3.2.7 Εδαφικό ανόργανο άζωτο

Οι συγκεντρώσεις $\text{NO}_3\text{-N}$ στο έδαφος ήταν πολύ υψηλότερες ($P=0,0000$) όταν εφαρμόστηκε το συμβατικό σύστημα καλλιέργειας, σε σύγκριση με το βιολογικό ($31,66 \text{ mg kg}^{-1}$ έναντι $12,42 \text{ mg kg}^{-1}$, αντίστοιχα) 35 ΗΜΣ (Πίνακας 16). Κατά την επόμενη δειγματοληψία που πραγματοποιήθηκε (60 ΗΜΣ) οι συγκεντρώσεις του εδάφους σε $\text{NO}_3\text{-N}$ μειώθηκαν δραστικά στα υποτεμάχια της συμβατικής καλλιέργειας με αποτέλεσμα να πλησιάσουν τις συγκεντρώσεις των βιολογικών υποτεμαχίων, παραμένοντας ωστόσο ακόμα υψηλότερες. Την 85^η ημέρα μετά τη σπορά, οι εδαφικές συγκεντρώσεις $\text{NO}_3\text{-N}$ παρέμειναν το ίδιο χαμηλές όσο και στην προηγούμενη δειγματοληψία και στα δύο καλλιεργητικά συστήματα που εφαρμόστηκαν. Όσον αφορά την υψηλή αλατότητα του νερού άρδευσης, από τη δεύτερη κιόλας δειγματοληψία (60 ΗΜΣ) παρουσίασε αύξηση στις συγκεντρώσεις $\text{NO}_3\text{-N}$ του εδάφους, ώσπου στο τέλος της καλλιέργειας (85 ΗΜΣ) υπερέιχαν σημαντικά σε σύγκριση με αυτές που προσδιορίστηκαν στα υποτεμάχια που δέχθηκαν νερό άρδευσης χαμηλής αλατότητας ($16,08 \text{ mg kg}^{-1}$ έναντι $10,16 \text{ mg kg}^{-1}$, αντίστοιχα).

Οι συγκεντρώσεις $\text{NH}_4\text{-N}$ στο έδαφος ήταν επίσης σημαντικά υψηλότερες ($P=0,0000$) στα υποτεμάχια του συμβατικού καλλιεργητικού συστήματος ($6,62 \text{ mg kg}^{-1}$) σε σχέση με αυτά που καλλιεργήθηκαν ακολουθώντας τις πρακτικές της βιολογικής γεωργίας ($4,57 \text{ mg kg}^{-1}$), 35 ΗΜΣ. Οι εδαφικές συγκεντρώσεις $\text{NH}_4\text{-N}$ παρέμειναν στα ίδια χαμηλά επίπεδα και στα δύο συστήματα καλλιέργειας (60 και 85 ΗΜΣ) με υψηλότερες πάντα συγκεντρώσεις στα συμβατικά υποτεμάχια. Η αλατότητα του νερού άρδευσης δεν παρουσίασε καμία επίδραση στις εδαφικές συγκεντρώσεις $\text{NH}_4\text{-N}$. Ο εμβολιασμός με CIAT899 δεν είχε επίδραση είτε στις συγκεντρώσεις $\text{NO}_3\text{-N}$, είτε $\text{NH}_4\text{-N}$ του εδάφους κατά τη διάρκεια της καλλιεργητικής περιόδου.

Πίνακας 16: Επίδραση του καλλιεργητικού συστήματος (ΚΣ) (συμβατικό: Σ; βιολογικό: Β) και της αλατότητας του νερού άρδευσης (χαμηλή αλατότητα: Χ.Α.; υψηλή αλατότητα: Υ.Α) εμβολιασμένων φυτών καθιστού φασολιού με *Rhizobium tropici* CIAT899 (+CIAT899) ή μη (-CIAT899) στις συγκεντρώσεις NO₃-N και NH₄-N του εδάφους, 30, 60 και 85 ημέρες μετά την σπορά (ΗΜΣ) σε καλλιέργεια φασολιού (άνοιξη- καλοκαίρι 2012).

ΗΜΣ	NO ₃ -N (mg kg ⁻¹)			NH ₄ -N (mg kg ⁻¹)		
	35	60	85	35	60	85
Σ-Χ.Α.+ CIAT899	27,57±0,71	12,57±4,28	11,45±1,19	4,53±0,05	6,88±0,17	7,86±0,58
Σ-Χ.Α.- CIAT899	38,58±8,86	6,62±1,31	8,35±4,34	8,42±0,54	5,72±1,08	7,52±0,37
Σ-Υ.Α.+ CIAT899	28,01±5,27	17,48±1,51	13,59±2,95	8,04±1,04	7,65±0,40	7,64±0,69
Σ-Υ.Α.- CIAT899	32,48±3,74	23,16±3,70	24,03±6,28	5,49±0,27	7,97±0,57	8,37±0,16
Β-Χ.Α.+ CIAT899	7,96±1,30	16,53±2,29	11,91±1,46	4,57±0,09	6,61±0,40	6,54±0,62
Β-Χ.Α.- CIAT899	16,92±2,93	13,08±1,75	8,96±2,48	4,46±0,06	5,96±0,51	6,97±0,52
Β-Υ.Α.+ CIAT899	13,88±1,68	8,72±1,63	14,93±3,98	4,09±0,12	5,10±0,47	6,44±0,41
Β-Υ.Α.- CIAT899	10,94±5,33	13,52±2,42	11,76±3,43	4,63±0,14	6,00±0,31	8,01±1,03
Συμβατικό ΚΣ	31,66	14,96	14,36	6,62	7,05	7,84
Βιολογικό ΚΣ	12,42	12,96	11,89	4,57	5,92	6,99
Χαμηλή Αλατότητα (Χ.Α.)	22,76	12,20	10,16	5,49	6,29	7,22
Υψηλή Αλατότητα (Υ.Α.)	21,33	15,72	16,08	5,69	6,68	7,61
Στατιστική Σημαντικότητα						
Καλλιεργητικό Σύστημα (ΚΣ)	***	NS	NS	***	**	NS
Αλατότητα (Α)	NS	NS	**	NS	NS	NS
Εμβολιασμός CIAT899 (Ε)	NS	NS	NS	NS	NS	NS
ΚΣ × Α	NS	NS	NS	NS	NS	NS
ΚΣ × Ε	NS	NS	NS	NS	NS	NS
Α × Ε	NS	NS	NS	NS	NS	NS
ΚΣ × Α × Ε	NS	NS	NS	NS	NS	NS

^α Οι τιμές είναι μέσοι όροι τεσσάρων επαναλήψεων ± τυπικά σφάλματα.

^β Τα επίπεδα σημαντικότητας παρουσιάζονται με (**) για P ≤ 0,01 και (***) για P ≤ 0,001; NS υποδηλώνει τις μη σημαντικές διαφορές.

3.2.8 Εκπομπές αερίων θερμοκηπίου (N₂O, CO₂, CH₄)

Οι αθροιστικές εκπομπές N₂O ήταν σημαντικά υψηλότερες όταν εφαρμόστηκε συμβατικό σύστημα καλλιέργειας σε σύγκριση με το βιολογικό σύστημα καλλιέργειας (231,26 g ha⁻¹ έναντι 158,20 g ha⁻¹, αντίστοιχα, στο τέλος της καλλιέργειας) σε όλη τη διάρκεια της καλλιεργητικής περιόδου (Πίνακας 17). Αντίθετα, η αλατότητα παρουσίασε σημαντική επίδραση στις εκπομπές N₂O μόνο στο τέλος της καλλιέργειας (222,67 g ha⁻¹ στην υψηλή αλατότητα έναντι 162,78 g ha⁻¹ στη χαμηλή αλατότητα του νερού άρδευσης. Ενώ ο εμβολιασμός του ριζικού συστήματος των φυτών με CIAT899 δεν είχε επίδραση. Σε αντίθεση με τις αθροιστικές εκπομπές N₂O, οι εκπομπές των CO₂ ήταν σημαντικά υψηλότερες (P=0,0168) στο βιολογικό σύστημα καλλιέργειας σε σύγκριση με το συμβατικό (806,81 kg ha⁻¹ έναντι 549,38 kg ha⁻¹ συνολικά στο τέλος της καλλιέργειας) από την 66^η ΗΜΣ έως το τέλος της καλλιέργειας (Πίνακας 18). Η αλατότητα του νερού άρδευσης αύξησε σημαντικά τις εκπομπές CO₂ μόνο 66 ΗΜΣ (314,07 kg ha⁻¹ στην υψηλή αλατότητα έναντι 236,63 kg ha⁻¹ στη χαμηλή) ενώ ο εμβολιασμός του ριζικού συστήματος με CIAT899 δεν είχε καμία επίδραση στις αθροιστικές εκπομπές CO₂. Δεν βρέθηκε καμία αλληλεπίδραση μεταξύ του συστήματος καλλιέργειας και της αλατότητας του νερού άρδευσης. Εν αντιθέσει με τις εκπομπές N₂O και CO₂ ανά καλλιεργούμενη μονάδα επιφάνειας, οι εκπομπές CH₄ παρέμειναν πολύ χαμηλές σε όλη την καλλιεργητική περίοδο και δεν επηρεάστηκαν από κανέναν από τους τρεις παράγοντες που μελετούνται (σύστημα καλλιέργειας, αλατότητα, εμβολιασμός με CIAT899) (Πίνακας 19).

Πίνακας 17: Επίδραση του καλλιεργητικού συστήματος (ΚΣ) (συμβατικό: Σ; βιολογικό: Β) και της αλατότητας του νερού άρδευσης (χαμηλή αλατότητα: Χ.Α.; υψηλή αλατότητα: Υ.Α) εμβολιασμένων φυτών καθιστού φασολιού με *Rhizobium tropici* CIAT899 (+CIAT899) ή μη (-CIAT899) στις αθροιστικές εκπομπές N₂O-N (g ha⁻¹) (άνοιξη- καλοκαίρι 2012).

ΗΜΣ	N ₂ O-N (g ha ⁻¹)					
	30	44	59	66	77	88
Σ-Χ.Α.+ CIAT899	0,78±0,41	11,75±3,28	35,50±3,35	64,75±8,06	111,50±9,72	158,25±18,65
Σ-Χ.Α.- CIAT899	0,39±0,38	33,50±15,70	75,50±15,02	105,50±39,22	155,75±46,48	194,50±45,48
Σ-Υ.Α.+ CIAT899	1,72±1,37	24,25±9,72	56,00±0,91	106,50±31,38	185,25±53,53	237,50±73,16
Σ-Υ.Α.- CIAT899	1,18±0,82	36,25±13,19	74,00±3,80	129,0±22,49	239,50±30,29	334,50±45,92
Β-Χ.Α.+ CIAT899	0,0±0,0	6,75±2,95	21,50±23,40	56,50±9,56	122,50±31,59	183,50±51,90
Β-Χ.Α.- CIAT899	0,128±0,13	5,50±0,29	16,00±20,34	45,75±5,53	92,75±10,52	114,75±12,50
Β-Υ.Α.+ CIAT899	0,0±0,0	15,75±6,79	40,00±33,05	53,75±12,49	70,75±6,17	76,75±5,50
Β-Υ.Α.- CIAT899	0,06±0,06	3,75±2,43	16,25±9,21	57,50±10,88	150,25±13,77	242,00±27,26
Συμβατικό ΚΣ	1,02	26,46	60,20	101,57	173,04	231,26
Βιολογικό ΚΣ	0,05	8,03	23,51	53,39	109,13	158,20

Στατιστική Σημαντικότητα

Καλλιεργητικό Σύστημα (ΚΣ)	*	**	**	**	**	**
Αλατότητα (Α)	NS	NS	NS	NS	NS	*
Εμβολιασμός CIAT899 (Ε)	NS	NS	NS	NS	NS	NS
ΚΣ × Α	NS	NS	NS	NS	NS	NS
ΚΣ × Ε	NS	*	NS	NS	NS	NS
Α × Ε	NS	NS	NS	NS	NS	NS
ΚΣ × Α × Ε	NS	NS	NS	NS	NS	NS

^α Οι τιμές είναι μέσοι όροι τεσσάρων επαναλήψεων ± τυπικά σφάλματα.

^β Τα επίπεδα σημαντικότητας παρουσιάζονται με (*) για P ≤ 0,05 και (**) για P ≤ 0,01; NS συμβολίζει μη σημαντικές διαφορές.

Πίνακας 18: Επίδραση του καλλιεργητικού συστήματος (ΚΣ) (συμβατικό: Σ; βιολογικό: Β) και της αλατότητας του νερού άρδευσης (χαμηλή αλατότητα: Χ.Α.; υψηλή αλατότητα: Υ.Α) εμβολιασμένων ή όχι φυτών καθιστού φασολιού με *Rhizobium tropici* CIAT899 (+CIAT899) ή μη (-CIAT899) στις αθροιστικές εκπομπές CO₂-C (kg ha⁻¹) (άνοιξη- καλοκαίρι 2012).

ΗΜΣ	CO ₂ -C (kg ha ⁻¹)					
	30	44	59	66	77	88
Σ-Χ.Α.	8,36±1,11	94,38±13,90	154,13±25,06	221,75±24,75	389,03±52,73	516,13±34,46
Σ-Υ.Α.	9,76±1,62	76,13±27,16	128,00±43,94	233,50±46,35	316,12±77,36	582,63±62,43
Β-Χ.Α.	6,96±1,77	90,50±15,91	157,13±20,98	251,50±23,75	606,43±100,17	760,75±112,37
Β-Υ.Α.	6,78±2,44	117,25±22,92	231,63±27,77	394,88±48,26	505,54±35,90	852,88±169,86
Συμβατικό ΚΣ	9,06	85,25	141,06	227,50	382,19	549,38
Βιολογικό ΚΣ	6,87	103,88	194,38	323,19	580,25	806,81
Χαμηλή αλατότητα	7,66	92,44	155,63	236,63	438,63	638,44
Υψηλή αλατότητα	8,27	96,69	179,81	314,07	523,81	717,75
Στατιστική Σημαντικότητα						
Καλλιεργητικό Σύστημα (ΚΣ)	NS	NS	NS	*	**	**
Αλατότητα (Α)	NS	NS	NS	*	NS	NS
ΚΣ × Α	NS	NS	NS	NS	NS	NS

^α Οι τιμές είναι μέσοι όροι τεσσάρων επαναλήψεων ± τυπικά σφάλματα.

^β Τα επίπεδα σημαντικότητας παρουσιάζονται με (*) για P ≤ 0.05 και (**) για P ≤ 0.01; NS συμβολίζει τις μη σημαντικές διαφορές.

Πίνακας 19: Επίδραση του καλλιεργητικού συστήματος (ΚΣ) (συμβατικό: Σ; βιολογικό: Β) και της αλατότητας του νερού άρδευσης (χαμηλή αλατότητα: Χ.Α.; υψηλή αλατότητα: Υ.Α) εμβολιασμένων φυτών καθιστού φασολιού με *Rhizobium tropici* CIAT899 (+CIAT899) ή μη (-CIAT899) στις αθροιστικές εκπομπές CH₄-C (g ha⁻¹) (άνοιξη-καλοκαίρι 2012).

ΗΜΣ	CH ₄ -C (g ha ⁻¹)					
	30	44	59	66	77	88
Σ-Χ.Α.+ CIAT899	-6,0±0,22	-77,85±4,32	-137,32±10,62	-152,52±14,67	-187,11±14,32	-234,25±12,44
Σ-Χ.Α.- CIAT899	-5,92±0,26	0,34±47,50	25,81±98,70	15,25±98,72	-13,57±97,56	-58,66±97,86
Σ-Υ.Α.+ CIAT899	-6,23±0,31	-131,05±48,13	-244,34±100,82	-256,26±102,71	-287,90±103,71	-329,98±103,70
Σ-Υ.Α.- CIAT899	-5,74±0,36	-28,32±38,47	-93,49±107,61	-135,70±128,43	-166,42±128,03	-203,43±127,99
Β-Χ.Α.+ CIAT899	-6,17±0,12	-39,95±42,20	-10,41±87,98	-0,89±102,88	-35,87±106,61	-90,62±108,46
Β-Χ.Α.- CIAT899	-0,59±0,19	-76,88±3,48	-90,99±47,54	-83,05±73,03	-118,71±72,83	-169,19±73,56
Β-Υ.Α.+ CIAT899	-5,64±0,14	-64,36±2,33	-115,02±4,73	-131,71±5,76	-164,65±8,28	-214,66±9,71
Β-Υ.Α.- CIAT899	-5,71±0,16	-17,52±51,21	-18,83±107,36	-38,03±106,38	-73,96±105,62	-125,98±106,52

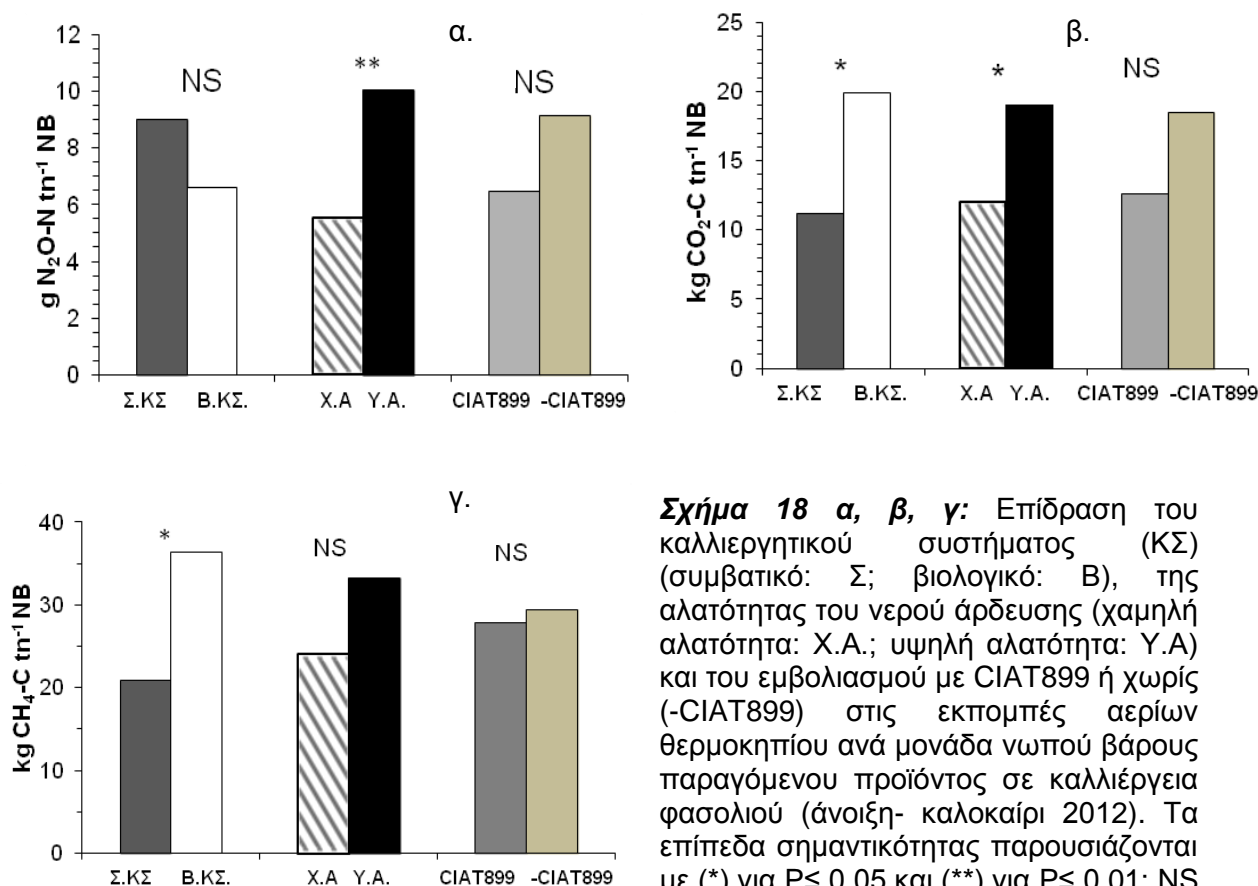
Στατιστική Σημαντικότητα

Καλλιεργητικό Σύστημα (ΚΣ)	NS	NS	NS	NS	NS	NS
Αλατότητα (Α)	NS	NS	NS	NS	NS	NS
Εμβολιασμός CIAT899 (Ε)	NS	NS	NS	NS	NS	NS
ΚΣ × Α	NS	NS	NS	NS	NS	NS
ΚΣ × Ε	NS	NS	NS	NS	NS	NS
Α × Ε	NS	NS	NS	NS	NS	NS
ΚΣ × Α × Ε	NS	NS	NS	NS	NS	NS

^α Οι τιμές είναι μέσοι όροι τεσσάρων επαναλήψεων ± τυπικά σφάλματα.

^β Τα επίπεδα σημαντικότητας παρουσιάζονται με NS να συμβολίζει τις μη σημαντικές διαφορές.

Όταν όμως οι εκπομπές αερίων του θερμοκηπίου εκφράστηκαν ανά μονάδα νωπού βάρους παραγόμενου φασολιού, οι εκπομπές N₂O αποδείχθηκαν παρόμοιες και στα δύο καλλιεργητικά συστήματα, ενώ εκείνες του CO₂ και του CH₄ ήταν σημαντικά υψηλότερες (P=0,0154 και P=0,0164, αντίστοιχα) στο βιολογικό σύστημα καλλιέργειας (Σχ. 18 α, β, γ). Η αλατότητα αύξησε σημαντικά τις εκπομπές N₂O και CO₂ (P=0,0059 και P=0,0459, αντίστοιχα) ανά μονάδα νωπού βάρους παραγόμενου φασολιού (10,04 g ton⁻¹ έναντι 5,56 g ton⁻¹ και 19,08 kg ton⁻¹ έναντι 12,01 kg ton⁻¹, αντίστοιχα) αλλά δεν είχε καμία επίδραση σε αυτές του CH₄. Ο εμβολιασμός του ριζικού συστήματος των φυτών με CIAT899 δεν είχε καμία επίδραση στις εκπομπές N₂O, CO₂ και CH₄ ανά μονάδα νωπού βάρους παραγόμενου φασολιού. Δεν βρέθηκε αλληλεπίδραση μεταξύ των τριών παραγόντων (καλλιεργητικό σύστημα, αλατότητα και εμβολιασμός με CIAT899) όσον αφορά τις εκπομπές αερίων του θερμοκηπίου, όταν αυτές εκφράζονται είτε ανά καλλιεργούμενη μονάδα επιφάνειας είτε ανά μονάδα νωπού βάρους παραγόμενου φασολιού.

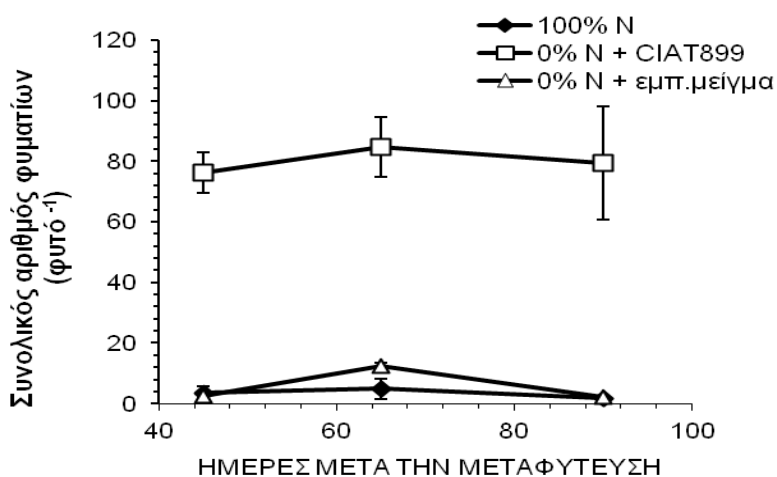


Σχήμα 18 α, β, γ: Επίδραση του καλλιεργητικού συστήματος (ΚΣ) (συμβατικό: Σ; βιολογικό: Β), της αλατότητας του νερού άρδευσης (χαμηλή αλατότητα: Χ.Α.; υψηλή αλατότητα: Υ.Α) και του εμβολιασμού με CIAT899 ή χωρίς (-CIAT899) στις εκπομπές αερίων θερμοκηπίου ανά μονάδα νωπού βάρους παραγόμενου προϊόντος σε καλλιέργεια φασολιού (άνοιξη- καλοκαίρι 2012). Τα επίπεδα σημαντικότητας παρουσιάζονται με (*) για P ≤ 0,05 και (**) για P ≤ 0,01; NS συμβολίζει μη σημαντικές διαφορές.

3.3 Πείραμα Θερμοκηπίου (3^ο)

3.3.1 Σχηματισμός ριζικών φυματίων

Ο εμβολιασμός των φυτών με το στέλεχος *R. tropici* CIAT899 ενίσχυσε τον σχηματισμό ριζικών φυματίων σε σύγκριση τόσο στη μεταχείριση στην οποία δεν πραγματοποιήθηκε εμβολιασμός με αζωτοβακτήρια αλλά και σε αυτή στην οποία έγινε εμβολιασμός με το εμπορικό σκεύασμα (Σχ. 19).



Σχήμα 19: Ο σχηματισμός ριζικών φυματίων σε φυτά υδροπονικής καλλιέργειας φασολιού, εμβολιαζόμενα είτε με το στέλεχος *R. tropici* CIAT899 ή με ένα εμπορικό μείγμα (εμπ. μείγμα) που περιέχει είδη *Rhizobium* και *Azotobacter* ή μη εμβολιασμένα. Τα εμβολιασμένα φυτά τροφοδοτούνταν με Θ.Δ. χωρίς άζωτο (0% N), ενώ τα μη εμβολιασμένα φυτά τροφοδοτούνταν με Θ.Δ. που περιείχε άζωτο συγκέντρωσης 100% του τυπικού συνιστώμενου επίπεδου (100% N). Οι κάθετες μπάρες απεικονίζουν τα τυπικά σφάλματα. Οι τιμές είναι μέσοι όροι τεσσάρων επαναλήψεων.

Ο συνολικός αριθμός των ριζικών φυματίων ανά φυτό στην επέμβαση που πραγματοποιήθηκε εμβολιασμός με *R. tropici* CIAT899 ήταν σημαντικά υψηλότερος (80 φυμάτια ανά φυτό κατά μέσο όρο από τις τρεις δειγματοληψίες) σε σύγκριση όχι μόνο με αυτόν που καταγράφηκε σε μη εμβολιασμένα φυτά (4 φυμάτια ανά φυτό κατά μέσο όρο από τις τρεις δειγματοληψίες), αλλά επίσης και με αυτόν που βρέθηκε στα φυτά που εμβολιάστηκαν με το εμπορικό μείγμα (6 φυμάτια ανά φυτό κατά μέσο όρο από τις τρεις δειγματοληψίες). Ο σχηματισμός φυματίων στα φυτά που παρέχονταν Θ.Δ. με μηδενική συγκέντρωση ολικού αζώτου και εμβολιάστηκαν με το εμπορικό μείγμα παρουσίασε επίσης αύξηση σε σύγκριση με τα μη εμβολιασμένα φυτά. Στατιστικά σημαντική διαφορά όμως βρέθηκε μόνο στη δειγματοληψία που πραγματοποιήθηκε 65 ΗΜΜ (12 έναντι 5 φυματίων ανά φυτό).

3.3.2 Αποτελέσματα αλυσιδωτής αντίδρασης πολυμεράσης (PCR)

Η ανάλυση της νουκλεοτιδικής αλληλουχίας μέσω της PCR αποκάλυψε την παρουσία του *R. tropici* CIAT899 σε όλα τα φυτά που εμβολιάστηκαν με αυτό το αζωτοδεσμευτικό βακτήριο, ενώ το ίδιο το βακτήριο (*R. tropici*) δεν μπόρεσε να απομονωθεί σε ρίζες των φυτών που προέρχονται από τις δύο άλλες επεμβάσεις (μη εμβολιασμός με *R. tropici* ή εμβολιασμός με εμπορικό σκεύασμα). Ωστόσο, στις ρίζες των φυτών που εμβολιάστηκαν με το εμπορικό σκεύασμα που περιείχε μείγμα *Rhizobium* και *Azotobacter* sp, δεν βρέθηκε κανένα από αυτά τα είδη. Επιπλέον, το στέλεχος *Agrobacterium radiobacter* K84 απομονώθηκε σε ρίζες των φυτών από όλες τις επεμβάσεις, συμπεριλαμβανομένου και του μάρτυρα, μολονότι σε αυτή την επέμβαση τα φυτά δεν εμβολιάστηκαν με κάποιο αζωτοδεσμευτικό βακτήριο (Πίνακας 20).

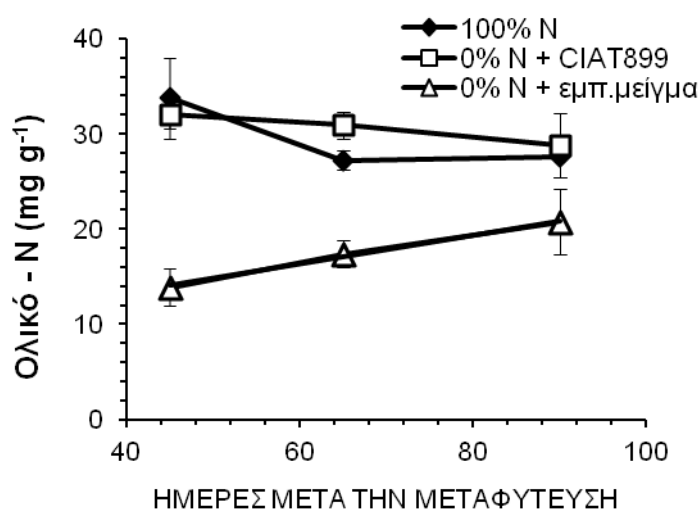
Πίνακας 20: PCR ανάλυση αλληλουχίας των βακτηρίων που έχουν απομονωθεί από βακτήρια ριζικών φυματίων υδροπονικής καλλιέργειας φασολιού, εμβολιασμένα είτε με *R. tropici* CIAT899 ή με εμπορικό μείγμα (*Rhizobium* και *Azotobacter* sp.) ή μη-εμβολιασμένα. Τα εμβολιασμένα φυτά με αζωτοβακτήρια τροφοδοτήθηκαν με Θ.Δ.χωρίς άζωτο (0% N), ενώ τα μη εμβολιασμένα φυτά τροφοδοτήθηκαν με Θ.Δ.που περιείχε άζωτο ίσο με το 100% του τυπικού συνιστώμενου επιπέδου (100% N).

Επέμβαση	Αποτελέσματα BlastN	% Ομοιότητα	<i>Rhizobia/Agrobacterium</i> +
100% N	<i>A. radiobacter</i> strain K84 16S ribosomal RNA, complete sequence	99	+
	<i>Rhizobium tropici</i> CIAT899 strain USDA 9030 16S ribosomal RNA, partial sequence/		
0% N+ CIAT899	<i>A. radiobacter</i> strain K84 16S ribosomal RNA, complete sequence	99	+
0% N+ εμπορικό μείγμα	<i>A. radiobacter</i> strain K84 16S ribosomal RNA, complete sequence	99	+

^a. Το σύμβολο (+) υποδηλώνει την παρουσία του βακτηρίου.

3.3.3 Θρεπτική κατάσταση αζώτου στους φυτικούς ιστούς

Όπως φαίνεται στο Σχ. 20, οι συγκεντρώσεις ολικού αζώτου στο υπέργειο τμήμα των φυτών που τρέφονταν με Θ.Δ. χωρίς N και εμβολιάστηκαν με *R. tropici* δεν ήταν χαμηλότερες σε σχέση με τα μη εμβολιασμένα φυτά που τρέφονταν με πρότυπο Θ.Δ.(100% N), τουλάχιστον από την πρώτη δειγματοληψία (45 ημέρες μετά την μεταφύτευση) και μετά.

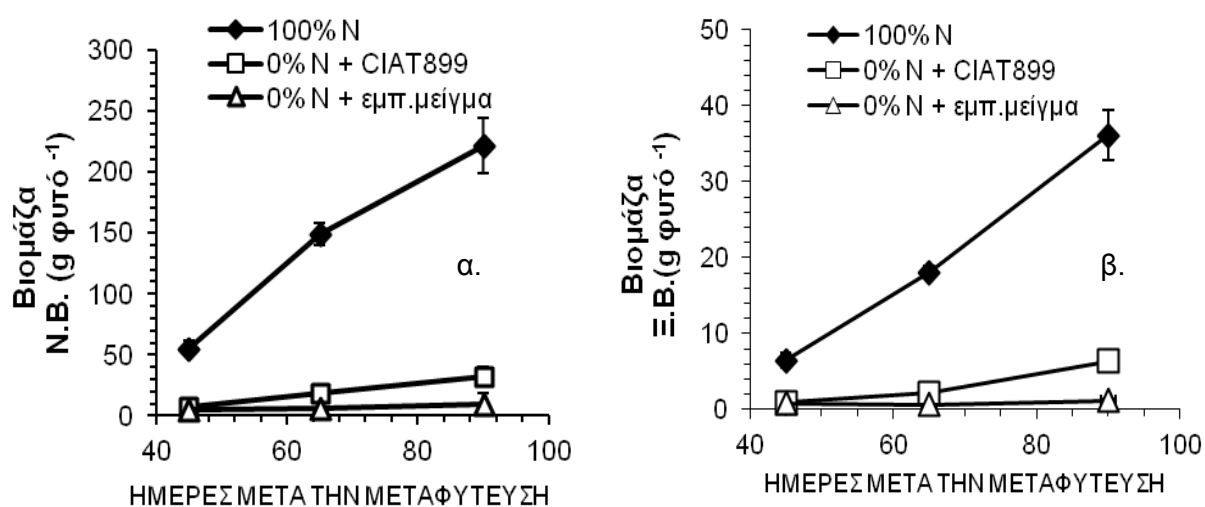


Σχήμα 20: Συγκέντρωση ολικού αζώτου (N) στο υπέργειο τμήμα φυτών φασολιού που καλλιεργήθηκαν υδροπονικά και εμβολιάστηκαν είτε με το στέλεχος *R. tropici* CIAT899 ή με ένα εμπορικό μείγμα (εμπ. μείγμα) που περιέχει είδη *Rhizobium* και *Azotobacter* ή δεν εμβολιάστηκαν με αζωτοβακτήρια. Τα εμβολιασμένα φυτά τροφοδοτούνταν με Θ.Δ. χωρίς άζωτο (0% N), ενώ τα μη εμβολιασμένα φυτά τροφοδοτούνταν με Θ.Δ. που περιείχε άζωτο ίσο με το 100% του τυπικού συνιστώμενου επίπεδου (100% N). Οι κάθετες μπάρες απεικονίζουν τα τυπικά σφάλματα. Οι τιμές είναι μέσοι όροι τεσσάρων επαναλήψεων (n=4).

Ειδικά 65 HMM, η συγκέντρωση ολικού N στο υπέργειο τμήμα των φυτών που τροφοδοτούνταν με Θ.Δ. χωρίς άζωτο και εμβολιάστηκαν με το στέλεχος CIAT899 ήταν ακόμη υψηλότερη (31 mg g⁻¹ έναντι 27 mg g⁻¹) σε σύγκριση με τα μη εμβολιασμένα φυτά που τροφοδοτούνταν με τυπικό Θ.Δ.(100% N). Από την άλλη πλευρά, το υπέργειο τμήμα των φυτών που τρέφονταν με Θ.Δ. χωρίς N και είχαν εμβολιαστεί με εμπορικό σκεύασμα αζωτοβακτηρίων περιείχε λιγότερο N (17,4 mg g⁻¹ κατά μέσο όρο από τις τρεις δειγματοληψίες) σε σύγκριση με εκείνα που τρέφονται με πρότυπο Θ.Δ. (100% N).

3.3.4 Ολική βιομάζα και παραγωγή

Η ολική βιομάζα του υπέργειου τμήματος των φυτών που εμβολιάστηκαν με το στέλεχος CIAT899 και τροφοδοτήθηκαν με Θ.Δ. χωρίς άζωτο, όπως και η ολική απόδοση σε νωπούς πράσινους λοβούς ήταν αισθητά χαμηλότερες σε σύγκριση με τις αντίστοιχες τιμές στα φυτά που δεν εμβολιάστηκαν με αζωτοβακτήρια και τροφοδοτήθηκαν με 100% N. Ακόμη χαμηλότερη βιομάζα παρουσίασαν και τα φυτά που εμβολιάστηκαν με το εμπορικό σκεύασμα και τροφοδοτούνταν επίσης με 0% N.



Σχήμα 21 α, β: Ολική βιομάζα (νωπό και ξηρό βάρος) υπέργειου τμήματος φυτών φασολιού που καλλιεργήθηκαν υδροπονικά και εμβολιάστηκαν είτε με το στέλεχος *R. tropici* CIAT899 ή με ένα εμπορικό μείγμα (εμπ. μείγμα) που περιέχει είδη *Rhizobium* και *Azotobacter* ή δεν εμβολιάστηκαν με αζωτοβακτήρια. Τα εμβολιασμένα φυτά τροφοδοτούνταν με Θ.Δ. χωρίς άζωτο (0% N), ενώ τα μη εμβολιασμένα φυτά τροφοδοτούνταν με Θ.Δ. που περιείχε άζωτο ίσο με το 100% του τυπικού συνιστώμενου επίπεδου (100% N). Κάθετες μπάρες απεικονίζουν τα τυπικά σφάλματα. Οι τιμές είναι μέσοι όροι τεσσάρων επαναλήψεων (n=4).

Συγκεκριμένα, 45 HMM η ολική βιομάζα του υπέργειου τμήματος (νωπό και ξηρό βάρος) των φυτών που εμβολιάστηκαν είτε με το CIAT899 ή με το εμπορικό μείγμα δεν διέφερε σημαντικά (Σχ. 21 α, β). Αντίθετα, 65 και 90 HMM η ολική νωπή βιομάζα των φυτών που εμβολιάστηκαν με CIAT899 παρουσίασε αύξηση σε σύγκριση με αυτή των φυτών που εμβολιάστηκαν με το εμπορικό σκεύασμα αλλά μόνο στις 65 HMM η διαφορά ήταν στατιστικά σημαντική (18,4 g έναντι 5,2 ανά φυτό, αντίστοιχα). Τα φυτά της επέμβασης του μάρτυρα (μη εμβολιασμένα και παροχή θρεπτικού διαλύματος 100% N) υπερέχον σημαντικά και στις τρεις δειγματοληψίες όσον αφορά

την ολική βιομάζα με τελική τιμή (90HMM) 221,43 g ανά φυτό έναντι 32,31 g (0%+CIAT899) και 9,5 g ανά φυτό (0%+ εμπ. μείγμα) στις δύο επεμβάσεις με μηδενική παροχή αζώτου. Η ολική ξηρή βιομάζα εμφάνισε παρόμοιες διαφορές μεταξύ των μεταχειρίσεων σε όλη τη διάρκεια του πειράματος.

Η απόδοση σε νωπούς πράσινους λοβούς ήταν σημαντικά μεγαλύτερη στα φυτά του μάρτυρα σε σύγκριση με αυτά που εμβολιάστηκαν είτε με το CIAT899 ή με το εμπορικό μείγμα (107,1 g έναντι 18,5 g και 3,8 g αντίστοιχα) (Πίνακας 21). Η ίδια τάση παρατηρήθηκε και με τις υπόλοιπες παραμέτρους απόδοσης, όπως τον συνολικό αριθμό λοβών, το μέσο βάρος λοβού και την επί % ξηρά ουσία λοβού.

Παρόλο που και οι δύο επεμβάσεις εμβολιασμού με αζωτοβακτήρια εμφάνισαν χαμηλότερες τιμές στις παραπάνω παραμέτρους σε σύγκριση με τον μάρτυρα, η επέμβαση με τον εμβολιασμό του CIAT899 υπερέιχε σημαντικά σε όλες τις παραμέτρους παραγωγής σε σύγκριση με αυτές που προέκυψαν με την χρήση του εμπορικού μείγματος.

Πίνακας 21: Απόδοση σε νωπό βάρος (N.B, φυτό⁻¹), ξηρό βάρος (Ξ.Β, φυτό⁻¹), συνολικό αριθμό λοβών (λοβοί φυτό⁻¹), μέσο βάρος λοβού (M.B, g) και στο ποσοστό ξηράς ουσίας (Ξ.Ο., %) σε υδροπονική καλλιέργεια φασολιού, εμβολιασμένου είτε με *R. tropici* CIAT899 ή με εμπορικό μείγμα που περιέχει διάφορα είδη *Rhizobium* και *Azotobacter*, ή μη-εμβολιασμένου με αζωτοβακτήρια. Τα εμβολιασμένα φυτά τροφοδοτήθηκαν με Θ.Δ. χωρίς άζωτο (0%N), ενώ τα μη εμβολιασμένα φυτά τροφοδοτήθηκαν με Θ.Δ. που περιείχε 100% άζωτο (100% N) του τυπικού συνιστώμενου επιπέδου.

Επέμβαση	Λοβοί (φυτό ⁻¹)	Απόδοση N.B (g φυτό ⁻¹)	Απόδοση Ξ.Β (g φυτό ⁻¹)	M.B Λοβών (g)	Ξ.Ο. (%)
100% N	11,5±0,5 a	107,1±7,5 a	8,6±0,81 a	9,3±0,55 a	8,01±0,2 b
0% N + CIAT899	3,1±0,1 b	18,5±1,1 b	1,7±0,13 b	6,5±0,54 b	9,04±0,3 a
0% N + εμπ. μείγμα	1,4±0,4 c	3,8±0,2 c	0,3±0,05 c	2,3±0,37 c	7,53±0,2 b
Στατιστική σημαντικότητα					
	***	***	***	***	**

^a Οι τιμές είναι μέσοι όροι τεσσάρων επαναλήψεων ± τυπικά σφάλματα.

^β Τα επίπεδα σημαντικότητας παρουσιάζονται με (**) για P ≤ 0,01 και (***) για P ≤ 0,001; NS συμβολίζει τις μη σημαντικές διαφορές.

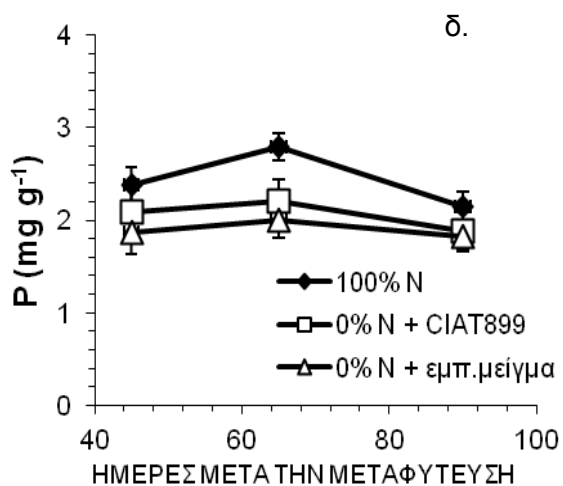
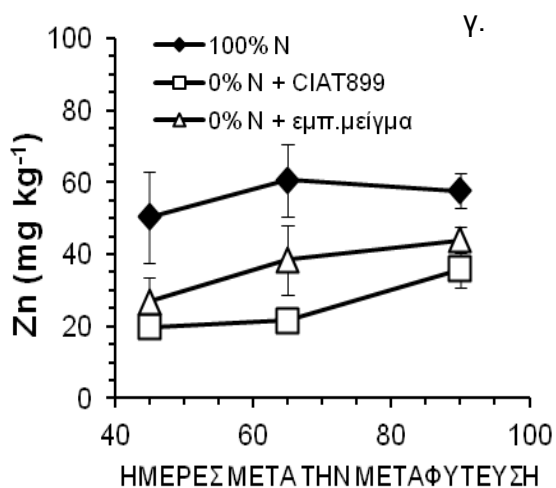
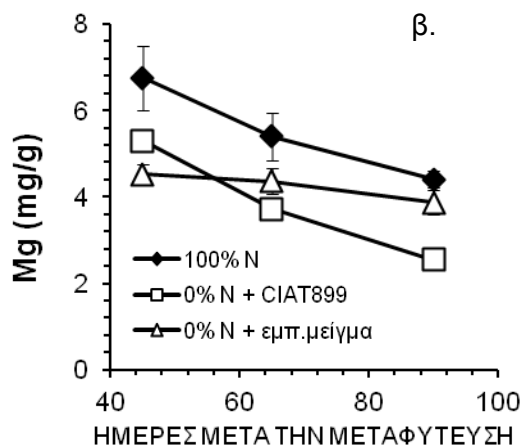
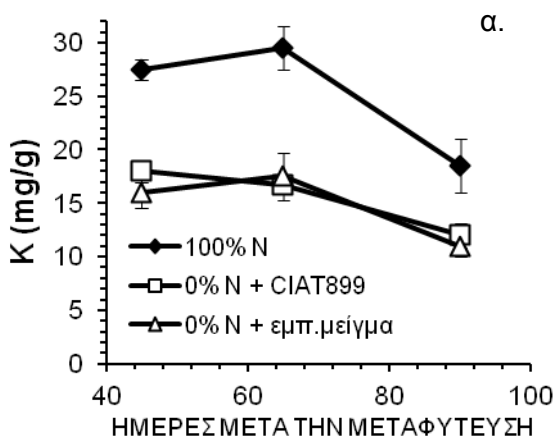
3.3.5 Θρεπτική κατάσταση φυτικών ιστών

Η παροχή θρεπτικού διαλύματος χωρίς άζωτο περιόρισε αισθητά τα επίπεδα K^+ , Mg^{2+} και Zn^{2+} στο υπέργειο τμήμα των φυτικών ιστών σε σχέση με αυτά του μάρτυρα (100% N), ανεξάρτητα από την επέμβαση εμβολιασμού (Σχ. 22 α, β, γ). Η συγκέντρωση Mg^{2+} στο υπέργειο μέρος των φυτικών ιστών εμφάνισε σημαντικά μεγαλύτερες τιμές στα φυτά της επέμβασης του μάρτυρα ($5,52 \text{ mg g}^{-1}$, μέσος όρος από τις τρεις δειγματοληψίες) σε σύγκριση με τις δύο επεμβάσεις εμβολιασμού με αζωτοβακτήρια ($3,86 \text{ mg g}^{-1}$ όταν τα φυτά εμβολιάστηκαν με το CIAT899 και $4,25 \text{ mg g}^{-1}$ όταν τα φυτά εμβολιάστηκαν με το εμπορικό μείγμα). Μόνο στην τρίτη δειγματοληψία (90 HMM) η συγκέντρωση Mg^{2+} στους φυτικούς ιστούς των φυτών που τροφοδοτούνταν με Θ.Δ. χωρίς άζωτο και εμβολιάστηκαν με το εμπορικό μείγμα ($3,87 \text{ mg g}^{-1}$) έτειναν να προσεγγίσουν εκείνη των φυτών του μάρτυρα ($4,41 \text{ mg g}^{-1}$) (Σχ. 22 β).

Τα επίπεδα K στο υπέργειο μέρος των φυτών που τροφοδοτούνταν με Θ.Δ. χωρίς άζωτο ήταν σημαντικά χαμηλότερα και στις τρεις δειγματοληψίες ($15,2 \text{ mg g}^{-1}$, μέσος όρος από τις τρεις δειγματοληψίες) σε σύγκριση με εκείνα των φυτών του μάρτυρα που τροφοδοτούνταν με πρότυπο Θ.Δ. πλήρες αζώτου ($25,17 \text{ mg g}^{-1}$, μέσος όρος από τις τρεις δειγματοληψίες) (Σχ. 22α).

Όσον αφορά, τα επίπεδα Zn (Σχ. 22γ) οι τιμές που προσδιορίστηκαν στα φυτά που τροφοδοτούνταν με θρεπτικό διάλυμα χωρίς άζωτο ήταν πάρα πολύ χαμηλές και στις τρεις δειγματοληψίες ($28,09 \text{ mg g}^{-1}$, μέσος όρος από τις τρεις δειγματοληψίες) σε σύγκριση με τα επίπεδα των φυτών που τροφοδοτούνταν με πρότυπο διάλυμα θρέψης το οποίο περιείχε 100% άζωτο ($56,22 \text{ mg g}^{-1}$, μέσος όρος από τις τρεις δειγματοληψίες).

Επίσης, η παροχή θρεπτικού διαλύματος χωρίς άζωτο μείωσε και την συγκέντρωση του φωσφόρου στο υπέργειο τμήμα των φυτών ανεξάρτητα την μεταχείριση εμβολιασμού με αζωτοβακτήρια (Σχ. 22δ). Και στις τρεις δειγματοληψίες τα επίπεδα φωσφόρου στους βλαστούς των φυτών που παρέχονταν Θ.Δ. με πλήρες άζωτο ήταν υψηλότερα ($2,44 \text{ mg g}^{-1}$, μέσος όρος των τριών δειγματοληψιών) σε σύγκριση με εκείνα των εμβολιασμένων φυτών που δέχτηκαν διάλυμα θρέψης χωρίς άζωτο ($1,98 \text{ mg g}^{-1}$, μέσος όρος των τριών δειγματοληψιών), αν και μόνο 65 HMM η διαφορά αυτή ήταν στατιστικά σημαντική.

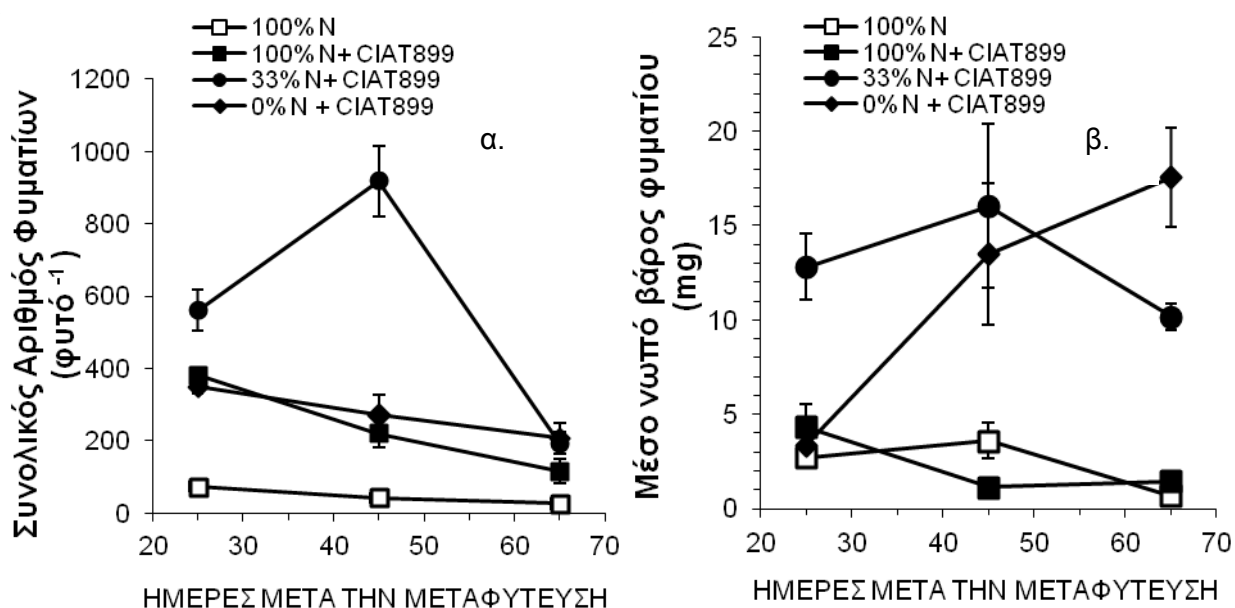


Σχήμα 22 α, β, γ, δ: Συγκεντρώσεις μαγνησίου (Mg), καλίου (K), ψευδαργύρου (Zn) και φωσφόρου (P) στο υπέργειο μέρος φυτών φασολιού που καλλιεργήθηκαν υδροπονικά και είτε εμβολιάστηκαν με *R. tropici* CIAT899 ή με εμπορικό μείγμα που περιέχει διάφορα είδη *Rhizobium* και *Azotobacter*, ή δεν εμβολιάστηκαν με αζωτοβακτήρια. Τα εμβολιασμένα φυτά τροφοδοτήθηκαν με Θ.Δ. χωρίς άζωτο (0%N), ενώ τα μη εμβολιασμένα φυτά τροφοδοτήθηκαν με Θ.Δ. πλήρες άζωτο (100%) του τυπικού συνιστώμενου επιπέδου N.

3. 4 Πείραμα Θερμοκηπίου (4^ο)

3.4.1 Σχηματισμός ριζικών φυματίων

Ο εμβολιασμός με το στέλεχος Rt CIAT899 αύξησε σημαντικά τον συνολικό αριθμό φυματίων που σχηματίστηκαν στις ρίζες των φυτών ιδιαίτερα κατά τις δύο πρώτες δειγματοληψίες, σε σύγκριση με τα μη εμβολιασμένα φυτά του μάρτυρα (100%N–CIAT899) (Σχ. 23 α). Όσον αφορά, τη σύγκριση μεταξύ των μεταχειρίσεων στις οποίες εφαρμόστηκε ο εμβολιασμός με CIAT899, η μεταχείριση που περιείχε άζωτο ίσο με το 33% του τυπικού συνιστώμενου επιπέδου N (33% N) ενίσχυσε περισσότερο το σχηματισμό φυματίων, ιδιαίτερα στα πρώιμα στάδια βλαστικής ανάπτυξης φυτών και συγκεκριμένα 25 HMM (561 φυμάτια ανά φυτό έναντι 365 φυμάτια ανά φυτό; μέσος όρος των υπόλοιπων δύο μεταχειρίσεων) καθώς και στο πρώιμο στάδιο γεμίσματος λοβών, συγκεκριμένα 45 HMM (918 φυμάτια ανά φυτό έναντι 245 φυμάτια ανά φυτό; μέσος όρος των υπόλοιπων δύο μεταχειρίσεων).



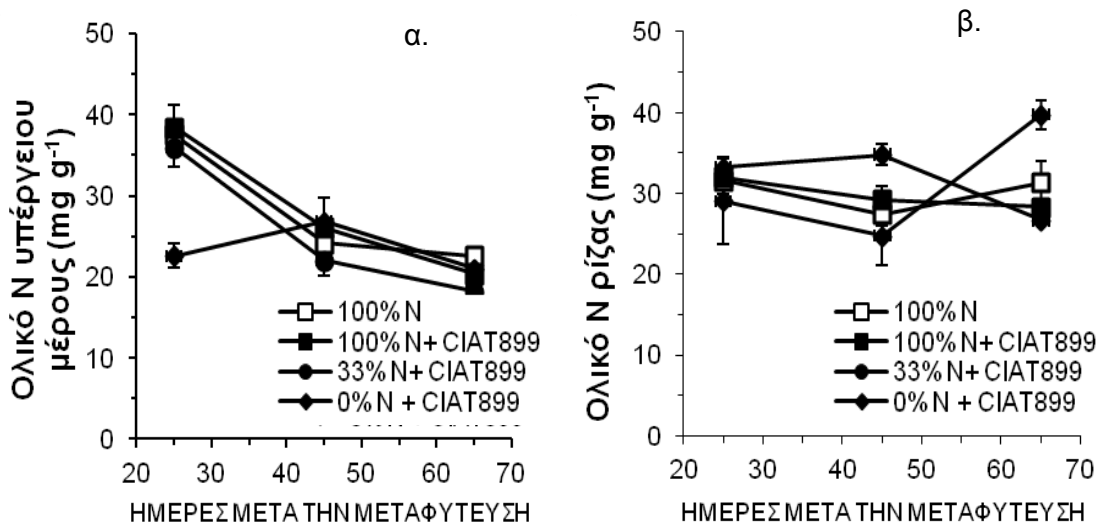
Σχήμα 23 α, β: Συνολικός αριθμός ριζικών φυματίων (α) και μέσο βάρος φυματίου (β) σε φυτά υδροπονικής καλλιέργειας αναρριχώμενου φασολιού, εμβολιασμένου με *R. tropici* CIAT899 ή μη εμβολιασμένου με αζωτοβακτήρια. Τα εμβολιασμένα φυτά τροφοδοτήθηκαν με Θ.Δ. που περιείχε άζωτο ίσο με 100%, 33% ή 0% του τυπικού συνιστώμενου επιπέδου, ενώ τα μη εμβολιασμένα φυτά τροφοδοτήθηκαν με Θ.Δ. που περιείχε άζωτο ίσο με 100% του τυπικού συνιστώμενου επιπέδου. Οι κάθετες ράβδοι απεικονίζουν τα τυπικά σφάλματα. Οι τιμές είναι μέσοι όροι τεσσάρων επαναλήψεων.

Τα φυτά, τα οποία εμβολιάστηκαν με CIAT899 σχημάτισαν παρόμοιο αριθμό φυματίων ανά φυτό στο πρώιμο βλαστικό στάδιο (25 HMM) όταν τροφοδοτούνταν με Θ.Δ. πλήρες αζώτου (100% N) με εκείνα που τροφοδοτήθηκαν με Θ.Δ. διάλυμα θρέψης χωρίς άζωτο (0% N) (365 φυμάτια, μέσος όρος των δύο μεταχειρίσεων).

Το μέσο νωπό βάρος φυματίου ήταν σημαντικά υψηλότερο στα εμβολιασμένα φυτά που τροφοδοτήθηκαν με Θ.Δ. 33% του τυπικού συνιστώμενου επιπέδου N (33% N) σε σύγκριση με αυτά που τροφοδοτήθηκαν με Θ.Δ. πλήρες αζώτου (100% N) σε όλες τις δειγματοληψίες (13,02 mg έναντι 2,31 mg, κατά μέσο όρο από τις τρεις δειγματοληψίες), ανεξάρτητα από τον εμβολιασμό των ριζών τους με Rt CIAT899) (Σχ. 23β). Τα φυτά που τροφοδοτήθηκαν με Θ.Δ. χωρίς άζωτο (0% N+ CIAT899) εμφάνισαν το ίδιο χαμηλό μέσο νωπό βάρος με αυτά που δέχτηκαν Θ.Δ. πλήρες αζώτου (100% N± CIAT899) 25 HMM (3,40 mg και 3,52 mg αντίστοιχα). Ωστόσο, 45 HMM το μέσο νωπό βάρος φυματίου των φυτών που τρέφονταν με Θ.Δ. χωρίς άζωτο (0% N) (13,5 mg) αυξήθηκε θεαματικά προσεγγίζοντας το επίπεδο των φυτών που τροφοδοτήθηκαν με Θ.Δ. με άζωτο ίσο με το 33% του τυπικού συνιστώμενου επιπέδου N (16 mg). Επιπλέον, στις 65 HMM το μεγαλύτερο μέσο νωπό βάρος φυματίου (17,60 mg) καταγράφηκε στην μεταχείριση Θ.Δ. χωρίς άζωτο (0% N+ CIAT899), σε σύγκριση με τις άλλες τρεις μεταχειρίσεις (4,10 mg, μέσος όρος των υπόλοιπων τριών μεταχειρίσεων).

3.4.2 Θρεπτική κατάσταση αζώτου στους φυτικούς ιστούς

Το επίπεδο ολικού αζώτου στο υπέργειο τμήμα των φυτών που εμβολιάστηκαν με CIAT899 και τροφοδοτήθηκαν με πλήρες Θ.Δ. σε άζωτο (100% N + CIAT899) ή περιείχε 33% του συνιστώμενου N (33% N+ CIAT899) ήταν τόσο υψηλά (37,22 mg g⁻¹) όσο και στα μη εμβολιασμένα φυτά που δέχτηκαν πλήρες Θ.Δ. σε άζωτο (37,48 mg g⁻¹), αλλά σημαντικά υψηλότερα από αυτά που διατρεφόταν με Θ.Δ. χωρίς άζωτο (22,60 mg g⁻¹) στο πρώιμο βλαστικό στάδιο, δηλαδή 25 HMM (Σχ. 24 α). Ωστόσο, 45 και 65 HMM, το επίπεδο ολικού N στο υπέργειο τμήμα των φυτών που διατρεφόταν με Θ.Δ. χωρίς άζωτο και εμβολιάστηκαν με CIAT899 (0% N+ CIAT899) ήταν τόσο υψηλό όσο και στις άλλες τρεις μεταχειρίσεις. Οι συνολικές συγκεντρώσεις αζώτου στις ρίζες των φυτών ήταν παρόμοιες σε όλες τις μεταχειρίσεις (από 29,03 έως 34,80 mg g⁻¹) 25 και 45 HMM.



Σχήμα 24 α, β: Συγκέντρωση ολικού αζώτου (N) στο υπέργειο τμήμα (α) και τη ρίζα (β) φυτών αναρριχώμενου φασολιού υδροπονικής καλλιέργειας, εμβολιασμένου με *R. tropici* CIAT899 ή μη εμβολιασμένου με αζωτοβακτήρια. Τα εμβολιασμένα φυτά τροφοδοτήθηκαν με Θ.Δ. που περιείχε άζωτο ίσο με 100%, 33% ή 0% του τυπικού συνιστώμενου επιπέδου, ενώ τα μη εμβολιασμένα φυτά τροφοδοτήθηκαν με Θ.Δ. που περιείχε άζωτο ίσο με 100% του τυπικού συνιστώμενου επιπέδου. Οι κάθετες ράβδοι απεικονίζουν τα τυπικά σφάλματα. Οι τιμές είναι μέσοι όροι τεσσάρων επαναλήψεων.

Αντίθετα, 65 HMM το υψηλότερο επίπεδο ολικής συγκέντρωσης αζώτου στις ρίζες των φυτών ($39,75 \text{ mg g}^{-1}$) μετρήθηκε στα φυτά που τροφοδοτούνταν με θρεπτικό διάλυμα χωρίς άζωτο (0% N) και εμβολιάστηκαν με CIAT899, σε σύγκριση με τις υπόλοιπες τρεις μεταχειρίσεις ($28,76 \text{ mg g}^{-1}$, μέσος όρος των τριών μεταχειρίσεων) (Σχ. 24β).

3.4.3 Ποσοστό αζώτου προερχόμενο από την ατμόσφαιρα

Στο Πίνακα 22 παρουσιάζονται οι τιμές $\delta^{15}\text{N}$ (‰) σε φυτά αναρριχώμενου φασολιού που δέχθηκαν διαφορετικές επεμβάσεις όσον αφορά τη συγκέντρωση N στο παρεχόμενο Θ.Δ. (100% N- CIAT899, 100% N+ CIAT899, 33% N+ CIAT899). Την μεγαλύτερη βιολογική δέσμευση αζώτου της ατμόσφαιρας (58,14%) την παρουσίασαν τα φυτά που εμβολιάστηκαν με CIAT899 και τροφοδοτούνταν με θρεπτικό διάλυμα που περιείχε άζωτο ίσο με 33% του τυπικού συνιστώμενου επιπέδου N (33% N+ CIAT899), σε σύγκριση με τα φυτά των μεταχειρίσεων που δέχτηκαν διάλυμα θρέψης πλήρες αζώτου (100% N± CIAT899), ανεξάρτητα από τον εμβολιασμό με το CIAT899 (Πίνακας 22). Η αρνητική επίδραση της παροχής

πλήρους Θ.Δ. σε άζωτο όσον αφορά την βιολογική αζωτοδέσμευση σε σύγκριση με αυτά που λάμβαναν N περιορισμένο στο 1/3 της κανονικής παροχής είναι σαφής.

Η συνολική ποσότητα αζώτου που συσσωρεύσαν τα φυτά φασολιού στο υπέργειο μέρος τους (kg ha^{-1}) ήταν σημαντικά μεγαλύτερη ($P=0,0001$) στις μεταχειρίσεις με χορήγηση πλήρους θρεπτικού διαλύματος σε άζωτο, ανεξάρτητα από τον εμβολιασμό τους με CIAT899 (μέσος όρος των δύο μεταχειρίσεων με πλήρες άζωτο $198,31 \text{ kg ha}^{-1}$) σε σύγκριση με την μεταχείριση με μειωμένο (1/3) επίπεδο N ($92,99 \text{ kg ha}^{-1}$).

Πίνακας 22: Επίδραση του εμβολιασμού με *R. tropici* (στέλεχος CIAT899) σε υδροπονική καλλιέργεια αναρριχώμενου φασολιού τροφοδοτούμενου με διαφορετικά επίπεδα αζώτου στο διάλυμα θρέψης στη φυσική αφθονία ^{15}N φυτών φασολιού σε σχέση με το ατμοσφαιρικό άζωτο N_2 ($\delta^{15}\text{N} \text{ ‰}$), στο ποσοστό του αζώτου που προέρχεται από την ατμόσφαιρα (Ndfa %), στη συνολική ποσότητα αζώτου φυτών φασολιού (kg N ha^{-1}) και στη ποσότητα δεσμευμένου N από την ατμόσφαιρα. Τα εμβολιασμένα φυτά τροφοδοτήθηκαν με Θ.Δ. που περιείχε άζωτο ίσο με 100%, 33% ή 0% του τυπικού συνιστώμενου επιπέδου, ενώ τα μη εμβολιασμένα φυτά τροφοδοτήθηκαν με Θ.Δ. που περιείχε άζωτο ίσο με 100% του τυπικού συνιστώμενου επιπέδου. Οι τιμές είναι μέσοι όροι τεσσάρων επαναλήψεων.

Επέμβαση	$\delta^{15}\text{N}$ (‰)	Ndfa (%)	N (kg ha^{-1})	Δεσμευμένο-N (kg ha^{-1})
100% N-CIAT899	0,09-0,93	-4,85 c	212,18 a	-7,89 b
100% N+CIAT899	0,23-0,85	-2,58 c	184,44 a	-6,20 b
33% N+CIAT899	(-1,15)-(-0,51)	58,14 b	92,99 b	54,30 a
0% N+ CIAT899	(-1,93)-(-1,39)	100,00 a	48,75 c	49,19 a
Στατιστική σημαντικότητα				
		***	***	**

^a Οι τιμές είναι μέσοι όροι τεσσάρων επαναλήψεων \pm τυπικά σφάλματα.

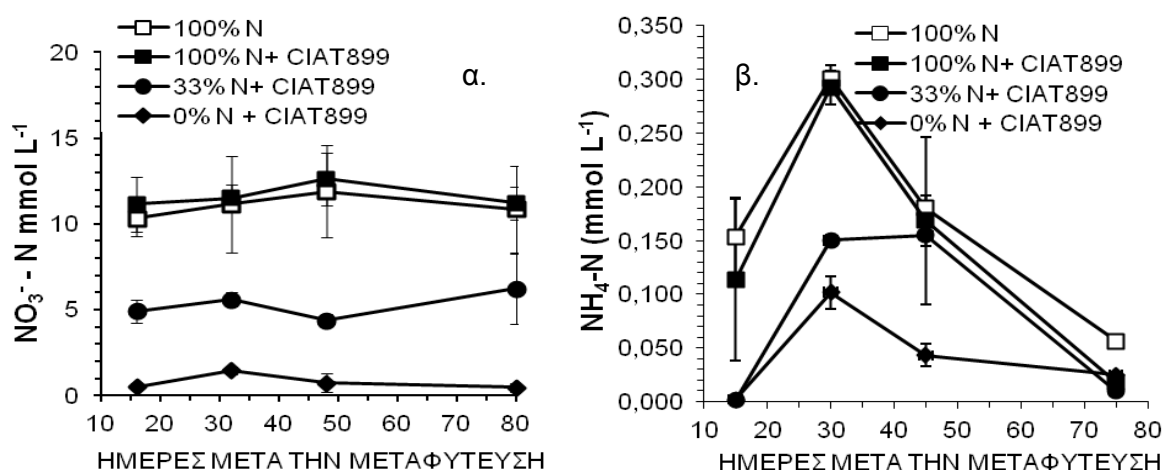
^b Τα επίπεδα σημαντικότητας παρουσιάζονται με (**) για $P \leq 0,01$; NS υποδηλώνει μη σημαντικές διαφορές.

Όταν το ποσοστό αζώτου που δεσμεύτηκε από την ατμόσφαιρα εκφράστηκε σε kg ha^{-1} , οι δύο μεταχειρίσεις με πλήρη παροχή N και ανεξάρτητα από τον εμβολιασμό CIAT899 παρουσίασαν αρνητικές τιμές ($-7,05 \text{ kg ha}^{-1}$) σε αντίθεση με τις εμβολιασμένες μεταχειρίσεις με μερική ή μηδενική παροχή N, οι οποίες παρουσίασαν σημαντικά υψηλότερες τιμές ($51,75 \text{ kg ha}^{-1}$, μέση τιμή των δύο μεταχειρίσεων)

ανεξάρτητα από το ποσοστό N του θρεπτικού διαλύματος. Η αρνητική τιμή δεν έχει φυσική υπόσταση και συνιστά στατιστική απόκλιση από το πραγματικό ποσοστό δεσμευμένου N που δεν μπορεί να είναι χαμηλότερο από μηδέν.

3.4.4 Συγκέντρωση νιτρικών ($\text{NO}_3\text{-N}$) και αμμωνιακών ($\text{NH}_4\text{-N}$) σε θρεπτικά διαλύματα ανακύκλωσης

Οι συγκεντρώσεις NO_3^- στα Θ.Δ. που συλλεγόταν και ανακυκλώνονταν στα κλειστά υδροπονικά συστήματα διατηρήθηκαν σε ελαφρώς υψηλότερα επίπεδα από τις εφαρμοζόμενες συγκεντρώσεις ολικού N ($\text{NO}_3\text{-N} + \text{NH}_4\text{-N}$) στα παρεχόμενα Θ.Δ. που περιείχαν άζωτο (Σχ. 25α). Στη μεταχείριση 0% N + CIAT899, η συγκέντρωση NO_3^- ήταν σχεδόν μηδέν 15, 45 και 75 HMM αλλά έδειξε μια μικρή αύξηση στο επίπεδο των $1,46 \text{ mmol L}^{-1}$ στις 30 HMM.



Σχήμα 25 α, β: Συγκέντρωση νιτρικών ($\text{NO}_3 - \text{N}$) και αμμωνιακών ($\text{NH}_4 - \text{N}$) στο ανακυκλωμένο Θ.Δ. κλειστού υδροπονικού συστήματος καλλιέργειας αναρριχώμενου φασολιού, εμβολιασμένου με *R. tropici* CIAT899 ή μη εμβολιασμένου με αζωτοβακτήρια. Τα εμβολιασμένα φυτά τροφοδοτήθηκαν με Θ.Δ. που περιείχε άζωτο ίσο με 100%, 33% ή 0% του τυπικού συνιστώμενου επιπέδου, ενώ τα μη εμβολιασμένα φυτά τροφοδοτήθηκαν με Θ.Δ. που περιείχε άζωτο ίσο με 100% του τυπικού συνιστώμενου επιπέδου. Οι κάθετες ράβδοι απεικονίζουν τα τυπικά σφάλματα. Οι τιμές είναι μέσοι όροι τεσσάρων επαναλήψεων.

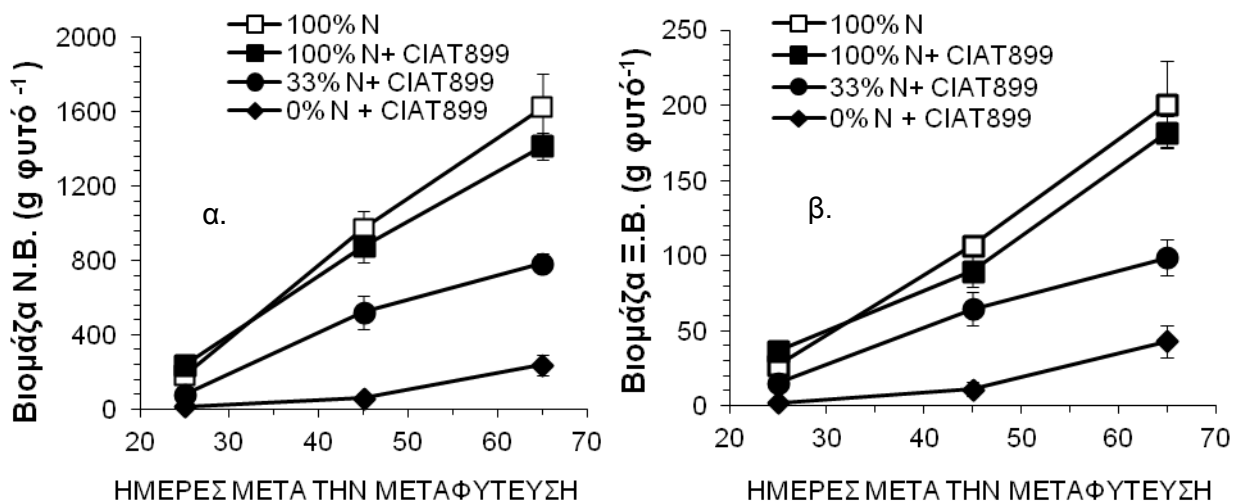
Οι μεγαλύτερες συγκεντρώσεις NO_3^- στα ανακυκλούμενα Θ.Δ. παρουσιάστηκαν στις μεταχειρίσεις με 100% N στο παρεχόμενο Θ.Δ. σε όλη την καλλιεργητική περίοδο ($11,33 \text{ mmol L}^{-1}$, μέσος όρος των τεσσάρων δειγματοληψιών των δύο μεταχειρίσεων).

Οι συγκεντρώσεις των NH_4^+ στο ανακυκλούμενο Θ.Δ. ήταν σε όλη την καλλιεργητική περίοδο πολύ χαμηλότερες από εκείνες που εφαρμοζόταν στο

παρεχόμενο Θ.Δ. στις τρεις μεταχειρίσεις που περιείχαν άζωτο, με τάση να μειώνονται με την πάροδο του χρόνου (Σχ. 26β). Όσον αφορά την επίδραση της μεταχείρισης, τα επίπεδα NH_4^+ στα ανακυκλούμενα θρεπτικά διαλύματα των μεταχειρίσεων με παροχή N στο 100% της συνιστώμενης συγκέντρωσης ήταν παρόμοια, ανεξάρτητα από τον εμβολιασμό με CIAT899, και υψηλότερα σε σχέση με την μεταχείριση 33% N + CIAT899 στις δύο πρώτες δειγματοληψίες (15 και 30 HMM). Ωστόσο, 45 και 75 HMM, η συγκέντρωση NH_4^+ στα ανακυκλούμενα θρεπτικά διαλύματα της μεταχείρισης 33% N + CIAT899 έφτασε στα ίδια επίπεδα με τις δύο μεταχειρίσεις στις οποίες το N ήταν στο 100% της συνιστώμενης συγκέντρωσης (0,16 και 0,10 mmol L⁻¹, αντίστοιχα). Τα πιο χαμηλά επίπεδα NH_4^+ στα ανακυκλούμενα θρεπτικά διαλύματα εμφανίστηκαν στη μεταχείριση 0% N + CIAT899 στις 30 και 45 HMM (0,10 και 0,04 mmol L⁻¹, αντίστοιχα), ενώ στις 15 HMM η συγκέντρωση NH_4^+ στη μεταχείριση αυτή ήταν μηδενική στο ανακυκλούμενο Θ.Δ.. Στην τελευταία δειγματοληψία (75 HMM), τα επίπεδα NH_4^+ στα ανακυκλούμενα θρεπτικά διαλύματα ήταν πολύ χαμηλά (0,01 έως 0,06 mmol L⁻¹), χωρίς σημαντικές διαφορές μεταξύ των επεμβάσεων.

3.4.5 Ολική βιομάζα και παραγωγή

Τα φυτά της επέμβασης με 100% N στο Θ.Δ. παρουσίασαν παρόμοια νωπή και ξηρή βιομάζα, ανεξάρτητα από το αν είχαν εμβολιαστεί οι ρίζες τους με Rt CIAT899 ή όχι (Σχ. 26 α, β). Ωστόσο, η παροχή Θ.Δ. είτε με μειωμένη συγκέντρωση N (33% του τυπικού συνιστώμενου επιπέδου N) είτε με 0% N μείωσε σημαντικά τη νωπή και ξηρή βιομάζα των φυτών και στις τρεις δειγματοληψίες σε σύγκριση με την παροχή Θ.Δ. με 100 % N, ανεξάρτητα από τον εμβολιασμό με το CIAT899. Επιπλέον, τα φυτά που εμβολιάστηκαν με το CIAT899 εμφάνισαν σημαντικά υψηλότερη νωπή και ξηρή βιομάζα όταν το παρεχόμενο N ήταν 33 % του τυπικού συνιστώμενου επιπέδου σε σύγκριση με εκείνα που διατρεφόταν με Θ.Δ. χωρίς άζωτο (ολική νωπή βιομάζα 783,43 g έναντι 237,35 g ανά φυτό, αντίστοιχα, στις 65 HMM).



Σχήμα 26 α, β: Ολική βιομάζα (νωπό και ξηρό βάρος) υπέργειου τμήματος φυτών υδροπονικής καλλιέργειας αναρριχώμενου φασολιού, εμβολιασμένου με *R. tropici* CIAT899 ή μη εμβολιασμένου με αζωτοβακτήρια. Τα εμβολιασμένα φυτά τροφοδοτήθηκαν με Θ.Δ. που περιείχε άζωτο ίσο με 100%, 33% ή 0% του τυπικού συνιστώμενου επίπεδου, ενώ τα μη εμβολιασμένα φυτά τροφοδοτήθηκαν με Θ.Δ. που περιείχε άζωτο ίσο με 100% του τυπικού συνιστώμενου επίπεδου. Οι κάθετες ράβδοι απεικονίζουν τα τυπικά σφάλματα. Οι τιμές είναι μέσοι όροι τεσσάρων επαναλήψεων.

Συγκριτικά, τα φυτά που εμβολιάστηκαν με CIAT899 έδωσαν μειωμένη παραγωγή κατά 75% όταν το παρεχόμενο Θ.Δ. δεν περιείχε N, σε σύγκριση με την παραγωγή που έδωσαν τα φυτά όταν το παρεχόμενο Θ.Δ. περιείχε N στο 100% N του συνιστώμενου επιπέδου. Ωστόσο, όταν η απόδοση εκφράστηκε σε βάρος ξηρών λοβών, σημαντική μείωση προέκυψε μόνο όταν ο εμβολιασμός με CIAT899 έγινε σε συνδυασμό με την παροχή θρεπτικού διαλύματος χωρίς άζωτο (0% N + CIAT899) σε σύγκριση με CIAT899 και 100% N.

Ομοίως, δε βρέθηκε σημαντική διαφορά στον συνολικό αριθμό των λοβών ανά φυτό μεταξύ των τριών μεταχειρίσεων που περιλάμβαναν παροχή N μέσω του Θ.Δ. (100% N, 100% N+ CIAT899, 33% N+ CIAT899) με μέσο όρο των τριών μεταχειρίσεων 47 λοβούς ανά φυτό. Ο συνολικός αριθμός των λοβών ανά φυτό μειώθηκε σημαντικά (63%) στα φυτά που εμβολιάστηκαν με CIAT899 αλλά τροφοδοτήθηκαν με θρεπτικό διάλυμα χωρίς άζωτο (0% N + CIAT899) σε σύγκριση με εκείνα που έλαβαν θρεπτικό διάλυμα πλήρες αζώτου (100% N). Οι διαφορές στο συνολικό νωπό και ξηρό βάρος λοβών ανά φυτό που εμφανίζονται μεταξύ των μεταχειρίσεων προέκυψαν αποκλειστικά λόγω της επίδρασης τους στον συνολικό αριθμό των λοβών ανά φυτό, αφού το μέσο βάρος λοβού δεν επηρεάστηκε από το επίπεδο της παροχής N όταν τα φυτά εμβολιάστηκαν με το CIAT899.

Οι παρόμοιες τιμές απόδοσης ξηρών λοβών που παρουσιάζονται μεταξύ των μεταχειρίσεων 100% N± CIAT899 και 33% N+ CIAT899, παρά το σημαντικά μειωμένο νωπό βάρος λοβών ανά φυτό στη δεύτερη μεταχείριση αντισταθμίστηκαν λόγω της σημαντικά αυξημένης περιεκτικότητας των λοβών σε ξηρά ουσία στην δεύτερη μεταχείριση. Ειδικότερα, τόσο η μειωμένη παροχή N (33% N+ CIAT899) όσο και η απουσία N στο παρεχόμενο Θ.Δ. (0% N+ CIAT899) αύξησε την περιεκτικότητα του λοβού σε ξηρά ουσία σε 11,53% και 11,19%, αντίστοιχα, σε σύγκριση με 8,31% και 7,51% όταν τα φυτά τροφοδοτήθηκαν με θρεπτικό διάλυμα πλήρες αζώτου (100% N), με ή χωρίς εμβολιασμό των ριζών με το CIAT899, αντίστοιχα.

Πίνακας 23: Απόδοση σε νωπό βάρος (N.B, φυτό⁻¹), ξηρό βάρος (Ξ.Β, φυτό⁻¹), συνολικό αριθμό λοβών (λοβοί φυτό⁻¹), μέσο βάρος λοβού (M.B, g) και στο ποσοστό ξηράς ουσίας (Ξ.Ο., %) σε φυτά υδροπονικής καλλιέργειας αναρριχώμενου φασολιού, εμβολιασμένου με *R. tropici* CIAT899 ή μη εμβολιασμένου με αζωτοβακτήρια. Τα εμβολιασμένα φυτά τροφοδοτήθηκαν με Θ.Δ. που περιείχε άζωτο ίσο με 100%, 33% ή 0% του τυπικού συνιστώμενου επίπεδου, ενώ τα μη εμβολιασμένα φυτά τροφοδοτήθηκαν με Θ.Δ. που περιείχε άζωτο ίσο με 100% του τυπικού συνιστώμενου επίπεδου. Οι τιμές είναι μέσοι όροι τεσσάρων επαναλήψεων.

Επέμβαση	Απόδοση N.B (g φυτό ⁻¹)	Απόδοση Ξ.Β (g φυτό ⁻¹)	Λοβοί (φυτό ⁻¹)	M.B.λοβού (g)	Ξ.Ο (%)
100% N-CIAT899	610,74 a	50,06 a	50,78 a	12,11	8,31 b
100% N+CIAT899	594,17 a	44,49 a	50,78 a	10,79	7,50 b
33% N+CIAT899	428,79 b	54,99 a	40,38 a	11,66	11,53 a
0% N+CIAT899	152,77 c	17,29 b	15,38 b	9,86	11,19 a
Στατιστική σημαντικότητα					
	***	*	***	NS	**

^a. Τα διαφορετικά γράμματα υποδηλώνουν σημαντικές στατιστικές διαφορές μεταξύ τους.

^b. Τα επίπεδα σημαντικότητας παρουσιάζονται με (*), (**), (***) για P≤ 0,05, 0,01, 0,001; NS υποδηλώνει μη σημαντικές διαφορές.

3.4.6 Σχετικός Ρυθμός Ανάπτυξης

Στον πίνακα 24 παρατίθενται τα αποτελέσματα μετά από τον υπολογισμένο σχετικό ρυθμό ανάπτυξης (RGR) των φυτών όλων των μεταχειρίσεων κατά τη διάρκεια της καλλιεργητικής περιόδου (0-25, 25-45 και 45-65 HMM). Ο σχετικός ρυθμός ανάπτυξης υπολογίζεται με βάση τον τύπο: $RGR = (\ln(W_2) - \ln(W_1)) / (t_2 - t_1)$

όπου $\ln(W_2)$: ο λογάριθμος του ξηρού βάρους του φυτού για την χρονική στιγμή 2

$\ln(W_1)$: ο λογάριθμος του ξηρού βάρους του φυτού για την χρονική στιγμή 1

t_2 : η χρονική στιγμή 2 (ημέρες)

t_1 : η χρονική στιγμή 1 (ημέρες)

Διαπιστώνεται ότι οι μεταχειρίσεις με μειωμένο ή μηδενικό N παρουσιάζουν σημαντικά μικρότερο ρυθμό στα αρχικά στάδια ανάπτυξης τους (0-25 HMM) σε σύγκριση με τις μεταχειρίσεις που τροφοδοτήθηκαν με πλήρες Θ.Δ. Αντίθετα, 45-65 HMM ο ρυθμός ανάπτυξης τους αυξάνεται και μάλιστα στην περίπτωση του μηδενικού N παρουσιάζεται σημαντικά μεγαλύτερος από όλες τις υπόλοιπες μεταχειρίσεις.

Πίνακας 24: Επίδραση του εμβολιασμού με *R. tropici* (στέλεχος CIAT899) σε υδροπονική καλλιέργεια αναρριχώμενου φασολιού τροφοδοτούμενου με διαφορετικά επίπεδα άζωτου στο διάλυμα θρέψης στον σχετικό ρυθμό ανάπτυξης των φυτών κατά τη διάρκεια της καλλιέργειας. Τα εμβολιασμένα φυτά τροφοδοτήθηκαν με Θ.Δ. που περιείχε άζωτο ίσο με 100%, 33% ή 0% του τυπικού συνιστώμενου επιπέδου, ενώ τα μη εμβολιασμένα φυτά τροφοδοτήθηκαν με Θ.Δ. που περιείχε άζωτο ίσο με 100% του τυπικού συνιστώμενου επιπέδου. Οι τιμές είναι μέσοι όροι τεσσάρων επαναλήψεων. Τα επίπεδα σημαντικότητας παρουσιάζονται με (*), (**), (***) για $P \leq 0,05$, $0,001$; NS υποδηλώνει μη σημαντικές διαφορές.

Επέμβαση	0-25 HMM	25-45 HMM	45-65 HMM
100% N-CIAT899	0,169 a	0,069	0,031 b
100% N+CIAT899	0,180 a	0,046	0,036 b
33% N+CIAT899	0,144 b	0,072	0,022 b
0%N+CIAT899	0,059 c	0,072	0,085 a

Στατιστική σημαντικότητα		
***	NS	*

^α. Τα διαφορετικά γράμματα υποδηλώνουν σημαντικές στατιστικές διαφορές μεταξύ τους.

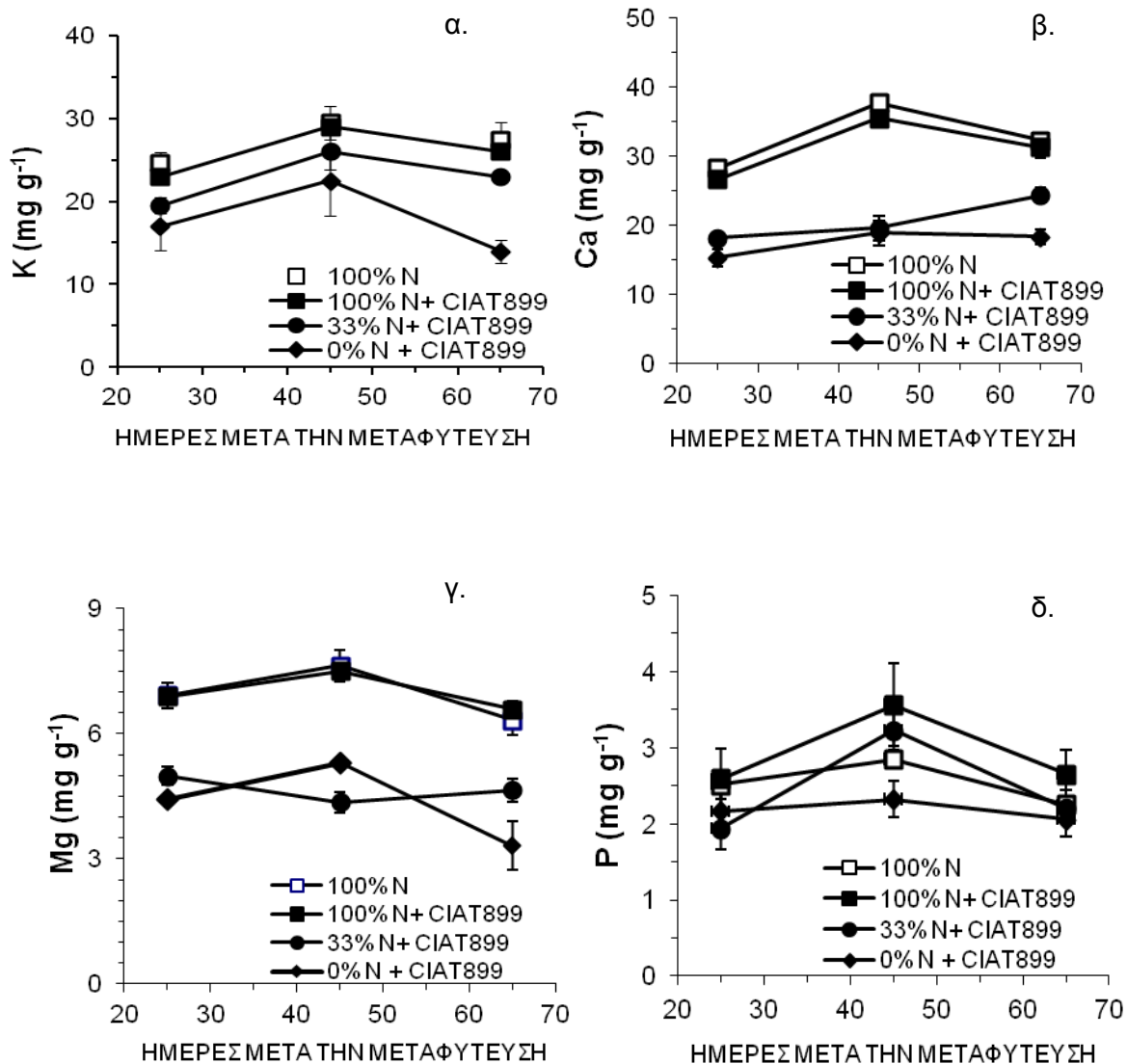
^β. Τα επίπεδα σημαντικότητας παρουσιάζονται με (*), (**), (***) για $P \leq 0,05$, $0,01$, $0,001$; NS υποδηλώνει μη σημαντικές διαφορές.

3.4.7 Θρεπτική κατάσταση φυτικών ιστών

Η συγκέντρωση του K στα φύλλα των φυτών φασολιού ήταν σημαντικά χαμηλότερη στην μεταχείριση 33% N + CIAT899 σε σύγκριση με τις δύο μεταχειρίσεις με 100% N στο παρεχόμενο Θ.Δ.. Οι τελευταίες δύο μεταχειρίσεις μάλιστα παρουσίασαν παρόμοιες συγκεντρώσεις K ανεξαρτήτως του εμβολιασμού με το CIAT899 (Σχ. 27α). Η παροχή διαλύματος θρέψης χωρίς άζωτο οδήγησε σε περαιτέρω δραστική μείωση της συγκέντρωσης K στο υπέργειο τμήμα των φυτών σε σύγκριση με τα φυτά που τροφοδοτούνταν με Θ.Δ. με 33% του τυπικού συνιστώμενου επιπέδου N (33% N + CIAT899) (οι μέσοι όροι των τριών δειγματοληψιών ήταν 17,83 mg g⁻¹ έναντι 22,83 mg g⁻¹, αντίστοιχα).

Επιπλέον, οι συγκεντρώσεις Ca και Mg στα φύλλα των φυτών ήταν σημαντικά μειωμένες όταν στο παρεχόμενο Θ.Δ. η συγκέντρωση N ήταν είτε στο 33% του τυπικού συνιστώμενου επιπέδου (33% N + CIAT899) είτε μηδενική (0% N + CIAT899) σε σύγκριση με αυτές που μετρήθηκαν στα φύλλα φυτών με πλήρη παροχή N (Σχ. 27 β, γ). Ωστόσο, οι συγκεντρώσεις Ca ήταν σημαντικά υψηλότερες στη μεταχείριση 33% N + CIAT899, σε σύγκριση με την μεταχείριση 0%N + CIAT899, στις 25 και 65 HMM (μέσοι όροι των δύο δειγματοληψιών 21,31 mg g⁻¹ έναντι 16,86 mg g⁻¹). Την ίδια τάση ακολούθησαν και οι συγκεντρώσεις Mg στο υπέργειο τμήμα των φυτών (μέσοι όροι των δύο δειγματοληψιών 4,82 mg g⁻¹ έναντι 3,87 mg g⁻¹, στις μεταχειρίσεις 33% N + CIAT899 και 0%N + CIAT899, αντίστοιχα).

Η συγκέντρωση P στα φύλλα 45 HMM ήταν σημαντικά χαμηλότερη στα φυτά που τροφοδοτήθηκαν με Θ.Δ. χωρίς N και εμβολιάστηκαν με CIAT899 (0% N + CIAT899) σε σύγκριση με εκείνα των τριών μεταχειρίσεων στις οποίες παρεχόταν N μέσω του Θ.Δ., ενώ στις 25 και 65 HMM δε βρέθηκαν σημαντικές διαφορές (Σχ. 27δ).



Σχήμα 27 α, β, γ, δ: Συγκεντρώσεις, καλίου (K), ασβεστίου (Ca), μαγνησίου (Mg), φωσφόρου (P) σε φύλλα φυτών υδροπονικής καλλιέργειας αναρριχώμενου φασολιού, εμβολιασμένου με *R. tropici* CIAT899 ή μη εμβολιασμένου με αζωτοβακτήρια. Τα εμβολιασμένα φυτά τροφοδοτήθηκαν με Θ.Δ. που περιείχε άζωτο ίσο με 100%, 33% ή 0% του τυπικού συνιστώμενου επίπεδου, ενώ τα μη εμβολιασμένα φυτά τροφοδοτήθηκαν με Θ.Δ. που περιείχε άζωτο ίσο με 100% του τυπικού συνιστώμενου επίπεδου. Οι κάθετες ράβδοι απεικονίζουν τα τυπικά σφάλματα. Οι τιμές είναι μέσοι όροι τεσσάρων επαναλήψεων.

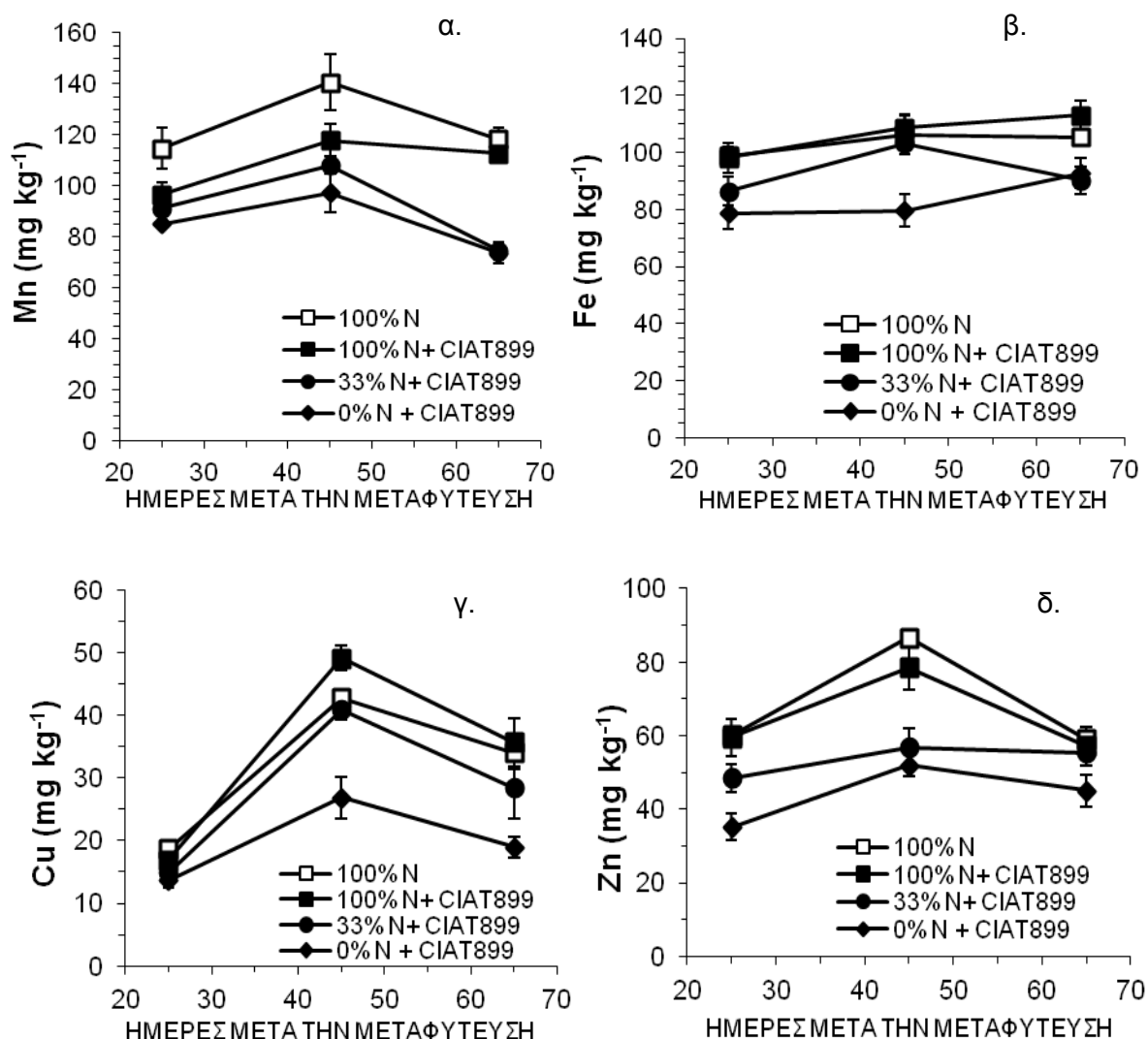
Οι συγκεντρώσεις Mn στα φύλλα των φυτών κυμαίνονταν από 73,75 έως 140,7 mg kg⁻¹. Οι χαμηλότερες συγκεντρώσεις Mn στα φύλλα παρουσιάστηκαν στα φυτά που τροφοδοτήθηκαν με Θ.Δ. χωρίς N και εμβολιάστηκαν με CIAT899 (0% N+CIAT899), ενώ τα υψηλότερα ποσοστά Mn βρέθηκαν 45 HMM στα φύλλα των φυτών που δέχτηκαν Θ.Δ. με πλήρες άζωτο (100% N) και δεν εμβολιάστηκαν με CIAT899 (Σχ. 28α). Στις 65 HMM, η διαφορά μεταξύ των δύο μεταχειρίσεων με πλήρες άζωτο και των δύο μεταχειρίσεων με μειωμένο (33%) ή καθόλου (0%) N ήταν σημαντική.

Οι συγκεντρώσεις Fe στα φύλλα των φυτών φασολιού κυμάνθηκαν από 78,75 έως 112,95 mg kg⁻¹ (Σχ. 28β). Τα χαμηλότερα επίπεδα Fe καταγράφηκαν στη μεταχείριση με παροχή διαλύματος χωρίς άζωτο και εμβολιασμό με CIAT899 (0%N +CIAT899) σε όλη την καλλιεργητική περίοδο. Ωστόσο, τα επίπεδα Fe στα φύλλα των φυτών που δέχτηκαν θρεπτικό διάλυμα χωρίς άζωτο (0% N + CIAT899) διέφεραν σημαντικά 45 HMM από αυτά που παρατηρήθηκαν στις τρεις μεταχειρίσεις στις οποίες το παρεχόμενο Θ.Δ. περιείχε N, ενώ 25 και 65 HMM ήταν παρόμοια με εκείνα που προσδιορίστηκαν στην μεταχείριση 33% N + CIAT899. Σημαντικές διαφορές παρατηρήθηκαν επίσης μεταξύ των μεταχειρίσεων με παροχή πλήρους Θ.Δ. σε άζωτο (100% N ± CIAT899) και των δύο μεταχειρίσεων με μειωμένα ποσοστά παροχής N (33% N + CIAT899 και 0% N + CIAT899) στις 25 και 65 HMM.

Οι συγκεντρώσεις Cu στα φύλλα των φυτών κυμαίνονταν από 13,7 έως 18,7 mg kg⁻¹ κατά την πρώτη δειγματοληψία (25 HMM) με σημαντικές διαφορές μεταξύ των μεταχειρίσεων στις οποίες το N στο παρεχόμενο Θ.Δ. ήταν στο 100% του συνιστώμενου επιπέδου (100% N± CIAT899) και αυτών με μειωμένα ποσοστά παρεχόμενου αζώτου (33% N + CIAT899 και 0% N + CIAT899). Στις 45 HMM, οι συγκεντρώσεις Cu αυξάνονται σε επίπεδα που κυμαίνονται από 40,9 έως 42,75 mg kg⁻¹ στις τρεις μεταχειρίσεις στις οποίες παρεχόταν άζωτο μέσω του Θ.Δ., ενώ στη μεταχείριση 0% N + CIAT899 η συγκέντρωση Cu στα φύλλα τη συγκεκριμένη ημερομηνία ήταν σημαντικά χαμηλότερη (26,85 mg kg⁻¹) (Σχ.28 γ). Σημαντική διαφορά στις συγκεντρώσεις Cu στα φύλλα των φυτών βρέθηκε μεταξύ των τριών μεταχειρίσεων στις οποίες παρεχόταν άζωτο και εκείνης χωρίς άζωτο (32,73 mg kg⁻¹ κατά μέσο όρο έναντι 18,95 mg kg⁻¹, αντίστοιχα) στις 65 HMM.

Τα υψηλότερα επίπεδα Zn στα φύλλα βρέθηκαν σε φυτά που τροφοδοτήθηκαν με πλήρες Θ.Δ. σε άζωτο στις 25 και 45 HMM, ανεξάρτητα από τον εμβολιασμό με CIAT899, ενώ τα χαμηλότερα επίπεδα Zn στα φύλλα παρατηρήθηκαν σε φυτά που τροφοδοτήθηκαν με Θ.Δ. χωρίς άζωτο (Σχ. 28δ). Τα επίπεδα Zn στα φύλλα φυτών της μεταχείρισης 33% N + CIAT899 δεν διέφεραν σημαντικά από εκείνα των μεταχειρίσεων 100% N ± CIAT899, αλλά ήταν σημαντικά υψηλότερα σε σύγκριση με

αυτά από φυτά που έλαβαν θρεπτικό διάλυμα χωρίς άζωτο (0% N+ CIAT899) στις 25 ΗΜΜ. Αντίθετα, 45 και 65 ΗΜΜ τα επίπεδα Zn στα φύλλα φυτών της μεταχείρισης 33% N + CIAT899 ήταν παρόμοια με εκείνα που παρατηρήθηκαν στις μεταχειρίσεις 0% N + CIAT899 και 100% N ± CIAT899.



Σχήμα 28 α, β, γ, δ : Συγκεντρώσεις μαγγανίου (Mn), σιδήρου (Fe), χαλκού (Cu) και ψευδαργύρου (Zn) σε φύλλα φυτών υδροπονικής καλλιέργειας αναρριχώμενου φασολιού, εμβολιασμένου με *R. tropici* CIAT899 ή μη εμβολιασμένου με αζωτοβακτήρια. Τα εμβολιασμένα φυτά τροφοδοτήθηκαν με Θ.Δ. που περιείχε άζωτο ίσο με 100%, 33% ή 0% του τυπικού συνιστώμενου επίπεδου, ενώ τα μη εμβολιασμένα φυτά τροφοδοτήθηκαν με Θ.Δ. που περιείχε άζωτο ίσο με 100% του τυπικού συνιστώμενου επίπεδου. Οι κάθετες ράβδοι απεικονίζουν τα τυπικά σφάλματα. Οι τιμές είναι μέσοι όροι τεσσάρων επαναλήψεων.

Κεφάλαιο 4

Συζήτηση

4.1 Συζήτηση Πειραμάτων Αγρού

4.1.1 Σχηματισμός ριζικών φυματίων

Τα συμβατικά καλλιεργητικά συστήματα στα οποία το N χορηγήθηκε σε ανόργανη μορφή και με μεγαλύτερη δοσολογία σχημάτισαν σημαντικά χαμηλότερο αριθμό φυματίων και με μικρότερο μέσο βάρος ανά φυμάτιο σε σύγκριση με τα βιολογικά και στα δύο πειράματα αγρού. Η αρνητική σχέση παροχής ανόργανου N με τον συνολικό αριθμό φυματίων και το μέσο βάρος φυματίου διαπιστώνεται και στα δύο πειράματα θερμοκηπίου τα οποία συζητούνται στην Ενότητα 4.2, όπου οι μεταχειρίσεις με 100%N του πρότυπου Θ.Δ. σχημάτισαν τα λιγότερα και μικρότερα φυμάτια σε σύγκριση με τις μεταχειρίσεις με μειωμένη ή καθόλου παροχή N. Πολλές μελέτες αναφέρουν ότι υψηλές συγκεντρώσεις διαθέσιμου N στο έδαφος μπορεί να καταστείλουν τη βιολογική αζωτοδέσμευση (Ledgard et al., 2001, Gan et al., 2004, Li et al., 2009). Συνεπώς, προτείνεται μειωμένη χρήση ανόργανων λιπασμάτων σε καλλιεργητικά συστήματα με ψυχανθή προκειμένου να βελτιστοποιηθεί η βιολογική αζωτοδέσμευση (Olivares et al., 2013). Ο σχηματισμός φυματίων περιορίζεται ιδιαίτερα από αυξημένες συγκεντρώσεις νιτρικού αζώτου στο περιβάλλον των ριζών των ψυχανθών (McKenzie et al., 2003, Nanjareddy et al., 2014). Συνεπώς, ο σχηματισμός λιγότερων φυματίων στο συμβατικό σύστημα καλλιέργειας φαίνεται ότι συνδέεται με την χρήση ανόργανου αζώτου σε αυτό, εν μέρει σε μορφή NO_3 και εν μέρει σε μορφή NH_4 , το οποίο όμως νιτροποιείται ταχύτατα στο έδαφος (Haynes and Swift, 1987). Όσον αφορά τους μηχανισμούς αυτής της επίδρασης, οι Richardson et al. (1956) θεωρούν ότι είναι πιθανό σε αυξημένες συγκεντρώσεις N οι υδατάνθρακες των φυτών να αξιοποιούνται στη διαδικασία σχηματισμού πρωτεΐνης σε τέτοιο βαθμό, ώστε να αποβάλλεται ελάχιστη ή και καθόλου ποσότητα υδατανθράκων από τις ρίζες στη ριζόσφαιρα. Αντίθετα, σύμφωνα με τον Mazé (1898), ένα φυτό ελλειμματικό σε N περιέχει περίσσεια υδατανθράκων και ένα μέρος από αυτή την ποσότητα αποβάλλεται από τις ρίζες των φυτών και προσελκύει τα βακτήρια προκειμένου να μολύνουν τις ρίζες των φυτών.

Σύμφωνα με τους Crespi και Galvez (2000), τα ψυχανθή μπορούν να βελτιώσουν τη γονιμότητα αλατούχων εδαφών και να τα επαναφέρουν ως παραγωγικά στη γεωργία, λόγω της ικανότητάς τους να αναπτύσσονται σε εδάφη

φτωχά σε N. Ωστόσο, πολλά είδη ψυχανθών, μεταξύ των οποίων και το κοινό φασόλι, είναι πολύ ευαίσθητα σε συνθήκες αλατότητας και ξηρασίας του εδάφους, καθώς δεν διαθέτουν τους κατάλληλους μηχανισμούς για να αντεπεξέλθουν επιτυχώς στο δίλημμα μεταξύ ελλείμματος νερού λόγω ωσμωτικής καταπόνησης και βιοχημικών διαταραχών που προκαλούνται από την εισροή ιόντων νατρίου. Πολλές μελέτες έχουν αναφέρει την αρνητική επίδραση της αλατότητας του νερού άρδευσης στο σχηματισμό και στο μέγεθος ριζικών φυματίων και κατά συνέπεια στην αζωτοδέσμευση, όχι μόνο στην περίπτωση του φασολιού, αλλά και σε άλλα ψυχανθή όπως αρακάς, βίγνα, ρεβύθι, κουκιά, σόγια, κ.α. (Rao et al., 2002; Cordovilla et al., 1995; Delgado et al., 1993; Abdel Ghaffar et al., 1982; Lauter et al., 1981). Σύμφωνα με τους Singleton and Bohon (1984) η αλατότητα δεν εμποδίζει τον αποικισμό των ριζών από τα αζωτοδεσμευτικά βακτήρια αλλά καθυστερεί την έναρξη ή την ανάπτυξη νέων φυματίων. Αυτό ακριβώς συνέβη και στην παρούσα μελέτη, αφού σε όλες τις μεταχειρίσεις υψηλής αλατότητας διαπιστώθηκαν σχηματισμένα φυμάτια που σημαίνει ότι ο αποικισμός μπόρεσε να πραγματοποιηθεί αλλά ο συνολικός αριθμός ήταν μειωμένος. Άλλοι ερευνητές όμως παρατήρησαν παρεμπόδιση σχηματισμού φυματίων, την οποία αποδίδουν κυρίως στη μείωση του αριθμού και της πλάγιας ανάπτυξης των ριζικών τριχιδίων, λόγω της αλατότητας (Tu, 1981). Η εφαρμογή του ανθεκτικού στελέχους στην αλατότητα CIAT899 (Tejera et al., 2005) στη δεύτερη καλλιέργεια φασολιού διαπιστώνεται ότι είχε θετική επίδραση στον συνολικό αριθμό φυματίων, αφού οι εμβολιασμένες μεταχειρίσεις με υψηλή αλατότητα παρουσίασαν 39,71 φυμάτια έναντι 26,3 φυματίων στις μη εμβολιασμένες μεταχειρίσεις με υψηλή αλατότητα (μέσος όρος των τριών δειγματοληψιών και των δύο συστημάτων καλλιέργειας). Επιπρόσθετα, ο αριθμός των φυματίων αυξάνεται σημαντικά μεταξύ 45 και 65 ΗΜΣ ακόμη και σε συνθήκες υψηλής αλατότητας. Τα αποτελέσματα αυτά είναι σε απόλυτη συμφωνία με τους El-Mokadem et al., (1991), οι οποίοι παρατήρησαν ότι ανθεκτικά στελέχη *R. leguminosarum* bv. *trifolii* και *R. meliloti* ευνόησαν το σχηματισμό φυματίων και τη συγκέντρωση N σε συνθήκες καταπόνησης από αλατότητα (1% NaCl). Αντίθετα, στο πρώτο πείραμα αγρού δεν μπόρεσε να προκύψει κάποιο ασφαλές συμπέρασμα για την ανθεκτικότητα του εμπορικού σκευάσματος που περιείχε μείγμα αζωτοβακτηρίων στην αλατότητα διότι εφαρμόστηκε μόνο στα φυτά της βιολογικής καλλιέργειας.

4.1.2 Ολικό άζωτο (N) και άνθρακας (C) των φυτικών ιστών

Οι αυξημένες συγκεντρώσεις N που παρατηρήθηκαν στους φυτικούς ιστούς του συμβατικού συστήματος 45 ΗΜΣ, σε σύγκριση με το βιολογικό καλλιεργητικό σύστημα στην πρώτη καλλιέργεια φασολιού, αποδίδονται στην παροχή ανόργανων λιπασμάτων στο πρώτο. Σύμφωνα με τους Marschner (1995) και Forde and Clarkson (1999), το N προσλαμβάνεται κυρίως σε ανόργανες μορφές από τα φυτά, ιδίως ως NO_3^- ή NH_4^+ ιόντα. Ωστόσο, η ανοργανοποίηση του οργανικά δεσμευμένου αζώτου που περιέχεται σε ουσίες που χρησιμοποιούνται ως οργανικά λιπάσματα (όπως αυτά που χρησιμοποιήθηκαν στο βιολογικό καλλιεργητικό σύστημα) απαιτεί χρόνο (Gutser et al., 2005). Αυτό έχει ως αποτέλεσμα, τα φυτά του βιολογικού καλλιεργητικού συστήματος να στερούνται N σε αφομοιώσιμες μορφές κατά τις πρώτες κρίσιμες εβδομάδες για την ανάπτυξη τους. Παρ' όλα αυτά, φαίνεται πως σε μεταγενέστερα στάδια ανάπτυξης του φασολιού, η συγκέντρωση N στο υπέργειο τμήμα των φυτών που καλλιεργήθηκαν βιολογικά δεν παρουσίασε διαφορά σε σύγκριση με το συμβατικό σύστημα καλλιέργειας. Η εξομοίωση των συγκεντρώσεων N στον υπέργειο βλαστό κατά τη δεύτερη δειγματοληψία (65 ΗΜΣ) η οποία προέκυψε από ταυτόχρονη μείωση στο συμβατικό σύστημα και μικρή αύξηση στο βιολογικό σύστημα, δεν μπορεί να οφείλεται μόνο στη βαθμιαία ανοργανοποίηση του οργανικού N στο δεύτερο, δεδομένου ότι το βιολογικό σύστημα επιπλέον της διαφορετικής μορφής N, έλαβε και μικρότερη συνολική ποσότητα N, επειδή είναι ένα χαμηλών εισροών σύστημα. Φαίνεται επομένως ότι η ανάκαμψη της διαθεσιμότητας N στο βιολογικό σύστημα οφείλεται και στην έναρξη της τροφοδότηση των φυτών με βιολογικά δεσμευμένο άζωτο της ατμόσφαιρας, η οποία πιθανότατα ήταν αυξημένη σε σύγκριση με το συμβατικό σύστημα. Η υπόθεση αυτή, η οποία υποστηρίζεται από τον αυξημένο αριθμό ριζικών φυματίων που μετρήθηκε στο βιολογικό σύστημα, επιβεβαιώθηκε στο δεύτερο πείραμα του 2012 μέσω της απευθείας μέτρησης του ποσοστού του αζώτου που προέρχεται από βιολογική αζωτοδέσμευση (βλέπε σχετική συζήτηση και στην Υποενότητα 4.1.2.1). Τα αποτελέσματα του δεύτερου πειράματος αγρού συμφωνούν με αυτά του πρώτου, όσον αφορά τη συγκέντρωση N στον υπέργειο βλαστό 65 ΗΜΣ. Για τεχνικούς λόγους, στο δεύτερο πείραμα αγρού η συγκέντρωση N στον υπέργειο βλαστό δεν μετρήθηκε σε πρώιμα στάδια καλλιέργειας, με συνέπεια να μην μπορεί να επιβεβαιωθεί η μειωμένη πρόσληψη N στο βιολογικό σύστημα. Τα δεδομένα όμως των εδαφολογικών αναλύσεων (Πίνακας 11) δείχνουν σαφέστατα ότι στο βιολογικό σύστημα καλλιέργειας το ανόργανο N (και συνεπώς διαθέσιμο για τα φυτά) ήταν δραστικά μειωμένο 30 ΗΜΣ, ενώ στις 60 και 85 ΗΜΣ ήταν παρόμοιο.

Αντίθετα, η αλατότητα φαίνεται ότι περιορίσε τις συγκεντρώσεις ολικού N και C στους φυτικούς ιστούς και στις δύο καλλιέργειες φασολιού. Η μείωση της συγκέντρωσης του ολικού αζώτου σε φυτά που οι ρίζες τους εκτίθενται σε αυξημένες συγκεντρώσεις NaCl εν μέρει μπορεί να οφείλεται σε μειωμένη πρόσληψη NO_3^- λόγω ανταγωνισμού μεταξύ NO_3^- και Cl (Marschner, 1995; Witt and Aparicio, 1995). Οφείλεται όμως και στη βλαπτική επίδραση που προκαλεί η αλατότητα στη δραστηριότητα ενζύμων που εμπλέκονται στην αφομοίωση του ανόργανου αζώτου στους φυτικούς ιστούς, όπως οι ρεδοκτάσες των νιτρικών και των νιτρωδών (Debouba et al., 2006). Ομοίως, οι Campbell et al. (1986) και οι Cordovilla et al. (1995) παρατήρησαν σημαντική μείωση του ολικού N σε φυτικούς ιστούς φασολιού που αναπτύσσονταν σε συνθήκες αλατότητας. Όσον αφορά τη μείωση του C στους ιστούς των φυτών που εκτέθηκαν σε αλατότητα, αυτή πιθανότατα συνδέεται με την δυσμενή επίδραση της αλατότητας στη φωτοσύνθεση (Seeman and Grichley, 1985, Brugnoli and Lauteri, 1991).

4.1.2.1 Συνεισφορά βιολογικής αζωτοδέσμευσης στο άζωτο του υπέργειου μέρους του φυτού και στους λοβούς φασολιού

Στη δεύτερη καλλιέργεια νάνου φασολιού που πραγματοποιήθηκε κατά τη διεξαγωγή της παρούσας διατριβής προσδιορίστηκε ποσοτικά η συνεισφορά της βιολογικής αζωτοδέσμευσης στο N που περιείχε το υπέργειο τμήμα των φυτών (φύλλα και βλαστοί) στο πρώιμο στάδιο του γεμίσματός τους (όψιμη άνθηση), αλλά και οι λοβοί φασολιού ξεχωριστά στο εμπορικό στάδιο συγκομιδής. Το στάδιο του πρώιμου γεμίσματός των λοβών θεωρείται καταλληλότερο για τον προσδιορισμό της βιολογικής αζωτοδέσμευσης σε σύγκριση με το ώριμο στάδιο ανάπτυξης των φυτών, αφού η πρόσληψη N δεν έχει ακόμα σταματήσει (Bergersen et al. 1985; Drevon 1997; Unkonovich και Pate 2000). Όσον αφορά το υπέργειο τμήμα των φυτών φασολιού, παρατηρήθηκε ότι τα φυτά που καλλιεργήθηκαν βιολογικά, δέσμευσαν το μεγαλύτερο ποσοστό N από την ατμόσφαιρα (65,08%) ενώ αντίθετα τα φυτά του συμβατικού συστήματος καλλιέργειας δέσμευσαν από την ατμόσφαιρα πολύ μικρότερο μέρος του περιεχόμενου N (27,56%). Σύμφωνα με τους Hansen et al. (2000), το N είναι το στοιχείο που βρίσκεται σε ανεπάρκεια τις περισσότερες φορές στα βιολογικά συστήματα καλλιέργειας, όπου δεν εφαρμόζονται συνθετικά αζωτούχα λιπάσματα και οι εισροές N είναι μειωμένες σε σχέση με τα συμβατικά συστήματα. Επιπρόσθετα, η αρνητική επίδραση του ανόργανου N στη βιολογική αζωτοδέσμευση έχει καταγραφεί σε πολλές μελέτες (Danso et al., 1992; Heridge and Brockwell, 1988).

Συνεπώς, είναι λογικό τα φυτά του βιολογικού καλλιεργητικού συστήματος λόγω μειωμένης διαθεσιμότητας N να προσπαθήσουν να δεσμεύσουν όσο περισσότερο N μπορούν από την ατμόσφαιρα ανάγοντας τη βιολογική αζωτοδέσμευση ως την κύρια πηγή N για την ανάπτυξη τους. Άλλες μελέτες που συνέκριναν βιολογικά συστήματα με συμβατικά αναφέρουν επίσης υψηλότερη βιολογική αζωτοδέσμευση στα πρώτα, σε επίπεδο αγροτικής εκμετάλλευσης (Hansen et al., 2000).

Τα φυτά του συμβατικού καλλιεργητικού συστήματος συγκέντρωσαν τελικά $175 \text{ kg ha}^{-1} \text{ N}$ από τα οποία περίπου το 44% δεσμεύτηκε βιολογικά, σε αντίθεση με το βιολογικό σύστημα που δέσμευσε από την ατμόσφαιρα το 84% της συνολικής ποσότητας N ($139,13 \text{ kg ha}^{-1}$). Βέβαια, όλη η ποσότητα του βιολογικά δεσμευμένου N δεν μπορεί να επιστρέψει στο έδαφος, δεδομένου ότι το N του φυτού χωρίζεται σε λοβούς, βλαστούς και φύλλα στο στάδιο της ωρίμανσης (Peoples et al., 1995a). Σύμφωνα με τους Peoples et al. (1995b), η συνολική ποσότητα δεσμευμένου N μπορεί να εκφραστεί ως το ολικό N που περιέχεται στο φυτό πολλαπλασιαζόμενο επί το ποσοστό N που δεσμεύτηκε από την ατμόσφαιρα (%Ndfa). Συνεπώς, είναι αναμενόμενο ότι οι βιολογικοί λοβοί δέσμευσαν μεγαλύτερη ποσότητα N δια μέσου συμβιωτικής αζωτοδέσμευσης από την ατμόσφαιρα (kg ha^{-1}), αφού παρουσίαζαν μεγαλύτερη συγκέντρωση ολικού N και ποσοστό δεσμευμένου N από την ατμόσφαιρα σε σύγκριση με τους συμβατικούς λοβούς. Παρ' όλα αυτά, και στα δύο καλλιεργητικά συστήματα παρατηρείται ότι η μεγαλύτερη ποσότητα ολικού N (kg ha^{-1}) που συγκεντρώθηκε στους λοβούς (συμβατικό: $72,98 \text{ kg ha}^{-1}$ και βιολογικό: $72,56 \text{ kg ha}^{-1}$) προέρχεται από την ατμόσφαιρα μέσω συμβιωτικής δέσμευσης ($50,66 \text{ kg ha}^{-1}$ και $66,45 \text{ kg ha}^{-1}$ αντίστοιχα).

Η ποσότητα N που αφαιρέθηκε με τη συγκομιδή των λοβών στο βιολογικό σύστημα καλλιέργειας ήταν μικρότερη από τη συνολική ποσότητα δεσμευμένου N από την ατμόσφαιρα με αποτέλεσμα να προκύπτει ένα θετικό ισοζύγιο του N ($+44,91 \text{ kg ha}^{-1}$) (διαφορά μεταξύ της ποσότητας N που συγκεντρώθηκε στους λοβούς και της ποσότητας N που δεσμεύτηκε βιολογικά). Ομοίως, το συμβατικό σύστημα καλλιέργειας παρουσίασε θετικό ισοζύγιο N ($+5,68 \text{ kg ha}^{-1}$) αλλά πολύ μικρότερο σε σύγκριση με αυτού του βιολογικού συστήματος καλλιέργειας. Συνεπώς, το βιολογικό σύστημα καλλιέργειας νωπού φασολιού υπερείχε όσον αφορά τη βιωσιμότητα σε σύγκριση με το συμβατικό αφού η συνεισφορά του στην παροχή N για την επόμενη καλλιέργεια ήταν πολύ μεγαλύτερη αντισταθμίζοντας αποτελεσματικά την ποσότητα N που αφαιρέθηκε με τη συγκομιδή των λοβών.

Θα πρέπει να επισημανθεί ότι ο προσδιορισμός του N που δεσμεύτηκε βιολογικά από την ατμόσφαιρα είναι υποεκτιμημένος αφού έχει προέλθει με βάση μόνο το υπέργειο μέρος των φυτών και χωρίς να συνυπολογισθεί το ποσοστό του N

που δεσμεύεται από τις ρίζες των φυτών. Σύμφωνα με τους Alves et al. (2003), εκτιμάται ότι το μη ανακτήσιμο N των ριζών αποτελεί το 30-35% του συνολικού N του φυτού. Στην περίπτωση του συμβατικού συστήματος εκτιμάται ότι μετά την απομάκρυνση του συνολικού N από τους λοβούς που έχουν συγκομιστεί, η ποσότητα N που μπορεί να επιστραφεί στο έδαφος συστρέφοντας τα φυτικά υπολείμματα προς αυτό είναι $102,39 \text{ kg ha}^{-1}$. Αντίθετα, στο βιολογικό σύστημα, η ποσότητα N που μπορεί να παραμείνει στο έδαφος δεν ξεπέρασε τα $66,57 \text{ kg ha}^{-1}$. Βέβαια, θα πρέπει να σημειωθεί ότι η χρήση ψυχανθών και η συστροφή των φυτικών υπολειμμάτων τους είναι μία πρακτική διαχείρισης που εφαρμόζεται κυρίως στα βιολογικά καλλιεργητικά συστήματα (Bilalis et al., 2010; Morse and Creamer, 2006).

Από την άλλη μεριά, φαίνεται ότι τα φυτά που εμβολιάστηκαν με το CIAT899 δεν διέφεραν ως προς τη βιολογική αζωτοδέσμευση από τα μη εμβολιασμένα, αν και παρουσίασαν υψηλότερο αριθμό φυματίων. Το εύρημα αυτό δικαιολογείται πλήρως σύμφωνα με τους Singleton and Tavares (1986), οι οποίοι αναφέρουν ότι ο εμβολιασμός αυξάνει την αζωτοδέσμευση μόνο όταν τα εμβολιασμένα φυτά παρουσιάζουν 2,5 φορές μεγαλύτερο αριθμό φυματίων από τα μη εμβολιασμένα, γεγονός που δεν επαληθεύεται στο συγκεκριμένο πείραμα (κατά μέσο όρο και από τις τρεις δειγματοληψίες 49,85 έναντι 32,45 φυματίων, αντίστοιχα).

Επίσης, διαπιστώνεται ότι η συγκέντρωση των 10 mM NaCl στο νερό άρδευσης δεν ήταν αρκετά υψηλή για να μειώσει τη βιολογική αζωτοδέσμευση, με αποτέλεσμα το ποσοστό N που δεσμεύτηκε από την ατμόσφαιρα να είναι το ίδιο με το ποσοστό των φυτών που δέχτηκαν νερό άρδευσης 0,5 mM NaCl. Πράγματι, άλλοι ερευνητές παρατηρούν ότι παράμετροι της βιολογικής αζωτοδέσμευσης επηρεάζονται αρνητικά σε συγκεντρώσεις υψηλότερες από 50 mM NaCl (López et al., 2008; Cordovilla et al., 1999). Πιθανότατα έπαιξε ρόλο και το γεγονός ότι στα αρχικά στάδια της καλλιέργειας, τα οποία θεωρούνται κρίσιμα για τον αποικισμό των ριζών με αζωτοβακτήρια, τα επίπεδα αλατότητας στο έδαφος ήταν ακόμα χαμηλά.

4.1.3 Συγκεντρώσεις καλίου (K), νατρίου (Na) και φωσφόρου (P) σε φυτικούς ιστούς φασολιού

Σύμφωνα με τους O' Hara et al. (1988), οι ελλείψεις σε θρεπτικά στοιχεία μειώνουν τόσο την αζωτοδέσμευση που προκύπτει από τη συμβιωτική σχέση *Rhizobium* - ψυχανθή όσο και την απόδοση των ψυχανθών σε επίπεδα κάτω από το μέγιστο δυναμικό τους σε πολλές μελέτες αγρού. Εκτός από το N που συζητήθηκε στην προηγούμενη ενότητα, προσδιορίστηκαν οι συγκεντρώσεις των φυτικών ιστών σε K^+ , Na^+ και συμπληρωματικά και σε P τη δεύτερη καλλιεργητική χρονιά.

Συγκεκριμένα, οι ξηροί φυτικοί ιστοί υπέργειου τμήματος δεν παρουσίασαν καμία διαφορά στις συγκεντρώσεις του K^+ οφειλόμενη στους τρεις παράγοντες που μελετήθηκαν (καλλιεργητικό σύστημα, αλατότητα νερού άρδευσης και εμβολιασμός) στις δύο καλλιέργειες φασολιού. Παρόμοια αποτελέσματα παρουσιάζουν και οι Cordovilla et al. (1995) για την επίδραση της αλατότητας (50 mM NaCl) στις συγκεντρώσεις K φυτικών ιστών φασολιού. Όσον αφορά τις συγκεντρώσεις P των ξηρών φυτικών ιστών φασολιού που προσδιορίστηκαν στη δεύτερη καλλιέργεια φασολιού και αυτές δεν επηρεάστηκαν από το σύστημα καλλιέργειας που εφαρμόστηκε, την αλατότητα ή τον εμβολιασμό.

Οι συγκεντρώσεις Na^+ των φυτικών ιστών συνδέονται άμεσα με τον παράγοντα της αλατότητας, αφού τα φυτά όταν βρίσκονται σε συνθήκες υψηλής αλατότητας καταπονούνται με δύο τρόπους; αρχικά λόγω αύξησης του ωσμωτικού δυναμικού στη ριζόσφαιρα, λόγω της αυξημένης συγκέντρωσης ηλεκτρολυτών και κατά δεύτερον λόγω της τοξικότητας που προκαλείται από υψηλή συγκέντρωση ιόντων νατρίου και χλωρίου (Demir & Kocakalikan, 2002). Παρ' όλα αυτά, στην παρούσα μελέτη οι συγκεντρώσεις Na^+ των ξηρών φυτικών ιστών φασολιού δε διέφεραν στα δύο διαφορετικά επίπεδα αλατότητας. Υπάρχουν περιπτώσεις ψυχανθών, τα οποία αντιδρούν και αντιστέκονται στην αλατότητα αποκλείοντας τα ιόντα νατρίου από τα φύλλα τους (Manchanda and Garg, 2008), ενώ σύμφωνα με τους Lauchli, (1984) και Lauter et al. (1988) η αντοχή των γλυκοφύτων στην αλατότητα σχετίζεται με την ικανότητά τους να αποφεύγουν να συσσωρεύουν Na^+ στα φύλλα τους. Σύμφωνα με τους Seemann and Critchley (1985), οι συγκεντρώσεις Na^+ σε φυτικούς ιστούς φασολιού παρουσιάζουν αξιόλογη αύξηση μόνο σε σχετικά υψηλή εξωτερική συγκέντρωση Na^+ . Συγκεκριμένα, αναφέρουν ότι σημαντική αύξηση στις συγκεντρώσεις Na^+ ήταν εμφανής όταν η εξωτερική συγκέντρωση NaCl ήταν 75-100 mM, πιθανότατα λόγω της υψηλής αναλογίας Na^+/Ca^{2+} στο θρεπτικό διάλυμα επηρεάζοντας τη διαπερατότητα της μεμβράνης (Greenway and Munns 1980). Ομοίως, οι Savvas et al. (2007) αναφέρουν ότι οι συγκεντρώσεις Na^+ σε φύλλα φασολιού αυξάνονται μόνο όταν η εξωτερική συγκέντρωση Na^+ ξεπεράσει τα επίπεδα των 50-60 mM. Συνεπώς, διαπιστώνεται ότι η μη αύξηση της συγκέντρωσης ιόντων Na^+ στον υπέργειο βλαστό των φυτών φασολιού στην παρούσα διατριβή οφείλεται στο γεγονός ότι το φασόλι αντιδρά αποτελεσματικά στην έκθεση σε αλατότητα NaCl με αποκλεισμό των ιόντων Na^+ από τα φωτοσυνθετικά ενεργά φύλλα σε συνδυασμό με τη μικρή συγκέντρωση NaCl (χαμηλότερη από 60 mM) στην οποία εκτέθηκε στο παρόν πείραμα (Wignarajah, 1990). Ένας άλλος λόγος για τον οποίο πιθανότατα δεν παρατηρήθηκαν αυξημένες συγκεντρώσεις Na^+ στους φυτικούς ιστούς του φασολιού είναι και η σχετικά σύντομη περίοδος που εκτέθηκαν τα φυτά σε

συνθήκες αλατότητας λόγω του μικρού βιολογικού κύκλου τους, περίπου 90 ημέρες (Sibole et al. 1998), και το γεγονός ότι η άρδευση με νερό αλατότητας 10mM NaCl ξεκίνησε 30 ΗΜΣ ώστε να μην επηρεάσει τα αρχικά στάδια ανάπτυξης τους. Επιπλέον, σύμφωνα με τους Savvas et al. (2007) η συγκέντρωση Na⁺ στα φύλλα φασολιού επηρεάστηκε από τη σταδιακή αύξηση της εξωτερικής συγκέντρωσης Na⁺ μετά την 70^η μέρα της καλλιέργειας. Συνεπώς, η μείωση που παρουσιάστηκε στην ανάπτυξη και παραγωγή των φυτών που δέχτηκαν νερό άρδευσης 10 mM NaCl πιθανότατα οφείλεται σε ωσμωτική καταπόνηση και όχι σε τοξικότητα ιόντων (Hawkins and Lewis, 1993). Η ωσμωτική καταπόνηση των φυτών φασολιού που δέχτηκαν νερό άρδευσης αλατότητας (10mM NaCl) επιδρά αρνητικά και στη λειτουργία της φωτοσύνθεσης, δεδομένου ότι εξαναγκάζει τα φυτά να κλείσουν μερικώς τα στομάτια και συνεπώς μειώνει τη στοματική αγωγιμότητα (Brugnoli και Lauteri, 1991). Αυτό συνέβη πιθανότατα και στην παρούσα μελέτη στα πιο προχωρημένα στάδια ανάπτυξης των φυτών, όπως αποδεικνύεται και από τα σημαντικά χαμηλότερα επίπεδα C στους φυτικούς ιστούς στη δεύτερη και την τρίτη δειγματοληψία στις μεταχειρίσεις αλατότητας, ανεξάρτητα από τις καλλιεργητικές πρακτικές.

4.1.4 Ολική βιομάζα και παραγωγή

Η μειωμένη παραγωγή βιομάζας στο υπέργειο τμήμα που παρατηρήθηκε στο βιολογικό καλλιεργητικό σύστημα, σε σύγκριση με το συμβατικό και στις δύο υπαίθριες καλλιέργειες φασολιού, αποδίδεται τουλάχιστον κατά ένα μέρος στην πολύ χαμηλότερη διαθεσιμότητα ανόργανου N στο πρώτο, κατά τη διάρκεια των πρώτων 4-6 εβδομάδων της καλλιέργειας (βλέπε Ενότητα 4.1.2). Φαίνεται λοιπόν ότι η παροχή οργανικά δεσμευμένου N στο βιολογικό καλλιεργητικό σύστημα, η οποία οδήγησε σε έλλειψη διαθέσιμου N για τα φυτά κατά τα αρχικά στάδια της καλλιέργειας φασολιών, περιόρισε την ανάπτυξη των φυτών. Είναι γνωστό ότι η έλλειψη N στο κοινό φασόλι περιορίζει δραστικά τον ρυθμό φωτοσύνθεσης και κατά συνέπεια την παραγωγή βιομάζας (Lima et al., 1999). Τα αποτελέσματα αυτά τονίζουν την ανάγκη εφαρμογής καλλιεργητικών πρακτικών διαχείρισης που διασφαλίζουν τον επαρκή εφοδιασμό των φυτών με ανόργανο N κατά τα αρχικά στάδια ανάπτυξης των φυτών σε βιολογική καλλιέργεια φασολιού, προκειμένου να μειωθούν ή ακόμη και να εξαλειφθούν τα προβλήματα μειωμένης ανάπτυξης των φυτών. Μάλιστα, οι Berry et al. (2002) αναφέρουν ότι η απόδοση καλλιεργειών που η διαχείρισή τους βασίζεται στις αρχές της βιολογικής γεωργίας περιορίζονται κυρίως

από τη χρονική στιγμή κατά την οποία το N είναι διαθέσιμο και όχι από τη συνολική ποσότητα του παρεχόμενου N.

Η μειωμένη βιομάζα υπέργειου τμήματος στα υποτεμάχια του βιολογικού καλλιεργητικού συστήματος περιόρισε και τον συνολικό αριθμό των λοβών φασολιού ανά φυτό και τελικά οδήγησε σε μειωμένη απόδοση σε νωπούς λοβούς. Σε αντίθεση όμως με τη συνολική απόδοση σε νωπούς λοβούς, το συνολικό βάρος των συγκομισμένων νωπών λοβών δεν επηρεάστηκε από το σύστημα καλλιέργειας που εφαρμόστηκε και τις δύο καλλιεργητικές χρονιές. Στην πραγματικότητα, η μείωση της ολικής απόδοσης νωπών λοβών λόγω του μειωμένου αριθμού λοβών ανά φυτό στο βιολογικό σύστημα αντισταθμίστηκε από τη σημαντικά υψηλότερη περιεκτικότητα των λοβών σε ξηρά ουσία και στις δύο καλλιέργειες φασολιού. Δεδομένου ότι η περιεκτικότητα των φυτικών ιστών σε άνθρακα δεν επηρεάστηκε από το σύστημα καλλιέργειας σε καμία από τις δύο καλλιέργειες, είναι λογικό να συμπεραίνουμε ότι η μειωμένη απόδοση λοβών στη βιολογική καλλιέργεια δεν οφείλεται σε περιορισμό της παραγωγής βιομάζας μέσω της φωτοσύνθεσης, αλλά κυρίως στη μείωση της περιεκτικότητας των λοβών σε νερό. Αυτό το αποτέλεσμα είναι εύλογο, δεδομένου ότι ο σχηματισμός και το γέμισμα των λοβών πραγματοποιήθηκαν στη φάση εκείνη που τα φυτά της βιολογικής καλλιέργειας χάρις στη βιολογική αζωτοδέσμευση ήταν επαρκώς εφοδιασμένα με άζωτο. Σημειώνεται ότι η ενισχυμένη περιεκτικότητα σε ξηρά ουσία σε βρώσιμους φυτικούς ιστούς, όπως στην περίπτωση των νωπών λοβών, θεωρείται θετικό ποιοτικό χαρακτηριστικό (Alföldi et al., 2006). Πολλοί άλλοι ερευνητές αναφέρουν ομοίως υψηλότερη περιεκτικότητα σε ξηρά ουσία σε φρούτα και λαχανικά βιολογικής παραγωγής (Woese et al., 1997; Heaton, 2002; Herencia et al., 2011).

Όσον αφορά, την επίδραση του συγκεκριμένου επιπέδου αλατότητας (10 mM NaCl) στη βλαστική ανάπτυξη και νωπή απόδοση των λοβών ήταν παρόμοια και στα δύο συστήματα καλλιέργειας, αφού δεν βρέθηκε σημαντική αλληλεπίδραση μεταξύ της αλατότητας και του καλλιεργητικού συστήματος. Τα αποτελέσματα αυτά δείχνουν ότι οι πρακτικές της βιολογικής γεωργίας δεν επιδείνωσαν αλλά ούτε μείωσαν τις επιπτώσεις της αλατότητας του νερού άρδευσης σε καλλιέργειες φασολιών, όταν στα φυτά εφαρμόστηκε άρδευση με νερό που περιείχε μέτρια επίπεδα NaCl. Η μείωση της βλαστικής ανάπτυξης και της απόδοσης των φυτών φασολιού σε μέτρια επίπεδα αλατότητας του νερού άρδευσης (10 mM NaCl) είναι αναμενόμενη, δεδομένου ότι τα φασόλια αποτελούν τυπικό παράδειγμα ευαίσθητου είδους φυτών στην αλατότητα (Wignarajah, 1990; Cabot et al., 2005). Όταν εξετάζουμε τον παράγοντα της αλατότητας μεμονωμένα, διαπιστώνεται ότι μείωσε τη νωπή και ξηρή βιομάζα, καθώς και την ολική παραγωγή και τον συνολικό αριθμό λοβών. Μάλιστα, παρόλο που οι

συγκεντρώσεις NaCl που εφαρμόστηκαν στο νερό άρδευσης παρέμειναν και στις δύο καλλιέργειες ίδιες, διαπιστώθηκε ότι η επίδραση της αλατότητας ήταν εντονότερη στη δεύτερη καλλιεργητική περίοδο από την πρώτη. Ενδεικτικά, αναφέρουμε ότι η απόδοση σε νωπούς λοβούς φασολιού μειώθηκε κατά 20,4% τη δεύτερη χρονιά καλλιέργειας έναντι 9,3% της πρώτης στα φυτά που δέχτηκαν νερό άρδευσης NaCl 10 mM. Πιθανότατα, αυτό να συμβαίνει λόγω συσσώρευσης αλάτων στο έδαφος από την προηγούμενη καλλιέργεια φασολιού. Μία άλλη πιθανή εξήγηση είναι η έκθεση των φυτών σε πιο ξηρές και θερμές συνθήκες στο δεύτερο πείραμα αγρού σε σύγκριση με το πρώτο, επειδή η σπορά έγινε πιο αργά αλλά και ενδεχομένως λόγω διαφοράς κλιματικών συνθηκών από έτος σε έτος. Η μέση μηνιαία θερμοκρασία για τους δύο πρώτους μήνες καλλιέργειας (Απρίλιος –Μάϊος) τον 2^ο χρόνο υπαίθριας καλλιέργειας φασολιού ήταν 19°C έναντι 17°C τους αντίστοιχους μήνες του 1^{ου} έτους. Την αρνητική επίδραση της αλατότητας στην ανάπτυξη και παραγωγή των ψυχανθών αναφέρουν και άλλοι ερευνητές όπως Ferri et al. (2000), Sibole et al. (2000), Zurayk et al. (1998) και Elsheikh and Wood (1990).

Ο εμβολιασμός με το εμπορικό μείγμα αζωτοβακτηρίων και το *R. tropici* CIAT899 δεν φάνηκε να επηρεάζει σημαντικά την ανάπτυξη και παραγωγή των φυτών, παρόλο που αύξησε τον συνολικό αριθμό φυματίων και στις δύο καλλιέργειες φασολιού. Στην πρώτη καλλιέργεια φασολιού εμβολιάστηκαν μόνο τα φυτά του βιολογικού καλλιεργητικού συστήματος με εμπορικό μείγμα αζωτοβακτηρίων, ενώ τη δεύτερη χρονιά τα φυτά εμβολιάστηκαν ανεξάρτητα του είδους του καλλιεργητικού συστήματος με το στέλεχος *Rt* CIAT899. Είναι όμως αναμενόμενο να μην υπάρχει στατιστικά σημαντική επίδραση του εμβολιασμού με CIAT899 στη βλαστική βιομάζα και την παραγωγή λοβών, με δεδομένο ότι ο εμβολιασμός με αυτό το στέλεχος του *R. tropici* δεν επηρέασε τις συγκεντρώσεις N στα φυτά. Παρόμοια αποτελέσματα προκύπτουν και στην περίπτωση των πειραμάτων θερμοκηπίου υδροπονικής καλλιέργειας φασολιού (Ενότητα 4.2). Η διαφορά όμως του εμβολιασμού μεταξύ των πειραμάτων αγρού και των πειραμάτων θερμοκηπίου έγκειται στο ότι στα πρώτα υπάρχει ο αστάθμητος παράγοντας της παρουσίας ανταγωνιστικών γηγενών αζωτοβακτηρίων του εδάφους. Τα αζωτοβακτήρια της γηγενούς χλωρίδας έχουν την ικανότητα να αποικίζουν το καλλιεργούμενο φυτό και συνεπώς να το τροφοδοτούν με N (Boonkerd et al., 1978; Segovia et al., 1991; Thies et al., 1991), ενώ επιπλέον, μπορούν ανταγωνιστικά να παρεμποδίζουν την εγκατάσταση των στελεχών του εμβολιασμού (Vargas et al., 2000). Επιπλέον, στα πειράματα θερμοκηπίου, ο εμβολιασμός με CIAT899 συνδυάστηκε με διαφορετικές συνθήκες όσον αφορά την διαθεσιμότητα ανόργανου N στο ριζικό περιβάλλον.

4.1.5 Εδαφικό ολικό άζωτο (N), ανόργανο άζωτο (NO₃-N & NH₄-N) και άνθρακας (C)

Οι υψηλότερες συγκεντρώσεις ολικού N στα δείγματα εδάφους του συμβατικού καλλιεργητικού συστήματος που παρατηρήθηκαν στην πρώτη δειγματοληψία και στις δύο καλλιέργειες φασολιού, σε σύγκριση με εκείνες που προσδιορίστηκαν σε δείγματα εδάφους του βιολογικού καλλιεργητικού συστήματος είναι λογικές. Πράγματι, οι συμβατικές πρακτικές καλλιέργειας όσον αφορά την λίπανση σχετίζονται εν γένει με υψηλότερες εισροές N από εκείνες που εφαρμόζονται στην βιολογική γεωργία (π.χ. Mäder et al., 2002; Dawson et al., 2008; Qin et al., 2010; Tully et al., 2013) και αυτό εφαρμόστηκε και στην παρούσα διατριβή. Ωστόσο, είναι ενδιαφέρον ότι οι συγκεντρώσεις εδαφικού ολικού N που συλλέχθηκαν στο πρώιμο στάδιο γεμίσματος των λοβών ήταν αισθητά υψηλότερες από εκείνες που προσδιορίστηκαν κατά την πρώτη δειγματοληψία σε όλες τις μεταχειρίσεις. Κατά τη διάρκεια αυτής της περιόδου δεν εφαρμόστηκαν N λιπάσματα ή οργανική ουσία, αφού η μόνη εφαρμογή λιπασμάτων ήταν στην αρχή της εγκατάστασης του πειράματος, πριν τη σπορά (βασική λίπανση). Η σημαντική συνεισφορά της βιολογικής αζωτοδέσμευσης στην αζωτούχο θρέψη του φασολιού επιβεβαιώνεται περαιτέρω και από την παρουσία πολυάριθμων ριζικών φυματίων σε όλες τις μεταχειρίσεις, ειδικά στο πρώιμο στάδιο γεμίσματος των λοβών. Επιπρόσθετα, στο ίδιο στάδιο αλλά στη δεύτερη καλλιέργεια φασολιού, ο εμβολιασμός με CIAT899 παρουσίασε σημαντική αύξηση στο επίπεδο του εδαφικού ολικού N σε όλες τις μεταχειρίσεις που εφαρμόστηκε, με σαφώς μεγαλύτερο επίπεδο να εμφανίζεται στη μεταχείριση του βιολογικού συστήματος με χαμηλή αλατότητα (0,5 mM NaCl) του νερού άρδευσης. Τα παρόμοια επίπεδα ολικού εδαφικού N σε όλες τις μεταχειρίσεις του πρώτου πειράματος αγρού στο πρώιμο στάδιο γεμίσματος των λοβών (65 ΗΜΣ), παρά τα σημαντικά χαμηλότερα επίπεδα ολικού N στα βιολογικά υποτεμάχια 35 ΗΜΣ, επισημαίνουν τα υψηλότερα επίπεδα βιολογικής αζωτοδέσμευσης στα βιολογικά τεμάχια σε σύγκριση με τα συμβατικά. Πράγματι, η υπόθεση αυτή επαληθεύεται τελικά στη 2^η καλλιέργεια φασολιού, αφού τα βιολογικά υποτεμάχια παρουσίασαν σημαντικά μεγαλύτερη N₂-δέσμευση από την ατμόσφαιρα σε σύγκριση με τα συμβατικά. Σε πολλές σχετικές μελέτες έχει διαπιστωθεί ότι η υψηλή διαθεσιμότητα ανόργανου N στο περιβάλλον των ριζών των ψυχανθών δρα ανασταλτικά στο σχηματισμό φυματίων και τη βιολογική αζωτοδέσμευση (Ledgard et al., 2001). Συγκεκριμένα, οι Afza et al. (1987) αναφέρουν ότι εφαρμογή υψηλών ποσοτήτων ανόργανων αζωτούχων λιπασμάτων (100 kg N ha⁻¹) σε καλλιέργεια σόγιας μείωσε σημαντικά τα ποσοστά της βιολογικής αζωτοδέσμευσης. Παρόμοια, οι

Tsai et al. (1993) βρήκαν ότι η αζωτοδέσμευση σε καλλιέργεια κοινού φασολιού αυξήθηκε όταν η παροχή N περιορίστηκε ενώ εκείνη των P, K και S ήταν επαρκής. Τα ευρήματα αυτά μας οδηγούν στο συμπέρασμα ότι η εισαγωγή ψυχανθών ειδικά στα συμβατικά καλλιεργητικά συστήματα θα πρέπει να συνοδεύεται από μειωμένη χρήση ανόργανων αζωτούχων λιπασμάτων, προκειμένου να μεγιστοποιηθεί η τροφοδότηση των καλλιεργούμενων φυτών με αφομοιώσιμο N προερχόμενο από βιολογική δέσμευση ατμοσφαιρικού N₂ (Olivares et al., 2013).

Όπως δείχνει η μείωση των επιπέδων εδαφικού C σε όλες τις μεταχειρίσεις και στα δύο πειράματα αγρού καθώς τα φυτά αναπτύσσονταν, εκτεταμένη αποσύνθεση της οργανικής ύλης πραγματοποιήθηκε κατά τη διάρκεια της καλλιεργητικής περιόδου. Είναι γνωστό ότι η αποσύνθεση της οργανικής ύλης οδηγεί σε ανοργανοποίηση του οργανικά δεσμευμένου N (Gutser et al., 2005). Η συγκέντρωση ανόργανου N στο έδαφος όμως δεν εξαρτάται μόνο από τους ρυθμούς ανοργανοποίησης της οργανικής ουσίας αλλά και από τους ρυθμούς ακινητοποίησης του αζώτου λόγω μικροβιακής δραστηριότητας, καθώς και τους ρυθμούς πρόσληψης του από φυτά (Carpenter-Boggs et al., 2000). Στην παρούσα μελέτη, το άζωτο που απελευθερωνόταν κατά τη διαδικασία της ανοργανοποίησης της οργανικής ουσίας ήταν σαφώς λιγότερο από το άθροισμα του ανόργανου N που προσλάμβαναν τα φυτά και αυτού που ακινητοποιούσαν οι μικροοργανισμοί του εδάφους. Αυτό φαίνεται ξεκάθαρα από τη μεγάλη μείωση στις συγκεντρώσεις ανόργανου N στο έδαφος στο πρώιμο στάδιο γεμίσματος των λοβών και τη σταθεροποίηση που ακολούθησε σε αυτά τα χαμηλά επίπεδα, παρά την αποσύνθεση της οργανικής ύλης. Τα αποτελέσματα αυτά αποδεικνύουν ότι η συμβίωση του φασολιού με τα αζωτοβακτήρια δεν του παρείχε άζωτο στα αρχικά στάδια ανάπτυξης του ενώ αντίθετα του στερούσε N λόγω ακινητοποίησής του από τα αζωτοβακτήρια. Σύμφωνα με μελέτες που συγκρίνουν εδάφη οργανικών και συμβατικών συστημάτων καλλιέργειας, οι υψηλότερες τιμές οργανικής ουσίας στο έδαφος και συνεπώς και τα υψηλότερα επίπεδα C στο έδαφος έχουν παρατηρηθεί στα εδάφη που εφαρμόστηκαν βιολογικές πρακτικές διαχείρισης (Drinkwater et al., 1995; Pimentel et al., 2005; Gattinger et al., 2012; Te Pas και Rees, 2014). Οι υψηλότερες τιμές του C στα χαμηλών εισροών βιολογικά καλλιεργητικά συστήματα σε σύγκριση με τα συμβατικά συνήθως προκύπτουν από τις εφαρμογές ζωικής κοπριάς και χλωρών λιπάνσεων στα βιολογικά συστήματα για πολλά διαδοχικά χρόνια (Gattinger et al., 2012). Ωστόσο, στην παρούσα ερευνητική εργασία, τόσο τα συμβατικά όσο και τα βιολογικά υποτεμάχια είχαν δεχτεί τις ίδιες ακριβώς μεταχειρίσεις πριν από την εγκατάσταση της καλλιέργειας φασολιού. Ως εκ τούτου, όταν γινόταν η σπορά για την

παρούσα μελέτη, τα επίπεδα C στο έδαφος ήταν παρόμοια και στα δύο συστήματα καλλιέργειας (βιολογικό και συμβατικό).

Τα υψηλότερα επίπεδα εδαφικού $\text{NO}_3\text{-N}$ και $\text{NH}_4\text{-N}$ κατά τις πρώτες 30-40 ΗΜΣ στα πειραματικά τεμάχια στα οποία εφαρμόστηκε συμβατικό καλλιεργητικό σύστημα οφειλόταν προφανώς στην παροχή συνθετικών λιπασμάτων σε αυτά κατά τη βασική λίπανση. Η αυξημένη συγκέντρωση εδαφικού $\text{NO}_3\text{-N}$ στα πειραματικά τεμάχια που καλλιεργήθηκαν με συμβατικές μεθόδους και αρδεύονταν με σχετικά υψηλής αλατότητας νερό (10 mM), σε σύγκριση με εκείνα που τους παρέχονταν νερό με χαμηλή αλατότητα, πιθανότατα οφείλεται σε μειωμένη πρόσληψη $\text{NO}_3\text{-N}$ από τα πρώτα, εξαιτίας της γνωστής ανταγωνιστικής επίδρασης του Cl^- στην απορρόφηση NO_3^- (Grattan and Grieve, 1999; Abdelgadir et al., 2005).

4.1.6 Εκπομπές αερίων θερμοκηπίου (N_2O , CO_2 , CH_4) υπαίθριας καλλιέργειας νάνου φασολιού

Τα αποτελέσματα που προκύπτουν από τις δύο υπαίθριες καλλιέργειες νάνου φασολιού καταδεικνύουν ότι οι πρακτικές της βιολογικής γεωργίας, οδηγούν σε σαφή μείωση των εκπομπών N_2O ανά μονάδα καλλιεργούμενης επιφάνειας. Λαμβάνοντας υπόψη το δυναμικό παγκόσμιας θέρμανσης του N_2O και εκφράζοντας τις εκπομπές N_2O με ισοδύναμα του CO_2 προκύπτει ότι εκλύθηκαν 102 και 115 $\text{kg CO}_2 \text{ ha}^{-1}$ στο βιολογικό σύστημα καλλιέργειας με χαμηλή και υψηλή αλατότητα, αντίστοιχα, τα οποία συγκρίνονται με 141 και 131 $\text{kg CO}_2 \text{ ha}^{-1}$ στο συμβατικό σύστημα με χαμηλή και υψηλή αλατότητα, αντίστοιχα, στον πρώτο χρόνο καλλιέργειας νάνου φασολιού (Βλέπε Ενότητα 1.5.2). Οι αντίστοιχες τιμές N_2O εκφραζόμενες με ισοδύναμα CO_2 για τον 2^ο χρόνο ήταν 44, 50, 53 και 85 $\text{kg CO}_2 \text{ ha}^{-1}$. Ομοίως και άλλοι ερευνητές έχουν αναφέρει μειωμένες εκπομπές N_2O σε βιολογικά καλλιεργητικά συστήματα σε σύγκριση με συμβατικές καλλιέργειες (π.χ. Burger et al., 2005; Petersen et al., 2006; Phillips, 2007; Ball et al., 2014; Scialabba και Muller-Lindenlauf, 2010). Υπάρχουν όμως και κάποιοι ερευνητές που δεν διαπίστωσαν παρόμοιες διαφορές (Robertson et al., 2000; Kramer et al. 2006; Syväsalto et al., 2006). Τις περισσότερες φορές οι χαμηλότερες εκπομπές N_2O που παρατηρούνται σε βιολογικά συστήματα καλλιέργειας οφείλονται σε μειωμένες εισροές ανόργανου N και επομένως σε χαμηλότερα επίπεδα δραστικού N στο επιφανειακό στρώμα του εδάφους (Qin et al., 2010). Θα πρέπει να επισημανθεί ότι η επίδραση του συμβατικού συστήματος στις αθροιστικές εκπομπές N_2O ανά καλλιεργούμενη επιφάνεια στη δεύτερη καλλιέργεια υπαίθριου φασολιού παρατηρήθηκε από την πρώτη κιόλας δειγματοληψία (30 ΗΜΣ)

και συνέχισε να υφίσταται μέχρι το τέλος της καλλιεργητικής περιόδου, σε αντίθεση με την πρώτη καλλιέργεια φασολιού που η διαφορά μεταξύ των συστημάτων ήταν σημαντική μετά από 60 ΗΜΣ. Ωστόσο, οι αθροιστικές εκπομπές N_2O ανά καλλιεργούμενη επιφάνεια μειώθηκαν περίπου στο ήμισυ το δεύτερο χρόνο καλλιέργειας φασολιού σε σύγκριση με τον πρώτο και στα δύο συστήματα καλλιέργειας (455 έναντι 231 $g\ ha^{-1}$ συμβατικό σύστημα και 363 έναντι 158 $g\ ha^{-1}$ βιολογικό σύστημα, πρώτος και δεύτερος χρόνος, αντίστοιχα). Οι χαμηλές αθροιστικές εκπομπές αερίων θερμοκηπίου που παρατηρήθηκαν τον 2^ο χρόνο καλλιέργειας πιθανότατα σχετίζονται με τη μειωμένη ολική βροχόπτωση στο χρονικό διάστημα της καλλιέργειας (100,2 mm) σε σύγκριση με την πρώτη καλλιεργητική χρονιά (180,9 mm). Πράγματι, έχει παρατηρηθεί ότι η διαβροχή του ξηρού εδάφους (όπως αυτό της περιοχής του Αγρινίου) αυξάνει τους ρυθμούς ανοργανοποίησης του N καθώς και νιτροποίησης του και προκαλεί απότομα μεγάλες αυξήσεις (αλλά μικρές σε διάρκεια) στις εκπομπές NO και N_2O (Scholes et al., 1997). Σε όλη τη διάρκεια της δεύτερης καλλιέργειας φασολιού, οι αθροιστικές εκπομπές N_2O ήταν μεγαλύτερες στα υποτεμάχια που δέχτηκαν νερό άρδευσης υψηλής αλατότητας σε σύγκριση με αυτά της χαμηλής αλατότητας. Ωστόσο, η διαφορά αυτή ήταν στατιστικά σημαντική μόνο στο τέλος της καλλιεργητικής περιόδου (88 ΗΜΣ). Οι μεγαλύτερες εκπομπές N_2O στα πειραματικά τεμάχια που ποτίστηκαν με νερό υψηλής αλατότητας, πιθανότατα πρέπει να αποδοθεί στις χαμηλότερες εδαφικές συγκεντρώσεις C που παρατηρήθηκαν και στις τρεις δειγματοληψίες, σε σύγκριση με τη χαμηλή αλατότητα του νερού άρδευσης. Ειδικότερα, σύμφωνα με τους Schmidt et al. (1999), η υψηλή διαθεσιμότητα οργανικού C στο έδαφος προωθεί την αναγωγή των NO_3-N , καταλήγοντας σε εκπομπές N_2 σαν τελικό προϊόν, αντί για εκπομπές N_2O .

Σε αντίθεση με το N_2O , οι εκπομπές CO_2 από το έδαφος ανά μονάδα καλλιεργούμενης επιφάνειας αυξήθηκαν στο βιολογικό σύστημα καλλιέργειας φασολιού. Εφόσον, το έδαφος δέχτηκε ακριβώς την ίδια πρακτική και στα δύο συστήματα καλλιέργειας πριν την καλλιέργεια φασολιού (χρήση βίκου ως χλωρή λίπανση) οι διαφορές που εμφανίζονται στις εκπομπές CO_2 αποδίδονται στις διαφορετικές πρακτικές που εφαρμόστηκαν στα δύο συστήματα καλλιέργειας (βιολογικό και συμβατικό) μετά τη σπορά του φασολιού. Έτσι, οι υψηλότερες εκπομπές CO_2 στα βιολογικά υποτεμάχια πιθανότατα οφείλονται σε αυξημένη ανοργανοποίηση οργανικής ουσίας λόγω της προσθήκης οργανικού λιπάσματος (κομπόστ) σε αυτά, σε αντίθεση με τα συμβατικά πειραματικά τεμάχια που λιπάνθηκαν με ανόργανο λίπασμα. Ομοίως, οι Fernández-Luqueño et al. (2009) αναφέρουν αυξημένες εκπομπές CO_2 εδάφους, στο οποίο έχει προστεθεί κομπόστ και έχει καλλιεργηθεί φασόλι, σε σύγκριση με την εφαρμογή συνθετικού λιπάσματος.

Σύμφωνα με τους Marinari et al. (2000), η δομή του εδάφους βελτιώνεται όταν προστίθεται λίπασμα τύπου κομπόστ το οποίο διευκολύνει την διείσδυση της ρίζας και τη ροή του νερού και των αερίων, προωθώντας έτσι την αποσύνθεση της οργανικής ύλης. Επιπλέον, η προσθήκη κομπόστ στο έδαφος αυξάνει τις εκκρίσεις της ρίζας και επομένως και τη μικροβιακή δραστηριότητα, η οποία με τη σειρά της ενισχύει τη μικροβιακή αναπνοή στη ριζόσφαιρα (Fernández-Luqueño et al., 2009). Οι Fernández-Luqueño et al. (2008) αναφέρουν ότι περίπου 50 ημέρες μετά τη σπορά φασολιού, δηλαδή στην έναρξη της άνθησης, ξεκινάει η γήρανση των φυματίων με αποτέλεσμα να αυξάνεται η διαθεσιμότητα υποστρωμάτων για τους μικροοργανισμούς. Το αποτέλεσμα της αυξημένης διαθεσιμότητας υποστρωμάτων για μικροοργανισμούς και της συνεπακόλουθης εντατικοποίησης της μικροβιακής δραστηριότητας είναι να αυξάνονται τελικά οι ρυθμοί εκπομπής CO₂ προς το τέλος της καλλιεργητικής περιόδου.

Οι συνολικές εκπομπές CH₄ στο πρώτο πείραμα αγρού με καλλιέργειες νάνου φασολιού ήταν γενικά πολύ χαμηλές με αποτέλεσμα η συνεισφορά τους στις εκπομπές αερίων θερμοκηπίου να είναι ελάχιστη. Ειδικότερα, οι εκπομπές CH₄, εκφρασμένες σε ισοδύναμα CO₂ ήταν 37, 36, 37 και 40 kg CO₂ ha⁻¹ στο βιολογικό σύστημα καλλιέργειας με χαμηλή και υψηλή αλατότητα και στο συμβατικό σύστημα καλλιέργειας με χαμηλή και υψηλή αλατότητα, αντίστοιχα. Στο δεύτερο πείραμα αγρού, οι καθαρές εκπομπές CH₄ που καταγράφηκαν εμφανίζουν όλες τις πειραματικές μεταχειρίσεις να λειτουργούν ως καταβόθρες και όχι ως πηγές CH₄ λόγω της οξειδωσης του ατμοσφαιρικού μεθανίου σε CO₂ από μεθανιότροφα βακτήρια (Smith et al., 2011). Οι Kerpler et al. (2006) αναφέρουν επίσης εκπομπές μεθανίου από χερσαία φυτά που καλλιεργούνται υπό αερόβιες συνθήκες. Οι ταχύτατα αυξανόμενες αθροιστικές εκπομπές CH₄ που εμφανίζονται σε όλες τις μεταχειρίσεις στην αρχή της πρώτης καλλιέργειας φασολιού (50 ΗΜΣ) και η παύση τους από εκείνο το σημείο και μετά, πιθανότατα να συνδέεται με τις κλιματικές συνθήκες που επικρατούσαν κατά τη διάρκεια της καλλιεργητικής περιόδου. Το μεθάνιο στο έδαφος παράγεται από μεθανογένεση όταν η οργανική ύλη αποσυντίθεται κάτω από ανοξικές συνθήκες και απουσία κατάλληλων εναλλακτικών δεκτών ηλεκτρονίων (Oenema et al., 2001). Στις περισσότερες περιπτώσεις, οι ανοξικές συνθήκες που προωθούν την μεθανογένεση στη γεωργία σχετίζονται με κορεσμένα εδάφη από νερό που παρουσιάζουν υπερβολική υγρασία και περιορίζουν τον αερισμό (Philippot and Halin, 2011).

Ακριβώς για αυτόν τον λόγο, οι περισσότερες εκπομπές CH₄ που σχετίζονται με την καλλιέργεια φυτών προκύπτουν από ορυζώνες (Mosier et al., 1998; Qin et al., 2010). Η περιοχή που πραγματοποιήθηκαν τα πειράματα αγρού (Αγρίνιο, Δυτική

Ελλάδα) χαρακτηρίζεται από υψηλή βροχόπτωση κατά τους φθινοπωρινούς, χειμωνιάτικους και ανοιξιάτικους μήνες, ενώ ακολουθεί ένα σχετικά ξηρό καλοκαίρι (Σχ. 3, 5). Συγκεκριμένα, τον πρώτο χρόνο καλλιέργειας νάνου φασολιού η σπορά πραγματοποιήθηκε στις 30 Απριλίου και η βροχόπτωση ήταν 53,2 mm τον Μάιο, 40,2 mm τον Ιούνιο και μηδέν τον Ιούλιο. Αντίθετα, οι ακόλουθες ξηρές συνθήκες του καλοκαιριού μείωσαν τις εκπομπές CH₄ από τις πρώτες κιόλας ημέρες του Ιουλίου. Έτσι εξηγούνται και οι αρνητικές εκπομπές του CH₄ που παρατηρούνται στον 2^ο χρόνο καλλιέργειας φασολιού, όπου η συνολική βροχόπτωση όπως ήδη αναφέρθηκε ήταν μειωμένη και μάλιστα μηδενική τους μήνες Ιούνιο και Ιούλιο. Το γεγονός ότι όλες οι μεταχειρίσεις εκπέμπαν παρόμοιες ποσότητες CH₄ είναι λογικό αφού όλα τα πειραματικά τεμάχια εκτέθηκαν στις ίδιες κλιματικές συνθήκες και η χλωρή λίπανση εφαρμόστηκε σε όλα τα τεμάχια πριν τη σπορά φασολιού. Συνεπώς, συμπεραίνεται ότι η σχετικά υψηλή ικανότητα συγκράτησης νερού του εδάφους (αργιλοπηλώδες) και η εφαρμογή της χλωρής λίπανσης, η οποία παρείχε ένα αποσυνθέσιμο υπόστρωμα για μικροβιακή δραστηριότητα, προώθησε το φαινόμενο της μεθανογένεσης στην αρχή της καλλιεργητικής περιόδου (45-50 ΗΜΣ) κατά το πρώτο πείραμα αγρού. Η εξάλειψη των εκπομπών CH₄ μετά τις πρώτες ημέρες του Ιουνίου αποδίδεται στη σταδιακή επικράτηση των ξηρών καλοκαιρινών συνθηκών και ταυτόχρονα στην ξηρότητα του εδάφους, η οποία είναι γνωστό ότι προάγει την οξειδωση του μεθανίου (Stiehl - Braun et al., 2011).

Μολονότι οι εκπομπές N₂O στο βιολογικό σύστημα καλλιέργειας φασολιού ήταν μειωμένες σε σύγκριση με το συμβατικό, η αρνητική επίδραση που είχε το βιολογικό σύστημα στην ολική παραγωγή νωπών λοβών δεν μας επιτρέπει να συμπεράνουμε ότι οι βιολογικές πρακτικές καλλιέργειας όπως εφαρμόστηκαν στη συγκεκριμένη μελέτη και κάτω από τις επικρατούσες συνθήκες παρουσίασαν ένα περιβαλλοντικό πλεονέκτημα στη παρούσα τουλάχιστον μελέτη. Πράγματι, όταν οι εκπομπές αερίων του θερμοκηπίου εκφράστηκαν ανά μονάδα νωπού βάρους παραγόμενου προϊόντος, διαπιστώθηκε ότι αυτές ήταν παρόμοιες και στα δύο καλλιεργητικά συστήματα. Στην περίπτωση των εκπομπών CO₂, η αναγωγή τους ανά μονάδα νωπού βάρους παραγόμενων φασολιών οδήγησε σε μεγαλύτερες τιμές στο βιολογικό σύστημα καλλιέργειας. Ομοίως, οι Synäsaló et al. (2006) δεν βρήκαν κανένα περιβαλλοντικό πλεονέκτημα όταν συνέκριναν βιολογικό με συμβατικό σύστημα καλλιέργειας όσον αφορά τις εκπομπές αερίων θερμοκηπίου. Σε μία σύγκριση ευρωπαϊκών καλλιεργητικών συστημάτων, οι εκπομπές N₂O εκφραζόμενες ανά μονάδα νωπού βάρους παραγόμενου προϊόντος σε βιολογικά συστήματα τείνουν να είναι υψηλότερες από αυτές των συμβατικών καλλιεργητικών συστημάτων, παρόλο που οι αθροιστικές εκπομπές ανά καλλιεργούμενη επιφάνεια

των βιολογικών καλλιεργειών είναι συχνά πιο χαμηλές (Rees et al., 2012). Τα αποτελέσματα αυτά υπογραμμίζουν την αναγκαιότητα να επιτευχθούν υψηλές αποδόσεις στις βιολογικές καλλιέργειες ψυχανθών, συγκρίσιμες με αυτές που λαμβάνονται από συμβατικές καλλιέργειες, προκειμένου να προκύψει όφελος από τις μειωμένες εκπομπές N₂O ανά μονάδα καλλιεργούμενης επιφάνειας.

Στην παρούσα μελέτη δεν υπολογίστηκε το καθαρό δυναμικό παγκόσμιας θέρμανσης (GWP) για κάθε μεταχείριση, αφού προσδιορίστηκαν μόνο οι εκπομπές CO₂ από το έδαφος οι οποίες οφειλόταν στην αναπνοή των μικροοργανισμών και των ριζών. Δεν προσδιορίστηκαν δηλαδή οι καθαρές ανταλλαγές CO₂ στο οικοσύστημα που υπολογίζονται μέσω εκτίμησης της διαφοράς μεταξύ της ολικής αναπνοής και της φωτοσύνθεσης του οικοσυστήματος. Σε όσες περιπτώσεις πραγματοποιήθηκαν τέτοιες μελέτες, διαπιστώθηκε ότι κατά κανόνα το συνολικό ισοζύγιο ανταλλαγών άνθρακα σε μία καλλιεργήσιμη επιφάνεια συνήθως είναι μηδενικό (Soussana et al., 2005). Αυτό σημαίνει ότι σε γενικές γραμμές η φυτική παραγωγή δεν συμβάλλει στις εκπομπές CO₂ αλλά από την άλλη πλευρά δεν φαίνεται να συμβάλλει και στον περιορισμό τους.

Τα βιολογικά συστήματα καλλιέργειας θεωρούνται από πολλούς πιο αποτελεσματικά από τα συμβατικά στην ακινητοποίηση του άνθρακα στο έδαφος λόγω της εφαρμογής καλλιεργητικών πρακτικών που προωθούν την αύξηση της οργανικής ουσίας του εδάφους (Gattinger et al., 2012). Ωστόσο, η ικανότητα των βιολογικών συστημάτων να δεσμεύει τον άνθρακα συχνά αμφισβητείται (Leifeld et al., 2013), ενώ σε κάθε περίπτωση, τα ποσοστά του δεσμευμένου άνθρακα ελαχιστοποιούνται μακροπρόθεσμα, καθώς το σύστημα τείνει σε ένα σημείο ισορροπίας. Από τα υπόλοιπα αέρια του θερμοκηπίου, μόνο το N₂O απελευθερώνεται σε σημαντικές ποσότητες από τα καλλιεργούμενα εδάφη (Schulze et al., 2009). Η παρούσα μελέτη κατέδειξε χαμηλότερες εκπομπές N₂O ανά μονάδα επιφάνειας και μη σημαντικές διαφορές ανάμεσα σε βιολογικά και συμβατικά συστήματα όταν οι εκπομπές N₂O εκφράστηκαν ανά μονάδα νωπού βάρους παραγόμενου προϊόντος. Από την άλλη πλευρά όμως, η βιολογική γεωργία περιορίζει και με έμμεσο τρόπο τις εκπομπές αερίων του θερμοκηπίου, μέσω ελάττωσης των αναγκών για παραγωγή αζωτούχων λιπασμάτων και της συνεπακόλουθης μείωσης των βιομηχανικών εκπομπών CO₂. Επιπλέον, υπάρχουν και πολλά άλλα πιθανά οφέλη για το περιβάλλον και την ανθρώπινη υγεία που συνδέονται με τη βιολογική γεωργία (Stockdale and Watson, 2009), όπως η μειωμένη χρήση φυτοφαρμάκων. Συνεπώς, η μεγιστοποίηση της παραγωγικότητας στα βιολογικά καλλιεργητικά συστήματα, εκτός από τα άμεσα οικονομικά οφέλη,

συνιστά μία αποτελεσματική στρατηγική και για την επίτευξη περιβαλλοντικών οφελών (Kontoroulou et al., 2015).

4.2 Συζήτηση Πειραμάτων Θερμοκηπίου

4.2.1 Σχηματισμός ριζικών φυματίων σε φυτά φασολιού (νάνα & αναρριχώμενη ποικιλία)

Ο σημαντικά αυξημένος αριθμός φυματίων στις ρίζες των φυτών που εμβολιάσθηκαν με το στέλεχος *Rt* CIAT899 σε σύγκριση με τα φυτά που δεν εμβολιάσθηκαν με το προαναφερόμενο ριζόβιο και στα δύο πειράματα θερμοκηπίου (Σχ. 19 και 23 α), αποδεικνύει ότι το στέλεχος CIAT899 αποικίζει με επιτυχία το κοινό φασόλι όταν καλλιεργείται σε χημικά αδρανή υποστρώματα, ανεξάρτητα από τον τύπο ποικιλίας (νάνο ή αναρριχώμενο). Προηγούμενες μελέτες (Thies et al., 1991; Zaman-Allah et al., 2007) αναφέρουν επίσης αύξηση του συνολικού αριθμού των φυματίων στις ρίζες ψυχανθών που καλλιεργήθηκαν σε χημικά αδρανή υποστρώματα και είχαν εμβολιαστεί με το βακτήριο *R. tropici*. Η ικανότητα του στελέχους CIAT899 να αποικίζει τις ρίζες του φασολιού δεν περιορίζεται μόνο σε χημικά αδρανή υποστρώματα, αφού παρόμοια αποτελέσματα παρατηρήθηκαν και στο δεύτερο πείραμα αγρού με καλλιέργεια φασολιού της παρούσας μελέτης στην οποία εφαρμόστηκε το ίδιο στέλεχος (Ενότητα 4.1.1). Όμοια, οι Hungria et al. (2003), Vargas et al. (2000), και Hungria et al. (2000) αναφέρουν αύξηση του συνολικού αριθμού των ριζικών φυματίων σε φυτά εμβολιασμένα με CIAT899 που καλλιεργήθηκαν στο έδαφος σε σύγκριση με μη εμβολιασμένα φυτά. Στο πρώτο πείραμα θερμοκηπίου με καλλιέργεια νάνου φασολιού, ο σχηματισμός φυματίων ενισχύθηκε ελαφρώς και στα φυτά που εμβολιάσθηκαν με το εμπορικό μείγμα αζωτοβακτηρίων και τροφοδοτούνταν με Θ.Δ. χωρίς N (0% + εμπ. μείγμα), σε σύγκριση με τα μη εμβολιασμένα φυτά. Παρ' όλα αυτά, η ανάλυση της νουκλεοτιδικής αλληλουχίας μέσω της PCR δεν αποκάλυψε την παρουσία κάποιου N-δεσμευτικού βακτηρίου στις ρίζες των φυτών που είχαν εμβολιαστεί με το εμπορικό μείγμα αζωτοβακτηρίων, παρά μόνο την παρουσία του *Agrobacterium radiobacter*. Σύμφωνα όμως με τους Mhamdi et al. (2005), ο εμβολιασμός φυτών κοινού φασολιού με στελέχη *Agrobacterium* σε αποστειρωμένο χαλίκι δεν είχε καμία επίδραση στο συνολικό αριθμό των ριζικών φυματίων. Συνεπώς, λαμβάνοντας υπόψη τα αποτελέσματα της ανάλυσης της PCR, συμπεραίνουμε ότι τα φυτά που εμβολιάσθηκαν με το εμπορικό μείγμα εμφάνισαν μικρή αύξηση στο συνολικό αριθμό των ριζικών φυματίων ανά φυτό, λόγω της στέρξης τους σε ανόργανο N και όχι εξαιτίας κάποιου μικροοργανισμού προερχόμενου από το εμπορικό μείγμα που εφαρμόστηκε στη συγκεκριμένη μεταχείριση.

Στο δεύτερο πείραμα θερμοκηπίου με καλλιέργεια αναρριχώμενου φασολιού, τόσο ο αριθμός όσο και το μέσο νωπό βάρος των φυματίων στις ρίζες εμβολιασμένων φυτών ήταν σημαντικά χαμηλότερα όταν τα φυτά τροφοδοτούνταν με Θ.Δ. πλήρες αζώτου (100%N + CIAT899), σε σύγκριση με εκείνα που έλαβαν Θ.Δ. με 33% του τυπικού συνιστώμενου επιπέδου N (33%N+ CIAT899). Τα παραπάνω αποτελέσματα συμφωνούν με τους Gan et al. (2004) και Li et al. (2009), οι οποίοι υποστηρίζουν ότι υψηλά επίπεδα διαθέσιμου ανόργανου N στις ρίζες ψυχανθών περιορίζουν δραστικά το σχηματισμό φυματίων, σε αντίθεση με μειωμένες συγκεντρώσεις N που ενθαρρύνουν το σχηματισμό φυματίων. Σε πολλές μελέτες αναφέρεται ότι υψηλά επίπεδα ανόργανου N και ιδίως $\text{NO}_3\text{-N}$, ασκούν έντονη παρεμποδιστική δράση στο σχηματισμό φυματίων (Lim et al., 2014; Schulze 2004). Συγκεκριμένα, φαίνεται ότι υψηλά επίπεδα $\text{NO}_3\text{-N}$ στις ρίζες των φυτών περιορίζουν κάποια από τα αρχικά στάδια του σχηματισμού φυματίων σε ρίζες ψυχανθών όπως την προσκόλληση των ριζοβίων στις ρίζες, την κάμψη των ριζικών τριχιδίων, την αρχική διαίρεση των φυτικών κυττάρων και τη διείσδυση του νήματος μολύσματος (Dazzo and Brill 1978; Heidstra et al. 1997; Carroll and Mathews, 1990). Άλλοι ερευνητές αναφέρουν ότι τα υψηλά επίπεδα $\text{NO}_3\text{-N}$ μπορεί να οδηγήσουν σε αδρανοποίηση της αιμοσφαιρίνης των ψυχανθών (Kanayama et al., 1990) καθώς και επιτάχυνση της ωρίμανσης και αποσύνθεσης των φυματίων (Fujikake et al., 2003).

Ταυτόχρονα, στην καλλιέργεια αναρριχώμενου φασολιού παρατηρήθηκε ότι, όταν το επίπεδο ανόργανου N στο ριζικό σύστημα πλησιάζει το μηδέν, οι θέσεις αποικισμού από τα ριζόβια περιορίζονται. Αυτό προκύπτει από τον χαμηλότερο συνολικό αριθμό φυματίων ανά φυτό που παρατηρείται όταν τα εμβολιασμένα φυτά με CIAT899 τροφοδοτούνταν με Θ.Δ. χωρίς N (0%+ CIAT899), σε σύγκριση με εμβολιασμένα φυτά που τροφοδοτούνταν με Θ.Δ. με 33% του τυπικού συνιστώμενου επιπέδου N (33%N+ CIAT899). Σύμφωνα με τους Williams et al. (1981) και Schulze (2004), σε περίπτωση που η παροχή N σε κάποιο ψυχανθές εξαρτάται πλήρως από τη συμβίωση του με ριζόβια, η περιορισμένη διαθεσιμότητα ενέργειας από προϊόντα της φωτοσύνθεσης στα αρχικά στάδια του αποικισμού των ριζών μπορεί να περιορίσει την ανάπτυξη των φυματίων στις ρίζες του φυτού. Το αποτέλεσμα είναι να περιορίζεται η βιολογική αζωτοδέσμευση καθώς και η παραγωγή φυτικής βιομάζας σε αυτό το αρχικό στάδιο καλλιέργειας. Εντούτοις, όταν η έλλειψη παροχής ανόργανου N μειώνει τις θέσεις αποικισμού των ριζοβίων στις ρίζες των φυτών στα πρώιμα στάδια ανάπτυξης των φυτών, τα φυτά φαίνεται να αντιδρούν αυξάνοντας αργότερα το βάρος των φυματίων που έχουν σχηματίσει, προκειμένου να μπορέσουν να αντεπεξέλθουν στην υψηλή απαίτηση σε άζωτο στο μεταβολισμό τους, όπως αναφέρουν και οι Müller et al. (1993). Έτσι εξηγείται και η αύξηση του μέσου νωπού

βάρους φυματίου που παρατηρείται στα εμβολιασμένα φυτά που τρέφονταν με Θ.Δ. χωρίς N (0%+ CIAT899), 45 και 65 HMM στο πείραμα θερμοκηπίου καλλιέργειας αναρριχώμενου φασολιού.

Σύμφωνα με τους Singleton and Tavares (1986), μία σημαντική αύξηση στον συνολικό αριθμό των φυματίων στις ρίζες των φυτών δεν οδηγεί πάντα και σε αύξηση της αζωτοδέσμευσης, αλλά μόνο όταν ο αριθμός των φυματίων στα εμβολιασμένα φυτά είναι τουλάχιστον 2,5 φορές μεγαλύτερος από ότι στα μη εμβολιασμένα φυτά. Στη παρούσα μελέτη, και στα δύο πειράματα θερμοκηπίου, ο συνολικός αριθμός των ριζικών φυματίων σε φυτά εμβολιασμένα με CIAT899 ήταν πολύ μεγαλύτερος σε σύγκριση με τα μη εμβολιασμένα φυτά (17 και 4 φορές μεγαλύτερος στα πειράματα νάνο και αναρριχώμενου φασολιού, αντίστοιχα). Τα αποτελέσματα αυτά υποδηλώνουν έμμεσα ότι ο εμβολιασμός με το στέλεχος *R. tropici* CIAT899 είχε θετική επίδραση στη βιολογική αζωτοδέσμευση και στις δύο υδροπονικές καλλιέργειες φασολιού θερμοκηπίου. Όπως θα αναφερθεί και παρακάτω (Ενότητα 5.2.3), η θετική επίδραση του εμβολιασμού με *R. tropici* στην αζωτοδέσμευση δεν τεκμαίρεται μόνο έμμεσα από τον αυξημένο αριθμό φυματίων στις ρίζες αλλά και άμεσα από τον προσδιορισμό του ποσοστού του περιεχόμενου στους φυτικούς ιστούς N που προερχόταν από αζωτοδέσμευση.

4.2.2 Θρεπτική κατάσταση αζώτου (N) στους φυτικούς ιστούς φασολιού

Η επιτυχημένη συμβιωτική σχέση που αναπτύχθηκε μεταξύ των φυτών φασολιού και του στελέχους *R. tropici* CIAT899 στα φυτά που εμβολιάστηκαν με το συγκεκριμένο αζωτοβακτήριο επιβεβαιώνεται από τις συγκεντρώσεις ολικού N που προσδιορίστηκαν στο υπέργειο τμήμα των εμβολιασμένων φυτών και στα δύο πειράματα θερμοκηπίου. Συγκεκριμένα, και στα δύο πειράματα θερμοκηπίου, οι συγκεντρώσεις ολικού N στο υπέργειο τμήμα των φυτών που είχαν εμβολιαστεί με το στέλεχος CIAT899 και τροφοδοτούνταν με Θ.Δ. χωρίς N (0%N+ CIAT899) δεν ήταν χαμηλότερες από τις αντίστοιχες συγκεντρώσεις στα μη εμβολιασμένα φυτά που τροφοδοτήθηκαν με πρότυπο Θ.Δ. (100%N), τουλάχιστον 45 HMM και μέχρι το τέλος της καλλιεργητικής περιόδου. Μάλιστα, στην υδροπονική καλλιέργεια νάνου φασολιού, 65 HMM, οι συγκεντρώσεις ολικού N στο υπέργειο τμήμα των φυτών που δεν τους παρέχόταν N μέσω του Θ.Δ. αλλά εμβολιάστηκαν με CIAT899 ήταν σημαντικά υψηλότερες από αυτές των μη εμβολιασμένων φυτών που τροφοδοτήθηκαν με πλήρες Θ.Δ. σε N (3.10% έναντι 2.73% επί του ξηρού βάρους). Τα αποτελέσματα αυτά συμφωνούν απόλυτα με τα ευρήματα των Hungria et al. (2000), οι οποίοι αναφέρουν παρόμοιες συγκεντρώσεις ολικού N σε υδροπονικά

φυτά φασολιού εμβολιασμένα με το στέλεχος CIAT899 που τρέφονταν με Θ.Δ. χωρίς N, σε σχέση με μη εμβολιασμένα φυτά που τροφοδοτούνταν με πλήρες Θ.Δ. σε ανόργανο N. Τα παραπάνω αποτελέσματα δείχνουν ότι, στα φυτά που έλαβαν μειωμένο ή και μηδενικό ανόργανο άζωτο μέσω του Θ.Δ. αλλά εμβολιάστηκαν με *Rt*, η μειωμένη βλαστική ανάπτυξη και παραγωγή (Σχ. 21, Πίνακας 21) δεν οφειλόταν σε μειωμένη περιεκτικότητα σε άζωτο, τουλάχιστον από το στάδιο ανάπτυξης που τα φυτά είχαν αναπτύξει φυμάτια και μετά.

Από την άλλη πλευρά, το υπέργειο μέρος των φυτών που τρεφόταν με Θ.Δ. χωρίς N και εμβολιάστηκαν με το εμπορικό μείγμα αζωτοβακτηρίων (στην καλλιέργεια νάνου φασολιού) παρουσίασε χαμηλότερες συγκεντρώσεις ολικού N σε όλη τη διάρκεια της καλλιεργητικής περιόδου ($17,4 \text{ mg g}^{-1}$ ξηρού βάρους, μέση τιμή των τριών δειγματοληψιών), σε σύγκριση με τα φυτά που τροφοδοτούνταν με πρότυπο Θ.Δ. (100% N). Ωστόσο αυτό είναι εύλογο, δεδομένου ότι, όπως αναφέρθηκε στην παραπάνω υποενότητα (4.2.1), ο αριθμός και το μέγεθος των φυματίων που σχημάτισαν τα φυτά της συγκεκριμένης μεταχείρισης ήταν περιορισμένα, ενώ η ανάλυση PCR αποκάλυψε την απουσία N-δεσμευτικών μικροοργανισμών στις ρίζες των εμβολιασμένων φυτών με το εμπορικό μείγμα.

Ένα άλλο σημαντικό εύρημα είναι ότι, στο 2^ο πείραμα θερμοκηπίου, τα φυτά που τρεφόταν με Θ.Δ. χωρίς καθόλου N αλλά είχαν εμβολιασθεί με *Rt*, περιείχαν σημαντικά λιγότερο N στον υπέργειο βλαστό 25 HMM από αυτά που τρεφόταν με 100% N ή λάμβαναν 30% N και εμβολιάστηκαν με *Rt*. Το αποτέλεσμα αυτό δείχνει ότι η αζωτοδέσμευση μέσω *Rt* καθυστερεί να παράσχει στο φυτό επαρκείς ποσότητες N σε συνθήκες απουσίας N στο περιβάλλον των ριζών του φασολιού. Πιθανότατα αυτό συμβαίνει επειδή η έλλειψη αζώτου δυσχεραίνει την ανάπτυξη των φυματίων στα αρχικά στάδια του αποικισμού με *Rt*, όταν τα βακτηριοειδή ακόμη αναπτύσσονται και δεν είναι λειτουργικά, οπότε χρειάζονται εξωγενές N για να τραφούν. Σύμφωνα με τους Müller et al. (1993) η χορήγηση διαθέσιμου ανόργανου N σε καλλιέργεια ψυχανθών στα πρώτα στάδια ανάπτυξης τους, είναι ικανή να ενεργοποιήσει τη βιολογική αζωτοδέσμευση των φυτών, παρέχοντας επαρκές N στα αζωτοδεσμευτικά βακτήρια έτσι ώστε να επιταχυνθεί ο πολλαπλασιασμός τους.

4.2.3 Βιολογικά δεσμευμένο άζωτο από την ατμόσφαιρα

Το ποσοστό του βιολογικά δεσμευμένου N που προήλθε από την ατμόσφαιρα προσδιορίστηκε μόνο στην υδροπονική καλλιέργεια αναρριχώμενου φασολιού. Συγκεκριμένα, το N που δεσμεύτηκε βιολογικά από φυτά εμβολιασμένα με CIAT899

ανήλθε σε 49,2 ή 54,3 kg ha⁻¹, το οποίο αντιστοιχούσε σε 58,14% ή 100% του συνολικά περιεχόμενου N στους φυτικούς ιστούς, στις μεταχειρίσεις με μειωμένη (1/3 του συνιστώμενου επιπέδου) ή μηδενική παροχή N, αντίστοιχα. Αυτές οι τιμές είναι συγκρίσιμες με εκείνες που αναφέρουν οι Akter et al. (2014) για το φασόλι (περίπου 30-50 kg N ha⁻¹). Θα πρέπει να επισημανθεί ότι, αν και παρατηρήθηκαν αξιοσημείωτες διαφορές στην ολική παραγωγή βιομάζας μεταξύ των μεταχειρίσεων που τροφοδοτήθηκαν με Θ.Δ. ίσο με 33% του τυπικού συνιστώμενου επιπέδου N ή με Θ.Δ. χωρίς προσθήκη N, δεν υπήρχε σημαντική διαφορά μεταξύ τους στην ποσότητα N (kg ha⁻¹) που δεσμεύτηκε βιολογικά από την ατμόσφαιρα. Λαμβάνοντας υπόψη τις παρόμοιες απόλυτες ποσότητες βιολογικά δεσμευμένου N και των συγκεντρώσεων N στους φυτικούς ιστούς μετά τον πλήρη σχηματισμό των φυματίων σε αυτές τις δύο μεταχειρίσεις, μολονότι τα επίπεδα παροχής ανόργανου N ήταν διαφορετικά, οδηγούμαστε στο συμπέρασμα ότι η παραγωγή ξηρής βιομάζας σε ψυχανθή τα οποία εξαρτώνται από N-δεσμευτικά βακτήρια τελικά καθορίζεται από τη διαθεσιμότητα ανόργανου N.

Σύμφωνα με τους Unkonovich et al. (2008), τα φυτά φασολιού μπορούν να δεσμεύσουν βιολογικά περίπου 15 kg N για κάθε παραγόμενο τόνο ξηρής ουσίας υπέργειου τμήματος. Λαμβάνοντας υπόψη τις ποσότητες της παραγόμενης ολικής βιομάζας υπέργειου τμήματος ανά φυτό, και το συνολικό ποσοστό βιολογικά δεσμευμένου N, η βιολογική αζωτοδέσμευση στην υδροπονική καλλιέργεια αναρριχώμενου φασολιού υπολογίζεται σε 12,8 και 28,5 kg ανά τόνο παραγόμενης ξηρής ουσίας στην μεταχειρίσεις με 1/3-N και 0-N, αντίστοιχα. Αυτά τα αποτελέσματα φανερώνουν ότι οι αναφερόμενες ποσότητες βιολογικά δεσμευμένου N ανά τόνο παραγόμενης ξηράς ουσίας φυτών φασολιού από τους Unkonovich et al. (2008) αφορούν φυτά που τροφοδοτήθηκαν με μειωμένη ποσότητα ανόργανου N, ενώ φυτά που στερήθηκαν πλήρως την παροχή ανόργανου N παρουσίασαν σχεδόν διπλάσια αζωτοδεσμευτική ικανότητα ανά τόνο παραγόμενης ξηράς ουσίας. Η πρακτική του εμβολιασμού των ψυχανθών με αζωτοβακτήρια εφαρμόζεται κυρίως σε χωράφια που δεν καλλιεργούνται παραδοσιακά ή δεν έχουν καλλιεργηθεί για πολλά χρόνια με ψυχανθή, με αποτέλεσμα να απουσιάζουν γηγενή συμβατά στελέχη αζωτοβακτηρίων (Brockwell et al. 1995). Από την άλλη μεριά, τα υποστρώματα που χρησιμοποιούνται για καλλιέργεια φασολιού με στόχο την παραγωγή πράσινων λοβών είτε είναι αδρανή βιολογικά επειδή έχουν υποστεί θερμική κατεργασία (π.χ. περλίτης) είτε δεν φιλοξενούν αποτελεσματικά στελέχη ριζοβίων για αζωτοδέσμευση. Συνεπώς, ο εμβολιασμός με στελέχη ριζοβίων που είναι αποτελεσματικά για φυτά φασολιού, όπως το *R. tropici* CIAT899, είναι απαραίτητος για την μείωση εξωτερικής παροχής ανόργανου N δια μέσου της βιολογικής αζωτοδέσμευσης. Τα αποτελέσματα της

παρούσας μελέτης έδειξαν ότι ο εμβολιασμός με το στέλεχος CIAT899 του είδους *R. tropici* οδήγησε σε πλούσιο σχηματισμό φυματίων, τα οποία διατήρησαν το N των φυτικών ιστών σε παρόμοια επίπεδα με εκείνα των φυτών που λάμβαναν πλήρες Θ.Δ. σε άζωτο.

4.2.4 Συγκέντρωση νιτρικών ($\text{NO}_3\text{-N}$) και αμμωνιακών ($\text{NH}_4\text{-N}$) στο θρεπτικό διάλυμα ανακύκλωσης

Οι McKenzie et al. (2003) και Nanjareddy et al. (2014) αναφέρουν ότι υψηλές συγκεντρώσεις NO_3^- στο ριζικό περιβάλλον των ψυχανθών παρεμποδίζουν το σχηματισμό ριζικών φυματίων. Στη παρούσα μελέτη προσδιορίστηκαν τα επίπεδα $\text{NO}_3\text{-N}$ και $\text{NH}_4\text{-N}$ στο ανακυκλωμένο θρεπτικό διάλυμα της υδροπονικής καλλιέργειας αναρριχώμενου φασολιού (2^ο πείραμα θερμοκηπίου). Τα αποτελέσματα του συγκεκριμένου πειράματος συμφωνούν απόλυτα με τους παραπάνω ερευνητές, αφού στην καλλιέργεια αναρριχώμενου φασολιού και οι δύο μεταχειρίσεις με πλήρες Θ.Δ. σε N ($100\%\text{N} \pm \text{CIAT899}$) εμφάνισαν χαμηλό αριθμό και μειωμένο βάρος φυματίων, ενώ ταυτόχρονα το ριζικό τους σύστημα περιβαλλόταν από υψηλά επίπεδα νιτρικών αλάτων λόγω του ανακυκλωμένου Θ.Δ.

Κατά τη διάρκεια της ανάπτυξης των φυτών, οι ρίζες των ψυχανθών στις οποίες έχουν σχηματιστεί φυμάτια, μπορεί να εκβάλλουν αζωτούχες ενώσεις που προέρχονται από τη βιολογική αζωτοδέσμευση στη ριζόσφαιρα, ιδιαίτερα NH_4^+ , αμινοξέα, ενώσεις ουρίας, πεπτιδία και πρωτεΐνες (Paynel et al., 2001). Όσον αφορά την αμμωνία, η οποία είτε απελευθερώνεται από τις ρίζες ή προκύπτει μετά από ανοργανοποίηση των οργανικών εκκρίσεων, μπορεί ακολούθως να νιτροποιηθεί (Muhlestein et al., 2000; Peng et al., 2006). Η νιτροποίηση και η επιλεκτική πρόσληψη του N υπό τη μορφή $\text{NH}_4\text{-N}$ (Haynes et al., 1987; Guo et al., 2002; Savvas et al., 2006) ήταν προφανώς οι λόγοι για τα πολύ χαμηλότερα επίπεδα $\text{NH}_4\text{-N}$ που εμφανίστηκαν στα Θ.Δ. ανακύκλωσης σε σύγκριση με τα Θ.Δ. παροχής.

Τα επίπεδα $\text{NO}_3\text{-N}$ που προσδιορίστηκαν στο ανακυκλωμένο Θ.Δ. ήταν σχεδόν παρόμοια με τα επίπεδα του παρεχόμενου Θ.Δ. και στις δύο μεταχειρίσεις με πλήρες N, ανεξάρτητα από τον εμβολιασμό με CIAT899 ή όχι. Αντίθετα, στις μεταχειρίσεις που χορηγήθηκε Θ.Δ. είτε με 33% του τυπικού συνιστώμενου επιπέδου N ή χωρίς N, τα επίπεδα $\text{NO}_3\text{-N}$ ήταν υψηλότερα στα Θ.Δ. ανακύκλωσης. Τα αποτελέσματα αυτά οδηγούν στο συμπέρασμα ότι μόνο οι ρίζες των φυτών φασολιού που τροφοδοτήθηκαν με μειωμένη ποσότητα ($1/3 \text{ N}$) ή καθόλου ανόργανο N αποβάλλουν N, το οποίο προέρχεται από τη βιολογική αζωτοδέσμευση, στο Θ.Δ. κατά την ανάπτυξη των φυτών.

4.2.5 Παράμετροι απόδοσης φυτών φασολιού

Τα αποτελέσματα που προέκυψαν από την υδροπονική καλλιέργεια αναρριχώμενου φασολιού (2^ο πείραμα θερμοκηπίου) έδειξαν ότι τα φυτά που τροφοδοτήθηκαν με επαρκείς ποσότητες ανόργανου N δεν επωφελήθηκαν από τον εμβολιασμό με CIAT899, όσον αφορά τη παραγωγή φυτικής βιομάζας και την ολική παραγωγή νωπών λοβών. Παρόμοια αποτελέσματα αναφέρουν οι Herridge et al. (1990) και Vargas et al. (2000). Σύμφωνα με τους Gibson και Harper (1985), η αναποτελεσματικότητα των ριζοβίων να προωθήσουν την ανάπτυξη ψυχανθών που τροφοδοτούνται με επαρκείς ποσότητες ανόργανου N οφείλεται σε μειωμένο σχηματισμό ριζικών φυματίων η οποία οδηγεί σε μειωμένη ή και καθόλου συνεισφορά της βιολογικής αζωτοδέσμευσης στην παροχή N στο φυτό. Ωστόσο, στην παρούσα μελέτη, ο συνολικός αριθμός αλλά και το μέγεθος των φυματίων στα φυτά που εμβολιάστηκαν με το στέλεχος CIAT899 και τροφοδοτήθηκαν με πλήρες Θ.Δ. σε N (100%+ CIAT899) ήταν παρόμοια με τις τιμές που προσδιορίστηκαν στα τροφοδοτούμενα φυτά με Θ.Δ. χωρίς N (0%N + CIAT899) στα πρώτα στάδια ανάπτυξης τους, παρόλο που οι διαφορές που παρουσιάστηκαν στη βιολογική αζωτοδέσμευση μεταξύ των μεταχειρίσεων ήταν μεγάλες. Επιπρόσθετα, οι Otieno et al. (2009) αναφέρουν αποτυχία στην εφαρμογή του εμβολιασμού με ριζόβια όσον αφορά την παραγωγή, παρόλο που μπορεί να παρουσίαζαν θετική επίδραση στο σχηματισμό ριζικών φυματίων. Επομένως, είναι λογικό να συμπεραίνουμε ότι το φασόλι, όταν τροφοδοτείται με επαρκές ανόργανο N δεν επωφελείται από τον εμβολιασμό με CIAT899, κυρίως γιατί η διαθεσιμότητα του ανόργανου N δεν συνιστά περιοριστικό παράγοντα για την βλαστική του αύξηση και την παραγωγή καρπών.

Τα φυτά αναρριχώμενου φασολιού που εμβολιάστηκαν με CIAT899 και τροφοδοτήθηκαν με Θ.Δ. χωρίς N παρουσίασαν ικανοποιητικά υψηλά επίπεδα N στους φυτικούς ιστούς τους, τουλάχιστον 45 ημέρες μετά την μεταφύτευση και μέχρι το τέλος της καλλιέργειας τους. Ωστόσο, η ολική βιομάζα καθώς και η παραγωγή τους σε νωπούς λοβούς φασολιού ήταν σημαντικά χαμηλότερη σε σύγκριση με αυτή των μη εμβολιασμένων φυτών που τροφοδοτήθηκαν με πλήρες Θ.Δ. σε N. Συνεπώς, οι παρόμοιες συγκεντρώσεις N στους φυτικούς ιστούς υποδηλώνουν ότι η καταστολή της ανάπτυξης και της παραγωγής νωπών λοβών σε φυτά φασολιού που εμβολιάστηκαν με το CIAT899 και δεν λάμβαναν ανόργανο N δεν σχετίζεται με έλλειψη N μετά τις πρώτες 6 εβδομάδες από τον εμβολιασμό με ριζόβια. Μία πιθανή εξήγηση για αυτό το εύρημα είναι ότι η φυτική βιομάζα περιορίστηκε λόγω έλλειψης N στα πρώτα στάδια ανάπτυξης των φυτών φασολιού, όταν τα βακτήρια του στελέχους CIAT899 δεν είχαν ακόμη αναπτυχθεί τόσο, ώστε να μπορέσουν να παρέχουν

επαρκές N στα φυτά. Στο πρώτο πείραμα θερμοκηπίου καθιστού φασολιού δεν μπορεί να αποδειχθεί ότι οι ολικές συγκεντρώσεις N στους φυτικούς ιστούς των εμβολιασμένων φυτών με CIAT899 που λάμβαναν μηδενικό N ήταν χαμηλότερες από τα κρίσιμα επίπεδα, στα αρχικά στάδια ανάπτυξης των φυτών (>45 ΗΜΜ), διότι δεν πραγματοποιήθηκε καμία δειγματοληψία για τον προσδιορισμό ολικού N στη συγκεκριμένη περίοδο ανάπτυξης. Εντούτοις, είναι αναμενόμενο να εμφανίζεται σοβαρό έλλειμμα N στα φυτά των μεταχειρίσεων που τροφοδοτήθηκαν με Θ.Δ. χωρίς N, παρόλο τον εμβολιασμό τους με το *R. tropici* CIAT899 κατά τη διάρκεια των 3-5 πρώτων εβδομάδων μετά τον εμβολιασμό, αφού δεν λάμβαναν N. Πράγματι, είναι γνωστό ότι χρειάζεται μία περίοδος 3-5 εβδομάδων από τη στιγμή της μόλυνσης με τα αζωτοδεσμευτικά βακτήρια και την έναρξη της αζωτοδέσμευσης, όπου σε αυτή την χρονική περίοδο το φυτό θα πρέπει να καλύψει εκτός από τις δικές του ανάγκες σε N και αυτές των βακτηρίων (Kucey, 1989; Marschner, 1995). Στη διάρκεια αυτής της περιόδου, η μοναδική πηγή N για τα φυτά και τους αζωτοδεσμευτικούς μικροοργανισμούς των μεταχειρίσεων που τροφοδοτούνταν με Θ.Δ. χωρίς N ήταν μόνο το N που περιέχεται στο σπόρο. Συνεπώς, η ανάπτυξη των φυτών σε αυτό το αρχικό στάδιο ανάπτυξης πρέπει να ήταν εξαιρετικά περιορισμένη, σε βαθμό αντίστοιχο με την εξαιρετικά περιορισμένη διαθεσιμότητα N. Η υπόθεση αυτή επαληθεύεται με τον υπολογισμό του σχετικού ρυθμού ανάπτυξης (RGR) στα τρία στάδια ανάπτυξης των φυτών (0-25, 25-45 και 45-65 ΗΜΣ) στην καλλιέργεια αναρριχώμενου φασολιού. Πράγματι, οι μεταχειρίσεις που τροφοδοτήθηκαν με 33% του απαιτούμενου N και ακόμη περισσότερο αυτές με 0% N στο Θ.Δ. παρουσίασαν σημαντικά μικρότερο ρυθμό ανάπτυξης μόνο στο αρχικό στάδιο ανάπτυξης τους (0-25 ΗΜΣ), σε σύγκριση με τις μεταχειρίσεις που τροφοδοτήθηκαν με πλήρες Θ.Δ. N (Πίνακας 23). Συγκεκριμένα, στο αρχικό στάδιο ανάπτυξης, η μεταχείριση με 0% N παρουσίασε περίπου τρεις φορές μικρότερο ρυθμό ανάπτυξης σε σύγκριση με τις μεταχειρίσεις με 100% N, ενώ και η μεταχείριση με μειωμένη παροχή N (33% του κανονικού) παρουσίασε μειωμένο ρυθμό αύξησης κατά 17%. Ωστόσο, στο στάδιο ανάπτυξης μεταξύ 25 και 45 ΗΜΣ (όταν τα ριζικά φυμάτια είχαν αναπτυχθεί και συνεπώς είχε ξεκινήσει η διαδικασία της αζωτοδέσμευσης) ο σχετικός ρυθμός αύξησης ήταν παρόμοιος σε όλες τις μεταχειρίσεις, ενώ στο διάστημα μεταξύ 45 και 65 ΗΜΣ ο ρυθμός ανάπτυξης στην μεταχείριση με μηδενική παροχή N εμφανίστηκε σημαντικά μεγαλύτερος από αυτόν των μεταχειρίσεων που τροφοδοτήθηκαν με 100%N. Από αυτά τα αριθμητικά δεδομένα προκύπτει το ασφαλές συμπέρασμα ότι η ανάπτυξη των φυτών φασολιού που τροφοδοτήθηκαν με μειωμένο (1/3 του κανονικού) ή μηδενικό N περιορίστηκε μόνο κατά την αρχική φάση ανάπτυξης των

φυτών λόγω έλλειψης N, επειδή σε αυτή την φάση ανάπτυξης δεν είχε ξεκινήσει ακόμη η βιολογική αζωτοδέσμευση.

4.2.6 Θρεπτική κατάσταση φυτών σε ανόργανα στοιχεία

Στο πρώτο πείραμα θερμοκηπίου υδροπονικής καλλιέργειας καθιστού φασολιού προσδιορίστηκαν οι συγκεντρώσεις K^+ , Mg^{2+} και Zn^{2+} στο υπέργειο τμήμα των φυτικών ιστών, ενώ στην επόμενη υδροπονική καλλιέργεια αναρριχώμενου φασολιού (2^ο πείραμα) προσδιορίστηκαν επιπλέον οι συγκεντρώσεις των κατιόντων Ca^{2+} , Fe^{2+} , Mn^{2+} και Cu^{2+} . Οι συγκεντρώσεις των κατιόντων μειώθηκαν στους φυτικούς ιστούς των φασολιών που τροφοδοτήθηκαν με Θ.Δ. χωρίς N και στα δύο πειράματα θερμοκηπίου. Επίσης, μείωση μικρότερου βαθμού παρουσιάστηκε και στις συγκεντρώσεις των κατιόντων στους φυτικούς ιστούς των μεταχειρίσεων που στις οποίες χορηγήθηκε Θ.Δ. με 1/3 της πλήρους δοσολογίας N στην υδροπονική καλλιέργεια αναρριχώμενου φασολιού.

Η μείωση της απορρόφησης κατιόντων πιθανότατα οφείλεται σε μειωμένη πρόσληψη NO_3^- λόγω μειωμένης διαθεσιμότητας NO_3^- στο περιβάλλον των ριζών. Όπως αναφέρουν οι Coskun et al. (2013), η απόσυρση των αμμωνιακών ιόντων από το μέσο ανάπτυξης των ριζών φυτών κριθαριού και *Arabidopsis* οδήγησε σε άμεση και έντονη αύξηση της εισροής K^+ στα κύτταρα, ενώ η αντικατάσταση της παροχής NH_4-N με παροχή ίσων ποσοτήτων NO_3-N αύξησε ακόμη περισσότερο την πρόσληψη K^+ . Η ενεργή πρόσληψη K^+ και Mg^{2+} απαιτεί ισοδύναμη πρόσληψη ανιόντων για την ηλεκτροχημική εξισορρόπηση στο κυτόπλασμα (Novoa and Loomis, 1981). Από την άλλη μεριά, τα NO_3^- είναι τα κυρίαρχα ανιόντα που απορροφούνται από τα κύτταρα των φυτών (Haynes, 1990). Υπολογίζεται ότι τα νιτρικά καλύπτουν γύρω στο 70-80% από τη συνολική πρόσληψη ανιόντων στα ανώτερα φυτά (van Beusichem et al., 1988). Τα φυτά όμως που τροφοδοτήθηκαν με Θ.Δ. χωρίς N δεν απορρόφησαν καθόλου NO_3^- και συνεπώς είχαν μειωμένη συνολική απορρόφηση ανιόντων. Αυτό πιθανότατα είχε ως αποτέλεσμα τη σηματοδότηση ανάλογης μείωσης στη συνολική πρόσληψη κατιόντων μέσω των μηχανισμών ενεργού μεταφοράς που λαμβάνουν χώρα στη μεμβράνη των κυττάρων της ρίζας.

Από τα παραπάνω προκύπτει ότι, η χαμηλή διαθεσιμότητα NO_3^- που παρουσιάζεται στις ρίζες των φυτών μπορεί να σηματοδοτήσει μία σημαντική μείωση της πρόσληψης K^+ και Mg^{2+} μέσω μηχανισμών ενεργού μεταφοράς που δραστηριοποιούνται στα κύτταρα των ριζών (Mengel και Kirkby, 2001), προκειμένου να διατηρηθεί η ηλεκτροχημική ισορροπία στο κυτόπλασμα. Σε συμφωνία με τα

παραπάνω, οι Raab and Terry (1995) υποστηρίζουν ότι χαμηλές συγκεντρώσεις NO_3^- στο ριζικό περιβάλλον των φυτών περιορίζουν την απορρόφηση των κατιόντων, αφού τα NO_3^- ανιόντα χρειάζονται για την εξισορρόπηση των κατιόντων στο ξυλώδες αγγειακό σύστημα. Επιπρόσθετα, οι Bolan et al. (1991) αναφέρουν ότι η αζωτοδέσμευση στα ψυχανθή οδηγεί σε καθαρή απελευθέρωση ιόντων H^+ , η οποία με τη σειρά της μπορεί να επιφέρει περαιτέρω περιορισμό στην πρόσληψη K^+ και Mg^{2+} από τις ρίζες των φυτών απουσία NO_3^- στο ριζικό σύστημα με στόχο πάλι την διατήρηση της ηλεκτροχημικής ισορροπίας. Η βιολογική αζωτοδέσμευση και η συνεπαγόμενη παραγωγή NH_4^+ στις ρίζες ψυχανθών (Hong et al., 2010) επιβάλλει περαιτέρω περιορισμό στην απορρόφηση K^+ και Mg^{2+} από τις ρίζες, αφού υποχρεωτικά πρέπει να είναι ισοδύναμη με αυτή των ανιόντων, η οποία είναι μειωμένη λόγω της ελαχιστοποιημένης απορρόφησης NO_3^- .

Τα K^+ , Mg^{2+} και Ca^{2+} αποτελούν τα τρία βασικά κατιόντα για την θρέψη των φυτών. Από αυτά μόνο το K^+ παρουσίασε χαμηλότερες συγκεντρώσεις στους φυτικούς ιστούς από το επίπεδο που αναφέρεται ως ελάχιστο όριο επάρκειας στη βιβλιογραφία. Συγκεκριμένα, οι συγκεντρώσεις K^+ στους ιστούς των εμβολιασμένων φυτών φασολιού που τροφοδοτήθηκαν με Θ.Δ. χωρίς N στην υδροπονική καλλιέργεια καθιστού και αναρριχώμενου φασολιού ήταν χαμηλότερες (μέσος όρος των τριών δειγματοληψιών $15,2 \text{ mg g}^{-1}$ και $16,8 \text{ mg g}^{-1}$, αντίστοιχα) από το κατώτερο κρίσιμο επίπεδο που προτείνουν οι Bergmann, (1988) και Mills and Jones (1996) το οποίο ανέρχεται σε $18-20 \text{ mg g}^{-1}$. Αντίθετα, οι συγκεντρώσεις του Ca^{2+} και του Mg^{2+} στους φυτικούς ιστούς δεν ήταν χαμηλότερες από τα ελάχιστα κρίσιμα επίπεδα, τα οποία ανέρχονται σε $5-8 \text{ mg g}^{-1}$ και 25 mg g^{-1} , αντίστοιχα. Το ίδιο ισχύει και για τις συγκεντρώσεις των Fe^{2+} , Mn^{2+} και Cu^{2+} στα φύλλα του φασολιού οι οποίες, αν και παρουσίασαν σημαντική μείωση εξαιτίας της μη παροχής ανόργανου N και στα δύο πειράματα θερμοκηπίου, δεν ήταν χαμηλότερες από τα κρίσιμα επίπεδα που προτείνονται από διάφορους ερευνητές (Romheld and Marschner, 1991; Mills και Jones, 1996). Τα αποτελέσματα αυτά υποδηλώνουν ότι, όσον αφορά τις ελλείψεις ανόργανων θρεπτικών στοιχείων, μόνο η τροφοπενία καλίου μπορεί να μείωσε την παραγωγή φυτικής βιομάζας στα φυτά φασολιού που στερήθηκαν ανόργανο N. Όπως αναφέρουν οι O'Hara et al. (1988), οι ελλείψεις θρεπτικών στοιχείων σε φυτά, που εξαρτώνται αποκλειστικά και μόνο από τη συμβιωτική σχέση τους με αζωτοβακτήρια για την τροφοδότησή τους με N, όπως αυτή του K^+ στην παρούσα μελέτη, περιορίζουν όχι μόνο άμεσα την ανάπτυξη αυτών των φυτών αλλά και έμμεσα εμποδίζοντας τη βιολογική αζωτοδέσμευση.

Η παροχή Θ.Δ χωρίς προσθήκη N μείωσε την συγκέντρωση P στα φύλλα του νάνου φασολιού, χωρίς διάκριση μεταξύ των φυτών που είχαν εμβολιαστεί με το

στέλεχος CIAT899 και αυτών που εμβολιάσθηκαν με το εμπορικό σκεύασμα αζωτοβακτηρίων. Ομοίως, στην καλλιέργεια του αναρριχώμενου φασολιού, οι συγκεντρώσεις P στα φύλλα παρουσίασαν μείωση όταν στο Θ.Δ. η συγκέντρωση N ήταν μηδενική. Μάλιστα, θα πρέπει να επισημανθεί ότι και στις δύο καλλιέργειες φασολιού, η μείωση του P στα φύλλα ήταν εντονότερη στο πρώιμο στάδιο γεμίσματος των λοβών φασολιού. Το μειωμένο επίπεδο P στα φύλλα του φασολιού θα μπορούσε να αποδοθεί στον αυξημένο αριθμό φυματίων που παρουσιάζεται στο συγκεκριμένο στάδιο ανάπτυξης και στις τρεις εμβολιασμένες μεταχειρίσεις, ανεξαρτήτως πειράματος, αφού πολλές έρευνες αναφέρουν ότι τα φυμάτια είναι ισχυρές καταβόθρες P (Drevon and Hartwig, 1997; Kleinert et al., 2014). Πράγματι, οι Vadez et al. (1996), αναφέρουν ότι οι συγκεντρώσεις P στα ριζικά φυμάτια που σχηματίζονται από N-δεσμευτικά βακτήρια είναι 3 φορές υψηλότερες σε σύγκριση με αυτές των φυτικών ιστών.

Συνοψίζοντας τα παραπάνω, διαπιστώνεται ότι η δραστική μείωση και ακόμη περισσότερο η πλήρης στέρηση ανόργανου N επιδρά αρνητικά στο φασόλι κυρίως λόγω της δραστικά μειωμένης διαθεσιμότητας N στα πρώιμα στάδια ανάπτυξης των φυτών, αλλά δευτερευόντως και λόγω δραστικού περιορισμού της απορρόφησης K. Η έλλειψη K πιθανότατα συντηρεί πρόσθετους ανατροφοδοτικούς μηχανισμούς μείωσης της παραγωγής βιομάζας, όπως η περιορισμένη διαθεσιμότητα προϊόντων της φωτοσύνθεσης (Hardy and Havelka, 1976; Schulze, 2004). Ειδικότερα, η μειωμένη παραγωγή προϊόντων της φωτοσύνθεσης, ειδικά στα αρχικά στάδια ανάπτυξης των φυτών, πιθανότατα μείωσε την παραγωγή βιομάζας όχι μόνο άμεσα αλλά και έμμεσα, μέσω περιορισμού του αποικισμού με ριζόβια λόγω της μειωμένης τροφοδότησής τους με ενέργεια. Η θεώρηση αυτή όμως, για να τεκμηριωθεί απαιτεί περαιτέρω έρευνα.

4.3 Συμπεράσματα

Λαμβάνοντας υπόψη τα αποτελέσματα που προέκυψαν από τα τέσσερα πειράματα που πραγματοποιήθηκαν στην παρούσα διατριβή καταλήγουμε στα παρακάτω συμπεράσματα:

- Η αρνητική σχέση παροχής N με τον συνολικό αριθμό φυματίων και το μέσο βάρος φυματίου διαπιστώθηκε και στις τέσσερις καλλιέργειες φασολιού (υπαίθρια και θερμοκηπιακή).
- Το στέλεχος Rt CIAT899 αποίκισε με επιτυχία τις ρίζες των φυτών φασολιού (νάνο ή αναρριχώμενο) είτε αυτά καλλιεργήθηκαν στο έδαφος (υπαίθρια καλλιέργεια) ή σε χημικά αδρανές, υδροπονικό υπόστρωμα ελαφρόπετρας (υδροπονική καλλιέργεια θερμοκηπίου) αυξάνοντας τον σχηματιζόμενο αριθμό ριζικών φυματίων. Αντίθετα, το εμπορικό σκεύασμα Azogiz, που περιείχε μείγμα αζωτοβακτηρίων, δεν κρίθηκε αποτελεσματικό ως προς τον αποικισμό του στις ρίζες φυτών φασολιού. Ο μεγαλύτερος συνολικός αριθμός φυματίων που παρουσιάστηκε στις ρίζες των βιολογικά καλλιεργούμενων φυτών φασολιού στην πρώτη υπαίθρια καλλιέργεια πρέπει να προέκυψε από γηγενή αζωτοβακτήρια και όχι από το εμπορικό σκεύασμα. Το συμπέρασμα αυτό εξάγεται από την απουσία θετικής επίδρασης στον σχηματισμό φυματίων όταν εφαρμόστηκε στην υδροπονική καλλιέργεια.
- Το N που απελευθερωνόταν κατά την ανοργανοποίηση της οργανικής ουσίας ήταν λιγότερο από αυτό που προσλάμβαναν τα φυτά και που ακινητοποιούσαν οι μικροοργανισμοί του εδάφους, αφού παρατηρήθηκε μεγάλη μείωση του ανόργανου N στο πρώιμο στάδιο γεμίσματος των λοβών και έπειτα σταθεροποίηση στα χαμηλά αυτά επίπεδα. Συνεπώς, η συμβίωση φασολιού-αζωτοβακτηρίων δεν παρείχε N στα φυτά στα αρχικά στάδια ανάπτυξης τους, αντίθετα στερούταν N λόγω ακινητοποίησης του από τα αζωτοβακτήρια.
- Η μειωμένη διαθεσιμότητα N σε αφομοιώσιμες μορφές για τα φυτά του βιολογικού καλλιεργητικού συστήματος στα αρχικά στάδια ανάπτυξης τους και όταν δεν έχει ξεκινήσει ακόμα η βιολογική αζωτοδέσμευση, λόγω της παροχής οργανικά δεσμευμένου N στο βιολογικό σύστημα, κρίθηκε κρίσιμη για την περαιτέρω ανάπτυξη των φυτών οδηγώντας σε μειωμένη παραγωγή βιομάζας, η οποία περιόρισε τον συνολικό αριθμό λοβών και τελικά την ολική απόδοση σε νωπούς λοβούς.

- Το 84 % της συνολικής ποσότητας N των βιολογικών φυτών φασολιού προήλθε από την συμβιωτική βιολογική αζωτοδέσμευση, ενώ αντίθετα τα φυτά του συμβατικού συστήματος κατάφεραν να δεσμεύσουν το 44 % του συνολικού N. Ενώ, και στα δύο καλλιεργητικά συστήματα η μεγαλύτερη ποσότητα N που συγκεντρώθηκε στους λοβούς προέρχεται από την ατμόσφαιρα, οι οποίοι είναι και το αναπαραγωγικό μέρος των φυτών.
- Τα δύο συστήματα καλλιέργειας μπορούν να θεωρηθούν βιώσιμα, αφού παρουσίασαν θετικό ισοζύγιο N, με το βιολογικό σύστημα καλλιέργειας να υπερτερεί αντισταθμίζοντας αποτελεσματικά την ποσότητα N που αφαιρέθηκε με τη συγκομιδή των λοβών βελτιώνοντας την παροχή N στο έδαφος.
- Η μειωμένη παραγωγή στο βιολογικό καλλιεργητικό σύστημα περιορίζει και το περιβαλλοντικό πλεονέκτημα που εμφανίζει το βιολογικό σύστημα όσον αφορά τις μικρότερες αθροιστικές εκπομπές N_2O ανά μονάδα καλλιεργούμενης επιφάνειας, αφού όταν οι εκπομπές N_2O εκφράζονται ανά μονάδα νωπού βάρους παραγόμενου προϊόντος, διαπιστώνεται ότι είναι παρόμοιες και στα δύο καλλιεργητικά συστήματα. Επομένως, τονίζεται πάλι η αναγκαιότητα επίτευξης υψηλών αποδόσεων στα βιολογικά συστήματα καλλιέργειας.
- Αντίθετα, οι αθροιστικές εκπομπές CO_2 εμφανίστηκαν υψηλότερες στο βιολογικό καλλιεργητικό σύστημα σε σύγκριση με το συμβατικό εξαιτίας της αυξημένης ανοργανοποίησης της οργανικής ουσίας λόγω εφαρμογής οργανικού λιπάσματος (κομπόστ). Από την άλλη πλευρά, το βιολογικό καλλιεργητικό σύστημα περιορίζει έμμεσα σε σημαντικό βαθμό τις εκπομπές αερίων θερμοκηπίου μέσω της μη χρήσης ανόργανων λιπασμάτων N τα οποία έχουν υψηλό αποτύπωμα άνθρακα.
- Η συνεισφορά του CH_4 στις εκπομπές αερίων θερμοκηπίου ήταν ελάχιστη τον 1ο χρόνο, ενώ τον 2ο χρόνο φαίνεται ότι λειτούργησαν σαν καταβόθρες CH_4 και όχι σαν πηγές.
- Η ανάπτυξη των φυτών φασολιού που τροφοδοτήθηκαν με μειωμένο ή μηδενικό N περιορίστηκε μόνο κατά την αρχική φάση ανάπτυξης των φυτών λόγω έλλειψης N, επειδή σε αυτή την φάση ανάπτυξης δεν είχε ξεκινήσει ακόμη η βιολογική αζωτοδέσμευση και αυτό διαπιστώνεται από τον μειωμένο ρυθμό ανάπτυξης που παρουσίασαν τα φυτά στο συγκεκριμένο στάδιο.
- Η δραστική μείωση της παροχής N στο 1/3 του συνιστώμενου επιπέδου N βελτίωσε το σχηματισμό φυματίων και ανάγκασε τα φυτά να καλύψουν

περισσότερο από το ήμισυ των συνολικών αναγκών τους από την συμβιωτική βιολογική αζωτοδέσμευση ($N_{dfa}=58\%$).

- Μια ηπιότερη μείωση της παροχής ανόργανου N (π.χ. 2/3 του τυπικού συνιστώμενου επιπέδου N) θα μπορούσε να είναι πιο αποτελεσματική από την άποψη της εξοικονόμησης N λιπασμάτων, χωρίς αντίστοιχη μείωση στην απόδοση των υδροπονικών καλλιεργειών φασολιών. Επιπλέον, εφαρμόζοντας διαφορετικά ποσοστά ανόργανου N πριν και μετά τον σχηματισμό αζωτοδεσμευτικών φυματίων θα μπορούσε επίσης να είναι μια αποτελεσματική στρατηγική. Η αποτελεσματικότητα αυτών των εναλλακτικών επιλογών για τη μείωση της παροχής N λιπάσματος σε υδροπονικές καλλιέργειες φασολιών χωρίς να διακυβεύεται η τελική παραγωγή πρέπει να ελεγχθεί πειραματικά.
- Η βιολογική αζωτοδέσμευση μειώνει τις εισροές αγροχημικών & αυξάνει την βιωσιμότητα τόσο σε βιολογικά όσο και σε υδροπονικά συστήματα καλλιέργειας ψυχανθών, με απαραίτητη προϋπόθεση όμως να διασφαλιστεί εξωγενής επαρκής τροφοδότηση N στα φυτά μέχρι τον σχηματισμό φυματίων ώστε να μην υπάρξει μείωση στον σχετικό ρυθμό ανάπτυξης (RGR) σε αυτό το στάδιο.
- Εκτός από τη μειωμένη διαθεσιμότητα N στα πρώιμα στάδια ανάπτυξης των φυτών ένας άλλος παράγοντας που επέδρασε αρνητικά στο φασόλι φαίνεται να είναι και ο περιορισμός της απορρόφησης K^+ . Τα μειωμένα επίπεδα K^+ πιθανότατα μείωσαν την παραγωγή βιομάζας άμεσα και έμμεσα, μέσω περιορισμού του αποικισμού με ριζόβια λόγω της μειωμένης τροφοδότησής τους με ενέργεια.

4.4 Πρωτοτυπία της διδακτορικής διατριβής

Η πρωτοτυπία της παρούσας διδακτορικής διατριβής έγκειται στα ακόλουθα:

- ❖ Για πρώτη φορά συγκρίθηκαν εκπομπές Α.Θ σε συμβατικό & βιολογικό Κ.Σ. σε υπαίθρια καλλιέργεια νωπού φασολιού.
- ❖ Για πρώτη φορά μελετήθηκε η επίδραση της αλατότητας στις εκπομπές Α.Θ στη Μεσόγειο.
- ❖ Για πρώτη φορά στην Ελλάδα προσδιορίστηκαν οι εκπομπές Α.Θ σε γεωργικά φυτικά οικοσυστήματα.
- ❖ Για πρώτη φορά ποσοτικοποιήθηκε η συμβιωτική αζωτοδέσμευση με τη μέθοδο της φυσικής αφθονίας σε καλλιέργεια φασολιού μετά από εμβολιασμό με το στέλεχος R_t CIAT899.
- ❖ Για πρώτη φορά έγινε σύγκριση συστημάτων (βιολογικό & συμβατικό) όσον αφορά τη βιολογική αζωτοδέσμευση φυτών υπαίθριας καλλιέργειας νωπού φασολιού εμβολιασμένων με CIAT899.
- ❖ Για πρώτη φορά προσδιορίστηκε ποσοτικά η συνεισφορά της συμβιωτικής αζωτοδέσμευσης στο συνολικό N υδροπονικής καλλιέργειας φυτών αναρριχώμενου φασολιού εμβολιασμένων με CIAT899, τα οποία τροφοδοτήθηκαν με διαφορετικές συγκεντρώσεις N στο θρεπτικό διάλυμα.

Βιβλιογραφία

- Abdelgadir, E.M., Oka, M., Fujiyama, H., 2005. Characteristics of nitrate uptake by plants under salinity. *J. Plant Nutr* 28, 33–46.
- Abdel-Ghaffar, A.S., El-Attar, H.A., El-Halfawi, M.H., AbdelSalam. A.A., 1982. Effect of inoculation, nitrogen fertilizer, salinity and water stress on symbiotic N₂-fixation by *Vicia faba* and *Phaseolus vulgaris*. In *Biological Nitrogen Fixation Technology for Tropical Agriculture*. Eds. P H Graham and S C Harris, 153-160. Centro International de Agricultura Tropical Call, Colombia.
- Alföldi, T., Granado, J., Kieffer, E., Kretzschmar, U., Morgner, M., Niggli, U., Schädeli, A., Speiser, B., Weibel, F., Wyss, G., Schmidt, W., Schmidt, G., 2006. Quality and safety of organic products. *FiBL Dossier* 4, 2-24.
- Altschul, S.F., Madden, T.L., Schaffer, A.A., Zhang, J., Zhang, Z., Miller, W., Lipman, D.J., 1997. Gapped BLAST and PSI-BLAST: a new generation of protein database search programs. *Nucl. Acid Res.* 25,3389-3402.
- Alvarez, C.E., Carracedo, A.E., Iglesias, E., Martinez, M.C., 1993. Pineapples cultivated by conventional and organic methods in a soil from a banana plantation: A comparative study of soil fertility, plant nutrition, and yields. *Biol. Agric. Hortic.* 9, 161–171.
- Amarger, N., Bours, M., Revoy, E., Allard, M.P., Laguerre, G, 1981. *Rhizobium tropici* nodulates field-grown *Phaseolus vulgaris* in France. *Plant and Soil* 161: 147-156, 1994.
- Amarger, N., Bours, M., Revoy, F., Allard, M.R., Laguerre, G., 1994. *Rhizobium tropici* nodulates field-grown *Phaseolus vulgaris* in France. *Plant Soil* 161, 147-156.
- Aoyama, M., Nozawa, T., 1993. Microbial biomass nitrogen and mineralization-Immobilization processes of nitrogen in soils incubated with various organic materials. *Soil Sci. Plant Nutr.* 39: 23-32
- Atkin, K., Nichols, M.A., 2004. Organic hydroponics. *Acta Hort.* 648, 121–127.
- Ball, B.C., Griffiths, B.S., Topp, C.F.E., Wheatley, R., Walker, R.L., Rees, R.M., Watson, C.A., Gordon, H., Hallett, P.D., McKenzie, B.M., Nevison, I.M., 2014. Seasonal nitrous oxide emissions from field soils under reduced tillage, compost application or organic farming. *Agric. Ecosyst. Environ.* 189, 171-180.
- Bayuelo-Jiménez, J.S., Debouck, D.G., Lynch, J.P., 2003. Growth, gas exchange, water relations, and ion composition of *Phaseolus* species grown under saline conditions. *Field Crops Res.* 80, 207-222.

- Beecher, H G., 1993, Effects of saline irrigation water on soybean yield and soil salinity in the Murrumbidgee Valley. *Aust J Exp Agric.*;33:85–91.
- Berensten, P.B.M., Giesen, G.W.J., Schneiders, M.M.F.H., 1998. Conversion from conventional to biological dairy farming: Economic and environmental consequences at farm level. *Biological Agriculture and Horticulture* 16, 311±328
- Bergmann, W., 1988. *Ernaehrungsstoerungen bei Kulturpflanzen. Entstehung, visuelle und analytische Diagnose.* Gustav Fischer Verlag, Stuttgart, New York, 614.
- Berry, P.M., Sylvester-Bradley, R., Philipps, L., Hatch, D.J., Cuttle, S.P., Rayns, F.W., Gosling, P., 2002. Is the productivity of organic farms restricted by the supply of available nitrogen? *Soil Use Manage.* 18, 248-255.
- Bilalis, D., Papastylianou, P., Konstantas, A., Patsiali, S., Karkanis, A., & Efthimiadou, A. 2010. Weed-suppressive effects of maize–legume intercropping in organic farming. *International Journal of Pest Management*, 56(2), 173-181.
- Boddey, R.M., Peoples, M.B., Palmer, B., Dart, P.J., 2000. Use of the 15N natural abundance technique to quantify biological nitrogen fixation by woody perennials. *Nutr. Cycl. Agroecosyst.* 57, 235–270.
- Bolan, N.S., Hedley, M.J., White, R.E., 1991. Processes of soil acidification during nitrogen cycling with emphasis on legume based pastures. *Plant Soil* 134, 53-63.
- Boonkerd, N., Weber, D.F, Bezdicek, D.F, 1978. Influence of *Rhizobium japonicum* strains and inoculation methods on soybeans grown in rhizobia-populated soil. *Agronomy Journal*, 70 (4), 547-549.
- Bouwman, A.F., 1990. Exchange of greenhouse gases between terrestrial ecosystems and the atmosphere. In: Bouwman AF (ed) *Soils and the Greenhouse Effect*, pp 61-127, Wiley and Sons, Chichester, UK
- Bramley, RGV, Ellis, N., Nable, RO., Garside , AL., *Australian Journal of Soil Research* 34(6) 967 – 984.
- Brockwell, J., Bottomley, P.J., Thies, J.E., 1995. Manipulation of rhizobia microflora for improving legume productivity and soil fertility: a critical assessment. *Plant Soil* 174, 143-180.
- Brugnoli, E., Lauteri, M., 1991. Effects of salinity on stomatal conductance, photosynthetic capacity, and carbon isotope discrimination of salt-tolerant (*Gossypium hirsutum* L.) and salt-sensitive (*Phaseolus vulgaris* L.) C3 non-halophytes. *Plant Physiol.* 95, 628-635.

- Burdman, S., Kigel, J., Okon, Y., 1997. Effects of *Azospirillum brasilense* on nodulation and growth of common bean (*Phaseolus vulgaris* L.). *Soil Biol. Biochem.* 29, 923–929.
- Burger, M., Jackson, L.E., Lundquist, E., Louie, D.T., Miller, R.L., Rolston, D.E., Scow, K.M., 2005. Microbial responses and nitrous oxide emissions during wetting and drying of organically and conventionally managed soil under tomatoes. *Biol. Fertil. Soils* 42, 109–118.
- Cabot, C., García, M.C., Sibole, J.V., 2005. Relationship between xylem ion concentration and bean growth responses to short-term salinisation in spring and summer. *J. Plant Physiol.* 162, 327–334.
- Camacho, M., Santamaria, C., Temprano, F., Rodriguez-Navarro, D.N., Daza, A., 2001. Co-inoculation with *Bacillus* sp. CECT450 improves nodulation in *Phaseolus vulgaris* L. *Can. J. Microbiol.* 47, 1058–1062.
- Carpenter-Boggs, L., Pikul, J.L., Vigil, M.F., Riedell, W.E., 2000. Soil nitrogen mineralization influenced by crop rotation and nitrogen fertilization. *Am. Soc. Agron.* 64, 2038-2045.
- Carroll B.J., Mathews A., 1990. Nitrate inhibition of nodulation in legumes, in: P.M.Gresshoff (Ed.), *Molecular Biology of Symbiotic Nitrogen Fixation*, CRC Press Inc., Boca Raton, FL, 159–180.
- Cassman, K.G., Dobermann, A., Walters, D.T., 2002. Agroecosystems, nitrogen-use efficiency and nitrogen management. *Ambio* 31 (2), 132-140.
- Catroux, G., Hartmann A., Revellin, C., 2001. Trends in rhizobial inoculant production and use. *Plant Soil* 230, 21-30.
- Chadwick, D.R., Cardenas, L., Misselbrook, T.H., Smith, K.A., Rees, R.M., Watson, C.J., McGeough, K.L., Williams, J.R., Cloy, J.M., Thorman, R.E., and Dhanoa M.S., 2014. Optimizing chamber methods for measuring nitrous oxide emissions from plot-based agricultural experiments. *Europ. J. Soil Sci.* 65, 295-307.
- Clarke, J., 1999. CAP Reform: Potential for the effects on environmental impact of farming. MAFF report SA0111
- Clayton, H.A.J., Smith, K.A., 1994. Measurement of nitrous oxide emissions from fertilised grassland using closed chambers. *J. Geophys. Res.* 99, 16599–16607.
- Cole, C.V., Duxbury, J., Freney, J., Heinemeyer, O., Minami, K., Mosier, A., Paustian K., Rosenberg, N., Sampson, N., Sauerbeck, D., Zhao, Q., 1997. Global estimates of potential mitigation of greenhouse gas emissions by agriculture. *Nutr. Cycling Agroecosyst.* 49, 221–228.

- Cordovilla, M.P., Ocaña, A., Ligeró, F., Lluch, C., 1995. Salinity effects on growth analysis and nutrient composition in four grain legumes- rhizobium symbiosis Journal of Plant Nutrition 1532-4087.
- Cordovilla, M.P., Ocaña, A., Ligeró, F., Lluch, C., 1999. Effect of salinity on growth, nodulation and nitrogen assimilation in nodules of faba bean (*Vicia faba* L.). Journal of Plant Nutrition, Appl Soil Ecol 11(1):1-7
- Crews, T.E., Peoples, M.P., 2004. Legume versus fertilizer sources of nitrogen: ecological tradeoffs and human needs. Agriculture, Ecosystems & Environment. 102(3), 279–297
- Crutzen, P.J. , 1981. Atmospheric chemical processes of the oxides of nitrogen, including nitrous oxide. Denitrification, nitrification and atmospheric nitrous oxide, 17-44.
- Davis, J., Abbott, L., 2006. Soil fertility in organic farming systems. Organic agriculture, a global perspective. CSIRO Publishing, Melbourne: 25-51.
- Dawson, J.C., Huggins, D.R., Jones, S.S., 2008. Characterizing nitrogen use efficiency in natural and agricultural ecosystems to improve the performance of cereal crops in low-input and organic agricultural systems. Field Crops Res. 107, 89-101.
- Dazzo, F.B., Brill, W.J., 1978. Regulation by fixed nitrogen of host-symbiont recognition in the *Rhizobium*-clover symbiosis, Plant Physiol 62, 18–21.
- Delgado, M.J., Ligeró, F., Lluch, C., 1994. Effects of salt stress on growth and nitrogen fixation by pea, faba-bean, common bean and soybean plants. Soil Biol. Biochem. 26, 371-376.
- Demir, Y., Kocakalkan, I., 2002. Effect of NaCl and proline on beanseedlings cultured in vitro. Biol Plant 45, 597–599
- Dendooven, L., Patiño-Zúñiga, L., Verhulst, N., Luna-Guido, M., Marsch, R., Govaerts, B., 2012. Global warming potential of agricultural systems with contrasting tillage and residue management in the central highlands of Mexico. Agric. Ecosyst. Environ. 152, 50-58.
- Drevon, J. J., Hartwig, U.A., 1997. Phosphorus deficiency increases the argon-induced decline of nodule nitrogenase activity in soybean and alfalfa. Planta 200, 463–469.
- Drinkwater, L.E., Wagoner, P., Sarrantonio, M., 1998. Legume-based cropping systems have reduced carbon and nitrogen losses. Nature 396.6708 : 262-265.
- Drinkwater, L.E., Letourneau, D.K., Workneh, F., Van Bruggen, A.H.C., Shennan, C., 1995. Fundamental difference between conventional and organic tomato agroecosystems in California. Ecol. Appl. 5, 1098–1112.

- Drinkwater, K.F., 2005, The response of Atlantic cod (*Gadus morhua*) to future climate change, ICES J. Mar. Sci. 62 (7): 1327-1337.
- Duxbury, J.M., Mosier, A.R., 1993. Status and issues concerning agricultural emissions of greenhouse gases. Agricultural dimensions of global climate change: 229-258.
- Eaton, A.D, Clesceri, L.S., Greenberg, A.E. (eds.), 1995. Standard methods for the examination of water and wastewater, 19th edition. Am. Public Health Assoc., Washington, USA.
- Edwards, C.A., 1989. The importance of integration in sustainable agricultural systems. Agriculture, ecosystems & environment 27.1: 25-35.
- El-Mokadem, M.T., Helemish, F.A., Abdel-Wahab, S.M, Abou-El-Nour, M. M., 1991. Salt response of clover and alfalfa inoculated with salt tolerant strains of *Rhizobium*. Ain Shams Sci. Bull. 28B, 441–468.
- Elsheikh, E. A. E., Wood, M., 1990. Effect of salinity on growth, nodulation and nitrogen yield of chickpea (*Cicer arietinum* L.). Journal of Experimental Botany 41.10 : 1263-1269.
- Eltun, R., 1996. Apelsvoll cropping system experiment. III. Yield and grain quality of cereals. Norwegian Journal of Agricultural Science 10, 7±22
- Faghire, M., Bargaz, A., Farissi, M., Palma, F., Mandri, B., Lluch, C., Tejera García, N.A., Herrera-Cervera, J.A., Oufdou, K., Ghoulam, C., 2011. Effect of salinity on nodulation, nitrogen fixation and growth of common bean (*Phaseolus vulgaris*) inoculated with rhizobial strains isolated from the Haouz region of Morocco. Symbiosis 55, 69–75.
- Fernández-Luqueño, F., Reyes-Varela, V., Martínez-Suárez, C., Reynoso-Keller, R.E., Méndez-Bautista, J., Ruiz-Romero, E., López-Valdez, F., Luna-Guido, M.L., Dendooven, L., 2009. Emission of CO₂ and N₂O from soil cultivated with common bean (*Phaseolus vulgaris* L.) fertilized with different N sources. Sci. Tot. Environ. 407, 4289–4296.
- Fernández-Luqueño, F., Espinosa-Victoria, D., Munive, A., Corlay-Chee, L., Serrano-Covarrubias, L.M., 2008. Nodule senescence and biomass components in common bean cultivars. Rev. Fitotec. Mex. 31, 195–201.
- Ferri, A., Lluch, C., Ocaña, A., 2000. Effect of salt stress on carbon metabolism and bacteroid respiration in root nodules of common bean (*Phaseolus vulgaris* L.). Plant Biol. 2, 396–402.
- Fesenko, A. N., et al., 1995. Selection of *Rhizobium leguminosarum* bv. *viceae* strains for inoculation of *Pisum sativum* L. cultivars: Analysis of symbiotic efficiency and nodulation competitiveness. Plant and Soil 172.2: 189-198.

- Flessa, H., Ruser, R., Dörsch, P., Kamp, T., Jimenez, M.A., Munch, J.C., Beese, F., 2002. Integrated evaluation of greenhouse gas emissions (CO₂, CH₄, N₂O) from two farming systems in southern Germany. *Agric. Ecosyst. Environ.* 91, 175-189.
- Forde, B.G., Clarkson, D.T., 1999. Nitrate and ammonium nutrition of plants: Physiological and molecular perspectives. *Adv. Bot. Res.* 30, 1-90.
- Forster, P., Ramaswamy, V., Artaxo, P., Berntsen, T., Betts, R., Fahey, D.W., Haywood, J., Lean, J., Lowe, D.C., Myhre, G., Nganga, J., Prinn, R., Raga, G., Schulz, M., and Van Dorland, R., 2007. Changes in Atmospheric Constituents and in Radiative Forcing. In: Solomon, S., D. Qin, M. Manning, Z. Chen, M. Marquis, K.B. Averyt, M. Tignor and H.L. Miller (eds.). *Climate Change 2007: The Physical Science Basis. Contribution of Working Group I to the 4th Assessment Report of the Intergovernmental Panel on Climate Change.* Cambridge University Press, Cambridge, UK and New York, NY, USA.
- Foster, N. W.; Nicolson, J. A.; Hazlett, P. W., 1986, Temporal Variation in Nitrate and Nutrient Cations in Drainage Waters from a Deciduous Forest. *Journal of Environmental Quality*, 18(2), 238-244.
- Fujikake H., Yamazaki A., Ohtake N., Sueyoshi K., Matsushashi S., Ito T., Mizu-niwa C., Kume T., Hashimoto S., Ishioka N.S., Watanabe S., Osa A., Sekine T., Uchida H., Tsuji A., Ohyama T., 2003. Quick and reversible inhibition of soybean root nodule growth by nitrate involves a decrease in sucrose supply to nodules, *J. Exp. Bot.* 54, 1379–1388.
- Fung, I., et al., 1991. Three-dimensional model synthesis of the global methane cycle. *Journal of Geophysical Research*, 96.D7.
- Galloway, J.N., Schlesinger, W.H., Levy II, H. Michaels, A., Schnoor, J.L., 1995. Nitrogen fixation: anthropogenic enhancement – environmental response. *Global Biogeochemical Cycles* 9(2), 235-252.
- Galloway, J.N., Aber, J.D., Erisman, J.W., Seitzinger, S.P., Howarth, R.W., Cowling, E.B., Cosby, B.J., 2003. The Nitrogen Cascade. *BioScience*, 53(4) , 341-356
- Cosby, B.J., 2003. The nitrogen cascade. *BioScience* 53 (4), 341–356.
- Gan, Y., Stulen, I., van Keulen, H., Kuiper, P.J.C., 2004. Low concentrations of nitrate and ammonium stimulate nodulation and N₂ fixation while inhibiting specific nodulation (nodule DW g⁻¹ root dry weight) and specific N₂ fixation (N₂ fixed g⁻¹ root dry weight) in soybean. *Plant Soil* 258, 281-292.
- Garland, J.L., Mackowiak, C.L., Strayer, R.F., Finger, B.W., 1997. Integration of waste processing and biomass production systems as part of the KSC Breadboard project. *Adv. Space Res.* 20, 1821–1826.

- Gattinger, A., Muller, A., Haeni, M., Skinner, C., Fliessbach, A., Buchmann, N., Mädera, P., Stolze, M., Smith, P., Scialabba, N.E., Niggli, U., 2012. Enhanced top soil carbon stocks under organic farming. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 109, 18226-18231.
- Geetanjali, M., Neera, G., 2008. Salinity and its effects on the functional biology of legumes. *Acta Physiol Plant* 30, 595–618
- Georgiev, G.I., Atkias, C.A., 1993. Effects of salinity on N₂ fixation, nitrogen metabolism and export and diffusive conductance of cowpea root nodules. *Symbiosis*;15:239–255.
- Gibson, A.H., Harper, J.E., 1985. Nitrate effect on nodulation of soybean by *Bradyrhizobium japonicum*. *Crop Sci.* 25, 497-501.
- Graham, P.H., Temple, S.R., 1984. Selection for improved nitrogen fixation in *Glycine max (L.) Merr.* and *Phaseolus vulgaris* L. *Plant Soil* 82, 315-327.
- Graham, P.H. 1981. Some problems of nodulation and symbiotic nitrogen fixation in *Phaseolus vulgaris* L.: a review. *Field Crops Res.* 4, 93-112.
- Graham, P.H., Halliday, J., 1977. Inoculation and nitrogen fixation in the genus *Phaseolus*. *Exploiting the Legume-Rhizobium Symbiosis in Tropical Agriculture* 145.
- Graham, P. H., Rosas, J.C., 1977. Growth and development of indeterminate bush and climbing cultivars of *Phaseolus vulgaris* L. inoculated with *Rhizobium*. *The Journal of Agricultural Science* 88.02: 503-508.
- Graham, P.H., 1978. Plant improvement to enhance levels of nitrogen fixation in cultivars of *Phaseolus vulgaris* L. Paper presented to the Symposium on Breeding Legumes for Enhanced Nitrogen Fixation. Boyce Thompson Institute, Ithaca, NY, 22.
- Graham, P.H., Carroll P.V., 2003. Legumes: importance and constraints to greater use. *Plant physiology* 131.3 : 872-877.
- Grattan, S.R., Grieve, C.M., 1999. Salinity-mineral nutrient relations in horticultural crops. *Sci. Hort.* 78, 127-157.
- Guo, S., Brück, H., Sattelmacher, B., 2002. Effects of supplied nitrogen form on growth and water uptake of French bean (*Phaseolus vulgaris* L.) plants. *Plant Soil* 239, 267–275.
- Gutser, R., Ebertseder, T., Weber, A., Schraml, M., Schmidhalter, U., 2005. Short-term and residual availability of nitrogen after long-term application of organic fertilizers on arable land. *J. Plant Nutr. Soil Sci.* 168, 439–446.

- Hafeez, F.Y., Zahoor A., Kauser A.M., 1988. Effect of salinity and inoculation on growth, nitrogen fixation and nutrient uptake of *Vigna radiata* (L.) Wilczek. *Plant and Soil* 106.1: 3-8.
- Halberga, N., Kristensen I.S., 1997 Expected Crop Yield Loss When Converting to Organic Dairy Farming in Denmark, *Biological Agriculture & Horticulture: An International Journal for Sustainable Production Systems* 14(1), 25-41
- Hansen, B., Kristensen, E.S., Grant, R., Høgh-Jensen, H., Simmelsgaard, S.E., Olesen, J.E., 2000. Nitrogen leaching from conventional versus organic farming systems — a systems modeling approach, *European Journal of Agronomy* 13, 65-82
- Hardarson, G. 1993. Methods for enhancing symbiotic nitrogen fixation. *Plant Soil* 152, 1-17.
- Hardy, R.W.F., Havelka, U.D. 1976. Photosynthate as a major factor limiting nitrogen fixation by field grown legumes with emphasis on soybeans. *International Biological Programme*.
- Hardy, R.W.F., Havelka, U.D., 1975. Photosynthate as a major factor limiting nitrogen fixation by field-grown legumes with emphasis on soybeans. In: P.S. Nutman, ed., *Symbiotic nitrogen fixation in plants*, Cambridge University Press, London, 421-439.
- Hawkins, H.J., Lewis O.A.M., 1993. Combination effect of NaCl salinity, nitrogen form and calcium concentration on the growth, ionic content and gaseous exchange properties of *Triticum aestivum* L.cv. Gamtoos. *New Phytol.* 124, 161-170.
- Haynes, R.J., Swift, R.S., 1987. Effect of trickle fertigation with three forms of nitrogen on soil pH, levels of extractable nutrients below the emitter and plant growth. *Plant and Soil* 102, 211- 221.
- Heaton, S., 2002. Assessing Organic Food Quality: Is it better for you? In: Powell, et al. (Eds.), *UK Organic Research 2002: Proceedings of the COR Conference*. 26–28th March, Aberystwyth, 55–60.
- Heidstra, R., Nilsen, G., Martinez Abarca, F., van Kammen, A., Bisseling, T., 1997. Nod factor-induced expression of leghemoglobin to study the mechanism of NH_4NO_3 inhibition on root hair deformation, *Mol. Plant Microbe Interact.* 10, 215–220.
- Herencia, J.F., García-Galavís, P.A., Dorado, J.A.R., Maqueda, C., 2011. Comparison of nutritional quality of the crops grown in an organic and conventional fertilized soil. *Sci. Hort.* 129, 882-888.
- Howard, A., 2015. *The Soil and Health: A Study of Organic Agriculture*. Lexington: The University Press of Kentucky, 2010. Project MUSE. Web. 9 Nov. 2015.

- Environmental Stress and Grain Yields in China Huang, J., Rozelle, S., 1995. *Am. J. Agr. Econ.* 77 (4): 853-864.
- Huang, Y., Zou, J., Zheng, X., Wang, Y., Xu, X., 2004. Nitrous oxide emissions as influenced by amendment of plant residues with different C:N ratios. *Soil Biol. Biochem.* 36: 973-981.
- Hume, D.J., Blair, D.H., 1992. Effect of numbers of *Bradyrhizobium japonicum* applied in commercial inoculants on soybean seed yield in Ontario. *Canadian Journal of Microbiology* 38.6: 588-593.
- Hungria, M., Jos, R.C., Mendes, I.C., 2003. Benefits of inoculation of the common bean (*Phaseolus vulgaris*) crop with efficient and competitive *Rhizobium tropici* strains. *Biol. Fertil. Soils* 39, 88–93.
- Hungria, M., Andrade, D.S., Chueire, L.M.O, Probanza, A., Guttierrez-Manero, F.J, Megías, M. 2000. Isolation and characterization of new efficient and competitive bean (*Phaseolus vulgaris* L.) rhizobia from Brazil. *Soil Biol. Biochem.* 32, 1515-1528.
- Hungria, M., Vargas, M.A.T., 2000. Environmental factors affecting N₂ fixation in grain legumes in the tropics, with an emphasis on Brazil. *Field Crops Research* 65.2 : 151-164.
- Reinhold-Hurek, B., Hurek, T., 1998. Life in grasses: diazotrophic endophytes. *Trends in microbiology* 6.4: 139-144.
- Jebara, M., Drevon, J.J., Aouani, M.E., 2001. Effects of hydroponic culture system and NaCl on interactions between common bean lines and native rhizobia from Tunisian soils. *Agronomie* 21, 601–605.
- Jenkinson, D.A., 2001. The impact of humans on the nitrogen cycle, with focus on temperate arable agriculture. *Plant Soil* 228: 3-15.
- Jiang, H., Dong, G. Zhang, B. Yu, L.R. Chapman, and M.W. Fields. 2006. Microbial diversity in water and sediment of Lake Chaka, an athallassohaline lake in northwestern China. *App. Environ. Microbiol.* 72:3832-3845.
- Johnson, J.M.F., Franzluebbers, A.J., Weyers, S.L., Reicosky, D.C., 2007. Agricultural opportunities to mitigate greenhouse gas emissions. *Environ. Poll.* 150, 107–124.
- Johnson, D. E., et al. 1993. Ruminants and other animals. *Atmospheric Methane: Sources, Sinks, and Role in Global Change.* Springer Berlin Heidelberg. 199-229.
- Johnson, Herbert, W., Means, U.M., Weber, C.R. 1965. Competition for nodule sites between strains of *Rhizobium japonicum* applied as inoculum and strains in the soil. *Agronomy Journal* 57.2: 179-185.

- Jordahl, J.L., Karlen, D.L., 1993. Comparison of alternative farming systems. III. Soil aggregate stability. *American Journal of Alternative Agriculture* 8.01: 27-33.
- Ikerd, J., 2003. Sustaining the Rural Community Commons, presented at Rural Life Day 2003: Farming in the Sacramental Commons , sponsored by Social Concerns Office, Diocese of Jefferson City and MSR Center for Rural Ministry, Jefferson City, MO.
- Imsande, J., 1986. Inhibition of nodule development in soybean by nitrate or reduced nitrogen. *J. Exp. Bot.* 37, 348–355.
- IPCC, 1996. Climate change 1995: the science of climate change. In: Houghton, J.T., Meira Filho, L.G., Callander, B.A., Harris, N., Kattenberg, A., Maskell, K. (Eds.), Intergovernmental Panel on Climate Change. Cambridge University Press, Cambridge, U.K.
- IPCC, 2001. Climate change 2001: the scientific basis. In: Houghton, J.T., Ding, Y. (Eds.), Noguera, M., van der Linden, P.J., Dai, X., Maskell, K. (Eds.), Contribution of Working Group I to the Third Assessment Report of the Intergovernmental Panel on Climate Change. Cambridge University Press, Cambridge, U.K. and New York, NY, USA, 881 pp.
- Kaffka, S., Koepf, H.H, 1989. A Case Study on the Nutrient Regime in Sustainable Farming. *Biological Agriculture & Horticulture: An International Journal for Sustainable Production Systems*, 6(2), 89-106.
- Kanayama Y., Watanabe I., Yamamoto Y., 1990. Inhibition of nitrogen-fixation in soybean plants applied with nitrate. 1. Nitrite accumulation and formation of nitrosylleghemoglobin in nodules, *Plant Cell Physiol.* 31, 341–346.
- Karl, David M., 2002. Microbiological oceanography: hidden in a sea of microbes. *Nature* 415.6872: 590-591.
- Keppler, F., Hamilton, J.T.G., Brass, M., Röckmann, T., 2006. Methane emissions from terrestrial plants under aerobic conditions. *Nature* 439, 187–191.
- Kleinert, A., Venter M., Kossmann J., Valentine A., 2014. The reallocation of carbon in P deficient lupins affects biological nitrogen fixation. *J. Plant Physiol.* 171, 1619–1624.
- Kontopoulou, C.K., Giagkou, S., Stathi, E., Iannetta, P.P.M and Savvas, D., 2015. Responses of hydroponically grown common bean Fed with nitrogen-free nutrient solution to root inoculation with N₂-fixing bacteria. *HortScience* 50(4), 1–6.
- Kramer, S.B., Reganold, J.P., Glover, J.D., Bohannon, B.J.M., Mooney, H.A., 2006. Reduced nitrate leaching and enhanced denitrifier activity and efficiency in organically fertilized soils. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 103: 4522–4527.

- Kristiansen, P., Merfield, C., 2006. Overview of organic agriculture. In: Kristiansen, P.; Taji, A. and Reganold, J. (Eds.) *Organic Agriculture: a Global Perspective*. CSIRO Publishing, Collingwood, pp. 1-23.
- Kucey, R.M.N., 1989. The influence of rate and time of mineral N application on yield and N₂ fixation by field bean. *Can. J. Plant Sci.* 69, 427-436.
- Lane, D.J., 1991. 16S/23S rRNA sequencing. In: Stackebrandt E., Goodfellow M. (eds) *Nucleic acid techniques in bacterial systematics*. Wiley, Chichester, pp 125-175.
- Lane, D.J., Pace, B., Olsen, G.J., Stahl, D. A., Sogin, M.L., Pace, N.R., 1985. Rapid determination of 16S ribosomal RNA sequences for phylogenetic analyses. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 82(20), 6955-6959.
- Larsson, L., Fern, M., Kasimir-Klemetsson, A., Klemetsson, L., 1998. Ammonia and nitrous oxide emissions from grass and alfalfa mulches. *Nutr. Cycl. Agroecosyst.* 51: 41-46
- Lauchli, A., 1984. Salt exclusion: An adaptation of legumes for crops and pastures under saline conditions. In: Staples RC, Toenniessen GH (eds) *Salinity tolerance in plants—strategies for cropimprovement*. Wiley, New York, 171–188
- Lauter, D.J., Meiri, A., Shuali, M., 1988. Isoosmotic regulation of cotton and peanut at saline concentrations of K and Na. *Plant Physiol* 87(4), 911–916
- Lauter D.J., Munns, D.N., Clarkin, K.L., 1981. Salt response of chickpea as influenced by nitrogen supply. *Agron. J.* 73, 961-966.
- Ledgard, S.F., Sprosen, M.S., Penno, J.W., Rajendram, G.S., 2001. Nitrogen fixation by white clover in pastures grazed by dairy cows: Temporal variation and effects of nitrogen fertilization. *Plant Soil* 229, 177-187.
- Ledgard, S.F., Steele, K.W., 1992. Biological nitrogen fixation in mixed legume/grass pastures. *Plant and Soil* 141, 137-153.
- Leifeld, J., Angers, D.A., Chenu, C., Fuhrer, J., Kätterer, T., Powlson, D.S., 2013. Organic farming gives no climate change benefit through soil carbon sequestration: *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 110, 301.
- Liebman, M., Gallandt, E.R., 1997. Many little hammers: Ecological approaches for management of crop weed interactions. In *Ecology in Agriculture*, ed Jackson L.E., San Diego, CA, Academic press, 291-343.
- Li, Y.Y., Yu, C.B., Cheng, X., Li, C.J., Sun, J.H., Zhang, F.S., Lambers, H., and Li, L., 2009. Intercropping alleviates the inhibitory effect of N fertilization on nodulation and symbiotic N₂ fixation of faba bean. *Plant Soil* 323, 295-308.

- Lima, J.D., Mosquim, P.R., Da Matta, F.M., 1999. Leaf gas exchange and chlorophyll fluorescence parameters in *Phaseolus vulgaris* as affected by nitrogen and phosphorus deficiency. *Photosynthetica*, 37, 113-121
- Lupwayi, N. Z., et al., 2000. Inoculant quality and its evaluation. *Field Crops Research* 65.2: 259-270.
- Manchanda, G., Garg, N., 2008. Salinity and its effects on the functional biology of legumes. *Acta Physiol. Plant.* 30, 595-618.
- Mannion, A.M., 1998. Global Environmental Change: The Causes and Consequences of Disruption to Biogeochemical Cycles *The Geographical Journal* 164(2)168-182.
- Marinari, S., Masciandaro, G., Ceccanti, B., Grego, S. 2000. Influence of organic and mineral fertilisers on soil biological and physical properties. *Bioresour. Technol.* 72, 9-17.
- Marshall, K. C., 1964. Survival of root-nodule bacteria in dry soils exposed to high temperatures. *Crop and Pasture Science* 15.2: 273-281.
- Marschner, H. 1995. Mineral nutrition of higher plants. 2nd edition. Academic Press, London, UK.
- Martinez-Romero, E., 2003. Diversity of *Rhizobium-Phaseolus vulgaris* symbiosis: overview and perspectives. *Plant Soil* 252, 11–23.
- Martinez-Romero, E., Segovia, L., Mercante, F.M., Franco, A.A., Graham P., Pardo, M.A., 1991. *Rhizobium tropici*, a novel species nodulating *Phaseolus vulgaris* L. beans and *Leucaena* sp. trees. *Intern. J. Syst. Bacteriol.* 41, 417-426.
- Matson, P.A., et al., 1997. Agricultural intensification and ecosystem properties. *Science* 277.5325: 504-509.
- Maze, P.M. 1898. Les microbes des nodosités des Légumineuses (Doctoral dissertation, Paris.).
- McSwiney, C.P., Robertson, G.P., 2005. Nonlinear response of N₂O flux to incremental fertilizer addition in a continuous maize (*Zea mays* L.) cropping system. *Global Change Biol.* 11, 1712–1719.
- Mengel, K., Kirkby, E.A., 2001. Principles of plant nutrition. 5th Edition. Kluwer Academic Publishers, Dordrecht, The Netherlands.
- Mhamdi, R., Mrabet, M., Laguerre, G., Tiwari, R., Aouani, M.E., 2005. Colonization of *Phaseolus vulgaris* nodules by *Agrobacterium*-like strains. *Can. J. Microbiol.* 51, 105–111.
- Mhamdi, R., G. Laguerre, M.E. Aouani, M. Mars, and N. Amarger, 2002. Different species and symbiotic genotypes of field rhizobia can nodulate *Phaseolus vulgaris* in Tunisian soils. *FEMS Microbiol. Ecol.* 41, 77–84.

- Millar, N., Ndufa, J.K., Cadisch, G., Baggs, E.M., 2004. Nitrous oxide emissions following incorporation of improved-fallow residues in the humid tropics. *Global Biogeochem. Cycles* 18.GB1032.
- Mills, H.A., Jones, J.B. Jr., 1996. *Plant Analysis Handbook II. A Practical Sampling, Preparation, Analysis, and Interpretation Guide*. MicroMacro Publishing Inc., Athens, GA, USA, 422.
- Morse, R.; Creamer, N., 2006, Developing no-tillage systems without chemicals: the best of both worlds?. *Organic agriculture: a global perspective*, 83-91
- Mosier, A.R., 2001. Exchange of gaseous nitrogen compounds between agricultural systems and the atmosphere. *Plant Soil* 228, 17-27.
- Mosier, A.R., Duxbury, J.M., Freney, J.R., Heinemeyer, O., Minami, K., Johnson, D.E., 1998. Mitigating agricultural emissions of methane. *Clim. Change Res.* 40, 39-80.
- Mostasso, L., Dias, B.G., Vargas, M.A.T., Hungria, M., 2002. Selection of bean (*Phaseolus vulgaris* L.) rhizobial strains for the Brazilian Cerrados. *Field Crop Res* 73, 121-132.
- Muhlestein, D.J., Hooten, T., Norton, J.M., Bugbee, B., 2000. The long term effects of high ammonium/nitrate ratios on wheat growth and nitrification in hydroponic culture. *Life Support & Biosph. Sci.* 7, 67.
- Muldoon, J.F., Hume, D.J, Beversdorf, W.D., 1980. Effects of seed-and soil-applied *Rhizobium japonicum* inoculants on soybeans in Ontario. *Canadian Journal of Plant Science* 60.2: 399-409.
- Muller, S., Pereira, P.A.A., Martin, R., 1993. Effect of different levels of mineral nitrogen on nodulation and N₂ fixation of two cultivars of common bean (*Phaseolus vulgaris* L.). *Plant Soil* 152, 139-143.
- Nelson, D.W., Sommers, L.E., 1996. Total carbon, organic carbon, and organic matter. In: Sparks, D.L. Page, A.L., Helmke, P.A., Loeppet, R.H., Soltanpour, P.N., Tabatabasi, M.A. (eds). *Methods of Soil Analysis, Part 3*. 3rd ed. Soil. Sci. Soc. Am. (SSSA), Book Ser. 5. SSSA, Madison, WI, USA, 961-1010.
- Nieberg, Schulze Pals, 1996. Profitability of farms converting to organic farming in Germany – empirical results of 107 farms. *Farm Management*, 9 (5), 218–227
- Nolte, C., Werner, W., 1994. Investigations on the Nutrient Cycle and its Components of a Biodynamically-Managed Farm. *Biological Agriculture & Horticulture: An International Journal for Sustainable Production Systems* 10(4), 235-254.
- Novoa, R., Loomis, R.S., 1981. Nitrogen and plant production. *Plant Soil* 58, 177-204.

- Oberson, A., Frossard, E., Buhlmann, C., Mayer, J., Mader, P., Luscher, A., 2013. Nitrogen fixation and transfer in grass-clover leys under organic and conventional cropping systems. *Plant Soil* 371, 237-255.
- Oberson, A., Nanzer, S., Bosshard, C., Dubois, D., Mäder, P., Frossard, E., 2007. Symbiotic N₂ fixation by soybean in organic and conventional cropping systems estimated by ¹⁵N dilution and ¹⁵N natural abundance. *Plant and Soil* 290, 69-83
- O'Hara, G.W., N. Boonkerd, and M.J. Dilworth. 1988. Mineral constraints to nitrogen fixation. *Plant Soil* 108, 93-110.
- Ohkawara, S. 1928. The influence of nitrates and sulohates on the nodule bacteria and nodule formation of Genge, Lupin and Serradella. *Inter. Congr. Soil. Sci. (Wash.) Proc.* 3, 172-182.
- Olivares, J., Bedmar, E.J., Sanjuan, J., 2013. Biological Nitrogen Fixation in the Context of Global Change. *Mol. Plant Microbe In.* 26, 486-494.
- Olsen, P.E., Rice, W.A., Bordeleau, L.M., Biederbeck, V.O. 1994. Analysis and regulation of legume inoculants in Canada: the need for an increase in standards. *Plant Soil*, 161: 127-134
- Olsen, Perry E., et al., 1996. Levels and identities of nonrhizobial microorganisms found in commercial legume inoculant made with nonsterile peat carrier. *Canadian journal of microbiology* 42.1: 72-75.
- Otieno, P.E., Muthomi, J.W., Chemining'wa G.N., and Nderitu, J.H. 2009. Effect of rhizobia inoculation, farm yard manure and nitrogen fertilizer on nodulation and yield of food grain legumes. *J Biol Sci* 9(4), 326-332.
- Page, A.L., 1982. *Methods of soil analysis. Part 2. Chemical and microbiological properties.* American Society of Agronomy, Soil Science Society of America.
- Pandeya, D., Agrawala, M., Bohra, J.S., 2012. Greenhouse gas emissions from rice crop with different tillage permutations in rice–wheat system. *Agric. Ecosyst. Environ.* 159, 133–144.
- Peng, Y., Zhu, G., 2006. Biological nitrogen removal with nitrification and denitrification via nitrite pathway. *Appl. Microbiol. Biotechnol.* 73, 15–26.
- Peoples, M. B., Gault, R. R., Lean, B., Sykes, J. D., Brockwell, J., 1995. Nitrogen fixation by soybean in commercial irrigated crops of central and southern New South Wales. *Soil Biology and Biochemistry*, 27(4), 553-561.
- Peoples, M.B., Herridge, D.F., & Ladha, J.K., 1995. Biological nitrogen fixation: an efficient source of nitrogen for sustainable agricultural production?. *Plant and soil*, 174(1-2), 3-28.

- Perez-Galdonaf, R., Kahn, M.L., 1994. Effects of organic acids and low pH on *Rhizobium meliloti* 104A14. *Microbiology*, 140(5), 1231-1235.
- Petersen, S.O., Regina, K., Pöllinger, A., Rigler, E., Valli, L., Yamulki, S., Esala, M., Fabbri, C., Syväsalo, E., Vinther, F.P., 2006. Nitrous oxide emissions from organic and conventional crop rotations in five European countries. *Agric. Ecosyst. Environ.* 112, 200–206.
- Philippot, L., Halin, S., 2011. Towards food, feed and energy crops mitigating climate change. *Trends Plant Sci.* 16, 476-480.
- Phillips, R.L., 2007. Organic agriculture and nitrous oxide emissions at sub-zero soil temperatures. *J. Environ. Qual.* 36, 23–30.
- Piha, M.I. and Munns, D.N., 1987. Nitrogen fixation potential of beans (*Phaseolus vulgaris* L.) compared with other grain legumes under controlled conditions. *Plant Soil* 98, 169-182.
- Pimentel, D., Hepperly, P., Hanson, J., Douds, D., Seidel, R., 2005. Environmental, energetic, and economic comparisons of organic and conventional farming systems. *BioScience* 55, 573-582.
- Postma, J., van Os, E., Bonants, P.J.M., 2008. Pathogen detection and management strategies in soilless plant growing systems. In: Raviv, M., Lieth, H.J. (eds). *Soilless Culture: Theory and Practice*. Elsevier, Amsterdam, 425-457.
- Poudel, D.D., Horwath, W.R., Lanini, W.T., Temple, S.R., van Bruggen, A.H.C., 2002. Comparison of soil N availability and leaching potential, crop yields and weeds in organic, low-input and conventional farming systems in northern California. *Agriculture, Ecosystems & Environment* 90(2), 125–137
- Qin, Y., Liu, S., Guo, Y., Liu, Q., Zou, J., 2010. Methane and nitrous oxide emissions from organic and conventional rice cropping systems in Southeast China. *Biol. Fertil. Soils* 46, 825–834.
- Raab, T.K., Terry, N., 1995. Carbon, nitrogen and nutrient interactions in *Beta vulgaris* L. as influenced by nitrogen source, NO³⁻ versus NH⁴⁺. *Plant Physiol* 107, 575–584.
- Raab, T.K., Terry, N., 1994. Nitrogen-source regulation of growth and photosynthesis in *Beta vulgaris* L. *Plant Physiol.* 105, 1159-1166.
- Rao, D.L.N., Giller, K.E., Yeo, A.R., Flowers, T.J., 2002. The effects of salinity and sodicity upon nodulation and nitrogen fixation in chickpea (*Cicer arietinum*). *Annals of Botany*, 89(5), 563-570.
- Ravishankara, A.R., Daniel, J.S., Robert W. Portmann, R.W., 2009. Nitrous oxide (N₂O): the dominant ozone-depleting substance emitted in the 21st century. *Science* 326, 123–125.

- Raviv, M., Lieth, H.J., 2008. Significance of soilless culture in agriculture. *Soilless culture: Theory and practice*. Elsevier, London: 1-10.
- Rees, R.M., Augustin, J., Alberti, G., Ball, B.C., Boeckx, P., Cantarel, A., Castaldi, S., Chirinda, N., Chojnicki, B., Giebels, M., Gordon, H., Grosz, B., Horvath, L., Juszczak, R., Klemedtsson, A.K., Klemedtsson, L., Medinets, S. Machon, A., Mapanda, F., Nyamangara, J., Olesen, J., Reay, D. Sanchez, L., Sanz Cobena, A., Smith, K.A., Sowerby, A., Sommer, M., Soussana, J.F., Stenberg, M., Topp, C.F.E., van Cleemput, O., Vallejo, A., Watson, C.A., Wuta, M., 2012. Nitrous oxide emissions from European agriculture; an analysis of variability and drivers of emissions from field experiments: *Biogeosciences Discuss.* 9, 9259–9288.
- Remans, R., Ramaekers, L., Schelkens, S., Hernandez, G., Garcia, A., Reyes, J.L., Mendez, N., Toscano, V., Mulling, M., Galvez, L., Vanderleyden, J. 2008. Effect of *Rhizobium–Azospirillum* coinoculation on nitrogen fixation and yield of two contrasting *Phaseolus vulgaris* L. genotypes cultivated across different environments in Cuba. *Plant Soil* 312, 25–37.
- Richardson D. A., Jordan, D. C., Garrard, E. H., 1957. The influence of combined nitrogen on nodulation and nitrogen fixation by *Rhizobium meliloti* dangeard. *Canadian Journal of Plant Science*, 37(3), 205-214
- Ridley, A.M., Mele, P.M., Beverly, C.R., 2004. Legume-based farming in Southern Australia: developing sustainable systems to meet environmental challenges. *Soil Biology and Biochemistry*, 36(8), 1213-1221.
- Robertson, G.P., Paul, E.A., Harwood, R.R., 2000. Greenhouse gases in intensive agriculture: contributions of individual gases to the radiative forcing of the atmosphere. *Science* 289, 1922–1925.
- Rochette P., Angers D.A., Belanger G., Chantigny M.H., Prevost D., Levesque G., 2004. Emissions of N₂O from alfalfa and soybeans crops in Eastern Canada. *Soil Sci. Soc. Am. J.* 68: 493-506.
- Rodelas, B., González-López, J.M., Martínez-Toledo, V., Pozo, C., Salmerón, V. 1999. Influence of *Rhizobium*/*Azotobacter* and *Rhizobium*/*Azospirillum* combined inoculation on mineral composition of faba bean (*Vicia faba* L.). *Biol. Fertil. Soils* 29, 165–169.
- Rossing, W.A.H., Meynard, J.M., Van Ittersum, M.K., 1997. Model-based explorations to support development of sustainable farming systems: case studies from France and the Netherlands. *Developments in Crop Science*, 25, 339-351.
- Sadowsky, M.J., Graham, P.H. 1998. Soil biology of the *Rhizobiaceae*. In *The Rhizobiaceae*, 155-172.

- Sainju, U.M., Caesar-TonThatet, T., Lenssen, A.W., Barsotti, J.L., 2012. Dryland soil greenhouse gas emissions affected by cropping sequence and nitrogen fertilization. *Soil Sci. Soc. Am. J.* 76, 1741–1757.
- Sanjuan, J., Olivares, J., 1991. Multicopy plasmids carrying the *Klebsiella pneumoniae* nifA gene enhance *Rhizobium meliloti* nodulation competitiveness on alfalfa. *Molec. Plant-Microbe Interact.* 4, 365-369.
- Savvas, D., Gianquinto, G.P., Tüzel, Y., Gruda, N., 2013. Soilless Culture. In: Good Agricultural Practices for Greenhouse Vegetable Crops. Principles for Mediterranean Climate Areas. Food and Agriculture Organization of the United Nations, Plant Production and Protection Paper 217, Rome, 303-354.
- Savvas, D., Mantzos, N., Barouchas, P., Tsirogiannis, I., Olympios, C., Passam, H.C., 2007. Modelling salt accumulation by a bean crop grown in a closed hydroponic system in relation to water uptake. *Sci. Hort.* 111, 311-318.
- Savvas, D. 2003. Hydroponics: A modern technology supporting the application of integrated crop management in greenhouse. *Journal of Food Agriculture and Environment*, 1, 80-86.
- Schils, R.L.M., Verhagen, A., Aarts, H.F.M., Sebek, L.B.J., 2005. A farm level approach to define successful mitigation strategies for GHG emissions from ruminant livestock systems. *Nutr. Cycl. Agroecosyst.* 71, 163–175.
- Schlesinger, W. H. 1999 Carbon sequestration in soils. *Science* 284, 2095.
- Scholberg, J.M.S., Locascio, S.J., 1999. Growth response of snap bean and tomato as affected by salinity and irrigation method. *HortScience* 34, 259-264.
- Schulze, E., Luysaert, S., Ciais, P., Freibauer, A., Janssens, I., Soussana, J., Smith, P., Grace, J., Levin, I., Thiruchittampalam, B., Heimann, M., Dolman, A., Valentini, R., Bousquet, P., Peylin, P., Peters, W., Roedenbeck, C., Etiope, G., Vuichard, N., Wattenbach, M., Nabuurs, G., Poussi, Z., Nieschulze, J., Gash, J., 2009. Importance of methane and nitrous oxide for Europe's terrestrial greenhouse-gas balance. *Nat. Geosci.* 2, 842-850.
- Scialabba, N.E.H., Muller-Lindenlauf, M., 2010. Organic agriculture and climate change. *Renew Agr. Food*, 25, 158-169.
- Scialabba, N.E.H., Hattam, C. (eds), 2002. Organic Agriculture, Environment, and Food Security. Environment and Natural Resources Series No 4, Food and Agriculture Organization of the United Nations, Rome, Italy, 258.
- Seemann, J.R., Critchley, C., 1985. Effects of salt stress on the growth, ion content, stomatal behaviour and photosynthetic capacity of a salt-sensitive species, *Phaseolus vulgaris* L. *Planta* 164, 151-162.

- Segovia, L., Pinero, D., Palacios, R., Martinez-Romero, E., 1991. Genetic structure of a soil population of nonsymbiotic *Rhizobium leguminosarum*. *Appl. Environ. Microbiol.* 57, 426-433.
- Seufert, V.M., Ramankutty, N., Foley, J.A., 2012. Comparing the yields of organic and conventional agriculture. *Nature* 485, 229-232.
- Shannon, D., Sen, A.M., Johnson, D.B., 2002. A comparative study of the microbiology of soils managed under organic and conventional regimes, *Soil Use and Management* 18(1), 274–283.
- Shinohara, M., Aouama, C., Fujiwara, K., Watanabe, A., Ohmori, H., Uehara, Y., Takano, M., 2011. Microbial mineralization of organic nitrogen into nitrate to allow the use of organic fertilizer in hydroponics. *Soil Sci. Plant Nutr.* 57, 190-203.
- Sibole, J.V., Montero, E., Cabot, C., Poschenrieder, C., Barcelo, J., 1998. Role of sodium in the ABA-mediated long-term growth response, of bean to salt stress. *Physiol Plant* 104, 299–305
- Silva, P.M., Tsai, S.M., Bonetti, R., 1993. Response to inoculation and N fertilization for increased yield and biological nitrogen fixation of common bean (*Phaseolus vulgaris* L.). *Plant Soil* 152, 123–130.
- Singleton, P.W., Bohlool, B.B. 1984. Effect of salinity on nodule formation by soybean. *Plant Physiology*, 74(1), 72-76.
- Singleton, P.W., Tavares, J.W., 1986. Inoculation response of legumes in relation to the number and effectiveness of indigenous *Rhizobium* populations. *Appl. Environ. Microbiol.* 1013-1018.
- Smil, V., 1999. Nitrogen in crop production: an account of global flows. *Global Biogeochem. Cycl.* 13, 647–662
- Smil, V. 2002. Nitrogen and food production: proteins for human diets. *AMBIO: A Journal of the Human Environment*, 31(2), 126-131.
- Smith, D.R., Hernandez-Ramirez, G., Armstrong, S.D., Bucholtz, D.L., Stott, D.E., 2011. Fertilizer and tillage management impacts on non-carbon-dioxide greenhouse gas emissions. *Soil Sci. Soc. Am. J.* 75, 1070–1082.
- Smith, P., Martino, D., Cai, Z., Gwary, D., Janzen, H., Kumar, P., McCarl, B., Ogle, S., O'Mara, F., Rice, C., Scholes, B., Sirotenko, O., 2007. Agriculture. In: Metz, B., Davidson, O.R., Bosch, P.R., Dave, R., Meyer, L.A. (Eds.). *Climate Change 2007: Mitigation. Contribution of Working Group III to the Fourth Assessment Report of the Intergovernmental Panel on Climate Change*. Cambridge University Press, Cambridge, U.K., 497–540.

- Smith, P., Martino, D., Cai, Z., Gwary, D., Janzen, H., Kumar, P., McCarl, B., Ogle, S., O'Mara, F., Rice, C., Scholes, B., Sirotenko, O., Howden, M., McAllister, T., Pan, G., Romanenkov, N., Schneider, U., Townprayoon, S., WattenBach, M., Smith, J., 2008. Greenhouse gas mitigation in agriculture. *Phil. Trans. R. Soc. B* 363, 789–813.
- Snyder, C.S., Bruulsema, T.W., Jensen, T.L., Fixen P.E., 2009. Review of greenhouse gas emissions from crop production systems and fertilizer management effects. *Agriculture, Ecosystems and Environment* 133, 247–266.
- Sonneveld, C., Voogt, W., 2009. *Plant Nutrition of Greenhouse Crops*. Springer, Dordrecht, Heidelberg, London, New York, 431.
- Soussana, J.F. et al., 2005. Sources and sinks of greenhouse gases from European grasslands and mitigation options: the 'GreenGrass' project. XX International Grassland Congress Dublin, Ireland.
- Sprent, J.I., Thomas, R.J. 1984. Nitrogen nutrition of seedling grain legumes: some taxonomic, morphological and physiological constraints. *Plant, Cell & Environment*, 7(9), 637-645.
- Stephens, J.H.G., Rask, H.M., 2000. Inoculant production and formulation. *Field Crops Res.* 65, 249-258.
- Stiehl-Braun, P.A., Hartmann, A.A., Kandeler, E.L.L.E., Buchmann, N.I.N.A., Niklaus, P.A., 2011. Interactive effects of drought and N fertilization on the spatial distribution of methane assimilation in grassland soils. *Glob. Change Biol.*, 17, 2629-2639.
- Stockdale, E.A., Watson, C.A., 2009. Biological indicators of soil quality in organic farming systems: *Renewable Agric. Food Syst.* 24, 308-318.
- Stockdale, E.A., Lampkin, N.H., Hovi, M., Keatinge, R., Lennartsson, E.K.M., Macdonald, D.W., Watson, C. A. 2001. Agronomic and environmental implications of organic farming systems. *Advances in Agronomy*, 70, 261-327.
- Stockdale, E.A., Reesa R.M., 1995. SECTION 4: NITROGEN DYNAMICS AND NITROGEN CYCLING Release of Nitrogen from Plant and Animal Residues and Consequent Plant Uptake Efficiency *Biological Agriculture & Horticulture: An International Journal for Sustainable Production Systems*, 11(1-4), 229-245.
- Stork, P.R., Jerie, P.H., Callinan, A.P.L. 2003. Subsurface drip irrigation in raised bed tomato production. II. Soil acidification under current commercial practice. *Soil Research*, 41(7), 1305-1315.
- Syväsalo, E., Regina, K., Turtola, E., Lemola, R., Esala, M., 2006. Fluxes of nitrous oxide and methane, and nitrogen leaching from organically and conventionally cultivated sandy soil in western Finland. *Agric. Ecosyst. Environ.* 113, 342-348.

- Tejera, N., Lluch, C., Martinez-Toledo, M.V., Gonzalez-Lopez, J. 2005. Isolation and characterization of *Azotobacter* and *Azospirillum* strains from the sugarcane rhizosphere. *Plant and soil*, 270(1), 223-232.
- Te Pas, C., Rees, R.M., 2014. Analysis of differences in productivity, profitability and soil fertility between organic and conventional cropping systems in the tropics and sub-tropics. *J. Int. Agri.*
- Thies, J.E., Singleton, P.W., Bohlool, B.B., 1991. Influence of the size of indigenous rhizobial populations on establishment and symbiotic performance of introduced rhizobia on field-grown legumes. *Appl. Environ. Microbiol.* 57, 19-28.
- Thompson, J. A., 1988. Survival of root-nodule bacteria on inoculated seed. *Microbiology in Action*, Research Studies Press, Letchworth, 67-80.
- Tilman, D., 1999. The ecological consequences of changes in biodiversity: a search for general principles. *Ecology* 80(5), 1455-1474.
- Torstensson, G., 1998. Nitrogen delivery and utilization by subsequent crops after incorporation of leys with different plant composition. *Biological Agriculture and Horticulture* 16, 129±143.
- Triplett, E., Sadowsky, M., 1992. Genetic of competition for nodulation of legumes. *Annu. Rev. Microbiol.* 46, 399-428.
- Tsai, S.M., Bonetti, R., Agbala, S.M., Rossetto, R., 1993. Minimizing the effect of mineral nitrogen on biological nitrogen fixation in common bean by increasing nutrient levels. *Plant Soil* 152, 131-138.
- Tu, J.C. 1981. Effect of salinity on Rhizobium-root-hair interaction, nodulation and growth of soybean. *Canadian Journal of Plant Science*, 61(2), 231-239.
- Tully, K.L., Lawrence, D., 2013. Organically managed coffee agroforests have larger soil phosphorus but smaller soil nitrogen pools than conventionally managed agroforests. *Biogeochemistry* 115, 385-397.
- Unkovich, M., Herridge, D., Peoples, M., Cadisch, G., Boddey, B., Giller, K., Alves, B., Chalk, P., 2008. Measuring plant-associated nitrogen fixation in agricultural systems. Australian Centre for International Agricultural Research (ACIAR), Monograph No. 136, Canberra, Australia, 258.
- Vadez, V., Rodier, F., Payre, H., Drevon, J.J., 1996. Nodule conductance to O₂ and nitrogenase-linked respiration in bean genotypes varying in the tolerance of N₂ fixation to P deficiency. *Plant Physiol. Biochem.* 34, 871–878.
- Van Beusichem, M.L., Kirkby, E.A., Baas, R., 1988. Influence of nitrate and ammonium nutrition on the uptake, assimilation, and distribution of nutrients in *Ricinus communis*. *Plant Physiol.* 86, 914-921.

- Vance, C.P., Miller, S.S., Driscoll, B.T., Robinson, D.L., Trepp, G., Gantt, J.S., Samas, D.A., 1998. Nodule carbon metabolism: organic acids for N₂ fixation. In *Biological nitrogen fixation for the 21st century*, 443-448.
- Vance, C.P. 2001. Symbiotic nitrogen fixation and phosphorus acquisition. *Plant nutrition in a world of declining renewable resources. Plant physiology*, 127(2), 390-397
- Van Hoorn, J.W., Katerji, N., Hamdy, A., Mastrorilli, M., 2001. Effect of salinity on yield and nitrogen uptake of four grain legumes and on biological nitrogen contribution from the soil. *Agric. Wat. Manage.* 51, 87–98.
- Van Os, E., Gieling, T.H., Lieth, H.J., 2008. Technical equipment in soilless production systems. In: Raviv, M., Lieth, H.J. (eds). *Soilless Culture: Theory and Practice*. Elsevier, Amsterdam, 157-207.
- Vargas, M.A.T., Mendes, I.C., Hungria, M. 2000. Response of field-grown bean (*Phaseolus vulgaris* L.) to *Rhizobium* inoculation and nitrogen fertilization in two Cerrados soils. *Biol. Fertil. Soils* 32, 228–233.
- Velagaleti, R.R., Marsh, S., Kramer, D., Fleischman, D., Corbin, J. 1990. Genotypic differences in growth and nitrogen fixation among soyabean (*Glycine max* (L.) Merr) cultivars grown under salt stress. *Tropical agriculture*, 67(2), 169-177.
- Vincent, J. M., 1974. Root-nodule symbioses with *Rhizobium*. In: Quispel, A. (Ed.). *The Biology of Nitrogen Fixation*. North Holland Publishing Company, Amsterdam, Netherlands, 266-307.
- Vincent, J.M. 1970. A manual for the practical study of the root-nodule bacteria. A manual for the practical study of the root-nodule bacteria. IBP Handbk 15 Oxford and Edinburgh: Blackwell Scientific Publications, 164.
- Vincent J.M., 1962. Influence of calcium and magnesium on the growth of *Rhizobium*. *J. Gen. Microbiol.*, 28, 653–663.
- Vitousek, P.M., Aber, J.D., Howarth, R.W., Likens, G.E., Matson, P.A., Schindler, D.W., Tilman, D.G., 1997. Human alteration of the global nitrogen cycle: sources and consequences. *Ecological applications*, 7(3), 737-750.
- Yan, X., Cai, Z., Ohara, T., Akimoto, H. 2003. Methane emission from rice fields in mainland China: Amount and seasonal and spatial distribution. *Journal of Geophysical Research: Atmospheres* (1984–2012), 108(D16).
- Yang, X.M., Drury, C.F., Reynolds, W.D., McKenney, D.J., Tan, C.S., Zhang, T.Q., Fleming, R.J., 2002. Influence of composts and liquid pig manure on CO₂ and N₂O emissions from a clay loam soil. *Canadian journal of soil science*, 82(4), 395-401.

- Wander M.M., Traina S.J., Stinner, B.R., Peters, S.E., 1994. Organic and Conventional Management Effects on Biologically Active Soil Organic Matter Pools, *Soil Science Society of America Journal*, 58(4), 1130-1139.
- Watson, C.A., Atkinson, D., Gosling, P., Jackson, L.R., Rayns, F.W. 2002. Managing soil fertility in organic farming systems. *Soil Use and Management* 18(1), 239-247.
- Wignarajah, K., 1990. Growth response of *Phaseolus vulgaris* to varying salinity regimes. *Environ. Exp. Bot.* 30, 141–147.
- Willems, A. 2006. The taxonomy of rhizobia: an overview. *Plant Soil* 287, 3–14.
- Williams, L. E., De Jong, T. M., Phillips, D. A., 1981. Carbon and Nitrogen Limitations on Soybean Seedling Development. *Plant Physiol.* 68, 1206-1209.
- Wipf, L., Cooper, D.C., 1940. Somatic doubling of chromosomes and nodular infection in certain *Leguminosae*. *American Journal of Botany*, Vol. 27, 821-824
- Witt, F.G, Aparicio, P.J., 1995. Characterization of the blue light-induced extracellular alkalinization associated with the monovalent anion uptake by *Monorapidium braunii*. Competition between NO₃ and Cl⁻. *Physiologia Plantarum*, Volume 94, Issue 4, 545–552.
- Woese, K., Lange, D., Boess, C.H., Werner, K., 1997. A comparison of organically and conventionally grown foods: results of a review of the relevant literature. *J. Sci. Food Agric.* 74, 281–293.
- Wolff, A.B., Streit, W., Kipe-Nolt, J.A., Vargas, H., Werner, D., 1991. Competitiveness of *Rhizobium leguminosarum* bv. *phaseoli* strains in relation to environmental stress and plant defense mechanisms. *Biol. Fertil. Soils* 12, 170-17.
- Zahran, H.H., 1991. Conditions for successful *Rhizobium*-legume symbiosis in saline environments. *Biology and Fertility of Soils.* 12(1), 73-78.
- Zahran, H.H., 1999. *Rhizobium*-Legume Symbiosis and Nitrogen Fixation under Severe Conditions and in an Arid Climate. *Microbiol. Mol. Biol. Rev.*63, 4968-989.
- Zaman-Allah, M., Sifi, B., L'Taief, B., El Aouni, M.H., Drevon, J.J.. 2007. Rhizobial inoculation and P fertilization response in common bean (*Phaseolus vulgaris*) under glasshouse and field conditions. *Exp. Agric.* 43, 67-77.
- Zhong, Z., Lemke, R.L., Nelson, L.M., 2009. Nitrous oxide emissions associated with nitrogen fixation by grain legumes. *Soil Biol. Biochem.* 41, 2283–2291.

