

ΠΑΝΕΠΙΣΤΗΜΙΟ ΙΩΑΝΝΙΝΩΝ

ΤΜΗΜΑ ΧΗΜΕΙΑΣ

ΔΙΑΤΜΗΜΑΤΙΚΟ ΠΡΟΓΡΑΜΜΑ

ΜΕΤΑΠΤΥΧΙΑΚΩΝ ΣΠΟΥΔΩΝ

«ΑΓΡΟΧΗΜΕΙΑ ΚΑΙ ΒΙΟΛΟΓΙΚΕΣ ΚΑΛΛΙΕΡΓΕΙΕΣ»

**Επίδραση του glyphosate στην ανάπτυξη και
φωτοσύνθεση μικρομοσχευμάτων ελιάς
(*Olea europae*)**

ΜΕΤΑΠΤΥΧΙΑΚΗ ΔΙΠΛΩΜΑΤΙΚΗ ΕΡΓΑΣΙΑ

ΚΟΥΡΤΕΣΗ ΟΛΓΑ

ΕΙΣΗΓΗΤΗΣ: ΡΟΥΜΠΟΣ ΑΘΑΝΑΣΙΟΣ

ΙΩΑΝΝΙΝΑ 2008



ΠΑΝΕΠΙΣΤΗΜΙΟ ΙΩΑΝΝΙΝΩΝ
ΤΜΗΜΑ ΧΗΜΕΙΑΣ

ΔΙΑΤΜΗΜΑΤΙΚΟ ΠΡΟΓΡΑΜΜΑ
ΜΕΤΑΠΤΥΧΙΑΚΩΝ ΣΠΟΥΔΩΝ
«ΑΓΡΟΧΗΜΕΙΑ ΚΑΙ ΒΙΟΛΟΓΙΚΕΣ ΚΑΛΛΙΕΡΓΕΙΕΣ»

**Επίδραση του glyphosate στην ανάπτυξη και
φωτοσύνθεση μικρομοσχευμάτων ελιάς
(*Olea europaea*)**

ΜΕΤΑΠΤΥΧΙΑΚΗ ΔΙΠΛΩΜΑΤΙΚΗ ΕΡΓΑΣΙΑ
ΚΟΥΡΤΕΣΗ ΟΛΓΑ

Που υποβλήθηκε στο Διατμηματικό Πρόγραμμα Μεταπτυχιακών Σπουδών
«Αγροχημεία και Βιολογικές Καλλιέργειες»
ως μέρος των απαιτήσεων για την απόκτηση Διπλωματικής Ειδίκευσης

ΕΙΣΗΓΗΤΗΣ: ΡΟΥΜΠΙΟΣ ΑΘΑΝΑΣΙΟΣ

ΙΩΑΝΝΙΝΑ 2008



ΕΥΧΑΡΙΣΤΙΕΣ

Αρχικά ευχαριστώ τον κ. Τριαντάφυλλο Αλμπάνη, υπεύθυνο του μεταπτυχιακού προγράμματος 'Αγροχημεία και Βιολογικές Καλλιέργειες', για την συγκατάθεση του να πραγματοποιηθεί το πειραματικό μέρος των μεταπτυχιακών μου σπουδών στην Θεσσαλονίκη.

Επίσης ευχαριστώ θερμά τον κ. Αθανάσιο Ρούμπο, προϊστάμενο και καθηγητή του τμήματος Φυτικής Παραγωγής του Αλεξάνδρειου Τεχνολογικού Εκπαιδευτικού Ιδρύματος Θεσσαλονίκης, που δέχτηκε να αναλάβει την εισήγηση της διπλωματικής μου, καθώς και τον κ. Μιχάλη Μουστάκα, Αναπληρωτή καθηγητή του τμήματος Βιολογίας του Αριστοτελείου Πανεπιστημίου Θεσσαλονίκης, για την πολύτιμη συμβολή του στην ολοκλήρωση της εργασίας.

Οφείλω επίσης να ευχαριστήσω τον κ. Απόστολο Σκαλτσογιάννη καθηγητή του τμήματος Δασολογίας του Αριστοτελείου Πανεπιστημίου Θεσσαλονίκης διότι δέχτηκε να εργαστώ στο εργαστήριο Γενετικής στο οποίο είναι υπεύθυνος και τον Πάρη Νικολάου, μεταπτυχιακό φοιτητή του ίδιου τμήματος, για την συνεχή καθοδήγηση και βοήθεια του κατά την εκτέλεση των πειραμάτων.

Τέλος θέλω να ευχαριστήσω τον κ. Θωμά Θωμίδα, καθηγητή Φυτοπαθολογίας του τμήματος Φυτικής Παραγωγής του Αλεξάνδρειου Τεχνολογικού Εκπαιδευτικού Ιδρύματος Θεσσαλονίκης, για την βοήθεια που παρείχε στη διεξαγωγή αποτελεσμάτων.



ΠΡΟΛΟΓΟΣ

Η παρούσα διπλωματική εργασία εκπονήθηκε στο Εργαστήριο Γενετικής του Τμήματος Δασολογίας του Αριστοτελείου Πανεπιστημίου Θεσσαλονίκης και στο Εργαστήριο Βοτανικής του Τμήματος Βιολογίας του ίδιου Ιδρύματος. Ωστόσο, προκαταρκτικά πειράματα έλαβαν χώρα στο αγρόκτημα του Αλεξάνδριου Τεχνολογικού Εκπαιδευτικού Ιδρύματος Θεσσαλονίκης στα πλαίσια του Προγράμματος Μεταπτυχιακών Σπουδών «Αγροχημεία και Βιολογικές Καλλιέργειες» υπό την επίβλεψη του κ. Αθανάσιου Ρούμπου.

Κύρια αντικείμενα μελέτης τα οποία πραγματεύεται η συγκεκριμένη επιστημονική εργασία είναι 1) τα συμπτώματα που δημιουργούνται στα δέντρα και στα μικρομοσχεύματα *Olea europaea* λόγω του ψεκασμού αυτών με glyphosate, 2) η εγκατάσταση των μικρομοσχευμάτων σε τροποποιημένα θρεπτικά υπόστρωμα που περιέχουν glyphosate σε τρεις διαφορετικές συγκεντρώσεις χρησιμοποιώντας τη μέθοδο της Ιστοκαλλιέργειας και 3) η μέτρηση των παραμέτρων του φθορισμού της χλωροφύλλης στα φύλλα των μικρομοσχευμάτων *Olea europaea* που έχουν υποστεί επίδραση glyphosate είτε μέσω ψεκασμού είτε μέσω ενσωμάτωσης στο θρεπτικό υπόστρωμα.

Τα τελευταία χρόνια ο πολλαπλασιασμός του φυτικού υλικού με τη μέθοδο της Ιστοκαλλιέργειας έχει διαδοθεί σε μεγάλο βαθμό. Κατά τη συγκεκριμένη μέθοδο και για την επίτευξη του μικροπολλαπλασιασμού απαιτείται η χρήση ρυθμιστών αύξησης. Κάποιοι από τους ρυθμιστές αύξησης, όπως η ζεατίνη, είναι οικονομικά ασύμφοροι και γ'αυτό το λόγο γίνεται προσπάθεια εύρεσης και χρήσης άλλων, οικονομικότερων χημικών ουσιών με την ίδια αποτελεσματικότητα. Έτσι, με την προσθήκη glyphosate στο θρεπτικό υπόστρωμα των μικρομοσχευμάτων *Olea europaea* εξετάζεται η πιθανότητα δράσης του ζιζανιοκτόνου ως ρυθμιστής αύξησης που προάγει την βλαστογένεση.

Τέλος, διερευνάται η όποια επίδραση μπορεί να έχει το glyphosate στη λειτουργία της φωτοσύνθεσης με τη μέθοδο του φθορισμού της χλωροφύλλης πριν ακόμα τα τυχόν συμπτώματα γίνουν αντιληπτά με γυμνό μάτι.



ΠΕΡΙΕΧΟΜΕΝΑ

| | Σελίδα |
|---|-----------|
| 1. Εισαγωγή | 1 |
| 1.1 Ζιζανιοκτόνα | 1 |
| 1.1.1 Ζιζανιοκτόνα που συνιστώνται για τους ελαιώνες | 2 |
| 1.1.2 Roundup | 4 |
| 1.1.3 Σύνθεση του Roundup | 5 |
| 1.1.4 Φυσικές και χημικές ιδιότητες του Roundup | 7 |
| 1.1.5 Τρόπος εφαρμογής και δράσης του glyphosate | 8 |
| 1.1.6 Φυτοτοξικότητα του glyphosate | 9 |
| 1.2 Η ελιά (<i>Olea europaea</i>) | 13 |
| 1.2.1 Βοτανικά και φυσιολογικά χαρακτηριστικά του δένδρου της ελιάς | 14 |
| 1.2.2 Τρόποι πολλαπλασιασμού της ελιάς – Μικροπολλαπλασιασμός | 15 |
| 1.3 Φωτοσύνθεση | 17 |
| 1.3.1 Ο φθορισμός της χλωροφύλλης στη μελέτη της φωτοσύνθεσης | 20 |
| 1.4 Σκοπός της εργασίας | 25 |
| 2. Υλικά και μέθοδοι | 27 |
| 2.1 Τόπος εκτέλεσης των πειραμάτων | 27 |
| 2.2 Γενετικό υλικό που χρησιμοποιήθηκε στο μικροπολλαπλασιασμό | 27 |
| 2.3 Προετοιμασία θρεπτικού υποστρώματος | 28 |
| 2.4 Προσθήκη του glyphosate στην στο θρεπτικό υπόστρωμα των μικρομοσχευμάτων <i>Olea europaea</i> | 30 |
| 2.5 Απεικόνιση του φθορισμού της χλωροφύλλης σε μικρομοσχεύματα <i>Olea europaea</i> που έχουν υποστεί επίδραση glyphosate | 30 |
| 3. Αποτελέσματα | 34 |
| 3.1 Επίδραση του glyphosate στην ανάπτυξη των μικρομοσχευμάτων <i>Olea europaea</i> | 34 |
| 3.2 Παράμετροι του φθορισμού της χλωροφύλλης σε φύλλα μικρομοσχευμάτων <i>Olea europaea</i> που έχουν υποστεί επίδραση glyphosate | 43 |
| 4. Συζήτηση - Συμπεράσματα | 70 |
| 5. Περίληψη | 73 |
| Βιβλιογραφία | 75 |



1. ΕΙΣΑΓΩΓΗ

1.1 Ζιζανιοκτόνα

Ζιζανιοκτόνα είναι οι χημικές ουσίες με τις οποίες επιχειρείται η διατάραξη της φυσιολογίας ενός φυτού με σκοπό την μερική ή και καθολική ξήραυσή του. Χρησιμοποιούνται για την καταπολέμηση της ανεπιθύμητης βλάστησης σε καλλιέργειες ή μη καλλιεργούμενες εκτάσεις και η χρήση τους συμπεριλαμβάνεται στις χημικές μεθόδους καταπολέμησης των ζιζανίων. Η αντιμετώπιση των ζιζανίων με χημικά μέσα (ζιζανιοκτόνα) αποτελεί ένα από τα μεγαλύτερα επιτεύγματα στην βελτίωση των καλλιεργητικών φροντίδων κατά τη διαδικασία παραγωγής γεωργικών προϊόντων (Ελευθεροχωρινός, 2002). Πρόκειται για οργανικά μόρια που επιδεικνύουν φυσικοχημικές ιδιότητες (μοριακή μάζα, λιποφιλικότητα) που τα καθιστούν ικανά να διεισδύσουν στο εσωτερικό των φυτών υπερνικώντας τα εμπόδια που περιβάλλουν τον συμπλάστη (εξωκυττάριος μήτρα, κυτταρική μεμβράνη) (Tilquin *et al.*, 2000). Έχουν ευρύ φάσμα δράσης, εκδηλώνουν τη δράση τους σε σύντομο χρονικό διάστημα και είναι προϊόντα σχετικώς χαμηλού κόστους (Ελευθεροχωρινός, 2002).

Οι βιοχημικοί μηχανισμοί δράσης των ζιζανιοκτόνων περιλαμβάνουν τη φωτοσύνθεση, την αναπνοή, καθώς και τη σύνθεση του RNA, των πρωτεϊνών και των λιπιδίων. Επιδράσεις σε αυτού του είδους τις διεργασίες μπορούν να εκδηλωθούν με μη φυσιολογική ανάπτυξη των φυτών ως αποτέλεσμα μορφολογικών, ανατομικών και κυτταρολογικών μεταβολών (Kirkwood, 1983).

Πολυάριθμες μελέτες έχουν αναφερθεί στην παρεμπόδιση, λόγω ζιζανιοκτόνου δράσης, της λήψης των ανόργανων ιόντων, των σακχάρων, και των αμινοξέων από τα φυτά ή τους φυτικούς ιστούς. Έχει αποδειχθεί ότι κάποια ζιζανιοκτόνα έχουν επιπτώσεις σε πλήθος διαφορετικών συστημάτων λήψης και ότι μπορούν να ενεργήσουν μέσω της διατάραξης της διατήρησης της ηλεκτροχημικής βαθμίδωσης πρωτονίων. Τα ζιζανιοκτόνα που έχουν αποδειχθεί ότι αυξάνουν τη διαρροή των ηλεκτρολυτών, των σακχάρων, ή των χρωστικών ουσιών των κυττάρων μπορούν επίσης να έχουν επιπτώσεις στις κυτταρικές λειτουργίες με το να διαταράζουν την βαθμίδωση πρωτονίων (Ratterman and Balke, 1988).



Η αποτελεσματικότητα ενός ζιζανιοκτόνου στη θανάτωση ενός φυτού, απαιτεί τη συσσώρευση κρίσιμης ποσότητας της δραστικής ουσίας επί του βιοχημικού στόχου του σημείου δράσης. Αυτό εξαρτάται από την επαρκή λήψη μέσω του φύλλου ή της ρίζας, τη μετακίνηση μέσα στο φυτό και την άφιξη στη σωστή υποκυττάρια θέση στη βιολογικά ενεργό μορφή (Cole, 1994).

Οι παράγοντες που επηρεάζουν τη μετακίνησή των ζιζανιοκτόνων μέσα στο φυτό δεν σχετίζονται αποκλειστικά και μόνο με τον τύπο του ζιζανιοκτόνου σκευάσματος αλλά έχουν να κάνουν με το φυτό που έχει υποστεί την επίδραση καθώς και με το περιβάλλον στο οποίο αναπτύσσεται. Οι παράγοντες που συσχετίζονται με το φυτό είναι το είδος, το στάδιο και οι συνθήκες ανάπτυξης του. Η μετακίνηση των ζιζανιοκτόνων είναι αποτελεσματικότερη όταν η εφαρμογή τους γίνεται σε φυτά που αναπτύσσονται κάτω από ευνοϊκές συνθήκες, αφού με τέτοιες συνθήκες ανάπτυξης, οι φυσιολογικές και μεταβολικές διεργασίες των φυτών (φωτοσύνθεση, διαπνοή, αναπνοή) πραγματοποιούνται με ταχύτερο ρυθμό, πράγμα που έχει ως συνέπεια και την ταχύτερη μετακίνηση των ζιζανιοκτόνων μέσα σε αυτά (Ελευθεροχωρινός, 1996).

Οι σπουδαιότεροι παράγοντες του περιβάλλοντος που επηρεάζουν τη μετακίνηση των ζιζανιοκτόνων στα φυτά είναι η θερμοκρασία, η υγρασία και η ένταση φωτισμού. Αυτό οφείλεται στο ότι αυτοί οι παράγοντες επηρεάζουν άμεσα τις σπουδαιότερες φυσιολογικές διεργασίες του φυτού (αναπνοή, διαπνοή, φωτοσύνθεση), οι οποίες με τη σειρά τους επηρεάζουν τη μετακίνηση των ζιζανιοκτόνων (Ελευθεροχωρινός, 1996).

1.1.1 Ζιζανιοκτόνα που συνιστώνται για τους ελαιώνες

Τα ζιζανιοκτόνα που χρησιμοποιούνται στην καλλιέργεια της ελιάς είναι προφυτρωτικά ή μεταφυτρωτικά. Τα προφυτρωτικά (ή υπολειμματικά ζιζανιοκτόνα εδάφους) εμποδίζουν το φύτεμα των ζιζανίων για ένα διάστημα ανάλογο με τη διάρκεια δράσης τους. Εφαρμόζονται σε γυμνό έδαφος (χωρίς ζιζάνια) πριν φυτρώσουν τα ζιζάνια το Φθινόπωρο ή οποτεδήποτε μετά την κατεργασία του εδάφους. Η δράση τους ευνοείται από την ύπαρξη αρκετής υγρασίας στο έδαφος. Η δόση τους πρέπει να είναι ανάλογη με τον τύπο του εδάφους (μικρότερη στα ελαφρά εδάφη, μεγαλύτερη στα βαριά) (Γιαννοπολίτης, 2002).

Τα μεταφυτρωτικά (ή φυλλώματος) ζιζανιοκτόνα ξηραίνουν τα φυτρωμένα ζιζάνια και δεν έχουν καμιά ουσιαστική δράση από το έδαφος. Η δράση τους ευνοείται από την ύπαρξη ικανοποιητικής εδαφικής και ατμοσφαιρικής υγρασίας ώστε τα ζιζάνια να είναι σε ενεργό ανάπτυξη (όχι σε θερινή 'αδράνεια' λόγω ξηροθερμικών συνθηκών). Η δόση είναι ανάλογη με το στάδια ανάπτυξης των ζιζανίων (μικρότερη στα μικρότερα ζιζάνια). Τα μεταφυτρωτικά ζιζανιοκτόνα μπορεί να έχουν απλή δράση επαφής οπότε ξηραίνουν το υπέργειο μέρος των ζιζανίων μόνο (τα πολυετή γρήγορα αναβλαστάνουν από τα υπόγεια όργανά τους) ή να είναι διασυστηματικά, οπότε μετακινούνται μέσα στο φυτό και φτάνουν και στα υπόγεια πολλαπλασιαστικά όργανα των πολυετών ζιζανίων νεκρώνοντας σ' ένα βαθμό και αυτά (Γιαννοπολίτης, 2002).

Πίνακας 1.1 Τα κυριότερα ζιζανιοκτόνα που συνιστώνται για την καλλιέργεια της ελιάς

| Δραστική ουσία | Σκευάσματα | Παρατηρήσεις |
|--------------------------|---|--|
| ΠΡΟΦΥΤΡΩΤΙΚΑ | | |
| Simazine | Γκεζατόπ κ.α. | Να έχουν περάσει τουλάχιστον 3-4 χρόνια από τη φύτευση των δένδρων |
| Diuron | Ντιουρόν R.P. | |
| Oxyfluorfen | Γκολ | Και για νεότερα δένδρα |
| EPTC | Επτάμ G | |
| Chlorthal dimethyl | Ντακτάλ | Φυτώρια ελιάς |
| ΜΕΤΑΦΥΤΡΩΤΙΚΑ | | |
| Paraquat | Γκραμοξόν κ.ά. | Έχουν δράση επαφής |
| Diquat | Ρεγκλόν | |
| Paraquat + diquat | Ρεγκάλ | |
| Glifosinate ammonium | Μπάστα | Έχει και μικρή δισυστηματική δράση |
| Glyphosate | Ραουντάπ κ.ά. | Έχουν διασυστηματική δράση |
| Glyphosate trimersium | ΜαέστροΕ | |
| Aminotriazole (amitrole) | Δεν διατίθεται σε αμιγές σκεύασμα στην Ελλάδα | |

| ΜΕΙΓΜΑΤΑ ΠΡΟ- ΚΑΙ ΜΕΤΑ- ΦΥΤΡΩΤΙΚΩΝ | | |
|------------------------------------|----------------|---|
| Simazine + paraquat | Γκραμαζίν | Χρησιμοποιούνται όπως τα προφυτρωτικά αλλά σε φυτρωμένα ζιζάνια |
| Simazine + aminotriazole | Σαμινόλ κ.ά. | |
| Diuron + aminotriazole | Χερμπιζάν κ.ά. | |
| Terbutylazine + glyphosate | Φόλαρ | |

Πηγή: Γεωργία – Κτηνοτροφία, 2002

1.1.2 Roundup

Το Roundup είναι ένα πολύ διαδεδομένο ζιζανιοκτόνο στην καλλιέργεια της ελιάς.

Εμπορικό όνομα σκευάσματος: Roundup 36 SL

Δραστική ουσία: Glyphosate

Χημικό όνομα σκευάσματος: Άλας Ισοπροπυλαμίνης της αζωτο-φωσφονο-μεθυλγλυσίνης (Isopropylamine salt of N-(phosphomethyl) glycine)

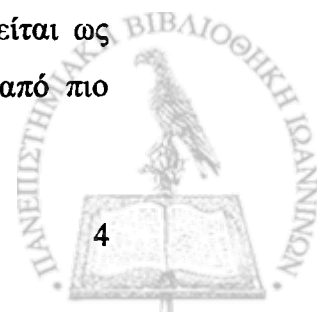
Χρήση σκευάσματος: Ζιζανιοκτόνο

Τύπος σκευάσματος: Το Roundup πωλείται ως υδατικό διάλυμα του ισοπροπυλαμινικού άλατος του glyphosate και άλλων διαβρεκτικών παραγόντων.

Κύριος παρασκευαστής σκευάσματος: Monsanto Agricultural Products Co (St. Louis, MO).

Πρόκειται για μη εκλεκτικό, μεταφυτρωτικό, διασυστηματικό ζιζανιοκτόνο φυλλώματος που χρησιμοποιείται για την καταπολέμηση ετήσιων και πολυετών, αγροστωδών, πλατύφυλλων και υδροχαρών ζιζανίων μέσα σε μη καλλιεργήσιμες εκτάσεις ή σε καλλιέργειες, με καθολική εφαρμογή σε καλλιεργούμενες εκτάσεις, μετά τη συγκομιδή των καλλιεργειών ή πριν την κατεργασία του εδάφους για σπορά (Ελευθεροχωρινός, 1996; Mollenhauer *et al.*, 1987; Morin *et al.*, 1997; Jain *et al.*, 1999). Μπορεί να χρησιμοποιηθεί για την καταπολέμηση ορισμένων μη επιθυμητών κωνοφόρων αλλά και πλατύφυλλων δέντρων ή θάμνων. Δεν μπορεί να εξοντώσει όλα τα πλατύφυλλα, ξυλώδη φυτά. Ο κατάλληλος χρόνος επέμβασης είναι κρίσιμος για την αποτελεσματικότητα του ζιζανιοκτόνου όσον αφορά τα πλατύφυλλα ξυλώδη φυτά και κωνοφόρα (Dicamba, 1995). Σε μικρότερες συγκεντρώσεις δρα ως ρυθμιστής αύξησης των φυτών (Environmental Protection Agency, 1999).

Παρασκευάζεται από την εταιρεία Monsanto στην Αμερική και πωλείται ως φιλική προς το περιβάλλον χημική ουσία (Eckatr Stien, 1996). Είναι ένα από πιο



ευρέως χρησιμοποιούμενα φυτοφάρμακα στον κόσμο (Beyond Pesticides, 2001). Είναι μείγμα των ουσιών glyphosate (που αποτελεί την δραστική ουσία του Roundup) και άλλων χημικών ουσιών, κοινώς αναφερόμενων ως αδρανείς ουσίες, που συμβάλλουν στην αποτελεσματικότερη δράση του ζιζανιοκτόνου (Pesticide Action Network North America, 2005) βελτιώνοντας την απορρόφηση, τη διείσδυση της δραστικής ουσίας στα φυτικά κύτταρα και την διακίνηση κάνοντας ομοιόμορφη την διασπορά της μέσα στο φυτό (Caroline Cox, 2001; Beyond Pesticides, 2001).

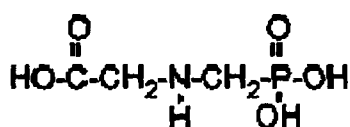
Τα συμπτώματα των ζιζανίων που έχουν ψεκαστεί με τη συνιστώμενη δόση Roundup είναι χλώρωση που εμφανίζεται πρώτα στη νέα αύξηση και η οποία συνοδεύεται από νέκρωση. Πολύ συχνά, κατά την αναβλάστηση των πολυετών ζιζανίων, παρατηρούνται παραμορφωμένα φύλλα ή με λευκές κηλίδες, καθώς επίσης και ανάπτυξη πολλαπλών βλαστών με μικρά φύλλα από ένα γόνατο (Ελευθεροχωρινός, 1996).

1.1.3 Σύνθεση του Roundup

Γενικότερα το Roundup αποτελείται από ένα υδατικό διάλυμα ισοπροπυλαμινικού άλατος του glyphosate που αποτελεί τη δραστική ουσία, από μία διαβρεκτική ουσία και ποικίλα άλλα δευτερεύοντα αδρανή συστατικά, συμπεριλαμβανομένων των αντιαφρωδών, των χρωστικών παραγόντων, των βιοκτόνων και των ανόργανων ιόντων για την ρύθμιση του pH (Thui and Thu, 2003).

Glyphosate

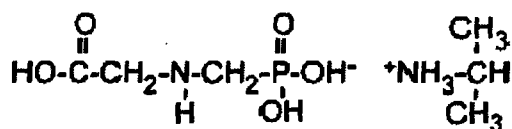
Το Glyphosate ή αλλιώς αζωτο-φωσφονο-μεθυλ-γλυσίνη είναι η δραστική ουσία του Roundup (N-phosphono-methyl glycine).



αζωτο-φωσφονο-μεθυλ-γλυσίνη

Το glyphosate είναι οξύ, συνήθως όμως χρησιμοποιείται υπό μορφή αλάτων και στη συγκεκριμένη περίπτωση υπό την μορφή του ισοπροπυλαμινικού άλατος (isopropynamine salt of glyphosate) (Caroline Cox, 2001).





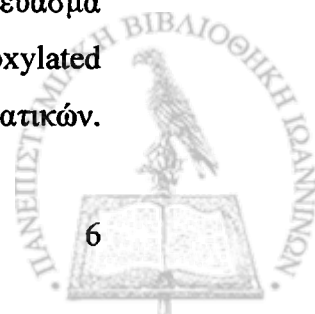
Άλας Ισοπροπυλαμίνης της αζωτο-φωσφονο-μεθυλ-γλυσίνης

Το glyphosate χρησιμοποιήθηκε για πρώτη φορά το 1974 στην Αμερική. Σύμφωνα με τις πιο πρόσφατες πληροφορίες της Υπηρεσίας Προστασίας Περιβάλλοντος EPA (Environmental Protection Agency), όσον αφορά τη χρήση των φυτοφαρμάκων, ήταν το έβδομο πιο ευρέως χρησιμοποιούμενο αδρανές συστατικό έως το 1997 στην γεωργία. Η χρήση του αυξάνεται με ρυθμό 20% ετησίως και ως το 2001 υπολογίζεται ότι οι πωλήσεις του αποτέλεσαν το 67% των συνολικών πωλήσεων της εταιρείας Monsanto. Αυτό οφείλεται κυρίως στην εμφάνιση και ταχεία αύξηση του αριθμού των γενετικά τροποποιημένων καλλιεργειών, ανθεκτικών στη συγκεκριμένη ουσία.

Η αποτελεσματικότητα του glyphosate σχετίζεται άμεσα με τη δυνατότητά του να διαπεράσει την φυλλική επιφάνεια. (Feng *et al*, 1999). Το ζιζανιοκτόνο πρέπει να ξεπεράσει διάφορα εμπόδια κατά την διαδρομή του από το ψεκαστικό δοχείο μέχρι το σημείο της δράσης του. Από την επιφάνεια των φύλλων, τα μόρια πρέπει να διαπεράσουν τη στοιβάδα κηρών που καλύπτει το στρώμα της εφυμενίδας, την εφυμενίδα, το κυτταρικό τοίχωμα και το πλασμαλήμα. Το glyphosate είτε σε μορφή οξέος είτε σε μορφή άλατος δεν είναι αρκετά αποτελεσματικό ως ζιζανιοκτόνο χωρίς κατάλληλες πρόσθετες ουσίες, κυρίως διαβρεκτικές ουσίες. Αυτές υποτίθεται ότι δεν έχουν σημαντική φυτοτοξικότητα μεμονωμένες, αλλά έχουν την ικανότητα να αυξάνουν την επίδραση του ενεργού συστατικού (Laerke and Streibig, 1995). Η αποτελεσματικότητα του glyphosate, ιδιαίτερα, επηρεάζεται έντονα από τις διαβρεκτικές ουσίες οι οποίες χρησιμοποιούνται στα ζιζανιοκτόνα σκευάσματα για να βελτιώσουν την κάλυψη, τη διαβροχή και τη λήψη του ζιζανιοκτόνου (Feng *et al.*, 1999).

Polyoxyethyleneamine

Η διαβρεκτική ουσία που χρησιμοποιείται εκτενέστερα στο ζιζανιοκτόνο σκεύασμα Roundup είναι η πολυοξυαιθυλεναμίνη (polyoxyethyleneamine - polyethoxylated tallowamine - POEA) η οποία ανήκει στην κατηγορία των αδρανών συστατικών.



Υποστηρίζεται ότι η τοξικότητα της ΡΟΕΑ μπορεί να είναι μεγαλύτερη από την τοξικότητα του glyphosate μεμονωμένα ή του εμπορικού σκευάσματος Roundup (Stacey Vaeth, 2000).

Πίνακας 1.2 Σύνθεση του Roundup

| Συστατικά | % Επί του βάρους (κατά προσέγγιση) | Σύμβολα και φράσεις κινδύνου της ΕΕ |
|---|---------------------------------------|---|
| Άλας Ισοπροπιλαμίνης του glyphosate | 41,5 | |
| Διαβρεκτική ουσία | 15,5 | Xn – Επιβλαβές N – Επικίνδυνο για το περιβάλλον R22 – επιβλαβές σε περίπτωση κατάποσης R41 – Κίνδυνος σοβαρών οφθαλμικών βλαβών R51/53 – Τοξικό στους υδρόβιους οργανισμούς, μπορεί να προκαλέσει μακροχρόνιες δυσμενείς επιπτώσεις στο υδάτινο περιβάλλον {a} Ετικέτα της ΕΕ |
| Νερό | 43 | |

Πηγή: <http://www.efthymiadis.gr/>

Πίνακας 1.3 Φυσικές και χημικές ιδιότητες του Roundup¹

| | |
|--|---------------------------|
| Χρώμα / διακυμάνσεις χρώματος: | Πορτοκαλόχρουν - Καστανό |
| Μορφή: | Υγρό |
| Οσμή: | Ελαφρά - Αμίνης |
| Σημείο ανάφλεξης: | Δεν αναφλέγεται |
| Θερμοκρασία αυτανάφλεξης: | 443° C |
| Σχετική πυκνότητα: | 1,172 @ 20°C / 4° C |
| Κινηματικό ιξώδες: | 62,47 cSt @ 20° C |
| Διαλυτότητα: | Στο νερό: απόλυτα διαλυτό |
| Τιμή pH: | 4,4 – 4,9 @ 80 g/l |
| Συντελεστής κατανομής (n – οκτανόλης / νερό) | -3,2 @ 25°C (γκλυφοσέιτ) |

Πηγή: <http://www.efthymiadis.gr/>

1.1.5 Τρόπος εφαρμογής και δράσης του Glyphosate

Το Roundup ψεκάζεται στα φύλλα του ανεπιθύμητου φυτού από όπου η δραστική ουσία glyphosate απορροφάται ταχέως και μεταφέρεται μέσω του φλοιώματος στους μεριστωματικούς ιστούς της ρίζας και του βλαστού (Mollenhauer *et al.*, 1987). Η δράση του περιλαμβάνει την παρεμπόδιση της σύνθεσης βασικών αμινοξέων με αποτέλεσμα τη μείωση της παραγωγής πρωτεϊνών, την παρεμπόδιση της ανάπτυξης του φυτού και τελικά την καθολική ξήρανση του μέσα σε χρονικό διάστημα 2-3 ημερών.

Πιο συγκεκριμένα το glyphosate αναστέλλει το ένζυμο φωσφο-ενολό-πυρουβουλσικιμικό οξύ (enolpyruvylshikimate-3phosphate synthase ή EPSP), που εντοπίζεται στους χλωροπλάστες (Mollenhauer *et al.*, 1987; Morin *et al.*, 1997; Geiger *et al.*, 1999; Jain *et al.*, 1999; Fuchs *et al.*, 2002; Feng *et al.*, 2003; Sergiev *et al.*, 2006). Η αναστολή του EPSP προκαλεί τη συσσώρευση του σικιμικού οξέος (Mollenhauer *et al.*, 1987; Sergiev *et al.*, 2006; Morin *et al.*, 1997), εμποδίζοντας τη βιοσύνθεση των αρωματικών αμινοξέων φαινυλαλανίνη, τυροσίνη, τρυπτοφάνη, καθώς και των

¹ Τα φυσικά δεδομένα είναι τυπικές τιμές, βασισμένες σε δοκιμασμένα υλικά, αλλά μπορεί να διαφέρουν από δείγμα σε δείγμα. Οι τυπικές τιμές δεν πρέπει να ερμηνεύονται ως εγγυημένη ανάλυση για συγκεκριμένες παρτίδες ή ως προδιαγραφές για το σκεύασμα

φαινυλοπροπανοϊδών, των αυξινών, των βιταμινών, και βασικών μεταβολιτών που παράγονται μέσω της μεταβολικής οδού του σικιμικού οξέος (Morin *et al.*, 1997; Fuchs *et al.*, 2002; Sergiev *et al.*, 2006).

Έχει επίσης αναφερθεί ότι το glyphosate προκαλεί χρωμοσωμικές ανωμαλίες, επηρεάζει την αναπνοή και την απορρόφηση των ιόντων, εμποδίζει τον σχηματισμό της χλωροφύλλης, επιταχύνει την αποδόμηση της χλωροφύλλης, τροποποιεί την υπερδομή των χλωροπλαστών και αναστέλλει τον μεταβολισμό του 3 —ινδολυλο - οξικού οξέος. Είναι πιθανό αυτές οι επιπλέον επιδράσεις του ζιζανιοκτόνου να ευθύνονται για τον τελικό θάνατο του φυτού (Morin *et al.*, 1997).

Γενικότερα έχει αποδειχθεί ότι η δράση του glyphosate επηρεάζει ένα ευρύ φάσμα φυτικών διεργασιών, μερικές από τις οποίες μπορεί να οφείλονται άμεσα στη μείωση των αρωματικών αμινοξέων ή στη διατάραξη του μεταβολισμού του άνθρακα λόγω ασυγκράτητης συσσώρευσης του σικιμικού οξέος, και μερικές από τις οποίες μπορεί να είναι είτε δευτερεύοντες συνέπειες της αρχικής δράσης είτε το αποτέλεσμα αλληλεπίδρασης με τις ανεξάρτητες περιοχές της δράσης του glyphosate (Mollenhauer *et al.*, 1987).

Τελικά, ένα φυτό το οποίο έχει υποστεί επίδραση glyphosate, θα νεκρωθεί εφόσον όλοι οι ιστοί του νεκρωθούν. Σε περίπτωση επιζώντος ιστού παρέχεται η ευκαιρία στο φυτό να αναβλαστήσει κάτω από ευνοϊκές συνθήκες (Feng *et al.*, 2003).

1.1.6 Φυτοτοξικότητα του glyphosate

Το glyphosate είναι μη εκλεκτικό ζιζανιοκτόνο, πράγμα που σημαίνει ότι σκοτώνει οτιδήποτε με το οποίο έρχεται σε επαφή. Κινείται εύκολα μέσα στα φυτά και γι' αυτό μπορεί να προκαλέσει βλάβη σε περιοχές του φυτού που δεν είναι άμεσα εκτεθειμένες σε αυτό (Stacey, 2000). Το glyphosate δεν πρέπει να έρχεται σε επαφή με πράσινα μέρη των καλλιεργούμενων φυτών ή με μη επουλωμένες πληγές από κλάδευμα ή αφαίρεση παραφυάδων ή γενικά με τραυματισμένα μέρη των φυτών. Μπορεί να προκαλέσει σοβαρές επιπτώσεις στα περισσότερα φυτικά είδη.

Το glyphosate συνήθως απορροφάται μόνο από τα φύλλα του φυτού. Δεν αποτελεί πτητική ουσία, οπότε ο μόνος τρόπος για να έρθει σε επαφή με το φύλλωμα των καλλιεργούμενων ειδών είναι μέσω τυχαίου ή προγραμματισμένου ψεκασμού αυτών. Κάποια φυτά (γενετικά τροποποιημένες ανθεκτικές στο Roundup καλλιέργειες)



είναι ανθεκτικά στο glyphosate και συχνά ψεκάζονται με Roundup για την καταπολέμηση των ζιζανίων που αναπτύσσονται ανάμεσά τους.

Σε γενικές γραμμές, τα κωνοφόρα είναι περισσότερο ανθεκτικά από τα πλατύφυλλα φυτά και τα ξυλώδη φυτά είναι περισσότερο ανθεκτικά από τα ποώδη.

Το glyphosate προκαλεί ποικίλα συμπτώματα στα φυτά. Είναι ένα απλό χημικό συστατικό που, όπως έχει προαναφερθεί, εμποδίζει την παραγωγή της τρυπτοφάνης επηρεάζοντας εμμέσως ποικίλες φυσιολογικές λειτουργίες του φυτού. Η τρυπτοφάνη είναι απαραίτητη για την παραγωγή μίας αυξίνης, του 3-Ινδολυλο-οξικού οξέος (3-indole Acetic Acid - IAA), η οποία είναι υπεύθυνη για την κυριαρχία της κορυφής. Επομένως με την αναστολή της παραγωγής της τρυπτοφάνης προκαλείται αναστολή της παραγωγής του IAA και αναστολή της κυριαρχίας της κορυφής των φυτών.

Η κυριαρχία της κορυφής είναι ένας όρος που αναφέρεται στην κυριαρχία της αύξησης του ακραίου σημείου ενός φυτού σε σχέση με την πλάγια αύξησή του. Εάν κοπεί το ακραίο σημείο ενός κλαδιού, τότε οι πλάγιες διακλαδώσεις του θα αναπτυχθούν ισχυρότερα, δίνοντας στο φυτό μία περισσότερο θαμνώδη μορφή. Η κυριαρχία της κορυφής ρυθμίζεται κυρίως από την παραγωγή της αυξίνης IAA στον ακραίο ανθοφόρο οφθαλμό, η οποία μετακινείται καθοδικά στους υπόλοιπους οφθαλμούς του ίδιου κλαδιού. Το glyphosate εμποδίζοντας την σύνθεση της τρυπτοφάνης, εμποδίζει παράλληλα και την παραγωγή της αυξίνης προκαλώντας τη μείωση ή ελαχιστοποίηση της κυριαρχίας της κορυφής σε ένα φυτό. Έτσι οι πλάγιες διακλαδώσεις αναπτύσσονται περισσότερο, και οι πλάγιοι οφθαλμοί που φυσιολογικά παραμένουν σε λήθαργο αρχίζουν να αναπτύσσονται και αυτοί.

Σε συνιστώμενες δόσεις εφαρμογής, το glyphosate δεν απορροφάται από τα νεκρά κύτταρα του κορμού. Ο κορμός, ο οποίος είναι χρώματος σκούρου καστανού ή μαύρου, έχει στρώσεις από νεκρά κύτταρα ανάμεσα στο εξωτερικό μέρος του και το εσωτερικό μέρος των ζωντανών κυττάρων. Πολλά ξυλώδη φυτά αποτελούνται από ζωντανά κύτταρα στο εξωτερικό του κορμού τους, όταν είναι νεαρά. Αυτά τα κύτταρα είναι αναγνωρίσιμα από τις χρωστικές ουσίες που περιέχουν. Το glyphosate μπορεί να απορροφηθεί από τα ζωντανά κύτταρα του κορμού και να μετακινηθεί μέσα στο φυτό. Η απόσταση που μπορεί να διανύσει εξαρτάται από την πυκνότητα του κορμού και από την ποσότητα που απορροφάται. Το glyphosate στη συνέχεια καταστρέφει τα κύτταρα στα οποία εισέρχεται.

Η ζημιά που προκαλεί το glyphosate στον κορμό είναι δύσκολο να διαγνωστεί διότι τα συμπτώματα εμφανίζονται μετά από χρονικό διάστημα ενός έτους ή και



παραπάνω από την ημέρα της εφαρμογής του. Παρ' όλο που τα κύτταρα νεκρώνονται αμέσως μετά την απορρόφηση της ουσίας, κανένα σύμπτωμα δεν μπορεί να είναι εμφανές έως ότου τα ανεπηρέαστα κύτταρα που περιβάλλουν τα προσβεβλημένα, διαχωριστούν και αναπτυχθούν. Όταν συμβεί αυτό, ο κορμός διαχωρίζεται στο σημείο όπου βρίσκονται τα προσβεβλημένα κύτταρα. Ο διαχωρισμός μπορεί να είναι πολύ μικρός, 2,5- 5cm ή μεγάλος, αρχίζοντας από το έδαφος και συνεχίζοντας 3m ψηλά, έως την κόμη του δέντρου.

Ένα από τα μεγαλύτερα προβλήματα που σχετίζονται με τις ζημιές που προκαλεί το glyphosate στα φυτά μη στόχους, είναι ότι τα συμπτώματα που προκαλούνται συνεχίζουν να επιδρούν στα φυτά για αρκετά χρόνια. Παρόλο που το glyphosate αδρανοποιείται ταχύτατα, όταν έρχεται σε επαφή με το έδαφος και διασπάται από μικροοργανισμούς του εδάφους σε χρονικό διάστημα εβδομάδων ή και μηνών, όταν εισέλθει μέσα στο φυτό παρουσιάζει κάποια σταθερότητα. Ορισμένα φυτά τα οποία εμφάνισαν δυσμενείς επιπτώσεις λόγω του glyphosate, έχουν μεταφερθεί από τον αγρό και έχουν μεταφυτευτεί σε δοχεία. Αναπτύχθηκαν για τρία χρόνια και ποτέ δεν ανέκτησαν την κυριαρχία της κουφής τους.

Το glyphosate εφαρμόστηκε στο βαμβάκι (*Gossypium hirsutum*) και αποδείχτηκε ότι επηρεάζει την φύτευση του σπόρου, τη ζωτικότητα και την εγκατάσταση του φυτού στις εξωτερικές συνθήκες του αγρού. Όταν το glyphosate χρησιμοποιήθηκε σε όσο το δυνατό μικρότερες ποσότητες, η φύτευση του σπόρου μειώθηκε σε ποσοστό 24-85% και το βάρος των σποροφύτων μειώθηκε σε ποσοστό 19-83% (Locke and Moseley, 1995).

Μελέτες που έχουν γίνει σχετικά με τον τρόπο που επηρεάζει το glyphosate την νιτροποίηση, έχουν δείξει ότι σε συγκεντρώσεις μιας τυπικής εφαρμογής του glyphosate, ο αριθμός των φυματίων των ριζών στο τριφύλλι (*Trifolium spp.*) που φυτεύτηκε 120 ημέρες μετά την εφαρμογή του ζιζανιοκτόνου, μειώνεται σε ποσοστό 70% (Eberbach and Douglas, 1983). Παρόμοιες συγκεντρώσεις του glyphosate μείωσαν σε ποσοστό 27% τον αριθμό των φυματίων σε υδροπονικά αναπτυσσόμενο τριφύλλι (Eberbach and Douglas, 1989) και σε ποσοστό 20% τη δέσμευση αζώτου από ένα βακτήριο εδάφους (Santos and Flores, 1995). Επίσης μειώθηκε σε ποσοστό 10-40% ο αριθμός των βακτηρίων που προκαλούν δέσμευση αζώτου στη σόγια (*Glycine max*) (Moorman *et al.*, 1992).

Εργαστηριακές μελέτες έδειξαν ότι το glyphosate είναι τοξικό και για τα μυκόρριζα τα οποία βοηθούν τα φυτά να απορροφήσουν θρεπτικά στοιχεία και νερό και



μπορούν να τα προστατέψουν από το κρύο και την ξηρασία. Κάποια κωνοφόρα στα οποία έχει εφαρμοστεί το ζιζανιοκτόνο σε πολύ μικρότερες συγκεντρώσεις από τις συνιστώμενες (1 ppm), παρουσίασαν τις σχετικές επιπτώσεις που προκαλούνται από το ζιζανιοκτόνο (Estok and Boyle, 1989; Chacravarty and Sidhu, 1987).

Στις ορχιδέες (*Bletilla striata*), η εφαρμογή του glyphosate μετέβαλε την ωφέλιμη αλληλεπίδραση μεταξύ του φυτού και των μυκορριζών του σε παρασιτισμό (κατά τον οποίο το φυτό δεν ωφελείται, αλλά επιβαρύνεται από τα μυκόρριζα) (Bayne *et al.*, 1995).

Τέλος, η χρήση του glyphosate αυξάνει την ευπάθεια των καλλιεργούμενων ειδών σε κάποιες ασθένειες. Για παράδειγμα αύξησε την ευπάθεια της τομάτας (*Lycopersicum esculentum*) σε ασθένειες της κορυφής και της ρίζας, (Brammall and Higgins, 1988) μείωσε την ικανότητα του φασολιού (*Phaseolus vulgaris*) να αμύνεται εναντίον της ασθένειας ανθράκωση, (Johal and Rahe, 1988) και αύξησε τον πληθυσμό δύο σημαντικών παθογόνων που προσβάλλουν τη ρίζα των μπιζελιών (*Pisum sativum*) (Kawate *et al.*, 1997).

1.2 Η ελιά (*Olea europaea*)

Η ελιά (*Olea europaea*) που ανήκει στην οικογένεια Oleaceae, κατατάσσεται μεταξύ των αρχαιότερων καλλιεργειών στον κόσμο. Το κέντρο καταγωγής της είναι η περιοχή της Μεσογείου όπου εμφανίζει και την μεγαλύτερη διάδοση. Απολιθώματα ελαιόδενδρων που έχουν βρεθεί στο νησί Σαντορίνη χρονολογούνται 50.000 έως 60.000 χρόνια π.Χ. και πυρήνες καλλιεργούμενων ποικιλιών ελιάς που έχουν βρεθεί στον αρχαίο οικισμό Σέσκλου στο νομό Μαγνησίας χρονολογούνται 6.000 χρόνια π.Χ. Υπάρχουν θεωρίες ότι η ελιά κατάγεται από την Μικρά Ασία, την Αίγυπτο και την Αβησσυνία (Ρούμπος Κωνσταντίνος, 2003) καθώς αρχαιολογικά ευρήματα δείχνουν ότι η ζώνη Συρία – Παλαιστίνη είναι τόπος καταγωγής της ελιάς διότι εκεί παρατηρείται η μεγαλύτερη γενετική παραλλακτικότητά της (Zohary and Hopf, 1994; Remesal – Rodriguez, 1996). Αρχαιοβοτανικές μελέτες που έγιναν στη περιοχή της Μεσσηνίας και σε δύο περιοχές της Κρήτης τον Τερσανά Ακρωτηρίου Χανίων και τον Δέλφινο ποταμό (Ανατολικά των Χανίων) χρονολογούν την γύρη που βρέθηκε σε αυτές τις τοποθεσίες στο 7.900π.Χ και 5.500π.Χ αντίστοιχα. Στην Παλαιστίνη, στις ακτές της θάλασσας της Γαλιλαίας βρέθηκε ο αρχαιότερος ελαιοπυρήνας άγριας ελιάς και χρονολογείται στα 19.000 χρόνια (Σαρπάκη – Χατζηδημητρίου 2006). Σήμερα η ελιά έχει εισαχθεί σε πολλές άλλες χώρες όπως αυτές της Βόρειας Αφρικής, της Κίνας, της Ιαπωνίας, της Αμερικής και της Αυστραλίας (Bartanco *et al.*, 1999). Στην Ελλάδα η ελιά είχε ξεχωριστή θέση από την αρχαιότητα και είχε συνδεθεί με τη διατροφή, τη θρησκεία, την υγεία και την τέχνη.

Η ελιά θεωρείται το σημαντικότερο καρποφόρο δέντρο που καλλιεργείται στη χώρα μας, γεγονός που την κατατάσσει τρίτη παγκοσμίως (μετά την Ισπανία και την Ιταλία). Καλλιεργείται στους 50 από τους 54 νομούς της χώρας και κυρίως στην Κρήτη, Πελοπόννησο, τα νησιά του Ιονίου και Αιγαίου Πελάγους. Η συνολική έκταση ελαιοκαλλιέργειας ανερχόταν το 2000 περίπου σε 7.300.000 στρέμματα με 140.900.000 δέντρα (Ποντίκης, 2000). Υπολογίζεται ότι υπάρχουν γύρω στα 130 εκατομμύρια ελαιόδενδρα, 2.800 ελαιοτριβεία, 335 συσκευαστήρια – ραφιναριστήρια – πυρηνελαιουργεία και 80 εργοστάσια επεξεργασίας επιτραπέζιας ελιάς. Ετησίως παράγονται περίπου 300.000 τόνοι ελαιόλαδου άριστης ποιότητας (το 75% είναι της ποιοτικής κατηγορίας «παρθένο»), από το οποίο οι 100.000 τόνοι εξάγονται. Παράγονται επίσης 70.000 τόνοι επιτραπέζιες ελιές από τις οποίες περίπου οι μισές

εξάγονται. Τέλος, παράγονται γύρω στους 25.000 τόνοι πυρηνέλαιο συμμετέχοντας έτσι κάθε χρόνο η ελιά κατά 2% στα συνολικά εθνικά έσοδα και κατά 15% στο εθνικό αγροτικό εισόδημα.

Ο αριθμός των ποικιλιών της ελιάς δεν είναι δυνατόν να προσδιοριστεί επακριβώς πρώτον γιατί ορισμένες ποικιλίες ενώ είναι ίδιες από περιοχή σε περιοχή είναι γνωστές με διαφορετικό όνομα και αντίστροφα διαφορετικές ποικιλίες από περιοχή σε περιοχή είναι γνωστές με το ίδιο όνομα. Εκτός αυτού σημαντικός αριθμός ποικιλιών ελιάς με τοπικό χαρακτήρα παραμένει άγνωστος. Για το σκοπό αυτό στο αγρόκτημα του Αλεξάνδρειου Τεχνολογικού Εκπαιδευτικού Ιδρύματος Θεσσαλονίκης εγκαταστάθηκε η μεγαλύτερη συλλογή ποικιλιών ελιάς στη χώρα μας, στην οποία γίνεται συγκέντρωση όλου του γενετικού υλικού με σκοπό να μελετηθούν οι ποικιλίες με κλασικά μέσα και να ταυτοποιηθούν με μεθόδους μοριακής Βιολογίας, καθώς επίσης να συγκροτηθεί και ο ελαιοκομικός χάρτης της Ελλάδας.

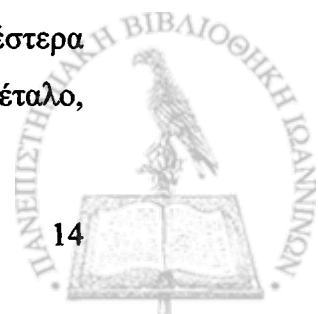
Οι σπουδαιότερες ποικιλίες που καλλιεργούνται στην Ελλάδα είναι η Καλαμών, η Χονδρολιά Χαλκιδικής, η Κορωνέικη και η Αμφίσσης. Από αυτές τις ποικιλίες, η Χονδρολιά Χαλκιδικής καλλιεργείται ευρέως στη βόρεια Ελλάδα (Pritsa and Voyatzis, 1997) και άρχισε πρόσφατα να διαδίδεται σε άλλες χώρες όπως η Ιταλία και η Ισπανία.

Όλες οι καλλιεργούμενες ποικιλίες ανήκουν στο είδος *Olea europaea* L. Οι ποικιλίες που έχουν χαμηλή ελαιοπεριεκτικότητα και υψηλή συγκέντρωση σακχάρων χρησιμοποιούνται κυρίως ως επιτραπέζιες ελιές. Αντίθετα, εκείνες με υψηλή ελαιοπεριεκτικότητα χρησιμοποιούνται για παραγωγή ελαιολάδου (Kiritsakis, 1988).

Η ελαιοκαλλιέργεια διαδραματίζει σημαντικό ρόλο στην αγροτική ανάπτυξη σαν μια από τις κύριες πηγές εισοδήματος και απασχόλησης στις σχετικά ξηρές περιοχές της Μεσογείου (Graaff de and Erpink, 1999). Θα πρέπει να σημειωθεί ότι πολλοί παραγωγοί στηρίζονται στη ελαιοκαλλιέργεια για την επιβίωσή τους (πάνω από 350.000 οικογένειες παράγουν ελαιόλαδο), όπως επίσης και πολλοί άλλοι άνθρωποι, που είναι εργάτες σε ελαιώνες και ελαιοτριβεία. (Kaneilakopoulos and Mitsotakis, 1992).

1.2.1 Βοτανικά και φυσιολογικά χαρακτηριστικά του δένδρου της ελιάς

Η Ελιά είναι αείφυλλο καρποφόρο δένδρο που ονομάζεται συνηθέστερα ελαιόδενδρο. Είναι ανώτερο φυτό, σπερματόφυτο, αγγειόσπερμο, δικότυλο, συμπέταλο,



της τάξεως των Στρεψιανθών και της οικογένειας των Ελαιδών (Oleaceae) η οποία περιλαμβάνει περισσότερα από 25 γένη. Τα χαρακτηριστικά της οικογένειας των Ελαιδών είναι ο μικρός ή ελλείπων κάλυκας, η άστροφη στεφάνη, οι δύο στήμονες, τα συμφυή καρποπέταλα και η δίχωρη ωοθήκη (Μπαλατσούρας, 1994). Τα άνθη απαντούν σε ταξιανθίες βότρυος οι οποίες εμφανίζονται στις μασχάλες των φύλλων βλαστών που διανύουν το δεύτερο έτος της ηλικίας τους ή σπανιότερα σε βλαστούς μεγαλύτερης ηλικίας όταν λανθάνοντες οφθαλμοί διαφοροποιούνται σε ανθοφόρους. Το γένος *Olea* περιλαμβάνει τριάντα είδη από τα οποία μόνο το είδος *Olea europaea* L. παρουσιάζει οικονομικό ενδιαφέρον. Το τελευταίο απαντά υπό δύο παραλλαγές:

- της ήρεμης, τυπικής ή κοινής ελιάς (*Olea europaea* var. *sativa*) και
- της άγριας ελιάς ή αγριελιάς (*Olea europaea* var. *oleaster*) (Ρούμπος, 2000).

Το ελαιόδεντρο είναι το μόνο καρποφόρο δέντρο που θεωρείται αλλά και είναι αιωνόβιο. Κατά τον Hatmann (1976) ζει κατά μέσο όρο χίλια χρόνια και αν συμβεί να ξεραθεί ο κορμός αναφύεται άλλος από τη ρίζα. Τη μακροζωία του οφείλει στους λανθάνοντες οφθαλμούς που δεν απαντούν μόνο στο νέο ξύλο (κλάδοι και κλαδίσκοι), αλλά και στο παλιό (βραχίονες, κορμός) και πολύ περισσότερο στο λαιμό. Οι οφθαλμοί αυτοί εκπτύσσονται είτε αυτόματα είτε με εξαναγκασμό από τον καλλιεργητή και δίνουν βλαστούς για ανανέωση (Μπαλατσούρας, 1992).

Τα φύλλα του είναι μικρά, δερματώδη καλυμμένα με χητίνη (αδιάβροχη ουσία) κατά την άνω επιφάνεια και με στομάτια στην κάτω που είναι πολλά, βαθιά όμως βυθισμένα και με μικρό άνοιγμα. Για το λόγο αυτό το ελαιόδενδρο έχει καταταγεί στα ξηρόφυτα χωρίς αυτό να σημαίνει ότι δεν έχει ανάγκη από αρδεύσεις, δύο ή περισσότερες, για μια ορθολογική εκμετάλλευση των φυτειών του. Τα φύλλα μένουν πάνω στο δένδρο για 2-3 χρόνια και όσα είναι γηρασμένα πέφτουν κατά την άνοιξη (Μπαλατσούρας, 1992).

1.2.3 Τρόποι πολλαπλασιασμού της ελιάς – Μικροπολλαπλασιασμός

Η ελιά πολλαπλασιάζεται σχετικά εύκολα σε σύγκριση με άλλα καρποφόρα δέντρα. Ο κυριότερος τρόπος αγενούς πολλαπλασιασμού είναι με φυλλοφόρα μοσχεύματα και ακολουθούν ο πολλαπλασιασμός με μοσχεύματα σκληρού ξύλου, με γόγγρους, με γροθάρια και με παραφυάδες. Επίσης η ελιά πολλαπλασιάζεται με εμβολιασμό επί σπορόφυτου ή επί κλωνικού υποκειμένου. Οι χρησιμοποιούμενοι

μέθοδοι πολλαπλασιασμού της ελιάς διαφέρουν από περιοχή σε περιοχή στην χώρα μας (Ρούμπος, 2000).

Τα τελευταία χρόνια διαδόθηκε ένας νέος τρόπος αγενούς πολλαπλασιασμού της ελιάς που ονομάζεται μικροπολλαπλασιασμός (Τσαμαρδάς, 2006). Η εφαρμογή του μικροπολλαπλασιασμού ξεκίνησε στα μέσα της δεκαετίας του 1960 με αρχές της δεκαετίας του 1970. Στα μέσα της δεκαετίας του 1970 άρχισε να χρησιμοποιείται σε εμπορικά εργαστήρια – φυτώρια στις Ηνωμένες Πολιτείες, στην Ευρώπη, στην Αυστραλία, στην Ασία και επεκτάθηκε περαιτέρω στα μέσα της δεκαετίας του 1980 (Hartman *et al.*, 1990).

Γενικότερα, μικροπολλαπλασιασμός είναι η τεχνολογία της παραγωγής φυτικού πολλαπλασιαστικού υλικού από πολύ μικρά φυτικά τμήματα στο εργαστήριο (*in vitro*). Τα φυτικά αυτά τμήματα, των οποίων το μέγεθος μπορεί να κυμαίνεται από γυμνούς πρωτοπλάστες και ατομικά κύτταρα, μέχρι και ολόκληρα όργανα όπως ωοθήκες και έμβρυα, καλλιεργούνται και αναπτύσσονται σε ασηπτικές συνθήκες, μέσα σε φιάλες, που περιέχουν ειδικά υποστρώματα. Για την ανάπτυξή τους απαιτούνται ειδικοί θάλαμοι καλλιέργειας, όπου οι κλιματικές συνθήκες (θερμοκρασία, υγρασία, ένταση φωτισμού και φωτοπερίοδος), ελέγχονται απόλυτα (Τσαμαρδάς, 2006). Εφόσον τα νεαρά φυτά φτάσουν στο κατάλληλο στάδιο ανάπτυξης, μεταφέρονται σταδιακά στο φυτώριο για να δεχθούν τις περιποιήσεις ώστε να αναπτυχθούν σε δενδρύλλια για μεταφύτευση. Με τον μικροπολλαπλασιασμό παράγεται σε σχετικά σύντομο χρονικό διάστημα τεράστιος αριθμός φυτών που είναι ελεύθερα από ασθένειες (ιώσεις) και είναι απαράλλακτα όμοια με το μητρικό φυτό από όπου έχουν προέλθει (Κωνσταντίνου, 2008)

Ο μικροπολλαπλασιασμός στα φυτά βασίζεται στην ζυγωτισμός των κυττάρων, δηλαδή την ικανότητα ενός απομονωμένου κυττάρου ή μιας ομάδας κυττάρων να αναγεννήσουν το φαινότυπο του πλήρους και εντελώς διαφοροποιημένου φυτού, από το οποίο προήλθαν (Γρηγοριάδου, 2003).

Όσον αφορά την ελιά, στις αρχές της δεκαετίας του 1990, λίγες μόνο ποικιλίες πολλαπλασιάζονταν *in vitro*, συνήθως από μικρομοσχεύματα προερχόμενα από ενήλικα δέντρα, εξαιτίας προβλημάτων όπως της δυσκολίας διατήρησης αποστειρωμένων καλλιεργειών, της υψηλής οξειδωσης των ιστών κατά την προετοιμασία των μικρομοσχευμάτων και της ιδιαίτερα επίπονης εργασίας, που ήταν αναγκαία στην καλλιέργεια ορισμένων ποικιλιών. Από τα μέσα, όμως, της δεκαετίας του 1990 και



μετά, έγιναν εντυπωσιακά βήματα για την επίλυση των παραπάνω προβλημάτων (Τσαμαρδάς, 2006).



1.3 Φωτοσύνθεση

Η ζωή επάνω στη γη εξαρτάται άμεσα από την ενέργεια που προέρχεται από τον ήλιο. Η φωτοσύνθεση είναι η μοναδική διεργασία βιολογικής σημασίας που μπορεί να αντλήσει αυτή την ενέργεια. Με τον όρο φωτοσύνθεση χαρακτηρίζεται η μετατροπή της ακτινοβόλου ενέργειας σε ελεύθερη χημική ενέργεια. Στα ανώτερα φυτά, ο πλέον ενεργός φωτοσυνθετικός ιστός είναι το μεσόφυλλο. Τα κύτταρα του μεσοφύλλου έχουν πολλούς χλωροπλάστες, οι οποίοι περιέχουν τις εξειδικευμένες φωτο-απορροφητικές πράσινες χρωστικές, τις χλωροφύλλες. Στη φωτοσύνθεση, το φυτό χρησιμοποιεί την ηλιακή ενέργεια για να οξειδώσει το νερό, οπότε απελευθερώνεται οξυγόνο, το οποίο προκαλεί την αναγωγή του διοξειδίου του άνθρακα σε οργανικά συστατικά, κατά κύριο λόγο σάκχαρα. Οι σύμπλοκες σειρές αντιδράσεων που κορυφώνονται στην αντίδραση του CO₂ περιλαμβάνουν τις αντιδράσεις στα θυλακοειδή και τις αντιδράσεις ενσωμάτωσης του άνθρακα (Βαμβαλή, 2007).

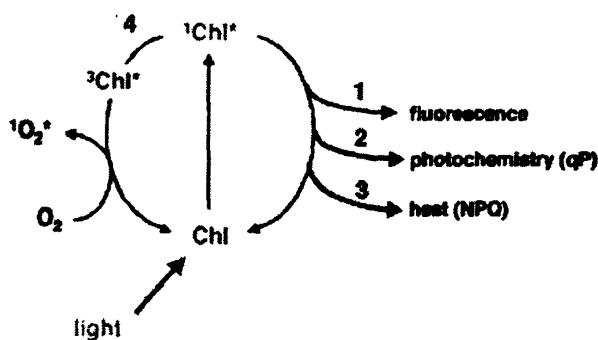
Το πρωταρχικό βήμα της φωτοσύνθεσης είναι η απορρόφηση φωτονίων μέσω των συμπλόκων φωτοσυλλογής, τα οποία αποτελούν τις φωτοσυνθετικές μονάδες. Οι τελευταίες περιέχουν μόρια χλωροφύλλης, φωτοχημικά ενεργά, τα λεγόμενα κέντρα αντίδρασης, και μόρια χλωροφύλλης φωτοχημικά ανενεργά, γνωστά ως μόρια αντέννες, σε μία μέση αριθμητική αναλογία 1:300. Κάθε μόριο χλωροφύλλης των κέντρων αντίδρασης απορροφά ένα φωτόνιο και μεταπίπτει σε μία υψηλότερη κατάσταση ενέργειας, όπως παρουσιάζεται στην ακόλουθη εξίσωση (Τσέκος, 2004).



Απορρόφηση κυανού φωτός διεγείρει τη χλωροφύλλη σε μία υψηλότερη ενεργειακή κατάσταση παρότι η απορρόφηση του ερυθρού φωτός, λόγω του γεγονότος ότι η ενέργεια των φωτονίων είναι μεγαλύτερη όταν το μήκος κύματος είναι βραχύτερο. Στην υψηλότερη διεγερμένη κατάσταση η χλωροφύλλη είναι άκρως ασταθής, αποβάλλει πολύ γρήγορα ορισμένη από την ενέργειά της ως θερμότητα προς τον περιβάλλοντα χώρο και εισέρχεται στη χαμηλότερη διεγερμένη κατάσταση, στην οποία μπορεί να είναι σταθερή για ένα μέγιστο χρόνο αρκετών νανοδευτερολέπτων. Εξαιτίας αυτής της συμφυούς αστάθειας της διεγερμένης κατάστασης, κάθε διεργασία που συλλαμβάνει την ενέργειά της θα πρέπει να είναι ιδιαίτερα γρήγορη (Τσέκος, 2004).

Στη χαμηλότερη διεγερμένη κατάσταση, η διεγερμένη χλωροφύλλη έχει αρκετές εναλλακτικές διαδρομές για την απόδοση της διαθέσιμης ενέργειας. Η χλωροφύλλη μπορεί να επανεκπέμψει ένα φωτόνιο και να επιστρέψει στη βασική της κατάσταση, μία διεργασία γνωστή ως φθορισμός. Όταν πραγματοποιείται φθορισμός, το μήκος κύματος του εκπεμπόμενου φωτονίου είναι μεγαλύτερο από το μήκος κύματος εκείνου που απορροφάται, μιας και είναι γνωστό ότι ένα τμήμα της ενέργειας διέγερσης μετατρέπεται σε θερμότητα προτού εκπεμφθεί το φθορίζον φωτόνιο. Η τελευταία διαπίστωση εξηγεί τη μετατόπιση προς μακρότερο μήκος κύματος και είναι γνωστό ότι οι χλωροφύλλες φθορίζουν στην ερυθρή περιοχή του φάσματος.

Εναλλακτικά, η διεγερμένη χλωροφύλλη μπορεί να επιστρέψει στη βασική της κατάσταση με άμεση μετατροπή της ενέργειας διέγερσης σε θερμότητα, χωρίς να συμβεί εκπομπή ενός φωτονίου μέσω του φαινομένου του φθορισμού. Μια τρίτη διαδικασία που αδρανοποιεί τη διεγερμένη χλωροφύλλη είναι η μεταφορά ενέργειας, κατά την οποία η τελευταία μεταβιβάζει την ενέργειά της σε άλλα μόρια των φωτοσυνθετικών μονάδων των PSI και PSII. Καταληκτικά, η ενέργεια της διεγερμένης κατάστασης μπορεί να αποδοθεί στα μόρια της αλυσίδας μεταφοράς ηλεκτρονίων, συντελώντας με αυτόν τον τρόπο στην μετατροπή της ακτινοβόλου ενέργειας σε χημική, μέσω διαδικασιών που περιλαμβάνονται στον όρο φωτοχημεία (Müller *et al.*, 2001; Τσέκος, 2004) (Σχήμα 1.1).

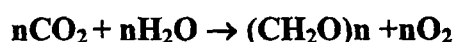


Σχήμα 1.1 Πιθανοί τρόποι απόδοσης της ενέργειας της διεγερμένης χλωροφύλλης (Müller *et al.*, 2001).

Η φωτοσύνθεση είναι μία οξειδοαναγωγική διεργασία που κατευθύνεται από το φως. Η ενέργεια των φωτονίων, η οποία μεταβιβάζεται στο κέντρο αντίδρασης



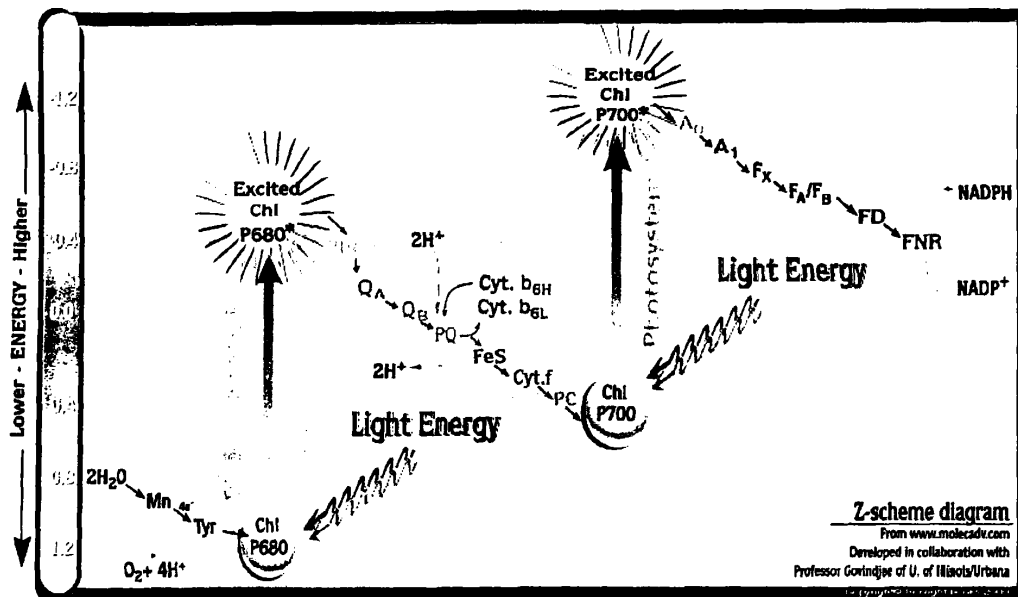
χρησιμοποιείται για την οξείδωση του νερού και την απελευθέρωση του οξυγόνου, ως παραπροϊόντος της προαναφερόμενης διαδικασίας, το οποίο χρησιμοποιείται για την αναγωγή του διοξειδίου του άνθρακα σε οργανικά συστατικά, κυρίως σάκχαρα. Η γενική εξίσωση της φωτοσυνθετικής διαδικασίας είναι η εξής:



Σήμερα είναι γνωστό ότι οι οργανισμοί που παράγουν οξυγόνο έχουν δύο φωτοσυστήματα, το PSI και το PSII, τα οποία λειτουργούν σε σειρά. Η ενέργεια διέγερσης διοχετεύεται από το σύστημα της αντέννας, το οποίο αποτελείται από μία ακολουθία χρωστικών, όπως η χλωροφύλλη a (Chl a), η χλωροφύλλη b (Chl b) και τα καροτενοειδή, με μέγιστα απορρόφησης που σταδιακά μετατοπίζονται προς τα μακρά ερυθρά μήκη κύματος, προς το κέντρο αντίδρασης, το οποίο συνίσταται από ένα σύμπλοκο Chl a και πρωτεϊνών. Στα ανώτερα φυτά, η Chl a και η Chl b βρίσκονται, συνήθως, σε μία αναλογία 3:1. Αξίζει να αναφερθεί ότι στους συγκεκριμένους οργανισμούς η κύρια φωτοσυνθετική χρωστική είναι η Chl a, ενώ η Chl b και τα καροτενοειδή αποτελούν τις βοηθητικές χρωστικές. Οι διάφοροι τύποι καροτενοειδών απαντώνται σε όλους τους φωτοσυνθετικούς οργανισμούς και λειτουργούν τόσο ως συμπληρωματικές χρωστικές όσο και ως φωτοπροστατευτικοί παράγοντες (Τσέκος, 2004). Στο PSI η ιδιαίτερη μορφή της Chl a έχει μέγιστο απορρόφησης στα 700 nm και είναι γνωστή ως P700, ενώ η ανάλογη μορφή της ίδιας χρωστικής του PSII παρουσιάζει μέγιστο απορρόφησης στα 680 nm, και ονομάζεται P680, αντιστοίχως. Η απορρόφηση φωτονίων και η μετάβαση της Chl a από τη βασική στη διεγερμένη κατάσταση φαίνεται στην εικόνα που ακολουθεί, η οποία παρουσιάζει το γνωστό σχήμα Z της φωτοσύνθεσης.

Το ερυθρό φως απορροφώμενο από το PSII παράγει ένα ισχυρό οξειδωτικό σώμα και ένα ασθενές αναγωγικό σώμα, σε αντίθεση με το υπέρυθρο φως που όταν απορροφάται από το PSI παράγει ένα ασθενές οξειδωτικό και ένα ισχυρό αναγωγικό σώμα. Το ισχυρό οξειδωτικό σώμα που παράγεται από το PSII οξειδώνει το νερό, ενώ το ισχυρό αναγωγικό σώμα που παράγεται από το PSI ανάγει το NADP^+ . Συγχρόνως, τα ασθενή αναγωγικά και ασθενή οξειδωτικά σώματα των PSII και PSI χρησιμεύουν για την αναγωγή και την οξείδωση, αντίστοιχα, του κυτοχρώματος-*b₆f*-σμπλόκου, το οποίο αποτελεί βασικό τμήμα της αλυσίδας μεταφοράς ηλεκτρονίων. Με τον τρόπο

αυτό το σχήμα Z εξηγεί τη λειτουργία των δύο από φυσική και χημική άποψη διακριτών φωτοσυστημάτων, τα οποία συντελούν στην πραγματοποίηση των κατευθυνόμενων από το φως χημικών αντιδράσεων της φωτοσύνθεσης, οι οποίες είναι γνωστές ως αντιδράσεις των θυλακοειδών, και συνδέονται στην αλυσίδα μεταφοράς ηλεκτρονίων (Τσέκος, 2004).



Εικόνα 1.1 Το σχήμα Z της φωτοσύνθεσης

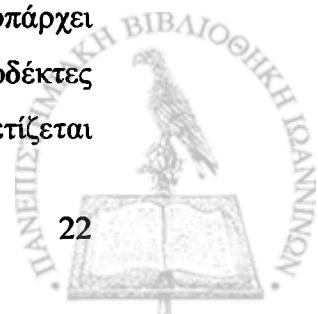
1.3.1 Ο φθορισμός της χλωροφύλλης στη μελέτη της φωτοσύνθεσης

Όπως έχει ήδη αναφερθεί, όταν ένα φωτόνιο απορροφάται από ένα μόριο χλωροφύλλης, ωθεί ένα ηλεκτρόνιο από την κανονική κατάσταση σε μία διεγερμένη. Κατά την αποδιέγερση της Chl^* , ένα μικρό ποσοστό της ενέργειας αποδιέγερσης, περίπου το 0.5-3.5%, καταναλώνεται σε μη φωτοχημικές διαδικασίες (Maxwell and Johnson, 2000). Κάτω από άριστες συνθήκες φωτισμού και σε θερμοκρασία δωματίου, περίπου το 97% της ενέργειας των απορροφώμενων φωτονίων χρησιμοποιείται φωτοχημικά, το 2.5% μετατρέπεται σε θερμότητα, ενώ μόνο το 0.5% της ενέργειας αποδιέγερσης εκπέμπεται ως φθορισμός στην ερυθρή περιοχή του φάσματος (Maxwell and Johnson, 2000; Müller *et al.*, 2001). Λόγω του γεγονότος ότι πρόκειται για τρεις ανταγωνιστικές διαδικασίες, προκύπτει ότι η μέτρηση της απόδοσης του φθορισμού παρέχει σημαντικές πληροφορίες για τις αλλαγές στο επίπεδο της ενέργειας

αποδιέγερσης που χρησιμοποιείται στη φωτοχημεία, καθώς και για εκείνες του επιπέδου της ενέργειας που μετατρέπεται σε θερμότητα (Maxwell and Johnson, 2000). Το φάσμα του φθορισμού διαφέρει από εκείνο της απορρόφησης και παρατηρείται εκπομπή φθοριζόντων φωτονίων σε ένα μήκος κύματος μακρότερο από εκείνο στο οποίο συντελέστηκε η απορρόφηση. Συνεπώς, η απόδοση του φθορισμού είναι δυνατό να υπολογισθεί εκθέτοντας ένα φύλλο σε φως ορισμένου μήκους κύματος και μετρώντας, στη συνέχεια, την ένταση του φωτός που επανεκπέμπεται σε ένα μετατοπισμένο μήκος κύματος (van Kooten and Snell, 1990; Maxwell and Johnson, 2000). Αξίζει να αναφερθεί ότι πρόκειται για σχετικές μετρήσεις μιας και η πιθανή απώλεια φωτός δεν είναι δυνατό να αποφευχθεί, με αποτέλεσμα να κρίνεται απαραίτητος ο υπολογισμός μιας σειράς παραμέτρων του φθορισμού προκειμένου να είναι δυνατή η σύγκριση της φωτοσυνθετικής ικανότητας των φυτών διαφορετικών γενοτύπων (Maxwell and Johnson, 2000).

Το φαινόμενο Kautsky, γνωστό και ως φαινόμενο των μεταβατικών επιπέδων του φθορισμού, παρατηρήθηκε κατά την μεταφορά φωτοσυνθετικού υλικού από το σκοτάδι στο φως ως μία αύξηση της απόδοσης του φθορισμού της χλωροφύλλης για χρονικό διάστημα περίπου ενός δευτερολέπτου, η οποία έχει διαπιστωθεί ότι οφείλεται στην αναγωγή των αποδεκτών των ηλεκτρονίων στο φωτοσυνθετικό μονοπάτι του PSII, και ιδιαίτερα στην αναγωγή του αποδέκτη Q_A της πλαστοκινόνης (PQ). Μόλις το PSII απορροφήσει ακτινοβολία ενέργεια η Q_A δέχεται ένα ηλεκτρόνιο και ανάγεται. Η τελευταία δεν είναι σε θέση να δεχθεί δεύτερο προτού το ήδη υπάρχον ηλεκτρόνιο περάσει στον επόμενο αποδέκτη της αλυσίδας μεταφοράς ηλεκτρονίων, την Q_B . Κατά τη διάρκεια της συγκεκριμένης περιόδου το κέντρο αντίδρασης του PSII χαρακτηρίζεται ως «κλειστό». Σε κάθε χρονική στιγμή, η παρουσία ενός ποσοστού κλειστών κέντρων αντίδρασης οδηγεί σε μία γενική ελάττωση την φωτοχημικής ικανότητας του PSII, γεγονός το οποίο οδηγεί σε μία αντίστοιχη αύξηση της απόδοσης του φθορισμού (Maxwell and Johnson, 2000).

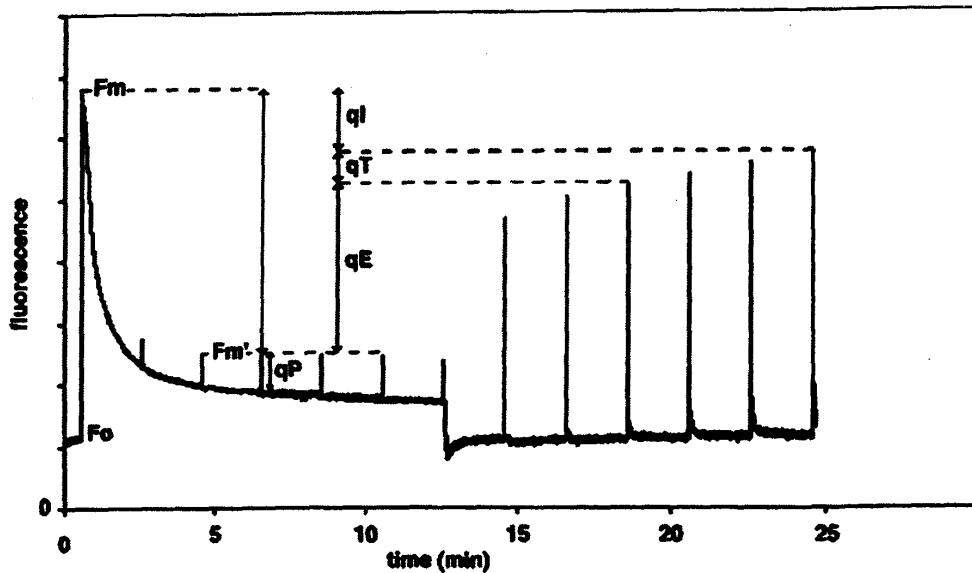
Όταν ένα φύλλο μεταφέρεται από το σκοτάδι στο φως τα κέντρα αντίδρασης του PSII προοδευτικά κλείνουν. Το γεγονός αυτό ακολουθείται από μία αύξηση του επιπέδου της απόδοσης του φθορισμού της χλωροφύλλης, το οποίο, όμως, μετά το πέρας μερικών λεπτών αρχίζει να ελαττώνεται. Το φαινόμενο αυτό, το οποίο καλείται απόσβεση του φθορισμού, μπορεί να εξηγηθεί με δύο τρόπους: πρωταρχικά, υπάρχει μία αύξηση του ρυθμού με τον οποίο τα ηλεκτρόνια μεταφέρονται σε μόρια αποδέκτες του PSII στην αλυσίδα μεταφοράς ηλεκτρονίων. Το συγκεκριμένο γεγονός σχετίζεται



με την φωτοεπαγόμενη ενεργοποίηση ενζύμων που σχετίζονται με το μεταβολισμό του άνθρακα και το άνοιγμα των στομάτων, και είναι γνωστό ως φωτοχημική απόσβεση του φθορισμού (qP). Συγχρόνως, παρατηρείται αύξηση της ικανότητας με την οποία η απορροφώμενη ενέργεια μετατρέπεται σε θερμότητα, φαινόμενο το οποίο καλείται μη-φωτοχημική απόσβεση του φθορισμού (qN) (Maxwell and Johnson, 2000). Σε ένα τυπικό φυτό, οι αλλαγές στις δύο προαναφερόμενες διαδικασίες συμπληρώνονται σε ένα χρονικό διάστημα 15-20 λεπτών με την επίτευξη μιας περίπου σταθερής κατάστασης φθορισμού, αν και το χρονικό διάστημα που μεσολαβεί μέχρι να επιτευχθεί η προαναφερόμενη κατάσταση είναι δυνατό να ποικίλλει μεταξύ διαφορετικών φυτικών ειδών (Johnson *et al.*, 1993).

Στη συνέχεια παρατίθεται ένα παράδειγμα της απόσβεσης του φθορισμού της χλωροφύλλης (Σχήμα 1.2). Προκειμένου να εκτιμηθεί η φυσιολογική σημασία της απόσβεσης του φθορισμού καθίσταται αναγκαία η αποτίμηση των επιμέρους διεργασιών που συμβάλλουν στην προαναφερόμενη διαδικασία. Εκτός από την φωτοχημική απόσβεση (qP), ιδιαίτερα σημαντικό ρόλο στο συγκεκριμένο φαινόμενο διαδραματίζει η μη-φωτοχημική απόσβεση του φθορισμού (qN). Στην τελευταία συνεισφέρουν διακριτές διαδικασίες, η μελέτη των οποίων κρίνεται απαραίτητη προκειμένου να αποτιμηθεί η συμβολή αυτής στην απόσβεση του φθορισμού της χλωροφύλλης.

Η κύρια και ταχύτερα επαγόμενη από τον φωτισμό συνιστώσα της μη-φωτοχημικής απόσβεσης του φθορισμού είναι η εξαρτώμενη από την ενέργεια απόσβεση (qE), η οποία απαιτεί την παρουσία χαμηλού pH στο χώρο εσωτερικά του θυλακοειδούς και θεωρείται ιδιαίτερα σημαντική στην προστασία του φύλλου από τις φωτοεπαγόμενες βλάβες (Horton *et al.*, 1996; Maxwell and Johnson, 2000). Μία δεύτερη συνιστώσα της μη-φωτοχημικής απόσβεσης είναι η κατάσταση μεταβατικού φθορισμού (qT), η οποία εμπλέκεται σε αντιστρεπτές φωσφορυλιώσεις πρωτεϊνών και θεωρείται σημαντική για την ισορροπημένη διανομή της ακτινοβόλου ενέργειας μεταξύ των PSII και PSI σε συνθήκες χαμηλού φωτισμού, αν και συνεισφέρει ελάχιστα στη συνολική απόσβεση του φθορισμού (Walters and Horton, 1991). Την τελευταία συνιστώσα της μη-φωτοχημικής απόσβεσης αποτελεί η φωτοανασταλτική απόσβεση (qI), η οποία αναφέρεται τόσο σε προστατευτικές διαδικασίες όσο και στις βλάβες των ενεργών



Σχήμα 1.2 Μέτρηση του φθορισμού της χλωροφύλλης σε φύλλο *Arabidopsis*. Φωτισμός του ιστού με διαμορφωμένη δέσμη φωτός χαμηλής έντασης επιτρέπει τη μέτρηση της ελάχιστης έντασης του φθορισμού (F_o). Στη συνέχεια ακολουθεί φωτισμός με κορεσμένη δέσμη φωτός, η οποία επιτρέπει τη μέτρηση της μέγιστης έντασης του φθορισμού (F_m). Ύστερα από τον συνεχή φωτισμό με προσαρμοσμένη δέσμη φωτός ($750 \mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$) η απόδοση του φθορισμού ελαττώνεται λόγω της συνεισφοράς της φωτοχημικής (q_P) και της μη-φωτοχημικής απόσβεσης (q_N). Η q_N αποτελεί το άθροισμα των q_E , q_T και q_I , και ισούται με τη διαφορά μεταξύ F_m και F_m' . Ύστερα από την παύση του φωτισμού, η τιμή F_m' επανέρχεται στο πρότερο επίπεδο της (Müller *et al.*, 2001).

κέντρων του PSII (Osmond, 1994), αν και τελευταία έχει επικρατήσει να αναφέρεται ως φωτοαναστολή η δεύτερη διαδικασία (Maxwell and Johnson, 2000).

Όπως προκύπτει από τα προαναφερόμενα στοιχεία, ο φθορισμός της χλωροφύλλης μπορεί να χρησιμοποιηθεί προκειμένου να μελετηθεί η λειτουργία του PSII και να εξαχθούν σημαντικές πληροφορίες για την κατάσταση στην οποία βρίσκεται το συγκεκριμένο φωτοσύστημα. Η μέθοδος του φθορισμού της χλωροφύλλης είναι δυνατό να μας πληροφορήσει για το ποσοστό της απορροφώμενης από την χλωροφύλλη ενέργειας την οποία το PSII χρησιμοποιεί για φωτοχημικές διαδικασίες, καθώς επίσης και για την έκταση της βλάβης που προκύπτει από τον έντονο φωτισμό (Maxwell and Johnson, 2000). Συγχρόνως, λόγω του γεγονότος ότι η ροή των ηλεκτρονίων διαμέσου του PSII είναι ενδεικτική του συνολικού ρυθμού της φωτοσύνθεσης, μιας κι έχει δειχθεί ότι είναι ανάλογη του ρυθμού μεταβολισμού του



άνθρακα (Genty *et al.*, 1989; Edwards and Baker, 1993), είναι δυνατό να υπολογισθεί η φωτοσυνθετική ικανότητα κάτω από διάφορες περιβαλλοντικές συνθήκες (Maxwell and Johnson, 2000). Μία επιπρόσθετη εφαρμογή του φθορισμού αφορά τον έλεγχο της ικανότητας εγκλιματισμού των φυτών σε διαφορετικά περιβάλλοντα και την ικανότητα αυτών να ανέχονται ποικίλους παράγοντες καταπόνησης, παρέχοντας σημαντικές πληροφορίες για την έκταση της βλάβης που προκλήθηκε στη φωτοσυνθετική συσκευή από εφαρμοζόμενη καταπόνηση.

1.4 Σκοπός της εργασίας

Η εργασία αυτή στηρίχθηκε σε παρατηρήσεις που έγιναν στον αγρό και αφορά τα συμπτώματα που προκαλεί το ζιζανιοκτόνο glyphosate στο δένδρο της ελιάς (*Olea europaea*). Στην περιοχή του ανατολικού Πηλίου όπου η ξυλώδης ανεπιθύμητη βλάστηση είναι έντονη οι ελαιοκαλλιεργητές χρησιμοποιούν glyphosate (Roundup) σε υψηλές συγκεντρώσεις (47.32mM glyphosate ή 400ml Roundup σε 18lt νερού) για την καταπολέμηση των ξυλωδών κυρίως ζιζανίων (κουτσουπιές, κουμαριές, κότινος, αριός, ερείκη κ.τ.λ.).

Κατά την εφαρμογή αυτού του ισχυρού ψεκαστικού υλικού η παραμικρή διαφυγή στα ελαιόδενδρα προκαλεί συμπτώματα σαν αυτά που απεικονίζονται στις εικόνες 1.2, 1.3, 1.4. Προκαλεί στην ελιά αλλά και σε ορισμένα ξυλώδη φυτά έκπτυξη των πλαγίων οφθαλμών ακολουθούμενη από αναστολή του νέου κορυφαίου οφθαλμού και διαδοχική έκπτυξη πλαγίων με αποτέλεσμα το σύνολο των βλαστηνόντων οφθαλμών να παίρνει την μορφή ροζέτας (Ρούμπος Κων/νος – προσωπική επικοινωνία). Τα παραπάνω συμπτώματα οδήγησαν στη διεξαγωγή αυτής της εργασίας όπου μελετήθηκαν η πιθανή δράση του ζιζανιοκτόνου ως αυξητική ορμόνη και η επίδραση που έχει στη λειτουργία της φωτοσύνθεσης εφαρμόζοντας τη μέθοδο της ιστοκαλλιέργειας σε συνδυασμό με τη μέθοδο της απεικόνισης του φθορισμού της χλωροφύλλης σε μικρομοσχεύματα *Olea europaea* που βρίσκονταν στο στάδιο του πολλαπλασιασμού. Επίσης διερευνήθηκε εάν τα συμπτώματα που παρατηρούνται *in vivo* επαναλαμβάνονται με τον ίδιο τρόπο *in vitro*.



Εικόνα 1.2 Επίδραση διαφεύγοντος ψεκαστικού υλικού συγκέντρωσης 47.32mM glyphosate σε *Olea europaea* ποικιλία Αμφίσσης και ηλικίας 20 ετών, στην περιοχή του ανατολικού Παρτηρείται διαδοχική έκπτυξη λανθανόντων και κανονικών οφθαλμών σε μορφή ροζέτας.
Πηγή: Ρούμπος Κωνσταντίνος



Εικόνα 1.3 Επίδραση διαφεύγοντος ψεκαστικού υλικού συγκέντρωσης 47.32mM glyphosate σε *Argutus unedo* στην περιοχή του ανατολικού Πηλίου.
Πηγή: Ρούμπος Κωνσταντίνος

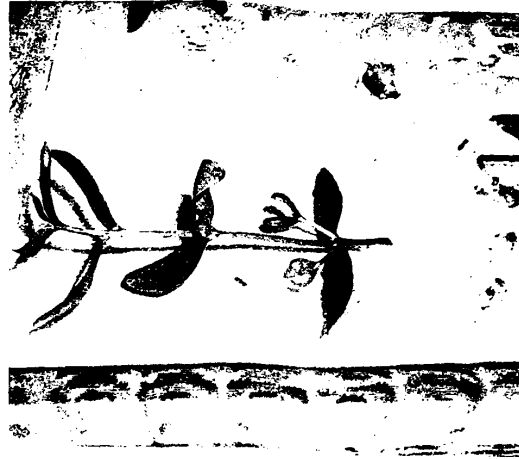
2. ΥΛΙΚΑ ΚΑΙ ΜΕΘΟΔΟΙ ΕΡΓΑΣΙΑΣ

2.1 Τόπος εκτέλεσης των πειραμάτων

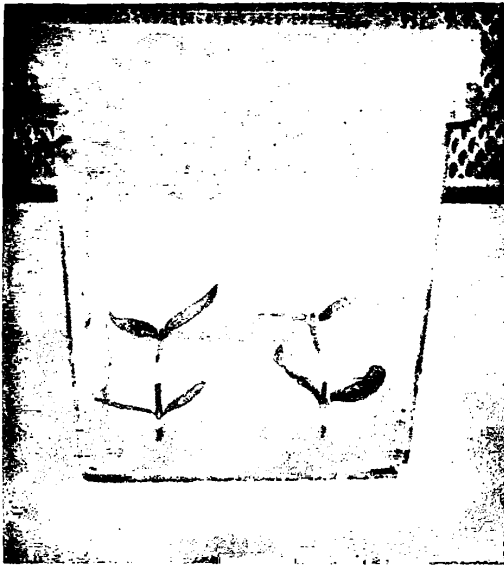
Τα πειράματα που σχετίζονται με τον μικροπολλαπλασιασμό πραγματοποιήθηκαν στον εργαστήριο Γενετικής της σχολής Δασολογίας του Αριστοτελείου Πανεπιστημίου Θεσσαλονίκης ενώ τα πειράματα που σχετίζονται με την απεικόνιση του φθορισμού της χλωροφύλλης πραγματοποιήθηκαν στο εργαστήριο Βοτανικής του τμήματος Βιολογίας του Αριστοτελείου Πανεπιστημίου Θεσσαλονίκης. Επίσης προκαταρκτικά πειράματα που αφορούσαν την κοπή και ριζοβολία φυλλοφόρων μοσχευμάτων *Olea europaea* καθώς και τον ψεκασμό τριών ποικιλιών ελαιοδένδρων (Αμφίσης, Μεγαρείτικης και Χονδρολιά Χαλκιδικής) με το ζιζανιοκτόνο σκεύασμα Roundup έγιναν στο αγρόκτημα του Αλεξάνδρειου Τεχνολογικού Εκπαιδευτικού Ιδρύματος Θεσσαλονίκης

2.2 Γενετικό υλικό που χρησιμοποιήθηκε στον μικροπολλαπλασιασμό

Η *in vitro* καλλιέργεια ξεκίνησε με μικρομοσχεύματα ελιάς ποικιλίας, Χονδρολιά Χαλκιδικής, τα οποία χορήγησε η εταιρεία *Vitro Hellas* που εδρεύει στο Νησέλι Ημαθίας. Το κάθε μικρομόσχευμα αποτελούνταν αρχικά από ένα γόνατο. Στην ελιά παρατηρείται έντονα το φαινόμενο της κυριαρχίας της κορυφής και αυτό επηρεάζει άμεσα τον τρόπο αύξησης των βλαστών της. Τα μικρομοσχεύματα που αναπτύχθηκαν (εικόνα 2.1) χωρίστηκαν σε περισσότερα τμήματα, με ένα γόνατο το καθένα και μεταφέρθηκαν σε νέα δοχεία ιστοκαλλιέργειας (εικόνα 2.2). Τα νέα μοσχεύματα αναπτύχθηκαν και αυτά με τη σειρά τους και η διαδικασία αυτή, του πολλαπλασιασμού, συνεχίστηκε μέχρι να δημιουργηθεί ο απαιτούμενος αριθμός βλαστών για την πραγματοποίηση των πειραμάτων. Από κάθε αρχικό μικρομόσχευμα επιτρέπονταν μέχρι 10 - 12 υποκαλλιέργειες. Ο χρόνος διάρκειας κάθε υποκαλλιέργειας ήταν 45 - 60 ημέρες.



Εικόνες 2.1 Ανεπτυγμένοι μικροβλαστοί *Olea europaea* ποικιλίας Χονδρολιά Χαλκιδικής, κατάλληλα διαχωριστούν σε νέα μικρομοσχεύματα για περαιτέρω πολλαπλασιασμό.



Εικόνα 2.2 Μεταφορά των μικρομοσχευμάτων *Olea europaea* ποικιλίας Χονδρολιά Χαλκιδικής δοχείο ιστοκαλλιέργειας με κατάλληλο θρεπτικό υπόστρωμα έτσι ώστε να εξελιχθούν σε μικροβλαστοί και να δώσουν νέο πολλαπλασιαστικό υλικό.

2.3 Προετοιμασία θρεπτικού υποστρώματος

Για την ανάπτυξη των μικρομοσχευμάτων χρησιμοποιήθηκε το WPM (Lio and McCown, 1980,) (πίνακας 2.1) ως θρεπτικό υπόστρωμα με προσθήκη 2% (w/v) σακχαρόζη, 0.71% (w/v) άγαρ, 7μM ζεατίνη (Zt), 1μM 6 - βενζύλ - αμινοπουρίνη (B. (Dimassi-Theriou, 1994; Grigoriadou *et al.*, 2002). Η τιμή του pH ρυθμίστηκε στα 5.5 και ακολούθησαν η προσθήκη του άγαρ και η αποστείρωση του υποστρώματος. Η ζεατίνη, λόγω της ευαισθησίας που παρουσιάζει σε υψηλές θερμοκρασίες, προστέθη

στο υπόστρωμα μετά την αποστείρωσή του, όταν η θερμοκρασία του κατέβηκε περίπου στους 40-45°C, μέσα στην τράπεζα με ειδικά φίλτρα αποστείρωσης. Όλες οι υποκαλλιέργειες διατηρήθηκαν σε θάλαμο ανάπτυξης θερμοκρασίας 27±1°C, ένταση φωτός 35 $\mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$ και φωτοπερίοδου 16 h.

Πίνακας 2.1 Αναλυτική σύνθεση του θρεπτικού υποστρώματος WPM (Lloyd & McCown 1980) που χρησιμοποιήθηκε για την *in vitro* καλλιέργεια

| Σύσταση | mg/l |
|--|------|
| <i>Μακροστοιχεία</i> | |
| NH ₄ NO ₃ | 400 |
| Ca(NO ₃) ₂ ·4H ₂ O | 556 |
| K ₂ SO ₄ | 990 |
| MgSO ₄ ·7H ₂ O | 370 |
| KH ₂ PO ₄ | 170 |
| CaCl ₂ ·2H ₂ O | 96 |
| <i>Μικροστοιχεία</i> | |
| Na ₂ EDTA·2H ₂ O | 37.3 |
| FeSO ₄ ·7H ₂ O | 27.8 |
| MnSO ₄ ·4H ₂ O | 22.3 |
| ZnSO ₄ ·7H ₂ O | 8.6 |
| H ₃ BO ₃ | 6.2 |
| Na ₂ MoO ₄ ·2H ₂ O | 0.25 |
| CuSO ₄ ·5H ₂ O | 0.25 |
| <i>Βιταμίνες</i> | |
| Θειαμίνη HCl | 10 |
| Νικοτινικό οξύ | 1 |
| Πυριδοσίνη HCl | 1 |
| Γλυκίνη | 2 |
| Myo-Inositol | 100 |

2.4 Προσθήκη του glyphosate στο θρεπτικό υπόστρωμα των μικρομοσχευμάτων *Olea europaea*

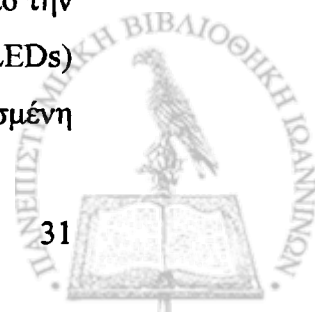
Σ' αυτό το πείραμα εφαρμόστηκε το πλήρες τυχαιοποιημένο σχέδιο. Για κάθε μεταχείριση χρησιμοποιήθηκαν 5 δοχεία ιστοκαλλιέργειας που το καθένα περιείχε 4 μικρομοσχεύματα ελιάς με 1 γόνατο. Οι μεταχειρίσεις αφορούσαν διαφοροποιήσεις στη σύσταση του θρεπτικού υποστρώματος. Το πείραμα περιελάμβανε τις εξής μεταχειρίσεις:

- Θρεπτικό υπόστρωμα WPM με προσθήκη ρυθμιστών της αύξησης και glyphosate σε συγκεντρώσεις: 0.0425mM, 0.425mM, 0.85mM
- Θρεπτικό υπόστρωμα WPM χωρίς ρυθμιστές της αύξησης και glyphosate στις ίδιες ως προηγουμένως συγκεντρώσεις: 0.0425mM, 0.425mM, 0.85mM
- Θρεπτικό υπόστρωμα WPM με προσθήκη ρυθμιστών της αύξησης χωρίς glyphosate (μάρτυρας)
- Θρεπτικό υπόστρωμα WPM χωρίς ρυθμιστές της αύξησης και χωρίς glyphosate

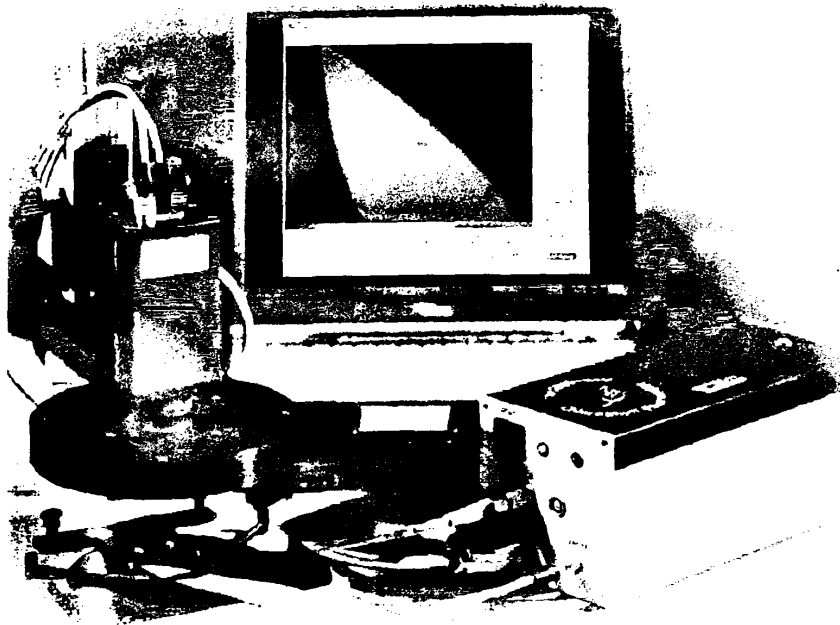
Η καταγραφή των αποτελεσμάτων έγινε από την έναρξη των πρώτων συμπτωμάτων έως και 60 ημέρες μετά την εγκατάσταση των μικρομοσχευμάτων στα τροποποιημένα θρεπτικά υποστρώματα. Οι μετρήσεις περιελάμβαναν το μήκος μικρομοσχευμάτων, τον αριθμό μοκροβλαστών ανά μόσχευμα, το ποσοστό μικρομοσχευμάτων με διαφοροποιημένο κάλο και οπτικές παρατηρήσεις των συμπτωμάτων των μικρομοσχευμάτων λόγω επίδρασης του glyphosate.

2.5 Απεικόνιση του φθορισμού της χλωροφύλλης σε μικρομοσχεύματα *Olea europaea* που έχουν υποστεί επίδραση glyphosate

Η λήψη των εικόνων των παραμέτρων φθορισμού χλωροφύλλης έγινε με τη χρήση του φθορισμόμετρου imaging-PAM (Walz, Effeltrich, Γερμανία) (εικόνα 2.3). Οι δίοδοι φωτός ήταν τοποθετημένοι σε κυκλική διάταξη και σε σταθερή απόσταση από την περιοχή του φύλλου. Οι δύο εξωτερικοί κύκλοι (συνολικά 96 δίοδοι φωτός, LEDs) παρείχαν δέσμη φωτός χαμηλής έντασης, δέσμη ακτινικού φωτός καθώς και κορεσμένη



παλμική δέσμη με μέγιστο μήκος κύματος στα 470nm. Ο εσωτερικός κύκλος (συνολικά 16 δίοδοι φωτός, LEDs) παρείχε τη διαμορφωμένη δέσμη φωτός για την εκτίμηση της απορρόφησης της φωτοσυνθετικά ενεργής ακτινοβολίας (PAR) σε μήκη κύματος 650nm και σε 780nm. Η μηχανή λήψης και ψηφιοποίησης εικόνας (CCD κάμερα) είχε ανάλυση 640 X 480 εικονοστοιχεία (pixel). Η ανάλυση των εικόνων των παραμέτρων φθορισμού έγινε με τη βοήθεια μιας χρωματικής κλίμακας που κυμαίνεται από το μαύρο (τιμή εικονοστοιχείου 0.000) και μέσω του κόκκινου, κίτρινου, πράσινου, και μπλε φθάνει στο ροζ (τελειώνοντας με τιμή εικονοστοιχείου σε 0.999). Όλες οι μετρήσεις πραγματοποιήθηκαν σε μια περιοχή δείγματος 17x22 mm. Τα φύλλα των μικρομοσχευμάτων της *Olea europaea* έμειναν στο σκοτάδι για 15min πριν από τη μέτρηση. Πάνω στο φύλλο επιλέχθηκαν πέντε περιοχές ενδιαφέροντος (Π.Ε), μία στο κέντρο του φύλλου, δύο στο εξωτερικό τμήμα του μπροστινού μέρους και δύο στο εξωτερικό τμήμα του πίσω μέρους του φύλλου προκειμένου να αξιολογηθεί η χωρική ετερογένεια. Στην έναρξη κάθε μέτρησης το φύλλο εκτέθηκε σε δέσμη φωτός χαμηλής έντασης και συχνότητας διαμόρφωσης 2 Hz για τον προσδιορισμό του F_0 (ελάχιστος φθορισμός στο σκοτάδι). Στη συνέχεια κορεσμένη παλμική δέσμη (800ms) λευκού φωτός ($2400 \mu\text{mol photons m}^{-2}\text{sec}^{-1}$) εφαρμόστηκε για να καθοριστεί το F_m (μέγιστος φθορισμός στο σκοτάδι). Η μέγιστη απόδοση φωτονίων (F_v/F_m) καθορίστηκε ως $F_m - F_0/F_m$. Ο προσδιορισμός των παραμέτρων φθορισμού έγινε σε ένταση $46 \mu\text{mol photons m}^{-2}\text{sec}^{-1}$ που εφαρμόστηκαν για 5 λεπτά και η αποθήκευση των αντίστοιχων τιμών έγινε σε χρόνο 2 και 5 λεπτών. Καθορίστηκε ο μέγιστος φθορισμός κατά τη διάρκεια του ακτινικού φωτισμού (F_m') και ο φθορισμός χλωροφύλλης κατά τη διάρκεια του ακτινικού φωτισμού (F_s).



Εικόνα 2.3 Φθορισμόμετρο imaging-PAM (Walz, Effeltrich, Γερμανία)

Η απόδοση φωτονίων (Φ_{PSII}) μετράει το ποσοστό της απορροφούμενης από τη χλωροφύλλη ενέργειας την οποία το φωτοσύστημα II (PSII) χρησιμοποιεί για φωτοχημικές διαδικασίες και υπολογίστηκε ως $F_m - F_s / F_m$. Η φωτοχημική απόσβεση, q_p , είναι ένα μέτρο του μέρους των ανοιχτών κέντρων αντίδρασης του PSII και υπολογίστηκε ως $(F_m - F_s) / (F_m - F_o')$ (Gentry et al 1989). Για να καθορισθεί το F_o' σωστά, θα ήταν απαραίτητο να σταματήσει η επίδραση της δέσμης ακτινικού φωτός και να επαναοξειδωθεί το PSII με τη βοήθεια υπέρυθρου φωτός (μήκος κύματος $\lambda > 700$ nm), αλλά αυτό δεν είναι εφικτό με το imaging-PAM δεδομένου ότι το υπέρυθρο φως θα διαπερνούσε τον ανιχνευτή της CCD κάμερας και θα προκαλούσε σοβαρές αλλοιώσεις στις εικόνες φθορισμού (Calatayud et al 2006). Η τιμή του F_o' υπολογίστηκε χρησιμοποιώντας την προσέγγιση του Oxborough και Baker (1997) $F_o' = F_s / (F_s / F_m + F_s / F_m)$. Η παράμετρος q_L υπολογίζει το τμήμα των ανοιχτών κέντρων αντίδρασης του PSII βασισμένη στο μοντέλο «λιμνών» για το φωτοσύστημα II και υπολογίστηκε ως $(F_m - F_s / F_m - F_o') (F_o' / F_s)$ (Kramer et al 2004).

Η παράμετρος NPQ που υπολογίστηκε ως $(F_m - F_m') / F_m'$ μετράει τη μη-φωτοχημική απόσβεση που αντιπροσωπεύει το διασκεδάσμο θερμότητας της ενέργειας



διέγερσης στο φωτοσυλλεκτικό σύμπλοκο. Η απόδοση φωτονίων που χάνεται λόγω μη φωτοχημικής απόσβεσης και οφείλεται σε μειωμένη ρύθμιση στο PSII (Φ_{NPQ}) υπολογίστηκε από την εξίσωση $\Phi_{NPQ}=1-\Phi_{II}-1/NPQ+1+q_L(F_m/F_o-1)$ και η παράμετρος Φ_{NO} , δηλαδή η απόδοση φωτονίων που χάνεται για άλλες μη φωτοχημικές διαδικασίες στο PSII, υπολογίστηκε ως $1/(NPQ + 1 + q_L (F_m/F_o - 1))$ (Kramer et al., 2004).

Οι παράμετροι του φθορισμού χλωροφύλλης F_v/F_m , Φ_{PSII} , NPQ, q_P , q_L , q_N , Φ_{NPQ} , Φ_{NO} , και $1-q_P$ υπολογίστηκαν:

- ο σε φυτά μάρτυρες,
- ο σε φυτά που είχαν υποστεί επίδραση glyphosate ενσωματωμένο στο θρεπτικό υπόστρωμα σε συγκεντρώσεις 0.425 και 0.85mM για 7, 8 και 12 ημέρες και
- ο σε φυτά που είχαν υποστεί επίδραση glyphosate ψεκασμένο στη φυλλική επιφάνεια σε συγκέντρωση 3.9mM για 24, 48, 72, 96 και 120 ώρες.



Εικόνα 2.4 Μικροβλαστοί *Olea europaea* ποικιλίας Χονδρολιά Χαλκιδικής που βρίσκονται μέσα στο δοχείο Ιστοκαλλιέργειας και έχουν ψεκαστεί με glyphosate σε συγκέντρωση 3.9mM για να ακολουθήσει η μέτρηση του φθορισμού της χλωροφύλλης.

3. ΑΠΟΤΕΛΕΣΜΑΤΑ

3.1 Επίδραση του glyphosate στην ανάπτυξη των μικρομοσχευμάτων *Olea europaea*

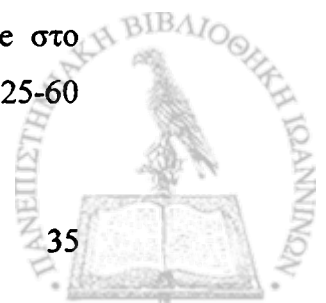
Τα αποτελέσματα έδειξαν ότι τα μικρομοσχεύματα ελιάς, στο θρεπτικό υπόστρωμα των οποίων προστέθηκαν ορμόνες (Zt + BA), χωρίς την προσθήκη glyphosate, παρουσίασαν στατιστικώς την μεγαλύτερη βλαστική αύξηση. Επίσης προέκυψε ότι αριθμός βλαστών ανά μόσχευμα ανέρχεται περίπου στους δύο (1.94) (εικόνα 3.2). Αντίθετα, δεν παρατηρήθηκε καθόλου βλαστική αύξηση ή έκπτυξη νέων βλαστών στα μικρομοσχεύματα τα οποία τοποθετήθηκαν σε θρεπτικά υποστρώματα που περιείχαν ζιζανιοκτόνο glyphosate σε συγκεντρώσεις 0.0425, 0.425 και 0.85 ανεξάρτητα από την προσθήκη ορμονών μέσα σε αυτά (εικόνες 3.3 – 3.8).

Τα αποτελέσματα επίσης έδειξαν ότι μόνο τα μικρομοσχεύματα τα οποία τοποθετήθηκαν σε θρεπτικό υπόστρωμα που περιείχε ορμόνες και δεν περιείχε glyphosate (εικόνα 3.2) ή περιείχε glyphosate στην χαμηλότερη συγκέντρωση (εικόνα 3.6) παρουσίασαν σχηματισμό κάλου σε ποσοστό 100%. Μικρό ποσοστό κάλου (6.25%) παρατηρήθηκε στα μικρομοσχεύματα που τοποθετήθηκαν σε θρεπτικό υπόστρωμα εμπλουτισμένο με τις απαραίτητες ορμόνες και glyphosate σε συγκέντρωση 0.425mM. Αντίθετα, δεν παρατηρήθηκε σχηματισμός κάλου σε κανένα μικρομόσχευμα των υπόλοιπων μεταχειρίσεων.

Η χλώρωση (3.1.β κ 3.1.γ) παρατηρήθηκε σε διάστημα 7 με 9 ημέρες στα μικρομοσχεύματα το υποστρώματα των οποίων περιείχε το ζιζανιοκτόνο glyphosate σε υψηλές συγκεντρώσεις (0.85mM και 0.425mM) και σε 11 ημέρες στην μικρότερη συγκέντρωση (0.0425mM).

Στις μεταχειρίσεις με τις μικρότερες συγκεντρώσεις glyphosate (0.0425mM) στο θρεπτικό υπόστρωμα, η έναρξη των καστανών κηλίδων (3.1.δ) παρατηρείται πολύ αργότερα (20 και 24 ημέρες) σε σχέση με τις μεταχειρίσεις όπου εφαρμόζονται μεγαλύτερες συγκεντρώσεις του ζιζανιοκτόνου (0.425mM και 0.85mM).

Τέλος σε όλες τις μεταχειρίσεις στις οποίες έχει προστεθεί glyphosate στο θρεπτικό υπόστρωμα, τα μικρομοσχεύματα νεκρώθηκαν μετά από διάστημα 25-60



ημέρες (3.1.στ). Εξαίρεση αποτελούν τα μικρομοσχεύματα στο θρεπτικό υπόστρωμα των οποίων έχει προστεθεί μόνο glyphosate στην μικρότερη συγκέντρωση και στην οποία περίπου το 65% των μικρομοσχευμάτων παρέμεινε ζωντανό για το χρονικό διάστημα των 60 ημερών που είναι και ο κατάλληλος χρόνος για την έναρξη νέας υποκαλλιέργειας από το πολλαπλασιαστικό υλικό που προκύπτει.

Πίνακας 3.1 Επίδραση του glyphosate στην βλαστική αύξηση των μικρομοσχευμάτων ελιάς.

| Μεταχειρίσεις | Συγκεντρώσεις glyphosate | Μήκος Βλαστού (mm) | Αριθμός βλαστών ανά μικρομόσχευμα |
|------------------------------|--------------------------------|--------------------|-----------------------------------|
| 1. H ^a (μάρτυρας) | Zt + BA - απουσία glyphosate | 34.8 | 1.94 |
| 2. H+GA | Zt + BA + 0. 85mM glyphosate | 0 | 0 |
| 3. H+G ^β B | Zt + BA + 0. 425mM glyphosate | 0 | 0 |
| 4. H+GC | Zt + BA + 0.0425mM glyphosate | 0 | 0 |
| 5. D | Απουσία ορμόνης και glyphosate | 0 | 0 |
| 6. GA | 0. 85mM glyphosate | 0 | 0 |
| 7. GB | 0.425mM glyphosate | 0 | 0 |
| 8. GC | 0.0425mM glyphosate | 0 | 0 |

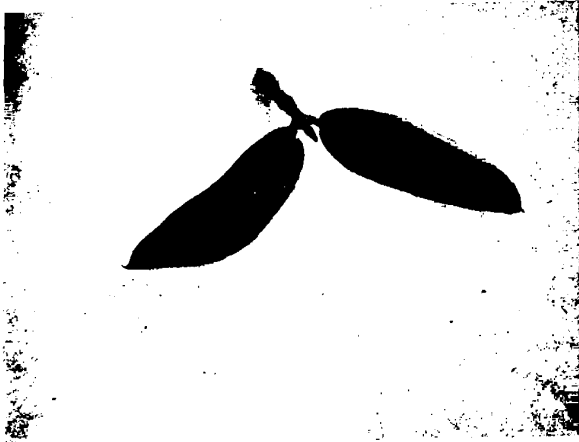
^aH = 7μM Ζεατίνη (Zt), 1μM 6-βενζιλ-αμινοπουρίνη (BA)

^βG = Glyphosate



Πίνακας 3.3 Παρατηρήσεις που λαμβάνονταν κατά την διάρκεια του πειράματος

| Παραχειρίσεις | Ποσοστό μικρομοσχευμάτων των με κάλο (%) | Έναρξη χλώρωσης (ημέρες) | Έναρξη καστανών κηλίδων | Ποσοστό ζωντανών φυτών στο τέλος του πειράματος(%) | Ημέρες που μεσολάβησαν έως την νέκρωση των μικρομοσχευμάτων |
|----------------------------|--|--------------------------|-------------------------|--|---|
| (μάρτυρας) | 100 | - | - | 100 | - |
| +GA | 0 | 7 | 12 | 0 | 25 |
| +GB | 6.25 | 9 | 14 | 0 | 25 |
| +GC | 100 | 11 | 24 | 0 | 60 |
| Πουσία μονών και γυphosate | 0 | - | - | 100 | - |
| A | 0 | 7 | 12 | 0 | 25 |
| B | 0 | 8 | 14 | 0 | 25 |
| C | 0 | 11 | 20 | 65 | - |



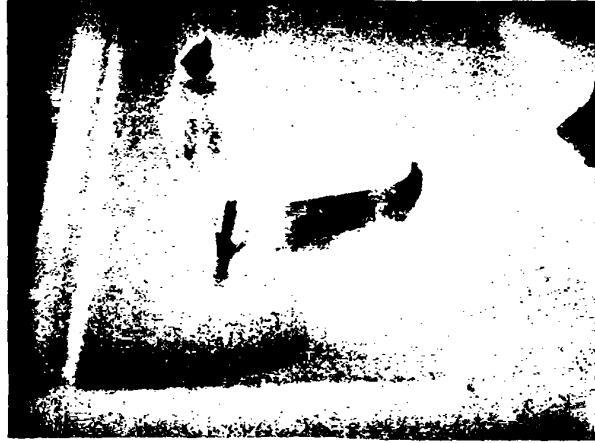
(α)



(β)



(γ)



(δ)



(ε)



(στ)

Εικόνα 3.1 Τα μορφολογικά στάδια από τα οποία διέρχονται τα μικρομοσχεύματα *Olea europaea* που έχουν υποστεί επίδραση glyphosate μέσω ενσωμάτωσής αυτού στο θρεπτικό υπόστρωμα: (α) υγιές μικρομόσχευμα έτοιμο για εγκατάσταση στο θρεπτικό υπόστρωμα, (β), (γ) χλώρωση, (δ) έναρξη κηλίδωσης, (ε) εξάπλωση των κηλίδων σε μεγαλύτερο μέρος του φύλλου και (στ) νέκρωση. Το χρονικό διάστημα που απαιτείται για την διέλευση των μικρομοσχευμάτων από το κάθε στάδιο εξαρτάται από την συγκέντρωση του glyphosate.



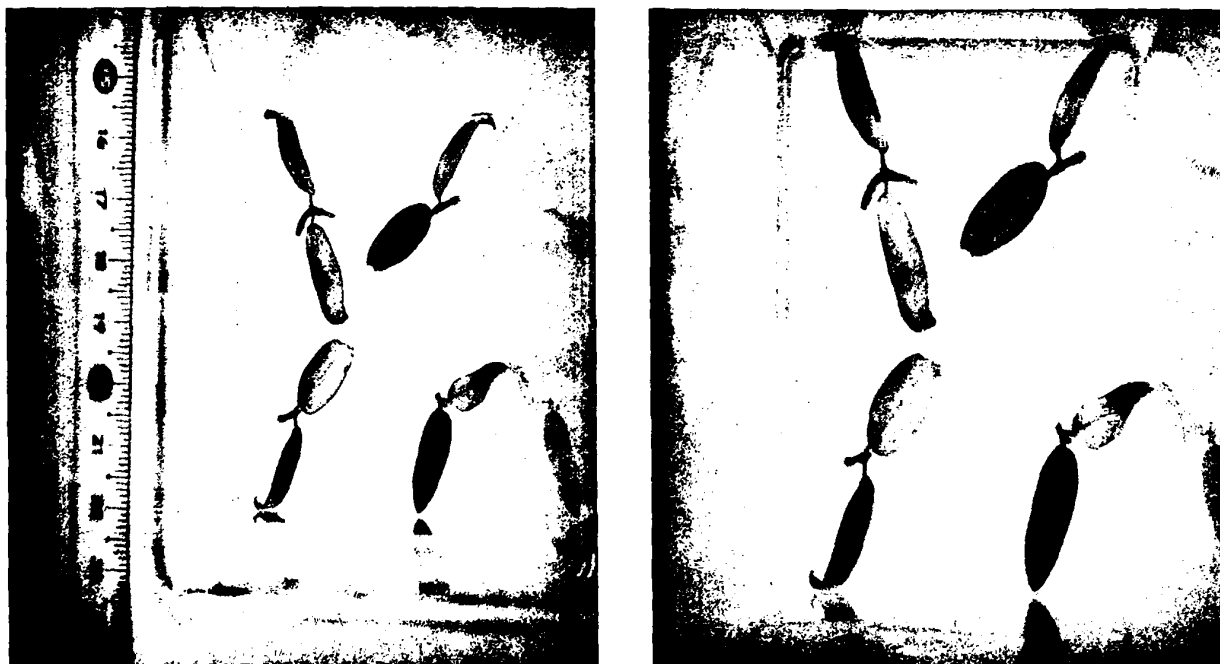
Εικόνα 3.2 Μικρομοσχεύματα *Olea europaea* μέγιστης ανάπτυξης ποικιλίας Χονδρολιά Χαλκιδικής που καλλιεργήθηκαν σε θρεπτικό υπόστρωμα WPM απουσία glyphosate και προσθήκη κυτοκινινών μετά από 60 ημέρες παραμονής στο θρεπτικό υπόστρωμα μέσα (αριστερά) και έξω (δεξιά) από το δοχείο ιστοκαλλιέργειας.



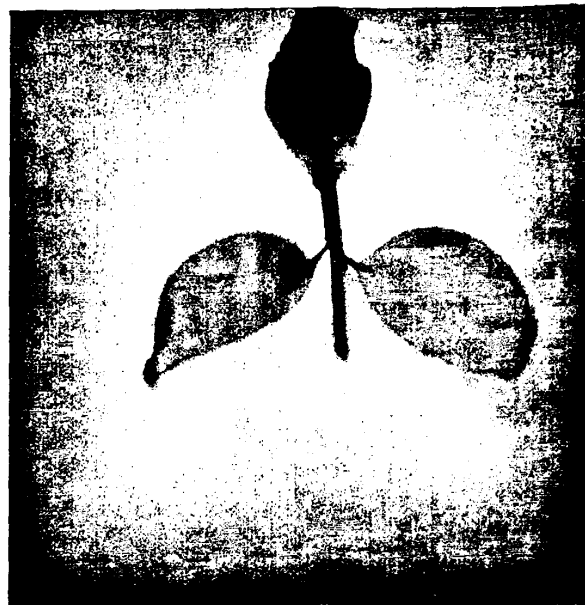
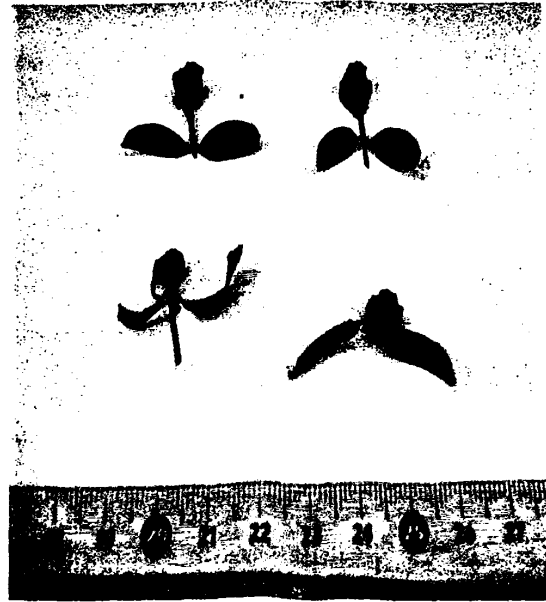
Εικόνα 3.3 Επίδραση 0.0425mM glyphosate σε μικρομοσχεύματα *Olea europaea* ποικιλίας Χονδρολιάς Χαλκιδικής που αναπτύχθηκαν σε θρεπτικό υπόστρωμα WPM απουσία κυτοκινινών σε χρονικό διάστημα 60 ημερών μέσα (αριστερά) και έξω (δεξιά) από το δοχείο ιστοκαλλιέργειας.



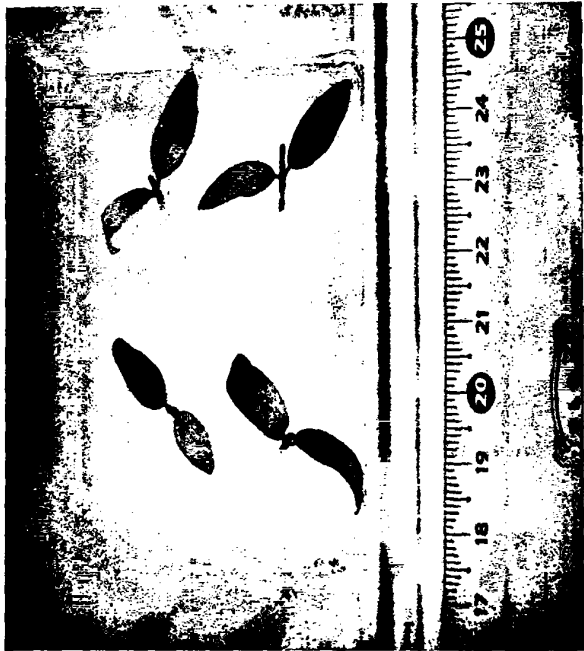
Εικόνα 3.4 Επίδραση 0.425mM glyphosate σε μικρομοσχέματα *Olea europaea* ποικιλίας Χονδρολιάς Χαλκιδικής που αναπτύχθηκαν σε θρεπτικό υπόστρωμα WPM απουσία κυτοκινινών σε χρονικό διάστημα 60 ημερών.



Εικόνα 3.5 Επίδραση 0.85mM glyphosate σε μικρομοσχέματα *Olea europaea* ποικιλίας Χονδρολιάς Χαλκιδικής που αναπτύχθηκαν σε θρεπτικό υπόστρωμα WPM απουσία κυτοκινινών σε χρονικό διάστημα 60 ημερών.



Εικόνα 3.6 Επίδραση 0.0425mM glyphosate σε μικρομοσχεύματα *Olea europaea* ποικιλίας Χονδρολιάς Χαλκιδικής που αναπτύχθηκαν σε θρεπτικό υπόστρωμα WPM με προσθήκη κυτοκινινών σε χρονικό διάστημα 60 ημερών μέσα (πάνω αριστερά) και έξω (πάνω δεξιά και κάτω) από το δοχείο ιστοκαλλιέργειας.



Εικόνα 3.7 Επίδραση 0.85mM (αριστερά) και 0.425mM (δεξιά) glyphosate σε μικρομοσχέματα *Olea europaea* ποικιλίας Χονδρολιάς Χαλκιδικής που αναπτύχθηκαν σε θρεπτικό υπόστρωμα WPM παρουσία κυτοκινινών σε χρονικό διάστημα 60 ημερών



Εικόνα 3.8 Μικρομοσχέματα *Olea europaea* ποικιλίας Χονδρολιά Χαλκιδικής που καλλιεργήθηκαν σε θρεπτικό υπόστρωμα WPM απουσία glyphosate και κυτοκινινών σε χρονικό διάστημα 60 ημερών μέσα (αριστερά) και έξω (δεξιά) από το δοχείο ιστοκαλλιέργειας.



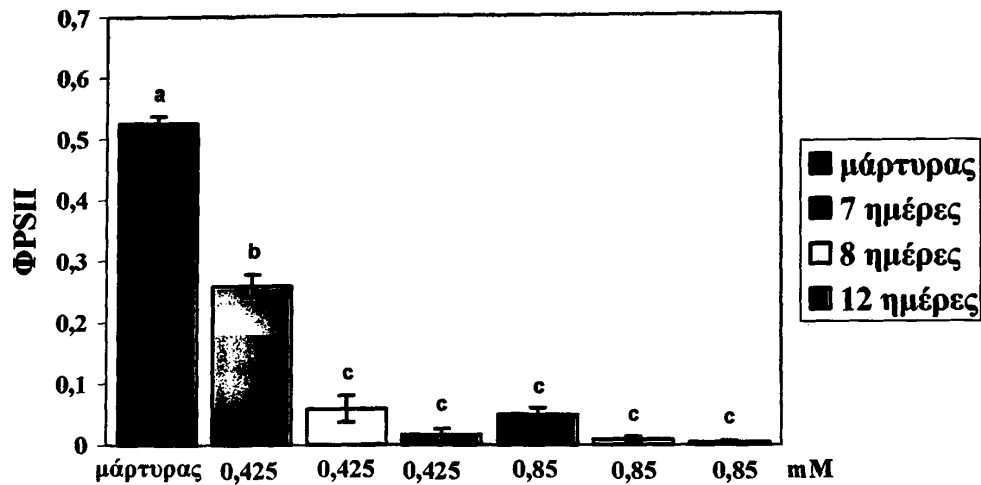
Εικόνα 3.9 Μικρομοσχεύματα *Olea europaea* ποικιλίας Χονδρολιά Χαλκιδικής που καλλιεργήθηκαν σε θρεπτικό υπόστρωμα WPM απουσία (πάνω) και παρουσία (κάτω) κιτοκινινών. Τα μικρομοσχεύματα είναι ηλικίας 30 ημερών περίπου.

3.2 Παράμετροι του φθορισμού της χλωροφύλλης σε φύλλα μικρομοσχευμάτων *Olea europaea* που έχουν υποστεί επίδραση glyphosate

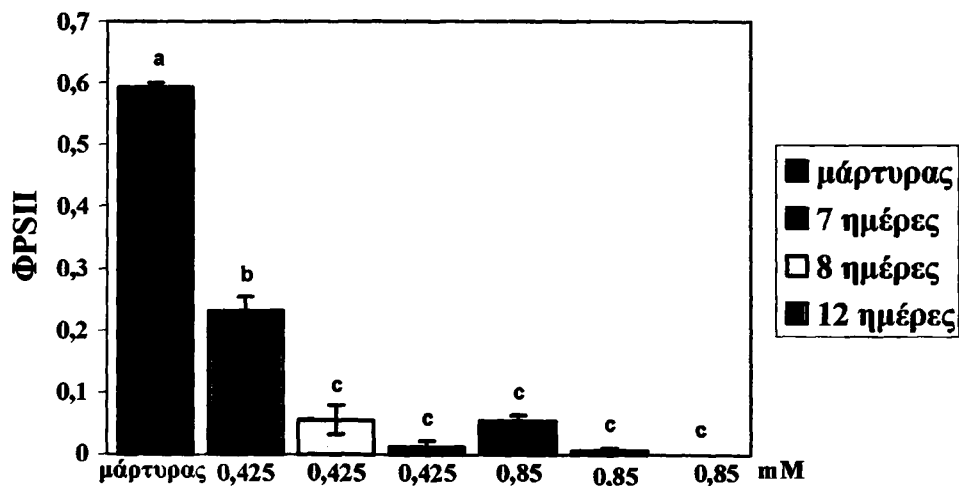
Στο σχήμα 3.1 και 3.2 φαίνεται η μεταβολή της φωτοχημικής απόδοσης φωτονίων (Φ_{PSII}) του PSII μετά από 2 λεπτά και 5 λεπτά αντίστοιχα σε ένταση φωτισμού $46 \mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$ και ύστερα από επίδραση συγκεντρώσεων glyphosate 0, 0.425 και 0.850 mM ενσωματωμένο στο θρεπτικό υπόστρωμα. Η φωτοχημική απόδοση των φυτών μαρτύρων (τα οποία δεν έχουν υποστεί επίδραση glyphosate) είναι μεγαλύτερη και διαφέρει στατιστικά σημαντικά από τις φωτοχημικές αποδόσεις όλων των υπόλοιπων φυτών, όπως και η φωτοχημική απόδοση των φυτών που έχουν υποστεί την επίδραση της μικρότερης συγκέντρωσης glyphosate σε χρονικό διάστημα 7 ημερών. Όπως φαίνεται στα σχήματα, η φωτοχημική απόδοση φωτονίων του PSII μειώνεται αντιστρόφως ανάλογα με την συγκέντρωση του glyphosate καθώς και με το χρονικό διάστημα της επίδρασης.

Η απόδοση φωτονίων που χάνεται λόγω μη φωτοχημικής απόσβεσης (Φ_{NPQ}) του PSII των φυτών μαρτύρων μετά από 2 λεπτά σε ένταση φωτισμού $46 \mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$ διαφέρει στατιστικά σημαντικά από τις αποδόσεις φωτονίων που χάνονται λόγω μη φωτοχημικής απόσβεσης όλων των φυτών που έχουν υποστεί την επίδραση glyphosate ενσωματωμένο στο θρεπτικό εκτός αυτών που έχουν υποστεί επίδραση 0.425mM και 0.85mM σε χρονικό διάστημα 8 ημερών (σχήμα 3.3).

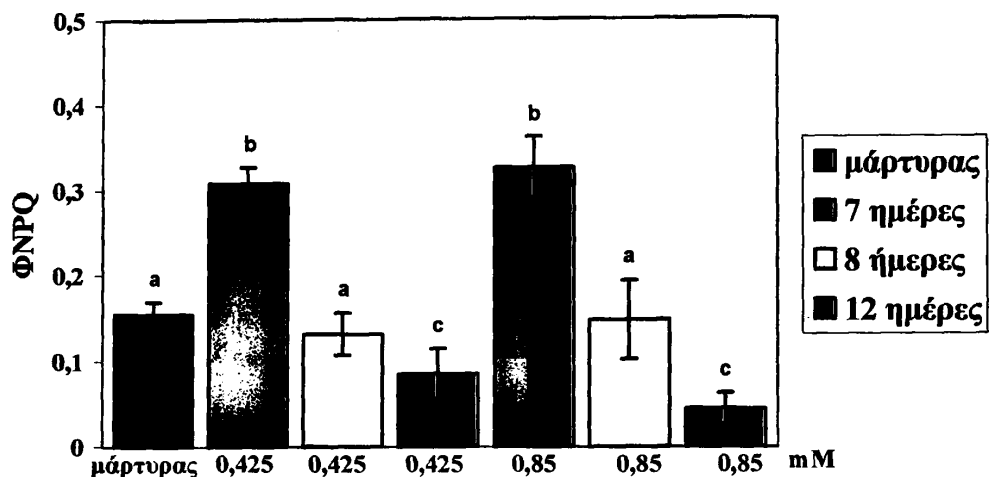
Στο σχήμα 3.4 φαίνεται η μεταβολή της απόδοσης φωτονίων που χάνεται λόγω μη φωτοχημικής απόσβεσης (Φ_{NPQ}) του PSII μετά από 5 λεπτά σε ένταση φωτισμού $46 \mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$ και ύστερα από επίδραση συγκεντρώσεων glyphosate 0, 0.425 και 0.850 mM ενσωματωμένο στο θρεπτικό υπόστρωμα. Η απόδοση φωτονίων που χάνεται λόγω μη φωτοχημικής απόσβεσης των φυτών μαρτύρων είναι μικρότερη και διαφέρει στατιστικά σημαντικά από τις αποδόσεις φωτονίων που χάνονται λόγω μη φωτοχημικής απόσβεσης όλων των φυτών εκτός αυτών που έχουν υποστεί επίδραση 0.425mM και 0.85mM glyphosate σε χρονικό διάστημα 12 ημερών.



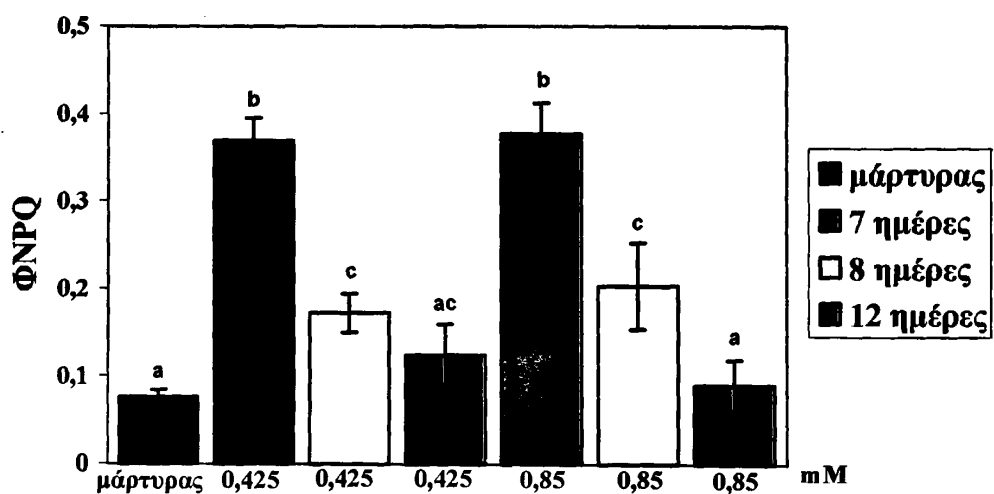
Σχήμα 3.1 Η φωτοχημική απόδοση φωτονίων του PSII (Φ_{PSII}) μετά από χρόνο 2 λεπτών σε ένταση ακτινοβολίας $46 \mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$, σε μικρομοσχεύματα ελιάς μάρτυρες και σε μικρομοσχεύματα ελιάς με ενσωματωμένο στο θρεπτικό υπόστρωμα glyphosate 0.425 και 0.850 mM, ύστερα από 7, 8 και 12 ημέρες επίδραση. Οι τιμές εκφράζουν τον μέσο όρο \pm SE ($n=5-15$). Οι μέσες τιμές που φέρουν το ίδιο γράμμα του αλφαβήτου δεν διαφέρουν στατιστικά σημαντικά μεταξύ τους ($p < 0.05$).



Σχήμα 3.2 Η φωτοχημική απόδοση φωτονίων του PSII (Φ_{PSII}) μετά από χρόνο 5 λεπτών σε ένταση ακτινοβολίας $46 \mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$, σε μικρομοσχεύματα ελιάς μάρτυρες και σε μικρομοσχεύματα ελιάς με ενσωματωμένο στο θρεπτικό υπόστρωμα glyphosate 0.425 και 0.850 mM, ύστερα από 7, 8 και 12 ημέρες επίδραση. Οι τιμές εκφράζουν τον μέσο όρο \pm SE ($n=5-15$). Οι μέσες τιμές που φέρουν το ίδιο γράμμα του αλφαβήτου δεν διαφέρουν στατιστικά σημαντικά μεταξύ τους ($p < 0.05$).



Σχήμα 3.3 Η απόδοση φωτονίων που χάνεται λόγω μη φωτοχημικής απόσβεσης του PSII (Φ_{NPQ}) μετά από χρόνο 2 λεπτών σε ένταση ακτινοβολίας $46 \mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$, σε μικρομοσχεύματα ελιάς μάρτυρες και σε μικρομοσχεύματα ελιάς με ενσωματωμένο στο θρεπτικό υπόστρωμα glyphosate 0.425 και 0.850 mM, ύστερα από 7, 8 και 12 ημέρες επίδραση. Οι τιμές εκφράζουν τον μέσο όρο \pm SE ($n=5-15$). Οι μέσες τιμές που φέρουν το ίδιο γράμμα του αλφαβήτου δεν διαφέρουν στατιστικά σημαντικά μεταξύ τους ($p<0.05$).



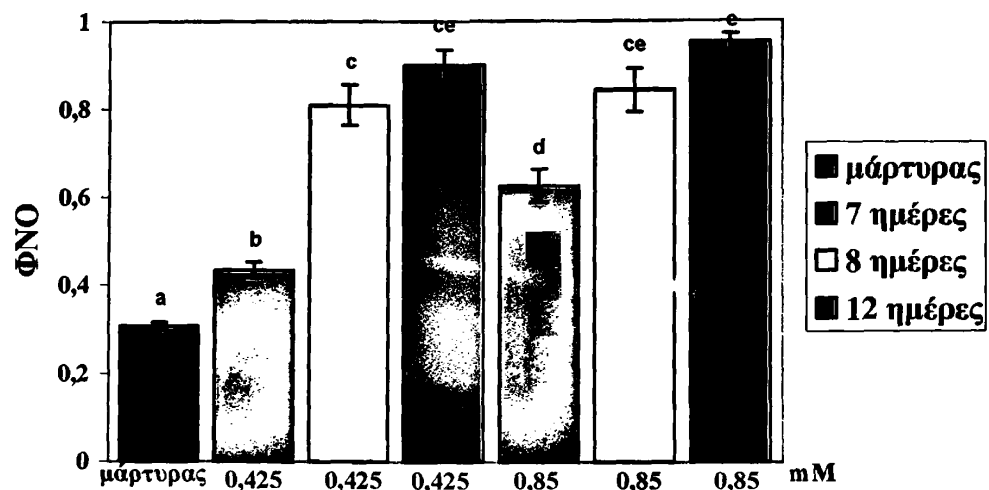
Σχήμα 3.4 Η απόδοση φωτονίων που χάνεται λόγω μη φωτοχημικής απόσβεσης του PSII (Φ_{NPQ}) μετά από χρόνο 5 λεπτών σε ένταση ακτινοβολίας $46 \mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$, σε μικρομοσχεύματα ελιάς μάρτυρες και σε μικρομοσχεύματα ελιάς με ενσωματωμένο στο θρεπτικό υπόστρωμα glyphosate 0.425 και 0.850 mM, ύστερα από 7, 8 και 12 ημέρες επίδραση. Οι τιμές εκφράζουν τον μέσο όρο \pm SE ($n=5-15$). Οι μέσες τιμές που φέρουν το ίδιο γράμμα του αλφαβήτου δεν διαφέρουν στατιστικά σημαντικά μεταξύ τους ($p<0.05$).

Η μεταβολή της απόδοσης φωτονίων που χάνεται για άλλες μη φωτοχημικές διαδικασίες (*FNO*) του PSII μετά από 2 λεπτά (σχήμα 3.5) και μετά από 5 λεπτά (σχήμα 3.6) σε ένταση φωτισμού $46 \mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$ και ύστερα από επίδραση συγκεντρώσεων glyphosate 0, 0.425 και 0.850 mM ενσωματωμένο στο θρεπτικό υπόστρωμα φαίνεται στο σχήμα 3.5. Η απόδοση φωτονίων που χάνεται για άλλες μη φωτοχημικές διαδικασίες των φυτών μαρτύρων είναι μικρότερη και διαφέρει στατιστικά σημαντικά από τις αποδόσεις φωτονίων που χάνονται για άλλες μη φωτοχημικές διαδικασίες όλων των φυτών που έχουν υποστεί επίδραση glyphosate. Όπως φαίνεται στα σχήματα, η απόδοση φωτονίων που χάνεται για άλλες μη φωτοχημικές διαδικασίες αυξάνεται ανάλογα με τη συγκέντρωση του glyphosate καθώς και με το χρονικό διάστημα της επίδρασης.

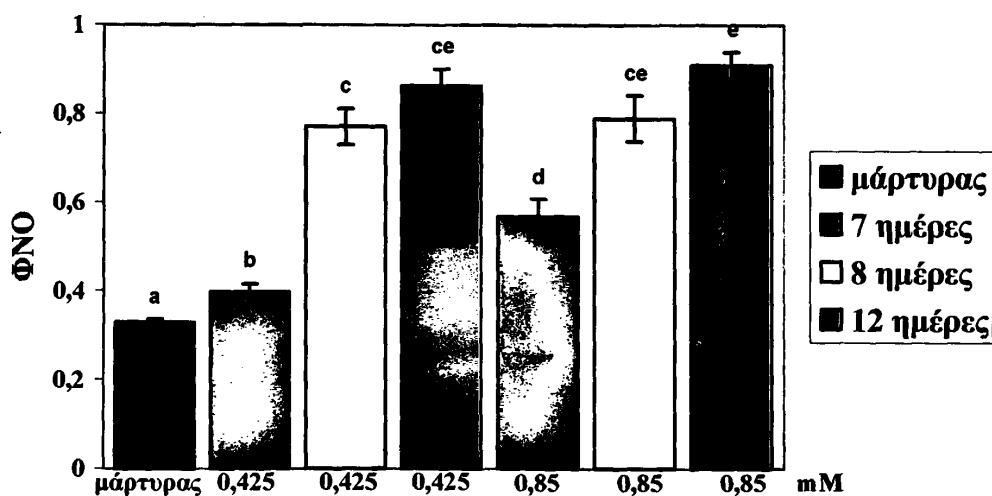
Στο σχήμα 3.7 φαίνεται η μεταβολή της μη φωτοχημικής απόσβεσης (*NPQ*) του PSII μετά από 2 λεπτά σε ένταση φωτισμού $46 \mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$ και ύστερα από επίδραση συγκεντρώσεων glyphosate 0, 0.425 και 0.850 mM ενσωματωμένο στο θρεπτικό υπόστρωμα. Η μη φωτοχημική απόσβεση των φυτών μαρτύρων διαφέρει στατιστικά σημαντικά από τις μη φωτοχημικές αποσβέσεις των φυτών που έχουν υποστεί επίδραση glyphosate για χρονικό διάστημα 8 και 12 ημέρες ανεξάρτητα από τη συγκέντρωση του ζιζανιοκτόνου.

Η μεταβολή της μη φωτοχημικής απόσβεσης (*NPQ*) του PSII μετά από 5 λεπτά σε ένταση φωτισμού $46 \mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$ και ύστερα από επίδραση συγκεντρώσεων glyphosate 0, 0.425 και 0.850 mM ενσωματωμένο στο θρεπτικό υπόστρωμα φαίνεται στο σχήμα 3.8. Η μη φωτοχημική απόσβεση των φυτών μαρτύρων διαφέρει στατιστικά σημαντικά από τις μη φωτοχημικές αποσβέσεις των φυτών που έχουν υποστεί επίδραση 0.425 και 0.85mM glyphosate σε χρονικό διάστημα 7 ημερών.

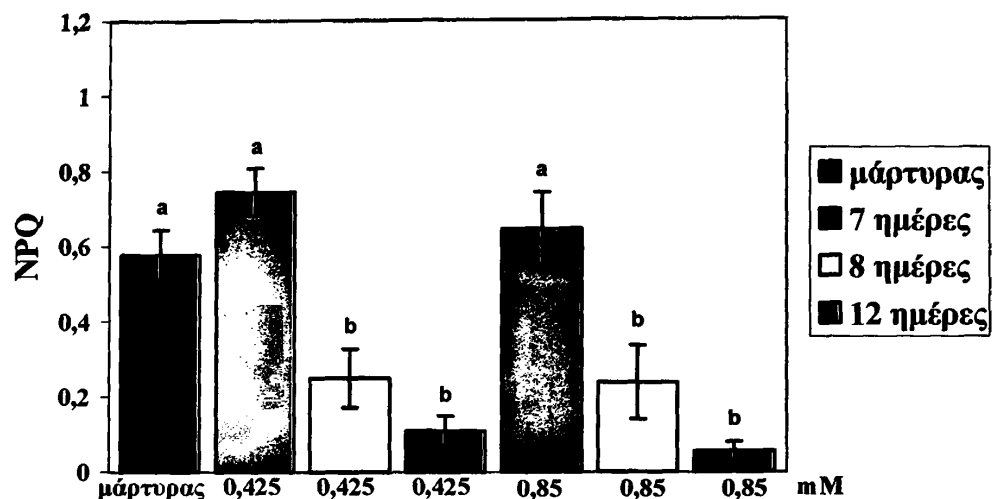
Αν στα σχήματα 3.7 και 3.8 εξαιρεθούν τα φυτά μάρτυρες, η μη φωτοχημική απόσβεση μειώνεται αντιστρόφως ανάλογα με τη συγκέντρωση του glyphosate καθώς και με το χρονικό διάστημα της επίδρασης.



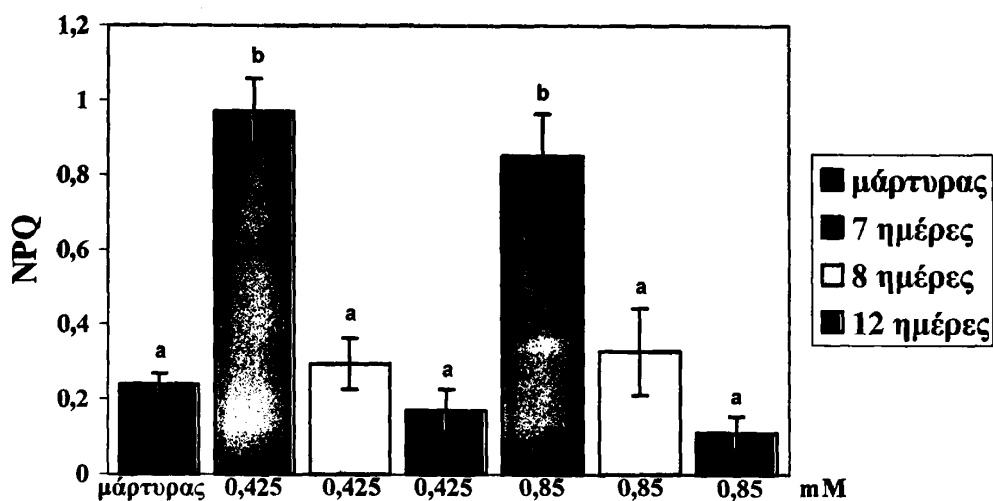
Σχήμα 3.5 Η απόδοση φωτονίων που χάνεται για άλλες μη φωτοχημικές διαδικασίες του PSII (Φ_{NO}) μετά από χρόνο 2 λεπτών σε ένταση ακτινοβολίας $46 \mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$, σε μικρομοσχεύματα ελιάς μάρτυρες και σε μικρομοσχεύματα ελιάς με ενσωματωμένο στο θρεπτικό υπόστρωμα glyphosate 0.425 και 0.850 mM, ύστερα από 7, 8 και 12 ημέρες επίδραση. Οι τιμές εκφράζουν τον μέσο όρο + SE (n=5-15). Οι μέσες τιμές που φέρουν το ίδιο γράμμα του αλφαβήτου δεν διαφέρουν στατιστικά σημαντικά μεταξύ τους ($p < 0.05$).



Σχήμα 3.6 Η απόδοση φωτονίων που χάνεται για άλλες μη φωτοχημικές διαδικασίες του PSII (Φ_{NO}) μετά από χρόνο 5 λεπτών σε ένταση ακτινοβολίας $46 \mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$, σε μικρομοσχεύματα ελιάς μάρτυρες και σε μικρομοσχεύματα ελιάς με ενσωματωμένο στο θρεπτικό υπόστρωμα glyphosate 0.425 και 0.850 mM, ύστερα από 7, 8 και 12 ημέρες επίδραση. Οι τιμές εκφράζουν τον μέσο όρο + SE (n=5-15). Οι μέσες τιμές που φέρουν το ίδιο γράμμα του αλφαβήτου δεν διαφέρουν στατιστικά σημαντικά μεταξύ τους ($p < 0.05$).



Σχήμα 3.7 Η μη φωτοχημική απόσβεση φωτονίων του PSII (*NPQ*) μετά από χρόνο 2 λεπτών σε ένταση ακτινοβολίας $46 \mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$, σε μικρομοσχεύματα ελιάς μάρτυρες και σε μικρομοσχεύματα ελιάς με ενσωματωμένο στο θρεπτικό υπόστρωμα glyphosate 0.425 και 0.850 mM, ύστερα από 7, 8 και 12 ημέρες επίδραση. Οι τιμές εκφράζουν τον μέσο όρο + SE ($n=5-15$). Οι μέσες τιμές που φέρουν το ίδιο γράμμα του αλφαβήτου δεν διαφέρουν στατιστικά σημαντικά μεταξύ τους ($p<0.05$).

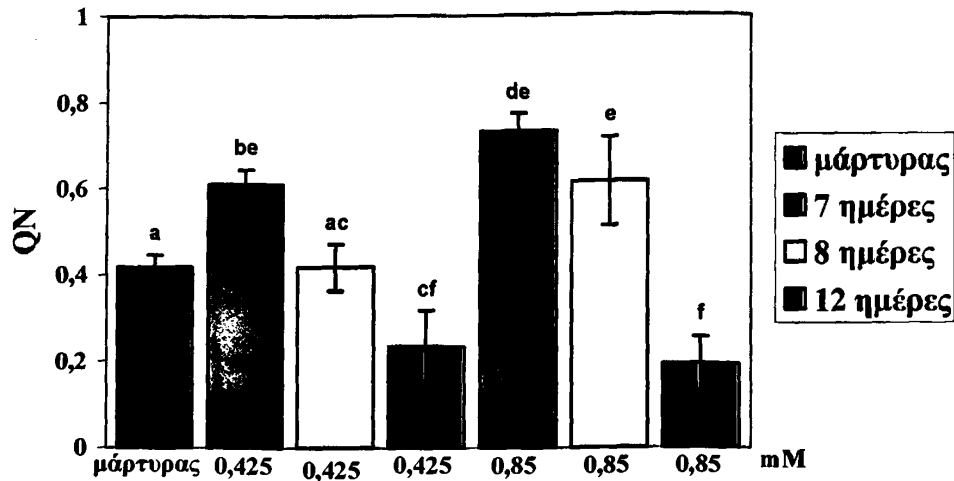


Σχήμα 3.8 Η μη φωτοχημική απόσβεση φωτονίων του PSII (*NPQ*) μετά από χρόνο 5 λεπτών σε ένταση ακτινοβολίας $46 \mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$, σε μικρομοσχεύματα ελιάς μάρτυρες και σε μικρομοσχεύματα ελιάς με ενσωματωμένο στο θρεπτικό υπόστρωμα glyphosate 0.425 και 0.850 mM, ύστερα από 7, 8 και 12 ημέρες επίδραση. Οι τιμές εκφράζουν τον μέσο όρο + SE ($n=5-15$). Οι μέσες τιμές που φέρουν το ίδιο γράμμα του αλφαβήτου δεν διαφέρουν στατιστικά σημαντικά μεταξύ τους ($p<0.05$).

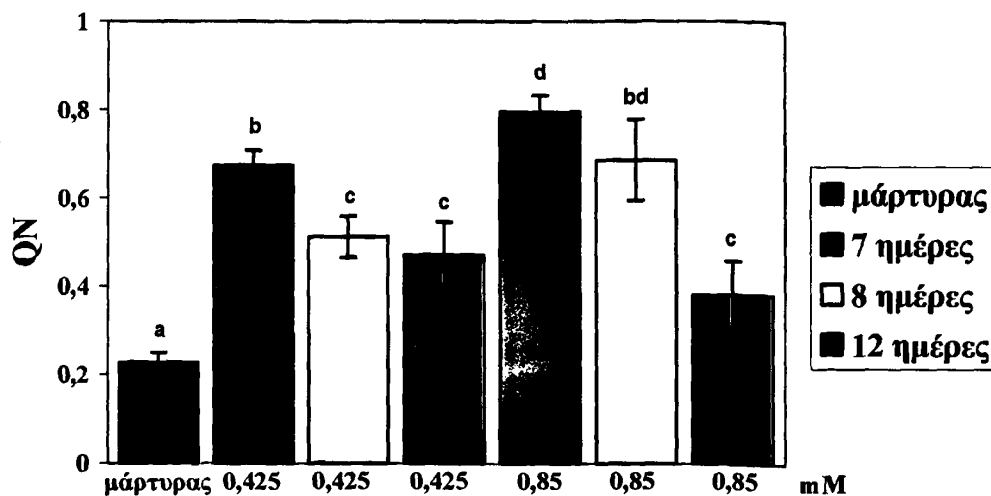
Η μη φωτοχημική απόσβεση που αντιπροσωπεύει το διασκεδασμό θερμότητας από την ενεργοποίηση των μεμβρανών των θυλακοειδών (Q_N) του PSII των φυτών μαρτύρων μετά από 2 λεπτά σε ένταση φωτισμού $46 \mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$ διαφέρει στατιστικά σημαντικά από τις μη φωτοχημικές αποσβέσεις Q_N όλων των φυτών που έχουν υποστεί επίδραση glyphosate ενσωματωμένο στο θρεπτικό υπόστρωμα εκτός αυτών που έχουν υποστεί επίδραση 0.425mM glyphosate σε χρονικό διάστημα 8 ημερών (σχήμα 3.9).

Στο σχήμα 3.10 φαίνεται η μεταβολή της μη φωτοχημικής απόσβεσης που αντιπροσωπεύει το διασκεδασμό θερμότητας από την ενεργοποίηση των μεμβρανών των θυλακοειδών (Q_N) του PSII μετά από 5 λεπτά σε ένταση φωτισμού $46 \mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$ και ύστερα από επίδραση συγκεντρώσεων glyphosate 0, 0.425 και 0.850 mM ενσωματωμένο στο θρεπτικό υπόστρωμα. Η μη φωτοχημική απόσβεση Q_N των φυτών μαρτύρων είναι μικρότερη και διαφέρει στατιστικά σημαντικά από τις μη φωτοχημικές αποσβέσεις Q_N όλων των φυτών που έχουν υποστεί επίδραση glyphosate.

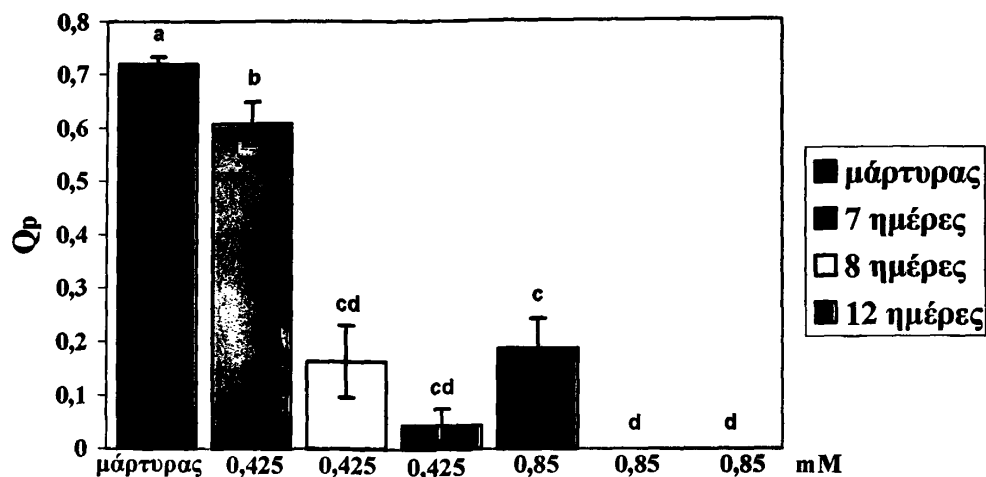
Η μεταβολή της φωτοχημικής απόσβεσης (Q_P) του PSII μετά από 2 λεπτά και 5 λεπτά σε ένταση φωτισμού $46 \mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$ και ύστερα από επίδραση συγκεντρώσεων glyphosate 0, 0.425 και 0.850 mM ενσωματωμένο στο θρεπτικό υπόστρωμα φαίνονται στα σχήματα 3.11 και 3.12 αντίστοιχα. Η φωτοχημική απόσβεση των φυτών μαρτύρων είναι μεγαλύτερη και διαφέρει στατιστικά σημαντικά από τις φωτοχημικές αποσβέσεις των φυτών που έχουν υποστεί επίδραση glyphosate. Η φωτοχημική απόσβεση των φυτών που έχουν υποστεί την επίδραση της μικρότερη συγκέντρωση glyphosate σε χρονικό διάστημα 7 ημερών διαφέρει επίσης στατιστικά σημαντικά από τις φωτοχημικές αποσβέσεις όλων των υπόλοιπων. Όπως φαίνεται στα σχήματα 3.11 και 3.12, η φωτοχημική απόσβεση Q_P του PSII μειώνεται αντιστρόφως ανάλογα με τη συγκέντρωση του glyphosate, καθώς και με το χρονικό διάστημα της επίδρασης.



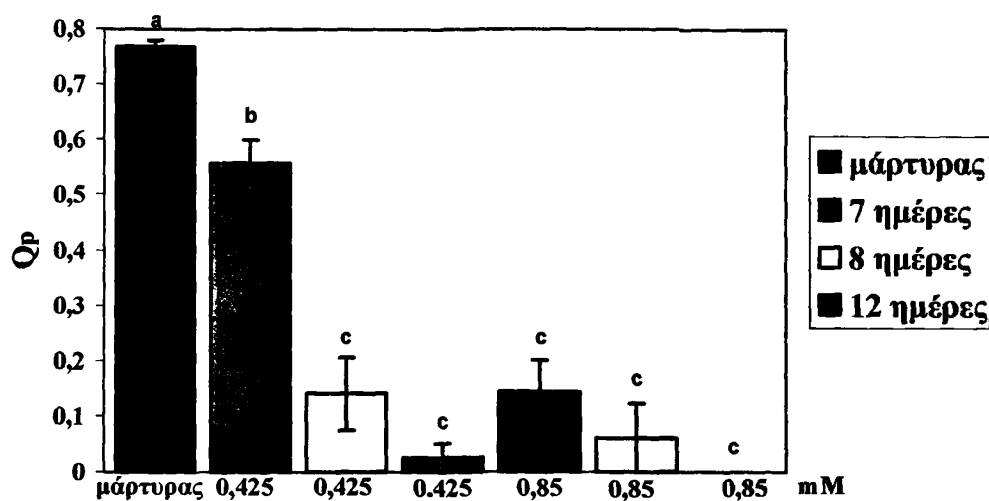
Σχήμα 3.9 Η μη φωτοχημική απόσβεση που αντιπροσωπεύει το διασκεδασμό θερμότητας από την ενεργοποίηση των μεμβρανών των θυλακοειδών του PSII (Q_N) μετά από χρόνο 2 λεπτών σε ένταση ακτινοβολίας $46 \mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$, σε μικρομοσχεύματα ελιάς μάρτυρες και σε μικρομοσχεύματα ελιάς με ενσωματωμένο στο θρεπτικό υπόστρωμα glyphosate 0.425 και 0.850 mM, ύστερα από 7, 8 και 12 ημέρες επίδραση. Οι τιμές εκφράζουν τον μέσο όρο + SE ($n=5-15$). Οι μέσες τιμές που φέρουν το ίδιο γράμμα του αλφαβήτου δεν διαφέρουν στατιστικά σημαντικά μεταξύ τους ($p<0.05$).



Σχήμα 3.10 Η μη φωτοχημική απόσβεση που αντιπροσωπεύει το διασκεδασμό θερμότητας από την ενεργοποίηση των μεμβρανών των θυλακοειδών του PSII (Q_N) μετά από χρόνο 5 λεπτών σε ένταση ακτινοβολίας $46 \mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$, σε μικρομοσχεύματα ελιάς μάρτυρες και σε μικρομοσχεύματα ελιάς με ενσωματωμένο στο θρεπτικό υπόστρωμα glyphosate 0.425 και 0.850 mM, ύστερα από 7, 8 και 12 ημέρες επίδραση. Οι τιμές εκφράζουν τον μέσο όρο + SE ($n=5-15$). Οι μέσες τιμές που φέρουν το ίδιο γράμμα του αλφαβήτου δεν διαφέρουν στατιστικά σημαντικά μεταξύ τους ($p<0.05$).



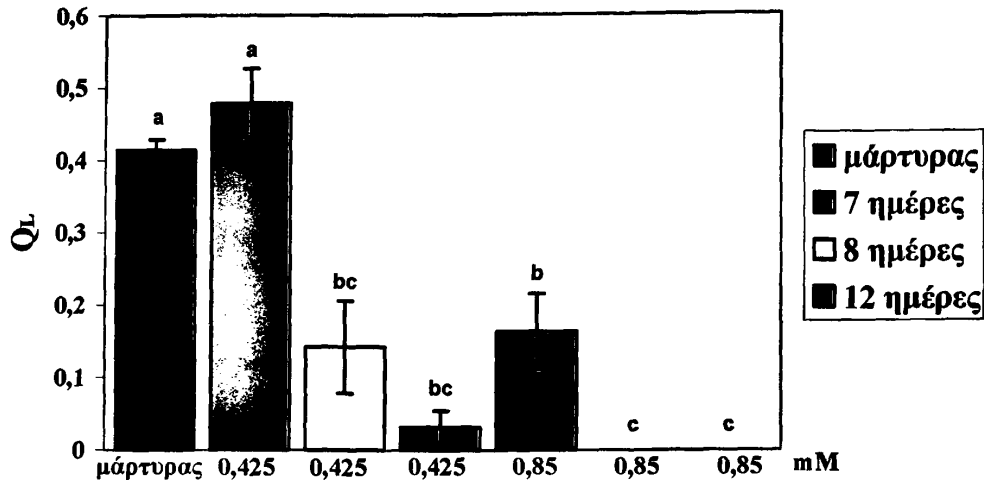
Σχήμα 3.11 Η φωτοχημική απόσβεση του PSII (Q_p) μετά από χρόνο 2 λεπτών σε ένταση ακτινοβολίας $46 \mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$, σε μικρομοσχεύματα ελιάς μάρτυρες και σε μικρομοσχεύματα ελιάς με ενσωματωμένο στο θρεπτικό υπόστρωμα glyphosate 0.425 και 0.850 mM, ύστερα από 7, 8 και 12 ημέρες επίδραση. Οι τιμές εκφράζουν τον μέσο όρο + SE ($n=5-15$). Οι μέσες τιμές που φέρουν το ίδιο γράμμα του αλφαβήτου δεν διαφέρουν στατιστικά σημαντικά μεταξύ τους ($p < 0.05$).



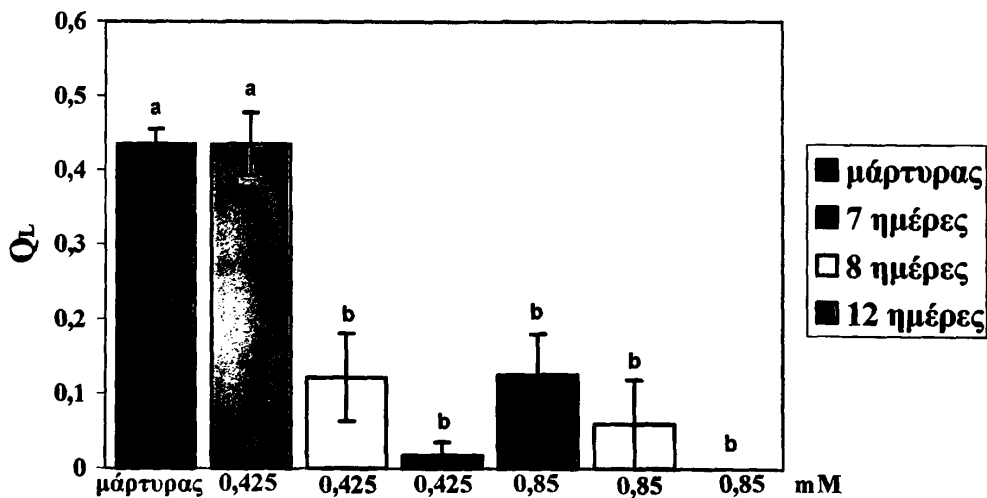
Σχήμα 3.12 Η φωτοχημική απόσβεση του PSII (Q_p) μετά από χρόνο 5 λεπτών σε ένταση ακτινοβολίας $46 \mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$, σε μικρομοσχεύματα ελιάς μάρτυρες και σε μικρομοσχεύματα ελιάς με ενσωματωμένο στο θρεπτικό υπόστρωμα glyphosate 0.425 και 0.850 mM, ύστερα από 7, 8 και 12 ημέρες επίδραση. Οι τιμές εκφράζουν τον μέσο όρο + SE ($n=5-15$). Οι μέσες τιμές που φέρουν το ίδιο γράμμα του αλφαβήτου δεν διαφέρουν στατιστικά σημαντικά μεταξύ τους ($p < 0.05$).

Στα σχήματα 3.13 και 3.14 φαίνεται η μεταβολή της φωτοχημικής απόσβεσης βάσει του μοντέλου των λιμών (Q_L) του PSII μετά από 2 λεπτά και 5 λεπτά αντίστοιχα σε ένταση φωτισμού $46 \mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$ και ύστερα από επίδραση συγκεντρώσεων glyphosate 0, 0.425 και 0.850 mM ενσωματωμένο στο θρεπτικό υπόστρωμα. Η φωτοχημική απόσβεση Q_L των φυτών μαρτύρων διαφέρει στατιστικά σημαντικά από τις φωτοχημικές αποσβέσεις Q_L όλων των φυτών που έχουν υποστεί επίδραση glyphosate εκτός αυτών που έχουν υποστεί επίδραση 0.425mM glyphosate σε χρονικό διάστημα 7 ημερών. Η φωτοχημική απόσβεση Q_L των φυτών που έχουν υποστεί την επίδραση της μικρότερης συγκέντρωσης glyphosate σε χρονικό διάστημα 7 ημερών, διαφέρει επίσης στατιστικά σημαντικά από τις φωτοχημικές αποσβέσεις Q_L όλων των υπόλοιπων. Όπως φαίνεται στα σχήματα 3.13 και 3.14, η φωτοχημική απόσβεση Q_L του PSII μειώνεται αντιστρόφως ανάλογα με τη συγκέντρωση του glyphosate καθώς και με το χρονικό διάστημα της επίδρασης.

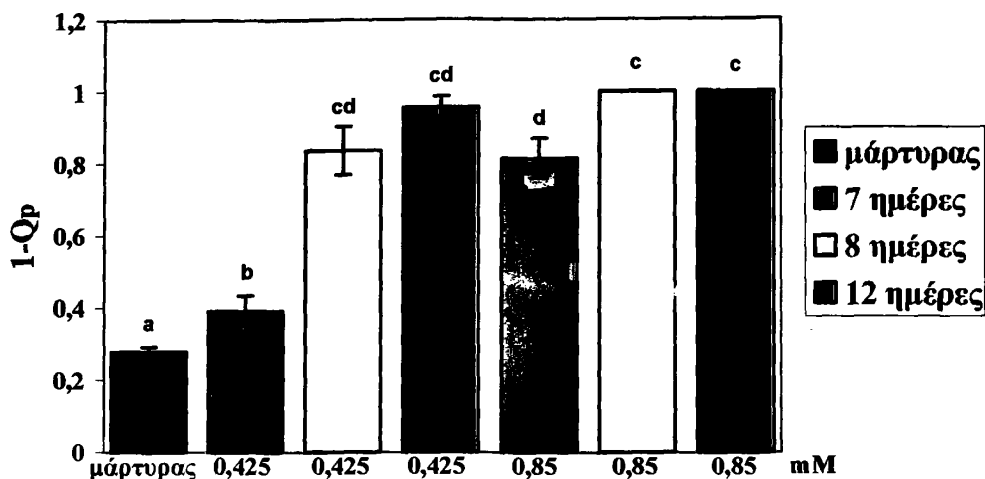
Στα σχήματα 3.15 και 3.16 φαίνεται η μεταβολή της αναγωγικής κατάστασης του QA δηλαδή ενός μέτρου του μέρους των κλειστών κέντρων αντίδρασης ($I-Q_p$) του PSII μετά από 2 λεπτά και 5 λεπτά αντίστοιχα σε ένταση φωτισμού $46 \mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$ και ύστερα από επίδραση συγκεντρώσεων glyphosate 0, 0.425 και 0.850 mM ενσωματωμένο στο θρεπτικό υπόστρωμα. Η αναγωγική κατάσταση του QA των φυτών μαρτύρων είναι μικρότερη και διαφέρει στατιστικά σημαντικά από τις αναγωγικές καταστάσεις του QA των φυτών που έχουν υποστεί επίδραση glyphosate. Όπως φαίνεται στα σχήματα 3.15 και 3.16, η αναγωγική κατάσταση του QA του PSII αυξάνεται ανάλογα με τη συγκέντρωση του glyphosate καθώς και με το χρονικό διάστημα της επίδρασης.



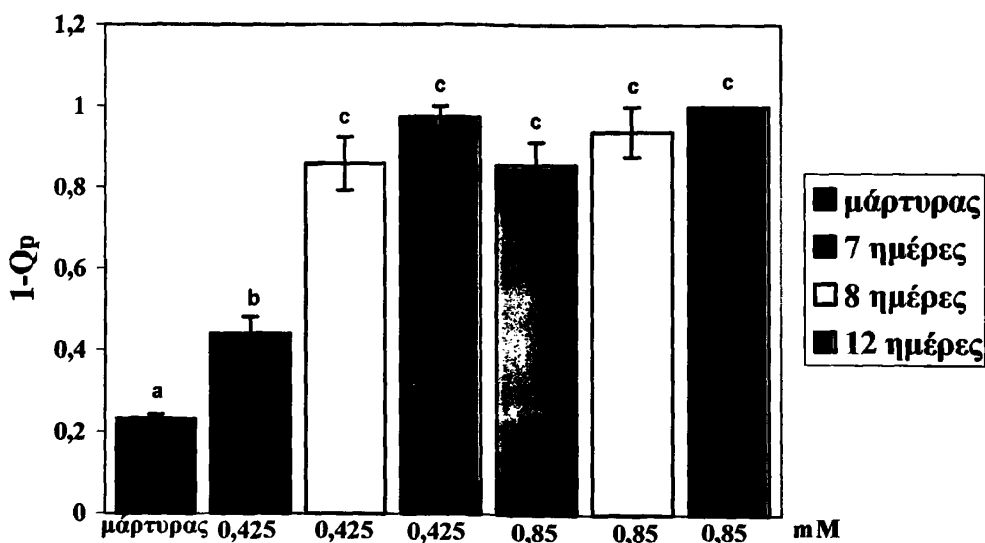
Σχήμα 3.13 Η φωτοχημική απόσβεση βάσει του μοντέλου των λιμών του PSII (Q_L) μετά από χρόνο 2 λεπτών σε ένταση ακτινοβολίας $46 \mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$, σε μικρομοσχεύματα ελιάς μάρτυρες και σε μικρομοσχεύματα ελιάς με ενσωματωμένο στο θρεπτικό υπόστρωμα glyphosate 0.425 και 0.850 mM, ύστερα από 7, 8 και 12 ημέρες επίδραση. Οι τιμές εκφράζουν τον μέσο όρο + SE ($n=5-15$). Οι μέσες τιμές που φέρουν το ίδιο γράμμα του αλφαβήτου δεν διαφέρουν στατιστικά σημαντικά μεταξύ τους ($p < 0.05$).



Σχήμα 3.14 Η φωτοχημική απόσβεση βάσει του μοντέλου των λιμών του PSII (Q_L) μετά από χρόνο 5 λεπτών σε ένταση ακτινοβολίας $46 \mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$, σε μικρομοσχεύματα ελιάς μάρτυρες και σε μικρομοσχεύματα ελιάς με ενσωματωμένο στο θρεπτικό υπόστρωμα glyphosate 0.425 και 0.850 mM, ύστερα από 7, 8 και 12 ημέρες επίδραση. Οι τιμές εκφράζουν τον μέσο όρο + SE ($n=5-15$). Οι μέσες τιμές που φέρουν το ίδιο γράμμα του αλφαβήτου δεν διαφέρουν στατιστικά σημαντικά μεταξύ τους ($p < 0.05$).



Σχήμα 3.15 Η αναγωγική κατάσταση του QA δηλαδή ενός μέτρου του μέρους των κλειστών κέντρων αντίδρασης του PSII ($1-Q_p$) μετά από χρόνο 2 λεπτών σε ένταση ακτινοβολίας $46 \mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$, σε μικρομοσχεύματα ελιάς μάρτυρες και σε μικρομοσχεύματα ελιάς με ενσωματωμένο στο θρεπτικό υπόστρωμα glyphosate 0.425 και 0.850 mM, ύστερα από 7, 8 και 12 ημέρες επίδραση. Οι τιμές εκφράζουν τον μέσο όρο + SE ($n=5-15$). Οι μέσες τιμές που φέρουν το ίδιο γράμμα του αλφαβήτου δεν διαφέρουν στατιστικά σημαντικά μεταξύ τους ($p<0.05$).

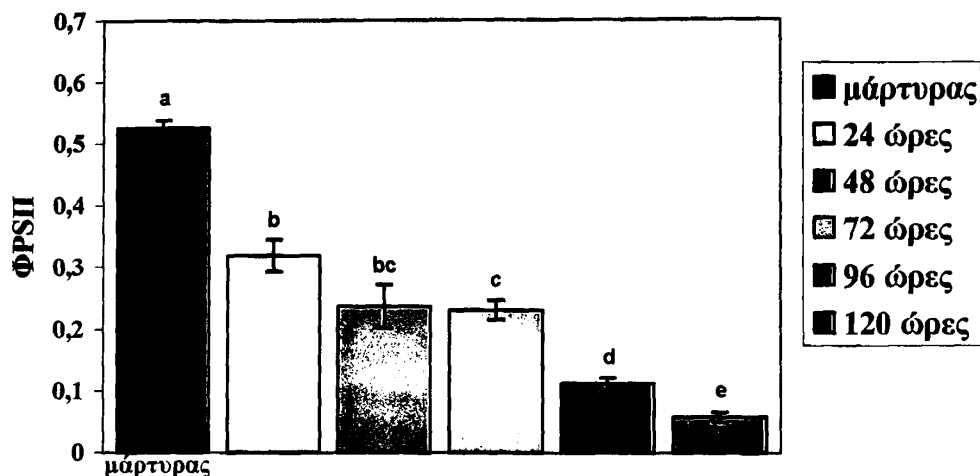


Σχήμα 3.16 Η αναγωγική κατάσταση του QA δηλαδή ενός μέτρου του μέρους των κλειστών κέντρων αντίδρασης του PSII ($1-Q_p$) μετά από χρόνο 5 λεπτών σε ένταση ακτινοβολίας $46 \mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$, σε μικρομοσχεύματα ελιάς μάρτυρες και σε μικρομοσχεύματα ελιάς με ενσωματωμένο στο θρεπτικό υπόστρωμα glyphosate 0.425 και 0.850 mM, ύστερα από 7, 8 και 12 ημέρες επίδραση. Οι τιμές εκφράζουν τον μέσο όρο + SE ($n=5-15$). Οι μέσες τιμές που φέρουν το ίδιο γράμμα του αλφαβήτου δεν διαφέρουν στατιστικά σημαντικά μεταξύ τους ($p<0.05$).

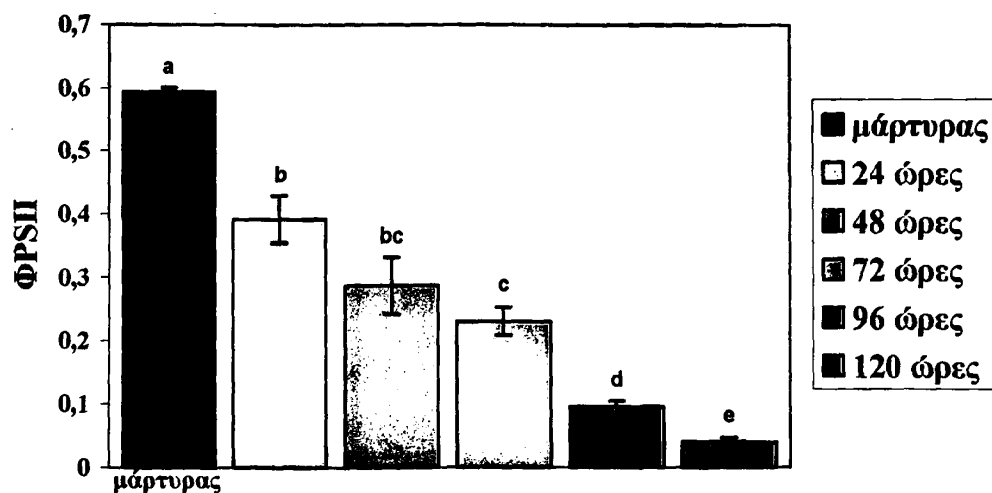
Η μεταβολή της φωτοχημικής απόδοσης φωτονίων (Φ_{PSII}) του PSII μετά από 2 λεπτά και 5 λεπτά σε ένταση φωτισμού $46 \mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$ και ύστερα από επίδραση συγκέντρωσης 3.9mM glyphosate ψεκασμένο στην φυλλική επιφάνεια φαίνεται στα σχήματα 3.17 και 3.18 αντίστοιχα. Η φωτοχημική απόδοση φωτονίων των φυτών μαρτύρων είναι μεγαλύτερη και διαφέρει στατιστικά σημαντικά από τις φωτοχημικές αποδόσεις φωτονίων των φυτών έχουν υποστεί επίδραση glyphosate ψεκασμένο στην φυλλική επιφάνεια. Η φωτοχημική απόδοση φωτονίων μειώνεται αντιστρόφως ανάλογα με το χρονικό διάστημα της επίδρασης.

Στο σχήμα 3.19 φαίνεται η μεταβολή της απόδοσης φωτονίων που χάνεται λόγω μη φωτοχημικής απόσβεσης (Φ_{NPQ}) του PSII μετά από 2 λεπτά σε ένταση φωτισμού $46 \mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$ και ύστερα από επίδραση συγκέντρωσης 3.9mM glyphosate ψεκασμένο στην φυλλική επιφάνεια. Η απόδοση φωτονίων που χάνεται λόγω μη φωτοχημικής απόσβεσης των φυτών μαρτύρων διαφέρει στατιστικά σημαντικά από τις αποδόσεις φωτονίων που χάνονται λόγω μη φωτοχημικής απόσβεσης όλων των φυτών που έχουν υποστεί επίδραση glyphosate πλην αυτών των οποίων η επίδραση glyphosate διαρκεί 96 ώρες.

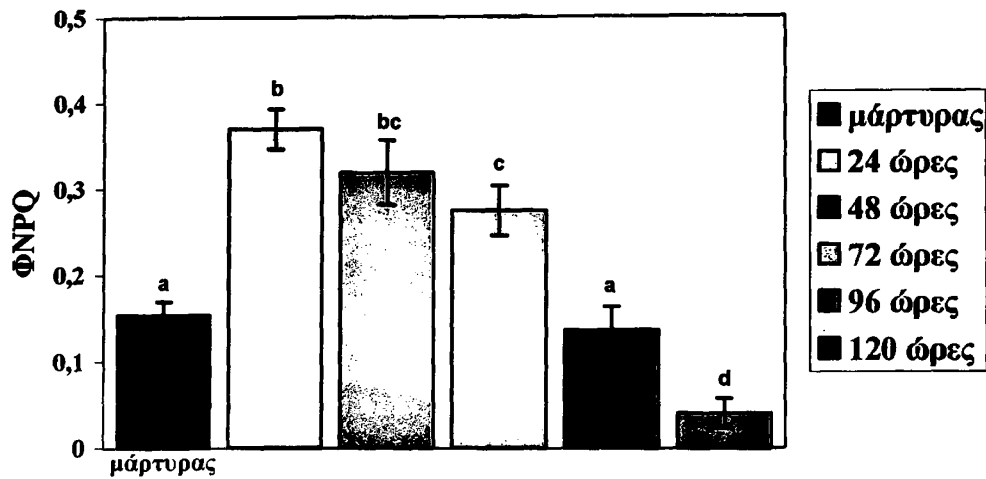
Η μεταβολή της απόδοσης φωτονίων που χάνεται λόγω μη φωτοχημικής απόσβεσης (Φ_{NPQ}) του PSII μετά από 5 λεπτά σε ένταση φωτισμού $46 \mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$ και ύστερα από επίδραση συγκέντρωσης 3.9mM glyphosate ψεκασμένο στην φυλλική επιφάνεια φαίνεται στο σχήμα 3.20. Η απόδοση φωτονίων που χάνεται λόγω μη φωτοχημικής απόσβεσης των φυτών μαρτύρων διαφέρει στατιστικά σημαντικά από τις αποδόσεις φωτονίων που χάνονται λόγω μη φωτοχημικής απόσβεσης όλων των φυτών που έχουν υποστεί επίδραση glyphosate πλην αυτών των οποίων το χρονικό διάστημα της επίδρασης glyphosate είναι 120 ώρες.



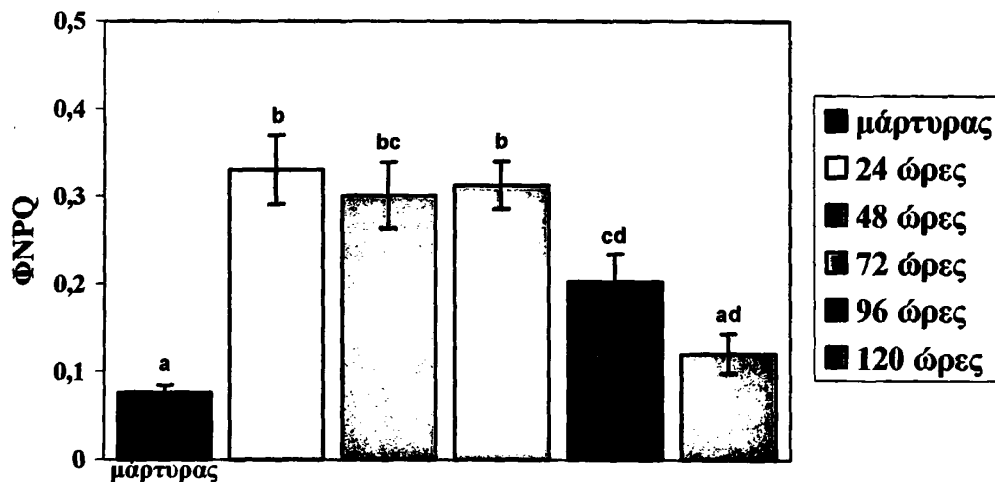
Σχήμα 3.17 Επίδραση 3.9 mM glyphosate ψεκασμένο στη φυλλική επιφάνεια μικρομοσχευμάτων ελιάς, στη φωτοχημική απόδοση φωτονίων του PSII (Φ_{PSII}) μετά από 2 λεπτά σε ένταση ακτινοβολίας $46 \mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$ και ύστερα από 24, 48, 72, 96 και 120 ώρες. Οι τιμές εκφράζουν τον μέσο όρο \pm SE ($n=5-15$). Οι μέσες τιμές που φέρουν το ίδιο γράμμα του αλφαβήτου δεν διαφέρουν στατιστικά σημαντικά μεταξύ τους ($p < 0.05$).



Σχήμα 3.18 Επίδραση 3.9 mM glyphosate ψεκασμένο στη φυλλική επιφάνεια μικρομοσχευμάτων ελιάς, στη φωτοχημική απόδοση φωτονίων του PSII (Φ_{PSII}) μετά από 5 λεπτά σε ένταση ακτινοβολίας $46 \mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$ και ύστερα από 24, 48, 72, 96 και 120 ώρες. Οι τιμές εκφράζουν τον μέσο όρο \pm SE ($n=5-15$). Οι μέσες τιμές που φέρουν το ίδιο γράμμα του αλφαβήτου δεν διαφέρουν στατιστικά σημαντικά μεταξύ τους ($p < 0.05$).



Σχήμα 3.19 Επίδραση 3.9 mM glyphosate ψεκασμένο στη φυλλική επιφάνεια μικρομοσχευμάτων ελιάς, στην απόδοση φωτονίων που χάνεται λόγω μη φωτοχημικής απόσβεσης του PSII (Φ_{NPQ}) μετά από 2 λεπτά σε ένταση ακτινοβολίας $46 \mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$ και ύστερα από 24, 48, 72, 96 και 120 ώρες. Οι τιμές εκφράζουν τον μέσο όρο \pm SE ($n=5-15$). Οι μέσες τιμές που φέρουν το ίδιο γράμμα του αλφαβήτου δεν διαφέρουν στατιστικά σημαντικά μεταξύ τους ($p < 0.05$).



Σχήμα 3.20 Επίδραση 3.9 mM glyphosate ψεκασμένο στη φυλλική επιφάνεια μικρομοσχευμάτων ελιάς, στην απόδοση φωτονίων που χάνεται λόγω μη φωτοχημικής απόσβεσης του PSII (Φ_{NPQ}) μετά από 5 λεπτά σε ένταση ακτινοβολίας $46 \mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$ και ύστερα από 24, 48, 72, 96 και 120 ώρες. Οι τιμές εκφράζουν τον μέσο όρο \pm SE ($n=5-15$). Οι μέσες τιμές που φέρουν το ίδιο γράμμα του αλφαβήτου δεν διαφέρουν στατιστικά σημαντικά μεταξύ τους ($p < 0.05$).

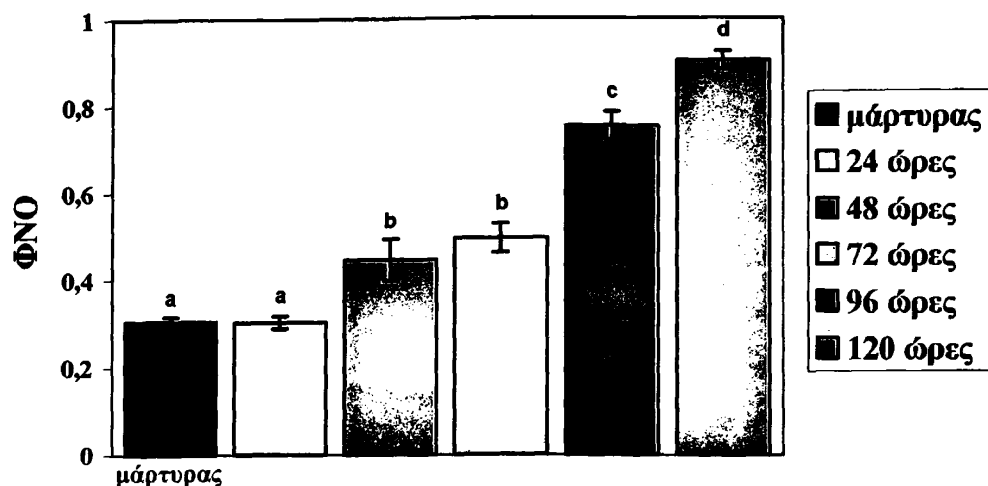
Η μεταβολή της απόδοσης φωτονίων που χάνεται για άλλες μη φωτοχημικές διαδικασίες (ΦNO) του PSII των φυτών μαρτύρων μετά από 2 λεπτά σε ένταση φωτισμού $46 \mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$ διαφέρει στατιστικά σημαντικά από τις αποδόσεις φωτονίων που χάνονται λόγω μη φωτοχημικής απόσβεσης όλων των φυτών που έχουν υποστεί επίδραση 3.9mM glyphosate ψεκασμένο στην φυλλική επιφάνεια εκτός αυτών των οποίων η επίδραση glyphosate διαρκεί 24 ώρες (σχήμα 3.21).

Στο σχήμα 3.22 φαίνεται η μεταβολή της απόδοσης φωτονίων που χάνεται για άλλες μη φωτοχημικές διαδικασίες (ΦNO) του PSII μετά από 5 λεπτά σε ένταση φωτισμού $46 \mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$ και ύστερα από επίδραση συγκέντρωσης 3.9mM glyphosate ψεκασμένο στην φυλλική επιφάνεια. Η απόδοση φωτονίων που χάνεται για άλλες μη φωτοχημικές διαδικασίες των φυτών μαρτύρων διαφέρει στατιστικά σημαντικά από τις αποδόσεις φωτονίων που χάνονται για άλλες μη φωτοχημικές διαδικασίες όλων των φυτών που έχουν υποστεί επίδραση glyphosate.

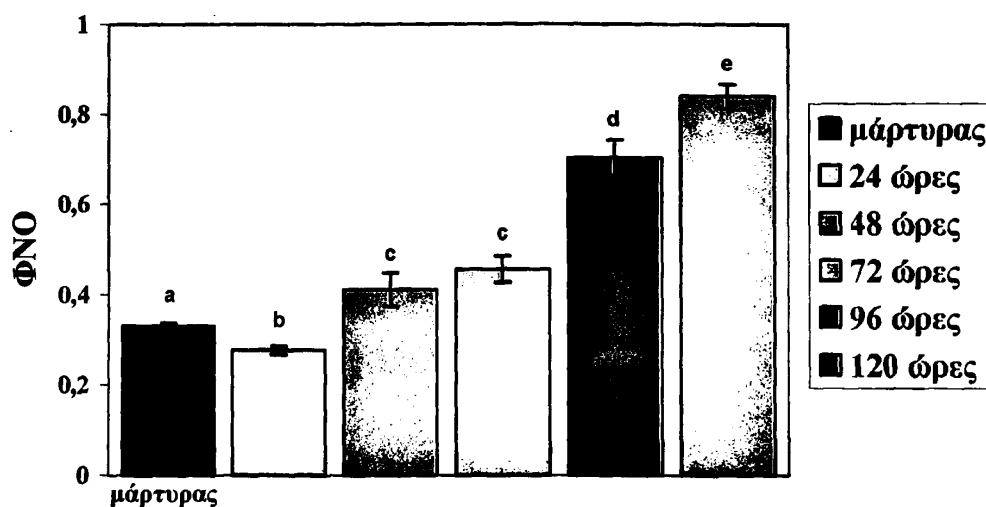
Αν στις δύο παραπάνω περιπτώσεις εξαιρεθούν τα φυτά μάρτυρες, παρατηρείται ότι η απόδοση φωτονίων που χάνεται για άλλες μη φωτοχημικές διαδικασίες αυξάνεται ανάλογα με το χρονικό διάστημα της επίδρασης.

Η μεταβολή της μη φωτοχημικής απόσβεσης (NPQ) του PSII μετά από 2 λεπτά σε ένταση φωτισμού $46 \mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$ και ύστερα από επίδραση συγκέντρωσης 3.9mM glyphosate ψεκασμένο στην φυλλική επιφάνεια φαίνεται στο σχήμα 3.23. Η μη φωτοχημική απόσβεση των φυτών μαρτύρων διαφέρει στατιστικά σημαντικά από τις μη φωτοχημικές αποσβέσεις όλων των φυτών εκτός αυτών των οποίων η επίδραση διαρκεί 72 ώρες.

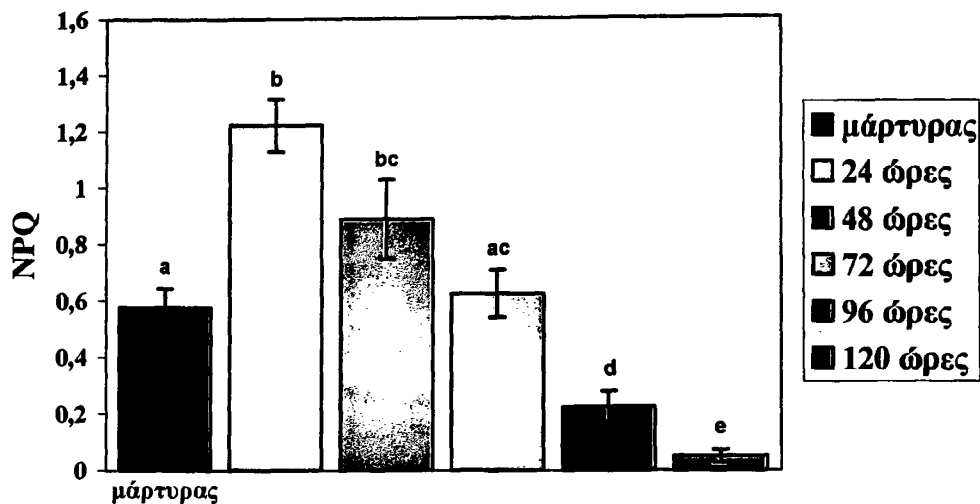
Η μεταβολή της μη φωτοχημικής απόσβεσης (NPQ) του PSII των φυτών μαρτύρων μετά από 5 λεπτά σε ένταση φωτισμού $46 \mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$ διαφέρει στατιστικά σημαντικά από τις μη φωτοχημικές αποσβέσεις όλων των φυτών που έχουν υποστεί επίδραση 3.9mM glyphosate ψεκασμένο στην φυλλική επιφάνεια εκτός αυτών των οποίων η επίδραση διαρκεί 96 και 120 ώρες (σχήμα 3.24).



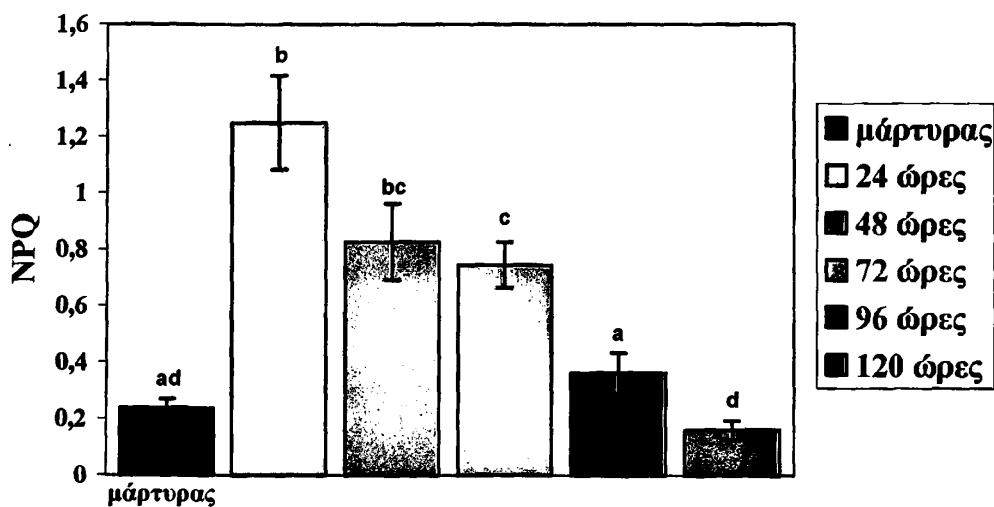
Σχήμα 3.21 Επίδραση 3.9 mM glyphosate ψεκασμένο στη φυλλική επιφάνεια μικρομοσχευμάτων ελιάς, στην απόδοση φωτονίων που χάνεται για άλλες μη φωτοχημικές διαδικασίες του PSII (Φ_{NO}) μετά από 2 λεπτά σε ένταση ακτινοβολίας $46 \mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$ και ύστερα από 24, 48, 72, 96 και 120 ώρες. Οι τιμές εκφράζουν τον μέσο όρο \pm SE ($n=5-15$). Οι μέσες τιμές που φέρουν το ίδιο γράμμα του αλφαβήτου δεν διαφέρουν στατιστικά σημαντικά μεταξύ τους ($p < 0.05$).



Σχήμα 3.22 Επίδραση 3.9 mM glyphosate ψεκασμένο στη φυλλική επιφάνεια μικρομοσχευμάτων ελιάς, στην απόδοση φωτονίων που χάνεται για άλλες μη φωτοχημικές διαδικασίες του PSII (Φ_{NO}) μετά από 5 λεπτά σε ένταση ακτινοβολίας $46 \mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$ και ύστερα από 24, 48, 72, 96 και 120 ώρες. Οι τιμές εκφράζουν τον μέσο όρο \pm SE ($n=5-15$). Οι μέσες τιμές που φέρουν το ίδιο γράμμα του αλφαβήτου δεν διαφέρουν στατιστικά σημαντικά μεταξύ τους ($p < 0.05$).



Σχήμα 3.23 Επίδραση 3.9 mM glyphosate ψεκασμένο στη φυλλική επιφάνεια μικρομοσχευμάτων ελιάς, στη μη φωτοχημική απόσβεση φωτονίων του PSII (*NPQ*) μετά από 2 λεπτά σε ένταση ακτινοβολίας $46 \mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$ και ύστερα από 24, 48, 72, 96 και 120 ώρες. Οι τιμές εκφράζουν τον μέσο όρο \pm SE ($n=5-15$). Οι μέσες τιμές που φέρουν το ίδιο γράμμα του αλφαβήτου δεν διαφέρουν στατιστικά σημαντικά μεταξύ τους ($p<0.05$).



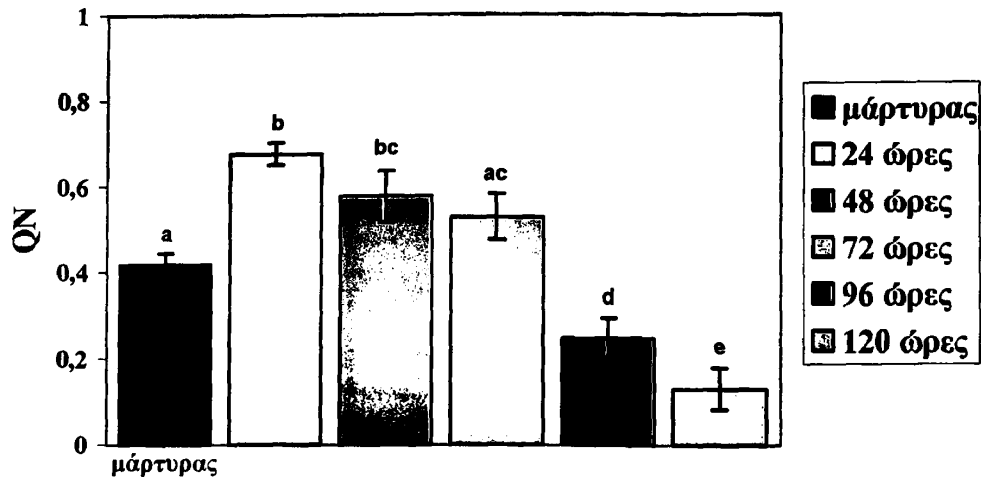
Σχήμα 3.24 Επίδραση 3.9 mM glyphosate ψεκασμένο στη φυλλική επιφάνεια μικρομοσχευμάτων ελιάς, στη μη φωτοχημική απόσβεση φωτονίων του PSII (*NPQ*) μετά από 5 λεπτά σε ένταση ακτινοβολίας $46 \mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$ και ύστερα από 24, 48, 72, 96 και 120 ώρες. Οι τιμές εκφράζουν τον μέσο όρο \pm SE ($n=5-15$). Οι μέσες τιμές που φέρουν το ίδιο γράμμα του αλφαβήτου δεν διαφέρουν στατιστικά σημαντικά μεταξύ τους ($p<0.05$).

Στο σχήμα 3.25 φαίνεται η μεταβολή της μη φωτοχημικής απόσβεσης που αντιπροσωπεύει το διασκεδασμό θερμότητας από την ενεργοποίηση των μεμβρανών των θυλακοειδών (Q_N) του PSII μετά από 2 λεπτά σε ένταση φωτισμού $46 \mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$ και ύστερα από επίδραση συγκέντρωσης 3.9mM glyphosate ψεκασμένο στην φυλλική επιφάνεια. Η μη φωτοχημική απόσβεση Q_N των φυτών μαρτύρων διαφέρει στατιστικά σημαντικά από τις μη φωτοχημικές αποσβέσεις Q_N όλων των φυτών εκτός αυτών των οποίων η επίδραση glyphosate διαρκεί 72 ώρες.

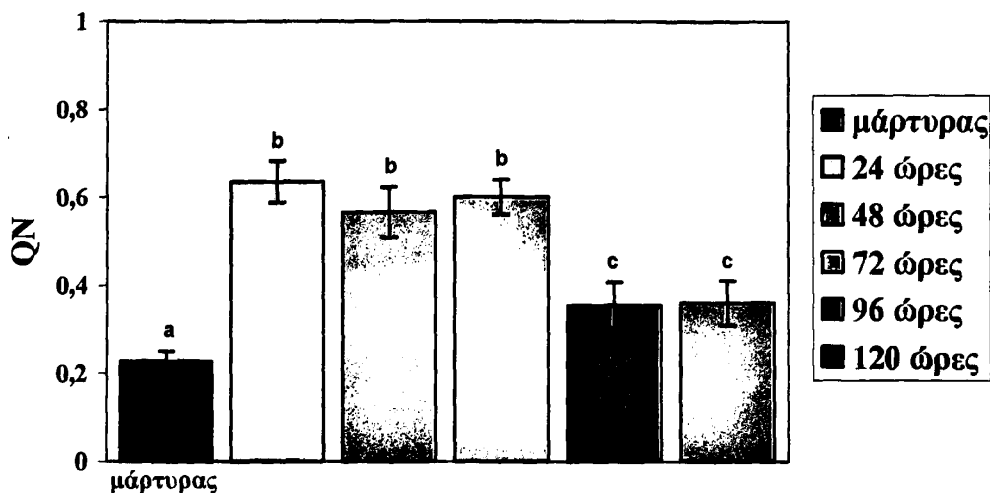
Η μεταβολή της μη φωτοχημικής απόσβεσης που αντιπροσωπεύει το διασκεδασμό θερμότητας από την ενεργοποίηση των μεμβρανών των θυλακοειδών (Q_N) του PSII μετά από 5 λεπτά σε ένταση φωτισμού $46 \mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$ και ύστερα από επίδραση συγκέντρωσης 3.9mM glyphosate ψεκασμένο στην φυλλική επιφάνεια φαίνεται στο σχήμα 3.26. Η μη φωτοχημική απόσβεση Q_N των φυτών μαρτύρων είναι μικρότερη και διαφέρει στατιστικά σημαντικά από τις μη φωτοχημικές αποσβέσεις όλων των φυτών που έχουν υποστεί επίδραση glyphosate.

Η μεταβολή της φωτοχημικής απόσβεσης (Q_P) του PSII των φυτών μαρτύρων μετά από 2 λεπτά σε ένταση φωτισμού $46 \mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$ είναι μεγαλύτερη και διαφέρει στατιστικά σημαντικά από τις φωτοχημικές αποσβέσεις Q_P όλων των φυτών που έχουν υποστεί επίδραση 3.9mM glyphosate ψεκασμένο στην φυλλική επιφάνεια (σχήμα 3.27).

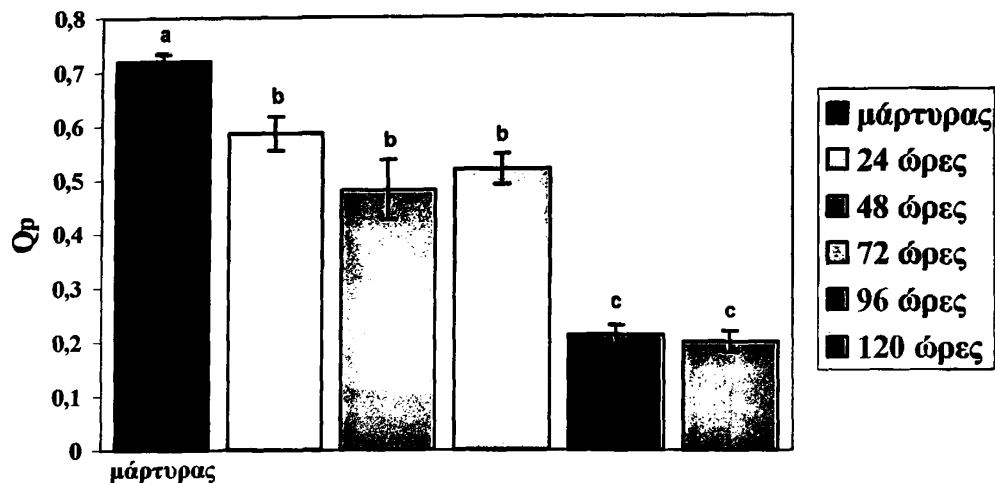
Στο σχήμα 3.28 φαίνεται η μεταβολή της φωτοχημικής απόσβεσης (Q_P) του PSII μετά από 5 λεπτά σε ένταση φωτισμού $46 \mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$ και ύστερα από επίδραση συγκέντρωσης 3.9mM glyphosate ψεκασμένο στην φυλλική επιφάνεια. Η φωτοχημική απόσβεση Q_P των φυτών μαρτύρων είναι μεγαλύτερη και διαφέρει στατιστικά σημαντικά από τις φωτοχημικές αποσβέσεις Q_P των υπόλοιπων φυτών εκτός αυτών των οποίων η επίδραση glyphosate διαρκεί 24 ώρες. Από το σχήμα παρατηρείται ότι η φωτοχημική απόσβεση Q_P μειώνεται αντιστρόφως ανάλογα με το χρονικό διάστημα της επίδρασης.



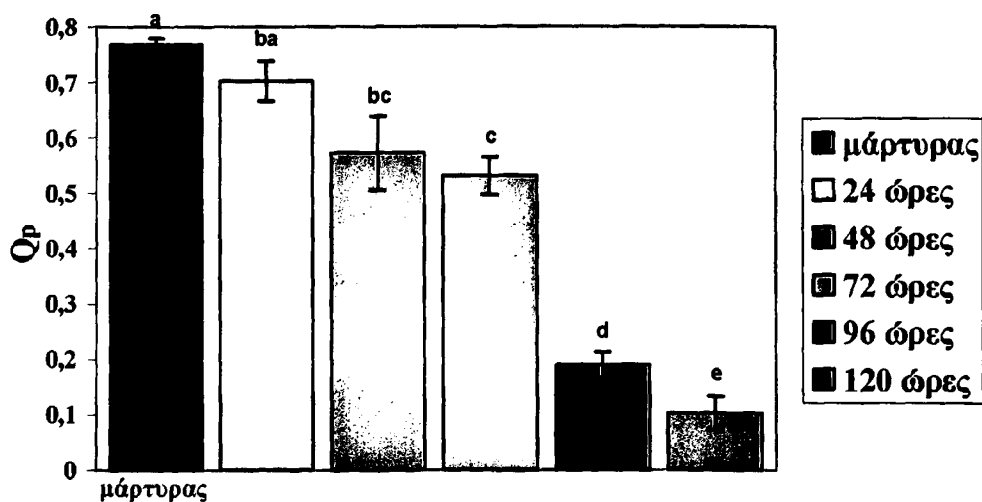
Σχήμα 3.25 Επίδραση 3.9 mM glyphosate ψεκασμένο στη φυλλική επιφάνεια μικρομοσχευμάτων ελιάς, στη μη φωτοχημική απόσβεση που αντιπροσωπεύει το διασκεδασμό θερμότητας από την ενεργοποίηση των μεμβρανών των θυλακοειδών του PSII (Q_N) μετά από 2 λεπτά σε ένταση ακτινοβολίας $46 \mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$ και ύστερα από 24, 48, 72, 96 και 120 ώρες. Οι τιμές εκφράζουν τον μέσο όρο \pm SE ($n=5-15$). Οι μέσες τιμές που φέρουν το ίδιο γράμμα του αλφαβήτου δεν διαφέρουν στατιστικά σημαντικά μεταξύ τους ($p < 0.05$).



Σχήμα 3.26 Επίδραση 3.9 mM glyphosate ψεκασμένο στη φυλλική επιφάνεια μικρομοσχευμάτων ελιάς, στη μη φωτοχημική απόσβεση που αντιπροσωπεύει το διασκεδασμό θερμότητας από την ενεργοποίηση των μεμβρανών των θυλακοειδών του PSII (Q_N) μετά από 5 λεπτά σε ένταση ακτινοβολίας $46 \mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$ και ύστερα από 24, 48, 72, 96 και 120 ώρες. Οι τιμές εκφράζουν τον μέσο όρο \pm SE ($n=5-15$). Οι μέσες τιμές που φέρουν το ίδιο γράμμα του αλφαβήτου δεν διαφέρουν στατιστικά σημαντικά μεταξύ τους ($p < 0.05$).



Σχήμα 3.27 Επίδραση 3.9 mM glyphosate ψεκασμένο στη φυλλική επιφάνεια μικρομοσχευμάτων ελιάς, στη φωτοχημική απόσβεση του PSII (Q_p) μετά από 2 λεπτά σε ένταση ακτινοβολίας $46 \mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$ και ύστερα από 24, 48, 72, 96 και 120 ώρες. Οι τιμές εκφράζουν τον μέσο όρο \pm SE ($n=5-15$). Οι μέσες τιμές που φέρουν το ίδιο γράμμα του αλφαβήτου δεν διαφέρουν στατιστικά σημαντικά μεταξύ τους ($p < 0.05$).



Σχήμα 3.28 Επίδραση 3.9 mM glyphosate ψεκασμένο στη φυλλική επιφάνεια μικρομοσχευμάτων ελιάς, στη φωτοχημική απόσβεση του PSII (Q_p) μετά από 5 λεπτά σε ένταση ακτινοβολίας $46 \mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$ και ύστερα από 24, 48, 72, 96 και 120 ώρες. Οι τιμές εκφράζουν τον μέσο όρο \pm SE ($n=5-15$). Οι μέσες τιμές που φέρουν το ίδιο γράμμα του αλφαβήτου δεν διαφέρουν στατιστικά σημαντικά μεταξύ τους ($p < 0.05$).

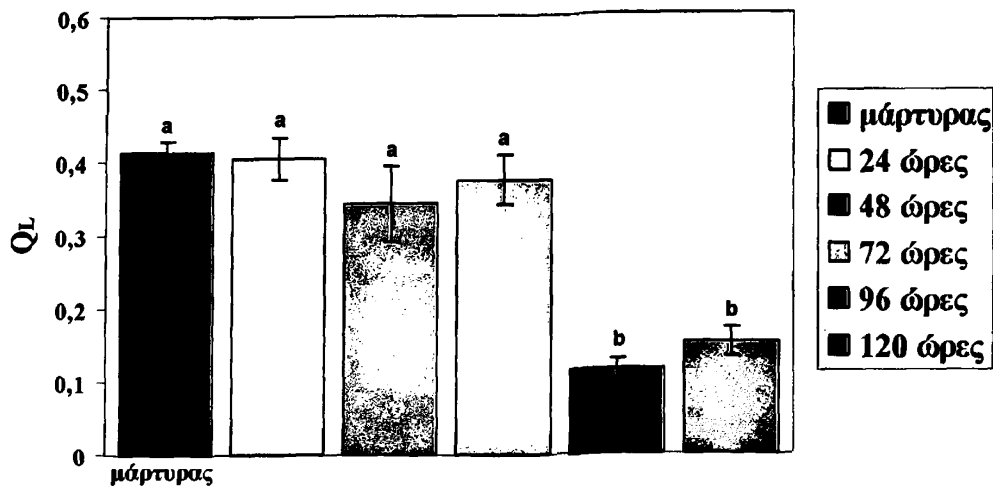


Η μεταβολή της φωτοχημικής απόσβεσης βάσει του μοντέλου των λιμών (Q_L) του PSII μετά από 2 λεπτά σε ένταση φωτισμού $46 \mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$ και ύστερα από επίδραση συγκέντρωσης 3.9mM glyphosate ψεκασμένο στην φυλλική επιφάνεια φαίνεται στο σχήμα 3.29. Η φωτοχημική απόσβεση Q_L των φυτών μαρτύρων είναι μεγαλύτερη και διαφέρει στατιστικά σημαντικά από τις φωτοχημικές αποσβέσεις Q_L των φυτών που έχουν υποστεί επίδραση glyphosate για 96 και 120 ώρες.

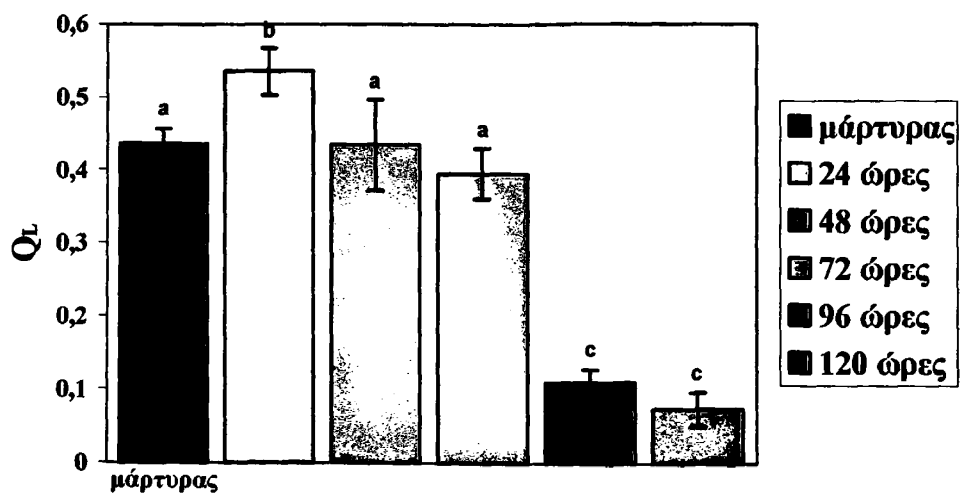
Η μεταβολή της φωτοχημικής απόσβεσης βάσει του μοντέλου των λιμών (Q_L) του PSII των φυτών μαρτύρων μετά από 5 λεπτά σε ένταση φωτισμού $46 \mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$ διαφέρει στατιστικά σημαντικά από τις φωτοχημικές αποσβέσεις Q_L των φυτών που έχουν υποστεί επίδραση 3.9mM glyphosate ψεκασμένο στην φυλλική επιφάνεια για 24, 96 και 120 ώρες (σχήμα 3.30).

Στο σχήμα 3.31 φαίνεται η μεταβολή της αναγωγικής κατάστασης του QA δηλαδή ενός μέτρου του μέρους των κλειστών κέντρων αντίδρασης ($I-Qp$) του PSII μετά από 2 λεπτά σε ένταση φωτισμού $46 \mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$ και ύστερα από επίδραση συγκέντρωσης 3.9mM glyphosate ψεκασμένο στην φυλλική επιφάνεια. Η αναγωγική κατάσταση του QA των φυτών μαρτύρων είναι μικρότερη και διαφέρει στατιστικά σημαντικά από τις αναγωγικές καταστάσεις του QA των φυτών που έχουν υποστεί επίδραση glyphosate.

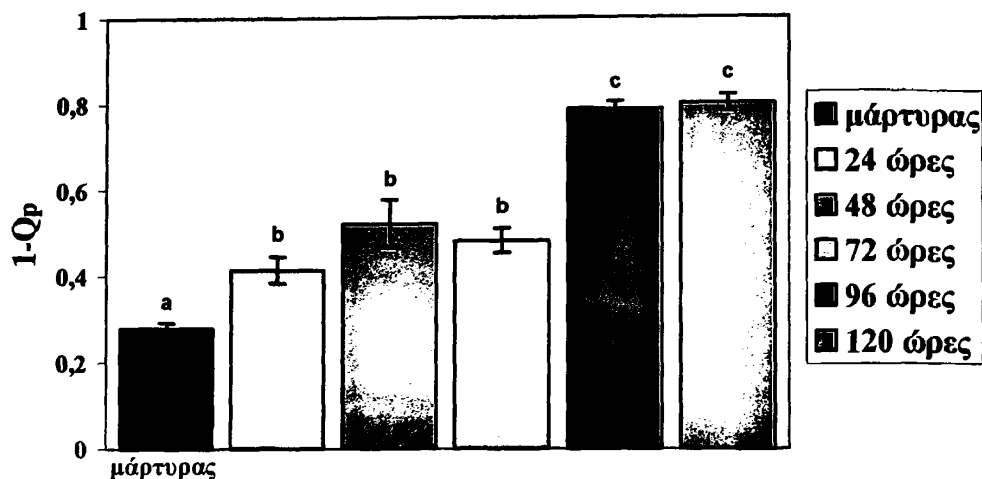
Η μεταβολή της αναγωγικής κατάστασης του QA δηλαδή ενός μέτρου του μέρους των κλειστών κέντρων αντίδρασης ($I-Qp$) του PSII μετά από 5 λεπτά σε ένταση φωτισμού $46 \mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$ και ύστερα από επίδραση συγκέντρωσης 3.9mM glyphosate ψεκασμένο στην φυλλική επιφάνεια φαίνεται στο σχήμα 3.32. Η αναγωγική κατάσταση του QA των φυτών μαρτύρων είναι μικρότερη και διαφέρει στατιστικά σημαντικά από τις αναγωγικές καταστάσεις του QA όλων των φυτών εκτός αυτών των οποίων η επίδραση glyphosate διαρκεί 24 ώρες. Η αναγωγική κατάσταση του QA των φυτών αυξάνεται ανάλογα με το χρονικό διάστημα της επίδρασης.



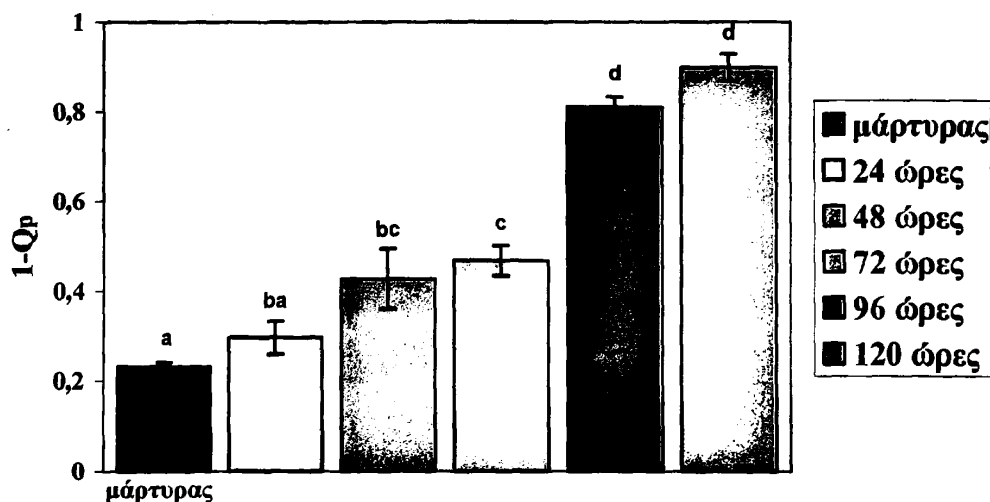
Σχήμα 3.29 Επίδραση 3.9 mM glyphosate ψεκασμένο στη φυλλική επιφάνεια μικρομοσχευμάτων ελιάς, στη φωτοχημική απόσβεση βάσει του μοντέλου των λιμών του PSII (Q_L) μετά από 2 λεπτά σε ένταση ακτινοβολίας $46 \mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$ και ύστερα από 24, 48, 72, 96 και 120 ώρες. Οι τιμές εκφράζουν τον μέσο όρο \pm SE ($n=5-15$). Οι μέσες τιμές που φέρουν το ίδιο γράμμα του αλφαβήτου δεν διαφέρουν στατιστικά σημαντικά μεταξύ τους ($p < 0.05$).



Σχήμα 3.30 Επίδραση 3.9 mM glyphosate ψεκασμένο στη φυλλική επιφάνεια μικρομοσχευμάτων ελιάς, στη φωτοχημική απόσβεση βάσει του μοντέλου των λιμών του PSII (Q_L) μετά από 5 λεπτά σε ένταση ακτινοβολίας $46 \mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$ και ύστερα από 24, 48, 72, 96 και 120 ώρες. Οι τιμές εκφράζουν τον μέσο όρο \pm SE ($n=5-15$). Οι μέσες τιμές που φέρουν το ίδιο γράμμα του αλφαβήτου δεν διαφέρουν στατιστικά σημαντικά μεταξύ τους ($p < 0.05$).



Σχήμα 3.31 Επίδραση 3.9 mM glyphosate ψεκασμένο στη φυλλική επιφάνεια μικρομοσχευμάτων ελιάς, στην αναγωγική κατάσταση του QA δηλαδή ενός μέτρου του μέρους των κλειστών κέντρων αντίδρασης του PSII ($1-Q_p$) μετά από 2 λεπτά σε ένταση ακτινοβολίας $46 \mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$ και ύστερα από 24, 48, 72, 96 και 120 ώρες. Οι τιμές εκφράζουν τον μέσο όρο \pm SE ($n=5-15$). Οι μέσες τιμές που φέρουν το ίδιο γράμμα του αλφαβήτου δεν διαφέρουν στατιστικά σημαντικά μεταξύ τους ($p < 0.05$).

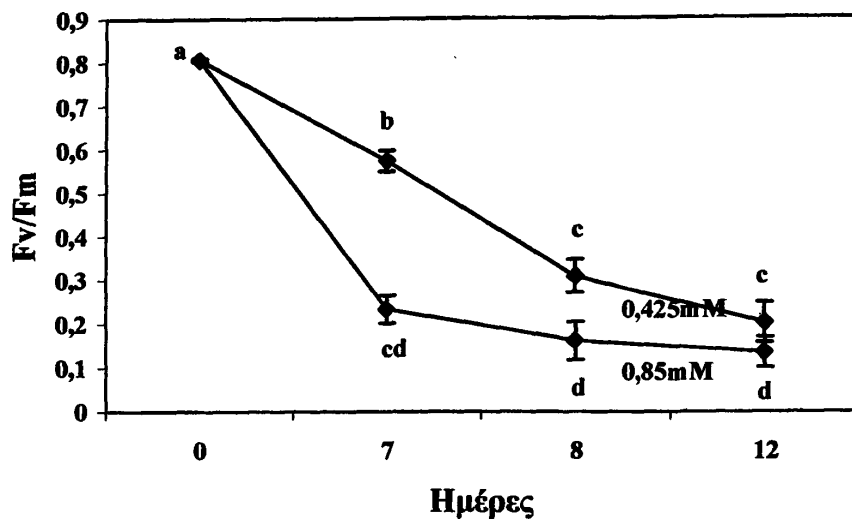


Σχήμα 3.32 Επίδραση 3.9 mM glyphosate ψεκασμένο στη φυλλική επιφάνεια μικρομοσχευμάτων ελιάς, στην αναγωγική κατάσταση του QA δηλαδή ενός μέτρου του μέρους των κλειστών κέντρων αντίδρασης του PSII ($1-Q_p$) μετά από 5 λεπτά σε ένταση ακτινοβολίας $46 \mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$ και ύστερα από επίδραση 24, 48, 72, 96 και 120 ώρες. Οι τιμές εκφράζουν τον μέσο όρο \pm SE ($n=5-15$). Οι μέσες τιμές που φέρουν το ίδιο γράμμα του αλφαβήτου δεν διαφέρουν στατιστικά σημαντικά μεταξύ τους ($p < 0.05$).

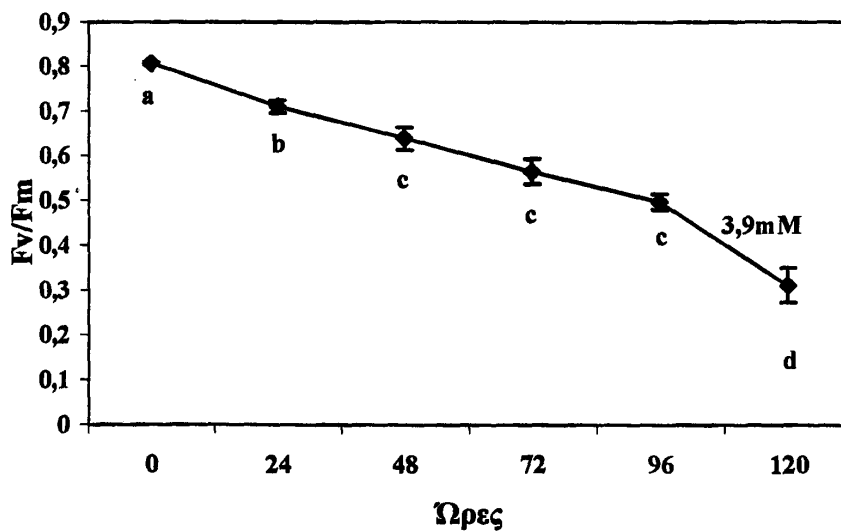
Στο σχήμα 3.33 φαίνεται η μεταβολή της μέγιστης απόδοσης φωτονίων (F_v/F_m) του PSII σε ένταση φωτισμού $46 \mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$ και ύστερα από επίδραση συγκεντρώσεων glyphosate 0, 0.425 και 0.850 mM ενσωματωμένο στο θρεπτικό υπόστρωμα. Η μέγιστη απόδοση φωτονίων των φυτών μαρτύρων είναι μεγαλύτερη και διαφέρει στατιστικά σημαντικά από τις μέγιστες αποδόσεις φωτονίων των φυτών που έχουν υποστεί επίδραση glyphosate. Η μέγιστη απόδοση φωτονίων μειώνεται αντιστρόφως ανάλογα με τη συγκέντρωση του glyphosate καθώς και με το χρονικό διάστημα της επίδρασης.

Η μεταβολή της μέγιστης απόδοσης φωτονίων (F_v/F_m) του PSII σε ένταση φωτισμού $46 \mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$ και ύστερα από επίδραση συγκέντρωσης 3.9mM glyphosate ψεκασμένο στην φυλλική επιφάνεια φαίνεται στο σχήμα 3.34. Η μέγιστη απόδοση φωτονίων των φυτών μαρτύρων είναι μεγαλύτερη και διαφέρει στατιστικά σημαντικά από τη μέγιστη απόδοση φωτονίων όλων των φυτών που έχουν υποστεί επίδραση glyphosate.

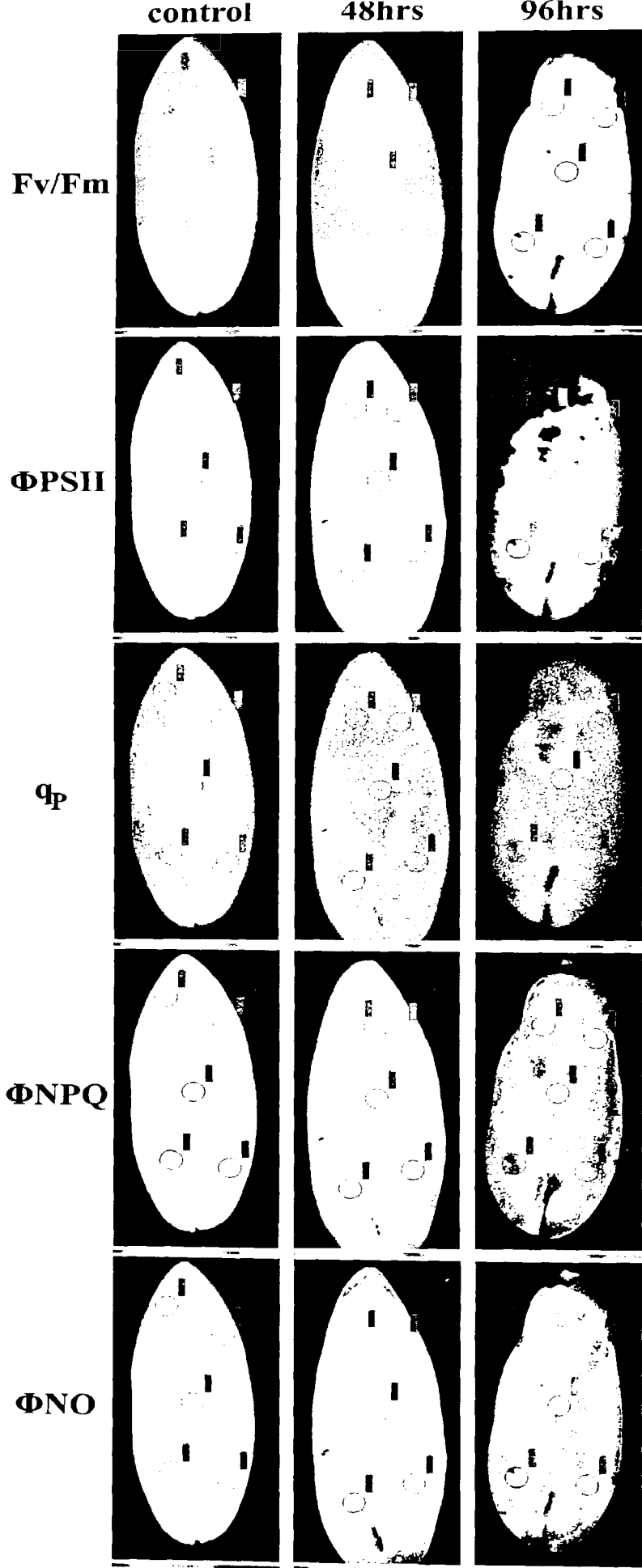
Στην εικόνα 3.9 απεικονίζεται ο φθορισμός της χλωροφύλλης σε μεμονωμένα φύλλα μικρομοσχευμάτων *Olea europaea* σε ένταση φωτισμού $46 \mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$ μετά από 2 λεπτά και ύστερα από επίδραση συγκέντρωσης glyphosate 3.9mM ψεκασμένη στη φυλλική επιφάνεια για 48 και 96 hrs. Τα φύλλα έμειναν στο σκοτάδι για 15min πριν από τη μέτρηση και πάνω σε κάθε φύλλο επιλέχτηκαν πέντε περιοχές ενδιαφέροντος (Π.Ε), προκειμένου να αξιολογηθεί η χωρική ετερογένεια. Η χρωματική κλίμακα προσδιορίζει το μέγεθος της ζημιάς που έχει υποστεί το φύλλο από τη δράση του glyphosate. Το ρόζ υποδηλώνει ότι το φύλλο δεν έχει υποστεί βλάβη, ενώ με το κόκκινο απεικονίζεται η μέγιστη βλάβη που μπορεί να έχει υποστεί το φύλλο. Στα φύλλα μικρομοσχευμάτων *Olea europaea* διαπιστώνονται χρωματικές διακυμάνσεις που δείχνουν τη σταδιακή βλάβη που προκάλεσε το glyphosate και η οποία είναι ανάλογη με το χρονικό διάστημα που πραγματοποιήθηκαν οι μετρήσεις.



Σχήμα 3.33 Μεταβολή της μέγιστης φωτοχημικής απόδοσης του PSII (F_v/F_m) σε μικρομοσχεύματα ελιάς μάρτυρες και σε μικρομοσχεύματα ελιάς με ενσωματωμένο στο θρεπτικό υπόστρωμα glyphosate 0.425 και 0.850 mM, ύστερα από 7, 8 και 12 ημέρες επίδραση. Οι τιμές εκφράζουν τον μέσο όρο \pm SE ($n=5-15$). Οι μέσες τιμές που φέρουν το ίδιο γράμμα του αλφαβήτου δεν διαφέρουν στατιστικά σημαντικά μεταξύ τους ($p<0.05$).



Σχήμα 3.34 Επίδραση 3.9 mM glyphosate ψεκασμένο στη φυλλική επιφάνεια μικρομοσχευμάτων ελιάς, στη μέγιστη φωτοχημική απόδοση του PSII (F_v/F_m) και ύστερα από 24, 48, 72, 96 και 120 ώρες. Οι τιμές εκφράζουν τον μέσο όρο \pm SE ($n=5-15$). Οι μέσες τιμές που φέρουν το ίδιο γράμμα του αλφαβήτου δεν διαφέρουν στατιστικά σημαντικά μεταξύ τους ($p<0.05$).



Εικόνα 3.3: Εικόνες τε
 φθορισμού τι
 χλωροφύλλης τα
 παραμέτρων Fv/Fi
 (μέγιστη απόδοσ
 φωτονίων στο σκοτάδι
 ΦPSII (απόδοση φωτονία
 του PSII), qP (φωτοχημικ
 απόσβεση), ΦNRQ
 (απόδοση φωτονίων πο
 χάνεται λόγω μ
 φωτοχημικής απόσβεση
 μέσω σκεδάσμού τη
 θερμότητας) και ΦN
 (απόδοση φωτονίων πο
 χάνεται για άλλες μ
 φωτοχημικές διαδικασίες
 με δέσμη ακτινικού φωτό
 46μmol photons m⁻²sec⁻¹
 μετά από 2 λεπτά σε φύλλι
 μικρο- μοςχευμάτων ελιά
 ύστερα από επίδρασι
 glyphosate 0 (control), κα
 3,9mM ψεκασμένο στη
 φυλλική επιφάνεια για 4
 και 96hrs. Τα φύλλα
 έμειναν στο σκοτάδι γι
 15min πριν από τη μέτρησι
 Πάνω στο φύλλι
 επιλέχτηκαν πέντε περιοχέ
 ενδιαφέροντος (Π.Ε)
 προκειμένου να αξιολογηθε
 η χωρική ετερογένεια. Η
 ανάλυση των εικόνων έγινε
 με τη βοήθεια μια
 χρωματικής κλίμακας ποι
 κυμαίνεται από το μαύρο
 (τιμή εικονοστοιχείου
 0.000) και μέσω του
 κόκκινου, κίτρινου,
 πράσινου, και μπλε φθάνει
 στο ροζ (τελειώνοντας με
 τιμή εικονοστοιχείου σε
 0.999). Η λήψη των εικόνων
 έγινε με τη χρήση του
 φθορισμόμετρου imaging-
 PAM

4. ΣΥΜΠΕΡΑΣΜΑΤΑ-ΣΥΖΗΤΗΣΗ

Από την εκτίμηση των αποτελεσμάτων προκύπτει το συμπέρασμα ότι ο σχηματισμός κάλου στα μικρομοσχεύματα ελιάς οφείλεται στη δράση των ορμονών και αναστέλλεται με την προσθήκη του glyphosate στο θρεπτικό υπόστρωμα. Επίσης, όσο μεγαλύτερη είναι η συγκέντρωση του glyphosate τόσο μικρότερο είναι το ποσοστό δημιουργίας κάλου. Το πρώτο σύμπτωμα που παρατηρείται στα μικρομοσχεύματα και οφείλεται στη δράση του glyphosate είναι η χλώρωση. Βέβαια παρατηρείται και κάποια μικρή χλώρωση στα μικρομοσχεύματα απουσία glyphosate και αυτό επειδή στον μικροπολλαπλασιασμό τα φυτά διατηρούνται σε θάλαμο ανάπτυξης με ένταση φωτισμού χαμηλότερη από την κανονική. Αμέσως μετά το στάδιο της χλώρωσης ακολουθεί η εμφάνιση καστανών κηλίδων στη φυλλική επιφάνεια των μικρομοσχευμάτων και ακολουθεί η καθολική ξήρανση. Τα φυτά που νεκρώνονται γρηγορότερα είναι αυτά που έχουν υποστεί τη μεγαλύτερη συγκέντρωση της ζιζανιοκτόνου ουσίας και ακολουθούν αυτά που έχουν υποστεί τη μικρότερη.

Όσον αφορά τα συμπτώματα της επίδρασης glyphosate *in vitro* (χλώρωση, πτώση φύλλων, αναστολή αύξησης, νέκρωση μικρομοσχευμάτων) δεν παρουσίασαν ομοιότητες με τα συμπτώματα επίδρασης glyphosate *in vivo* (εμφάνιση ομάδας μασχαλιαίων οφθαλμών στα δέντρα ελιάς). Αυτό προφανώς οφείλεται στο γεγονός ότι τα μικρομοσχεύματα ελιάς παρουσιάζουν μεγαλύτερη ευαισθησία στη ζιζανιοκτόνο δράση σε σχέση με τα ανεπτυγμένα δένδρα ελιάς στις ίδιες συγκεντρώσεις. Επιπλέον, το glyphosate στις συγκεντρώσεις που ενσωματώθηκε στο θρεπτικό υπόστρωμα, δεν φάνηκε να έχει δράση ορμόνης όπως αρχικά υποτέθηκε αλλά πιθανόν μικρότερες συγκεντρώσεις ζιζανιοκτόνου να είχαν τέτοια αποτελέσματα. Τα μικρομοσχεύματα που είχαν υποστεί επίδραση ζιζανιοκτόνου, ανεξαρτήτως συγκέντρωσης, δεν παρουσίασαν καθόλου αύξηση παρόλο που σε κάποιες μεταχειρίσεις δεν έλειψαν από το θρεπτικό υπόστρωμα οι απαραίτητες συγκεντρώσεις ορμονών που προάγουν την κυτταρική διαίρεση και τον πολλαπλασιασμό του βλαστού (6 - βενζύλ - αμινοπυρίνη και ζεατίνη).

Η μέθοδος του φθορισμού της χλωροφύλλης αποδείχθηκε πολύ αποτελεσματική στο ότι προσφέρει τη δυνατότητα εντοπισμού ανωμαλιών στο μεταβολισμό των φύλλων του φυτού αρκετά πριν την έναρξη ορατών επιπτώσεων



στη μορφολογία του φύλλου ή στην ανάπτυξη του φυτού και στηρίζεται στη θεωρία ότι η απορροφημένη ηλιακή ενέργεια που δεν αξιοποιείται από το φυτό για την λειτουργία της φωτοσύνθεσης αποδίδεται εν μέρει ως φθορισμός της χλωροφύλλης, αλλά κυρίως ως θερμότητα. Οπότε η μείωση της φωτοσυνθετικής ικανότητας κατά το επερχόμενο στρες υποδηλώνει αύξηση της μη εκμεταλλεύσιμης από το φυτό ενέργειας (Chaerle *et al.*, 2003).

Με τη συγκεκριμένη μέθοδο δεν είναι δυνατό να εντοπιστούν τροποποιήσεις στο μεταβολισμό του φύλλου που δεν επηρεάζουν άμεσα ή έμμεσα τη λειτουργία της φωτοσύνθεσης. Ωστόσο, πολλές διαταραχές των μεταβολικών αντιδράσεων που δεν συνδέονται με κάποιο τρόπο με τη λειτουργία της φωτοσύνθεσης έχει βρεθεί ότι τροποποιούν το φθορισμό της χλωροφύλλης. Σύμφωνα με τα αποτελέσματά μας μέσω της μεθόδου του φθορισμού της χλωροφύλλης στα μικρομοσχεύματα *Olea europaea*, διαπιστώθηκε ότι το glyphosate επηρεάζει σε μεγάλο βαθμό τη λειτουργία της φωτοσύνθεσης παρόλο που ο τρόπος δράσης του είναι η αναστολή της βιοσύνθεσης αρωματικών αμινοξέων. Η απεικόνιση του φθορισμού της χλωροφύλλης φανέρωσε τις διαταραχές στα φύλλα των μικρομοσχευμάτων *Olea europaea* κάτω από συνθήκες καταπόνησης λόγω επίδρασης του glyphosate, την ετερογενή κατανομή της αξιοποίησης του φωτός καθώς και τη φωτοσυνθετική δραστηριότητα στην επιφάνεια του φύλλου.

Σχεδόν όλες οι παράμετροι του φθορισμού της χλωροφύλλης των μικρομοσχευμάτων που είχαν υποστεί επίδραση glyphosate μέσω του υποστρώματος ήταν χαμηλότερες από αυτές των ψεκασμένων με glyphosate στα φύλλα. Το γεγονός αυτό ίσως να οφείλεται στο ότι οι μετρήσεις στα ψεκασμένα φύλλα των μικρομοσχευμάτων πραγματοποιήθηκαν από 0 έως 120 ώρες οπότε και η επίδραση του ζιζανιοκτόνου διήρκεσε λιγότερο από την επίδραση μέσω ενσωμάτωσης στο θρεπτικό υπόστρωμα κατά την οποία οι μετρήσεις πραγματοποιήθηκαν σε 7, 8 και 12 ημέρες. Παρόλα αυτά στις δύο περιπτώσεις υπήρχαν κάποια κοινά στοιχεία: Στα φυτά μάρτυρες το ΦPSII ήταν μεγαλύτερο σε σχέση με τα φυτά που είχαν υποστεί επίδραση του ζιζανιοκτόνου. Το Fv/Fm ήταν επίσης μεγαλύτερο στα φυτά μάρτυρες όπως και η παράμετρος q_p η οποία προκάλεσε την μείωση αντιστοίχως της παραμέτρου I-Qp.

Οι παράμετροι του φθορισμού της χλωροφύλλης συνδέονται άμεσα με το ρυθμό αφομοίωσης του φωτοσυνθετικού CO₂ στο φύλλο και έχουν χρησιμοποιηθεί ευρέως στη μελέτη της φωτοσύνθεσης (Barbagallo *et al.*, 2003). Οι σημαντικές



διαφορές των περισσότερων παραμέτρων εμφανίζονται μόλις στις 24 ώρες για τα ψεκασμένα μικρομοσχεύματα και στις 7 ημέρες για τα μικρομοσχεύματα που έχουν υποστεί επίδραση 0.425mM glyphosate στο θρεπτικό υπόστρωμα. Σε φυτά *Arabidopsis* τα οποία ψεκάστηκαν με 3.9mM glyphosate οι μεταβολές των παραμέτρων εντοπίστηκαν μετά από 6 ώρες (Barbagallo *et al.*, 2003). Η τιμή Fv/Fm (0.35) που μετρήθηκε σε φυτά *Arabidopsis* σε χρονικό διάστημα 48 ωρών (Barbagallo *et al.*, 2003) βρέθηκε πιο χαμηλή σε σύγκριση με την τιμή Fv/Fm (0.64) των μικρομοσχευμάτων *Olea europaea* που είχαν ψεκαστεί με την ίδια συγκέντρωση glyphosate για το ίδιο χρονικό διάστημα.

Οι μεταβολές των παραμέτρων του φθορισμού της χλωροφύλλης σε μικρομοσχεύματα *Olea europaea* που έχουν υποστεί επίδραση glyphosate σε συνδυασμό με την απουσία ορατών επιπτώσεων επιδεικνύουν το ενδεχόμενο της χρήσης της μεθόδου του φθορισμού της χλωροφύλλης για τον ταχύτατο εντοπισμό μεταβολικών διαταραχών στο φύλλο.



5. ΠΕΡΙΛΗΨΗ

Το glyphosate είναι ένα ευρέου φάσματος, μη εκλεκτικό, διασυστηματικό, μεταφυτρωτικό ζιζανιοκτόνο που χρησιμοποιείται για την καταπολέμηση ετήσιων και πολυετών, αγροστωδών, πλατύφυλλων και υδροχαρών ζιζανίων σε καλλιεργήσιμες και μη εκτάσεις. Χρησιμοποιείται εκτεταμένα στην καλλιέργεια της ελιάς.

Αφορμή για τη διεξαγωγή των πειραμάτων ήταν οι μορφολογικές ανωμαλίες που παρατηρήθηκαν σε δέντρα ελιάς στην περιοχή του ανατολικού Πηλίου όταν ψεκάστηκαν με glyphosate. Οι ανωμαλίες αυτές εμφανίστηκαν κατά την καταπολέμηση με glyphosate των ζιζανίων που φύονται στους ελαιώνες. Από την ποσότητα της ζιζανιοκτόνου ουσίας κάποια έπεσε τυχαία στα ελαιόδενδρα προκαλώντας το εξής σύμπτωμα: Στο σημείο της μασχάλης των φύλλων δημιουργήθηκε ομάδα οφθαλμών σε μορφή ροζέτας. Η παραπάνω *in vivo* επίπτωση του ζιζανιοκτόνου συγκρίθηκε με τις επιπτώσεις *in vitro* και μελετήθηκε το ενδεχόμενο η ζιζανιοκτόνος ουσία να έχει δράση ορμόνης που προάγει τη βλαστογένεση. Έτσι, το glyphosate προστέθηκε στο θρεπτικό υπόστρωμα μικρομοσχευμάτων *Olea europaea*, ποικιλίας Χονδρολιά Χαλκιδικής, σε συγκεντρώσεις 0.0425, 0.425 και 0.85mM. Η επίδραση των κυτοκινινών ζεατίνη (7 μ M) και BA (1 μ M) ήταν καθοριστική. Χωρίς την προσθήκη τους στο θρεπτικό υπόστρωμα η δημιουργία νέων μικροβλαστών ήταν αδύνατη. Η δράση του glyphosate στις συγκεντρώσεις που χρησιμοποιήθηκε αποδείχθηκε κάθε άλλο παρά θετική για την ανάπτυξη των μικρομοσχευμάτων. Πιο συγκεκριμένα προκάλεσε την σταδιακή νέκρωση των μικρομοσχευμάτων ξεκινώντας με χλώρωση και καταλήγοντας στην εμφάνιση καστανών κηλίδων και στην καθολική ξήρανσή τους.

Στη συνέχεια προκειμένου να μελετηθούν η λειτουργία του PSII, η κατάσταση στην οποία βρίσκεται το συγκεκριμένο φωτοσύστημα καθώς και το μέγεθος της καταπόνησης ή βλάβης που προκλήθηκε από το glyphosate στη λειτουργία της φωτοσύνθεσης, υπολογίστηκαν οι παράμετροι του φθορισμού χλωροφύλλης F_v/F_m , Φ_{PSII} , NPQ , q_P , q_L , q_N , Φ_{NPQ} , Φ_{NO} , και $1-q_P$. Οι παράμετροι του φθορισμού της χλωροφύλλης υπολογίστηκαν σε φυτά μάρτυρες, σε φυτά που είχαν υποστεί επίδραση glyphosate ενσωματωμένο στο θρεπτικό υπόστρωμα σε συγκεντρώσεις 0.425 και 0.85mM για 7, 8 και 12 ημέρες και σε φυτά που είχαν υποστεί επίδραση



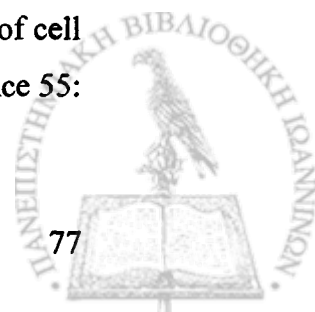
glyphosate ψεκασμένο στη φυλλική επιφάνεια σε συγκέντρωση 3.9mM για 24, 48, 72, 96 και 120 ώρες. Η λήψη των εικόνων των παραμέτρων φθορισμού χλωροφύλλης έγινε με τη χρήση του φθορισμόμετρου imaging-PAM και έδειξε ότι η ενέργεια που εκμεταλλεύεται το φυτό για τη λειτουργία της φωτοσύνθεσης (ΦPSII) σε φυτά μάρτυρες ήταν μεγαλύτερη και ελαττώθηκε σε φυτά που είχαν υποστεί επίδραση glyphosate ανάλογα με την συγκέντρωσή του. Αντιθέτως, η μη εκμεταλλεύσιμη από τα φυτά ενέργεια (ΦNPQ και ΦNO) ήταν μικρότερη σε φυτά μάρτυρες και μεγαλύτερη σε φυτά που είχαν υποστεί επίδραση glyphosate. Τα ανοιχτά κέντρα αντίδρασης (q_p) έτοιμα για να δεχτούν ηλεκτρόνια ώστε να πραγματοποιηθεί η λειτουργία της φωτοσύνθεσης ήταν περισσότερα σε φυτά μάρτυρες και λιγότερα σε φυτά που είχαν υποστεί την επίδραση του ζιζανιοκτόνου. Το αντίθετο συνέβηκε με τα κλειστά κέντρα αντίδρασης ($1-Q_p$). Τέλος, και η μέγιστη απόδοση φωτονίων στο σκοτάδι (F_v/F_m) ήταν μεγαλύτερη στα φυτά μάρτυρες. Η λειτουργία της φωτοσύνθεσης κυμάνθηκε σε φυσιολογικά επίπεδα για τα φυτά μάρτυρες ενώ στα φυτά που είχαν υποστεί επίδραση glyphosate παρουσιάστηκαν προβλήματα τα οποία εντοπίστηκαν με την μέθοδο του φθορισμού της χλωροφύλλης πριν εμφανιστούν ορατά συμπτώματα που να μαρτυρούν την επίδραση του glyphosate στη λειτουργία της φωτοσύνθεσης.

ΒΙΒΛΙΟΓΡΑΦΙΑ

- Barbagallo R, Oxborough K, Pallett K and Baker N (2003).** Rapid, noninvasive screening for perturbations of metabolism and plant growth using chlorophyll fluorescence imaging. *Plant Physiology* 132: 485-493.
- Barranco D, Fernandez-Escobar R and Rallo L (1999).** *El Cultivo del Olivo*. Mundi-Prensa, (ed.) 3a. edicion. Madrid, Spain, pp.701.
- Bayne F et al., (1995).** Colonization of *Orchis morio* protocorms by a mycorrhizal fungus: effects on nitrogen nutrition and glyphosate in modifying the responses. *Canadian Journal of Botany* 73: 1128-1140.
- Brammall A and Higgins V (1988).** The effect of glyphosate on resistance of tomato to *Fusarium* crown and root rot disease and on the formation of host structural defensive barriers. *Canadian Journal of Botany* 66: 1547-1555.
- Calatayud A, Roca D and Martinez P (2006).** Spatial-temporal variations in rose leaves under water stress conditions studied by chlorophyll fluorescence imaging. *Plant Physiology* 44: 546-573.
- Chacravarty P and Sidhu S (1987).** Effects of glyphosate, hexazinone and triclopyr on in vivo growth of five species of ectomycorrhizal fungi. *European Journal of Forest Pathology* 17: 204-210.
- Chaerle L, Hulsen K, Hermans C, Strasser R, Valcke R, Hofte M and Van Der Straeten D (2003).** Robotized time-lapse imaging to assess in-planta uptake of phenylurea herbicides and their microbial degradation. *Physiologia Plantarum* 118: 613-619.
- David J and Cole (1994).** Detoxification and activation of agrochemicals in plants. *Pesticide Science*. 42: 209-222.
- Dicamba (Banvel) Pesticide Fact Sheet, USFS (1995).** Prepared for the U.S. departement of Agriculture, forest service by information ventures, Inc.
- Dimassi - Theriou K (1994).** In vitro propagation of cv. Kalamon olives (*Olea europaea sativa* L.). *Advances in Horticulture* 8: 185-189.
- Eberbach L and Douglas L (1989).** Herbicide effects on the growth and nodulation potential of *Rhizohium trilonii* with *Trilonium subterraneum* L. *Plant and Soil* 119: 15-23.
- Eberbach L and Douglas L (1983).** Persistence of glyphosate in a sandy loam. *Soil Biology and Biochemistry* 15(4): 485-487.



- Edwards E and Baker R (1993).** Can CO₂ assimilation in maize leaves be predicted accurately from chlorophyll fluorescence analysis? *Photosynthesis Research* 37: 89–102.
- Estok D, Freedman B, and Boyle D (1989).** Effects of the herbicides 2,4-D, glyphosate, hexazinone, and triclopyr on the growth of three species of ectomycorrhizal fungi. *Bull. Environ. Contam. Toxicol.* 42: 835-839.
- Feng F, Ryerse J, Jones C and Sammons R (1999).** Analysis of surfactant leaf damage using microscopy and its relation to glyphosate or deuterium oxide uptake in velvetleaf (*Abutilon theophrasti*). *Pesticide Science* 55: 343-389.
- Feng P, Chiu T and Sammons D (2003).** Glyphosate efficacy is contributed by its tissue concentration and sensitivity in velvetleaf (*Abutilon theophrasti*). *Pesticide Biochemistry and Physiology* 77: 83-91.
- Fuchs M, Geiger D, Reynolds T and Bourque J (2002).** Mechanisms of glyphosate toxicity in velvetleaf (*Abutilon theophrasti medikus*). *Pesticide Biochemistry and Physiology* 74: 27-39.
- Geiger D, Shieh W-J and Fuchs M (1999).** Causes of self-limited translocation of Glyphosate in *Beta vulgaris* plants. *Pesticide Biochemistry and Physiology* 64: 124-133.
- Genty B, Briantais M and Baker R (1989).** The relationship between the quantum yield of photosynthetic electron-transport and quenching of chlorophyll fluorescence. *Biochim. Biophys. Acta* 990: 87–92.
- Graaff de J and Eppink L AAJ (1999).** Olive oil production and soil conservation in Southern Spain in relation to EU subsidy policies. *Land use policy* 16: 259 – 267.
- Grigoriadou K, Vasilakakis M and Eleftheriou E (2002).** In vitro propagation of the Greek olive cultivar 'Chondrolia Chalkidikis'. *Plant Cell, Tissue and Organ Culture* 71: 47-54.
- Hartman T, Kester E and Davies T (1990).** Plant propagation principles and practices. Prentice Hall International Editions, New Jersey.
- Horton P, Ruban V and Walters G (1996).** Regulation of light harvesting in green plants. *Annual Review of Plant Physiology and Plant Molecular Biology* 47: 655–684.
- Jain M, Bhatnagar R and Sarin N (1999).** Isolation and biochemical diagnosis of cell lines of groundnut (*Arachis hypogaea L*) selected on glyphosate. *Pesticide Science* 55: 843-849.



- Jahal S and Rahe J (1988).** Glyphosate, hypersensitivity and phytoalexin accumulation in the incompatible bean anthracnose host-parasite interaction. *Physiological and Molecular Plant Pathology* 32: 267-281.
- Johnson N, Young J, Scholes D and Horton P (1993).** The dissipation of excess excitation energy in British plant species. *Plant Cell Environment* 16: 673-679.
- Kaneilakopoulos C and Mitsotakis A (1992).** Consequences of new facts in the Greek olive oil export market and the need for developing a new strategy. *Proceedings of the International Seminar on Export Marketing of Cretan Agricultural Products*. Mediterranean Agronomic Institute of Chania – Crete, Greece.
- Kawate K et al., (1997).** Effect of glyphosate-treated henbit (*Lamium amplexicaule*) and downy brome (*Bromus tectorum*) on *Fusarium solani* f. sp. pisi and *Pythium ultimum*. *Weed Science* 45: 739-743.
- Kiritsakis A (1988).** Olive oil (3rd ed.) Agric Co – op. Pub., Thessaloniki, Greece.
- Kirkwood R (1983).** The Relationship of metabolism studies to the modes of action of herbicides. *Pesticide Science* 14: 453-460.
- Kramer M, Johnson G, Kiirats O and Edwards E (2004).** New fluorescence parameters for the determination of QA redox state and excitation energy fluxes. *Photosynthesis Research* 79: 209-218.
- Laerke P and Streibig J (1995).** Foliar absorption of some Glyphosate formulations and their efficacy on plants. *Pesticide Science* 44: 107-116.
- Lloyd G and McCown B (1980).** Commercial feasible micropropagation of mountain laurel, *kalmia latifolia*, by use of shoot-tip culture. *Proc. Int. Plant Prop. Soc.* 30: 421-427.
- Locke D, Landivar J and Moseley D (1995).** The effects of rate and timing of glyphosate applications on defoliation efficiency, regrowth inhibition, lint yield, fiber quality and seed quality. *Proc. Beltwide Cotton Conf., National Cotton Council of America*: 1088-1090.
- Maxwell K and Johnson N (2000).** Chlorophyll fluorescence-a practical guide. *Journal of experimental Botany* 51: 659-668.
- Mollenhauer C, Smart C and Amrhein N (1987).** Glyphosate toxicity in the shoot apical region on the tomato plant. *Pesticide Biochemistry and Physiology* 29: 55-65.
- Moorman B et al., (1992).** Production of hydrobenzoic acids by *Bradyrhizodium japonicum* strains after treatment with glyphosate. *Journal of Agricultural and Food Chemistry* 40: 289-293.



- Morin F, Vera V, Nurit F, Tissut M, and Marigo G (1997).** Glyphosate uptake in *Catharanthus roseus* cells: Role of a phosphate transporter. *Pesticide Biochemistry and Physiology* 58: 13-22.
- Müller P, Li X-P and Niyogi K (2001).** Non-photochemical quenching. A response to excess light energy. *Plant Physiology* 125: 1558–1566.
- Osmond B (1994).** What is photoinhibition? Some insights from comparisons of sun and shade plants. In N.R. Baker and J.R. Bowyer, eds, *Photoinhibition of photosynthesis: from molecular mechanisms to the field*. Bios Scientific Publishers, Oxford, pp. 1–24.
- Oxborough K and Baker R (1997).** Resolving chlorophyll fluorescence images of photosynthetic efficiency into photochemical and non photochemical components – calculation of qP and Fv/Fm without measuring F'o. *Photosynthesis Research* 54: 135-142.
- Pritsa S and Voyatzis G (1997).** The in vitro morphogenetic capacity of olive embryos, as affected by their developmental stage and the L-Agrinine and L-Glutamine concentration in the nutrient substrate. *Acta Horticulturae* 474: 87-90.
- Ratterman D and Nelson B (1988).** Herbicidal disruption of proton gradient and maintenance by plasmalemma and tonoplast vesicles from oat root. *Pesticide Biochemistry and Physiology*. 31: 221-236.
- Remesal – Rodriguez J (1996).** Economía oleícola: En la antigüedad. In: 'Enciclopedia del Olivo'. Consejo Oleícola Internacional (ed). Plaza & Janes Aditores SA., Barcelona, Spain, 47-58.
- Santos A and Flores M (1995).** Effects of glyphosate on nitrogen fixation of free-living heterotrophic bacteria. *Letters in Applied Microbiology* 20: 349-352.
- Sergiev I, Alexieva V, Ivanov S, Moskova I and Karanov E (2006).** The Phenylurea cytokinin 4PU-30 protects maize plants against glyphosate action. *Pesticide Biochemistry and Physiology* 85: 139-146.
- Tilquin M, Peltier J and Marigo G (2000).** Mechanisms for the coupling of iron and glyphosate uptake in *Catharanthus roseus* cells. *Pesticide Biochemistry and Physiology* 67: 145-154.
- Van Kooten O and Snel H (1990).** The use of chlorophyll fluorescence nomenclature in plant stress physiology. *Photosynthesis Research* 25: 147–150.

- Walters G and Horton P (1991).** Resolution of components of non-photochemical chlorophyll fluorescence quenching in barley leaves. *Photosynthesis Research* 27: 121-133.
- Zohary D and Hopf M (1994).** Domestication of plants in the old world, 2nd ed. Clarendon Press, Oxford, UK.
- Βαμβαλή Μ (2008).** Αξιολόγηση διαγονιδιακών φυτών *Arabidopsis* στα οποία υπερεκφράζεται ο μεταγραφικός παράγοντας HAP5c (NF-YC-9) ως προς την ανθεκτικότητα στην αλατότητα. Διπλωματική εργασία σελ. 1-225, Θεσσαλονίκη.
- Γιαννοπολίτης Κ (2002).** 'Με καλλιέργεια ή ακαλλιέργεια του εδάφους'. Γεωργία – Κτηνοτροφία. Αφιέρωμα: Ελαιοκομία 2002. Τεύχος 3/2001, σελ. 1-176, Εκδόσεις Αγροτύπος, Αθήνα.
- Γρηγοριάδου Α (2003).** Μελέτη της *in vitro* αναπαραγωγής ελληνικών ποικιλιών ελιάς (*Olea europaea* L.) Διδακτορική διατριβή, Θεσσαλονίκη, σελ 1-239.
- Εθνική στατιστική υπηρεσία Ελλάδος (1990).**
- Ελευθεροχωρινός Γ (1996).** 'Ζιζανιολογία'. Εκδόσεις Αγρότυπος, Αθήνα.
- Ελευθεροχωρινός Γ (2002).** 'Ζιζανιολογία': Ζιζάνια, Ζιζανιοκτόνα, Περιβάλλον, Αρχές και μέθοδοι διαχείρισης, (2^η έκδοση). Εκδόσεις Αγρότυπος, Αθήνα.
- Μπαλατσούρας Γ (1992).** 'Ελιά: καλλιέργεια με σύγχρονες μεθόδους'. Εκδόσεις Πελεκάνος, Αθήνα.
- Μπαλατσούρας Γ (1994).** 'Το ελαιόδενδρο'. Τόμος Πρώτος, Εκδόσεις Πελεκάνος, Αθήνα – Θεσσαλονίκη.
- Ποντίκης Κ (2000).** 'Ειδική Δενδροκομία. - Ελαιοκομία'. Τόμος Τρίτος, Εκδόσεις ΑΘ. Σταμούλης, Αθήνα.
- Ρούμπος Κ (2003).** Οικότυποι ελιάς "*Olea europaea*" του Αγίου Όρους. Πτυχιακή διατριβή σελ. 1-76, Θεσσαλονίκη.
- Ρούμπος Α (2000).** Σημειώσεις 'Μαθήματα Ελαιοκομίας', σελ 1-111. ΤΕΙ Θεσσαλονίκης.
- Σαρπάκη Α και Χατζηδημητρίου Μ (2006).** 'Η εμφάνιση της ελιάς στον Ελλαδικό χώρο'. Ελαιοπαραγωγή. Εύριπος εκδοτική σελ. 1-288, Αθήνα.
- Τσαμαρδάς Β (2006).** 'Ο μικροπολλαπλασιασμός της ελιάς'. Ελαιοπαραγωγή. Εύριπος εκδοτική σελ. 1-288, Αθήνα.
- Τσέκος Β (2004).** 'Φυσιολογία Φυτών'. 2η έκδοση. Εκδοτικός Οίκος Αδελφών Κυριακίδη Α.Ε., Θεσσαλονίκη.

Ηλεκτρονικές Πηγές

- Beyond Pesticides (2001).** Glyphosate Chemical Watch Factsheet Vol. 21, No. 1.
<http://www.beyondpesticides.org/pesticides/factsheets/Glyphosate.pdf>
- Caroline C (1998).** Glyphosate factsheet. Journal of Pesticide Reform vol. 108, No 3.
<http://www.mindfully.org/Pesticide/Roundup-Glyphosate-Factsheet-Cox.htm>
- Eckatr S (1996).** 'Roundup'. Gentech archive 8.96-97.
<http://www.gene.ch/gentech/1997/8.96-5.97/msg00359.html>
- Environmental Protection Agency (1999).** Pesticides Industry Sales and Usage: 1996 and 1997 Market Estimates. EPA-733-R-99-001. p. 21, Table 8.
<http://www.epa.gov/oppbead1/pestsales/97pestsales/97pestsales.pdf>
- Environmental Protection Agency (2008).** Ground water and drinking water. 'Consumer factsheet on glyphosate'.
http://www.epa.gov/OGWDW/contaminants/dw_contamfs/glyphosa.html
- Κωνσταντίνου Δ (2008).** Αγενής Πολλαπλασιασμός.
http://teivos.samos.aegean.gr/~trikala/dhmhtrios_kwnstantinou/agenhs_pollaplasiasm os.htm
- Monsanto Europe S.A. (2004).** Roundup 36SL. Δελτίο δεδομένων ασφαλείας εμπορικού σκευάσματος. Έκδοση 1.
http://www.efthymiadis.gr/pdfs/ROUNDUP_36SL.pdf#search=%22Monsanto%2036SL%22
- Pesticide Action Network North America, (2005).** Rethinking Roundup.
http://www.panna.org/resources/panups/panup_20050805.dv.html
- Stacey V (2000).** Roundup (Glyphosate). U.B. Pesticide Report – B.A. Environmental Studies.
<http://wings.buffalo.edu/ubgreen/content/resources/pesticidereport2000.html#sec03>
- Thui T and Thu M (2003).** Aquatic toxicity of glyphosate – based formulations: comparison between different organisms and the effects of environmental factors. PubMed 52(7): 1189-97.
http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=pubmed&dopt=A bstract&list_uids=12821000&query hl=5