



ΕΛΛΗΝΙΚΟ ΜΕΣΟΓΕΙΑΚΟ ΠΑΝΕΠΙΣΤΗΜΙΟ  
ΣΧΟΛΗ ΓΕΩΠΟΝΙΚΩΝ ΕΠΙΣΤΗΜΩΝ  
ΤΜΗΜΑ ΓΕΩΠΟΝΙΑΣ

## **ΜΕΤΑΠΤΥΧΙΑΚΗ ΔΙΑΤΡΙΒΗ**

**«ΜΕΤΑΒΟΛΙΚΗ ΚΑΙ ΦΩΤΟΣΥΝΘΕΤΙΚΗ ΜΕΛΕΤΗ ΤΗΣ  
ΕΠΙΔΡΑΣΗΣ ΤΗΣ ΑΥΞΗΜΕΝΗΣ ΑΛΑΤΟΤΗΤΑΣ ΣΤΗΝ ΚΡΗΤΙΚΗ  
ΠΟΙΚΙΛΙΑ *P. VULGARIS* VAR. ΑΣΠΡΟΚΟΛΙ»**

**ΕΛΠΙΔΑ ΚΑΛΛΙΟΠΗ ΓΑΛΑΝΑΚΗ**

**Πρόγραμμα Μεταπτυχιακών Σπουδών  
"Εφαρμοσμένη Επιστήμη και Τεχνολογία στη Γεωπονία"**

ΜΑΙΟΣ, 2023





**ΜΕΛΗ ΕΠΙΤΡΟΠΗΣ ΑΞΙΟΛΟΓΗΣΗΣ**

1. ΟΝΟΜΑΤΕΠΩΝΥΜΟ: ΔΡΑΓΑΣΑΚΗ ΜΑΓΔΑΛΗΝΗ  
ΙΔΙΟΤΗΤΑ ΕΠΙΚΟΥΡΗ ΚΑΘΗΓΗΤΡΙΑ  
ΙΔΡΥΜΑ/ΦΟΡΕΑΣ ΕΛΛΗΝΙΚΟ ΜΕΣΟΓΕΙΑΚΟ ΠΑΝΕΠΙΣΤΗΜΙΟ
2. ΟΝΟΜΑΤΕΠΩΝΥΜΟ: ΚΟΝΤΑΞΑΚΗΣ ΕΜΜΑΝΟΥΗΛ  
ΙΔΙΟΤΗΤΑ ΕΠΙΚΟΥΡΟΣ ΚΑΘΗΓΗΤΗΣ  
ΙΔΡΥΜΑ/ΦΟΡΕΑΣ ΕΛΛΗΝΙΚΟ ΜΕΣΟΓΕΙΑΚΟ ΠΑΝΕΠΙΣΤΗΜΙΟ
3. ΟΝΟΜΑΤΕΠΩΝΥΜΟ: ΛΟΥΛΑΚΑΚΗΣ ΚΩΝΣΤΑΝΤΙΝΟΣ  
ΙΔΙΟΤΗΤΑ ΚΑΘΗΓΗΤΗΣ, ΑΝΑΠΛΗΡΩΤΗΣ ΠΡΟΕΔΡΟΣ ΤΜΗΜΑΤΟΣ  
ΙΔΡΥΜΑ/ΦΟΡΕΑΣ ΕΛΛΗΝΙΚΟ ΜΕΣΟΓΕΙΑΚΟ ΠΑΝΕΠΙΣΤΗΜΙΟ

**ΤΟ ΈΡΓΟ ΑΥΤΟ ΥΛΟΠΟΙΗΘΗΚΕ ΣΤΟ ΕΡΓΑΣΤΗΡΙΟ ΒΙΟΧΗΜΕΙΑΣ & ΒΙΟΤΕΧΝΟΛΟΓΙΑΣ ΦΥΤΩΝ ΤΟΥ ΤΜΗΜΑΤΟΣ ΓΕΩΠΟΝΙΑΣ, ΤΗΣ ΣΧΟΛΗΣ ΓΕΩΠΟΝΙΚΩΝ ΕΠΙΣΤΗΜΩΝ ΤΟΥ ΕΛΜΕΠΑ ΜΕ ΤΗΝ ΕΠΙΣΤΗΜΟΝΙΚΗ ΥΠΟΣΤΗΡΙΞΗ ΤΟΥ ΕΡΓΑΣΤΗΡΙΟΥ ΒΙΟΧΗΜΕΙΑΣ ΦΥΤΩΝ ΚΑΙ ΦΩΤΟΒΙΟΛΟΓΙΑΣ ΤΟΥ ΤΜΗΜΑΤΟΣ ΒΙΟΛΟΓΙΑΣ ΤΟΥ ΠΑΝΕΠΙΣΤΗΜΙΟΥ ΚΡΗΤΗΣ**



Στην κα Ελένη Ναβακούδη,  
την ευχαριστώ.

# ΠΡΟΛΟΓΟΣ

## Η

παρούσα Μεταπτυχιακή Διατριβή ξεκίνησε και ολοκληρώθηκε στο εργαστήριο Βιοχημείας & Βιοτεχνολογίας Φυτών του Τμήματος Γεωπονίας της Σχολής Γεωπονικών Επιστημών του Ελληνικού Μεσογειακού Πανεπιστημίου με την επιστημονική υποστήριξη του εργαστηρίου Βιοχημεία Φυτών και Φωτοβιολογίας του τμ. Βιολογίας παν/μίου Κρήτης. Αυτή τη στιγμή που το έργο έχει ολοκληρωθεί, θα ήθελα να ευχαριστήσω τον καθηγητή Κωνσταντίνο Λουλακάκη για την ευκαιρία που μου έδωσε ως προς την εποπτεία εκπόνησης της διπλωματικής διατριβής μου. Επιπρόσθετα, θα ήθελα να ευχαριστήσω την κα Ελένη Ναβακούδη για την υποστήριξη και τον προσωπικό χρόνο της που μου παρείχε στον σχεδιασμό και στην υλοποίηση του πειραματικού μέρους της διατριβής. Τέλος, αναμφίβολα πολλά ευχαριστώ αξίζουν στους φίλους και την οικογένεια μου για την ψυχολογική ενίσχυση σε όλο το δύσκολο έργο δημιουργίας της διατριβής.

# ΠΕΡΙΕΧΟΜΕΝΑ

<b>ΠΡΟΛΟΓΟΣ</b>	<b>VI</b>
<b>ΠΕΡΙΕΧΟΜΕΝΑ</b>	<b>VII</b>
<b>ΛΙΣΤΑ ΣΥΝΤΟΜΕΥΣΕΩΝ</b>	<b>IX</b>
<b>ΠΕΡΙΛΗΨΗ</b>	<b>X</b>
<b>1 ΕΙΣΑΓΩΓΗ</b>	<b>12</b>
1.1 ΦΥΤΑ, ΠΕΡΙΒΑΛΛΟΝ ΚΑΙ ΚΑΤΑΠΟΝΗΣΗ	12
1.2 ΑΝΤΑΠΟΚΡΙΣΗ ΦΥΤΩΝ ΣΤΗΝ ΚΑΤΑΠΟΝΗΣΗ	13
1.2.1 ΤΟ ΑΡΧΙΚΟ ΕΡΕΘΙΣΜΑ, ΣΗΜΑΤΟΔΟΤΗΣΗ ΚΑΙ ΦΥΣΙΟΛΟΓΙΚΗ ΑΝΤΙΔΡΑΣΗ	15
1.2.2 ΜΗΧΑΝΙΣΜΟΙ ΑΜΥΝΑΣ	16
1.3 ΑΛΑΤΟΤΗΤΑ	17
1.3.1 ΦΥΤΑ ΚΑΙ ΑΛΑΤΟΤΗΤΑ	21
1.4 <i>FHASEOLUS VULGARIS</i>	25
1.5 ΣΤΟΧΟΙ ΤΗΣ ΠΤΥΧΙΑΚΗΣ ΕΡΓΑΣΙΑΣ	29
<b>2 ΥΛΙΚΑ ΚΑΙ ΜΕΘΟΔΟΙ</b>	<b>30</b>
2.1 ΦΥΤΙΚΟ ΥΛΙΚΟ	30
2.2 ΠΕΙΡΑΜΑΤΙΚΕΣ ΜΕΤΑΧΕΙΡΙΣΕΙΣ	30
2.3 ΕΠΑΓΩΓΙΚΟΣ ΦΘΟΡΙΣΜΟΣ-ΦΥΣΙΚΟΧΗΜΙΚΕΣ ΑΝΑΛΥΣΕΙΣ ΤΗΣ ΜΟΡΙΑΚΗΣ ΔΟΜΗΣ ΚΑΙ ΛΕΙΤΟΥΡΓΙΑΣ ΤΟΥ ΦΩΤΟΥΝΘΕΤΙΚΟΥ ΜΗΧΑΝΙΣΜΟΥ	34
2.4 ΠΟΣΟΤΙΚΗ ΕΚΤΙΜΗΣΗ ΠΡΩΤΕΪΝΩΝ	38
2.5 ΠΟΣΟΤΙΚΗ ΕΚΤΙΜΗΣΗ ΧΛΩΡΟΦΥΛΛΩΝ	38
2.6 ΠΟΣΟΤΙΚΗ ΕΚΤΙΜΗΣΗ ΟΛΙΚΩΝ ΣΑΚΧΑΡΩΝ	39
2.7 ΠΟΣΟΤΙΚΗ ΕΚΤΙΜΗΣΗ ΦΑΙΝΟΛΙΚΩΝ	40
2.8 ΠΟΣΟΤΙΚΗ ΕΚΤΙΜΗΣΗ ΑΣΚΟΡΒΙΚΟΥ	40
2.9 ΠΟΣΟΤΙΚΗ ΕΚΤΙΜΗΣΗ ΤΩΝ ΠΟΛΥΑΜΙΝΩΝ	42



<b>3</b>	<b>ΑΠΟΤΕΛΕΣΜΑΤΑ ΚΑΙ ΣΥΖΗΤΗΣΗ</b>	<b>44</b>
3.1	ΟΡΑΤΑ ΣΥΜΠΤΩΜΑΤΑ	45
3.2	ΕΠΑΓΩΓΙΚΟΣ ΦΘΟΡΙΣΜΟΣ	48
3.3	ΧΛΩΡΟΦΥΛΛΗ	55
3.4	ΠΡΩΤΕΪΝΕΣ	57
3.5	ΟΛΙΚΑ ΣΑΚΧΑΡΩΝ	59
3.6	ΦΑΙΝΟΛΙΚΑ	60
3.7	ΑΣΚΟΡΒΙΚΟ ΟΞΥ	61
3.8	ΠΟΛΥΑΜΙΝΕΣ	64
<b>4</b>	<b>ΣΥΜΠΕΡΑΣΜΑΤΑ – ΜΕΛΛΟΝΤΙΚΕΣ ΕΡΓΑΣΙΕΣ</b>	<b>66</b>
4.1	<u>ΣΤΡΑΤΗΓΙΚΕΣ ΑΠΟΚΑΤΑΣΤΑΣΗΣ ΚΑΙ ΔΙΑΧΕΙΡΙΣΗΣ</u>	<u>66</u>
4.2	<u>ΤΕΛΙΚΑ ΣΥΜΠΕΡΑΣΜΑΤΑ</u>	<u>67</u>
	<b>ΒΙΒΛΙΟΓΡΑΦΙΑ</b>	<b>70</b>

## ΛΙΣΤΑ ΣΥΝΤΟΜΕΥΣΕΩΝ

**Πίνακας 1:** Οι συντομεύσεις που χρησιμοποιούνται μέσα στο κείμενο και στις Εικόνες / Σχήματα

<b>Σύντμηση</b>	<b>Πλήρες όνομα</b>
PA <sub>s</sub>	πολυαμίνες
Spd	σπερμιδίνη
Spm	σπερμίνη
Put	πουτρεσκίνη
PS II	φωτοσυστημα II
ROS	Ενεργές Ρίζες Οξυγόνου
SOD	Υπεροξειδική δισμουτάση
CAT	Καταλάση
GPX	Υπεροξειδάση της γλουταθειόνης
APX	Ασκορβική υπεροξειδάση
GR	Αναγωγή γλουταθειόνης

# ΠΕΡΙΛΗΨΗ

Τα φυτά εκτίθενται συχνά σε μια πληθώρα δυσμενών περιβαλλοντικών συνθηκών, που ονομάζονται αβιοτικές καταπονήσεις και ως εκ τούτου είναι σοβαρές απειλές για τη βιωσιμότητα της απόδοσης των καλλιεργειών. Η αλατότητα του εδάφους και του νερού, μια από τις πιο σοβαρές αβιοτικές καταπονήσεις η οποία περιορίζει την παραγωγή θέτοντας σε κίνδυνο την διατροφική επάρκεια του πλανήτη ενώ αναμένεται να έχει καταστροφικές παγκόσμιες επιπτώσεις απώλειας γης έως και 50% τις επόμενες δύο δεκαετίες. Οι δυσμενείς επιπτώσεις της αλατότητας έχουν αποδοθεί κυρίως στην αύξηση ιόντων νατρίου ( $\text{Na}^+$ ) και του χλωρίου ( $\text{Cl}^-$ ) τα οποία δημιουργούν κρίσιμες συνθήκες για την επιβίωση των φυτών αναχαιτίζοντας πλήθος μεταβολικών διεργασιών. Η ανταπόκριση ενός φυτού στο στρες του αλατιού εξαρτάται από τον γονότυπο, το στάδιο ανάπτυξης, την ιδιαιτερότητα της φύσης των ιόντων που προκαλούν το στρες, την ένταση και διάρκειά του. Η αυξημένη αλατότητα έχει ποικίλες επιδράσεις στη φυσιολογία των φυτών ως απόκριση σε περεταίρω καταπονήσεις όπως το οσμωτικό στρες, η διατροφική και ορμονική ανισορροπία και η οξειδωτική βλάβη. Εκτός από τα ανώτερα μέρη του φυτού, η αλατότητα επηρεάζει επίσης την ανάπτυξη και τη φυσιολογία των ριζών και τη λειτουργία τους στην πρόσληψη θρεπτικών συστατικών. Το αποτέλεσμα αυτών των επιπτώσεων μπορεί να προκαλέσουν αποδιοργάνωση των κυτταρικών μεμβρανών, αναστολή της φωτοσύνθεσης, δημιουργία τοξικών μεταβολιτών και μείωση της απορρόφησης θρεπτικών συστατικών, οδηγώντας τελικά σε θάνατο των φυτών. Στην παρούσα εργασία μελετήθηκαν οι πρώτες αποκρίσεις όσον αφορά στη φωτοσύνθεση και σε καίριους μεταβολικούς παράγοντες φυτών φασολιάς της τοπικής ποικιλίας Ασπροκόλι σε συνθήκες αυξημένης αλατότητας. Σύμφωνα με ό,τι γνωρίζουμε μέχρι τώρα, η ποικιλία αυτή χρησιμοποιείται για πρώτη φορά σε μελέτη αλατότητας. Ο σκοπός της παρούσας μελέτης είναι διττός: α) να αποσαφηνιστούν τα όρια ανοχής της ποικιλίας αυτής στην αλατότητα για λόγους γεωπονικού και γεωργικού ενδιαφέροντος και β) να μελετηθούν οι πρώτες αντιδράσεις της βιολογίας ενός φυτού όσον αφορά στις αλλαγές που επάγονται στο μεταβολισμό και τη φωτοσύνθεση, με την επίδραση ήπιας έως έντονης καταπόνησης από αλατότητα

# 1 ΕΙΣΑΓΩΓΗ

## 1.1 Φυτά, περιβάλλον και καταπόνηση

Τα φυτά ανηκουν στους οργανισμούς με την σπουδαιότερη σημασία για τον πλανήτη καθώς όλοι οι υπόλοιποι οργανισμοί, είτε άμεσα είτε έμμεσα, εξαρτώνται από αυτά. Εξαιτίας της μακροχρόνιας παρουσίας τους, ο πολλαπλασιασμός τους έχει δημιουργήσει μια μεγάλη ποικιλότητα ανα τον κόσμο όπου τους έχει δοθεί η ευκαιρία να εκτεθούν και να προσαρμοστούν σε συγκεκριμένες συνθήκες περιβάλλοντος. Τετοιες συνθήκες χαρακτηρίζονται ως ιδανικές, στις οποίες τα φυτά αποδίδουν τα μέγιστα καθόλη την διάρκεια του βιολογικού τους κύκλου. Οι ιδανικές αυτές συνθήκες διαφέρουν πολύ ανάμεσα στα είδη αλλά και στα γένη εξαιτίας των διακριτών γεωγραφικών διαφοροποιήσεων των περιοχών που αποτελούν το περιβάλλον τους. Το γεγονός αυτό βοηθάει στην ταξινόμηση ποικιλιών με διαφορετικά όρια αντοχής από τα οποία εξαρτάται η εκκίνηση και ο τερματισμός του βιολογικού τους κύκλου καθώς και η συμπεριφορά τους μέσα σε αυτών (Ρουμπελάκη Αγγελάκη, 2018). Κατά την εξέλιξη των βιολογικών σταδίων ανάπτυξης, πληθώρα περιβαλλοντικών συνθηκών, ως προς τον αριθμό και το είδος θα αλληλεπιδράσουν με τον φυτικό οργανισμό. Οι βιοτικές ή αβιοτικές καταπονήσεις που θα υποστούν απο το περιβάλλον τους, δημιουργούν καθοριστικές πιέσεις στα φυτά ώστε να επηρεάσουν ακόμα και στην γονιδιακή έκφρασή τους με τις ακόλουθες βιοχημικές μετατροπές στα μονοπάτια που επηρεάζουν την φυσιολογία και την μορφολογία τους

(Καραμπουρνιώτης, 2012). Οι τροποποιήσεις και ο τρόπος αντίδρασης των φυτών σε μία ή περισσότερες καταπονήσεις θα καθορίσει την πιθανή προσαρμογή και επιβίωσή τους.

Το ζήτημα της επισιτιστικής επάρκειας εξαιτίας της πληθυσμιακής αύξησης αλλά και οι ποιοτικές απαιτήσεις των καταναλωτών χάρη στο ανώτερο μορφωτικό τους επίπεδο έχουν στρέψει το ενδιαφέρον της έρευνας στον αγροδιατροφικό τομέα. Η αστική ανάπτυξη και οι περιβαλλοντικές επιπτώσεις που την ακολουθούν καθώς και τα μεγαλύτερης κλίμακας και συχνότητας ακραία κλιματικά φαινόμενα έχουν γενικότερα απειλήσει την παραγωγή σε μεγάλο βαθμό. Εξαιτίας των ανεξέλεγκτων ανθρώπινων παρεμβάσεων και την σύνδεσή τους με το κλίμα, οι αβιοτικές καταπονήσεις (και οι βιοτικές) μοιραία ευνοούν στην επικράτηση ανθεκτικότερων καλλιεργειών σε αντίξοες περιβαλλοντικές συνθήκες (Peleg et al., 2011, Hasanuzzaman et al., 2013). Όλο το σύστημα φυσιολογίας των φυτών από το ερέθισμα, στη σηματοδότηση, στην αντίδραση και τελικά στην επιβίωση του φυτού αποτελεί σημείο αιχμής στην έρευνα για την δημιουργία ανθεκτικών φυτικών ειδών και αρκετά παραγωγικότερων σε ένα κόσμο όπου το κλίμα συνεχώς αλλάζει.

## **1.2 Ανταπόκριση φυτων στην καταπόνηση**

Μία δυνητικά επιβλαβής απειλή με την οποία έρχεται αντιμέτωπος ένας φυτικός οργανισμός, του δημιουργεί βιολογική διαταραχή ως έκφραση της πίεσης που του ασκήθηκε πριν φανερωθούν τα πιθανά αποτελέσματα της βλάβης. Η αντίληψη και η αντίδραση των φυτών έναντι του κινδύνου της καταπόνησης οφείλεται στην ικανότητα τους να προσλαμβάνουν και να μεταφέρουν στο εσωτερικό τους μηνύματα ώστε να ενεργοποιηθούν οι μηχανισμοί επιβίωσης (Ρουμπελάκη Αγγελάκη, 2018). Η ικανότητα αντίδρασης ενός φυτού σε ένα δυσμενώς μεταβαλλόμενο περιβάλλον έχει διακριτές διαφορές ανάμεσα στα φυτικά είδη και αυτό καθορίζεται από πολλούς παράγοντες. Πρώτα και κύρια ανάμεσα στους φυτικούς γονότυπους υπάρχουν γενετικά καθορισμένα χαρακτηριστικά όπου μέσω των γονιδίων μπορούν να εκφραστούν και να επηρεάσουν καθοριστικά την συμπεριφορά τους απέναντι σε κάποιο ερέθισμα (Perin et al., 2019). Επιπροσθέτως, το στάδιο ανάπτυξης του συγκεκριμένου φυτικού ιστού όπως επίσης οι συνθήκες κατα τις οποίες αναπτύσσεται επιδρούν σε μεγάλο βαθμό στην αντίδρασή του. Η ένταση και η συχνότητα πίεσης που δέχεται το φυτό από ένα ή περισσότερους παράγοντες καταπόνησης μπορεί να έχουν προσθετικό ή συνεργιστικό αποτέλεσμα στο είδος και στο

αποτέλεσμα της ανταπόκρισης του φυτού σε αυτές τις αντίξοες συνθήκες (Peleg et al., 2011, Καραμπουρνιώτης, 2012).

Η έκφραση της διαταραχής του φυτού, ανεξάρτητα από το είδος της καταπόνησης, ξεκινάει με το στάδιο του συναγερμού όπου ο μεταβολισμός αντιλαμβάνεται την διαταραχή της εύρυθμης λειτουργίας του και οδηγείται σε οξεία βλάβη. Εάν καταφέρει να αντιδράσει μπορεί να αποφευχθεί η οξεία βλάβη και να παρουσιάσει αντοχή οι οποία μεταφράζεται είτε με την προσαρμογή είτε με τον εγκλιματισμό είτε με την επιδιόρθωση (Qaderi et al., 2023). Παρόλη την προσπάθεια αντοχής υπάρχει πάντα και η πιθανότητα της εξάντλησης εξαιτίας ίσως της υπερβολικής πίεσης που προκαλεί η καταπόνηση, κυρίως όταν είναι μακροχρόνια, είτε λόγω της υπερπροσπάθειας του φυτού να προσαρμοστεί. Κάποιοι φυτικοί οργανισμοί παρουσιάζουν ανάνηψης ή αναγέννησης κατά το οποίο παρουσιάζεται μερική ή και ολοκληρωτική επαναφορά των φυσιολογικών λειτουργιών μετά την αναστολή της πίεσης (Ρουμπελάκη Αγγελάκη, 2018).

Οι μεταβολές που θα προκληθούν από την αντίδρασή είναι πιθανό σε κάποιους φυτικούς οργανισμούς, σε συνδυασμό με την χρονική έκθεση σε ανάλογες συνθήκες, να παρουσιάσουν κληρονομικότητα στις επόμενες γενιές. Σε αυτή την περίπτωση, η καταπόνηση που δεχτηκε το φυτό πιθανών ξεκλείδωσε ειδικές ορμόνες και αγγελιοφόρες ενώσεις με αποτέλεσμα την αναδιοργάνωση του DNA για την προσαρμογή του (Savita et al., 2021). Η αποκωδικοποίηση των μηχανισμών αντίδρασης που αφορούν ένα πολύπλοκο σύστημα βιολογικών διασυνδέσεων και αλληλεπιδράσεων βρίσκεται σε εξέλιξη στα αρχικά στάδια έρευνας. Ο τρόπος αντίδρασης και το μέγεθος της απαντησης του φυτού είναι ανάλογο με το μέγεθος της εκθεσης και την ενταση αντίληψης από τον δέκτη. Χαριν τούτου οι καταπονήσεις διαχωρίζονται σε ευοίωνες που αφορούν πιο ήπιες μορφές, ικανές να διεγείρουν θετικά τον μεταβολισμό (Perin et al., 2019) και τις δυσοίωνες οι οποίες είναι ισχυρά βλαβερές για την εύρυθμη λειτουργία και μορφολογία του φυτού (Li et al., 2021). Αν το φυτό δεν καταφέρει να ανταπεξέλθει στην περιβαλλοντική πίεση τότε επέρχεται η βλάβη με την οποία εκφράζεται ως το αποτέλεσμα της εντασης που δέχτηκε την οποία και δεν είναι δυνατό να αντιμετωπίσει. Η βλάβη μπορεί να είναι παροδική (ελαστική) όπου μπορεί να αποκατασταθεί στα φυσιολογικά επίπεδα αφού περάσει η καταπόνηση, είτε μόνιμη (πλαστική) όταν τα αποτελέσματα είναι μη αναστρέψιμα (Ρουμπελάκη Αγγελάκη, 2018).

### **1.2.1 Το αρχικό ερέθισμα, σηματοδότηση και φυσιολογική αντίδραση**

Σε ένα φυτό που ζει και αναπτύσσεται φυσιολογικά στο περιβάλλον του κατά την εμφάνιση μια καταπόνησης δίνεται το ερέθισμα και η μετάδοση ενός σήματος μέσα στα φυτικά κύτταρα για να ενεργοποιηθούν οι μεταβολικοί οδοί αντιμετώπισης ή να εκφραστούν τα κατάλληλα γονίδια. Τα φυτά διαθέτουν εξειδικευμένους δέκτες για να αντιληφθούν τις συνθήκες του περιβάλλοντός τους ώστε στην περίπτωση της καταπόνησης να σηματοδοτηθεί μια σειρά αντιδράσεων για να επιτευχθεί ο εγκλιματισμός. Όταν δοθεί το εξωτερικό ερέθισμα μεταβάλλονται οι αισθητήρες αναγνώρισης σήματος και αυτό αποτελεί το πρώτο στάδιο της αντίληψης. Στην συνέχεια μεσολαβούν πολλαπλές αντιδράσεις μέχρι να ανταποκριθεί ο φυτικός οργανισμός και να πραγματοποιήσει την μεταγωγή του σήματος. Σε αυτό το στάδιο πραγματοποιούνται ελεγχόμενες μεταβολικές αλλαγές και διαβιβάζονται μηνύματα από την περιοχή του δέκτη στις καθορισμένες περιοχές απάντησης. Η μεταφορά του μηνύματος μπορεί να γίνει είτε σε διαφορετικές περιοχές του κυττάρου είτε μέσω διαφορετικών κυττάρων. Στο στάδιο της μεταγωγής παρατηρείται γονιδιακή έκφραση και σύνθεση νέων οικογενειών πρωτεϊνών γνωστές και ως πρωτεΐνες καταπόνησης. Η μεταβολή στην έκφραση γονιδίων οδηγεί στην ενίσχυση του σήματος μέσω βιοχημικών και μοριακών διεργασιών. Η σύνθεση των πρωτεϊνών καταπόνησης αλλά και η τροποποίηση της ενζυμικής δραστηριότητας διαφοροποιούν την μεταβολική οδό του οργανισμού. Η μεταγωγή του σήματος και γενικά η ρύθμιση των αντιδράσεων του φυτού στην καταπόνηση είναι ως ένα βαθμό συνδεδεμένες με ορμονική δραστηριότητα (Καραμπουρνιώτης, 2012, Ρουμπελάκη - Αγγελάκη, 2018). Η αύξηση και η μείωση των ορμονών πραγματοποιείται μετά την γονιδιακή έκφραση και την συνεπακόλουθη αλλαγή της ενζυμικής σύνθεσης. Τα ένζυμα στην συνέχεια συμμετέχουν στην σύνθεση ή αποδόμηση ορμονών. Από τα πιο σύνηθες παραδείγματα της ορμονικής δραστηριότητας είναι όταν ένας παράγοντας καταπόνησης, όπως η αύξηση της αλατότητας στο περιβάλλον της ρίζας, προκαλεί κλείσιμο το στοματίων στα φύλλα με απώτερο στόχο την μείωση της διαπνοής. Όταν αυτό συμβαίνει αυξάνεται η συγκέντρωση του αμπισικού οξέος (ABA) στο βλαστό και μειώνονται οι κυτοκινίνες που μεταφέρονται από την ρίζα στο βλαστό (Lovelli et al., 2013). Ο ρόλος των ορμονών δεν περιορίζεται μόνο στην μεταφορά μηνυμάτων. Ορμόνες και η σχέση αλληλεξάρτησης μεταξύ τους εντοπίζονται σε όλα τα διαφορετικά στάδια αντίδρασης του φυτού στην καταπόνηση με ιδιαίτερα σημαντικό ρόλο στάδια του συναγερμού και της ανάνηψης. Ιδιαίτερο ενδιαφέρον παρουσιάζει το ABA σε συγκεκριμένες αβιοτικές καταπονήσεις

συμπεριλαμβανομένης και της αλατότητας όπου η ανοχή των φυτών ήταν ανάλογη με την συγκέντρωση της ορμόνης. Το ABA είναι ακόμη υπεύθυνο για αναπτυξιακές μεταβολές στην ρίζα και στο βλαστό όπως και στην σύνθεση πρωτεϊνών και λιπιδίων (Shevyakova et al., 2013, Perin et al., 2019). Οι ειδικές ρυθμιστικές πρωτεΐνες που συντίθενται αμέσως μετά την έκθεση του φυτού στην καταπόνηση οφείλονται στην επαγωγή ή την καταστολή έκφρασης γονιδίων που ελέγχονται από τις οδούς μεταγωγής σημάτων. Κάποιες παραγόμενες πρωτεΐνες είναι κοινές σε διαφορετικές αβιοτικές καταπονήσεις, όπως είναι η ωσμωτίνη και οι LEA όμως υπάρχουν και εξειδικευμένες που σχετίζονται με συγκεκριμένα είδη όπως οι *de novo* απο αλατότητα που δραστηριοποιούνται ως συμβατοί κυτταροπλασματικοί ωσμωλύτες. Οι περισσότερες παραγόμενες πρωτεΐνες καταπόνησης αποδομούνται αμέσως μετά την ενδεχόμενη προστασία που παρέχουν στο φυτό (Hasanuzzaman et al., 2013, Shevyakova et al., 2013, Perin et al., 2019).

### 1.2.2 Μηχανισμοί άμυνας

Οι φυτικοί οργανισμοί για να ανταπεξέλθουν σε δυσμενείς συνθήκες υιοθετούν ποικίλες στρατηγικές άμυνας. Καποιοι φυτικοί οργανισμοί παρουσιάζουν μηχανισμούς αποφυγής με αποτέλεσμα να αναστέλλουν την επίδραση της καταπόνησης σε κυτταρικό επίπεδο και να μειώνουν την έκθεση στην καταπόνηση. Τα φυτά εκείνα διαφοροποιούνται συνήθως μορφολογικά δημιουργώντας κατάλληλες συνθήκες για επιβίωση όπως για παράδειγμα μακρύτερες ρίζες προς αναζήτηση νερού σε βαθύτερα στρώματα κατά την περίοδο λειψυδρίας. Σε αυτή την κατηγορία μπορούν να συμπεριληφθούν και τα φυτά που ολοκληρώνουν ετήσια τον βιολογικό τους κύκλο σε ευνοϊκές για αυτά συνθήκες αποφεύγοντας την χρονική περίοδο της καταπόνησης χρησιμοποιώντας μια στρατηγική διαφυγής ώστε να επιβιώσουν (Καραμπουρνιώτης et al., 2012). Όταν όμως τα φυτικά κύτταρα έρθουν σε φυσικοχημική ισορροπία με την επίδραση της καταπόνησης σημαίνει ότι διαθέτουν μηχανισμούς ανοχής. Τα φυτά αυτής της κατηγορίας συμπεριφέρονται σαν να αποδέχονται το αποτέλεσμα της αβιοτικής καταπόνησης, την πλήρη αφυδάτωση του πρωτοπλάσματος για παράδειγμα, ενώ συνεχίζουν τον βιολογικό τους κύκλο με φυσιολογικούς ρυθμούς. Απο την άλλη πλευρά τα φυτά τα οποία παρουσία των παραγόντων καταπόνησης διατηρούν τις φυσιολογικές λειτουργίες τους με μεγαλύτερη μεταβολική δραστηριότητα από όταν θα ήταν στις ευνοϊκές τους συνθήκες θεωρούνται ότι αναπτύσσουν ανθεκτικότητα ως μηχανισμό

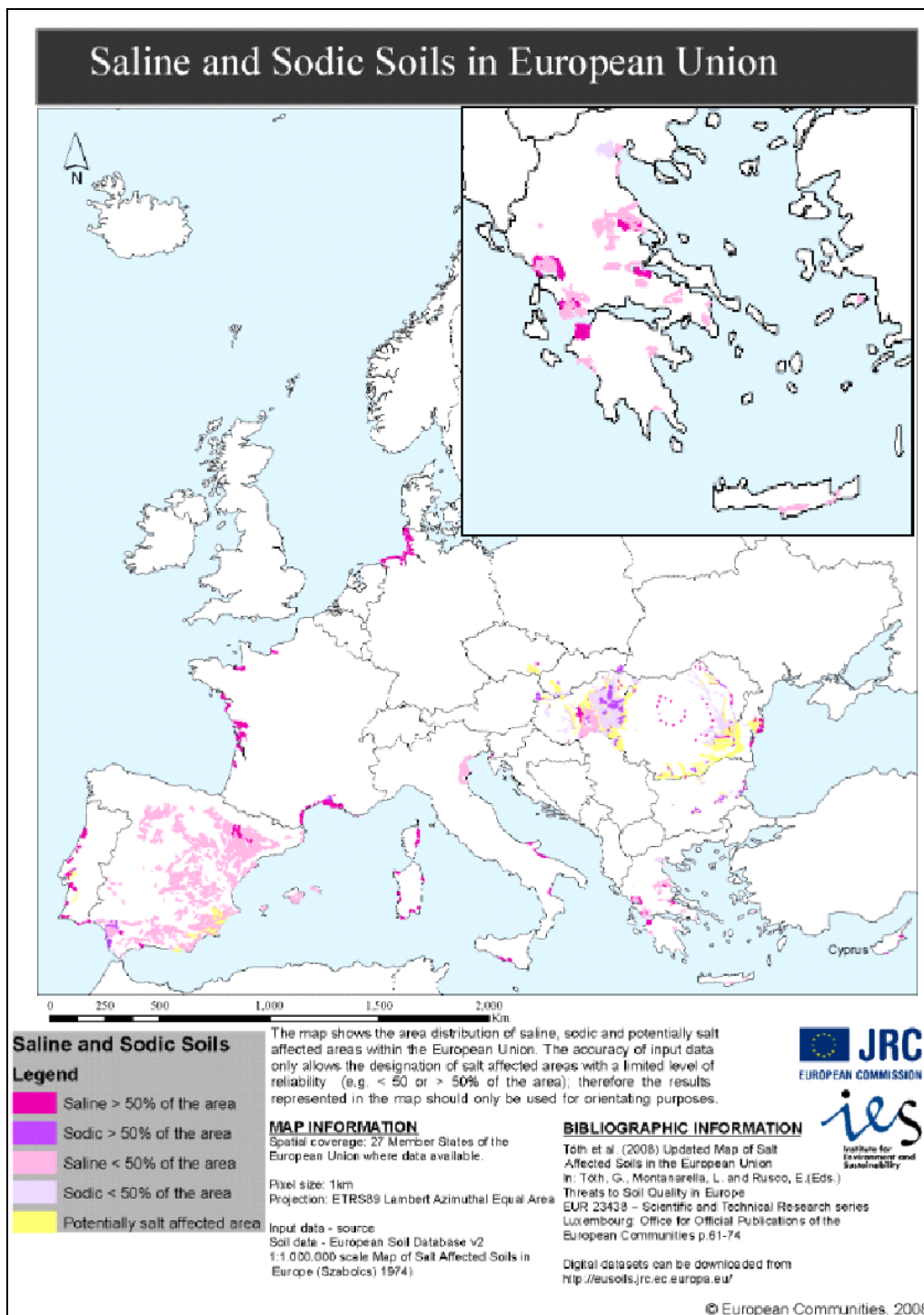


αντιμετώπισης. Η αντοχή που παρουσιάζουν οι φυτικοί οργανισμοί αυτής της κατηγορίας οφείλονται σε εγγενείς μηχανισμούς, σε μηχανισμούς προσαρμογής και μηχανισμούς εγκλιματισμού (Καραμπουρνιώτης *et al.*, 2012, Ρουμπελάκη Αγγελάκη, 2018). Οι εγγενείς μηχανισμοί αφορούν στην έκφραση συγκεκριμένων γονιδίων ανεξάρτητα από τις περιβαλλοντικές συνθήκες που επικρατούν όπως είναι η θέση των στοματίων, το βαθύ ριζικό σύστημα κ.α. Οι μηχανισμοί προσαρμογής από την άλλη πλευρά αφορούν μακροχρόνιες αντιδράσεις σε βιοχημικό επίπεδο κατά την βαθμιαία έκθεση των φυτών αυτής της κατηγορίας σε αντίξοες συνθήκες όπως είναι η αντίδραση των χλωροπλαστών στις ποσότητες χρωστικών. Τέλος, οι μηχανισμοί εγκλιματισμού αφορούν ταχείες μεταβολικές αντιδράσεις του φυτικού κυττάρου στο μεταβαλλόμενο περιβάλλον. Σε αυτή την περίπτωση μεταβάλλεται η ομοιόσταση του φυτού με την αύξηση του αναβολισμού και τον περιορισμό των τοξικών υποπροϊόντων. Παραδείγματα εγκλιματισμού θεωρείται η ενεργοποίηση ισοενζύμων κατά την φωτοσύνθεση, η αναδιάταξη φυσιολογικών λειτουργιών και η ωσμωτική προσαρμογή. Επιπρόσθετα, τα φυτά χρησιμοποιούν διάφορους δευτερογενείς μεταβολίτες ως αμυντικό σύστημα ενάντια και σε βιοτικές και σε αβιοτικές καταπονήσεις. Το πλήθος των δευτερογενών μεταβολιτών που θα παραχθούν σχετίζεται σε μεγάλο βαθμό στο είδος μιας μεμονωμένης καταπόνησης και στην αλληλεπίδραση πολλών πιέσεων όπως είναι η αλατότητα, ο έντονος φωτισμός και η αύξηση της θερμοκρασίας (Yang *et al.*, 2018, Qaderi *et al.*, 2023).

### **1.3 Αλατότητα**

Οι αβιοτικές καταπονήσεις παίζουν σπουδαίο ρόλο στην αγροτική οικονομία και στην επισιτιστική επάρκεια του πλανήτη. Μια από τις σημαντικότερες προκλήσεις που αντιμετωπίζει η σημερινή γεωργική πρακτική αφορά στη διαχείριση της αλατότητας και της αλκαλίωσης των εδαφών καθώς ο βαθμός συσσώρευσης αλάτων επιδρά σημαντικά στην γονιμότητα και στην μικροβιακή δραστηριότητα των εδαφών (Haj-Amor *et al.*, 2022). Τα άλατα που μπορούν να συσσωρευτούν στο έδαφος αλλά και στο νερό περιλαμβάνουν χλωριούχο, θειικό, ανθρακικό και διττανθρακικό νάτριο, κάλιο, μαγνήσιο και ασβέστιο (ESDAC, 2023). Το ζήτημα της αλατότητας αποτελεί σοβαρή μορφή υποβάθμισης των εδαφών και απειλεί με ερημοποίηση πάνω από 1 εκατομμύριο εκταρίων στην ΕΕ, εκτάσεις που αφορούν κυρίως τις μεσογειακές χώρες (εικ.1.1). Η αλατότητα του εδάφους, μια από τις πιο σοβαρές αβιοτικές καταπονήσεις, περιορίζει την

παραγωγή περίπου 6 % της συνολικής γης στον κόσμο και 20 % της αρδευόμενης γης (17 % των συνολικών καλλιεργούμενων εκτάσεων) και επηρεάζει αρνητικά την παραγωγή καλλιεργειών παγκοσμίως. Από την άλλη πλευρά, η αυξημένη αλατότητα της γεωργικής γης αναμένεται να έχει καταστροφικές παγκόσμιες επιπτώσεις, με αποτέλεσμα την απώλεια γης έως και 50% τις επόμενες δύο δεκαετίες (Peleg et al., 2011, Hasanuzzaman et al., 2013, Parihar et al., 2015) Η πρωτογενής αλατότητα είναι η συσσώρευση αλατιού μέσω φυσικών διεργασιών εξαιτίας του μητρικού υλικού ή των υπόγειων υδάτων. Η υψηλή συγκέντρωση αλάτων στο έδαφος είναι φυσιολογικό να εντοπιστεί και σε παραθαλάσσιες περιοχές όπου φυτικοί οργανισμοί είναι αναγκαστικά προσαρμοσμένοι σε αυτές τις συνθήκες και χαρακτηρίζονται ως αλόφυτα (IBÁÑEZ et al., 2016, Ρουμπελάκη - Αγγελάκη, 2018). Εν αντιθέσει, η δευτερογενής αλατότητα προκαλείται από ανθρωπογενείς παρεμβάσεις ως συνέπεια της εξατμισοδιαπνοής του αρδευόμενου νερού και συσσωρεύει άλατα στο έδαφος. Η ποικιλομορφία των αλατούχων εδαφών αλλά κυρίως από η μέτρια ή κακή ποιότητα νερού άρδευσης καθώς και από το βαθμό αποστράγγισης θεωρούνται η βασικές πηγές αλατότητας. Η καταπόνηση λόγω της δευτερογενούς αλατότητας είναι μακράν σοβαρότερο πρόβλημα διότι συνεπάγεται η απώλεια γης που άλλοτε ήταν γόνιμη και απειλείται η παραγωγή. Οι πηγές δευτερογενούς αλατότητας δεν είναι δύσκολο να περιγραφτούν. Η έντονη βιομηχανική δραστηριότητα είναι η βασική πηγή διαφόρων ρυπογόνων ουσιών που αποβάλλονται στο περιβάλλον και δημιουργούν πιέσεις στα φυτά μεταξύ αυτών και τα άλατα (Ρουμπελάκη - Αγγελάκη, 2018).



**Εικόνα 1.1:** Γεωγραφική κατανομή αλατούχων εδαφών για την χώρες που ανήκουν στην ΕΕ (ESDAC, 2023). Στο ένθετο ο ελλαδικός χώρος.

Επιπλέον ο ρίψη αλατιού το χειμώνα στους δρόμους δημιουργεί αστική απορροή ενισχύοντας την συγκέντρωση αλατότητας χρησιμοποιώντας των κύκλο του νερού. Στην γεωργική πρακτική εξαιτίας της χρήση νερού κακής ποιότητας αυξάνεται λόγω της λειψυδρίας και των αυξανόμενων αναγκών που έχουν οι καλλιεργούμενες εκτάσεις ειδικά σε ανυδρες ή ημιξηρες περιοχές της Μεσογείου (Καραμπουρνιώτης et al., 2012

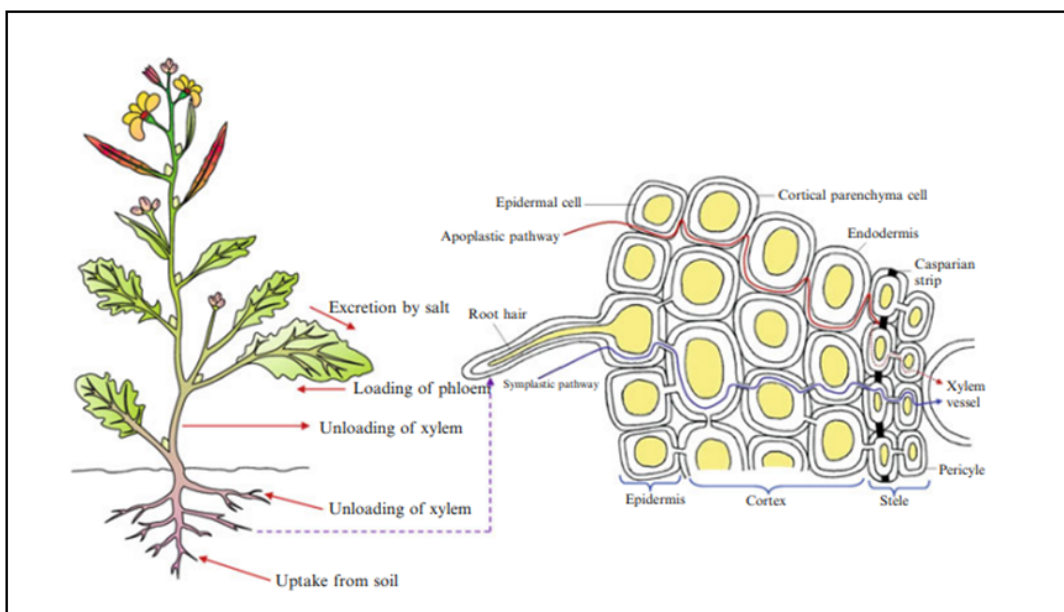
Assimakoroulou et al., 2015, IBÁÑEZ et al., 2016, ESDAC, 2023). Τα εδάφη μπορούν να κατηγοριοποιηθούν σε τέσσερις διακριτές ομάδες ανάλογα τα φυσικά χαρακτηριστικά τους και τις σχέσεις που αναπτύσσουν με τα φυτά λόγω του είδους αλατότητας. Τα αλατούχα εδάφη είναι ο πρώτος τύπος εδάφους και έχουν διαλυτά άλατα κυρίως  $\text{NaCl}$  και  $\text{Na}_2\text{SO}_4$  αλλά και αξιόλογες ποσότητες  $\text{Cl}^-$  και  $\text{SO}_4^{2-}$  του  $\text{Ca}^{2+}$  και  $\text{Mg}^{2+}$ . Σε αυτά τα εδάφη η αρνητική επίδραση των διαλυτών αλάτων είναι μεγάλη ώστε να είναι πολύ δύσκολη η ανάπτυξη των περισσότερων φυτικών ειδών. Μια διαφορετική κατηγορία είναι τα νατριούχα ή αλκαλικά εδάφη που περιέχουν άλατα  $\text{Na}^+$  ικανά για αλκαλική υδρόλυση, κυρίως  $\text{Na}_2\text{CO}_3$ . Άλλος τύπος εδάφους λιγότερης έκτασης ανά τον κόσμο αλλά με ικανή ποσότητα διαλυτών αλάτων είναι τα όξινα-θειικά εδάφη. Αυτά τα εδάφη έχουν  $\text{pH}$  κάτω από 3,5 έως 4,0 και βρίσκονται σε βάθος 50 cm που προκαλείται άμεσα ή έμμεσα από  $\text{H}_2\text{SO}_4$  που σχηματίζεται από την οξείδωση του πυρίτη ( $\text{FeS}_2$ ) ή άλλων ανηγμένων ενώσεων  $S$  που είναι επιταχύνεται από υφάλμυρους και αλμυρούς βάλτους μαγκρόβιων. Εκτός από την υψηλή αλατότητα, αυτό το έδαφος είναι επίσης υπεύθυνο για τις τοξικότητες σιδήρου ( $\text{Fe}$ ) και αλουμινίου ( $\text{Al}$ ) και ανεπάρκεια φωσφόρου ( $\text{P}$ ). Τέλος υπάρχουν και τα υποβαθμισμένα νατριούχα εδάφη τα οποία είναι σε προχωρημένο στάδιο αλάτωσης προκαλούμενο από την έκπλυση των αλάτων. Σε αυτό τον τύπο εδάφους η άργιλος και η οργανική ύλη να μετακινούνται προς τα κατώτερα στρώματα, με αποτέλεσμα το σχηματισμό ενός σκούρου, εξαιρετικά συμπαγούς στρώματος που έχει μια σαφώς καθορισμένη άνω επιφάνεια και συγχωνεύεται σταδιακά στο υπέδαφος μειώνοντας δραματικά την γονιμότητά τους (Hasanuzzaman et al., 2013, Wang et al., 2023). Η αλατότητα προκαλεί οσμωτικό, ιοντικό και οξειδωτικό στρες στα φυτά καθώς και ορμονικές ανισορροπίες. Η συσσώρευση υψηλών συγκεντρώσεων ιόντων, κυρίως  $\text{Na}^+$  και  $\text{Cl}^-$ , που συνήθως πρωτοστατούν στην αύξηση αλατότητας στην ριζόσφαιρα, έχει ως μοιραία συνέπεια την αλλαγή του υδάτινου δυναμικού προκαλώντας οσμωτική καταπόνηση στο φυτό και επιπλέον αδυναμία πρόσληψης θρεπτικών (Boshkovski et al., 2020). Το χαμηλό οσμωτικό δυναμικό ( $\Psi_s$ ) του εδαφικού διαλύματος παρακρατεί το διαθέσιμο νερό με αποτέλεσμα τα φύλλα να αντιλαμβάνονται την ανάγκη μείωσης του δικού τους  $\Psi_s$  για να διατηρήσουν ισορροπία ανάμεσα στο υπόγειο και στο υπέργειο τμήμα τους (Hasanuzzaman et al., 2013, Ρουμπελάκη - Αγγελάκη, 2018). Η αλατότητα δημιουργεί τοξικότητα στα φυτά η οποία εκφράζεται με ανωμαλίες στην διαπερατότητα των μεμβρανών και παρεμπόδιση ενζυμικών δραστηριοτήτων. Όταν διαφοροποιηθεί το ιοντικό περιβάλλον των ενζύμων εκείνα αδρανοποιούνται και σταματούν την σύνθεση

πρωτεϊνών (Al Hassan et al., 2016, Le et al., 2021). Επιπλέον, δυσλειτουργίες σημειώνονται στον φωτοσυνθετικό μηχανισμό και στην αναπνευστική δραστηριότητα ενώ παρατηρούνται και ορατά συμπτώματα στην ομαλή ανάπτυξη των φυτών (Kaymakanova et al., 2008, Chaves et al., 2009, Ibrahimova et al., 2021).

### **1.3.1 Φυτά και αλατότητα**

Τα φυτά δεν έχουν τη δυνατότητα μετακίνησης και επομένως είναι αναγκασμένα να υφίστανται όλες τις αλλαγές που συμβαίνουν στο περιβάλλον τους. Τα περισσότερα φυτά αναπτύσσονται σε περιβαλλοντικές συνθήκες που είναι, σε σημαντικό βαθμό, δυσμενείς για την ανάπτυξή τους. Έτσι, είναι σε θέση να «αισθανθούν» τις περιβαλλοντικές αλλαγές και στη συνέχεια να «ανταποκρίνονται» στο παράγοντα καταπονηση όμως λόγω της στασιμής φύσης τους, μπορούν να αντιδράσουν μεταβολικά και δομικά. Η ξηρασία, η αλατότητα, οι ακραίες θερμοκρασίες και το οξειδωτικό στρες είναι συχνά αλληλένδετες καταπονήσεις όπου μεμονωμένα ή σε συνδυασμό προκαλούν κυτταρική βλάβη (Jajoo, 2013). Κάθε περιβαλλοντικός παράγοντας έχει συνήθως ένα ελάχιστο και μέγιστο επίπεδο, πέρα από το οποίο τα φυτά δεν μπορούν να επιβιώσουν. Η συσσώρευση αλάτων, ιδιαίτερα αλάτων νατρίου, είναι μία από τις κύριες φυσιολογικές απειλές για τα οικοσυστήματα. Το αλάτι εμποδίζει, περιορίζει ή διαταράσσει τον φυσιολογικό μεταβολισμό, την ποιότητα του νερού και την πρόσληψη θρεπτικών συστατικών ενώ η υπερβολική ποσότητα αλατιού στα καλλιεργούμενα εδάφη οδηγεί ακόμη και τα φυτά στο θάνατο (Peleg et al., 2011, Parihar et al., 2015). Όταν το νερό που περιέχει μεγάλη ποσότητα διαλυμένου αλατιού έρχεται σε επαφή με ένα φυτικό κύτταρο, η πρωτοπλασματική επένδυση θα συρρικνωθεί. Αυτή η δράση, γνωστή ως πλασμόλυση, αυξάνεται με τη συγκέντρωση του άλατος. Επιπλέον, τα άλατα νατρίου μπορεί να είναι διαβρωτικά και τοξικά για τον οργανικό ιστό. Η φύση του αλατιού, το είδος του φυτού, η ποικιλία, το στάδιο ανάπτυξης και οι υπόλοιποι περιβαλλοντικοί παράγοντες καθορίζουν τα όρια αντοχής των φυτών (Bayuelo-Jiménez et al., 2002, Arkadiusz et al., 2008, ESDAC, 2023). Οι αρνητικές επιπτώσεις της αλατότητας προκαλούνται κυρίως από ιόντα  $Na^+$  και  $Cl^-$  στα φυτά τα οποία παράγουν τις καθοριστικές συνθήκες για την επιβίωση των φυτών αναχαιτίζοντας διαφορετικούς φυτικούς μηχανισμούς. Ανάμεσα στα διάφορα είδη των φυτών ξεχωρίζουν τα αλόφυτα τα οποία έχουν άριστη φυσιολογική λειτουργία σε συνθήκες υψηλής αλατότητας και τα γλυκόφυτα, φυτά τα οποία δεν μπορούν ή

δυσκολεύονται να επιβιώσουν σε αντίστοιχες συνθήκες καθώς οι μηχανισμοί αντοχής που διαθέτουν δεν είναι αποτελεσματική στο χρόνο δράσης τους (Peleg et al., 2011, Rasool et al., 2013). Ανάμεσα σε αυτές τις δύο διακριτά διαφορετικές κατηγορίες φυτών υπάρχουν και αρκετά φυτικά είδη στα οποία τα όρια αντοχής τους διαφέρουν. Τα περισσότερα καλλιεργούμενα είδη παρουσιάζουν ευαισθησία σε συνθήκες έστω και ήπιας αλατότητας παρόλα η διαβάθμιση αντοχής ποικίλει ανάλογα το είδος. Οι πολύ ανθεκτικές καλλιέργειες μπορούν να αντέξουν σε συγκέντρωση αλατιού του κορεσμένου εκχυλίσματος έως και  $10 \text{ g L}^{-1}$ , οι μέτρια ανθεκτικές καλλιέργειες μπορούν να αντέξουν τη συγκέντρωση αλατιού έως και  $5 \text{ g L}^{-1}$ . Το όριο της ευαίσθητης ομάδας είναι περίπου  $2,5 \text{ g L}^{-1}$ . Οι ρίζες των φυτών επηρεάζονται γενικά λόγω των  $\text{Na}^+$  και  $\text{Cl}^-$  μαζί με άλλα κατιόντα που υπάρχουν στα εδάφη σε διαφορετική συγκέντρωση ( $1-150 \text{ mM}$  για τα γλυκόφυτα, περισσότερο για τα αλόφυτα). Στο ριζικό σύστημα των φυτών υπάρχουν κάποια σημεία αναφοράς που ρυθμίζουν την πρόσληψη και μεταφορά του αλατιού. Τα σημεία αυτά διακρίνονται στην επιλεκτική πρόσληψη από το εδαφικό διάλυμα, στη φόρτωση στα ξυλώδη αγγεία, στην απομάκρυνση αλατιού από το αγγειακό σύστημα στο ανώτερο μέρος του φυτού, στην φόρτωση του φλοιώματος και στην απέκκριση μέσω αλατόδεις αδένες ή κύστεις (εικ. 1.2)(Hasanuzzaman et al., 2013, Li et al., 2021).



**Εικόνα 1.2:** Μεταφορά και ρύθμιση αλατιού στο σύστημα εδάφους-φυτών (Hasanuzzaman et al., 2013).

Βιβλιογραφικά αναφέρεται ότι για ένα φυτό ανθεκτικό στο αλάτι που αναπτύσσεται για κάποιο χρονικό διάστημα σε εδαφικό διάλυμα  $100 \text{ mM NaCl}$ , οι συγκεντρώσεις των ριζών σε  $\text{Na}^+$  και  $\text{Cl}^-$  είναι συνήθως περίπου  $50 \text{ mM}$ , ενώ στα ξυλώδη αγγεία περίπου

στα 5 mM και η συγκέντρωση στο παλαιότερο φύλλο είναι ιδιαίτερα υψηλή στα 500 mM. Τα τοξικά ιόντα μετακινούνται στο φυτό με τη ροή του νερού. Τα ιόντα μετακινούνται από το έδαφος στο αγγειακό σύστημα της ρίζας μέσω συμπλαστικών και αποπλαστικών οδών. Στη συμπλαστική οδό, το νερό εισέρχεται στις ρίζες μέσω των πλασματικών μεμβρανών της επιδερμίδας και η περαιτέρω κίνηση από κύτταρο σε κύτταρο λαμβάνει χώρα μέσω των πλασμοδεσμών και μονοπατιών ενέργειας που σχετίζονται με το οσμωτικό δυναμικό. Ως εκ τούτου, με βάση την όσμωση, το φυτό μπορεί να ελέγξει τα τοξικά ιόντα όπως το  $\text{Na}^+$  για να εισέλθουν στο κύτταρο. Στα ευαίσθητα φυτά έχει εντοπιστεί ότι χρησιμοποιούν έναν μηχανισμό αποφυγής ελέγχοντας την δίοδο των ιόντων από το έδαφος στην ρίζα και περιορίζοντας την είσοδό τους στο βλαστό. Εν αντιθέσει στα ανθεκτικά φυτά εντοπίζονται υψηλότερες συγκεντρώσεις  $\text{Na}^+$  στο βλαστό από ότι στην ρίζα, όπου μέσω της διαμερισματοποίησης και την απομάκρυνσης του από το κυτταρόπλασμα επιτυγχάνεται μια ωσμωτική προσαρμογή και έτσι συνεχίζεται η φυσιολογική τους ανάπτυξη. Η ικανότητα των ανθεκτικών φυτών να απορροφούν την περίσσεια ιόντων στο χυμοτόπιο μειώνει το υδατικό δυναμικό ( $\Psi_s$ ) των φύλλων ώστε η προσληψη νερού και θρεπτικών από το εδαφικό διάλυμα να γίνεται ομαλά χωρίς μεταβολικό κόστος. Ο τρόπος με τον οποίο τα ανθεκτικά φυτά καταφέρνουν να μεταφέρουν το  $\text{Na}^+$  στο χυμοτόπιο είναι με την άντληση άλλων πρωτονίων και ιόντων όπως το  $\text{K}^+$ . Στην αλατοτητα παρατηρείται αύξηση της δραστηριότητας των χυμοτοπιακών αντιμεταφορέων  $\text{Na}^+/\text{H}^+$  γεγονός που προϋποθέτει μετατροπή του ηλεκτροχημικού δυναμικού στον τονοπλάστη χαρη στην μεταβολή του pH εξαιτίας της άντλησης  $\text{H}^+$ . Για την ενεργοποίηση του αντιμεταφορέα  $\text{Na}^+/\text{H}^+$  σημαντικό ρόλο παίζουν οι ATPάσες της πλασματικής μεμβράνης και του χυμοτοπίου. Τα ιόντα  $\text{K}^+$  που είναι περιορισμένα στα αλατούχα εδάφη. Σε πολυ υψηλες συγκεντρώσεις  $\text{Na}^+$  στο εδαφικό περιβάλλον περιορίζεται η μεταφορά  $\text{K}^+$  (Zuccharini, 2008). Όταν όμως υπάρχει  $\text{Ca}^{2+}$  τότε καταφέρνει να λειτουργήσει ένας ισχυρός μηχανισμός άντλησης  $\text{K}^+$  αντί για  $\text{Na}^+$ . Τα ιόντα  $\text{Ca}^{2+}$  προσδίδουν μία ανθεκτικότητα ακόμα και στα ευαίσθητα είδη και αυτό δικαιολογείται με τον ρόλο του ασβεστίου ως προς την ενίσχυση των κυτταρικών μεμβρανών και την διατήρηση της εκλεκτικής διαπερατότητας των ιόντων (Ibrahimova et al., 2021). Η καλύτερη απόδοση των φυτών υπο καταπόνηση αλατότητας χάρη στην παρουσία  $\text{Ca}^{2+}$  ελέγχεται από γενετικούς παράγοντες του κάθε φυτικού οργανισμού (Cabot et al., 2009, Hasanuzzaman et al., 2013) Η υψηλές συγκεντρώσεις  $\text{Na}^+$  μπλοκάρουν την πρόσληψη  $\text{Ca}^{2+}$  με αποτέλεσμα σε αλατούχα εδάφη με μικρή συγκέντρωση  $\text{Ca}^{2+}$  να προκαλείται τροφопενία. Ευαίσθητα είδη όπως το *Phaseolus*

*vilgaris* δεν αντέδρασε θετικά παρουσία του  $Ca^{+}$  λόγω του  $Na^{+}$  παρόλο που κατάφερε να αυξήσει την συγκέντρωση  $K^{+}$  (Cabot et al., 2009). Τα ανθεκτικά φυτά στην αλατότητα καλούνται συνεχώς να εξισορροπούν τις ανάγκες τους και να χρησιμοποιούν μεθόδους αποφυγής βλάβης στον βιολογικό τους κύκλο. Ένας από τους τρόπους διαχείρισης της είναι ο σχηματισμός νέων χυμοτοπίων όπου μέσα σε αυτά αποθηκεύουν αρκετό νερό το οποίο χρησιμεύει στην αραιώση των αλάτων. Άλλα ανθεκτικά φυτά αραιώνουν τα άλατα στο βλαστό ενώ ταυτόχρονα αποκλείουν την είσοδό τους στην ρίζα. Υπάρχουν και τα φυτά που δεν αποκλείουν τη είσοδό  $NaCl$  από την ρίζα αλλά τα αποβάλλουν ως  $Na^{+}$  και  $Cl^{-}$  με εκκρίσεις από εξειδικευμένους αδένες των βλαστικών κυττάρων (Hasanuzzaman et al., 2013, Assimakopoulou et al., 2015, Ρουμπελάκη - Αγγελάκη, 2018). Οι αλατούχες εκκρίσεις που παράγονται χρησιμοποιούνται από κάποια φυτά για την απορρόφηση της ατμοσφαιρικής υγρασίας σε ξηρά περιβάλλοντα. Τόσο τα ευαίσθητα όσο και τα ανθεκτικά φυτά στην αλατότητα εκφράζουν με διαφορετικό ρυθμό την προσπάθειά τους να μειώσουν το  $\Psi_s$ . Φυτά και των δύο κατηγοριών με διαφορετική ένταση συσσωρεύουν ανόργανα ιόντα και οργανικά μόρια χωρίς να χάσουν την κυτταρική σπαργή τους. Τα ανθεκτικά αλόφυτα συσσωρεύουν γρηγορότερα τα ανόργανα ιόντα στα χυμοτοπία τους από ότι τα ευαίσθητα γλυκόφυτα ενώ εκείνα χρησιμοποιούν την ωσμωτική προσαρμογή με την συσσώρευση των οργανικών μορίων, ωσμολυτών, για διαλύσουν τα άλατα χωρίς να εμπλέξουν τον κυτταρικό μεταβολισμό. Ο ρόλος της ωσμωτικής προσαρμογής συνδέεται με τον εγκλιματισμό αφού οι ωσμολύτες που παράγονται από αυτή την διαδικασία ενισχύουν την μείωση  $\Psi_s$  του φυτού με αποτέλεσμα να μειώνεται το  $\Psi_w$  της ρίζας έναντι στο  $\Psi_w$  του εδάφους βοηθώντας την απορρόφηση του νερού και των θρεπτικών που βρίσκονται εκεί. Κατά την διαδικασία της ωσμωτικής προσαρμογής πολλές οργανικές ενώσεις εμπλέκονται όπως σάκχαρα, πολυαμίνες, μεθυλιωμένες ινοσιτόλες, πολυόλες-πολυδατομένες αλκοόλες ή φορτισμένοι μεταβολίτες. Όλες αυτές οι διεργασίες πραγματοποιούνται με μεγάλο ενεργειακό κόστος για το φυτό ένα εκ των οποίων είναι το σημαντικό ποσοστό άνθρακα χρησιμοποιείται για την παραγωγή ωσμολυτών (Ρουμπελάκη Αγγελάκη, 2018). Αυτοί στην συνέχεια διαμερισματοποιούνται στο κυτταρόπλασμα, στο στρώμα και σε κοιλότητες των οργανιδίων προσφέροντας την πολυπόθητη ωσμωτική εξισορρόπησή τους με το χυμοτόπιο και κατ'επέκταση την επίτευξη αντοχής σε όλο το κύτταρο. Με το πέρασμα της καταπόνησης τα μονομερή πολυμερίζονται σε άμυλο και φρουκτάνες και αποθηκεύονται για αμεσότερη μελλοντική εφαρμογή σε αντίστοιχες συνθήκες. Οι μεγάλες συγκεντρώσεις ωσμολυτών μειώνουν τις



επιπτώσεις του NaCl ιδιαίτερα στην ενεργότητα των ενζύμων με αποτέλεσμα να δρουν ως μη ενζυμικοί μικρού μοριακού βάρους συνοδοί. Παράδειγμα αποτελεί η δράση της γλυκίνης-μπεταΐνης που παράγεται ως μεταβολίτης και παρεμποδίζει την καταστολή της Rubisco και την αποσταθεροποίηση του PSII εξαιτίας της αλατότητας. Από τις πολυόλες-πολυυδατωμένες αλκοόλες, οι σορβιτόλη, μαννιτόλη και προλίνη απομακρύνουν ρίζες υδροξυλίου (ROS) ενισχύοντας έτσι την προσαρμογή και την συντήρηση των κυτταρικών δομών και πρωτεϊνών (Chaves et al., 2009, Parihar et al., 2015, Ρουμπελάκη Αγγελάκη, 2018). Επιπρόσθετα πιστεύεται ότι ορισμένοι οσμωλύτες συμμετέχουν και στην μεταγωγή σήματος της ωσμωτικής καταπόνησης που προκαλείται από την αλατότητα (Jajoo, 2013, Rasool et al., 2013).

Η έλλειψη νερού λόγω της αλατότητας ενεργοποιεί γονίδια σύνθεσης πρωτεϊνών και ενζύμων του αντιοξειδωτικού μηχανισμού με σημαντικότερη την SalT η οποία είναι μικρού μοριακού βάρους, ανιχνεύεται κατά τον εγκλιματισμό και θεωρείται ως ένα είδος πρωτεΐνης φορέα που μετέχει και στην επιδιόρθωση της βλάβης. Κατά την πίεση που προκαλεί η αλατότητα εντοπίζονται πολλά mRNA γονιδίων που συνδέονται με την σπαργή φύλλων. Αυτή η αύξηση των mRNA των συγκεκριμένων γονιδίων και ο ρολος που καταλαμβάνουν αποτελούν μηχανισμού ρύθμιση της συγκέντρωσης και της δράσης της υδατοπορίνης κατά την διάρκεια υδατικής καταπόνησης από αλατότητα (Rasool et al., 2013, Ρουμπελάκη - Αγγελάκη, 2018).

#### **1.4 PHASEOLUS VULGARIS**

Η καλλιέργεια ψυχανθών (Fabaceae ή Leguminosae) είναι από τις σπουδαιότερες του κόσμου καθώς συμπεριλαμβάνεται στην ανθρώπινη διατροφή αλλά και σε εκείνη των ζώων. Ένα ακόμα ενδιαφέρον χαρακτηριστικό αυτής της οικογένειας είναι η ικανότητα των φυτών να αναπτύσουν φυμάτια στο ριζικό τους σύστημα όπου με την συμβίωση αζωτοβακτηρίων του εδάφους να καταφέρνουν να δεσμεύουν το ατμοσφαιρικό άζωτο και να το μετατρέπουν σε αφομοιώσιμη μορφή για τα φυτά (Savita et al., 2021). Πέρα από την πλούσια διατροφική αναγνώρισή της αξίας του, φυτικά είδη αυτής της οικογένειας χρησιμοποιούνται για χλωρή λίπανση όπου τα τελευταία χρόνια έχει αποκτήσει αυξανόμενο ενδιαφέρον στην γεωργική πρακτική. Τα είδη του γένους Phaseolus που ανήκουν στα ψυχανθή είναι πολυάριθμα και εντοπίζονται σε ολόκληρο τον κόσμο όπου η καταγωγή των προγόνων τους προσανατολίζεται στο Μεξικό ή σε περιοχές της Νότιας

Αμερικής. Στην χώρα μας καλλιεργείται κυρίως το *Phaseolus vulgaris* (κοινό φασόλι). Το κοινό φασόλι είναι ένα ετήσιο ποώδες φυτό, το οποίο στην διαδικασία του φυτρώματος διαμορφώνει πασαλώδη ρίζα που όμως γρήγορα διακλαδίζεται έντονα με αποτέλεσμα να χαρακτηρίζεται γενικά ως επιπολαιόριζο καθώς ο όγκος όλου του ριζικού συστήματος δεν ξεπερνά τα 25 cm. Υπάρχει όμως το ενδεχόμενο εάν ο σπόρος βρεθεί σε γόνιμο, καλά αεριζόμενο και αρδευόμενο έδαφος να αποκτήσει ρίζα μέχρι και 1m στο βάθος. Το υπέργειο μέρος του φασολιού κοσμείται από τα συμμετρικά και καρδιόσχημα σύνθετα φύλλα με το πλούσια ανεπτυγμένο νευρικό σύστημα κινητικών κυττάρων με το οποίο ρυθμίζεται η μεταφορά νερού και θρεπτικών (εικ.1.3).



***Εικόνα 1.3:*** το νευρικό σύστημα των σύνθετων φύλλων του *P. vulgaris* Var. ασπροκόλι

*Οι ποικιλίες του φασολιού κατηγοριοποιούνται σύμφωνα με τον τρόπο ανάπτυξης του σε νάνες, αναρριχώμενες και ημιαναρριχώμενες. Ο βλαστός στις νάνες ποικιλίες είναι όρθιας ανάπτυξης, ισχυρός με μικρό μήκος ο οποίος διακλαδίζεται πλούσια. Στις αναρριχώμενες και ημιαναρριχώμενες ο βλαστός είναι πιο λεπτός, αρκετά ευκαμπτος με ελάχιστες διακλαδώσεις οι οποίες παρουσιάζουν μεγάλα μεσογονάτια διαστήματα. Τα είδη αυτών των κατηγοριών έχουν την δυνατότητα αναρρίχησης μεχρι και τρία μέτρα για τις πλήρως αναρριχώμενες. Εξαιτίας της μορφολογίας του βλαστού ως προς το γωνιώδες σχήμα και*

το ινώδες εσωτερικό τα φυτά καταφέρνουν να περιστρέφονται με αποτέλεσμα να μην σκιάζονται φύλλα με την κατακόρυφη ανάπτυξή τους μιας και παίρνουν διαφορετικές θέσης. Τα άνθη τους είναι είτε μεμονωμένα είτε σε ταξιανθία βότρυ ανάλογα την ποικιλία και ο λοβός περιέχει 4-8 σπόρους. Εκτός από την ποσότητα των σπόρων που περιέχονται σε ένα λοβό το σχήμα, η διάσταση και το μέγεθός τους διαφέρει επίσης ανάμεσα στις ποικιλίες. Το χρώμα, ο σχήμα και το βάρος των σπόρων ποικίλει επηρεάζοντας έτσι τις καταναλωτικές προτιμήσεις και την εμπορική αξία της κάθε ποικιλίας φασολιού (Παπακώστα Τασοπούλου, 2005, Ολύμπιος, 2015). Το φασόλι εμφανίζεται και προσαρμόζεται τόσο στις τροπικές και υποτροπικές όσο και στις εύκρατες ζώνες του πλανήτη με καλύτερες αποδόσεις να παρουσιάζει στις τελευταίες. Ο ρόλος της θερμοκρασίας είτε υψηλή είτε χαμηλή επηρεάζει στενά διάφορες λειτουργίες του φυτού όπως την φωτοσύνθεση, την αναπνοή και την γονιμότητα της γύρης μεταξύ άλλων. Βέλτιστη θερμοκρασία κυμαίνεται από τους 14-24°C ενώ η διαφορά θερμοκρασίας ημέρας με νύχτα ρυθμίζει τον ρυθμό ανάπτυξης του φυτού. Η βλάστηση των σπόρων είναι ιδιαίτερα ευαίσθητη σε χαμηλές θερμοκρασίες και γενικά τα φυτά παρουσιάζουν μεγάλη ευπάθεια στον παγετό σε όλα τα στάδια ανάπτυξής τους. Το φασόλι θεωρείται περισσότερο βραχείας φωτοπερίοδου κατά την άνθηση με τους μεγαλόσπερμους αναρριχώμενους γενότυπους να αντιδρούν περισσότερο στην φωτοπερίοδο. Σε γενικές γραμμές τα φασόλια χαρακτηρίζονται ως ηλιόφιλό το οποίο χρειάζεται ομοιόμορφη και συγκεκριμένη εδαφική υγρασία καθόλη την καλλιέργεια του για να ολοκληρώσει ομαλά τον βιολογικό κύκλο του. Οι ξηροί άνεμοι, η χαλαζόπτωση και οι πάχνη είναι από τις αβιοτικές καταπονήσεις που προκαλούν δυσάρεστες συνέπειες στην φυσιολογία των φυτών της φασολιάς. Η ποικιλία των εδαφών στα οποία μπορεί να αναπτυχθεί η φασολιά είναι μεγάλη αρκεί να στραγγίζει καλά, να αερίζεται και να υπάρχει διαθεσιμότητα νερού. Καταλληλότερα θεωρούνται μέσης σύστασης εδάφη με pH ανάμεσα στο 5-7. Δεν συνίσταται ασβεστούχα εδάφη καθώς είναι απαραίτητη η απορρόφηση φωσφόρου και σιδήρου. Το φασόλι συγκαταλέγεται σε εκείνα τα φυτικά είδη που είναι ιδιαίτερα ευαίσθητα στην αυξημένη αλατότητα του εδάφους ή/και του αρδευόμενου νερού όμως η ευαισθησία του διαφοροποιείται ανα ποικιλία (Παπακώστα Τασοπούλου, 2005, Assimakouroulou et al., 2015, Ολύμπιος, 2015). Έχει καταγραφεί η συμπεριφορά του φασολιού με την αύξηση της αλατότητας κατά  $1 \text{ mmho cm}^{-1}$  και με κατώφλι αλατότητας ίση με  $EC_e = 1$  βρέθηκε να μειώνεται η παραγωγικότητα του φυτού κατά 18,9% ποσοστό που το κατατάσσει στο τρίτο πιο ευαίσθητο μετά από την σόγια και την βερυκοκιά

(Καραμπουρνιώτης, 2012) ενώ σαν όριο αντοχής αναφέρεται το *IdSm-1* (Παπακόστα Τασοπούλου, 2005). Διεθνείς μελέτες που ασχολήθηκαν με την καταπόνηση της αλατότητας σε φυτά της κοινής αλλά και άγριων ειδών φασολιάς ανέφεραν διαφοροποιήσεις μεταξύ των ειδών όσον αφορά στις παραμέτρους που μελέτησαν (Bayuelo-Jiménez et al., 2003, Al Hassan et al., 2016).

## **1.5 Στόχοι της Πτυχιακής Εργασίας**

Η ποικιλία *Ασπροκόλι* είναι μια από τις πιο διαδεδομένες στην Κρήτη όπου προτιμάται για τα ιδιαίτερα χαρακτηριστικά της. Η παρούσα εργασία αφορά στη μελέτη μεταβολομικών και φωτοσυνθετικών διαφοροποιήσεων που επάγονται σε νεαρά φυτά της ποικιλίας *Ασπροκόλι* κατά την έκθεσή τους σε νερό αυξημένης αλατότητας. Εστιάζει κυρίως σε μια εκτίμηση των πρώιμων αλλαγών στις συγκεντρώσεις αντιοξειδωτικών (ολικές φαινόλες, ασκορβικό οξύ) και δεικτών *stress* (ολικά σάκχαρα, πολυαμίνες, πρωτεΐνες) σε φύλλα του φυτού, μετά από μεταχείρισή του σε συνθήκες αυξημένης αλατότητας. Εκτιμήθηκαν επίσης παράμετροι της φωτοσυνθετικής επίδοσης των φυτών με λεπτομερή καταγραφή της μοριακής δομής και λειτουργίας του φωτοσυνθετικού μηχανισμού και των αλλαγών στις συγκεντρώσεις των χλωροφυλλών. Τελικός στόχος είναι να συσχετίσουμε το *stress* της αλατότητας με το πρότυπο των μεταβολομικών και φωτοσυνθετικών διαφοροποιήσεων στην πολύ σημαντική για τις διατροφικές συνήθειες του νησιού ποικιλία *φασολιού* και πιθανόν να εντοπίσουμε πρώιμες ενδείξεις του *stress* στα φυτά αυτά. Εάν κάποιος αναλογιστεί ότι η ποιότητα ζωής πολλών περιοχών της χώρας μας εξαρτάται από τον πρωτογενή τομέα, το ζήτημα της αλατότητας και η αύξηση της ανεπάρκειας γόνιμης γης είναι μεγάλης οικονομικής σημασίας με συνέπεια η έρευνα των επιπτώσεων στα φυτά και η ανάγκη για εύρεση ανθεκτικών γενοτύπων να αυξάνεται.

## 2 ΥΛΙΚΑ ΚΑΙ ΜΕΘΟΔΟΙ

### 2.1 Φυτικό υλικό

Το φυτικό υλικό που χρησιμοποιήθηκε ανήκει σε τοπική ποικιλία σύμφωνα με προσωπική επικοινωνία με τον ΕΛΓΟ-Δήμητρα (Ινστιτούτο Γενετικής Βελτίωσης και Φυτογενετικών Πόρων) και είναι γνωστό ως ασπροκόλι. Η τοπική αγορά της Κρήτης έχει δηλώσει την διατροφική του προτίμηση στην ντόπια ποικιλία ασπροκόλι όπως και διάφοροι οργανισμοί συλλογής γενετικού πολλαπλασιαστικού υλικού για την διατήρηση της βιοποικιλότητας (Laghetti et al., 2018).

### 2.2 Πειραματικές μεταχειρίσεις

Για την υλοποίηση του πειράματος φυτεύτηκαν 60 σποροι από *Phaseolus vulgaris* var. ασπροκόλι (εικ.2.1).





**Εικόνα 2.1:** Σπόροι από την τοπική ποικιλία της Κρήτης *P. vulgaris* Var. ασπροκόλι

Οι σπόροι τοποθετήθηκαν με γλαστρακια φυτωρίου με μείγμα ξανθιάς/μαύρης τύρφης με περλίτη και σε θάλαμο σταθερών συνθηκών ανάπτυξης (22oC, 30-40 μE, 80% RH) όπου αναπτύχθηκαν για 15 ημέρες μέχρι αποκτήσουν τα πρώτα πραγματικά φύλλα τους (εικ.2.2).



**Εικόνα 2.2:** Φυτά από την τοπική ποικιλία της Κρήτης *P. vulgaris* Var. ασπροκόλι σε θάλαμο ανάπτυξης

Για την εγκατάσταση του πειράματος, τα φυτά κόπηκαν στο σημείο του λαιμού και τοποθετήθηκαν σε διαλύματα αυξημένης αλατότητας. Για το σκοπό αυτό χρησιμοποιήθηκε φυσικό μεταλλικό νερό γνωστής σύστασης (πίνακας 1) σε ανόργανα στοιχεία. Παρασκευάστηκαν διαλύματα NaCl με τις εξής συγκεντρώσεις: 0 (Control), 50 (A), 75 (B), 100 (C) mM NaCl. Τα φυτά τοποθετήθηκαν σε κωνικές φιάλες όγκου 250 ml. γεμάτες μέχρι το πάνω όριο με καθένα από τα διαλύματα NaCl. Τοποθετήθηκαν 5 φυτά σε κάθε μεταχείριση. Στη συνέχεια οι κωνικές φιάλες τοποθετήθηκαν σε θάλαμο α) σε συνθήκες χαμηλού φωτισμού (10  $\mu$ E) ή β) υψηλού φωτισμού (200-220  $\mu$ E). Στις συνθήκες του χαμηλού φωτισμού (LL) τοποθετήθηκαν οι εξής μεταχειρίσεις όσον αφορά στην αλατότητα : 0, 50, 75 και 100 mM. Στις συνθήκες του υψηλού φωτισμού (HL) τοποθετήθηκαν μεταχειρίσεις με 0 mM αλατότητα. Στις συνθήκες αυτές παρέμειναν για 24 ώρες (εικ.2.3α, β).



**Πίνακας 1: Χημική ανάλυση του νερού που χρησιμοποιήθηκε για τα διαλύματα αλατότητας του πειράματος σύμφωνα με αναλύσεις του ΙΓΜΕ (2/4/2020)**

**pH:** 8.1 (22°C), **Ολική σκληρότητα:** 128 mg/l CaCO<sub>3</sub>, **Αγωγιμότητα:** 266μS/cm (25 °C), **Στερεό υπόλειμμα:** (180 °C): 160mg/l

ΚΑΤΙΟΝΤΑ/CATIONS	Ca <sup>+2</sup>	Mg <sup>+2</sup>	Na <sup>+</sup>	K <sup>-</sup>	NH <sub>4</sub> <sup>+</sup>	Fe	Mn
(mg/l)	29.3	13.4	7.4	0.5	<0.1	<0.01	<0.005

ΑΝΙΟΝΤΑ/ANIONS	Cl <sup>-</sup>	SO <sub>4</sub> <sup>-2</sup>	HCO <sub>3</sub> <sup>-</sup>	CO <sub>3</sub> <sup>-2</sup>	NO <sub>3</sub> <sup>-</sup>	NO <sub>2</sub> <sup>-</sup>	SiO <sub>2</sub>
(mg/l)	13.3	6.2	148	0.0	4.0	<0.05	<8.8



**Εικόνα 2.3:** Βλαστικά μέρη *P. vulgaris* Var. ασπροκόλι τοποθετημένα σε κωνικές φιάλες α) συγκεντρώσεων 0, 50, 75, 100 mM NaCl τοποθετούνται σε θάλαμο χαμηλού φωτισμού 10 μE και β) βλαστικά μέρη τοποθετημένα σε κωνικές χωρίς NaCl σε συνθήκες υψηλού φωτισμού 200-220 μE.

Μετά την παρέλευση του χρόνου μεταχείρισης σε αλατότητα και φωτισμό (24h) τα φύλλα των φυτών χρησιμοποιήθηκαν για να κοπούν φυλικοί δίσκοι διαμέτρου 3cm. Οι φυλικοί δίσκοι ζυγίστηκαν σε ζυγό ακριβείας και τοποθετήθηκαν άμεσα σε χαμηλή

θερμοκρασία (-30°C) για προσωρινή αποθήκευση. Στη συνέχεια, οι φυλλικοί δίσκοι λειοτριβήθηκαν γρήγορα σε γουδί με απεσταγμένο νερό και άμεσα το διάλυμα που προέκυψε διαχωρίστηκε σε όγκους κατάλληλους για τις βιοχημικές μετρήσεις, έτσι ώστε από τον ίδιο φυλλικό δίσκο να υπάρχουν δεδομένα μετρήσεων για όλες τις παραμέτρους (εκτός των χλωροφυλλών). Οι φυλλικοί δίσκοι κόπηκαν έτσι ώστε να μην περιλαμβάνουν το κεντρικό αγγείο. Από κάθε πειραματική μεταχείριση αποκτήθηκαν 10 φυλλικοί δίσκοι. 5 φυλλικοί δίσκοι από κάθε πειραματική μεταχείριση χρησιμοποιήθηκαν περαιτέρω για τις βιοχημικές αναλύσεις. Το πείραμα επαναλήφθηκε και δεύτερη φορά. Κάθε φυλλικός δίσκος λειοτριβήθηκε ξεχωριστά, σε γουδί με 1 ml dH<sub>2</sub>O. Από το διάλυμα που προέκυψε, διαχωρίστηκαν δείγματα ως εξής:

- 1x 150 μl για προσδιορισμό του ασκορβικού οξέος
- 1x 300 μl για προσδιορισμό του ολικών φαινολών
- 1x 300 μl για προσδιορισμό του πολυαμινών
- 1x 150 μl για προσδιορισμό ολικών σακχάρων
- 1x 5 μl για προσδιορισμό ολικών πρωτεϊνών

### ***2.3 Επαγωγικός φθορισμός – Φυσικοχημικές αναλύσεις της μοριακής δομής και λειτουργίας του φωτοσυνθετικού μηχανισμού (μέθοδος JIP-test)***

Μόνο ένα μέρος της ενέργειας που απορροφάται από τις χρωστικές του φωτοσυνθετικού μηχανισμού χρησιμοποιείται για τη φωτοχημεία της φωτοσύνθεσης. Το υπόλοιπο εκπέμπεται είτε ως θερμότητα είτε ως φθορισμός. Η επαγωγή του φθορισμού από φωτοσυνθετικούς οργανισμούς παρατηρήθηκε για πρώτη φορά από τον Kautsky το 1931 (Kautsky et al. 1931). Η επαγωγή του φθορισμού από τα φυτά πραγματοποιείται σε δύο φάσεις, εκ των οποίων η πρώτη είναι ταχεία και η δεύτερη αργή. Σήμερα, η μελέτη της καμπύλης του επαγωγικού φθορισμού – ιδιαίτερα της ταχείας φάσης - έχει εξελιχθεί σε πολύτιμο ερευνητικό μέσο για τη μελέτη της δραστηριότητας αλλά και της απόδοσης του φωτοσυνθετικού μηχανισμού. Βάσει της μεθόδου των Strasser and Strasser (1995), μπορεί να εκτιμηθεί, εκτός των άλλων, το

μέγεθος του LHCII, η πυκνότητα των κέντρων αντίδρασης και μια σειρά από παραμέτρους που αφορούν τη δομή και τη λειτουργία του φωτοσυνθετικού μηχανισμού.

Ο φθορισμός αυξάνεται όταν η φωτοχημική απόδοση της φωτοσύνθεσης παρεμποδίζεται για οποιοδήποτε λόγο. Το μεγαλύτερο μέρος του φθορισμού εκπέμπεται από τις χρωστικές της κεραίας του φωτοσυστήματος II. Όταν ο φωτοσυνθετικός μηχανισμός, μετά από την προσαρμογή του στο σκοτάδι, δεχτεί την επίδραση συνεχούς φωτισμού, τότε ο φθορισμός του αυξάνεται από το αρχικό του επίπεδο (F0) σε ένα μέγιστο επίπεδο (Fm). Οι μετρήσεις του επαγωγικού φθορισμού έγιναν με τη συσκευή «ανάλυσης της απόδοσης των φυτών» (Plant Efficiency Analyser, PEA), της Hansatech Instruments, και ακολούθησε επεξεργασία των δεδομένων με χρήση εξειδικευμένου λογισμικού εφαρμογής του JIP-test (Biolyzer 4.0), σύμφωνα με τη μέθοδο των Strasser and Strasser (1995). Όλες οι μετρήσεις έγιναν σε δείγματα συγκεκριμένης επιφάνειας φυλλικού δίσκου 7, 065 cm<sup>2</sup> τα οποία προτού διεγερθούν είχαν παραμείνει στο σκοτάδι για 15 min προκειμένου να αδειάσουν τα κέντρα αντίδρασης από ηλεκτρόνια (εικ.2.4).



**Εικόνα 2.4:** Φύλλα *P. vulgaris* κατά τη διάρκεια της προετοιμασίας τους για καταγραφή του επαγωγικού φθορισμού με την συσκευή Plant Efficiency Analyser (PEA)

Από τις μετρήσεις υπολογίστηκε ο λόγος  $F_v/F_m$  που συνδέεται με τη φωτοσυνθετική απόδοση σύμφωνα με τη μέθοδο Strasser and Strasser (1995). Επίσης με εφαρμογή του JIP-TEST για τιμές φθορισμού που αντιστοιχούν σε καθορισμένα στάδια (J, I και P) υπολογίστηκαν τα επιμέρους χαρακτηριστικά του φωτοσυνθετικού μηχανισμού όπως το σχετικό μέγεθος φωτοσυνθετικής κεραίας (ABS/RC), η απόδοση ( $\Psi_o = E_{To}/TR_o$ ) με την οποία ένα παγιδευμένο φωτόνιο μπορεί να κινηθεί ένα ηλεκτρόνιο κατά μήκος της αλυσίδας μεταφοράς ηλεκτρονίων πέρα από την QA-, η πιθανότητα να μετακινηθεί ένα ηλεκτρόνιο στην αλυσίδα μεταφοράς ηλεκτρονίων ( $E_{To}/TR_o$ ), η μέγιστη τιμή ενεργειακής διάχυσης στη δεξαμενή πλαστοκινόνης (qPQ), η κβαντική απόδοση της φωτοχημείας του PS II (φPO) και οι δείκτες ευρωστίας (SFI abs) και επίδοσης (Performance Index). Στον πίνακα 1 παρουσιάζονται οι σημαντικότερες παράμετροι και ο τρόπος υπολογισμού αυτών. Η μέθοδος βασίζεται σε μετρήσεις της ταχείας μεταβολής του φθορισμού με ανάλυση 10μs σε χρονικό διάστημα 1 δευτερολέπτου. Ο φθορισμός μετρήθηκε με 12-bit ανάλυση και η διέγερση έγινε από 6 διόδους φωτισμού (LEDs) οι οποίες έχουν ένταση ακτινοβολίας μέχρι  $600\text{Wm}^{-2}$  ερυθρού φωτός (630nm). Η διέγερση του φωτοσυστήματος II έγινε με ακτινοβολία έντασης  $3000\mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$ .

**Πίνακας 1:** από το JIP TEST των Strasser&Strasser (1995)

$F_o$	$F_{50\mu s}$ , ένταση φθορισμού στα 50μs
$F_{150}$	ένταση φθορισμού στα 150μs
$F_{300}$	ένταση φθορισμού στα 300μs
$F_J$	ένταση φθορισμού στο στάδιο J
$F_m$	μέγιστη ένταση φθορισμού
$M_o$ ή $(dV/dt)_o$	$4(F_{300}-F_o)/(F_m-F_o)$
<i>Κβαντικές αποδόσεις</i>	
$\phi P_o$ ή $TR_o/ABS$ $\phi E_o$ ή $E_{To}/ABS$ $\psi_o$ ή $E_{To}/TR_o$	$(1-F_o/F_m) = F_v/F_m$ $(1-F_o/F_m)\psi_o$ $1-V_J$

<p><i>Ενεργότητες ανά κέντρο αντίδρασης</i></p> <p><i>ABS/RC</i></p> <p><i>TRo/RC</i></p> <p><i>DIo/RC</i></p>	<p><math>(1+K)Mo(1/VJ)(1/φρo)</math></p> <p><math>(1+K)Mo(1/VJ)(1/ψo)</math></p> <p><math>(ABS/CS)/(ABS/RC)</math></p>
<p><i>Γενικοί Δείκτες</i></p>	
<p><i>PIABS Δείκτης απόδοσης (Performance Index)</i></p>	<p><math>(RC/ABS)[φPο/1-φPο][ψo/1-ψo]</math></p>
<p><i>SFIABS Δείκτης πρωτογενούς Φωτοχημείας</i></p>	<p><math>(1-φPο)(1-ψo)</math></p>

## **2.4 Ποσοτική μέτρηση πρωτεϊνών**

Η εκτίμηση των συνολικών πρωτεϊνών σε δείγματα κυττάρων, απομονωμένων μεμβρανών και απομονωμένων πρωτεϊνικών συμπλόκων πραγματοποιήθηκε φασματοφωτομετρικά, σύμφωνα με τη μέθοδο Bradford (1976). Επιγραμματικά, για την παρασκευή του αντιδραστήριου Bradford διαλυθηκε 50mg Coomassie Brilliant Blue G-250 σε 25 ml 95% αιθανόλης (δηλ. 23,75 ml EtOH + 1,25 ml H<sub>2</sub>O), και προστέθηκε 50 ml 85% (β/ο) φωσφορικό οξύ. Στην συνέχεια αραιώθηκε στα 500 ml όταν το χρώμα έχει διαλυθεί πλήρως και το διηθήθηκε μέσω χαρτιού Whatman λίγο πριν τη χρήση. Το αντιδραστήριο Bradford πρέπει να έχει ανοιχτό καφέ χρώμα. Η διήθηση χρειάστηκε να επαναληφθεί για να απαλλαγεί το αντιδραστήριο από τον μπλε μεταχρωματισμό.

Για κάθε δείγμα που μετρήθηκε, προστέθηκε 1ml του αντιδραστήριου Bradford σε ένα σωληνάριο eppendorf και 20 μl δείγματος. Σε σύντομο χρονικό διάστημα χρησιμοποιήθηκε το φασματοφωτόμετρο όπου στα 595 nm εντοπίστηκε η απορρόφηση. Για την τυπική καμπύλη προετοιμαστηκαν πρότυπα που περιέχουν μια σειρά από 5 έως 100 μικρογραμμάρια πρωτεΐνης (λευκωματίνη ή γ-σφαιρίνη) σε όγκο 20 μl. Προστέθηκε 1 ml αντιδραστήριου βαφής και επώαστηκε για 5 λεπτά. Τελος μετρήθηκε η απορρόφηση στα 595 nm.

## **2.5 Ποσοτική μέτρηση/εκτίμηση χλωροφυλλών**

Για τη μέτρηση των χλωροφυλλών ακολουθήθηκε η μέθοδος Holden, ως εξής: για κάθε δείγμα ένας φυλλικός δίσκος λειοτριβήθηκε με 0,1 g acid-washed Silicon dioxide (Supelco 18649), προστέθηκαν 3ml μεθανόλη (MeOH, analytical grade) και το προϊόν μεταφέρθηκε σε δοκιμαστικούς σωλήνες, ζεστάθηκε στους 60°C για 3 min αναδευόμενο και φυγοκεντρήθηκε (1500 g, 5min). Το υπερκείμενο διαχωρίστηκε και μετά από 10x αραιώση με μεθανόλη, φωτομετρήθηκε σε φωτόμετρο (Perkin Elmer, LS50B) στα 665 και 650 nm, μετά από μηδενισμό του φωτομέτρου στο κάθε δείγμα στα 700nm. Οι τιμές φωτομέτρησης χρησιμοποιήθηκαν για την εκτίμηση των

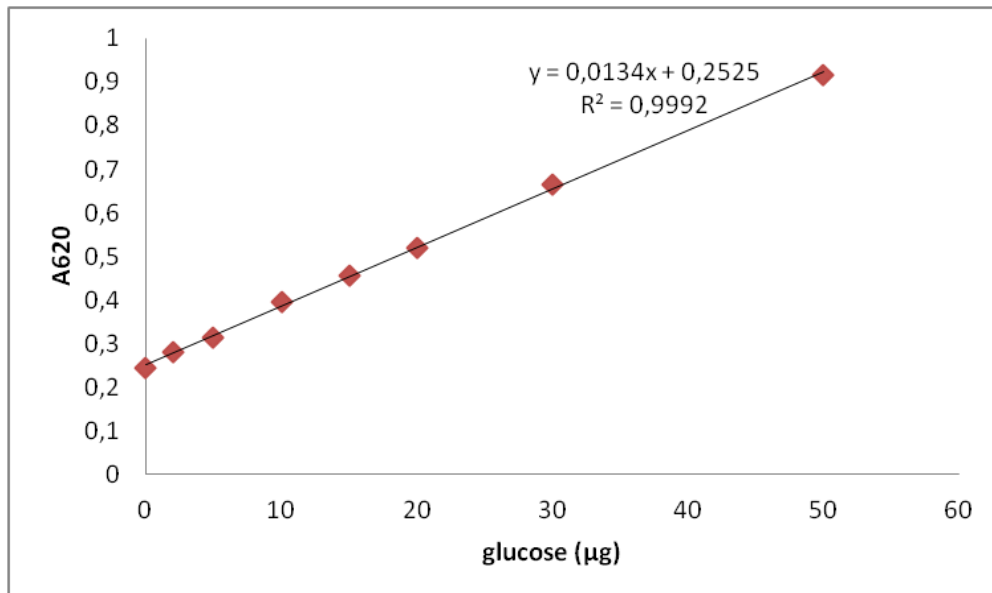
χλωροφυλλών σύμφωνα με τους τύπους:

$$\text{Chla} : 16.5 \times A_{665} - 8.3 \times A_{650} \text{ (}\mu\text{g/ml)}$$

$$\text{Chlb} : 33.8 \times A_{650} - 12.3 \times A_{665} \text{ (}\mu\text{g/ml)}$$

## 2.6 Ποσοτική εκτίμηση ολικών σακχάρων

Παρασκευάστηκε διάλυμα 0.05% anthrone σε 66% H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>. Χρησιμοποιήθηκαν 15 μl δείγματος από το εκχύλισμα των φυλλικών δίσκων που προέκυψαν από λειοτρίβηση φυλλικού ιστού επιφάνειας με 3cm (βάρους ~0,1g/1ml). Διαλύουμε το δείγμα σε τελικό όγκο 100 μl (με H<sub>2</sub>O) και προσθέτουμε 1 ml διαλύματος anthrone. Ακολουθεί ισχυρή ανάδευση. Στη συνέχεια το δείγμα θερμαίνεται σε υδατόλουτρο, στους 100 οC για 15 min. Μετά τη θέρμανση επαναφέρεται το δείγμα σε θερμοκρασία δωματίου, με την τοποθέτησή του για ~20-30 min σε υδατόλουτρο ή για λιγα λεπτά σε πάγο. Ακολουθεί φωτομέτρηση στα 620 nm, και προσδιορισμός της περιεκτικότητας σε σάκχαρα, μέσω της εξίσωσης που προκύπτει από την εφαρμογή της μεθόδου σε διαλύματα σακχάρων (συν. γλυκόζης) γνωστής συγκέντρωσης.

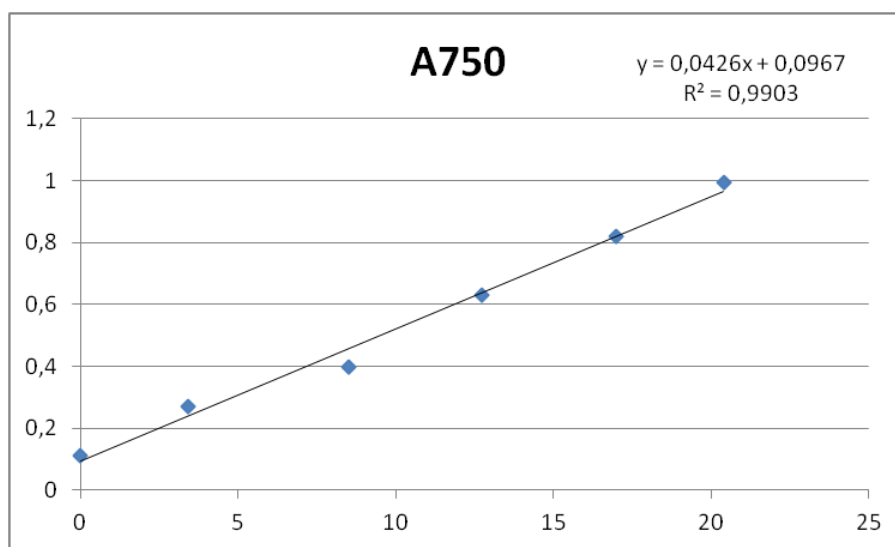


**Γράφημα 1:** Πρότυπη καμπύλη ολικών σακχάρων

## 2.7 Ποσοτική εκτίμηση φαινολικών

Παρασκευάστηκε διάλυμα  $\text{Na}_2\text{CO}_3$  2% και χρησιμοποιήθηκε το αντιδραστήριο Folin–denis' reagent (Fluka, 47742). Για την πρότυπη καμπύλη χρησιμοποιείται Gallic acid συγκέντρωσης 10 mg/ml και δημιουργούνται υδατικά διαλύματα περιεκτικότητας 0, 3, 8, 12, 17, 20, 25, 30, 34, 42, 51, 68  $\mu\text{g}$  γαλλικού οξέος, σε τελικό όγκο 100  $\mu\text{l}$ .

Στα δείγματα των φυτικών εκχυλισμάτων προηγείται διαδικασία απομάκρυνσης των χλωροφυλλών, η οποία περιλαμβάνει προσθήκη 1 ml διαιθυλαιθέρα, ισχυρή ανάδευση και φυγοκέντρηση στις 5000 rpm (Eppendorf centrifuge 5415 C). Ακολούθως αφαιρούμε το πράσινο υπερκείμενο και παίρνουμε 100  $\mu\text{l}$  από το άχρωμο υποκείμενο για την περαιτέρω διαδικασία προσδιορισμού των φαινολικών. Στα 100  $\mu\text{l}$  του δείγματος προστίθενται σταδιακά 2,4 ml  $\text{dH}_2\text{O}$ , 2 ml διάλυμα  $\text{Na}_2\text{CO}_3$  και 200  $\mu\text{l}$  Folin–Denis' reagent. Ακολουθεί επώαση για 60 min σε θερμοκρασία δωματίου και μέτρηση της απορρόφησης στα 750 nm.



**Γράφημα 2:** Πρότυπη καμπύλη φαινολικών

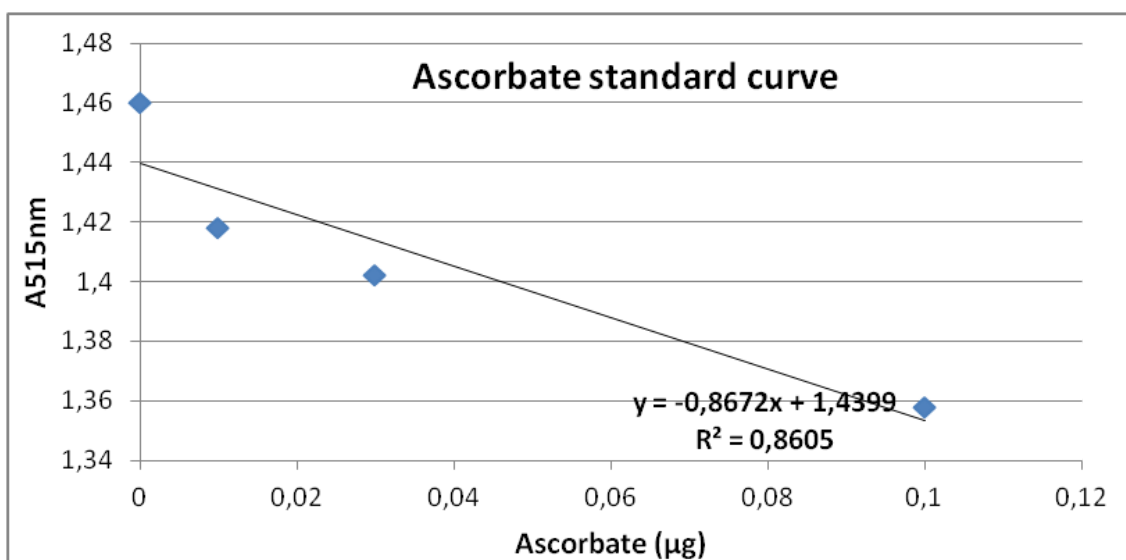


## 2.8 Ποσοτική εκτίμηση ασκορβικού

Για τον ποσοτικό προσδιορισμό του ασκορβικού οξέως παρασκευάστηκαν τα εξής διαλύματα:

1. Metaphosphoric acid 1% w/v
2. Acetate buffer: 4 g sodium acetate + 1g oxalic acid σε 1 L νερό.
3. 2,6-Dichlorophenolindophenol (DCPIP) 0,03% : 0.3 g DCPIP διαλύθηκαν αρχικά σε 10 ml ethanol και έπειτα συμπληρώθηκε ο τελικός όγκος σε 1lt με νερό. Διήθηση μέσω Whatman.
4. Για την κατασκευή της πρότυπης καμπύλης του ασκορβικού (γραφ.3), παρασκευάζεται διάλυμα Ascorbate συγκέντρωσης 1 mg/ml. Από αυτό παίρνουμε τους εξής όγκους: 0, 2, 4, 5, 8, 10, 12, 15, 20, 25 μl, οι οποίοι περιέχουν αντίστοιχα 0, 2, 4, 5, 8, 10, 12, 15, 20, και 25 μg Ascorbate και προστίθενται αντίστοιχα σε 150, 148, 146, 145, 142, 140, 138, 135, 130, και 125 μl dH<sub>2</sub>O.

Σε δειγματα φυλλικών δίσκων όγκου 150 μl προστίθεται 1 ml διάλυμα metaphosphoric acid. Ακολουθεί ανάδευση και φυγοκέντρηση σε 10.000 rpm για 5 min. Στη συνέχεια λαμβάνεται 400 μl από το υπερκείμενο και προστίθενται 400 μl Acetate Buffer και 250 μl διαλύματος DCPIP. Ανάδευση και μέτρηση της απορρόφησης στα 515 nm (εντός 30 min).



**Γράφημα 3:** Πρότυπη καμπύλη ασκορβικού οξέος

## **2.9 Ποσοτική και ποιοτική εκτίμηση των πολυαμινών**

Στα δείγματα των φυλλικών εκχυλισμάτων για προσδιορισμό των πολυαμινών προστέθηκαν 33ml NaOH 10 N, έτσι ώστε να προκύψει διάλυμα 1N NaOH. Το διάλυμα αυτό μεταφέρθηκε σε βιδωτά erpendorf και αφού προστέθηκε ίσος όγκος HCl 36.5% αναδεύτηκαν και τοποθετήθηκαν σε φούρνο στους 110°C για τουλάχιστον 18 h, ώστε να υδρολυθούν. Στη συνέχεια στεγνώθηκαν σε thermoblock και το εναπομείναν ίζημα επαναδιαλύθηκε σε 300 μl PCA 5% (perchloric acid). Ακολούθησε η διαδικασία της βενζυλίωσης που καθιστά «ορατές» τις πολυαμίνες σε ανιχνευτή απορρόφησης φωτός (diode array detector), ως εξής: Τα δείγματα μεταφέρθηκαν σε γυάλινο δοκιμαστικό σωλήνα και προστέθηκε 1 ml NaOH 2N. Μετά από ανάδευση προστέθηκαν 10 μl benzoyl-chloride. Ακολούθησε ισχυρή ανάδευση και στη συνέχεια επώαση των δειγμάτων σε θερμοκρασία δωματίου για τουλάχιστον 20 min. Μετά από την επώαση έγινε παύση της αντίδρασης βενζυλίωσης με την προσθήκη 2 ml κορεσμένου χλωριούχου νατρίου. Ακολούθησε ανάδευση, προσθήκη 2 ml διαιθυλαιθέρα και ισχυρή ανάδευση, με μεγάλη προσοχή μέχρι οι δύο φάσεις (υδατική φάση και διαιθυλαιθέρας) να αναμειχθούν εντελώς. Μετά την έλευση μικρού χρονικού διαστήματος ώστε να επιτραπεί να ξεχωρίσουν ξανά οι δύο φάσεις απομακρύνθηκε ο διαιθυλαιθέρας και τοποθετήθηκε σε καθαρό σωλήνα, μέσα σε υδατόλουτρο (60°C) ώστε να εξατμιστεί. Το ίζημα των βενζυλιωμένων πλέον πολυαμινών επαναδιαλύθηκε σε 200μl 63% μεθανόλης και χρησιμοποιήθηκε για την ποιοτική και την ποσοτική ανάλυση πολυαμινών σε HPLC (High Performance Liquid Chromatography) με narrow bore στήλη 18C (εικ.2.5). Η ανίχνευση έγινε με την χρήση ενός diode array ανιχνευτή σύμφωνα με την μέθοδο των Kotzabassis et al., (1993).



**Εικόνα 2.5:** Προετοιμασία δειγμάτων και χρήση συστήματος για την ποιοτική και την ποσοτική ανάλυση πολυαμινών σε HPLC

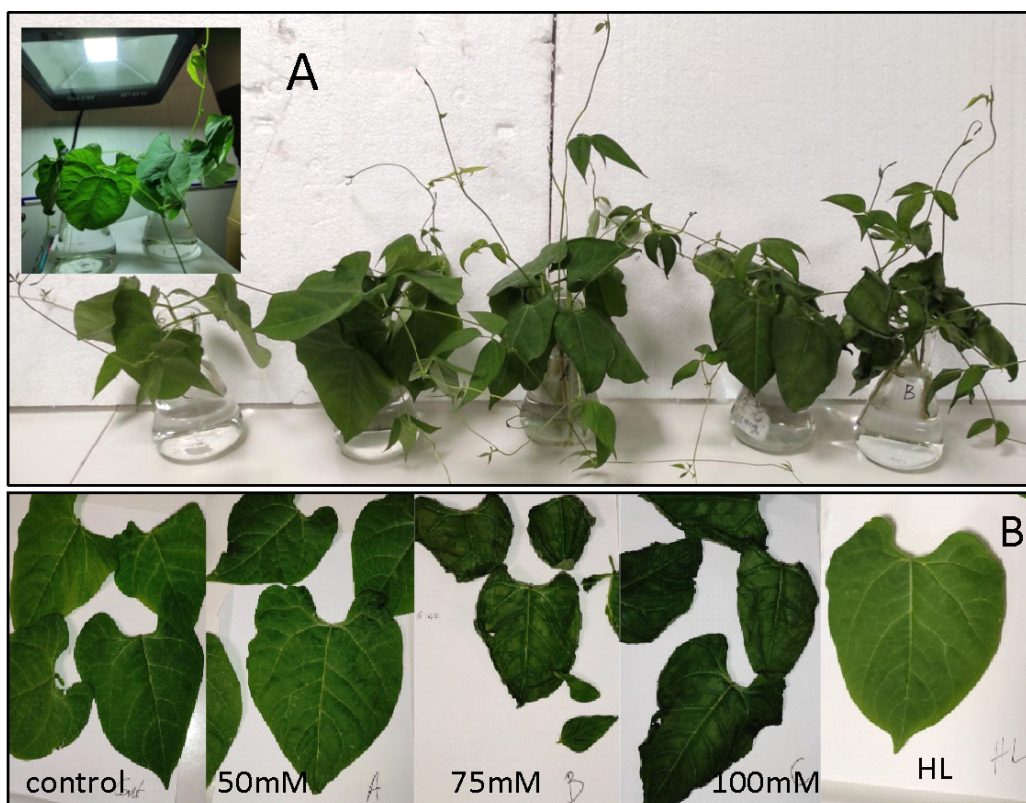
### 3 ΑΠΟΤΕΛΕΣΜΑΤΑ ΚΑΙ ΣΥΖΗΤΗΣΗ

Είναι πλέον γνωστό ότι η αλατότητα του εδάφους είναι ένας από τους σημαντικότερους αβιοτικούς παράγοντες που επηρεάζουν την ανάπτυξη και τις αποδόσεις των καλλιεργειών και τα επίπεδα του ορίου αντοχής στην αλατότητα εξαρτώνται από το είδος της καλλιέργειας, την ποικιλία, το στάδιο ανάπτυξης και τους περιβαλλοντικούς παράγοντες. Το *Phaseolus vulgaris* σε σχέση με τα συγγενικά του κατατάσσεται στα ευαίσθητα φυτά ως προς την αλατότητα και υπάρχουν πολλές βιβλιογραφικές αναφορές και δημοσιεύσεις πάνω στα όρια αντοχής του και στις επιπτώσεις αυτής της καταπόνησης (Kaymakanova et al., 2008, Al Hassan et al., 2016, Le et al., 2021). Οι Arkadiusz et al. (2008) μελέτησαν την επίδραση που είχαν διαφορετικές συγκεντρώσεις NaCl του εδαφικού διαλύματος σε διάφορους παραμέτρους οξειδωτικής καταπόνησης όπως την περιεκτικότητα σε ασκορβικό οξύ, φαινόλες και φλαβονοειδή σε φυτά φασολιών. Στα φυτά γλάστρας προστέθηκαν 10,30,50 mM NaCl και καταμετρήθηκαν τα φυτά σε 14,21 και 28 ημέρες και εμφανίστηκε η συγκεντρωση χλωρίου να ξεπερνάει την συγκεντρωση NaCl του εδάφους. Η δράση αντιοξειδωτικών ενζύμων αυξήθηκε προοδευτικά με τις μέρες που βρισκόταν υπό πίεση τα φασόλια ενώ τα μη αντιοξειδωτικά ενζυμα περιορίστηκαν αισθητά. Επιπρόσθετα, οι Assimakoroulou et al. (2015) ασχολήθηκαν με μεγαλύτερο εύρος συγκεντρώσεων 0-75mM NaCl σε τρεις διαφορετικές ποικιλίες

φασολιού που χρησιμοποιούνται πολύ στην χώρα μας και σύγκριναν τις επιδόσεις τους. Οι ποικιλίες μεταξύ τους έδειξαν διακριτές διαφορές ως προς την ευαισθησία τους στο NaCl και της ικανότητας τους να κρατήσουν το Na στις ρίζες για καλύτερες αναλογίες μεταξύ K/Na και Ca/Na.

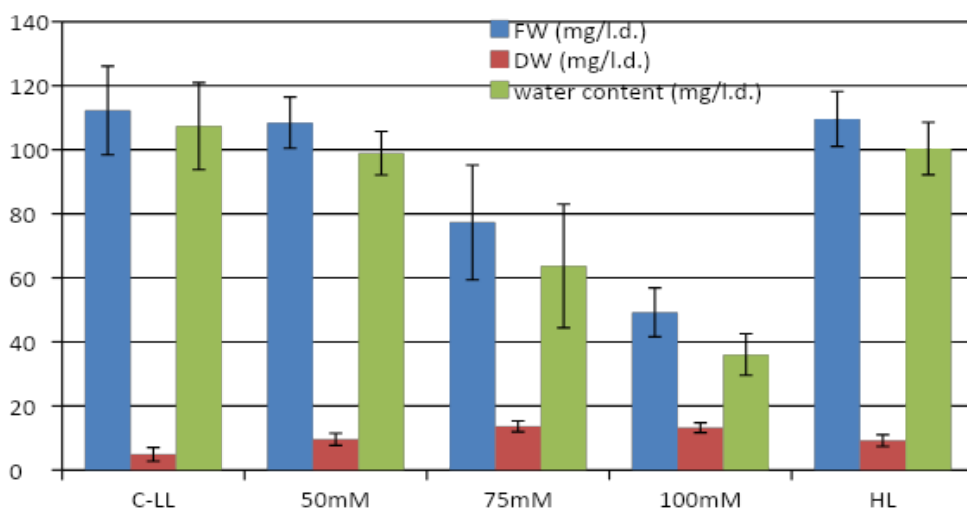
### 3.1 Ορατά αποτελέσματα

Για τους σκοπούς του πειράματος τα φυτά, αφαιρουμένων των ριζών τους, τοποθετήθηκαν στα αντίστοιχα διαλύματα (0, 50, 75 και 100 mM NaCl) και παρέμειναν για 24 ώρες σε αυτά, υπό συγκεκριμένες συνθήκες φωτισμού (χαμηλός φωτισμός (LL) ή υψηλός φωτισμός (HL)). Η επιλογή των 24 ωρών μεταχείρισης των φυτών έγινε με σκοπό να παρακολουθήσουμε τις πρώτες αντιδράσεις των φυτών στις συνθήκες καταπόνησης. Με την πάροδο των 24 ωρών ήταν ήδη εμφανείς αρκετές επιπτώσεις της καταπόνησης κυρίως στις υψηλές συγκεντρώσεις αλατότητας. Όπως μπορούμε να διακρίνουμε στην εικόνα 3.1 φύλλα των υψηλότερων συγκεντρώσεων NaCl, B (75mM) και C (100mM), παρουσίασαν έντονη απώλεια της σπαργής των κυττάρων τους.



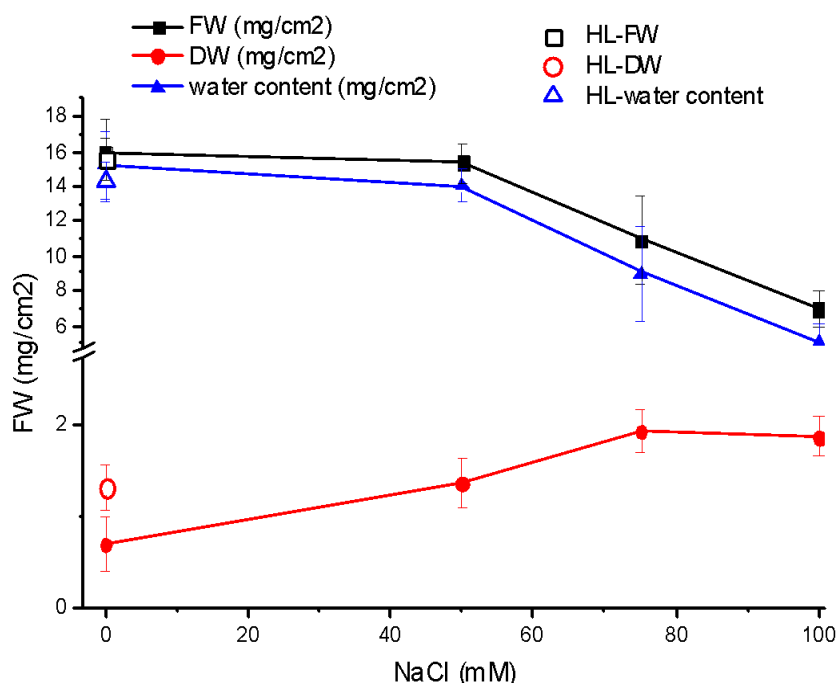
**Εικόνα 3.1:** Α) Η εγκατάσταση του πειράματος με τα βλαστικά μέρη *P. vulgaris* Var. ασπροκόλι τοποθετημένα για 24 ώρες σε θάλαμο χαμηλού φωτισμού (LL, 10  $\mu$ E) με ή χωρίς NaCl. Στο ένθετο η μεταχείριση του υψηλού φωτισμού (HL, ~200  $\mu$ E). Β) Αποκομμένα φύλλα των μεταχειρίσεων του πειράματος με 0 (control), 50, 75, και 100 mM NaCl σε χαμηλό φωτισμό και του υψηλού φωτισμού χωρίς NaCl.

Σε αντίθεση στην συγκεντρωση των 50 mM NaCl, και στον υψηλό φωτισμό δεν παρουσιάζονται ορατές διαφορές από των μάρτυρα. Η εμφανής επίδραση της αλατότητας μόλις σε λίγες ώρες από την εγκατάσταση του πειράματος συμφωνεί με βιβλιογραφικές αναφορές που υποστηρίζουν την απώλεια νερού από τα κύτταρα τα πρώτα λεπτά μετά την προσθήκη NaCl. Με την επίδραση της αλατότητας επέρχεται συρρίκνωση των κυττάρων, τα οποία όμως είναι δυνατό να ανακάμψουν μετά από μερικές ώρες ανακτώντας τον όγκο τους και συνεχίζοντας την ανάπτυξή τους όμως σε μειωμένους ρυθμούς (Hasanuzzaman et al., 2013). Οι μεταβολές στη βιομάζα των φυτών μελετήθηκαν μέσω του φρέσκου βάρους τους FW (φρέσκο βάρος φυλλικών δίσκων) και του ξηρού βάρους DW (ξηρό βάρος φυλλικών δίσκων μετά από 7h αποξήρανση σε περιβάλλον θερμού αέρα στους 80°C). Από τις μετρήσεις αυτές (εικ. 3.2) προέκυψαν ενδιαφέροντα αποτελέσματα: ενώ το φρέσκο βάρος μειώνεται με την επίδραση της αλατότητας, το ξηρό βάρος φαίνεται να αυξάνει.



**Εικόνα 3.2:** Γραφική παράσταση όπου απεικονίζονται όλες οι επιμέρους τιμές φρέσκου βάρους (FW), του ξηρού βάρους (DW) και της περιεκτικότητας σε νερό (water content) των φυτών ανά φυλλικό δίσκο, σε συνάρτηση με τις μεταχειρίσεις.

Επομένως υπολογίστηκε η περιεκτικότητα σε νερό των δειγμάτων, η οποία έδειξε να ακολουθεί την πτωτική τάση του φρέσκου βάρους. Επομένως, η μείωση του φρέσκου βάρους ανά μεταχείριση δηλώνει την απώλεια υγρασίας. Η γρήγορη μείωση της υγρασίας οφείλεται στην οσμωτικό σοκ που εμφανίζεται τις πρώτες 24 ώρες και χαρακτηρίζεται ως την πρώτη φάση αντίδρασης των φυτών στην αλατότητα. Η δεύτερη φάση είναι μία χρονοβόρα διαδικασία όπου συσσωρεύονται άλατα στα φύλλα και επιδρούν στο φωτοσυνθετικό μηχανισμό και τελικά επηρεάζουν την απόδοση των φυτών ή των θάνατο των φύλλων στα πιο ευαίσθητα είδη όπως το φασόλι. Για να γίνουν πιο εμφανή τα αποτελέσματα αυτά κατασκευάστηκε και αντίστοιχο διάγραμμα (εικ. 3.3).



**Εικόνα 3.3:** Γραφική παράσταση όπου απεικονίζονται οι πτωτικές τάσεις του φρέσκου βάρους (FW) και της περιεκτικότητας σε νερό (water content) των φυτών, καθώς και η αυξητική τάση του ξηρού βάρους (DW) σε  $\text{mg}/\text{cm}^2$  φυλλικής επιφάνειας.

Στο διάγραμμα αυτό, εκτός του ότι οι αυξητικές/ πτωτικές τάσεις φαίνονται ευκρινέστερα, επιπλέον διακρίνεται ότι η τιμή της περιεκτικότητας νερού στη μεταχείριση HL είναι σημαντικά διαφορετική από την αντίστοιχη τιμή του control LL, δηλαδή εμφανίζει αυξητική τάση παρόμοια με τις μεταχειρίσεις του NaCl.

Όσον αφορά στις μετρήσεις των μεταβολικών παραγόντων που μελετήθηκαν στην εργασία

αυτή, προκειμένου να έχουμε μια πλήρη άποψη των αλλαγών που συμβαίνουν στα επίπεδα κάθε μεταβολίτη, αυτά εκφράστηκαν ανά φυλλική επιφάνεια, ανά φρέσκο βάρος και ανά ξηρό βάρος. Ο λόγος που μελετήθηκαν και οι τρεις εκφράσεις είναι ότι δεδομένης της συρρίκνωσης της φυλλικής επιφάνειας (μαρασμός) που συμβαίνει σε συνάρτηση με την αλατότητα ή και της αύξησης του πάχους του φύλλου που συμβαίνει π.χ υπό την επίδραση της έντασης φωτισμού, η σύγκριση μόνο των φυλλικών δίσκων δεν είναι αντιπροσωπευτική. Παρομοίως, επειδή τα φυτά χάνουν υγρασία συναρτήσει της αλατότητας, η σύγκριση μέσω του φρέσκου βάρους μόνο δεν είναι αντιπροσωπευτική. Επίσης, η σύγκριση μέσω του ξηρού βάρους έχει νόημα διότι δεν επηρεάζεται από το ενδογενές ποσοστό υγρασίας, το οποίο μπορεί να εξαρτάται άμεσα και από τη δραστηριότητα των στοματίων, η οποία αναμένεται στη συγκεκριμένη πειραματική σχεδίαση να μεταβάλλεται συναρτήσει της αλατότητας. Επιπλέον, συγκρίνοντας τις συγκεντρώσεις των μεταβολικών προϊόντων επί ξηρού βάρους είναι αυτονόητο ότι συγκρίνουμε τις μεταξύ τους ποσοτικές διαφορές. Επομένως, και οι τρεις εκφράσεις είναι πολύτιμες για τη συμπερασματολογία.

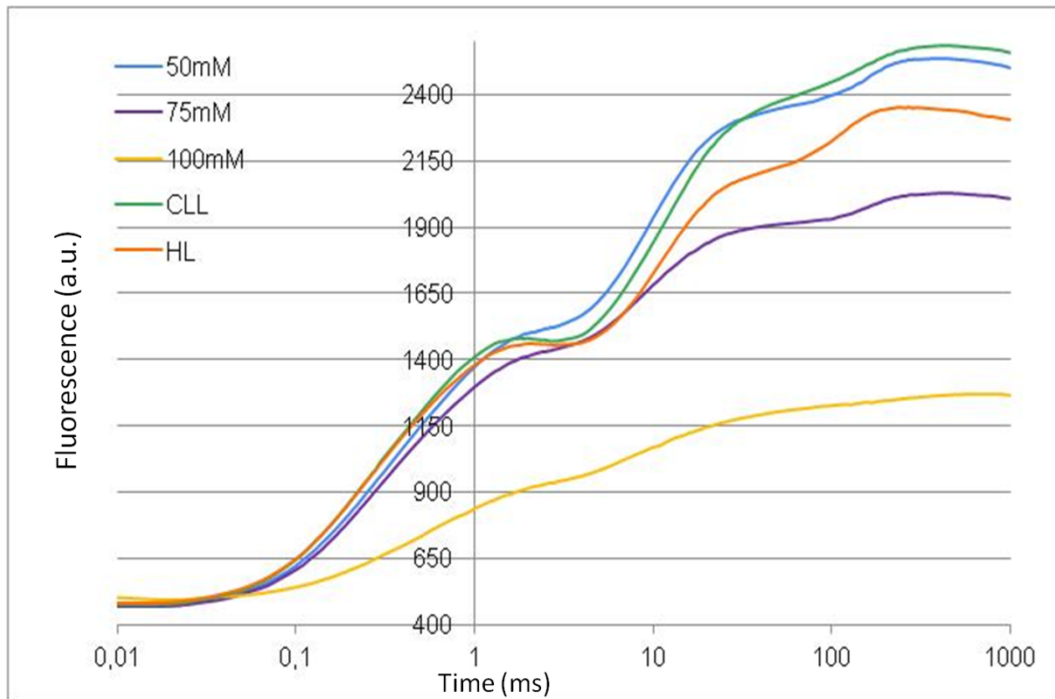
### 3.2 Φθορισμός

Πολλές από τις αλλαγές στο φυσικό περιβάλλον των φυτών (ένταση και ποιότητα φωτισμού, διαθεσιμότητα νερού, διαθεσιμότητα θρεπτικών στοιχείων, έκθεση σε ρυπαντές, θερμοκρασία, αύξηση του CO<sub>2</sub>, κ.ά.) προκαλούν ριζικές αλλαγές στη δομή και λειτουργία του φωτοσυνθετικού μηχανισμού (Webber and Baker, 1996, Vothknecht and Westhoff, 2001).

Υπολειτουργία ή βλάβες στο φωτοσυνθετικό μηχανισμό συνεπάγονται μειωμένη φωτοσύνθεση και κατ' επέκταση μειωμένη φυτική παραγωγή. Επομένως είναι σημαντικό να γνωρίζουμε τα όρια εύρυθμης λειτουργίας του φωτοσυνθετικού μηχανισμού αλλά και ει δυνατόν τρόπους αποκατάστασης αυτών. Στο πνεύμα αυτό, η παρούσα μελέτη εστιάστηκε και στη φωτοσύνθεση. Ένας γρήγορος, μη επεμβατικός και πολύ πληροφοριακός τρόπος να “δούμε” τη δομή και τη λειτουργία του φωτοσυνθετικού μηχανισμού είναι μέσω του φθορισμού της χλωροφύλλης. Οι χλωροφύλλες είναι οι μοναδικές χρωστικές οι οποίες παρουσιάζουν το φαινόμενο του φθορισμού. Σε φυσιολογικές θερμοκρασίες τα μόρια της

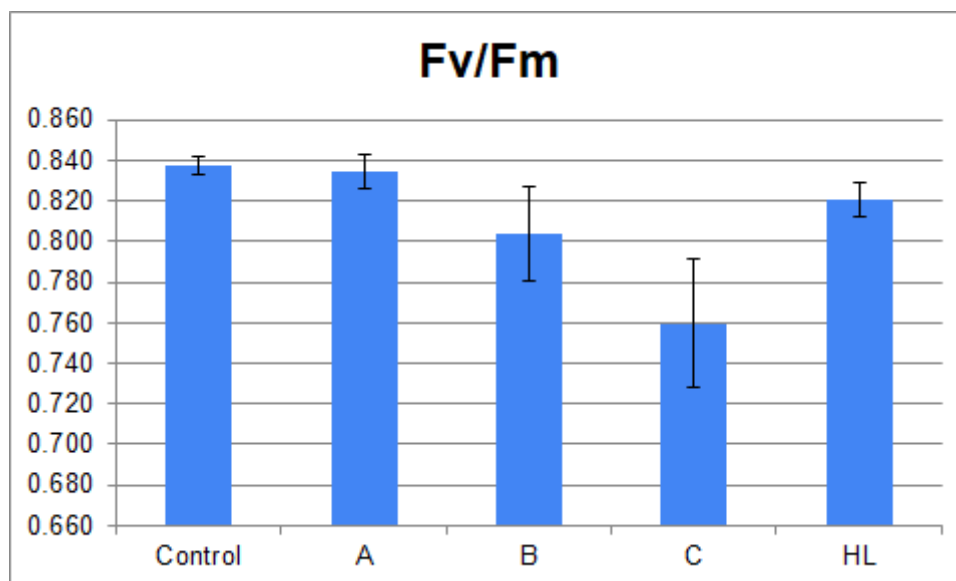


χλωροφύλλης του PSII εκπεμπουν φθορισμό όταν υπόκεινται σε ορατή ακτινοβολία (φως). Η ένταση του φθορισμού παραμένει σταθερή εφόσον η ένταση της φωτεινής ακτινοβολίας παραμένει σταθερή και τα φυτά έχουν προσαρμοστεί στη συνθήκη αυτή. Όταν ένα φύλλο παραμένει στο σκοτάδι για κάποιο χρονικό διάστημα και μετά αιφνιδιαστεί από μεγάλη ένταση φωτισμού, εκπέμπει ακτινοβολία φθορισμού, η οποία ακολουθεί μία χαρακτηριστική καμπύλη στη διάρκεια χρόνου περίπου ίση με 1 sec, μέσω της οποίας μπορούν να υπολογιστούν αρκετές παράμετροι και να βγουν συμπεράσματα που αφορούν στην καταπόνηση που ίσως δέχεται το PSII (Καραμπουρνιώτης, 2012, Ρουμπελάκη Αγγελάκη, 2018). Το Φωτοσυστήμα II (PS II) είναι ιδιαίτερα ευαίσθητο σε αβιοτικές καταπονήσεις όπως υψηλή θερμοκρασία, αλατότητα, ωσμωτική καταπόνηση κ.λπ. Η αλατότητα επηρεάζει τη δραστηριότητα του PS II και τα αποτελέσματά του ποικίλλουν ανάλογα με τη διάρκεια του στρες και με την ποικιλία του φυτικού είδους. Η κινητική επαγωγής χλωροφύλλης και φθορισμού έχει αναδειχθεί ως ένα πολύ γρήγορο, ευαίσθητο και μη επεμβατικό εργαλείο για την ανίχνευση αντιδράσεων στο στρες στα πρώιμα αναπτυξιακά στάδια. Το PS II εμφανίζει λειτουργική και δομική ετερογένεια, εκτελώντας “χρέη” φωτοσυλλεκτικής κεραίας αλλά και “γείωσης” αφού αποσβένει την περίσσεια ενέργειας όταν οι συνθήκες το καλούν (Jajoo, 2013). Μέσω λοιπόν του επαγωγικού φθορισμού της χλωροφύλλης μελετήθηκε η δομή και η λειτουργία του φωτοσυνθετικού μηχανισμού με μη επεμβατικό τρόπο. Καταγράφηκαν περίπου 10 καμπύλες επαγωγικού φθορισμού για κάθε μεταχείριση και υπολογίστηκε ο μέσος όρος τους. Από την καταγραφή του επαγωγικού φθορισμού διαπιστώθηκε ότι η καταπόνηση των φυτών γίνεται εμφανής στο φωτοσυνθετικό μηχανισμό μέσα στις 24 ώρες εφαρμογής του stress (εικ. 3.4).



**Εικόνα 3.4:** Καμπύλες επαγωγικού φθορισμού της χλωροφύλλης, όπως καταγράφηκαν με το Plant Efficiency Analyser. Απεικονίζονται οι μέσοι όροι των καμπυλών που μετρήθηκαν για κάθε μεταχείριση. Ο χρόνος είναι σε λογαριθμική κλίμακα.

Η καμπύλη του control εμφανίζει τις χαρακτηριστικές κορυφές J, I, P που υποδεικνύουν τη φυσιολογική δομή και λειτουργία του φωτοσυστήματος II. Είναι εμφανές ότι αυξανόμενης της αλατότητας η καμπύλη φθορισμού αλλάζει μορφή και χάνονται σταδιακά οι κορυφές J, I, P, με μείωση κυρίως του  $F_m$ . Η καμπύλη της μεταχείρισης HL εμφανίζεται μεταξύ της μεταχείρισης 50mM και 75 mM, ενώ τη μεγαλύτερη βλάβη εμφανίζει η καμπύλη των φυτών με 100 mM NaCl. Συνηθέστερα ως δείκτης της καταπόνησης του φωτοσυνθετικού μηχανισμού χρησιμοποιείται η φωτοσυνθετική απόδοση των φυτών ( $F_v/F_m$ ) που παίρνει τιμές ανάλογες προς την φωτοσυνθετική απόδοση ανά φωτόνιο. Ο λόγος  $F_v/F_m$  αποτελεί ένδειξη της φωτοχημικής ικανότητας, ο οποία πράγματι δείχνει σημαντικές διαφορές σε συνάρτηση με τις μεταχειρίσεις (εικ. 3.5).

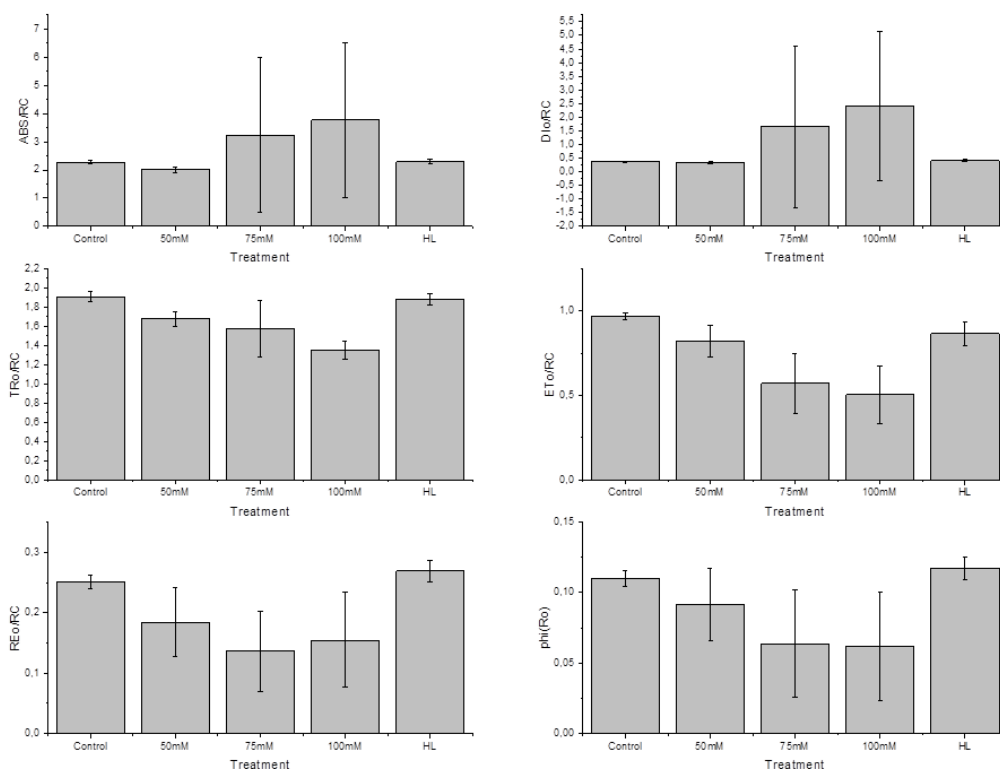


**Εικόνα 3.5:** Γραφική παράσταση των τιμών της φωτοσυνθετικής απόδοσης ( $F_v/F_m$ ) των φυτών στις μεταχειρίσεις του πειράματος : Control = 0 mM NaCl, A= 50mM NaCl, B= 75 mM NaCl, C= 100 mM NaCl, HL= 0 mM NaCl - υψηλός φωτισμός.

Οι φυσιολογικές τιμές του  $F_v/F_m$  κυμαίνονται ανάμεσα στο 0,80-0,85. Οι τιμές που αποκλίνουν από αυτά τα φυσιολογικά όρια αποτελούν ένδειξη βλάβης στο PSII που μπορούν να προκύψουν από πληθώρα παραγόντων καταπόνησης. Στο πείραμα ενώ η μεταχείριση με 50 mM NaCl δεν δείχνει σημαντική διαφορά από το control, οι άλλες δύο μεταχειρίσεις αλατότητας (75 και 100 mM NaCl) δείχνουν σημαντική πτώση της φωτοσυνθετικής απόδοσης, ενώ η μεταχείριση HL οριακά μόνο εμφανίζει μειωμένη τιμή σε σχέση με το control. Επομένως, όπως αναμενόταν η μεταχείριση με υψηλό φωτισμό 200  $\mu E$  αποτελεί καταπόνηση για τα φυτά αυτά, που συγκρίνεται με καταπόνηση αλατότητας μεταξύ 50 και 75 mM NaCl.

Ακολούθησε ανάλυση των καμπυλών κατά JIP-test (Strasser and Strasser, 1995), ώστε να αποκαλυφθούν οι λεπτομέρειες της δομής και της λειτουργίας του φωτοσυνθετικού μηχανισμού. Στην εικ. 3.6 απεικονίζονται επιλεγμένα κάποιες από τις παραμέτρους που υπολογίζονται με τη μέθοδο JIP-test. Η παράμετρος ABS/RC δηλώνει την απορρόφηση της φωτοσυλλεκτικής κεραίας ανά ενεργό κέντρο αντίδρασης του φωτοσυνθετικού μηχανισμού, το DIO/RC είναι η απόσβεση της ενέργειας ανά ενεργό κέντρο αντίδρασης, το TRo/RC δηλώνει την ενέργεια που απορροφάται και που είναι διαθέσιμη για ωφέλιμο έργο στα ενεργά κέντρα αντίδρασης, το ETo/RC είναι η ενέργεια που διοχετεύεται σε ηλεκτρονιακή μεταφορά μετά το διαχωρισμό των φορτίων στο κέντρο αντίδρασης του

PSII, το REo/RC δηλώνει την ενέργεια που ανάγει τους τελικούς αποδέκτες των ηλεκτρονίων στο φωτοσύστημα I και επομένως δηλώνει την ενέργεια που φτάνει να διοχετευτεί στον κύκλο του Calvin, δηλαδή στη σύνθεση σακχάρων. Τέλος, η παράμετρος φρο αποτελεί μια άλλη έκφραση της φωτοσυνθετικής απόδοσης ( $F_v/F_m$ ) και ως εκ τούτου οι δύο παράμετροι εμφανίζουν παρόμοιο πρότυπο αλλαγών.



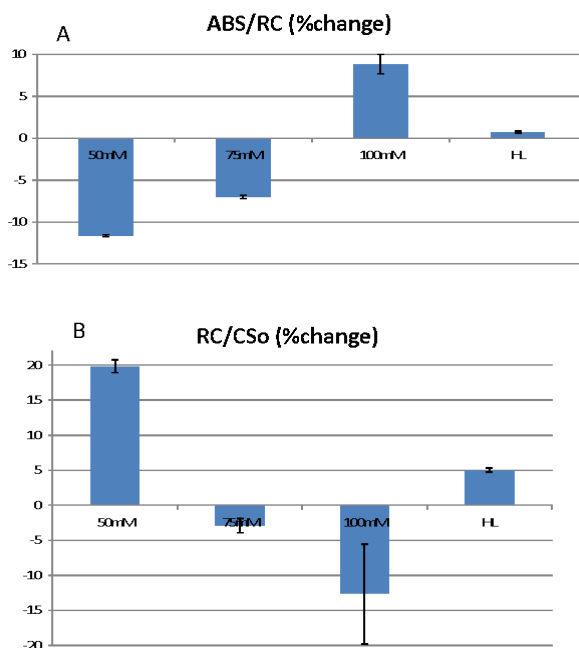
**Εικόνα 3.6:** Γραφικές παραστάσεις παραμέτρων της JIP ανάλυσης των καμπυλών επαγωγικού φθορισμού: ABS/RC, DIO/RC, TRo/RC, ETo/RC, REo/RC, φRo.

Από τα αποτελέσματα της εικ. 3.6 διακρίνεται ότι ακόμα και η μεταχείριση των 50 mM NaCl, παρόλο που από τις καμπύλες του φθορισμού και το λόγο  $F_v/F_m$  δεν φαίνεται να καταπονείται ιδιαίτερα, εντούτοις υφίσταται μεταβολές στη δομή και λειτουργία του φωτοσυνθετικού μηχανισμού, καίτοι οριακές. Σημαντική διαφοροποίηση της μεταχείρισης 50 mM NaCl σε σχέση με το control αποτελεί η παράμετρος TRo/RC, γεγονός που σημαίνει ότι μια από τις πρωταρχικές αλλαγές που συμβαίνουν στο φωτοσυνθετικό μηχανισμό με την έναρξη μιας ήπιας καταπόνησης είναι η μείωση της ικανότητας παγίδευσης της ενέργειας των φωτονίων στον πυρήνα του φωτοσυστηματος II. Οι μεγάλες

διακυμάνσεις που παρατηρούνται στις μεταχειρίσεις 75 και 100 mM NaCl, όσον αφορά στις παραμέτρους ABS/RC και DIO/RC υποδεικνύουν ότι υπάρχει μεγάλη ετερογένεια στη φυλλική διατομή με κέντρα αντίδρασης που απενεργοποιούνται υπό το βάρος της καταπόνησης και άλλα που εξακολουθούν να λειτουργούν. Υπολογισμός των % μεταβολών, σε σχέση με το control, α) του μεγέθους της φωτοσυλλεκτικής κεραίας ABS/RC και β) του πλήθους των ενεργών κέντρων ανά επιφάνεια διατομής, δείχνει ότι σε πολύ ήπια μεταχείριση αλατότητας (50mM) το μέγεθος της φωτοσυλλεκτικής κεραίας μειώνεται, ενώ αντίστοιχα αυξάνει ο αριθμός των κέντρων αντίδρασης. Τα δύο αυτά χαρακτηριστικά είναι ενδεικτικά μιας διαμόρφωσης τύπου υψηλού φωτισμού. Είναι μάλιστα εντυπωσιακό ότι όσον αφορά στα δύο αυτά χαρακτηριστικά η μεταχείριση των 50mM ξεπερνά ακόμα και τη μεταχείριση του υψηλού φωτισμού (HL). Αν και πρώιμο, μπορούμε να υποθέσουμε ότι το φυτό στην προσπάθειά του να προσαρμοστεί στις συνθήκες καταπόνησης που υφίσταται υιοθετεί έναν μηχανισμό παρόμοιο με την προσαρμογή σε συνθήκες υψηλού φωτισμού. Η μεταχείριση των 100mM δείχνει ένα πρότυπο εντελώς αντίθετο από αυτό των 50mM: αύξηση του μεγέθους της φωτοσυλλεκτικής κεραίας και μείωση των κέντρων αντίδρασης, δηλ. μια προσαρμογή που είναι αναμενόμενη για φυτά προσαρμοσμένα σε χαμηλό φωτισμό. Αφού η μεταβολές αυτές έχουν υπολογιστεί σε σχέση με το control με το οποίο μοιράζονται την ίδια ένταση φωτισμού (10  $\mu$ E), ουσιαστικά τα φυτά στη μεταχείριση των 100 mM φαίνεται να αποκτούν τέτοια διαμόρφωση σαν να υφίστανται ακόμα χαμηλότερο φωτισμό. Τα δε φυτά στη μεταχείριση των 75mM δείχνουν μια ενδιάμεση κατάσταση μεταξύ των άλλων δύο. Επομένως, διακρίνουμε μια τάση να γίνει διαχείριση της προσπίπτουσας ενέργειας μέσω της πλαστικότητας του φωτοσυνθετικού μηχανισμού. Δεδομένου ότι τα φυτά των 100 mM είχαν ορατά σημάδια έντονης καταπόνησης (μαρασμός), υποθέτουμε ότι τα φυτά αυτά αδυνατούν να διαχειριστούν σωστά την ενέργεια και να διαμορφώσουν το φωτοσυνθετικό τους μηχανισμό με τρόπο συμφερόντα (κάτι που επιτυγχάνουν τα φυτά των 50mM) και γι' αυτό καταρρέουν.

Η απόσβεση της προσλαμβανόμενης ενέργειας (DIO/RC) εμφανίζει αυξητική τάση με την επίδραση της αλατότητας, ενώ TRo/RC, ETo/RC και REo/RC εμφανίζουν πτωτική τάση. Είναι λογικό σύμφωνα και με τα προηγούμενα ότι όσο αυξάνεται η ένταση της καταπόνησης τα φυτά θα εμφανίζουν αδυναμία για σωστή διαχείριση της ενέργειας, πράγμα που αντικατοπτρίζεται ακριβώς με τις παραμέτρους αυτές, δηλ. μεγαλύτερο μέρος

της προσλαμβανόμενης ενέργειας συνιστά απώλεια (DIO/RC) αντί να παράξει έργο (TRo/RC, ETo/RC). Έτσι, λιγότερη ενέργεια καταλήγει να φτάσει στο φωτοσύστημα I και να ανάγει τους τελικούς αποδέκτες (REo/RC) και συνεκδοχικά λιγότερη ενεργεια θα παραχθεί για να “κινήσει” τον κύκλο του Calvin και να συντεθούν σάκχαρα.



**Εικόνα 3.7:** Γραφικές παραστάσεις της % μεταβολής των παραμέτρων (A) ABS/RC και (B) RC/CSo του JIP-test. Οι % μεταβολές υπολογίστηκαν με βάση τις αντίστοιχες τιμές του Control LL.

Από τη βιβλιογραφία είναι γνωστό ότι η μείωση των ρυθμών φωτοσύνθεσης σε φυτά υπό αλατότητα σχετίζεται άμεσα με τη μείωση του υδατικού δυναμικού (Ref). Υπάρχουν εργασίες που αναφέρουν ότι η φωτοσύνθεση αναστέλλεται όταν συσσωρεύονται υψηλές συγκεντρώσεις Na + και/ή Cl<sup>-</sup> στους χλωροπλάστες (Ref). Ενώ κάποιοι αναφέρουν ότι η φωτοσυνθετική μεταφορά ηλεκτρονίων είναι σχετικά μη ευαίσθητη στα άλατα (Ref), στην παρούσα μελέτη διαπιστώνουμε το αντίθετο. Αυτή η ασυμφωνία μπορεί κάλλιστα να οφείλεται στο γεγονός ότι α) μελετήσαμε τις διαφοροποιήσεις που συμβαίνουν σε ένα πολύ πρώιμο (αρχικό) στάδιο της καταπόνησης και β) μελετήσαμε τί συμβαίνει ακόμα και σε πολύ ήπια καταπόνηση. Πράγματι, στις περισσότερες μελέτες οι ερευνητές υποβάλλουν τα φυτά είτε σε πολύ ισχυρές καταπονήσεις ή σε μακρόχρονες καταπονήσεις (ημέρες ή και εβδομάδες πολλές φορές). Ως εκ τούτου, σε ισχυρές συνθήκες καταπόνησης πάρα πολλές

συνθήκες μεταβάλλονται ενδογενώς με αποτέλεσμα να παρακολουθούνται όχι πλέον οι πρωτογενείς προσαρμογές, αλλά δευτερογενείς και τριτογενείς. Πάντως, και άλλες εργασίες αναφέρουν ότι επηρεάζεται είτε ο μεταβολισμός του άνθρακα είτε η φωτοφωσφορυλίωση με την επίδραση της καταπόνησης από αλατότητα (Ref). Επίσης, η ένταση της επίδρασης της αλατότητας στον φωτοσυνθετικό ρυθμό εξαρτάται και από το είδος και από τον γονότυπο του φυτού (Ref). Σε συμφωνία με τα αποτελέσματα της παρούσας εργασίας, υπάρχουν αναφορές ότι σε χαμηλή συγκέντρωση η αλατότητα μερικές φορές διεγείρει τη φωτοσύνθεση (Ref). Στις περισσότερες περιπτώσεις όμως οι συνθήκες είναι τόσο έντονες που ο φωτοσυνθετικός ρυθμός επηρεάζεται αρνητικά τόσο άμεσα από την ίδια την αλατότητα, όσο και έμμεσα από άλλες, δευτερεύουσες επιπτώσεις της στο φυτό (Ref). Είναι χαρακτηριστικό ότι άλλοι ερευνητές αναφέρουν έως και σημάδια γήρανσης στα φυτά, γεγονός που αποδεικνύει πόσο έντονη είναι η υφιστάμενη καταπόνηση. Κάποιοι ερευνητές αναφέρουν ότι αλλαγές σε ενζυμικές δραστηριότητες προκαλούν αλλαγές στην κυτταρική δομή και κατ' επέκταση επιδρούν στην φωτοσύνθεση (Ref), όμως, δεν είναι σαφές αν στην πραγματικότητα συμβαίνει το αντίθετο: οι πρώτες αλλαγές που συμβαίνουν στο φωτοσυνθετικό μηχανισμό επηρεάζοντας όλη τη διαχείριση της ενέργειας, μέχρι και τη σύνθεση των σακχάρων είναι επίσης πιθανόν να επηρεάζουν άλλες μεταβολικές διαδικασίες και κατ' επέκταση ενζυμικές ενεργότητες.

Άλλος ένας παράγοντας που επιδρά αρνητικά στη φωτοσύνθεση είναι βέβαια και η μείωση της στοματικής αγωγιμότητας για την εξοικονόμηση νερού, η οποία οδηγεί στον περιορισμό της διαθεσιμότητας του CO<sub>2</sub> για τις αντιδράσεις καρβοξυλίωσης (σκοτεινές αντιδράσεις φωτοσύνθεσης) (Ref).

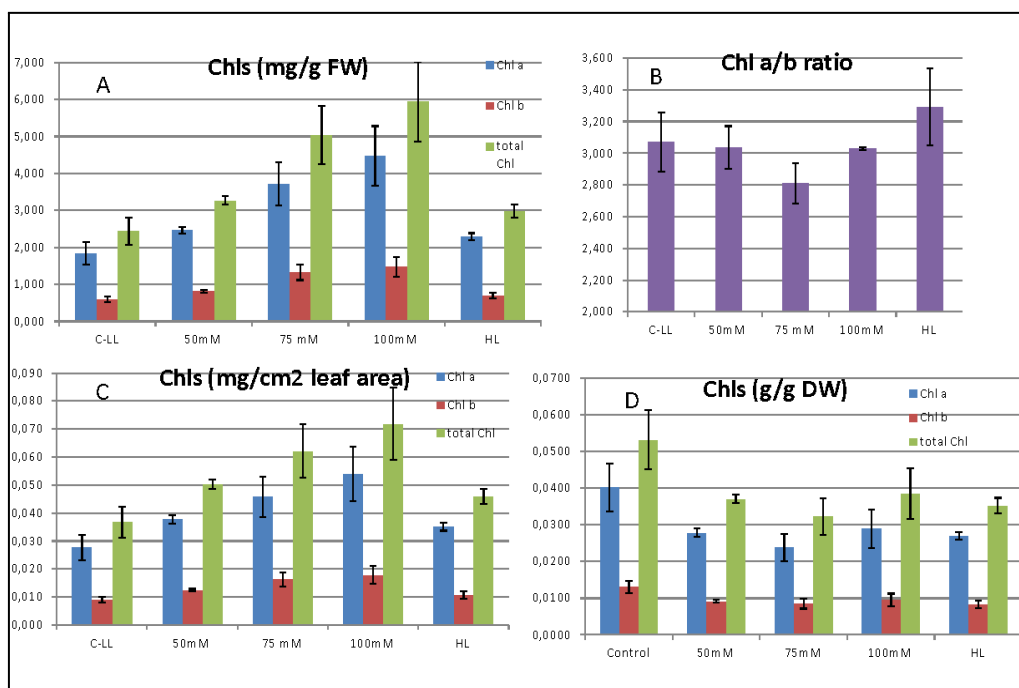
### **3.3 Χλωροφύλλη**

Ενδεικτικές της φωτοσυνθετικής λειτουργίας είναι και οι χλωροφύλλες. Οι χλωροφύλλες α και β είναι οργανικές ενώσεις (χρωστικές) που απορροφούν την ορατή ακτινοβολία και δρουν ως σύμπλοκα με πρωτεΐνες του φωτοσυνθετικού μηχανισμού για να μετατρέψουν την φωτονιακή ενέργεια σε χημική (Ρουμπελάκη Αγγελάκη, 2018). Προκειμένου να έχουμε μια πλήρη άποψη των αλλαγών που συμβαίνουν στα επίπεδα των χλωροφυλλών, αυτά εκφράστηκαν ανά φυλλική επιφάνεια, ανά φρέσκο βάρος και ανά ξηρό βάρος (εικ.

3.8). Τα αποτελέσματά μας ανά FW και ανά φυλλική επιφάνεια έδειξαν σχετικά μικρή διαφοροποίηση των χλωροφυλλών (εικ. 3.8) στα φυτά του HL, σε σχέση με το control. Τα φυτά της αλατότητας όμως έδειξαν μεγάλη αύξηση των χλωροφυλλών τους. Τα αποτελέσματα αυτά μπορούν να θεωρηθούν μόνο πλασματικά αφού η μεγάλη απώλεια υγρασίας που προκαλείται με την αλατότητα, αλλά και με την έντονη διαπνοή στο HL, αλλοιώνει τα δεδομένα. Πράγματι, τα αποτελέσματα ανά ξηρό βάρος δείχνουν ότι τα φυτά του HL έχουν αυξημένα επίπεδα χλωροφυλλών σε σχέση με το control, ενώ αυτά της αλατότητας έχουν μειωμένα επίπεδα που φτάνουν σε αυτά του HL. Επομένως, από τις πρώτες επιδράσεις της αλατότητας είναι να μειώσει τα επίπεδα χλωροφυλλών. Τα αποτελέσματά μας συμφωνούν με τη διεθνή βιβλιογραφία, όπου αναφέρεται ότι ένα δυσμενές αποτέλεσμα του στρες αλατότητας είναι η μειωμένη βιοσύνθεση της χλωροφύλλης (Hasanuzzaman et al., 2013).

Το σύμπλοκο του PS II στα ανώτερα φυτά και τα πράσινα φύκη, αποτελείται από τον πυρήνα του φωτοσυστήματος (κέντρο αντίδρασης, RC) και ένα σύμπλοκο που αποτελεί την φωτοσυλλεκτική κεραία (Light Harvesting Complex, LHC II). Το LHC II συλλέγει το φως και προωθεί την ενέργειά του στο κέντρο αντίδρασης. Το κέντρο αντίδρασης κυρίως επιτελεί τη φωτοχημεία της όλης διαδικασίας, δηλαδή της φωτόλυση του νερού. Τα κέντρα αντίδρασης του φωτοσυστήματος II (PSII) επανδρώνονται αποκλειστικά από χλωροφύλλη α, ενώ η φωτοσυλλεκτική του κεραία (LHCII) επανδρώνεται κυρίως από χλωροφύλλη β. Επομένως, ο λόγος χλωροφύλλης α/β γίνεται ένας δείκτης της αναλογίας κέντρων αντίδρασης / φωτοσυλλεκτική κεραία, ενώ επίσης είναι γνωστό ότι σε συνθήκες χαμηλού φωτισμού αυξάνεται το μέγεθος της φωτοσυλλεκτικής κεραίας αναλογικά προς τα κέντρα αντίδρασης, ενώ αντίθετα, σε συνθήκες υψηλού φωτισμού αυξάνεται το πλήθος των κέντρων αντίδρασης αναλογικά με το μέγεθος της φωτοσυλλεκτικής κεραίας (Ρουμπελάκη Αγγελάκη, 2018).





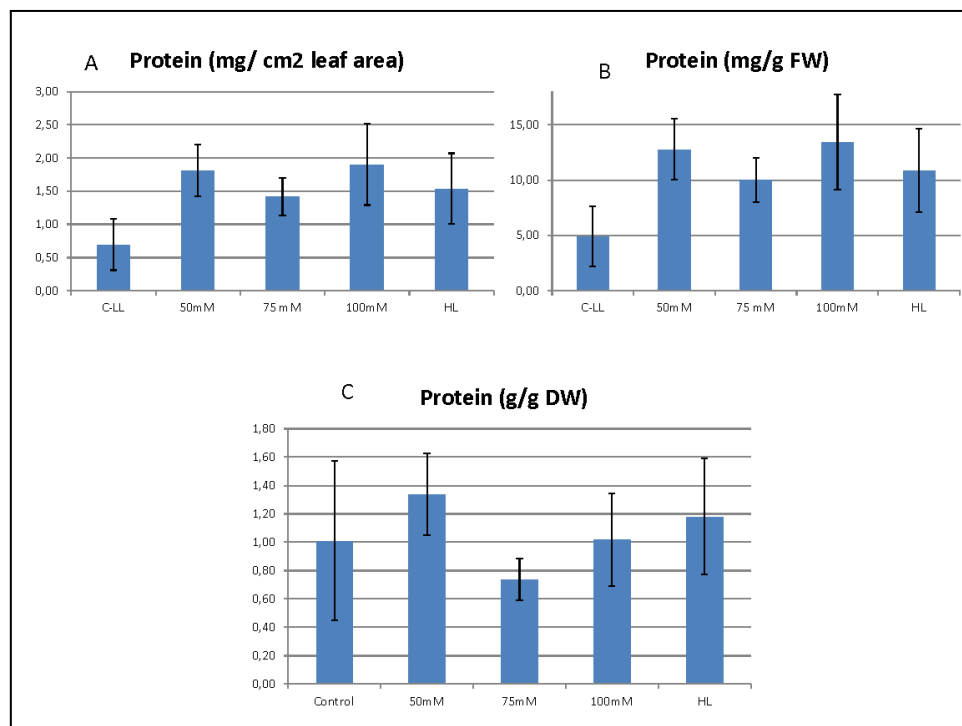
**Εικόνα 3.8:** Γραφικές παραστάσεις των χλωροφυλλών α και β και της συνολικής χλωροφύλλης (α + β) στις μεταχειρίσεις του πειράματος, ανά φρέσκο βάρος (A), ανά φυλλική επιφάνεια (B), και ανά ξηρό βάρος (C), καθώς και ο λόγος χλωροφύλλης α/β.

Ο λόγος χλωροφύλλης α/β (εικ. 3.8B) έδειξε μεγάλη αύξηση στο HL σε σχέση με το control, όπως ακριβώς αναμενόταν, αφού στο HL αυξάνεται η πυκνότητα των κέντρων αντίδρασης τα οποία επανδρώνονται από χλωροφύλλη α. Όμως τα φυτά της αλατότητας δεν έδειξαν ανάλογη αύξηση, μάλιστα παρουσιάζουν πτωτική τάση. Προφανώς, η αντίδραση του φωτοσυνθετικού μηχανισμού στην αλατότητα δεν προσομοιάζει σε φωτοπροσαρμογή όπως θα συνέβαινε μεταξύ υψηλού/χαμηλού φωτισμού, αλλά εστιάζεται σε βλάβες (οξειδωτική διασπαση) που συμβαίνουν στα συστατικά των φωτοσυνθετικών δομών (πιθανότατα καταστροφή κέντρων αντίδρασης λόγω αδυναμίας διατήρησης του κύκλου παραγωγής πρωτεϊνών που τα επανδρώνουν).

### 3.4 Πρωτεΐνες

Η εκτίμηση των συνολικών πρωτεϊνών έδωσε επίσης αξιολογικά αποτελέσματα (εικ. 3.9). Διαπιστώνουμε ότι το πρότυπο των αλλαγών στα επίπεδα των συνολικών πρωτεϊνών ανά μονάδα φυλλικής επιφάνειας και ανά φρέσκο βάρος είναι ακριβώς το ίδιο. Όλες οι

μεταχειρίσεις αυξάνουν τα επίπεδα των πρωτεϊνών τους σε σχέση με το control. Ανά ξηρό βάρος το control δείχνει αυξημένα επίπεδα μόνο σε σχέση με την μεταχείριση των 75mM. Όμως, λόγω της μεγάλης διακύμανσης που εμφανίζουν οι τιμές του control, επί του παρόντος δεν μπορούμε να αποφανθούμε και να συμπερασματολογήσουμε με ασφάλεια.

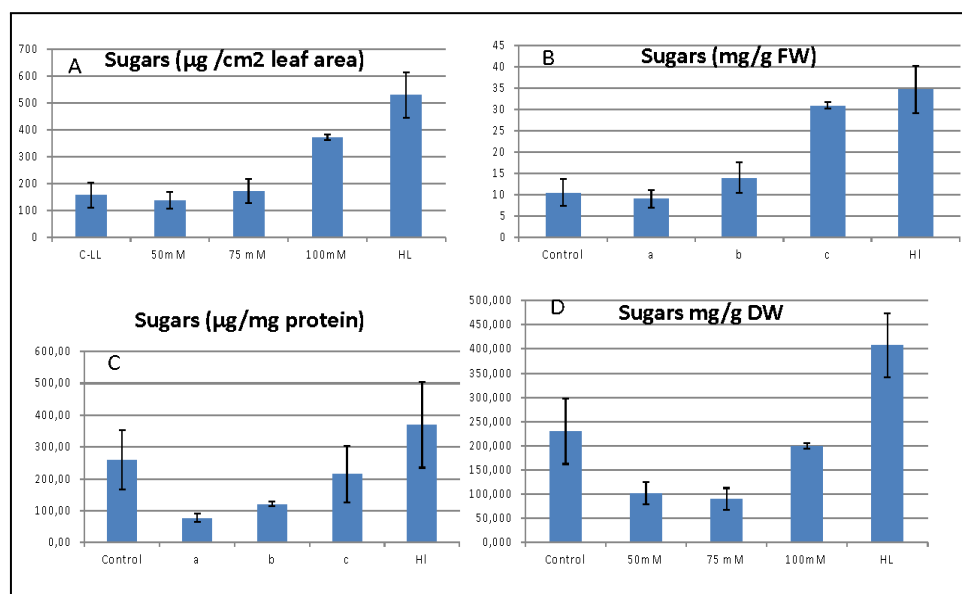


**Εικόνα 3.9:** Γραφικές παραστάσεις πρωτεϊνών

Κατά την διάρκεια των καταπονήσεων είναι σύνηθες να αυξηθεί ο αριθμός των πρωτεϊνών ως αντίδραση στον παράγοντα που προκαλεί το στρες ή/και στην ανεπάρκεια του φυτού να προσλάβει σημαντικά στοιχεία για τον μεταβολισμό του (Ref). Στα φυτικά κύτταρα υπό πίεση μπορεί να συσσωρευτούν πρωτεΐνες που παράγονται όπως έχει παρατηρηθεί και υπό την επίδραση άλλων αβιοτικών παραγόντων καταπόνησης (Ref). Συγκεκριμένα, παράγονται πρωτεΐνες εξειδικευμένες στο στρες αλατότητας. Η συσσώρευση των πρωτεϊνών παρέχει στο φυτό μία πηγή αζώτου, ενώ επίσης παίζουν σημαντικό ρόλο για την ωσμωτική προσαρμογή του. Σημαντικό αριθμός τέτοιων κυτταροπλασματικών πρωτεϊνών διεγείρονται από την αλατότητα και μεταβάλλουν το ιζώδες των κυττάρων (Rasool et al., 2013).

### 3.5 Ολικά σάκχαρα

Τα σάκχαρα (γλυκόζη) στα φυτά παράγονται πρωτογενώς μέσω της φωτοσύνθεσης (κύκλος Calvin, σκοτεινές αντιδράσεις φωτοσύνθεσης) με χρήση του δεσμευμένου ατμοσφαιρικού CO<sub>2</sub> (ref). Δευτερογενώς μπορεί να παράγονται και από τη διάσπαση αποθηκευμένων πολυσακχαριτών (π.χ. άμυλο).



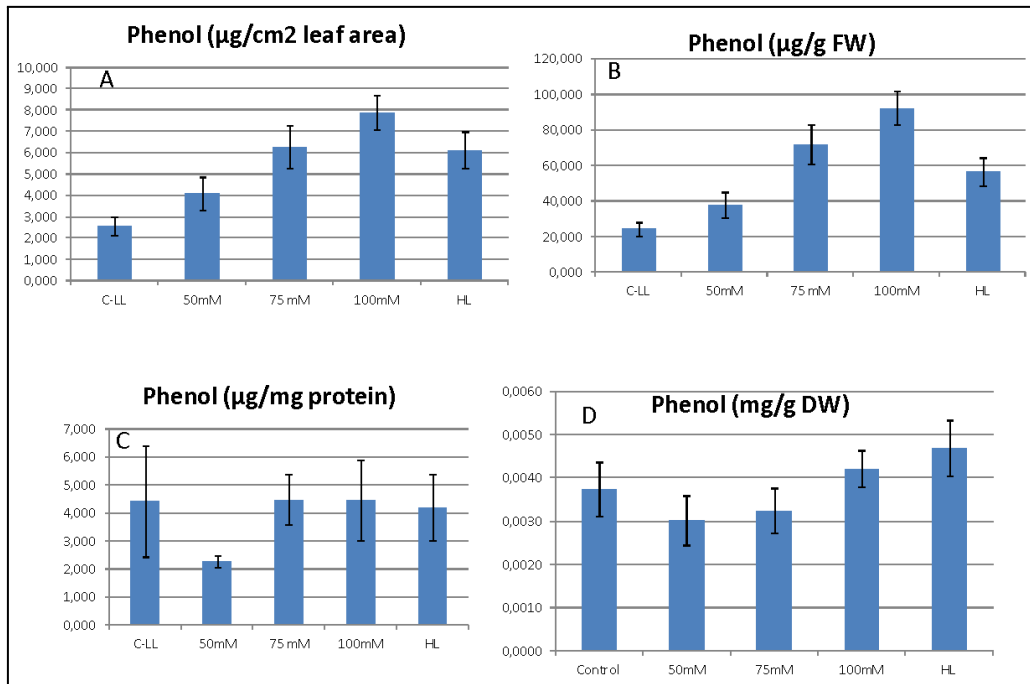
**Εικόνα 3.10:** Γραφικές παραστάσεις ολικών σακχάρων ανά φυλλική επιφάνεια (A), ανά φρέσκο βάρος (B), ανά πρωτεΐνη (C) και ανά ξηρό βάρος, στις μεταχειρίσεις του πειράματος

Στα αποτελέσματά μας (εικ. 3.10) ανά φυλλική επιφάνεια και ανά φρέσκο βάρος (εικ. 3.10 A και B) τα αποτελέσματα είναι πολύ όμοια και δείχνουν μια αύξηση των σακχάρων σε όλες σχεδόν τις μεταχειρίσεις σε σχέση με το control. Εξάιρεση αποτελεί η μεταχείριση των 50mM στην οποία τα επίπεδα των ολικών σακχάρων είναι ίδια με αυτά του Control. Επίσης, ανά πρωτεΐνη και ανά ξηρό βάρος μεταξύ τους δείχνουν την ίδια τάση (εικ. 3.10, C και D): τα φυτά της αλατότητας έχουν μειωμένα σάκχαρα σε σχέση και με το control και με το HL. Μεταξύ τους όμως δείχνουν αυξητική τάση, όσο αυξάνεται η αλατότητα. Το HL τέλος έχει πολύ αυξημένα επίπεδα σακχάρων ειδικά ανά ξηρό βάρος. Είναι προφανές ότι στο HL παράγονται περισσότερα σάκχαρα μέσω της φωτοσύνθεσης. Είναι λογικό να περιμένουμε ότι σε φυτά που υφίστανται καταπόνηση και η φωτοσύνθεσή τους όπως είδαμε παραπάνω έχει υποστεί βλάβες, να έχουν μειωμένη συγκέντρωση σακχάρων. Πώς

όμως εξηγείται η αυξανόμενη συγκέντρωση σακχάρων μεταξύ των φυτών σε μεταχειρίσεις αλατότητας; Είναι πολύ πιθανό ότι φυτά που βρίσκονται σε έντονη καταπόνηση να κινητοποιούν διαδικασίες μεταβολισμού όπως η οξειδωτική διάσπαση πολυσακχαριτών (άμυλο) προκειμένου να ανταπεξέλθουν στις δυσμενείς συνθήκες, αφού μέσω της επιβαρυνμένης φωτοσύνθεσης δεν μπορούν να παράγουν την ενέργεια που απαιτείται για την επιβίωσή τους. Σε ήπιες καταστάσεις καταπόνησης (μικρή αλατότητα) είναι πιθανό να μη συμβαίνει αυτό, αφού η φωτοσύνθεσή τους δεν έχει επιβαρυνθεί τόσο πολύ από τις συνθήκες και διατηρεί μια έστω μικρή παραγωγή σακχάρων.

### **3.6 Φαινολικά**

Η καταπόνηση της αλατότητα προκαλεί υπερβολική μείωση της αλυσίδας φωτοσυνθετικών ηλεκτρονίων και προάγει την παραγωγή δραστικών ειδών οξυγόνου (ROS) και επομένως οξειδωτικό στρες. Τα ανώτερα φυτά έχουν αναπτύξει διαφορετικούς προσαρμοστικούς μηχανισμούς για τη μείωση της οξειδωτικής βλάβης που προκύπτει, μέσω της βιοσύνθεσης ενός πλήθους αντιοξειδωτικών. Μεταξύ αυτών, οι φαινολικές ενώσεις όπως τα φαινολικά οξέα, τα φλαβονοειδή και οι προανθοκυανιδίνες. Οι φαινολικές ουσίες είναι μία από τις κύριες ομάδες των φυτικών δευτερογενών μεταβολιτών, συμπεριλαμβανομένων πάνω από 9.000 διαφόρων ενώσεων. Διαθέτουν ένα ευρύ φάσμα βιολογικών λειτουργιών στα φυτά που σχετίζονται με την άμυνα τους προς βιοτικό και αβιοτικό στρες. Από τις σημαντικότερες δράσεις των φαινολικών είναι η προστασία από τα ROS που παράγονται όταν ο αερόβιος ή φωτοσυνθετικός μεταβολισμός επηρεάζεται από διάφορες περιβαλλοντικές πιέσεις, όπως η αλατότητα. Οι φαινολικές ενώσεις παίζουν ρόλο αντιοξειδωτικό στα κύτταρα και έχει βρεθεί ότι αυξάνονται σε καταστάσεις καταπόνησης (Ref) (Waśkiewicz et al., 2013, Ρουμπελάκη Αγγελάκη, 2018).



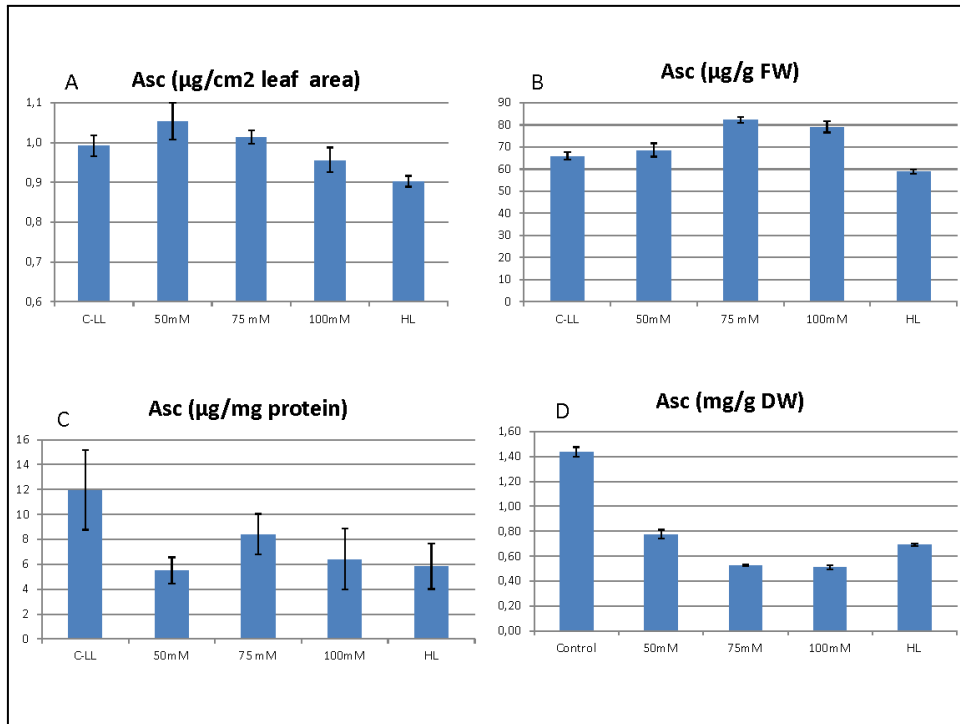
**Εικόνα 3.11:** Γραφικές παραστάσεις ολικών φαινολικών ανά φυλλική επιφάνεια (A), ανά φρέσκο βάρος (B), ανά πρωτεΐνη (C) και ανά ξηρό βάρος, στις μεταχειρίσεις του πειράματος

Στα αποτελέσματά μας (εικ. 3.11) ανά φυλλική επιφάνεια και ανά φρέσκο βάρος (εικ. 3.11, A και B) βλέπουμε σαφή αύξηση των φαινολικών σε όλες τις μεταχειρίσεις σε σχέση με το control. Το HL εμφανίζει κι αυτό μεγάλη αύξηση, αν και δεν φτάνει αυτή της μεταχείρισης με 100 mM NaCl. Είναι λογικό και αναμενόμενο να αυξάνονται τα φαινολικά σε όλες αυτές τις μεταχειρίσεις του πειράματος, δεδομένου ότι λόγω της καταπόνησης παράγονται ελεύθερες ρίζες που επάγουν τη σύνθεση φαινολικών. Ανά πρωτεΐνη όμως και ανά ξηρό βάρος (εικ. 3.11, C και D) βλέπουμε ότι είναι η μεταχείριση των 50 mM στη μία περίπτωση ή και αυτή των 75 mM στη δεύτερη περίπτωση, που εμφανίζουν μείωση των φαινολικών. Στα 100mM και στο HL είτε δεν βλέπουμε καμία αλλαγή σε σχέση με το control (C) είτε διαπιστώνουμε μια μικρή αύξηση.

### 3.7 Ασκορβικό οξύ

Η προκαλούμενη καταπόνηση από την αλατότητα προκαλεί έλλειμμα νερού στα φυτικά κύτταρα, λόγω της διαφοράς στο οσμωτικό δυναμικό, προκαλώντας σοβαρές αντιδράσεις στον μεταβολισμό. Η παραγωγή ROS αποτελεί μια από τις σημαντικότερες αντιδράσεις

στον μεταβολισμό που προκαλούν οξειδωτικές βλάβες στις μεμβράνες, στις πρωτεΐνες, στα λιπίδια ακόμα και στα νουκλεϊκά οξέα. Για την επιδιόρθωση της βλάβης που προκαλούν τα ROS, τα φυτά αναπτύσσουν ένα πολύπλοκο αντιοξειδωτικό σύστημα. Τα κύρια συστατικά αυτού του συστήματος περιλαμβάνουν καροτενοειδή, ασκορβικό, γλουταθειόνη και τοκοφερόλες, εκτός από ένζυμα όπως η υπεροξειδική δισμουτάση (SOD), η καταλάση (CAT), η υπεροξειδάση της γλουταθειόνης (GPX), οι υπεροξειδάσες και τα ένζυμα που εμπλέκονται στον κύκλο ασκορβικού-γλουταθειόνης όπως ασκορβική υπεροξειδάση (APX) και αναγωγή γλουταθειόνης (GR) τα οποία αυξάνουν την δραστηριότητά τους σε καταπόνηση αλατότητας. Η ενεργοποίηση των αντιοξειδωτικών έχει αποδειχθεί ότι απομακρύνει τα ROS και συνεισφέρει στην αντοχή της αλατότητας σε πολλές καλλιέργειες (Rasool et al., 2013). Το ασκορβικό αζύ ανήκει στα μη ενζυμικά μόρια το οποίο συντίθεται σε κυτταρόπλασμα ανώτερων φυτών κυρίως από τη μετατροπή της d-γλυκόζης. Το ασκορβικό έχει ουσιαστικό ρόλο σε διάφορες φυσιολογικές διεργασίες στα φυτά, συμπεριλαμβανομένης της ανάπτυξης, της διαφοροποίησης και του μεταβολισμού. Λειτουργεί ως αναγωγικό για πολλές ελεύθερες ρίζες, ελαχιστοποιώντας έτσι τη βλάβη που προκαλείται από το οξειδωτικό στρες. Σε συνθήκες καταπόνησης και συγκεκριμένα στην περίπτωση της αλατοτητας τα φυτά εμφάνισαν διαφορετική ικανότητα μεταβολισμού του ασκορβικού που αποδόθηκε στη διακύμανση της σύνθεσης και αναγέννησής του. Επίσης έχει αναφερθεί αύξηση ασκορβικού στα φύλλα που παρακολουθεί την αύξηση των συγκεντρώσεων αλατιού στο έδαφος σχεδόν ανάλογα (Telesinski et al., 2008, Hasanuzzaman et al., 2013).

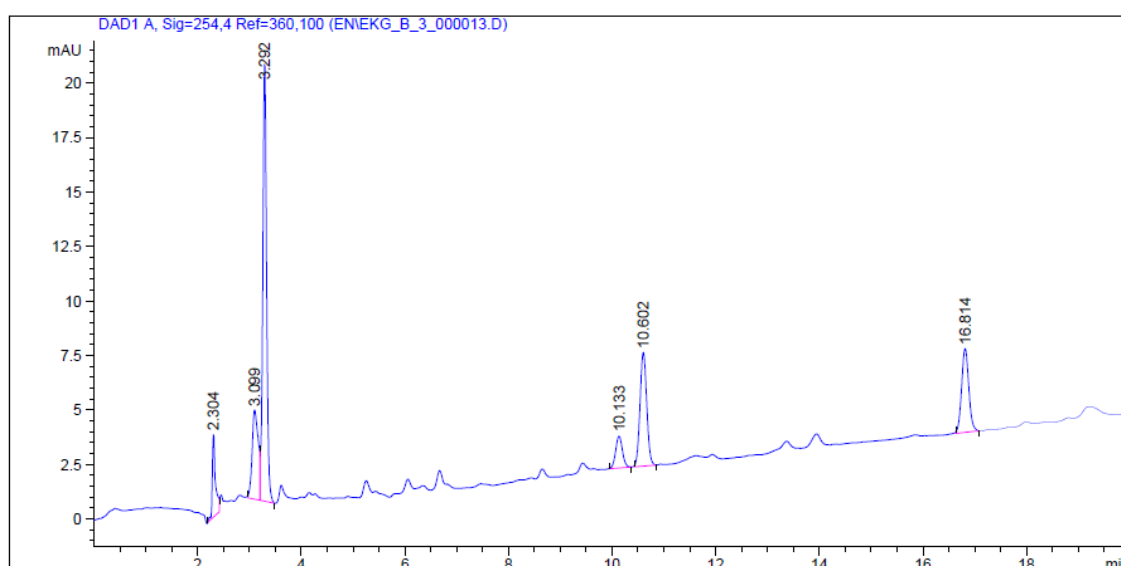


**Εικόνα 3.12:** Γραφικές παραστάσεις συγκεντρώσεων ασκορβικού ανά φυλλική επιφάνεια (A), ανά φρέσκο βάρος (B), ανά πρωτεΐνη (C) και ανά ξηρό βάρος, στις μεταχειρίσεις του πειράματος

Στα αποτελέσματά μας παρατηρείται πράγματι μια αύξηση του ασκορβικού στη μεταχείριση των 50mM, όταν η συγκέντρωσή του υπολογίζεται ανά φυλλική επιφάνεια (εικ. 12A), αλλά και στις μεταχειρίσεις των 75 και 100 mM, όταν υπολογίζεται ανά φρέσκο βάρος (εικ. 12B). Τα φυτά του HL σε κάθε περίπτωση εμφανίζουν μείωση του ασκορβικού. Υπολογιζόμενο ανά πρωτεΐνη και ανά ξηρό βάρος, σε όλες τις μεταχειρίσεις της αλατότητας το ασκορβικό εμφανίζεται μειωμένο κατά πολύ (εικ. 12 C και D). Μπορούμε να υποθέσουμε ότι οι αυξημένες ανάγκες για αντιοξειδωτικά μόρια κατα τις καταστάσεις καταπόνησης δημιουργεί και αυξημένη κατανάλωση αυτών, γι' αυτό και δεν παρατηρείται αύξηση. Αυτή η υποθεση ενισχύεται από τα αποτελέσματα που αφορούν στη μεταχείριση του HL, για την οποία γνωρίζουμε ότι εξ' ορισμού υφίσταται υψηλότερο οξειδωτικό στρες συγκριτικά με τον χαμηλό φωτισμό (control) και επομένως, ότι ασκορβικό παράγεται προφανώς καταναλώνεται με ταχύτερους ρυθμούς απ' ότι στον χαμηλό φωτισμό.

### 3.8 Πολυαμίνες

Οι πολυαμίνες (PAs) είναι χαμηλού μοριακού βάρους αλειφατικές αμίνες που εμπλέκονται στη ρύθμιση της ανάπτυξης των φυτών. Οι PA εμφανίζουν υψηλή βιολογική δραστηριότητα και εμπλέκονται σε ένα ευρύ φάσμα θεμελιωδών διεργασιών στα φυτά, όπως η αναπαραγωγή και η έκφραση γονιδίων, η ανάπτυξη και η ανάπτυξη, η γήρανση, η σταθεροποίηση της μεμβράνης, η ρύθμιση της ενζυμικής δραστηριότητας και η προσαρμογή σε βιοτικές και αβιοτικές καταπονήσεις. Επίσης οι PA λειτουργούν ως κυτταρικά σήματα σε ενδογενή ομιλία με ορμονικές οδούς συμπεριλαμβανομένου του ABA καθώς και ως ισχυροί επαγωγείς του NO στα φυτά που είναι ένα άλλο ισχυρό μόριο σηματοδότησης. Στα ανώτερα φυτά, οι πιο κοινές PA είναι η σπερμιδίνη (Spd), η σπερμίνη (Spm) και η υποχρεωτική πρόδρομη διαμίνη τους πουτρεσκίνη (Put).

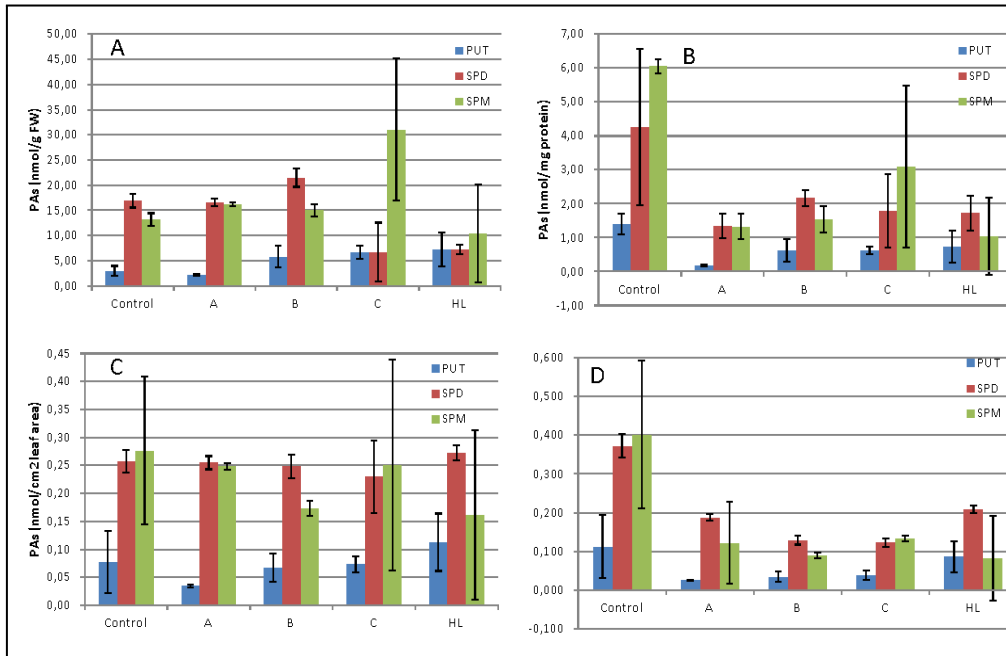


**Εικόνα 3.13:** Παράδειγμα ανάλυσης χρωματογραφήματος από High Performance Liquid Chromatography (HPLC), με τις χαρακτηριστικές κορυφές των πολυαμινών : Put (rt=3,292), Spd (rt=10.602), Spm (rt=16.814)

Βιβλιογραφικά υπάρχουν αναφορές που συσχετίζουν την αύξηση της σπερμιδίνης και την μείωση της πουτρεσκίνης στα κυτταρα του βλαστού και της ρίζας σε καταπόνηση απο αλατότητα και από αυτό εξαρτάται η αντοχή του φυτού. Έχει ακόμα τεκμηριωθεί ότι η προσθήκη εξωγενών PA βελτιώνει την αντοχή τους σε αλατότητα όπως για παράδειγμα η εφαρμογή Put αύξησε τις συγκεντρώσεις  $K^+$  και μείωσε τις συγκεντρώσεις  $Na^+$  και  $Cl^-$  στους ιστούς των φύλλων, γεγονός που έδειξε ότι το Put θα μπορούσε να βελτιώσει την



ανοχή της ευαίσθητης στο αλάτι ρυθμίζοντας την απορρόφηση και τη συσσώρευση ιόντων καθώς και βελτιώνοντας τις αντιοξειδωτικές ενζυμικές δραστηριότητες (Hasanuzzaman et al., 2013, Rasool et al., 2013).



**Εικόνα 3.13:** Γραφικές παραστάσεις συγκεντρώσεων των πολυαμινών ανά φρέσκο βάρος (A), ανά πρωτεΐνη (B), ανά φυλλική επιφάνεια (C) και ανά ξηρό βάρος, στις μεταχειρίσεις του πειράματος

Στην εικ.3.13A βλέπουμε ότι στις μεταχειρίσεις υψηλής αλατότητας (75 και 100 mM) έχουμε αύξηση των πολυαμινών και ειδικά της Put. Παρομοίως και στο HL, όμως χωρίς αντίστοιχη αύξηση της Spd και της Spm. Ανά φυλλική επιφάνεια διαπιστώνουμε μια τάση για αύξηση ουσιαστικά μόνο στην Put στις μεταχειρίσεις υψηλής αλατότητας (75 και 100mM) και στο HL. Αντίθετα, ανά πρωτεΐνη και ανά ξηρό βάρος διαπιστώνουμε μια τάση για μείωση των πολυαμινών και ειδικά της Put. Είναι πολύ πιθανό ότι στα πρώτα αυτά στάδια της καταπόνησης οι πολυαμίνες να μην παίζουν προστατευτικό ρόλο αλλά να αποτελούν πηγή αζώτου για να συντηρηθεί ο μεταβολισμός απαραίτητων πρωτεϊνών και άλλων σημαντικών βιομορίων (ref).

## 4 ΣΥΜΠΕΡΑΣΜΑΤΑ

### 4.1 Στρατηγικές αποκατάστασης και διαχείρισης

Η αύξηση της αλατότητας στα εδάφη είναι σχεδόν μη αναστρέψιμη ακόμα και αν χρησιμοποιείται συχνά αποστράγγιση και έκπλυση του εδάφους με νερα. Ιδιαίτερα στην περίπτωση εδαφών με βαριά μηχανική σύσταση, η έκπλυση των αλάτων είναι σπάνια αποτελεσματική. Επειδή η αποκατάσταση, η βελτίωση και η διαχείριση των εδαφών με αλατότητα απαιτεί πολύπλοκες και δαπανηρές τεχνολογίες, πρέπει να καταβληθούν όλες οι προσπάθειες για την αποτελεσματική πρόληψη με συνεχείς και σωστούς ελέγχους. Οι κατάλληλες πρακτικές διατήρησης του εδάφους και του νερού, που βασίζονται σε μια ολοκληρωμένη εκτίμηση υποβάθμισης του εδάφους ή της γης, μπορούν να παρέχουν ένα «σύστημα έγκαιρης προειδοποίησης» που παρέχει δυνατότητες για αποτελεσματικό έλεγχο της αλατότητας (ή αλκαλικότητας), την πρόληψη αυτών των περιβαλλοντικών καταπονήσεων και των ανεπιθύμητων οικολογικών, οικονομικών και κοινωνικών επιπτώσεων (ESDAC, 2023). Η αποκατάσταση των εδαφών που παρουσιάζουν ερημοποίηση εξαιτίας της αυξημένης αλατότητας είναι ένα πολύ δύσκολο και ίσως αδύνατο να επιτευχθεί και εξαρτάται αποκλειστικά τον βαθμό συσσώρευσης. Η διαχείριση της αλατότητας περιλαμβάνει αρκετές μεθόδους προσπάθειας επαναφοράς σε γόνιμο έδαφος ή προστασία πριν την αλατοποίηση. Μια προσωρινή μέθοδος είναι η μηχανική απομάκρυνση και αντικατάσταση του εδάφους με υψηλές συγκεντρώσεις αλατότητας. Η

μέθοδος αυτή είναι μια κοστοβόρα διαδικασία χωρίς να αποκλείει το ενδεχόμενο να συσσωρευτεί ξανά αλάτι και να εντείνει το πρόβλημα. Μια άλλη μέθοδος είναι εκείνη με την έκπλυση του εδάφους με μεγάλη ποσότητα νερού όπου τα άλατα διαλύονται και απομακρύνονται από τη ζώνη της ρίζας χάρη στην αποστράγγιση. Η αποτελεσματικότητα αυτής της μεθόδου εξαρτάται από πολλούς παράγοντες όπως από τον βαθμό στραγγίσης του νερού μέχρι την ποιότητα του νερού.

Μια άλλη εφαρμοσμένη τεχνική μείωσης της αλατότητας είναι η προσθήκη κοπριάς και άλλων χημικών ή φυσικών εδαφοβελτιωτικών για την αλλαγή της σύστασης και την καλύτερη αποστράγγιση του νερού. Επίσης η εναλλαγή κάποιων ειδών καλλιέργειας για κάποια χρόνια με στόχο την χλωρή λίπανση και εδαφοβελτίωση. Μια ακόμη εφικτή λύση που προτείνεται είναι η καλλιέργεια φυτικών ειδών με ανοχή στην αλατότητα ιδιαίτερα εάν το βρόχινο νερό ή τα υπόγεια ύδατα είναι ο μοναδικός τρόπος άρδευσης (Rasool et al., 2013)

## **4.2 Τελικά συμπεράσματα**

Με την διεξαγωγή του πειράματος αποδείχθηκε ότι το *Phaseolus vulgaris var. ασπροκόλι* παρουσίασε την αναμενόμενη ευαισθησία του στην αλατότητα από τις μικρότερες συγκεντρώσεις NaCl. Πολύ γρήγορα, μέσα σε 24 ώρες καταπόνησης έστω και με λίγο αλάτι (50 mM) υπάρχουν ενδείξεις αλλοιώσεων τόσο στη φωτοσύνθεση όσο και στο μεταβολισμό. Από τις παραμέτρους που μελετήθηκαν παρατηρήθηκε μια γενική αυξητική τάση στις συγκεντρώσεις ασκορβικού, φαινολών και σακχάρων. Τα σάκχαρα αυξάνονται πιθανώς επειδή τα κύτταρα προσπαθούν να αυξήσουν το οσμωτικό τους δυναμικό για να πάρουν νερό. Η αύξηση των σακχαρών μπορεί να σχετίζεται με τη φωτοσύνθεση. Η αυξημένη φωτοσύνθεση λόγω της πίεσης της καταπόνησης οδηγεί σε νέα σύνθεση σακχάρων. Επίσης τα αυξανόμενα σάκχαρα μπορεί να προκύπτουν και/ή από την αποδόμηση του συσσωρευμένου αμύλου. Το ασκορβικό και τα φαινολικά από την άλλη πλευρά, σαν δευτερογενείς μεταβολίτες αυξάνονται για να αντιμετωπίσει το οξειδωτικό στρες που προκλήθηκε από την καταπόνηση. Από αυτή την συμπεριφορά των φυτών είμαστε σε θέση να προβλέψουμε ότι τόσο η ευρωστία των φυτών όσο και η παραγωγή θα επηρεαστεί σημαντικά από τα σενάρια αύξησης της αλατότητας τα επόμενα χρόνια.

Επίσης το *Phaseolus vulgaris* var. ασπροκόλι παρουσίασε καταπόνηση στον υψηλό φωτισμό παρόμοιο με της αλατότητας αλλά όχι με την ίδια ταχύτητα και ένταση σε όλες τις παραμέτρους που μελετήθηκαν. Οι ενδείξεις όμως ίσως των αρχικών συμπτωμάτων καταπόνησης στο υψηλό φωτισμό να προβλέπουν μια ευαισθησία του είδους και σε αυτή τη μορφή καταπόνησης εάν εκτεθεί περισσότερο χρόνο σε αυτή.



## ΒΙΒΛΙΟΓΡΑΦΙΑ

- Al Hassan, M., Morosan, M., López-Gresa, M.D.P., Prohens, J., Vicente, O., Boscaiu, M., 2016. Salinity-Induced Variation in Biochemical Markers Provides Insight into the Mechanisms of Salt Tolerance in Common (*Phaseolus vulgaris*) and Runner (*P. coccineus*) Beans. *Int. J. Mol. Sci.* 17, 1582.
- Arkadiusz, I., Telesiński, A., Nowak, J., Smolik, B., Dubowska, A., Skrzypiec, N., 2008. Effect of soil salinity on activity of antioxidant enzymes and content of ascorbic acid and phenols in bean (*Phaseolus vulgaris* L.) plants. *J. Elem.* 13, 401–409.
- Assimakopoulou, A., SALMAS, I., Nifakos, K., KALOGEROPOULOS, P., 2015. Effect of Salt Stress on Three Green Bean (*Phaseolus vulgaris* L.) Cultivars. *Not. Bot. Horti Agrobot. Cluj-Napoca* 43, 113–118.
- Bayuelo-Jiménez, J.S., Debouck, D.G., Lynch, J.P., 2002. Salinity Tolerance in *Phaseolus* Species during Early Vegetative Growth. *Crop Sci.* 42, 2184–2192.
- Boshkovski, B., Tzerakis, C., Doupis, G., Zapolska, A., Kalaitzidis, C., Koubouris, G., 2020. Relationships of Spectral Reflectance with Plant Tissue Mineral Elements of Common Bean (*Phaseolus Vulgaris* L.) Under Drought and Salinity Stresses. *Commun. Soil Sci. Plant Anal.* 51, 675–686.
- Bradford, M., 1976. A rapid and sensitive for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. *Analytical Biochemistry* 72: 248-254.
- Cabot, C., Sibole, J.V., Barceló, J., Poschenrieder, C., 2009. Sodium-calcium interactions with growth, water, and photosynthetic parameters in salt-treated beans. *J. Plant Nutr. Soil Sci.* 172, 637–643.
- Chaves, M.M., Flexas, J., Pinheiro, C., 2009. Photosynthesis under drought and salt stress: regulation mechanisms from whole plant to cell. *Ann. Bot.* 103, 551–560. <https://doi.org/10.1093/aob/mcn125>
- ESDAC, 2023. Αλατοποίηση εδάφους - ESDAC - Ευρωπαϊκή Επιτροπή [WWW Document]. *Soil Salinization*. URL <https://esdac.jrc.ec.europa.eu/themes/soil-salinization> (accessed 5.18.23).
- Haj-Amor, Z., Araya, T., Kim, D.-G., Bouri, S., Lee, J., Ghiloufi, W., Yang, Y., Kang, H., Jhariya, M.K., Banerjee, A., Lal, R., 2022. Soil salinity and its associated effects on soil microorganisms, greenhouse gas emissions, crop yield, biodiversity and desertification: A review. *Sci. Total Environ.* 843, 156946.
- Hasanuzzaman, M., Nahar, K., Fujita, M., 2013. Plant Response to Salt Stress and Role of Exogenous Protectants to Mitigate Salt-Induced Damages, in: Ahmad, P., Azooz, M.M., Prasad, M.N.V. (Eds.), *Ecophysiology and Responses of Plants under Salt Stress*. Springer, New York, NY, pp. 25–87.
- Holden M. (1965), Chlorophylls. In: *Chemistry and Biochemistry of Plant Pigments* (Goodwin T. W., ed.). Academic Press, London, pp. 461-488
- Ibrahimova, U., Zivcak, M., Gasparovic, K., Rastogi, A., Allakhverdiev, S.I., Yang, X., Brestic, M., 2021. Electron and proton transport in wheat exposed to salt stress: is the increase of the thylakoid membrane proton conductivity responsible for decreasing the photosynthetic activity in sensitive genotypes? *Photosynth. Res.* 150, 195–211.
- Jajoo, A., 2013. Changes in Photosystem II in Response to Salt Stress, in: Ahmad, P.,

- Azooz, M.M., Prasad, M.N.V. (Eds.), *Ecophysiology and Responses of Plants under Salt Stress*. Springer, New York, NY, pp. 149–168.
- Kaymakanova, M., Stoeva, N., Mincheva, T., 2008. Salinity and its effects on the physiological response of bean (*Phaseolus vulgaris* L.). *J. Cent. Eur. Agric.*
- Kotzambasis, K., Fotinou, C., Roubelakis-Angelakis, K.A., Ghanotakis, D., 1993. Polyamines in the photosynthetic apparatus. Photosystem II highly resolved subcomplexes are enriched in spermine. *Photosynthesis Research* 38(1), 83-88.
- Laghetti, G., Bisignano, V., Urbano, M., 2018. Genetic resources of vegetable crops and their safeguarding in Italy. *Horticulture International Journal* 2(3), 73-75 DOI: 10.15406/hij.2018.02.00029
- Le, L.T.T., Kotula, L., Siddique, K.H.M., Colmer, T.D., 2021. Na<sup>+</sup> and/or Cl<sup>-</sup> Toxicities Determine Salt Sensitivity in Soybean (*Glycine max* (L.) Merr.), Mungbean (*Vigna radiata* (L.) R. Wilczek), Cowpea (*Vigna unguiculata* (L.) Walp.), and Common Bean (*Phaseolus vulgaris* L.). *Int. J. Mol. Sci.* 22, 1909.
- Li, P., Yang, X., Wang, H., Pan, T., Yang, J., Wang, Y., Xu, Y., Yang, Z., Xu, C., 2021. Metabolic responses to combined water deficit and salt stress in maize primary roots. *J. Integr. Agric.* 20, 109–119.
- Lovelli, S., Sofo, A., Perniola, M., Scopa, A., 2013. Abscisic Acid and Biomass Partitioning in Tomato Under Salinity, in: Ahmad, P., Azooz, M.M., Prasad, M.N.V. (Eds.), *Ecophysiology and Responses of Plants under Salt Stress*. Springer, New York, NY, pp. 267–282. Parihar, P., Singh, S., Singh, R., Singh, V.P., Prasad, S.M., 2015. Effect of salinity stress on plants and its tolerance strategies: a review. *Environ. Sci. Pollut. Res. Int.* 22, 4056–4075.
- Peleg, Z., Apse, M.P., Blumwald, E., 2011b. Chapter 12 - Engineering Salinity and Water-Stress Tolerance in Crop Plants: Getting Closer to the Field, in: Turkan, I. (Ed.), *Advances in Botanical Research, Plant Responses to Drought and Salinity Stress*. Academic Press, pp. 405–443.
- Perin, E.C., da Silva Messias, R., Borowski, J.M., Crizel, R.L., Schott, I.B., Carvalho, I.R., Rombaldi, C.V., Galli, V., 2019. ABA-dependent salt and drought stress improve strawberry fruit quality. *Food Chem.* 271, 516–526.
- Qaderi, M.M., Martel, A.B., Strugnell, C.A., 2023. Environmental Factors Regulate Plant Secondary Metabolites. *Plants Basel Switz.* 12, 447.
- Rasool, S., Hameed, A., Azooz, M.M., Muneeb-u-Rehman, Siddiqi, T.O., Ahmad, P., 2013. Salt Stress: Causes, Types and Responses of Plants, in: Ahmad, P., Azooz, M.M., Prasad, M.N.V. (Eds.), *Ecophysiology and Responses of Plants under Salt Stress*. Springer, New York, NY, pp. 1–24.
- Savita, Sharma, A., Kalia, R., Sareen, S., Kumari, A., Jandyal, S., Katnoria, J.K., Bhardwaj, R., Nagpal, A.K., 2021. 16 - Genetic engineering of legumes for abiotic stress tolerance, in: Singh, V.P., Singh, S., Tripathi, D.K., Prasad, S.M., Bhardwaj, R., Chauhan, D.K. (Eds.), *Abiotic Stress and Legumes*. Academic Press, pp. 371–393.
- Shaghghi M., Manzoori L. J., Jouyban A., 2008. Determination of total phenols in tea infusions, tomato and apple juice by terbium sensitized fluorescence method as an alternative approach to the Folin–Ciocalteu spectrophotometric method. *Food Chemistry* 108: 695-701.
- Shevyakova, N.I., Musatenko, L.I., Stetsenko, L.A., Vedenicheva, N.P., Voitenko, L.P., Sytnik, K.M., Kuznetsov, V.I., 2013. Effects of abscisic acid on the contents of polyamines and proline in common bean plants under salt stress. *Russ. J. Plant*

- Physiol.* 60, 200–211.
- Strasser BJ, Strasser RJ (1995) Measuring fast fluorescence transients to address environmental questions: the JIP test. In: Mathis P (ed) *Photosynthesis: from light to biosphere*. Kluwer, Dordrecht, pp 977–980
- Telesinski, A., Nowak, J., Smolik, B., Dubowska, A., Skrzypiec, N., 2008. Effect of soil salinity on activity of antioxidant enzymes and content of ascorbic acid and phenols in bean [*Phaseolus vulgaris* L.] plants. *J. Elem.* 13.
- Vothknecht U.C., Westhoff P. (2001) Biogenesis and origin of thylakoid membranes. *Biochim. Biophys. Acta* 1541: 91-101.
- Wang, Z., Cao, C., Wang, Q., Shen, J., Han, M., Xia, W., Zhou, T., Yu, Z., Shan, X., 2023. Analysis of the pore structure characteristics of saline soil in the profile within the frozen depth. *Cold Reg. Sci. Technol.* 212, 103882.
- Waśkiewicz, A., Muzolf-Panek, M., Goliński, P., 2013. Phenolic Content Changes in Plants Under Salt Stress, in: Ahmad, P., Azooz, M.M., Prasad, M.N.V. (Eds.), *Ecophysiology and Responses of Plants under Salt Stress*. Springer, New York, NY, pp. 283–314.
- Webber A.N., Baker N. R. (1996) Control of thylakoid membrane development and assembly In *Oxygenic photosynthesis: the light reactions*, pp. 41-53, Kluwer Academic Publishers, The Netherlands.
- Yang, L., Wen, K.-S., Ruan, X., Zhao, Y.-X., Wei, F., Wang, Q., 2018. Response of Plant Secondary Metabolites to Environmental Factors. *Mol. Basel Switz.* 23, 762.
- Zuccarini, P., 2008. Effects of silicon on photosynthesis, water relations and nutrient uptake of *Phaseolus vulgaris* under NaCl stress. *Biol. Plant.* 52, 157–160.
- Καραμπουρνιώτης, Γ.Α., Λιακοπουλος, Γ., Νικολόπουλος, Δ., 2012. ΦΥΣΙΟΛΟΓΙΑ ΚΑΤΑΠΟΝΗΣΕΩΝ ΤΩΝ ΦΥΤΩΝ.
- Ολύμπιος, Μ.Χ.Μ.Χ., 2015. Η ΤΕΧΝΙΚΗ ΤΗΣ ΚΑΛΛΙΕΡΓΕΙΑΣ ΤΩΝ ΥΠΑΙΘΡΩΝ ΚΗΠΕΥΤΙΚΩΝ.
- Παπακώστα Τασοπούλου, Δ., 2005. Ειδική Γεωργία Ι (Τεύχος Β'). Ψυχανθή (Καρποδοτικά, χορτοδοτικά). Σύγχρονη Παιδεία.
- Ρουμπελάκη Αγγελάκη, Κ.Α. 2, 2018. ΦΥΣΙΟΛΟΓΙΑ ΦΥΤΩΝ. Ηράκλειο.