



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

ΠΡΟΠΤΥΧΙΑΚΗ ΔΙΠΛΩΜΑΤΙΚΗ ΔΙΑΤΡΙΒΗ

**«Επίδραση νερού πλούσιου σε κυανοτοξίνες στο καρότο και έλεγχος
της δυνατότητας επαναφοράς»**

ΠΑΠΑΒΑΣΙΛΕΙΟΥ ΕΛΕΝΗ

ΕΠΙΒΛΕΠΟΥΣΑ ΚΑΘΗΓΗΤΡΙΑ: ΛΕΒΙΖΟΥ ΕΥΘΥΜΙΑ

Βόλος, 2018

“ΕΠΙΔΡΑΣΗ ΝΕΡΟΥ ΠΛΟΥΣΙΟΥ ΣΕ ΚΥΑΝΟΤΟΞΙΝΕΣ ΣΤΟ ΚΑΡΟΤΟ ΚΑΙ ΕΛΕΓΧΟΣ ΤΗΣ ΔΥΝΑΤΟΤΗΤΑΣ ΕΠΑΝΑΦΟΡΑΣ”

Παπαβασιλείου Ελένη

Επιβλέπουσα καθηγήτρια

Λεβίζου Ευθυμία

Επίκουρος Καθηγήτρια Φυσιολογίας Φυτών, Τμήμα Γεωπονίας Φυτικής Παραγωγής και Αγροτικού Περιβάλλοντος, Πανεπιστήμιο Θεσσαλίας

Μέλη επιτροπής

Αντωνιάδης Βασίλειος

Επίκουρος Καθηγητής Εφαρμοσμένης Εδαφολογίας, Τμήμα Γεωπονίας Φυτικής Παραγωγής και Αγροτικού Περιβάλλοντος, Πανεπιστήμιο Θεσσαλίας

Κορμάς Κωνσταντίνος

Καθηγητής Οικολογίας Υδρόβιων Οργανισμών, Τμήμα Γεωπονίας Ιχθυολογίας και Υδάτινου Περιβάλλοντος

Ευχαριστίες

Η παρούσα πτυχιακή διατριβή πραγματοποιήθηκε στο εργαστήριο Ζιζανιολογίας του Τμήματος Γεωπονίας Φυτικής Παραγωγής και Αγροτικού Περιβάλλοντος, υπό την επίβλεψη της κ.Λεβίζου Ευθυμίας Επίκουρος Καθηγήτρια Φυσιολογίας Φυτών. Θα ήθελα πρωταρχικά να ευχαριστήσω την κ.Λεβίζου για τον πολύτιμο χρόνο που αφιέρωσε, την βοήθεια που μου προσέφερε και την εμπιστοσύνη που μου έδειξε για την διεξαγωγή του πειράματος αλλά κυρίως για την σωστή καθοδήγησή της, τον σωστό προγραμματισμό του πειράματος και τον εμπλουτισμό του με νέες ιδέες και μεθόδους κατά την διάρκεια του πειράματος.

Επίσης, θα ήθελα να ευχαριστήσω τον κ. Αντωνιάδη Βασίλειο Επίκουρο Καθηγητή Εφαρμοσμένης Εδαφολογίας στο Τμήμα Γεωπονίας Φυτικής Παραγωγής και Αγροτικού Περιβάλλοντος, Πανεπιστήμιο Θεσσαλίας καθώς και τον κ. Κορμά Κωνσταντίνο Καθηγητή Οικολογίας Υδρόβιων Οργανισμών στο Τμήμα Γεωπονίας Ιχθυολογίας και Υδάτινου Περιβάλλοντος που βοήθησαν στην διεξαγωγή του πειράματος και στην ολοκλήρωση της παρούσας πτυχιακής διατριβής.

Επίσης θα ήθελα να ευχαριστήσω τον κ. Υψηλάντη Ιωάννη Επίκουρο Καθηγητή Εδαφολογίας του Τμήματος Γεωπονίας, Δασολογίας και Φυσικού Περιβάλλοντος του Αριστοτελείου Πανεπιστημίου Θεσσαλονίκης για την πολύτιμη βοήθειά του στην ολοκλήρωση του πειράματος αλλά και την υπομονή του.

Επίσης, θα ήθελα να ευχαριστήσω για την πολύτιμη βοήθεια του, τον συμφοιτητή μου, Παπαδημητρίου Νικόλαο με τον οποίο συνεργαστήκαμε καθ' όλη την διάρκεια του πειράματος.

Τέλος, θα ήθελα να ευχαριστήσω την οικογένειά μου και τους φίλους μου για την πολύτιμη βοήθειά τους και την υποστήριξη τους.

Περιεχόμενα

Περίληψη.....	6
Abstract.....	8
1. Εισαγωγή.....	9
1.1 Κυανοβακτήρια.....	9
1.2 Κυανοτοξίνες.....	9
1.2.1 Μικροκυστίνες.....	10
1.3 Μικροκυστίνες και φυτό.....	11
1.4 Επιπτώσεις στην ανθρώπινη υγεία.....	12
1.5 Νερό πλούσιο σε μικροκυστίνες στον ταμιευτήρα της Κάρλας.....	13
1.6 Σκοπός της εργασίας.....	15
2. Υλικά και Μέθοδοι.....	16
2.1 <i>Daucus carota</i> (L.) <i>subsp sativus</i> (Hoffm).....	16
2.2 Πειραματικός σχεδιασμός.....	16
2.3 Καθορισμός της ποσότητας άρδευσης και λιπάσματος.....	19
2.4 Τελική συλλογή.....	19
2.5 Καταμέτρηση μυκόρριζων.....	20
2.6 Προσδιορισμός ολικών φαινολικών.....	21
2.6.1 Διαδικασία.....	22
2.6.2 Αντίδραση.....	22
2.6.3 Πρότυπη καμπύλη φαινολικών.....	22
2.7 Προσδιορισμός προλίνης.....	23
2.7.1 Διάλυμα.....	24
2.7.2 Διαδικασία.....	24
2.8 Στατιστική επεξεργασία.....	25
3. Αποτελέσματα.....	26
3.1 Τελική συλλογή: μορφολογικά χαρακτηριστικά.....	27

3.2 Τελική συλλογή: καταμέτρηση μυκορριζικών αποικισμών.....	35
3.3 Τελική συλλογή: βιοχημικές παράμετροι.....	36
3.3.1 Ολικά φαινοτικά.....	36
3.3.2 Προλίνη.....	36
4. Συζήτηση.....	37
4.1 Γενικά.....	37
4.2 Επίδραση στην φυτρωτική ικανότητα των σπόρων.....	37
4.3 Επίδραση στα μορφολογικά χαρακτηριστικά του καρότου.....	37
4.4 Επίδραση μικροκυστινών στα βιοχημικά χαρακτηριστικά του καρότου.....	39
5. Συμπεράσματα.....	40
6. Βιβλιογραφία.....	41
6.1 Ξενόγλωσση βιβλιογραφία.....	41
6.2 Διαδικτυακή βιβλιογραφία.....	44
6.3 Ελληνική βιβλιογραφία.....	44

Περίληψη

Στην παρούσα εργασία μελετήθηκε η επίδραση της άρδευσης καρότων με νερό προερχόμενο από τον Ταμιευτήρα της Κάρλας το οποίο είναι πλούσιο σε κυανοτοξίνες και ειδικότερα σε μικροκυστίνες, σε διαφορετικά αναπτυξιακά στάδια των φυτών. Το πείραμα διεξήχθη σε ρεαλιστικές πειραματικές συνθήκες σε ότι αφορά τις συγκεντρώσεις των τοξινών, τη μεγάλη αναπτυξιακή/πειραματική περίοδο που διήρκεσε από τη σπορά μέχρι την τελική συγκομιδή (περίπου 4 μήνες) και τη χρήση εδάφους ως υπόστρωμα ανάπτυξης των φυτών. Οι μεταχειρίσεις των φυτών ήταν τέσσερις: α) φυτά που αρδεύονταν σε όλη την αναπτυξιακή περίοδο με νερό βρύσης και αποτελούσαν τους μάρτυρες του πειράματος (C), β) φυτά που αρδεύονταν σε όλη την αναπτυξιακή περίοδο με νερό Κάρλας (S), γ) φυτά που αρδεύονταν με νερό βρύσης μέχρι την εμφάνιση του τέταρτου πραγματικού φύλλου και έπειτα από αυτό το στάδιο αρδεύονταν με νερό του Ταμιευτήρα της Κάρλας (4L) και δ) φυτά που αρδεύονταν με νερό πλούσιο σε μικροκυστίνες από την σπορά μέχρι περίπου δύο μήνες μετά, ενώ στο υπόλοιπο μισό του πειράματος αρδεύονταν με νερό βρύσης (R). Μετά την συγκομιδή των φυτών στο εμπορεύσιμο στάδιο πραγματοποιήθηκαν μορφολογικές και βιοχημικές μετρήσεις, ενώ καταγράφηκε και το ποσοστό μυκορριζικού αποικισμού σε κάθε μεταχείριση. Οι μορφολογικές παρατηρήσεις ήταν η μέτρηση της ξηρής και νωπής βιομάζας υπέργειου και υπόγειου τμήματος αλλά και το μήκος, το πλάτος και τον όγκο της κονδυλόριζας. Τα αποτελέσματα των μετρήσεων αυτών ήταν ότι το επιβαρυμένο με μικροκυστίνες νερό επηρέασε δυσμενώς τη φύτευση των σπόρων αλλά και την μετέπειτα ανάπτυξη των καρότων. Τα φυτά της μεταχείρισης S είχαν σταθερά τις μικρότερες τιμές σε όλες τις αναπτυξιακές και βιοχημικές παραμέτρους που καταγράφηκαν στο παρόν πείραμα. Αντιθέτως, τα φυτά 4L στις περισσότερες μετρηθείσες παραμέτρους εμφάνισαν τιμές χαμηλότερες μεν, αλλά χωρίς σημαντικές διαφορές, από τους μάρτυρες. Διαπιστώθηκε λοιπόν ότι όσο πιο νωρίς κατά τα αρχικά στάδια σπόρου ή αρτίβλαστου έρθουν σε επαφή τα φυτά με το νερό Κάρλας τόσο εντονότερη είναι η αρνητική του επίδραση, άρα τόσο μικρότερη είναι η ανάπτυξη τους. Σε ότι αφορά τη δυνατότητα επαναφοράς, διαπιστώθηκε ότι παρότι σε κάποιο βαθμό υπήρξε και τα φυτά R πλησίασαν τις τιμές παραμέτρων των φυτών μαρτύρων τουλάχιστον όσον αφορά το μέγεθος της κονδυλόριζας, η επαναφορά αυτή δεν ήταν πλήρης. Τέλος, δεν καταγράφηκαν διαφορές μεταξύ των μεταχειρίσεων ως προς τον μυκορριζικό

αποικισμό στις ρίζες των καρότων καθώς και σε βιοχημικές παραμέτρους, συγκεκριμένα την προλίνη και τα ολικά φαινολικά.

Abstract

This study investigated the effect of carrots irrigation with water from the Karla Reservoir, which is rich in cyanotoxins and especially microcystins, at different stages of growth of plants. The experiment was conducted in realistic experimental conditions with respect to the concentrations of toxins, the long developmental / experimental period that ran from sowing to the final harvest (about 4 months) and the use of soil as a substrate for plant growth. Plant treatments were four: a) plants irrigated throughout the developmental period with tap water and consisted of the experiment (C), b) plants irrigated throughout the developmental period with Karla water (S), c) plants which were irrigated with tap water until the appearance of the fourth real leaf and then irrigated with water from Karla Reservoir (4L) and d) plants irrigated with water rich in microcystins from sowing, up to almost two months afterwards, whereas in the remainder half of the experiment was irrigated with tap water (R). After the harvesting of the plants at commercial stage morphological and biochemical measurements were performed, while the percentage of mycorrhizal colonization was recorded in each treatment. The morphological observations were the measurement of the dry and fresh biomass of the ground and underground section of the plant, but also the length, width and volume of the taproot. The results of these measurements were that water contaminated with microcystins adversely affected seed germination and carrot growth. Treatment plants S consistently had the lowest values in all the developmental and biochemical parameters recorded in this experiment. In contrast, 4L plants in most measured parameters showed values lower but not significantly different from controls. It has been proved that the sooner during the primary stages of the seed or the seedling the plants come in contact with the water from Karla Reservoir, the stronger its negative impact and consequently the slower their growth. Regarding the possibility of recovery, although it was observed to some extent and the plants R were close to the values of the parameters of the controlled ones, at least as far as the size of the taproot is concerned, the recovery was not complete. Finally, there were no differences between treatments for mycorrhizal colonization in carrot roots as well as biochemical parameters, namely proline and total phenolics.

1. Εισαγωγή

1.1 Κυανοβακτήρια

Τα κυανοβακτήρια εκτιμάται ότι υπάρχουν εδώ και 3,5 δισεκατομμύρια χρόνια (Whitton and Potts 2012, Stal 2012). Είναι αερόβιοι, φωτοσυνθετικοί προκαρυωτικοί οργανισμοί που αναπτύσσονται τόσο σε χερσαία όσο και σε υδρόβια οικοσυστήματα με απαραίτητη την παρουσία φωτός (Whitton and Potts 2012). Αποτελούν εξαίρεση έναντι των υπόλοιπων προκαρυωτών καθώς είναι οι μοναδικοί που φωτοσυνθέτουν όπως ακριβώς φωτοσυνθέτουν τα φυτά (PSII και PSI) (Stal 1995). Φωτοσυνθέτουν ακόμα και σε χαμηλή ένταση φωτισμού (Stal 2012). Ανήκουν στα είδη που κυριαρχούν στην φύση λόγω της τεράστιας αφθονίας τους (Whitton and Potts 2012).

1.2 Κυανοτοξίνες

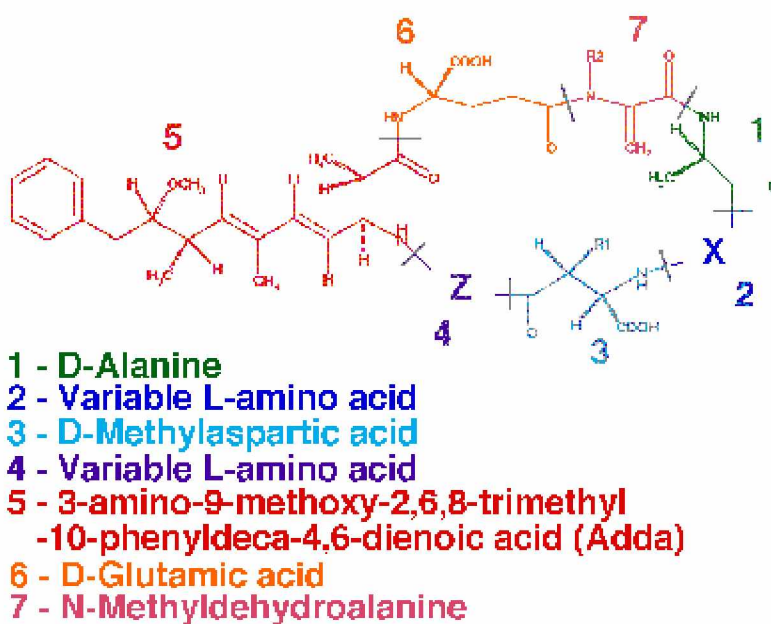
Τα κυανοβακτήρια είναι υπεύθυνα για την παραγωγή διάφορων τοξινών που ονομάζονται κυανοτοξίνες. Ο Παγκόσμιος Οργανισμός Υγείας το 2003 (WHO 2003) δημοσίευσε ότι το 50-75% των κυανοβακτηριακών ανθίσεων συσχετιζόταν με την εμφάνιση των κυανοτοξινών στα γλυκά νερά. Σύμφωνα με τους Corbel et al. (2014) οι μικροκυστίνες είναι από τις πιο διαδεδομένες κυανοτοξίνες και απαντώνται στο 40-75% των κυανοβακτηριακών ανθίσεων στα υδάτινα οικοσυστήματα. Η αυξημένη θερμοκρασία και οι ευτροφικές συνθήκες ευνοούν την εξάπλωση των κυανοβακτηρίων και εντείνουν το πρόβλημα των κυανοβακτηριακών ανθίσεων. Θεωρείται μάλιστα βέβαιη η επιδείνωση του προβλήματος με την κλιματική αλλαγή που βρίσκεται σε εξέλιξη (O'Neil et al. 2012).

Οι κυανοτοξίνες ανήκουν στην κατηγορία των βιοτοξινών δηλαδή τοξικών ουσιών με βιολογική προέλευση που ευθύνονται για οξείες και χρόνιες δηλητηριάσεις ανθρώπων και ζώων (<http://www.biosciences-labs.bham.ac.uk/exhibit/whatare.html>). Στις κυανοτοξίνες περιλαμβάνονται οι κυτοτοξίνες δηλαδή τοξίνες που δρουν σε επίπεδο κυττάρου σκοτώνοντας μεμονωμένα κύτταρα σε διάφορα όργανα όπως νεφρά, ήπαρ, λεπτό έντερο και επινεφρίδια, αλλά και βιοτοξίνες που δρουν σε επίπεδο οργάνου όπως είναι οι νευροτοξίνες δηλαδή ουσίες που επηρεάζουν το νευρικό σύστημα, οι ηπατοτοξίνες δηλαδή ουσίες που επηρεάζουν το ήπαρ αλλά και οι δερματοτοξίνες δηλαδή τοξίνες που προκαλούν ερεθισμό του δέρματος (Carmichael 2012, Corbel et al. 2014).

1.2.1 Μικροκυστίνες

Οι ηπατοτοξίνες είναι η κυριότερη κατηγορία κυανοτοξινών που απαντάται στα υδάτινα οικοσυστήματα. Σε αυτές συγκαταλέγονται οι μικροκυστίνες, οι κυλινδροσπερμοψίνες και οι νοντουλαρίνες (Carmichael 2012). Οι ηπατοτοξίνες που βρίσκονται σε υδάτινα οικοσυστήματα έχουν μελετηθεί αρκετά και ιδιαίτερα ο τρόπος που δρουν ως αλληλοπαθητικές ενώσεις εναντίον πλαγκτονικών μικροφυκών, μακροφυκών καθώς και μακροφυτών (Pflugmacher 2002, Corbel et al. 2014).

Οι μικροκυστίνες (MCs) είναι μονοκυκλικά επταπεπτίδια όπως φαίνονται και στην παρακάτω εικόνα (Εικόνα 1). Τα 7 αμινοξέα αποτελούνται από 5 D-αμινοξέα (κοινά) καθώς και 2 L-αμινοξέα (μεταβλητά). Τα 5 D-αμινοξέα ανήκουν το β-μεθυλασπαρτικό οξύ, η αλανίνη, η μεθυλδεϋδροαλανίνη (Mdha), το γλουταμινικό οξύ καθώς και το αμινοξύ (Adda) (3-αμινο-9-μεθοξύ-2,6,8-τριμεθύλ-10-φαινυλδεΐκα-4,6-διενοϊκό οξύ) (Tillet et al. 2000., Cordeiro-Araújo et al.2015) . Τα αμινοξέα (Mdha) και (Adda) είναι δύο νέα D-αμινοξέα, ενώ τα προαναφερθέντα L-αμινοξέα είναι αυτά που διαχωρίζουν την κάθε τοξίνη (Tillet et al. 2000). Για παράδειγμα τα μεταβλητά αμινοξέα της μικροκυστίνης-LR (MC-LR) είναι η αργινίνη (R) και η λευκίνη (L) (Figueiredo et al., 2004). Οι (MCs) αναστέλλουν την πρωτεϊνική φασφατάση σερίνης/θρεονίνης (PP) 1 και 2A, η αναστολή αυτή αντιπροσωπεύει την ηπατοτοξικότητα τους (Tillet et al. 2000).



Εικόνα 1: Δομή των μικροκυστινών (Πηγή: cyanosite.bio.purdue.edu)

1.3 Μικροκυστίνες και φυτό

Τις τελευταίες δύο δεκαετίες έχουν πραγματοποιηθεί αρκετές έρευνες σχετικά με την τοξικότητα των κυανοτοξινών στα θηλαστικά και τον άνθρωπο, δεν υπάρχουν όμως αρκετές δημοσιευμένες έρευνες που να εστιάζουν στην επίδραση των κυανοτοξινών στα χερσαία φυτά διερευνώντας την φυτοτοξικότητά τους (Corbel et al. 2014). Ο λόγος που οι επιστήμονες έχουν επικεντρωθεί, τα τελευταία χρόνια, στην έρευνα της τοξικότητας που προκαλούν οι κυανοτοξίνες στα χερσαία φυτά είναι ότι η βιοσυσσωρεύσή τους στα βρώσιμα φυτικά μέρη ενέχει κίνδυνο για την ανθρώπινη υγεία καθώς οι τοξίνες μεταφέρονται μέσω της τροφικής αλυσίδας στον άνθρωπο. Ταυτοχρόνως, είναι γεγονός ότι σε πολλές περιοχές της υψηλίου οι καλλιέργειες αρδεύονται με νερό πλούσιο σε κυανοτοξίνες που προέρχεται από κάποιον ταμειυτήρα (Corbel et al. 2014). Η πρόσληψη των μικροκυστινών από τα φυτά πραγματοποιείται αρχικά από τη ρίζα και στην συνέχεια μεταφέρεται στα φύλλα (Cobert et al., 2014). Η άρδευση φυτών με νερό επιβαρυσμένο σε μικροκυστίνες στις περισσότερες περιπτώσεις επιφέρει αρνητικές επιδράσεις στην ανάπτυξη αυτών των φυτών αλλά και οξειδωτικό στρες (Cordeiro-Araújo et al., 2015). Οι αρνητικές επιδράσεις που έχουν καταγραφεί σε αντίστοιχα πειράματα αφορούν την αναστολή της βλάστησης κάποιων σπερμάτων, τη μείωση της φωτοσυνθετικής ικανότητας των φυτών, την παρεμπόδιση της μεταφοράς σακχαρόζης, καθώς και καθυστέρηση της ανάπτυξης της ρίζας (Cobert et al., 2014, Pflugmacher et al. 2007). Η άρδευση με νερό πλούσιο σε μικροκυστίνες μπορεί να προκαλέσει οξειδωτικό στρες στα φυτά τα οποία προσπαθούν να αμυνθούν διεγείροντας το αντιοξειδωτικό τους σύστημα που περιλαμβάνει ένα δίκτυο ενζύμων με υπεροξειδάση (POD), καταλάση (CAT), υπεροξειδική δισμουτάση (SOD), αναγωγή της γλουταθειόνης (GSR), S-τρανσαφεράση (GST) και γλουταθειόνη (GSH). Αυτό το δίκτυο ενζύμων αντιμετωπίζει τα αρνητικά αποτελέσματα των δραστικών μορφών οξυγόνου ROS (reactive oxygen species) που βλάπτουν πολλά συστατικά του κυττάρου (πρωτεΐνες, λιπίδια, DNA). Επίσης, διεγείρεται η σύνθεση αντιοξειδωτικών με μικρό μοριακό βάρος όπως η τοκοφερόλης, το ασκορβικό οξύ και η γλουταθειόνη (Pflugmacher et al. 2007).

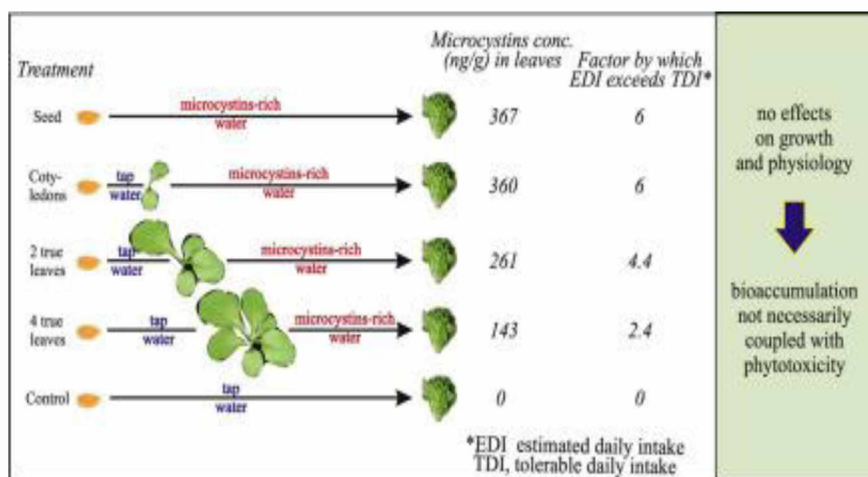
Σύμφωνα με πρόσφατη έρευνα που πραγματοποιήθηκε στα καρότα που αρδεύονταν με νερό πλούσιο σε MC-LR (50mg/L) σε διάστημα ενός μήνα παρατηρήθηκε περιορισμένη ανάπτυξη ριζών και αλλαγές στην περιεκτικότητα των

βιταμινών όπως το ασκορβικό οξύ και των μεταλλικών στοιχείων όπως το Mg, Na, K, Fe, Zn και P, ενώ καταγράφηκε αύξηση της φωτοσυνθετικής ικανότητας (Machado et al., 2017).

Σημαντική είναι και η επιβάρυνση του εδάφους από την άρδευση των φυτών με μικροκυστίνες. Στο προαναφερθέν πείραμα με τα καρότα παρατηρήθηκε ότι η μισή περίπου ποσότητα τοξίνης που εφαρμόστηκε στα φυτά συγκρατήθηκε από το έδαφος (Machado et al., 2017). Σύμφωνα με τους Lee et al., (2017) η MC-LR που δεν απορροφήθηκε από τα φυτά παρέμεινε στο έδαφος με αποτέλεσμα να αποτελεί σοβαρό κίνδυνο και για τις επόμενες καλλιέργειες που θα καλλιεργηθούν στο ίδιο έδαφος.

1.4 Επιπτώσεις στην ανθρώπινη υγεία

Η άρδευση λαχανικών, όπως το μαρούλι, με νερό πλούσιο σε MCs είναι ικανή να επιφέρει σημαντικά προβλήματα υγείας στον άνθρωπο που τα καταναλώνει. Αυτό το γεγονός, γίνεται πιο έντονο στην περίπτωση που τα λαχανικά αρδεύονται από νωρίς κατά την ανάπτυξη του φυτού, όπως το στάδιο της σποράς και της έκπτυξης των κοτυληδόνων (Levizou et al., 2017) όπως φαίνεται στην παρακάτω εικόνα (Εικόνα 2).



Εικόνα 2: Επίδραση αρδευόμενου νερού πλούσιου σε μικροκυστίνες σε διαφορετικές μεταχειρίσεις στο μαρούλι, καθώς και ο λόγος της εκτιμώμενης προς την ανεκτή ημερήσια πρόσληψη μικροκυστινών από το μαρούλι στις διάφορες μεταχειρίσεις. (Πηγή: Levizou et al., 2017).

Επίσης παρατηρήθηκε ότι η υπολογιζόμενη ημερήσια πρόσληψη (EDI) MCs ξεπέρασε την ανεκτή (TDI) σε πείραμα που διεξήχθη με μαρούλια (*Lactuca sativa*

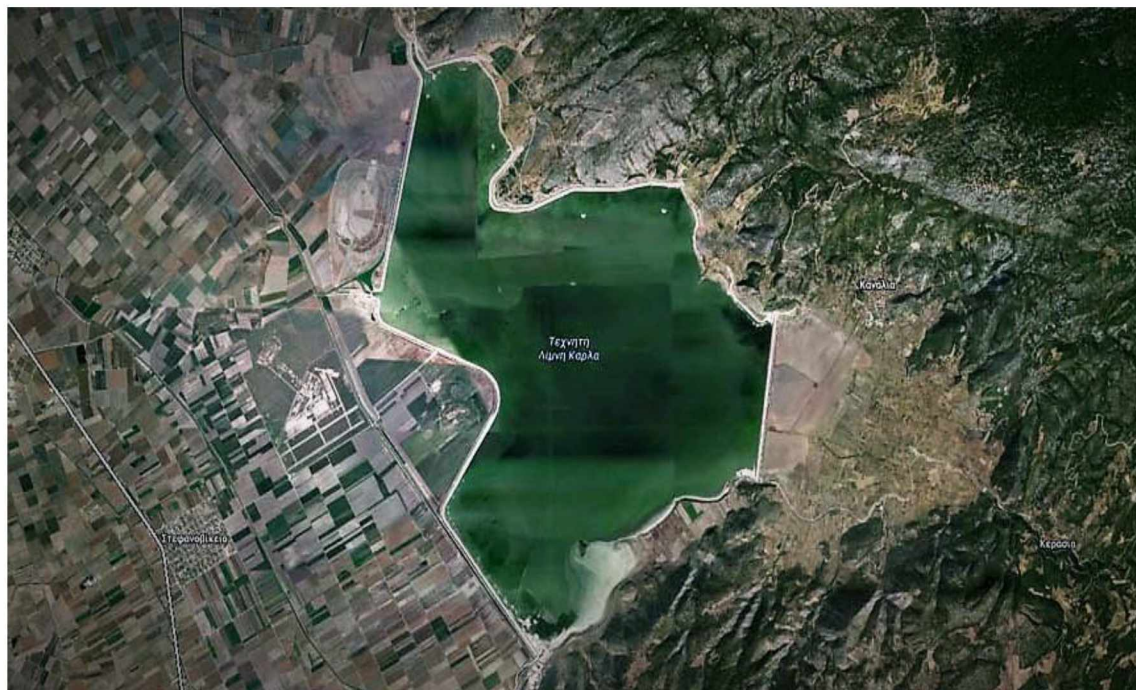
L.), αποτελώντας σοβαρό κίνδυνο για την δημόσια υγεία. Στην εργασία αυτή δεν παρατηρήθηκε επίδραση του επιβαρυσμένου με τοξίνες νερού στην ανάπτυξη του μαρουλιού, αναδεικνύοντας το γεγονός ότι η βιοσυσσώρευση μικροκυστινών δεν είναι απαραίτητα συνδεδεμένη με την φυτοτοξικότητα.

Σύμφωνα με παλαιότερες έρευνες ο καρκίνος του ήπατος και του παχέως εντέρου καθώς και άλλα σοβαρά προβλήματα υγείας μπορούν να προκληθούν από την χρόνια έκθεση σε MCs (Sivonen & Jones 1999). Μεγάλες λίμνες ανά τον κόσμο, όπως η λίμνη Taihu, που βρίσκεται στην Κίνα, και είναι πλούσιες σε μικροκυστίνες λειτουργούν ως ταμιευτήρες πόσιμου νερού για τους κατοίκους των περιοχών αυτών (Whitton and Potts 2012).

1.5 Νερό πλούσιο σε μικροκυστίνες στον ταμιευτήρα της Κάρλας

Ο ταμιευτήρας της Κάρλας βρίσκεται στην Κεντρική Ελλάδα, νότια του Θεσσαλικού Κάμπου, μεταξύ των νομών Μαγνησίας και Λαρίσης. Η Λίμνη Κάρλα ήταν μία φυσική λίμνη μέχρι το 1962, έπειτα αποξηράνθηκε μέχρι το 1964, ενώ το 2010 έγινε ανασύσταση της και σήμερα βρίσκεται στο στάδιο της τελικής ανακατασκευής της. Είναι ταμιευτήρας εξαιρετικής οικολογικής σημασίας και χαρακτηρίζεται ως περιοχή Natura 2000 όσο αφορά την βιοποικιλότητά του, ενώ ανήκει στο δίκτυο των ελληνικών προστατευμένων περιοχών με υψηλή αξία διατήρησής (Papadimitriou et al 2013). Σύμφωνα με τον Ανανιάδη (1956) η λίμνη Κάρλα πριν την αποξήρανσή της ήταν μία φυσική λίμνη που περιείχε μεγάλο όγκο νερού καθώς τροφοδοτούνταν από τον ποταμό Πηνειό. Μέχρι το 1930 η Κάρλα ήταν μία ρηχή λίμνη με βάθος περίπου 4-6 μέτρα όμως το 1950 το βάθος του νερού έφτασε τα 2 μέτρα. Η λίμνη αυτή χαρακτηρίστηκε ως ευτροφική πριν την αποξήρανση της (Ananiadis, 1956). Το 1962 οι αρχές οδηγήθηκαν στην αποξήρανση της λίμνης καθώς μειώθηκε σημαντικά η στάθμη των υδάτων εξαιτίας πολλών παραγόντων. Στην απόφαση αυτή συνέβαλαν η μείωση των ιχθύων, η αύξηση της αλατότητας και η εξάπλωση της ελονοσίας. Η αποξήρανση προκάλεσε την περιβαλλοντική υποβάθμιση της περιοχής (Zalidis et al. 2005). Υπάρχουν πηγές που αναφέρουν ότι η ανακατασκευή της λίμνης αποφασίστηκε καθώς τα εδάφη ήταν ακατάλληλα για καλλιέργεια σε συνδυασμό με την αδυναμία υδροδότησης των οικισμών, την ραγδαία πτώση του υδροφόρου ορίζοντα και την εμφάνιση ρηγμάτων (Zalidis & Gerakis 1999). Τα εδάφη που πλέον καλύπτει ο ταμιευτήρας ήταν εμπλουτισμένα με λιπάσματα λόγω των γεωργικών εκμεταλλεύσεων στην περιοχή (Triantafyllou et al. 2001). Οι προσπάθειες

αποκατάστασης της λίμνης ξεκίνησαν στην δεκαετία του '80 (Sidiropoulos et al. 2012). Η ανασυσταθείσα λίμνη (Εικόνα 3) καλύπτει μια περιοχή ίση με 38km^2 σε αντίθεση με την αρχική έκταση που κάλυπτε η λίμνη Κάρλα πριν την αποξήρανσή της, που ήταν εξαρτώμενη από τις ετήσιες κατακρημνίσεις και κυμαίνονταν από 41km^2 έως 180km^2 (Νεβεσκιώτης 2010).



Εικόνα 3 : Η ανακατασκευασμένη λίμνη Κάρλα. (Πηγή: Google Earth)

Ο παρών ταμιευτήρας είναι μέρος της παλιάς φυσικής λίμνης και διαθέτει μέγιστο βάθος $4,5\text{m}$ και μέσο βάθος $2,5\text{m}$ (Sidiropoulos et al. 2017). Το νεοσύστατο υδάτινο οικοσύστημα του ταμιευτήρα Κάρλας ανήκει στο δίκτυο Natura 2000. Ο στόχος της ανασύστασης ήταν η άρδευση των αγροτεμαχίων του Θεσσαλικού κάμπου και τελικό στόχο αποτελεί η ύδρευση του Βόλου (Νεβεσκιώτης 2010). Ωστόσο, εξαιτίας της γεωργικής και βιομηχανικής ρύπανσης και της κακής ποιότητας νερού που εισέρχεται από τον ποταμό Πηνειό, έχουν προκύψει σοβαρά προβλήματα στην οικολογική της κατάσταση (Οικονομου et al. 2012). Εμφανίζει έντονο ευτροφισμό, με συνδυασμό υπερτροφικών συνθηκών και αφθονίας τοξικών κυανοβακτηρίων, με αποτέλεσμα να απειλείται η βιοποικιλότητά του (Sidiropoulos et al. 2017). Ο ταμιευτήρας εμφανίζει εκτεταμένες κυανοβακτηριακές ανθίσεις, ενώ κυριαρχούν οι κυανοτοξίνες και ειδικότερα οι μικροκυστίνες (Οικονομου et al. 2012). Οι συγκεντρώσεις των μικροκυστινών που έχουν ανιχνευτεί έως τώρα στον

ταμειυτήρα της Κάρλας κυμαίνονται μεταξύ 1,5μg/L και 33μg/L (Papadimitriou et al. 2013).

1.6 Σκοπός της εργασίας

Η παρούσα εργασία πραγματοποιήθηκε για να εκτιμηθούν οι επιδράσεις της άρδευσης με νερό πλούσιο σε κυανοτοξίνες σε αναπτυξιακά και βιοχημικά χαρακτηριστικά του καρότου. Το αρδευτικό νερό προήλθε από τον ταμειυτήρα της Κάρλας όπου έχουν καταγραφεί σχετικά υψηλές συγκεντρώσεις κυανοτοξινών και ειδικότερα μικροκυστινών. Η ιδέα για τη συγκεκριμένη εργασία προήλθε από προηγούμενη έρευνα του εργαστηρίου με μαρούλι (Levizou et al. 2017) όπου βρέθηκε, μεταξύ άλλων, ότι το υπέργειο εδώδιμο τμήμα του φυτού σημείωσε μικρότερη βιοσυσσώρευση μικροκυστινών σε σχέση με το υπόγειο. Στο καρότο, αντιθέτως, βρώσιμο τμήμα είναι η κονδυλόριζα, επομένως είχε ενδιαφέρον τόσο το εάν ισχύει το ίδιο πρότυπο βιοσυσσώρευσης με το μαρούλι, όσο και καθεαυτές οι επιδράσεις των τοξινών σε μορφολογικά και φυσιολογικά χαρακτηριστικά. Τέλος, μελετήθηκε η δυνατότητα επαναφοράς των καρότων που αρδεύονταν με νερό πλούσιο σε κυανοτοξίνες από το στάδιο του σπόρου για μεγάλο χρονικό διάστημα και έπειτα αρδεύονταν με νερό απαλλαγμένο από αυτές (νερό βρύσης).

2 Υλικά και Μέθοδοι

2.1 *Daucus carota* (L.) subsp *sativus* (Hoffm)

Το καρότο συγκαταλέγεται στην οικογένεια των Σκιαδανθών (Apiaceae) ενώ σημαντικότερο γένος είναι το γένος *Daucus*. Το γένος αυτό διαθέτει 20 είδη, από τα οποία τα περισσότερα είναι αυτοφυή. Αντίθετα το καλλιεργούμενο καρότο ονομάζεται *Daucus carota* (L.) subsp *sativus* (Hoffm) που είναι ένα υποείδος του είδους *Daucus carota* (Χα και Πετρόπουλος 2014). Η ποικιλία καρότου που χρησιμοποιήθηκε στο συγκεκριμένο πείραμα ήταν η ποικιλία Nantes 2. Η συγκεκριμένη ποικιλία διαθέτει κονδυλόριζα μεσαίου μεγέθους (μήκους 16εκ.) σε σχήμα κυλινδρικό. Θεωρείται ποιοτικά η καλύτερη ποικιλία καρότων καθώς διαθέτει τρυφερή και τραγανή σάρκα σε συνδυασμό με ξυλώδες ιστό και καλλιεργείται για νωπή κατανάλωση (Ολύμπιος 2015). Η καλλιέργεια των καρότων πραγματοποιείται για την edώδιμη σαρκώδη κονδυλόριζα του (Ολύμπιος 2015). Τα φύλλα του φυτού επίσης είναι edώδιμα αλλά χρησιμοποιούνται σε ελάχιστες περιπτώσεις. Έχουν σχήμα ροζέτας ύψους 25-60 εκ. και εμφανίζονται στον πρώτο χρόνο της καλλιέργειας (Ολύμπιος 2015). Επίσης διαθέτουν μεγάλο ριζικό σύστημα που φτάνει σε βάθος 60-75εκ. Τα καρότα δεν καλλιεργούνται μόνο για την νωπή κατανάλωσή τους αλλά προορίζονται και για μεταποίηση καθώς και για ζωοτροφή σε περίπτωση που ξεπεραστεί το στάδιο συγκομιδής (Χα και Πετρόπουλος 2014). Το καρότο είναι σημαντική πηγή βιταμίνης Α, ενώ η ρίζα του διαθέτει καροτένιο και οι σπόροι του διαθέτουν αιθέριο έλαιο αποτελούμενο από καροτόλη, δαυκόλη, και β-μπισαμπολένιο (Χα και Πετρόπουλος 2014).

2.2 Πειραματικός σχεδιασμός

Το συγκεκριμένο πείραμα διεξήχθη στο εργαστήριο Ζιζανιολογίας καθώς και στο θερμοκήπιο του εργαστηρίου Γενετικής Βελτίωσης Φυτών, του Τμήματος Γεωπονίας Φυτικής Παραγωγής και Αγροτικού Περιβάλλοντος. Το πείραμα πραγματοποιήθηκε στο διάστημα από 5 Οκτωβρίου του 2016 που πραγματοποιήθηκε η σπορά των καρότων μέχρι 9 Μαρτίου του 2017 όπου πραγματοποιήθηκε η συγκομιδή.

Επαρκής ποσότητα νερού για ολόκληρο το πείραμα συλλέχθηκε από τον Ταμιευτήρα της Κάρλας, άπαξ τον Σεπτέμβριο και αποθηκεύτηκε σε σκοτεινό δωμάτιο στους 10°C περίπου. Το νερό αυτό περιείχε μικροκυστίνες σε συγκέντρωση 3,8 µg/L.

Το έδαφος συλλέχθηκε από το Αγρόκτημα του Τμήματος στο Βελεστίνο και κοσκινίστηκε σε κόσκινο 4,75mm. Το έδαφος αναμίχθηκε με περλίτη σε αναλογία 1:1 πριν μπει στις θήκες φυτωρίου. Ακολούθησε η σπορά καρότων ποικιλίας Nantes 2 σε δυο θήκες, εκ των οποίων η πρώτη ποτιζόταν καθημερινά μέχρι την μεταφύτευσή τους με νερό Κάρλας ενώ η δεύτερη με νερό βρύσης (Εικόνα 4, Εικόνα 5). Η σπορά πραγματοποιήθηκε στις 5 Οκτώβρη και τα φυτά βρίσκονταν στις πλάκες φυτωρίου μέχρι τις 27 Οκτώβρη (Εικόνα 5). Σε αυτό το διάστημα πραγματοποιήθηκε οι απαραίτητες μεταχειρίσεις που απαιτούνταν όπως το βοτάνισμα αλλά και ξερίζωμα των πιο αδύναμων βλαστών στις θήκες που διέθεταν περισσότερα από έναν βλαστό καρότου, για να αποφευχθεί ο ανταγωνισμός των φυτών στην απορρόφηση νερού και θρεπτικών. Επίσης, πραγματοποιήθηκε καταμέτρηση των βλαστών και καταγραφή των αποτελεσμάτων από κάθε πλάκα φυτωρίου σε συγκεκριμένες ημερομηνίες σχετικά με την βλαστική ικανότητα των φυτών σε αυτό το αρχικό στάδιο ανάπτυξης των σπόρων ανάμεσα στις δύο μεταχειρίσεις, δηλαδή των φυτών που ποτιζονταν με νερό της λίμνης Κάρλας και των υπόλοιπων που ποτιζονταν με νερό βρύσης.



Εικόνα 4: Βλάστηση καρότων αρδευόμενα με νερό της λίμνης Κάρλας (27-10-16)



Εικόνα 5: Βλάστηση καρότων αρδευόμενα με νερό βρύσης (27-10-16)

Στις 27 Οκτωβρίου πραγματοποιήθηκε η μεταφύτευση των πιο εύρωστων βλαστών σε καθαρά φυτοδοχεία 2L με αναλογία χώματος-περλίτη 1:1. Τα φυτοδοχεία διαχωρίστηκαν τυχαία σε τέσσερις ομάδες, με 12 επαναλήψεις (γλάστρες) η κάθε μία. Η πρώτη ομάδα ονομάστηκε ομάδα C και ήταν ο μάρτυρας του πειράματος που ποτίζονταν καθ' όλη την διάρκεια του πειράματος με νερό βρύσης. Η δεύτερη ομάδα ήταν η 4L και ποτίζονταν με νερό βρύσης έως την απόκτηση του τέταρτου πραγματικού φύλλου, ενώ στην συνέχεια με νερό Κάρλας. Η τρίτη ομάδα, η S ποτίζονταν αποκλειστικά με νερό της λίμνης Κάρλας καθ' όλη την διάρκεια του πειράματος. Η τέταρτη και τελευταία ομάδα του πειράματος ήταν η ομάδα της εκτίμησης της δυνατότητας επαναφοράς, η R, στην οποία το πότισμα αρχικά πραγματοποιήθηκε με νερό Κάρλας και σε 1,5 μήνα (19 Δεκεμβρίου) άρχισαν να ποτίζονται με νερό βρύσης μέχρι και την συγκομιδή. Συνοπτικά τα παραπάνω δεδομένα παρουσιάζονται στον παρακάτω πίνακα (Πίνακας 1).

Πίνακας 1: Παρουσίαση των ομάδων πειράματος και του προτύπου άρδευσης τους.

ΜΕΤΑΧΕΙΡΗΣΗ	ΤΡΟΠΟΣ ΠΟΤΙΣΜΑΤΟΣ
Ομάδα C	Πότισμα πάντα με νερό βρύσης
Ομάδα 4L	Αρχικά πότισμα με νερό βρύσης μέχρι την απόκτηση του τέταρτου φύλλου και στη συνέχεια νερό Κάρλας
Ομάδα S	Πότισμα πάντα με νερό Κάρλας
Ομάδα R	Αρχικά πότισμα με νερό Κάρλας και αργότερα με νερό βρύσης

Δύο φορές τον μήνα γινόταν αλλαγή στις θέσεις των τεσσάρων μεταχειρίσεων μεταξύ τους και αλλαγή των θέσεων των φυτοδοχείων εντός της κάθε μεταχείρισης

(rotation). Σκοπός ήταν να αποφευχθεί η επίδραση της μικροθέσης στην ανάπτυξη των φυτών.

2.3 Καθορισμός της ποσότητας άρδευσης και λιπάσματος

Το πότισμα των φυτών ήταν σταθερό τόσο στην ποσότητα όσο και στον χρόνο αλλά πάντα προσαρμοσμένο στις συνθήκες του περιβάλλοντος καθώς και στις ανάγκες του συνόλου των φυτών. Τα φυτά ποτίζονταν όλα με την ίδια ποσότητα νερού και ανάλογα με την μεταχείριση τους αντίστοιχα με νερό βρύσης ή με νερό Κάρλας κάθε πέντε περίπου μέρες, ανάλογα τις καιρικές συνθήκες.

Εφαρμοζόταν υδρολίπανση σε κάθε δεύτερο πότισμα με υδατοδιαλυτό λίπασμα σε σκόνη και αναλογία στοιχείων 14-6-28+5(Mg) (Best, Φυτοθεραπευτική). Η ποσότητα λιπάσματος που εφαρμόζονταν ήταν 1g λιπάσματος σε 1L αρδευτικού νερού και αναλόγως την μεταχείριση ήταν είτε νερό βρύσης είτε νερό της λίμνης Κάρλας. Η πρώτη λίπανση πραγματοποιήθηκε στις 4 Δεκεμβρίου και συνεχίστηκε η εφαρμογή της ανά δέκα περίπου ημέρες. Η τελευταία υδρολίπανση έλαβε χώρα στις 24 Φεβρουαρίου ενώ η τελευταία άρδευση πραγματοποιήθηκε στις 3 Μαρτίου.

2.4 Τελική συλλογή

Η συγκομιδή των καρότων πραγματοποιήθηκε σε διάστημα δύο ημερών (8 και 9 Μαρτίου). Αρχικά διαχωρίστηκε το υπέργειο από το υπόγειο τμήμα. Στο υπέργειο τμήμα ζυγίστηκε το νωπό βάρος και στη συνέχεια το υπέργειο 6 φυτών – τυχαία επιλεγμένων - τοποθετήθηκε στο ξηραντήριο στους 80°C για καταμέτρηση του ξηρού βάρους. Το υπέργειο των υπόλοιπων 6 φυτών τοποθετήθηκε στους -20°C για τις επακόλουθες βιοχημικές μετρήσεις.

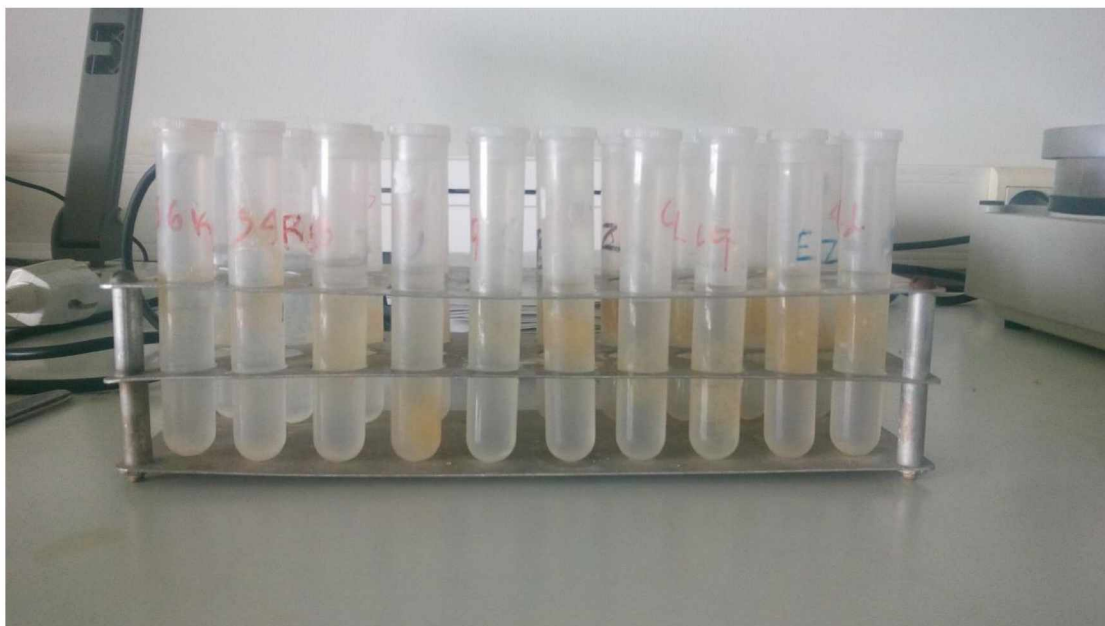
Για τις μετρήσεις του υπόγειου τμήματος των φυτών ακολουθήθηκε η παρακάτω διαδικασία. Αφού απομακρύνθηκε πλήρως το χώμα καταγράφηκε το νωπό τους βάρος. Στη συνέχεια έγιναν μετρήσεις μήκους και του πλάτους της κονδυλόμενης με ηλεκτρονικό παχύμετρο. Όσα φυτά προορίζονταν για μέτρηση του ξηρού βάρους, όπως και τα υπέργεια μέρη τους, τοποθετήθηκαν στο ξηραντήριο, σε χάρτινα σακουλάκια που περιείχαν την κονδυλόμενη και τα ριζίδια του κάθε φυτού ξεχωριστά (6/μεταχείριση). Οι υπόλοιπες κονδυλόμενες από κάθε μεταχείριση τοποθετήθηκαν στην κατάψυξη στους -20°C για βιοχημικές αναλύσεις.

Έπειτα από 3 ημέρες πραγματοποιήθηκε η μέτρηση του ξηρού βάρους των φυτών τόσο του υπέργειου όσο και του υπόγειου μέρους τους.

2.5 Καταμέτρηση μυκόρριζων

Για να διεξαχθεί η καταμέτρηση των μυκορριζικών αποικισμών πραγματοποιήθηκε πλύση και χρώση των πλευρικών ριζιδίων των καρότων σύμφωνα με τους Kargouzas et al. 2014. Η διαδικασία αυτή περιγράφεται παρακάτω:

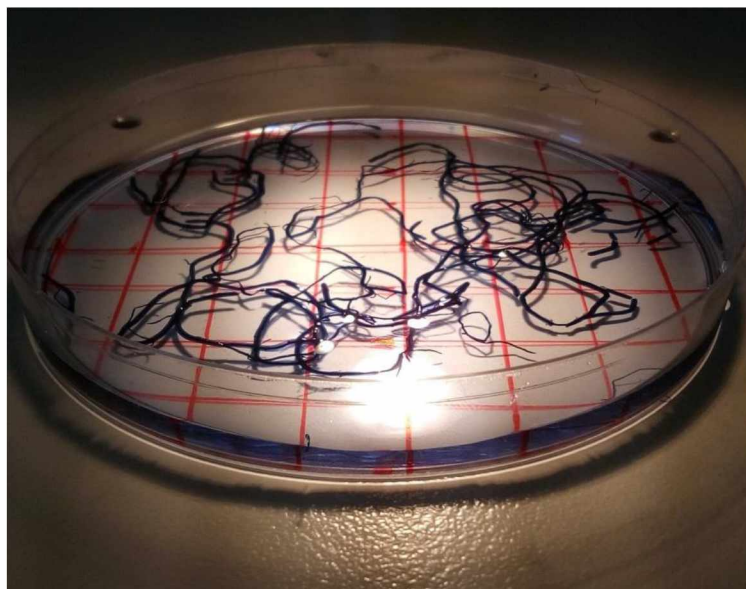
Αρχικά, πραγματοποιήθηκε πλύσιμο των ριζών σε διάλυμα που περιείχε 10% KOH και στην συνέχεια μεταφέρθηκαν στο υδατόλουτρο στους 80°C για 40 λεπτά μέσα σε δοκιμαστικούς σωλήνες (Εικόνα 6).



Εικόνα 6: Δοκιμαστικοί σωλήνες από κάθε μεταχείριση που περιέχουν διάλυμα KOH και ρίζες καρότων.

Έπειτα απομακρύνθηκε το διάλυμα KOH με νερό βρύσης 3-4 φορές στο κάθε δείγμα, προστέθηκε νερό καθώς και λίγες σταγόνες HCl. Οι ρίζες παρέμειναν μέσα στους δοκιμαστικούς σωλήνες από βραδύς και στραγγίστηκαν χωρίς όμως να ξεπλυθούν και πραγματοποιήθηκε η χρώση τους το επόμενο πρωί. Ύστερα προστέθηκε η χρωστική trypan blue 0,05% σε 1:1:1 γλυκερόλη, λακτικό οξύ και νερό. Τελικά, τοποθετήθηκαν οι δοκιμαστικοί σωλήνες στο υδατόλουτρο στους 80°C για 15 λεπτά. Εάν οι δοκιμαστικοί σωλήνες δεν τοποθετούνταν στο υδατόλουτρο θα παρέμεναν με την χρωστική όλο το βράδυ και το επόμενο πρωινό θα πραγματοποιούνταν οι παρατηρήσεις στο στερεοσκόπιο.

Αρχικά τοποθετήθηκαν λίγες ρίζες από το κάθε δείγμα ξεχωριστά σε τριβλίο petri στο κάτω μέρος του οποίου σχεδιάστηκαν τετράγωνα (1x1cm) που κάλυπταν όλο το τριβλίο petri για να είναι πιο εύκολος ο εντοπισμός των αποικιών (Εικόνα 7)



Εικόνα 7: Καταμέτρηση μυκορριζικών αποικισμών των πλευρικών ριζών καρότου σε στερεοσκόπιο.

Έπειτα, προστέθηκε μικρή ποσότητα απιονισμένου νερού ώστε να γίνει αραιώμα των ριζών για να φαίνονται ξεκάθαρα τα σημεία του μυκορριζικού αποικισμού. Η διαδικασία που ακολουθήθηκε για την καταγραφή των αποικισμών στα συγκεκριμένα δείγματα ήταν η παρατήρηση μυκόρριζων σε όλες τις διασταυρώσεις των τετραγώνων ξεκινώντας από την διασταύρωση στο ανώτερο τετράγωνο πάνω αριστερά στο τριβλίο πέτρι με κατεύθυνση κατά μήκος μέχρι το τελευταίο τετράγωνο της τελευταίας σειράς κάτω δεξιά αυτού. Σε κάθε δείγμα έγιναν μετρήσεις σε 100 διαφορετικά σημεία (διασταυρώσεις) και καταγράφονταν αν υπήρχε η όχι αποικισμός μυκόρριζων. Η διαδικασία αυτή πραγματοποιήθηκε για κάθε δείγμα ξεχωριστά.

2.6 Προσδιορισμός ολικών φαινολικών

Τα ολικά φαινολικά προσδιορίστηκαν με την μέθοδο Folin-Ciocalteu (Waterman & Mole, 1994).

Τα υλικά που χρειάστηκαν για τον προσδιορισμό αυτό ήταν η μεθανόλη (6ml/δείγμα), το αντιδραστήριο Folin-Ciocalteu (0,25ml/δείγμα) που ήταν

προστατευμένο από το φως καθώς και 20g διαλύματος Na_2CO_3 σε 100ml νερού το οποίο παρασκευάζεται φρέσκο πριν την μέτρηση (0,75ml/δείγμα).

2.6.1 Διαδικασία

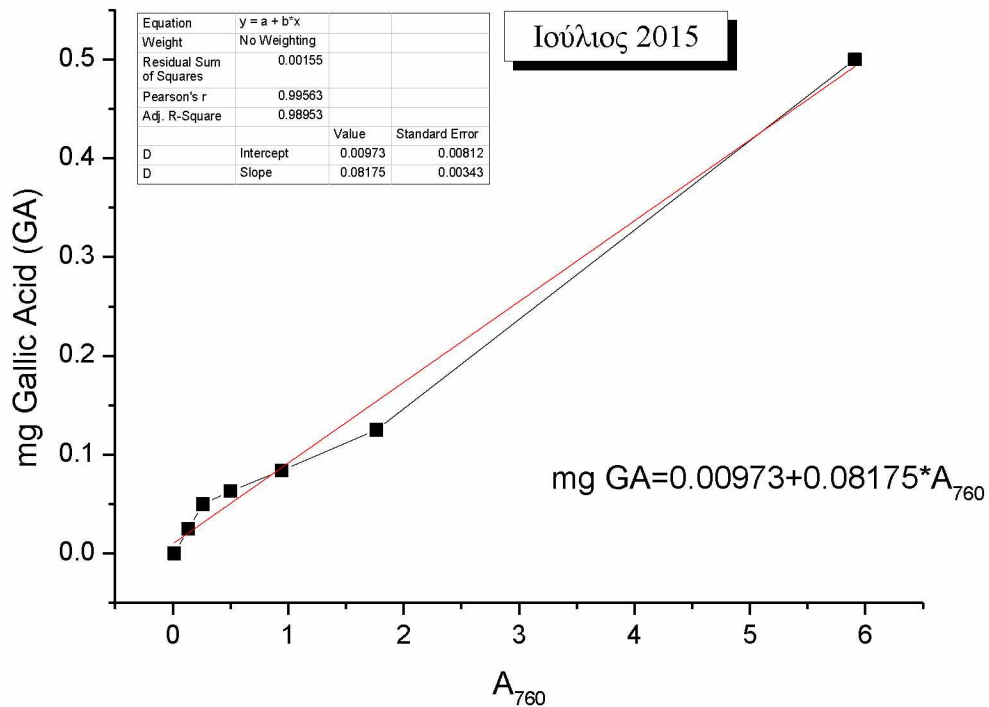
Η διαδικασία που ακολουθήθηκε ήταν το ζύγισμα 300mg κονιορτοποιημένου ξηρού δείγματος και τοποθέτηση αυτού σε δοκιμαστικούς σωλήνες (πλαστικοί σωλήνες με πώμα). Έπειτα προστέθηκαν 6ml υδατικού διαλύματος μεθανόλης 50%. Το διάλυμα αυτό σφραγίστηκε και επώαστηκε σε υδατόλουτρο στους 40°C για μία ώρα, υπό ήπια ανάδευση. Έπειτα τα δείγματα εκχυλίστηκαν σε χάρτινο φίλτρο με την βοήθεια χωνιού και παραλήφθηκε το διαυγές διάλυμα σε νέους γυάλινους δοκιμαστικούς σωλήνες.

2.6.2 Αντίδραση

Η αντίδραση που πραγματοποιήθηκε έγινε σε μεγαλύτερου μεγέθους δοκιμαστικούς σωλήνες με την προσθήκη 3,95ml απιονισμένο νερό, 0,05 ml (50λ) του υπερκείμενου καθώς και 0,25 ml (250λ) αντιδραστήριου Folin-Ciocalteu. Πρέπει να σημειωθεί ότι στο τυφλό διάλυμα έγινε αντικατάσταση των 50λ υπερκείμενου με 50λ υδατικού διαλύματος μεθανόλης 50%. Στην συνέχεια, πραγματοποιήθηκε ανάδευση των σωλήνων με vortex για λίγα δευτερόλεπτα στο κάθε δοκιμαστικό σωλήνα. Αφού πέρασαν 1-8min προστέθηκαν 0,75ml (750λ) διαλύματος ανθρακικού νατρίου (Na_2CO_3) και πραγματοποιήθηκε και για δεύτερη φορά vortex με τον ίδιο τρόπο και μετέπειτα ακολούθησε επώαση σε θερμοκρασία δωματίου για 2h με συχνά vortex ανά 20min. Τέλος μετρήθηκε η απορρόφηση των δειγμάτων σε φασματοφωτόμετρο στα 760nm και η συγκέντρωση των ολικών φαινολικών εκφράστηκε ως ισοδύναμα γαλλικού οξέος με βάση την πρότυπη καμπύλη που περιγράφεται παρακάτω.

2.6.3 Πρότυπη καμπύλη φαινολικών

Κατασκευάστηκε καμπύλη αναφοράς για διαφορετικές συγκεντρώσεις γαλλικού οξέος. Η συγκέντρωση ολικών φαινολικών εκφράζεται σε mg ισοδύναμου ταννικού οξέος ανά g ξηρής ουσίας (Phm). Η συγκέντρωση ολικών φαινολικών ανά επιφάνεια ελάσματος (Pha) υπολογίζεται ως το γινόμενο Phm και LMA.



Ο μαθηματικός τύπος που χρησιμοποιήθηκε για τον προσδιορισμό των ολικών φαινολικών είναι αυτός του Γαλλικού Οξέος.

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

Όπου C η τιμή GA σε mg/ml όπως προκύπτει από την πρότυπη

V ο όγκος εκχυλίσματος που χρησιμοποιείται

M τα g του ιστού

2.7 Προσδιορισμος προλίνης

Για τον προσδιορισμό της συγκέντρωσης προλίνης στα φύλλα του καρότου χρησιμοποιήθηκε η μέθοδος της όξινης νινυδρίνης, που προτάθηκε αρχικά από τους Bates et al., (1973), αλλά εδώ ακολουθείται μία τροποποιημένη μέθοδος από τους Khan et al. 2000.

Τα διαλύματα που χρησιμοποιήθηκαν ανά δείγμα ήταν 3% σουλφοσαλυκυλικό (10ml x αριθμός δειγμάτων) και 6M ορθοφωσφορικό οξύ για την Παρασκευή του διαλύματος όξινης νινυδρίνης. Το αντιδραστήριο ορθοφωσφορικού οξέος βρίσκεται

σε συγκέντρωση 14,8M, οπότε υπόκειται την κατάλληλη αραιώση για να φτάσει τα 6M (MB=98).

2.7.1 Διάλυμα

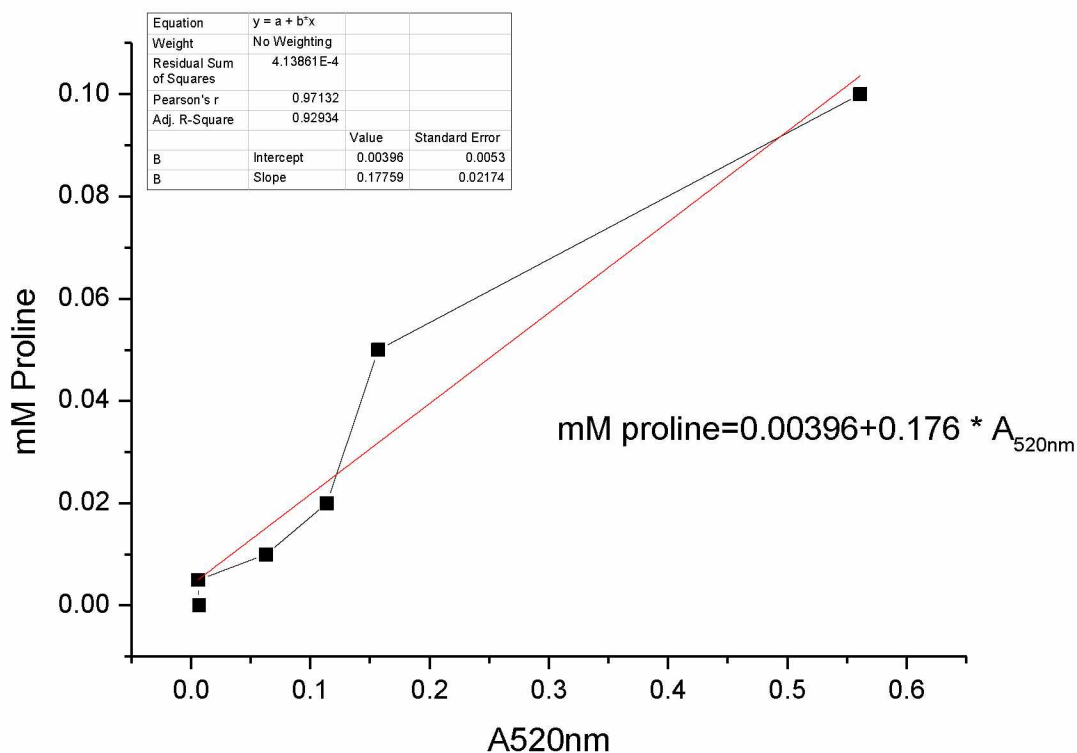
Το διάλυμα όξινης νινυδρίνης παρασκευάστηκε με 1.25g νινυδρίνη, οξικό οξύ (30 ml) και 6M ορθοφωσφορικό οξύ (20ml). Ακολούθησε ανάδευση και ελαφριά θέρμανση ενώ ήταν καλυμμένο με αλουμινόχαρτο για προστασία από το φως. Υπήρχε δυνατότητα διατήρησης του διαλύματος στους 4°C για 24 ώρες. Χρειάστηκαν 2ml οξικού οξέως για το κάθε δείγμα. Έπειτα χρησιμοποιήθηκε ανά δείγμα οξικό οξύ (2ml), τουλουόλιο (τολουένη) (4ml), αλλά και πάγος, χωνιά και φίλτρα διήθησης.

2.7.2 Διαδικασία

Η διαδικασία του εκχυλίσματος πραγματοποιήθηκε ως εξής: Αρχικά ζυγίστηκαν 250mg νωπών φύλλων καρότου, κομμένα σε μικρά κομμάτια και εκχυλίστηκαν σε 3% σουλφοσαλυκιλικού με τελικό όγκο 10ml υδατικού διαλύματος και τοποθετήθηκαν με μικρούς σωλήνες φυγοκέντρου με πάμα. Ακολούθησε φυγοκέντρηση στα 4000g για 10 λεπτά. Σε άλλους σωληνίσκους που διέθεταν πάμα προστέθηκαν 2ml εκχυλίσματος και 2ml του αντιδραστηρίου της όξινης νινυδρίνης καθώς και 2ml οξικού οξέος. Στην συνέχεια σφραγίστηκαν και επώαστηκαν σε υδατόλουτρο στους 100°C για 1h. Έπειτα μεταφέρθηκαν σε πάγο. Το περιεχόμενο των σωλήνων μεταφέρθηκε σε μεγάλους δοκιμαστικούς σωλήνες και προστέθηκαν 4ml τουλουόλιου και πραγματοποιήθηκε ανάδευση για 15sec. Μετά το πέρας της διαδικασίας αυτής τα δείγματα αφέθηκαν σε θερμοκρασία δωματίου για να κρυώσουν.

Ακολούθησε διαχωρισμός φάσεων: το χρωμοφόρο το οποίο περιέχει τουλουόλιο διαχωρίστηκε από την υδατική φάση του διαλύματος. Στην συνέχεια παραλήφθηκε το υπερκείμενο και μετρήθηκε η απορρόφηση σε φασματοφωτόμετρο στα 520nm, με τυφλό τουλουόλιο.

Πρότυπη καμπύλη προλίνης



Η πρότυπη δίνει mM, δηλ. mmol/L, άρα μmol/mL. Αυτά πολλαπλασιάζονται με τα ml εκχύλισης (10ml) και ακολουθεί αναγωγή στο g νωπού βάρους.

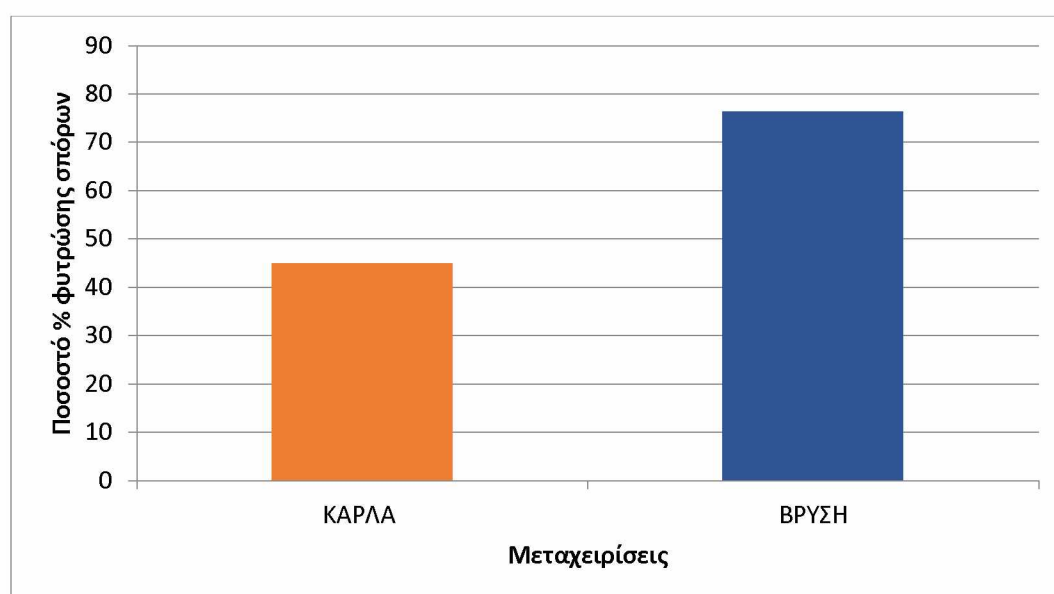
2.8 Στατιστική επεξεργασία

Για την στατιστική ανάλυση των δεδομένων χρησιμοποιήθηκε το στατιστικό πακέτο IBM SPSS Statistics version 23 for Windows. Ο έλεγχος των στατιστικώς σημαντικών διαφορών έγινε με One-Way ANOVA και LSD προκειμένου να προσδιοριστούν οι διαφορές μεταξύ των μεταχειρίσεων σε επίπεδο $p < 0,05$.

3. Αποτελέσματα

Στην συνέχεια παρουσιάζονται τα γραφήματα που προέκυψαν από τις μετρήσεις κατά την συγκομιδή των φυτών αλλά και τις ανατομικές και βιοχημικές μετρήσεις που ακολούθησαν.

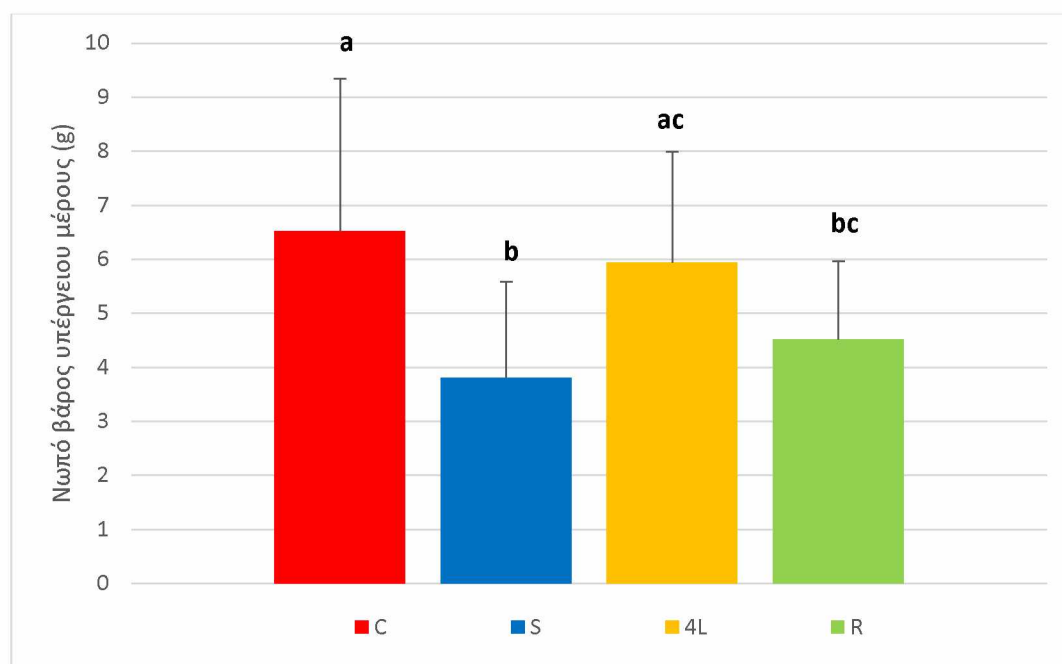
Κατά το αρχικό στάδιο ανάπτυξης, δηλαδή το στάδιο από την σπορά μέχρι την μεταφύτευση των καρότων υπήρχαν δύο μεταχειρίσεις: νερό βρύσης και νερό Κάρλας. Στο σχήμα 1 απεικονίζεται το ποσοστό των σπόρων που φύτεψαν υπό την επίδραση των δύο αυτών μεταχειρίσεων. Φαίνεται ότι το ποσοστό των σπόρων που αρδεύονταν με νερό βρύσης ήταν σημαντικά υψηλότερο από το ποσοστό των σπόρων που αρδεύονταν με νερό από την λίμνη Κάρλα.



Σχήμα 1: Επί τοις εκατό ποσοστό φύτεψης σπόρων καρότου που ποτίζονταν με νερό βρύσης και Κάρλας.

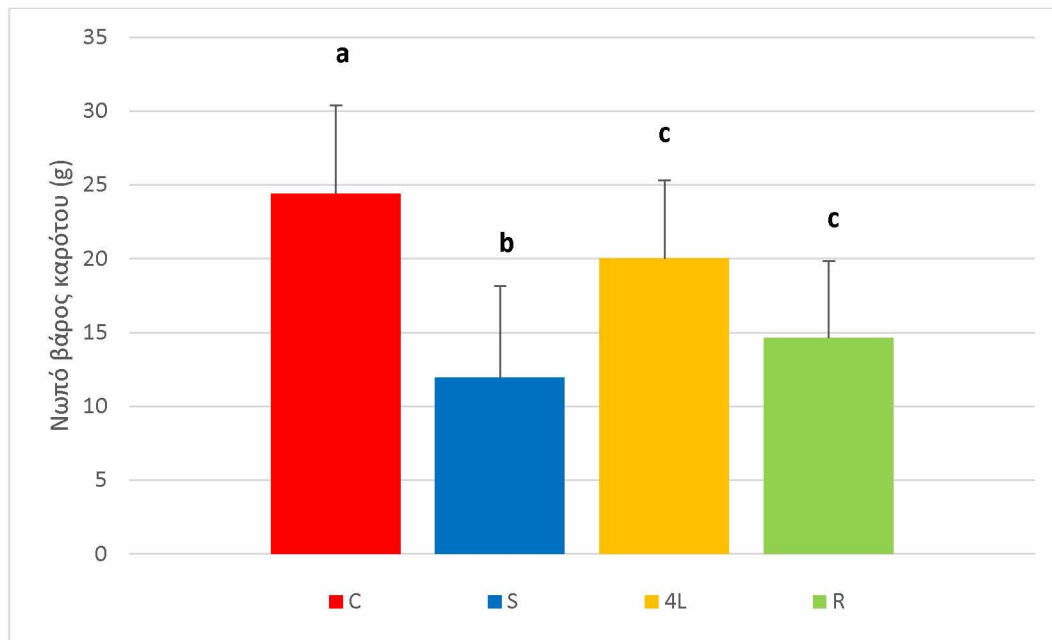
3.1 Τελική συλλογή: μορφολογικά χαρακτηριστικά

Στο σχήμα 2 απεικονίζεται ο μέσος όρος του νωπού βάρους του υπέργειου τμήματος των φυτών των διάφορων μεταχειρίσεων. Από την One-Way ANOVA και τον LSD έλεγχο, προέκυψε ότι εμφανίζονται στατιστικά σημαντικές διαφορές στο νωπό βάρος ανάμεσα στις μεταχειρίσεις C (μάρτυρας) και R, C και S, καθώς και στις μεταχειρίσεις 4L και S. Τα φυτά των μεταχειρίσεων S και R κατά μέσο όρο έχουν μικρότερο νωπό βάρος στο υπέργειο τμήμα τους σε σχέση με τα φυτά των υπόλοιπων μεταχειρίσεων.



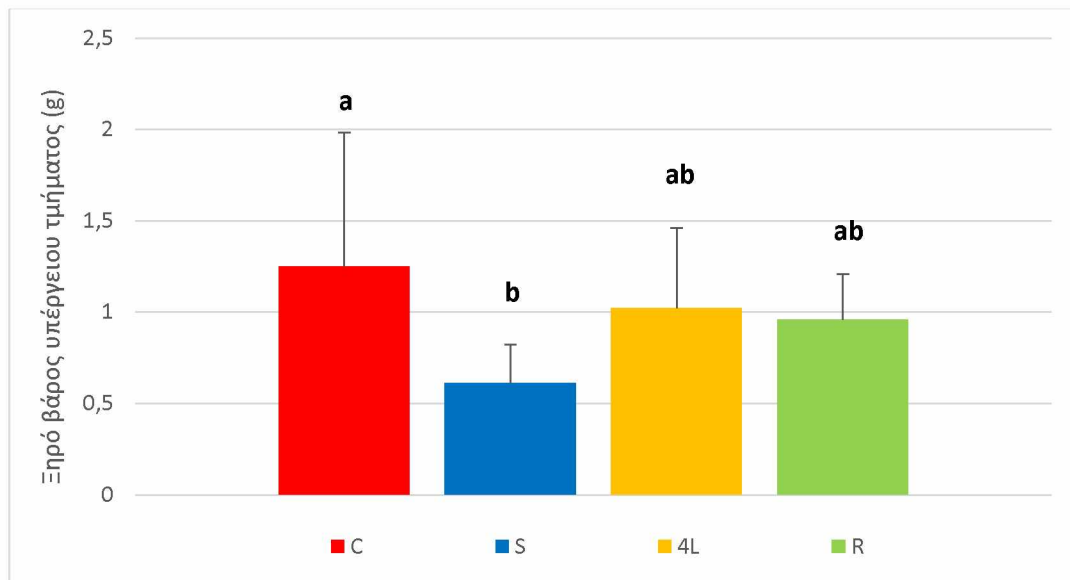
Σχήμα 2: Νωπό βάρος του υπέργειου τμήματος των φυτών των διάφορων μεταχειρίσεων (M.O \pm SD). Τα διαφορετικά γράμματα υποδεικνύουν στατιστικώς σημαντικές διαφορές σε επίπεδο $p < 0.05$.

Στο σχήμα 3 απεικονίζεται ο μέσος όρος του νωπού βάρους του καρότου των διάφορων μεταχειρίσεων. Ο μάρτυρας εμφανίζει τις μεγαλύτερες τιμές και ακολουθείται από τα φυτά των 4L και R μεταχειρίσεων που δεν έχουν διαφορές μεταξύ τους. Αντίθετα όλες οι μεταχειρίσεις διαφέρουν σημαντικά από τα φυτά S που παρουσιάζουν το χαμηλότερο νωπό βάρος αντιστοίχως με το νωπό βάρος του υπέργειου τμήματος των συγκεκριμένων φυτών (σχήμα 2).



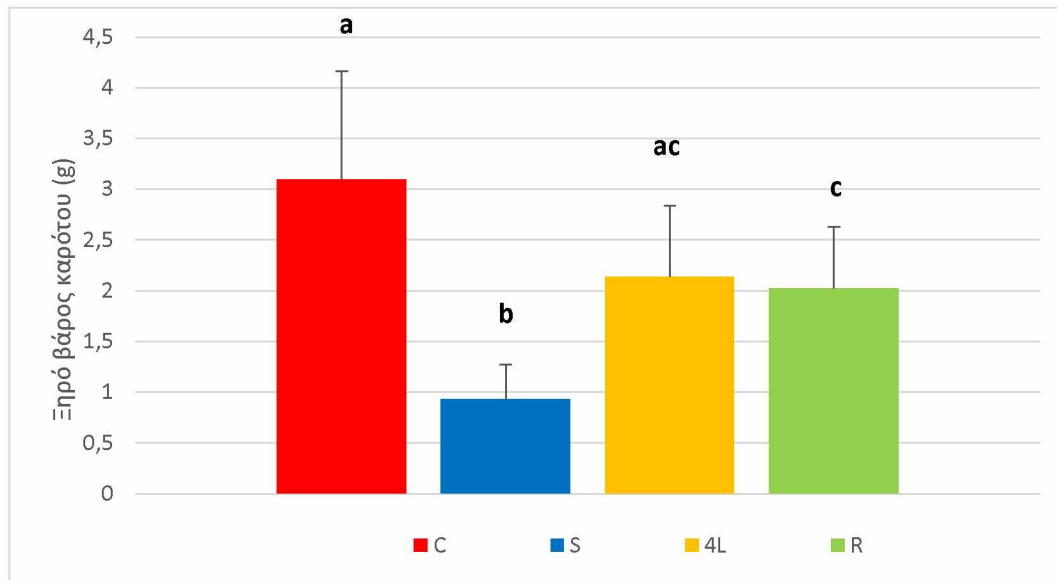
Σχήμα 3: Νωπό βάρος του καρότου φυτών των διάφορων μεταχειρίσεων. (M.O ±SD). Τα διαφορετικά γράμματα υποδεικνύουν στατιστικώς σημαντικές διαφορές σε επίπεδο $p < 0.05$.

Στο σχήμα 4 φαίνεται το ξηρό βάρος στα υπέργεια τμήματα των φυτών των διάφορων μεταχειρίσεων. Ο μάρτυρας (C) εμφάνισε και πάλι την μεγαλύτερη βιομάζα ακολουθούμενος, χωρίς σημαντικές διαφορές, από τα φυτά 4L και R. Η μεταχείριση S ήταν αυτή με το μικρότερο ξηρό βάρος στο υπέργειο τμήμα των φυτών.



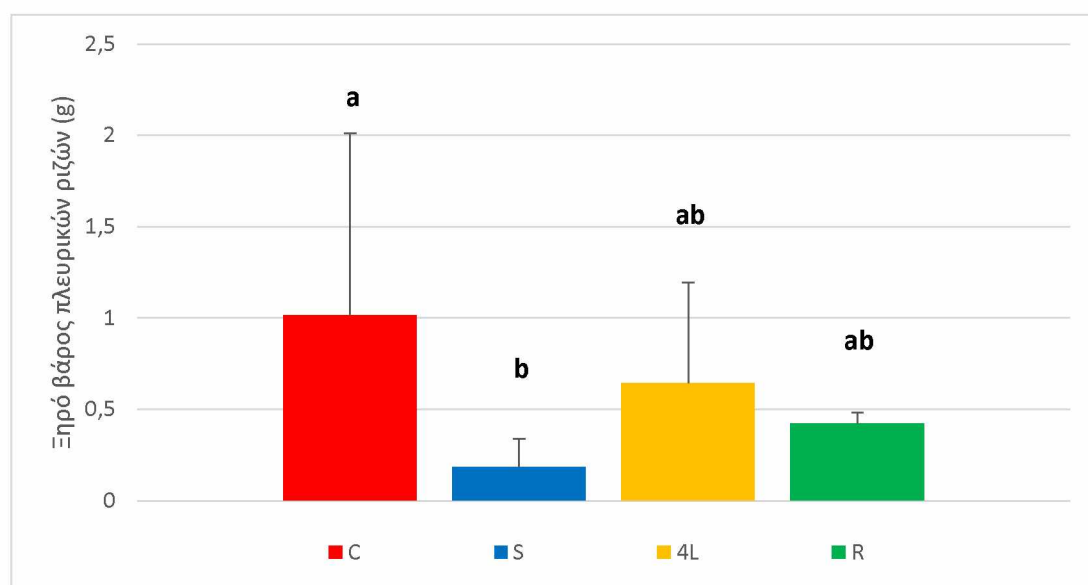
Σχήμα 4: Ξηρό βάρος υπέργειου τμήματος των φυτών στις διάφορες μεταχειρίσεις (M.O \pm SD). Τα διαφορετικά γράμματα υποδεικνύουν στατιστικώς σημαντικές διαφορές σε επίπεδο $p < 0.05$.

Το ξηρό βάρος της κονδυλόριζας απεικονίζεται στο σχήμα 5. Η μεταχείριση S διαθέτει το μικρότερο ξηρό βάρος κονδυλόριζας, διαφέροντας σημαντικά από όλες τις υπόλοιπες μεταχειρίσεις. Τα φυτά R και 4L δεν διέφεραν σημαντικά, αλλά τα R εμφάνισαν σημαντικά μικρότερο βάρος από το μάρτυρα.



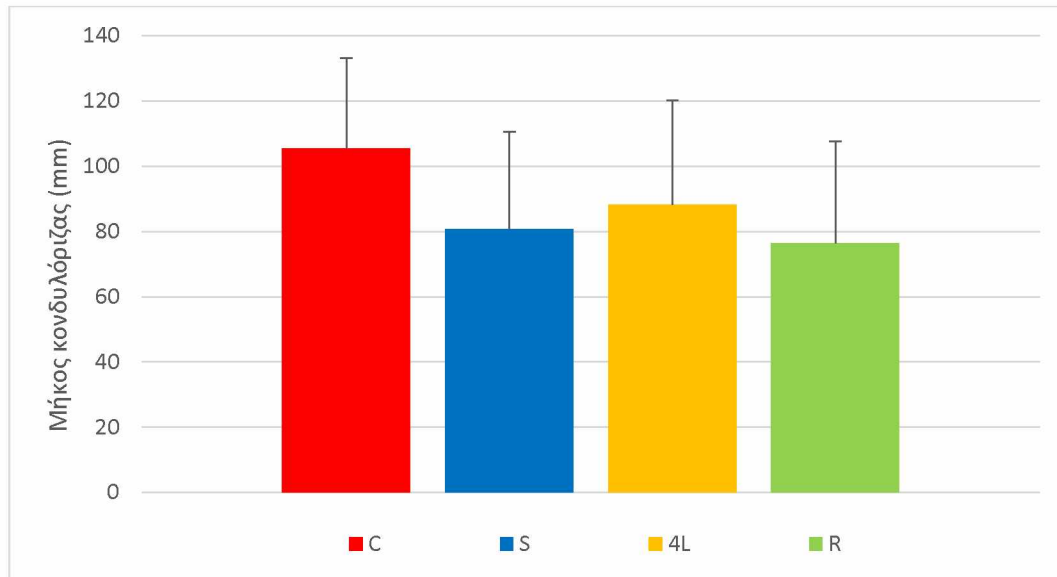
Σχήμα 5: Ξηρό βάρος υπόγειου τμήματος (καρότου) στις διάφορες μεταχειρίσεις (M.O ±SD). Τα διαφορετικά γράμματα υποδεικνύουν στατιστικώς σημαντικές διαφορές σε επίπεδο $p < 0.05$.

Στο σχήμα 6 παρουσιάζεται ο μέσος όρος του ξηρού βάρους του υπόλοιπου (εκτός κονδυλόριζας) τμήματος του υπόγειου μέρους του φυτού, δηλαδή των πλευρικών ριζών. Στις αποξηραμένες ρίζες των φυτών παρατηρήθηκε στατιστικώς σημαντική διαφορά μόνο μεταξύ των μεταχειρίσεων C και S.



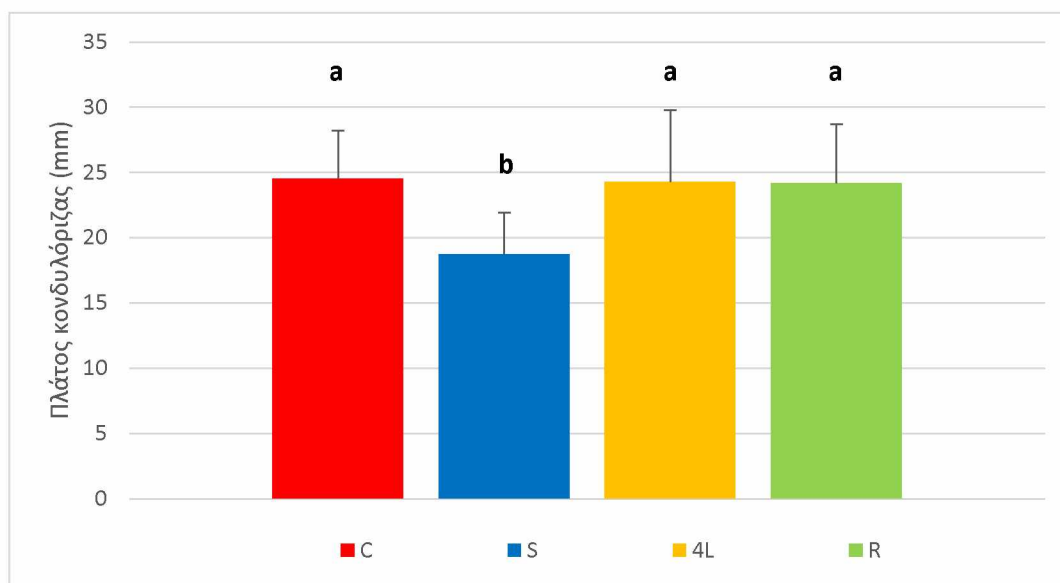
Σχήμα 6: Ξηρό βάρος πλευρικών ριζών στις διάφορες μεταχειρίσεις (M.O ±SD). Τα διαφορετικά γράμματα υποδεικνύουν στατιστικώς σημαντικές διαφορές σε επίπεδο $p < 0.05$.

Περνώντας τώρα στο μορφολογικά χαρακτηριστικά της κονδυλόριζας, στο σχήμα 7 παρουσιάζονται τα αποτελέσματα του μήκους. Παρότι τα καρότα στα φυτά του μάρτυρα είχαν μεγαλύτερο μήκος, η διαφορά τους από εκείνα των φυτών των υπόλοιπων μεταχειρίσεων δεν ήταν στατιστικώς σημαντική.



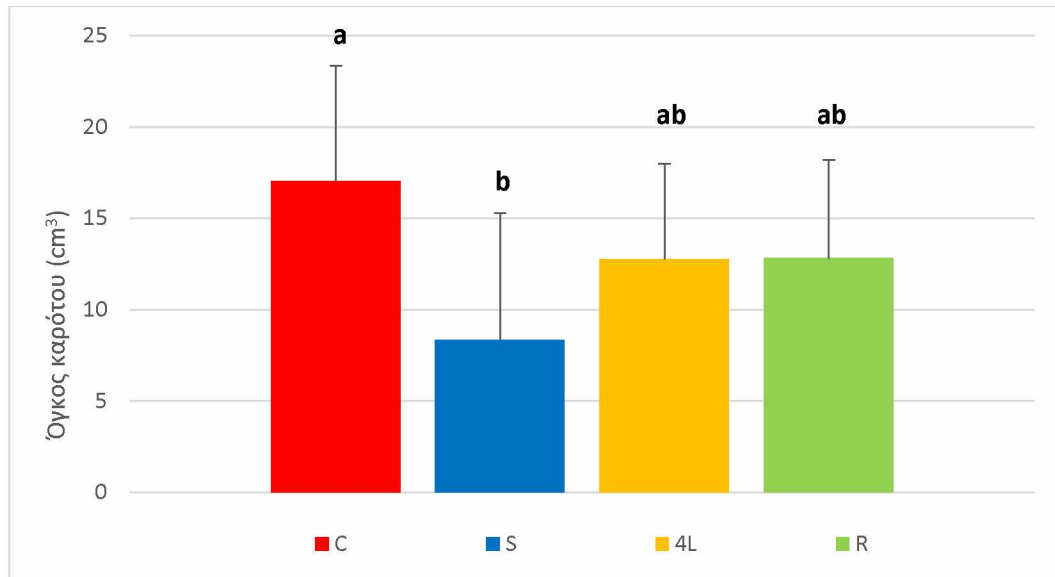
Σχήμα 7: Μήκος κονδυλόριζας των διαφόρων μεταχειρίσεων (Μ.Ο ±SD).

Στο σχήμα 8 απεικονίζεται ο μέσος όρος του πλάτους της κονδυλόριζας των διάφορων μεταχειρίσεων. Από τις μετρήσεις που πραγματοποιήθηκαν στο πλάτος των κονδυλόριζων προέκυψε ότι σε ό,τι αφορά την παράμετρο αυτή μόνο τα φυτά S διέφεραν στατιστικά σημαντικές από τις υπόλοιπες μεταχειρίσεις.



Σχήμα 8: Πλάτος κονδυλόριζας στις διάφορες μεταχειρίσεις (Μ.Ο ±SD). Τα διαφορετικά γράμματα υποδεικνύουν στατιστικώς σημαντικές διαφορές σε επίπεδο $p < 0.05$.

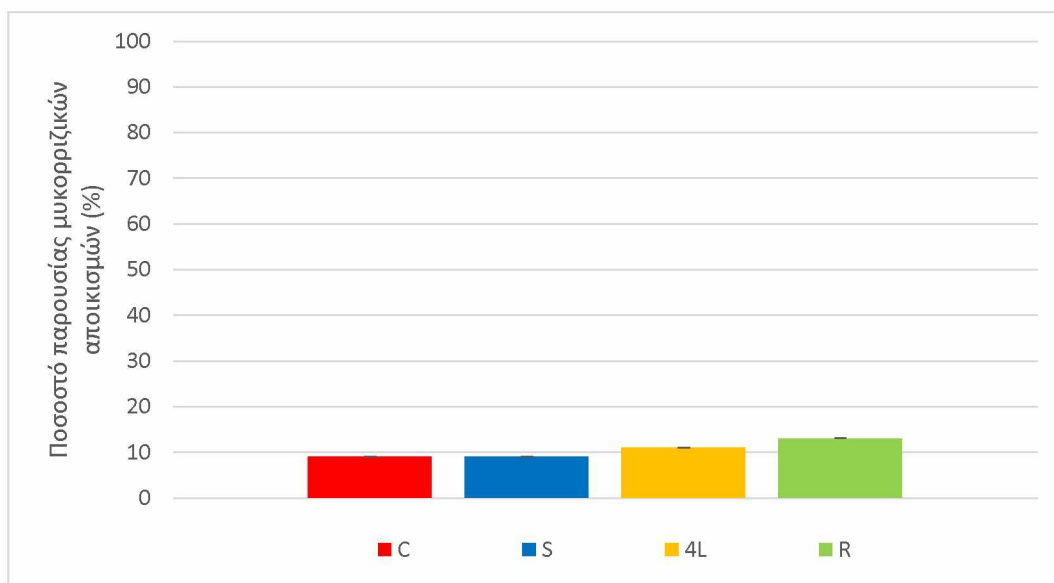
Στο σχήμα 9 φαίνεται ο όγκος της κονδυλόριζας των φυτών των διάφορων μεταχειρίσεων. Από τις μετρήσεις που πραγματοποιήθηκαν στον όγκο των κονδυλόριζων στις διάφορες μεταχειρίσεις παρατηρήθηκε ότι διαφέρουν στατιστικώς σημαντικά η μεταχείριση C και η μεταχείριση S.



Σχήμα 9: Όγκος κονδυλόριζας στις διάφορες μεταχειρίσεις (Μ.Ο ±SD). Τα διαφορετικά γράμματα υποδεικνύουν στατιστικώς σημαντικές διαφορές σε επίπεδο $p < 0.05$.

3.2 Τελική συλλογή: καταμέτρηση μυκορριζικών αποικισμών

Μετά το τέλος του πειράματος έγινε μέτρηση των μυκορριζικών αποικισμών, σε μία προσπάθεια να δούμε εάν επέδρασε στις μυκόρριζες το νερό της Κάρλας. Στο παρακάτω σχήμα παρουσιάζονται τα αποτελέσματα, όπου δεν φάνηκαν διαφορές μεταξύ των μεταχειρίσεων.

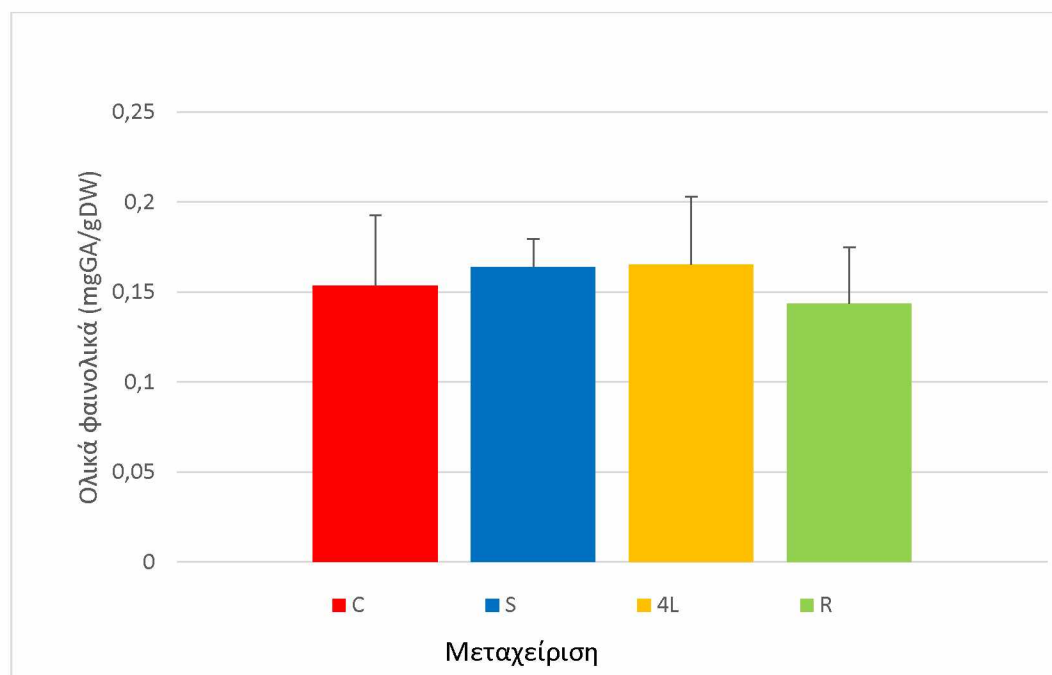


Σχήμα 10: Επί τοις εκατό ποσοστό της ρίζας που έφερε μυκορριζικές συμβιώσεις (M.O ±SD).

3.3 Τελική συλλογή: βιοχημικές παράμετροι

3.3.1 Ολικά φαινολικά

Οι συγκεντρώσεις των ολικών φαινολικών των φύλλων δεν φάνηκε να επηρεάστηκαν από το νερό της Κάρλας και όπως αποτυπώνεται στο Σχήμα 11 δεν διαφέρουν στατιστικώς σημαντικά μεταξύ τους.



Σχήμα 11: Συγκέντρωση ολικών φαινολικών ουσιών των φύλλων, εκφρασμένη ως ισοδύναμα γαλλικού οξέως (mgGA) ανά g ξηρού βάρους φύλλου (Μ.Ο±SD).

3.3.2 Προλίνη

Σύμφωνα με την διαδικασία που αναφέρθηκε στα υλικά και μέθοδοι όσο αφορά τον προσδιορισμό της προλίνης παρατηρήθηκε ότι δεν είχε συγκεντρωθεί προλίνη στα φυτά.

4. Συζήτηση

4.1 Γενικά

Στην παρούσα εργασία εκτιμήθηκε η επίδραση νερού από τον Ταμιευτήρα της Κάρλας πλούσιου σε μικροκυστίνες σε αναπτυξιακά, μορφολογικά και βιοχημικά χαρακτηριστικά των καρότων. Επίσης, επιχειρήθηκε μία εκτίμηση της δυνατότητας επαναφοράς/αντιστροφής των επιδράσεων όταν στα φυτά σταματά η άρδευση με νερό Κάρλας και συνεχίζεται με νερό βρύσης. Τα αποτελέσματα εξαρτώνται από το στάδιο ανάπτυξης κατά το οποίο τα φυτά έλαβαν το επιβαρυνμένο νερό και αναλύονται σε ενότητες μετρήσεων.

4.2 Επίδραση στην φυτρωτική ικανότητα των σπόρων

Στην συγκεκριμένη εργασία παρατηρήθηκε αρνητική επίδραση του νερού της Κάρλας στην φυτρωτική ικανότητα των σπόρων καρότου. Οι σπόροι που χρησιμοποιήθηκαν ήταν από την ίδια συσκευασία σπόρων, το περιβάλλον που αναπτύχθηκαν ήταν το ίδιο και η ποσότητα αρδευόμενου νερού ήταν ίδια. Το μόνο που άλλαξε ανάμεσα στις δύο αρχικές μεταχειρίσεις ήταν η προέλευση και κατά συνέπεια η ποιότητα του αρδευόμενου νερού. Το ποσοστό φύτευσης των σπόρων που αρδεύονταν με νερό Κάρλας ήταν σχεδόν το μισό από αυτό που καταγράφηκε στους σπόρους που αρδεύονταν με νερό της βρύσης.

4.3 Επίδραση στα μορφολογικά χαρακτηριστικά του καρότου

Σε όλες τις μετρήσεις που πραγματοποιήθηκαν παρατηρήθηκε ότι το νερό που ήταν πλούσιο σε κυανοτοξίνες ανέστειλε σημαντικά την ανάπτυξη τόσο του υπόγειου όσο και του υπέργειου μέρους των φυτών. Σημαντικό αλλά και αναμενόμενο αποτέλεσμα είναι ότι η μεταχείριση S, δηλαδή η μεταχείριση που αρδεύονταν με νερό πλούσιο σε κυανοτοξίνες από το σπόρο έως την τελική συλλογή, εμφάνισε τις χαμηλότερες τιμές σε όλες τις αναπτυξιακές παραμέτρους που μετρήθηκαν: μήκος, πλάτος και όγκο καρότου, καθώς και συνολική βιομάζα υπόγειου και υπέργειου μέρους. Αυτό το γεγονός συμφωνεί με τους Cordeiro et al 2015 που ανέφεραν ότι η άρδευση με νερό πλούσιο σε μικροκυστίνες προκαλεί μειωμένη ανάπτυξη των φυτών και οξειδωτικό στρες. Πιο συγκεκριμένα, παρατηρήθηκε ότι το νωπό βάρος του υπόγειου τμήματος των φυτών της μεταχείρισης S ήταν κατά μέσο όρο το μισό σε σχέση με αυτό του μάρτυρα (μεταχείριση C). Ακόμα σημαντικότερη διαφορά μεταξύ της μεταχείρισης S

και C παρατηρήθηκε στην ξηρή βιομάζα του υπόγειου μέρους των φυτών δηλαδή των κονδυλόριζων και των πλευρικών ριζών αλλά και στον όγκο των κονδυλόριζων, με τα S φυτά να εμφανίζουν μειωμένα μεγέθη κατά 70% και 80% αντίστοιχα. Στατιστικά σημαντική ήταν και η διαφορά μεταξύ C και S ως προς τον όγκο του καρότου που άγγιζε ποσοστό μεγαλύτερο του 50%. Αυτό σημαίνει ότι το επιβαρυνόμενο νερό επέδρασε σε μεγαλύτερο βαθμό στο υπόγειο μέρος των καρότων που είναι και το βρώσιμο τμήμα τους.

Όσο αφορά τις μεταχειρίσεις 4L και S παρατηρήθηκε ότι διαφέρουν σε σημαντικό βαθμό στο πλάτος της κονδυλόριζας αλλά και στην νωπή βιομάζα των φυτών. Εκεί που παρατηρήθηκε όμως η σημαντικότερη διαφορά ήταν στην ξηρή βιομάζα της κονδυλόριζας, δηλαδή στο εδώδιμο τμήμα του φυτού. Ο μέσος όρος του ξηρού βάρους των κονδυλόριζων της μεταχείρισης 4L ήταν διπλάσιος σε σχέση με αυτό της μεταχείρισης S. Η μεταχείριση 4L αρδεύτηκε με νερό από την λίμνη Κάρλα στο μεγαλύτερο μέρος της ανάπτυξης του φυτού. Θα περιμέναμε ανάλογο αποτέλεσμα με αυτό της μεταχείρισης S. Αυτό δεν συνέβη καθώς η άρδευση με νερό Κάρλας δεν πραγματοποιήθηκε από την σπορά αλλά σε μεγαλύτερο αναπτυξιακό στάδιο δηλαδή αυτό της εμφάνισης των τεσσάρων πραγματικών φύλλων. Φαίνεται λοιπόν ότι για τα φυτά 4L ήταν καθοριστική η πρώτη περίοδος ποτίσματος με νερό βρύσης, αν και σχετικά σύντομη. Σε αυτό το συμπέρασμα συνηγορεί και η απουσία σημαντικών διαφορών της ομάδας αυτής από τα φυτά-μάρτυρες. Επομένως, συμπεραίνουμε ότι όσο νωρίτερα κατά την ανάπτυξή τους έρθουν σε επαφή τα φυτά με επιβαρυνόμενο νερό τόσο ισχυρότερη επίδραση έχει αυτό στα αναπτυξιακά χαρακτηριστικά τους. Αυτό συμφωνεί με την έρευνα των Levizou et al. (2017) που συμπέραναν ότι η άρδευση με νερό πλούσιο σε MCs στην καλλιέργεια μαρουλιού προκάλεσε μεγαλύτερη βιοσυσσώρευση μικροκυστινών όταν η άρδευση ξεκινούσε από πρώιμα αναπτυξιακά στάδια των φυτών.

Τα φυτά της μεταχείρισης 4L δεν διαφέρουν σημαντικά με εκείνα της R ως προς τις αναπτυξιακές και βιοχημικές παραμέτρους που μετρήθηκαν στο παρόν πείραμα. Στις περισσότερες περιπτώσεις οι μετρήσεις που αφορούσαν τα φυτά 4L κυμάνθηκαν σε τιμές ενδιάμεσες των C και R. Εντούτοις, η μεταχείριση R υπολείπεται σημαντικά από τον μάρτυρα ως προς το νωπό βάρος του συνόλου του φυτού, την υπόγεια βιομάζα αλλά και το μήκος του βρώσιμου τμήματος. Από την άλλη, οι μεταχειρίσεις R και S διαφέρουν στο μήκος και στο πλάτος του καρότου.

Αυτό σημαίνει ότι υπάρχει πτώση της απόδοσης μια καλλιέργειας καρότου σε περίπτωση που αρδεύει με νερό Κάρλας -πλούσιου σε μικροκυστίνες από την σπορά μέχρι και την συγκομιδή σε σύγκριση με την καλλιέργεια που θα αρδεύει από την σπορά μέχρι και ένα ώριμο στάδιο ανάπτυξης με επιβαρυμένο νερό αλλά στην υπόλοιπη καλλιεργητική περίοδο που απομένει αρδεύει με νερό απαλλαγμένο από μικροκυστίνες. Η αλλαγή του νερού άρδευσης από Κάρλας σε βρύσης στα φυτά R έγινε περίπου 1,5 μήνα μετά τη μεταφύτευση και συνολικά δύο μήνες από την σπορά, διάστημα κατά το οποίο τα αρτίβλαστα και μετέπειτα τα φυτά λάμβαναν επιβαρυμένο νερό. Φαίνεται ότι παρότι μία δυνατότητα επαναφοράς υπάρχει, ώστε τα φυτά R να πλησιάσουν σε τιμές παραμέτρων των φυτών μαρτύρων, η επαναφορά αυτή δεν ήταν πλήρης. Μία πρόσφατη εργασία των Cordeiro-Araújo et al. (2017), στην οποία επιχειρήθηκε «καθαρισμός» φυτών μαρουλιού και ρόκας από κυανοτοξίνες (κυλινδροσπερμοψίνες) με παρόμοιο πρωτόκολλο με της παρούσας μελέτης κατέληξε σε μέγιστες τιμές καθαρισμού 60% για το μαρούλι και 44% για τη ρόκα. Αυτό πρακτικώς σημαίνει ότι το 40% και 60% αντιστοίχως των τοξινών παρέμειναν στους φυτικούς ιστούς. Επομένως, και στην περίπτωση αυτή η επαναφορά/καθαρισμός δεν ήταν πλήρης.

4.4 Επίδραση μικροκυστινών στα βιοχημικά χαρακτηριστικά του καρότου

Τα φυτά σε καταστάσεις καταπόνησης αυξάνουν τις αμυντικές/αντιοξειδωτικές ουσίες τους. Τέτοια παραδείγματα είναι τα ολικά φαινολικά αλλά και αμινοξέα όπως η προλίνη. Στο πείραμά αυτό δεν παρατηρήθηκαν σημαντικές διαφορές μεταξύ των μεταχειρίσεων όσον αφορά τα δύο αυτά βιοχημικά χαρακτηριστικά του φυτού. Ανάλογα αποτελέσματα βρέθηκαν και από τους Levizou et al. (2017), όταν εξέτασαν την επίδραση του νερού της Κάρλας στο μαρούλι.

5. Συμπεράσματα

Τα συμπεράσματα της συγκεκριμένης πτυχιακής εργασίας σε πιο συνοπτική μορφή είναι τα εξής:

- Το αρδευτικό νερό που προήλθε από την Κάρλα επηρέασε αρνητικά σε μεγάλο ποσοστό τη φύτευση των σπόρων καρότου.
- Επηρεάστηκε δυσμενώς η ανάπτυξη των καρότων στα οποία εφαρμόστηκε το επιβαρυνμένο νερό, κάτι το οποίο έγινε φανερό μέσω των μετρήσεων βιομάζας τόσο υπέργειου όσο και υπόγειου τμήματος φυτών.
- Όσο πιο νωρίς κατά την ανάπτυξη τους αρδεύονταν τα φυτά με νερό πλούσιο σε μικροκυστίνες τόσο μεγαλύτερη πτώση των αναπτυξιακών χαρακτηριστικών παρουσίασαν.
- Υπάρχει δυνατότητα επαναφοράς του φυτού όσο αφορά το μέγεθος της κονδυλίου δηλαδή του εδάδιμου τμήματος του φυτού, εντούτοις δεν είναι πλήρης ως προς τα υπόλοιπα μορφο-αναπτυξιακά χαρακτηριστικά.
- ο μυκορριζικός αποικισμός δεν παρουσίασε σημαντικές μεταβολές μεταξύ των μεταχειρίσεων.
- Τα ολικά φαινορικά δεν παρουσίασαν σημαντική αύξηση στις συνθήκες καταπόνησης λόγω αρδευτικού νερού πλούσιου σε κυανοτοξίνες, ενώ δεν καταγράφηκε βιοσύνθεση προλίνης.

6. Βιβλιογραφία

6.1 Ξενόγλωσση βιβλιογραφία

Ananiadis, C.I. 1956. "Limnological Study of Lake Karla." Bulletin de l' Institute Oceanographic. Vol. 1083: 1-19.

Bates, L. S., Waldren, R & Teare, I .D. 1973. "Rapid Determination of Free Proline for Water Stress Studies." Plant and Soil 39: 205–7.

Carmichael W.W. 2012. Health Effects of Toxin-Producing Cyanobacteria. «The CyanoHABS». pp. 1393-1407.

Corbel, S., Mougín, C., Bouaïcha, N., 2014. "Cyanobacterial toxins: Modes of actions, fate in aquatic and soil ecosystems, phytotoxicity and bioaccumulation in agricultural crops." Chemosphere 96: 1–15.

Cordeiro-Araújo, M., Kézia Chia, Mathias., Ahii Hereman, Talita., Caroline Sasaki, Fabiana., Fumido Carmo Bittencourt-Oliveira, Maria. 2015. "Selective Membrane Permeability and Peroxidase Activity Response of Lettuce and Arugula Irrigated with Cyanobacterial Contaminated Water." Environmental Earth Sciences 74: 1547–53.

Cordeiro-Araújo, M. K., Chia, M. A., Arruda-Neto, J. D. de T., Tornisielo, V. L., Vilca, F. Z., & Bittencourt-Oliveira, M. do C. 2016. "Microcystin-LR bioaccumulation and depuration kinetics in lettuce and arugula: Human health risk assessment." Science of the Total Environment, 566–567: 1379–1386.

Karpouzas. D.G., Papadopoulou. E., Ipsilantis. I., Friedel, I., Petric, I., Udikovic-Kolic, N., Djuric, S., Kandeler, E., Menkissoglu-Spiroudi, U., Martin-Laurent, F. 2014. "Effects of Nicosulfuron on the Abundance and Diversity of Arbuscular Mycorrhizal Fungi Used as Indicators of Pesticide Soil Microbial Toxicity." Ecological indicators 39: 44-53.

Khan, A. A., McNeilly, T., Collins, J. C. 2000. "Accumulation of amino acids, proline, and carbohydrates in response to aluminum and manganese stress in maize." Journal of Plant Nutrition, 23:9: 1303-1314.

- Lee, S., Jiang, X., Manubolu, M., Riedl, K., Ludsin, S. A., Martin, J. F., & Lee, J. 2017. "Fresh produce and their soils accumulate cyanotoxins from irrigation water: Implications for public health and food security." *Food Research International*, 102:234-245.
- 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." *Ecotoxicology and Environmental Safety* 143: 193-200.
- Machado, J., Azevedo, J., Freitas, M., Pinto, E., Almeida, A., Vasconcelos, V., Campos, A. 2017. "Analysis of the Use of Microcystin-Contaminated Water in the Growth and Nutritional Quality of the Root-Vegetable, *Daucus Carota*." *Environmental Science and Pollution Research* 24(1): 752–64. 4-245.
- O'Neil, J. M., T. W. Davis, M. A. Burford, and C. J. Gobler. 2012. "The Rise of Harmful Cyanobacteria Blooms: The Potential Roles of Eutrophication and Climate Change." *Harmful Algae* 14: 313–34.
- Oikonomou, A., Katsiapi, M., Karayanni ,H., Moustaka-Gouni, M., Kormas, K, A. 2012. "Plankton Microorganisms Coinciding with Two Consecutive Mass Fish Kills in a Newly Reconstructed Lake." *The Scientific World Journal* 2012: 1–14.
- Papadimitriou, T., Katsiapi, M., Kormas, K. A., Moustaka-Gouni, M., & Kagalou, I. 2013. "Artificially-born "killer" lake: phytoplankton based water quality and microcystin affected fish in a reconstructed lake." *Science of the total environment*, 452: 116-124.
- Pflugmacher, Stephan. 2002. "Possible Allelopathic Effects of Cyanotoxins, with Reference to Microcystin-LR, in Aquatic Ecosystems." *Environmental Toxicology* 17: 407–13.
- Pflugmacher, S., Aulhorn, M., and Grimm B. 2007. "Influence of a Cyanobacterial Crude Extract Containing Microcystin-LR on the Physiology and Antioxidative Defence Systems of Different Spinach Variants." *New Phytologist* 175: 482–89.

Stal, L. J. 1995. "Physiological Ecology of Cyanobacteria in Microbial Mats and Other Communities." *New Phytologist* 131: 1–32.

Stal, L. J. 2012. "Microbial mats and stromatolites. The ecology of cyanobacteria". Springer, pp 61-120.

Sidiropoulos, P., Papadimitriou, T., Stabouli, Z., Loukas, A., Mylopoulos, N., & Kagalou, I. 2012. "Past, present and future concepts for conservation of the reconstructed Lake Karla (Thessaly-Greece)." *Fresenius Environ. Bull* 21: 3027-34.

Sidiropoulos, P., Chamoglou, M., Kagalou, I., 2017. "Combining conflicting, economic, and environmental pressures: Evaluation of the restored Lake Karla (Thessaly-Greece)." *Ecohydrology & Hydrobiology*, 17: 177-189.

Sivonen, K., Jones, G., Chorus, I., Bartram J., 1999. "Toxic cyanobacteria in water: a guide to their public health consequences, monitoring and management," *Cyanobacterial toxins*. E.& F.N. Spon, London, 41-91

Tillett, D., Dittmann, E., M. Erhard, H. von_Döhren, T. Börner, B.A. Neilan. 2000. "Structural organization of microcystin biosynthesis in *Microcystis aeruginosa* PCC 7806: an integrated peptide-polyketide synthetase system." *Chem. Biol.*, 7: 753-764.

Triantafyllou G., Petihakis G., Dounas C., Theodorou A. 2001. "Assessing marine ecosystem response to nutrient inputs." *Marine Pollution Bulletin*, 43:175–186.

Waterman, Peter G., and Mole S. 1994. "Analysis of Phenolic Plant Metabolites." *Methods in ecology*: 238.

Whitton, Brian A., and Malcolm Potts. 2012. "Introduction to the Cyanobacteria." *Ecology of Cyanobacteria II: Their Diversity in Space and Time* 9789400738: 1–13.

WHO, 2003. "Algae and cyanobacteria in fresh water. In: Guidelines for safe recreational water environments." World Health Organization, Geneva, Switzerland, Coastal and fresh waters Vol. 1: 136–158.

Zalidis G., and Gerakis A. 1999. "Evaluating sustainability of watershed resources management through wetland functional analysis." *Environmental Management*, 24:193– 207.

Zalidis C. G., Takavakoglou V., Panoras A., Bilas G., Katsavouni S. 2005. "Reestablishing a sustainable wetland at former lake Karla, Greece, using Ramsar restoration guidelines." *Environmental Management*, 34:875-886.

6.2 Διαδικτυακή βιβλιογραφία

<http://www-cyanosite.bio.purdue.edu/cyanotox/toxins.html>

<http://www-cyanosite.bio.purdue.edu/cyanotox/toxins/microcystins.html>

<http://www.biosciences-labs.bham.ac.uk/exhibit/whatare.html>

6.3 Ελληνική βιβλιογραφία

Νεβεσκιώτης Χ. Θ. 2010. Μελέτη της υπό ανασύσταση λίμνης Κάρλας με μεθόδους υπολογιστικής ρευστομηχανικής. Παραμετρική διερεύνηση και περιβαλλοντική αποτίμηση. Μεταπτυχιακή Διατριβή.

Ολύμπιος, Χρήστος Μ. 2015. Η Τεχνική της Καλλιέργειας των Υπαίθριων Καλλιεργειών. Εκδόσεις Σταμούλης.

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