

ΓΕΩΠΟΝΙΚΟ ΠΑΝΕΠΙΣΤΗΜΙΟ ΑΘΗΝΩΝ

ΤΜΗΜΑ ΦΥΤΙΚΗΣ ΠΑΡΑΓΩΓΗΣ

ΕΡΓΑΣΤΗΡΙΟ ΔΕΝΔΡΟΚΟΜΙΑΣ

**Βλαστική ανάπτυξη και βιοχημικές μεταβολές κατά την
υδατική καταπόνηση *in vitro* της χοχόμπας (*Simmondsia chinensis*
(Link) Schneider.)**

ΜΕΤΑΔΙΔΑΚΤΟΡΙΚΗ ΔΙΑΤΡΙΒΗ



ΑΘΗΝΑ 2005

Αφιερώνεται στους Γονείς μου

Ανάργυρο και Αλοϊσία

*Για ό,τι έχουν κάνει όλα αυτά τα χρόνια για
εμένα και την αδελφή μου.*

Σας ευχαριστούμε πολύ.

ΠΡΟΛΟΓΟΣ

Στο σημείο αυτό θα ήθελα να ευχαριστήσω τον Καθηγητή Δενδροκομίας του Γεωπονικού Πανεπιστημίου Αθηνών κ. Κωνσταντίνο Ποντίκη για την αποδοχή διεξαγωγής της παρούσας ερευνητικής εργασίας στο Εργαστήριο Δενδροκομίας του Γεωπονικού Πανεπιστημίου Αθηνών, καθώς και για την επί χρόνια άψογη συνεργασία μας, την καθοδήγησή του και τις πολύτιμες συμβουλές του.

Θα ήθελα να εκφράσω επίσης τις ευχαριστίες μου στο Ίδρυμα Κρατικών Υποτροφιών για την αποδοχή της ερευνητικής πρότασης και την τιμητική υποτροφία άνευ τροφείων που έτυχα για αυτήν.

ΠΙΝΑΚΑΣ ΠΕΡΙΕΧΟΜΕΝΩΝ

ΠΡΟΛΟΓΟΣ	3
ΠΙΝΑΚΑΣ ΠΕΡΙΕΧΟΜΕΝΩΝ	4
ΕΙΣΑΓΩΓΗ	7
ΥΛΙΚΑ ΚΑΙ ΜΕΘΟΔΟΙ	15
1. Προέλευση φυτικού υλικού και επεμβάσεις	15
2. Αναλύσεις εκφύτων. Σφάλμα! Δεν έχει οριστεί σελιδοδείκτης.	
2.1 Υπολογισμός της διαρροής ηλεκτρολυτών Σφάλμα! Δεν έχει οριστεί σελιδοδείκτης.	
2.2 Υπολογισμός βαθμού οξείδωσης λιπαρών. Σφάλμα! Δεν έχει οριστεί σελιδοδείκτης.	
2.3 Μέτρηση χλωροφυλλών. Σφάλμα! Δεν έχει οριστεί σελιδοδείκτης.	
2.4 Μέτρηση της συγκέντρωσης υπεροξειδίου του υδρογόνου. Σφάλμα! Δεν έχει οριστεί σελιδοδείκτης.	
2.5 Μέτρηση της συγκέντρωσης φαινολικών ουσιών. Σφάλμα! Δεν έχει οριστεί σελιδοδείκτης.	
2.6 Μέτρηση της συγκέντρωσης της προλίνης. Σφάλμα! Δεν έχει οριστεί σελιδοδείκτης.	
2.7 Μέτρηση της συγκέντρωσης των ελεύθερων μορφών των πολυαμινών. Σφάλμα! Δεν έχει οριστεί σελιδοδείκτης.	
2.8 Μέτρηση της συγκέντρωσης των σακχάρων. Σφάλμα! Δεν έχει οριστεί σελιδοδείκτης.	
3. Στατιστική ανάλυση. Σφάλμα! Δεν έχει οριστεί σελιδοδείκτης.	

ΑΠΟΤΕΛΕΣΜΑΤΑ **ΣΦΑΛΜΑ! ΔΕΝ ΕΧΕΙ ΟΡΙΣΤΕΙ**
ΣΕΛΙΔΟΔΕΙΚΤΗΣ.

1. Επίδραση της υδατικής καταπόνησης στα βιομετρικά χαρακτηριστικά των εκφύτων. **Σφάλμα! Δεν έχει οριστεί σελιδοδείκτης.**
2. Επίδραση της υδατικής καταπόνησης στη ριζοβολία των εκφύτων. 18
3. Επίδραση της υδατικής καταπόνησης στη συγκέντρωση των χλωροφυλλών, στην διαρροή ηλεκτρολυτών, στην οξείδωση των λιπαρών και στη συγκέντρωση υπεροξειδίου του υδρογόνου στους ιστούς των εκφύτων. 19
4. Επίδραση της υδατικής καταπόνησης στη συγκέντρωση της προλίνης των εκφύτων. **Σφάλμα! Δεν έχει οριστεί σελιδοδείκτης.**
5. Επίδραση της υδατικής καταπόνησης στη συγκέντρωση φαινολικών ουσιών των εκφύτων. **Σφάλμα! Δεν έχει οριστεί σελιδοδείκτης.**
6. Επίδραση της υδατικής καταπόνησης στη συγκέντρωση των ελεύθερων πολυαμινών των εκφύτων. **Σφάλμα! Δεν έχει οριστεί σελιδοδείκτης.**
7. Επίδραση της υδατικής καταπόνησης στη συγκέντρωση των σακχάρων των εκφύτων. **Σφάλμα! Δεν έχει οριστεί σελιδοδείκτης.**
8. Επίδραση του επιπέδου υδατικής καταπόνησης στο δείκτη ειδικής φυλλικής επιφάνειας. **Σφάλμα! Δεν έχει οριστεί σελιδοδείκτης.**
9. Συσχέτιση μετρούμενων παραμέτρων και επιπέδου υδατικής καταπόνησης. **Σφάλμα! Δεν έχει οριστεί σελιδοδείκτης.**

ΣΥΖΗΤΗΣΗ

24

1. Επίδραση της υδατικής καταπόνησης στα βιομετρικά χαρακτηριστικά της χοχόμπας. 24
2. Επίδραση της υδατικής καταπόνησης στα επίπεδα οξειδωτικών ουσιών εντός των κυττάρων, στην ακεραιότητα των κυτταρικών μεμβρανών και στη συγκέντρωση των χλωροφυλλών. 26

3. Επίδραση της υδατικής καταπόνησης στη συγκέντρωση της προλίνης των εκφύτων. **Σφάλμα! Δεν έχει οριστεί σελιδοδείκτης.**
4. Επίδραση της υδατικής καταπόνησης στη συγκέντρωση των φαινολικών ουσιών των εκφύτων. **Σφάλμα! Δεν έχει οριστεί σελιδοδείκτης.**
5. Επίδραση της υδατικής καταπόνησης στη συγκέντρωση ελεύθερων πολυαμινών των εκφύτων. **Σφάλμα! Δεν έχει οριστεί σελιδοδείκτης.**
6. Επίδραση της υδατικής καταπόνησης στη συγκέντρωση των υδατανθράκων των εκφύτων. 28

ΒΙΒΛΙΟΓΡΑΦΙΑ

30

ΕΙΣΑΓΩΓΗ

Η απόδοση των φυτών καθώς και η ποιότητα των παραγομένων προϊόντων πολλών οικονομικής σημασίας φυτικών ειδών επηρεάζεται σημαντικά από περιβαλλοντικούς παράγοντες όπως είναι η θερμοκρασία, η ηλιακή ακτινοβολία, η αλατότητα του εδαφικού υποστρώματος και η παροχή ύδατος. Ως καταπόνηση αναφέρεται η επίδραση δυσμενών συνθηκών περιβάλλοντος οι οποίες τείνουν να παρεμποδίσουν την εύρυθμη λειτουργία φυσιολογικών λειτουργιών του φυτού (Καραμπουρνιώτης, 2003).

Τόσο η αλατότητα του υποστρώματος ανάπτυξης όσο και η υδατική καταπόνηση αποτελούν σημαντικό ανασχετικό της αύξησης παράγοντα σε μεγάλο ποσοστό των καλλιεργούμενων εκτάσεων ανά τον κόσμο. Πρέπει δε να τονιστεί ότι ο συνδυασμός αλατότητας εδάφους και χαμηλής ποιότητας νερού άρδευσης επιδεινώνει ακόμα περισσότερο την υφιστάμενη κατάσταση.

Είναι πλέον αποδεκτό ότι για να αντιμετωπιστεί αποτελεσματικά η μόνιμη ή η παροδική έλλειψη νερού θα πρέπει να χρησιμοποιηθούν ανθεκτικά είδη ή/και ποικιλίες, ώστε να γίνει εφικτή η καλλιέργεια φυτικών ειδών υπό συνθήκες καταπόνησης. Θα πρέπει στο σημείο αυτό να σημειωθεί ότι ως γεωργική υδατική καταπόνηση ορίζεται η κατάσταση εκείνη που επιδρά στην αύξηση και ανάπτυξη του φυτού και είναι συνδυασμός πολλών περιβαλλοντικών παραγόντων (έλλειψη νερού, υψηλή θερμοκρασία αέρος, χαμηλή ατμοσφαιρική υγρασία κτλ.). Υπάρχει σαφής διαχωρισμός μεταξύ της ξηρασίας (aridity) και της λειψυδρίας (drought) (Καραμπουρνιώτης, 2003). Ως ξηρασία εννοείται η μόνιμη κατάσταση έλλειψης νερού που συναντάται στις έρημους, λόγω του μικρού ετήσιου ύψους βροχόπτωσης, ενώ ως λειψυδρία εννοείται η παροδική κατάσταση έλλειψης ύδατος (όταν το ύψος βροχόπτωσης βρίσκεται κάτω από τα κανονικά επίπεδα ή ενώ είναι ικανοποιητικό άλλοι παράγοντες όπως η υψηλή θερμοκρασία, ισχυροί άνεμοι κ.ά, προκαλούν παροδική έλλειψη ύδατος) (Καραμπουρνιώτης, 2003).

Η ανάγκη λοιπόν να καταστούν καλλιεργήσιμες περιοχές με χαμηλό δείκτη ετήσιας βροχόπτωσης αλλά και να βελτιωθούν οι αποδόσεις σε περιοχές με παροδικά προβλήματα ελλείψεως νερού κάνει επιτακτική την προσπάθεια εξεύρεσης φυτών ανθεκτικών υπό τις συνθήκες που περιγράφηκαν νωρίτερα.

Η χοχόμπα ή γιογιόμπα ή τζοτζόμπα (*Simmondsia chinensis* (Link) Schneider) αποτελεί ένα από τα είδη που μπορούν να αποδώσουν ικανοποιητικά υπό συνθήκες τόσο αλατότητας υποστρώματος όσο και υδατικής καταπόνησης (Mills et al. 1997; Mills et al. 2001). Παράλληλα τα τελευταία χρόνια έχει εκδηλωθεί έντονο ενδιαφέρον παγκοσμίως για φυτικά είδη που παράγουν μη εδώδιμα προϊόντα όπως είναι και η χοχόμπα.

Η χοχόμπα είναι πολυετής, ξυλώδης, αειθαλής θάμνος (ή και πολυστέλεχο μικρού μεγέθους δένδρο) το οποίο αναπτύσσεται φυσικώς σε περιοχές ημιξηρικές, όπως είναι η περιοχή της Αριζόνας στις Η.Π.Α. του Μεξικού και του Ισραήλ (Εικόνα 1). Τα φύλλα της βρίσκονται αντίθετα στον ίδιο κόμβο, με σχήμα οβάλ ή λογχοειδές, χρώματος γκριζο-πράσινου και καλύπτονται από κηρώδη επιδερμίδα η οποία λειτουργεί ως φυσικός φραγμός στην έντονη απώλεια νερού. Το φυτό σχηματίζει λίγες πασσαλώδεις ρίζες οι οποίες φθάνουν σε μεγάλο βάθος και εξασφαλίζουν την παροχή της απαραίτητης ποσότητας νερού ακόμα και υπό συνθήκες μικρού ύψους βροχόπτωσης. Η χοχόμπα είναι φυτό δίοικο. Ο καρπός της είναι κάψα και περιέχει περί τους τρεις σπόρους.



Εικόνα 1. Φυτεία χοχόμπας.

Όσον αφορά τις απαιτήσεις της, αναπτύσσεται σε περιοχές που δεν συμβαίνουν παγετοί, ενώ είναι ιδιαίτερα ανθεκτική στις υψηλές θερμοκρασίες. Οι φυσικοί πληθυσμοί χοχόμπας αναπτύσσονται σε περιοχές που χαρακτηρίζονται από

επίπεδα ετήσιας βροχόπτωσης περί τα 50 mm νερού. Σε εγκατεστημένες φυτείες η άρδευση είναι προτιμότερο να γίνεται κατά τα τέλη του χειμώνα με αρχές ανοίξεως. Όσον αφορά το έδαφος αναπτύσσεται ικανοποιητικά σε ελαφριά εδάφη με καλή αποστράγγιση. Καλό είναι να αποφεύγονται τα βαριά εδάφη όπου συγκρατείται η υγρασία και υπάρχει κίνδυνος εδαφογενών ασθeneιών. Όσον αφορά τη γονιμότητα του εδάφους δεν έχει ιδιαίτερες απαιτήσεις, αρκεί το pH του να κυμαίνεται μεταξύ 5-8 (προτιμότερο άνω του 6). Η αζωτούχος και η φωσφορική λίπανση δε φαίνεται να αυξάνουν περαιτέρω την παραγωγή, ενώ βασική λίπανση θεωρείται η καλιούχος. Είναι άλλωστε γνωστό ότι η χοχόμπα αξιοποιεί στην κυριολεξία εδάφη όπου ελάχιστες άλλες καλλιέργειες θα μπορούσαν να αποδώσουν.

Η χοχόμπα έχει προκαλέσει εδώ και πολλά χρόνια το ενδιαφέρον των επιστημόνων και των καλλιεργητών σε όλο τον κόσμο, κυρίως λόγω της δυνατότητας αξιοποίησης άγονων εδαφών όπως και ακαλλιεργητων εκτάσεων, στα οποία δύσκολα θα μπορούσε να καλλιεργηθεί και να παράγει ικανοποιητικά ένα άλλο φυτό, όπως επίσης και λόγω των ποικίλων χαρακτηριστικών και χρήσεων του λαδιού των σπόρων της (Mills et al. 1997; Mills et al. 2001; Agrawal et al., 2002) (Εικόνα 2).



Εικόνα 2. Καρποί χοχόμπας.

Ο πολυετής θάμνος της χοχόμπας παράγει σπόρους που η ελαιοπεριεκτικότητα αυτών κυμαίνεται μεταξύ 45-54% β/β (Μαλικουτσάκη-

Μαθιουδάκη, 1997). Το μοναδικής ποιότητας λάδι (κηρός για την ακρίβεια) της χοχόμπας μπορεί να χρησιμοποιηθεί πολλαπλώς, όπως:

- Στη βιομηχανία λιπαντικών,
- Στη φαρμακευτική και στη βιομηχανία καλλυντικών,
- Στην παρασκευή αρωμάτων, κεριών κτλ (Botti et al. 1998).

Το εξαιρετικής ποιότητας λάδι της είναι στην ακρίβεια ένας καθαρός μη κυκλικός υγρός εστέρας, με μία αλκολοομάδα, ο οποίος είναι πολύ δύσκολο να οξειδωθεί και για το λόγο αυτό αποτελεί εξαιρετικό αντι-οξειδωτικό παράγοντα. Λόγω του ότι οι φυσικοχημικές ιδιότητες του εστέρα αυτού είναι σχεδόν πανομοιότυπες με αυτές του λίπους της φάλαινας φυσητήρα και λόγω της απαγόρευσης θήρευσης φαλαινών με σκοπό την εξαγωγή του λίπους των, το λάδι της χοχόμπας αποτελεί ιδανικό αντικαταστάτη του λίπους της φάλαινας και μάλιστα σε κάποιες περιπτώσεις ακόμα και καλύτερο από αυτό (χαρακτηριστικό είναι ότι παραμένει αναλλοίωτο σε θερμοκρασίες μέχρι και 300 °C).

Για όλους λοιπόν τους παραπάνω λόγους η χοχόμπα αποτελεί ένα ενδιαφέρον είδος της τροπικής-υποτροπικής ζώνης όπου μπορεί να αποδώσει πολύ καλά και να αξιοποιήσει εδάφη και περιβαλλοντικές συνθήκες που λίγα μόνο φυτικά είδη μπορούν.

Η αύξηση της καλλιεργούμενης έκτασης με χοχόμπα εξαρτάται σε σημαντικό βαθμό από τις διατιθέμενες ποικιλίες και τα χαρακτηριστικά αυτών. Στην προσπάθεια να εξευρεθούν νέες ποικιλίες και κλώνοι με επιθυμητά χαρακτηριστικά η βελτίωση του υπάρχοντος γενετικού υλικού παίζει τον σημαντικότερο ρόλο. Γνωρίζοντας όμως ότι η διαδικασία της βελτίωσης ενός φυτικού είδους είναι μια επίπονη και μακρόχρονη διαδικασία, θα πρέπει να είμαστε σε θέση να επιλέγουμε τους νέους γονότυπους σε πολύ αρχικά στάδια, ώστε να μειώνουμε σημαντικά τον απαιτούμενο χρόνο βελτίωσης. Στην προσπάθεια αυτή βοηθάει πολύ το γεγονός της γνώσης των μηχανισμών εκείνων που κάνουν μια ποικιλία, έναν γονότυπο, να υπερτερεί έναντι των άλλων. Μελετώντας λοιπόν τα βιοχημικά, μορφολογικά και φυσιολογικά χαρακτηριστικά των γονοτύπων θα είμαστε σε θέση να γνωρίζουμε με ποιους μηχανισμούς αντεπεξέρχονται επιτυχώς σε συνθήκες καταπόνησης.

Στην παρούσα διατριβή μελετήθηκαν οι μηχανισμοί και η ανταπόκριση ενός κλώνου χοχόμπας υπό συνθήκες υδατικής καταπόνησης *in vitro*. Χρησιμοποιήθηκε η τεχνική *in vitro* γιατί με την τεχνική αυτή μπορεί να μελετηθεί γρήγορα και αξιόπιστα η ανταπόκριση σε συνθήκες καταπόνησης, με παρόμοια αποτελέσματα με αυτά που παίρνουμε χρησιμοποιώντας ενήλικα φυτά χοχόμπας υπό συνθήκες αγρού (Mills and Benzioni, 1992). Η τεχνική όμως αυτή μας επιτρέπει τον έλεγχο πολλών παραγόντων ταυτόχρονα, ενώ σημαντικό της πλεονέκτημα είναι ο μικρός χρόνος που απαιτείται για τη συλλογή στοιχείων και αποτελεσμάτων.

Η υδατική καταπόνηση είναι γνωστό ότι επηρεάζει σημαντικά πολλές βιοσυνθετικές οδούς. Πολλά φυτικά είδη αντιδρούν στις υφιστάμενες συνθήκες καταπόνησης με παρόμοιο τρόπο.

Γενικά τα φυτά έχουν αναπτύξει διάφορες στρατηγικές ώστε να αντεπεξέλθουν σε δυσμενής συνθήκες τόσο βιοτικού όσο και αβιοτικού χαρακτήρα. Σε γενικές γραμμές οι στρατηγικές αυτές διακρίνονται σε τρεις κύριες κατηγορίες (Chaves et al., 2002; Καραμπουρνιώτης, 2003):

- Διαφυγή, όταν τα φυτά αναπτύσσουν το βιολογικό τους κύκλο πριν την έναρξη του παράγοντα καταπόνησης (π.χ. ετήσια ανοιξιάτικα φυτά κτλ).
- Ανθεκτικότητα, όταν τα φυτά υπό συνθήκες καταπόνησης διατηρούν υψηλή μεταβολική δραστηριότητα και
- Αποφυγή, όταν τα φυτά διαθέτουν μηχανισμούς οι οποίοι τους επιτρέπουν την άμβλυση των επιπτώσεων των δυσμενών συνθηκών.

Στην παρούσα εργασία μελετήθηκαν οι μεταβολές που συμβαίνουν σε επίπεδο βιοχημικό και φυσιολογικό στη χοχόμπα όταν καλλιεργείται υπό συνθήκες υδατικής καταπόνησης. Οι μεταβολές αυτές ανήκουν στην κατηγορία της στρατηγικής της ανθεκτικότητας, εφόσον το φυτό μεταβάλλει ορισμένες φυσιολογικές του λειτουργίες για να αντεπεξέλθει στις δυσμενείς συνθήκες.

Είναι γενικά αποδεκτό ότι τα φυτά αντιδρούν στην υδατική καταπόνηση προσπαθώντας να επιφέρουν οσμωτική εξισορρόπηση, κατά την οποία το οσμωτικό δυναμικό των ιστών θα ρυθμιστεί σε χαμηλότερο επίπεδο αυτού του εξωτερικού μέσου, διατηρώντας έτσι μια διαφορά οσμωτικού δυναμικού που να επιτρέπει την όσο το δυνατόν απρόσκοπτη μεταφορά νερού από το εξωτερικό μέσο προς το φυτό και ένα ανεκτό επίπεδο σπαργής κυττάρων. Η μείωση αυτή του οσμωτικού δυναμικού των κυττάρων επέρχεται είτε παθητικά με την έλλειψη νερού (παθητική πτώση του

οσμωτικού δυναμικού λόγω αφυδάτωσης) είτε, όταν μιλάμε για ανθεκτικότητα και μηχανισμούς ανθεκτικότητας, ενεργά με τη συσσώρευση οσμωτικά ενεργών μεταβολιτών (Καραμπουρνιώτης, 2003)..

Στις οσμωτικά ενεργές ουσίες που συσσωρεύονται εντός των φυτών περιλαμβάνονται ανόργανα ιόντα (όπως π.χ. κάλιο) και οργανικές ενώσεις. Στις οργανικές ενώσεις που συμβάλλουν σημαντικά στη ρύθμιση του οσμωτικού δυναμικού των κυττάρων ανήκουν ευδιάλυτα αμινοξέα όπως η προλίνη, τεταρτοταγείς ενώσεις αμμωνίου (όπως η βεταΐνη της γλυκίνης) σάκχαρα και αλκοολοσάκχαρα (όπως η σορβιτόλη, η μαννιτόλη και η πινιτόλη)(Franco and Melo, 2000; Patakas et al., 2002; Tonon et al., 2004). Αυτές οι οργανικές ενώσεις ονομάζονται συμβατοί οσμωλύτες για το λόγο ότι ενώ συσσωρεύονται σε μεγάλες συγκεντρώσεις εντός των κυττάρων αυτή η συσσώρευσή τους δεν επιφέρει μεταβολικές δυσλειτουργίες (Patakas et al., 2002).

Οι συμβατοί αυτοί οσμωλύτες όμως πέρα από την οσμωτική ρύθμιση που επιτυγχάνουν, προστατεύουν παράλληλα και έως ένα βαθμό ευαίσθητα οργανικά μόρια, όπως πρωτεΐνες (από αφυδάτωση και καταστροφή του μορίου τους) ενώ ορισμένοι από αυτούς τους οσμωλύτες (όπως η προλίνη) λειτουργούν και ως αντιοξειδωτικοί παράγοντες, εξουδετερώνοντας ελεύθερες ρίζες οξυγόνου και προστατεύοντας μηχανισμούς, οργανικές ουσίες και κυτταρικές δομές (όπως τα φωσφολιπίδια των μεμβρανών και τις σουλφυδρικές ομάδες των πρωτεϊνών) (Tonon et al., 2004).

Είναι γνωστό ότι όταν τα φυτά αναπτύσσονται υπό συνθήκες καταπόνησης σχηματίζονται τοξικές ανηγμένες ενδιάμεσες μορφές οξυγόνου, οι λεγόμενες και ενεργές μορφές οξυγόνου, οι οποίες περιλαμβάνουν την ελεύθερη ρίζα υδροξυλίου (OH[•]) ή το ανιόν του υπεροξειδίου (O₂⁻) και το ίδιο το υπεροξείδιο H₂O₂ (Fu and Huang, 2001; Jiang and Huang, 2001). Πιστεύεται ότι κατά την ανάπτυξη των φυτών υπό συνθήκες καταπόνησης προκαλούνται αλλοιώσεις της δομής των μεμβρανών δια μέσου των οποίων μεταφέρονται ηλεκτρόνια με αποτέλεσμα την μη ελεγχόμενη διαρροή ηλεκτρονίων και την αύξηση του επιπέδου των ενεργών μορφών οξυγόνου (κυρίως εντός των χλωροπλαστών)(Srivalli et al., 2003). Επίσης οι παράγοντες καταπόνησης επιφέρουν και διαταραχές στους μηχανισμούς απόσβεσης της ενέργειας (π.χ. κατά τη φωτοσύνθεση η ενέργεια που προσδίδει η ηλιακή ακτινοβολία) με αποτέλεσμα η ροή των ηλεκτρονίων στην αλυσίδα μεταφοράς τους και απόσβεσης

της ενέργειας να υπερβαίνει τις δυνατότητες των μηχανισμών που εμπλέκονται (αποδέκτες) με συνέπεια την αυξημένη παραγωγή ενεργών μορφών οξυγόνου.

Αυτές οι ενεργές μορφές οξυγόνου όπως αναφέρθηκε προκαλούν αλλοιώσεις στη δομή λιπιδίων, νουκλεϊκών οξέων και πρωτεϊνών (Jiang and Huang, 2001). Ο σχηματισμός οξειδωμένων μορφών λιπιδίων στις κυτταρικές μεμβράνες έχει ως αποτέλεσμα την καταστροφή των κυτταρικών μεμβρανών και το σχηματισμό μιας σειράς προϊόντων διάσπασης των λιπιδίων όπως η μαλονοδιαλδεΐδη και ορισμένοι υδρογονάνθρακες. Αποτέλεσμα λοιπόν της δράσης αυτών των οξειδωτικών στοιχείων είναι η αυξημένη συγκέντρωση αυτής της αλδεΐδης που αποτελεί και στοιχείο αποδιοργάνωσης των λιπιδίων των κυτταρικών μεμβρανών (Srivalli et al., 2003). Με την αποδιοργάνωση και καταστροφή των λιπιδίων των κυτταρικών μεμβρανών έχουμε αύξηση της διαρροής ηλεκτρολυτών, το οποίο αποτελεί ακόμα ένα δείκτη του βαθμού αλλοίωσης των κυτταρικών μεμβρανών.

Όπως ήδη αναφέρθηκε υπάρχουν μηχανισμοί ελέγχου όσο αυτό είναι δυνατόν, της παραγόμενης ποσότητας ενεργών μορφών οξυγόνου. Ανάμεσα σε αυτούς τους μηχανισμούς, πέρα από την προλίνη, είναι οι πολυαμίνες και ορισμένα ενζυμικά συστήματα που βοηθούν στην απενεργοποίηση των ενεργών μορφών οξυγόνου μέσω της συμμετοχής τους σε ενζυμικές αντιδράσεις που έχουν ως αποτέλεσμα την περαιτέρω αναγωγή τους και μείωση της συγκέντρωσής τους στο κύτταρο (Jiang and Huang, 2001; Srivalli et al., 2003). Οι πολυαμίνες είναι πολυκατιονικά αλειφατικά οργανικά μόρια με μία ή περισσότερες ομάδες αμμωνίου στο μόριό τους, οι οποίες εμπλέκονται σε πολυάριθμες φυσιολογικές λειτουργίες των φυτών (τόσο στον πολλαπλασιασμό των κυττάρων, τη ριζογένεση κτλ., όσο και στη σταθεροποίηση της δομής των μεμβρανών) (Nayar and Chander, 2004; Roussos et al., 2004). Με την ιδιότητα αυτών να δεσμεύονται στις κυτταρικές μεμβράνες και σε πρωτεΐνες είναι σε θέση να προστατεύουν τη δομή των μεμβρανών και κατά συνέπεια ολόκληρου του κυττάρου (Liu HP et al., 2004).

Παράλληλα με τη διέγερση της σύνθεσης ή του καταβολισμού αυτών των μορίων συμβαίνουν και μεταβολές στα επίπεδα των δευτερογενών μεταβολιτών των φυτών υπό συνθήκες καταπόνησης. Οι φαινολικές ενώσεις είναι μια μεγάλη ομάδα ουσιών που ανήκουν στους δευτερογενείς μεταβολίτες. Ορισμένες από αυτές είναι ευοξειδωτες με αποτέλεσμα να χαρακτηρίζονται από υψηλή αντιοξειδωτική ικανότητα, που προσδίδει ιδιαίτερο ρόλο σε αυτές τις ενώσεις υπό συνθήκες καταπόνησης, ως παράγοντες μείωσης των συγκεντρώσεων των ενεργών μορφών

οξυγόνου μέσω της οξείδωσής τους (Roussos and Pontikis, 2003). Έχει βρεθεί ότι ιστοί που χαρακτηρίζονται από υψηλά επίπεδα φαινολικών ουσιών είναι πιο ανθεκτικοί σε καταπονήσεις έναντι άλλων ιστών με μικρότερη συγκέντρωση φαινολικών ουσιών (Waterman and Mole, 1994).

Στην παρούσα διατριβή μελετώνται πέραν των φυσιολογικών αντιδράσεων της χοχόμπας σε συνθήκες υδατικής καταπόνησης λαμβάνοντας υπόψη βιομετρικές παραμέτρους, οι βιοχημικές μεταβολές που υφίστανται τα έκφυτα όταν αναπτύσσονται υπό τις συνθήκες αυτές. Πιο συγκεκριμένα μελετήθηκαν οι μεταβολές των σακχάρων και αλκοολοσακχάρων των εκφύτων, όπως επίσης των φαινολικών ουσιών αυτών καθώς και οι μεταβολές που υφίστανται οι συγκεντρώσεις των ελεύθερων πολυαμινών. Παράλληλα μετρήθηκε η οξείδωση των λιπαρών οξέων των μεμβρανών με δείκτη την παραγωγή μαλonoδιαλδεϋδης (ως ουσίες αντίδρασης με θειοβαρβιτουρικό οξύ), η διαρροή ηλεκτρολυτών ως δείκτης της λειτουργικότητας των μεμβρανών και η συγκέντρωση υπεροξειδίου του υδρογόνου καθώς επίσης και οι μεταβολές στις συγκεντρώσεις των χλωροφυλλών.

ΥΛΙΚΑ ΚΑΙ ΜΕΘΟΔΟΙ

1. Προέλευση φυτικού υλικού και επεμβάσεις

Το υλικό για το παρόν πείραμα απετέλεσαν έκφυτα ενός κλώνου χοχόμπας που διατηρούνταν *in vitro* με συνεχείς επανακαλλιέργειες σε τροποποιημένο θρεπτικό υπόστρωμα DKW όπως περιγράφεται από τους Roussos et al. (1999) εφοδιασμένο με 4 ppm βενζυλαμινοπουρίνη (BA) προς ενδυνάμωση.

Έκφυτα αποτελούμενα από έναν κόμβο μεταφυτεύτηκαν για ένα μήνα σε δοκιμαστικούς σωλήνες στο παραπάνω υπόστρωμα (10 ml) εφοδιασμένο με BA 4 ppm. Στη συνέχεια μεταφυτεύτηκαν ανά δύο σε κωνικές φιάλες Erlenmeyer στο ίδιο θρεπτικό υπόστρωμα (100 ml) όπου και παρέμειναν για δύο μήνες με σκοπό την παραγωγή βλαστών. Τα έκφυτα αυτά στη συνέχεια μεταφυτεύτηκαν και πάλι σε 100 ml ιδίου θρεπτικού υποστρώματος σε κωνικές φιάλες ανά δύο όπου εφαρμόστηκαν οι εξής επεμβάσεις:

A/a	Κωδικός επέμβασης	Επέμβαση	Οσμωτικό δυναμικό (MPa)
1	M0	Μάρτυρας	-0.217
2	M1	Υπόστρωμα + μαννιτόλη 50mM	-0.34
3	M2	Υπόστρωμα + μαννιτόλη 100mM	-0.465
4	M3	Υπόστρωμα + μαννιτόλη 250mM	-0.837
5	M4	Υπόστρωμα + μαννιτόλη 500mM	-1.457

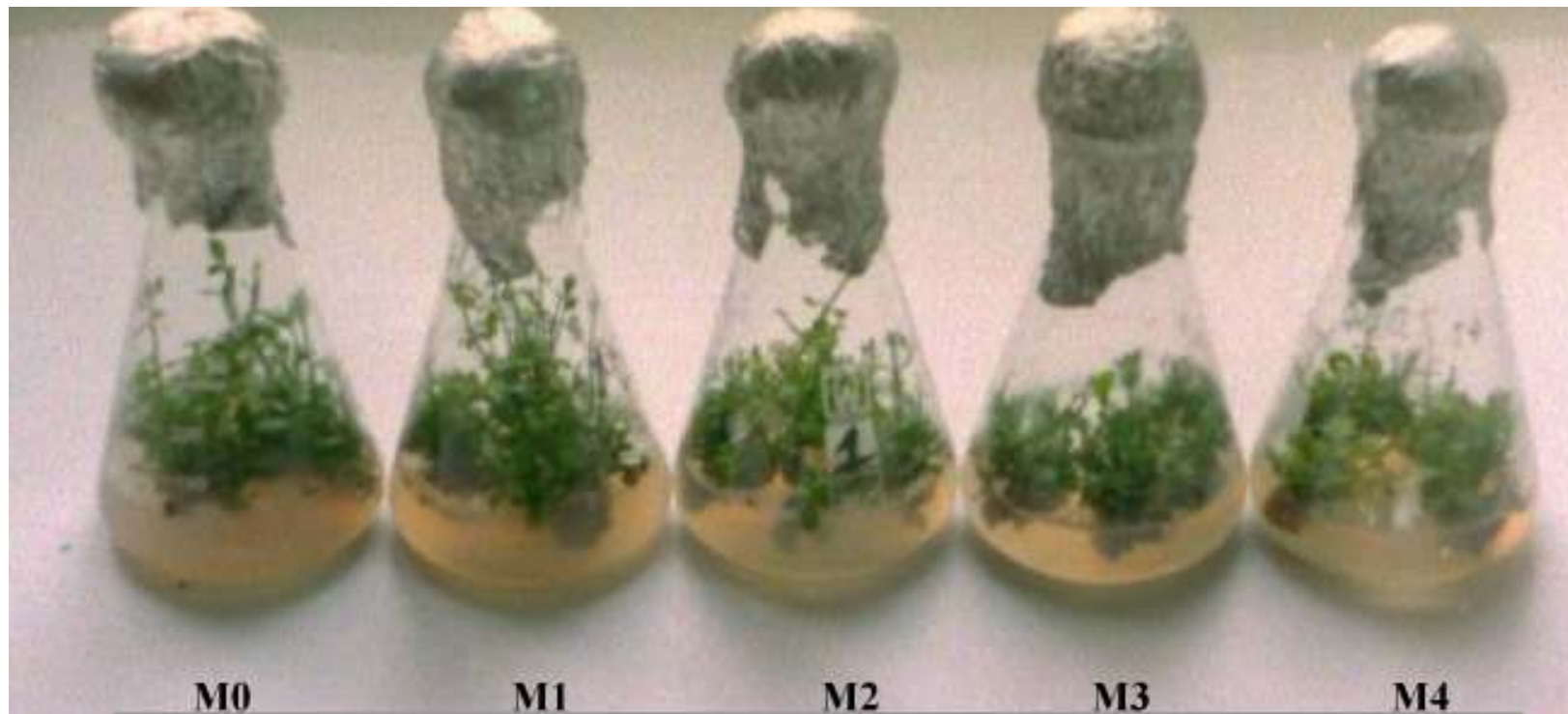
Για να επιτευχθεί οσμωτική καταπόνηση *in vitro* επιλέχθηκε η προσθήκη μαννιτόλης στο υπόστρωμα (Karunaratne et al., 1991; Gangopadhyay et al., 1997; Ledbetter et al., 1998; Komori et al., 2000; Mohamed et al., 2000; Mahamed et al., 2002; Pandey et al., 2004; Sadeghian and Yavari, 2004). Αρχικά δοκιμάστηκε η προσθήκη πολυαιθυλενικής γλυκόλης (PEG 6000) σε συγκεντρώσεις από 0-4% β/ο. Η προσθήκη της όμως εμπόδιζε την στερεοποίηση του υποστρώματος με αποτέλεσμα να προτιμηθεί η λύση της μαννιτόλης. Το τελικό οσμωτικό δυναμικό του

Στον Πίνακα 2 παρουσιάζεται η σχετική περιεκτικότητα των φύλλων σε νερό, ο σχετικός ρυθμός αύξησης των εκφύτων και ο συντελεστής ανεκτικότητας τόσο με βάση το ξηρό βάρος όσο και βάσει τον μέσο αριθμό κόμβων ανά έκφυτο.

Πίνακας 2. Επίδραση της υδατικής καταπόνησης στη σχετική περιεκτικότητα των φύλλων σε νερό (ΣΠΝ), στο σχετικό ρυθμό αύξησης των εκφύτων (ΣΡΑ) και στο συντελεστή ανεκτικότητας αυτών (ΣΑ).

Επέμβαση	ΣΠΝ (%)	ΣΡΑ (g/εβδομάδα)	ΣΑ	
			Ξηρό βάρος	Αρ. Κόμβων
M0	90,4	0,47	-	-
M1	83,2	0,16	89	51
M2	73,6	0,18	105	57
M3	82,0	0,13	107	46
M4	73,0	0,10	84	41

Παρατηρούμε ότι όσον αφορά τη σχετική περιεκτικότητα των φύλλων σε νερό αυτή είναι υψηλότερη στο μάρτυρα ενώ η χαμηλότερη τιμή της παρουσιάζεται στα έκφυτα που αναπτύσσονται υπό συνθήκες υψηλής υδατικής καταπόνησης. Όσον αφορά το ΣΡΑ αυτός είναι σημαντικά υψηλότερος στα έκφυτα που αναπτύσσονται υπό κανονικές συνθήκες ενώ είναι σχεδόν υποπενταπλάσιος σε αυτά που αναπτύσσονται στο υψηλό επίπεδο καταπόνησης. Ο ΣΑ όταν υπολογίζεται με βάση το ξηρό βάρος παρατηρείται ότι είναι υψηλός για τα έκφυτα που αναπτύσσονται στα επίπεδα υδατικής καταπόνησης M2 και M3 και μικρότερος στα επίπεδα M2 και M4. Παρατηρείται όμως ότι όταν ο συντελεστής υπολογίζεται με βάση το μέσο αριθμό κόμβων ανά έκφυτο τότε είναι υψηλότερος στα δύο πρώτα επίπεδα και βαίνει μειούμενος στα δύο υψηλότερα, υποδηλώνοντας όμως σημαντική υστέρηση έναντι του μάρτυρα σε όλα τα επίπεδα υδατικής καταπόνησης, αφού σε κανένα από αυτά δεν ξεπερνά το 60% της ανάπτυξης του μάρτυρα.



Εικόνα 1. Ανάπτυξη εκφύτων χοχόμπας κατά την τέταρτη εβδομάδα υπό συνθήκες υδατικής καταπόνησης.

1. Επίδραση της υδατικής καταπόνησης στη ριζοβολία των εκφύτων.

Στον Πίνακα 3 παρουσιάζονται τα αποτελέσματα της επίδρασης της υδατικής καταπόνησης κατά το στάδιο της ανάπτυξης των βλαστών, στη ριζοβολία των εκφύτων.

Πίνακας 3. Επίδραση της υδατικής καταπόνησης κατά την ανάπτυξη των βλαστών, στην ριζοβολία των εκφύτων.

Επέμβαση	Ποσοστό ριζοβολίας	Μέσος αριθμός ριζών ανά έκφυτο	Μέσο μήκος ριζών (cm)
M0	83.4 a	22.6 a	0.98 a
M1	46.0 b	3.0 b	0.6 b
M2	51.3 b	4.6 b	0.41 b
M3	41.8 b	5.4 b	0.46 b
M4	29.1 b	5.5 b	0.35 b

Μέσοι εντός της ίδιας στήλης που ακολουθούνται από το ίδιο γράμμα δε διαφέρουν στατιστικά σημαντικά σύμφωνα με τη δοκιμασία του Tukey HSD σε επίπεδο σημαντικότητας $\alpha=0,05$.

Παρατηρείται ότι όσα έκφυτα αναπτύχθηκαν υπό κανονικές συνθήκες κατά το προηγούμενο στάδιο παρουσιάζουν σημαντικά υψηλότερους δείκτες ριζοβολίας. Αυτό γίνεται ιδιαίτερα φανερό όσον αφορά το ποσοστό ριζοβολίας των εκφύτων, όπου έκφυτα του μάρτυρα ριζοβόλησαν σε ποσοστό περί το 83% έναντι μόλις 29-51% των επεμβάσεων υδατικής καταπόνησης. Το ίδιο συμβαίνει και όσον αφορά το μέσο αριθμό ριζών (22 στο μάρτυρα έναντι 3-5.5 στις υπόλοιπες επεμβάσεις) και όσον αφορά το μέσο μήκος αυτών (0,98 στο μάρτυρα έναντι 0,35-0,6 των υπολοίπων επεμβάσεων).

2. Επίδραση της υδατικής καταπόνησης στη συγκέντρωση των χλωροφυλλών, στην διαρροή ηλεκτρολυτών, στην οξείδωση των λιπιδίων των μεμβρανών και στη συγκέντρωση υπεροξειδίου του υδρογόνου στους ιστούς των εκφύτων.

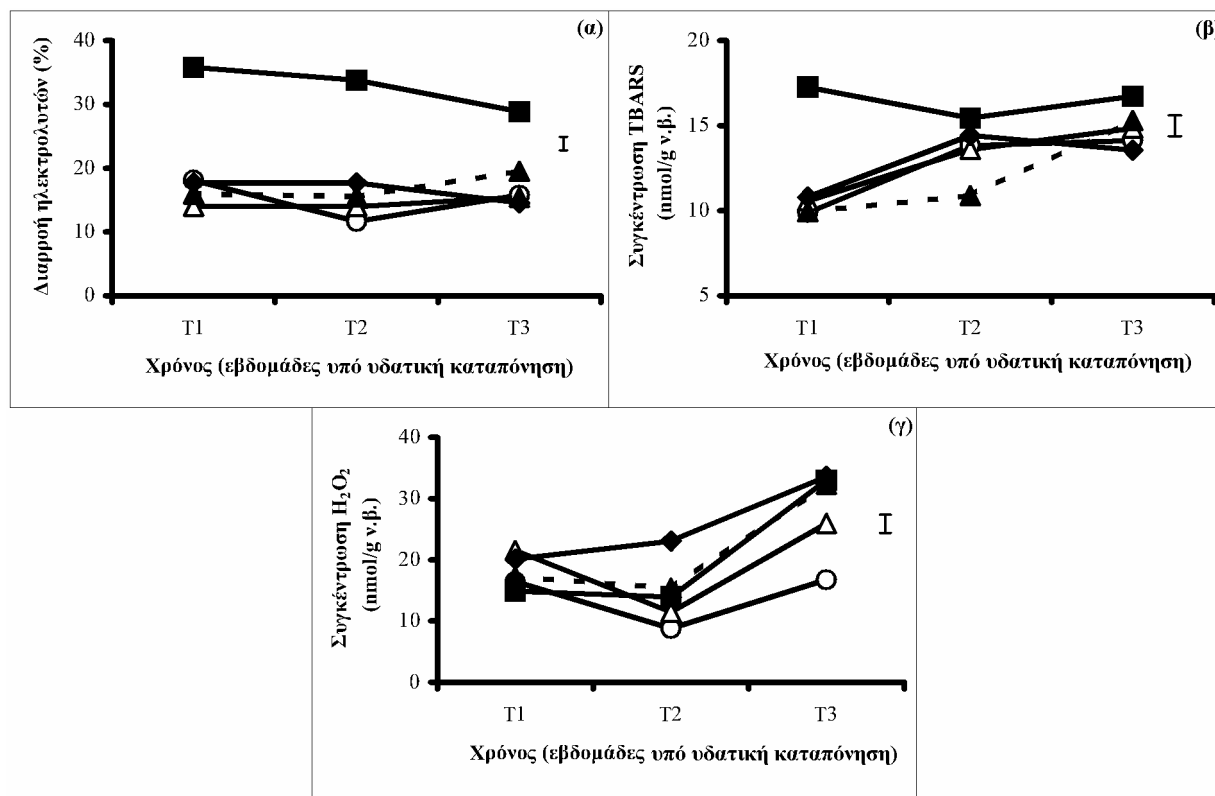
Όπως παρατηρείται και στον Πίνακα 4 η υδατική καταπόνηση είχε σημαντική επίδραση σε όλα τα μετρούμενα χαρακτηριστικά. Ο χρόνος καλλιέργειας υπό συνθήκες υδατικής καταπόνησης είχε σημαντική επίδραση σε μερικά μόνο από τα χαρακτηριστικά που μετρήθηκαν ενώ υπήρχε και σημαντική αλληλεπίδραση μεταξύ επιπέδου υδατικής καταπόνησης και χρόνου καλλιέργειας υπό αυτές τις συνθήκες.

Πίνακας 4. Ανάλυση διασποράς του παραγοντικού πειράματος που αφορά την επίδραση του επιπέδου υδατικής καταπόνησης και του χρόνου καλλιέργειας υπό συνθήκες καταπόνησης στη συγκέντρωση χλωροφυλλών, την διαρροή ηλεκτρολυτών και τη συγκέντρωση TBARS και H₂O₂ σε έκφυτα χοχόμπας κατά τη διάρκεια του σταδίου βλαστογένεσης.

Μεταβλητές	Πηγή παραλλακτικότητας		
	E. Υ. Κ.	Χρόνος	E. Υ. Κ.*Χρόνος
Διαρροή ηλεκτρολυτών	<0.001	ns	<0.05
TBARS	<0.01	<0.01	ns
H ₂ O ₂	<0.001	<0.001	<0.05
Chl a	<0.05	<0.05	<0.01
Chl b	<0.05	ns	<0.01
Chl a / Chl b	<0.05	<0.001	<0.05
Ολικές Chls	<0.05	ns	<0.01

Συντομεύσεις: E.Υ.Κ., Επίπεδο υδατικής καταπόνησης - *, υποδηλώνει αλληλεπίδραση- ns, μη σημαντική επίδραση.

Στο Σχεδιάγραμμα 2 μπορούμε να δούμε ότι η διαρροή ηλεκτρολυτών από τις μεμβράνες των κυττάρων είναι σημαντικά υψηλότερη στα έκφυτα που καλλιεργήθηκαν υπό το υψηλό επίπεδο υδατικής καταπόνησης έναντι όλων των άλλων καθ' όλη τη διάρκεια της καταπόνησης (Σχεδ. 1α). Αντίθετα δεν υπάρχουν σημαντικές διαφορές μεταξύ των άλλων επιπέδων καταπόνησης. Όσον αφορά την οξείδωση των ακόρεστων λιπιδίων των μεμβρανών παρατηρείται ότι και πάλι έκφυτα προερχόμενα από το υψηλό επίπεδο υδατικής καταπόνησης εμφανίζουν υψηλότερες τιμές συγκέντρωσης TBARS έναντι των άλλων επεμβάσεων, με σημαντική διαφορά κυρίως κατά την πρώτη εβδομάδα (Σχεδ. 1β). Οι υπόλοιπες επεμβάσεις δεν παρουσιάζουν ιδιαίτερες διαφορές παρά μόνο κατά τη δεύτερη εβδομάδα όπου έκφυτα από το επίπεδο M2 παρουσιάζουν σημαντικά μικρότερες τιμές συγκέντρωσης TBARS.

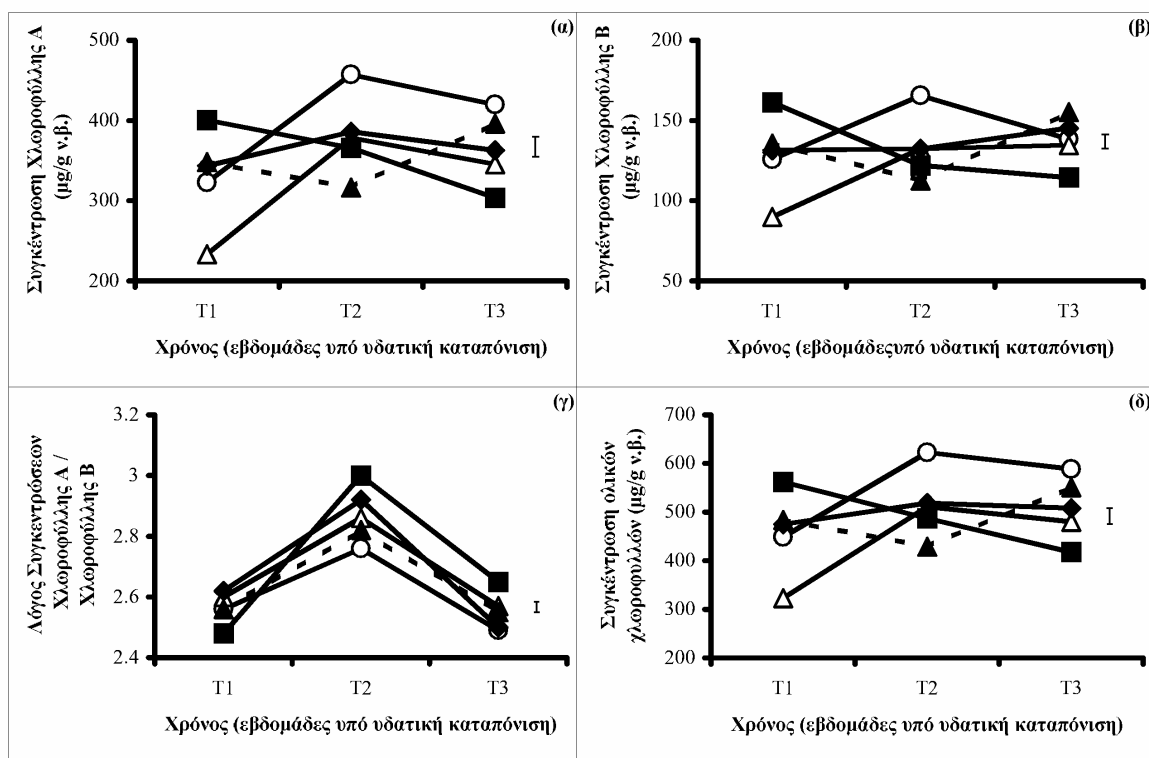


Σχεδιάγραμμα 2. Επίδραση της υδατικής καταπόνησης στη διαρροή ηλεκτρολυτών, στην οξείδωση των λιπαρών οξέων των μεμβρανών εκφρασμένη ως συγκέντρωση TBARS και στη συγκέντρωση υπεροξειδίου του υδρογόνου σε ιστούς εκφύτων χοχόμπα. Οι κάθετες μπάρες είναι το τυπικό σφάλμα της ανάλυσης διασποράς. ○ : Επίπεδο M0, △ : επίπεδο M1, ■ : επίπεδο M2, ◆ : επίπεδο M3, ■ : επίπεδο M4.

Η συγκέντρωση υπεροξειδίου του υδρογόνου παρουσιάζει διακυμάνσεις με το χρόνο, όπου την πρώτη και τρίτη εβδομάδα ανιχνεύονται οι υψηλότερες

συγκεντρώσεις του (Σχεδ. 1γ). Χαρακτηριστικό είναι ότι από την δεύτερη εβδομάδα και μετά τα έκφυτα του μάρτυρα παρουσιάζουν σημαντικά μικρότερες συγκεντρώσεις H_2O_2 έναντι εκφύτων άλλων επεμβάσεων, και αυτό είναι ιδιαίτερα εμφανές κατά την τρίτη εβδομάδα. Κατά το χρονικό αυτό διάστημα σημαντική είναι και η αύξηση του H_2O_2 στα τρία μεγαλύτερα επίπεδα υδατικής καταπόνησης.

Στο Σχεδιάγραμμα 3 παρουσιάζεται η επίδραση της υδατικής καταπόνησης στη συγκέντρωση των χλωροφυλλών των εκφύτων. Παρατηρούμε ότι η συγκέντρωση τόσο της χλωροφύλλης α όσο και της χλωροφύλλης β και φυσικά των συνολικών χλωροφυλλών ακολουθούν τις ίδιες μεταβολές. Παρόλο που οι μεταβολές αυτές δεν είναι σταθερές μεταξύ των διαφόρων επεμβάσεων, παρατηρείται ότι έκφυτα του μάρτυρα παρουσιάζουν κυρίως κατά τη δεύτερη και δευτερευόντως κατά την τρίτη εβδομάδα της υδατικής καταπόνησης σημαντικά υψηλότερη συγκέντρωση χλωροφυλλών έναντι των άλλων επεμβάσεων.



Σχεδιάγραμμα 3. Επίδραση της υδατικής καταπόνησης στη συγκέντρωση της χλωροφύλλης α (α), χλωροφύλλης β (β), του λόγου συγκέντρωσης χλωροφύλλης α/β (γ) και της συγκέντρωσης ολικών χλωροφυλλών (δ). Οι κάθετες μπάρες είναι το τυπικό σφάλμα της ανάλυσης διασποράς. —○— : Επίπεδο M0, —△— : επίπεδο M1, - -▲- - : επίπεδο M2, —◆— : επίπεδο M3, —■— : επίπεδο M4.

υδατικής καταπόνησης (M1 και M2) παρουσιάζουν υψηλότερη συγκέντρωση έναντι των υπολοίπων επεμβάσεων καταπόνησης με τα έκφυτα από το μάρτυρα να παρουσιάζουν ενδιάμεσες τιμές.

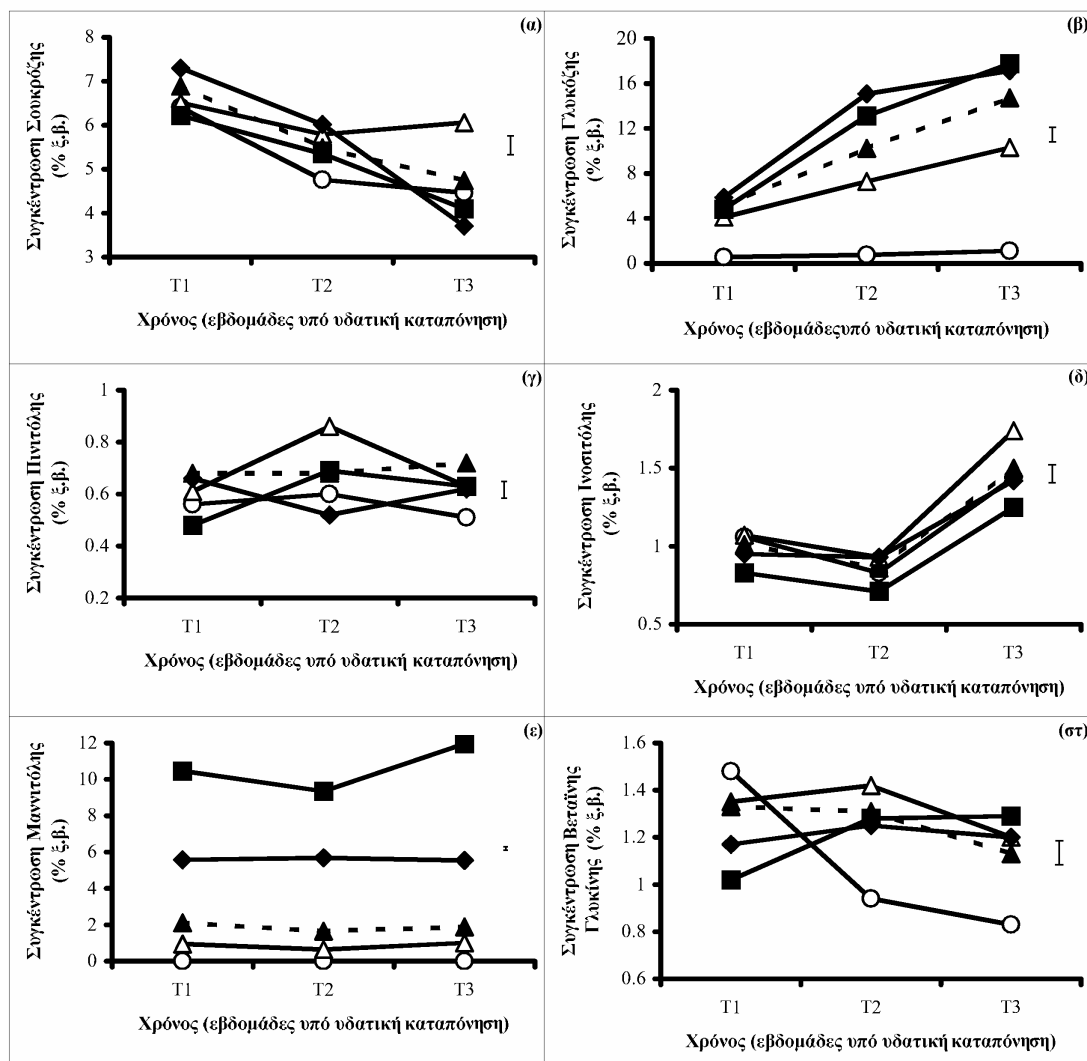
Πίνακας 7. Ανάλυση διασποράς του παραγοντικού πειράματος που αφορά την επίδραση του επιπέδου υδατικής καταπόνησης και του χρόνου καλλιέργειας υπό συνθήκες καταπόνησης στη συγκέντρωση υδατανθράκων και βεταΐνης της γλυκίνης σε έκφυτα χοχόμπας κατά τη διάρκεια του σταδίου βλαστογένεσης.

Μεταβλητές	Πηγή παραλλακτικότητας ¹		
	E. Υ. Κ.	Χρόνος	E. Υ. Κ.*Χρόνος
Σακχαρόζη	ns	<0.001	ns
Γλυκόζη	<0.001	<0.001	<0.001
Πινιτόλη	<0.05	ns	ns
Ινοσιτόλη	<0.05	<0.001	ns
Μαννιτόλη	<0.01	<0.001	<0.01
Βεταΐνη της γλυκίνης	ns	ns	<0.05

Συνοτμήσεις: E.Υ.Κ., Επίπεδο υδατικής καταπόνησης - *, υποδηλώνει αλληλεπίδραση.

Όσον αφορά τη συγκέντρωση της ινοσιτόλης (Σχεδ. 8δ) αυτή ακολουθεί κατά το μάλλον ή ήττον παρόμοια πορεία σε όλες τις επεμβάσεις, αφού μετά από μια μικρή πτώση κατά τη δεύτερη εβδομάδα ακολουθεί σημαντική άνοδο την τρίτη εβδομάδα. Χαρακτηριστικό είναι ότι τα έκφυτα που αναπτύσσονται υπό το υψηλό επίπεδο καταπόνησης παρουσιάζουν τις μικρότερες τιμές συγκέντρωσης ινοσιτόλης καθ' όλη τη διάρκεια της καταπόνησης. Η συγκέντρωση της μαννιτόλης (Σχεδ. 8ε) παραμένει σχεδόν σταθερή στο χρόνο ενώ παρατηρείται μια ξεκάθαρη διαφορά ανάμεσα στις επεμβάσεις, αφού όσο υψηλότερο είναι το επίπεδο καταπόνησης τόσο υψηλότερη η συγκέντρωση της μαννιτόλης. Χαρακτηριστικό είναι επίσης ότι δεν ανιχνεύθηκε μαννιτόλη στα έκφυτα του μάρτυρα. Η συγκέντρωση της βεταΐνης της γλυκίνης (Σχεδ. 8στ) αυξάνει μέσα στο χρόνο στα έκφυτα που αναπτύσσονται υπό τα δύο

υψηλότερα επίπεδα υδατικής καταπόνησης (M3 και M4) ενώ στα μικρότερα επίπεδα καταπόνησης (M2 και M3) παρατηρείται μείωση με το χρόνο και ιδιαίτερα στο μάρτυρα όπου αυτή η μείωση είναι σημαντική.



Σχεδιάγραμμα 8. Επίδραση της υδατικής καταπόνησης στη συγκέντρωση σακχάρων των εκφύτων [σακχαρόζη (α), γλυκόζη (β), πινιτόλη (γ), ινοσιτόλη (δ) μαννιτόλη (ε) και βεταΐνη γλυκίνης (στ)]. Η κάθετη μπάρα είναι το τυπικό σφάλμα της ανάλυσης διασποράς. —○— : Επίπεδο M0, —△— : επίπεδο M1, - -▲ - - : επίπεδο M2, —◆— : επίπεδο M3, —■— : επίπεδο M4.

ΣΥΖΗΤΗΣΗ

Η υδατική καταπόνηση εμφανιζόμενη είτε ως έλλειψη νερού είτε ως ταυτόχρονη έλλειψη νερού και υψηλή εξατμισοδιαπνοή λόγω π.χ. ψηλών θερμοκρασιών, είτε ως οσμωτική καταπόνηση λόγω αύξησης του οσμωτικού δυναμικού του εδαφικού διαλύματος ή του υποστρώματος ανάπτυξης γενικότερα, αποτελεί έναν από τους βασικότερους αβιοτικούς παράγοντες καταπόνησης των φυτών.

Η χοχόμπα αποτελεί είδος ανεκτικό στην υδατική καταπόνηση. Παρόλα αυτά όμως δεν έχουν μελετηθεί επαρκώς οι μηχανισμοί και η βιοχημεία της ανεκτικότητάς της. Στην παρούσα εργασία μελετήθηκαν ορισμένοι από τους πιθανούς μηχανισμούς επαγωγής ανεκτικότητας έναντι υδατικής καταπόνησης καθώς και οι βιομετρικές αντιδράσεις του φυτού.

1. Επίδραση της υδατικής καταπόνησης στα βιομετρικά χαρακτηριστικά της χοχόμπας.

Τέσσερις εβδομάδες μετά την επαγωγή της υδατικής καταπόνησης, ως αύξηση του οσμωτικού δυναμικού του θρεπτικού υποστρώματος με την προσθήκη μαννιτόλης παρατηρήθηκε σημαντική μείωση των τιμών των βιομετρικών χαρακτηριστικών που μελετήθηκαν. Η μείωση αυτή ήταν σημαντική κυρίως σε σχέση με το μάρτυρα, αφού δεν παρατηρήθηκε σημαντική διαφορά μεταξύ των διαφόρων επεμβάσεων υδατικής καταπόνησης, πέραν του ολικού μήκους ανά έκφυτο. Παρόλα αυτά όμως, ήταν φανερό ότι όσο αυξάνονταν το επίπεδο της υδατικής καταπόνησης τόσο μειώνονταν οι τιμές των μεταβλητών που μετρήθηκαν. Παρόμοια αποτελέσματα έχουν βρεθεί και από άλλους ερευνητές όσον αφορά την ανάπτυξη των φυτών υπό συνθήκες υδατικής καταπόνησης (Irvine et al., 1998; Li et al., 2000). Η μείωση της σχετικής περιεκτικότητας των φύλλων σε νερό σε σχέση με το μάρτυρα φανερώνει ίσως την αδυναμία απορρόφησης νερού και θρεπτικών στοιχείων κατ' επέκταση από το θρεπτικό υπόστρωμα, το οποίο έχει ως αποτέλεσμα την ελλιπή θρέψη και το μειωμένο ρυθμό αύξησης, όπως άλλωστε φάνηκε και από τα αποτελέσματα, σύμφωνα με το μέσο αριθμό κόμβων ανά έκφυτο. Μείωση της σχετικής περιεκτικότητας σε νερό έχει βρεθεί και από άλλους ερευνητές ως αποτέλεσμα της μερικής ή ολικής αδυναμίας απορρόφησης νερού από το μέσο ανάπτυξης

(Nepomuceno et al., 1998; Patanagul and Madore, 1999; Fu and Huang, 2001; Egert and Tevini, 2002; Bargali and Tewari, 2004). Αποτέλεσμα επίσης της μειωμένης αυτής απορρόφησης νερού από το υπόστρωμα είναι και ο μειωμένος ρυθμός αύξησης, ο οποίος μειώθηκε κατά περίπου 80% στο υψηλότερο επίπεδο υδατικής καταπόνησης. Παρόμοια είναι τα αποτελέσματα και άλλων ερευνητών όσον αφορά το σχετικό ρυθμό αύξησης υπό συνθήκες καταπόνησης σε διάφορα άλλα φυτά (Sanchez-Blanco et al., 2002; Nayyar and Chander, 2004; Tonon et al., 2004).

Η ανεκτικότητα που εμφανίζει η χοχόμπα υπό συνθήκες υδατικής καταπόνησης φανερώνεται και από τις τιμές του αντιπροσωπευτικού συντελεστή ανεκτικότητας. Ο υπολογισμός του συντελεστή αυτού με βάση τις μεταβολές του ξηρού βάρους των εκφύτων στην παρούσα περίπτωση ενέχει τον κίνδυνο υπερεκτίμησης της ανεκτικότητας, εφόσον στη συνέχεια γίνεται φανερό ότι τα έκφυτα συσσωρεύουν σημαντικές ποσότητες οργανικών ουσιών σε σχέση με το μάρτυρα, με αποτέλεσμα να καθίσταται η χρήση του ξηρού βάρους των εκφύτων λιγότερο αντικειμενική. Παρόλο που η μείωση του ξηρού βάρους των εκφύτων είναι ο κανόνας υπό συνθήκες υδατικής καταπόνησης (Nepomuceno et al., 1998; Sanchez-Blanco et al., 2002; Liu HP. et al., 2004) υπάρχουν εντούτοις αναφορές για μερική αύξηση του ξηρού βάρους των εκφύτων (Chaves et al., 2002) όπως συνέβη και εδώ, για το μικρό αυτό χρονικό διάστημα. Με τη χρησιμοποίηση στο δείκτη ανεκτικότητας του μέσου αριθμού κόμβων ανά έκφυτο, ο οποίος μάλιστα δεικνύει τη δυναμική και το ρυθμό πολλαπλασιασμού του φυτού, γίνεται εφικτός ο αντικειμενικότερος υπολογισμός του δείκτη ανεκτικότητας. Με βάση λοιπόν το μέσο αριθμό κόμβων ανά έκφυτο φαίνεται ότι η χοχόμπα αναπτύσσεται σχετικά καλά υπό συνθήκες υδατικής καταπόνησης, χωρίς μεγάλες διαφορές ανάμεσα στα τρία πρώτα επίπεδα καταπόνησης, παράγοντας όμως σχεδόν τους μισούς κόμβους ανά έκφυτο σε σχέση με το μάρτυρα.

Ο δείκτης ειδικής φυλλικής επιφάνειας δείχνει πως αντιδρά μορφολογικά το φύλλο και κατ' επέκταση το φυτό υπό συνθήκες καταπόνησης. Στο παρόν πείραμα η ειδική φυλλική επιφάνεια ανά ξηρό βάρος μειώνονταν όσο αυξάνονταν το επίπεδο καταπόνησης, φανερώνοντας ότι για ίδιο βάρος φύλλου η φυλλική επιφάνεια είναι μικρότερη, δηλαδή τα φύλλα συσσωρεύουν μεταβολίτες, πιθανόν για να ρυθμίσουν το οσμωτικό τους δυναμικό και να επιτύχουν διαφορά υδατικού δυναμικού με το εξωτερικό μέσο. Ανάλογη μείωση του δείκτη ειδικής φυλλικής επιφάνειας έχει

παρατηρηθεί και σε άλλα φυτά υπό συνθήκες υδατικής καταπόνησης (Rieger et al., 2003; Silva et al., 2004; Brisson and Casals, 2005; Yang et al., 2005).

Όσον αφορά την ανταπόκριση των εκφύτων στο στάδιο ριζοβολίας, καθίσταται έκδηλο ότι η υδατική καταπόνηση μειώνει σημαντικά τόσο το ποσοστό ριζοβολίας των εκφύτων (38-65%) όσο και το μέσο αριθμό και μήκος ριζών ανά έκφυτο. Οι λόγοι για την ανταπόκριση αυτή των εκφύτων πιθανόν να είναι ορμονοθεραπευτικοί. Η επαγωγή υδατικής καταπόνησης ίσως να επιδρά στα επίπεδα ενδογενών φυτορυθμιστικών ουσιών (αυξίνες, αμπισισικό οξύ)(Yang et al., 2005) σε τέτοιο βαθμό που να επηρεάζει την επαγωγή ριζοβολίας. Επιπλέον, μπορεί τα επίπεδα των θρεπτικών στοιχείων, τα οποία δε μετρήθηκαν στο παρόν πείραμα, να επηρεάζονται σε τέτοιο βαθμό ώστε να καθιστούν, ταυτόχρονα με τη μεταβολή των ενδογενών φυτορυθμιστικών ουσιών, δυσκολότερη την επαγωγή ριζοβολίας στα έκφυτα, ακόμα και με τη χρήση εξωγενών αυξινών.

2. Επίδραση της υδατικής καταπόνησης στα επίπεδα οξειδωτικών ουσιών εντός των κυττάρων, στην ακεραιότητα των κυτταρικών μεμβρανών και στη συγκέντρωση των χλωροφυλλών.

Από τα αποτελέσματα που παρουσιάστηκαν στο προηγούμενο κεφάλαιο κατέστη εμφανές ότι το επίπεδο υδατικής καταπόνησης επηρέασε σημαντικά τόσο την ακεραιότητα των κυτταρικών μεμβρανών όσο και τη συγκέντρωση οξειδωτικών ουσιών εντός των κυττάρων. Τα αποτελέσματα συμφωνούν με αυτά άλλων ερευνητών, οι οποίοι αναφέρουν αύξηση της συγκέντρωσης των ουσιών αντίδρασης με θειοβαρβιτουρικό οξύ (TBARS), το αντίστοιχο της μαλονοδιαλδεΐδης, στα κύτταρα ως προϊόντα οξείδωσης των λιπιδίων των μεμβρανών (Sairam and Saxena 2000; Srivalli et al., 2003; Li et al., 2004; Chai et al., 2005; Yang et al., 2005). Αποτέλεσμα της οξείδωσης των λιπιδίων των μεμβρανών είναι η αυξημένη διαρροή ηλεκτρολυτών, κατόπιν της διάρρηξης της συνοχής των μεμβρανών, η οποία είναι τόσο μεγάλη όσο είναι και τα επίπεδα των TBARS και έχει αναφερθεί και από άλλους ερευνητές σε διάφορα φυτικά είδη (Sairam and Saxena, 2000; Lin and Wang, 2002; Li et al., 2004; Nayyar and Chander, 2004; Liu HP. et al., 2004; Reddy et al., 2004; Chai et al., 2005; Duan et al., 2005; Yang et al., 2005). Ανάμεσα στις ουσίες οι οποίες είναι υπεύθυνες για την οξείδωση των μεμβρανών, την παραγωγή TBARS και

τη διαρροή ηλεκτρολυτών είναι το υπεροξειδίο του υδρογόνου (Moran et al., 1994; Munne-Bosch et al., 2001), το οποίο σχηματίζεται από την αυξημένη παραγωγή της ρίζας υπεροξειδίου στα κύτταρα, εφόσον αδυνατεί το κύτταρο να απορροφήσει την αυξημένη παραγωγή ηλεκτρονίων λόγω της καταπόνησης την οποία υφίσταται, μέσω των οξειδοαναγωγικών μηχανισμών του, με συνέπεια αυτά να οδηγούνται στο οξυγόνο και να σχηματίζεται έτσι η ρίζα υπεροξειδίου. Μία από τις οδούς τις οποίες ακολουθεί η ρίζα αυτή είναι η αντίδρασή της με μόριο νερού και το σχηματισμό υπεροξειδίου, το οποίο ως δραστικό οξειδωτικό μόριο είναι μερικώς υπεύθυνο για οξειδώσεις εντός των κυττάρων. Αυξημένες συγκεντρώσεις υπεροξειδίου του υδρογόνου έχουν αναφερθεί, όπως άλλωστε και στο παρόν πείραμα, και από άλλους ερευνητές κατά την υδατική καταπόνηση φυτών (Sairam et al., 1998; Munne-Bosch et al., 2001; Kaminska Rozek and Pukacki, 2004; Li et al., 2004; Luna et al., 2005) ενώ υπάρχουν και αναφορές για σταθερή συγκέντρωση υπεροξειδίου του υδρογόνου κατά την υδατική καταπόνηση (Moran et al., 1994; Simonovicova et al., 2004).

Η παρουσία οξειδωτικών ουσιών εντός των κυττάρων δεν ενέχει μόνο τον κίνδυνο οξείδωσης των λιπαρών συστατικών των μεμβρανών αλλά και άλλων ευαίσθητων στην οξείδωση ενώσεων, όπως είναι και οι χλωροφύλλες. Στο παρόν πείραμα παρουσιάστηκε μια σχετική μείωση της συγκέντρωσης των χλωροφυλλών των εκφύτων με την επαγωγή υδατικής καταπόνησης. Σημαντική ήταν η μείωση του επιπέδου της CHLa αλλά και της συνολικής συγκέντρωσης των χλωροφυλλών κατά το τέλος του πειράματος. Παρόμοια μείωση στη συγκέντρωση των χλωροφυλλών αναφέρουν και άλλοι ερευνητές με την επαγωγή υδατικής καταπόνησης (Munne-Bosch and Alegre, 2000; Alonso et al., 2001; Fu and Huang, 2001; Jiang and Huang, 2001; Egert and Tevini, 2002; Herbinger et al., 2002; Jung, 2004). Υπάρχουν βέβαια και αναφορές στις οποίες η συγκέντρωση των χλωροφυλλών δεν επηρεάζεται σημαντικά από την υδατική καταπόνηση που υφίστανται τα φυτά (Egert and Tevini, 2002) ενώ έχει επίσης παρατηρηθεί η συγκέντρωση των χλωροφυλλών να εμφανίζει στην αρχή μια μικρή αύξηση σε σχέση με αυτή του μάρτυρα και στη συνέχεια μείωση κάτω από τα επίπεδα του μάρτυρα (Jiang and Huang, 2001), όπως και στο παρόν πείραμα. Στην παρούσα εργασία η συγκέντρωση των χλωροφυλλών στα έκφυτα είναι σημαντικά μικρότερη από αυτή που αναφέρεται στα φύλλα άλλων ειδών, λόγω πιθανόν της χρησιμοποίησης ολόκληρων των βλαστών των εκφύτων και όχι μόνο των φύλλων.

συνοδεύεται από μείωση της πουτρεσκίνης, ενώ παράλληλα να έχουμε μείωση της συγκέντρωσης της σπερμιδίνης και αύξηση αυτής της σπερμίνης (Tonon et al., 2004) όπως περίπου συμβαίνει και σε αυτό το πείραμα.

Γενικότερα όμως, ενώ φαίνεται να παίζουν κάποιο σημαντικό ρόλο κατά την ανταπόκριση του φυτού στις συνθήκες καταπόνησης, οι μεταβολές αυτών δεν είναι σταθερές, αφού έχει καταγραφεί τόσο αύξηση της συγκέντρωσης της πουτρεσκίνης (Capell et al., 2004; Legocka and Kluk, 2005; Liu HP. et al., 2004) όσο και μείωση αυτής (Nayyar and Chander, 2004; Tonon et al., 2004) ενώ παρόμοια είναι τα αποτελέσματα και για τις υπόλοιπες ελεύθερες πολυαμίνες (Legocka and Kluk, 2005; Liu HP. et al., 2004; Nayyar and Chander, 2004; Tonon et al., 2004). Είναι όμως αποδεκτό ότι η αύξηση της συγκέντρωσης των πολυαμινών σχετίζεται με την προστασία των ιστών από τα αποτελέσματα της καταπόνησης και τη συνέχιση όσο είναι δυνατόν της αύξησης και ανάπτυξης των φυτών.

3. Επίδραση της υδατικής καταπόνησης στη συγκέντρωση των υδατανθράκων των εκφύτων.

Σημαντικό οσμωρυθμιστικό ρόλο παίζουν επίσης και οι υδατάνθρακες και κυρίως τα αλκοολοσάκχαρα. Η αύξηση της συγκέντρωσης των υδατανθράκων εντός του κυττάρου αυξάνει το οσμωτικό του δυναμικό με αποτέλεσμα να δημιουργείται ικανοποιητική διαφορά υδατικού δυναμικού ώστε να είναι σε θέση του φυτού να απορροφήσει κάποια ποσότητα νερού από το υπόστρωμα ανάπτυξης. Στο παρόν πείραμα η ύπαρξη ενός αλκοολοσακχάρου στο υπόστρωμα σε μεγάλη συγκέντρωση, ώστε να επιτευχθεί το επιθυμητό οσμωτικό δυναμικό, οδήγησε στην απορρόφησή του από τα έκφυτα και τη πιθανή χρησιμοποίησή του για την επίτευξη διαφοράς οσμωτικού δυναμικού. Χαρακτηριστικό όμως είναι το γεγονός ότι το ίδιο το φυτό δεν είναι σε θέση να συνθέσει το αλκοολοσάκχαρο αυτό, αφού δεν ανιχνεύθηκαν ποσότητες μαννιτόλης στο μάρτυρα, ενώ δεν έχει αναφερθεί η παρουσία του σε ιστούς χοχόμπας στη βιβλιογραφία. Παράλληλα όμως με τη μαννιτόλη, παρατηρήθηκε και σημαντική αύξηση της συγκέντρωσης της γλυκόζης, όπως και μικρή αύξηση της συγκέντρωσης της πινιτόλης, ενώ δεν επηρεάστηκε η συγκέντρωση της σακχαρόζης από το επίπεδο υδατικής καταπόνησης. Αύξηση στη συγκέντρωση των σακχάρων περιγράφεται στη βιβλιογραφία υπό συνθήκες υδατικής καταπόνησης, με σκοπό τη ρύθμιση του οσμωτικού δυναμικού των κυττάρων (Kerepesi et al., 1998;

Arndt et al., 2001; Streeter et al., 2001; Correia et al., 2005) όπως άλλωστε και μείωση, κυρίως λόγω καταβολισμού ή μείωσης του ρυθμού βιοσύνθεσης (Ernst and Krug, 1998; Sanchez-Rodriguez et al., 1999; Patakas et al., 2002; Liu F. et al., 2004).

Η βεταΐνη της γλυκίνης είναι άλλη μια ουσία που προσφέρει οσμωρύθμιση υπό συνθήκες καταπόνησης, και η συγκέντρωσή της οποίας συχνά αυξάνεται ώστε να προστατεύσει τα κύτταρα αλλά και πολλές φορές εφαρμόζεται εξωγενώς για να αποφευχθούν τυχόν προβλήματα από έναν ενδεχόμενο κίνδυνο καταπόνησης. Στο παρόν πείραμα η συγκέντρωσή της βεταΐνης της γλυκίνης ήταν υψηλότερη στα έμφυτα που αναπτύχθηκαν υπό συνθήκες υδατικής καταπόνησης, όπως άλλωστε έχει αναφερθεί και σε άλλα φυτικά είδη (Reddy et al., 2004; Zhu et al., 2005).

Παρατηρούμε λοιπόν ότι η χοχόμπα παρουσιάζει ικανοποιητική ανοχή σε συνθήκες υδατικής καταπόνησης, η οποία μπορεί να οφείλεται σε παράγοντες όπως την ενδογενή αύξηση οσμωρυθμιστικών ουσιών όπως η προλίνη, γλυκόζη, πινιτόλη, βεταΐνη της γλυκίνης, ουσιών με αντιοξειδωτική δράση όπως πιθανόν φαινολικές ενώσεις και ουσιών με προστατευτική γενικότερα δράση όπως οι πολυαμίνες σπερμίνη και κανταβερίνη. Σημειώνεται δε ότι τα πιο σοβαρά ίσως συμπτώματα καταπόνησης φάνηκαν μόνο στο υψηλότερο επίπεδο (οσμωτικό δυναμικό $-1,457$) στο οποίο παρατηρήθηκε σημαντική οξειδωτική κυτταρικών μεμβρανών λόγω πιθανόν της υψηλής συγκέντρωσης υπεροξειδίου του υδρογόνου, με αποτέλεσμα την αυξημένη διαρροή ηλεκτρολυτών και μειωμένη αύξηση καθώς επίσης και σημαντική μείωση του ποσοστού ριζοβολίας.

BIBΛΙΟΓΡΑΦΙΑ

- Agrawal V., Prakash S. and Gupta S.C. (2002). Effective protocol for in vitro shoot production through nodal explants of *Simmondsia chinensis*. *Biologia Plantarum* **45**: 449-453.
- Alonso R., Elvira S., Castillo FJ. and Gimeno BS. (2001). Interactive effects of ozone and drought stress on pigments and activities of antioxidative enzymes in *Pinus halepensis*. *Plant Cell and Environment* **24**: 905-916.
- Arndt SK., Clifford SC., Wanek W., Jones HG. and Popp M. (2001). Physiological and morphological adaptations of the fruit tree *Ziziphus rotundifolia* in response to progressive drought stress. *Tree Physiology* **21**: 705-715.
- Arnous A., Makris D. and Kefalas P. (2002). Correlation of pigment and flavanol content with antioxidant properties in selected aged regional wines from Greece. *Journal of Food Composition and Analysis* **15**: 655-665.
- Bargali K. and Tewari A. (2004). Growth and water relation parameters in drought stressed *Coriaria nepalensis* seedlings. *Journal of Arid Environments* **58**: 505-512.
- Bjorkman C. (2000). Interactive effects of host resistance and drought stress on the performance of a gall-making aphid living on Norway spruce. *Oecologia* **123**: 223-231.
- Botti C., Prat L., Palzkill D. and Canaves L. (1998). Evaluation of jojoba clones grown under water and salinity stresses in Chile. *Industrial Crops and Products*, **9**: 39-45.
- Brisson N. and Casals ML. (2005). Leaf dynamics and crop water status throughout the growing cycle of durum wheat crops grown in two contrasted water budget conditions. *Agronomy for Sustainable Development* **25**: 151-158.
- Capell T., Bassie L. and Christou P. (2004). Modulation of the polyamine biosynthetic pathway in transgenic rice confers tolerance to drought stress. *Proceedings of the national Academy of Sciences of the United States of America* **101**: 9909-9914.

- Chai TT., Fadzillah NM., Kusnan M. and Mahmood M. (2005). Water stress induced oxidative damage and antioxidant responses in micropropagated banana plantlets. *Biologia Plantarum* **49**: 153-156.
- Chaves MM., Pereira JS., Maroco J., Rodrigues ML., Ricardo CPP., Osorio ML., Carvalho I., Faria T. and Pinheiro C. (2002). How plants cope with water stress in the field. Photosynthesis and growth. *Annals of Botany* **89**: 907-916.
- Correia MJ., Fonseca F., Azedo-Silva J., Dias C., Davis MM., Barrote I., Osorio ML. and Osorio J. (2005). Effects of water deficit on the activity of nitrate reductase and content of sugars, nitrate and free amino acids in the leaves and roots of sunflower and white lupin plants growing under two nutrient supply regimes. *Physiologia Plantarum* **124**: 61-70.
- De Mejia EG., Martinez-Resendiz V., Castano-Tostado E. and Loarca-Pina G. (2003). Effect of drought on polyamine metabolism, yield, protein content and *in vitro* protein digestibility in tepary (*Phaseolus acutifolius*) and common (*Phaseolus vulgaris*) bean seeds. *Journal of the Science of Food and Agriculture* **83**: 1022-1030.
- Duan BL., Lu YW., Yin CY., Junttila O. and Li CY. (2005). Physiological responses to drought and shade in two contrasting *Picea asperata* populations. *Physiologia Plantarum* **124**: 476-484.
- Egert M. and Tevini M. (2002). Influence of drought on some physiological parameters symptomatic for oxidative stress in leaves of chives (*Allium schoenoparasum*). *Environmental and Experimental Botany* **48**: 43-49.
- Ernst M. and Krug H. (1998). Seasonal growth and development of asparagus (*Asparagus officinalis* L.) III. The effect of temperature and water stress on carbohydrate content in storage roots and rhizome buds. *Gartenbauwissenschaft* **63**: 202-208.
- Franco OL. and Melo F. (2000). Osmoprotectants – A plant strategy in response to osmotic stress. *Russian Journal of Plant Physiology* **47**: 137-144.
- Fu J. and Huang B. (2001). Involvement of antioxidants and lipid peroxidation in the adaptation of two cool-season grasses to localized drought stress. *Environmental and Experimental Botany* **45**: 105-114.

- Gangopadhyay G., Basu S. and Gupta S. (1997). In vitro selection and physiological characterization of NaCl and mannitol adapted callus lines in *Brassica juncea*. *Plant Cell Tissue and Organ Culture* **50**: 161-169.
- Glynn C., Ronnberg-Wastjung AC., Julkunen-Tiitto R. and Weih M. (2004). Willow genotype but not drought treatment affects foliar phenolic concentrations and leaf-beetle resistance. *Entomologia Experimentalis Et Applicata* **113**: 1-14. (Abstract)
- Herbinger K., Tausz M., Wonisch A., Soja G., Sorger A. and Grill D. (2002). Complex interactive effects of drought and ozone stress on the antioxidant defence systems of two wheat cultivars. *Plant Physiology and Biochemistry* **40**: 691-696.
- Hernandez I., Alegre L. and Munne-Bosch S. (2004). Drought induced changes in flavonoids and other low molecular weight antioxidants in *Cistus clusii* grown under Mediterranean field conditions. *Tree Physiology* **24**: 1303-1311.
- Jiang Y. and Huang B. (2001). Drought and heat stress injury to two cool season turfgrasses in relation to antioxidant metabolism and lipid peroxidation. *Crop Science* **41**: 436-442.
- Jung SY. (2004). Variation in antioxidant metabolism of young and mature leaves of *Arabidopsis thaliana* subjected to drought. *Plant Science* **166** : 459-466.
- Irvine J., Perks MP., Magnani F. and Grace J. (1998). The response of *Pinus sylvestris* to drought: stomatal control of transpiration and hydraulic conductance. *Tree Physiology* **18**: 393-402.
- Kaminska-Rozek E. and Pukacki PM. (2004). Effect of water deficit on oxidative stress and degradation of cell membranes in needles of Norway spruce (*Picea abies*). *Acta Physiologiae Plantarum* **26**: 431-442 (Abstract)
- Καραμπουρνιώτης Γ. (2003). Φυσιολογία καταπονήσεων των φυτών. Εκδόσεις Έμβρυο, Αιγάλεω, σελ. 274.
- Karunaratne S., Santha S. and Kovoov A. (1991). An *in vitro* assay for drought tolerant coconut germplasm. *Euphytica* **53**: 25-30.
- Kerepesi I., Galiba G. and Banyai E. (1998). Osmotic and salt stresses induced differential alteration in water-soluble carbohydrate content in wheat seedlings. *Journal of Agricultural and Food Chemistry* **46**: 5347-5354.

- Kirakosyan A., Skymour E., Kaufman PB., Warber S., Bolling S. and Chang SC. (2003). Antioxidant capacity of polyphenolic extracts from leaves of *Crataegus laevigata* and *Crataegus monogyna* (Hawthorn) subjected to drought and cold stress. *Journal of Agricultural and Food Chemistry* **51**: 3973-3976.
- Komori T., Myers PN., Yamada S., Kubo T. and Imaseki H. (2000). Comparative study of the *Nicotiana* species with respect to water deficit tolerance during early growth. *Euphytica* **116**: 121-130.
- Ledbetter CA., Palmquist DE. and Peterson SJ. (1998). Germination and net *in vitro* growth of peach, almond and peach-almond hybrid embryos in response to mannitol inclusion in the nutrient medium. *Euphytica* **103**: 243-250.
- Legocka J. and Kluk A.(2005). Effect of salt and osmotic stress on changes in polyamine content and arginine decarboxylase activity in *Lupinus luteous* seedlings. *Journal of Plant Physiology* **162**: 662-668.
- Li C., Jiao J. and Wang G. (2004). The important roles of reactive oxygen species in the relationship between ethylene and polyamines in leaves of spring wheat seedlings under root osmotic stress. *Plant Science* **166**: 303-315.
- Li CY., Berninger F., Koskela J. and Sonninen E. (2000). Drought responses of *Eucalyptus microtheca* provenances depend on seasonality of rainfall in their place of origin. *Australian Journal of Plant Physiology* **27**: 231-238.
- Lin JS. and Wang GX. (2002). Doubled CO₂ could improve the drought tolerance better in sensitive cultivars than intolerant cultivars in spring wheat. *Plant Science* **163**: 627-637.
- Liu F., Jensen CR. and Andersen MN. (2004). Drought stress effect on carbohydrate concentration in soybean leaves and pods during early reproductive development: its implication in altering pod set. *Food Crops Research* **86**: 1-13
- Liu HP., Dong BH., Zhang YY., Liu ZP. and Liu YL. (2004). Relationship between osmotic stress and the levels of free, conjugated and bound polyamines in leaves of wheat cultivars. *Plant Science* **166**: 1261-1267.
- Luna CM., Pastori GM., Driscoll S., Groten K., Bernard S. and Foyer CH. (2005). Drought controls on H₂O₂ accumulation, catalase (CAT) activity and CAT gene expression in wheat. *Journal of Experimental Botany* **56**: 417-423.

- Μαλικουτσάκη-Μαθιουδάκη Μ. (1997). Χοχόμπα. Βιομηχανικό φυτό με πολλαπλές χρήσεις. *Αγροτική Έρευνα και Τεχνολογία* **5**: 24-25.
- Mills D. and Benzioni A. (1992). Effect of NaCl salinity on growth and development of jojoba clones: II. Nodal segments *in vitro*. *Journal of Plant Physiology* **139**: 737-741.
- Mills D., Wenkart S. and Benzioni A. (1997). Micropropagation of *Simmondsia chinensis* (Jojoba). In: Bajaj YPS (ed) Biotechnology in Agriculture and Forestry, Vol 40. High-Tech and Micropropagation VI (pp 370–393). Springer-Verlag, Berlin, Heidelberg
- Mills D., Zhang G. and Benzioni A. (2001). Effect of different salts and of ABA on growth and mineral uptake in jojoba shoots grown *in vitro*. *Journal of Plant Physiology* **158**: 1031-1039.
- Mohamed MAH., Harris PJC. and Henderson J. (2000). In vitro selection and characterization of a drought tolerant clone of *Tagetes minuta*. *Plant Science* **159**: 213-222.
- Moran JF., Becana M., Iturbeormatxe I., Frechilla S., Klucas RV. and Aparicotejo P. (1994). Drought induces oxidative stress in pea plants. *Planta* **194**: 346-352.
- Munne-Bosch S. and Alegre L. (2000). Changes in carotenoids, tocopherols and diterpenes during drought and recovery, and the biological significance of chlorophyll loss in *Rosmarinus officinalis*. *Planta* **210**: 925-931.
- Munne-Bosch S., Jubany-Mari T. and Alegre L. (2001). Drought induced senescence is characterized by a loss of antioxidant defences I chloroplasts. *Plant Cell and Environment* **24**: 1319-1327.
- Nacif de Abreu I. and Mazzafera P. (2005). Effect of water and temperature stress on the content of active constituents of *Hypericum brasiliense* Choisy. *Plant Physiology and Biochemistry* **43**: 241-248.
- Nayyar H. and Chander S. (2004). Protective effects of polyamines against oxidative stress induced by water and cold stress in chickpea. *Journal of Agronomy and Crop Science* **190**: 355-365.

- Nepomuceno AL., Oosterhuis DM. and Stewart JM. (1998). Physiological responses of cotton leaves and roots to water deficit induced by polyethylene glycol. *Environmental and Experimental Botany* **40**: 29-41.
- Pandey R., Agarwal RM., Jeevaratnam K. and Sharma GL. (2004). Osmotic stress induced alterations in rice (*Oryza sativa* L.) and recovery on stress release. *Plant Growth Regulation* **42**: 79-87.
- Patakas A., Nikolaou N., Zioziou E., Radoglou K. and Noitsakis B. (2002). The role of organic solute and ion accumulation in osmotic adjustment in drought-stressed grapevines. *Plant Science* **163**: 361-367.
- Patanagul W. and Madore MA. (1999). Water deficit effects on raffinose family oligosaccharide metabolism in coleus. *Plant Physiology* **121**: 987-993.
- Reddy AR., Chaitanya KV., Jutur PP. and Sumithra K. (2004). Differential antioxidative response to water stress among five mulberry (*Morus alba* L.) cultivars. *Environmental and Experimental Botany* **52**: 33-42.
- Rieger M., Lo Bianco R. and Okie WR. (2003). Response of *Prunus ferganensis*, *Prunus persica* and two interspecific hybrids to moderate drought stress. *Tree Physiology* **23**: 51-58.
- Roussos PA. and Pontikis CA. (2003). Long term effects of sodium chloride salinity on growing *in vitro*, proline and phenolic compound content of jojoba explants. *European Journal of Horticultural Science* **68**: 38-44.
- Roussos PA., Pontikis CA. and Zoti MA. (2004). The role of free polyamines in the alternate-bearing of pistachio (*Pistacia vera* cv. Pontikis). *Trees* **18**: 61-69.
- Roussos P.A., Tolia-Marioli A., Pontikis C.A. and D. Kotsias (1999). Rapid multiplication of jojoba seedlings by *in vitro* culture. *Plant Cell Tissue and Organ Culture* **57**: 133-137.
- Roussos PA., Vemmos SN. and Pontikis CA. (2005). The role of carbohydrates on the salt tolerance of jojoba [*Simmondsia chinensis* (Link)] explants *in vitro*. *European Journal of Horticultural Science (in press)*.
- Sadeghian SY. and Yavari N. (2004). Effect of water deficit stress on germination and early seedling growth in sugar beet. *Journal of Agronomy and Crop Science* **190**: 138-144.

- Sairam RK. and Saxena DC. (2000). Oxidative stress and antioxidants in wheat genotypes: possible mechanism of water stress tolerance. *Journal of Agronomy and Crop Science* **184**: 55-61.
- Sairam RK., Deshmukh PS. and Saxena DC. (1998). Role of antioxidant systems in wheat genotypes tolerance to water stress. *Biologia Plantarum* **41**: 387-394.
- Sanchez FJ., Manzanares M., de Andres EF., Tenorio JL. and Ayerbe L. (1998). Turgor maintenance osmotic adjustment and soluble sugar and praline accumulation in 49 pea cultivars in response to water stress. *Field Crops Research* **59**: 225-235.
- Sanchez-Blanco MJ., Rodrigues P., Morales MA., Ortuno MF. and Torrecillas A. (2002). Comparative growth and water relations of *Cistus albidus* and *Cistus monspeliensis* plants during water deficit conditions and recovery. *Plant Science* **162**: 107-113.
- Sanchez-Rodriguez J., Perez P. and Martinez-Carrasco R. (1999). Photosynthesis, carbohydrate levels and chlorophyll fluorescence-estimated intracellular CO₂ in water stressed *Casuarina equisetifolia* Forst & Forst. *Plant Cell and Environment* **22**: 867-873.
- Silva FCE., Shvaleva A., Maroco JP., Almeida MH., Chaves MM. and Pereira JS. (2004). Responses to water stress in two *Eucalyptus globules* clones differing in drought tolerance. *Tree Physiology* **24**: 1165-1172.
- Simonovicova M., Huttova J., Mistrik I., Siroka B. and Tamas L. (2004). Peroxidase mediated hydrogen peroxide production in barley roots grown under stress conditions. *Plant Growth Regulation* **44**: 267-275.
- Srivalli B., Sharma G. and Khanna-Chopra R. (2003). Antioxidative defense system in an upland rice cultivar subjected to increasing intensity of water stress followed by recovery. *Physiologia Plantarum* **119**: 503-512.
- Streeter JG., Lohnes DG. and Fioritto RJ. (2001). Patterns of pinitol accumulation in soybean plants and relationships to drought tolerance. *Plant Cell and Environment* **24**: 429-438.
- Tattini M., Galardi C., Pinelli P., Massai R., Remorini D. and Agati G. (2004). Differential accumulation of flavonoids and hydroxycinnamates in leaves of *Ligustrum vulgare* under excess light and drought. *New Phytologist* **163** : 547-561.

Tonon G., Kevers C., Faivre-Rampant O., Graziani M. and Gaspar T. (2004). Effect of NaCl and mannitol iso-osmotic stresses on proline and free polyamine levels in embryogenic *Fraxinus angustifolia* callus. *Journal of Plant Physiology* **161**: 701-708.

Van Heerden PDR., and Kruger GHJ. (2002) Separately and simultaneously induced dark chilling and drought stress effects on photosynthesis, proline accumulation and antioxidant metabolism in soybean. *Journal of Plant Physiology* **159**: 1077-1086.

Waterman PG. and Mole S. (1994). Analysis of phenolic plant metabolites. Blackwell Scientific Publications, Oxford, pp.237.

Yang Y., Yao Y., Xu G. and Li C. (2005). Growth and physiological responses to drought and elevated ultraviolet-B in two contrasting populations of *Hippophae rhamnoides*. *Physiologia Plantarum* **124**: 431-440.

Zhu X., Gong H., Ghen G., Wang S. and Zhang C. (2005). Different solute levels in two spring wheat cultivars induced by progressive water stress at different developmental stages. *Journal of Arid Environments* **62**: 1-14.