



ΣΧΟΛΗ ΓΕΩΠΟΝΙΚΩΝ ΕΠΙΣΤΗΜΩΝ

**ΤΜΗΜΑ ΓΕΩΠΟΝΙΑΣ ΦΥΤΙΚΗΣ ΠΑΡΑΓΩΓΗΣ ΚΑΙ ΑΓΡΟΤΙΚΟΥ
ΠΕΡΙΒΑΛΛΟΝΤΟΣ**

ΕΡΓΑΣΤΗΡΙΟ ΦΥΣΙΟΛΟΓΙΑΣ ΑΝΑΤΟΜΙΑΣ ΚΑΙ ΜΟΡΦΟΛΟΓΙΑΣ ΦΥΤΩΝ

**ΑΥΞΗΜΕΝΑ ΕΠΙΠΕΔΑ ΚΑΔΜΙΟΥ ΣΤΟ ΕΔΑΦΟΣ ΣΥΝΔΥΑΣΜΕΝΑ ΜΕ
ΑΖΩΤΟΥΧΟ ΛΙΠΑΝΣΗ: ΕΠΙΠΤΩΣΕΙΣ ΣΕ ΑΝΑΠΤΥΞΙΑΚΑ ΚΑΙ ΒΙΟΧΗΜΙΚΑ
ΧΑΡΑΚΤΗΡΙΣΤΙΚΑ ΤΗΣ ΡΙΓΑΝΗΣ**

ΦΛΩΡΟΚΑΠΗ ΓΕΩΡΓΙΑ

ΠΤΥΧΙΑΚΗ ΕΡΓΑΣΙΑ

ΕΠΙΒΛΕΠΟΥΣΑ ΚΑΘΗΓΗΤΡΙΑ: ΛΕΒΙΖΟΥ ΕΥΘΥΜΙΑ

Βόλος, Οκτώβριος 2020

**ΑΥΞΗΜΕΝΑ ΕΠΙΠΕΔΑ ΚΑΔΜΙΟΥ ΣΤΟ ΕΔΑΦΟΣ ΣΥΝΔΥΑΣΜΕΝΑ ΜΕ
ΑΖΩΤΟΥΧΟ ΛΙΠΑΝΣΗ: ΕΠΙΠΤΩΣΕΙΣ ΣΕ ΑΝΑΠΤΥΞΙΑΚΑ ΚΑΙ ΒΙΟΧΗΜΙΚΑ
ΧΑΡΑΚΤΗΡΙΣΤΙΚΑ ΤΗΣ ΡΙΓΑΝΗΣ**

**INCREASED SOIL CADMIUM LEVELS COMBINED WITH NITROGEN
FERTILIZER APPLICATION: IMPACTS ON GROWTH AND BIOCHEMICAL
CHARACTERISTICS OF OREGANO**

Τριμελής Συμβουλευτική Επιτροπή :

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

Αντωνιάδης Βασίλειος: Επίκουρος Καθηγητής Εφαρμοσμένης Εδαφολογίας, Τμήμα Γεωπονίας Φυτικής Παραγωγής και Αγροτικού Περιβάλλοντος, Πανεπιστήμιο Θεσσαλίας.

Πετούμενου Δέσποινα: Λέκτορας Αμπελουργίας, Τμήμα Γεωπονίας Φυτικής Παραγωγής και Αγροτικού Περιβάλλοντος, Πανεπιστήμιο Θεσσαλίας.

«Βεβαιώνω ότι είμαι ο συγγραφέας αυτής της πτυχιακής εργασίας, η οποία εκπονήθηκε σύμφωνα με τον Κανονισμό Εκπόνησης Πτυχιακής Εργασίας του ΤΓΦΠΑΠ»

ΕΥΧΑΡΙΣΤΙΕΣ

Θα ήθελα να ευχαριστήσω ιδιαίτερα την επιβλέπουσα καθηγήτρια μου κα. Λεβίζου Ευθυμία για όλη την στήριξη και βοήθεια τόσο κατά την διάρκεια του πειράματος όσο και στην καθοδήγηση για την συγγραφή της παρούσας διατριβής. Επιπροσθέτως, θα ήθελα να ευχαριστήσω και τον κ. Αντωνιάδη Βασίλειο για την εξαιρετική συνεργασία κατά την διάρκεια εξέλιξης του πειράματος αλλά και γενικότερα τα μέλη της τριμελούς επιτροπής για τον χρόνο που θα αφιερώσουν στην μελέτη της παρούσας διατριβής. Τέλος, θα ήθελα να ευχαριστήσω τον κ. Τσιρόπουλο Νικόλαο για την παραχώρηση του Εργαστηρίου Αναλυτικής Χημείας και Γεωργικής Φαρμακολογίας με σκοπό την διεκπεραίωση των απαιτούμενων μετρήσεων του πειράματος αλλά και όλους τους συμφοιτητές-φίλους μου που στα 5 αυτά έτη των σπουδών γίναμε μια οικογένεια.

Περιεχόμενα

Περίληψη	
1. Εισαγωγή.....	8-16
1.1. Βαρέα Μέταλλα.....	8-10
1.1.1. Γενικά στοιχεία.....	8
1.1.2. Απόκριση των φυτών στην έκθεση σε βαρέα μέταλλα.....	9
1.1.3. Στρατηγικές αντιμετώπισης της καταπόνησης από βαρέα μέταλλα	9-10
1.2. Κάδμιο	10-12
1.2.1. Γενικά στοιχεία	10
1.2.2. Επιπτώσεις από την συσσώρευση καδμίου στα φυτά.....	11-12
1.3. Ρίγανη.....	13-16
1.3.1. Χαρακτηριστικά του φυτού	13
1.3.2. Το αιθέριο έλαιο της ρίγανης	13-14
1.3.3. Τεχνική πολλαπλασιασμού.....	14
1.3.4. Καλλιεργητικές τεχνικές	15
1.3.5. Συλλογή.....	15
1.4. Σκοπός της πτυχιακής εργασίας	16
2. Υλικά και μέθοδοι	16-23
2.1. Πειραματικός σχεδιασμός	16-20
2.2. Μέτρηση ξηρού βάρους.....	20
2.3. Απομόνωση και ποσοτικός προσδιορισμός φωτοσυνθετικών χρωστικών.....	21
2.4. Υπολογισμός MDA για τον προσδιορισμό υπεροξειδωσης των λιπιδίων.....	22
2.5. Στατιστική ανάλυση.....	23
3. Αποτελέσματα.....	23-33
4. Συζήτηση	34-36
5. Συμπεράσματα.....	37
6. Βιβλιογραφία	38-40

ΠΕΡΙΛΗΨΗ

Στην παρούσα πτυχιακή διατριβή ερευνήθηκε η επίδραση δύο παραγόντων, του καδμίου και του αζώτου σε αναπτυξιακά και βιοχημικά χαρακτηριστικά φυτών ρίγανης (*Origanum vulgare L.*). Δημιουργήθηκαν συνολικά έξι μεταχειρίσεις των τριάντα φυτών η καθεμιά στις οποίες πραγματοποιήθηκαν επιμολύνσεις με διαφορετικές συγκεντρώσεις καδμίου (0, 20, 40ppm), ενώ χορηγήθηκαν δύο επίπεδα αζώτου (9 και 30 kg/στρέμμα). Η διάρκεια του πειράματος ήταν 2,5 μήνες, κατά τους οποίους τα φυτά ποτίζονταν τακτικά ώστε να μην υποστούν επιπλέον καταπόνηση. Μόλις τα φυτά έφτασαν στο στάδιο της πλήρους ανθοφορίας (τέλος Ιουνίου), πραγματοποιήθηκε η συγκομιδή και στην συνέχεια οι μετρήσεις αναπτυξιακών παραμέτρων (υπέργεια και υπόγεια βιομάζα και αριθμός πλάγιων κλάδων) και βιοχημικών χαρακτηριστικών (συγκέντρωση φωτοσυνθετικών χρωστικών και του δείκτη υπεροξειδωσής των λιπιδίων malondialdehyde (MDA)). Σύμφωνα με τα αποτελέσματα των μετρήσεων, ο καθοριστικός παράγοντας για τη συσσώρευση βιομάζας τόσο στο υπέργειο, όσο και στο υπόγειο μέρος του φυτού ήταν η λίπανση με άζωτο, ενώ η αυξημένη παρουσία καδμίου δεν φάνηκε να επηρεάζει την ανάπτυξη των φυτών. Παρόμοια εικόνα καλύτερης ανάπτυξης στις τρεις μεταχειρίσεις που έλαβαν επιπλέον άζωτο καταγράφηκε και στον αριθμό των πλάγιων κλάδων. Αντίστοιχα σημαντική θετική επίδραση του αζώτου εμφανίστηκε στις συγκεντρώσεις της χλωροφύλλης a και b αλλά και των καροτενοειδών, μειώνοντας έτσι τις αρνητικές επιπτώσεις από την πιθανή καταπόνηση με κάδμιο. Ο λόγος της χλωροφύλλης a προς την χλωροφύλλη b εμφάνισε όμοιες τιμές και στις έξι διαφορετικές μεταχειρίσεις, όπως επίσης η συγκέντρωση του MDA. Καθώς το MDA είναι το τελικό προϊόν της υπεροξειδωσής των λιπιδίων, οι όμοιες τιμές της συγκέντρωσης του στις μεταχειρίσεις με αυξημένο κάδμιο παραπέμπουν σε απουσία οξειδωτικής καταπόνησης. Συμπερασματικά, όπως προκύπτει από τα αποτελέσματα της παρούσας πτυχιακής διατριβής, η ρίγανη αποδείχτηκε ένα ανθεκτικό φυτό σε υψηλές συγκεντρώσεις καδμίου, τετραπλάσιες των επιτρεπτών ορίων σε

αγροτικό έδαφος, ακόμη και χωρίς τη χορήγηση αυξημένου αζώτου. Βέβαια, όπως έγινε αντιληπτό η προσθήκη επιπλέον αζώτου οδήγησε σε αυξημένη περιεκτικότητα φωτοσυνθετικών χρωστικών και βελτιωμένη ανάπτυξη των φυτών ρίγανης, ακόμη και σε έδαφος υψηλής περιεκτικότητας σε κάδμιο.

1.ΕΙΣΑΓΩΓΗ

1.1. Βαρέα μέταλλα

1.1.1 Γενικά στοιχεία

Ως βαρέα μέταλλα χαρακτηρίζονται τα χημικά στοιχεία του περιοδικού πίνακα που διαθέτουν μεταλλικές ιδιότητες αλλά έχουν ατομικό αριθμό μεγαλύτερο του 20 και πυκνότητα υψηλότερη των 5 g/cm³. Στην κατηγορία αυτή περιλαμβάνονται στοιχεία όπως ο μόλυβδος, το αρσενικό, το κάδμιο, ο χαλκός κ.α. Βασικό χαρακτηριστικό των στοιχείων αυτών, πέρα από την συσσώρευση τους σε οργανισμούς αποτελεί η μακροχρόνια παραμονή τους στο έδαφος σε τοξικά επίπεδα (Καραμπουρνιώτης κ.ά., 2012).

Γενικά, τα βαρέα μέταλλα είναι φυσικά στοιχεία τα οποία εντοπίζονται στον φλοιό της γης. Οι ανθρώπινες δραστηριότητες όμως ευθύνονται για την ρύπανση του περιβάλλοντος με βαρέα μέταλλα αλλά και την ανθρώπινη έκθεση σε αυτά. Οι δραστηριότητες αυτές περιλαμβάνουν διεργασίες εξόρυξης, απόρριψη βιομηχανικών αποβλήτων αλλά και την εκτεταμένη χρήση μετάλλων και μεταλλικών ενώσεων στην γεωργία (Tchounpou et al., 2012). Τα μέταλλα αυτά καταλήγουν μέσω διάφορων μονοπατιών στο περιβάλλον: στον αέρα μέσω της καύσης, στα επιφανειακά ύδατα και στο έδαφος μέσω της απορροής και απόθεσης, με τελικό αποτέλεσμα την έκθεση σε αυτά των περισσότερων οργανισμών που διαβιούν στις ρυπασμένες περιοχές (Jagup, 2003). Τα τελευταία χρόνια το πρόβλημα της ρύπανσης του εδάφους από βαρέα μέταλλα, λόγω της έντονης βιομηχανικής δραστηριότητας αλλά και της εντατικοποίησης της γεωργίας έχει προκαλέσει έντονη ανησυχία. Η συχνή και ευρεία ανίχνευσή τους αλλά και το γεγονός ότι εμφανίζουν οξεία και χρόνια τοξικότητα στα φυτά, τα οποία αναπτύσσονται σε ρυπασμένο έδαφος, αποτελούν τις αιτίες της ανησυχίας αυτής (Yadav, 2010).

1.1.2. Απόκριση των φυτών στην έκθεση σε βαρέα μέταλλα

Η απόκριση των φυτών στην αυξημένη παρουσία βαρέων μετάλλων στο έδαφος είναι ειδο-ειδική. Κάθε φυτικό είδος επομένως εμφανίζει διαφορετικά επίπεδα αντοχής στην παρουσία των μετάλλων. Για τα περισσότερα φυτά η καταπόνηση είναι σημαντική και αναλόγως της επιβάρυνσης μπορεί να αποδειχθεί θανατηφόρος καθώς διαταράσσεται τόσο πολύ η ομοιόστασή τους που δεν μπορούν να αναπτυχθούν καν (Yadav, 2010). Υπάρχουν όμως και ορισμένα φυτά που έχουν την ικανότητα να αναπτύσσονται και να μεγαλώνουν φυσιολογικά σε επιβαρυμένο από βαρέα μέταλλα έδαφος. Πέραν όμως από την ευαισθησία ή την ανθεκτικότητα των φυτών, και η συγκέντρωση των μετάλλων στα διάφορα μέρη του φυτού ποικίλει. Η υψηλότερη συγκέντρωση τους εντοπίζεται συνήθως στις ρίζες και στην συνέχεια στο βλαστό (Αλεξιάδου κ.ά.,2016).

1.1.3. Στρατηγικές αντιμετώπισης της καταπόνησης από βαρέα μέταλλα

Τα φυτά προκειμένου να επιβιώσουν αλλά και να καταφέρουν να αναπτυχθούν ομαλά σε περιβάλλον επιβαρυμένο από βαρέα μέταλλα έχουν αναπτύξει διάφορες στρατηγικές διαχείρισης της καταπόνησης. Τα περισσότερα φυτικά είδη χρησιμοποιούν την τακτική της αποφυγής, μιας και η στρατηγική της ανθεκτικότητας δεν μπορεί να εξασφαλίσει φυσιολογική ανάπτυξη και λειτουργία για τα περισσότερα φυτά λόγω της ευαισθησίας του συμπλάστη στην συσσώρευση μετάλλων. Κατά την στρατηγική της αποφυγής, τα φυτά έχουν την ικανότητα να μην επιτρέπουν την είσοδο των μετάλλων στους ευαίσθητους ιστούς ή και να τα αποθηκεύουν/εξουδετερώνουν σε άλλα όργανα που δεν εμφανίζουν ευαισθησία. Οι μηχανισμοί με τους οποίους επιτυγχάνεται αυτό είναι α) μέσω της έκκρισης ουσιών από την ρίζα οι οποίες δεσμεύουν ή/και

ακινητοποιούν τα βαρέα μέταλλα, β) λόγω της εκλεκτικότητας των μεμβρανών, η οποία καθιστά αδύνατο τα μέταλλα να εισχωρήσουν στο εσωτερικό, είτε γ) ακόμα και αν καταφέρουν με κάποιο τρόπο να εισχωρήσουν στο εσωτερικό της ρίζας να ενεργοποιούνται μηχανισμοί αποτοξίνωσης των μετάλλων ώστε να δεσμευτούν στην ρίζα και να μην καταφέρουν να μεταφερθούν στο υπέργειο τμήμα του φυτού επηρεάζοντας τα φωτοσυνθετικά όργανα (Καραμπουρνιώτης κ.ά., 2012).

1.2. Κάδμιο

1.2.1 Γενικά Στοιχεία

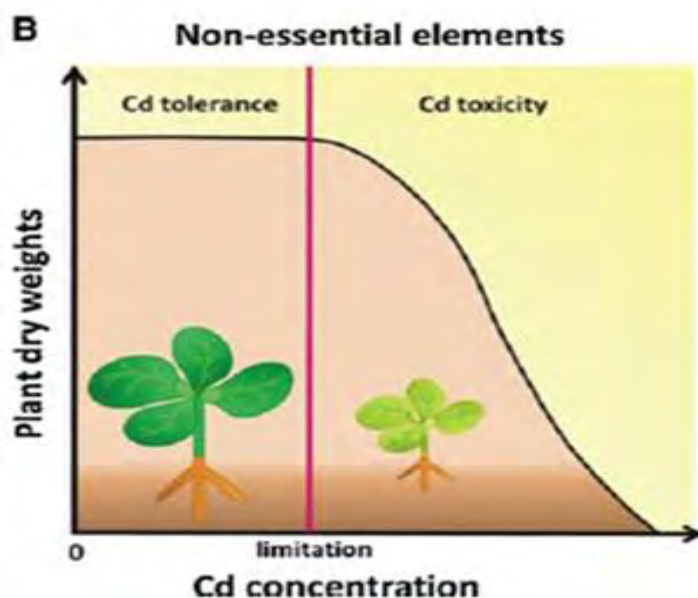
Μεταξύ των βαρέων μετάλλων που είναι ιδιαίτερα τοξικά για τον άνθρωπο αλλά και για το περιβάλλον βρίσκεται και το κάδμιο (Cd). Το κάδμιο, όπως και όλα τα βαρέα μέταλλα, εντοπίζεται στην φύση στον φλοιό της γης και συγκεκριμένα σε συγκέντρωση ίση περίπου με 0,1 mg/kg (Tchounpou et al., 2014). Όσον αφορά τις οδούς μέσω των οποίων εισέρχεται στη βιόσφαιρα διαχωρίζονται σε φυσικές μέσω των πυρκαγιών, σε γεωργικές μέσω των γεωργικών λιπασμάτων, σε βιομηχανικές μέσω της επεξεργασίας μεταλλευμάτων και πλαστικών, σε αστικές μέσω της καύσης πετρελαίου, γαιανθράκων αλλά και μέσω των μπαταριών (Μανουσάκη, 2008, Tran et al., 2013).

Σύμφωνα με έρευνες, έχει βρεθεί ότι το κάδμιο είναι ένα από το στοιχεία που παρουσιάζει έντονη κινητικότητα στα φυτά (Αλεξιάδου κ.ά.,2016, Das et al., 1997). Κύριος παράγοντας που επηρεάζει άμεσα την πρόσληψη του από τα φυτά είναι το pH του εδάφους. Συγκεκριμένα, έχει βρεθεί ότι με την μείωση του pH, αυξάνεται η απορρόφηση του καδμίου (Μανουσάκη, 2008). Η μορφή με την οποία προσλαμβάνεται από τα φυτά είναι ως δισθενή κατιόντα, χηλικές ενώσεις και σύμπλοκα (Moreno-Jimenez, 2009). Το επιτρεπτό όριο του καδμίου στο έδαφος είναι 100 mg/kg εδάφους , το οποίο όμως συνεχώς τείνει να αυξάνεται λόγω της εκτεταμένης ανθρώπινης δραστηριότητας (Yadav, 2010).

1.2.2. Επιπτώσεις από την συσσώρευση καδμίου στα φυτά

Μία από τις κύριες επιπτώσεις της συσσώρευσης καδμίου στα φυτά είναι η παρεμπόδιση της πρόσληψης, μεταφοράς και χρήσης θρεπτικών στοιχείων όπως το ασβέστιο, το κάλιο, ο φώσφορος, το μαγνήσιο, καθώς το κάδμιο είναι ιδιαίτερα ανταγωνιστικό έναντι πολλών θρεπτικών στοιχείων (Nagajyoti et al., 2010). Επιπροσθέτως, το κάδμιο οδηγεί σε μείωση του Fe (II) λόγω της παρεμπόδισης της Fe(III) ρεδοκτάσης στις ρίζες (Benavides et al., 2005), η οποία είναι υπεύθυνη για την μετατροπή του σιδήρου από Fe^{3+} σε Fe^{2+} . Όλα τα παραπάνω είναι εμφανή στο φυτό καθώς παρουσιάζει χλώρωση και κοκκίνισμα των νεύρων στα φύλλα, αλλά και καθυστέρηση στην ανάπτυξη των βλαστών και των ριζών (Irfan et al., 2013), ενώ σε έντονη τοξικότητα εμφανίζεται μερική ή και ολική νέκρωση του φυτού. Ακόμα, έχει παρατηρηθεί έντονο καφέτιασμα στις ρίζες των φυτών που έχουν εκτεθεί σε κάδμιο λόγω συσσώρευσης φαινολικών ενώσεων στο σημείο αυτό (Αλεξιάδου κ.ά.,2016). Επιπροσθέτως, η τοξικότητα του καδμίου μπορεί να οφείλεται στο ότι μειώνει και την περιεκτικότητα σε νερό της πλασματικής μεμβράνης των κυττάρων, μεταβάλλοντας έτσι την διαπερατότητα της αλλά και διαταράσσοντας την ομαλή λειτουργία της. Σε πειράματα που έχουν πραγματοποιηθεί σε σιτηρά και ηλιοτρόπιο, βρέθηκε ότι συσσώρευση καδμίου μειώνει την δραστηριότητα της ATPάσης, στις ρίζες, η οποία εμπλέκεται στην είσοδο καλίου και έξοδο νατρίου από το κύτταρο. Η τοξικότητα καδμίου φαίνεται ότι επηρεάζει γενικώς την φυσιολογική λειτουργία των μεμβρανών του κυττάρου, επάγοντας την υπεροξειδωση των λιπιδίων αλλά και την ομαλή λειτουργία του χλωροπλάστη παρεμποδίζοντας την βιοσύνθεση των χλωροφυλλών και μειώνοντας την ενεργότητα των ενζύμων που συμβάλλουν στην δέσμευση του διοξειδίου του άνθρακα (Benavides et al., 2005). Οι βλάβες που μπορεί να προκαλέσει το κάδμιο σε διάφορες μεταβολικές οδούς του φυτού επεκτείνονται και σε εκείνες που δημιουργούνται στην φωτοσυνθετική συσκευή προάγοντας την παραγωγή ενεργών μορφών οξυγόνου (ROS) οι οποίες αλληλεπιδρούν με κυτταρικά μόρια προκαλώντας οξειδωση σε κύτταρα και βλάβη στην κυτταροπλασματική μεμβράνη των κυττάρων (Lin et al., 2012). Σύμφωνα με έρευνες, η παραγωγή ελεύθερων ριζών ή η μείωση παραγωγής αντιοξειδωτικών ουσιών είναι

αποτέλεσμα της οξειδωτικής καταπόνησης που επέρχεται ως αποτέλεσμα της συσσώρευσης καδμίου στο εσωτερικό του φυτού (Benavides et al., 2005).



Εικόνα 1. Καμπύλη αντίδρασης του φυτού έναντι της συγκέντρωσης Cd (Lin et al., 2012).

Στην Εικόνα 1 η καμπύλη συγκέντρωσης του καδμίου παρουσιάζεται συναρτήσει του ξηρού βάρους του φυτού. Όπως φαίνεται στην καμπύλη, στα βαρέα μέταλλα τα οποία δεν κρίνονται απαραίτητα για την ανάπτυξη των φυτών, όπως είναι και το κάδμιο, δεν παρατηρείται κατώτερο και ανώτερο όριο δόσης. Αντιθέτως, υπάρχει ένα και μοναδικό όριο της συγκέντρωσης κάτω από το οποίο τα φυτά εμφανίζουν ανεκτικότητα και επιβιώνουν ενώ όταν η συγκέντρωση υπερβεί το όριο αυτό, τα φυτά υφίστανται τα αποτελέσματα της τοξικότητας του καδμίου και παρουσιάζουν σημαντική μείωση της ανάπτυξής τους.

1.3. Ρίγανη

1.3.1 Χαρακτηριστικά του φυτού

Η ρίγανη (*Origanum vulgare L.*) ανήκει στην οικογένεια Lamiales και είναι ένα φυτό με πολύ σπουδαία οικονομική αξία και είναι ευρέως διαδεδομένο όχι μόνο στην Ελλάδα αλλά και ανά τον κόσμο (Γαβαλάς, 2004). Στην Ελλάδα χρησιμοποιούνται κυρίως φυτά του υποείδους *hirtum* τα οποία θεωρούνται αυτόχθονα. Επομένως, όταν γίνεται αναφορά σε ελληνική ρίγανη εννοείται η ποικιλία *Origanum vulgare L. ssp. Hirtum* (Ανυφαντή, 2015). Μερικά από τα χαρακτηριστικά του φυτού είναι ότι είναι πολυετές, ξυλώδες, διαθέτει πυκνούς βότρες που διαχωρίζονται εύκολα από τα κλαδιά και τους βλαστούς αλλά και βλαστό ο οποίος μπορεί να ξεπεράσει το 1m σε ύψος (Γαβαλάς, 2004). Μπορεί να καλλιεργηθεί σε υψόμετρο από το επίπεδο της θάλασσας έως 1500 m και εμφανίζεται σε μεγάλη αφθονία σε ξηρά περιβάλλοντα πλησίον της ακτής. Το γεγονός ότι μπορεί να ευδοκιμήσει από μεσογειακά παραθαλάσσια μέρη μέχρι ορεινές δασικές εκτάσεις υποδεικνύει ότι διαθέτει μηχανισμούς προσαρμογής στο εκάστοτε περιβάλλον και ανεκτικότητα στο στρες (Levizou et al., 2019).

1.3.2 Το αιθέριο έλαιο της ρίγανης

Πέραν από την συνηθισμένη χρήση της στην μαγειρική και γενικά στην βιομηχανία τροφίμων, η ρίγανη χρησιμοποιείται ήδη από τα αρχαία χρόνια για την αντιμετώπιση διάφορων παθήσεων με μεγάλη αποτελεσματικότητα. Η δυναμικότητά της αυτή ως φάρμακο καθώς και το έντονο χαρακτηριστικό της άρωμα οφείλονται στις φαινολικές ενώσεις και άλλες ουσίες που περιέχονται στο αιθέριο έλαιο της. Η περιεκτικότητα της σε αιθέριο έλαιο είναι 1,1-8,2 % και η απόδοση της εξαρτάται από τον γεωγραφικό τόπο και την εποχή συγκομιδής του φυτού. Παρόλο που το φθινόπωρο φαίνεται να μειώνεται η απόδοση σε σύγκριση με το καλοκαίρι, το άθροισμα των συστατικών της, τα οποία είναι η καρβακρόλη, η θυμόλη, το γ-τερπινένιο και το ρ-κυμένιο, παραμένει σταθερό σε κάθε περίπτωση. Μεταξύ των φυτών της οικογένειας Lamiales στην οποία ανήκει, η ρίγανη διαπιστώθηκε ότι είναι το φυτό με την μεγαλύτερη

αντιμικροβιακή και μυκητοκτόνο δράση. Αυτό οφείλεται στην μεγάλη περιεκτικότητα της σε αντιοξειδωτικές ουσίες και κυρίως σε φαινολικές ενώσεις. Κύριες φαινολικές ενώσεις του αιθερίου ελαίου της είναι η καρβακρόλη και η θυμόλη, με την πρώτη να παρουσιάζει την μεγαλύτερη αντιμικροβιακή δράση (Ανυφαντή, 2015).

1.3.3. Τεχνική Πολλαπλασιασμού

Η ρίγανη είναι από τα φυτά που έχουν την δυνατότητα να πολλαπλασιαστούν εγγενώς αλλά και αγενώς. Στην πρώτη περίπτωση, ο σπόρος σπέρνεται στα σπορεία αφού προηγουμένως έχει αναμειχθεί με άμμο επειδή είναι πολύ μικρός. Μελέτες έχουν δείξει ότι ο εγγενής πολλαπλασιασμός προκαλεί καθυστέρηση στην ετήσια παραγωγή και για αυτό προτείνεται ο αγενής (Ανυφαντή, 2015). Επιπλέον, ένα ακόμα μειονέκτημα είναι το γεγονός ότι προκαλείται ποιοτική υποβάθμιση της παραγωγής λόγω της ανομοιομορφίας που προκαλείται στο φυτικό υλικό από τον σπόρο (Μαλούπα κ.ά, 2013). Στην δεύτερη περίπτωση του αγενούς πολλαπλασιασμού, αυτός επιτυγχάνεται είτε με μοσχεύματα είτε με παραφυάδες.

1.3.4. Καλλιεργητικές τεχνικές

Η ρίγανη είναι ένα φυτό το οποίο μπορεί να καλλιεργηθεί τόσο σε ξερικές, όσο και αρδευόμενες εκτάσεις. Η άρδευση έχει αποδειχθεί ότι αυξάνει την παραγωγικότητα της καλλιέργειας λόγω δημιουργίας μεγαλύτερων ταξιανθιών (Μαλούπα κ.ά., 2013). Είναι μια από τις καλλιέργειες που δεν έχει μεγάλες απαιτήσεις σε έδαφος μιας και μπορεί να καλλιεργηθεί και σε άγονα εδάφη. Βέβαια, όπως και σε όλα τα φυτά έτσι και στην περίπτωση της ρίγανης η προσθήκη λιπασμάτων βοηθά στην ανάπτυξη του φυτού και ενισχύει την παραγωγή αλλά ταυτόχρονα αυξάνει τις απαιτήσεις σε νερό (Δόρδας, 2012). Φαινόμενα έλλειψης νερού στο φυτό όμως, όπως και έλλειψη σε θρεπτικά όπως το άζωτο έχει βρεθεί ότι οδηγούν στην δημιουργία στρες στο φυτό και στην έκκριση αμπισσικού οξέος, οδηγώντας έτσι στο κλείσιμο των στομάτων και επομένως στην μείωση της φωτοσύνθεσης (Ανυφαντή, 2015).

Η προστασία του φυτού από την παρουσία ζιζανίων κρίνεται απαραίτητη καθώς τα ζιζάνια αποτελούν ανταγωνιστές των φυτών για την δέσμευση των διαφόρων θρεπτικών αλλά ακόμα και του ίδιου του νερού. Η προστασία αυτή του φυτού και καταπολέμηση των ζιζανίων μπορεί να πραγματοποιηθεί είτε με σκάλισμα είτε με την χρήση εγκεκριμένου ζιζανιοκτόνου.

1.3.5. Συλλογή

Η συλλογή της ρίγανης γίνεται κατά την ανθοφορία δηλαδή την περίοδο του Ιουνίου- Ιουλίου και η διάρκεια της κυμαίνεται στις 15 περίπου ημέρες. Η περίοδος της συγκομιδής εξαρτάται άμεσα από την περιοχή στην οποία βρίσκεται η καλλιέργεια. Ανάλογα με το εάν η συγκομιδή αποσκοπεί στην χρήση της ρίγανης με σκοπό την απόσταξη για την παραγωγή αιθέριου ελαίου ή την παραγωγή δρόγης τότε αυτή πραγματοποιείται στην πλήρη ανθοφορία ή στην αρχή της ανθοφορίας αντίστοιχα (Κατσιώτης κ.ά., 2019).

1.4. Σκοπός της πτυχιακής εργασίας

Στόχος της παρούσας πτυχιακής εργασίας ήταν η μελέτη της επίδρασης του καδμίου (Cd) σε φυτά ρίγανης και κατά πόσον η πιθανή καταπόνηση που προκαλείται επηρεάζεται από την παρουσία αζώτου (N). Συγκεκριμένα, ερευνήθηκε η επίδραση των δυο παραγόντων αλλά και η αλληλεπίδρασή τους σε αναπτυξιακά και βιοχημικά χαρακτηριστικά του φυτού.

2. ΥΛΙΚΑ ΚΑΙ ΜΕΘΟΔΟΙ

2.1. Πειραματικός Σχεδιασμός

Για την υλοποίηση του πειράματος χρησιμοποιήθηκε ο χώρος του θερμοκηπίου που βρίσκεται στη σχολή Γεωπονικών Επιστημών του Πανεπιστημίου Θεσσαλίας καθώς και ο χώρος γύρω από αυτό, μετά την έκθεση των φυτών σε συνθήκες φυσικού περιβάλλοντος.

Σπορόφυτα ρίγανης του είδους *Origanum vulgare* L. subsp. *hirtum* αγοράστηκαν από τοπικό φυτώριο. Στην συνέχεια πραγματοποιήθηκε φύτευση τους σε γλαστράκια των 0.2L και αφέθηκαν να αναπτυχθούν εντός του θερμοκηπίου. Ταυτοχρόνως πραγματοποιήθηκε εδαφοληψία από το Βελεστίνο, και η κατάλληλη ποσότητα εδάφους αεροξηράνθηκε και κοσκινίστηκε (4mm). Με το έδαφος αυτό και περλίτη σε αναλογία 1:1 γεμίστηκαν οι γλάστρες του πειράματος (των 2L). Ακολούθησε η επιμόλυνση του εδάφους στις γλάστρες με κάδμιο και η σχεδιασμένη παροχή αζώτου μέσω διαλυμάτων $\text{Cd}(\text{NO}_3)_2$ και NH_4NO_3 αντίστοιχα. Δημιουργήθηκαν έτσι έξι μεταχειρίσεις με 30 γλάστρες η κάθε μία. Ειδικότερα, οι διαφορετικές

συγκεντρώσεις των διαλυμάτων που χρησιμοποιήθηκαν φαίνονται στον πίνακα και ακολουθεί και συνοψίζει το πείραμα. Χρησιμοποιήθηκαν τα εξής πυκνά διαλύματα: διάλυμα νιτρικού καδμίου: 5600 ppm Cd ($7,68 \text{ g Cd(NO}_3)_2 \cdot 4\text{H}_2\text{O}$ σε 500 mL νερού) και διάλυμα νιτρικής αμμωνίας: 2324,83 ppm N ($13,30 \text{ g NH}_4\text{NO}_3$ σε 2.000 mL νερού).

Πίνακας 1. Συγκεντρώσεις διαλυμάτων που χρησιμοποιήθηκαν για την επιμόλυνση των γλαστρών των διαφόρων μεταχειρίσεων.

Μεταχειρίσεις	Διάλυμα Νιτρικού Καδμίου (mL)	Διάλυμα Νιτρικής Αμμωνίας (mL)
N(0) Cd(0)	0 mL	3,0 mL
N(0) Cd(20)	2,5 mL	1,5 mL
N(0) Cd(40)	5,0 mL	0,0 mL
N(1) Cd(0)	0 mL	18,0 mL
N(1) Cd(20)	2,5 mL	16,5 mL
N(1) Cd(40)	5,0 mL	15,0 mL

Όπως είναι προφανές από τον παραπάνω πίνακα ο σχεδιασμός περιελάμβανε 3 επίπεδα Cd (0, 20, 40ppm) και 2 επίπεδα N (αυτό που έχει ήδη το έδαφος-N(0) και 30 kg/στρ-N(1)). Καθώς κατά την επιμόλυνση με $\text{Cd(NO}_3)_2$ της εκάστοτε μεταχείρισης αναπόφευκτα προστίθετο άζωτο, κρίθηκε απαραίτητο να προστεθεί διάλυμα NH_4NO_3 σε μειούμενες συγκεντρώσεις καθώς αυξανόταν η ποσότητα $\text{Cd(NO}_3)_2$ ακόμη και στις τρεις μεταχειρίσεις N(0) ώστε να μην διαφέρουν μεταξύ τους σε επίπεδα αζώτου. Επίσης, η ισορροπία σε περιεχόμενο άζωτο εξασφαλίστηκε και στις τρεις μεταχειρίσεις N(1) με μειούμενες συγκεντρώσεις NH_4NO_3 , αυξανόταν η ποσότητα $\text{Cd(NO}_3)_2$.

Δεκαπέντε ημέρες μετά την επιμόλυνση, στις 11/4/2019 μεταφυτεύθηκαν τα νεαρά φυτά της ρίγανης στις γλάστρες με το επιμολυσμένο έδαφος. Επιλέχθηκαν τα πιο εύρωστα φυτά και η κατανομή τους στις διάφορες μεταχειρίσεις έγινε με απολύτως τυχαιοποιημένο τρόπο. Μία εβδομάδα μετά, τα φυτά μεταφέρθηκαν στον περιβάλλοντα χώρο του θερμοκηπίου, σε σημείο χωρίς σκίαση και αφέθηκαν να αναπτυχθούν. Πραγματοποιούνταν τακτικά ποτίσματα, ανάλογα τις περιβαλλοντικές συνθήκες αλλά και τις απαιτήσεις των φυτών, τα οποία κυμαινόταν σε 2-3 φορές την εβδομάδα ή και περισσότερο όταν παρατηρούνταν αυξημένες θερμοκρασίες. Στο χρονικό διάστημα αυτό της

ανάπτυξης τους σε συνθήκες περιβάλλοντος έγινε αφαίρεση των ζιζανίων χειρωνακτικά καθότι αυτά αποτελούσαν ανταγωνιστές των φυτών για θρεπτικά και νερό. Όταν τα φυτά περιήλθαν στο στάδιο της πλήρους ανθοφορίας, περίπου τέλος Ιουνίου, πραγματοποιήθηκε η συγκομιδή τους, μετά από 2,5 μήνες πειράματος.

Την ημέρα της συγκομιδής καταγράφηκε ο αριθμός των πλάγιων βλαστών σε 8 φυτά από την κάθε μεταχείριση. Εν συνεχεία έγινε διαχωρισμός του υπέργειου από το υπόγειο μέρος και πραγματοποιήθηκαν μετρήσεις που αφορούσαν το ξηρό βάρος του υπέργειου αλλά και του υπόγειου τμήματος, την εκτίμηση των φωτοσυνθετικών χρωστικών στα φύλλα αλλά και τον υπολογισμό του δείκτη υπεροξειδωσης των λιπιδίων σε αυτά.



Εικόνα 1: Νεαρά φυτά ρίγανης κατά την ανάπτυξη τους σε μη ελεγχόμενες θερμοκηπιακές συνθήκες, πριν την μεταφύτευση.



Εικόνα 2: Επιμόλυνση του εδάφους με άζωτο και κάδμιο



Εικόνα 3: Φυτά ρίγανης στο στάδιο ανάπτυξης σε συνθήκες περιβάλλοντος

2.2. Μέτρηση ξηρού βάρους

Πραγματοποιήθηκε ξήρανση του υπέργειου και του υπόγειου τμήματος των συνολικά 48 φυτών, 8 από κάθε μεταχείριση, σε φούρνο στους 70 °C για 3-4 ημέρες. Στην συνέχεια, παραλήφθηκαν τα δείγματα από το φούρνο και έγινε μέτρηση του βάρους τους σε ηλεκτρονική ζυγαριά ακριβείας.

2.3. Απομόνωση και ποσοτικός προσδιορισμός φωτοσυνθετικών χρωστικών

Κατά την τελική συγκομιδή συλλέχθηκαν 2 φύλλα ανά φυτό και τοποθετήθηκαν σε υπερκαταψύκτη (-80°C), μέχρι την ημέρα της εκχύλισης. Η εκχύλιση πραγματοποιήθηκε σε ακετόνη (διάλυμα 80%) και τα βήματα που ακολουθήθηκαν για την διαδικασία της απομόνωσης των φωτοσυνθετικών χρωστικών είναι τα εξής:

1. Για κάθε δείγμα χρησιμοποιήθηκαν δύο δίσκοι συνολικής επιφάνειας 1cm², προερχόμενοι από δύο φύλλα. Κόπηκαν σε μικρά κομματάκια και τοποθετήθηκαν σε γουδί πορσελάνης μαζί με 0,1g καθαρής άμμου και 0,01g ανθρακικού ασβεστίου (CaCO₃).
2. Το εκχύλισμα μεταγγίστηκε σε σωλήνα φυγοκέντρου και φυγοκεντρήθηκε για 10 min στα 2500g (4000 στροφές το λεπτό).
3. Το διαυγές πράσινο υπερκείμενο φωτομετρήθηκε στα 470, 646, 663, 720 nm. Η απορρόφηση στα 720 nm οφείλεται σε πιθανό σκεδασμό και όχι τις φωτοσυνθετικές χρωστικές, οπότε η τιμή του αφαιρείται από τις υπόλοιπες μετρήσεις.
4. Με βάση τις εξισώσεις των Lichtenthaler and Wellburn (1983)
$$C_a = 12.21A_{663} - 2.81A_{646},$$
$$C_b = 20.13A_{646} - 5.03A_{663},$$
$$C_{x+c} = (1000A_{720} - 3.27C_a - 104C_b) / 229$$

υπολογίσθηκαν οι συγκεντρώσεις της χλωροφύλλης a, της χλωροφύλλης b και των συνολικών καροτενοειδών σε mg/ml διαλύματος. Μετά τις κατάλληλες αναγωγές στον όγκο εκχύλισης, την αραίωση και την επιφάνεια, υπολογίσθηκαν οι συγκεντρώσεις των φωτοσυνθετικών χρωστικών ως mg/cm².

2.4. Υπολογισμός MDA για τον προσδιορισμό υπεροξειδωσης των λιπιδίων

Για την διαδικασία χρειάστηκαν:

1. 0.1% (w/v) TCA: 5ml x αριθμό δειγμάτων
2. 20% (w/v) TCA που περιέχει 0,5% (w/v) TBA: 4ml x αριθμό δειγμάτων
3. Γουδί/γουδοχέρι
4. Πάγο

Η διαδικασία είχε ως εξής:

- Ζυγίστηκαν και ψιλοκόπηκαν 0,2 g νωπού δείγματος
- Προστέθηκαν 5 ml διαλύματος 0,1% TCA και πραγματοποιήθηκε λειοτρίβηση
- Φυγοκέντρηση σε 5000g για 10 min
- Παραλαβή 0,5 ml από το υπερκείμενο και τοποθετήθηκε σε 4 ml 20% (w/v) TCA που περιέχει 0,5% (w/v) TBA (αντίστοιχα για τον μάρτυρα με 0,5 ml καθαρού 0,1% TCA).
- Vortex
- Τοποθέτηση του μείγματος σε 95 ° C για 30 min
- Διακοπή της αντίδρασης με τοποθέτηση των διαλυμάτων σε πάγο (περίπου 3-5')
- Μόλις επανήλθαν σε θερμοκρασία δωματίου, έγινε φυγοκέντρηση σε 5000g για 10 min.
- Παραλαβή του υπερκείμενου και μέτρηση της απορρόφησης στα 532 και 600 nm, με τυφλό τον μάρτυρα όλες.

Η συγκέντρωση του MDA υπολογίσθηκε ως εξής: nmoles MDA ανά g νωπού βάρους δείγματος = $(A_{532} - A_{600}) / 155 * 10^3 * V_{εκχυλ} / g_{Νωπού\ βάρους}$

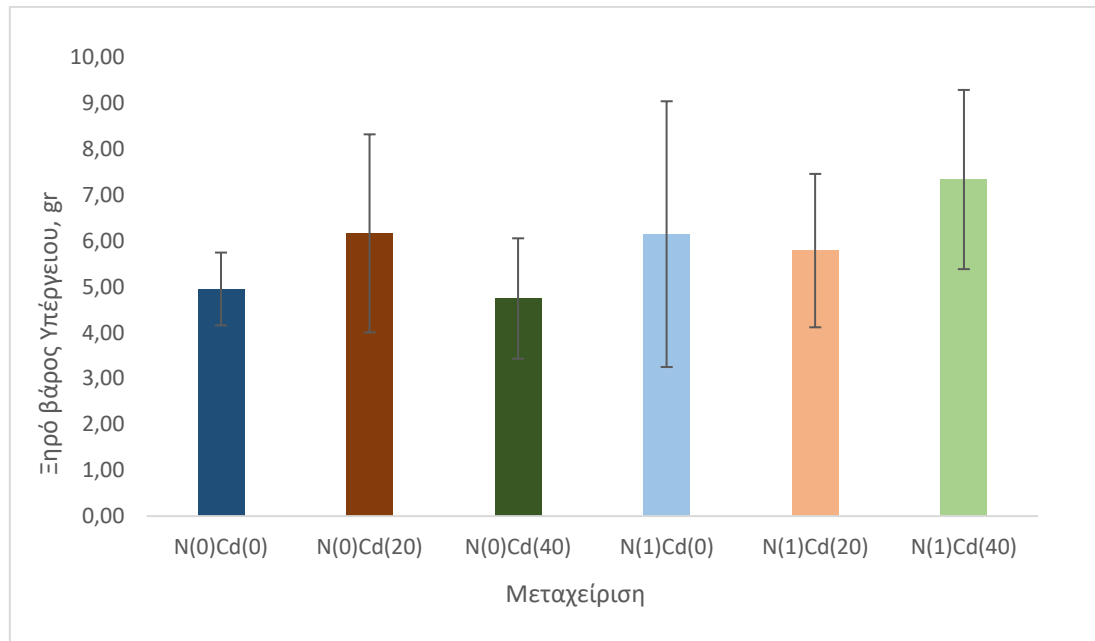
2.5. Στατιστική ανάλυση

Στο παρόν πείραμα, εξετάστηκε η επίδραση δυο παραγόντων ταυτοχρόνως, του καδμίου όσον αφορά την καταπόνηση από βαρέα μέταλλα και του αζώτου όσον αφορά την λίπανση και θρέψη του φυτού. Για το λόγο αυτό, η στατιστική ανάλυση πραγματοποιήθηκε με Two- Way ANOVA και με Kruskal-Wallis test όπου δεν ικανοποιούνταν οι προϋποθέσεις της ANOVA. Και στις δύο περιπτώσεις το επίπεδο σημαντικότητας των διαφορών ορίστηκε σε $p < 0.05$. Όλες οι αναλύσεις έγιναν με τη χρήση του ελεύθερου λογισμικού JASP 0.13.1.

3. ΑΠΟΤΕΛΕΣΜΑΤΑ

Παρακάτω παρουσιάζονται τα αποτελέσματα των μετρήσεων αναπτυξιακών και βιοχημικών παραμέτρων που πραγματοποιήθηκαν κατά και μετά την τελική συγκομιδή των φυτών ρίγανης. Τα αποτελέσματα της στατιστικής ανάλυσης για κάθε παράμετρο εμφανίζονται σε πίνακα πάνω από το αντίστοιχο γράφημα, και αναλύονται σε μεμονωμένες επιδράσεις του καδμίου ή του επιπλέον αζώτου και στις αλληλεπιδράσεις των δύο αυτών παραγόντων σε επίπεδο $p < 0.05$.

	Sig
N	*
Cd	
N * Cd	

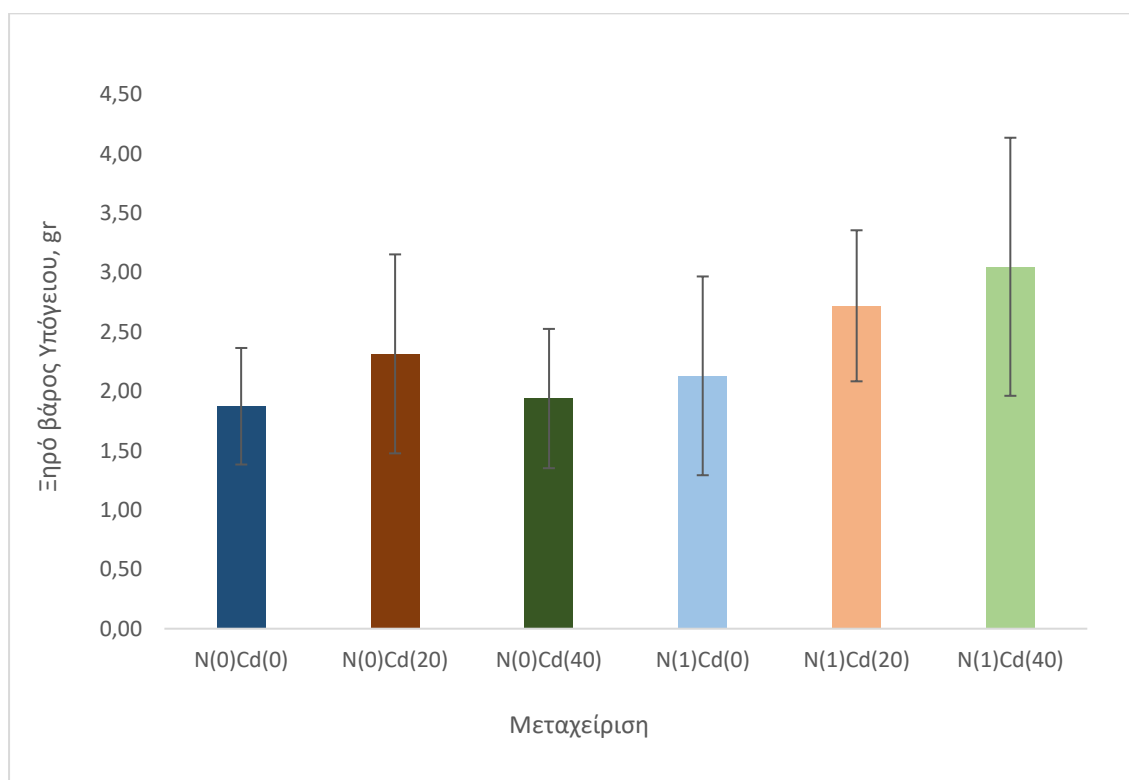


Γράφημα 1: Ξηρό βάρος του υπέργειου τμήματος των φυτών ανά μεταχείριση (μέσοι όροι \pm SD). Οι στατιστικώς σημαντικές διαφορές λόγω της επίδρασης του κάθε παράγοντα αλλά και της αλληλεπίδρασής τους υποδεικνύονται με αστεράκι στον παραπάνω πίνακα σε $p < 0.05$.

Στο ξηρό βάρος του υπέργειου τμήματος των φυτών της ρίγανης προέκυψε ότι στατιστικά σημαντικές διαφορές εντοπίζονται μεταξύ των μεταχειρίσεων με αυξημένο άζωτο και των N(0). Στις μεταχειρίσεις N(0)Cd(0) και N(1)Cd(0), παρατηρείται αύξηση του υπέργειου τμήματος των φυτών που δέχτηκαν επιπλέον άζωτο, ενώ κάτι τέτοιο δεν καταγράφηκε στο άλλο ζεύγος μεταχειρίσεων με αυξημένο επίπεδο καδμίου, τα N(0)Cd(20) και N(1)Cd(20). Στις μεταχειρίσεις N(0)Cd(40) και N(1)Cd(40), παρότι υπάρχει αύξηση της ποσότητας του καδμίου, φαίνεται ξεκάθαρα ότι τα φυτά στα οποία προστέθηκε σημαντική ποσότητα αζώτου υπερτερούν έναντι των N(0).

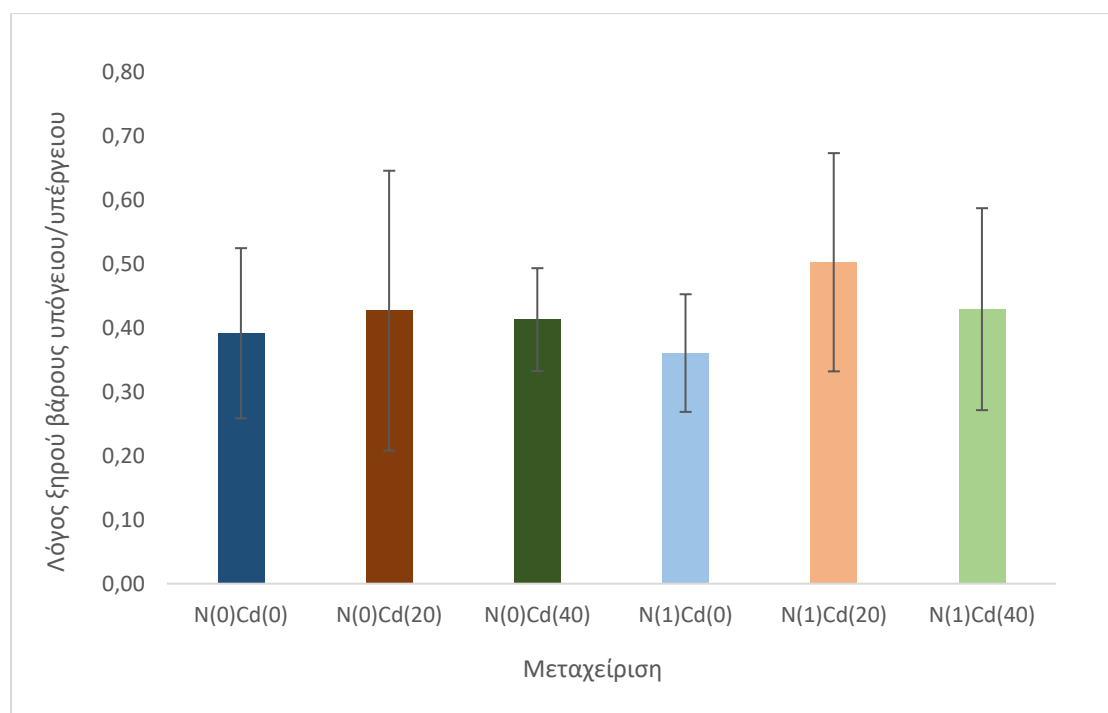
Η βιομάζα του ριζικού συστήματος εμφάνισε μία διαφορετική εικόνα στις μεταχειρίσεις που δέχτηκαν επιπλέον άζωτο. Από τα αποτελέσματα της στατιστικής ανάλυσης όπως φαίνονται στον αντίστοιχο πίνακα προέκυψε ότι το επίπεδο αζώτου ήταν ο μόνος παράγοντας που οδήγησε σε στατιστικώς σημαντικές διαφοροποιήσεις στο ξηρό βάρος της ρίζας. Στις μεταχειρίσεις που λάμβαναν και επιπλέον άζωτο καταγράφηκε μία σταδιακή αύξηση της βιομάζας της ρίζας παράλληλα με την αύξηση του παρεχόμενου καδμίου. Αντίθετα στις τρεις μεταχειρίσεις N(0) δεν εμφανίστηκαν σημαντικές επιδράσεις του καδμίου στη βιομάζα της ρίζας, εκτός από μία μικρή τάση για αύξηση στα 20ppm Cd.

	Sig
N	*
Cd	
N * Cd	



Γράφημα 2: Ξηρό βάρος του υπόγειου τμήματος των φυτών ανά μεταχείριση (Μέσοι Όροι ± SD). Οι στατιστικώς σημαντικές διαφορές λόγω της επίδρασης του κάθε παράγοντα αλλά και της αλληλεπίδρασής τους υποδεικνύονται με αστεράκι στον παραπάνω πίνακα σε $p < 0.05$.

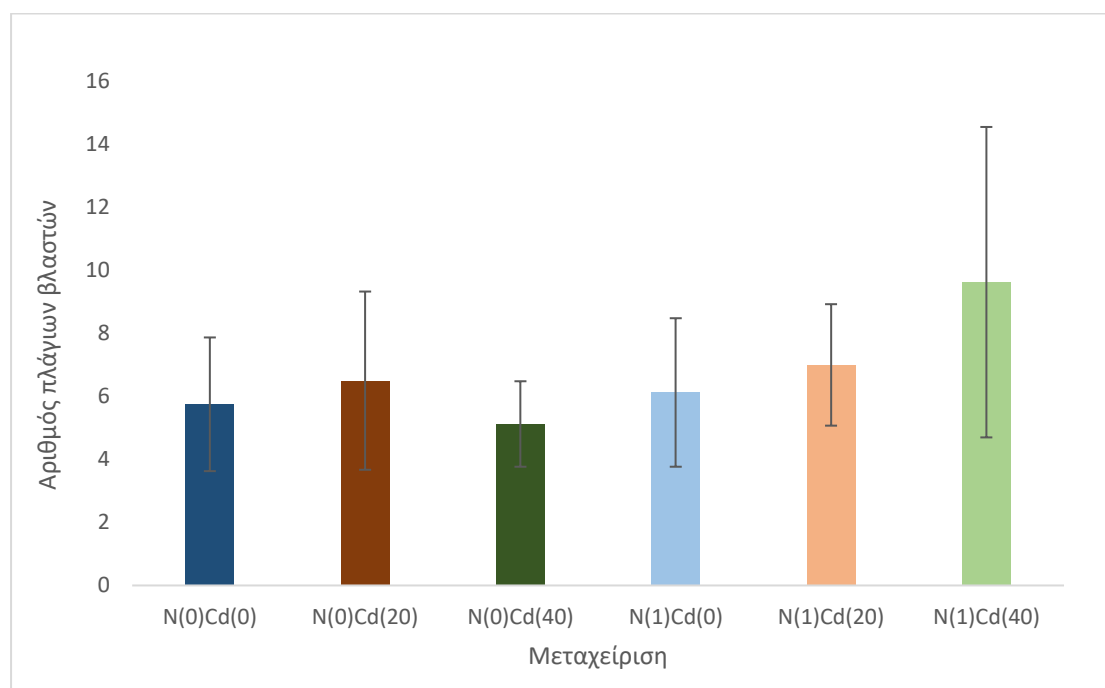
Σε ότι αφορά το λόγο υπόγειας/υπέργεια βιομάζα φαίνεται ότι μόνο στην περίπτωση των 20ppm Cd εμφανίστηκε μία τάση για μεγαλύτερους λόγους στη μεταχείριση N(1). Να σημειωθεί εδώ ότι στην περίπτωση του λόγου αυτού οι στατιστικώς σημαντικές διαφορές ελέγχθηκαν με μη παραμετρικό τεστ και δεν ανιχνεύθηκαν σημαντικές διαφορές σε επίπεδο $p < 0.05$.



Γράφημα 3: Λόγος του ξηρού βάρους του υπόγειου τμήματος προς το ξηρό βάρος του υπέργειου τμήματος των φυτών ανά μεταχείριση (Μέσοι Όροι ± SD).

Ολοκληρώνοντας την καταγραφή των μορφολογικών-αναπτυξιακών παραμέτρων των φυτών της ρίγανης, παρουσιάζεται στο γράφημα 4 ο αριθμός των πλάγιων κλάδων των φυτών. Από τα αποτελέσματα της στατιστικής ανάλυσης φαίνονται σημαντικές διαφορές οι οποίες εντοπίζονται στις μεταχειρίσεις που έχει γίνει προσθήκη αζώτου έναντι εκείνων που δεν έλαβαν επιπλέον άζωτο. Η πιο εντυπωσιακή διαφορά, όπως φαίνεται και στο γράφημα, εντοπίζεται μεταξύ των μεταχειρίσεων N(0)Cd(40) και N(1)Cd(40) όπου η πρώτη έχει τον μικρότερο μέσο όρο και η δεύτερη τον μεγαλύτερο.

	Sig
N	*
Cd	
N * Cd	

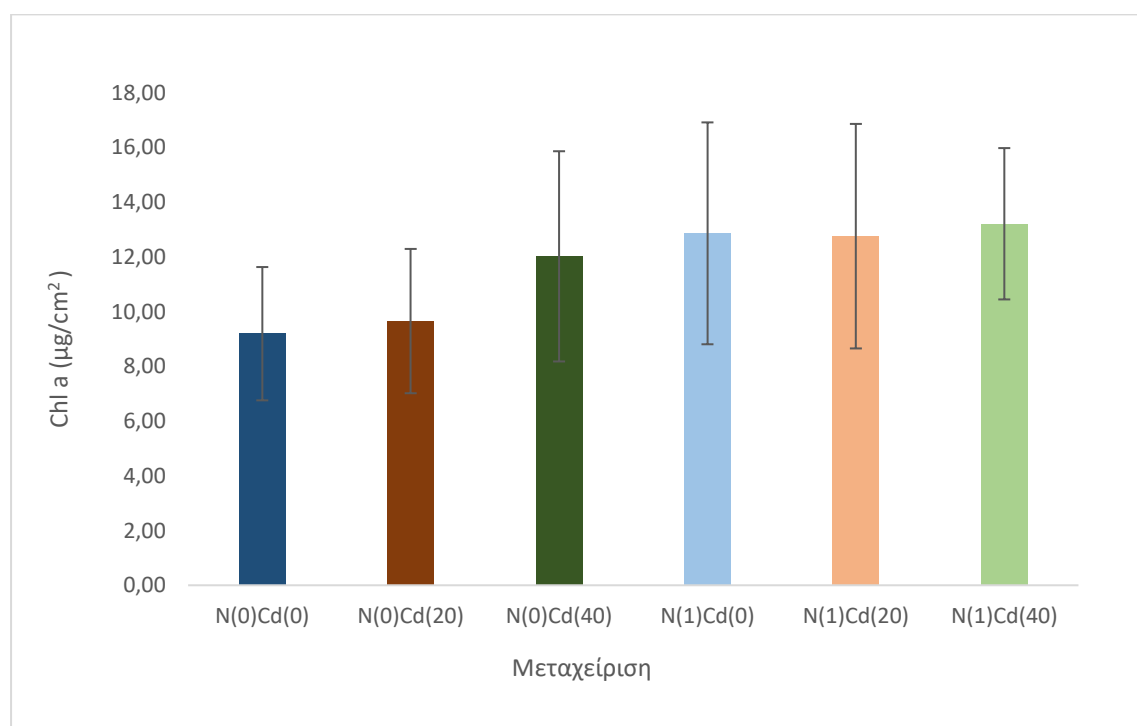


Γράφημα 4: Αριθμός πλάγιων βλαστών στο στάδιο της συγκομιδής ανά μεταχείριση (Μέσοι Όροι \pm SD). Οι στατιστικώς σημαντικές διαφορές λόγω της επίδρασης του κάθε παράγοντα αλλά και της αλληλεπίδρασής τους υποδεικνύονται με αστεράκι στον παραπάνω πίνακα σε $p < 0.05$.

Βιοχημικά χαρακτηριστικά

Όπως φαίνεται στο γράφημα 5, οι συγκεντρώσεις της χλωροφύλλης a στα φύλλα της ρίγανης στις μεταχειρίσεις που περιέχουν αυξημένο άζωτο είναι εμφανώς μεγαλύτερες σε σχέση με τις μεταχειρίσεις N(0). Σύμφωνα με τα αποτελέσματα της στατιστικής ανάλυσης σημαντικές διαφορές εμφανίζονται μεταξύ των μεταχειρίσεων που περιείχαν επιπλέον άζωτο και εκείνων που δεν περιείχαν επιπλέον ποσότητα. Το γεγονός αυτό μας δείχνει ότι το άζωτο ως θρεπτικό συμβάλει στην αύξηση της χλωροφύλλης στους φυτικούς ιστούς και επομένως στο πράσινο χρώμα των φύλλων κάτι που είναι εμφανές και από το διάγραμμα.

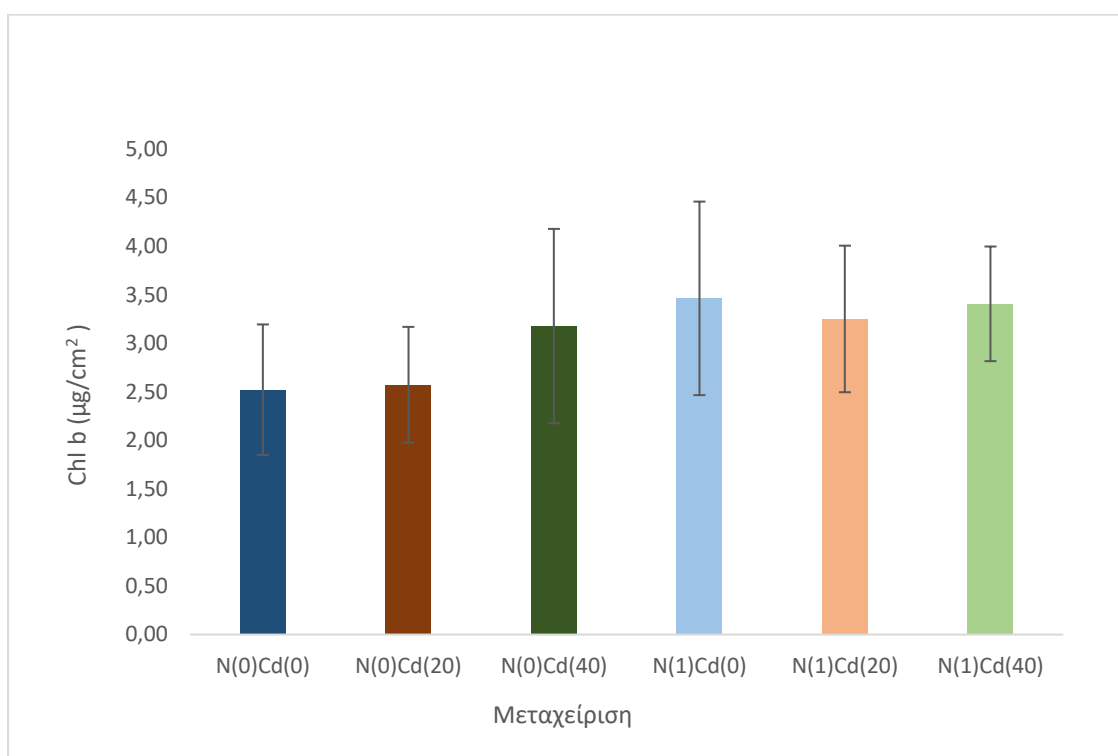
	Sig
N	*
Cd	
N * Cd	



Γράφημα 5: Συγκέντρωση χλωροφύλλης a των φύλλων τη ρίγανης ανά μεταχείριση (Μέσοι Όροι \pm SD). Οι στατιστικώς σημαντικές διαφορές λόγω της επίδρασης του κάθε παράγοντα αλλά και της αλληλεπίδρασής τους υποδεικνύονται με αστεράκι στον παραπάνω πίνακα σε $p < 0.05$.

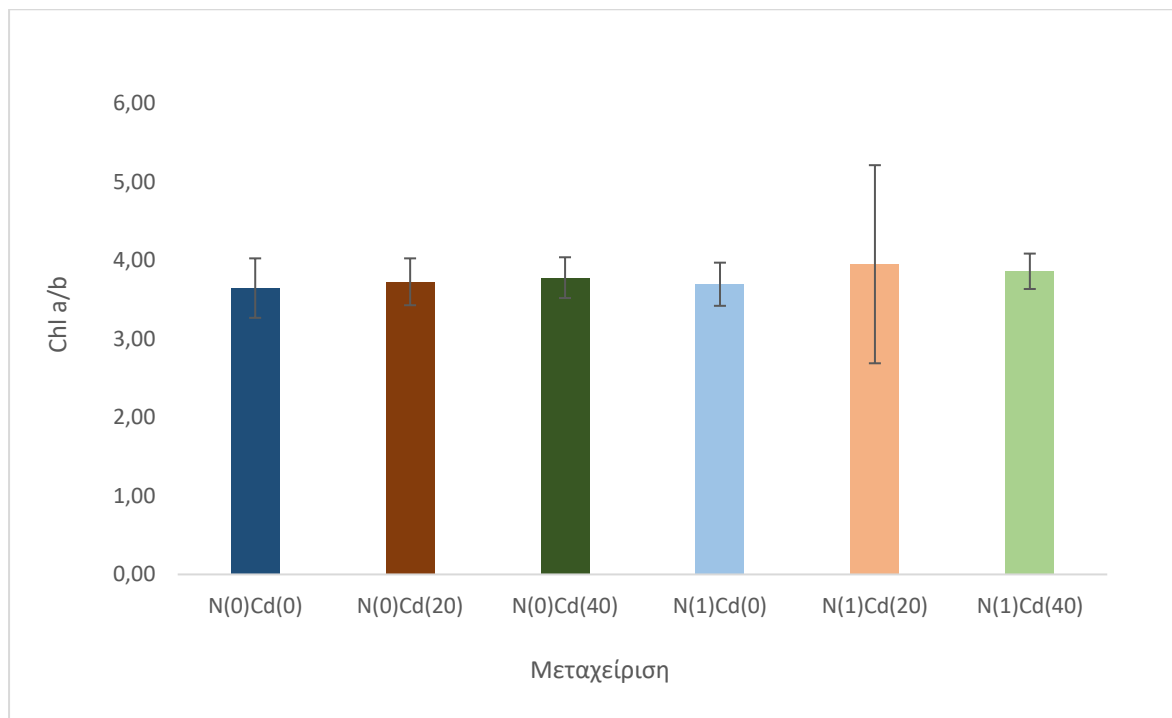
Όπως συνέβη και στην χλωροφύλλη a, έτσι και στην χλωροφύλλη b παρουσιάζεται στατιστικώς σημαντική διαφορά στις μεταχειρίσεις που περιέχεται άζωτο έναντι εκείνων που δεν έχει γίνει προσθήκη. Ενδιαφέρον είναι, σύμφωνα με το γράφημα 6, ότι τα φυτά της μεταχείρισης N(0)Cd(0) εμφανίζουν την μικρότερη περιεκτικότητα σε χλωροφύλλη b, ενώ η μεταχείριση N(1)Cd(0) τη μεγαλύτερη. Επίσης, χαρακτηριστικές είναι οι παρόμοιες συγκεντρώσεις που καταγράφηκαν στις δύο μεταχειρίσεις που έλαβαν 40ppm Cd, ανεξάρτητα από το επιπλέον άζωτο που δέχτηκαν.

	Sig
N	*
Cd	
N * Cd	



Γράφημα 6: Συγκέντρωση χλωροφύλλη b των φύλλων τη ρίγανης ανά μεταχείριση (Μέσοι Όροι \pm SD). Οι στατιστικώς σημαντικές διαφορές λόγω της επίδρασης του κάθε παράγοντα αλλά και της αλληλεπίδρασής τους υποδεικνύονται με αστεράκι στον παραπάνω πίνακα σε $p < 0.05$.

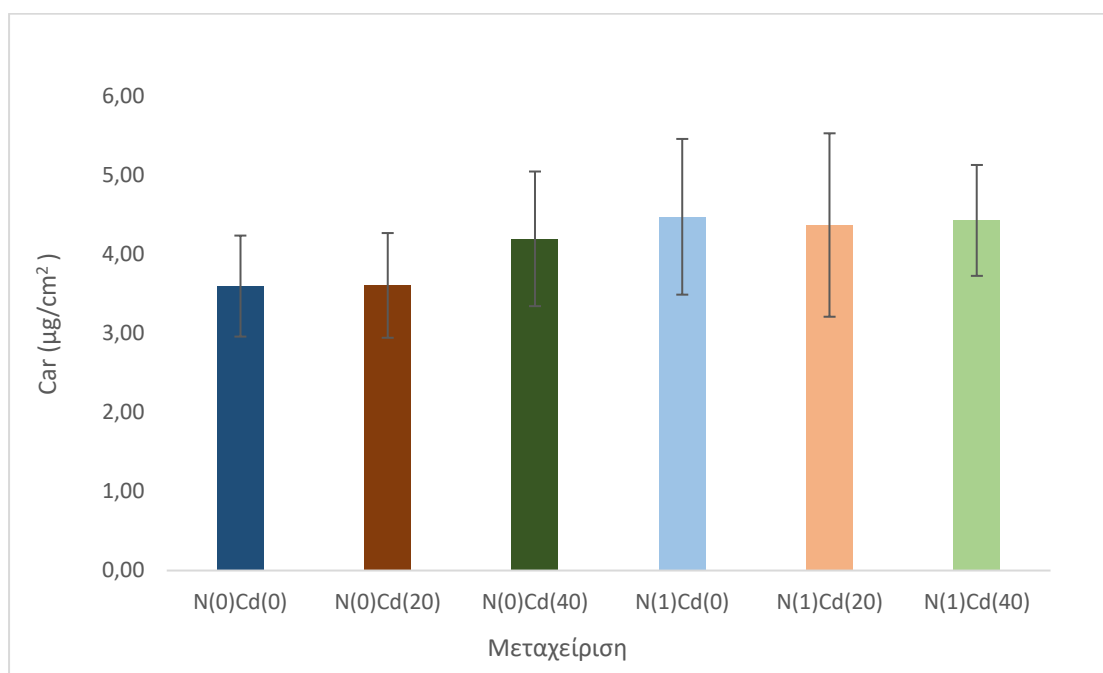
Όπως φαίνεται από το γράφημα 7, ο λόγος των συγκεντρώσεων χλωροφύλλης a/χλωροφύλλη b παρουσιάζει σημαντικές όμοιες τιμές και στις έξι διαφορετικές μεταχειρίσεις. Να σημειωθεί εδώ ότι στην περίπτωση του λόγου αυτού οι στατιστικώς σημαντικές διαφορές ελέγχθηκαν με μη παραμετρικό τεστ και δεν ανιχνεύθηκαν σημαντικές διαφορές σε επίπεδο $p < 0.05$



Γράφημα 7: Λόγος συγκεντρώσεων χλωροφύλλης a προς χλωροφύλλη b των φύλλων τη ρίγανης ανά μεταχείριση (Μέσοι Όροι ± SD).

Στην περίπτωση των συγκεντρώσεων καροτενοειδών στα φύλλα της ρίγανης εμφανίζεται η ίδια εικόνα με τις υπόλοιπες φωτοσυνθετικές χρωστικές. Όπως φαίνεται στο γράφημα 8, η προσθήκη αζώτου συνεπάγεται αυξημένη συγκέντρωση καροτενοειδών με τη διαφορά να είναι στατιστικώς σημαντική.

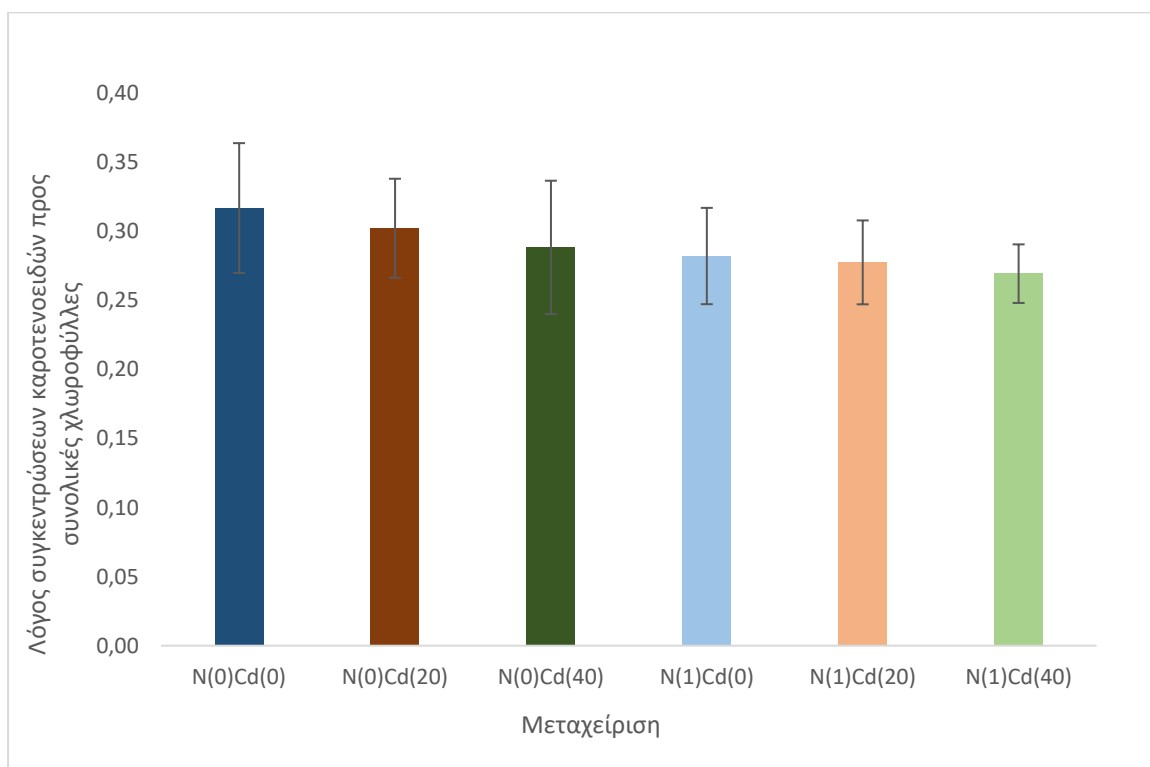
	Sig
N	*
Cd	
N * Cd	



Γράφημα 8: Συγκέντρωση καροτενοειδών των φύλλων τη ρίγανης ανά μεταχείριση (Μέσοι Όροι \pm SD). Οι στατιστικώς σημαντικές διαφορές λόγω της επίδρασης του κάθε παράγοντα αλλά και της αλληλεπίδρασής τους υποδεικνύονται με αστεράκι στον παραπάνω πίνακα σε $p < 0.05$.

Όπως φαίνεται και από τα διαγράμματα, ο λόγος συγκεντρώσεων καρροτενοειδών/συνολικές χλωροφύλλες εμφανίζει μια σταδιακή μείωση καθώς κινούμαστε προς υψηλότερες συγκεντρώσεις Cd και N. Υψηλότερη συγκέντρωση φέρεται να έχουν τα φυτά της μεταχείρισης N(0)Cd(0), και μειώνεται σταδιακά καθώς προχωράμε στο N(0)Cd(20), στην συνέχεια στο N(0)Cd(40), στο N(1)Cd(0), στο N(1)Cd(20) και καταλήγουμε στο N(1)Cd(40). Σύμφωνα με τα αποτελέσματα της στατιστικής ανάλυσης όπως αποτυπώνονται στον πίνακα παρακάτω, στατιστικά σημαντικές διαφορές εντοπίζονται λόγω της προσθήκης επιπλέον αζώτου. Από το γεγονός αυτό φαίνεται ότι η προσθήκη αζώτου αυξάνει σε μεγαλύτερο βαθμό την συγκέντρωση των χλωροφυλλών στο φυτό από ότι αυξάνει την συγκέντρωση των καρροτενοειδών.

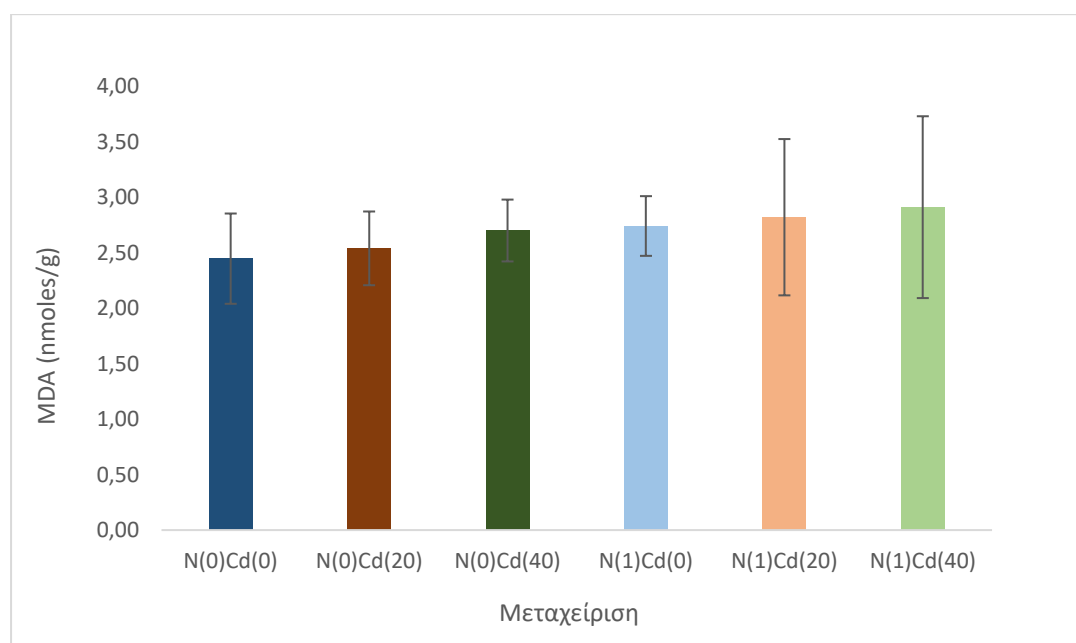
	Sig
N	*
Cd	



Γράφημα 9: Λόγος συγκεντρώσεων καρροτενοειδών προς συνολικές χλωροφύλλες ανά μεταχείριση (Μέσοι Όροι ± SD). Οι στατιστικώς σημαντικές διαφορές ελέγχθηκαν με μη παραμετρικό τεστ σε επίπεδο $p < 0.05$.

Σύμφωνα με το γράφημα 10, φαίνεται ότι δεν επηρεάστηκε η ποσότητα του MDA, που αποτελεί δείκτη της υπεροξειδωσής των λιπιδίων. Τα αποτελέσματα της στατιστικής ανάλυσης επιβεβαιώνουν ότι δεν υπάρχουν διαφορές μεταξύ των μεταχειρίσεων ούτε όσον αφορά την προσθήκη αζώτου, ούτε όσον αφορά την συγκέντρωση του καδμίου αλλά ούτε και στην αλληλεπίδραση του καδμίου με το άζωτο.

	Sig
N	
Cd	
N * Cd	



Γράφημα 10: Δείκτης υπεροξειδωσής των λιπιδίων (MDA) ανά μεταχείριση (Μέσοι Όροι ± SD). Οι στατιστικώς σημαντικές διαφορές λόγω της επίδρασης του κάθε παράγοντα αλλά και της αλληλεπίδρασής τους υποδεικνύονται με αστεράκι στον παραπάνω πίνακα σε $p < 0.05$.

4. ΣΥΖΗΤΗΣΗ

Στην παρούσα πτυχιακή διατριβή, ερευνήθηκε η επίδραση δύο παραγόντων, του καδμίου και του αζώτου σε αναπτυξιακά και βιοχημικά χαρακτηριστικά φυτών ρίγανης (*Origanum vulgare L.*). Μελετήθηκε η επίδραση καθενός παράγοντα ξεχωριστά αλλά και η αλληλεπίδρασή τους στο σύνολο των μετρήσεων που πραγματοποιήθηκαν. Δημιουργήθηκαν συνολικά έξι μεταχειρίσεις των τριάντα φυτών η καθεμιά στις οποίες πραγματοποιήθηκαν επιμολύνσεις με διαφορετικές συγκεντρώσεις καδμίου (0, 20, 40ppm) και αζώτου. Σε όλες τις μεταχειρίσεις τα φυτά κατάφεραν να επιβιώσουν και να αναπτυχθούν, γεγονός που δείχνει ότι οι συγκεντρώσεις σε βαρέα μέταλλα που χρησιμοποιήθηκαν δεν ξεπέρασαν τα όρια αντοχής της ρίγανης, η οποία αποδεικνύεται ανθεκτική σε μία ακόμη καταπόνηση.

Σύμφωνα με τα αποτελέσματα των μετρήσεων της ξηράς ουσίας του υπέργειου τμήματος των φυτών προέκυψε ότι τα φυτά που έλαβαν αυξημένο άζωτο είχαν σημαντικά μεγαλύτερη ανάπτυξη από εκείνα στα οποία δεν τους χορηγήθηκε μεγάλη ποσότητα αζώτου. Το γεγονός αυτό επιβεβαιώθηκε και από τα αποτελέσματα της στατιστικής ανάλυσης όπου παρατηρήθηκε σημαντικότητα μόνο όσον αφορά το άζωτο. Η παρουσία αζώτου λειτουργεί θετικά στην αύξηση και ανάπτυξη των φυτών, μειώνοντας έτσι τα δυσμενή αποτελέσματα από την καταπόνηση με κάδμιο. Τα συμπεράσματα αυτά συμφωνούν και με άλλα αντίστοιχα πειράματα που έχουν πραγματοποιηθεί σε φυτά ρίγανης υπό την επίδραση βαρέων μετάλλων και αζώτου (Ευθυβούλης 2020). Στην τελευταία περίπτωση ελέγχθηκε η συνδυασμένη επίδραση Cd με Cr στα φυτά ρίγανης, η οποία αποδείχθηκε ανθεκτική έως τα 30ppm Cd (Ευθυβούλης 2020), με παρόμοια εικόνα με το παρόν πείραμα ως προς τη βιομάζα του υπέργειου μέρους και το λόγο βιομάζας υπόγειο/υπέργειο.

Όσον αφορά τα αποτελέσματα από την μέτρηση της ξηρής ουσίας του υπόγειου τμήματος των φυτών, η επίδραση του αζώτου φαίνεται να έχει καθοριστικό ρόλο όσον αφορά την αύξηση των ριζών αφού λειτουργεί ως θρεπτικό στοιχείο για τα φυτά. Βέβαια πέραν του αζώτου, τόσο η παρουσία αυξημένου καδμίου όσο και η αλληλεπίδραση των δυο παραγόντων δεν προκάλεσαν στατιστικώς σημαντικές διαφορές. Η προσθήκη επιπλέον καδμίου φάνηκε να αυξάνει το ξηρό βάρος των ριζών στις περιπτώσεις που το φυτό είχε στη διάθεσή του αυξημένο άζωτο. Αυτή η θετική επίδραση του καδμίου στις ρίζες έρχεται σε αντιδιαστολή με άλλες έρευνες όπως των He et.al. (2011) που αναφέρουν αρνητικές επιπτώσεις στην ανάπτυξη των ριζών φυτών ρυζιού υπό την επίδραση καδμίου και επομένως μείωση του ξηρού τους βάρους.

Σχετικά με τις μετρήσεις των χλωροφυλλών a και b εμφάνισαν μία παρόμοια απόκριση στους παράγοντες του πειράματος. Τα φυτά στα οποία έχει γίνει προσθήκη αζώτου υπερτερούν έναντι εκείνων που περιέχουν μόνο βαρέα μέταλλα. Το γεγονός αυτό επιβεβαιώνεται και από άλλες έρευνες όπως του Ατσαλάκη (2014) όπου δεν παρατηρήθηκε σημαντική μείωση των χλωροφυλλών λόγω της συσσώρευσης καδμίου. Ο λόγος της χλωροφύλλης a προς την χλωροφύλλη b δεν εμφάνισε στατιστικά σημαντικές διαφορές μιας και τα αποτελέσματα από την μέτρηση των δυο τύπων χλωροφύλλης έμοιαζαν αρκετά.

Παρόμοια συμπεριφορά με τις χλωροφύλλες είχαν και τα καροτενοειδή. Στις μεταχειρίσεις στις οποίες είχε προστεθεί αυξημένο άζωτο εμφανίστηκε αύξηση της ποσότητας των καροτενοειδών. Το αποτέλεσμα αυτό είναι σχετικά αναμενόμενο εφόσον και οι χλωροφύλλες εμφάνιζαν αύξηση λόγω της επίδρασης του αζώτου. Έτσι, η συνολική απόκριση των φωτοσυνθετικών χρωστικών έρχεται σε συμφωνία με έρευνα για την επίδραση του αζώτου στα φυτά των Chenard et.al. (2005) όπου παρατηρήθηκε αύξηση των χλωροφυλλών και των καροτενοειδών λόγω αζώτου σε φυτά *Petroselinum crispum* Nym.

Ο λόγος των καροτενοειδών προς τις συνολικές χλωροφύλλες εμφάνισε μια βαθμιαία μείωση όσο αυξανόταν η συγκέντρωση του καδμίου, κάτι που υποδεικνύει ότι τα φυτά έχουν υποστεί καταπόνηση από τον παράγοντα αυτόν. Βέβαια, φαίνεται ότι η προσθήκη αζώτου αυξάνει σε μεγαλύτερο βαθμό την συγκέντρωση των χλωροφυλλών στο φυτό από ότι αυξάνει την συγκέντρωση των καροτενοειδών. Παρόμοια αποτελέσματα είχε και έρευνα των Houri et.al (2020) όπου λόγω της επίδρασης βαρέων μετάλλων παρατηρήθηκε μείωση του λόγου των καροτενοειδών προς τις συνολικές χλωροφύλλες σε γεώφυτα.

Σε ότι αφορά την υπεροξειδωση των λιπιδίων μέσω της μέτρησης της ποσότητας του MDA φαίνεται ότι δεν επηρεάστηκε σημαντικά από το κάδμιο, κάτι που υποδεικνύει ότι τα φυτά δεν ήρθαν αντιμέτωπα με παρουσία μεγάλων ποσοτήτων ενεργών ριζών οξυγόνου, είτε ότι τις αντιμετώπισαν εγκαίρως, με τους κατάλληλους αντιοξειδωτικούς μηχανισμούς.

Γενικότερα, φαίνεται ότι η προσθήκη αζώτου ενισχύει σε τέτοιο βαθμό το φυτό και μειώνει τις αρνητικές συνέπειες από την αυξημένη παρουσία καδμίου στο έδαφος. Η ρίγανη είναι ένα ανθεκτικό φυτό σε υψηλές συγκεντρώσεις καδμίου, τετραπλάσιες των επιτρεπτών ορίων σε αγροτικό έδαφος, ακόμη και χωρίς τη χορήγηση αυξημένου αζώτου. Η λίπανση όμως με άζωτο οδηγεί σε αυξημένη περιεκτικότητα φωτοσυνθετικών χρωστικών και βελτιωμένη ανάπτυξη των φυτών ρίγανης, ακόμη και σε έδαφος υψηλής περιεκτικότητας σε κάδμιο.

5. ΣΥΜΠΕΡΑΣΜΑΤΑ

- 1) Η προσθήκη αζώτου ενισχύει σε τέτοιο βαθμό το φυτό και μειώνει τις αρνητικές συνέπειες από την αυξημένη παρουσία καδμίου στο έδαφος.
- 2) Τα φυτά που δέχτηκαν επιπλέον άζωτο εμφάνισαν σημαντικά μεγαλύτερο ξηρό βάρος τόσο του υπόγειου αλλά και του υπέργειου τμήματος, ενώ η αυξημένη παρουσία καδμίου δεν φάνηκε να επηρεάζει σημαντικά την ανάπτυξη των φυτών.
- 3) Η χλωροφύλλη a, η χλωροφύλλη b και τα καροτενοειδή εμφάνισαν παρόμοια συμπεριφορά στις διάφορες μεταχειρίσεις του πειράματος και αποδείχθηκε ότι καθοριστικός παράγοντας στην αύξησή τους ήταν το άζωτο.
- 4) Ανεπηρέαστες φάνηκε να έμειναν οι ποσότητες του MDA και από τους δυο παράγοντες του πειράματος, το οποίο αποτελεί δείκτη για την υπεροξειδωση των λιπιδίων, επομένως ένα μέτρο της οξειδωτικής καταπόνησης που υφίσταται το φυτό.
- 5) Η ρίγανη αποδείχτηκε ένα ανθεκτικό φυτό σε υψηλές συγκεντρώσεις καδμίου, τετραπλάσιες των επιτρεπτών ορίων σε αγροτικό έδαφος, ακόμη και χωρίς τη χορήγηση αυξημένου αζώτου. Η λίπανση όμως με άζωτο οδηγεί σε αυξημένη περιεκτικότητα φωτοσυνθετικών χρωστικών και βελτιωμένη ανάπτυξη των φυτών ρίγανης, ακόμη και σε έδαφος υψηλής περιεκτικότητας σε κάδμιο.

6. ΒΙΒΛΙΟΓΡΑΦΙΑ

- 1) Αλεξιάδου Α., Αλεξιάδου Ι., 2016. Βαρέα μέταλλα σε βότανα της Κρήτης και στα αφεψήματά τους. Πτυχιακή Διατριβή. Πανεπιστήμιο Αιγαίου, Μυτιλήνη
- 2) Ανυφαντή Ε., 2015. Ποιοτικά και ποσοτικά χαρακτηριστικά αιθέριου ελαίου του αρωματικού και φαρμακευτικού φυτού *Origanum vulgare* spp. *hirtum* σε εκτατική καλλιέργεια στη περιοχή Αμμοτόπου Άρτας. Μεταπτυχιακή Διατριβή. Πανεπιστήμιο Ιωαννίνων, Ιωάννινα
- 3) Ατσαλάκης Κ., 2014. Φυτοεξυγίανση εδάφους από κάδμιο με χρήση του αλόφυτου *Crithmim maritimum* (L.). Μεταπτυχιακή Διατριβή. Πολυτεχνείο Κρήτης, Χανιά
- 4) Γαβαλάς Ν., 2004. Πληθυσμοί ρίγανης (*origanum vulgare* L.) στη Βόρεια και Κεντρική Ελλάδα: επίδραση αβιοτικών παραγόντων στα φαινοτυπικά γνωρίσματά τους. Διδακτορική διατριβή. Αριστοτέλειο Πανεπιστήμιο Θεσσαλονίκης, Θεσσαλονίκη
- 5) Δόρδας Χ., 2012. Αρωματικά και Φαρμακευτικά Φυτά, Εκδόσεις Σύγχρονη Παιδεία, Θεσσαλονίκη
- 6) Ευθυβούλης Ι., 2020. Επίδρασεις επιμολυσμένου με βαρέα μέταλλα εδάφους στις φυσιολογικές λειτουργίες φυτών ρίγανης, Πτυχιακή Διατριβή. Πανεπιστήμιο Θεσσαλίας, Βόλος
- 7) Καραμπουρνιώτης Γ.Α., Λιακόπουλος Γ., Νικολόπουλος Δ., 2012. Αβιοτικοί Παράγοντες Καταπόνησης, Εκδόσεις Έμβρυο, Αθήνα, σελ. 175-182
- 8) Κατσιώτης Σ., Χατζοπούλου Π., 2019. Αρωματικά Φαρμακευτικά Φυτά Και Αιθέρια Έλαια, Εκδόσεις Κυριακίδη, Θεσσαλονίκη, σελ. 522
- 9) Μαλούπα Ε., Γρηγοριάδου Κ., Λάζαρη Δ., Κρίγκας Ν., 2013. Καλλιέργεια, Μεταποίηση και Διασφάλιση Ποιότητας Των Ελληνικών Αρωματικών- Φαρμακευτικών Φυτών: Βασικές Αρχές

Καθετοποιημένης Παραγωγής, Εκδόσεις Γεώργιος Κ. Λουπέλης,
Καβάλα

- 10) Μανουσάκη Ε., 2008. Χαρακτηρισμός της ικανότητας μεσογειακών φυτών για απομάκρυνση Pb και Cd από ρυπασμένα εδάφη. Διδακτορική διατριβή. Πολυτεχνείο Κρήτης, Χανιά
- 11) Benavides M.P., Susana M.G, Tomaro M.L., 2005. Cadmium toxicity in plants. *Brazilian Journal of Plant Physiology*
- 12) Chenard C.H., Kopsell D.E., Kopsell D.A., 2005. Nitrogen Concentration affects nutrient and carotenoid Accumulation in Parsley. *Journal of plant nutrition*, 28:2
- 13) Das, P., Samantaray, S. & Rout, G., 1997. Studies on cadmium toxicity in plants: a review. *Environ Pollut*, p. 29–36.
- 14) He J., Ren Y., Wang Y., Li Z., 2011. Root morphological and physiological. responses of rice seedlings with different tolerance to cadmium stress. *Shengtai Xuebao/ Acta Ecologica Sinica*, 2: 522-528
- 15) Houry T., Khairallah Y., Zahab A.A., Osta B., Romanos D., Haddad G., 2019. Heavy metals accumulation effects on the photosynthetic Performance of Geophytes in Mediterranean Reserve. *Journal of King Saud University- Science*
- 16) Irfan M., Hayat S., Ahmad A., Alyemeni M.N., 2013. Soil cadmium enrichment: Allocation and plant physiological manifestations. *National Center for Biotechnology Information*, 20:1-10
- 17) Jarup L., 2003. Hazards of heavy metal contamination. *British Medical Bulletin*, 88:167-182
- 18) Levizou E., Zanni A.A., Antoniadis V., 2019. Varying concentrations of soil chromium (VI) for the exploration of tolerance thresholds and phytoremediation potential of the oregano (*Origanum vulgare*), *Environmental Science and Pollution Research*, 26:14-23
- 19) Lin Y., L. & Mark, A. G. M., 2012. The molecular mechanism of zinc and cadmium stress response in plants. *Cell. Mol. Life Sci.*
- 20) Moreno-Jimenez E., Penalosa J.M., Manzano R., Carpena-Ruiz R.O., Gamarra R., Esteban E., 2009. Heavy metals distribution in soil surrounding an abandoned mine in NW Madrid (Spain) and their

transference to wild flora, *Journal of Hazardous Materials*, 162:854-859

- 21) Nagajyoti P.C., Lee K.D., Sreekanth T.V.M., 2010. Heavy metals, occurrence and toxicity for plants: a review, *Environ Chem Lett*, pp. 199-216.
- 22) Tchounwou P.B, Yedjou C.G., Patlolla A.K., Sutton D.J., 2012. Heavy Metals Toxicity and the Environment. *National Center for Biotechnology Information*, 101:133–164
- 23) Tran T.A., Popova L.P., 2013, Functions and toxicity of cadmium in plants: recent advances and future prospects. *Turkish Journal of Botany*
- 24) Yadav S.K., 2010. Heavy metals toxicity in plants: An overview on the role of glutathione and phytochelatins in heavy metal stress tolerance of plants. *South African Journal of Botany*, 76:167-179