



ΠΑΝΕΠΙΣΤΗΜΙΟ ΘΕΣΣΑΛΙΑΣ
ΣΧΟΛΗ ΓΕΩΠΟΝΙΚΩΝ ΕΠΙΣΤΗΜΩΝ

Τμήμα Γεωπονίας Φυτικής Παραγωγής και Αγροτικού Περιβάλλοντος
ΕΡΓΑΣΤΗΡΙΟ ΖΙΖΑΝΙΟΛΟΓΙΑΣ

Πτυχιακή Διατριβή

**Φωτοσυνθετικές χρωστικές και αμυντικές αποκρίσεις στο ραπανάκι όταν
αναπτύσσεται παρουσία μικροκυστίνης-LR**

ΠΑΡΑΣΚΕΥΟΠΟΥΛΟΥ ΑΓΓΕΛΙΚΗ
Επιβλέπουσα καθηγήτρια: Λεβίζου Ευθυμία

Βόλος 2020

Φωτοσυνθετικές χρωστικές και αμυντικές αποκρίσεις στο ραπανάκι όταν αναπτύσσεται
παρουσία μικροκυστίνης-LR

Photosynthetic pigments and defense responses of radish exposed to microcystin-LR

Παρασκευοπούλου Αγγελική

Τριμελής εξεταστική επιτροπή:

Ε. Λεβίζου, Επίκουρος Καθηγήτρια, Φυσιολογία Φυτών, Πανεπιστήμιο Θεσσαλίας

Α. Καρκάνης, Επίκουρος Καθηγητής, Ζιζανιολογία, Πανεπιστήμιο Θεσσαλίας

Δ. Πετούμενου, Λέκτορας, Αμπελουργία, Πανεπιστήμιο Θεσσαλίας

Βεβαιώνω ότι είμαι η συγγραφέας αυτής της πτυχιακής εργασίας, η οποία εκπονήθηκε σύμφωνα με τον Κανονισμό Εκπόνησης Πτυχιακής Εργασίας του Τμήματος Γεωπονίας Φυτικής Παραγωγής και Αγροτικού Περιβάλλοντος.

Ευχαριστίες

Θα ήθελα να ευχαριστήσω ιδιαίτερα την επιβλέπουσα καθηγήτρια μου κα. Ευθυμία Λεβίζου για την εμπιστοσύνη της, την μεγάλη υπομονή της και την βοήθειά της για την εκτέλεση του πειράματος, καθώς και για την πολύτιμη καθοδήγησή της κατά την διάρκεια της συγγραφής της εργασίας.

Επίσης, θα ήθελα να ευχαριστήσω τον Επίκουρο Καθηγητή Καρκάνη Ανέστη και την Λέκτορα Πετούμενου Δέσποινα του τμήματος Γεωπονίας Φυτικής Παραγωγής και Αγροτικού Περιβάλλοντος της Σχολής Γεωπονικών Επιστημών του Πανεπιστημίου Θεσσαλίας για τη συμμετοχή τους στην τριμελή επιτροπή.

Περίληψη

Η εμφάνιση ανθίσεων τοξικών κυανοβακτηρίων είναι συχνό φαινόμενο σε επιφανειακά νερά (π.χ. λίμνες) αλλά και σε δεξαμενές νερού που προορίζονται για άρδευση. Τα κυανοβακτήρια παράγουν μία σειρά τοξινών, μεταξύ των οποίων και ηπατοτοξίνες, με πιο αντιπροσωπευτική κατηγορία αυτών τις μικροκυστίνες (MCs). Έρευνες έχουν υποδείξει ότι η έκθεση σε MCs μέσω του αρδευτικού νερού αποτελεί απειλή για την ποιότητα και απόδοση των καλλιεργούμενων φυτών. Στην παρούσα εργασία μελετήθηκε η επίδραση του νερού της Κάρλας που περιέχει MCs, καθώς και συγκεκριμένες παρόμοιες συγκεντρώσεις καθαρής MC (MC-LR) σε φυτά ραπανακίου (*Raphanus sativus*). Στόχος είναι να εκτιμηθεί η επίδραση των τοξινών αυτών σε βιοχημικά χαρακτηριστικά του φυτού. Καθώς το νερό της Κάρλας μπορεί να περιέχει και άλλες βιοενεργές ουσίες, ο πειραματικός σχεδιασμός περιελάμβανε μεταχειρίσεις με διαλύματα καθαρής MC σε ίδια επίπεδα με αυτά που περιέχει η Κάρλα και λίγο υψηλότερα ώστε να εξασφαλιστεί ότι το όποιο αποτέλεσμα καταγραφόταν στο φυτό προκαλούνταν από την τοξίνη. Κατά την πειραματική διαδικασία, η καλλιέργεια χωρίστηκε σε πέντε ομάδες ανάλογα με τις μεταχειρίσεις άρδευσης. Μία ομάδα αρδευόταν με νερό από τη λίμνη Κάρλα (περιελάμβανε $2\mu\text{g l}^{-1}$ MC σύμφωνα με μετρήσεις), η δεύτερη ομάδα λάμβανε διάλυμα $2\mu\text{g l}^{-1}$ καθαρής MC-LR σε νερό βρύσης και η τρίτη $12\mu\text{g l}^{-1}$ αντίστοιχα. Επιπλέον, υπήρχε η ομάδα που αρδευόταν με νερό από τη λίμνη Κάρλα στο οποίο είχαν προστεθεί $10\mu\text{g l}^{-1}$ καθαρής MC-LR ώστε να φτάσει στο $12\mu\text{g l}^{-1}$ της 3^{ης} μεταχείρισης. Τέλος, μάρτυρας ήταν η ομάδα φυτών που ποτίζονταν με νερό βρύσης. Κατά την διάρκεια της ανάπτυξης έγιναν μετρήσεις της συγκέντρωσης ολικής χλωροφύλλης ενώ μετά την συγκομιδή των φυτών πραγματοποιήθηκε μέτρηση των φαινολικών στη ρίζα και στα φύλλα των φυτών, προσδιορισμός των φωτοσυνθετικών χρωστικών στα φύλλα και της περιεκτικότητας σε προλίνη. Οι συγκεντρώσεις των χλωροφυλλών a και b, οι μεταξύ τους αναλογίες αλλά και τα καροτενοειδή κυμάνθηκαν σε ίδια επίπεδα για τα φυτά όλων των μεταχειρίσεων. Αντίστοιχα τα φαινολικά τόσο των φύλλων, όσο και της κονδυλόριζας δεν διέφεραν σημαντικά μεταξύ των φυτών των διάφορων ομάδων. Ελεύθερη προλίνη δεν ανιχνεύτηκε σε κανένα φυτό. Φαίνεται λοιπόν ότι τόσο οι χαμηλές συγκεντρώσεις καθαρών μικροκυστινών όσο και οι μικροκυστίνες που περιέχονται στο νερό της Κάρλας δεν επηρεάζουν αρνητικά τις εξετασθείσες βιοχημικές παραμέτρους στο ραπανάκι.

Περιεχόμενα

1. Εισαγωγή	7
1.1 Γενικά για τις μικροκυστίες	7
1.2 Χημική Δομή	8
1.3 Μικροκυστίες και άνθρωπος.....	10
1.4 Μικροκυστίες και φυτά.....	10
1.5 Σκοπός της εργασίας.....	13
2. Υλικά και μέθοδοι	14
2.1 Περίοδος ανάπτυξης των φυτών	14
2.2 Μετρήσεις	15
2.2.1 Μέτρηση χλωροφύλλης	15
2.2.2 Προσδιορισμός ολικών φαινολικών ενώσεων	15
2.2.3 Προσδιορισμός φωτοσυνθετικών χρωστικών	16
2.2.4 Μέτρηση Προλίνης	17
2.3 Στατιστική επεξεργασία.....	18
3. Αποτελέσματα	19
3.1 Τιμές SPAD κατά την διάρκεια της αναπτυξιακής περιόδου	19
3.2 Φαινολικά ρίζας	20
3.3 Φαινολικά φύλλων.....	21
3.4 Συγκέντρωση χλωροφύλλης a και χλωροφύλλης b	22
3.5 Συγκέντρωση καροτενοειδών	23
3.6 Συγκέντρωση ολικών χλωροφυλλών	24
3.7 Λόγος συγκέντρωσης χλωροφύλλης a/b.....	25
3.8 Λόγος ολικών χλωροφυλλών/καροτενοειδή	26
3.9.Τιμές SPAD κατά την συγκομιδή σε φύλλα διαφορετικού σταδίου ανάπτυξης	27
3.10 Συγκέντρωση προλίνης.....	28
4. Συζήτηση	29
5. Συμπεράσματα.....	30
6. Βιβλιογραφία	31

1. Εισαγωγή

1.1 Γενικά για τις μικροκυστίνες

Τα οικοσυστήματα γλυκών υδάτων, σε παγκόσμια κλίμακα, αντιμετωπίζουν τον απειλητικό πολλαπλασιασμό των κυανοβακτηρίων, φαινόμενο που ευθύνεται για την μεγάλη παραγωγή τοξινών καθώς πολλά κυανοβακτήρια είναι τοξικά (Beaulieu et al., 2013; Taranu et al., 2015). Η αυξημένη εμφάνιση ανθίσεων κυανοβακτηρίων είναι εμφανής στα ευτροφικά νερά που λαμβάνουν σημαντικές εισροές θρεπτικών ουσιών από τις γύρω λεκάνες απορροής (Beaver et al., 2014; Paerl et al., 2018). Δεν έχουν διευκρινιστεί πλήρως έως τώρα οι αιτίες για την σημαντική αύξηση των κυανοβακτηριακών ανθίσεων, εντούτοις φαίνεται ότι η συγκέντρωση θρεπτικών συστατικών παίζει τον πρωταρχικό ρόλο στα λιμνάζοντα νερά (Dolman et al., 2012; Rigosi et al., 2014; Marmen et al., 2016). Οι αναλύσεις του Οργανισμού Προστασίας του Περιβάλλοντος των ΗΠΑ για την Εκτίμηση Λιμνών (EPA NLA) του 2012 έδειξαν ότι η κατανομή των τοξικών κυανοβακτηρίων σχετίζεται με την ποιότητα του νερού και ιδιαίτερα τη συγκέντρωση του ολικού φωσφόρου (Beaver et al., 2018). Ωστόσο, η συνεισφορά της συγκέντρωσης του αζώτου για την πρόβλεψη της βιομάζας των κυανοβακτηρίων δεν μπορεί να αγνοηθεί (Beaulieu et al., 2013). Οι συνέπειες της ρύπανσης από θρεπτικά στοιχεία συνδυάζονται με τις αλλαγές στο παγκόσμιο κλίμα - ιδιαίτερα την αύξηση της θερμοκρασίας, καθώς πολλά είδη κυανοβακτηρίων προτιμούν τα ζεστά επιφανειακά νερά (Wagner and Andrian, 2009; Carey et al., 2012; Wilkison et al., 2018).



Εικόνα 1. Απεικόνιση της κυανοβακτηριακής άνθισης στη λίμνη Erie, Ohio USA, 2014.

(Πηγή : NOAA.gov.)

Τα κυανοβακτήρια μπορούν να παράγουν μια σειρά από ενώσεις, πολλές από τις οποίες είναι τοξικές για τους υδρόβιους οργανισμούς και τους ανθρώπους (Graham et al., 2010). Οι τοξίνες αυτές είναι νευροτοξίνες (π.χ. anatoxins), κυτοτοξίνες, ενδοτοξίνες και ηπατοτοξίνες (de Figueiredo et al., 2004). Η μεγαλύτερη κατηγορία ηπατοτοξινών είναι οι μικροκυστίνες (MCs). Το είδος *Microcystis aeruginosa* ή άλλα είδη του γένους *Microcystis* αλλά και τα *Planktothrix*, *Anabaena*, *Oscillatoria* και *Nostoc* είναι αυτά που παράγουν τις MCs. Περισσότερα από 90 είδη μικροκυστινών έχουν ήδη βρεθεί και η πιο κοινή είναι η μικροκυστίνη-LR (microcystin-LR) (Corbel et al. 2014). Οι Loftin et al. (2016) εντόπισαν πιθανά είδη παραγωγής μικροκυστίνης στο 95% των δειγμάτων που ελήφθησαν από 1161 λίμνες και δεξαμενές σε όλες τις Ηνωμένες Πολιτείες. Το *Microcystis*, ο κύριος παραγωγός μικροκυστίνης, ήταν το πιο συχνά ανιχνευόμενο γένος κυανοβακτηρίων. Οι κυανοβακτηριακές ανθίσεις περιέχουν τυπικά μια μικτή κοινότητα κυανοβακτηρίων που μπορεί να περιλαμβάνει τοξικά και μη τοξικά στελέχη του ίδιου είδους (Dolman et al., 2012).

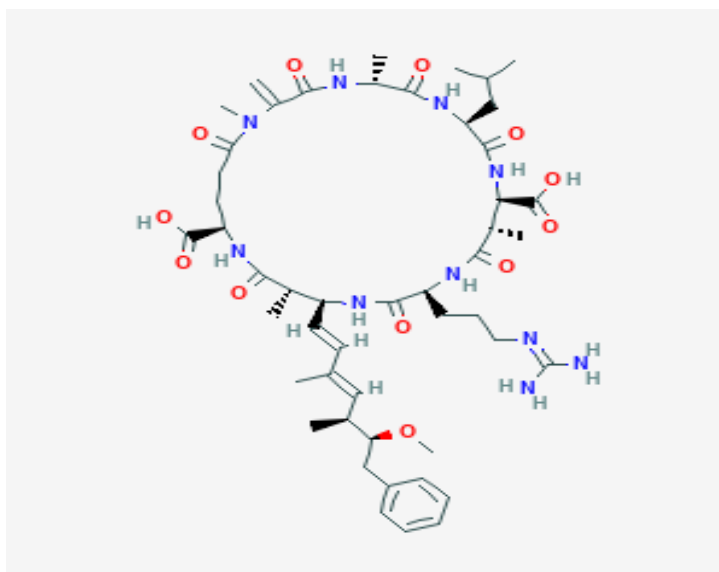
Πέραν των υψηλών συγκεντρώσεων θρεπτικών στοιχείων, οι πολλαπλές τροφικές αλληλεπιδράσεις εντός του νερού, ρυθμίζουν το σχηματισμό και την αποικοδόμηση των ανθίσεων των κυανοβακτηρίων, ιδιαίτερα οι αλληλεπιδράσεις με το ζωοπλαγκτόν (Wilson et al., 2006; Uttutia – Cordrto et al., 2015; Ger et al., 2018). Η παραγωγή τοξινών από την πλευρά των κυανοβακτηρίων φαίνεται ότι κυρίως εξυπηρετεί την άμυνά τους απέναντι στους εχθρούς τους και αλληλοπαθητικές σχέσεις με άλλους υδρόβιους οργανισμούς (Corbel et al. 2014).

1.2 Χημική Δομή

Οι μικροκυστίνες περιλαμβάνουν τη μεγαλύτερη και πιο διαφορετική ομάδα κυανοβακτηριακών τοξινών. Περίπου 90 ισόμορφα μικροκυστίνης που ποικίλλουν ανάλογα με το βαθμό μεθυλίωσης, υδροξυλίωσης, επιμερισμού, πεπτιδικής αλληλουχίας και τοξικότητας έχουν αναγνωρισθεί (Sivonen and Jones, 1999; Welker and von Dohren, 2006). Οι μικροκυστίνες μπορούν να περιγραφούν ως μονοκυκλικά επταπεπτίδια με μοριακό βάρος περίπου 1000 dalton (Εικόνα 2). Η χημική δομή των μικροκυστινών περιλαμβάνει δύο μεταβλητά αμινοξέα και ένα ασυνήθιστο αρωματικό αμινοξύ, το ADDA (3-αμινο-9-μεθοξυ-2,6,8-τριμεθυλ-10-φαινυλδεκα-4,6-διενοϊκό οξύ) που ανιχνεύεται από ποσοτικές μεθόδους, όπως η ELISA. Οι διαφορετικές μικροκυστίνες έχουν διαφορετικές λιποφιλίες και πολικότητες, οι οποίες θα μπορούσαν να επηρεάσουν την τοξικότητά τους.

Η μικροκυστίνη-LR ήταν η πρώτη μικροκυστίνη που αναγνωρίστηκε χημικά. Μέχρι σήμερα, οι περισσότερες εργασίες που σχετίζονται με τις μικροκυστίνες και τις επιδράσεις

τους έχουν διεξαχθεί με τη χρήση αυτής της μικροκυστίνης. Με αυτή άλλωστε έχουν συσχετιστεί τα περισσότερα περιστατικά τοξικότητας σε διάφορες χώρες (Fawell et al., 1993).



Εικόνα 2. Απεικόνιση της χημικής δομής της Microcystin-LR. (Πηγή: PubChem)

Οι ενδοκυττάριας μικροκυστίνες παράγονται και παραμένουν μέσα στα κυανοβακτηριακά κύτταρα και καθώς αυτά πεθαίνουν και λύνονται, οι τοξίνες απελευθερώνονται στο νερό. Οι μικροκυστίνες είναι εξαιρετικά σταθερές και αντιστέκονται στην κοινή χημική διάσπαση, όπως η υδρόλυση ή η οξείδωση, κάτω από συνθήκες που βρίσκονται στα περισσότερα φυσικά υδατικά συστήματα. Αυτές οι τοξίνες μπορούν να διασπαστούν αργά σε υψηλή θερμοκρασία (40 °C) είτε σε πολύ χαμηλό (<1) είτε σε υψηλό (> 9) pH (Harada et al., 1996). Ο χρόνος ημιζωής, ο χρόνος δηλαδή που χρειάζεται για να αποικοδομηθεί το ήμισυ της τοξίνης σε pH 1 και 40 °C, είναι 3 εβδομάδες. Σε τυπικές συνθήκες περιβάλλοντος, ο χρόνος ημιζωής είναι 10 εβδομάδες. Οι μικροκυστίνες διασπώνται αργά σε πλήρη ηλιακή ακτινοβολία (Tsuji et al., 1995).

Παρ'όλο που οι μικροκυστίνες μπορούν να διασπαστούν από ορισμένες βακτηριακές πρωτεάσες, σε πολλές περιπτώσεις τα βακτήρια αυτά δεν υπάρχουν, έτσι η τοξίνη διατηρείται επί μήνες ή και χρόνια όταν απελευθερώνεται σε ψυχρότερα και σκοτεινά φυσικά υδάτινα σώματα (Rapala et al., 2005; Rapala et al., 1993; Lahti et al., 2001; Jones et al., 1995). Οι μικροκυστίνες μπορούν ακόμη να παραμείνουν μετά το βρασμό, υποδεικνύοντας ότι το μαγείρεμα δεν είναι αρκετό για να καταστρέψει τις τοξίνες (WHO, 1999).

1.3 Μικροκυστίνες και άνθρωπος

Η άνθιση των κυανοβακτηρίων έχει τεκμηριωθεί σε όλο τον κόσμο. Οι μαζικοί πληθυσμοί αυτών των οργανισμών παρουσιάζουν συνήθως κινδύνους για την ανθρώπινη υγεία. Η τοξικότητα ιδιαίτερα της μικροκυστίνης σε ζωικά και κυτταρικά μοντέλα έχει ερευνηθεί αρκετά. Ωστόσο, είναι λιγότερο γνωστά τα αρνητικά αποτελέσματά τους στην ανθρώπινη υγεία, είτε μέσω οξείας είτε χρόνιας έκθεσης. Πολλά περιστατικά δηλητηριάσεων έχει θεωρηθεί ότι σχετίζονται με τις μικροκυστίνες, αλλά αυτό δεν έχει επιβεβαιωθεί λόγω έλλειψης πληροφοριών και συγκεκριμένων μετρήσεων κυανοτοξινών στην ανθρώπινη τροφή ή την παροχή νερού. Παρ'όλα αυτά, η προσβολή από τις μικροκυστίνες δεν μπορεί να προκύψει μόνον από το στόμα (Carmichael et al., 2001). Τα οξέα κρούσματα δηλητηρίασης από μικροκυστίνη μπορεί να προκαλέσουν γρήγορο θάνατο σε ανθρώπους και άλλα ζώα. Κατά την κατάποση, η μικροκυστίνη μεταφέρεται στο ήπαρ με πρωτεΐνες μεταφοράς, όπου εκδηλώνει την τοξικότητά της μέσω αναστολής πρωτεϊνικών φωσφατασών 1 και 2A (PPA1 και 2). Αυτό τελικά προκαλεί τοπική βλάβη ιστών, ανεπάρκεια οργάνων και αιμορραγικό σοκ (Pearson et al., 2010). Με βάση αυτό το μηχανισμό δράσης θεωρείται πιθανό ότι η έκθεση του ανθρώπου σε μη θανατηφόρες δόσεις αυτών των ενώσεων μπορεί να συμβάλει αθροιστικά στην ανάπτυξη καρκίνου, κάτι που μένει να αποδειχθεί.

1.4 Μικροκυστίνες και φυτά

Η άρδευση με νερό που εμπεριέχει MC-LR και η επιβεβαιωμένη βιοσυσσώρευση αυτών των τοξινών σε φυτικούς ιστούς (Peuthert et al., 2007; Crush et al., 2008) αποτελεί μια οδό εισαγωγής αυτών των τοξινών στην ανθρώπινη τροφική αλυσίδα (Crush et al., 2008; Saqrane et al., 2009). Πέραν τούτου, πολλές μελέτες δείχνουν σαφώς ότι η άρδευση με νερό που περιέχει κυανοτοξίνες μπορεί να αποτελέσει απειλή τόσο για την ποιότητα όσο και για την απόδοση των καλλιεργειών (Peuthert et al., 2007; Crush et al., 2008). Το ερευνητικό ενδιαφέρον για τις φυτοτοξικές επιδράσεις των κυανοτοξινών στα χερσαία φυτά ξεκίνησε από τους Koes et al., (1995), οι οποίοι ανέφεραν ότι το MC ανέστειλε την ανάπτυξη των σπόρων μουστάρδας. Έκτοτε, το ερευνητικό ενδιαφέρον έχει αυξηθεί, μελετώντας φυσιολογικές και μορφολογικές μεταβολές λόγω των κυανοτοξινών σε μια σειρά χερσαίων φυτών (Chen et al., 2004). Στα σχετικά πειράματα χρησιμοποιούνται είτε καθαρές τοξίνες, είτε ακατέργαστα εκχυλίσματα που προέρχονται από πολλαπλασιασμό κυανοβακτηρίων

(χωρίς όμως τα ίδια τα κυανοβακτήρια μέσα), είτε νερό από επιβαρυμένα με MCs επιφανειακά νερά (Levizou et al. 2017).

Παρότι η ανθεκτικότητα των φυτικών ειδών στις κυανοτοξίνες είναι ποικίλη, φαίνεται ότι η φύτευση του σπέρματος είναι ένα ευαίσθητο στην παρουσία τοξινών στάδιο της ζωής του φυτού. Αντίστοιχα αποτελέσματα αναφέρθηκαν από πειράματα με σπόρους ρυζιού (*Oryza sativa* L.) και σπόρους από γογγύλι (*Brassica napus* L.) (Chen et al., 2004), οι οποίοι μετά από 10 ημέρες έκθεσης σε υψηλά επίπεδα τοξινών ($0,6 \mu\text{g mL}^{-1}$) προκάλεσαν σημαντικές μειώσεις στο ποσοστό βλάστησης των σπόρων, ενώ τα αρτίβλαστα εμφάνισαν περισσότερο από 50% νέκρωση στην φυλλική τους επιφάνεια (Chen et al., 2004). Αναστολή της βλάστησης παρατηρήθηκε επίσης μετά την έκθεση των φυτών της μηδικής (*Medicago sativa*) σε κυανοτοξίνες (μικροκυστίνες και ανατοξίνη-α) και ακατέργαστο εκχύλισμα χωρίς κυανοβακτηριακά κύτταρα (Pflugmacher et al., 2006). Μια ακόμη μελέτη επιβεβαιώνει ότι η έκθεση μειώνει τον ρυθμό φύτευσης των σπόρων, έπειτα από το πέρας τεσσάρων ημερών στο υδατικό εκχύλισμα κυανοβακτηρίων που περιέχει MC-LR, σε φυτά *Lens esculenta*, *Zea mays*, *Triticum durum* και *Pisum sativum* (Saqrane et al., 2008). Ωστόσο, η επίδραση των MC στο ρυθμό βλάστησης των σπόρων ήταν εξαρτώμενη από τη δόση και σημαντικά διαφορετική ανάλογα με την ευαισθησία αυτών των φυτών, για παράδειγμα το *Pisum sativum* αποδείχτηκε το πιο ευαίσθητο είδος μεταξύ των τεσσάρων που εξετάστηκαν.

Σε μεγαλύτερα φυτά πλέον, βρέθηκε ότι η ανάπτυξη της πατάτας (*Solanum tuberosum*) μειώθηκε σε συγκεντρώσεις μικροκυστινών που βρίσκουμε στη φύση (σε επιβαρυμένα βέβαια νερά). Μειώσεις λοιπόν καταγράφηκαν στα $0,005 \text{ mg kg}^{-1}$ MC-LR και πλήρης αναστολή στα $0,5-5 \text{ mg kg}^{-1}$ MC-LR, ενώ η ανάπτυξη φυτών φασολιών (*Phaseolus vulgaris*) αναστέλλεται με MC-LR στα $1,12 \text{ mg kg}^{-1}$ (McElhiney et al., 2001). Οι Gehringer et al. (2003) παρατήρησαν σημαντική μείωση στο μήκος των φύλλων και ριζών και στην παραγωγικότητα του *Lepidium sativum* που προκλήθηκαν από το εκχύλισμα MC. Παράλληλα χρησιμοποιήθηκε και καθαρή MC-LR που προκάλεσε παρόμοια μείωση, υποδεικνύοντας ότι η επίδραση του εκχυλίσματος κυανοβακτηρίων οφείλεται στις MCs. Αργότερα, αναφέρθηκε ότι διαφορετικές ποικιλίες σπανακιού επηρεάστηκαν στα μορφολογικά τους χαρακτηριστικά μετά από έκθεση 6 εβδομάδων σε ακατέργαστο εκχύλισμα κυανοβακτηρίων που περιείχε $0,5 \mu\text{g mL}^{-1}$ MC-LR (Pflugmacher et al., 2007). Ένα ακόμη σημαντικό εύρημα αυτής της μελέτης ήταν ότι διάφορες ποικιλίες των ίδιων φυτικών ειδών μπορούν να αντιδρούν με διαφορετικούς τρόπους στην ίδια τοξίνη.

Η αναστολή της ανάπτυξης λόγω της παρουσίας κυανοτοξινών μπορεί να οδηγήσει σε μείωση της απόδοσης των καλλιεργειών. Αυτή η υπόθεση επιβεβαιώθηκε πρόσφατα όταν οι Saqrane et al. (2009) μελέτησαν την έκθεση για 30 ημέρες των *Triticum durum*, *Zea mays*,

Pisum sativum και *Lens esculenta* σε εκχύλισμα κυανοβακτηρίων που περιέχει 0,5-4,2 mg ισοδύναμα MC-LRmL⁻¹. Παρατηρήθηκε μείωση στο ύψος των φυτών, καθώς και στον αριθμό των φύλλων και το μήκος της ρίζας. Σημαντικές ήταν και οι μεταβολές στην απόδοση των φυτών, όπως υπολογίστηκε είτε από τη νωπή είτε από την ξηρή βιομάζα, η οποία μειώθηκε επίσης.

Όλες οι παραπάνω έρευνες υποδεικνύουν ότι η έκθεση σε MCs μέσω του αρδευτικού νερού που έχει μολυνθεί με τοξικά κυανοβακτήρια, μπορεί να αποτελέσει απειλή για την ανάπτυξη και την απόδοση των καλλιεργούμενων φυτών. Σε ότι αφορά τώρα τα βιοχημικά και φυσιολογικά χαρακτηριστικά των φυτών που ποτίζονται με επιβαρυσμένο με MCs νερό, έχουν καταγραφεί και εκεί αρνητικές επιπτώσεις. Ένα σημαντικό πείραμα που αξίζει να αναφερθεί είναι των Gutiérrez-Praena et al. (2014) όπου διερευνήθηκε η τοξικότητα της μικροκυστίνης – LR (MC-LR) στην τομάτα (*Lycopersicon esculentum*) σε φυτά 2 μηνών σε περιβάλλον θερμοκηπίου. Τα φυτά εκτέθηκαν για 2 εβδομάδες είτε σε καθαρά εκχυλίσματα MC-LR (100 μgL⁻¹) είτε σε ακατέργαστα εκχυλίσματα *Microcystis aeruginosa* που περιείχαν 100 μgL⁻¹ MC-LR. Οι μετρήσεις που πραγματοποιήθηκαν ήταν ο φθορισμός χλωροφύλλης, η βιοσυσσώρευση τοξίνης, ενώ μελετήθηκε και το πρωτέωμα (proteomics) των φύλλων. Οι μεταβολές σε αρκετούς δείκτες πρωτεϊνών (υπομονάδες συνθετάσης ATP, σύμπλεγμα σιδήρου-θείου, συμπλόκου κυτοχρωμάτων) υποδηλώνουν τη μείωση της ικανότητας των φυτών να συνθέσουν ATP και να φωτοσυνθέσουν, ενώ οι μεταβολές σε άλλες πρωτεΐνες παραπέμπουν σε μείωση των αντιδράσεων μεταβολισμού υδατανθράκων σε φυτά που εκτίθενται σε MC-LR. Τα αποτελέσματα προκαλούν ανησυχίες σχετικά με την ασφάλεια των τροφίμων και επισημαίνουν την αναγκαιότητα παρακολούθησης της βιοσυσσώρευσης σε βρώσιμους ιστούς των τοξινών που εμπεριέχονται στο αρδευτικό νερό (Gutiérrez-Praena et al., 2014).

Στις δυσμενείς επιδράσεις των κυανοτοξινών στις καλλιέργειες συγκαταλέγονται αρνητικές επιδράσεις στις επωφελείς συμβιώσεις του φυτού με μικροοργανισμούς. Παράδειγμα αποτελεί η μειωμένη παρουσία ριζικών φυματίων, επομένως η ανάπτυξη των ριζοβίων σε ψυχανθή που θα έχει σημαντικές επιπτώσεις στην πρόσληψη αζώτου (ElKhalloufi et al., 2010; Lahrouni et al., 2012).

Πολλές σχετικές εργασίες αναφέρουν ότι φυτά που αναπτύχθηκαν εκτεθειμένα σε MCs υπέστησαν σημαντική καταπόνηση, όπως αποδεικνύεται από την ανίχνευση υψηλών συγκεντρώσεων ενεργών ριζών οξυγόνου (Reactive oxygen species, ROS) (Botha et al., 2004; Pflugmacher, 2004). Τα ROS αντιδρούν με λιπίδια, πρωτεΐνες και DNA προκαλώντας εκτεταμένες βλάβες στο φυτό. Σε αρκετές περιπτώσεις το φυτό προσπάθησε να αντιμετωπίσει την οξειδωτική καταπόνηση με αύξηση ενζυμικών και μη ενζυμικών αντιοξειδωτικών. Στην

πρώτη περίπτωση εντάσσονται ένζυμα, όπως δισμουτάση υπεροξειδίου (SOD), καταλάση (CAT) και υπεροξειδάση ασκορβικού, ενώ στα μη-ενζυμικά αντιοξειδωτικά η ανηγμένη γλουταθειόνη και βιταμίνες (Corbel et al. 2014).

1.5 Σκοπός της εργασίας

Η αυξημένη συγκέντρωση τοξικών κυανοβακτηρίων είναι ένα πρόβλημα που έχει εντοπιστεί σε διάφορες λίμνες της Ελλάδας, μεταξύ αυτών και στην ανασυσταθείσα λίμνη Κάρλα (ΝΑ Θεσσαλία), η οποία προορίζεται για να καλύψει τις αρδευτικές ανάγκες μέρους του Θεσσαλικού Κάμπου. Η παρούσα εργασία είχε ως στόχο να εκτιμήσει βασικές βιοχημικές παραμέτρους φυτών ραπανιού όταν αρδεύονται με νερό Κάρλας. Καθώς όμως το νερό της λίμνης είναι ένα μείγμα διαφόρων ουσιών –μεταξύ αυτών και πιθανώς κάποιες βιοενεργές- χρειάστηκε μία πειραματική διάταξη που να μας επιτρέπει να ποσοτικοποιήσουμε τις αντίστοιχες επιδράσεις. Για να εκτιμηθεί η συνεισφορά των μικροκυστινών που εμπεριέχονται στο νερό της Κάρλας στο όποιο αποτέλεσμα χρησιμοποιήθηκαν διάφορες συγκεντρώσεις καθαρής μικροκυστίνης.

2. Υλικά και μέθοδοι

2.1 Περίοδος ανάπτυξης των φυτών

Το πείραμα πραγματοποιήθηκε στο θερμοκήπιο του Πανεπιστημίου Θεσσαλίας του τμήματος Γεωπονίας Φυτικής Παραγωγής και Αγροτικού Περιβάλλοντος. Το χώμα που χρησιμοποιήθηκε για την ανάπτυξη των φυτών συλλέχτηκε από την περιοχή του Βελεστίνου (39° 22', 22° 44', 85 m) τον Οκτώβριο του 2017. Στη συνέχεια, ακολούθησε το κοσκίνισμα του χώματος με κόσκινο με διάμετρο πόρων 4mm και έγινε ανάμειξη με περλίτη σε αναλογία 1:1. Στις 7/11/2017 πραγματοποιήθηκε η σπορά του ραπανιού (*Raphanus sativus* L.) ποικιλίας large red. Οι μεταχειρίσεις άρδευσης αναλύονται στη συνέχεια.

- 1^η μεταχείριση: Φυτά που αρδεύονταν με νερό βρύσης (C).
- 2^η μεταχείριση: Φυτά που αρδεύονταν με νερό από τη λίμνη Κάρλα (K).
- 3^η μεταχείριση: Φυτά που αρδεύονταν με νερό βρύσης το οποίο περιείχε 2 μgL^{-1} MC-LR (MC2).
- 4^η μεταχείριση: Φυτά που αρδεύονταν με νερό βρύσης το οποίο περιείχε 12 μgL^{-1} MC-LR (MC12).
- 5^η μεταχείριση: Φυτά που αρδεύονταν με νερό από τη λίμνη Κάρλα το οποίο περιείχε 2 μgL^{-1} MC-LR στα οποία προστέθηκαν άλλα 10 μg για να φτάσει στο επίπεδο της μεταχείρισης 4 (MC12K).

Συνολικά χρησιμοποιήθηκαν 110 φυτά ραπανακιού, δηλαδή 22 φυτά σε κάθε μεταχείριση.

Για το πότισμα παρασκευάστηκε ένα 500 μgL^{-1} το οποίο με κατάλληλες αραιώσεις έδινε τα κατάλληλα για κάθε μεταχείριση διαλύματα. Το νερό αυτό ήταν αποχλωριωμένο, δηλαδή μόλις έβγαινε από τη βρύση έμενε σε ανοιχτούς κουβάδες για περισσότερο από μία μέρα.

Στις 14/11/2017 έγινε μεταφύτευση των φυτών σε γλάστρες χωρητικότητας 2 λίτρων οι οποίες περιείχαν χώμα και περλίτη (1:1). Τα φυτά τοποθετήθηκαν στο θερμοκήπιο και ποτίζονταν με ίδιες ποσότητες από το διάλυμα που αντιστοιχούσε σε κάθε μεταχείριση 2 φορές την εβδομάδα. Το πείραμα διήρκεσε δύο μήνες και έληξε στις 10/1/2018.

2.2 Μετρήσεις

2.2.1 Μέτρηση χλωροφύλλης

Καθ' όλη την διάρκεια της ανάπτυξης της καλλιέργειας μέχρι και την συγκομιδή πραγματοποιήθηκαν 5 μετρήσεις της συγκέντρωσης της χλωροφύλλης μέσω του δείκτη SPAD (SPAD, Minolta). Οι τέσσερις πρώτες μετρήσεις έλαβαν χώρα 30, 37, 45 και 54 ημέρες μετά την μεταφύτευση των φυτών στην τελική τους θέση, όπου μετρήθηκαν 30 φύλλα από κάθε μεταχείριση, ενώ η πέμπτη μέτρηση έγινε στη συγκομιδή των φυτών (60 ημέρες μετά τη μεταφύτευση), όπου μετρήθηκαν για κάθε φυτό 3 φύλλα με διαφορετικό ηλικιακό προφίλ, νεαρό, ώριμο και γηρασμένο, σε συνολικά 10 φυτά ανά μεταχείριση.

2.2.2 Προσδιορισμός ολικών φαινολικών ενώσεων

Ο προσδιορισμός των ολικών φαινολικών ενώσεων έγινε με τη μέθοδο Folin-Ciocalteu (Waterman&Mole, 1994). Η αρχή της μεθόδου βασίζεται στην οξείδωση των φαινολικών ενώσεων από το αντιδραστήριο Folin-Ciocalteu.

Η μέτρηση αφορούσε τόσο το υπέργειο, όσο και το υπόγειο μέρος των φυτών και χρησιμοποιήθηκαν:

- Υδατικό διάλυμα μεθανόλης 50% (6ml/δείγμα)
- Αντιδραστήριο Folin-Ciocalteu (0,25ml/δείγμα)
- Διάλυμα Na_2CO_3 (0,75ml/δείγμα)
- Υδατόλουτρο
- Πλαστικοί και γυάλινοι δοκιμαστικοί σωλήνες
- Vortex
- Φασματοφωτόμετρο

Αρχικά, ζυγίστηκαν 250mg κονιορτοποιημένου ξηρού δείγματος τα οποία τοποθετήθηκαν σε πλαστικούς δοκιμαστικούς σωλήνες. Στη συνέχεια, προστέθηκαν 6ml υδατικού διαλύματος μεθανόλης 50% και αφού έγινε σφράγιση των σωλήνων, ακολούθησε η διαδικασία της επώασης σε υδατόλουτρο στους 40°C για 1 ώρα υπό ήπια ανάδευση. Η παραπάνω διαδικασία αφορούσε την εκχύλιση των φαινολικών από τον φυτικό ιστό. Στη συνέχεια έγινε μεταφορά του εκχυλίσματος σε μεγαλύτερους γυάλινους δοκιμαστικούς σωλήνες.

Έπειτα, ακολούθησε η διαδικασία της αντίδρασης. Σε κάθε γυάλινο δοκιμαστικό σωλήνα προστέθηκαν 3,95ml απιονισμένο νερό, 0,05ml του εκχυλίσματος και 0,25ml του αντιδραστηρίου Folin-Ciocalteu. Επιπλέον, παρασκευάστηκε ένα «τυφλό» διάλυμα το οποίο αντί για 0,05ml του υπερκείμενου περιείχε 0,05ml υδατικού διαλύματος μεθανόλης 50%. Ακολούθησε ανάδευση στο vortex και μετά προστέθηκαν 0,75ml διαλύματος ανθρακικού νατρίου (Na_2CO_3). Οι παραπάνω σωλήνες επώαστηκαν σε θερμοκρασία δωματίου για 2 ώρες με συχνές επαναλήψεις στο vortex. Τέλος, μετρήθηκε η απορρόφηση τους σε φασματοφωτόμετρο διπλής δέσμης (Shimatzu UV1900) στα 760nm. Η τελική συγκέντρωση των φαινολικών παρουσιάζεται ως συγκέντρωση ισοδυνάμων γαλλικού οξέος ανά γραμμάριο ξηρού βάρους του κάθε ιστού, σύμφωνα με πρότυπη καμπύλη απορρόφησης-γνωστών συγκεντρώσεων γαλλικού οξέος.

2.2.3 Προσδιορισμός φωτοσυνθετικών χρωστικών

Η μέτρηση της συγκέντρωσης των φωτοσυνθετικών χρωστικών έγινε με εκχύλιση των χλωροφυλλών σε ακετόνη 80% και εφαρμογή των αντίστοιχων εξισώσεων, σύμφωνα με τους Lichtenthaler and Wellburn (1983).

Για τον προσδιορισμό των φωτοσυνθετικών χρωστικών χρησιμοποιήθηκαν:

- Διάλυμα ακετόνης 80%
- Γουδί προσελάνης
- Καθαρή άμμος
- Ανθρακικό ασβέστιο
- Σωλήνες φυγοκέντρου
- Φυγόκεντρος
- Φασματοφωτόμετρο

Από κάθε μεταχείριση χρησιμοποιήθηκαν 5 φύλλα βάρους 2g τα οποία κόπηκαν σε μικρά κομματάκια και τοποθετήθηκαν σε γουδί προσελάνης μαζί με 0,5g καθαρής άμμου και 0,1g CaCO_3 . Στη συνέχεια, έγινε εκχύλιση των φύλλων με 0,5ml διαλύματος ακετόνης 80%. Αμέσως μετά την ομογενοποίηση, το εκχύλισμα μεταγγίστηκε σε σωλήνα φυγόκεντρου και για να ξεπλυθεί το γουδί προστέθηκε σταδιακά ακετόνη 80% ανά 1,5ml. Συνολικά για κάθε δείγμα χρησιμοποιήθηκαν 5ml διαλύματος ακετόνης 80%.

Ακολούθησε φυγοκέντρηση για 10 λεπτά στα 2500g (4000 στροφές ανά λεπτό). Το διαυγές πράσινο υπερκείμενο μέρος χρησιμοποιήθηκε ως δείγμα για την φασματοφωτομέτρηση, ενώ το ίζημα απορρίφθηκε. Επιπλέον, έγινε μετάγγιση του

υπερκειμένου σε ογκομετρικό σωλήνα και καταγράφηκε ο όγκος του. Τέλος, τα δείγματα φωτομετρήθηκαν στα 470, 646, 663 και 720nm στο φασματοφωτόμετρο διπλής δέσμης.

Με την παραπάνω διαδικασία υπολογίστηκαν οι συγκεντρώσεις της χλωροφύλλης a, χλωροφύλλης b και των συνολικών καροτενοειδών ανά g νωπού βάρους φύλλου σύμφωνα με τις εξισώσεις:

$$c_a = 12,21A_{663} - 2,81A_{646}$$

$$c_b = 20,13A_{646} - 5,03A_{663}$$

$$c_{x+c} = (1000A_{470} - 3,27 c_a - 104 c_b) / 229$$

Όπου,

A_λ , η απορρόφηση σε μήκη κύματος λ

c_a , η συγκέντρωση της χλωροφύλλης a, μgml^{-1} διαλύματος

c_b , η συγκέντρωση της χλωροφύλλης b, μgml^{-1} διαλύματος

c_{x+c} , η συγκέντρωση των συνολικών καροτενοειδών (ξανθοφύλλες + καροτένια), μgml^{-1} διαλύματος

Για την τελική έκφραση την ποσοστών κάθε χρωστικής έγιναν οι απαραίτητες αναγωγές με βάση το βάρος των φύλλων που χρησιμοποιήθηκαν, τον όγκο του εκχυλίσματος καθώς και τυχόν αραιώσεις.

2.2.4 Μέτρηση Προλίνης

Για την μέτρηση της προλίνης ακολουθήθηκε η τροποποιημένη μέθοδος όξινης νινυδρίνης από τους Khan et al. (2000) και χρησιμοποιήθηκαν:

- Σωλήνες φυγόκεντρου
- Υδατικό διάλυμα σουλφοσαλκυλικού
- Διάλυμα όξινης νινυδρίνης, το οποίο περιέχει νινυδρίνη, οξικό οξύ και ορθοφωσφορικό οξύ
- Υδατόλουτρο
- Τολουόλιο
- Πάγος

Αρχικά, ζυγίστηκαν 250mg νωπού δείγματος και εκχυλίστηκαν με 3% σουλφοσαλκυλικού με τελικό όγκο 10ml. Τα εκχυλίσματα τοποθετήθηκαν σε μικρούς σωλήνες φυγόκεντρου με πάμα. Ακολούθησε φυγοκέντρηση στα 4000g για 10 λεπτά και τα υπερκείμενα μέρη μεταφέρθηκαν σε μικρούς γυάλινους δοκιμαστικούς σωλήνες. Το διάλυμα

όξινης νινυδρίνης ετοιμάστηκε στους πρώτους σωλήνες φυγόκεντρου οι οποίοι περιείχαν 2ml εκχυλίσματος, 2ml του αντιδραστηρίου της όξινης νινυδρίνης και 2ml οξικού οξέος. Σφραγίστηκαν και επώαστηκαν σε υδατόλουτρο στους 100°C για 1 ώρα και στη συνέχεια μεταφέρθηκαν σε πάγο. Το περιεχόμενο των σωλήνων μεταφέρθηκε σε μεγάλους δοκιμαστικούς σωλήνες και αφού προστέθηκαν 4ml τολουόλιο αναδεύτηκαν για 15 δευτερόλεπτα. Με αυτή τη διαδικασία επιτεύχθηκε διαχωρισμός των φάσεων, όπου η υδατική φάση παρέμεινε στην βάση του σωλήνα και το χρωμοφόρο μέρος (το οποίο περιέχει το τολουόλιο) συγκεντρώθηκε στο επάνω τμήμα. Το υπερκείμενο υγρό συλλέχθηκε ώστε να γίνει μέτρηση στο φασματοφωτόμετρο στα 520nm με «τυφλό» τολουόλιο.

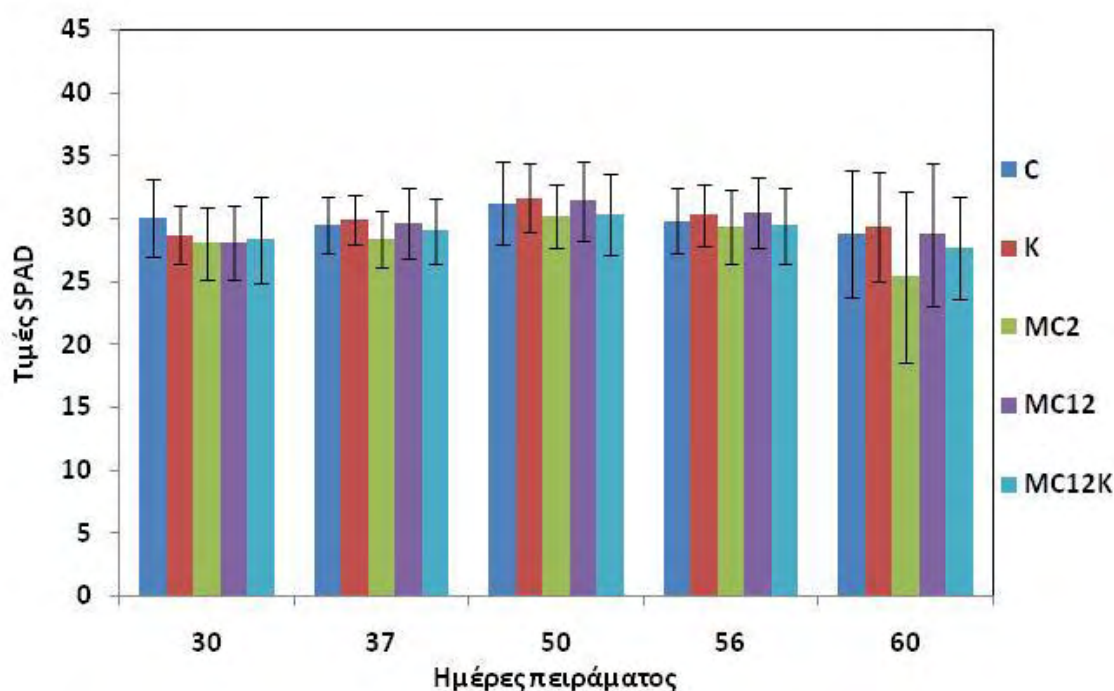
2.3 Στατιστική επεξεργασία

Η στατιστική ανάλυση των δεδομένων έγινε εφαρμόζοντας one-way ANOVA σε επίπεδο εμπιστοσύνης 95% ($p < 0.05$) χρησιμοποιώντας το SPSS ver. 24.0 (SPSS, IBM, USA).

3. Αποτελέσματα

3.1 Τιμές SPAD κατά την διάρκεια της αναπτυξιακής περιόδου

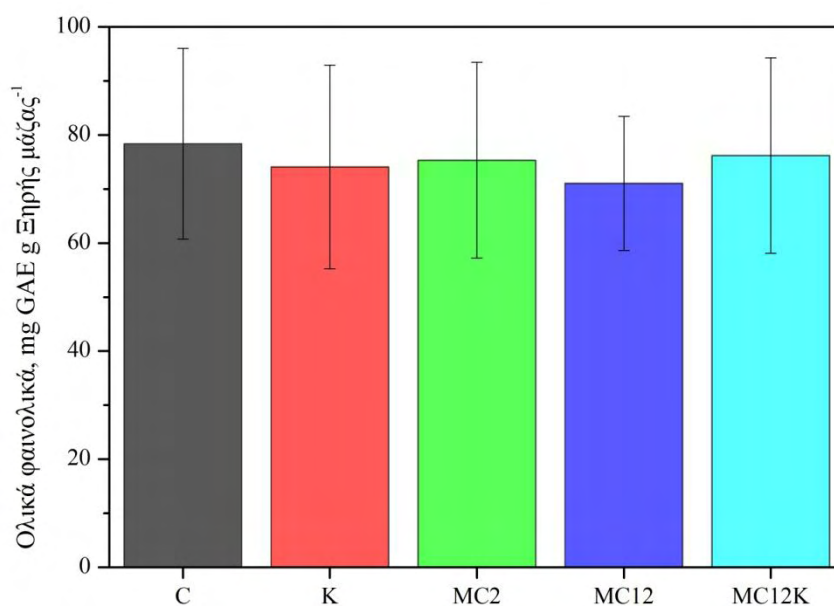
Στο Διάγραμμα 1 παρουσιάζονται οι συγκεντρώσεις των χλωροφυλλών των φύλλων των φυτών μέσω του δείκτη spad από μετρήσεις που πραγματοποιήθηκαν κατά την διάρκεια της αναπτυξιακής περιόδου των φυτών. Στις 13/12/2017 έγινε η 1^η μέτρηση (30 μέρες μετά την μεταφύτευση) όπου παρατηρήθηκε ότι τα φύλλα του μάρτυρα παρουσίασαν ελαφρώς μεγαλύτερη συγκέντρωση χλωροφύλλης, ενώ τα φύλλα που ποτίζονταν με το διάλυμα MC12 είχαν τη μικρότερη περιεκτικότητα κατά 6,7%, χωρίς όμως να είναι στατιστικώς σημαντική αυτή η διαφορά. Κατά τις υπόλοιπες μετρήσεις φαίνεται να μην υπάρχει κάποια διαφορά μεταξύ των φυτών όλων των μεταχειρίσεων, ενώ σταθερά φαίνεται να διατηρούνται τα επίπεδα των ολικών χλωροφυλλών σε όλη τη διάρκεια της αναπτυξιακής περιόδου, με μία μικρή τάση για μείωση κατά το τέλος αυτής.



Διάγραμμα 1. Συγκέντρωση χλωροφύλλης με τον δείκτη spad κατά την διάρκεια της αναπτυξιακής περιόδου της καλλιέργειας ραπανακίου.

3.2 Φαινολικά ρίζας

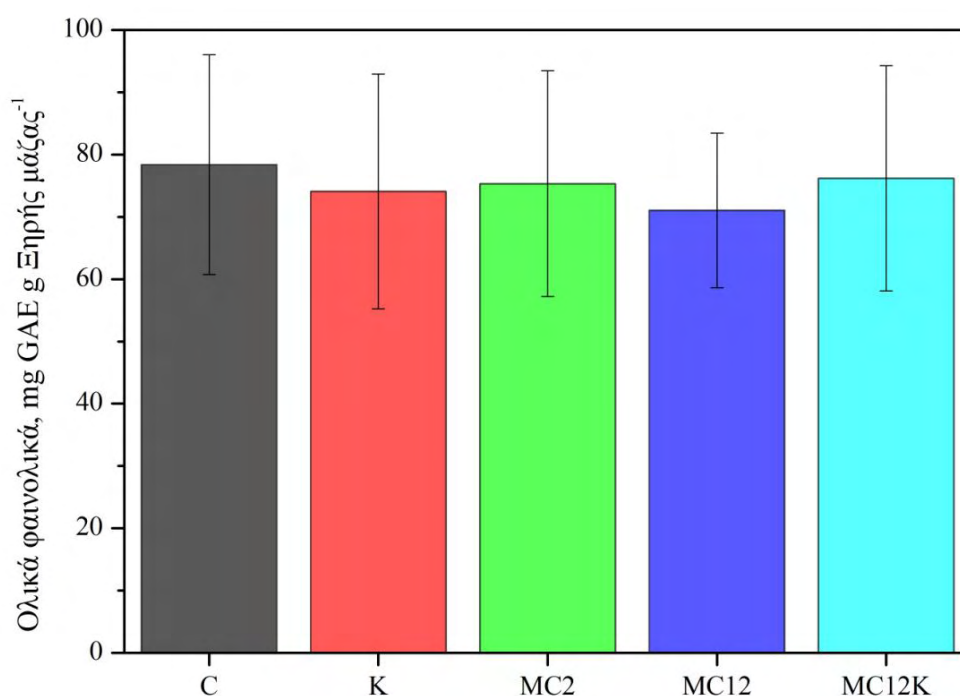
Στο Διάγραμμα 2 παρουσιάζονται τα αποτελέσματα του προσδιορισμού των φαινολικών ουσιών στην ρίζα των φυτών του ραπανακίου. Τα επίπεδα των φαινολικών της ρίζας των φυτών που αρδεύονταν με το διάλυμα MC12 παρουσίασαν την ελάχιστη συγκέντρωση φαινολικών συγκριτικά με τις υπόλοιπες μεταχειρίσεις. Ωστόσο, τα αποτελέσματα αυτά δεν παρουσιάζουν μεταξύ τους στατιστικά σημαντικές μεταβολές ($p>0.05$).



Διάγραμμα 2. Συγκέντρωση ολικών φαινολικών ουσιών της ρίζας των φυτών της καλλιέργειας ραπανακίου εκφρασμένη ως ισοδύναμα γαλλικού οξέος (mgGAE) ανά γραμμάριο ξηρού βάρους.

3.3 Φαινολικά φύλλων

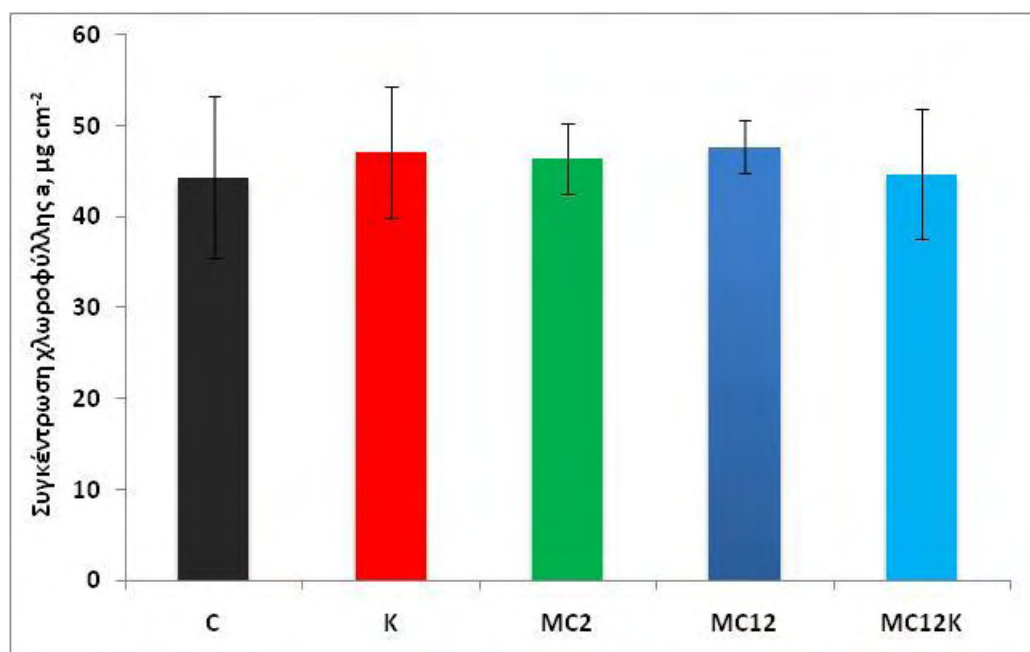
Στο Διάγραμμα 3 παρουσιάζονται τα αποτελέσματα του προσδιορισμού των φαινολικών ουσιών στα φύλλα των φυτών του ραπανακίου. Φαίνεται ότι όλα τα φυτά όλων των μεταχειρίσεων κινούνται σε παρόμοια επίπεδα συγκεντρώσεων φαινολικών και δεν παρουσιάζουν στατιστικά σημαντικές διαφορές μεταξύ τους ($p>0.05$).



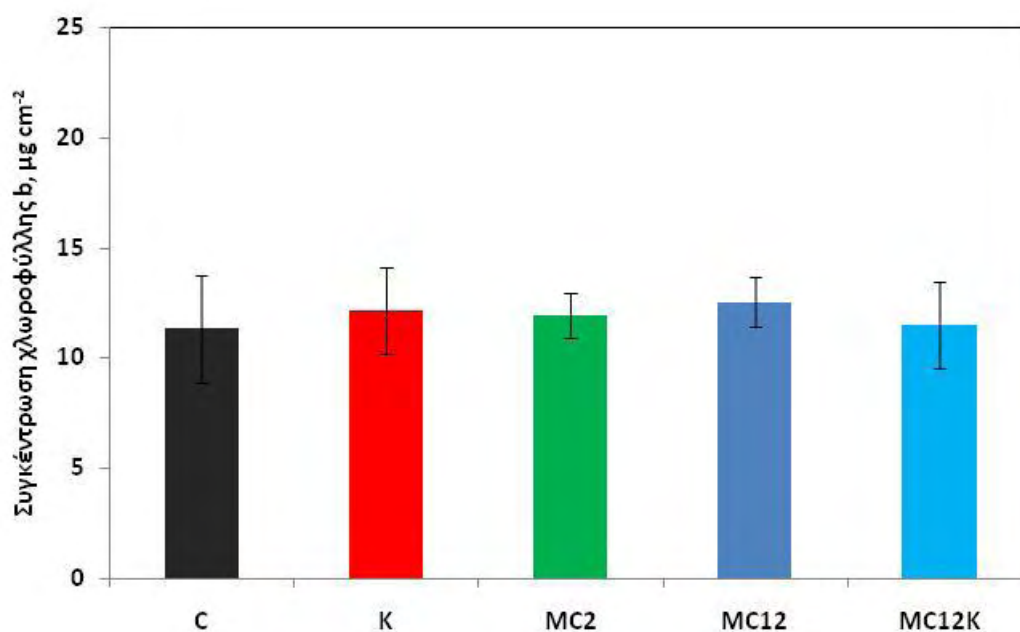
Διάγραμμα 3. Συγκέντρωση ολικών φαινολικών ουσιών των φύλλων της καλλιέργειας ραπανακίου εκφρασμένη ως ισοδύναμα γαλλικού οξέος (mgGAE) ανά γραμμάριο ξηρού βάρους.

3.4 Συγκέντρωση χλωροφύλλης a και χλωροφύλλης b

Παρόμοια εικόνα με τα φαινοτικά των φύλλων καταγράφεται και για το περιεχόμενο των φύλλων σε χλωροφύλλη a (Διάγραμμα 4), αλλά και την χλωροφύλλη b (Διάγραμμα 5). Δεν υπήρχαν σημαντικές διαφορές μεταξύ των μεταχειρίσεων.



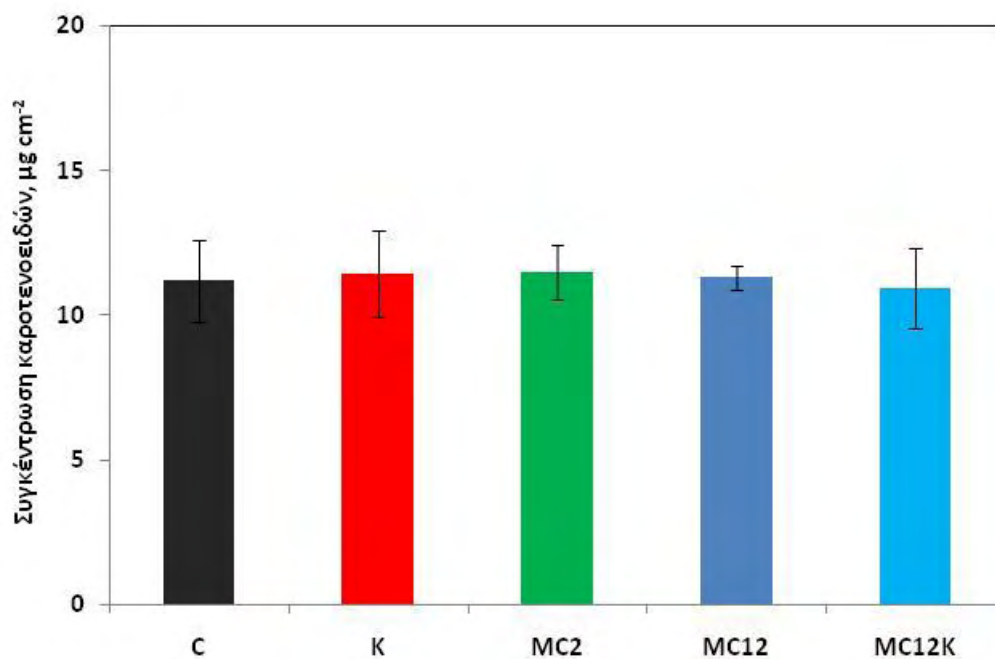
Διάγραμμα 4. Συγκέντρωση χλωροφύλλης a των φύλλων της καλλιέργειας ραπανακίου (μgcm^{-2}).



Διάγραμμα 5 Συγκέντρωση χλωροφύλλης b των φύλλων της καλλιέργειας ραπανακίου. (μgcm^{-2}).

3.5 Συγκέντρωση καροτενοειδών

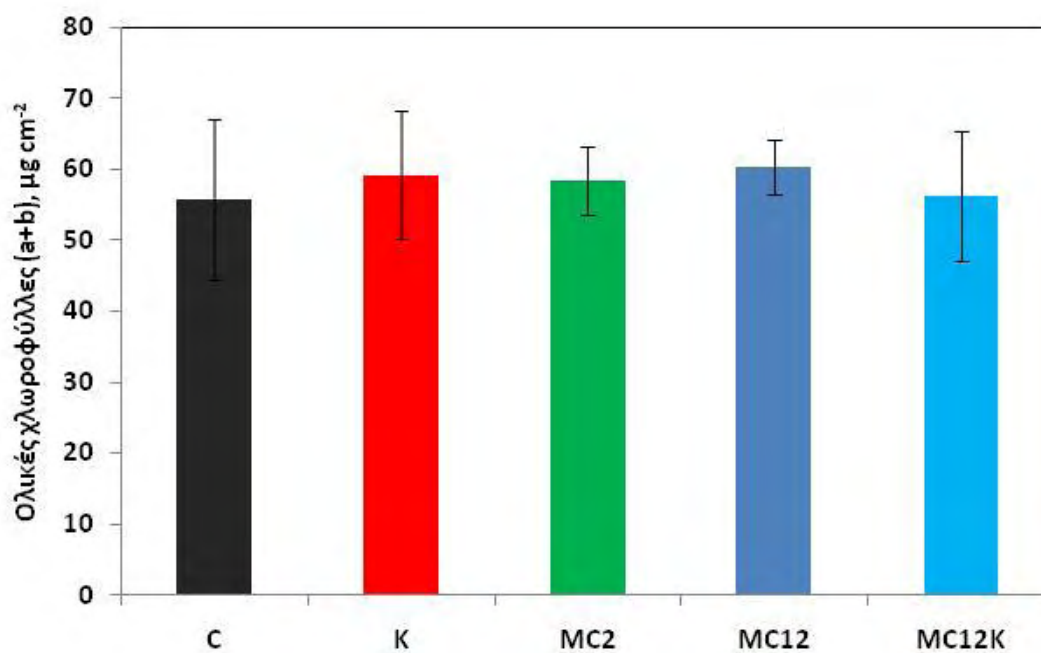
Τα επίπεδα της συγκέντρωσης των καροτενοειδών στα φυτά όλων των μεταχειρίσεων ήταν παρόμοια και δεν παρουσιάζουν στατιστικά σημαντικές διαφορές μεταξύ τους ($p>0.05$).



Διάγραμμα 6. Συγκέντρωση καροτενοειδών των φύλλων της καλλιέργειας ραπανακίου(μgcm⁻²).

3.6 Συγκέντρωση ολικών χλωροφυλλών

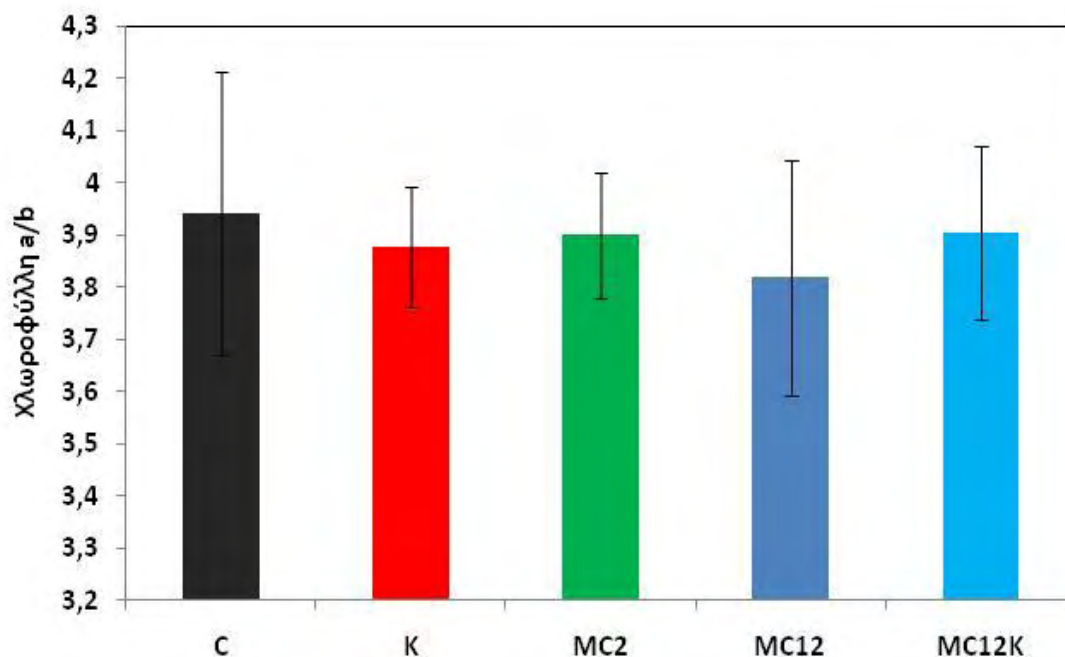
Στο Διάγραμμα 7 παρουσιάζονται τα αποτελέσματα της συγκέντρωσης των ολικών χλωροφυλλών των φύλλων. Μία πολύ μικρή τάση των φυτών K και MC12 για αυξημένες τιμές δεν είναι στατιστικώς σημαντική.



Διάγραμμα 7. Συγκέντρωση ολικών χλωροφυλλών (a+b) των φύλλων της καλλιέργειας ραπανακίου (μgcm^{-2}).

3.7 Λόγος συγκέντρωσης χλωροφύλλης a/b

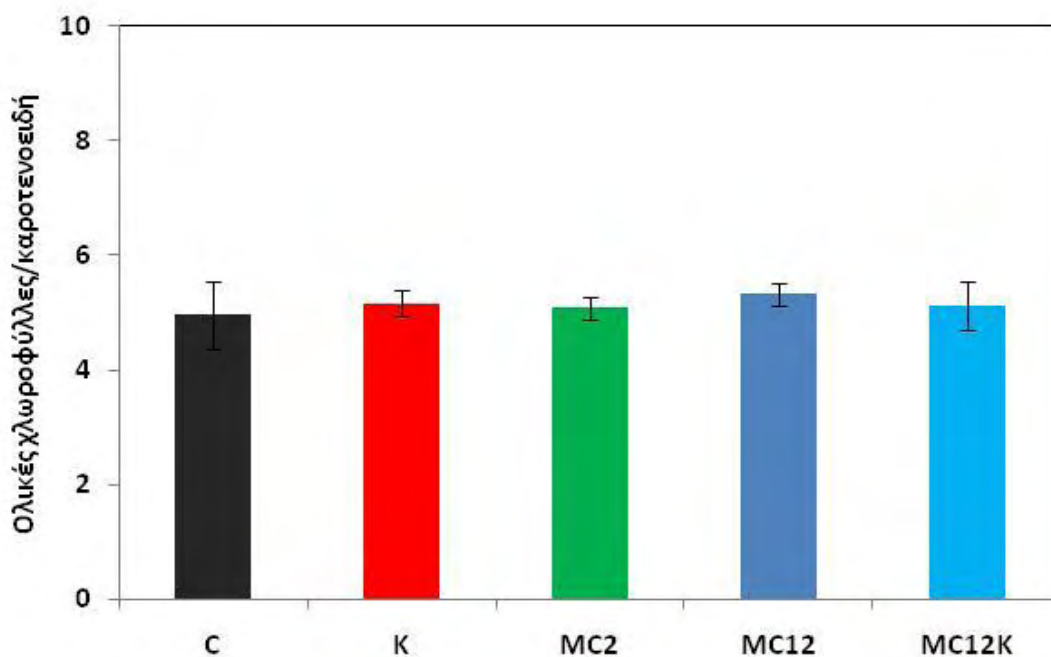
Στο Διάγραμμα 8 παρουσιάζεται ο λόγος της χλωροφύλλης a προς την χλωροφύλλη b στις πέντε μεταχειρίσεις του πειράματος. Τα φυτά του μάρτυρα, δηλαδή της πρώτης μεταχείρισης C, παρουσίασαν το μεγαλύτερο λόγο χλωροφύλλης a/b. Όμως πρόκειται απλώς για μία τάση και τα αποτελέσματα δεν παρουσιάζουν στατιστικά σημαντικές μεταβολές μεταξύ τους ($p > 0.05$).



Διάγραμμα 8. Λόγος συγκέντρωσης χλωροφύλλης a/b των φύλλων της καλλιέργειας ραπανακίου.

3.8 Λόγος ολικών χλωροφυλλών/καροτενοειδή

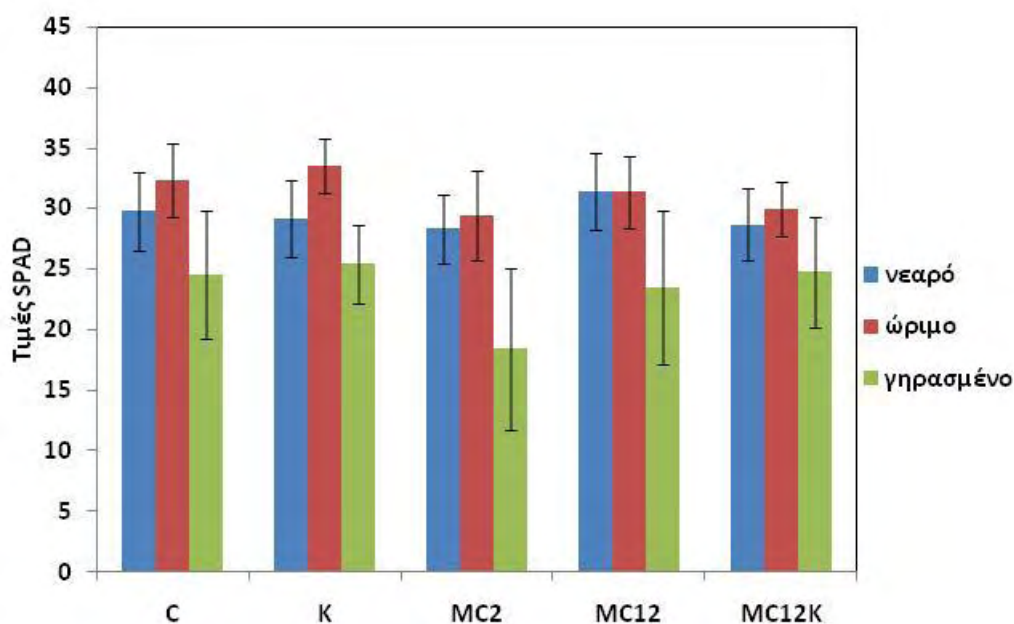
Στο Διάγραμμα 9 παρουσιάζεται ο λόγος της συγκέντρωσης των ολικών χλωροφυλλών (χλωροφύλλη a+b) προς την συγκέντρωση των καροτενοειδών στα φύλλα των φυτών του ραπανακίου στις διάφορες μεταχειρίσεις. Καμία διαφορά δεν παρατηρήθηκε μεταξύ των φυτών των διάφορων ομάδων.



Διάγραμμα 9. Λόγος των ολικών χλωροφυλλών προς τα καροτενοειδή των φύλλων των φυτών.

3.9. Τιμές SPAD κατά την συγκομιδή σε φύλλα διαφορετικού σταδίου ανάπτυξης

Στο Διάγραμμα 10 παρουσιάζεται μία καταγραφή του πώς επηρεάζει το ηλικιακό προφίλ των φύλλων του φυτού τα επίπεδα των ολικών χλωροφυλλών. Η μέτρηση έλαβε μέρος κατά την τελική συγκομιδή στις 10/1/2018, όπου μετρήθηκαν για κάθε φυτό 3 φύλλα με διαφορετικό ηλικιακό προφίλ, νεαρό, ώριμο και γηρασμένο, σε συνολικά 10 φυτά ανά μεταχείριση. Καταρχήν, όπως είναι αναμενόμενο τα ώριμα φύλλα όλων των μεταχειρίσεων είχαν υψηλότερα επίπεδα χλωροφυλλών από τις υπόλοιπες ηλικιακές ομάδες. Η μεταχείριση MC12 υπερέτερουσε ελαφρώς σε συγκέντρωση χλωροφυλλών στα νεότερα φύλλα, αλλά χωρίς να είναι σημαντική από στατιστικής άποψης αυτή η υπεροχή. Στα ώριμα φύλλα των φυτών της μεταχείρισης K η συγκέντρωση χλωροφυλλών αυξήθηκε κατά 12,18% σε σχέση με τα μεσαία φύλλα της μεταχείρισης MC2, τα οποία παρουσίασαν την χαμηλότερη τιμή. Τέλος, τα γηρασμένα φύλλα των φυτών του ραπανακίου παρουσίασαν τις χαμηλότερες τιμές χλωροφύλλης συγκριτικά με τα φύλλα όλων των υπόλοιπων σταδίων ανάπτυξης της καλλιέργειας. Και σε αυτή την περίπτωση ωστόσο, τα αποτελέσματα δεν παρουσίασαν στατιστικά σημαντικές διαφορές ($p>0.05$).



Διάγραμμα 10. Τιμές spad κατά την τελική μέτρηση σε φύλλα διάφορων ηλικιακών ομάδων (νεαρά, ώριμα και γηρασμένα) των φυτών της καλλιέργειας ραπανακίου.

3.10 Συγκέντρωση προλίνης

Οι αναλύσεις που πραγματοποιήθηκαν με σκοπό την ανίχνευση προλίνης δεν οδήγησαν σε κάποιο αποτέλεσμα, καθώς η ουσία αυτή δεν εντοπίστηκε σε κανένα από τα φυτά των πέντε μεταχειρίσεων.

4. Συζήτηση

Ο αριθμός των ερευνών σχετικά με τις επιδράσεις των κυανοτοξινών στα καλλιεργούμενα φυτά αυξήθηκε τα τελευταία χρόνια λόγω τόσο των κινδύνων που εγκυμονεί η βιοσυσσωρεύσή τους για την δημόσια υγεία όσο και των αρνητικών επιδράσεων που μπορούν να προκαλέσουν στα φυτά. Οι υδάτινοι πόροι που έχουν μολυνθεί με κυανοτοξίνες και προορίζονται για χρήση ως νερό άρδευσης μπορούν να αποτελέσουν απειλή τόσο για την επισιτιστική ασφάλεια όσο και για την διασφάλιση της ποιότητας των τροφίμων. Επιπλέον, η απορρόφηση αυτών των κυανοτοξινών από τα καλλιεργούμενα φυτά έχει αποδειχθεί ότι προκαλεί μορφολογικές και φυσιολογικές αλλαγές που οδηγούν σε πιθανή απώλεια παραγωγικότητας. Ωστόσο, οι επιβλαβείς επιδράσεις των κυανοτοξινών στα καλλιεργούμενα φυτά και στη δημόσια υγεία φαίνεται ότι εξαρτώνται από τις συγκεντρώσεις τους στο νερό.

Στην παρούσα εργασία εκτιμήθηκαν βασικές βιοχημικές παράμετροι φυτών ραπανιού όταν αρδεύονται με νερό Κάρλας. Το νερό της λίμνης είναι ένα μείγμα διαφόρων ουσιών –μεταξύ αυτών και πιθανώς κάποιες βιοενεργές. Επομένως, για να εκτιμηθεί η συνεισφορά των μικροκυστινών που εμπεριέχονται στο νερό της Κάρλας στο όποιο αποτέλεσμα χρησιμοποιήθηκαν διάφορες συγκεντρώσεις καθαρής μικροκυστίνης, σε επίπεδα παρόμοια με αυτές που έχουν μετρηθεί στο νερό της Κάρλας και λίγο μεγαλύτερες.

Τα επίπεδα χλωροφύλλης των φύλλων των φυτών του ραπανακίου δεν παρουσίασαν διαφοροποιήσεις ως προς τις διαφορετικές δόσεις μικροκυστινης-LR και νερού από τη λίμνη Κάρλα. Η συγκέντρωση των επιμέρους χλωροφυλλών, της ολικής χλωροφύλλης αλλά και των καροτενοειδών των φυτών του μάρτυρα κυμαίνεται στα ίδια επίπεδα με τη συγκέντρωση όλων των υπόλοιπων μεταχειρίσεων. Αντίστοιχα, δεν καταγράφηκαν διαφορές στους λόγους χλωροφύλλης a/b και ολικών χλωροφυλλών/καροτενοειδή. Πρόσφατα, μια μελέτη που έγινε από τους Corbel et al. (2015), έδειξε επίσης ότι οι χαμηλές συγκεντρώσεις MC-LR που ήταν παρόμοιες με αυτές του πειράματός μας δεν επηρέασαν αρνητικά τις συγκεντρώσεις χλωροφύλλης a και b του *Lens esculentum*. Σύμφωνα με τους Machado et al. (2017), η έκθεση καρότων σε δύο συγκεντρώσεις MC-LR των $10 \mu\text{g}^{\text{L}^{-1}}$ και $50\mu\text{g}^{\text{L}^{-1}}$, δεν επηρέασε τα επίπεδα του β-καροτενίου, βασικού συστατικού της ομάδας των καροτενοειδών.

Η περιεκτικότητα άλλων μη ενζυμικών αντιοξειδωτικών, όπως των φαινολικών ενώσεων, έχει αναφερθεί ότι μεταβάλλεται στα φυτά μετά την έκθεση τους σε MC-LR (El Khalloufi et al., 2012). Σε αρκετές περιπτώσεις έχει καταγραφεί αύξηση των συγκεντρώσεων φαινολικών σε φυτά που ήρθαν αντιμέτωπα με μικροκυστίνες (Corbel et al. 2014). Επίσης, αύξηση ενζυμικών κυρίως αντιοξειδωτικών, αλλά και μη ενζυμικών, όπως η γλουταθειόνη και το ασκορβικό οξύ, έχουν αναφερθεί συχνά υπό παρόμοιες συνθήκες. Το σημαντικό όμως είναι ότι μεγάλες αυξήσεις καταγράφονται σε πολύ υψηλές συγκεντρώσεις MC-LR και όχι στο

επίπεδο αυτών που χρησιμοποιήθηκαν στην παρούσα εργασία και απαντώνται στη λίμνη Κάρλα. Οι Levizou et al. (2017), ύστερα από μελέτη που πραγματοποίησαν σε καλλιέργεια μαρουλιού έδειξαν ότι το νερό της λίμνης Κάρλας δεν επηρέασε σημαντικά την περιεκτικότητα σε φαινολικές ενώσεις και προλίνης. Στην παρούσα εργασία, τα φυτά που καλλιεργήθηκαν και αρδεύονταν με νερό από τη λίμνη Κάρλα δεν παρουσίασαν σημαντικές μεταβολές ως προς την περιεκτικότητα των φαινολικών. Τέλος, ελεύθερη προλίνη δεν ανιχνεύθηκε στα φυτά μας.

5. Συμπεράσματα

Το νερό της λίμνης Κάρλας και οι διαφορετικές συγκεντρώσεις καθαρής μικροκυστίνης-LR που μελετήθηκαν στην παρούσα εργασία φαίνεται ότι δεν επηρέασαν τα εξετασθέντα βιοχημικά χαρακτηριστικά των φυτών ραπανακίου. Τόσο οι συγκεντρώσεις και οι μεταξύ τους αναλογίες των χλωροφυλλών a και b, όσο και τα καροτενοειδή παρέμειναν σε ίδια επίπεδα για τα φυτά όλων των μεταχειρίσεων. Αντίστοιχα τα φαινολικά τόσο των φύλλων, όσο και της κονδυλόριζας δεν διέφεραν σημαντικά μεταξύ των μεταχειρίσεων. Ελεύθερη προλίνη δεν ανιχνεύτηκε σε κανένα φυτό. Φαίνεται λοιπόν ότι τόσο οι χαμηλές συγκεντρώσεις καθαρών μικροκυστινών όσο και οι μικροκυστίνες που περιέχονται στο νερό της Κάρλας δεν επηρεάζουν αρνητικά τις εξετασθείσες βιοχημικές παραμέτρους στο ραπανάκι.

6. Βιβλιογραφία

Asada K. (1992). Ascorbate peroxidase: a hydrogen peroxide scavenging enzyme in plants. *Physiologia Plantarum* 85: 235–241.

Beaulieu, M., Pick, F., Gregory-Eaves, I. (2013). Nutrients and water temperature are significant predictors of cyanobacterial biomass in 1147 lakes data set. *Limnol. Oceanogr.* 58, 1736–1746.

Beaver, J.R., Manis, E.E., Loftin, K.A., Graham, J.L., Pollard, A.I., Mitchell, R.M. (2014). Land use patterns, ecoregion, and microcystin relationships in US lakes and reservoirs: A preliminary evaluation. *Harmful Algae*, 36, 57–62.

Beaver, J.R., Tausz, C.E., Scotese, K.C., Pollard, A.I., Mitchell, R.M. (2018). Environmental factors influencing the quantitative distribution of microcystin and common potentially toxigenic cyanobacteria in US lakes and reservoirs. *Harmful Algae*, 78, 118–128.

Bierman, V.J., Kaur, J., DePinto, J.V., Feist, T.J., Dilks, D.W. (2005). Modeling the role of zebra mussels in the proliferation of blue-green algae in Saginaw Bay, Lake Huron. *J. Great Lakes Res.*, 31, 32–55.

Botes, D; Wessels, P; Kruger, H; Runnegar, M; Santikarn, S; Smith, R; Barna, J; Williams, D. (1985). Structural studies on cyanoginosins-LR, -YR, -YA, and -YM, peptide toxins from *Microcystis aeruginosa*. *J Chem Soc, I*, 2747–2748.

Botha N, Gehringer MM, Downing TG, Van De Venter M, Shephard EG. (2004). The role of microcystin-LR in the induction of apoptosis and oxidative stress in CaCO₂ cells. *Toxicon* 43: 85–92.

Carey, C.C., Ibelings, B.W., Hoffmann, E.P., Hamilton, D.P., Brookes, J.D. (2012). Eco-physiological adaptations that favour freshwater cyanobacteria in a changing climate. *Water Res.*, 46, 1394–1407.

Carmichael, W.W.; Azevedo, S.M.F.O.; An, J.S.; Molica, R.J.R.; Jochimsen, E.M.; Lau, S.; Rinehart, K.L.; Shaw, G.R.; Eaglesham, G.K. (2001). Human fatalities from cyanobacteria: Chemical and biological evidence for cyanotoxins. *Environ. Health Perspect.*, 109, 663–668.

Chen J., Song L., Dai J., Gan N., Liu Z. (2004). Effects of Microcystins on the Growth and the Activity of Superoxide Dismutase and Peroxidase of Rape (*Brassica napus* L.) and Rice (*Oryza sativa* L.) *Toxicon*.;43:393–400 doi: 10.1016/j.toxicon.2004.01.011.

Chorus, I; Bartram, J. (1999). Toxic Cyanobacteria in Water. In *A Guide to their Public Health Consequences, Monitoring and Management*; E & FN Spon: London, UK.

Corbel S., Bouaïcha N., Mougín C. (2014). Dynamics of the toxic cyanobacterial microcystin-leucine-arginine peptide in agricultural soil. *Environ. Chem. Lett.*, 12 (4), 535-541, 10.1007/s10311-014-0482-2.

Crush J.R., Briggs L.R., Sprosen J.M., Nichols S.N. (2008). Effect of Irrigation With Lake Water Containing Microcystins on Microcystin Content and Growth of Ryegrass, Clover, Rape, and Lettuce. *Environ. Toxicol.*; 23:246–252. doi: 10.1002/tox.20331.

deFigueiredo, D. R., Azeiteiro, U. M., Esteves, S. M., Gonçalves, F. J., & Pereira, M. J. (2004). Microcystin-producing blooms—a serious global public health issue. *Ecotoxicology and environmental safety*, 59 (2), 151-163.

de Silva E.D., Williams D.E., Andersen J., Allen T.M. (1992). Motuporin, A Potent Protein Phosphatase Inhibitor Isolated from the Papua New Guinea Sponge *Theonella swinhoei* Gray. *Tetrahedron Lett*, 33, 1561-1564.

Demott, W.R., Moxter, F. (1991). Foraging on cyanobacteria by copepods—Responses to chemical defenses and resource abundance. *Ecology*, 72, 1820–1834.

Dolman, A.M., Rucker, J., Pick, F.R., Fastner, J., Rohrlack, T., Mischke, U., Wiedner, C. (2012). Cyanobacteria and cyanotoxins: The influence of nitrogen versus phosphorus. *PLoS ONE*, 7.

El Khalloufi F., El Ghazali I., Saqrane S., Oufdou K., Vasconcelos V., Oudra B. (2012). Phytotoxic effects of a natural bloom extract containing microcystins on *Lycopersicon esculentum*. *Ecotoxicol. Environ. Saf.* 79, 199–205. doi: 10.1016/j.ecoenv.2012.01.002.

El Khalloufi F., Oufdou K., Lahrouni M., El Ghazali I., Saqrane S., Vasconcelos V. (2010). Oudra B. Allelopathic effects of cyanobacteria extracts containing microcystins on *Medicago sativa*-*Rhizobia* symbiosis. *Ecotoxicol. Environ. Saf.* 74, 431–438. doi: 10.1016/j.ecoenv.2010.10.006.

El Khalloufi, F., El Ghazali I, Saqrane S, Oufdou K, Vasconcelos V, Oudra B .(2012). Phytotoxic effects of a natural bloom extract containing microcystins on *Lycopersicon esculentum*. *Ecotoxicol Environ Saf* 79, 199–205. doi:10.1016/j.ecoenv.2012.01.002

Esterbauer H, Schaur RJ, Zollner H. (1991). Chemistry and biochemistry of 4-hydroxynonenal, malonaldehyde and related aldehydes. *Free Radical and Biological Medicine* 1, 81–128.

Fawell J.K., Hart, J., James, H.A. & Parr, W. (1993) Blue-green algae and their toxins—analysis, toxicity, treatment and environmental control. *Water Suppl.*, 11(3/4), 109-121.

Fulton, R.S., Paerl, H.W. (1987). Effects of colonial morphology on zooplankton utilization of algal resources during blue-green-algal (*microcystis-aeruginosa*) blooms. *Limnol.Oceanogr.*, 32, 634–644.

Gehring M.M., Kewada V., Coates N., Downing T.G. (2003). The Use of *Lepidium sativum* in a Plant Bioassay System for the Detection of Microcystin-LR. *Toxicol.*; 41:871–876.

Ger, K.A., Otten, T.G., DuMais, R., Ignoffo, T., Kimmerer, W. (2018). In situ ingestion of *Microcystis* is negatively related to copepod abundance in the upper San Francisco Estuary. *Limnol. Oceanogr.*, 63, 2394–2410.

Graham, J.L., Loftin, K.A., Meyer, M.T., Ziegler, A.C. (2010). Cyanotoxin Mixtures and Taste-and-Odor Compounds in Cyanobacterial Blooms from the Midwestern United States. *Environ. Sci. Technol.*, 44, 7361–7368.

Grosse, Y., Baan, R., Straif, K., Secretan, B., El Ghissassi, F., Coglianò, V. (2006). Carcinogenicity of nitrate, nitrite, and cyanobacterial peptide toxins. *Lancet Oncol.*, 7(8), 628-9.

Gutiérrez-Praena D., Campos A., Azevedo J., Neves J., Freitas M., Guzmán-Guillén R., Cameán A., Renaut J., Vasconcelos V. (2014). Exposure of *Lycopersicon Esculentum* to Microcystin-LR: Effects in the Leaf Proteome and Toxin Translocation from Water to Leaves and Fruits. *Toxins (Basel)*.6(6): 1837–1854. doi: 10.3390/toxins6061837

Harada, K.I., et al., Stability of microcystins from cyanobacteria. III. Effect of pH and temperature. *Phycologia*, 1996. 35(6), 83-88.

IARC, (2006). Ingested nitrates and nitrites, and cyanobacterial peptide toxins. International Agency for Research on Cancer.

Jones, G., I.R. Falconer, and R.M. Wilkins (1995). Persistence of cyclic peptide toxins in dried *Microcystis aeruginosa* crusts from lake Mokoan, Australia. *Environmental Toxicology & Water Quality*, 10(1), 19-24.

Kim, B.R., Nakano, S., Kim, B.H., Han, M.S. (2006). Grazing and growth of the heterotrophic flagellate *Diphyllia rotans* on the cyanobacterium *Microcystis aeruginosa*. *Aquat. Microb. Ecol.*, 45, 163–170.

Koes P., Gorzo G., Suranyi G., Borbely G. (1995). Simple and Efficient Method for Isolation and Measurement of Cyanobacterial Hepatotoxins by Plant Tests (*Sinapis alba* L.) *Anal. Biochem.*; 225:49–53.

Lahrouni M., Oufdou K., Faghire M., Peix A., El Khalloufi F., Vasconcelos V., Oudra B. (2012). Cyanobacterial extracts containing microcystins affect the growth, nodulation process and nitrogen uptake of faba bean (*Vicia faba* L., Fabaceae) *Ecotoxicology*. 21, 681–687. doi: 10.1007/s10646-011-0826-7.

Lahti, K., Rapala J, Kivimäki AL, Kukkonen J, Niemelä M, Sivonen K. (2001). Occurrence of microcystins in raw water sources and treated drinking water of Finnish waterworks. *Water Sci Technol*, 43(12), 225-8.

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

Loftin, K.A., Graham, J.L., Hilborn, E.D., Lehmann, S.C., Meyer, M.T., Dietze, J.E., Griffith, C.B. (2016). Cyanotoxins in inland lakes of the United States: Occurrence and potential recreational health risks in the EPA Natural Lakes Assessment 2007. *Harmful Algae*, 56, 77–90.

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*. *Environ Sci Pollut Res*, 24, 752–764

Marmen, S., Aharonovich, D., Grossowicz, M., Blank, L., Yacobi, Y.Z., Sher, D.J. (2016) Distribution and Habitat Specificity of Potentially-Toxic Microcystis across Climate, Land, and Water Use Gradients. *Front Microbiol*. 15, 7:271

Máthé C., Beyer D., Erdodi F., Serfozo Z., Székvölgyi L., Vasas G., M-Hamvas M., Jámbrik K., Gonda S., Kiss A., (2009). Microcystin-LR induces abnormal root development by altering microtubule organization in tissue-cultured common reed (*Phragmites australis*) plantlets. *Aquat. Toxicol*. 92:122–130. doi: 10.1016/j.aquatox.2009.02.005.

McElhiney J., Lawton L.A., Leifert C. (2001). Investigations into the Inhibitory Effects of Microcystins on Plant Growth, and the Toxicity of Plant Tissues Following Exposure. *Toxicon*.; 39:1411–1420.

Mohamed, Z., Alshehri, A. (2013). Grazing on *Microcystis aeruginosa* and degradation of microcystins by the heterotrophic flagellate *Diphyllia rotans*. *Ecotox. Environ. Saf.*, 96, 48–52.

Namikoshi, M; Yuan, M; Sivonen, K; Carmichael, WW; Rinehart, KL; Rouhiainen, L; Sun, F; Brittain, S; Otsuki, A. (1998). Seven new microcystins possessing two l-glutamic acid units, isolated from *Anabaena* sp. strain 186. *Chem Res Toxicol*, 11, 143–149.

Paerl, H.W. (2018). Mitigating Toxic Planktonic Cyanobacterial Blooms in Aquatic Ecosystems Facing Increasing Anthropogenic and Climatic Pressures. *Toxins*, 10, 76.

Pearson L., Mihali T., Moffitt M., Kellmann R., Neilan B. (2010). On the chemistry, toxicology and genetics of the cyanobacterial toxins, microcystin, nodularin, saxitoxin and cylindrospermopsin. *Mar Drugs*, 8, 1650-1680.

Pereira S., Saker M.L., Vale M., Vasconcelos V.M. (2009). Comparison of sensitivity of grasses (*Lolium perenne* L. and *Festuca rubra* L.) and lettuce (*Lactuca sativa* L.) exposed to water contaminated with microcystins. *Bull. Environ. Contam.Toxicol.* 83, 81–84.

Peuthert A., Chakrabarti S., Pflugmacher S. (2007). Uptake of Microcystins-LR and -LF (Cyanobacterial Toxins) in Seedlings of Several Important Agricultural Plant Species and the Correlation With Cellular Damage (lipid peroxidation). *Environ. Toxicol.*; 22, 436–442.

Peuthert A., Pflugmacher S. (2010). Influence of the cyanotoxin microcystin-LR on tocopherol in Alfalfa seedlings (*Medicago sativa*) *Toxicon.* 56, 411–417. doi: 10.1016/j.toxicon.2010.04.004.

Pflugmacher S. (2004). Promotion of oxidative stress in the aquatic macrophyte *Ceratophyllum demersum* during biotransformation of the cyanobacterial toxin microcystin-LR. *Aquatic Toxicology* 70, 169–178.

Pflugmacher S., Aulhorn M., Grimm B. (2007). Influence of a Cyanobacterial Crude Extract Containing Microcystin-LR on the Physiology and Antioxidative Defence Systems of Different Spinach Variants. *New Phytol.*; 175, 482–489.

Pflugmacher S., Jung K., Lundvall L., Neumann S., Peuthert A. (2006). Effects of Cyanobacterial Toxins and Cyanobacterial Cell-free Crude Extract on Germination of Alfalfa (*Medicago sativa*) and Induction of Oxidative Stress. *Environ. Toxicol.Chem.* 25, 2381–2387.

Polle A. (2001). Dissecting the superoxide dismutase ascorbate glutathione pathway in chloroplasts by metabolic modelling. Computer simulations as a step towards flux analysis. *Plant Physiology* 126, 445–462.

Pouria S., De Andrade A., Barbosa J., Cavalcanti R.L., Barreto V.T.S., Ward C.J., W. Preiser, Poon G.K., Neild G.H., Codd G.A. (1998). Fatal microcystin intoxication in haemodialysis unit in Caruaru, *Brazil Lancet*, 352, 21-26,

Prieto A., Campos A., Cameán A., Vasconcelos V. (2011). Effects on growth and oxidative stress status of rice plants (*Oryza sativa*) exposed to two extracts of toxin-producing cyanobacteria (*Aphanizomenon ovalisporum* and *Microcystis aeruginosa*) *Ecotoxicol. Environ. Saf.* 74, (7),1973-80

Rapala, J., Berg, K.A., Lyra, C., Niemi R.M., Manz, W., Suomalainen, S., Paulin, L., Lahti, K. (2005). *Paucibacter toxinivorans* gen. nov., sp. nov., a bacterium that degrades cyclic cyanobacterial hepatotoxins microcystins and nodularin. *Int J SystEvolMicrobiol*, 55, (4), 1563-8.

Rapala, J., Sivonen, K., Luukkainen, R., Niemelä, S.I (1993) Anatoxin-a concentration in *Anabaena* and *Aphanizomenon* at different environmental conditions and comparison of

growth by toxic and non-toxic *Anabaena* strains, a laboratory study,. *J. App. Phycol.*, 5, (6), 581-591.

Rigosi, A., Carey, C.C., Ibelings, B.W., Brookes, J.D. (2014). The interaction between climate warming and eutrophication to promote cyanobacteria is dependent on trophic state and varies among taxa. *Limnol.Oceanogr.*, 59, 99–114.

Rinehart, K; Namikoshi, N; Choi, B. (1994). Structure and biosynthesis of toxins from blue-green algae (cyanobacteria). *J App Phycol*, 6, 159–176.

Saqrane S., El Ghazali I., Oudra B., Bouarab L., Vasconcelos V. (2008). Effects of Cyanobacteria Producing Microcystins on Seed Germination and Seedling Growth of Several Agricultural Plants.*J. Environ. Sci. Health B.*; 43, 443–451.

Saqrane S., Ouahid Y., El Ghazali I., Oudra B., Bouarab L., del Campo F.F. (2009). Physiological Changes in *Triticum durum*, *Zea mays*, *Pisum sativum* and *Lens esculenta* Cultivars, Caused by Irrigation with Water Contaminated with Microcystins: A Laboratory Experimental Approach. *Toxicon.*; 53, 786–796. doi: 10.1016/j.toxicon.2009.01.028.

Sivonen, K. (1996). Cyanobacterial toxins and toxin production. *Phycologia*, 35, 12–24.

Sivonen, K; Jones, G. (1999). Toxic Cyanobacteria in Water: A Guide to Their Public Health consequences, Monitoring and Management; E and FN Spon: *New York, NY, USA*, Volume 1, pp. 40–111.

Smith R.D., Walker J.C. (1996). Plant protein phosphatases. *Annu. Rev. Plant Physiol. Plant Mol. Biol.* 47, 101–125. doi: 10.1146/annurev.arplant.47.1.101.

Svircev, Z.; Drobac, D.; Tokodi, N.; Mijovic', B.; Codd, G.A.; Meriluoto, J. (2017) Toxicology of microcystins with reference to cases of human intoxications and epidemiological investigations of exposures to cyanobacteria and cyanotoxins. *Arch. Toxicol.*, 91, 1–30.

Taranu, Z.E., Gregory-Eaves, I., Leavitt, P.R., Bunting, L., Buchaca, T., Catalan, J., Domaizon, I., Guilizzoni, P., Lami, A., McGowan, S., Moorhouse, H., Morabito, G., Pick, F.R., Stevenson, M.A., Thompson, P.L., Vinebrooke, R.D. (2015). Acceleration of cyanobacterial dominance in north temperate-subarctic lakes during the Anthropocene. *Ecol. Lett.*, 18, 375–384.

Triest, L., Stiers, I., Van Onsem, S. (2016) Biomanipulation as a nature-based solution to reduce cyanobacterial blooms. *Aquat. Ecol.*, 50, 461–483.

Tsuji, K., Watanuki, T., Kondo, F., Watanabe, M.F., Suzuki S., Nakazawa, H., Suzuki, M., Uchida, H., Harada, K.I. (1995) Stability of microcystins from cyanobacteria--II. Effect of UV light on decomposition and isomerization. *Toxicon*, 1995. 33, (12), 1619-31.

Urrutia-Cordero, P., Ekvall, M.K., Hansson, L.A. (2015). Responses of cyanobacteria to herbivorous zooplankton across predator regimes: Who mows the bloom? *Freshw. Biol.*, 60, 960–972.

Van Wichelen, J., van Gremberghe, I., Vanormelingen, P., Debeer, A.E., Leporcq, B., Menzel, D., Codd, G.A., Descy, J.P., Vyverman, W. (2010). Strong effects of amoebae grazing on the biomass and genetic structure of a *Microcystis* bloom (Cyanobacteria). *Environ. Microbiol.*, 12, 2797–2813.

Wagner, C., Adrian, R. (2009). Cyanobacteria dominance: Quantifying the effects of climate change. *Limnol. Oceanogr.*, 54, 2460–2468.

Welker, M.; von Dohren, H. (2006). Cyanobacterial peptides -nature's own combinatorial biosynthesis. *FEMS Microbiol Rev*, 30, 530–563

Whitton, B. A., & Potts, M. (Eds.). (2007). The ecology of cyanobacteria: their diversity in time and space. *Springer Science & Business Media*.

WHO (1999). Toxic Cyanobacteria in Water: A guide to their public health consequences, monitoring and management. Routledge: London and New York.

WHO (2003) Cyanobacterial toxins: Microcystin-LR in drinking-water. Background document for preparation of WHO Guidelines for drinking-water quality. Geneva, World Health Organization (WHO/SDE/WSH/03.04/57).

Wilkinson, A.A., Hondzo, M., Guala, M. (2018). Investigating a biotic drivers for vertical and temporal heterogeneities of cyanobacteria concentrations in lakes using a seasonal in-situ monitoring station. *Water Resour. Res.*

Wilson, A.E., Sarnelle, O., Tillmanns, A.R. (2006) Effects of cyanobacterial toxicity and morphology on the population growth of freshwater zooplankton: Meta-analyses of laboratory experiments. *Limnol. Oceanogr.*, 51, 1915–1924.

Yang, Z., Kong, F.X. (2012). Formation of large colonies: A defense mechanism of *Microcystis aeruginosa* under continuous grazing pressure by flagellate *Ochromonas* sp. *J. Limnol.*, 71, 61–66.

Yang, Z., Kong, F.X., Shi, X.L., Zhang, M., Xing, P., Cao, H.S. (2008). Changes in the morphology and polysaccharide content of *Microcystis aeruginosa* (Cyanobacteria) during flagellate grazing. *J. Phycol.*, 44, 716–720.

Ηλεκτρονικές Πηγές

<https://www.michiganradio.org/post/lake-erie-cyanobacterial-bloom-rapidly-expanding>

<https://pubchem.ncbi.nlm.nih.gov/compound/Microcystin-LR#section=Structures>

https://www.researchgate.net/profile/Liang_Chen78/publication/295246594/figure/fig2/AS:349609697267714@1460364855058/Fig-2-Chemical-structure-of-microcystin-LR-MC-LR-in-February-1996-in-Brazil-where.png