



**ΑΝΩΤΑΤΟ ΤΕΧΝΟΛΟΓΙΚΟ ΕΚΠΑΙΔΕΥΤΙΚΟ ΙΔΡΥΜΑ ΚΡΗΤΗΣ  
ΣΧΟΛΗ ΤΕΧΝΟΛΟΓΙΑΣ ΓΕΩΠΟΝΙΑΣ  
ΤΜΗΜΑ ΘΕΡΜΟΚΗΠΙΑΚΩΝ ΚΑΛΛΙΕΡΓΕΙΩΝ ΚΑΙ ΑΝΘΟΚΟΜΙΑΣ**

**ΠΤΥΧΙΑΚΗ ΕΡΓΑΣΙΑ**

**ΕΠΙΔΡΑΣΗ ΤΩΝ ΒΑΡΕΩΝ ΜΕΤΑΛΛΩΝ ΚΑΔΜΙΟΥ (Cd) ΚΑΙ  
ΧΑΛΚΟΥ (Cu) ΣΤΗΝ ΑΝΑΠΤΥΞΗ ΚΑΛΛΙΕΡΓΟΥΜΕΝΩΝ  
(*Nicotiana tabacum*) ΚΑΙ ΑΓΡΙΩΝ (*Nicotiana glauca*)  
ΦΥΤΩΝ ΚΑΠΝΟΥ**

**ΧΡΙΣΤΟΦΟΡΟΣ Ε. ΣΗΝΙΟΛΑΚΗΣ**

**ΕΙΣΗΓΗΤΗΣ: Δρ. ΝΙΚΟΛΑΟΣ ΠΡΙΜΗΚΥΡΙΟΣ**

**ΗΡΑΚΛΕΙΟ 2007**

*"Στους γονείς μου..."*

## ΠΡΟΛΟΓΟΣ

Η εργασία αυτή πραγματοποιήθηκε στο Εργαστήριο Βιοτεχνολογίας και Φυσιολογίας Φυτών της Σχολής Τεχνολογίας Γεωπονίας του Α.Τ.Ε.Ι. Κρήτης υπό την επίβλεψη του Δρ. Πριμηκύριου Νικόλα. Θα ήθελα να ευχαριστήσω όλους εκείνους που με βοήθησαν κατά τη διάρκεια της προσπάθειας μου για την πολύτιμη συμπαράστασή τους. Τις μεγαλύτερες ευχαριστίες μου θα ήθελα να εκφράσω στον επιβλέποντα καθηγητή μου Δρ. Ν. Πριμηκύριο και στον Δρ. Κ. Λουλακάκη για τη συνεχή καθοδήγησή τους, τις ανεκτίμητες επιστημονικές συμβουλές τους και το ενδιαφέρον που έδειξαν για τη διεκπεραίωση της εργασίας μου. Επίσης, θα ήθελα να ευχαριστήσω την Γεωπόνο κα. Παπαδάκη Αναστασία που πραγματοποίησε τον προσδιορισμό των ενδογενών συγκεντρώσεων καδμίου στα φύλλα των φυτών και την εταιρία 'Αγροχημικά Κρήτης' για τον αντίστοιχο του χαλκού. Τέλος, ευχαριστώ θερμά όλους τους συναδέλφους μου για τη βοήθεια που μου προσέφεραν κατά τη διεξαγωγή του πειράματος αυτού.

Η εργασία αποτελεί μέρος ερευνητικού προγράμματος που υλοποιείται στο εργαστήριο με τίτλο «Φυτοεξυγίανση εδαφών ρυπασμένων με βαρέα μέταλλα από διασταλάζοντα υγρά χωματερών» που αποτελεί υποέργο του έργου «ΠΕΡΙΒΑΛΛΟΝ – ΑΡΧΙΜΗΔΗΣ: Ενίσχυση ερευνητικών ομάδων του Α.Τ.Ε.Ι. Κρήτης» (ΕΠΕΑΕΚ ΙΙ, ΕΝΕΡΓΕΙΑ 2.6.1, ΚΑΤΗΓΟΡΙΑ ΠΡΑΞΕΩΝ 2.6.1.ιδ.)

## ΠΕΡΙΕΧΟΜΕΝΑ

<b>A. ΕΙΣΑΓΩΓΗ</b>	5
A.1. Γενικά	5
A.2. Γενικά Χαρακτηριστικά των Βαρέων Μετάλλων	6
A.3. Κάδμιο (Cd) και Χαλκός (Cu)	7
A.3.1. Κάδμιο	7
A.3.2. Χαλκός	9
A.4. Φυτοεξυγίανση (Phytoremediation)	11
A.4.1. Φυτοεκχύλιση	15
A.4.2. Φυτά Υπερσυσσωρευτές (Hyperaccumulators plants)	16
A.4.3. Πρόσληψη μετάλλων από τα φυτά	19
A.4.4. Περιοριστικοί παράγοντες της φυτοεκχύλισης	20
A.4.5. Συμπεράσματα – Βελτίωση της Αποτελεσματικότητας της μεθόδου	20
A.5. Αντίδραση των φυτών στα Βαρέα Μέταλλα	21
A.5.1. Γλουταμική Αφυδρογονάση (GDH)	23
A.5.2. Ωσμωτίνη	27
A.6. Επαγωγικός φθορισμός χλωροφύλλης	28
A.7. Βοτανικά Χαρακτηριστικά	31
A.7.1. <i>Nicotiana tabacum</i>	31
A.7.2. <i>Nicotiana glauca</i>	33
A.8. Σκοπός Εργασίας	35
<b>B. ΥΛΙΚΑ ΚΑΙ ΜΕΘΟΔΟΙ</b>	36
B.1. Φυτά στο Θερμοκήπιο	36
B.2. <i>In vitro</i> Καλλιέργεια	38
B.3. Μέθοδοι	40
B.3.1. Μέτρηση ολικών χλωροφυλλών	40
B.3.2. Προσδιορισμός επαγωγικού φθορισμού (fluorescence induction) χλωροφύλλης	41
B.3.3. Εκχύλιση πρωτεϊνών από φυτικούς ιστούς	42
B.3.4. Ποσοτικός προσδιορισμός ολικής πρωτεΐνης (Modified Lowry)	42

B.3.5. Αποδιατακτική ηλεκτροφόρηση πρωτεϊνών (Polyacrylamide Gel Electrophoresis)	43
B.3.6. Χρώση πρωτεϊνών με Coomassie Brilliant Blue R-250	45
B.3.7. Μεταφορά κατά Western Blot – Ανοσοανίχνευση	46
B.3.8. Μέτρηση ενεργότητας του ενζύμου GDH (Λουλακάκης 2004)	47
<b>Γ. ΑΠΟΤΕΛΕΣΜΑΤΑ</b>	48
Γ.1. Φυτά στο Θερμοκήπιο	48
Γ.1.1. Επίδραση του καδμίου (Cd) και του χαλκού (Cu) στα μορφολογικά χαρακτηριστικά του φυτικού είδους <i>Nicotiana tabacum</i>	48
Γ.1.2. Επίδραση του καδμίου (Cd) και του χαλκού (Cu) σε βιοχημικά χαρακτηριστικά του φυτικού είδους <i>Nicotiana tabacum</i>	57
Γ.1.2.α. Ολικές πρωτεΐνες και ενζυμική ενεργότητα της γλουταμικής αφυδρογονάσης (GDH) στις επεμβάσεις καδμίου (Cd) και χαλκού (Cu) σε φύλλα <i>Nicotiana tabacum</i>	58
Γ.1.2.β. Επίδραση καδμίου (Cd) και χαλκού (Cu) στην έκφραση της GDH και της ωσμοτίνης σε φυτά <i>Nicotiana tabacum</i>	59
Γ.1.3. Επίδραση του καδμίου (Cd) και του χαλκού (Cu) στα μορφολογικά χαρακτηριστικά του φυτικού είδους <i>Nicotiana glauca</i>	62
Γ.1.4. Επίδραση του καδμίου (Cd) και του χαλκού (Cu) σε βιοχημικά χαρακτηριστικά του φυτικού είδους <i>Nicotiana glauca</i>	72
Γ.1.4.α. Ολικές Πρωτεΐνες και ενζυμική ενεργότητα της γλουταμικής αφυδρογονάσης (GDH) στις επεμβάσεις καδμίου (Cd) και χαλκού (Cu) σε φύλλα <i>Nicotiana glauca</i>	73
Γ.1.4.β. Επίδραση καδμίου (Cd) και χαλκού (Cu) στην έκφραση της GDH και της ωσμοτίνης σε φυτά <i>Nicotiana glauca</i>	74
Γ.2. <i>In vitro</i> Καλλιέργεια	78
<b>Δ. ΣΥΖΗΤΗΣΗ</b>	83
<b>Ε. ΒΙΒΛΙΟΓΡΑΦΙΑ</b>	88

## **A. ΕΙΣΑΓΩΓΗ**

### *A.1. Γενικά*

Η συνεχής ρύπανση των εδαφών από τοξικά μέταλλα εγκυμονεί σοβαρούς κινδύνους τόσο για το περιβάλλον όσο και την ανθρώπινη υγεία. Η ρύπανση προέρχεται από ανθρώπινες δραστηριότητες, όπως η εξόρυξη και η διαδικασία καθαρισμού μεταλλοφόρων ορυκτών, η χρήση φυσικών καυσίμων, η διαχείριση των αστικών και βιομηχανικών αποβλήτων και η χρήση λιπασμάτων και φυτοπροστατευτικών προϊόντων στη γεωργία. Στην περίπτωση των χωματερών, βαρέα μέταλλα συσσωρεύονται στα εκρέοντα διασταλάζοντα υγρά τα οποία ρυπαίνουν τα εδάφη της κοίτης απορροής.

Οι συμβατικές μέθοδοι ανάκτησης των ρυπασμένων εδαφών, που βασίζονται στην απομάκρυνση ή στην καθήλωση των τοξικών μετάλλων, μηχανικά ή χημικά, παρουσιάζουν αρκετά προβλήματα (χώροι εναπόθεσης, υψηλό κόστος κ.α.).

Τα τελευταία χρόνια έχει εισαχθεί μια ταχύτατα αναπτυσσόμενη εναλλακτική βιοτεχνολογική προσέγγιση του προβλήματος που χρησιμοποιεί φυτά για την απορρύπανση εδαφών, η λεγόμενη φυτοεξυγίανση. Σε σύγκριση με άλλες μεθόδους η φυτοεξυγίανση είναι μια φυσική, χαμηλού κόστους (έως και 1000 φορές φθηνότερη από τις συμβατικές) και υψηλής αποτελεσματικότητας πράσινη τεχνολογία, που επιπλέον είναι αποδεκτή από τις γειτονικές του προς εξυγίανση χώρου κοινότητες. Για την φυτοεξυγίανση εδαφών από βαρέα μέταλλα απαιτούνται φυτά ικανά να αντέχουν και να συσσωρεύουν υψηλές συγκεντρώσεις βαρέων μετάλλων στην υπέργεια βιομάζα τους, η οποία είτε απλά απομακρύνεται ή και αξιοποιείται περαιτέρω για την απομόνωση και εμπορική εκμετάλλευση των μετάλλων.

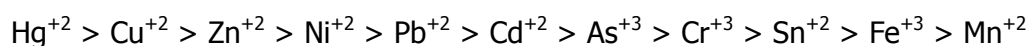
Η φυτοεξυγίανση περιλαμβάνει αρκετές τεχνικές οι οποίες διαφέρουν μεταξύ τους στον τρόπο με τον οποίο τα φυτά μεταχειρίζονται τους ρυπαντές (αφαίρεση, σταθεροποίηση, διάσπαση) καθώς και στον τύπο του ρυπαντή που στοχεύουν (οργανικοί ή ανόργανοι ρυπαντές).

## A.2. Γενικά Χαρακτηριστικά των Βαρέων Μετάλλων

Βαρέα ονομάζονται τα μέταλλα με ατομικό βάρος μεγαλύτερο από εκείνο του σιδήρου (Fe) ( $AB_{Fe} = 56$ ) και πυκνότητα μεγαλύτερη από  $5 \text{ g/cm}^3$ . Υπάρχουν περίπου 40 στοιχεία (ψευδάργυρος Zn, χαλκός Cu, κάδμιο Cd, υδράργυρος Hg, νικέλιο Ni, μόλυβδος Pb) που ανήκουν σε αυτή την κατηγορία.

Ενώ πολλά από αυτά τα μέταλλα σε μικρές ποσότητες είναι απαραίτητα για την δράση των βιταμινών και τις διάφορες ζωτικές λειτουργίες, σε μεγάλες ποσότητες προκαλούν σειρά δυσμενών επιδράσεων στους ζωντανούς οργανισμούς και κατά συνέπεια και στον άνθρωπο, όπως νευροφυσιολογικές διαταραχές, γενετικές αλλοιώσεις των κυττάρων (μεταλλάξεις), επιδράσεις στην ενζυμική και ορμονική δραστηριότητα, προβλήματα στην αναπαραγωγή, τερατογενέσεις και καρκινογενέσεις.

Η σειρά τοξικότητας τους είναι η εξής:



Η τοξικότητα των βαρέων μετάλλων εξαρτάται από τη συγκέντρωση τους, το είδος του μετάλλου, την ύπαρξη και συνεργιστική δράση άλλων μετάλλων και το είδος του οργανισμού.

Οι κυριότεροι από τους μηχανισμούς τοξικής δράσης των βαρέων μετάλλων είναι:

- Δηλητηρίαση ενζυμικών συστημάτων.
- Δημιουργία ανιόντων (π.χ. αρσενικά, αντιμονικά, σεληνιακά κ.α.) που δρουν ως «αντιμεταβλητές» παίρνοντας τη θέση των  $\text{PO}_4^{-3}$  ή  $\text{NO}_3^{-1}$
- Σχηματισμός ιζημάτων αντιδρώντας με φωσφορικά βιομόρια.
- Ένας μεγάλος αριθμός βαρέων μετάλλων επηρεάζει αρνητικά το φωτοσυνθετικό σύστημα των φυτών αναστέλλοντας τη μεταφορά ηλεκτρονίων στους χλωροπλάστες.

- Αντιδρούν με τις μεμβράνες των κυττάρων, περιορίζοντας την δραστηριότητα τους (π.χ. τα μέταλλα Cd, Hg, Cu, Pb) έτσι ώστε να παρεμποδίζεται ή να διακόπτεται τελείως η μεταφορά Na, K, Cl ή οργανικών μορίων δια μέσω της μεμβράνης.

Ένα από τα κύρια χαρακτηριστικά αυτών των στοιχείων είναι ότι δεν βιοαποδομούνται αλλά καθιζάνουν ως δυσδιάλυτα άλατα ή σύμπλοκα. Συνήθως μεταφέρονται μέσω των αστικών λυμάτων και βιομηχανικών καταλοίπων με τα νερά της βροχής ή των ποταμών, ακόμα και σε καλλιεργήσιμα εδάφη όπου παραμένουν για εκατονταετίες μιας και δεν υπάρχει κανένας φυσικός ή βιολογικός τρόπος για την καταστροφή τους. Υψηλή συγκέντρωση βαρέων μετάλλων στην επιφάνεια του εδάφους μπορεί να προκαλέσει διάφορα προβλήματα στα καλλιεργούμενα φυτά, όπως τοξικότητα, αλλά και στον ίδιο τον άνθρωπο που στη συνέχεια θα τραφεί με αυτά.

### *A.3. Κάδμιο (Cd) και Χαλκός (Cu)*

#### *A.3.1. Κάδμιο*

Το κάδμιο (Cd) εκτός από τα ορυκτά του εμφανίζεται ως πρόσμιξη στα ορυκτά του ψευδαργύρου (κοινώς τσίγκος). Χρησιμοποιείται κυρίως στην ηλεκτροαπόθεση, ως σταθεροποιητής στα πλαστικά και στις μπαταρίες νικελίου-καδμίου.

Το μέταλλο αυτό ανήκει στις καρκινογόνες ενώσεις και είναι γνωστό ότι έχει αρνητικές επιπτώσεις στα υδατικά οικοσυστήματα και εδάφη. Ρυπαίνει το περιβάλλον κατά την χρήση και καθαρισμό των μεταλλευμάτων του και κατά την τήξη και καθαρισμό του χαλκού και νικελίου. Επίσης υπάρχει στα καυσαέρια των καυσίμων. Η περιβαλλοντική διάχυση και απόθεση του καδμίου εξαρτάται από τις συνθήκες και την χημική σύνθεση του μετάλλου, αλλά συνήθως μεγάλο ποσοστό παραμένει στο έδαφος και στο υδρόβιο περιβάλλον συσσωρεύεται στα ιζήματα αντί στο σώμα των οργανισμών.



Η αύξηση των επιπέδων του καδμίου στα εδάφη είναι κυρίως το αποτέλεσμα της εκτεταμένης χρήσης λιπασμάτων που περιέχουν κάδμιο σαν ακαθαρσία, όπως τα φωσφορικά λιπάσματα, οι λάσπες βιολογικών καθαρισμών, τα κομποστοποιημένα αστικά απόβλητα και οι στάχτες από την καύση του άνθρακα.

Το κάδμιο είναι ένα βαρύ τοξικό μέταλλο που απορροφάται εύκολα από τα φυτά και διοχετεύεται εύκολα μέσω της τροφικής αλυσίδας στα νεφρά και το συκώτι του ανθρώπου με αποτέλεσμα να προξενεί σοβαρές βλάβες στην υγεία.

Το μέταλλο έχει την ικανότητα να βιοσυσσωρεύεται σε μικροοργανισμούς και σε ιστούς φυτών και ζώων. Στα υδρόβια μακρόφυτα, παρουσιάζει συντελεστές βιοσυγκέντρωσης, περίπου 50 φορές και στα ψάρια 100 φορές σε σχέση με τις συγκεντρώσεις στα νερά. Παρά το ότι το κάδμιο συσσωρεύεται στους οργανισμούς του γλυκού νερού δεν βιομεγενθύνεται στην τροφική αλυσίδα.

Είναι ένα μη απαραίτητο στοιχείο για τα φυτά, που προκαλεί επίσχεση της ανάπτυξης, αλληλεπιδρά με την απορρόφηση και τη διακίνηση των θρεπτικών στοιχείων, παρεμποδίζει ένζυμα, μειώνει τη φωτοσύνθεση και παράγει ελεύθερες ρίζες (Hernandez et al., 1997 και Gouia et al., 2000).

Το κάδμιο δρα στο φωτοσύστημα II (PSII) τόσο στο οξειδωτικό όσο και στο αναγωγικό μέρος. Επίσης, τα ενεργά κέντρα του PSII καθώς και η μεταφορά των ηλεκτρονίων επηρεάζονται από την αλληλεπίδραση με το Cd που προκαλεί ζημιές στην ενεργότητα των ενζύμων και/ή την δομή των πρωτεϊνών. Μια άλλη έμμεση επίδραση του προέρχεται από την παρεμπόδιση της βιοσύνθεσης των χλωροφυλλών (Haag-Kerwer et al., 1999).

Μια γενική απόκριση των φυτών στα βαρέα μέταλλα είναι η επαγωγή της σύνθεσης μικρο ή μακρομοριακών ενώσεων που τα δεσμεύουν, συμβάλλοντας στην αποτοξίνωση. Στην πρώτη κατηγορία ανήκουν αμινοξικής φύσης ενώσεις όπως η προλίνη, η ιστιδίνη και οι πολυαμίνες. Στη δεύτερη κατηγορία περιλαμβάνονται ενώσεις πεπτιδικής φύσης, πλούσιες σε κυστεΐνη (αμινοξύ που περιέχει θείο, S) και γλουταμικό, όπως η γλουταθειόνη, οι φυτοχηλατίνες και οι μεταλλοθειονίνες (Sharma and Dietz, 2006) οι οποίες

συμπλοκοποιούν το μέταλλο και με τον τρόπο αυτό παρεμποδίζουν τη δράση του στις ενδοκυττάριας θέσεις αποδέκτες. Η συσσώρευση του καδμίου σε μακρόφυτα (υδρόβια φυτά, ορατά με γυμνό μάτι) ποικίλει ανάλογα με το είδος και τους ιστούς που εξετάζονται. Το κάδμιο συσσωρεύεται κυρίως στις ρίζες των υδρόβιων μακρόφυτων αντί στα φύλλα και τον κορμό.

### *A.3.2. Χαλκός*

Οι πηγές ρύπανσης των εδαφών με χαλκό από ανθρωπογενείς δραστηριότητες περιλαμβάνουν την εξόρυξη και των καθαρισμό χαλκούχων ορυκτών, τη διαχείριση αστικών και βιομηχανικών αποβλήτων και τη χρήση αγροχημικών (Llorens et al., 2000).

Ο χαλκός (Cu) είναι ένα απαραίτητο ιχνοστοιχείο για το φυσιολογικό μεταβολισμό των φυτών που παίζει σημαντικό ρόλο σε μεγάλο αριθμό μεταλλοενζύμων, στη συνδεόμενη με τη φωτοσύνθεση πλαστοκυανίνη και στη δομή των μεμβρανών. Σε μεγάλες συγκεντρώσεις όμως θεωρείται ιδιαίτερα τοξικό μέταλλο με σημαντικές αρνητικές επιδράσεις σε όλους τους οργανισμούς (Panou-Filotheou et al., 2001).

Το μέταλλο στο έδαφος είναι ισχυρά δεσμευμένο στα ορυκτά της αργίλου. Ο ανταλλάξιμος Cu συγκρατείται πολύ ισχυρότερα από άλλα κατιόντα και δεν είναι άμεσα διαθέσιμος για τα φυτά. Η οργανική ύλη επίσης δεσμεύει το χαλκό, και επομένως όσο περισσότερο οργανική ύλη και άργιλο υπάρχει στο έδαφος, τόσο μεγαλύτερη είναι η προσρόφηση του σε αυτό. Επιπροσθέτως, υψηλό εδαφικό pH μειώνει τη διαθεσιμότητα του στοιχείου αυτού στα φυτά, επιτρέποντας μεγαλύτερη συσσώρευση του στο έδαφος, χωρίς την εμφάνιση φυτοτοξικότητας στα καλλιεργούμενα σε αυτό φυτικά είδη. Από τα παραπάνω λοιπόν συμπεραίνουμε ότι λόγω της ισχυρής δέσμευσης του ο χαλκός εκπλύνεται πολύ λίγο και συσσωρεύεται στην επιφάνεια των εδαφών.

Τα περισσότερα καλλιεργούμενα φυτά περιέχουν χαλκό στα φύλλα και τους βλαστούς τους στο εύρος των 5-30 ppm. Υπάρχει τεράστια διακύμανση

στην ικανότητα των φυτών να ανέχονται υψηλά επίπεδα χαλκού. Γενικά επίπεδα των 20-30 ppm στα φύλλα θεωρούνται τοξικά, χωρίς αυτό να σημαίνει πως δεν υπάρχουν φυτά που να ανέχονται αυτά τα επίπεδα χωρίς την εμφάνιση συμπτωμάτων.

Ο χαλκός δεν μετακινείται εύκολα μέσα στο φυτό, με αποτέλεσμα υψηλότερα επίπεδα να παρατηρούνται στις ρίζες από ότι στα υπέργεια τμήματα, συνεπώς ανιχνεύεται πολύ δύσκολα στους ιστούς των βλαστών και των φύλλων σε μεγάλες συγκεντρώσεις. Γι' αυτό η φυτοτοξικότητα του στοιχείου κυρίως εμφανίζεται με μειωμένη ανάπτυξη των ριζών και καταστροφές των μεμβρανών των κυττάρων της ρίζας (Gharbi et al., 2005). Ο χαλκός καταστρέφει τις κυτταρικές μεμβράνες προσδεδεμένος στις σουλφυδρικές ομάδες (SH) των μεμβρανικών πρωτεϊνών και προκαλώντας οξείδωση των λιπιδίων (Chen et al., 2000). Ακόμη, η τοξικότητα του μπορεί επίσης να προκαλέσει στα φυτά ανεπάρκεια σιδήρου (Fe) και χλωρώσεις.

Έχει αναφερθεί ότι ο χαλκός αυξάνει τις ενεργότητες των αντιοξειδωτικών ενζύμων, όπως η υπεροξειδική δυσμουτάση (SOD), η καταλάση (CAT) και η περοξειδάση (POD). Ο Cu μπορεί να αυξήσει την παραγωγή υπεροξειδίου ( $H_2O_2$ ), το οποίο αποτελεί υπόστρωμα για την σκλήρυνση των κυτταρικών τοιχωμάτων, γεγονός που έχει σαν αποτέλεσμα την επίσχεση της ανάπτυξης.

Υψηλά επίπεδα χαλκού μεταβάλλουν το μεταβολισμό του αζώτου (N), μειώνοντας το ολικό άζωτο. Η έκθεση σε υψηλές συγκεντρώσεις χαλκού έχει σαν αποτέλεσμα την αύξηση των ενδογενών επιπέδων των ελεύθερων αμινοξέων και την παρεμπόδιση της νιτρικής ρεδοукτάσης.

Γενικά, τα κύρια συμπτώματα τοξικότητας του χαλκού στα φυτά είναι:

- Βράχυνση του βλαστού
- Μείωση του όγκου των ριζών, παρεμποδίζοντας την ανάπτυξη πλευρικών ριζών
- Μείωση του μεγέθους του ελάσματος του φύλλου
- Μεσονεύρια χλώρωση στο έλασμα του φύλλου

#### A.4. Φυτοεξυγίανση (Phytoremediation)

Η τεχνολογία της φυτοεξυγίανσης εκμεταλλεύεται τη φυσική ιδιότητα πολλών φυτικών ειδών να απορροφούν, να συσσωρεύουν και σε μερικές περιπτώσεις να μεταβολίζουν συστατικά του εδάφους και του νερού. Μερικά φυτά έχουν την ικανότητα να συσσωρεύουν σε μεγάλες συγκεντρώσεις ακόμη και μέταλλα που δεν τους είναι χρήσιμα για την ανάπτυξη τους.

Είναι γνωστό ήδη από τις αρχές του 20<sup>ου</sup> αιώνα ότι περί τα 200 είδη που ανήκουν σε 45 οικογένειες όχι μόνο αντέχουν, αλλά συσσωρεύουν και τεράστιες ποσότητες βαρέων μετάλλων στα υπέργεια μέρη τους. Κλασικό παράδειγμα είναι το *Thlaspi caerulescens* (Brassicaceae), που συσσωρεύει Cd και Zn στους βλαστούς του (έως  $40 \text{ mg Zn} \cdot \text{g}^{-1}$ , όταν  $500 \text{ } \mu\text{g} \cdot \text{g}^{-1}$  θεωρούνται τοξικά).

Η ιδέα της φυτοεξυγίανσης, με τη χρήση φυτών-υπερσυσσωρευτών μετάλλων, για τον καθαρισμό χερσαίων και υδάτινων οικοσυστημάτων που έχουν ρυπανθεί, αναπτύχθηκε μόλις την τελευταία 25ετία. Επειδή όμως οι περισσότεροι υπερσυσσωρευτές είναι μικρά φυτά και βραδείας ανάπτυξης, η δυνατότητα ευρείας χρήσης τους δυσχεραίνεται. Γι' αυτό έχει ενταθεί η μελέτη των βιοχημικών, φυσιολογικών και μοριακών μηχανισμών αντοχής, με απώτερο σκοπό τη μεταφορά γονιδίων αντοχής σε φυτά που παράγουν μεγαλύτερη βιομάζα.

Η χρήση της μεθόδου ενδείκνυται ιδιαίτερα σε περιπτώσεις ρύπανσης του εδάφους και του νερού με βαρέα μέταλλα και ραδιενεργά στοιχεία αλλά και με οργανικές ενώσεις, όπως χλωριωμένους διαλύτες, πολυκυκλικούς αρωματικούς υδρογονάνθρακες, πολυχλωριωμένα διφαινύλια, εκρηκτικές ουσίες, απορρυπαντικά, θρεπτικά συστατικά (π.χ. φωσφορικά, νιτρικά), που προκαλούν ευτροφισμό επιφανειακών υδάτων.

Αυτή η τεχνολογία χρησιμοποιεί την καλλιέργεια φυτών για την εξυγίανση μολυσμένων εδαφών, επιφανειακών και υπογείων υδάτων. Εφαρμόζεται κυρίως σε περιπτώσεις, όπου η ρύπανση είναι:

- ευρείας έκτασης (σε επιφάνεια)
- βρίσκεται στα ανώτερα στρώματα του εδάφους (μέχρι 1 m βάθος) ή του υδροφόρου ορίζοντα (μέχρι 3 m βάθος), και
- έχει σχετικά χαμηλή περιεκτικότητα ρυπαντών, έτσι ώστε η εκσκαφή του μολυσμένου εδάφους ή η άντληση του μολυσμένου νερού και η ακόλουθη επεξεργασία τους να καθίσταται αντιοικονομική.

Η επιτυχία της μεθόδου εξαρτάται κυρίως από τους παρακάτω παράγοντες:

- Επιλογή του κατάλληλου φυτικού είδους. Τα φυτά αυτά πρέπει να είναι ανθεκτικά στις τοξικές συγκεντρώσεις των βαρέων μετάλλων, να παράγουν μεγάλη βιομάζα και να έχουν την ικανότητα να απορροφούν και να μεταφέρουν τα μέταλλα από το ριζικό τους σύστημα στην υπέργεια βιομάζα.
- Η διαθεσιμότητα των μετάλλων. Τα μέταλλα είναι απαραίτητο να βρίσκονται σε μη-υπολειμματική μορφή, έτσι ώστε να είναι δυνατή η απορρόφηση τους από τη ρίζα και ακολούθως η μεταφορά τους στο βλαστό. Για να αυξηθεί η διαθεσιμότητα των μετάλλων και κατά συνέπεια η πρόσληψη τους από τα φυτά, έχουν χρησιμοποιηθεί ευρέως σε μελέτες χημικοί παράγοντες (EDTA, κιτρικό οξύ, μαλικό οξύ και νιτρώδες αμμώνιο).

Η τεχνολογία της φυτοεξυγίανσης περιλαμβάνει τις παρακάτω πέντε βασικές τεχνικές:

1. Φυτοεκχύλιση (Phytoextraction): Η τεχνική αυτή χρησιμοποιείται για την εξυγίανση ρυπασμένων εδαφών. Οι ρυπαντές απορροφούνται και συσσωρεύονται σε όλους τους φυτικούς ιστούς και στο ριζικό σύστημα, που πρέπει να μαζευτούν κατά τη συγκομιδή για περαιτέρω επεξεργασία.

2. Ριζοδιύλιση (Rhizofiltration): Η τεχνική αυτή χρησιμοποιείται για διύλιση ρύπων από το νερό μέσω της προσρόφησης τους από τις ρίζες των φυτών.
3. Φυτομετατροπή (Phytotransformation): Χρησιμοποιείται σε χώμα και νερό και βασίζεται στο μεταβολισμό των ρυπαντών από τα φυτά. Κατά τη φυτομετατροπή αποικοδομούνται από το φυτό πολύπλοκες οργανικές ουσίες, οι οποίες ενσωματώνονται υπό μορφή απλών μορίων στους φυτικούς ιστούς.
4. Φυτοδιέγερση (Phytostimulation): Χρησιμοποιείται σε χώμα και νερό και στηρίζεται στη διέγερση της μικροβιακής αποικοδόμησης των ρυπαντών, που συντελείται από μικροοργανισμούς (μικρόβια και μύκητες), που βρίσκονται στις ρίζες των φυτών. Τα φυτά απελευθερώνουν από το ριζικό τους σύστημα ένζυμα ή άλλα προϊόντα μεταβολισμού τους, τα οποία διεγείρουν το μεταβολισμό των ρυπαντών από τους μικροβιακούς πληθυσμούς που υπάρχουν στο γύρω περιβάλλον.
5. Φυτοσταθεροποίηση (Phytostabilization): Περιλαμβάνει συσσώρευση και κατακρήμνιση των ρυπαντών και χρησιμοποιείται για να μειώσει την κινητικότητα των ρυπαντών στο έδαφος, έτσι ώστε να αποφευχθεί η μόλυνση του υδροφόρου ορίζοντα ή η μεταφορά τους με τον άνεμο ή ακόμη και η είσοδος τους στην τροφική αλυσίδα.

Οι τεχνολογίες φυτοεξυγίανσης έχουν αρχίσει να αναγνωρίζονται ως οικονομικώς αποδοτικές μέθοδοι για την εξυγίανση περιοχών μολυσμένων με τοξικά μέταλλα, με μικρότερο κόστος των συμβατικών τεχνολογιών, όπως οι στρατηγικές εδαφολογικής αντικατάστασης και σταθεροποίησης.

#### *Συγκομιδή, επεξεργασία και διάθεση των φυτών*

Μετά την φυτοεξυγίανση των μολυσμένων περιοχών τα φυτά πρέπει να κοπούν και το ριζικό τους σύστημα να ξεριζωθεί. Η επεξεργασία που θα ακολουθήσει στη συνέχεια εξαρτάται από την τοξικότητα των βιοσυσσωρευμένων ουσιών. Η πιο συνηθισμένη επεξεργασία είναι η θερμική αποδόμηση ή η ελεγχόμενη αποτέφρωση, ιδιαίτερα στην περίπτωση των βαρέων μετάλλων. Με αυτόν τον τρόπο επιτυγχάνεται η συγκέντρωση των

βαρέων μετάλλων στην παραγόμενη στάχτη, η οποία καταλαμβάνει πολύ μικρό όγκο. Στην περίπτωση της συσσώρευσης ραδιενεργών στοιχείων από τα φυτά είναι απαραίτητη η διάθεση τους μαζί με άλλα ραδιενεργά απόβλητα σε ειδικά σχεδιασμένους χώρους υγειονομικής ταφής.

### *Πλεονεκτήματα και μειονεκτήματα της Φυτοεξυγίανσης*

#### Πλεονεκτήματα

- Το βασικότερο προτέρημα της μεθόδου αυτής είναι ότι παράγονται λιγότερα δευτερογενή απόβλητα από ότι σε άλλες τεχνολογίες.
- Η φυτοεξυγίανση εφαρμόζεται επί τόπου και δεν είναι αναγκαία μια εκσκαφή ή άντληση για περαιτέρω επεξεργασία. Για αυτό το λόγο δε διαταράσσεται καθόλου το φυσικό τοπίο της μολυσμένης περιοχής.
- Είναι οικονομική επεξεργασία ιδιαίτερα για μεγάλους όγκους χώματος ή νερού, που είναι μολυσμένα με μικρές ποσότητες τοξικών ρυπαντών.
- Επιτυγχάνεται η συγκέντρωση των τοξικών ουσιών σε πολύ μικρούς όγκους. Για παράδειγμα σε πρόγραμμα φυτοεξυγίανσης απομακρύνθηκαν τα βαρέα μέταλλα από 5.000 τόνους μολυσμένου εδάφους. Το έδαφος αυτό που θα έπρεπε να εκσκαφθεί και να διατεθεί σε χώρους υγειονομικής ταφής, μπορεί να ξαναχρησιμοποιηθεί για καλλιέργεια μετά από φυτοεξυγίανση. Τα βαρέα μέταλλα που υπήρχαν στο μολυσμένο χώμα συγκεντρώθηκαν σε 25 – 30 τόνους στάχτης φυτικών ιστών και επομένως μόνο αυτό το 1 / 200 του αρχικού όγκου πρέπει να διατεθεί σε ειδικούς χώρους υγειονομικής ταφής.

#### Μειονεκτήματα

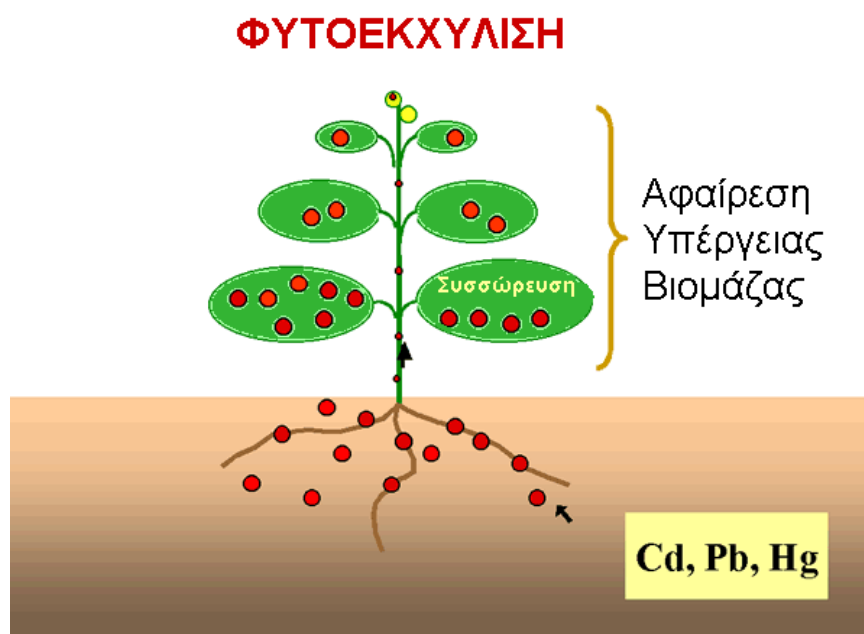
- Στα μειονεκτήματα συγκαταλέγονται οι ιδιαίτερα αργοί ρυθμοί φυτοεξυγίανσης, οι οποίοι συμπεριλαμβάνουν μερικές συνεχόμενες περιόδους καλλιέργειας των φυτών μέχρι να εξυγιανθεί τελείως το περιβάλλον από τους ρυπαντές.
- Η φυτοεξυγίανση φέρνει μόνο αποτελέσματα, όταν το βάθος της μόλυνσης δε ξεπερνά το 1 m στο έδαφος και τα 3 m στον υδροφόρο ορίζοντα.

- Μειονέκτημα αποτελεί η δυνατότητα να μεταδοθούν οι τοξικές ουσίες στην τροφική αλυσίδα μετά από πιθανή βρώση των φυτών από τα ζώα.
- Οι κλιματικές ή οι υδρολογικές συνθήκες στην μολυσμένη περιοχή μπορεί να μην επιτρέψουν την καλλιέργεια και ανάπτυξη των κατάλληλων για την φυτοεξυγίανση φυτών.

#### A.4.1. Φυτοεκχύλιση

Φυτοεκχύλιση είναι η πρόσληψη ρυπαντών από τις φυτικές ρίζες και η μετακίνηση τους στο υπέργειο μέρος των φυτών. Η απομάκρυνση των ρυπαντών από τη θέση της μόλυνσης γίνεται με τη συγκομιδή των φυτών. Η συγκομιζόμενη βιομάζα μπορεί να μειωθεί κατ' όγκο ή κατά βάρος, με θερμικά, μικροβιολογικά, φυσικά ή χημικά μέσα. Η ανάκτηση μερικών μετάλλων όπως των Ni, Zn και Cu μπορεί να δώσει και ένα επιπλέον έσοδο.

Η τεχνική αυτή εφαρμόζεται κυρίως σε περιπτώσεις εδαφών και αποβλήτων που έχουν μολυνθεί από βαρέα μέταλλα και ραδιενεργά υλικά. Μετά από ένα πρόγραμμα φυτοεκχύλισης, το έδαφος παραμένει γόνιμο και κατάλληλο για περαιτέρω καλλιέργεια.



**Εικόνα 1.** Συσσώρευση βαρέων μετάλλων στην φυτική βιομάζα.



Η φυτοεκχύλιση βαρέων μετάλλων μπορεί να επιτευχθεί με δύο προσεγγίσεις:

- Φυσική φυτοεκχύλιση: Χρησιμοποιούνται φυτά τα οποία έχουν την ικανότητα να συσσωρεύουν μεγάλες ποσότητες βαρέων μετάλλων στους βλαστούς και τα φύλλα τους. Τυπικά, τα φυτά αυτά είναι μικρά, με μικρό ριζικό σύστημα και σχετικά αργή ανάπτυξη. Τα επιλεγμένα φυτά φυτεύονται ή μεταφυτεύονται στο ρυπασμένο έδαφος και αναπτύσσονται υπό κανονικές καλλιεργητικές συνθήκες. Μετά την πλήρη ανάπτυξη, τα υπέργεια μέρη των φυτών συλλέγονται και απομακρύνονται.
- Επαγόμενη φυτοεκχύλιση: Περιλαμβάνει την επιλογή και καλλιέργεια φυτών με γρήγορη ανάπτυξη στις μολυσμένες περιοχές. Κατά τη διάρκεια της ανάπτυξης των φυτών προστίθενται στο έδαφος χηλικές ενώσεις (π.χ. EDTA) προκειμένου να αυξήσουν τη διαθεσιμότητα των μετάλλων στα φυτά. Όταν τα φυτά ωριμάσουν, χρησιμοποιούνται χημικοί παράγοντες επαγωγής για να κατευθύνουν τη συσσώρευση των μετάλλων στο υπέργιο μέρος των φυτών. Τα φυτά τότε συλλέγονται και απομακρύνονται.

#### *A.4.2. Φυτά Υπερσυσσωρευτές (Hyperaccumulators plants)*

Τα φυτά που επιλέγονται να χρησιμοποιηθούν για τον παραπάνω σκοπό ονομάζονται υπερσυσσωρευτές και μπορούν να χαρακτηρισθούν έτσι εάν έχουν την ικανότητα να παράγουν μεγάλη βιομάζα και η συσσώρευση του μετάλλου να κυμαίνεται μεταξύ 1-3% περιεκτικότητα σε μέταλλο / ξηρό βάρος (Cunningham et al., 1996).

Από διάφορες μελέτες που έχουν πραγματοποιηθεί έχουν αναγνωριστεί ήδη κάποια φυτά υπερσυσσωρευτές, που όχι μόνο παρουσιάζουν μεγάλη ανθεκτικότητα σε τοξικές συγκεντρώσεις συγκεκριμένων βαρέων μετάλλων, αλλά έχουν και την ικανότητα να προσλαμβάνουν και να δεσμεύουν στα

διάφορα φυτικά τους μέρη (και ειδικά στο ριζικό τους σύστημα) αυτά τα στοιχεία.

Πολλά λοιπόν από αυτά τα φυτικά είδη έχουν την ικανότητα να συσσωρεύουν σημαντικές ποσότητες μετάλλων, σε επίπεδα 100 φορές μεγαλύτερες από εκείνες που ανιχνεύονται στους ιστούς των κοινών φυτών (χαρακτηρίζονται ως υπερσυσσωρευτές). Όπως είναι φυσικό τα φυτικά αυτά είδη παρουσιάζουν ιδιαίτερο ενδιαφέρον για τη χρησιμοποίησή τους σε προγράμματα φυτοεξυγίανσης. Μέχρι σήμερα έχουν προσδιοριστεί περισσότερα από 400 φυτικά είδη, που ανήκουν σε τουλάχιστον 45 οικογένειες φυτών, εκ των οποίων κάποια χρησιμοποιούνται ήδη σε προγράμματα φυτοεξυγίανσης.

Τα φυτά υπερσυσσωρευτές έχουν αναπτύξει διάφορους φυσιολογικούς μηχανισμούς ώστε να μπορέσουν να επιβιώσουν σε εδάφη πλούσια σε τέτοια τοξικά στοιχεία. Τέτοιοι μηχανισμοί είναι η επιλεκτική πρόσληψη μετάλλων, η απέκκριση, η συγκράτηση μόνο των ωφέλιμων για τον μεταβολισμό ιόντων και η απομόνωση των βλαβερών σε κενά διαστήματα μέσα στα κύτταρα (Kneer and Zenk, 1992).

Ένας υπερσυσσωρευτής μπορεί να συγκεντρώνει περισσότερα από 10 ppm υδραργύρου (Hg), 100 ppm καδμίου (Cd), 1000 ppm κοβαλτίου (Co), χρωμίου (Cr), χαλκού (Cu) και μόλυβδου (Pb), 10.000 ppm ψευδαργύρου (Zn) και νικελίου (Ni).

Τα περισσότερα από τα γνωστά φυτά υπερσυσσωρευτές συσσωρεύουν Ni, Co, Cu και Zn, και λιγότερα έχουν βρεθεί να συσσωρεύουν τα υπόλοιπα βαρέα μέταλλα. Επίσης πρόσφατα βρέθηκε ότι η φτέρη *Pteris vitatta* συσσωρεύει στους υπέργειους ιστούς της έως και 14.500 ppm αρσενικού (As), χωρίς να εμφανίζει συμπτώματα τοξικότητας.

Στον παρακάτω πίνακα παρουσιάζονται τα φυτικά είδη που εκδηλώνουν ικανότητα πρόσληψης κα αφομοίωσης συγκεκριμένων στοιχείων κατά την ανάπτυξη τους σε επιβαρυμένα εδάφη. Χρησιμοποιούμενα φυτικά είδη για την εξυγίανση εδαφών από κάδμιο (Cd) και χαλκό (Cu) είναι τα *Thlaspi caerulescens* και *Ipomoea alpina* αντίστοιχα.

**Πίνακας 1.** Χρησιμοποιούμενοι υπερσυσσωρευτές διαφόρων βαρέων μετάλλων.

<b>ΜΕΤΑΛΛΟ</b>	<b>ΦΥΤΙΚΟ ΕΙΔΟΣ</b>
<b>Cd</b>	<i>Thlaspi caerulescens</i>
<b>Cu</b>	<i>Ipomoea alpina</i>
Co	<i>Haumaniastrum robertii</i>
Pb	<i>Thlaspi rotundifolium, Brassica juncea</i>
Zn	<i>Thlaspi caerulescens</i>
Ni	<i>Psychotria douarrei, Sebertia acuminata</i>
Mn	<i>Macademia neurophylla</i>

Ο πιο γνωστός υπερσυσσωρευτής είναι το *Thlaspi caerulescens*. Ενώ τα περισσότερα φυτά εμφανίζουν συμπτώματα τοξικότητας σε συγκεντρώσεις Zn περίπου 100 ppm, το *Thlaspi caerulescens* μπορεί να συσσωρεύει έως και 26.000 ppm χωρίς κανένα σύμπτωμα. Εκτός από Zn, έχει την ικανότητα να συσσωρεύει και μεγάλες ποσότητες Cd.



**Εικόνα 2.** Ο υπερσυσσωρευτής *Thlaspi caerulescens*.

Επίσης, το *Brassica juncea* (ινδική μουστάρδα) συσσωρεύει σημαντικές ποσότητες μόλυβδου και χρησιμοποιείται ευρέως σε προγράμματα φυτοεξυγίανσης. Άλλα φυτικά είδη που έχουν χρησιμοποιηθεί είναι η λεύκα, το τριφύλλι, ο ηλίανθος, το καλάμι, το άλυσσο και η τσουκνίδα. Οι λεύκες έχουν αποδειχθεί πολύ αποτελεσματικές στην προσρόφηση και συσσώρευση

αρσενικού και καδμίου. Οι ηλιάνθοι έχουν χρησιμοποιηθεί στο παρελθόν για την εξυγίανση επιφανειακών υδάτων κοντά στο Τσερνόμπιλ κυρίως από ραδιενεργό στρόντιο και καίσιο.

#### *A.4.3. Πρόσληψη μετάλλων από τα φυτά*

Τα φυτά για να αναπτυχθούν χρειάζονται τα απαραίτητα θρεπτικά στοιχεία (μακρο-μικροστοιχεία) και διαθέτουν ειδικούς μηχανισμούς πρόσληψης, μεταφοράς και αποθήκευσης καθενός από τα στοιχεία αυτά.

Τα βαρέα μέταλλα Zn, Mn, Ni και Cu είναι απαραίτητα μικροστοιχεία για τα φυτά. Τα κοινά φυτά προσλαμβάνουν και συσσωρεύουν μικρές ποσότητες αυτών των μικροστοιχείων (< 10 ppm), που δεν ξεπερνούν τις μεταβολικές τους ανάγκες. Αντίθετα, ένας υπερσυσσωρευτής μπορεί να προσλάβει πολύ μεγαλύτερες ποσότητες (χιλιάδες ppm). Είναι γεγονός ότι η διαδικασία αυτή είναι ενεργοβόρα και επομένως εύλογα τίθεται το ερώτημα πιο είναι το εξελικτικό πλεονέκτημα των φυτών αυτών. Πρόσφατες μελέτες έχουν συσχετίσει την συσσώρευση βαρέων μετάλλων στα φύλλα των φυτών με την ανθεκτικότητά τους σε εχθρούς και ασθένειες (έντομα, μύκητες και βακτήρια).

Επίσης, οι υπερσυσσωρευτές προσλαμβάνουν όχι μόνο τα απαραίτητα μικροστοιχεία, αλλά και άλλα μη απαραίτητα μέταλλα, όπως το Cd. Στις περιπτώσεις αυτές, φαίνεται ότι τα μη απαραίτητα μέταλλα προσλαμβάνονται και μεταφέρονται στο φυτό με τους μηχανισμούς πρόσληψης και μεταφοράς άλλων απαραίτητων μικροστοιχείων (π.χ. το Cd με το μηχανισμό του Zn).

Η πρόσληψη των μετάλλων από τα φυτά υπερσυσσωρευτές εξαρτάται από τους παρακάτω παράγοντες:

- Τύπος και συγκέντρωση του μετάλλου.
- Τύπος και είδος του φυτού.
- Ηλικία του φυτού.
- Ρυθμός και συνθήκες ανάπτυξης.
- Τύπος του εδάφους, καθώς φυσικά και χημικά χαρακτηριστικά του, όπως περιεκτικότητα σε οργανική ουσία και pH.

#### *A.4.4. Περιοριστικοί παράγοντες της φυτοεκχύλισης*

Όπως προαναφέρθηκε, πολλά φυτικά είδη συσσωρεύουν σημαντικές ποσότητες τοξικών μετάλλων στους ιστούς τους και μπορούν να χρησιμοποιηθούν σε προγράμματα βιοεξυγίανσης ρυπασμένων περιοχών. Παρόλα αυτά, υπάρχουν παράγοντες που περιορίζουν την επιτυχία και την εφαρμοσιμότητα της τεχνολογίας αυτής. Τέτοιοι περιοριστικοί παράγοντες είναι:

- Η μικρή βιομάζα και η αργή ανάπτυξη των υπερσυσσωρευτών.
- Η περιορισμένη ανθεκτικότητα πολλών φυτών στους ρύπους.
- Η ανάγκη καλλιέργειας πολλών διαφορετικών ειδών για την αντιμετώπιση των ρύπων.
- Η μειωμένη μετακίνηση σε αρκετά φυτικά είδη των μετάλλων από τη ρίζα στο βλαστό.
- Το πρόβλημα της εναπόθεσης των ρυπασμένων φυτών μετά τη συγκομιδή τους.
- Ο κίνδυνος μεταφοράς των τοξικών μετάλλων στην τροφική αλυσίδα μετά από βρώση των φυτών.

#### *A.4.5. Συμπεράσματα – Βελτίωση της Αποτελεσματικότητας της Μεθόδου*

Από τα παραπάνω γίνεται φανερό ότι τα φυτά διαθέτουν το γενετικό δυναμικό για την απομάκρυνση βαρέων μετάλλων από ρυπασμένες περιοχές με την τεχνική της φυτοεκχύλισης. Βέβαια, η σχετικά μικρή βιομάζα και η αργή ανάπτυξη των περισσότερων υπερσυσσωρευτών αποτελούν τους κύριους αρνητικούς παράγοντες για την αποτελεσματική φυτοεξυγίανση εδαφών από βαρέα μέταλλα και περιορίζουν την χρησιμοποίηση αγρονομικών πρακτικών, όπως τη μηχανική συλλογή των φυτών.

Για την αντιμετώπιση αυτών των προβλημάτων έχουν γίνει προσπάθειες μεταφοράς της ικανότητας υπερσυσσώρευσης μετάλλων από

φυτά υπερσυσσωρευτές σε ταχέως αναπτυσσόμενα, υψηλής βιομάζας φυτικά είδη, με τη χρήση της κλασσικής βελτίωσης φυτών. Δυστυχώς όμως, η κλασσική βελτίωση δεν έχει δώσει σημαντικά αποτελέσματα λόγω της φυλετικής ασυμβατότητας που οφείλεται σε ανατομικές διαφορές μεταξύ των ειδών.

Εναλλακτικά, η βιοτεχνολογία με τη γενετική τροποποίηση φυτών παρέχει τη δυνατότητα για άμεση μεταφορά των υπεύθυνων γονιδίων, ξεπερνώντας έτσι το πρόβλημα της ασυμβατότητας μεταξύ των ειδών. Τα ερευνητικά αποτελέσματα στον τομέα αυτό φανερώνουν ότι είναι δυνατή η δημιουργία γενετικά τροποποιημένων φυτών με αυξημένη ικανότητα βιοσυσσώρευσης.

Σε πλήθος πειραμάτων έχουν μελετηθεί οι μηχανισμοί πρόσληψης και συσσώρευσης των βαρέων μετάλλων από τα φυτά και επίσης έχουν απομονωθεί γονίδια υπεύθυνα για τη βιοσυσσώρευση. Η περαιτέρω κατανόηση των φυσιολογικών και μοριακών μηχανισμών πρόσληψης και συσσώρευσης αποτελούν σήμερα θέματα αιχμής στην έρευνα της βιολογίας φυτών διεθνώς και αποσκοπούν τελικά στη δημιουργία αποτελεσματικών υπερσυσσωρευτών.

#### *A.5. Αντίδραση των φυτών στα Βαρέα Μέταλλα*

Η υψηλή συγκέντρωση βαρέων μετάλλων και γενικότερα οι περιβαλλοντικές καταπονήσεις προκαλούν μοριακές, βιοχημικές, φυσιολογικές και μορφολογικές αντιδράσεις των φυτών. Οι μεταβολές τις οποίες προκαλούν οι καταπονήσεις στη γονιδιακή έκφραση προξενούν αλλαγές στη συμπεριφορά πολλών ενζύμων, στην αύξηση ή τη μείωση των αντίστοιχων μεταβολικών προϊόντων και μεταβολές στη σύνθεση νέων πρωτεϊνών και πολυπεπτιδίων. Έχει αποδειχθεί η επαγωγή σύνθεσης πρωτεϊνών (πρωτεϊνών καταπόνησης, stress ή shock proteins) από αλατότητα, ωσμωτική καταπόνηση, θερμοπληξία,

παγετό, ανοξία (αναεροβίωση), μηχανική καταπόνηση, ατμοσφαιρική ρύπανση, υπεριώδη ακτινοβολία, οξειδωτική καταπόνηση και βαρέα μέταλλα.

Μερικές από τις πρωτεΐνες είναι χαρακτηριστικές για ένα συγκεκριμένο είδος καταπόνησης, π.χ οι φυτοχηλατίνες για καταπόνηση από βαρέα μέταλλα, ή είναι κοινές για περισσότερες τις μιας καταπονήσεις, π.χ. η ωσμωνίνη και οι LEA (Late Embryogenesis Abundant) πρωτεΐνες για καταπόνηση από ψύχος, ξηρασία, αλατότητα, ενώ επιπλέον απαντούν και σε φυσιολογικά κύτταρα μετά από επίδραση αμπισσικού οξέος (ABA). Αρκετές από τις πρωτεΐνες αυτές έχουν ταυτοποιηθεί, όπως π.χ. τα πολυπεπτίδια που επάγονται από αναεροβίωση και έχουν εξειδικευμένες λειτουργίες (ένζυμα γλυκόλυσης, ζυμώσεων), οι θερμοπληξιακές πρωτεΐνες (μοριακοί συνοδοί) ή συντιθέμενες *de novo* από αλατότητα πρωτεΐνες LEA (δραστηριοποιούνται ως κυτταροπλασματικοί ωσμωνλύτες). Οι περισσότερες, όμως, αν και ενδεχομένως προστατεύουν από τις αρνητικές συνέπειες μιας καταπόνησης, αποδομούνται αμέσως μετά. Ο ακριβής φυσιολογικός ρόλος τους, ο οποίος προσδίδει ανθεκτικότητα, δεν έχει διευκρινιστεί για τις περισσότερες από αυτές.

Μερικές από τις μεταβολές είναι αναμενόμενες και η ερμηνεία τους προφανής, όπως συμβαίνει για παράδειγμα σε βλαστούς φυτών που υπόκεινται σε καταπονήσεις αλατότητας και ξηρασίας, όπου η συγκέντρωση των ολικών πρωτεϊνών ελαττώνεται εξαιτίας μειωμένης σύνθεσης, αλλά και αυξημένης πρωτεόλυσής τους. Αντιθέτως, κατά την εκβλάστηση σπόρων στις ίδιες καταπονήσεις, η ποσότητα των πρωτεϊνών αυξάνεται, όχι λόγω αυξημένης σύνθεσης, αλλά λόγω μειωμένης πρωτεόλυσής τους. Η γενική αντίληψη είναι, πάντως, ότι οι αντίξοες περιβαλλοντικές συνθήκες και η παρουσία βαρέων μετάλλων έχουν αρνητική επίδραση σε όλο τον πρωτεϊνικό μεταβολισμό.

Έχουν αναφερθεί παραπάνω τα φυτά υπερσυσσωρευτές, που έχουν την ικανότητα να συγκεντρώνουν μεγάλες ποσότητες βαρέων μετάλλων στους βλαστούς και τα φύλλα τους, με αποτέλεσμα να τροποποιείται η γονιδιακή τους έκφραση από το ίδιο το μέταλλο. Τα βαρέα μέταλλα μεταφέρονται με πρόσδεση σε μικρού βάρους ουσίες, όπως τις φυτοχηλατίνες, οι οποίες είναι μικρά πλούσια σε θείο πολυπεπτίδια. Οι

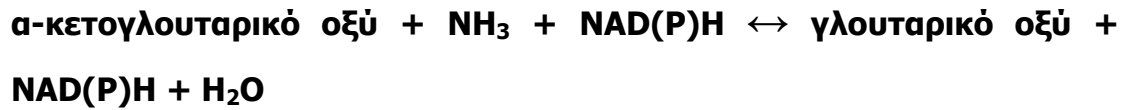
φυτοχηλατίνες είναι ασυνήθιστα πεπτίδια με γενικό τύπο (γ-γλουταμικό οξύ-κυστίνη)<sub>v</sub> - γλυκίνη, όπου v=2-8. Η ασυνήθιστη δομή τους οφείλεται στο γεγονός, ότι το πεπτίδιο συνδέεται μεταξύ γλουταμίνης και κυστίνης χρησιμοποιώντας γ καρβοξυλομάδα της γλουταμίνης (την καρβοξυλομάδα της πλευρικής αλυσίδας), και όχι το α-καρβοξύλιο, χαρακτηριστικό των πρωτεϊνών. Ο δεσμός αυτός υποδεικνύει, ότι οι φυτοχηλατίνες δεν συνθέτονται στα ριβοσώματα αλλά είναι προϊόν κάποιων βιοσυνθετικών μονοπατιών. Η αδυναμία σύνθεσης φυτοχηλατίνης, που επιτελείται με μια μη ενζυμική οδό και με πρόδρομη ένωση γλουταθειόνη, οδηγεί σε νέκρωση του φυτού. Οι φυτοχηλατίνες συμπλέκονται στο κυτταρόπλασμα με τα μέταλλα και πιθανόν τα μεταφέρουν για αποθήκευση στο χυμοτόπιο, όπου τα παραδίνουν για πρόσδεση σε οργανικά οξέα, ενώ το αποπεπτιδικό τμήμα τους ελευθερώνεται και πάλι στον συμπλάστη, για να προσδέσει και να μεταφέρει πρόσθετα μέταλλα. Σημαντικές ποσότητες φυτοχηλατινών βρέθηκαν όταν οι συγκεντρώσεις των βαρέων μετάλλων ήταν σε τοξικά επίπεδα (Cobbett, 2000 και Sharma and Dietz, 2006).

Μέχρι σήμερα έχει μελετηθεί σε σχετικά λίγες περιπτώσεις η επίδραση της συγκέντρωσης των βαρέων μετάλλων στα επίπεδα πρωτεϊνών όπως η γλουταμική αφυδρογονάση (GDH), ένζυμο που φαίνεται να επηρεάζεται από διάφορες συνθήκες καταπόνησης, και η ωσμωτίνη. Παρακάτω παρουσιάζονται συνοπτικά τα χαρακτηριστικά αυτών των πρωτεϊνών καθώς και τα μέχρι σήμερα δεδομένα.

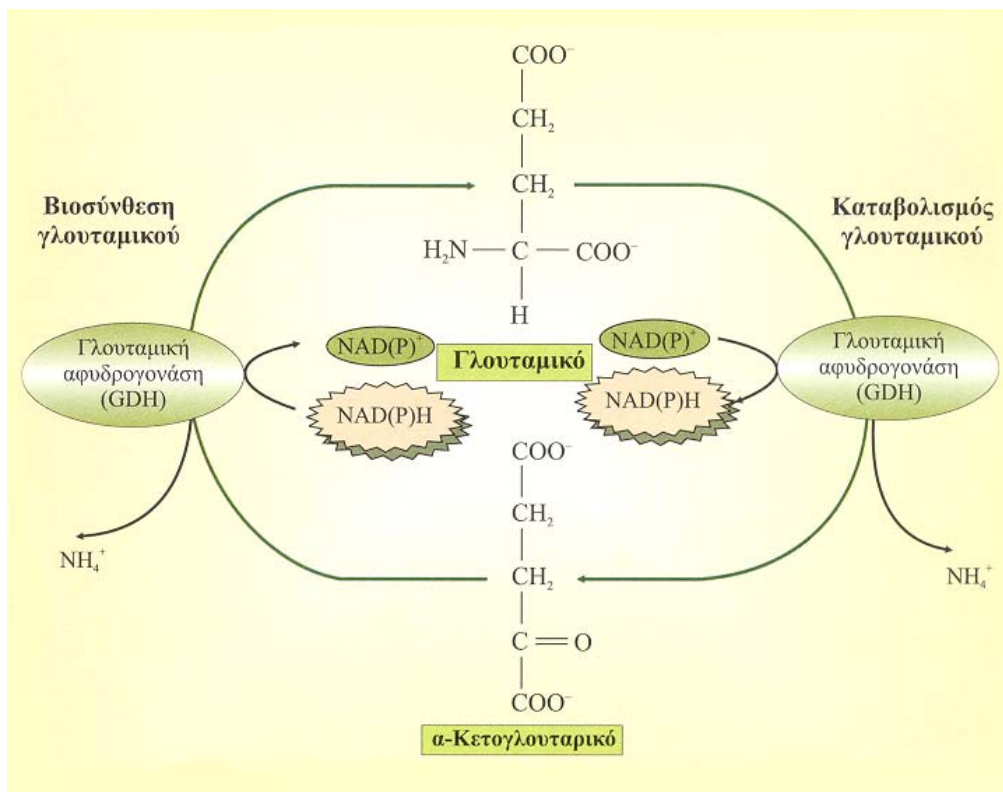
#### *A.5.1. Γλουταμική Αφυδρογονάση (GDH)*

Η γλουταμική αφυδρογνάση είναι το ένζυμο που καταλύει την αναγωγική αμίνωση του α-κετογλουταρικού οξέος σε γλουταμικό οξύ (αναβολική αντίδραση, NADH-GDH) και την απαμίνωση του γλουταμικού οξέος (καταβολική αντίδραση, NAD-GDH):





Ο ρόλος της GDH σήμερα στο μεταβολισμό των ανώτερων φυτών παραμένει αδιευκρίνιστος, παρά το γεγονός ότι ανιχνεύεται σε όλα τα φυτά και συχνά υπάρχει σε υψηλά επίπεδα στους διάφορους φυτικούς ιστούς. Το ένζυμο μπορεί να λειτουργεί με δυο τρόπους. Στην αφομοίωση ή την επαναφομοίωση του αμμωνίου, δρώντας έτσι συμπληρωματικά με το δίδυμο GS/GOGAT στη σύνθεση του γλουταμικού οξέος, ιδιαίτερα κάτω από συνθήκες καταπόνησης (υψηλή θερμοκρασία, έλλειψη νερού, αλατότητα, μολύνσεις από παθογόνα) ή σε ειδικά στάδια ανάπτυξης. Εναλλακτικά, το ένζυμο μπορεί να καταλύει την οξειδωση του γλουταμικού οξέος, εξασφαλίζοντας ανθρακικούς σκελετούς για την αποτελεσματική λειτουργία του κύκλου των τρικαρβοξυλικών οξέων (κύκλος Krebs), κάτω από περιοριστικές συνθήκες άνθρακα.



**Εικόνα 3.** Αμινωτική και απαμινωτική αντίδραση, που καταλύονται από τη γλουταμική αφυδρογονάση (από Ρουμπελάκη-Αγγελάκη, 2003).

Στα ανώτερα φυτά έχουν αναφερθεί δύο κύριες μορφές της GDH : μια μορφή εξαρτώμενη από NADH (NADH-GDH) που εντοπίζεται στα μιτοχόνδρια και μια NADPH (NADPH-GDH) εξαρτώμενη μορφή που σχετίζεται με τους χλωροπλάστες. Η NADH-GDH είναι όπως προαναφέρθηκε μιτοχονδριακό ένζυμο με πολλαπλές ισοενζυμικές μορφές. Σε βιοχημικό επίπεδο, το ένζυμο έχει μελετηθεί εκτενώς σε διάφορα φυτικά είδη, ιδιαίτερα στο αμπέλι, τη σόγια και το *Arabidopsis*. Τα μοριακά δεδομένα υποδεικνύουν την παρουσία δυο διακριτών γονιδίων της GDH, που εμφανίζουν διαφοροποιημένη έκφραση ανάλογα με το αναπτυξιακό στάδιο των ιστών / οργάνων και εξωγενείς παράγοντες όπως το φως και η πηγή αζώτου (Loulakakis and Roubelakis-Agelakis, 1991; 1992).

Τα χαρακτηριστικά της GDH έχουν μελετηθεί σε αρκετά φυτικά είδη, εκτενέστερα δε στο αμπέλι. Το ένζυμο παρουσιάζει πρότυπο επτά συνενζύμων σε όλους τους ιστούς, σε διαφορετικές ποσότητες. Το ένζυμο είναι εξαμερές αποτελούμενο από 2 είδη υπομονάδων, την α και τη β, που διαφέρουν μεταξύ τους στο μοριακό βάρος και στο φορτίο τους. Βρέθηκε ότι όλα τα ισοένζυμα της GDH περιέχουν και τους δυο τύπους υπομονάδων. Το ισοένζυμο 7 της GDH περιέχει μόνο α-υπομονάδες και το ισοένζυμο 1 μόνο β-υπομονάδες, ενώ τα ενδιάμεσα ισοένζυμα αποτελούνται και από τις δυο υπομονάδες σε μια διατεταγμένη σειρά. Δηλαδή από το ισοένζυμο 1 προς το ισοένζυμο 7, η συμμετοχή της α-υπομονάδας αυξάνει και της β- μειώνεται. Τα δυο ακραία είναι ομοεξαμερή ενώ τα ισοένζυμα δυο έως έξι περιέχουν της α- και β-υπομονάδες σε αναλογία 1:5, 2:4, 3:3, 4:2 και 5:1 αντίστοιχα. Σε ότι αφορά το φυσιολογικό ρόλο των 7 ισοενζύμων της GDH, δείχθηκε ότι κάθε ένα από αυτά, εμφανίζει παρόμοια συμπεριφορά ως προς την *in vitro* αναβολική και καταβολική του ενεργότητα. Παρόμοια αποτελέσματα προέκυψαν και από τη μελέτη της GDH του αβοκάντο *Persea spp.* Το μοντέλο έχει επιβεβαιωθεί πρόσφατα από άλλους ερευνητές σε διάφορα φυτικά είδη, όπως το *Arabidopsis thaliana*.

Επίσης, το αμπέλι ήταν το πρώτο φυτικό είδος στο οποίο μελετήθηκαν τα γονίδια της GDH. Συγκεκριμένα από μια cDNA βιβλιοθήκη απομονώθηκε ένας κλώνος της GDH του αμπελιού. Ο κλώνος αυτός φέρει ανοιχτό πλαίσιο

ανάγνωσης 1233 νουκλεοτιδίων που κωδικοποιεί πρωτεΐνη αποτελούμενη από 411 αμινοξέα. Η παράγωγος αμινοξική αλληλουχία εμφανίζει υψηλή ομολογία με άλλες φυτικές GDHs και σχετικά υψηλότερη ομολογία με την GDH των εξτρεμόφιλων αρχαιοβακτηρίων, παρά με τις αλληλουχίες μη φυτικών ευκαρυωτικών οργανισμών. Το γεγονός αυτό υποδηλώνει λειτουργική ή και εξελικτική σχέση μεταξύ των δυο αυτών ενζύμων. Τα αποτελέσματα μπορούν να υποστηρίξουν την προσαρμογή του φυτικού ενζύμου για λειτουργία υπο συνθήκες καταπόνησης (stress). Εντοπίστηκε επίσης η ύπαρξη περισσότερων του ενός γονιδίων της GDH στο γονιδίωμα του αμπελιού, υποδηλώνοντας ότι η σύνθεση κάθε υπομονάδας του ενζύμου ελέγχεται από διαφορετικό γονίδιο. Ο κλώνος της GDH του αμπελιού που απομονώθηκε, αντιστοιχεί στο γονίδιο που κωδικοποιεί την α-υπομονάδα του ενζύμου (Syntichaki et al., 1996).

Σε μερικά φυτικά είδη έχει μελετηθεί η επίδραση των βαρέων μετάλλων στα επίπεδα της GDH. Σε πειράματα που έγιναν για το σκοπό αυτό, διάφορες συγκεντρώσεις βαρέων μετάλλων προστέθηκαν στο μέσο ανάπτυξης των φυτών και ακολούθως έγινε προσπάθεια να προσδιοριστούν οι αλλαγές που επήλθαν στο ένζυμο. Παρακάτω παρουσιάζονται συνοπτικά τα μέταλλα και τα φυτικά είδη που χρησιμοποιήθηκαν σε κάποιες από αυτές τις έρευνες, καθώς και τα αποτελέσματα στα οποία αυτές κατέληξαν:

- Σπορόφυτα σιταριού (*Triticum aestivum*) και κριθαριού (*Hordeum vulgare*), αναπτύχθηκαν σε θρεπτικό μέσο που περιείχε βόριο (B) σε συγκέντρωση 10 mM για 5 ημέρες. Τα αποτελέσματα έδειξαν ότι η τοξικότητα του B αύξησε την ενεργότητα της GDH κατά 81% στις ρίζες και κατά 30% στα φύλλα (Mahboobi et al., 2002).
- Σπορόφυτα μπιζελιού (*Pisum sativum*) αναπτύχθηκαν σε θρεπτικό υπόστρωμα συγκέντρωσης 10 mM σε κάδμιο (Cd). Τα επίπεδα ενεργότητας της GDH πενταπλασιάστηκαν στις ρίζες και τριπλασιάστηκαν στους βλαστούς (Chugh et al., 1992).
- Σπορόφυτα καλαμποκιού (*Zea mays*) αναπτύχθηκαν σε θρεπτικό υπόστρωμα που περιείχε CdSO<sub>4</sub>, έτσι ώστε η συγκέντρωση του σε κάδμιο (Cd) να κυμαίνεται στα 20 mM. Δεν παρατηρήθηκε καμία αξιοσημείωτη

μεταβολή όσων αφορά στα επίπεδα της GDH και της GOGAT, ενώ παρατηρήθηκε σαφής αύξηση του επιπέδου της GS (Ju G.C. et al., 1997).

- Σπορόφυτα καλαμποκιού (*Zea mays*) αναπτύχθηκαν σε θρεπτικά υποστρώματα με αυξανόμενες συγκεντρώσεις σε κάδμιο (Cd) για 12 ημέρες. Τα αποτελέσματα έδειξαν ότι παρεμποδίστηκε σημαντικά η δράση των ενζύμων GS και GOGAT, ενώ αντίθετα η δράση της GDH αυξήθηκε (Boussama et al., 1999).
- Σπορόφυτα φασολιού (*Phaseolus vulgaris*) αναπτύχθηκαν σε υποστρώματα ιστοκαλλιέργειας που περιείχαν αυξανόμενες συγκεντρώσεις καδμίου (Cd). Τα αποτελέσματα έδειξαν ότι όλες οι επεμβάσεις προκάλεσαν παρεμπόδιση της ανάπτυξης των φυταρίων. Επίσης, αναλογικά της αύξησης της συγκέντρωσης του μετάλλου στο θρεπτικό μέσο, αυξήθηκε και η ενεργότητα της GDH και ειδικά στα φύλλα και στις ρίζες. Σε αυτό το γεγονός αποδίδεται και η αύξηση στην αφομοίωση του αζώτου που παρατηρήθηκε στους συγκεκριμένους ιστούς (Gouia et al., 2003).

#### A.5.2. Ωσμωνίνη

Οι ωσμωνίνες είναι πρωτεΐνες που ανήκουν σε ομάδα πρωτεϊνών μικρού MB (24 kD), που συντίθεται ως προ-πρωτεΐνες, καθίστανται ώριμες με την απομάκρυνση ενός τμήματός τους και διαμερισματοποιούνται κυρίως στο χυμοτόπιο, στον τονοπλάστη, στο πλασμάλημμα, αλλά και στους μεσοκυττάριους χώρους. Η ωσμωνίνη θεωρείται χαρακτηριστική εκπρόσωπος των πρωτεϊνών ωσμωνικής καταπόνησης, όμως η μεταγραφή των γονιδίων της επάγεται, εκτός από την έλλειψη νερού από την αλατότητα και το ψύχος, και από τουλάχιστον επτά επιπλέον σήματα, όπως είναι η υπεριώδης ακτινοβολία, ο μηχανικός τραυματισμός, οι μυκητιακές προσβολές, η προσβολή από τον ιό του μωσαϊκού του καπνού (TMV), το αμπισικό οξύ, το αιθυλένιο και η αυξίνη. Τα γονίδια της ωσμωνίνης επάγονται από αρκετές καταπονήσεις, η πρωτεΐνη όμως, συσσωρεύεται σε ικανές ποσότητες μόνο

μετά από εφαρμογή αιθυλενίου, προσβολή μυκήτων, ή κατά τον εγκλιματισμό σε έλλειψη νερού και σε αλατότητα. Οι ωσμωνικές είναι ομόλογες με τις παθογενετικές πρωτεΐνες, με αντιμυκητολογική δράση PR (pathogenesis-related proteins) οι οποίες αποτελούν μια μεγάλη οικογένεια των αμυντικών πρωτεϊνών των φυτών. Οι ωσμωνικές πιο συγκεκριμένα ανήκουν στην πέμπτη οικογένεια των PR πρωτεϊνών και είναι αρκετά συγγενείς με τις θαυματίνες (thaumatin).

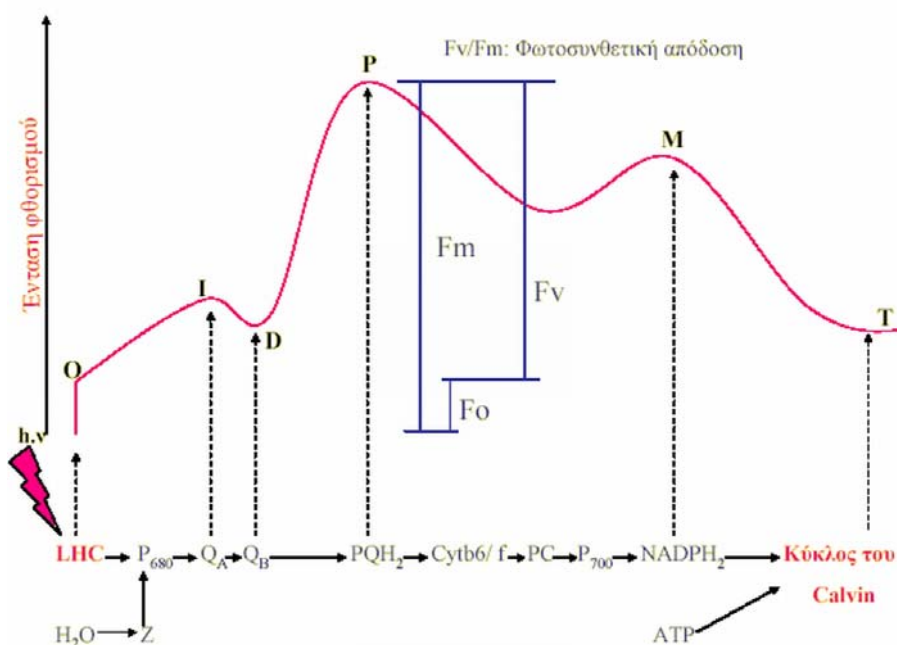
Τα προϊόντα των γονιδίων της ωσμωνικής εμφανίζουν *in vitro* αντιμυκητιακή δράση. Η αντιπαθογόνα δράση της ωσμωνικής περιγράφεται ως εξής: οι υφές του μύκητα εκλύουν τοξίνες οι οποίες διασπούν την κυτταρική μεμβράνη του φυτού, προξενώντας διαρροή θρεπτικών ουσιών που χρησιμοποιούνται από τον μύκητα. Έτσι, μειώνεται η σπαργή του φυτού, οπότε αυξάνεται η συσσώρευση ωσμωνικής, που διαχέεται εκτός του φυτικού κυττάρου και επικάθεται σε ομόλογο δέκτη στην επιφάνεια του μύκητα. Στη συνέχεια, η ωσμωνική εισχωρεί και σχηματίζει πόρους στις μυκηλιακές μεμβράνες, καθιστώντας τις διαπερατές και παρεμποδίζοντας την ανάπτυξη των μυκηλίων. Ο μηχανισμός δράσης της ωσμωνικής σε έλλειψη νερού και σε αλατότητα δεν είναι ακόμη γνωστός.

#### *A.6. Επαγωγικός φθορισμός χλωροφύλλης*

Μόνο ένα μέρος της ενέργειας που απορροφάται από τις χρωστικές του φωτοσυνθετικού μηχανισμού χρησιμοποιείται για τη φωτοχημεία της φωτοσύνθεσης. Η επιπλέον ενέργεια από αυτήν που χρησιμοποιείται για τη φωτοχημεία της φωτοσύνθεσης πρέπει να απελευθερωθεί αποτελεσματικά με μη-φωτοχημικές διαδικασίες. Οι διαδικασίες αυτές περιλαμβάνουν την εκπομπή θερμότητας και την επανεκπομπή μικρών αλλά ανιχνεύσιμων ποσών της απορροφημένης ακτινοβολίας ως μεγαλύτερου μήκους κύματος φωτεινή ενέργεια. Αυτή η επανεκπομπή του φωτός καλείται φθορισμός χλωροφύλλης. Η επαγωγή του φθορισμού από φωτοσυνθετικούς οργανισμούς παρατηρήθηκε για πρώτη φορά από τους Kautsky and Hirsch το 1931 (Krause and Weis,

1991). Η επαγωγή του φθορισμού από τα φυτά πραγματοποιείται σε δύο φάσεις, εκ των οποίων η πρώτη είναι ταχεία και η δεύτερη αργή (Εικ. 4). 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.

Ο φθορισμός αυξάνεται όταν η φωτοχημική απόδοση της φωτοσύνθεσης παρεμποδίζεται για οποιοδήποτε λόγο, για παράδειγμα όταν δεν υπάρχει διαθέσιμος οξειδωμένος δέκτης ηλεκτρονίων σε κάποιο σημείο στην πορεία της ηλεκτρονιακής μεταφοράς. Το μεγαλύτερο μέρος του φθορισμού εκπέμπεται από τις χρωστικές της κεραίας του Φωτοσυστήματος II, κι αυτό γιατί το PSII έχει ένα ιδιαίτερο χαρακτηριστικό: όταν τα κέντρα του είναι «κλειστά», τότε αυτά τα ίδια τα κέντρα αποσβένουν αρκετά αποτελεσματικά τον φθορισμό. 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 ( $F_0$ ) σε ένα μέγιστο επίπεδο ( $F_m$ ) και στη συνέχεια μειώνεται βαθμιαία μέχρις ένα σταθερό επίπεδο ( $F_s$ ).



**Εικόνα 4.** Τυπική καμπύλη επαγωγικού φθορισμού

### Ελάχιστος φθορισμός ( $F_0$ )

Κατά τη διάρκεια της φωτοσύνθεσης, τα κέντρα αντίδρασης στο PSII είναι ανοικτά και υπάρχει μια ελεύθερη ροή ηλεκτρονίων. Κάθε φωτόνιο που απορροφάται από ένα μόριο χλωροφύλλης μετατοπίζει ένα ηλεκτρόνιο από την θεμελιώδη σε μία διεγερμένη κατάσταση. Κατά τη διάρκεια αυτής της διαδικασίας τα κέντρα αντίδρασης στο PSII είναι σε ανοικτή κατάσταση διότι η μεταφορά ηλεκτρονίων είναι αρκετά γρήγορη έτσι ώστε να επιτρέπεται η είσοδος περαιτέρω ηλεκτρονίων. Υπάρχει μια σταθερή ροή ηλεκτρονίων και εμφανίζεται ένας ελάχιστος φθορισμός ( $F_0$ ).

### Μέγιστος φθορισμός ( $F_m$ )

Όταν ένας παλμός κορεσμού φωτός στέλνεται σε ένα φωτοσυνθετικό δείγμα τότε προκαλείται σε αυτό ο μέγιστος φθορισμός. Το οξειδωμένο κέντρο αντίδρασης θα γίνει εντελώς ανηγμένο με την αύξηση της μεταφοράς των ηλεκτρονίων (περισσότερο φως). Τα κέντρα αντίδρασης είναι τώρα κλειστά και ο αποδέκτης ηλεκτρονίων ( $Q_A$ ) ανάγεται εντελώς. Η ροή των ηλεκτρονίων εμποδίζεται επειδή η ποσότητα των  $Q_A$  δεν μπορεί να μεταφέρει τα ηλεκτρόνια αρκετά γρήγορα έτσι ώστε να συμβαδίσει με την εισροή των φωτονίων με αποτέλεσμα να εμφανίζεται η μέγιστη κβαντική απόδοση του PSII ( $F_m$ ). Σε αυτή την κατάσταση, η εκπομπή φθορισμού είναι μέγιστη.

### Μεταβλητός φθορισμός ( $F_v$ )

Η διαφορά μεταξύ των εντάσεων φθορισμού με τα κλειστά και ανοικτά κέντρα αντίδρασης είναι γνωστή ως μεταβλητός φθορισμός χλωροφύλλης ( $F_v = F_m - F_0$ ). Αυτό αντιστοιχεί στο μέρος της απορροφημένης φωτεινής ενέργειας που θα χρησιμοποιούταν στη φωτοσύνθεση εάν όλα τα κέντρα αντίδρασης ήταν στην ανοικτή κατάσταση.

### Ο λόγος $F_v / F_m$

Ο λόγος του φθορισμού  $F_v / F_m$  είναι ανάλογος του κβαντικού επιπέδου της φωτοχημείας της φωτοσύνθεσης. Η μείωση του λόγου  $F_v / F_m$  είναι ενδεικτική του αποτελέσματος κάποιων περιβαλλοντολογικών εξωτερικών παραγόντων, και αυτή η αλλαγή δείχνει απώλεια της φωτοχημικής απόδοσης. Η ευνοϊκότερη τιμή του λόγου  $F_v / F_m$  για τα περισσότερα είδη φυτών είναι 0,83

$\pm 0,05$  (Krause and Weis, 1991). Τιμές χαμηλότερες από αυτή δείχνουν ότι το φυτό είναι εκτεθειμένο σε κάποιου είδους καταπόνηση.

### *A.7. Βοτανικά Χαρακτηριστικά*

Παρακάτω παρουσιάζονται τα βοτανικά χαρακτηριστικά των φυτικών ειδών *Nicotiana tabacum* και *Nicotiana glauca*, τα οποία και μελετήθηκαν στην παρούσα εργασία.

#### *A.7.1. Nicotiana tabacum*

Το φυτό *Nicotiana tabacum* ανήκει στην ομάδα των δικοτυλήδων και στην οικογένεια Solanaceae. Είναι ετήσιο φυτό, θάμνος ή μικρό δέντρο από 0,90 έως 1,50 m ύψος ανάλογα με την ποικιλία. Τα φύλλα του είναι ελλειπτικά ή λογχοειδή, η ταξιανθία είναι βότρυς στο τέλος της διακλάδωσης, έχουν κυλινδρικό κάλυκα και είναι πρασινωπά ή κοκκινωπά στο πάνω μέρος. Ο καρπός είναι κάψα και έχει διάφορα σχήματα με σφαιρικούς σπόρους.

Είναι ευαίσθητο στη θερμοκρασία, στον αέρα και στην υψηλή υγρασία. Θερμοκρασία μεταξύ 20 με 30 °C είναι η καλύτερη για την επαρκή ανάπτυξη των φυτών, ατμοσφαιρική υγρασία 80-85 % και έδαφος χωρίς υψηλά επίπεδα αζώτου είναι επίσης απαραίτητα.

Είναι ιθαγενές της τροπικής και υποτροπικής Αμερικής αλλά τώρα καλλιεργείται εμπορικά παγκοσμίως. Άλλες ποικιλίες καλλιεργούνται σαν διακοσμητικά φυτά ή αναπτύσσονται σαν αγριόχορτα.

Κάθε μέρος του φυτού εκτός από τους σπόρους περιέχει νικοτίνη, αλλά η συγκέντρωση σχετίζεται με τις διαφορετικές λειτουργίες ανάλογα με το είδος, τον τύπο του εδάφους, την καλλιέργεια και τις συνθήκες του καιρού. Η συγκέντρωση της νικοτίνης αυξάνεται με την ηλικία του φυτού. Τα φύλλα του καπνού περιέχουν 2-8 % νικοτίνη. Η κατανομή της νικοτίνης σε ένα ώριμο φυτό σε άγρια ποικιλία είναι: 64 % στα φύλλα, 18 % στο βλαστό, 13 % στις ρίζες και 5 % στα άνθη.



Ο καπνός χρησιμοποιείται σαν τοπικό αναλγητικό. Τα στεγνά φύλλα του χρησιμοποιούνται για μάσημα ή για κάπνισμα.

Σε πείραμα που πραγματοποιήθηκε για τη μελέτη της επίδρασης του Cd και του Ni (με επεμβάσεις των 20 ppm και 25 ppm αντίστοιχα) στο *Nicotiana tabacum* παρατηρήθηκε αναστολή της ανάπτυξης των ριζικών τριχιδίων του φυτού στην παρουσία των μετάλλων, γεγονός που καθιστά τις συγκεκριμένες συγκεντρώσεις Cd και Ni τοξικές για τα ριζικά τριχίδια του φυτού (Boominathan and Doran, 2003).

Από πείραμα έχει διαπιστωθεί πως η ανάπτυξη του φυτού μειώνεται, όταν αυτό καλλιεργείται σε εδάφη με υψηλές συγκεντρώσεις μόλυβδου και ψευδαργύρου.



**Εικόνα 5.** *Nicotiana tabacum*

### A.7.2. *Nicotiana glauca*

Το φυτό *Nicotiana glauca* ανήκει στην ομάδα των δικοτυλήδων και στην οικογένεια Solanaceae. Είναι αυτοφυές στη Βολιβία, στην Αργεντινή, στη Ν. Αμερική και στις Μεσογειακές χώρες.

Είναι βραχύβιος θάμνος ή ένα μικρό δέντρο που συχνά φτάνει τα 7,5 μέτρα στη φύση. Είναι χαρακτηριστική η εμφάνιση του εξαιτίας των μεγάλων ωσειδών γαλαζοπράσινων φύλλων του. Αυτά είναι παχιά, ελαστικά, απλά, λεία, γλαυκά με διακεκριμένες νευρώσεις και εναλλάσσονται γύρω από τον κορμό με μακρύ μίσχο, έχουν μήκος περίπου 17,5 cm και πλάτος 15 cm. Η ταξιανθία είναι φόβυς με κίτρινα σωληνοειδή άνθη, με πέντε πέταλα, τα οποία αναπτύσσονται στο τέλος της διακλάδωσης χωρίς φύλλα. Τα άνθη είναι άοσμα και έχουν μήκος  $1\frac{3}{4}$  ίντσες και πλάτος  $\frac{1}{2}$  ίντσα. Οι αγωγοί των ανθέων έχουν πέντε λοβούς και κλείνουν κατά τη διάρκεια του απογεύματος. Αυτά ακολουθούνται από μία ωσειδής σποριόκαψα που περιέχει πολυάριθμους καφέ σπόρους. Μπορεί να ανθίζει όλο το χρόνο σε θερμά κλίματα, αλλά συνήθως ανθίζει Αύγουστο έως Οκτώβριο.

Το φυτό είναι καλλιεργούμενο και απαιτεί πλήρη ηλιοφάνεια ή ημισκιά και βαθύ πλούσιο έδαφος. Στην σκιά δεν μεγαλώνει. Επίσης μπορεί να αναπτυχθεί σε αμμώδη ή αργιλώδη, υγρά και καλά στραγγιζόμενα, όξινα, ουδέτερα ή αλκαλικά εδάφη. Γενικά δεν έχει ιδιαίτερες απαιτήσεις. Ένα κατάλληλο compost για καλλιέργεια του συνιστάται από δύο μέρη πηλού, δύο μέρη τύρφης peat moss και ένα μέρος άμμου. Λιπαίνεται μηνιαία με ισορροπημένο λίπασμα. Για την βέλτιστη ανάπτυξη του φυτού τοποθετείται σε υγρό μέρος. Είναι φυτό ταχείας ανάπτυξης. Το κλάδεμα προάγει την ανάπτυξη περισσότερων βραχιόνων και περισσότερων ανθέων. Κατά το κλάδεμα δεν πρέπει να απομακρύνουμε τα μαραμμένα άνθη έτσι ώστε το φυτό να μπορεί να παράγει σπόρους. Το φυτό μπορεί να γίνει ζιζάνιο αν το τοποθετήσουμε σε θερμοκήπιο. Πολλαπλασιάζεται με τμήματα φυτού ή με σπόρους. Οι εχθροί του είναι πουλιά και έντομα κυρίως της τάξης Lepidoptera.

Το *Nicotiana glauca* χρησιμοποιείται κυρίως σε δημόσιους χώρους, πάρκα και δρόμους. Το φυτό έχει φαρμακευτική χρήση, αλλά επειδή όλα τα

μέρη του είναι εξαιρετικά δηλητηριώδη, πρέπει να χρησιμοποιείται με ιδιαίτερη προσοχή. Το *Nicotiana glauca* ενώ σχετίζεται με το *Nicotiana tabacum* δεν περιέχει νικοτίνη.

Έχει χρησιμοποιηθεί σε πειράματα φυτοεξυγίανσης ως υπερσυσσωρευτής εξαιτίας της γρήγορης ανάπτυξής του, της μεγάλης βιομάζας του και της προσαρμοστικότητας του στις περιβαλλοντικές συνθήκες (Barazani et al., 2004). Τα αποτελέσματα ήταν ικανοποιητικά ιδιαίτερα στις περιπτώσεις του Pb, Cd και Zn αφού μπόρεσε να αναπτυχθεί πολύ καλά χωρίς να αλλοιωθούν ιδιαίτερα τα μορφολογικά χαρακτηριστικά του και να συγκεντρώσει πάνω από 10000 ppm βαρέος μετάλλου. Τέτοιου είδους πειράματα έχουν γίνει σε Ευρώπη, Αυστραλία και Αμερική, όπου το *Nicotiana glauca* βρέθηκε φυτό κατάλληλο για φυτοεξυγίανση.



**Εικόνα 6.** *Nicotiana glauca*

#### A.8. Σκοπός Εργασίας

Σκοπός της παρούσας εργασίας ήταν η μελέτη της επίδρασης των βαρέων μετάλλων καδμίου και χαλκού στην ανάπτυξη καλλιεργούμενων (*Nicotiana tabacum*) και άγριων (*Nicotiana glauca*) φυτών καπνού. Ο λόγος που επιλέχτηκαν τα συγκεκριμένα φυτά δεν ήταν τυχαίος. Το *Nicotiana glauca* είναι ήδη γνωστό από τη βιβλιογραφία ότι λειτουργεί αρκετά καλά ως φυτό υπερσυσσωρευτής και μπορεί να ανταπεξέλθει ικανοποιητικά στην παρουσία βαρέων μετάλλων. Το άλλο φυτικό είδος, το *Nicotiana tabacum* μελετήθηκε διότι είναι συγγενικό είδος του *Nicotiana glauca* και θα εξήγαμε χρήσιμα συμπεράσματα συγκρίνοντας τα αποτελέσματα που θα προέκυπταν από τα πειράματα μεταξύ των δύο αυτών ειδών.

## B. ΥΛΙΚΑ ΚΑΙ ΜΕΘΟΔΟΙ

Στην εργασία χρησιμοποιήθηκαν καλλιεργούμενα (*Nicotiana tabacum*) και άγρια (*Nicotiana glauca*) φυτά καπνού και πραγματοποιήθηκε σε δύο φάσεις. Μελετήσαμε πρώτον τις επιδράσεις διαλυμάτων διαφόρων συγκεντρώσεων  $\text{CdSO}_4$  και  $\text{CuSO}_4$  σε ανεπτυγμένα σπορόφυτα των προαναφερθέντων ειδών σε συνθήκες θερμοκηπίου και δεύτερον την επίδραση στην ανάπτυξη σπόρων των φυτών αυτών σε θρεπτικό υπόστρωμα Murashige and Skoog (MS) με την προσθήκη βαρέων μετάλλων (καδμίου και χαλκού) σε διάφορες συγκεντρώσεις σε *in vitro* καλλιέργεια.

### B.1. Φυτά στο Θερμοκήπιο

Για τις ανάγκες του πειράματος στο θερμοκήπιο χρησιμοποιήθηκαν 30 φυτά καλλιεργούμενου καπνού (*Nicotiana tabacum*) και άλλα 30 άγριου (*Nicotiana glauca*). Όλα τα φυτά ήταν ήδη ανεπτυγμένα και τοποθετήθηκαν ταξινομημένα ανά επέμβαση σε ειδικό πάγκο εργασίας και σε φυσιολογικές συνθήκες θερμοκηπίου.

Οι επεμβάσεις που πραγματοποιήσαμε ήταν συνολικά 5 και στην καθεμία χρησιμοποιήθηκαν 6 φυτά από κάθε είδος. Από αρχικά διαλύματα με  $\text{CdSO}_4$  και  $\text{CuSO}_4$  με την ανάλογη αραιώση είχαμε τελικά διαλύματα αραιών και πυκνών  $\text{CdSO}_4$  και  $\text{CuSO}_4$  με τις επιθυμητές συγκεντρώσεις, με τα οποία πραγματοποιούσαμε ριζοπότισμα στα φυτά. Συγκεκριμένα, οι επεμβάσεις ήταν:

- i. Μάρτυρας
- ii. Αραιό  $\text{CdSO}_4$  (2mM Cd)
- iii. Πυκνό  $\text{CdSO}_4$  (10mM Cd)
- iv. Αραιό  $\text{CuSO}_4$  (5mM Cu)
- v. Πυκνό  $\text{CuSO}_4$  (25mM Cu)

Το πείραμα πραγματοποιήθηκε κατά τους μήνες Μάρτιο – Μάιο, και σύμφωνα με την εποχή και τις απαιτήσεις των φυτών, κρίθηκε ικανοποιητικό για την φυσιολογική τους ανάπτυξη τα ριζοποτίσματα με τα μέταλλα να γίνονται 3 φορές την εβδομάδα, με ποσότητα 100 mL του ανάλογου διαλύματος ανά φυτό. Επίσης, εβδομαδιαίως γινόταν και λίπανση των φυτών με πλήρες λίπασμα (20-20-20).

Οι παρατηρήσεις που γίνονταν στα φυτά ανά τακτά διαστήματα αφορούσαν το ύψος των φυτών, των αριθμό των φύλλων τους καθώς επίσης και την ποσότητα των ολικών χλωροφυλλών (αυθαίρετες μονάδες SPAD) 5 έως 8 φύλλων από τη μέση του βλαστού των φυτών (ούτε κορυφόφυλλα ούτε φύλλα της βάσης). Επίσης προσδιορίστηκε ο επαγωγικός φθορισμός των χλωροφυλλών για ένα φύλλο από κάθε φυτό από τη μέση του βλαστού και μόνο από το *N. glauca* (τεχνικοί λόγοι δεν επέτρεψαν το προσδιορισμό στο *N. tabacum*).



**Εικόνα 7.** Η διάταξη φυτών *Nicotiana tabacum* και *Nicotiana glauca* σε πάγκο στο θερμοκήπιο.

Δύο μήνες από την εγκατάσταση των φυτών στο θερμοκήπιο έγινε συγκομιδή ιστών από τα φυτά για περαιτέρω αναλύσεις. Συγκεκριμένα, συγκομίστηκαν φύλλα από την κορυφή και τη βάση των φυτών, τα οποία

ξηραθήκαν σε φούρνο στους 85 °C, λειοτριβήθηκαν και στη συνέχεια στη σκόνη που προέκυψε προσδιορίστηκαν οι συγκεντρώσεις του μεν καδμίου από το εργαστήριο Φυλλοδιαγνωστικής της Σχολής Τεχνολογίας Γεωπονίας του Α.Τ.Ε.Ι. Κρήτης και του δε χαλκού από την εταιρία 'Αγροχημικά Κρήτης ΑΒΕΕ' από τη χημικό κα. Σπυριδάκη. Επίσης, συγκομίστηκαν φύλλα από τη μέση των φυτών, τα οποία χρησιμοποιήθηκαν για βιοχημικές (πρωτεϊνικές) αναλύσεις.

## *B.2. In vitro Καλλιέργεια*

Για το πείραμα χρησιμοποιήθηκαν σπόροι των ειδών *Nicotiana tabacum* και *Nicotiana glauca*, οι οποίοι πριν από τη χρήση τους πλύθηκαν και απολυμάνθηκαν με την ανάλογη διαδικασία, δηλαδή ξέπλυμα με οινόπνευμα 1 φορά 5-10 sec, στη συνέχεια ξέπλυμα με χλωρίνη 15 % 15 sec και τέλος ξέπλυμα με απιονισμένο-αποστειρωμένο νερό 2-3 φορές, ενώ αποστείρωση έγινε και σε όλα τα εργαλεία που χρησιμοποιήθηκαν κατά τη διαδικασία του πειράματος.

Για την καλλιέργεια *in vitro* σπόρων και των δύο ειδών καπνού χρησιμοποιήθηκε θρεπτικό υπόστρωμα Murashige and Skoog (MS), κάθε λίτρο του οποίου περιείχε εκτός των άλλων στοιχείων (Πίνακας 2), 7,5 g άγαρ (agar) και 30 g σακχαρόζης.

Για την καλλιέργεια και των δύο ειδών παρασκευάστηκαν 5 L θρεπτικού διαλύματος, τα χωρίστηκαν σε 5 κωνικές φιάλες του 1 L. Στις τέσσερις φιάλες προστέθηκαν τέσσερις διαφορετικές συγκεντρώσεις βαρέων μετάλλων, καδμίου (Cd) και χαλκού (Cu). Οι παραπάνω ποσότητες που προστέθηκαν ήταν σε μορφή αλάτων των αντίστοιχων μετάλλων, και ήταν τέτοιες ώστε στα τελικά διαλύματα τα μέταλλα να βρίσκονται σε συγκεντρώσεις (σε mM) 0,05 και 0,25 για το κάδμιο και 0,5 και 2,5 για το χαλκό.

Στο 1 L από το αρχικό MS δεν έγινε καμία επέμβαση με μέταλλα, με σκοπό τη χρησιμοποίηση του ως θρεπτικό υπόστρωμα ανάπτυξης για τα φυτά μάρτυρες.

Στη συνέχεια έγινε ρύθμιση του pH στο 6,0 με 1 N NaOH και κατόπιν αυτά μοιράστηκαν ισόποσα σε δοκιμαστικούς σωλήνες, οι οποίοι σφραγίστηκαν με βαμβάκι και φύλλο αλουμινόχαρτου και τοποθετήθηκαν στο αυτόκαυστο (κλίβανος) για αποστείρωση στους 121 °C για 20 min.

Όλη η διαδικασία εμφύτευσης εκτελέστηκε μέσα σε εστία νηματικής ροής υπό ασηπτικές συνθήκες. Αφού οι σπόροι εμφυτεύτηκαν στους δοκιμαστικούς σωλήνες (24 σωλήνες ανά επέμβαση) με το θρεπτικό υπόστρωμα, τοποθετήθηκαν στη συνέχεια σε θάλαμο ανάπτυξης με ελεγχόμενες συνθήκες φωτισμού (16 h φως και 8 h σκοτάδι) και σε θερμοκρασία 25 ± °C.

**Πίνακας 2.** Σύσταση του βασικού θρεπτικού υποστρώματος MS, που χρησιμοποιήθηκε για την *in vitro* καλλιέργεια φυτών καπνού (*Nicotiana tabacum* και *Nicotiana glauca*).

<b>ΣΥΣΤΑΤΙΚΑ</b>		<b>ΤΕΛΙΚΗ ΣΥΓΚΕΝΤΡΩΣΗ (mg/L)</b>
<b>ΜΑΚΡΟΣΤΟΙΧΕΙΑ</b>	KNO <sub>3</sub>	2000
	MgSO <sub>4</sub> 7H <sub>2</sub> O	370
	KH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub>	170
	CaCl <sub>2</sub> 2H <sub>2</sub> O	150
<b>ΜΙΚΡΟΣΤΟΙΧΕΙΑ</b>	KI	0,83
	H <sub>3</sub> BO <sub>3</sub> 6H <sub>2</sub> O	6,2
	MnSO <sub>4</sub> 4H <sub>2</sub> O	22,3
	ZnSO <sub>4</sub> 7H <sub>2</sub> O	8,6
	CuSO <sub>4</sub> 5H <sub>2</sub> O	0,025
	CoCl <sub>2</sub> 6H <sub>2</sub> O	0,025
	NaMoO <sub>4</sub> 2H <sub>2</sub> O	0,25
	FeNa EDFS	43
<b>ΒΙΤΑΜΙΝΕΣ</b>	Biotin	0,1
	Nicotinic acid	5
	Pyridoxine HCL	5
	Thiamine HCL	5
	D-Pantothenic acid	5
	Myoinositol	100



### *B.3. Μέθοδοι*

#### *B.3.1. Μέτρηση ολικών χλωροφυλλών*

Για τη μέτρηση της πυκνότητας της χλωροφύλλης χρησιμοποιήθηκε ο φορητός μετρητής χλωροφύλλης SPAD-502 (Minolta), που επιτρέπει γρήγορες μετρήσεις, χωρίς καταστροφή του φύλλου και μπορεί να αντικαταστήσει τις παραδοσιακές χρωματομετρικές μεθόδους προσδιορισμού της χλωροφύλλης στα φύλλα.

Η αρχή μέτρησης του οργάνου βασίζεται στην διαφορά της οπτικής πυκνότητας σε δύο μήκη κύματος (650 nm ερυθρό και 640 nm υπέρυθρο). Πηγή φωτισμού είναι 2 LEDs (φωτοεκπομπός δίοδος), μία για το ερυθρό και μία για το υπέρυθρο, που είναι τοποθετημένες στην κεφαλή του οργάνου και εκπέμπουν φως σε σειρά όταν αυτή κλείνει. Το φως από τα LEDs φεύγει δια μέσου του παραθύρου εκπομπής (επιφάνειας 6 mm<sup>2</sup>) και αφού περάσει δια μέσου του φύλλου που βρίσκεται στην κεφαλή μέτρησης, εισέρχεται στο παράθυρο υποδοχής. Ο υποδοχέας μετατρέπει το μεταβιβαζόμενο φως σε ανάλογο ηλεκτρικό σήμα, που στη συνέχεια μετατρέπεται σε αριθμητικό. Το τελευταίο χρησιμοποιείται από ένα μικροϋπολογιστή για το υπολογισμό των τιμών SPAD (Minolta 1989), από τις οποίες υπολογίζεται η συγκέντρωση της χλωροφύλλης στα φύλλα.



**Εικόνα 8.** Ο φορητός μετρητής χλωροφύλλης SPAD-502 (Minolta).

### B.3.2. Προσδιορισμός επαγωγικού φθορισμού (*fluorescence induction*) χλωροφύλλης

Η επαγωγή φθορισμού της χλωροφύλλης είναι μια διαδεδομένη μέθοδος για την αξιολόγηση της φωτοσυνθετικής δραστηριότητας (Krause and Weis, 1991). Η μέθοδος αυτή είναι μη καταστρεπτική, ιδιαίτερα ευαίσθητη, γρήγορη και εύκολη. Όταν τα μόρια χλωροφύλλης στο φωτοσύστημα II απορροφούν το φως, εκείνο το φως μπορεί να χρησιμοποιηθεί στις φωτεινές αντιδράσεις της φωτοσύνθεσης ή μπορεί να απελευθερωθεί ως ενέργεια φθορισμού ή θερμότητας. Ο *in vivo* φθορισμός αυξάνεται όταν μειώνεται η φωτοσύνθεση ή όταν εμποδίζεται.

Οι μετρήσεις για τον προσδιορισμό του φθορισμού των φύλλων πραγματοποιήθηκαν χρησιμοποιώντας το OS-30p Chlorophyll Fluorometer (OPTI-SCIENCES) (Εικ. 9) στα 660 nm μετά από 10 λεπτά επώασης στο σκοτάδι σε θερμοκρασία δωματίου. Η μεταφορά των δεδομένων πραγματοποιήθηκε με το πρόγραμμα Opti-Sciences Data Capture V3.0.



**Εικόνα 9.** OS-30p Chlorophyll Fluorometer.

### *B.3.3. Εκχύλιση πρωτεϊνών από φυτικούς ιστούς*

#### Διαλύματα:

- Σύσταση διαλύματος εκχύλισης (extraction buffer): 100 mM Tris-HCL, pH:8, 2 mM EDTA, 3 mM MgCl<sub>2</sub>, 10% Glycerol, 0,2% Triton X 100, 5 mM DTT ή Μερκαπτοαιθανόλη

#### Διαδικασία:

Ακολούθησε η διαδικασία που περιγράφεται από το Κ.Α. Λουλακάκη (2004). Όλα τα στάδια εκχύλισης των πρωτεϊνών εκτελέστηκαν μέσα σε πάγο. Όλα τα διαλύματα και οι μικροσυσκευές διατηρήθηκαν μέσα σε πάγο. Η αναλογία φυτικού ιστού και extraction buffer (διατηρημένο στους 4 ° C), που λειοτριβήθηκε ήταν 1:4 για τα φύλλα που χρησιμοποιήσαμε. Η λειοτριβήση έγινε με τη χρήση υγρού αζώτου (N<sub>2</sub>). Κατόπιν τα μίγματα μεταφέρθηκαν σε σωλήνες φυγοκέντρου και ομογενοποιήθηκαν στο μαχαίρι Ultra Turax τρεις φορές στις 24000 rpm, διάρκειας 30 sec η κάθε μία, με ανάδευση στο Vortex μεταξύ αυτών. Ακολούθησε επώαση στον πάγο, ανάδευση και αφού έγινε ισοζύγιση φυγοκεντρήθηκαν σε ψυχόμενη φυγόκεντρο στις 12.000 g και 4 °C για 30 min. Τα υπερκείμενα μοιράστηκαν σε μικροσωλήνες erendorf των 50 mL και φυλάχτηκαν στον καταψύκτη για τους επόμενους προσδιορισμούς.

### *B.3.4. Ποσοτικός προσδιορισμός ολικής πρωτεΐνης (Modified Lowry)*

#### Διαλύματα:

- Διάλυμα Α: 2 g NaOH, 10 g Na<sub>2</sub>CO<sub>3</sub>, 0,1 g τρυγικό Na-K σε 500 ml H<sub>2</sub>O
- Διάλυμα Β: 0,5 g CuSO<sub>4</sub> 5H<sub>2</sub>O σε 100 mL H<sub>2</sub>O
- Διάλυμα Γ: 0,5 g διαλύματος Α και 0,2 mL διαλύματος Β σε αναλογία 100:2 (παρασκευάζεται λίγο πριν τη χρήση)
- Διάλυμα Δ: 1 μέρος διάλυμα Folin-Phenol 2X και ένα μέρος H<sub>2</sub>O (παρασκευάζεται λίγο πριν τη χρήση)

### Διαδικασία:

Σε μικροσωλήνες erendorf αναμειγνύονται 25  $\mu\text{L}$  εκχυλίσματος και 25  $\mu\text{L}$  20% TCA, τοποθετούνται στο ψυγείο για 30 min και ακολουθεί φυγοκέντριση στις 14.000 rpm για 20 min σε μικροφυγόκεντρο. Έπειτα γίνεται άντληση του υπερκειμένου με αντλία Bernoulli ή πιπέτα. Επαναδιαλύεται η πελέτα (πρωτεϊνικό ίζημα) σε 100  $\mu\text{L}$  διαλύματος Α στο Vortex. Προσθέτονται από 100  $\mu\text{L}$  σε ακόμα 2 erendorf τα οποία θα χρησιμοποιηθούν σαν μάρτυρας (τυφλό διάλυμα). Προστίθεται 1 mL διαλύματος Γ και επώαση 10 min σε θερμοκρασία δωματίου. Προστίθενται 100  $\mu\text{L}$  διαλύματος Δ και επώαση για 30 min σε θερμοκρασία δωματίου. Αφού μηδενιστεί το φασματοφωτόμετρο με το «τυφλό» διάλυμα ακολουθεί μέτρηση της απορρόφησης (Absorbance) των διαλυμάτων στα 625 nm. Οι τιμές απορρόφησης μετατρέπονται σε συγκέντρωση πρωτεΐνης (mg/mL) με τη βοήθεια πρότυπης καμπύλης.

### *B.3.5. Αποδιατακτική ηλεκτροφόρηση πρωτεϊνών (Polyacrylamide Gel Electrophoresis)*

#### Διαλύματα:

Σε φλάσκα των 50 mL φτιάχνεται το *resolving gel* (10% ακρυλαμίδης) του οποίου η σύσταση είναι:

- 3,6 mL 4X Lower Tris pH 8,8
- 6,0 mL  $\text{H}_2\text{O}$
- 4,8 mL Bis-Acrylamide
- 55  $\mu\text{L}$  APS 10% (ammonium per sulfate) (χρησιμοποιείται σαν πηκτικό και πρέπει να φτιάχνεται πάντα λίγο πριν από τη χρήση)
- 6  $\mu\text{L}$  TEMED (πηκτικό)

Η σύσταση του *stacking gel* είναι:

- 2,5 mL 4X Upper-Tris
- 6,1 mL H<sub>2</sub>O
- 1,35 mL Bis-Acrylamide
- 42 μL APS
- 17 μL TEMED

Διαδικασία:

Παρασκευάστηκαν επίπεδα πηκτώματα (gel) πάχους 1,5 mm τα οποία μετά την ηλεκτροφόρηση χρησιμοποιήθηκαν για την χρώση ολικών πρωτεϊνών ή για τη μεταφορά των διαχωρισμένων πρωτεϊνών σε μεμβράνες νιτροκυτταρίνης (NC). Κάθε πήκτωμα αποτελείται από δύο επιμέρους πηκτώματα όπου το ένα, το πήκτωμα επιστοιβάξης (*stacking gel*) προηγείται του άλλου, του πηκτώματος ανάλυσης (*resolving gel*). Το πήκτωμα ανάλυσης περιείχε 10% και το πήκτωμα επιστοιβάξης 4% πολυακρυλαμίδη. Η επιμέρους σύσταση κάθε πηκτώματος φαίνεται στον Πίνακα 3.

Για την μετουσίωση των δειγμάτων προστέθηκε σε κάθε πρωτεϊνικό δείγμα διάλυμα μετουσίωσης (*sample buffer*) σε αναλογία 4:1. Το μίγμα επωάστηκε στους 100 °C για 5 min και στη συνέχεια μεταφέρθηκε σε πάγο.

**Πίνακας 3.** Ποσοτική σύσταση των πηκτωμάτων που χρησιμοποιήθηκαν στην αποδιατακτική ηλεκτροφόρηση.

<b>SDS PAGE (15 mL)</b>			
<b>Stock Solution</b>	<b>Stacking gel (7,5 mL)</b>	<b>Resolving gel Final Acrylamide Concentration (%)</b>	
		<b>4,00%</b>	<b>7,50%</b>
<b>D H<sub>2</sub>O (mL)</b>	4,59	7,43	6,18
<b>Upper Tris 4X (mL)</b>	1,88	0	0
<b>Lower Tris 4X (mL)</b>	0	3,75	3,75
<b>Acryl. Bis (30:0,8) (mL)</b>	1	3,75	3,75
<b>APS 10% (μL)</b>	26	64	64
<b>TEMED (μL)</b>	11	6	5
<b>TOTAL (mL)</b>	<b>7,5</b>	<b>15</b>	<b>15</b>

Ηλεκτροφόρηση: Το πήκτωμα διαχωρισμού τοποθετήθηκε στη συσκευή και αφέθηκε μέχρι να πολυμεριστεί. Στη συνέχεια παρασκευάστηκε και εφαρμόστηκε στη συσκευή το πήκτωμα επιστοίβασης. Αμέσως εφαρμόστηκε στον υποδοχέα η κτένα δημιουργίας «πηγαδιών» στα οποία τοποθετήθηκαν τα προς ανάλυση δείγματα. Τα διάλυμα αφέθηκε να πολυμεριστεί. Τα δοχεία της ηλεκτροφόρησης γεμίστηκαν με ρυθμιστικό διάλυμα ηλεκτροφόρησης (Tank Buffer). Τέλος, η ποσότητα μετουσιωμένων δειγμάτων (15-30 µg ολικής πρωτεΐνης κάθε δείγματος) μεταφέρθηκε με μικροσύριγγα στα πηγάδια (wells) και ηλεκτροφορήθηκαν στα 80 V για περίπου 2 ώρες.

### *B.3.6. Χρώση πρωτεϊνών με Coomassie Brilliant Blue R-250*

Η μέθοδος έγινε σύμφωνα με το Λουλακάκη (2004).

#### Διαλύματα:

- Διάλυμα χρώσης (stain): 0,1% Coomassie Brilliant Blue R-250, 50% μεθανόλη, 10% οξικό οξύ
- Διάλυμα αποχρωματισμού (destain): 20% μεθανόλη, 7% οξικό οξύ

#### Διαδικασία:

Με την συμπλήρωση της SDS-PAGE, το πήκτωμα μεταφέρθηκε σε κατάλληλο δοχείο το οποίο περιείχε διάλυμα χρώσης (περίπου 100 mL). Το δοχείο τοποθετήθηκε σε ανακινούμενη πλάκα και αφέθηκε να αναδευτεί ελαφρά για τουλάχιστον 1 ώρα. Στη συνέχεια, αφού απομακρύνθηκε το διάλυμα χρώσης και το gel ξεπλύθηκε με απιονισμένο H<sub>2</sub>O, προστέθηκε το διάλυμα αποχρωματισμού και η ανάδευση συνεχίστηκε για αρκετές ώρες. Με τη διαδικασία αυτή η πηκτή (gel) αποχρωματίστηκε και παρέμειναν χρωματισμένες (μπλε-μωβ) μόνο οι ζώνες των πρωτεϊνών. Τα πρωτεϊνικά πρότυπα παρατηρήθηκαν σε φωτεινή τράπεζα. Με τη διαδικασία αυτή ανιχνεύτηκαν ζώνες που περιείχαν το λιγότερο 0,1-1 µg πρωτεΐνης.

### *B.3.7. Μεταφορά κατά Western Blot – Ανοσοανίχνευση*

#### Διαλύματα:

- Διάλυμα μεταφοράς: 20 mM Tris, 192 mM γλυκίνη
- PBS (phosphate buffered saline): 0,8 % NaCl, 0,02% KCl, 0,115% Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub>, 0,02% KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>
- 2% BSA (αλβουμίνη από ορό βοδιού) σε PBS 1x
- 20% Tween-20
- Διάλυμα πλύσης: 0,05% Tween-20 σε PBS
- 1% BSA σε διάλυμα πλύσης

#### Διαδικασία:

Η μεταφορά των πρωτεϊνών έγινε στα 80 V (400 mA σταθερά) για 1 ώρα και 15 min. Η μεμβράνη NC που ετοιμάστηκε με αυτό τον τρόπο χρησιμοποιήθηκε για την ανίχνευση των πολυπεπτιδίων του ενζύμου γλουταμικής αφυδρογονάσης (GDH) ή της ωσμωτίνης με τη βοήθεια του κατάλληλου αντισώματος. Τα αντισώματα που χρησιμοποιήθηκαν είχαν παρασκευαστεί προηγουμένως σε κουνέλια εναντίων των αντίστοιχων πρωτεϊνών του αμπελιού.

Τα κύρια στάδια της ανίχνευσης ήταν:

1. Πλύσιμο NC σε PBS 1x για 10-15 min.
2. Η NC τοποθετείται σε διάλυμα 2% BSA σε PBS 1x (0,5 g BSA σε 25 mL PBS 1x) και ανάδευση για 30 min (blocking).
3. Πλύσιμο 1 x 5 min σε PBS 1x + 0,05% TWEEN 20.
4. Προστίθεται το πρώτο αντίσωμα που περιέχεται σε (1:2000) 1% BSA διαλυμένης PBS 1x + 0,05% TWEEN 20. Ανάδευση για τουλάχιστον 1 ώρα και 30 min.
5. Πλύσιμο 5 x 5 min σε PBS 1x + 0,05% TWEEN 20.
6. Προστίθεται GDH Anti Antibody (Alkaline Phosphatase) (Anti Rabbit) (1:5000) in 1% BSA σε PBS 1x + 0,05% TWEEN 20. Ανάδευση 1 ώρα και 30 min.

7. Πλύσιμο 2 x 5 min σε PBS 1x + 0,05% TWEEN 20.
8. Επώαση στο διάλυμα αντίδρασης [staining: 30 mL 100 mM Tris-HCl pH 9, 3 mg NBT, 150 μL BCiP (stock 10 mg/mL)], έως να εμφανιστούν οι ζώνες.
9. Πλύσιμο με απιονισμένο H<sub>2</sub>O.

#### *B.3.8. Μέτρηση ενεργότητας του ενζύμου GDH (Λουλακάκης 2004)*

##### Διαλύματα:

- 1 M Tris-HCl pH 8,0
- 2 M NH<sub>4</sub>Cl
- 10 mM CaCl<sub>2</sub>
- 200 mM α-κετογλουταρικό οξύ
- 2 mM NADH

##### Διαδικασία:

Η ενεργότητα της GDH μετρήθηκε μέσω της αμινωτικής αντίδρασης (Λουλακάκης, 2004). Από τα παραπάνω διαλύματα παρασκευάστηκε μίγμα (GDH mix) με τελικό όγκο 50 mL, το οποίο αποτελούνταν από: 5 mL 1 M Tris-HCl, 5 mL 2 M NH<sub>4</sub>Cl, 5 mL 10 mM CaCl<sub>2</sub>, 5 mL 200 mM α-κετογλουταρικό οξύ και 22,5 mL D-H<sub>2</sub>O. Ακολούθησε εξισορρόπηση του μίγματος στους 27 ° C. Για την αμινωτική αντίδραση προστέθηκαν σε κυβέτα του 1 mL, 850 μL GDH mix, 50 μL εκχυλίσματος φυτικού ιστού και τελικά 100 μL 2 mM NADH για την έναρξη της αντίδρασης. Η ενζυμική δραστηριότητα προσδιορίστηκε με την μέτρηση της αλλαγής της απορρόφησης στα 340 nm σε φασματοφωτόμετρο. Στη συνέχεια υπολογίστηκε η ειδική ενεργότητα της GDH [Specific activity = GDH activity (ΔOD/min\*mL) / συνολικές πρωτεΐνες (mg/mL)]. Τα αποτελέσματα εκφράστηκαν επίσης σε μmol NADH που καταναλώθηκε / min και σε μmol NADH που καταναλώθηκε / g φυτικού ιστού.



## Γ. ΑΠΟΤΕΛΕΣΜΑΤΑ

### Γ.1. Φυτά στο Θερμοκήπιο

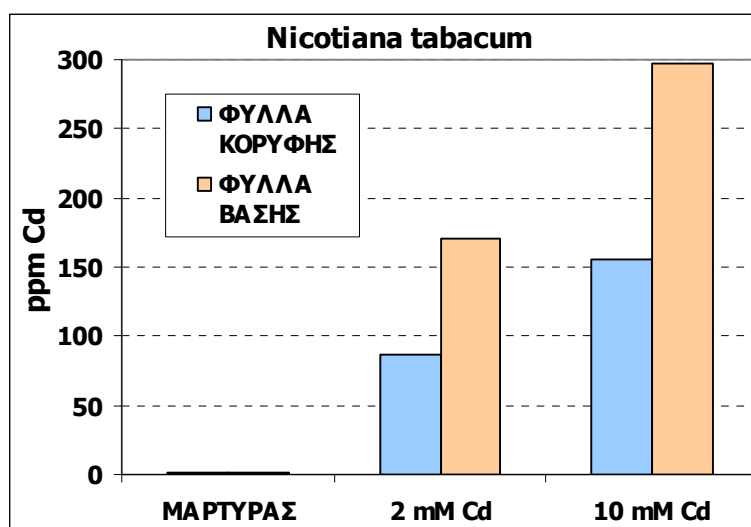
Κατά την απεγκατάσταση των φυτών από το θερμοκήπιο, αφού φωτογραφήθηκαν έγινε δειγματοληψία φύλλων, από τα φυτά όλων των επεμβάσεων αλλά και από τα φυτά μάρτυρες, από τρία μέρη κάθε φυτού (φύλλα βάσης, μεσαία φύλλα και φύλλα κορυφής). Στα φύλλα της βάσης και στα φύλλα της κορυφής προσδιορίστηκαν οι ενδογενείς συγκεντρώσεις των μετάλλων του Cd και του Cu. Τα μεσαία φύλλα συντηρήθηκαν σε κατάψυξη στους  $-80\text{ }^{\circ}\text{C}$  μέχρι να χρησιμοποιηθούν για την εκχύλιση των ολικών πρωτεϊνών.

#### Γ.1.1. Επίδραση του καδμίου (Cd) και του χαλκού (Cu) στα μορφολογικά χαρακτηριστικά του φυτικού είδους *Nicotiana tabacum*

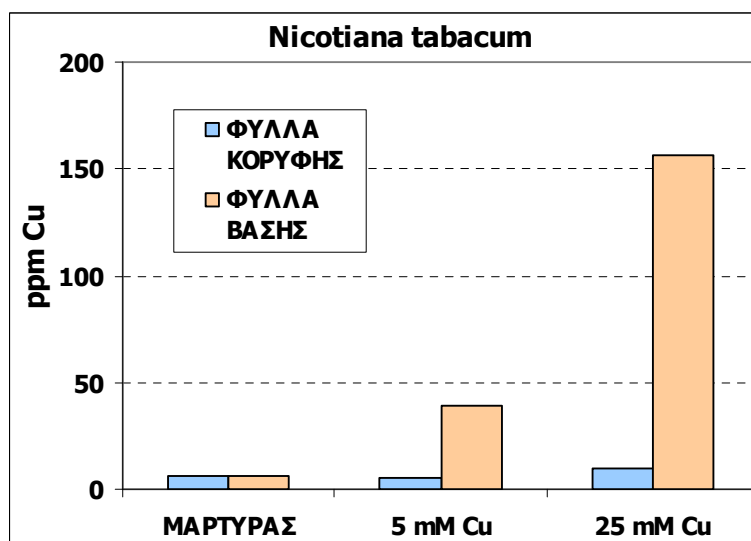
Κατά τη διάρκεια του πειράματος στα φυτά του είδους *Nicotiana tabacum* γινόταν προσθήκη αλάτων καδμίου ( $\text{CdSO}_4$ ) και χαλκού ( $\text{CuSO}_4$ ) με το νερό άρδευσης για 9 εβδομάδες, σε συγκεντρώσεις 2 και 10 mM για το Cd και 5 και 25 mM για τον Cu. Προκειμένου να μελετηθούν οι επιδράσεις που επέφεραν στα φυτά οι επεμβάσεις με βαρέα μέταλλα, χρησιμοποιήθηκαν φυτά μάρτυρες, τα οποία αναπτυσσόταν στις ίδιες ακριβώς συνθήκες, χωρίς όμως να τους γίνεται καμία επέμβαση με τα διαλύματα καδμίου ή χαλκού που χρησιμοποιούσαμε στα υπόλοιπα φυτά.

Τα δύο μέταλλα προσλήφθηκαν από τα φυτά και από τις δύο συγκεντρώσεις. Τα ενδογενή επίπεδα του καδμίου στα φύλλα ήταν 2 με 15 φορές υψηλότερα από εκείνα του χαλκού (Εικ. 10, 11). Ακόμα, τα φύλλα της βάσης συσώρευσαν διπλάσια ποσότητα καδμίου σε σύγκριση με τα φύλλα της κορυφής (Εικ. 10), ενώ στην περίπτωση του χαλκού τα φύλλα της βάσης συσώρευσαν 7πλάσια ποσότητα στην μικρή συγκέντρωση (5 mM) και 15πλάσια στη μεγάλη (25 mM). Μάλιστα στην μικρή συγκέντρωση του χαλκού

η ενδογενής συγκέντρωση του στα φύλλα της κορυφής δεν διέφερε από εκείνη του μάρτυρα (Εικ. 11).



**Εικόνα 10.** Ενδογενείς συγκεντρώσεις του καδμίου (σε ppm) στο ξηρό βάρος ιστών (φύλλα κορυφής και φύλλα βάσης) φυτών *Nicotiana tabacum*.



**Εικόνα 11.** Ενδογενείς συγκεντρώσεις του χαλκού (σε ppm) στο ξηρό βάρος ιστών (φύλλα κορυφής και φύλλα βάσης) φυτών *Nicotiana tabacum*.

Τα φυτά του μάρτυρα αναπτύχθηκαν αρκετά και ομοιόμορφα, ενώ μακροσκοπικά δεν παρουσίασαν μορφολογικές ανωμαλίες. Τα κιτρινισμένα φύλλα στη βάση των φυτών είναι αποτέλεσμα φυσιολογικής γήρανσης (τα φυτά στο τέλος του πειράματος είχαν ηλικία τεσσάρων μηνών περίπου) (Εικ. 12).

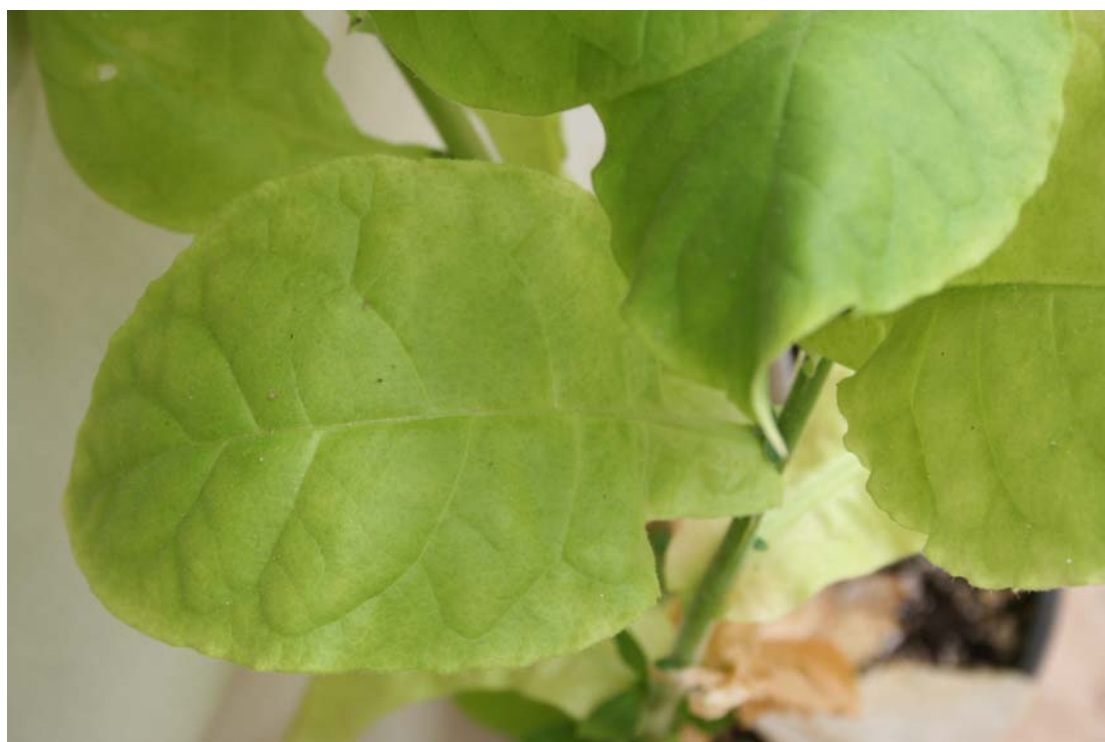


**Εικόνα 12.** Φυτά μάρτυρες του είδους *Nicotiana tabacum* μετά το πέρας του πειράματος.

Η διαβάθμιση της συγκέντρωσης των μετάλλων, κατά μήκος του βλαστού, που περιγράφηκε παραπάνω συσχετίζεται καλά με τις χλωρώσεις που παρατηρήθηκαν στα φύλλα των φυτών που έγιναν οι μεταχειρίσεις με τα μέταλλα (Εικ. 13, 14, 15, 16, 17, 18, 19, 20). Και το κάδμιο και περισσότερο ο χαλκός, και στις δύο συγκεντρώσεις, προκάλεσαν μεσονεύριες χλωρώσεις και κιτρίνισμα των φύλλων, συμπτώματα που ήταν εντονότερα στα φύλλα της βάσης και εξασθενούσαν προς την κορυφή και τα οποία δεν μπορούν να αποδοθούν αποκλειστικά στη φυσιολογική γήρανση. Στις μεγάλες συγκεντρώσεις των δύο μετάλλων η χλώρωση των φύλλων επεκτεινόταν υψηλότερα στο βλαστό συγκριτικά με τη μικρή συγκέντρωση (Εικ. 13, 15 και 17, 19) και ήταν εντονότερη σε ένταση και έκταση στα ελάσματα των φύλλων (Εικ. 14, 16 και 18, 20).



**Εικόνα 13.** Φυτά του είδους *Nicotiana tabacum* στα οποία έγινε επέμβαση με 2 mM Cd ( $\text{CdSO}_4$ ) μετά το πέρας του πειράματος.



**Εικόνα 14.** Άποψη φύλλου από φυτά του είδους *Nicotiana tabacum* στα οποία έγινε επέμβαση με 2 mM Cd ( $\text{CdSO}_4$ ).



**Εικόνα 15.** Φυτά του είδους *Nicotiana tabacum* στα οποία έγινε επέμβαση με 10 mM Cd ( $\text{CdSO}_4$ ) μετά το πέρας του πειράματος.



**Εικόνα 16.** Άποψη φύλλου από φυτά του είδους *Nicotiana tabacum* στα οποία έγινε επέμβαση με 10 mM Cd ( $\text{CdSO}_4$ ).



**Εικόνα 17.** Φυτά του είδους *Nicotiana tabacum* στα οποία έγινε επέμβαση με 5 mM Cu (CuSO<sub>4</sub>) μετά το πέρας του πειράματος.



**Εικόνα 18.** Άποψη φύλλου από φυτά του είδους *Nicotiana tabacum* στα οποία έγινε επέμβαση με 5 mM Cu (CuSO<sub>4</sub>).

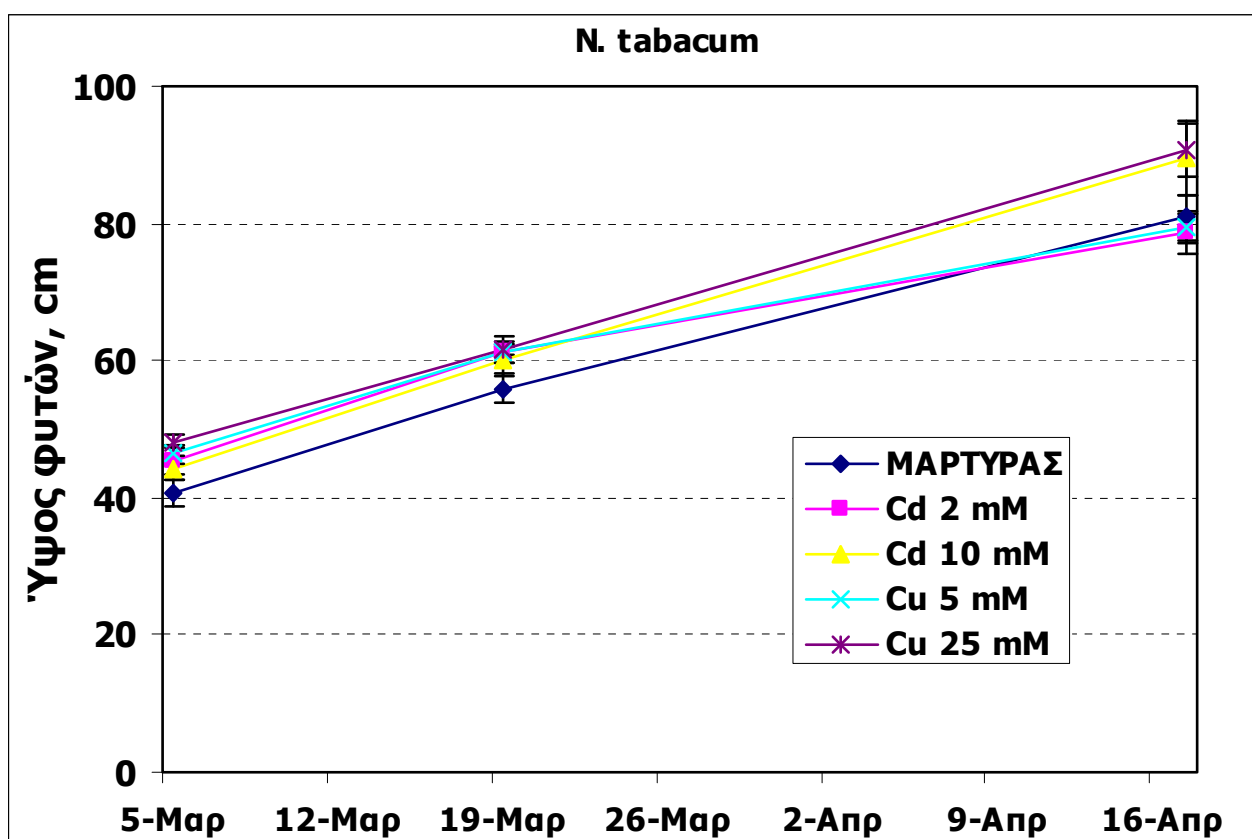


**Εικόνα 19.** Φυτά του είδους *Nicotiana tabacum* στα οποία έγινε επέμβαση με 25 mM Cu (CuSO<sub>4</sub>) μετά το πέρας του πειράματος.



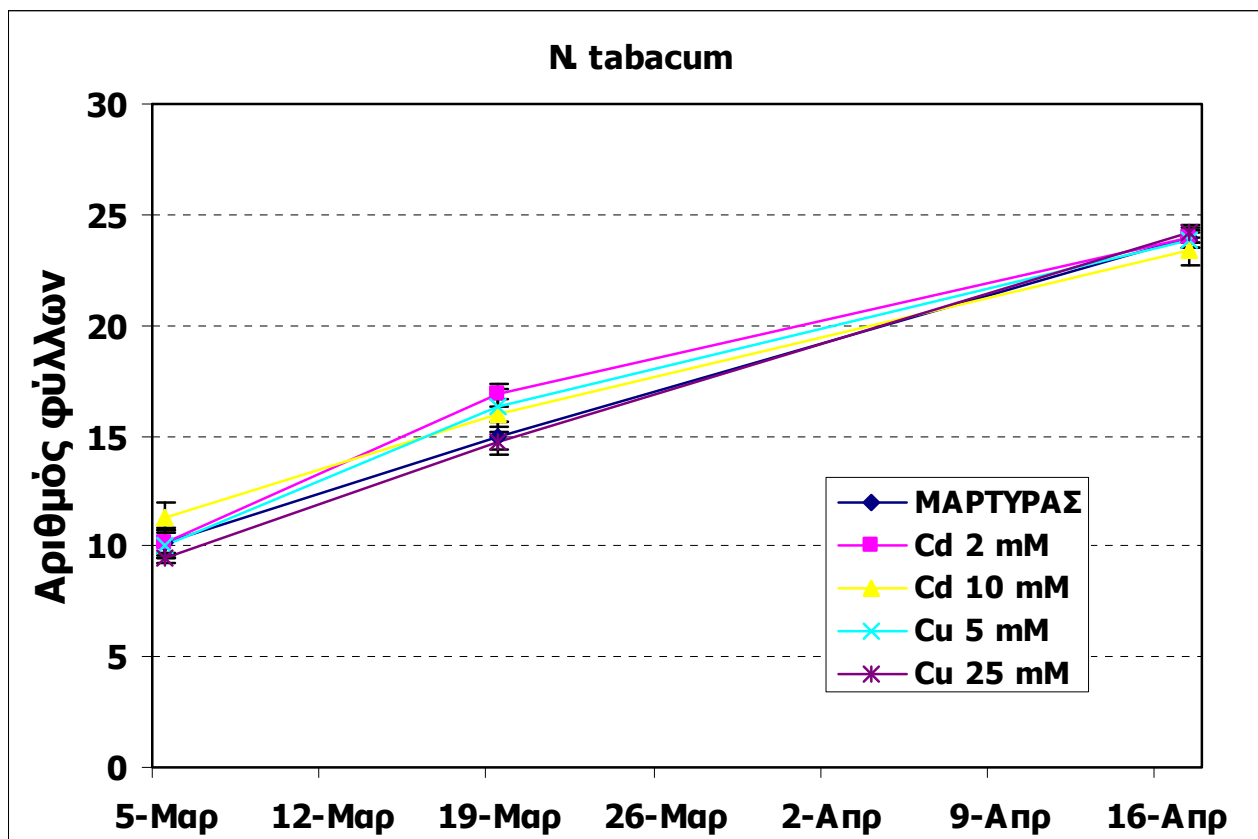
**Εικόνα 20.** Άποψη φύλλου από φυτά του είδους *Nicotiana tabacum* στα οποία έγινε επέμβαση με 25 mM Cu (CuSO<sub>4</sub>).

Άλλα μακροσκοπικά χαρακτηριστικά της ανάπτυξης των φυτών που μελετήθηκαν παρουσίασαν μικρές διαφορές μεταξύ του μάρτυρα και των φυτών που δέχθηκαν τις επεμβάσεις με τις δύο συγκεντρώσεις των μετάλλων. Πιο συγκεκριμένα, η μεταβολή του ύψους των φυτών, κατά τη διάρκεια του πειράματος, παρουσίασε μικρές διαφορές ανάμεσα στα φυτά του μάρτυρα και σε αυτά στα οποία έγιναν οι επεμβάσεις με τις δύο συγκεντρώσεις των μετάλλων, για να καταλήξει, στο τέλος του πειράματος, το ύψος των φυτών στις επεμβάσεις που δέχονταν τις υψηλές συγκεντρώσεις ελαφρώς μεγαλύτερο από τις υπόλοιπες (Εικ. 21). Τέλος, ο αριθμός των φύλλων των φυτών δεν επηρεάστηκε από τις επεμβάσεις (Εικ. 22).



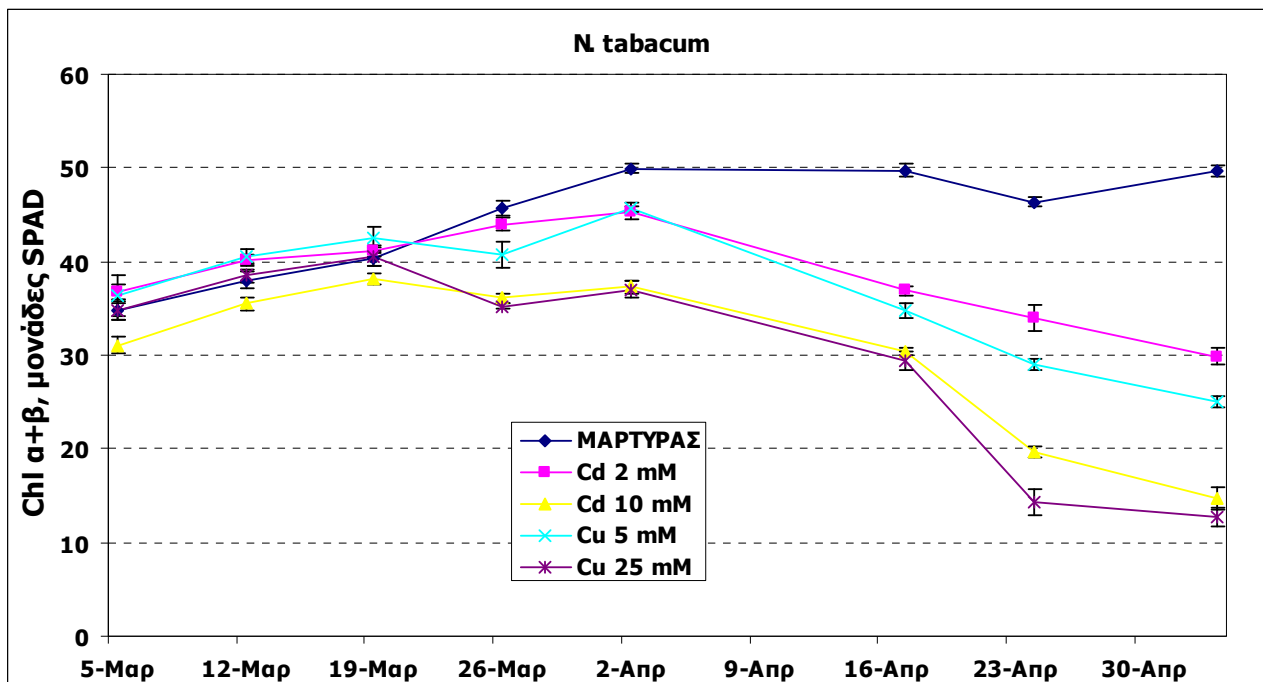
**Εικόνα 21.** Μεταβολή του ύψους των φυτών *Nicotiana tabacum* ανά επέμβαση (μέσος όρος 6 φυτών).





**Εικόνα 22.** Μεταβολή του αριθμού φύλλων των φυτών *Nicotiana tabacum* ανά επέμβαση (μέσος όρος 6 φυτών).

Αντίθετα με τα παραπάνω, πολύ έντονη ήταν η επίδραση των επεμβάσεων στη μεταβολή των ολικών χλωροφυλλών των φύλλων κατά τη διάρκεια του πειράματος. Ενώ τις δύο πρώτες εβδομάδες από την εφαρμογή των μετάλλων οι ολικές χλωροφύλλες (SPAD) των επεμβάσεων δεν διέφεραν ούτε μεταξύ τους, ούτε με το μάρτυρα, από την τρίτη εβδομάδα δημιουργούνται τρεις ευδιάκριτες ομάδες φυτών: τα φυτά του μάρτυρα, που μέχρι το τέλος του πειράματος είχαν μια τιμή SPAD γύρω στο 50, τα φυτά των χαμηλών συγκεντρώσεων των δύο μετάλλων με τιμές SPAD που έφθιναν συνεχώς κατά τις 4 τελευταίες εβδομάδες του πειράματος, με εντονότερη πτώση για το Cu, και κατέληξαν σε τιμές 30 και 25 για το Cd και το Cu αντίστοιχα, και τέλος τα φυτά των υψηλών συγκεντρώσεων των δύο μετάλλων με τιμές SPAD που επίσης έφθιναν, αλλά εντονότερα από την προηγούμενη ομάδα και έφθασαν σε πολύ χαμηλές τιμές (κάτω του 15) και για τα δύο μέταλλα (Εικ. 23).



**Εικόνα 23.** Μεταβολή των ολικών χλωροφυλλών (αυθαίρετες μονάδες SPAD) των φυτών *Nicotiana tabacum* ανά επέμβαση (μέσος όρος 6 φυτών).

### Γ.1.2. Επίδραση του καδμίου (Cd) και του χαλκού (Cu) σε βιοχημικά χαρακτηριστικά του φυτικού είδους *Nicotiana tabacum*

Από τα μεσαία φύλλα των φυτών που είχαν φυλαχθεί στους  $-80\text{ }^{\circ}\text{C}$  έγινε εκχύλιση ολικών πρωτεϊνών και τα πρωτεϊνικά εκχυλίσματα που προέκυψαν χρησιμοποιήθηκαν για το χαρακτηρισμό του ενζύμου GDH και της ωσμωτίνης των φυτών του *N. tabacum*.

Στα εκχυλίσματα έγινε ποσοτικός προσδιορισμός των πρωτεϊνών με τη μέθοδο Lowry, για να εκτιμηθεί η σχετική περιεκτικότητα των εκχυλισμάτων κάθε δείγματος σε πρωτεΐνες και στην συνέχεια ίση ποσότητα ολικών πρωτεϊνών από κάθε δείγμα μετουσιώθηκε και ηλεκτροφορήθηκε με SDS-PAGE σε επίπεδα πηκτώματα 10% ακρυλαμίδης, με σκοπό την ανάλυση των επιμέρους πρωτεϊνικών ζωνών. Το πρωτεϊνικό πρότυπο κάθε δείγματος, προέκυψε μετά την χρώση του πηκτώματος με Coomassie Brilliant Blue R-250.

Για τη μελέτη του ενζύμου της γλουταμικής αφυδρογονάσης (GDH) και της πρωτεΐνης της ωσμωτίνης, τα πρωτεϊνικά εκχυλίσματα που αναλύθηκαν με

SDS-PAGE, υποβλήθηκαν σε Western Blot (με τη μέθοδο αυτή οι πρωτεΐνες μεταφέρονται από το πήκτωμα σε σταθερό υπόστρωμα, στην προκειμένη περίπτωση σε μεμβράνη νιτροκυτταρίνης, όπου στη συνέχεια μπορεί εύκολα να ανιχνευτεί μια συγκεκριμένη πρωτεΐνη, από το σύνολο των πρωτεϊνών που έχουν αναλυθεί) και ανιχνεύτηκαν ανοσολογικά. Η ανοσοανίχνευση έγινε με τη βοήθεια αντισωμάτων κουνελιού που αναγνωρίζουν το ένζυμο της GDH και την πρωτεΐνη της ωσμωτίνης του αμπελιού. Ακόμα προσδιορίστηκε η *in vitro* ενζυμική ενεργότητα της GDH στα πρωτεϊνικά εκχυλίσματα.

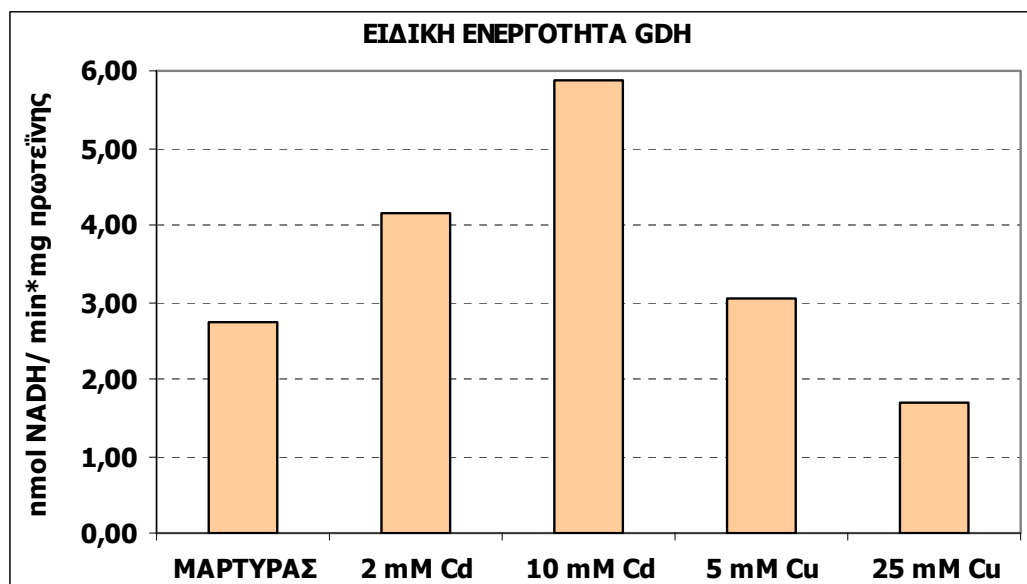
*Γ.1.2.α. Ολικές πρωτεΐνες και ενζυμική ενεργότητα της γλουταμικής αφυδρογονάσης (GDH) στις επεμβάσεις καδμίου (Cd) και χαλκού (Cu) σε φύλλα Nicotiana tabacum*

Οι ολικές πρωτεΐνες προσδιορίστηκαν με τη μέθοδο Lowry. Η ενζυμική ενεργότητα της GDH υπολογίστηκε μέσω της αμινωτικής αντίδρασης, μετρώντας την μεταβολή της απορρόφησης (ΔOD) στα 340 nm σε φασματοφωτόμετρο. Μέσω της ΔOD υπολογίστηκε η ειδική ενεργότητα, καθώς και η καταλυτική ενεργότητα στους ιστούς. Τα αποτελέσματα των επεμβάσεων παρουσιάζονται στον Πίνακα 4.

**Πίνακας 4.** Ολικές πρωτεΐνες και ενζυμική ενεργότητα της GDH, ανά επέμβαση με κάδμιο (Cd) και χαλκό (Cu) σε φυτά *Nicotiana tabacum*

<b>ΕΠΕΜΒΑΣΕΙΣ</b>	<b>ΟΛΙΚΗ ΠΡΩΤΕΪΝΗ</b> (mg/mL)	<b>ΕΝΕΡΓΟΤΗΤΑ GDH</b> (ΔOD/min*50μL)	<b>ΕΝΕΡΓΟΤΗΤΑ GDH</b> (ΔOD/min*mL)	<b>ΕΙΔΙΚΗ ΕΝΕΡΓΟΤΗΤΑ GDH</b> (ΔOD/min*mg πρωτεΐνης)	<b>ΕΝΕΡΓΟΤΗΤΑ GDH</b> (nmol NADH/min*mg πρωτεΐνης)	<b>ΚΑΤΑΛΥΤΙΚΗ ΕΝΕΡΓΟΤΗΤΑ</b> (nmol NADH/min*g φυτ. ιστού)
ΜΑΡΤΥΡΑΣ	0,88	0,00075	0,015	0,017	2,73	12,00
2 mM Cd	0,85	0,00110	0,022	0,026	4,14	17,60
10 mM Cd	0,79	0,00145	0,029	0,037	5,87	23,20
5 mM Cu	0,95	0,00090	0,018	0,019	3,03	14,40
25 mM Cu	0,94	0,00050	0,010	0,011	1,70	8,00

Όπως φαίνεται στην Εικόνα 24, η ειδική ενεργότητα της GDH τόσο στη μικρή όσο και στη μεγάλη συγκέντρωση του Cd αυξήθηκε ανάλογα, ενώ αντίθετα η μεγάλη συγκέντρωση του Cu είχε ως αποτέλεσμα τη μείωση της.

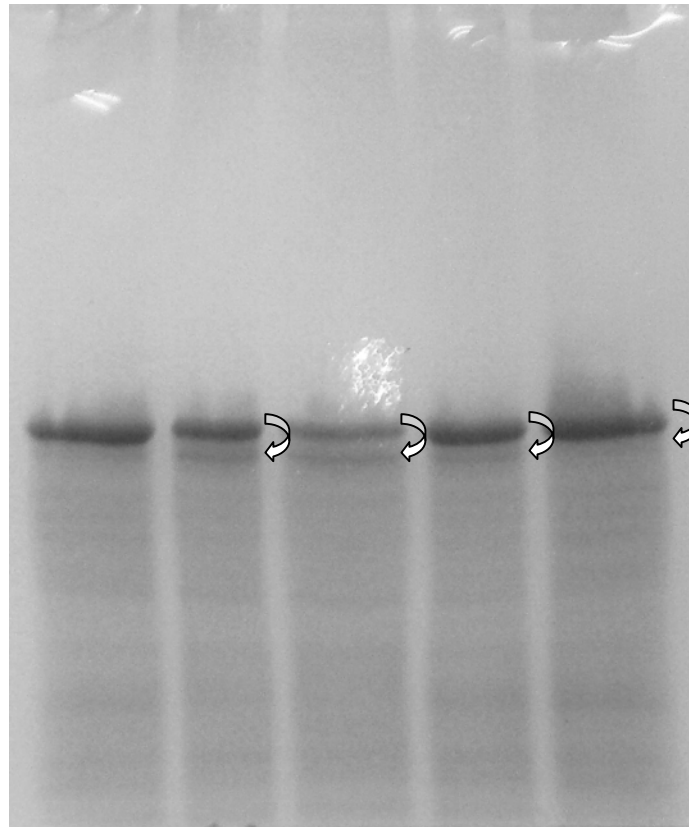


**Εικόνα 24.** Ειδική Ενεργότητα της GDH (nmol NADH/min\*mg πρωτεΐνης) στα φύλλα *Nicotiana tabacum*.

#### Γ.1.2.β. Επίδραση καδμίου (Cd) και χαλκού (Cu) στην έκφραση της GDH και της ωσμωτίνης σε φυτά *Nicotiana tabacum*

Στην εικόνα 25 παρουσιάζονται τα πρωτεϊνικά πρότυπα που προέκυψαν μετά την ανάλυση με SDS-PAGE των ολικών πρωτεϊνικών εκχυλισμάτων. Όπως φαίνεται στην εικόνα αυτή, διακρίνονται μικρές διαφορές στην παρουσία αλλά και στην ένταση των πρωτεϊνικών ζωνών μεταξύ των δειγμάτων κάθε επέμβασης.

Σε όλα τα παρακάτω πρωτεϊνικά εκχυλίσματα έγινε ανοσοανίχνευση (με τη βοήθεια αντισωμάτων κουνελιού που αναγνωρίζουν την GDH και την ωσμωτίνη του αμπελιού) των δύο πρωτεϊνών (GDH και ωσμωτίνη) και τα αποτελέσματα παρουσιάζονται αναλυτικά στη συνέχεια.

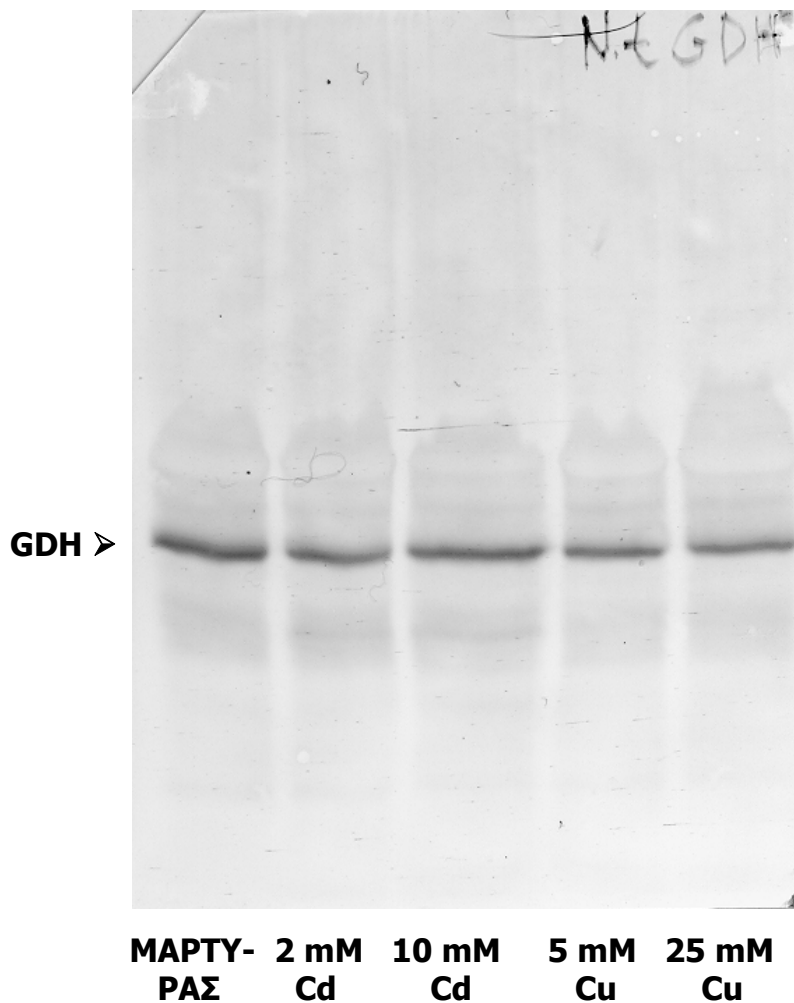


**MARTY- 2 mM 10 mM 5 mM 25 mM**  
**PAΣ Cd Cd Cu Cu**

**Εικόνα 25.** Πρωτεϊνικά πρότυπα από φυτικούς ιστούς φυτών *Nicotiana tabacum* που αναπτύχθηκαν στο θερμοκήπιο υπό την επίδραση διαφόρων συγκεντρώσεων καδμίου (Cd) και χαλκού (Cu). Τα πρότυπα προέκυψαν μετά από ανάλυση με SDS-PAGE και χρώση του πηκτώματος με Coomassie Brilliant Blue R-250.

### *Γλουταμική αφυδρογονάση (GDH)*

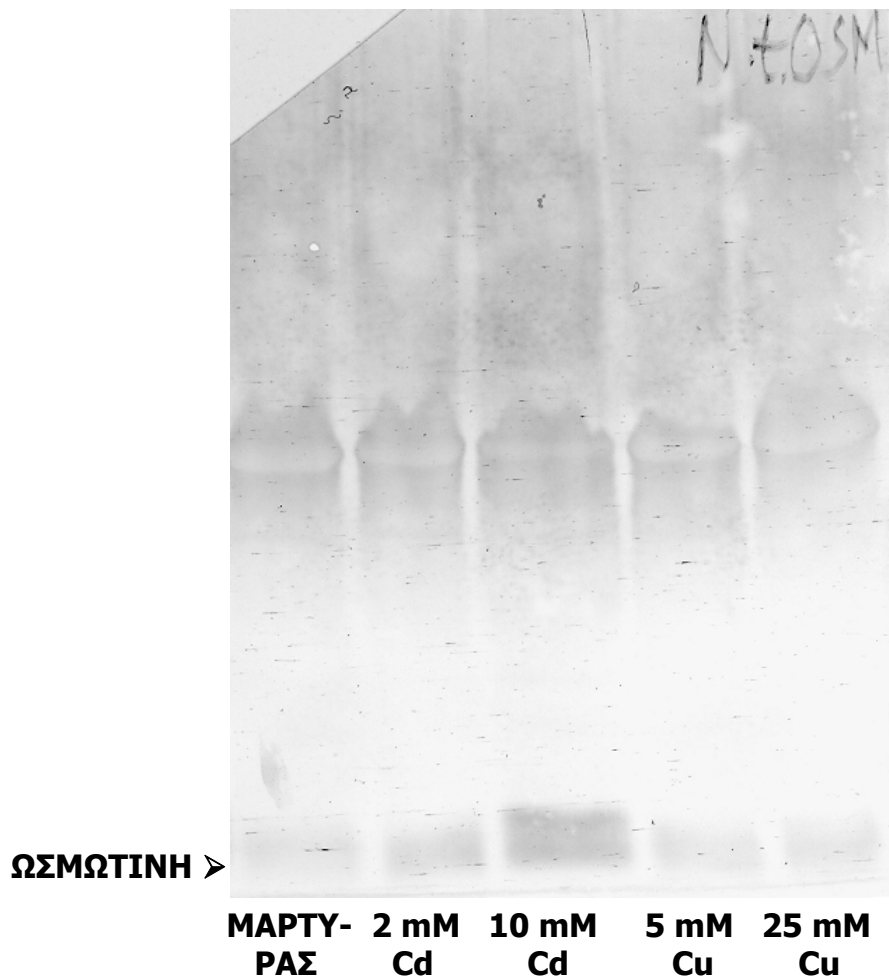
Η ανοσοανίχνευση της GDH του καλλιεργούμενου καπνού με το αντίσωμα της GDH του αμπελιού εμφάνισε μία πρωτεϊνική ζώνη σε ύψος που αντιστοιχεί σε M.B. 40 KDa περίπου. Στην εικόνα 26 παρουσιάζεται η μεμβράνη νιτροκυτταρίνης μετά την ανοσοανίχνευση της GDH. Η ένταση της ανοσοανιχνευόμενης ζώνης στην επέμβαση των 10 mM Cd εμφανίζεται μεγαλύτερη, ενώ των ζωνών των επεμβάσεων του Cu μικρότερη σε σχέση με τη ζώνη του μάρτυρα.



**Εικόνα 26.** Πρωτεϊνικές ζώνες της GDH από φυτικούς ιστούς φυτών *Nicotiana tabacum* που αναπτύχθηκαν στο θερμοκήπιο υπό την επίδραση διαφόρων συγκεντρώσεων καδμίου (Cd) και χαλκού (Cu). Οι ολικές πρωτεΐνες αναλύθηκαν με SDS-PAGE και μεταφέρθηκαν σε μεμβράνη νιτροκυτταρίνης με τη μέθοδο Western Blot. Στη μεμβράνη έγινε ανίχνευση της GDH με τη χρήση του ανάλογου αντισώματος.

### *Ωσμοτίνη*

Η ανοσοανίχνευση της ωσμοτίνης του καλλιεργούμενου καπνού με το αντίσωμα της ωσμοτίνης του αμπελιού εμφάνισε δύο πρωτεϊνικές ζώνες σε ύψος που αντιστοιχεί σε M.B. 20 KDa περίπου. Όπως φαίνεται και στην εικόνα 27, το Cd προκάλεσε μεγάλη αύξηση στην ένταση των ανοσοανιχνευόμενων ζωνών της ωσμοτίνης τόσο στη μικρή όσο και στη μεγάλη συγκέντρωση, σε αντίθεση με το Cu.



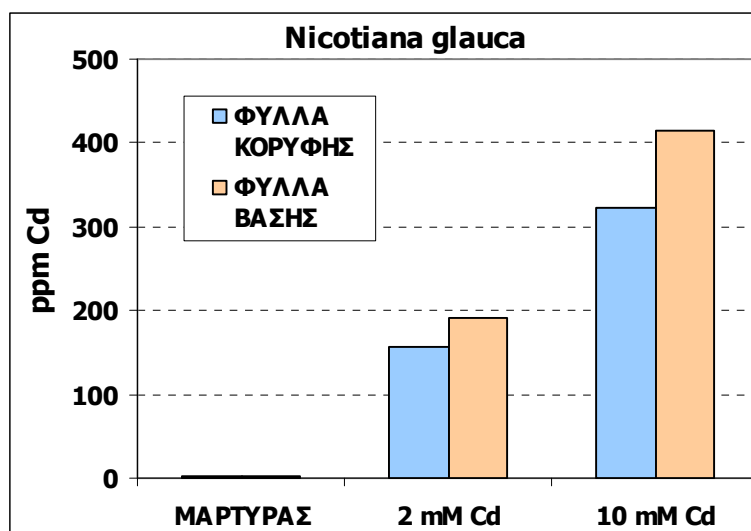
**Εικόνα 27.** Πρωτεϊνικές ζώνες της ωσμοτίνης από πρωτεϊνικά εκχυλίσματα *Nicotiana tabacum*. Οι ολικές πρωτεΐνες αναλύθηκαν με SDS-PAGE και μεταφέρθηκαν σε μεμβράνη νιτροκυτταρίνης με τη μέθοδο Western Blot. Στη μεμβράνη έγινε ανίχνευση της ωσμοτίνης με τη χρήση του ανάλογου αντισώματος.

### Γ.1.3. Επίδραση του καδμίου (Cd) και του χαλκού (Cu) στα μορφολογικά χαρακτηριστικά του φυτικού είδους *Nicotiana glauca*

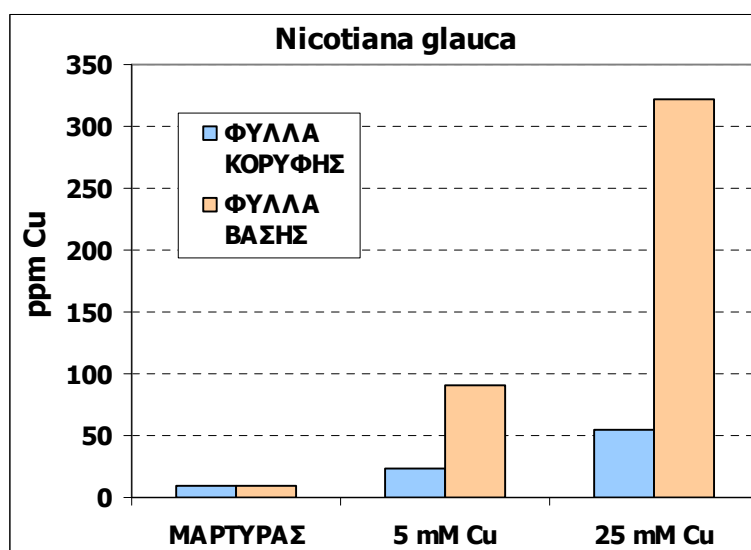
Ανάλογες επεμβάσεις με αυτές που αναφέρθηκαν προηγουμένως για τα φυτά του είδους *Nicotiana, tabacum* έγιναν και για το άλλο φυτικό είδος που μελετήσαμε, το *Nicotiana glauca*. Και σε αυτά λοιπόν γινόταν προσθήκη αλάτων καδμίου (CdSO<sub>4</sub>) και χαλκού (CuSO<sub>4</sub>) με το νερό άρδευσης τους σε δύο διαφορετικές συγκεντρώσεις για κάθε μέταλλο, 2 και 10 mM για το Cd και 5 και 25 mM για το Cu. Προκειμένου να μελετηθούν οι επιδράσεις που

επέφεραν στα φυτά οι επεμβάσεις με βαρέα μέταλλα, χρησιμοποιήθηκαν φυτά μάρτυρες και από αυτό το φυτικό είδος, τα οποία αναπτυσσόταν στις ίδιες ακριβώς συνθήκες, χωρίς όμως να γίνεται ούτε σε αυτά καμία επέμβαση με τα διαλύματα καδμίου ή χαλκού που χρησιμοποιούσαμε στα υπόλοιπα φυτά.

Και σε αυτά τα φυτά τα δύο μέταλλα προσελήφθηκαν από τα φυτά σε όλες τις παραπάνω συγκεντρώσεις. Τα ενδογενή επίπεδα του καδμίου στα φύλλα ήταν από 30 έως και 600 % υψηλότερα από εκείνα του χαλκού (Εικ. 29, 30). Επιπλέον, τα φύλλα της βάσης συσσωρεύουν λίγο περισσότερη ποσότητα καδμίου σε σχέση με αυτά της κορυφής (Εικ. 28), ενώ στην περίπτωση του χαλκού τα φύλλα της βάσης συσώρευαν 3πλάσια ποσότητα στην μικρή συγκέντρωση και 6πλάσια στην μεγάλη (Εικ. 29).



**Εικόνα 28.** Ενδογενείς συγκεντρώσεις του καδμίου (σε ppm) στο ξηρό βάρος ιστών (φύλλα κορυφής και φύλλα βάσης) φυτών *Nicotiana glauca*.



**Εικόνα 29.** Ενδογενείς συγκεντρώσεις του χαλκού (σε ppm) στο ξηρό βάρος ιστών (φύλλα κορυφής και φύλλα βάσης) φυτών *Nicotiana glauca*.



Και αυτά τα φυτά μάρτυρες, όπως φαίνεται και στην εικόνα 30, είχαν αναπτυχθεί αρκετά και ομοιόμορφα, ενώ μακροσκοπικά ούτε σε αυτά τα φυτά παρουσιάστηκαν μορφολογικές ανωμαλίες. Όπως και στους μάρτυρες *Nicotiana tabacum*, τα κιτρινισμένα φύλλα στη βάση των φυτών ήταν αποτέλεσμα φυσιολογικής γήρανσης (και αυτά τα φυτά στο τέλος του πειράματος είχαν ηλικία περίπου τεσσάρων μηνών).



**Εικόνα 30.** Φυτά μάρτυρες του είδους *Nicotiana glauca* μετά το πέρας του πειράματος.

Η διαβάθμιση της συγκέντρωσης των μετάλλων, κατά μήκος του βλαστού, που περιγράφηκε παραπάνω, συσχετίζεται καλά με τις χλωρώσεις που παρατηρήθηκαν στα φύλλα των φυτών (Εικ. 31, 32, 33, 34, 35, 36, 37, 38). Και το κάδμιο και ο χαλκός, ιδιαίτερα στις μεγάλες συγκεντρώσεις προκάλεσαν μεσονεύριες χλωρώσεις και κιτρίνισμα των φύλλων, συμπτώματα που ήταν εντονότερα στα φύλλα της βάσης και εξασθενούσαν προς την κορυφή και τα οποία δεν μπορούν να αποδοθούν αποκλειστικά στη φυσιολογική γήρανση. Στις μεγάλες συγκεντρώσεις των μετάλλων επίσης, η χλώρωση των φύλλων επεκτεινόταν υψηλότερα στο βλαστό σε σχέση με τις χαμηλές (Εικ. 31, 33 και 35, 37) και ήταν εμφανέστερη σε ένταση και έκταση στο έλασμα των φύλλων (Εικ. 32, 34 και 36, 38).



**Εικόνα 31.** Φυτά του είδους *Nicotiana glauca* στα οποία έγινε επέμβαση με 2 mM Cd ( $\text{CdSO}_4$ ) μετά το πέρας του πειράματος.



**Εικόνα 32.** Άποψη φύλλου από φυτά του είδους *Nicotiana glauca* στα οποία έγινε επέμβαση με 2 mM Cd ( $\text{CdSO}_4$ ).



**Εικόνα 33.** Φυτά του είδους *Nicotiana glauca* στα οποία έγινε επέμβαση με 10 mM Cd ( $\text{CdSO}_4$ ) μετά το πέρας του πειράματος.



**Εικόνα 34.** Άποψη φύλλου από φυτά του είδους *Nicotiana glauca* στα οποία έγινε επέμβαση με 10 mM Cd ( $\text{CdSO}_4$ ).



**Εικόνα 35.** Φυτά του είδους *Nicotiana glauca* στα οποία έγινε επέμβαση με 5 mM Cu (CuSO<sub>4</sub>) μετά το πέρας του πειράματος.



**Εικόνα 36.** Άποψη φύλλου από φυτά του είδους *Nicotiana glauca* στα οποία έγινε επέμβαση με 5 mM Cu (CuSO<sub>4</sub>).

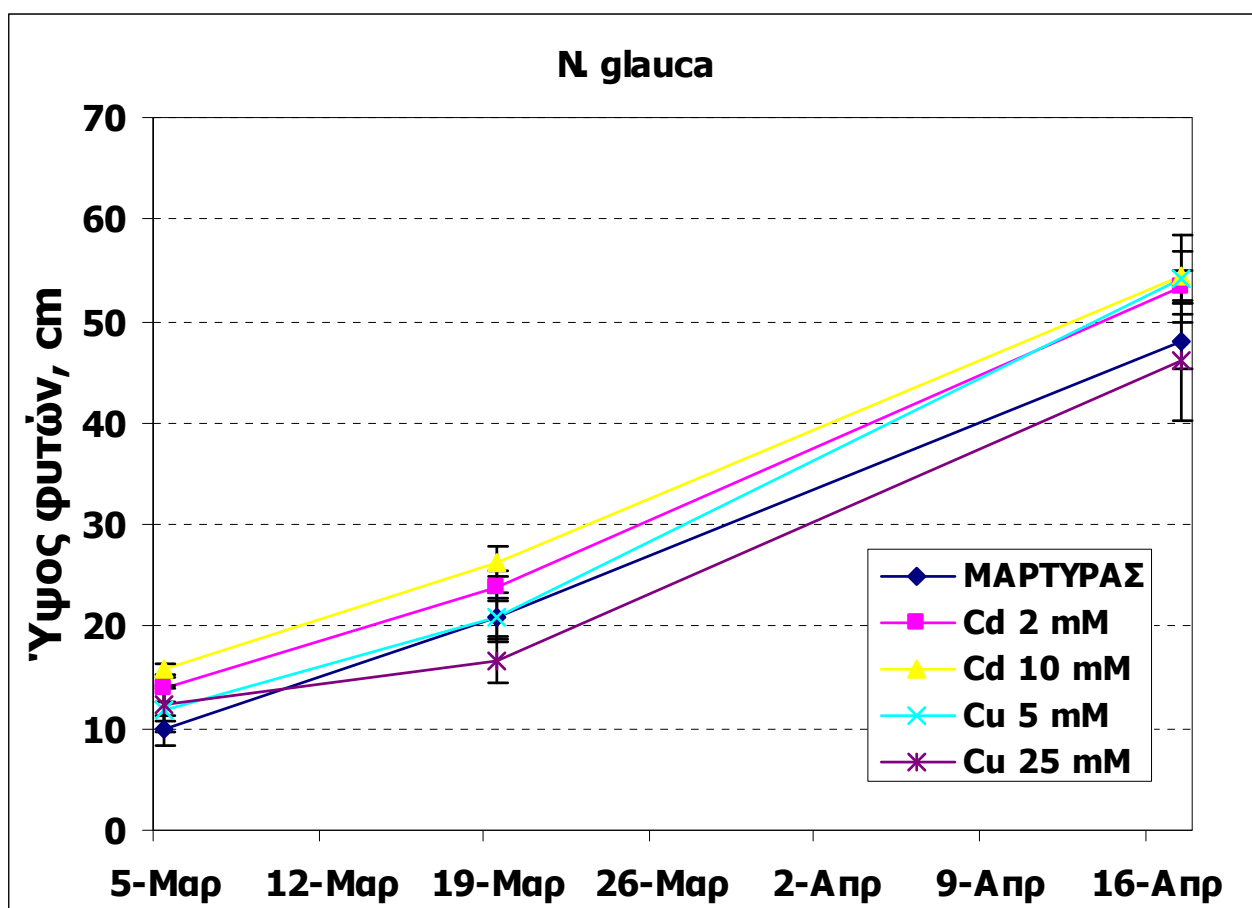


**Εικόνα 37.** Φυτά του είδους *Nicotiana glauca* στα οποία έγινε επέμβαση με 25 mM Cu ( $\text{CuSO}_4$ ) μετά το πέρας του πειράματος.

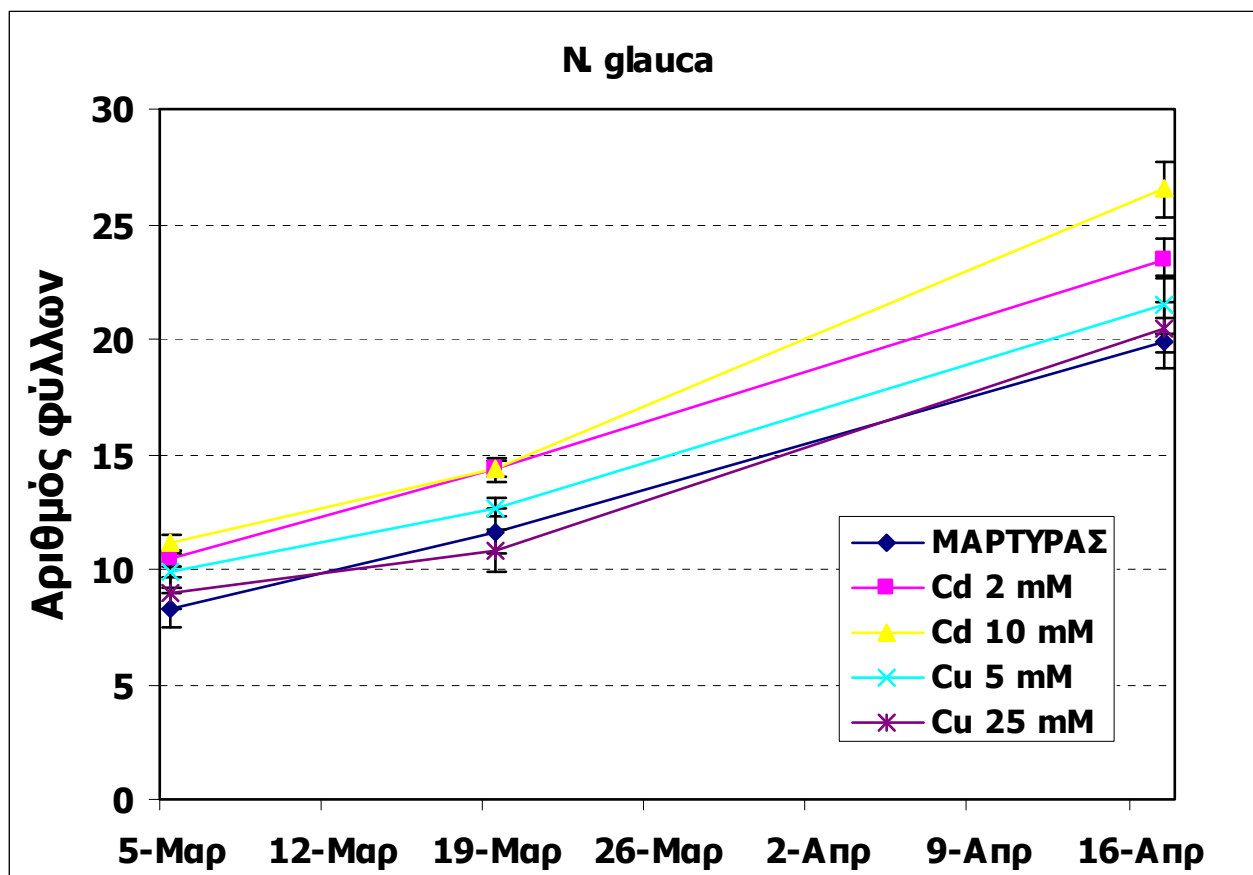


**Εικόνα 38.** Άποψη φύλλου από φυτά του είδους *Nicotiana glauca* στα οποία έγινε επέμβαση με 25 mM Cu ( $\text{CuSO}_4$ ).

Άλλα μακροσκοπικά χαρακτηριστικά της ανάπτυξης των φυτών παρουσίασαν μικρές διαφορές μεταξύ του μάρτυρα και των φυτών που δέχθηκαν τις επεμβάσεις με τις δύο συγκεντρώσεις των μετάλλων. Πιο συγκεκριμένα, η μεταβολή του ύψους των φυτών κατά τη διάρκεια του πειράματος παρουσίασε μάλλον αύξηση στις μεγάλες επεμβάσεις των μετάλλων, εκτός από τη μεγάλη συγκέντρωση του Cu, σε σχέση με τον μάρτυρα (Εικ. 39). Όσον αφορά τον αριθμό των φύλλων των φυτών, στις επεμβάσεις με χαλκό δεν επηρεάστηκε σχεδόν καθόλου, αλλά στις επεμβάσεις με το κάδμιο παρατηρήθηκε αύξηση, και μάλιστα αισθητή στη μεγάλη του συγκέντρωση (Εικ. 40).



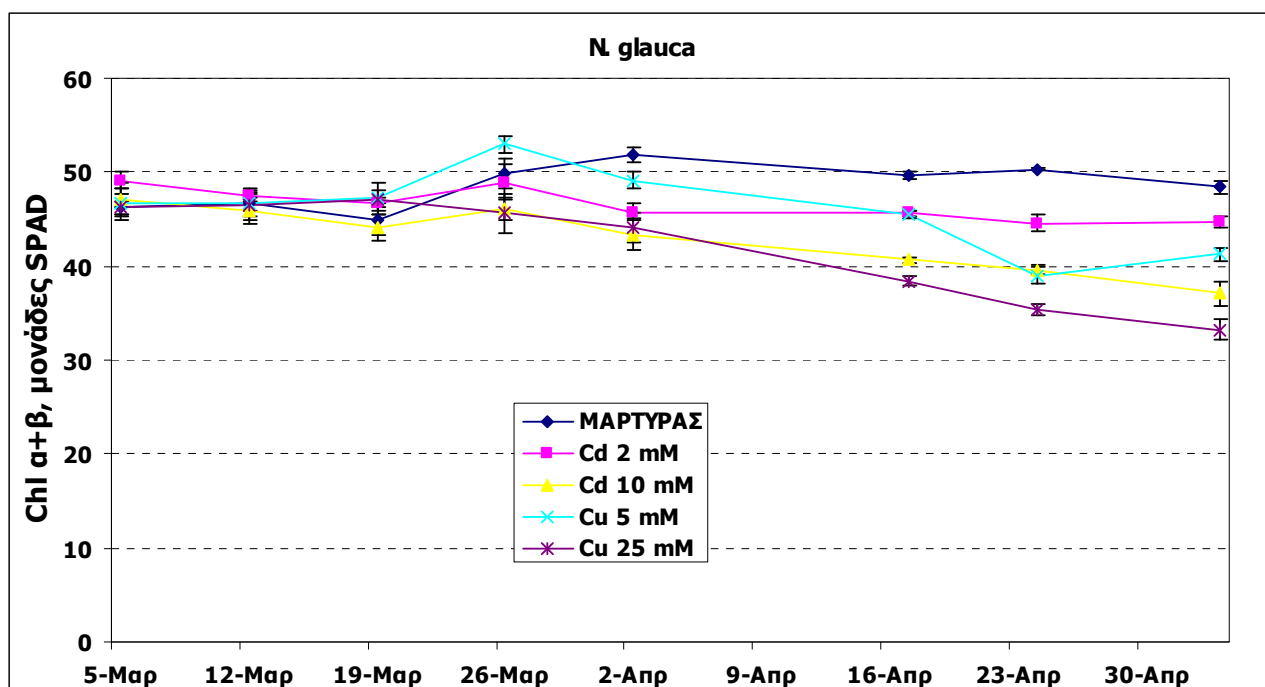
**Εικόνα 39.** Μεταβολή του ύψους των φυτών *Nicotiana glauca* ανά επέμβαση (μέσος όρος 6 φυτών).



**Εικόνα 40.** Μεταβολή του αριθμού φύλλων των φυτών *Nicotiana glauca* ανά επέμβαση (μέσος όρος 6 φυτών).

Εμφανής ήταν και σε αυτό το φυτικό είδος, όπως και στο *N. tabacum*, αλλά σε μικρότερο βαθμό, η επίδραση των μετάλλων στη μεταβολή των ολικών χλωροφυλλών των φύλλων κατά τη διάρκεια του πειράματος. Ενώ και πάλι τις δύο πρώτες εβδομάδες από την εφαρμογή των μετάλλων οι ολικές χλωροφύλλες (SPAD) των επεμβάσεων δεν διέφεραν μεταξύ τους αλλά ούτε με το μάρτυρα, από την τρίτη εβδομάδα δημιουργούνται και πάλι τρεις ευδιάκριτες ομάδες, αν και οι διαφορές μεταξύ τους δεν είναι τόσο πολύ έντονες όσο στο άλλο φυτικό είδος: αρχικά έχουμε τα φυτά του μάρτυρα, όπου μέχρι το τέλος του πειράματος έχουν σχεδόν σταθερή τιμή SPAD (50), δεύτερον τα φυτά των δύο χαμηλών συγκεντρώσεων των μετάλλων, με τιμές που παρουσίασαν μια εμφανή μείωση (γύρω στο 45) στο τέλος και τρίτον τα φυτά των υψηλών συγκεντρώσεων των δύο μετάλλων, ιδιαίτερα του χαλκού, τα οποία έφθιναν συνεχώς και τελικά στο τέλος του πειράματος έφθασαν σε

τιμές αρκετά χαμηλές (γύρω στα 35) σε σχέση με τα φυτά του μάρτυρα (Εικ. 41).

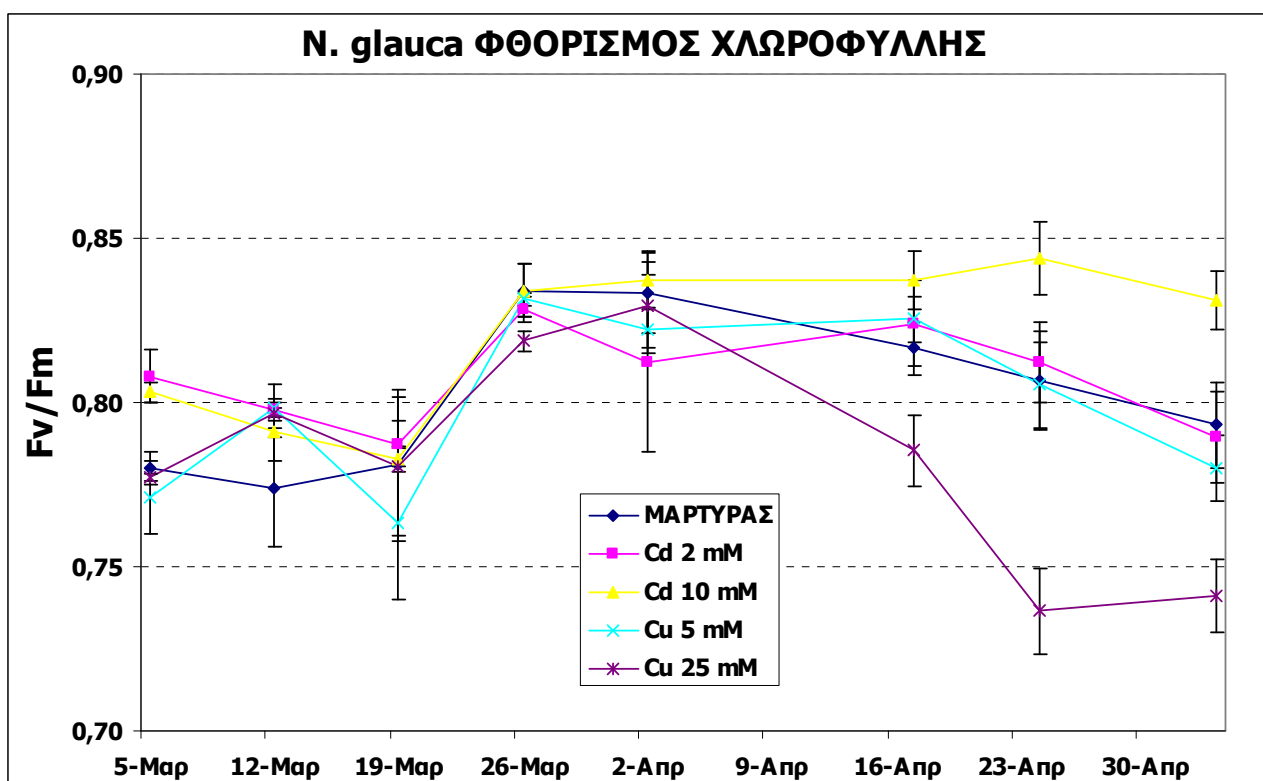


**Εικόνα 41.** Μεταβολή των ολικών χλωροφυλλών (αυθαίρετες μονάδες SPAD) των φυτών *Nicotiana glauca* ανά επέμβαση (μέσος όρος 6 φυτών).

Πολύ ενδιαφέροντα αποτελέσματα προέκυψαν και από τη μέτρηση του επαγωγικού φθορισμού της χλωροφύλλης των φύλλων των φυτών. Μετά το αρχικό σοκ που υπέστησαν τα φυτά κατά τη μεταφύτευση και εγκατάσταση τους στο θερμοκήπιο, την τρίτη εβδομάδα όλα τα φυτά είχαν τιμές  $F_v/F_m$  γύρω στο 0,83, που θεωρείται η βέλτιστη τιμή για όλα τα φυτικά είδη. Από το σημείο αυτό και μετά όμως, άρχισε μια διαφοροποίηση στις τιμές για τα φυτά των επεμβάσεων. Συγκεκριμένα, τα φυτά του μάρτυρα παρουσίασαν μια συνεχόμενη και σταθερή μείωση μέχρι το τέλος, γεγονός το οποίο οφείλεται στο φυσιολογικό γηρασμό των φύλλων. Την τάση αυτή του μάρτυρα ακολούθησαν σχεδόν με τον ίδιο ρυθμό και τα φυτά των δύο χαμηλών συγκεντρώσεων των μετάλλων (κάτω από 0,8), με μικρές διαφορές στις τελικές τιμές. Όμως, η έντονη διαφοροποίηση εμφανίζεται στις μεγάλες συγκεντρώσεις των μετάλλων, όπου όσον αφορά το χαλκό η συνεχόμενη μείωση ήταν σαφώς εντονότερη και η τελική τιμή αρκετά χαμηλότερη (0,75),



ενώ αντίθετα η υψηλή συγκέντρωση του καδμίου διατήρησε τον λόγο  $F_v/F_m$  σταθερό μέχρι το τέλος του πειράματος με τελική τιμή γύρω στη βέλτιστη, δηλαδή 0,83 (Εικ. 42).



**Εικόνα 42.** Μεταβολή φθορισμού της χλωροφύλλης των φυτών *Nicotiana glauca* ανά επέμβαση (μέσος όρος 6 φυτών).

#### Γ.1.4. Επίδραση του καδμίου (Cd) και του χαλκού (Cu) σε βιοχημικά χαρακτηριστικά του φυτικού είδους *Nicotiana glauca*

Από τα μεσαία φύλλα των φυτών που είχαν φυλαχθεί στους  $-80\text{ }^{\circ}\text{C}$  έγινε εκχύλιση ολικών πρωτεϊνών και τα πρωτεϊνικά εκχυλίσματα που προέκυψαν χρησιμοποιήθηκαν για το χαρακτηρισμό του ενζύμου GDH και της ωσμοτίνης των φυτών *N. glauca*.

Στα εκχυλίσματα έγινε ποσοτικός προσδιορισμός των πρωτεϊνών με τη μέθοδο Lowry, για να εκτιμηθεί η σχετική περιεκτικότητα των εκχυλισμάτων κάθε δείγματος σε πρωτεΐνες και στην συνέχεια ίση ποσότητα ολικών πρωτεϊνών από κάθε δείγμα μετουσιώθηκε και ηλεκτροφορήθηκε με SDS-

PAGE σε επίπεδα πηκτώματα 10% ακρυλαμίδης, με σκοπό την ανάλυση των επιμέρους πρωτεϊνικών ζωνών. Το πρωτεϊνικό πρότυπο κάθε δείγματος, προέκυψε μετά την χρώση του πηκτώματος με Coomassie Brilliant Blue R-250.

Για την μελέτη του ενζύμου της γλουταμικής αφυδρογονάσης (GDH) και της πρωτεΐνης της ωσμωτίνης, τα πρωτεϊνικά εκχυλίσματα που αναλύθηκαν με SDS-PAGE, υποβλήθηκαν σε Western Blot (με τη μέθοδο αυτή οι πρωτεΐνες μεταφέρονται από το πήκτωμα σε σταθερό υπόστρωμα, στην προκειμένη περίπτωση σε μεμβράνη νιτροκυτταρίνης, όπου στη συνέχεια μπορεί εύκολα να ανιχνευτεί μια συγκεκριμένη πρωτεΐνη, από το σύνολο των πρωτεϊνών που έχουν αναλυθεί) και ανιχνεύτηκαν ανοσολογικά. Η ανοσοανίχνευση έγινε με τη βοήθεια αντισωμάτων κουνελιού που αναγνωρίζουν το ένζυμο της GDH και της πρωτεΐνης της ωσμωτίνης του αμπελιού. Ακόμα προσδιορίστηκε η *in vitro* ενζυμική ενεργότητα της GDH στα πρωτεϊνικά εκχυλίσματα.

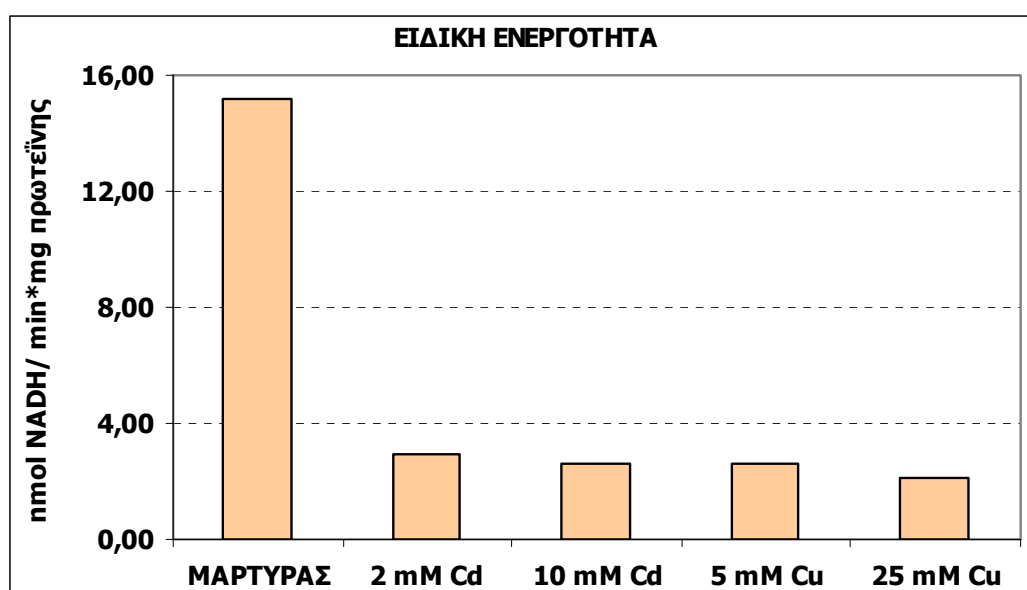
#### *Γ.1.4.α. Ολικές πρωτεΐνες και ενζυμική ενεργότητα της γλουταμικής αφυδρογονάσης (GDH) στις επεμβάσεις καδμίου (Cd) και χαλκού (Cu) σε φύλλα Nicotiana glauca*

Οι ολικές πρωτεΐνες προσδιορίστηκαν με τη μέθοδο Lowry. Η ενζυμική ενεργότητα της GDH υπολογίσθηκε μέσω της αμινωτικής αντίδρασης, μετρώντας την μεταβολή της απορρόφησης ( $\Delta OD$ ) στα 340 nm σε φασματοφωτόμετρο. Μέσω της  $\Delta OD$  υπολογίσθηκε η ειδική ενεργότητα, καθώς και η καταλυτική ενεργότητα στους ιστούς. Τα αποτελέσματα των επεμβάσεων παρουσιάζονται στον Πίνακα 5.

Όπως φαίνεται στην Εικόνα 43, η ειδική ενεργότητα της GDH στα φυτά του μάρτυρα ήταν ιδιαίτερα υψηλή, με τιμή γύρω στο 15 (σε nmol NADH/min\*mg πρωτεΐνης), ενώ για τα φυτά των επεμβάσεων με τα μέταλλα οι τιμές αυτές ήταν αρκετά χαμηλότερες, δηλαδή στο 2 με 3.

**Πίνακας 5.** Ολικές πρωτεΐνες και ενζυμική ενεργότητα της GDH, ανά επέμβαση με Κάδμιο (Cd) και Χαλκό (Cu) σε φυτά *Nicotiana glauca*

ΕΠΕΜΒΑΣΕΙΣ	ΟΛΙΚΗ ΠΡΩΤΕΪΝΗ (mg/mL)	ΕΝΕΡΓΟΤΗΤΑ GDH (ΔOD/min*50μL)	ΕΝΕΡΓΟΤΗΤΑ GDH (ΔOD/min*mL)	ΕΙΔΙΚΗ ΕΝΕΡΓΟΤΗΤΑ GDH (ΔOD/min*mg πρωτεΐνης)	ΕΙΔΙΚΗ ΕΝΕΡΓΟΤΗΤΑ GDH (nmol NADH/min*mg πρωτεΐνης)	ΚΑΤΑΛΥΤΙΚΗ ΕΝΕΡΓΟΤΗΤΑ (nmol NADH/min*g φυτ. ιστού)
ΜΑΡΤΥΡΑΣ	0,77	0,00365	0,073	0,095	15,17	46,72
2 mM Cd	1,53	0,00140	0,028	0,018	2,93	17,92
10 mM Cd	1,7	0,00140	0,028	0,016	2,64	17,92
5 mM Cu	0,93	0,00075	0,015	0,016	2,58	9,60
25 mM Cu	0,83	0,00055	0,011	0,013	2,12	7,04

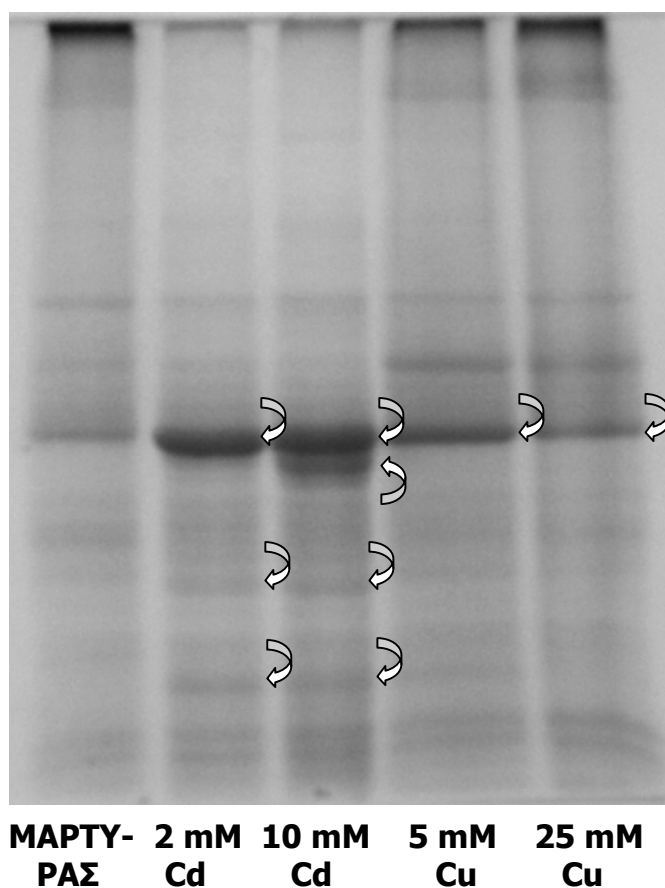


**Εικόνα 43.** Ειδική Ενεργότητα της GDH (nmol NADH/min\*mg πρωτεΐνης) σε φυτά *Nicotiana glauca*.

#### Γ.1.4.β. Επίδραση καδμίου (Cd) και χαλκού (Cu) στην έκφραση της GDH και της ωσμοτίνης σε φυτά *Nicotiana glauca*

Στην εικόνα 44 παρουσιάζονται τα πρωτεϊνικά πρότυπα που προέκυψαν μετά την ανάλυση με SDS-PAGE των ολικών πρωτεϊνικών εκχυλισμάτων. Όπως φαίνεται στην εικόνα αυτή διακρίνονται σημαντικές διαφορές τόσο στην παρουσία όσο και στην ένταση κάποιων πρωτεϊνικών ζωνών μεταξύ των δειγμάτων κάθε επέμβασης, με εντονότερες σε αυτές με τα εκχυλίσματα του καδμίου.

Σε όλα τα παρακάτω πρωτεϊνικά εκχυλίσματα έγινε ανοσοανίχνευση (με τη βοήθεια αντισωμάτων κουνελιού που αναγνωρίζουν την GDH και την ωσμοτίνη του αμπελιού) και μελέτη των δύο πρωτεϊνών (GDH και ωσμοτίνη) και τα αποτελέσματα παρουσιάζονται αναλυτικά για κάθε πρωτεΐνη στη συνέχεια.

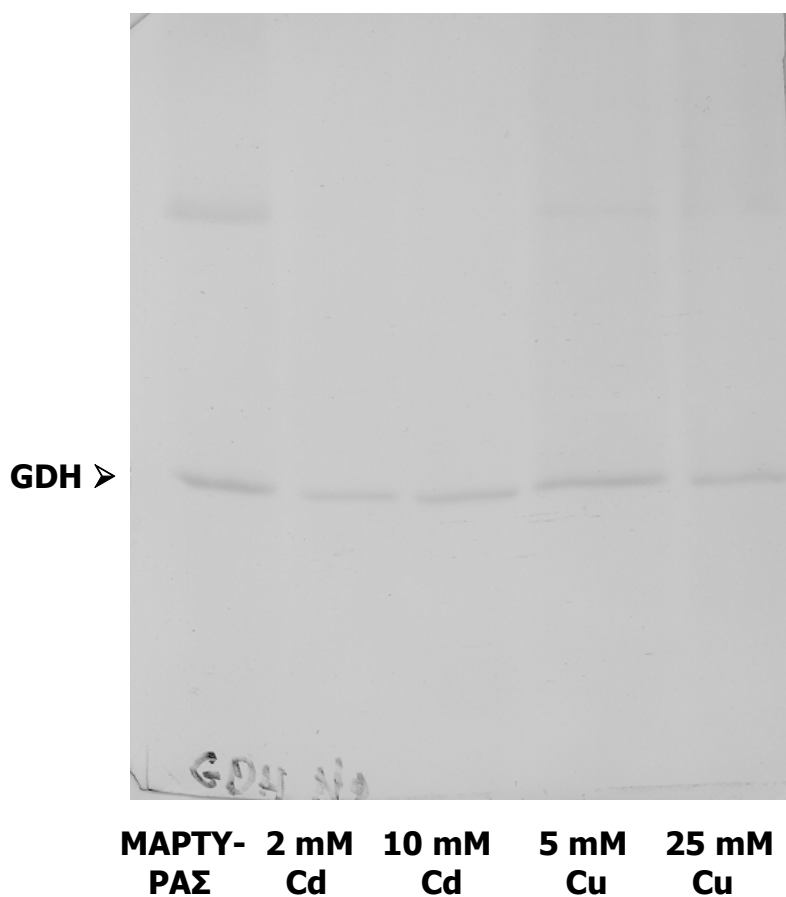


**Εικόνα 44.** Πρωτεϊνικά πρότυπα από φυτικούς ιστούς φυτών *Nicotiana glauca* που αναπτύχθηκαν στο θερμοκήπιο υπό την επίδραση διαφόρων συγκεντρώσεων καδμίου (Cd) και χαλκού (Cu). Τα πρότυπα προέκυψαν μετά από ανάλυση με SDS-PAGE και χρώση του πηκτώματος με Coomassie Brilliant Blue R-250.

#### *Γλουταμική αφυδρογονάση (GDH)*

Η ανοσοανίχνευση της GDH του άγριου καπνού με το αντίσωμα της GDH του αμπελιού εμφάνισε μια πρωτεϊνική ζώνη σε ύψος που αντιστοιχεί σε M.B. 40 KDa περίπου. Στην Εικόνα 45 παρουσιάζεται η μεμβράνη

νιτροκυτταρίνης μετά την ανοσοανίχνευση της GDH. Οι επεμβάσεις των δύο μετάλλων προκάλεσαν μείωση της έντασης της ανοσοανιχνευόμενης ζώνης της GDH, και μάλιστα η μείωση αυτή είναι μεγαλύτερη για το Cd και λιγότερο για τον Cu.



**Εικόνα 45.** Πρωτεϊνικές ζώνες της GDH από φυτικούς ιστούς φυτών *Nicotiana glauca* που αναπτύχθηκαν στο θερμοκήπιο υπό την επίδραση διαφόρων συγκεντρώσεων καδμίου (Cd) και χαλκού (Cu). Οι ολικές πρωτεΐνες αναλύθηκαν με SDS-PAGE και μεταφέρθηκαν σε μεμβράνη νιτροκυτταρίνης με τη μέθοδο Western Blot. Στη μεμβράνη έγινε ανίχνευση της GDH με τη χρήση του ανάλογου αντισώματος.

### *Ωσμωτίνη*

Η ανοσοανίχνευση της ωσμωτίνης του άγριου καπνού με το αντίσωμα της ωσμωτίνης του αμπελιού εμφάνισε μία πρωτεϊνική ζώνη σε ύψος που αντιστοιχεί σε M.B. 20 KDa περίπου. Όπως φαίνεται και στην εικόνα 46, τόσο

το Cd όσο και ο Cu προκάλεσαν μεγάλη αύξηση στην ένταση της ανοσοανιχνευόμενης ζώνης της ωσμωνίνης τόσο στη μικρή όσο και στη μεγάλη συγκέντρωση.



**Εικόνα 46.** Πρωτεϊνικές ζώνες της ωσμωνίνης από πρωτεϊνικά εκχυλίσματα *Nicotiana glauca*. Οι ολικές πρωτεΐνες αναλύθηκαν με SDS-PAGE και μεταφέρθηκαν σε μεμβράνη νιτροκυτταρίνης με τη μέθοδο Western Blot. Στη μεμβράνη έγινε ανίχνευση της ωσμωνίνης με τη χρήση του ανάλογου αντισώματος.

## Γ.2. *In vitro* Καλλιέργεια

Για την εκπόνηση της εργασίας, εκτός από τα φυτά που αναπτύχθηκαν στο θερμοκήπιο, χρησιμοποιήθηκαν και σπορόφυτα και των δύο φυτικών ειδών (*Nicotiana tabacum* και *Nicotiana glauca*) τα οποία αναπτύχθηκαν *in vitro* σε θρεπτικό υπόστρωμα Murashige and Skoog (MS).

Μέσα στο θρεπτικό υπόστρωμα προστέθηκαν, μαζί με όλα τα υπόλοιπα απαραίτητα στοιχεία, βαρέα μέταλλα (κάδμιο και χαλκός) έτσι ώστε να έχουμε τις επιθυμητές τελικές συγκεντρώσεις, οι οποίες ήταν:

- |      |              |            |
|------|--------------|------------|
| i.   | M (Μάρτυρας) | 24 σωλήνες |
| ii.  | 0,05 mM Cd   | 24 σωλήνες |
| iii. | 0,25 mM Cd   | 24 σωλήνες |
| iv.  | 0,5 mM Cu    | 24 σωλήνες |
| v.   | 2,5 mM Cu    | 24 σωλήνες |

Και για τα δύο φυτικά είδη, στους σωλήνες του μάρτυρα οι σπόροι φύτρωσαν και αναπτύχθηκαν κανονικά, και τα σπορόφυτα που προέκυψαν είχαν σκούρο πράσινο χρώμα και ύψος το οποίο έφτανε το ύψος του σωλήνα μετά από 1,5 μήνα (Εικ. 47, 49). Στους σωλήνες της επέμβασης με 0,05 mM Cd, οι σπόροι και των δύο ειδών να μην φύτρωσαν, αλλά τα σπορόφυτα είχαν μειωμένη ανάπτυξη και αρκετά μικρότερο ύψος. Επίσης όλα τα φυτά της συγκεκριμένης επέμβασης ήταν χλωρωτικά ενώ παρουσίασαν και το φαινόμενο της βραχυγονάτωσης (Εικ. 48, 50).

Το πείραμα επαναλήφθηκε και δεύτερη φορά και αποδείχτηκε ότι η παρουσία των μετάλλων στις υπόλοιπες τρεις επεμβάσεις (0,25 mM Cd, 0,5 και 2,5 mM Cu) αποτέλεσε ανασταλτικό παράγοντα για την φύτευση των σπόρων.

Παρακάτω παρουσιάζονται εικόνες με τα φυτά των δύο πρώτων επεμβάσεων μετά από διάστημα δύο μηνών από την εγκατάστασή τους, μέσα και εκτός των δοκιμαστικών σωλήνων με το θρεπτικό υπόστρωμα Murashige and Skoog (MS) στο οποίο αναπτύχθηκαν.



**Εικόνα 47.** Φυτά μάρτυρες *Nicotiana tabacum* εντός (πάνω) και εκτός του σωλήνα (κάτω).





**Εικόνα 48.** Φυτά *Nicotiana tabacum* με επέμβαση 0,05 mM Cd εντός (πάνω) και εκτός του σωλήνα (κάτω).



**Εικόνα 49.** Φυτά μάρτυρες *Nicotiana glauca* εντός (πάνω) και εκτός του σωλήνα (κάτω).



**Εικόνα 50.** Φυτά *Nicotiana glauca* με επέμβαση 0,05 mM Cd εντός (πάνω) και εκτός του σωλήνα (κάτω).

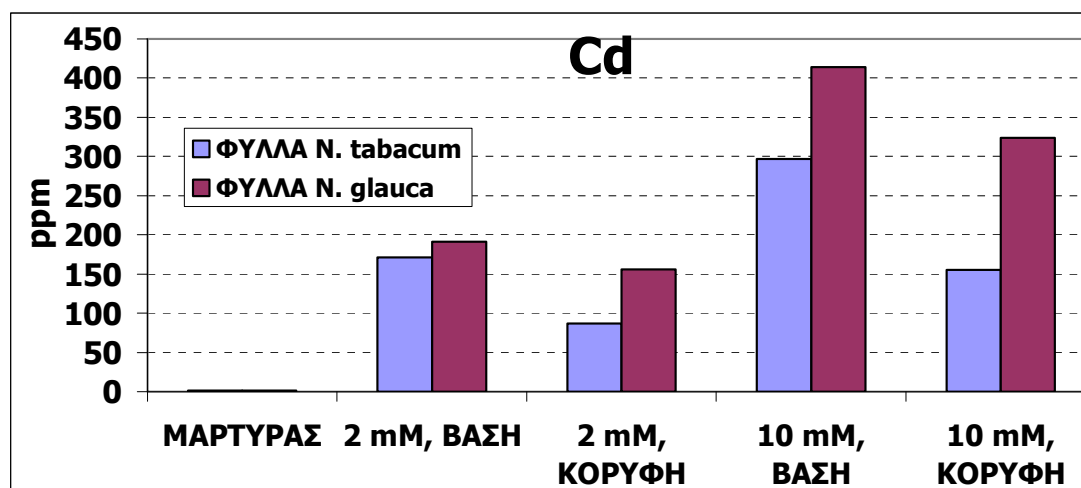
## Δ. ΣΥΖΗΤΗΣΗ

Η εργασία αυτή έγινε με σκοπό τη μελέτη της επίδρασης των βαρέων μετάλλων καδμίου και χαλκού, σε δύο διαφορετικές συγκεντρώσεις στο νερό άρδευσης, σε μορφολογικές και βιοχημικές παραμέτρους της ανάπτυξης φυτών καλλιεργούμενου (*N. tabacum*) και άγριου (*N. glauca*) καπνού εγκατεστημένων σε γλάστρες στο θερμοκήπιο. Επιλέχθηκαν για τη μελέτη ένα καλλιεργούμενο φυτό και ένα συγγενικό του (του ίδιου γένους) αυτοφυές, με δυναμικό υπερσυσσώρευσης βαρέων μετάλλων, για να συγκριθούν οι αποκρίσεις τους στα δύο παραπάνω μέταλλα.

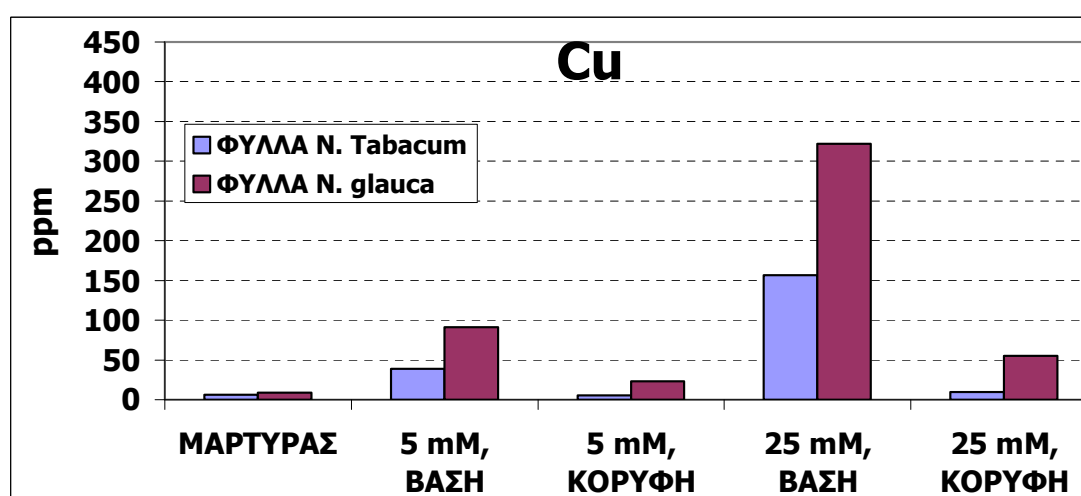
Και τα δύο μέταλλα προσλήφθηκαν από τα δύο φυτικά είδη σε όλες τις συγκεντρώσεις που χρησιμοποιήθηκαν. Το Cd, παρόλο που χρησιμοποιήθηκε σε μικρότερες συγκεντρώσεις (2 και 10 mM) από ότι ο Cu (5 και 25 mM), ανιχνεύθηκε σε μεγαλύτερες συγκεντρώσεις στους ιστούς των δύο φυτικών ειδών. Επίσης, ο Cu στη μικρή συγκέντρωση προσλήφθηκε σε πολύ μικρή ποσότητα από τα φυτά συγκριτικά με τη μεγάλη (Εικ. 52). Τα παραπάνω αιτιολογούνται από την ισχυρότερη δέσμευση του Cu στα ορυκτά της αργίλου και την οργανική ύλη του εδάφους από τα άλλα κατιόντα και συνεπώς τη μη άμεση διαθεσιμότητα του για τα φυτά (Gharbi et al., 2005). Επομένως, μεγαλύτερες συγκεντρώσεις Cu είναι απαραίτητες για να κορεστούν τα κολλοειδή του εδάφους και να γίνει διαθέσιμο το μέταλλο για τα φυτά.

Και τα δύο μέταλλα ανιχνεύθηκαν σε υψηλότερα επίπεδα στα φύλλα του άγριου από ότι του καλλιεργούμενου καπνού (Εικ. 51 και 52). Πιο συγκεκριμένα για το Cd, στην επέμβαση των 2 mM ενώ τα δύο φυτικά είδη είχαν μικρή διαφορά στα ενδογενή επίπεδά του στα φύλλα της βάσης, στα φύλλα της κορυφής τα επίπεδά του εμφανίζονται διπλάσια στον άγριο καπνό, και στην επέμβαση των 10 mM στα φύλλα της βάσης ο άγριος καπνός παρουσιάζει 40 % υψηλότερα επίπεδα από τον καλλιεργούμενο, ποσοστό που φτάνει το 100 % για τα φύλλα της κορυφής (Εικ. 51). Η κατάσταση είναι διαφορετική για τον Cu, μέταλλο δύσκολα διακινούμενο στα φυτά. Ο άγριος καπνός συσσωρεύσε διπλάσιες έως πενταπλάσιες ποσότητες Cu στα φύλλα του συγκριτικά με τον καλλιεργούμενο και τα φύλλα της βάσης είχαν

συστηματικά υψηλότερα επίπεδα από εκείνα της κορυφής και στα δύο είδη (Εικ. 52). Ο άγριος καπνός έχει χρησιμοποιηθεί σε πειράματα φυτοεξυγίανσης ως υπερσυσσωρευτής εξαιτίας της γρήγορης ανάπτυξής του, της μεγάλης βιομάζας του και της προσαρμοστικότητας του στις περιβαλλοντικές συνθήκες (Barazani et al., 2004).



**Εικόνα 51.** Ενδογενείς συγκεντρώσεις του καδμίου στο ξηρό βάρος φύλλων (βάσης και κορυφής) των φυτών *N. tabacum* και *N. glauca*.



**Εικόνα 52.** Ενδογενείς συγκεντρώσεις του χαλκού στο ξηρό βάρος φύλλων (βάσης και κορυφής) των φυτών *N. tabacum* και *N. glauca*.

Στον καλλιεργούμενο καπνό οι μεγάλες συγκεντρώσεις των δύο μετάλλων αύξησαν το ύψος των φυτών χωρίς να επηρεάσουν τον αριθμό των φύλλων (Εικ. 21, 22) πράγμα που σημαίνει μεγαλύτερα μεσογονάτια (φαίνονται και στις Εικόνες 15 και 19). Αντίθετα, στη βιβλιογραφία αναφέρεται ότι ο χαλκός προκαλεί μείωση στο ύψος των φυτών (Ραπου-Filothou et al., 2001 και οι αναφορές εκεί). Φαίνεται ότι οι πολύ υψηλότερες συγκεντρώσεις

Cu που χρησιμοποιήθηκαν εδώ (20x) προκαλούν αυτό το αντίθετο αποτέλεσμα, υπόθεση που ενισχύεται και από το γεγονός ότι στη μικρή συγκέντρωση Cu δεν παρατηρήθηκε σημαντική επίδραση στο ύψος των φυτών.

Η ένταση και η έκταση των χλωρώσεων που παρατηρήθηκαν μακροσκοπικά στα φύλλα των δύο ειδών, συσχετίζονται πολύ καλά με τις τιμές των ολικών χλωροφυλλών που προσδιορίστηκαν και με τις συγκεντρώσεις των μετάλλων. Η αναστολή των ενζύμων βιοσύνθεσης των χλωροφυλλών και οι χλωρώσεις που έχει σαν αποτέλεσμα, αποτελούν τυπικές επενέργειες Cd και Cu (Haag-Kerwer et al., 1999, Panou-Filothou et al., 2001, Gharbi et al., 2005).

Από την άλλη, στον άγριο καπνό, ο επαγωγικός φθορισμός των χλωροφυλλών (ο λόγος  $F_v/F_m$ , δείκτης της φωτοχημικής απόδοσης της φωτοσύνθεσης) δεν επηρεάστηκε από τις χαμηλές συγκεντρώσεις Cd και Cu (2 και 5 mM αντίστοιχα) και μόνο η υψηλή συγκέντρωση του Cu μείωσε το λόγο σε σχέση με τον μάρτυρα, υποδεικνύοντας καταπόνηση του φωτοσυνθετικού μηχανισμού, ενώ η υψηλή συγκέντρωση του Cd έδρασε αντίθετα και διατήρησε το λόγο στο βέλτιστο (0,83), προστατεύοντας τον φωτοσυνθετικό μηχανισμό από την φυσιολογική γήρανση των φύλλων (Εικ. 42). Παρόλο που έχει αναφερθεί ανασταλτική δράση των βαρέων μετάλλων στο Φωτοσύστημα II, υπάρχει τουλάχιστον μία δημοσίευση που αναφέρει διάφορες επιδράσεις του Cd στο *Brassica juncea* αλλά όχι και στην φωτοσύνθεση (Haag-Kerwer et al., 1999).

Τα δύο μέταλλα προκάλεσαν σημαντικές αλλαγές γενικότερα στη γονιδιακή έκφραση των δύο φυτικών ειδών, αλλαγές οι οποίες ανιχνεύθηκαν από τη διαφοροποίηση του προτύπου των ολικών πρωτεϊνών, μετά από μίας διάστασης αποδιατακτική ηλεκτροφόρηση (Εικ. 25, 44). Αλλαγές, από το Cd και τον Cu, στην έκφραση συγκεκριμένων γονιδίων, οι οποίες ανιχνεύονται έμμεσα είτε από τα επίπεδα της ανοσοανιχνευόμενης πρωτεΐνης που κωδικοποιούν ή από την *in vitro* ενεργότητα του αντίστοιχου ενζύμου, έχουν ήδη αναφερθεί. Πιο συγκεκριμένα, επαγωγή των μεταλλοθειονινών και του ενζύμου της συνθάσης των φυτοχηλατινών προκαλούν όλα τα βαρέα μέταλλα

σε όλα τα φυτικά είδη (Cobbett, 2000 και οι αναφορές εκεί), όπως επίσης ο Cu επάγει τα αντιοξειδωτικά ένζυμα (Chen et al., 2000, Panou-Filothou et al., 2001) ενώ πολλά ένζυμα στο μεταβολισμό του αζώτου επάγονται ή καταστέλλονται από βαρέα μέταλλα (Chugh et al., 1992, Ju et al., 1997, Llorens et al., 2000, Gouia et al., 2000, 2003).

Στην παρούσα μελέτη το Cd αύξησε την ενεργότητα και την ανοσοανιχνευόμενη πρωτεΐνη της γλουταμικής αφυδρογονάσης στον καλλιεργούμενο καπνό ενώ τη μείωσε στον άγριο (Εικ. 24, 43 και 26, 45). Αυτή η διαφορετική αντίδραση των δύο φυτικών ειδών στο μέταλλο έχει παρατηρηθεί και με τον Zn και τον Pb σε φυτά πιπεριάς (αύξηση) και αγγουριάς (μείωση, Μαρουλάκη, 2003). Αλλά, ακόμα και το ίδιο το Cd μείωσε την ενεργότητα και την ανοσοανιχνευόμενη πρωτεΐνη της GDH σε σπορόφυτα καλαμποκιού (Ju et al., 1997) ενώ την αύξησε σε σπορόφυτα μπιζελιάς και φασολιάς (Chugh et al., 1992 και Gouia et al., 2000 και 2003, αντίστοιχα). Ο Cu προκάλεσε μείωση της ενεργότητας και της ανοσοανιχνευόμενης πρωτεΐνης της GDH, τόσο στον καλλιεργούμενο όσο και στον άγριο καπνό (Εικ. 24, 43 και 26, 45).

Η ανοσοανίχνευση της πρωτεΐνης της ωσμωτίνης στα φυτά του καλλιεργούμενου και άγριου καπνού έδωσε δύο ζώνες γύρω στα 20-25 kDa: η με μεγαλύτερο MB ζώνη αντιστοιχεί στην προ-πρωτεΐνη της ωσμωτίνης (αυτή με το πεπτιδίο σήμα, το υπεύθυνο για την είσοδο και τη διαμερισματοποίησή της στο χυμοτόπιο και η με μικρότερο MB ζώνη αντιστοιχεί στην ώριμη πρωτεΐνη της ωσμωτίνης (αυτή μετά την αποκοπή του πεπτιδίου σήματος). Στον καλλιεργούμενο καπνό μόνο το Cd προκάλεσε επαγωγή στην ανοσοανιχνευόμενη ζώνη που αντιστοιχεί και στις δύο μορφές της ωσμωτίνης αντίθετα με τον άγριο καπνό όπου τόσο το Cd όσο και ο Cu προκάλεσαν επαγωγή, επιβεβαιώνοντας την καταπόνηση (stress) από τα δύο μέταλλα. Το παραπάνω αιτιολογείται από τη δυσκολία διακίνησης του χαλκού μέσα στα φυτά και περισσότερο στον καλλιεργούμενο συγκριτικά με τον άγριο καπνό, γεγονός που έχει σαν αποτέλεσμα τη πολύ μικρή ενδογενή συγκέντρωση του Cu και ιδιαίτερα στα ανώτερα φύλλα των φυτών (Εικ. 52). Τέλος, παρά τις υποπολλαπλάσιες συγκεντρώσεις Cd και Cu (0,05, 0,25 mM και 0,5, 2,5 mM

αντίστοιχα – 40 και 10 φορές μικρότερες από εκείνες στο νερό άρδευσης των φυτών στο θερμοκήπιο) που χρησιμοποιήθηκαν στα υποστρώματα της ιστοκαλλιέργειας, μόνο στη μικρή συγκέντρωση Cd βλάστησαν οι σπόροι και των δύο φυτικών ειδών για να δώσουν χλωρωτικά και με ελάχιστη ανάπτυξη φυτά ενώ η υψηλή συγκέντρωση του Cd και οι δύο του Cu αποδείχθηκαν ολοκληρωτικά παρεμποδιστικές για τη βλάστηση των σπόρων.

Συμπερασματικά, Cd και Cu προκάλεσαν σημαντικές αλλαγές σε όλες τις παραμέτρους ανάπτυξης που μελετήθηκαν των δύο φυτικών ειδών και οι οποίες συσχετίζονται με την απορρόφηση και συσσώρευση των μετάλλων στους φυτικούς ιστούς. Ο άγριος καπνός, παρόλο που συσσώρευσε μεγαλύτερες συγκεντρώσεις των μετάλλων συγκριτικά με τον καλλιεργούμενο επηρεάστηκε λιγότερο, γεγονός που αποδίδεται από την βιβλιογραφία στην ύπαρξη μηχανισμού αποτοξίνωσης των μετάλλων ο οποίος συνδέεται με την αυξημένη σύνθεση χηλικών των μετάλλων ενώσεων (μεταλλοθειονίνες και φυτοχηλατίνες – πεπτιδία πλούσια σε κυστεΐνη και γλουταμικό, Cobbett, 2000). Έτσι ίσως εξηγείται και η επαγωγή της πρωτεΐνης και της ενεργότητας της GDH τουλάχιστον στον καλλιεργούμενο καπνό, προκειμένου να αναπληρώσει τα αποθέματα του γλουταμικού που χρησιμοποιείται για την σύνθεση των προαναφερθέντων πεπτιδίων.



## E. ΒΙΒΛΙΟΓΡΑΦΙΑ

- Barazani, O., Sathiyamoorthy, P., Manandhar, U., Vulkan, R., Golan-Goldhirsh, A., 2004. Heavy metal accumulation by *Nicotiana glauca* Graham in a solid waste disposal site. *Chemosphere*, 54: 867–872
- Boominathan, R., Doran, P.M., 2003. Cadmium tolerance and antioxidative defenses in hairy roots of the cadmium hyperaccumulator, *Thlaspi caerulescens*. *Biotechnol. Bioeng.*, 20;83(2): 158-167.
- Boussama, N., Ouariti, O., Suzuki, A., Ghorbal, M.H., 1999. Cd-stress on nitrogen assimilation. *J. Plant Physiol.*, 155: 310-317.
- Chen, L.M., Lin, C.C., Kao, C.H., 2000. Copper toxicity in rice seedlings: Changes in antioxidative enzyme activities H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> level, and cell wall peroxidase activity in roots. *Botanical Bulletin of Academia Sinica*, Vol. 41: 99-103.
- Chugh, L.K., Gupta, V.K., Sawhney, S.K., 1992. Effect of cadmium on enzymes of nitrogen metabolism in pea seedlings. *Phytochemistry*, 31: 395-400.
- Cobbett, C.S., 2000. Phytochelatins and Their Roles in Heavy Metal Detoxification. *Plant Physiology*, Vol. 123: 825-832.
- Cunningham, S.D., Anderson, T.A., Schwab, A.P., Hsu, F.C., 1996. Phytoremediation of soils contaminated with organic pollutants. *Advances in Agronomy*, 56: 55-114.
- Gharbi, F., Rejeb, S., Ghorbal, M.H., Morel, J.L., 2005. Plants Response to Copper Toxicity as Affected by Plant Species and Soil Type. *Journal of Plant Nutrition*, 28: 379-392.
- Gouia, H., Ghorbal, M.H., Meyer, C., 2000. Effects of cadmium on activity of nitrate reductase and on other enzymes of the nitrate assimilation pathway in bean. *Plant Physiol. Biochem.*, 38: 629-638.
- Gouia, H., Suzuki, A., Brulfert, J., Ghorbal, M.H., 2003. Effects of cadmium on nitrogen and carbon metabolism in bean seedlings. *Journal of Plant Physiology*, 160: 367-376.

- Haag-Kerwer, A., Schafer, H.J., Heiss, S., Walter, C., Rausch, T., 1999. Cadmium exposure in *Brassica juncea* causes a decline in transpiration rate and leaf expansion without effect on photosynthesis. *Journal of Experimental Botany*, Vol. 50, No. 341, pp: 1827-1835.
- Hernandez, L.E., Garate, A., Carpena-Ruiz, R., 1997. Effects of cadmium on the uptake, distribution and assimilation of nitrate in *Pisum sativum*. *Plant and Soil*, 189: 97-106.
- Ju, G.C., Li, X.Z., Rauser, W.E., Oaks, A., 1997. Influence of cadmium on the production of  $\gamma$ -glutamylcysteine peptides and enzymes of nitrogen assimilation in *Zea mays* seedlings. *Physiologia Plantarum*, 101: 793-799.
- Kneer, R., Zenk, M.H., 1992. Phytochelatins protect plant enzymes from heavy metal poisoning. *Phytochemistry*, Vol. 31, No 8: 2663-2667.
- Krause, G.H., Weis, E., 1991. Chlorophyll fluorescence and photosynthesis: The Basics. *Annu. Rev. Plant. Physiol. Plant Mol. Biolo.*, 42: 313-349.
- Llorens, N., Arola, L., Blade, C., Mas, A., 2000. Effects of copper exposure upon nitrogen metabolism in tissue cultured *Vitis vinifera*. *Plant Science*, 160: 159-163.
- Λουλακάκης, Κ.Α., 2004. Βιοτεχνολογία Φυτών Ασκήσεις Εργαστηρίου. Τ.Ε.Ι. Κρήτης, Σ.Τ.Ε.Γ.. Ηράκλειο. 98 σελ..
- Loulakakis, K.A., Roubelakis-Angelakis, K.A., 1991. Plant NAD(H)-glutamate dehydrogenase consists of two subunit polypeptides and their participation in the seven isoenzymes occurs in an ordered ratio. *Plant Physiol.*, 97: 104-111.
- Loulakakis, K.A., Roubelakis-Angelakis, K.A., 1992. Ammonium-induced increase in NAD(H)-glutamate dehydrogenase activity is caused by *de novo* synthesis of the  $\alpha$ -subunit. *Planta*, 187:322-327.
- Mahboobi, H., Yucel, M., Oktem, H.A., 2002. Nitrate reductase and glutamate dehydrogenase activities of resistant and sensitive cultivars of wheat and Boron toxicity. *Journal of plant nutrition*, 25(8): 1829-1837.

- Μαρουλάκη, Μ. Ι., 2003. Επίδραση βαρέων μετάλλων (ψευδαργύρου και μολύβδου) στα ένζυμα αφομοίωσης αζώτου των φυτικών ειδών αγγουριάς (*Cucumis sativus*) και πιπεριάς (*Capsicum annuum*). Πτυχιακή εργασία, ΤΕΙ Κρήτης, Ηράκλειο.
- Panou-Filotheou, H., Bosabalidis, A.M., Karataglis, S., 2001. Effects of Copper Toxicity on Leaves of Oregano (*Origanum vulgare subsp. hirtum*). *Annals of Botany*, 88: 207-214.
- Ρουμπελάκη-Αγγελάκη, Α.Κ., 2003. Φυσιολογία Φυτών. Πανεπιστημιακές Εκδόσεις Κρήτης, Ηράκλειο. 708 σελ..
- Sharma, S.S., Dietz, K.J., 2006. The significance of amino acids and amino acid-derived molecules in plant responses and adaptation to heavy metal stress. *Journal of Experimental Botany*, Vol. 57, No. 4 pp: 711-726.
- Syntichaki, K.M., Loulakakis, K.A., Roubelakis-Angelakis, K.A., 1996. The amino-acid sequence similarity of plant glutamate dehydrogenase to the extremophilic archaeal enzyme conforms to its stress-related function. *Gene.*, 168(1): 87-92.