



ΠΑΝΕΠΙΣΤΗΜΙΟ ΘΕΣΣΑΛΙΑΣ
«Σχολή Γεωπονικών Επιστημών»
«Τμήμα Γεωπονίας Φυτικής Παραγωγής & Αγροτικού
Περιβάλλοντος»

Εργαστήριο Ζιζανιολογίας

«Ανάπτυξη ή άμυνα: συσχέτιση της συγκέντρωσης ολικών φαινολικών
με
αναπτυξιακά χαρακτηριστικά καλλιεργειών υπό καταπόνηση»

ΑΝΑΣΤΑΣΙΟΣ ΑΡΓΥΡΟΠΟΥΛΟΣ

ΒΟΛΟΣ, 2021

«Ανάπτυξη ή άμυνα: συσχέτιση της συγκέντρωσης ολικών φαινολικών
με
αναπτυξιακά χαρακτηριστικά καλλιεργειών υπό καταπόνηση»

Αργυρόπουλος Αναστάσιος

Τριμελής Συμβουλευτική Επιτροπή

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

Νάνος Γεώργιος, Καθηγητής Δενδροκομίας, Τμήμα Γεωπονίας Φυτικής Παραγωγής και Αγροτικού Περιβάλλοντος, Πανεπιστήμιο Θεσσαλίας, Μέλος.

Καρκάνης Ανέστης, Επίκουρος Καθηγητής, Ζιζανιολογίας, Τμήμα Γεωπονίας Φυτικής Παραγωγής και Αγροτικού Περιβάλλοντος, Πανεπιστήμιο Θεσσαλίας, Μέλος.

ΕΥΧΑΡΙΣΤΙΕΣ

Η παρούσα πτυχιακή εργασία εκπονήθηκε στο Τμήμα Φυτικής Παραγωγής και Αγροτικού Περιβάλλοντος, του Πανεπιστημίου Θεσσαλίας στο εργαστήριο Ζιζανιολογίας. Το θέμα της πτυχιακής διατριβής ήταν « Ανάπτυξη ή άμυνα: συσχέτιση της συγκέντρωσης ολικών φαινολικών με αναπτυξιακά χαρακτηριστικά καλλιεργειών υπό καταπόνηση»

Θα ήθελα να ευχαριστήσω θερμά την επιβλέπουσα της πτυχιακής διατριβής μου Επίκουρη Καθηγήτρια κα. Λεβίζου Ευθυμία, για την υποστήριξη και τις υποδείξεις της καθ' όλη τη διάρκεια εκπόνησης της πτυχιακής μου διατριβής, καθώς και για την ευκαιρία που μου έδωσε να αποκτήσω καινούργιες εμπειρίες και να ασχοληθώ με ένα καινούργιο αντικείμενο. Επιπλέον, θα ήθελα να την ευχαριστήσω για το γεγονός ότι πίστεψε σε μένα και στις δυνατότητές μου. Επίσης, ήθελα να ευχαριστήσω τον Καθηγητή κ. Νάνο αλλά και τον Επίκουρο Καθηγητή κ. Καρκάνη, για τη συμμετοχή τους στην αξιολόγηση της εργασίας αυτής.

Θα ήταν παράληψή μου να μην ευχαριστήσω από καρδιάς την κ. Ευλαλία Κουφοστάθη για την πολύτιμη συνεργασία και καθοδήγηση της στα πειράματά μου.

Τέλος, θα ήθελα να ευχαριστήσω ολόψυχα τη μητέρα μου και τον πατέρα μου για την αδιάκοπη στήριξη τους και φυσικά τον Ραφαηλία, που με εμπιστεύτηκε και δε σταμάτησε να με στηρίζει και να με βοηθά με οποιοδήποτε τρόπο.

ΠΕΡΙΛΗΨΗ

Δευτερογενής μεταβολισμός είναι ο μεταβολισμός τα προϊόντα του οποίου εμπλέκονται κυρίως σε αλληλεπιδράσεις μεταξύ του φυτού και του βιοτικού ή αβιοτικού περιβάλλοντος. Τα προϊόντα του δευτερογενούς μεταβολισμού παίζουν σημαντικό ρόλο στην άμυνα των φυτών έναντι εχθρών και έχουν μία ποικιλία άλλων ρόλων στις σχέσεις του φυτού με τους ωφέλιμους για αυτό μικροοργανισμούς και έντομα. Επιπλέον, με τους δευτερογενείς μεταβολίτες τα φυτά αντιμετωπίζουν κάθε είδους καταπόνηση κυρίως την οξειδωτική κατά την οποία παράγονται τοξικές ουσίες για τα φυτικά κύτταρα γνωστές ως ενεργές μορφές οξυγόνου (ROS). Οι φαινολικές ενώσεις (ταννίνες, φλαβονοειδή κ.α.) είναι μια από τις κυριότερες ομάδες δευτερογενών μεταβολιτών, οι οποίες δρουν κατά την άμυνα των φυτών εναντίων παθογόνων και εχθρών, προστατεύουν τα φυτά από την περίσσεια ηλιακής ακτινοβολίας, αποτελούν φίλτρα απορρόφησης της UVB ακτινοβολίας, ενώ ακόμα περιορίζουν τις βλάβες από ROS (οξειδωτική καταπόνηση). Σύμφωνα με τη διεθνή βιβλιογραφία η συσσώρευση φαινολικών ενώσεων στους φυτικούς ιστούς συσχετίζεται με το δίλημμα του φυτού για *ανάπτυξη ή άμυνα*. Κύριος σκοπός της έρευνας αυτής ήταν να διαπιστώσουμε εάν ισχύει ο ανταγωνισμός μεταξύ ανάπτυξης και άμυνας σε καρότο, ραπανάκι και σπανάκι, τα οποία προέρχονταν από πειράματα καταπόνησης. Τα δείγματα καρότου και ραπανιού προέρχονταν από πείραμα με νερό άρδευσης με αυξημένη συγκέντρωση μικροκυστινών που δόθηκε στα φυτά σε διάφορα στάδια της ανάπτυξης τους, α) από το στάδιο του σπέρματος, β) των κοτυληδόνων, γ) των δύο πρώτων φύλλων και δ) των 4 πρώτων φύλλων, ενώ τα δείγματα σπανακιού προέρχονταν από πείραμα με νερό άρδευσης με αυξημένη συγκέντρωση μικροκυστινών (Κάρλα) που χορηγήθηκε στα φυτά είτε με ριζοπότισμα είτε με ψεκασμό. Για όλα τα δείγματα πραγματοποιήθηκε η φασματοφωτομετρική μέθοδος Folin-Ciocalteu (Waterman & Mole, 1994) για τον προσδιορισμό των ολικών φαινολικών. Τα αποτελέσματα έδειξαν ότι, το κάθε φυτικό είδος που εξετάστηκε είχε διαφορετική στρατηγική απέναντι στην καταπόνηση από τις υψηλές συγκεντρώσεις μικροκυστινών ως προς την απόκριση των φαινολικών του. Στο ραπανάκι, τόσο στο υπέργειο όσο και στο υπόγειο μέρος του, αλλά και στα φύλλα σπανακιού, δεν φάνηκε να υπάρχει οποιαδήποτε συσχέτιση της συσσώρευσης φαινολικών με την ανάπτυξη ενώ οι συντελεστές συσχέτισης ήταν πολύ κοντά στο μηδέν. Το καρότο ήταν το μόνο

φυτό όπου συσχετίστηκε η συγκέντρωση των φαινολικών του με την ανάπτυξη και μάλιστα με μία σημαντική αρνητική συσχέτιση. Στατιστικά σημαντικές συσχετίσεις φάνηκαν μεταξύ του ξηρού βάρους υπέργειου, νωπού και ξηρού βάρους ρίζας και των επιπέδων φαινολικών στα αντίστοιχα φυτικά τμήματα. Οι πιο σημαντικές όμως συσχετίσεις εμφανίστηκαν όταν μπήκαν στην ανάλυση όλοι οι ιστοί (υπόγειο και υπέργειο) καρότου. Το συγκεκριμένο συμπέρασμα επιβεβαιώνεται από τη βιβλιογραφία και υποστηρίζεται ότι η συγκέντρωση των φαινολικών ενώσεων αυξάνεται σε ένα φυτό ως πρόσθετος αμυντικός μηχανισμός σε καταστάσεις καταπόνησης του φυτού. Έτσι λοιπόν, όταν ένα φυτό βρίσκεται σε κατάσταση στρες, επιλέγει να αυξήσει τις φαινολικές του ενώσεις σε βάρος της αύξησης των αποθεμάτων του σε άνθρακα (και αντιστρόφως), συνεπώς σε βάρος της ανάπτυξής του. Πρόκειται για την απόκριση του φυτού στο γνωστό «δίλημμα»: *ανάπτυξη ή άμυνα*.

Περιεχόμενα

1. Εισαγωγή	7
1.1. Δευτερογενής Μεταβολισμός και Δευτερογενείς Μεταβολίτες	7
1.2 Φαινολικές ενώσεις	9
1.3 Ρόλος Φαινολικών	11
1.4 Εντοπισμός των φαινολικών στους φυτικούς ιστούς και αντίστοιχη δράση	15
1.5 Παράγοντες που επηρεάζουν τη συγκέντρωση των φαινολικών στα φυτά	16
2. Μικροκυστίνες και φαινολικά	17
3. Σκοπός Εργασίας	17
4. Υλικά και Μέθοδοι	18
5. Αποτελέσματα	22
5.1 Σπανάκι	22
5.2 Ραπανάκι	24
5.3 Καρότο	28
6. Συζήτηση	32
7. Συμπεράσματα	34
8. Βιβλιογραφία	35

1.Εισαγωγή

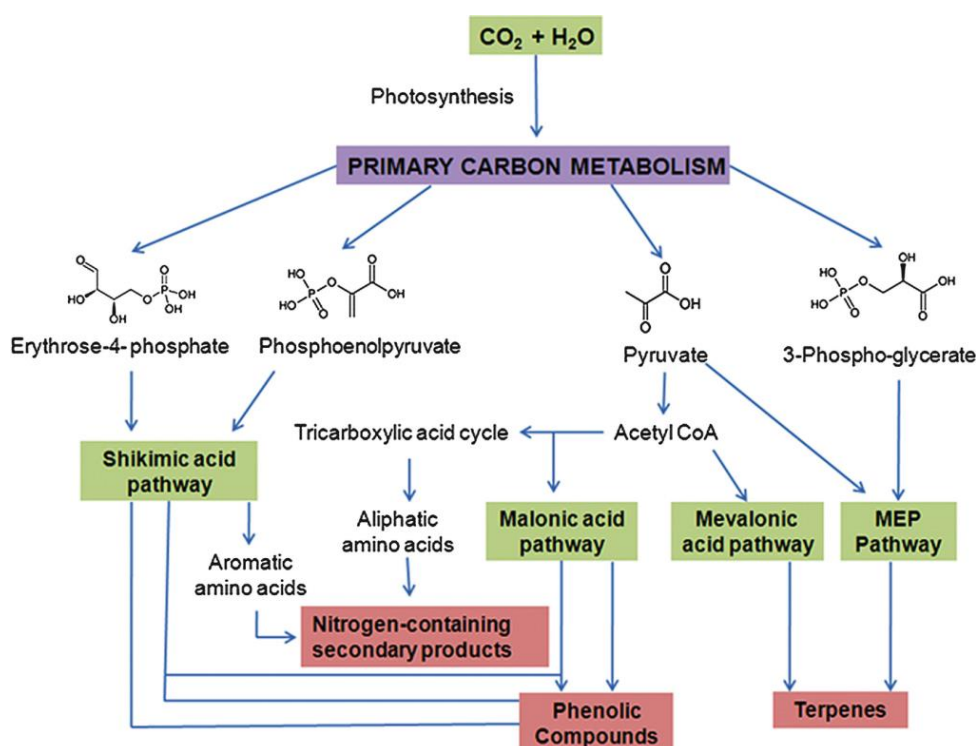
1.1. Δευτερογενής Μεταβολισμός και Δευτερογενείς Μεταβολίτες

Όλα τα φυτικά είδη έχουν παρόμοιες οδούς για να συνθέσουν τα βασικά συστατικά τους όπως σάκχαρα, αμινοξέα, βάσεις, υδατάνθρακες, πρωτεΐνες και νουκλεοτίδια που είναι βασικά για την ανάπτυξη τους, δηλαδή για τον πρωτογενή μεταβολισμό τους. Ο πρωτογενής μεταβολισμός των φυτών είναι ο μεταβολισμός που σχετίζεται με ζωτικές λειτουργίες και λειτουργεί σε όλα τα φυτικά κύτταρα. Οι φυτικοί οργανισμοί όμως παράγουν και διαφορετικές από τις παραπάνω ενώσεις οι οποίες περιέχουν άνθρακα και φαίνεται να μην παίζουν ρόλο στον πρωτογενή μεταβολισμό τους. Οι ενώσεις αυτές λέγονται προϊόντα του δευτερογενούς μεταβολισμού των φυτών ή δευτερογενείς μεταβολίτες (Wu and Chappell, 2008). Ως δευτερογενής μεταβολισμός ορίζεται ο μεταβολισμός τα προϊόντα του οποίου εμπλέκονται κυρίως σε αλληλεπιδράσεις μεταξύ του φυτού και του βιοτικού ή αβιοτικού περιβάλλοντος. Οι δευτερογενείς μεταβολίτες προέρχονται από προϊόντα του πρωτογενή μεταβολισμού, τα οποία ακολουθούν άλλα βιοσυνθετικά μονοπάτια για να καταλήξουν στην παραγωγή χιλιάδων ουσιών. Δεν συναντούμε τις ίδιες ουσίες σε όλα τα φυτά, αλλά υπάρχουν διαφορές ανάμεσα στο είδη αλλά και στις οικογένειες. Τα προϊόντα του δευτερογενούς μεταβολισμού έχουν πολλούς και διαφορετικούς ρόλους: για παράδειγμα, άλλα παράγονται για βασικούς σκοπούς άμυνας έναντι εχθρών και παράσιτων και άλλα δίνουν πιο έντονο χρώμα ώστε να προσελκύουν επικονιαστές και για πολλές ουσίες η αίτια παραγωγής τους από τα φυτά δεν είναι ακόμα γνωστή. Οι δευτερογενείς μεταβολίτες που παράγουν τα φυτά είναι πολλές φορές η απάντησή τους σε καταπονήσεις. Με αυτούς προσπαθούν να αντιμετωπίσουν την κάθε είδους καταπόνηση και επίσης να αποφύγουν την κατάληξη όλων που είναι η οξειδωτική καταπόνηση κατά την οποία παράγονται τοξικές ουσίες για τα φυτικά κύτταρα γνωστές ως ενεργές μορφές οξυγόνου (ROS). Τα προϊόντα του δευτερογενούς μεταβολισμού κατατάσσονται σε 3 γενικές κατηγορίες ανάλογα με την χημική μορφή τους σε φαινολικές ουσίες, τερπένια και αζωτούχες ενώσεις (Καραμπουρνιώτης κ.α. 2012), (Σχήμα 1). Στις μέρες μας είναι γνωστά πάνω από 100.000 δευτερογενή προϊόντα.

Τα τερπένια έχουν ως βασικό σκελετό ένα μόριο υδρογονάνθρακα με 5 άτομα άνθρακα (ισοπεντάνιο). Στην ομάδα των τερπενίων περιλαμβάνονται ουσίες του

πρωτογενούς μεταβολισμού, όπως είναι οι χλωροφύλλες, τα καροτενοειδή, αλλά και ορισμένες φυτορμόνες όπως το αμψισικό οξύ και οι γιββερελίνες. Όταν όμως συνενώνονται διαφορετικοί αριθμοί βασικών μονάδων ισοπεντανίου προκύπτουν πιο πολύπλοκα μόρια που ανήκουν στους δευτερογενείς μεταβολίτες. Πολλοί από αυτούς έχουν πτητική ιδιότητα και άλλοι είναι τοξικοί για τα έντομα. Μαζί με άλλα συστατικά σχηματίζουν τα αιθέρια ελαία που βρίσκονται στις αδενώδεις τρίχες και στους αδένες δίνοντας χαρακτηριστικό άρωμα στα άνθη και σε άλλα όργανα. Έτσι, τερπένια είναι το λιμονένιο και η μενθόλη που είναι χαρακτηριστικά συστατικά αιθερίων ελαίων του λεμονιού και της μέντας, όπως επίσης, το β-καροτένιο και το καουτσούκ (Καραμπουρνιώτης κ.α. 2012).















Οι αζωτούχες ενώσεις είναι μία μεγάλη ομάδα δευτερογενών μεταβολιτών που περιλαμβάνει πολύ διαφορετικές μεταξύ τους ουσίες. Προέρχονται κυρίως από αμινοξέα. Χαρακτηριστικές ουσίες σε αυτή την κατηγορία είναι τα αλκαλοειδή, όπως η κωνίνη και η παπαβερίνη, τα κυανογόνα γλυκοσίδια που μπορούν να απελευθερώσουν την τοξική ρίζα κυάνιου και αμυντικές πρωτεΐνες, όπως οι χιτινάσες.



Σχήμα 1. Οι τρεις κύριες κατηγορίες δευτερογενών μεταβολιτών: ενώσεις που περιέχουν άζωτο, φαινολικές ενώσεις και τερπένια και τα βιοσυνθετικά μονοπάτια από τα οποία προέρχονται (Rani et al., 2018).

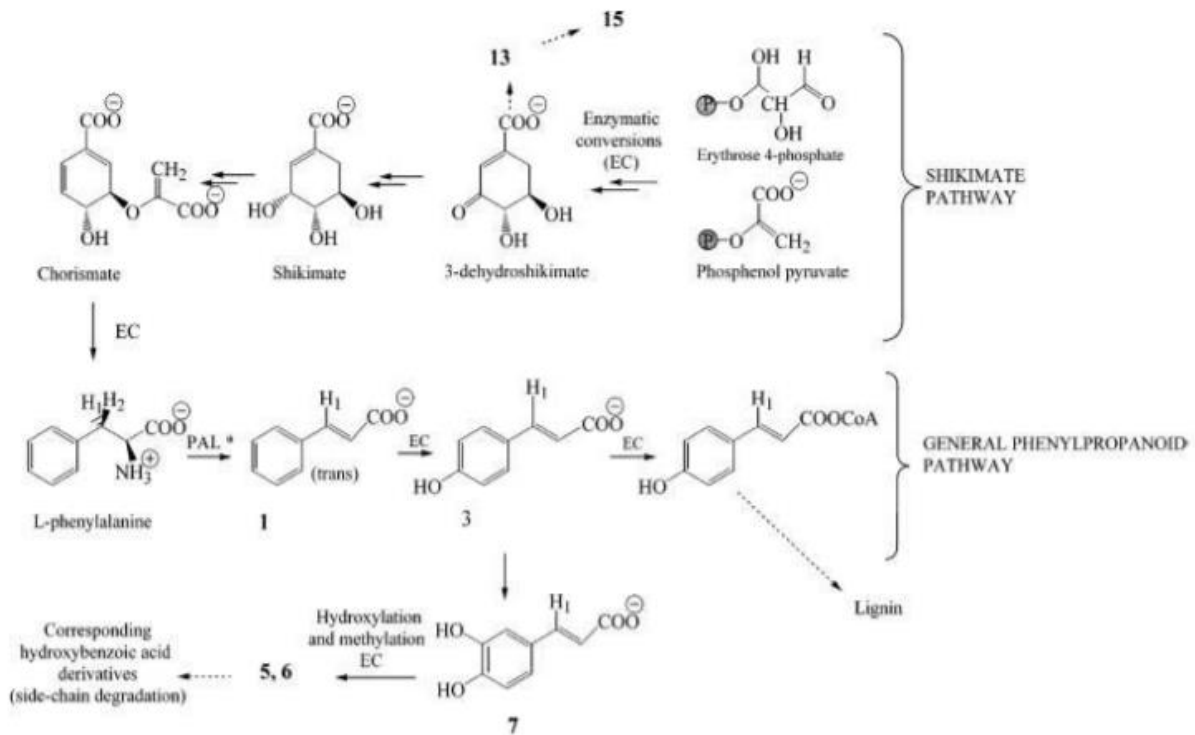
1.2 Φαινολικές ενώσεις

Μια μεγάλη ομάδα δευτερογενών μεταβολιτών είναι οι φαινολικές ενώσεις. Είναι μια κατηγορία ενώσεων που έχουν τουλάχιστον ένα αρωματικό δακτύλιο ο οποίος έχει ένα ή παραπάνω υδροξύλια (Καραμπουρνιώτης κ.α., 2012). Οι ενώσεις αυτές υπάρχουν σε 8000 φυτά περίπου και προκύπτουν μέσω διάφορων βιοσυνθετικών μονοπατιών (Robbins, 2003). Σε αυτές τις φαινολικές ενώσεις ανήκουν οι φαινόλες, τα φαινολικά οξέα κ.α. (Πίνακας 1) (Morton et al., 2000).

αριθμός ατόμων άνθρακα	τύπος βασικού ανθρακικού σκελετού	κατηγορία ενώσεων	χαρακτηριστικοί εκπρόσωποι
6		απλές φαινόλες	υδροκινόνη, κατεχόλη
7		παράγωγα υδρόξυβενζοϊκού οξέος	γαλλικό οξύ
8		ακετοφαινόλες, παράγωγα οξικού οξέος, φαινυλίου	4-υδρόξυακετοφαινόλη, 4-υδροξυφαινυλοξικό οξύ
9		παράγωγα υδρόξυκιναμικού οξέος φαινυλοπροπανίου κουμαρίνες	καφεϊκό οξύ ευγενόλη εσκουλετίνη
10		ναφθοκινόνες	γιογκλόνη
13		ξανθόνες	μαντζαφερίνη
14		στιλβένια, ανθρακινόνες	ρεσβερατρόλη, εμοντίνη
15		φλαβονοειδή, ανθοκυανίνες	καιμπερόλη, δελφινιδίνη
18		λιγνάνες	πινορεσινόλη
30		διφλαβονοειδή	αμεντοφλαβόνη
n		μελανίνες της κατεχόλης	πολυμερή του ναφθαλενίου
n		υδρολυόμενες ταννίνες	γαλλοταννίνες
n		λιγνίνες	πολυμερή της κοινοφερυλικής και κουμαρυλικής αλκοόλης (γυμνόσπερμα) πολυμερή της κοινοφερυλικής και σιναπικής αλκοόλης (αγγειόσπερμα)
n		συμπυκνωμένες ταννίνες	πολυμερή φλαβονοειδών

Πίνακας 1. Οι κυριότερες υποομάδες των φαινολικών ενώσεων (Καραμπουρνιώτης κ.α. 2012).

Τα σημαντικότερα μονοπάτια του μεταβολισμού των φυτών στα οποία δημιουργούνται τα φαινολικά συστατικά είναι αυτά του σικιμικού οξέος και του γενικού μονοπατιού των φενυλ-προπανοειδών (Σχήμα 2) (Robbins, 2003).



Σχήμα 2. Βιοσυνθετικά μονοπάτια σικιμικού οξέος και του γενικού μονοπατιού των φενυλ-προπανοειδών (Robbins, 2003).

Οι φαινολικές ενώσεις δε βρίσκονται στα φυτά ελεύθερες, αλλά ενωμένες υπό τη μορφή εστέρων, αιθέρων, τερπενίων, ή γλυκοζιτών. Η γλυκοζυλίωση λαμβάνει χώρα με τη συμμετοχή κυρίως της γλυκόζης, αλλά και της γαλακτόζης, της ραμνόζης, της ξυλόζης, της αραβινόζης και της ρουτινόζης. Υπό τη μορφή γλυκοζιτών, οι φαινολικές ενώσεις είναι περισσότερο υδατοδιαλυτές μέσα στους φυτικούς ιστούς, ενώ γίνονται λιγότερο ευαίσθητες σε αντιδράσεις με ελεύθερες ρίζες, με αποτέλεσμα να ενισχύεται ο προστατευτικός τους ρόλος για το φυτό (Urquiaga & Leighton, 2000).

1.3 Ρόλος Φαινολικών

Πολλοί ερευνητές προσπάθησαν να δώσουν τη δικιά τους ερμηνεία σχετικά με τα ρόλο των φαινολικών και τον τρόπο σύνθεσής τους στα φυτικά είδη, έτσι δημιουργήθηκαν κάποιες υποθέσεις όπως:

Διαθεσιμότητα των πόρων: Τα επίπεδα της άμυνας μπορούν να μεταβληθούν σύμφωνα με τον ρυθμό ανάπτυξης του φυτού. Όταν αυτός μειώνεται το επίπεδο άμυνας παρουσιάζει αύξηση. Η διαθεσιμότητα των πόρων για την ανάπτυξη (νερό, θρεπτικά στοιχεία και ηλιακή ακτινοβολία), σημαίνει ότι δεν διατίθενται αρκετοί για την άμυνα.

Ισορροπίας C/ Θρεπτικών Στοιχείων: Συσχετίστηκε η διαθεσιμότητα των θρεπτικών στοιχείων, με τον τύπο της χημικής άμυνας που θα επιλέξει το φυτό. Πιο συγκεκριμένα διακρίνει τους μεταβολίτες που σχετίζονται με την άμυνα σε αυτούς που έχουν βάση τον άνθρακα και σε αυτούς που έχουν βάση το άζωτο. Στην περίπτωση που το φυτό βρίσκεται σε μια κατάσταση έλλειψης θρεπτικών περιορίζεται περισσότερο η ανάπτυξη απ' ότι η φωτοσύνθεση. Με αποτέλεσμα να έχουμε περίσσια φωτοσυνθετικών προϊόντων π.χ. με μορφή υδατανθράκων. Επομένως, θα παρατηρηθεί αύξηση του C/N και την παραγωγή δευτερογενών μεταβολιτών που έχουν βάση τον άνθρακα. Αντίθετα, όταν έχουμε επάρκεια θρεπτικών ο λόγος C/N μειώνεται και έτσι το φυτό επιλεγεί την ανάπτυξη πάρα την άμυνα του.

Ισορροπία Ανάπτυξης – Διαφοροποίησης: Επεκτείνεται η παραπάνω υπόθεση αναφέροντας ότι υπάρχει μια ισορροπία μεταξύ της άμυνας του φυτού και της κυρίαρχης τάσης για ανάπτυξη με κύριο στόχο την αντιμετώπιση των ανταγωνιστών (εχθροί κ.τ.λ.) αλλά και την ταυτόχρονη προστασία των δομών που υπάρχουν ήδη.

Έπειτα διατυπώθηκε το μοντέλο ανταγωνισμού για παραγωγή πρωτεϊνών – φαινολικών ενώσεων. Οι Haukioja et al (1998) προτείνουν ότι η πρωτεϊνοσύνθεση που αφορά την ανάπτυξη και η δημιουργία των φαινολικών που είναι μέρος της άμυνας, αντιπροσωπεύουν διαδικασίες που είναι ανταγωνιστικές μεταξύ τους. Κοινό πρόδρομο μόριο και για τις δυο διαδικασίες που αναφερθήκαν είναι η φαινιλαλανίνη. Όταν το φυτό επιλέξει την ανάπτυξη, την σύνθεση δηλαδή πρωτεϊνών τότε αναμένεται να περιοριστεί η σύνθεση των φαινολικών. Τα φυτικά είδη που καλλιεργεί ο άνθρωπος με σκοπό να τραφεί, είναι με τέτοιο τρόπο προσαρμοσμένα ώστε να ξοδεύουν λιγότερη ενέργεια από τα προϊόντα της φωτοσύνθεσης για την άμυνα τους. Μάλιστα από την απουσία άμυνας τα φυτά αυτά έχουν ευαισθησία σε ασθένειες και εχθρούς που

καταπολεμούνται με φυτοφάρμακα. Τα καλλιεργούμενα φυτά επομένως είναι πιο ευάλωτα σε εχθρούς από ότι τα φυσικά οικοσυστήματα.

Με βάση τους Herms & Mattson (1992), το μοίρασμα των πόρων στο δευτερογενή μεταβολισμό παίζει ανταγωνιστικό ρόλο με εκείνο του πρωτογενούς μεταβολισμού. Οι φυτικοί οργανισμοί πρέπει να αντιμετωπίσουν το δίλημμά της αξιοποίησης των προϊόντων φωτοσύνθεσης μεταξύ των απαιτήσεων για ανάπτυξη και της άμυνας. Όμως πολλές φορές, ο τρόπος που κατανέμονται οι πόροι στο δευτερογενή μεταβολισμό δεν επηρεάζεται μόνο από τις απαιτήσεις για άμυνα έναντι των βιοτικών καταπονήσεων, αλλά και τις ανάγκες προστασίας έναντι των αβιοτικών. Αυτό, είναι αποτέλεσμα της πολυλειτουργικότητας σχεδόν όλων των κατηγοριών δευτερογενών μεταβολικών. Μεταξύ αυτών τα φαινολικά φαίνεται ότι έχουν ένα μεγάλο αριθμό λειτουργιών (Karabourniotis et al., 2014) που περιγράφονται παρακάτω.

Οι φαινολικές ενώσεις είναι οι πιο γνωστοί δευτερογενείς μεταβολίτες εξαιτίας της έντονης παρουσίας τους σε υψηλές συγκεντρώσεις και του ρόλου τους στα κύτταρα και στους ιστούς όλων των φυτικών ειδών (Waterman & Mole, 1994; Latanzio et al., 2016). Όλες αυτές οι ενώσεις θεωρούνται μεταξύ των πιο ισχυρών ουσιών άμυνας που δρουν έναντι των φυτοφάγων ζώων (Herms & Mattson, 1992) και φυτοπαθογόνων. Η συσσώρευση φαινολικών ενώσεων έχει σχέση με το δίλημμα *ανάπτυξη ή άμυνα*. Η τελική άμυνα απαιτεί πολλές αλυσίδες άνθρακα και ενέργειας για να συνθέσουν δευτερογενούς μεταβολίτες, αναμεσά στους οποίους κορυφαία θέση κατέχουν τα φαινολικά. Έτσι η τελική άμυνα συνήθως μειώνει τις επενδύσεις σε άνθρακα και ενέργεια στις διαδικασίες ανάπτυξης. Για αυτό το λόγο οι φυτικοί οργανισμοί που χρειάζονται αυξημένη άμυνα έχουν πιο πολλές φορές χαμηλά επίπεδα ανάπτυξης (Herms & Mattson, 1992). Οι Karbourniotis et al 2014 συμπεραίνουν ότι η αυξημένη συγκέντρωση των φαινολικών στο φυτό έχει αρνητική σχέση με την φωτοσύνθεση και συνεπώς με την ανάπτυξη του φυτού. Άρα λοιπόν όταν το φυτό βρίσκεται σε κατάσταση στρες ευνοείται η αύξηση των φαινολικών ενώσεων σε βάρος της αύξησης των αποθεμάτων σε άνθρακα και συνεπώς σε βάρος της ανάπτυξης του.

Ο ανταγωνισμός αυτός μεταξύ ανάπτυξης και άμυνας φαίνεται στο Σχήμα 3.



Σχήμα 3. Ο ανταγωνισμός μεταξύ ανάπτυξης και άμυνας για το φωτοσυνθετικό προϊόν (Καραμπουρνιώτης κ.α. 2012).

Η ηλιακή ενέργεια που απορροφάται από τα φύλλα υπερβαίνει γενικά τη φωτοσυνθετική ικανότητα. Μερική από αυτή την περίσσεια ενέργειας μπορεί να απομακρυνθεί ακίνδυνα ως θερμότητα μέσω του κύκλου των ξανθοφυλλών (Demmig-Adams and Adams, 1996). Ενώ άλλες διεργασίες αξιοποίησης της ηλιακής ενέργειας, όπως η φωτοαναπνοή και ο κύκλος νερού-νερού, μειώνουν περαιτέρω τα επίπεδα ενέργειας (Niyogi, 1999). Όταν η ηλιακή ενέργεια βρίσκεται σε περίσσεια σε σχέση με την ικανότητα των φωτοσυνθετικών και φωτοπροστατευτικών διεργασιών, προκαλεί το σχηματισμό ROS και ριζών υδροξυλίου. Αυτά τα υποπροϊόντα μπορούν να προκαλέσουν οξειδωτική βλάβη. Συγκεκριμένα, μπορούν να οξειδώσουν λιπίδια, πρωτεΐνες, χρωστικές ουσίες αλλά και ένζυμα του κύκλου Calvin (Karabourniotis et al. 2014). Εάν οι συνθήκες είναι σοβαρές, μπορούν να προκαλέσουν θανατηφόρα βλάβη στους ιστούς των φύλλων. Για το λόγο αυτό, τα φυτά παράγουν μια μεγάλη γκάμα φαινολικών ενώσεων και ενζύμων προκειμένου να αποτρέψουν τις μόνιμες βλάβες της φωτοσυνθετικής συσκευής. Αυτές οι ενώσεις περιλαμβάνουν το ασκορβικό οξύ, τη γλουταθειόνη, τα καροτενοειδή και τις τοκοφερόλες (Καραμπουρνιώτης κ.α 2012).

Τα φλαβονοειδή, τα οποία είναι φαινολικά χαμηλού μοριακού βάρους, είναι δραστικά αντιοξειδωτικά *in vitro* και μπορούν να δράσουν ως φυσικά φυτικά αντιοξειδωτικά. Ομοίως, έχει αποδειχθεί αντιοξειδωτική δράση για τις ανθοκυανίνες και φαινολικά οξέα. Οι συμπυκνωμένες και υδρολυόμενες τανίνες υψηλού μοριακού βάρους έχουν επίσης αποδειχθεί ότι δρουν ως ισχυρά αντιοξειδωτικά *in vitro*, και είναι

15-30 φορές πιο αποτελεσματικές στην απόσβεση των υπεροξυλικών ριζών (Hagerman et al. 1998).

Επίσης, οι φαινολικές ενώσεις λειτουργούν και ως φίλτρα που εμποδίζουν την διείσδυση της UV ακτινοβολίας στο φύλλο (Schreiner et al., 2012). Η έκθεση σε UV-B ακτινοβολία επηρεάζει και τη συγκέντρωση άλλων δευτερογενών μεταβολιτών, πολλοί από τους οποίους έχουν και φαρμακολογική δράση, γεγονός που συνήθως αποδίδεται στις αντιοξειδωτικές τους ιδιότητες ή στην επίδρασή τους σε διάφορες λειτουργίες του φυτού σύμφωνα με τους Zhang και Bjorn (2009). Σύμφωνα με μελέτες έπειτα από έκθεση των φυτών σε UV-B ακτινοβολία επάγεται η σύνθεση φλαβονοειδών. Δρουν ως φίλτρα (UV screeners), απορροφώντας την ακτινοβολία και στη συνέχεια εκπέμποντας μέρος αυτής ως θερμότητα ή ακτινοβολία με χαμηλότερη ενέργεια. Επίσης λόγω της αντιοξειδωτικής τους δράσης, περιορίζουν τις βλάβες που προέρχονται από τις ROS (Karabourniotis et al. 2014). Στις ενώσεις αυτές ανήκει το μοριακό οξυγόνο (O_2) απλής διεγερμένης κατάστασης, αλλά και ελεύθερες ρίζες, δηλαδή ενώσεις που φέρουν ένα ή περισσότερα μονήρη ηλεκτρόνια, όπως οι οξυγονούχες ρίζες $O_2^{\bullet-}$, HO^{\bullet} , HO_2^{\bullet} και ROO^{\bullet} που λόγω της δραστηριότητάς τους μπορούν να προκαλέσουν οξείδωση στα λιπίδια των κυτταρικών μεμβρανών, στις πρωτεΐνες κλπ. (Agati et al., 2012).

Οι φαινολικές ουσίες παίζουν σημαντικό ρόλο και στο έδαφος γύρω από το φυτό, αλλά και στις σχέσεις του φυτού με μικροοργανισμούς. Οι πολυφαινόλες, οι οποίες εισέρχονται στο έδαφος κυρίως από εκκρίσεις του υπογείου και του υπέργειου τμήματος συμμετέχουν στον έλεγχο της δεξαμενής και της μορφής των θρεπτικών ουσιών που είναι διαθέσιμα για το φυτό. Πχ. οι φαινολικές ενώσεις επηρεάζουν άμεσα την σύνθεση και την δραστηριότητα των κοινοτήτων των μικροοργανισμών που κάνουν την αποσύνθεση. Έτσι οι συγκεντρώσεις τους επηρεάζουν τους ρυθμούς αποσύνθεσης και τον κύκλο θρεπτικών ουσιών.

Η σχέση των ριζών των φυτών με μικροοργανισμούς επηρεάζεται φαινολικές ενώσεις. Για παράδειγμα διαφορετικές διαλυτές πολυφαινόλες ή τα φλαβονοειδή αποτρέπουν τη βλάστηση των σπορίων και την ανάπτυξη των υφών των σαπροφυτικών μυκήτων. Πολλά βακτήρια και μύκητες επηρεάζονται από τις εκκρίσεις των ριζών. Πχ τα ισοφλαβονοειδή και τα φλαβονοειδή στις εκκρίσεις των ριζών ορισμένων ψυχανθών ενεργοποιούν τα γονίδια ριζιδίου που είναι υπεύθυνα για την διαδικασία επικοινωνίας με τα αζωτοδεσμευτικά βακτήρια που θα μπουν μέσα στη ρίζα και θα συμβιώσουν με

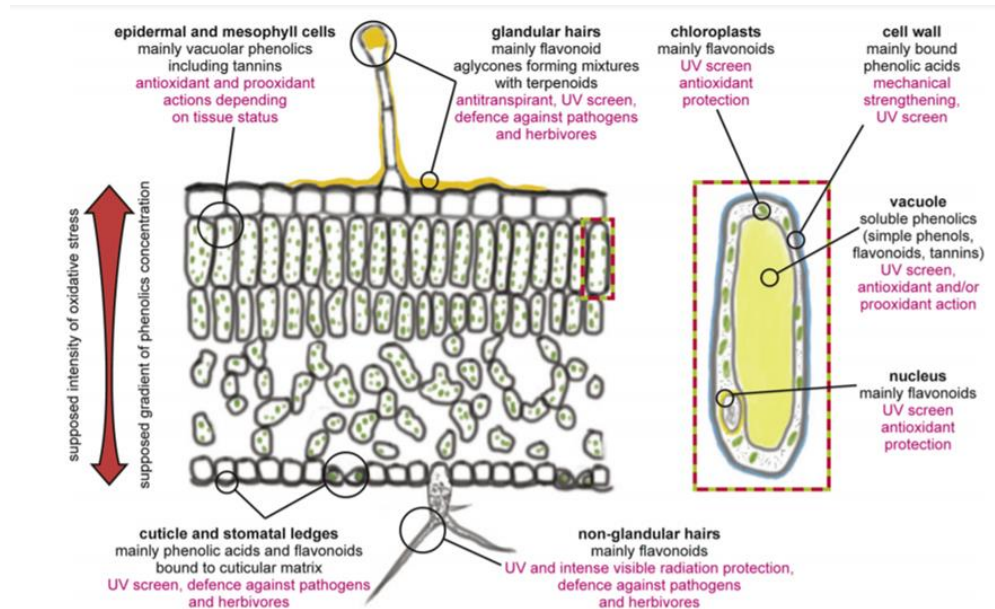
το φυτό. Αντίστοιχες ουσίες αναλαμβάνουν την επικοινωνία με τους μυκορριζικούς μύκητες και για τον αποικισμό των ριζών (Taiz et al. 2018).

1.4 Εντοπισμός των φαινολικών στους φυτικούς ιστούς και αντίστοιχη δράση

Η ομάδα των φαινολικών υποδιαιρείται σε μοριακό επίπεδο σε πολλές υποομάδες, όπως απλές φαινόλες, λιγνάνες, κουμαρίνες, φλαβονοειδή, τανίνες, κινόνες κλπ., με βάση την κατασκευή του σκελετού άνθρακα, το είδος του υποκαταστάτη και τον βαθμό πολυμερισμού. Επιπλέον, η διαλυτότητα και η τοξικότητα κάθε μορίου εξαρτάται από τη γλυκοσυλίωση, ενώ οι αντιοξειδωτικές ιδιότητες τους εξαρτώνται από τον αριθμό των υδροξυλικών ομάδων (Waterman & Mole, 1994).

Κάποιες φαινολικές ενώσεις όπως τα φλαβονοειδή βρίσκονται κυρίως στην επιδερμίδα και στις αδενώδεις ή μη αδενώδεις τρίχες (Karabourniotis and Liakopoulos, 2005). Οι μη αδενώδεις τρίχες συνήθως συνθέτουν πυκνά στρώματα σκεπάζοντας την πάνω ή την κάτω επιφάνεια του φύλλου. Αυτού του τύπου οι τρίχες εμπεριέχουν φαινολικά και κυρίως φλαβονοειδή που έχουν σχέση με τα κυτταρικά τοιχώματα (Karabourniotis et al., 1992) αλλά και τανίνες (Karioti et al., 2010). Οι αδενώδεις τρίχες συνθέτουν και εγκλωβίζουν δευτερογενείς μεταβολίτες. Σε κάποια είδη φυτικών οργανισμών συνθέτονται υψηλά επίπεδα ουσιών στις αδενώδεις τρίχες και εκκρίνονται δημιουργώντας ένα συνεχές στρώμα στην επιφάνεια των φύλλων. Οι ουσίες αυτές συνήθως δημιουργούν ένα σύνθετο ρητινώδες μείγμα δευτερογενών μεταβολιτών. Συχνά τα φαινολικά που παράγονται στις επιφανειακές δομές δεν έχουν σχέση με εκείνα των εσωτερικών δομών, άρα τα φαινολικά του μεσόφυλλου διαφέρουν με αυτά των επιδερμικών κυττάρων. Τα φαινολικά της επιδερμίδας όπως αυτά στις αδενώδεις τρίχες και τα εκκρίματα αυτών είναι υπεύθυνα να εμποδίσουν τη διείσδυση της UVB ακτινοβολίας στο εσωτερικό του φύλλου. Επίσης, έχουν και ρόλο στη μείωση της διαπνοής. Ένας ακόμη ρόλος τους είναι ο αμυντικός, γιατί αποτρέπουν την είσοδο παθογόνων και τη φυτοφαγία από μικρούς φυτοφάγους οργανισμούς. Τα κύτταρα που υπάρχουν στο μεσόφυλλο διαθέτουν επίσης διάφορων ειδών φαινολικά πχ φλαβονοειδή, ανθοκυανίνες αλλά και τανίνες (Ferrerres et al., 2011). Ο ρόλος των φαινολικών μέσα στο μεσόφυλλο φαίνεται να είναι προστατευτικός ενάντια στις ROS ιδιαίτερα σε δυσμενείς συνθήκες (Agati et al., 2009). Οι φαινικές ενώσεις που

βρίσκονται μέσα στο μεσόφυλλο βρίσκονται σε διαφορετικούς υποκυττάριους χώρους με διαφορετικές λειτουργίες ο καθένας (Σχήμα 4).



Σχήμα : Σχηματική αναπαράσταση τυπικών ανατομικών χαρακτηριστικών, που συχνά εμφανίζονται σε υποστρωματικά φύλλα, δείχνοντας τον εντοπισμό των διαφορετικών υποομάδων φαινολικών σε επίπεδο ιστών και κυττάρων. Οι βασικοί ρόλοι των φαινολικών κάθε σχήματος παρουσιάζονται με μωβ απόχρωση. Το αμφίδρομο βέλος δείχνει την υποθετική βαθμίδα του οξειδωτικού στρες και την υποθετική συγκέντρωση φαινολικών ενώσεων σε ιστούς μεσόφυλλων (Karabourniotis et al., 2014).

1.5 Παράγοντες που επηρεάζουν τη συγκέντρωση των φαινολικών στα φυτά

Το σύνολο των φαινολικών ενώσεων μέσα στους φυτικούς ιστούς διαφέρει σε συγκέντρωση ανάλογα με την επίδραση συγκεκριμένων παραγόντων. Σύμφωνα με μελέτες η έκθεση στην ηλιακή ακτινοβολία αυξάνει τα φλαβονοειδή στα σταφύλια και στα μούρα ενώ από τη θερμοκρασία δε φαίνεται να επηρεάζονται (Makris et al., 2006). Κάποιοι άλλοι παράγοντες όπως το είδος του εδάφους, οι κλιματικές συνθήκες αλλά και οι καλλιεργητικές τεχνικές δείχνουν να επηρεάζονται τα επίπεδα των φαινολικών στα φυτά. Η συγκέντρωση των φαινολικών συστατικών αλλάζει κατά την ωριμότητα των φρούτων. Τέλος, εξωτερικοί παράγοντες όπως η καταστροφή του φυτικού ιστού από τα έντομα έχει άμεση επίδραση στη συγκέντρωση των φαινολικών που παρουσιάζουν

αύξηση για να υπάρχει ένα είδος άμυνας και εναντίον του οξειδωτικού stress (Makris et al., 2006).

2. Μικροκυστίνες και φαινολικά

Όπως έχει αναφερθεί και παραπάνω, τα φαινολικά είναι ενώσεις που παρέχουν σημαντική προστασία από το αβιοτικό στρες (Karabourniotis et al 2014 a). Σύμφωνα με τους Levizou et al. (2020), σε συνθήκες εντόνου στρες που συμβαίνει στο φυτό λόγω της ανεβασμένης συγκέντρωσης μικροκυστινών και ιδιαίτερα MC-LR στο νερό της άρδευσης βρέθηκαν αυξημένα ολικά φαινολικά πράγμα που σημαίνει ότι μπήκε σε ενέργεια το αντιοξειδωτικό σύστημα. Περίπου ίδιες αποκρίσεις είχαν βρεθεί και για άλλα συστατικά του αμυντικού μηχανισμού, όπως ορισμένα ενζυμικά και μη ενζυμικά αντιοξειδωτικά, όπως το ασκορβικό οξύ και η γλουταθειόνη (Cao et al 2017, Freitas et al 2015). Σε πολλές μελέτες τα ολικά φαινολικά έδειξαν σημαντική αύξηση σε υψηλές συγκεντρώσεις MC-LR που υπερβαίνουν τα 50 mg L⁻¹ (Corbel et al 2016, Levizou et al 2017). Αυτό συνεπάγεται ότι σε χαμηλές δόσεις τοξινών το εγγενές αντιοξειδωτικό δυναμικό παρέχει επαρκή προστασία.

3. Σκοπός Εργασίας

Κύριος σκοπός της συγκεκριμένης εργασίας ήταν να μελετήσουμε και να ελέγξουμε σε διαφορετικά είδη φυτών υπό καθεστώς καταπόνησης, τη συσχέτιση μεταξύ της συγκέντρωσης των ολικών φαινολικών και της ανάπτυξης φυτών σπανακιού, ραπανακιού και καρότου. Επομένως, σκοπός ήταν να διαπιστώσουμε εάν ισχύει για όλα τα φυτά που μελετήθηκαν ο ανταγωνισμός μεταξύ ανάπτυξης και άμυνας.

4. Υλικά και Μέθοδοι

Το παρόν πείραμα διεξήχθη στο εργαστήριο Ζιζανιολογίας του Πανεπιστημίου Θεσσαλίας. Οι μετρήσεις ξεκίνησαν τον Μάρτιο του έτους 2018 και ολοκληρώθηκαν τον Οκτώβριο του ίδιου έτους. Συγκεντρώθηκαν δείγματα υπέργειου και υπόγειου μέρους από αποξηραμένα ραπανάκια, καρότα και σπανάκια. Όλα αυτά τα φυτά συμμετείχαν σε πειράματα όπου υπέστησαν διάφορες μεταχειρίσεις με νερό από τη λίμνη Κάρλα, δηλαδή νερό με αυξημένη συγκέντρωση μικροκυστινών. Τα πειράματα που σχετίζονται με το καρότο και το σπανάκι διεξήχθησαν και οι μετρήσεις βιομάζας πάρθηκαν από τις εξής διπλωματικές εργασίες προπτυχιακών και μεταπτυχιακών φοιτητών του Τμήματος Γεωπονίας Φυτικής Παραγωγής και Αγροτικού Περιβάλλοντος του Πανεπιστημίου Θεσσαλίας:

- 1) Καρότο: πείραμα με νερό άρδευσης με αυξημένη συγκέντρωση μικροκυστινών που δόθηκε στα φυτά σε διάφορα στάδια της ανάπτυξης τους, α) από το στάδιο του σπέρματος, β) των κοτυληδόνων, γ) των δύο πρώτων φύλλων και δ) των 4 πρώτων φύλλων. Πτυχιακή εργασία της Ελένης Παπαβασιλείου (2018) με τίτλο «Επίδραση νερού πλούσιου σε κυανοτοξίνες στο καρότο και έλεγχος της δυνατότητας επαναφοράς».
- 2) Σπανάκι: πείραμα με νερό άρδευσης με αυξημένη συγκέντρωση μικροκυστινών (Κάρλα) που χορηγήθηκε στα φυτά είτε με ριζοπότισμα είτε με ψεκασμό. Μεταπτυχιακή Διατριβή της Ευαγγελίας Τσουμαλάκου (2017) με τίτλο «Άρδευτικό νερό πλούσιο σε κυανοτοξίνες εφαρμόζεται με ψεκασμό σε καλλιέργεια σπανακιού (*Spinacia oleracea* L.): επιδράσεις σε μορφο-ανατομικά χαρακτηριστικά και φυσιολογικές λειτουργίες του φυτού»

Τα φυτικά δείγματα τοποθετήθηκαν στον φούρνο για >12h πριν τη μέτρηση για να φύγει όση υγρασία είχαν μαζέψει κατά την αποθήκευσή τους. Στη συνέχεια μετρήθηκαν τα ολικά φαινολικά ακολουθώντας τη φασματοφωτομετρική μέθοδο Folin-Ciocalteu (Waterman & Mole, 1994). Η ποσότητα δείγματος προσαρμόζεται ανάλογα με το φυτικό είδος και την καταπόνηση, ώστε οι απορροφήσεις να βρίσκονται μέσα στα όρια ακρίβειας του φωτομέτρου που χρησιμοποιείται. Έτσι, πριν την μέτρηση των δειγμάτων που περιλήφθηκαν στην εργασία αυτή γινόταν για

κάθε νέο φυτικό είδος μία δοκιμαστική μέτρηση με διαφορετικές ποσότητες ιστού για να αποφασιστεί πόσος ξηρός ιστός θα χρησιμοποιούνταν.

Τα αντιδραστήρια που χρησιμοποιήθηκαν είναι:

- Μεθανόλη (6ml/δείγμα)
- Αντιδραστήριο Folin-Ciocalteu (0,25ml/δείγμα)
- Διάλυμα Na_2CO_3^- : 20g σε 100ml νερού (0,75ml/δείγμα)

Έπειτα ακολούθησε η διαδικασία της εκχύλισης. Αρχικά, ζυγίστηκαν 250mg κονιοροποιημένου ξηρού δείγματος και τοποθετήθηκαν σε πλαστικούς δοκιμαστικούς σωλήνες. Αμέσως μετά, προστέθηκαν 6ml υδατικού διαλύματος μεθανόλης 50%, σφραγίστηκαν και επώαστηκαν σε υδατόλουτρο στους 40°C για 1 ώρα, υπό ήπια ανάδευση. Στη συνέχεια, τα δείγματα πέρασαν από χάρτινο φίλτρο με τη βοήθεια χωνιού και το διαυγές διάλυμα παραλήφθηκε σε νέους (μικρούς) δοκιμαστικούς σωλήνες. Όσον αφορά την αντίδραση, σε μεγαλύτερου μεγέθους δοκιμαστικούς σωλήνες προστέθηκαν:

- 3,95 ml απιονισμένου νερού
- 0,05 ml του υπερκείμενου
- 0,25 ml αντιδραστηρίου Folin-Ciocalteu

(στο τυφλό διάλυμα σε αντικατάσταση των 0,05ml του υπερκείμενου, προστέθηκαν 0,05ml υδατικού διαλύματος μεθανόλης 50%). Ακολούθησε φυγοκέντρηση (Vortex) των δειγμάτων και σταδιακή προσθήκη 0,75ml διαλύματος ανθρακικού νατρίου σε 1-8 min. Έπειτα, τα δείγματα επώαστηκαν σε θερμοκρασία δωματίου για 2h και τέλος σε 1-8 min μετρήθηκε η απορρόφηση τους στα 760nm σε φωτόμετρο (UV-1900 Shimatzu, Japan).

Η μέθοδος αυτή, ανιχνεύει το σύνολο των -OH που υπάρχουν σ' ένα διάλυμα. Βασίζεται στην ικανότητα των φαινολικών ενώσεων να ανάγουν ενώσεις του φωσφομολυβδαινικού οξέος και του φωσφοβολφραμικού οξέος που περιέχονται στο αντιδραστήριο Folin Ciocalteu. Από την τιμή της απορρόφησης των ενώσεων σε φωτόμετρο στα 760nm, προσδιορίζεται η συγκέντρωση των ολικών φαινολικών ενώσεων. Κατά την εφαρμογή της μεθόδου, γίνεται προσθήκη διαλύματος ανθρακικού

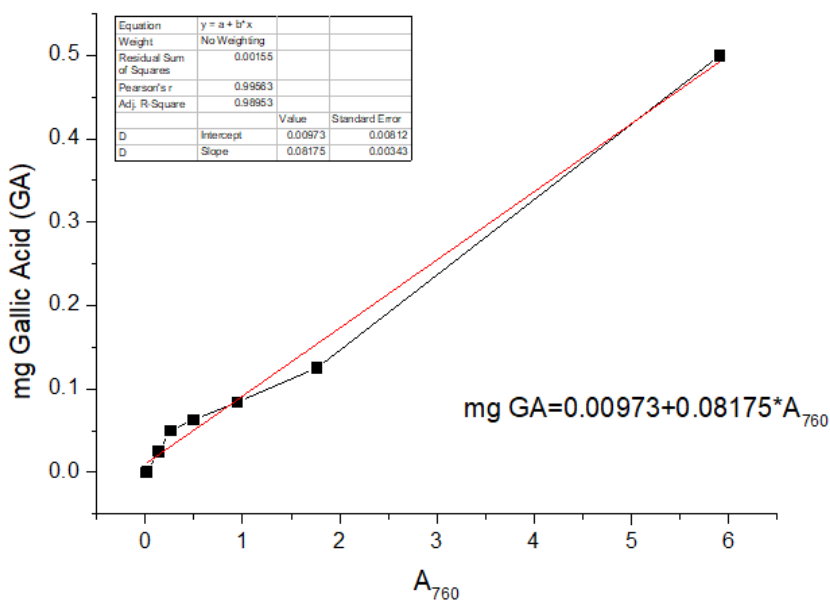
νατρίου (Na_2CO_3 Sigma Aldrich), επειδή η αναγωγική δράση των φαινολικών επιτυγχάνεται σε αναγωγικό περιβάλλον (Φυσικόπουλος & Κουτσούκος, 2011).

Ο ποσοτικός προσδιορισμός των ολικών φαινολικών γίνεται με τη βοήθεια πρότυπης καμπύλης γαλλικού οξέος (Εικόνα 5), ενώ δεν είναι δυνατή η ταυτοποίηση κάθε ένωσης ξεχωριστά. Η συγκέντρωση ολικών φαινολικών εκφράζεται σε mg ισοδύναμου γαλλικού οξέος ανά g ξηρής ουσίας (Gallic Acid Equivalents, GAE). Υπολογίζεται σύμφωνα με τον παρακάτω τύπο.

$$\text{GAE (mg/g)} = C * V/M$$

όπου

C	η τιμή GA σε mg/ml όπως προκύπτει από την πρότυπη
V	ο όγκος εκχυλίσματος που χρησιμοποιείται (50λ=0,05ml)
M	τα g του ιστού



Εικόνα 5. Πρότυπη καμπύλη φαινολικών.

Στατιστική ανάλυση

Πραγματοποιήθηκε ανάλυση της συσχέτισης μεταξύ της συγκέντρωσης των ολικών φαινολικών των φυτικών ιστών και της παραγωγής φρέσκου ιστού ή της συσσώρευσης βιομάζας (ξηρός ιστός) σε αυτούς. Καταγράφονται σε κάθε περίπτωση ο συντελεστής συσχέτισης Pearson's r και το επίπεδο σημαντικότητας p . Οι αναλύσεις συσχέτισης πραγματοποιήθηκαν στο στατιστικό πρόγραμμα SPSS (IBM SPSS Statistics v.24.0 (IBM corp.)).

5. Αποτελέσματα

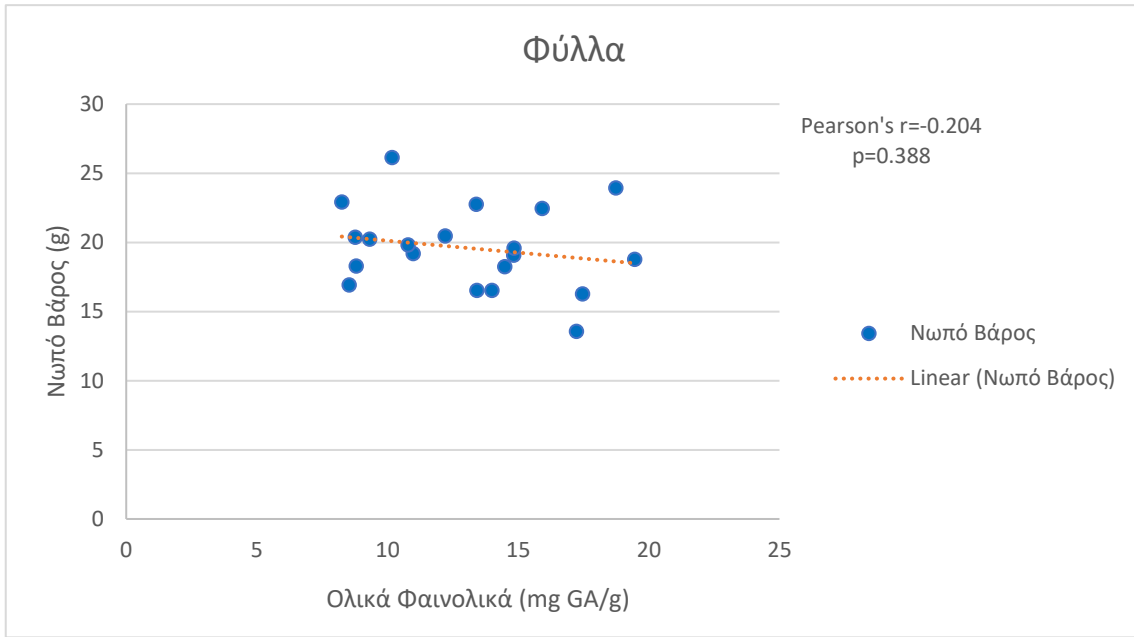
Πραγματοποιήθηκε ανάλυση της συσχέτισης μεταξύ της συγκέντρωσης των ολικών φαινολικών των φυτικών ιστών και της παραγωγής φρέσκου ιστού ή της συσσώρευσης βιομάζας (ξηρός ιστός) σε αυτούς. Οι μετρήσεις νωπού και ξηρού βάρους ήταν η εκτίμηση της ανάπτυξης των φυτών που συμμετείχαν στο πείραμα. Οι συσχετίσεις πραγματοποιήθηκαν και παρουσιάζονται για κάθε φυτικό είδος χωριστά, ως εξής:

- α) συγκέντρωση ολικών φαινολικών φύλλων με νωπό βάρος φύλλων
- β) συγκέντρωση ολικών φαινολικών φύλλων με ξηρό βάρος φύλλων
- γ) συγκέντρωση ολικών φαινολικών ρίζας με νωπό βάρος ρίζας
- δ) συγκέντρωση ολικών φαινολικών ρίζας με ξηρό βάρος ρίζας
- ε) συγκέντρωση ολικών φαινολικών φύλλων και ρίζας με νωπό βάρος όλων των φυτικών ιστών μαζί (φύλλων και ρίζας)
- στ) συγκέντρωση ολικών φαινολικών φύλλων και ρίζας με ξηρό βάρος όλων των φυτικών ιστών μαζί (φύλλων και ρίζας)

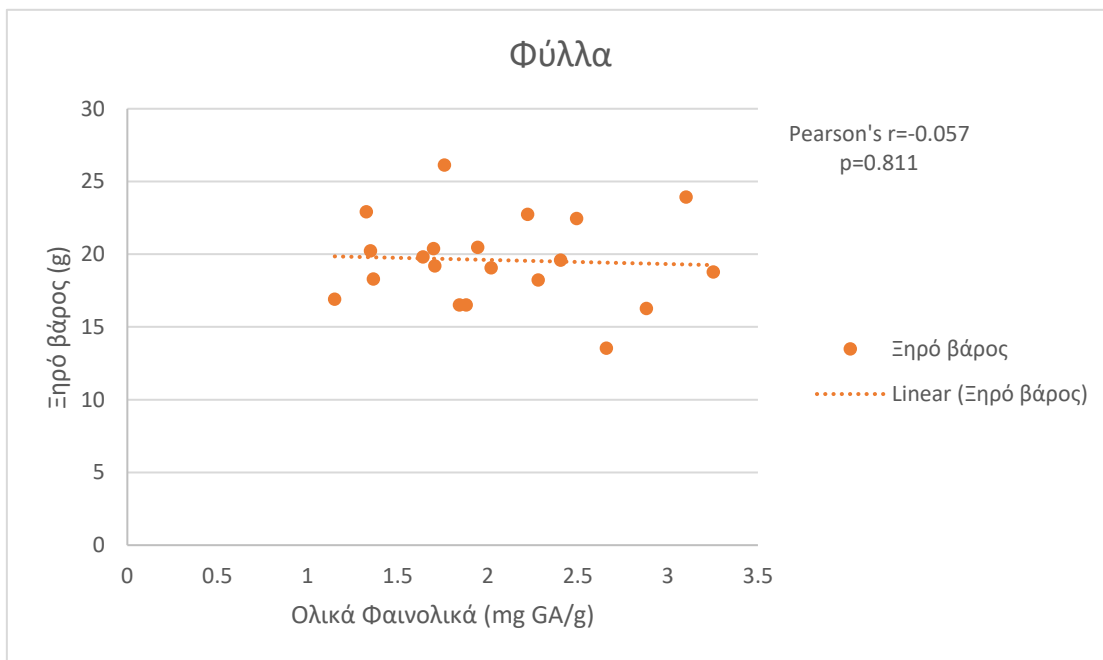
5.1 Σπανάκι

Στο σπανάκι ειδικά παρουσιάζονται μόνο τα αποτελέσματα για το υπέργειο μέρος, καθώς δεν είχαμε στη διάθεσή μας ριζικό ιστό. Στο Γράφημα 1 απεικονίζεται η συσχέτιση του νωπού βάρους του υπέργειου μέρους σπανακιού με τα ολικά φαινολικά με μία αρνητική γραμμική σχέση. Η γραμμή τάσης δείχνει μία αρνητική συσχέτιση, αλλά και στατιστικώς μη σημαντική καθώς η τιμή του συντελεστή Pearson's r είναι πολύ χαμηλή.

Στο Γράφημα 2 απεικονίζεται αντίστοιχα η συσχέτιση του ξηρού βάρους του υπέργειου σπανακιού με τα ολικά φαινολικά. Εδώ η έλλειψη συσχέτισης είναι πολύ πιο έντονη και φαίνεται από τον μηδενικό συντελεστή r και την πολύ ψηλή τιμή του p .



Γράφημα 2. Η συσχέτιση του νωπού βάρους (g) των φύλλων σπανακιού με τη συγκέντρωση των ολικών φαινολικών (σε ισοδύναμα γαλλικού οξέος, GAE, mg/g).



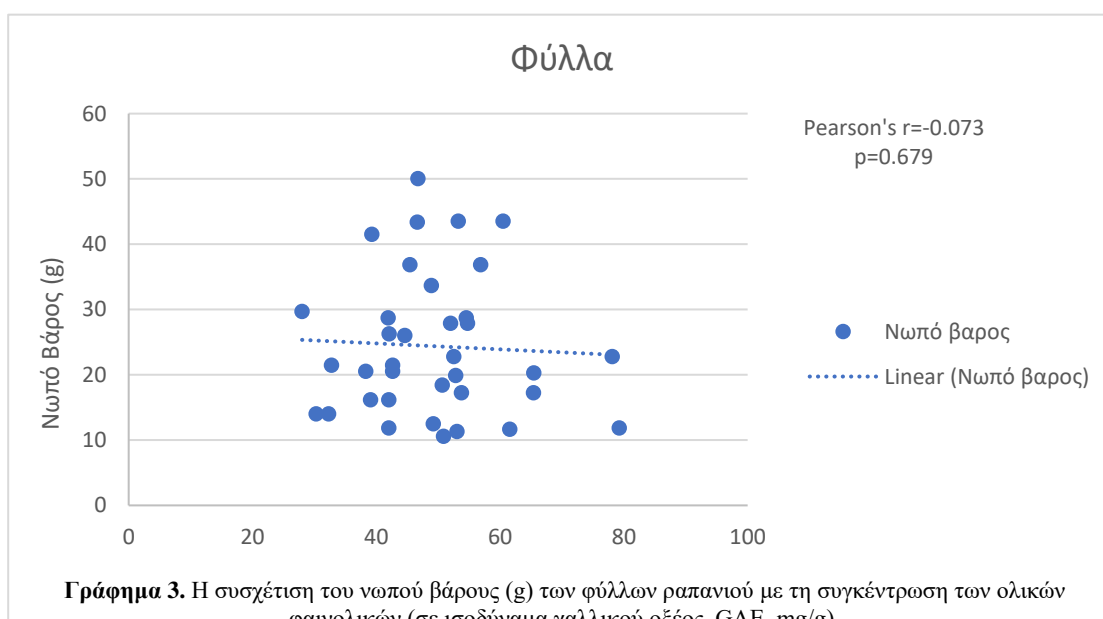
Γράφημα 3. Η συσχέτιση του ξηρού βάρους (g) των φύλλων σπανακιού με τη συγκέντρωση των ολικών φαινολικών (σε ισοδύναμα γαλλικού οξέος, GAE, mg/g).

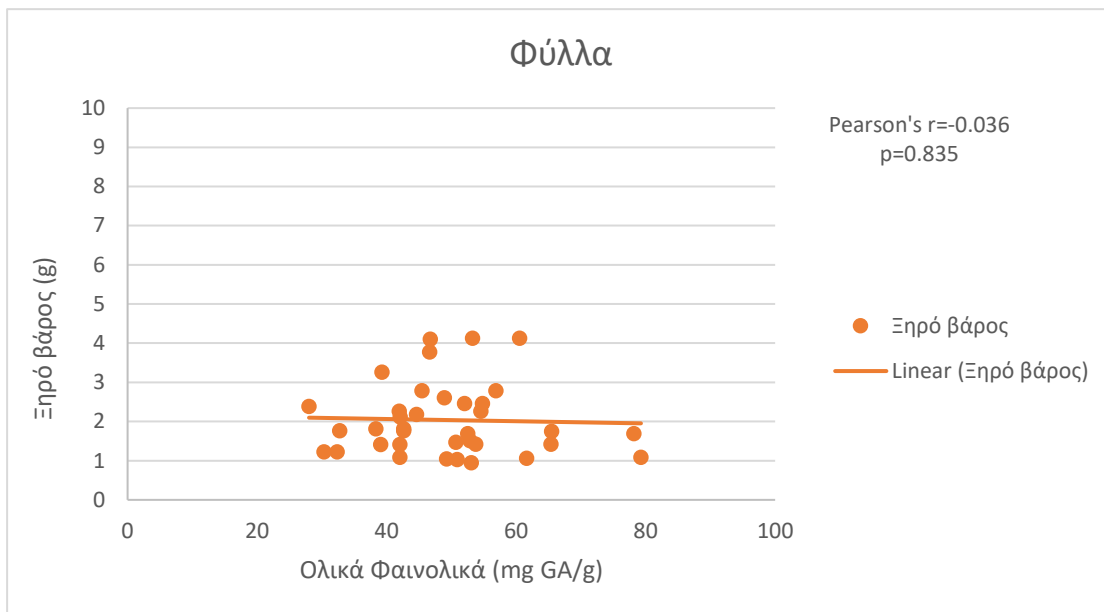
5.2 Ραπανάκι

Στο Γράφημα 3 απεικονίζεται η συσχέτιση του νωπού βάρους του υπέργειου μέρους από ραπανάκι και στο Γράφημα 4 αντίστοιχα του ξηρού βάρους με τα ολικά φαινολικά. Το νέφος των τιμών, η γραμμή τάσης που είναι σχεδόν παράλληλη με τον άξονα των X, αλλά και ο σχεδόν μηδενικός συντελεστής συσχέτισης δείχνουν ότι δεν υπάρχει συσχέτιση των επιπέδων των ολικών φαινολικών με τα βάρη των φύλλων του ραπανιού.

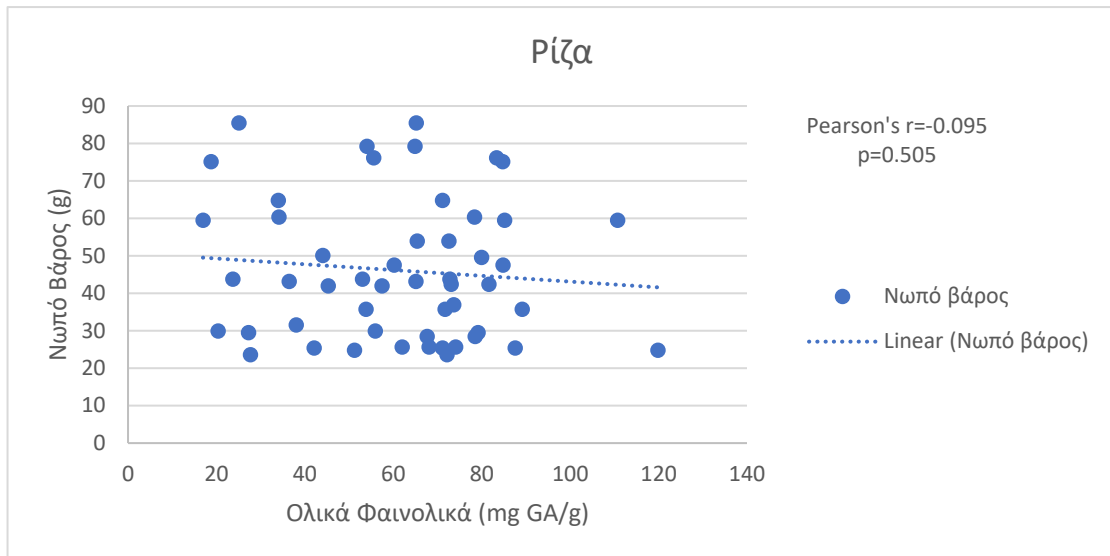
Παρόμοια εικόνα παρουσιάζει η συσχέτιση του νωπού και του ξηρού βάρους του υπόγειου μέρους του ραπανιού, όπως φαίνεται στο Γράφημα 5 και 6 αντίστοιχα με τα ολικά φαινολικά.

Μετά από αυτά τα αποτελέσματα, είναι φυσικό να μην εμφανίζονται στατιστικά σημαντικές συσχετίσεις εάν βάλουμε όλα τα δεδομένα από όλους του ιστούς σε ένα διάγραμμα, όπως έγινε στο Γράφημα 7 και 8 όπου απεικονίζεται η συσχέτιση των ολικών φαινολικών σε επίπεδο φυτού με την νωπή και ξηρή βιομάζα του φυτού αντίστοιχα.

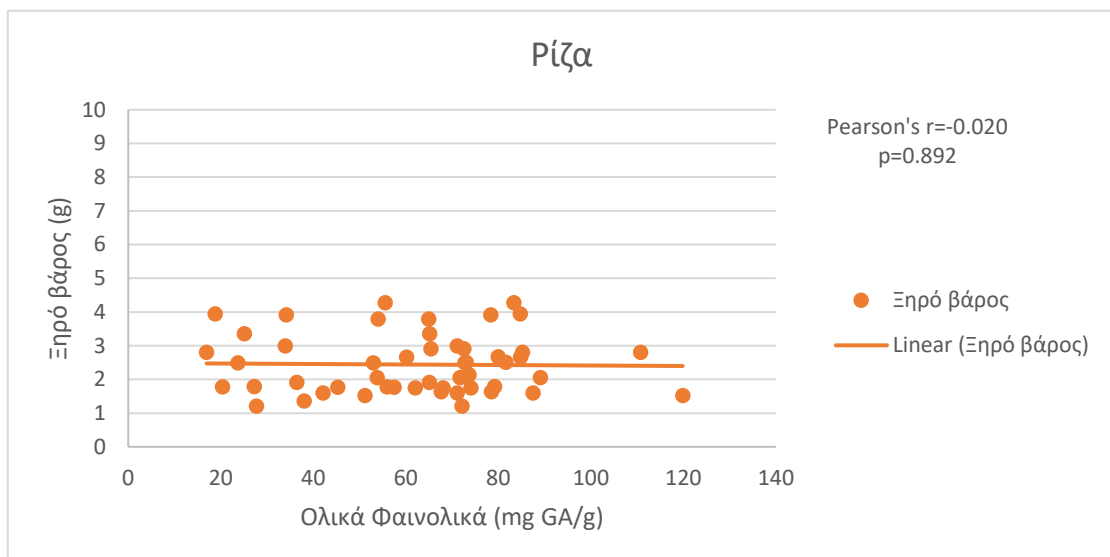




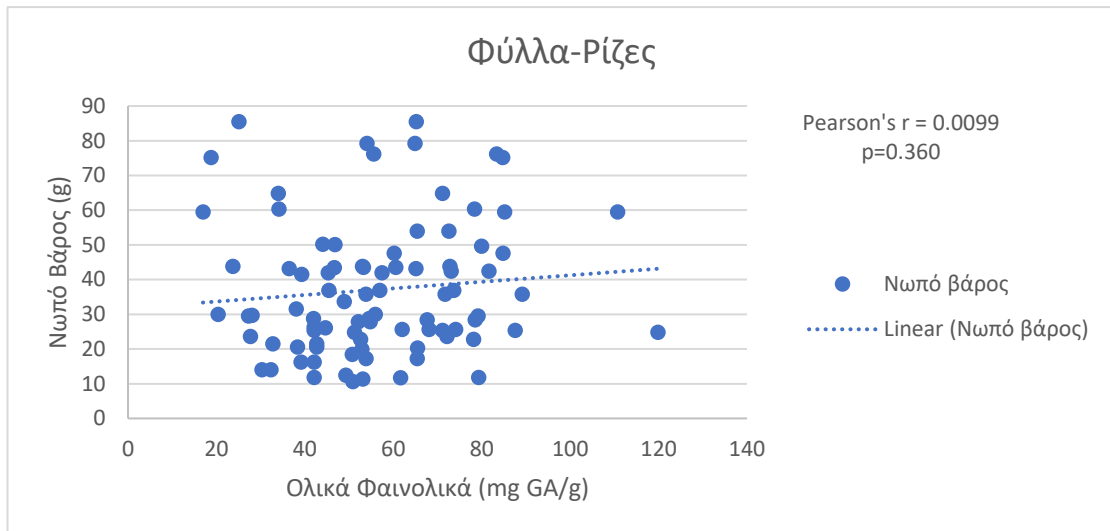
Γράφημα 4. Η συσχέτιση του ξηρού βάρους (g) των φύλλων ραπανιού με τη συγκέντρωση των ολικών φαινολικών (σε ισοδύναμα γαλλικού οξέος, GAE, mg/g).



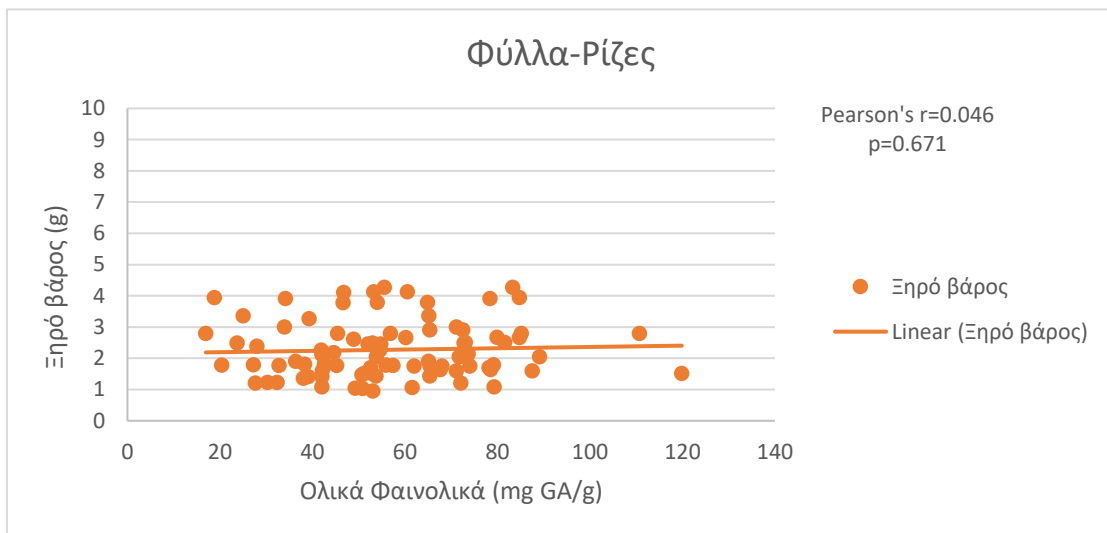
Γράφημα 5. Η συσχέτιση του νωπού βάρους (g) των ριζών ραπανιού με τη συγκέντρωση των ολικών φαινολικών (σε ισοδύναμα γαλλικού οξέος, GAE, mg/g).



Γράφημα 6. Η συσχέτιση του ξηρού βάρους (g) των ριζών ραπανιού με τη συγκέντρωση των ολικών φαινολικών (σε ισοδύναμα γαλλικού οξέος, GAE, mg/g).



Γράφημα 7. Η συσχέτιση του νωπού βάρους (g) της συνολικής βιομάζας ραπανιού με τη συγκέντρωση των ολικών φαινολικών (σε ισοδύναμα γαλλικού οξέος, GAE, mg/g).



Γράφημα 8. Η συσχέτιση του ξηρού βάρους (g) της συνολικής βιομάζας ραπανιού με τη συγκέντρωση των ολικών φαινολικών (σε ισοδύναμα γαλλικού οξέος, GAE, mg/g).

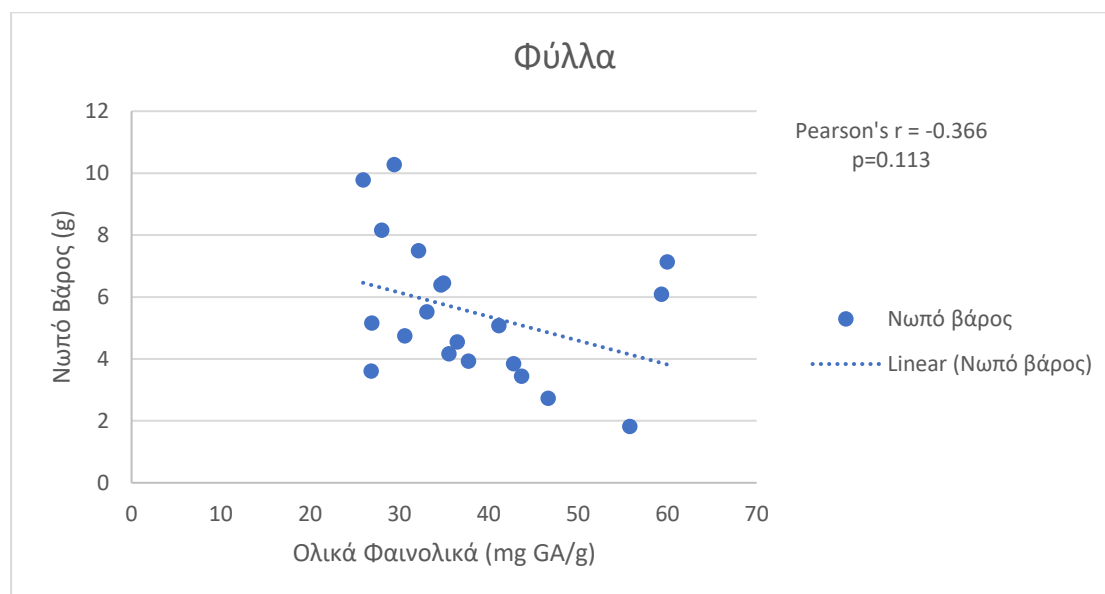
5.3 Καρότο

Στο Γράφημα 9 απεικονίζεται η συσχέτιση του νωπού βάρους του υπέργειου μέρους καρότου και στο Γράφημα 10 αντίστοιχα του ξηρού βάρους με τα ολικά φαινολικά με αρνητική γραμμική σχέση. Η γραμμή τάσης δηλαδή αποτυπώνει το γεγονός ότι όσο μεγαλύτερη ήταν η ανάπτυξη στο υπέργειο τμήμα τόσο μικρότερη ήταν η συγκέντρωση των φαινολικών οξέων σε αυτό.

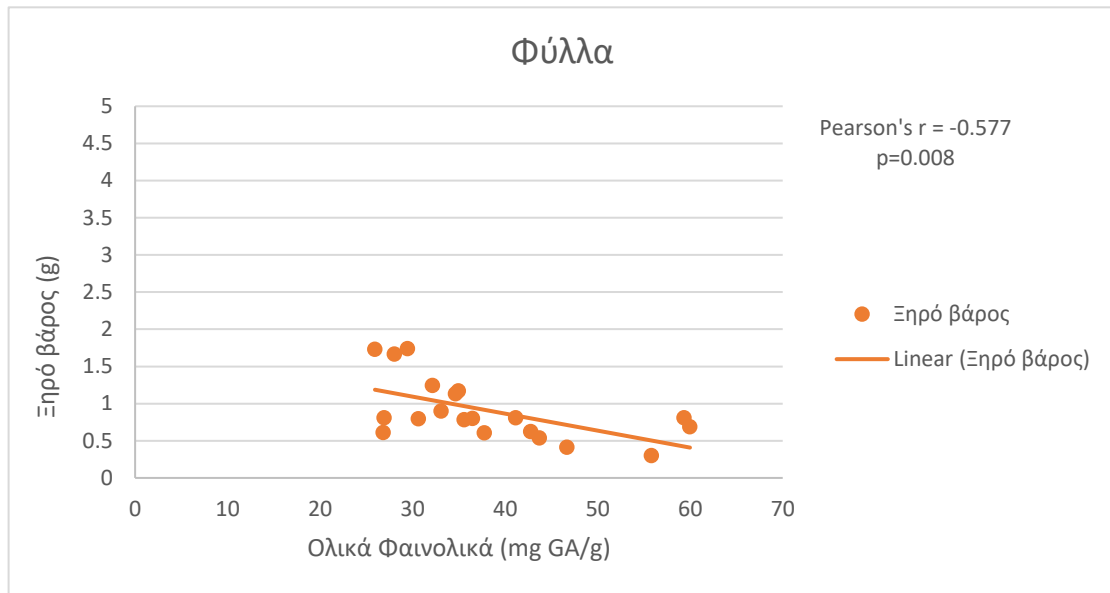
Στην περίπτωση του Γραφήματος 9, δεν υπάρχει μεγάλη συσχέτιση και αυτό φαίνεται και από το επίπεδο σημαντικότητας. Όμως στο Γράφημα 10 όπου και ο συντελεστής συσχέτισης είναι υψηλός και το επίπεδο σημαντικότητας χαμηλό, επιβεβαιώνεται ότι η συσχέτιση είναι στατιστικά σημαντική και ισχυρή.

Στατιστικά σημαντικές αρνητικές συσχετίσεις του νωπού και του ξηρού βάρους του υπόγειου μέρους του καρότου με τα ολικά φαινολικά φαίνονται στο Γράφημα 11 και 12 αντίστοιχα.

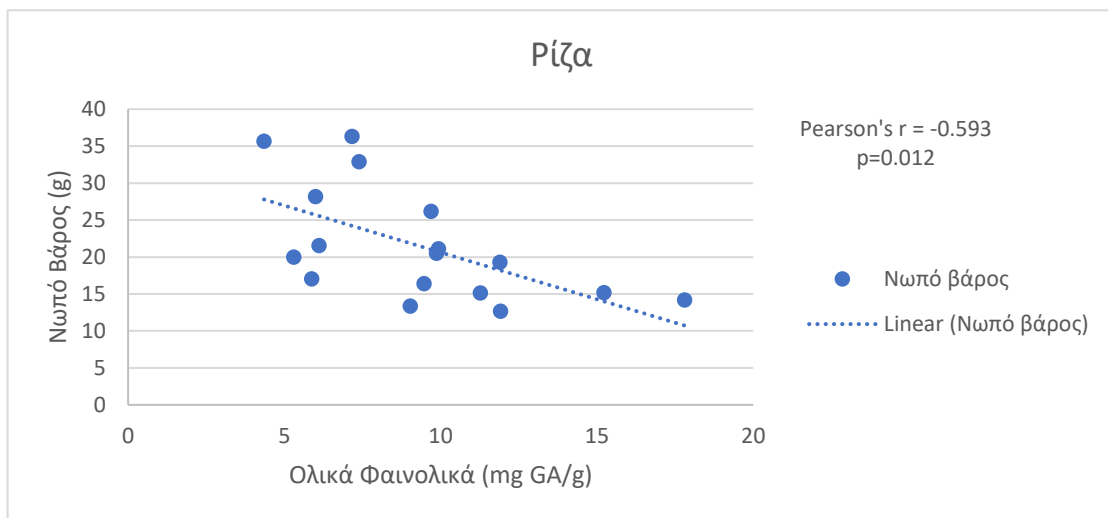
Ωστόσο, στο Γράφημα 13 και 14 απεικονίζεται η συσχέτιση των ολικών φαινολικών σε επίπεδο φυτού με την νωπή και ξηρή συνολική βιομάζα του φυτού, αντίστοιχα. Φαίνεται ότι υπάρχει μία σημαντική συσχέτιση που περιγράφεται με μία αρνητική εκθετική καμπύλη.



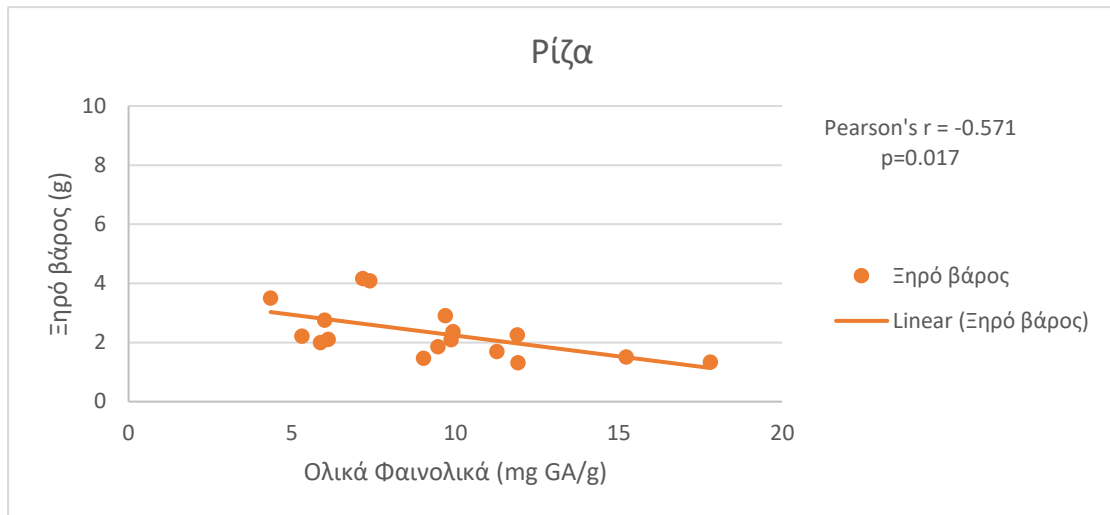
Γράφημα 9. Η συσχέτιση του νωπού βάρους (g) των φύλλων καρότου με τη συγκέντρωση των ολικών φαινολικών (σε ισοδύναμα γαλλικού οξέος, GAΕ, mg/g).



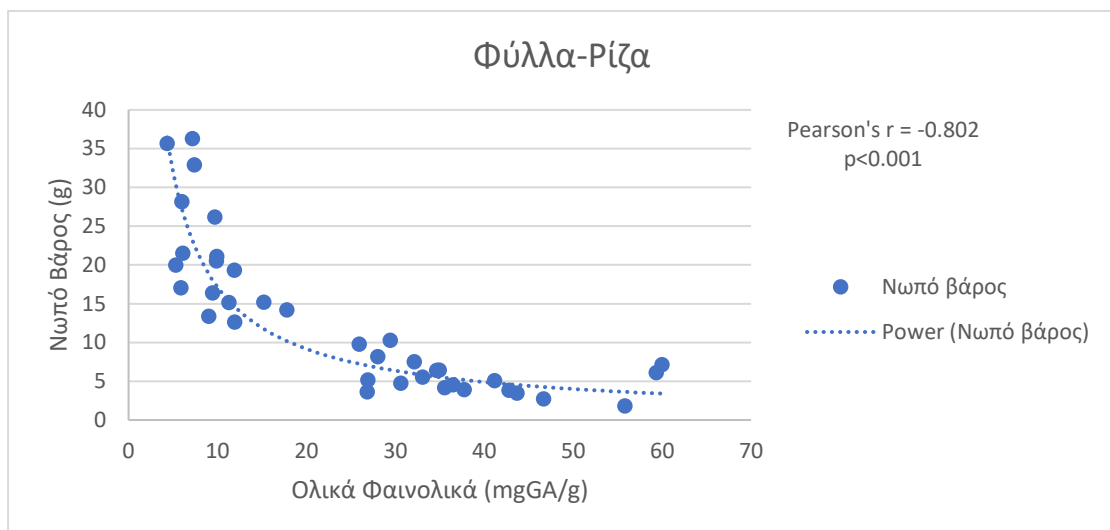
Γράφημα 10. Η σχέση του ξηρού βάρους (g) των φύλλων καρότου με τη συγκέντρωση των ολικών φαινολικών (σε ισοδύναμα γαλλικού οξέος, GAE, mg/g).



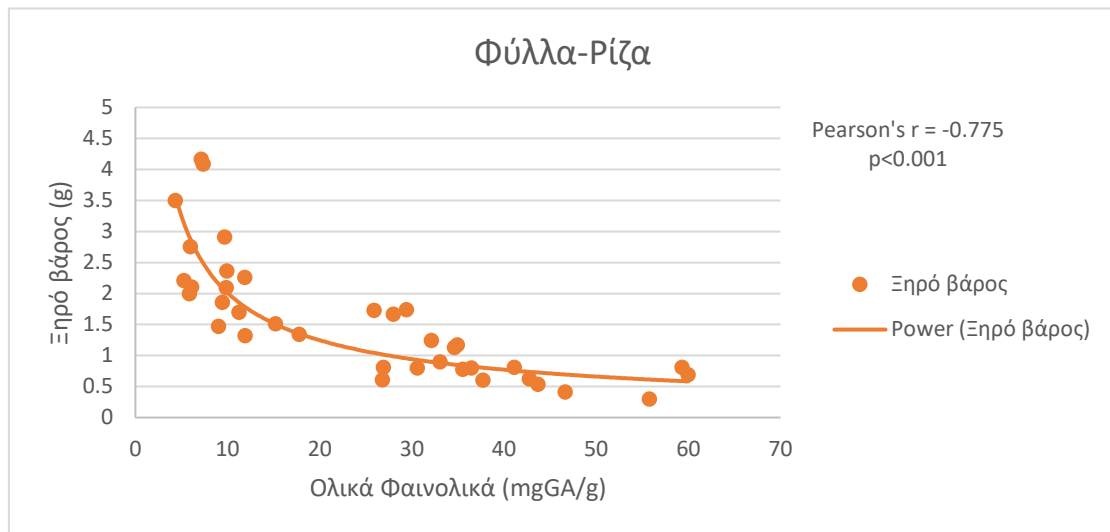
Γράφημα 11. Η συσχέτιση του νωπού βάρους (g) του υπόγειου μέρους του καρότου με τη συγκέντρωση των ολικών φαινολικών (σε ισοδύναμα γαλλικού οξέος, GAE, mg/g).



Γράφημα 12. Η σχέση του ξηρού βάρους (g) του υπόγειου μέρους καρότου με τη συγκέντρωση των ολικών φαινολικών (σε ισοδύναμα γαλλικού οξέος, GAE, mg/g).



Γράφημα 13. Η συσχέτιση του νωπού βάρους (g) της συνολικής βιομάζας καρότου με τη συγκέντρωση των ολικών φαινολικών (σε ισοδύναμα γαλλικού οξέος, GAE, mg/g).



Γράφημα 14. Η συσχέτιση του ξηρού βάρους (g) της συνολικής βιομάζας καρότου με τη συγκέντρωση των ολικών φαινολικών (σε ισοδύναμα γαλλικού οξέος, GAE, mg/g).

6. Συζήτηση

Τα δείγματα καρότου και ραπανιού που εξετάστηκαν όπως αναφέρθηκε και στην ενότητα υλικά και μέθοδοι, προέρχονταν από πειράματα όπου έλαβαν νερό άρδευσης που είχε αυξημένη συγκέντρωση μικροκυστινών σε διάφορα στάδια ανάπτυξης. Στα φυτά σπανακιού χορηγούνταν το ίδιο νερό άρδευσης είτε με ριζοπότισμα είτε με ψεκασμό. Όλα τα φυτά που ήταν καταπονημένα λόγω των αυξημένων συγκεντρώσεων μικροκυστινών και είχαν προβληματική ανάπτυξη, τόσο στο υπέργειο όσο και στο υπόγειο μέρος τους.

Από τα αποτελέσματα των βιοχημικών μετρήσεων του πειράματος, φαίνεται ότι το κάθε φυτικό είδος που εξετάστηκε είχε διαφορετική στρατηγική απέναντι στην καταπόνηση από τις υψηλές συγκεντρώσεις μικροκυστινών.

Στο ραπανάκι, τόσο στο υπέργειο όσο και στο υπόγειο μέρος του δεν φάνηκε να υπάρχει οποιαδήποτε συσχέτιση της συσσώρευσης φαινολικών με την ανάπτυξη. Οι συντελεστές συσχέτισης ήταν πολύ κοντά στο μηδέν. Το ίδιο αποτέλεσμα βρέθηκε και στα φύλλα σπανακιού. Όπως ανέφερε η Τσουμαλάκου (2017) το πότισμα των φυτών σπανακιού με νερό πλούσιο σε μικροκυστίνες, όπως είναι της Κάρλας, μείωσε σημαντικά την ανάπτυξή τους. Παρά το ότι υπήρχε λοιπόν μείωση ανάπτυξης, αυτή δεν συσχετίστηκε με αύξηση της συγκέντρωσης των φαινολικών.

Το καρότο ήταν το μόνο φυτό όπου συσχετίστηκε η συγκέντρωση των φαινολικών του με την ανάπτυξη και μάλιστα με μία σημαντική αρνητική συσχέτιση. Στατιστικά σημαντικές λοιπόν συσχετίσεις φάνηκαν μεταξύ των φαινολικών και του ξηρού βάρους υπέργειου, νωπού και ξηρού βάρους ρίζας. Οι πιο σημαντικές όμως συσχετίσεις εμφανίστηκαν όταν μπήκαν στην ανάλυση όλοι οι ιστοί (υπόγειο και υπέργειο). Εκεί ο συντελεστής Pearson's r έφτασε σε τιμές μέχρι -0.802 , που είναι πολύ σημαντική συσχέτιση. Συμπερασματικά λοιπόν φαίνεται πως τα δείγματα του καρότου που εξετάστηκαν, όσο μικρότερη ανάπτυξη είχαν, τόσο περισσότερα φαινολικά συσσώρευσαν στους ιστούς τους. Από την άλλη πλευρά όσο καλύτερα ανεπτυγμένα ήταν τα φυτά, τόσο χαμηλότερες ήταν οι συγκεντρώσεις των φαινολικών στους ιστούς τους, άρα πρόκειται για μία αρνητική σχέση μεταξύ των δύο παραμέτρων. Η Παπαδημητρίου (2018) επιβεβαιώνει ότι το νερό με μικροκυστίνες αποτέλεσε μία σοβαρή καταπόνηση για τα φυτά καρότου και μάλιστα, όσο πιο νωρίς στην ζωή τους άρχιζαν να ποτίζονται με αυτό τόσο μεγαλύτερα προβλήματα είχαν στην ανάπτυξή τους.

Το συγκεκριμένο συμπέρασμα επιβεβαιώνεται από τη μελέτη των Karabourniotis et al. (2014), οι οποίοι υποστηρίζουν πως η συγκέντρωση των φαινολικών ενώσεων αυξάνεται σε ένα φυτό ως πρόσθετος αμυντικός μηχανισμός σε καταστάσεις καταπόνησης του φυτού. Πέρα από τις καταπονήσεις των φυτών λόγω της υπεριώδους ακτινοβολίας ή της ξηρασίας, ο «μηχανισμός» των φαινολικών ενώσεων «ενεργοποιείται» και σε καταστάσεις οξειδωτικού στρες των φυτών, όπως πιθανώς συνέβη και στα φυτά που είχαν αρδευτεί με νερό πλούσιο σε μικροκυστίνες. Πιο συγκεκριμένα, οι Karabourniotis et al. (2014) βρήκαν πως η συγκέντρωση των φαινολικών στο φυτό έχει αρνητική συσχέτιση με τη φωτοσυνθετική ικανότητα. Η φωτοσυνθετική ικανότητα όμως είναι άμεσα συνδεδεμένη με την αύξηση και την ανάπτυξη του φυτού και έμμεσα με τη βιομάζα του. Έτσι λοιπόν όταν ένα φυτό βρίσκεται σε κατάσταση στρες, επιλέγει να αυξήσει τις φαινολικές του ενώσεις σε βάρος της αύξησης των αποθεμάτων του σε άνθρακα (και αντιστρόφως), συνεπώς σε βάρος της ανάπτυξής του. Πρόκειται για την απόκριση του φυτού στο γνωστό «δίλημμα»: ανάπτυξη ή άμυνα. Με αυτή τη διαδικασία λοιπόν, γίνεται κατανοητό το γεγονός κατά το οποίο τα δείγματα φυτών καρότου-ραπανακίου-σπανακιού που προέρχονταν από πειράματα καταπόνησης είχαν τα ανάλογα αποτελέσματα ανάπτυξης, βιομάζας – φαινολικών ενώσεων.

7. Συμπεράσματα

- Το καρότο ήταν το μόνο φυτό όπου συσχετίστηκε η συγκέντρωση των φαινολικών του με την ανάπτυξη και μάλιστα με μία πολύ σημαντική αρνητική συσχέτιση.
- Πιο σημαντική ήταν η συσχέτιση όταν περιλήφθηκαν όλοι οι ιστοί-υπόγειοι και υπέργειοι- του καρότου.
- Στο ραπανάκι και στο σπανάκι δεν υπήρξε συσχέτιση φαινολικών-ανάπτυξης ούτε για τους υπέργειους ιστούς, ούτε για τις ρίζες.
- Το καρότο είναι το μόνο από τα φυτά που εξετάστηκαν στο οποίο επιβεβαιώθηκε ο ανταγωνισμός μεταξύ ανάπτυξης και άμυνας.

8. Βιβλιογραφία

- Agati, G., Azzarello, E., Pollastri, S., Tattini, M. (2012). Flavonoids as antioxidants in plants: location and functional significance, *Plant Sci.* 67–76.
- Agati, G., Stefano, G., Biricolti, S., Tattini, S. (2009). Mesophyll distribution of antioxidant flavonoids in *Ligustrum vulgare* leaves under contrasting sunlight irradiance. *Ann. Bot.* 104, 853–861.
- Cao, Q., Steinman, A.D., Yao, L., Xie, L. (2017). Increment of root membrane permeability caused by microcystins result in more elements uptake in rice (*Oryza sativa*). *Ecotoxicol. Environ. Saf.* 145, 431–435.
- Corbel, S., Mougín, C., Nlieu, S., Delarue, G., Bouacha, N. (2016). Evaluation of the transfer and the accumulation of microcystins in tomato (*Solanum lycopersicum* cultivar MicroTom) tissues using a cyanobacterial extract containing microcystins and the radiolabeled microcystin-LR (14C-MC-LR). *Sci. Total Environ.* 541, 1052–1058.
- Demmig-Adams, B. and Adams, W.W. III. (1996). The role of xanthophyll cycle carotenoids in the protection of photosynthesis. *Trends Plant Sci.* 1, 21-26.
- Ferreres, F., Gil-Izquierdo, A., Vinholes, J., Grosso, C., Valentão, P., Andrade, P.B. (2011). Approach to the study of C-glycosyl flavones acylated with aliphatic and aromatic acids from *Spergularia rubra* by high performance liquid chromatography-photodiode array detection/ electrospray ionization multi-stage mass spectrometry. *Rapid Commun Mass Spectrom.* 25, 700–712.
- Freitas, M., Azevedo, J., Pinto, E., Neves, J., Campos, A., Vasconcelos, V., (2015). Effects of microcystin-LR, cylindrospermopsin and a microcystin-LR/cylindrospermopsin mixture on growth, oxidative stress and mineral content in lettuce plants (*Lactuca sativa* L.). *Ecotoxicol. Environ. Saf.* 116, 59–67.
- Hagerman, A.E., Riedl, K.M., Jones, G.A., Sovik, K.N., Ritchard, N.T., Hartzfeld, P.W., Riechel T.L. (1998). High molecular weight plant polyphenolics (tannins) as biological antioxidants. *J. Agric. Food Chem.*, 46, 1887-1892.
- Haukioja, E., Ossipov, V., Koricheva, J. et al. (1998). Biosynthetic origin of carbon-based secondary compounds: cause of variable responses of woody plants to fertilization? *Chemoecology.* 8, 133-139.
- Herms, D.A., Mattson, W.J., (1992). The dilemma of plants: to grow or defend, *Q. Rev. Biol.* 67, 283–335.

- Karabourniotis, G., Liakopoulos, G., Nikolopoulos, D., Bresta, P., Stavroulaki, V., Sumbele, S. (2014). Carbon gain vs. water saving, growth vs. defence: two dilemmas with soluble phenolics as a joker. *Plant Sci.* 227, 21–27.
- Karioti, A. et al., (2010). Erinea formation on *Quercus ilex* leaves: anatomical, physiological and chemical responses of leaf hairs against mite attack, *Phytochemistry* 72, 230–237.
- Lattanzio, V., Lattanzio, V.M.T., Cardinali, A. (2006). Role of phenolics in the resistance mechanisms of plants against fungal pathogens and insects, in: F. Imperato (Ed.), *Phytochemistry: Advances in Research*, Research Signpost, Kerala, 23–67.
- Levizou, E., Papadimitriou, T., Papavasileiou, E., Papadimitriou, N., & Kormas, K. A. (2020). Root vegetables bioaccumulate microcystins-LR in a developmental stage-dependent manner under realistic exposure scenario: The case of carrot and radish. *Agric. Water Manag.* 240.
- Levizou, E., Statoris, G., Papadimitriou, T., Laspidou, C.S., Kormas, K.A. (2017). Lettuce facing microcystins-rich irrigation water at different developmental stages: effects on plant performance and microcystins bioaccumulation. *Ecotoxicol. Environ. Saf.*
- Makris, D.P., Kallithraka, S., Kefalas P. (2006). Flavonols in grapes, grape products and wines: burden, profile and influential parameters. *J Food Compos Anal.* 19, 396-404.
- Morton LW, Caccetta RA, Puddey IB, Croft, KD. (2000). Chemistry and biological effects of dietary phenolic compounds: relevance to cardiovascular disease. *Clin Exp Pharmacol Physiol.* 27, 152–159.
- Niyogi, KK. (1999). Photoprotection revisited: genetic and molecular approaches. *Annu Rev Plant Physiol Plant Mol Biol.* 50, 333–359.
- Rani, R., Arora, S., Kaur, J. and Manhas, R.K. (2018). Phenolic compounds as antioxidants and chemopreventive drugs from *Streptomyces cellulosa* strain TES17 isolated from rhizosphere of *Camellia sinensis*. *BMC Complement Altern Med.* 18, 82.
- Robbins, R.J. (2003). Phenolic acids in foods: An overview of analytical methodology. *J Agric Food Chem.* 51, 2866-2887.
- Schreiner, M., et al. (2012). UV-B-induced secondary plant metabolites – potential benefits for plant and human health. *Crit. Rev. Plant Sci.* 31, 229–240.

- Taiz, L., Zeiger, E., Møller, IM., Murphy, A (eds) (2018) Plant physiology and development, 6th edn. Oxford University Press, New York
- Urquiaga, I and Leighton, F. (2000). Plant polyphenol antioxidants and oxidative stress. Biol Res. 33, 55-64.
- Waterman, P.G., Mole, S. (1994). Analysis of Phenolic Plant Metabolites, Blackwell Sci. Publ., Oxford.
- Wu, S, Chappell, J. (2008). Metabolic engineering of natural products in plants; tools of the trade and challenges for the future. Curr Opin Biotechnol. 19, 145–152
- Zhang, WJ., Björn, LO. (2009). The effect of ultraviolet radiation on the accumulation of medicinal compounds in plants. Fitoterapia. 80, 207–218.
- Καραμπουρνιώτης, Γ. (2012). Φυσιολογία Καταπονήσεων των Φυτών. Εκδόσεις Έμβρυο.
- Παπαβασιλείου Ελένη, (2018). Επίδραση νερού πλούσιου σε κυανοτοξίνες στο καρότο και έλεγχος της δυνατότητας επαναφοράς. Προπτυχιακή Διπλωματική Εργασία στο Τμήμα Γεωπονίας Φυτικής Παραγωγής και Αγροτικού Περιβάλλοντος, Πανεπιστήμιο Θεσσαλίας, Βόλος.
- Τσουμαλάκου Ευαγγελία, (2017). Αρδευτικό νερό πλούσιο σε κυανοτοξίνες εφαρμόζεται με ψεκασμό σε καλλιέργεια σπανακιού (*Spinacia oleracea* L.): επιδράσεις σε μορφο-ανατομικά χαρακτηριστικά και φυσιολογικές λειτουργίες του φυτού. Μεταπτυχιακή Διατριβή Ειδίκευσης στο ΠΜΣ «Αειφόρος Αγροτική Παραγωγή και Διαχείριση Περιβάλλοντος» του Τμήματος Γεωπονίας Φυτικής Παραγωγής και Αγροτικού Περιβάλλοντος, Πανεπιστήμιο Θεσσαλίας, Βόλος.
- Φυσικόπουλος, Δ., Κουτσούκος, Π., (2011). Φυσικοχημική μελέτη κρυστάλλωσης φαινολών και ανάκτησης τους από υγρό απόβλητο ελαιοτριβείου, Τμήμα Χημικών Μηχανικών Πανεπιστημίου Πατρών