

ΓΕΩΠΟΝΙΚΟ ΠΑΝΕΠΙΣΤΗΜΙΟ ΑΘΗΝΩΝ

ΣΧΟΛΗ ΑΓΡΟΤΙΚΗΣ ΠΑΡΑΓΩΓΗΣ, ΥΠΟΔΟΜΩΝ ΚΑΙ ΠΕΡΙΒΑΛΛΟΝΤΟΣ

ΤΜΗΜΑ ΕΠΙΣΤΗΜΗΣ ΦΥΤΙΚΗΣ ΠΑΡΑΓΩΓΗΣ

ΕΡΓΑΣΤΗΡΙΟ ΟΙΚΟΛΟΓΙΑΣ ΚΑΙ ΠΡΟΣΤΑΣΙΑΣ ΠΕΡΙΒΑΛΛΟΝΤΟΣ

ΠΡΟΓΡΑΜΜΑ ΜΕΤΑΠΤΥΧΙΑΚΩΝ ΣΠΟΥΔΩΝ ΕΠΙΣΤΗΜΕΣ ΚΑΙ ΣΥΣΤΗΜΑΤΑ ΦΥΤΙΚΗΣ ΠΑΡΑΓΩΓΗΣ

Η επίδραση δύο φυτοπροστατευτικών, ένταντι του όζοντος, ουσιών στο μεταβολισμό φυτών φασολιού εκτεθειμένων σε φυτοτοξικά επίπεδα όζοντος.

Μεταπτυχιακή διατριβή

Επιβλέπων Κωνσταντίνος Σαϊτάνης,
Αν. Καθηγητής



Βασιλική Ι. Βουγελέκα

Αθήνα, 2017

ΓΕΩΠΟΝΙΚΟ ΠΑΝΕΠΙΣΤΗΜΙΟ ΑΘΗΝΩΝ

ΣΧΟΛΗ ΑΓΡΟΤΙΚΗΣ ΠΑΡΑΓΩΓΗΣ, ΥΠΟΔΟΜΩΝ ΚΑΙ ΠΕΡΙΒΑΛΛΟΝΤΟΣ
ΤΜΗΜΑ ΕΠΙΣΤΗΜΗΣ ΦΥΤΙΚΗΣ ΠΑΡΑΓΩΓΗΣ
ΕΡΓΑΣΤΗΡΙΟ ΟΙΚΟΛΟΓΙΑΣ ΚΑΙ ΠΡΟΣΤΑΣΙΑΣ ΠΕΡΙΒΑΛΛΟΝΤΟΣ
ΠΡΟΓΡΑΜΜΑ ΜΕΤΑΠΤΥΧΙΑΚΩΝ ΣΠΙΟΥΔΩΝ: ΕΠΙΣΤΗΜΕΣ ΚΑΙ ΣΥΣΤΗΜΑΤΑ
ΦΥΤΙΚΗΣ ΠΑΡΑΓΩΓΗΣ

**«Επίδραση δύο φυτοπροστατευτικών, έναντι του
όζοντος, ουσιών στο μεταβολισμό φυτών φασολιού
εκτεθειμένων σε φυτοτοξικά επίπεδα όζοντος»**

ΜΕΤΑΠΤΥΧΙΑΚΗ ΔΙΑΤΡΙΒΗ

ΕΠΙΒΛΕΠΩΝ: ΚΩΝΣΤΑΝΤΙΝΟΣ ΣΑΪΤΑΝΗΣ,

ΑΝΑΠΛΗΡΩΤΗΣ ΚΑΘΗΓΗΤΗΣ



ΒΑΣΙΛΙΚΗ Ι. ΒΟΥΓΕΛΕΚΑ

ΑΘΗΝΑ, 2017

**«Επίδραση δύο φυτοπροστατευτικών, έναντι του
όζοντος, ουσιών στο μεταβολισμό φυτών φασολιού
εκτεθειμένων σε φυτοτοξικά επίπεδα όζοντος»**

ΜΕΤΑΠΤΥΧΙΑΚΗ ΔΙΑΤΡΙΒΗ

ΒΑΣΙΛΙΚΗ Ι. ΒΟΥΓΕΛΕΚΑ



Τριμελής Εξεταστική Επιτροπή:

1. Κωνσταντίνος Σαϊτάνης, Αν. Καθηγητής Γ.Π.Α., Επιβλέπων
2. Δημήτριος Σάββας, Καθηγητής Γ.Π.Α., Μέλος
3. Κωνσταντίνος Αλιφέρης, Λέκτορας Γ.Π.Α., Μέλος

ΠΡΟΛΟΓΟΣ

Το παρόν πόνημα, αποτελεί μεταπτυχιακή μελέτη που πραγματοποιήθηκε στο Εργαστήριο Οικολογίας και Προστασίας Περιβάλλοντος του Γεωπονικού Πανεπιστημίου Αθηνών, ένα από τα αντικείμενα του οποίου είναι η μελέτη των επιδράσεων των ρύπων στα φυτά. Όπως δείχνουν οι ερευνητικές εργασίες, η παραγωγή του φασολιού, ενός φυτού μεγάλης καλλιέργειας και ιδιαίτερης σημασίας για τη θρέψη των ανθρώπων σε όλο τον πλανήτη, μειώνεται εξαιτίας ενός ανθρωπογενούς ατμοσφαιρικού ρύπου, του όζοντος. Συμβάλλοντας με ένα μικρό λιθαράκι στην προσπάθεια να γίνει γνωστή η δράση του όζοντος και η προστασία των φυτών από αυτό, εφαρμόστηκε μια σύγχρονη προσέγγιση, η μεταβολομική.

Για την εκτέλεση των πειραμάτων χρησιμοποιήθηκε η υλικοτεχνική υποδομή του Εργαστηρίου Οικολογίας και Προστασίας Περιβάλλοντος καθώς και του Εργαστηρίου Γεωργικής Φαρμακολογίας.

Ευχαριστίες...

Ας μου επιτραπεί να εκφράσω τις ευχαριστίες μου πρώτα στον Αναπληρωτή Καθηγητή κ. Κωνσταντίνο Σαϊτάνη, στον οποίο οφείλω όχι μόνο την εργασία αυτή, αλλά και τη συνέχιση των σπουδών μου σε μεταπτυχιακό επίπεδο. Του οφείλω την αλλαγή στον τρόπο σκέψης μου, και τον ευχαριστώ για την πολυετή και ανεκτίμητη βοήθειά του στην επιλογή του αντικειμένου έρευνας, για τη διακριτική καθοδήγησή του, για τις οξυδερκείς επισημάνσεις του, τις διορθώσεις του και τον πολύτιμο χρόνο του που μου διέθεσε σε όλα τα στάδια της εργασίας μου, ακόμα κι όταν βρισκόταν σε εκπαιδευτική άδεια στην άλλη πλευρά του πλανήτη.

Θερμές ευχαριστίες στον Καθηγητή κ. Δημήτριο Σάββα, μέλος της Τριμελούς Εξεταστικής Επιτροπής και την ερευνήτρια Δρ. Γεωργία Ντάτση του Εργαστηρίου Κηπευτικών Καλλιιεργειών, για την υποστήριξή τους και τις πολύτιμες συμβουλές τους τόσο στο σχεδιασμό του πειράματος όσο και σε όλα τα στάδια των μεταπτυχιακών μου ερευνών.

Ευχαριστώ το Λέκτορα κ. Κωνσταντίνο Αλιφέρη, μέλος της Τριμελούς Εξεταστικής Επιτροπής, για την εμπιστοσύνη που μου έδειξε και μου άνοιξε μια πόρτα στον απίστευτο κόσμο της μεταβολομικής.

Ευχαριστώ επίσης τον ερευνητή Δρ. Ευγένιο Αγαθοκλέους για τη μεταλαμπάδευση της εμπειρίας του στην εφαρμογή των επεμβάσεων και τους υποψήφιους διδάκτορες Μαρτίνα Χατζηγιάννη και Ιωάννη Καλαμπόκη για τη βοήθεια κατά τις αναλύσεις μεταβολομικής.

Τέλος αλλά περισσότερο ευχαριστώ τις τέσσερις αστείρευτες πηγές ενέργειάς μου, το σύζυγό μου κ. Κωνσταντίνο Καλαμπόκα, που επωμίστηκε ένα μέρος του δικού μου οικογενειακού φόρτου, συμμερίζεται τον ενθουσιασμό μου και υποστηρίζει κάθε νέο μου βήμα. Στους τρεις μικρούς: Γιώργο-Λεωνίδα, Ιωάννα-Λητώ και Θαλή-Διηνέκη ζητώ μεν συγνώμη για το χρόνο που τους έκλεψα, διευκρινίζω όμως ότι αυτή η εργασία ήταν η πηγή ενέργειάς μου για τις ώρες ουσιαστικού παιχνιδιού μαζί τους, στο σπίτι.

«Αρχή σοφίας της άγνοιας η γνώση»
Κλεόβουλος 600-530 π.Χ.

ΠΕΡΙΛΗΨΗ

Το τροποσφαιρικό όζον είναι ένας από τους πιο διαδεδομένους φυτοτοξικούς ατμοσφαιρικούς ρύπους παγκοσμίως. Τα επίπεδά του αυξάνονται συνεχώς, απειλώντας φυσικά και γεωργικά οικοσυστήματα. Προκαλεί χλωρωτικές και νεκρωτικές κηλίδες και μειώνει τη φωτοσύνθεση. Επίσης, επεμβαίνει στο μεταβολισμό και μειώνει σημαντικά την ανάπτυξη και την απόδοση των φυτών. Η ethylene diurea (EDU) καταστέλλει τα συμπτώματα της χρόνιας και της οξείας έκθεσης στο όζον, σε διάφορα είδη φυτών, ωστόσο ο ακριβής μηχανισμός δράσης της είναι άγνωστος. Επίσης, η δραστική ουσία Penconazole χρησιμοποιείται σε μυκητοκτόνα σκευάσματα και φαίνεται να έχει φυτοπροστατευτική δράση έναντι της τοξικότητας του όζοντος. Στην παρούσα μελέτη η προστατευτική δράση της EDU και της Penconazole έναντι της τοξικότητας που προκαλείται από το όζον, αξιολογήθηκε χρησιμοποιώντας φυτά φασολιού (*Phaseolus vulgaris* L.) της ποικιλίας Pinto που είναι ευαίσθητη στο όζον. Το πείραμα διεξήχθη υπό εργαστηριακές συνθήκες σε θαλάμους ελεγχόμενου περιβάλλοντος. Φυτά τριών εβδομάδων ψεκάστηκαν με EDU ή Penconazole και εκτέθηκαν σε συγκέντρωση όζοντος 70 ppb ή φιλτραρισμένο αέρα. Πραγματοποιήθηκε μεταβολομική ανάλυση με χρήση αερίου χρωματογραφίας-φασματομετρίας μάζας (GC/EI/MS) σε ιστούς του πρώτου πραγματικού φύλλου (πλήρως εκπτυχθέντος) των φυτών. Η εφαρμογή πολυπαραγοντικής ανάλυσης (OPLS-DA) των μεταβολικών προφίλ έδωσε πλήρως διακριτές ομάδες - που διαφοροποιούσαν τα φυτά που δέχθηκαν τις μεταχειρίσεις από τα φυτά μάρτυρες. Επίσης εντοπίστηκαν και παρουσιάζονται τα μεταβολικά μονοπάτια τα οποία εμπλέκονται στη δράση του όζοντος, της EDU και της Penconazole.

Λέξεις κλειδιά: όζον, EDU, Penconazole, μεταβολομική

ABSTRACT

Ambient ozone (O_3) is a photochemical air pollutant with increasing trend following a diurnal and a seasonal circle. Concerning its seasonal circle, its maximum concentrations occur during late spring and summer time, which is the cultivation period for the majority of vegetables, while concerning its diurnal circle, its maximum concentration occurs during midday and afternoon hours, when photosynthesis also reaches its maximum. Thus, O_3 is a crucial factor for agriculture, causing negative effects on plants (*e.g.*, visible injuries, yield reduction) mainly through metabolic alteration. Ethylene diurea (EDU) is known to prevent ozone induced injury in various plant species via metabolic cascades. However, the exact mechanism of its action is still unknown. In the present study the effects of O_3 on bean's (*Phaseolus vulgaris* cv Pinto) metabolism and the protective effect of EDU against ozone-related injuries were evaluated. The cultivar is known to be highly sensitive to ozone. The experiment was conducted under controlled laboratory conditions. Three weeks-old plants were treated with EDU and then exposed, in controlled environment chambers, either to ozone (70 ppb) or to charcoal filtered air (control). Gas chromatography-mass spectrometry (GC/EI/MS) metabolomics was performed in tissue samples coming from the first trifoliolate (fully expanded) leaf. Multivariate analysis OPLS-DA application of metabolic profiles resulted in completely distinct groups - which differentiated the treated plants by the control plants. Metabolic pathways involved in the action of ozone, EDU and Penconazole have also been identified and presented.

Key words: ozone, EDU, Penconazole, metabolomics

ΠΙΝΑΚΑΣ ΠΕΡΙΕΧΟΜΕΝΩΝ

ΓΕΩΠΟΝΙΚΟ ΠΑΝΕΠΙΣΤΗΜΙΟ ΑΘΗΝΩΝ	0
ΠΡΟΛΟΓΟΣ	3
Ευχαριστίες.....	4
ΠΕΡΙΛΗΨΗ.....	6
ABSTRACT	7
ΠΙΝΑΚΑΣ ΠΕΡΙΕΧΟΜΕΝΩΝ	8
1. ΕΙΣΑΓΩΓΗ.....	12
1.1. ΤΟ ΟΖΟΝ.....	12
1.1.1. Το όζον, ως χημική ένωση.....	12
1.1.2. Το όζον στην τροπόσφαιρα	14
1.1.3. Τα επίπεδα του τροποσφαιρικού όζοντος - μελλοντικές τάσεις.....	15
1.1.4. Το όζον ως τοξικός παράγοντας.....	16
α) Επιπτώσεις στον άνθρωπο.....	16
β. Οι επιδράσεις του όζοντος στα φυτά.....	17
1.1.5. Μηχανισμός δράσης του όζοντος στα φυτά	19
1.2. ΦΥΤΟΠΡΟΣΤΑΤΕΥΤΙΚΕΣ ΟΥΣΙΕΣ ΕΝΑΝΤΙ ΤΟΥ ΟΖΟΝΤΟΣ.....	21
1.2.1. Η Penconazole ως φυτοπροστατευτική έναντι του όζοντος ουσία	21
1.2.2. Η αιθυλενεδιουρία (EDU).....	22
1.3. ΤΟ ΦΑΣΟΛΙ (<i>Phaseolus vulgaris</i> L.)	22
1.3.1. Συνθήκες καλλιέργειας του φασολιού.....	24
1.3.1.1. Κλιματικές συνθήκες καλλιέργειας του φασολιού	24
1.3.1.2. Εδαφικές συνθήκες καλλιέργειας του φασολιού.....	24
1.3.2. Πολλαπλασιασμός του φασολιού	25
1.3.3. Η διατροφική αξία του φασολιού	25
1.4. ΜΕΤΑΒΟΛΙΣΜΟΣ ΚΑΙ ΜΕΤΑΒΟΛΟΜΙΚΗ ΑΝΑΛΥΣΗ.....	26
1.4.1. Τι είναι ο μεταβολισμός	26
1.4.1.1. Γλυκόλυση.....	28
1.4.1.2. Αναπνοή και κύκλος του Krebs	30
1.4.2. Βιοσυνθετικές οδοί.....	32
1.4.3. Ο μεταβολισμός των περιβαλλοντικών καταπονήσεων	33

1.4.4. Η μεταβολομική ως μέθοδος ανάλυσης	34
1.5. ΣΚΟΠΟΣ	36
2. ΥΛΙΚΑ ΚΑΙ ΜΕΘΟΔΟΙ	37
2.1. Προκαταρκτικά πειράματα	38
2.2. Φυτικό υλικό και συνθήκες ανάπτυξης	38
2.3. Πειραματικό σχέδιο.....	39
2.4. Δειγματοληψία ιστών.....	40
2.5. Χημική ανάλυση	41
2.6. Ταυτοποίηση μεταβολιτών	44
2.7. Βιοπληροφορική ανάλυση	47
3. ΑΠΟΤΕΛΕΣΜΑΤΑ.....	48
3.1 Επίδραση διαφόρων συγκεντρώσεων όζοντος.....	49
3.2. Μακροσκοπικά ορατά συμπτώματα της επίδρασης του όζοντος στο φασόλι.....	51
3.3. Επισκόπηση μεταβολομικής ανάλυσης.....	55
3.4. Επίδραση των επεμβάσεων στο μεταβολισμό του φασολιού ανάλογα με τη χαρακτηριστική χημική ομάδα των μεταβολιτών.....	56
3.5. Επίδραση της EDU, της Penconazole και του όζοντος στις ομάδες μεταβολικών οδών του <i>Phaseolus vulgaris</i>	60
3.5.1. Επίδραση της EDU στις ομάδες μεταβολικών οδών του φασολιού.....	63
3.5.2. Επίδραση της Penconazole στις ομάδες μεταβολικών οδών του φασολιού	68
3.5.3. Η συνεργιστική δράση των ουσιών EDU και Penconazole στις ομάδες μεταβολικών οδών του φασολιού	68
3.5.4. Η επίδραση του όζοντος στις ομάδες μεταβολικών οδών του φασολιού	69
3.6. Αποτελέσματα της συσχέτισης των μεταβολιτών.....	69
3.6.1. Η επίδραση της EDU –μεταβολίτες βιοδείκτες	69
3.6.2. Η επίδραση της Penconazole - μεταβολίτες.....	70
3.6.3. Η συνεργιστική δράση των ουσιών EDU και Penconazole στο μεταβολισμό του φασολιού – μεταβολίτες.....	70
3.6.4. Η επίδραση του όζοντος - μεταβολίτες	70

3.7. Σημαντικοί βιοσημαντές (biomarkers)	71
4. ΣΥΖΗΤΗΣΗ-ΣΥΜΠΕΡΑΣΜΑΤΑ.....	79
4.1. Η επίδραση του όζοντος.....	80
4.2. Η επίδραση της μεταχείρισης με EDU.....	84
4.3. Η επίδραση της μεταχείρισης EDU x O ₃	87
4.4. Η επίδραση της Penconazole	90
4.5. Η επίδραση της Penconazole x O ₃	93
4.6. Μεταβολίτες με ιδιαίτερο ενδιαφέρον	94
4.6.1. Το Ασκορβικό οξύ (Ascorbate).....	94
4.6.2. Η Τρεχαλόζη (Trehalose)	95
4.6.3. Το γ-αμινοβουτυρικό οξύ (GABA).....	97
4.6.4. Το Αιθυλένιο (Ethylene)	98
4.6.5. Το 4-Κουμαρικό οξύ (4-Coumarate)	99
4.6.6. Το α-Λινολενικό οξύ (α-Linolate)	99
4.6.6. Άλλοι μεταβολίτες	100
5. ΒΙΒΛΙΟΓΡΑΦΙΑ	102
ΠΑΡΑΡΤΗΜΑ Α.....	112
6.1. Penconazole-ετικέτα.....	113
6.2. Penconazole-φύλλο δεδομένων ασφάλειας.....	114
6.3. Penconazole-άδεια κυκλοφορίας στην Ελλάδα	131
6.4. Μεταβολίτες που ανιχνεύθηκαν και διαθέσιμες πληροφορίες	147

1



Εισαγωγή

1. ΕΙΣΑΓΩΓΗ

1.1. ΤΟ ΟΖΟΝ

1.1.1. Το όζον, ως χημική ένωση

Το όζον είναι αέριο με ελαφρά κυανό χρώμα, αντιληπτό σε μεγάλες συγκεντρώσεις ή μεγάλη οπτική διαδρομή, με χαρακτηριστική οσμή που μοιάζει με την οσμή του χλωρίου. Η σύντομη εισπνοή του σε μεγάλες σχετικά συγκεντρώσεις αφήνει την αίσθηση της οσμής του για αρκετή ώρα μετά την εισπνοή και μπορεί να απευαισθητοποιήσει την όσφρηση. Η οσμή του όζοντος, στα όρια που γίνεται αισθητή, είναι ιδιάζουσα. Υγροποιείται στους $-111,9\text{ }^{\circ}\text{C}$, παρέχοντας ένα έντονα κυανό υγρό και λαμβάνεται σε σχετικώς καθαρή κατάσταση, επειδή το οξυγόνο υγροποιείται σε πολύ χαμηλότερη θερμοκρασία ($-183,0\text{ }^{\circ}\text{C}$). Στερεοποιείται στους $-192,5\text{ }^{\circ}\text{C}$ παρέχοντας ένα μελανοϊώδες στερεό. Τόσο το υγρό όσο και το στερεό όζον είναι εξαιρετικά ασταθή και διασπώνται εκρηκτικά προς αέριο οξυγόνο. Το όζον διασπάται ταχύτατα σε όξινα διαλύματα ενώ είναι σταθερότερο σε αλκαλικά. Σε θερμοκρασία δωματίου ο χρόνος ημιζωής του σε διαλύματα NaOH 1 M, 5M και 20 M είναι αντιστοίχως 2 min, 40 min 83 h (Greenwood N. και Earnshaw A., 1984, καθώς και Wiberg E. et al., 2002.)

Το όζον είναι ισχυρότατο οξειδωτικό μέσο (μόνο το φθόριο, το ατομικό οξυγόνο, η ρίζα OH και τα υπερξενικά ιόντα είναι πιο οξειδωτικά από αυτό).

Οι υπόλοιπες φυσικοχημικές του ιδιότητες είναι:

Σχετική μοριακή μάζα: 47,998

Διαλυτότητα στο νερό: 0,105 gr/100 mL ($0\text{ }^{\circ}\text{C}$)

Διπολική ροπή: 0,5337 D

Πρώτος ο ολλανδός Martinus Van Marum (1750 – 1837) παρατήρησε ότι ο αέρας κοντά σε μια ηλεκτροστατική γεννήτρια αποκτούσε μια διαφορετική οσμή, όταν η γεννήτρια λειτουργούσε και πραγματοποιούνταν ηλεκτρικές εκκενώσεις.

Παρόμοια οσμή αποκτούσε ο αέρας κατά τη διάρκεια καταιγίδων με ηλεκτρικές εκκενώσεις (αστραπές, κεραυνοί) αποτέλεσμα του σχηματισμού όζοντος. Αυτή η χαρακτηριστική οσμή γίνεται αντιληπτή από τους περισσότερους ανθρώπους σε συγκεντρώσεις 0,02 - 0,05 ppmv ή περίπου το 1/10 της μέγιστης επιτρεπόμενης για έκθεση 15 λεπτών (0,3 ppmv).

Ο Christian Friedrich Schönbein, το 1840, ονόμασε την εκλυόμενη αέρια ουσία κατά την ηλεκτρόλυση ύδατος, όζον, από την ελληνική λέξη όζω (Nicolet, 1979). Ο ελβετός χημικός Jacques – Louis Soret (1827 – 1890) το 1863, απέδειξε ότι το όζον είναι τριατομικό οξυγόνο, γεγονός που επιβεβαιώθηκε από τον Schönbein δύο χρόνια αργότερα.

Το όζον σχηματίζει την προστατευτική στοιβάδα μεταξύ στρατόσφαιρας και μεσόσφαιρας που απορροφά την υπεριώδη ακτινοβολία του ηλίου (κυρίως της περιοχής UV-B, 240-320 nm), λειτουργώντας προστατευτικά για τη χλωρίδα και την πανίδα που βρίσκεται στην επιφάνεια της γης. Βρίσκεται σε ίχνη 0,1 - 1,1 ppmv και η μέγιστη απορρόφησή του παρουσιάζεται στα 255,3 nm (Greenwood N. και Earnshaw A., 1984).

Προφανώς, όταν ακόμα δεν υπήρχε το όζον στην ατμόσφαιρα, οι αρχέγονοι οργανισμοί παρέμεναν στο νερό των ωκεανών και σε αρκετό βάθος όπου προφυλάσσονταν από την υπεριώδη ακτινοβολία. Τα τελευταία 500 εκατομμύρια χρόνια τα κυανοβακτήρια παρήγαγαν με φωτοσύνθεση αρκετό οξυγόνο, μέρος του οποίου μετατράπηκε σε όζον.

Ως δραστικό οξειδωτικό μέσο το όζον είναι αναμενόμενο να προκαλεί φθορές τόσο σε διάφορα υλικά (αποχρωματισμούς, ρωγμώσεις σε ελαστικά αντικείμενα κ.λ.π.) όσο και στους ζωντανούς οργανισμούς (Valavanidis et al. 2009). Για το λόγο αυτό, πολλές δοκιμές αντοχής υλικών στο χρόνο, γίνονται σε ατμόσφαιρες με αυξημένη συγκέντρωση όζοντος ώστε να προσομοιωθούν σε σύντομο χρονικό διάστημα οι επιπτώσεις της μακροχρόνιας έκθεσής τους στην ατμόσφαιρα.

Λόγω της έντονης οξειδωτικής του δράσης χωρίς υπολειμματικότητα το όζον χρησιμοποιείται ως μικροβιοκτόνο και μυκητοκτόνο. Διασπάται ταχύτατα σε οξυγόνο και είναι ένα εξαιρετικό φυσικό αποσμητικό. Για τους λόγους αυτούς εφαρμόζεται ως λευκαντική και αποχρωστική ουσία (π.χ. για άλευρα, λίπη, κηρούς, χαρτί), ως αποσμητικό πολυσύχναστων χώρων (ιδιαίτερα με καπνιστές), ως μέσο «εξυγίανσης» κτιρίων από μικροοργανισμούς και παραμένουσες οσμές, ως εντομοκτόνο σε χώρους αποθήκευσης σπόρων, ως απολυμαντικό εδάφους και πόσιμου ύδατος αλλά και ύδατος για δεξαμενές κολύμβησης. Στην ιατρική χρησιμοποιείται για την αποστείρωση ύδατος και σκευών και στα χημικά εργαστήρια –βιομηχανίες σαν οξειδωτικό αντιδραστήριο. Η χρήση του για την επεξεργασία και απολύμανση φυσικών υδάτων πλεονεκτεί σημαντικά έναντι του χλωρίου - αν και το κόστος είναι μεγαλύτερο- γιατί δεν παραμένουν ίχνη επιβλαβών χλωριούχων οργανικών ενώσεων (π.χ. CHCl₃) που σχηματίζονται από την

αντίδραση του χλωρίου με φυσικά οργανικά συστατικά. Επιπλέον, στην περίπτωση επεξεργασίας λυμάτων, το όζον διασπά τις οργανικές ενώσεις σε μικρότερα μόρια βοηθώντας έτσι τη βιοαποδομησιμότητά τους σε επόμενα στάδια επεξεργασίας (Σαϊτάνης, 2003).

1.1.2. Το όζον στην τροπόσφαιρα

Στην τροπόσφαιρα το όζον σχηματίζεται ως προϊόν χημικών αντιδράσεων μεταξύ οξυγόνου και πτητικών οργανικών ενώσεων (VOCs) ή οξειδίων του αζώτου (NO_x) παρουσία ηλιακής ακτινοβολίας, λειτουργώντας ως ρύπος. Το τροποσφαιρικό όζον καθώς και το διοξείδιο του άνθρακα αυξάνονται συνεχώς στην ατμόσφαιρα, ως αποτέλεσμα της παγκόσμιας κλιματικής αλλαγής (Ainsworth, 2008).

Οι αντιδράσεις που λαμβάνουν χώρα είναι (Krupa et al 1988):

$N_2 + O_2 \rightarrow 2NO$ (Σχηματισμός NO σε συνθήκες υψηλής θερμοκρασίας και πίεσης π.χ. σε μηχανές εσωτερικής καύσης.)

$2NO + O_2 \rightarrow 2NO_2$ (Το NO οξειδώνεται από το ατμοσφαιρικό οξυγόνο προς το πορτοκαλόχρουν αέριο NO₂.)

$NO_2 + h\nu (UV) \rightarrow NO + O\cdot$ (Υπό την επίδραση υπεριώδους ακτινοβολίας το NO₂ διασπάται παρέχοντας ατομικό οξυγόνο και το NO επανέρχεται στον κύκλο της αντίδρασης. Η αντίδραση προϋποθέτει ηλιοφάνεια.)

$O\cdot + O_2 \rightarrow O_3$ Το ατομικό οξυγόνο αντιδρά με το μοριακό οξυγόνο παρέχοντας όζον. Να σημειωθεί ότι μεγάλες συγκεντρώσεις NO καταστρέφουν το παραγόμενο όζον λόγω οξειδωσής του προς NO₂.

Οι παραπάνω μέθοδοι σχηματισμού του όζοντος εξηγούν τη διαφοροποίηση του όζοντος ως ρύπου από τους υπόλοιπους. Οι μέγιστες τιμές του μετρώνται κατά τις πρώτες απογευματινές ώρες, ενώ οι μέγιστες τιμές για το μονοξείδιο του αζώτου, το μονοξείδιο του άνθρακα, το διοξείδιο του θείου, και γενικά για όλους τους πρωτογενείς ρύπους, μετρούνται γύρω στην 9^η πρωινή ώρα. Η κατανομή των τιμών του δείχνει αυξημένες συγκεντρώσεις όχι στο κέντρο των πόλεων –πηγή ρύπων- αλλά στην περιφέρειά τους, γι' αυτό και αποκαλείται «ρύπος των προαστίων». Αυτό συμβαίνει γιατί, όπως φάνηκε στις παραπάνω αντιδράσεις, στο σχηματισμό του όζοντος συνεισφέρουν το ηλιακό φως, τα οξείδια του αζώτου και οι υδρογονάνθρακες (Lefohn, 1992). Στη διάρκεια των χημικών αντιδράσεων

μέσω των οποίων παράγεται ο ρύπος αυτός, οι οποίες διαρκούν αρκετές ώρες, αέρια ρεύματα παρασύρουν τόσο τα αντιδρώντα όσο και τα προϊόντα συστατικά προς διάφορες κατευθύνσεις απομακρύνοντας τα από τις πηγές τους. Επίσης, σε αυτές τις απομακρυσμένες περιοχές απουσιάζουν οι άλλοι ρύποι που αλληλεπιδρούν με το όζον και το διασπούν σε άλλες μορφές ή ενώσεις (Heliotis et al., 1988 και Chaloulakou et al., 1999).

1.1.3. Τα επίπεδα του τροποσφαιρικού όζοντος - μελλοντικές τάσεις

Στην τροπόσφαιρα που δεν έχει δεχτεί ανθρωπογενείς επιδράσεις το όζον υπάρχει σε χαμηλές συγκεντρώσεις 5 έως 15 ppb (Marengo et al., 1994).

Οι πρώτες μετρήσεις όζοντος πραγματοποιήθηκαν στα μέσα της δεκαετίας του 1800 σε διάφορα μέρη της Ευρώπης και των Η.Π.Α. Ωστόσο, η παρακολούθηση συνεχίστηκε μόνο σε μερικούς σταθμούς με αποτέλεσμα τα μακροχρόνια δεδομένα να είναι περιορισμένα.

Στην Ελλάδα οι Cartalis και Varotsos (1994) μελέτησαν τις συγκεντρώσεις του όζοντος στην Αθήνα κατά τις αρχές και τα τέλη του 20^{ου} αιώνα παρατηρώντας αύξηση των συγκεντρώσεων του από 28,2 έως 57,4 ppb κατά τη διάρκεια της ημέρας, και από 26,6 έως 48,5 ppb κατά τη διάρκεια της νύχτας. Οι μετρήσεις που έγιναν από τους Kalabokas et al. (1999) για τα έτη 1987- 1997 ξεπερνούσαν συχνά το όριο ασφαλείας των 110 $\mu\text{g m}^{-3}$, (8-h μέσος όρος) τόσο στους σταθμούς μέτρησης των Λιοσίων όσο και της Νέας Σμύρνης. Η παρουσία όζοντος έχει εντοπιστεί σε διάφορες αγροτικές περιοχές της Ελλάδας (Saitanis and Karandinos, 2001 ; Saitanis, 2008) αλλά και συγκεκριμένα στην Τρίπολη (Saitanis et al., 2015a).

Όπως δείχνουν τα στοιχεία, οι συγκεντρώσεις όζοντος έχουν υπερδιπλασιαστεί τον τελευταίο αιώνα (Meehl et al., 2007) και υπάρχουν ενδείξεις για αύξηση της ετήσιας μέσης τιμής από 0,1 έως 1 ppb ανά έτος (Coyle et al., 2002). Στο Ηνωμένο Βασίλειο, η μέση ετήσια συγκέντρωση όζοντος στις αγροτικές περιοχές προβλέπεται να φτάσει τα 30-40 ppb. Αυτό, θα οδηγήσει σε διπλασιασμό των τιμών του AOT40 το έτος 2030 (Coyle et al., 2002). Ο ρυθμός αύξησης του τροποσφαιρικού όζοντος πάνω από την ανατολική Ασία (Akimoto and Narita 1994; Li et al., 2011 ; Ding et al., 2008), είναι μεγαλύτερος από οποιαδήποτε άλλη περιοχή του πλανήτη γεγονός που μπορεί να αποδοθεί στην ταχέως αναδυόμενη εκβιομηχάνιση

της ασιατικής ηπείρου (Ding et al., 2008). Η αύξηση αυτή προκάλεσε αύξηση -λόγω μεταφοράς του όζοντος- και στις συγκεντρώσεις που μετρήθηκαν στη Β. Αμερική (Mauzerall et al., 2000) αλλά και στη Τζακάρτα (Rai et al., 2011).

1.1.4. Το όζον ως τοξικός παράγοντας

α) Επιπτώσεις στον άνθρωπο

Το όζον στον άνθρωπο προκαλεί αναπνευστικά προβλήματα και έχει κατηγορηθεί για πρόωρες γεννήσεις ή γεννήσεις λιποβαρών βρεφών και άλλα συμπτώματα ανάλογα με τη δόση (συγκέντρωση x διάρκεια έκθεσης), όπως παρουσιάζονται στον

Πίν. 1. (Ritz et al., 2008).

Πίν. 1 Αποτελέσματα εισπνοής αέρα με όζον σε διάφορες συγκεντρώσεις. (Ritz et al., 2008).

Παρατηρούμενο αποτέλεσμα	Συγκέντρωση (ppmv)
Κατώφλιο οσμής (φυσιολογικά άτομα)	0,01 - 0,04
Ελαφρύς ερεθισμός οφθαλμών, μύτης και λάρυγγα	>0,1
Δυσκολία αναπνοής, μείωση κατανάλωσης οξυγόνου, ερεθισμός πνευμόνων, έντονη κόπωση, πόνοι στο στήθος, ξηρός βήχας	0,5 - 1,0
Πονοκέφαλος, ερεθισμός αναπνευστικού, πιθανό κώμα, πιθανή πνευμονία σε περιπτώσεις έκθεσης μεγάλης διάρκειας	1,0 -10
Θανατηφόρα για μικρά ζώα μέσα σε 2 ώρες	15-20
Θανατηφόρα για έκθεση λίγων λεπτών	>1.700

Με την Οδηγία 2002/3/ΕΚ προσδιορίζονται οι οριακές και κατευθυντήριες τιμές για τις συγκεντρώσεις όζοντος στον ατμοσφαιρικό αέρα (Κ.Υ.Α. Η.Π.38638/2016, Φ.Ε.Κ. 1334/Β/21.9.05). Σύμφωνα με αυτή η οριακή τιμή (μέγιστη ημερήσια 8ωρη μέση τιμή) για την προστασία της ανθρώπινης υγείας είναι 120 $\mu\text{g}/\text{m}^3$ των οποίων δεν πρέπει να σημειώνεται υπέρβαση περισσότερες από 25 φορές κατά μέσο όρο ανά ημερολογιακό έτος για διάστημα τριών ετών. Το όριο ενημέρωσης της Επιτροπής Ε.Κ. είναι

180 $\mu\text{g}/\text{m}^3$ (μέσος όρος 1 ώρας) και το όριο συναγερμού είναι 240 $\mu\text{g}/\text{m}^3$ μετρούμενα επί τρεις συνεχείς ώρες.

β. Οι επιδράσεις του όζοντος στα φυτά

Το όζον παρουσιάζει έντονη φυτοτοξική δράση λόγω της ικανότητας διείσδυσης από τα στομάτια των φύλλων και της οξειδωτικής του δράσης σε πολλά ένζυμα και βιομόρια. Σύμφωνα με τους Leisner και Ainsworth (2012) είναι ένας από τους πιο καταστροφικούς αέριους ρύπους για την ανάπτυξη και την παραγωγικότητα των φυτών.

Η δράση του όζοντος στα φυτά δεν αφήνει κανένα υπόλειμμα, κι έτσι δεν είναι εφικτή η ανίχνευσή του με χημική ανάλυση των ιστών. Τα αποτελέσματα της δράσης του είναι ορατά είτε μετά από ένα βραχυπρόθεσμο επεισόδιο υψηλής συγκέντρωσης όζοντος, είτε μετά από ένα μακροπρόθεσμο επεισόδιο χαμηλής συγκέντρωσης. Ο τύπος και η σοβαρότητα των συμπτωμάτων εξαρτώνται από διάφορους παράγοντες συμπεριλαμβανομένης της διάρκειας και της συγκέντρωσης της έκθεσης, τις καιρικές συνθήκες, την προηγούμενη κατάσταση υγείας του φυτού αλλά και τη γενετικά καθορισμένη αντοχή τους.

Μετά από ικανή έκθεση στο όζον, τα κύτταρα καταρρέουν και νεκρώνονται, δημιουργώντας νεκρωτικές κηλίδες στην επιφάνεια του ελάσματος. Η καταστροφή της φυλλικής επιφάνειας οδηγεί στη μείωση της φωτοσυνθετικής ικανότητας του φυτού και κατ' επέκταση της συνολικής του ανάπτυξης αλλά και της ικανότητάς του να αντιδρά στην καταπόνηση από εξωτερικούς βιοτικούς και αβιοτικούς παράγοντες (Caregnato et al., 2013). Στα πλατύφυλλα δένδρα, συνήθως τα φύλλα παρουσιάζουν κόκκινες ή μαύρες περιοχές μεταξύ των νεύρων, οι οποίες αποτελούνται από μικροσκοπικά στίγματα, ως αποτέλεσμα της νέκρωσης των κυττάρων. Τελικό αποτέλεσμα είναι η πρόωρη γήρανση και πτώση των φύλλων. Στα κωνοφόρα, συνήθως παρουσιάζονται κιτρινωπές κηλίδες, αλλά μπορούν να υπάρξουν και άλλα ορατά συμπτώματα, όπως κιτρινωπές λωρίδες στις βελόνες, κιτρίνισμα ή ξήρανση των άκρων των βελόνων ή και πρόωρη πτώση των βελόνων (Heliotis, 1988).

Το φασόλι είναι ένα φυτό ευαίσθητο στο όζον (Salvatori et al., 2013) και τα συμπτώματα που παρατηρούνται μακροσκοπικά είναι ερυθρόχρωος μεταχρωματισμός, χλώρωση, χλωρωτικές και νεκρωτικές κηλίδες, καχεξία, μείωση της φωτοσυνθετικής ικανότητας, μειωμένη παραγωγή κ.α.

Οι Ojanperä et al. (1992) παρατήρησαν ότι η χλώρωση εμφανίστηκε στην άκρη των φύλλων με βασιπέταλη κατεύθυνση και τελική χλώρωση ολόκληρου του ελάσματος. Εντόπισαν μια σειρά προοδευτικών αλλαγών στα κύτταρα του μεσόφυλλου, όπως μείωση της ποσότητας του κυτοπλάσματος, αύξηση των κενοτοπίων επιρροή των χλωροπλαστών με μείωση της επιφάνειάς τους και στη συνέχεια χαλάρωση της επαφής της κυτταρικής μεμβράνης με το κυτταρικό τοίχωμα και τελικό αποτέλεσμα την πρόωρη γήρανση των φύλλων.

Οι Kraft et al. (1996), προσπάθησαν να συσχετίσουν ορατές και άορατες δράσεις του όζοντος μελετώντας τη φασματική ανακλαστικότητα φύλλων στο ορατό φως. Ενώ ανιχνεύθηκε μειωμένη υπέρυθη ανακλαστικότητα από τα φύλλα τριφυλλιού και αραβοσίτου που είχαν εκτεθεί στο όζον, στο σίτο δεν παρατηρήθηκε καμία αλλαγή ακόμα κι όταν υπήρχαν ήδη συμπτώματα της δράσης του όζοντος. Αντίθετα, τα φύλλα του τριφυλλιού εμφάνισαν μειωμένη ανακλαστικότητα στο υπέρυθρο φως πριν ακόμα γίνουν ορατά τα συμπτώματα.

Οι Sachin et al. (2014), υπολόγισαν τις επιπτώσεις του όζοντος στην παραγωγή φυτών μεγάλης καλλιέργειας της Ινδίας για την πρώτη δεκαετία του 21^{ου} αιώνα. Ο σίτος δέχτηκε τη μεγαλύτερη επιρροή με απώλειες $3,8 \pm 0,8$ εκατομμύρια τόνους, ποσοστό περίπου 9,2 % της εθνικής παραγωγής. Η ποσότητα αυτή ήταν αρκετή για να θρέψει περίπου 94 εκατομμύρια ανθρώπων που ζουν κάτω από το όριο της φτώχειας στην Ινδία.

Για την εμφάνιση φυτοτοξικότητας όζοντος, έχουν μεγάλη σημασία τόσο η συγκέντρωση όσο και η διάρκεια έκθεσης, το σχήμα της καμπύλης έκθεσης και η συχνότητα των μέγιστων τιμών (Musselman and Massman, 1999). Στις μέρες μας, συχνά η έκθεση στο όζον εκφράζεται ως η σωρευμένη έκθεση πάνω από το όριο των 40 ppb (AOT40) και υπολογίζεται ως το άθροισμα των διαφορών των μέσων ωριαίων συγκεντρώσεων (ppb) του όζοντος και του κατωφλίου των 40 ppb, για τις ώρες που υπάρχει επαρκής για τη φωτοσύνθεση ηλιοφάνεια (Fuhrer et al., 1997). Η χρονική βάση για τον υπολογισμό του AOT40 είναι οι τρεις μήνες, συνήθως οι μήνες (Μάιος, Ιούνιος, Ιούλιος). Ως κρίσιμη τιμή έχει οριστεί η τιμή 3000 ppb*h κάτω από το οποίο δεν παρουσιάζονται συνήθως μακροσκοπικά ορατά συμπτώματα φυτοτοξικότητας.

Μια διαφορετική προσέγγιση για τη διαπίστωση της παρουσίας φυτοτοξικών επιπέδων όζοντος προσφέρουν τα φυτά βιοδείκτες όζοντος, συγκεκριμένα η ποικιλία καπνού BelW3 (*Nicotiana tabaccum* L.) η ποικιλία

τριφυλλιού Regal (*Trifolium repens* L.) και οι ποικιλίες φασολιού R123 και S156 (Agathokleous et al., 2017).

Για τα Μεσόγεια (Saitanis et al. 2003), αλλά και τις πόλεις της Κορίνθου (Saitanis, 2003) και του Βόλου (Saitanis et al. 2004) έχουν διαπιστωθεί συγκεντρώσεις όζοντος που μπορούν να προκαλέσουν φυτοτοξικότητα. Οι Mills et al. το 2011 παρουσίασαν τις επιπτώσεις του όζοντος στις καλλιέργειες και την αυτοφυή βλάστηση δεκαοκτώ ευρωπαϊκών χωρών (συμπεριλαμβανομένης και της Ελλάδας) για τα έτη 1990-2006. Στο Ηράκλειο της Κρήτης το 2012, οι Goumenaki et al., χρησιμοποιώντας ως δείκτη τη φασολιά (*Phaseolus vulgaris* L.) διαπίστωσαν ότι οι επιπτώσεις που παρατηρήθηκαν κατά τη διάρκεια των πειραμάτων έδειξαν ότι το όζον έχει ήδη αρνητικές επιπτώσεις στις κηπευτικές καλλιέργειες σε όλο το νησί.

1.1.5. Μηχανισμός δράσης του όζοντος στα φυτά

Η είσοδος του όζοντος στα φυτά γίνεται μέσω των στοματίων των φύλλων με αποτέλεσμα η αγωγιμότητά τους να καθορίζει την ποσότητα του ρύπου που φτάνει στο εσωτερικό του φυτού (Heath, 2008). Η αγωγιμότητα των στοματίων ορίζεται ως η ποσότητα του CO₂ που εισέρχεται από τα στομάτια ή η ποσότητα του νερού υπό μορφή υδρατμών που εξέρχεται από αυτά.

Τόσο η χρόνια όσο και η βραχεία έκθεση στο όζον επιδρά στις φυσιολογικές και τις βιοχημικές λειτουργίες των φυτών πριν ακόμα εμφανιστεί οποιοδήποτε σύμπτωμα (Heath and Taylor, 1997). Ο βαθμός της επίδρασης εξαρτάται από την ποσότητα του ρύπου που φτάνει στα σημεία στόχους καθώς και από τη δυνατότητα των κυττάρων να διατηρούν την ομοιόστασή τους καλύπτοντας μεταβολικές αλλαγές. Το όζον παρεμβαίνει σε διάφορους μηχανισμούς και επιδρά άμεσα (με την παραγωγή ενεργών μορφών οξυγόνου, Reactive Oxygen Species, ROS) ή έμμεσα σε αυτούς.

Η ευαισθησία των φυτών στο όζον συχνά σχετίζεται με την απόκριση των στοματίων. Η έκθεση σε όζον συχνά προκαλεί κλείσιμο των στοματίων, με αποτέλεσμα φυτά που έχουν τη δυνατότητα να κλείνουν γρήγορα τα στομάτιά τους να παρουσιάζουν καλύτερη ανοχή στο όζον (Sarkar et al., 2009).

Το όζον φαίνεται να δρα ως αέριο μόριο μετάδοσης σήματος αντίστοιχο με τους διεγέρτες (elicitors) των μυκήτων (Ebel and Cosio,

1994). Έχει αποδειχτεί ότι εγείρει αποκρίσεις που οδηγούν σε δραστικές αλλαγές έκφρασης γονιδίων (Kubo, 2002) ακόμα και πριν την εμφάνιση μακροσκοπικά ορατών συμπτωμάτων (Mahalingam and Fedoroff, 2003; Mahalingam et al, 2005). Ως αποτέλεσμα της έκθεσης στο όζον, τα φυτά προάγουν ή καταστέλνουν γονιδιακές εκφράσεις (Sandermann Jr, 1996), γεγονός που αντιδιαστέλλεται με την παλαιότερη επικρατούσα άποψη που υποστήριζε ότι το όζον διασπάται στον αποπλαστικό χώρο. Ωστόσο, ο ακριβής μηχανισμός, οι εμπλεκόμενοι μεμβρανικοί υποδοχείς και η μετάδοση του σήματος παραμένουν αδιευκρίνιστα. Ορισμένα λιπίδια κυτταρικών μεμβρανών μπορούν να χρησιμεύσουν ως γενικοί υποδοχείς, αφού μπορούν να οξειδωθούν παρουσία όζοντος (Baier et al., 2005).

Υπάρχουν επιστημονικές μελέτες που καταδεικνύουν ότι η ευαισθησία στο όζον σχετίζεται κατά κανόνα με τη δράση του ασκορβικού οξέος στους ιστούς του φύλλου (Conklin and Barth, 2004). Επιπρόσθετα, οι Baier et al. (2005) σημείωσαν ότι οι δραστικές μορφές οξυγόνου (Reactive Oxygen Species, ROS) που παράγονται αποπλαστικά μπορούν να ενεργοποιήσουν την αντλία Ca^{2+} επάγοντας περαιτέρω το σήμα. Το γεγονός αυτό επιβεβαιώνει τις έρευνες των Clayton et al. (1999) οι οποίοι κατέγραψαν συγκεκριμένη αύξηση στην ενδοκυτταρική συγκέντρωση Ca^{2+} όταν η ατμοσφαιρική συγκέντρωση του όζοντος ξεπερνούσε τα 70 ppb. Όσον αφορά στη μετάδοση του σήματος, οι διάλυτοι Ca^{2+} της κυτταρικής μεμβράνης θα μπορούσαν επίσης να λειτουργούν ως αισθητήρες των ROS.

Μελέτες σε φυτά καπνού που εκτέθηκαν σε όζον έχουν δείξει ότι οι ROS μπορούν να διαδραματίσουν ρόλο αγγελιαφόρου στη μετάδοση του σήματος που ενεργοποιεί μια αλληλουχία διαδικασιών, όπως μείωση των επιπέδων των αντιοξειδωτικών ενζύμων καταλάση και υπεροξειδάση του ασκορβικού οξέος αλλά και συσσώρευση των ROS (Foyer and Noctor, 2005).

Οι αλλαγές στην ομοιόσταση του H_2O_2 πυροδότησαν προγραμματισμένο κυτταρικό θάνατο και μια αλληλουχία αντιδράσεων που οδήγησε σε παραγωγή της οξειδάσης NADPH (Dat et al., 2003).

Αντίστροφα, όταν σε μεταλλαγμένα φυτά *Arabidopsis thaliana* *rcd1*, εφαρμόστηκε μια ουσία που δρα ανασταλτικά στην παραγωγή οξειδάσης NADPH, το διφαινυλενικό ιώδιο, η συσσώρευση των ROS ανεστάλη και τα φυτά εμφάνισαν λιγότερα μακροσκοπικά ορατά συμπτώματα (Overmyer et al., 2000).

1.2. ΦΥΤΟΠΡΟΣΤΑΤΕΥΤΙΚΕΣ ΟΥΣΙΕΣ ΕΝΑΝΤΙ ΤΟΥ ΟΖΟΝΤΟΣ

Από τα δεδομένα που έχουν παρουσιαστεί στις προηγούμενες παραγράφους, κρίνεται επιτακτική η προστασία των φυτών από το όζον. Όμως, η άνευ προηγουμένου, αναζήτηση προστατευτικής ουσίας είναι εξαιρετικά δύσκολη. Για την πιθανή προστατευτική -έναντι του όζοντος- δράση τους έχουν ελεγχθεί πολλές και ετερόκλητες ουσίες, από το κοινό ελαιόλαδο (Agathokleous et al., 2016b) μέχρι ουσίες που δεν είναι διαθέσιμες στο εμπόριο, όπως η αιθυλενεδιουρία (EDU) (Manning et al., 2011). Έχουν επίσης ελεγχθεί πολλά αγροχημικά σκευάσματα που ήδη κυκλοφορούν στην αγορά για την προστασία των φυτών και τον έλεγχο παθογόνων και ασθενειών (Saitanis et al., 2015b).

Παράγοντες που πρέπει να ληφθούν υπόψη κατά την αναζήτηση της κατάλληλης ουσίας είναι οι άλλες επιδράσεις που θα έχει η εφαρμογή των ουσιών αυτών στο φυτό. Για παράδειγμα, το γεγονός ότι το κλείσιμο των στοματίων προστατεύει τα φυτά από το όζον δεν μπορεί να χρησιμοποιηθεί, γιατί κάτι τέτοιο θα είχε δυσμενή επίπτωση στην ανάπτυξη του φυτού.

Ένα άλλο παράδειγμα ανεπιτυχούς προσπάθειας είναι η μείωση της στοματικής αγωγιμότητας, η οποία ταυτόχρονα εμποδίζει την πρόσληψη CO₂ από τα φυτά με συνέπεια τη μείωση της ανάπτυξης των φυτών και της απόδοσή τους (Agathokleous et al., 2016b).

1.2.1. Η Penconazole ως φυτοπροστατευτική έναντι του όζοντος ουσία

Penconazole είναι το κοινό όνομα (κατά την IUPAC) της ουσίας 1-[2-(2,4-Dichlorophenyl)-2-propylethyl]-1*H*-1,2,4-triazole με μοριακό τύπο C₁₃H₁₅Cl₂N₃ και με μοριακό βάρος 284.2. Ανήκει στην οικογένεια των τριαζολών (DMIs) οι οποίες σε βιοχημικό επίπεδο αναστέλλουν τα ένζυμα της αποφωσφορυλίωσης τα οποία μετατρέπουν το ATP σε ADP, με αποτέλεσμα την παρεμπόδιση της βιοσύνθεσης του ενζύμου C14 διμεθυλάση, το οποίο μετατρέπει τη λανοστερόλη σε εργοστερόλη. Η εργοστερόλη, είναι ένα βασικό συστατικό της κυτταρικής μεμβράνης των μυκήτων. Ως συνέπεια, παρεμποδίζει τη βλάστηση των σπορίων, την ανάπτυξη και την αναπαραγωγή των μυκήτων. Είναι γνωστό ότι στην Penconazole οξειδώνεται το προπυλικό άκρο της ανθρακικής αλυσίδας και οι υδροξυλιωμένες ενώσεις που σχηματίζεται μπορούν να σχηματίσουν

γλυκοζίτες. Το μόριο μπορεί επίσης να μεταβολιστεί ως τριαζολαμίνη και τριαζολακετικό οξύ (Roberts and Hutson, 1998).

Η Penconazole ως σκεύασμα διατίθεται από την Syngenta Hellas με το εμπορικό όνομα TOPAS (Παράρτημα 6.1.). Η κυκλοφορία του εγκρίθηκε από την αρμόδια αρχή στις 14.11.2016 και ανανεώθηκε μέχρι το έτος 2020 (αριθμός έγκρισης 60437, Παράρτημα 6.3.). Το σκεύασμα στη σύνθεσή του περιέχει 10% penconazole και είναι διασυστηματικό μυκητοκτόνο με προστατευτική και θεραπευτική δράση για την καταπολέμηση του ωιδίου σε μηλοειδή, πυρηνόκαρπα, αμπέλι, λαχανικά, καπνό, ανθοκομικά και άλλες καλλιέργειες. Διατίθεται σε μορφή γαλακτωματοποιήσιμου υγρού (EC), σε φιάλες των 100 και 400 mL. Το φύλλο δεδομένων ασφαλείας, σύμφωνα με τον Κανονισμό (ΕΕ) Νο. 1907/2006 παρατίθεται στο Παράρτημα.

1.2.2. Η αιθυλενεδιουρία (EDU)

Ήδη από το 1978 έχει αναφερθεί ότι η ουσία N-[-2-(2-oxo-1-imidazolidinyl) ethyl]-N'-phenylurea] (συντ. EDU) προστατεύει σημαντικά τα φυτά έναντι του όζοντος (Carnahan et al., 1978). Έκτοτε, χρησιμοποιείται ευρέως για ερευνητικούς σκοπούς (Saitanis, 2008; Paoletti et al., 2009; Feng et al., 2010; Rai et al., 2011) αν και δεν έχει αποσαφηνιστεί ο τρόπος δράσης της (Harris and Manning, 2010; Agathokleous, 2017). Μπορεί να εφαρμοστεί είτε με ριζοπότισμα είτε με ψεκασμό του φυλλώματος σε συγκεντρώσεις 200-400 mg L⁻¹. Αν και δεν είναι τοξική για τα φυτά στις συγκεντρώσεις που δρα προστατευτικά έναντι του όζοντος, συγκεντρώσεις EDU μεγαλύτερες των 600 mg L⁻¹ μπορούν να είναι τοξικές σε ευαίσθητους φυτικούς οργανισμούς (Agathokleous et al., 2016c).

1.3. ΤΟ ΦΑΣΟΛΙ (*Phaseolus vulgaris* L.)

Το φασόλι κατάγεται από την Κεντρική Αμερική και συγκεκριμένα από το νότιο Μεξικό. Σύμφωνα με μελέτες ραδιενεργού άνθρακα το *Phaseolus coccineus* καλλιεργήθηκε στο Μεξικό περί το 2.000 π.Χ. Στην Ευρώπη πιστεύεται ότι μεταφέρθηκαν στα μέσα του 16ου αιώνα στην Αγγλία, ενώ στην Ελλάδα στο τέλος του ίδιου αιώνα.

Το φασόλι είναι φυτό ποώδες ή αναρριχώμενο, ουδέτερο στη φωτοπερίοδο. Οι ποικιλίες που καλλιεργούνται διακρίνονται, ανάλογα με

τον τύπο βλαστικής ανάπτυξης, σε νάνες, ημιαναρριχώμενες και αναρριχώμενες. Επίσης, κατατάσσονται ανάλογα με τα χαρακτηριστικά του λοβού και του σπόρου, καθώς και τον τρόπο κατανάλωσης. Η βιομηχανία κατάψυξης προτιμά ποικιλίες νάνες με πράσινο ελλειπτικό ή στρογγυλής διατομής λοβό, χωρίς ίνες. Για κονσερβοποίηση, προτιμούνται ποικιλίες με λευκούς ή ανοιχτόχρωμους σπόρους, γιατί το επεξεργασμένο προϊόν έχει ελκυστικό χρώμα και επιπλέον, γιατί δε χρωματίζεται η υγρή φάση στην κονσέρβα από τις χρωστικές ουσίες των έγχρωμων σπόρων. Το φασόλι καλλιεργείται ως κηπευτικό όταν ο στόχος της καλλιέργειας είναι η συγκομιδή των πράσινων ανώριμων λοβών του. Οι λοβοί τρώγονται είτε σε νωπή κατάσταση είτε αφού έχουν διατηρηθεί σε θάλαμο κατάψυξης. Συγκομίζονται άγουροι, όταν έχουν ακόμα πράσινο χρώμα και το σχήμα τους μπορεί να είναι επίμηκες, πεπλατυσμένο ή κυλινδρικό. Οι ποικιλίες φασολιού που καλλιεργούνται για τους ξηρούς σπόρους είναι νάνες ή αναρριχώμενες, οι λοβοί τους περιέχουν 4-9 σπέρματα που ποικίλλουν σε μέγεθος και χρώμα.

Στην Ελλάδα καλλιεργούνται ποικιλίες του *Phaseolus vulgaris* L. αλλά και ποικιλίες *Phaseolus coccineus* L. που είναι αναρριχώμενες και παράγουν σπόρους λευκούς, μεγάλου μεγέθους (γίγαντες, ελέφαντες) που καταναλώνονται ξηροί. Όσον αφορά τις ποικιλίες που καλλιεργούνται για νωπό φασόλι (φασολάκι) στην Ελλάδα, χρησιμοποιούνται αρκετοί γονότυποι που εισάγονται από το εξωτερικό και καλλιεργούνται κυρίως για τη βιομηχανία. Όμως, σε αρκετά μεγάλη κλίμακα, καλλιεργούνται για την αγορά νωπής κατανάλωσης και τοπικές παραδοσιακές ποικιλίες, όπως τα μπαρμπούνια (νάνα και αναρριχώμενα), τα καναρίνια (αναρριχώμενα), οι αισέδες κλπ. Το φασόλι με βάση την έκταση είναι η πέμπτη κατά σειρά καλλιέργεια, ακολουθώντας την πατάτα, τη νωπή τομάτα, το καρπούζι και το κρεμμύδι.

Το φασόλι συμπεριλαμβάνεται σε προγράμματα αμειψισποράς, όπου, ως ψυχανθές παρέχει άζωτο στις επόμενες καλλιέργειες προερχόμενο από τη συμβιωτική αζωτοδέσμευση (Giller and Cadisch, 1995). Επίσης, χρησιμοποιείται αποτελεσματικά σε συστήματα συγκαλλιέργειας με άλλα κύρια καλλιεργούμενα είδη, όπως για παράδειγμα με κύρια καλλιέργεια το κουνουπίδι (Yildirim and Guvenç, 2005) ή το γλυκοκαλάμποκο, αυξάνοντας το εισόδημα ανά μονάδα καλλιεργούμενης επιφάνειας. Επίσης, καλλιεργείται υδροπονικά σε θερμοκηπιακές καλλιέργειες (Kontopoulou et al., 2017).

1.3.1. Συνθήκες καλλιέργειας του φασολιού

1.3.1.1. Κλιματικές συνθήκες καλλιέργειας του φασολιού

Το φασόλι ευδοκμεί σε θερμές περιόδους του έτους και δεν αντέχει στον παγετό. Θερμοκρασίες κάτω από 15 °C και πάνω από 30 °C είναι βλαβερές για το φυτό. Πάντως, ο μικρός βιολογικός του κύκλος επιτρέπει την καλλιέργειά του ακόμη και σε περιοχές των εύκρατων ζωνών με μικρή βλαστική περίοδο. Κατά τη σπορά, οι θερμοκρασίες εδάφους σε βάθος 5cm περίπου, πρέπει να είναι 15-30 °C με άριστη τους 26-27 °C. Στους 15 °C ο σπόρος φυτρώνει σε 16 ημέρες, στους 25 °C φυτρώνει σε 6 ημέρες (αλλά μόνο σε ποσοστό 50% περίπου), ενώ σε θερμοκρασίες άνω των 35 °C και κάτω των 10-12 °C το φύτεμα των σπόρων των περισσότερων ποικιλιών είναι αδύνατο. Οι άριστες θερμοκρασίες αέρα για ανάπτυξη του φυτού είναι 21-26 °C. Η καρπόδεση είναι αδύνατη σε θερμοκρασίες κάτω από 10°C και άνω των 32-33 °C. Ο συνδυασμός υψηλής θερμοκρασίας και χαμηλής σχετικής υγρασίας αέρα προκαλεί ανθόρροια (πτώση των ανθέων). Πολύ υψηλές θερμοκρασίες, ιδιαίτερα σε συνδυασμό με έλλειψη υγρασίας στο έδαφος, μπορεί να προκαλέσουν ατελή γονιμοποίηση με αποτέλεσμα φτωχή ανάπτυξη των σπόρων και παραμορφωμένους λοβούς. Οι χαμηλές θερμοκρασίες κατά την περίοδο ωρίμανσης των λοβών το φθινόπωρο, μπορεί να εμποδίσουν την κανονική ανάπτυξη των σπόρων, με αποτέλεσμα κενούς λοβούς. Μεγάλη σχετική υγρασία και βροχερός καιρός μπορεί να προκαλέσουν ανθόρροια. Οι ποικιλίες διαφέρουν ως προς την ευπάθειά τους σε ακραίες συνθήκες του περιβάλλοντος.

1.3.1.2. Εδαφικές συνθήκες καλλιέργειας του φασολιού

Τα καλύτερα εδάφη για την ανάπτυξή του είναι τα καλά στραγγιζόμενα, ελαφριά, σκοτεινά καφέ και μαύρα, που έχουν υψηλό ποσοστό οργανικής ουσίας, ενώ δεν ανέχεται τα αλκαλικά και αλατούχα εδάφη. Σε γενικές γραμμές, ελαφρά εδάφη, που στραγγίζουν και θερμαίνονται νωρίς την άνοιξη, είναι κατάλληλα για πρώιμη σπορά. Αμμώδη ως και αργιλλοπηλώδη και οργανικά εδάφη μπορεί να χρησιμοποιηθούν για την καλλιέργεια του φασολιού, στα βαριά όμως δε λαμβάνονται υψηλές αποδόσεις. Φτωχή στράγγιση μπορεί να προκαλέσει σήψη της ρίζας. Το φυτό προτιμά ελαφρώς όξινα εδάφη (pH 5,5-6,5) αλλά αναπτύσσεται ικανοποιητικά και σε pH 5,5-7,0. Σε αλκαλικά όμως εδάφη, στα οποία μπορεί να παρατηρηθεί έλλειψη μαγγανίου (Mn), δεν ευδοκμεί.

1.3.2. Πολλαπλασιασμός του φασολιού

Ο πολλαπλασιασμός του φασολιού γίνεται με απευθείας σπορά στο χωράφι. Η προετοιμασία φυτών σε σπορείο και εν συνεχεία η μεταφύτευσή τους στο χωράφι βρίσκει περιορισμένη πρακτική εφαρμογή, γιατί η προετοιμασία μεγάλου αριθμού φυτών που απαιτούνται στην περίπτωση του φασολιού είναι κοπιαστική και το κόστος είναι υψηλό. Με την απευθείας σπορά, η βλάστηση, ανάπτυξη και καρποφορία γίνονται σε σύντομα χρονικά διαστήματα, υπό την προϋπόθεση βέβαια ότι η θερμοκρασία εδάφους και ατμόσφαιρας κατά και μετά την απευθείας σπορά, είναι σε κατάλληλα επίπεδα.

1.3.3. Η διατροφική αξία του φασολιού

Ο άνθρωπος καταναλώνει είτε τους φρέσκους λοβούς του φασολιού είτε τους σπόρους αποξηραμένους. Πρόκειται για ένα τρόφιμο με υψηλή διατροφική αξία γι' αυτό και του αποδόθηκε ο χαρακτηρισμός «κρέας του φτωχού». Στην Ελλάδα καθιερώθηκε ως το «εθνικό φαγητό» χάρη στην μεγάλη αξία των ξερών φασολιών ως βασική τροφή. Τα φασόλια είναι πλούσια τροφή σε λευκώματα και πρωτεΐνες, με κύρια την φασεολίνη.

Οι υδατάνθρακες που περιέχουν τα φασόλια, απαρτίζονται από άμυλο και πεντόζες, το δε λίπος του είναι πλούσιο σε λεκιθίνη και φωσφατίδια. Παρά την υψηλή θρεπτική αξία του φασολιού, έχει παρατηρηθεί μείωση της κατανάλωσής του, ίσως εξαιτίας της ανόδου του βιοτικού επιπέδου που επέτρεψε τη χρησιμοποίηση πρωτεϊνών ζωικής προέλευσης σε βάρος των φυτικών. Τα τελευταία χρόνια όμως, που παρατηρείται στροφή στην παραδοσιακή μεσογειακή διατροφή αυξάνεται η κατανάλωσή του. Σε αυτό συνετέλεσε η κατανόηση της σημασίας που έχουν τα όσπρια και η στροφή της σύγχρονης κοινωνίας στη μεσογειακή διατροφή. Τα φασόλια όταν καταναλώνονται ως νωποί λοβοί, αν και έχουν λίγες θερμίδες (μόνο 43,75 τα 100 gr), είναι πλούσια σε θρεπτικά στοιχεία. Αποτελούν εξαιρετική πηγή βιταμινών A, K και C, Mn, K, Fe, φυτικών ινών και φολικού οξέος. Είναι επίσης καλή πηγή μαγνησίου, θειαμίνης, ριβοφλαβίνης, χαλκού, ασβεστίου, φώσφορου, πρωτεϊνών, ωμέγα-3 λιπαρών οξέων και νιασίνης. Η βιταμίνη K που παρέχεται από 100 gr πράσινων φασολιών καλύπτει το 122% της συνιστώμενης ημερήσιας δόσης (Σ.Η.Δ.) ενός μέσου ενήλικα. Όσον αφορά τις βιταμίνες A και C, ποσότητα

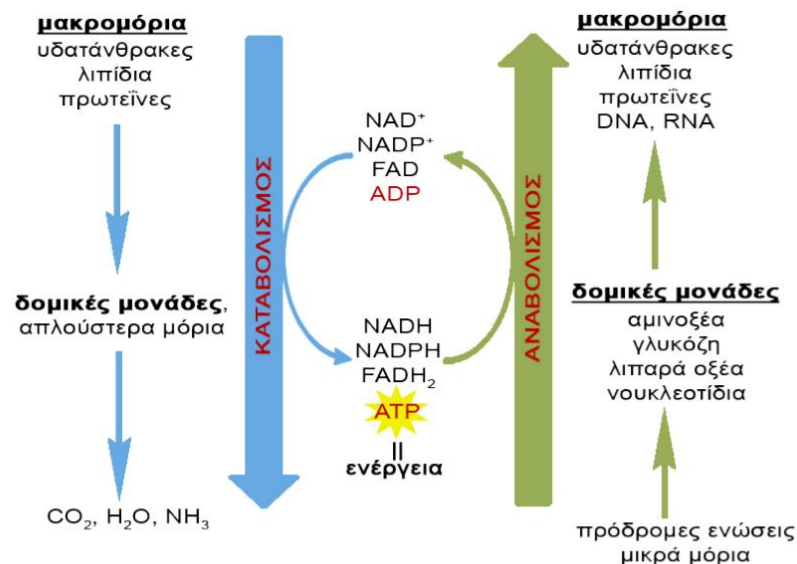
100 gr παρέχει το 16,6% της ημερήσιας ανάγκης για βιταμίνη Α και το 20,2% για βιταμίνη C.

Τα ξερά φασόλια αποτελούν μια ιδιαίτερα θρεπτική τροφή κι αυτό αποτυπώνεται στο γεγονός, ότι βρίσκονται στη βάση της μεσογειακής πυραμίδας, δηλαδή συγκαταλέγονται μεταξύ των τροφών που πρέπει να καταναλώνονται με μεγάλη συχνότητα. Αποτελούν πολύ καλή πηγή πρωτεϊνών και φυτικών ινών, ενώ ταυτόχρονα συμμετέχουν στον έλεγχο των επιπέδων σακχάρου και λιπιδίων στο αίμα. Τα φασόλια επίσης περιέχουν πρεβιοτικά συστατικά, όπως φρουκτοολιγοσακχαρίτες και ινουλίνη και αντιοξειδωτικές ουσίες κυρίως φλαβονοειδή (βρίσκονται στο εξωτερικό περίβλημα και ευθύνονται για το χρώμα τους) καθώς και φυλλικό οξύ που συμβάλλει στην καλή λειτουργία της καρδιάς.

1.4. ΜΕΤΑΒΟΛΙΣΜΟΣ ΚΑΙ ΜΕΤΑΒΟΛΟΜΙΚΗ ΑΝΑΛΥΣΗ

1.4.1. Τι είναι ο μεταβολισμός

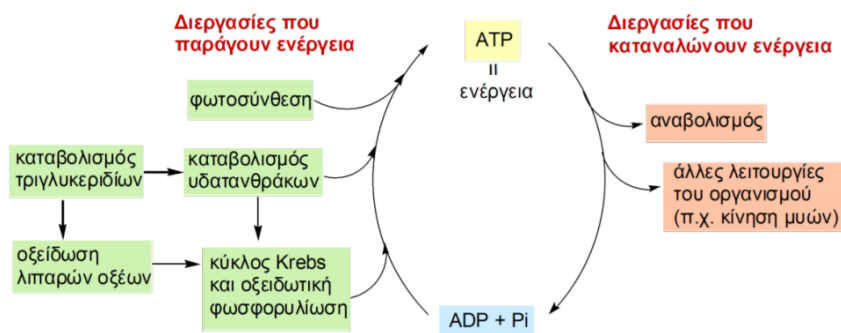
Το σύνολο των αντιδράσεων που πραγματοποιούνται στα κύτταρα ενός οργανισμού ονομάζεται μεταβολισμός. Διακρίνεται στον αναβολισμό και τον καταβολισμό (Εικ. 1).



Εικ. 1: Ενεργειακή σχέση αναβολισμού και καταβολισμού (τροποποιημένο, Γάλαρης, 2015)

Το σύνολο των μεταβολικών διεργασιών μέσω των οποίων πραγματοποιείται σύνθεση μεγάλων βιομορίων από άλλα μικρότερα αποκαλούνται αναβολισμός, ενώ οι μεταβολικές διεργασίες μέσω των οποίων μακρομόρια διασπώνται σε μικρότερα-απλούστερα ονομάζεται καταβολισμός. Ο αναβολισμός περιλαμβάνει τη γλυκονεογένεση, που είναι η βιοσύνθεση της γλυκόζης, τη βιοσύνθεση των τριγλυκεριδίων, των λιπαρών οξέων και των αμινοξέων, καθώς και τη φωτοσύνθεση. Οι καταβολικές διεργασίες συνήθως εκλύουν ενέργεια, ενώ στις αναβολικές διεργασίες συνήθως απορροφάται ενέργεια (**Εικ. 1**). Κατά το τελευταίο στάδιο του καταβολισμού τα μικρότερα μόρια διασπώνται περαιτέρω σχηματίζοντας ακετυλο-ομάδες, ενωμένες μέσω ενός θειολοεστερικού δεσμού με κάποιο μεγαλύτερο μόριο φορέα, το συνένζυμο Α. Η σχηματιζόμενη ένωση, το ακέτυλο συνένζυμο Α (ακέτυλο CoA) αποτελεί το ενδιάμεσο κατά τη διάσπαση όλων σχεδόν των μορίων (Ridge Irene, 2005).

Οι ακέτυλο-ομάδες, οξειδώνονται στον κύκλο του κιτρικού οξέος σχηματίζοντας διοξείδιο του άνθρακα. Σε αυτό το στάδιο εκλύεται επίσης μεγάλη ποσότητα ενέργειας, η οποία χρησιμοποιείται στο επόμενο στάδιο της αναπνευστικής αλυσίδας για την παραγωγή μορίων του νουκλεοτιδίου τριφωσφορική αδενοσίνη-ATP (**Εικ. 2**). Το τελικό αυτό αποτέλεσμα του καταβολισμού αναφέρεται και ως «ενεργειακό απόθεμα» του κυττάρου. Η μετατροπή ανόργανου άνθρακα σε οργανικές ουσίες είναι η χαρακτηριστική μεταβολική δραστηριότητα των αυτότροφων οργανισμών.

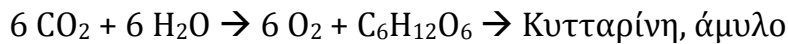


Εικ. 2: Διεργασίες που παράγουν ή καταναλώνουν ενέργεια (ATP) (τροποποιημένο, Γάλαρης, 2015)

Σε όλη την εξελικτική κλίμακα των αυτότροφων, από τα κυανοβακτήρια έως τα ευκαριωτικά φύκη και τα φυτά, η κύρια μεταβολική πορεία που αφήνει καθαρό κέρδος σε άνθρακα είναι όμοια και ονομάζεται κύκλος Calvin ή κύκλος C3. Σε αναερόβια φωτοσυνθετικά ή

χημειοσυνθετικά βακτήρια η πορεία είναι διαφορετική. Σε πλανητική κλίμακα, ο κύκλος C3 επικρατεί κατά πολύ, υπάρχουν ωστόσο και οι μηχανισμοί C4 και CAM. Τα φυτά C4 αποτελούν μόνο το 1% των γνωστών ειδών, ωστόσο περιλαμβάνουν μερικά από τα πιο διαδεδομένα ζιζάνια, πολλά μέλη των οικογενειών Poaceae και Cyperaceae και κάποια πολύ σημαντικά καλλιεργούμενα φυτά όπως το καλαμπόκι και το ζαχαροκάλαμο. Τα δύο ιδιαίτερα χαρακτηριστικά των φυτών αυτών είναι η ειδική ανατομία του φύλλου και μία επιπλέον βιοχημική πορεία (κύκλος C4) κατά την οποία το CO₂ δεσμεύεται και απελευθερώνεται εκ νέου. Ο μηχανισμός CAM είναι ακόμα σπανιότερος και απαντά κυρίως σε φυτά των θερμών κλιμάτων και των ερήμων (Γαλάτης, 2014).

Η φωτοσύνθεση είναι μια διαδικασία κατά την οποία το ηλιακό φως προσφέρει την απαραίτητη ενέργεια για τη μετατροπή CO₂ σε γλυκόζη. Στη συνέχεια πολλά μόρια γλυκόζης συνδέονται με χημικούς δεσμούς, σχηματίζοντας μεγαλύτερα μόρια υδατανθράκων, τα οποία αποθηκεύονται από το φυτό με μορφή κυτταρίνης ή αμύλου.



Οι υδατάνθρακες απαντούν σε κάθε ζωντανό οργανισμό και περιλαμβάνουν μια ευρεία κατηγορία πολυυδροξυλιωμένων αλδευδών και κετονών. Ταξινομούνται σε δύο γενικές κατηγορίες, στους απλούς και στους σύνθετους. Τα απλά σάκχαρα ή μονοσακχαρίτες είναι υδατάνθρακες όπως η γλυκόζη και η φρουκτόζη που δεν μπορούν να υδρολυθούν σε άλλα μικρότερα μόρια. Οι σύνθετοι υδατάνθρακες απαρτίζονται από δύο ή περισσότερα απλά σάκχαρα συνδεδεμένα μεταξύ τους. Με την υδρόλυση οι πολυσακχαρίτες διασπώνται στις μονοσακχαρικές δομικές τους μονάδες.

Το φυτό, αποθηκεύει ενέργεια και σε μορφή λιπιδίων. Τα λιπίδια είναι υδρόφοβα μόρια που έχουν κύριο ρόλο στην κατασκευή των κυτταρικών μεμβρανών, στην αποθήκευση ενέργειας και άνθρακα, στην προστασία του φυτού από δυσμενείς επιδράσεις και στη μετάδοση σημάτων.

1.4.1.1. Γλυκόλυση

Ένα κύριο καταβολικό μονοπάτι είναι η γλυκόλυση, δηλαδή η διάσπαση της γλυκόζης που προέρχεται από την αποδόμηση των υδατανθράκων παράγοντας πυροσταφυλικό οξύ, ATP και NADH. Πρόκειται για μια διεργασία που πραγματοποιείται σε όλους τους ζωντανούς οργανισμούς και αποτελεί ένα αρχέγονο μηχανισμό προσπορισμού

ενέργειας προερχόμενης από ουσίες του περιβάλλοντος των κυττάρων. Η μεταβολική ακολουθία της γλυκόλυσης περιλαμβάνει δέκα επιμέρους αντιδράσεις αρχίζοντας με τη φωσφορυλίωση της γλυκόζης και φρουκτόζης που προκύπτουν από την υδρόλυση του αμύλου, της σακχαρόζης και των φρουκτοζανών, με τη βοήθεια των υδρολυτικών ενζύμων των αμυλασών, της ιμπερτάσης και της φρουκτοφουρανοζιδάσης αντίστοιχα. Τα προϊόντα των φωσφορυλίωσεων αυτών είναι η 6-φωσφορογλυκόζη και η 6-φωσφοροφρουκτόζη και τα ένζυμα που τις καταλύουν είναι η εξοκινάση και η φρουκτοκινάση αντίστοιχα. Οι αντιδράσεις αυτές είναι εξεργονικές και η πραγματοποίησή τους γίνεται με την παρουσία ATP, από την διάσπαση του οποίου η φωσφορική ρίζα και η απαιτούμενη ενέργεια χρησιμοποιούνται για το σχηματισμό των φωσφοροσακχάρων, ενώ παράγεται ADP.

Τα στάδια της γλυκόλυσης, που ονομάζεται επίσης βιοσυνθετική οδός Embden-Meyerhof, από τα ονόματα των ερευνητών που την ανακάλυψαν, είναι συνοπτικά τα εξής:

Στάδιο 1: Η γλυκόζη φωσφορυλιώνεται από το ATP προς 6-φωσφορική γλυκόζη.

Στάδιο 2: Η 6-φωσφορική γλυκόζη ισομερίζεται προς 6-φωσφορική φρουκτόζη.

Στάδιο 3: Η 6-φωσφορική φρουκτόζη φωσφορυλιώνεται από το ATP προς 1,6-διφωσφορική φρουκτόζη.

Στάδιο 4: Η 1,6-διφωσφορική φρουκτόζη διασπάται σε δυο τμήματα τριών ατόμων άνθρακα, από το ένζυμο αλδολάση.

Στάδιο 5: Η φωσφορική διυροξυακετόνη, ένα από τα προϊόντα του 4^{ου} σταδίου, ισομερίζεται προς 3-φωσφορική γλυκεραλδεϋδη, το άλλο προϊόν του 4^{ου} σταδίου.

Στάδιο 6: Η 3-φωσφορική γλυκεραλδεϋδη οξειδώνεται και φωσφορυλιώνεται προς σχηματισμό του 1,3-διφωσφορογλυκερικού ιόντος.

Στάδιο 7: Μία φωσφορική ομάδα μεταφέρεται από την καρβοξυλική ομάδα στο ADP, οπότε σχηματίζονται ATP και 3-φωσφορογλυκερικό ιόν.

Στάδιο 8: Μία φωσφορική ομάδα μεταφέρεται από το υδροξύλιο του C3 στο υδροξύλιο του C2, σχηματίζοντας 2-φωσφορογλυκερικό ιόν.

Στάδιο 9: Πραγματοποιείται αφυδάτωση προς φωσφοενολο-πυρουβικό ιόν (PEP).

Στάδιο 10: Μία φωσφορική ομάδα μεταφέρεται από το PEP στο ADP, σχηματίζοντας πυρουβικό ιόν και ATP.

Το πυρροβικό ιόν που σχηματίζεται στο τέλος της γλυκόλυσης με τον καταβολισμό της γλυκόζης μπορεί περαιτέρω να υποστεί πολλούς μετασχηματισμούς, ανάλογα με τις επικρατούσες συνθήκες και τον οργανισμό. Συνήθως μετατρέπεται σε ακέτυλο-συνένζυμο-A, μέσω μιας πολύπλοκης αλληλουχίας αντιδράσεων, για την οποία απαιτούνται τρία διαφορετικά ένζυμα και τέσσερα διαφορετικά συνένζυμα.

Ένα άλλο κύριο μονοπάτι είναι ο καταβολισμός των τριγλυκεριδίων και των λιπαρών οξέων, κατά τον οποίο τα λιπαρά οξέα αποδομούνται μέσω της β-οξειδωσης και δίνουν ακέτυλο-CoA, NADH και FADH₂.

Όταν αυτές οι κύριες πηγές ενέργειας δεν επαρκούν, τα αμινοξέα χρησιμοποιούνται ως εναλλακτική πηγή. Τα αμινοξέα ως συστατικά στοιχεία των πρωτεϊνών έχουν μεγάλη σημασία για κάθε ζωντανό οργανισμό. Στους φυτικούς ιστούς, όταν η κύρια πηγή ενέργειας κατά τη διάρκεια της ημέρας είναι η φωτοσύνθεση, οπότε τα αμινοξέα χρησιμοποιούνται για τη σύνθεση πρωτεϊνών και δευτερογενών μεταβολιτών (Galili et al., 2014). Ωστόσο κατά τη διάρκεια της νύχτας ή υπό καταπονήσεις οι οποίες προκαλούν μεγάλη έλλειψη ενέργειας ή μείωσης της φωτοσύνθεσης, τα αμινοξέα χρησιμεύουν ως σημαντική πηγή ενέργειας μέσω του καταβολισμού τους στον κύκλο του Krebs (Araújo et al., 2011). Επίσης, είναι σημαντικά μόρια στη μετακίνηση του οργανικού αζώτου μέσα στο φυτό (Pratelli and Pilot, 2014).

1.4.1.2. Αναπνοή και κύκλος του Krebs

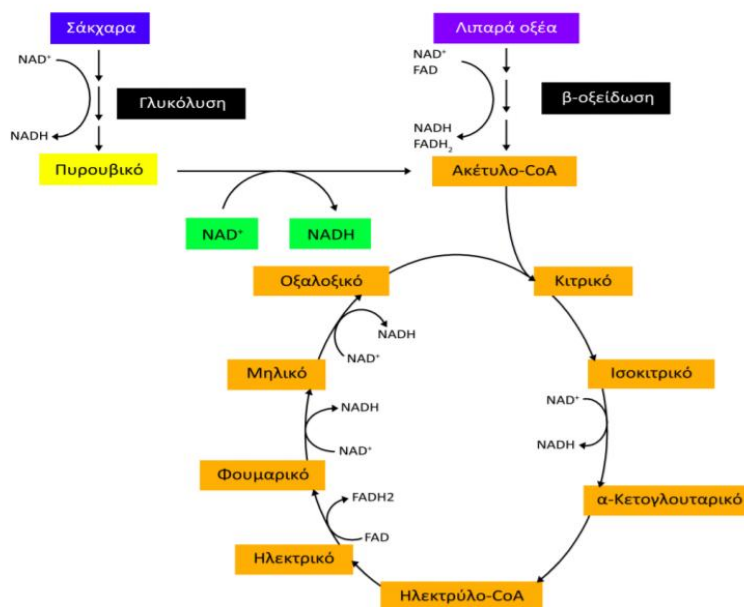
Η αναπνοή περιλαμβάνει τον κύκλο του κιτρικού οξέος ή κύκλο των τρικαρβοξυλικών οξέων ή κύκλο του Krebs, ο οποίος αποσαφήνισε την όλη διαδικασία το 1937. Στον κύκλο του Krebs (**Εικ. 3**), το ακετυλο-CoA που προέρχεται από τα προηγούμενα καταβολικά στάδια παράγει ένα (1) μόριο GTP, τρία (3) μόρια NADH και ένα (1) μόριο FADH₂, και την οξειδωτική φωσφορυλίωση, όπου συντίθεται ATP από τα NADH και FADH₂ που σχηματίζονται στις παραπάνω καταβολικές οδούς.

Τα στάδια του κύκλου εν συντομία είναι τα εξής:

1. το ακέτυλο CoA προστίθεται στο οξαλοξικό ιόν και σχηματίζεται κιτρικό ιόν.
2. το κιτρικό ιόν ισομερίζεται προς ισοκιτρικό, με μετατόπιση της ομάδας OH.

3. το ισοκιτρικό ιόν οξειδώνεται, αποβάλλει CO₂ και σχηματίζεται α-κετογλουταρικό ιόν.
4. Το α-κετογλουταρικό ιόν αποβάλλει CO₂ και αντιδρά με HSCoA σχηματίζοντας σουκίνυλο CoA.
5. Το σουκίνυλο CoA υδρολύεται προς σουκινικό ιόν και HSCoA, ενώ ένα μόριο GDP φωσφορυλιώνεται προς GTP.
6. Το σουκινικό ιόν αφυδρογονώνεται από το συνέζυμο FAD προς φουμαρικό ιόν.
7. Με προσθήκη ενός μορίου H₂O στο φουμαρικό ιόν σχηματίζεται μηλικό ιόν.
8. Ο κύκλος ολοκληρώνεται με την οξείδωση του μηλικού ιόντος προς οξαλοξικό.

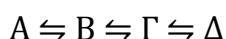
Ο κύκλος του Krebs εξασφαλίζει την απαραίτητη ενέργεια (από την οξείδωση του ακέτυλο CoA), για την κάλυψη των αναγκών του φυτού αλλά ταυτόχρονα παράγει ενδιάμεσα προϊόντα (Δροσόπουλος, 1998). Σε περίπτωση περίσσειας ενέργειας τα ενδιάμεσα αυτά προϊόντα χρησιμοποιούνται στον αναβολισμό, για τη σύνθεση λιπαρών οξέων, αμινοξέων και νουκλεοτιδίων, όπως φαίνεται στο παρακάτω σχήμα (Εικ.3) (Γαλάρης, 2015). Ως εκ τούτου, το ενεργειακό ισοζύγιο του κυττάρου ρυθμίζει τον κύκλο του Krebs.



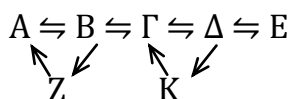
Εικ. 3: Ενεργειακή απόδοση και μεταβολισμός Σακχάρων και Λιπών (τροποποιημένο Γαλάρης, 2015)

1.4.2. Βιοσυνθετικές οδοί

Οι αντιδράσεις του καταβολισμού και του αναβολισμού είναι αλληλένδετες και αποτελούνται από μια σειρά διαδοχικών ενζυμικών αντιδράσεων που αποτελούν τις βιοσυνθετικές οδούς. Βιοσυνθετική οδός ονομάζεται μια αλληλουχία βιοχημικών αντιδράσεων που οδηγεί στη μετατροπή του αρχικού μορίου σε τελικό προϊόν. Μια βιοσυνθετική οδός μπορεί να είναι γραμμική ή κυκλική. Στη γραμμική οδό, το αρχικό αντιδρών A μετατρέπεται σταδιακά στο προϊόν Δ, ενώ στην κυκλική το αρχικό αντιδρών A αναγεννιέται στο τέλος του κύκλου. Όμως δεν πρόκειται για μια σειρά αμφίδρομων αντιδράσεων της μορφής



όπου η μία κατεύθυνση προς τα δεξιά εκφράζει τον καταβολισμό και η αντίστροφη προς τα αριστερά τον αναβολισμό, αλλά για μια σειρά αμφίδρομων αντιδράσεων στις οποίες παρεμβάλλονται μονόδρομες παράπλευρες αντιδράσεις του τύπου



όπως για παράδειγμα στην αρχή και στο τέλος της γλυκόλυσης. Με αυτόν τον τρόπο το κύτταρο εξασφαλίζει τη δυνατότητα ελέγχου και ρύθμισης του μεταβολισμού ανάλογα με τις ανάγκες του. Η ρύθμιση επιτυγχάνεται μέσω ενζύμων-κλειδιών. Τα ένζυμα που εμπλέκονται στην αποδόμηση είναι διαφορετικά από τα ένζυμα που εμπλέκονται στη βιοσύνθεση. Παράλληλα, η ενεργότητα ενός ενζύμου μιας μεταβολικής οδού μπορεί να αναστέλλεται λόγω μεγάλης συγκέντρωσης του τελικού προϊόντος της οδού αυτής με τη διαδικασία της ανάδρομης ρύθμισης. Τέλος, σε μια βιοσυνθετική οδό πολλών σταδίων επιτυγχάνεται διασύνδεση αναβολισμού και καταβολισμού, καθώς, ενδιάμεσα προϊόντα του καταβολισμού ενδέχεται να χρησιμοποιούνται στις αναβολικές διαδικασίες.

Οι αντιδράσεις του μεταβολισμού πραγματοποιούνται σε περισσότερες από μία θέσεις μέσα στο κύτταρο. Για παράδειγμα, ο καταβολισμός της γλυκόζης γίνεται στο κυτταρόπλασμα μέχρι το επίπεδο του πυροσταφυλικού οξέος και στη συνέχεια στα μιτοχόνδρια. Η βιοσύνθεση των λιπαρών οξέων πραγματοποιείται στο κυτταρόπλασμα, ενώ η αποδόμησή τους στα μιτοχόνδρια.

1.4.3. Ο μεταβολισμός των περιβαλλοντικών καταπονήσεων

Τα φυτά, εκτίθενται σε αντίξοες συνθήκες, οι οποίες επηρεάζουν την ανάπτυξή τους και καθορίζουν την επιβιώσή τους. Με τον όρο καταπόνηση, αναφερόμαστε στην επίδραση των δυσμενών παραγόντων του περιβάλλοντος, οι οποίοι τείνουν να παρεμποδίσουν την εύρυθμη λειτουργία των φυσιολογικών μηχανισμών ενός οργανισμού. Οι αποκλίσεις από τα κανονικά επίπεδα λειτουργίας αποτελούν ενδείξεις ύπαρξης παραγόντων καταπόνησης.

Ανεξάρτητα από το αίτιο της καταπόνησης, η αντιμετώπισή της ακολουθεί συνήθως μια ορισμένη σειρά γεγονότων που περιλαμβάνονται σε τρία στάδια: το στάδιο της λήψης του ερεθίσματος, της διαβίβασης σήματος και της αντίδρασης.

Κατά το στάδιο της λήψης, τα φυτά «αντιλαμβάνονται» τα συγκεκριμένα εξωτερικά ερεθίσματα με εξειδικευμένους αισθητήρες-υποδοχείς. Η λήψη του ερεθίσματος προκαλεί μεταβολές στις ιδιότητες του αισθητήρα. Οι υποδοχείς λήψης είναι συνήθως πρωτεΐνες, που εντοπίζονται σε μεμβράνες. Τα ερεθίσματα προκαλούν τροποποίηση της δομής των υποδοχέων πρωτεϊνών.

Το δεύτερο στάδιο είναι το στάδιο διαβίβασης σήματος, κατά το οποίο οι μεταβολές του αισθητήρα πυροδοτούν μια ακολουθία διαδικασιών με αποτέλεσμα τη μεταβίβαση ενός εσωτερικού σήματος-μηνύματος προς τα σημεία εκείνα στα οποία τελικά θα εκδηλωθεί η αντίδραση. Η διαβίβαση του σήματος συμβαίνει είτε μεταξύ κυττάρων είτε μεταξύ διαφορετικών περιοχών εντός του ίδιου κυττάρου. Η διαδικασία διαβίβασης του σήματος περιλαμβάνει και φαινόμενα ενίσχυσης του σήματος και διασταύρωσής του με τη χρήση μηχανισμών διαβίβασης διαφορετικών σημάτων (cross-talk). Η διαβίβαση σήματος πραγματοποιείται με τη συμμετοχή πολλών συστατικών του κυττάρου, όπως για παράδειγμα τα ιόντα ασβεστίου, τα κυκλικά νουκλεοτίδια, ορμόνες και ρυθμιστικές πρωτεΐνες όπως οι μιτωτικές κινάσες (MAPK). Το τελικό αποτέλεσμα του σταδίου της διαβίβασης περιλαμβάνει μεταβολικές τροποποιήσεις ή και μεταβολές στην έκφραση γονιδίων που επάγουν τη σύνθεση συγκεκριμένων πρωτεϊνών που ονομάζονται πρωτεΐνες καταπόνησης.

Το τρίτο και τελευταίο στάδιο, είναι το στάδιο της αντίδρασης των κυττάρων στο αρχικό ερέθισμα. Το είδος της αντίδρασης εξαρτάται από το είδος του αρχικού ερεθίσματος, ενώ το μέγεθός της από το μέγεθος του ερεθίσματος. Ως δόση ορίζεται ο συνδυασμός της έντασης του ερεθίσματος και ο χρόνος επίδρασής του. Για τη διερεύνηση των επιπτώσεων ενός

παράγοντα καταπόνησης μελετάται η κατάσταση στην οποία βρίσκονται είτε ορισμένοι εξειδικευμένοι στόχοι είτε μη εξειδικευμένοι στόχοι. Στη δεύτερη περίπτωση περιλαμβάνονται η ενεργοποίηση ορισμένων βιοσυνθετικών οδών του δευτερογενούς μεταβολισμού, καθώς και των αντιοξειδωτικών συστημάτων.

Αντιοξειδωτικά αμυντικά συστήματα:

1. Αντιοξειδωτικά ένζυμα (SOD, καταλάση, υπεροξειδάσες της γλουταθειόνης, περοξυαναγωγάσες)
2. Μικρού μοριακού βάρους αντιοξειδωτικοί παράγοντες οι οποίοι έχουν την ικανότητα να εξουδετερώνουν δραστικές μορφές οξυγόνου (ασκορβικό οξύ, α-τοκοφερόλη)
3. Πρωτεΐνες οι οποίες δεσμεύουν μόρια διαμεσολαβητές της τοξικότητας των δραστικών μορφών οξυγόνου όπως ιόντα σιδήρου, ιόντα χαλκού, αίμη κ.α. (τρανσφερίνη, φεριτίνη, απτοσφαιρίνη, αιμοπτερίνη, σερουλοπλασμίνη κ.λ.π.)
4. Πρωτεΐνες οι οποίες έχουν την ικανότητα να προστατεύουν τα βιομόρια από βλάβες προκαλούμενες μεταξύ άλλων και από οξειδωτικές στρες (heat shock proteins)
5. Επιδιορθωτικά ένζυμα, όπως τα άμεσα και έμμεσα συστήματα DNA, πρωτεϊνών και λιπιδίων

Η ανάπτυξη μηχανισμών άμυνας έναντι των καταπονήσεων απαιτεί δαπάνη ενέργειας. Η επιβίωση σε συνθήκες καταπόνησης επιβάλλει μεταβολικές τροποποιήσεις με το αντίστοιχο ενεργειακό κόστος, που είναι συνήθως υψηλό. Η τελική επιβίωση των φυτικών οργανισμών φαίνεται ότι αποτελεί το προϊόν της κατάλληλης κατανομής των πόρων μεταξύ παραγωγικότητας και επιβίωσης.

1.4.4. Η μεταβολομική ως μέθοδος ανάλυσης

Η μεταβολομική (metabolomics) είναι ένας ταχέως αναπτυσσόμενος τομέας της βιολογίας συστημάτων που προσφέρει μια ισχυρή και πολλά υποσχόμενη προσέγγιση διαφόρων εφαρμογών. Ένας ακόμα ορισμός που έχει δοθεί είναι «Η συστηματική μελέτη των μοναδικών χημικών αποτυπωμάτων που αφήνουν πίσω τους συγκεκριμένες κυτταρικές διεργασίες» (Daviss B., 2005). Αρχικά, χρησιμοποιούνταν ο όρος

metabonomics από τις ελληνικές λέξεις *μεταβολή* και *νόμος*, αλλά σήμερα έχει επικρατήσει ο όρος *metabolomics*. Για την πραγματοποίησή της, συνδυάζονται γνώσεις πολλών επιστημονικών πεδίων, όπως της Αναλυτικής Χημείας, της Επεξεργασίας δεδομένων, της Βιολογίας, της Βιοπληροφορικής, της Στατιστικής, της Φυσιολογίας κ.α. Η μεταβολομική επικεντρώνεται στη μελέτη και ανάλυση των μεταβολιτών χαμηλού μοριακού βάρους που βρίσκονται σε κύτταρα, βιο-υγρά, ιστούς, φυτά, τρόφιμα κ.α. παρέχοντας πληροφορίες με μεγάλη λεπτομέρεια σχετικά με τα βιολογικά συστήματα και την τρέχουσα κατάστασή τους (Weckwerth, 2003). Μπορεί να αναλύσει την επίδραση του χρόνου, του παράγοντα καταπόνησης και της θρεπτικής κατάστασης σε εκατοντάδες μεταβολίτες που παράγονται ταυτόχρονα παρέχοντας σύνθετα σύνολα δεδομένων (Dixon et al., 2006).

Οι αναλυτικές μέθοδοι που χρησιμοποιούνται περιλαμβάνουν την αέρια χρωματογραφία συζευγμένη με τη φασματομετρία μάζας (GC/MS), την υγρή χρωματογραφία συζευγμένη με τη φασματομετρία μάζας (LC/MS), την τριχοειδή ηλεκτροφόρηση συζευγμένη με φασματομετρία μάζας (CE/MS), τη φασματοσκοπία μάζας συντονισμού-μετασχηματισμού ιόντων κατά Fourier (FT-ICR/MS) (Oikawa et al., 2006) και τη φασματοσκοπία πυρηνικού μαγνητικού συντονισμού (NMR).

Στις γεωπονικές επιστήμες και στις επιστήμες περιβάλλοντος, η μεταβολομική έχει χρησιμοποιηθεί για την ανάλυση φυτικών ιστών και τη διερεύνηση τόσο γενικά της φυσιολογίας καταπονήσεων (Kráľová et al., 2012) και (Shulaev et al., 2008) όσο και ειδικά της δράσης του όζοντος σε φυτά *Oryza sativa* L. (Cho et al., 2008) και σε *Rhaphanus sativus* L. (Park et al., 2016). Επίσης χρησιμοποιείται για τη μελέτη της δράσης των φυτοπροστατευτικών προϊόντων στα φυτά (Aliferis and Jabaji, 2011).

Με τη μεταβολομική είναι δυνατή η διερεύνηση της άμυνας του φυτού έναντι παθογόνων, όπως των μυκήτων (Aliferis et al., 2014).

Για την ανάλυσή τους χρησιμοποιείται σε ευρεία κλίμακα η αέρια φασματογραφία/φασματομετρία μάζας (GC/MS) δίνοντας αξιόπιστα αποτελέσματα (Dettmer et al., 2007; Koek et al., 2011). Άλλοι μέθοδοι ανάλυσης είναι με τη χρήση NMR (Aliferis et al., 2009) και HPLC-UV (Kráľová et al., 2012).

1.5. ΣΚΟΠΟΣ

Σκοποί της παρούσας εργασίας ήταν:

α) να διερευνηθεί η επίδραση του όζοντος με την εφαρμογή μεταβολομικής, με τη χρήση αέριου χρωματογραφίας-φασματομετρίας μάζας και πολυπαραγοντικής ανάλυσης, στην ευαίσθητη στο όζον ποικιλία φασολιού (*Phaseolus vulgaris* L.) Pinto

β) να μελετηθούν, μεταβολομικά, ως προς την προστατευτική - έναντι του όζοντος- δράση τους, δύο χημικές ουσίες: Η αιθυλενεδιουρία (ethylenediurea) [EDU] και η δραστική ουσία Penconazole (εμπορικό σκεύασμα Topas).

2



Υλικά-Μέθοδοι

2. ΥΛΙΚΑ ΚΑΙ ΜΕΘΟΔΟΙ

2.1. Προκαταρκτικά πειράματα

Πριν την έναρξη των πειραμάτων πραγματοποιήθηκε ένα σύνολο δοκιμών μικρής κλίμακας για την επιλογή της κατάλληλης συγκέντρωσης όζοντος που θα εφαρμοζόταν στο κύριο πείραμα. Η συγκέντρωση αυτή έπρεπε να μην είναι τοξική και θανατηφόρος αλλά ούτε πολύ χαμηλή και καθόλου τοξική. Επιδιώχθηκε μια ενδιάμεση συγκέντρωση η οποία να επάγει μεταβολικές διαδικασίες χωρίς να προκαλεί άμεσα νεκρώσεις. Κατά τα πειράματα αυτά έγινε οπτική εκτίμηση των συμπτωμάτων του όζοντος και μέτρηση της έντασης του πράσινου χρώματος των φύλλων-τιμή SPAD, που έχει προταθεί ως ικανός δείκτης καταπόνησης των φυτών από όζον (Agathokleous et al., 2016a).

2.2. Φυτικό υλικό και συνθήκες ανάπτυξης

Οι σπόροι των φυτών φασολιού ποικιλίας Pinto (*Phaseolus vulgaris* L. cv. Pinto) που χρησιμοποιήθηκαν διατηρούνται στο Εργαστήριο Οικολογίας και Προστασίας Περιβάλλοντος σε ψυκτικό θάλαμο θερμοκρασίας 5 °C για τη διατήρηση της φυτρωτικότητάς τους. Για να φυτρώσουν τοποθετήθηκαν σε δίσκο με υγρό απορροφητικό χαρτί (Εικ. 4) σκεπασμένο με διάφανη μεμβράνη, για τη διατήρηση της υγρασίας.



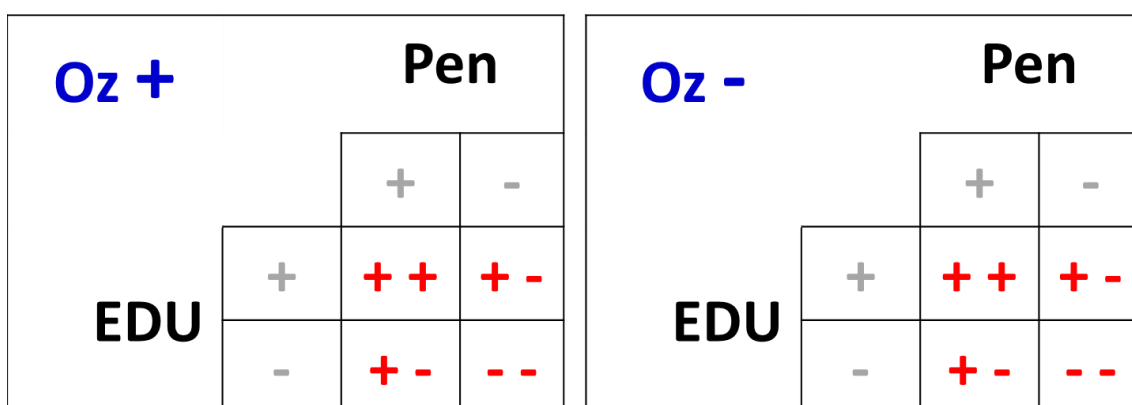
Εικ. 4: Οι σπόροι του *Phaseolus vulgaris* cv. Pinto, τοποθετήθηκαν σε δίσκο με υγρό απορροφητικό χαρτί ώστε να επιλεγούν όσοι φύτρωσαν την ίδια χρονική στιγμή.

Στη συνέχεια, ο δίσκος τοποθετήθηκε σε θάλαμο ανάπτυξης με θερμοκρασία 27 °C. Το χαρτί υγραινόταν τακτικά ώστε να παραμένει πάντα υγρό. Μετά από περίπου 10 ημέρες το μεγαλύτερο ποσοστό των σπόρων είχε φυτρώσει. Όσοι σπόροι φύτρωσαν ομοιόμορφα, και βρίσκονταν στο στάδιο όπου μόλις είχε αρχίσει να φαίνεται το ριζίδιο και το βλαστήδιο, τοποθετήθηκαν σε γλάστρες των 5 lt που περιείχαν φυτόχωμα. Τα φυτά ποτίζονταν σε τακτά χρονικά διαστήματα. Μόλις έφτασαν το ύψος των 10 cm περίπου, υποστυλώθηκαν με ξύλα στήριξης και ειδικό κλιπ.

2.3. Πειραματικό σχέδιο

Στο πλαίσιο της παρούσας εργασίας δημιουργήθηκαν δυο Κύριες Ομάδες φυτών (**Εικ. 5**), Ομάδα I και Ομάδα II. Στη συνέχεια τα φυτά και των δύο Κύριων Ομάδων διαχωρίστηκαν σε τέσσερις Υποομάδες στις οποίες εφαρμόστηκαν οι εξής διαφορετικές μεταχειρίσεις: ψεκάσμος με απεσταγμένο νερό (Control-W, C_w), ψεκάσμος με EDU, ψεκάσμος με Penconazole και ψεκάσμος με EDU+Penconazole. Στη συνέχεια τα φυτά της ομάδας I εκτέθηκαν σε όζον ενώ τα φυτά της ομάδας II διατηρήθηκαν σε φιλτραρισμένο αέρα και αποτελούσαν την ομάδα μάρτυρα (Control-G, C_g).

Πραγματοποιήθηκαν δειγματοληψίες σε τρεις χρονικές στιγμές: Μια πριν την έκθεση σε όζον και αποτελούσε το μάρτυρα ως προς το χρόνο έκθεσης στο όζον (control-T₀, C_{T0}), δύο ώρες μετά την έκθεση (T₁) και 4 ώρες μετά την έκθεση (T₂). Για κάθε μεταχείριση χρησιμοποιήθηκαν πέντε φυτά (επαναλήψεις).



Εικ. 5: Σχηματική απεικόνιση του πειραματισμού σχεδίου

Η έκθεση στο όζον πραγματοποιήθηκε όταν αυτά ήταν ηλικίας τριών εβδομάδων από τη σπορά. Ακριβώς 24 ώρες πριν την έκθεση των φυτών στο όζον τα φυτά ψεκάστηκαν είτε με:

α) Διάλυμα Topas, σύμφωνα με τη συνιστώμενη αναλογία, δηλαδή 50mL/100L που ισοδυναμούν με 5mL Penconazole/100 L, **β)** EDU (300 ppm διαλυμένα σε χλιαρό απιονισμένο νερό το οποίο στη συνέχεια αφέθηκε να αποκτήσει θερμοκρασία περιβάλλοντος), **γ)** με συνδυασμό των δύο ουσιών και **δ)** καθαρό νερό (Control C_w).

Τα φυτά εκτέθηκαν σε 70 ppb όζοντος για 8 ώρες (από τις 7:00 έως τις 15:00. Οι ώρες κατά τις οποίες τα φυτά δέχονταν φως ήταν 5:00-17:00).

2.4. Δειγματοληψία ιστών

Δειγματοληψίες πραγματοποιήθηκαν:

- α)** Πριν την έκθεση των φυτών σε όζον (24 ώρες αφού είχαν ψεκαστεί) (T0)
- β)** ύστερα από έκθεση σε όζον για 2 ώρες (T1) και
- γ)** ύστερα από έκθεση σε όζον για 4 ώρες (T2).

Όταν το πρώτο πραγματικό (σύνθετο, τρίφυλλο) φύλλο είχε πλήρως εκπτυχθεί πραγματοποιήθηκε η δειγματοληψία. Το πρώτο φύλλο κόπηκε με ψαλίδι και τοποθετήθηκε σε πλαστικά φυαλίδια (falcon tubes) των 50 mL μαζί με υγρό άζωτο. Στη συνέχεια το tube τοποθετήθηκε σε υγρό άζωτο και περιοδικά, κάθε δέκα περίπου δείγματα τοποθετούνταν σε καταψύκτη με θερμοκρασία -80 °C.

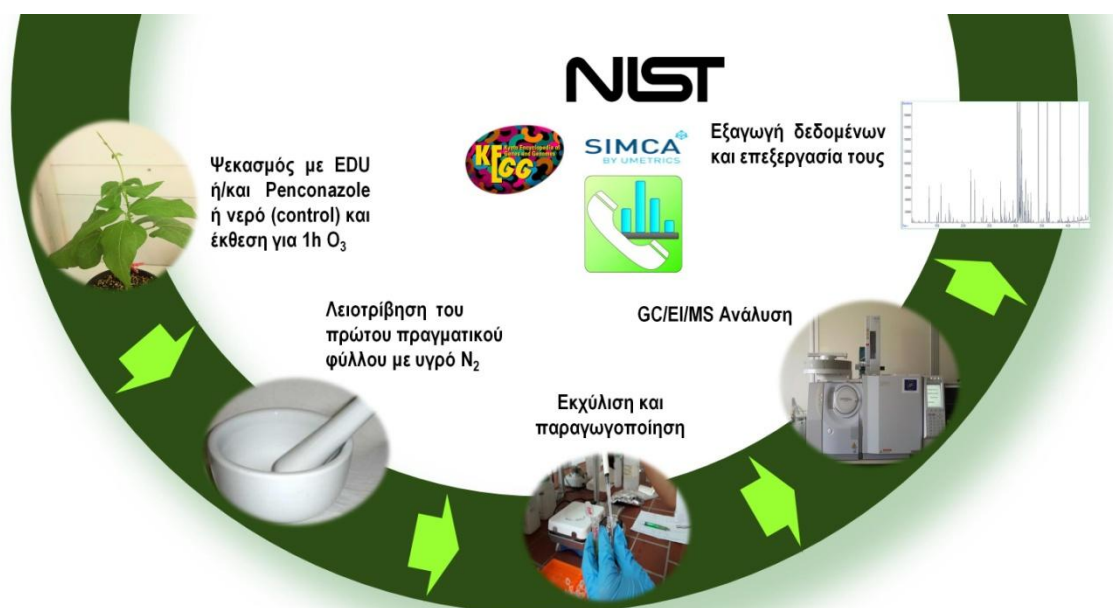
Μετά την ολοκλήρωση της δειγματοληψίας τα tubes παρέμειναν στον καταψύκτη. Αργότερα, για την ανάλυση των δειγμάτων πραγματοποιήθηκε η κονιορτοποίησή τους με υγρό άζωτο σε γουδί πορσελάνης. Το δείγμα τοποθετούνταν στο ίδιο tube και στη συνέχεια σε δοχείο με υγρό άζωτο μέχρι την τελική τοποθέτησή τους σε καταψύκτη με θερμοκρασία -80 °C

Στη συνέχεια, για την ανάλυση στο GC/EI/MS, χρησιμοποιήθηκαν 0,030±0,001 gr δείγματος. Η συγκεκριμένη ποσότητα ελήφθη με τη χρήση σπάτουλας που είχε προηγουμένως ψυχθεί με υγρό άζωτο, και τοποθετήθηκε σε πλαστικό φυαλίδιο-tube των 2 mL που είχε επίσης ψυχθεί με υγρό άζωτο. Αφού κλείστηκε καλά το tube τοποθετήθηκε σε δοχείο με υγρό άζωτο και περιοδικά, κάθε δέκα περίπου ζυγίσεις, τα δείγματα τοποθετούνταν σε κατάψυξη με θερμοκρασία -80 °C.

2.5. Χημική ανάλυση

Τα δείγματα υπέστησαν χημικούς χειρισμούς (Εικ. 6) και στη συνέχεια αναλύθηκαν σε αέριο χρωματογράφο-φασματοόμετρο μάζας (GC/EI/MS).

Αρχικά, στο πλαστικό φυαλίδιο-tube που περιείχε την επιθυμητή ποσότητα δείγματος, προστέθηκε, με τη χρήση πιπέτας (pipetman 200-1000μl) που είχε αποστειρωμένο ρύγχος, 1 mL ρυθμιστικού διαλύματος εκχύλισης αποτελούμενο από ίσους όγκους οξικού αιθυλεστέρα και μεθανόλης (50:50 v/v ethylacetate-methanol) (Carlo ERBA Reagents).



Εικ. 6: Σχηματικό διάγραμμα της ροής εργασιών μεταβολομικών αναλύσεων.

Κατόπιν, προστέθηκε με τη χρήση πιπέτας (pipetman 20-200μl) που είχε αποστειρωμένο ρύγχος, 20 μl διαλύματος ριβιτόλης (0,2 mg/mL) σε μεθανόλη-νερό (50-50, v/v) (Sigma-Aldrich Ltd) ώστε να υπάρχει μέτρο αναφοράς (internal standard) των συγκεντρώσεων των μεταβολιτών που θα ανιχνευθούν (Kanani et al., 2008).

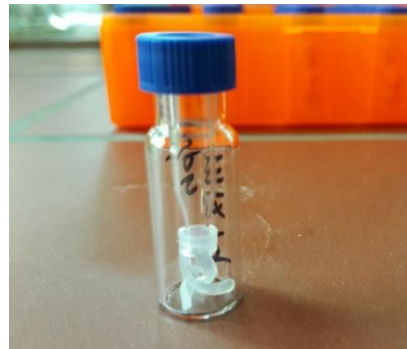
Τα δείγματα τοποθετήθηκαν σε λουτρό υπερήχων (Sonic Branson 1210) για 20 min ώστε να δράσουν τα διαλύματα και να εκχυλιστεί το μέγιστο δυνατό των μεταβολιτών από τα κύτταρα. Για τη βελτιστοποίηση του αποτελέσματος, στη συνέχεια τα δείγματα αναδεύτηκαν για 2h σε 200 rpm (GFL 3006). Τα εκχυλίσματα τοποθετήθηκαν σε κατάψυξη θερμοκρασίας $-80\text{ }^\circ\text{C}$ μέχρι την πραγματοποίηση του επόμενου σταδίου.

Κατά το επόμενο στάδιο, τα εκχυλίσματα διηθήθηκαν με τη χρήση φίλτρου PTFE (Machery Nagel 25mm με διάμετρο πόρων \varnothing 0,2 μm) και τοποθετήθηκαν σε νέα πλαστικά φυαλίδια (Eppendorf tubes) των 2 mL. Πραγματοποιήθηκε εξάτμιση με αέρα θερμοκρασίας 25-30 $^{\circ}$ C και στη συνέχεια πραγματοποιήθηκε παραγωγοποίηση (derivatization) των δειγμάτων ως εξής: Προστέθηκαν 80 μl διαλύματος υδροχλωρικής μεθοξυλαμίνης (methoxyamine hydrochloride) συντ. MEOX (Sigma-Aldrich Ltd) με τη χρήση πιπέτας (pipetman 50-200 μl) και αμέσως κλείσιμο του καλύματος του πλαστικού φυαλιδίου προς αποφυγή εξάτμισης. Τα πλαστικά φυαλίδια (Eppendorf tubes), που περιείχαν τα δείγματα, τοποθετήθηκαν σε υδατόλουτρο (Daihan Labtech co Ltd) (Εικ. 7) θερμοκρασίας 30 $^{\circ}$ C για 2h. Κατόπιν, προστέθηκαν 80 μl N-μεθυλ-N (τριμεθυλσυλil) τριφθοροακεταμίδιο [N-methyl-N (trimethylsilyl) trifluoroacetamide] συντ. MSTFA (Sigma-Aldrich Ltd). Τα πλαστικά φυαλίδια, που περιείχαν τα δείγματα, τοποθετήθηκαν ξανά σε υδατόλουτρο (Daihan Labtech Co Ltd) (Εικ. 7) θερμοκρασίας 38,7 $^{\circ}$ C για 1,5 h.



Εικ. 7: Υδατόλουτρο Daihan Labtech co Ltd στο οποίο τοποθετήθηκαν τα πλαστικά φυαλίδια (Eppendorf tubes), που περιείχαν τα δείγματα.

Το τελικό προϊόν των αντιδράσεων τοποθετήθηκε σε γυάλινα φυαλίδια (microinserters Machery Nagel 150 μl , Fisher Scientific Company) (Εικ. 8) προς ανάλυση στον αέριο χρωματογράφο-φασματομέτρο μάζας του Εργαστηρίου Γεωργικής Φαρμακολογίας (GC/EI/MS Agilent 6890n, Agilent Technologies Inc.) με ανιχνευτή μάζας 5973 (inert mass selective detector, MSD) και αυτόματο δειγματολήπτη (7683 autosampler) (Εικ. 9). Σε στήλη (HP-5MS, μήκους 30 m, διαμέτρου 0.25 mm, πάχος υμενίου 0.25 μm - Agilent Technologies Inc) και φέρον αέριο ήλιο (He 6.0).



Εικ. 8: Τα δείγματα από τα eppendorf tubes (αριστερή εικόνα), αφού διηθήθηκαν τοποθετήθηκαν σε microinserters (δεξιά εικόνα) ώστε να αναλυθούν στο GC/EI/MS.

Αναλύθηκε 1μL δείγματος από το εκχύλισμα των φυτικών ιστών φασολιού. Με τον αυτόματο δειγματολήπτη, λαμβανόταν 1mL το οποίο αναλύοταν εφαρμόζοντας αναλογία διαχωρισμού 10:1.

Επίσης, αναλύθηκαν:

α) κενά δείγματα, ώστε να ελεγχθεί πιθανή ρύπανση των δειγμάτων κατά το χειρισμό, την προετοιμασία και τη διεξαγωγή των χημικών αντιδράσεων αλλά και η λειτουργία του οργάνου και

β) μείγματα των δειγμάτων που αποτέλεσαν μέσα επαλήθευσης των αναλύσεων.



Εικ. 9: Για τις αναλύσεις χρησιμοποιήθηκε GC/EI/MS Agilent με αυτόματο δειγματολήπτη, στήλη HP-5MS και φέρον αέριο ήλιο.

Η μέθοδος που εφαρμόστηκε στο GC/EI/MS ήταν η ακόλουθη:

Αρχική θερμοκρασία κλιβάνου 70 °C σταθερή για 5 min. Στη συνέχεια, η θερμοκρασία αυξανόταν με ρυθμό 5 °C ανά λεπτό μέχρι να φτάσει τους 295° C. Η συνολική διάρκεια ήταν 52min.

Οι υπόλοιπες ρυθμίσεις ήταν: θετικός ιονισμός ηλεκτρονίων στα 70eV. Η θερμοκρασία για την πηγή MS ήταν 230 °C και για το τετραπόλο στους 150 °C. Τα φάσματα μάζας πλήρους σάρωσης αποκτήθηκαν στην περιοχή μαζών 50-800 Da με ρυθμό 2 σαρώσεις ανά δευτερόλεπτο.

2.6. Ταυτοποίηση μεταβολιτών

Τα φάσματα μάζας που ελήφθησαν από το GC/EI/MS, συγκρίθηκαν με αντίστοιχα -ίδια αναλυτικής μεθόδου- της βάσης δεδομένων του NIST 08. NIST είναι το ακρωνύμιο του Εθνικού Ινστιτούτου Προτύπων και Τεχνολογίας (National Institute of Standards and Technology, <https://www.nist.gov>) που ιδρύθηκε το 1901 και τώρα αποτελεί τμήμα του Υπουργείου Εμπορίου των Η.Π.Α. Είναι ένα ηλεκτρονικό δίκτυο με αρχεία μετρήσεων και προτύπων για ένα πλήθος υλικών και προϊόντων που περιλαμβάνει από υλικά ναυτεχνολογίας έως παγκόσμια δίκτυα επικοινωνίας. Το NIST παρέχει σχετικά εργαλεία λογισμικού (Automated Mass Spectral Deconvolution and Identification System συντ. AMDIS) και καταρτίζει βιβλιοθήκες φασμάτων μάζας αναφοράς. Τα δεδομένα αυτά συγκρινόμενα με αυτά που ελήφθησαν από τις αναλύσεις της παρούσας εργασίας, οδήγησαν στη δυνητική αναγνώριση των ενώσεων. Όταν υπήρχε ταύτιση σε μεγάλο βαθμό (π.χ. 90%) η χημική ένωση θεωρούνταν δυνητικά ταυτοποιημένη. Σε διαφορετική περίπτωση, πραγματοποιούνταν απόλυτη αναγνώριση με ανάλυση γνωστών ενώσεων στο ίδιο GC/EI/MS, με την ίδια μέθοδο, οι οποίες έδωσαν ίδια χρωματογραφήματα. Μεταβολίτες μη βιολογικής προέλευσης αποκλείστηκαν από την περαιτέρω ανάλυση. Επίσης, εμβαδομετρήθηκε η καμπύλη συγκέντρωσής της. Το εμβαδόν συγκρίθηκε με το αντίστοιχο εμβαδόν της εργαστηριακά παραγόμενης ουσίας ριβιτόλη, η οποία είχε προστεθεί κατά τη χημική ανάλυση, και ποσοτικοποιήθηκε.

Για μεταβολομική ανάλυση υψηλής απόδοσης, απαιτείται η κατασκευή βάσης δεδομένων των μεταβολιτών του υπό μελέτη οργανισμού. Για το λόγο αυτό, με τη χρήση του προγράμματος MS Excel (Microsoft Office 2010) καταρτίστηκε πίνακας (Παράρτημα Β, 6.4) που περιείχε, για κάθε ένωση που ανιχνεύθηκε, τα εξής στοιχεία: χρόνο

κατακράτησης (Retention Time, RT) στο GC/EI/MS, κοινό όνομα και συνώνυμα, κωδικός της ένωσης στις βάσεις δεδομένων (KEGG, Golm, PubChem), μοριακό τύπο και βάρος, τα βιολογικά μονοπάτια στα οποία ανήκει και χημική ομάδα στην οποία κατηγοριοποιείται. Τα στοιχεία αυτά αντλήθηκαν από τις παρακάτω βάσεις δεδομένων:

α. Golm Metabolom Database: Η διαδικτυακή βάση δεδομένων Golm Metabolom Database (<http://gmd.mpimp-golm.mpg.de>) έχει ιδρυθεί και υποστηρίζεται από τα: Max Planck Society, the German Research Foundation και την Ευρωπαϊκή Επιτροπή (European Commission) μέσω της επιχορήγησης COSMOS του 7^{ου} Προγραμματικού Πλαισίου. Διευκολύνει την αναζήτηση φασμάτων μάζας αναφοράς από βιολογικά δραστικούς μεταβολίτες που ποσοτικοποιήθηκαν με τη χρήση αερίου χρωματογραφίας (GC) συζευγμένης με φασματομετρία μάζας (MS). Οι μελέτες των χρωματογραφημάτων με στόχο την ταυτοποίηση των ενώσεων, εξαρτώνται από τη σύγκριση των παρατηρούμενων χρωματογραφημάτων και των χρόνων κατακράτησης, με βιβλιοθήκες αναφοράς όπως η GMD. Η συγκεκριμένη βάση δεδομένων περιλαμβάνει δείκτες φάσματος μάζας και χρόνους κατακράτησης καθαρών ουσιών αναφοράς των μη αναγνωρισμένων μεταβολιτών με σκοπό την ταυτοποίησή τους.

δ. Kyoto Encyclopedia of Genes and Genomes (KEGG): Η Εγκυκλοπαίδεια του Κιότο για τα Γονίδια (<http://www.genome.jp/kegg>), είναι μια διαδικτυακή βάση που περιλαμβάνει δεδομένα για την κατανόηση των λειτουργιών βιολογικών συστημάτων από το μέγεθος κυττάρου έως οργανισμούς και οικοσυστήματα. Είναι πηγή δεδομένων για την κατανόηση λειτουργιών υψηλού επιπέδου και παρέχει πληροφορίες για χημικές ουσίες αλλά και για βιολογικά μονοπάτια, ασθένειες, φάρμακα και γονίδια που χρησιμοποιούνται σε καινοτόμα πεδία, όπως η βιοπληροφορική, οι μελέτες και αναλύσεις «omics» (genomics, metagenomics, metabolomics) η μοντελοποίηση βιολογικών συστημάτων και η μεταγραφική έρευνα στην ανάπτυξη φαρμάκων. Σύμφωνα με τους δημιουργούς του, η KEGG είναι μια «ηλεκτρονική αναπαράσταση» του βιολογικού συστήματος.

γ. PubChem: Η PubChem (<https://pubchem.ncbi.nlm.nih.gov>) είναι μια βάση δεδομένων χημικών μορίων και των επιδράσεων τους σε βιολογικές αναλύσεις. Το σύστημα υποστηρίζεται από το Εθνικό κέντρο για βιοτεχνολογικές πληροφορίες (National Center for Biotechnology Information) (NCBI) των Η.Π.Α. και την Εθνική βιβλιοθήκη ιατρικής (National Library of Medicine), που είναι μέλος των Εθνικών Ινστιτούτων Υγείας των ΗΠΑ (National Institutes of Health) (NIH). Είναι μια ελεύθερα

προσβάσιμη βάση δεδομένων η οποία περιέχει περιγραφές ουσιών και μικρομορίων με λιγότερα από 1000 άτομα και 1000 δεσμούς. Παρέχει πληροφορίες για συνώνυμα, χημικές ιδιότητες, χημική δομή, βιοδραστικότητα και σχέσεις με δομικά σχετικές ενώσεις και άλλες βάσεις δεδομένων NCBI όπως η PubMed. Απαρτίζεται από τρεις επιμέρους βάσεις οι οποίες είναι συνδεδεμένες μεταξύ τους:

-Βάση για ενώσεις που περιλαμβάνει καθαρές και χαρακτηρισμένες χημικές ενώσεις και το Σεπτέμβριο 2014 περιείχε 54 εκατομμύρια καταχωρίσεις.

-Βάση για ουσίες που περιλαμβάνει μείγματα, εκχυλίσματα, σύμπλοκα και μη χαρακτηρισμένες ουσίες και το Σεπτέμβριο 2014 περιείχε 163,5 εκατομμύρια καταχωρίσεις.

-Βάση βιολογικής δραστηριότητας, αποτέλεσμα 6059 προγραμμάτων.

Η αναζήτηση των βάσεων δεδομένων είναι δυνατή για μια ευρεία περιοχή ιδιοτήτων που περιλαμβάνει χημική δομή, ονόματα τμημάτων, χημικό τύπο, μοριακή μάζα και αριθμό δοτών και αποδεκτών δεσμών υδρογόνου.

Τελικά, με τη χρήση του GC/EI/MS ανιχνεύτηκαν 179 μεταβολικοί χαρακτήρες της ποικιλίας Pinto, από τους οποίους 122 έχουν ταυτοποιηθεί ενώ για τους 27 γνωρίζουμε την ομάδα στην οποία ανήκουν (π.χ. υδατάνθρακες, καρβοξυλικά οξέα). Για τους 30 γνωρίζουμε μόνο το χρόνο εξόδου (retention time). Δηλαδή αριθμητικά, ταυτοποιήθηκε πλήρως ή μερικώς το 83.2% των μεταβολικών χαρακτήρων. Εκτός από την αριθμητική εκτίμηση όμως, χρήσιμο είναι να ληφθεί υπόψη το γεγονός, ότι οι μη ταυτοποιημένοι μεταβολικοί χαρακτήρες καταλαμβάνουν ως σχετική περιεκτικότητα ποσοστό μικρότερο του 5% του καταγεγραμμένου μεταβολικού προφίλ.

Έχοντας στοιχεία για τις βιοσυνθετικές οδούς στις οποίες συμμετέχουν οι μεταβολίτες που ανιχνεύτηκαν, κατέστη δυνατό να σχηματιστεί το δίκτυο αλληλεπιδράσεών τους στο μεταβολισμό της ποικιλίας Pinto. Συνεχές βέλος χρησιμοποιήθηκε για το συμβολισμό άμεσης σχέσης, ενώ διακεκομμένο για την ύπηρεξη ενδιάμεσων μεταβολιτών. Επίσης, απεικονίστηκε η συμπεριφορά της ουσίας μετά τις μεταχειρίσεις, δηλαδή εάν η παραγωγή της, παρουσίασε αύξηση-ερυθρός χρωματισμός, μείωση-πράσινος χρωματισμός ή καμία μεταβολή-γκρι χρωματισμός. Τα δεδομένα παρουσιάζονται ξεχωριστά για κάθε μεταχείριση (Ozone, EDU, Penconazole) τις δύο χρονικές στιγμές δειγματοληψίας (timepoints T1- T2)

(**Εικ. 27** έως και **Εικ. 31**) Επίσης, καταρτίστηκαν τα αντίστοιχα δίκτυα που παρουσιάζουν την επίδραση όλων των μεταχειρίσεων για τις δύο χρονικές στιγμές T1 (2h) και T2 (4h) (**Εικ. 32** και **Εικ. 33**).

2.7. Βιοπληροφορική ανάλυση

Για τον ποιοτικό έλεγχο της ανάλυσης, την ομαδοποίηση των επεμβάσεων και την ανακάλυψη βιοσημαντών (biomarkers) πραγματοποιήθηκε πολυπαραγοντική ανάλυση χρησιμοποιώντας το λογισμικό SIMCA-P+ v.12.0 (Umetrics, MKS Instruments Inc., Umeå, Sweden), όπου κάθε σημείο απεικονίζει μια μεταχείριση. Για την ανακάλυψη βιοσημαντών (biomarkers) χρησιμοποιήθηκε η μέθοδος ορθογωνίων ελαχίστων τετραγώνων (Orthogonal Partial Least Squares-Discriminant Analysis, OPLS-DA) ($P < 0.05$). Για τον υπολογισμό των σφαλμάτων χρησιμοποιήθηκε η μέθοδος Jack-knifing με διάστημα εμπιστοσύνης 95%.

3



Αποτελέσματα

3. ΑΠΟΤΕΛΕΣΜΑΤΑ

3.1 Επίδραση διαφόρων συγκεντρώσεων όζοντος

Τα αποτελέσματα των προκαταρκτικών πειραμάτων βοήθησαν στην επιλογή της κατάλληλης συγκέντρωσης όζοντος για την πραγματοποίηση της μεταβολομικής μελέτης.

Αρχικά εφαρμόστηκε συγκέντρωση όζοντος 150 ppb για 8 h. Όμως τα φυτά παρουσίασαν συμπτώματα σε μεγάλο βαθμό (**Εικ. 10, Εικ. 11**). Στη συνέχεια εφαρμόστηκε συγκέντρωση 90 ppb αλλά τα αποτελέσματα εξακολουθούσαν να μην είναι ικανοποιητικά. Τέλος αποφασίστηκε να εφαρμοστεί συγκέντρωση 70 ppb όζοντος που μάλιστα αντιστοιχεί και στις συνήθεις συγκεντρώσεις όζοντος στο μεσογειακό χώρο (και στη χώρα μας) κατά τους καλοκαιρινούς μήνες.



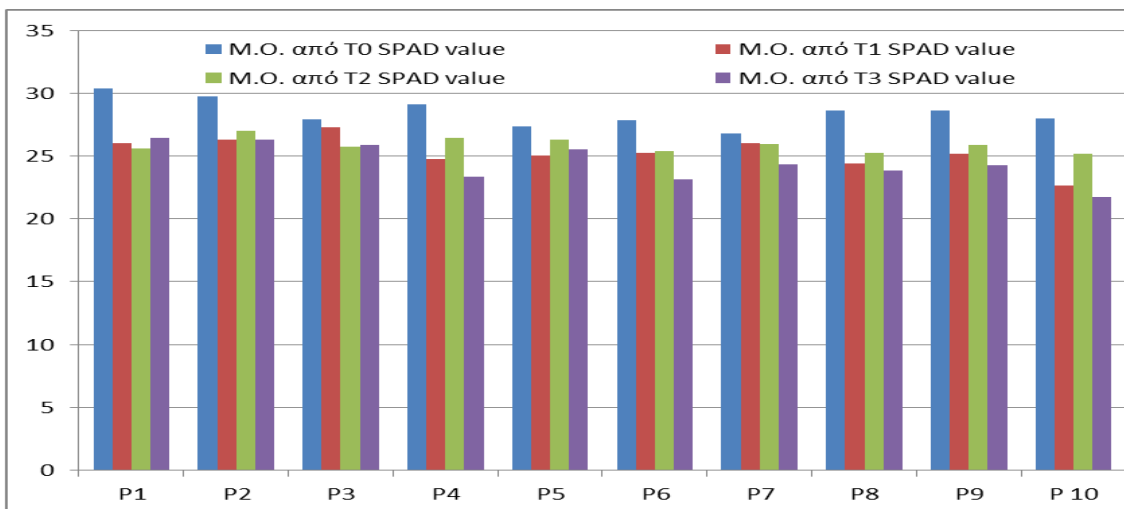
Εικ. 10: Φυτά *Phaseolus vulgaris* cv. Pinto ύστερα από έκθεση σε όζον συγκέντρωσης 150 ppb για 8 h.

Όσον αφορά το χρόνο δράσης του όζοντος μέχρι τη στιγμή της δειγματοληψίας, διαπιστώθηκε ότι οι 8 h που αναφέρονται στη

βιβλιογραφία επιφέρουν καταστροφή των ιστών σε τέτοιο βαθμό που είναι αδύνατη η πραγματοποίηση μεταβολομικής ανάλυσης.

Συγχρόνως, αυτά τα προκαταρκτικά πειράματα έδωσαν τη δυνατότητα να καταρτιστεί ένα ακριβέστερο χρονοδιάγραμμα σποράς και δειγματοληψίας. Γενικά καταβλήθηκε μέριμνα ώστε η μεταβολομική ανάλυση να πραγματοποιείται κατά το δυνατόν σε ομοιόμορφο φυτικό υλικό, ώστε να μην επιδρούν άλλοι παράγοντες εκτός αυτών που μελετώνται. Για το λόγο αυτό, εκτός από τον υπολογισμό της φυτρωτικότητας των διαθέσιμων σπόρων, εκτιμήθηκε κατά προσέγγιση και το ποσοστό των σπόρων που φυτρώνουν και αναπτύσσονται ομοιόμορφα. Αυτή η τακτική έδωσε τη δυνατότητα να σπαρθούν τόσοι σπόροι, ώστε να εξασφαλιστεί μεν το απαιτούμενο υλικό ταυτόχρονα δε να μην σπαταληθεί.

Διαπιστώθηκε ότι η δειγματοληψία του πρώτου πραγματικού φύλλου (τρίφυλλου) δίνει ικανοποιητική ποσότητα φυτικού ιστού για τις αναλύσεις που επρόκειτο να γίνουν.



Εικ. 11: Μέσος όρος (δέκα μετρήσεων) της τιμής SPAD πλήρως εκπτυγμένων φύλλων δέκα φυτών (P1-P10) που εκτέθηκαν σε όζον συγκέντρωσης 150 ppb για 8 h. Οι μετρήσεις πάρθηκαν πριν την έκθεση (T0), μετά από 2 (T1), 3 (T2) και 5 (T3) ημέρες μετά την έκθεση.

3.2. Μακροσκοπικά ορατά συμπτώματα της επίδρασης του όζοντος στο φασόλι

Αμέσως μετά την έκθεση στο όζον, δεν παρατηρήθηκαν ορατά μακροσκοπικά συμπτώματα. Μία ημέρα μετά, και ενώ είχε παύσει η έκθεση στο όζον εμφανίστηκαν χλωρωτικές και νεκρωτικές κηλίδες, ελαφρά βυθισμένες χαρακτηριστικές της δράσεις του όζοντος, όπως φαίνεται στην **Εικ. 12**.

Η οπτική εκτίμηση των μακροσκοπικά ορατών συμπτωμάτων κατέγραψε ποσοστά της τάξης 5-7% για τα φυτά που δέχτηκαν ταυτόχρονη επέμβαση με EDU και Penconazole για την πρώτη δειγματοληψία που πραγματοποιήθηκε μετά από 2 ώρες έκθεσης σε όζον.

Κατά τη δεύτερη δειγματοληψία, ύστερα από 4 ώρες συνολικής έκθεσης σε όζον παρουσιάστηκαν συμπτώματα σε:

- φυτά που δέχτηκαν επέμβαση μόνο EDU σε ποσοστό συμπτωμάτων 7-10%
- φυτά που δέχτηκαν ταυτόχρονη επέμβαση με EDU και Penconazole σε ποσοστό 5%.



Εικ. 12: Ύστερα από έκθεση σε όζον συγκέντρωσης 70 ppb, εμφανίστηκαν χλωρωτικές και νεκρωτικές κηλίδες χαρακτηριστικές της δράσης του.



Εικ. 13: Φυτά *Phaseolus vulgaris* cv. Pinto που ψεκάστηκαν με καθαρό νερό και εκτέθηκαν σε όζον 70 ppb για χρονική διάρκεια (από αριστερά προς τα δεξιά) 0, 2, 4, 6, 8 ώρες.



Εικ. 14: Φυτά *Phaseolus vulgaris* cv. Pinto που ψεκάστηκαν με EDU και εκτέθηκαν σε όζον 70 ppb για χρονική διάρκεια (από αριστερά προς τα δεξιά) 0, 2, 4, 6, 8 ώρες.



Εικ. 15: Φυτά *Phaseolus vulgaris* cv. Pinto που ψεκάστηκαν με Penconazole και εκτέθηκαν σε όζον 70 ppb για χρονική διάρκεια (από αριστερά προς τα δεξιά) 0, 2, 4, 6, 8 ώρες.



Εικ. 16: Φυτά *Phaseolus vulgaris* cv. Pinto που ψεκάστηκαν με EDU και Penconazole και εκτέθηκαν σε όζον 70 ppb για χρονική διάρκεια (από αριστερά προς τα δεξιά) 0, 2, 4, 6, 8 ώρες.

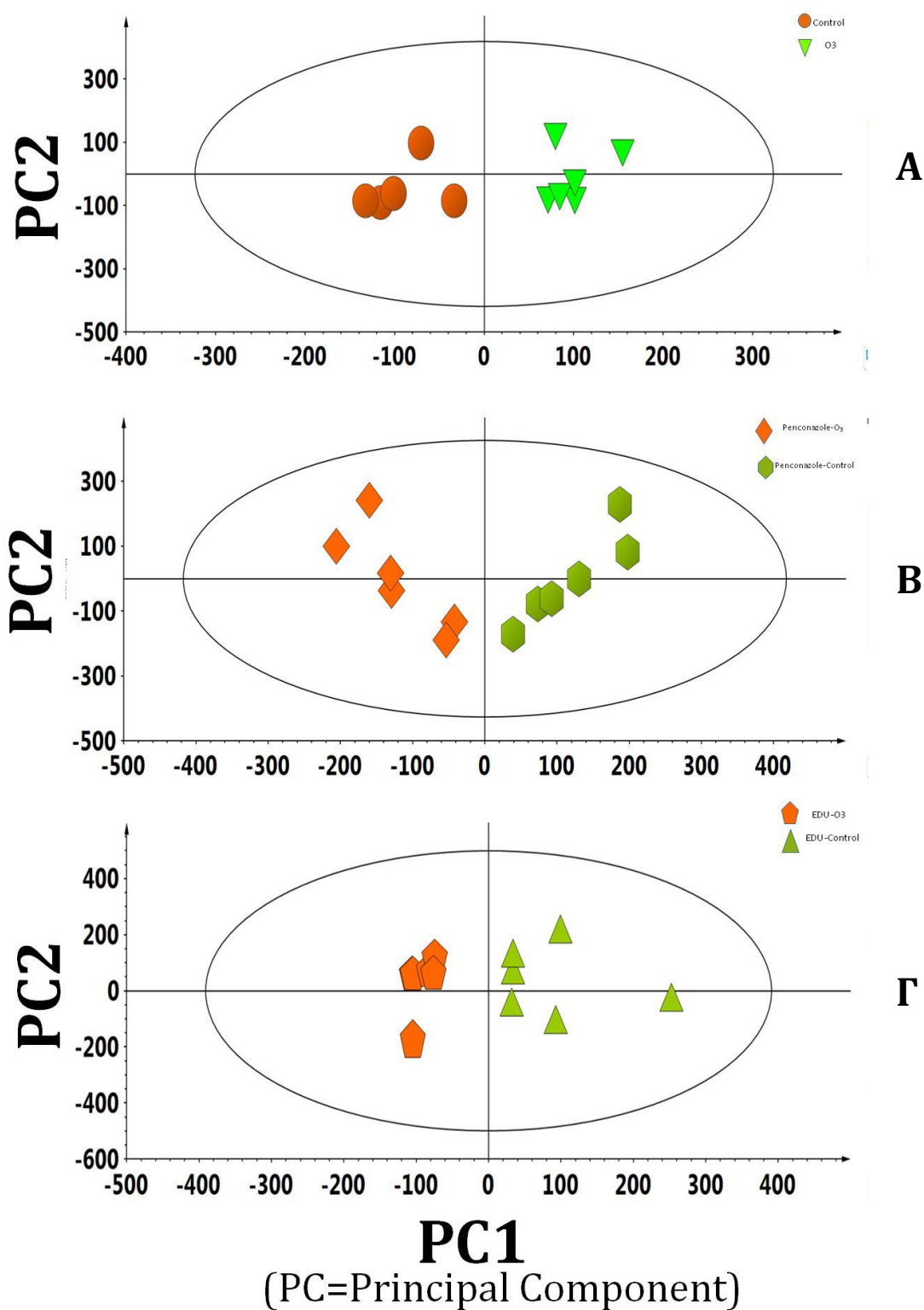


Εικ. 17: Φυτά *Phaseolus vulgaris* cv. Pinto που (από αριστερά προς τα δεξιά), είτε δεν δέχτηκαν καμία μεταχείριση (Control), είτε εκτέθηκαν σε όζον συγκέντρωσης 70 ppb για χρονική διάρκεια 2 ώρες και ψεκάστηκαν με καθαρό νερό, EDU, Penconazole, EDU και Penconazole.



Εικ. 18: Φυτά *Phaseolus vulgaris* cv. Pinto που (από αριστερά προς τα δεξιά), είτε δεν δέχτηκαν καμία μεταχείριση (Control), είτε εκτέθηκαν σε όζον συγκέντρωσης 70 ppb για χρονική διάρκεια 4 ώρες και ψεκάστηκαν με καθαρό νερό, EDU, Penconazole, EDU και Penconazole.

3.3. Επισκόπηση μεταβολομικής ανάλυσης



Εικ. 19: OPLS-DA score-plots πολυπαραγοντικών αναλύσεων των μεταβολικών προφίλ των μεταχειρίσεων με Όζον (A), Penconazole x Όζον (B) και EDU x Όζον (Γ) και των αντίστοιχων μαρτύρων (controls).

Τα αποτελέσματα της πολυπαραγοντικής ανάλυσης παρουσιάζονται στην **Εικ. 19** όπου τα μεταβολικά προφίλ ομαδοποιούνται σε πλήρως διακριτές ομάδες. Το μοτίβο αυτό δείχνει ότι οι επιλεγθείσες μεταβλητές έχουν υψηλή διαχωριστική (διακριτική) ικανότητα. Ταυτόχρονα, οι εσωτερικές μεταβλητές κατάταξης του μοντέλου έχουν και ενημερωτικό χαρακτήρα για την επίδραση των επεμβάσεων με όζον, EDU και Penconazole. Η **Εικ. 19** δείχνει σχετικά καλή επαναληψιμότητα στις επεμβάσεις που αποτελεί επιβεβαίωση της εφαρμοστικότητας και της των βιοαναλυτικών – βιοπληροφορικών αναλύσεων.

3.4. Επίδραση των επεμβάσεων στο μεταβολισμό του φασολιού ανάλογα με τη χαρακτηριστική χημική ομάδα των μεταβολιτών

Στις εικόνες 20 έως 22 παρουσιάζεται ομαδοποίηση των μεταβολιτών που ταυτοποιήθηκαν σύμφωνα με τη χαρακτηριστική τους χημική ομάδα. Επίσης, έχει καταγραφεί ο αριθμός των μελών της ομάδας. Όπως φαίνεται, ανάλογα με τη μεταχείριση, εντοπίστηκε διαφορετικός αριθμός μεταβολιτών ανά κατηγορία. Συγκεκριμένα, φαίνεται ότι οι πολυπληθέστερες χημικές ομάδες σε όλες τις μεταχειρίσεις είναι οι υδατάνθρακες, τα καρβοξυλικά οξέα και τα λιπαρά οξέα. Στη μεταχείριση μόνο με όζον, εκτός από τις προαναφερθείσες ομάδες, σχετικά αυξημένες τιμές παρουσίασε και η ομάδα των αμινοξέων.

CHEMICAL GROUPS PHASEOLUS VULGARIS	EOT1_up	EOT1_down	EOT1_non	EPOT1_up	EPOT1_down	EPOT1_non	EPT1_up	EPT1_down	EPT1_non	ET1_up	ET1_down	ET1_non	POT1_up	POT1_down	POT1_non	PT1_up	PT1_down	PT1_non
Aldehydes	1	0	0	1	0	0	0	0	1	1	0	0	1	0	0	0	0	1
Amino acids	1	6	4	2	6	3	7	3	1	4	5	2	4	4	3	6	2	3
Carbohydrates	9	12	10	17	9	5	8	12	11	5	13	13	9	7	15	12	10	9
Carbohydrates; Carbohydrate derivatives; Sugar a	5	2	2	8	1	0	2	3	4	1	2	6	1	2	6	4	2	3
Carbohydrates; Carbohydrate phosphates	0	1	0	1	0	0	1	0	0	0	0	1	0	1	0	1	0	0
Carbohydrates; Disaccharides	1	0	0	1	0	0	1	0	0	1	0	0	1	0	0	1	0	0
Carbohydrates; Glucosides	1	1	0	1	1	0	0	1	1	1	1	0	1	0	1	0	2	0
Carbohydrates; Glycosides	1	0	0	0	1	0	0	1	0	0	1	0	1	0	0	0	1	0
Carbohydrates; Phosphoric acid derivatives	1	0	0	1	0	0	1	0	0	0	0	1	0	1	0	1	0	0
Carbohydrates; Sugar acids	1	0	1	0	1	1	1	0	1	1	0	1	1	0	1	1	0	1
Carbohydrates; Sugar acids; Gluconates	0	1	0	0	1	0	1	0	0	0	0	1	0	1	0	1	0	0
Carboxylic acids	18	3	2	13	8	2	9	7	7	5	12	6	3	6	14	8	11	4
Carboxylic acids; Carboxylic acids esters	1	0	0	1	0	0	0	0	1	0	0	1	0	0	1	1	0	0
Carboxylic acids; Phenylpropanoids	0	0	2	0	2	0	0	2	0	0	2	0	0	0	2	1	1	0
Carboxylic acids; Vitamins	0	0	2	1	1	0	2	0	0	0	0	2	0	1	1	2	0	0
Fatty acyls; Fatty acids and conjugates	7	4	4	5	4	6	5	4	6	2	6	7	4	4	7	7	2	6
Fatty acyls; Fatty acids and conjugates; Carboxylic	1	0	0	0	0	1	1	0	0	0	1	0	0	1	0	1	0	0
Fatty acyls; Fatty alcohols	1	1	0	1	1	0	1	1	0	0	2	0	0	0	2	0	2	0
Fatty acyls; Fatty Amides	1	0	0	1	0	0	0	0	1	1	0	0	1	0	0	0	0	1
Fatty acyls; Fatty nitriles	0	1	0	1	0	0	0	1	0	0	1	0	0	0	1	0	1	0
Fatty acyls; Hydrocarbons	1	0	1	0	1	1	1	1	0	0	0	2	1	1	0	0	0	2
Gas; Plant hormones	1	0	0	1	0	0	1	0	0	0	0	1	0	0	1	1	0	0
Glycerolipids	1	0	0	0	1	0	1	0	0	0	1	0	0	1	0	1	0	0
Penconazole	0	0	1	1	0	0	1	0	0	0	0	1	1	0	0	1	0	0
Phosphoric acid derivatives	0	1	0	1	0	0	0	0	1	0	1	0	0	0	1	0	1	0
Phosphoric acid derivatives; Amino alcohols	0	0	1	0	0	1	0	0	1	0	0	1	0	0	1	0	0	1
Sterol lipids	1	0	0	1	0	0	0	1	0	0	0	1	0	0	1	0	0	1
Terpenoids; Diterpenoids	1	0	0	1	0	0	0	1	0	0	1	0	1	0	0	0	1	0

Εικ. 20: Ομαδοποίηση των μεταβολιτών που ανιχνεύτηκαν, σύμφωνα με τη χαρακτηριστική χημική τους ομάδα, ύστερα από έκθεση των φυτών σε όζον (O) για 2h (T1) και μεταχειρίσεις είτε με EDU (E), είτε με Penconazole (P), είτε με EDU και Penconazole (EP) και αύξησαν (up), μείωσαν (down) ή διατήρησαν σταθερή τη συγκέντρωσή τους (non)

CHEMICAL GROUPS PHASEOLUS VULGARIS	EOT2_up	EOT2_down	EOT2_non	EPOT2_up	EPOT2_down	EPOT2_non	EPT2_up	EPT2_down	EPT2_non	ET2_up	ET2_down	ET2_non	POT2_up	POT2_down	POT2_non	PT2_up	PT2_down	PT2_non
Aldehydes	0	0	1	0	0	1	0	0	1	0	0	1	0	1	0	0	0	1
Amino acids	3	5	3	7	1	3	5	3	3	0	7	4	9	1	1	4	4	3
Carbohydrates	13	7	11	17	3	11	10	4	17	13	4	14	15	7	9	9	3	19
Carbohydrates; Carbohydrate derivatives; Sugar alcohols	3	1	5	4	0	5	2	1	6	0	2	7	6	1	2	2	2	5
Carbohydrates; Carbohydrate phosphates	1	0	0	1	0	0	0	1	0	0	1	0	1	0	0	0	1	0
Carbohydrates; Disaccharides	0	1	0	0	1	0	0	1	0	0	1	0	1	0	0	0	1	0
Carbohydrates; Glucosides	1	0	1	1	0	1	0	1	1	0	1	1	1	1	0	0	1	1
Carbohydrates; Glycosides	0	1	0	1	0	0	0	1	0	0	1	0	0	1	0	0	1	0
Carbohydrates; Phosphoric acid derivatives	1	0	0	1	0	0	1	0	0	1	0	0	1	0	0	1	0	0
Carbohydrates; Sugar acids	1	1	0	0	1	1	0	0	2	0	1	1	1	1	0	0	0	2
Carbohydrates; Sugar acids; Gluconates	1	0	0	1	0	0	0	1	0	0	1	0	1	0	0	0	0	1
Carboxylic acids	9	4	10	10	4	9	6	8	9	5	8	10	9	9	5	7	5	11
Carboxylic acids; Carboxylic acids esters	0	0	1	1	0	0	1	0	0	0	0	1	0	0	1	0	0	1
Carboxylic acids; Phenylpropanoids	2	0	0	2	0	0	0	1	1	0	1	1	2	0	0	1	0	1
Carboxylic acids; Vitamins	2	0	0	1	0	1	1	0	1	1	0	1	1	1	0	0	0	2
Fatty acyls; Fatty acids and conjugates	7	2	6	6	1	8	4	4	7	3	5	7	8	0	7	3	3	9
Fatty acyls; Fatty acids and conjugates; Carboxylic acids	1	0	0	0	0	1	0	0	1	0	0	1	1	0	0	0	1	0
Fatty acyls; Fatty alcohols	1	1	0	0	1	1	1	1	0	0	1	1	0	1	1	0	1	1
Fatty acyls; Fatty Amides	0	1	0	0	1	0	0	1	0	0	0	1	1	0	0	0	0	1
Fatty acyls; Fatty nitriles	0	0	1	0	0	1	0	0	1	1	0	0	0	0	1	0	0	1
Fatty acyls; Hydrocarbons	1	1	0	0	0	2	0	1	1	0	0	2	2	0	0	0	0	2
Gas; Plant hormones	1	0	0	0	0	1	0	0	1	0	0	1	0	0	1	0	0	1
Glycerolipids	1	0	0	0	1	0	1	0	0	1	0	0	1	0	0	1	0	0
Penconazole	0	0	1	1	0	0	1	0	0	0	0	1	1	0	0	1	0	0
Phosphoric acid derivatives	1	0	0	1	0	0	0	0	1	0	0	1	1	0	0	0	0	1
Phosphoric acid derivatives; Amino alcohols	0	0	1	1	0	0	0	0	1	0	0	1	1	0	0	0	0	1
Sterol lipids	0	1	0	0	0	1	0	0	1	1	0	0	0	1	0	0	0	1
Terpenoids; Diterpenoids	1	0	0	1	0	0	0	1	0	0	1	0	1	0	0	0	1	0

Εικ. 21: Ομαδοποίηση των μεταβολιτών που ανιχνεύτηκαν, σύμφωνα με τη χαρακτηριστική χημική τους ομάδα, ύστερα από έκθεση των φυτών σε όζον (O) για 4h (T2) και μεταχειρίσεις είτε με EDU (E), είτε με Penconazole (P), είτε με EDU και Penconazole (EP) και αύξηση (up), μείωση (down) ή διατήρησαν σταθερή τη συγκέντρωσή τους (non).

CHEMICAL GROUPS PHASEOLUS VULGARIS	C VS C0 T1_up	C VS C0 T1_down	C VS C0 T1_non	C VS C0 T2_up	C VS C0 T2_down	C VS C0 T2_non
Aldehydes	0	0	1	0	0	1
Amino acids	5	3	3	2	4	5
Carbohydrates	10	9	12	9	5	17
Carbohydrates; Carbohydrate derivatives; Sugar a	1	1	7	4	1	4
Carbohydrates; Carbohydrate phosphates	0	1	0	0	1	0
Carbohydrates; Disaccharides	1	0	0	1	0	0
Carbohydrates; Glucosides	0	1	1	0	1	1
Carbohydrates; Glycosides	0	0	1	0	1	0
Carbohydrates; Phosphoric acid derivatives	0	1	0	0	1	0
Carbohydrates; Sugar acids	0	0	2	1	0	1
Carbohydrates; Sugar acids; Gluconates	0	0	1	0	1	0
Carboxylic acids	5	10	8	4	8	11
Carboxylic acids; Carboxylic acids esters	0	1	0	0	0	1
Carboxylic acids; Phenylpropanoids	0	1	1	0	2	0
Carboxylic acids; Vitamins	0	1	1	0	0	2
Fatty acyls; Fatty acids and conjugates	6	4	5	2	7	6
Fatty acyls; Fatty acids and conjugates; Carboxylic	0	0	1	0	1	0
Fatty acyls; Fatty alcohols	1	0	1	0	1	1
Fatty acyls; Fatty Amides	1	0	0	1	0	0
Fatty acyls; Fatty nitriles	0	1	0	0	1	0
Fatty acyls; Hydrocarbons	1	0	1	0	1	1
Gas; Plant hormones	0	0	1	0	0	1
Glycerolipids	0	1	0	1	0	0
Penconazole	0	0	0	0	0	0
Phosphoric acid derivatives	0	1	0	0	0	1
Phosphoric acid derivatives; Amino alcohols	0	0	1	0	0	1
Sterol lipids	0	1	0	1	0	0
Terpenoids; Diterpenoids	0	1	0	0	1	0

Εικ. 22: Ομαδοποίηση των μεταβολιτών που ανιχνεύτηκαν, σύμφωνα με τη χαρακτηριστική χημική τους ομάδα, ύστερα από έκθεση των φυτών σε **καθαρό αέρα (C) ή σε όζον (CO)** είτε για 2h (T1) είτε για 4h (T2) και αύξησαν (up), μείωσαν (down) ή διατήρησαν σταθερή τη συγκέντρωσή τους (non)

3.5. Επίδραση της EDU, της Penconazole και του όζοντος στις ομάδες μεταβολικών οδών του *Phaseolus vulgaris*

Οι μεταβολίτες που ανιχνεύτηκαν κατηγοριοποιούνται στις παρακάτω δεκατρείς (13) ομάδες μεταβολικών οδών, σύμφωνα με τη Διαδικτυακή Εγκυκλοπαίδεια του Κιότο για τα Γονίδια (KEGG).

- **Global and overview maps**

- map01200 Carbon metabolism
- map01210 2-Oxocarboxylic acid metabolism
- map01212 Fatty acid metabolism
- map01220 Degradation of aromatic compounds
- map01230 Biosynthesis of amino acids

- **Carbohydrate metabolism**

- map00010 Glycolysis / Gluconeogenesis
- map00020 Citrate cycle (TCA cycle)
- map00030 Pentose phosphate pathway
- map00040 Pentose and glucuronate interconversions
- map00051 Fructose and mannose metabolism
- map00052 Galactose metabolism
- map00053 Ascorbate and aldarate metabolism
- map00500 Starch and sucrose metabolism
- map00520 Amino sugar and nucleotide sugar metabolism
- map00562 Inositol phosphate metabolism
- map00620 Pyruvate metabolism
- map00630 Glyoxylate and dicarboxylate metabolism
- map00640 Propanoate metabolism
- map00650 Butanoate metabolism
- map00660 C5-Branched dibasic acid metabolism

- **Biosynthesis of other secondary metabolites**

- map00901 Indole alkaloid biosynthesis
- map00940 Phenylpropanoid biosynthesis
- map00960 Tropane, piperidine and pyridine alkaloid biosynthesis

- **Chemical structure transformation maps**

- map01061 Biosynthesis of phenylpropanoids
- map01062 Biosynthesis of terpenoids and steroids
- map01063 Biosynthesis of alkaloids derived from shikimate pathway
- map01064 Biosynthesis of alkaloids derived from ornithine, lysine and nicotinic acid
- map01065 Biosynthesis of alkaloids derived from histidine and purine
- map01066 Biosynthesis of alkaloids derived from terpenoid and polyketide
- map01070 Biosynthesis of plant hormones

- **Energy metabolism**

- map00190 Oxidative phosphorylation
 - map00195 Photosynthesis
 - map00710 Carbon fixation in photosynthetic organisms
 - map00910 Nitrogen metabolism

- **Lipid metabolism**

- map00061 Fatty acid biosynthesis
 - map00062 Fatty acid elongation
 - map00071 Fatty acid degradation
 - map00073 Cutin, suberine and wax biosynthesis
 - map00100 Steroid biosynthesis
 - map00120 Primary bile acid biosynthesis
 - map00561 Glycerolipid metabolism
 - map00564 Glycerophospholipid metabolism
 - map00591 Linoleic acid metabolism
 - map00592 alpha-Linolenic acid metabolism
 - map00600 Sphingolipid metabolism
 - map01040 Biosynthesis of unsaturated fatty acids

- **Nucleotide metabolism**

- map00230 Purine metabolism
 - map00240 Pyrimidine metabolism

- **Amino acid metabolism**

- map00220 Arginine biosynthesis
 - map00250 Alanine, aspartate and glutamate metabolism
 - map00260 Glycine, serine and threonine metabolism
 - map00270 Cysteine and methionine metabolism
 - map00280 Valine, leucine and isoleucine degradation
 - map00290 Valine, leucine and isoleucine biosynthesis
 - map00300 Lysine biosynthesis
 - map00310 Lysine degradation
 - map00330 Arginine and proline metabolism
 - map00340 Histidine metabolism
 - map00350 Tyrosine metabolism
 - map00360 Phenylalanine metabolism

- **Metabolism of other amino acids**

- map00410 beta-Alanine metabolism
 - map00430 Taurine and hypotaurine metabolism
 - map00450 Selenocompound metabolism
 - map00471 D-Glutamine and D-glutamate metabolism
 - map00472 D-Arginine and D-ornithine metabolism

map00473 D-Alanine metabolism
map00480 Glutathione metabolism

- **Metabolism of cofactors and vitamins**

map00130 Ubiquinone and other terpenoid-quinone biosynthesis
map00730 Thiamine metabolism
map00750 Vitamin B6 metabolism
map00760 Nicotinate and nicotinamide metabolism
map00770 Pantothenate and CoA biosynthesis
map00860 Porphyrin and chlorophyll metabolism

- **Translation**

map00970 Aminoacyl-tRNA biosynthesis

- **Membrane transport**

map02060 Phosphotransferase system (PTS)

- **Signal transduction**

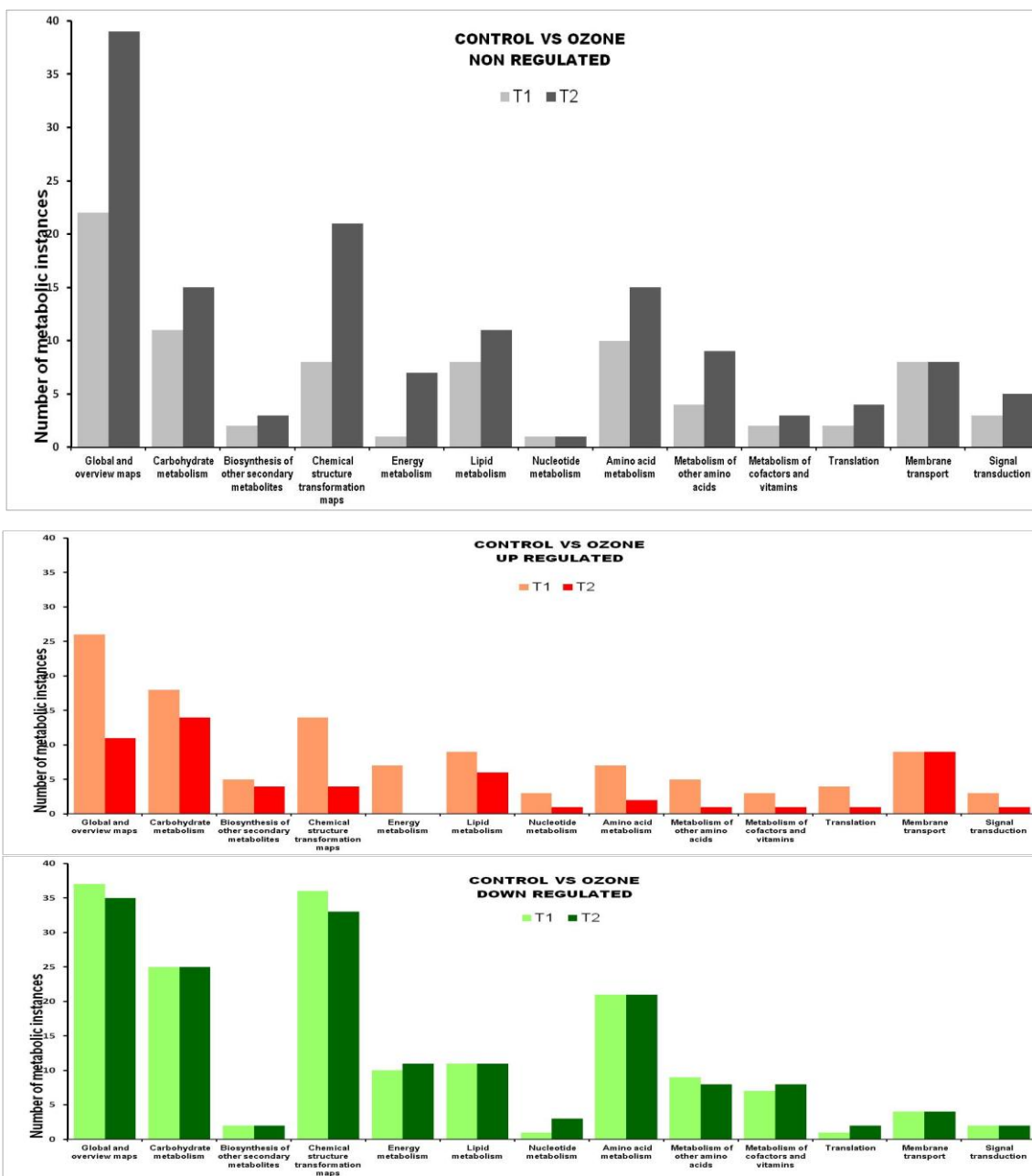
map02020 Two-component system
map04070 Phosphatidylinositol signaling system
map04071 Sphingolipid signaling pathway
map04075 Plant hormone signal transduction

Σύμφωνα με τη μεταβολομική ανάλυση παρατηρήθηκε σημαντική επίδραση των μεταχειρίσεων στις βιοσυνθετικές οδούς.

Παρατηρείται ότι η πολυπληθέστερη ομάδα είναι αυτή του μεταβολισμού των υδατανθράκων (Carbohydrate metabolism), του μεταβολισμού των λιπιδίων (Lipid metabolism) και του μεταβολισμού των αμινοξέων (Amino acid metabolism) (**Εικ. 20-22**).

Στις παρακάτω εικόνες παρουσιάζεται ο αριθμός των μεταβολιτών ανά ομάδα μεταβολικών οδών στις δύο χρονικές στιγμές δειγματοληψίας T1 και T2. Με ερυθρούς χρωματισμούς απεικονίζονται οι μεταβολίτες που υπερπαραράχθηκαν, με πράσινους οι μεταβολίτες που υποπαραράχθηκαν και με γκρι όσοι δεν παρουσίασαν μεταβολή.

Οι απεικονίσεις αυτές καθιστούν ευκολότερη την εξαγωγή αποτελεσμάτων των χειρισμών. Ανάλογα με τις επεμβάσεις παρατηρούνται τα εξής:

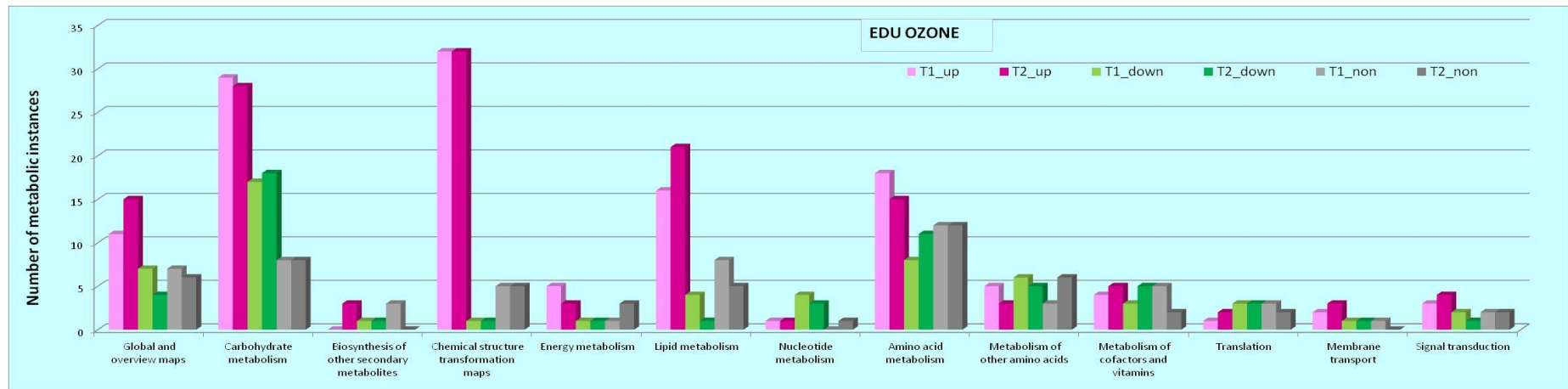
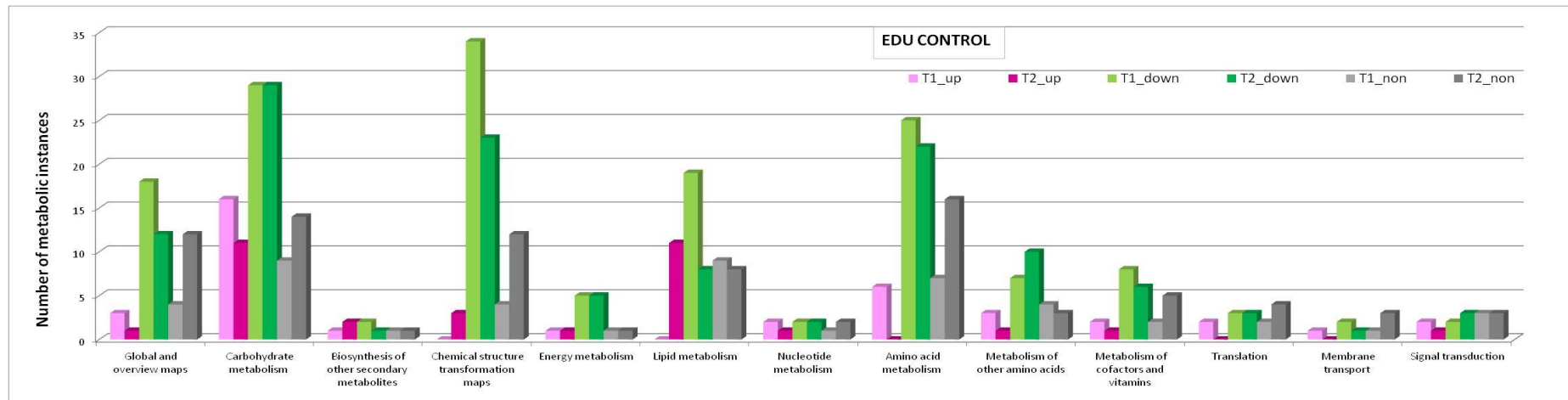


Εικ. 23: Αριθμός μεταβολικών οδών, ανά ομάδα (map), που δεν παρουσίασαν αλλαγή (άνω διάγραμμα) ή παρουσίασαν αύξηση (μεσαίο διάγραμμα) ή μείωση (κάτω διάγραμμα) ύστερα από έκθεση σε όζον για 2h (T1) και 4h (T2).

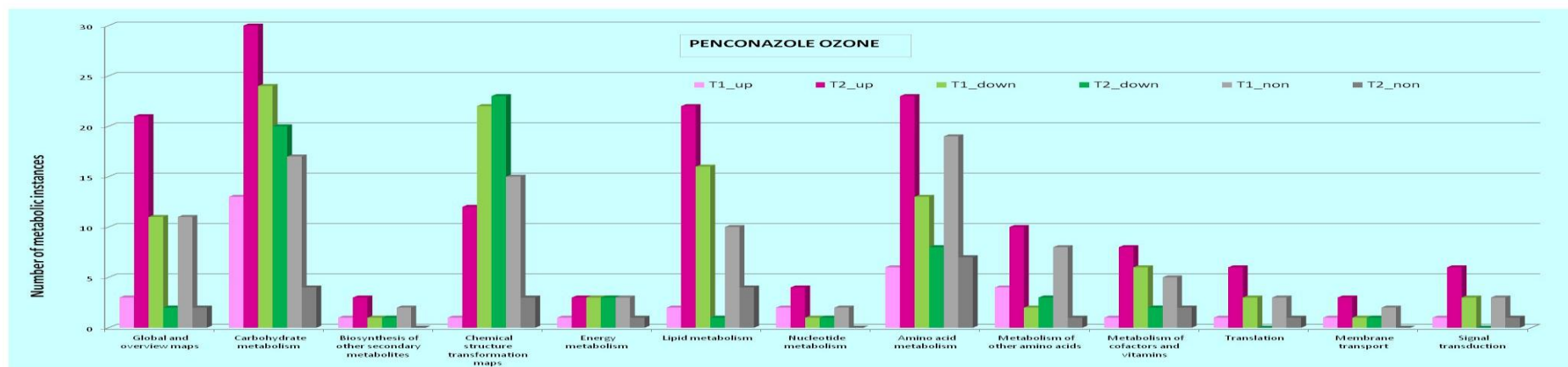
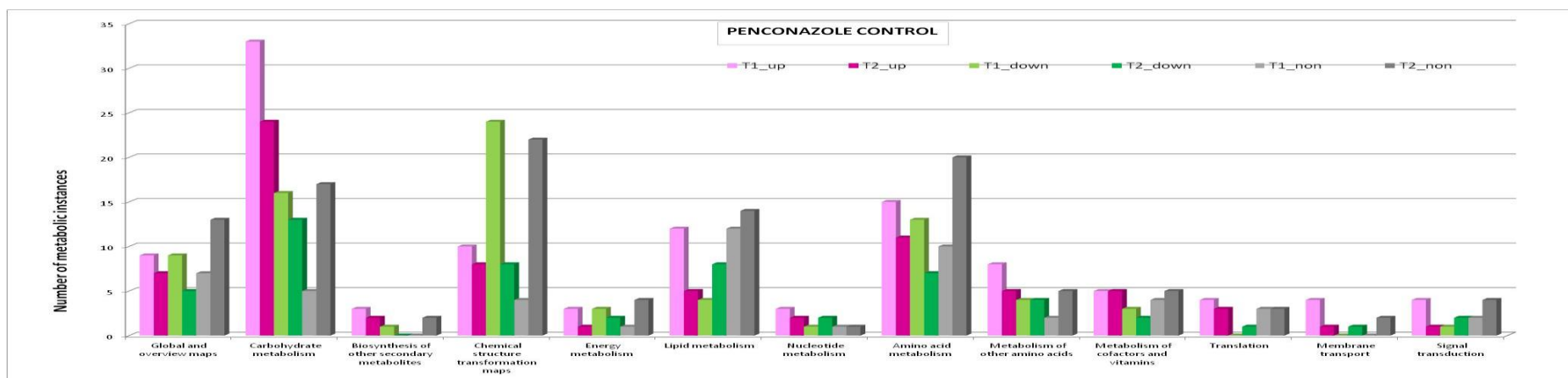
3.5.1. Επίδραση της EDU στις ομάδες μεταβολικών οδών του φασολιού

Σε φυτά που δέχτηκαν την επίδραση της EDU κατεστάλη ο μεταβολισμός των υδατανθράκων (Carbohydrate metabolism), των

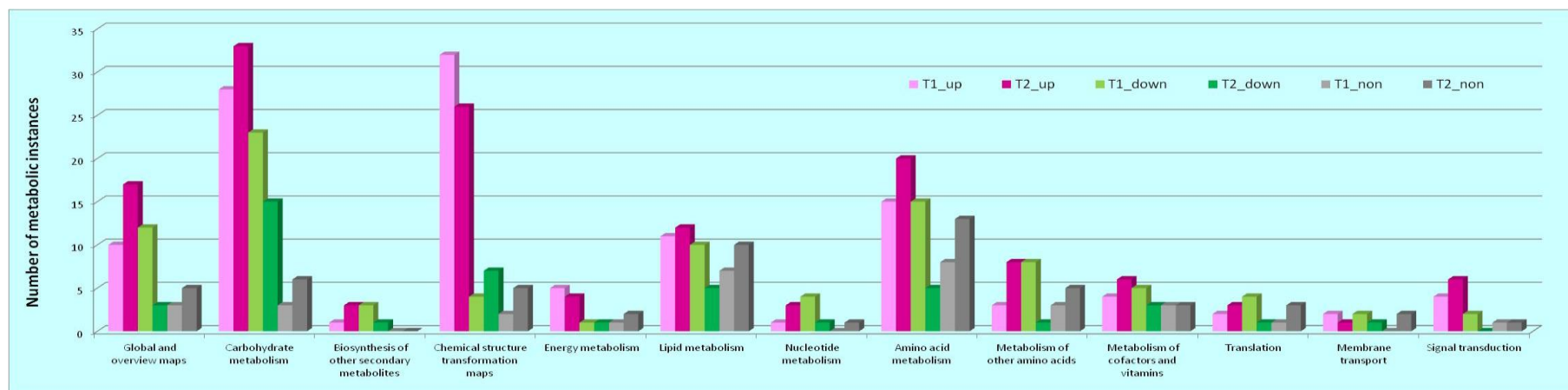
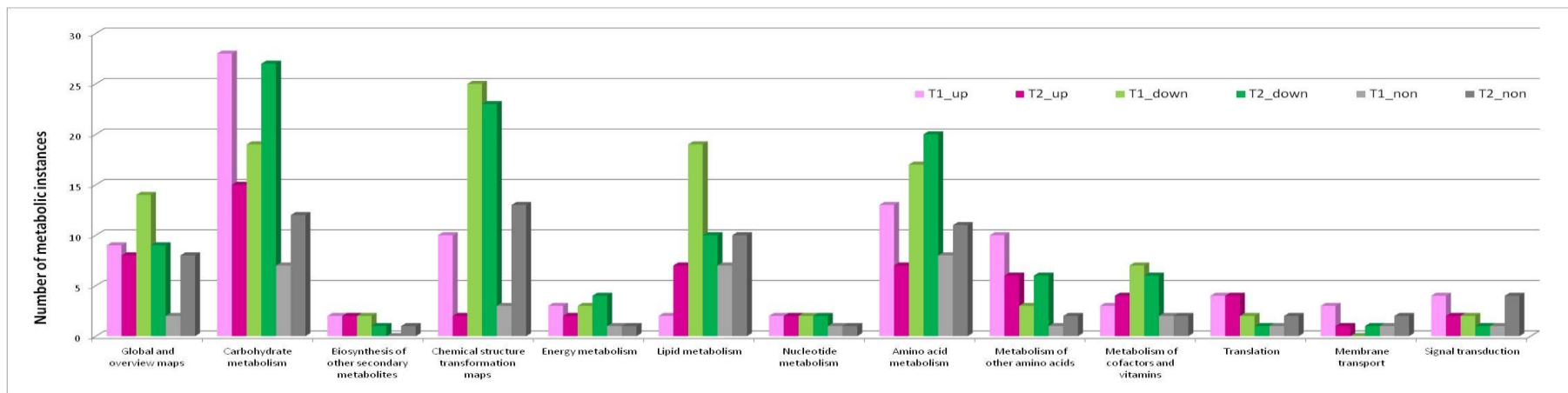
αμινοξέων (Amino acid metabolism) και των λιπαρών οξέων (Lipid metabolism) Εικ. 25. Ως συνολική εικόνα, παρατηρείται ότι υπό τη δράση της EDU οι περισσότερες ομάδες μεταβολιτών απαρτίζονταν από μεταβολίτες οι οποίοι υποπαραχθήκαν. Επίσης, όταν τα φυτά που είχαν δεχτεί μεταχείριση με EDU εκτέθηκαν σε όζον παρουσίασαν ακριβώς την αντίθετη εικόνα στη μεταβολική δραστηριότητα. Άμεσα, οι περισσότεροι μεταβολίτες υπερπαραγονται και αυτό φαίνεται τόσο κατά την πρώτη δειγματοληψία (2h όζον) όσο και κατά τη δεύτερη (4h όζον). Σημαντική αύξηση παρουσιάζεται στο μεταβολισμό των υδατανθράκων, των λιπών αλλά και των αμινοξέων.



Εικ. 24: Αριθμός μεταβολικών οδών, ανά ομάδα (map), που παρουσίασαν αύξηση (ερυθροί χρωματισμοί,) μείωση (πράσινοι χρωματισμοί) ή καμία μεταβολή (γκρι χρωματισμοί) ύστερα από ψεκασμό με EDU και έκθεση σε όζον για 2h (T1) και 4h (T2).



Εικ. 25: Αριθμός μεταβολικών οδών, ανά ομάδα (map), που παρουσίασαν αύξηση (ερυθροί χρωματισμοί,) μείωση (πράσινοι χρωματισμοί) ή καμία μεταβολή (γκρι χρωματισμοί) ύστερα από ψεκασμό με Penconazole και έκθεση σε όζον για 2h (T1) και 4h (T2).



Εικ. 26: Αριθμός μεταβολικών οδών, ανά ομάδα (map), που παρουσίασαν αύξηση (ερυθροί χρωματισμοί,) μείωση (πράσινοι χρωματισμοί) ή καμία μεταβολή (γκρι χρωματισμοί) ύστερα από ψεκασμό με EDU και Penconazole και έκθεση σε όζον για 2h (T1) και 4h (T2).

3.5.2. Επίδραση της Penconazole στις ομάδες μεταβολικών οδών του φασολιού

Σε φυτά που δέχτηκαν την επίδραση της Penconazole παρατηρήθηκε ότι υπάρχει έντονη μεταβολική δραστηριότητα στις ομάδες μεταβολικών οδών των υδατανθράκων (Carbohydrates metabolism), του μετασχηματισμού των δομών (Chemical structure transformation maps) των αμινοξέων (Amino acid metabolism) και των λιπιδίων (Lipid metabolism). Αύξηση παραγωγής σημειώθηκε στο μεταβολισμό των υδατανθράκων ενώ αντίθετα, οι βιοσυνθετικές οδοί μετασχηματισμού δομών μείωσαν την παραγωγή τους.

Όταν τα φυτά αυτά εκτέθηκαν σε όζον παρουσιάστηκε σαφής εικόνα υπερπαραγωγής στις βιοσυνθετικές οδούς του μεταβολισμού των υδατανθράκων, των λιπιδίων και των αμινοξέων. Αντίθετα, υποπαρήγε ο μεταβολισμός μετασχηματισμού των δομών (Chemical structure transformation maps).

3.5.3. Η συνεργιστική δράση των ουσιών EDU και Penconazole στο μεταβολισμό του φασολιού

Σε φυτά που δέχτηκαν την ταυτόχρονη επίδραση της EDU και της Penconazole παρατηρήθηκε ότι από την πρώτη δειγματοληψία (2 h όζον) παρουσίασε αύξηση ο μεταβολισμός των υδατανθράκων (Carbohydrates metabolism), ενώ παρουσιάζει μείωση ο μεταβολισμός των λιπών (Lipid metabolism), των αμινοξέων (Amino acid metabolism) και του μετασχηματισμού των δομών (Chemical structure transformation maps). Κατά τη δεύτερη δειγματοληψία (4 h όζον) το φαινόμενο μετρίασε την έντασή του.

Όταν τα φυτά αυτά εκτέθηκαν σε όζον τόσο κατά την πρώτη (2 h όζον) όσο και κατά τη δεύτερη (4 h όζον) δειγματοληψία παρουσιάστηκε σαφής εικόνα αύξησης παραγωγής στην πλειοψηφία των βιοσυνθετικών οδών και κυρίως σε αυτές του μεταβολισμού των υδατανθράκων (Carbohydrates metabolism), των αμινοξέων (Amino acid metabolism) και του μετασχηματισμού των δομών (Chemical structure transformation maps).

3.5.4. Η επίδραση του όζοντος στο μεταβολισμό του φασολιού

Σε φυτά που δέχτηκαν την επίδραση του όζοντος για χρονικό διάστημα 2 h παρατηρήθηκε ότι η πλειοψηφία των βιοσυνθετικών οδών παρουσίασε μείωση της παραγωγής μεταβολιτών. Συγκεκριμένα, σε αξιολογική σειρά αναφερόμενες, επηρεάστηκαν οι ομάδες του μετασχηματισμού δομών (Chemical structure transformation maps), του μεταβολισμού των υδατανθράκων (Carbohydrates metabolism) του μεταβολισμού των αμινοξέων (Amino acid metabolism) και του μεταβολισμού των λιπών (Lipid metabolism).

Όταν τα φυτά δέχτηκαν την επίδραση του όζοντος για μεγαλύτερο χρονικό διάστημα (4 h συνολικά) παρατηρήθηκε ότι το φαινόμενο που περιγράφηκε στην προηγούμενη παράγραφο διατήρησε το μοτίβο του, μετριάστηκε όμως η έντασή του.

3.6. Αποτελέσματα της συσχέτισης των μεταβολιτών

Γνωρίζοντας τη σχέση μεταξύ των μεταβολικών οδών και των μεταβολιτών, κατέστη δυνατό να σχηματιστεί το δίκτυο αλληλεπιδράσεων τους στο μεταβολισμό του της ποικιλίας φασολιού Pinto. Επίσης, απεικονίστηκε η συμπεριφορά της ουσίας μετά τις μεταχειρίσεις, δηλαδή εάν η παραγωγή της, παρουσίασε αύξηση-ερυθρός χρωματισμός, μείωση-πράσινος χρωματισμός ή καμία μεταβολή-γκρι χρωματισμός. Τα δεδομένα παρουσιάζονται ξεχωριστά για κάθε μεταχείριση (Ozone, EDU, Penconazole) τις δύο χρονικές στιγμές δειγματοληψίας (timepoints T1- T2) (**Εικ. 50** έως και **Εικ. 54**) Επίσης, καταρτίστηκαν τα αντίστοιχα δίκτυα που παρουσιάζουν την επίδραση όλων των μεταχειρίσεων για τις δύο χρονικές στιγμές T1 (2h) και T2 (4h) (**Εικ. 55** και **Εικ. 56**). Οι απεικονίσεις αυτές καθιστούν ευκολότερη την παρουσίαση των αποτελεσμάτων τα οποία συνοψίζονται στις επόμενες παραγράφους.

3.6.1. Η επίδραση της EDU -μεταβολίτες

Η μεταχείριση με EDU στους περισσότερους μεταβολίτες δεν προκάλεσε ποσοτική αλλαγή στη βιοσύνθεση (12 μεταβολίτες) ή προκάλεσε αρχικά κάποια αλλαγή η οποία στη συνέχεια ρυθμίστηκε στα ίδια επίπεδα με αυτά του μάρτυρα (control) (11 μεταβολίτες). Όσον αφορά τους μεταβολίτες των οποίων η παραγωγή επηρεάστηκε, στους περισσότερους μειώθηκε και σε λιγότερους αυξήθηκε η παραγωγή.

Πρέπει να σημειωθεί ότι η παραγωγή των περισσότερων μεταβολιτών που συμμετέχουν στον κύκλο του Krebs και συγκεκριμένα τα: ηλεκτρικό (Succinate), μηλικό (Malate) και φουμαρικό οξύ (Fumarate), παρουσίασαν μείωση. Άλλες ουσίες των οποίων η παραγωγή μειώθηκε τόσο μετά από 2 όσο και μετά από 4 ώρες δράσης όζοντος είναι οι παλμιτικό οξύ (Palmitate), L-σερίνη (L-Serine), 2-οξογλουταρικό οξύ (2-Oxoglutarate), γλυκερόλη (Glycerol), ραμνόζη (Rhamnose), L-ορνιθίνη (L-Ornithine), 4-κουμαρικό οξύ (4-Coumarate) και μυριστικό οξύ (Myristate).

Η βιοσύνθεση της γλυκόζης αυξήθηκε και μάλιστα με μεγάλη διαφορά καταδεικνύοντάς την ως βιοσημαντή (biomarker) για τη δράση της EDU.

3.6.2. Η επίδραση της Penconazole - μεταβολίτες

Η Penconazole κατά την εφαρμογή της, προκάλεσε αύξηση στο ρυθμό παραγωγής των περισσότερων ουσιών ($29/54=53,7\%$). Στη συνέχεια στο ένα τρίτο αυτών διατήρησε αυξανόμενη παραγωγή, κάποιες έφτασαν στην ίδια ρύθμιση με αυτή του μάρτυρα (control) ενώ σε κάποιες μειώθηκε ο ρυθμός παραγωγής τους. Οι τελευταίες μάλιστα μειώθηκαν σε μεγάλο βαθμό.

Σε κάποιους μεταβολίτες, παρατηρήθηκε ότι η βιοσύνθεση παρουσίασε χρονοϋστέρηση, δηλαδή, ενώ κατά την πρώτη δειγματοληψία η συγκέντρωση παρέμεινε σε τιμές ίδιες με τις αντίστοιχες του μάρτυρα (control), κατά τη δεύτερη δειγματοληψία η συγκέντρωση αυξήθηκε σημαντικά.

3.6.3. Η συνεργιστική δράση των ουσιών EDU και Penconazole στο μεταβολισμό του φασολιού - μεταβολίτες

Σε φυτά που δέχτηκαν την ταυτόχρονη επίδραση της EDU και της Penconazole η εικόνα που παρουσιάζεται δεν είναι σαφής. Ο αριθμός των μεταβολιτών που παρουσιάζει αύξηση ή μείωση ή καμία αλλαγή στο ρυθμό παραγωγής είναι παρόμοιος.

3.6.4. Η επίδραση του όζοντος - μεταβολίτες

Από την ανάλυση βρέθηκε ότι για τους περισσότερους μεταβολίτες, τις πρώτες τέσσερις ώρες από την έκθεσή τους στο όζον, δεν μεταβλήθηκε

σημαντικά η συγκέντρωσή τους. Όμως σε όσους μεταβολίτες το φυτό πραγματοποίησε αλλαγές αυτές πραγματοποιήθηκαν σε μεγάλο βαθμό.

Οι μεταβολίτες στους οποίους τόσο μετά από 2 όσο και μετά από 4 ώρες όζον αυξήθηκε η συγκέντρωση είναι οι: γλυκόζη, φρουκτόζη, θρεονίνη και μυοϊνοσιτόλη.

Οι μεταβολίτες στους οποίους τόσο μετά από 2 όσο και μετά από 4 ώρες όζον μειώθηκε η συγκέντρωση είναι οι: μηλικό οξύ, 4-κουμαρικό οξύ και D- μυοϊνοσιτόλη 1,3,5,6-5P.

3.7. Μεταβολίτες-βιοσημαντές (biomarkers)

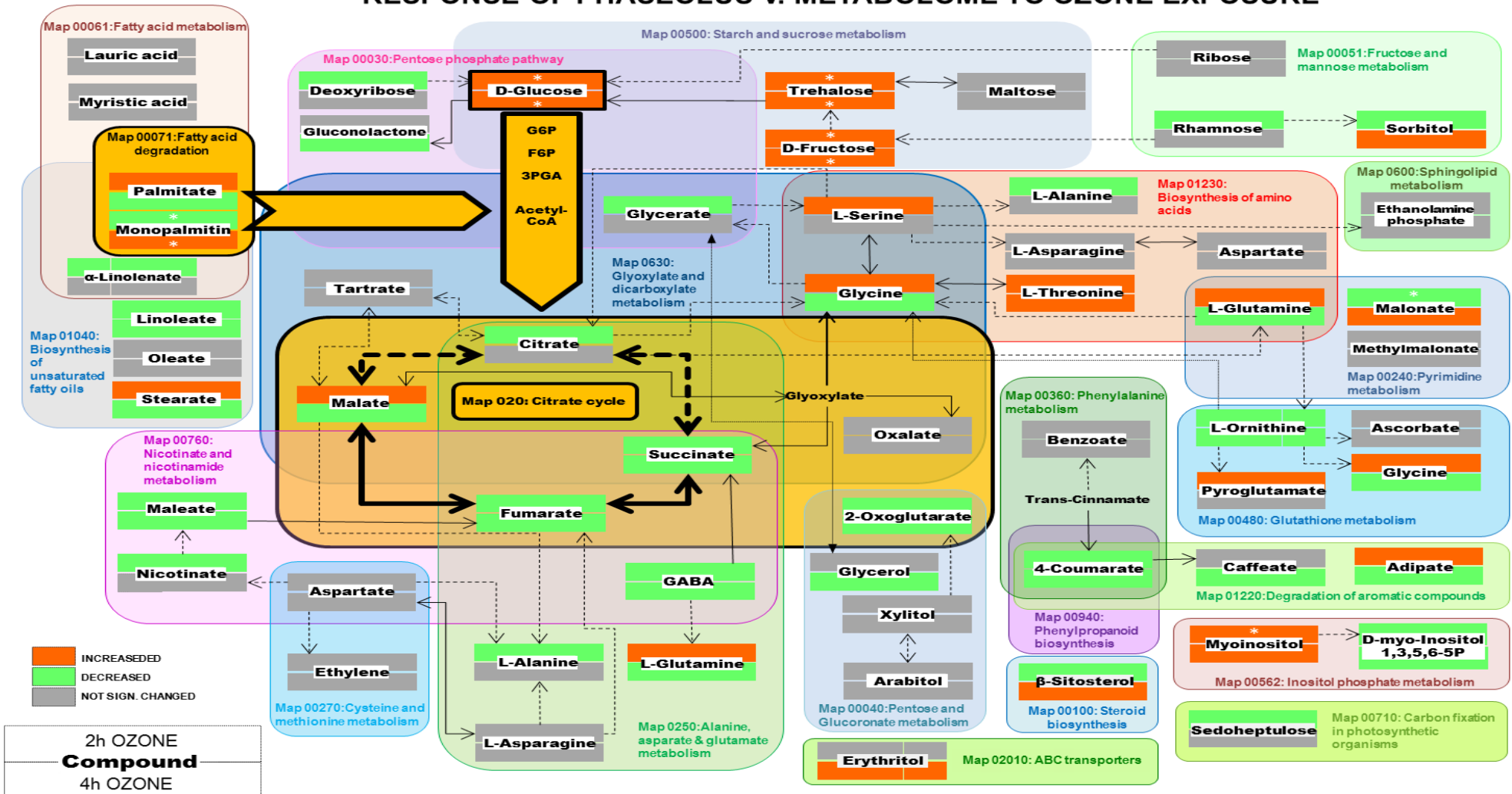
Όπως φαίνεται από τα δίκτυα μεταβολικών οδών, κάποιοι μεταβολίτες παρουσίασαν αύξηση ή μείωση τόσο μετά από χρονικό διάστημα 2 ωρών και 4 ωρών. Η μεταχείριση με όζον προκάλεσε αύξηση της γλυκόζης, φρουκτόζης, τρεχαλόζης, θρεονίνης και μυοϊνοσιτόλης και μείωση των οξέων ηλεκτρικό, φουμαρικό, 4-κουμαρικό, μηλικό και οξογλουταρικό, καθώς και του GABA.

Η μεταχείριση με EDU αύξησε τη γλυκόζη, τη φρουκτόζη και το οξαλικό οξύ, ενώ μείωσε τα οξέα ηλεκτρικό, φουμαρικό, παλμιτικό, μυριστικό, 4-κουμαρικό και 2-οξογλουταρικό. Επίσης μείωσε την σερίνη, γλυκερόλη, ορνιθίνη και ραμνόζη.

Στα φυτά που είχαν δεχτεί μεταχείριση με EDU και στη συνέχεια εκτέθηκαν σε όζον παρατηρήθηκε αύξηση πολλών μεταβολιτών και συγκεκριμένα: παλμιτικό οξύ, μονοπαλμιτίνη, λινολενικό οξύ, γλυκερικό οξύ, σερίνη, σορβιτόλη, κιτρικό οξύ, ηλεκτρικό οξύ, φουμαρικό οξύ, μηλικό οξύ, αιθυλένιο, μυοϊνοσιτόλη. Στα φυτά αυτά παρατηρήθηκε μείωση της γλυκόζης, φρουκτόζης, γλουταμίνης, θρεονίνης και γλυκίνης.

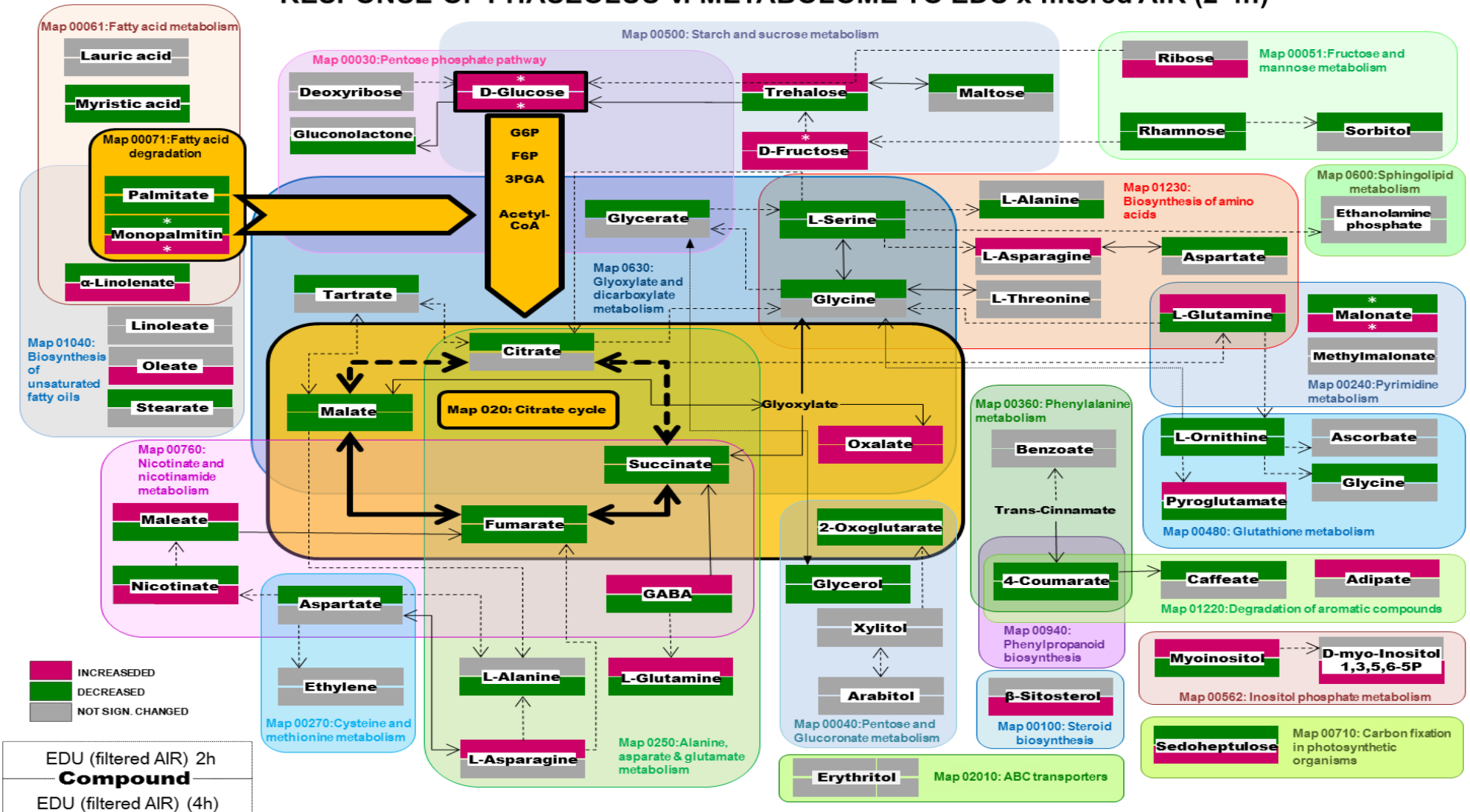
Η μεταχείριση με Penconazole αύξησε τη γλυκόζη, τη φρουκτόζη, τη σορβιτόλη, την αραβιτόλη, την ασπαραγίνη και τη θρεονίνη, ενώ μείωσε την ορνιθίνη, το GABA και τη ραμνόζη. Όταν τα φυτά αυτά εκτέθηκαν σε όζον αυξήθηκε η τρεχαλόζη, η ριβόζη, η αλανίνη, η αραβιτόλη, η γλουταμίνη και το GABA ενώ μειώθηκαν τα οξέα μηλικό, ηλεκτρικό και φουμαρικό.

RESPONSE OF PHASEOLUS V. METABOLOME TO OZONE EXPOSURE



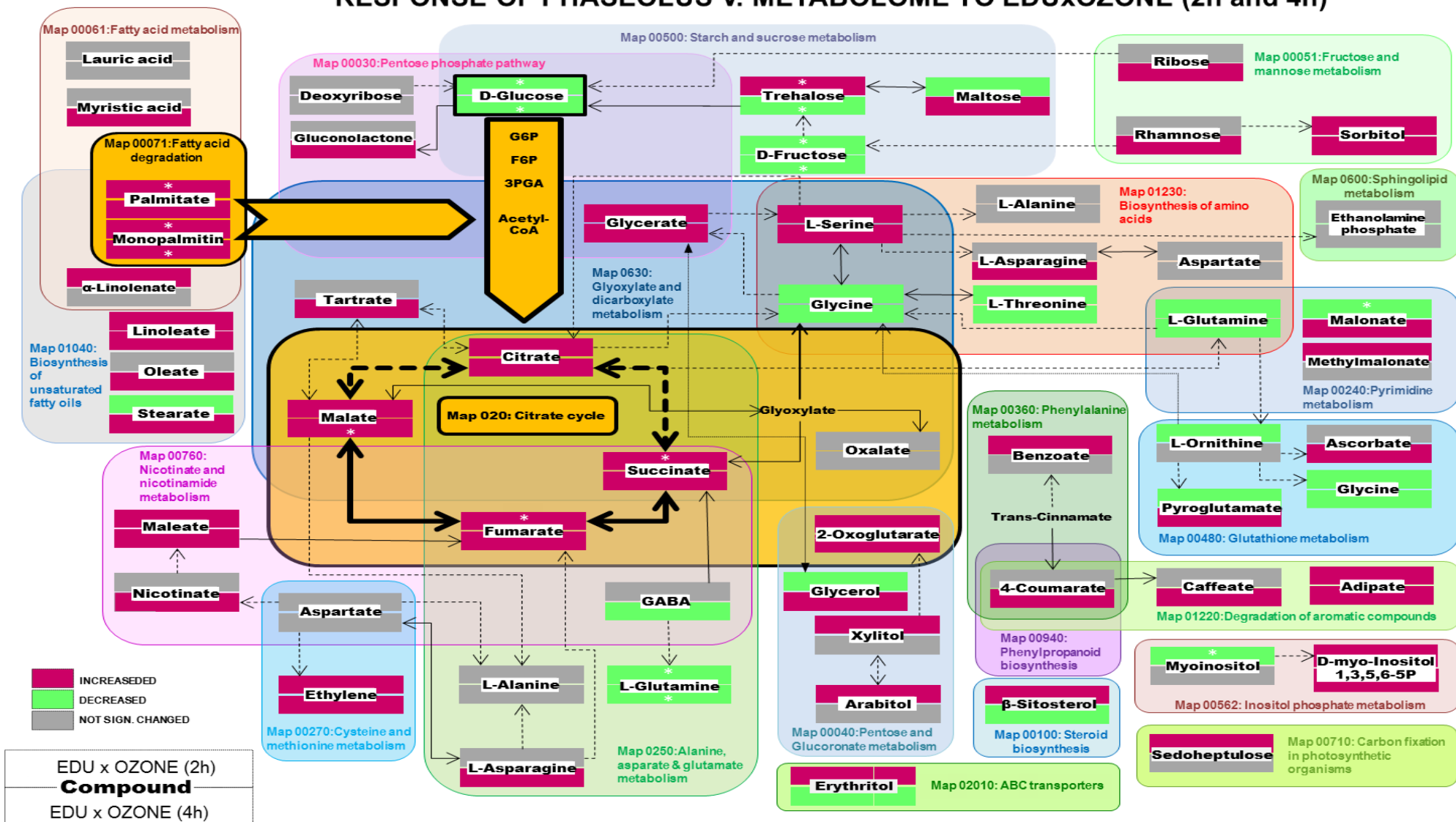
Εικ. 27: Δίκτυο μεταβολιτών και αντίστοιχες βιοσυνθετικές οδοί του *Phaseolus vulgaris* cv. Pinto ύστερα από μεταχείριση 2 (πάνω) και 4 (κάτω) ωρών όζοντος. Ο ερυθρός χρωματισμός σημαίνει αύξηση, ο πράσινος μείωση και ο γκρι καμία μεταβολή συγκέντρωσης.

RESPONSE OF PHASEOLUS V. METABOLOME TO EDU x filtered AIR (2-4h)



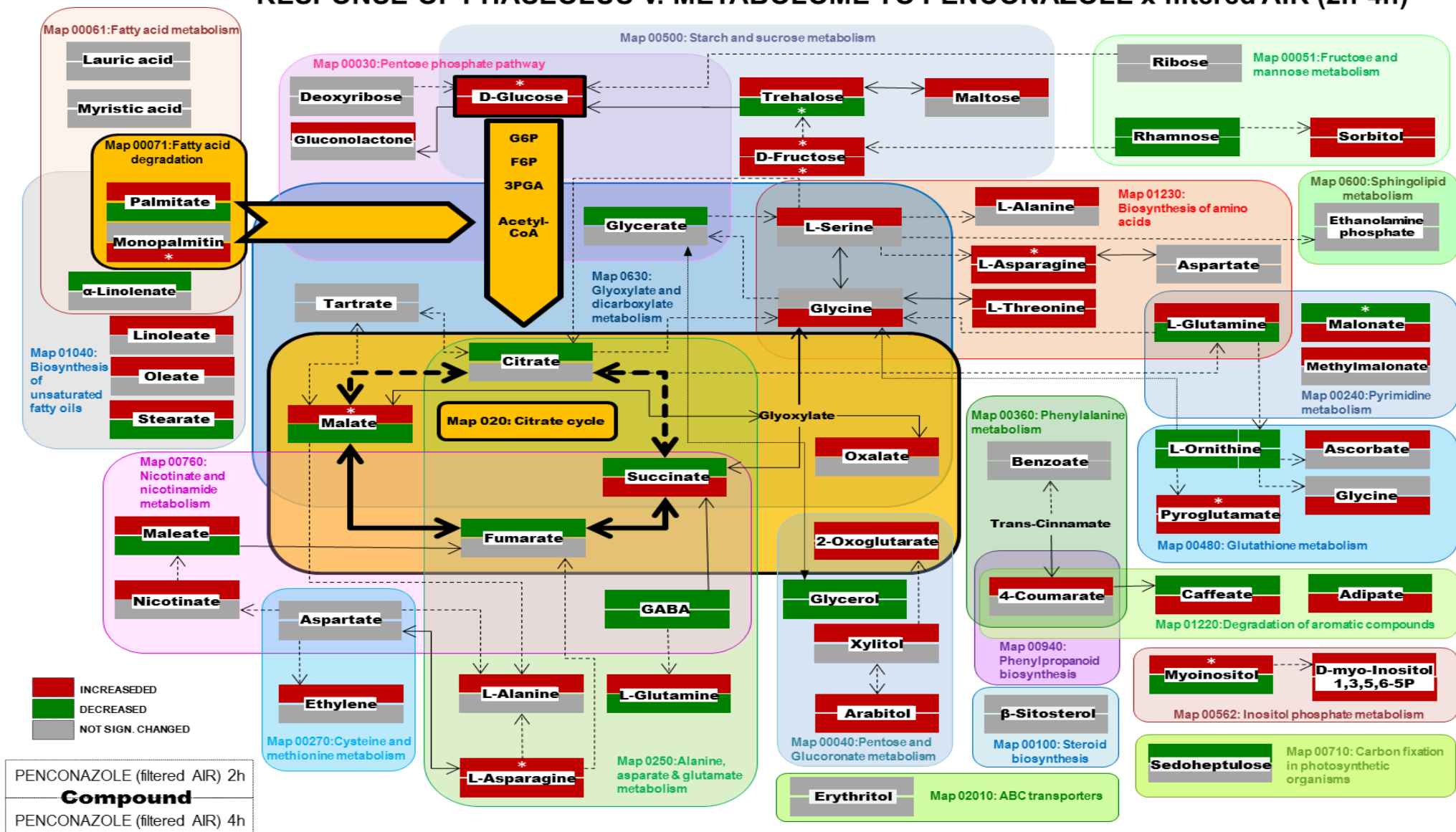
Εικ. 28: Δίκτυο μεταβολιτών και αντίστοιχες βιοσυνθετικές οδοί του *Phaseolus vulgaris* cv. Pinto ύστερα από μεταχείριση 2 (πάνω) και 4 (κάτω) ωρών EDU. Ο ερυθρός χρωματισμός σημαίνει αύξηση, ο πράσινος μείωση και ο γκρι καμία μεταβολή συγκέντρωσης.

RESPONSE OF PHASEOLUS V. METABOLOME TO EDUxOZONE (2h and 4h)



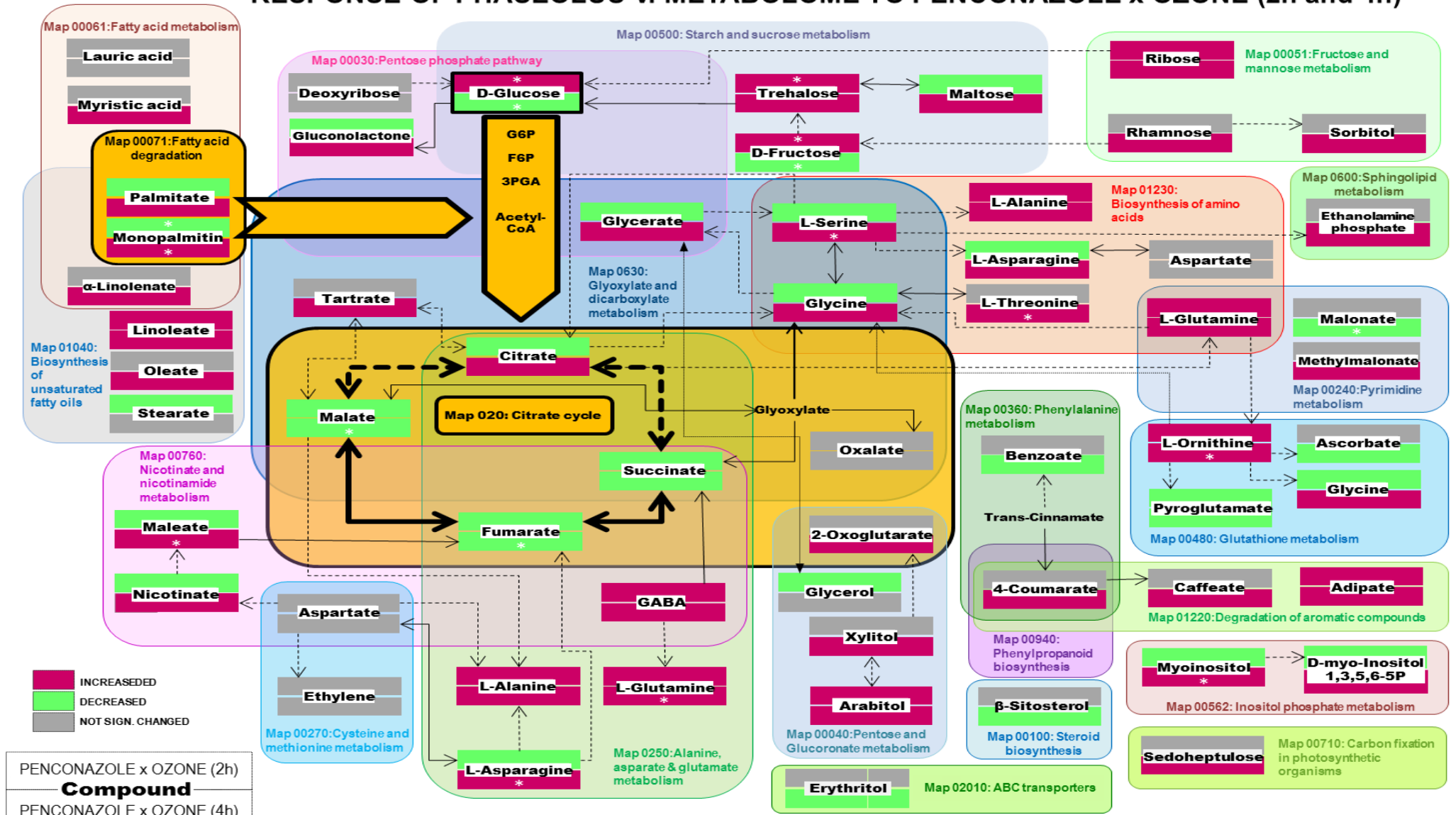
Εικ. 29 Δίκτυο μεταβολιτών και αντίστοιχες βιοσυνθετικές οδοί του *Phaseolus vulgaris* cv. Pinto ύστερα από μεταχείριση 2 (πάνω) και 4 (κάτω) ωρών EDU x O₃. Ο ερυθρός χρωματισμός σημαίνει αύξηση, ο πράσινος μείωση και ο γκρι καμία μεταβολή συγκέντρωσης.

RESPONSE OF PHASEOLUS V. METABOLOME TO PENCONAZOLE x filtered AIR (2h-4h)



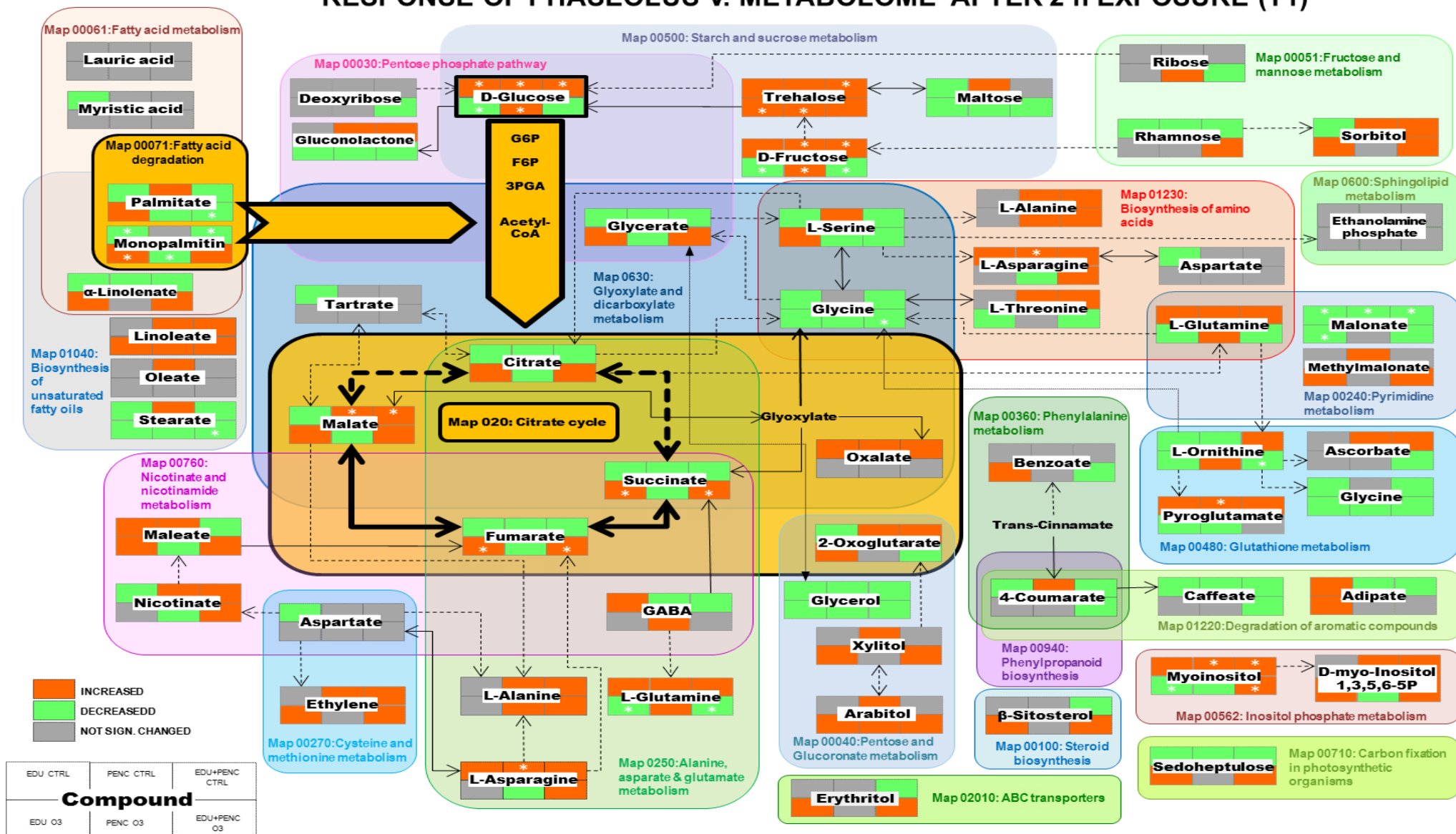
Εικ. 30: Δίκτυο μεταβολιτών και αντίστοιχες βιοσυνθετικές οδοί του *Phaseolus vulgaris* cv. Pinto ύστερα από μεταχείριση 2 (πάνω) και 4 (κάτω) ωρών *Penconazole*. Ο ερυθρός χρωματισμός σημαίνει αύξηση, ο πράσινος μείωση και ο γκρι καμία μεταβολή συγκέντρωσης.

RESPONSE OF PHASEOLUS V. METABOLOME TO PENCONAZOLE x OZONE (2h and 4h)



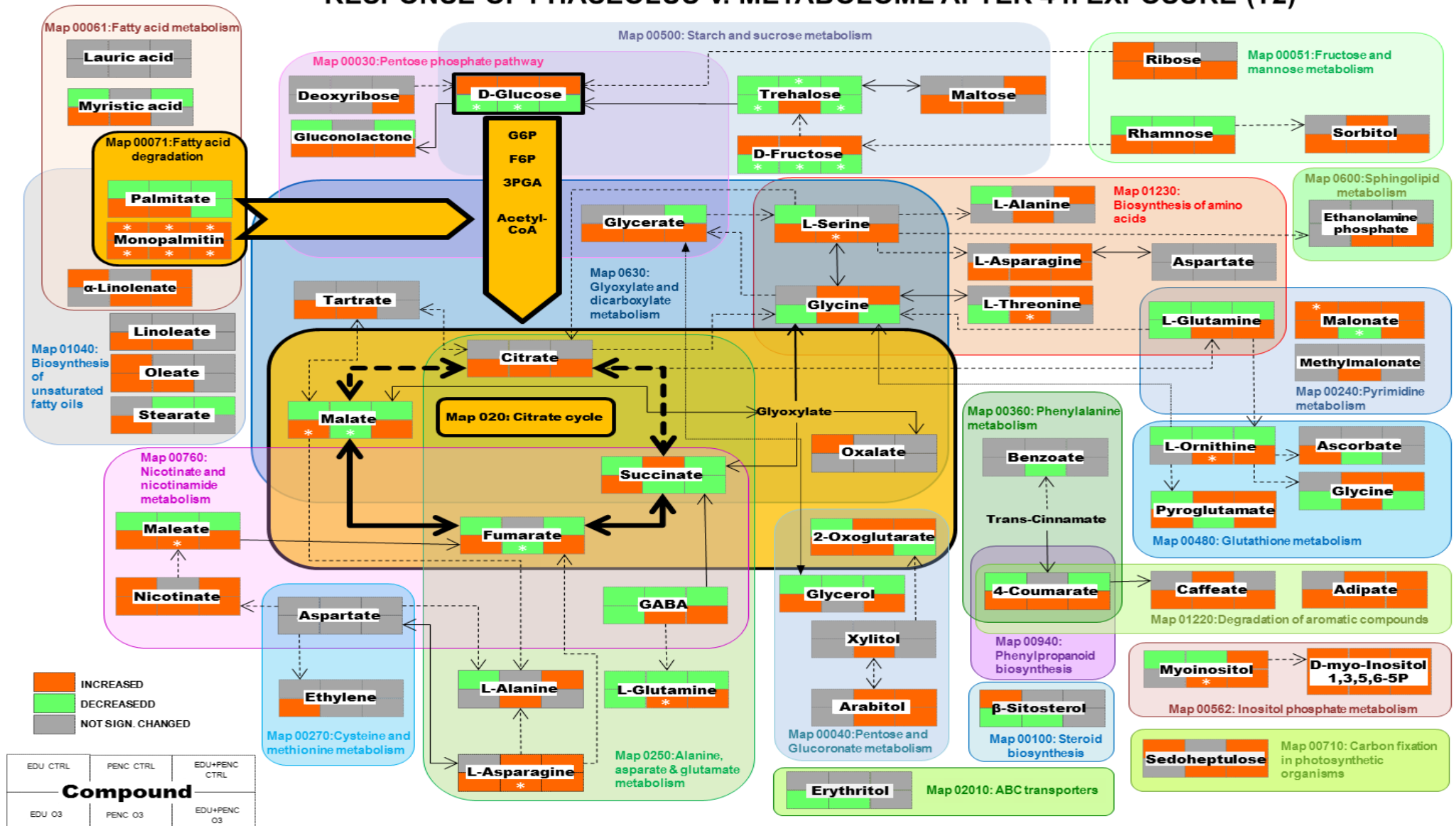
Εικ. 31 Δίκτυο μεταβολιτών και αντίστοιχες βιοσυνθετικές οδοί του *Phaseolus vulgaris* cv. Pinto ύστερα από μεταχείριση 2 (πάνω) και 4 (κάτω) ωρών *Penconazole* x O₃. Ο ερυθρός χρωματισμός σημαίνει αύξηση, ο πράσινος μείωση και ο γκρι καμία μεταβολή συγκέντρωσης.

RESPONSE OF PHASEOLUS V. METABOLOME AFTER 2 h EXPOSURE (T1)



Εικ. 32: Δίκτυο μεταβολικών και αντίστοιχες βιοσυνθετικές οδοί του *Phaseolus vulgaris* cv. Pinto όλων των μεταχειρίσεων, ύστερα από 2 ώρες. Ο ερυθρός χρωματισμός σημαίνει αύξηση, ο πράσινος μείωση και ο γκρι καμία μεταβολή συγκέντρωσης.

RESPONSE OF PHASEOLUS V. METABOLOME AFTER 4 h EXPOSURE (T2)



Εικ. 33: Δίκτυο μεταβολιτών και αντίστοιχες βιοσυνθετικές οδοί του *Phaseolus vulgaris* cv. Pinto όλων των μεταχειρίσεων, ύστερα από 4 ώρες. Ο ερυθρός χρωματισμός σημαίνει αύξηση, ο πράσινος μείωση και ο γκρι καμία μεταβολή συγκέντρωσης

4



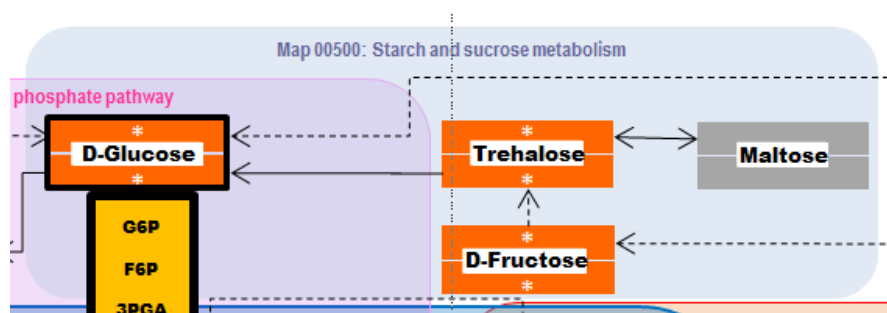
Συζήτηση
Συμπεράσματα

4. ΣΥΖΗΤΗΣΗ-ΣΥΜΠΕΡΑΣΜΑΤΑ

4.1. Η επίδραση του όζοντος

Η πρώτη αντίδραση του φυτού στη δράση του όζοντος είναι το κλείσιμο των στοματίων (Kollist et al., 2000) και (Vahisalu et al., 2010), με αποτέλεσμα τη μείωση της προσλαμβανόμενης ποσότητας άνθρακα και δευτερογενώς μείωση του ρυθμού φωτοσύνθεσης (Biswas et al., 2008). Το φυτό, για να συνεχίσει να ανταπεξέρχεται ενεργειακά και να διατηρήσει την ομοιόστασή του, θα αναζητήσει ενέργεια εκεί όπου την έχει αποθηκεύσει, δηλαδή σε υδατάνθρακες, λίπη ακόμα και αμινοξέα (Galili et al., 2014). Ταυτόχρονα η μείωση του προσλαμβανόμενου άνθρακα επιφέρει μείωση του αναβολισμού υδατανθράκων (Sehmer et al., 1998). Επιπλέον, ως αντίδραση στην καταπόνηση από το όζον αναμένεται αύξηση των επιπέδων των αντιοξειδωτικών ουσιών για την εξουδετέρωση των ROS (Chameides, 1989) για την σύνθεση των οποίων το φυτό χρειάζεται περεταίρω ενέργεια (Bolton, 2009). Έτσι, υπό συνθήκες καταπόνησης από όζον τα φυτά βρίσκονται σε κατάσταση αυξημένων ενεργειακών αναγκών.

Στην παρούσα μελέτη διαπιστώθηκε αύξηση των επιπέδων των **σακχάρων**: φρουκτόζη, τρεχαλόζη και γλυκόζη ύστερα από έκθεση σε όζον για 2 και 4 ώρες (**Εικ. 34**).



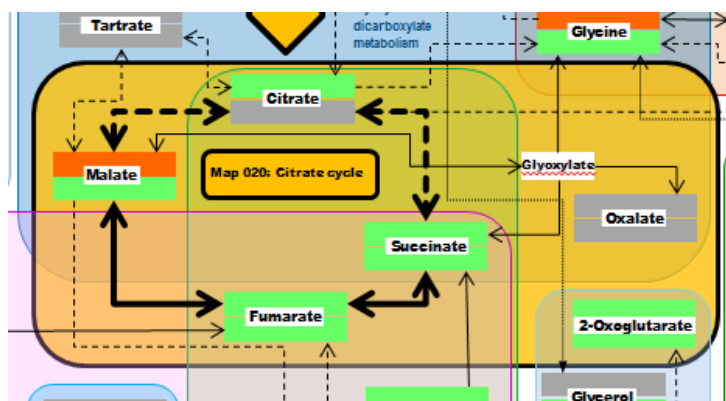
Εικ. 34: Μεταβολίτες που ανιχνεύτηκαν από το μονοπάτι μεταβολισμού αμύλου και σακχάρων (map00500) του *Phaseolus vulgaris* cv. Pinto υπό την επίδραση 2 (πάνω) και 4 (κάτω) ωρών όζοντος. Ο ερυθρός χρωματισμός σημαίνει αύξηση, ο πράσινος μείωση και ο γκρι καμία μεταβολή συγκέντρωσης. Απόσπασμα της, **Εικ. 27**.

Είναι γνωστό ότι από τον κύκλο του Calvin (σκοτεινές αντιδράσεις της φωτοσύνθεσης) παράγεται 3-φωσφορική γλυκεραλδεϋδη που μέσω της γλυκονεογένεσης δίνει γλυκόζη, η οποία διασπάται γλυκολιτικά για την κάλυψη των άμεσων αναγκών σε ενέργεια (Δροσόπουλος, 1998; Ridge, 2005), ενώ το όποιο περίσσειμά της αποθηκεύεται σε πιο σύνθετες μορφές

σακχάρων. Η αύξηση των σακχάρων ίσως οφείλεται στο γεγονός ότι το φυτό τα συνθέτει κατά προτεραιότητα για την κάλυψη των αυξημένων του ενεργειακών αναγκών. Η αύξηση των σακχάρων, συμφωνεί με τους Ludwikow και Sadowski (2008), οι οποίοι βρήκαν ότι το όζον επάγει την έκφραση γονιδίων που ευθύνονται για την αύξηση της γλυκόζης.

Ένα ακόμα δεδομένο που προκύπτει από την αναπαράσταση του δικτύου των μεταβολιτών, είναι ότι η **φρουκτόζη**, η οποία είναι ένας ακόμα μονοσακχαρίτης, μεταβολίζεται σε **τρεχαλόζη** και τελικά σε **γλυκόζη** (Εικ. 34), συνεπώς η αύξηση των τελευταίων ίσως οφείλεται στην αύξηση της φρουκτόζης. Συνοψίζοντας, η - υπό την επίδραση του όζοντος - αύξηση της φρουκτόζης, της τρεχαλόζης και της γλυκόζης συντελεί στην παραγωγή άμεσα καταναλώσιμων ενεργειακών μονάδων από το φυτό.

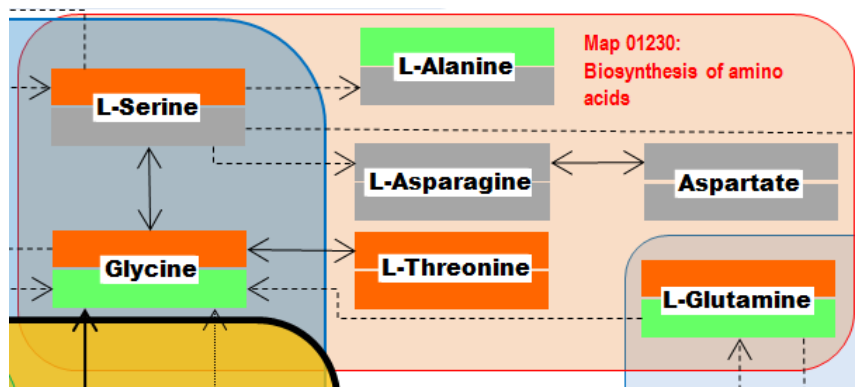
Επίσης, η εφαρμογή του όζοντος αφ'εαυτού μείωσε τα επίπεδα των κύριων μεταβολιτών (οξέα: κιτρικό, ηλεκτρικό, φουμαρικό και μηλικό) του **κύκλου του Krebs** (Εικ. 35). Τα επίπεδα των μεταβολιτών παρέμειναν μειωμένα και μετά από 4 ώρες έκθεσης σε όζον. Η μείωση των επιπέδων των μεταβολιτών που εμπλέκονται στο κύκλο του Krebs έχει ως αποτέλεσμα την ενεργειακή ανεπάρκεια του φυτού υπό συνθήκες καταπόνησης με όζον καθιστώντας τα φυτά ευαίσθητα σε αυτό τον τοξικό παράγοντα (Dizengremel et al., 2008).



Εικ. 35: Μεταβολίτες που ανιχνεύτηκαν από τον κύκλο του κιτρικού οξέος (map0020) του *Phaseolus vulgaris* cv. Pinto υπό την επίδραση 2 (πάνω) και 4 (κάτω) ωρών όζοντος. Ο ερυθρός χρωματισμός σημαίνει αύξηση, ο πράσινος μείωση και ο γκρι καμία μεταβολή συγκέντρωσης. Απόσπασμα της **Εικ. 27**.

Η μείωση των βασικών μεταβολιτών του κύκλου του Krebs επηρέασε διαφορετικά τα επίπεδα των διαφόρων **αμινοξέων** (Εικ. 36) και λιπαρών οξέων (Εικ. 37). Από τα αμινοξέα, αυξήθηκε η L-θρεονίνη, αυξήθηκαν και στη συνέχεια μειώθηκαν η γλυκίνη και το L-γλουταμικό οξύ, ενώ δεν

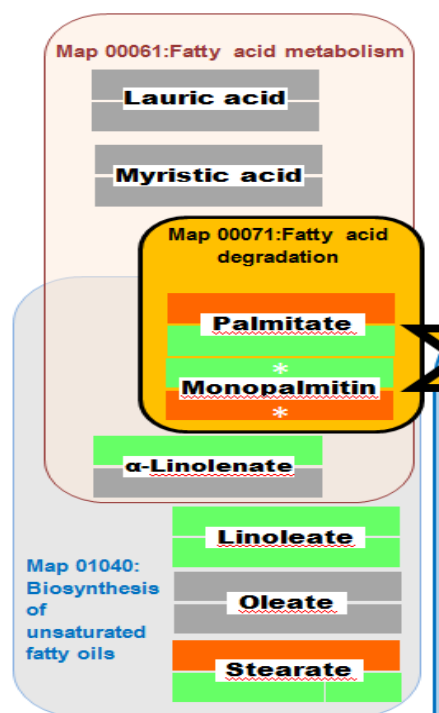
μεταβλήθηκε η ποσότητα του L-ασπαραγινικού και του ασπαρτικού οξέος. Η μη αύξηση και πολύ περισσότερο η μείωση των **λιπαρών οξέων** και αμινοξέων φανερώνει ότι ο κύκλος του Krebs δεν οδήγησε σε αύξηση της ενέργειας. Η μείωση των αμινοξέων φανερώνει ότι χρησιμοποιήθηκαν ως εναλλακτική πηγή ενέργειας, όπως έχει αναφερθεί από τον Araújo et al. (2011).



Εικ. 36: Μεταβολίτες που ανιχνεύτηκαν από το μονοπάτι βιοσύνθεσης αμινοξέων (map01230) του *Phaseolus vulgaris* cv. Pinto υπό την επίδραση 2 (πάνω) και 4 (κάτω) ωρών όζοντος. Ο ερυθρός χρωματισμός σημαίνει αύξηση, ο πράσινος μείωση και ο γκρι καμία μεταβολή συγκέντρωσης. Απόσπασμα της **Εικ. 27**.

Για το χρονικό διάστημα των τεσσάρων ωρών που πάρθηκαν οι μετρήσεις, τα πιο σύνθετα λίπη όπως **Λαυρινικό και Μυριστικό** οξύ δεν αύξησαν ούτε μείωσαν τα επίπεδά τους (**Εικ. 37**). Η βιοσύνθεση των λιπαρών οξέων πραγματοποιείται όταν το ενεργειακό ισοζύγιο του κύκλου του Krebs είναι θετικό και σταματά στο παλμιτικό οξύ που απαρτίζεται από 16 άνθρακες. Λιπαρά οξέα που έχουν περισσότερους άνθρακες συντίθενται από το παλμιτικό οξύ με προσθήκη δύο ατόμων άνθρακα (Γαλάτης, 2014). Συνεπώς, στην παρούσα εργασία, η διαθέσιμη ποσότητα παλμιτικού οξέος δεν ήταν επαρκής για τη βιοσύνθεση πιο σύνθετων λιπαρών οξέων (ώστε να αυξηθεί η συγκέντρωσή τους). Επίσης το φυτό δεν καταβόλιζε αυτά τα λιπαρά οξέα (γι' αυτό και η ποσότητά τους δεν μειώθηκε). Αντίθετα, η ποσότητα των λιπαρών οξέων **Λινοεϊκό, Ελαϊκό και Στεατικό** μειώθηκε, ίσως επειδή καταβολίστηκαν παρέχοντας στο φυτό παλμιτικό οξύ το οποίο μπορεί να χρησιμοποιηθεί για παροχή ενέργειας. Ακόμη, το φυτό φαίνεται ότι χρησιμοποιεί άμεσα τη διαθέσιμη ποσότητα **μονοπαλμιτίνης**, με αποτέλεσμα τη δραστική μείωσή της. Η μονοπαλμιτίνη, ανήκει στις μονοακυλγλυκερόλες και η ανθρακική της αλυσίδα απαρτίζεται από 19 άνθρακες. Μπορεί να υποτεθεί, ότι η μείωσή της οφείλεται στην κατανάλωσή της για άμεση χρήση της αποθηκευμένης σε αυτήν ενέργειας.

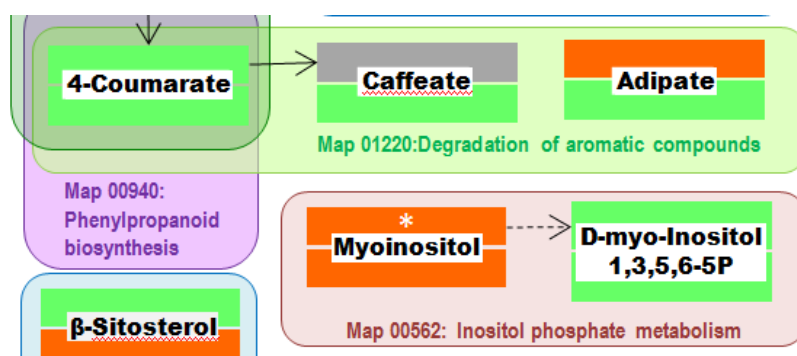
Η αύξηση της μονοπαλμιτίνης που παρατηρείται ύστερα από έκθεση τεσσάρων ωρών σε όζον, μπορεί να ερμηνευτεί ως αποτέλεσμα του καταβολισμού πιο σύνθετων λιπαρών οξέων.



Εικ. 37: Μεταβολίτες που ανιχνεύτηκαν από τα μονοπάτια βιοσύνθεσης ακόρεστων λιπαρών οξέων, βιοσύνθεσης και καταβολισμού λιπαρών οξέων (map 01040, map00061 και map00071) του *Phaseolus vulgaris* cv. Pinto υπό την επίδραση 2 (πάνω) και 4 (κάτω) ωρών όζοντος. Ο ερυθρός χρωματισμός σημαίνει αύξηση, ο πράσινος μείωση και ο γκρι καμία μεταβολή συγκέντρωσης. Απόσπασμα της **Εικ. 27**.

Ένα ακόμα σημείο που του δικτύου των μεταβολιτών που αξίζει να σχολιαστεί είναι η συμπεριφορά του μονοπατιού μετασχηματισμού των δομών που περιλαμβάνει τις βιοσυνθετικές οδούς των φαινυλπροπανοειδών, των τερπενοειδών, των στεροειδών και των αλκαλοειδών, ουσίες που συμβάλλουν στην αντοχή των φυτών στις καταπονήσεις (Cheng et al., 2007; Di Baccio et al., 2008 και Cotrozzi et al., 2016). Τα στεροειδή επιπλέον δρουν ως μόρια μετάδοσης σήματος που ενεργοποιούν τους υποδοχείς των στεροειδών στις κυτταρικές μεμβράνες (Wang et al., 2001). Από το μονοπάτι σύνθεσης φαινυλπροπανοειδών έχει ανιχνευτεί το **4-κουμαρικό** οξύ το οποίο μειώνεται τόσο μετά από 2 όσο και μετά από 4 ώρες έκθεσης σε όζον. Παράγωγο του 4-κουμαρικού οξέος είναι το **καφεϊκό** οξύ που επίσης μειώνεται. Τόσο το κουμαρικό όσο και το καφεϊκό οξύ είναι ουσίες με αντιοξειδωτική δράση (Dixon and Paiva, 1995) οι οποίες, κατά πάσα πιθανότητα, καταναλώθηκαν για την προστασία του

φυτού από την καταπόνηση του όζοντος. Αντίθετα το φυτό αύξησε την ποσότητα της **μυοϊνοσιτόλης**, η οποία σχηματίζεται από την d-γλυκόζη (Loewus and Murthy, 2000) και έχει διττό ρόλο που σχετίζεται με τη μετάδοση σήματος και την καταπόνηση (Valluru and Van den Ende, 2011). Συνεπώς, η ποικιλία φασολιού που μελετήθηκε, ενεργοποιεί μάλλον το μονοπάτι που σχετίζεται με τη μυοϊνοσιτόλη παρά αυτό που σχετίζεται GABA για την προστασία του από το όζον.



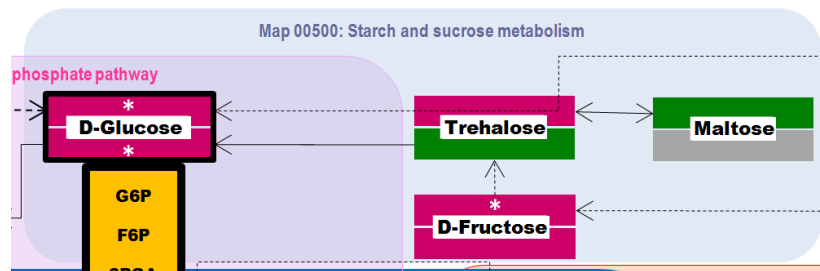
Εικ. 38: Μεταβολίτες που ανιχνεύτηκαν από τα μονοπάτια βιοσύνθεσης φαινυλπροπανοειδών, μεταβολισμού φωσφατάσης της ινοσιτόλης και καταβολισμού αρωματικών ενώσεων (map 00940, map00562 και map01220) του *Phaseolus vulgaris* cv. Pinto υπό την επίδραση 2 (πάνω) και 4 (κάτω) ωρών όζοντος. Ο ερυθρός χρωματισμός σημαίνει αύξηση, ο πράσινος μείωση και ο γκρι καμία μεταβολή συγκέντρωσης. Απόσπασμα της **Εικ. 27**.

Από την **Εικ. 23** φαίνεται ότι η μεταχείριση με όζον μείωσε τα επίπεδα των υδατανθράκων, των λιπαρών οξέων και των αμινοξέων γεγονός που αντικατοπτρίζει τη μείωση των ενεργειακών αποθεμάτων του φυτού. Αυτή η εξάντληση των αποθεμάτων άνθρακα σε συνδυασμό με την αύξηση της ζήτησης για ενέργεια οδηγεί σε μια ανισορροπία που συμβάλει στον κυτταρικό θάνατο (Dizengremel, 2001).

4.2. Η επίδραση της μεταχείρισης με EDU

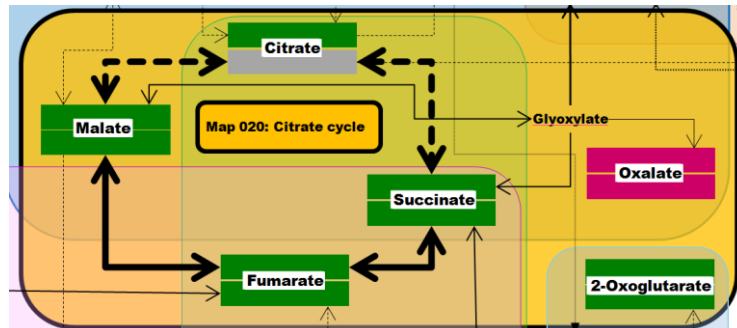
Η εφαρμογή της EDU αφ' εαυτής (με καθαρό/φιλτραρισμένο αέρα) αύξησε τα αποθέματα σε φρουκτόζη, τρεχαλόζη και γλυκόζη (**Εικ. 39**) και μείωσε τα επίπεδα της μαλτόζης (δισακχαρίτης). Η αύξηση της τρεχαλόζης και της γλυκόζης μπορεί να είναι το αποτέλεσμα α) της εντονότερης φωτοσύνθεσης υπό την επίδραση της EDU (Yuan et al., 2015), β) της διάσπασης της μαλτόζης αλλά και γ) της διάσπασης της φρουκτόζης η οποία εμφανίζεται αυξημένη υπό την επίδραση της EDU. Η αύξηση των

μονοσακχαριτών αυτών φανερώνει ότι η EDU συμβάλλει θετικά στην ενεργειακή υποστήριξη του φυτού.



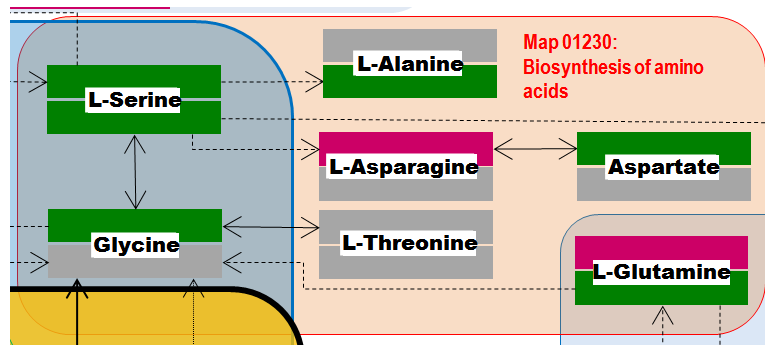
Εικ. 39: Μεταβολίτες που ανιχνεύτηκαν από το μονοπάτι μεταβολισμού αμύλου και σακχάρων (map00500) του *Phaseolus vulgaris* cv. Pinto υπό την επίδραση 2 (πάνω) και 4 (κάτω) ωρών EDU. Ο ερυθρός χρωματισμός σημαίνει αύξηση, ο πράσινος μείωση και ο γκρι καμία μεταβολή συγκέντρωσης. Απόσπασμα της **Εικ. 28**.

Επίσης, η εφαρμογή της EDU σε καθαρό/φιλτραρισμένο αέρα, **μείωσε** τους μεταβολίτες που συμμετέχουν στον κύκλο του Krebs (**κιτρικό οξύ, ηλεκτρικό οξύ, φουμαρικό οξύ και μηλικό οξύ**) (**Εικ. 40**). Ο κύκλος του Krebs ρυθμίζεται από το ενεργειακό ισοζύγιο των κυττάρων (Γαλάρης 2015).



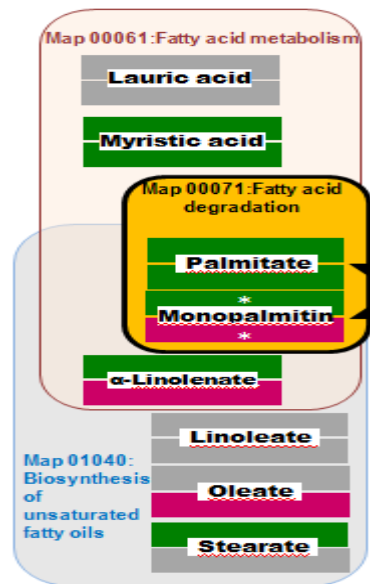
Εικ. 40: Μεταβολίτες που ανιχνεύτηκαν από τον κύκλο του κιτρικού οξέος (map0020) του *Phaseolus vulgaris* cv. Pinto υπό την επίδραση 2 (πάνω) και 4 (κάτω) ωρών EDU. Ο ερυθρός χρωματισμός σημαίνει αύξηση, ο πράσινος μείωση και ο γκρι καμία μεταβολή συγκέντρωσης. Απόσπασμα της **Εικ. 28**.

Η αύξηση της ποσότητας των αμινοξέων **ασπαραγίνη** και **γλουταμίνη** (**Εικ. 41**), ενισχύει την άποψη ότι υπήρξε περίσσεια ενέργειας που οδήγησε στη βιοσύνθεσή τους. Φαίνεται δε ότι οι μεταβολίτες αυτοί δεν συνέβαλαν στον αναβολισμό των λιπαρών οξέων, ίσως επειδή αυτά βιοσυντίθενται από το ακέτυλοCoA πριν τον κύκλο του Krebs.



Εικ. 41: Μεταβολίτες που ανιχνεύτηκαν από το μονοπάτι βιοσύνθεσης αμινοξέων (map01230) του *Phaseolus vulgaris* cv. Pinto υπό την επίδραση 2 (πάνω) και 4 (κάτω) ωρών EDU. Ο ερυθρός χρωματισμός σημαίνει αύξηση, ο πράσινος μείωση και ο γκρι καμία μεταβολή συγκέντρωσης. Απόσπασμα της **Εικ. 28**.

Η εφαρμογή της EDU αφ' εαυτής (με καθαρό/φιλτραρισμένο αέρα) μείωσε τα αποθέματα σε παλμιτικό οξύ και μονοπαλμιτίνη (**Εικ. 42**) που μπορεί να είναι αποτέλεσμα **α)** της κατανάλωσής τους για παροχή ακέτυλοCoA ή **β)** της χρησιμοποίησής τους για τη βιοσύνθεση λιπαρών οξέων με μεγαλύτερη ανθρακική αλυσίδα. Οι ποσότητες των πιο σύνθετων **λιπαρών οξέων** (Λαουρινικό και Λινολεϊκό) δεν μεταβλήθηκαν σημαντικά, συνεπώς ενισχύεται η άποψη ότι ισχύει η πρώτη περίπτωση.

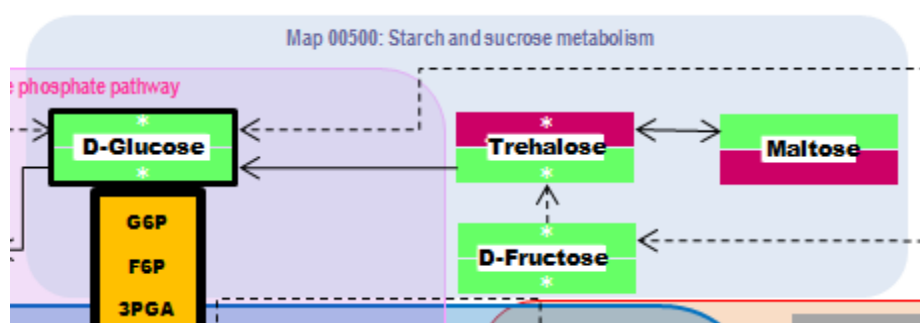


Εικ. 42: Μεταβολίτες που ανιχνεύτηκαν από τα μονοπάτια βιοσύνθεσης ακόρεστων λιπαρών οξέων, βιοσύνθεσης και καταβολισμού λιπαρών οξέων (map 01040, map00061 και map00071) του *Phaseolus vulgaris* cv. Pinto υπό την επίδραση 2 (πάνω) και 4 (κάτω) ωρών EDU. Ο ερυθρός χρωματισμός σημαίνει αύξηση, ο πράσινος μείωση και ο γκρι καμία μεταβολή συγκέντρωσης. Απόσπασμα της **Εικ. 28**.

Μία από τις σημαντικότερες παρατηρήσεις για την επίδραση της EDU στο μεταβολισμό της ποικιλίας Pinto είναι η αύξηση της ποσότητας των αντιοξειδωτικών μυοϊνοσιτόλης και πυρογλουταμικού οξέος (που συμμετέχει στο μεταβολικό μονοπάτι της γλουταθειόνης). Επίσης αυξήθηκε το GABA και η τρεχαλόζη που δρουν προστατευτικά έναντι του όζοντος, όπως αναλύθηκε στις παραγράφους 4.1.2 και 4.1.3.

4.3. Η επίδραση της μεταχείρισης EDU x O₃

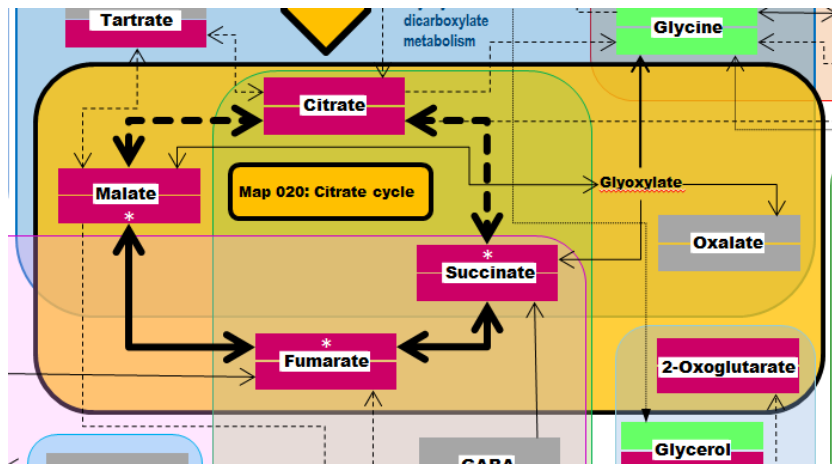
Τα αυξημένα αποθέματα φρουκτόζης και γλυκόζης που προκάλεσε η EDU αφ' εαυτής μειώθηκαν δραστικά όταν τα φυτά εκτέθηκαν παράλληλα σε όζον (έκθεση EDU x O₃). Ως εκ τούτου, η αυξημένη παραγωγή ενεργειακών μονάδων φρουκτόζης, τρεχαλόζης και γλυκόζης που παρέχονται από την εφαρμογή της EDU δαπανώνται κατά προτεραιότητα υπό συνθήκες καταπόνησης από όζον - και αυτός θα μπορούσε να εκληφθεί ως ένας από τους μηχανισμούς προστασίας που παρέχει η EDU σε φυτά έναντι του όζοντος.



Εικ. 43: Μεταβολίτες που ανιχνεύτηκαν από το μονοπάτι μεταβολισμού αμύλου και σακχάρων (map00500) του *Phaseolus vulgaris* cv. Pinto υπό την επίδραση 2 (πάνω) και 4 (κάτω) ωρών EDUxO₃. Ο ερυθρός χρωματισμός σημαίνει αύξηση, ο πράσινος μείωση και ο γκρι καμία μεταβολή συγκέντρωσης. Απόσπασμα της **Εικ. 29**.

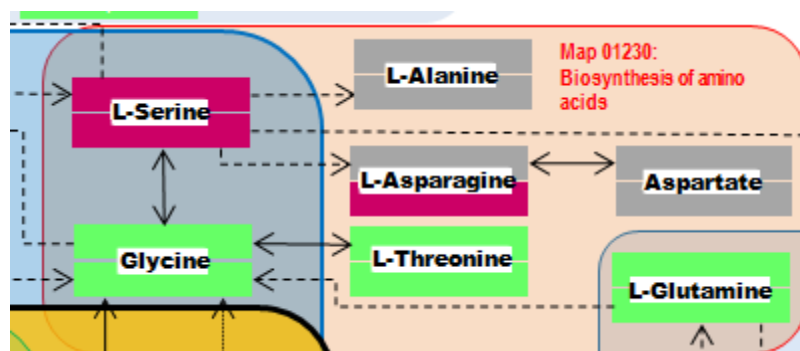
Όμως, ο συνολικός μηχανισμός προστασίας της EDU έναντι του όζοντος, φαίνεται να είναι αρκετά πιο σύνθετος καθώς α) το όζον αφ' εαυτού αύξησε τα επίπεδα αυτών των σακχάρων και β) η τρεχαλόζη και η μαλτόζη έδειξαν αντιφατική συμπεριφορά ανάλογα με την διάρκεια έκθεσης στο όζον: η μαλτόζη αρχικά (μετά από 2h) μειώθηκε και στην συνέχεια (μετά από 4h) αυξήθηκε ενώ η τρεχαλόζη συμπεριφέρθηκε αντίστροφα. Επίσης, το γεγονός ότι τόσο το όζον όσο και η EDU δρώντας από μόνα τους αυξάνουν τα σάκχαρα (φρουκτόζη, τρεχαλόζη και γλυκόζη) ενώ η ταυτόχρονη δράση τους μειώνει τα επίπεδά τους φανερώνει ένα πιο

σύνθετο μηχανισμό ανταγωνιστικής αλληλεπίδρασης των δύο αυτών παραγόντων.



Εικ. 44: Μεταβολίτες που ανιχνεύτηκαν από τον κύκλο του κιτρικού οξέος (map0020) του *Phaseolus vulgaris* cv. Pinto υπό την επίδραση 2 (πάνω) και 4 (κάτω) ωρών EDUxO3. Ο ερυθρός χρωματισμός σημαίνει αύξηση, ο πράσινος μείωση και ο γκρι καμία μεταβολή συγκέντρωσης. Απόσπασμα της **Εικ. 29**.

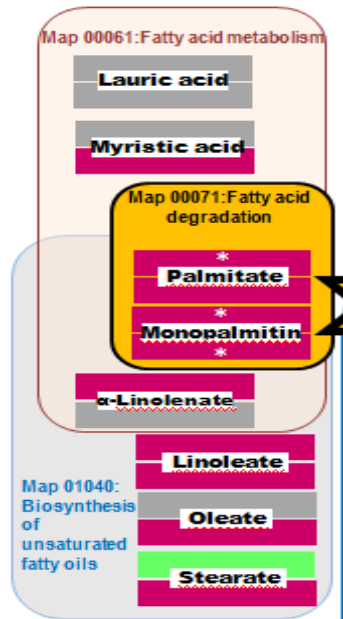
Ο παράλληλος χειρισμός των φυτών με EDU και όζον, αύξησε την παραγωγή **κιτρικού οξέος** και **μηλικού οξέος** και ακόμα περισσότερο την παραγωγή **ηλεκτρικού οξέος** και **φουμαρικού οξέος** τόσο μετά από 2 όσο και μετά από 4 ώρες (**Εικ. 44**). Η αύξηση των μεταβολιτών δεν μπορεί να αποδοθεί στη μεμονωμένη δράση του όζοντος ή της EDU, γιατί όπως φαίνεται στις εικόνες 35 και 39 τόσο το όζον όσο και η EDU μείωσαν την ποσότητα των μεταβολιτών που συμμετέχουν στον κύκλο του Krebs.



Εικ. 45: Μεταβολίτες που ανιχνεύτηκαν από το μονοπάτι μεταβολισμού αμύλου και σακχάρων (map00500) του *Phaseolus vulgaris* cv. Pinto υπό την επίδραση 2 (πάνω) και 4 (κάτω) ωρών EDUxO3. Ο ερυθρός χρωματισμός σημαίνει αύξηση, ο πράσινος μείωση και ο γκρι καμία μεταβολή συγκέντρωσης. Απόσπασμα της **Εικ. 29**.

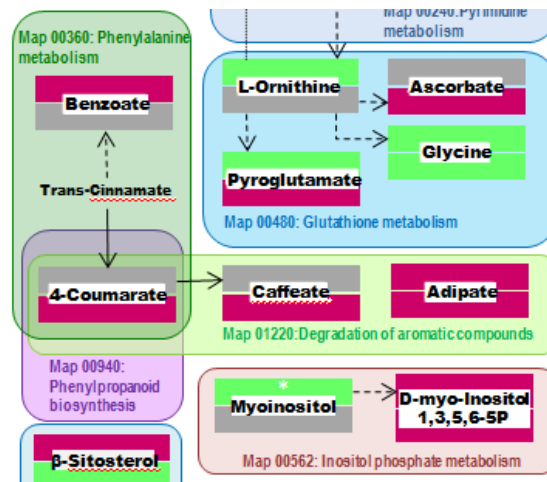
Ένα ακόμα γεγονός που δυσχεραίνει την εξαγωγή συμπεράσματος είναι τα αντιφατικά ευρήματα σχετικά με την επίδραση της EDU στη φωτοσύνθεση (Manning et al., 2011). Κάποιοι ερευνητές παρατήρησαν ότι η EDU προστάτευσε τα φυτά από το όζον χωρίς να επηρεαστεί η φωτοσύνθεση (Hassan et al., 2007), ενώ κάποιοι άλλοι παρατήρησαν ότι επηρεάστηκε (Paoletti et al., 2008b)

Τέλος, αξίζει να σημειωθεί η αύξηση της συγκέντρωσης του **λινολεϊκού** και του **α-λινολεϊκού οξέος** τα οποία δρουν ως αντιοξειδωτικά (Larson, 1988).



Εικ. 46: Μεταβολίτες που ανιχνεύτηκαν από τα μονοπάτια βιοσύνθεσης ακόρεστων λιπαρών οξέων, βιοσύνθεσης και καταβολισμού λιπαρών οξέων (map 01040, map00061 και map00071) του *Phaseolus vulgaris* cv. Pinto υπό την επίδραση 2 (πάνω) και 4 (κάτω) ωρών EDUxO₃. Ο ερυθρός χρωματισμός σημαίνει αύξηση, ο πράσινος μείωση και ο γκρι καμία μεταβολή συγκέντρωσης. Απόσπασμα της **Εικ. 29**.

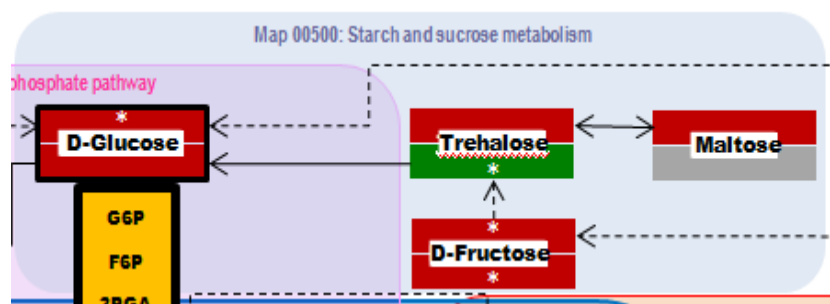
Αξίζει επίσης να σημειωθεί η μεταχείριση με EDU x O₃ αρχικά (τις πρώτες 2h) δεν ενεργοποίησε αμυντικούς μηχανισμούς που σχετίζονται με τα φαινυλπροπανοειδή (4-κουμαρικό και καφεϊκό οξύ) (**Εικ. 47**) ούτε το GABA. Όμως, αυξήθηκαν τα επίπεδα του αιθυλενίου που δρα ως μέσο μετάδοσης σήματος και ίσως ενεργοποιεί αμυντικούς μηχανισμούς του φυτού (Schraudner et al., 1996).



Εικ. 47: Μεταβολίτες που ανιχνεύτηκαν από τα μονοπάτια βιοσύνθεσης φαινυλπροπανοειδών, μεταβολισμού φωσφατάσης της ινοσιτόλης και καταβολισμού αρωματικών ενώσεων (map 00940, map00562 και map01220) του *Phaseolus vulgaris* cv. Pinto υπό την επίδραση 2 (πάνω) και 4 (κάτω) ωρών EDUx03. Ο ερυθρός χρωματισμός σημαίνει αύξηση, ο πράσινος μείωση και ο γκρι καμία μεταβολή συγκέντρωσης. Απόσπασμα της **Εικ. 29**.

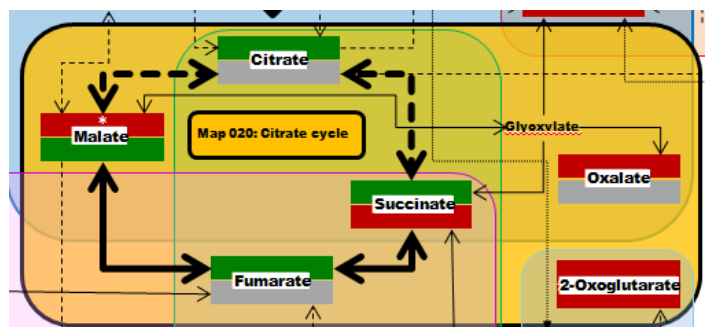
4.4. Η επίδραση της Penconazole

Η εφαρμογή της Penconazole αφ' εαυτής (με καθαρό/φιλτραρισμένο αέρα) αύξησε τα αποθέματα σε φρουκτόζη και γλυκόζη (**Εικ. 48**) και αύξησε παροδικά (τις 2 πρώτες ώρες) τα επίπεδα της **μαλτόζης** και της **τρεχαλόζης**. Η αύξηση της φρουκτόζης και της γλυκόζης μπορεί να είναι το αποτέλεσμα α) της επίδρασης στη φωτοσύνθεση, β) της διάσπασης της μαλτόζης αλλά και γ) της διάσπασης της φρουκτόζης η οποία εμφανίζεται αυξημένη υπό την επίδραση της Penconazole.



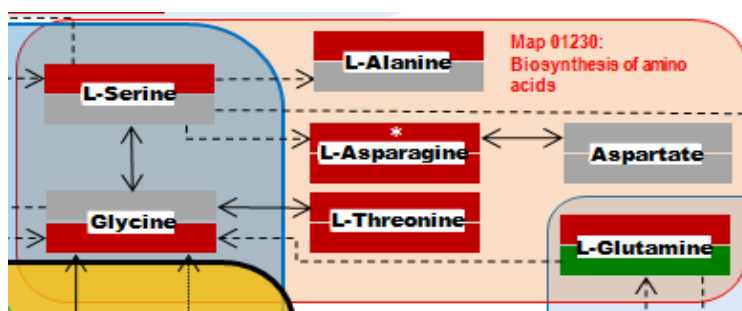
Εικ. 48 : Μεταβολίτες που ανιχνεύτηκαν από το μονοπάτι μεταβολισμού αμύλου και σακχάρων (map00500) του *Phaseolus vulgaris* cv. Pinto υπό την επίδραση 2 (πάνω) και 4 (κάτω) ωρών Penconazole. Ο ερυθρός χρωματισμός σημαίνει αύξηση, ο πράσινος μείωση και ο γκρι καμία μεταβολή συγκέντρωσης. Απόσπασμα της **Εικ. 30**.

Η αύξηση των μονοσακχαριτών αυτών φανερώνει ότι η Penconazole επιδρά στη διαχείριση της ενέργειας του φυτού.



Εικ. 49: Μεταβολίτες που ανιχνεύτηκαν από τον κύκλο του κιτρικού οξέος (map0020) του *Phaseolus vulgaris* cv. Pinto υπό την επίδραση 2 (πάνω) και 4 (κάτω) ωρών Penconazole. Ο ερυθρός χρωματισμός σημαίνει αύξηση, ο πράσινος μείωση και ο γκρι καμία μεταβολή συγκέντρωσης. Απόσπασμα της **Εικ. 30**.

Επίσης, η εφαρμογή της Penconazole σε καθαρό/φιλτραρισμένο αέρα, μείωσε παροδικά (τις πρώτες 2h) το κιτρικό οξύ, το φουμαρικό οξύ και το ηλεκτρικό οξύ που συμμετέχουν στον κύκλο του Krebs αλλά αύξησε παροδικά (τις πρώτες 2h) το μηλικό οξύ (**Εικ. 49**). Τις επόμενες ώρες η συγκέντρωση του κιτρικού και του φουμαρικού οξέος παρέμειναν σε σταθερές, αλλά αυξήθηκε η συγκέντρωση του ηλεκτρικού οξέος και μειώθηκε η συγκέντρωση του μηλικού οξέος. Οι αυξομειώσεις αυτές δεν συνάδουν σε μια ενιαία απόκριση του κύκλου του Krebs και δεν είναι δυνατό να εξαχθεί συμπέρασμα.

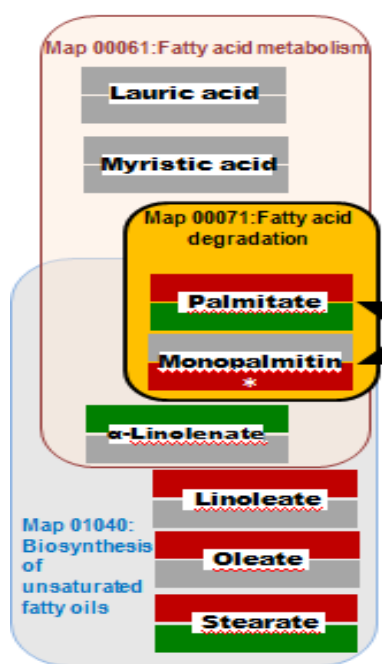


Εικ. 50: Μεταβολίτες που ανιχνεύτηκαν από το μονοπάτι βιοσύνθεσης αμινοξέων (map01230) του *Phaseolus vulgaris* cv. Pinto υπό την επίδραση 2 (πάνω) και 4 (κάτω) ωρών Penconazole. Ο ερυθρός χρωματισμός σημαίνει αύξηση, ο πράσινος μείωση και ο γκρι καμία μεταβολή συγκέντρωσης. Απόσπασμα της **Εικ. 30**.

Αντίθετα, στο μονοπάτι βιοσύνθεσης αμινοξέων παρατηρήθηκε αύξηση των περισσότερων μεταβολιτών, όπως της **L-ασπαραγίνης, L-**

θρεονίνης αλλά και παροδική αύξηση των υπολοίπων αμινοξέων (L-αλανίνη, L-σερίνη και L-γλουταμίνη) (**Εικ. 50**). Η αύξηση της ποσότητας των αμινοξέων ίσως σημαίνει ότι το penconazole επιδρά στο συγκεκριμένο μονοπάτι.

Η εφαρμογή της Penconazole αφ' εαυτής (με καθαρό/φιλτραρισμένο αέρα) αύξησε και στη συνέχεια μείωσε τα αποθέματα σε παλμιτικό οξύ και στεατικό οξύ (**Εικ. 51**) που μπορεί να είναι αποτέλεσμα όρμισης. Η μείωση των επιπέδων ίσως προκλήθηκε λόγω **α)** της κατανάλωσής τους για παροχή ακέτυλοCoA ή **β)** της χρησιμοποίησής τους για τη βιοσύνθεση λιπαρών οξέων με μεγαλύτερη ανθρακική αλυσίδα.

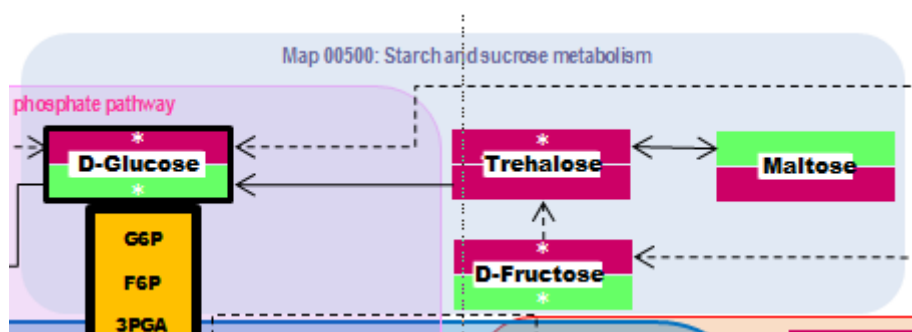


Εικ. 51: Μεταβολίτες που ανιχνεύθηκαν από τα μονοπάτια βιοσύνθεσης ακόρεστων λιπαρών οξέων, βιοσύνθεσης και καταβολισμού λιπαρών οξέων (map 01040, map00061 και map00071) του *Phaseolus vulgaris* cv. Pinto υπό την επίδραση 2 (πάνω) και 4 (κάτω) ωρών Penconazole. Ο ερυθρός χρωματισμός σημαίνει αύξηση, ο πράσινος μείωση και ο γκρι καμία μεταβολή συγκέντρωσης. Απόσπασμα της **Εικ. 30**.

Οι ποσότητες των πιο σύνθετων λιπαρών οξέων (Λαουρινικό και Λινολειακό) δεν μεταβλήθηκαν σημαντικά, συνεπώς ενισχύεται η άποψη ότι ισχύει η πρώτη περίπτωση.

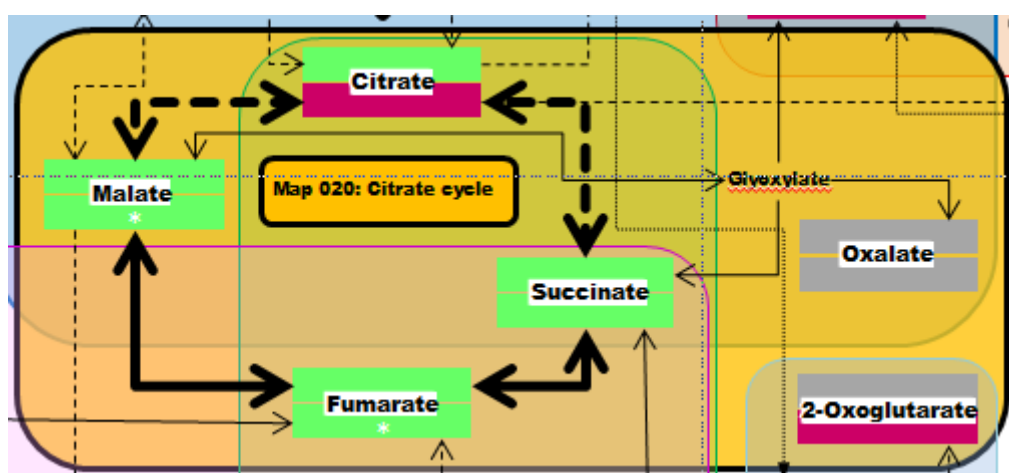
4.5. Η επίδραση της Penconazole x O₃

Υπό την επίδραση της Penconazole τόσο στα φυτά που εκτέθηκαν σε όζον όσο και στα φυτά που εκτέθηκαν σε καθαρό/φιλτραρισμένο αέρα, παρατηρήθηκε αύξηση της φρουκτόζης, της τρεχαλόζης αλλά και της γλυκόζης.



Εικ. 52: Μεταβολίτες που ανιχνεύτηκαν από το μονοπάτι μεταβολισμού αμύλου και σακχάρων (map00500) του *Phaseolus vulgaris* cv. Pinto υπό την επίδραση 2 (πάνω) και 4 (κάτω) ωρών Penconazole x O₃. Ο ερυθρός χρωματισμός σημαίνει αύξηση, ο πράσινος μείωση και ο γκρι καμία μεταβολή συγκέντρωσης. Απόσπασμα της **Εικ. 31**.

Ενδεχομένως ο μηχανισμός δράσης του Penconazole να είναι παρόμοιος με αυτόν της EDU, ήτοι αύξηση των μονοσακχαριτών που συμβάλλουν θετικά στην ενεργειακή υποστήριξη του φυτού που τελεί υπό καταπόνηση όζοντος.



Εικ. 53: Μεταβολίτες που ανιχνεύτηκαν από τον κύκλο του κιτρικού οξέος (map0020) του *Phaseolus vulgaris* cv. Pinto υπό την επίδραση 2 (πάνω) και 4 (κάτω) ωρών Penconazole x O₃. Ο ερυθρός χρωματισμός σημαίνει αύξηση, ο πράσινος μείωση και ο γκρι καμία μεταβολή συγκέντρωσης. Απόσπασμα της **Εικ. 31**.

Σε φυτά που είχαν δεχτεί χειρισμό με Penconazole και εκτέθηκαν σε όζον μειώθηκε η ποσότητα των μεταβολιτών που συμμετέχουν στον **κύκλο του Krebs**. Το όζον επίσης μείωσε τις ποσότητες των ουσιών αυτών. Συνεπώς, η Penconazole δρα επίσης επιβαρυντικά στα συστατικά του κύκλου, όπως και το όζον.

4.6. Μεταβολίτες με ιδιαίτερο ενδιαφέρον

Ορισμένοι από τους μεταβολίτες που ανιχνεύθηκαν παρουσιάζουν ιδιαίτερο ενδιαφέρον και μελετώνται εκτενέστερα παρακάτω.

4.6.1. Το Ασκορβικό οξύ (Ascorbate)

Το ασκορβικό οξύ (βιταμίνη C) είναι μια ισχυρά αντιοξειδωτική ουσία που έχει την ιδιότητα να εξουδετερώνει μια ελεύθερη ρίζα ($RO\cdot$) με την παροχή μιας ρίζας υδρογόνου ($H\cdot$) ή με την παροχή ενός πρωτονίου και ενός ηλεκτρονίου μεταπίπτοντας το ίδιο σε σχετικά μη δραστική -λόγω της χημικής της δομής- ρίζα ασκορβικού (Γαλάρης, 2015).

Ήδη από το 1960 έχει βρεθεί ότι το ασκορβικό οξύ, εφαρμοζόμενο είτε διαφυλλικά είτε με ριζοπότισμα, παρέχει κάποια προστασία στα φυτά έναντι του όζοντος (Freebairn, 1960). Παράλληλα, εκτός από την ποσότητά του στα κύτταρα, σημαντικό ρόλο διαδραματίζει και η δραστικότητα των μεταβολικών οδών που είναι υπεύθυνες για τη βιοσύνθεσή του (Dizengremel et al., 2009; Luwe, 1996). Επίσης, διαπιστώθηκε ότι αποτελεί την πρώτη γραμμή άμυνας έναντι των ενεργών μορφών οξυγόνου (ROS) και, ως εκ τούτου, σχετίζεται με την απόκριση των φυτών στο όζον (Conklin and Barth, 2004). Για παράδειγμα, οι Caregnato et al. το 2013 μέτρησαν την ποσότητα ασκορβικού οξέος σε φυτά φασολιού με διαφορετική ανεκτικότητα όζοντος και βρήκαν ότι: **α)** η λιγότερο ανθεκτική ποικιλία διατήρησε σχεδόν σταθερά τα επίπεδα ασκορβικού οξέος ενώ **β)** η περισσότερο ανθεκτική ποικιλία συγκρινόμενη με την λιγότερο ανθεκτική είχε μικρότερη ποσότητα ασκορβικού οξέος πριν την έκθεση στο όζον. Όμως, μετά την έκθεση στο όζον τα επίπεδα ασκορβικού οξέος αυξηθήκαν σημαντικά.

Στην παρούσα μελέτη, το όζον δεν επηρέασε τα επίπεδα ασκορβικού οξέος στα φυτά της ποικιλίας φασολιού Pinto που εκτέθηκαν σε όζον χωρίς να εφαρμοστεί σε κάποια φυτοπροστατευτική ουσία. Η αδυναμία της

ποικιλίας αυτής να αυξήσει τα επίπεδα ασκορβικού οξέος ίσως εξηγεί το γεγονός ότι είναι αρκετά ευαίσθητη στο όζον. Η εφαρμογή της Penconazole αφ' εαυτής, δεν αύξησε τα επίπεδα ασκορβικού οξέος. Όμως, ο ταυτόχρονος χειρισμός των φυτών με Penconazole και όζον (ύστερα από 4h έκθεσης), μείωσε την ποσότητα ασκορβικού οξέος. Η μείωση του ασκορβικού οξέος ως αποτέλεσμα του χειρισμού με Penconazole δεν προστατεύει τα φυτά έναντι του όζοντος. Επίσης, η εφαρμογή EDU αφ' εαυτής, δεν μετέβαλε τα επίπεδα ασκορβικού οξέος. Ο ταυτόχρονος όμως χειρισμός των φυτών με EDU και όζον (ύστερα από 4h έκθεσης), αύξησε την ποσότητα ασκορβικού οξέος. Ως εκ τούτου, η αύξηση του ασκορβικού οξέος λόγω της εφαρμογής EDU, υπό συνθήκες αυξημένου όζοντος, ίσως αποτελεί τον τρόπο δράσης της EDU ως προστατευτική έναντι του όζοντος ουσία.

4.6.2. Η Τρεχαλόζη (Trehalose)

Η τρεχαλόζη είναι ένας δισακχαρίτης που συντίθεται τόσο σε προκαρυωτικά όσο και σε ευκαρυωτικά κύτταρα (βακτήρια, μύκητες, φυτά και ασπόνδυλα) (Paul et al., 2008) και αποτελείται από δύο μόρια γλυκόζης ενωμένα με έναν α , α -1,1-γλυκοζιτικό δεσμό¹ (Feofilova et al., 2014).

Έχει τεκμηριωθεί, ότι σε πολλούς οργανισμούς, η τρεχαλόζη αυξάνει την ανοχή στην καταπόνηση από αβιοτικούς παράγοντες. Δρεπτά άνθη που διατηρήθηκαν σε νερό με τρεχαλόζη παρουσίασαν καθυστέρηση της μάρανσης κάτι που οι ερευνητές ερμήνευσαν ως ένδειξη ότι η τρεχαλόζη αναστέλλει το φαινόμενο του αποπτωτικού κυτταρικού θανάτου (Tetsuya et al., 2002). Οι δυσμενείς επιπτώσεις της αλατότητας, της ξηρασίας και των υψηλών ή χαμηλών θερμοκρασιών φαίνεται να μετριάζονται με την τρεχαλόζη και η χρήση της αναμένεται να αποτελέσει μελλοντικά ένα δυναμικό εργαλείο για την προστασία των φυτών (Iordachescu and Imai, 2011). Επίσης, η τρεχαλόζη φαίνεται να συμμετέχει στη διαδικασία

¹ Η τρεχαλόζη διασπάται από το ένζυμο τρεχαλάση σε γλυκόζη. Πιο αναλυτικά, στα φυτά, η trehalose 6-phosphate συνθετάση (TPS) καταλύει τη σύνθεση του ενδιάμεσου μεταβολίτη trehalose 6-phosphate από glucose-6-phosphate και Uridine Diphosphate (UDP)-glucose και στη συνέχεια η trehalose 6-phosphate phosphatase (TPP) δρα αποφωσφορυλιώνοντας την trehalose 6-phosphate σε trehalose (Iordachescu and Imai, 2011).

γήρανσης που σχετίζεται άμεσα με τον προγραμματισμένο κυτταρικό θάνατο (programmed cell death, συντ. PCD) ο οποίος συμβαίνει ως αποτέλεσμα επίθεσης παθογόνων (Greenberg et al., 1994) (Wang, 1996) (Del Pozo and Lam, 1998) αλλά και αβιοτικών παραγόντων (που αυξάνουν τις ROS) (Solomon, 1999) (Pasqualini et al., 2003). Αν και δεν έχει σαφώς εξακριβωθεί, δεν αποκλείεται ο PCD να εμπλέκεται στο μηχανισμό αντίδρασης των φυτών στο όζον (Pellinen et al., 1999). Για παράδειγμα, οι Pasqualini και συν. (2003), μετά από μόλις 2,5 ώρες έκθεσης φυτών της εξαιρετικά ευαίσθητης στο όζον ποικιλίας καπνού Bel-W3, σε 150 ppb όζοντος, παρατήρησαν μιτοχρονδριακές αλλαγές (μείωση του μιτοχονδριακού κυτοχρώματος c με ταυτόχρονη αύξηση του κυττοπλασμικού κυτοχρώματος c) που θα μπορούσαν να εκληφθούν ως σοβαρές ενδείξεις O₃-επαγόμενου PCD. Επίσης, βρέθηκε μια εργασία στην οποία αναφέρεται σαφώς ότι το όζον επάγει τον PCD σε φυτά Arabidopsis (Overmyer et al., 2005).

Στην παρούσα μελέτη, η έκθεση στο όζον αύξησε τη βιοσύνθεση της τρεχαλόζης όσο μετά από 2 όσο και μετά από 4 ώρες. Η απλή εφαρμογή EDU ή Penconazole αρχικά, στις 2 πρώτες ώρες, αύξησε τα επίπεδα της τρεχαλόζης αλλά μετά από 4 ώρες αυτά βρέθηκαν σημαντικά μειωμένα. Στα φυτά που δέχτηκαν ταυτόχρονη μεταχείριση με Penconazole και όζον η ποσότητα της τρεχαλόζης ήταν αυξημένη τόσο μετά από 2 όσο και μετά από 4 ώρες. Όμως, στα φυτά που δέχτηκαν ταυτόχρονη μεταχείριση με EDU και όζον η τρεχαλόζη αρχικά (2h έκθεσης) αυξήθηκε και στη συνέχεια (4h έκθεσης) μειώθηκε. Το ίδιο μοτίβο παρατηρήθηκε και στις συνδυασμένες επεμβάσεις EDU x Penconazole και EDU x Penconazole x Ozone (**Εικ. 54**). Αυτή η βραχεία αυξομείωση της τρεχαλόζης δεν είναι εύκολο να ερμηνευτεί. Δεδομένου ότι όλες οι μεταχειρίσεις (ozone, EDU, Penconazole και συνδυασμοί αυτών) είναι ξеноβιοτικές ουσίες, η αρχική αύξηση της τρεχαλόζης τις 2 πρώτες ώρες, σε όλες τις μεταχειρίσεις μπορεί να εκληφθεί ως εμφάνιση όρμησης (hormesis) που είναι σύνηθες φαινόμενο στην τοξικολογία. Για παράδειγμα, έχει προταθεί ότι η EDU, εφαρμοζόμενη σε χαμηλές δόσεις, ενδέχεται να προστατεύει τα φυτά από τις βλαπτικές επιδράσεις της O₃ ενεργοποιώντας την άμυνα του μέσω EDU-επαγόμενης όρμησης (Agathokleous, 2017). Σε κάθε περίπτωση, η (έστω προσωρινή) αύξηση της τρεχαλόζης αποτελεί ένδειξη ενεργοποίησης του μηχανισμού άμυνας που σχετίζεται με αναστολή του κυτταρικού θάνατο (Tetsuya et al., 2002).

	Τρεχαλόζη	Αιθυλένιο	GABA	Ασκορβικό οξύ	4-Κουμαρικό οξύ	α-Λινολενικό οξύ
Ozone	↑↑		↓↓		↓↓	↓
EDU	↑↓		↑↓		↓↓	↓↑
Penc	↑↓	↑	↓↓	↑	↑	↓
Ozone - EDU	↑↓	↑↑	↓	↑	↑	↑↑
Ozone - Penc	↑↑		↑↑	↓	↑	↑↑
EDU - Penc	↑↓	↑	↓↓	↑	↓↓	↑↑
Ozone – EDU - Penc	↑↓	↑	↑	↓	↓↑	↑↑

Εικ. 54: Παρουσίαση της συγκέντρωσης των μεταβολιτών: τρεχαλόζη, αιθυλένιο, GABA, Ασκορβικό οξύ, 4-Κουμαρικό οξύ και α-Λινολενικό οξύ της ποικιλίας φασολιού Pinto ύστερα από τις μεταχειρίσεις της παρούσας εργασίας. Η αύξηση παρουσιάζεται με κόκκινο άνω βέλος, η μείωση με πράσινο κάτω βέλος και η μη μεταβολή με γκρι ταινία.

4.6.3. Το γ-αμινοβουτυρικό οξύ (GABA)

Στην παρούσα εργασία το όζον μείωσε τα επίπεδα της GABA (Εικ. 54). Ο ταυτόχρονος χειρισμός με EDU και όζον μείωσε ή διατήρησε στα ίδια επίπεδα το GABA. Όμως, ο ταυτόχρονος χειρισμός με Penconazole και όζον αύξησε τη βιοσύνθεση του GABA. Συνεπώς, μια παράλληλη δράση της μυκητοκτόνου αυτής ουσίας είναι η αύξηση του GABA. Το GABA είναι ένα μη πρωτεϊνικό αμινοξύ που συσσωρεύεται ταχύτατα σε φυτικούς ιστούς ύστερα από βιοτική ή αβιοτική καταπόνηση (Shelp et al., 2012). Έχουν διατυπωθεί διάφορες εκδοχές αναφορικά με το ρόλο που διαδραματίζει στα φυτά που περιλαμβάνουν από την απλή συμμετοχή του στο μεταβολισμό του αζώτου έως και τη διαβίβαση σημάτων (Roberts, 2007). Σύμφωνα με έρευνες των Bown και Shelp το 2016, το GABA συσσωρεύεται γρήγορα όταν τα φυτά εκτίθενται σε καταπόνηση αλλά παραμένει προς διευκρίνιση εάν η συσσώρευση αυτή οφείλεται στη ρύθμιση του μεταβολισμού του φυτού ως απόκριση στην καταπόνηση ή εάν αποτελεί μια προσαρμογή για τη μετρίαση των συνεπειών της. Η ρύθμιση των επιπέδων GABA λειτουργεί ως άμυνα έναντι της υδατικής καταπόνησης και της επίθεσης από έντομα (Shelp et al., 2012) αλλά εμπλέκεται στη μετάδοση του σήματος (Ramesh et

al., 2015) - κάτι όμως το οποίο δεν έχει επιβεβαιωθεί καθώς δεν έχει ακόμα ταυτοποιηθεί ο αντίστοιχος α-υποδοχέας (Bown and Shelp, 2016).

4.6.4. Το Αιθυλένιο (Ethylene)

Το αιθυλένιο είναι μια φυτορμόνη η οποία παίζει ρόλο διαμεσολαβητή στις αποκρίσεις των φυτών σε βιοτικές ή αβιοτικές καταπονήσεις, περιλαμβανομένων των μηχανικών καταπονήσεων, της ξηρασίας και της καταπόνησης από όζον. Η αέρια φύση του επιτρέπει την εύκολη μεταφορά του στο φυτικό ιστό και το καθιστά ιδιαίτερα αποδοτικό ως συντονιστή των αναπτυξιακών αποκρίσεων (Xu and Zhang, 2015). Αν και όλα τα φυτά συνθέτουν αιθυλένιο, τα επίπεδά του στους φυτικούς ιστούς είναι γενικά χαμηλά και αυξάνονται δραματικά, όταν χρειαστεί, για την ρύθμιση διαδικασιών όπως η ωρίμανση των καρπών, η γήρανση και η αποκοπή των φύλλων. Το αιθυλένιο ανήκει στις φυτικές ορμόνες ή ρυθμιστές φυτικής ανάπτυξης (plant growth regulators συντ. PGR) των οποίων οι επιδράσεις είναι ειδικές και σε κάποιο βαθμό φαίνεται να απευθύνονται σε ειδικές κατηγορίες ιστών. Πολλές από τις αλλαγές που προκαλούνται από τους PGR απαιτούν την έκφραση γονιδίων, όπως επίσης και ενεργοποίηση μηχανισμών πρόσληψης και απόκρισης (Ecker, 1995). Υπάρχουν αρκετές μελέτες που τεκμαίρουν την απελευθέρωση αιθυλενίου μετά από καταπόνηση φυτών από όζον (Cracker and Starbuck, 1972; Pell et al., 1997; Heath, 2008). Για παράδειγμα, άμεση αύξηση της συγκέντρωσης του αιθυλενίου σε φυτά καπνού ποικιλίας cv Bel W3 μετά από μόλις 1-2 ώρες έκθεσης σε όζον έχει αναφερθεί και από τους Langebartels et al. (1991). Επίσης, όταν φυτά της ευαίσθητης (Bel-W3) και της ανθεκτικής (Bel-B) ποικιλίας καπνού εκτέθηκαν σε διάφορες συγκεντρώσεις όζοντος (για 1 ώρα) παρατηρήθηκε παραγωγή αιθυλενίου στην ευαίσθητη ποικιλία αλλά όχι στην ανθεκτική. Αυτή η άμεση αύξηση παραγωγής αιθυλενίου φαίνεται να σχετίζεται με την ευαισθησία των φυτών στο όζον (Schraudner et al., 1996).

Ωστόσο, αν και, στο πλαίσιο της παρούσας μεταβολομικής ανάλυσης, ανιχνεύθηκε αιθυλένιο τα επίπεδα του δεν βρέθηκε να διαταραχτήκαν ούτε από το όζον ούτε από την EDU ούτε από την συνδυασμένη μεταχείριση Penconazole X όζον. Η μεταχείριση των φυτών με Penconazole ή EDU X Penconazole ή EDU X Penconazole X όζον επέφερε μια προσωρινή αύξηση των επιπέδων αιθυλενίου (τις 2 πρώτες ώρες έκθεσης) (**Εικ. 54**). Στη μεταχείριση όζον X EDU παρατηρήθηκε επίσης αύξηση του αιθυλενίου τόσο μετά από 2 όσο και μετά από 4 ώρες έκθεσης. Προφανώς η αύξηση της

παραγωγής αιθυλενίου - όπου αυτή παρατηρήθηκε - βοηθά στη γρηγορότερη μετάδοση του σήματος καταπόνησης από όζον ενεργοποιώντας άμεσα τον αμυντικό του μηχανισμό (Langebartels et al., 1991; Pasqualini et al., 2007).

4.6.5. Το 4-Κουμαρικό οξύ (4-Coumarate)

Η ανθεκτικότητα των φυτών φασολιού στο όζον είναι αποτέλεσμα περισσοτέρων του ενός μηχανισμών (Guidi et al., 2010). Ένας από τους μηχανισμούς αυτούς φέρεται να σχετίζεται με τα φαινυλπροπανοειδή (Cotrozzi et al., 2016; Paoletti et al., 2008a). Για παράδειγμα, έχει προταθεί ότι τα φαινυλπροπανοειδή δρουν στα φύλλα ως αντιοξειδωτικά που απενεργοποιούν τις ενεργές ρίζες οξυγόνου (ROS) (Agati et al., 2009), σε σημεία του κυττάρου όπου δεν υπάρχουν αντιοξειδωτικά ένζυμα, όπως στα κυτταρικά τοιχώματα (Hernández et al., 2009). Ωστόσο, οι (Di Baccio et al., 2008) παρατήρησαν ότι μετά από έκθεσης ευαίσθητου στο όζον κλώνου λεύκης (*Populus deltoides x maximowiczii*) αυξήθηκαν τα επίπεδα των φαινυλπροπανοειδών στα φύλλα του αλλά η αύξηση αυτή δεν επαρκούσε για την εξουδετέρωση του H₂O₂ και την προστασία έναντι του οξειδωτικού στρες.

Στην παρούσα μελέτη, στο μεταβολικό μονοπάτι σύνθεσης φαινυλπροπανοειδών παρατηρήθηκε μεγάλη μείωση του 4-κουμαρικού οξέος υπό την επίδραση του όζοντος. Υποθέτουμε ότι η ανικανότητα σύνθεσης φαινυλπροπανοειδών αυξάνει την ευαισθησία της συγκεκριμένης ποικιλίας στο όζον.

Στα φυτά που δέχτηκαν ταυτόχρονη μεταχείριση με είτε με EDU και όζον είτε με Penconazole και όζον, αυξήθηκε το 4-κουμαρικό οξύ γεγονός που οδηγεί στο συμπέρασμα ότι ίσως ασκεί προστατευτική-αντιοξειδωτική δράση η οποία οφείλεται στην αύξηση φαινυλπροπανοειδών.

4.6.6. Το α-Λινολενικό οξύ (α-Linolate)

Το α-Λινολενικό οξύ παράγει άμεσα ιασμονικό οξύ που δρα προστατευτικά έναντι των καταπονήσεων (Reinbothe et al. 1994). Το γεγονός αυτό του καθιστά σημαντική την ανίχνευσή του κατά τη μεταβολομική ανάλυση και σηματοδοτεί την ανάγκη περαιτέρω μελέτης του.

4.6.6. Άλλοι μεταβολίτες

Πέραν των παραπάνω μεταβολικών που είναι γνωστό ότι παίζουν σημαντικό ρόλο στη φυσιολογία των φυτών, και στην ανταπόκριση τους σε παράγοντες περιβαλλοντικών καταπονήσεων, ενδιαφέρον παρουσιάζουν και οι παρακάτω μεταβολίτες οι οποίοι βρέθηκαν να επηρεάζονται σημαντικά από την επίδραση του όζοντος. Συγκεκριμένα, αυξήθηκαν σημαντικά η γλυκόζη, το μηλικό οξύ, το 2-οξογλουταρικό οξύ και η L-γλουταμίνη, ενώ μειώθηκαν σημαντικά το πυρογλουταμικό οξύ, το 2-κετογλουταρικό οξύ, η L-σερίνη και η L-ασπαραγίνη. Αυτοί οι μεταβολίτες - και πολύ περισσότερο συνδυασμοί αυτών - έχει ενδιαφέρον να επαναξιολογηθούν ως πιθανοί βιοσημαντές καταπόνησης φυτών από όζον ακόμα και απουσία μακροσκοπικά ορατών συμπτωμάτων.

5



Βιβλιογραφία

5. ΒΙΒΛΙΟΓΡΑΦΙΑ

Agathokleous, E.: Perspectives for elucidating the ethylenediurea (EDU) mode of action for protection against O₃ phytotoxicity, *Ecotoxicol. Environ. Saf.*, 142C(March), 530–537, doi:10.1016/j.ecoenv.2017.04.057, 2017.

Agathokleous, E., Paoletti, E., Saitanis, C. J., Manning, W. J., Shi, C. and Koike, T.: High doses of ethylene diurea (EDU) are not toxic to willow and act as nitrogen fertilizer, *Sci. Total Environ.*, 566–567, 841–850, doi:10.1016/j.scitotenv.2016.05.122, 2016a.

Agathokleous, E., Saitanis, C. J., Stamatelopoulos, D., Mouzaki-Paxinou, A. C., Paoletti, E. and Manning, W. J.: Olive Oil for Dressing Plant Leaves so as to Avoid O₃ Injury, *Water. Air. Soil Pollut.*, 227(8), doi:10.1007/s11270-016-2986-9, 2016b.

Agathokleous, E., Mouzaki-Paxinou, A. C., Saitanis, C. J., Paoletti, E. and Manning, W. J.: The first toxicological study of the antiozonant and research tool ethylene diurea (EDU) using a *Lemna minor* L. bioassay: Hints to its mode of action, *Environ. Pollut.*, 213, 996–1006, doi:10.1016/j.envpol.2015.12.051, 2016c.

Agathokleous, E., Saitanis, C. J., Burkey, K. O., Ntatsi, G., Vougeleka, V., Mashaeet, A. M. and Pallides, A.: Application and further characterization of the snap bean S156/R123 ozone biomonitoring system in relation to ambient air temperature, *Sci. Total Environ.*, 580, 1046–1055, doi:10.1016/j.scitotenv.2016.12.059, 2017.

Agati, G., Stefano, G., Biricolti, S. and Tattini, M.: Mesophyll distribution of “antioxidant” flavonoid glycosides in *Ligustrum vulgare* leaves under contrasting sunlight irradiance, *Ann. Bot.*, 104(5), 853–861, doi:10.1093/aob/mcp177, 2009.

Aliferis, K. A. and Jabaji, S.: Metabolomics - A robust bioanalytical approach for the discovery of the modes-of-action of pesticides: A review, *Pestic. Biochem. Physiol.*, 100(2), 105–117, doi:10.1016/j.pestbp.2011.03.004, 2011.

Aliferis, K. A., Materzok, S., Paziotou, G. N. and Chrysayi-Tokousbalides, M.: *Lemna minor* L. as a model organism for ecotoxicological studies performing 1H NMR fingerprinting, *Chemosphere*, doi:10.1016/j.chemosphere.2009.04.025, 2009.

Aliferis, K. A., Faubert, D. and Jabaji, S.: A Metabolic Profiling Strategy for the Dissection of Plant Defense against Fungal Pathogens, *PLoS One*, 9(11), e111930, doi:10.1371/journal.pone.0111930, 2014.

Araújo, W. L., Tohge, T., Ishizaki, K., Leaver, C. J. and Fernie, A. R.: Protein degradation - an alternative respiratory substrate for stressed plants, *Trends Plant Sci.*, 16(9), 489–498, doi:10.1016/j.tplants.2011.05.008, 2011.

Arora, a, Sairam, R. K. and Srivastava, G. C.: Oxidative stress and oxidative system in plants, *Curr. Sci.*, 82(10), 1227–1238, 2002.

Di Baccio, D., Castagna, A., Paoletti, E., Sebastiani, L. and Ranieri, A.: Could the differences in O₃ sensitivity between two poplar clones be related to a difference in antioxidant defense and secondary metabolic response to O₃ influx?, *Tree Physiol.*, 28(12), 1761–72, doi:10.1093/treephys/28.12.1761, 2008.

Biswas, D. K., Xu, H., Li, Y. G., Liu, M. Z., Chen, Y. H., Sun, J. Z. and Jiang, G. M.: Assessing the genetic relatedness of higher ozone sensitivity of modern wheat to its wild and cultivated progenitors/relatives, *J. Exp. Bot.*, 59(4), 951–963, doi:10.1093/jxb/ern022, 2008.

Bolton, M. D.: Primary Metabolism and Plant Defense—Fuel for the Fire, *Mol. Plant-Microbe Interact.*, 22(5), 487–497, doi:10.1094/MPMI-22-5-0487, 2009.

Bown, A. W. and Shelp, B. J.: Plant GABA: Not Just a Metabolite, *Trends Plant Sci.*, 21(10), 811–813, doi:10.1016/j.tplants.2016.08.001, 2016.

Caregnato, F. F., Bortolin, R. C., Divan, A. M. J. and Moreira, J. C. F.: Exposure

to elevated ozone levels differentially affects the antioxidant capacity and the redox homeostasis of two subtropical *Phaseolus vulgaris* L. varieties, *Chemosphere*, (93), 320–330, doi:10.1016/j.chemosphere.2013.04.084, 2013.

Carnahan, J. E., Jenner, E. L. and Wat, E. K. W.: Prevention of ozone injury to plants by a new protectant chemical, *Dis. Control Pest Manag.*, 68, 1225–1229, 1978.

Chameides, W. L.: The chemistry of ozone deposition to plant leaves: role of ascorbic acid, *Environ. Sci. Technol.*, 23(5), 595–600, doi:10.1021/es00063a013, 1989.

Cheng, A.-X., Lou, Y.-G., Mao, Y.-B., Lu, S., Wang, L.-J. and Chen, X.-Y.: Plant Terpenoids: Biosynthesis and ecological functions, *J. Integr. Plant Biol.*, 49(2), 179–186, doi:10.1111/j.1672-9072.2006.00395.x, 2007.

Cho, K., Shibato, J., Agrawal, G. K., Jung, Y. H., Kubo, A., Jwa, N. S., Tamogami, S., Satoh, K., Kikuchi, S., Higashi, T., Kimura, S., Saji, H., Tanaka, Y., Iwahashi, H., Masuo, Y. and Rakwal, R.: Integrated transcriptomics, proteomics, and metabolomics analyses to survey ozone responses in the leaves of rice seedling, *J. Proteome Res.*, 7, 2980–2998, doi:10.1021/pr800128q, 2008.

Conklin, P. L. and Barth, C.: Ascorbic acid, a familiar small molecule intertwined in the response of plants to ozone, pathogens, and the onset of senescence, *Plant, Cell Environ.*, 27(8), 959–970, doi:10.1111/j.1365-3040.2004.01203.x, 2004.

Cotrozzi, L., Campanella, A., Pellegrini, E., Lorenzini, G., Nali, C. and Paoletti, E.: Phenylpropanoids are key players in the antioxidant defense to ozone of European ash, *Fraxinus excelsior*, *Environ. Sci. Pollut. Res.*, 1–11, doi:10.1007/s11356-016-8194-8, 2016.

Coyle, M., Smith, R., Stedman, J., Weston, K. and Fowler, D.: Quantifying the spatial distribution of surface ozone concentration in the UK, *Atmos. Environ.*, 36, 1013–1024, doi:10.1016/S1352-2310(01)00303-X, 2002.

Cracker, L. E. and Starbuck, J. S.: Metabolic changes associated with ozone injury of bean leaves, *Can. J. Plant Sci.*, 52(July 1972), 589–597, 1972.

Dat, J. F., Pellinen, R., Beeckman, T., Van De Cotte, B., Langebartels, C., Kangasjärvi, J., Inzé, D. and Van Breusegem, F.: Changes in hydrogen peroxide homeostasis trigger an active cell death process in tobacco, *Plant J.*, 33(4), 621–632, doi:10.1046/j.1365-313X.2003.01655.x, 2003.

Dettmer, K., Aronov, P. A. and Hammock, B. D.: Mass spectrometry-based metabolomics, *Mass Spectrom. Rev.*, 26(1), 51–78, doi:10.1002/mas.20108, 2007.

Ding, A. J., Wang, T., Thouret, V., Cammas, J.-P. and Nédélec, P.: Tropospheric ozone climatology over Beijing: analysis of aircraft data from the MOZAIC program, *Atmos. Chem. Phys.*, 8(1), 1–13, doi:10.5194/acp-8-1-2008, 2008.

Dixon, R. A. and Paiva, N. L.: Stress-Induced Phenylpropanoid Metabolism, *Plant Cell*, 7, 1085–1097, 1995.

Dixon, R. A., Gang, D. R., Charlton, A. J., Fiehn, O., Kuiper, H. A., Reynolds, T. L., Tjeerdema, R. S., Jeffery, E. H., German, J. B., Ridley, W. P. and Seiber, J. N.: Applications of metabolomics in agriculture, *J. Agric. Food Chem.*, 54(24), 8984–8994, doi:10.1021/jf061218t, 2006.

Dizengremel, P.: Effects of ozone on the carbon metabolism of forest trees, *Plant Physiol. Biochem.*, 39, 729–742, doi:10.1016/S0981-9428(01)01291-8, 2001.

Dizengremel, P., Le Thiec, D., Bagard, M. and Jolivet, Y.: Ozone risk assessment for plants: Central role of metabolism-dependent changes in reducing power, *Environ. Pollut.*, 156, 11–15, doi:10.1016/j.envpol.2007.12.024, 2008.

Dizengremel, P., Le Thiec, D., Hasenfratz-Sauder, M. P., Vaultier, M. N., Bagard, M. and Jolivet, Y.: Metabolic-dependent changes in plant cell redox power after ozone exposure, *Plant Biol.*, 11(SUPPL.1), 35–42, doi:10.1111/j.1438-

8677.2009.00261.x, 2009.

Ecker: The ethylene signal transduction pathway in plants, *Science* (80-.), 268, 667–675, doi:10.1126/science.7732375, 1995.

Feng, Z., Wang, S., Szantoi, Z., Chen, S. and Wang, X.: Protection of plants from ambient ozone by applications of ethylenediurea (EDU): A meta-analytic review, *Environ. Pollut.*, 158(10), 3236–3242, doi:10.1016/j.envpol.2010.07.009, 2010.

Feofilova, E. P., Usov, A. I., Mysyakina, I. S. and Kochkina, G. A.: Trehalose: Chemical structure, biological functions, and practical application, *Microbiology*, 83(3), 184–194, doi:10.1134/S0026261714020064, 2014.

Foyer, C. H. and Noctor, G.: Oxidant and antioxidant signalling in plants: A re-evaluation of the concept of oxidative stress in a physiological context, *Plant, Cell Environ.*, 28(8), 1056–1071, doi:10.1111/j.1365-3040.2005.01327.x, 2005.

Freebairn, H. T.: *The Prevention of Air Pollution Damage to Plants by the Use of Vitamin C Sprays*, *J. Air Pollut. Control Assoc.*, 10(4), 314–317, doi:10.1080/00022470.1960.10467938, 1960.

Galili, G., Avin-Wittenberg, T., Angelovici, R. and Fernie, A. R.: The role of photosynthesis and amino acid metabolism in the energy status during seed development, *Front. Plant Sci.*, 5(447), 1–6, doi:10.3389/fpls.2014.00447, 2014.

Giller, K. E. and Cadisch, G.: Future benefits from biological nitrogen fixation: An ecological approach to agriculture, *Plant Soil*, 174(1–2), 255–277, doi:10.1007/BF00032251, 1995.

Greenberg, J. T., Guo, A., Klessig, D. F. and Ausubet, F. M.: Programmed cell death in plants: A pathogen-triggered response activated coordinately with multiple defense functions, *Cell*, 77(4), 551–563, doi:10.1016/0092-8674(94)90217-8, 1994.

Guidi, L., Degl'Innocenti, E., Giordano, C., Biricolti, S. and Tattini, M.: Ozone tolerance in *Phaseolus vulgaris* depends on more than one mechanism, *Environ. Pollut.*, 158(10), 3164–3171, doi:10.1016/j.envpol.2010.06.037, 2010.

Harris, T. B. and Manning, W. J.: Nitrogen dioxide and ozone levels in urban tree canopies, *Environ. Pollut.*, 158(7), 2384–2386, doi:10.1016/j.envpol.2010.04.007, 2010.

Hassan, I. A., Bell, J. N. B. and Marshal, F. M.: Effects of air filtration on egyptian clover (*Trifolium alexandrinum* L. cv. Messkawy) grown in open-top chambers in a rural site in Egypt, , 395–402, 2007.

Heath, R. L.: Modification of the biochemical pathways of plants induced by ozone: What are the varied routes to change?, *Environ. Pollut.*, 155(3), 453–463, doi:10.1016/j.envpol.2008.03.010, 2008.

Heath, R. L. and Taylor, G. E.: *Physiological Processes and Plant Responses to Ozone Exposure*, pp. 317–368, Springer Berlin Heidelberg., 1997.

Hernández, I., Alegre, L., Van Breusegem, F. and Munné-Bosch, S.: How relevant are flavonoids as antioxidants in plants?, *Trends Plant Sci.*, 14(3), 125–132, doi:10.1016/j.tplants.2008.12.003, 2009.

Iordachescu, M. and Imai, R.: Trehalose and Abiotic Stress in Biological Systems, in *Abiotic Stress in Plants - Mechanisms and Adaptations*, edited by P. A. Shanker, InTech., 2011.

Kanani, H., Chrysanthopoulos, P. K. and Klapa, M. I.: Standardizing GC-MS metabolomics, *J. Chromatogr. B Anal. Technol. Biomed. Life Sci.*, 871(2), 191–201, doi:10.1016/j.jchromb.2008.04.049, 2008.

Koek, M. M., Jellema, R. H., van der Greef, J., Tas, A. C. and Hankemeier, T.: Quantitative metabolomics based on gas chromatography mass spectrometry: Status and perspectives, *Metabolomics*, 7(3), 307–328, doi:10.1007/s11306-010-0254-3, 2011.

Kollist, H., Moldau, H., Mortensen, L., Rasmussen, S. K. and Jørgensen, L. B.: Ozone Flux to Plasmalemma in Barley and Wheat is controlled by Stomata rather than by direct Reaction of Ozone with Cell Wall Ascorbate, *J. Plant Physiol.*, 156(5–6), 645–651, doi:10.1016/S0176-1617(00)80226-6, 2000.

Kontopoulou, C. K., Liasis, E., Iannetta, P. P. M., Tampakaki, A. and Savvas, D.: Impact of rhizobial inoculation and reduced N supply on biomass production and biological N₂ fixation in common bean grown hydroponically, *J. Sci. Food Agric.*, (September 2016), doi:10.1002/jsfa.8202, 2017.

Kráľová, K., Jampílek, J. and Ostrovský, I.: Metabolomics - Useful Tool for Study of Plant Responses to Abiotic Stresses, *Ecol. Chem. Eng. S*, 19(2), 133–161, doi:10.2478/v10216-011-0012-0, 2012.

Langebartels, C., Kerner, K., Leonardi, S., Schraudner, M., Trost, M., Heller, W. and Sandermann Jr., H.: Biochemical Plant Responses to Ozone, *Plant Physiol.*, 95, 882–889, doi:10.1104/pp.104.1.67, 1991.

Larson, R. A.: The antioxidants of higher plants, *Phytochemistry*, 27(4), 969–978, doi:10.1016/0031-9422(88)80254-1, 1988.

Li, L., Chen, C. H., Fu, J. S., Huang, C., Streets, D. G., Huang, H. Y., Zhang, G. F., Wang, Y. J., Jang, C. J., Wang, H. L., Chen, Y. R. and Fu, J. M.: Air quality and emissions in the Yangtze River Delta, China, *Atmos. Chem. Phys.*, 11(4), 1621–1639, doi:10.5194/acp-11-1621-2011, 2011.

Loewus, F. A. and Murthy, P. P. N.: myo-Inositol metabolism in plants, *Plant Sci.*, 150(1), 1–19, doi:10.1016/S0168-9452(99)00150-8, 2000.

Ludwikow, A. and Sadowski, J.: Gene networks in plant ozone stress response and tolerance, *J. Integr. Plant Biol.*, 50(10), 1256–1267, doi:10.1111/j.1744-7909.2008.00738.x, 2008.

Luwe, M.: Antioxidants in the apoplast and symplast of beech (*Fagus sylvatica* L.) leaves: seasonal variations and responses to changing ozone concentrations in air, *Plant. Cell Environ.*, 19(3), 321–328, doi:10.1111/j.1365-3040.1996.tb00254.x, 1996.

Manning, W. J., Paoletti, E., Sandermann, H. and Ernst, D.: Ethylenediurea (EDU): A research tool for assessment and verification of the effects of ground level ozone on plants under natural conditions, *Environ. Pollut.*, 159(12), 3283–3293, doi:10.1016/j.envpol.2011.07.005, 2011.

Marengo, A., Gouget, H., Nédélec, P., Pagés, J.-P. and Karcher, F.: Evidence of a long-term increase in tropospheric ozone from Pic du Midi data series: Consequences: Positive radiative forcing, *J. Geophys. Res.*, 99(D8), 16617, doi:10.1029/94JD00021, 1994.

Mauzerall, D. L., Narita, D., Akimoto, H., Horowitz, L., Walters, S., Hauglustaine, D. a. and Brasseur, G.: Seasonal characteristics of tropospheric ozone production and mixing ratios over East Asia: A global three-dimensional chemical transport model analysis, *J. Geophys. Res.*, 105(D14), 17895, doi:10.1029/2000JD900087, 2000.

Meehl, G. A., Stocker, T. F., Collins, W. D., Friedlingstein, P., Gaye, A. T., Gregory, J. M., Kitoh, A., Knutti, R., Murphy, J. M., Noda, A., Raper, S. C. B., Watterson, I. G., Weaver, A. J. and Zhao, Z.-C.: 2007: Global Climate Projections, *Clim. Chang. 2007 Contrib. Work. Gr. I to Fourth Assess. Rep. Intergov. Panel Clim. Chang.*, 747–846, doi:10.1080/07341510601092191, 2007.

Oikawa, A., Nakamura, Y., Ogura, T., Kimura, A., Suzuki, H., Sakurai, N., Shinbo, Y., Shibata, D., Kanaya, S. and Ohta, D.: Clarification of Pathway-Specific Inhibition by Fourier Transform Ion Cyclotron Resonance/Mass Spectrometry-Based Metabolic Phenotyping Studies, *Plant Physiol.*, 142(2), 398–413,

doi:10.1104/pp.106.080317, 2006.

Overmyer, K., Tuominen, H., Kettunen, R., Betz, C., Langebartels, C., Sandermann, H. J. and Jaakko, K.: Ozone-Sensitive Arabidopsis rcd1 Mutant Reveals Opposite Roles for Ethylene and Jasmonate Signaling Pathways in Regulating Superoxide-Dependent Cell Death, *Plant Cell Online*, 12, 1849–1862, doi:10.1105/tpc.12.10.1849, 2000.

Overmyer, K., Brosché, M., Pellinen, R., Kuittinen, T., Tuominen, H., Ahlfors, R., Keinänen, M., Saarma, M., Scheel, D. and Kangasjärvi, J.: Ozone-Induced Programmed Cell Death in the Arabidopsis radical-induced cell death1 Mutant, *Plant Physiol.*, 137(3) [online] Available from: <http://www.plantphysiol.org/content/137/3/1092.short> (Accessed 15 June 2017), 2005.

Paoletti, E., Ranieri, A. and Lauteri, M.: Moving toward effective ozone flux assessment, *Environ. Pollut.*, 156(1), 16–19, doi:10.1016/j.envpol.2008.02.025, 2008a.

Paoletti, E., Contran, N., Manning, W. J., Castagna, A., Ranieri, A. and Tagliaferro, F.: Protection of ash (*Fraxinus excelsior*) trees from ozone injury by ethylenediurea (EDU): Roles of biochemical changes and decreased stomatal conductance in enhancement of growth, *Environ. Pollut.*, 155(3), 464–472, doi:10.1016/j.envpol.2008.01.040, 2008b.

Paoletti, E., Contran, N., Manning, W. J. and Ferrara, A. M.: Use of the antiozonant ethylenediurea (EDU) in Italy: Verification of the effects of ambient ozone on crop plants and trees and investigation of EDU's mode of action, *Environ. Pollut.*, 157(5), 1453–1460, doi:10.1016/j.envpol.2008.09.021, 2009.

Park, C. H., Baskar, T. B., Park, S. Y., Kim, S. J., Arasu, M. V., Al-Dhabi, N. A., Kim, J. K., Park, S. U. and Xiao, J.: Metabolic profiling and antioxidant assay of metabolites from three radish cultivars (*Raphanus sativus*), *Molecules*, 21(2), doi:10.3390/molecules21020157, 2016.

Paqualini, S., Piccioni, C., Reale, L., Ederli, L., Della Torre, G. and Ferranti, F.: Ozone-Induced Cell Death in Tobacco Cultivar Bel W3 Plants. The Role of Programmed Cell Death in Lesion Formation, *Plant Physiol.*, 133(3), 1122–1134, doi:<https://doi.org/10.1104/pp.103.026591>, 2003.

Paqualini, S., Paolucci, F., Borgogni, A., Morettini, R. and Ederli, L.: The overexpression of an alternative oxidase gene triggers ozone sensitivity in tobacco plants, *Plant, Cell Environ.*, 30(12), 1545–1556, doi:10.1111/j.1365-3040.2007.01730.x, 2007.

Paul, M. J., Primavesi, L. F., Jhurrea, D. and Zhang, Y.: Trehalose Metabolism and Signaling, *Annu. Rev. Plant Biol.*, 59(1), 417–441, doi:10.1146/annurev.arplant.59.032607.092945, 2008.

Pell, -Eva J., Schlaghauser, C. D. and Arteca, R. N.: Ozone-induced oxidative stress: Mechanisms of action and reaction, *Physiol. Plant.*, 100(2), 264–273, doi:10.1111/j.1399-3054.1997.tb04782.x, 1997.

Pellinen, R., Palva, T. and Kangasjärvi, J.: Short communication: subcellular localization of ozone-induced hydrogen peroxide production in birch (*Betula pendula*) leaf cells, *Plant J.*, 20(3), 349–356, doi:10.1046/j.1365-313X.1999.00613.x, 1999.

Del Pozo, O. and Lam, E.: Caspases and programmed cell death in the hypersensitive response of plants to pathogens Results and discussion Synthetic caspase inhibitors abolish HR cell death, *Curr. Biol.*, 8, 1129–1132 [online] Available from: <http://biomednet.com/elecref/0960982200801129> (Accessed 31 March 2017), 1998.

Pratelli, R. and Pilot, G.: Regulation of amino acid metabolic enzymes and transporters in plants, *J. Exp. Bot.*, doi:10.1093/jxb/eru320, 2014.

Rai, R., Rajput, M., Agrawal, M. and Agrawal, S. B.: Gaseous air pollutants: A

review on current and future trends of emissions and impact on agriculture, *J. Sci. Res.*, 55, 77–102, 2011.

Ramesh, S. A., Tyerman, S. D., Xu, B., Bose, J., Kaur, S., Conn, V., Domingos, P., Ullah, S., Wege, S., Shabala, S., Feijó, J. A., Ryan, P. R. and Gillham, M.: GABA signalling modulates plant growth by directly regulating the activity of plant-specific anion transporters, *Nat. Commun.*, 6, 7879, doi:10.1038/ncomms8879, 2015.

Roberts, M. R.: Does GABA Act as a Signal in Plants? Hints from Molecular Studies, *Plant Signal. Behav.*, 2(5), 408–409, doi:10.1111/j.1365-3040.2006.01526.x, 2007.

Saitanis, C.: Tropospheric ozone: A menace for crops and natural vegetation in Greece, *Ital. J. Agron.*, 3(1), 71–77, 2008.

Saitanis, C. J. and Karandinos, M. G.: Instrumental recording and biomonitoring of ambient ozone in the Greek countryside, *Chemosphere*, 44(4), 813–821, doi:10.1016/S0045-6535(00)00518-X, 2001.

Saitanis, C. J., Panagopoulos, G., Dasopoulou, V., Agathokleous, E. and Papatheochari, Y.: Integrated assessment of ambient ozone phytotoxicity in Greece's Tripolis Plateau, *J. Agric. Meteorol.*, 71(2), 55–64, doi:10.2480/agrmet.D-14-00030, 2015a.

Saitanis, C. J., Lekkas, D. V., Agathokleous, E. and Flouri, F.: Screening agrochemicals as potential protectants of plants against ozone phytotoxicity, *Environ. Pollut.*, 197, 247–255, doi:10.1016/j.envpol.2014.11.013, 2015b.

Salvatori, E., Fusaro, L., Mereu, S., Bernardini, A., Puppi, G. and Manes, F.: Different O₃ response of sensitive and resistant snap bean genotypes (*Phaseolus vulgaris* L.): The key role of growth stage, stomatal conductance, and PSI activity, *Environ. Exp. Bot.*, 87, 79–91, doi:10.1016/j.envexpbot.2012.09.008, 2013.

Sandermann Jr, H.: OZONE AND PLANT HEALTH, *Annu. Rev. Phytopathol.*, 34(1), 347–366, doi:10.1146/annurev.phyto.34.1.347, 1996.

Sarkar, P. K., Prajapati, P. K., Shukla, V. J., Ravishankar, B. and Choudhary, A. K.: Toxicity and recovery studies of two ayurvedic preparations of iron, *Indian J. Exp. Biol.*, 47(12), 987–992, doi:10.1002/mas, 2009.

Schraudner, M., Langebartels, C. and Sandermann, H.: Plant defence systems and ozone., *Biochem. Soc. Trans.*, 24(2), 456–461 [online] Available from: <http://www.biochemsoctrans.org/content/24/2/456> (Accessed 6 June 2017), 1996.

Sehmer, L., Fontaine, V., Antoni, F. and Dizengremel, P.: Effects of ozone and elevated atmospheric carbon dioxide on carbohydrate metabolism of spruce needles. Catabolic and detoxification pathways, *Physiol. Plant.*, 102(4), 605–611, doi:10.1034/j.1399-3054.1998.1020416.x, 1998.

Shelp, B. J., Bozzo, G. G., Zarei, A., Simpson, J. P., Trobacher, C. P. and Allan, W. L.: Strategies and tools for studying the metabolism and function of γ -aminobutyrate in plants. II. Integrated analysis, *Botany*, 90(9), 781–793, doi:10.1139/b2012-041, 2012.

Shulaev, V., Cortes, D., Miller, G. and Mittler, R.: Metabolomics for plant stress response, *Physiol. Plant.*, 132(2), 199–208, doi:10.1111/j.1399-3054.2007.01025.x, 2008.

Singh, S. N., Ed.: *Climate change and crops*, Springer-Verlag Berlin Heidelberg, 2009.

Solomon, M.: The Involvement of Cysteine Proteases and Protease Inhibitor Genes in the Regulation of Programmed Cell Death in Plants, *Plant Cell Online*, 11(3), 431–444, doi:10.1105/tpc.11.3.431, 1999.

Tetsuya, Y., Yasumasa, T., Toru, M., Masakazu, K. and Wataru, M.: Suppressive effect of trehalose on apoptotic cell death leading to petal senescence in

ethylene-insensitive flowers of gladiolus, *Plant Sci.*, 164(2), 213–221, doi:10.1016/S0168-9452(02)00403-X, 2002.

Vahisalu, T., Puzõrjova, I., Brosché, M., Valk, E., Lepiku, M., Moldau, H., Pechter, P., Wang, Y.-S., Lindgren, O., Salojärvi, J., Loog, M., Kangasjärvi, J. and Kollist, H.: Ozone-triggered rapid stomatal response involves the production of reactive oxygen species, and is controlled by SLAC1 and OST1, *Plant J.*, 62(3), 442–453, doi:10.1111/j.1365-3113X.2010.04159.x, 2010.

Valluru, R. and Van den Ende, W.: Myo-inositol and beyond - Emerging networks under stress, *Plant Sci.*, 181(4), 387–400, doi:10.1016/j.plantsci.2011.07.009, 2011.

Wang, H.: Apoptosis: A Functional Paradigm for Programmed Plant Cell Death Induced by a Host-Selective Phytotoxin and Invoked during Development, *Plant Cell Online*, 8(3), 375–391, doi:10.1105/tpc.8.3.375, 1996.

Wang, Z. Y., Seto, H., Fujioka, S., Yoshida, S. and Chory, J.: BRI1 is a critical component of a plasma-membrane receptor for plant steroids., *Nature*, 410(6826), 380–383, doi:10.1038/35066597, 2001.

Weckwerth, W.: METABOLOMICS IN SYSTEMS BIOLOGY, *Annu. Rev. Plant Biol.*, 54, 669–89, doi:10.1146/annurev.arplant.54.031902.135014, 2003.

Xu, J. and Zhang, S.: *Ethylene in Plants*, pp. 1–25., 2015.

Yildirim, E. and Guvenc, I.: Intercropping based on cauliflower: More productive, profitable and highly sustainable, *Eur. J. Agron.*, 22(1), 11–18, doi:10.1016/j.eja.2003.11.003, 2005.

Yuan, X., Calatayud, V., Jiang, L., Manning, W. J., Hayes, F., Tian, Y. and Feng, Z.: Assessing the effects of ambient ozone in China on snap bean genotypes by using ethylenediurea (EDU), *Environ. Pollut.*, 205, 199–208, doi:10.1016/j.envpol.2015.05.043, 2015.

Greenwood N. N., Earnshaw A., 1984. *Chemistry of the Elements*. Pergamon Press. ISBN 97807506333659

Robert Hutson *Metabolic pathways of Agrochemicals Insecticides and Fungicides* ISBN 0-85404-499-x)

Ridge Irene (Επιμέλεια αγγλικής Έκδοσης), Μανέτας Γιάννης (Επιμέλεια ελληνικής έκδοσης), 2005. *Φυσιολογία Φυτών, εκδόσεις Ίων* ISBN 960-411-522-7

Scheel Dierk and Wasternack Claus, 2002. *Frontiers of Molecular Biology- Plant Signal Transduction*. Oxford University Press ISBN 0-19- 963879-9

Ainsworth A. Elizabeth, 2008. Rice production in a changing climate: a meta-analysis of responses to elevated carbon dioxide and elevated ozone concentration. *Gl. Change Biology, Vol. 14, 7*:1642-1650.

Akimoto, H. and Narita, H.: Distribution of SO₂, NO_x, and CO₂ emissions from fuel combustion and industrial activities in Asia with 1°×1° resolution, *Atmos. Environ.*, 28(2), 213–225, 1994.

- Cartalis C., Varotsos C., 1994. Surface ozone in Athens, Greece, at the beginning and at the end of the twentieth century. *Atmos. Environ.* **28**: 3-8.
- Chaloulakou A., Assimacopoulos D., Lekkas T., 1999. Forecasting Daily Maximum Ozone Concentrations in the Athens Basin. *Environ.l Mon. and Assessment* **56**: 97-112.
- Daviss, Bennett, 2005. Growing pains for metabolomics. *The Scientist.* **19** (8): 25-28
- Fuhrer, J., Skärby, L., Ashmore, M., 1997. Critical levels for ozone effects on vegetation in Europe. *Environ.l Pollut.* **97**: 91 – 106.
- Goumenaki E., Karidis Z., Paschalidis K.A., 2012. Assessment of tropospheric ozone impact on crops in Crete (Greece) using snap bean as bioindicator. *Acta Horticulturae.* **938**: 401 – 407.
- Lefohn A. S. 1992. Surface Level Ozone Exposures and Their Effects on Vegetation. Lewis Publishers.
- Heliotis F. D., Karandinos M.G., Whiton J.C., 1988. Air pollution and the decline of the fir forest in Parnis National Park, near Athens, Greece.
- Kalabokas P.D., Viras L. G., Repapis C.C., Bartzis J.G., (1999) Analysis of the 11-year record (1987- 1997) of air pollution measurements in Athens, Greece. Part II: Photochemical air pollutants. *Global Nest: the Int. J.* **Vol 1, No 3**: 169-176.
- Kraft Martin, Weigel Hans-Joachim, Mejer Gerd-Jürgen, Brandes Frank, (1996). Reflectance Measurements of Leaves for Detecting Visible and Non-visible Ozone Damage to Crops. *J. of Plant Physiology.* **148 (1-2)**: 148 – 154.
- Krupa S. V., Manning W. J., (1988). Atmospheric ozone: formation and effects on vegetation. *Environ. Pollut.* **50**: 101-137.
- Leisner P. C., Ainsworth A. E., 2012. Quantifying the effects of ozone on plant reproductive growth and development. *Global Change Biol.* **18**: 606-616.
- Mills G., Hayes F., Simpson D., Embersons L., Norris D., Harmens H., Bukers (2011). Evidence of widespread effects of ozone on crops and (semi-)natural vegetation in Europe (1990-2006) in relation to AOT40- and flux-based risk maps. *Glob. Change Biol.* **17**: 592 – 613.

- Musselman, W.J.; Massman, W.J. (1999). Ozone flux to vegetation and its relationship to plant response and ambient air quality standards. *Atmospheric Environment*. **33**:65-73.
- Ojanperä, K., Sutinen, S., Pleijel, H., Sellden, G., 1992. Exposure of spring wheat, *Triticum aestivum* L., cv. Drabant, to different concentrations of ozone in open-top chambers: effects on the ultrastructure of flag leaf cells. *New Phytol.* **120**: 39-48.
- Ritz B., Wilhelm M., 2008. Ambient air pollution and adverse birth outcomes: Methodologic issues in an emerging field. *Basic Clin Pharmacol. Toxicol.* **102**: 182 – 190.
- Sachin D. Ghude, Chinmay Jena, D. M. Chate, G. Beig, G. G. Pfister, Rajesh Kumar, V. Ramanathan, (2014) Reductions in India's crop yield due to ozone. *Geoph. Res. letters.* **41 (15)**: 5685 – 5691.
- Saitanis C. J. (2003) Background ozone monitoring and phytodetection in the greater rural area of Corinth-Greece. *Chemosphere.* **51**: 913-923.
- Saitanis C. J., Katsaras D.H., Riga-Karandinos A.N., Lekkas D. B., Arapis G., 2004. Evaluation of ozone phytotoxicity in the greater area of the typical Mediterranean small city (Volos) and in the nearby forest (Pelion Mt.), central Greece. *Bulletin of Environmental Contamination and Toxicology.* **72**: 1268 – 1277.
- Valavanidis A., Loridas S., Vlachogianni Th., Fiotakis K., 2009. Influence of ozone on traffic-related particulate matter on the generation of hydroxyl radicals through a heterogeneous synergistic effect. *J. Hazardous Materials.* **162**: 886 - 892.
- Wiberg E., Wiberg N., Holleman A.F.: "Inorganic Chemistry", *Academic Press*, 2002, p. 482.
- Γαλάρης Δημήτριος, 2015. Ελεύθερες ρίζες και οξειδωτικό στρες. Χημεία-Βιολογία-Ιατρική. Ελληνικά Ακαδημαϊκά Ηλεκτρονικά Συγγράμματα και Βοηθήματα (www.kallipos.gr)
- Γαλάτης Β., Γανωτάκης Δ., Γκανή-Σπυροπούλου Κ., Καραμπουρνιώτης Γ., Κοτζαμπάσης Κ., Κωνσταντινίδου Ε.-Ι., Μανέτας Ι., Ρουμπελάκη-Αγγελάκη Α., 2014. Φυσιολογία Φυτών από το μόριο στο περιβάλλον. Πανεπιστημιακές Εκδόσεις Κρήτης ISBN 978-960-524-168-1
- Δροσόπουλος, 1998. Φυσιολογία Φυτών, Σημειώσεις Γεωπονικό Πανεπιστήμιο Αθηνών


Καραμπουρνιώτης Γεώργιος, Λιακόπουλος Γεώργιος, Νικολόπουλος Δημοσθένης, 2012. Φυσιολογία Καταπονήσεων των Φυτών-οι λειτουργίες των φυτών κάτω από αντίξοες συνθήκες του περιβάλλοντος. Εκδόσεις Έμβρυο ISBN2630 978-960-8002-63-0

Σάββας Δημήτριος, Γενική Λαχανοκομία, 2016, εκδόσεις πεδίο ISBN 960-546-782-8

ΥΠΑΠΑΝ, Ιούλιος 2015. Γενική Διεύθυνση Περιβαλλοντικής Πολιτικής Τμήμα Ποιότητας της Ατμόσφαιρας Ετήσια έκθεση Ατμοσφαιρικής Ρύπανσης 2014

ΠΑΡΑΡΤΗΜΑ

6.2. Penconazole-φύλλο δεδομένων ασφάλειας

ΦΥΛΛΟ ΔΕΔΟΜΕΝΩΝ ΑΣΦΑΛΕΙΑΣ βάσει του Κανονισμού (ΕΕ) No. 1907/2006 

TOPAS 100 EC

Έκδοση 19- Αυτή η έκδοση αντικαθιστά όλες τις προηγούμενες εκδόσεις. SDS Number: S1190622
Ημερομηνία Τροποποίησης 26.10.2016 Ημερομηνία εκτύπωσης 11.11.2016

1. ΣΤΟΙΧΕΙΑ ΟΥΣΙΑΣ/ ΜΕΙΓΜΑΤΟΣ & ΕΤΑΙΡΕΙΑΣ/ ΕΠΙΧΕΙΡΗΣΗΣ.

1.1 Αναγνωριστικός κωδικός προϊόντος

Εμπορικό όνομα TOPAS 100 EC
Κωδικός σχεδιασμού A6209G

1.2 Συναφείς προσδιοριζόμενες χρήσεις της ουσίας ή του μείγματος και αντενδεικνυόμενες χρήσεις.

Χρήση: Μυκητοκτόνο

1.3 Στοιχεία του προμηθευτή του ΔΔΑ

Παρασκευαστής Syngenta Crop Protection AG
Postfach
CH-4002 Basel
Switzerland

Τηλέφωνο +41 61 323 11 11
Fax +41 61 323 12 12
Πληροφορίες για το προϊόν Τηλέφωνο (ώρες γραφείου) +41 61 323 40 40
Ηλεκτρονικό ταχυδρομείο sds.ch@syngenta.com

1.4 Αριθμός τηλεφώνου επείγουσας ανάγκης

Αριθμός τηλεφώνου επείγουσας ανάγκης Τηλέφωνο (24h) +44 1484 538444

Πληροφορίες έκτακτης ανάγκης που αφορούν :
- μεταφορά, βλέπε τηλέφωνο έκτακτης ανάγκης στα φορτωτικά έγγραφα
- αποθήκευση, βλέπε τηλέφωνα της Syngenta Hellas AEBE

Αντιπρόσωπος Syngenta Hellas AEBE
Λεωφ. Ανθούσας,
15349 Αθήνα
Ελλάδα

Τηλέφωνο +30 210 6666612
Fax +30 210 6665777

Τηλ. Κέντρου Δηλητηριάσεων 210 77 93 777
Ελλάδας

email greece.sds@syngenta.com

TOPAS 100 EC

Έκδοση 19- Αυτή η έκδοση αντικαθιστά όλες τις προηγούμενες εκδόσεις. SDS Number: S1190622

Ημερομηνία Τροποποίησης 26.10.2016

Ημερομηνία εκτύπωσης 11.11.2016

2. ΠΡΟΣΔΙΟΡΙΣΜΟΣ ΕΠΙΚΙΝΔΥΝΟΤΗΤΑΣ

2.1 Ταξινόμηση της ουσίας ή του μείγματος.

Ταξινόμηση σύμφωνα με τον κανονισμό (ΕΕ) 1272/2008:

Οφθαλμικός ερεθισμός	Κατηγορία 2	H319
Χρόνια υδρόβια τοξικότητα	Κατηγορία 2	H411
	Κατηγορία 2	H361d

Για το πλήρες κείμενο των φράσεων Η βλέπε κεφάλαιο 16.

2.2 Επισήμανση

Σήμανση σύμφωνα με τον Κανονισμό (ΕΕ) No. 1272/2008

Εικονογράμματα κινδύνου:



Προειδοποιητική λέξη
 Δηλώσεις επικινδυνότητας:

H319: Προκαλεί σοβαρό οφθαλμικό ερεθισμό.
 H361d: Υποκτο για πρόκληση βλάβης στο έμβρυο.
 H411: Τοξικό για τους υδρόβιους οργανισμούς, με μακροχρόνιες επιπτώσεις.

Δηλώσεις προφύλαξης:

P102: Μακριά από παιδιά.
 P405: Φυλάσσεται κλειδωμένο.
 P270: Μην τρώτε, πίνετε, ή καπνίζετε, όταν χρησιμοποιείτε αυτό το προϊόν.
 P201: Εφοδιαστείτε με τις ειδικές οδηγίες πριν από τη χρήση.
 P280: Να φοράτε προστατευτικά γάντια /προστατευτικά ενδύματα / μέσα ατομικής προστασίας για τα μάτια /πρόσωπο.
 P305+P351+P338: ΣΕ ΠΕΡΙΠΤΩΣΗ ΕΠΑΦΗΣ ΜΕ ΤΑ ΜΑΤΙΑ: Ξεπλύνετε προσεκτικά με νερό για αρκετά λεπτά. Εάν υπάρχουν φακοί επαφής, αφαιρέστε τους, εφόσον είναι εύκολο. Συνεχίστε να ξεπλένετε.
 P337+P313: Εάν δεν υποχωρεί ο οφθαλμικός ερεθισμός: Συμβουλευθείτε/ Επισκεφθείτε γιατρό.
 P308+P313: ΣΕ ΠΕΡΙΠΤΩΣΗ έκθεσης ή πιθανής έκθεσης: Συμβουλευθείτε/ Επισκεφθείτε γιατρό.
 Σε περίπτωση επανεισόδου αμέσως μετά τον ψεκάσμό, να φοράτε βαμβακερό μακρύ παντελόνι, μακρυμάνικο πουκάμισο και γάντια.
 SP1: Να μην ρυπαίνεται το νερό με το προϊόν ή τη συσκευασία του.
 Sp3: Για την προστασία των υδρόβιων οργανισμών, να

Σελίδα 2 από 17

TOPAS 100 EC

Έκδοση 19- Αυτή η έκδοση αντικαθιστά όλες τις προηγούμενες εκδόσεις. SDS Number: S1190622

Ημερομηνία Τροποποίησης 26.10.2016

Ημερομηνία εκτύπωσης 11.11.2016

αφήνεται απέκαστη ζώνη ασφαλείας 5 μέτρων σε καλλιέργειες πυρηνόκαρπων.
 Συμπληρωματικές πληροφορίες: EUH401 Για να αποφύγετε τους κινδύνους για την ανθρώπινη υγεία και το περιβάλλον, ακολουθήστε τις οδηγίες χρήσης.

Επικίνδυνα συστατικά τα οποία θα πρέπει να αναγράφονται στην ετικέτα:

- penconazole

2.3 Άλλοι κίνδυνοι

Αυτή η ουσία/μίγμα δεν περιέχει συστατικά που να θεωρούνται PBT ή vPvB σε ποσοστά μεγαλύτερα από 0,1%.

3. ΣΥΝΘΕΣΗ/ ΠΛΗΡΟΦΟΡΙΕΣ ΓΙΑ ΤΑ ΣΥΣΤΑΤΙΚΑ

Χημική ονομασία	Αριθμός CAS Αριθμός EC (Αριθμός REACH)	Σήμανση ΕΕ 1272/2008	Συγκέντρωση
penconazole (ISO)	66246-88-6 266-275-6	Acute Tox. 4; H302 Repr. 2; H361d Aquatic Acute 1; H400 Aquatic Chronic 1; H410	>= 10 - < 20
cyclohexanone	108-94-1 203-631-1 01-2119453616-35	Flam. Liq. 3; H226 Eye Dam. 1; H318 Acute Tox. 4; H302 Acute Tox. 4; H312 Acute Tox. 4; H332 Skin Irrit. 2; H315	>= 10 - < 20
calcium dodecylbenzene sulphonate	26264-06-2 247-557-8 01- 2119560592-37	Skin Irrit. 2; H315 Eye Dam. 1; H318 Aquatic Chronic 3; H412	>= 5 - < 10
2-methylpropan- 1-ol	78-83-1 201-148-0 01-2119484609-23	Flam. Liq. 3; H226 Skin Irrit. 2; H315 Eye Dam. 1; H318 STOT SE 3; H336 STOT SE 3; H335	>= 3 - < 5
Ουσίες με όριο έκθεσης στο χώρο εργασίας:			
(2- methoxymethyleth oxy) propanol	34590-94-8 252-104-2 01-2119450011-60		>= 50 - < 70

Για το πλήρες κείμενο των φράσεων H που αναφέρονται στο παρόν Κεφάλαιο βλέπε Κεφάλαιο 16.

TOPAS 100 EC

Έκδοση 19- Αυτή η έκδοση αντικαθιστά όλες τις προηγούμενες εκδόσεις. SDS Number: S1190622

Ημερομηνία Τροποποίησης 26.10.2016

Ημερομηνία εκτύπωσης 11.11.2016

4. ΜΕΤΡΑ ΠΡΩΤΩΝ ΒΟΗΘΕΙΩΝ**4.1 ΠΕΡΙΓΡΑΦΗ ΤΩΝ ΜΕΤΡΩΝ ΠΡΩΤΩΝ ΒΟΗΘΕΙΩΝ**

Γενικές οδηγίες :	Να έχετε διαθέσιμη την συσκευασία, την ετικέτα ή το MSDS του προϊόντος σε περίπτωση που απευθυνθείτε για βοήθεια στο γιατρό ή το Κέντρο Δηλητηριάσεων ή το 24ωρο τηλέφωνο επείγουσας ανάγκης της Syngenta.
Εισπνοή :	Μετακινήστε τον παθόντα σε καθαρό αέρα. Εάν δεν αναπνέει κανονικά ή καθόλου εφαρμόστε τεχνητή αναπνοή. Διατηρήστε τον ζεστό και ξαπλωμένο. Καλέστε γιατρό ή το Κέντρο δηλητηριάσεων.
Επαφή με το δέρμα :	Αφαιρέστε τα μολυσμένα ρούχα και ξεπλύνετε καλά τα προσβεβλημένα μέρη του σώματος με νερό. Αν ο ερεθισμός επιμένει καλέστε γιατρό. Πλύνετε τα μολυσμένα ρούχα πριν τα ξαναφορέσετε.
Επαφή με τα μάτια :	Ξεπλύνετε αμέσως τα προσβεβλημένα μάτια για τουλάχιστον 15 λεπτά με άφθονο νερό με τα βλέφαρα ανοιχτά και αναζητήστε αμέσως ιατρική βοήθεια. Αφαιρέστε τους φακούς επαφής.
Κατάποση :	Σε περίπτωση κατάποσης, αναζητήστε αμέσως ιατρική συμβουλή και δείξτε αυτή τη συσκευασία ή την ετικέτα. ΜΗΝ προκαλέσετε εμετό.

4.2 ΣΗΜΑΝΤΙΚΟΤΕΡΑ ΣΥΜΠΤΩΜΑΤΑ ΚΑΙ ΕΠΙΔΡΑΣΕΙΣ, ΟΞΕΙΕΣ Ή ΜΕΤΑΓΕΝΕΣΤΕΡΕΣ

Συμπτώματα: Δεν υπάρχουν δεδομένα.

4.3 ΕΝΔΕΙΞΗ ΟΙΑΣΔΗΠΟΤΕ ΑΠΑΙΤΟΥΜΕΝΗΣ ΑΜΕΣΗΣ ΙΑΤΡΙΚΗΣ ΦΡΟΝΤΙΔΑΣ ΚΑΙ ΕΙΔΙΚΗΣ ΘΕΡΑΠΕΙΑΣ

Ιατρικές συμβουλές: Δεν υπάρχει συγκεκριμένο διαθέσιμο αντίδοτο.
Ακολουθήστε συμπτωματική θεραπεία.

TOPAS 100 EC

Έκδοση 19- Αυτή η έκδοση αντικαθιστά όλες τις προηγούμενες εκδόσεις. SDS Number: S1190622

Ημερομηνία Τροποποίησης 26.10.2016

Ημερομηνία εκτύπωσης 11.11.2016

5. ΜΕΤΡΑ ΓΙΑ ΤΗΝ ΚΑΤΑΠΟΛΕΜΗΣΗ ΤΗΣ ΠΥΡΚΑΓΙΑΣ

5.1 Πυροσβεστικά μέσα

Κατάλληλα μέσα πυρόσβεσης :

Κατάλληλα μέσα πυρόσβεσης για μικρές πυρκαγιές:
Χρησιμοποιήστε νερό σε σταγονίδια, αφρό ανθεκτικό στην αλκοόλη, μέσα ξηρής κατάσβεσης ή διοξειδίο του άνθρακα.
Κατάλληλα μέσα πυρόσβεσης για μεγάλες πυρκαγιές:
Αφρό ανθεκτικό στην αλκοόλη.

Ακατάλληλα μέσα πυρόσβεσης :

Μην χρησιμοποιείτε συμπαγή βολή νερού γιατί μπορεί να διασκορπίσει το φλεγόμενο υλικό.

5.2 Ειδικοί κίνδυνοι που προκύπτουν από την ουσία ή το μείγμα:

Καθώς το προϊόν περιέχει εύφλεκτους οργανικούς διαλύτες, η πυρκαγιά θα παράξει μαύρο πυκνό καπνό ο οποίος θα περιέχει επικίνδυνα προϊόντα καύσης (βλέπε κεφάλαιο 10). Έκθεση σε προϊόντα αποδόμησης μπορεί να είναι επικίνδυνη για την υγεία. Πιθανότητα ανάφλεξης από μακρινή απόσταση.

5.3 Συστάσεις για τους πυροσβέστες

Φορέστε πλήρη προστατευτικό ρουχισμό και αυτόνομη αναπνευστική συσκευή.

Μην επιτρέψετε να φτάσει το μολυσμένο νερό της κατάσβεσης στο αποχετευτικό δίκτυο ή σε υδάτινους αποδέκτες. Ψεκάξτε με νερό τις κλειστές συσκευασίες για να τις διατηρήσετε δροσερές.

TOPAS 100 EC

Έκδοση 19- Αυτή η έκδοση αντικαθιστά όλες τις προηγούμενες εκδόσεις. SDS Number: S1190622

Ημερομηνία Τροποποίησης 26.10.2016

Ημερομηνία εκτύπωσης 11.11.2016

6. ΜΕΤΡΑ ΓΙΑ ΤΗΝ ΑΝΤΙΜΕΤΩΠΙΣΗ ΤΥΧΑΙΑΣ ΕΚΛΥΣΗΣ**6.1 Προσωπικές προφυλάξεις, προστατευτικός εξοπλισμός και διαδικασίες έκτακτης ανάγκης**

Βλέπε μέτρα προστασίας στα κεφάλαια 7 και 8.

6.2 Περιβαλλοντικές προφυλάξεις

Αποφύγετε περαιτέρω διαρροές, εφόσον είναι ασφαλές.

Μην απορρίπτετε στο αποχετευτικό δίκτυο ή στα επιφανειακά νερά.

Στην περίπτωση μόλυνσης ποταμών, λιμνών ή αποχετευτικών δικτύων ενημερώστε τις αρμόδιες αρχές.

6.3 Μέθοδοι και υλικά για περιορισμό και καθαρισμό.

Περιορίστε και συλλέξτε με μη εύφλεκτο απορροφητικό υλικό, (π.χ. άμμο, χώμα, γη διατόμων, βερμικουλίτη) και διαθέστε σε κατάλληλο περιέκτη σύμφωνα με τους τοπικούς/εθνικούς κανονισμούς (βλέπε κεφάλαιο 13).

6.4 Παραπομπή σε άλλα τμήματα:

Αναφορά στα μέσα προστασίας, βλέπε Κεφάλαιο 7 και 8.

Αναφορά στους τρόπους απόρριψης, βλέπε Κεφάλαιο 13.

7. ΧΕΙΡΙΣΜΟΣ ΚΑΙ ΑΠΟΘΗΚΕΥΣΗ**7.1 Προφυλάξεις για ασφαλή χειρισμό :**

Δεν απαιτείται η λήψη ειδικών μέτρων για την περίπτωση πυρκαγιάς.

Αποφεύγετε επαφή με το δέρμα και τα μάτια.

Όταν το χρησιμοποιείτε μην τρώτε, πίνετε ή καπνίζετε.

Για μέσα ατομικής προστασίας βλέπε κεφάλαιο 8.

7.2 Συνθήκες για την ασφαλή φύλαξη, συμπεριλαμβανομένων τυχόν ασυμβίβαστων.

Διατηρείτε τα δοχεία ερμητικά κλειστά σε ξηρό, δροσερό και επαρκώς αεριζόμενο χώρο.

Μακριά από παιδιά.

Μακριά από εύφλεκτα υλικά.

Διατηρείστε το σε περιοχή εξοπλισμένη με ποτιστήρια.

Μακριά από τρόφιμα, ποτά και ζωοτροφές.

Μην καπνίζετε.

Όταν αποθηκεύεται μέσα στον αρχικό, μη ανοιγμένο

TOPAS 100 EC

Έκδοση 19- Αυτή η έκδοση αντικαθιστά όλες τις προηγούμενες εκδόσεις. SDS Number: S1190622

Ημερομηνία Τροποποίησης 26.10.2016

Ημερομηνία εκτύπωσης 11.11.2016

περιέκτη πύλωσης, σε θερμοκρασίες περιβάλλοντος, είναι φυσικά και χημικά σταθερό για τουλάχιστον 2 έτη.

7.3 Ειδική τελική χρήση ή χρήσεις :

Εγκεκριμένα φυτοπροστατευτικά προϊόντα: Για τη σωστή και ασφαλή χρήση του προϊόντος να ακολουθείτε τις οδηγίες που υπάρχουν στην ετικέτα του προϊόντος.

8. ΕΛΕΓΧΟΣ ΤΗΣ ΕΚΘΕΣΗΣ/ ΑΤΟΜΙΚΗ ΠΡΟΣΤΑΣΙΑ

8.1 Παράμετροι ελέγχου

Συστατικά	Cas No	Όριο έκθεσης	Τύπος	Πηγή
(2-ΜΕΤΗΟΧΥΜΕΤΗΥΛΕΤΗΟΧΥ) PROPANOL)	34590-94-8	50 PPM 308 MG/M3	TWA	2000/39/EC
ΕΠΙΠΛΕΟΝ ΠΛΗΡΟΦΟΡΙΕΣ	ΑΝΑΓΝΩΡΙΖΕΙ ΤΗΝ ΠΙΘΑΝΟΤΗΤΑ ΣΗΜΑΝΤΙΚΗΣ ΠΡΟΣΛΗΨΗΣ ΜΕΣΩ ΤΟΥ ΔΕΡΜΑΤΟΣ			
	34590-94-8	50 PPM 300 MG/M3	TWA	CH SUVA
ΕΠΙΠΛΕΟΝ ΠΛΗΡΟΦΟΡΙΕΣ	NATIONAL INSTITUTE FOR OCCUPATIONAL SAFETY AND HEALTH			
	34590-94-8	50 PPM 300 MG/M3	STEL	CH SUVA
ΕΠΙΠΛΕΟΝ ΠΛΗΡΟΦΟΡΙΕΣ	NATIONAL INSTITUTE FOR OCCUPATIONAL SAFETY AND HEALTH			
CYCLOHEXANONE	108-94-1	10 PPM 40.8 MG/M3	TWA	2000/39/EC
ΕΠΙΠΛΕΟΝ ΠΛΗΡΟΦΟΡΙΕΣ	ΑΝΑΓΝΩΡΙΖΕΙ ΤΗΝ ΠΙΘΑΝΟΤΗΤΑ ΣΗΜΑΝΤΙΚΗΣ ΠΡΟΣΛΗΨΗΣ ΜΕΣΩ ΤΟΥ ΔΕΡΜΑΤΟΣ			
	108-94-1	20 PPM 81.6 MG/M3	STEL	2000/39/EC
ΕΠΙΠΛΕΟΝ ΠΛΗΡΟΦΟΡΙΕΣ	ΑΝΑΓΝΩΡΙΖΕΙ ΤΗΝ ΠΙΘΑΝΟΤΗΤΑ ΣΗΜΑΝΤΙΚΗΣ ΠΡΟΣΛΗΨΗΣ ΜΕΣΩ ΤΟΥ ΔΕΡΜΑΤΟΣ			
	108-94-1	25 PPM 100 MG/M3	TWA	CH SUVA
ΕΠΙΠΛΕΟΝ ΠΛΗΡΟΦΟΡΙΕΣ	ΤΟΞΙΚΟ ΠΙΘΑΝΩΣ ΜΕ ΑΠΟΡΡΟΦΗΣΗ ΤΟΥ ΔΕΡΜΑΤΟΣ. ΟΥΣΙΕΣ, ΟΙ ΟΠΟΙΕΣ ΕΙΝΑΙ ΕΥΚΟΛΑ ΑΠΟΡΡΟΦΙΣΗΜΕΣ ΜΕΣΩ ΤΟΥ ΔΕΡΜΑΤΟΣ, ΜΠΟΡΟΥΝ ΝΑ ΔΩΣΟΥΝ ΠΡΟΣΘΕΤΗ ΑΠΟΡΡΟΦΗΣΗ ΔΕΡΜΑΤΟΣ ΜΕ ΟΥΣΙΑ ΥΨΗΛΟΤΕΡΟΥ ΚΙΝΔΥΝΟΥ ΣΕ ΣΥΓΚΡΙΣΗ ΜΕ ΜΟΝΟ ΕΙΣΠΝΟΗ ΑΠΟ ΤΟΥΣ ΑΕΡΑΓΩΓΟΥΣ., INSTITUT NATIONAL DE RECHERCHE ET DE SECURITE POUR LA PREVENTION DES ACCIDENTS DU TRAVAIL ET DES MALADIES PROFESSIONNELLES, ΒΛΑΒΗ ΣΤΟ ΑΓΕΝΝΗΤΟ ΠΑΙΔΙ ΔΕΝ ΘΑ ΠΡΕΠΕΙ ΝΑ ΑΝΑΜΕΝΕΤΑΙ ΟΤΑΝ ΓΙΝΕΤΑΙ ΣΕΒΑΣΤΗ Η ΟΕΛ ΑΞΙΑΣ			
	108-94-1	50 PPM 200 MG/M3	STEL	CH SUVA
ΕΠΙΠΛΕΟΝ ΠΛΗΡΟΦΟΡΙΕΣ	ΤΟΞΙΚΟ ΠΙΘΑΝΩΣ ΜΕ ΑΠΟΡΡΟΦΗΣΗ ΤΟΥ ΔΕΡΜΑΤΟΣ. ΟΥΣΙΕΣ, ΟΙ			

Σελίδα 7 από 17

TOPAS 100 EC

Έκδοση 19- Αυτή η έκδοση αντικαθιστά όλες τις προηγούμενες εκδόσεις. SDS Number: S1190622

Ημερομηνία Τροποποίησης 26.10.2016

Ημερομηνία εκτύπωσης 11.11.2016

	ΟΠΟΙΕΣ ΕΙΝΑΙ ΕΥΚΟΛΑ ΑΠΟΡΡΟΦΙΣΗΜΕΣ ΜΕΣΩ ΤΟΥ ΔΕΡΜΑΤΟΣ, ΜΠΟΡΟΥΝ ΝΑ ΔΩΣΟΥΝ ΠΡΟΣΘΕΤΗ ΑΠΟΡΡΟΦΗΣΗ ΔΕΡΜΑΤΟΣ ΜΕ ΟΥΣΙΑ ΥΨΗΛΟΤΕΡΟΥ ΚΙΝΔΥΝΟΥ ΣΕ ΣΥΓΚΡΙΣΗ ΜΕ ΜΟΝΟ ΕΙΣΠΝΟΗ ΑΠΟ ΤΟΥΣ ΑΕΡΑΓΩΓΟΥΣ., INSTITUT NATIONAL DE RECHERCHE ET DE SECURITE POUR LA PREVENTION DES ACCIDENTS DU TRAVAIL ET DES MALADIES PROFESSIONNELLES, ΒΛΑΒΗ ΣΤΟ ΑΓΕΝΝΗΤΟ ΠΑΙΔΙ ΔΕΝ ΘΑ ΠΡΕΠΕΙ ΝΑ ΑΝΑΜΕΝΕΤΑΙ ΟΤΑΝ ΓΙΝΕΤΑΙ ΣΕΒΑΣΤΗ Η ΟΕΛ ΑΞΙΑΣ			
PENCONAZOLE (ISO)	66246-88-6	2 MG/M3	TWA	SYNGENTA
2-METHYLPROPAN-1-OL	78-83-1	50 PPM 150 MG/M3	TWA	CH SUVA
ΕΠΙΠΛΕΟΝ ΠΛΗΡΟΦΟΡΙΕΣ	INSTITUT NATIONAL DE RECHERCHE ET DE SECURITE POUR LA PREVENTION DES ACCIDENTS DU TRAVAIL ET DES MALADIES PROFESSIONNELLES, ΒΛΑΒΗ ΣΤΟ ΑΓΕΝΝΗΤΟ ΠΑΙΔΙ ΔΕΝ ΘΑ ΠΡΕΠΕΙ ΝΑ ΑΝΑΜΕΝΕΤΑΙ ΟΤΑΝ ΓΙΝΕΤΑΙ ΣΕΒΑΣΤΗ Η ΟΕΛ ΑΞΙΑΣ			
	78-83-1	50 PPM 150 MG/M3	STEL	CH SUVA
ΕΠΙΠΛΕΟΝ ΠΛΗΡΟΦΟΡΙΕΣ	INSTITUT NATIONAL DE RECHERCHE ET DE SECURITE POUR LA PREVENTION DES ACCIDENTS DU TRAVAIL ET DES MALADIES PROFESSIONNELLES, ΒΛΑΒΗ ΣΤΟ ΑΓΕΝΝΗΤΟ ΠΑΙΔΙ ΔΕΝ ΘΑ ΠΡΕΠΕΙ ΝΑ ΑΝΑΜΕΝΕΤΑΙ ΟΤΑΝ ΓΙΝΕΤΑΙ ΣΕΒΑΣΤΗ Η ΟΕΛ ΑΞΙΑΣ			

ΒΙΟΛΟΓΙΚΑ ΟΡΙΑ ΕΠΑΓΓΕΛΜΑΤΙΚΗΣ ΕΚΘΕΣΗΣ

Συστατικά	Cas No	Παράμετροι ελέγχου	Τύπος	Πηγή
CYCLOHEXANONE	108-94-1	TOTAL 1,2-CYCLOHEXANEDIOL: 100 MG/L (URINE)	ΑΜΕΣΩΣ ΜΕΤΑ ΤΗΝ ΕΚΘΕΣΗ Η ΜΕΤΑ ΤΙΣ ΩΡΕΣ ΕΡΓΑΣΙΑΣ, ΣΕ ΠΕΡΙΠΤΩΣΗ ΤΟΥ ΜΑΚΡΟΧΡΟΝΙΑ ΕΚΘΕΣΙΑΚΟ: ΜΕΤΑ ΠΕΡΙΣΣΟΤΕΡΑ ΑΠΟ ΜΙΑ ΑΛΛΑΓΗ	CH BAT
		TOTAL 1,2-CYCLOHEXANEDIOL: 0.86 MMOL/L (URINE)	ΑΜΕΣΩΣ ΜΕΤΑ ΤΗΝ ΕΚΘΕΣΗ Η ΜΕΤΑ ΤΙΣ ΩΡΕΣ ΕΡΓΑΣΙΑΣ, ΣΕ ΠΕΡΙΠΤΩΣΗ ΤΟΥ ΜΑΚΡΟΧΡΟΝΙΑ ΕΚΘΕΣΙΑΚΟ: ΜΕΤΑ ΠΕΡΙΣΣΟΤΕΡΑ ΑΠΟ ΜΙΑ ΑΛΛΑΓΗ	CH BAT
		TOTAL CYCLOHEXANOL: 12 MG/L (URINE)	ΑΜΕΣΩΣ ΜΕΤΑ ΤΗΝ ΕΚΘΕΣΗ Η ΜΕΤΑ ΤΙΣ ΩΡΕΣ ΕΡΓΑΣΙΑΣ, ΣΕ ΠΕΡΙΠΤΩΣΗ ΤΟΥ ΜΑΚΡΟΧΡΟΝΙΑ ΕΚΘΕΣΙΑΚΟ: ΜΕΤΑ ΠΕΡΙΣΣΟΤΕΡΑ	CH BAT

Σελίδα 8 από 17

TOPAS 100 EC

Έκδοση 19- Αυτή η έκδοση αντικαθιστά όλες τις προηγούμενες εκδόσεις. SDS Number: S1190622

Ημερομηνία Τροποποίησης 26.10.2016

Ημερομηνία εκτύπωσης 11.11.2016

		TOTAL CYCLOHEXANOL: 0.12 MMOL/L (URINE)	ΑΠΟ ΜΙΑ ΑΛΛΑΓΗ ΑΜΕΣΩΣ ΜΕΤΑ ΤΗΝ ΕΚΘΕΣΗ Η ΜΕΤΑ ΤΙΣ ΩΡΕΣ ΕΡΓΑΣΙΑΣ, ΣΕ ΠΕΡΙΠΤΩΣΗ ΤΟΥ ΜΑΚΡΟΧΡΟΝΙΑ ΕΚΘΕΣΙΑΚΟ: ΜΕΤΑ ΠΕΡΙΣΣΟΤΕΡΑ ΑΠΟ ΜΙΑ ΑΛΛΑΓΗ	CH BAT
--	--	--	--	--------

8.2 ΈΛΕΓΧΟΙ ΈΚΘΕΣΗΣ

Μέτρα για την τεχνική επεξεργασία:

Η συλλογή και / ή η απομόνωση είναι το πλέον αξιόπιστο μέτρο τεχνικής προστασίας όταν η έκθεση δεν είναι δυνατό να αποφευχθεί.
Ο βαθμός των μέτρων αυτών εξαρτάται από τους πρακτικούς κινδύνους κατά την χρήση.
Εφόσον σχηματιστούν ατμοί ή σταγονίδια, χρησιμοποιήστε τον τοπικό σύστημα εξαερισμού.
Εκτιμήστε την έκθεση και χρησιμοποιήστε πρόσθετα μέτρα για να διατηρήσετε τις συγκεντρώσεις στον αέρα κάτω από τα όρια έκθεσης.
Όπου είναι απαραίτητο, αναζητήστε πρόσθετη επαγγελματική συμβουλή σε θέματα υγιεινής.

Μέτρα προστασίας:

Η εφαρμογή των τεχνικών μέτρων έχει πάντα μεγαλύτερη προτεραιότητα από την χρήση ατομικού εξοπλισμού προστασίας.
Κατά την επιλογή ατομικού εξοπλισμού προστασίας, αναζητήστε πρόσθετη επαγγελματική συμβουλή.
Ο ατομικός εξοπλισμός εργασίας θα πρέπει να διαθέτει την κατάλληλη πιστοποίηση.

Αναπνευστική προστασία

Συνήθως δεν απαιτείται προσωπικός αναπνευστικός προστατευτικό εξοπλισμό.
Όταν οι εργαζόμενοι αντιμετωπίζουν συγκεντρώσεις πάνω από την έκθεση πρέπει να χρησιμοποιούν τα κατάλληλα επίσημα αναγνωρισμένους αναπνευστήρες.

Προστασία χεριών

Κατάλληλο υλικό: Γάντια νιτριλίου.
Χρόνος χρήσης: > 480 λεπτά
Πάχος γαντιών: 0.5 χιλ
Απαιτούνται γάντια χημικής προστασίας.
Τα γάντια θα πρέπει να είναι πιστοποιημένα.
Τα γάντια θα πρέπει να έχουν ελάχιστο χρόνο χρήσης, κατάλληλο για τη διάρκεια της έκθεσης.
Ο χρόνος αυτός εξαρτάται από το πάχος, το υλικό και τον κατασκευαστή.
Τα γάντια θα πρέπει να απορρίπτονται και να αντικαθίστανται εάν υπάρχει κάποια ένδειξη χημικής αποικοδόμησης ή διείσδυσης. Τα προστατευτικά γάντια πρέπει να πληρούν τις προδιαγραφές της οδηγίας της ΕΕ 89/686 / ΕΟΚ και του πρότυπου EN 374 που προέρχεται από αυτό.
Γυαλιά που εφαρμόζουν σφιχτά

Προστασία οφθαλμών

TOPAS 100 EC

Έκδοση 19- Αυτή η έκδοση αντικαθιστά όλες τις προηγούμενες εκδόσεις. SDS Number: S1190622

Ημερομηνία Τροποποίησης 26.10.2016

Ημερομηνία εκτύπωσης 11.11.2016

Προστασία σώματος και δέρματος	<p>Να φοράτε πάντα προστατευτικά γυαλιά όταν το δυναμικό για την ακούσια επαφή με τα μάτια με το προϊόν δεν μπορεί να αποκλειστεί.</p> <p>Χρησιμοποιήστε την προστασία των ματιών σύμφωνα με το πρότυπο EN 166.</p> <p>Αξιολογήστε την έκθεση και επλέξτε ενδυμασία ανθεκτική στο χημικό σύμφωνα με την πιθανότητα επαφής και τα διαποτιστικά/διεισδυτικά χαρακτηριστικά του υλικού ενδυμασίας.</p> <p>Πλυθείτε με νερό και σαπούνι, αφού αφαιρέσετε την προστατευτική φόρμα.</p> <p>Καθαρίστε την ενδυμασία πριν ξαναχρησιμοποιηθεί ή χρησιμοποιείστε εξοπλισμό μιας χρήσης (στολές, ποδιές, μανίκια, μπότες, κτλ.)</p> <p>Κατάλληλη ενδυμασία: Αδιαπέραστη προστατευτική φόρμα.</p>
--------------------------------	---

9. ΦΥΣΙΚΕΣ ΚΑΙ ΧΗΜΙΚΕΣ ΙΔΙΟΤΗΤΕΣ

9.1. Στοιχεία για τις βασικές φυσικές και χημικές ιδιότητες.

Φυσική κατάσταση :	Υγρό
Μορφή:	Υγρό
Χρώμα :	Ελαφρύ κίτρινο προς καφετί
pH :	4-8 σε 1 % w/v
Σημείο/ περιοχή ζέσεως:	> 143 °C
Σημείο ανάφλεξης :	62,5 °C Method: Pensky-Martens c.c.
Πυκνότητα:	0.985 g/cm ³ στους 20 °C
Θερμοκρασία αυτανάφλεξης:	210 °C
Θερμική διάσπαση:	Δεν υπάρχουν δεδομένα.
Ιξώδες (δυναμικό):	7.53 mPa.s στους 20 °C 4.37 mPa.s στους 40 °C
Οξειδωτικές ιδιότητες :	Δεν είναι οξειδωτικό.
Εκρηκτικές ιδιότητες :	Δεν είναι εκρηκτικό.

9.2 Άλλες πληροφορίες

Επιφανειακή τάση:	30.3 mN/m στους 25 °C
-------------------	-----------------------

10. ΣΤΑΘΕΡΟΤΗΤΑ ΚΑΙ ΔΡΑΣΤΙΚΟΤΗΤΑ

10.1. Δραστηκότητα	Βλέπε κεφάλαιο 10.3 "Πιθανότητα επικίνδυνων αντιδράσεων".
10.2. Χημική σταθερότητα	Το προϊόν είναι σταθερό όταν χρησιμοποιείται σε κανονικές συνθήκες
10.3. Πιθανότητα επικίνδυνων αντιδράσεων :	Δεν προκαλεί επικίνδυνες αντιδράσεις από συνήθη χειρισμό κατά την

TOPAS 100 EC

Έκδοση 19- Αυτή η έκδοση αντικαθιστά όλες τις προηγούμενες εκδόσεις. SDS Number: S1190622

Ημερομηνία Τροποποίησης 26.10.2016

Ημερομηνία εκτύπωσης 11.11.2016

		αποθήκευση σύμφωνα με το διατάξεις.
10.4.	Συνθήκες προς αποφυγή:	Δεν αποσυντίθεται αν χρησιμοποιείται σύμφωνα με τις οδηγίες.
10.5.	Μη συμβατά υλικά:	Καμία από τις ουσίες δεν οδηγούν στο σχηματισμό επικίνδυνων ουσιών ή θερμικών αντιδράσεων.
10.6.	Επικίνδυνα προϊόντα αποσύνθεσης :	Η ανάφλεξη ή θερμική αποδόμηση προκαλεί έκλυση τοξικών και ερεθιστικών ατμών .

11. ΤΟΞΙΚΟΛΟΓΙΚΕΣ ΠΛΗΡΟΦΟΡΙΕΣ

11.1. Πληροφορίες για τις τοξικολογικές επιδράσεις

Σκευάσματος/Μίγματος

Οξεία τοξικότητα κατάποσης: LD50 Θηλυκός Αρουραίος, 2,574 mg/kg

Οξεία τοξικότητα εισπνοής : LC50 Αρουραίος, > 5,294 mg/m³, 4 h
Συμπέρασμα: Το σκεύασμα δεν έχει οξεία τοξικότητα εισπνοής.Οξεία τοξικότητα δέρματος : LD50 αρσενικός και θηλυκός Αρουραίος, > 4,000 mg/kg
Συμπέρασμα: Το σκεύασμα δεν έχει οξεία τοξικότητα δέρματος.Ουσίες

penconazole

Οξεία τοξικότητα κατάποσης: LD50 (Κουνέλι θηλυκό, αρσενικό): 971 mg/kg
Οξεία τοξικότητα εισπνοής : LC50 (Αρουραίος θηλυκός, αρσενικός): > 4,046 mg/m³, 4 h
Οξεία τοξικότητα δέρματος: LD50 (Αρουραίος θηλυκός, αρσενικός): > 3,000 mg/kg
Συμπέρασμα: Η ουσία δεν έχει οξεία τοξικότητα δέρματος.

cyclohexanone:

Οξεία τοξικότητα κατάποσης: LD50 (Αρουραίος): 1.534 mg/kg
Οξεία τοξικότητα εισπνοής : LC50 (Αρουραίος): 11 mg/l, 4 h
Οξεία τοξικότητα δέρματος: LD50 (Κουνέλι): 1,100 mg/kg

2-methylpropan-1-ol:

Οξεία τοξικότητα κατάποσης: LD50 (Αρουραίος): 2,830 - 3,350 mg/kg
Οξεία τοξικότητα εισπνοής : LC50 (Αρουραίος): > 18.18 mg/l, 6 h
Οξεία τοξικότητα δέρματος: LD50 (Αρουραίος): > 2,000 - 2,460 mg/kg

2-methoxymethylethoxy)propanol:

Οξεία τοξικότητα κατάποσης: LD50 Oral (Αρουραίος) > 5,000 mg/kg
Οξεία τοξικότητα εισπνοής : LC50 (Αρουραίος): 3.35 mg/l, 7 h
Οξεία τοξικότητα δέρματος: LD50 Dermal (Κουνέλι): 9,510 mg/kg

Διάβρωση του δέρματος/

Δερματικός ερεθισμός:

Σκευάσματος/Μίγματος

Κουνέλι: Μη ερεθιστικό στο δέρμα

Ουσίες

penconazole

Κουνέλι: Μη ερεθιστικό στο δέρμα

Σελίδα 11 από 17

TOPAS 100 EC

Έκδοση 19- Αυτή η έκδοση αντικαθιστά όλες τις προηγούμενες εκδόσεις. SDS Number: S1190622

Ημερομηνία Τροποποίησης 26.10.2016

Ημερομηνία εκτύπωσης 11.11.2016

cyclohexanone:	Ερεθιστικό στο δέρμα
calcium dodecylbenzene sulphonate:	Ερεθιστικό στο δέρμα
2-methylpropan-1-ol:	Ερεθιστικό στο δέρμα
Σοβαρή οφθαλμική βλάβη/ Οφθαλμικός ερεθισμός:	
<u>Σκευάσματος/Μίγματος</u>	Κουνέλι: Ερεθιστικό στα μάτια, αναστρέψιμο σε 7 ημέρες
<u>Ουσίες</u>	
penconazole	Κουνέλι: Μη ερεθιστικό στα μάτια
cyclohexanone:	Κίνδυνος για σοβαρές οφθαλμικές βλάβες στους οφθαλμούς
calcium dodecylbenzene sulphonate:	Κίνδυνος για σοβαρές οφθαλμικές βλάβες στους οφθαλμούς
2-methylpropan-1-ol:	Κίνδυνος για σοβαρές οφθαλμικές βλάβες στους οφθαλμούς
Ευαισθητοποίηση (αναπνευστική ή δερματική) :	
<u>Σκευάσματος/Μίγματος</u>	Ινδικό χοιρίδιο: Δεν προκαλεί ευαισθητοποίηση σε πειράματα σε ζώα.
<u>Ουσίες</u>	
penconazole	Ινδικό χοιρίδιο: Δεν προκαλεί ευαισθητοποίηση σε πειράματα σε ζώα.
2-methylpropan-1-ol:	Ινδικό χοιρίδιο: Δεν προκαλεί ευαισθητοποίηση σε πειράματα σε ζώα.
Μεταλλαξογόνος δράση:	
<u>Ουσίες</u>	
Penconazole	Δεν παρατηρήθηκε μετάλλαξη σε εργαστηριακά πειράματα σε ζώα.
cyclohexanone:	Δεν παρατηρήθηκε μετάλλαξη σε εργαστηριακά πειράματα σε ζώα.
2-methylpropan-1-ol	Δεν παρατηρήθηκε μετάλλαξη σε εργαστηριακά πειράματα σε ζώα.
2-(methoxymethylethoxy)propa nol:	Δεν παρατηρήθηκε μετάλλαξη σε in vitro δοκιμές
Καρκινογένεση:	
<u>Ουσίες</u>	
penconazole	Δεν παρατηρήθηκε καρκινογένεση σε εργαστηριακά πειράματα που έγιναν σε ζώα.
cyclohexanone:	Δεν παρατηρήθηκε καρκινογένεση σε εργαστηριακά πειράματα που έγιναν σε ζώα.
2-methylpropan-1-ol	Δεν παρατηρήθηκε καρκινογένεση σε εργαστηριακά πειράματα που έγιναν σε ζώα.
Τοξικότητα στην αναπαραγωγή:	
<u>Ουσίες</u>	
Penconazole	Κατάποση υπερβολικών ποσοτήτων από έγκυα ζώα είχε ως αποτέλεσμα τοξικότητα μητρική και εμβρυακή. Αυτές οι συγκεντρώσεις υπερβαίνουν σχετικά επίπεδα δόσης για τον άνθρωπο.
cyclohexanone:	Δεν παρατηρήθηκε τοξικότητα στην αναπαραγωγή σε εργαστηριακά.
2-methylpropan-1-ol:	Δεν παρατηρήθηκε τοξικότητα στην αναπαραγωγή. Σε ζώα δεν έδειξαν καμία επιδράσεις στην ανάπτυξη του εμβρύου.
2-(methoxymethylethoxy)propa nol:	Πειράματα σε ζώα δεν έδειξαν καμία επιδράσεις στην ανάπτυξη του εμβρύου.

TOPAS 100 EC

Έκδοση 19- Αυτή η έκδοση αντικαθιστά όλες τις προηγούμενες εκδόσεις. SDS Number: S1190622

Ημερομηνία Τροποποίησης 26.10.2016

Ημερομηνία εκτύπωσης 11.11.2016

**STOT- Μεμονωμένη έκθεση:
2-methylpropan-1-ol**

Εκτίμηση: Η ουσία ή το μείγμα ταξινομείται ως τοξικό για ειδικό όργανο-στόχο, εφάπαξ έκθεση, κατηγορία 3 με ερεθισμό της αναπνευστικής οδού. Η ουσία ή το μείγμα ταξινομείται ως τοξικό για ειδικό όργανο, μία εφάπαξ έκθεση, κατηγορία 3 με νευροτοξική δράση.

**STOT- Επαναλαμβανόμενη έκθεση:
penconazole**

Δεν παρατηρήθηκε καμία δυσμενής επίπτωση σε πειράματα χρόνιας τοξικότητας.

12. ΟΙΚΟΛΟΓΙΚΕΣ ΠΛΗΡΟΦΟΡΙΕΣ

**12.1. Τοξικότητα
Μίγματος/σκευάσματος
Τοξικότητα στα ψάρια :**

LC50 *Oncorhynchus mykiss* (ιριδίζουσα πέστροφα), 6.8 mg/l , 96 h

**Τοξικότητα σε υδρόβια
ασπόνδυλα:**

EC50 *Daphnia magna* (δάφνια), 36 mg/l , 48 h

**Τοξικότητα στα υδρόβια
φυτά :**

EC50 *Desmodesmus subcapitus* (πράσινα φύκη), 3.9 mg/l, 72 h

ErC50 *Desmodesmus subcapitus* (πράσινα φύκη), 7.9 mg/l, 72 h

Ουσίες

Penconazole

Τοξικότητα στα ψάρια :

LC50 (*Oncorhynchus mykiss* (rainbow trout)): 1.3 mg/l, 96 h

Τοξικότητα σε υδρόβια
ασπόνδυλα:

EC50 (*Daphnia magna* (Water flea)): 6.75 mg/l, 48 h

Τοξικότητα στα υδρόβια
φυτά:

ErC50 (*Pseudokirchneriella subcapitata* (green algae)): 4.7 mg/l, 96 h

NOEC (*Pseudokirchneriella subcapitata* (green algae)): 0.55 mg/l, 96 h

EC50 (*Lemna gibba* (duckweed)): 0.22 mg/l, 14 d

NOEC (*Lemna gibba* (duckweed)): 0.1 mg/l, 14 d

M-Factor (Acute aquatic toxicity)

: 1

Παράγοντας M:

(οξείας τοξικότητας
Στους υδρόβιους)

Τοξικότητα στα βακτήρια:

EC50 (activated sewage sludge): > 100 mg/l, 3 h

Τοξικότητα στα ψάρια
(χρόνια τοξικότητα):

NOEC: 0.36 mg/l *Pimephales promelas* (fathead minnow) 35 d

Τοξικότητα σε υδρόβια
ασπόνδυλα (χρόνια
τοξικότητα):

NOEC: 0.069 mg/l *Daphnia magna* (Water flea) 21 d

Παράγοντας M:

(χρόνιας τοξικότητας
Στους υδρόβιους)

: 1

Οικοτοξικολογική Αξιολόγηση
cyclohexanone:

Πολύ τοξικό στο υδάτινο περιβάλλον

Τοξικότητα στα ψάρια:

LC50 (*Pimephales promelas* (fathead minnow)): 527 mg/l, 96 h

Τοξικότητα σε υδρόβια
ασπόνδυλα:

(*Daphnia magna* (Water flea)): 820 mg/l, 24 h

**calcium dodecylbenzene
sulphonate:**

Βλαβερό στο υδάτινο περιβάλλον με μακροχρόνιες επιπτώσεις

Οικοτοξικολογική Αξιολόγηση

Σελίδα 13 από 17

TOPAS 100 EC

Έκδοση 19- Αυτή η έκδοση αντικαθιστά όλες τις προηγούμενες εκδόσεις. SDS Number: S1190622
 Ημερομηνία Τροποποίησης 26.10.2016 Ημερομηνία εκτύπωσης 11.11.2016

2-methylpropan-1-ol:	
Τοξικότητα στα ψάρια :	LC50 (Pimephales promelas (fathead minnow)): 1,430 mg/l, 96 h
Τοξικότητα σε υδρόβια ασπόνδυλα:	EC50 (Daphnia magna (Water flea)): 1,100 mg/l, 48 h NOEC : 20 mg/l, 21 d Test Type: semi-static test
Τοξικότητα στα υδρόβια φυτά:	EC50 (Pseudokirchneriella subcapitata (green algae)): 1,799 mg/l, 72 h
(2-methoxymethylethoxy)propanol:	
Τοξικότητα στα ψάρια :	LC50 (Poecilia reticulata (guppy)): > 1,000 mg/l, 96 h
Τοξικότητα σε υδρόβια ασπόνδυλα:	EC50 (Daphnia magna (Water flea)): 1,919 mg/l, 48 h
Τοξικότητα στα υδρόβια φυτά:	ErC50 (Pseudokirchneriella subcapitata (green algae)): > 969 mg/l, 96 h
Τοξικότητα σε υδρόβια ασπόνδυλα (χρόνια τοξικότητα):	NOEC: > 0.5 mg/l Daphnia magna (Water flea), 22 d
Οικοτοξικολογική Αξιολόγηση:	Χρόνια υδρόβια τοξικότητα: Δεν έχει γνωστές οικοτοξικολογικές επιδράσεις

12.2. Ανθεκτικότητα και ικανότητα αποικοδόμησης

penconazole	
Βιοαποικοδόμησημο Σταθερότητα στο νερό:	Αποτέλεσμα: Δεν είναι εύκολα βιοαποικοδομήσιμο. Ημπερίοδος αποικοδόμησης: > 706 d Εμφανίζει υπολειμματική δράση στο νερό
Cyclohexanone:	
Βιοαποικοδόμησημο	Αποτέλεσμα: Άμεσα βιοαποικοδομήσιμο.
(2-methoxymethylethoxy)propanol:	
Βιοαποικοδόμησημο	Αποτέλεσμα: Εύκολα βιοαποικοδομήσιμο. 75% βιοαποδομίσημο- 28d

12.3. Δυνατότητα βιοσυσσώρευσης

penconazole	Δεν βιοσυσσωρεύεται.
--------------------	----------------------

12.4. Κινητικότητα στο έδαφος:

Penconazole	
Σταθερότητα στο έδαφος	Μεγάλη κινητικότητα στο έδαφος. Ημπερίοδος αποικοδόμησης 138 d Δεν είναι υπολειμματικό στο έδαφος.

12.5. Αποτελέσματα της αξιολόγησης των PBT και vPvB εκτιμήσεων.

Σκευάσματος/Μίγματος Το συγκεκριμένο σκεύασμα/μίγμα δε περιέχει ουσίες που να θεωρούνται έμμονες, βιοσυσσωρεύσιμες και τοξικές (PBT), είτε ουσίες άκρως έμμονες και άκρως βιοσυσσωρεύσιμες(vPvB) σε περιεκτικότητα μεγαλύτερη από 0,1%.

penconazole	Η συγκεκριμένη ουσία δεν θεωρείται έμμονη, βιοσυσσωρεύτική και τοξική. (PBT) Η συγκεκριμένη ουσία δεν θεωρείται άκρως έμμονη και άκρως βιοσυσσωρεύσιμη (vPvB).
--------------------	---

TOPAS 100 EC

Έκδοση 19- Αυτή η έκδοση αντικαθιστά όλες τις προηγούμενες εκδόσεις. SDS Number: S1190622

Ημερομηνία Τροποποίησης 26.10.2016

Ημερομηνία εκτύπωσης 11.11.2016

cyclohexanone:	Η συγκεκριμένη ουσία δεν θεωρείται έμμονη, βιοσυσσωρευτική και τοξική. (PBT)
2-methylpropan-1-ol:	Η συγκεκριμένη ουσία δεν θεωρείται έμμονη, βιοσυσσωρευτική και τοξική. (PBT)
(2-methoxymethylethoxy)propanol:	Η συγκεκριμένη ουσία δεν θεωρείται άκρωσ έμμονη και άκρωσ βιοσυσσωρεύσιμη (vPvB). Η συγκεκριμένη ουσία δεν θεωρείται έμμονη, βιοσυσσωρευτική και τοξική. (PBT) Η συγκεκριμένη ουσία δεν θεωρείται άκρωσ έμμονη και άκρωσ βιοσυσσωρεύσιμη (vPvB).

12.6. Άλλες αρνητικές επιπτώσεις**Σκευάσματος/ Μίγματος:****Ουσίες**

penconazole:	Επιπλέον Οικotoξικολογικές Πληροφορίες: Μη διαθέσιμες πληροφορίες
cyclohexanone:	Επιπλέον Οικotoξικολογικές Πληροφορίες: Μη διαθέσιμες πληροφορίες
calcium dodecylbenzene sulphonate:	Επιπλέον Οικotoξικολογικές Πληροφορίες: Μη διαθέσιμες πληροφορίες
2-methylpropan-1-ol:	Επιπλέον Οικotoξικολογικές Πληροφορίες: Μη διαθέσιμες πληροφορίες
(2-methoxymethylethoxy)propanol:	Επιπλέον Οικotoξικολογικές Πληροφορίες: Μη διαθέσιμες πληροφορίες

13. ΣΤΟΙΧΕΙΑ ΣΧΕΤΙΚΑ ΜΕ ΤΗΝ ΑΠΟΡΡΙΨΗ**13.1. Μέθοδοι διαχείρισης αποβλήτων**

Προϊόν :	Μην μολύνετε λίμνες, υδάτινους αποδέκτες ή κανάλια με την ουσία ή χρησιμοποιημένα δοχεία. Μην απορρίπτετε στο δίκτυο αποχέτευσης. Όπου είναι δυνατό προτιμήστε την ανακύκλωση από την απόρριψη ή την αποτέφρωση. Εφόσον η ανακύκλωση δεν είναι εφαρμόσιμη, το υλικό θα πρέπει να διατεθεί σύμφωνα με την εθνική νομοθεσία
Μολυσμένη συσκευασία :	Αδειάζετε τα υπολείμματα της ουσίας. Ξεπλένετε τρεις φορές τα δοχεία. Τα άδεια δοχεία θα πρέπει να διατίθενται προς ανακύκλωση ή απόρριψη. Μην ξαναχρησιμοποιείτε άδεια δοχεία.

TOPAS 100 EC

Έκδοση 19- Αυτή η έκδοση αντικαθιστά όλες τις προηγούμενες εκδόσεις. SDS Number: S1190622

Ημερομηνία Τροποποίησης 26.10.2016

Ημερομηνία εκτύπωσης 11.11.2016

14. ΠΛΗΡΟΦΟΡΙΕΣ ΣΧΕΤΙΚΑ ΜΕ ΤΗΝ ΜΕΤΑΦΟΡΑ**14.1 Αριθμός UN:**

ADN: UN 3082
 ADR: UN 3082
 RID: UN 3082
 IMDG: UN 3082
 IATA: UN 3082

14.2 Οικεία ονομασία αποστολής UN:

ADN: ΠΕΡΙΒΑΛΛΟΝΤΙΚΑ ΕΠΙΚΙΝΔΥΝΗ ΟΥΣΙΑ, ΥΓΡΟ, Ν.Ο.Σ.
 (penconazole)
 ADR: penconazole
 RID: ΠΕΡΙΒΑΛΛΟΝΤΙΚΑ ΕΠΙΚΙΝΔΥΝΗ ΟΥΣΙΑ, ΥΓΡΟ, Ν.Ο.Σ.
 (penconazole)
 IMDG: ΠΕΡΙΒΑΛΛΟΝΤΙΚΑ ΕΠΙΚΙΝΔΥΝΗ ΟΥΣΙΑ, ΥΓΡΟ, Ν.Ο.Σ.
 (penconazole)
 IATA: ΠΕΡΙΒΑΛΛΟΝΤΙΚΑ ΕΠΙΚΙΝΔΥΝΗ ΟΥΣΙΑ, ΥΓΡΟ, Ν.Ο.Σ.
 (penconazole)

14.3 Τάξη/τάξεις κινδύνου κατά τη μεταφορά:

ADN: 9
 ADR: 9
 RID: 9
 IMDG: 9
 IATA: 9

14.4 Ομάδα συσκευασίας:

ADN:
 Ομάδα συσκευασίας: III
 Κωδικός Σήμανσης M6
 Αριθμός αναγνώρισης κινδύνου 90
 Σήμανση 9

ADR:
 Ομάδα συσκευασίας: III
 Κωδικός Σήμανσης M6
 Αριθμός αναγνώρισης κινδύνου 90
 Σήμανση 9
 Κωδικός περιορισμού για
 διέλευση σε σήραγγες: (E)

RID:
 Ομάδα συσκευασίας: III
 Κωδικός Σήμανσης M6
 Αριθμός αναγνώρισης κινδύνου 90
 Σήμανση 9

IMDG:
 Ομάδα συσκευασίας: III
 Σήμανση 9
 EmS Κωδικός F-A, S-F

IATA:

Οδηγία συσκευασίας (φορτίου
 αεροσκάφος): 964

Οδηγία συσκευασίας (επιβατηγά
 αεροσκάφη) : 964
 οδηγία συσκευασίας (LQ): Y964
 Ομάδα συσκευασίας: III
 Ετικέτες: Διάφορα

TOPAS 100 EC

Έκδοση 19- Αυτή η έκδοση αντικαθιστά όλες τις προηγούμενες εκδόσεις. SDS Number: S1190622
 Ημερομηνία Τροποποίησης 26.10.2016 Ημερομηνία εκτύπωσης 11.11.2016

14.5 Περιβαλλοντικοί κίνδυνοι:

ADN: Επικίνδυνο για το περιβάλλον : Ναι
 ADR: Επικίνδυνο για το περιβάλλον : Ναι
 RID: Επικίνδυνο για το περιβάλλον : Ναι
 IMDG: Θαλάσσιος Ρυπαντής : Ναι

14.6 Ειδικές προφυλάξεις για τον χρήστη Δεν απαιτούνται.
 14.7 Χύδην μεταφορά σύμφωνα με το Παράρτημα II μη εφαρμόσιμο του MARPOL 73/78 και τον κώδικα IBC.

15. ΣΤΟΙΧΕΙΑ ΣΧΕΤΙΚΑ ΜΕ ΤΗΝ ΝΟΜΟΘΕΣΙΑ

15.1. Κανονισμοί/ νομοθεσία σχετικά με την ασφάλεια, την υγεία και το περιβάλλον για την ουσία ή το μείγμα.

Σύμφωνα με τον Κανονισμό (ΕΕ) Νο. 1272/2008 και τον 98/24/ΕΕ και με Αριθμό Έγκρισης Κυκλοφορίας 60437 στην Ελλάδα.

15.2. Αξιολόγηση Χημικής Ασφάλειας

Δεν απαιτείται για αυτήν την ουσία.

**16. ΆΛΛΕΣ ΠΛΗΡΟΦΟΡΙΕΣ
 ΠΑΡΑΡΤΗΜΑ: ΣΕΝΑΡΙΑ ΕΚΘΕΣΗΣ**

Περαιτέρω πληροφορίες

Φράσεις H που αναφέρονται στα κεφάλαια 2 και 3:

H226	Υγρό και ατμοί εύφλεκτα.
H302	Επιβλαβές σε περίπτωση κατάποσης.
H312	Επιβλαβές σε επαφή με το δέρμα.
H315	Προκαλεί ερεθισμό του δέρματος.
H318	Προκαλεί σοβαρή οφθαλμική βλάβη.
H319	Προκαλεί σοβαρό οφθαλμικό ερεθισμό.
H332	Επιβλαβές σε περίπτωση εισπνοής.
H335	Μπορεί να προκαλέσει ερεθισμό της αναπνευστικής οδού.
H336	Μπορεί να προκαλέσει υπνηλία ή ζάλη.
H411	Τοξικό για τους υδρόβιους οργανισμούς, με μακροχρόνιες επιπτώσεις.

Οι πληροφορίες που παρατίθενται στο παρόν Φύλλο Δεδομένων Ασφαλείας βασίζονται στην μέγιστη δυνατή γνώση μας έως την ημερομηνία της έκδοσης. Οι πληροφορίες που δίνονται αποτελούν οδηγίες για ασφαλή χειρισμό, χρήση, επεξεργασία, αποθήκευση, μεταφορά, διάθεση και αποδέσμευση, και όχι εγγύηση ή προδιαγραφές ποιότητας. Οι πληροφορίες αναφέρονται μόνο στο συγκεκριμένο προϊόν, άρα ενδέχεται να μην ισχύουν για τον συνδυασμό του με άλλες ουσίες, ή για οποιαδήποτε επεξεργασία και εφαρμογή που δεν αναφέρεται στο κείμενο.

Οι όποιες αλλαγές υποδεικνύονται με κάθετες γραμμές στο αριστερό περιθώριο και αντικαθιστούν όλες τις της προηγούμενες εκδόσεις.

Οι εμπορικές ονομασίες αποτελούν πατέντα της Syngenta Group Company.

6.3. Penconazole-άδεια κυκλοφορίας στην Ελλάδα

ΑΝΑΡΤΗΤΕΑ ΣΤΟ ΔΙΑΔΙΚΤΥΟ



ΕΛΛΗΝΙΚΗ ΔΗΜΟΚΡΑΤΙΑ
ΥΠΟΥΡΓΕΙΟ ΑΓΡΟΤΙΚΗΣ ΑΝΑΠΤΥΞΗΣ
& ΤΡΟΦΙΜΩΝ
ΓΕΝΙΚΗ Δ/ΝΣΗ ΦΥΤΙΚΗΣ ΠΑΡΑΓΩΓΗΣ
Δ/ΝΣΗ ΠΡΟΣΤΑΣΙΑΣ ΦΥΤΙΚΗΣ ΠΑΡΑΓΩΓΗΣ
ΤΜΗΜΑ ΓΕΩΡΓΙΚΩΝ ΦΑΡΜΑΚΩΝ

Αθήνα, 18.12.2014
Αριθ. πρωτ: 14122/160950

Ταχ. Δ/ση: Λ. Συγγρού 150
Ταχ. Κώδικας: 176 71 - ΑΘΗΝΑ
TELEFAX: 210 92 12 090
Πληροφορίες: Δ. Πιταροκοίλη
Τηλέφωνο: 210 92 87 254
e-mail: syg081@minagric.gr

Προς: Syngenta Hellas AEBE
15349 Ανθούσα Αττικής

ΘΕΜΑ: Α. Χορήγηση οριστικής άδειας διάθεσης στην αγορά στο φυτοπροστατευτικό προϊόν (μυκητοκτόνο) TOPAS 100 EC.
Β. Ανάκληση της με αριθ. 6489 έγκρισης του φυτοπροστατευτικού προϊόντος (μυκητοκτόνο) TOPAS 100 EC.

ΑΠΟΦΑΣΗ

Ο

ΥΠΟΥΡΓΟΣ ΑΓΡΟΤΙΚΗΣ ΑΝΑΠΤΥΞΗΣ ΚΑΙ ΤΡΟΦΙΜΩΝ

Έχοντας υπόψη

1. Τον Κανονισμό (ΕΚ) αριθ. 1107/2009 (L 309/24.11.2009) του Ευρωπαϊκού Κοινοβουλίου και του Συμβουλίου της 21^{ης} Οκτωβρίου 2009 σχετικά με τη διάθεση φυτοπροστατευτικών προϊόντων στην αγορά και την κατάργηση των οδηγιών 79/117/ΕΟΚ και 91/414/ΕΟΚ του Συμβουλίου και ειδικότερα το άρθρο 37 αυτού.
2. Το Νόμο 4036/2012 (Α' 8) για τη διάθεση γεωργικών φαρμάκων στην αγορά, ορθολογική χρήση αυτών και συναφείς διατάξεις.
3. Τη με αριθ. 265/3-9-2002 (ΦΕΚ 1214/Β/19-9-2002) Απόφαση του Υπ. Οικονομίας και Οικονομικών περί «Ταξινόμησης, συσκευασίας και επισήμανσης των επικίνδυνων παρασκευασμάτων σε εναρμόνιση προς την Οδηγία 1999/45 (ΕΕ L 200 της 30.7.1999) του Ευρ. Κοινοβουλίου και του Συμβουλίου, όπως ισχύει σήμερα.
4. Τον Κανονισμό 396/2005 του Ευρωπαϊκού Κοινοβουλίου και του Συμβουλίου της 23ης Φεβρουαρίου 2005 για τα ανώτατα όρια καταλοίπων φυτοφαρμάκων μέσα η πάνω στα τρόφιμα

ΑΝΑΡΤΗΤΕΑ ΣΤΟ ΔΙΑΔΙΚΤΥΟ

και τις ζωτροφές φυτικής και ζωικής προέλευσης και για την τροποποίηση της οδηγίας 91/414/ΕΟΚ του Συμβουλίου.

5. Τον Κανονισμό (ΕΕ) αριθ. 540/2011 της Επιτροπής της 25ης Μαΐου 2011 σχετικά με την εφαρμογή του Κανονισμού (ΕΚ) αριθ. 1107/2009 του Ευρωπαϊκού Κοινοβουλίου και του Συμβουλίου όσον αφορά τον κατάλογο των εγκεκριμένων δραστικών ουσιών στον οποίο έχει συμπεριληφθεί η δραστική ουσία penconazole.

6. Τον Κανονισμό (ΕΕ) αριθ. 547/2011 της Επιτροπής της 8ης Ιουνίου 2011 για την εφαρμογή του Κανονισμού (ΕΚ) αριθ. 1107/2009 του Ευρωπαϊκού Κοινοβουλίου και του Συμβουλίου όσον αφορά τις απαιτήσεις επισήμανσης για τα φυτοπροστατευτικά προϊόντα.

7. Τη με αριθ. 462/106101/3.9.13 (ΦΕΚ 2240/Β'/10-9-2013) Απόφαση του Αναπληρωτή Υπουργού Αγροτικής Ανάπτυξης και Τροφίμων για «Μεταβίβαση στους Γενικούς Γραμματείς, Προϊσταμένους Γενικής Διεύθυνσης, Προϊσταμένους Διεύθυνσης και Προϊσταμένους Τμήματος του δικαιώματος να υπογράψουν “με εντολή Αναπληρωτή Υπουργού.

8. Τη με αριθ. 79265/20.06.1988 Υπουργική Απόφαση με την οποία χορηγήθηκε η έγκριση κυκλοφορίας του φυτοπροστατευτικού προϊόντος με αριθ. 6489 (μυκητοκτόνο) TOPAS 100 EC, όπως τροποποιήθηκε και ισχύει.

9. Την έκθεση αξιολόγησης (Registration report) από την Πορτογαλία.

10. Την από 29.06.2012 αίτηση της εταιρείας Syngenta Hellas ΑΕΒΕ.

11. Το Εισηγητικό Σημείωμα της Υπηρεσίας.

ΑΠΟΦΑΣΙΖΟΥΜΕ

A Χορηγούμε οριστική έγκριση διάθεσης στην αγορά, σύμφωνα με το άρθρο 37 του Κανονισμού 1107/2009, στο φυτοπροστατευτικό προϊόν TOPAS 100 EC της εταιρείας Syngenta Hellas ΑΕΒΕ, με τα ακόλουθα στοιχεία:

1 Ταυτότητα του φυτοπροστατευτικού προϊόντος

Αριθμός Άδειας Διάθεσης στην Αγορά (ΑΑΔΑ)

1.1.α Ημερομηνία χορήγησης

1.1.β Ημερομηνία λήξης

60437

18.12.2014

31.12.2020

1.2 Φυτοπροστατευτικό προϊόν

1.2.α Εμπορικό όνομα

1.2.β Μορφή:

TOPAS 100 EC

Γαλακτωματοποιήσιμο υγρό (EC)

1.3 Δραστικές ουσίες

Κοινή ονομασία της δραστικής ουσίας κατά ISO

Περιεκτικότητα της τεχνικά καθαρής δραστικής ουσίας σε καθαρή δραστική ουσία

Χημική ομάδα

Παρασκευαστής

Penconazole

95% min

ομάδα τριαζολών (DMIs)

Syngenta Syngenta Crop Protection AG
4002 - Βασιλεία Ελβετίας

ΑΝΑΡΤΗΤΕΑ ΣΤΟ ΔΙΑΔΙΚΤΥΟ

Εργοστάσιο παρασκευής της δ.ο.

Παρασκευάζεται στις εγκαταστάσεις της επιχείρησης:

Nippon Kagaku Co Ltd
Kashima Plant, 6
Sunayama, Kamitsu-shi
Ibaraki 314-0255
Japan

Τεχνικές προδιαγραφές της δραστικής ουσίας:

Οι τεχνικές προδιαγραφές της δραστικής ουσίας dicamba όπως αυτές κατατέθηκαν με την με αριθ. πρωτ. 7201/73237/29.06.2012 αίτηση της ενδιαφερόμενης εταιρείας για το σκεύασμα TOPAS 100 EC. Είναι εμπιστευτική πληροφορία και παραμένουν στα αρχεία της ΣΕΑ.

1.4 Πληροφορίες για το σκεύασμα

α) Κάτοχος της άδειας:

Syngenta Hellas AEBE
Λ.Ανθούσας
15349 Ανθούσα Αττική
ΑΜΕ
Τ.Κ.15349
Τηλ.:210-6666612-13
Fax:210 6665777
E-mail: voula.kalliakaki@syngenta.com

β) Υπεύθυνος επικοινωνίας:

Ο κάτοχος της έγκρισης

γ) Υπεύθυνος για την τελική διάθεση στην αγορά (εφόσον δεν έχει έδρα στη χώρα)

Ο κάτοχος της έγκρισης

δ) Παρασκευαστής σκευάσματος:

Syngenta Syngenta Crop Protection AG
4002 - Βασιλεία Ελβετίας

ε) Εργοστάσιο παρασκευής του σκευάσματος:

Παρασκευάζεται στις εγκαταστάσεις της επιχείρησης:

Syngenta Crop Protection AG
Rout de l' Ile au Bois
CH-1870 Monthey
Ελβετία

ΑΝΑΡΤΗΤΕΑ ΣΤΟ ΔΙΑΔΙΚΤΥΟ

<p>στ) Εργοστάσια συσκευασίας του σκευάσματος:</p>	<p>Συσκευάζεται στις εγκαταστάσεις των επιχειρήσεων:</p> <ol style="list-style-type: none"> 1. Syngenta Hellas AEBE Οινόφυτα-Βοιωτίας 2. Syngenta Crop Protection AG Rout de l' Ile au Bois CH-1870 Monthey Ελβετία
<p>ζ) Εγγυημένη σύνθεση του σκευάσματος:</p>	<p>Δραστική ουσία: Penconazole 10% β/ο Βοηθητικές ουσίες: 89.36 % β/β Η πλήρης εγγυημένη σύνθεση του σκευάσματος όπως αυτή κατατέθηκε με την με αριθ. πρωτ. 7201/73237/29.06.2012 αίτηση της ενδιαφερόμενης εταιρείας. Είναι εμπιστευτική πληροφορία και παραμένει στα αρχεία της ΣΕΑ.</p>

2 Συσκευασία(ες)

2.2 Συσκευασία(ες):

Α/Α	Είδος	Μέγεθος	Υλικό
1	Μπουκαλάκια μέσα σε κουτί	10, 20, 25, 35, 50, 70, 100, 200, 250 και 350 κ.εκ.	HDPE f-HDPE HDPE/PA PET
2	Μπουκαλάκια	10, 20, 25, 35, 50, 70, 100, 200, 250 και 350 κ.εκ.	HDPE f-HDPE HDPE/PA PET
3	Φιάλες	400, 500 κ.εκ. και 1 λίτρο, 5 λίτρα	HDPE f-HDPE HDPE/PA PET

ΑΝΑΡΤΗΤΕΑ ΣΤΟ ΔΙΑΔΙΚΤΥΟ

3 Οδηγίες χρήσης:

Προορίζεται για επαγγελματίες και για ερασιτέχνες χρήστες

Τρόπος εφαρμογής: Ψεκασμός φυλλώματος

Τρόπος παρασκευής ψεκαστικού υγρού:
Γεμίστε το δοχείο του ψεκαστικού μηχανήματος με νερό μέχρι τη μέση. Προσθέστε την απαιτούμενη ποσότητα σκευάσματος αναδεύοντας και συμπληρώστε με το υπόλοιπο νερό συνεχίζοντας την ανάδευση.

Οδηγίες για την ασφαλή απόσυρση του φυτοπροστατευτικού προϊόντος και της συσκευασίας: Τα κενά μέσα συσκευασίας (φιαλίδια, φιάλες) ξεπλένονται υπό πίεση με ειδικό μηχανισμό ή γίνεται τριπλό ξέπλυμα (τα νερά του ξέπλυματος τα ρίχνουμε στο ψεκαστικό υγρό) και αφού καταστραφούν προηγουμένως με τρύπημα και τα κουτιά με σκίσιμο για τη διασφάλιση της μη περαιτέρω χρήσης, εναποτίθενται όλα σε σημεία συλλογής, για ανακύκλωση ή ανάκτηση ενέργειας.

4 Κατηγορία και τρόπος δράσης:

Διασυστηματικό μυκητοκτόνο με προστατευτική και θεραπευτική δράση για την καταπολέμηση του ωιδίου σε μηλοειδή, πυρηνόκαρπα, αμπέλι, λαχανικά, καπνό, ανθοκομικά και άλλες καλλιέργειες.

5 5.1 Φάσμα δράσης						
Πεδίο Εφαρμογής	Στόχος	Δόσεις σκευάσματος			Τρόπος και χρόνος εφαρμογής	Αρ. εφαρμογών / καλλιεργητική περίοδο (max)
		κ.εκ./ στρ. (max)	κ.εκ./ 100 λίτρα ψεκ. Υγρού	Όγκος ψεκ. υγρού λίτρα / στρέμμα		
Μήλα, Αχλάδια Κυδωνιά	Ωίδιο (<i>Podosphaera leucotricha</i>)	50	25-50	50-140	BBCH 71- 78 ** δόση σκευάσματος 0,25 λτ/HA LWA	3 εφαρμογές με 12- 14 ημέρες μεσοδιάστημα
Ροδακινιά Νεκταρίνια Βερικοκιά	Ωίδιο (<i>Podosphaera tridactyla</i> , <i>Podosphaera pannosa</i> , <i>Sphaerotheca pannosa</i>)	75	35-50	80-150	BBCH 71- 89	2 εφαρμογές με 12 -14 ημέρες μεσοδιάστημα

ΑΝΑΡΤΗΤΕΑ ΣΤΟ ΔΙΑΔΙΚΤΥΟ

Αμπέλι	Ωίδιο (<i>Erysiphe necator</i>)	30	30	50-100	BBCH 53-79	3 εφαρμογές με 10-14 ημέρες μεσοδιάστημα
Αγκινάρα	Ωίδιο (<i>Leveillula taurica</i> , <i>Erysiphe cichoracearum</i>)	50	--	50-100	BBCH 51-81	2 εφαρμογές με 10-12 ημέρες μεσοδιάστημα
Φράουλα (αγρού, θερμοκηπίο υ)	Ωίδιο (<i>Podosphaera arhanis</i>)	50	50	50-100	BBCH 41-89	2 εφαρμογές με 10-14 ημέρες μεσοδιάστημα
Αγγούρι Καρπούζι Πεπόνι Κολοκύθα (αγρού - θερμοκηπίο υ)	Ωίδιο (<i>Sphaerotheca fuliginea</i> , <i>Erysiphe cichoracearum</i>)	50	35-50	50-120	BBCH 51-89	2 εφαρμογές με 10-14 ημέρες μεσοδιάστημα
Κολοκυθάκι (αγρού - θερμοκηπίο υ)	Ωίδιο (<i>Sphaerotheca fuliginea</i> , <i>Erysiphe cichoracearum</i>)	50	35-50	50-120	BBCH 51-79	2 εφαρμογές με 10-14 ημέρες μεσοδιάστημα
Πυτεριά (Αγρού, θερμοκηπίο υ)	Ωίδιο (<i>Leveillula taurica</i>)	50	35-50	50-100	BBCH 55-89	2 εφαρμογές με 10-12 ημέρες μεσοδιάστημα

ΑΝΑΡΤΗΤΕΑ ΣΤΟ ΔΙΑΔΙΚΤΥΟ

Μελιτζάνα (Αγρού - Θερμοκητίο υ)	Ωίδιο (<i>Leveillula taurica</i> , <i>Oidium</i> <i>neolycopersici</i>)	50	35-50	50-100	BBCH 51-89	2 εφαρμογές με 10-12 ημέρες μεσοδιάστημα
Τομάτα (Αγρού - Θερμοκητίο υ)	Ωίδιο (<i>Leveillula taurica</i> <i>Oidium</i> <i>neolycopersici</i>)	50	35-50	50-100	BBCH 21-89	2 εφαρμογές με 10-12 ημέρες μεσοδιάστημα
Καπνός	Ωίδιο (<i>Erysiphe</i> <i>cichoracearum</i>)	50	--	20-100	BBCH 20-99	2 εφαρμογές με 10 -14 ημέρες μεσοδιάστημα
Ανθοκομικά (Αγρού, θερμοκητίο υ): Τριανταφυλ λιά Μπιγκόνια Ντάλια Καλεντούλα Χρυσάνθεμο Πελαργόνιο Γαρυφαλλιά Ποτεντίλα Αγγελική Japanese spindle tree Αλθέα	<i>Sphaerotheca</i> <i>rannosa</i> <i>Phragmidium</i> sp <i>Erysiphe</i> sp <i>Sphaerotheca</i> sp <i>Oidium</i> sp <i>Puccinia</i> sp <i>Puccinia horiana</i> <i>Puccinia pelargonii-</i> <i>zonalis</i> <i>Puccinia</i> sp <i>Puccinia</i> sp. <i>Oidium evonimy</i> <i>japon</i> <i>Oidium</i> sp. <i>Puccinia</i> sp	50	30-50	50-100	BBCH 13-89	2 εφαρμογές με 7-12 ημέρες μεσοδιάστημα
<p>Το εγκεκριμένο Έντυπο Ορθής Γεωργικής Πρακτικής (GEP) παρουσιάζεται στο Παράρτημα II της παρούσας Παρατηρήσεις:</p> <p>* * HA LWA: 10.000 m² έκταση επιφάνειας κόμης</p> <p>- Να μην εφαρμόζετε σε καλλιέργειες που προορίζονται για μεταποίηση (τομάτα, φράουλα).</p>						

ΑΝΑΡΤΗΤΕΑ ΣΤΟ ΔΙΑΔΙΚΤΥΟ

Οι χρήσεις στις καλλιέργειες Σμέουρα και Βατόμουρα θα χορηγηθούν όταν και εάν καθοριστούν στον κανονισμό 396/2005 MRLs σύμφωνα με την παρακάτω ΟΓΠ. Ο κάτοχος της έγκρισης υποχρεούται να ενημερώσει άμεσα την αρμόδια αρχή.

Πεδίο Εφαρμογής	Στόχος	Δόσεις σκευάσματος			Τρόπος και χρόνος εφαρμογής	Μέγιστος αριθμός εφαρμογών ανά καλλιεργητική περίοδο
		κ.εκ./στρ. (max)	κ.εκ./100 λίτρα ψεκ. Υγρού	Όγκος ψεκ. υγρού λίτρα / στρέμμα		
Σμέουρα Βατόμουρα	Ωίδιο (<i>Podosphaera aphanis</i>)	40	40	50-100	BBCH 51-97	1

6 Ειδικές συνθήκες γεωργικές, φυτοϋγείας ή περιβαντολλογικές υπό τις οποίες το σκεύασμα μπορεί να χρησιμοποιηθεί ή να αποκλειστεί

- Στο αμπέλι και στα μηλοειδή η εφαρμογή του πρέπει να εναλλάσσεται με μυκητοκτόνα διαφορετικού τρόπου δράσης και οι επεμβάσεις με το σκεύασμα να μην ξεπερνούν τις τρεις (3) ανά καλλιεργητική περίοδο, στις υπόλοιπες καλλιέργειες (πυρηνόκαρπα, φράουλα, αγκινάρα, πιπεριά, τομάτα, μελιτζάνα και καλλωπιστικά) οι επεμβάσεις με το σκεύασμα να μην ξεπερνούν τις δύο (2) ανά καλλιεργητική περίοδο.
- Για την αποφυγή ανάπτυξης ανθεκτικότητας, να μην ξεπερνούν οι ψεκασμοί με μυκητοκτόνα DMIs το 50% των συνολικών επεμβάσεων.
- Στις περιπτώσεις πολύ υψηλών προσβολών ή σε πολύ καθυστερημένες θεραπευτικές εφαρμογές, να εφαρμόζονται εναλλαγές μυκητοκτόνων διαφορετικών ομάδων ή μείγματα μυκητοκτόνων με διαφορετικό τρόπο δράσης.

7. Χρονικό διάστημα ασφαλείας μεταξύ εφαρμογής και:
- σποράς ή φύτευσης της προστατευόμενης καλλιέργειας
- σποράς ή φύτευσης των καλλιεργειών που ακολουθούν
- της πρόσβασης του ανθρώπου ή των ζώων στην καλλιέργεια στην οποία έχει εφαρμοστεί το σκεύασμα


-
-

Η είσοδος επιτρέπεται όταν έχει στεγνώσει πλήρως το ψεκαστικό διάλυμα στις φυλλικές επιφάνειες των καλλιεργειών.

8 Στοιχεία φυτοτοξικότητας, ευαισθησίας ποικιλιών και κάθε άλλης παρενέργειας στα φυτά ή τα προϊόντα τους.

Δεν είναι φυτοτοξικό όταν εφαρμόζεται σύμφωνα με τις οδηγίες χρήσης. Για τις χρήσεις στα ανθοκομικά φυτά σε περίπτωση ποικιλιών ελάχιστα διαδεδομένων ή πρόσφατα εισηγμένων στη χώρα, να κάνετε δοκιμές μικρής έκτασης πριν επεκτείνετε την εφαρμογή σε ευρεία κλίμακα.

ΑΝΑΡΤΗΤΕΑ ΣΤΟ ΔΙΑΔΙΚΤΥΟ

9 Σήμανση σκευάσματος ¹ :	
10 Δηλώσεις προφύλαξης	<p>H319: Προκαλεί σοβαρό οφθαλμικό ερεθισμό. H361d: Υποπτο για πρόκληση βλάβης στο έμβρυο. H411: Τοξικό για τους υδρόβιους οργανισμούς, με μακροχρόνιες επιπτώσεις.</p>
11 Δηλώσεις επικινδυνότητας	<p>P102: Μακριά από παιδιά. P405: Φυλάσσεται κλειδωμένο. P270: Μην τρώτε, πίνετε, ή καπνίζετε, όταν χρησιμοποιείτε αυτό το προϊόν. P201: Εφοδιαστείτε με τις ειδικές οδηγίες πριν από τη χρήση. P280: Να φοράτε προστατευτικά γάντια /προστατευτικά ενδύματα / μέσα ατομικής προστασίας για τα μάτια /πρόσωπο.</p> <p>Σε περίπτωση επανεισόδου αμέσως μετά τον ψεκασμό, να φοράτε βαμβακερό μακρύ παντελόνι, μακρυμάνικο πουκάμισο και γάντια.</p> <p>SP1: Να μην ρυπαίνεται το νερό με το προϊόν ή τη συσκευασία του. Sp3: Για την προστασία των υδρόβιων οργανισμών, να αφήνετε απέκαστη ζώνη ασφαλείας 5 μέτρων σε καλλιέργειες πυρηνόκαρπων.</p> <p><i>EUH401: Για να αποφύγετε τους κινδύνους για την ανθρώπινη υγεία και το περιβάλλον, ακολουθήστε τις οδηγίες χρήσης.</i></p>

¹ Σύμφωνα με τον Κανονισμό 1272/2008 CLP όπως εκάστοτε ισχύει κατά την ημερομηνία κατάθεσης της αίτησης

12 Πρώτες βοήθειες -
Αντίδοτο

ΠΡΩΤΕΣ ΒΟΗΘΕΙΕΣ
Σε περίπτωση ατυχήματος ζητείστε αμέσως ιατρική συμβουλή και δείξτε αυτό το δοχείο, το Δελτίο Δεδομένων Ασφαλείας ή την ετικέτα.

P305+P351+P338: ΣΕ ΠΕΡΙΠΤΩΣΗ ΕΠΑΦΗΣ ΜΕ ΤΑ ΜΑΤΙΑ: Ξεπλύνετε προσεκτικά με νερό για αρκετά λεπτά. Εάν υπάρχουν φακοί επαφής, αφαιρέστε τους, εφόσον είναι εύκολο. Συνεχίστε να ξεπλένετε.

P337+P313: Εάν δεν υποχωρεί ο οφθαλμικός ερεθισμός: Συμβουλευθείτε / Επισκεφθείτε γιατρό.

P308+P313: ΣΕ ΠΕΡΙΠΤΩΣΗ έκθεσης ή πιθανής έκθεσης: Συμβουλευθείτε / Επισκεφθείτε γιατρό.

Κατάποση: Σε περίπτωση κατάποσης ζητήστε αμέσως ιατρική συμβουλή.

Εισπνοή: Σε περίπτωση ατυχήματος λόγω εισπνοής, απομακρύνετε το θύμα για καθαρό αέρα και αφήστε το να ηρεμήσει. Εφαρμόστε τεχνική αναπνοή εάν παρουσιαστεί δυσκολία κατά την αναπνοή και καλέστε αμέσως γιατρό.

Επαφή με το δέρμα: Μετά την επαφή με το δέρμα, πλύνετε αμέσως με άφθονο νερό και σαπούνι. Πλύντε τα ρούχα πριν τα ξαναφορεθούν.

Συμπτωματική θεραπεία. Δεν υπάρχει ειδικό αντίδοτο.
Τηλέφωνο Κέντρου Δηλητηριάσεων: 210-7793777

13 Προστασία των καταναλωτών

13.1 Για τις καλλιέργειες έχουν καθοριστεί από την Επιτροπή της ΕΕ κοινοτικά Ανώτατα Όρια Υπολειμμάτων (MRLs) με την αιτούμενη Ο.Γ.Π. (Ορθή Γεωργική Πρακτική)

Έχουν καθοριστεί οριστικά Ευρωπαϊκά MRLs στο Παράρτημα II του Κανονισμού 396/2005.

ΑΝΑΡΤΗΤΕΑ ΣΤΟ ΔΙΑΔΙΚΤΥΟ

13.2 Τελευταία επέμβαση πριν τη συγκομιδή ή πριν τη διάθεση στην αγορά όταν πρόκειται για μετασυλλεκτικές χρήσεις

Φυτικά προϊόντα	Ημέρες
Μηλιά, Αχλαδιά,Κυδωνιά	14
Βερικοκιά, Ροδακινιά, Νεκταρίνια	14
Αγκινάρα	14
Αμπέλι επιτραπέζιο	14
Αμπέλι οινοποιήσιμο	21
Φράουλες	3
Αγγούρι, Κολοκυθάκι, Κολοκύθα Πεπόνι, Καρπούζι	3
Τομάτα, Μελιτζάνα, Πυτεριά	3
Καπνός	14
Ανθοκομικά	Δ/Ο

Η παρακάτω τελευταία επέμβαση πριν τη συγκομιδή θα συμπληρωθεί όταν και εάν χορηγηθούν οι χρήσεις στις καλλιέργειες Σμέουρα και Βατόμουρα

Σμέουρα, Βατόμουρα	3
--------------------	---

14 Συνθήκες αποθήκευσης, χρονική σταθερότητα του σκευάσματος².

Να αποθηκεύεται στην αρχική του κλειστή συσκευασία σε χώρο δροσερό, ξηρό και καλά αεριζόμενο μακριά από το άμεσο ηλιακό φως.
Στις συνθήκες αυτές διατηρείται σταθερό για δύο (2) χρόνια.

15 Ανάκληση της έγκρισης/παράταση της έγκρισης

Η παρούσα άδεια διάθεσης στην αγορά μπορεί να ανακληθεί οποιαδήποτε στιγμή εάν οι όροι για την απόκτησή της δεν πληρούνται ή έπαψαν να πληρούνται ή παρασχέθηκαν πλαστά ή παραπλανητικά στοιχεία βάσει των οποίων χορηγήθηκε αυτή.

² Η ημερομηνία λήξης θα αναγράφεται στην ετικέτα εάν είναι μικρότερη των δύο (2) ετών

ΑΝΑΡΤΗΤΕΑ ΣΤΟ ΔΙΑΔΙΚΤΥΟ

16 Κατάλογος προστατευομένων μελετών

Στο [Παράρτημα III](#) της παρούσας καταγράφονται οι μελέτες στις οποίες στηρίχθηκε η παρούσα απόφαση καθώς και η περίοδος προστασίας αυτών. Οι μελέτες αυτές, πλην των εμπιστευτικών, παραμένουν στα αρχεία της ΣΕΑ στην διάθεση των ενδιαφερομένων.

17 Κατάθεση συμπληρωματικών στοιχείων/μελετών

Ο κάτοχος της έγκρισης οφείλει εντός 24 μηνών από την ημερομηνία έκδοσης της παρούσας απόφασης να προσκομίσει στην ΣΕΑ τα ακόλουθα:

- Αναλυτική Μελέτη ILV για το αμπέλι.
- Αναλυτική Μελέτη ILV για τα μούρα και τα σμέουρα.
- Μελέτη μεταβολισμού στα μηρυκαστικά.
- Πειράματα φυτοτοξικότητας για την καλλιέργεια της μελιτζάνας και της αχλαδιάς.
- Μελέτες που αφορούν τη διαδικασία οινοποίησης (fermentation trials) στη δόση των 30 κ.εκ./100 λίτρα ψεκ. υγρού.
- Μελέτες που αφορούν τα ποιοτικά χαρακτηριστικά (taint tests) των καλλιεργειών (τομάτα, φράουλα και πυρηνόκαρπα).

B Ανακαλούμε τη με αριθ. 6489 έγκριση κυκλοφορίας του φυτοπροστατευτικού προϊόντος (μυκητοκτόνο) TOPAS 100 EC, η οποία χορηγήθηκε με τη με αριθ. 79265/20.06.1988 Υπουργική Απόφαση όπως τροποποιήθηκε και ισχύει.

Συγκεκριμένα :

1. Επιτρέπεται από την υπογραφή της παρούσας η τιμολόγηση του σκευάσματος από τον κάτοχο της έγκρισης προς τα καταστήματα εμπορίας φυτοπροστατευτικών προϊόντων για 3 μήνες ακόμη.
2. Επιτρέπεται η πώληση των υπαρχόντων αποθεμάτων του σκευάσματος από τις υπόλοιπες επιχειρήσεις χονδρικής και λιανικής πώλησης φυτοπροστατευτικών προϊόντων για έξι επιπλέον μήνες από την υπογραφή της παρούσας.
3. Επιτρέπεται τη χρήση των υπαρχόντων αποθεμάτων του σκευάσματος από τους επαγγελματίες χρήστες για ένα επιπλέον έτος από την ημερομηνία της παραγράφου 2 ανωτέρω.
4. Ορίζεται ότι τυχόν αδιάθετες ή μη χρησιμοποιηθείσες ποσότητες του σκευάσματος μετά το πέρας των ορισθεισών προθεσμιών, θα πρέπει να επιστραφούν στον υπεύθυνο για τη διάθεση του σκευάσματος στην αγορά για επανεξαγωγή ή καταστροφή, με ευθύνη και δαπάνες αυτού.
5. Στους παραβάτες της παρούσας επιβάλλονται οι ποινικές και διοικητικές κυρώσεις που προβλέπονται από την ισχύουσα νομοθεσία.

ΑΝΑΡΤΗΤΕΑ ΣΤΟ ΔΙΑΔΙΚΤΥΟ

Γ Γενικές υποχρεώσεις

1. Ο κάτοχος της άδειας είναι υποχρεωμένος σε οποιαδήποτε χρονική στιγμή να ενημερώσει την ΣΕΑ για οποιοσδήποτε δυσμενείς επιπτώσεις στον άνθρωπο ή/και το περιβάλλον που περιήλθε σε γνώση τους από την χρήση του προϊόντος. Τυχόν απόκρυψη μιας τέτοιας πληροφορίας αποτελεί αδίκημα και διώκεται ποινικά ενώ παράλληλα ανακαλείται η έγκριση.
2. Ο κάτοχος της έγκρισης θα πρέπει να διατηρεί συνεχώς ενημερωμένους τους φακέλους του σκευάσματος που τηρούνται στην ΣΕΑ με βάση τα νεότερα επιστημονικά δεδομένα για οποιαδήποτε μελλοντική επανεξέταση.
3. Η ετικέτα του σκευάσματος θα είναι σύμφωνη με τον Κανονισμό 547/2011 και την παρούσα απόφαση.
4. Η διαφήμιση του σκευάσματος επιτρέπεται μόνο εφ' όσον είναι σύμφωνη με τους όρους της έγκρισης του σκευάσματος και την ισχύουσα νομοθεσία.
5. Για κάθε εγκεκριμένη συσκευασία να υποβληθεί στην ΣΕΑ τελική ετικέτα πριν το προϊόν με την συγκεκριμένη συσκευασία διατεθεί στην αγορά.
6. Ο κάτοχος της άδειας οφείλει να τηρεί για τουλάχιστον πέντε (5) χρόνια αρχείο των ποσοτήτων που εισάγει και διαθέτει στην αγορά του φυτοπροστατευτικού προϊόντος στο οποίο αναφέρεται η παρούσα απόφαση και να προσκομίσει τα στοιχεία αυτά στην ΣΕΑ όποτε αυτά ζητηθούν.
7. Η ενδιαφερόμενη εταιρεία έχει δικαίωμα να υποβάλει ένσταση εντός τριάντα (30) ημερών από την ανάρτηση αυτής στην ΔΙΑΥΓΕΙΑ.

Ο ΠΡΟΙΣΤΑΜΕΝΟΣ
ΤΗΣ ΓΕΝΙΚΗΣ ΔΙΕΥΘΥΝΣΗΣ ΦΥΤΙΚΗΣ
ΠΑΡΑΓΩΓΗΣ
α/α

Κ. ΑΓΓΕΛΑΚΗΣ



ΕΛΛΗΝΙΚΗ ΔΗΜΟΚΡΑΤΙΑ
ΥΠΟΥΡΓΕΙΟ ΑΓΡΟΤΙΚΗΣ ΑΝΑΠΤΥΞΗΣ &
ΤΡΟΦΙΜΩΝ
ΓΕΝΙΚΗ Δ/ΝΣΗ ΦΥΤΙΚΗΣ ΠΑΡΑΓΩΓΗΣ
Δ/ΝΣΗ ΠΡΟΣΤΑΣΙΑΣ ΦΥΤΙΚΗΣ ΠΑΡΑΓΩΓΗΣ
ΤΜΗΜΑ ΓΕΩΡΓΙΚΩΝ ΦΑΡΜΑΚΩΝ

Αθήνα 23-4-2009

Αριθ. Πρωτ.: 128413

Ταχ.Δ/ση: Α. Συγγρού 150
Ταχ. Κώδικας: 176 71, Αθήνα
FAX: 210-92 12 090
Πληροφορίες: Α. Φονταρά
Τηλέφωνο: 210-9287227

ΠΡΟΣ: 1) AGROLOGY ΠΑΠΑΟΙΚΟΝΟΜΟΥ ΑΒΕΕ
2) AGROTECHNICA O.B.E.E
3) ALAPIS CropScience A.E.
4) ANORTKAXHM A.E.
5) ΔΑΠΑΦΑΡΜ ΑΕ
6) DELTA GAMMA AGRO ΑΒΕΕ
7) ΕΛΛΑΙΡΕΤ ΑΒΕΕ
8) ΕΛΤΟΝ ΔΙΕΘΝΟΥΣ ΕΜΠΟΡΙΟΥ
9) ΙΝΑΓΚΡΟ ΕΠΕ
10) ΝΙΤΡΟΦΑΡΜ Α.Ε.
11) ΥΨΙΛΟΝ ΑΕ
12) Syngenta Hellas ΑΕΒΕ
13) ΦΑΡΜΑ-ΧΗΜ ΑΒΕΕ
14) ΧΕΛΛΑΦΑΡΜ Α.Ε.
15) VECTOR AGRO Α.Ε.

ΘΕΜΑ: "Τροποποίηση των εγκρίσεων των φυτοπροστατευτικών προϊόντων (μυκητοκτόνα), που περιέχουν τη δραστική ουσία penconazole, ως προς τη σήμανση."

ΚΟΙΝ.: 1) Γραφείο Υφυπουργού κ. Κ. Κιλιτσή
2) Γραφείο Γ. Γρ. κ. Κ. Σκιαδά
3) Μπανάκειο Φυτοπαθολογικό Ινστιτούτο
Τμήμα Ελέγχου Γεωργικών Φαρμάκων
Εκάλης 2, 145 61 Κηφισιά
4) Π.Κ.Π.Φ. & Π.Ε.- Έδρες τους
5) Νομαρχιακές Αυτοδιοικήσεις
Δ/σεις Αγροτικής Ανάπτυξης (με e-mail),
6) Τμήματα Β, Γ & Ε της Δ/σής μας
7) Γραμματεία της Δ/σής μας

ΑΠΟΦΑΣΗ

Ο

ΥΠΟΥΡΓΟΣ ΑΓΡΟΤΙΚΗΣ ΑΝΑΠΤΥΞΗΣ ΚΑΙ ΤΡΟΦΙΜΩΝ

Έχοντας υπόψη:

1. Τις διατάξεις του Π.Δ. 115/15-5-1997 (Α' 104/30-5-1997) για "την έγκριση, διάθεση στην αγορά και έλεγχο των φυτοπροστατευτικών προϊόντων σε συμμόρφωση προς την οδηγία 91/414/ΕΟΚ του Συμβουλίου όπως έχει συμπληρωθεί" και ειδικότερα το άρθρο 4, (παρ. 6).
2. Τη με αριθ. 83345/28-7-88 (ΦΕΚ 599/Β/24-8-88) απόφασή μας όσον αφορά «τον καθορισμό και την τυποποίηση της σήμανσης και των προφυλάξεων των γεωργικών φαρμάκων», όπως ισχύει σήμερα.
3. Τη με αριθ. 265/2002/3-9-2002 (ΦΕΚ 1214/Β'/19-9-2002) ΚΥΑ με θέμα την «ταξινόμηση, συσκευασία και επισήμανση επικίνδυνων παρασκευασμάτων», καθώς και τη με αριθ. 108114/30-7-2003 (ΦΕΚ 1121/Β'/8-8-2003) Απόφασή μας, με θέμα τη «διαδικασία και προϋποθέσεις εφαρμογής της ΚΥΑ 265/2002 στα φυτοπροστατευτικά προϊόντα και βιοκτόνα».
4. Το με αριθ. Πρωτ. ΕΜΠ 380/16-3-2009 έγγραφο του Μ.Φ.Ι με το αντίστοιχο Υπηρεσιακό Σημείωμα του Εργαστηρίου Τοξικολογικού ελέγχου Γεωργικών Φαρμάκων.
5. Το Π.Δ. 206/2007 /(ΦΕΚ 232/Α/19-9-2007) «Διορισμός Υπουργών και Υφυπουργών».

6. Τη με αριθ. 263545/4-1-2008 (ΦΕΚ 47/Β'/18-1-2008) απόφαση του Υπουργού Αγροτικής Ανάπτυξης και Τροφίμων για «μεταβίβαση στους Γενικούς Γραμματείς, Ειδικό Γραμματέα, Προϊσταμένους Γενικής Διεύθυνσης, Προϊσταμένους Διεύθυνσης και Προϊσταμένους Τμήματος της εξουσίας να υπογράψουν με “Έντολή Υπουργού”»

Αποφασίζουμε

I. Τροποποιούμε τις εγκρίσεις διάθεσης στην αγορά των φυτοπροστατευτικών προϊόντων (μυκητοκτόνα), που περιέχουν τη δραστική ουσία **penconazole** και περιλαμβάνονται στον παρακάτω πίνακα, ως προς τη **σήμανση**, (παράγραφος 16 και 17 των Υ.Α. των εγκρίσεών τους), επειδή με βάση τις τοξικολογικές ιδιότητες της δ.ο. penconazole, τα φυτοπροστατευτικά προϊόντα που την περιέχουν ταξινομούνται ως τοξικά στην ανάπτυξη κατηγορίας 3 με τη φράση κινδύνου **R63 [Πιθανός κίνδυνος δυσμενών επιδράσεων στο έμβρυο κατά τη διάρκεια της κύησης]** και παίρνουν το σύμβολο **Xn- Επιβλαβές**.

Α/Α	ΑΡΙΘΜΟΣ ΕΓΚΡΙΣΗΣ	ΕΜΠΟΡΙΚΟ ΟΝΟΜΑ	ΚΑΤΟΧΟΣ ΤΗΣ ΕΓΚΡΙΣΗΣ / ΥΠΕΥΘΥΝΟΣ ΕΠΙΚΟΙΝΩΝΙΑΣ	ΔΡΑΣΤΙΚΗ ΟΥΣΙΑ
1	6668	ΤΟΠΛΑΣ 20 EW	Syngenta Hellas A.E.B.E.	penconazole
2	60046	ΤΟΡΕΝΚΟ 10 EC	ΑΝΟΡΓΚΑΧΗΜ Α.Ε.	penconazole
3	60048	FAST 10 EC	ALAPIS CropScience ΑΕ	penconazole
4	60057	ΡΟΕΜ 10 EC	ΦΑΡΜΑ-ΧΗΜ ΑΒΕΕ	penconazole
5	60080	PENCONAZOLE AGROLOGY 10 EC	AGROLOGY ΠΑΠΑΔΟΚΟΝΟΜΟΥ Α.Β.Ε.Ε.	penconazole
6	60105	PENCONAZOLE VECTOR 10 EC	VECTOR AGRO Α.Ε.	penconazole
7	60119	KRILL 10 EC	ΧΕΛΛΑΦΑΡΜ ΑΕ	penconazole
8	60129	PENCONAZOLE AGROTECHNICA 10 EC	AGROTECHNICA Ο.Β.Ε.Ε.	penconazole
9	60180	PENCONAZOLE- ΛΑΠΑΦΑΡΜ 10 EC	ΛΑΠΑΦΑΡΜ ΑΕ	penconazole
10	60208	PENCONAZOLE-DGA 10 EC	DELTA GAMMA AGRO Α.Β.Ε.Ε.	penconazole
11	60222	PENCONAZOLE- ΙΝΑΓΚΡΟ 10 EC	ΙΝΑΓΚΡΟ ΕΠΕ	penconazole
12	60224	PENCONAZOLE- ΝΙΤΡΟΦΑΡΜ 10 EC	ΝΙΤΡΟΦΑΡΜ ΑΕ	penconazole
13	60227	HELSTAR 10 EC	ΕΛΛΑΓΡΕΤ ΑΒΕΕ	penconazole
14	60232	PENCONAZOLE SAPEC 10 EC	ΕΛΤΟΝ ΔΙΕΘΝΟΥΣ ΕΜΠΟΡΙΟΥ ΑΕΒΕ	penconazole
15	60233	CONFER 10 EC	ΥΨΙΛΟΝ ΑΕ	penconazole

Συγκεκριμένα στην υπάρχουσα σήμανση του κάθε φυτοπροστατευτικού προϊόντος, που περιλαμβάνεται στον πίνακα, προστίθενται οι ακόλουθες επιπλέον σημάνσεις:

16. Σημάνσεις τοξικότητας:
Xn- Επιβλαβές

17. Κίνδυνοι για τον άνθρωπο (R φράσεις):
R63 Πιθανός κίνδυνος δυσμενών επιδράσεων στο έμβρυο κατά τη διάρκεια της κύησης.

II. Ως προς τα λοιπά στοιχεία ισχύουν οι υπάρχουσες Υπ. Αποφάσεις των ανωτέρω φυτοπροστατευτικών προϊόντων, όπως ισχύουν σήμερα.

Ε. Υ.
Ο ΓΕΝΙΚΟΣ ΓΡΑΜΜΑΤΕΑΣ



ΑΚΡΙΒΕΣ ΑΝΤΙΓΡΑΦΟ

Κ. ΣΚΙΑΔΑΣ

ΣΤ. ΣΕΝΗ

6.4. Μεταβολίτες που ανιχνεύθηκαν και διαθέσιμες πληροφορίες

(βλέπε συνοδευτικό αρχείο σε μορφή excel)