

ΠΑΝΕΠΙΣΤΗΜΙΟ ΘΕΣΣΑΛΙΑΣ

ΤΜΗΜΑ ΓΕΩΠΟΝΙΑΣ ΦΥΤΙΚΗΣ ΠΑΡΑΓΩΓΗΣ  
& ΑΓΡΟΤΙΚΟΥ ΠΕΡΙΒΑΛΛΟΝΤΟΣ  
Αριθμ. Πρωτοκ. 543  
Ημερομηνία 14-10-2016

Τμήμα Γεωπονίας Φυτικής Παραγωγής και Αγροτικού  
Περιβάλλοντος

Εργαστήριο Ζιζανιολογίας

«Κυανοτοξίνες στο αρδευτικό νερό: επίδραση του νερού της Κάρλας στη  
φυσιολογία και την ανάπτυξη του *Lactuca sativa*»

ΠΤΥΧΙΑΚΗ ΔΙΑΤΡΙΒΗ

ΣΤΑΤΗΡΗΣ ΓΕΩΡΓΙΟΣ



ΕΠΙΒΛΕΠΟΥΣΑ

Ευθυμία Λεβίζου, Λέκτορας Φυσιολογίας Φυτών

Νέα Ιωνία, Βόλος, 2016



ΠΑΝΕΠΙΣΤΗΜΙΟ ΘΕΣΣΑΛΙΑΣ  
ΒΙΒΛΙΟΘΗΚΗ & ΚΕΝΤΡΟ ΠΛΗΡΟΦΟΡΗΣΗΣ  
ΕΙΔΙΚΗ ΣΥΛΛΟΓΗ «ΓΚΡΙΖΑ ΒΙΒΛΙΟΓΡΑΦΙΑ»

Αριθ. Εισ.: 16337/1  
Ημερ. Εισ.: 12/06/2017  
Δωρεά: Συγγραφέα  
Ταξιθετικός ΠΤ-ΦΠΑΠ  
Κωδικός: 2016  
ΣΤΑ

**«Κυανοτοξίνες στο αρδευτικό νερό: επίδραση του νερού της Κάρλας στη  
φυσιολογία και την ανάπτυξη του *Lactuca sativa*»**

### **Τριμελής Συμβουλευτική Επιτροπή**

**Λεβίζου Ευθυμία** (Επιβλέπουσα) Λέκτορας Φυσιολογίας Φυτών, Τμήμα Γεωπονίας Φυτικής Παραγωγής και Αγροτικού Περιβάλλοντος, Πανεπιστήμιο Θεσσαλίας

**Αντωνιάδης Βασίλειος** (Μέλος) Επίκουρος Καθηγητής Εφαρμοσμένης Εδαφολογίας, Τμήμα Γεωπονίας Φυτικής Παραγωγής και Αγροτικού Περιβάλλοντος, Πανεπιστήμιο Θεσσαλίας

**Κωνσταντίνος Κορμάς** (Μέλος) Καθηγητής Οικολογίας Υδρόβιων Μικροοργανισμών, Τμήμα Γεωπονίας Ιχθυολογίας και Υδάτινου Περιβάλλοντος, Πανεπιστήμιο Θεσσαλίας

## ΕΥΧΑΡΙΣΤΙΕΣ

Η παρούσα διπλωματική εργασία εκπονήθηκε στα πλαίσια του Προπτυχιακού Προγράμματος Σπουδών του τμήματος Γεωπονίας Φυτικής Παραγωγής και Αγροτικού Περιβάλλοντος της σχολής Γεωπονικών Επιστημών του Πανεπιστημίου Θεσσαλίας, υπό την επίβλεψη της κας Ευθυμίας Λεβίζου Λέκτορα Φυσιολογίας Φυτών. Θα ήθελα λοιπόν, καταρχάς να ευχαριστήσω θερμά την κυρία Λεβίζου για την εμπιστοσύνη που μου έδειξε και για την αμέριστη συμπαράσταση της καθ' όλη τη διάρκεια της διπλωματικής αυτής εργασίας. Ευχαριστώ επίσης και όλα τα υπόλοιπα μέλη της τριμελούς επιτροπής, τους κυρίους Αντωνιάδη Βασίλειο επίκουρο καθηγητή του τμήματος Γεωπονίας, Φυτικής Παραγωγής και Αγροτικού Περιβάλλοντος και Κωνσταντίνο Κορμά, καθηγητή του τμήματος Γεωπονίας, Ιχθυολογίας και Υδάτινου Περιβάλλοντος για την συμβολή τους στην ολοκλήρωση της παρούσας εργασίας.

Θα ήθελα ακόμη να ευχαριστήσω όλους τους φίλους μου που ακόμη και εν αγνοία τους με βοήθησαν τόσο στο συγκεκριμένο εγχείρημα όσο και στην κατανόηση της ίδιας της ζωής.

Τέλος, ευχαριστώ του γονείς μου και τον αδερφό μου για την στήριξη των επιλογών μου και την αγάπη που τόσο απλόχερα μου προσφέρουν.

## Περιεχόμενα

Περίληψη .....	6
Abstract .....	7
Εισαγωγή.....	8
1.1 Κάρλα .....	8
1.2 Μαρούλι .....	9
1.3 Μικροκυστίνες.....	9
1.4 Μικροκυστίνες και φυτά .....	11
1.5 Σκοπός της εργασίας .....	12
Υλικά και Μέθοδοι .....	13
2.1 Πειραματικές Συνθήκες.....	13
2.2 Τελική Συλλογή.....	14
2.3 Στατιστική Ανάλυση .....	18
Αποτελέσματα.....	19
3.1 Μορφολογικές μετρήσεις .....	19
3.2 Μέτρηση βιοχημικών παραμέτρων .....	27
Συζήτηση .....	33
4.1 Επίδραση των μικροκυστινών στα μορφολογικά χαρακτηριστικά των μαρουλιών.....	33
4.2 Επίδραση των μικροκυστινών στις βιοχημικές παραμέτρους των μαρουλιών.....	34
Συμπεράσματα .....	35
Βιβλιογραφία .....	36

## Περίληψη

Ο ταμειυτήρας της Κάρλας ανασυστάθηκε με σκοπό την κάλυψη των αρδευτικών αναγκών της Θεσσαλίας. Ο ταμειυτήρας χαρακτηρίζεται από ευτροφικές συνθήκες και από έντονη παρουσία κυανοβακτηρίων. Πολλά από τα είδη αυτών είναι τοξικά και ευθύνονται για τη συσσώρευση υψηλών συγκεντρώσεων κυανοτοξίνων στο νερό. Στις κυανοτοξίνες ανήκουν και οι ηπατοτοξικές μικροκυστίνες, η βιοσυσσώρευση των οποίων έχει συνήθως αρνητικές επιδράσεις στην ανάπτυξη των φυτών, ενώ φυτικά προϊόντα που προορίζονται για ανθρώπινη κατανάλωση θεωρούνται επικίνδυνα για τη δημόσια υγεία. Στην παρούσα μελέτη εξετάστηκαν οι επιδράσεις αρδευτικού νερού προερχόμενου από τον Ταμειυτήρα της Κάρλας, άρα με υψηλό περιεχόμενο μικροκυστινών, σε διαδοχικά αναπτυξιακά στάδια του μαρουλιού. Καταγράφηκαν οι αποκρίσεις 4 ομάδων φυτών που έλαβαν το επιβαρυσμένο νερό από το στάδιο του σπέρματος, των κοτυληδόνων, των δύο πρώτων φύλλων και των 4 πρώτων φύλλων και πραγματοποιήθηκαν συγκρίσεις με φυτά-μάρτυρες που έλαβαν νερό βρύσης. Το πείραμα διήρκεσε 2 μήνες, καλύπτοντας την αναπτυξιακή περίοδο του μαρουλιού από τη φύτευση του σπέρματος μέχρι τη συγκομιδή στο εμπορεύσιμο στάδιο. Καταγράφηκαν διάφορες αναπτυξιακές και βιοχημικές παράμετροι ενώ μετρήθηκαν επίσης τα επίπεδα ανόργανων στοιχείων στα φύλλα. Σε ότι αφορά τόσο την ανάπτυξη όσο και μερικές βιοχημικές παραμέτρους εμφανίστηκαν μικρές διαφοροποιήσεις ενώ τα φυτά που έλαβαν το επιβαρυσμένο νερό από το στάδιο του σπέρματος είχαν περισσότερες χλωροφύλλες και άζωτο. Η αντίδραση του μαρουλιού όλων των αναπτυξιακών σταδίων παραπέμπει λοιπόν σε αυξημένη ανθεκτικότητα έναντι των μικροκυστινών.

## **Abstract**

Karla reservoir has been constructed in order to cover the irrigation needs of Thessaly Plain. The reservoir is characterized by eutrophic conditions and intense presence of cyanobacteria. Many of these species are toxic and are responsible for the accumulation of high concentrations of cyanotoxins in water. Microcystins are a group of hepatotoxic cyanotoxins, the bioaccumulation of which has adverse effects on plant growth and, through the food chain, on public health. The present study investigates the effects of irrigation water of Karla in lettuce plants of different stages of development. We followed 4 lettuce plant groups receiving toxin-rich water from seeds, the cotyledon, two true leaves and four true leaves stages, all of which were compared to control plants receiving tap water. It was a two month-long experiment, covering the whole period from seed germination to harvest at marketable size. Lettuce growth, biochemical and mineral characteristics were recorded. Growth appeared minor alterations; several biochemical compounds remained unaffected, while plants receiving toxin-rich water from the seed stage exhibited higher chlorophylls and leaf nitrogen content. The overall performance of lettuce at various developmental stages pointed to an increased tolerance against microcystin-rich irrigation water.

## Εισαγωγή

### 1.1 Κάρλα

Η ανασύσταση της λίμνης Κάρλας (Θεσσαλία) θεωρείται ως ένα από τα μεγαλύτερα περιβαλλοντικά έργα τόσο από την άποψη των περιβαλλοντικών όσο και από την άποψη των οικονομικών οφελών, όχι μόνο για την Ελλάδα αλλά και για ολόκληρη την Ευρώπη (Gialis et al., 2014). Μετά την αποξήρανση της λίμνης στις αρχές της δεκαετίας του '60 δόθηκαν στρέμματα καλλιεργήσιμης έκτασης στους αγρότες της Θεσσαλίας για την ανάπτυξη της ελληνικής γεωργίας. Όμως η αποξήρανση της λίμνης είχε ως αποτέλεσμα την διαταραχή του οικοσυστήματος της περιοχής γι' αυτό και το 2010 η εκ νέου κατασκευή της λίμνης Κάρλας (υπό μορφή ενός ταμιευτήρα ή πολλαπλών ταμιευτήρων) ήταν ένα δημόσιο αίτημα προκειμένου η περιοχή να αναβαθμιστεί περιβαλλοντικά, οικονομικά και κοινωνικά. Ο ανοικοδομημένος ταμιευτήρας βρίσκεται στην περιοχή της κεντρικής Ελλάδας, νοτιοανατολικά της Λάρισας και μεταξύ των νομών Λάρισας και Μαγνησίας, η οποία είναι μια από τις πιο παραγωγικές γεωργικές περιοχές της Ελλάδας. Οι κατά κύριο λόγο καλλιέργειες της περιοχής είναι το βαμβάκι, το σιτάρι, το κριθάρι, ο αραβόσιτος και λαχανοκομικά προϊόντα όπως το καρπούζι, το πεπόνι, η βιομηχανική τομάτα και το μαρούλι. Αν και το βάθος του ταμιευτήρα δεν ξεπερνά τα 2 m και η συνολική του επιφάνεια φτάνει τα 38 km<sup>2</sup>, η περιφέρεια Θεσσαλίας έχει ως στόχο την εγκατάσταση αντλιοστασίου και δικτύου άρδευσης για την διαχείριση του νερού και τον εφοδιασμό των αγροτών με νερό από τον ταμιευτήρα, ενώ η χρήση του νερού για πόση είναι ο τελικός στόχος του προγράμματος ανασύστασης. Παρ' όλα αυτά, ο ταμιευτήρας της Κάρλας έχει επηρεαστεί τόσο από τα αγροτικά όσο και από τα αστικά απόβλητα της περιοχής. Έτσι, δεδομένης της φτωχής ποιότητας και της οικολογικής κατάστασης του Πηνειού ποταμού (του οποίου εκτροπές εκβάλλουν στην λίμνη), είναι συχνό φαινόμενο οι ανθίσεις των κυανοβακτηρίων (Oikonomou et al., 2012). Έτσι, έχουν παρατηρηθεί στην Κάρλα υψηλές συγκεντρώσεις μικροκυστινών που κυμαίνονται από 1.5 μg/L έως 33 μg/L (Papadimitriou et al., 2013).



## 1.2 Μαρούλι

Το μαρούλι θεωρείται ως ένα από τα πιο καταναλώσιμα λαχανικά σε όλο τον κόσμο. Η παγκόσμια παραγωγή του ήταν περίπου 24 εκατομμύρια τόνοι το 2011 (FAOSTAT, 2011). Η μέση κατά κεφαλή ημερήσια κατανάλωση μαρουλιού στην Ευρώπη είναι 22.5 g, η οποία αντιστοιχεί στο 6,5% περίπου της συνολικής διαιτητικής πρόσληψης από τα λαχανικά (WHO, 2003). Επιπλέον, το μαρούλι είναι σημαντικό για την ανθρώπινη διατροφή αφού περιέχει βασικά μακροστοιχεία (K, Na, Ca και Mg) και ιχνοστοιχεία (Fe, Mn, Cu, Zn, Se) (Kawashima & Soares, 2003).

Είναι επίσης γνωστό ως πηγή φωτοσυνθετικών χρωστικών (χλωροφύλλες και καροτενοειδή) αλλά και άλλων φυτοχημικών ουσιών, οι οποίες επηρεάζουν θετικά τη διατροφή και έχουν σημαντικό ρόλο στην πρόληψη αρκετών ασθενειών που σχετίζονται με το οξειδωτικό στρες (Llorach et al., 2008).

Σύμφωνα με τους Xu et al., (2013) τα λαχανικά μπορούν να προσλάβουν από το έδαφος όχι μόνο θρεπτικά συστατικά, αλλά και δυνητικά επιβλαβείς ουσίες, όπως τοξικά ιχνοστοιχεία. Ειδικότερα, τα μαρούλια που προέρχονται από τις καλλιέργειες δεν παρουσιάζουν υψηλά επίπεδα τοξικών στοιχείων, όπως Sb, As, Cd, Pb, Ni και U. Συνήθως όλα τα προαναφερθέντα βρίσκονται κάτω από τα επιτρεπτά όρια. Ωστόσο, ακόμη και όταν η παραγωγή γίνεται σε μη μολυσμένα ή ελαφρώς μολυσμένα εδάφη η συσσώρευση των τοξικών στοιχείων στα μαρούλια είναι πιθανή, αφού η απορρόφησή τους εξαρτάται από διάφορους παράγοντες μεταφοράς από το έδαφος στο φυτό (EFSA, 2009, 2010).

## 1.3 Μικροκυστίνες

Τα κυανοβακτήρια συγκροτούν ένα από τα κύρια βασίλεια των βακτηρίων. Εδώ και 3 δισεκατομμύρια χρόνια αποτελούν κομμάτι του φυσικού οικοσυστήματος, ενώ θεωρούνται ως οι πρώτοι φωτοτροφικοί οργανισμοί που παρήγαγαν οξυγόνο στη γη, μετατρέποντας την ατμόσφαιρα της από ανοξική σε οξυγονούχα. Τα κυανοβακτήρια δεν έχουν ιδιαίτερες ανάγκες σε θρέψη. Δεν χρειάζονται βιταμίνες, ενώ κύρια πηγή αζώτου είναι τα νιτρικά άλατα, οι νιτρώδεις ρίζες και η αμμωνία. Πολλά είδη είναι

αζωτοδεσμευτικά. Τα κυανοβακτήρια αναπτύσσονται σε χερσαία και θαλάσσια οικοσυστήματα. Επιπλέον, αναπτύσσονται σε λίμνες με γλυκό νερό και ευνοούνται όταν αυτές είναι πλούσιες σε θρεπτικά συστατικά. Αρκετά από τα προϊόντα του μεταβολισμού των κυανοβακτηρίων είναι επικίνδυνα για την ανθρώπινη υγεία καθώς είναι τοξικά παράγωγα (Madigan et al., 2014).

Οι μεταβαλλόμενες παγκόσμιες κλιματικές συνθήκες και η αύξηση των ανθρωπογενών πιέσεων ευνοούν την εμφάνιση κυανοβακτηρίων (Houghton et al., 2001, IPCC, 2007), Paerl and Huisman, 2008). Η παγκόσμια ανάπτυξη των κυανοβακτηρίων έχει αυξηθεί σημαντικά στα θαλάσσια, υφάλμυρα και ηπειρωτικού τύπου οικοσυστήματα κατά τον τελευταίο αιώνα. Αυτό φαίνεται να είναι ένα παγκόσμιο φαινόμενο (Codd et al., 2010). Το υψηλό φορτίο θρεπτικών ουσιών σε πολλά υδρόβια οικοσυστήματα οδηγεί σε αύξηση της συγκέντρωσης των κυανοβακτηρίων. Κύρια αιτία της άνθισης των κυανοβακτηρίων είναι ο ευτροφισμός των λιμνών. Η αλληλεπίδραση αυτών των δυο έχει ως αποτέλεσμα την διαταραχή των λιμναίων και χερσαίων οικοσυστημάτων (Wiegand et al., 2000). Το φαινόμενο αυτό ενισχύεται από την ικανότητα των πλαγκτονικών κυανοβακτηρίων να συνθέτουν κυστίδια αέρα που τους επιτρέπουν να επιπλέουν στην υδάτινη στήλη και σε συνδυασμό με τον ανεξέλεγκτο πολλαπλασιασμό στο κάτω μέρος των λιμνών, των ποταμών και των παράκτιων υδάτων οδηγούνται στο σχηματισμό πυκνής κυανοπράσινης κρούστας κοντά στις ακτές (Araoz et al., 2008).

Τα κυανοβακτήρια είναι γνωστά ως παραγωγοί ενός ευρέος φάσματος τοξινών (κυανοτοξίνες), με δυσμενείς επιπτώσεις τόσο σε χερσαίους όσο και σε υδρόβιους οργανισμούς. Η κυανοβακτηριακή άνθιση αποτελεί έναν σημαντικό κίνδυνο για την ανθρώπινη δημόσια υγεία και την υγεία των ζώων. Οι κυανοτοξίνες είναι επικίνδυνες για τα ζώα και τον άνθρωπο, καθώς αυτές μπορούν να προκαλέσουν προβλήματα υγείας και σε πολλές περιπτώσεις θάνατο όταν οι συγκεντρώσεις τους ξεπερνούν τα φυσιολογικά επίπεδα. Η πιο κοινή ομάδα κυανοτοξινών είναι οι ηπατοτοξίνες, (π.χ. μικροκυστίνες και νοντουλαρίνες) που συναντώνται σε αφθονία και είναι οι πιο διαδεδομένες. Η δράση τους είναι ηπατοτοξική. Ο κύριος μηχανισμός τοξικότητας των μικροκυστινών είναι η μη αναστρέψιμη αναστολή των πρωτεϊνικών φωσφατασών 1 και 2A. Η βιοσυσσώρευση των μικροκυστινών έχει εντοπισθεί σε μια πληθώρα υδρόβιων και χερσαίων οργανισμών (Papadimitriou, 2010).

Άλλοι τύποι κυανοτοξινών είναι οι νευροτοξίνες με άμεσο αντίκτυπο στη δημόσια υγεία και τις ανθρώπινες δραστηριότητες (Araoz et al., 2008).

Η διαχείριση της ποιότητας των υδάτων για τη μείωση των τοξικών κυανοβακτηρίων και τον περιορισμό των πιθανών επιπτώσεων των κυανοβακτηριακών τοξινών, απαιτούν την κατανόηση των ιδιοτήτων των τοξινών και των οδών έκθεσης, μέσω των οποίων οι τοξίνες παρουσιάζουν κινδύνους για την υγεία, όπως μέσω της επαφής με το δέρμα, της εισπνοής, της αιμοκάθαρσης και της κατάποσης (Codd et al., 2010).

#### 1.4 Μικροκυστίνες και φυτά

Ανάλογα με τη σύνθεση των κυανοβακτηριακών ανθήσεων, η παραγωγή βιοδραστικών ουσιών, όπως οι μικροκυστίνες, μπορούν να επηρεάσουν αρνητικά την χλωρίδα και την πανίδα των υδάτινων οικοσυστημάτων (Kozdęba et al., 2014). Η έκθεση βρώσιμων καλλιεργούμενων φυτών σε κυανοτοξίνες μέσω της άρδευσης με ψεκάσμο ή πότισμα μπορεί να προκαλέσει συσσώρευση αυτών στους φυτικούς ιστούς. Αποτέλεσμα της συσσώρευσης είναι η εισαγωγή των τοξινών στην ανθρώπινη τροφική αλυσίδα. Αρκετές μελέτες έχουν αναφέρει ότι η έκθεση των κυανοβακτηριακών υδατικών εκχυλισμάτων επάγει μια σημαντική μείωση του ρυθμού βλάστησης χερσαίων φυτών, όπως της φακής, του αραβόσιτου, του σιταριού, του αρακά και της μηδικής (Chen et al., 2004, Pflugmacher et al., 2006, Saqrane et al., 2008, El Khalloufi et al., 2011).

Τα κυανοβακτηριακά παράγωγα προκαλούν οξειδωτικό στρες στα φυτά (Cordeiro-Araújo et al., 2015, Pflugmacher et al., 2007, Saqrane et al., 2007). Εκτός από την πρόκληση οξειδωτικού στρες οι μικροκυστίνες (MCs) μπορούν να προκαλέσουν αλλαγές στην ανάπτυξη (Pflugmacher et al., 2007), στον ρυθμό παραγωγής φωτοσυνθετικών προϊόντων (Abe et al., 1996) και στην διαπερατότητα των μεμβρανών (Cordeiro-Araújo et al., 2015). Επιπλέον, μετά από έκθεση φυτών σε MCs εξαιτίας της άρδευσης με μολυσμένο νερό, τα φυτά παράγουν μεγαλύτερες ποσότητες ενεργών ριζών οξυγόνου (reactive oxygen species, ROS), οι οποίες μπορούν να προκαλέσουν οξειδωτική βλάβη στα κύτταρα τους (Pflugmacher et al.,

2007). Οι ROS μπορούν να βλάψουν το DNA και να οδηγήσουν σε υπεροξειδωση των λιπιδίων.

Τα φυτά διαθέτουν αποτελεσματικά αντιοξειδωτικά αμυντικά συστήματα που περιλαμβάνουν ένζυμα όπως η γλουταθειόνη S-τρανσφεράση (GST), η υπεροξειδική δισμουτάση (SOD), η υπεροξειδάση (POD) και η καταλάση (CAT) που βοηθούν στην πρόληψη και στην καταπολέμηση των επιβλαβών συνεπειών που συνδέονται με την υψηλή παραγωγή ROS (Cordeiro-Araújo et al., 2015).

Έχουν καταγραφεί αρνητικές επιπτώσεις των κυανοτοξινών στην ανάπτυξη και τη φωτοσυνθετική διαδικασία του φυτού (Kurki-Helasma and Meriluoto, 1998), Pflugmacher 2002, Pflugmacher et al., 2006, Crush et al., 2008, Saqrane et al., 2009).

Σύμφωνα με τον Wiegand, (2000) πολλοί οργανισμοί έχουν αναπτύξει μια μεταβολική διεργασία αποτοξίνωσης με σκοπό την αντοχή τους σε στρεσογόνους προάγοντες που αποτελείται από τρεις φάσεις: (1) την ενεργοποίηση (P450-μονοοξυγενασών) (2) σύζευξη (γλουταθειόνης S-τρανσφεράσης, και άλλων τρανσφεράσεων) και (3) την περαιτέρω επεξεργασία, εναπόθεση, ή αποβολή των παραγόντων αυτών.

## 1.5 Σκοπός της εργασίας

Με βάση τις παραπάνω μελέτες φαίνεται η αναγκαιότητα για περεταίρω έρευνα πάνω στις επιδράσεις των μικροκυστινών στις φυσιολογικές λειτουργίες των φυτών και τους παράγοντες που τις επηρεάζουν. Η παρούσα εργασία πραγματοποιήθηκε με σκοπό τη μελέτη της επίδρασης του νερού της λίμνης Κάρλας ως αρδευτικό, στην ανάπτυξη, τη φυσιολογία και στις διάφορες βιοχημικές παραμέτρους του μαρουλιού. Επιπλέον, διερευνήθηκε εάν η πιθανή επίδραση σχετίζεται με τον αναπτυξιακό στάδιο κατά το οποίο το φυτό δέχεται το επιβαρυνμένο με μικροκυστίνες αρδευτικό νερό.

## Υλικά και Μέθοδοι

### 2.1 Πειραματικές Συνθήκες

Το πείραμα έλαβε χώρα στα θερμοκήπια του Τμήματος Γεωπονίας Φυτικής Παραγωγής και Αγροτικού Περιβάλλοντος του Πανεπιστημίου Θεσσαλίας από τις αρχές του Οκτώβρη του 2014 έως τα τέλη Ιουνίου του 2015. Στις 13/10/14 φυτεύτηκαν οι σπόροι των μαρουλιών. Αρχικά, τα φυτά κατηγοριοποιήθηκαν σε 5 μεταχειρίσεις (treatments) των 13 επαναλήψεων (13 φυτά σε κάθε μεταχείριση). Οι μεταχειρίσεις κατηγοριοποιήθηκαν σε 5 ομάδες φυτών που λάμβαναν νερό από τη λίμνη Κάρλα σε διαφορετικά αναπτυξιακά στάδια:

- 1) Control (C): φυτά που λάμβαναν νερό βρύσης.
- 2) Seed (S): φυτά που ποτίζονταν εξ' αρχής με νερό από τη λίμνη Κάρλα.
- 3) Cotyledon (Cot): φυτά που αρχικά ποτίζονταν με νερό βρύσης και έπειτα από την έκπτυξη των 2 κοτυληδόνων ποτίζονταν με νερό από τη λίμνη.
- 4) 2Leaves (2L): φυτά που αρχικά ποτίζονταν με νερό βρύσης και μετά από την έκπτυξη των 2 πραγματικών φύλλων ξεκίνησαν να ποτίζονται με νερό από τη λίμνη.
- 5) 4Leaves (4L): φυτά που έλαβαν νερό από τη λίμνη μετά την έκπτυξη των 4 πραγματικών φύλλων.

Στις 20/10/14 έγινε αραίωση για τη μείωση του ανταγωνισμού, ενώ στις 21/10/14 πραγματοποιήθηκε η μεταφύτευση των φυτών σε γλάστρες 1.5 L.

Οι μεταχειρίσεις ξεκίνησαν χρονικά ως εξής:

- 1) Control, S στις 13/10/14
- 2) Cot στις 18/10/14
- 3) 2L στις 29/10/14
- 4) 4L στις 8/11/14

Τα ποτίσματα των φυτών διεξάγονταν τακτικά 2-3 φορές την εβδομάδα ενώ κάθε 15 μέρες πραγματοποιούνταν αλλαγή της θέσης όλων των φυτών (rotation) προκειμένου να αποφευχθεί οποιαδήποτε επίδραση της μικροθέσης.

Η ποικιλία του μαρουλιού που χρησιμοποιήθηκε ήταν η *Parris Island Cos*.

## 2.2 Τελική Συλλογή

Στις 18 και 19/12/14 έγινε η συγκομιδή των φυτών και η καταγραφή των μορφολογικών χαρακτήρων ως μήκος x πλάτος, της συγκέντρωση των ολικών χλωροφυλλών και του πάχους των φυτών. Στη συνέχεια έγινε ομαδοποίηση των φύλλων σε νεαρά, ώριμα και γερασμένα, αναλόγως με τη θέση τους στο βλαστό.

Πιο αναλυτικά, στα 5 φυτά που παρακολουθούνταν έγινε καταγραφή των μορφολογικών χαρακτηριστικών, ως μήκος x πλάτος, των ολικών χλωροφυλλών και του πάχους των φύλλων. Ακολούθησε ομαδοποίηση στις ομάδες νεαρά, ώριμα, γερασμένα και μέτρηση του νωπού βάρους των φύλλων και του βλαστού. Σε ότι αφορά το υπόγειο μέρος απομακρύνθηκε το χώμα και καθαρίστηκε η ρίζα. Στη συνέχεια οι ιστοί τοποθετήθηκαν σε ξηραντήριο, στους 80 °C για 48 ώρες, ώστε να καταγραφεί το ξηρό βάρος των διαφόρων ομάδων φύλλων, βλαστού και ρίζας.

Σε άλλα 5 τυχαία φυτά έγινε καταγραφή των μορφολογικών παραμέτρων ως μήκος x πλάτος των φύλλων, ομαδοποίηση στις ομάδες νεαρά, ώριμα, γερασμένα και μέτρηση του νωπού βάρους των φύλλων και του βλαστού. Στη συνέχεια, οι ιστοί τοποθετήθηκαν σε ξηραντήριο, στους 80 °C για 48 ώρες, ώστε να καταγραφεί και το ξηρό βάρος των διαφόρων ομάδων φύλλων, βλαστού και ρίζας.

Τέλος, σε 3 φυτά τόσο το υπέργειο όσο και το υπόγειο μέρος τους αποθηκεύτηκαν σε ψυγείο στους -20 °C.

### Μέτρηση ολικού αζώτου

Στις 29/04/15 έγινε προσδιορισμός της συγκέντρωσης ολικού αζώτου με τη μέθοδο Kjeldahl σε ξηρό ιστό φύλλων. Η μέθοδος στηρίζεται στην ολική μετατροπή των μορφών αζώτου σε αμμωνιακά άλατα. Χρησιμοποιήθηκε 1 g ξηρού ιστού. Το δείγμα μεταφέρθηκε σε φιάλη πέψης όπου και προστέθηκαν δυο ταμπλέτες καταλύτη Kjeldahl και 15 mL πυκνού H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> και στη συνέχεια εφαρμόστηκε πρόγραμμα βρασμού. Η απόσταξη έγινε σε αυτόματο μηχάνημα (Behr Labor-Technik, Germany) και η τιτλοδότηση πραγματοποιήθηκε σε κωνική φιάλη των 300 mL με δείκτη ερυθρό του μεθυλίου (Methyl Red) στην οποία προστέθηκε HCl 0,1N μέχρι τη μόνιμη

αλλαγή του χρώματος. Τα mL της τιτλοδότησης μετατράπηκαν σε συγκέντρωση N, σύμφωνα με την εξίσωση:

$$N\% = [(mL\ HCl - mL\ Blank) \times N_{\delta/\tau\omicron\zeta\ HCl} \times 0,014007/\text{βαρος δείγματος g}] \times 100$$

η οποία προέκυψε από την πρότυπη καμπύλη συσχέτισης ml HCl με γνωστές συγκεντρώσεις αζωτούχων ουσιών.

#### Μέτρηση φωσφόρου

Στις 04/05/15 έγινε μέτρηση της συγκέντρωσης φωσφόρου σύμφωνα με την μέθοδο Olsen. Η μέθοδος στηρίζεται στην ανάπτυξη χρώματος σε διαλύματα που περιέχουν φώσφορο, η συγκέντρωση του οποίου ποσοτικοποιείται φασματοφωτομετρικά. Σε πλαστικά φιαλίδια τύπου falcon των 50 mL ζυγίστηκαν περίπου 0,5 g αλλά ακριβώς καταγεγραμμένο, ξηρού φυτικού ιστού και προστέθηκαν 20 mL 0,5 M NaHCO<sub>3</sub>. Έπειτα έγινε ανάδευση για 30 min και ύστερα από διήθηση με διηθητικό χαρτί παραλήφθηκε το εκχύλισμα. Η ανάπτυξη χρώματος στα άγνωστα δείγματα έγινε σε ογκομετρικές φιάλες των 25 mL όπου προστέθηκαν 5 mL εκχυλίσματος, 2,5 mL ασκορβικού οξέος και 8 mL 1M NaOH για τη ρύθμιση του pH στην τιμή 7 με 8. Η πλήρωση της φιάλης έγινε με νερό. Η καμπύλη βαθμολόγησης, από όπου υπολογίζουμε τη συγκέντρωση του φωσφόρου στο εκχύλισμα (ppm ή mg L<sup>-1</sup>) έγινε με τη χρήση πρότυπων διαλυμάτων με γνωστές συγκεντρώσεις φωσφόρου 0, 0.2, 0.4, 0.6 (mg P L<sup>-1</sup>), αντίστοιχα.

#### Μέτρηση προλίνης

Στις 18-19/05/15 πραγματοποιήθηκε μέτρηση προλίνης με τη μέθοδο όξινης νινυδρίνης κατά (Bates et al., 1973) τροποποιημένη για 200 mg νωπού δείγματος (Khan et al., 2000). Αρχικά για κάθε δείγμα, ζυγίστηκαν περίπου 200 mg, ακριβώς καταγεγραμμένο, ξηρού ιστού φύλλων, τοποθετήθηκαν σε σωλήνες φυγοκέντρου και στη συνέχεια προστέθηκαν 10 mL υδατικού διαλύματος αιθανόλης 80 %. Μετά από επώαση σε υδατόλουτρο στους 60 °C για 30 min έγινε διήθηση μέσω χωνιού-χάρτινου φίλτρου σε άλλους μικρούς γυάλινους δοκιμαστικούς σωλήνες. Έπειτα προστέθηκαν 2 mL εκχυλίσματος, 2 mL του αντιδραστηρίου της όξινης νινυδρίνης και 2 mL οξικού οξέος σε σωλήνες φυγοκέντρου και ακολούθησε επώαση σε υδατόλουτρο στους 100 °C για 1 h. Στη συνέχεια, το περιεχόμενο των σωλήνων

μεταφέρθηκε σε μεγάλους δοκιμαστικούς σωλήνες και προστέθηκαν 4 mL τολουόλιου και έγινε ανάδευση για 15 sec. Τέλος, έγινε διαχωρισμός των φάσεων καθώς το χρωμοφόρο το οποίο περιέχει τολουόλιο διαχωρίζεται από την υδατική φάση του διαλύματος και με το υπερκείμενο μετρήθηκε η απορρόφηση στα 520 nm, με τυφλό τολουόλιο. Η συγκέντρωση της προλίνης υπολογίστηκε σύμφωνα με πρότυπη καμπύλη αναφοράς, η οποία προέκυψε με τη χρήση γνωστών συγκεντρώσεων L-προλίνης.

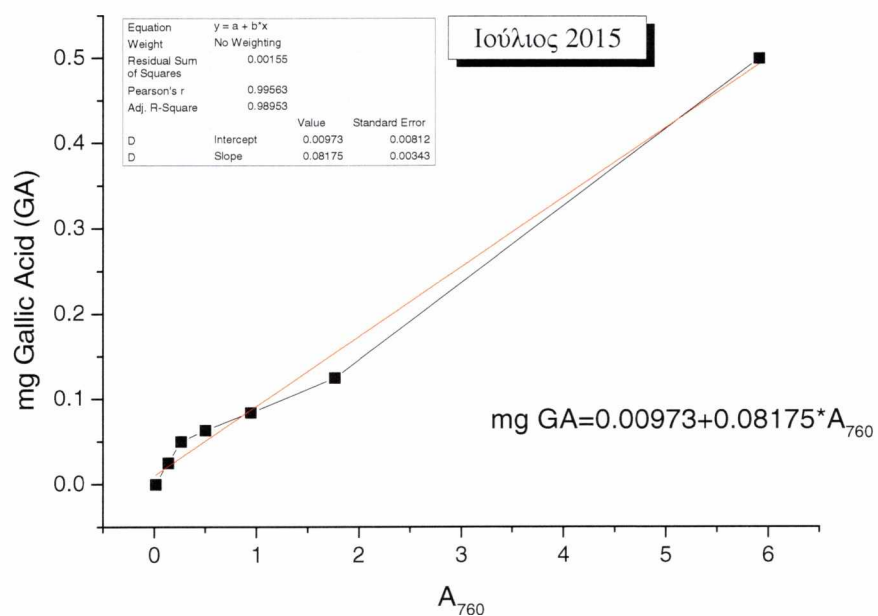
#### Μέτρηση φαινολικών

Στις 31-1/07/2015 έγινε προσδιορισμός της συγκέντρωσης των ολικών φαινολικών ουσιών με τη μέθοδο Folin-Ciocalteu (Waterman & Mole, 1994). Για τη μέθοδο χρησιμοποιήθηκαν περίπου 200 mg κονιορτοποιημένου ξηρού ιστού φύλλων, αλλά ακριβώς καταγεγραμμένο και τοποθετήθηκαν σε δοκιμαστικούς σωλήνες. Στη συνέχεια προστέθηκαν 6ml υδατικού διαλύματος μεθανόλης 50% και ακολούθησε εκχύλιση σε υδατόλουτρο στους 40 °C για 1 h, υπό ήπια ανάδευση. Μετά το φιλτράρισμα με τη βοήθεια διηθητικού χαρτιού παραλήφθηκε το διαυγές διάλυμα σε νέους δοκιμαστικούς σωλήνες. Στη συνέχεια προστέθηκαν 3,95 mL απιονισμένου νερού, 0,05 mL (50λ) του εκχυλίσματος και 0,25 mL (250λ) αντιδραστηρίου Folin-Ciocalteu. Ακολούθησε επώαση σε θερμοκρασία δωματίου για 2 h (με συχνά Vortex). Τέλος, μετρήθηκε η απορρόφηση στα 760nm και με γνωστές συγκεντρώσεις γαλλικού οξέος κατασκευάστηκε πρότυπη καμπύλη αναφοράς.

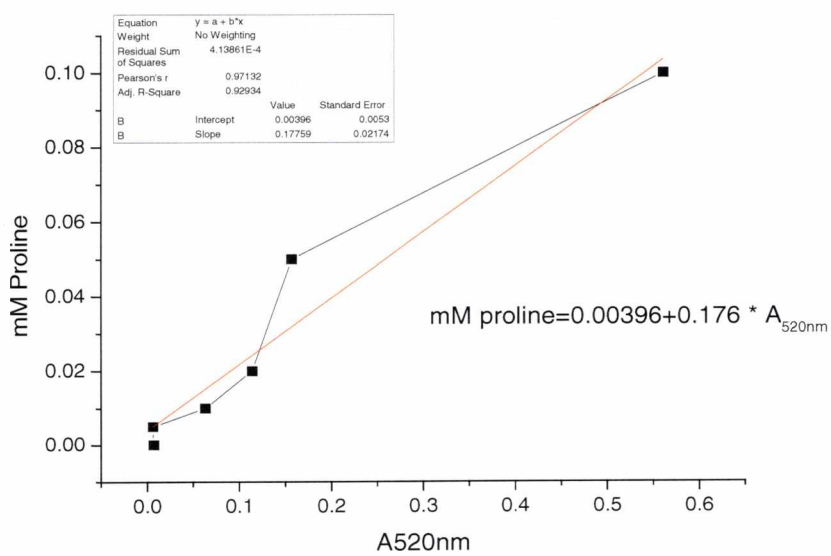
Η συγκέντρωση ολικών φαινολικών εκφράζεται σε mg ισοδύναμου γαλλικού οξέος ανά g ξηρής ουσίας (Phm).



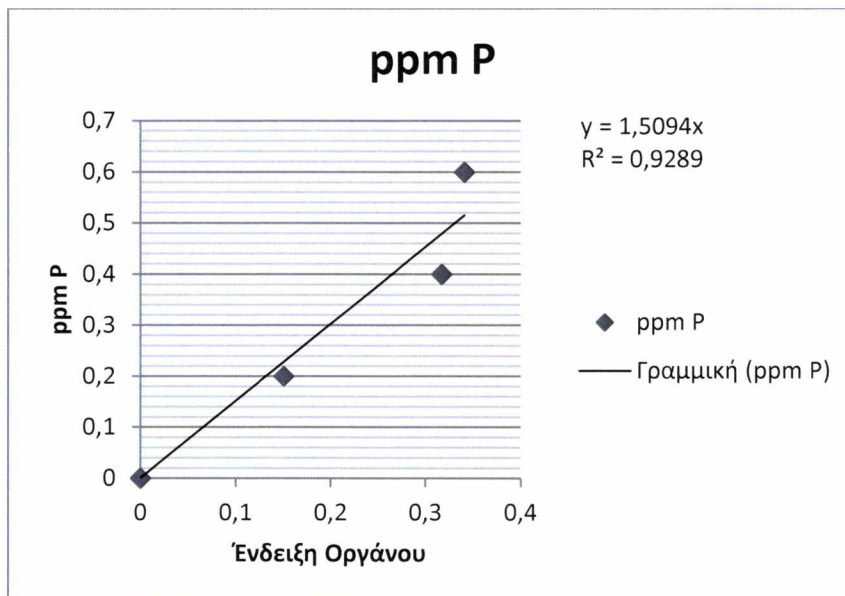
### Πρότυπη καμπύλη φαινολικών



### Πρότυπη καμπύλη προλίνης



### Πρότυπη καμπύλη φωσφόρου



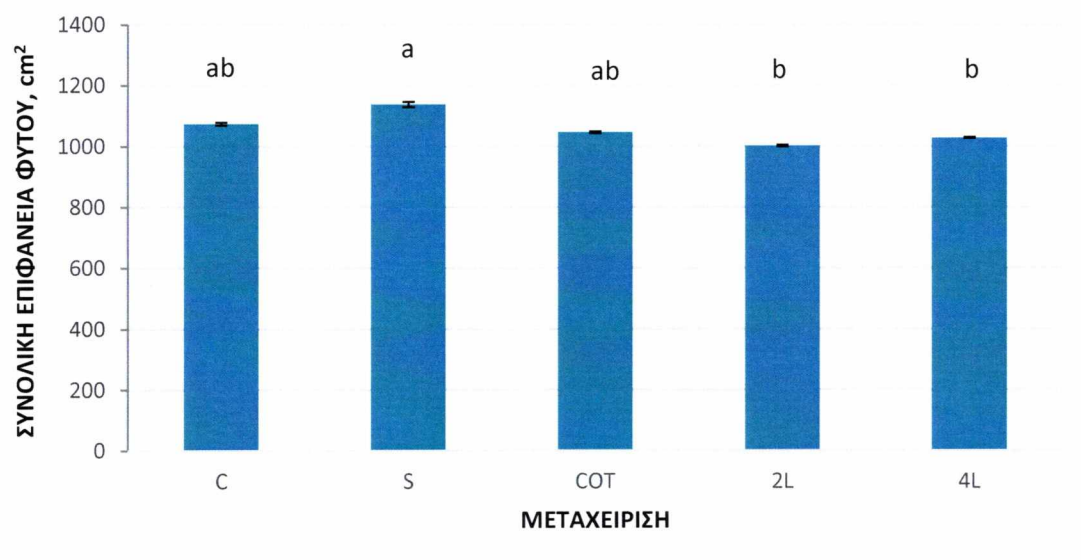
### 2.3 Στατιστική Ανάλυση

Για τη στατιστική ανάλυση των αποτελεσμάτων χρησιμοποιήθηκε η μονοπαραγοντική μέθοδος One-Way ANOVA και ακολούθησαν Post-Hoc tests (SPSS v.20, IBM Corp.). Το επίπεδο σημαντικότητας των διαφορών μεταξύ των μεταχειρίσεων, ορίστηκε στο  $P < 0.05$  (Sig).

## Αποτελέσματα

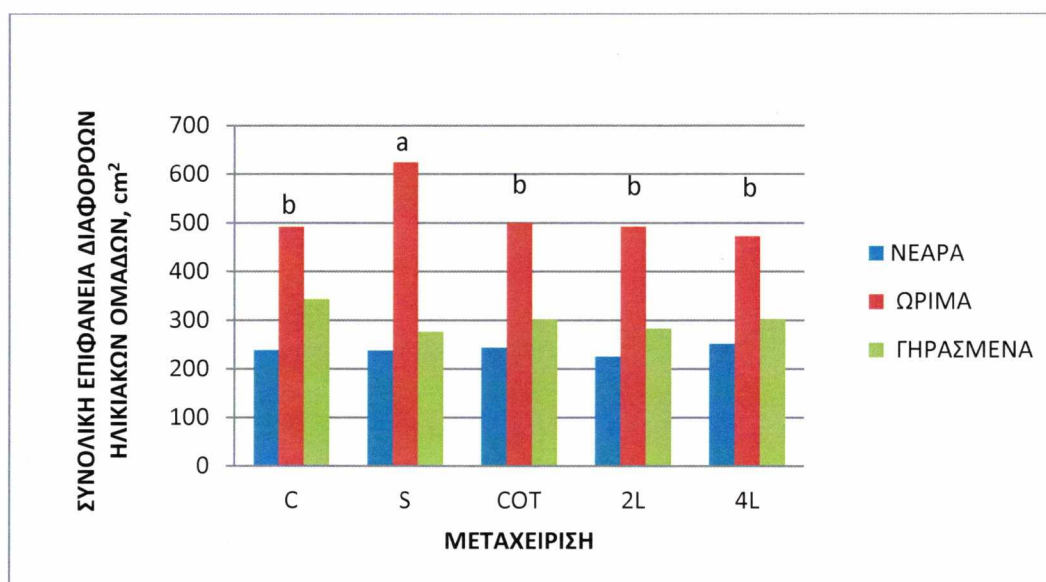
### 3.1 Μορφολογικές μετρήσεις

Στο σχήμα 1 φαίνεται η συνολική φυλλική επιφάνεια του φυτού για κάθε μεταχείριση. Οι μεταχειρίσεις C, Cot, 2L και 4L δεν έχουν στατιστικά σημαντικές διαφορές μεταξύ τους. Αντίθετα η μεταχείριση S διαφέρει στατιστικά με τις μεταχειρίσεις 2L, 4L αλλά όχι με τις μεταχειρίσεις C και Cot.



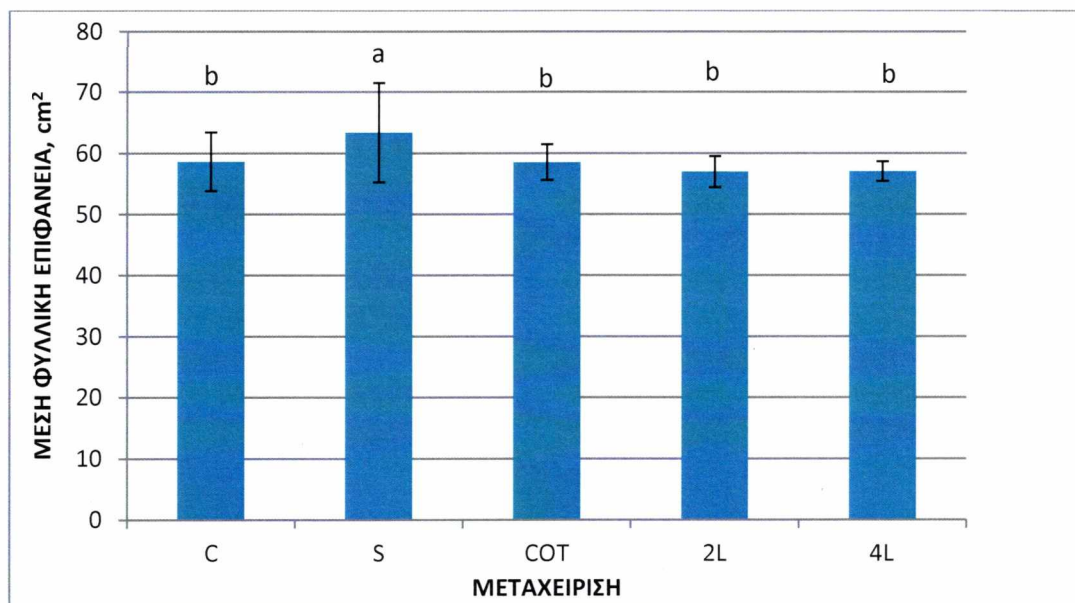
Σχήμα 1: Συνολική επιφάνεια φύλλων φυτού, εκφρασμένη ως M.O± SD. Τα διαφορετικά γράμματα υποδεικνύουν στατιστικώς σημαντική διαφορά σε επίπεδο  $P < 0,05$ .

Στο σχήμα 2 απεικονίζεται η συνολική επιφάνεια των φύλλων στις διάφορες ηλικιακές ομάδες για τις πέντε μεταχειρίσεις των φυτών. Η συνολική επιφάνεια των νεαρών φύλλων φαίνεται να μην έχει στατιστικά σημαντικές διαφορές σε όλες τις μεταχειρίσεις. Όσον αφορά τη συνολική επιφάνεια των ώριμων φύλλων, η μεταχείριση S σημείωσε την υψηλότερη τιμή, ενώ σύμφωνα με την στατιστική ανάλυση φαίνεται ότι διαφέρει σημαντικά από τις υπόλοιπες μεταχειρίσεις. Τέλος, τα γηρασμένα φύλλα δεν είχαν ιδιαίτερες μεταβολές στη συνολική τους επιφάνεια από μεταχείριση σε μεταχείριση.



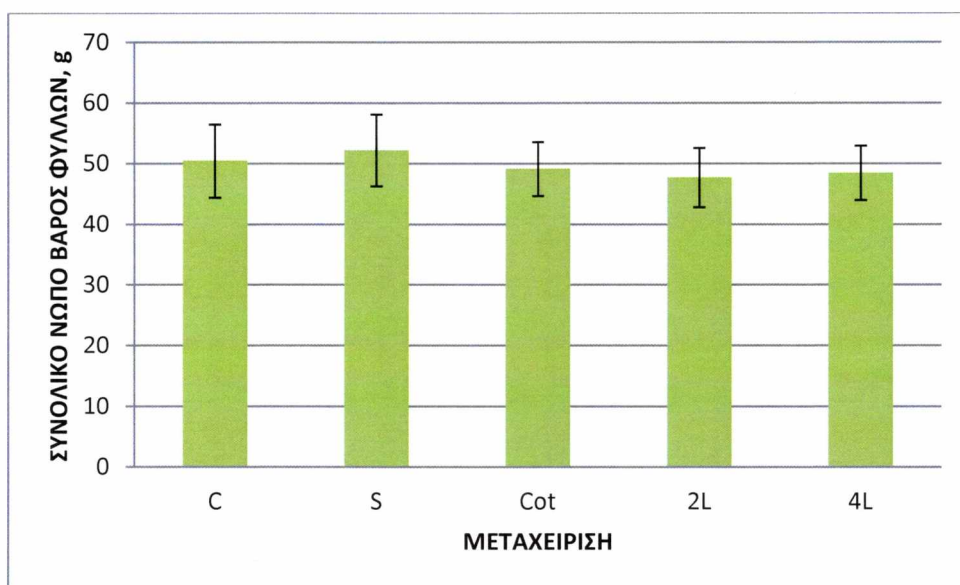
Σχήμα 2: Συνολική επιφάνεια φύλλων για τις διάφορες ηλικιακές ομάδες κάθε μεταχείρισης. Τα διαφορετικά γράμματα υποδεικνύουν στατιστικώς σημαντική διαφορά σε επίπεδο  $P < 0,05$ .

Στο σχήμα 3 φαίνεται η μέση φυλλική επιφάνεια της κάθε μεταχείρισης. Την υψηλότερη τιμή μέσης φυλλικής επιφάνειας έχει η μεταχείριση S, η οποία εμφανίζει στατιστικά σημαντική διαφορά με τις μεταχειρίσεις C, Cot, 2L και 4L. Παρόλα αυτά, σύμφωνα με την στατιστική ανάλυση, δεν φαίνεται να υπάρχουν σημαντικές διαφορές μεταξύ των υπόλοιπων μεταχειρίσεων.

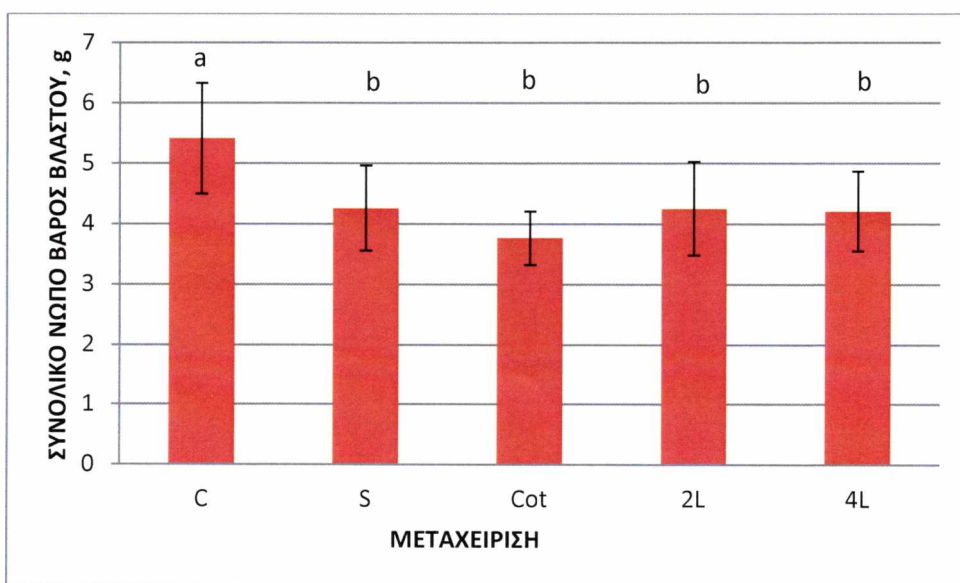


Σχήμα 3: Μέση φυλλική επιφάνεια (M.O ± SD). Τα διαφορετικά γράμματα υποδεικνύουν στατιστικώς σημαντική διαφορά σε επίπεδο  $P < 0,05$ .

Στα σχήματα 4 και 5 καταγράφεται το συνολικό νωπό βάρος των φύλλων και του βλαστού της κάθε μεταχείρισης αντίστοιχα. Στο νωπό βάρος των φύλλων δεν υπάρχει κάποια σημαντική διαφορά. Αντίθετα στο νωπό βάρος του βλαστού, η μεταχείριση C σημείωσε στατιστικά σημαντική διαφορά με τις υπόλοιπες μεταχειρίσεις σε επίπεδο  $P < 0,05$ .

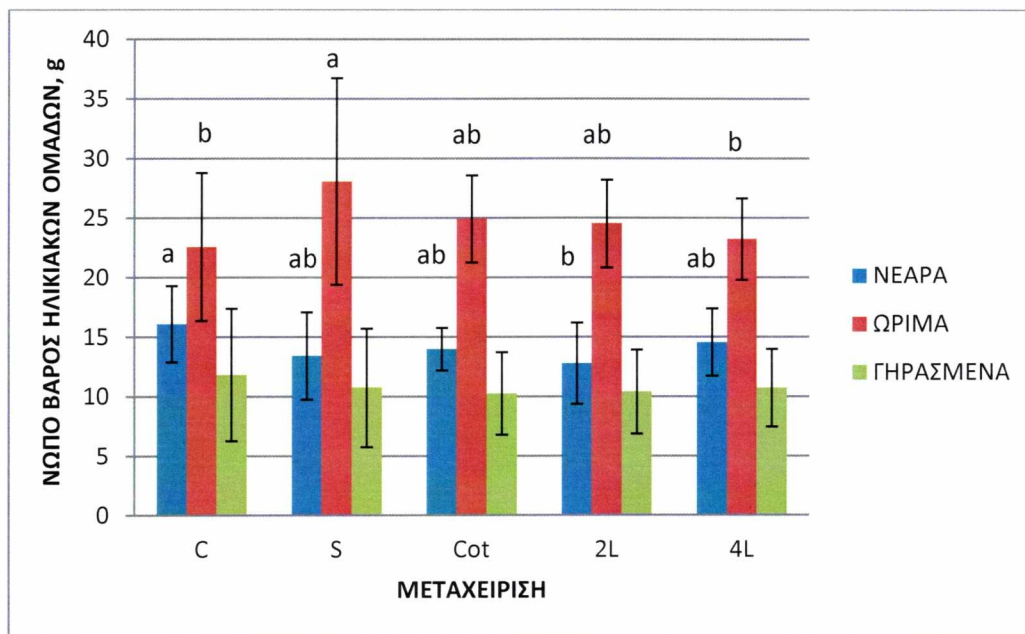


Σχήμα 4: Συνολικό νωπό βάρος των φύλλων της κάθε μεταχείρισης, εκφρασμένο ως  $M.O \pm SD$ .



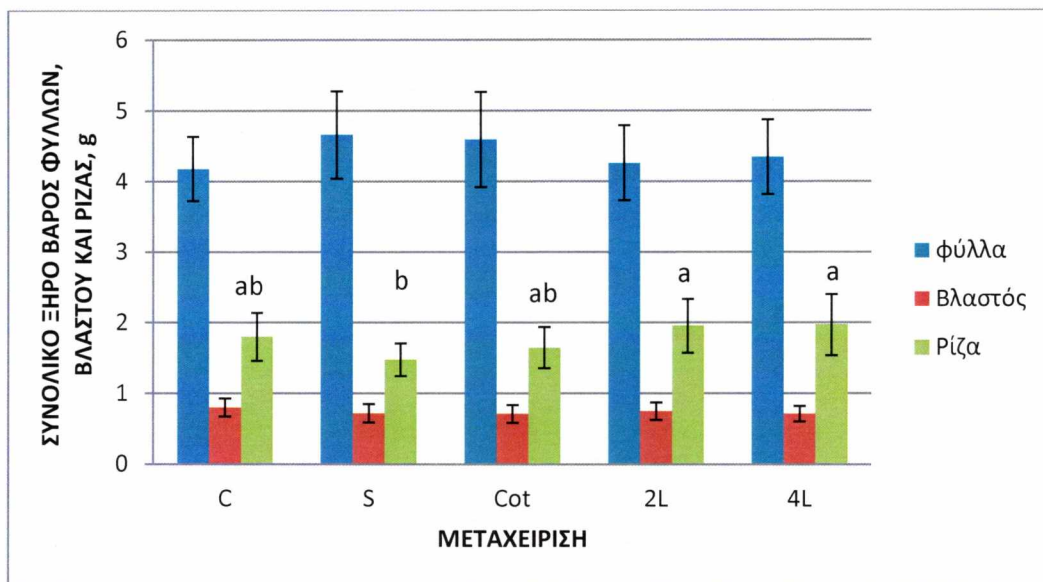
Σχήμα 5: Συνολικό νωπό βάρος του βλαστού της κάθε μεταχείρισης, εκφρασμένο ως  $M.O \pm SD$ . Τα διαφορετικά γράμματα υποδεικνύουν στατιστικώς σημαντική διαφορά σε επίπεδο  $P < 0,05$ .

Στο σχήμα 6 παρουσιάζεται το νωπό βάρος των φύλλων των διάφορων ηλικιακών ομάδων. Η μεταχείριση C είχε το υψηλότερο νωπό βάρος στα νεαρά φύλλα ενώ παρουσίασε στατιστικά σημαντική διαφορά με την μεταχείριση 2L. Παρόμοιο αποτέλεσμα παρατηρήθηκε στα γερασμένα φύλλα, παρόλο που δεν υπήρξαν στατιστικά σημαντικές διαφορές. Στα ώριμα φύλλα η υψηλότερη τιμή του νωπού βάρους παρατηρήθηκε στη μεταχείριση S η οποία σημείωσε στατιστικά σημαντική διαφορά με τις μεταχειρίσεις C και 4L. Η μεταχείριση C παρουσίασε σημαντική διαφορά μόνο με τη μεταχείριση S.



Σχήμα 6: Νωπό βάρος φύλλων διάφορων ηλικιακών ομάδων κάθε μεταχείρισης (Μ.Ο±SD). Τα διαφορετικά γράμματα υποδεικνύουν στατιστικώς σημαντική διαφορά σε επίπεδο  $P < 0,05$ .

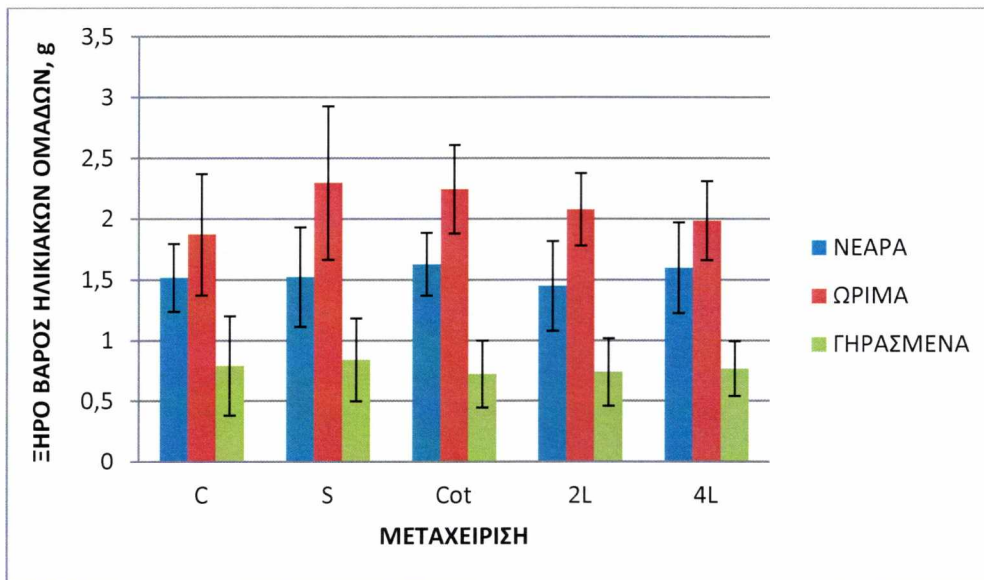
Στο σχήμα 7 φαίνεται το συνολικό ξηρό βάρος των φύλλων, του βλαστού και της ρίζας σε κάθε μεταχείριση. Στα φύλλα, οι τιμές των μεταχειρίσεων S, Cot και 2L, 4L αντίστοιχα, κυμάνθηκαν στα ίδια επίπεδα χωρίς όμως να σημειωθεί στατιστικώς σημαντική διαφορά. Η μεταχείριση C είχε το μικρότερο συνολικό ξηρό βάρος. Αντίστοιχο πρότυπο παρατηρήθηκε και στις ρίζες, όπου σημειώθηκε στατιστικά σημαντική διαφορά μεταξύ της μεταχείρισης S και των μεταχειρίσεων 2L και 4L. Τα ξηρά βάρη των βλαστών δεν είχαν αλλαγές από μεταχείριση σε μεταχείριση.



Σχήμα 7: Συνολικό ξηρό βάρος φύλλων – βλαστού – ρίζας κάθε μεταχείρισης (Μ.Ο±SD). Τα διαφορετικά γράμματα υποδεικνύουν στατιστικώς σημαντική διαφορά σε επίπεδο  $P < 0,05$ .

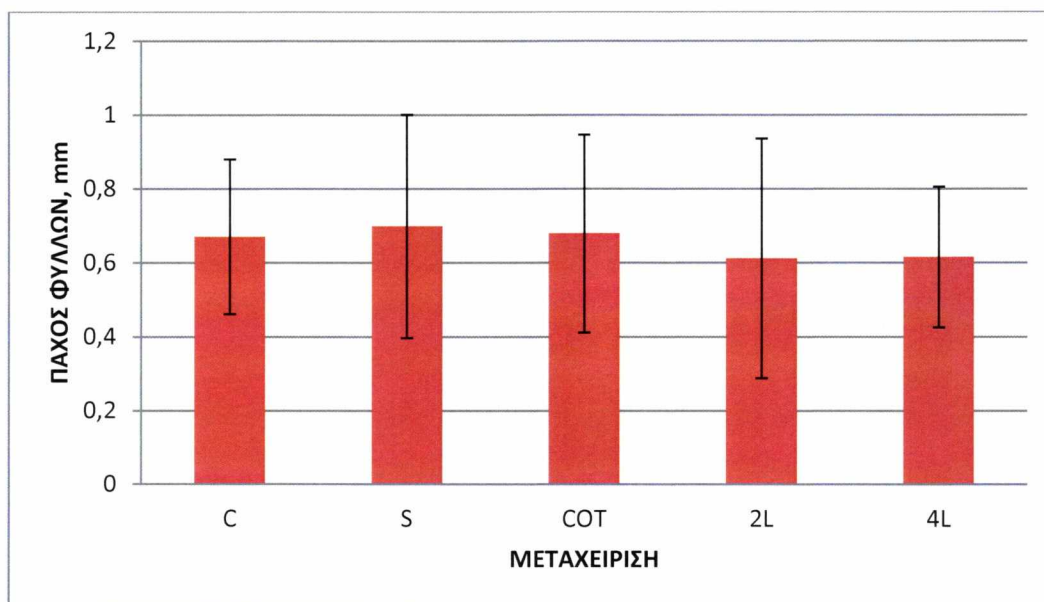


Στο σχήμα 8 φαίνεται το ξηρό βάρος των ηλικιακών ομάδων, όπου δεν καταγράφηκαν στατιστικά σημαντικές διαφορές. Στα ώριμα φύλλα, η μεταχείριση S εμφάνισε μία τάση για υψηλότερη τιμή ξηρού βάρους, ενώ η χαμηλότερη καταγράφηκε στα φυτά-μάρτυρες.



Σχήμα 8: Ξηρό βάρος διαφόρων ηλικιακών ομάδων κάθε μεταχείρισης.

Όπως φαίνεται στο σχήμα 9 το πάχος των φύλλων σημείωσε ελάχιστη μεταβολή από μεταχείριση σε μεταχείριση. Στις μεταχειρίσεις C, S, Cot το πάχος των φύλλων βρίσκεται στο ίδιο επίπεδο. Μικρή πτώση της τιμής παρατηρήθηκε στις μεταχειρίσεις 2L και 4L. Σύμφωνα με την στατιστική ανάλυση οι μεταχειρίσεις δεν παρουσίασαν σημαντικές διαφορές.

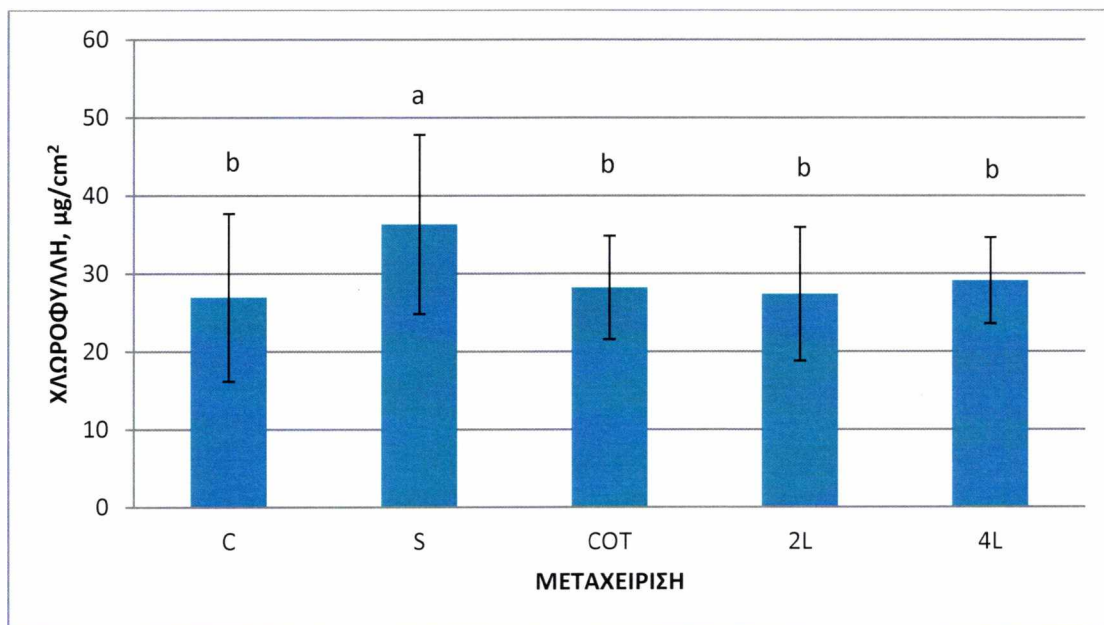


Σχήμα 9: Πάχος των φύλλων (mm) στις μεταχειρίσεις.

### 3.2 Μέτρηση βιοχημικών παραμέτρων

#### Μέτρηση χλωροφύλλης

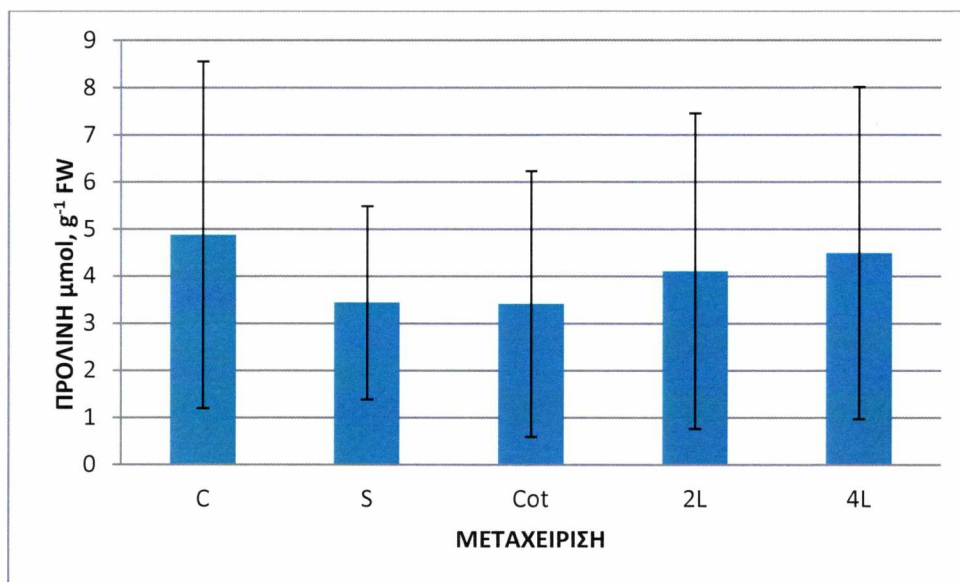
Σύμφωνα με το σχήμα 10 η συγκέντρωση της χλωροφύλλης στις μεταχειρίσεις παρουσίασε μεταβολές. Στις μεταχειρίσεις C, Cot, 2L, 4L η συγκέντρωση της χλωροφύλλης κυμάνθηκε σε παρόμοια επίπεδα σε αντίθεση με τη μεταχείριση S όπου η τιμή της συγκέντρωσης ήταν υψηλότερη. Όπως φαίνεται και συγκεντρωτικά στον Πίνακα 1, οι μεταχειρίσεις C, COT, 2L, 4L παρουσίασαν στατιστικά σημαντική διαφορά σε σχέση με τη μεταχείριση S.



Σχήμα 10: Συγκέντρωση χλωροφύλλης a+b σε  $\mu\text{g}/\text{cm}^2$  (M.O $\pm$ SD). Τα διαφορετικά γράμματα υποδεικνύουν στατιστικώς σημαντική διαφορά σε επίπεδο  $P < 0,05$ .

### Μέτρηση προλίνης

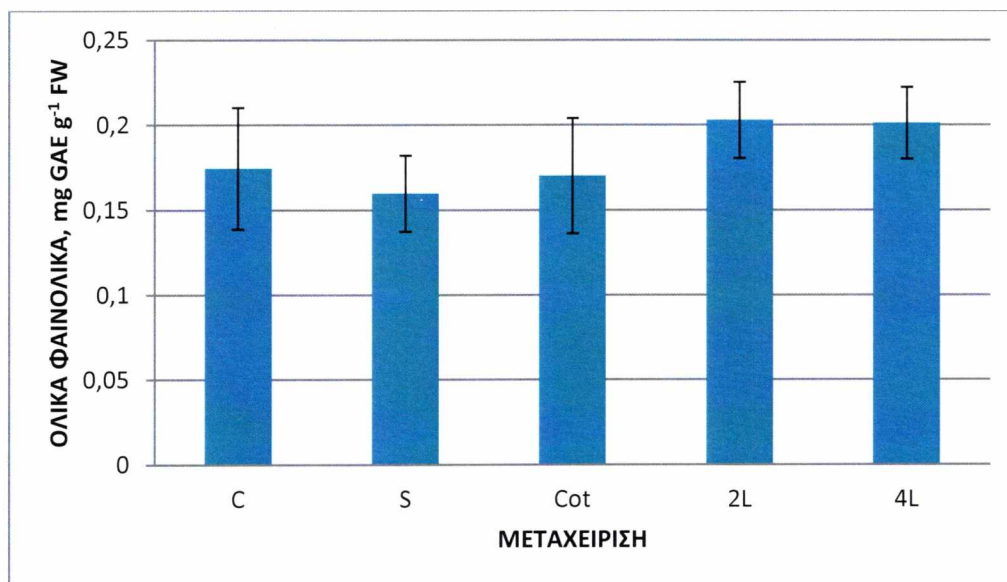
Το σχήμα 11 δείχνει τη συγκέντρωση προλίνης σε  $\mu\text{mol}$  ανά γραμμάριο ξηρής μάζας των φυτών κάθε μεταχείρισης. Οι μεταχειρίσεις S και Cot δεν διαφέρουν σημαντικά μεταξύ τους. Οι μεταχειρίσεις 2L και 4L έχουν παρόμοιες συγκεντρώσεις προλίνης, ενώ, η μεταχείριση C έχει την υψηλότερη συγκέντρωση (Πίνακας 1), όμως καμία στατιστικώς σημαντική διαφορά δεν καταγράφηκε.



Σχήμα 11: Συγκέντρωση προλίνης σε  $\mu\text{mol g}^{-1}$  ξηρής φυτικής μάζας στις μεταχειρίσεις.

### Μέτρηση φαινολικών

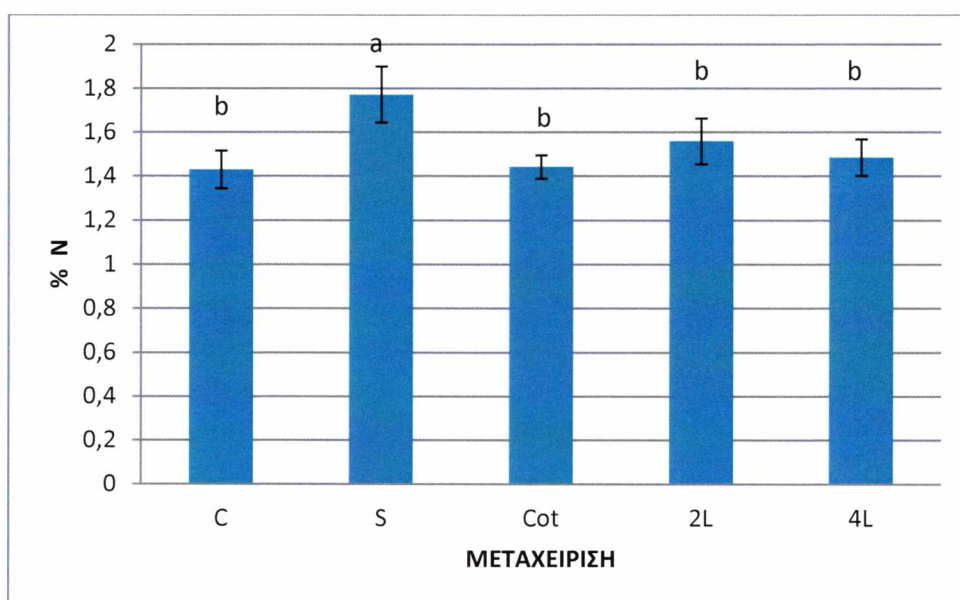
Στο σχήμα 12 απεικονίζεται η συγκέντρωση ολικών φαινολικών σε ισοδύναμα (mg) γαλλικού οξέος σε όλες τις μεταχειρίσεις. Παρότι μία εμφανής τάση για υψηλότερη συγκέντρωση παρατηρείται στις μεταχειρίσεις 2L και 4L, δεν καταγράφηκαν στατιστικώς σημαντικές διαφορές (βλ. και Πίνακα 1).



Σχήμα 12: Συγκέντρωση φαινολικών ουσιών εκφρασμένων σε ισοδύναμα γαλλικού οξέος.

### Μέτρηση ολικού αζώτου

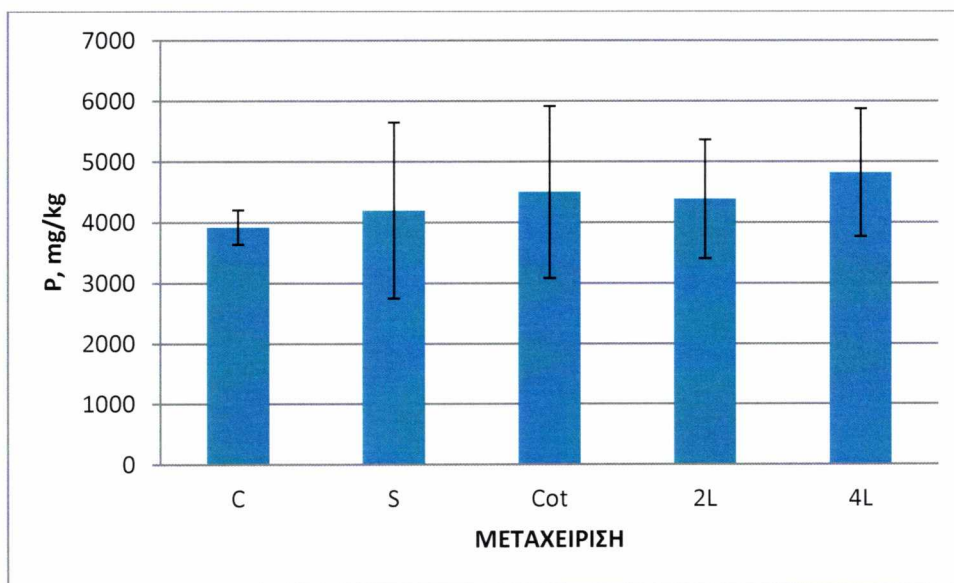
Στο σχήμα 13 γίνεται σύγκριση της ποσοστιαίας συγκέντρωσης αζώτου ανά μονάδα ξηρού φυτικού ιστού όλων των μεταχειρίσεων. Η μεταχείριση S είχε την υψηλότερη συγκέντρωση και παρουσίασε στατιστικά σημαντική διαφορά με τις υπόλοιπες μεταχειρίσεις. Οι μεταχειρίσεις C, Cot, 2L και 4L δεν παρουσίασαν σημαντικές διαφορές μεταξύ τους (βλ. και Πίνακα 1).



Σχήμα 13: Ποσοστιαία συγκέντρωση αζώτου επί ξηρού φυτικού ιστού σε όλες τις μεταχειρίσεις εκφρασμένη ως M.O  $\pm$  SD. Τα διαφορετικά γράμματα υποδεικνύουν στατιστικώς σημαντική διαφορά σε επίπεδο  $P < 0,05$ .

### Μέτρηση φωσφόρου

Στο σχήμα 14 φαίνεται η συγκέντρωση του φωσφόρου σε ppm ( $\text{mg kg}^{-1}$ ) σε κάθε μεταχείριση. Υψηλότερες συγκεντρώσεις παρατηρήθηκαν στις μεταχειρίσεις Cot, 2L και 4L. Η χαμηλότερη συγκέντρωση φωσφόρου παρατηρήθηκε στη μεταχείριση C, ενώ η μεταχείριση S σημείωσε πτώση της συγκέντρωσης σε σχέση με τις μεταχειρίσεις Cot, 2L και 4L. Παρόλα αυτά καμία μεταβολή δεν κρίθηκε στατιστικά σημαντική (Πίνακας 1).



Σχήμα 14: Συγκέντρωση φωσφόρου σε ppm ( $\text{mg kg}^{-1}$ ) σε όλες τις μεταχειρίσεις.

Πίνακας 1: Βιοχημικές παραμέτροι και ανόργανα στοιχεία στους ιστούς των φύλλων μαρουλιού στην τελική συγκομιδή. Οι τιμές εκφράζονται ως μέση τιμή  $\pm$  SD (n = 10). Τα διαφορετικά γράμματα σημαίνουν στατιστικώς σημαντικές διαφορές σε  $p < 0,05$ .

	Χλωροφύλλη a+b ( $\mu\text{g cm}^{-2}$ )	Ολικά Φαινολικά (mg GAE g FW <sup>-1</sup> )	Προλίνη ( $\mu\text{mol g FW}^{-1}$ )	Ολικό Άζωτο (%)	Φωσφόρος (mg kg <sup>-1</sup> )
C	29.93 $\pm$ 3.85 a	0,174 $\pm$ 0.036	4,88 $\pm$ 3.68	1.43 $\pm$ 0.09 a	3921.7 $\pm$ 284.6
S	36.31 $\pm$ 5.73 b	0,160 $\pm$ 0.022	3,44 $\pm$ 2.05	1.77 $\pm$ 0.13 b	4195,2 $\pm$ 1448.3
Cot	28.20 $\pm$ 3.72 a	0,170 $\pm$ 0.034	3,41 $\pm$ 2.82	1.44 $\pm$ 0.05 a	4499,8 $\pm$ 1415.9
2L	27.38 $\pm$ 4.32 a	0,203 $\pm$ 0.022	4,11 $\pm$ 3.36	1.56 $\pm$ 0.10 a	4383,4 $\pm$ 997.9
4L	29.07 $\pm$ 3.70 a	0,201 $\pm$ 0.021	4,49 $\pm$ 3.52	1.48 $\pm$ 0.08 a	4821,1 $\pm$ 1053.9



## Συζήτηση

### 4.1 Επίδραση των μικροκυστινών στα μορφολογικά χαρακτηριστικά των μαρουλιών

Νερό με σημαντική συγκέντρωση μικροκυστινών χρησιμοποιήθηκε για την άρδευση φυτών μαρουλιού διαφόρων αναπτυξιακών σταδίων. Τα μαρούλια έλαβαν επιβαρυσμένο νερό από το στάδιο του σπέρματος, των κοτυληδόνων, των δύο πρώτων φύλλων και των 4 πρώτων φύλλων. Η επίδραση των μικροκυστινών στην ανάπτυξη και τη φυσιολογία του μαρουλιού εκτιμήθηκε μέσω μετρήσεων σε διάφορες αναπτυξιακές και βιοχημικές παραμέτρους των φυτών.

Συνολικά, σε μορφολογικό επίπεδο, οι μεταχειρίσεις που εφαρμόστηκαν στην παρούσα μελέτη δεν προκάλεσαν αισθητά αρνητικές επιπτώσεις στα φυτά μαρουλιού (π.χ. χλώρωση ή νέκρωση). Η μεταχείριση S παρουσίασε την υψηλότερη συνολική επιφάνεια σε σχέση με τις μεταχειρίσεις 2L και 4L, ενώ στην κατηγορία ώριμα σημείωσε στατιστικά σημαντική διαφορά με τις μεταχειρίσεις C, Cot, 2L και 4L.

Στο υπέργειο τμήμα του φυτού, το νωπό βάρος των φύλλων δεν παρουσίασε σημαντικές μεταβολές. Οι μικροκυστίνες δεν φαίνεται να είναι ανασταλτικός παράγοντας στην ανάπτυξη των φύλλων. Από την άλλη, στο νωπό βάρος του βλαστού καταγράφηκε μία υπεροχή των φυτών-μαρτύρων σε σχέση με τις μεταχειρίσεις S, Cot, 2L και 4L. Σύμφωνα με τους Freitas et al., (2015) μικρές συγκεντρώσεις μείγματος μικροκυστινών είναι ικανές να οδηγήσουν σε αύξηση του νωπού βάρους των φύλλων του μαρουλιού, αντιθέτως έκθεση των φυτών σε υψηλότερες συγκεντρώσεις μπορεί να προκαλέσει σημαντική μείωση στο νωπό βάρος.

Βέβαια, πολλοί είναι οι παράγοντες που μπορούν να επηρεάσουν την επίδραση των μικροκυστινών στα φυτά. Παράγοντες όπως τα φυτικά είδη, το στάδιο ανάπτυξης του φυτού, η χρήση καθαρής τοξίνης ή ακατέργαστων εκχυλισμάτων, ο χρόνος έκθεσης και το εύρος των συγκεντρώσεων φαίνεται να παίζουν καθοριστικό ρόλο στην εμφάνιση τοξικότητας ή ανθεκτικότητας.

Σε γενικές γραμμές, τα φυτά μαρουλιού φαίνεται να διαθέτουν ομοιοστατικούς μηχανισμούς, οι οποίοι έχουν την ικανότητα να επανορθώσουν ζημίες που έχουν προκληθεί από έκθεση των φυτών σε χαμηλές συγκεντρώσεις

μικροκυστινών. Ωστόσο, υψηλές συγκεντρώσεις είναι ικανές, όπως φαίνεται από τη σχετική βιβλιογραφία, να οδηγήσουν σε αρνητικές επιπτώσεις όσον αφορά την απόδοση και την αύξηση των φύλλων, γεγονός που δηλώνει ότι οι κυανοτοξίνες προωθούν ορμονικές αντιδράσεις (Prieto et al., 2011).

Στην παρούσα μελέτη, το ξηρό βάρος του υπέργειου τμήματος του φυτού δεν παρουσίασε στατιστικά σημαντικές διαφορές. Αντίθετα, στο υπόγειο μέρος του φυτού παρατηρήθηκαν στατιστικώς σημαντικές μεταβολές μεταξύ των μεταχειρίσεων S και 2L, 4L, με τα S φυτά να εμφανίζουν χαμηλότερα ξηρά βάρη ριζών. Παρόμοια αποτελέσματα αναφέρουν και οι Prieto et al., (2011) όπου διαφορετικά εκχυλίσματα μικροκυστινών δεν φάνηκε να προκαλούν σημαντικές αλλαγές στο νωπό και ξηρό βάρος των ριζών στο ρύζι.

Τέλος, η συγκέντρωση των κυανοτοξινών δεν φαίνεται να επηρεάζει το πάχος των φύλλων.

#### 4.2 Επίδραση των μικροκυστινών στις βιοχημικές παραμέτρους των μαρουλιών

Οι επιδράσεις των κυανοτοξινών σε ότι αφορά τα θρεπτικά στοιχεία των καλλιεργούμενων φυτών έχουν ελάχιστα μελετηθεί (Freitas et al., 2015). Στην παρούσα εργασία διερευνώνται οι επιπτώσεις των μικροκυστινών στην περιεκτικότητα των ανόργανων στοιχείων στα φύλλα μαρουλιού, καθώς αυτά αποτελούν και το βρώσιμο τμήμα του φυτού.

Γενικά, η έκθεση των φυτών μαρουλιού σε κυανοτοξίνες οδήγησε σε σημαντικές αλλαγές σε ότι αφορά το περιεχόμενο της χλωροφύλλης και του αζώτου στα φύλλα τους. Η συγκέντρωση τόσο των ολικών χλωροφυλλών όσο και του αζώτου ήταν υψηλότερη στη μεταχείριση S έναντι των υπολοίπων μεταχειρίσεων. Από την άλλη, αξιοσημείωτες μεταβολές δεν παρατηρήθηκαν σε προλίνη, ολικά φαινολικά και φωσφόρο. Βέβαια το αποτέλεσμα αυτό δεν συνάδει με τους Freitas et al, (2015) που σε παρόμοιο πείραμα ανέφεραν πως η έκθεση των φυτών μαρουλιού σε μικροκυστίνες είχε ως αποτέλεσμα τη μείωση της περιεκτικότητας των ανόργανων θρεπτικών συστατικών στα φύλλα.

## Συμπεράσματα

Η ανάπτυξη του μαρουλιού των διάφορων αναπτυξιακών σταδίων δεν επηρεάστηκε αρνητικά από την παρουσία μικροκυστινών. Καταρχάς, το νωπό βάρος των φύλλων δεν μεταβλήθηκε σημαντικά μεταξύ των μεταχειρίσεων, πράγμα που δηλώνει ότι οι κυανοτοξίνες δεν αποτελούν ανασταλτικό παράγοντα κατά την ανάπτυξη των φύλλων. Βέβαια, το νωπό βάρος του βλαστού όλων των μεταχειρίσεων, πλην του μάρτυρα, ήταν μειωμένο δείχνοντας έτσι πως η ανάπτυξη του επηρεάζεται από τις τοξίνες. Σε ότι αφορά το ξηρό βάρος του υπέργειου τμήματος των φυτών, δεν φαίνεται να επηρεάζεται με κάποιον τρόπο. Στατιστικά σημαντικές μεταβολές του ξηρού βάρους του ριζικού συστήματος των φυτών παρουσίασε η μεταχείριση S.

Όσον αφορά τις βιοχημικές παραμέτρους, σημαντικές διαφορές εντοπίστηκαν στα ποσοστά της συγκέντρωσης αζώτου και των περιεχόμενων χλωροφυλλών μεταξύ της μεταχείρισης S και των υπόλοιπων μεταχειρίσεων. Καμία άλλη σημαντική μεταβολή δεν καταγράφηκε στις υπόλοιπες μετρήσεις τόσο των βιοχημικών παραμέτρων όσο και των ανόργανων στοιχείων. Η αντίδραση του μαρουλιού όλων των αναπτυξιακών σταδίων παραπέμπει λοιπόν σε αυξημένη ανθεκτικότητα έναντι των μικροκυστινών.

## Βιβλιογραφία

- Abe T., Lawson T., Weyers J.D.B., Codd G.A., 1996. Microcystin-LR inhibits photosynthesis of *Phaseolus vulgaris* primary leaves: implications for current spray irrigation practice. *New Phytol.*133, 651–658.
- Araoz R., Molgo J., Tandeau de Marsac N., (2008). Neurotoxic cyanobacterial toxins. *Toxicon* 56:813-28
- 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
- Codd G., Bell S., Kaya K., Ward C., Beattie K., Metcalf J., 2010. Cyanobacterial toxins, exposure routes and human health. *European Journal of Phycology*, 34:405-415
- Cordeiro-Araújo M.K., Chia M.A., Hereman T.C., Sasaki F.F., Bittencourt-Oliveira M. C., 2015. Selective membrane permeability and peroxidase activity response of lettuce and arugula irrigated with cyanobacterial –contaminated water. *Environ, Earth Sci.*74:1547–1553.
- Crush JR, Briggs LR, Sprosen JM, Nichols SN, 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
- EFSA, 2009. Scientific Opinion of the Panel on Contaminants in the Food Chain on a request from German Federal Institute for Risk Assessment (BfR) on uranium in foodstuffs, in particular mineral water. *EFSA Journal*, 1018:1–59.
- EFSA, 2010. Panel on Contaminants in the Food Chain (CONTAM), Scientific Opinion on Lead in Food. *EFSA Journal*, 8(4):1570.
- El Khalloufi F, Oufdou K, Lahrouni M, El Ghazali I, Saqrane S, Vasconcelos V, Oudra B, 2011. Allelopathic effects of cyanobacteria extracts containing microcystins on *Medicago sativa*/rhizobia symbiosis. *Ecotoxicol Environ Saf*, 74(3):431–438
- FAOSTAT. 2011. The FAO (Food and Agriculture Organization of the United Nations) Statistical Database. Retrieved from <http://faostat.fao.org>.

- Freitas M., Azevedo J., Pinto E., Neves J., Campos A., Vasconcelos V., 2015, Effects of microcystin-LR, cylindrospermopsin and a microcystin-LR/cylindrospermopsin mixture on growth, oxidative stress and mineral content in lettuce plants (*Lactuca sativa* L.), *Ecotoxicol. Environ. Saf.* 116:59-67.
- Gialis, S., and Laspidou, C., 2014. Lake Karla and the contradictory character of Greek Environmental Policies: A brief historical overview. Proceedings to the IWA Regional Symposium on Water, Wastewater and Environment: Traditions and Culture, 22-24 March 2014, Patras, Greece.
- Houghton J.T., Ding Y., Griggs D.J., Noguier M., Van der Linden P.J., Dai X., Maskell K., Johnson C.A., 2001. *Climate Change 2001: The Scientific Basis*. Cambridge University Press, Cambridge.
- International Panel on Climate Change – IPCC, 2007. *Climate Change 2007: Synthesis Report. Contribution of Working Groups I, II and III to the Fourth Assessment Report of the Intergovernmental Panel on Climate Change*. In: Core Writing Team, Pachauri, R.K. and Reisinger, A., (Eds.). IPCC, Geneva, Switzerland: 104pp.
- Kawashima L. M., and Soares L. M. V., 2003. Mineral profile of raw and cooked leafy vegetables consumed in Southern Brazil. *Journal of Food Composition and Analysis*, 16(5):605–611.
- Kozdęba M., Borowczyk J., Zimoląg E., Wasylewski M., Dziga D., Madeja Z., Drukala J., 2014. Microcystin-LR affects properties of human epidermal skin cells crucial for regenerative processes. *Toxicon*, 80:38–46.
- Kurki-Helasma K, Meriluoto J, 1998. Microcystin uptake inhibits growth and protein phosphatase activity in Mustard (*Sinapis alba* L.) seedlings. *Toxicon* 36:1921–1926
- Llorach R., Martinez-Sanchez A., Tomas-Barberan F. A., Gil M. I., & Ferreres F., 2008. Characterisation of polyphenols and antioxidant properties of five lettuce varieties and escarole. *Food Chemistry*, 108(3):1028–1038.

- Madigan M.T., Martinko J.M., Parker J., Brock Biology of Microorganisms, Southern Illinois University Carbondale, Pearson Education Inc, 2014 (ΠΑΝΕΠΙΣΤΗΜΙΑΚΕΣ ΕΚΔΟΣΕΙΣ ΚΡΗΤΗΣ)
- Oikonomou A., Katsiapi M., Karayanni H., Moustaka-Gouni M., Kormas K., 2012. Plankton microorganisms coinciding with two consecutive mass fish kills in a newly reconstructed lake. *Sci World J* <http://dx.doi.org/10.1100/2012/504135>.
- Paerl H.W., Huisman J., 2008. Blooms like it hot. *Science* 320:57–58.
- Papadimitriou T., 2010. Effects of microcystin concentrations on aquatic animals (Doctoral Dissertation) in Greek with English Summary. Department of Biological Applications and Technology, University of Ioannina
- Papadimitriou Th., Katsiap M., Kormas Ar. K., Moustaka-Gouni M., Kagalou I., 2013. Artificially-born "killer" lake: phytoplankton based water quality and microcystin affected fish in a reconstructed lake. *Science of the Total Environment*, (452-453), 116-124.
- 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
- Pflugmacher S., 2002. Possible allelopathic effects of cyanotoxins, with reference to microcystin-LR, in aquatic ecosystems. *Environ Toxicol* 17:407–413
- Pflugmacher S., Aulhorn M., Grimm B., 2007. Influence of acyanobacterial crude extract containing microcystin-LR on the physiology and antioxidative defence systems of different spinach variants. *NewPhytol.*175:482–489.
- 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.
- 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. Environmental Science Health B* 43:443–451

- Saqrane S., Elghazali I., Ouahid Y., El Hassni M., El Hadrami I., Bouarab L., Del Campo F.F., Oudra B., Vasconcelos V., 2007. Phytotoxic effects of cyanobacteria extract on the aquatic plant *Lemna gibba*: Microcystin accumulation, detoxication and oxidative stress induction. *Aquat. Toxicol.*, 83:284–294.
- Saqrane S., Ouahid Y., El Ghazali I., Oudra B., Bouarab L., del Campo FF., 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
- WHO, 2003. GEMS/Food regional diets: regional per capita consumption of raw and semi-processed agricultural commodities. Geneva.
- Xu D. C., Zhou P., Zhan J., Gao Y., Dou C. M., & Sun, Q. Y., 2013. Assessment of trace metal bioavailability in garden soils and health risks via consumption of vegetables in the vicinity of Tongling mining area, China. *Ecotoxicology and Environmental Safety*, 90:103–111.



ΠΑΝΕΠΙΣΤΗΜΙΟ ΘΕΣΣΑΛΙΑΣ  
ΒΙΒΛΙΟΘΗΚΗ



004000134367