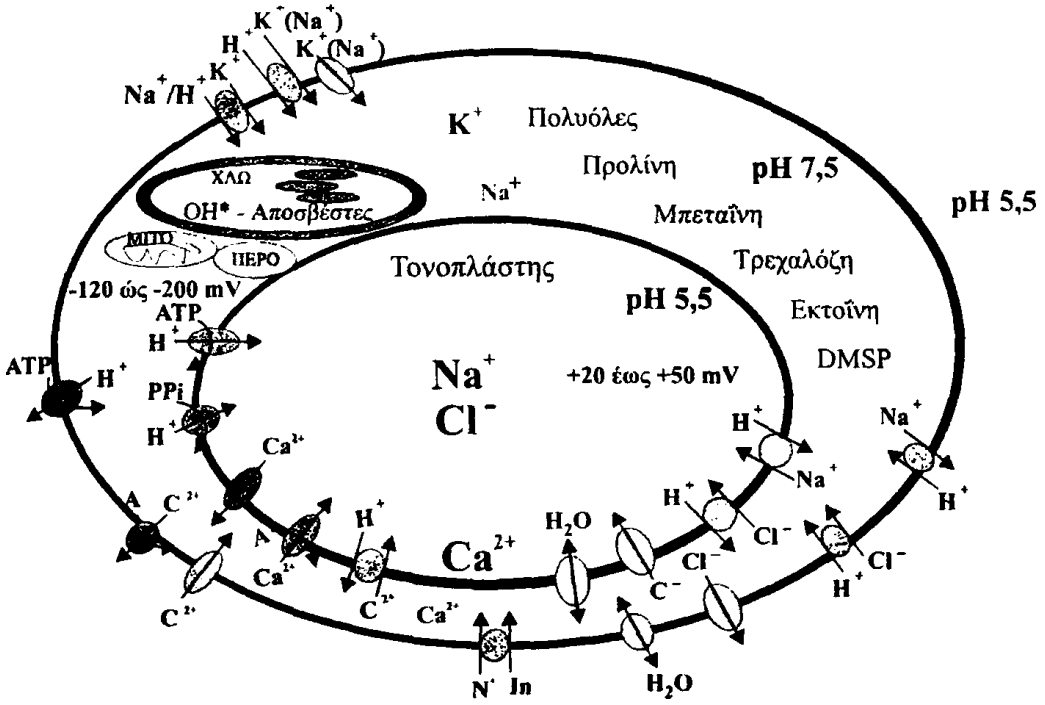
ΠΑΝΕΠΙΣΤΗΜΙΟ ΙΩΑΝΝΙΝΩΝ

ΣΧΟΛΗ ΘΕΤΙΚΩΝ ΕΠΙΣΤΗΜΩΝ

ΤΜΗΜΑ ΧΗΜΕΙΑΣ

ΔΙΑΤΜΗΜΑΤΙΚΟ ΠΡΟΓΡΑΜΜΑ ΜΕΤΑΠΤΥΧΙΑΚΩΝ ΣΠΟΥΔΩΝ

ΑΓΡΟΧΗΜΕΙΑ ΚΑΙ ΒΙΟΛΟΓΙΚΕΣ ΚΑΛΛΙΕΡΓΕΙΕΣ



ΜΕΤΑΠΤΥΧΙΑΚΗ ΜΕΛΕΤΗ

Μελέτη βιοχημικών δεικτών του μηχανισμού ανοχής των φυτών, ως απάντηση στην αύξηση της αλατότητας του θρεπτικού διαλύματος, σε ένα κλειστό υδροπονικό σύστημα

ΚΥΡΚΑΣ ΔΗΜΗΤΡΗΣ

ΙΩΑΝΝΙΝΑ 2007

ΠΑΝΕΠΙΣΤΗΜΙΟ ΙΩΑΝΝΙΝΩΝ

ΕΚΠΑΙΔΕΥΤΙΚΟΣ ΟΡΓΑΝΙΣΜΟΣ

ΤΜΗΜΑ ΔΙΟΙΚΗΣΗΣ

ΔΙΑΤΜΗΜΑΤΙΚΟ ΕΙΔΙΚΟ ΠΡΟΓΡΑΜΜΑ ΠΡΟΠΤΥΧΙΑΚΩΝ ΣΠΟΥΔΩΝ

ΑΠΟΦΟΙΤΗΣΑ ΤΑΞΗ ΜΕΤΑΠΤΥΧΙΑΚΗΣ ΚΑΤΑΡΤΙΣΗΣ

ΜΕΤΑΠΤΥΧΙΑΚΗ ΕΡΓΑΣΙΑ

[illegible]

ΕΙΣΗΓΗΤΗΣ: [illegible]

ΜΕΛΗ ΕΠΙΤΡΟΠΗΣ: [illegible]

ΚΥΡΙΑΚΗ ΛΑΜΠΡΙΝΟΥ

ΙΩΑΝΝΙΝΑ [illegible]

[illegible]

ΠΑΝΕΠΙΣΤΗΜΙΟ ΙΩΑΝΝΙΝΩΝ

ΣΧΟΛΗ ΘΕΤΙΚΩΝ ΕΠΙΣΤΗΜΩΝ

ΤΜΗΜΑ ΧΗΜΕΙΑΣ

ΔΙΑΤΜΗΜΑΤΙΚΟ ΠΡΟΓΡΑΜΜΑ ΜΕΤΑΠΤΥΧΙΑΚΩΝ ΣΠΟΥΔΩΝ

ΑΓΡΟΧΗΜΕΙΑ ΚΑΙ ΒΙΟΛΟΓΙΚΕΣ ΚΑΛΛΙΕΡΓΕΙΕΣ

Η παρούσα εργασία έγινε στα πλαίσια Διατμηματικού Προγράμματος Μεταπτυχιακών Σπουδών. Το έργο συγχρηματοδοτήθηκε από το Ευρωπαϊκό Κοινωνικό Ταμείο και από Εθνικούς πόρους (ΕΠΕΑΕΚ).

Η ΠΑΙΔΕΙΑ ΣΤΗΝ ΚΟΡΥΦΗ
Επιχειρησιακό Πρόγραμμα Εκπαίδευσης και Αρχικής Επαγγελματικής Κατάρτισης

ΜΕΤΑΠΤΥΧΙΑΚΗ ΜΕΛΕΤΗ

Μελέτη βιοχημικών δεικτών του μηχανισμού ανοχής των φυτών, ως απάντηση στην αύξηση της αλατότητας του θρεπτικού διαλύματος, σε ένα κλειστό υδροπονικό σύστημα

ΕΙΣΗΓΗΤΗΣ: Γεωργιος Κ. Παπαδοπουλος Καθηγητης Τ.Ε.Ι. Ηπείρου

ΜΕΛΗ ΕΠΙΤΡΟΠΗΣ: Γεώργιος Γκίζας Αναπληρωτής Καθηγητής Τ.Ε.Ι. Ηπείρου

Κωνσταντίνος Δραίνας Καθηγητής Πανεπιστημίου Ιωαννίνων

ΚΥΡΚΑΣ ΔΗΜΗΤΡΗΣ

ΙΩΑΝΝΙΝΑ 2006

Το σχήμα στο εξώφυλλο είναι από:

Κωνσταντινίδου, Α.Ε., 2003. Φυσιολογία αβιοτικών καταπονήσεων. Φυσιολογία φυτών, από το μόριο στο περιβάλλον, Επιμέλεια Ρουμπελάκη-Αγγελάκη, Κ.Α., *Πανεπιστημιακές Εκδόσεις Κρήτης*. Σελ.:595, (κατόπιν άδεια του εκδότη)

Στην Χαρά, Μαρίνα, Ειρήνη

ΕΥΧΑΡΙΣΤΙΕΣ

Με την ολοκλήρωση αυτής της εργασίας, επιθυμώ να εκφράσω τις θερμές ευχαριστίες μου στους ανθρώπους εκείνους που με στήριξαν, με τον ένα ή τον άλλο τρόπο και βοήθησαν στην ολοκλήρωση της παρούσας μεταπτυχιακής μελέτης.

Πρώτα από όλους θα ήθελα να ευχαριστήσω τον Καθηγητή μου κ. Γεώργιο Κ. Παπαδόπουλο για την εμπιστοσύνη που μου δείχνει όλα αυτά τα χρόνια πού συνεργαζόμαστε με αποκορύφωμα την ανάθεση της συγκεκριμένης μεταπτυχιακής μελέτης. Τον ευχαριστώ ακόμη για την καθοδήγησή του σε κάθε προσπάθεια μου σε ερευνητικό και προσωπικό επίπεδο, συμβάλλοντας έτσι καθοριστικά στη μέχρι τώρα πορεία μου στο Τ.Ε.Ι..

Ευχαριστίες θα ήθελα να εκφράσω στην πρώην Αναπληρώτρια Καθηγήτρια του τμήματος Α.Α.Τ. κ. Μαρία Κωνσταντίνου για την αμέριστη στήριξη και κατανόηση που έδειξε κατά την παρακολούθηση των μαθημάτων του μεταπτυχιακού προγράμματος. Ακόμη θέλω να ευχαριστήσω θερμά τον Επίκουρο Καθηγητή του Γ.Π.Α. κ.Δημήτριο. Σάββα, τον Αναπληρωτή Καθηγητή του Α.Α.Τ. Γεώργιο. Γκίζα και τον Επίκουρο Καθηγητή του Α.Α.Τ. Γεώργιο Καρρά, για την συμβολή τους στην εκπόνηση αλλά και την συγγραφή της παρούσας μελέτης.

Επιπλέον θέλω να ευχαριστήσω τον φίλο μου, συνάδελφο Νίκο Μάντζο για την βοήθεια και την συμπαράσταση του στις δύσκολες στιγμές κατά την εκπόνηση αυτής της εργασίας. Ακόμη τον φίλο και συνεργάτη Ευάγγελο Φίλη γιατί αν και δεν έκανε τίποτα για την εργασία αυτή, η βοήθειά του ήταν πολύτιμη σε επιστημονικό και προσωπικό επίπεδο.

Επίσης θέλω να ευχαριστήσω τον φίλο και συνεργάτη Δημήτρη Γιώτη καθώς και την Ελένη Χατζηευστρατίου για την φροντίδα των καλλιεργειών.

Τέλος θέλω να ευχαριστήσω την οικογένεια μου, που χωρίς την δική της στήριξη, υπομονή και κατανόηση, η πραγματοποίηση αυτής της εργασίας δεν θα ήταν δυνατή.

ΠΕΡΙΛΗΨΗ

Στην παρούσα εργασία έγινε μια προσπάθεια να διερευνηθεί η απάντηση των φυτών στην καταπόνηση από αλατότητα, μέσω της αύξηση της δραστικότητας των αντιοξειδωτικών ενζύμων και των οσμωλυτών στο κυτταρικό περιβάλλον. Τρία διαφορετικά λαχανοκομικά φυτά, φασόλι κολοκύθι και πιπεριά, καλλιεργήθηκαν σε θερμοκήπιο και υποβλήθηκαν σε καταπόνηση από αλατότητα κατά την εφαρμογή κλειστού υδροπονικού συστήματος θρέψης. Στην διάρκεια των πειραμάτων μετρήθηκαν η αύξηση της ηλεκτρικής αγωγιμότητας στο διάλυμα απορροής και μελετήθηκαν η περιεκτικότητα των φύλλων των φυτών σε χλωροφύλλες a και b, η συγκέντρωση της προλίνης ως ωσμολύτη, καθώς και η δραστικότητα ενζύμων που εμπλέκονται στον μηχανισμό αντιμετώπισης της οξειδωτικής βλάβης.

Το φασόλι και η πιπεριά καλλιεργηθήκαν σε τέσσερις διαφορετικές συνθήκες μεταχείρισης όπου σε κάθε μια κατά την παρασκευή του θρεπτικού διαλύματος προστέθηκε και NaCl ώστε οι τελικές συγκεντρώσεις του, να φτάνουν τα 0,8, 3, 6 και 9 mM για το φασόλι και 0,8, 4, 8 και 12 mM για την πιπεριά. Στην καλλιέργεια του κολοκυθιού εγκαταστάθηκαν τέσσερις διαφορετικές μεταχειρίσεις, εκ των οποίων ανά δυο είχαν διαφορετική συγκέντρωση NaCl στο θρεπτικό διάλυμα, 0,2 και 8 mM, ενώ προστέθηκε και πυρίτιο σε συγκέντρωση 1,5 mM που σύμφωνα με μελέτες φαίνεται να επηρεάζει την αντοχή των φυτών σε καταπόνηση λόγω αλατότητας. Τα πειράματα πραγματοποιήθηκαν σε ανεξάρτητα μεταξύ τους κλειστά υδροπονικά συστήματα με τρεις επαναλήψεις για κάθε μεταχείριση. Για κάθε ένα από τα φυτά έγιναν τέσσερις δειγματοληψίες παλαιών και νέων φύλλων, δίσκοι των οποίων εγχυλίστικαν στο εργαστήριο και τοποθετήθηκαν στην κατάψυξη ως πηγή ενζύμων. Παράλληλα υπολογίστηκαν η συγκέντρωση των χλωροφύλλών (a και b) και της προλίνης.

Η έναρξη της ανακύκλωσης του διαλύματος απορροής είχε ως αποτέλεσμα, την αύξηση της ηλεκτρικής αγωγιμότητας, στην περιοχή των ριζών, λόγω της συσσώρευσης NaCl ανάλογη με την αρχική προσθήκη NaCl.

Στην καλλιέργεια φασολιού η αύξηση της ηλεκτρικής αγωγιμότητας είχε ως αποτέλεσμα την σταδιακή μείωση της χλωροφύλλης στα παλαιά κυρίως, φύλλα 80 ημέρες μετά την έναρξη, της ανακύκλωσης του θρεπτικού διαλύματος. Η μείωση ήταν στατιστικώς σημαντικά μεγαλύτερη στην μεταχείριση με την μεγαλύτερη συγκέντρωση NaCl στο θρεπτικό διάλυμα. Ακόμη, παρατηρήθηκε αύξηση της δραστικότητας της όξινης φωσφατάσης η οποία έφτασε στις 23 μονάδες ενζύμου ανά g χλωρού βάρους και της καταλάσης στις 90 μονάδες ενζύμου ανά g χλωρού βάρους για την μεταχείριση με την μεγαλύτερη συγκέντρωση NaCl, ενώ δεν παρατηρήθηκαν διαφορές στην συγκέντρωση της προλίνης.

Στο κολοκύθι η μείωση της χλωροφύλλης στα παλαιά φύλλα ήταν ίδια και για τις τέσσερις μεταχειρίσεις. Εντελώς διαφορετική ήταν όμως η εικόνα στα νεαρά φύλλα όπου στη μεταχείριση με την αυξημένη αλατότητα στο διάλυμα τροφοδοσίας, χωρίς την προσθήκη πυριτίου, η περιεκτικότητα των φύλλων σε χλωροφύλλη ήταν στατιστικώς σημαντικά μικρότερη από τις υπόλοιπες μεταχειρίσεις. Αντίθετα από την συγκέντρωση της χλωροφύλλης, η συγκέντρωση της προλίνης εμφανίζεται αυξημένη στις δυο μεταχειρίσεις που στο διάλυμα τροφοδοσίας έχει προστεθεί και πυρίτιο, ανεξάρτητα από την συγκέντρωση του NaCl στο διάλυμα τροφοδοσίας. Η δραστικότητα της όξινης φωσφατάσης ήταν μεγαλύτερη στις δυο μεταχειρίσεις με το πυρίτιο, έφτασε όμως 100 μέρες μετά την ανακύκλωση στην μεταχείριση με την αλατότητα τις 23 μονάδες ενζύμου ανά mg πρωτεϊνών. Αντίστοιχη με την δραστικότητα της όξινης φωσφατάσης εμφανίζεται και η δραστικότητα της καταλάσης.

Η συγκέντρωση της χλωροφύλλης στα νέα φύλλα της πιπεριάς δεν είχε μεγάλες διακυμάνσεις, με εξαίρεση την μεταχείριση με την μεγαλύτερη αλατότητα, όπου 185 μέρες μετά την έναρξη της ανακύκλωσης παρατηρήθηκε σημαντική μείωση. Η συγκέντρωση της προλίνης αυξήθηκε και ήταν ανάλογη με την συγκέντρωση του NaCl στο διάλυμα τροφοδοσίας. Αύξηση ανάλογη της συγκέντρωσης του NaCl στο διάλυμα τροφοδοσίας είχε η δραστικότητα της όξινης φωσφατάσης και της καταλάσης.

Η συνολική παραγωγή και για τα τρία φυτά, στις μεταχειρίσεις όπου υπήρχε αυξημένη συγκέντρωση NaCl μειώθηκε λόγω της μείωσης του αριθμού των καρπών αλλά και του βάρους τους. Εξαίρεση φαίνεται να αποτελεί στο κολοκύθι ο χειρισμός όπου στην αυξημένη συγκέντρωση NaCl, στο διάλυμα τροφοδοσίας έχει προστεθεί και πυρίτιο.

Συμπερασματικά η απάντηση των φυτών στην αύξηση της αλατότητας δεν είναι ίδια μεταξύ των διαφορετικών ειδών και δύσκολα μπορούν να προσδιοριστούν ενιαία κριτήρια για την ενεργοποίηση του μηχανισμού ανοχής. Πιθανότερο είναι να καθορίσουμε ορισμένους βιοχημικούς δείκτες για κάθε φυτό χωριστά, χωρίς να έχουμε την δυνατότητα γενίκευσης.

ΠΕΡΙΕΧΟΜΕΝΑ

1. ΕΙΣΑΓΩΓΗ ..... [illegible]

1.1. ΑΛΑΤΟΠΙΤΑ ..... [illegible]

1.1.1. [illegible] ..... [illegible]

1.1.2. [illegible] ..... [illegible]

1.2. ΟΥΖΑ ΚΑΙ ΑΛΑΙΠΙΤΑ ..... [illegible]

1.2.1. [illegible] ..... [illegible]

1.3. ΜΑΝΑΝΙΤΙΗΣ ΠΕΝΤΕΛΗΣ ΟΥΖΟΝ ΑΛΑΙΠΙΤΑ 10

1.4. ΟΥΖΟ ΚΑΙ ΘΕΡΑΠΕΥΤΙΚΗ ΚΑΤΑΝΑΛΩΣΗ 15

1.4.1. [illegible] 15

1.4.2. [illegible] 17

1.5. ΑΝΤΟΧΗ ΤΗΣ ΚΡΕΑΤΟΣ 19

1.5.1. [illegible] 21

1.5.2. [illegible] ..... [illegible]

1.6. ΘΕΡΑΠΕΥΤΙΚΗ ΧΡΗΣΗ 24

1.7. ΠΡΟΛΗΨΗ 28

1.8. ΚΑΤΑΣΤΑΣΗ 30

1.8.1. [illegible] 31

1.9. ΣΥΜΠΕΡΑΣΜΑ 34

2. ΣΚΟΠΟΣ 35

3. ΥΛΙΚΑ ΚΑΙ ΜΕΘΟΔΟΙ 36

3.1. ΠΑΡΑΓΩΓΗ ΟΥΖΟΥ 37

3.1.1. [illegible] 38

3.1.2. [illegible] 38

3.1.3. [illegible] 39

3.1.4. [illegible] ..... [illegible]

3.2. ΟΡΓΑΝΟΛΕΠΤΙΚΟΙ ΕΛΕΓΧΟΙ ΤΟΥ ΑΛΑΙΠΙΤΟΥ ΚΑΙΝΟΥΡΓΙΟΥ ..... [illegible]

3.2.1. [illegible] ..... [illegible]

3.2.2. [illegible] ..... [illegible]

3.2.3. [illegible] ..... [illegible]

3.3. ΕΠΙΛΟΓΗ ΟΥΖΟΥ ΓΙΑ ΤΟ ΠΕΙΡΑΜΑ ..... [illegible]

3.4. ΜΕΤΡΗΣΕΙΣ ΦΥΣΙΚΟΧΗΜΙΚΩΝ ΙΔΙΟΤΗΤΩΝ 52

3.4.1. [illegible] 54

ΠΕΡΙΕΧΟΜΕΝΑ

1. ΕΙΣΑΓΩΓΗ 3
1.1. ΑΛΑΤΟΤΗΤΑ 3
1.1.1. Τι είναι η αλατότητα. 3
1.1.2. Προέλευση του προβλήματος 3
1.2. ΦΥΤΑ ΚΑΙ ΑΛΑΤΟΤΗΤΑ 6
1.2.1 Επίδραση της Αλατότητας στη Παραγωγή 7
1.3. Η ΑΠΑΝΤΗΣΗ ΤΩΝ ΦΥΤΩΝ ΣΤΗΝ ΑΛΑΤΟΤΗΤΑ 10
1.4. ΦΥΤΑ ΚΑΙ ΟΞΕΙΔΩΤΙΚΗ ΚΑΤΑΠΟΝΗΣΗ 15
1.4.1. Αντιδραστικές οντότητες οξυγόνου 15
1.4.2. Μηχανισμός αντιμετώπισης οξειδωτικής βλάβης 17
1.5. ΑΝΤΙΟΞΕΙΔΩΤΙΚΑ ΕΝΖΥΜΑ 19
1.5.1. Η Υπεροξειδάση 21
1.5.2. Η Καταλάση 22
1.6. ΟΞΙΝΗ ΦΩΣΦΑΤΑΣΗ 24
1.7. ΠΡΟΛΙΝΗ 26
1.8. ΦΩΤΟΣΥΝΘΕΣΗ 30
1.8.1. Χλωροφύλλες 31
1.9. ΠΥΡΙΤΙΟ 34
2. ΣΚΟΠΟΣ 36
3. ΥΛΙΚΑ ΚΑΙ ΜΕΘΟΔΟΙ 38
3.1. ΚΑΛΛΙΕΡΓΕΙΑ ΦΥΤΩΝ 38
3.1.1. Θερμοκήπιο 38
3.1.2. Υδροπονικό Σύστημα 38
3.1.3. Διάλυμα τροφοδοσίας 39
3.1.5. Γενετικό υλικό - προετοιμασία 43
3.2. ΣΧΕΔΙΑΣΜΟΣ ΤΩΝ ΠΕΙΡΑΜΑΤΙΚΩΝ ΚΑΛΛΙΕΡΓΕΙΩΝ 45
3.2.1. Φασόλι: 45
3.2.2. Κολοκύθι: 46
3.2.3. Πιπεριά: 47
3.3. ΕΚΧΥΛΙΣΗ ΦΥΤΙΚΩΝ ΔΕΙΓΜΑΤΩΝ 49
3.4. ΥΠΟΛΟΓΙΣΜΟΣ ΕΖΥΜΙΚΗΣ ΔΡΑΣΤΙΚΟΤΗΤΑΣ 50
3.4.1. Όξινη φωσφατάση 50

3.4.2. Υπεροξειδάση 51
3.4.3. Καταλάση 52
3.5. ΠΟΣΟΤΙΚΟΣ ΠΡΟΣΔΙΟΡΙΣΜΟΣ ΠΡΩΤΕΙΝΩΝ 53
3.6. ΥΠΟΛΟΓΙΣΜΟΣ ΤΩΝ ΧΛΩΡΟΦΥΛΛΩΝ 55
3.7. ΥΠΟΛΟΓΙΣΜΟΣ ΠΡΟΛΙΝΗΣ 56
3.8. ΣΤΑΤΙΣΤΙΚΗ ΑΝΑΛΥΣΗ 58
4. ΑΠΟΤΕΛΕΣΜΑΤΑ 59
4.1. ΗΛΕΚΤΡΙΚΗ ΑΓΩΓΙΜΟΤΗΤΑ 59
4.2. ΣΥΓΚΕΝΤΡΩΣΗ ΧΛΩΡΟΦΥΛΛΩΝ 62
4.3. ΣΥΓΚΕΝΤΡΩΣΗ ΠΡΟΛΙΝΗΣ 67
4.4. ΔΡΑΣΤΙΚΟΤΗΤΑ ΟΞΙΝΗΣ ΦΩΣΦΑΤΑΣΗΣ 70
4.5. ΔΡΑΣΤΙΚΟΤΗΤΑ ΚΑΤΑΛΑΣΗΣ 74
4.6. ΔΡΑΣΤΙΚΟΤΗΤΑ ΥΠΕΡΟΞΕΙΔΑΣΗΣ 79
4.7. ΑΝΑΚΕΦΑΛΑΙΩΣΗ 80
5. ΣΥΜΠΕΡΑΣΜΑΤΑ – ΣΥΖΗΤΗΣΗ 83
5.1. Χλωροφύλλες 83
5.2. Προλίνη 83
5.3. Όξινη φωσφατάση 84
5.4. Καταλάση 84
5.5. Πυρίτιο 85
ΣΥΝΤΟΜΟΓΡΑΦΙΕΣ 87
ΒΙΒΛΙΟΓΡΑΦΙΑ 88

ΕΥΡΕΤΗΡΙΟ ΣΧΗΜΑΤΩΝ

ΣΧΗΜΑ **ΣΕΛΙΔΑ**

Σχήμα 1. Μοντέλα σχέσης μεταξύ αλατότητας στο περιβάλλον των ριζών και αύξησης των φυτών με διαφορετική γονοτυπική προσαρμοστικότητα ... 6

Σχήμα 2. Το πρότυπο που εκφράζει τη σχέση μεταξύ της παραγωγής μιας καλλιέργειας και της ηλεκτρικής αγωγιμότητας στο μέσο ανάπτυξης..... 8

Σχήμα 3. Κυτταρική ομοιόσταση μετά από την προσαρμογή σε NaCl..... 13

Σχήμα 4. Τα ένζυμα που απαρτίζουν τον αντιοξειδωτικό μηχανισμό..... 19

Σχήμα 5. Δοκιμή της φωσφατάσης με π-νιτροφαινυλοφωσφορικό εστέρα.. 24

Σχήμα 6. Μοριακός τύπος της L-προλίνης στην αδιάστατη μορφή της..... 26

Σχήμα 7. Η χλωροφύλλη a και η χλωροφύλλη b..... 32

Σχήμα 8. Τα μέγιστα απορρόφησης της χλωροφύλλης a και της χλωροφύλλης b σε ακετόνη..... 33

Σχήμα 9. Κάτοψη της εγκατάστασης του υδροπονικού συστήματος με τις 12 πειραματικές μονάδες και ο τρόπος τυχαιοποίησής τους στη καλλιέργεια φασολιου..... 40

Σχήμα 10. Προσδιορισμός τη υπεροξειδάσης με γκουαϊακόλη 51

Σχήμα 11. Η πρότυπη καμπύλη BSA (Λευκωματίνη βόειου ορού) όπως υπολογίστηκε στο εργαστήριο..... 54

Σχήμα 12. Η πρότυπη καμπύλη της προλίνης όπως υπολογίστηκε στο εργαστήριο..... 57

Σχήμα 13 Αύξηση της ηλεκτρικής αγωγιμότητας στο διάλυμα απορροής λόγω της συσσώρευσης του NaCl, στο φασόλι σε κλειστό υδροπονικό σύστημα, στα τέσσερα διαφορετικά επίπεδα NaCl στο νερό άρδευσης..... 59

Σχήμα 14. Αύξηση της ηλεκτρικής αγωγιμότητας στο διάλυμα απορροής λόγω της συσσώρευσης του NaCl, στο κολοκύθι σε κλειστό υδροπονικό σύστημα, στα δυο διαφορετικά επίπεδα NaCl στο νερό άρδευσης με ή χωρίς την προσθήκη πυριτίου..... 60

Σχήμα 15. Αύξηση της ηλεκτρικής αγωγιμότητας στο διάλυμα απορροής λόγω της συσσώρευσης του NaCl, στη πιπεριά σε κλειστό υδροπονικό

σύστημα, στα τέσσερα διαφορετικά επίπεδα NaCl στο νερό άρδευσης 61

Σχήμα 16. Συγκεντρώσεις χλωροφύλλης a και b σε φύλλα φυτών φασολιού, που αναπτύσσονται σε ένα κλειστό υδροπονικό σύστημα, όπως επηρεάζονται από τη συγκέντρωση NaCl στο νερό άρδευσης..... 62

Σχήμα 17. Οι συγκεντρώσεις χλωροφύλλης a και b σε νεαρά φύλλα φυτών κολοκυθιού, που αναπτύσσονται σε κλειστό υδροπονικό σύστημα σε δύο διαφορετικά επίπεδα NaCl στο νερό άρδευσης, παρουσία ή όχι Si..... 63

Σχήμα 18. Οι συγκεντρώσεις χλωροφύλλης a και b σε παλαιά φύλλα φυτών κολοκυθιού, που αναπτύσσονται σε ένα κλειστό υδροπονικό σύστημα σε δύο διαφορετικά επίπεδα NaCl στο νερό άρδευσης, παρουσία ή όχι Si 64

Σχήμα 19. Οι συγκεντρώσεις χλωροφύλλης a και b σε νέα φύλλα φυτών πιπεριάς, που αναπτύσσονται σε ένα κλειστό υδροπονικό σύστημα σε τέσσερα διαφορετικά επίπεδα NaCl στο νερό άρδευσης..... 65

Σχήμα 20. Οι συγκεντρώσεις της προλίνης σε νέα φύλλα στο κολοκύθι, που αναπτύσσονται σε ένα κλειστό υδροπονικό σύστημα σε δύο διαφορετικά επίπεδα NaCl στο νερό άρδευσης, παρουσία ή όχι πυριτίου..... 67

Σχήμα 21. Οι συγκεντρώσεις της προλίνης σε νέα φύλλα στο κολοκύθι, που αναπτύσσονται σε ένα κλειστό υδροπονικό σύστημα σε αυξημένα επίπεδα (8 mM) NaCl στο νερό άρδευσης, παρουσία ή όχι πυριτίου..... 68

Σχήμα 22. Οι συγκεντρώσεις της προλίνης σε νέα φύλλα στη πιπεριά, που αναπτύσσονται σε ένα κλειστό υδροπονικό σύστημα σε τέσσερα διαφορετικά επίπεδα NaCl στο νερό άρδευσης. 69

Σχήμα 23. Η δραστικότητα της όξινης φωσφατάσης σε μmol ανά g χλωρού βάρους νέων φύλλων στο φασόλι, που αναπτύσσονται σε ένα κλειστό υδροπονικό σύστημα σε τέσσερα διαφορετικά επίπεδα NaCl στο νερό άρδευσης..... 70

Σχήμα 24. Η δραστικότητα της όξινης φωσφατάσης σε μονάδες ανά mg πρωτεϊνών στα νέα φύλλα στο κολοκύθι, που αναπτύσσονται σε ένα κλειστό υδροπονικό σύστημα σε δύο διαφορετικά επίπεδα NaCl στο νερό άρδευσης, παρουσία ή όχι πυριτίου..... 71

Σχήμα 25. Η δραστικότητα της όξινης φωσφατάσης σε μονάδες ανά g χλωρού βάρους νέων φύλλων στη πιπεριά, που αναπτύσσονται σε ένα κλειστό υδροπονικό σύστημα σε τέσσερα διαφορετικά επίπεδα NaCl στο νερό άρδευσης,..... 72

Σχήμα 26. Η δραστικότητα της καταλάσης σε νέα φύλλα στο φασόλι, που

αναπτύσσονται σε ένα κλειστό υδροπονικό σύστημα σε διαφορετικά επίπεδα NaCl στο νερό άρδευσης. 74

Σχήμα 27. Η δραστικότητα της καταλάσης σε νέα φύλλα στο κολοκύθι, που αναπτύσσονται σε ένα κλειστό υδροπονικό σύστημα σε δύο διαφορετικά επίπεδα NaCl στο νερό άρδευσης, παρουσία ή όχι πυριτίου..... 75

Σχήμα 28. Η δραστικότητα της καταλάσης σε νέα φύλλα στο κολοκύθι, που αναπτύσσονται σε ένα κλειστό υδροπονικό σύστημα σε αυξημένα επίπεδα (8 mM) NaCl στο νερό άρδευσης, παρουσία ή όχι πυριτίου..... 76

Σχήμα 29. Η δραστικότητα της καταλάσης σε νέα φύλλα στη πιπεριά σε μονάδες ενζύμου ανά χλωρό βάρος φύλου, που αναπτύσσονται σε ένα κλειστό υδροπονικό σύστημα σε τέσσερα διαφορετικά επίπεδα NaCl στο νερό άρδευσης..... 77

Σχήμα 30. Η δραστικότητα της καταλάσης σε νέα φύλλα στη πιπεριά ανά μονάδα φυλλικής επιφανείας, που αναπτύσσονται σε ένα κλειστό υδροπονικό σύστημα σε τέσσερα διαφορετικά επίπεδα NaCl στο νερό άρδευσης..... 78

Σχήμα 31. Συνοπτική παρουσίαση των αποτελεσμάτων στο φασόλι..... 79

Σχήμα 32. Συνοπτική παρουσίαση των αποτελεσμάτων στο κολοκύθι..... 80

Σχήμα 33. Συνοπτική παρουσίαση των αποτελεσμάτων στη πιπεριά..... 81

ΕΥΡΕΤΗΡΙΟ ΕΙΚΟΝΩΝ

ΕΙΚΟΝΑ **ΣΕΛΙΔΑ**

Εικόνα 1. Τα κανάλια καλλιέργειας πριν την εγκατάσταση της καλλιέργειας του φασολιού..... 39

Εικόνα 2. Η εγκατάσταση για την παρασκευή των θρεπτικών διαλυμάτων στον βοηθητικό χώρο του θερμοκηπίου..... 42

Εικόνα 3. Τα φυτά του φασολιού υποστυλώθηκαν με κατακόρυφο σχοινί που αναρτήθηκε σε οριζόντιο σύρμα πάνω από το κάθε κανάλι καλλιέργειας..... 43

Εικόνα 4. Η καλλιέργεια των φυτών κολοκυθιάς στο θερμοκήπιο..... 46

Εικόνα 5. Αφαίρεση δίσκων από το έλασμα φύλλων φασολιάς..... 49

ΕΥΡΕΤΗΡΙΟ ΠΙΝΑΚΩΝ

ΠΙΝΑΚΑΣ **ΣΕΛΙΔΑ**

Πίνακας 1. Η σύνθεση του θρεπτικού διαλύματος για την καλλιέργεια φασολιού..... 42

1. ΕΙΣΑΓΩΓΗ

1.1. ΑΛΑΤΟΤΗΤΑ

1.1.1. Τι είναι η αλατότητα.

Αλατότητα είναι η υπερβολική συγκέντρωση διαλυτών αλάτων (ανόργανων ιόντων) στο διάλυμα που βρίσκεται στην περιοχή του ριζοστρώματος των φυτών είτε πρόκειται για εδαφικό ή τεχνητό θρεπτικό διάλυμα. Η αλατότητα είναι ένας πολύπλοκος περιβαλλοντικός παράγοντας καταπόνησης που παρουσιάζει τρεις παραμέτρους, την ωσμωτική παράμετρο εξαιτίας της μείωσης του εξωτερικού υδατικού δυναμικού (Ψs) του εδάφους, την ιοντική παράμετρο, η οποία συνδέεται με την συσσώρευση ιόντων που γίνονται τοξικά σε υψηλές συγκεντρώσεις και την τροφική παράμετρο με μείωση απαραίτητων θρεπτικών στοιχείων όπως το κάλιο και το ασβέστιο ως συνέπεια της καταπόνησης (Lefevre et al. 2001). Τα ιόντα που βρίσκονται σε υπερβολική συγκέντρωση είναι συνήθως το Na^+ και το Cl^-, ενώ σε μικρότερο βαθμό υπεύθυνα μπορούν να είναι το Ca^{2+}, το Mg^{2+}, το SO_4^{2-} και το HCO_3^-. Η αλατότητα μπορεί να μετρηθεί με μονάδες που εκφράζουν άμεσα την συνολική συγκέντρωση διαλυτών αλάτων στο διάλυμα (g l^{-1} ή mmol l^{-1} ή meq l^{-1}). Συνήθως όμως εκφράζεται σε μονάδες που δηλώνουν έμμεσα την συγκέντρωση διαλυτών αλάτων όπως η ηλεκτρική αγωγιμότητα σε mmohs cm^{-1} ή dS m^{-1} και το οσμωτικό δυναμικό σε bar ή kPa ή at. Κατά προσέγγιση στα νερά άρδευσης ισχύει η σχέση: 1 dS m^{-1} = 10 meq l^{-1}.

Η ηλεκτρική αγωγιμότητα ενός διαλύματος σε μια συγκεκριμένη θερμοκρασία, είναι ανάλογη της συγκέντρωσης των ιόντων που βρίσκονται διαλυμένα μέσα σε αυτό. Ενώ η ηλεκτρική αγωγιμότητα δεν μας δίνει καμιά πληροφορία για το είδος των αλάτων του νερού άρδευσης ή του θρεπτικού διαλύματος, χρησιμοποιείται ως βασικό μέγεθος αναφοράς, τόσο για την παρασκευή, όσο και για τον έλεγχο της σύνθεσης των θρεπτικών διαλυμάτων (Savvas, 2001).

1.1.2. Προέλευση του προβλήματος

Το πρόβλημα της υψηλής συγκέντρωσης αλάτων δεν περιορίζεται μόνο στις παραθαλάσσιες περιοχές, αλλά επεκτείνεται και σε καλλιεργούμενες εκτάσεις. Τα περισσότερα καλλιεργούμενα εδάφη στις ξηρές και θερμές περιοχές της γης είναι

αρδευόμενα και τα διαλυμένα ιόντα που περιέχονται στο νερό μπορούν να συσσωρεύονται φτάνοντας σε επίπεδα που έχουν δυσμενή επίπτωση στην αύξηση και την παραγωγή των φυτών. Οι τρέχουσες εκτιμήσεις δείχνουν ότι 10 - 35% του παγκόσμιου γεωργικού εδάφους επηρεάζεται σήμερα από την αλατότητα, με τα μισά από αυτά να είναι αρδευόμενα, ενώ σημαντικές περιοχές κρίνονται ακατάλληλες προς χρήση κάθε χρόνο. Πρόκειται για ένα παγκόσμιο πρόβλημα, που είναι οξύτερο στην Κεντρική και Βόρεια Ασία, τη Νότια Αμερική και την Αυστραλασία.

Το πρόβλημα της αυξημένης περιεκτικότητας του εδάφους με άλατα είναι ακόμη πιο έντονο στις πεδινές και παραθαλάσσιες περιοχές, δεδομένου ότι η πτώση της στάθμης του υδροφόρου ορίζοντα ανοίγει τον δρόμο για την μετακίνηση του θαλασσινού νερού προς το εσωτερικό. Η μετακίνηση του θαλασσινού νερού έχει ως αποτέλεσμα την ανάμειξη του, με το νερό των υπόγειων υδροφόρων στρωμάτων, με συνέπεια την αύξηση της περιεκτικότητας του σε άλατα και κυρίως σε NaCl.

Η υψηλή αλατότητα προκαλεί, υψηλό ωσμωτικό στρες και υπερβολική συγκέντρωση ιόντων, με συνέπεια ακόμη και τον θάνατο των φυτών (Hasegawa et al. 2000). Υψηλή συγκέντρωση Na^+ συνοδεύεται συχνά από υψηλή συγκέντρωση Ca^{2+}, Mg^{2+}, SO_4^{2-}, αλλά και NaCl. Το χαμηλό ωσμωτικό δυναμικό (Ψ_s) που δημιουργείται στο έδαφος παρακρατεί το διαθέσιμο νερό, οπότε τα φύλλα πρέπει να αποκτήσουν ακόμη αρνητικότερο Ψ_s για να διατηρήσουν τη διαβάθμιση υδατικού δυναμικού (Ψ_w) στο σύστημα έδαφος - ρίζα - φυτό.

$$\Psi_w = \Psi_s + \Psi_p \qquad (1)$$

Όπου: Ψ_p είναι το δυναμικό πίεσης.

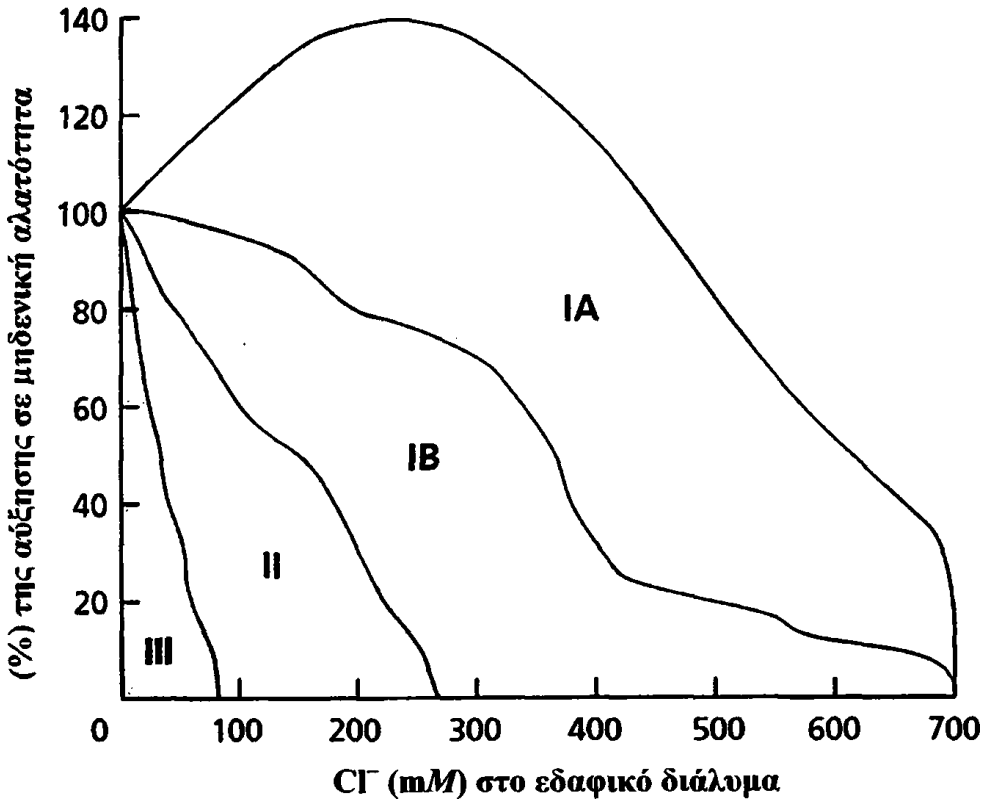
Υπ' αυτή την έννοια, η αντοχή στην ξηρασία και στην αλατότητα συσχετίζονται άμεσα (Κωνσταντινίδου, 2003).

Ένα μέρος από το νερό της άρδευσης εξατμίζεται, φαινόμενο πιο έντονο σε περιοχές με θερμό και ξηρό κλίμα, ενώ το μεγαλύτερο μέρος απορροφάται από τα φυτά. Αποτέλεσμα της εξάτμισης και της διαπνοής είναι η συσσώρευση στο έδαφος ιόντων που δεν χρησιμοποιούν τα φυτά μέσω του μηχανισμού εκλεκτικής απορρόφησης και απέκκρισης θρεπτικών στοιχείων και άλλων ιόντων που περιέχονται στο νερό άρδευσης. Ο μόνος τρόπος απομάκρυνσης αυτών των ιόντων από το έδαφος είναι η παροχή μεγάλων ποσοτήτων νερού, ώστε το νερό να αρχίσει να διηθείται σε βαθύτερα στρώματα παρασύροντας μαζί του και τα συσσωρευμένα άλατα. Ο

παραπάνω τρόπος όμως δεν είναι εφικτός σε περιοχές με ξηροθερμικό κλίμα, λόγω της ανεπάρκειας νερού επιδεινώνοντας έτσι σε μεγαλύτερο βαθμό το πρόβλημα. Επίσης η περιεκτικότητα του νερού άρδευσης σε άλατα εξαρτάται και από τα γεωλογικά δεδομένα μιας περιοχής τα οποία υπαγορεύουν σε μεγάλο βαθμό το είδος των αλάτων που έρχεται σε επαφή το νερό στην διαδρομή του.

1.2. ΦΥΤΑ ΚΑΙ ΑΛΑΤΟΤΗΤΑ

Η αλατότητα μπορεί να έχει επιπτώσεις σε οποιαδήποτε διαδικασία στον κύκλο ζωής των φυτών, με αποτέλεσμα την σημαντική μείωση της παραγωγής (Boyer, 1982). Όταν στο ριζόστρωμα των φυτών έχουμε υψηλή περιεκτικότητα διαλυτών αλάτων τα φυτά απαντούν μέσω του μηχανισμού εκλεκτικής απέκκρισης στην απορρόφηση



Σχήμα 1. Μοντέλα σχέσης μεταξύ αλατότητας στο περιβάλλον των ριζών και αύξησης των φυτών με διαφορετική γονοτυπική προσαρμοστικότητα: IA: αλόφυτα, IB: ανθεκτικά στην αλατότητα, II: μέτρια ευαίσθητα στην αλατότητα φυτά, III: ευαίσθητα στην αλατότητα φυτά, (Greenway and Munns, 1980)

αλάτων με εντατικότερους ρυθμούς από αυτούς που είναι αναγκαίοι για την θρέψη τους με αποτέλεσμα να αδυνατούν να προσλάβουν νερό λόγω αυξημένου ωσμωτικού δυναμικού στο εδαφικό διάλυμα. Η δαπάνη μεταβολικής ενέργειας που απαιτείται για την απέκκριση των αλάτων, που μέσω της διάχυσης εισέρχονται στα κύτταρα, οδηγεί σε σημαντική ενεργειακή καταπόνηση του φυτού. Υπάρχουν όμως και φυτά που επιτρέπουν την είσοδο μεγαλύτερων ποσοτήτων αλάτων, σε σύγκριση με αυτές που είναι απαραίτητες για την θρέψη τους, χωρίς να καταπονούνται ενεργειακά αφού αυτό γίνεται προς την κατεύθυνση της βαθμίδωσης του χημικού δυναμικού.

Παράλληλα αυξάνουν το ωσμωτικό δυναμικό των κυττάρων τους και μπορούν ευκολότερα να απορροφήσουν νερό από το υψηλό ωσμωτικό δυναμικό στην περιοχή της ρίζας. Στην περίπτωση αυτή όμως έχουμε φαινόμενα τοξικότητας λόγω της υπερβολικής συγκέντρωσης ιόντων, όπως του Na^+, που προκαλεί σημαντική μείωση της δραστικότητας πολλών ενζύμων (Greenway and Muns, 1980).

Τα φυτά ανταποκρίνονται στην αλατότητα υιοθετώντας την μία ή την άλλη στρατηγική, αναπτύσσοντας ειδικούς μηχανισμούς ανοχής των αντίστοιχων δυσμενών συνθηκών μέσω της ανάπτυξης ειδικών προσαρμοστικών μηχανισμών.

Μεταξύ υποχρεωτικών αλοφύτων (euhalophytes), δηλαδή φυτών που αναπτύσσονται άριστα μόνο σε πολύ αλατούχα εδάφη και γλυκοφύτων (glycophytes) δηλαδή φυτών που δεν επιβιώνουν σε αλατούχα εδάφη, υπάρχουν διαβαθμίσεις αντοχής (Σχήμα 1). Τα εσπεριδοειδή και το αβοκάντο είναι ιδιαίτερα ευαίσθητα, η τομάτα, η σόγια, το κρεμμύδι, το λάχανο και το φασόλι είναι ευαίσθητα, ενώ το βαμβάκι και το κριθάρι είναι ενδιάμεσα και τα σακχαρότευτλα ανθεκτικά. Εκπρόσωποι των αλοφύτων είναι τα *Suaeda maritime*, *Atriplex* sp., *Tamarix*, *Mesembryanthemun crystallinum* και άλλα περίπου 70 είδη ξυλωδών φυτών (μαγκροβίων) που αναπτύσσονται μέσα στο θαλασσινό νερό τροπικών ακτών. Ακόμη και τα γλυκόφυτα διαθέτουν μηχανισμούς προσαρμογής, οι οποίοι όμως είναι τόσο βραδείς ώστε αποβαίνουν αναποτελεσματικοί, εκτός εάν η καταπόνηση επέλθει σταδιακά.

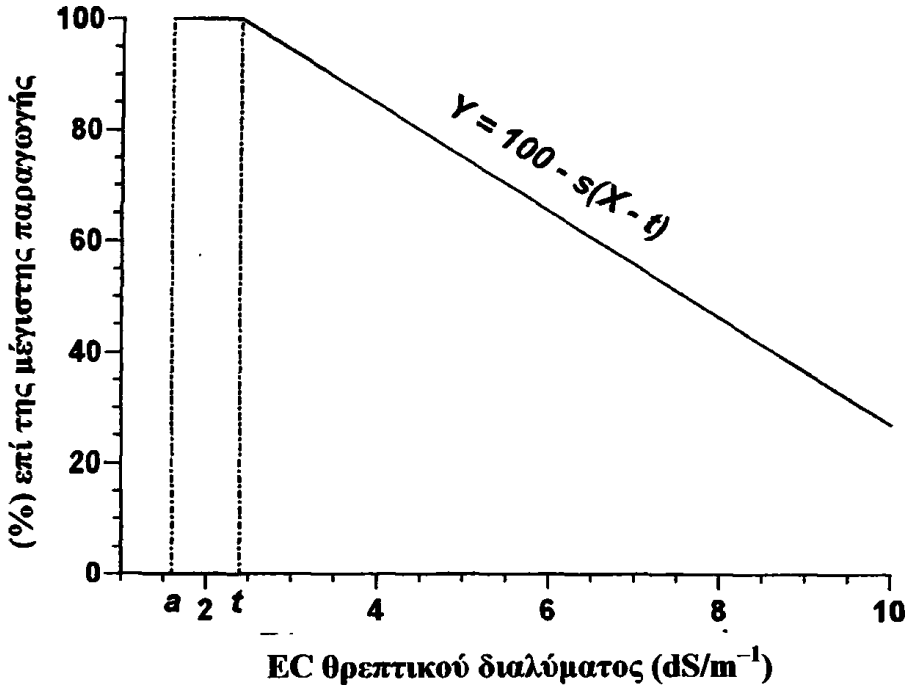
Συμπτώματα που εμφανίζονται στα φυτά κατά την διάρκεια της ανάπτυξης τους λόγω της αλατότητας είναι η χλώρωση, η νέκρωση και η πτώση των φύλων, η μείωση του ρυθμού ανάπτυξης και τέλος η νέκρωση του φυτού (Bethke and Drew, 1992; Jian - Kang Zhu, 2001).

1.2.1 Επίδραση της Αλατότητας στη Παραγωγή

Ο αποκλεισμός των αλάτων από τα μεταβολικώς ενεργά φύλλα και τις κορυφές αύξησης, καθώς και η ωσμωτική προσαρμογή των κυττάρων, επιβάλουν στα φυτά που αναπτύσσονται σε συνθήκες αυξημένης αλατότητας, ένα σημαντικά δυσμενέστερο ενεργειακό ισοζύγιο με αποτέλεσμα αυτά να παρουσιάζουν χαμηλότερους ρυθμούς αύξησης. Τα καλλιεργούμενα φυτά που αντιμετωπίζουν με αυτό τον τρόπο την αλατότητα, αντιδρούν με πτώση της παραγωγής σε βαθμό ανάλογο με την αύξηση της αλατότητας πάνω από ένα όριο, (Maas and Hoffman, 1977). Η μείωση της παραγωγής εξαρτάται όχι μόνον από την ποσότητα των αλάτων

στην ριζόσφαιρα, αλλά και από το είδος των αλάτων, το στάδιο ανάπτυξης, το είδος και την ποικιλία του φυτού, τον τρόπο άρδευσης, τις συνθήκες του περιβάλλοντος, καθώς και την διάρκεια έκθεσης των φυτού στην αλατότητα. Επίσης η μείωση της παραγωγής είναι γραμμική όταν η αγωγιμότητα του θρεπτικού διαλύματος αυξάνεται πάνω από το όριο t που είναι η οριακή τιμή της ηλεκτρικής αγωγιμότητας για άριστη ανάπτυξη (Σχήμα 2), (Savvas, 2001).

Μείωση της παραγωγής από την καταπόνηση σε αλατότητα οφείλεται στις διάφορες



Σχήμα 2. Το πρότυπο που εκφράζει τη σχέση μεταξύ της παραγωγής μιας καλλιέργειας και της ηλεκτρικής αγωγιμότητας στο μέσο ανάπτυξης (Savvas, 2001).

φυσιολογικές αποκρίσεις των φυτών, όπως είναι η ανεπαρκής φωτοσύνθεση εξαιτίας του κλεισίματος των στομάτων, και της επακόλουθης μείωσης στην αφομοίωση διοξειδίου του άνθρακα. Διαταράσσει επίσης, την ομοιόσταση στο δυναμικό του νερού και την κατανομή των ιόντων, τόσο σε ολόκληρο το φυτό όσο και σε κυτταρικό επίπεδο (Jian -Kang Zhu, 2001). Στον μηχανισμό, με τον οποίο κλείνουν τα στομάτια των φύλλων, συμμετέχει το ABA, το οποίο ενεργοποιεί την παραγωγή H_2O_2 μέσω της δράσης της οξειδάσης του NAD(P)H στα καταφρακτικά κύτταρα, τα οποία και ρυθμίζουν το άνοιγμα και το κλείσιμο (Neill et al. 2002). Εκτός αυτού, η καταπόνηση μπορεί και άμεσα να αναστείλει την κυτταρική διαίρεση και ανάπτυξη.

Ακόμη και ελαφριά καταπόνηση μπορεί να οδηγήσει στην επιβράδυνση της ανάπτυξης των φυτών και την μείωση της παραγωγικότητας. Επίσης οι καταπονήσεις είναι δυνατόν να επηρεάζουν τον κυτταρικό κύκλο ασκώντας μεταφραστικό ή και μετα-μεταφραστικό έλεγχο σε άλλους παράγοντες που εμπλέκονται σε αυτόν, όπως για παράδειγμα οι ορμόνες που επάγουν την κυτταρική διαίρεση (Jian -Kang Zhu, 2001).

Η υψηλή συγκέντρωση ανόργανων αλάτων στο υπόστρωμα ανάπτυξης των φυτών καθυστερεί την ανάπτυξή τους, επηρεάζοντας την κατανομή του ξηρού βάρους και τις βιοχημικές διαδικασίες όπως η αφομοίωση του N και του CO_2 και η σύνθεση των πρωτεϊνών (Greenway and Munns, 1980).

Η αλατότητα μειώνει την συνολική παραγωγή καρπών των καλλιεργούμενων λαχανικών, κυρίως λόγω της μείωσης του μεγέθους των καρπών και λιγότερο λόγω της μείωσης του αριθμού τους (Plaut, 1997). Ο αριθμός των καρπών της πιπεριάς είναι σταθερός σε μέτρια επίπεδα αλατότητας ενώ μειώνεται σημαντικά το μέσο βάρος τους (Chartzoulakis and Klapaki, 2000). Σε αυξημένα επίπεδα αλατότητας όμως εκτός της μείωσης του νωπού βάρους των καρπών της πιπεριάς παρατηρείται και μεγάλη μείωση του αριθμού των καρπών ανά φυτό (Gomez et al. 1996). Η μείωση της παραγωγής στην μελιτζάνα οφείλεται στην μείωση του νωπού βάρους των καρπών (Savvas and Lenz, 2000). Η αλατότητα διαταράσσει την ομοιόσταση στο δυναμικό νερού και την κατανομή των ιόντων, τόσο σε ολόκληρο το φυτό όσο και στο κυτταρικό επίπεδο, προκαλώντας ζημιές στην ανάπτυξη του φυτού και σε ακραίες περιπτώσεις τον θάνατο (Zhu, 2001).

1.3. Η ΑΠΑΝΤΗΣΗ ΤΩΝ ΦΥΤΩΝ ΣΤΗΝ ΑΛΑΤΟΤΗΤΑ

Το άριστο για την ενζυμική δράση και την σύνθεση των πρωτεϊνών ιοντικό περιβάλλον στο κυτταρόπλασμα των φυτών περιέχει 100-200 mM K^+ και 1-10 mM Na^+. Υψηλότερη αναλογία Na^+ προς K^+ αλλά και υψηλότερες συγκεντρώσεις ιόντων αδρανοποιούν διάφορα ένζυμα και παρεμποδίζουν την σύνθεση των πρωτεϊνών (Blumwald, 2000). Σε ακόμη υψηλότερες συγκεντρώσεις, το Na^+ προκαλεί μεταφορά Ca^{2+} από την κυτταρική μεμβράνη, που ανιχνεύεται από τη διαρροή K^+ στο περιβάλλον μέσο. Η καταπόνηση λόγω αλατότητας στα φυτά οφείλεται στην είσοδο ιόντων Na^+ στο κύτταρο μέσα από τα κανάλια K^+ και την έξοδο νερού από τα κανάλια νερού της κυτταρικής μεμβράνης (Allakhverdiev et al. 2000). Η συγκέντρωση Na^+ στις ρίζες και τα φύλλα αυξάνεται, ενώ μειώνονται σημαντικά μόνο στα φύλλα οι συγκεντρώσεις K^+ και Ca^{2+}. Τα ιόντα K^+ και Ca^{2+} έχουν σημαντικό ρόλο σε διάφορες φυσιολογικές διαδικασίες, σε αντίθεση με τα ιόντα Na^+ που δεν λειτουργούν ως θρεπτικό συστατικό, με αποτέλεσμα η αντικατάσταση του K^+ από Na^+ και η μείωση του Ca^{2+} μπορεί να οδηγήσει σε ανισορροπία της θρέψης (Dasgan et al. 2002). Η είσοδος ιόντων Na^+ στο κύτταρο γίνεται από κανάλια σχεδιασμένα για την κίνηση ιόντων K^+. Οι ομοιότητες ανάμεσα στα ιόντα Na^+ και K^+ καθιστούν δύσκολη την διάκριση μεταξύ τους, γεγονός που αποτελεί και την βάση της τοξικότητας των ιόντων Na^+. Με δεδομένη την αρνητική διαφορά δυναμικού της κυτταρικής μεμβράνης, η υψηλή εξωκυτταρική συγκέντρωση των ιόντων Na^+ προκαλεί μία ισχυρή ηλεκτροχημική διαβάθμιση, η οποία διευκολύνει την παθητική μεταφορά τους μέσα στο κύτταρο.

Εάν τα γλυκόφυτα περιορίζουν την είσοδο ιόντων στον βλαστό, ελέγχοντας τη είσοδο τους στη ρίζα, τα αλόφυτα εκτός από τα μαγκρόβια τείνουν να έχουν μεγαλύτερες συγκεντρώσεις Na^+ στον βλαστό παρά στη ρίζα τους. Με μια ιδιόρρυθμη ωσμωτική προσαρμογή, δηλαδή διαμερισματοποίηση της περίσσειας Na^+ και απομάκρυνση του από το κυτταρόπλασμα, στο χυμοτόπιο ή και εκτός κυττάρου, αναπτύσσονται ικανοποιητικά, επιζητώντας κυτταρικές συγκεντρώσεις NaCl από 20 έως 500 mM. Η ικανότητα της απορρόφησης και του περιορισμού του Na^+, στα χυμοτόπια, σε αλατούχα περιβάλλοντα, μειώνει αρκετά το Ψ_s των φύλλων, διευκολύνοντας έτσι την πρόσληψη νερού από το έδαφος και ελαττώνοντας το μεταβολικό κόστος σύνθεσης δαπανηρών ωσμωλυτών.

Προκειμένου τα αλόφυτα να συσσωρεύσουν Na^+ στα χυμοτόπια, θα πρέπει να το αντισταθμίσουν με άντληση πρωτονίων και να έχουν πρόσθετους μηχανισμούς για την απόκτηση άλλων ιόντων, κυρίως K^+, που συνήθως είναι περιορισμένα στα αλατούχα εδάφη. Έτσι, η αλατότητα σε πολλά φυτά, συμπεριλαμβανομένων των ανθεκτικών γλυκοφύτων, αυξάνει τη δραστικότητα του αντιμεταφορέα Na^+/H^+ που εδράζεται στον τονοπλάστη, και σχετίζεται με την εκδήλωση ανθεκτικότητας. Η λειτουργία αυτού του αντιμεταφορέα προϋποθέτει μια διαβάθμιση ηλεκτροχημικού δυναμικού, μεταξύ των δυο πλευρών της μεμβράνης του τονοπλάστη, η οποία προέρχεται κυρίως από διαβαθμίσεις του pH, που δημιουργούνται από τη δράση αντλιών H+ (Σχήμα 3). Ανάμεσα στις αντλίες που ενεργοποιούν τους αντιμεταφορείς Na^+/H^+ είναι η H^+-ATPάση της κυτταρικής μεμβράνης, (Sussman, 1994), η H^+-ATPάση του χυμοτοπίου και η H^+-πυροφωσφατάση (H^+-PPάση) του τονοπλάστη. Στο *Mesembryanthemun crystallinum* η αύξηση της δραστικότητας του αντιμεταφορέα Na^+/H^+, που προκαλείται από το NaCl, σχετίζεται με αυξημένη δραστικότητα της H^+-ATPάσης του χυμοτοπίου, αλλά όχι της H^+-PPάσης, υποδεικνύοντας τόσο τη διαφορετική συμβολή των δύο αντλιών στο δυναμικό του τονοπλάστη που ενεργοποιεί τη μεταφορά πλεονάζοντος Na^+ στα χυμοτόπια, όσο και τήν πολυπλοκότητα του όλου φαινομένου (Κωνσταντινίδου, 2003).

Πρόσφατες μελέτες υποστηρίζουν τη σημασία του αντιμεταφορέα Na^+/H^+ στην αντοχή σε αλατότητα, καθώς η υπερέκφρασή του επέτρεψε στην *Arabidopsis* να αναπτύσσεται στα 200 mM NaCl με στόχο την δημιουργία γενετικώς τροποποιημένων φυτών. Ως προς το K^+, ο μεταφορέας υψηλής συγγένειας K^+, ο HKT1, δρα επίσης ως ισχυρός συμμεταφορέας K^+/Na^+. Σε υψηλές συγκεντρώσεις εξωγενούς Na^+, η μεταφορά K^+ σταματά και ο HKT1 συμπεριφέρεται ως χαμηλής συγγένειας σύστημα πρόσληψης Na^+ (Jian -Kang Zhu, 2001). Εφόσον υπάρχει αρκετό Ca^{2+} στο έδαφος, το τελευταίο ενεργοποιεί έναν υψηλής συγγένειας μηχανισμό για το K^+, οπότε τα φυτά προσλαμβάνουν K^+ παρά Na^+. Αντοχή σε αλατότητα επιτεύχθηκε και σε φυτά τομάτας με την υπερέκφραση του γονιδίου *HAL1*, το οποίο εμπλέκεται στην ρύθμιση της μεταφοράς K^+. Μετρήσεις σε γενετικά τροποποιημένα φυτά των ενδοκυτταρικών επιπέδων K^+ έδειξαν αυξημένη συγκέντρωση σε σχέση με το Na^+ ,σε μεγαλύτερο βαθμό από ότι στα κανονικά φυτά (Gisbert et al. 2000).

Στην πολύπλοκη αυτή σχέση, τα αλόφυτα θα πρέπει συνεχώς να εξισορροπούν τις ανάγκες τους. Μία από αυτές, η συσσώρευση Na^+ και Cl^- ως αδάπανων ωσμωλυτών,

προϋποθέτει συνεχή δημιουργία νέων χυμοτοπίων και συνεχή αύξηση. Έτσι αρκετά αλόφυτα, είναι χυμώδη (succulent), έχουν δηλαδή υψηλή αναλογία όγκου προς επιφάνεια, επειδή διογκώνονται με απορρόφηση νερού, οπότε προκύπτει και αραίωση των αλάτων. Άλλα φυτά, όπως τα μαγκρόβια, επιτυγχάνουν την αραίωση αυτή στον βλαστό με ταχεία αύξηση και με ταυτόχρονο αποκλεισμό της εισόδου αλάτων από τη ρίζα με την αναπτυγμένη ενδοδερμίδα που διαθετουν. Μερικά αλόφυτα, εναλλακτικά ή επιπρόσθετα, δεν αποκλείουν την είσοδο NaCl, αλλά ενισχύουν την αποβολή των Na^+ και Cl^- με έκκριση τους από εξειδικευμένους αδένες και κύστες, που είναι εξελικτικά νεότερα κύτταρα των βλαστών τους. Επίσης άλλα φυτά, χρησιμοποιούν αλατούχες εκκρίσεις για να απορροφούν υγροσκοπικά την ατμοσφαιρική υγρασία, στα ξηρά περιβάλλοντα, όπου ευδοκιμούν.

Η σύγκριση αλοφύτων και γλυκοφύτων αποκαλύπτει δύο κοινές διεργασίες, που εκφράζονται σε διαφορετικό βαθμό στις δύο ομάδες και που αφορούν αποκλειστικά τη μείωση του Ψ_s με συσσώρευση ανόργανων ιόντων και οργανικών μορίων, χωρίς όμως ταυτόχρονη απώλεια σπαργής. Η πρώτη αφορά τη συσσώρευση ανόργανων ιόντων στα χυμοτόπια, είναι εντονότερη στα αλόφυτα και ήδη περιγράφηκε. Η δεύτερη, γνωστή ως ωσμωτική προσαρμογή (osmotic adjustment) είναι εντονότερη στα γλυκόφυτα και στα μαγκρόβια και επιτυγχάνεται με τη συσσώρευση οργανικών μορίων που λέγονται ωσμωλύτες (osmolytes). Είναι οργανικοί μεταβολίτες που δεν είναι τοξικοί για τα φυτά και συσσωρεύονται στο κυτταρόπλασμα έτσι ώστε το υδατικό δυναμικό να διατηρείται σε ισορροπία με εκείνο του χυμοτοπίου. Παρουσιάζουν υψηλή διαλυτότητα και δεν εμπλέκονται στον κυτταρικό μεταβολισμό, ακόμη και σε αυξημένες συγκεντρώσεις.

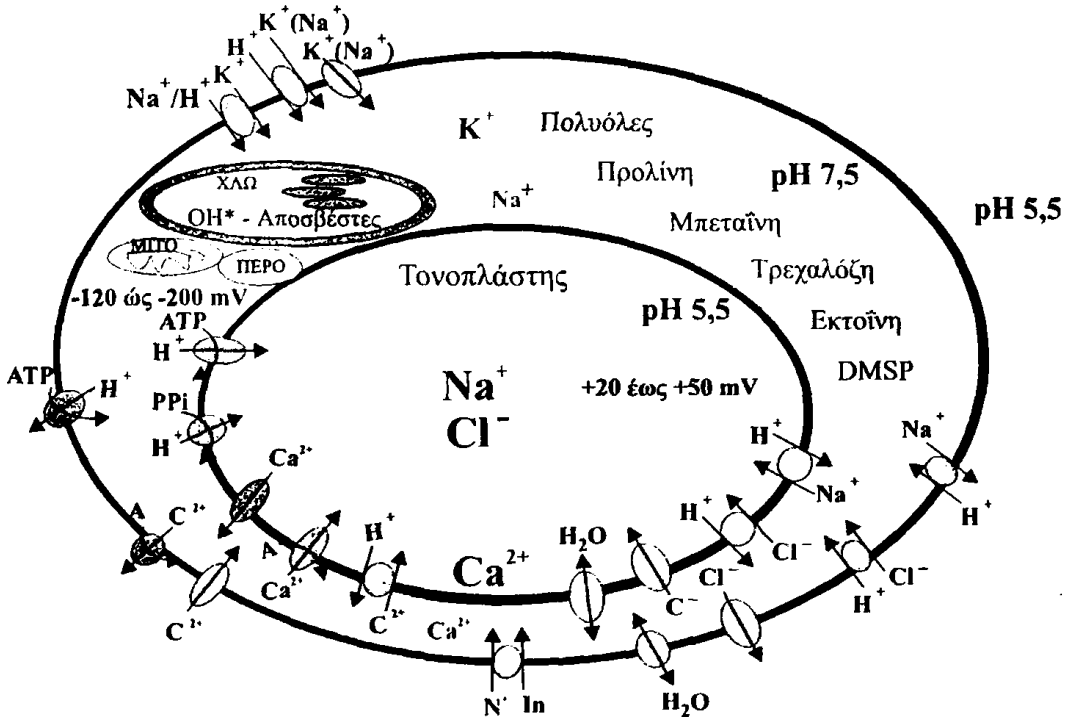
Η συγκέντρωση ωσμωλυτών, που επιτυγχάνεται μέσω της ωσμωτικής προσαρμογής, υπερβαίνει εκείνη που προκύπτει όταν διαλυμένες ουσίες συγκεντρώνονται παθητικά λόγω της αφυδάτωσης. Η ωσμωτική προσαρμογή παίζει σημαντικό ρόλο στον εγκλιματισμό του φυτού σε συνθήκες ξηρασίας ή αλατότητας, καθώς μειώνει το Ψ_s του φυτού και οδηγεί το Ψ_w της ρίζας σε τιμές αρνητικότερες από το Ψ_w του εδάφους, επιτρέποντας έτσι στο νερό να μετακινηθεί από το έδαφος στο φυτό.

Στην ωσμωτική προσαρμογή συμβάλλουν διάφορες οργανικές ενώσεις, που έχουν ανόμοια χημική δομή και είναι κοινές σε βακτήρια, ζώα και φυτά. Οι συχνότερα απαντώμενες είναι σάκχαρα (σακχαρόζη, φρουκτόζη. τρεχαλόζη, ραφφινόζη, φρουκτάνες), πολυαμίνες, μεθυλιωμένες ινοσιτόλες, πολυόλες-πολυυδατωμένες αλκοόλες, όπως πινιτόλη, μαννιτόλη, γλυκερόλη και σορβιτόλη (μια γλυκοαλκοόλη),

ή φορτισμένοι μεταβολίτες, όπως γλυκίνη μπεταΐνη (μια τεταρτοταγής αμίνη), προλίνη και εκτοΐνη (Ashraf and Harris, 2004).

Σημαντικό ποσοστό άνθρακα, 10% του φυτικού βάρους, δαπανάται από το φυτό για τη σύνθεση των ωσμωλυτών. Αυτοί διαμερισματοποιούνται στο κυτταρόπλασμα, στο στρώμα και στις κοιλότητες των οργανιδίων, προσφέροντας ωσμωτική εξισορρόπηση μεταξύ τους και με το χυμοτόπιο (Σχήμα 3), και επομένως αντοχή. Εφόσον οι αντίξοες συνθήκες ανασταλούν, τα μονομερή (π.χ. γλυκόζη, φρουκτόζη) πολυμερίζονται σε άμυλο και φρουκτάνες και αποθηκεύονται, ώστε μελλοντικά να διευκολύνουν τη γρήγορη και αναστρέψιμη ωσμωτική προσαρμογή.

Εκτός από τη συμμετοχή τους στην ωσμωτική προσαρμογή, πιθανολογείται ότι η συσσώρευση ωσμωλυτών λειτουργεί επίσης προστατευτικά στην έλλειψη νερού. Επειδή είναι υδρόφιλοι, οι ωσμωλύτες μπορούν να υποκαταστήσουν το νερό που λείπει στο πρωτεϊνικό κέλυφος ή στις μεμβράνες, επομένως δρουν ως ωσμωπροστάτες (osmoprotectors). Επιπλέον, σε μεγάλες συγκεντρώσεις μειώνουν την αρνητική επίδραση του NaCl στην δραστικότητα των ενζύμων, δρώντας ως μη ενζυμικοί συνοδοί μικρού μοριακού βάρους (chaperones). Η γλυκίνη μπεταΐνη



Σχήμα 3. Κυτταρική ομοιόσταση μετά από την προσαρμογή σε NaCl. ΧΛΩ: χλωροπλάστης, ΜΙΤΟ: μιτοχόνδριο, ΠΕΡΟ: υπεροξεδιόσωμα, DMSP: διμεθυλοθειο-νυλο-προπιονικό, (από Ρουμπελάκη- Αγγελάκη, 2003 κατόπιν άδειας του εκδότη).

παρεμποδίζει την καταστολή της Rubisco από την αλατότητα ή την αποσταθεροποίηση του φωτοσυστήματος PSII. Οι σορβιτόλη, μανιτόλη και προλίνη απομακρύνουν τις Ενεργές ή Αντιδραστικές Οντότητες Οξυγόνου (Reactive Oxygen Species, ROS) και επίσης συμμετέχουν στον εγκλιματισμό στο ψύχος, οπότε ονομάζονται κρυοπροστάτες, προσφέροντας και εκεί διττή προστασία (προσαρμογή ωσμωτικών δυναμικών, συντήρηση κυτταρικής δομής και πρωτεϊνών). Επιπλέον, είναι πιθανόν ορισμένοι ωσμωλύτες να συμμετέχουν στη μεταγωγή του σήματος της ωσμωτικής καταπόνησης.

Η προστασία απέναντι στην οξειδωτική καταπόνηση που προσφέρει η παραγωγή ωσμωλυτών όπως η μανιτόλη, η προλίνη, και η γλυκίνη μπεταΐνη, φαίνεται να είναι πιο αποτελεσματική όταν η παραγωγή αυτών των ουσιών γίνεται μέσα στον χλωροπλάστη (Shen et al. 1997).

Τέλος, η έλλειψη νερού λόγω αλατότητας επάγει ενεργοποίηση των γονιδίων και σύνθεση πρωτεϊνών όπως και στην περίπτωση της ξηρασίας, δηλαδή σύνθεση πρωτεϊνών ωσμωτικής καταπόνησης, υδατοπορίνης και ενζύμων του αντιοξειδωτικού μηχανισμού (Ashraf and Harris, 2004).

1.4. ΦΥΤΑ ΚΑΙ ΟΞΕΙΔΩΤΙΚΗ ΚΑΤΑΠΟΝΗΣΗ

1.4.1. Αντιδραστικές οντότητες οξυγόνου

Οι αερόβιοι οργανισμοί χρησιμοποιούν το οξυγόνο ως δέκτη ηλεκτρονίων, προκειμένου να επιτύχουν υψηλότερη ενεργειακή απόδοση από τον καταβολισμό των σακχάρων ή άλλων μορίων. Συγχρόνως όμως παράγονται ανηγμένες, ενδιάμεσες οντότητες οξυγόνου, οι οποίες είναι ισχυρότερα οξειδωτικά από το οξυγόνο, όταν αυτό βρίσκεται στη βασική του κατάσταση, είναι τοξικές και ονομάζονται συνολικά: Ενεργές ή Αντιδραστικές Οντότητες Οξυγόνου (ROS). Σε φυσιολογικές συνθήκες, στα βιολογικά συστήματα η αναγωγή του οξυγόνου σε νερό είναι συνεχής, αν όμως, για κάποιο λόγω το οξυγόνο δεχθεί μόνο ένα, δύο ή τρία ηλεκτρόνια, παράγονται αντίστοιχα το ανιόν του σουπεροξειδίου ($O_2\cdot^-$), το υπεροξείδιο του υδρογόνου (H_2O_2) και η ρίζα του υδροξυλίου ($OH\cdot$), (Kanazawa et al. 2000, Becana et al. 2000).

Οι ROS παράγονται αναπόφευκτα μέσω πολλών μεταβολικών οδών του κυττάρου όπως η φωτοσύνθεση και η φωτοαναπνοή (Foyer and Noctor, 2000), η οξείδωση των λιπαρών οξέων και η γήρανση (Vitória et al. 2001). Οι ROS παράγονται επίσης κατά τη διάρκεια του φυσιολογικού αερόβιου μεταβολισμού από την αλληλεπίδραση μεταξύ του O_2 και των ηλεκτρονίων που μεταφέρονται από τις αλυσίδες μεταφοράς ηλεκτρονίων στους χλωροπλάστες και τα μιτοχόνδρια (Halliwell and Gutteridge 1989; Maribel and Satoshi, 1998).

$$\mathbf{O2 + 4e^- + 4H^+ \rightarrow 2H_2O} \qquad \mathbf{(2)}$$

Το Οξυγόνο μονήρους κατάστασης ($^1O_2$), παράγεται από μεταφορά e^- στο φωτοσύστημα ΙΙ στους χλωροπλάστες. Μπορεί να αντιδράσει εύκολα με αμινοξέα (όπως η κυστεΐνη, μεθειονίνη, θρυπτοφάνη και ιστιδίνη) και αποτελεί τον μεγαλύτερο καταλύτη για την έναρξη της υπεροξείδωσης των λιπιδίων, η οποία οδηγεί σε καταστροφή της μεμβράνης. Υποστηρίζεται επίσης ότι τα φυτά μπορεί εσκεμμένα να παράγουν χημικές οντότητες ενεργού οξυγόνου κατά την χημική άμυνα για να προσβάλλουν τα παθογόνα ή για να εισάγουν την αντίδραση υπερευαισθησίας (Mehdy, 1994).

Ανιόντα του σουπεροξειδίου (O_2^-) παράγονται, από την μεταφορά e^- στα μιτοχόνδρια, την αναγωγή (O_2) από το κέντρο Fe-S του φωτοσυστήματος I, τη φωτοαναπνοή στα υπεροξειδιοσώματα και γλυοξειδιοσώματα (Del Rio et al. 1988), και την καθήλωση του αζώτου. Διάφορα οξειδοαναγωγικά-κυκλικά ξενοβιοτικά όπως το ζιζανιοκτόνο paraquat (1,1-διμεθυλο-4-4΄-διπυριδίνιο) μπορούν να καταλύσουν μεγάλα ποσοστά από τον σχηματισμό της ρίζας του υπεροξειδίου, ενεργώντας ως δέκτες ηλεκτρονίων (π.χ. από ανηγμένη φερρεδοξίνη σε χλωροπλάστες) μεταφέροντάς τα στο οξυγόνο (Winston, 1990). Η ρίζα υπεροξειδίου μπορεί να ενεργήσει ως οξειδωτικό μέσο (και μερικές φορές ως αναγωγικό μέσο), πιθανώς όμως να είναι περισσότερο επιβλαβής λόγω του σχηματισμού υπεροξειδίου του υδρογόνου και ριζών υδροξυλίου που ακολουθεί (Halliwell and Gutteridge, 1989).

Το Υπεροξείδιο υδρογόνου (H_2O_2), παράγεται κατά τη φωτοαναπνοή, τη β-οξείδωση των λιπαρών οξέων, την πρωτονιακή αποσύνθεση O_2^- και την άμυνα εναντίον παθογόνων μικροοργανισμών. Παρά το ότι το H_2O_2 δεν είναι ελεύθερη ρίζα, συμπεριλαμβάνεται στις ROS επειδή έχει παρόμοιες χημικές ιδιότητες με το O_2^- και σχηματίζει εύκολα OH. Σχηματίζεται επίσης με αυτο-οξειδοαναγωγή του ανιόντος του σουπεροξειδίου:

$$2\,O_2^- + 2\,H^+ \rightarrow H_2O_2 + O_2 \qquad (3)$$

Αυτή η αντίδραση πραγματοποιείται αργά σε ουδέτερο pH, εφόσον η πρωτονιωμένη μορφή της ρίζας υπεροξειδίου είναι περισσότερο δραστική (η υδροϋπεροξειδική ρίζα έχει $pK_a = 4.8$ (Halliwell and Gutteridge, 1989)). Το H_2O_2 προξενεί καταπόνηση ακόμη και μακριά από το σημείο παραγωγής του γιατί, σε αντίθεση με τις άλλες ROS, διαχέεται εύκολα μέσω των κυτταρικών μεμβρανών. Τα ένζυμα του κύκλου του Calvin είναι ευαίσθητα στο H_2O_2. Κατά τη φωτοαναπνοή, η παραγωγή H_2O_2 γίνεται στο στάδιο σύνθεσης γλυοξυλικού από γλυκολικό (Κωνσταντινίδου, 2003).

Οι υδροξυλικές ρίζες (**OH·**), παράγονται κατά την πρωτονιακή αποσύνθεση O_3 στον αποπλάστη, την αναγωγική αποδόμηση του H_2O_2, την αντίδραση H_2O_2 και O_2^- παρουσία μετάλλων (Haber-Weiss) και την άμυνα εναντίων των παθογόνων (HR). Η ρίζα του OH είναι ένα από τα πιο δραστικά και επιβλαβή μόρια στα βιολογικά συστήματα, με μικρή διάρκεια ζωής αφού αντιδρά στην περιοχή όπου σχηματίζεται,

με τα περισσότερα βιολογικά μόρια συμπεριλαμβανομένων των πρωτεϊνών, των λιπιδίων και των νουκλεϊνικών οξέων.

Η κυριότερη πορεία για τον σχηματισμό της in vivo, είναι η αντίδραση Haber-Weiss που καταλύεται από σίδηρο:

$$O_2^{\cdot -} + Fe^{3+} \rightarrow O^{2\cdot} + Fe^{2+}$$

$$Fe^{2+\cdot} + H_2O_2 \rightarrow OH^{\cdot} + OH^{\cdot -} + Fe^{3+} \qquad (4)$$

Ο χαλκός και άλλα μεταλλικά κατιόντα θα μπορούσαν επίσης να καταλύσουν την αντίδραση (Halliwell and Gutteridge, 1989). Σημαντικό χαρακτηριστικό του σχηματισμού της ρίζας του υδροξυλίου, είναι η διαθεσιμότητα του σιδήρου ή άλλων μεταλλικών κατιόντων στην κατάλληλη μορφή τους για το σχηματισμό σταθεροποιητικών συμπλόκων.

Οι ROS έχουν την δυνατότητα να αλληλεπιδράσουν με πολλά κυτταρικά συστατικά, όπως πρωτεΐνες, λιπίδια των κυτταρικών μεμβρανών, νουκλεϊκά οξέα και πολλά μικρά μόρια (π.χ. φαινόλες, σάκχαρα κ.α.), (Lin and Kao, 2000, Foyer et al. 1994). Οι βλάβες που προξενούν εκδηλώνονται με μεταβολή των ιδιοτήτων και της λειτουργικότητας των μεμβρανών, εκροή ενδοκυτταρικών συστατικών, μεταλλάξεις στο DNA, διάσπαση χρωστικών, μείωση της φωτοσυνθετικής και αναπνευστικής ικανότητας, γήρανση και νέκρωση (Davies, 1987, Fridovich, 1986).

Μεταξύ των αερόβιων οργανισμών, η υψηλότερη κυτταρική συγκέντρωση αέριου οξυγόνου παρατηρείται στα φυτά λόγω της συχνότερης έκθεσή τους σε ακραία περιβάλλοντα. Όταν η παραγωγή των ROS υπερβαίνει την απόσβεση τους από τον αντιοξειδωτικό μηχανισμό, που το φυτό ενεργοποιεί, προκαλείται οξειδωτική καταπόνηση (oxidative stress), (Κωνσταντινίδου, 2003).

1.4.2. Μηχανισμός αντιμετώπισης οξειδωτικής βλάβης

Η ποσότητα των ROS στα φυτικά κύτταρα πρέπει να παρακολουθείται και να ελέγχεται, για την αντιμετώπιση πιθανής οξειδωτικής βλάβης στα συστατικά του κυττάρου. Για τον λόγο αυτό τα φυτά έχουν αναπτύξει έναν εντυπωσιακό αντιοξειδωτικό μηχανισμό, που περιλαμβάνει μια σειρά αντιοξειδωτικά ένζυμα και μη ενζυμικά μόρια. Ο ρόλος τους είναι η απόσβεση και η εξουδετέρωση των ROS ή της βλάβης που οι ROS προξενούν (Dionisio-Sese and Tobita 1998; Shalata and Tal

1998; Bor et al. 2003). Αναλόγως της συγκέντρωσής τους, οι ROS οδηγούν σε τρεις αποκρίσεις: ενεργοποίηση του αντιοξειδωτικού μηχανισμού, προγραμματισμένο κυτταρικό θάνατο ή σε γενικευμένη νέκρωση, όταν η συγκέντρωση τους είναι υψηλή. Εκτός από τη συγκέντρωση, άλλοι παράγοντες που επηρεάζουν την απόκριση του φυτού είναι το είδος των ROS, η διαμερισματοποίησή τους, η διάρκεια της καταπόνησης καθώς και η ηλικία του φυτού. Σε χαμηλή συγκέντρωση ROS, που υπό φυσιολογικές συνθήκες παρατηρείται σε ήπιες καταπονήσεις ή σε κύτταρα απομακρυσμένα από το σημείο παραγωγής των ROS, επάγεται ο αντιοξειδωτικός μηχανισμός. Εκτός από τα ένζυμα που περιγράφονται σε επόμενο κεφάλαιο, ο αντιοξειδωτικός μηχανισμός των φυτών περιλαμβάνει ακόμη:

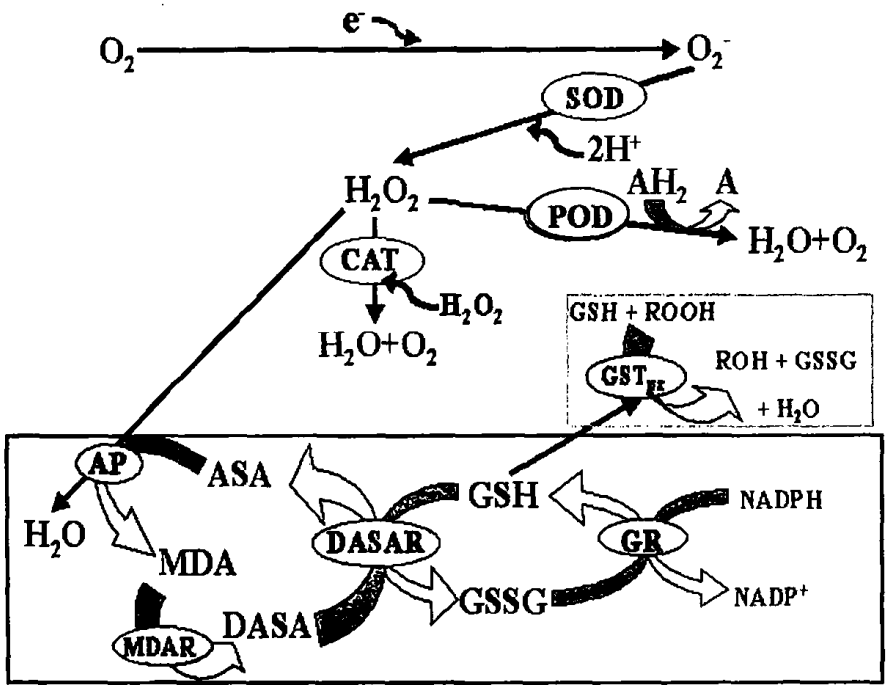
Το ασκορβικό οξύ (βιταμίνη C) βρίσκεται σ' όλους τους ιστούς αλλά η συγκέντρωσή του μπορεί να ποικίλλει. Συνήθως είναι υψηλότερη στα φωτοσυνθετικά κύτταρα και στα μεριστώματα, όπως και σε μερικούς καρπούς. Η υψηλή συγκέντρωση στα φωτοσυνθετικά κύτταρα είναι αποτέλεσμα της υψηλής συγκέντρωσης στους χλωροπλάστες, όπου η συγκέντρωσή του είναι γύρω στα 20-30 mM (Foyer et al. 1983).

Το-γλουταθείο (GSH) που βρίσκεται στα φύλλα και τις ρίζες σε συγκεντρώσεις οι οποίες κυμαίνονται από 0.1 έως 1 mM, με τις μεγαλύτερες τιμές να βρίσκονται στα φύλλα και τα μεριστώματα. Η ποσότητα του GSH είναι συνήθως ανηγμένη κατά 90% (Law et al. 1983). Η ανάλυση των χλωροπλαστών των χυμοτοπίων και των πρωτοπλαστών του καπνού, δείχνει συγκεντρώσεις GSH από 0,06 mM στο κυτταρόπλασμα, 0,02 mM στα χυμοτόπια και 1-5 mM στους χλωροπλάστες (Foyer and Halliwell, 1976; Law et al. 1983; Rennenberg, 1982).

Την α-τοκοφερόλη (βιταμίνη E), ένα λιπόφιλο μόριο που υπάρχει στις μεμβράνες. Συντίθεται στους χλωροπλάστες και είναι συγκεντρωμένη στις μεμβράνες των θυλακοειδών των χλωροπλαστών (Soll et al. 1985). Δρα ως εκκαθαριστικό μόριο (scavenger) της αντιδραστικής οντότητας οξυγόνου στις μεμβράνες και είναι σημαντική στα θυλακοειδή, όπου το φως αλληλεπιδρά με χρωστικές ουσίες που βρίσκονται στην μεμβράνη (membrane-bound) και μπορούν δυνητικά να λειτουργήσουν ως δέκτες του ερεθίσματος του φωτός για τον σχηματισμό του μονήρους οξυγόνου, οδηγώντας στην υπεροξείδωση των λιπιδίων (Fryer, 1992).

1.5. ΑΝΤΙΟΞΕΙΔΩΤΙΚΑ ΕΝΖΥΜΑ

Τα ένζυμα που απαρτίζουν τον αντιοξειδωτικό μηχανισμό είναι οι δισμουτάσες του σουπεροξειδίου (SOD), που αποσβένουν τα O_2^-, οι καταλάσες (CAT) και οι υπεροξειδάσες (GuPOX), που απομακρύνουν το H_2O_2. Άλλα ένζυμα επίσης είναι η υπεροξειδάση του ασκορβικού (APO), οι αναγωγάσες του μονοδεϋδροασκορβικού (MDHAR) και του δεϋδροασκορβικού (DHAR) και η αναγωγάση του γλοταθείου (GR), που επίσης αποσβένουν το H_2O_2. Οι SOD, CAT και οι υπεροξειδάσες (POD) δρουν ως προστατευτικά ένζυμα, καθώς εξουδετερώνουν άμεσα τα τοξικά μόρια, ενώ οι αναγωγάσες υποβοηθούν στη διατήρηση της αντιοξειδωτικής δεξαμενής στην ανηγμένη της μορφή (Κωνσταντινίδου, 2003). Ως προς την απόσβεση των OH· και



Σχήμα 4. Τα ένζυμα που απαρτίζουν τον αντιοξειδωτικό μηχανισμό (από http://www.science.lsus.edu)

$^1O_2$, δεν αναφέρονται ειδικά ένζυμα, αλλά οι SOD πιθανόν να εμπλέκονται εμμέσως στην απομάκρυνση τους. Τα αντιοξειδωτικά ένζυμα και οι ισοενζυμικές μορφές τους, όπως εξάλλου και τα μη ενζυμικά οξειδωτικά, δραστηριοποιούνται σε διαφορετικά οργανίδια. Η διαμερισματοποίησή τους, ακόμη και η διαφορετική θέση τους μέσα στο ίδιο οργανίδιο, είναι κρίσιμη για τη λειτουργία τους, καθώς οι ίδιες βιοχημικές

λειτουργίες επιτυγχάνονται με διακριτά, τοπικώς ολοκληρωμένα αντιοξειδωτικά συστήματα. Για παράδειγμα, το H_2O_2 διασπάται από την CAT στο κυτταρόπλασμα, στα γλυοξυσώματα και τα υπεροξειδιοσώματα, αλλά και από την APO στο κυτταρόπλασμα και στα πλαστίδια.

Την διαμερισματοποίηση υποδεικνύουν αποτελέσματα υπερέκφρασης αντιοξειδωτικών ενζύμων σε γενετικώς τροποποιημένα φυτά, όπου η αυξημένη συγκέντρωση ενός μεμονωμένου αντιοξειδωτικού ενζύμου δεν ήταν συχνά επαρκής για να προστατευθούν οι φυτικοί ιστοί. Επιπλέον, η συγχρονισμένη επαγωγή των αντιοξειδωτικών ενζύμων αποτελεί προϋπόθεση για την αποτελεσματική αντιμετώπιση της καταπόνησης, καθώς απαιτείται εναρμονισμένη δράση τους. Για παράδειγμα, οι SOD που καταλύουν τη μετατροπή O_2^- σε H_2O_2 δρουν σε συνδυασμό με τις CAT, που θα πρέπει στη συνέχεια να αποτοξινώσουν το H_2O_2, μετατρέποντάς το σε H_2O.

Μια επακόλουθη συνέπεια του στρες λόγω αλατότητας στα φυτά είναι η υπερβολική παραγωγή ROS, η οποία προκύπτει από τις εξασθενισμένες διαδικασίες μεταφοράς ηλεκτρονίων στους χλωροπλάστες και στα μιτοχόνδρια καθώς επίσης και από τις διαδικασίες όπως η φωτοαναπνοή. Τα αποτελέσματα των περισσότερων μελετών έχουν δείξει ότι η αντίσταση στο στρες λόγω αλατότητας συχνά συσχετίζεται με την απόδοση του αντιοξειδωτικού μηχανισμού (Shalata and Tal, 1998, Olmos et al. 1994). Ο μηχανισμός για την ανοχή των φυτών στο χλωριούχο νάτριο παραμένει αόριστος. Τα τελευταία χρόνια, εν τούτοις, πολλές μελέτες έχουν εστιαστεί στη σχέση μεταξύ του στρες λόγω αλατότητας και της αντιοξειδωτικής ενζυμικής δραστικότητας. Ορισμένες μελέτες έχουν αποδείξει ότι η αλατότητα αυξάνει την σύνθεση πρωτεϊνών σε διάφορα είδη φυτών, αλλά δεν υπήρξε εστίαση στα αντιοξειδωτικά ένζυμα. Η ενισχυμένη επαγωγή των αντιοξειδωτικών ενζύμων σε ποικιλίες βαμβακιού ανθεκτικότερες στο στρες λόγω αλατότητας παρουσιάστηκε επίσης στα καλλιεργημένα ωάρια (ovules) που ελήφθησαν από τα φυτά (Rajguru et al. 1999). Παρακάτω θα γίνει αναφορά σε δύο από τα ένζυμα που έχουν σημαντικό ρόλο στον αντιοξειδωτικό μηχανισμό του φυτού και που θα μελετηθούν στην παρούσα εργασία.

1.5.1. Η Υπεροξειδάση

Οι υπεροξειδάσεις (EC: 1.11.1.7) (POD) των φυτών, είναι μονομερή ένζυμα που είναι συνήθως γλυκοζυλιωμένα και καταλύουν μια μεγάλη ποικιλία των αντιδράσεων (Siegel 1993). Ένα μόριο υπεροξειδίου του υδρογόνου δρα ως δέκτης ατόμων υδρογόνου και μια άλλη ένωση δίνει τα άτομα υδρογόνου, χωρίς να σχηματίζεται μοριακό οξυγόνο κατά την αντίδραση.

$$2\ AH + H_2O_2 \xrightarrow{\text{υπεροξειδάση}} A\text{-}A + 2\ H_2O \qquad (5)$$

Στα φυτά υπάρχει ένας μεγάλος αριθμός υπεροξειδασών που μπορούν να διαφέρουν περισσότερο από 50% στην αλληλουχία των αμινοξέων (Welinder, 1992). Οι υπεροξειδάσες είναι οξειδοαναγωγάσες που καταλύουν την οξείδωση μιας διαφορετικής ομάδας οργανικών ενώσεων χρησιμοποιώντας το υπεροξείδιο του υδρογόνου ως τον τελευταίο αποδέκτη ηλεκτρονίων (Dawson, 1988).

Οι υπεροξειδάσες συνδέονται με πολλές βιοχημικές και φυσιολογικές διαδικασίες των φυτών, όπως την αύξηση, το σχηματισμό των κυττάρων, την ανάπτυξη των καρπών, τη βιοσύνθεση του αιθυλενίου, καθώς επίσης και την απάντηση στις διάφορες αβιοτικές καταπονήσεις (Matamoros et al. 2003).

Οι υπεροξειδάσες μελετήθηκαν για τον σημαντικό ρόλο τους σε διάφορα στάδια του μεταβολισμού, όπως στον καταβολισμό της αυξίνης (Normanly et al. 1995) στον σχηματισμό των διφαινυλικών γεφυρών (δεσμών), τη διασύνδεση των πρωτεϊνών πλούσιων σε υδροξυπρολίνη στο κυτταρικό τοίχωμα (Schnabelrauch et al. 1996; Amaya et al. 1999). Ακόμη μελετήθηκαν για την ενεργό συμμετοχή τους στον έλεγχό της οξειδοαναγωγικής λειτουργίας του αποπλάστη και στην οξείδωση των κινναμινο-αλκοολών πριν από τον πολυμερισμό τους κατά τη διάρκεια του σχηματισμού της λιγνίνης (lignin) και φελλίνης (suberin), (Roberts et al. 1988, Whetten et al. 1998). Η συμμετοχή των υπεροξειδασών παρατηρήθηκε σε σχετικά φυσιολογικές θέσεις κάτω από στρες (Low και Merida 1996), καθώς επίσης και στις αλληλεπιδράσεις των παθογόνων με τα φυτά (Wojtaszek 1997).

Η δραστικότητα της υπεροξειδάσης, είναι υψηλότερη στο έμβρυο και τις κοτυληδόνες σποροφύτων φασολιού (*Phaseolus vulgaris* L. cv. Carioca) που βλαστάνουν σε αυξημένα επίπεδα NaCl, (Lima, et al. 1997).

1.5.2. Η Καταλάση

Η καταλάση (EC 1.11.1.6) (CAT), καταλύει την αντίδραση όπου ένα μόριο υπεροξειδίου του υδρογόνου δρα ως δότης και ένα δεύτερο δρα ως δέκτης ατόμων υδρογόνου ενώ τα προϊόντα της αντίδρασης είναι νερό και μοριακό οξυγόνο.

$$2H_2O_2 \xrightarrow{\text{καταλάση}} 2H_2O + O_2 \qquad (6)$$

Η καταλάση είναι ένα από τα κυριότερα ένζυμα, που έχει ως ρόλο να καταστρέφει το μεταβολισμό του υπεροξειδίου του υδρογόνου, (υπεροξείδιο του υδρογόνου: οξειδοαναγωγάση υδρογόνου-υπεροξειδίου).

Το ένζυμο είναι ένα από τα λίγα που παρουσιάζουν διπλή ενζυμική δραστικότητα. Αναπτύσσει δραστικότητα της υπεροξειδάσης, που είναι ανεξάρτητη του pH για την περιοχή 3 με 9, (Catalytic activity), όταν καταλύει τη μετατροπή του υπεροξειδίου του υδρογόνου σε νερό και οξυγόνο (6).

Η άλλη δραστικότητα της καταλάσης (Peroxidative activity), εμφανίζεται όταν τα υποστρώματα είναι ένα μόριο οργανικού υπεροξειδίου και ένα αναγωγικό ως χορηγός ηλεκτρονίων και ιόντων (7).

$$ROOH + AH_2 \xrightarrow{\text{καταλάση}} H_2O + ROH + A \qquad (7)$$

Οι καταλάσες έχουν μοριακό βάρος 240.000 και περιέχουν τέσσερις ομάδες πρωτοαιμίνης ανά μόριο. Τα τέσσερα ενεργά κέντρα δρουν ανεξάρτητα το ένα από το άλλο. Συναντώνται ως πολλαπλάσια ισοένζυμων, υπάρχουν ως μικρές οικογένειες γονιδίων και κωδικοποιούνται από γονίδια του πυρήνα. Στα φυτικά κύτταρα βρίσκονται συνήθως στα υπεροξειδιοσώματα και γλυοξυσώματα, στα μιτοχόνδρια και στο κυτοσόλιο (Scandalios et al. 1997). Οι καταλάσες των φυτών είναι κυρίως υπεροξειδωτικά ένζυμα και τα περισσότερα από αυτά περιέχουν μια συντηρητική καρβοξυ-τελική αλληλουχία (Gould et al. 1988). Οι καταλάσες διαδραματίζουν έναν συγκεκριμένο ρόλο υπεροξειδάσης και η λειτουργία τους είναι να προστατεύουν τα κύτταρα από τα τοξικά προϊόντα του υπεροξειδίου του υδρογόνου. Επίσης διαδραματίζουν σημαντικό ρόλο στις αμυντικές αντιδράσεις των φυτών στη βιοτική ή αβιοτική καταπόνηση (Lebeda et al. 1999, Luhova et al. 1999). Διεργασίες στα φυτά που προκαλούν οξειδωτική τάση, αυξάνουν την δραστικότητα της καταλάσης

(Hertwig et al. 1992; Streb et al. 1993). Η καταλάση έχει καθαριστεί πλήρως σε ομοιογενή μορφή από τη φακή (Scheiffer et al. 1976) και το αγγούρι (Lamp et al. 1978).

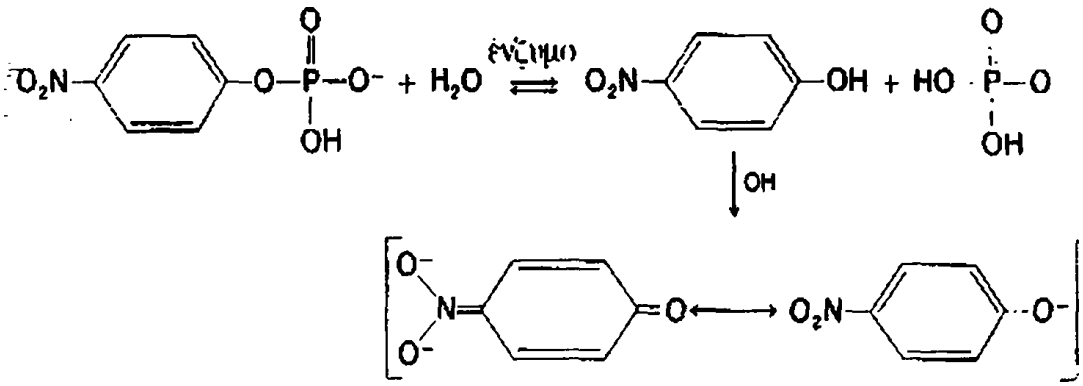
Κατά τη διάρκεια της φωτοαναπνοής, η γλυκολική οξειδάση (EC 1.1.3.15) καταλύει την ουσιαστικά αμετάκλητη οξείδωση του εστέρα του γλυκολικού οξέος από O_2 για την μορφοποίηση του γλυκοξέος. Κατά τη διάρκεια αυτής της αντίδρασης παράγεται υπεροξείδιο του υδρογόνου, το οποίο διασπάται στη συνέχεια σε νερό και οξυγόνο από την καταλάση. Η απομόνωση φυτών κριθαριού που στερούνται τη δράση της επιβεβαιώνει ότι ο σημαντικότερος ρόλος της καταλάσης στα φύλλα φυτών C3 είναι η αποτοξίνωση του υπεροξειδίου του υδρογόνου που παράγεται κατά τη διάρκεια της φωτοαναπνοής (Kendall 1983). Τα μεταλλαγμένα φυτά παραπάνω, εμφανίζουν νωρίς βλάβες στους χλωροπλάστες προκαλούμενες από την υπεροξείδωση των λιπιδίων, έχοντας ως τελικό αποτέλεσμα τον θάνατό τους (Smith et al. 1984). Η δραστικότητα της καταλάσης, σχετίζεται με τις συνθήκες ανάπτυξης των φυτών. Σε χαμηλά επίπεδα οξυγόνου για να εξαλειφθεί η φωτοαναπνοή, η δραστικότητα της καταλάσης είναι ελαττωμένη, ενώ επανέρχεται σε κανονικά επίπεδα όταν στα φυτά επιτρέπεται η φωτοαναπνοή. Η καταλάση υπόκειται σε φωτο-απενεργοποίηση, μερικώς επειδή ο συμπαράγοντας της αίμης μπορεί να απορροφά στο μπλε φως καταστρέφοντας την πρωτεΐνη. Υπάρχει επίσης απόδειξη ότι μέρος της απενεργοποίησης προκαλείται από την απορρόφηση φωτός στους χλωροπλάστες, ακόμη και αν η καταλάση βρίσκεται σε διαφορετικό οργανίδιο (Feierabend and Engel, 1986). Η καταλάση υφίσταται συνεχή ανακύκλωση απενεργοποίησης και σύνθεσης. Η φωτο-απενεργοποίηση είναι εμφανής κάτω από αυστηρές φωτοοξειδωτικές συνθήκες ή όταν οι παρεμποδιστές της φωτοσύνθεσης και οι περιβαλλοντικοί παράγοντες παρεμποδίζουν την πρωτεϊνοσύνθεση, όπως η χαμηλή θερμοκρασία που εμποδίζει την επανασύνθεση της καταλάσης (Feierabend and Engel, 1986; Feierabend et al. 1992). Αυτή η απόκριση είναι όμοια με αυτή της πρωτεΐνης D1 του PSII, η οποία επίσης ανακυκλώνεται ταχύτατα στο φως, εξαιτίας της φωτοκαταστροφής.

(Hertwig et al. 1992; Streb et al. 1993). Η καταλάση έχει καθαριστεί πλήρως σε ομοιογενή μορφή από τη φακή (Scheiffer et al. 1976) και το αγγούρι (Lamp et al. 1978).

Κατά τη διάρκεια της φωτοαναπνοής, η γλυκολική οξειδάση (EC 1.1.3.I5) καταλύει την ουσιαστικά αμετάκλητη οξείδωση του εστέρα του γλυκολικού οξέος από O_2 για την μορφοποίηση του γλυκοξέος. Κατά τη διάρκεια αυτής της αντίδρασης παράγεται υπεροξείδιο του υδρογόνου, το οποίο διασπάται στη συνέχεια σε νερό και οξυγόνο από την καταλάση. Η απομόνωση φυτών κριθαριού που στερούνται τη δράση της επιβεβαιώνει ότι ο σημαντικότερος ρόλος της καταλάσης στα φύλλα φυτών C3 είναι η αποτοξίνωση του υπεροξειδίου του υδρογόνου που παράγεται κατά τη διάρκεια της φωτοαναπνοής (Kendall 1983). Τα μεταλλαγμένα φυτά παραπάνω, εμφανίζουν νωρίς βλάβες στους χλωροπλάστες προκαλούμενες από την υπεροξείδωση των λιπιδίων, έχοντας ως τελικό αποτέλεσμα τον θάνατό τους (Smith et al. 1984). Η δραστικότητα της καταλάσης, σχετίζεται με τις συνθήκες ανάπτυξης των φυτών. Σε χαμηλά επίπεδα οξυγόνου για να εξαλειφθεί η φωτοαναπνοή, η δραστικότητα της καταλάσης είναι ελαττωμένη, ενώ επανέρχεται σε κανονικά επίπεδα όταν στα φυτά επιτρέπεται η φωτοαναπνοή. Η καταλάση υπόκειται σε φωτο-απενεργοποίηση, μερικώς επειδή ο συμπαράγοντας της αίμης μπορεί να απορροφά στο μπλε φως καταστρέφοντας την πρωτεΐνη. Υπάρχει επίσης απόδειξη ότι μέρος της απενεργοποίησης προκαλείται από την απορρόφηση φωτός στους χλωροπλάστες, ακόμη και αν η καταλάση βρίσκεται σε διαφορετικό οργανίδιο (Feierabend and Engel, 1986). Η καταλάση υφίσταται συνεχή ανακύκλωση απενεργοποίησης και σύνθεσης. Η φωτο-απενεργοποίηση είναι εμφανής κάτω από αυστηρές φωτοοξειδωτικές συνθήκες ή όταν οι παρεμποδιστές της φωτοσύνθεσης και οι περιβαλλοντικοί παράγοντες παρεμποδίζουν την πρωτεϊνοσύνθεση, όπως η χαμηλή θερμοκρασία που εμποδίζει την επανασύνθεση της καταλάσης (Feierabend and Engel, 1986; Feierabend et al. 1992). Αυτή η απόκριση είναι όμοια με αυτή της πρωτεΐνης D1 του PSII, η οποία επίσης ανακυκλώνεται ταχύτατα στο φως, εξαιτίας της φωτοκαταστροφής.

1.6. ΟΞΙΝΗ ΦΩΣΦΑΤΑΣΗ

Οι φωσφατάσες είναι ένζυμα που καταλύουν την υδρόλυση των φωσφορικών μονοεστέρων με την επακόλουθη απελευθέρωση ανόργανου φωσφορικού και είναι πολύ διαδεδομένες στην φύση. Τα ένζυμα αυτά δρουν μόνο σε ορισμένα υποστρώματα και σε τέτοιες περιπτώσεις δεν είναι δύσκολο να βρεθεί η φυσιολογική λειτουργία τους. Για παράδειγμα, η φωσφατάση της διφωσφορικής φρουκτόζης (1,6 δι-φωσφορική φρουκτόζη —> 6-φωσφορική φρουκτόζη + P_i) καταλύει μία ενδιάμεση αντίδραση στην γλυκονεογένεση. Παρόλα αυτά, υπάρχει και ένα άλλο είδος φωσφατάσης στα κύτταρα των περισσοτέρων οργανισμών. Αυτού του είδους τα ένζυμα έχουν μία ευρεία εξειδίκευση ως προς το υπόστρωμα και γενικά κατατάσσονται ως όξινες ή αλκαλικές φωσφατάσες, εξαρτώμενες από το pH στο οποίο δείχνουν την βέλτιστη δράση τους.



Σχήμα 5. Δοκιμή της φωσφατάσης με π-νιτροφαινυλοφωσφορικό εστέρα, (από Clark and Switzer, 1992 κατόπιν άδειας του εκδότη).

Οι σπόροι των φυτών είναι μία πλούσια πηγή τυπικών όξινων φωσφατασών. Η δραστικότητα της φωσφατάσης συνήθως αυξάνει γρήγορα κατά την περίοδο της βλάστησης και στη συνέχεια ελαττώνεται καθώς το φυτό μεγαλώνει.

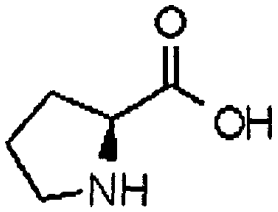
Η όξινη φωσφατάση (EC 3.1.3.2.) (ΟΦ), είναι ευρέως διαδεδομένη στα φυτά και έχει παρατηρηθεί από καιρό, ότι η δράση της ΟΦ, αυξάνεται χαρακτηριστικά, όταν τα φυτά είναι ανεπαρκή σε φωσφόρο (P_i). Η αύξηση της δραστικότητας της ΟΦ σχετίζεται με χαμηλά επίπεδα φωσφόρου, σε πολλά είδη και μέρη φυτών (Barrett-

Lennard et al. 1982; Duff et al. 1989; Goldstein et al. 1989; Lefebvre et al. 1990; Ueki και Sato, 1977). Κάτω από συνθήκες στρες λόγω αλατότητας και έλλειψης νερού έχει αποδειχθεί ότι αυξάνεται η δράση της (Barrett-Lennard et al. 1982; Pan, 1987; Szabo-Nagy et al. 1992). Έχει, επίσης, αποδειχθεί ότι η έλλειψη νερού προκαλεί αύξηση της δράσης της όξινης φωσφατάσης, χωρίς να επηρεάζει σημαντικά το επίπεδο φωσφόρου (Barrett-Lennard et al. 1982). Οι Szabo-Nagy et al. (1992) απέδειξαν ότι η επαγωγή της όξινης φωσφατάσης, υπό συνθήκες στρες, δεν συνοδεύεται από μείωση του ποσοστού φωσφόρου. Αναφέρεται επίσης ότι η μεθυλική γιασμίνη προκαλεί την δράση της όξινης φωσφατάσης σε απομονωμένα φύλλα ρυζιού, υπό συνθήκες φωτός και ότι η επαγωγή δεν προκαλείται από μείωση του P_i (Shih και Kao, 1998).

Η δραστικότητα της ΟΦ αυξήθηκε σημαντικά σε καλλιέργεια κυττάρων μπιζελιού (*Pisum sativum*) με διάλυμα (85 mM NaCl) και εντοπίστηκε στο κυτταρικό τοίχωμα, στα σωματίδια Golgi, στα μικροσωμάτια και στα χυμοτόπια (Olmos and Hellin 1997). Τα αποτελέσματα έδειξαν μια πιθανή συμμετοχή της όξινης φωσφατάσης και της ATPάσης στην συνέχιση της αύξησης των κυττάρων κάτω από συνθήκες αυξημένης αλατότητας.

1.7. ΠΡΟΛΙΝΗ

Η προλίνη[1] είναι ένα από τα αμινοξέα που απαντάται σε αρκετά μεγάλες ποσότητες σε πολλά ανώτερα φυτά. Η προλίνη είναι ένα ουδέτερο, γενετικά κωδικοποιούμενο αμινοξύ που έχει αλειφατική πλευρική αλυσίδα η οποία όμως, σε αντίθεση με τα άλλα αμινοξέα, συνδέεται και με το άτομο αζώτου και με το άτομο α-άνθρακα, (δηλαδή αυστηρά θεωρούμενη ή προλίνη είναι ιμινο-οξύ).



Pro Proline

Σχήμα 6. Μοριακός τύπος της L-προλίνης στην αδιάστατη μορφή της.

Η προλίνη μπορεί να επηρεάσει ιδιαίτερα την πρωτεϊνική αρχιτεκτονική γιατί ο δακτύλιος της δομής της την κάνει πιο άκαμπτη από τα άλλα αμινοξέα, δεν στηρίζει την α-έλικα και είναι το μόνο αμινοξύ που εμφανίζεται σε πεπτιδικό δεσμό cis.

Η συσσώρευση της προλίνης είναι μια χαρακτηριστική φυσιολογική απάντηση των φυτών στις διάφορες καταπονήσεις, π.χ. αλατότητα, κρύο, ξηρασία, βαρέα μέταλλα κ.α. Ανήκει στην κατηγορία των ωσμολυτών (osmolytes), ή συμβατών διαλυτών ουσιών (compatible solutes), που συμβάλλουν στο να αντιμετωπίζουν τα φυτά ακραίες περιβαλλοντικές καταστάσεις, (Stewart and Lee, 1974; Delauney and Verma, 1993; Samaras et al. 1995; Taylor, 1996). Πρόκειται για οργανικούς μεταβολίτες που δεν είναι τοξικοί για το κύτταρο, (δεν εμποδίζουν τις βιοχημικές αντιδράσεις) και συσσωρεύονται στο κυτταρόπλασμα ώστε αφενός το υδατικό δυναμικό του να διατηρείται σε ισορροπία με εκείνο του χυμοτοπίου και αφετέρου το υδατικό δυναμικό του κυττάρου να διατηρείται χαμηλό χωρίς απώλεια της σπαργής του (Yoshiba et al. 1997).

Αυτές οι ενώσεις έχουν την ιδιότητα να είναι φορτισμένες σε ουδέτερο pH και να έχουν μεγάλη διαλυτότητα στο νερό. Επιπλέον, σε υψηλές συγκεντρώσεις έχουν από μικρή έως καθόλου συμμετοχή στις αντιδράσεις μεταξύ μακρομορίων και διαλυτών

[1] **Σύμβολο pro P, Μοριακή δομή $C_5H_9NO_2$, Μ.Β. 115.13, Ισοηλεκτρικό σημείο (pH) 6.30, Τιμή pK 1.99, 10.60, CAS Registry Number 147-85-3.**

(Yancey et al. 1982; Low, 1985; Somero, 1986; Timasheff, 1993; Yancey, 1994). Σε αντίθεση με τους αλληλεπιδρώντες διαλύτες, (π.χ. ανόργανα ιόντα) οι οποίοι εισέρχονται αυθόρμητα στην σφαίρα ενυδάτωσης των πρωτεϊνών, ευνοώντας έτσι την αποδιάταξή τους, οι συμβατοί ωσμολύτες έχουν την τάση να μην συμμετέχουν στην σφαίρα ενυδάτωσης και να σταθεροποιούν τις φυσικές (αναδιπλωμένες) δομές των πρωτεϊνών (Low, 1985).

Η διάσπαση της προλίνης στο κυτταρικό περιβάλλον μετά από μια περίοδο καταπόνησης μπορεί να καταστεί πηγή άνθρακα, αζώτου και ενέργειας (Hare et al. 1999). Η ποσότητα της προλίνης που βρίσκεται σε πολλά είδη φυτών είναι πραγματικά ρυθμιστής ωσμωτικής πίεσης, δεδομένου ότι η προλίνη που συσσωρεύεται σε διάφορα φυτά κάτω από συνθήκες στρες λόγω έλλειψης νερού, καταναλώνεται ραγδαία όταν αίρονται οι συνθήκες στρες, ενεργώντας ως παροδική ένωση αποθήκευσης για το μειωμένο άζωτο και τη μειωμένη ενέργεια. Ο Singh το 1973 έδειξε ότι το ποσοστό της ανάπτυξης των φυτών κριθαριού μετά την αποκατάστασή τους από στρες λόγω νερού, συσχετίστηκε θετικά με τη ποσότητα της προλίνης που συσσωρεύτηκε κατά τη διάρκεια των άνυδρων συνθηκών.

Το ABA έχει αποδειχθεί, πως προωθεί την συγκέντρωσης της προλίνης, ως απάντηση των φυτών σε μια ποικιλία από καταπονήσεις του περιβάλλοντος. Επίσης έχει αποδειχθεί ότι η συσσώρευση της προλίνης κάτω από συνθήκες στρες λόγω έλλειψης νερού και η διάσπασή της, στη διάρκεια αποκατάστασης του νερού στα φυτά, ακολουθείται από αύξηση και μείωση του ABA αντίστοιχα, στο κυτταρικό περιβάλλον (Trotel-Aziz et al. 2003).

Η προλίνη προστατεύει τις μεμβράνες, τις πρωτεΐνες και τα ένζυμα του κυττάρου, από τα δυσμενή αποτελέσματα που προκαλούν οι υψηλές συγκεντρώσεις των ανόργανων ιόντων και οι ακραίες θερμοκρασίες (Pollard and Wyn Jones, 1979; Paleg et al. 1984; Brady et al. 1984; Rudolph et al. 1986, Santarius, 1992; Santoro et al. 1992). Έχει αναφερθεί ότι η εξωγενής προλίνη προστατεύει τα φυτά που αναπτύσσονται σε αυξημένα επίπεδα αλατότητας. Βελτίωσε δε την ανοχή των σωματικών εμβρύων του σέλινου στη μερική αφυδάτωση (Saranga et al. 1992). Οι Okuma et al. το 2000, διαπίστωσαν ότι η προσθήκη προλίνης, βελτίωσε την ανάπτυξη κυτταροκαλλιεργειών καπνού σε αυξημένα επίπεδα αλατότητας, βελτίωση που αποδόθηκε στο ρόλο της προλίνης ως ωσμωπροστάτη για τα ένζυμα και τις μεμβράνες ενάντια στο στρες λόγω αλατότητας, παρά ως συμβατή διαλυτή ουσία. Η συσσώρευση της προλίνης συμμετέχει στην ρύθμιση της ανάπτυξης των ριζών σε

σπορόφυτα ρυζιού κάτω από αυξημένα επίπεδα NaCl. Ενώ όταν τα σπορόφυτα μεταφέρονται σε υπόστρωμα με απεσταγμένο νερό, τα επίπεδα της προλίνης στην ρίζα μειώνονται, (Lin and Kao, 1996). Η προλίνη έχει βρεθεί επίσης σε μεγάλες συγκεντρώσεις στα άνθη των αγγειόσπερμων όπου μπορεί να συμμετέχει στη γονιμοποίηση και στη βλάστηση της γύρης.

Η προλίνη που συσσωρεύεται ως απάντηση των κυττάρων στην ξηρασία ή την αύξηση της αλατότητας στα φυτά είναι πρωτίστως εντοπισμένη στο κυτόπλασμα που αποτελείται από το θεμελιώδες πλάσμα και τα κυτταρικά οργανίδια εκτός του πυρήνα (κυτοσόλιο) (Ketchum et al. 1991 Pahlich et al. 1983). Σε αυξημένα επίπεδα αλατότητας σε καλλιέργεια πιπεριάς συσσωρεύεται προλίνη, εξασφαλίζοντας για τα φυτά σταθεροποίηση των πρωτεϊνών και ωσμωρύθμιση (Gunes et al. 1996). Οι Werner and Finkelstein (1995) διαπίστωσαν ότι φυτά *Arabidopsis,* με μετάλλαξη που προκαλούσε ανεπάρκεια στη σύνθεση της προλίνης, ήταν ανίκανα να συνεχίσουν την βλάστηση σε υπόστρωμα με αυξημένη αλατότητα επειδή δεν μπορούσαν να συσσωρεύουν προλίνη σε επίπεδα που είχε το μη μεταλλαγμένο φυτό.

Σε κυτταροκαλλιέργειες καπνού που αναπτύσσονται σε 428 mM NaCl, η προλίνη αντιπροσωπεύει πάνω από το 80% του συνόλου των ελεύθερων αμινοξέων. Εάν υπσθέσουμε ότι υπάρχει ομοιόμορφη κατανομή της προλίνης στον συνολικό ενδοκυτταρικό υδατικό όγκο τότε είναι παρούσα σε επίπεδα μεγαλύτερα των 129 mM (Binzel et al. 1987). Εάν όμως περιορίζεται στο κυτταρόπλασμα, η συγκέντρωση της προλίνης θα μπορούσε να υπερβεί 200 mM στα κύτταρα και επομένως να συμβάλλει ουσιαστικά στην κυτταροπλασματική οσμωτική ρύθμιση (Binzel et al. 1987).

Η προλίνη διαδραματίζει έναν σημαντικό ρόλο στον αμυντικό μηχανισμό των στρεσαρισμένων κυττάρων απαλύνοντας την αλλαγή της τιμής του οξειδοαναγωγικού δυναμικού με την επαναπλήρωση του $NADP^+$. Η σύνθεση προλίνης εμπλέκεται ως μηχανισμός στην κυτταροπλασματική ακίδωση, και μπορεί να διατηρήσει τις αναλογίες NADP/NADPH σε τιμές συμβατές με το μεταβολισμό (Hare and Cress, 1997). Ο γρήγορος καταβολισμός της προλίνης στη διάρκεια αποκατάστασης του νερού στα φυτά μπορεί να παρέχει τη μείωση των αντίτιμων που υποστηρίζουν την οξειδωτική φωσφορυλίωση στα μιτοχόνδρια και την παραγωγή του ATP για την αποκατάσταση των ζημιών από την αλατότητα (Hare and Cress, 1997, Hare et al. 1998).

Η πορεία βιοσύνθεσης της προλίνης, που χαρακτηρίστηκε πρώτα στα βακτήρια γίνεται από γλουταμινικό οξύ και ορνιθίνη.

Η προλίνη, η οποία αυξάνεται αναλογικά γρηγορότερα από τα άλλα αμινοξέα σε φυτά που καλλιεργούνται σε συνθήκες στρες, έχει χρησιμοποιηθεί για την αξιολόγηση μελετών του στρες των φυτών σε σχέση με το περιβάλλον (Ashraf and Harris, 2004).

1.8. ΦΩΤΟΣΥΝΘΕΣΗ

Η φωτοσύνθεση είναι η φυσικοχημική διεργασία μέσω της οποίας τα φυτά, χρησιμοποιούν την ηλιακή ενέργεια για να συνθέσουν οργανικές ενώσεις. Αποτελεί τον μοναδικό μηχανισμό, στην γη, δέσμευσης και μετατροπής της ηλιακής ακτινοβολίας, δίνοντας άμεσα στους αυτότροφους οργανισμούς ή έμμεσα στους ετερότροφους τα απαραίτητα στοιχεία για την ζωή. Η φωτοσυνθετική διεργασία έχει ως αποτέλεσμα την απελευθέρωση οξυγόνου (O_2) και την δέσμευση του διοξειδίου του άνθρακα (CO_2), το οποίο και χρησιμοποιείται για την σύνθεση υδατανθράκων. Η φωτοσύνθεση στα φυτά μπορεί να χωριστεί σε δυο στάδια (Γανωτάκης και Κοτζαμπάσης, 2003).

- Στις φωτεινές αντιδράσεις, οι οποίες περιλαμβάνουν την απορρόφηση του φωτός, τη μεταφορά της ενέργειας στα κέντρα φωτοσυνθετικής αντίδρασης και τις αντιδράσεις μεταφοράς ηλεκτρονίων και πρωτονίων που οδηγούν στην παραγωγή NADPH και ATP.
- Στις σκοτεινές αντιδράσεις, (κύκλος του Calvin), οι οποίες περιλαμβάνουν την αναγωγή του CO_2 και την σύνθεση υδατανθράκων, χρησιμοποιώντας το NADPH και το ATP που παράγονται από της φωτεινές αντιδράσεις.

Η φωτοσύνθεση στα πράσινα φυτά επιτελείται από δυο συνδεδεμένα φωτοσυστήματα, το φωτοσύστημα I και II. Στο φωτοσύστημα II, η διέγερση ενός ειδικού ζεύγους μορίων χλωροφύλλης (P680) που βρίσκονται στην επιφάνεια επαφής μεταξύ δυο όμοιων πρωτεϊνικών υπομονάδων, οδηγεί στην μεταφορά ενός ηλεκτρονίου στην πλαστοκινόνη. Το κέντρο αντίδρασης επανακτά τα ηλεκτρόνια του από το νερό μέσω ενός πρωτεϊνικού κέντρου που περιέχει τέσσερα ιόντα μαγγανίου, ένα ιόν χλωρίου και ένα κατάλοιπο τυροσίνης. Το κέντρο Mn^{2+} στην ανηγμένη μορφή του οξειδώνει δύο μόρια νερού ώστε να παραχθεί ένα μόριο O_2. Έτσι κάθε φορά που η απορρόφηση φωτός αποβάλει ένα ηλεκτρόνιο από το P680, το θετικά φορτισμένο ζεύγος αφαιρεί ένα ηλεκτρόνιο από το κέντρο Mn^{2+}. Η πλαστοκινόνη που παράγεται επανοξειδώνεται από το σύμπλεγμα κυτοχρωμάτων *bf* το οποίο μεταφέρει τα ηλεκτρόνια προς μια διαλυτή πρωτεΐνη χαλκού, την πλαστοκυανίνη. Το φωτοσύστημα II βρίσκεται στην μεμβράνη των θυλακοειδών έτσι ώστε η αναγωγή της κινόνης να γίνεται προς την πλευρά του στρώματος του χλωροπλάστη, ενώ το κέντρο Mn^{2+}, όπου γίνεται η οξείδωση του νερού να γίνεται στον αυλό του

θυλακοειδούς. Από την πλαστοκυανίνη τα ηλεκτρόνια εισέρχονται στο φωτοσύστημα I, όπου διεγείρεται ένα ειδικό ζεύγος P700 και απελευθερώνει ηλεκτρόνια τα οποία ρέουν προς την φερρεδοξίνη. Η αναγωγάση του ζεύγους φερρεδοξίνης-$NADP^+$, είναι μια φλαβινοπρωτεΐνη και βρίσκεται στην πλευρά της μεμβράνης των θυλακοειδών που είναι προς το στρώμα, καταλύει τη σύνθεση του NADPH. Η ροή ηλεκτρονίων μέσω του φωτοσυστήματος II, του συμπλέγματος κυτοχρωμάτων *bf* και της αναγωγάσης του ζεύγους φερρεδοξίνης-$NADP^+$, παράγει μια βαθμίδωση συγκέντρωσης πρωτονίων.

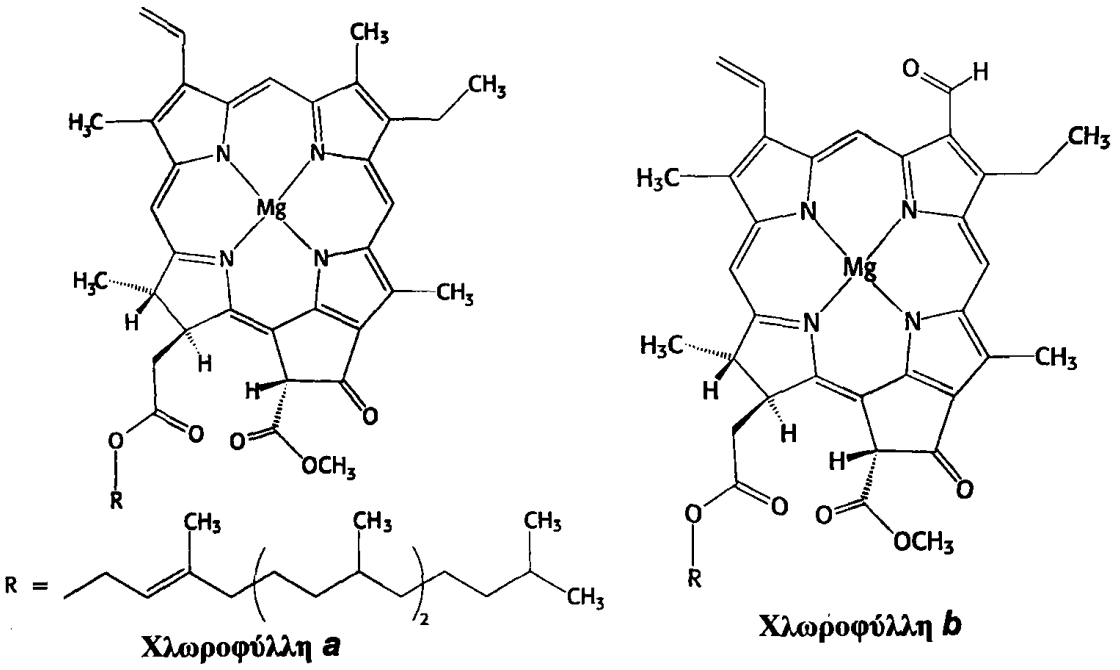
Έντονη είναι η επίδραση του NaCl στο φωτοσυνθετικό μηχανισμό και κυρίως των ιόντων Na^+. Κατά την έκθεση των κυττάρων στην αλατότητα ιόντα Na^+ εισέρχονται μέσω της μεμβράνης του χλωροπλάστη στο εσωτερικό του, με αποτέλεσμα την απόσπαση εξωγενών πρωτεϊνών (κυτόχρωμα c_{550}) από το φωτοσύστημα II και την μερική απενεργοποίηση του μηχανισμού διαχείρισης του οξυγόνου (Allakhverdiev et al. 2000). Οι Seeman και Critchley (1985) βρήκαν μια αρνητική σχέση μεταξύ της χλωροφύλλης και των συγκεντρώσεων Na^+ και Cl^- στα φύλλα του φασολιού και κατέληξαν στο συμπέρασμα ότι τα μειωμένα επίπεδα χλωροφύλλης με την αυξανόμενη αλατότητα μπορεί να αφορούν τη μείωση της φωτοσυνθετικής ικανότητας των φυτών. Ενώ η μεταφορά ηλεκτρονίων στην διεργασία της φωτοσύνθεση δεν επηρεάζεται από την συσσώρευση αλάτων το πιθανότερο είναι να επηρεάζεται ο μεταβολισμός του άνθρακα και η φωτοφωσφορυλίωση (Taiz and Zeiger, 2002).

1.8.1. Χλωροφύλλες

Στα πράσινα φυτά η φωτοσύνθεση πραγματοποιείται στους χλωροπλάστες, όπου η ενέργεια του φωτός συλλέγεται από μόρια χρωστικών, που έχουν την ικανότητα να απορροφούν την ορατή ακτινοβολία σε ορισμένα μήκη κύματος. Οι δυο κύριες κατηγορίες φωτοσυνθετικών χρωστικών που απαντώνται στα ανώτερα φυτά είναι οι χλωροφύλλες και τα καροτενοειδή. Οι χλωροφύλλες (a και b) είναι οι χρωστικές που δίνουν το πράσινο χρώμα λόγω του ότι απορροφούν μπλε και κόκκινο φως και ανακλούν στην περιοχή του πράσινου στο φάσμα του ορατού ηλιακού φωτός.

Η χλωροφύλλη a είναι πράσινη, ενώ η χλωροφύλλη b είναι κιτρινοπράσινη. Η χλωροφύλλη b που απαντάται στα ανώτερα φυτά, αποτελεί το 1/3 της a. Το μόριο της χλωροφύλλης περιέχει μια πορφυρινική κεφαλή και μια ουρά φυτολίου που είναι

υδρόφοβη αλκοόλη 20 ατόμων άνθρακα, εστεροποιημένη σε μια πλευρική αλυσίδα οξέος (Berg et al. 2004). Ο πυρήνας της πολικής, υδρόφιλης πορφυρίνης, αποτελείται

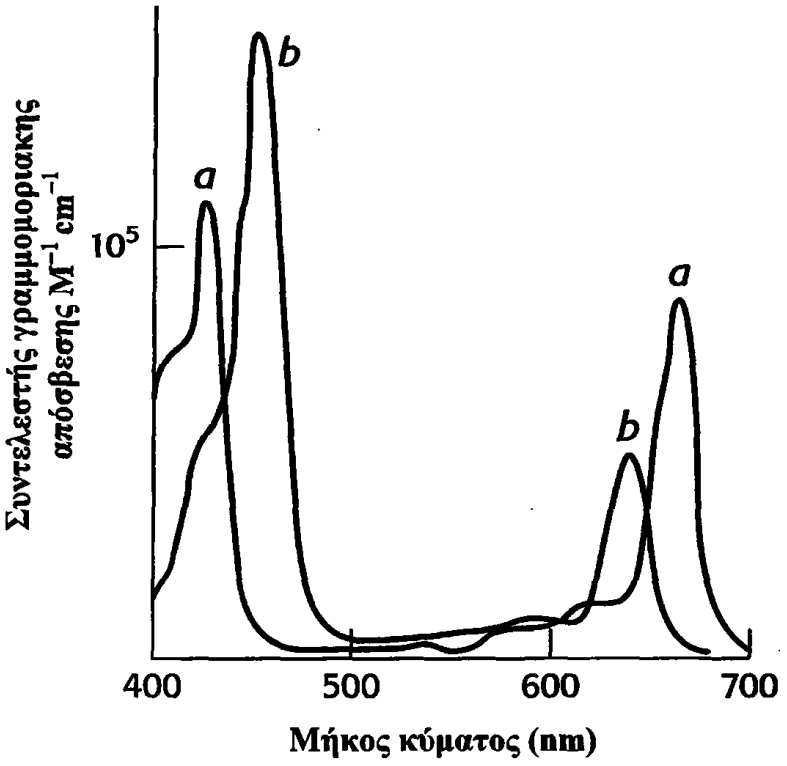


Σχήμα 7. Η χλωροφύλλη a και η χλωροφύλλη b, (από Berg et al. 2004, κατόπιν άδειας του εκδότη).

από έναν τετραπυρολικό δακτύλιο και ένα κεντρικό άτομο μαγνησίου (Σχήμα 7). Μέσα στις μεμβράνες των θυλακοειδών του χλωροπλάστη, το πορφυρινικό μέρος του μορίου αλληλεπιδρά με πρωτεΐνες, ενώ η υδρόφοβη αλυσίδα του φυτολίου εκτείνεται μέσα στη λιπιδική διπλοστιβάδα των θυλακοειδών.

Οι χλωροφύλλες είναι πολύ αποτελεσματικοί φωτοϋποδοχείς διότι αποτελούνται από συστήματα εναλλασσόμενων μονών και διπλών δεσμών, που καλούνται πολυένια. Τα πολυένια έχουν πολύ ισχυρές ζώνες απορρόφησης στην περιοχή του ορατού φάσματος, όπου υπάρχει το μέγιστο ποσοστό της ηλιακής ενέργειας η οποία φτάνει στη Γη. Τα μέγιστα απορρόφησης της χλωροφύλλης a και της χλωροφύλλης b σε ακετόνη είναι 663/430 nm και 645/455 nm αντίστοιχα (Σχήμα 8). Ο γραμμομοριακός συντελεστής μοριακής απόσβεσης της χλωροφύλλης a στο μέγιστο της απορρόφησης, είναι μεταξύ των υψηλότερων για οργανικές ενώσεις: $E = 10^5\ M^{-1}\ cm^{-1}$ (Σχήμα 8)

Η βιοσύνθεση των χλωροφυλλών αποτελεί προϋπόθεση για την ανάπτυξη του φωτοσυνθετικού μηχανισμού και του χλωροπλάστη. Τα αυξανόμενα επίπεδα NaCl στη ζώνη της ρίζας του φασολιού δεν περιορίζουν τη δυνατότητα διακίνησης του K^+, του Ca^{2+}, ή του Mg^{2+}, στα νέα φύλλα, αλλά η περιεκτικότητα των φύλλων σε χλωροφύλλη μειώνεται, ειδικά στα παλαιά φύλλα. Με αυτόν τον τρόπο φαίνεται ότι η δυνατότητα των φυτών φασολιού να φωτοσυνθέσουν επηρεάζεται από αύξηση της αλατότητας (Seeman and Critchley, 1985).



Σχήμα 8. Τα μέγιστα απορρόφησης της χλωροφύλλης a και της χλωροφύλλης b σε ακετόνη, (Από Berg et al. 2004, κατόπιν άδειας του εκδότη).

1.9. ΠΥΡΙΤΙΟ

Το πυρίτιο είναι το δεύτερο σε περιεκτικότητα χημικό στοιχείο στο στερεό φλοιό της γης μετά το αργίλιο, όμως μόνο ένα μικρό μέρος από αυτό διαλυτοποιείται ώστε να είναι διαθέσιμο για τα φυτά. Μεγαλύτερη ανθεκτικότητα στην αποσάθρωση και διαλυτοποίησή παρουσιάζει το πυρίτιο της κρυσταλλικής άμμου, που είναι και το λιγότερο διαθέσιμο. Το διαλυτό πυρίτιο που υπάρχει στο νερό του εδάφους είναι σε μορφή αδιάστατου μορίου $Si(OH)_4$ (πυριτικό οξύ). Η μορφή αυτή του πυριτίου αρχίζει να διίσταται μόνο όταν το pH γίνει μεγαλύτερο του 9,4. Δεδομένου όμως ότι τέτοιες τιμές pH δεν συναντάμε σε εδάφη στα οποία αναπτύσσεται βλάστηση, τα φυτά έρχονται σε επαφή μόνο με το αδιάστατο μόριο του πυριτικού οξέος

Παρότι το πυρίτιο δεν συγκαταλέγεται στα απαιτούμενα θρεπτικά στοιχεία, τα τελευταία χρόνια πληθαίνουν οι μελέτες που υποστηρίζουν ότι ασκεί θετική επίδραση στην ανάπτυξη πολλών ανώτερων φυτών. Το γεγονός αυτό έχει οδηγήσει πολλούς επιστήμονες στη διατύπωση της άποψης ότι Si πιθανότατα είναι απαραίτητο για τη θρέψη ορισμένων τουλάχιστον φυτικών ειδών (Epstein, 1999). Θεωρείται απαραίτητο για τα αγρωστώδη όπου η συγκέντρωση του φτάνει το 16% του ξηρού βάρους στο ρύζι και το 1-4% στον αραβόσιτο. Η έλλειψη πυριτίου σ' αυτά τα φυτά, προκαλεί μείωση της αύξησης των φύλλων, αύξηση της διαπνοής και πρόωρη πτώση των παλαιών φύλλων. Στο ρύζι και σε άλλα υδρόβια φυτά, ο σχηματισμός και η σταθερότητα του αερεγχύματος, εξαρτάται από την προσθήκη πυριτίου, (Raskin and Kende, 1993).

Το πυρίτιο είναι ευεργετικό για την ανάπτυξη των φυτών βοηθώντας στην αντιμετώπιση των βιοτικών και αβιοτικών καταπονήσεων με την αύξηση της μηχανικής αντοχής των φυτικών ιστών. Η επίδραση αυτή του πυριτίου φαίνεται να οφείλεται στην εναπόθεση άμορφου $SiO_2.nH_2O$ στο κυτταρικό τοίχωμα, σε διάφορα καλλιεργούμενα φυτά (Epstein, 1999). Επίσης το πυρίτιο συμβάλλει στην δημιουργία φύλλων με τραχεία εμφάνιση, ισχυρών ανθικών στελεχών σε ανθοκομικά φυτά, καθώς επίσης και βλαστών σιτηρών με μεγαλύτερη ανθεκτικότητα στο πλάγιασμα. Έχει αποδειχτεί ότι η προσθήκη πυριτίου στα φυτά συμβάλει στην αύξηση της ανθεκτικότητας ενάντια σε διάφορες ασθένειες και προσβολές εντόμων, (Ma, 2004; Epstein, 1999).

Τέλος έχει αποδειχτεί ότι το πυρίτιο προστατεύει τα φυτά από την τοξικότητα Mn όταν το τελευταίο βρίσκεται σε υψηλές συγκεντρώσεις στο χώρο των ριζών (Williams and Vlamis, 1957). Η επίδραση αυτή του πυριτίου δε φαίνεται να οφείλεται σε βιοχημικούς παράγοντες αλλά στην ομοιόμορφη κατανομή του μαγγανίου μέσα στους φυτικούς ιστούς παρουσία Si. Η προστατευτική αυτή επίδραση του πυριτίου δεν περιορίζεται μόνο στο μαγγάνιο αλλά επεκτείνεται και στο ψευδάργυρο, το χαλκό, το αργίλιο και το νάτριο, (Epstein, 1999).

Ενδεδειγμένη θεωρείται η λίπανση με πυρίτιο στις υδροπονικές καλλιέργειες, δεδομένου ότι οι συγκεντρώσεις στο νερό είναι συνήθως χαμηλότερες από αυτές που έχει βρεθεί ότι ασκούν θετική επίδραση στην ανάπτυξη ορισμένων φυτών. Γι' αυτό τα τελευταία χρόνια, η προσθήκη πυριτίου, έχει αρχίσει να συνιστάται για ορισμένα τουλάχιστον από τα υδροπονικά καλλιεργούμενα φυτά και ειδικότερα για το τριαντάφυλλο το αγγούρι και τη ζέρμπερα (Savvas, et al. 2002; Sonneveld and Straver, 1994).

Ο προσδιορισμός τελευταία ενός μεταφορέα πυριτίου στα κύτταρα των φυτών, δίνει πληροφορίες για το σύστημα πρόσληψης και προσθέτει νέα δεδομένα στην έρευνα τόσο στην φυσιολογία όσο και στη βιοτεχνολογία των φυτών, με στόχο τη βελτίωση της ικανότητας της ρίζας στην πρόσληψη πυριτίου, (Ma, et al. 2006).

2. ΣΚΟΠΟΣ

Σκοπός αυτής της ερευνητικής εργασίας είναι η συσχέτιση των ενζύμων που συμμετέχουν στην διεργασία της φωτοσύνθεσης με την αύξηση της αλατότητας στο υπόστρωμα καλλιέργειας σε ένα κλειστό υδροπονικό σύστημα. Καθώς και η μελέτη του ρόλου του πυριτίου στην ενεργοποίηση του μηχανισμού ανοχής των φυτών στην καταπόνηση από την αύξηση της αλατότητας.

Πολλές μελέτες δείχνουν ότι η αλατότητα οδηγεί στην αυξανόμενη παραγωγή των αντιδραστικών οντοτήτων οξυγόνου (ROS) (Smimoff, 1995; Greenway and Munns, 1980; Hasegawwa et al. 2000). Τελευταία υποστηρίζεται, ότι η αρνητική επίπτωση των διάφορων περιβαλλοντικών καταπονήσεων στα φυτά οφείλεται, τουλάχιστον μερικώς, στη Αντιδραστικές Οντότητες Οξυγόνου ή/και την παρεμπόδιση του μηχανισμού που δρα ενάντια τους. Οι Αντιδραστικές Οντότητες Οξυγόνου παράγονται κατά τη διάρκεια του αερόβιου μεταβολισμού από την αλληλεπίδραση μεταξύ του O_2 και των ηλεκτρονίων που διαρρέουν από τις αλυσίδες μεταφοράς ηλεκτρονίων στους χλωροπλάστες και τα μιτοχόνδρια.

Μέχρι σήμερα για να αποφευχθούν οι επιζήμιες επιδράσεις της αλατότητας λαμβάνονται ειδικά μέτρα όπως η απαλλοτρίωση αλατούχων εδαφών, η βελτίωση του αλμυρού νερού άρδευσης και ειδικές τεχνικές καλλιέργειας. Οι λύσεις αυτές του προβλήματος της αλατότητας είναι συνήθως ακριβές και θεωρούνται μόνο ως προσωρινές. Πιο μόνιμη και οικονομική λύση θεωρείται η επιλογή και καλλιέργεια των ποικιλιών που μπορούν να αναπτυχθούν και να αποφέρουν οικονομικά συμφέρουσα παραγωγή κάτω από συνθήκες αλατότητας (Dasgan et al. 2002). Για να επιτευχθεί αυτό απαιτείται κατανόηση του μηχανισμού με τον οποίο προκύπτει οξειδωτική καταπόνηση στα φυτά, πως ενεργοποιείται και δρα ο προσαρμοστικός μηχανισμός των φυτών, καθώς και σε πια μονοπάτια του μεταβολισμού των κυττάρων εμπλέκεται. Κατά συνέπεια, υπάρχει η ανάγκη να προσδιοριστούν οι βιοχημικοί μηχανισμοί που βρίσκονται πίσω από την ανοχή των φυτών στην αλατότητα και να καθορισθούν δείκτες, που θα βοηθήσουν τους καλλιεργητές στην επιλογή των φυτών.

Τα αποτελέσματα από αυτήν την μελέτη μπορούν να παρέχουν πληροφορίες για την πιθανή συμμετοχή των αντιδραστικών οντοτήτων οξυγόνου στο μεταβολισμό των κυττάρων από την αύξηση του NaCl στο υπόστρωμα καλλιέργειας των φυτών καθώς

και να δώσουν στοιχεία για την κατανόηση του μοριακού μηχανισμού της ανοχής των φυτών, στην προκληθείσα από την αλατότητα, οξειδωτική καταπόνηση.

3. ΥΛΙΚΑ ΚΑΙ ΜΕΘΟΔΟΙ

3.1. ΚΑΛΛΙΕΡΓΕΙΑ ΦΥΤΩΝ

3.1.1. Θερμοκήπιο

Η πειραματική εγκατάσταση των καλλιεργειών, πραγματοποιήθηκε στο αυτοματοποιημένο, υαλόφρακτο θερμοκήπιο του τμήματος Ανθοκομίας-Αρχιτεκτονικής Τοπίου, της Σχολής Τεχνολογίας Γεωπονίας, που βρίσκεται στο αγρόκτημα του Τ.Ε.Ι. Ηπείρου, στους Κωστακιούς Άρτας. Το θερμοκήπιο είναι αμφίρρικτο, πολλαπλό και έχει εμβαδόν 600 m^2 για την ανάπτυξη των καλλιεργειών και 100 m^2 για βοηθητικούς χώρους. Ο χώρος καλλιέργειας χωρίζεται σε τρεις ανεξάρτητους τομείς 200 m^2 ο κάθε ένας, ώστε να είναι δυνατή η ανάπτυξη φυτών με διαφορετικές απαιτήσεις, αλλά και η εφαρμογή διαφορετικών πειραματικών μοντέλων. Έχει κεντρικό σύστημα θέρμανσης και είναι εξοπλισμένο με συστήματα αυτόματης διαχείρισης του κλίματος, παρασκευής και μεταφοράς του θρεπτικού διαλύματος, καθώς και ανακύκλωσης των απορροών. Στον βοηθητικό χώρο του θερμοκηπίου βρίσκεται ο Η/Υ, μέσω του οποίου ελέγχεται η όλη διαδικασία παρασκευής των διαλυμάτων, όπως και οι αυτοματισμοί για την διατήρηση των ιδανικών συνθηκών στο εσωτερικό του. Το λογισμικό που είναι εγκαταστημένο στον Η/Υ, είναι της εταιρείας Autonet και έχει δημιουργηθεί ειδικά για τις ανάγκες του συγκεκριμένου θερμοκηπίου, βασισμένο και σε πειραματικά δεδομένα και μοντέλα θρέψης, που αναπτύχθηκαν στο Τμήμα Ανθοκομίας – Αρχιτεκτονικής Τοπίου, στα πλαίσια ερευνητικών προγραμμάτων (Savvas and Manos, 1999, Savvas and Adamidis, 1999, Savvas, 2002, Savvas et al. 2005b).

3.1.2. Υδροπονικό Σύστημα

Κάθε μια από τις πειραματικές καλλιέργειες, εγκαταστάθηκε σε έναν τομέα του θερμοκηπίου, ο οποίος είναι εξοπλισμένος με δώδεκα κλειστά, ανεξάρτητα μεταξύ τους υδροπονικά συστήματα. Κάθε τέτοιο σύστημα αποτελείται από έναν πάγκο ύψους 120 cm, με δύο κανάλια καλλιέργειας το κάθε ένα μήκους 5 μέτρων και πλάτους 25 cm, η δε απόσταση μεταξύ τους είναι 40 cm (Εικόνα 1). Σε κάθε πάγκο

έχει εγκατασταθεί ένα δοχείο απορροής, ένα δοχείο τροφοδοσίας, μια αντλία μεταφοράς και το σύστημα άρδευσης με σταλάκτες.

Η άρδευση γίνεται αυτόματα και η συχνότητά της καθορίζεται από διάφορες παραμέτρους με κυριότερη την ένταση της ηλιακής ακτινοβολίας. Η ακτινοβολία μετριέται συνεχώς με έναν αισθητήρα που βρίσκεται στην κορυφή του θερμοκηπίου, και αθροιστικά καταγράφεται από το λογισμικό του Η/Υ ο οποίος δίνει και την εντολή στις αντλίες για να ξεκινήσει η άρδευση. Σε έναν κύκλο άρδευσης, το

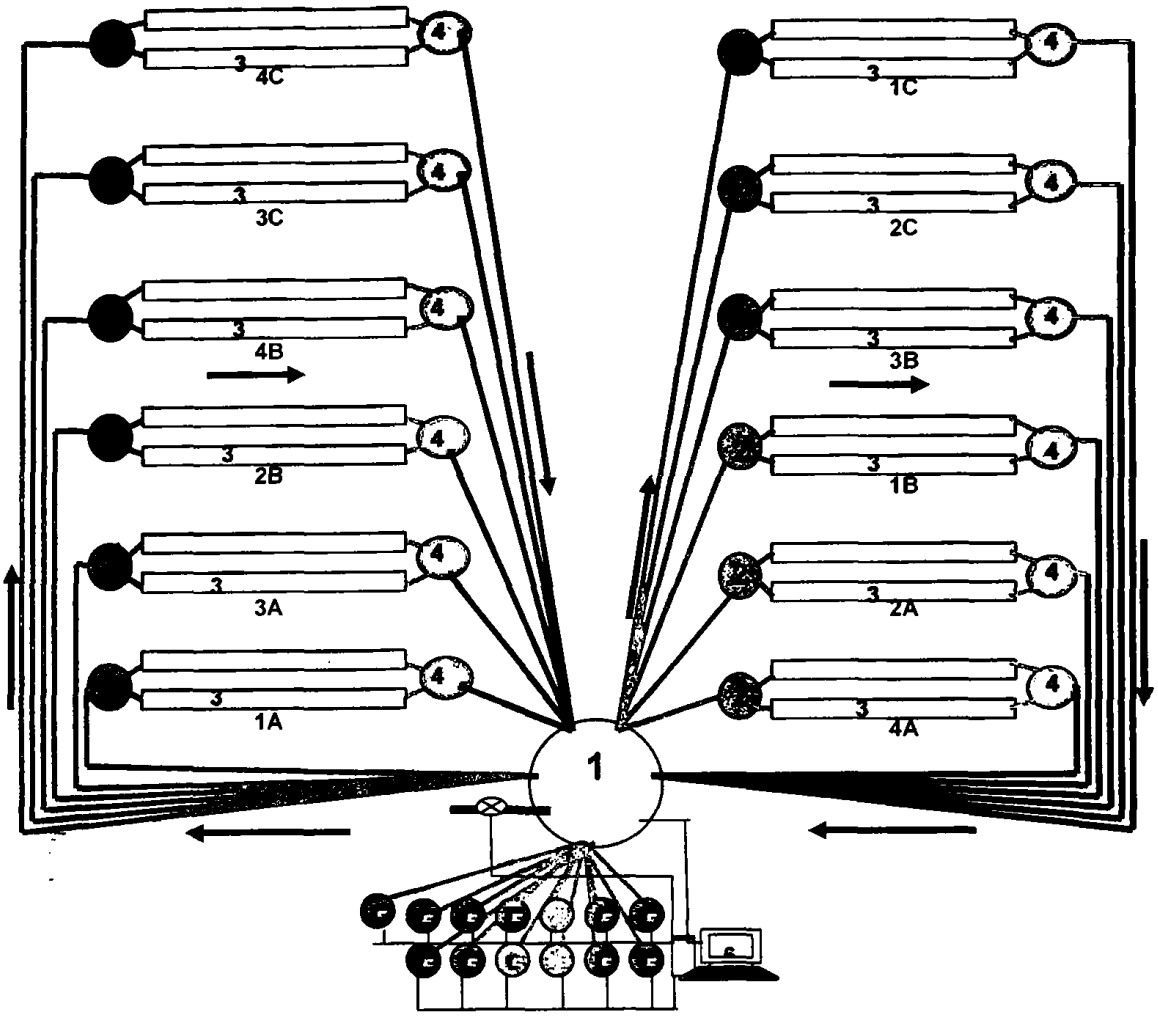
Εικόνα 1. Τα κανάλια καλλιέργειας πριν την εγκατάσταση της καλλιέργειας του φασολιού (Δ. Κύρκας).

θρεπτικό διάλυμα μεταφέρεται, μετά την παρασκευή του από το βοηθητικό χώρο, στο δοχείο τροφοδοσίας που υπάρχει σε κάθε πάγκο καλλιέργειας και από εκεί μέσω του συστήματος άρδευσης στα φυτά (Σχήμα 9).

3.1.3. Διάλυμα τροφοδοσίας

Το διάλυμα τροφοδοσίας παρασκευάζεται σε ένα δοχείο 80 l, μέσω εντολών από τον Η/Υ. Το διάλυμα απορροής, χωριστά για κάθε πειραματική μονάδα, συλλέγεται στο

δοχείο απορροής μετά το τέλος κάθε κύκλου άρδευσης και επιστρέφει με αντλία στο δοχείο παρασκευής. Εκεί προστίθεται νερό και λιπάσματα, ώστε να αναπληρωθούν οι



Σχήμα 9. Κάτοψη της εγκατάστασης του υδροπονικού συστήματος με τις 12 πειραματικές μονάδες και ο τρόπος τυχαιοποίησής τους στη καλλιέργεια φασολιου. 1) Δοχείο παρασκευής θρεπτικού διαλύματος. 2) Βαρέλια διαλύματος τροφοδοσίας. 3) Κανάλια καλλιέργειας. 4) Βαρέλια διαλύματος απορροής. 5) Δοχεία πυκνών διαλυμάτων λιπασμάτων. 6) Η/Υ ελέγχου του συστήματος (Ευγενική προσφορά Ν. Μάντζος).

απώλειες από την πρόσληψη των φυτών και προωθείται στο δοχείο τροφοδοσίας. Τα λιπάσματα βρίσκονται σε ξεχωριστά δοχεία με την μορφή πυκνών διαλυμάτων, από όπου μέσω περισταλτικών αντλιών μεταφέρονται στο δοχείο παρασκευής (Εικόνα 2).

Η αναπλήρωση των θρεπτικών στοιχείων, (Πίνακας 1), στο διάλυμα τροφοδοσίας σχετίζεται με τον χρόνο λειτουργίας των αντλιών, βασίζεται δε, σε ένα μοντέλο που αναπτύχθηκε για ανοιχτά υδροπονικά συστήματα (Savvas ahd Adamidis, 1999, Sonneveld et al. 1999) και επεκτάθηκε για κλειστά (Savvas, 2002). Μέσω του μοντέλου αυτού είναι δυνατή η αυτόματη παρασκευή θρεπτικών διαλυμάτων οποιασδήποτε σύνθεσης, με την εισαγωγή σ' ένα κατάλληλο πρόγραμμα Η/Υ των απαιτούμενων χαρακτηριστικών του διαλύματος (ηλεκτρική αγωγιμότητα, pH,

αναλογίες θρεπτικών στοιχείων ή επιθυμητές συγκεντρώσεις), όταν είναι γνωστή τ περιεκτικότητα του νερού σε θρεπτικά στοιχεία.

Για την παρασκευή θρεπτικού διαλύματος τροφοδοσίας στα κλειστά υδροπονικό συστήματα, χρησιμοποιείται και το διάλυμα απορροής, το οποίο όμως, δεν έχε

Εικόνα 2. Η εγκατάσταση για την παρασκευή των θρεπτικών διαλυμάτων στον βοηθητικό χώρο του θερμοκηπίου. Α: περισταλτικές αντλίες, Β: μονάδα κεντρικού ελέγχου, Γ: δοχείο παρασκευής θρεπτικών διαλυμάτων, Δ: βαρέλια με λιπάσματα σε μορφή πυκνών διαλυμάτων (Δ. Κύρκας).

σταθερή σύνθεση. Για το λόγο αυτό σε τακτά χρονικά διαστήματα γίνεται ανάλυσ του διαλύματος στο εργαστήριο, για τον προσδιορισμό της περιεκτικότητάς του σ θρεπτικά στοιχεία. Έτσι για τον υπολογισμό των θρεπτικών στοιχείων το διαλύματος τροφοδοσίας, συνυπολογίζονται και οι συγκεντρώσεις των στοιχείων το διαλύματος απορροής, ώστε να αφαιρεθούν, μαζί με αυτές του νερού άρδευσης, απ τις τελικές.

Η αύξηση της ηλεκτρικής αγωγιμότητας (EC) με την πάροδο του χρόνου σε έν κλειστό υδροπονικό σύστημα, λόγω της συσσώρευσης αλάτων στο διάλυμ απορροής, αποτελεί βασικό πρόβλημα που πρέπει να ξεπεραστεί, γιατί μπορεί ν οδηγήσει σε λάθος υπολογισμό της προστιθεμένης ποσότητας των θρεπτικά

στοιχείων. Το πρόβλημα αυτό μπορεί να ξεπεραστεί αν μεταβάλλεται κάθε φορά η τιμή της ηλεκτρικής αγωγιμότητας του διαλύματος τροφοδοσίας (E_{ta}), βάση της συσσώρευσης του NaCl στο διάλυμα απορροής. Επειδή όμως αυτό δεν μπορεί να γίνει σε πραγματικό χρόνο, η E_{ta} υπολογίζεται με την εισαγωγή της εξίσωσης:

$$E_{ta} = E_{tb} + \alpha(E_{ra} - E_{rb}) \quad (8)$$

(Savvas et al. 2005), όπου E_{tb} είναι η ηλεκτρική αγωγιμότητα του διαλύματος τροφοδοσίας, σε dS m^{-1}, πριν την έναρξη της ανακύκλωσης, E_{ra} η ηλεκτρική αγωγιμότητα του διαλύματος τροφοδοσίας μετά το τέλος του κύκλου άρδευσης, σε πραγματικό χρόνο, E_{rb} η ηλεκτρική αγωγιμότητα του διαλύματος απορροής τη μέρα έναρξης της ανακύκλωσης και α το κλάσμα του όγκου του διαλύματος απορροής που συλλέγεται προς το διάλυμα τροφοδοσίας υπολογισμένο σε πραγματικό χρόνο.

Πίνακας 1. Η σύνθεση του θρεπτικού διαλύματος για την καλλιέργεια φασολιού. (Από Sonneveld and Straver, 1994).

Μακροστοιχεία	**Συγκέντρωση mmol l^{-1}**	**Μικροστοιχεία**	**Συγκέντρωση μmol l^{-1}**
NH_4^+	1,0	Fe^{2+}	10
K^+	5,5	Mn^{2+}	10
Ca^{2+}	3,25	Zn^{2+}	4
Mg^{2+}	1,25	B^{3+}	20
NO_3^{2-}	12,0	Cu^{2+}	0,5
SO_4^-	1,125	Mo	0,5
$H_2PO_4^-$	1,25		

Σε όλες τις μεταχειρίσεις η συχνότητα και η διάρκεια άρδευσης ρυθμίζονται με τέτοιο τρόπο ώστε, καθ' όλη τη διάρκεια του πειράματος, το διάλυμα απορροής που συλλέγεται μετά το τέλος του κύκλου άρδευσης, να αντιστοιχεί στο 35 – 45% του διαλύματος τροφοδοσίας.

3.1.5. Γενετικό υλικό - προετοιμασία

Για την καλλιέργεια του κολοκυθιού χρησιμοποιήθηκαν σπόροι της ποικιλίας "Rival F1" του Ολλανδικού σποροπαραγωγικού οίκου Nickerson–Zwaan, για το φασόλι χρησιμοποιήθηκαν σπόροι της ποικιλίας "Helda" του σποροπαραγωγικού οίκου Fytro seeds στην Αθήνα και για την πιπεριά χρησιμοποιήθηκε το υβρίδιο «Pepper F1 Hybrid Calix (PB 99016)». Τα σπορόφυτα αναπτύχθηκαν, μέχρι το στάδιο του δεύτερου πραγματικού φύλλου, σε δίσκους σποράς 72 θέσεων και σε υπόστρωμα τύρφης - περλίτη σε αναλογία 1:1. Για το φασόλι το υπόστρωμα, ήταν τύρφη - περλίτης σε αναλογία 1:1. Τα φυτά ποτίζονταν καθημερινά, έως τη μεταφύτευσή τους στην οριστική θέση, μόνο με νερό. Στη συνέχεια τα νεαρά φυτά κολοκυθιού μεταφυτεύθηκαν σε γλάστρες οι οποίες περιείχαν υδροπονικό περλίτη και

Εικόνα 3. Τα φυτά του φασολιού υποστυλώθηκαν με κατακόρυφο σχοινί που αναρτήθηκε σε οριζόντιο σύρμα πάνω από το κάθε κανάλι καλλιέργειας (Δ. Κύρκας).

καλύφθηκαν με αδιαφανές πλαστικό για την ελαχιστοποίηση της απώλειας νερού, μέσω της εξάτμισης, ενώ δημιουργήθηκαν οπές για την έξοδο του στελέχους των φυτών.

Το φασόλι και η πιπεριά μεταφυτεύθηκαν απευθείας στα κανάλια καλλιέργειας, τα οποία είχαν προετοιμαστεί κατάλληλα με διαβροχή του υποστρώματος, δυο μέρες πριν, με θρεπτικό διάλυμα ηλεκτρικής αγωγιμότητας 2,0 dS m^{-1}, ενώ την επόμενη μέρα το υπόστρωμα ξεπλύθηκε με το θρεπτικό διάλυμα που αντιστοιχούσε σε κάθε μεταχείριση. Όλα τα κανάλια καλλιέργειας πληρώθηκαν με ελαφρόπετρα διαμέτρου 0-5 cm σε ύψος 8 cm και καλύφθηκαν, όπως και στο κολοκύθι, με αδιαφανές πλαστικό κάλυμμα, στο οποίο ανοίχτηκαν τρύπες για τη δημιουργία των θέσεων φύτευσης. Η σπορά του φασολιού πραγματοποιήθηκε στις 27 Σεπτεμβρίου 2004, της πιπεριάς στις 22 Οκτωβρίου 2005 και του κολοκυθιού έγινε στις 15 Δεκεμβρίου 2005. Στην καλλιέργεια κολοκυθιού, σε κάθε πειραματική μονάδα, μεταφυτεύθηκαν δεκαέξι φυτά, οκτώ σε κάθε κανάλι καλλιέργειας και σε αποστάσεις 60 cm μεταξύ τους, τα οποία μετά από λίγες μέρες υποστυλώθηκαν με κατακόρυφο σχοινί στο οριζόντιο σύρμα ακριβώς πάνω από το κάθε κανάλι καλλιέργειας.

Σε κάθε πειραματική μονάδα, στη καλλιέργεια φασολιού, μεταφυτεύθηκαν εκατόν εξήντα φυτά, ογδόντα σε κάθε κανάλι καλλιέργειας και ανά δύο σε κάθε θέση. Οι αποστάσεις μεταξύ των φυτών ήταν 20 cm και η απόσταση μεταξύ των σειρών στο ίδιο κανάλι 15 cm. Επίσης, και τα φυτά του φασολιού υποστυλώθηκαν με κατακόρυφο σχοινί που αναρτήθηκε στο οριζόντιο σύρμα 2,2 m πάνω από το κάθε κανάλι καλλιέργειας (Εικόνα 3).

Στην καλλιέργεια της πιπεριάς μεταφυτεύθηκαν εκατόν ογδόντα φυτά, δεκαπέντε σε κάθε κανάλι, με αποστάσεις φύτευσης 30 cm και μετά από περίπου ένα μήνα στα φυτά πραγματοποιήθηκε διστέλεχο σύστημα κλαδέματος και όλοι οι υπόλοιποι βλαστοί κλαδεύτηκαν στο δεύτερο φύλλο για να αναπτυχθεί και ο καρπός στη βάση της διακλάδωσης. Τέλος και τα φυτά της πιπεριάς υποστυλώθηκαν με σχοινί όπως και παραπάνω.

3.2. ΣΧΕΔΙΑΣΜΟΣ ΤΩΝ ΠΕΙΡΑΜΑΤΙΚΩΝ ΚΑΛΛΙΕΡΓΕΙΩΝ

3.2.1. Φασόλι:

Εγκαταστάθηκαν τέσσερις πειραματικές μεταχειρίσεις με διαφορετικό επίπεδο αλατότητας η κάθε μια, που επιτεύχθηκε με την προσθήκη NaCl στο θρεπτικό διάλυμα. Και σ' αυτό το πειραματικό σχέδιο, όπως και στις άλλες καλλιέργειες, για κάθε μια από τις μεταχειρίσεις υπήρξαν τρεις επαναλήψεις, τυχαία κατανεμημένες στο χώρο του θερμοκηπίου. Σε όλες τις μεταχειρίσεις για την παρασκευή του θρεπτικού διαλύματος χρησιμοποιήθηκε νερό του δικτύου ύδρευσης του οποίου η περιεκτικότητα σε NaCl ήταν 0,8 mM. Στην πρώτη μεταχείριση, που ήταν και μάρτυρας, δεν χρησιμοποιήθηκε NaCl εκτός αυτού που περιείχε το νερό ύδρευσης. Στη δεύτερη μεταχείριση η συγκέντρωση του NaCl στο νερό άρδευσης ήταν 3 mM, στην τρίτη μεταχείριση ήταν 6 mM και τέλος στην τέταρτη μεταχείριση 9 mM. Ανάλογη με την περιεκτικότητα σε NaCl ήταν και η ηλεκτρική αγωγιμότητα του θρεπτικού διαλύματος για κάθε μεταχείριση και διαμορφώθηκε πριν την έναρξη της ανακύκλωσης στα 1,7 dS m^{-1}, 2,1 dS m^{-1}, 2,4 dS m^{-1} και 2,7 dS m^{-1}, για την πρώτη, δεύτερη, τρίτη και τέταρτη μεταχείριση αντίστοιχα.

Η επιθυμητή ηλεκτρική αγωγιμότητα του διαλύματος τροφοδοσίας, μετά την έναρξη της ανακύκλωσης, και για τις τρεις καλλιέργειες του πειράματος, υπολογιζόταν με την εξίσωση (8) που αναφέρθηκε παραπάνω. Στη συνέχεια, η εκάστοτε υπολογιζόμενη επιθυμητή τιμή της EC μέσω της (9) χρησιμοποιούταν στο μοντέλο CDW (Savvas, 2002) με στόχο τον αυτόματο υπολογισμό των δοσολογιών προσθήκης λιπασμάτων σε συνθήκες πραγματικού χρόνου και την έγχυσή τους στο μείγμα διαλύματος απορροής – νερού. Ο εμπλουτισμός του νερού άρδευσης με NaCl γίνονταν με την προσθήκη κατάλληλης ποσότητας πυκνού διαλύματος NaCl, μέσω μιας περισταλτικής αντλίας (SEKO, Italia S.p.A., S. Ruffina (RI), type SE 57BT) σταθερής παροχής ($J = 60$ l s^{-1}).

Ο υπολογισμός, κάθε φορά, της χρονικής διάρκειας λειτουργίας της αντλίας (T) και συνεπώς της ποσότητας που εκχυνόταν στο θρεπτικό διάλυμα, γίνονταν αυτόματα με βάση την παρακάτω μαθηματική σχέση:

$$T = MV\,(1 - a)\,(C_i - C_w)/DJ \qquad (9)$$

(Savvas et al. 2005a) όπου: M είναι το μοριακό βάρος σε mol του NaCl, V είναι ο όγκος παρασκευαζόμενου θρεπτικού διαλύματος σε m^3, a το κλάσμα του συλλεγόμενου διαλύματος απορροής (0 – 1), C_i η συγκέντρωση του NaCl στο νερό άρδευσης σε κάθε μεταχείριση (mM), C_w η συγκέντρωση του NaCl στο νερό του δικτύου ύδρευσης (0,8 mM) και D η συγκέντρωση του NaCl στο πυκνό διάλυμα NaCl σε kg m^{-3}.

Αμέσως μετά τη μεταφύτευση τα φυτά τροφοδοτήθηκαν με το θρεπτικό διάλυμα που αντιστοιχούσε στην κάθε μεταχείριση, χωρίς να γίνεται ανακύκλωση του διαλύματος απορροής. Η ανακύκλωση και συνεπώς η ουσιαστική έναρξη του πειράματος, άρχισε στις 15 Οκτωβρίου του 2004, επτά μέρες μετά τη μεταφύτευση και τελείωσε στις 31 Ιανουαρίου του 2005.

3.2.2. Κολοκύθι:

Στο κολοκύθι όπως και στο φασόλι εγκαταστάθηκαν τέσσερις πειραματικές επεμβάσεις με τρεις επαναλήψεις (Εικόνα 4), ενώ χρησιμοποιήθηκε νερό βρόχινο το οποίο συλλέχθηκε από τις υδρορροές της σκεπής του θερμοκηπίου για να είναι

Εικόνα 4. Η καλλιέργεια των φυτών κολοκυθιάς στο θερμοκήπιο (Δ. Κύρκας).

απαλλαγμένο από πυρίτιο. Στην πρώτη μεταχείριση, για την παρασκευή του θρεπτικού διαλύματος δεν χρησιμοποιήθηκε καθόλου πυρίτιο και η αλατότητα διατηρήθηκε στα επίπεδα του νερού της βροχής όπου η συγκέντρωση του NaCl ήταν 0,2 έως 0,3 mM. Στη δεύτερη μεταχείριση χρησιμοποιήθηκε πυρίτιο σε συγκέντρωση 1,5 mM με τα επίπεδα αλατότητας να είναι ίδια με αυτά της πρώτης. Στην τρίτη μεταχείριση δεν χρησιμοποιήθηκε καθόλου πυρίτιο αλλά είχαμε επίπεδα υψηλής αλατότητας με τη συγκέντρωση του NaCl στο διάλυμα τροφοδοσίας να είναι 7-8 mM και απορροής 8,5-10 mM. Τέλος στην τέταρτη μεταχείριση χρησιμοποιήθηκε πυρίτιο με τα επίπεδα αλατότητας να είναι ίδια με αυτά της τρίτης μεταχείρισης. Το pH και στις τέσσερις μεταχειρίσεις κυμάνθηκε από 5-5,5 στο διάλυμα τροφοδοσίας και 5,5-6,5 στο διάλυμα απορροής.

Σε όλες τις μεταχειρίσεις η συχνότητα και η διάρκεια άρδευσης ρυθμιζόταν με τέτοιο τρόπο ώστε, αμέσως μετά τη μεταφύτευση και για 20 μέρες περίπου τα φυτά να ποτίζονται κάθε 300 wh. ενώ στη συνέχεια και μέχρι το τέλος του πειράματος κάθε 200 wh. Το πότισμα γινόταν με την τοποθέτηση δυο σταλαχτών ανά γλάστρα. Η ανακύκλωση, άρχισε στις 8 Δεκεμβρίου του 2005, και τελείωσε στις 25 Απριλίου 2006.

3.2.3. Πιπεριά:

Στο πείραμα με την πιπεριά χρησιμοποιήθηκαν και εδώ τέσσερα διαφορετικά επίπεδα αλατότητας 0,8 mM για τον μάρτυρα, 4 mM, 8 mM και 12 mM NaCl, τα οποία επιτεύχθηκαν με την προσθήκη NaCl στο θρεπτικό διάλυμα. Η παροχή του θρεπτικού διαλύματος στα φυτά κάθε μεταχείρισης γινόταν μέσω ενός πλαστικού σωλήνα ο οποίος έφερε διακόπτες εξόδου για τον έλεγχο της ροής και ήταν συνδεδεμένος με ένα δοχείο που περιείχε 50 l θρεπτικού διαλύματος και την αντίστοιχη ποσότητα NaCl ανάλογα με το επίπεδο της αλατότητας.

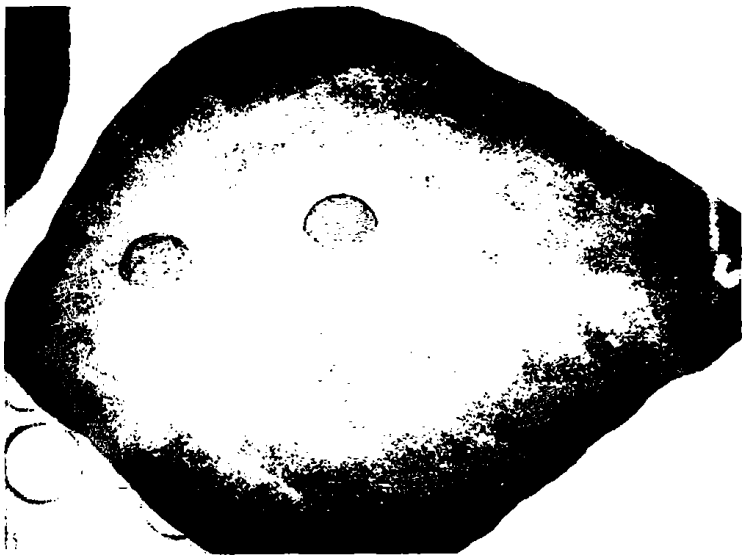
Κατά τους τέσσερις πρώτους μήνες του πειράματος η άρδευση γινόταν κάθε δεύτερη μέρα, ενώ τους υπόλοιπους μήνες καθημερινά. Το σύστημα άρδευσης στη πιπεριά ήταν μερικώς αυτοματοποιημένο, το θρεπτικό διάλυμα παρασκευαζόταν με την βοήθεια προγράμματος στον Η/Υ και κατέληγε σε ένα κεντρικό δοχείο στο χώρο του πειράματος, όπου μέσω ενός πλαστικού σωλήνα μήκους 20-30 m με διακόπτη για έλεγχο της ροής, διοχετευόταν στα δώδεκα δοχεία απορροής. Η άρδευση των φυτών σε όλα τα κανάλια διαρκούσε μέχρι του σημείου κορεσμού και μισή ώρα μετά οι

διακόπτες απορροής άνοιγαν ώστε το διάλυμα που είχε απομείνει στο κανάλι να επιστρέψει στο αντίστοιχο βαρέλι απορροής.

Καθημερινά γινόταν μέτρηση του συνολικού όγκου του θρεπτικού διαλύματος που καταναλώθηκε από τα φυτά στο κάθε κανάλι και στην συνέχεια το δοχείο απορροής πληρωνόταν μέχρι τα 50 l, ακολουθούσε προσθήκη NaCl στις μεταχειρίσεις με την αλατότητα, γινόταν μέτρηση της ηλεκτρικής αγωγιμότητας και ρύθμιση του pH στο 5,5 με προσθήκη αραιού HNO_3. Η ανακύκλωση, άρχισε στις 4 Νοεμβρίου του 2005, και τελείωσε στις 27 Απριλίου 2006.

3.3. ΕΚΧΥΛΙΣΗ ΦΥΤΙΚΩΝ ΔΕΙΓΜΑΤΩΝ

Η συλλογή των φυτικών δειγμάτων για τον υπολογισμό της ενζυμικής δραστικότητας, καθώς και των ολικών πρωτεϊνών, έγινε σε φύλλα του ίδιου σταδίου ανάπτυξης των φυτών και την ίδια ώρα της μέρας. Τα δείγματα που συλλέχθηκαν από το θερμοκήπιο ήταν φύλλα της βάσης από τα κατώτερα γόνατα των φυτών και νεαρά φύλλα κυρίως από το 4° γόνατο της κορυφής, έχοντας έτσι για κάθε μέρα συλλογής, δυο σειρές δειγμάτων από φύλλα διαφορετικής ηλικίας. Αρχικά τα φύλλα παραλαμβάνονταν από το θερμοκήπιο και ξεπλένονταν με απιοντισμένο νερό για να απομακρυνθούν τυχόν σκόνες και υπολείμματα από ψεκασμούς, στην συνέχεια τοποθετούνταν σε φορητό ψυγείο και μεταφέρονταν στο εργαστήριο. Τα ίδια πάντα φύλλα χρησιμοποιούνται και για τον υπολογισμό της προλίνης και των χλωροφυλλών.



Εικόνα 5. Αφαίρεση δίσκων από το έλασμα φύλλων φασολιάς (Δ. Κύρκας).

Από το έλασμα των φύλλων αφαιρούμε 2 δίσκους με φελλοτρυπητήρα (Εικόνα 5.), συνολικής επιφάνειας 257,36 mm^2 τους ζυγίζουμε σε ζυγό ακριβείας και τους τοποθετούμε σ' ένα, εκ των προτέρων, ψυχρό γουδί, με 2 ml ρυθμιστικό διάλυμα εκχύλισης για να λειοτριβηθούν. Το ρυθμιστικό διάλυμα είναι Tris–Mes 50 mM, pH 7, που περιέχει 13 mM μερκαπτοαιθανόλη, 1 mM EDTA, 1% PVP και 20% γλυκερόλη (Shih και Kao, 1998). Η όλη διαδικασία της λειοτρίβησης έγινε σε παγόλουτρο στους +4°C. Το εκχύλισμα φυγοκεντρήθηκε σε 10.000g για 30 λεπτά στους +4°C και το προκύπτον υπερκείμενο αποθηκεύτηκε στην κατάψυξη για τον περαιτέρω υπολογισμό της ενζυμικής δραστικότητας και της περιεκτικότητας σε πρωτεΐνες.

3.4. ΥΠΟΛΟΓΙΣΜΟΣ ΕΖΥΜΙΚΗΣ ΔΡΑΣΤΙΚΟΤΗΤΑΣ

3.4.1. Όξινη φωσφατάση

Η δραστικότητα της όξινη φωσφατάσης υπολογίστηκε στο φασματοφωτόμετρο (SHIMADZU UV-2501PC) χρησιμοποιώντας ως υπόστρωμα π-νιτροφαινυλοφωσφορικό εστέρα (NPP). Ο βαθμός υδρόλυσης του υποστρώματος καθορίστηκε με φωτομετρική μέτρηση της π-νιτροφαινόλης που ελευθερώνεται κατά την αντίδραση, όπου σε αλκαλικό διάλυμα απορροφά ισχυρά στο μήκος κύματος 405 nm (Clark and Switzer, 1992).

Αρχικά έγιναν δοκιμές με όξινη φωσφατάση (Sigma P-3627), για να καθοριστεί ο χρόνος που θα σταματάμε την αντίδραση καθώς και η ποσότητα του δείγματος. Δόθηκε ιδιαίτερη σημασία σε αυτό γιατί η φωσφατάση υπόκειται σε αναστολή δράσης από το προϊόν (ανόργανο φωσφορικό) όπως αναφέρεται στην βιβλιογραφία (Clark and Switzer, 1992) και αποδείχτηκε από τις δοκιμές που έγιναν με διάφορες συγκεντρώσεις ενζύμου σε διαφορετικούς χρόνους. Όλες οι μετρήσεις έγιναν στους 37^0C, θερμοκρασία βέλτιστη για την δράση του ενζύμου.

Ο συντελεστής μοριακής απόσβεσης της π-νιτροφαινόλης σε αλκαλικό διάλυμα pH 9,5 είναι:

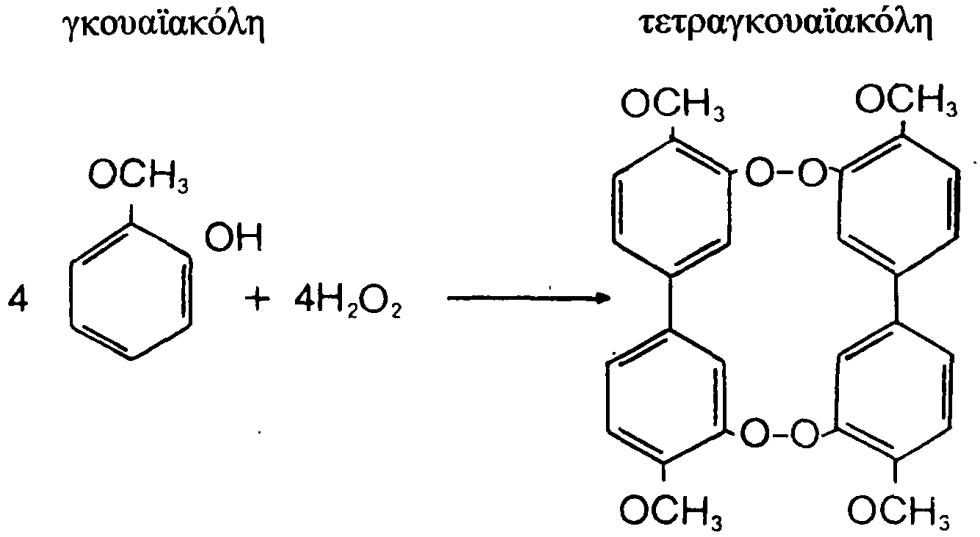
$$\varepsilon_{405\ nm} = 18{,}8x10^3\ M^{-1}\ cm^{-1} \qquad (10)$$

Το ρυθμιστικό διάλυμα περιέχει 0,10 M κιτρικό οξύ και 0,15 M αιθυλενοδιαμίνη, pH=5, ενώ για το υπόστρωμα χρησιμοποιήθηκαν δισκία π-νιτροφαινυλοφωσφορικού εστέρα (Sigma N-9389), ένα δισκίο των 5 mg ανά 5 ml ρυθμιστικού. Για την διακοπή της αντίδρασης χρησιμοποιήθηκε 2 M NaOH.

Σε πλαστικές κυψελίδες μιας χρήσεως του 1,4 ml προσθέτουμε 450 μl υποστρώματος και 50 μl από το εκχύλισμα και μετά από επώαση για 3 min στους 37 ^0C προσθέτουμε 500 μl 2 M NaOH για να διακόψουμε την αντίδραση, στη συνέχεια μετράμε την απορρόφηση στα 405 nm. Για την επώαση του υποστρώματος και του ενζύμου χρησιμοποιούμε την ειδική κεφαλή του φασματοφωτόμετρου με την οποία ρυθμίζεται η θερμοκρασία με μεγάλη ακρίβεια (Σύστημα Peltier).

3.4.2. Υπεροξειδάση

Η δράση της υπεροξειδάσης (POD) καθορίστηκε χρησιμοποιώντας μια αλυσιδωτή αντίδραση με υπεροξείδιο του υδρογόνου και γκουαϊακόλη (Strack and Mock, 1993) Η αύξηση της απορρόφησης λόγω της οξείδωσης της γκουαϊακόλης από το O_2 που



Σχήμα 10. Προσδιορισμός τη υπεροξειδάσης με γκουαϊακόλη, (από Μουρίκης 1981)

εκλύεται από την διάσπαση του H_2O_2 σε H_2O και O_2, λόγω της δράσης της υπεροξειδάσης, μετρήθηκε στα 470 nm. Το μίγμα της αντίδρασης (τελικός όγκος: 1 ml) περιέχει 800 μl υποστρώματος και 200 μl εκχύλισμα φυτών. Για την επώαση του υποστρώματος και του ενζύμου χρησιμοποιήθηκαν δοκιμαστικοί σωλήνες στους 37° C για μια περίοδο 10 λεπτών και στην συνέχεια μεταφέρθηκε σε πλαστικές κυψελίδες στο φασματοφωτόμετρο. Το όργανο μηδενίστηκε με το υπόστρωμα και το δείγμα σε μηδέν χρόνο.

Ο συντελεστής μοριακής απόσβεσης της τετραγκουαϊακόλης είναι:

$$\varepsilon_{470\ nm} = 26{,}6\ mM^{-1}\ cm^{-1} \qquad (11)$$

Το ρυθμιστικό διάλυμα περιέχει 0,20 M φωσφορικό κάλιο, 5 mM γκουαϊακόλη (sigma G-5502) και 5 mM υπεροξείδιο υδρογόνου, pH 5,8. Για διάλυμα 100 ml, προσθέτουμε 2,72 g KH_2PO_4, 57 μl H_2O_2 και 55 μl γκουαϊακόλη.

3.4.3. Καταλάση

Η δράση της Καταλάσης (CAT) καθορίστηκε από της Havir and McHale 1987, υπολογίζοντας την μείωση της απορρόφησης στα 240 nm. Το μίγμα της αντίδρασης (τελικός όγκος: 2,05 ml) περιέχει 1 ml υποστρώματος, 50 μl εκχύλισμα φυτών και η αντίδραση τερματίζεται με την προσθήκη 1 ml 2 M, HCl. Για την επώαση του υποστρώματος και του ενζύμου χρησιμοποιήθηκαν δοκιμαστικοί σωλήνες της 37 °C για μια περίοδο 15 λεπτών και στην συνέχεια μεταφέρθηκε σε κυψελίδες χαλαζία στο φασματοφωτόμετρο. Το όργανο μηδενίστηκε με το υπόστρωμα και το δείγμα σε μηδέν χρόνο. Στο εργαστήριο έγιναν δοκιμές με καθαρό ένζυμο (Fluka 60631 από *Aspergillus niger*) και φυτικά δείγματα, για να καθοριστεί ο χρόνος επώασης της αντίδρασης καθώς και η συγκέντρωση του υπεροξειδίου του υδρογόνου.
Ο συντελεστής μοριακής απόσβεσης του υπεροξειδίου του υδρογόνου υπολογίστηκε στο εργαστήριο με την δημιουργία πρότυπης καμπύλης και είναι:

$$\mathbf{E_{240nm} = 45{,}2\ cm^{-1}\ mol^{-1}} \qquad \mathbf{(12)}$$

Το ρυθμιστικό διάλυμα περιέχει 0,050 M φωσφορικό κάλιο και 60 mM υπεροξείδιο υδρογόνου, pH 7. Για την παρασκευή ρυθμιστικού διαλύματος 100 ml, προσθέτουμε 0,68 g KH_2PO_4 και 680 μl από 30% H_2O_2.

3.5. ΠΟΣΟΤΙΚΟΣ ΠΡΟΣΔΙΟΡΙΣΜΟΣ ΠΡΩΤΕΙΝΩΝ

Η μέθοδος Bradford (Bradford, 1976), είναι ένας γρήγορος και ακριβής τρόπος εκτίμησης της πρωτεϊνικής συγκέντρωσης και βασίζεται στην ένωση της χρωστικής κυανού του Coomassie G250 (Sigma B-0770) με τις πρωτεΐνες. Είναι ευαίσθητη για ποσότητες 5 μg έως 200 μg πρωτεΐνης ανάλογα την καθαρότητα της χρωστικής. Η χρωστική απαντάται σε δύο χρωματισμούς ανάλογα με την τιμή του pH. Στο όξινο ρυθμιστικό διάλυμα, το κατιόν της χρωστικής έχει μέγιστο μήκος κύματος στα 470 nm. Αντίθετα, το ανιόν της χρωστικής σε βασικό pH, δεσμευόμενο στην πρωτεΐνη, έχει μέγιστο μήκος κύματος στα 595 nm. Επομένως μετρώντας την απορρόφηση στα 595 nm και χρησιμοποιώντας την πρότυπη καμπύλη βρίσκουμε την ισοδύναμη συγκέντρωση της πρωτεΐνης για τα άγνωστα δείγματα.

Για την δημιουργία της πρότυπης καμπύλης χρησιμοποιούμε ως πρότυπο διάλυμα BSA (Bovine Serum Albumin, Sigma A-2153), αρχικής συγκέντρωσης 1 mg/ml. Ένα διάλυμα BSA του 1 mg/ml πρέπει να έχει απορρόφηση 0,66 στα 280 nm για να είναι σωστή η αναλογία, εκτός και αν η πρωτεΐνη είναι υδρόφιλη χρησιμοποιούμε IgG.

Αντιδραστήριο Bradford

Για 500 ml χρησιμοποιούμε: 50 mg της χρωστικής Coomassie Blue G, 25 ml αιθανόλη 95%, 50 ml Φωσφορικού οξέος 85% (ορθοφωσφορικό οξύ) και συμπληρώνουμε με απεσταγμένο νερό. Διαλύουμε την χρωστική στην αιθανόλη και προσθέτουμε το ορθοφωσφορικό οξύ στην απαγωγό εστία. Το προκύπτον μίγμα αφού συμπληρωθεί με νερό, φιλτράρεται με διηθητικό χαρτί Wattman №1 και τοποθετείται σε ένα αδιαφανές μπουκάλι, σε θερμοκρασία δωματίου. Το ρυθμιστικό διάλυμα μπορούμε να το αποθηκεύσουμε για 4 εβδομάδες, είναι όμως προτιμότερο να έχουμε φρέσκο, ενώ πρέπει να το φιλτράρουμε πριν τη χρήση.

Πρότυπη καμπύλη

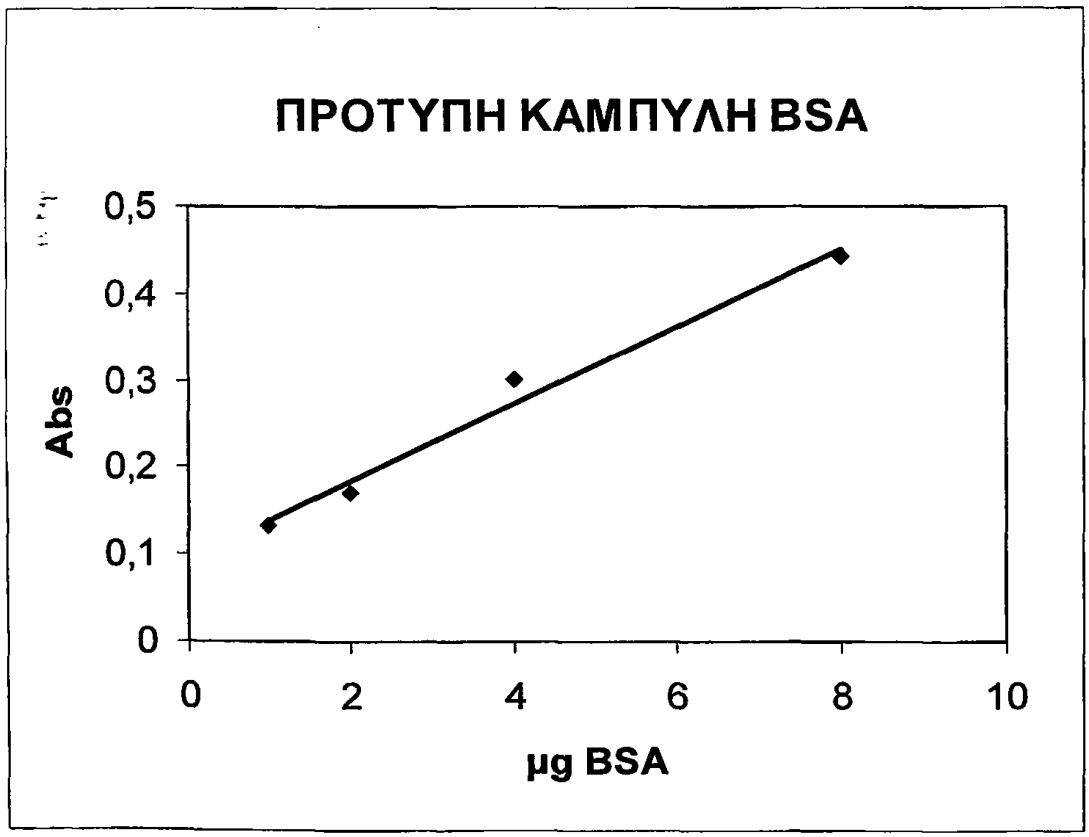
Για την δημιουργία της πρότυπης καμπύλης παρασκευάζουμε από το αρχικό διάλυμα BSA, αραιώσεις γνωστών συγκεντρώσεων, 1-10 μg BSA σε έναν συνολικό όγκο 100 μl μέσα σε Eppendorf των 2 ml. Αυτό είναι ισοδύναμο με 1, 2, 4, 6, 8 και 10 μl του πρότυπου BSA διαλύματος, για να φτάσουμε τον συνολικό όγκο των 100 μl χρησιμοποιούμε ρυθμιστικό διάλυμα PBS. Στην συνέχεια σε κάθε Eppendorf προσθέτουμε 1 ml από το αντιδραστήριο Bradford, και το αναδεύουμε ήπια σε αναδευτήρα vortex, χρησιμοποιούμε ως τυφλό διάλυμα για να μηδενίσουμε το

φασματοφωτόμετρο μόνο 100 μl διάλυμα PBS και 1 ml από το αντιδραστήριο Bradford. Μετά την προσθήκη του αντιδραστηρίου Bradford τα δείγματα παραμένουν ακίνητα για 5-10 λεπτά και μεταφέρονται σε μίας χρήσης κυψελίδες για να πάρουμε απορρόφηση στα 595 nm. Από την πρότυπη καμπύλη που επαναλαμβανόταν για κάθε σειρά δειγμάτων, προκύπτει η εξίσωση:

$$y = 0{,}0447x + 0{,}0944 \qquad R^2 = 0{,}9817 \tag{13}$$

Υπολογισμός πρωτεϊνών στα φυτικά δείγματα

20 μl από τα φυτικά δείγματα μαζί με 80 μl PBS τοποθετούνται σε φιαλίδια eppendorf των 2 ml μαζί με 1 ml από το αντιδραστήριο Bradford και μετράμε την απορρόφηση κάθε δείγματος στα 595 nm 5-10 λεπτά μετά από την προσθήκη του αντιδραστηρίου.



Σχήμα 11. Η πρότυπη καμπύλη BSA (Λευκωματίνη βόειου ορού) όπως υπολογίστηκε στο εργαστήριο.

3.6. ΥΠΟΛΟΓΙΣΜΟΣ ΤΩΝ ΧΛΩΡΟΦΥΛΛΩΝ

Η περιεκτικότητα των φύλλων σε χλωροφύλλες a (Chl a) και b (Chl b), μετρήθηκε και στις τέσσερεις μεταχειρίσεις, τις ίδιες ημερομηνίες που έγιναν και οι υπόλοιπες μετρήσεις από τα ίδια δείγματα φύλλων. Πολλοί διαλύτες έχουν χρησιμοποιηθεί για την εξαγωγή της χλωροφύλλης από τους φυτικούς ιστούς τα τελευταία χρόνια, με κύριο μειονέκτημα, το ότι η εξαγωγή απαιτεί διάφορα χρονοβόρα στάδια όπως η λειοτρίβηση και φυγοκέντρηση. Συνεπώς, αναζητήθηκαν εναλλακτικοί οργανικοί διαλύτες που να επιτρέπουν την εξαγωγή και τον φασματοφωτομετρικό προσδιορισμό των χλωροφυλλών χωρίς την ανάγκη τέτοιων διαδικαστικών σταδίων. Ένας από αυτούς τους διαλύτες που μπορεί να εξαγάγει επιτυχώς τη χλωροφύλλη από τις λειχήνες, τα άλγη, και τα άθικτα φύλλα ανώτερων φυτών είναι το DMSO (διμεθυλο-σουλφοξείδιο), (Barnes, et al. 1992). Ένα ακόμη πλεονέκτημα είναι το ότι το DMSO δεν εξατμίζεται και ο προσδιορισμός των χλωροφυλλών δεν χρειάζεται να γίνει άμεσα.

Από τα φύλλα που παίρνουμε δίσκους για τον υπολογισμό της δράσης των ενζύμων, αφαιρούμε και έναν δίσκο της ίδιας επιφάνειας (128,68 mm^2) για να μετρήσουμε τις χλωροφύλλες. Αφού τους ζυγίσουμε πρώτα βάζουμε ολόκληρους τους δίσκους σε δοκιμαστικούς σωλήνες που περιέχουν 3 ml DMSO και τοποθετούνται στους 60 ^{0}C σε υδατόλουτρο για περίοδο 60 λεπτών, στο τέλος της οποίας οι δίσκοι έχουν πλήρως αποχρωματιστεί. Στην συνέχεια μεταφέρουμε το διάλυμα σε πλαστικές κυψελίδες μιας χρήσης και μετράμε την απορρόφηση στα 648 και 665.

Για τον υπολογισμό των χλωροφυλλών a και b χρησιμοποιούμε τις εξισώσεις, Barnes, et al. 1992:

$$\textbf{Chl a } \mu g/ml = 14{,}85 * A_{665} - 5{,}14 * A_{648} \quad (14)$$

$$\textbf{Chl b } \mu g/ml = 25{,}48 * A_{648} - 7{,}36 * A_{665} \quad (15)$$

$$\textbf{Chl a+b } \mu g/ml = \textbf{Chl a} + \textbf{Chl b} \quad (16)$$

Η ποσότητα των χλωροφυλλών a και b εκφράστηκε σε mg Chl (a+b) ανά g χλωρού βάρους (f.w.), ή mg Chl (a+b) / 100 mm^2 ,ή mg Chl a ανά g χλωρού βάρους, ή και mg Chl b ανά g χλωρού βάρους.

3.7. ΥΠΟΛΟΓΙΣΜΟΣ ΠΡΟΛΙΝΗΣ

Η προλίνη μεταβάλλεται στο διάστημα της ημέρας και η συλλογή των δειγμάτων γίνεται την ίδια στιγμή για να μην υπάρχουν αποκλίσεις στις μετρήσεις. Η μέτρηση της περιεκτικότητας των φύλλων σε προλίνη έγινε με την μέθοδο Bates et al.1973 που στηρίζεται στην αντίδραση με όξινη νινυδρίνη την οποία μπορούμε να μετρήσουμε στο φασματοφωτόμετρο.

Η μέτρηση γίνεται σε φύλλα που έχουν την ίδια ηλικία, 3° έως 4° για τα νέα φύλλα και τα πιο κοντά στην βάση του φυτού όταν πρόκειται για παλαιότερα. Τα φύλλα παραλαμβάνονται από το θερμοκήπιο και ακολουθείται η διαδικασία όπως και στη περίπτωση της εκχύλισης των φυτικών δειγμάτων για τα ένζυμα. Από το έλασμα των φύλων κόβουμε 2 δίσκους με φελλοτρυπητήρα συνολικής επιφάνειας 257,36 mm^2 τους ζυγίζουμε σε ζυγό ακριβείας και τους τοποθετούμε σε δοκιμαστικούς σωλήνες των 10 ml που περιέχουν 2 ml απεσταγμένο νερό. Στην συνέχεια βράζουμε τα δείγματα για 60 λεπτά και αφού τα αφήνουμε να κρυώσουν παίρνουμε 1 ml από το δείγμα το προσθέτουμε σε 1 ml όξινης νινυδρίνης και το βράζουμε για άλλα 60 λεπτά.

Διάλυμα όξινης νινυδρίνης 100 ml

60 ml → Παγώδες οξικό οξύ

40 ml → 6 M H_3PO_4

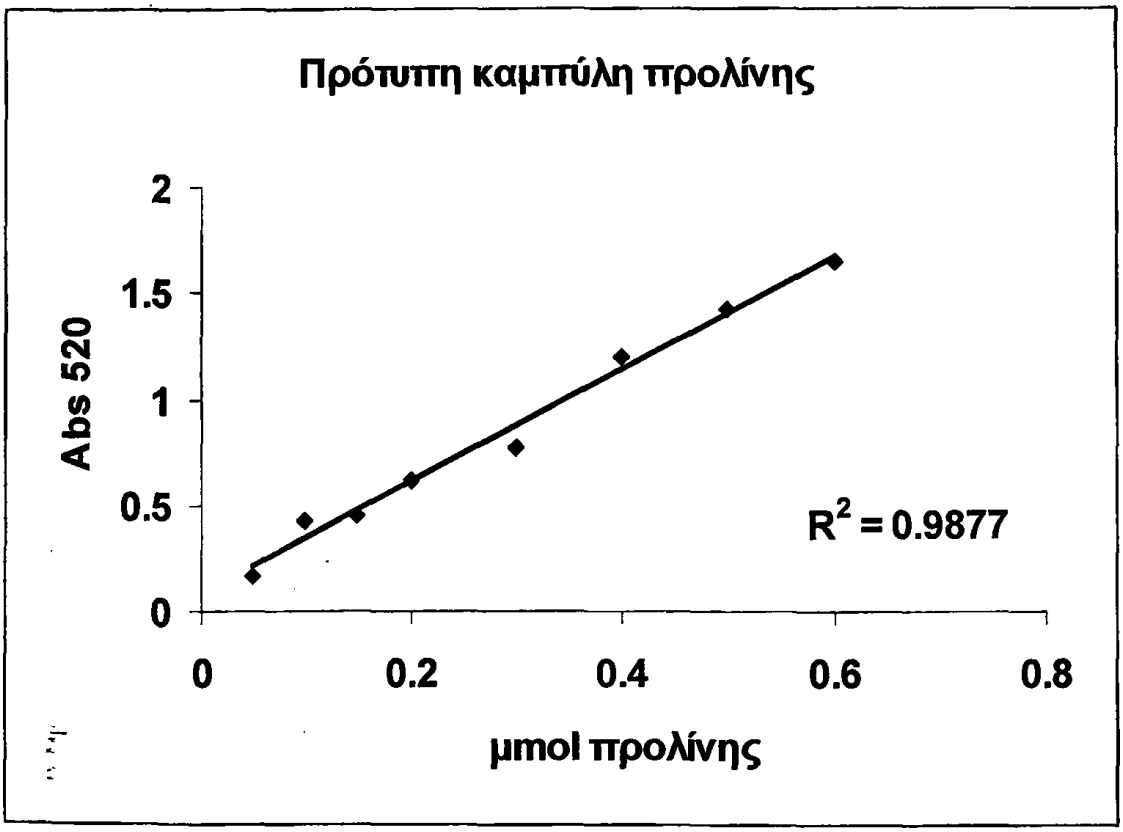
2,5 g Νινυδρίνη (Merck K 32877162)

Η όξινη νινυδρίνη διαλύθηκε θερμαινόμενη σε μαγνητικό αναδευτήρα και τοποθετήθηκε σε δροσερό περιβάλλον. Το αντιδραστήριο παραμένει ακίνητο για 24 ώρες σε σκοτεινό δοχείο, ενώ δεν μπορεί να χρησιμοποιηθεί μετά την πάροδο τριών ημερών.

Τα δείγματα αμέσως μετά τον βρασμό με την όξινη νινυδρίνη τα τοποθετούμε σε παγόλουτρο για να σταματήσει η αντίδραση. Στην συνέχεια προσθέτουμε 2 ml τολουόλιο και τα αναδεύουμε καλά σε vortex για 15 sec ώστε να περάσει στο τολουόλιο το χρώμα από την αντίδραση.

Μηδενίζουμε το φασματοφωτόμετρο (SHIMADZU UV-2501PC) με τολουόλιο και μετράμε την απορρόφηση (Abs) από το υπερκείμενο των δειγμάτων στα 520 nm σε κυψελίδες του 1,5 ml.

Για την τυποποίηση της διαδικασίας και της ποσοτικοποίησης των δειγμάτων δημιουργήθηκε πρότυπη καμπύλη με την χρησιμοποίηση καθαρής προλίνης από Fluka (81709).



Σχήμα 12. Η πρότυπη καμπύλη της προλίνης όπως υπολογίστηκε στο εργαστήριο.

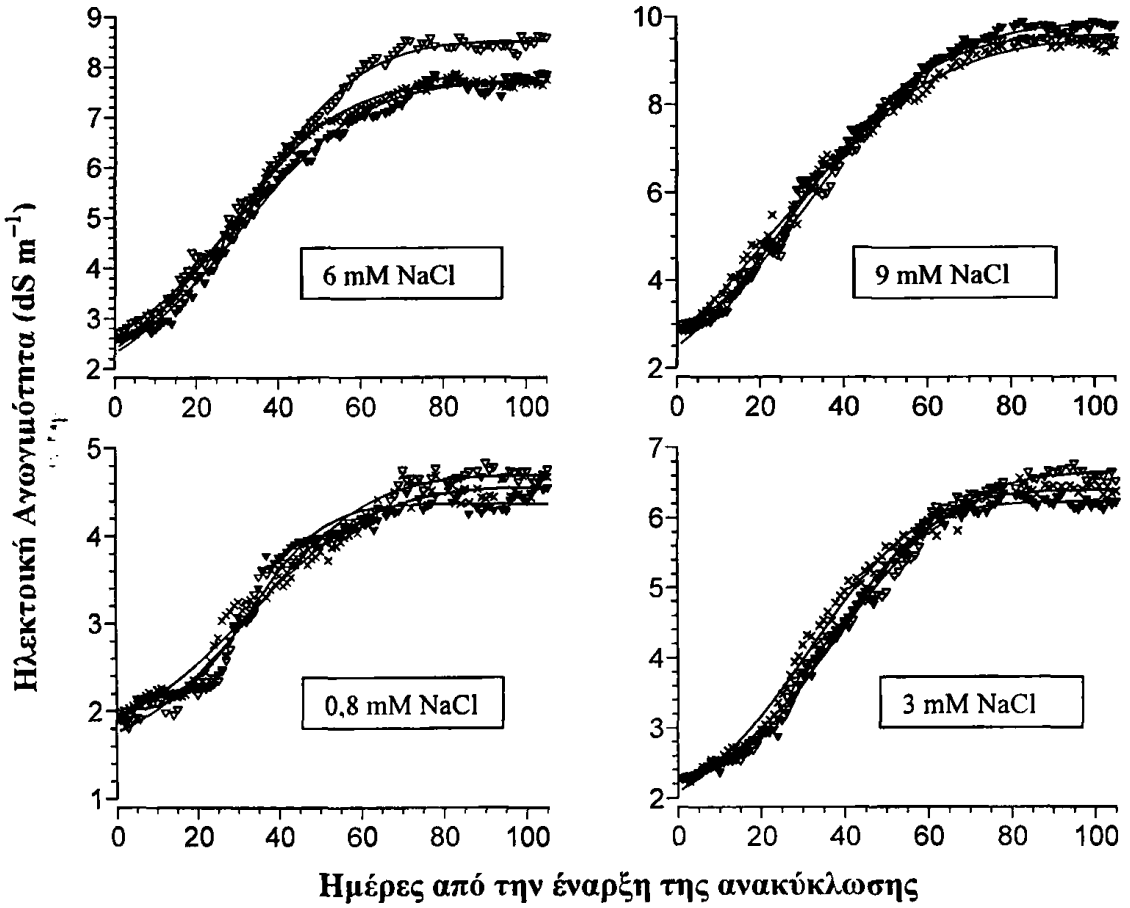
3.8. ΣΤΑΤΙΣΤΙΚΗ ΑΝΑΛΥΣΗ

Για την στατιστική ανάλυση των δεδομένων, όπως και για την δημιουργία των γραφικών παραστάσεων χρησιμοποιήθηκε το πρόγραμμα PlotIT 3.2. με ανάλυση της διασποράς δύο παραγόντων (two way ANOVA). Η αξιολόγηση των αποτελεσμάτων όσον αφορά την διαφοροποίηση μεταξύ των τεσσάρων χειρισμών και των τριών φυτών, έγινε με την χρήση του τεστ Duncan, για επίπεδο σημαντικότητας 5% (α=0,05).

4. ΑΠΟΤΕΛΕΣΜΑΤΑ

4.1. ΗΛΕΚΤΡΙΚΗ ΑΓΩΓΙΜΟΤΗΤΑ

Όπως φαίνεται στο Σχήμα 13, η αύξηση της ηλεκτρικής αγωγιμότητας στο διάλυμα απορροής και συνεπώς στο περιβάλλον των ριζών, στην καλλιέργεια του φασολιού, ακολουθεί το πρότυπο της σιγμοειδούς καμπύλης σε όλες τις μεταχειρίσεις. Μέχρι τις 20 περίπου ημέρες από την έναρξη της ανακύκλωσης η αύξηση ήταν σχετικά αργή,

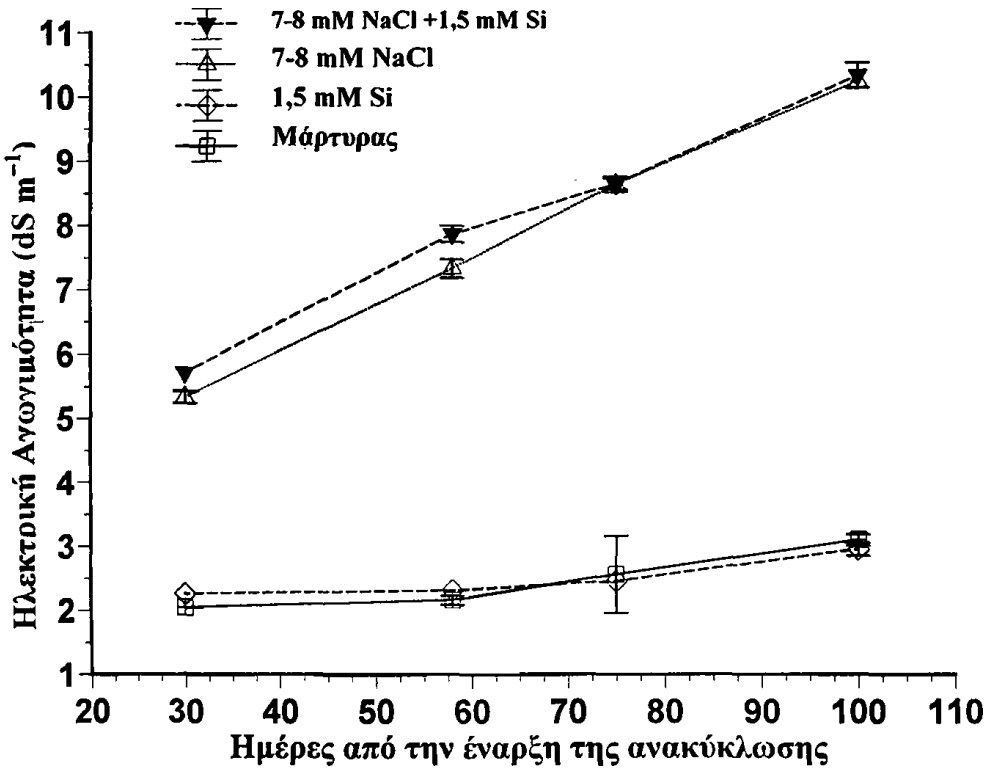


Σχήμα 13. Αύξηση της ηλεκτρικής αγωγιμότητας στο διάλυμα απορροής λόγω της συσσώρευσης του NaCl, στο φασόλι σε κλειστό υδροπονικό σύστημα, στα τέσσερα διαφορετικά επίπεδα NaCl στο νερό άρδευσης. Σε κάθε γραφική παράσταση υπάρχουν τρεις επαναλήψεις, με τις γραμμές να αντιστοιχούν σε καμπύλες μη γραμμικής παλινδρόμησης.

επιταχύνθηκε σημαντικά όμως στην συνέχεια, για να σταθεροποιηθεί τελικά 70 περίπου ημέρες μετά από την έναρξη σε διαφορετικά πάντα επίπεδα για κάθε χειρισμό.

Έτσι, όταν η συγκέντρωση του NaCl στο νερό άρδευσης ήταν 0,8 mM, 3, 6 και 9 mM οι τελικές τιμές της ηλεκτρικής αγωγιμότητας κυμάνθηκαν από 4,4 έως 4,7 dS m^{-1}, 6,2 έως 6,6 dS m^{-1}, 7,5 έως 8,5 dS m^{-1}, και 8,5 έως 9,2 dS m^{-1}, αντίστοιχα.

Στο Σχήμα 14 παρουσιάζεται η πορεία αύξησης της ηλεκτρικής αγωγιμότητας στο διάλυμα απορροής και συνεπώς στο περιβάλλον των ριζών, στην καλλιέργεια του κολοκυθιού. Και στην περίπτωση αυτή ακολουθεί μια αυξητική πορεία, κυρίως για τις μεταχειρίσεις που στο νερό άρδευσης έχει προστεθεί NaCl, ενώ η αύξηση είναι πολύ μικρότερη στις μεταχειρίσεις που χρησιμοποιείται μόνο νερό.

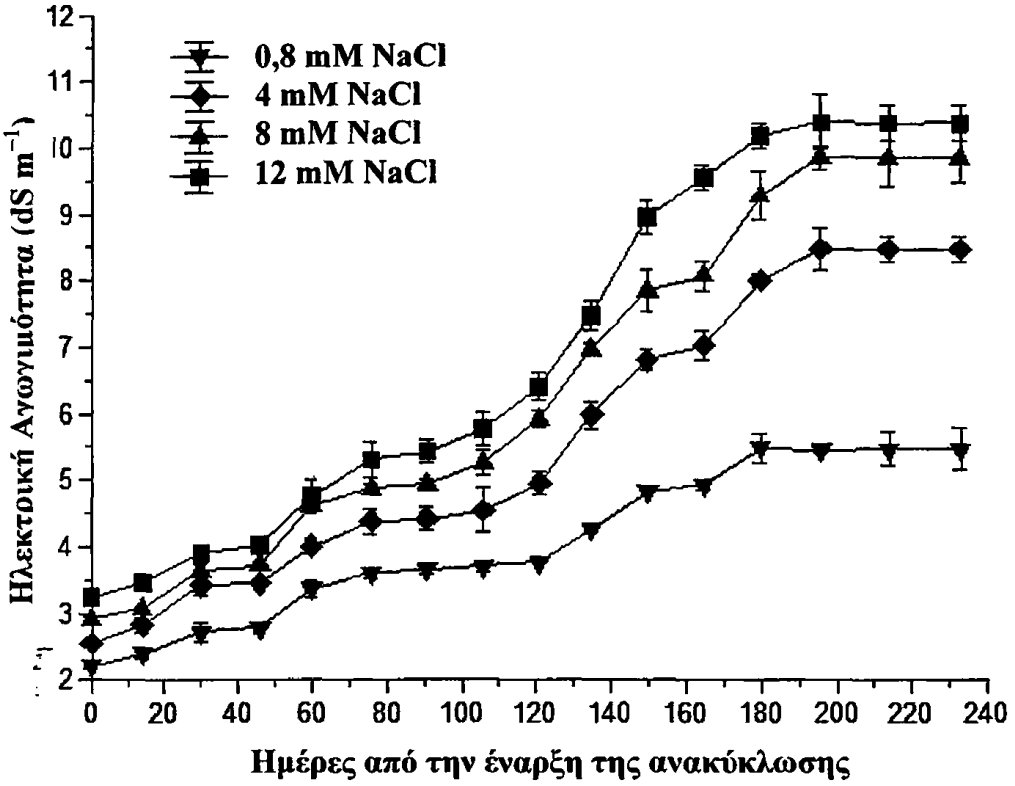


Σχήμα 14. Αύξηση της ηλεκτρικής αγωγιμότητας στο διάλυμα απορροής λόγω της συσσώρευσης του NaCl, στο κολοκύθι σε κλειστό υδροπονικό σύστημα, στα δυο διαφορετικά επίπεδα NaCl (0,3 και 8 mM) στο νερό άρδευσης με ή χωρίς την προσθήκη πυριτίου.

Ειδικότερα και στις δυο μεταχειρίσεις οπού στο νερό άρδευσης η συγκέντρωση του NaCl ήταν 7-8 mM, η πορεία αύξησης της ηλεκτρικής αγωγιμότητας στο διάλυμα απορροής ήταν ταυτόσημη και κυμάνθηκε από 5,5 έως 10,5 dS m^{-1}. Αντίθετα στις μεταχειρίσεις όπου χρησιμοποιήθηκε για άρδευση, νερό βρόχινο, με την συγκέντρωση του NaCl να είναι 0,2 έως 0,3 mM, δεν παρατηρήθηκε μεγάλη

διακύμανση. Σ' αυτή την περίπτωση, η ηλεκτρική αγωγιμότητα στο διάλυμα απορροής στο κολοκύθι κυμάνθηκε από 1,8 έως 2,8 dS m^{-1}.

Στην πιπεριά η πορεία αύξησης της ηλεκτρικής αγωγιμότητας στο διάλυμα απορροής



Σχήμα 15. Αύξηση της ηλεκτρικής αγωγιμότητας στο διάλυμα απορροής λόγω της συσσώρευσης του NaCl, στη πιπεριά σε κλειστό υδροπονικό σύστημα, στα τέσσερα διαφορετικά επίπεδα NaCl στο νερό άρδευσης.

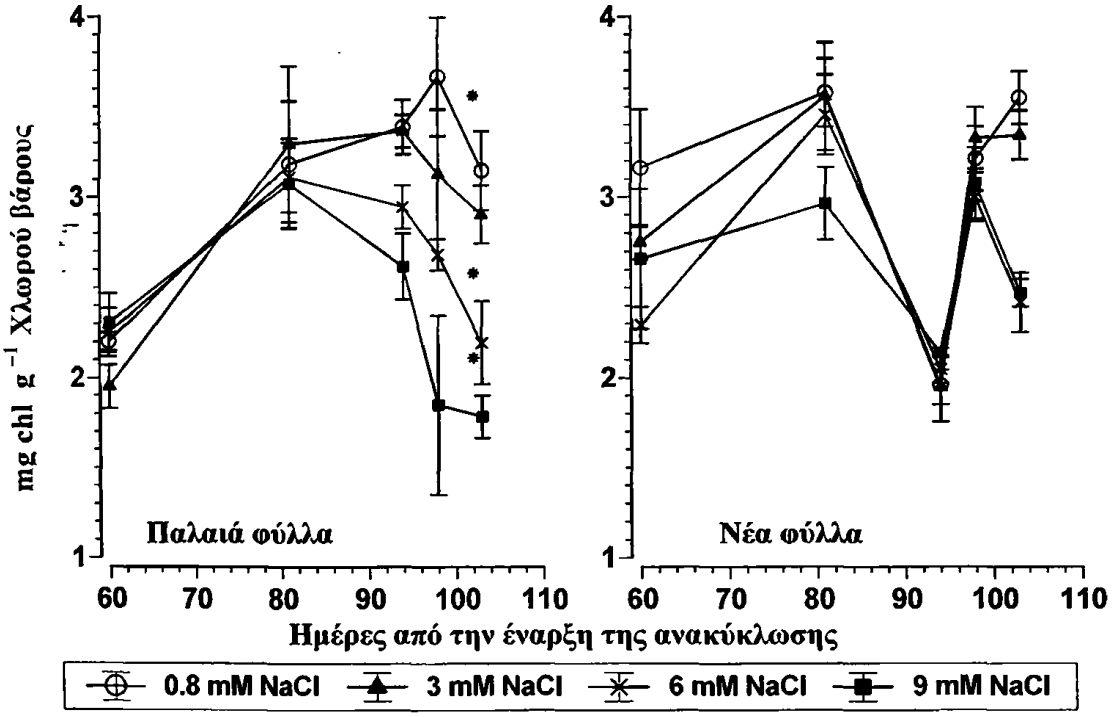
είναι παρόμοια με αυτή στο φασόλι και παρουσιάζεται στο Σχήμα 3. Μέχρι τις 100 περίπου ημέρες από την έναρξη της ανακύκλωσης η αύξηση ήταν σχετικά αργή, επιταχύνθηκε σημαντικά όμως στην συνέχεια, για να σταθεροποιηθεί τελικά 180 περίπου ημέρες μετά από την έναρξη σε διαφορετικά πάντα επίπεδα για κάθε χειρισμό.

Συγκεκριμένα όταν η συγκέντρωση του NaCl στο νερό άρδευσης ήταν 0,8, 4, 8 και 12 mM οι τελικές τιμές της ηλεκτρικής αγωγιμότητας κυμάνθηκαν αντίστοιχα από 5,1 έως 5,4, 7,9 έως 8,4, 9,2 έως 9,9, και 10,2 έως 10,4 dS m^{-1}.

4.2. ΣΥΓΚΕΝΤΡΩΣΗ ΧΛΩΡΟΦΥΛΛΩΝ

Η περιεκτικότητα της χλωροφύλλης a και b στο φασόλι, εκφρασμένη σε mg g^{-1} χλωρού βάρους, δεν μειώθηκε σημαντικά από την αύξηση της αλατότητας μέχρι την 82η ημέρα μετά από την έναρξη του πειράματος αλλά μειώθηκε σημαντικά τις ημέρες 94, 99 και 104 στα παλαιά φύλλα και την 94η ημέρα στα νέα φύλλα (Σχήμα 16). Τα αποτελέσματα δείχνουν ότι η συγκέντρωση χλωροφύλλης στα φύλλα του φασολιού είναι περιορισμένη μόνο σε σχετικά υψηλά εξωτερικά επίπεδα NaCl. Η συγκέντρωση της χλωροφύλλης, τις τελευταίες μέρες του πειράματος στα παλαιότερα φύλλα, είναι ανάλογη της συγκέντρωσης του NaCl στο διάλυμα τροφοδοσίας.

Στον μάρτυρα όπου η συγκέντρωση του NaCl είναι 0,8 mM η περιεκτικότητα των

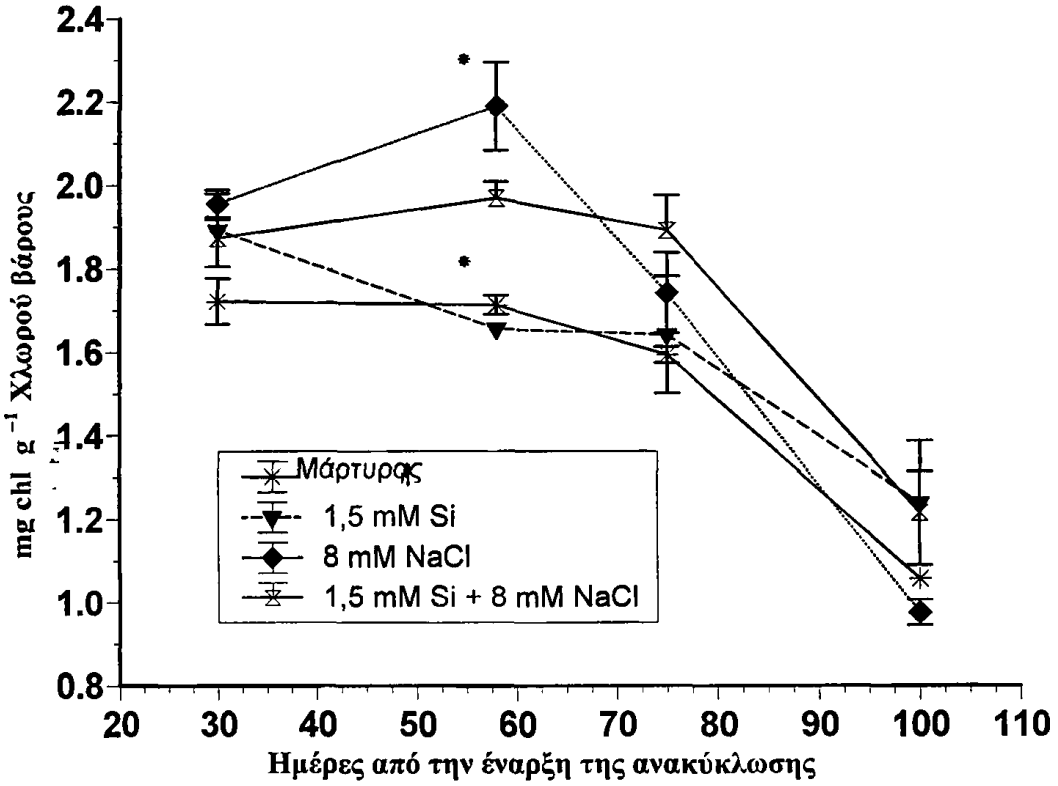


Σχήμα 16. Συγκεντρώσεις χλωροφύλλης a και b σε φύλλα φυτών φασολιού, που αναπτύσσονται σε ένα κλειστό υδροπονικό σύστημα, όπως επηρεάζονται από τη συγκέντρωση NaCl στο νερό άρδευσης (*p<0,05).

παλαιών φύλλων σε χλωροφύλλες την 104η ημέρα παραμένει στα επίπεδα 3,2 mg ενώ για την μεταχείριση όπου η συγκέντρωση του NaCl είναι 9 mM η περιεκτικότητα των φύλλων σε χλωροφύλλες μειώνεται στα 1,7 mg ανά g χλωρού βάρους. Στα νέα φύλλα την 94η ημέρα από την έναρξη της ανακύκλωσης παρατηρείται μια ραγδαία πτώση της περιεκτικότητας των χλωροφυλλών και για τις τέσσερις μεταχειρίσεις ανεξάρτητα

από τις συγκεντρώσεις του NaCl στο θρεπτικό διάλυμα. Την 104η ημέρα η εικόνα είναι διαφορετική με τις μεταχειρίσεις με τις μικρότερες συγκεντρώσεις NaCl (0,8 και 3 mM), η περιεκτικότητα φύλλων σε χλωροφύλλες να είναι στα επίπεδα των 3,4 mg ενώ για τις μεταχειρίσεις με τις μεγαλύτερες συγκεντρώσεις NaCl (6 και 9 mM) οι χλωροφύλλες να μειώνονται στα επίπεδα των 2,4 mg ανά g χλωρού βάρους.

Στο κολοκύθι η συγκέντρωση των χλωροφυλλών a και b στα νέα φύλλα δεν μειώθηκε

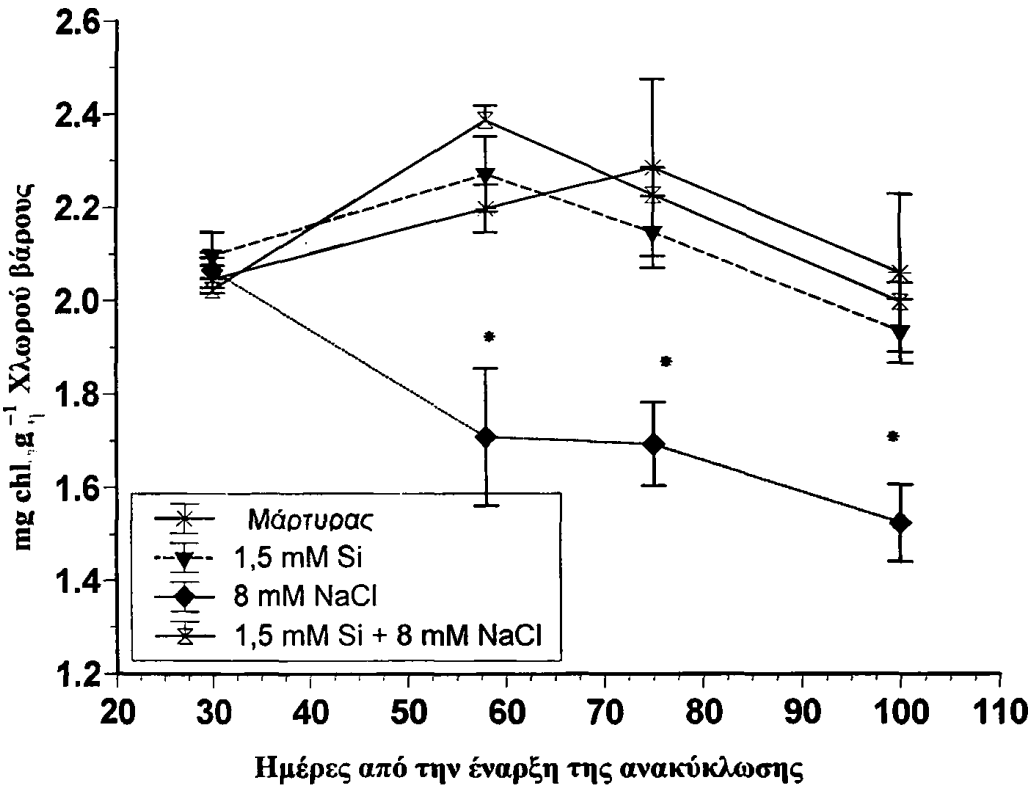


Σχήμα 17. Οι συγκεντρώσεις χλωροφύλλης a και b σε νεαρά φύλλα φυτών κολοκυθιού, που αναπτύσσονται σε κλειστό υδροπονικό σύστημα σε δύο διαφορετικά επίπεδα NaCl στο νερό άρδευσης, παρουσία ή όχι Si, (*$p<0,05$).

σημαντικά σε όλες τις μεταχειρίσεις 75 μέρες μετά από την έναρξη του πειράματος και διατηρήθηκε στα ίδια επίπεδα. Μειώθηκε όμως σημαντικά την 100η ημέρα, μετά την έναρξη της ανακύκλωσης σε όλες τις μεταχειρίσεις, λίγο πριν τα φυτά απομακρυνθούν από το θερμοκήπιο, χωρίς να υπάρχει στατιστικώς σημαντική διαφορά μεταξύ τους (Σχήμα 17).

Αντίθετα στα παλαιά φύλλα (Σχήμα 18), η χλωροφύλλη a και b είναι στατιστικώς σημαντικά μειωμένη στην μεταχείριση με την αυξημένη αλατότητα στο νερό

άρδευσης (η συγκέντρωση του NaCl ήταν 7-8 mM), απουσία όμως πυριτίου κάτι που είναι εμφανές και από την μακροσκοπική εικόνα των φυτών. Η μείωση της χλωροφύλλης, στην μεταχείριση με την αυξημένη αλατότητα απουσία πυριτίου, επέρχεται 57 ημέρες μετά την έναρξη της ανακύκλωσης και διατηρείται μέχρι το τέλος της καλλιέργειας στα ίδια επίπεδα των 1,5 mg ανά g χλωρού βάρους. Στις άλλες τρεις μεταχειρίσεις, ακόμη και σε αυτήν με την αυξημένη αλατότητα στο νερό άρδευσης παρουσία όμως πυριτίου, η συγκέντρωση της χλωροφύλλης a και b δεν



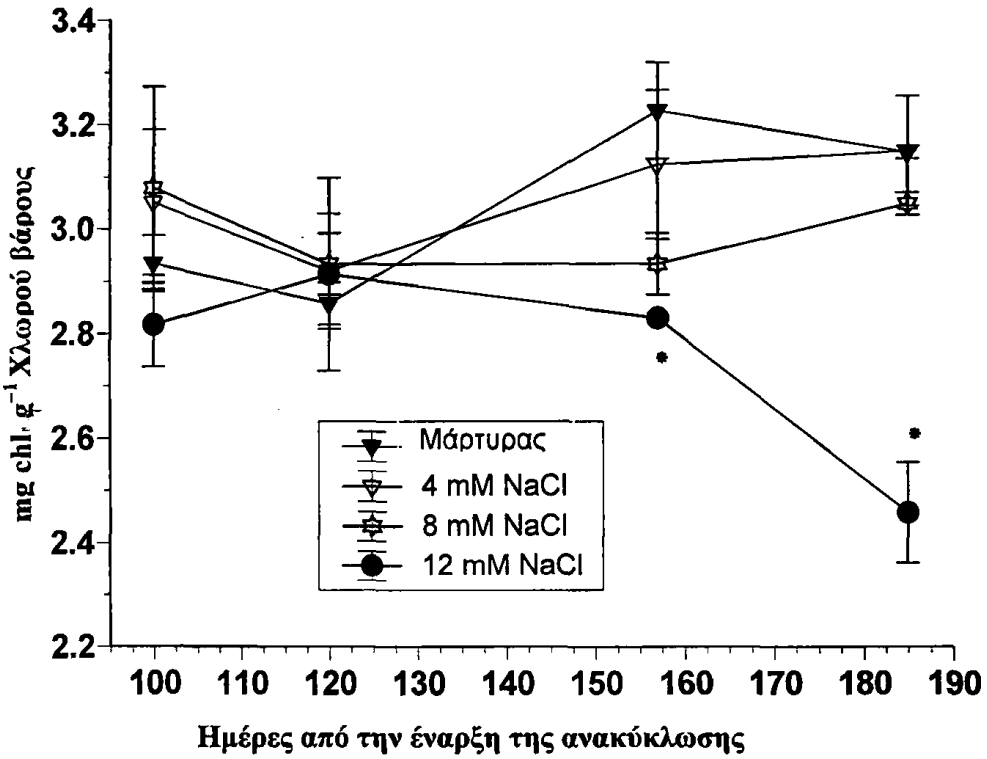
Σχήμα 18. Οι συγκεντρώσεις χλωροφύλλης a και b σε παλαιά φύλλα φυτών κολοκυθιού, που αναπτύσσονται σε ένα κλειστό υδροπονικό σύστημα σε δύο διαφορετικά επίπεδα NaCl στο νερό άρδευσης, παρουσία ή όχι Si, (*$p<0,05$).

μεταβλήθηκε στατιστικώς σημαντικά, μειώθηκε δε αναλογικά και στις τρεις μεταχειρίσεις τις τελευταίες μέρες της καλλιέργειας, φτάνοντας τα 2 mg ανά g χλωρού βάρους.

Επιπλέον, τα αποτελέσματα δείχνουν ότι η μείωση στη συγκέντρωση της χλωροφύλλης, στην συγκεκριμένη μεταχείριση, εμφανίζεται στα παλαιότερα φύλλα, παρόλο που τα επίπεδα συγκέντρωσής της είναι μεγαλύτερα ανά g χλωρού βάρους από αυτά των νέων, (Σχήμα 17, 18).

Η συγκέντρωση της χλωροφυλλών a και b στη πιπεριά υπολογίστηκε μόνο για τα νέα φύλλα, μια και μετρήσεις στα παλαιοτέρα φύλλα δεν ήταν δυνατό να πραγματοποιηθούν, λόγω έντονης προσβολής από ωίδιο κατά ένα μεγάλο διάστημα της καλλιέργειας. Συνεπώς μετρήσεις έγιναν μόνο στα νέα φύλλα, οι οποίες και παρουσιάζονται στο Σχήμα 19.

Στα αποτελέσματα φαίνεται πως δεν υπάρχει στατιστικώς σημαντική διαφορά μεταξύ των μεταχειρίσεων, 155 μέρες μετά από την έναρξη του πειράματος, στην



Σχήμα 19. Οι συγκεντρώσεις χλωροφύλλης a και b σε νέα φύλλα φυτών πιπεριάς, που αναπτύσσονται σε ένα κλειστό υδροπονικό σύστημα σε τέσσερα διαφορετικά επίπεδα NaCl στο νερό άρδευσης, (*$p<0,05$).

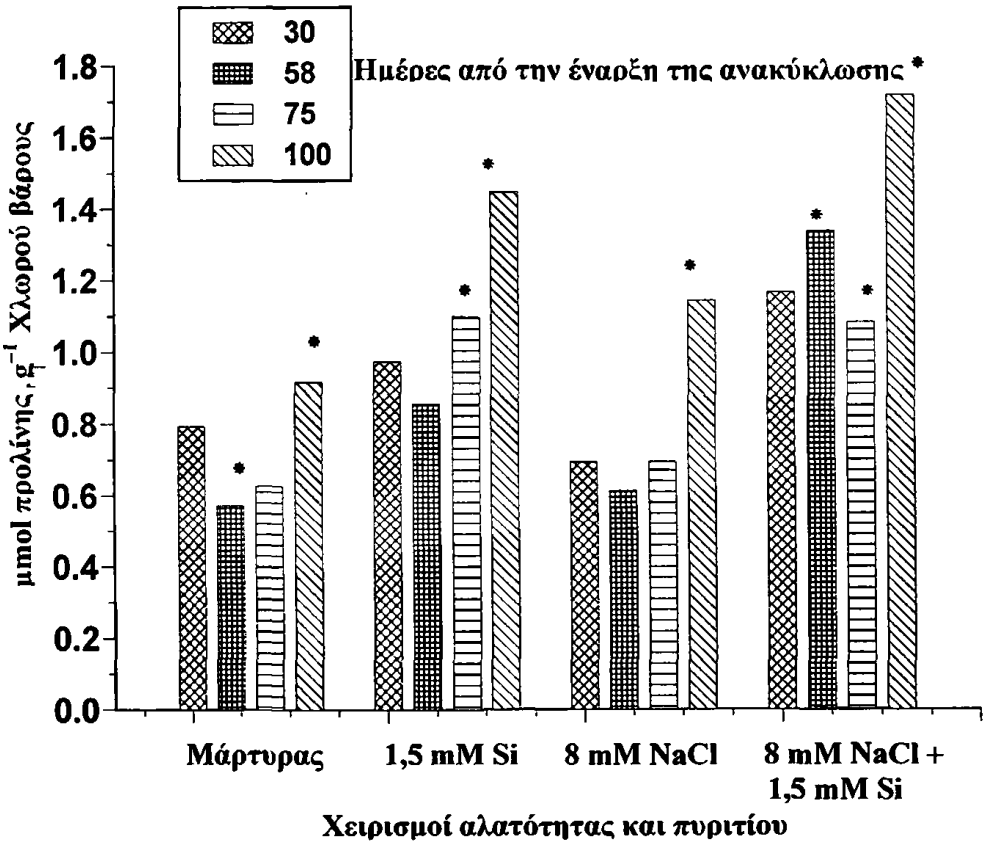
περιεκτικότητα των νέων φύλων σε χλωροφύλλες και για τα τέσσερα επίπεδα συγκέντρωσης NaCl στο θρεπτικό διάλυμα. Μειώθηκε όμως στατιστικώς σημαντικά (test Duncan, $\alpha=0,05$) στην τελευταία δειγματοληψία, 185 μέρες από την έναρξη του πειράματος, φτάνοντας τα επίπεδα των 2,5 mg ανά g χλωρού βάρους στην μεταχείριση οπού τα επίπεδα NaCl στο νερό άρδευσης ήταν 12 mM, λίγο πριν τα φυτά να απομακρυνθούν από το θερμοκήπιο. Μεταξύ και των τριών φυτών του

πειράματος, τα φύλλα του φασολιού έχουν τη μεγαλύτερη περιεκτικότητα σε χλωροφύλλες

4.3. ΣΥΓΚΕΝΤΡΩΣΗ ΠΡΟΛΙΝΗΣ

Επειδή η συγκέντρωση της προλίνης μεταβάλλεται στο διάστημα της ημέρας, η συλλογή των δειγμάτων έγινε την ίδια χρονική στιγμή για να μην υπάρχουν αποκλίσεις στις μετρήσεις. Στο φασόλι οι μετρήσεις της προλίνης έχουν μεγάλες διακυμάνσεις και τα αποτελέσματα δεν είναι δυνατό να αξιολογηθούν.

Τα αποτελέσματα των μετρήσεων της προλίνης στα νέα φύλλα στο κολοκύθι

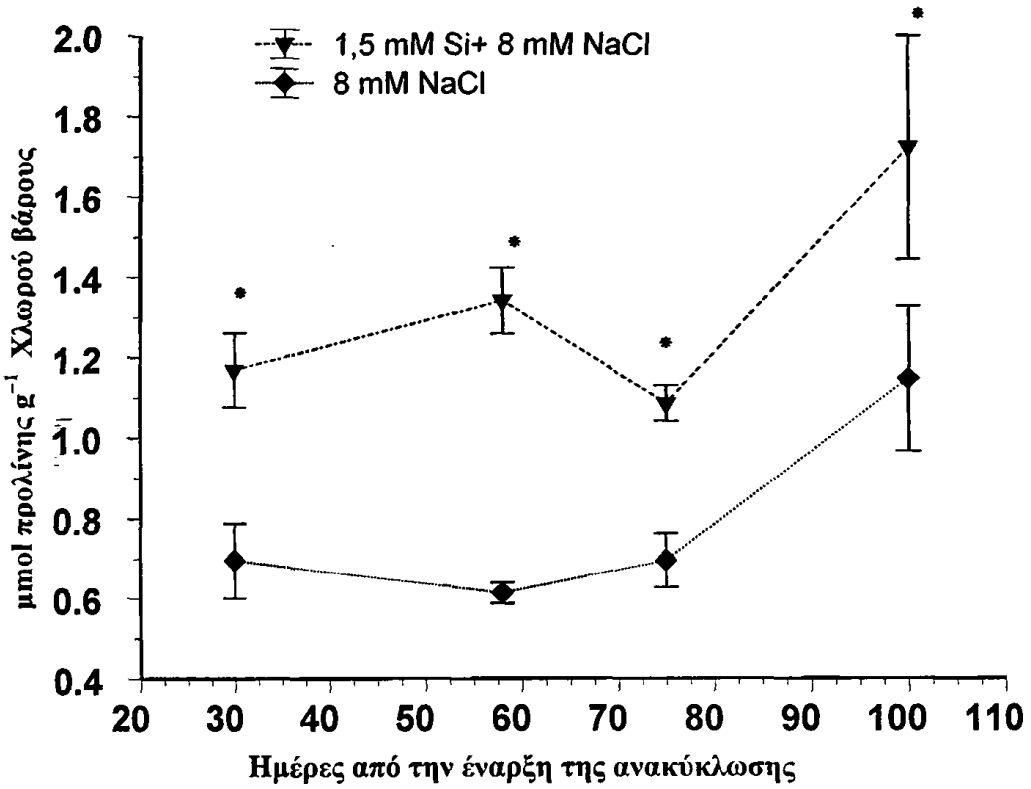


Σχήμα 20. Οι συγκεντρώσεις της προλίνης σε νέα φύλλα στο κολοκύθι, που αναπτύσσονται σε ένα κλειστό υδροπονικό σύστημα σε δύο διαφορετικά επίπεδα NaCl στο νερό άρδευσης, παρουσία ή όχι πυριτίου, (*$p<0,05$).

παρουσιάζονται στο Σχήμα 20 και εκφράζονται σε μmol προλίνης ανά g φρέσκου βάρους φύλλων. Η συγκέντρωση της προλίνης 100 ημέρες μετά την έναρξη της ανακύκλωσης είναι στατιστικώς σημαντικά αυξημένη σε όλες τις μεταχειρίσεις, σε σχέση με τις προηγούμενες μετρήσεις 30, 58 και 75 ημέρες μετά την έναρξη της ανακύκλωσης, ανεξάρτητα από την ηλεκτρική αγωγιμότητα στο διάλυμα απορροής ή

την συγκέντρωση του NaCl στο νερό άρδευσης. Εμφανίζεται δε, να επηρεάζεται σημαντικά η συγκέντρωση της, περισσότερο από την προσθήκη πυριτίου στο νερό άρδευσης παρά από την αυξημένη συγκέντρωση του NaCl.

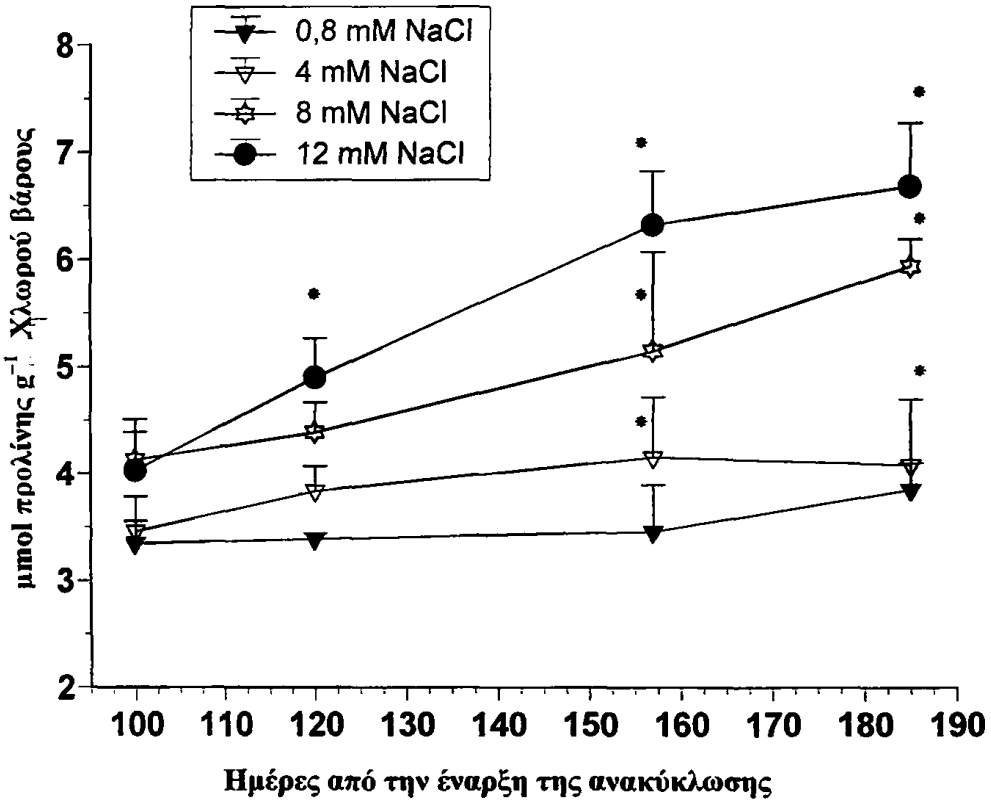
Ειδικότερα στο Σχήμα 21 παρουσιάζεται η πορεία συγκέντρωσης της προλίνης, κατά την διάρκεια της καλλιέργειας, μόνο των δύο μεταχειρίσεων με την αυξημένη αλατότητα στο νερό άρδευσης (7-8 mM NaCl). Στα φυτά που υπάρχει και πυρίτιο στο κλειστό υδροπονικό σύστημα η περιεκτικότητα της προλίνης είναι στατιστικώς



Σχήμα 21. Οι συγκεντρώσεις της προλίνης σε νέα φύλλα στο κολοκύθι, που αναπτύσσονται σε ένα κλειστό υδροπονικό σύστημα σε αυξημένα επίπεδα (8 mM) NaCl στο νερό άρδευσης, παρουσία ή όχι πυριτίου, (*$p<0,05$).

σημαντικά μεγαλύτερη σε όλη την διάρκεια του πειράματος ξεκινώντας από τα επίπεδα των 1,2 μmol την 30η ημέρα και καταλήγοντας στα 1,7 μmol την 100η ημέρα. Στην μεταχείριση όπου δεν υπάρχει πυρίτιο η συγκέντρωση της προλίνης ξεκινά από τα επίπεδα των 0,7 μmol την 30η ημέρα και καταλήγει στα 1,1 μmol την 100η ημέρα. Επίσης και στις δυο περίπτωσης αυξάνεται προς το τέλος του πειράματος όταν και η ηλεκτρική αγωγιμότητα στο διάλυμα απορροής έχει φτάσει στα επίπεδα των 10 dS m^{-1}.

Η συγκέντρωση της προλίνης στη πιπεριά παρουσιάζεται στο Σχήμα 22. Στις δυο μεταχειρίσεις, με τις χαμηλές συγκεντρώσεις NaCl, 0,8 και 4 mM, 100 περίπου ημέρες από την έναρξη της ανακύκλωσης, η συγκέντρωση της προλίνης είναι στα επίπεδα των 3,5 μmol ανά g χλωρού βάρους. Επίσης και στις δυο μεταχειρίσεις όπου το NaCl είναι σε με μεγαλύτερες συγκεντρώσεις, 8 και 12 mM, η συγκέντρωση της προλίνης είναι αυξημένη και φτάνει στα επίπεδα των 4 μmol ανά g χλωρού βάρους. Στην συνέχεια και μέχρι 185 περίπου ημέρες μετά από την έναρξη της ανακύκλωσης οι τιμές διαφοροποιήθηκαν και αυξήθηκαν ανάλογα με την συγκέντρωση του NaCl στο νερό άρδευσης και για τις τέσσερις μεταχείρισης.

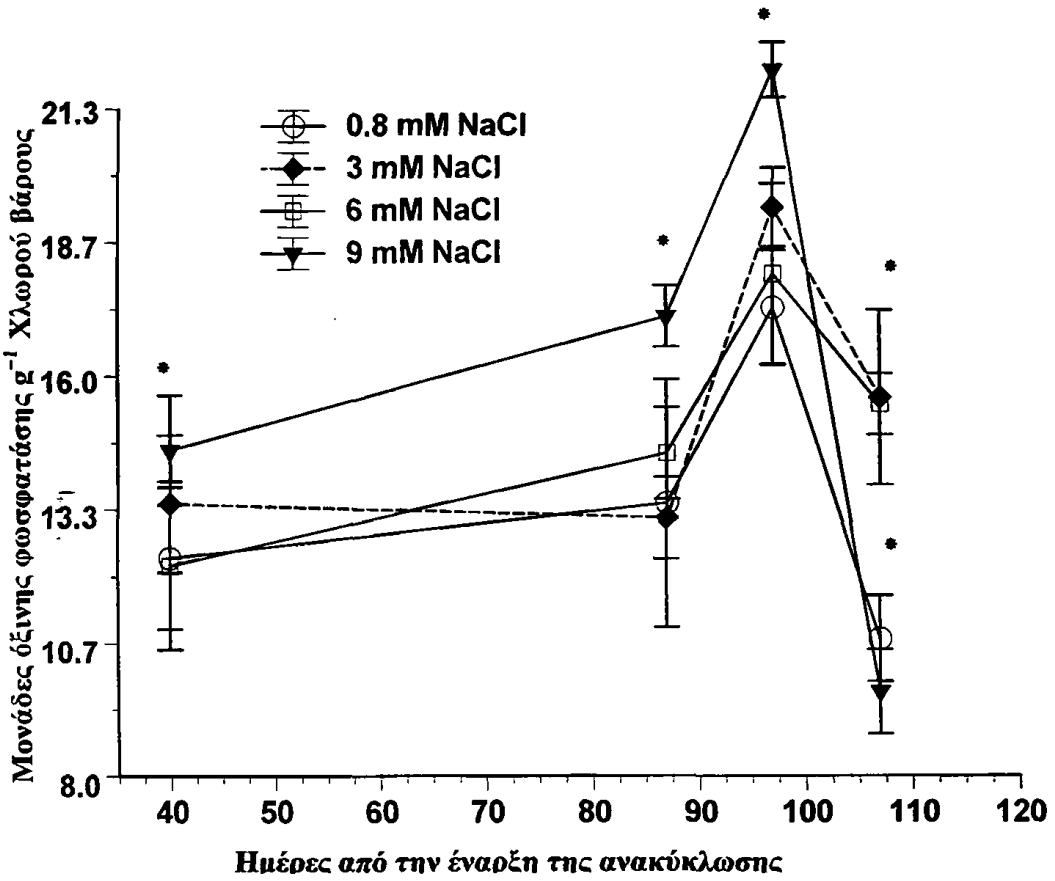


Σχήμα 22. Οι συγκεντρώσεις της προλίνης σε νέα φύλλα στη πιπεριά, που αναπτύσσονται σε ένα κλειστό υδροπονικό σύστημα, σε τέσσερα διαφορετικά επίπεδα NaCl στο νερό άρδευσης. Κάθε γραμμή αντιστοιχεί σε διαφορετική συγκέντρωση NaCl, (*$p<0,05$).

Συγκεκριμένα μεγαλύτερη αύξηση στην συγκέντρωση της προλίνης παρουσιάστηκε στο χειρισμό όπου στο νερό άρδευσης η συγκέντρωση του NaCl ήταν 12 mM, και έφτασε τα επίπεδα των 6,5 μmol ανά g χλωρού βάρους, ενώ την μικρότερη ο χειρισμός όπου στο νερό άρδευσης η συγκέντρωση του NaCl ήταν 0,8 mM και δεν ξεπέρασε τα 4 μmol ανά g χλωρού βάρους.

4.4. ΔΡΑΣΤΙΚΟΤΗΤΑ ΟΞΙΝΗΣ ΦΩΣΦΑΤΑΣΗΣ

Η δραστικότητα της όξινης φωσφατάσης στην καλλιέργεια του φασολιού παρουσιάζεται στο Σχήμα 23 και εκφράζεται σε μονάδες όξινης φωσφατάσης ανά g χλωρού βάρους φύλλου. Και για τις τέσσερις μεταχείρισης έχουμε αύξηση της δραστικότητας του ενζύμου, έως και την 97η ημέρα, με την μεταχείριση όπου η

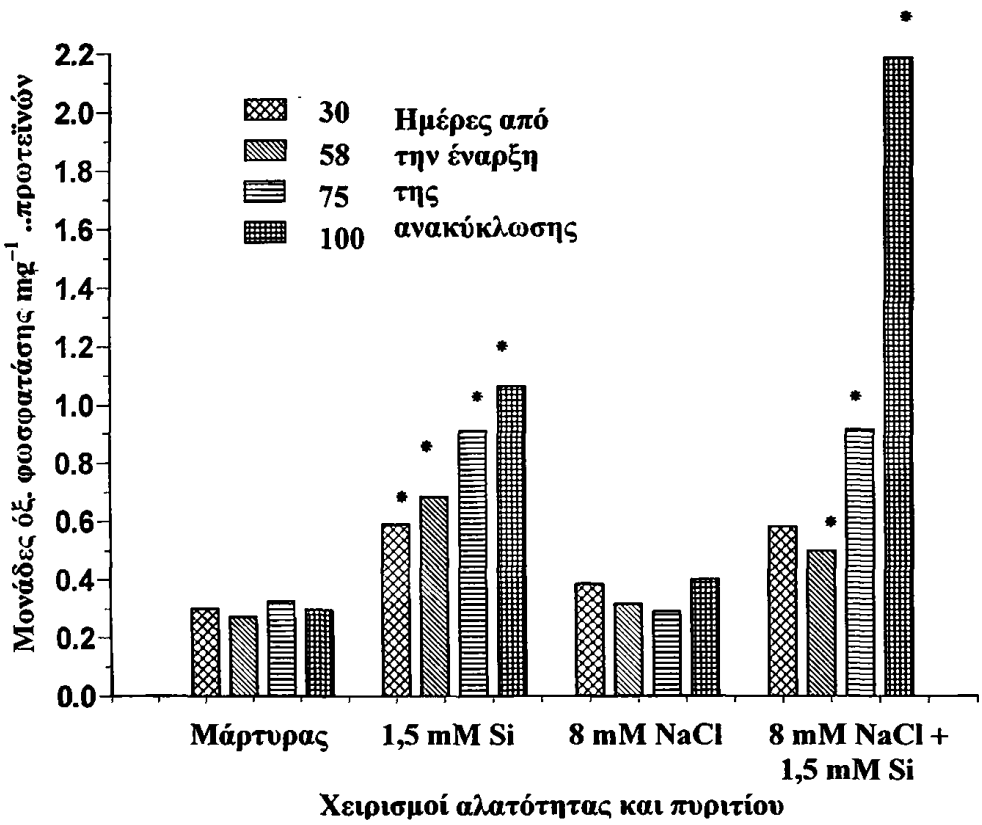


Σχήμα 23. Η δραστικότητα της όξινης φωσφατάσης σε μονάδες ανά g χλωρού βάρους νέων φύλων στο φασόλι, που αναπτύσσονται σε ένα κλειστό υδροπονικό σύστημα σε τέσσερα διαφορετικά επίπεδα NaCl στο νερό άρδευσης(*$p<0,05$).

συγκέντρωση του NaCl στο θρεπτικό διάλυμα είναι 9 mM, να έχει σαφώς την μεγαλύτερη, η οποία ξεπερνά τις 21,5 μονάδες ενζύμου. Από την 97η ημέρα και έως το τέλος της καλλιέργειας παρουσιάζεται μια ραγδαία μείωση της δραστικότητας του ενζύμου για όλες τις μεταχειρίσεις, την περισσότερη δε μείωση είχε η μεταχείριση με την μεγαλύτερη αλατότητα στο διάλυμα τροφοδοσίας που έφτασε τα επίπεδα των 9 μονάδων ενζύμου, όση μείωση παρουσίασε και ο μάρτυρας.

Στο πείραμα με το κολοκύθι η δραστικότητα της όξινης φωσφατάσης παρουσιάζεται στο Σχήμα 24 και εκφράζεται σε μονάδες όξινης φωσφατάσης ανά mg ολικών πρωτεϊνών. Η δραστικότητα του ενζύμου είναι στατιστικώς σημαντικά μεγαλύτερη καθ' όλη την διάρκεια του πειράματος στις μεταχειρίσεις που στο νερό άρδευσης έχει προστεθεί πυρίτιο 1,5 mM και φτάνει 100 ημέρες μετά την έναρξη της ανακύκλωσης, τις 2,2 μονάδες για τον χειρισμό με την αλατότητα και τις 1,1 μονάδες για τον χειρισμό χωρίς αλατότητα στο διάλυμα τροφοδοσίας.

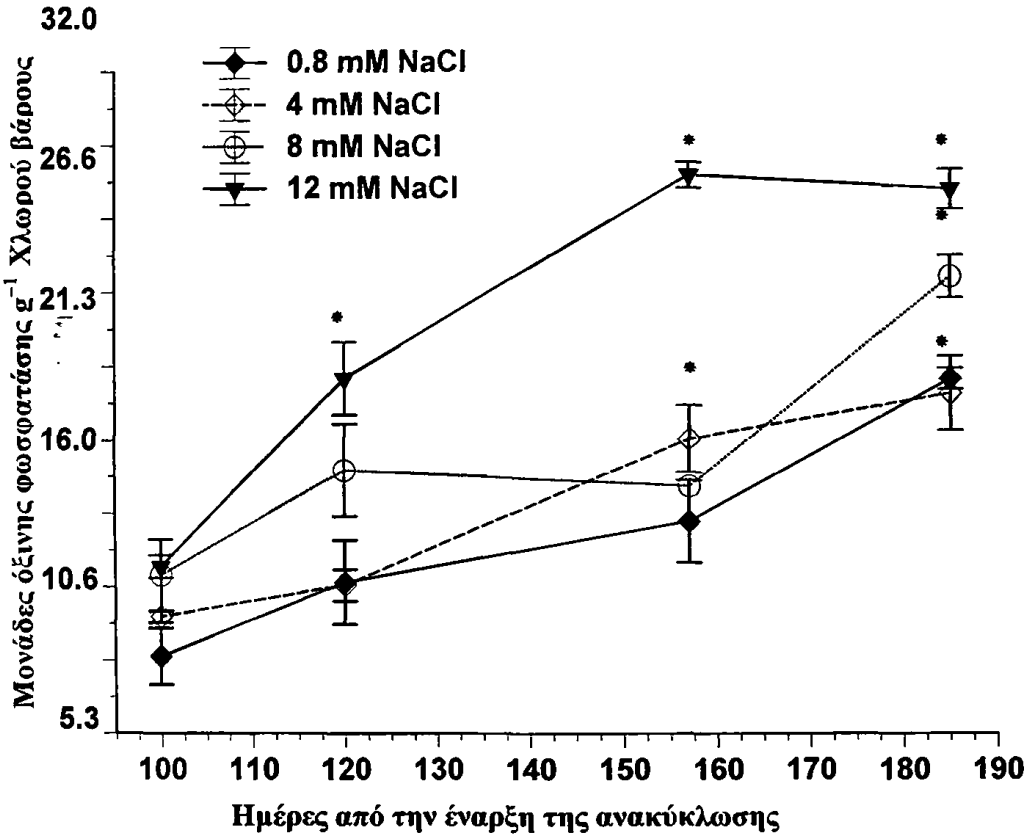
Τα αποτελέσματα δείχνουν σαφώς ότι η δραστικότητα του ενζύμου επηρεάζεται όχι μόνο από την αλατότητα αλλά και από την παρουσία ή όχι πυριτίου. Στους χειρισμούς που δεν προστέθηκε πυρίτιο στο νερό άρδευσης, η δραστικότητα του



Σχήμα 24. Η δραστικότητα της όξινης φωσφατάσης σε μονάδες ανά mg πρωτεϊνών στα νέα φύλλα στο κολοκύθι, που αναπτύσσονται σε ένα κλειστό υδροπονικό σύστημα σε δύο διαφορετικά επίπεδα NaCl στο νερό άρδευσης, παρουσία ή όχι πυριτίου (*$p<0,05$).

ενζύμου δεν ξεπέρασε τα 0,4 μονάδες ανά mg ολικών πρωτεϊνών και ο μάρτυρας παρουσιάζει την ίδια εικόνα με την μεταχείριση οπού η συγκέντρωση του NaCl ήταν 8 mM.

Η δραστικότητα της όξινης φωσφατάσης στην καλλιέργεια της πιπεριάς παρουσιάζεται στο Σχήμα 25 και εκφράζεται σε μονάδες ενζύμου ανά g χλωρού βάρους φύλλου. Και στις τέσσερις μεταχειρίσεις έχουμε αύξηση της δραστικότητας του ενζύμου, έως και το τέλος της καλλιέργειας. Στατιστικώς σημαντικά μεγαλύτερη, καθ' όλη την διάρκεια του πειράματος, είναι η δραστικότητα του ενζύμου, στην μεταχείριση που στο νερό άρδευσης το NaCl είναι στα επίπεδα των 12 mM. Από την 157η ημέρα και μέχρι το τέλος του πειράματος, στην παραπάνω μεταχείριση, η δραστικότητα του ενζύμου σταθεροποιείται στις 25 μονάδες ανά g χλωρού βάρους.
Η δραστικότητα του ενζύμου, στην μεταχείριση που στο διάλυμα τροφοδοσίας το



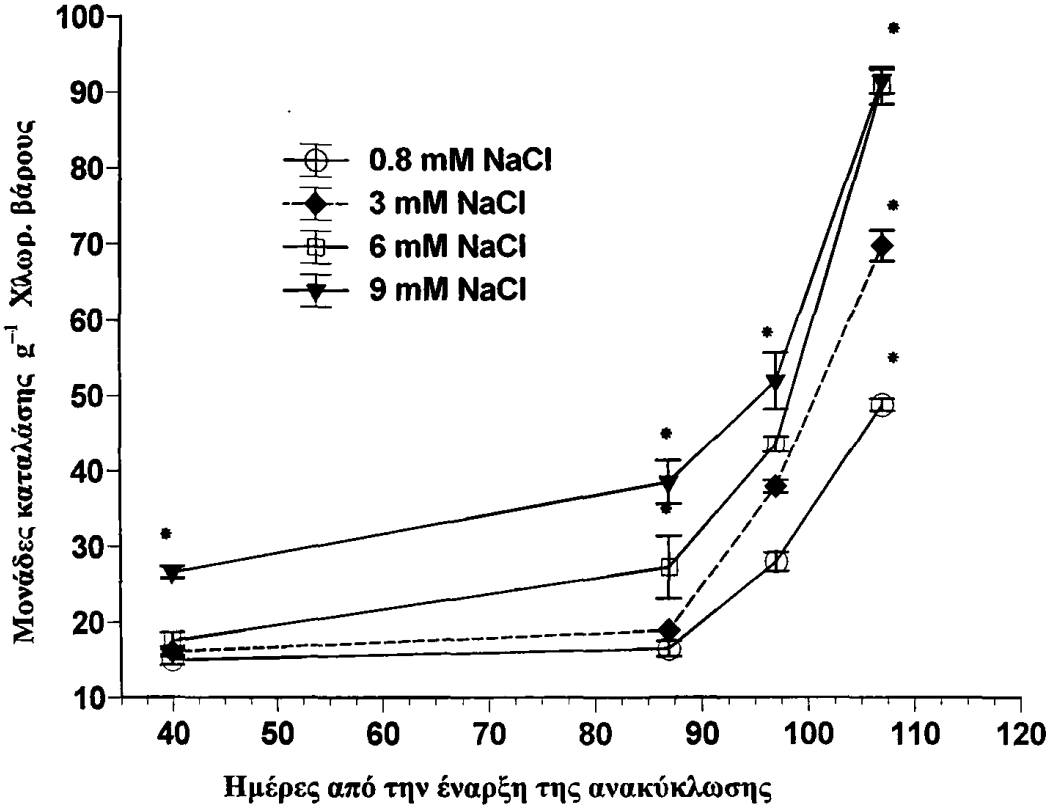
Σχήμα 25. Η δραστικότητα της όξινης φωσφατάσης σε μονάδες ανά g χλωρού βάρους νέων φύλων στη πιπεριά, που αναπτύσσονται σε ένα κλειστό υδροπονικό σύστημα σε τέσσερα διαφορετικά επίπεδα NaCl στο νερό άρδευσης (*$p<0,05$).

NaCl είναι στα επίπεδα των 8 mM, ενώ τις υπόλοιπες μέρες ακολουθεί μια ανάλογη πορεία με αυτή της μεγαλύτερης συγκέντρωσης NaCl, 157 ημέρες μετά την έναρξη της ανακύκλωσης, παρουσιάζει μια σημαντική πτώση, και βρίσκεται σε επίπεδα ανάλογα με αυτά των χειρισμών με τις μικρότερες συγκεντρώσεις NaCl.

Η δραστικότητα του ενζύμου 185 μέρες από την έναρξη του πειράματος, εμφανίζει μια εικόνα ανάλογη με τις συγκεντρώσεις του NaCl στο θρεπτικό διάλυμα.

4.5. ΔΡΑΣΤΙΚΟΤΗΤΑ ΚΑΤΑΛΑΣΗΣ

Η δραστικότητα της καταλάσης στην καλλιέργεια του φασολιού παρουσιάζεται στο Σχήμα 26 και εκφράζεται σε μονάδες καταλάσης ανά g χλωρού βάρους φύλλου. Και στις τέσσερις μεταχειρίσεις έχουμε αύξηση της δραστικότητας, η οποία είναι ανάλογη της αύξησης της ηλεκτρικής αγωγιμότητας του διαλύματος απορροής συνέπεια των συγκεντρώσεων του NaCl στο διάλυμα τροφοδοσίας. Έως την 87η ημέρα όπου η αύξηση της ηλεκτρικής αγωγιμότητας στο διάλυμα απορροής είναι ομαλή, η

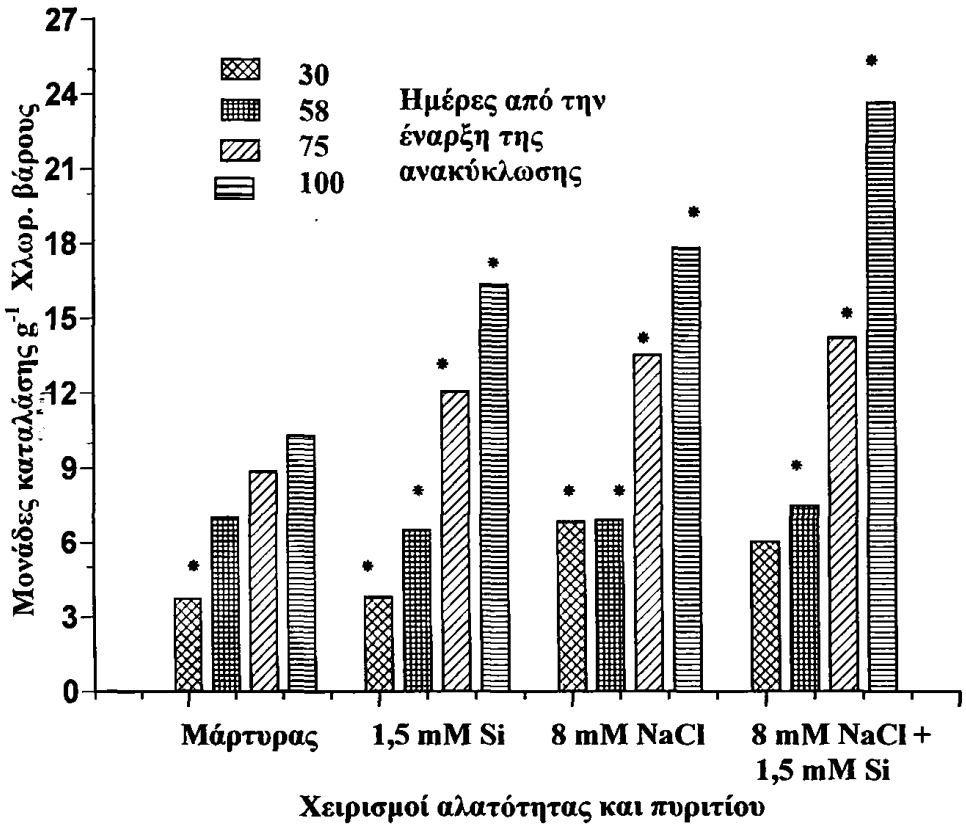


Σχήμα 26. Η δραστικότητα της καταλάσης σε νέα φύλλα στο φασόλι, που αναπτύσσονται σε ένα κλειστό υδροπονικό σύστημα σε διαφορετικά επίπεδα NaCl στο νερό άρδευσης, (*$p<0,05$).

δραστικότητα της καταλάσης είναι μικρή. Από την 87η ημέρα και ως το τέλος της καλλιέργειας όταν ηλεκτρική αγωγιμότητα σταθεροποιείται σε υψηλά επίπεδα η δραστικότητας της καταλάσης εμφανίζεται να αυξάνει ραγδαία.

Την 107η ημέρα για τις δυο μεταχειρίσεις με την μεγαλύτερη συγκέντρωση 6 και 9 mM NaCl στο θρεπτικό διάλυμα, έχουμε 90 μονάδες καταλάσης ανά g χλωρού βάρους, ενώ ό μάρτυρας, την ίδια περίοδο δεν ξεπερνάει τις 50 μονάδες καταλάσης ανά g χλωρού βάρους. Στην μεταχείριση όπου η συγκέντρωση του NaCl στο θρεπτικό διάλυμα είναι 3 mM, η δραστικότητα της καταλάσης φτάνει τις 70 μονάδες ανά g χλωρού βάρους.

Στο κολοκύθι η δραστικότητα της καταλάσης στα νέα φύλλα, εκφράζεται σε μονάδες

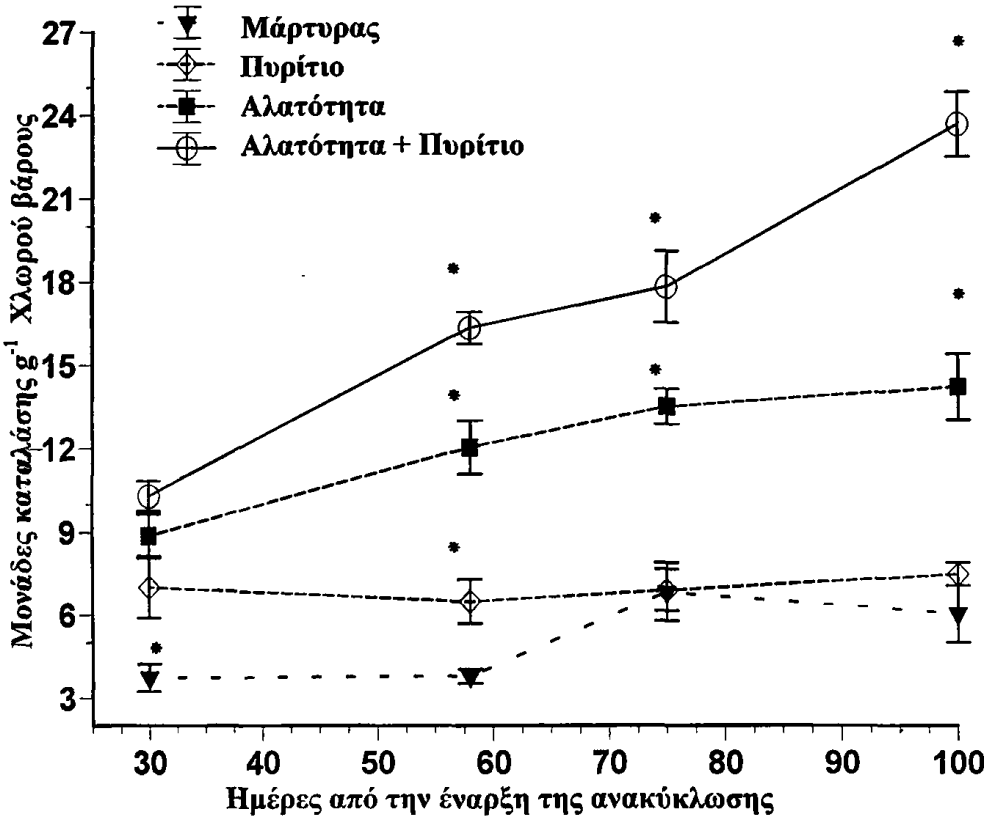


Σχήμα 27. Η δραστικότητα της καταλάσης σε νέα φύλλα στο κολοκύθι, που αναπτύσσονται σε ένα κλειστό υδροπονικό σύστημα σε δύο διαφορετικά επίπεδα NaCl στο νερό άρδευσης, παρουσία ή όχι πυριτίου, (*$p<0,05$).

ενζύμου ανά g χλωρού βάρους και παρουσιάζεται στο Σχήμα 27 σε σχέση με τις τέσσερις μεταχειρίσεις, ενώ στο Σχήμα 28 παρουσιάζεται σε σχέση με τον χρόνο. Η αύξηση της δραστικότητας της καταλάσης είναι σαφώς μεγαλύτερη στην μεταχείριση όπου στο θρεπτικό διάλυμα εκτός από την προσθήκη 7-8 mM NaCl, έχει προστεθεί και πυρίτιο 1,5 mM και φτάνει τις 25 μονάδες 100 ημέρες μετά την έναρξη της ανακύκλωσης, ενώ 70 ημέρες πριν ήταν περίπου στις 10 μονάδες.

Αύξηση της δραστικότητας της καταλάσης έχουμε και στην δεύτερη μεταχείριση που η αλατότητα είναι αυξημένη στο θρεπτικό διάλυμα, είναι όμως στατιστικώς μικρότερη από την δραστικότητα του ενζύμου στην μεταχείριση που υπάρχει και πυρίτιο στο νερό άρδευσης.

Στις μεταχειρίσεις του πειράματος που δεν έχουμε αυξημένη αλατότητα η δραστικότητα της καταλάσης στα νεαρά φύλλα του κολοκυθιού παραμένει σταθερή ή

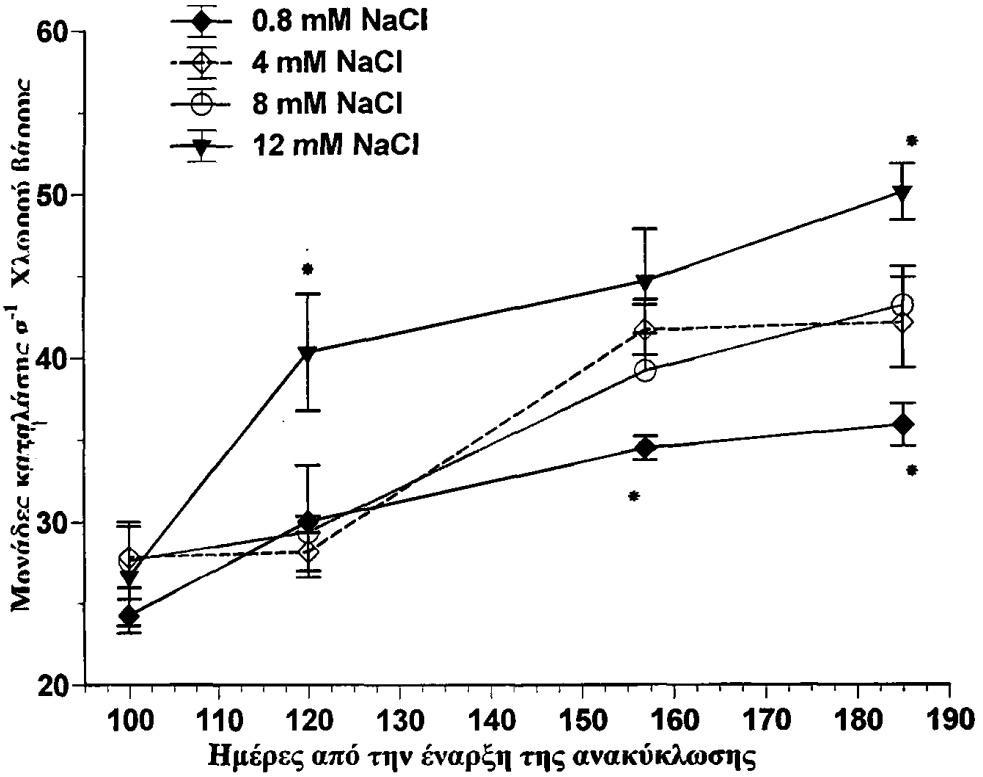


Σχήμα 28. Η δραστικότητα της καταλάσης σε νέα φύλλα στο κολοκύθι, που αναπτύσσονται σε ένα κλειστό υδροπονικό σύστημα σε αυξημένα επίπεδα (8 mM) NaCl στο νερό άρδευσης, παρουσία ή όχι πυριτίου, (*$p<0,05$).

και αυξάνεται ελάχιστα. Πιθανόν η παρουσία πυριτίου να προκαλεί μικρή αύξηση της καταλάσης ακόμη και αν δεν υπάρχει αυξημένη συγκέντρωση NaCl στο νερό άρδευσης.

Τα αποτελέσματα της δραστικότητας της καταλάσης στην πιπεριά παρουσιάζονται σε δύο σχήματα, και εκφράζονται σε μονάδες καταλάσης ανά g χλωρού βάρους ή μονάδες καταλάσης ανά 100 mm^2 επιφάνειας νέων φύλλων.

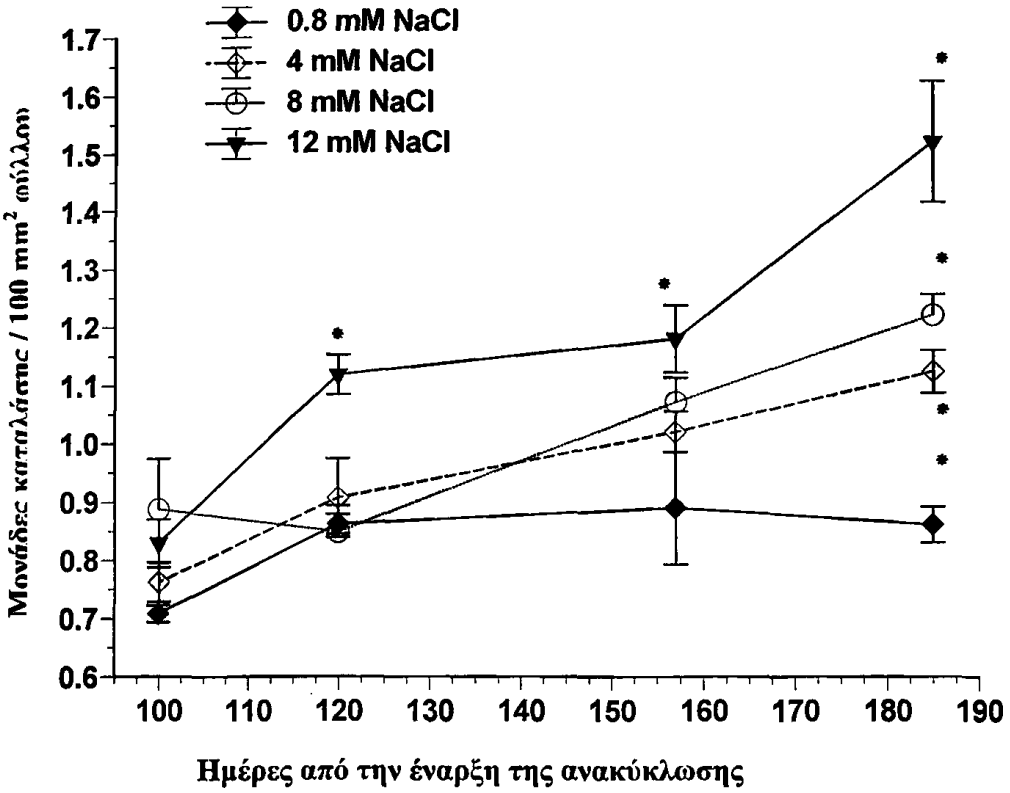
Και στις δυο περιπτώσεις, στις μεταχειρίσεις του πειράματος όπου η συγκέντρωση του NaCl ήταν 12 mM στο θρεπτικό διάλυμα, η δραστικότητα της καταλάσης ήταν στατιστικώς σημαντικά μεγαλύτερη καθ' όλη την διάρκεια του περάματος και έφτασε τις 50 μονάδες ανά g χλωρού βάρους ή τις 1,6 μονάδες ανά 100 mm^2 φυλλικής επιφάνειας. Οι δυο μεταχειρίσεις με τις μικρότερες συγκεντρώσεις NaCl 4 και 9 mM στο θρεπτικό διάλυμα, εμφάνισαν μια σχεδόν παράλληλη πορεία, αποδεικνύοντας πως σε αυτά τα επίπεδα αλατότητας δεν υπάρχει μεγάλη απόκλιση όσο αφορά την



Σχήμα 29. Η δραστικότητα της καταλάσης σε νέα φύλλα στη πιπεριά σε μονάδες ενζύμου ανά χλωρό βάρος φύλου, που αναπτύσσονται σε ένα κλειστό υδροπονικό σύστημα σε τέσσερα διαφορετικά επίπεδα NaCl στο νερό άρδευσης, (*$p<0,05$).

δραστικότητα του ενζύμου.

Η δραστικότητα της καταλάσης στον μάρτυρα βρίσκεται σε χαμηλότερα επίπεδα, από τις άλλες μεταχειρίσεις καθ' όλη την διάρκεια του περάματος. Στις 120 ημέρες όμως μετά την έναρξη της ανακύκλωσης, εμφανίζεται στα ίδια επίπεδα με τις μεταχειρίσεις όπου η συγκέντρωση NaCl στο θρεπτικό διάλυμα είναι 4 και 9 mM.



Σχήμα 30. Η δραστικότητα της καταλάσης σε νέα φύλλα στη πιπεριά ανά μονάδα φυλλικής επιφανείας, που αναπτύσσονται σε ένα κλειστό υδροπονικό σύστημα σε τέσσερα διαφορετικά επίπεδα NaCl στο νερό άρδευσης, (*$p<0,05$).

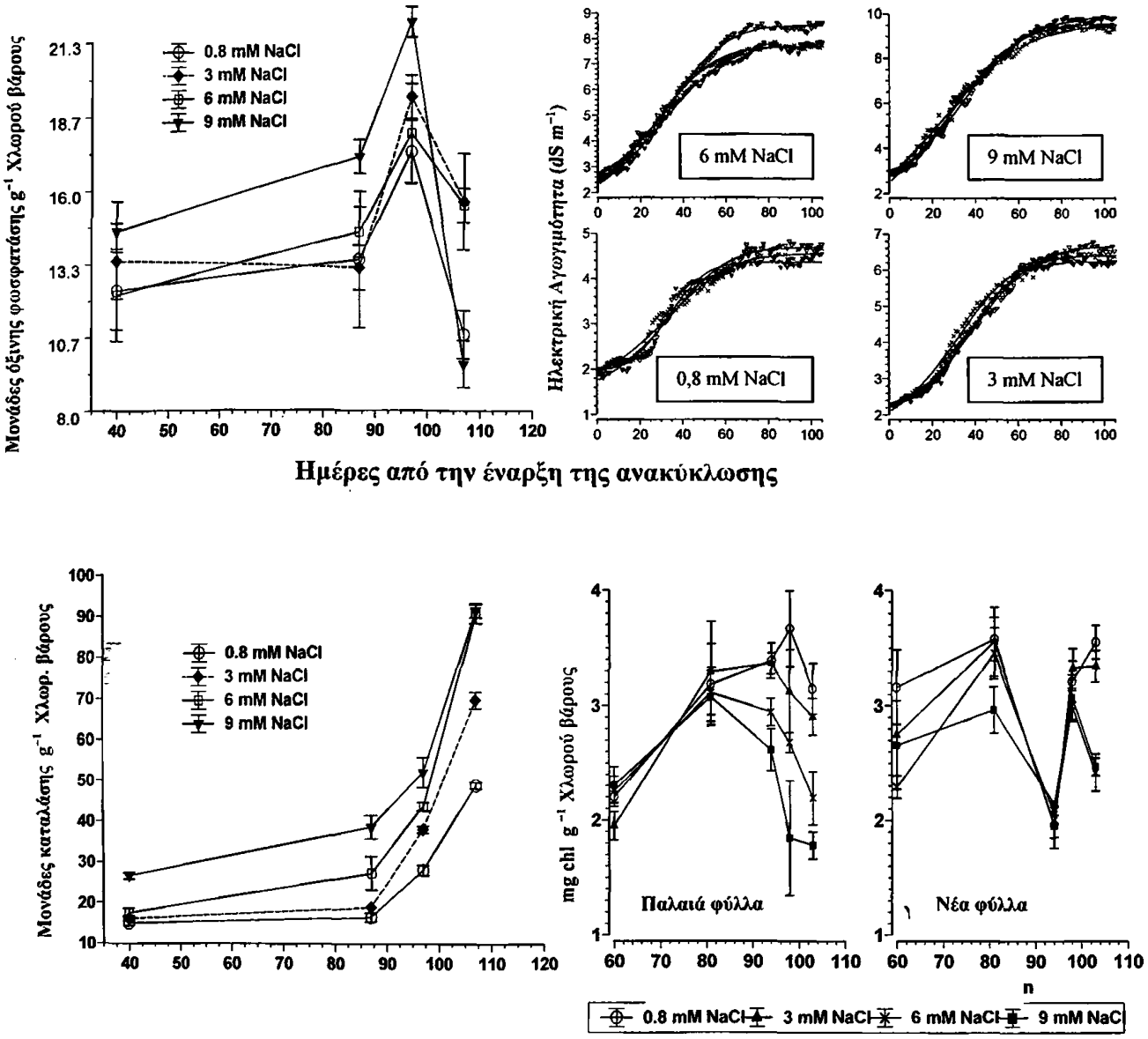
Σε κάθε περίπτωση όμως, η δραστικότητας της καταλάσης στο τέλος της καλλιέργειας είναι ανάλογη της ηλεκτρικής αγωγιμότητας στο διάλυμα απορροής και των συγκεντρώσεων του NaCl στο θρεπτικό διάλυμα τροφοδοσίας.

4.6. ΔΡΑΣΤΙΚΟΤΗΤΑ ΥΠΕΡΟΞΕΙΔΑΣΗΣ

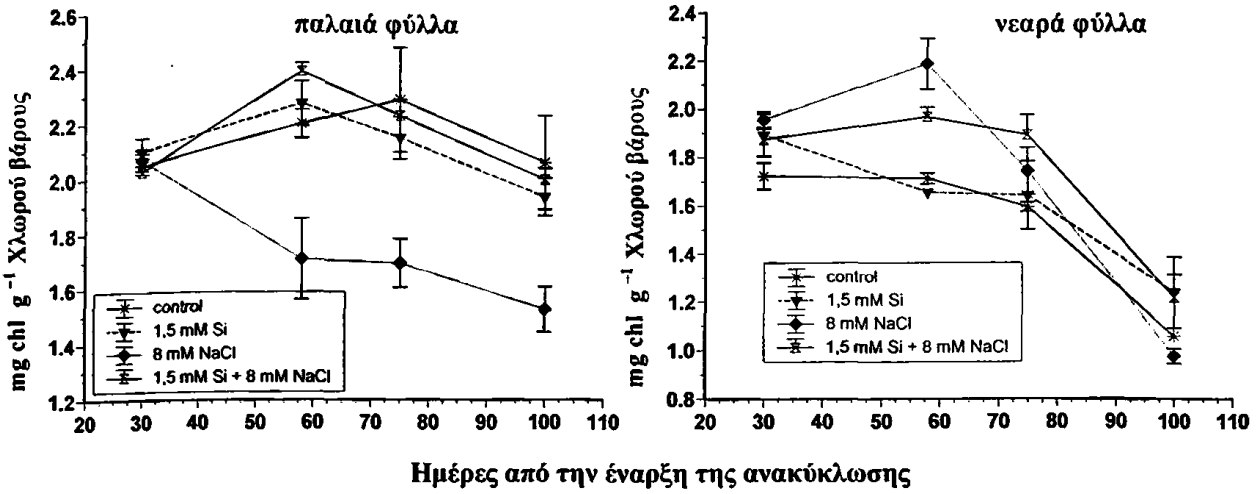
Στο εργαστήριο έγιναν πολλές προσπάθειες για τον υπολογισμό της δράσης της υπεροξειδάσης χωρίς όμως μεγάλη επιτυχία. Τα αποτελέσματα και για το φασόλι, την πιπεριά και το κολοκύθι, δεν μπορούν να παρουσιαστούν και να αξιολογηθούν, δίδοντας ασφαλή αποτελέσματα για την δράση του ενζύμου στις διάφορες μεταχειρίσεις. Δοκιμές που έγιναν στο εργαστήριο με καθαρό ένζυμο από (Sigma p-6782 από ρεπάνι), έδωσαν αποτελέσματα με την οξείδωση της γκουαϊακόλης από το O_2 με την απορρόφηση να είναι 0,324 σε 5 min αντί 13,3 για 20 μl παρασκευάσματος από το αρχικό διάλυμα 5 u/ml. Το γεγονός της πολύ μειωμένης δραστικότητας ακόμη και του καθαρού ενζύμου, παραπέμπει σε λάθη από μέρους μας και παρά τους εκτεταμένους πειραματισμούς μας (διαλύματα, χρόνοι, συγκεντρώσεις) δεν κατέστη δυνατό να διαλευκανθεί.

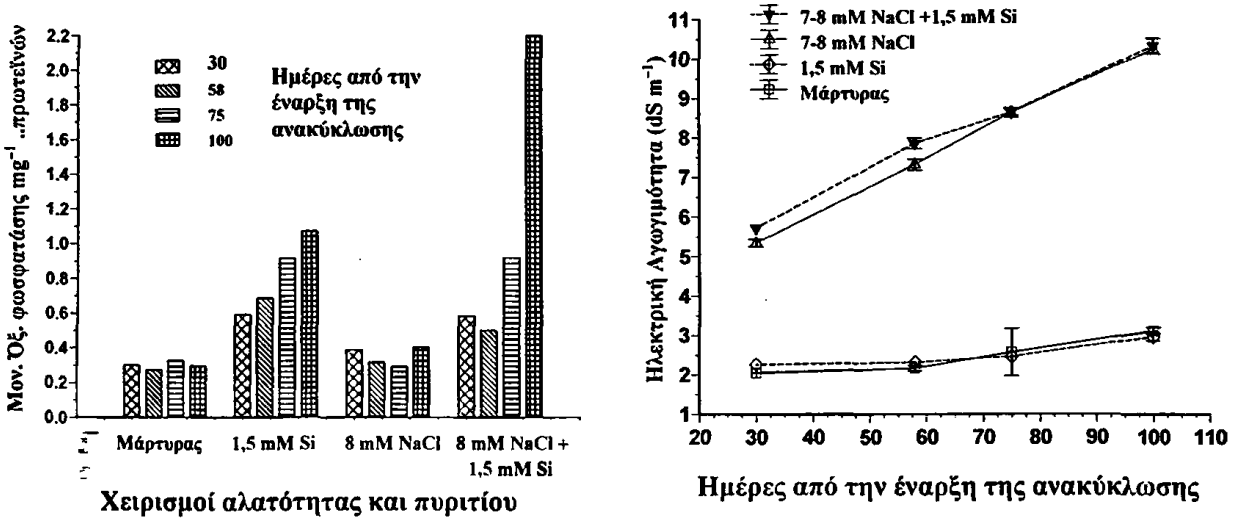
Συνεπώς όλα αυτά χρήζουν περαιτέρω διερεύνησης σε μελοντικές μελέτες, ώστε να καταλήξουμε σε ασφαλή συμπεράσματα για το λόγο που στα συγκεκριμένα φυτά κάτω από συνθήκες αυξημένης αλατότητας δεν ανιχνεύτηκε ένα από τα ένζυμα που θεωρείται από τους καθοριστικούς δείκτες εμφάνισης καταπόνησης.

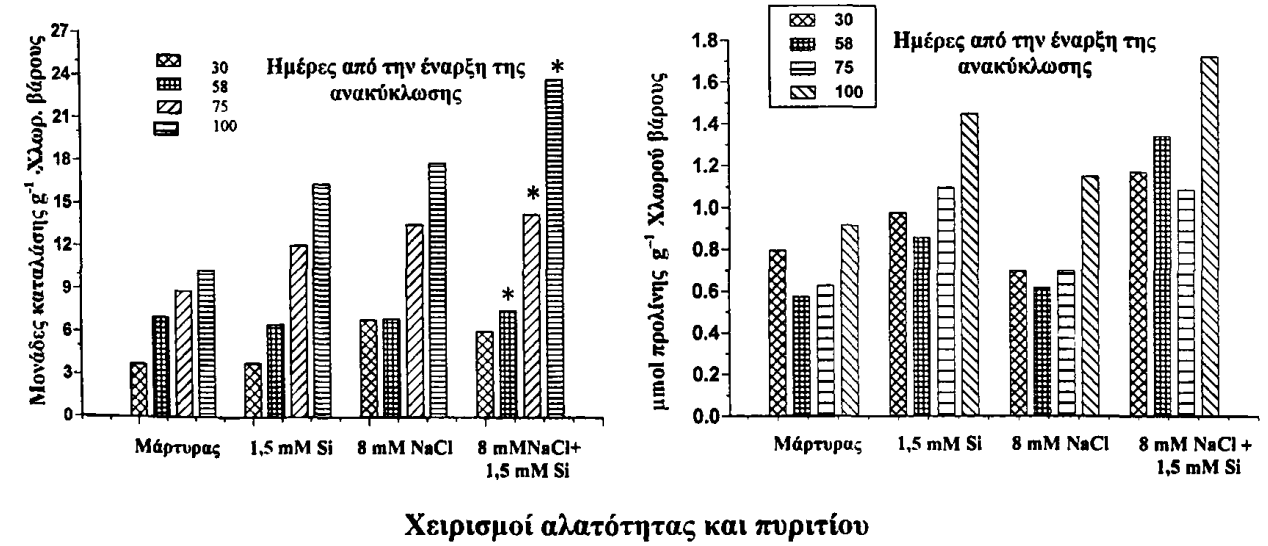
4.7. ΑΝΑΚΕΦΑΛΑΙΩΣΗ



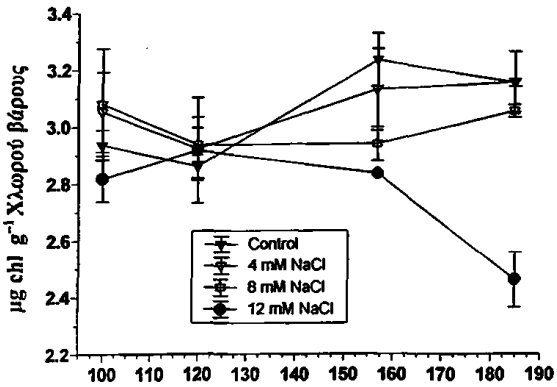
Σχήμα 31. Συνοπτική παρουσίαση των αποτελεσμάτων στο φασόλι.

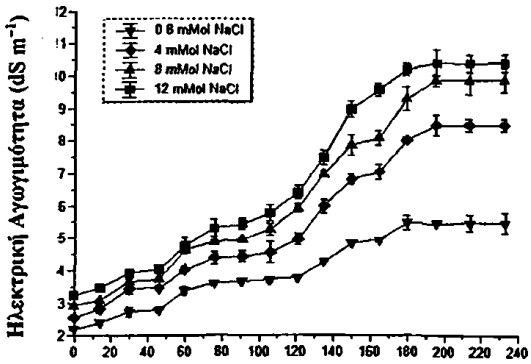




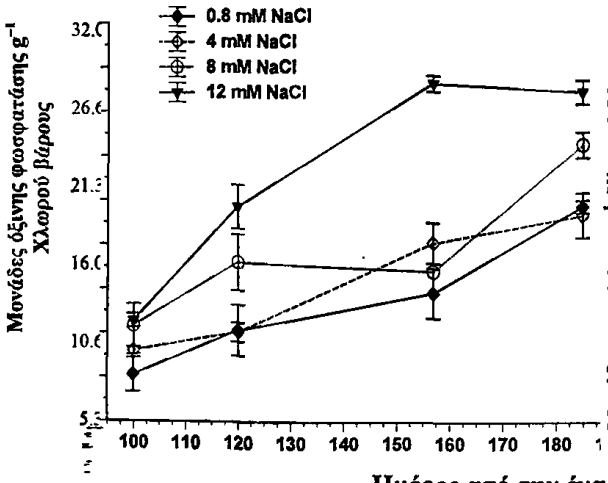


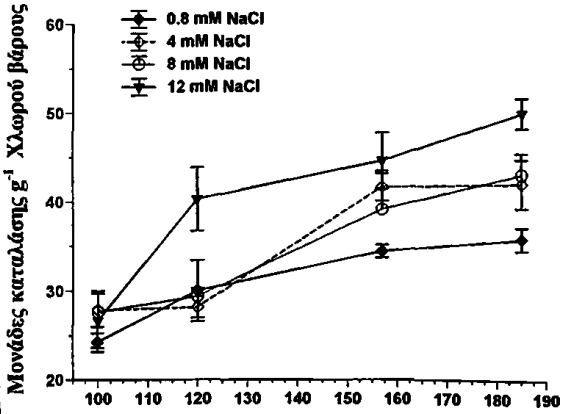
Σχήμα 32. Συνοπτική παρουσίαση των αποτελεσμάτων στο κολοκύθι.



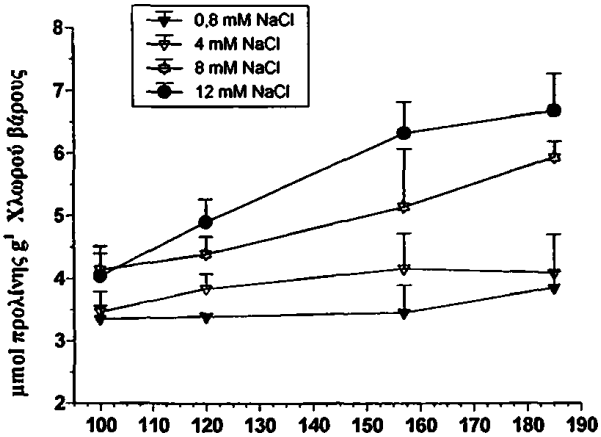


Ημέρες από την έναρξη της ανακύκλωσης





Ημέρες από την έναρξη της ανακύκλωσης



Ημέρες από την έναρξη της ανακύκλωσης

Σχήμα 33. Συνοπτική παρουσίαση των αποτελεσμάτων στην πιπεριά.

5. ΣΥΜΠΕΡΑΣΜΑΤΑ – ΣΥΖΗΤΗΣΗ

5.1. Χλωροφύλλες

Όπως προκύπτει και από τα αποτελέσματα των πειραμάτων, η περιεκτικότητα σε χλωροφύλλες a και b των φύλλων και των τριών φυτών, μειώθηκε στους χειρισμούς που υπήρχε αυξημένη συγκέντρωση NaCl, σε σύγκριση με αυτή των υπολοίπων. Υπάρχει πιθανότητα μικρή μείωση των χλωροφυλλών να οφείλεται και στην αύξηση του πάχους των φύλλων, μορφολογική αλλαγή που συμβαίνει σε πολλά φυτά που στρεσάρονται από την αυξημένη αλατότητα, όταν οι μετρήσεις γίνονται σε mg ανά g χλωρού βάρους (Greenway and Munns, 1980).

Μείωση των χλωροφυλλών στη πιπεριά σε συνθήκες αυξημένης αλατότητας έχει αναφερθεί και από τους (Bethke and Drew, 1992; Kaya et al. 2001; Gunes et al. 1996).

Οι Seeman και Critchley (1985), βρήκαν μια αρνητική σχέση μεταξύ της χλωροφύλλης και των συγκεντρώσεων Cl στα φύλλα του φασολιού και κατέληξαν στο συμπέρασμα ότι τα μειωμένα επίπεδα χλωροφύλλης με την αυξανόμενη αλατότητα μπορούν να αφορούν τη μείωση της φωτοσυνθετικής ικανότητας των φυτών. Η μείωση της περιεκτικότητας των φύλλων σε χλωροφύλλη, σε συνθήκες αυξημένης αλατότητας, μπορεί να οφείλεται στην χαλάρωση των συμπλεγμάτων των πρωτεϊνών-χρωστικών-λιπιδίων ή την αυξημένη δραστικότητα της χλωροφυλλάσης (Gunes et al. 1996).

5.2. Προλίνη

Τα φυτά συσσωρεύουν σε μεγαλύτερο ποσοστό προλινη από τα άλλα αμινοξέα στο εσωτερικό του, σε απάντηση στην αύξηση της αλατότητας στο εξωτερικό περιβάλλον. Η σύνθεση της προλίνης, όπως προκύπτει και από τα αποτελέσματα, είναι μια συγκεκριμένη απάντηση των φυτών στην καταπόνηση λόγω αλατότητας. Η προλίνη ρυθμίζει την συσσώρευση του αζώτου, συμβάλει στην σταθερότητα των μεμβρανών και μετριάζει τις δυσμενείς επιπτώσεις που έχει επίδραση του NaCl στην διάσπαση των κυτταρικών μεμβρανών (Mansour, 1998). Ακόμη και σε υψηλές συγκεντρώσεις δεν φαίνεται να επηρεάζει την ενζυμική δραστικότητα ούτε στο κολοκύθι ούτε στην πιπεριά.

Οι Maggio et al. (2002), υποστηρίζουν πως η προλίνη μπορεί να ενεργήσει ως ρυθμιστικό μόριο, σηματοδότης, ικανό να ενεργοποιήσει πολλαπλές απαντήσεις του κυττάρου ως στοιχείο της διαδικασίας προσαρμογής.

Στην πιπεριά η μεγαλύτερη αύξηση της συγκέντρωσης προλίνης παρατηρήθηκε στην μεταχείριση όπου στο θρεπτικό διάλυμα το NaCl βρίσκονταν σε μεγαλύτερη συγκέντρωση. Οι Gunes et al. το 1996 καταλήγουν στο ίδιο συμπέρασμα για την πιπεριά, υποστηρίζοντας πως η συσσώρευση της προλίνης, εξασφαλίζει στα φυτικά κύτταρα σταθεροποίηση των πρωτεϊνών και ωσμορύθμιση.

Μια σημαντική παράμετρος που εμφανίζεται στα αποτελέσματα στο κολοκύθι είναι η συσχέτιση της συσσώρευσης της προλίνης, στα νέα φύλλα, με την παρουσία πυριτίου στο θρεπτικό διάλυμα. Οι Aroiee et al. (2005), βρήκαν πως η ελεύθερη προλίνη αυξάνεται στο κολοκύθι όταν τα φυτά εκτεθούν σε υψηλά επίπεδα NaCl.

5.3. Όξινη φωσφατάση

Τα αποτελέσματα για την όσο αφορά την όξινη φωσφατάση δείχνουν μια σημαντική αύξηση της δραστικότητας του ενζύμου στις μεταχειρίσεις με την αυξημένη αλατότητα στο διάλυμα τροφοδοσίας. Εξαίρεση ίσως αποτελεί η πορεία της δραστικότητας του ενζύμου τις τελευταίες μέρες της καλλιέργειας στο φασόλι όπου παρατηρείται μείωση χωρίς να σχετίζεται με την συγκέντρωση του NaCl στο θρεπτικό διάλυμα. Ο Shih and Kao το 1998 απέδειξαν πως η δραστικότητα της όξινης φωσφατάσης αυξάνεται σε αυξημένα επίπεδα αλατότητας στο ρύζι ενώ υπάρχουν μελέτες που αναφέρουν πως η αύξηση της δραστικότητας της ΟΦ σχετίζεται με χαμηλά επίπεδα φωσφόρου, σε πολλά είδη και μέρη φυτών (Barrett-Lennard et al. 1982; Duff et al. 1989; Goldstein et al. 1989; Lefebvre et al. 1990; Ueki and Sato, 1977).

5.4. Καταλάση

Στο φασόλι η δραστικότητας της καταλάσης εμφανίζεται να αυξάνει ραγδαία από την 87^{η} ημέρα και ως το τέλος της καλλιέργειας όταν ηλεκτρική αγωγιμότητα σταθεροποιείται σε υψηλά επίπεδα. Από τα αποτελέσματα φαίνεται πως υπάρχει ένα κρίσιμο όριο όσο αφορά την τιμή της ηλεκτρικής αγωγιμότητας, αλλά και του χρόνου, πέρα του οποίου η δραστικότητα του ενζύμου αυξάνεται σημαντικά. Πιθανόν το όριο αυτό, να σχετίζεται και με άλλες παραμέτρους της καλλιέργειας.

Τα αποτελέσματα στο κολοκύθι δεν συμφωνούν με αυτά των Zhu, et al. το 2004, για το αγγούρι όπου σπορόφυτα δέκα μέρες μετά την βλάστηση εμφάνισαν μείωση της καταλάσης στην μεταχείριση με τη αυξημένη αλατότητα. Η μικρή αύξηση της δραστικότητας της καταλάσης παρουσία Si, ακόμη και στην μεταχείριση με την χαμηλή συγκέντρωση NaCl στο θρεπτικό διάλυμα, παραπέμπει στο ότι το Si, προάγει τη δραστικότητα του ενζύμου. Ο Liang το 2003 αναφέρει ότι η προσθήκη εξωγενώς Si αύξησε σημαντικά την δραστηριότητα της καταλάσης σε φυτά κριθαριού.

Στην πιπεριά η αύξηση της δραστικότητα της καταλάσης, είναι ανάλογη της αύξησης της ηλεκτρικής αγωγιμότητας του διαλύματος απορροής, κυρίως για τις μεταχειρίσεις με την μεγαλύτερη και μικρότερη συγκέντρωση NaCl στο θρεπτικό διάλυμα. Η αύξηση της δραστικότητα του εζύμου στην πιπεριά είναι ομαλότερη αυτής στο φασόλι.

Σύμφωνα με τους Scandalios 1993 η καταλάση και η υπεροξιδάση είναι τα σημαντικότερα ένζυμα για την προστασία των φυτικών κυττάρων από τις αρνητικές επιπτώσεις των ROS. Επίσης οι Azevedo Neto et al. το 2006 καταλήγουν στο ότι η καταλάση και η υπεροξιδάση είναι τα πιο σημαντικά ένζυμα για την απόσβεση του H_2O_2 στα φύλλα του καλαμποκιού.

5.5. Πυρίτιο

Η προσθήκη του Si στο θρεπτικό διάλυμα στην καλλιέργεια του κολοκυθιού αύξησε σημαντικά τη δραστικότητα της καταλάσης και της όξινης φωσφατάσης. Αυξημένη ήταν και η προλίνη στις μεταχειρίσεις με το πυρίτιο ανεξάρτητα από το στρεσάρισμα των φυτών από την αλατότητα, αποτέλεσμα το οποίο δείχνει σε πρώτη φάση, ότι προάγεται η συγκέντρωση της προλίνης. Το αποτέλεσμα χρήζει περεταίρω μελέτης μιας και μπορεί σε αυτό να οφείλεται η αποτελεσματικότερη δράση του μηχανισμού ανοχής των φυτών στην καταπόνηση από αλατότητα. Η σημαντική αύξηση στα αντιοξειδωτικά ένζυμα των στρεσαρισμένων από την αλατότητα φύλλων, από την προσθήκη Si προτείνει ότι το Si μπορεί να συμμετέχει στη μεταβολική ή στη φυσιολογική δραστηριότητα του κολοκυθιού που εκτίθεται στο στρες λόγω αλατότητας. Το Si μπορεί να ενεργήσει για να ανακουφίσει το στρες στο κολοκύθι με τη διατήρηση της ομαλής λειτουργίας των μεμβρανών, όπως την μείωση της διαπερατότητας των μεμβρανών του πλάσματος και της υπεροξείδωσης των λιπιδίων (Liang, 1999;). Έχει επίσης αναφερθεί πως το πυρίτιο επιδρά σε ορισμένες βιοχημικές

ρυθμίσεις προτείνοντας, πως φυτά που αναπτύσσονται σε υπόστρωμα με αυξημένο πυρίτιο, ενεργοποιούν σε μεγαλύτερο βαθμό τον μεταβολισμό του κυττάρου για την απόσβεση των ROS (Liang, 1999;). Ο Liang το 1999 υποστηρίζει πως η επίδραση αυτή, φαίνεται να σχετίζεται κυρίως με το γεγονός ότι το πυρίτιο μειώνει τον ρυθμό απορρόφησης του νατρίου στα φυτά. Αυτό σημαίνει ότι το πυρίτιο απαλύνει τα συμπτώματα της αλατότητας μόνο σε περίπτωση που αυτή οφείλεται σε NaCl ενώ δεν ασκεί κανένα προστατευτικό ρόλο έναντι υπερβολικών συγκεντρώσεων θρεπτικών στοιχείων.

Η βελτίωση της ανοχής των φυτών στην καταπόνηση λόγω αλατότητας από την προσθήκη του Si έχει αναφερθεί στο κριθάρι (Liang et al. 1996, Liang, 1998; Liang, 1999; Liang et al. 2003), στο ρύζι (Matoh et al. 1986), στο σιτάρι (Ahmad et al. 1992) και στην ντομάτα (Aghabary et al. 2004). Τα παρουσιαζόμενα αποτελέσμα τα της παρούσας μελέτης είναι σύμφωνα με τα προηγούμενα συμπεράσματα.

Η ανάπτυξη των στρεσαρισμένων από την αλατότητα φυτών της κολοκυθιάς βελτιώθηκε σημαντικά από την προσθήκη του Si. Αναφέρεται επίσης, ότι η βελτίωση της ανοχής των φυτών στην καταπόνηση λόγω αλατότητας από την προσθήκη Si οφείλεται, στη μείωση της περιεκτικότητας σε Na^+, στο βλαστό του ρυζιού (Matoh et al. 1986; Yeo et al. 1999) και του κριθαριού (Liang, 1999) και στην ενισχυμένη της πρόσληψης K^+ στο κριθάρι (Liang et al. 1996) ενώ βελτίωσε τον ρυθμό της φωτοσύνθεσης στο κριθάρι και στην ντομάτα (Liang, 1998; Aghabary et al. 2004).

ΣΥΝΤΟΜΟΓΡΑΦΙΕΣ

ABA	Αποσκισικό ή αψιζινικό ή αφοριστικό οξύ
Abs	Absorbance (απορρόφηση)
APO	Περοξειδάση του ασκορβικού
ATP	Τριφωσφορική αδενοσίνη
BSA	Bovine Serum Albumin /Λευκωματίνη βόειου ορού
CAT	Καταλάση
Cis	Διαμόρφωση πεπτιδικού δεσμού (cis-trans)
Dhn	Πρωτεΐνη ωσμωτικής καταπόνησης
DMSO	Διμεθυλο-σουλφοξείδιο
EC	Ηλεκτρική αγωγιμότητα
EDTA	Αιθυλενοδιαμινοτετραοξικό οξύ
GSH	Γλουταθείο
HR	Hypersensitivity reaction / Αντίδραση υπερευαισθησίας
IgG	Ανοσοσφαιρίνη Γ
LEA	Πρωτεΐνη ωσμωτικής καταπόνησης
NADP	Φωσφορικό νικοτιναμιδο-αδενινο-δινουκλεοτίδιο (οξειδωμένη μορφή)
NPP	Π-νιτροφαινυλοφωσφορικός εστέρας
OSM	Πρωτεΐνη ωσμωτικής καταπόνησης
PBS	Φωσφορικό ρυθμιστικό διάλυμα / Phosphate Buffered Saline
Pro	Προλίνη
PSII	Φωτοσύστημα ΙΙ της χλωροπλάστες
PVP	Polyvinylpyrrolidone / Πολύ-βινιλο-πυρρολιδόνη
ROS	Reactive oxygen species, αντιδραστικές οντότητες οξυγόνου,
Rubisco	Διφωσφορική καρβοξυλάση/οξυγενάση της ρυβουλόζης
SOD	Δισμουτάσες του σουπεροξειδίου
HKT1	Μεταφορέας υψηλής συγγένειας K^+
ΟΦ	Όξινη φωσφατάση
P_i	Ανόργανο ορθοφωσφορικό
POD	Υπεροξειδάση
Tris	Τρις (υδροξυμεθυλ) αμινομεθάνιο

ΒΙΒΛΙΟΓΡΑΦΙΑ

Ahmad, R., Zaheer, S.H. and S. Ismail, 1992. Role of silicon in salt tolerance of wheat (*Triticum aestivum* L.), *Plant Sci.* 85: 43–50.

Al-Aghabary, K., Zhu, Z.J. and Q.H. Shi, 2004. Influence of silicon supply on chlorophyll content, chlorophyll fluorescence and antioxidative enzyme activities in tomato plants under salt stress, *J. Plant Nutr.* 27.

Allakhverdiev, S.I, Sakamoto, A., Nishiyama, Y., Inaba, M. and N. Murata, 2000. Ionic and osmotic effects of NaCl-induced inactivation of photosystems I and II in *Synechococcus* sp. *Plant Physiol.* 123: 1047-1056.

Amaya., I., Botella, M.A., Calle, M., Medina, M.I., Heredia, A., Bressan, R.A., Hasegawa, P.M., Quesada, M.A. and V. Valpuesta, 1999. Improved germination under osmotic stress of tobacco plants overexpressing a cell wall peroxidase. *FEBS Lett* 457: 80-84.

Aroiee, H., Azizi, M. and R. Omibaigi, 2005. Effect of salinity and nitrogen nutrition on free proline and seed oil content of medicinal pumpikin (*Cucurbita pepo* Subsp *pepo* convar *pepo* Var. styriaca). *Acta Hort.* (ISHS) 676: 45-51.

Ashraf, M. and P.J.C., Harris, 2004. Potential biochemical indicators of salinity tolerance in plants. *Plant Science.* 166: 3-6.

Barnes, J.D., L. Balaguer, E. Manrique, S., Elvira and A.W. Davison, 1992. A reappraisal of the use of DMSO for the extraction and determination of chlorophylls *a* and *b* in lichens and higher plants. *Environmental Experimental Botany* 32: 85-100.

Barrett-Lennard, E.G., Robson, A.D. and H. Greenway, 1982. Effect of phosphorus deficiency and water deficit on phosphatase activities from wheat leaves. *Journal Experimental Botany.* 33: 682-693.

Bates, L.S., Waldren, R.P. and D. Teare, 1973. Rapid determination of free proline for water stress studies. *Plant and Soil*, 39: 205-297.

Becana, M., Dalton, D.A., Moran, J.F., Iturbe, O.I., Matamoros, M.A. and M.C. Rubio, 2000. Reactive oxygen species and antioxidants in legume nodules. *Physiologia Plantarum.* 109: 372–381.

Berg, J.M., Tymoczko, L.J. end L., Stryer, 2004. Βιοχημεία, Τόμος 1, έκδοση 5η, *Πανεπιστημιακές Εκδόσεις Κρήτης*. Σελ.:591-596

Bethke, P.C. and M.C. Drew, 1992. Stomatal and nonstomatal components to inhibition of photosynthesis in leaves of *Capsicum annuum* during progressive exposure to NaCl salinity. *Plant Physiol.* 99: 219–226.

Binzel, M.L., Hasegawa, P.M., Rhodes, D., Handa, S., Handa, A.K. and R.A. Bressan, 1987. Solute accumulation in tobacco cells adapted to NaCl. *Plant Physiol.* 84: 1408-1415.

Blumwald, E., 2000. Sodium transport and salt tolerance in plants. *Current Opinion cell Biol.* 12: 431 -434.

Bor, M., Özdemir, F. and I. Türkan, 2003. The effect of salt stress on lipid peroxidation and antioxidants in leaves of sugar beet *Beta vulgaris* L. and wild beet *Beta maritima* L. *Plant Sci.* 164:77-74.

Boyer, JS., 1982. Plant productiviy and the environment. *Science* 218: 443-448

Bradford, M.M., 1976. A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. *Anal. Biochem.* 72: 248–254.

Brady, C.J., Gibson, T.S., Barlow, E.W.R., Spiers, J. and R.G. Wyn Jones, 1984. Salt tolerance in plants. I. Ions, compatible solutes and the stability of plant ribosomes. *Plant, Cell and Environ.* 7: 571-578.

Chartzoulakis, K. and G. Klapaki, 2000. Response of two greenhouse pepper hybrids to NaCl salinity during different growth stages. *Scientia Horticulturae.* 86: 247-260.

Clark, M.J. and R.L. Switzer, 1992. Experimental Biochemistry, *Πανεπιστημιακές Εκδόσεις Κρήτης,* σελ. 97-100.

Dasgan, H.Y., Aktas, H., Abak, K. and I. Cakmak, 2002. Determination of screening techniques to salinity tolerance in tomatoes and investigation of genotype responses. *Plant Sci.* 163: 695-703.

Davies, K.J.A., 1967. Protein damage and degradation by oxygen radicals I. General aspects, *J. Biol. Chem.* 262: 9895-9901.

Dawson, J.H., 1988. Probing structure-function relations in heme-containing oxygenases and peroxidases. *Science* 240: 433-439.

De Azevedo Neto, A.D., Prisco, J.T., Enéas-Filho, J., Abreu, C.E.and E. Gomes-Filho, 2006. Effect of salt stress on antioxidative enzymes and lipid peroxidation in leaves and roots of salt-tolerant and salt-sensitive maize genotypes, *Environmental and Experimental Botany,* 56: 87-94.

Delauney A.J. and D.R.S. Verma, 1993. Proline biosynthesis and osmoregulation in plants. Plant J. 4: 215-223.

del Rio, L.A., Corpas, F.J., Sandalio, L.M., Palma, J.M., Gomez, M. and J.B. Barroso, 2002. Reactive oxygen species, antioxidant systems and nitric oxide in peroxisomes. *Journal of Experimental Botany* 53: 1255–1272.

Dionisio-Sese, M.L. and S. Tobita, 1998. Antioxidant responses of rice seedlings to salinity stress. *Plant Science*, 135:1-9.

Duff, S.M.G., Moorhead, G.B.G., Lefebvre, D.D. and W.C. Plaxton, 1989. Phosphate starvation inducible `bypass' of adenylate and phosphate dependent glycolytic enzymes in *Brassica nigra* suspension cells. *Plant Physiol.* 90: 1275-1278.

Ehsanpour, A.A. and F. Amini, 2003. Effect of salt and drought stress on acid phosphatase activities in alfalfa (*Medicago sativa* L.) explants under in vitro culture. *African Journal of Biotechnology* 2: 133-135.

Epstein, E. 1999. Silicon. *Annu. Rev. Plant Physiol. Plant Mol. Biol.* 50: 641–664.

Feierabend, J. and S. Engel, 1986. Photoinactivation of catalase in vitro and in leaves. *Arch Biochem Biophys.* 251: 567-576.

Feierabend, J., Schaan, C. and B. Hertwig, 1992. Photoinactivation of catalase occurs under both high- and low-temperature stress conditions and accompanies photoinhibition of photosystem II. *Plant Physiol.* 100: 1554-1561.

Foyer, C.H. and B. Halliwell, 1976. The presence of glutathione and glutathione reductase in chloroplasts: a proposed role in ascorbic acid metabolism. *Planta* 133: 21-25.

Foyer, C.H. and G. Noctor, 2000. Oxygen processing in photosynthesis: regulation and signaling. *New Phytol.* 146: 359–388.

Foyer, C.H., Lelandais, M. and K.J. Kunert, 1994. Photooxidative stress in plants. *Physiol. Plant.* 92: 696–717.

Foyer, C.H., Rowell, J. and D. Walker, 1983. Measurement of the ascorbate content of spinach leaf protoplasts and chloroplasts during illumination. *Planta.* 157: 239–244.

Fridovich, I., 1986. Biological effects of the superoxide radical. *Arch. Biochem. Biophys.* 247 1-11.

Fryer, M.J. 1992. The antioxidant effects of thylakoid vitamin E (a-tocopherol). *Plant Cell Environ.* 15: 381-392.

Gisbert, C., Rus, A.M., Bolarin, M.C., Lopez-Coronado, J.M., Arrillaga, I., Montesinos, C., Caro, M., Serrano, R. and V. Moreno, 2000. The yeast HAL1 gene improves salt tolerance of transgenic tomato. *Plant Physiol.* 123: 393-402.

Goldstein, A.H., Baertlein, D., and A. Danon, 1989. Phosphate starvation stress as an experimental system for molecular analysis. *Plant Mol. Biol. Rep.* 7: 7-16.

Gomez, I., Navvaro Pedreno, J., Moral, L., Iborra, M.R., Palacios, G. and J. Mataix, 1996. Salinity and nitrogen fertilization affecting the macro-nutrient content and yield of sweet pepper plants. *J. Plant Nutr.* 19: 353–359.

Gould, S.J., Keller, G.A. and S. Subramani, 1988. Identification of peroxisomal targeting signals located at the carboxy terminus of four peroxisomal proteins. *J Cell Biol.* 107: 897–905.

Greenway, H. and H. Munns, 1980. Mechanisms of salt tolerance in nonhalophytes. *Ann. Rev. Plant Physiol.* 31: 149–190.

Gunes, A., Inal, A., and M. Alpastan,1996. Effect of salinity on stomatal resistance, proline and mineral composition of peper. *Journal of Plant Nutrition* 19: 389-398.

Halliwell, B. and J.M.C. Gutteridge, 1989. Free Radicals in Biology and Medicine. *Clarendon Press*, Oxford

Hare, P.D. and W.A. Cress, 1997. Metabolic implications of stress-induced proline accumulation in plants. *Plant Growth Regulation.* 21: 79-102.

Hare, P.D., Cress, and J. van Staden, 1998. Dissecting the roles of osmolyte accumulation during stress. *Plant Cell Envir.* 21: 535-553.

Hare, P.D., Cress, W.A. and J. van Staden, 1999. Proline synthesis and degradation: a model system for elucidating stress-related signal transduction. *Journal of Experimental Botany* 50, 413–434.

Hasegawa, P.M., Bressan, R.A., Zhu, J-K. and HJ. Bohnert, 2000. Plant cellular and molecular responses to high salinity. *Ann.Rev. Plant Physiol. Plant Mol. Biol.* 51:463-499.

Havir, E.A. and N.A. McHale, 1987. Biochemical and developmental characterization of multiple forms of catalase in tobacco leaves. *Plant Physicil* 84: 450-455.

Hertwig, B., Streb, P. and J. Feierabend, 1992. Light dependence of catalase synthesis and degradation in leaves and the influence of interfering stress conditions. *Plant Physiology*, 100: 1547-1553.

Hiscox, J.D., and G. Israelstam, 1979. A method for the extraction of chlorophyll from leaf tissue without leaf maceration. *Can. J. Bot.* 57: 1332-1334.

Hooley, R., 1984. Gibberellic acid controls the secretion of acid phosphatase in aleurone layers and isolated aleurone protoplasts of *Avena fatua. Journal Experimental Botany* 35: 822-828.

Jian -Kang Zhu, 2001. Plant salt tolerance. Review Article *Trends in Plant Science* 6: 66-71.

Kanazawa, S., Sano, S., Koshiba, T. and T. Ushimaru, 2000. Changes in antioxidative in cucumber cotyledons during natural senescence: comparison with those during dark-induced senescence. *Physiol. Plant.* 109: 211–216.

Ketchum, R.E.B., Warren, R.C., Klima, L.J., Lopez-Gutierrez, F. and M.W. Nabors, 1991. The mechanism and regulation of proline accumulation in suspension cultures of the halophytic grass *Distichlis spicata* L. *J. Plant Physiol.* 137: 368-374.

Lamb, J.E., Riezman, H., Becker, W.M. and C.M. Leaver, 1978. Regulation of glyoxysomal enzymes during germination of cucumber. *Plant Physiol.* 62: 754–760.

Law, M.Y., Charles, S.A. and B. Halliwell, 1983. Glutathione and ascorbic acid in spinach (*Spinacia oleracea*) chloroplasts. *Biochem J.* 210: 899-903.

Lebēda, A., Janèová, D. and L. Luhová, 1999. Enzymes in fungal plant pathogenesis. *Phyton-Ann. Rei Bot.* 39: 51–56.

Lefebvre, D.D., Duff, S.M.G., Fife., C., Julien-Inalsingh, C., and W.C. Plaxton, 1990. Response to phosphate deprivation in Brassica nigra suspension cells. Enhancement of intracellular, cell surface and secreted phosphatase activities compared to increase in Pi-absorption rate. *Plant Physiol.* 93: 504-511.

Lefevre, I., Gratia, E. and S. Lutts, 2001. Discrimination between the ionic and osmotic components of salt stress in relation to free polyamine level in Rice *(Oryza stiva). Plant Sci.* 161: 943-952.

Liang, Y.C., 1998. Effects of silicon on leaf ultrastructure, chlorophyll content and photosynthetic activity in barley under salt stress, *Pedosphere* 8: 289–296.

Liang, Y.C., 1999. Effects of silicon on enzyme activity and sodium, potassium and calcium concentration in barely under salt stress. *Plant Soil* 29: 217–224.

Liang, Y.C., Chen, Q., Liu, Q., Zhang, W.H. and R.X. Ding, 2003. Exogenous silicon (Si) increases antioxidant enzyme activity and reduces lipid peroxidation in roots of salt-stressed barley (*Hordeum vulgare* L.). *J. Plant Physiol.* 160: 1157–1164.

Liang, Y.C., Shen, Q.R. Shen, Z.G. and T.S. Ma, 1996. Effects of silicon on salinity tolerance of two barely cultivars, J. Plant Nutr. 19: 173–183.

Lima, G.P.P., Rossi, C. and D.M.R. Hakvoort, 1997. Atividade de peroxidases (E.C. 1.11.1.7) e teor de prolina no embriâo e cotiledones de feljoeiro *Phaseolus vulgaris* L. cultivado em condicoes de salinidade. *Scientia Agricola*, vol.54 n.3.

Lin, C.C. and C.H. Kao, 1996. Proline accumulation is associated with inhibition of rice seedling root growth caused by NaCl. *Plant Sci.*114: 121–128.

Lin, C.C. and C.H. Kao, 1999. NaCl induced changes in ionically bound peroxidase activity in roots ofrice seedlings. *Plant and Soil* 216: 147–153.

Lin, C.C. and C.H. Kao, 2000. Effect of NaCl stress on H_2O_2 metabolism in rice leaves. *Plant Growth Regul.* 30: 151–155.

Low, P.S. and J.R. Merida, 1996. The oxidative burst in plant defense: Function and signal transduction. *Physiol Plant* 96: 533–542.

Luhová L., Janèová D., Frébort I., Lebeda A., Šebela M., Køístková E. ahd P. Peè, 1999. Amine oxidase, peroxidase, catalase and acid phosphatase activities in powdery mildew infected plants of Cucumis sativus. *Phyton-Ann. Rei Bot.*, 39: 235–241.

Ma, J.F., 2004. Role of silicon in enhancing the resistance of plants to biotic and abiotic stresses. *Soil Sci. Plant Nutr.*, 50: 11–18.

Ma, J.F., Tamai, K., Yamaji, N., Mitani, N., Konishi, S., Katsuhara, M., Ishiguro, M., Murata, Y. and M. Yano, 2006. *A* silicon transporter in rice *Nature* 440: 688-691.

Maas, E.V. and G.J., Hoffman, 1977. Crop salt tolerance - current assessment. *J. Irrig. Drain. Div. ASCE* 103: 115–134.

Maggio, A., Miyazaki, S., Veronese, P., Fujita, T., Ibeas, J.I., Dasm, B., Narasimhan, M.L., Hasegawa, P.M., Joly, R.J. and R.A. Bressan, 2002. Does proline accumulation play an active role in stress-induced growth reduction? *The Plant Journal*. 31: 699-712.

Mansour, M.M.F., 1998. Protection of plasma membrane of onion epidermal cells by glycinbetaine and proline against NaCl stress. *Plant Physiol. Biochem.*, 36: 767-772.

Maribel, L., Dionisio-Sese and S. Tobita, 1998. Antioxidant responses of rice seedlings to salinity stress. *Plant Science* 135: 1-9.

Matoh, T., Kairusmee, P. and E. Takahashi, 1986. Salt-induced damage to rice plants and alleviation effect of silicate, *Soil Sci. Plant Nutr.* 32: 295–304.

Mehdy MC., 1994. Active oxygen species in plant defense against pathogens. *Plant Physiol.* 105: 467–472.

Nakano, Y. and K. Asada, 1981. Hydrogen peroxide is scavenged by ascorbate-specific peroxidase in spinach chloroplasts. *Plant and Cell Physiology* 22: 867–880.

Neill, S.J., Desikan, R., Hurst, R.D. and J.T. Hancock, 2002. Hydrogen peroxide and nitric oxide as signallin molecules in plants. *J. Exp. Bot.* 53: 1237-1247.

Normanly, J., Slovin, J.P. and J.D. Cohen, 1995. Rethinking auxin biosynthesis and metabolism. *Plant Physiol.* 107: 323–329.

Okuma, E., Soeda, K., Tada, M. and Y. Murata, 2000. Exogenous proline mitigates the inhibition of growth of *Nicotiana tabacum* cultured cells under saline conditions. *Soil Science and Plant Nutrition* 46: 257–263.

Olmos, E. and E. Hellin, 1997. Cytochemical localization of ATpase plasma membrane and acid phosphatase by cerium based in a salt-adapted cell line of *Pisum sativum. J. Exp. Bot.* 48: 1529-1535.

Olmos, E., Hemandez, J.A., Sevilla, F. and E. Hellin, 1994. Induction of several antioxidant enzymes in the selection of a salt-tolerant cell line of *Pisum sativum. J. Plant Physiol.* 144: 594–598.

Pahlich, E., Kerres, R. and H-J. Jager, 1983. Influence of water stress on the vacuole/extravacuole distribution of proline in protoplasts of *Nicotiana rustica. Plant Physiol.* 72: 590-591.

Paleg, L.G., Stewart, G.R, and J.W. Bradbeer, 1984. Proline and glycine betaine influence protein solvation. *Plant Physiol.* 75: 974-978

Pan, S., 1987. Characterization of multiple acid phosphatases in salt stressed spinach leaves. *Aust J Plant Physiol.* 14: 117–124

Plaut, Z., 1997. Irrigation with low-quality water: effects on productivity, fruit quality and physiological processes of vegetable crops. *Acta Horticultural* 449: 591-597.

Pollard, A. and R.G. Wyn Jones, 1979. Enzyme activities in concentrated solutions of glycinebetaine and other solutes. *Planta* 144: 291-298.

Porra, R.J., Thompson, W.A. and P.E. Kriedmann, 1989. Determination of accurate extinction coefficients and simultaneous equations for assaying chlorophylls a and b extracted with four different sovents: verification of the concentration of chlorophyll standards by atomic absorption spectroscopy. *Biochem. Biophys. Acta* 975:384.

Rajguru, S.N., Banks, S.W., Gossett, D.R., Lucas, M.C., and E.P. Millhollon, 1999. Antioxidant response to salt stress during fiber development in cotton ovules. *The Journal of Cotton Science*. 3: 11-18.

Raskin, I. and H. Kende, 1993. How Does Deep Water Rice Solve Its Aeration Problem, *Plant physiol* 72: 447-454.

Rennenberg, H., 1982. Glutathione metabolism and possible biological roles in higher plants, *Phytochemistry* 21: 2771-2781.

Rhodes, D., 1987. Metabolic responses to stress. In "The Biochemistry of Plants" (DD Davies ed), Vol. 12, *Academic Press, New York*, pp. 201-241.

Roberts, E., Kutchan, T. and P.E. Kolattukudy, 1988. Cloning and sequencing of cDNA for a highly anionic peroxidase from potato and the induction of its mRNA in suberizing potato tubers and tomato fruits. *Plant Mol Biol.* 11: 15-26.

Rudolph, A.S., Crowe, J.H. and L.M. Crowe, 1986. Effects of three stabilizing agents - proline, betaine and trehalose - on membrane phospholipids. *Arch. Biochem. Biophys*. 245: 134-143.

Samaras, Y., Bressan, R.A., Csonka, L.N., Gracia-Rios, M.G., Paino D'Urzo, M. and D. Rhodes, 1995. Proline accumulation during drought and salinity. In: Smirnoff N, ed. *Environment and plant metabolism: flexibility and accumulation*. Oxford, UK: BIOS Scientific Publishers, 161–187.

Santarius, K.A, 1992. Freezing of isolated thylakoid membranes in complex media. VIII. Differential cryoprotection by sucrose, proline and glycerol. *Physiol. Plant*. 84: 87-93.

Santoro, M.M., Liu, Y., Khan, S.M.A., Hou, L-X. and D.W. Bolen, 1992. Increased thermal stability of proteins in the presence of naturally occurring osmolytes. Biochemistry 31: 5278-5283.

Saranga, Y., Rhodes, D. and J. Janick, 1992. Changes in amino acid composition associated with tolerance to partial desiccation of celery somatic embryos. *Journal of the American Society for Horticultural Science* 117: 337–341

Savas , D. and G. Manos, 1999. Automated composition control of nutrient solution in closed soilless culture systems. *J. Agric. Eng. Res.* 73: 29-33.

Savvas, D. and F. Lenz, 2000. Effects of NaCl or nutrient-induced salinity on growth, yield, and composition of eggplants grown in rockwool. *Scientia Horticulturae* 84: 37-47.

Savvas, D. and K. Adamidis, 1999. Automated management of nutrient solutions based on target electrical conductivity, pH, and nutrient concentration ratios. *J. Plant Nutr.* 22: 1415 – 1432.

Savvas, D., 2001. Nutritional management of vegetables and ornamental plants in hydroponics. In: Dris, R., Niskanen, R. and S.M. Jain (Eds). *Crop management and postharvest handling of horticultural products. Vol. I Quality management. Science publishers,* Enfield, NH., USA..

Savvas, D., 2002. Automated replenishment of recycled greenhouse effluents with individual nutrients in hydroponics by means of two alternative models. *Bio. Eng.* 83: 225 – 236.

Savvas, D., Kotsiras, A., Meletiou, G., Margariti, S. and I. Tsirogiannis, 2005b. Modeling the relationship between water uptake by cucumber and NaCl accumulation in a closed hydroponic system. *HortScience* 40: 802 – 807.

Savvas, D., Manos, G., Kotsiras, A. and S. Souvaliotis, 2002. Effects of silicon and nutrient-induced salinity on yield, flower quality, and nutrient uptake of gerbera grown in a closed hydroponic system. *Journal of Applied Botany,* 76: 153-158.

Savvas, D., Pappa, V.A., Gizas, G. and A. Kotsiras, 2005a. NaCl accumulation in a cucumber crop grown in a completely closed hydroponic system as influenced by NaCl concentration in irrigation water. *European J. Hort. Sci.* 70: 217 – 223.

Scandalios J.G., 1993. Oxygen stress and superoxide dismutases. *Plant Physiol.* 101: 7-12.

Scheiffer, S., Tüfel, W., and H., Kindl, 1976. Plant microbody proteins, I. Purification and characterisation of catalase from leaves of *Lens culinaris*. Hoppe-Seyler. Z *Physiol Chem Biol.* 357: 163–175.

Schnabelrauch, L.S., Kieliszewski, M., Upham, B.L., Alizedeh, H., and D.T.A. Lamport, 1996. Isolation of pI 4.6 extensin peroxidase from tomato cell suspension cultures and identification of Val-Tyr-Lys as putative intermolecular cross-link site. *Plant J.* 9: 477–489.

Seemann, J.R., and C. Critchley, 1985. Effects of salt stress on the growth, ion content, stomatal behaviour and photosynthetic capacity of a salt-sensitive species, Phaseolus vulgaris L. *Planta* 164: 151-162.

Shalata, A. and M. Tal, 1998. The effect of salt stress on lipid peroxidation and antioxidants in the leaf of the cultivated tomato and its wild salt-tolerant relative *Lycopersicon pennellii. Physiol. Plant.* 104: 167–174.

Shen, B., Jensen, R.G. and H.J. Bohnert, 1997. Increased resistance to oxidative stress in transgenic plants by targetting mannitol biosynthesis to chloroplasts. *Plant Physiol.* 113: 1177-1183.

Shih, C.Y., and C.H., Kao, 1998. Induction of acid phosphatase in detached rice leaves under stress conditions. *Bot. Bull. Acad. Sin.* 39: 29-32.

Siegel, B.Z., 1993. Plant peroxidases: an organismic perspective. *Plant Growth Regulation* 12: 303-312.

Singh, T.N., Paleg, L.,G., and D Aspinall, 1973. Stress metabolism. I. Nitrogen metabolism and growth in the barley plant during water stress. *Aust J Biol Sci* **26**: 45–56.

Smimoff, N., 1995. Antioxidant systems and plant response to the environment; in *Environment and Plant Metabolism*, Smimoff, N. (ed.), pp 217-243, Bios Scientific Publishers, Oxford, United Kingdom.

Smith, I.K., Kendall, A.C., Keys, A.J., Turner, J.C. and P.J. Lea, 1984. Increased levels of glutathione in a catalase-deficient mutant of barley (*Hordeum vulgare* L.). *Plant Sci Lett*, 37: 29–33.

Soll, J., Schultz, G., Joyard, J., Douce, R. and M. A. Block, 1985. Localization and synthesis of prenylquinones in isolated outer and inner envelope membranes from spinach chloroplasts.*Arch. Biochem. Biophys.* 238: 290-299.

Sonneveld, C. and N. Straver, 1994. Nutrient Solutions for Vegetables and Flowers Grown in Water or Substrates, 10th Edition, Serie: Voedingsoplossingen Glastuinbouw, No. 8, P.B.G. Aalsmeer, The Netherlands, 12 pp.

Sonneveld, C., Voogt, W. and L. Spaans, 1999. A universal algorithm for calculation of nutrient solutions. *Acta Horticulturae* 481: 331-339.

Stewart, G.R. and J.A. Lee, 1974. The role of proline accumulation in halophytes. *Planta* 120: 279-289.

Strack, D. and H.P. Mock, 1993. In "Methods in plant Biochemistry", Vol. 9: Enzymes of Secondary Metabolism (Dey and Harborne, eds), p.p. 87-91. *U.K.Academic press.*

Streb, P., Michael-Knauf, A. and J. Feierabend, 1993. Preferential photoinactivation of catalase and photoinhibition of photosystem II are common early symptoms under various osmotic and chemical stress conditions. *Physiol Plant.* 88: 590-598.

Sussman, M.R., 1994. Molecular analysis of protein in the plasma membrane. Ann. Rev. *Plant Physiol. Plant Mol. Biol.* 45: 211-234.

Szabo-Nagy, A., G., Galiba, and E. Erdei, 1992. Induction of soluble phosphatases under ionic and non-ionic osmotic stress in wheat. *J. Plant Physiol.* 140: 629-633.

Taiz, L. and E. Zeiger, 2002. Plant Physiology. Sinauer Associates, Inc., Sunderland USA, pp: 611-620.

Taylor, C.B, 1996. Proline and water deficit: ups and downs. *Plant Cell* 8: 1221-1224.

Timasheff, S.N., 1993. The control of protein stability and association by weak interactions with water: how do solvents affect these processes? *Annu. Rev. Biophys. Biomol. Struct.* 22: 67-97.

Trotel-Aziz, Patricia, Niogret, Marie-Françoise, Deleu, Carole, Bouchereau, Alain, Aziz, Aziz and François, Robert, Larher, 2003. The control of proline consumption by abscisic acid during osmotic stress recovery of canola leaf discs. *Physiologia Plantarum* 117: 213-221.

Ueki, K. and S. Sato, 1977. Regulation of phosphatase synthesis by orthophosphate in cultured tobacco cells. *Plant Cell Physiol.* 18: 1253-1263.

Vitória, A.P., Lea, P.J. and R.A. Azevedo, 2001. Antioxidant enzymes responses to cadmium in radish tissues. *Phytochemistry* 57: 710–710.

Welinder, K.G., 1992. Superfamily of plant, fungal and bacterial peroxidases. *Curr Opin Struct Biol.* 2: 388-392.

Werner, J.E., and R.R. Finkelstein, 1995. *Arabidopsis* mutants with reduced response to NaCl and osmotic stress. *Physiologia Plantarum* 93: 659–666.

Whetten, R.W., MacKay, J.J. and R.R. Sederoff, 1998. Recent advances in understanding lignin biosynthesis. *Annu Rev Plant Physiol Plant Mol Biol.* 49: 585–609.

Williams, E.D. and J. Vlamis, 1957. The effect of silicon on yield and manganese-54 uptake and distribution in the leaves of barley plants grown in culture solutions. *Plant Physiol.*, 32: 404–409.

Winston, G. W., 1990. Physiochemical basis for free radical formation in cells: Production and defenses. *In Stress Responses in Plants*: Adaptation and Acclimation Mechanisms, 1990, pp 58–86. Wiley-Liss Inc. New York, USA.

Wojtaszek, P., 1997. Oxidative burst: an early plant response to pathogen infection. *Biochemical Journal* 322: 681-692.

Yancey, P.H., Clark, M.E., Hand, S.C., Bowlus, R.D. and GN. Somero, 1982. Living with water stress: evolution of osmolyte systems. *Science* 217: 1214–1222.

Yeo, A.R., Flowers, S.A., Rao, G., Welfare, K., Senanayake, N. and T.J. Flowers, 1999. Silicon reduces sodium uptake in rice (*Oryza sativa* L.) in saline conditions and this is accounted for by a reduction in the transpirational bypass flow, *Plant Cell Environ.* 22: 559–565.

Yoshiba, Y., Kiyosue, T., Nakashima, K., Yamaguchi-Shinozaki, K. and K. Shinozaki, 1997. Regulation of the level of proline as an osmolyte in plants under water stress. *Plant Cell Physiol.* 38: 1095–1102.

Zhu, Z., Wei, G., Li, J., Qian, Q. and J. Yu, 2004. Silicon alleviates salt stress and increases antioxidant enzymes activity in leaves of salt-stressed cucumber (*Cucumis sativus* L.). *Plant Science* 167: 527–533.

Γανωτάκης, Δ. και Κ. Κοτζαμπάσης, 2003. Φωτοσύνθεση Ι: Μετατροπή της ηλιακής ακτινοβολίας σε χημική ενέργεια. Φυσιολογία φυτών, από το μόριο στο περιβάλλον, Επιμέλεια Ρουμπελάκη-Αγγελάκη, Κ.Α.,. *Πανεπιστημιακές Εκδόσεις Κρήτης*. Σελ.:145-190.

Κωνσταντινίδου, Α.Ε., 2003. Φυσιολογία αβιοτικών καταπονήσεων. Στο φυσιολογία φυτών, από το μόριο στο περιβάλλον, Επιμέλεια Ρουμπελάκη-Αγγελάκη, Κ.Α.,. *Πανεπιστημιακές Εκδόσεις Κρήτης*. Σελ.:575-598.

Μουρκίδης Α., 1981. Ενζυμα. Θεσσαλονίκη σελ.: 155.