



ΠΑΝΕΠΙΣΤΗΜΙΟ  
ΙΩΑΝΝΙΝΩΝ

ΤΜΗΜΑ ΓΕΩΠΟΝΙΑΣ

# " Ρόλος του βιοδιεγέρτη (εκχύλισμα *Ascorhyllum nodosum*) στην ανάπτυξη του μαρουλιού (*Lactuca sativa* L.) σε συνθήκες υδατικής καταπόνησης



**Αναστασία Λειβαδίτου**

**Επιβλέπουσα:**

**Μπέζα Παρασκευή**

## ***ΕΥΧΑΡΙΣΤΙΕΣ***

---

*Ξεκινώντας θα ήθελα να ευχαριστήσω θερμά όλους εκείνους που συνέβαλαν στη δημιουργία, ολοκλήρωση και τελειοποίηση της πτυχιακής μου εργασίας. Ευχαριστώ θερμά την επιβλέπων καθηγήτριά μου κα. Παρασκευή Μπέζα για τις συμβουλές και τις κατευθύνσεις της ώστε να βρεθούν περαιτέρω πηγές άντλησης πληροφοριών, τις απαραίτητες διορθώσεις της όσον αφορά τα στοιχεία και το κείμενο της εργασίας και γενικά την όλη υποστήριξή της σε όλο το πλαίσιο ολοκλήρωσης της εργασίας μου. Ακόμη θα ήθελα να ευχαριστήσω την συμφοιτήτριά μου Σιώζου Παρασκευή για τη βοήθεια της στο πείραμα και τον καθηγητή κο. Μάντζο Νικόλαο με τις πολύτιμες συμβουλές του και για την επίβλεψη της καλλιέργειας του μαρουλιού. Επίσης θα ήθελα να ευχαριστήσω και όλους τους καθηγητές και φίλους συμφοιτητές μου που με υποστήριξαν και με βοήθησαν όλα αυτά τα χρόνια της φοίτησής μου.*

*Με εκτίμηση*

*Λειβαδίτη Αναστασία*

## ***ΑΦΙΕΡΩΜΕΝΗ***

*Στην οικογένειά μου, για την υπομονή και την πίστη που υπέδειξαν όλα αυτά τα έτη των σπουδών μου, και για την στήριξή τους καθ' όλη τη διάρκεια της προετοιμασίας και ολοκλήρωσης αυτής της εργασίας.*

# ΠΕΡΙΕΧΟΜΕΝΑ

---

<b>ΕΥΧΑΡΙΣΤΙΕΣ</b> .....	<b>1</b>
<b>ΠΕΡΙΕΧΟΜΕΝΑ</b> .....	<b>2</b>
<b>ΠΙΝΑΚΑΣ ΕΙΚΟΝΩΝ</b> .....	<b>4</b>
<b>ΠΙΝΑΚΑΣ ΠΙΝΑΚΩΝ – ΔΙΑΓΡΑΜΜΑΤΩΝ</b> .....	<b>5</b>
<b>ΠΕΡΙΛΗΨΗ</b> .....	<b>6</b>
<b>ABSTRACT</b> .....	<b>8</b>
<b>ΕΙΣΑΓΩΓΗ</b> .....	<b>10</b>
<b>Α ΜΕΡΟΣ: ΒΙΒΛΙΟΓΡΑΦΙΚΗ ΑΝΑΣΚΟΠΗΣΗ</b> .....	<b>13</b>
<b>ΚΕΦΑΛΑΙΟ 1<sup>ο</sup>: ΟΙ ΒΙΟΔΙΕΓΕΡΤΕΣ</b> .....	<b>13</b>
1.1. ΟΡΙΣΜΟΣ ΤΟΥ ΒΙΟΔΙΟΓΕΡΤΗ.....	13
1.2. ΤΥΠΟΙ ΒΙΟΔΙΕΓΕΡΤΩΝ.....	14
1.2.1. <i>Εκχυλίσματα φυκών και φυτικών μερών</i> .....	15
1.2.2. <i>Χουμικές ουσίες</i> .....	16
1.2.3. <i>Υδρολυμένες πρωτεΐνες: ζωικής ή φυτικής προέλευσης</i> .....	17
1.3. ΜΗΧΑΝΙΣΜΟΣ ΔΡΑΣΗΣ ΒΙΟΔΙΕΓΕΡΤΩΝ.....	19
1.4. ΕΠΙΔΡΑΣΗ.....	22
1.5. ΑΠΟΤΕΛΕΣΜΑΤΑ ΧΡΗΣΗΣ ΒΙΟΔΙΕΓΕΡΤΩΝ.....	22
<b>ΚΕΦΑΛΑΙΟ 2<sup>ο</sup> : ΚΑΤΑΠΟΝΗΣΗ ΤΩΝ ΦΥΤΩΝ ΚΑΙ Η ΑΝΤΟΧΗ ΤΟΥΣ ΣΕ ΑΒΙΟΤΙΚΟ ΣΤΡΕΣ</b> .....	<b>26</b>
2.1. ΟΙ ΠΙΟ ΚΟΙΝΕΣ ΜΟΡΦΕΣ ΦΥΤΙΚΟΥ ΣΤΡΕΣ.....	26
2.2. ΜΗΧΑΝΙΣΜΟΙ ΑΝΤΟΧΗΣ ΣΤΗΝ ΥΔΑΤΙΚΗ ΚΑΤΑΠΟΝΗΣΗ.....	34
2.3. ΕΙΔΗ ROS (REACTIVE OXYGEN SPECIES, ROS).....	38
<b>ΚΕΦΑΛΑΙΟ 3<sup>ο</sup> : ΕΛΕΥΘΕΡΕΣ ΡΙΖΕΣ - ΑΝΤΙΟΞΕΙΔΩΤΙΚΑ &amp; ΠΟΛΥΦΑΙΝΟΛΕΣ</b> .....	<b>41</b>
3.1. ΕΛΕΥΘΕΡΕΣ ΡΙΖΕΣ ΚΑΙ ΔΡΑΣΤΙΚΑ ΕΙΔΗ ΟΞΥΓΟΝΟΥ.....	41
3.2. ΠΩΣ ΔΗΜΙΟΥΡΓΟΥΝΤΑΙ ΟΙ ΕΛΕΥΘΕΡΕΣ ΡΙΖΕΣ ΣΤΟΝ ΟΡΓΑΝΙΣΜΟ ΜΑΣ.....	42
3.3. ΑΝΤΙΟΞΕΙΔΩΤΙΚΟΙ ΚΥΤΤΑΡΙΚΟΙ ΜΗΧΑΝΙΣΜΟΙ.....	43
3.4. ΕΠΙΔΡΑΣΗ ΤΩΝ ROS ΣΤΗΝ ΥΓΕΙΑ.....	44
3.5. ΠΡΟΣΔΙΟΡΙΣΜΟΣ ΑΝΤΙΟΞΕΙΔΩΤΙΚΗΣ ΔΡΑΣΗΣ.....	45
3.6. ΦΥΣΙΟΛΟΓΙΚΗ ΛΕΙΤΟΥΡΓΙΑ ΚΑΙ ΘΕΡΑΠΕΥΤΙΚΕΣ ΔΡΑΣΕΙΣ ΤΩΝ ROS.....	46
3.7. ΑΝΤΙΟΞΕΙΔΩΤΙΚΑ ΚΑΙ ΔΙΑΤΡΟΦΗ.....	48
3.8. ΑΡΝΗΤΙΚΕΣ ΕΠΙΔΡΑΣΕΙΣ ΑΝΤΙΟΞΕΙΔΩΤΙΚΩΝ.....	49
3.9. ΣΥΜΠΕΡΑΣΜΑΤΑ.....	51
<b>ΚΕΦΑΛΑΙΟ 4<sup>ο</sup> : ΠΟΛΥΦΑΙΝΟΛΕΣ</b> .....	<b>52</b>
4.1. ΓΕΝΙΚΕΣ ΚΑΤΗΓΟΡΙΕΣ.....	52
4.1.1. <i>Απλές Φαινόλες &amp; Φλαβονοειδή</i> .....	53
4.2. ΑΝΕΥΡΕΣΗ ΣΤΗ ΦΥΣΗ.....	55
4.3. ΜΕΘΟΔΟΙ ΠΡΟΣΔΙΟΡΙΣΜΟΥ ΤΩΝ ΠΟΛΥΦΑΙΝΟΛΩΝ.....	56
4.3.1. <i>Η Μέθοδος Folin-Ciocalteu</i> .....	56
4.3.2. <i>Η Μέθοδος DPPH</i> .....	57
4.3.3. <i>Η Μέθοδος HPLC</i> .....	58

4.3.4.	<i>Η Μέθοδος TLC</i> .....	59
4.3.5.	<i>Η Μέθοδος CGC-MS</i> .....	59
4.3.6.	<i>Η Μέθοδος του Δείκτη Υπερμαγγανικού Καλίου (KMnO4)</i> .....	60
4.3.7.	<i>Η Μέθοδος FRAP</i> .....	60
4.3.8.	<i>Η Μέθοδος ORAC</i> .....	60
4.3.9.	<i>Η Μέθοδος της Χημειοφωταγείας</i> .....	61
4.4.	Η ΠΡΟΣΦΟΡΑ ΤΩΝ ΠΟΛΥΦΑΙΝΟΛΩΝ ΣΤΗΝ ΥΓΕΙΑ.....	61
4.5.	ΑΝΤΙΟΞΕΙΔΩΤΙΚΗ ΔΡΑΣΗ.....	61
4.6.	ΛΟΙΠΕΣ ΩΦΕΛΕΙΕΣ ΤΩΝ ΠΟΛΥΦΑΙΝΟΛΩΝ.....	62
4.7.	ΠΟΛΥΦΑΙΝΟΛΕΣ: ΚΙΝΔΥΝΟΙ ΚΑΙ ΠΑΡΕΝΕΡΓΕΙΕΣ.....	62
<b>Β ΜΕΡΟΣ: ΠΕΙΡΑΜΑΤΙΚΗ ΔΙΑΔΙΚΑΣΙΑ</b> .....		<b>65</b>
<b>ΚΕΦΑΛΑΙΟ 5<sup>ο</sup> : ΠΕΙΡΑΜΑΤΙΚΗ ΔΙΑΔΙΚΑΣΙΑ, ΥΛΙΚΑ ΚΑΙ ΜΕΘΟΔΟΙ ΠΟΥ ΧΡΗΣΙΜΟΠΟΙΗΘΗΚΑΝ</b> .....		<b>65</b>
5.1.	ΠΕΙΡΑΜΑΤΙΚΗ ΕΓΚΑΤΑΣΤΑΣΗ.....	65
5.1.1.	<i>Το θερμοκήπιο</i> .....	65
5.2.	ΤΟ ΠΕΙΡΑΜΑ.....	66
5.2.1.	<i>Η διαδικασία της καλλιέργειας</i> .....	66
5.2.2.	<i>Τα πότισμα</i> .....	66
5.2.3.	<i>Πειραματικός σχεδιασμός</i> .....	67
5.2.4.	<i>Διαδικασία δειγματοληψίας και οι αναλύσεις</i> .....	68
<b>ΚΕΦΑΛΑΙΟ 6<sup>ο</sup> : ΑΠΟΤΕΛΕΣΜΑΤΑ</b> .....		<b>74</b>
6.1.	ΚΑΜΠΥΛΕΣ ΑΝΑΦΟΡΑΣ.....	74
6.2.	ΟΛΙΚΑ ΦΑΙΝΟΛΙΚΑ.....	75
6.3.	ΧΛΩΡΟΦΥΛΛΗ.....	77
6.4.	ΕΠΙΦΑΝΕΙΑ ΦΥΤΟΥ.....	80
6.5.	ΒΛΑΣΤΙΚΗ ΑΝΑΠΤΥΞΗ ΦΥΤΩΝ.....	81
<b>ΚΕΦΑΛΑΙΟ 7<sup>ο</sup> : ΣΥΜΠΕΡΑΣΜΑΤΑ</b> .....		<b>84</b>
<b>ΣΥΝΤΟΜΟΓΡΑΦΙΕΣ</b> .....		<b>86</b>
<b>ΒΙΒΛΙΟΓΡΑΦΙΑ</b> .....		<b>87</b>

## ΠΙΝΑΚΑΣ ΕΙΚΟΝΩΝ

Εικόνα 1. Μαρούλι Starfighter (Πηγή: <a href="https://www.rijkzwaan.gr/starfighter-rz">https://www.rijkzwaan.gr/starfighter-rz</a> ) .....	11
Εικόνα 2 καλλιέργεια μαρουλιού σε έδαφος θερμοκηπίου και το φυτό μαρουλιού τύπου <i>Lactuca sativa</i> L. ....	12
Εικόνα 3 Πολύπλοκοι πολυσακχαρίτες από εκχυλίσματα θαλάσσιων φυκών Α. λαμιναρίνη είναι πολυσακχαρίτης της γλυκόζης που αποτελείται από β(1→3)-μονάδες γλυκόζης με διακλαδώσεις β(1→6).-Β. φουκάνες πολυσακχαρίτες που αποτελείται από μονάδες θειικής L-φουκόζης Γ. Το αλγινικό οξύ είναι ένα γραμμικό συμπολυμερές των (1-4)-β-D-μανουρονικού οξέος (M) με το επιμερές στον C-5 επιμερές αυτού το α-L-γλουκορουρικού (G), που ενώνονται με ομοιοπολικούς δεσμούς σε δαιφορετικά συγκροτήματα στο ίδιο μεγαλομόριο.....	15
Εικόνα 4. Φυτικές Ορμόνες .....	16
Εικόνα 5 Συνθήκες έλλειψης ύδατος και λειτουργία ωσμωρύθμισης στο κύτταρο (Σημειώσεις Φυσιολογίας Φυτών Γεωπονικό Πανεπιστήμιο Αθηνών).....	20
Εικόνα 6 Ωσμωλυτικές ουσίες που παράγονται στα κύτταρα σε συνθήκες αβιοτικών καταπονήσεων.....	21
Εικόνα 7. Αβιοτικό στρες: η καταπόνηση που προκαλείται από μη ζωντανούς οργανισμούς στο φυτό που επηρεάζουν σε ακραίο βαθμό το περιβάλλον που αναπτύσσεται το φυτό (Πηγή: <a href="https://www.albit.gr/xarakteristika/itemlist/user/938-albit">https://www.albit.gr/xarakteristika/itemlist/user/938-albit</a> ).....	26
Εικόνα 8. Στρες φυτών λόγω ξηρασίας (Πηγή: <a href="https://blog.farmacon.gr/katigories/tehniki-arthrografia/fytoprostatia/item/2022-oi-pio-koines-morfes-fytikoy-stres">https://blog.farmacon.gr/katigories/tehniki-arthrografia/fytoprostatia/item/2022-oi-pio-koines-morfes-fytikoy-stres</a> ) .....	28
Εικόνα 9. . Στρες φυτών λόγω ξηρασίας (Πηγή: <a href="https://blog.farmacon.gr/katigories/tehniki-arthrografia/fytoprostatia/item/2022-oi-pio-koines-morfes-fytikoy-stres">https://blog.farmacon.gr/katigories/tehniki-arthrografia/fytoprostatia/item/2022-oi-pio-koines-morfes-fytikoy-stres</a> ) .....	29
Εικόνα 10. . Στρες φυτών λόγω υπερβολικής υγρασίας (Πηγή: <a href="https://blog.farmacon.gr/katigories/tehniki-arthrografia/fytoprostatia/item/2022-oi-pio-koines-morfes-fytikoy-stres">https://blog.farmacon.gr/katigories/tehniki-arthrografia/fytoprostatia/item/2022-oi-pio-koines-morfes-fytikoy-stres</a> ).....	30
Εικόνα 11. . Στρες φυτών λόγω αλατότητας (Πηγή: <a href="https://blog.farmacon.gr/katigories/tehniki-arthrografia/fytoprostatia/item/2022-oi-pio-koines-morfes-fytikoy-stres">https://blog.farmacon.gr/katigories/tehniki-arthrografia/fytoprostatia/item/2022-oi-pio-koines-morfes-fytikoy-stres</a> ) .....	31
Εικόνα 12. . Στρες φυτών λόγω υψηλών θερμοκρασιών (Πηγή: <a href="https://blog.farmacon.gr/katigories/tehniki-arthrografia/fytoprostatia/item/2022-oi-pio-koines-morfes-fytikoy-stres">https://blog.farmacon.gr/katigories/tehniki-arthrografia/fytoprostatia/item/2022-oi-pio-koines-morfes-fytikoy-stres</a> ).....	33
Εικόνα 13. : Φυσιολογικές, βιοχημικές και μοριακές αποκρίσεις στην υδατική καταπόνηση στα ανώτερα φυτά (Ramachandra Reddy et al, 2004). .....	35
Εικόνα 14. Είδη ROS (Πηγή: <a href="https://www.semanticscholar.org/paper/Reactive-oxygen-species-(ROS)-and-response-of-as-in-Das-Roychoudhury/af0ce326f25ee7fc393ecacfd09e13561e4933d/figure/0">https://www.semanticscholar.org/paper/Reactive-oxygen-species-(ROS)-and-response-of-as-in-Das-Roychoudhury/af0ce326f25ee7fc393ecacfd09e13561e4933d/figure/0</a> ).....	40
Εικόνα 15 Κύριες τάξεις πολυφαινολικών ενώσεων (κατάταξη βάσει Harhnone, 1989) .....	53
Εικόνα 16 Βασική δομή και σύστημα αρίθμησης των φλαβονοειδών (Παπαγεωργίου, 2005) .....	54
Εικόνα 17 Κατάταξη φλαβονοειδών τροφίμων (κατάταξη βάσει Harb#one, 1993).....	55
Εικόνα 18 Η ελεύθερη ρίζα DPPH (Molyneux, 2004) .....	57
Εικόνα 19 Η σπορά και η μεταφύτευση των φυτών .....	65
Εικόνα 20 Η προετοιμασία των γλαστρών και η τοποθέτηση τους στα κανάλια μετρά την μεταφύτευση .....	66
Εικόνα 21 Παρασκευή και αποθήκευση του θρεπτικού διαλύματος, σκεύασμα ψεκασμού και διαδικασία απομόνωση των φυτών και ψεκασμός με βιοδιαγέρτη .....	67

Εικόνα 22 Ζύγιση, μέτρηση της επιφάνειας των φύλων και διαχωρισμός των μερών του κάθε φυτού .....	68
Εικόνα 23 Η διαδικασία της εκχύλισης και το εκχυλούμενο δήγμα .....	70
Εικόνα 24 Η προετοιμασία των αντιδραστηρίων και τα δήγματα μετρά την προσθήκη τους.....	71

## **ΠΙΝΑΚΑΣ ΠΙΝΑΚΩΝ – ΔΙΑΓΡΑΜΜΑΤΩΝ**

---

Πίνακας 1. Περιγραφή των μεταχειρίσεων .....	68
Διάγραμμα 6. 1 Πρότυπη καμπύλη αναφοράς για τον προσδιορισμό της συγκέντρωσης πολικών φαινολικών ουσιών με την μέθοδο Folin-ciocalteu. ....	74
Διάγραμμα 6. 2 καμπύλη αναφορά mg φύλλου και Abs <sub>765nm</sub> .....	75
Διάγραμμα 6. 3 ολικές φαινολικές ενώσεις σε mg GAE/g βάρους νωπών φύλλων .....	76
Διάγραμμα 6. 4 Συγκεντρώσεις χλωροφύλλης α σε mg/g φύλλων .....	78
Διάγραμμα 6. 5 Συγκεντρώσεις χλωροφύλλης b σε mg/g φύλλων .....	78
Διάγραμμα 6. 6 Συνολική συγκεντρώσεις χλωροφύλλης σε mg/g φύλλων .....	79
Διάγραμμα 6. 7 Εμβαδόν επιφάνειας φύλλων φυτού σε cm <sup>2</sup> .....	80
Διάγραμμα 6. 8. Νωπό βάρος φύλλων φυτού .....	81
Διάγραμμα 6. 9. Ξηρό βάρος φύλλων φυτού .....	82

## ΠΕΡΙΛΗΨΗ

---

Οι βιοδιεγέρτες είναι μια κατηγορία προϊόντων, που λόγω του περιεχομένου τους σε ουσίες και μικροοργανισμούς, έχουν την ικανότητα να επιδρούν στη αύξηση και την ανάπτυξη των φυτικών οργανισμών. Τα προϊόντα αυτά περιλαμβάνουν εκχυλίσματα φυκών, χουμικά και φουλβικά οξέα, πρωτεΐνες και αμινοξέα, χιτοζάνη, ανόργανες ενώσεις, μύκητες και βακτήρια. Χρησιμοποιούνται έχοντας σκοπό να ενισχυθεί η αποτελεσματικότητα της θρέψης, η ανοχή σε αβιοτικούς και βιοτικούς στρεσογόνους παράγοντες και η ποιότητα των καλλιεργειών, γενικότερα στοχεύουν στην αύξηση της ποσότητας των παραγόμενων ειδών αλλά και στην βελτίωση της ποιότητας τους.

Οι φυσικοί βιοδιεγέρτες μπορεί να προέρχονται από ανανεώσιμες πηγές και βιομηχανικά απόβλητα, ή/και να περιέχουν ωφέλιμους μικροοργανισμούς του εδάφους. Η χρήση τους αποτελεί συμπληρωματική διαδικασία στη θρέψη και στη προστασία των φυτών, δεδομένου ότι βελτιώνεται η ευρωστία και διεγείρεται η ανάπτυξή τους. Επίσης, συμβάλουν άμεσα στις φυσιολογικές διεργασίες των φυτών και βελτιώνεται η γονιμότητα του εδάφους, με αποτέλεσμα τη διέγερση του ριζικού συστήματος, την αύξηση της πρόσληψης των θρεπτικών στοιχείων και του νερού από το φυτό.

Το βιολογικό στρες είναι μια δυσμενή δύναμη ή κατάσταση που εμποδίζει την κανονική λειτουργία μιας εγκατάστασης. Αυτές οι πιέσεις μπορεί να είναι βιοτικές ή αβιοτικές. Αυτή η εργασία εξετάζει τα στοιχεία των αβιοτικών στρεσογόνων για το μαρούλι Starfighter, το οποίο ανήκει στην ποικιλία Batavia. Το αβιοτικό στρες που εξετάζεται στην παρούσα μελέτη είναι η ξηρασία (έλλειψη νερού).

Σκοπός της παρούσας μελέτης, είναι η διερεύνηση του ρόλου του βιοδιεγέρτη millerplex (οργανοανόργανο λίπασμα με θαλάσσια φύκη) στην ανάπτυξη πειραματικής καλλιέργειας για το μαρούλι Starfighter, σε συνθήκες υδατικής καταπόνησης (όπως έλλειψη ύδατος). Ο χρόνος της καλλιέργειας ήταν 5 μήνες από τον Σεπτέμβριο του 2018 έως τον Ιανουάριο του 2019.

Οι μεταχειρίσεις ήταν άρδευση μόνο με θρεπτικό διάλυμα (M), άρδευση με θρεπτικό διάλυμα και ψεκασμός με διάλυμα βιοδιεγέρτη (MB), άρδευση με θρεπτικό διάλυμα σε μεγαλύτερα χρονικά διαστήματα (EN) και άρδευση με θρεπτικό διάλυμα σε μεγαλύτερα χρονικά διαστήματα και ψεκασμός με διάλυμα βιοδιεγέρτη (ENB).

Ως δείκτες για την απόκριση του φυτού μελετήθηκαν το περιεχόμενο σε ολικές πολυφαινόλες, η χλωροφύλλες a, b και τα μορφομετρικά χαρακτηριστικά της καλλιέργειας κατά τα διάφορα στάδια της ανάπτυξης. Οι συγκεντρώσεις των ολικών φαινολικών κυμάνθηκαν από 0,160 έως 0,833 mg GAE /Kg φύλλου. Στην 83 ημέρα της δειγματοληψία η τιμή της μεταχείρισης με βιοδιεγέρτη ήταν κατά 54 % υψηλότερη από αυτήν του μάρτυρα.

Η φυλλική επιφάνεια ελαττώνεται λόγω της αβιοτικής καταπόνησης Η ολική φυλλική επιφάνεια του ENB ελαττώθηκε κατά 2,5 φορές σε σχέση με την αντίστοιχη της μεταχείρισης MB. Το νωπό και το ξηρό βάρος ακολούθησε την ίδια τάση με την μεγαλύτερη διαφοροποίηση της MB μεταχείρισης σε σχέση με τις υπόλοιπες να σημειώνεται την 83 ημέρα του πειράματος. Η ολική χλωροφύλλη (chl-a+chl-b) δεν εμφάνισε σημαντική διακύμανση στις μεταχειρίσεις ανά δειγματοληψία. Ο λόγος χλωροφύλλης a/ χλωροφύλλη b με τιμή 7,2 για την μεταχείριση EN την 29 η ημέρα του πειράματος λειτουργεί ως δείκτης υδατικής καταπόνησης.

*Λέξεις – κλειδιά: βιοδιεγέρτες, αβιοτικοί στρεσογόνοι παράγοντες, καλλιέργεια μαρουλιού*



## ABSTRACT

---

Biostimulants are a category of products that, due to their content in substances and microorganisms, have the ability to affect the growth and development of plant organisms. These products include algae extracts, humic and fulvic acids, proteins and amino acids, chitosan, minerals, fungi and bacteria. They are used in order to enhance the effectiveness of nutrition, tolerance to abiotic and biotic stressors and the quality of crops, generally aimed at increasing the quantity of species produced and improving their quality.

Natural biostimulants may come from renewable sources and industrial waste, and / or contain beneficial soil microorganisms. Their use is a complementary process in the nutrition and protection of plants, as it improves their vigor and stimulates their growth. They also contribute directly to the normal processes of plants and improve soil fertility, resulting in stimulation of the root system, increasing the uptake of nutrients and water by the plant.

Biological stress is an adverse force or condition that impedes the normal operation of an installation. These pressures can be biotic or abiotic. This paper examines the evidence of abiotic stressors for Starfighter lettuce, which belongs to the Batavia variety. The abiotic stress that is examined in the present study is the drought (lack of water).

The purpose of this diploma thesis is to investigate the role of the biostimulant millerplex (organic – inorganic mineral fertilizer with seaweed) in the development of experimental cultivation for Starfighter lettuce which belongs to the Batavia type varieties, in conditions of water stress, such. The cultivation time was 5 months from September 2018 to January 2019.

The treatments were nutrient solution irrigation as control (M), nutrient solution irrigation and biostimulator solution (MB), nutrient solution irrigation at longer intervals (EN) and nutrient irrigation at longer intervals and bioremediation spraying (ENB).

The content of total polyphenols, chlorophyll a,b and morphometric characteristics of the crop at different stages of development as leaf area are dry weight and wet weight were studied as indicators for the plant response. Total phenolics were varied between 0,160 until 0,833 mg GAE /Kg leaf. In the 83 –day of the experiment total phenolics MB was in a

percentage 54% higher than those of EN. Leaf area was reduced under abiotic stress. Cumulative leaf area of ENB treatment was reduced to a ratio of f 2,5 comparing with corresponding value of MB treatment. Wet and dry weight follow the same trend with a differentiation of MB treatment at the 83 –day of the experiment. Total chlorophyll (chl-a+chl-b) did not appear a great variation between treatments at the same sampling date. Chl-a/ chl-b ratio value 7, 2 for EN treatment in the 29-day of the experiment operates as abiotic stress index.

***Key – words:*** *biostimulants, abiotic stressors, lettuce cultivation*

## ΕΙΣΑΓΩΓΗ

---

Το μαρούλι *Lactuca sativa* L. (εικόνα 1) είναι από τα πιο δημοφιλή και διαδεδομένα κηπευτικά της οικογενείας των Asteraceae, γένος *Lactuca* και είδος *L. Sativa*. Είναι φυτό ψυχρής εποχής και καλλιεργείται σε περιοχές και εποχές που επικρατούν χαμηλές θερμοκρασίες. Στην Ελλάδα η καλλιέργεια του ξεκινά με τις πρώιμες σπορές του Σεπτεμβρίου και συνεχίζεται σταδιακά μέχρι τον Απρίλιο του επόμενου έτους.

Υπάρχουν αρκετοί τύποι μαρουλιού που καλλιεργούνται και κάθε τύπος περιλαμβάνει πολλές ποικιλίες. Οι τέσσερις πιο γνωστοί τύποι μαρουλιού που καλλιεργούνται στη χώρα μας είναι οι παρακάτω

### 1) Ρωμαϊκά μαρούλια (Μαρούλι ρομάνο)

Είναι τρυφερά και νόστιμα μαρούλια, πλούσια σε ασβέστιο και βιταμίνες Α και C και είναι πολύ δημοφιλή στη χώρα μας. Τα ρωμαϊκά μαρούλια χρησιμοποιούνται πολύ για σαλάτες και σάντουιτς, ιδιαίτερα στη χώρα μας γιατί είναι ένα κομψό λαχανικό που τα φύλλα του σχηματίζουν ένα όρθιο και μακρουλό κεφάλι. Τα μαρούλια αυτά χρειάζονται γύρω στις 70 μέρες μετά την σπορά για να ωριμάσουν. Τα φύλλα τους είναι πιο κατσαρά από τα φύλλα του φυλλώδους μαρουλιού, αλλά τα εσωτερικά τους φύλλα είναι πολύ τρυφερά και πολύ νόστιμα. Φυτεύονται από τις αρχές Σεπτεμβρίου έως το τέλος Μαρτίου σε όλα τα εδάφη και μπορούν να καλλιεργηθούν εύκολα και σε γλάστρες.

Τα ρωμαϊκά μαρούλια (ρομάνο) ήταν γνωστά στους αρχαίους Ρωμαίους ως μαρούλια Καππαδοκίας, αλλά αργότερα πήραν το σημερινό τους όνομα. Αυτό συνέβη τον 14ο αιώνα, όταν οι Πάπες της καθολικής εκκλησίας μετακόμισαν στο Αβινιόν στη Γαλλία και τα ρωμαϊκά μαρούλια άρχισαν να καλλιεργούνται στους κήπους τους. Στην Αγγλία όμως το μαρούλι αυτό ονομάζεται -μαρούλι της Κω- από το ελληνικό νησί. Ήταν επίσης γνωστό και δημοφιλές στην αρχαία Κίνα, όπου το έτρωγαν ωμό ή και μαγειρεμένο. Οι πιο γνωστές ποικιλίες του μαρουλιού ρομάνο είναι η COS PARRIS ISLANT, COS PARRIS ODESSA, COS MESSAPIA και η COS DORIS TOLEDO. Σπόρους πιστοποιημένους για μαρούλια ρομάνο θα βρείτε μόνο σε γεωπονικά καταστήματα.

### 2) Μαρούλια “Σαλάτα” - Κατσαρά μαρούλια

Τα μαρούλια “σαλάτες” είναι μικρά σε μέγεθος κατσαρά μαρούλια που σχηματίζουν ένα χαλαρό κεφάλι. Τα φύλλα τους είναι πολύ τρυφερά, έχουν μια ελαφρώς γλυκιά γεύση και είναι πλούσια σε σίδηρο. Εάν οι θερμοκρασίες κατά την ανάπτυξη είναι ψηλές, τα μαρούλια “σαλάτες” αποκτούν πικρή γεύση γι’ αυτό και φυτεύονται μέχρι το τέλος Φεβρουαρίου. Για να φτάσουν στην ωρίμανση, χρειάζονται 55 έως 75 ημέρες.

Διακρίνονται σε μέτρια κατσαρές σαλάτες (τύπου BATTAVIA) και σε πολύ κατσαρές φυλλώδεις σαλάτες (τύπου LOLLO LOOSE LEAF) ενώ οι πολύ κατσαρές σαλάτες μπορεί να είναι με κόκκινο ή πράσινο φύλλωμα (κόκκινες κατσαρές-lollo rosso και πράσινες κατσαρές σαλάτες-lollo green). Στην αγορά διατίθενται και μαρούλια σαλάτες τύπου BUTTERHEAD (BOYTYPOY) που είναι μόνο για υπαίθριες καλλιέργειες.

Στις ποικιλίες τύπου Batavia ανήκει και το Starfighter το οποίο είναι το μαρούλι που καλλιεργήθηκε για της ανάγκες της παρούσας εργασίας και χρησιμοποιήθηκε στην πειραματική διαδικασία.



Εικόνα 1. Μαρούλι Starfighter (Πηγή: <https://www.rijkszaan.gr/starfighter-rz>)

### 3) Φυλλώδη μαρούλια

Έχουν τραγανά ίσια φύλλα, πλούσια σε βιταμίνη Α και C και ασβέστιο. Τα φυλλώδη μαρούλια καλλιεργούνται σχετικά εύκολα και ωριμάζουν σύντομα. Υπάρχουν ποικιλίες με πράσινα και με κοκκινωπά φύλλα. Τα φυλλώδη μαρούλια ωριμάζουν μεταξύ 45 και 60 ημερών μετά τη φύτευση. Όταν συγκομίζουμε ένα φυλλώδες μαρούλι, δεν κόβουμε ολόκληρο το φυτό. Κόβουμε πρώτα τα μεγαλύτερα εξωτερικά φύλλα όταν φτάσουν τα 15–20 cm σε μήκος. Με αυτό τον τρόπο, τα εσωτερικά φύλλα θα συνεχίσουν να μεγαλώνουν και έτσι θα μπορούμε να έχουμε δύο ή τρεις συγκομιδές τη σαιζόν.

### 4) Μαρούλια Κεφαλωτά – Iceberg

Τα μαρούλια iceberg καθώς μεγαλώνουν δημιουργούν με τα φύλλα του μικρά έως μεγάλα σφιχτά κεφάλια για αυτό και λέγονται κεφαλωτά. Τα κεφάλια είναι στρογγυλά, συνεκτικά, ομοιόμορφα με τα φύλλα τους να είναι μαλακά, παχιά και τραγανά. Χρησιμοποιούνται για σαλάτες και σε ντεκόρ σε εξωτικά πιάτα. Συνήθως φυτεύονται στις αρχές της Άνοιξης αλλά υπάρχουν και ποικιλίες για Φθινοπωρινές και Χειμωνιάτικες φυτεύσεις (υπαίθριες ή θερμοκηπίου) και η συγκομιδή τους γίνεται περίπου μετά από δύο μήνες. Η πιο γνωστή και εμπορική ποικιλία είναι η ANTIGUA γιατί η βάση του κεφαλιού είναι επίπεδη και μπορεί εύκολα να συσκευαστεί με πλαστικά φιλμ.



Εικόνα 2 καλλιέργεια μαρουλιού σε έδαφος θερμοκηπίου και το φυτό μαρουλιού τύπου *Lactuca sativa* L.

# Α ΜΕΡΟΣ: ΒΙΒΛΙΟΓΡΑΦΙΚΗ ΑΝΑΣΚΟΠΗΣΗ

## ΚΕΦΑΛΑΙΟ 1<sup>ο</sup>: ΟΙ ΒΙΟΔΙΕΓΕΡΤΕΣ

---

### 1.1.Ορισμός του βιοδιογέρτη

Ο όρος «Βιοδιεγέρτες» δόθηκε από τους Zhang και Schmidt στο Κρατικό Πανεπιστήμιο της Βιρτζίνια το 1997 και αναφερόταν στις «ουσίες που εφαρμόζονται σε μικρές ποσότητες στα φυτά και μπορούν να βοηθήσουν στην ανάπτυξη τους» (du Jardin, 2015). Σήμερα οι βιοδιεγέρτες φυτών, σύμφωνα με το Συμβούλιο της Ευρωπαϊκής Βιομηχανίας Βιοδιεγερτών, είναι οποιαδήποτε ουσία ή μικροοργανισμός που όταν εφαρμόζεται σε φυτό, σπόρο, έδαφος ή θρεπτικό υπόστρωμα και σε συνδυασμό με το πρόγραμμα θρέψης βελτιώνουν την ανάπτυξη των φυτών, ενισχύουν την ποιότητα παραγωγής, βελτιστοποιούν τη διατροφική αποτελεσματικότητα, την ανοχή στο αβιοτικό και βιοτικό στρες (π.χ. αλατότητα, ξηρασία) και ενισχύουν τα ποιοτικά χαρακτηριστικά των καλλιεργειών φυτών (E.B.I.C 2011).

Οι βιοδιεγέρτες είναι φυσικές οργανικές ουσίες ή εκχυλίσματα με ποικιλία συστατικών τα οποία έχουν πολλαπλές και σύνθετες δράσεις. Οι βιοδιεγέρτες δεν έχουν άμεση δράση κατά των παρασίτων και συνεπώς δεν εμπίπτουν στο ρυθμιστικό πλαίσιο των φυτοφαρμάκων, ούτε και των λιπασμάτων που περιέχουν κάποια συγκεκριμένα ανόργανα θρεπτικά στοιχεία. (Du Jardin, 2015).

Η κύρια δράση των βιοδιεγερτών είναι υποστηρικτική, συγκεκριμένα οι βιοδιεγέρτες βελτιώνουν την γονιμότητα του εδάφους και την ικανότητα των φυτών για υγιή ανάπτυξη. Επιπλέον, διεγείρουν και ενισχύουν τις φυσικές διεργασίες σε έδαφος και φυτά, την ανοχή στις αντίξοες συνθήκες και τον ανταγωνισμό, καθώς επίσης και την φωτοσυνθετική δράση (Sharma et al., 2014).

Οι βιοδιεγέρτες είναι μια κατηγορία προϊόντων, που λόγω του περιεχομένου τους σε ουσίες και μικροοργανισμούς, έχουν την ικανότητα να επιδρούν στη αύξηση και την ανάπτυξη των φυτικών οργανισμών. Τα προϊόντα αυτά περιλαμβάνουν εκχυλίσματα φυκών, χουμικά και φουλβικά οξέα, πρωτεΐνες και αμινοξέα, χιτοζάνη, ανόργανες ενώσεις, μύκητες

και βακτήρια. Χρησιμοποιούνται έχοντας ως στόχο την αύξηση της ποσότητας των παραγόμενων ειδών αλλά και την βελτίωση της ποιότητας. (Vasconcelos 2020)

Οι φυτικοί βιοδιεγέρτες περιλαμβάνουν ποικιλία ουσιών και μικροοργανισμών, οι οποίοι συντελούν στην ανάπτυξη των φυτών. Όπως υποδεικνύει και το όνομά τους, οι βιοδιεγέρτες διεγείρουν την ανάπτυξη, σαν τα λιπάσματα, (όμως και το νερό προκαλεί φυτοδιέγερση αλλά δεν είναι λίπασμα) με μια διαφορά, αυτοί κάνουν ακόμη περισσότερα.

Οι φυσικοί βιοδιεγέρτες μπορεί να προέρχονται από ανανεώσιμες πηγές και βιομηχανικά απόβλητα, ή/και να περιέχουν ωφέλιμους μικροοργανισμούς του εδάφους. Η χρήση τους αποτελεί συμπληρωματική διαδικασία στη θρέψη και στη προστασία των φυτών, δεδομένου ότι βελτιώνεται η ευρωστία και διεγείρεται η ανάπτυξή τους. Επίσης, συμβάλουν άμεσα στις φυσιολογικές διεργασίες των φυτών και βελτιώνεται η γονιμότητα του εδάφους, με αποτέλεσμα τη διέγερση του ριζικού συστήματος, την αύξηση της πρόσληψης των θρεπτικών στοιχείων και του νερού από το φυτό.

## **1.2. Τύποι βιοδιεγερτών**

.Οι βιοδιεγέρτες φυτών κατηγοριοποιούνται ανάλογα με την πηγή των πρώτων υλών. Οι κύριες κατηγορίες είναι οι εξής:

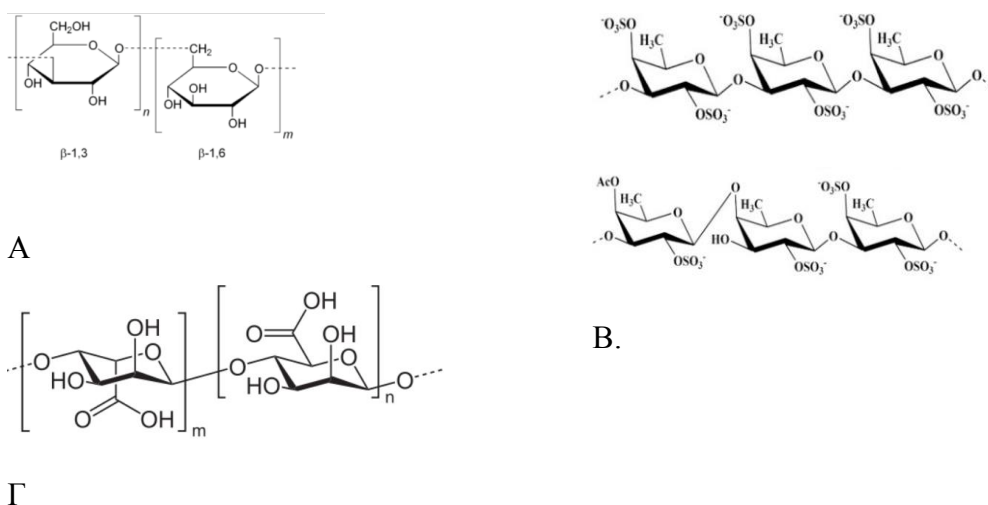
- 1) Εκχυλίσματα φυκών και φυτικών μερών
- 2) Χουμικά και φουλβικά οξέα
- 3) Προϊόντα υδρόλυσης πρωτεϊνών και αμινοξέα
- 4) Εμβόλια μικροοργανισμών (μύκητες, βακτήρια)
- 5) Χιτοζάνη και άλλα βιοπολυμερή και

6) Ανόργανες ενώσεις (Al, Co, Na, Se και Si) (Calvo et al., 2014, Du Jardin, 2015, Halpern et al., 2015, Van Oosten et al., 2017).

### 1.2.1. Εκχυλίσματα φυκών και φυτικών μερών

Τα φύκη χρησιμοποιούνται εδώ και αιώνες για να εξυπηρετήσουν ανθρώπινες ανάγκες (Calvo et al., 2014, Du Jarbin, 2015). Τα πρώτα ευρήματα για τη αξιοποίηση των φυκών από τον άνθρωπο βρέθηκαν στο Μόντε Βέρντεν (Monte Verden) της Νότιας Χιλής, χρησιμοποιήθηκαν ως πηγή τροφής και υπολογίζεται ότι είναι 15.000 ετών (Battacharyya et al., 2015, Calvo et al., 2014, Du Jarbin, 2015). Αναφορές για τη χρήση φυκών έχουμε ακόμα και στην αρχαία Ιαπωνία, με τη θεά του φαγητού Ukimochi, στην αρχαία Ρώμη όπου χρησιμοποιούνταν στη γεωργική πρακτική και σε πολλούς άλλους αρχαίους πολιτισμούς με χρήσεις σε διάφορους κλάδους μεταξύ των οποίων είναι η γεωργία, η ιατρική, η φαρμακολογία και η υφαντουργία (Battacharyya et al., 2015, Khan et al., 2009).

Τα εκχυλίσματα θαλάσσιων φυκών αποτελούν πηγή φυσικών ρυθμιστών ανάπτυξης των φυτών έχοντας τελικά το ρόλο των βιοδιεγερτών. Τα φύκια περιέχουν μια ποικιλία οργανικών ενώσεων περιλαμβάνοντας αμινοξέα (ασπαρταμικό οξύ, γλουταμικό οξύ και αλανίνη καθώς κ.α.), ένα ευρύ φάσμα βιταμινών, όπως βιταμίνες C, B (θειαμίνη), B2 (ριβοφλαβίνη), B12, E, K κ.α. και πολύπλοκους πολυσακχαρίτες όπως λαμιναρίνη, φουκάνες και παράγωγα αλγινικού οξέος (Kuzetsova et al, 2020, Kraan 2012).

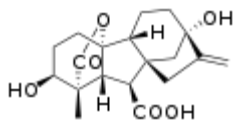


Εικόνα 3 Πολύπλοκοι πολυσακχαρίτες από εκχυλίσματα θαλάσσιων φυκών Α. λαμιναρίνη είναι πολυσακχαρίτης της γλυκόζης που αποτελείται από β(1→3)-μονάδες γλυκόζης με διακλαδώσεις β(1→6).-Β. φουκάνες πολυσακχαρίτες που αποτελείται από μονάδες θειικής L-φουκόζης Γ. Το αλγινικό οξύ είναι ένα γραμμικό συμπολυμερές των (1-4)-β-D-μανουρονικού οξέος (M) με το επιμερές στον C-5 επιμερές αυτού το α-L-γλουκορονικού (G), που ενώνονται με ομοιοπολικούς δεσμούς σε διαφορετικά συγκροτήματα στο ίδιο μεγαλομόριο.

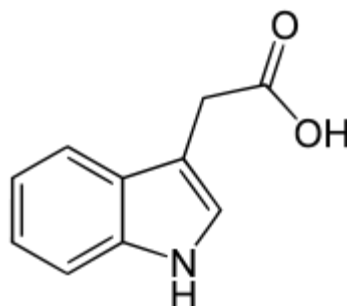
Επίσης, υπάρχουν ενδείξεις παρουσίας και άλλων ουσιών, με ρόλο διεγερτικό και αντιβιοτικό, καθώς και ρόλο φυτικών ορμονών όπως αυξίνη και κυτονίνη γιβερελίνες στερολες, πολυαμίνες (Εικόνα 4). Ο βιολογικός ρόλος του εκχυλίσματος του φαιοφύκου *Ascophyllum nodosum* αποδίδεται σε μεγάλο βαθμό στο περιεχόμενο σε φυτικές ορμονες οι



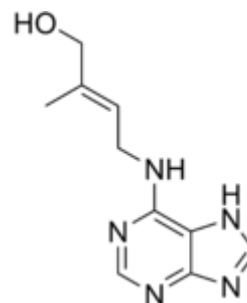
οποιες ρυθμίζουν την βιοσύνθεση των γονιδίων και λιγότερο στις άμεση δράση των ορμονών (Du Jarbin, 2015).



**Γιβερελίνη Α**



**Αυξίνη: IAA (Ινδολο-3-ακετικό οξύ**



**Κυτοκίνη ζεατίνη που ανευρίσκεται στο καλαμπόκι**

#### Εικόνα 4. Φυτικές Ορμόνες

##### 1.2.2. Χουμικές ουσίες

Οι χουμικές ουσίες παράγονται από την αποικοδόμηση και οξείδωση φυτικών και ζωικών υπολειμμάτων συνεπεία μικροβιολογικής δραστηριότητας και είναι η μεγαλύτερη δεξαμενή οργανικής ουσίας στην επιφάνεια της γης. Τα χουμικά είναι ετερογενή μίγματα και κατηγοριοποιούνται σύμφωνα με το μοριακό τους βάρος και τη διαλυτότητά τους στο νερό.

Οργανικά μίγματα με μεγάλο μοριακό βάρος και αδιάλυτα στο νερό, εκείνα με ενδιάμεσο μοριακό βάρος και διαλυτά σε αλκαλικό νερό καλούνται χουμικά οξέα (Humic acids, HA), ενώ εκείνα με χαμηλό μοριακό βάρος και διαλυτά στο νερό ανεξαρτήτως pH καλούνται φουλβικά οξέα (Fulvic acid, FA).

Οι χουμικές ουσίες που χρησιμοποιούμε σαν βιοδιεγέρτες παράγονται από λεοναρδίτη, λιγνίνη, τύρφη ή ανανεώσιμες πηγές, όπως το composte και vermicompost. Τα χουμικά θεωρούνται βιοδιεγέρτες, διότι έχουν θετική επίδραση στη γονιμότητα του εδάφους και άμεσα αποτελέσματα στις φυσιολογικές διεργασίες των φυτών. Τα χουμικά δεν είναι μια άμεση πηγή θρεπτικών στοιχείων για τα φυτά, όμως έχουν ισχυρή επίδραση στις χημικές, φυσιολογικές και βιολογικές διεργασίες των φυτών, διότι ρυθμίζουν έμμεσα την ανάπτυξη και τη βλάστησή τους. Τα αρνητικά φορτία τους είναι μεγαλύτερα από τα φορτία των θρεπτικών στοιχείων και αντιπροσωπεύουν πάνω από το 90% της IAK (ικανότητα ανταλλαγής κατιόντων (Exchange Ion Capacity, EIC) ) στα εδάφη. Η μεγάλη EIC δίνει

δυνατότητα συγκράτησης των κατιόντων των λιπασμάτων, μειώνοντας έτσι την απώλεια μέσω του ξεπλύματος των εδαφών. Η μεγάλη πυκνότητα και η συμμετοχή του περιεχομένου οξυγόνου σε λειτουργίες όπως, καρβοξυλίωση, αλκοολικές, φαινολικές και εστερικές ενώσεις, δίνουν μεγάλη δυνατότητα στα χουμικά να διαφοροποιήσουν και να σταθεροποιήσουν τη δομή του εδάφους. Οι ωφέλιμοι μικροοργανισμοί του εδάφους ευνοούνται σημαντικά από τη χρήση χουμικών.

Τα χουμικά διεγείρουν την ανάπτυξη των ριζών, ώστε ν' απελευθερώσουν σάκχαρα και οργανικά οξέα, βοηθώντας μ' αυτό τον τρόπο στην αλλαγή του χημικού περιβάλλοντος προς όφελος των μικροοργανισμών του εδαφικού συστήματος. Επιπλέον, τα χουμικά, προκαλούν αύξηση του αριθμού των ριζικών τριχιδίων καθώς και εμφάνιση πλευρικών ριζών, οι οποίες αλλάζουν την επιφανειακή και ενδοφυτική αποίκιση των μικροοργανισμών του εδάφους. Ένα από τα πιο συνήθη αποτελέσματα που παρέχουν τα χουμικά στα φυτά είναι η βελτίωση της ριζοβολίας και αύξηση της πρόσληψης θρεπτικών στοιχείων από την καλλιέργεια.

### ***1.2.3. Υδρολυμένες πρωτεΐνες: ζωικής ή φυτικής προέλευσης***

Οι υδρολυμένες πρωτεΐνες είναι μίγματα πολυπεπτιδίων, ολιγοπεπτιδίων και αμινοξέων οι οποίες παρασκευάζονται από πηγές πρωτεϊνών με τη χρήση μερικής υδρόλυσης και παράγονται είτε, μέσω χημικής, είτε, μέσω ενζυματικής υδρόλυσης, πρωτεϊνών που προέρχονται από αγροτικές πηγές όπως απόβλητα ζώων από ζώα ή υπολείμματα καλλιεργειών ( π.χ. υποπροϊόντα από τη βιομηχανία δέρματος, τη διαδικασία παραγωγής ψαριών, ή από βιομάζα ψυχανθών.).

Μέχρι στιγμής, περισσότερο από το 90% των υδρολυμένων πρωτεϊνών προέλευσης ( ειδικά από κολλαγόνο και υποπροϊόντα δέρματος ), ενώ οι ενζυματικής προέλευσης πρωτεΐνες παράγονται από φυτά και λόγω της πρόσφατης νέας τεχνολογίας που χρησιμοποιείται για την παραγωγή τους, κατέχουν ακόμη, πολύ μικρότερο ποσοστό στην αγορά. Οι δυο διαδικασίες ( χημική ή ενζυματική υδρόλυση) και η πηγή πρωτεϊνών (ζωικής ή φυτικής προέλευσης) έχουν μεγάλο ενδιαφέρον ώστε να πετύχουμε υψηλής ποιότητας υδρολυμένες πρωτεΐνες. Η διαδικασία υδρόλυσης με οξύ χρησιμοποιεί υψηλές θερμοκρασίες ( πάνω από 138 C και πίεση > 220,6 kPa) προκαλώντας μια ανεξέλεγκτη υδρόλυση πρωτεϊνών με απελευθέρωση πολλών ελεύθερων αμινοξέων, αλλά και καταστροφή μερικών αμινοξέων όπως είναι η τρυπτοφάνη.

Από την άλλη πλευρά η μέθοδος της ενζυματικής υδρόλυσης χρησιμοποιεί πρωτεολυτικά ένζυμα και θερμοκρασίες όχι μεγαλύτερες των 60° C. Τα πρωτεολυτικά ένζυμα χρησιμοποιούνται για την επιλεκτική υδρόλυση των πρωτεϊνών σε αμινοξέα και πεπτίδια ενώ το pH παραμένει κοντά στο 7.

Πρωτεΐνες που παράγονται με ενζυματική υδρόλυση περιέχουν λιγότερα ελεύθερα αμινοξέα, αλλά περισσότερα διαλυτά πεπτίδια και αμινοξέα, όπως η τρυπτοφάνη, η οποία δεν μπορεί να παραχθεί με τη διαδικασία της χημικής υδρόλυσης. Τα αμινοξέα εμφανίζονται με L και D μορφές, αλλά μόνο οι L μορφές μπορούν να χρησιμοποιηθούν από τα φυτικά κύτταρα.

Η «ρακεμοποίηση» (racemization) είναι η μετατροπή των L μορφών των αμινοξέων σε D μορφές, ενώ ο βαθμός ρακεμοποίησης αντιπροσωπεύει την αναλογία μεταξύ των αμινοξέων D μορφής και L μορφής, που είναι παρόντα στο συνολικό περιεχόμενο αμινοξέων. Ο υψηλός βαθμός ρακεμοποίησης δείχνει ότι το προϊόν είναι χαμηλής ποιότητας εξαιτίας του υψηλού περιεχομένου του σε D μορφής αμινοξέα (τα οποία όπως τονίσαμε πιο πάνω δεν μπορούν να χρησιμοποιηθούν από τα φυτικά κύτταρα, σε αντίθεση με τα L που απορροφώνται κατ' ευθείαν από τα φυτικά κύτταρα).

Με τη χημική υδρόλυση παρουσιάζεται υψηλός βαθμός ρακεμοποίησης, κυρίως εξαιτίας των ακραίων συνθηκών που επικρατούν κατά τη διάρκεια της αντίδρασης (υψηλές θερμοκρασίες, πίεση και οξύτητα). Με τη χημική υδρόλυση παρουσιάζεται ανεξέλεγκτο σπάσιμο της αλυσίδας των αμινοξέων μετατρέποντας τις L-μορφές σε D-μορφές.

Με την ενζυματική υδρόλυση, η οποία γίνεται σε συνθήκες χαμηλής θερμοκρασίας και ουδέτερου pH, οι ενζυματικά παραγόμενες υδρολυμένες πρωτεΐνες, έχουν μεγάλο περιεχόμενο σε αμινοξέα L-μορφής καθώς και χαμηλό ποσό χλωρίου και νατρίου, σε αντίθεση με τα χημικής υδρόλυσης αμινοξέα, που εξαιτίας της χρήσης χλωριούχου οξέος και υδροξειδίου του νατρίου κατά τη διαδικασία παραγωγής τους παρουσιάζουν αυξημένη ποσότητα χλωρίου και νατρίου στη σύνθεσή τους.

Η σύνθεση των αμινοξέων (αμινόγραμμα) αλλάζει ανάλογα με την πηγή προέλευσης των πρωτεϊνών. Αμινοξέα που προερχόμενα από πρωτεΐνες φυτικής προέλευσης, παρουσιάζουν μεγάλη περιεκτικότητα σε ασπαρτικό και γλουταμινικό οξύ, τα οποία παίζουν σημαντικό ρόλο στο μεταβολισμό του αζώτου των φυτών και στη βιοσύνθεση της χλωροφύλλης (Bulgari et al, 2019)..

Οι ζωικής προέλευσης υδρολυμένες πρωτεΐνες παρουσιάζουν μεγάλη περιεκτικότητα σε γλυκίνη και προλίνη οι οποίες έχουν ζωτικής σημασίας ρόλο στη σταθεροποίηση των πρωτεϊνών και των κυτταρικών τοιχωμάτων. Επίσης ρυθμίζουν την ωσμωτική πίεση στο κυτόπλασμα σε περιπτώσεις έντονου stress (Ντάσκας, 2016).

### **1.3.Μηχανισμός δράσης βιοδιεγερτών**

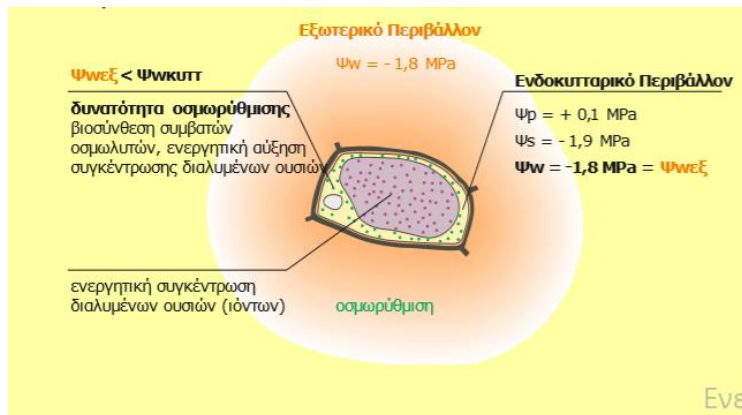
Οι βιοδιεγέρτες χρησιμοποιούνται για να ενισχύσουν την άμυνα των φυτών, για να βελτιώσουν την εδαφική δομή και για να προωθήσουν την αύξηση και την ανάπτυξη των φυτικών οργανισμών. Πιο συγκεκριμένα, αυξάνεται η πρόσληψη θρεπτικών συστατικών και διευκολύνεται η χρήση τους από τα φυτά και έτσι ενισχύεται η ανοχή τους σε βιοτικές (μύκητες, βακτήρια, έντομα) και αβιοτικές (ξηρασία, αλατότητα, μη ευνοϊκές θερμοκρασίες, οξειδωτικό στρες) καταπονήσεις (Du Jarbin, 2015, Van Oosten et al., 2017, Povero et al., 2016). Ακόμη, οι βιοδιεγερτικές ουσίες σχετίζονται με την βελτίωση κάποιων φυσικοχημικών ιδιοτήτων του εδάφους λόγω ανάπτυξης μικροβιακής δραστηριότητας και ανάπτυξης συμπληρωματικών μικροοργανισμών (Calvo et al., 2014). Τέλος, η χρήση τέτοιων προϊόντων επιφέρει μεγαλύτερη και ποιοτικότερη παραγωγή (Du Jarbin, 2015, Van Oosten et al., 2017).(πτυχιακη τει κρητης)

Η χρήση βιοδιεγερτικών ουσιών στην γεωργική πρακτική επηρεάζει μια σειρά από διαδικασίες, όπως η διευκόλυνση της πρόσληψης θρεπτικών ουσιών, η αύξηση της μικροβιακής δραστηριότητας, η βελτίωση φυσικοχημικών ιδιοτήτων του εδάφους, η προστασία των φυτών σε αντίξοες βιοτικές και αβιοτικές συνθήκες, η ανάπτυξη του ριζικού συστήματος αλλά και η ποσοτική και ποιοτική βελτίωση των παραγόμενων προϊόντων .

### **ΟΣΜΩΤΙΚΗ ΕΞΙΣΟΡΡΟΠΙΣΗ Ή ΟΣΜΩΡΥΘΜΙΣΗ**

Η ωσμωτική εξισορρόπηση χαμηλώνει το οσμωτικό δυναμικό ( $\Psi_s$ ) των κυττάρων Έτσι μειώνεται με τη σειρά του το δυναμικό νερού του κυττάρου ( $\Psi_w$ ) Η μείωση αυτή έχει ως αποτέλεσμα την διατήρηση της ικανότητας των κυττάρων να προσλάβουν νερό όταν η διαθεσιμότητά του είναι μειωμένη (συνθήκες υπό τις οποίες το δυναμικό νερού του εδάφους είναι επίσης χαμηλό) Τα παραπάνω συμβαίνουν ταυτόχρονα με την διατήρηση μιας ανεκτής πίεσης σπαργής των κυττάρων και την αποτροπή της πλασμόλυσης. Η ωσμωτική πίεση

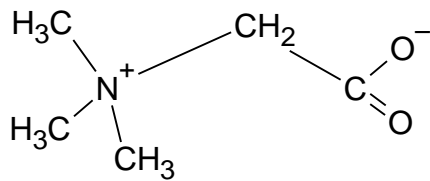
προκαλεί κλείσιμο των στομάτων στο μεσόφυλλο, ελάττωση της φωτοσύνθεσης και αναστολή της ανάπτυξης.



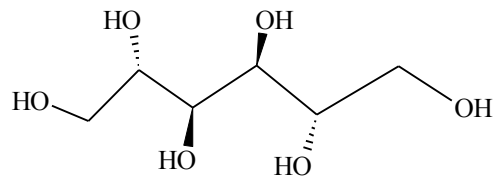
Εικόνα 5 Συνθήκες έλλειψης ύδατος και λειτουργία οσμωρύθμισης στο κύτταρο (Σημειώσεις Φυσιολογίας Φυτών Γεωπονικό Πανεπιστήμιο Αθηνών)

Τα φυτά υπόκεινται κατά τον κύκλο της ζωής τους σε αβιοτικές καταπονήσεις όπως αλατότητα, ξηρασία, ακραίες θερμοκρασίες, ρύπανση από βαρέα μέταλλα, μόλυνση από παθογόνα, έλλειψη θρεπτικών και έκθεση σε UV ακτινοβολία. Μια στρατηγική που αναπτύσσουν για να ανταπεξέλθουν σε καταπονήσεις είναι η συσσώρευση οσμωλυτών όπως η προλίνη, η γλυκίνη-μπεταΐνη, προλίνη-μπεταΐνη, γλυκερόλη, μαννιτολη και σορβιτόλη. Ο δισακχαρίτης τρεαλόζη, η γλυκόζη και ορισμένοι ολιγοσακχαρίτες που προστατεύουν τα κύτταρα έναντι των αβιοτικών στρεσογόνων παραγόντων (Εικόνα 3)

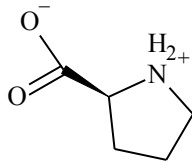
Είναι μικρά μόρια χωρίς φορτίο σε φυσιολογικό Ph με υψηλή διαλυτότητα στο νερό το οποίο τους επιτρέπει να συσσωρεύονται χωρίς να είναι τοξικά. Θα πρέπει να είναι πολικά μόρια ώστε να είναι ευδιάλυτα στο χυμοτόπιο, να έλκουν μεγάλο αριθμό μορίων νερού και ταυτόχρονα να προστατεύουν τα ευαίσθητα πρωτεϊνικά μόρια του κυτταροπλάσματος από την αλληλεπίδραση με αποσταθεροποιητικά μόρια. Θα πρέπει να είναι εύκολο να αποκτηθούν από το κύτταρο και η υψηλή συσσώρευσή τους να μην προκαλεί δυσλειτουργίες στον κυτταρικό μεταβολισμό.



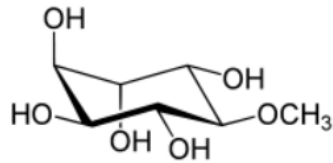
Γλυκίνη μεταΐνη



L-μανιτόλη



L-προλίνης



Πινιτόλη

**Εικόνα 6** Οσμωλυτικές ουσίες που παράγονται στα κύτταρα σε συνθήκες αβιοτικών καταπονήσεων.

Κατά την διάρκεια της αφυδάτωσης των ιστών που συμβαίνει σε μια ομάδα φυτών εξαιρετικά ανθεκτικών στην έλλειψη νερού που ονομάζονται αναβιώνοντα φυτά αυτά έχουν την δυνατότητα να ανακάμπτουν ταχύτατα μετά από περιόδους παρατεταμένης ξηρασίας έχει δειχθεί πως τα σάκχαρα αλληλεπιδρούν με τις προεξέχουσες πολικές κεντρικές ομάδες των πρωτεϊνών αντικαθιστώντας τα μόρια του ύδατος. Έτσι τα σάκχαρα επιτρέπουν την απομάκρυνση του νερού από τις πρωτεΐνες χωρίς αυτή να οδηγεί σε αλλαγές στη διάταξη ή σε απώλεια της ενζυμικής λειτουργίας. Λειτουργούν ως υποκατάστατα νερού διατηρώντας το δίκτυο δεσμών υδρογόνου (Carpenter and Gowe, 1988, Wolkers et al, 1998).

Στη βιβλιογραφία αναφέρεται η συσσώρευση προλίνης σε φυτά που έχουν υποστεί υδατική καταπόνηση. Πέρα από τον ρύθμιση της ωσμωτικής πίεσης που επιφέρει, δρα και ως ένα μόριο αντιοξειδωτικό που επιφέρει την καταστροφή των ROS (δραστικά είδη οξυγόνου). Ο ρυθμός του κύκλου του Calvin κατά την διάρκεια των καταπονήσεων ελαττώνεται με αποτέλεσμα να εμποδίζεται η οξείδωση του NADPH και η παραγωγή του NADP<sup>+</sup>. Η ροή των ηλεκτρονίων στην αλυσίδα μεταφοράς των ηλεκτρονίων ανακόπτεται λόγω της έλλειψης του υποδοχέα NADP. Αυτό με την σειρά του οδηγεί στην παραγωγή απλά διεγερμένου οξυγόνου <sup>1</sup>O<sub>2</sub> στο κέντρο του φωτοσυστήματος PSI και στην συσσώρευση των ROS results in the (Chaves et al. 2009). Η βιοσύνθεση της προλίνης είναι ένα αναγωγικό μονοπάτι και χρησιμοποιεί NADPH για την αναγωγή το γλουταμικό σε P5C (pyrroline-5-carboxylate) και στη συνέχεια το P5C σε προλίνη και γεννά NADP<sup>+</sup> το οποίο μπορεί να συζευχθεί περαιτέρω ως υποδοχέας ηλεκτρονίων στο οξειδωτικό μονοπάτι

των φωσφορικών πεντοζών. Κατά αυτόν τον τρόπο αύξηση του ρυθμού βιοσύνθεσης της προλίνης στους χλωροπλάστες υπό συνθήκες stress βοηθά στην διατήρηση της αναλογίας NADPH/NADP<sup>+</sup> σε χαμηλά επίπεδα και στην προστασία του φωτοσυνθετικού κέντρου διέγερσης, σταθεροποιεί το οξειδοαναγωγικό δυναμικό και προστατεύει την φωτοσυνθετική μηχανή από φωτοαναστολή (Iqbal et al.2016). Κατά την ανάκαμψη από το stress, η οξείδωση της προλίνης παρέχει ισοδύναμα 30 ATP που είναι απαραίτητα για τις υψηλές ενεργειακές απαιτήσεις των οργανισμών. Η παραγωγή προλίνης σε συνθήκες κααπόνησης έχει βρεθεί ότι ενεργοποιεί τα ένζυμα που είναι υπεύθυνα για την καταστροφή των ROS

#### **1.4.Επίδραση**

Η εφαρμογή υδρολυμένων πρωτεϊνών στα φυτά επηρεάζει την ανάπτυξή τους, τη θρέψη τους, την αντοχή τους σε αβιοτικό stress και τη μικροβιακή κοινότητα γύρω από τη ριζόσφαιρα.

Τα προϊόντα αυτά προάγουν την ανάπτυξη των ριζών και των βλαστών εξαιτίας της παρουσίας βιο διεγερτικών πεπτιδίων και αμινοξέων, τα οποία είναι πρόδρομοι μερικών φυτοορμονών όπως της τρυπτοφάνης, της αυξίνης, της αργινίνης και της πολυαμίνης. Οι υδρολυμένες πρωτεΐνες μπορούν να επηρεάσουν θετικά την αζωτούχο θρέψη των φυτών. Το οργανικό άζωτο που περιέχουν τα αμινοξέα και τα πεπτίδια αποτελεί μια κατευθείαν πηγή αζώτου στα φυτά , διότι το άζωτο αυτό είναι σε μορφή άμεσα αφομοιώσιμη είτε από τις ρίζες είτε από τα φύλλα.

Είναι πολύ σημαντικό να τονίσουμε ότι οι υδρολυμένες πρωτεΐνες εφαρμόζονται συνήθως σε πολύ χαμηλές δόσεις, οι οποίες δεν μπορούν να εφοδιάσουν τα φυτά με το απαραίτητο άζωτο.

#### **1.5.Αποτελέσματα χρήσης βιοδιεγερτών**

Το 2015 στη Φλωρεντία της Ιταλίας έγινε το 2ο παγκόσμιο συνέδριο, σχετικά με τη χρήση των βιοδιεγερτών στη γεωργία. Στο συνέδριο αυτό, συμμετείχαν πάνω από 900 άνθρωποι από 65 διαφορετικές χώρες του κόσμου και πάνω από 550 εταιρείες και οργανισμοί, οι οποίοι βρέθηκαν εκεί για να παρακολουθήσουν το συνέδριο.

Τα συμπεράσματα και τις τοποθετήσεις των συνέδρων στο συνέδριο αυτό, δίνουν πολλές επιστημονικές απαντήσεις σε ερωτήσεις που απασχολούν τον επιστημονικό κόσμο.

Με αυτό το άρθρο, θα προσπαθήσουμε να μεταφέρουμε χρησιμοποιώντας σαν βασική πηγή πληροφόρησης άρθρα που δημοσιεύτηκαν στο περιοδικό New Ag international, όλα τα συμπεράσματα που προέκυψαν από το συνέδριο και να ρίξουμε μια βαθιά ματιά σε επτά κατηγορίες ουσιών, που κατά τεκμήριο παρουσιάζουν βιοδιεγερτικές ιδιότητες.

Στα θετικά αποτελέσματα δεν συγκαταλέγονται μόνο η αύξηση της ριζικής επιφάνειας, αλλά και η αυξημένη δραστηριότητα της ριζικής μεμβράνης στη μεταφορά θρεπτικών στοιχείων, όπως το άζωτο και ο σίδηρος. Τα χουμικά συμβάλουν στην ανάπτυξη των φυτών μέσω του άνθρακα και του μεταβολισμού του αζώτου. Η νιτρική ρεδουκτάση, η γλουταμινική διυρογονάση και η γλουταμινική συνθετάση, είναι ένζυμα συνδεδεμένα με το μεταβολισμό του αζώτου και διεγείρονται με τη χρήση διαφόρων ειδών χουμικών. Η εφαρμογή των χουμικών μπορεί να μειώσει το συνολικό ποσό των υδατανθράκων που χρησιμοποιούνται για την παραγωγή σακχάρων και οι υδατάνθρακες να χρησιμοποιηθούν για υποστήριξη της ανάπτυξης και του μεταβολισμού του αζώτου. Επιπλέον, τα χουμικά λόγω των αλλαγών που προκαλούν στο φυτικό μεταβολισμό και στην απορρόφηση θρεπτικών στοιχείων, έχουν σημαντικό ρόλο και στο δευτερεύοντα μεταβολισμό αυξάνοντας την έκφραση των ενζύμων ( φαινυλ-αλανίνη, τυροσίνη ), που εμπλέκονται στη βιοσύνθεση των φαινολικών ενώσεων. Άλλη μια δραστηριότητα που έχουν τα χουμικά είναι η αύξηση των αντιοξειδωτικών ενζύμων (π.χ. περοξειδάση), προάγοντας τη συσσώρευση αντιοξειδωτικών, τα οποία μειώνουν τις ζημιές που επιφέρει η αντίδραση ειδών οξυγόνου που γεννιούνται στους φυτικούς ιστούς κάτω από συνθήκες βιοτικού ή αβιοτικού stress.

Η καλύτερη ανάπτυξη των ριζών, η βελτίωση του πρωτεύοντος και δευτερεύοντος μεταβολισμού μαζί με τη δράση τους στο αντιοξειδωτικό αμυντικό σύστημα επιτρέπουν μια συνολική αύξηση της αντοχής της καλλιέργειας σε βιοτικό ή αβιοτικό stress π.χ. ( ξηρασία, πάγος, περονόσπορος ). Επειδή τα χουμικά είναι δύστροπα στην αποδόμηση από τους μικροοργανισμούς, είναι πολύ σημαντικά για τη δημιουργία αποικιών μικροοργανισμών γύρω από τη ριζόσφαιρα (βιολίπανση ).

Αυτό είναι ένας νέος ορίζοντας στη χρήση χουμικών, ο οποίος αναμένεται να επεκταθεί μελλοντικά, ως συνέπεια του ενδιαφέροντος για χρήση ωφέλιμων μικροοργανισμών στη γεωργία. Από πρακτικής άποψης, τα χουμικά μπορούν να εφαρμοσθούν στο εδαφικό υπόστρωμα σε ξηρή ή το πιο σύνηθες σε υγρή μορφή ( διαλύματα χουμικών και φουλβικών οξέων ) μέσα από τα αρδευτικά συστήματα.

Μικρά μόρια όπως αυτά των φουλβικών οξέων είναι πιο αποτελεσματικά από αυτά των χουμικών οξέων, επομένως είναι πολύ σημαντικό όταν χρησιμοποιούμε ένα μίγμα



χουμικών/φουλβικών οξέων να δίνουμε μεγάλη σημασία στην περιεκτικότητά του σε φουλβικά. Όσο μεγαλύτερο ποσοστό φουλβικών περιέχει, τόσο δραστικότερο είναι.

Τα μονοκοτυλήδονα ανταποκρίνονται, κάτω από κανονικές συνθήκες, καλύτερα από τα δικοτυλήδονα, ενώ κατά κανόνα η αντίδραση των φυτών σε χουμικά που προέρχονται από λιγνίτη, λεοναρδίτη και υποπροϊόντα γαιάνθρακα είναι μικρότερη έναντι αυτών που προέρχονται από τύρφη, compost ή vermicomposts. Τέλος, σε γενικές γραμμές, οι καλλιέργειες ανταποκρίνονται καλύτερα στη χρήση χουμικών, όταν τα εδάφη είναι φτωχά σε θρεπτικά στοιχεία, αμμώδη ή αλατούχα.

Τα θετικά αποτελέσματα των υδρολυμένων πρωτεϊνών στη θρέψη των φυτών, σχετίζονται με την αύξηση της βιοδιαθεσιμότητας των θρεπτικών στοιχείων λόγω της ικανότητας των πεπτιδίων και των αμινοξέων να συμπλέκονται με τα θρεπτικά στοιχεία, προστατεύοντάς διευκολύνοντας την αφομοίωση τους τα από την έλλειψη διαλυτότητας. Το αποτέλεσμα αυτό είναι πολύ χρήσιμο ιδιαίτερα για την αύξηση της βιοδιαθεσιμότητας των ιχνοστοιχείων (όπως ο σίδηρος, ο ψευδάργυρος, το μαγγάνιο ) στα αλκαλικά εδάφη. Οι υδρολυμένες πρωτεΐνες μπορούν επίσης να προάγουν τη θρέψη των καλλιεργειών λόγω της συμμετοχής τους στην ενεργοποίηση ειδικών ενζύμων στις ρίζες που σχετίζονται με την απορρόφηση των θρεπτικών στοιχείων.

Για παράδειγμα, εδαφικές ή διαφυλλικές εφαρμογές με φυτικής παραγωγής υδρολυμένες πρωτεΐνες, ενεργοποιούν τη χηλική ρεδοκτάση του σιδήρου στο ριζικό σύστημα φυτών τομάτας αυξάνοντας την απορρόφηση του σιδήρου σε αλκαλικό περιβάλλον. Για τους πιο πάνω λόγους, καλλιέργειες που γίνονται επεμβάσεις με υδρολυμένες πρωτεΐνες (αμινοξέα-πεπτίδια), παρουσιάζουν καλύτερη εικόνα σχετικά με τη θρεπτική τους κατάσταση. Οι υδρολυμένες πρωτεΐνες μπορούν, όπως τονίσαμε και πιο πάνω, να αυξήσουν την αντοχή των καλλιεργειών σε αβιοτικό stress, όπως ξηρασία, αλατότητα, θερμικό stress και χαμηλές συνθήκες φωτισμού.

**Συμπερασματικά τα θετικά αποτελέσματα των υδρολυμένων πρωτεϊνών στην αντιμετώπιση του αβιοτικού stress, συνοψίζονται:**

- στην καλύτερη ανάπτυξη του ριζικού συστήματος,
- υψηλότερη αναλογία ριζών/βλαστών,
- καλύτερη θρεπτική κατάσταση,
- υψηλότερη σταθερότητα των κυτταρικών μεμβρανών,
- συσσώρευση ωσμωλιτικών (όπως η προλίνη) και αντιοξειδωτικών,

- ενεργοποίηση του ενζυματικού συστήματος προστασίας από οξειδωτικό stress και τροποποίηση της ορμονικής κατάστασης των φυτών.

Πρόσφατες **μελέτες έδειξαν** ότι οι υδρολυμένες πρωτεΐνες, όχι μόνο αυξάνουν δευτερευόντως την αντοχή στο αβιοτικό stress, αλλά και την αντοχή των φυτών σε ασθένειες, όπως ο περονόσπορος στο αμπέλι, λόγω της συσσώρευσης ρεσβερατρόλης (είναι η κυριότερη φυτοαλεξίνη του αμπελιού) στα φύλλα.

Οι υδρολυμένες πρωτεΐνες **βελτιώνουν την ποιότητα των φρούτων και των λαχανικών**, λόγω της αύξησης της φωτοσύνθεσης, της βιοσύνθεσης πρωτεϊνών και της ενεργοποίησης δευτερεύοντος μεταβολισμού στα κύτταρα. Για παράδειγμα, υψηλή συσσώρευση σακχάρων και αντιοξειδωτικών (καροτενοειδών, πολυπεπτιδίων κ.τ.λ.) παρατηρείται στους καρπούς της πιπεριάς όταν εφαρμόζονται στα φυτά, πρωτεΐνες φυτικής υδρόλυσης.

Οι υδρολυμένες πρωτεΐνες **μπορούν να μειώσουν το περιεχόμενο ανεπιθύμητων θρεπτικών, όπως τα νιτρώδη στα φυλλώδη λαχανικά.**

Στην πράξη εφαρμόστηκαν υδρολυμένες πρωτεΐνες σε μαρούλια διαφυλλικά και με ριζοπότισμα και το αποτέλεσμα ήταν να παρουσιάσουν μικρότερο περιεχόμενο νιτρικών στα φύλλα από φυτά που εφαρμόστηκε μόνο νιτρική αμμωνία. Αυτό συνέβη εξαιτίας της ικανότητας των υδρολυμένων πρωτεϊνών να αυξάνουν τις ενζυματικές διεργασίες που σχετίζονται με την αφομοίωση των νιτρικών και τη μείωση της απορρόφησης νιτρικών από τις ρίζες.

## ΚΕΦΑΛΑΙΟ 2<sup>ο</sup> : ΚΑΤΑΠΟΝΗΣΗ ΤΩΝ ΦΥΤΩΝ ΚΑΙ Η ΑΝΤΟΧΗ ΤΟΥΣ ΣΕ ΑΒΙΟΤΙΚΟ ΣΤΡΕΣ

### 2.1. Οι πιο κοινές μορφές φυτικού στρες

Τα φυτά εκτίθενται συνεχώς σε πολλούς παράγοντες καταπόνησης (stress) στον τομέα, οι οποίοι επηρεάζουν την παραγωγή τους. Το βιολογικό στρες είναι μια δυσμενή δύναμη ή κατάσταση που εμποδίζει την κανονική λειτουργία μιας καλλιέργειας. Αυτές οι πιέσεις μπορεί να είναι βιοτικές ή αβιοτικές. Οι βιοτικές καταπονήσεις περιλαμβάνουν παθογόνα (ιούς, βακτήρια και μύκητες), έντομα, φυτοφάγα και τρωκτικά. Οι αβιοτικές καταπονήσεις περιλαμβάνουν κρύο (ψύξη και παγετό), θερμότητα (υψηλή θερμοκρασία), αλατότητα (αλάτι), ξηρασία (κατάσταση έλλειψης νερού), υπερβολική ποσότητα νερού (πλημμύρα), ακτινοβολία (υπεριώδης και ορατή φωτεινότητα υψηλής έντασης) (βαρέα μέταλλα, φυτοφάρμακα και αερολύματα), οξειδωτικό στρες (αντιδραστικά είδη οξυγόνου, όζον), άνεμος (σωματίδια άμμου και σκόνης στον άνεμο) και στέρηση θρεπτικών ουσιών στο έδαφος. Όλοι αυτοί οι παράγοντες μπορεί να επηρεάσουν την ανάπτυξη και αναπαραγωγή των φυτών με διαφορετικά επίπεδα σοβαρότητας.



Εικόνα 7. Αβιοτικό στρες: η καταπόνηση που προκαλείται από μη ζωντανούς οργανισμούς στο φυτό που επηρεάζουν σε ακραίο βαθμό το περιβάλλον που αναπτύσσεται το φυτό (Πηγή: <https://www.albit.gr/xarakteristika/itemlist/user/938-albit>)

Πολλές φορές, όπως προαναφέρθηκε, λόγω των δύσκολων και μη ευνοϊκών περιβαλλοντικών συνθηκών, τα φυτά προκειμένου να επιβιώσουν αναγκάζονται να φτάσουν στα όρια των δυνατοτήτων τους. Στην παρούσα υποενότητα συνοψίζονται οι πιο συνηθισμένες μορφές του στρες των φυτών.

### **Περιβαλλοντικό στρες**

Το περιβαλλοντικό στρες, το προκαλούν οι δυσμενείς αβιοτικοί παράγοντες. Σε αυτό περιλαμβάνονται όλοι οι μη ζωντανοί περιβαλλοντικοί παράγοντες, η επίδραση των οποίων είναι αρνητική ή επιβλαβής στην ανάπτυξη των φυτών. Ο αριθμός των επιστημονικών ερευνών που έχει διεξαχθεί σε σχέση με το στρες που προκαλεί η ξηρασία, η υπερβολική υγρασία, η αλατότητα και οι ακραίες θερμοκρασίες, είναι πολύ μεγάλος. Επιπλέον, τα ζητήματα των υψηλών εντάσεων φωτός και των ελλείψεων σε ανόργανα θρεπτικά συστατικά, απασχολούν εξίσου τους καλλιεργητές. Τα προβλήματα που προαναφέρθηκαν, καθώς επιδρούν δυσμενώς στις αποδόσεις των καλλιεργειών, χρήζουν αντιμετώπισης,

### **Μηχανικό στρες**

Η ευαισθησία των φυτών στο μηχανικό στρες είναι πολύ μεγάλη. Είναι γνωστό σε κάθε παραγωγό, πως όταν κάποιος αγγίζει υπερβολικά τα φυτά, μπορεί να γίνουν πιο κοντά. Επίσης, σοβαρά προβλήματα μπορεί να δημιουργηθούν ένα τραυματιστούν οι φυτικοί ιστοί. Μηχανικό στρες μπορεί να προκληθεί και εξαιτίας ισχυρού ανέμου ή δονήσεων. Σίγουρα, δεν είναι δυνατόν να αποφευχθεί τελείως, είναι όμως δυνατόν να περιοριστεί σημαντικά.

### **Στρες λόγω ξηρασίας**

Οι πολύ ζεστές και ξηρές ημέρες, οδηγούν στο μαρασμό των φυτών, καθώς ο ρυθμός απορρόφησης νερού από το έδαφος υστερεί σε σχέση με τον ρυθμό που χάνεται νερό μέσω της διαπνοής. Η ελλιπής υγρασία του εδάφους, αποτελεί σημαντικό εμπόδιο στην ανάπτυξη των φυτών. Όμως, η ύπαρξη συστημάτων ελέγχου στα φυτά, βοηθά στην αντιμετώπιση των ελλείψεων νερού.

Στην ουσία, τα φυτά αμύνονται στην ξηρασία μειώνοντας τον ρυθμό διαπνοής. Εξαιτίας της έλλειψης νερού, κλείνουν τα στόματα των φύλλων και η διαπνοή επιβραδύνεται, ενώ διεγείρεται η σύνθεση και απελευθερώνεται αμψιζικό οξύ. Η συγκεκριμένη ορμόνη, βοηθά στη διατήρηση των κλειστών στομάτων. Υπάρχουν ακόμα πολλοί τρόποι ανταπόκρισης των φύλλων στην ξηρασία, όπως το να τυλίγονται σε σχήμα σωλήνα μειώνοντας τη διαπνοή και περιορίζοντας την επιφάνεια του φύλλου που εκτίθεται στις συνθήκες ξηρασίας. Με τον τρόπο αυτό, διατηρείται το νερό, όμως μειώνεται και η φωτοσύνθεση, αποτελώντας έτσι μια αιτία μείωσης της απόδοσης των καλλιεργειών λόγω ξηρασίας.



**Εικόνα 8.** Στρες φυτών λόγω ξηρασίας (Πηγή: <https://blog.farmacon.gr/katigories/tehniki-arthrografia/tytoprostantia/item/2022-oi-pio-koines-morfes-fytikoy-stres>)

Εκτός από τα φύλλα των φυτών, αμύνεται και το ριζικό τους σύστημα απέναντι στις συνθήκες ξηρασίας. Η έλλειψη νερού, στεγνώνει το έδαφος από πάνω προς τα κάτω. Έτσι, οι ρηχές ρίζες δε μπορούν να αναπτυχθούν, κυρίως γιατί δε μπορεί να διατηρηθεί στα κύτταρα η αναγκαία σκλήρυνση για την επιμήκυσή τους. Παρόλο που οι πιο βαθιές ρίζες αναπτύσσονται ακόμα, ο τρόπος πολλαπλασιασμού του ριζικού συστήματος αυξάνει την έκθεση στην υγρασία του εδάφους απαιτώντας πιο πολύ ενέργεια των φυτών.

Για να αντιμετωπιστεί το στρες λόγω ξηρασίας, είναι καίριας σημασίας να προστατευθεί η καλλιέργεια από το στέγνωμα με παράλληλη διατήρηση των επιπέδων φωτοσύνθεση στα συνήθη επίπεδα λειτουργίας. Όταν κλείνουν τα στόματα των φύλλων, μειώνεται το διαθέσιμο διοξείδιο του άνθρακα για το φυτό και συσσωρεύονται ελεύθερες ρίζες στους χλωροπλάστες. Για αυτό ευθύνεται η μεταγωγή σήματος, μια σύνθετη κατανομή χημικών αντιδράσεων, που αφορά την απόκριση του φυτού στις ελεύθερες ρίζες με την παραγωγή αντιοξειδωτικών ουσιών. Αρκετά συχνά, η εμπλοκή ορισμένων φυτικών ορμονών και ελεύθερων αμινοξέων βοηθά τα φυτά στην απόκτηση ανοχής στις συνθήκες ξηρασίας, που αποτελούν αιτία στρες.



Εικόνα 9. . Στρες φυτών λόγω ξηρασίας (Πηγή: <https://blog.farmacon.gr/katigories/tekniki-arthrografia/fytoprostatia/item/2022-oi-pio-koines-morfes-fytikoy-stres>)

Δεν είναι λίγες οι φορές, που μόλις το στρες λόγω ξηρασίας έχει τελειώσει, παρατηρείται γρήγορη ανάκαμψη των μαραμμένων φύλλων. Ωστόσο, τα φύλλα των φυτών που επηρεάστηκαν θα παρουσιάσουν ξανά γήρανση εντός λίγων ημερών. Για αυτή τη γρήγορη γήρανση των φύλλων, ευθύνεται το σπάσιμο του μορίου της χλωροφύλλης, λόγω βλάβης που προκλήθηκε κυρίως από τις ελεύθερες ρίζες που προαναφέρθηκαν.

### Στρες λόγω υπερβολικής υγρασίας

Όσο απειλητική είναι για την επιβίωση του φυτού η έλλειψη νερού, τόσο είναι και το υπερβολικό πότισμά του. Η διαθεσιμότητα οξυγόνου για το ριζικό σύστημα, είναι περιορισμένη σε υδάτινο έδαφος, καθώς η διάχυσή του μέσα από το νερό γίνεται σχεδόν 10.000 πιο αργά σε σχέση με αυτή μέσα από τον αέρα. Όταν δεν υπάρχει αρκετό οξυγόνο, πραγματοποιείται στις ρίζες αναερόβια αναπνοή, έχοντας ως συνέπεια τη δημιουργία τοξικών ενώσεων στο φυτό. Η υπερβολική υγρασία παρουσιάζει τα εξής συμπτώματα: μαρασμό, κιτρίνισμα των φύλλων, σηψηρριζίες και μειωμένη φυτική ανάπτυξη.



Εικόνα 10. . Στρες φυτών λόγω υπερβολικής υγρασίας (Πηγή: <https://blog.farmacon.gr/katigories/tekniki-arthrografia/tytoprostantia/item/2022-oi-pio-koines-morfes-fytikoy-stres>)

Η έλλειψη οξυγόνου, αποτελεί το κύριο πρόβλημα στην περίπτωση του στρες λόγω υπερβολικής υγρασίας. Η έλλειψη αυτή, οδηγεί αρκετά φυτικά είδη στην παραγωγή αιθυλενίου, προκαλώντας το θάνατο του ριζικού συστήματος. Όταν αυτά τα κύτταρα καταστρέφονται, δημιουργούνται σωλήνες αέρα, γεμίζοντας αέρα από τα αναερόβια μέρη

του φυτού. Έτσι, επιτυγχάνεται η λήψη του απαραίτητου οξυγόνου από τις ρίζες. Χάρη στο μηχανισμό αυτό, τα φυτά βοηθούνται σημαντικά ώστε να αντιμετωπίσουν την δύσκολη κατάσταση που έχει δημιουργηθεί από την έλλειψη οξυγόνου. Όμως, τις πιο πολλές φορές δεν είναι δυνατή η ανταπόκριση των καλλιεργειών, με επακόλουθο τον σταδιακό θάνατο των ριζών.

### Στρες λόγω αλατότητας

Ακόμα μια απειλή για τα φυτά, αποτελεί η υπερβολική συγκέντρωση αλάτων στο έδαφος. Το στρες λόγω αλατότητας, προκαλείται από δύο λόγους. Ο πρώτος λόγος, είναι ότι παρά την ύπαρξη αρκετού νερού στο έδαφος, δημιουργείται στα φυτά έλλειμμα νερού από το αλάτι. Επιπλέον, η υψηλή συγκέντρωση νατρίου και άλλων ιόντων γίνεται τοξική για τα φυτά, κατακλύζοντας την επιλεκτική διαπερατότητα των μεμβρανών των ριζών. Δεν είναι δηλαδή, δυνατή η απορρόφηση από το φυτό των σωστών θρεπτικών συστατικών και αντιθέτως, απορροφάται μόνο το νάτριο.



Εικόνα 11. . Στρες φυτών λόγω αλατότητας (Πηγή: <https://blog.farmacon.gr/katigories/texniki-arthrografia/fytoprostatia/item/2022-oi-pio-koines-morfes-fytikoy-stres>)

Η ανταπόκριση πολλών φυτών σε υπόστρωμα μέτριας αλατότητας, γίνεται με την παραγωγή διαλυμένων ουσιών που είναι καλά ανεκτές σε υψηλές συγκεντρώσεις.



Ειδικότερα, είναι αποδεδειγμένη η ικανότητα της φράουλας στην παραγωγή «φαινολικών ενώσεων», οι οποίες θεωρείται ότι συμβάλλουν στην αποκατάσταση ή διατήρηση του δυναμικού νερού των κυττάρων του φυτού, απορρίπτοντας τις τοξικές ποσότητες αλατιού. Όμως, η ενίσχυση αυτή είναι μόνο προσωρινή, καθώς δε μπορεί να αποτρέψει τις απώλειες παραγωγής. Είναι σημαντικό το στρες λόγω αλατότητας να αντιμετωπιστεί γρήγορα, διότι η παρατεταμένη διάρκειά του θα προκαλέσει τελικά τον θάνατο των φυτών.

### **Στρες λόγω υψηλών θερμοκρασιών**

Σοβαρές ζημιές προκαλούνται στα φυτά και εξαιτίας πολύ υψηλών θερμοκρασιών, τόσο άμεσα όσο και έμμεσα, καθώς χάνεται πολύ νερό και προκαλείται έντονη ξηρασία. Επίσης, τα φυτά καίγονται και από ηλιακά εγκαύματα, εάν είναι εκτεθειμένα στον ήλιο κατά τις θερμές και ξηρές περιόδους. Λόγω των εξαιρετικά υψηλών θερμοκρασιών, τα φυτά ωθούνται στην άντληση νερού από τις ρίζες προς στα φύλλα και τα στελέχη. Έπειτα, το νερό βγαίνει από το φυτό μέσα από τα στόματα κατά τη διαπνοή.

Με τη διαδικασία της διαπνοής, ψύχονται τα φύλλα και άλλα μέρη του φυτού, αποτρέποντας τη ζημιά που θα μπορούσε να προκαλέσει η καταπόνηση από την έντονη ζέστη. Όμως, εάν η διαθεσιμότητα του νερού δεν είναι επαρκής για να πραγματοποιηθεί η διαπνοή, θυσιάζεται ένα μέρος της επιφάνειας του φύλλου και καίγεται.



Εικόνα 12. . Στρες φυτών λόγω υψηλών θερμοκρασιών (Πηγή: <https://blog.farmacon.gr/katigories/texniki-arthrografia/fytoprosthata/item/2022-oi-pio-koines-morfes-fytikoy-stres>)

### **Στρες λόγω ψύχους και παγετού**

Σημαντικές βλάβες στις καλλιέργειες μπορούν να προκαλέσουν το ψύχος και ο παγετός, ειδικά σε εκείνες τις ομάδες φυτών που παρουσιάζουν αυξημένη ευαισθησία απέναντι στις συνθήκες αυτές. Βέβαια, ακόμη και στα πιο ανθεκτικά φυτά μπορεί να προκληθούν ζημιές, σε περίπτωση έκθεσης της νέας ανάπτυξης σε παγετό ύστερα από μια θερμή περίοδο. Η εμφάνιση των συμπτωμάτων, παρατηρείται κυρίως τη νύχτα, επηρεάζοντας πολλά φυτά. Μπορεί να προκληθεί μαύρισμα στα φύλλα και στους μίσχους και αποχρωματισμός στα άνθη. Λόγω των δυσμενών συνεπειών του ψύχους, δεν είναι δυνατή η παραγωγή καρπών σε ορισμένα άνθη.

### **Χημικό στρες**

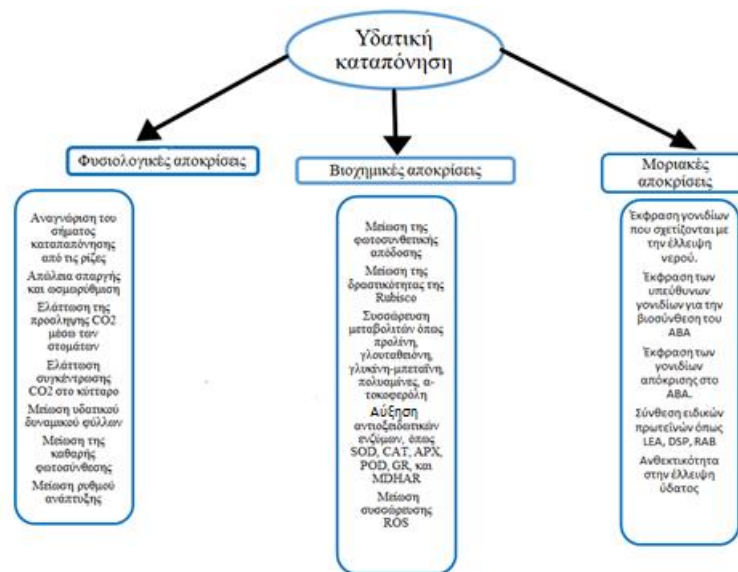
Η εφαρμογή χημικών σκευασμάτων κάθε είδους, σε λάθος δοσολογία ή χρονική στιγμή, μπορεί να προκαλέσει σοβαρές βλάβες στο φυτό. Η συχνότερη αιτία χημικών βλαβών είναι η λάθος εφαρμογή παρασιτοκτόνων και η απρόσεκτη χρήση των ζιζανιοκτόνων. Ακόμη, συχνά προκαλούνται ακούσια ζημιές στα φυτά εξαιτίας μετατόπισης του ψεκασμού.

Η χημική βλάβη εμφανίζεται στα φύλλα του φυτού ως κόκκινο, κίτρινο ή καφέ σημείο, οι άκρες των φύλλων μετατρέπονται σε καφετιά, ακανόνιστα φυτά και τελικά επέρχεται ο θάνατος του φυτού.

Οι έρευνες για την αντίληψη των φυτών έναντι των στρεσογόνων παραγόντων και για την ενίσχυση της ανθεκτικότητάς τους απέναντι στις διάφορες μορφές περιβαλλοντικού στρες, συνεχίζονται ακόμα.

## **2.2.Μηχανισμοί ανοχής στην υδατική καταπόνηση**

Πολλά φυτά δοκιμάζονται κατά περιόδους από έλλειψη νερού στο έδαφος ή στην ατμόσφαιρα καθώς και σε υψηλή αλατότητα εδάφους. Εκτιμάται ότι παγκόσμια περίπου το 6% της ξηράς και το 30% των αρδευόμενων περιοχών υποφέρουν από υφαλμύρωση των εδαφών. Η επέκταση της γεωργικής παραγωγής σε άνυδρες και ξηρές περιοχές με την άρδευση θα αυξήσουν την δευτερογενή υφαλμύρωση ως αποτέλεσμα της έλλειψης υδρολογικού ισοζυγίου των εδαφών μεταξύ του νερού που παρέχεται και του νερού που χρησιμοποιείται από τις καλλιέργειες (διαπνοή). Επιπλέον η με γοργούς ρυθμούς κλιματική αλλαγή αναμένεται να επιφέρουν ξηρασία σε πολλές περιοχές του πλανήτη και ανάμεσα σε αυτές και στη Μεσόγειο τα επόμενα χρόνια (Intergovernmental Panel on Climate Change, 2007). Τα φυτά για να ανταπεξέλθουν στις συνθήκες έλλειψης νερού έχουν αναπτύξει μηχανισμούς της αποφυγής και της ανοχής στην αφυδάτωση. Η αποφυγή της αφυδάτωσης, είναι η ικανότητα του φυτού να διατηρεί υψηλό υδατικό δυναμικό και επιτυγχάνεται μέσω μορφολογικών αλλαγών όπως κλείσιμο στομάτων, μείωση της φυλλικής επιφάνειας, και ανάπτυξη εκτεταμένου ριζικού συστήματος. Η ανοχή είναι ικανότητα του φυτού να διατηρεί τις λειτουργίες του ακόμη και σε πολύ χαμηλό υδάτινο δυναμικό και επιτελείται με ειδικούς φυσιολογικούς, βιοχημικούς και μοριακούς κυτταρικούς μηχανισμούς.



**Εικόνα 13. : Φυσιολογικές, βιοχημικές και μοριακές αποκρίσεις στην υδατική καταπόνηση στα ανώτερα φυτά (Ramachandra Reddy et al, 2004).**

Η απόδοση των καλλιεργειών εξαρτάται από την ικανότητα της μονάδας να προσαρμόζεται σε διαφορετικούς τύπους περιβαλλοντικών αντιξοοτήτων, οι οποίες γενικά προκαλούν οξειδωτικό στρες.

Το αμυδιικό οξύ (**abscisic acid** ,ABA) είναι μία από τις κύριες ορμόνες στα λαχανικά. Το μόριο αυτό συμμετέχει σε μια σειρά βασικών φυσιολογικών διεργασιών, όπως η βλάστηση των σπόρων και η ανοχή πριν από το περιβαλλοντικό άγχος. Η ουσία αυτή θεωρείται υπεύθυνη για τον έλεγχο της κίνησης των στομάτων σε φυτά που υφίστανται υδατική καταπόνηση. Το αμυδιικό οξύ που υπάρχει στις ρίζες λαμβάνει το σήμα της ξηρασίας από τις ρίζες του φυτού και το μεταδίδει στο υπέργειο τμήμα του φυτού μέσω του ρεύματος της διαπνοής (Μπουράνης και Χωριανοπούλου, Σημειώσεις Φυσιολογίας Φυτών).

Ο ρυθμός της φωτοσύνθεσης λόγω του κλεισίματος των στομάτων του φύλλου, μειώνεται. Η ελαττούμενη πρόσληψη CO<sub>2</sub> από την ατμόσφαιρα και η μείωση της αφομοίωσης στο κύτταρο συντελεί στην ελάττωση της ενδοκυττάριας συγκέντρωσης του CO<sub>2</sub> (C<sub>i</sub>). Η μείωση της φωτοσύνθεσης οφείλεται σε αλλαγές στον μεταβολισμό του άνθρακα. Σε φυτά που έχουν υποστεί υδατική καταπόνηση μειώνεται η ποσοτητα και η δραστηριότητα του ενζύμου της καρβοξυλάσης της 1-5 φωσφορικής ριβουλόξης (RubisCo)

ενός ενζύμου που κυριαρχεί στη φωτοσύνθεση αλλά και η σύνθεση του ενζύμου της 1,5 διψυφορικής ριβουλόζης (RuBP) Ακόμα η έλλειψη νερού προκαλεί μείωση του pH στους χλωροπλάστες και αυτό οδηγεί σε απώλεια της δραστηριότητας του RubisCo. Μείωση της περιεκτικότητας των χλωροφυλλών, του β-καροτενίου, της λουτεΐνης, και της νεοξανθίνης υποδηλώνει σοβαρή βλάβη του φωτοσυνθετικού μηχανισμού.

Μια άλλη αντίδραση των φυτών σε καταπονήσεις όπως , έλλειψη νερού, υφαλμύρωση των εδαφών, υψηλές θερμοκρασίες είναι η βιοσύνθεση ωσμωλυτών , δηλαδή η συσσώρευση μικρών μορίων με μεγάλη διαλυτότητα στο νερό. Ο ρόλος τους είναι σημαντικός στην ωσμωρύθμιση και την διατήρηση της σπαργής. Ο κύριος ρόλος τους είναι η διατήρηση της ροής του νερού μέσα στο κύτταρο και η πρόσληψη ύδατος μέσω των ριζών μέσω της αύξησης του ωσμωτικού δυναμικού του κυττάρου. Η ενδοκυτταρική συγκέντρωση των ωσμωλυτών φθάνει τα φθάνει 200Mm ενώ η συγκέντρωση της προλίνης σε συνθήκες stress ευθύνεται για το 80% της ολικής συγκεντρώσεων των ελεύθερων αμινοξέων. Επιπρόσθετα με την ωσμωρύθμιση που ασκούν, οι ουσίες αυτές επιτελούν και άλλες λειτουργίες όπως η προστασία της ακεραιότητας των κυτταρικών δομών και των ενζύμων των πρωτεϊνών, η διατήρηση της τριτοταγούς δομής των πρωτεϊνών σε χαμηλό υδατικό περιεχόμενο, η σάρωση των ελεύθερων ριζών. Μια μελέτη αποκάλυψε τον ενεργό ρόλο της γλυκομπεταΐνης στην προστασία του μεταγραφικού και μεταφραστικού μηχανισμού σε συνθήκες υδατικής καταπόνησης. Οι ρίζες υδροξυλίου είναι η πιο δραστική μορφή οξυγόνου και δεν υπάρχει ένζυμο που να βοηθά στην εξουδετέρωση τους. Υδατοδιαλυτές ενώσεις όπως η προλίνη, η μαννιτολη και η κιτρουλλίνη αντιδρούν με τις ρίζες υδροξυλίου.

Δρουν ως υποκατάστατα των μορίων του νερού γύρω από νουκελινικά οξέα, πρωτεΐνες και κυτταρικές μεμβράνες σε περιόδους έλλειψης νερού. Η μείωση του ύδατος προκαλεί αύξηση της ιονικής ισχύος και αυτό επιφέρει την αποσταθεροποίηση των μακρομορίων. Τα μικρά πολικά μόρια υποκαθιστούν τον ρόλο του νερού προστατεύοντας τα μακρομόρια από τις ηλεκτροστατικές αλληλεπιδράσεις με τα ιόντα. Για παραδειγμα έχει αναφερθεί η προστασία του ενζύμου RuBisCO από τη μεταινιη προλίνη και η σταθεροποίηση του φωτοσυστήματος από τη μεταΐνη. (Lisar et al, 2012).

Το περιβαλλοντικό στρες προκαλεί τη συσσώρευση δραστικών ειδών οξυγόνου (ROS) στα κύτταρα των φυτών, τα οποία μπορούν να προκαλέσουν σοβαρή οξειδωτική βλάβη στα φυτά, αναστέλλοντας έτσι την ανάπτυξη και την απόδοση των κόκκων. Οι

δραστικές μορφές οξυγόνου είναι μερικώς ανηγμένα μόρια του ατμοσφαιρικού οξυγόνου και είναι πιο δραστικά από αυτό. Προέρχονται από την διέγερση  $O_2$  οπότε δημιουργείται το οξυγόνο απλής διέγερσης ( $^1O_2$ ) ή από τη μεταφορά ενός, δύο ή τριών ηλεκτρονίων οπότε δημιουργούνται αντίστοιχα το σουπεροξειδικό ανιόν ( $O_2^-$ ), το υπεροξειδίο του υδρογόνου ( $H_2O_2$ ) και η ρίζα υδροξυλίου ( $^{\circ}OH$ ). Τα ROS εμπλέκονται σε διαδικασίες όπως ανάπτυξη, απόκριση σε βιοτικά και αβιοτικά περιβαλλοντικά ερεθίσματα, προγραμματισμένο κυτταρικό θάνατο και μπορεί να λειτουργούν ως μορφοτροπείς σήματος. Οι καταστολείς, οι ορμόνες, η ανάπτυξη και άλλες διάφορες μεταβολικές οδούς μπορούν να διεγείρουν την παραγωγή ROS η οποία με τη σειρά της μπορεί να προκαλέσει άλλες οδούς ή να δράσει άμεσα ως αμυντικές ενώσεις.

Οι γνώσεις σχετικά με τους οξειδωτικούς μηχανισμούς στα φυτά μπορούν να συμβάλουν στην ανάπτυξη φυτών που είναι καλύτερα προσαρμοσμένα στο περιβάλλον και ανθεκτικά στα παθογόνα. Τα φυτά έχουν αμυντικούς μηχανισμούς κατά της οξειδωτικής βλάβης που ενεργοποιούνται κατά τη διάρκεια του στρες για τη ρύθμιση των τοξικών επιπέδων του ROS. Τα αντιοξειδωτικά και τα μη αντιοξειδωτικά συστήματα εμπλέκονται στην αποτοξίνωση του ROS.

Αυτές οι περιβαλλοντικές αντιξοότητες προκαλούν γενικά τη συσσώρευση Δραστικών ειδών οξυγόνου (ROS), η οποία μπορεί να προκαλέσει σοβαρή οξειδωτική βλάβη στα φυτά. Τα ROS είναι τοξικά μόρια που βρίσκονται σε διάφορα υποκυτταρικά διαμερίσματα. Η ισορροπία μεταξύ της παραγωγής και της καταστροφής των ROS υποστηρίζεται από τα ενζυματικά και μη-ενζυματικά αντιοξειδωτικά. Λόγω της προόδου των μοριακών προσεγγίσεων κατά τις τελευταίες δεκαετίες, σήμερα είναι δυνατόν να αναπτυχθούν οικονομικά σημαντικές διαγονιδιακές καλλιέργειες που έχουν αυξημένη ανοχή στις καταπονήσεις

Οι μηχανισμοί καταστροφής των ROS υπάρχουν σε όλα τα φυτά και κατατάσσονται σε ενζυματικούς [(SOD (σουπεροξειδική δεσμουτάση), CAT (καταλάση), APX (περοξειδάση του ασκορβικού οξέος) (POD (περοξειδάση), GR (αναγωγή της γλουταθειόνης), και MDAR (μονοαφυδροασκορβική αναγωγή)] και σε μη ενζυματικούς (φλαβονοειδή, ανθοκυανίνες, καροτενοειδή και ασκορβικό οξύ). Κατά τη διάρκεια των τελευταίων δεκαετιών έχουν αναγνωρισθεί εξειδικευμένες πρωτεΐνες σε φυτά που υπόκεινται σε υδατική καταπόνηση οι οποίες κατατάσσονται σε LEA (πρωτεΐνες όψιμης εμβρυογένεσης), πρωτεΐνες απόκρισης στην παραγωγή αβιδικού οξέος (ABA, abscisic acid)

Αφυδρίνες (Dhns), πρωτεάσες, θερμοπληξιακές πρωτεΐνες (HSP) ένζυμα που απαιτούνται για την βιοσύνθεση ωσμοπροστατευτικών ουσιών (σάκχαρα, πρωτεΐνες και γλυκίνη-βεταΐνη), ένζυμα αντιοξειδωτικά και παράγοντες πρωτεΐνης που αναμιγνύονται στην μεταγωγή του σήματος καταπόνησης και την έκφραση γονιδίων, όπως κινάσες πρωτεϊνών, φωσφατάσες καθώς και μεταγραφικοί παράγοντες (Λαζαρίδη, 2012).

Οι γνώσεις σχετικά με τους οξειδωτικούς μηχανισμούς στα φυτά μπορούν να συμβάλουν στην ανάπτυξη φυτών που είναι καλύτερα προσαρμοσμένα στο περιβάλλον και ανθεκτικά στα παθογόνα. Τα φυτά έχουν αμυντικούς μηχανισμούς κατά της οξειδωτικής βλάβης που ενεργοποιούνται κατά τη διάρκεια του στρες για τη ρύθμιση των τοξικών επιπέδων του ROS. Τα αντιοξειδωτικά και τα μη αντιοξειδωτικά συστήματα εμπλέκονται στην αποτοξίνωση του ROS.

### **2.3. Είδη ROS (Reactive Oxygen Species, ROS)**

Το περιβαλλοντικό άγχος συσχετίζεται άμεσα με την αυξημένη συσσώρευση ROS. Η ισορροπία μεταξύ παραγωγής και σάρωσης ROS μπορεί να διαταραχθεί από έναν αριθμό βιοτικών και αβιοτικών παραγόντων, οι οποίοι μπορεί να αυξήσουν τα ενδοκυτταρικά επίπεδα της ROS. Όταν το επίπεδο του ROS είναι αυξημένο και υπερβαίνει τους αμυντικούς μηχανισμούς, το κύτταρο βρίσκεται σε κατάσταση οξειδωτικού στρες. Οι υψηλές συγκεντρώσεις ROS είναι πολύ επιβλαβείς για τους οργανισμούς και όταν τα συμπτώματα επιμένουν, εμφανίζεται μη αναστρέψιμη βλάβη στα κύτταρα, με αποτέλεσμα την απώλεια φυσιολογικής ικανότητας και ενδεχομένου κυτταρικού θανάτου. Ως εκ τούτου, αμυντικοί μηχανισμοί κατά της οξειδωτικής βλάβης ενεργοποιούνται κατά τη διάρκεια του στρες για να ρυθμίζουν τα τοξικά επίπεδα της ROS.

Τα ROS είναι μια ομάδα ελεύθερων ριζών, αντιδρώντων μορίων και ιόντων που προέρχονται από οξυγόνο. Τα πιο συνηθισμένα ROS περιλαμβάνουν οξυγόνο απλής ( $O_2$ ), ρίζα υπεροξειδίου ( $O_2^-$ ), υπεροξείδιο υδρογόνου ( $H_2O_2$ ) και ρίζα υδροξυλίου (OH). Αυτές οι ουσίες είναι εξαιρετικά δραστικές και τοξικές και μπορούν να οδηγήσουν σε οξειδωτική καταστροφή του κυττάρου. Τα ROS βρίσκονται σε διάφορα υποκυτταρικά διαμερίσματα όπως οι χλωροπλάστες, τα μιτοχόνδρια και τα υπεροξυσώματα λόγω της υψηλής μεταβολικής δραστηριότητας που συμβαίνει κανονικά σε αυτά τα διαμερίσματα. Τα ROS παράγονται σε χλωροπλάστες μέσω της αντίδρασης Mehler, στα μιτοχόνδρια μέσω μεταφοράς ηλεκτρονίων και σε υπεροξυσώματα μέσω φωτοαναπνοής

Η παραγωγή  $H_2O_2$  μπορεί επίσης να γίνει μέσω ενζυματικών πηγών όπως οξειδάσες NADPH πλάσματος-μεμβρανελιωμένη, αμινοξειδάσες και υπεροξειδάσες κυτταρικού τοιχώματος. Διαφορετικά οργανίδια και κυτταρικά διαμερίσματα διαθέτουν ενδεχόμενους στόχους για οξειδωτική βλάβη, καθώς και μηχανισμούς για την εξάλειψη της περίσσειας ROS. Ωστόσο, η ισορροπία μεταξύ παραγωγής και εξάλειψης των ROS μπορεί να διαταραχθεί σοβαρά από διάφορες βιοτικές και αβιοτικές καταπονήσεις. Αυτές οι διαταραχές στην ισορροπία ROS μπορούν να οδηγήσουν σε μια ταχεία αύξηση των ενδοκυτταρικών επιπέδων ROS, τα οποία μπορεί να προκαλέσουν σημαντική βλάβη στις κυτταρικές δομές.

Η ομοιόσταση οξειδοαναγωγής είναι η ισορροπία μεταξύ της παραγωγής και της απομάκρυνσης του ROS. Ωστόσο, όταν η παραγωγή ROS ξεπερνά την κυτταρική ικανότητα απομάκρυνσης, εμφανίζεται μια ανισορροπία της κυτταρικής οξειδοαναγωγής, με αποτέλεσμα μια ταχεία και παροδική περίσσεια ROS, γνωστή ως οξειδωτικό stress. Έτσι, η αντιοξειδωτική ανισορροπία άμυνας διαταράσσει τις μεταβολικές δραστηριότητες προκαλώντας σοβαρές οξειδωτικές βλάβες στα κυτταρικά συστατικά, γεγονός που μπορεί να οδηγήσει σε απώλεια της λειτουργίας και ακόμη και στον κυτταρικό θάνατο.

Το ROS μπορεί να επηρεάσει πολλές κυτταρικές λειτουργίες, για παράδειγμα, μπορεί να βλάψει νουκλεϊνικά οξέα (οξείδωση της δεοξυριβόζης, θραύσματα κλώνων, απομάκρυνση / διαγραφή νουκλεοτιδίων, τροποποίηση βάσεων και διασυνδεδεμένο πρωτεϊνικό DNA), λιπίδια (σπάσιμο της αλυσίδας και αύξηση της ρευστότητας και της διαπερατότητας της μεμβράνης) και πρωτεϊνών (τροποποίηση ειδικού θέματος αμινοξέων, θραυσματοποίηση της πεπτιδικής αλυσίδας, συσσωμάτωση προϊόντων διασταυρούμενης αντίδρασης, αλλοίωση του ηλεκτρικού φορτίου, απενεργοποίηση ενζύμων και αύξηση της ευαισθησίας των πρωτεϊνών σε πρωτεόλυση) και μπορεί να ενεργοποιήσει τον προγραμματισμένο κυτταρικό θάνατο. (Salway, 2006)





Εικόνα 14. Είδη ROS (Πηγή: [https://www.semanticscholar.org/paper/Reactive-oxygen-species-\(ROS\)-and-response-of-as-in-Das-Roychoudhury/af0ce326f25ee7fc393ecacfd09e13561e4933d/figure/0](https://www.semanticscholar.org/paper/Reactive-oxygen-species-(ROS)-and-response-of-as-in-Das-Roychoudhury/af0ce326f25ee7fc393ecacfd09e13561e4933d/figure/0))

## ΚΕΦΑΛΑΙΟ 3<sup>ο</sup> : ΕΛΕΥΘΕΡΕΣ ΡΙΖΕΣ - ΑΝΤΙΟΞΕΙΔΩΤΙΚΑ & ΠΟΛΥΦΑΙΝΟΛΕΣ

Το 1956 ο *Denham Harman* μίλησε για την ύπαρξη της ελεύθερης ρίζας. Αργότερα ανέφερε τον ρόλο τους στην γήρανση μέσω των πρόκλησης διασταυρωμένων αντιδράσεων και δημιουργίας ομοιοπολικών δεσμών τροποποιώντας λιπίδια, πρωτεΐνες, κυτταρικό DNA, ιδιαίτερα το μιτοχondριακό DNA. Οι ελεύθερες ρίζες απελευθερώνονται φυσιολογικά στον ανθρώπινο οργανισμό από τα μιτοχόνδρια, όπου λαμβάνει χώρα η οξείδωση των τροφών. Οι ελεύθερες ρίζες οξυγόνου παράγονται λοιπόν ως υποπροϊόντα, κατά την διάρκεια παραγωγής ενέργειας με την χρησιμοποίηση οξυγόνου. (Halliwell 1994) Είναι μόρια με ένα ασύζευκτο, υψηλά ενεργό, ηλεκτρόνιο. Στην προσπάθεια τους να ισορροπήσουν την δομή τους αποσπών ηλεκτρόνια από γειτονικά μόρια, μετατρέποντας τα μόρια αυτά σε ελεύθερες ρίζες, έτσι ξεκινάει μια αλυσιδωτή αντίδραση που έχει ως αποτέλεσμα βλάβες σε κυτταρικές δομές. Τελικό αποτέλεσμα της επίδρασης αυτής είναι ο θάνατος και η αποσύνθεση του κυττάρου και συνεπώς πιθανή ανάπτυξη ασθενειών.

### 3.1.Ελεύθερες Ρίζες Και Δραστικά Είδη Οξυγόνου

Τα μόρια αποτελούνται από έναν ή περισσότερους ατομικούς πυρήνες οι οποίοι περιβάλλονται από ηλεκτρόνια τα οποία περιφέρονται γύρω από τον πυρήνα. Τα ηλεκτρόνια είναι διευθετημένα σε έναν αριθμό τροχιακών, τα οποία βρίσκονται σε διαφορετικές αποστάσεις από τον πυρήνα. Στα περισσότερα μόρια τα ηλεκτρόνια που βρίσκονται σε κάθε τροχιακό ζευγαρώνουν με ένα άλλο ηλεκτρόνιο. Τα δύο ηλεκτρόνια κάθε ζεύγους περιστρέφονται γύρω από τον εαυτό τους (*spin*) σε αντίθετες κατευθύνσεις. Τα ζευγαρωμένα ηλεκτρόνια διατηρούν το μόριο σχετικά σταθερό σε μικρότερη ενεργειακή κατάσταση και ως εκ τούτου λιγότερο δραστικό. Όταν ένα ή περισσότερα ηλεκτρόνια, ιδιαίτερα αυτά που βρίσκονται στα εξωτερικά τροχιακά του ατόμου, είναι ασύζευκτα, δεν έχουν δηλαδή ζευγάρι, τότε το μόριο γίνεται ασταθές σε μεγαλύτερη ενεργειακή κατάσταση και συνεπώς πιο δραστικό από άλλα μόρια. Άτομα ή μόρια με ασύζευκτα ηλεκτρόνια ονομάζονται παραμαγνητικά, ενώ όταν δεν διαθέτουν τέτοια ηλεκτρόνια, διαμαγνητικά. Ένα ασύζευκτο ηλεκτρόνιο έχει τεράστια έλξη στα ηλεκτρόνια γειτονικών ατόμων με αποτέλεσμα την πρόκληση χημικών αντιδράσεων μεταξύ ατόμων ή μορίων, κατά τις οποίες έχουμε μεταφορά ηλεκτρονίων. Οι αντιδράσεις αυτές λέγονται οξειδοαναγωγικές (Halliwell 1994).

Η πολύ μεγάλη βλαπτική επίδραση των ελευθέρων ριζών οφείλεται ακριβώς στον πολλαπλασιασμό των μεταβολών που προκαλούνται από παρόμοιες αλυσιδωτές αντιδράσεις. Οι πλέον σημαντικές ελεύθερες ρίζες είναι μοριακά είδη με κέντρο το οξυγόνο και μερικές φορές το άζωτο ή τον άνθρακα. Συνολικά όλα τα μοριακά είδη που περιλαμβάνουν οξυγόνο, είτε είναι ελεύθερες ρίζες είτε όχι, ονομάζονται δραστικά είδη οξυγόνου (ΔΕΟ). Τα κυριότερα ROS είναι: η ρίζα υπεροξειδίου ( $O_2^-$ ), η ρίζα υδροξυλίου ( $OH$ ), η ρίζα υπεροξειδίου ( $ROO^-$ ), το  $O_2$  απλής κατάστασης, το υπεροξείδιο του υδρογόνου ( $H_2O_2$ ) και το υποχλωριώδες οξύ ( $HOCl$ ). Στα δραστικά αυτά μοριακά είδη συμπεριλαμβάνεται επίσης και η δραστική μορφή αζώτου, το μονοξείδιο του αζώτου ( $NO$ ), το οποίο είναι ελεύθερη ρίζα (με τελεία συμβολίζεται η ελεύθερη ρίζα, ενώ με (-) συμβολίζεται το αρνητικό φορτίο της ρίζας και με  $R$ , ένα άτομο ή μία ομάδα ατόμων, κυρίως αλυσίδα ατόμων άνθρακα). (Halliwell 1994) (Harman, 2011).

### **3.2. Πως Δημιουργούνται Οι Ελεύθερες Ρίζες Στον Οργανισμό Μας**

Ελεύθερες ρίζες δημιουργούνται στον οργανισμό μας είτε από φυσιολογικές διαδικασίες του είτε από εξωτερικές πηγές. Οι κυριότερες από τις φυσιολογικές διαδικασίες παραγωγής ελευθέρων ριζών περιλαμβάνουν:

(α) Την παραγωγή ελευθέρων ριζών σουπεροξειδίου, ως παραπροϊόν ή «χημικό ατύχημα» κατά τη λειτουργία της αναπνευστικής αλυσίδας των μιτοχονδρίων των κυττάρων. Κατά τη διαδικασία αυτή ορισμένα ηλεκτρόνια ξεφεύγουν από τα μόρια που μεταφέρουν τα ηλεκτρόνια στην αναπνευστική αλυσίδα και περνούν στο οξυγόνο ανάγοντας το σε σουπεροξείδιο.

(β) Τη φυσιολογική δράση οξειδωτικών ενζύμων όπως, οι λιποξυγονάσες, οι κυκλοοξυγονάσες, οι υπεροξειδάσες και οι αφυδρογονάσες κατά την οποία παράγονται ελεύθερες ρίζες ως παραπροϊόντα των ενζυμικών αντιδράσεων (Valko, 2004).

(γ) Την παραγωγή ελευθέρων ριζών υδροξυλίου, οι οποίες είναι και οι πλέον δραστικές, με χημικές αντιδράσεις παρουσία μεταλλικών ιόντων.

(δ) Την παραγωγή ελευθέρων ριζών ως μέρος της λειτουργίας του ανοσοποιητικού συστήματος. Ορισμένα από τα κύτταρα του συστήματος αυτού παράγουν ελεύθερες ρίζες για να εξουδετερώσουν βακτήρια εισβολείς (Halliwell, 1994). Σε περιπτώσεις που η διαδικασία αυτή είναι εκτός ελέγχου, όπως συμβαίνει με τις αυτοάνοσες ασθένειες, μερικές

ελεύθερες ρίζες που παράγονται προκαλούν βλάβες στα ίδια μας τα κύτταρα. Ένας αριθμός παραγόντων που βρίσκεται εκτός του σώματος μας μπορεί επίσης να αποτελέσει πηγή παραγωγής ελευθέρων ριζών από τη στιγμή που θα έρθει σε επαφή με το σώμα μας. Μερικά παραδείγματα τέτοιων πηγών αποτελούν ο καπνός του τσιγάρου, οι ακτίνες-Χ, η υπεριώδης ακτινοβολία, διάφορες χημικές ενώσεις και φάρμακα καθώς επίσης το νέφος της ατμοσφαιρικής ρύπανσης (όζον, νιτροξειδία) (Harman, 2011).

### **3.3.Αντιοξειδωτικοί Κυτταρικοί Μηχανισμοί**

Σε κάθε βιολογικό σύστημα πρέπει να διατηρείται η ισορροπία μεταξύ του σχηματισμού και της απομάκρυνσης των ΔΕΟ. Έχει υπολογισθεί ότι περίπου 10.000 ελεύθερες ρίζες τη μέρα «Βομβαρδίζουν» κάθε κύτταρο μας. Η αύξηση των οξειδώσεων από τα ROS οδηγεί τα κύτταρα σε μία κατάσταση που λέγεται οξειδωτικό στρες και είναι παράγοντας πρόκλησης ασθενειών. Λόγω της συνεχούς έκθεσης σε ROS και για την πρόληψη του οξειδωτικού στρες, ο οργανισμός μας, όπως όλα τα φυτά και τα ζώα, έχει αναπτύξει για προστασία διάφορους αντιοξειδωτικούς μηχανισμούς στους οποίους παίρνουν μέρος αντιοξειδωτικές ουσίες (Valko, 2004). Γενικά χαρακτηρίζουμε ως αντιοξειδωτική ουσία κάθε ουσία η οποία βρίσκεται σε μικρές συγκεντρώσεις σε σύγκριση με το υπόστρωμα που οξειδώνεται και η οποία καθυστερεί σημαντικά ή αποτρέπει την οξείδωση του υποστρώματος αυτού (Harman, 2011). Τα αντιοξειδωτικά γενικά λειτουργούν με δύο τρόπους:

(1) είτε παρεμποδίζουν τη δημιουργία ROS

(2) είτε σταματούν τη διάδοση των ελευθέρων ριζών που προκαλείται από τις αλυσιδωτές αντιδράσεις. Επίσης είναι δυνατόν η παρουσία κάποιου αντιοξειδωτικού (για παράδειγμα της βιταμίνης C) να συμβάλλει στη διατήρηση της αντιοξειδωτικής δράσης κάποιου άλλου αντιοξειδωτικού, όπως της τοκοφερόλης. Στην περίπτωση αυτή έχουμε συνεργατική δράση των δύο αντιοξειδωτικών και λέμε ότι η βιταμίνη C έχει συν-αντιοξειδωτική δράση.

Μπορούμε επίσης να διαφοροποιήσουμε τα αντιοξειδωτικά ανάλογα με την προέλευση τους και τη χημική τους σύσταση. Έτσι υπάρχουν ενδογενείς αντιοξειδωτικές ουσίες και αντιοξειδωτικά τα οποία προσλαμβάνει ο οργανισμός μας με την τροφή.

Τα ενδογενή αντιοξειδωτικά διακρίνονται σε ουσίες: (α) μεγάλου Μοριακού Βάρους (MB) και (β) μικρού MB. Στην πρώτη κατηγορία περιλαμβάνονται ένζυμα, όπως η δισμουτάση του υπεροξειδίου, η καταλάση, η υπεροξειδάση της γλουταθειόνης, η παραοξονάση και το πρωτεάσωμα τα οποία ελαττώνουν τη δημιουργία ΔΕΟ μέσω της απομάκρυνσης δυνητικών οξειδωτικών ή μετατρέποντας ΔΕΟ σε σχετικά σταθερές χημικές ενώσεις. Στην κατηγορία αυτή περιλαμβάνονται επίσης διάφορες πρωτεΐνες του πλάσματος (αίμα) όπως η αλβουμίνη, η σερουλοπλασμίνη, η τρανσφερίνη και η ατογλοβίνη, οι οποίες δεσμεύουν μεταλλικά ιόντα και ως εκ τούτου περιορίζουν τη δημιουργία ελεύθερων ριζών μέσω αντιδράσεων που καταλύονται από μέταλλα (Harman, 2011). Τα μικρού MB ενδογενή αντιοξειδωτικά υποδιαιρούνται περαιτέρω σε λιποδιαλυτά αντιοξειδωτικά μικρά χημικά μόρια, όπως η τοκοφερόλη (βιταμίνη E), τα καροτενοειδή, η χολερυθρίνη, ορισμένες κινόνες και πολυφαινόλες και σε υδατοδιαλυτά μόρια, όπως το ασκορβικό οξύ (βιταμίνη C), το ουρικό οξύ και ορισμένες πολυφαινόλες. Τα κυριότερα αντιοξειδωτικά της διατροφής αποτελούν λιποδιαλυτές και υδατοδιαλυτές φυτικές ενώσεις όπως η τοκοφερόλη, το β-καροτένιο, το λυκοπένιο, η βιταμίνη C, η λουτεΐνη και διάφορες πολυφαινόλες (φλαβονοειδή και άλλες ενώσεις). (Masella, Halliwell, 1996)

### **3.4.Επίδραση Των ROS Στην Υγεία**

Έχει γίνει πλέον επιστημονικά αποδεκτό ότι η παραβίαση της απαραίτητης οξειδοαναγωγικής ισορροπίας των κυττάρων μας προς την κατάσταση του οξειδωτικού στρες έχει ως αποτέλεσμα την εκδήλωση διαφόρων παθολογικών καταστάσεων ενώ επιπλέον συμμετέχει και στη διαδικασία της γήρανσης (Valko, 2004). Αυτό οφείλεται στο γεγονός ότι το οξειδωτικό στρες οδηγεί σε οξείδωση των βασικών βιοχημικών συστατικών του κυττάρου, όπως τα λιπίδια, οι πρωτεΐνες και το DNA με αποτέλεσμα τη μεταβολή των δομικών και λειτουργικών τους ιδιοτήτων (Harman, 2011). Ο κατάλογος των ασθενειών για τις οποίες έχουν ενοχοποιηθεί σε μεγαλύτερο ή μικρότερο βαθμό τα ΔΕΟ αυξάνεται συνεχώς και περιλαμβάνει καρδιαγγειακές παθήσεις, τον καρκίνο, νευροεκφυλιστικές ασθένειες, τον καταρράκτη, τον διαβήτη και διάφορες αυτοάνοσες ασθένειες. Ένα παράδειγμα παθολογικής κατάστασης στη δημιουργία της οποίας συμμετέχουν καταλυτικά τα ΔΕΟ αποτελεί η αθηροσκλήρωση η οποία αποτελεί και την κύρια αιτία θανάτου στον δυτικό κόσμο. Στο υποενδοθηλιακό περιβάλλον των αιμοφόρων αγγείων, τα ΔΕΟ οξειδώνουν τα σωματίδια της LDL (χαμηλής πυκνότητας λιποπρωτεΐνη). Η LDL αποτελεί το κύριο μέσο μεταφοράς της χοληστερόλης στην κυκλοφορία και η φυσιολογική της

λειτουργία είναι να μεταφέρει τη χοληστερόλη στα κύτταρα. (Halliwell, 1996) Τα σωματίδια της *LDL* έχουν μία μέση διάμετρο 22 nm. Ο πυρήνας τους αποτελείται από περίπου 170 μόρια τριγλυκεριδίων και 1600 μόρια εστεροποιημένης χοληστερόλης. Η επιφανειακή τους μονοστοιβάδα περιέχει περίπου 700 μόρια φωσφολιπιδίων και ένα μόριο της πρωτεΐνης apoB-100, η οποία είναι μία από τις μεγαλύτερες γνωστές πρωτεΐνες με 4536 αμινοξέα. Επιπλέον, τα σωματίδια της *LDL* περιέχουν περίπου 600 μόρια μη-εστεροποιημένης χοληστερόλης καθώς επίσης και λιπόφιλα αντιοξειδωτικά μόρια, όπως η α-τοκοφερόλη (περίπου 6 μόρια/σωματίδιο *LDL*). Τα ΔΕΟ αρχικά οξειδώνουν μόνο τα φωσφολιπίδια της *LDL*. Αυτό έχει ως αποτέλεσμα τη συσσώρευση μονοκυττάρων στον υποενδοθηλιακό χώρο και τη μετατροπή τους σε μακροφάγα κύτταρα. Στη συνέχεια έχουμε οξείδωση και της πρωτεΐνης της *LDL*, οπότε λέμε ότι η *LDL* είναι πλήρως οξειδωμένη. Η οξειδωμένη *LDL* μεταφέρεται στο εσωτερικό των μακροφάγων μέσω ειδικών υποδοχών, 3-4 φορές ταχύτερα από τη μη-οξειδωμένη *LDL*, με αποτέλεσμα τη συσσώρευση μεγάλων ποσοτήτων οξειδωμένης *LDL* μέσα στα μακροφάγα, τα οποία μετατρέπονται έτσι σε αφρώδη κύτταρα. Καθώς τα αφρώδη κύτταρα συσσωρεύονται κάτω από το ενδοθήλιο έχουμε την έναρξη του σχηματισμού της αθηρωματικής πλάκας, η οποία και οδηγεί περαιτέρω στην κλινική εκδήλωση της νόσου.

### 3.5. Προσδιορισμός Αντιοξειδωτικής Δράσης

Έχουν αναπτυχθεί ποικίλες μέθοδοι για τον προσδιορισμό της ολικής αντιοξειδωτικής ικανότητας διαφόρων βιολογικών δειγμάτων, όπως το πλάσμα ή ο ορός, το κρασί, τα φρούτα και τα λαχανικά, ή ζωικοί ιστοί. Οι μέθοδοι αυτοί είναι απαραίτητοι λόγω: (α) της δυσκολίας της μέτρησης κάθε αντιοξειδωτικού συστατικού ξεχωριστά και (β) των πιθανών αλληλεπιδράσεων μεταξύ των διαφόρων αντιοξειδωτικών συστατικών σε πολύπλοκα βιολογικά δείγματα. Ο προσδιορισμός της αντιοξειδωτικής δράσης ενός δείγματος περιλαμβάνει κυρίως την ικανότητα του δείγματος να δώσει ηλεκτρόνια (ή άτομα υδρογόνου) σε ένα ειδικό ROS ή σε κάθε δέκτη ηλεκτρονίων. Το προϊόν της αντίδρασης αυτής μετράται τελικά με μία αναλυτική μέθοδο όπως αυτές που αναφέρθηκαν στην περίπτωση προσδιορισμού των ROS. Παρακάτω αναφέρονται μερικές από τις σπουδαιότερες μεθόδους μέτρησης αντιοξειδωτικής δράσης.

Για τη μέτρηση της αντιοξειδωτικής δράσης καθαρών ενώσεων, συστατικών τροφίμων ή κυτταρικών εκχυλισμάτων χρησιμοποιείται η αντίδραση των αντιοξειδωτικών

με σταθερές έγχρωμες ελεύθερες ρίζες (*ABTS*, *DPPH*) η οποία έχει ως αποτέλεσμα τον αποχρωματισμό τους.

Η μέθοδος *ORAC* (*Oxygen Radical Absorbance Capacity* / Ικανότητα Απορροφητικότητας Ριζών Οξυγόνου) στηρίζεται στην ελάττωση του φθορισμού ορισμένων ουσιών (φυκοερυθρίνες) με την προσθήκη ελευθέρων ριζών. Η δράση αυτή των ελευθέρων ριζών αναστέλλεται παρουσία των αντιοξειδωτικών.

Με τη μέθοδο *EPR* μπορούμε να προσδιορίσουμε την αντιοξειδωτική δράση ουσιών με βάση την ελάττωση του *EPR* σήματος συγκεκριμένων ελευθέρων ριζών μετά την αντίδρασή τους με το αντιοξειδωτικό παρουσία μιας παγίδας σπιν.

Η μέθοδος *FRAP* (*Ferric Reducing Antioxidant Power*/Αντιοξειδωτική Ισχύς Αναγωγής Τρισθενούς Σιδήρου) στηρίζεται στην αναγωγή ενός συμπλόκου του τρισθενούς σιδήρου από το αντιοξειδωτικό προς ένα προϊόν με έντονο κυανούν χρώμα.

Η μέθοδος *TRAP* (*Total Peroxyl Radical-Trapping Potential*/ Συνολικό Δυναμικό Παγίδευσης Ριζών Υπεροξειδίου) Βασίζεται στην αντίδραση ελευθέρων ριζών υπεροξειδίου με μία ουσία, τη λουμινόλη. Το προϊόν της αντίδρασης είναι μία ρίζα λουμινόλης η οποία εκπέμπει φως (χημειοφωταύγεια) το οποίο και μετράται. Παρουσία αντιοξειδωτικών, η χημειοφωταύγεια ελαττώνεται (*Methods in Enzymology*, 1999),

### **3.6.Φυσιολογική Λειτουργία Και Θεραπευτικές Δράσεις Των ROS**

Λόγω της μεγάλης δραστηριότητας και επίδρασης των ΔΕΟ στα Βιολογικά συστήματα δεν είναι περίεργο το γεγονός ότι η φυσική επιλογή βρήκε τρόπους για να εκμεταλλευτεί τη δράση τους αυτή προς όφελος των οργανισμών. Έτσι, είναι γνωστό ότι ο οργανισμός μας χρησιμοποιεί το οξυγόνο για την καύση των τροφών και την παραγωγή της ενέργειας που χρειάζεται για τη λειτουργία του. Αυτό λαμβάνει χώρα μέσα στα μιτοχόνδρια των κυττάρων με μία διαδικασία μεταφοράς ηλεκτρονίων που ονομάζεται οξειδωτική φωσφορυλίωση, κατά την οποία παράγονται ROS ως προϊόντα αναγωγής του οξυγόνου, με σκοπό την παραγωγή ATP, ίου μορίου δηλαδή που χρησιμοποιείται για την αποθήκευση μεγάλων ποσών ενέργειας.

Οι ελεύθερες ρίζες είναι επίσης ένας σημαντικός παράγοντας των αμυντικών συστημάτων του οργανισμού μας. Βασικό στοιχείο της άμυνας του οργανισμού έναντι παθογόνων μικροοργανισμών είναι τα μακροφάγα κύτταρα τα οποία κυκλοφορούν στο

σώμα μας και εξουδετερώνουν βακτήρια και άλλους μικροοργανισμούς με μηχανισμό που περιλαμβάνει τη δημιουργία ROS. Το ήπαρ χρησιμοποιεί επίσης την ελεγχόμενη παραγωγή ελευθέρων ριζών με σκοπό την αποιοξίκωση, δηλαδή τη μείωση της τοξικότητας ορισμένων ουσιών με χημικές μεταβολές που οδηγούν είτε σε ενώσεις με μικρότερη τοξικότητα είτε στην ταχύτερη απομάκρυνση τους από τον οργανισμό.

Τα ROS παίζουν επίσης σημαντικό ρόλο στην κυτταρική σηματοδότηση. Έτσι ο οργανισμός χρησιμοποιεί τη δημιουργία και απελευθέρωση ROS για να στέλνει ρυθμιστικά σήματα είτε μέσα στα κύτταρα (ενδοκυτταρική σηματοδότηση) είτε από το ένα κύτταρο (διακυτταρική σηματοδότηση) στο άλλο με σκοπό τον έλεγχο της λειτουργίας τους.

Η χαρακτηριστική ιδιότητα των ελευθέρων ριζών, δηλαδή η μεγάλη τους δραστικότητα, η οποία έχει ως αποτέλεσμα σε πολλές περιπτώσεις τη δημιουργία κυτταρικών βλαβών, μπορεί να χρησιμοποιηθεί για θεραπεία και ιδιαίτερα στην περίπτωση του καρκίνου. Η ραδιοθεραπεία, αποτελεί την πλέον γνωστή μορφή θεραπείας του καρκίνου με τη βοήθεια ιοντίζουσας ακτινοβολίας (ακτίνες-X, ακτίνες-γ, σωματιδιακή ακτινοβολία). Η ακτινοβόληση δημιουργεί τεράστιες ποσότητες ROS στην περιοχή των καρκινικών όγκων (ο ιστός-στόχος) τα οποία και καταστρέφουν τα καρκινικά κύτταρα. Λόγω όμως της μη αποτελεσματικής στόχευσης, τις περισσότερες φορές η ακτινοβολία καταστρέφει μαζί με τα καρκινικά και υγιή κύτταρα. Μία άλλη μορφή ραδιοθεραπείας χρησιμοποιεί ραδιοσημασμένα αντισώματα (ραδιοανοσοθεραπεία) τα οποία στοχεύουν επακριβώς μόνο πρωτεΐνες των καρκινικών κυττάρων, στα οποία και αποδεσμεύουν την απαραίτητη ακτινοβολία που θα τα καταστρέφει.

Μία άλλη μεθοδολογία με την οποία επιτυγχάνουμε θεραπευτική δράση με τη βοήθεια των ROS αποτελεί και η φωτοδυναμική θεραπεία (*PDT*),<sup>8</sup> ο πλέον γνωστός τύπος φωτοχημειοθεραπείας, η οποία χρησιμοποιεί το υπεριώδες, ορατό και υπέρυθρο φως παράλληλα με τη χορήγηση ορισμένων χημικών ενώσεων γνωστών ως φωτοευαισθητοποιητών, όπως οι πορφυρίνες, συστατικό της αιμοσφαιρίνης. Κατά την *PDT* θεραπεία του καρκίνου, ο φωτοευαισθητοποιητής που εισέρχεται στα καρκινικά κύτταρα, απορροφά ενέργεια από τα φωτόνια και στη συνέχεια μεταφέρει την ενέργεια αυτή σε γειτονικά μόρια οξυγόνου δημιουργώντας έτσι οξυγόνο απλής κατάστασης (δραστικό οξυγόνο) και ελεύθερες ρίζες οξυγόνου. Τα ROS αυτά είναι υπεύθυνα για την καταστροφή των καρκινικών κυττάρων.



Μία παρόμοια μέθοδος για τη θεραπεία του καρκίνου, ονομάζεται ηχοδυναμική θεραπεία<sup>9</sup> και χρησιμοποιεί την ενέργεια υπερήχων, οι οποίοι κατευ- θυνονται στην εστία του όγκου όπου και ενεργοποιούν ορισμένα φάρμακα- ηχοευαισθητοποιητές. Κατά τη διαδικασία της ηχοευαισθητοποίησης παράγονται επίσης ελεύθερες ρίζες και ROS στα οποία οφείλεται η αντικαρκινική δράση των υπερήχων.

Στο πλαίσιο της χρησιμοποίησης των ROS για τη θεραπεία του καρκίνου έχει αρχίσει να μελετάται πρόσφατα, η χρήση κατάλληλων χημικών ενώσεων που ονομάζονται προφάρμακα (*prodrugs*). Οι ενώσεις αυτές, όπως το ινδολο- 3-οξικό οξύ -η ένωση αυτή είναι φυτική ορμόνη- ενεργοποιούμενες κατάλληλα σε καρκινικούς στόχους από το ένζυμο υπεροξειδάση, παράγουν ελεύθερες ρίζες οι οποίες έχουν κυτταροτοξική δράση. (Wardman, 2002)

### **3.7.Αντιοξειδωτικά Και Διατροφή**

Τα τελευταία χρόνια έχει γίνει μία «έκρηξη» στο ενδιαφέρον για αντιοξειδωτικές χημικές ενώσεις που απομονώνονται από φυτά (φυτοχημικά αντιοξειδωτικά) και χρησιμοποιούνται ως πρόσθετα για την ενίσχυση των αντιοξειδωτικών ιδιοτήτων ενός τροφίμου -χυμών, γαλακτοκομικών προϊόντων, μαργαρινών και άλλων, ή ως συμπληρώματα διατροφής και αφορούν κυρίως στη χρήση βιταμίνης C, βιταμίνης E και 6-καροιενίου. Στην αγορά κυκλοφορούν πολλά συμπληρώματα διατροφής και λειτουργικά τρόφιμα εμπλουτισμένα με αντιοξειδωτικά. Πολλές εταιρίες παρέχουν επίσης αντιοξειδωτικά σκευάσματα ως συμπληρώματα διατροφής τα οποία περιλαμβάνουν αντιοξειδωτικά ένζυμα. Τα ένζυμα όμως αυτά δεν είναι αποτελεσματικά γιατί είναι πρωτεΐνες και ως πρωτεΐνες διασπώνται κατά τη διαδικασία της πέψης πριν απορροφηθούν από τα κύτταρά μας.

Αν και δεν υπάρχει αμφιβολία ότι τα αντιοξειδωτικά είναι απαραίτητα συστατικά για τη διατήρηση της υγείας, δεν υπάρχει επιστημονική τεκμηρίωση για το αν πρέπει να παίρνουμε αντιοξειδωτικά πρόσθετα και σε τι ποσότητα. Αν και αρχικά πιστεύαμε ότι τα αντιοξειδωτικά πρόσθετα ήταν αβλαβή, σήμερα όλο και περισσότερες επιστημονικές έρευνες τονίζουν την πιθανή τοξική τους δράση ιδιαίτερα όταν καταναλώνονται σε μεγάλες ποσότητες και για μεγάλα χρονικά διαστήματα. Για παράδειγμα, είναι γνωστό το πείραμα χημειοπροστασίας από καρκίνο του πνεύμονα που συμπεριέλαβε πολλές χιλιάδες εθελοντές Φινλανδούς καπνιστές, οι οποίοι λάμβαναν για αρκετά χρόνια ημερήσιες δόσεις β-

καροτενίου μαζί με βιταμίνη E ή βιταμίνη A. Και στις δυο περιπτώσεις, προς μεγάλη έκπληξη των επιστημόνων, αντί να έχουμε προστατευτική δράση -σύμφωνα με επιδημιολογικές μελέτες, η αυξημένη κατανάλωση β-καροτενίου στην τροφή συνδέεται με μειωμένο κίνδυνο καρκινογένεσης- είχαμε αυξημένο ποσοστό καρκίνου του πνεύμονα μεταξύ των εθελοντών. (The Alpha-Tocopherol Beta-Carotene Cancer Prevention Study Group, 1994) Επιπλέον, αποδείχθηκε πρόσφατα ότι η βιταμίνη C μπορεί να προκαλέσει *in vitro* διάσπαση υδροϋπεροξειδίων λιπιδίων και δημιουργία τοξικών ενώσεων, οι οποίες είναι δυνατόν να προκαλέσουν βλάβες στο *DNA* των κυττάρων. (Lee, Oe & Blair, 2001)

Λόγω της μεγάλης σημασίας των φυτοχημικών αντιοξειδωτικών για την υγεία, συστήνεται από επιστημονικούς φορείς, όπως το Εθνικό Ινστιτούτο Καρκίνου των ΗΠΑ, η κατανάλωση φρούτων και λαχανικών, τουλάχιστον πέντε γεύματα φρούτων και λαχανικών ημερησίως ([www.5aday.com](http://www.5aday.com)). Επειδή όμως υπάρχουν τόσα πολλά φυτοχημικά αντιοξειδωτικά και το κάθε ένα από αυτά δρα με διαφορετικό τρόπο στο σώμα, είναι ασφαλέστερο σύμφωνα με τα παραπάνω, να λαμβάνουμε το απαραίτητο «αντιοξειδωτικά δυναμικό», με εξαίρεση πιθανόν τη βιταμίνη E, από φυσικές πηγές διατροφής και κυρίως από φρούτα, Λαχανικά, δημητριακά και παρθένο ελαιόλαδο, αυτό που αποκαλούμε Μεσογειακή Δίαιτα, εφόσον γνωρίζουμε την περιεκτικότητα του τροφίμου στα συγκεκριμένα αντιοξειδωτικά μόρια και την απαιτούμενη ημερήσια ποσότητά του που πρέπει να καταναλώσουμε.

### **3.8.Αρνητικές Επιδράσεις Αντιοξειδωτικών**

Στον αντίποδα έρχονται 2 έρευνες να καταρρίψουν όλες τις προηγούμενες θεωρίες για τα αντιοξειδωτικά. Η πρώτη έλαβε χώρα στον Καναδά εκεί οι ερευνητές του Πανεπιστημίου *McGill* πειραματίστηκαν με το νηματώδες σκουλήκι *C.elegans*, ένα πρότυπο ζωικό μοντέλο για τη μελέτη της γήρανσης. Το συμπέρασμά τους είναι ότι οι ελεύθερες ρίζες, δραστικές μορφές οξυγόνου που εξουδετερώνονται από τα οξειδωτικά, στην πραγματικότητα παρατείνουν τη ζωή. Εφόσον τα αποτελέσματα επιβεβαιωθούν και στον άνθρωπο, η θεωρία ότι η γήρανση οφείλεται σε βλάβες που προκαλούνται από ελεύθερες ρίζες θα έχει ανατραπεί οριστικά. Αυτό όμως δεν σημαίνει απαραίτητα ότι υπάρχουν οριστικές απαντήσεις για τη χρησιμότητα των αντιοξειδωτικών. Η μελέτη στον Καναδά έδειξε ότι οι ελεύθερες ρίζες παρεμβαίνουν το μηχανισμό αυτοκαταστροφής των κυττάρων. Ο προγραμματισμένος κυτταρικός θάνατος, γνωστός ως απόπτωση,

ενεργοποιείται σε μια ποικιλία καταστάσεων: τα κύτταρα αυτοκτονούν όταν κινδυνεύουν να εξελιχθούν σε καρκίνο, όταν μπορεί να προκαλέσουν αυτοάνοσα νοσήματα, ή όταν έχουν μολυνθεί από ιούς. Ο μηχανισμός αυτός είναι σχεδόν ίδιος σε όλα τα ζώα, ανακαλύφθηκε όμως στο σκουλήκι *C.elegans*, μια ανακάλυψη που τιμήθηκε με Νόμπελ. (Callista Yee 2014) Οι ερευνητές του *McGill* διαπίστωσαν ότι ο ίδιος μηχανισμός, όταν ενεργοποιηθεί κατάλληλα από τις ελεύθερες ρίζες, αυξάνει την αντοχή του κυττάρου και παρατείνει τη ζωή του: τα πειραματόζωα έζησαν περισσότερο όταν οι ερευνητές αύξησαν τεχνητά τα επίπεδα των ελεύθερων ριζών. «Ο κόσμος πιστεύει ότι οι ελεύθερες ρίζες είναι επιβλαβείς και προκαλούν γήρανση, η θεωρία όμως αυτή είναι εσφαλμένη» υποστηρίζει ο Ζίγκφριντ Χέκιμι, επικεφαλής της μελέτης. Η Δεύτερη αναφέρει πως πολλά αντιοξειδωτικά που προέρχονται είτε από τα σούπερ τρόφιμα είτε από τα διατροφικά συμπληρώματα ίσως να μην κάνουν καλό στην υγεία, όπως θεωρείται μέχρι σήμερα, αλλά κακό. Αυτό υποστηρίζει ο μοριακός βιολόγος και γενετιστής *James Watson*, ο οποίος το 1953 ανακάλυψε μαζί με τον Βρετανό επιστήμονα *James Watson* και *Francis Crick* τη δομή του γενετικού υλικού (*DNA*) και έλαβε το Νόμπελ Ιατρικής του 1962.

Ο "πατέρας του *DNA*" υποστηρίζει ότι τα αντιοξειδωτικά «μπορεί να έχουν προκαλέσει περισσότερους καρκίνους απ' όσους έχουν αποτρέψει". Πιστεύει μάλιστα ότι δεν θα υπάρξει θεραπεία για πολλούς καρκίνους εάν δεν επανεξετασθεί ο ρόλος που παίζουν τα αντιοξειδωτικά. Και πραγματικά σε μεγάλες δόσεις φαίνεται ότι τα αντιοξειδωτικά δεν κάνουν καλό στην υγεία.

Η πεποίθηση ότι τα αντιοξειδωτικά έχουν ισχυρές αντικαρκινικές ιδιότητες, επειδή καταπολεμούν τα μόρια οξυγόνου που είναι γνωστά ως ελεύθερες ρίζες, είναι ευρέως διαδεδομένη.

Ο δρ *Watson* υποστηρίζει ότι οι ελεύθερες ρίζες οξυγόνου μπορεί να είναι το κλειδί για την πρόληψη και την θεραπεία του καρκίνου, και ότι ο περιορισμός τους στο σώμα μπορεί να είναι επιζήμιος. Οι ελεύθερες ρίζες οξυγόνου, γράφει σε άρθρο του, όχι μόνον διατηρούν υπό έλεγχο τα άρρωστα κύτταρα, αλλά παίζουν καθοριστικό ρόλο στην αποτελεσματικότητα πολλών αντικαρκινικών φαρμάκων και της ακτινοθεραπείας, που διεγείρουν την παραγωγή τους για να σκοτώσουν τα καρκινικά κύτταρα.

Εάν, συνεπώς, οι ασθενείς με καρκίνο παίρνουν αντιοξειδωτικά, μπορεί να υπονομεύουν άθελά τους τη θεραπεία τους κι αυτός είναι ένας ακόμα λόγος για τον οποίο πρέπει απαραιτήτως να ενημερώνουν τον ογκολόγο τους για οποιοδήποτε διατροφικό

συμπλήρωμα, βότανο ή φάρμακο παίρνουν εν όσο κάνουν θεραπεία για τον καρκίνο τους. (Watson 2013).

### **3.9.Συμπεράσματα**

Τα σημερινά επιστημονικά δεδομένα υποστηρίζουν, αλλά δεν αποδεικνύουν αδιαμφισβήτητα, το ότι τα αντιοξειδωτικά της διατροφής προστατεύουν από μία σειρά σημαντικών ασθενειών, όπως ο καρκίνος και οι καρδιαγγειακές παθήσεις, για τις οποίες ενοχοποιούνται οι ελεύθερες ρίζες. Η προστατευτική αυτή επίδραση των αντιοξειδωτικών συνδέεται από επιδημιολογικές μελέτες κυρίως με την μεγάλη κατανάλωση φρούτων και λαχανικών παρά με την πρόσληψη συγκεκριμένων αντιοξειδωτικών συστατικών. Αν και πολύ ενθαρρυντικά, τα δεδομένα αυτά δεν αρκούν για να συστήσουμε ανεπιφύλακτα την ευρεία χρήση αντιοξειδωτικών σκευασμάτων για την πρόληψη των ασθενειών αυτών. Είναι όμως επιθυμητό να ενθαρρύνεται η μεγάλη κατανάλωση φυτικών τροφών πλούσιων σε αντιοξειδωτικά συστατικά, η οποία και συμβάλλει στη διατήρηση της καλής υγείας. Ελπίζουμε ότι οι ερευνητικές προσπάθειες των επιστημόνων θα διευκρινίσουν στο εγγύς μέλλον τους μηχανισμούς δράσης, τις αλληλεπιδράσεις και τις ωφέλιμες επιπτώσεις των αντιοξειδωτικών διατροφικών συστατικών στη λειτουργία του οργανισμού. Χωρίς τη γνώση αυτή δεν μπορούμε παρά να επιλέγουμε μόνο με τη διαίσθησή μας το ποια αντιοξειδωτικά, σε τι ποσότητα και για πόσο χρονικό διάστημα θα πρέπει να τα λαμβάνουμε.

## ΚΕΦΑΛΑΙΟ 4<sup>ο</sup> : ΠΟΛΥΦΑΙΝΟΛΕΣ

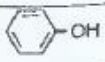

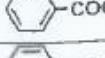
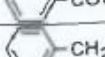
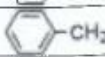
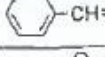
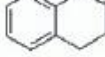

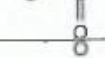
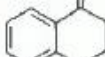
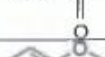


---

### 4.1.Γενικές Κατηγορίες

Οι πολυφαινόλες (φαινολικές ενώσεις, *PP*) είναι μια μεγάλη κατηγορία ενώσεων του φυτικού βασιλείου με ένα ή περισσότερα υδροξύλια συνδεδεμένα απ' ευθείας σε έναν ή περισσότερους αρωματικούς ή και ετεροκυκλικούς δακτυλίους. Αποτελούν προϊόντα του δευτερογενούς μεταβολισμού των φυτών, ενώ ήδη έχουν ταυτοποιηθεί περισσότερες από 8000 φαινολικές δομές (Harbome, 1993). Στη διεθνή βιβλιογραφία έχει επικρατήσει με τον όρο «πολυφαινόλες» να νοείται «μια μεγάλη ομάδα ενώσεων με ένα ή περισσότερα υδροξύλια απ' ευθείας συνδεδεμένα σε έναν ή περισσότερους αρωματικούς δακτυλίους» (Harbome, 1989).

Η δομή των πολυφαινολών μπορεί να είναι απλή (όπως τα φαινολικά οξέα) ως και εξαιρετικά πολύπλοκη και πολυμερή (όπως οι ταννίνες). Στη φύση συχνά απαντώνται συζευγμένες μέσω των υδροξυλίων τους με υδατάνθρακες. Το υδατανθρακικό τμήμα μπορεί να είναι είτε μονοσακχαρίτης, είτε δισακχαρίτης ή ακόμη κι ολιγοσακχαρίτης. Το πιο κοινό σάκχαρο που απαντάται είναι η γλυκόζη και άλλα σάκχαρα είναι η γαλακτόζη, η ραμνόζη, τα γλυκουρονικά, τα γαλακτουρονικά οξέα, η ξυλόζη, η αραβινόζη κ.α.

Οι πολυφαινόλες διακρίνονται τουλάχιστον σε 15 κατηγορίες (Harbome, 1989) ανάλογα με τη βασική χημική δομή τους. Από τις σημαντικότερες κατηγορίες είναι αυτή των φλαβονοειδών, η οποία διακρίνεται περαιτέρω σε 13 υποκατηγορίες διαθέτοντας επί συνόλου περισσότερα από 5000 μέλη. Στον ακόλουθο πίνακα παρατίθενται οι κυριότερες τάξεις πολυφαινολικών ενώσεων.

Απλές φαινόλες		Τυροσόλη, υδροξυτυροσόλη
Βενζοκινόνες		
Φαινολικά οξέα		Γαλλικό, συριγγικό, βανιλλικό (αλδεύδες)
Ακετοφαινόλες		Λιγότερο συχνά στα φυτά
Φαινυλοξικά οξέα		
Φαινυλοπροπανοειδή		
(Υδροξυ)κινναμωμικά οξέα		Φερουλικό, καφεϊκό, σιναπικό, κουμαρικό
Κουμαρίνες, Ισοκουμαρίνες		Συνήθως ως γλυκοζίτες
Χρωμόνες		
Ναφθοκινόνες		
Ξανθόνες		
Στιλβένια		
Ανθρακινόνες		Εροδίνη κλιπ
Φλαβονοειδή	Βλέπε Πίνακα 2.	
Λιγνάνες, νεολιγνάνες, λιγνίνες		

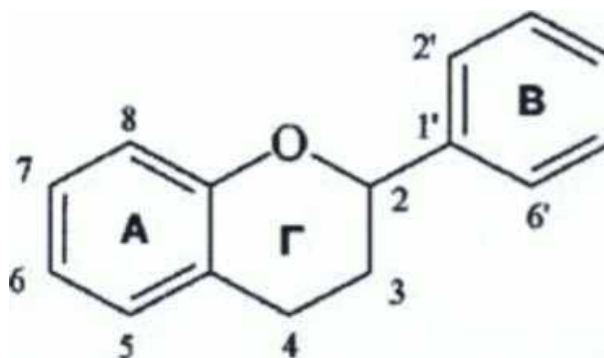
Εικόνα 15 Κύριες τάξεις πολυφαινολικών ενώσεων (κατάταξη βάσει Harhorne, 1989)

#### 4.1.1. Απλές Φαινόλες & Φλαβονοειδή

Οι απλές φαινόλες όπως η φαινόλη, η θυμόλη, η κρεσόλη, η ορκινόλη, η ρεζοριανόλη, η υδροκινόνη και διάφορα παράγωγα όπως η αρμπουτίνη και η σησαμόλη, είναι ευρέως διαδεδομένες στη φύση. Φαινολικά παράγωγα όπως τα υδροξυβενζοϊκά ή φαινολικά οξέα (βανιλλικό, γαλλικό) και οι αλδεύδες, όπως η βανιλίνη, απαντούν σε ανώτερα φυτά και φτέρες. Ανευρίσκονται στη φύση ελεύθερες ή και με τη μορφή μεθυλο- και αιθυλο-εστέρων και γλυκοζιτών (Harbome, 1989). Τα φαινυλοπροπανοειδή και τα υδροξυκινναμικά οξέα είναι ενώσεις μικρού μοριακού βάρους, με σπουδαιότερους εκπροσώπους το π-κουμαρικό, το καφεϊκό και το σιναπικό, καθώς και τα παράγωγά τους.

Οι ναφθοκινόνες αποτελούνται από 10 άτομα άνθρακα, οι ξανθόνες αποτελούνται από 13 άτομα άνθρακα, ενώ τα στυλβένια από 14 άτομα άνθρακα. Οι κιναιμικές αλκοόλες, όπως η σιναπική αλκοόλη, αποτελούν το κύριο συστατικό των λιγνινών ενώ οι χρωμόνες είναι λιγότερο γνωστές από τις κουμαρίνες, οι οποίες βρίσκονται υπό τη μορφή γλυκοζιτών (π.χ. σκοπολετίνη).

Τα φλαβονοειδή αποτελούν τη μεγαλύτερη τάξη των φαινολικών ενώσεων (Manach, et. al., 2004). Είναι ευρέως διαδεδομένα στη φύση και περιλαμβάνουν χαλκόνες, διϋδροχαλκόνες, χρυσόνες, φλαβόνες, φλαβονόλες, διϋδροφλαβονόλες, φλαβανόνες, φλαβανόλες, φλαβανοδιόλες, ανθοκυανιδίνες, ισοφλαβονοειδή, διφλαβονοειδή και προανθοκυανιδίνες ή συμπυκνωμένες ταννίνες, που διαφέρουν κυρίως στον ετεροκυκλικό C-δακτύλιο (Heim, et. al., 2002). Η γενική δομή των φλαβονοειδών φαίνεται στην ακόλουθη εικόνα, ενώ ο επόμενος πίνακας παρουσιάζει την κατάταξη τους βάσει Harbome (1993).



Εικόνα 16 Βασική δομή και σύστημα αρίθμησης των φλαβονοειδών (Παπαγεωργίου, 2005)

Χαλκόνες		
Διϋδροχαλκόνες		
Χρυσόνες		
Φλαβόνες		Απιγενίνη, λουτεολίνη, δισομιτίνη Ο-γλυκοζίτες και C-γλυκοζίτες
Φλαβονόλες		Κερκετίνη, μυρισετίνη. Συνήθως ως Ο-γλυκοζίτες
Διϋδροφλαβονόλες		
Φλαβανόνες		Ναριγγενίνη, εσπεριδίνη
Φλαβανόλες		
Φλαβανοδιόλες		
Ανθοκυανιδίνες		Σημαντικά υδατοδιαλυτά πιγμέντα λουλουδιών πελαργονιδίνη, δελφινιδίνη κλπ
Ισοφλαβονοειδή		γενιστεΐνη κλπ
Διφλαβονοειδή, Προανθοκυανιδίνες ή συμπυκνωμένες ταννίνες		

Εικόνα 17 Κατάταξη φλαβονοειδών τροφίμων (κατάταξη βάσει Harbone, 1993)

#### 4.2. Ανεύρεση Στη Φύση

Οι πολυφαινόλες είναι ευρέως διαδεδομένες στα εδάφιμα φυτά (λαχανικά, δημητριακά, όσπρια, φρούτα, ξηρούς καρπούς, κλπ.) και ποτά (κρασί, μύρα, τσάι, κακάο, κλπ.). Βέβαια, διαφορές στη συγκέντρωση πολυφαινολών υπάρχουν ακόμη και μεταξύ καλλιεργειών του ίδιου είδους, καθώς η παρουσία των πολυφαινολών στα φυτά επηρεάζεται πολύ από παράγοντες όπως οι γενετικοί, η βλάστηση, ο βαθμός ωρίμανσης, η ποικιλία, η επεξεργασία και η αποθήκευση (Hermann, 1988; Porter, 1989; Mazza, 1995).



Η περιεκτικότητα σε πολυφαινόλες των φυτικών τροφίμων μπορεί να κυμαίνεται σε αρκετά ευρύ όρια. Στα όσπρια και τα δημητριακά, οι κυριότερες πολυφαινόλες είναι φλαβονοειδή, φαινολικά οξέα, και ταννίνες, με την περιεκτικότητα συνήθως να είναι λιγότερη από το 1% της ξηρής ύλης. Σε ότι αφορά στα όσπρια, την υψηλότερη περιεκτικότητα σε πολυφαινόλες έχουν οι σκούρες ποικιλίες, όπως τα κόκκινα και τα μαύρα φασόλια. Οι ισοφλαβόνες όπως η γενιστεΐνη, ανευρίσκονται στα περισσότερα όσπρια, ενώ τα λαχανικά περιέχουν κυρίως φλαβονοειδείς γλυκοζίτες. Επιπλέον, φρούτα όπως τα μήλα και τα εσπεριδοειδή είναι πλούσια σε φαινολικά οξέα και φλαβονοειδή, ενώ οι φλαβανόνες είναι άφθονες σε εσπεριδοειδή (εσπεριδίνη) και δαμάσκηνα. Η κύρια φαινολική ένωση στα φρούτα είναι η φλαβονόλη και οι μεγαλύτερες συγκεντρώσεις συναντώνται στο φλοιό (Kiihnau, 1976).

Ακολούθως, το τσάι περιέχει κυρίως κατεχίνες οι κυριότερες από τις οποίες είναι: ο γαλλικός εστέρας επιγαλλοκατεχίνης (EGCG), η επιγαλλοκατεχίνη (EGC), ο γαλλικός εστέρας επικατεχίνης (ECG) και η επικατεχίνη (EC), ενώ οι κύριες φλαβονόλες είναι η κερκετίνη, η καιμπφερόλη και η μυρισετίνη κι ανευρίσκονται σε μικρότερες ποσότητες από τις κατεχίνες. Η EGCG είναι η πιο άφθονη κατεχίνη στο τσάι (50-60% του συνόλου των κατεχινών) και Θεωρείται το δραστικό συστατικό του. Αναλυτικότερα, το πράσινο τσάι είναι πολύ πλούσιο σε φλαβανόλες, ενώ το μαύρο περιέχει μεγάλες ποσότητες οξειδωμένων πολυφαινολών όπως οι θεαφλαβίνες και οι θεαρουμπιγίνες (Shao, et. al., 1995). Στο κακάο τώρα, η κυριότερη πολυφαινόλη στους σπόρους, είναι η φλαβανόλη επικατεχίνη, ενώ παρουσιάζεται 21 υψηλή περιεκτικότητα σε ανθοκυανίνες και ταννίνες. Τέλος στο κρασί, οι πολυφαινόλες περιλαμβάνουν φαινολικά οξέα, ανθοκυανίνες, ταννίνες και άλλα.

### **4.3.ΜΕΘΟΔΟΙ ΠΡΟΣΔΙΟΡΙΣΜΟΥ ΤΩΝ ΠΟΛΥΦΑΙΝΟΛΩΝ**

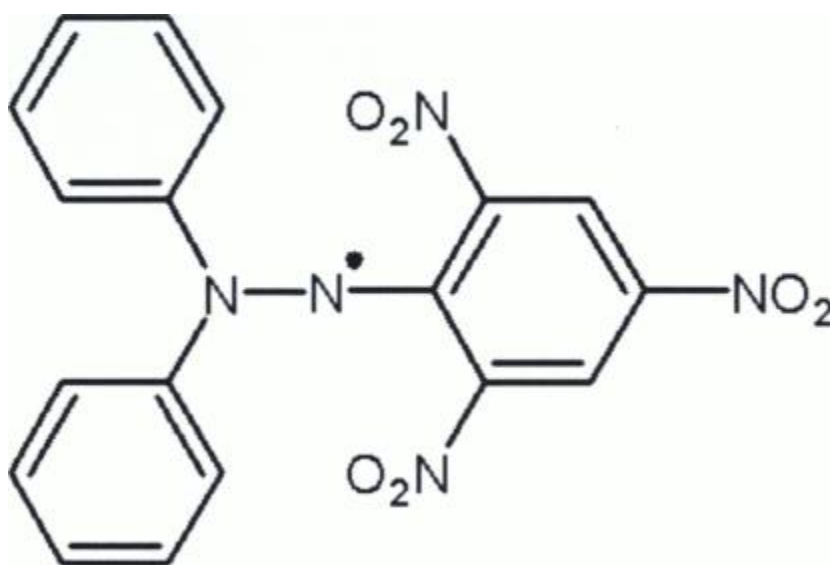
#### **4.3.1.Η Μέθοδος Folin-Ciocalteu**

Η μέθοδος *Folin-Ciocalteu* (FC) είναι μια φωτομετρική τεχνική βασισμένη στην «αναγωγική δράση» παρουσία πολυφαινολικών ομάδων, που χρησιμοποιείται για τον προσδιορισμό του ολικού πολυφαινολικού περιεχομένου σε φυσικά προϊόντα (Balentine, et. al., 1997). Η μέθοδος βασίζεται σε χρωματομετρική οξειδοαναγωγική αντίδραση με την οποία προσδιορίζεται το συνολικό φαινολικό περιεχόμενο του δείγματος, χωρίς διαχωρισμό μεταξύ μονομερών, διμερών και μεγαλύτερων φαινολικών συστατικών. Το αντιδραστήριο FC είναι διάλυμα σύνθετων πολυμερών ιόντων που σχηματίζονται από φωσφο-

μολυβδαινικά και φωσφο-βολφραμικά ετεροπολυμερή οξέα. Το προϊόν είναι σύμπλεγμα μολυβδαινίου-βολφραμίου (*Mo-W*), χαρακτηριστικής μπλε χρώσης, που απορροφά στο ορατό (725nm). Γενικά, οι φαινόλες που καθορίζονται από τον δείκτη *FC* εκφράζονται πολύ συχνά σε ισοδύναμα γαλλικού οξέος. (Liua X et al,2007).

#### 4.3.2. Η Μέθοδος DPPH

Η μέθοδος *DPPH* (*1,1-diphenyl-2-picrylhydrazyl*) είναι μια μέθοδος εκτίμησης του πολυφαινολικού περιεχομένου που βασίζεται στη μέτρηση της ικανότητας δέσμευσης ελευθέρων ριζών. Στην ικανότητα αυτή των πολυφαινολών, αποδίδεται η αντιοξειδωτική τους δράση, με αποτέλεσμα η μέθοδος αυτή να δίνει μετρήσεις της συνολικής αντιοξειδωτικής ικανότητας των πολυφαινολών του εκχυλίσματος αυτού. Αποτελεί *in vitro* τεχνική και πλεονεκτεί ως προς το ότι η δέσμευση των ελευθέρων ριζών του *DPPH* από τις πολυφαινόλες του δείγματος και η φασματοφωτομέτρηση του συνολικού διαλύματος αντίδρασης (π.χ. εκχύλισμα *DPPH*) δεν είναι χρονοβόρες διαδικασίες. Οι φωτομετρήσεις πραγματοποιούνται περίπου μια ώρα μετά την παρασκευή του διαλύματος στα 520-700 nm. Μεγαλύτερη αντιοξειδωτική ικανότητα συνεπάγεται αυξημένη δέσμευση των ελευθέρων (κατά τα άλλα σταθερών) ριζών του *DPPH*, και κατά επέκταση μειωμένη τιμή απορρόφησης. Η ικανότητα αυτή του δεσμευτικού παράγοντα στηρίζεται στην προσφορά ενός ατόμου υδρογόνου κάθε φορά, γεγονός που οδηγεί σε αύξηση του βαθμού δέσμευσης ελευθέρων ριζών (Roginsky & Lissi, 2004).



Εικόνα 18 Η ελεύθερη ρίζα *DPPH* (Molyneux, 2004)

#### **4.3.3. Η Μέθοδος HPLC**

Από τις πλέον χρησιμοποιούμενες τεχνικές διαχωρισμού, ταυτοποίησης και ποσοτικού προσδιορισμού των φαινολικών ουσιών των τροφίμων είναι η υγρή χρωματογραφία υψηλής πίεσης (*High Performance Liquid Chromatography - HPLC*). Ως *HPLC*, ονομάζεται η μέθοδος χρωματογραφίας στήλης, η οποία εκτελείται με τη βοήθεια ενός συγκροτήματος οργάνων (συσκευή υγρού χρωματογράφου). Ως κινητή φάση χρησιμοποιούνται αδρανείς διαλύτες (οργανικοί, νερό, ρυθμιστικά διαλύματα και άλλα), υπό ελεγχόμενη πίεση, ενώ η στατική φάση αποτελείται από πυριτική πηκτή ή από πολυμερείς ενώσεις (Ανδρικόπουλος, 1999).

Ανάλογα με το είδος της στατικής φάσης, η μέθοδος *HPLC* αποδίδει χρωματογραφικούς διαχωρισμούς σύμφωνα με τις αρχές προσρόφησης ή της κατανομής ή συνδυασμού αυτών, ή της ιοντοανταλλαγής ή τέλος της μοριακής διήθησης. Τα συστατικά διαχωρίζονται καθώς διέρχονται από τη στατική φάση της στήλης, με τη βοήθεια της κινητής φάσης που αποτελείται από διαλύτες κατάλληλης πολικότητας για τον διαχωρισμό. Από τη σύγκριση του χρόνου έκλυσης με αυτούς προτύπων ουσιών σε όμοιες χρωματογραφικές συνθήκες γίνεται προσδιορισμός του κάθε συστατικού.

Τα τελευταία χρόνια, η υγρή χρωματογραφία υψηλής πίεσης-ανάστροφης φάσης (*Reversed-Phase High Pressure Liquid Chromatography, RP-HPLC*) σε συνδυασμό με ανιχνευτή υπεριώδους-ορατού (*Ultraviolet-Visible, UV-Vis*), αποτελεί την πρώτιστη μέθοδο ανάλυσης, για δεδομένες αναλύσεις (Romani, et. al., 1999). Με *RP-HPLC*, συνδυασμένη με ηλεκτροχημικό ανιχνευτή και κινητή φάση ακετονιτρίλιο-οξικό οξύ, έχει δειχθεί ότι μπορούν ταυτόχρονα να διαχωριστούν και ποσοτικοποιηθούν οι κύριες φαινολικές ενώσεις, όπως αυτές που παραλαμβάνονται από εκχύλιση του ελαιολάδου (Akasbi, et. al., 1993). Τέλος, αξίζει να σημειωθεί ότι εκτός από τη *RP-HPLC/UV-Vis*, έχουν εφαρμοστεί συστήματα όπως υγρή χρωματογραφία με ανιχνευτή υπερύθρου (*Infrared Liquid Chromatography, IR-LC*) (Visser, et. al., 1997) και υγρή χρωματογραφία με ανιχνευτή κυκλικού διχρωϊσμού (*Circular Dichroism Liquid Chromatography, CD-LC*) (Bringmann et al., 1999).

#### **4.3.4. Η Μέθοδος TLC**

Άλλη μία από τις πλέον χρησιμοποιούμενες τεχνικές διαχωρισμού, ταυτοποίησης και ποσοτικού προσδιορισμού των φαινολικών ουσιών των τροφίμων είναι η χρωματογραφία λεπτής στοιβάδας (*Thin Layer Chromatography - TLC*). Στην *TLC*, ο διαχωρισμός γίνεται σε πλάκες με στατική φάση κυτταρίνη, πολυαμίδιο και συνηθέστερα *silica gel*, ενώ ως σύστημα ανάπτυξης μίγματα διαφόρων διαλυτών. Για την επιλογή των καταλληλότερων από τα παραπάνω, λαμβάνεται υπόψη η πολικότητα των συστατικών των οποίων επιδιώκεται ο διαχωρισμός. Επειδή ελάχιστες φαινολικές ενώσεις είναι έγχρωμες και επομένως απευθείας ανιχνεύσιμες πάνω στην πλάκα, συνήθως η τελευταία παρατηρείται στο υπεριώδες φως και ψεκάζεται με διάφορα αντιδραστήρια. Η εμφάνιση φθορισμού και χαρακτηριστικών χρώσεων αποτελεί ένδειξη παρουσίας φαινολικών ενώσεων με ιδιαίτερα δομικά χαρακτηριστικά ή και αντιοξειδωτική δράση (Harbome, 1997).

#### **4.3.5. Η Μέθοδος CGC-MS**

Αντίστοιχα με την υγρή χρωματογραφία, υπάρχει και η αέρια χρωματογραφία, (*Gas Chromatography - CGC*) όπου ονομάζεται η μέθοδος χρωματογραφίας στήλης, η οποία εκτελείται με τη βοήθεια ενός συγκροτήματος οργάνων (συσκευή αερίου χρωματογράφου). Ως κινητή φάση χρησιμοποιούνται αδρανή αέρια (άζωτο ή ήλιο), υπό ελεγχόμενη θερμοκρασία, ενώ η στατική φάση αποτελείται από πυριτική πηκτή ή στερεό προσροφητικό μέσο που συνιστά τη στερεή ή φέρουσα φάση με μόνιμη επικάλυψη υγρής φάσης (Ανδρικόπουλος, 1999). Με τρόπο ανάλογο της υγρής χρωματογραφίας, τα συστατικά μεταβαίνουν από τον εισαγωγέα στη στήλη και διαχωρίζονται με τη βοήθεια του φέροντος αερίου και της θερμοκρασίας του φούρνου. Επιπρόσθετα, για την αύξηση της πτητικότητας και σταθερότητας ορισμένων συστατικών συχνά απαιτείται παραγωγοποίηση αυτών.

Τα τελευταία χρόνια, ο συνδυασμός αέριας χρωματογραφίας- φασματομετρίας μάζας (*Gas Chromatography-Mass Spectrometry, GC-MS*), θεωρείται βασικό εργαλείο για την ανάλυση του φαινολικού περιεχομένου φυσικών προϊόντων, καθώς είναι μια εξαιρετικά ευαίσθητη μέθοδος, κατάλληλη για τον προσδιορισμό πτητικών ενώσεων, από τη *CGC*. Στην περίπτωση των πολικών φαινολών εφαρμόζονται μέθοδοι παραγωγοποίησης για την αύξηση της πολικότητας και σταθερότητας των ενώσεων. Παράλληλα, σε ότι αφορά την εξέλιξη της φασματομετρίας μάζας (*mass spectrometry, MS*) επιτρέπεται πλέον η ταυτοποίηση πολικών μορίων όπως οι πολυφαινόλες. Οι Miletova, et. al. (1998) απέδειξαν

ότι ο ποσοτικός προσδιορισμός πολυφαινολών μπορεί να είναι πολύ ακριβής με υγρή χρωματογραφίαφασματομετρία μάζας ιοντισμού με ηλεκτροψεκασμό (*Liquid Chromatographyelectrospray Ionization Mass Spectrometry, LC-ESIMS*).

#### **4.3.6. Η Μέθοδος του Δείκτη Υπερμαγγανικού Καλίου (KMnO<sub>4</sub>)**

Όπως η μέθοδος *Follin-Ciocalteu*, έτσι και αυτή προσδιορίζει τις ολικές φαινολικές ουσίες σε ένα δείγμα. Η μέθοδος αυτή στηρίζεται στην οξείδωση των φαινολικών ουσιών από το υπερμαγγανικό κάλιο, στη θερμοκρασία του περιβάλλοντος. Το τέλος της αντίδρασης σημειώνεται με την αλλαγή του χρώματος του δείκτη *carmin-indigo*, από το κυανό στο κίτρινο. Ο δείκτης αυτός οξειδώνεται πριν από ορισμένα συστατικά του δείγματος, αλλά μετά από τις φαινολικές ουσίες. Η αλλαγή του χρώματός του συμπίπτει με το τέλος της οξείδωσης των φαινολικών ουσιών, έτσι ώστε να αποφεύγεται παραπέρα κατανάλωση για οξείδωση άλλων διαφόρων συστατικών του δείγματος (Σουφλερός, 1997).

#### **4.3.7. Η Μέθοδος FRAP**

Η φασματοφωτομετρική μέθοδος *FRAP* (*Ferric Reducing Antioxidant Power*) είναι αρκετή γρήγορη και άμεση, υπολογίζει τη συνολική αντιοξειδωτική δύναμη (αναγωγικής ικανότητας) ενός φυτικού εκχυλίσματος (Soobrattee, et. al., 2005) και στηρίζεται στην αναγωγή, κάτω από όξινες συνθήκες, του συμπλόκου *Fe+3-TPTZ* σε δισθενή μορφή, που αποκτά έντονο μπλε χρώμα και απορροφά στα 593nm. Οι συνθήκες της δοκιμής ευνοούν την αναγωγή του τρισθενούς συμπλόκου από το σύνολο των αντιοξειδωτικών ουσιών που βρίσκονται στο διάλυμα δοκιμής (Benzie & Strain, 1996). Η μέθοδος αυτή θεωρείται μια οικονομική και αξιόπιστη μέθοδος αλλά έχει το μειονέκτημα ότι δεν προσδιορίζει τις θειολικές ομάδες σαν αντιοξειδωτικά.

#### **4.3.8. Η Μέθοδος ORAC**

Η *Oxygen Radical Absorbance Capacity* (*ORAC*), είναι μία μέθοδος προσδιορισμού της αντιοξειδωτικής ικανότητας. Χρησιμοποιεί μία «γεννήτρια» ελευθέρου ριζών, μέσω θερμικής αποσύνθεσης μίας αζωτοένωσης, ώστε να δώσει μία σταθερή ροή υπεροξυλοριζών σε ένα κορεσμένο διάλυμα αέρα. Τα αντιοξειδωτικά συναγωνίζονται με το υπόστρωμα για τις ρίζες και εμποδίζουν ή επιβραδύνουν την οξείδωση του υποστρώματος.

Σύμφωνα με την πρότυπη μορφή αυτής της μεθόδου, ο ρυθμός της υπεροξειδωσής ρυθμίζεται μέσω της απώλειας του φθορισμού της β-PE είναι μία ένδειξη φθοράς από την αντίδρασή της με την υπεροξυλο-ρίζα. Η ένταση του φθορισμού (485-525nm) μετρείται για 3 5 mi η σε pH=7,4 και στους 37°C (Huang, et. ah. 2005).

#### **4.3.9. Η Μέθοδος της Χημειοφωταύγειας**

Ολοκληρώνοντας, η μέθοδος αυτή βασίζεται στην ικανότητα της λουμινόλης και συγγενών ενώσεων να εκπέμπουν φως υπό την ροή ελευθέρων ριζών. Η ένταση του παραγόμενου φωτός κατά την διάρκεια των αντιδράσεων της χημειοφωταύγειας είναι συνάρτηση της συγκέντρωσης υπεροξειδίου. Η παρουσία των αντιοξειδωτικών προκαλεί μία πτώση της έντασης (Huang, et. al, 2005).

#### **4.4. Η Προσφορά Των Πολυφαινολών Στην Υγεία**

Οι πολυφαινόλες λοιπόν, είναι ως ένα βαθμό υπεύθυνες για τις οργανοληπτικές και διατροφικές ιδιότητες των φυτικών τροφίμων. Για παράδειγμα η στυφή και πικρή γεύση των τροφίμων και των ποτών εξαρτώνται από την περιεκτικότητά τους σε πολυφαινολικές ενώσεις. Εκτός από τις ιδιότητες που προσδίδουν στα τρόφιμα, οι πολυφαινόλες προστατεύουν το ελαιόλαδο στις υψηλές θερμοκρασίες και παίζουν πολύ σημαντικό ρόλο στην ανθρώπινη υγεία. Είναι ιδιαίτερα ωφέλιμες για τον ανθρώπινο οργανισμό, αφού παρέχουν προστασία έναντι των καρδιοπαθειών και ορισμένων μορφών καρκίνου (Hertog, et. al., 1995), ενώ επιπλέον, παρουσιάζουν κι άλλες δράσεις, πολλές από τις οποίες είναι ευεργετικές για την υγεία. Οι κυριότερες δράσεις τους περιγράφονται αναλυτικά στη συνέχεια.

#### **4.5. Αντιοξειδωτική Δράση**

Οι πολυφαινόλες που έχουν ορθο-διφαινολική, κατεχολική δομή στο μόριο τους εμφανίζουν προστατευτική δράση που οφείλεται στην αντιοξειδωτική δράση τους ως εκκαθαριστές ελευθέρων ριζών ή ως αποδομητές αλυσιδωτών οξειδωτικών αντιδράσεων. Η δράση τους αυτή εκδηλώνεται με την προστασία της *LDL* από την οξείδωση που συνεπάγεται με τη μείωση της αποτιθέμενης χοληστερόλης στους ιστούς, αλλά και με τη δράση της έναντι των οξειδωτικών παραγόντων του επιθηλιακού ιστού, με αποτέλεσμα να

μειώνονται οι πιθανότητες σχηματισμού αθηρωματικής πλάκας και έτσι να μειώνεται ο κίνδυνος για καρδιαγγειακά νοσήματα (μείωση κινδύνου εμφάνισης καρδιοπαθειών). (Huang, et. al, 2005)

#### **4.6.Λοιπές Ωφέλειες των Πολυφαινολών**

Αρχικά, οι εκτενώς πολυμερισμένες ταννίνες συνδέονται και καταβυθίζουν πρωτεΐνες (μεταξύ αυτών πρωτεΐνες και ένζυμα της πέψης λιπών και υδατανθράκων), με αποτέλεσμα να καθυστερεί η απορρόφηση. Επίσης, επιδρούν σημαντικά στην απορρόφηση μεταλλικών κατιόντων, παρεμποδίζοντας τα ιόντα που συμβάλλουν στη δημιουργία ελευθέρων ριζών, κυρίως από φλαβονοειδή που προκαλούν μείωση της απορρόφησης *Fe*, *Cu*, *Zn*, *Na*, *Al* υπό τη δημιουργία συμπλοκών. Επιπλέον, οι ταννίνες και οι πολυφαινόλες του ελαιόλαδου, μειώνουν τα επίπεδα σακχάρου και χοληστερόλης στο αίμα, ενώ παράλληλα προστατεύουν τα επιθηλιακά κύτταρα του αναπνευστικού συστήματος. Ακόμη, οι πολυφαινόλες του ελαιόλαδου έχουν σημαντική αντιμικροβιακή και αντιβακτηριακή δράση, καθώς και αντιαλλεργικές ιδιότητες, όπως την παρεμπόδιση συσσώρευσης αιμοπεταλίων. Τέλος, αξίζει να σημειωθεί ότι οι πολυφαινόλες έχουν σημαντική αγγειοδιασταλτική δράση διαμέσου της παραγωγής ενδοκυτταρικού *NO*. (Huang, et. al, 2005)

#### **4.7.Πολυφαινόλες: Κίνδυνοι και παρενέργειες**

Οι πλούσιες σε πολυφαινόλες τροφές, ως μέρος μιας υγιεινής διατροφής, είναι ασφαλείς για τους περισσότερους ανθρώπους. Τα άτομα με τροφικές αλλεργίες, ή ορισμένες παθήσεις, μπορεί να χρειαστεί να αποφύγουν ορισμένες τροφές πλούσιες σε πολυφαινόλες.

Οι πολυφαινόλες εμφανίζονται φυσικά σε πολλές φυτικές τροφές. Αλλά μπορούν να προστεθούν και τεχνητά σε μερικά τρόφιμα. Επίσης μπορούν να εξαχθούν και να χρησιμοποιηθούν για την παρασκευή συμπληρωμάτων. Οι πολυφαινόλες φαίνεται να προσφέρουν πολλά οφέλη. Αλλά, σε υπερβολικές ποσότητες ενδέχεται να έχουν δυσμενείς επιπτώσεις. Ορισμένα συμπληρώματα περιέχουν πολυφαινόλες σε υψηλότερες ποσότητες από αυτές που θα καταναλώνονταν σε μια ισορροπημένη διατροφή.

Μία έρευνα έδειξε, ότι μια υψηλή δόση μιας συγκεκριμένης πολυφαινόλης προκάλεσε νεφρική βλάβη σε ποντικούς. Υπάρχουν, επίσης, αρκετές άλλες μελέτες σε ζώα

στις οποίες οι πολυφαινόλες οδήγησαν στην ανάπτυξη όγκων και αλλοίωσαν την παραγωγή των θυρεοειδικών ορμονών. Ορισμένα τρόφιμα πλούσια σε πολυφαινόλες μπορεί επίσης να επηρεάσουν την απορρόφηση ορισμένων θρεπτικών ουσιών. Αυτό συμβαίνει με το τσάι και τον σίδηρο από τα φυτικά τρόφιμα. Ο χυμός γκρέιπφρουτ είναι γνωστό ότι αλληλεπιδρά με πολλά φάρμακα. Αυτή η αλληλεπίδραση μπορεί να σχετίζεται με έναν τύπο πολυφαινόλης, που βρίσκεται στον χυμό γκρέιπφρουτ. (Huang, et. al, 2005)

#### **4.8.Χλωροφύλλες**

Οι χλωροφύλλες (χλωροφύλλη a και b) είναι οι χρωστικές οι οποίες δίνουν στα φυτά το χαρακτηριστικό πράσινο χρώμα τους. Η χλωροφύλλη a είναι πράσινη, ενώ η χλωροφύλλη b είναι κιτρινοπράσινη. Τα μέγιστα απορρόφησης της χλωροφύλλης a και της χλωροφύλλης b σε ακετόνη είναι 663/430 nm και 645/455 nm, αντίστοιχα. Το μόριο της χλωροφύλλης περιέχει μια πορφυρινική “κεφαλή” και μια “ουρά” φυτόλης. Ο πυρήνας της πολικής (υδρόφιλης) πορφυρίνης αποτελείται από έναν τετραπυρολικό δακτύλιο και ένα άτομο μαγνησίου. Μέσα στις μεμβράνες των θυλακοειδών, το πορφυρινικό μέρος του μορίου αλληλεπιδρά με πρωτεΐνες, ενώ η υδρόφοβη αλυσίδα της φυτόλης εκτείνεται μέσα στη λιπιδική διπλοστοιβάδα των θυλακοειδών. Στη βιβλιογραφία αναφέρεται ο ευεργετικός ρόλος των χλωροφυλλών στον ανθρώπινο οργανισμό. Ενδιαφέρον παρουσιάζει ακόμη και η πορεία διάσπασής τους, το φθινόπωρο, κατά το στάδιο γηρασμού των φυτών, καθώς έχει παρατηρηθεί πως το τετραπυρόλιο αποτελεί ισχυρό αντιοξειδωτικό παράγοντα, όταν βρίσκεται στα φύλλα αλλά και στον καρπό γιγαρτοκάρπων (Muller T. et al, 2007).

Η χλωροφύλλη είναι αδιάλυτη στο νερό αλλά διαλυτή σε οργανικούς διαλύτες. Για τον προσδιορισμό της χλωροφύλλης χρησιμοποιούνται δύο μέθοδοι: η κλασσική μέθοδος του Amon (1949) και η μέθοδος του διμεθυλσουλφοξειδίου (DMSO) (Hiscox and Israelstam, 1979, Bames et a l, 1992, Tait and Hik, 2003, Richardson et a l, 2002).

Η μέθοδος του Amon χρησιμοποιείται ευρέως από πολλούς ερευνητές παρά το γεγονός ότι έχει κάποια σφάλματα και το μίγμα των διαλυτών που χρησιμοποιεί παρουσιάζει μειονεκτήματα (Wellbum, 1994). Το κύριο πρόβλημα της είναι ότι το μίγμα της ακετόνης και του νερού (80% v/v), μπορεί να ευθύνεται για τη μη πλήρη εξαγωγή της χλωροφύλλης, καθώς και η μη προσδιορίσιμη εξάτμιση της ακετόνης κατά το σπάσιμο των ιστών, τη φυγοκέντριση, τη διήθηση και τη μέτρηση με το φασματοφωτόμετρο. Οι αλλαγές της



συγκέντρωσης της ακετόνης με το νερό είναι σημαντικός παράγων λάθους διότι ο ειδικός συντελεστής απορρόφησης της χλωροφύλλης a και b μεταβάλλεται ανάλογα με την περιεκτικότητα της ακετόνης (π.χ. αυτός της 79% είναι ελαφρώς διαφορετικός από αυτόν του 80%) (Wellbum, 1994).

Η χρήση εναλλακτικών διαλυτών για φασματοφωτομερικό προσδιορισμό των χρωστικών έχει ζητηθεί για διάφορους λόγους όπως για τον ακριβή προσδιορισμό των συντελεστών των εξισώσεων υπολογισμού, για τη διαφορετική συμπεριφορά των διάφορων τύπων φυτικών ιστών στα διάφορα εκχυλιστικά μέσα. Έτσι υπάρχουν εκχυλιστικά μέσα (π.χ. 80% ακετόνη) που είναι αναποτελεσματικά, άλλα είναι αποτελεσματικά αλλά χρειάζεται διαβροχή, σπάσιμο του ιστού, διαύγαση, φυγοκέντριση και γενικά μεγάλος χρόνος προετοιμασίας και άλλα απαιτούν μόνο διαβροχή και ανακίνηση για την εξαγωγή των χρωστικών (Wellbum, 1994).

## Β ΜΕΡΟΣ: ΠΕΙΡΑΜΑΤΙΚΗ ΔΙΑΔΙΚΑΣΙΑ

### ΚΕΦΑΛΑΙΟ 5<sup>ο</sup> : ΠΕΙΡΑΜΑΤΙΚΗ ΔΙΑΔΙΚΑΣΙΑ, ΥΛΙΚΑ ΚΑΙ ΜΕΘΟΔΟΙ ΠΟΥ ΧΡΗΣΙΜΟΠΟΙΗΘΗΚΑΝ

---

#### 5.1. Πειραματική εγκατάσταση

##### 5.1.1. Το θερμοκήπιο

Η καλλιέργεια των φυτών του μαρουλιού που χρησιμοποιήθηκαν για το πείραμα πραγματοποιήθηκε σε αυτοματοποιημένο γιαλογρακτο θερμοκήπιο συνολικής έκτασης 700 από τα οποία τα 600 m<sup>2</sup> χρησιμοποιούνται για καλλιέργεια και τα 100 m<sup>2</sup> ως βοηθητικός χώρος . Είναι καλυμμένο με υαλοπίνακες , αμφιρικότο πολλαπλό. Είναι εξοπλισμένο με κεντρικό σύστημα θέρμανσης και σύστημα αυτόματου ελέγχου του κλίματος. Το θερμοκήπιο βρίσκεται εγκατεστημένο στο αγρόκτημα του γεωπονικού πανεπιστήμιου Ιωαννίνων στους Κωστίους Άρτας.

Στις 21 Σεπτεμβρίου του 2018 πραγματοποιήθηκε η σπορά και είκοσι έξη μέρες αργότερα στις 17 Οκτωβρίου του 2018 πραγματοποιήθηκε η μεταφύτευση. Το κάθε φυτό μεταφυτεύτηκε σε ξεχωριστή γλάστρα . Όλες οι γλάστρες τοποθετήθηκαν με απόσταση 20 cm η μια από την άλλη σε κανάλια καλλιέργειας. Αμέσως μετρά την μεταφύτευση πραγματοποιήθηκε άρδευση με θρεπτικό διάλυμα.



Εικόνα 19 Η σπορά και η μεταφύτευση των φυτών

## 5.2. Το πείραμα

### 5.2.1. Η διαδικασία της καλλιέργειας

Σε 120 πλαστικές θήκες φυτώριου είχαν αναπτυχθεί σπόροι μαρουλιού ποικιλίας Starfighter μέχρι το στάδιο του τέταρτου πραγματικού φύλου. Στο διάστημα αυτής της περιόδου οι σπόροι ποτιζόντουσαν σε τακτά χρονικά διαστήματα με νερό. Αμέσως μετρά πραγματοποιήθηκε η μεταφύτευση των φυτών σε 40 γλάστρες οι οποίες περιείχαν μίγμα 1:1 τύρφη και περλίτη. Οι γλάστρες ήταν διαμέτρου 20cm και χωρητικότητας όγκου τριών λίτρων.



Εικόνα 20 Η προετοιμασία των γλαστρών και η τοποθέτησή τους στα κανάλια μετρά την μεταφύτευση

### 5.2.2. Τα πότισμα

Η διαδικασία του ποτίσματος ήταν απλή, με ένα μεγάλο ογκομετρικό κύλινδρο ποτίζονταν η κάθε γλάστρα ξεχωριστά και όλες με την ίδια ποσότητα ( ml ) οι οποία κυμαίνονταν λαμβανομένου υπόψη την υγρασία του περιβάλλοντος και τις καιρικές συνθήκες. το πότισμα πραγματοποιούνταν κάθε φορά με το ανάλογο διάλυμα για την κάθε μεταχείριση. Στις μεταχειρίσεις EN και ENB χρησιμοποιούνταν κάθε φορά το διάλυμα 2 (το οποίο περιείχε μισή συγκέντρωση) πλην μιας που χρησιμοποιήθηκε νερό βρύσης. Το σύνολο των ποτισμάτων ήταν 16 ( 15 με διάλυμα και 1 με νερό βρύσης ), επίσης πραγματοποιήθηκαν 4 ψεκασμοί με βιοδιεγέρτη. Όσον αφορά τις μεταχειρίσεις M και MB χρησιμοποιήθηκε το διάλυμα 1 για όλα τα ποτίσματα που πραγματοποιήθηκαν, στο σύνολο 28 και οι ψεκασμοί με το βιοδιεγέρτη ήταν και σε αυτή την μεταχείριση 4. Η επιλογή του

διαλύματος καθώς και η ποσότητα που χρησιμοποιήθηκε κάθε φορά για τις μεταχειρίσεις EN και ENB είχαν σκοπό να στρεσάρουν το φυτό. Το διάλυμά του βιοδιεγέρτη το οποίο χρησιμοποιήθηκε ήταν ίδιο για όλες τις μεταχειρίσεις και αναλογίας 10 ml βιοδιεγέρτη σε 1L νερό κάθε φορά που γινόταν ο ψεκασμός.

### 5.2.3. Πειραματικός σχεδιασμός

Πραγματοποιήθηκε η εγκατάσταση τεσσάρων πάγκων στον χώρο του θερμοκήπιου με 10 γλάστρες ο καθένας. Για κάθε δυο πάγκους υπήρχε διαφορετική μεταχείριση και 4 επαναλήψεις τυχαία διανεμημένες. Σε δύο μεταχειρίσεις (M: μάρτυρας και MB: μάρτυρας-βιοδιεγέρτης) τα φυτά αρδεύονταν με θρεπτικό διάλυμα ανά δύο ημέρες με όγκους που εξαρτώνταν από τις κλιματολογικές συνθήκες και το στάδιο ανάπτυξης του φυτού, ενώ στις δύο άλλες μεταχειρίσεις (EN: έλλειψη νερού και ENB: έλλειψη νερού-βιοδιεγέρτης) τα φυτά αρδεύονταν με τους ίδιους όγκους θρεπτικού διαλύματος σε χρονικά διαστήματα τεσσάρων ημερών, ώστε να δημιουργηθούν συνθήκες έλλειψης νερού. (πίνακας ...). Στις μεταχειρίσεις MB και ENB τα φυτά κάθε 15 ημέρες απομονωνόταν και ψεκάζονταν με διάλυμα βιοδιεγέρτη millerplex 3-3-3 (οργανικό λίπασμα με εκχύλισμα από φύκια) σε συγκέντρωση 2ml σκευάσματά ανά 200 ml νερού κάθε φορά που πραγματοποιούνταν ο ψεκασμός. Το πότισμα όλων των μεταχειρίσεων γινόταν κάθε φορά με θρεπτικό διάλυμα το οποίο αποτελούνταν από 0,5g λιπάσματος 14-0-46 και 0,24g λιπάσματος 12-48-8 ανά λίτρο νερού και η τελική του συγκέντρωση ήταν 100ppmN, 30ppm και P<sub>2</sub>O<sub>5</sub> 150 ppm K<sub>2</sub>O.



Εικόνα 21 Παρασκευή και αποθήκευση του θρεπτικού διαλύματος, σκεύασμα ψεκασμού και διαδικασία απομόνωση των φυτών και ψεκασμός με βιοδιεγέρτη

	Μεταχειρίσεις
1 <sup>η</sup> μεταχείριση (M): μάρτυρας	Άρδευση μόνο με θρεπτικό διάλυμα
2 <sup>η</sup> μεταχείριση (MB): Βιοδιεγέρτης	Άρδευση με θρεπτικό διάλυμα και ψεκασμός με διάλυμα βιοδιεγέρτη
3 <sup>η</sup> μεταχείριση (EN): έλλειψη νερού	Άρδευση με θρεπτικό διάλυμα σε μεγαλύτερα χρονικά διαστήματα
4 <sup>η</sup> μεταχείριση (ENB ): έλλειψη νερού και βιοδιεγέρτης	Άρδευση με θρεπτικό διάλυμα σε μεγαλύτερα χρονικά διαστήματα και ψεκασμός με διάλυμα βιοδιεγέρτη

**Πίνακας 1. Περιγραφή των μεταχειρίσεων**

#### **5.2.4. Διαδικασία δειγματοληψίας και οι αναλύσεις**

Πραγματοποιήθηκαν πέντε δειγματοληψίες στο διάστημα Νοέμβριος 2018 έως τον Ιανουάριο του 2019 με τη 1<sup>η</sup> στις 7/11/2018, την 2<sup>η</sup> στις 16/11/2018, την 3<sup>η</sup> στις 30/11/2018, την 4<sup>η</sup> στις 19/12/2018 και η 5<sup>η</sup> και τελευταία στις 10/01/2019. Σε κάθε μια από τις δειγματοληψίες επιλέγονταν 8 τυχαία φυτά 2 από κάθε μεταχείριση. Το φυτό απομονωνόταν από την γλαρά και ξεπλένονταν ελαφρώς, στην συνέχεια αποσπόντα η ρίζα στο σημείο ένωσης με τον βλαστό. Αμέσως μετά ζυγίζόταν το υπέργειο τμήμα του φυτού και μετρούνταν η επιφάνεια σε ειδικό μηχάνημα μέτρησης επιφανείας φύλλων. Επακολούθως τα φύλλα ξεχωριστά από το βλαστό τοποθετούνταν σε φούρνο ξήρανσης (Memmert model 500) στους 80 °C για όσο χρόνο ήταν απαραίτητο για την σταθεροποίηση του βάρους τους το οποίο και καταμετρούταν.



**Εικόνα 22 Ζύγιση, μέτρηση της επιφάνειας των φύλλων και διαχωρισμός των μερών του κάθε φυτού**

Για την μέτρηση των φαινολικών με εκχύλιση φύλλων είχε χρησιμοποιηθεί 1 φύλλο από κάθε φυτό για κάθε δειγματοληψία. Από κάθε φυτό δυο φύλλα όμοια μεταξύ τους απομονωνόταν και το ένα ακολουθούσε την διαδικασία της ξήρανσης και το άλλο διατηρούνταν στην κατάψυξη μέχρι την μέρα που θα πραγματοποιούνταν η εκχύλιση.

## **I. Μέθοδος προσδιορισμού φαινολικών ( Folin Ciocalteu, FC )**

### **A.Όργανα- Σκεύη**

- Απιονισμένο ύδωρ από ιοντοεναλλακτική ρητίνη τύπου Dionex
- Γουδί λειοτρίβισης
- Γουδοχέρι
- Διηθητικό χαρτί
- Ηλεκτρονικό ζυγό
- Ηλεκτρονικός αναδευτήρας (vortex)
- Κοπίδι φίλων με στρογγυλή σπή 1cm
- Κυψελίδες
- Κωνική φιάλη με υάλινη πλάγια είσοδο 100ml για αφυδάτωση
- Λαβίδα
- Ογκομετρική φιάλη 25 ml, 50ml, 100ml, 250ml,500ml και 1000ml με υάλινο ή πλαστικό πώμα
- Ογκομετρικοί κύλινδροι 10ml, 25ml, 50ml, 100ml, 500ml και
- Ποτήρι ζέσεως 50 ml και 100 ml
- Στατώ διαφόρων μεγεθών
- Υάλινοι δοκιμαστικοί σωλήνες με βιδωτό πώμα 15 ml
- Υδατόλουτρο
- Υδροβολέας
- Φασματοφωτόμετρο Υπεριώδους – Ορατού HITACHI mpdel τύπου U – 1800
- Χωνί

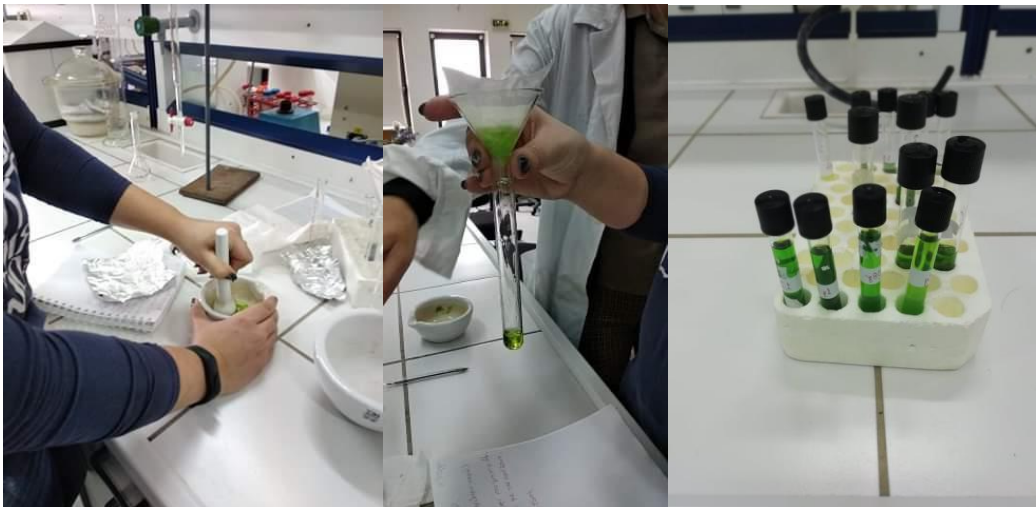
### **B.Αντιδραστήρια**

- Απιονισμένο H<sub>2</sub>O
- Μείγμα 80% ακετόνη 20% H<sub>2</sub>O
- Γαλλικό οξύ (GA, Gallic acid, Sigma Aldrich )
- Αντιδραστήριο Folin Ciocalteu 0,2 N σε αραιώση 1: 10 ( εταιρία Sigma)

- δ.  $\text{Na}_2\text{CO}_3$  περιεκτικότητας 7,5 % (3,75gr σε 50ml απιονισμένο  $\text{H}_2\text{O}$ )

### Γ. Πορεία Πειράματος

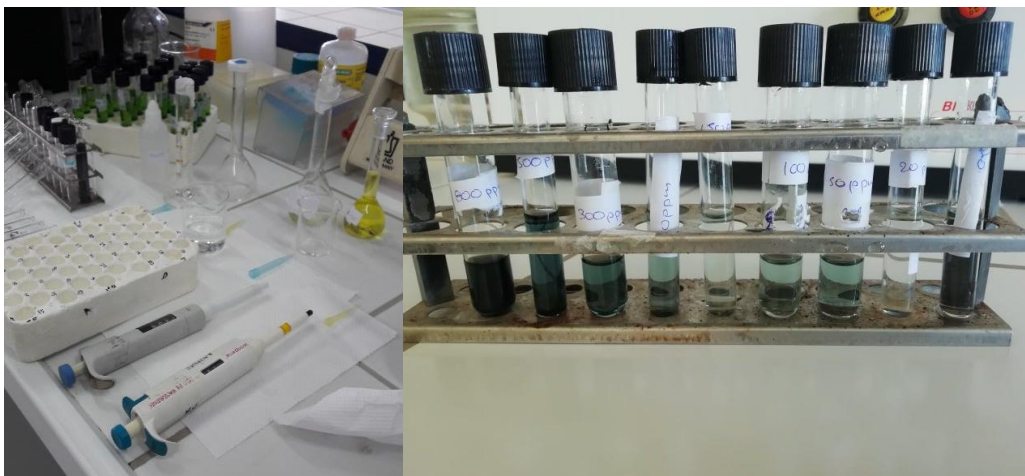
Για τον προσδιορισμό της ποσότητας των ολικών φαινολικών χρησιμοποιήθηκε η μέθοδος προσδιορισμού πολικών φαινολικών (Folin Ciocalteu, F.C.). Πραγματοποιήθηκαν πέντε δειγματοληψίες, με την 1<sup>η</sup> στις 7/11/2018, την 2<sup>η</sup> στις 16/11/2018, την 3<sup>η</sup> στις 30/11/2018, την 4<sup>η</sup> στις 19/12/2018 και την 5<sup>η</sup> και τελευταία στις 10/01/2019. Από κάθε φυτό επιλέχτηκε ένα φύλλο περίπου στο μέσο της κόμης και ζυγίστηκε 1g το οποίο τοποθετήθηκε σε γουδί, σε αυτό προστέθηκαν 13 ml ακετόνη 80 : 20 (v/v) και αναδεύτηκε καλά μέχρι ομογενοποίησης του δείγματος. Στην συνέχεια το μείγμα τοποθετήθηκε σε χιόνι με διηθητικό χαρτί για να συλλεχθεί το διήθημα το οποίο τοποθετούνταν σε φιαλίδια των 15 ml. Αμέσως μετά τα φιαλίδια τοποθετούνταν στο ψυγείο για 8 ώρες (over night ) σε θερμοκρασία 4 °C έτσι ώστε να ολοκληρωθεί η διαδικασία της εκχύλισης. Αμέσως μετά την ολοκλήρωση της διαδικασίας αυτής τα φιαλίδια τοποθετούνταν στην φυγόκεντρο στις 1000 rpm για 2 min για τον καλύτερο διαχωρισμό των αιωρούμενων στέρεων σωματιδίων.



Εικόνα 23 Η διαδικασία της εκχύλισης και το εκχυλούμενο δείγμα

Μετά την φυγόκέντρωση με μια πιπέτα και πολύ προσεκτικά μετρήθηκε η ποσότητα του υπερκείμενου δείγματος. Από το δείγμα συλλέχθηκαν 100 μl τα οποία τοποθετήθηκαν σε δοκιμαστικό σωλήνα. Στην συνέχεια και με την ακόλουθη σειρά τοποθετήθηκαν τα εξής αντιδραστήρια : 270ml απιονισμένο ύδωρ, 1,5ml F.C. (1: 10 ) και 1,2ml  $\text{Na}_2\text{CO}_3$  7,5% W/V. Αμέσως μετά πραγματοποιούνταν ανάμιξη των δειγμάτων στο Vortex και στην συνέχεια

η τοποθέτηση τους στο υδατόλουτρο στους 40 °C για 15min έτσι ώστε να ολοκληρωθεί η αντίδραση. Αφού η διαδικασία είχε ολοκληρωθεί τα δείγματα αφαιρούνταν και αφήνονταν σε ηρεμία ούτως ώστε να αποκτήσουν θερμοκρασία δωματίου. Ακολούθως το τελευταίο στάδιο ήταν η μέτρηση της απορρόφησης των δειγμάτων στα 765 nm στο φασματοφωτόμετρο ορατού υπεριώδους.



Εικόνα 24 Η προετοιμασία των αντιδραστηρίων και τα δείγματα μετρά την προσθήκη τους

#### 4.Κατασκευή καμπύλης αναφοράς

Για την κατασκευή της καμπύλης αναφορά χρησιμοποιήθηκε ως πρότυπη ουσία γαλλικό οξύ (Gallic acid G.A.). Παρασκευάστηκε Διάλυμα γαλλικού οξέος περιεκτικότητας (1000 mg/ L). Ζυγίστηκαν 0,5 gr στερεού γαλλικού οξέος σε μείγμα 80:20 CH<sub>3</sub>COCH<sub>3</sub>:H<sub>2</sub>O ογκομετρική φιάλη των 50ml και προστέθηκαν ml. Αμέσως μετρά παρασκευάστηκαν με αραιώση από το πυκνό διάλυμα μια σειρά δευτερογενών προτύπων διαλυμάτων σε όγκο 10 ml. Η σειρά των δευτερογενών προτύπων γαλλικού οξέος με αραιώση σε νερό που παρασκευάστηκαν είναι: 20ppm, 50ppm, 100ppm, 150ppm και 200ppm.

Η διαδικασία μέτρησης των προτύπων διαλυμάτων γαλλικού οξέος ήταν η εξής : από κάθε αραιωμένο πρότυπο πάρθηκε όγκος 100μL ο οποίος και τοποθετήθηκε σε δοκιμαστικούς σωλήνες. Στην συνέχεια προστέθηκαν και με την ακόλουθη σειρά 270μL απιονισμένο ύδωρ, 1,5ml F.C.(1:10) και 1,2 ml Na<sub>2</sub>CO<sub>3</sub> 7,5 % w/v. Μετά από ανάμιξη στο vortex τα δείγματα τοποθετήθηκαν στο υδατόλουτρο στους 40 °C για 15 min. Μετά το πέρας του χρόνου και αφότου είχε ολοκληρωθεί η αντίδραση τα δείγματα παρέμειναν σε ηρεμία ώστε να αποκτήσουν θερμοκρασία δωματίου. Αμέσως μετά φασματοφωτομετρήθηκαν στα



765nm. Τα αποτελέσματα παρουσιάζονται σε ισοδύναμα γαλλικού οξέος (Gallic Acid Equivalent, GAE ) ανά L διαλύματος.

### **E. Μέτρηση δειγμάτων**

Μέσο της πρότυπης καμπύλης αναφοράς του γαλλικού οξέος επί την αραιώση έγινε ο υπολογισμός των ολικών φαινολικών (Ολικά φαινολικά = C x αραιώση mg/L γαλλικού οξέος). Το τελικό αποτέλεσμα εκφράζεται σε mg GAE/g βάρους νωπών φύλλων C φυτικό εκχύλισμα  $\cdot (100/1000) = C$  μέτρησης\* ml αντιδραστηρίων

Ο προσδιορισμός των ολικών φαινολικών ουσιών στα εκχυλίσματα φύλλων πραγματοποιήθηκε με την μέτρηση της απορρόφησης στα 756nm στο φασματοφωτόμετρο ατομικής απορρόφησης HITACHI model U-1800. Η αναליση έγινε με βάση την προτιπη καμπύλη. Οι τιμές υπολογίστηκαν με την εξίσωση του γραφήματος  $A = 0,003C - 0,020$ . Στην συνέχεια υπολογίστηκε ο μέσος ορός για κάθε τιμή. Εν τέλει πραγματοποιήθηκε η μέτρηση των τιμών σε mg GAE/g βάρους νωπών φύλλων.

## **II. Μέθοδος προσδιορισμού γλωροφυλλών**

### **A. Όργανα – Σκεύη**

- Απιονισμένο νερό από ιοντοεναλλακτική ρητίνη
- Ακετόνη 90% Merck τύπου Dionex
- Γουδί λειοτριβίσης
- Γουδοχέρι
- Διηθητικό χαρτί
- Ηλεκτρονικό ζυγό
- Κυψελίδες και υάλινες οπτικής διαδρομής
- Κωνική φιάλη με υάλινη πλάγια είσοδο 100ml ( για αφυδάτωση )
- Λαβίδα
- Μικροπιπέτες ογκου 1-10 ml, 5-50 ml, 20-200 ml, 100-1000 ml, και 200-1000 ml
- Ογκομετρικοί κύλινδροι 25ml, 50ml, 100ml και 1000ml

- Ποτήρι ζέσεως 50ml
- Υάλινοι δοκιμαστικοί σωλήνες με πώμα βιδωτό
- Χωνί
- Υδροβολέας
- Φασματοφωτομετρο Υπεριώδους – Ορατού τύπου HITACHI model U-1800

## **B. Αντιδραστήρια**

- Απιονισμένο H<sub>2</sub>O
- 80 % ακετόνη 20 % H<sub>2</sub>O (διάλυμα που χρησιμοποιήθηκε για την εκχέλιση των φύλλων ) (Merck KGaA 64271 Darmstadt )

## **Γ. Πορεία Πειράματος**

Παρασκευή εκχυλίσματος φύλλων μαρουλιού – Λήψη φάσματος χλωροφυλλών

Αρχικά ζυγίστηκαν 0,26-0,30g φύλλου από τα φύλλα που επιλεχτήκαν και τοποθετήθηκαν σε γουδί. Στην συνέχεια προστέθηκαν 13ml ακετόνη 80/20 (v/v) και αναδεύτηκαν μέχρι ομογενοποίησης του μίγματος .

Στην συνέχεια το ομογενοποιημένο δείγμα τοποθετήθηκε σε φιαλίδια των 15ml και έπειτα παρέμεινε για 8 ώρες στο ψυγείο στους 4oC μέχρι να ολοκληρωθεί η διαδικασία της εκχέλισης. Μετά την ολοκλήρωση της διαδικασίας τα δείγματα τοποθετούνταν σε φυγόκεντρο στις 1000 rpm για 2 min ώστε να υπάρξει καλύτερος διαχωρισμός των αιωρούμενων στερεών. Η μέτρηση της χλωροφύλλης πραγματοποιούνταν στο φασματοφωτομετρο ατομικής απορρόφησης HITACHI model U-1800 στα 663nm.

Υπολογισμός ποσοτήτων χλωροφύλλης και στα δυο εκχυλίσματα

Οι παρακάτω σχέσεις προσδιορίζουν την ποσότητα χλωροφύλλης σε mg/gr φύλλου.

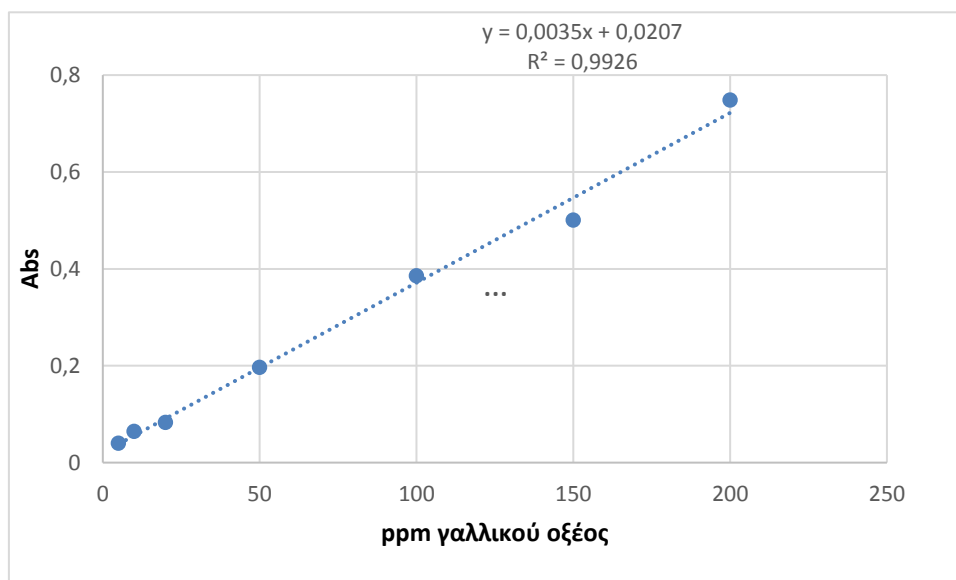
Χλωροφύλλη a = ( ( 12,7 \* A<sub>663</sub> ) – ( 2,6 \* A<sub>645</sub> ) ) \* ml διαλύτη ) / mg φύλλου

Χλωροφύλλη b = ( ( 22,9 \* A<sub>645</sub> ) – ( 4,68 \* A<sub>663</sub> ) \* ml διαλύτη ) / mg φύλλου

Με βάση τις δυο εξισώσεις οι οποίες ονομάζονται εξισώσεις του Daniel Arnon υπολογίζονται οι ποσότητες των χλωροφυλλών a και b.

## ΚΕΦΑΛΑΙΟ 6<sup>ο</sup> : ΑΠΟΤΕΛΕΣΜΑΤΑ

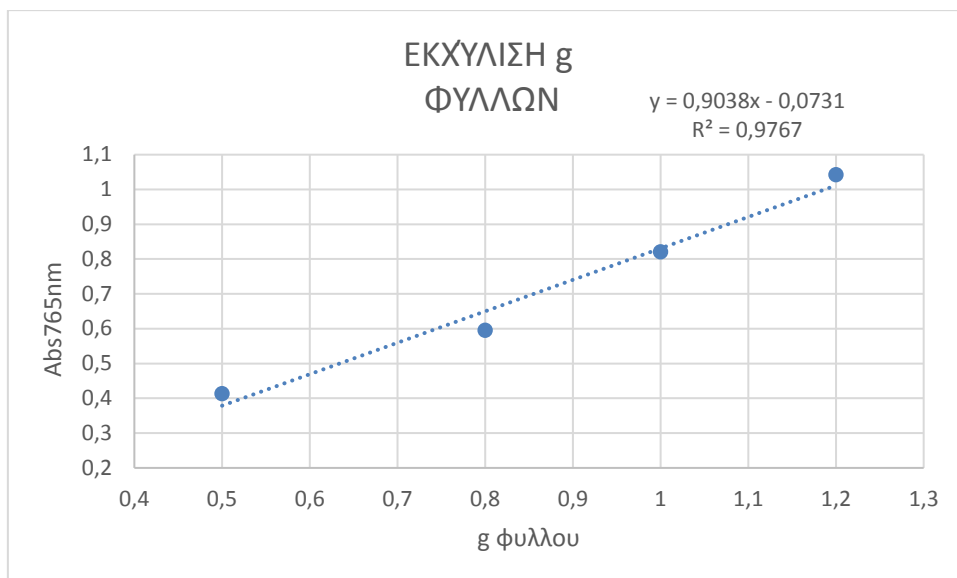
### 6.1. Καμπύλες αναφοράς



Διάγραμμα 6. 1 Πρότυπη καμπύλη αναφοράς για τον προσδιορισμό της συγκέντρωσης πολικών φαινολικών ουσιών με την μέθοδο Folin-ciocalteu.

Ως πρότυπη ουσία χρησιμοποιήθηκε το ΓΑως υποκατάστατο των φαινολικών ενώσεων Τα πρότυπα διαλύματα που χρησιμοποιήθηκαν για την παρασκευή της καμπύλης αναφοράς ήταν 5, 10, 20, 50, 100, 150 και 200 mg/L. Ο συντελεστής γραμμικής συσχέτισης απορρόφησης και συγκέντρωσης των μετρούμενων προτύπων διαλυμάτων βρέθηκε 0.9926

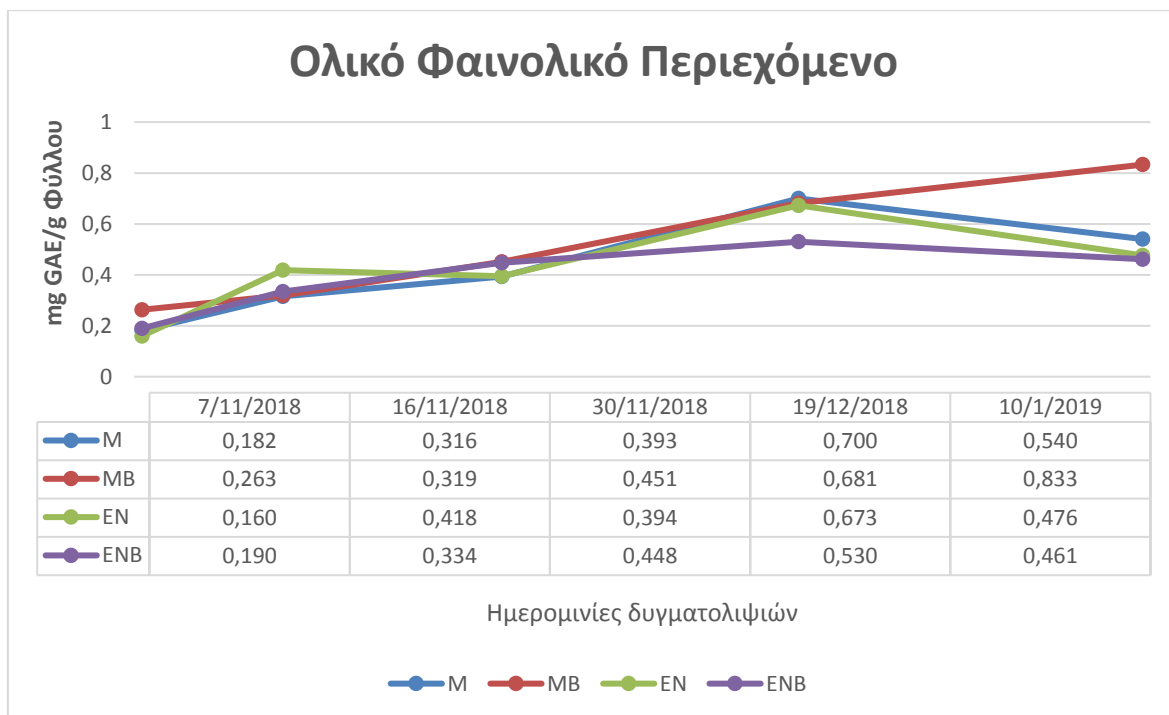
Για αν μελετηθεί η αξιόπιστα της εκχύλισης, εκχυλίστηκαν από το ίδιο φύλλο μαρουλιού ποσότητες 0,5, 0,8 1 και 1,2 mg εφαρμόσθηκε η διαδικασία της μέτρησης με το αντιδραστήριο F.C και μετρήθηκαν οι απορροφήσεις των δειγμάτων Τα αποτελέσματα αναπαρίστανται στο διάγραμμα 6.2 και δείχνουν γραμμικότητα με συντελεστή  $R^2=0,9767$ .



Διάγραμμα 6. 2 καμπύλη αναφορά mg φύλλου και Abs<sub>765nm</sub>

## 6.2.Ολικά φαινολικά

Στο παρακάτω διάγραμμα παρουσιάζεται το ολικό φαινολικό περιεχόμενο για τα εκχυλίσματα φύλλων μαρουλιού. Στην 1<sup>η</sup> δειγματοληψία (20 ημέρα πειράματος) η μεγαλύτερη συγκέντρωση 0,263 mg GAE/g φυτού παρατηρήθηκε στην μεταχείριση οποία με βιοδιεγέρτη (MB) ενώ η μικρότερη 0,160 mg GAE/g φυτού παρατηρήθηκε στην μεταχείριση στην οποία είχε πραγματοποιηθεί αραιό πότισμα με σκοπό την δημιουργία στρες στα φυτά (EN). Στην 5η δειγματοληψία (83η μέρα καλλιέργειας ) παρατηρείται μια απότομη άνοδο των φαινολικών συγκεντρώσεων στην μεταχείριση η οποία ψεκάζεται με βιοδιεγέρτη (MB) στο 0,833 όπου η συγκέντρωση στην μεταχείριση με βιοδιεγέρτη ήταν κατά 54 % υψηλότερη από αυτή του μάρτυρα. Συγκριτικά οι τιμές για τις μεταχειρίσεις (EN) και (ENB) δεν παρουσιάζουν μεγάλη διακύμανση μεταξύ τους σε όλη την διάρκεια της καλλιέργειας.



**Διάγραμμα 6. 3 ολικές φαινολικές ενόσεις σε mg GAE/g βάρους νεπών φύλλων**

Σύμφωνα με το διάγραμμα παρατηρείται ότι το ολικό φαινικό περιεχόμενο είναι τελικά χαμηλότερο στις μεταχειρίσεις με την έλλειψη νερού διότι αυτές εκτέθηκαν σε έντονο στρες. Αντίθετα μεγαλύτερες τιμές συγκέντρωσης ολικών φαινολικών παρουσιάζουν οι μεταχειρίσεις στις οποίες οι συνθήκες ανάπτυξης ήταν φυσιολογικές και η μια εκ' των οποίων ψεκαζόταν και με βιοδιεγέρτη. Από την βιβλιογραφία αναφέρεται η ευεργετική δράση των εκχυλισμάτων *A. nodosmum* ως παράγοντες ανάπτυξης. Αυτό αποδίδεται στις περιεχόμενες φυτοορμόνες στο εκχύλισμα του φύκου, όπως κυτοκίνες, γιβρελλίνες περιεχόμενο τους σε φυτό (Shukla et al, 2019).

Τα φυτά υπόκεινται κατά τον κύκλο της ζωής τους σε αβιοτικές καταπονήσεις όπως ξηρασία. Η έλλειψη νερού επίσης διεγείρει τη σύνθεση και την απελευθέρωση του αμπισζικού οξέος στα φύλλα. Αυτή η ορμόνη βοηθά να διατηρηθούν τα στόματα κλειστά. Το κλείσιμο των στομάτων οδηγεί σε μειωμένη διαθεσιμότητα διοξειδίου του άνθρακα για το φυτό. Και οι χημικές αντιδράσεις του συστήματος της φωτοσύνθεσης δεν μπορούν να τεθούν εκτός λειτουργίας. Η έλλειψη διοξειδίου του άνθρακα λόγω του κλεισίματος των στομάτων έχει ως αποτέλεσμα τη συσσώρευση ελευθέρων ριζών στους χλωροπλάστες. Μια σύνθετη κατανομή χημικών αντιδράσεων, που ονομάζεται μεταγωγή σήματος, είναι υπεύθυνη για αυτό. Το φυτό αποκρίνεται σε αυτές τις ελεύθερες ρίζες παράγοντας αντιοξειδωτικές ουσίες. Μια στρατηγική που αναπτύσσονται για να ανταπεξέλθουν σε

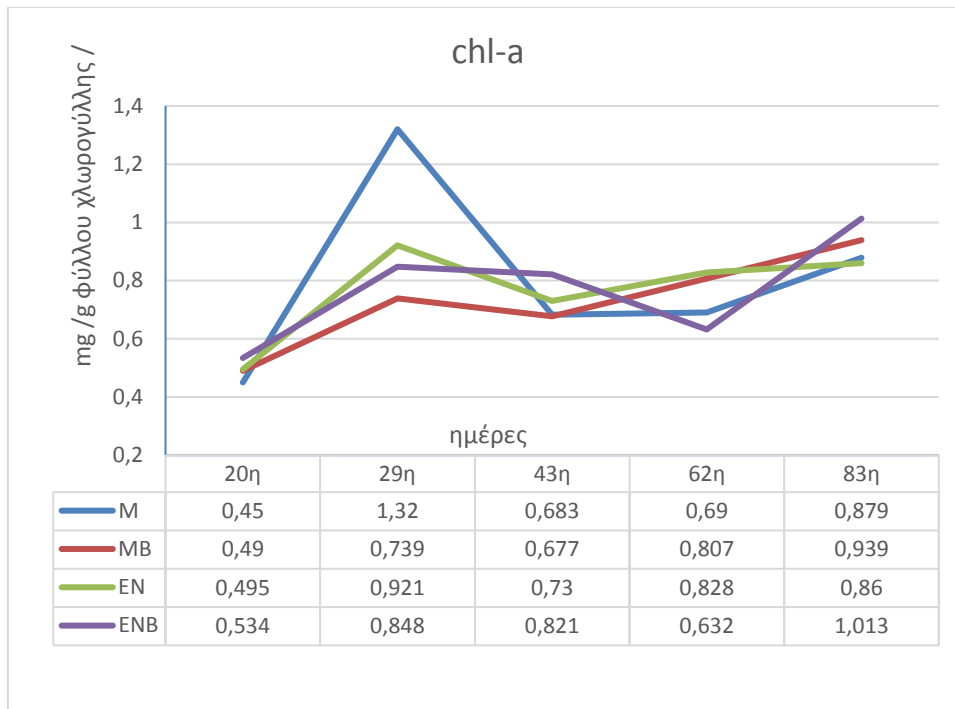
καταπονήσεις είναι η συσσώρευση ωσμωλυτών όπως η προλίνη, η γλυκίνη-μπεταΐνη, προλίνη-μπεταΐνη, γλυκερόλη, μαννιτολη και σορβιτόλη, ο δισακχαρίτης τρεαλόζη, η γλυκόζη και ορισμένοι ολιγοσακχαρίτες που προστατεύουν τα κύτταρα έναντι των αβιοτικών στρεσογόνων παραγόντων. Έχει δειχθεί πως τα σάκχαρα αλληλεπιδρούν με τις προεξέχουσες πολικές κεντρικές ομάδες των πρωτεϊνών αντικαθιστώντας τα μόρια του ύδατος. Έτσι τα σάκχαρα επιτρέπουν την απομάκρυνση του νερού από τις πρωτεΐνες χωρίς αυτή να οδηγεί σε αλλαγές στη διάταξη ή σε απώλεια της ενζυμικής λειτουργίας. Λειτουργούν ως υποκατάστατα νερού διατηρώντας το δίκτυο δεσμών υδρογόνου (Carpenter and Gowe, 1988, Wolkers et al, 1998). Η προλίνη πέρα από των ρύθμιση της ωσμωτικής πίεσης που επιφέρει, δρα και ως ένα μόριο αντιοξειδωτικό που επιφέρει την καταστροφή των ROS (δραστικών ειδών οξυγόνου). Η παραγωγή προλίνης σε συνθήκες καταπόνησης έχει βρεθεί ότι ενεργοποιεί τα ένζυμα που είναι υπεύθυνα για την καταστροφή των ROS. Επίσης η προλίνη αποτελεί σημαντικό συστατικό των πρωτεϊνών στα κυτταρικά τοιχώματα. Οι Sánchez et al. (1998) κατέληξαν στο συμπέρασμα ότι ο ρόλος της προλίνης είναι να ελαχιστοποιηθούν οι ζημιές που προκαλούνται από την αφυδάτωση, η οποία προκαλείται είτε από την έλλειψη νερού. Παρόμοια αποτελέσματα είχαν αναφερθεί και από τους Wang et al. (1999).

### 6.3.Χλωροφύλλη

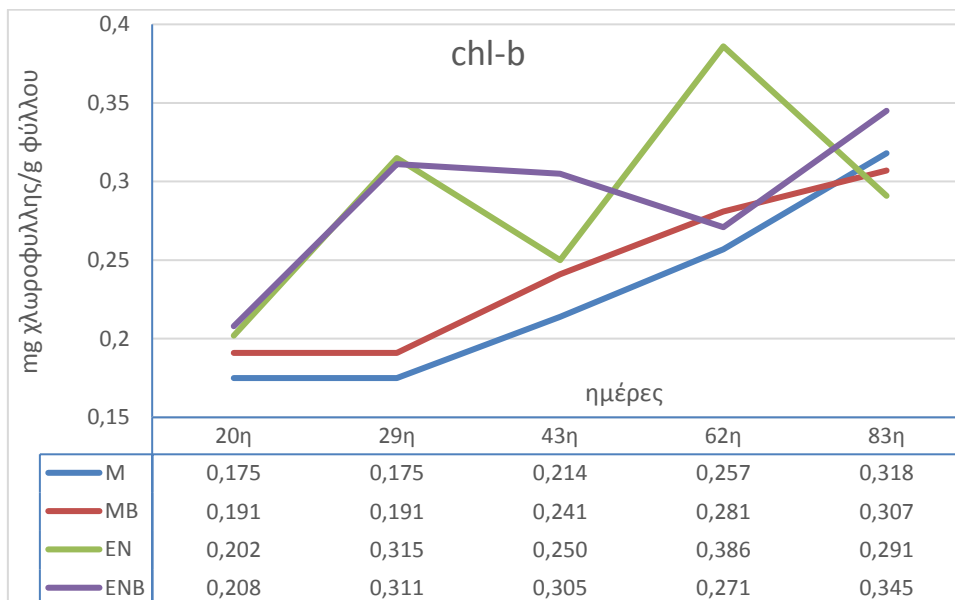
Οι συγκεντρώσεις χλωροφύλλης α και b στα φύλα μαρουλιού όπως φαίνεται και στο παρακάτω διάγραμμα παρουσιάζουν μικρές διαφορές κατά την διάρκεια της καλλιέργειας και οι τιμές είναι κυμαινόμενες (διάγραμμα 6.6). Η μεγαλύτερη αρχική συγκέντρωση ολικής χλωροφύλλης 0,983 mg/g φύλλου παρατηρήθηκε στην μεταχείριση η οποία ποτιζόταν με το πρότυπο θρεπτικό διάλειμμα και ψεκαζόταν και με βιοδιεγέρτη (MB) ενώ η μικρότερη συγκέντρωση 0,6255 mg/L παρατηρήθηκε μόνο στη μεταχείριση με το πρότυπο θρεπτικό διάλειμμα (M).

Chla είναι η κύρια φωτοσυνθετική χρωστική και ανάλογα με το πρωτεϊνικό περιεχόμενο λειτουργεί ως κεραία για την πρόσληψη του ηλιακού φωτός, ή σαν αναγωγικός παράγοντας στο ενεργό κέντρο της φωτοσύνθεσης του PSII και του PSI. Η chl-b είναι η κύρια χρωστική του πρωτεϊνικού συμπλόκου συλλογής φωτός με κύριο ρόλο την απορρόφηση και την μεταφορά ενέργειας (. Την 29<sup>η</sup> ημέρα του πειράματος (2<sup>η</sup> δειγματοληψία) το δείγμα με τη μεταχείριση M παρουσίασε την μεγαλύτερη συγκέντρωση

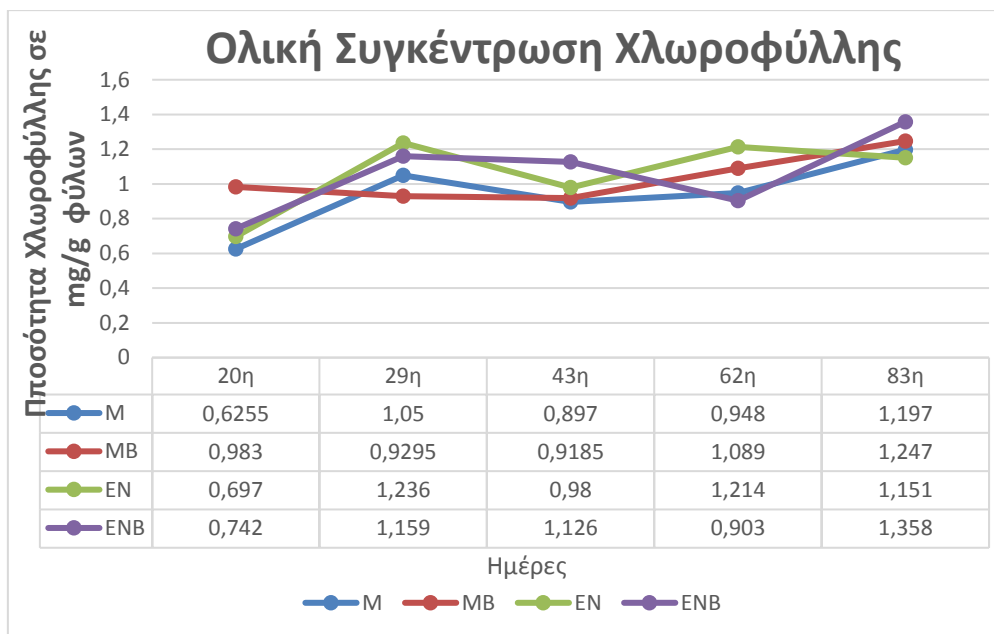
χλωροφύλλης α (1,32), ενώ το τη μικρότερη συγκέντρωση το δείγμα MB (0,739). Ενώ στην ίδια δειγματοληψία η χλωροφύλλη b παρουσιάζει την μεγαλύτερη συγκέντρωση στα δείγματα EN και ENB (0,315). Ο λόγος χλωροφύλλης α/χλωροφύλλη b κυμαίνεται από 7,2 έως 2, 7 και λειτουργεί ως δείκτης της καταπόνησης του φυτού.



**Διάγραμμα 6. 4** Συγκεντρώσεις χλωροφύλλης α σε mg/g φύλλων



**Διάγραμμα 6. 5** Συγκεντρώσεις χλωροφύλλης b σε mg/g φύλλων



Διάγραμμα 6. 6 Συνολική συγκεντρώσεις χλωροφύλλης σε mg/g φύλλων

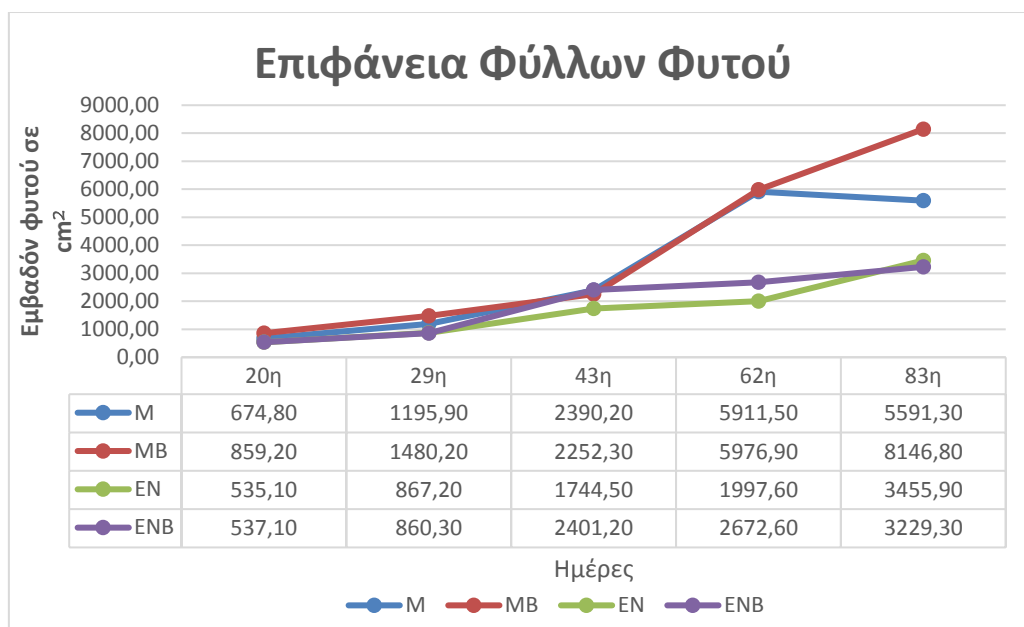
Όσον αφορά την χλωροφύλλη α η μεταχείριση στην οποία χρησιμοποιήθηκε μόνο το πρότυπο θρεπτικό διάλυμα (M) όπως και η μεταχείριση η οποία υπέστη έλλειψη νερού EN και ξεκίνησαν από χαμηλές τιμές παρουσίασαν ένα μέγιστο συγκέντρωσης περίπου στα φύλλα ηλικίας 25 έως 40 ημερών, ενώ η μεταχείριση στην οποία χρησιμοποιήθηκε το πρότυπο διάλυμα και ψεκαζόταν με βιοδιεγέρτη (MB) καθώς και η μεταχείριση η οποία υπέστη στρες και ψεκαζόταν με βιοδιεγέρτη (ENB) είχαν μια πορεία συγκέντρωσης η οποία αυξομειωνόταν συνεχώς και κατέληγαν με την μέγιστη συγκέντρωση να παρατηρείτε στα φύλλα ηλικίας περίπου 75 με 83 ημερών. Γενικά η χλωροφύλλη α είχε μεγαλύτερο εύρος τιμών συγκέντρωσης από την χλωροφύλλη β .

Στις συγκεντρώσεις τις χλωροφύλλης β όσον αφορά τις μεταχειρίσεις (M), (MB) και (ENB) οι τιμές είναι συνεχώς αυξανόμενες με την μέγιστη με την μέγιστη συγκέντρωση να παρουσιάζεται στα φύλλα ηλικιας 60 με 83 ημερών , ενώ η μεταχείριση η οποία υπέστη έλλειψη νερού παρουσιάζει μέγιστη συγκέντρωση περίπου όταν τα φύλλα ήταν ηλικίας 50 έως 70 ημερών και στην συνέχεια μειώνετε ελαφρώς στην διάρκεια της καλλιέργειας.



#### 6.4.Επιφάνεια Φύλλων

Ο υπολογισμός της επιφάνειας του φυτού στο παρακάτω διάγραμμα είναι αποτέλεσμα της άθροισης της επιφάνειας του κάθε φύλλου.



Διάγραμμα 6. 7 Εμβαδόν επιφάνειας φύλλων φυτού σε  $\text{cm}^2$

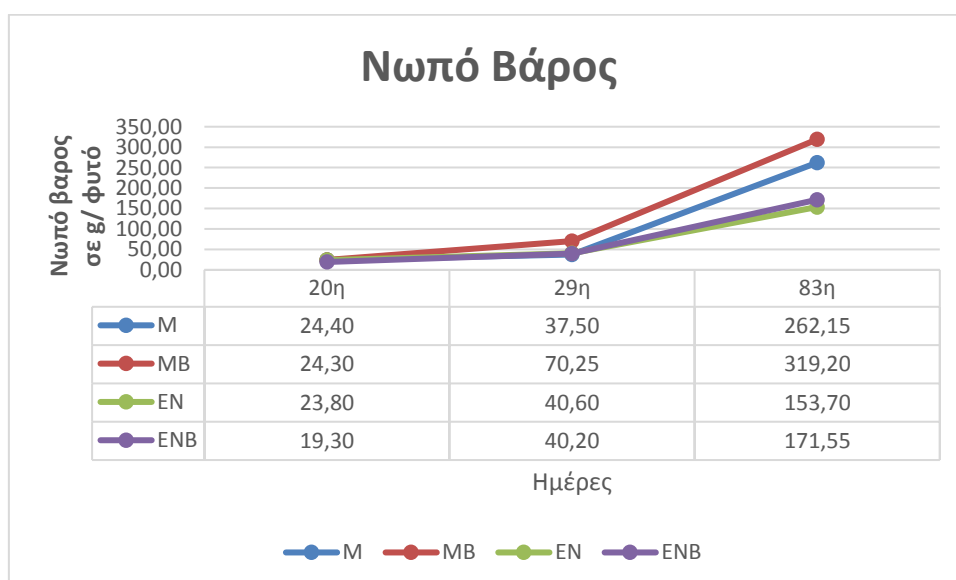
Όπως φαίνεται και παραπάνω (διάγραμμα 6.7) η επιφάνεια του φυτού αρχικά κυμαίνεται στα ίδια επίπεδα με την υψηλότερη αρχική τιμή  $859,20 \text{ cm}^2$  της μεταχείρισης η οποία ποτίζεται με το πρότυπο διάλειμμα και ψεκάζεται με βιοδιεγερτη (MB) και την μικρότερη  $535,10 \text{ cm}^2$  στην μεταχείριση η οποία υπέστη έλλειψη νερού (EN). Έως την 43η ημέρα καλλιέργειας η αύξηση της επιφάνειας των φύλλων είναι σταδιακή και συνεχώς αυξανόμενη με μικρές διαφορές μεταξύ των μεταχειρίσεων. Στις 62 ημέρες της καλλιέργειας η φυλλική επιφάνεια των μεταχειρίσεων χωρίς καταπόνηση είναι 2,9 φορές μεγαλύτερη από αυτήν με την έλλειψη νερού. Στην τελευταία δειγματοληψία η οποία πραγματοποιήθηκε παρατηρείται η διαφορά της μεταχείρισης (MB) από τις υπόλοιπες καθώς αποτελεί την μεγαλύτερη μέτρηση της τελευταίας δειγματοληψίας με τιμή  $8146,80 \text{ cm}^2$  η οποία αποτελεί 2,5 φορές μεγαλύτερη τιμή από την αντίστοιχη  $3229 \text{ cm}^2$  που αντιστοιχεί σε αυτήν με τον βιοδιεγέρτη και την ταυτόχρονη έλλειψη νερού (ENB).

Αμέσως μετά με σημαντική διαφορά ακολουθεί η μεταχείριση (M) με τιμή  $5591,30 \text{ cm}^2$  και στο τέλος οι μεταχειρίσεις EN  $3455,90 \text{ cm}^2$  και ENB  $3229,30 \text{ cm}^2$  με μικρή διαφορά μεταξύ τους.

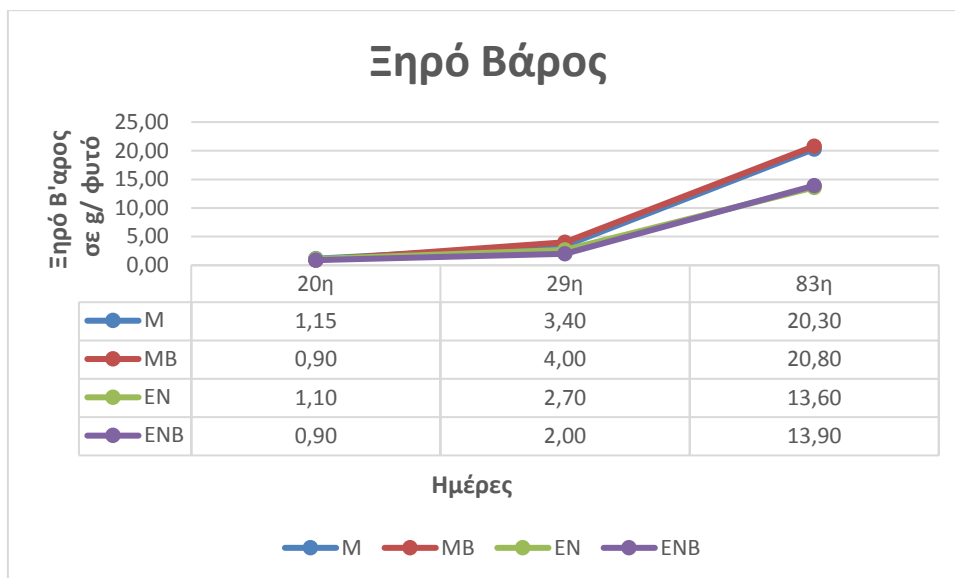
Τα φυτά όταν υπόκεινται σε υδατική καταπόνηση αντιδρούν με ελάττωση της φυλλικής επιφάνειας, ως ένα μηχανισμό αποφυγής της ξηρασίας με σκοπό να διατηρήσει υψηλό δυναμικό νερού στους ιστούς.

## 6.5.ΒΛΑΣΤΙΚΗ ΑΝΑΠΤΥΞΗ ΦΥΤΩΝ

Στο παρακάτω διάγραμμα (διάγραμμα 6.8.) απεικονίζεται η εξέλιξη του νωπού βάρους των φύλων στην διάρκεια της καλλιέργειας. Πραγματοποιήθηκαν τρεις μετρήσεις με την πρώτη στην 20η ημέρα καλλιέργειας την δεύτερη στην 29η ημέρα καλλιέργειας και την τρίτη στην 83η ημέρα καλλιέργειας. Η διαφοροποίηση μεταξύ των μεταχειρίσεων του νωπού βάρους των φυτών ξεκίνησε περίπου από την 29η ημέρα καλλιέργειας. Οι σημαντικές διαφορές μεταξύ των μεταχειρίσεων παρατηρήθηκαν στην 83η ημέρα καλλιέργειας και μετά. Οι τελικές τιμές που μετρήθηκαν στο νωπό βάρος με φθίνουσα την σειρά η οποία ακολουθεί ήταν οι εξής: 319,20 g/ φυτό στην μεταχείριση η οποία ποτιζόταν με το πρότυπο θρεπτικό διάλειμμα και ψεκαζόταν με βιοδιεγέρτη (MB), 262,15 g/ φυτό στην μεταχείριση η οποία ποτιζόταν με το πρότυπο θρεπτικό διάλειμμα (M), 171,55 g/ φυτό στην μεταχείριση η οποία υπέστη έλλειψη νερού και ψεκαζόταν με βιοδιεγέρτη (ENB) και 153,70 g/ φυτό στην μεταχείριση η οποία υπέστη έλλειψη νερού (EN).



Διάγραμμα 6. 8. Νωπό βάρος φύλων φυτού



Διάγραμμα 6. 9. Ξηρό βάρος φύλλων φυτού

Οι τιμές αυτές δείχνουν ότι οι μεταχειρίσεις οι οποίες αποτελούν μάρτυρα έχουν μεγαλύτερες τιμές από τις μεταχειρίσεις οι οποίες υπέστη stress. Την μεγαλύτερη τιμή παρουσιάζει η μεταχείριση η οποία ποτιζόταν με το πρότυπο θρεπτικό διάλυμα και ψεκαζόταν με βιοδιεγερτη.

Οι τιμές του νεπού βάρους της κόμης του φυτού μαρουλιού (διάγραμμα 6.9.) άρχισαν να διαφοροποιούνται ελάχιστα από την 29η ημέρα καλλιέργειας. Το ξηρό βάρος των μεταχειρίσεων οι οποίες εκτέθηκαν σε στρες είναι μικρότερο από τις μεταχειρίσεις οι οποίες αποτελούν μάρτυρα . Στο τέλος της καλλιέργειας (83η ημέρα ) το ξηρό βάρος της κάθε μεταχείρισης ήταν MB 20,80 g/ φυτό, M 20,30 g/ φυτό, ENB 13,90 g/ φυτό και EN 13,60 g/ φυτό.

Η ξηρασία η οποία υπάρχει στο έδαφος δημιουργεί stress στο φυτό και επιφέρει μείωση στην ανάπτυξη του όπως αυτή παρουσιάζεται στις μετρήσεις του νεπού (NB) και ξηρού βάρους (ΞΒ)των φύλλων του φυτού (διάγραμμα 6.8 και 6.9). Το ξηρό περιβάλλον επιδρά αρνητικά στην ανάπτυξη των φυτών και αυτό συμβαίνει διότι ο ρυθμός απώλειας νερού μέσω της διαπνοής είναι μεγαλύτερη από τον ρυθμό με τον οποίο το φυτό προσλαμβάνει νερό από το έδαφος. Το φυτό διαθέτει μηχανισμούς οι οποίοι του επιτρέπουν να αντιμετωπίζει συνθήκες ξηρασίας. Η ξηρασία στο περιβάλλον των φυτών οδηγεί σε μείωση του ρυθμού διαπνοής και με αυτό το τρόπο διεγείρεται η σύνθεση και απελευθέρωση το αμυϊκού οξέος και διατηρούνται τα στόματα του φυτού κλειστά. Αυτή η κατάσταση οδηγεί στην ελάττωση της φωτοσύνθεσης και κατ' επέκταση αναστολή της ανάπτυξης.

Εντέλει η αδυναμία πρόσληψης του νερού με σκοπό την τροφοδότηση του υδατικού δυναμικού στο υπέργειο μέρος του φυτού μπορεί να συμβάλει σε κάποιο βαθμό στο μειούμενο νωπό και ξηρό βάρος.

## ΚΕΦΑΛΑΙΟ 7<sup>ο</sup> : ΣΥΜΠΕΡΑΣΜΑΤΑ

---

Η υποβολή των φυτών σε κατάσταση στρες έχει ως αποτέλεσμα την ενεργοποίηση των μηχανισμών αντιμετώπισης που διαθέτουν τα φυτά και κα επέκταση την αναστολή της ανάπτυξης τους. Οι συγκεντρώσεις των ολικών φαινολικών κυμάνθηκαν από 0,160 έως 0,833 mg GAE /Kg φύλλου. Στην 83 ημέρα της δειγματοληψία η τιμή της μεταχείρισης με βιοδιεγέρτη ήταν κατά 54 % υψηλότερη από αυτήν του μάρτυρα. Η εκτεταμένη έλλειψη νερού φαίνεται να επιδρά αρνητικά στην εξέλιξη του νωπού και ξηρού βάρους των φυτών. Η μέση φυλλική επιφάνεια μειώθηκε χαρακτηριστικά στις μεταχειρίσεις με έλλειψη νερού ενώ και τέλος τα ολικά φαινολικά ήταν μειωμένα σε σχέση με την μεταχείριση η οποία ποτιζόταν με το πρότυπο θρεπτικό διάλυμα και διαφυλλικό ψεκάσμο με βιοδιεγερτη. Η μείωση της φυλλικής επιφάνειας θεωρείται ως ένας μηχανισμό αποφυγής της ξηρασίας με σκοπό να διατηρήσει υψηλό δυναμικό νερού στους ιστούς.

Η χρήση των βιοδιεγερτών στην μεταχείριση η οποία υποβλήθηκε σε αβιοτικό στρες και λόγω της έλλειψης νερού φαίνεται να μην έχει κάποια σημαντική διαφορά με την μεταχείριση η οποία υποβλήθηκε μόνο σε στρες (EN). Επίσης ο ψεκάσμος δεν επηρέασε την συγκέντρωση της χλωροφύλλης στα φύλλα σε σχέση με τις υπόλοιπες μεταχειρίσεις. Η χρήση βιοδιεγέρτη επίσης δεν φαίνεται να επηρέασε θετικά το ολικό φαινολικό περιεχόμενο. Μόνο η μεταχείριση που αποτελούσε μάρτυρα και ψεκαζόταν με βιοδιεγέρτη έχει μια σημαντική διαφορά από τις υπόλοιπες το οποίο φαίνεται και στο διάγραμμα. Τέλος παρατηρήθηκε ότι και το νωπό και ξηρό βάρος δεν έχει μεγάλες διαφορές ανά ζεύγος μεταχειρίσεων. Διαφορά παρατηρείται ανάμεσα στις μεταχειρίσεις οι οποίες αποτελούν μάρτυρα και στις μεταχειρίσεις οι οποίες υποβλήθηκαν σε stress.

Η έρευνα για την ρόλο των βιοδιεγερτών στην φυσιολογία του φυτού ιδιαίτερα σε περιόδους υδατικής καταπόνησης θα οδηγήσει σε οφέλη στην ποιότητα και την ποσότητα των αγροτικών προϊόντων ιδιαίτερα σε περιπτώσεις ακραίων κλιματικών συνθηκών.



## ΣΥΝΤΟΜΟΓΡΑΦΙΕΣ

Abscisic acid, ABA	Αψισικό οξύ
APX, Ascorbic acid peroxidase	Περοξειδάση του ασκορβικού οξέος
CAT	Καταλάση
DPPH, ( <i>1,1-diphenyl-2-picrylhydrazyl</i> )	1,1 διφαινυλ-2 πικρυλυδραζυλική ρίζα
FC, Folin-Ciocalteu	Μέθοδος Folin Ciocalteu
FRAP ( <i>Ferric Reducing Antioxidant Power/</i>	Αντιοξειδωτική Ισχύς Αναγωγής Τρισθενούς Σιδήρου)
GR, Glutathione Reductase	Αναγωγή της γλουταθειόνης
Intergovernmental Panel on Climate Change, IPCC	Διακυβερνητική Επιτροπή για την Αλλαγή του Κλίματος
LEA (Late Embryogenesis Abundant Proteins)	Πρωτεΐνες όψιμης εμβρυογένεσης
MDAR Mono dehydrating Ascorbic Acid Reductase	Μονοαφυδροασκορβική αναγωγή
PP, polyphenols	Πολυφαινολικές ενώσεις
ROS	Δραστικά Είδη Οξυγόνου
SOD	Υπεροξειδική δεσμουτάση
TRAP, <i>Total Peroxyl Radical-Trapping Potential/</i>	Συνολικό Δυναμικό Παγίδευσης Ριζών Υπεροξειδίου

## ΒΙΒΛΙΟΓΡΑΦΙΑ

### Ελληνική

ΕΦΑΡΜΟΣΜΕΝΗ ΦΥΣΙΟΛΟΓΙΑ ΘΕΩΡΙΑ (2017). Γεωπονικό Πανεπιστήμιο Αθηνών  
ΑΘΗΝΑ.

Λαζαρίδη Ε., (2012). Μελέτη της διαγονιδιακής έκφρασης της χαρπίνης HnrZrsh στο φυτό *Nicotiane benthamiana* κάτω από συνθήκες αβιοτικών καταπονήσεων. Μεταπτυχιακή διατριβή, Γεωπονικό Πανεπιστήμιο Αθηνών, Τμήμα Επιστήμης Φυτικής Παραγωγής.

Μποτονάκης Γ., (2005). Ανοσοχαρακτηρισμός και Έκφραση της Ωσμωτίνης στο *Nicotiana Glauca*. Πτυχιακή Εργασία ΤΕΙ Κρήτης, Τμήμα Θερμοκηπιακών Καλλιεργειών.

Μπουράνης Δ., Χωριανοπούλου Σ. Φυσιολογία Φυτών 3ου Εξαμήνου. Τμήμα Γεωπονικής Βιοτεχνολογίας, Γεωπονικό Πανεπιστήμιο Αθηνών

Παπαγεωργίου, Γ. Ε. (2005), «Βιοχημεία Ελευθέρων Ριζών, Αντιοξειδωτικά και Λιπιδική Υπεροξειδάση», *University Studio Press*, σελ. 114-126, Θεσσαλονίκη.

Παυλάκη Ε. (2018), Χρήση βιοδιεγερτικών ουσιών στη γεωργική πρακτική (Πτυχιακή Διατριβή), ΤΕΙ Κρήτης, Σχολή Τεχνολογίας, Γεωπονίας και Τεχνολογίας Τροφίμων, Ηράκλειο

Σουφλερός, Ε. (1997), «Οινολογία Επιστήμη και Τεχνογνωσία», Τυπογραφεία Παπαγεωργίου, Τόμος Ι, σελ 7, Θεσσαλονίκη.

Salway, J. G. (2006), *Ιατρική Βιοχημεία με μια Ματιά*, 2η Έκδοση. Blackwell Publishing. ISBN 1-4051-1322-7

### Ξενόγλωσση

Amon D., 1949. Copper enzymes in isolated chloroplasts polyphenoloxidase in *Beta Vulgaris*. *Plant Physiology*, V.24 (1): 1-15.

Balentine, D. A., Wiseman, S. A. and Bouwens, L. C. M. (1997), “The Chemistry of Tea Flavonoids”, *Critical Reviews in Food Science and Nutrition*, Vol. 37, pp. 693704.

Barnes J.D., Balaguer L, Manrique E, Elvira S. and Davison A.W., 1992 A reappraisal of



the use of DMSO for the extraction and determination of chlorophylls a and b in lichens and higher plants. *Envir. Exp. Bot.* 32: 85-100

Battacharyya, D., Zamani Babgohari, M., Rathor, P. & Prithiviraj, B. (2015), "Seaweed extracts as biostimulants in horticulture", *Scientia Horticulturae*, 196, pp: 39-48

Benzie, I. F. F. and Strain, J. J. (1996), "The Ferric Reducing Ability of Plasma (FRAP) as a Measure of Antioxidant Power: The FRAP Assay", *Analytical Biochemistry*, Vol. 239, pp. 70-76.

Bringmann, G., Messer, K., Wohlarth, M., Kraus, J., Dumbuya, K. and Ruckert, M. (1999), "HPLC-CD On-line Coupling in Combination with HPLC-NMR and HPLC- MSMS for the Determination of the Full Absolute Stereostructure of New Metabolites in Plant Extracts", *Analytical Chemistry*, Vol. 71, pp. 2678-2686.

Bulgari R., Franzoni G., Ferrante A., (2019). Biostimulants Application in Horticultural Crops under abiotic stress Conditions. *Agronomy*, 9, 306.

Callista Yee, Wen Yang, Siegfried Hekimi. "The Intrinsic Apoptosis Pathway Mediates the ProLongevity Response to Mitochondrial ROS in *C. elegans*. *Cel Total Phenolics, Flavonoids, and Antioxidant Activity.*" 2014: 157-857.

Calvo, P., Nelson, L. & Kloepper, J. (2014), "Agricultural uses of plant biostimulants", *Plant Soil*, 383, pp: 3-41

Chaves M.M. Flexas J., Pinheiro C., (2009) Photosynthesis under drought and salt stress: regulation mechanisms from whole plant to cell. *Ann Bot* 103:551–560

Denham Harman, M.D., Ph.D. A Theory Based On Free Radical And Radiation Chemistry.2011

Du Jardin, P. (2015). "Plant biostimulants: Definition, concept, main categories and regulation", *Scientia Horticulturae*, 196, pp: 3-14.

Feitosa de Vasconcelos A.C. (2020). Amelioration of Drought Stress on Plants under Biostimulant Sources DOI: 10.5772/intechopen.91975. Available from: <https://www.intechopen.com/online-first/amelioration-of-drought-stress-on-plants-under-biostimulant-sources>

- Halliwell, DSc Pro B. Free radicals, antioxidants, and human disease.1994.
- Halliwell. "Vitamin C: Antioxidant or pro-oxidant in vivo Free Rad Res." 1996: 439–454.
- Halliwell, Barry. Free Radicals in Biology and Medicine .1994
- Halpern, M., Bar-Tar, A., Ofek, M., Minz, D., Muller, T. & Yermiyahu. (2015), “The Use of Biostimulants for Enhancing Nutrient Uptake”, *Advances in Agronomy*, 1, pp: 141-174
- Harbome, J. B. (1989), “Methods in Plant Biochemistry I: Plant Phenolics”, *Academic Press*, London.
- Harbome, **J.** B. (1993), “The Flavonoids: Advances in Research since 1986”, *Chapman and Hall*, London.
- Harbome, J. B. (1997), “Plant Phenolics in Methods in Plant Biochemistry”, *Academy Press*, pp. 197-199, London.
- Heim, K. E., Tagliaferro, A. R. and Bobilya, D. J. (2002), “Flavonoid Antioxidants: Chemistry Metabolism and Structure-activity Relationships”, *Journal of Nutritional Biochemistry*, Vol. 13, pp. 572-584.
- Hermann, H. (1988), ‘On the Occurrence of Flavonol and Flavonone Glycosides in Vegetables”, *European Food Research and Technology*, Vol. 186, pp. 1-5.
- Hiscox J.D. and Israelstam GF, 1979. A method for the extraction of chlorophyll from leaf tissue without maceration. *Can. J. Bot.*57: 1332-1334
- Huang, D., Ou, B. and Prior R. L. (2005), “The Chemistry' behind Antioxidant Capacity Assays”, *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, Vol. 53, pp. 1841-56.
- Intergovernmental Panel on Climate Change, 2007: The Physical Science Basis. Contribution of Working Group I to the Fourth Assessment Report of the IPCC. Cambridge, United Kingdom Cambridge, University Press VL-499-587.
- Kraan S. (2012). Algal Polysaccharides, Novel Applications and Outlook, *Carbohydrates - Comprehensive Studies on Glycobiology and Glycotechnology*, Chuan-Fa Chang, IntechOpen, DOI: 10.5772/51572.

- Khan, W., Rayirath, U., Subramanian, S., Jithesh, M., Rayorath, P., Hodges, M., Chitchley, A., Craigie, J., Norrie, J. & Prithiviraj, B. (2009), "Seaweed Extracts as Biostimulants of Plant Growth and Development", *Journal of Plant Growth Regulation*, 28(4), pp: 386-399
- Kuhnau, J. (1976), "The Flavonoids: A Class of Semi-essential Food Components: Their Role in Human Nutrition", *World Review of Nutrition and Dietetics*, Vol. 24, pp. 117-191.
- Kuzetsova T., Andryukov B., Besednova N., Zaporozhets T, Kalinin A.(2020). Marine algae Polysaccharides as Basis for Wound Dressings, Drug Delivery, and Tissue Engineering. A review. *J. Mar. Sci. Eng.*, 8(7), 481
- Lee S.H., Oe T. and Blair I.A., "Vitamin C-induced decomposition of lipid hydroperoxides to endogenous genotoxins", *Science*, 292 (2001), 2083-2086.
- Liua X., Shane A. Bunning M., Parry J., Zhou K., Stushnoff C., Stonikerc F., Liangli Yub, and Kendall P., (2007). Total phenolic content and DPPH and radical scavenging activity of lettuce (*Lactuca sativa* L.) grown in Colorado. *LWT* 40 (2007) 552-557
- Lisar S.Y., Motafakkerazad R., Hossain M.M., Rahman I., (2012). Introductory Chapter Water Stress in Plants: Causes, Effects and Responses. Διαθέσιμο στην ηλεκτρονική διεύθυνση <https://www.intechopen.com/books/water-stress/water-stress-in-plants-causes-effects-and-responses> (πρόσβαση στις 18/9/2020).
- Masella R, Di Benedetto R, Vari R, Filesi C, Giovannini C. " Novel mechanisms of natural antioxidant compounds in biological systems: Involvement of glutathione and glutathione-related ."
- Mazza G., (1995). Anthocyanins in grape and grape products. *Critical Reviews in Food Science and Nutrition*,35, pp. 341-371.
- Methods in Enzymology (1999) Vol 299, Oxidants and Antioxidants (Part A), Packer L (ed.), Academic Press, San Diego.
- Miketova, P., Schram, K. H., Whitney, J. L., Kerns, E. H., Valcic, S., Timmermann, B. N. and Volk, K. J. (1998), "Mass Spectrometry of Selected Components of Biological Interest in Green Tea Extracts", *Journal of Natural Products*, Vol. 61, pp. 461-467.

- Molyneux, P. (2004), "The Use of the Stable Free Radical Diphenylpicrylhydrazyl (DPPH) for Estimating Antioxidant Activity, *Songklanakar Journal of Science and Technology*, Vol. 26, No. 2, p. 212.
- Muller, T.; Ulrich M.; Ongaria K.; Krautler B. (2007). Colorless Tetrapyrrolic Chlorophyll Catabolites found in ripening fruit are effective antioxidants. *Angew Chem.* 46: 8699-8702.
- N. Iqbal et al. (eds.), (2016). Osmolytes and Plants Acclimation to Changing Environment: Emerging Omics Technologies, DOI 10.1007/978-81-322-2616-1 in chapter. Proline Accumulation in Plants: Roles in Stress Tolerance and Plant Development
- Porter, L. W. (1989), "Tannins", in "*Methods in Plant Biochemistry I: Plant Phenolics*", Academic Press, pp. 389-419, London.
- Povero, G., Mejia, J., Di Tommaso, D., Piaggese, A. & Warrior, P. (2016), "A Systematic Approach to Discover and Characterize Natural Plant Biostimulants", *Frontiers in Plant Science*, 7, pp: 1-12.
- Oh Myung-Min Carey E., Rajashekar C.B., (2010). Regulated Water Deficits Improve Phytochemical Concentration in Lettuce. *J. AMER. SOC. HORT. SCI.* 135(3):223–229.
- Ramachandra Reddy Kolluru Viswanatha Chaitanyaa, Munusamy Vivekanandanb (2004). Drought-induced responses of photosynthesis and antioxidant metabolism in higher plants. *Journal of Plant Physiology* 161 1189–1202.
- Richardson A.D, Duigan S.P and Berlyn G.P., 2002. An evaluation of noninvasive methods to estimate foliar chlorophyll content. *New Phytol.*153: 185-194.
- Roginsky, V. and Lissi, E. A. (2004), "Review of Methods to Determine Chain Breaking Antioxidant Activity in Food", *Food Chemistry*, Vol. 92, pp. 235-254.
- Sharma Shekhar, H.S., Fleming, C., Selby, C., Rao, J.R. & Martin, T. (2014), "Plant biostimulants: a review on the processing of macroalgae and use of extracts for crop management to reduce abiotic and biotic stresses", *J. Appl. Phycol.*, 26, pp: 465-490
- Shukla P.S., Mantin E.G, Adil M., Sruti Bajpai S., Critchley A.T., and Prithivirajb., (2019). Ascophyllum nodosum-Based Biostimulants: Sustainable Applications in Agriculture for the Stimulation of Plant Growth, Stress Tolerance, and Disease

Management. *Frontiers in Plant Science* 10, Article 655.

Soobratee, M., Neergheen, V., Luximon-Ramma, A., Auroma, O. and Bahorum, T. (2005), "Phenolics as Potential Antioxidant Therapeutic Agents: Mechanism and Actions", *Mutation Research*, Vol. 579, pp. 200-213.

Tait M.A. and Hik D.S., 2003. Is dimethylsulfoxide a reliable solvent for extracting chlorophyll under field conditions. *Photos. Res.* 78: 87-91

The Alpha-Tocopherol Beta-Carotene Cancer Prevention Study Group, "The effect of vitamin E and beta-carotene on the incidence of lung cancer and other cancers in male smokers", *N. Engl. J. Med.*, 330 (1994), 1029-1035.

Valko M, , Izakovic M, Mazur M, Rhodes Cj, Telser J. " Role of oxygen radicals in DNA damage and cancer incidence." *Cell Biochem*, 2004: 37–56. Valko M, Leibfritz D, Moncol J, Cronin M, Mazur M, Telser J. " Free radicals and antioxidants in normal physiological functions and human disease." *Int J Biochem Cell Bio*, 2007: 44 -84

Van Oosten, M., Pepe, O., De Pascale, S., Silletti, S. & Maggio, A. (2017), "The role of biostimulants and bioeffectors as alleviators of abiotic stress in crop plants", *Chemical and Biological Technologies in Agriculture*, 4, pp: 1-12

Visser, T., Vredenbergregt, M. J., Ten Hove, G. J., De Jong, A. P. J. M. and Somsen, G. W. (1997), "Gradient Elution Liquid Chromatography-Infrared Spectrometry at pg<sup>1</sup> Level Using Capillary Column Switching and Addition of a Make-up Liquid: A Preliminary Study", *Journal of Analytica Chimica Acta*, Vol. 342, pp. 151-158.

Wardman P., "Indole-3-acetic acids and horseradish peroxidase: a new prodrug / enzyme combination for targeted cancer therapy", *Curr. Phar. Des*, 8 (2002), 13631374

Watson, Jim. "Oxidants, antioxidants and the current incurability of metastatic cancers ." 2013.

Wellbum A.R., 1994. The spectral determination of chlorophylls a and b ,as well as total carotenoids, using various solvents with spectrophotometers of different resolution. *J. Plant Physiol.* V.144: 307-313.

## Διαδίκτυο

5-A-Day Ανάκτηση δεδομένων από: <https://www.5aday.com> Ημερομηνία 01/02/2020

EBIC (2011), “Biostimulants Definition Agreed”, Ανάκτηση δεδομένων από: <http://www.biostimulants.eu/2011/10/biostimulants-definition-agreed/> Ημερομηνία 11/02/2020

Ντάσκας Γ. Γεωπόνος(2016) Βιοδιεγέρτες - Τι πρέπει να γνωρίζουμε από το εργαστήριο ως το χωράφι» Ανάκτηση δεδομένων από: <https://blog.farmacon.gr/katigories/texniki-arthrografia/threpsi-lipansi/item/897-viodiegertes-ti-prepei-na-gnorizoume-apo-to-ergastirio-os-to-xorafi-meros-a> Ημερομηνία 01/02/2020

## **Εικόνες από το Διαδίκτυο**

Lactuca sativa I: <https://bit.ly/34iHIBf>. Ανάκτηση στις 22/09/2020

Lettuce, Wikipedia [https://en.wikipedia.org/wiki/Lettuce#/media/File:Planche\\_Lactuca\\_sativa.jpg](https://en.wikipedia.org/wiki/Lettuce#/media/File:Planche_Lactuca_sativa.jpg) Ημερομηνία 22/09/2020

Οι πιο κοινές μορφές φυτικού στρες (17 Μαΐου 2018), Ομάδα γεωπόνων της Farmacon - Farmacon Team, Ανάκτηση δεδομένων από: <https://blog.farmacon.gr/katigories/texniki-arthrografia/fytoprosthasia/item/2022-oi-pio-koines-morfes-fytikoy-stres>) Ημερομηνία 25/09/2020