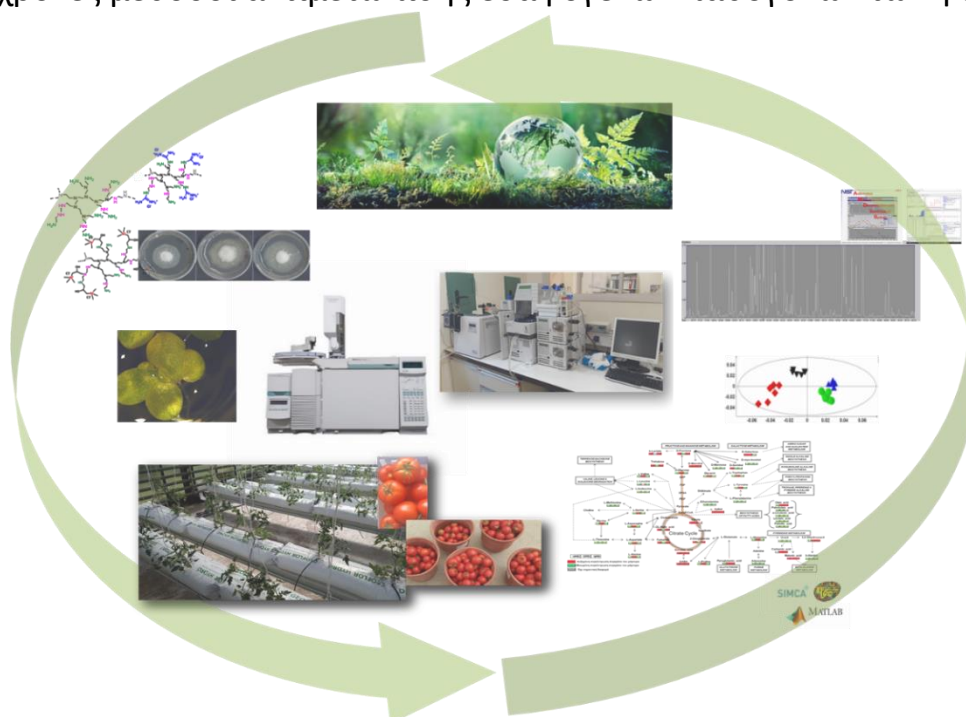




**ΓΕΩΠΟΝΙΚΟ ΠΑΝΕΠΙΣΤΗΜΙΟ ΑΘΗΝΩΝ
ΤΜΗΜΑ ΕΠΙΣΤΗΜΗΣ ΦΥΤΙΚΗΣ ΠΑΡΑΓΩΓΗΣ
ΕΡΓΑΣΤΗΡΙΟ ΓΕΩΡΓΙΚΗΣ ΦΑΡΜΑΚΟΛΟΓΙΑΣ**

Διδακτορική Διατριβή

Σύγχρονες μέθοδοι αντιμετώπισης εδαφογενών παθογόνων των φυτών



Μαρία Λυκογιάννη

Επιβλέπων Καθηγητής:

Κωνσταντίνος Α. Αλιφέρης, Επίκουρος Καθηγητής ΓΠΑ

Τριμελής Συμβουλευτική Επιτροπή:

Κωνσταντίνος Α. Αλιφέρης, Επίκουρος Καθηγητής ΓΠΑ

Δημήτριος Τσιτσιγιάννης, Καθηγητής ΓΠΑ

Ωραιοζήλη Σιδεράτου, Ερευνήτρια Α' ΕΚΕΦΕ Δημόκριτος



ΑΘΗΝΑ 2023

**ΓΕΩΠΟΝΙΚΟ ΠΑΝΕΠΙΣΤΗΜΙΟ ΑΘΗΝΩΝ
ΤΜΗΜΑ ΕΠΙΣΤΗΜΗΣ ΦΥΤΙΚΗΣ ΠΑΡΑΓΩΓΗΣ
ΕΡΓΑΣΤΗΡΙΟ ΓΕΩΡΓΙΚΗΣ ΦΑΡΜΑΚΟΛΟΓΙΑΣ**

Διδακτορική Διατριβή

Σύγχρονες μέθοδοι αντιμετώπισης εδαφογενών παθογόνων των φυτών

Novel plant protection methods against soil borne plant pathogens

Μαρία Λυκογιάννη



Επταμελής Εξεταστική Επιτροπή:

Κωνσταντίνος Α. Αλιφέρης, Επίκουρος Καθηγητής Γ.Π.Α.

Δημήτριος Τσιτσιγιάννης, Καθηγητής Γ.Π.Α.

Ωραιοζήλη Σιδεράτου, Ερευνήτρια Α' ΕΚΕΦΕ Δημόκριτος

Δημήτριος Σάββας, Καθηγητής Γ.Π.Α.

Σωτήριος Τζάμος, Αναπληρωτής Καθηγητής Γ.Π.Α.

Φιλίτσα Καραμαούνα, Ερευνήτρια Α' Μ.Φ.Ι.

Κωνσταντίνος Γκρίντζαλης, Επίκουρος Καθηγητής, Dublin City University

Περίληψη

Η βιώσιμη γεωργία είναι ένα πολύπλοκο και πολύπλευρο ζήτημα. Από άποψη φυτοπροστασίας, οι ασθένειες των φυτών μπορούν να οδηγήσουν σε σημαντική μείωση της παραγωγής εκ των όποιων τα εδαφογενή παθογόνα αποτελούν μία πολύ σημαντική πρόκληση καθώς υπάρχει έλλειψη σε φυτοφάρμακα για την αντιμετώπισή τους. Ως αποτέλεσμα αυτού, είναι επιτακτική η ολιστική προσέγγιση και απαραίτητη η εύρεση καινοτόμων λύσεων για την αντιμετώπισή τους.

Σε αυτό το πλαίσιο, στην παρούσα διδακτορική διατριβή, αρχικά ελέγχθηκαν η αποτελεσματικότητα και η φυτοτοξικότητα νανοσωματιδίων υπερδιακλαδισμένης πολυαιθυλενιμίνης (HPEI) με διαφορετικά μοριακά βάρη (5000 και 25000 Da) καθώς και των παραγώγων της που προέκυψαν από την τροποποίηση του HPEI με ομάδες γουανιδίνης (GPEI) ή ομάδες τεταρτοταγούς αμμωνίου (QPEI) με στόχο τη διευρεύνηση της αξιοποίησής τους ως καινοτόμες δραστικές ουσίες στην αντιμετώπιση των εδαφογενών φυτοπαθογόνων. Τα αποτελέσματα έδειξαν την επίδραση του μοριακού βάρους, το οποίο ήταν ανάλογο με τη βιοδραστικότητά τους, καθώς και των τελικών ομάδων, όπου το QPEI ήταν το λιγότερο τοξικό.

Με βάση αυτά τα αποτελέσματα επιλέχθηκαν τρία νανοσωματίδια (HPEI, GPEI, QPEI) με ίδιο μοριακό βάρος (25000 Da) για την περαιτέρω μελέτη της αποτελεσματικότητας στο εδαφογενές φυτοπαθογόνο *Verticillium dahliae*, και η επίδρασή τους στο μεταβολισμό του. Η συγκριτική μελέτη των HPEI, GPEI, QPEI έδειξε ότι η τροποποίησή του HPEI με τεταρτοταγείς αμμωνιακές ομάδες (QPEI) οδηγεί σε μειωμένη αποτελεσματικότητα έναντι της μυκηλιακής ανάπτυξης του μύκητα, ενώ η τροποποίηση με γουανιδινικές ομάδες (GPEI) έχει ως αποτέλεσμα υψηλότερη τοξικότητα στο *V. dahliae*. Η μεταβολομική ανάλυση έδειξε ότι τα νανοσωματίδια έχουν ξεχωριστό μηχανισμό τοξικότητας. Ωστόσο, με βάση τα αποτελέσματα των αναλύσεων με το GC/EI/MS δεν μπορούν να εξαχθούν ασφαλή συμπεράσματα για τον ακριβή μηχανισμό δράσης τους. Επίσης, δημιουργήθηκε ηλεκτρονική βιβλιοθήκη με τους μεταβολίτες που ανιχνεύτηκαν. Η παρούσα εργασία αποτελεί την πρώτη μελέτη του μεταβολισμού του βερτισιλλίου. Τα αποτελέσματα συνολικά ενίσχυσαν την ιδέα της πιθανής αξιοποίησής των υπό εξέταση νανοσωματιδίων ως καινοτόμα φυτοπροστατευτικά προϊόντα, για αυτό το λόγο στην συνέχεια εξετάστηκε η επίδρασή τους στην ανάπτυξη της λέμνας (*Lemna minor* L.). Παρόμοια με τα αποτελέσματα στο βερτισίλλιο, αποδείχθηκε η επίδραση της εισαγωγής τελικών ομάδων, όπου και πάλι το QPEI ήταν το λιγότερο τοξικό, καθώς επίσης επισημάνθηκε η επίδραση των τελικών ομάδων στο μηχανισμό τοξικότητάς τους. Επιπρόσθετα, επισημάνθηκε η σημασία της εξέτασης και μικρότερων δόσεων για την καλύτερη κατανόηση της επίδρασης των νανοσωματιδίων.

Τέλος, βρέθηκε ότι η λέμνα αυξάνει τη δραστηριότητα των αντιοξειδωτικών ενζύμων ως απόκριση στο στρες που προκαλούν τα νανοσωματίδια.

Σε δεύτερο στάδιο, μελετήθηκε η επίδραση της εφαρμογής υποχλωριώδους νατρίου κατά την απολύμανση του θρεπτικού διαλύματος (ΘΔ) υδροπονικής καλλιέργειας τομάτας στην θρέψη, ανάπτυξη και παραγωγή των φυτών τομάτας καθώς και την ασφάλεια των τελικών προϊόντων. Η απολύμανση του ΘΔ αποτελεί συνήθη γεωργική πρακτική για την αντιμετώπιση των εδαφογενών παθογόνων που αναπτύσσονται σε αυτό, χωρίς αυτό να υποστηρίζεται από πειραματικά δεδομένα σχετικά με την επίδραση της μεθόδου στα καλλιεργούμενα φυτά. Τα αποτελέσματα αυτής της μελέτης έδειξαν ότι το εφαρμοζόμενο πρωτόκολλο απολύμανσης δεν προκάλεσε προβλήματα φυτοτοξικότητας ή θρέψης στην καλλιέργεια της τομάτας. Η συγκέντρωση των $2,5 \mu\text{g mL}^{-1}$ χλωρίου οδήγησε σε σημαντική αύξηση της παραγωγής για την οποία απαιτείται περαιτέρω διερεύνηση για την εξήγηση αυτής της αύξησης. Επιπλέον, η ανάλυση υπολειμμάτων στους καρπούς της extra κλάσης έδειξε ότι δεν περιείχαν υπολείμματα των τοξικών για τον άνθρωπο χλωρικών και υπερχλωρικών ιόντων. Τέλος, κατά την φυτοπροστασία της καλλιέργειας με βάση τις αρχές της Ολοκληρωμένης Διαχείρισης Εχθρών και Ασθενειών (IPM) εφαρμόστηκε spinosad για την αντιμετώπιση του λεπιδόπτερου *Tuta absoluta*. Για αυτό το λόγο, πραγματοποιήθηκε, επιπλέον, ανάλυση υπολειμμάτων στην οποία δεν βρέθηκαν υπολείμματα spinosad, συσχετίζοντας την υδροπονική καλλιέργεια με την παραγωγή ασφαλέστερων τροφίμων.

Αναγνωρίζοντας, λοιπόν, το διεπιστημονικό χαρακτήρα της αειφορικής αντιμετώπισης των εδαφογενών παθογόνων η παρούσα διατριβή απαντά σχετικά ερωτήματα προσπαθώντας να ενισχύσει τη βιώσιμη γεωργία.

Επιστημονική Περιοχή: Έρευνα και ανάπτυξη γεωργικών φαρμάκων

Λέξεις κλειδιά: Νανοτεχνολογία, αποτελεσματικότητα νάνο-φυτοπροστατευτικών προϊόντων, οικοτοξικότητα νάνο-φυτοπροστατευτικών προϊόντων, μεταβολομική ανάλυση, οξειδωτικό στρες, όρμηση, υδροπονία, τομάτα, χλωρικά ιόντα, υπολείμματα, ασφάλεια τροφίμων

Novel plant protection methods against soil borne plant pathogens

Department of Crop Science
Laboratory of Pesticide Science

Abstract

Sustainability in agriculture is a complex and multifaceted issue. In terms of plant protection, plant diseases can lead to significant reduction in yield of crops and soilborne pathogens are a major challenge as there is a shortage of pesticides against them. As a result, a holistic approach is imperative and innovative solutions need to be found against them.

Within this context, in the present dissertation, the efficacy and phytotoxicity of hyperbranched polyethyleneimine (HPEI) nanoparticles with different molecular weights and ending functional groups - with guanidinium (GPEI) groups and quaternary ammonium groups (QPEI) were tested to clarify if they could be employed against soilborne phytopathogens. The results showed the effect of molecular weight, which was proportional to their bioactivity, as well as the effect of the ending functional groups, since it was found that QPEI was the least toxic. Based on these results, three nanoparticles (HPEI, GPEI, QPEI) with the same molecular weight (25000 Da) were selected to further study their efficacy and ecotoxicity. In more detail, the efficacy of these nanoparticles in the soilborne pathogen *Verticillium dahliae*, and their effect on its metabolism, were examined. The comparative study of HPEI, GPEI and QPEI showed that the functionalization of HPEI with quaternary ammonium groups (QPEI) leads to reduced efficacy against the fungus, while the functionalization with guanidinium groups (GPEI) results in higher toxicity against *V. dahliae*. Furthermore, according to the metabolomics analysis, the nanoparticles seem to possess a distinct mechanism of action. However, the data obtained from the chemical analysis with GC/EI/MS are not sufficient to detect their exact mode of action. Moreover, an electronic library was created with the metabolites detected. Also, to the best of our knowledge, this is the first study of the metabolism of *Verticillium dahliae* in literature. Altogether, the results reinforced the idea of the possible use of HPEI-based nanoparticles as novel nanopesticides, for this reason their effect on the growth of *Lemna minor* L. was examined, too. Similarly to the results in the verticillium study, the effect of the type of the ending groups on the growth of *L. minor* was demonstrated since QPEI was found to be the least toxic, as well as the effect of the type of the ending groups on their mechanism of toxicity. Additionally, the importance of testing lower doses for a better understanding of the impact of nanoparticles was highlighted. Finally, *L. minor* was found to increase the activity of antioxidant enzymes in response to nanoparticles.

In the second step, the effect of disinfection of the nutrient solution in a hydroponic tomato culture by applying sodium hypochlorite was studied on the nutrition, growth and yield of tomato plants and the safety of tomato fruits. The disinfection of the nutrient solution is a common agricultural practice for the treatment of soilborne pathogens that grow in it. However,

there is a lack of corresponding knowledge-information from the academic community. The results of this study showed that the disinfection protocol applied did not cause any phytotoxicity or nutritional problems in tomatoes. In fact, the concentration of $2.5 \mu\text{g mL}^{-1}$ chlorine led to a significant increase in yield. However, further investigation is needed to explain this increase. Moreover, residues analysis of the fruits (extra class) showed that they did not contain residues toxic to humans' chlorates and perchlorates. Finally, during the applied plant protection of tomato culture based on the principles of IPM, a spinosad-based insecticide was used to control the lepidoptera *Tuta absoluta* infestation. For this reason, an additional residue analysis was performed in which no spinosad residues were found, pointing out thus that the applied plant protection based on IPM enhances the safety of the tomato fruits. Recognizing the interdisciplinary nature of the sustainable management of soilborne pathogens, this dissertation answers relevant questions in an effort to enhance sustainable agriculture.

Scientific area: Research and development of pesticides

Keywords: Nanotechnology, nano-pesticides' efficacy, nano-pesticides' ecotoxicity, metabolomics, oxidative stress, hormesis, hydroponics, tomato, chlorates, residues, food safety

Η έγκριση της Διδακτορικής Διατριβής από το Τμήμα Επιστήμης Φυτικής Παραγωγής της Σχολής Αγροτικής Παραγωγής Υποδομών & Περιβάλλοντος του Γεωπονικού Πανεπιστημίου Αθηνών δεν υποδηλώνει την αποδοχή των γνώμων του συγγραφέως (Ν. 5343/1932, άρθρο 202, παρ.2).

Με την άδειά μου, η παρούσα εργασία ελέγχθηκε από την Εξεταστική Επιτροπή μέσα από λογισμικό ανίχνευσης λογοκλοπής που διαθέτει το ΓΠΑ και διασταυρώθηκε η εγκυρότητα και η πρωτοτυπία της.

Το έργο συγχρηματοδοτείται από την Ελλάδα και την Ευρωπαϊκή Ένωση (Ευρωπαϊκό Κοινωνικό Ταμείο) μέσω του Επιχειρησιακού Προγράμματος «Ανάπτυξη Ανθρώπινου Δυναμικού, Εκπαίδευση και Διά Βίου Μάθηση», στο πλαίσιο της Πράξης «Ενίσχυση του ανθρώπινου ερευνητικού δυναμικού μέσω της υλοποίησης διδακτορικής έρευνας – 2^{ος} Κύκλος» (MIS-5000432), που υλοποιεί το Ίδρυμα Κρατικών Υποτροφιών (ΙΚΥ)



Επιχειρησιακό Πρόγραμμα
Ανάπτυξη Ανθρώπινου Δυναμικού,
Εκπαίδευση και Διά Βίου Μάθηση

Με τη συγχρηματοδότηση της Ελλάδας και της Ευρωπαϊκής Ένωσης



Στην οικογένειά μου
Θαλή, Χριστίνα, Δημήτρη, Νίκο, Εύη,
Στον θείο Θοδωρή
και στον Δημήτρη μου

It is not the critic who counts; not the man who points out how the strong man stumbles, or where the doer of deeds could have done them better. The credit belongs to the man who is actually in the arena, whose face is marred by dust and sweat and blood; who strives valiantly; who errs, who comes short again and again, because there is no effort without error and shortcoming; but who does actually strive to do the deeds; who knows great enthusiasms, the great devotions; who spends himself in a worthy cause; who at the best knows in the end the triumph of high achievement, and who at the worst, if he fails, at least fails while daring greatly.

Theodore Roosevelt

Ευχαριστίες

Η παρούσα διατριβή με τίτλο «Σύγχρονες μέθοδοι αντιμετώπισης εδαφογενών παθογόνων των φυτών» πραγματοποιήθηκε κυρίως στο εργ. Γεωργικής Φαρμακολογίας υπό την επίβλεψη του Επίκουρου Καθηγητή κ. Κωνσταντίνου Α. Αλιφέρη. Η διατριβή χρηματοδοτήθηκε από το Ίδρυμα Κρατικών Υποτροφιών (ΙΚΥ).

Αρχικά, θα ήθελα να ευχαριστήσω τον κ. Αλιφέρη για το ενδιαφέρον θέμα που μου ανέθεσε. Επίσης, πολύτιμη ήταν η παρότρυνσή του να ασχοληθώ με πολλές και διαφορετικές πλευρές στην αντιμετώπιση των εδαφογενών παθογόνων και γενικότερα να κατανοήσω καλύτερα την πολυπλοκότητα της βιώσιμης γεωργίας. Ευχαριστώ, ακόμη, για τις συμμετοχές μου σε διεθνή και ελληνικά συνέδρια, και σε δημοσιεύσεις σε επιστημονικά περιοδικά.

Επίσης, ευχαριστώ τα μέλη της τριμελούς συμβουλευτικής επιτροπής Ερευνήτρια Α' κ. Ζήλη Σιδεράτου και Καθηγητή κ. Δημήτριο Τσιτσιγιάννη, για το ενδιαφέρον τους κατά τη διάρκεια της μελέτης, καθώς και διορθώσεις κατά την συγγραφή του τελικού κειμένου. Επίσης, θα ήθελα να ευχαριστήσω τον Ερευνητή Α' κ. Δημήτριο Τσιούρβα, ο οποίος μαζί με την κ. Σιδεράτου συνέβαλε στις δημοσιεύσεις που αφορούν τα νανοσωματίδια που μελετήθηκαν.

Για την εκπόνηση της παρούσας διδακτορικής διατριβής σημαντική ήταν η συμβολή των Καθηγητών κ. Δημήτριου Σάββα και κ. Σπυρίδωνος Κίντζιου καθώς το πείραμα της υδροπονίας πραγματοποιήθηκε στο εργ. Κηπευτικών Καλλιεργειών και οι αναλύσεις ROS και αντιοξειδωτικών ενζύμων στο εργ. Κυτταρικής Τεχνολογίας του Γ.Π.Α. Επιπλέον, ένα θερμό ευχαριστώ στην Ερευνήτρια Β' κ. Φιλίτσα Καραμαούνα για τις σημαντικές διορθώσεις και σχόλια στη συγγραφή της δημοσίευσης που αφορά στην εισαγωγή της διατριβής. Ακόμη, ευχαριστώ τα μέλη της εφταμελούς επιτροπής κ. Τζάμο Σωτήριο και Γκρίντζαλη Κωνσταντίνο για τη συμμετοχή τους στην επιτροπή και τις πολύτιμες διορθώσεις-παρατηρήσεις τους στο κείμενο της διατριβής.

Θα ήθελα, ακόμη, να εκφράσω τη βαθιά μου ευγνωμοσύνη στις Επίκουρες Καθηγήτριες κ. Γεωργία Ντάτση και κ. Σοφία Μαυρίκου και στην Ερευνήτρια Γ' κ. Ελευθερία Μπεμπέλου. Με την κ. Ντάτση συνεργαστήκαμε στο πείραμα της υδροπονίας, με την κ. Μαυρίκου στις αναλύσεις των ROS κι αντιοξειδωτικών ενζύμων και με την κ. Μπεμπέλου στις αναλύσεις υπολειμμάτων και στην δημοσίευση που αφορά στην εισαγωγή της διατριβής. Η στήριξή τους ήταν ουσιαστική, πολύτιμη και σημαντική τόσο σε επιστημονικό όσο και σε προσωπικό επίπεδο.

Σε αυτό το σημείο θα ήθελα να ευχαριστήσω τους συναδέλφους Σπύρο Βλογιαννίτη, Γιάννη Καραβίδα, Βασίλη Τσεκούρα και Δανάη Γκίζη για την άψογη συνεργασία που είχαμε, ασταμάτητη ενθάρρυνση και υποστήριξη. Ακόμη, ευχαριστώ τους Γιάννη Καλαμπόκη, Ευαγγελία Μώρου, Βασιλική Βουγελέκα, Χρήστο Αναγνωστόπουλο για τη βοήθειά τους. Επιπλέον, κατά τη διάρκεια της διατριβής είχα την τύχη και χαρά να συνεργαστώ με τους Εβίνα Παπαδοπούλου, Νίκο Μπαρκολιά, Στέφανο Κολαΐνη, Σοφία Κωστοπούλου, Αναστασία Κωλέττη, Μαρία Κουτρουμάνου και Εύα Αλεξανδρή από το εργ. Γεωργικής Φαρμακολογίας,

Μαρία Θεοδωρακοπούλου, Αθανασία Παπακώστα, Νικόλα Ανδρέου, Μαρτίνα Χατζηγιάννη και Θεοδώρα Ντανάση από το εργ. Κηπευτικών Καλλιέργειών τους οποίους ευχαριστώ για το όμορφο κλίμα και τις ωραίες αναμνήσεις που παίρνω μαζί. Ιδιαίτερα ευχαριστώ τις συναδέλφους Δήμητρα Καραμάνου και Ελευθερία Φωτοπούλου, καθώς ο χρόνος που περάσαμε παρέα στο Εργαστήριο ήταν η πιο ωραία περίοδος του διδακτορικού. Επιπλέον, ευχαριστώ τα παιδιά Εύα, Μαξ, Φιλιάννα και όλο το PMG group για το χαρούμενο περιβάλλον στο Εργαστήριο Γεωργικής Φαρμακολογίας του Γ.Π.Α.

Ευχαριστώ και τους συναδέλφους μου στο Μπενάκειο Φυτοπαθολογικό Ινστιτούτο Δώρα Νικολοπούλου, Στέλιο Μπούρα, Φίλιππο Μυλωνά, Βαγγέλη Καρανάσιο, Νικολέττα Ντάλλη, Θανάση Γιατρόπουλο, Αργυρώ Αμπατζή, Μυρτώ Μπαρδά και Μαρία Σαμαρά καθώς και τον Γιώργο Κολιόπουλο γιατί ήταν πάντα υποστηρικτικοί, ενθαρρυντικοί και υπομονετικοί μαζί μου κάθε φορά που τους απασχολούσα με τις ανησυχίες μου για το διδακτορικό. Για τους ίδιους λόγους ευχαριστώ πολύ και την Ερευνήτρια Α' Αιμιλία Μαρκέλλου.

Ένα μεγάλο ευχαριστώ στους φίλους μου Εύα, Παναγιώτη, Mariana cute, Γιώργο, Τάσο, Μαριάννα, Χριστίνα, Σοφούλι και δάσκαλο Κωνσταντίνο, Γιάννη, στις Κατερίνα και Μαρία, και στα ξαδέρφια μου Ιωάννα, Μάγδα και Μαρίνο.

Κατά το διάστημα, 2018-2022, όπως αναφέρθηκα νωρίτερα, ήμουν υπότροφος του ΙΚΥ και τους ευχαριστώ για τη σημαντική οικονομική υποστήριξη.

Τέλος, θα ήθελα να ευχαριστήσω την οικογένειά μου που πίστεψαν σε μένα και με έμαθαν να μην τα παρατάω όσες και αν είναι οι δυσκολίες, να κοιτάζω μπροστά χωρίς φόβο και να προσπαθώ να προοδεύω.

Ευχαριστώ ιδιαίτερα τον Δημήτρη μου, που συμπορεύεται ηρωικά μαζί μου όλο αυτό το διάστημα και τον μικρό Θαλή μου, που μου έδωσε δύναμη και επιπλέον κίνητρο για να ολοκληρώσω αυτό το πόνημα.

Περιεχόμενα

Περίληψη	iii
Abstract.....	v
Περιεχόμενα.....	i
Ευχαριστίες.....	x
Γενικό μέρος. Το πρόβλημα των εδαφογενών φυτοπαθογόνων	1
Κεφάλαιο 1. Εισαγωγή	2
1.1 Η βιώσιμη γεωργία	2
1.2 Η σύγχρονη χημική φυτοπροστασία	6
1.3 Το πρόβλημα των εδαφογενών φυτοπαθογόνων.....	11
1.4 Καινοτόμες λύσεις.....	12
1.4.1 Νανοτεχνολογία – Βιοδραστικά νανοσωματίδια	14
1.4.2 Καλλιέργειες εκτός εδάφους – Απολύμανση θρεπτικού διαλύματος	17
1.5 Σκοπός της μελέτης.....	21
Ειδικό μέρος. Σύγχρονες λύσεις αντιμετώπισης εδαφογενών φυτοπαθογόνων	22
Ειδικό μέρος Ι. Η χρήση νανοσωματιδίων ως καινοτόμες δραστικές ουσίες στη σύγχρονη φυτοπροστασία.....	24
Κεφάλαιο 2. Αξιολόγηση της αποτελεσματικότητας και φυτοτοξικότητας νανοσωματιδίων υπερδιακλαδισμένης πολυαιθυλενιμίνης	25
2.1 Εισαγωγή.....	25
2.2 Υλικά και Μέθοδοι	27
2.2.1 Χημικά και αντιδραστήρια	27
2.2.2 Βιολογικό υλικό.....	29
2.2.3 Μελέτη της επίδρασης των νανοσωματιδίων με βάση παράγωγα της υπερδιακλαδισμένης πολυαιθυλενιμίνης σε φυτοπαθογόνους μύκητες και ωομύκητες	30
2.2.4 Μελέτη της επίδρασης των νανοσωματιδίων με βάση παράγωγα της υπερδιακλαδισμένης πολυαιθυλενιμίνης σε φυτικά είδη.....	31
2.3 Αποτελέσματα – Συζήτηση	32
2.3.1 Σύνθεση νανοσωματιδίων με βάση παράγωγα της υπερδιακλαδισμένης πολυαιθυλενιμίνης	32

2.3.2 Μυκητοτοξικότητα νανοσωματιδίων με βάση παράγωγα της υπερδιακλαδισμένης πολυαιθυλενιμίνης	34
2.3.3 Βιοδραστικότητα των νανοσωματιδίων με βάση παράγωγα της υπερδιακλαδισμένης πολυαιθυλενιμίνης στη βλαστικότητα σπόρων μαρουλιού και τομάτας.....	39
2.3.4 Βιοδραστικότητα των νανοσωματιδίων με βάση παράγωγα της υπερδιακλαδισμένης πολυαιθυλενιμίνης στην επιμήκυνση του ριζιδίου σπόρων αγγουριού και τομάτας.....	41
2.3.5 Τοξικότητα των νανοσωματιδίων με βάση παράγωγα της υπερδιακλαδισμένης πολυαιθυλενιμίνης στη φυλλική επιφάνεια αγριοβρώμης (<i>Avena sterilis</i> L.) και βρώμης (<i>Avena sativa</i> L.)	43
2.4 Συμπεράσματα.....	44
Κεφάλαιο 3. Επίδραση νανοσωματιδίων με βάση παράγωγα της υπερδιακλαδισμένης πολυαιθυλενιμίνης στο μεταβολισμό του μύκητα <i>Verticillium dahliae</i>	45
3.1 Εισαγωγή.....	45
3.2 Υλικά και Μέθοδοι.....	47
3.2.1 Χημικά και αντιδραστήρια που χρησιμοποιήθηκαν κατά τη μεταβολομική ανάλυση ..	47
3.2.2 Βιολογικό υλικό.....	48
3.2.3 Εκτίμηση της τοξικότητας των νανοσωματιδίων με βάση παράγωγα της υπερδιακλαδισμένης πολυαιθυλενιμίνης στη μυκηλιακή ανάπτυξη του <i>Verticillium dahliae</i> Kleb	49
3.2.4 Μεταβολομική ανάλυση με εφαρμογή GC/EI/MS για την ανίχνευση της επίδρασης των νανοσωματιδίων με βάση παράγωγα της υπερδιακλαδισμένης πολυαιθυλενιμίνης στο μεταβολισμό του <i>Verticillium dahliae</i> Kleb	49
3.3 Αποτελέσματα – Συζήτηση	52
3.3.1 Αποτελεσματικότητα νανοσωματιδίων με βάση παράγωγα της υπερδιακλαδισμένης πολυαιθυλενιμίνης έναντι του <i>Verticillium dahliae</i>	52
3.3.2 Κατασκευή ειδικής βιβλιοθήκης GC/EI/MS μεταβολιτών για το <i>Verticillium dahliae</i>	54
3.3.3 Επισκόπηση της GC/EI/MS μεταβολομικής ανάλυσης του μύκητα <i>Verticillium dahliae</i>	55
3.3.4 Τα νανοσωματίδια με βάση παράγωγα της υπερδιακλαδισμένης πολυαιθυλενιμίνης προκαλούν διακριτές μεταβολές στο μεταβολικό προφίλ του <i>Verticillium dahliae</i>	56
3.3.5 Η επίδραση των νανοσωματιδίων με βάση παράγωγα της υπερδιακλαδισμένης πολυαιθυλενιμίνης στον μεταβολισμό του μύκητα <i>Verticillium dahliae</i>	61
3.4 Συμπεράσματα.....	65
Κεφάλαιο 4. Μελέτη της επίδρασης πολυμερικών νανοσωματιδίων στην ανάπτυξη της <i>Lemna minor</i> L. και ο ρόλος του οξειδωτικού στρες ως πιθανός μηχανισμός της τοξικότητάς τους	67

4.1	Εισαγωγή.....	67
4.2	Υλικά και Μέθοδοι.....	70
4.2.1	Νανοςωματίδια.....	70
4.2.2	Βιολογικό υλικό.....	71
4.2.3	Πειραματικό σχέδιο και μετρήσεις ανάπτυξης.....	71
4.2.4	Μελέτη του οξειδωτικού στρες που προκαλούν τα νανοςωματίδια με βάση τα παράγωγα της υπερδιακλαδισμένης πολυαιθυλενιμίνης στα φυτά της <i>Lemna minor</i> L.	72
4.2.5	Στατιστική ανάλυση.....	76
4.3	Αποτελέσματα – Συζήτηση.....	76
4.3.1	Η επίδραση των νανοςωματιδίων με βάση παράγωγα της υπερδιακλαδισμένης πολυαιθυλενιμίνης στην ανάπτυξη της λέμνας.....	76
4.3.2	Υπολογισμός της όρμησης που προκαλούν τα νανοςωματίδια με βάση τα παράγωγα της υπερδιακλαδισμένης πολυαιθυλενιμίνης στη <i>Lemna minor</i> L.	82
4.3.3	Η μελέτη των νανοςωματιδίων με βάση τα παράγωγα της υπερδιακλαδισμένης πολυαιθυλενιμίνης στην περιεκτικότητα σε O_2^- και H_2O_2 στη λέμνα.....	84
4.3.4	Η υπεροξείδωση των λιπιδίων κατά την επίδραση νανοςωματιδίων με βάση τα παράγωγα της υπερδιακλαδισμένης πολυαιθυλενιμίνης στη λέμνα.....	85
4.3.5	Η δραστηριότητας των αντιοξειδωτικών ενζύμων κατά την επέμβαση νανοςωματιδίων με βάση τα παράγωγα της υπερδιακλαδισμένης πολυαιθυλενιμίνης στη λέμνα.....	86
4.4	Συμπεράσματα.....	88
	Ειδικό μέρος II. Καλλιέργειες εκτός εδάφους - Απολύμανση θρεπτικού διαλύματος.....	89
	Κεφάλαιο 5. Μελέτη της επίδρασης διαφόρων συγκεντρώσεων χλωρίου κατά την απολύμανση του θρεπτικού διαλύματος σε υδροπονική καλλιέργεια τομάτας στην ανάπτυξη, θρεπτική κατάσταση και παραγωγή των φυτών.....	90
5.1	Εισαγωγή.....	90
5.2	Υλικά και Μέθοδοι.....	93
5.2.1	Πειραματικός Σχεδιασμός, βιολογικό υλικό και συνθήκες καλλιέργειας.....	93
5.2.2	Μελέτη επίδρασης υποχλωριώδους νατρίου στην ανάπτυξη φυτών τομάτας.....	97
5.2.3	Μελέτη της επίδρασης υποχλωριώδους νατρίου στη θρεπτική κατάσταση της καλλιέργειας της τομάτας.....	97
5.2.4	Εκτίμηση της παραγωγής των φυτών τομάτας.....	98
5.2.5	Εκτίμηση της επίδρασης υποχλωριώδους νατρίου στο χρώμα των καρπών τομάτας...	98
5.2.6	Στατιστική ανάλυση αποτελεσμάτων.....	98

5.3	Αποτελέσματα – Συζήτηση	99
5.3.1	Η επίδραση της προσθήκης υποχλωριώδους νατρίου στο θρεπτικό διάλυμα στις τιμές αγωγιμότητας (EC) και pH στα διαλύματα απορροών	99
5.3.2	Η επίδραση της απολύμανσης του θρεπτικού διαλύματος στην ανάπτυξη των φυτών τομάτας και την ανταλλαγή αερίων κατά τη φωτοσύνθεση.....	101
5.3.3	Επισκόπηση της επίδρασης της απολύμανσης του θρεπτικού διαλύματος στη θρέψη των φυτών.....	103
5.3.4	Η συνολική παραγωγή φυτών τομάτας μετά την απολύμανση θρεπτικού διαλύματος.....	109
5.3.5	Η επίδραση της απολύμανσης του θρεπτικού διαλύματος στο χρώμα των καρπών ..	110
5.4	Συμπεράσματα.....	111
Κεφάλαιο 6.	Αξιολόγηση της επίδρασης της απολύμανσης του θρεπτικού διαλύματος στην παραγωγή των φυτών τομάτας υδροπονικής καλλιέργειας και την παραγωγή τοξικών ουσιών στους καρπούς	112
6.1	Εισαγωγή.....	112
6.2	Υλικά και Μέθοδοι	116
6.2.1	Πειραματικός σχεδιασμός	116
6.2.2	Ανίχνευση υπολειμμάτων χλωρικών και υπερχλωρικών ιόντων σε καρπούς τομάτας.....	116
6.2.3	Ανάλυση θρεπτικού διαλύματος για τον προσδιορισμό υπολειμμάτων χλωρικών και υπερχλωρικών ιόντων.....	119
6.2.4	Ανίχνευση υπολειμμάτων spinosad σε καρπούς τομάτας	119
6.3	Αποτελέσματα - Συζήτηση	121
6.3.1	Επισκόπηση της ανάλυσης υπολειμμάτων χλωρικών και υπερχλωρικών ιόντων στους καρπούς και το θρεπτικό διάλυμα	121
6.3.2	Αποτελέσματα αναλύσεων υπολειμμάτων χλωρικών και υπερχλωρικών ιόντων σε καρπούς τομάτας.....	123
6.3.3	Ανίχνευση υπολειμμάτων χλωρικών ιόντων στο θρεπτικό διάλυμα	124
6.3.4	Επισκόπηση της ανάλυσης υπολειμμάτων spinosad στους καρπούς τομάτας	125
6.3.5	Αποτελέσματα ανάλυσης υπολειμμάτων spinosad	126
6.4	Συμπεράσματα.....	127
Κεφάλαιο 7.	Γενικά συμπεράσματα – Πρωτοτυπία της διατριβής	129
	Βιβλιογραφικές αναφορές.....	133
	Παράρτημα	171
	Δημοσιεύσεις/Ανακοινώσεις της Διδακτορικής Διατριβής (ΔΔ)	179

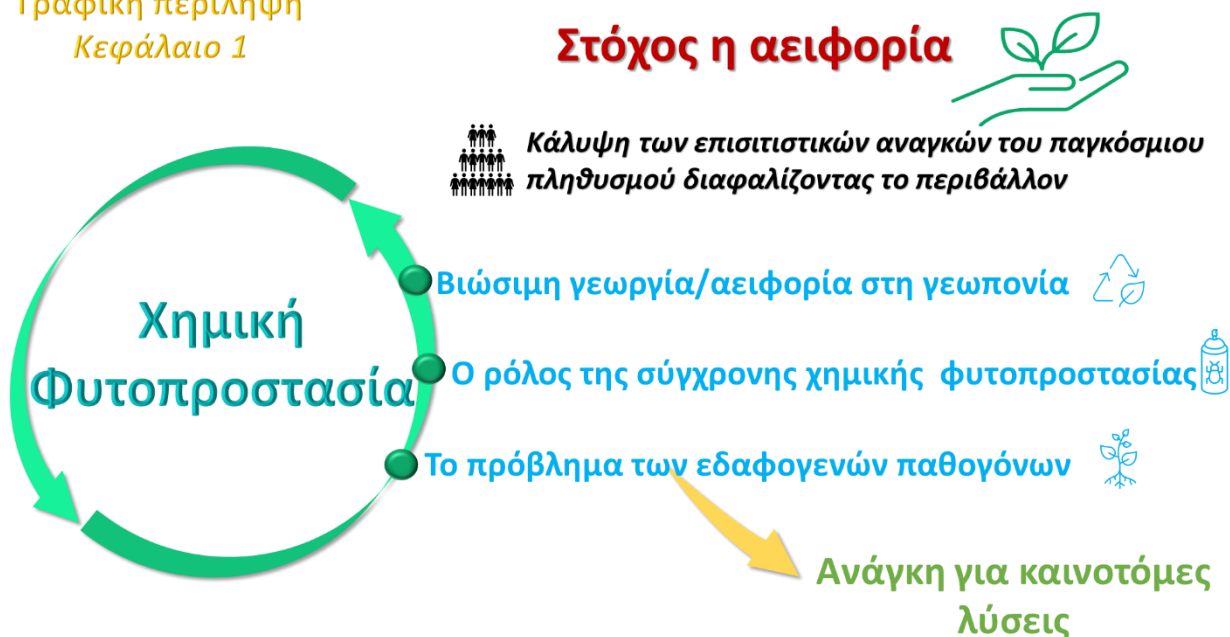
Επιστημονικές δημοσιεύσεις σε περιοδικά με κριτές.....	179
Ανακοινώσεις.....	180
Λοιπές Δημοσιεύσεις/Ανακοινώσεις.....	181

Γενικό μέρος.

Το πρόβλημα των εδαφογενών φυτοπαθογόνων

Κεφάλαιο 1. Εισαγωγή

Γραφική περίληψη
Κεφάλαιο 1



ΣΥΝΤΟΜΟΓΡΑΦΙΕΣ:

δ.ο.: δραστική(ές) ουσία(ες); E&A: Έρευνα και Ανάπτυξη; ΕΕ: Ευρωπαϊκή Ένωση; ΗΠΑ: Ηνωμένες Πολιτείες Αμερικής; ΦΠ: Φυτοπροστατευτικό(α) Προϊόν(ντα);

FAO: Food and Agriculture Organization of the United Nations (Διεθνής Οργανισμός Τροφίμων και Γεωργίας);
WHO: World Health Organization (Παγκόσμιος Οργανισμός Υγείας)

1.1 Η βιώσιμη γεωργία

Η πρόσβαση σε ποιοτικά τρόφιμα προσιτά σε όλους, αποτελεί θεμελιώδες ανθρώπινο δικαίωμα ανεξαρτήτως οικονομικού και κοινωνικού επιπέδου (FAO, 2009). Για την επίτευξη της παραγωγής ποσοτήτων τροφίμων που θα ικανοποιούν τις ανάγκες του ανθρώπινου πληθυσμού παγκοσμίως, ο γεωργικός τομέας θα βρεθεί αντιμέτωπος με πλήθος προκλήσεων μέσα στα επόμενα χρόνια, καθώς ο παγκόσμιος πληθυσμός προβλέπεται ότι θα φτάσει τα 9,7 δις το 2050 και 10,9 δις το 2100 (United Nations, 2019). Το παραπάνω φαινόμενο αναπόφευκτα οδηγεί στην εκτόξευση της ζήτησης σε τρόφιμα και άλλους αναγκαίους πόρους (Viola and Marinelli, 2016). Ειδικότερα, εντός της επόμενης δεκαετίας η βιομηχανία τροφίμων θα πρέπει να αυξήσει την παραγωγή της για την ικανοποίηση των διατροφικών αναγκών του αυξανόμενου πληθυσμού (OECD-FAO, 2019) και μέχρι το 2050, εκτιμάται αναγκαία αύξηση κατά 50% (FAO, 2017).

Υπό αυτές τις συνθήκες, είναι προφανές ότι ο τομέας της γεωπονίας βρίσκεται σε μεταβατική φάση με επιτακτικό στόχο την αειφορία (Squatrito et al., 2020). Ο όρος «αειφορία» ή «βιώσιμη γεωργία» περιγράφει την επείγουσα ζήτηση για κάλυψη των επισιτιστικών αναγκών του αυξανόμενου παγκόσμιου πληθυσμού διασφαλίζοντας παράλληλα τον μικρότερο αντίκτυπο στο περιβάλλον και τους ανθρώπους, και παράλληλα επαρκές εισόδημα για τους παραγωγούς (UCDavis, 2021). Στην παρούσα διατριβή θα χρησιμοποιηθεί ο όρος

«βιώσιμη γεωργία». Παρ' όλα αυτά, η έννοια της βιώσιμης γεωργίας παραμένει αόριστη και ο σαφής ορισμός της αποτελεί πρόκληση (Binder et al., 2010, de Olde et al., 2017). Ωστόσο, φαίνεται να υπάρχει συμφωνία ότι ο όρος «βιώσιμη γεωργία» («agricultural sustainability») πρέπει να αξιολογεί παράλληλα περιβαλλοντικούς, οικονομικούς και κοινωνικούς παράγοντες που συνδέονται με την πρακτική της (Εικόνα 1.1) (Pham and Smith, 2014).

Αναμφίβολα, η αναδυόμενη ανάγκη να γεφυρωθεί το χάσμα μεταξύ προσφοράς και ζήτησης τροφίμων που αναμένεται τα επόμενα χρόνια, παρεμποδίζεται από τις επιπτώσεις της κλιματικής αλλαγής στη γεωργία, την υποβάθμιση και την εξάντληση της καλλιεργήσιμης γης καθώς και την έλλειψη νερού και άλλων πόρων (Dubey and Mailapalli, 2016, FAO, 2018). Ειδικότερα, λαμβάνοντας υπόψη τη φυτοπροστασία, οι ετήσιες απώλειες καλλιεργειών από εχθρούς και ασθένειες των φυτών εκτιμάται ότι κυμαίνονται μεταξύ 20-40% της παγκόσμιας παραγωγής (FAO, 2017). Αυτό επιδεινώνεται περαιτέρω από την κλιματική αλλαγή, η οποία συμβάλλει στην εκδήλωση ασθενειών (Zayan, 2019), προσβολών από εχθρούς (Canto et al., 2009, Salih et al., 2020) και ιούς (Trebicki, 2020), ή συμβάλλει στην ανάπτυξη ανθεκτικότητας (Pu et al., 2020). Ως επακόλουθο, προκύπτει αύξηση των εφαρμογών φυτοφαρμάκων (Heeb et al., 2019), π.χ. οι εφαρμογές φυτοφαρμάκων για τον έλεγχο των λεπιδόπτερων στο γλυκό καλαμπόκι είναι τρεις έως έξι φορές υψηλότερες στη Φλόριντα, μια νότια και θερμότερη περιοχή των Ηνωμένων Πολιτειών Αμερικής (ΗΠΑ), συγκριτικά με τη Νέα Υόρκη, μια βορειότερη και πιο δροσερή περιοχή (Hatfield et al., 2011).



Εικόνα 1.1: Οι μεταβλητές που περιλαμβάνονται στον υπολογισμό της αειφορίας στη γεωπονία [τροποποιημένη από (Lampridi et al., 2019)]

Ωστόσο, η αύξηση της χρήσης φυτοφαρμάκων συνδέεται με δυσμενείς επιπτώσεις στο περιβάλλον και την ανθρώπινη υγεία (Larsen et al., 2019). Υπάρχουν αναφορές που συνδέουν την εφαρμογή φυτοφαρμάκων με την κατάρρευση πληθυσμών εντόμων (Basset and Lamarre, 2019, Goulson, 2019, van der Sluijs, 2020) και προβλέπουν εξαφάνιση για το 40% των ειδών εντόμων παγκοσμίως (Sánchez-Bayo and Wyckhuys, 2019). Παρ' όλα αυτά, στο παραπάνω φαινόμενο επηρεάζουν και άλλοι παράγοντες όπως η απώλεια ενδιαιτημάτων λόγω της εντατικοποίησης της γεωργίας (κύριο αίτιο) (Sánchez-Bayo and Wyckhuys, 2019), η κλιματική αλλαγή, η εισβολή άλλων ειδών κι η μόλυνση του περιβάλλοντος (Lewis et al., 2020, Wagner, 2020). Οι Mineau and Whiteside (2013) αναφέρουν ότι η χρήση φυτοφαρμάκων συνδέεται με τη μείωση πληθυσμού πτηνών στις ΗΠΑ διατηρώντας επιφυλάξεις για την πρόσβαση σε δεδομένα που αποκαλύπτουν τον πραγματικό αντίκτυπο των φυτοφαρμάκων, ενώ στη διεθνή βιβλιογραφία επισημαίνεται η πολυδιάστατη φύση αυτού του φαινομένου (Arpaia et al., 2021, Homburg et al., 2019).

Επιπρόσθετα, οι Zikankuba et al. (2019) συνδέουν τη μη ορθή χρήση των αγροχημικών [μη ελεγχόμενες εφαρμογές, λάθος απόρριψη, μη χρήση προστατευτικού εξοπλισμού, χρήση παράνομων ή πλαστών φυτοπροστατευτικών προϊόντων (ΦΠ)] με τη μόλυνση του νερού και του εδάφους καθώς και επιπτώσεις στην ασφάλεια των τροφίμων σχετικές με τη χρόνια ανθρώπινη έκθεση σε λιποδιαλυτές και βιοσυσσωρευτικές δραστικές ουσίες (δ.ο.). Μάλιστα, το εμπόριο πλαστών φυτοφαρμάκων έχει αναπτυχθεί σε παγκόσμιο πρόβλημα (Karasali et al., 2014, Miszczyk et al., 2018), καθιστώντας το μία από τις κορυφαίες κερδοφόρες επιχειρήσεις οργανωμένου εγκλήματος (Europol, 2015, Fishel, 2015). Η κακή πρακτική των φυτοφαρμάκων είναι πιο σημαντική στις αναπτυσσόμενες χώρες όπου οι πωλήσεις πλαστών φυτοφαρμάκων κυμαίνονται από 20 έως 30% σε σύγκριση με 5-7% στις ανεπτυγμένες χώρες (Pfonka et al., 2016), και επιδεινώνεται περαιτέρω από την άγνοια ή ακόμη και τη μη διαθεσιμότητα προστατευτικού εξοπλισμού (Bhandari et al., 2018, Ngowi et al., 2016). Γενικά, περιπτώσεις κακής χρήσης οδηγούν σε έκθεση σε φυτοφάρμακα που σχετίζονται με συμπτώματα όπως έμετο, ερεθισμό του δέρματος, ψυχική σύγχυση, πονοκέφαλοι και μακροχρόνιες επιδράσεις όπως προβλήματα στα νεφρά και στο αναπαραγωγικό σύστημα ή ακόμα καρκίνο και θάνατο (Debnath and Khan, 2017) ειδικά για τους ευαίσθητους πληθυσμούς π.χ. ομάδες παιδιών στην Τανζανία (Lekei et al., 2017) και στην Κίνα (Yimaer et al., 2017).

Τα παραπάνω καθιστούν σαφές ότι απαιτείται συγκεκριμένο θεσμικό πλαίσιο που θα ορίζει την ορθολογική χρήση των ΦΠ. Ήδη από το 1985 ανησυχίες σχετικά με την εισαγωγή-εξαγωγή και ασφαλή χρήση των ΦΠ οδήγησαν το Διεθνή Οργανισμό Τροφίμων και Γεωργίας (Food and Agriculture Organization – FAO) μαζί με τον Παγκόσμιο Οργανισμό Υγείας (World Health Organization – WHO) σε συμφωνία με υπηρεσίες των Ηνωμένων Εθνών και άλλους οργανισμούς να θεσπίσουν τον διεθνή κώδικα δεοντολογίας για τη διαχείριση των αγροχημικών γνωστό ως «Code of Conduct on Pesticide Management» (FAO, 1985, FAO-WHO, 2014). Βασικά, ο κώδικας όντας εκούσιος, σχεδιάστηκε ώστε να ωφελήσει τη διεθνή κοινότητα και να υπηρετήσει στην αύξηση της εμπιστοσύνης σχετικά με τη διάθεση, θεσμοθέτηση, αγορά

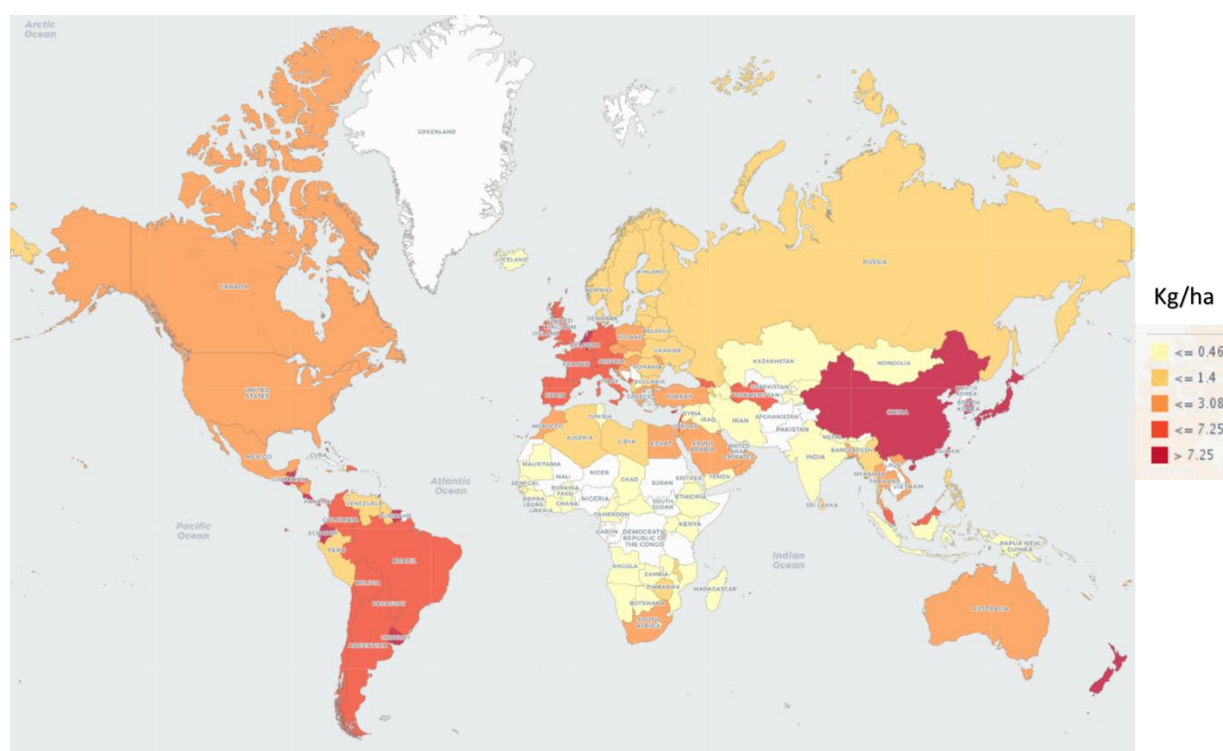
και χρήση των ΦΠ για τη βελτίωση της γεωργίας και της δημόσιας υγείας (FAO, 1985). Η πλειονότητα των χωρών παγκοσμίως αναφέρουν τη χρήση αυτού του Κώδικα (WHO-FAO, 2019), παρ' όλα αυτά, η προσαρμογή του ποικίλλει από το αυστηρό θεσμικό πλαίσιο στην Ευρωπαϊκή Ένωση (ΕΕ) (Directive 2009/128/EC) έως το πολύ πιο χαλαρό πλαίσιο σε άλλες χώρες όπως η Βραζιλία (Phillips, 2018). Επιπλέον, μια πρόσφατη έρευνα που διεξήχθη από κοινού από τον WHO και τον FAO έδειξε ότι το 65% των χωρών δεν απαγορεύουν ή περιορίζουν τη χρήση εξαιρετικά επικίνδυνων φυτοφαρμάκων και γενικότερα στις χώρες της Αφρικής υπάρχουν σοβαρά ζητήματα σχετικά με τις διαδικασίες καταχώρισης και διαχείρισης φυτοφαρμάκων (WHO-FAO, 2019). Σύμφωνα με την ίδια πηγή, γενικά στην Αφρική, υπάρχουν σοβαρά ζητήματα σχετικά με τις διαδικασίες καταγραφής και διαχείρισης φυτοφαρμάκων. Επιπλέον, στην ανατολική ζώνη της ανατολικής Αφρικής υπάρχει πρόβλημα συσσώρευσης ληγμένων φυτοφαρμάκων που αποστέλλονται πίσω στις ανεπτυγμένες χώρες για ασφαλή απόρριψη (Loha et al., 2018).

Όταν οι ανησυχίες σχετικά με το αντίκτυπο της χρήσης φυτοφαρμάκων επικεντρώνονται στο κατά πόσον τα τρόφιμα στο πιάτο μας είναι ασφαλή, η νομοθεσία για τα ανώτατα όρια υπολειμμάτων (maximum residue levels - MRLs) και τα αντίστοιχα όρια κατά την εισαγωγή προϊόντων (import tolerances), όπως εφαρμόζονται στην ΕΕ, μπορούν να διασφαλίσουν ότι τα ΦΠ πληρούν τα απαραίτητα κριτήρια ασφάλειας (Eurofins agrosience services, 2018). Παρ' όλα αυτά, δεν είναι σαφές ποια είναι η κατάσταση στις εθνικές αγορές για αυτά τα προϊόντα, παρ' όλο που αυξάνεται η ευαισθητοποίηση για τον κίνδυνο που σχετίζεται με τη χρήση φυτοφαρμάκων και υπάρχουν κίνητρα για πιο ελκυστικά προϊόντα εξαγωγής, οδηγώντας, έτσι, στην ανανέωση και βελτίωση του κανονισμού σε σημαντικές χώρες γεωργικής παραγωγής όπως Βραζιλία, Κίνα, Ινδονησία, Κένυα και Βιετνάμ (Möhrling et al., 2021). Επί του παρόντος, η ΕΕ ενισχύει τις προσπάθειες για τη στήριξη της βιώσιμης γεωργίας στο πλαίσιο της Κοινής Γεωργικής Πολιτικής (ΚΑΠ) με την επιβολή της πράσινης πολιτικής «Farm to Fork» (European Commission, 2020, Schebesta and Candel, 2020). Ωστόσο, υπάρχουν αυξανόμενες ανησυχίες σχετικά με την αποτελεσματικότητα της τακτικής αυτής, λαμβάνοντας ιδίως υπόψη τις οικονομικές δυσκολίες που θα προκύψουν λόγω του Covid 19 (Schebesta and Candel, 2020).

Σε αυτό το πλαίσιο, και δεδομένου ότι η βιώσιμη γεωργία αποτελεί έναν διεπιστημονικό στόχο, είναι απαραίτητο όλοι οι ενδιαφερόμενοι, δηλαδή οι αγρότες, οι συντονιστικοί φορείς, οι αξιολογητές, οι ερευνητές, η βιομηχανία των αγροχημικών και τροφίμων, οι καταναλωτές κ.λπ., να λάβουν την κατάλληλη εκπαίδευση, αξιοποιώντας την αποκτηθείσα εμπειρία και να εργαστούν από κοινού (Loha et al., 2018) χωρίς προκατάληψη, προκειμένου να ξεπεραστούν οι δυσκολίες και οι περιορισμοί.

1.2 Η σύγχρονη χημική φυτοπροστασία

Η επιτυχία στην αύξηση της παραγωγικότητας κατά τη λεγόμενη «Πράσινη Επανάσταση», βασίστηκε στην πρόοδο που παρατηρήθηκε στον αγροδιατροφικό τομέα, όπως την ένταξη της λίπανσης και τη χρήση βελτιωμένων ποικιλιών, αλλά και στην εισαγωγή στον τομέα της φυτοπροστασίας χημικών ουσιών με τη μορφή ΦΠ, με στόχο την αντιμετώπιση εχθρών και ασθενειών των φυτών (Farmer, 1986). Τα αγροχημικά έχουν συνεισφέρει στην αξιοσημείωτη αύξηση της σύγχρονης φυτικής παραγωγής και μάλιστα, η χημική αντιμετώπιση αποτελεί σήμερα την κορωνίδα της φυτοπροστασίας στις ανεπτυγμένες χώρες συντελώντας στην βιομηχανοποίηση της φυτικής παραγωγής (Magarey et al., 2019, Nishimoto, 2019) (Εικόνα 1.2).



Εικόνα 1.2: Η χρήση φυτοφαρμάκων το 2018 (μετρημένο σε kg/ha).
(<https://ourworldindata.org/pesticides>)

Το 1960 η βιομηχανία των αγροχημικών είχε αξία μικρότερη από 10 δις δολάρια και υπήρχαν περίπου 100 δραστικές ουσίες (δ.ο.) διαθέσιμες στους παραγωγούς. Πλέον, η βιομηχανία των αγροχημικών εκτιμάται ότι αξίζει λίγο περισσότερο από 50 δις δολάρια και υπάρχουν παγκόσμια περισσότερες από 600 δ.ο. (McDougall, 2018). Αναλυτικότερα, από το 2009 έως το 2014 υπήρξε αύξηση στην αγορά και χρήση ΦΠ, ως αποτέλεσμα της αυξημένης ζήτησης ΦΠ στις αναπτυσσόμενες χώρες. Από το 2014 έως 2017 παρατηρήθηκε πτώση, λόγω του αποθέματος σοδειάς που δημιουργήθηκε το 2014 και της αντίστοιχης μείωσης των τιμών, με τα πρώτα στοιχεία ανάκαμψης να φαίνονται το 2018 (Phillips, 2019).

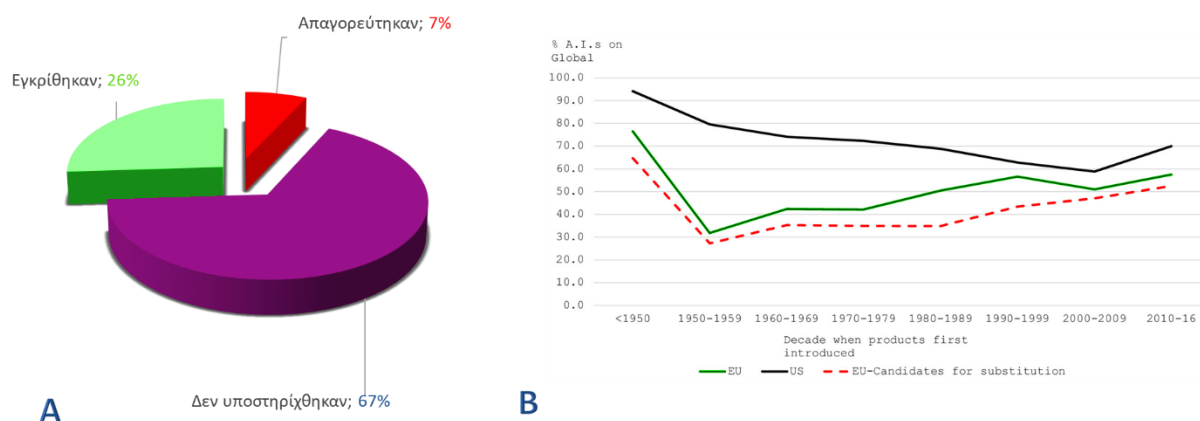
Τα πιο πρόσφατα στοιχεία από το FAO δείχνουν ότι η κατανάλωση αγροχημικών παρουσιάζει αύξηση στην Αμερική και την Ασία, και οι χώρες με τη μεγαλύτερη χρήση αγροχημικών σε σχέση με την καλλιεργούμενη γη είναι μεταξύ άλλων η Ιαπωνία, η Δημοκρατία της Κορέας, η Κίνα, το Ισραήλ και η Μάλτα (FAOSTAT, 2018). Στην ΕΕ δεν υπάρχει μεγάλη διακύμανση στις πωλήσεις των αγροχημικών από το 2011-2018 (EUROSTAT, 2020). Ωστόσο, το 2019, οι πωλήσεις ΦΠ στην ΕΕ έφτασαν στο χαμηλότερο επίπεδο από το 2011. Μόνο 333.418 τόνοι φυτοφαρμάκων πουλήθηκαν το 2019 σε σύγκριση με τον μέσο όρο 360.000 τόνων ετησίως από το 2011 (EUROSTAT, 2021). Σε παγκόσμιο επίπεδο τις περισσότερες πωλήσεις στα ΦΠ έχουν τα ζιζανιοκτόνα, κι ακολουθούν τα εντομοκτόνα και μετά τα μυκητοκτόνα (McDougall, 2018).

Συνολικά, η χρήση συνθετικών ΦΠ και λιπασμάτων είναι σημαντική για τη φυτική παραγωγή και την ασφάλεια των τροφίμων και θεωρείται ότι εξοικονομεί 40 δις δολάρια το χρόνο στις ΗΠΑ (Pimentel and Burgess, 2014). Ακόμη, οι απώλειες παραγωγής χωρίς την εφαρμογή μέτρων φυτοπροστασίας, συμπεριλαμβανομένων των φυτοφαρμάκων, θα μπορούσαν να είναι μεταξύ 50-80% της συνολικής παραγωγής (OECD-FAO, 2012). Επιπλέον, πρέπει να σημειωθεί ότι η χρήση ΦΠ έχει συντελέσει στην αύξηση της παραγωγής χωρίς την αντίστοιχη αύξηση σε καλλιεργήσιμη γη (McDougall, 2018). Γενικά, δεδομένης της αύξησης του παγκόσμιου πληθυσμού σε συνδυασμό με την κλιματική αλλαγή προβλέπεται ότι η καλλιεργήσιμη γη που αντιστοιχεί σε κάθε άτομο παγκοσμίως θα συνεχίσει να μειώνεται (Nishimoto, 2019). Συνεπώς, η χρήση ΦΠ αποτελεί σημαντική «μεταβλητή» στην θρέψη του παγκόσμιου πληθυσμού διατηρώντας την αειφορία (McDougall, 2018). Ωστόσο, σήμερα, λόγω της αλόγιστης χρήσης των ΦΠ, η εφαρμογή τους έχει πλέον συνδεθεί με αρνητικές επιπτώσεις σε οργανισμούς μη-στόχους (Mulé et al., 2017, Uwizeyimana et al., 2017, Van Hoesel et al., 2017, Wani and Mamta, 2019), επικονιαστές (Jaffe et al., 2019, Olaya-Arenas et al., 2020, Tarek et al., 2018), με τη μόλυνση σε νερό και έδαφος (Zikankuba et al., 2019) και την ανθρώπινη υγεία (Bisht et al., 2019, Dhananjayan and Ravichandran, 2018), όπως αναφέρθηκε και νωρίτερα. Μάλιστα, το εξωτερικό κόστος (π.χ. θεσμικό κόστος, κόστος για την ανθρώπινη υγεία κ.λπ.) των αγροχημικών στις ΗΠΑ, εκτιμάται ετησίως σε περισσότερα από 10 δισεκατομμύρια δολάρια (Bourguet and Guillemaud, 2016, Pimentel and Burgess, 2014).

Παρ' όλα αυτά, πρέπει να σημειωθεί ότι σήμερα τα ΦΠ αποτελούν ουσίες που ελέγχονται από το νόμο παγκοσμίως (WHO, 2019). Εκτός από την ΕΕ και τις ΗΠΑ, επίσης στον Καναδά, την Αυστραλία και την Ιαπωνία υπάρχουν συγκεκριμένοι νόμοι, κανονισμοί και οδηγίες σχετικά με τις απαιτήσεις και τις προϋποθέσεις για την έγκριση, την εγγραφή και διάθεση των φυτοφαρμάκων στην αγορά (OECD, 2021). Ακόμη και η Κίνα θέτει αυστηρότερα κριτήρια κατά την αξιολόγηση, έγκριση κι διανομή των ΦΠ (Xu, 2017). Επιπρόσθετα, απαιτούνται για την έγκρισή τους περισσότερα δεδομένα συγκριτικά με λοιπά χημικά, ακόμα και σε σύγκριση με χημικά που χρησιμοποιούνται καθημερινά στο νοικοκυριό ή στην προσωπική φροντίδα (McDougall, 2018). Συνολικά αυτή τη στιγμή υπάρχουν 883 δ.ο. που σχετίζονται με παρασιτοκτόνο δράση και χρήση στη γεωργία: 255 μυκητοκτόνα (FRAC, 2020),

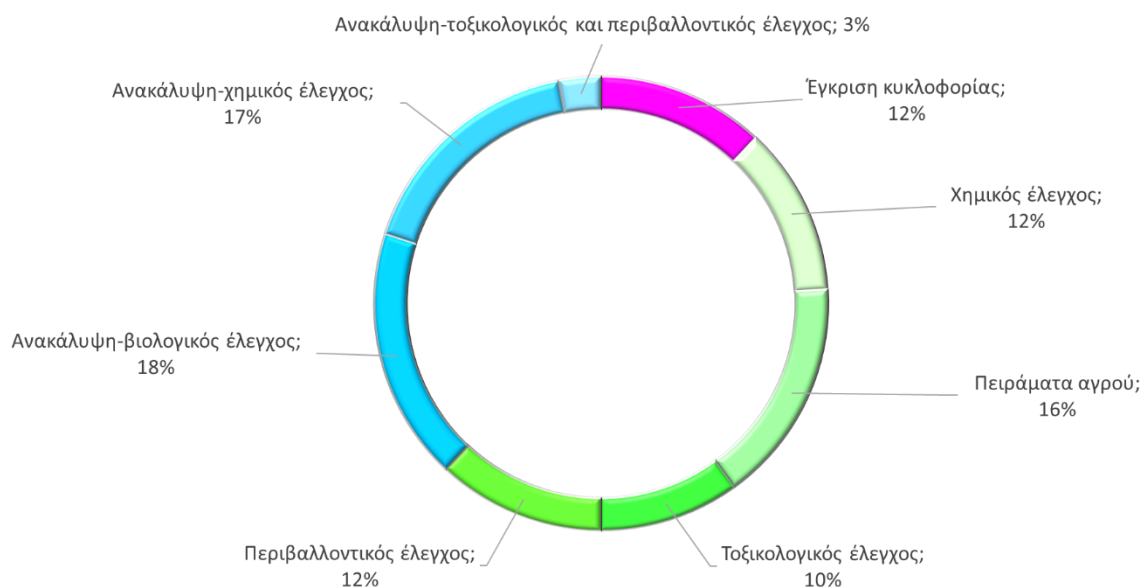
272 εντομοκτόνα (IRAC, 2021) και 356 ζιζανιοκτόνα (HRAC, 2021). Αυτές διακρίνονται σε ουσίες με διαφορετικό μηχανισμό δράσης (MoA): 14 MoA για μυκητοκτόνα (FRAC, 2020), 35 MoA για εντομοκτόνα (IRAC, 2021) και 25 MoA για ζιζανιοκτόνα (HRAC, 2021).

Το αυστηρό θεσμικό πλαίσιο έχει οδηγήσει στην κατάργηση δ.ο., μη ανανέωση άλλων δ.ο. και τη δυσκολία έγκρισης νέων δ.ο. (Barzman et al., 2015). Πιο συγκεκριμένα, λόγω του θεσμικού πλαισίου πολλά ΦΠ έχουν αποσυρθεί από την αγορά λόγω της κατάργησης της δ.ο. ή επειδή δεν υποστηρίχθηκαν κατά τη διαδικασία επανέγκρισής τους (McDougall, 2018). Αναλυτικότερα, κάποιες δ.ο. δεν υποστηρίχθηκαν από τις εταιρείες καθώς δεν ήταν πλέον κερδοφόρες ή δεν πληρούσαν τα νέα αυστηρότερα κριτήρια για την ασφάλεια του περιβάλλοντος και των ανθρώπων (Bylemans et al., 2019). Για παράδειγμα στην Αμερική 60 δ.ο. δεν εμπορεύονται πια (McDougall, 2018) και στην Ευρώπη, όπου το θεσμικό πλαίσιο είναι περισσότερο αυστηρό [Regulation (EC) 1107/2009], περίπου 70 ουσίες απαγορεύτηκαν (Εικόνα 1.3) (Bylemans et al., 2019). Αξίζει να σημειωθεί ότι τώρα στην Ευρώπη 65 δ.ο. είναι υποψήφιες για αντικατάσταση (CfS – Candidate for Substitution). Αυτό σημαίνει ότι παρότι είναι ασφαλείς για τον άνθρωπο και το περιβάλλον με βάση τα κριτήρια που έχουν τεθεί από την Οδηγία 91/414/EEC και τον Κανονισμό 1107/2009, εξαιτίας κάποιων ενδογενών επικίνδυνων ιδιοτήτων τους πιθανόν να αντικατασταθούν. Η πλειονότητα των ουσιών που ανήκουν σε αυτήν την κατηγορία έχουν δύο από τις τρεις ακόλουθες ιδιότητες: επιμένουν στο περιβάλλον, βιοσυσσωρεύονται ή είναι τοξικές (EU Pesticides Database, 2021).



Εικόνα 1.3: (A) Το ποσοστό των δ.ο. που εγκρίθηκαν, απαγορεύτηκαν ή δεν υποστηρίχθηκαν για επανέγκριση από τις εταιρείες στην ΕΕ υπό το πρόγραμμα αξιολόγησης που πραγματοποιήθηκε τη χρονική περίοδο 1993-2009 (Bylemans et al., 2019) και (B) τα εγκεκριμένα αγροχημικά στις ΗΠΑ και ΕΕ σύμφωνα με AgbioInvestor (Phillips, 2019).

Στις μέρες μας, κατά την έγκριση ενός ΦΠ, μεγάλη προσοχή δίνεται στην αξιολόγηση της χημείας, τοξικότητάς του στους ανθρώπους, οικοτοξικότητας, τύχης και συμπεριφοράς του στο περιβάλλον, υπολειμματικότητάς του σε φυτικά και ζωικά προϊόντα και αποτελεσματικότητάς του (Εικόνα 1.4). Σημαντικές διαφορές παρουσιάζουν τα κριτήρια αξιολόγησης στην ΕΕ και τις ΗΠΑ (Bylemans et al., 2019). Αναλυτικότερα, η ΕΕ κατακρίνεται ότι εστιάζει στον πιθανό κίνδυνο ενός ΦΠ αντί να εφαρμόζει μία ρεαλιστική ανάλυση πιθανοτήτων πρόκλησης ζημίας. Κριτήρια



Εικόνα 1.4: Το κόστος των νέων αγροχημικών. Το κόστος έγκρισης αντιστοιχεί σε 33 εκατομμύρια δολάρια, η πράσινη κατηγορία (κόστος ανάπτυξης) αντιστοιχεί σε 146 εκατομμύρια δολάρια και η γαλάζια κατηγορία (κόστος ανακάλυψης) αντιστοιχεί σε 107 εκατομμύρια δολάρια. Η εικόνα τροποποιήθηκε από τους Sparks and Lorschbach (2017).

όπως η εμμονή μίας ουσίας στο περιβάλλον ή η τοξικότητα που προκαλεί σε εργαστηριακές συνθήκες οδηγούν στον αποκλεισμό ουσιών από την εφαρμογή τους στη φυτοπροστασία. Αντίθετα, στις ΗΠΑ η πιθανότητα πρόκλησης ζημίας εξετάζεται σε άμεση συνάφεια με την έκθεση στην δ.ο. και πιθανά οφέλη από την εφαρμογή της συνυπολογίζονται. Υπό αυτό το πρίσμα, μία δ.ο. υψηλής τοξικότητας θα προκαλέσει ζημία μόνο σε περίπτωση που επαρκής έκθεση προκληθεί ή δεν υπάρχουν μέτρα για τον περιορισμό στην έκθεσή της ώστε να διασφαλιστεί η προστασία των ανθρώπων και του περιβάλλοντος (McDougall, 2018). Χαρακτηριστικό παράδειγμα των παραπάνω αποτελούν τα νεονικοτινοειδή τα οποία όταν απαγορεύτηκαν στην ΕΕ οδήγησαν σε μείωση της παραγωγής της ελαιοκράμβης κατά 912.000 τόννους, συνοδευόμενη από κόστος 350 εκατομμυρίων ευρώ (McDougall, 2018). Παρ' όλα αυτά, φαίνεται ότι θα μπορούσαν να εφαρμοστούν περιοριστικά μέτρα στην εφαρμογή τους αντί της απαγόρευσής τους (Bylemans et al., 2019). Συνολικά, από τα ΦΠ τα οποία εισήχθησαν στην αγορά την δεκαετία του 1950 και εμπορεύονταν μέχρι και το 2018, περίπου το 80% αυτών επιτρέπονται στις ΗΠΑ και μόλις το 30% αυτών επιτρέπονται στην ΕΕ (Phillips, 2019).

Ωστόσο, πρέπει να τονιστεί ότι υπάρχει ο αντίλογος ότι ακόμα και η τωρινή αυστηρή αξιολόγηση της οικοτοξικότητας των ΦΠ στην ΕΕ παρουσιάζει πολλούς περιορισμούς (π.χ. δεν περιλαμβάνει την αξιολόγηση μιγμάτων δ.ο. ούτε εξετάζει τις οικολογικές αλληλεπιδράσεις κ.ά.) (Topping et al., 2020). Άλλες ανησυχίες αφορούν στην επίδραση εντομοκτόνων, κυρίως πυρεθροειδών και νεονικοτινοειδών, σε υδρόβια ασπόνδυλα και επικονιαστές (Schulz et al., 2021). Επιπλέον, η αξιολόγηση της οικοτοξικότητας βασίζεται παγκοσμίως στις μέλισσες εξαιρώντας άλλους επικονιαστές (Franklin and Raine, 2019). Τέλος, φαίνεται να μη λαμβάνονται υπόψιν όλοι οι πιθανοί τρόποι μεταφοράς των δ.ο. στο περιβάλλον, θέτοντας ως εκ τούτου το

ερώτημα εάν οι ισχύοντες κανονισμοί αποτυγχάνουν να διακρίνουν τις οδούς μεταφοράς φυτοφαρμάκων (Schönenberger and Stamm, 2021).

Σύμφωνα με τα παραπάνω, γίνεται προφανές ότι τα ΦΠ ανήκουν στις πιο μελετημένες χημικές ενώσεις της ζωής μας. Ο κίνδυνος που παρουσιάζουν δεν είναι μηδενικός αλλά είναι αποδεκτός; Η ΕΕ διασφαλίζει σύγχρονη αξιολόγηση στο μέλλον θεσπίζοντας ως υποχρεωτική την επαναξιολόγησή των δ.ο. κάθε 15 χρόνια (Bylemans et al., 2019). Μάλιστα, οι παράγοντες ασφάλειας (safety factors) που λαμβάνονται υπόψιν είναι εξαιρετικά υψηλοί π.χ.

- για να οριστεί η αποδεκτή ημερήσια κατανάλωση (ADI – acceptable Daily Intake) ως παράγοντας ασφαλείας στην ΕΕ λαμβάνεται το 100
- στον υπολογισμό της δύναμης μίας σκεπής σε ένα κτίριο ο παράγοντας ασφαλείας είναι 1,5 (Bylemans et al., 2019).

Συνολικά, οι θεσμοθετικές απαιτήσεις για την έγκριση των ΦΠ έχουν συντελέσει στον διπλασιασμό του κόστους στην έρευνα και ανάπτυξη (R&D – research and development) νέων ΦΠ από το 1995 καθώς και στην αύξηση του απαιτούμενου χρόνου (McDougall, 2016).

Σχετικά με την εισαγωγή νέων δ.ο. στην αγορά πρέπει να σημειωθεί ότι η ανακάλυψη και παραγωγή ενός νέου ΦΠ με πραγματικά καινούριο μηχανισμό δράσης αποτελεί μια χρονοβόρα και κοστοβόρα διαδικασία, ενώ παρουσιάζεται και δυσκολία ανακάλυψης δραστικών ουσιών με διαφορετικό από τους ήδη υπάρχοντες μηχανισμό δράσης (Duke, 2012). Ωστόσο, η ανάπτυξη ανθεκτικότητας των εχθρών και παθογόνων στα ήδη υπάρχοντα ΦΠ αποτελεί βασικό μοχλό για την ανάπτυξη νέων ΦΠ με νέο μηχανισμό δράσης (Menne and Köcher, 2012, Hollomon, 2015, Sparks and Nauen, 2015). Κατά τη διάρκεια της τελευταίας δεκαετίας 105 συνθετικά χημικά κυκλοφόρησαν ή είναι υπό ανάπτυξη: 43 μυκητοκτόνα, 40 εντομοκτόνα/ακαρεοκτόνα/νηματοδοκτόνα, 21 ζιζανιοκτόνα και 1 προστατευτικό (safener) (Umetsu and Shirai, 2020). Από αυτά οι συνθετικές δ.ο. [σύμφωνα με τους Umetsu and Shirai (2020) και επιπρόσθετες πληροφορίες] οι οποίες εμφανίζουν νέο ή άγνωστο μηχανισμό δράσης φαίνονται στους Συμπληρωματικούς Πίνακες στο τέλος του κεφαλαίου (Συμπληρωματικός Πίνακας 1 και Συμπληρωματικός Πίνακας 2).

Υπάρχουν πολλοί παράγοντες που επηρεάζουν την έρευνα και ανάπτυξη (E&A) των νέων ΦΠ πέραν της ανάγκης νέων μηχανισμών δράσης λόγω της ανάπτυξης ανθεκτικότητας (Beckie and Harker, 2017, Dayan, 2019, Sparks and Lorsbach, 2017). Καταρχάς, όπως αναφέρθηκε και νωρίτερα, έχει αυξηθεί πολύ το κόστος και οι απαιτήσεις έγκρισης των δ.ο.. Αυτό πιθανώς οδήγησε στην ενοποίηση των εταιρειών που ασχολούνται με την E&A των νέων ΦΠ, καταλήγοντας σε σημαντική μείωση των συμμετεχόντων εταιρειών (Nishimoto, 2019). Επιπρόσθετα, η E&A έχει επηρεαστεί από τη διαχείριση δ.ο. που είναι προς κατάργηση, π.χ. εφαρμογή νέων μορφών τυποποίησης (π.χ. νανοτυποποίηση) σε δ.ο. που έχουν χάσει την πατέντα τους. Ακόμη σημαντικό ρόλο έχει παίξει το γεγονός ότι υπάρχει στροφή προς την παραγωγή σπόρων γενετικά τροποποιημένων (με εφαρμογή genetic manipulation, RNAi, CRISPR), οι οποίοι συνδυάζονται με τα κατάλληλα ΦΠ (Duke, 2018) και επίσης, η χρήση άλλων σκευασμάτων όπως βιολογικά σκευάσματα ή βιοδιεγέρτες στο πλαίσιο της ολοκληρωμένης

διαχείρισης των παθογόνων και εχθρών των φυτών (Phillips, 2019). Τέλος, ένας σημαντικός παράγοντας που επηρεάζει την Ε&Α των νέων ΦΠ φαίνεται να είναι πως οι εταιρείες στοχεύουν σε αναπτυσσόμενες αγορές όπου υπάρχει μεγαλύτερο περιθώριο κέρδους. Συνεπώς, το ενδιαφέρον έχει στραφεί σε εχθρούς και καλλιέργειες που επικρατούν σε αυτές τις περιοχές (Phillips, 2019).

Αξίζει, βέβαια, να σημειωθεί ότι οι επενδύσεις στη βιομηχανία των αγροχημικών παραμένουν υψηλές, καθώς παράλληλα αναπτύσσονται και ολοκληρωμένες λύσεις που σχετίζονται με καινοτόμες τεχνολογίες και με γεωργία ακριβείας. Μάλιστα, οι μεγάλες εταιρείες επενδύουν 7-10% των πωλήσεών τους ετησίως στην Ε&Α νέων ΦΠ τα τελευταία 50 χρόνια (McDougall, 2018). Επιπλέον, παρ' ότι οι νέες δ.ο. των συνθετικών ΦΠ που προστίθενται κάθε χρόνο έχουν μειωθεί τα τελευταία 20 χρόνια (McDougall, 2018), υπάρχει ταχεία αύξηση των βιολογικών ΦΠ που βγαίνουν στην αγορά (Umetsu and Shirai, 2020). Τα βιολογικά ΦΠ είναι σκευάσματα τα οποία βασίζονται σε φυσικά προϊόντα, φερομόνες, ζωντανούς οργανισμούς και αρπαχτικά εντόμων (Copping, 1998) ή με την πιο ευρεία έννοια πρόκειται για βιοχημικά ΦΠ όπως οι φερομόνες ή άλλα ελκυστικά, μικροβιακά σκευάσματα, και εν κατακλείδι ΦΠ τα οποία προέρχονται από γενετικούς χειρισμούς (Lerpla et al, 2018, Glare et al., 2012). Συνεπώς, υπό την ευρεία έννοια τα βιολογικά ΦΠ θα μπορούσαν να είναι συνθετικά.

Η τοξικότητα των ΦΠ αξιολογείται κατά τη διάρκεια έγκρισης ενός προϊόντος και τα σκευάσματα τα οποία δεν πληρούν τα κριτήρια ασφάλειας δεν επιτρέπονται στην αγορά. Η προέλευση ενός ΦΠ, είτε είναι συνθετικό ή βιολογικής προέλευσης, δεν παρέχει πληροφορίες σχετικά με το τοξικολογικό του προφίλ και δεν είναι σωστό να γίνονται τέτοιου είδους γενικεύσεις (Bahlai et al., 2010). Συχνά, τα βιολογικά ΦΠ κατηγοριοποιούνται ως ουσίες μικρού ρίσκου ("low risk") και χαίρουν μεγαλύτερης αποδοχής από τους καταναλωτές (Hammitt, 1990). Παρ' όλα αυτά, έρευνες έχουν δείξει ότι τα βιολογικά εντομοκτόνα (*Beauveria bassiana* και mineral oil) ήταν κατώτερα των συνθετικών εντομοκτόνων (flonicamid και spirotetramat) όταν συγκρίθηκαν η επίδρασή τους στο περιβάλλον, η αποτελεσματικότητα έναντι αφίδων στη σόγια και η εκλεκτικότητά τους (Bahlai et al., 2010). Τέλος, πρέπει να τονιστεί ότι τα ΦΠ που παρουσιάζουν εξειδικευμένη δράση είναι πιο πιθανό να χάσουν την αποτελεσματικότητά τους, συνεπώς θα ήταν προτιμότερο να στοχεύσουμε σε νέα ΦΠ με πολλαπλή δράση (Gressel, 2020).

1.3 Το πρόβλημα των εδαφογενών φυτοπαθογόνων

Αναφέρθηκε νωρίτερα ότι σε παγκόσμιο επίπεδο οι απώλειες στις καλλιέργειες λόγω φυτοπαθογόνων και εχθρών υπολογίζεται ετησίως στο 20-40% της συνολικής παραγωγής (FAO, 2017). Επιπρόσθετα, οι ασθένειες των φυτών οδηγούν σε 14,1% απώλειες στην παραγωγή και εκτιμάται ότι κοστίζουν στην παγκόσμια οικονομία 220 δις δολάρια το χρόνο (Agrios, 2005).

Μία σημαντική κατηγορία φυτοπαθογόνων, για τα οποία μάλιστα υπάρχει έλλειψη σε ΦΠ για την αντιμετώπισή τους, είναι τα εδαφογενή παθογόνα. Τα εδαφογενή παθογόνα περιλαμβάνουν μύκητες και ωομύκητες (Jambhulkar et al., 2015), νηματώδεις (Mesa-Valle et al., 2020, Savary et al., 2019), ιούς που μεταδίδονται από νηματώδεις ή άλλους οργανισμούς (Sarwar et al., 2020, Nicol et al., 2011) και παρασιτικά φυτά [π.χ. οροβάγχη (Dor et al., 2020, Nosratti et al., 2020)]. Γενικά, οι ασθένειες που προκαλούνται από εδαφογενή παθογόνα οδηγούν σε σοβαρές ζημιές σε πολλές καλλιέργειες, είτε μέσω προσβολής σπόρων, αδρομυκώσεις ή ασθένειες των ριζών. Παρ' ότι πρόκειται για διάφορους οργανισμούς υπάρχουν κάποια κοινά χαρακτηριστικά που συνδέονται με το γεγονός ότι δραστηριοποιούνται και επιβιώνουν στο έδαφος για τουλάχιστον μέρος της ζωής τους (Katan, 2017).

Καταρχάς, οι ασθένειες που προκαλούνται από εδαφογενή παθογόνα επηρεάζονται από τα βιοτικά και αβιοτικά συστατικά του εδάφους, όπως επίσης από τη γεωργική πρακτική που εφαρμόζεται στο έδαφος όπως άρδευση, όργωμα και λίπανση. Επιπρόσθετα, προσβάλλουν τα φυτά στα υπόγεια μέρη τους, αλλά μπορούν να επηρεάσουν και υπέργεια μέρη τους (Katan, 2017). Γενικότερα, διαφέρουν από τις ασθένειες του φυλλώματος, γιατί σπανίζουν στα φυσικά οικοσυστήματα. Εξάιρεση αποτελεί η *Phytophthora cinnamomi* σε δάση με ευκάλυπτους στην Αυστραλία (Cook and Baker, 1983). Αυτό σημαίνει ότι η έξαρση των εδαφογενών παθογόνων προωθείται από την εφαρμοζόμενη γεωργική πρακτική που οδηγεί στην αύξηση του μολύσματος στο έδαφος (Katan, 2002, Park, 1963). Επίσης, οι ασθένειες φυλλώματος είναι πολυκυκλικές και επηρεάζονται από τις συνθήκες του περιβάλλοντος ενώ οι εδαφογενείς ασθένειες είναι συνήθως μονοκυκλικές και επηρεάζονται από το περιβάλλον του εδάφους, το οποίο δεν έχει μεγάλες διακυμάνσεις (Katan, 2017).

Επιπλέον, τα εδαφογενή παθογόνα πρέπει να επιβιώσουν για μεγάλα χρονικά διαστήματα χωρίς τον κύριο ξενιστή τους. Η επιβίωση αυτή μπορεί να είναι παθητική μέσω της παραγωγής δομών, οι οποίες είναι ανθεκτικές σε βιοτικούς και αβιοτικούς παράγοντες και παραμένουν αδρανείς στην απουσία του ξενιστή, ή ενεργητική μέσω της προσβολής οργανικής ουσίας του εδάφους ή των ριζών φυτών τα οποία δεν είναι οι κύριοι ξενιστές (ασυμπτωματικά φυτά) (Malcolm et al., 2013, Katan, 1971). Τέλος, η κίνηση των εδαφογενών παθογόνων στο έδαφος είναι περιορισμένη. Παρ' όλα αυτά, η εξάπλωση τους στον αγρό είναι διευρυμένη γεγονός που υποδεικνύει την αποτελεσματική μετάδοσή τους μέσω πολλαπλασιαστικού υλικού, προσβεβλημένου χώματος, προσβεβλημένα μηχανήματα κ.ά. (Katan, 2017).

1.4 Καινοτόμες λύσεις

Η τρέχουσα γεωργική πρακτική αντιμετωπίζει πολλούς περιορισμούς όπως η χαμηλή απόδοση των αγροχημικών προϊόντων (National Academies of Sciences & Medicine, 2019), οι απώλειες παραγωγής λόγω παρασίτων και ασθενειών που φτάνουν το 50% σε τροπικές περιοχές

(Maxmen, 2013), οι τεράστιες απώλειες σε ενέργεια (National Academies of Sciences & Medicine, 2019) και προβλήματα ευτροφισμού (Diaz and Rosenberg, 2008) ή νερού που περιέχει έμμονους ρύπους (π.χ. εντομοκτόνα) (Klarich et al., 2017), καθώς και αύξηση των εκπομπών των αερίων του θερμοκηπίου (EPA, 2020). Λαμβάνοντας υπόψη, επιπλέον, την απαραίτητη αύξηση της παραγωγής κατά 50-80% έως το 2050, καθίσταται σαφές ότι μια νέα γεωργική επανάσταση είναι επιτακτική. Στην πραγματικότητα, μια νέα αγρο-τεχνολογική επανάσταση αναδύεται, με στόχο την βιώσιμη ικανοποίηση μελλοντικών απαιτήσεων. Η επανάσταση, η οποία τροφοδοτείται από νέα υλικά όπως η νανοτεχνολογία (Kah et al., 2019, Rodrigues et al., 2017), και μοντέρνες μεθόδους παραγωγής ακριβείας όπως η υδροπονία (Herman and Surantha, 2019), υπόσχεται να κάνει τη γεωργία πιο αποτελεσματική, ανθεκτική και αειφορική και ενδεχομένως να μπορεί να δώσει λύσεις σε φυτοπαθολογικά προβλήματα όπως είναι τα εδαφογενή παθογόνα.

Τα εδαφογενή παθογόνα, όπως περιγράφηκε παραπάνω, παρουσιάζουν δυσκολίες αλλά και εναλλακτικές λύσεις για την αντιμετώπισή τους. Η παρουσία των παθογόνων στο έδαφος καθιστά την εφαρμογή των μέτρων αντιμετώπισης τους δύσκολη, αλλά παράλληλα επιτρέπει τον ακριβή προσδιορισμό του αρχικού μολύσματος με τα κατάλληλα εργαλεία (Katan et al., 2012). Ωστόσο, το μόλυσμα που υπάρχει στο έδαφος δεν είναι η μοναδική πηγή μόλυνσης για αυτό κατά την αντιμετώπιση πρέπει να λαμβάνονται υπόψιν όλες οι πιθανές πηγές μόλυνσης (Katan, 2017). Οι Chellemi et al. (2016) έχουν προτείνει τέσσερις πυλώνες για τη διαχείριση των εδαφογενών παθογόνων: (α) πρόληψη της εισαγωγής και εξάπλωσής τους στα αγροτεμάχια, (β) μείωση του υπάρχοντος πληθυσμού παθογόνων με βιολογικούς τρόπους, (γ) βελτίωση των χαρακτηριστικών του εδάφους που δρουν ανασταλτικά προς τα παθογόνα και (δ) εφαρμογή ΦΠ στο πλαίσιο της ολοκληρωμένης διαχείρισής τους (Εικόνα 1.5). Αναλυτικότερα, οι βασικές στρατηγικές διαχείρισης των εδαφογενών παθογόνων περιλαμβάνουν φυσικά, χημικά, βιολογικά και καλλιεργητικά μέτρα, όπως επίσης και γενετική βελτίωση, για παράδειγμα: ηλιοαπολύμανση, χρήση βιολογικών σκευασμάτων, γεωργικά φάρμακα, ανθεκτικές ποικιλίες, εμβολιασμό σε ανθεκτικά υποκείμενα κ.ά. Όσον αφορά τη διαχείριση των εδαφογενών φυτοπαθογόνων στο θερμοκήπιο η διαχείρισή τους πρέπει να περιλαμβάνει και την απολύμανση του θρεπτικού διαλύματος ή του νερού άρδευσης (Chellemi et al., 2016).

Οι εφαρμοζόμενες πρακτικές σήμερα χωρίζονται σε τρεις κατηγορίες: (i) απολύμανση του εδάφους, (ii) ανθεκτικές ποικιλίες και εμβολιασμός σε ανθεκτικά υποκείμενα, και (iii) επιπλέον μέτρα όπως η εφαρμογή βιολογικών ΦΠ (σκευάσματα που περιέχουν το *Trichoderma* sp.), μυκητοκτόνα σε σπόρους, επαγωγείς της άμυνας των φυτών και καλλιεργητικές τεχνικές (Katan, 2017).

Συνολικά, η καλύτερη στρατηγική για τη διαχείριση των ασθενειών που προκαλούνται από εδαφογενή παθογόνα πρέπει να στοχεύει στην οικονομικά ασφαλή μείωση τους με τη μικρότερη δυνατή αναταραχή του περιβάλλοντος. Απαιτείται μία ολιστική προσέγγιση στην αντιμετώπισή τους η οποία καθιστά αναγκαία την εύρεση καινοτόμων λύσεων (Kinkel et al.,

2011). Ουσιαστικά, η ανάπτυξη νέων εργαλείων πρέπει να είναι μια ασταμάτητη εργασία και όχι μία ανάγκη η οποία προκύπτει επιτακτικά λόγω συνθηκών.



Εικόνα 1.5: Σχηματική απεικόνιση των τεσσάρων πυλώνων για την ολοκληρωμένη αντιμετώπιση των εδαφογενών φυτοπαθογόνων σύμφωνα με τους Chellemi et al. (2016)

1.4.1 Νανοτεχνολογία – Βιοδραστικά νανოსωματίδια

Οι εφαρμογές νανοτεχνολογίας στη γεωπονία έχουν συζητηθεί από τα τέλη της δεκαετίας του '90 (Scott and Chen, 2012, Roco et al., 2000), ωστόσο τα σχετικά προϊόντα είναι ακόμη περιορισμένα (Kah et al., 2019). Γενικά, υπάρχουν πολλές εφαρμογές νανοτεχνολογίας στη γεωπονία π.χ. νανο-σκευάσματα που παρέχουν ελεγχόμενη απελευθέρωση δ.ο. για φυτοφάρμακα ή λιπάσματα, νανοϋλικά που χρησιμοποιούνται για επεξεργασία σπόρων καθώς και νανοαισθητήρες που παρακολουθούν τις ασθένειες *in situ* (Fraceto et al., 2016, Lowry et al., 2019). Λαμβάνοντας υπόψη τα προαναφερθέντα, η νανοτεχνολογία ωφελεί την παραγωγή καλλιεργειών εξασφαλίζοντας μεγαλύτερη ακρίβεια και συντελώντας στην αειφορία (Kah et al., 2019, Rodrigues et al., 2017). Μια πολύ ελπιδοφόρα εφαρμογή της νανοτεχνολογίας στη γεωργία είναι τα νανο-ΦΠ.

Τα νάνο-ΦΠ, είναι καινοτόμα ΦΠ που αξιοποιούν τη νανοτεχνολογία στη φυτοπροστασία. Το πρόθεμα «νάνο» χρησιμοποιείται για να περιγράψει υλικά μικρότερα από 100 νανόμετρα (EFSA, 2021). Συνολικά, τα νάνο-ΦΠ είναι πολλά υποσχόμενα για εφαρμογή στη φυτοπροστασία διασφαλίζοντας την αειφορία (Hofmann et al., 2020, Vega-Vásquez et al., 2020). Παρ' όλα αυτά, η αξιολόγηση της ανάπτυξης των νάνο-ΦΠ δεν είναι εφικτή καθώς δεν υπάρχει ακριβής ορισμός για αυτά (Grillo et al., 2021). Η γενικά αποδεκτή ιδέα είναι ότι τα νανο-ΦΠ είναι προϊόντα που αποτελούνται από i) οργανικά / ανόργανα νανοσωματίδια που έχουν "κτόνο" δράση (Lykogianni et al., 2020, Elmer et al., 2018), (ii) υβριδικές συνθέσεις τόσο ανόργανων όσο και οργανικών υλικών (Camara et al., 2019, Huang et al., 2018, Zhao et al., 2018) ή iii) πιο συχνά, νανοτυποποιημένες δ.ο. που έχουν ελεγχόμενη απελευθέρωση (Singh et al., 2020). Στην Ευρώπη υπάρχει μόνο σχετική σύσταση που αφορά τον ορισμό των νανοϋλικών (European Commission, 2021a) και οι προτεινόμενες οδηγίες για την εκτίμηση επικινδυνότητας των νανοϋλικών είναι ίδιες με αυτές που ισχύουν για τα ΦΠ γενικά (Grillo et al., 2021, EFSA, 2018a). Ωστόσο, ο όρος «νάνο-ΦΠ» χρησιμοποιείται στην επιστημονική βιβλιογραφία για σκευάσματα που αποτελούνται από σωματίδια έως 1000 nm, τόσο για τα ΦΠ όσο και για τα βιοκτόνα (Grillo et al., 2021). Επομένως, η έλλειψη σαφή ορισμού καθιστά αδύνατη την κατανόηση εάν ένα νάνο-ΦΠ που αναφέρεται στη βιβλιογραφία βρίσκεται επί του παρόντος σε στάδιο E&A ή πρόκειται σύντομα να εμπορευτεί κ.λπ. (Grillo et al., 2021).

Όσον αφορά την αποτελεσματικότητα των νανοφαρμάκων πρέπει να αναφερθεί ότι αντιπροσωπεύουν μια καινοτόμο πηγή βιοδραστηκότητας. Μεταξύ των πλεονεκτημάτων τους παρουσιάζουν ελεγχόμενη απελευθέρωση των δ.ο., βελτιωμένο τοξικολογικό προφίλ καθώς και εκλεκτικότητα (Saini et al., 2020, Balaure et al., 2017). Επιπλέον, αξιολόγηση των νανο-ΦΠ σε σύγκριση με τα συμβατικά φυτοφάρμακα έδειξε ότι το όφελος στην αποτελεσματικότητα κυμαίνεται από 20-30% (Kah et al., 2018a, 2018b). Πιο συγκεκριμένα, το μικρότερο μέγεθος των σωματιδίων, η υψηλότερη αναλογία επιφάνειας προς όγκο προσδίδει στα νάνο-ΦΠ μεγαλύτερη αποτελεσματικότητα και σταθερότητα από τα συμβατικά σκευάσματα για ζιζανιοκτόνα (Tong et al., 2017, de Oliveira et al., 2015, Oliveira et al., 2015, Grillo et al., 2014, Pereira et al., 2014), εντομοκτόνα (Chen et al., 2018, Wang et al., 2018), ακαρεοκτόνα (de Oliveira et al., 2018), νηματοδοκτόνα (Cao et al., 2015) και μυκητοκτόνα (Campos et al., 2015). Επιπρόσθετα, η νανοτυποποίηση της δ.ο. βελτιώνει την πρόσφυση και τη διείσδυση στα φύλλα, χαρακτηριστικά τα οποία θα μπορούσαν, ενδεχομένως, να μειώσουν τις απαιτούμενες εφαρμογές των ΦΠ, το συνολικό κόστος, καθώς και τον αντίστοιχο κίνδυνο ανάπτυξης ανθεκτικότητας (Balaure et al., 2017). Επίσης, από εμπορική άποψη, η νανοτυποποίηση θα μπορούσε να αξιοποιηθεί για δ.ο. χωρίς προστασία ευρεσιτεχνίας (Phillips, 2019).

Λαμβάνοντας υπόψη την αύξηση της βιβλιογραφίας από πανεπιστήμια και ερευνητικά κέντρα σε όλο τον κόσμο σχετικά με τα νανο-ΦΠ καθώς και τον αυξανόμενο αριθμό διπλωμάτων ευρεσιτεχνίας (Grillo et al., 2021, Kah et al., 2019) είναι βέβαιο ότι τα νανο-ΦΠ θα συμβάλουν σημαντικά στην προστασία των φυτών, και θα αποτελέσουν σημαντική εισροή ξενοβιοτικών ουσιών στο περιβάλλον (Kookana et al., 2014). Μέχρι στιγμής, η τρέχουσα γνώση

για την οικοτοξικότητά τους είναι ελλιπής, ενώ υπάρχει πληθώρα μελετών σχετικά με την αποτελεσματικότητα τους στους οργανισμούς στόχους (Grillo et al., 2021). Ωστόσο, στα κριτήρια έγκρισης νέων φυτοφαρμάκων, μια σημαντική πτυχή είναι η εκτίμηση του περιβαλλοντικού κινδύνου. Συνολικά, το κόστος για μελέτες περιβαλλοντικής χημείας σχεδόν διπλασιάστηκε από το 1995 λόγω της αυστηρότερης νομοθεσίας (McDougall, 2016). Επομένως, πριν από τη διάθεση ενός νέου νανο-ΦΠ στην αγορά, τα κριτήρια αξιολόγησης θα έχουν διασφαλίσει την ασφάλειά του στην παραγωγή καλλιεργειών, στο περιβάλλον και στους ανθρώπους. Στην ΕΕ, προς το παρόν, η εκτίμηση επικινδυνότητας για τα νανο-ΦΠ στο περιβάλλον, είναι σύμφωνη με την εκτίμηση επικινδυνότητας για είδη που δεν αποτελούν στόχο και δεν έχουν αναπτυχθεί συγκεκριμένες δοκιμές για νανο-ΦΠ (Grillo et al., 2021).

Παρ' όλα αυτά, η καταλληλότητα των δοκιμών είναι ένα ακόμα αμφιλεγόμενο θέμα. Προς το παρόν, η FIFRA (Scientific Advisory Panel of the US Federal Insecticide, Fungicide, and Rodenticide Act) εξέτασε τα φυτοφάρμακα που περιέχουν νανο-μέταλλα ή οξείδια μετάλλων (Grillo et al., 2021, FIFRA, 2010). Πιο συγκεκριμένα, έχει αναγνωριστεί ότι οι πιθανοί κίνδυνοι για την υγεία και το περιβάλλον τέτοιων νανοσωματιδίων, μπορεί να διαφέρουν από τα συμβατικά φυτοφάρμακα και οι τρέχουσες μέθοδοι πιθανώς δεν επαρκούν για την αποκατάσταση ή την πρόβλεψη της τύχης και συμπεριφοράς τους στο περιβάλλον (Grillo et al., 2021). Επίσης, είναι απαραίτητο για τα νανο-ΦΠ να ληφθούν υπόψη οι μακροπρόθεσμες επιπτώσεις (Kah et al., 2019), η απόκριση χαμηλής δόσης σε οργανισμούς στόχους και μη-στόχους (Agathokleous et al., 2020), καθώς και οι παράμετροι που αξιολογούνται (Villaverde et al., 2018). Τέλος, πρέπει να εξεταστούν σε πραγματικές συνθήκες.

Συνολικά, υπάρχει έλλειψη στη βιβλιογραφία για την τοξικότητα και την τύχη και συμπεριφορά στο περιβάλλον των νανο-ΦΠ που έχουν δοκιμαστεί σε διάφορες περιβαλλοντικές συνθήκες και οργανισμούς (Walker et al., 2018, Kobetičová and Černý, 2017). Οι κύριοι λόγοι για τους οποίους οι τυπικοί προσδιορισμοί ενδέχεται να μην ταιριάζουν είναι ότι τα νανο-ΦΠ είναι πιθανώς διαφορετικά στην κινητική απελευθέρωσης/διάλυσης της δ.ο. και πιθανώς, αλληλεπιδρούν διαφορετικά με τα φυτά και το έδαφος (Fojtóná et al., 2019). Αυτό οφείλεται στο γεγονός ότι τα νανο-ΦΠ έχουν διαστάσεις στη νάνο-κλίμακα, η οποία θα μπορούσε να οδηγήσει σε διακριτή αλληλεπίδραση με ή μέσα σε έναν οργανισμό (Grillo et al., 2021). Συνεπώς, η ανάπτυξη τυποποιημένων μεθόδων για τον έλεγχο των νάνο-ΦΠ αποτελεί επιτακτική ανάγκη (Hund-Rinke et al., 2016, OECD, 2016). Επιπλέον, οι δοκιμές που εξετάζουν την πιθανή τροφική μεταφορά νανοσωματιδίων (Gardea-Torresdey et al., 2014) και μελέτες "omics" (Majumdar and Keller, 2020, Revel et al., 2017) μπορεί να είναι απαραίτητες για την ανακάλυψη των ανεπιθύμητων επιδράσεων και τον περαιτέρω προσδιορισμό νέων στρατηγικών για την επιτυχή εφαρμογή των νανοϋλικών στη φυτοπροστασία (Kah et al., 2019). Σε γενικές γραμμές, υπάρχει συναίνεση στην ανάγκη τυποποίησης και επικύρωσης πρωτοκόλλων για την αξιολόγηση των νανο-ΦΠ (Grillo et al., 2021, Vega-Vásquez et al., 2020).

1.4.2 Καλλιέργειες εκτός εδάφους – Απολύμανση θρεπτικού διαλύματος

Η καλλιέργεια στο έδαφος αντιμετωπίζει σήμερα πολλές προκλήσεις όπως η αστικοποίηση, η λειψυδρία, η κλιματική αλλαγή κ.ά. Επίσης, οι ξαφνικές φυσικές καταστροφές και η απεριόριστη χρήση χημικών για γεωργικούς σκοπούς προκαλούν εξάντληση της γονιμότητας και της ποιότητας του εδάφους. Αυτός είναι ο λόγος για τον οποίο, οι επιστήμονες έχουν αναπτύξει μια νέα εναλλακτική προσέγγιση στα συστήματα καλλιέργειας, την καλλιέργεια εκτός εδάφους (Seerat et al., 2020).

Το κύριο πλεονέκτημα της καλλιέργειας εκτός εδάφους, η οποία συχνά αναφέρεται ως «υδροπονία», είναι ουσιαστικά η ανεξαρτησία της καλλιέργειας από το έδαφος (Πίνακας 1.1). Το έδαφος ως φυσικό μέσο είναι ετερογενές και μπορεί να είναι άγονο, αλατούχο ή αλκαλιωμένο. Επίσης, έχει φυτοπαθογόνους οργανισμούς και σε μονοκαλλιεργητικά συστήματα τείνει να υποβαθμίζεται (Savvas and Gruda, 2018). Η ανεξάρτηση από το έδαφος ως μέσου ανάπτυξης του ριζικού συστήματος επιτρέπει τη βελτιστοποίηση τόσο των φυσικών όσο και των χημικών χαρακτηριστικών στο ριζικό περιβάλλον καθώς και έναν αποτελεσματικότερο έλεγχο των παθογόνων μικροοργανισμών που διαβιούν στο έδαφος και προσβάλλουν το φυτό μέσω του ριζικού συστήματος χωρίς την ανάγκη εφαρμογής υποκαπνιστικών εδάφους. Αυτό συνεπάγεται υψηλότερες αποδόσεις των καλλιεργειών με μικρότερο συνήθως κόστος παραγωγής σε συνδυασμό με μειωμένη χρήση φυτοφαρμάκων και υψηλή ποιότητα προϊόντων (Gruda et al 2018).

Η υδροπονική καλλιέργεια αποτελεί μία καλλιεργητική τεχνική η οποία μπορεί να συνεισφέρει στην ποιοτική και ποσοτική αύξηση της παραγωγής των θερμοκηπιακών κηπευτικών (Σαββας, 2011). Ο όρος “υδροπονία” καθιερώθηκε από τον Gericke (1937), και προέρχεται από την σύνθεση δυο ελληνικών λέξεων, ύδωρ- που σημαίνει νερό και -πόνος με την αρχαιοελληνική έννοια της εργασίας. Η υδροπονία χρησιμοποιείται τις περισσότερες φορές ως συνώνυμο του όρου “καλλιέργεια εκτός εδάφους” και αναφέρεται σε όλες τις καλλιεργητικές μεθόδους στις οποίες η ανάπτυξη των φυτών δεν πραγματοποιείται στο έδαφος (Savvas, 2003, Gruda et al., 2016). Παρ’ όλα αυτά, ορισμένοι επιστήμονες διαχωρίζουν τους δύο όρους θεωρώντας την υδροπονία ως στενότερο όρο από αυτόν των καλλιεργειών εκτός εδάφους, διαχωρίζοντας την από την καλλιέργεια σε ενεργά χημικά μέσα (τύρφη, κόκος και ζεολίτης) (Adams, 2002).

Αναλυτικότερα η καλλιέργεια εκτός εδάφους ανάλογα με το μέσο ανάπτυξης της ρίζας διακρίνεται σε: I) αυτή που πραγματοποιείται σε υπόστρωμα (growing media) π.χ. σε σάκους, φυτοδοχεία ή κανάλια γεμισμένα με υπόστρωμα και χρησιμοποιείται συνήθως για την καλλιέργεια φρούτων και δρεπτών ανθέων, καθώς επίσης II) υδροκαλλιέργεια όπως η καλλιέργεια σε στάσιμο θρεπτικό δ/μα, σε σύστημα επίπλευσης ή σε ρηχό ρεύμα θρεπτικού διαλύματος (Nutrient Film Technique) κ.ά. και III) αεροπονία, οι οποίες χρησιμοποιούνται κυρίως για την παραγωγή φυλλώδων λαχανικών (Savvas and Gruda, 2018). Επιπρόσθετα, υπάρχει η διάκριση ανάλογα με τον τρόπο διαχείρισης των απορροών που υπάρχουν σε δύο

συστήματα: το ανοιχτό και κλειστό σύστημα. Στο πρώτο η περίσσεια θρεπτικού διαλύματος απορρέει ενώ στο δεύτερο ανακυκλώνεται (Σάββας, 2011). Στην παρούσα διατριβή ο όρος υδροπονία χρησιμοποιείται ως συνώνυμος των καλλιέργειών εκτός εδάφους.

Πίνακας 1.1: Θετικά και αρνητικά της υδροπονικής καλλιέργειας (Σάββας, 2011)

ΘΕΤΙΚΑ	ΑΡΝΗΤΙΚΑ
Είναι μέθοδος καλλιέργειας στείρα από εδαφογενή παθογόνα	Υψηλό κόστος αρχικής εγκατάστασης
Δεν επηρεάζεται από τη γονιμότητα του εδάφους και την ποιότητα του νερού άρδευσης	Σχετική μόρφωση του επικεφαλής της εγκατάστασης
Μειωμένο κόστος θέρμανσης και μειωμένο κόστος εργατικών	Στο κλειστό σύστημα είναι αυξημένος ο κίνδυνος μετάδοσης ασθενειών
Ακριβέστερη θρέψη της καλλιέργειας	Στο ανοιχτό σύστημα είναι υψηλό το κόστος λιπασμάτων
Δυνατότητα πρωίμησης της παραγωγής και παραγωγή τροφίμων αυξημένης διατροφικής αξίας	Πιο ευαίσθητο σε λανθασμένους χειρισμούς συγκριτικά με την καλλιέργεια σε έδαφος
Μηχανοποίηση και αυτοματοποίηση των καλλιεργητικών εργασιών	
Το κλειστό υδροπονικό σύστημα αποτελεί φιλική προς το περιβάλλον μέθοδο καλλιέργειας	

Συνολικά, η υδροπονία είναι μία φιλική προς το περιβάλλον και κερδοφόρα τεχνολογία. Φαίνεται ότι θα αξίζει 22.2 δις δολάρια το 2028 από 9.5 δις που άξιζε το 2020 (Globalnewswire, 2021). Για αυτούς τους λόγους και ιδιαίτερα χάρις στη συνεισφορά της στην επίτευξη του στόχου της ασφάλειας των τροφίμων, η υδροπονία υποστηρίζεται και προωθείται από πολλούς κυβερνητικούς και μη κυβερνητικούς οργανισμούς. Μάλιστα, η ανάγκη για την κάλυψη των διατροφικών αναγκών του αυξανόμενου πληθυσμού έχει λειτουργήσει καταλυτικά στην ανάπτυξη της υδροπονίας και η αύξηση στη ζήτηση των υδροπονικών προϊόντων είναι εκθετική. (Mordor Intelligence, 2021). Η Ευρώπη θεωρείται η δεύτερη μεγαλύτερη αγορά παγκόσμια για είδη που καλλιεργούνται υδροπονικά με την Ολλανδία, την Γαλλία, την Γερμανία, την Ελλάδα, την Ιταλία, και την Ισπανία να είναι οι κύριες χώρες παραγωγής (Grand view research, 2021).

Γενικά στις υδροπονικές καλλιέργειες η εφαρμογή αγροχημικών είναι σημαντικά πιο περιορισμένη σε σύγκριση με τις καλλιέργειες στο έδαφος καθώς τα φυτά δεν έρχονται σε επαφή με το έδαφος, ενώ παράλληλα και το εναέριο περιβάλλον είναι ελεγχόμενο, αφού αυτές πραγματοποιούνται στο θερμοκήπιο (Postma et al., 2008). Αν και η υδροπονία επιτρέπει την έναρξη μίας καλλιέργειας χωρίς να προϋπάρχουν εδαφογενή παθογόνα στο περιβάλλον της ρίζας (Savvas and Gruda, 2018), ο κίνδυνος ανάπτυξης εδαφογενών παθογόνων στα υδροπονικά συστήματα δεν είναι μηδενικός καθώς υπάρχει η πιθανότητα μόλυνσης των φυτών μέσω του νερού άρδευσης, του φυτικού υλικού, των μέσων ανάπτυξης, του εργατικού προσωπικού που έρχεται σε επαφή με τα φυτά, αλλά και του αέρα (Stewart-Wade, 2011). Μέχρι σήμερα, έχουν ανιχνευθεί διάφορα εδαφογενή παθογόνα σε υδροπονικές καλλιέργειες

(μύκητες, βακτήρια, ιοί και νηματώδεις) (Stewart-Wade, 2011). Συνεπώς δεν αποκλείεται η σημειακή εμφάνιση μίας προσβολής από εδαφογενή παθογόνα στη διάρκεια μίας υδροπονικής καλλιέργειας. Στα κλειστά υδροπονικά συστήματα, καθώς το διάλυμα που στραγγίζει από το περιβάλλον της ρίζας (διάλυμα απορροής: Δ.Α.) ανακυκλώνεται, υπάρχει ο κίνδυνος γρήγορης εξάπλωσης φυτοπαθογόνων από μία σημειακή προσβολή σε όλη την καλλιέργεια. Ωστόσο, η καλλιεργητική εμπειρία δείχνει ότι η διάδοση εδαφογενών ασθενειών μέσω της ανακύκλωσης του θρεπτικού διαλύματος είναι μικρότερης έκτασης και λιγότερο συχνή από ό,τι θα αναμενόταν (Σάββας, 2011). Ο κίνδυνος όμως είναι υπαρκτός και αρκετός για να καθιστά αναγκαία την εγκατάσταση ενός συστήματος απολύμανσης του Δ.Α. πριν την ανακύκλωσή του στα κλειστά υδροπονικά συστήματα.

Για να εφαρμοστεί μία μέθοδος αντιμετώπισης των εδαφογενών ασθενειών στα κλειστά υδροπονικά συστήματα, σε πρώτο στάδιο είναι απαραίτητη η έγκαιρη και ακριβής ανίχνευση των παθογόνων ώστε να υπολογιστεί ο κίνδυνος της ασθένειας. Αναλυτικότερα, θα πρέπει να οριστούν το κατώφλι ανίχνευσης, όπου εξετάζεται αν ένα παθογόνο μπορεί να ανιχνευτεί χρησιμοποιώντας συγκεκριμένες μεθόδους δειγματοληψίας και το βιολογικό κατώφλι, στο οποίο υπολογίζεται η ποσότητα μολύσματος και η πιθανότητα εμφάνισης της ασθένειας (Hong and Moorman, 2005). Αξιοποιώντας τα παραπάνω υπολογίζεται στη συνέχεια (III) το οικονομικό κατώφλι (Steinberg et al. 1994, Ehret et al. 2001), και κατά συνέπεια αξιολογείται η ανάγκη ενός προγράμματος απολύμανσης.

Σχετικά με τις εφαρμοζόμενες μεθόδους απολύμανσης αυτές ταξινομούνται σε τέσσερις κατηγορίες: καλλιεργητικές, φυσικές, χημικές και βιολογικές (Stewart-Wade, 2011). Οι καλλιεργητικές μέθοδοι αφορούν στον περιορισμό της παρουσίας του μολύσματος ή την αποφυγή εξ ολοκλήρου της μόλυνσης από παθογόνα (Stewart-Wade, 2011). Είναι σημαντικό να αποτραπεί η εισαγωγή φυτικών παθογόνων σε πηγές νερού, π.χ. λίμνες, αποτρέποντας τη μεταφορά μολυσμένου εδάφους και φυτικών υπολειμμάτων μέσα στο νερό που χρησιμοποιείται για την άρδευση (Hong and Moorman, 2005). Ακόμη, ο τύπος, η διάρκεια και ο χρόνος άρδευσης μπορούν να επηρεάσουν την παραγωγή παθογόνου εμβολίου και την επακόλουθη ασθένεια των φυτών μέσω του ανακυκλωμένου Δ.Α (Nielsen et al. 2004). Στην κατηγορία των φυσικών μεθόδων απολύμανσης συγκαταλέγεται η αργή διήθηση με πορώδης στήλη (άμμου, πετροβάμβακα, ελαφρόπετρας ή η διήθηση μέσω κατάλληλων μεμβρανών (Stewart-Wade, 2011). Επίσης, σε αυτή την κατηγορία εντάσσονται και η χρήση θερμότητας για την παστερίωση του Δ.Α. καθώς και η απολύμανση με χρήση υπεριώδους ακτινοβολίας (UV) (Son et al., 2020).

Η βιολογική αντιμετώπιση των παθογόνων σε ένα σύστημα ανακύκλωσης του Δ.Α. περιλαμβάνει τον εμβολιασμό των μέσων καλλιέργειας με καλλιέργειες συγκεκριμένων ωφέλιμων μικροοργανισμών ή την ενίσχυση της υπάρχουσας φυσικής μικροχλωρίδας με μικροβιακά στελέχη που ανταγωνίζονται τα παθογόνα ή, σύμφωνα με νέες ανακαλύψεις στην έρευνα, επάγουν την άμυνα των φυτών (Stewart-Wade, 2011). Φαίνεται να υπάρχουν τρεις κατευθύνσεις στον βιολογικό έλεγχο των παθογόνων: i) η προσθήκη ανταγωνιστικών

μικροοργανισμών π.χ. ριζοβακτήρια (PGPRs) (Garcia et. al., 2004), ii) ο συνδυασμός βιολογικών παραγόντων με παράλληλη εφαρμογή άλλων μεθόδων απολύμανσης και iii) η τροποποίηση των υποστρωμάτων για να ενισχυθεί η ανάπτυξη της ανταγωνιστικής μικροχλωρίδας σε αυτά (Vallance et al., 2011).

Τέλος, στις χημικές μεθόδους απολύμανσης του θρεπτικού διαλύματος της υδροπονικής καλλιέργειας περιλαμβάνονται η χρήση χλωρίου, διοξειδίου του χλωρίου, όζοντος, υπεροξειδίου του υδρογόνου κ.ά. (Stewart-Wade, 2011). Αναλυτικότερα για το χλώριο, μπορεί να εφαρμοστεί σε υγρή, στερεή ή αέρια μορφή (Clark and Smajstrla 1992). Η πιο διαδεδομένη είναι η υγρή μορφή ως υποχλωριώδες νάτριο, δηλαδή κοινώς χλωρίνη (Stewart-Wade, 2011). Η αποτελεσματικότητα της απολύμανσης με χλώριο επηρεάζεται από το ποσοστό οργανικής ουσίας στο διάλυμα, το είδος του παθογόνου, την ποσότητα του μολύσματος και τη θερμοκρασία στο διάλυμα (υψηλότερη αποτελεσματικότητα σε υψηλότερες θερμοκρασίες) (Hong and Moorman, 2005). Επιπλέον, για μέγιστη αποτελεσματικότητα προτείνεται το pH του διαλύματος να κυμαίνεται μεταξύ 5-6 (Wohanka, 2002). Σύμφωνα με την βιβλιογραφία, η συνιστώμενη συγκέντρωση Cl που προκύπτει μετά την προσθήκη χλωρίνης είναι μεταξύ 2.5 κι 5 mg L⁻¹ για την αντιμετώπιση διαφόρων μυκήτων και ωομυκήτων π.χ. είδη του γένους *Pythium* sp. (Cayanan et al., 2008, 2009, Hong et al. 2003c) και *Phytophthora* sp. (Hong, 2001, Hong and Richardson, 2004), *Fusarium oxysporum* f. sp. *dianthii* (Price and Fox, 1984), βακτηρίων όπως το *Agrobacterium tumefaciens* (Poncet et al., 2001), του ιού CLSV (cucumber leaf spot virus) (Rosner et al., 2006) και κομβονηματώδων (Stanton and O'Donnell, 1994), ώστε να μην αναμένεται φυτοτοξικότητα (Σάββας, 2011). Ωστόσο, περαιτέρω έρευνα είναι απαραίτητη σχετικά με την επίδραση της χλωρίνης στα καλλιεργούμενα φυτά. Τέλος, σημαντικά μειονεκτήματα της χρήσης χλωρίου είναι τα προβλήματα συσσώρευσης Na⁺ και Cl⁻ (Postma et al., 2008) και η δημιουργία παραγώγων που είναι τοξικά για τους ανθρώπους (Stewart-Wade, 2011).

1.5 Σκοπός της μελέτης

Απώτερος στόχος της παρούσας διδακτορικής διατριβής ήταν η πρόταση-εύρεση λύσεων έναντι των εδαφογενών παθογόνων στο πλαίσιο της βιώσιμης γεωργίας. Η διατριβή πραγματοποιήθηκε σε δύο ερευνητικά μέρη τα οποία θα μπορούσαν να ενταχθούν στον ευρύτερο τομέα της έρευνας και ανάπτυξης γεωργικών φαρμάκων.

Σε πρώτο στάδιο, και με βάση την επιρροή από τις πρόσφατες εφαρμογές της νανοτεχνολογίας στα φάρμακα των ανθρώπων, επιλέχθηκαν πολυμερικά νανοσωματίδια για τον έλεγχο της εφαρμογής τους στη γεωπονία - φυτοπροστασία. Αναλυτικότερα, αρχικά, εξετάστηκαν νανοσωματίδια υπερδιακλαδισμένης πολυαιθυλενιμίνης ως προς την αποτελεσματικότητα και φυτοτοξικότητά τους ώστε να επιλεγούν αυτά με το καλύτερο προφίλ για περαιτέρω μελέτη. Αυτά που επιλέχθηκαν, μελετήθηκαν περαιτέρω *in vitro* για την αποτελεσματικότητά τους έναντι στο *Verticillium dahliae* Kleb και τους μηχανισμούς δράσης τους με εφαρμογή μεταβολομικής ανάλυσης. Επίσης, στο πλαίσιο ελέγχου της οικοτοξικότητάς τους (σε οργανισμούς μη-στόχους), εξετάστηκε η επίδρασή τους στην ανάπτυξη του οργανισμού-μοντέλο *Lemna minor* L..

Σε δεύτερο στάδιο μελετήθηκε η επίδραση της απολύμανσης του θρεπτικού διαλύματος υδροπονικής καλλιέργειας τομάτας με εφαρμογή υποχλωριώδους νατρίου στην ανάπτυξη, θρέψη και παραγωγή των φυτών καθώς και στην ασφάλεια των καρπών από την πιθανή παραγωγή των τοξικών για τον άνθρωπο χλωρικών και υπερχλωρικών ιόντων. Πιο συγκεκριμένα, παρ'ότι η υδροπονική καλλιέργεια επεκτάθηκε συν των άλλων πλεονεκτημάτων της, ως μία λύση των εδαφογενών παθογόνων στα θερμοκήπια, είναι πλέον ξεκάθαρο ότι ανιχνεύονται εδαφογενή παθογόνα και στο θρεπτικό διάλυμα. Σε αυτό το πλαίσιο, οι παραγωγοί χρησιμοποιούν συχνά υποχλωριώδες νάτριο, χωρίς όμως τα απαραίτητα ερευνητικά δεδομένα σχετικά με την επίδρασή της απολύμανσης στα καλλιεργούμενα φυτά.

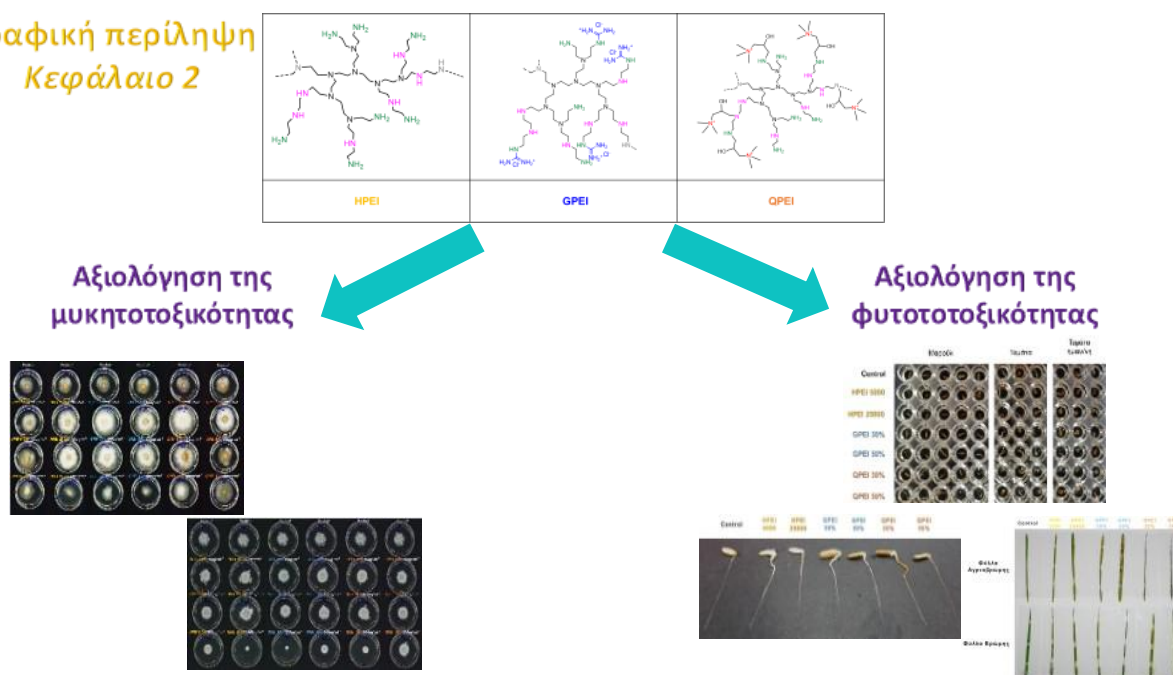
Ειδικό μέρος.
Σύγχρονες λύσεις αντιμετώπισης εδαφογενών
φυτοπαθογόνων

Ειδικό μέρος Ι.

Η χρήση νανοσωματιδίων ως καινοτόμες δραστικές ουσίες στη σύγχρονη φυτοπροστασία

Κεφάλαιο 2. Αξιολόγηση της αποτελεσματικότητας και φυτοτοξικότητας νανοσωματιδίων υπερδιακλαδισμένης πολυαιθυλενιμίνης

Γραφική περίληψη Κεφάλαιο 2



ΣΥΝΤΟΜΟΓΡΑΦΙΕΣ:

δ.ο.: δραστική(ές) ουσία(ες); νάνο-ΦΠ: νανο-φυτοπροστατευτικό(ά) προϊόν(τα); ΦΠ: φυτοπροστατευτικό(ά) προϊόν(τα);

GPEI: υπερδιακλαδισμένη πολυαιθυλενιμίνη τροποποιημένη με γουανιδινικές ομάδες; HPEI: υπερδιακλαδισμένη πολυαιθυλενιμίνη; PDA: Potato Dextrose Agar; QPEI: υπερδιακλαδισμένη πολυαιθυλενιμίνη τροποποιημένη με ομάδες τεταρτοταγών αμμωνιακών αλάτων

2.1 Εισαγωγή

Υπάρχει η γενική συναίνεση ότι είναι αναγκαία η ανακάλυψη νέων πηγών βιοδραστικότητας οι οποίες πρέπει να αναπτυχθούν σε καινοτόμα, βελτιωμένα φυτοπροστατευτικά προϊόντα (ΦΠ), βοηθώντας τον τομέα των αγροχημικών να αντιμετωπίσει μερικά από τα σημαντικά προβλήματα που αντιμετωπίζει, ώστε να διασφαλίζοντας την παραγωγή τροφίμων και τη βιώσιμη γεωργία. Οι πρόσφατες απαιτήσεις στο θεσμολογικό πλαίσιο (Storck et al., 2017), η ανάπτυξη ανθεκτικότητας σε ΦΠ από παθογόνα, εχθρούς και ζιζάνια (Barzman et al., 2015), η παρουσία υπολειμμάτων στα τρόφιμα (Lechenet et al., 2017) και το περιβάλλον (Barzman et al., 2015), καθώς και ζητήματα τοξικότητας σε οργανισμούς μη-στόχους (Mesnage and Séralini,

2018), αποτελούν ορισμένες από εκείνες τις προκλήσεις. Επιπρόσθετα, υπάρχουν κι τα εδαφογενή φυτοπαθογόνα (π.χ. βερτισιλλιώσεις ή φουζαριώσεις) για τα οποία υπάρχει έλλειψη σε εγκεκριμένα ΦΠ για την αντιμετώπισή τους (Jiménez-Díaz et al., 2015, Depotter et al., 2016). Ως αποτέλεσμα των προαναφερθέντων, δριμείς ζημίες στην παραγωγή προκαλούνται συχνά, οι οποίες μερικές φορές οδηγούν σε ολική απώλεια της παραγωγής σε κάποιες καλλιέργειες (Weber, 2002, Keller et al., 2005, Takagi, 2008).

Προκειμένου να αντιμετωπιστούν οι προαναφερθείσες προκλήσεις είναι απαραίτητη η ανακάλυψη νέων πηγών βιοδραστικότητας καθώς και η περαιτέρω ανάπτυξή τους ως ΦΠ ή η ανακάλυψη νέων μορφών τυποποίησης. Με βάση τις πρόσφατες εξελίξεις στον τομέα της νανοτεχνολογίας, τα νανοσωματίδια φαίνεται να έχουν μεγάλες δυνατότητες για την ανάπτυξη ΦΠ νέας γενιάς, τα λεγόμενα νανο-ΦΠ (Kah, 2015, Balaure et al., 2017, Stadler, 2018). Αν και έχουν αναφερθεί πολλές εφαρμογές νανοτεχνολογίας στην ιατρική (Boisseau and Loubaton, 2011, Morigi et al., 2012), η εφαρμογή της στην έρευνα και ανάπτυξη των ΦΠ είναι ακόμη στα σπάργανα (Kah and Hofmann, 2014, Walker et al., 2018).

Τα νανοσωματίδια αποτελούν νέες πηγές βιοδραστικότητας και μπορούν να αξιοποιηθούν είτε *per se* ως ΦΠ είτε ως φορείς κατά την τυποποίηση νάνο-φυτοπροστατευτικά προϊόντα (ΦΠ). Η νανοτυποποίηση δραστικών ουσιών (δ.ο.) με χρήση νανοφορέων έχει ήδη προσελκύσει το ενδιαφέρον πολλών ερευνητών (Balaure et al., 2017, Schallenhämmer et al., 2017, Kah et al., 2018) καθώς συνδέεται με ευνοϊκά χαρακτηριστικά όπως ελεγχόμενη απελευθέρωση των δ.ο., βελτιωμένο τοξικολογικό προφίλ και εκλεκτικότητα (Balaure et al., 2017, Saini et al., 2020). Επιπλέον, μελέτες έχουν δείξει ότι αυξάνει την αποτελεσματικότητά των ΦΠ σε σύγκριση με τα συμβατικά σκευάσματα (Kah et al., 2018) καθώς και την πρόσφυση ή τη διείσδυση στα φύλλων των φυτών, μειώνοντας, κατά συνέπεια, τις απαιτούμενες εφαρμογές σε συχνότητα κι ποσότητα δ.ο., το συνολικό κόστος και τον κίνδυνο ανάπτυξης ανθεκτικότητας (Balaure et al., 2017). Επιπλέον, η νανοτυποποίηση θα μπορούσε να είναι σημαντική από εμπορική άποψη, ειδικά για δ.ο. που έχουν χάσει την προστασία των διπλωμάτων ευρεσιτεχνίας (Phillips, 2019).

Οι νανο-φορείς είναι νανοσωματίδια στα οποία είτε μπορούν να προσδεθούν χημικά ή/και να εγκλείσουν δ.ο., προκειμένου να εξασφαλίσουν τη μεταφορά τους στο σημείο στόχο και ιδανικά, να απελευθερώσουν ελεγχόμενα τη δ.ο. (Kurniasih, 2015, Ray et al., 2019). Διάφορα οργανικά ή ανόργανα υλικά που παρουσιάζουν χαρακτηριστικά όπως η μια τους διάσταση να είναι της μικρότερη από 100 nm και υψηλή αναλογία επιφάνειας προς όγκο κ.ά. θα μπορούσαν να χρησιμεύσουν ως νανο-φορείς (Kesharwani et al., 2014). Μεταξύ των νανοφορέων, οι δένδριτικοί νανο-φορείς εμφανίζουν ιδιότητες ευνοϊκές στη νανοτυποποίηση (Caminade et al., 2015) και τα υπερδιακλαδισμένα πολυμερή περιλαμβάνονται σε αυτήν την κατηγορία. Αναλυτικότερα τα υπερδιακλαδισμένα πολυμερή είναι μακρομόρια με τρισδιάστατη δομή και φέρουν ποικιλία λειτουργικών ομάδων στα τελικά τους σημεία (Kurniasih, 2015). Συντίθενται μέσω πολυμερισμού ενός σταδίου (Caminade et al., 2015), ο οποίος μειώνει το σχετικό κόστος παραγωγής (Kurniasih, 2015). Μια ομάδα υπερ-

διακλαδισμένων πολυμερών που εμφανίζουν ευνοϊκά χαρακτηριστικά για την ανάπτυξη νανο-ΦΠ είναι αυτή της υπερ-διακλαδισμένης πολυαιθυλενιμίνης (HPEI), των οποίων οι τελικές αμινομάδες μπορούν να τροποποιηθούν με διάφορες λειτουργικές ομάδες όπως ομάδες γουανιδίνης ή και τεταρτοταγών αμμωνιακών αλάτων (Sideratou et al., 2000, Paleos et al., 2008).

Σε αυτό το κεφάλαιο εξετάζεται η αποτελεσματικότητα και φυτοτοξικότητα *in vitro* επιλεγμένων δενδριτικών υπερδιακλαδισμένων πολυμερών (νανοσωματιδίων) με διάφορους υποκαταστάτες και μοριακά βάρη. Η συγκεκριμένη εργασία είχε στόχο την αξιολόγηση της βιοδραστικότητας των εν λόγω νανοσωματιδίων έτσι ώστε να γίνει επιλογή των καταλληλότερων από αυτά για περαιτέρω διερεύνηση της δυνατότητας αξιοποίησής τους στη φυτοπροστασία.

2.2 Υλικά και Μέθοδοι

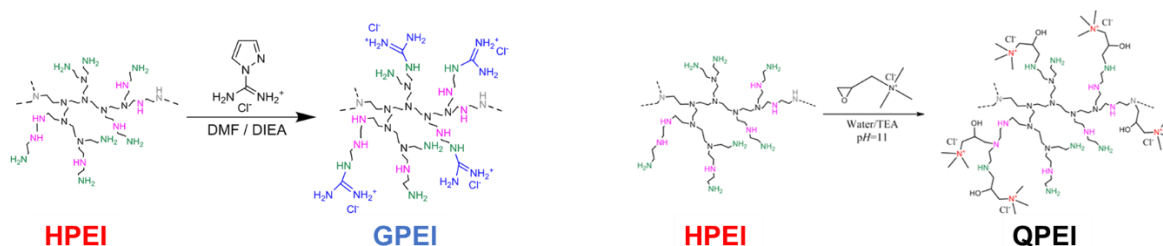
2.2.1 Χημικά και αντιδραστήρια

Στο σύνολο των βιοδοκιμών χρησιμοποιήθηκαν 6 είδη νανοσωματιδίων με βάση παράγωγα της υπερδιακλαδισμένης πολυαιθυλενιμίνης. Τα νανοσωματίδια χρησιμοποιήθηκαν προκειμένου να αξιολογηθεί η βιοδραστικότητά τους και να διερευνηθεί στη συνέχεια η δυνατότητα χρήσης τους ως δραστικές ουσίες. Τα νανοσωματίδια που αξιολογήθηκαν ήταν τα παρακάτω:

- Υπερδιακλαδισμένη πολυαιθυλενιμίνη με M.B.=5000 Da (HPEI 5000)
- Υπερδιακλαδισμένη πολυαιθυλενιμίνη με M.B.=25000 Da (HPEI 25000)
- HPEI 5000 τροποποιημένη με γουανιδινικές ομάδες (υποκατάσταση 30%) (GPEI 30%)
- HPEI 5000 τροποποιημένη με γουανιδινικές ομάδες (υποκατάσταση 50%) (GPEI 50%)
- HPEI 5000 τροποποιημένη με γουανιδινικές ομάδες (υποκατάσταση 50%) (GPEI 50%)
- HPEI 25000 τροποποιημένη με τεταρτοταγείς αμμωνιακές ομάδες (υποκατάσταση 30%) (QPEI 30%)
- HPEI 25000 τροποποιημένη με τεταρτοταγείς αμμωνιακές ομάδες (υποκατάσταση 50%) (QPEI 50%)

Τα νανοσωματίδια παρασκευάστηκαν στο Εργαστήριο Λειτουργικών Νανο-υλικών Οργανωμένης Δομής του Ινστιτούτου Νανοεπιστήμης και Νανοτεχνολογίας του ΕΚΕΦΕ «Δημόκριτος» (Εικόνα 2.1). Υπερδιακλαδισμένη πολυαιθυλενιμίνη (Hyperbranched polyethyleneimine - HPEI) με μοριακό βάρος 5000 Da και 25000 Da (Lupasol® G100, water-free, 99%) ήταν ευγενική χορηγία από την εταιρεία BASF (Ludwigshafen, Germany). Τα ακόλουθα χημικά: χλωριούχο (2,3 εποξυπροπυλο)τριμεθυλο αμμώνιο, Υδροχλωρική 1Η-πυραζολο-1-καρβοξαμιδίνη, Ν,Ν-δι(ισοπροπυλο)αιθυλαμίνη, τριαιθυλαμίνη και μεμβράνη διαπίδυσης

(μοριακό βάρος αποκοπής: 1200), προμηθεύτηκαν από την Sigma-Aldrich Ltd. (Steinheim, Germany).



Εικόνα 2.1: Σχηματική απεικόνιση της σύνθεσης των νανοσωματιδίων GPEI και QPEI

Σύνθεση του παραγώγου GPEI

Το παράγωγο της υπερδιακλαδισμένης πολυαιθυλενιμίνης (HPEI) που φέρει γουανιδινικές ομάδες με 30% και 50% υποκατάσταση των πρωτοταγών αμινομάδων της (GPEI) παρασκευάστηκε σύμφωνα με τη μέθοδο των Tziveleka et al. (2007). Πιο συγκεκριμένα, 0.01 mmol HPEI με μοριακό βάρος 25000 Da, διαλύθηκε σε ξηρό dimethylformamide (DMF), και εν συνεχεία προστέθηκε σε διάλυμα DMF που περιείχε 0,2 mmol υδροχλωρική 1H-πυραζολο-1-καρβοξαμίδίνη και 0.04 mmol *N,N*-δι(ισοπροπυλο)αιθυλαμίνη. Το μείγμα αφέθηκε υπό ανάδευση σε θερμοκρασία δωματίου για 24 ώρες και ατμόσφαιρα αργού. Το προϊόν καταβυθίστηκε με διαιθυλαιθέρα και ακολούθησε ξήρανση υπό κενό. Ακολούθως, το ακατέργαστο προϊόν διαλύθηκε σε νερό και υπέστη περαιτέρω καθαρισμό με μεμβράνες διαπύδσης μοριακού βάρους αποκλεισμού 1200 Da έναντι απεσταγμένου νερού για 24 ώρες. Το τελικό προϊόν παραλήφθηκε μετά από λυοφιλίωση. Ο βαθμός υποκατάστασης προσδιορίστηκε ότι ήταν 30% και 50% με χρήση ^1H NMR και ^{13}C NMR φασματοσκοπίας. Κατά αναλογία παρασκευάστηκε το GPEI 30%.

Σύνθεση του παραγώγου QPEI

Το παράγωγο της υπερδιακλαδισμένης πολυαιθυλενιμίνης (HPEI) που φέρει τεταρτοταγείς αμμωνιακές ομάδες (QPEI) με 30% και 50% υποκατάσταση των πρωτοταγών αμινομάδων της παρασκευάστηκε σύμφωνα με το πρωτόκολλο των Sideratou et al. (2000), Sapalidis et al. (2018). Εν συντομία, υδατικό διάλυμα (10 mL) που περιείχε 12 mmol χλωριούχο (2,3 εποξυπροπυλο)τριμεθυλο αμμώνιο και 24 mmol τριαιθυλαμίνη προστέθηκε στάγδην σε 0,1 mmol HPEI με μοριακό βάρος 25000 Da, διαλυμένο σε 20 mL απεσταγμένο νερό. Το μείγμα αναδεύτηκε επί 48 ώρες, και τέλος, υπέστη περαιτέρω καθαρισμό με μεμβράνες διαπύδσης μοριακού βάρους αποκλεισμού 1200 Da έναντι απεσταγμένου νερού για 24 ώρες έτσι ώστε να απομακρυνθούν τα μικρού μοριακού βάρους παραπροϊόντα. Το QPEI παραλήφθηκε μετά από λυοφιλίωση. Ο βαθμός εισαγωγής των τεταρτοταγών αμμωνιακών ομάδων στην εξωτερική

επιφάνεια του HPEI προσδιορίστηκε με χρήση ^1H NMR φασματοσκοπίας και βρέθηκε ότι είναι 30% και 50% των πρωτοταγών αμινομάδων .

Επιπλέον, η μορφολογία των νανοσωματίδιων HPEI 25000 Da, GPEI 50% και QPEI 50% μελετήθηκε με Μικροσκοπία Σάρωσης με Ακίδα. Το μικροσκόπιο ακίδας που χρησιμοποιήθηκε είναι το μικροσκόπιο ατομικών δυνάμεων AFM model APCS-0001 της εταιρίας Veeco, εφοδιασμένο με κατάλληλη διάταξη που επιτρέπει την ταλάντωση της ακίδας και την περιοδική επαφή της με την επιφάνεια του δείγματος (Tapping Mode). Για την προετοιμασία του δείγματος 4 μL διαλυμάτων νανοσωματιδίων σε μεθανόλη ($2,5 \mu\text{g mL}^{-1}$) εναποτέθηκαν σε ειδικά δοκίμια μίκας (freshly cleaved mica, Pelco Muscovite διαμέτρου 9,9 mm) και ο διαλύτης απομακρύνθηκε υπό ήπια ροή N_2 . Για κάθε δείγμα, έγιναν τρία διαφορετικά δοκίμια.

Πριν την εφαρμογή τους στις βιοδοκιμές, όλα τα νανοσωματίδια διαλύθηκαν σε απεσταγμένο νερό και αποστειρώθηκαν με χρήση φίλτρων ($0,2 \mu\text{m}$). Στη συνέχεια, δημιουργήθηκαν στοκ διαλύματα συγκέντρωσης $10000 \mu\text{g mL}^{-1}$, τα οποία αποθηκεύτηκαν στους -20°C μέχρι τη περαιτέρω επεξεργασία τους.

2.2.2 Βιολογικό υλικό

2.2.2.1 Μελέτη της επίδρασης των νανοσωματιδίων με βάση παράγωγα της υπερδιακλαδισμένης πολυαιθυλενιμίνης στη μυκηλιακή ανάπτυξη μυκήτων και ωομυκήτων *in vitro*

Στις βιοδοκιμές αξιολόγησης της επίδρασης των νανοσωματιδίων με βάση παράγωγα της υπερδιακλαδισμένης πολυαιθυλενιμίνης στη μυκηλιακή ανάπτυξη μυκήτων και ωομυκήτων *in vitro* χρησιμοποιήθηκαν 6 είδη εδαφογενών φυτοπαθογόνων από τη συλλογή του Εργαστηρίου Γεωργικής Φαρμακολογίας, Τμήμα Επ. Φυτικής Παραγωγής, Γ.Π.Α. Συγκεκριμένα, επιλέχθηκαν τα παρακάτω είδη:

Φύλο Ascomycota (Ασκομύκητες)

- *Verticillium dahliae*
- *Fusarium graminearum*

Φύλο Basidiomycota (Βασιδιομύκητες)

- *Rhizoctonia solani* [2 ομάδες αναστόμωσης: AG1(IA), AG3]

Φύλο Oomycota και κλάση Oomycetes (Ωομύκητες)

- *Phytophthora infestans*.

Ο ωομύκητας *Phytophthora infestans*, παρότι προσβάλει εναέρια τμήματα των φυτών επιλέχθηκε ως δείκτης για τη δράση των νανοσωματιδίων στο γένος *Phytophthora* sp., του οποίου είδη είναι εδαφογενή παθογόνα (πχ *P. nicotianae*).

2.2.2.2 Βιοδοκιμές Αξιολόγησης φυτοτοξικότητας

Το βιολογικό υλικό που χρησιμοποιήθηκε στις βιοδοκιμές φυτοτοξικότητας της συγκεκριμένης μελέτης αποτελούνταν από 5 φυτικά είδη (καλλιεργούμενα και ζιζάνια). Συγκεκριμένα, επιλέχθηκαν σπόροι από τα παρακάτω είδη:

- Βρώμη (*Avena sativa* L.)
- Αγριοβρώμη (*Avena sterilis* L.)
- Αγγούρι και Αγγούρι κοντό (*Cucumis sativus* L.)
- Μαρούλι (*Lactuca sativa* L. οικ. Asteraceae)
- Τομάτα αναρριχώμενη και ημιαναρριχώμενη (*Solanum lycopersicum* L.).

Οι σπόροι των φυτών αγγούρι, τομάτα, μαρούλι ήταν ευγενική παροχή του Εργαστηρίου Κηπευτικών Καλλιεργειών, Τμήμα Επ. Φυτικής Παραγωγής, Γ.Π.Α, οι σπόροι αγριοβρώμης ανήκουν στη συλλογή του Εργαστηρίου Γεωργικής Φαρμακολογίας, Τμήμα Επ. Φυτικής Παραγωγής, Γ.Π.Α.

2.2.3 Μελέτη της επίδρασης των νανοσωματιδίων με βάση παράγωγα της υπερδιακλαδισμένης πολυαιθυλενιμίνης σε φυτοπαθογόνους μύκητες και ωομύκητες

Για τη βιοδοκιμή αυτή χρησιμοποιήθηκε βιολογικό υλικό από καλλιέργειες 8 ημερών όλων των μυκήτων εκτός από τις δύο ομάδες αναστόμωσης του *R. solani* των οποίων οι καλλιέργειες ήταν 6 ημερών. Οι συγκεντρώσεις που εφαρμόστηκαν ήταν 0, 10, 100 και 500 $\mu\text{g mL}^{-1}$, ενώ δεν πραγματοποιήθηκαν επαναλήψεις καθώς σκοπός των συγκεκριμένων βιοδοκιμών ήταν η προκαταρκτική αξιολόγηση της βιοδραστικότητας των νανοσωματιδίων. Σε κάθε τρυβλίο τοποθετούνταν 5 mL θρεπτικού υλικού (PDA, Difco, BD, Srr, Ελβετία) και ακολουθούσε εμβολιασμός με 4 mm κυκλικού μυκηλιακού δίσκου για τον εκάστοτε μύκητα. Οι χειρισμοί πραγματοποιήθηκαν σε θάλαμο οριζόντιας νηματικής ροής (laminar), υπό ασηπτικές συνθήκες και ακολούθησε επώαση των καλλιεργειών στους 22°C υπό συνθήκες σκότους. Οι μετρήσεις της ανάπτυξης των καλλιεργειών λαμβάνονταν καθημερινά μέχρι οι αποικίες τους να φτάσουν στην άκρη των τρυβλίων. Για την αξιολόγηση των αποτελεσμάτων υπολογίστηκαν τα ποσοστά παρεμπόδισης της μυκηλιακής ανάπτυξης σε σχέση με το μάρτυρα για κάθε μύκητα και είδος νανοσωματιδίων που εξετάστηκε.

2.2.4 Μελέτη της επίδρασης των νανοσωματιδίων με βάση παράγωγα της υπερδιακλαδισμένης πολυαιθυλενιμίνης σε φυτικά είδη

2.2.4.1 Μελέτη της επίδρασης των νανοσωματιδίων με βάση παράγωγα της υπερδιακλαδισμένης πολυαιθυλενιμίνης στη βλαστικότητα σπόρων μαρουλιού και τομάτας

Η δοκιμή πραγματοποιήθηκε σε 96-well microplate λόγω του μικρού μεγέθους των σπόρων των δύο φυτικών ειδών, με τελική ποσότητα διαλύματος 200 μL σε κάθε κελί. Εφαρμόστηκε η συγκέντρωση 500 $\mu\text{g mL}^{-1}$ για το σύνολο των νανοσωματιδίων, ενώ ο μάρτυρας περιείχε μόνο αποστειρωμένο νερό. Για τη βιοδοκιμή των σπόρων μαρουλιού πραγματοποιήθηκαν 5 επαναλήψεις, ενώ για τις δοκιμές της αναρριχώμενης και ημιαναρριχώμενης τομάτας 3. Πριν την έναρξη της βιοδοκιμής, οι σπόροι απολυμάνθηκαν σε διάλυμα χλωρίνης 5%. Για την απολύμανσή τους αρχικά βυθίζονταν για 1 min στο διάλυμα χλωρίνης, στη συνέχεια ξεπλένονταν με αποστειρωμένο νερό, και τέλος αφήνονταν να στεγνώσουν σε διηθητικό χαρτί. Σε κάθε κελί τοποθετήθηκε ένας σπόρος που αντιστοιχούσε σε μία επανάληψη. Τέλος, το πλακίδιο τυλίχθηκε με βρεγμένο χαρτί, για τη μείωση των απωλειών υγρασίας, και επιπλέον με αλουμινόχαρτο. Η επώαση γινόταν σε επωαστικό θάλαμο στους 22°C στο σκοτάδι. Η λήψη των μετρήσεων έγινε 7 και 10 ημέρες μετά την τοποθέτηση των σπόρων στο πλακίδιο. Αναφορικά με την εκβλάστηση των σπόρων μαρουλιού καταγράφηκε ο αριθμός των σπόρων που εκβλάστησαν και για τους σπόρους τομάτας μετρήθηκε επιπρόσθετα το μήκος του ριζιδίου.

2.2.4.2 Μελέτη της επίδρασης των νανοσωματιδίων με βάση παράγωγα της υπερδιακλαδισμένης πολυαιθυλενιμίνης στην επιμήκυνση του ριζιδίου σπόρων αγγουριού

Η βιοδοκιμή πραγματοποιήθηκε σε υδροπονική καλλιέργεια προβλαστημένων σπόρων 7 ημερών αγγουριού και κοντού αγγουριού, μέσα σε σωληνάριο τύπου erpendorf (erpendorf tubes) χωρητικότητας 1,5 mL. Ο τελικός όγκος διαλύματος ήταν 500 μL . Εφαρμόστηκε η συγκέντρωση 500 $\mu\text{g mL}^{-1}$ για όλα τα νανοσωματίδια. Το στόμιο των tubes καλύφθηκε με parafilm για τον περιορισμό των απωλειών υγρασίας εκτός από μια μικρή οπή που έγινε για τον επαρκή αερισμό των σπόρων. Τα tubes τοποθετήθηκαν σε θάλαμο υπό συνεχή φωτισμό στους 24°C. Στη συγκεκριμένη βιοδοκιμή δεν πραγματοποιήθηκαν επαναλήψεις καθώς στόχος της ήταν αποκλειστικά να παρθεί μία ένδειξη σχετικά με τη φυτοτοξικότητα της υψηλής συγκέντρωσης των νανοσωματιδίων (500 $\mu\text{g mL}^{-1}$).

2.2.4.3 Μελέτη της επίδρασης των νανοσωματιδίων με βάση παράγωγα της υπερδιακλαδισμένης πολυαιθυλενιμίνης στη φυλλική επιφάνεια βρώμης και αγριοβρώμης

Η εφαρμογή των νανοσωματιδίων στα φύλλα βρώμης και αγριοβρώμης πραγματοποιήθηκε σε τρυβλία διαμέτρου 90 mm. Για τη δοκιμή αυτή τα φύλλα που χρησιμοποιήθηκαν λήφθηκαν από φυτάρια βρώμης και αγριοβρώμης τα οποία είχαν αναπτυχθεί σε υπόστρωμα τύρφης:περλίτη (1:1). Συγκεκριμένα, στη βιοδοκιμή χρησιμοποιήθηκε το πρώτο πραγματικό φύλλο από κάθε φυτάριο βρώμης και αγριοβρώμης. Εφαρμόστηκε η συγκέντρωση 500 $\mu\text{g mL}^{-1}$, ενώ δεν πραγματοποιήθηκαν επαναλήψεις.

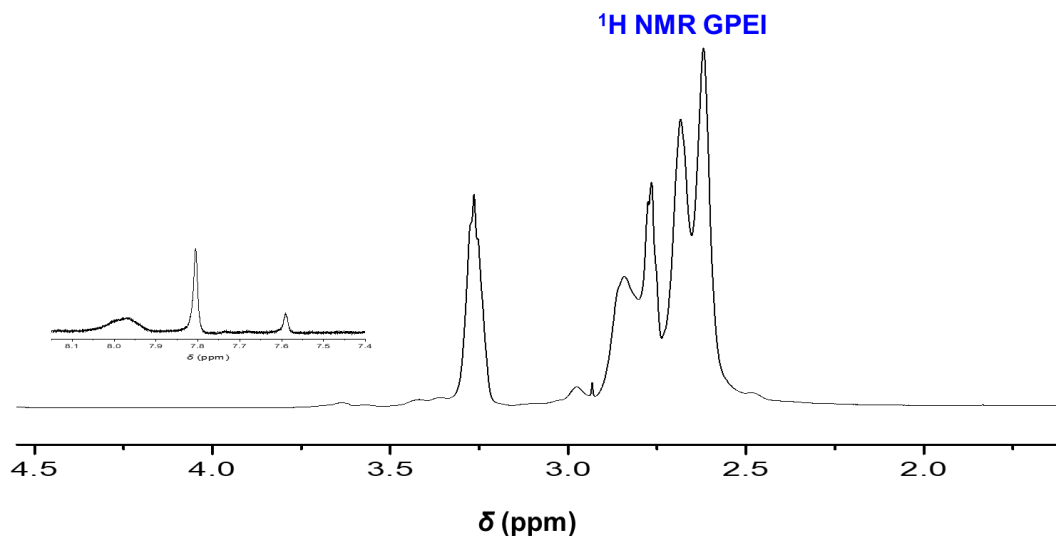
Αρχικά, σε κάθε τρυβλίο τοποθετήθηκε διηθητικό χαρτί το οποίο είχε εμποτιστεί με αποστειρωμένο νερό και πάνω στο διηθητικό χαρτί τοποθετήθηκε μία αντικειμενοφόρος πλάκα. Στη συνέχεια, τα φύλλα που είχαν επιλεγεί για τη δοκιμή τοποθετήθηκαν μέσα στα τρυβλία, ένα φύλλο ανά τρυβλίο πάνω στην αντικειμενοφόρο πλάκα με τρόπο ώστε η κομμένη τους άκρη να προεξέχει από την αντικειμενοφόρο πλάκα και να είναι βυθισμένη στο νερό του τρυβλίου. Με τη βοήθεια αποστειρωμένης βελόνας ανασηκώθηκε η εφυμενίδα σε τρία διακριτά σημεία της επιφάνειας κάθε φύλλου. Τέλος, σε κάθε ένα από τα σημεία αυτά προστέθηκε σταγόνα 10 μL διαλύματος του εκάστοτε νανοσωματιδίου. Στα τρυβλία του μάρτυρα στις οπές των φύλλων προστέθηκαν 10 μL αποστειρωμένου νερού. Τα τρυβλία τοποθετήθηκαν σε θάλαμο με συνεχή φωτισμό στους 24°C. Τα αποτελέσματα εκφράστηκαν ποιοτικά, καθώς πραγματοποιήθηκε παρατήρηση της εικόνας της επιφάνειας των φύλλων μετά από 24 ώρες.

2.3 Αποτελέσματα – Συζήτηση

2.3.1 Σύνθεση νανοσωματιδίων με βάση παράγωγα της υπερδιακλαδισμένης πολυαιθυλενιμίνης

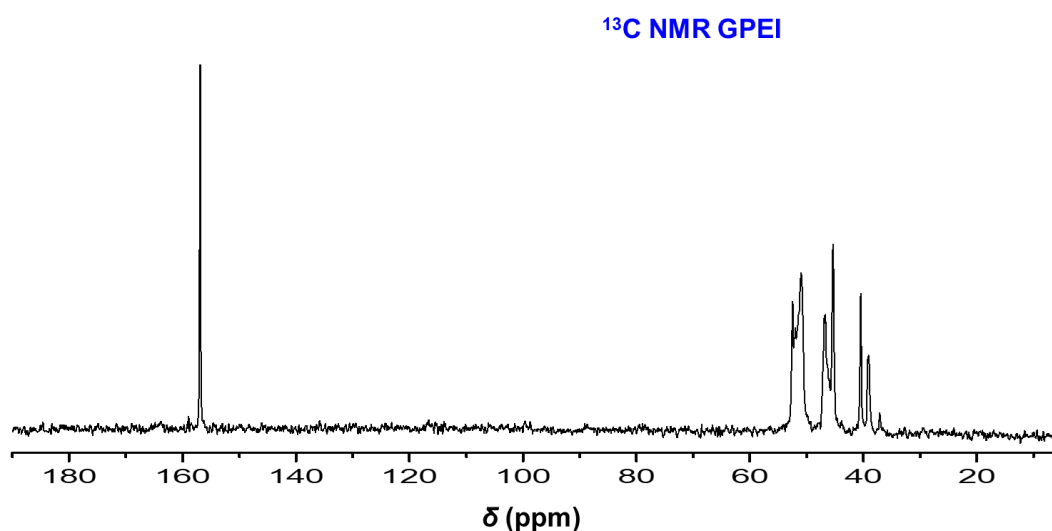
Το HPEI που χρησιμοποιήθηκε στη σύνθεση των νανοσωματιδίων GPEI και QPEI, χαρακτηρίστηκε από αντίστροφη ^{13}C NMR ανάλυση όπως έχει περιγραφθεί προηγουμένως (Sideratou et al., 2018). Τα αποτελέσματα της ανάλυσης έδειξαν ότι η αναλογία πρωτοταγών: δευτερογενών: τριτοταγών αμινομάδων (NH_2 : NH : N) ήταν 1,06: 1,26: 1,00, ενώ ο βαθμός διακλάδωσης ήταν 0,68. Η συνθετική πορεία που ακολουθήθηκε είχε ως αποτέλεσμα τη σύνθεση των νανοσωματιδίων GPEI και QPEI με βαθμό υποκατάστασης 30% και 50% των

πρωτοταγών αμινομάδων της HPEI. Η σύνθεση του QPEI καθώς και ο δομικός χαρακτηρισμός του έχουν περιγραφθεί πρόσφατα (Saralidis et al., 2018).



¹H NMR: (500 MHz, DMSO- d_6) δ (ppm) = 7.85 (broad s, NH), 7.80 and 7.59 (s, NH_2^+), 3.25 (m, $\text{NCH}_2\text{CH}_2\text{NH-G}$), 2.70 - 2.50 (m, CH_2 of HPEI scaffold).

Εικόνα 2.2: ¹H NMR φάσμα του GPEI



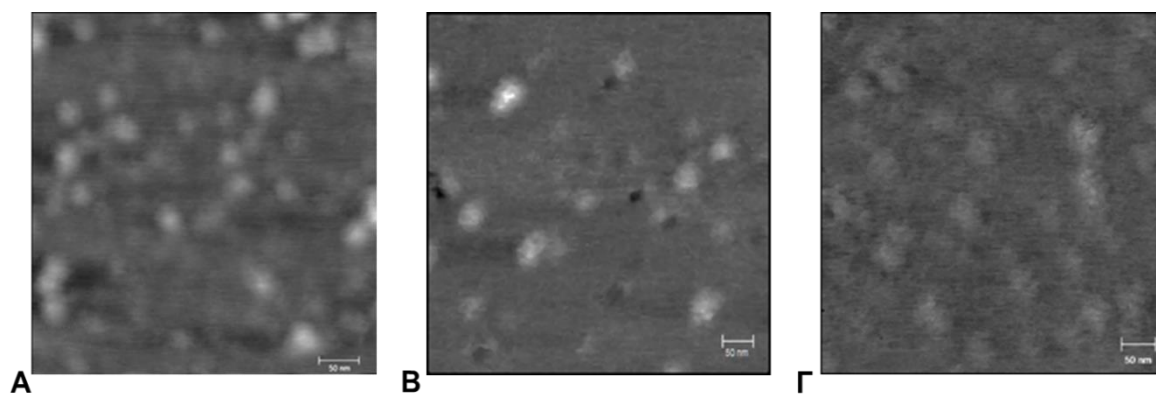
¹³C NMR (125.1 MHz, D_2O): δ (ppm) = 158.5 ($\text{CH}_2\text{NHCO}(\text{NH}_2)\text{NH}_2^+$), 55–51.0 (CH_2 of HPEI scaffold), 41.0 και 40.0 (C_{1-2} and C_{1-3} of CH_2NH_2 group, respectively), 39 και 37 (C_{1-2} and C_{1-3} of $\text{CH}_2\text{NH-G}$ group, respectively).

Εικόνα 2.3: ¹³C NMR φάσμα του GPEI

Αντίστοιχα, η επιτυχής υποκατάσταση του HPEI με γουανιδινικές ομάδες αξιολογήθηκε με φασματοσκοπία ¹H και ¹³C NMR. Αναλυτικότερα, στο ¹H NMR φάσμα του GPEI 50% παρατηρούνται νέες κορυφές στα 7,85 και 7,20 ppm που αποδίδονται στα πρωτόνια των ομάδων της γουανιδίνης καθώς και άλλη μια στα 3.15 ppm, η οποία αποδίδεται στα πρωτόνια των ομάδων α -μεθυλενίου δίπλα στις ομάδες της γουανιδίνης (Εικόνα 2.2). Επιπλέον,

παρατηρείτε η πολλαπλή κορυφή στα 2,60 ppm η οποία αποδίδεται στα πρωτόνια των μεθυλενίων του σκελετού του HPEI. Ο βαθμός υποκατάστασης του HPEI υπολογίστηκε από τη σύγκριση των ολοκληρωμάτων των κορυφών στα 3,15 και 2,60 ppm, και βρέθηκε ότι το 50% των πρωτοταγών αμινομάδων του HPEI υποκαταστάθηκε από ομάδες γουανιδίνης. Η δομή του GPEI 50% μελετήθηκε περαιτέρω με φασματοσκοπία ^{13}C NMR. Η επιτυχής σύνδεση των ομάδων γουανιδίνης στο HPEI επιβεβαιώθηκε από την παρουσία νέων σημάτων στο φάσμα ^{13}C NMR του (Εικόνα 2.3) στα 158,5 ppm που αποδίδονται στον άνθρακα της γουανιδινικής ομάδας, και στα 36 και 39 ppm που αποδίδονται στους άνθρακες C_{1-3} και C_{1-2} των α -μεθυλενίων δίπλα στην ομάδα της γουανιδίνης, αντίστοιχα.

Επιπλέον, χρησιμοποιήθηκε μικροσκοπία ατομικής δύναμης (AFM) για τη μελέτη της μορφολογίας των νανοσωματιδίων HPEI, GPEI και QPEI. Όπως φαίνεται στην Εικόνα 2.4 όλα τα νανοσωματίδια έχουν σχήμα δίσκου με διάμετρο περίπου 30 nm και ύψος 0,3 nm. Το αποτέλεσμα αυτό ήταν αναμενόμενο, καθώς τα GPEI και QPEI προέρχονται από την τροποποίηση του ίδιου υπερδιακλαδισμένου πολυμερούς, δηλαδή της HPEI.



Εικόνα 2.4: AFM εικόνες των (Α) HPEI (Β) GPEI (Γ) QPEI νανοσωματιδίων

2.3.2 Μυκητοτοξικότητα νανοσωματιδίων με βάση παράγωγα της υπερδιακλαδισμένης πολυαιθυλενιμίνης

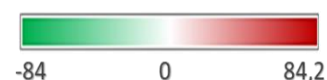
Πραγματοποιήθηκε αξιολόγηση της βιοδραστικότητας των νανοσωματιδίων HPEI 5000, HPEI 25000, GPEI 30%, GPEI 50%, QPEI 30%, QPEI 50% σε διάφορα είδη εδαφογενών φυτοπαθογόνων τα οποία προσβάλλουν σημαντικές καλλιέργειες της χώρας μας. Η εφαρμογή των νανοσωματιδίων στους μύκητες είχε ως σκοπό να αξιολογηθεί η αποτελεσματικότητά τους ως δραστικές ουσίες.

Στην Εικόνα 2.5 παρουσιάζονται σε πίνακα τα αποτελέσματα των ποσοστών παρεμπόδισης της ανάπτυξης των μυκήτων μετά από εφαρμογή των νανοσωματιδίων. Οι υπολογισμοί έγιναν για τους μύκητες *Rhizoctonia solani* (και για τις δύο ομάδες αναστόμωσης) και *Fusarium graminearum* την ημέρα που η μυκηλιακή ανάπτυξη του μάρτυρα ή κάποιας

επέμβασης κάλυψε όλο το τρυβλίο και για τον μύκητα *Verticillium dahliae* και ωομύκητα *Phytophthora infestans* πραγματοποιήθηκε 8 ημέρες μετά τις επεμβάσεις. Ο χρωματισμός είναι ανάλογος της παρεμπόδισης. Με κόκκινο φαίνεται η παρεμπόδιση της ανάπτυξης ενώ με πράσινο η ενίσχυση της ανάπτυξης.

Τα αποτελέσματα έδειξαν ότι τα νανοσωματίδια προκάλεσαν τοξικότητα, η οποία κυμαινόταν ανάλογα με το είδος του μύκητα. Η μεγαλύτερη αποτελεσματικότητα καταγράφηκε για το GPEI 30% έναντι του ωομύκητα *P. infestans*, ενώ δεν επηρεάστηκε η ανάπτυξη του μύκητα *Rhizoctonia solani* AG3. Αντιθέτως, ενδιαφέρον προκάλεσε το γεγονός ότι οι επεμβάσεις με τα νανοσωματίδια στον μύκητα *F. graminearum* προώθησαν τη μυκηλιακή ανάπτυξή του για την πλειοψηφία των συγκεντρώσεων που εφαρμόστηκαν.

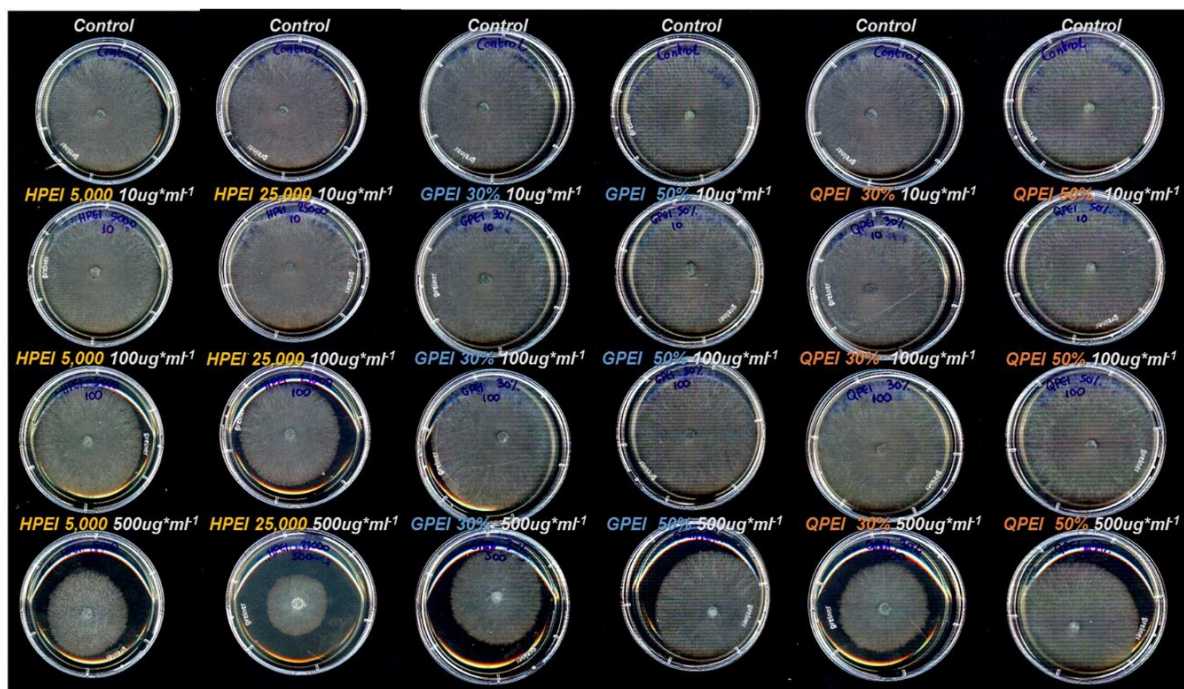
Επεμβάσεις	Συγκέντρωση ($\mu\text{g}\cdot\text{ml}^{-1}$)	<i>Rhizoctonia solani</i> AG1 (IA)	<i>Rhizoctonia solani</i> AG3	<i>Fusarium</i> <i>graminearum</i>	<i>Verticillium dahliae</i>	<i>Phytophthora</i> <i>infestans</i>
HPEI 5000	10	0,00	0,00	-20,00	17,65	0,00
	100	15,56	0,00	-28,00	0,00	0,00
	500	40,00	0,00	-16,00	47,06	26,32
HPEI 25000	10	-2,22	10,87	-60,00	0,00	0,00
	100	24,44	0,00	-56,00	11,76	-10,53
	500	57,78	13,04	24,00	70,59	73,68
GPEI 30%	10	-2,22	0,00	-72,00	5,88	0,00
	100	-2,22	0,00	-76,00	5,88	5,26
	500	31,11	10,87	24,00	64,71	84,21
GPEI 50%	10	-2,22	0,00	-64,00	0,00	0,00
	100	-2,22	2,17	-64,00	5,88	0,00
	500	8,89	17,39	36,00	64,71	42,11
QPEI 30%	10	-2,22	0,00	-84,00	-5,88	5,26
	100	-2,22	0,00	-64,00	-5,88	5,26
	500	37,78	0,00	-20,00	58,82	63,16
QPEI 50%	10	-2,22	0,00	-52,00	11,76	0,00
	100	-2,22	0,00	-12,00	11,76	0,00
	500	8,89	4,35	-40,00	11,76	0,00



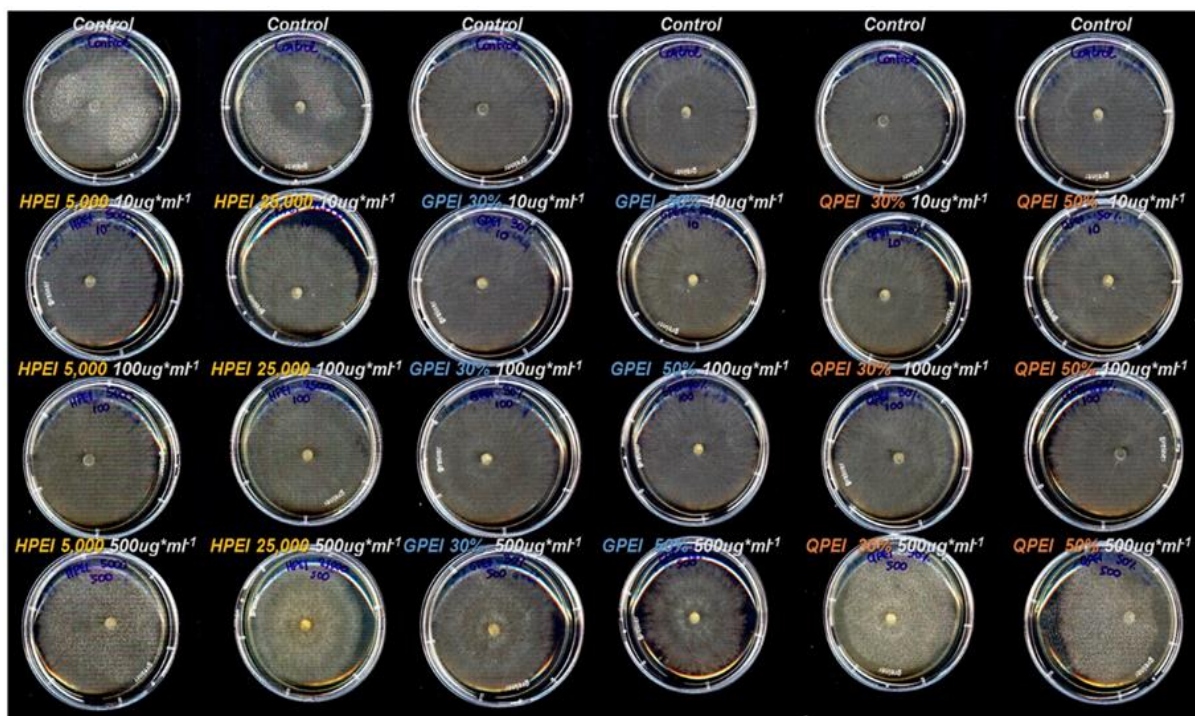
Εικόνα 2.5: Ποσοστά παρεμπόδισης της μυκηλιακής ανάπτυξης καλλιεργειών των μυκήτων μετά την επώαση τους με διάφορες συγκεντρώσεις των νανοσωματιδίων με βάση παράγωγα της υπερδιακλαδισμένης πολυαιθυλενιμίνης σε σχέση με τον μάρτυρα.

Στη συγκεκριμένη βιοδοκιμή δεν πραγματοποιήθηκαν επαναλήψεις και ο χρωματισμός των κελιών του πίνακα χρησιμοποιείται ως ένδειξη της παρεμπόδισης που σημειώθηκε. Με πράσινο χρώμα σημειώνεται η αρνητική παρεμπόδιση (ενίσχυση της ανάπτυξης) και με κόκκινο η αποτελεσματικότητα των νανοσωματιδίων.

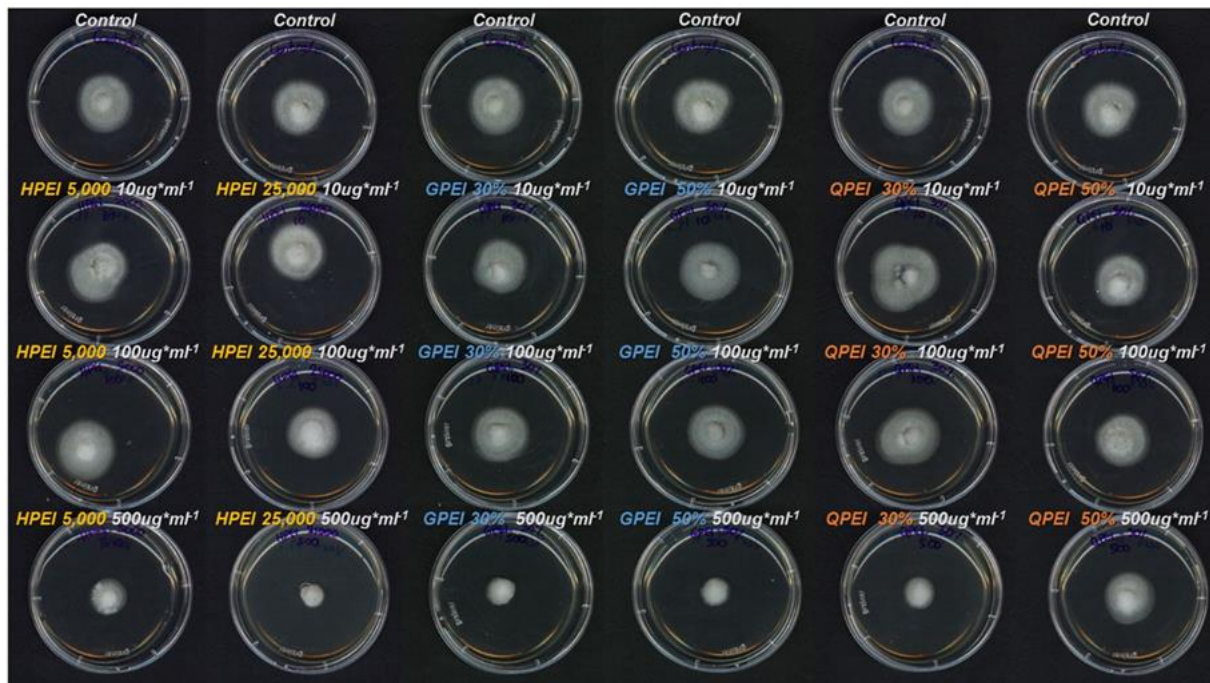
Επίσης, στις: Εικόνες 2.6-2.10 απεικονίζεται η επίδραση των νανοσωματιδίων στη μυκηλιακή ανάπτυξη καλλιεργειών των μυκήτων την ημέρα υπολογισμού των ποσοστών παρεμπόδισης. Συνολικά, το HPEI 25000 εμφάνισε τη μεγαλύτερη τοξικότητα, ενώ το QPEI 50% τη μικρότερη.



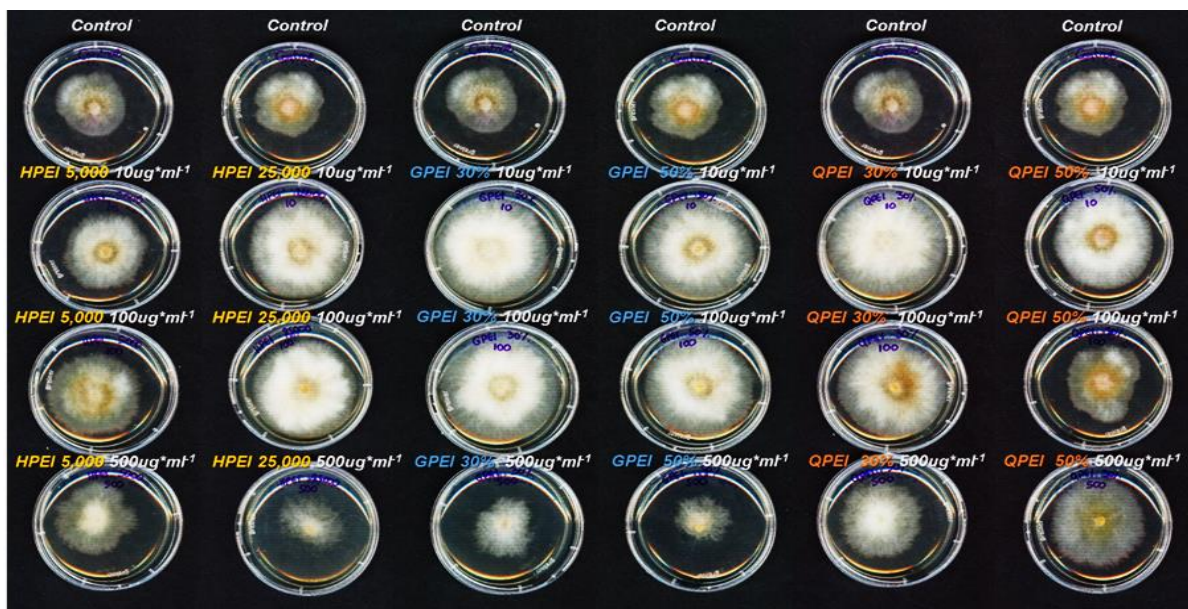
Εικόνα 2.6: Επίδραση των νανοσωματιδίων στη μυκηλιακή ανάπτυξη καλλιεργειών του μύκητα *Rhizoctonia solani* AG1 (IA) 48 ώρες μετά τις επεμβάσεις



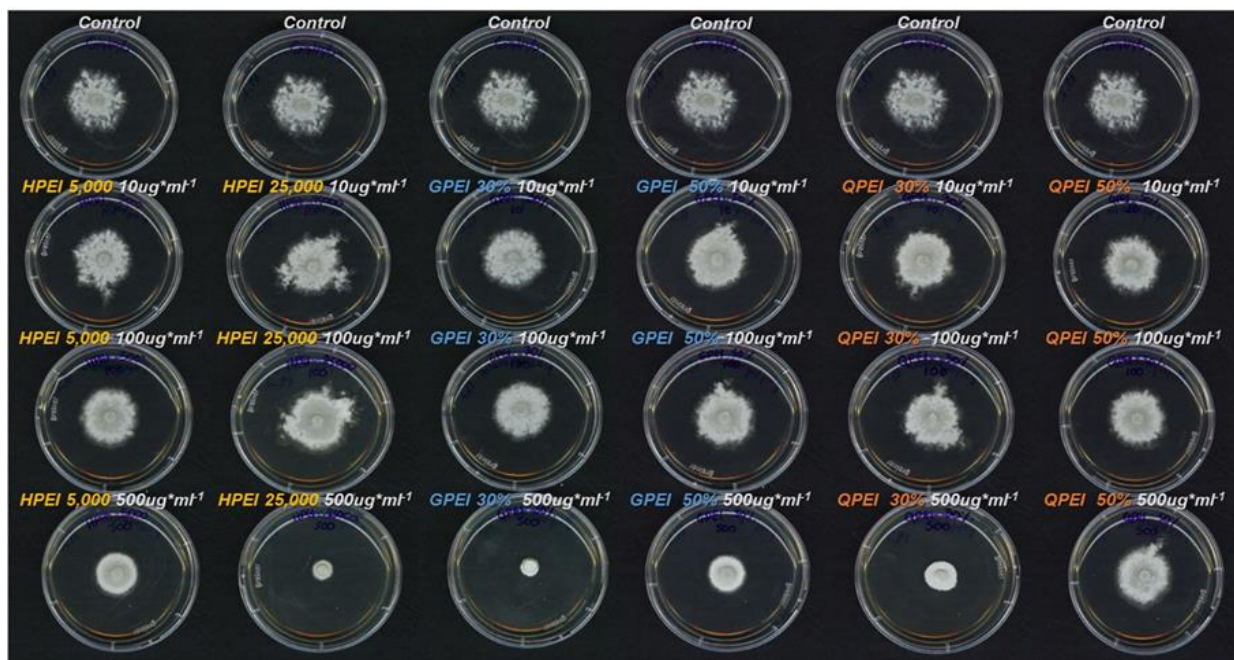
Εικόνα 2.7: Επίδραση των νανοσωματιδίων στη μυκηλιακή ανάπτυξη καλλιεργειών του μύκητα *Rhizoctonia solani* AG3 72 ώρες μετά τις επεμβάσεις



Εικόνα 2.8: Επίδραση των νανοσωματιδίων στη μυκηλιακή ανάπτυξη καλλιεργειών του μύκητα *Verticillium dahliae* 8 ημέρες μετά τις επεμβάσεις



Εικόνα 2.9: Επίδραση των νανοσωματιδίων στη μυκηλιακή ανάπτυξη καλλιεργειών του μύκητα *Fusarium graminearum* 316A 96 ώρες μετά τις επεμβάσεις



Εικόνα 2.10: Επίδραση των νανοσωματιδίων στη μυκηλιακή ανάπτυξη καλλιεργειών του ωομύκητα *Phytophthora infestans* 8 ημέρες μετά τις επεμβάσεις

Συνολικά φάνηκε κυμαινόμενη τοξικότητα των νανοσωματιδίων στους φυτοπαθογόνους μύκητες που μελετήθηκαν. Επίσης, διαπιστώθηκε η επίδραση του μοριακού βάρους, αλλά και των υποκαταστατών των νανοσωματιδίων στη βιοδραστικότητά τους. Γενικά, παρατηρήθηκε θετική συσχέτιση του μοριακού βάρους με τη βιοδραστικότητα, ενώ η υποκατάσταση με τεταρτοταγείς αμμωνιακές ομάδες (QPEI) οδήγησε σε μειωμένη βιοδραστικότητα των νανοσωματιδίων. Αντιθέτως, η υποκατάσταση με γουανιδινικές ομάδες (GPEI) δεν διαφοροποίησε στις συγκεκριμένες βιοδοκιμές τη βιοδραστικότητά της υπερδιακλαδισμένης πολυαιθυλενιμίνης. Γενικότερα, παρατηρήθηκε ότι το νανοσωματίδιο HPEI 25000 είχε τη μεγαλύτερη βιοδραστικότητα στο σύνολο των μυκήτων σε σύγκριση με τα υπόλοιπα πέντε νανοσωματίδια. Αντιθέτως, το QPEI 50% παρουσίασε τη μικρότερη βιοδραστικότητα δεδομένου ότι δεν παρεμπόδισε την ανάπτυξη των μυκήτων σε ποσοστό μεγαλύτερο του 12% στην μεγαλύτερη συγκέντρωση (500 $\mu\text{g mL}^{-1}$) που εξετάστηκε.

Η βιοδραστικότητα των υπερδιακλαδισμένων νανο-πολυμερών που χρησιμοποιήθηκαν στις βιοδοκιμές εξετάστηκε για πρώτη φορά στην παρούσα διατριβή, επομένως δεν υπάρχουν δεδομένα για να πραγματοποιηθούν συγκρίσεις. Παρ' όλα αυτά, για κάποια από τα είδη μυκήτων που χρησιμοποιήθηκαν έχουν μελετηθεί ανόργανα νανοσωματίδια και η αποτελεσματικότητά τους σε αυτά. Αναλυτικότερα, στην περίπτωση του μύκητα *R. solani* η εφαρμογή νανοσωματιδίων αργύρου οδήγησε σε υψηλό ποσοστό παρεμπόδισης τόσο της ανάπτυξής του *in vitro* (Krishnaraj et al., 2012, Nejad et al., 2016), όσο και σε *in vivo* πειράματα (Nejad et al., 2016). Συγκεκριμένα, σε συγκεντρώσεις 5, 10, 25 και 50 $\mu\text{g mL}^{-1}$ νανοσωματιδίων, τα ποσοστά παρεμπόδισης της μυκηλιακής ανάπτυξης του μύκητα ήταν 8, 35, 67 και 85% αντίστοιχα, ενώ παράλληλα παρατηρήθηκαν ελάττωση της εμφάνισης συμπτωμάτων του

παθογόνου σε φυτάρια ρυζιού και αύξηση του νωπού βάρους των φυταρίων (Nejad et al., 2016). Τα αποτελέσματα αυτά δε συμφωνούν με τα αποτελέσματα της εφαρμογής των υπερδιακλαδισμένων πολυμερών στις δύο AGs του μύκητα *R. solani* που χρησιμοποιήθηκαν, καθώς τα ποσοστά παρεμπόδισης της ανάπτυξης των μυκήτων ήταν χαμηλά στην πλειοψηφία των επεμβάσεων (Εικόνα 2.5, Εικόνα 2.6 και Εικόνα 2.7).

Όσον αφορά τον μύκητα *F. graminearum*, τα αποτελέσματα άλλων μελετών δεν είναι σε συμφωνία με τα αντίστοιχα της παρούσας μελέτης για τα περισσότερα από τα νανοσωματίδια που εξετάστηκαν. Συγκεκριμένα, αναφέρεται ότι η εφαρμογή 6 τύπων οργανικών νανοσωματιδίων παρουσίασε αρνητική επίδραση στη μυκηλιακή ανάπτυξη και βλάστηση των σπορίων του μύκητα. Αναλυτικότερα, παρ' όλο που τα νανοσωματίδια δε φάνηκε να επηρεάζουν τη διάμετρο των αποικιών, μειώθηκε η πυκνότητα των υφών του μύκητα, δηλαδή επηρεάστηκε η μάζα του, πιθανότατα λόγω επίδρασης των νανοσωματιδίων στη διακλάδωση των υφών (Wang et al., 2014). Αλλά και η εφαρμογή ανόργανων νανοσωματιδίων οξειδίου του ψευδαργύρου (ZnO) παρεμπόδισε σημαντικά την ανάπτυξη του μύκητα (Dimkra et al., 2013). Εδώ, αποκλειστικά τα νανοσωματίδια HPEI 25000 και τα GPEI φάνηκε να μειώνουν τη διάμετρο των αποικιών και οι υφές φαινοτυπικά δείχνουν λιγότερες. Ωστόσο αυτό επιτεύχθηκε στην υψηλή συγκέντρωση των 500 $\mu\text{g mL}^{-1}$.

2.3.3 Βιοδραστικότητα των νανοσωματιδίων με βάση παράγωγα της υπερδιακλαδισμένης πολυαιθυλενιμίνης στη βλαστικότητα σπόρων μαρουλιού και τομάτας

Η βιοδοκιμή για την αξιολόγηση της επίδρασης των νανοσωματιδίων στη βλαστικότητα σπόρων μαρουλιού και τομάτας πραγματοποιήθηκε σε 96-well plate, χάρις στο μικρό μέγεθος των σπόρων των δύο φυτικών ειδών (Εικόνα 2.11), σε αντίθεση με τη βιοδοκιμή για την αξιολόγηση της επίδρασης των νανοσωματιδίων στην επιμήκυνση του ριζιδίου σπόρων αγγουριού. Παρατηρήθηκε ότι η επίδραση των νανοσωματιδίων στη βλαστικότητα των σπόρων ήταν κυμαινόμενη. Γενικά, φαίνεται ότι τα νανοσωματίδια στο σύνολό τους είχαν μηδενική ή θετική επίδραση στο ποσοστό βλαστικότητας των σπόρων μαρουλιού, ενώ για τους σπόρους τομάτας φαίνεται ότι ισχύει το αντίστροφο.

Όσον αφορά στα νανοσωματίδια, τα HPEI 5000 και HPEI 25000 εμφάνισαν τη μεγαλύτερη δραστικότητα για το σύνολο των σπόρων, ενώ το QPEI 50% δεν επηρέασε τη βλαστικότητα των σπόρων. Πιο συγκεκριμένα, η εφαρμογή του HPEI 5000 διπλασίασε το ποσοστό βλαστικότητας των σπόρων μαρουλιού σε σχέση με το μάρτυρα, ενώ μείωσε το ποσοστό εκβλάστησης των σπόρων τομάτας και τομάτας ημιαναρριχώμενης. Αντίστοιχα, η εφαρμογή του HPEI 25000 προώθησε την εκβλάστηση των σπόρων μαρουλιού, ενώ αντίθετα

στην ημιαναρριχώμενη τομάτα οδήγησε στο μικρότερο ποσοστό εκβλάστησης ανάμεσα στα νανοσωματίδια που εξετάστηκαν.

	Μαρούλι	Τομάτα	Τομάτα ημιαν/νη
HPEI 5000	200 ± 71	60 ± 35	67 ± 33
HPEI 25000	150 ± 65	100 ± 20	33 ± 33
GPEI 30%	100 ± 58	80 ± 20	67 ± 33
GPEI 50%	100 ± 41	100 ± 20	133 ± 33
QPEI 30%	150 ± 65	80 ± 20	100 ± 33
QPEI 50%	100 ± 41	100 ± 20	100 ± 33

Εικόνα 2.11: Ποσοστά βλαστικότητας σπόρων μαρουλιού, τομάτας και τομάτας ημιαναρριχώμενης μετά από επέμβαση με $500 \mu\text{g mL}^{-1}$ των νανοσωματιδίων (7 ημέρες μετά τις επεμβάσεις). Με πράσινο χρώμα σημειώνεται η ενίσχυση της βλαστικότητας και με κόκκινο η φυτοτοξική δράση των νανοσωματιδίων. Οι τιμές αντιπροσωπεύουν τους μέσους ($n=3$) $\pm$ τυπικό σφάλμα.

Αυτή είναι η πρώτη φορά που εξετάζεται η φυτοτοξικότητα νανοσωματιδίων υπερδιακλαδισμένης πολυαιθυλενιμίνης. Παρ' όλα αυτά, άλλες μελέτες έχουν δείξει ότι η βλαστικότητα σπόρων μαρουλιού δεν επηρεάστηκε από την εφαρμογή 5 διαφορετικών τύπων νανοσωματιδίων: multi walled carbon nanotubes (MWCNT), αργιλίου (Al), οξειδίου του αργιλίου (Al_2O_3), ψευδαργύρου (Zn) και οξειδίου του ψευδαργύρου (ZnO), συγκέντρωσης $2000 \mu\text{g mL}^{-1}$ (Lin and Xing, 2007). Επίσης, αυτά τα νανοσωματίδια δεν παρουσίασαν κάποια επίδραση στη βλαστικότητα σπόρων αγγουριού, ραπανιού και γογγυλιού. Αντίθετα, για τα νανοσωματίδια ψευδαργύρου και οξειδίου του ψευδαργύρου ($2000 \mu\text{g mL}^{-1}$) καταγράφηκε παρεμπόδιση της βλαστικότητας των σπόρων σίκαλης και αραβόσιτου (Lin and Xing, 2007). Εδώ αντίστοιχα ήταν τα αποτελέσματα της εφαρμογής των οργανικών υπερδιακλαδισμένων νανοπολυμερών στις βιοδοκιμές βλαστικότητας σπόρων μαρουλιού, καθώς τα GPEI 30% και 50% και QPEI 50% δεν παρουσίασαν βιοδραστικότητα στη βλαστικότητα των σπόρων μαρουλιού, σε αντίθεση με τα HPEI 5000 και 25000 και QPEI 30%, των οποίων η εφαρμογή φάνηκε ότι προωθεί την εκβλάστηση των σπόρων.

Όσον αφορά στους σπόρους τομάτας, έχει αναφερθεί ότι τα ποσοστά βλαστικότητας ήταν σημαντικά αυξημένα σε σχέση με τον μάρτυρα μετά από εφαρμογή συγκεντρώσεων 10, 20 και $40 \mu\text{g mL}^{-1}$ οργανικών νανοσωματιδίων (Khodakovskaya et al., 2009). Παρόμοια αποτελέσματα σε σπόρους τομάτας έχουν παρουσιαστεί και μετά από εφαρμογή νανοσωματιδίων οξειδίου του πυριτίου (Siddiqui and Al-Whaibi, 2014). Τα αποτελέσματα αυτά έρχονται σε αντίθεση με όσα παρουσιάζονται στην παρούσα μελέτη όπου σημειώθηκε παρεμπόδιση της βλαστικότητας σπόρων τομάτας.

Γενικότερα, το ποσοστό βλαστικότητας των σπόρων εξαρτάται σε μεγάλο βαθμό από το εξωτερικό περίβλημά τους, το οποίο διαδραματίζει σπουδαίο ρόλο στην προστασία του εμβρύου από εξωγενείς παράγοντες, ενώ εμφανίζει συχνά εκλεκτική διαπερατότητα (Wierzbicka and Obidzinska, 1998). Έτσι, παρά τη δραστικότητα που ενδέχεται να παρουσιάζει κάποιος εξωγενής παράγοντας στην ανάπτυξη του φυταρίου, εάν δεν μπορεί να διαπεράσει το εξωτερικό περίβλημα του σπόρου, δεν μπορεί να επιδράσει και στη βλαστικότητά του (Lin and Xing, 2007). Σύμφωνα με τα παραπάνω, μία πιθανή επεξήγηση για τη βιοδραστικότητα που παρουσίασαν ορισμένα από τα νανοσωματίδια στις βιοδοκιμές βλαστικότητας των σπόρων είναι η ενδεχόμενη δυνατότητα διείσδυσής τους στο σπόρο, χωρίς ακόμα, βέβαια να είναι γνωστός ο μηχανισμός που ευθύνεται για την εμφάνιση των αποτελεσμάτων που παρουσιάστηκαν παραπάνω. Επιπλέον, η δράση των νανοσωματιδίων μπορεί να σχετίζεται και με την απορρόφηση νερού από τους σπόρους στους οποίους εφαρμόστηκαν. Συγκεκριμένα, έχει αναφερθεί ότι σπόροι τομάτας που βλάστησαν σε διάλυμα με οργανικά νανοσωματίδια παρουσίασαν μεγαλύτερα ποσοστά υγρασίας σε σύγκριση με τον μάρτυρα, το οποίο υποδηλώνει ενίσχυση της απορρόφησης νερού από τους σπόρους, επομένως αυξημένα ποσοστά βλαστικότητας. Ο μηχανισμός μέσω του οποίου τα νανοσωματίδια πιθανότατα αυξάνουν την ικανότητα απορρόφησης νερού από τους σπόρους δεν είναι ακόμα γνωστός, παρ' όλα αυτά πιθανολογείται ότι, μέσω της διείσδυσης μικρού μεγέθους νανοσωματιδίων στους σπόρους, δημιουργούνται νέοι πόροι για την είσοδο του νερού (Khodakovskaya et al., 2009).

2.3.4 Βιοδραστικότητα των νανοσωματιδίων με βάση παράγωγα της υπερδιακλαδισμένης πολυαιθυλενιμίνης στην επιμήκυνση του ριζιδίου σπόρων αγγουριού και τομάτας

Τα αποτελέσματα της επίδρασης των νανοσωματιδίων στην επιμήκυνση των ριζιδίων σπόρων αγγουριού, τομάτας και τομάτας ημιαναρριχώμενης φαίνονται στην Εικόνα 2.12. Πιο συγκεκριμένα, παρατηρήθηκε ότι η πλειονότητα των νανοσωματιδίων (στα 500 $\mu\text{g mL}^{-1}$) επηρέασε αρνητικά την επιμήκυνση του ριζιδίου των σπόρων αγγουριού, τομάτας και τομάτας ημιαναρριχώμενης. Αναλυτικότερα, τα ποσοστά επιμήκυνσης του ριζιδίου των σπόρων αγγουριού ήταν μικρότερα από τον μάρτυρα ως αποτέλεσμα της εφαρμογής όλων των νανοσωματιδίων, εκτός του QPEI 50%, το οποίο φάνηκε να προωθεί την ανάπτυξη της ρίζας. Αντιθέτως, οι σπόροι τομάτας και τομάτας ημιαναρριχώμενης παρουσίασαν μεγαλύτερα ποσοστά επιμήκυνσης του ριζιδίου τους σε σχέση με τους σπόρους αγγουριού. Γενικά, το QPEI 50% φάνηκε να επιδρά περισσότερο θετικά από τα υπόλοιπα στην επιμήκυνση των ριζών.

	Τομάτα	Τομάτα ημιαν/νη	Αγγούρι
HPEI 5000	72 ± 11	62 ± 31	50
HPEI 25000	89 ± 6	92	50
GPEI 30%	100 ± 10	98 ± 35	50
GPEI 50%	122 ± 6	92 ± 46	25
QPEI 30%	94 ± 22	162 ± 13	75
QPEI 50%	89 ± 45	123 ± 67	125

Εικόνα 2.12: Πίνακας που περιλαμβάνει τα ποσοστά σχετικής επιμήκυνσης του ριζιδίου σπόρων αγγουριού, τομάτας και τομάτας ημιαναρριχώμενης σε συγκέντρωση $500 \mu\text{g mL}^{-1}$ των νανοσωματιδίων (5 ημέρες μετά τις επεμβάσεις). Με πράσινο χρώμα σημειώνεται η ενίσχυση της επιμήκυνσης του ριζιδίου και με κόκκινο η φυτοτοξική δράση των νανοσωματιδίων. Οι τιμές για τις τομάτες και τομάτες ημιαναρριχώμενη αντιπροσωπεύουν τους μέσους $\pm$ τυπικό σφάλμα. Όσον αφορά το αγγούρι δεν πραγματοποιήθηκαν επαναλήψεις.

Για τους σπόρους κοντού αγγουριού παρατηρείται ότι τα νανοσωματίδια στο σύνολό τους, στη συγκέντρωση των $500 \mu\text{g mL}^{-1}$, δεν επέδρασαν στην επιμήκυνση του ριζιδίου (Εικόνα 2.13). Ωστόσο, ιδιαίτερο ενδιαφέρον παρουσιάζει η έκπτυξη των κοτυληδόνων των σπόρων κοντού αγγουριού, οι οποίοι είχαν στις επεμβάσεις των HPEI 5000 και HPEI 25000.



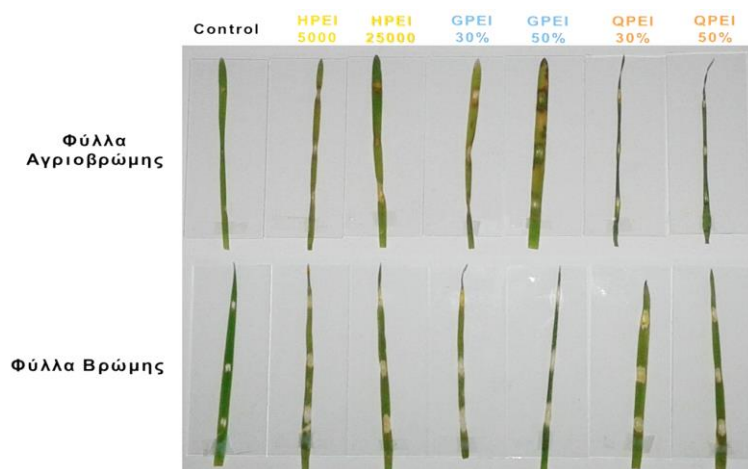
Εικόνα 2.13: Επίδραση συγκέντρωσης $500 \mu\text{g mL}^{-1}$ των νανοσωματιδίων στην επιμήκυνση του ριζιδίου σπόρων κοντού αγγουριού (5 ημέρες μετά τις επεμβάσεις)

Τα αποτελέσματα αυτά είναι σε συμφωνία με αποτελέσματα άλλων μελετών στις οποίες διερευνήθηκε η επίδραση οργανικών και ανόργανων νανοσωματιδίων στην επιμήκυνση του ριζιδίου σπόρων αγγουριού και τομάτας. Για παράδειγμα, η εφαρμογή νανοσωματιδίων

ψευδαργύρου και οξειδίου του ψευδαργύρου συγκέντρωσης $2000 \mu\text{g mL}^{-1}$ παρεμπόδισε την ανάπτυξη του ριζιδίου σπόρων αγγουριού, αλλά και σπόρων άλλων φυτικών ειδών, όπως μαρουλιού, αραβοσίτου και ραπανιού, ενώ παράλληλα παρατηρήθηκε έκπτυξη των κοτυληδόνων όλων των σπόρων (Lin and Xing, 2007). Παρόμοια αποτελέσματα επέφερε και η εφαρμογή οργανικών νανοσωματιδίων, αλλά και νανοσωματιδίων οξειδίου του σιδήρου (Fe_3O_4), καθώς παρατηρήθηκε μειωμένη ριζική ανάπτυξη σε σπόρους αγγουριού (Mushtaq, 2011). Σε αντίθεση με τα παραπάνω αποτελέσματα, έχει αναφερθεί και ενίσχυση της επιμήκυνσης του ριζιδίου σπόρων αγγουριού μετά την εφαρμογή οργανικών νανοσωματιδίων (single-walled carbon nanotubes, SWCNT). Παρ' όλα αυτά, ίδια νανοσωματίδια παρουσίασαν παρεμποδιστική δράση της ανάπτυξης του ριζιδίου σπόρων τομάτας, ενώ δεν επηρέασαν την επιμήκυνση της ρίζας σπόρων λάχανου και καρότου (Cañas et al., 2008).

2.3.5 Τοξικότητα των νανοσωματιδίων με βάση παράγωγα της υπερδιακλαδισμένης πολυαιθυλενιμίνης στη φυλλική επιφάνεια αγριοβρώμης (*Avena sterilis* L.) και βρώμης (*Avena sativa* L.)

Στην Εικόνα 2.14 παρουσιάζεται η επίδραση των νανοσωματιδίων HPEI 5000, HPEI 25000, GPEI 30%, GPEI 50%, QPEI 30%, QPEI 50% στη φυλλική επιφάνεια αγριοβρώμης και βρώμης. Με βάση το φαινότυπο, παρουσιάστηκε φυτοτοξικότητα σε υποκυτταρικό επίπεδο στα φύλλα της αγριοβρώμης και βρώμης μετά την εφαρμογή των νανοσωματιδίων. Στην πλειονότητα των επεμβάσεων με τα νανοσωματίδια εμφανίστηκαν συμπτώματα χλώρωσης και λεύκανσης, παρόμοια με εκείνα που προκαλούνται από την εφαρμογή ζιζανιοκτόνων που δρουν στη βιοσύνθεση καροτενοειδών.



Εικόνα 2.14: Επίδραση των νανοσωματιδίων με βάση παράγωγα της υπερδιακλαδισμένης πολυαιθυλενιμίνης στη φυλλική επιφάνεια αγριοβρώμης και βρώμης (24 ώρες μετά τις επεμβάσεις)

Συνολικά, δεν παρατηρήθηκαν διαφορές της επίδρασης των νανοσωματιδίων ανάμεσα στα δύο φυτικά είδη, επομένως, φαίνεται ότι τα προς εξέταση υπερδιακλαδισμένα πολυμερή πιθανώς δεν παρουσιάζουν εκλεκτικότητα σε υποκυτταρικό επίπεδο. Στο σύνολο των νανοσωματιδίων, το QPEI 50% φάνηκε να έχει τη μικρότερη επίδραση στα φύλλα.

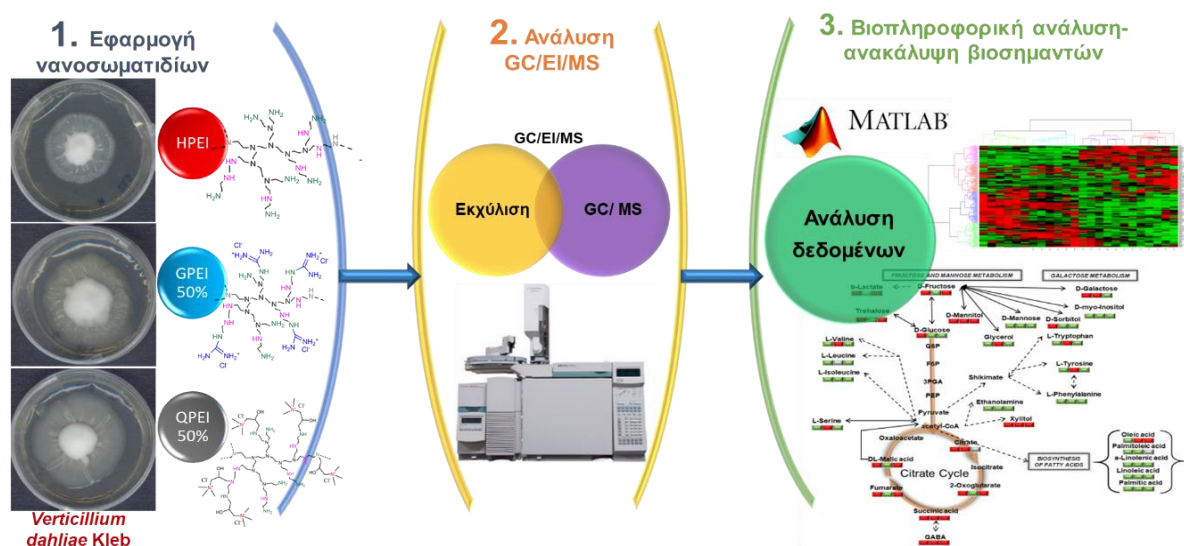
2.4 Συμπεράσματα

Συνολικά, τα αποτελέσματα των ανωτέρω πειραμάτων έδειξαν ότι τα 6 νανοσωματίδια με βάση παράγωγα της υπερδιακλαδισμένης πολυαιθυλενιμίνης που χρησιμοποιήθηκαν εμφάνισαν κυμαινόμενη βιοδραστικότητα στη μυκηλιακή ανάπτυξη των εδαφογενών παθογόνων καθώς και στους σπόρους στους οποίους εφαρμόστηκαν. Γενικότερα, φάνηκε ότι το μοριακό βάρος των πολυμερών αυτών είναι ανάλογο της δραστικότητάς τους και ότι η υποκατάσταση με τεταρτοταγείς αμμωνιακές ομάδες (QPEI) μειώνει τη δραστικότητά τους. Μάλιστα, το νανοσωματίδιο QPEI 50% ήταν το λιγότερο τοξικό στο σύνολο των βιοδοκιμών.

Με βάση τα αποτελέσματα επιλέχθηκαν για περαιτέρω μελέτη τα νανοσωματίδια HPEI 25000, GPEI 25000 50% και QPEI 25000 50%. Κριτήριο αποτέλεσε το γεγονός ότι το HPEI 25000 ήταν πιο δραστικό από το αντίστοιχο μικρότερου μοριακού βάρους παράγωγο και αποφασίστηκε να εξεταστεί η επίδραση της υποκατάστασης των τελικών ομάδων του συγκεκριμένου νανοσωματιδίου στην αποτελεσματικότητα σε μύκητες στο Κεφάλαιο 3 και οργανισμούς μη-στόχους στο Κεφάλαιο 4.

Κεφάλαιο 3. Επίδραση νανოსωματιδίων με βάση παράγωγα της υπερδιακλαδισμένης πολυαιθυλενιμίνης στο μεταβολισμό του μύκητα *Verticillium dahliae*

Γραφική περίληψη Κεφάλαιο 3



ΣΥΝΤΟΜΟΓΡΑΦΙΕΣ:

AA: αμινοξέα; δ.ο.: δραστική(ές) ουσία(ες); E&A: έρευνα και ανάπτυξη; νανο-ΦΠ: νανο-φυτοπροστατευτικό(ά) προϊόν(τα); ΦΠ: φυτοπροστατευτικό(ά) προϊόν(τα);

GPEI: υπερδιακλαδισμένη πολυαιθυλενιμίνη τροποποιημένη με γουανιδινικές ομάδες; HCA: Hierarchical cluster analysis (ιεραρχική ανάλυση κατά συστάδες); HPEI: υπερδιακλαδισμένη πολυαιθυλενιμίνη; OPLS-DA: Orthogonal partial least squares-discriminant analysis (ορθογώνια διακριτή ανάλυση μερικών ελαχίστων τετραγώνων); PDA: Potato Dextrose Agar; QPEI: υπερδιακλαδισμένη πολυαιθυλενιμίνη τροποποιημένη με ομάδες τεταρτοταγών αμμωνιακών αλάτων; ROS: Reactive Oxygen Species (Δραστικές μορφές οξυγόνου)

3.1 Εισαγωγή

Παρ' ότι τα νανοςωματίδια που μελετήθηκαν παραπάνω παρουσιάζουν πολύ καλές προοπτικές στην αξιοποίησή τους στη φυτοπροστασία, υπάρχουν σημαντικές προκλήσεις που πρέπει να αντιμετωπιστούν πριν την περαιτέρω ανάπτυξή τους ως νανο-ΦΠ. Στις μέρες μας, υπάρχουν αυξημένες ανησυχίες από τους καταναλωτές και τους ρυθμιστικούς οργανισμούς σχετικά με το θεσμικό πλαίσιο της έγκρισης, αγοράς, διάθεσης και παρακολούθησης τέτοιων νανο-ΦΠ (Kah et al., 2013, Kookana et al., 2014, Kah, 2015). Οι ξεχωριστές φυσικοχημικές τους ιδιότητες, λόγω του μικροσκοπικού τους μεγέθους, καθιστούν δύσκολη τη θέσπιση κατάλληλων πρωτόκολλων για την μελέτη της τοξικότητάς τους σε οργανισμούς στόχους και οργανισμούς μη-στόχους, τη

τύχη και συμπεριφορά τους στο περιβάλλον και την υπολειμματικότητά τους στα αγροτικά προϊόντα. Μάλιστα, σημαντικό ερώτημα αποτελεί η διερεύνηση του μηχανισμού δράσης τους, δεδομένου ότι η σχετική γνώση καθορίζει τη δυνατότητα μίας δ.ο. να αξιοποιηθεί στην ανάπτυξη ενός ΦΠ (Aliferis and Jabaji, 2011).

Επί του παρόντος, η γνώση σχετικά με το μηχανισμό δράσης των νανοσωματιδίων είναι αποσπασματική, αποτελώντας ένα ισχυρό εμπόδιο για την ανάπτυξη και εφαρμογή των νανοσωματιδίων στη γεωργική πρακτική (Hardy, 2018, Kah et al., 2018). Ωστόσο, υπάρχουν μελέτες για το μηχανισμό δράσης μεταλλικών νανοσωματιδίων σε μικρόβια (Prabhu and Poulouse, 2012, Ingle et al., 2014). Πιο συγκεκριμένα, η τοξικότητα που προκαλούν νανοσωματίδια αργύρου αποδίδεται στην αλληλεπίδρασή τους με το βακτηριακό κυτταρικό τοίχωμα οδηγώντας στη λύση του (Danilczuk et al., 2006, Kim et al., 2007), στο σχηματισμό ιόντων αργύρου, τα οποία αλληλοεπιδρούν με ένζυμα και προκαλούν την αδρανοποίησή τους (Feng et al., 2000, Matsumura et al., 2003), ή στην καταστροφή του DNA μέσω της αντίδρασης του αργύρου με τα θειϊκά και φωσφορικά ιόντα (Hatchett and White, 1996, Morones et al., 2005). Στην περίπτωση των νανοσωματιδίων χαλκού, η βιοδραστητικότητά τους αποδίδεται στην αδρανοποίηση βακτηριακών ενζύμων και σύνθεση/συσσώρευση υπεροξειδίου του υδρογόνου (Das et al., 2010), στη μετουσίωση πρωτεϊνών (Schrand et al., 2010), στην αλληλεπίδραση με το DNA (Ren et al., 2009), ή στη διαταραχή ποικίλων βιοχημικών διαδικασιών (Stohs and Bagchi, 1995) και των κυτταρικών μεμβρανών (Gopalakrishnan, 2012).

Για να ανακαλυφθούν οι πληροφορίες που λείπουν σχετικά με το μηχανισμό δράσης και τον μηχανισμό τοξικότητας των νανοσωματιδίων, απαιτείται η εφαρμογή προηγμένων «omics» αναλύσεων μεγάλης κλίμακας (Shin et al., 2018). Συγκεκριμένα, η μεταβολομική ανάλυση μπορεί να προσφέρει τέτοιες πληροφορίες, δεδομένης της δυνατότητας που παρέχει στην παρακολούθηση του μεταβολισμού των μυκήτων κατά την απόκρισή τους σε βιοδραστητικές ενώσεις (Aliferis and Jabaji, 2011, Kalampokis et al., 2018, Sevastos et al., 2018). Με τον όρο μεταβολομική ανάλυση περιγράφεται η ολοκληρωμένη ποσοτική και ποιοτική ανίχνευση των μεταβολιτών ενός βιολογικού συστήματος (Fiehn et al., 2007), δηλαδή πρόκειται για μία μέθοδο που περιλαμβάνει τον πειραματικό σχεδιασμό και εκτέλεση του πειράματος, χημική ανάλυση, βιοπληροφορική ανάλυση και, τέλος, βιολογική ερμηνεία των αποτελεσμάτων (Aliferis and Jabaji, 2011).

Συνεπώς, η μεταβολομική ανάλυση θα μπορούσε να δώσει σημαντικές πληροφορίες σχετικά με τη βιοδραστητικότητα και το μηχανισμό δράσης των επιλεγμένων νανοσωματιδίων με βάση παράγωγα της υπερδιακλαδισμένης πολυαιθυλενιμίνης για την αντιμετώπιση εδαφογενών φυτοπαθογόνων μυκήτων. Μέχρι σήμερα, έχει εφαρμοστεί επιτυχώς στην *in vitro* και *in vivo* μελέτη της νανοτοξικότητας (Schnackenberg et al., 2012, Shin et al., 2018). Εστιάζοντας στις γεωπονικές και περιβαλλοντικές επιστήμες, η μεταβολομική έχει εφαρμοστεί στην έρευνα και ανάπτυξη (E&A) των ΦΠ (Aliferis and Chrysayi-Tokousbalides, 2010, Aliferis and Jabaji, 2011), στην οικοτοξικολογία (Bundy et al., 2008, Kostopoulou et al., 2020), στην επιστήμη των τροφίμων (Diez-Simon et al., 2019, Hatzakis, 2019), τη μικροβιολογία (Reyes-Garcés and

Gionfriddo, 2019), και στην επιστήμη της φυτικής παραγωγής (Bowne, 2018, Saia et al., 2019, Schwachtje et al., 2019). Αναφορικά με τη νανοτεχνολογία, η μεταβολομική ανάλυση έχει εφαρμοστεί στη μελέτη των επιδράσεων διαφόρων νανοσωματιδίων σε διάφορα βιολογικά συστήματα όπως, φυτά (Soria et al., 2017, Zhao et al., 2017), αρουραίοι (Hadrup et al., 2012), κυτταρικές σειρές (Carrola et al., 2016, Carrola et al., 2018) και άλλους οργανισμούς (Lankadurai et al., 2015, Ratnasekhar, 2015). Τέτοιες μελέτες επιβεβαιώνουν τις δυνατότητες της ανάλυσης και την ισχυρή εφαρμογή της κατά την αξιολόγηση της βιοδραστικότητας των νανοσωματιδίων καθώς και την ανακάλυψη των αντίστοιχων βιοσημαντών.

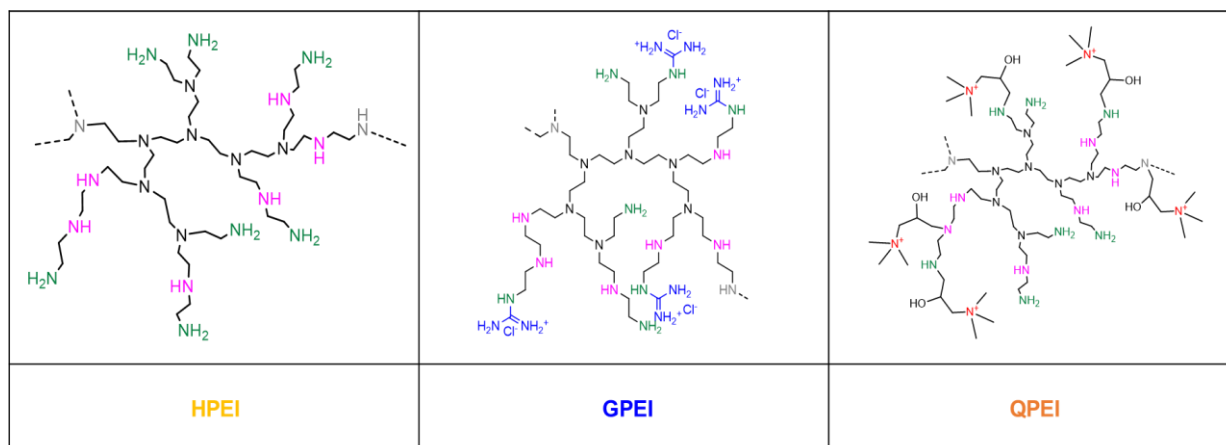
Σε αυτό το πλαίσιο, στο Κεφάλαιο 3 της παρούσας διατριβής μελετήθηκε η βιοδραστικότητα επιλεγμένων νανοσωματιδίων υπερδιακλαδισμένης πολυαιθυλενιμίνης στο εδαφογενές φυτοπαθογόνο *Verticillium dahliae* Kleb. Επίσης, επιχειρήθηκε η βαθύτερη διερεύνηση της επίδρασής τους στο μεταβολισμό του μύκητα εφαρμόζοντας GC/EI/MS μεταβολομική ανάλυση, σε μία προσπάθεια να αντλήσουμε σημαντικές πληροφορίες για το μηχανισμό δράσης τους. Το βερτισίλλιο είναι ένα καταστροφικό εδαφογενές φυτοπαθογόνο που προκαλεί μεγάλες απώλειες στην απόδοση των φυτών, έχοντας ένα ευρύ φάσμα ξενιστών (Daayf, 2015) συμπεριλαμβανομένων, μεταξύ άλλων, λαχανικά (Guerrero et al., 2019) και την ελιά (Colella et al., 2008). Έχει μοναδική βιολογία (π.χ. μακροχρόνια επιβίωση στο έδαφος) και επιπλέον, υπάρχει έλλειψη εγκεκριμένων χημικών ΦΠ, καθώς τα υποκαπνιστικά εδάφους, τα οποία αποτελούσαν το κύριο μέτρο φυτοπροστασίας, απαγορεύτηκαν σχετικά πρόσφατα καθιστώντας προβληματική την προστασία των καλλιεργειών κατά του μύκητα (Milgroom et al., 2014, Carroll et al., 2017).

3.2 Υλικά και Μέθοδοι

3.2.1 Χημικά και αντιδραστήρια που χρησιμοποιήθηκαν κατά τη μεταβολομική ανάλυση

Τα αντιδραστήρια που χρησιμοποιήθηκαν κατά τη μεταβολομική ανάλυση ήταν τα ακόλουθα: οι οργανικοί διαλύτες που χρησιμοποιήθηκαν για την εκχύλιση των μεταβολιτών αιθανικού αιθυλεστέρα (GC/MS grade, 99.9% καθαρότητα) και μεθανόλης (GC/MS grade, 99.9% καθαρότητα) οι οποίοι προμηθεύτηκαν από την CARLO ERBA Reagents S.A.S. (Val-de-Reuil, France), και υδροχλωρική μεθοξαμίνη (98%, w/w), N-μεθυλο-N-(τριμέθυλο πυρίτιο) τριφθοροακεταμίδιο (N-methyl-N-(trimethyl-silyl)trifluoroacetamide), (MSTFA), και πυριδίνη (99.8%, v/v), που χρησιμοποιήθηκαν κατά την παραγωγοποίηση των μεταβολιτών για την ανάλυση στον αέριο χρωματογράφο (GC/EI/MS) και αγοράστηκαν από την Sigma-Aldrich (Steinheim, Germany).

Υπερδιακλαδισμένη πολυαιθυλενιμίνη (Hyperbranched polyethyleneimine - HPEI) με μοριακό βάρος 25000 Da (Lupasol® WF, water-free, 99%) ήταν ευγενική χορηγία από την εταιρεία BASF (Ludwigshafen, Germany). Τα νανοσωματίδια HPEI που φέρουν τεταρτοταγείς αμμωνιακές ομάδες (QPEI) και γουανιδινικές ομάδες (GPEI) (Εικόνα 3.1) παρασκευάστηκαν στο Εργαστήριο Λειτουργικών Νανο-υλικών Οργανωμένης Δομής του Ινστιτούτου Νανοεπιστήμης και Νανοτεχνολογίας του ΕΚΕΦΕ «Δημόκριτος» όπως περιγράφεται αναλυτικά στην παράγραφο §2.2.1.



Εικόνα 3.1: Νανοσωματίδια υπερδιακλαδισμένης πολυαιθυλενιμίνης που χρησιμοποιήθηκαν στην διατριβή. HPEI είναι η υπερδιακλαδισμένη πολυαιθυλενιμίνη, GPEI είναι η υπερδιακλαδισμένη πολυαιθυλενιμίνη τροποποιημένη με ομάδες γουανιδίνης και QPEI είναι η υπερδιακλαδισμένη πολυαιθυλενιμίνη τροποποιημένη με ομάδες τεταρτοταγούς αμμωνίου.

3.2.2 Βιολογικό υλικό

Το στέλεχος *V. dahliae* PMG27 της συλλογής του Pesticide Metabolomics Group (PMG) (Εργαστήριο Γεωργικής Φαρμακολογίας, Γεωπονικό Πανεπιστήμιο Αθηνών), χρησιμοποιήθηκε στα πειράματα. Οι καλλιέργειες αρχικά ξεκίνησαν από κατεψυγμένα μυκηλιακά τμήματα που είχαν αποθηκευτεί σε διάλυμα με 50% γλυκερόλη σε ειδικά σωληνάρια (cryotubes) των 2 mL (Thermo Fisher Scientific, Waltham, MA, USA), στους -80°C. Τα τμήματα μεταφέρθηκαν σε τρυβλία Petri (διαμέτρου 5 cm) που περιέχουν θρεπτικό υλικό (PDA, Difco, BD, Srr, Ελβετία) και επώαστηκαν στους 22°C στο σκοτάδι. Η ανακαλλιέργεια πραγματοποιήθηκε κάθε δύο εβδομάδες χρησιμοποιώντας μυκηλιακούς δίσκους διαμέτρου 4 mm ως εμβόλιο.

3.2.3 Εκτίμηση της τοξικότητας των νανοσωματιδίων με βάση παράγωγα της υπερδιακλαδισμένης πολυαιθυλενιμίνης στη μυκηλιακή ανάπτυξη του *Verticillium dahliae* Kleb

Προκειμένου να μπορέσουμε να εξαγάγουμε συμπεράσματα σχετικά με τους μηχανισμούς με τους οποίους οι βιοδραστικές ενώσεις ασκούν την τοξικότητά τους σε ένα βιολογικό σύστημα εφαρμόζοντας τη μεταβολομική ανάλυση είναι σημαντικό να διαταράσσεται ελαφρώς ο μεταβολισμός του (Aliferis and Jabaji, 2011). Επομένως, σε ένα πρώτο βήμα, αξιολογήσαμε την τοξικότητα των νανοσωματιδίων που μελετήθηκαν στο *V. dahliae*, με βάση την επίδρασή τους στη μυκηλιακή ανάπτυξη των καλλιεργειών του (Εικόνα 3.2) χρησιμοποιώντας το λογισμικό image J (Schneider, 2012). Η υψηλότερη συγκέντρωση που δοκιμάστηκε ήταν αυτή των 750 $\mu\text{g mL}^{-1}$. Οι μετρήσεις έγιναν σε διαστήματα 24 ωρών και έως και 20 ημέρες μετά τον αρχικό εμβολιασμό του μέσου σε τρυβλία Petri με τμήματα μυκηλίου (διάμετρος 4 mm). Τα εμβόλια ελήφθησαν από την περίμετρο των επτά ημερών καλλιεργειών *V. dahliae*. Πραγματοποιήθηκαν τρεις επαναλήψεις ανά επέμβαση, και καλλιέργειες στις οποίες προστέθηκε αποστειρωμένο νερό σε ισοδύναμο όγκο με εκείνο των διαλυμάτων των νανοσωματιδίων, χρησίμευσαν ως μάρτυρες. Λόγω της αργής ανάπτυξης των καλλιεργειών, οι τιμές EC_{50} υπολογίστηκαν 14 ημέρες μετά τις επεμβάσεις, χρησιμοποιώντας το λογισμικό JMP v.13 (SAS Institute Inc., Cary, NC, USA). Η EC_{50} είναι η αποτελεσματική συγκέντρωση που προκαλεί 50% παρεμπόδιση ανάπτυξης του μυκηλίου του μύκητα *V. dahliae*.

3.2.4 Μεταβολομική ανάλυση με εφαρμογή GC/EI/MS για την ανίχνευση της επίδρασης των νανοσωματιδίων με βάση παράγωγα της υπερδιακλαδισμένης πολυαιθυλενιμίνης στο μεταβολισμό του *Verticillium dahliae* Kleb

3.2.4.1 Πειραματικό σχέδιο

Οι μυκηλιακοί δίσκοι (διαμέτρου 4 mm) που χρησιμοποιήθηκαν ως εμβόλιο για την έναρξη νέων καλλιεργειών, ελήφθησαν ασηπτικά από τις άκρες των καλλιεργειών *V. dahliae* ηλικίας 14 ημερών. Οι νέες καλλιέργειες αναπτύχθηκαν σε τρυβλία Petri (διαμέτρου 9 cm) που περιείχαν 15 mL PDA με HPEI, GPEI ή QPEI σε συγκεντρώσεις ίσες με τις αντίστοιχες τιμές EC_{50} ή αποστειρωμένο νερό. Επώαστηκαν για 14 ημέρες, στους 22°C, στο σκοτάδι. Προκειμένου να διευκολυνθούν οι αναλύσεις του ενδο-μεταβολόματος (π.χ. διαχωρισμός των υφών από το θρεπτικό μέσο), οι καλλιέργειες αναπτύχθηκαν σε αποστειρωμένες μεμβράνες σελοφάν (UCB, North Augusta, USA). Συνολικά, πραγματοποιήθηκαν 15 επαναλήψεις ανά επέμβαση, κάθε τρεις από τις οποίες τελικά συγκεντρώθηκαν για να δώσουν μία βιολογική επανάληψη.

3.2.4.2 Δειγματοληψία και εκχύλιση των μεταβολιτών

Υφές, εξαιρουμένης της περιοχής του αρχικού εμβολίου, αποξέστηκαν χρησιμοποιώντας μεταλλική σπάτουλα και κονιορτοποιήθηκαν αμέσως σε μορφή σκόνης χρησιμοποιώντας ένα γουδοχέρι σε γουδί με τη βοήθεια υγρού αζώτου, το οποίο χρησιμοποιήθηκε για την ακαριαία παύση του μεταβολισμού (quenching). Οι κονιορτοποιημένες υφές συλλέχθηκαν αμέσως σε σωληνάριο τύπου errendorf (errendorf tubes) (1,5 mL) και αποθηκεύτηκαν στους -80 °C μέχρι την περαιτέρω επεξεργασία τους.

Για την εξαγωγή του ενδο-μεταβολόματος, εφαρμόστηκε ένα πρωτόκολλο που έχει περιγραφθεί από τους Kalampokis et al. (2018) με μικρές τροποποιήσεις. Εν συντομία, 1 mL μίγματος μεθανόλης: οξικού αιθυλεστέρα (50:50, v/v) προστέθηκε στις κονιορτοποιημένες υφές (40 mg) σε γυάλινα φιαλίδια αυτόματης δειγματοληψίας (2 mL) (Macherey-Nagel), ακολουθούμενη επώαση σε λουτρό υπερήχων (Branson 1210, Connecticut, ΗΠΑ) για 20 λεπτά, και στη συνέχεια, ακολούθησε ανάδευση για δύο ώρες στους 24°C σε τροχιακό αναδευτήρα (GFL 3006, Burgwedel, Γερμανία). Μετά προστέθηκε διάλυμα ριβιτόλης (Sigma-Aldrich Ltd, Steinheim, Germany) (20 µL 0,2 mg mL⁻¹ σε μεθανόλη) ως εσωτερικό πρότυπο. Τα ακατέργαστα εκχυλίσματα διηθήθηκαν μέσω φίλτρων PTFE (0,2 µm, Macherey-Nagel, Duren, Γερμανία) για την απομάκρυνση των στερεών υπολειμμάτων (debris) και εξατμίστηκαν πλήρως σε συμπυκνωτή κενού (Labconco, Kansas City, MO, USA).

3.2.4.3 Παραγωγοποίηση των μεταβολιτών και χημική ανάλυση

Η παραγωγοποίηση των ξηρών εκχυλισμάτων πραγματοποιήθηκε σύμφωνα με προηγούμενα πρωτόκολλα (Kalampokis et al., 2018, Kostoroulou et al., 2020). Εν συντομία, αρχικά, 80 µL διαλύματος υδροχλωρικής μεθοξυλαμίνης (MeOX) σε πυριδίνη (20 mg mL⁻¹) προστέθηκαν στα ξηρά εκχυλίσματα, και ακολούθησε επώαση σε υδατόλουτρο στους 30°C για 2 ώρες ώστε να σταθεροποιηθούν οι καρβονυλικές ρίζες των μεταβολιτών. Στη συνέχεια, ακολούθησε η πυριτικοποίηση (silylation) με προσθήκη 80 µL N-μεθυλο-N-(τριμέθυλο πυρίτιο) τριφθοροακεταμιδίου (MSTFA) και τα προκύπτοντα διαλύματα επώαστηκαν στους 37°C για 90 λεπτά. Το MSTFA είναι άριστος δότης ομάδων τριμέθυλο πυριτίου και αντικαθιστά τα ενεργά υδρογόνα μορίων με ομάδες -Si(CH₃)₃. Τα παραγωγοποιημένα δείγματα εισήχθηκαν σε μικροενθετήρες (180 µL) σε γυάλινα φιαλίδια (2 mL) προκειμένου να εισέλθουν στον αέριο χρωματογράφο με τη βοήθεια του αυτόματου δειγματολήπτη.

Στις αναλύσεις χρησιμοποιήθηκε αέριος χρωματογράφος Agilent 6890N (Agilent Technologies Inc., Santa Clara, CA, USA), με ανιχνευτή μάζας 7683 (MSD), στήλη HP-5MS (UI) (με μήκος 30 m, πάχος επίστρωσης 0.25 mm, Agilent Technologies Inc.) και εφαρμόστηκε θετικός ιονισμός (70 eV). Τα φάσματα πλήρους σάρωσης αποκτήθηκαν στο εύρος μάζας 50-800 Da (ρυθμός σάρωσης: 4 σαρώσεις ανά δευτερόλεπτο) με αρχική καθυστέρηση 10 λεπτών. Η

θερμοκρασία της πηγής MS ρυθμίστηκε στους 230°C και εκείνη του τετραπόλου στους 150°C. Η θερμοκρασία του εγχυτήρα ρυθμίστηκε στους 230°C και τα δείγματα (1 μ L) εγχύθηκαν με αναλογία διαίρεσης 5:1. Το φέρον αέριο ήταν ήλιο με ρυθμό ροής 1 mL min⁻¹. Η αρχική θερμοκρασία του φούρνου ήταν 70°C για 5 λεπτά και αυξήθηκε με ρυθμό 5°C min⁻¹ έως τους 310°C. Επιπλέον, αναλύθηκαν πειραματικά τυφλά δείγματα (blanks) για την ανίχνευση μεταβολικών χαρακτηριστικών που δεν σχετίζονται με το αναλυθέν βιολογικό δείγμα (π.χ. μόλυνση εξοπλισμού, πιθανή μόλυνση της πηγής, κλπ).

3.2.4.4 Επεξεργασία χρωματογραφήματων, κατασκευή βιβλιοθήκης με τους μεταβολίτες του βερτισιλλίου, και βιοπληροφορική ανάλυση για την ανακάλυψη των μεταβολιτών-βιοσημαντών της τοξικότητας των νανοσωματιδίων στο βερτισίλλιο

Τα πρωτογενή χρωματογραφήματα GC/EI/MS υποβλήθηκαν σε επεξεργασία σύμφωνα με τους Kalampokis et al. (2018) και Kostoroulou et al. (2020). Εν συντομία, το λογισμικό AMDIS v.2.66 (National Institute of Standards and Technology Library, NIST, Gaithersburg, MD, USA) χρησιμοποιήθηκε για την αρχική επεξεργασία (deconvolution) των αποκτηθέντων χρωματογραφήματων. Η δυνητική ταυτοποίηση των μεταβολιτών πραγματοποιήθηκε με αντιστοίχιση των φασμάτων μάζας τους με εκείνα της βιβλιοθήκης NIST (NIST '08), ενώ η απόλυτη αναγνώριση των επιλεγμένων μεταβολιτών πραγματοποιήθηκε συνδυάζοντας τα φάσματα μάζας και τους χρόνους κατακράτησης με εκείνα των αναλυτικών προτύπων που είχαν αναλυθεί στην ίδια πλατφόρμα υπό πανομοιότυπες αναλυτικές συνθήκες (Sumner et al., 2007). Για τους αναγνωρισμένους μεταβολίτες συμπληρώθηκαν πληροφορίες από τις βάσεις δεδομένων Kyoto Encyclopedia of Genes and Genomes-GenomeNet (KEGG ID), Pubchem CID, και επιπλέον, πληροφορίες που αφορούσαν το CAS registry number, βιοχημικά μονοπάτια στα οποία συμμετέχουν, μονοϊσοτοπική μάζα (Da), μέση μοριακή μάζα (Da) και μοριακός τύπος από τα αποθετήρια KEGG (<https://www.kegg.jp/>), PubChem (<https://pubchem.ncbi.nlm.nih.gov/>) και Golm Metabolome (<http://gmd.mpimp-golm.mpg.de/>). Η ηλεκτρονική βιβλιοθήκη ανοιχτής πρόσβασης που περιέχει τις παραπάνω πληροφορίες κατασκευάστηκε χρησιμοποιώντας το λογισμικό Microsoft Expression Web v.4.0.

Για την ανακάλυψη των τάσεων και των αντίστοιχων μεταβολιτών-βιοσημαντών της τοξικότητας των νανοσωματιδίων στο *V. dahliae*, τα ακατέργαστα χρωματογραφήματα GC/EI/MS (Agilent ".D") μετατράπηκαν σε μορφή "*.cdf" χρησιμοποιώντας το λογισμικό ACD Labs Spectrus (ACD Labs, Τορόντο, Καναδάς). Τα δεδομένα υποβλήθηκαν σε επεξεργασία (π.χ. ευθυγράμμιση) χρησιμοποιώντας το λογισμικό MS-DIAL v.3.70, προσαρμόζοντας τις συνιστώμενες ρυθμίσεις για το GC/EI/MS. Η ληφθείσα ευθυγραμμισμένη μήτρα στη συνέχεια εξήχθη στο MS Excel® για περαιτέρω επεξεργασία, προσθήκη των πληροφοριών που σχετίζονται με τους αναγνωρισμένους μεταβολίτες και ομαλοποίηση στα συνολικά ολοκληρώματα.

Η επεξεργασμένη μήτρα εξήχθη τελικά στο λογισμικό βιοπληροφορικής ανάλυσης SIMCA-P + v.13.0.3 (Umetrics, Sartorius Stedim Biotech, Umeå, Sweden) για την ανακάλυψη των τάσεων και βιοσημαντών. Για την παρακολούθηση των επιδράσεων των εφαρμοζόμενων νανοσωματιδίων στον μεταβολισμό του βερτισιλλίου, πραγματοποιήθηκε ορθογώνια διακριτή ανάλυση μερικών ελαχίστων τετραγώνων (OPLS-DA) και OPLS-HCA (Hierarchical cluster analysis - ιεραρχική ανάλυση κατά συστάδες) σύμφωνα με τη μέθοδο Ward (Kalampokis et al., 2018). Η OPLS-DA είναι μία τροποποίηση της ανάλυσης ελαχίστων τετραγώνων (PLS) και προτιμήθηκε καθώς βελτιώνει την ερμηνευσιμότητα και διαφάνεια του μοντέλου χωρίς να μειώνει την ακρίβεια της πρόβλεψης (Trygg and Wold, 2002). Η ανακάλυψη των αντίστοιχων μεταβολιτών-βιοσημαντών τοξικότητας βασίστηκε σε συντελεστές παλινδρόμησης (regression coefficients) με βάση την OPLS-DA ανάλυση ($P < 0,05$) και τα τυπικά σφάλματα υπολογίστηκαν με βάση την τεχνική Jack-knifing (Efron and Gong, 1983). Επιπλέον, η σημαντικότητα των μεταβολιτών βρέθηκε με βάση VIP plot (variable influence on projection), με διαστήματα εμπιστοσύνης που προέρχονται από το jack-knifing (Galindo-Prieto et al., 2014). Τέλος, τα αποτελέσματα απεικονίστηκαν και σε Heat maps, τα οποία κατασκευάστηκαν χρησιμοποιώντας το λογισμικό Matlab R2019a (Natick, Massachusetts, USA) (Kostopoulou et al., 2020).

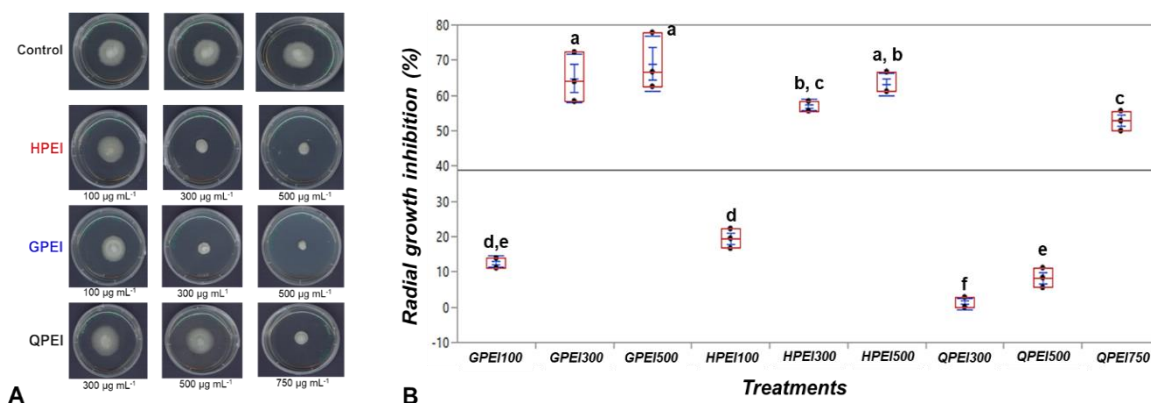
3.3 Αποτελέσματα – Συζήτηση

3.3.1 Αποτελεσματικότητα νανοσωματιδίων με βάση παράγωγα της υπερδιακλαδισμένης πολυαιθυλενιμίνης έναντι του *Verticillium dahliae*

Η εκτίμηση της τοξικότητας των νανοσωματιδίων HPEI, GPEI και QPEI στο *V. dahliae* αποκάλυψε ότι το GPEI είναι το πιο τοξικό νανοσωματίδιο προκαλώντας σημαντική μείωση στη μυκηλιακή ανάπτυξη των καλλιεργειών του μύκητα σε σύγκριση με το HPEI (Εικόνα 3.2), με τιμή EC_{50} 207 $\mu\text{g mL}^{-1}$. Το HPEI ήταν ελαφρώς λιγότερο τοξικό από το GPEI, με EC_{50} 212 $\mu\text{g mL}^{-1}$. Από την άλλη πλευρά, το QPEI ήταν μέτρια τοξικό στη μέγιστη συγκέντρωση 750 $\mu\text{g mL}^{-1}$ που εξετάστηκε, ωστόσο, ήταν σημαντικά λιγότερο τοξικό από τα άλλα δύο νανοσωματίδια, προκαλώντας 45% μείωση στη μυκηλιακή ανάπτυξη του μύκητα στη μέγιστη εφαρμοσμένη συγκέντρωση. Τέτοια αποτελέσματα παρέχουν στοιχεία ότι η υποκατάσταση των πρωτοταγών αμινομάδων του HPEI με ομάδες γουανιδίνης αυξάνει την μυκητοτοξικότητα, ενώ αντίθετα, η υποκατάσταση με ομάδες τεταρτοταγών αμμωνιακών αλάτων τη μειώνει.

Σύμφωνα με τη βιβλιογραφία, αυτή είναι η πρώτη εργασία σχετικά με τη συγκριτική τοξικότητα των HPEI, GPEI και QPEI σε μύκητες. Παρ'όλα αυτά, οι πληροφορίες σχετικά με τον ακριβή μηχανισμό δράσης τους και τους μηχανισμούς τοξικότητας είναι σε μεγάλο βαθμό ελλιπείς. Οι γουανιδινικές ομάδες είναι οι κατιονικές μορφές της γουανιδίνης (Tan and Coles, 2014) και υπάρχουν επίσης στο μόριο της αργινίνης, με καλά μελετημένη βιοδραστικότητα.

Είναι γνωστό ότι αλληλεπιδρούν έντονα με τις κυτταρικές μεμβράνες επιτρέποντας τη διείσδυση τους στα κύτταρα (Hamley, 2017) και η παρουσία των γουανιδινικών ομάδων σε μόρια συσχετίζεται σε μεγάλο βαθμό με την αντιβακτηριακή τους δράση κατά του *Escherichia coli* (Qian et al., 2008), των οργανισμών ESKAPE (Fleeman et al., 2015, Wang et al., 2016), *Enterobacter cloacae* και *Acitenobacter baumannii* (Zamperini et al., 2017). Τα ευρήματά μας συμφωνούν με τέτοιες παρατηρήσεις, υποστηρίζοντας τον ρόλο των γουανιδινικών ομάδων στις αντιμικροβιακές ιδιότητες των νανοσωματιδίων.



Εικόνα 3.2: (Α) Εικόνες από τις καλλιέργειες του *Verticillium dahliae* για τον μάρτυρα (control) και τις επεμβάσεις HPEI, GPEI και QPEI την 14^η μέρα ανάπτυξης του μύκητα, (Β) Θηκόγραμμα με τα αποτελέσματα σχετικής ανάπτυξης του βερτισιλλίου. Τρεις επαναλήψεις πραγματοποιήθηκαν ανά επέμβαση και οι διαφορετικοί χαρακτήρες υποδηλώνουν στατιστικά σημαντικές διαφορές με βάση το Student's t test ($P < 95\%$)

Επίσης, πολυμερή που φέρουν άλατα τεταρτοταγούς αμμωνίου έχουν μελετηθεί ως αντιμικροβιακοί παράγοντες (Cheng et al., 2017, Schallenhämmer et al., 2017). Παρομοίως, η αντιμικροβιακή δραστηριότητα υπερδιακλαδισμένων δενδριτικών πολυμερών που φέρουν ομάδες τεταρτοταγών αμμωνιακών αλάτων έχει αποδειχθεί σε *E. Coli* (Feng et al., 2000, Yang et al., 2014), *Staphylococcus aureus* (Worley et al., 2014, Yang et al., 2014), *Pseudomonas aeruginosa* (Worley et al., 2014) και *Vibrio fischeri* (Feng et al., 2000). Επιπλέον, έχει επιβεβαιωθεί ότι οι ομάδες τεταρτοταγούς αμμωνίου αυξάνουν την αντιμυκητιακή αποτελεσματικότητα της χιτοζάνης έναντι σημαντικών φυτοπαθογόνων μυκήτων (Brunel et al., 2013, Richter et al., 2015, Hamley, 2017). Παρ' όλα αυτά, τα αποτελέσματα της συγκεκριμένης μελέτης έδειξαν μειωμένη αντιμικροβιακή δραστηριότητα των νανοσωματιδίων QPEI σε σύγκριση με τα GPEI και HPEI, υποδεικνύοντας ότι η ενεργοποίηση του HPEI με ομάδες τεταρτοταγούς αμμωνίου μειώνει τη μυκητοτοξικότητα των νανοσωματιδίων.

Επιπρόσθετα, το εξωτερικό φορτίο των νανοσωματιδίων έχει μεγάλο αντίκτυπο στη βιοδραστηριότητα τους. Επί παραδείγματι, η τροποποίηση στο φορτίο της ανοσοσφαιρίνης (immunoglobulin) G επιτρέπει την είσοδό της στο κυτταρόπλασμα των ηπατικών κυττάρων (Lee et al., 2010). Επίσης, η επικάλυψη νανοσωματιδίων αργύρου (AgNPs) με κατιονικά στρώματα

πολυηλεκτρολύτη, βελτιώνει το περιβαλλοντικό τους αποτύπωμα και την προσκόλλησή τους στις μεμβράνες των βακτηριακών κυττάρων, καθιστώντας τα τοξικά για είδη όπως *E. coli*, *P. Aeruginosa* και στα ανθεκτικά στην τεταρτοταγή αμίνη *Ralstonia* sp. (Richter et al., 2015). Επιπλέον, οι αλλαγές στις τελικές ομάδες τεταρτοταγούς αμμωνίου μεταβάλλουν τις μηχανικές και αντιβακτηριακές ιδιότητες (Liang et al., 2018). Τα ευρήματά μας επιβεβαιώνουν τέτοιες παρατηρήσεις, υποδηλώνοντας ότι η γουανιδινική ομάδα αλληλεπιδρά πολύ ισχυρότερα με την κυτταρική μεμβράνη σε σύγκριση με την ομάδα του τεταρτοταγούς αμμωνίου, η οποία έχει χαμηλότερη βασικότητα από τη γουανιδινική ομάδα. Οι τιμές pKa της γουανιδινικής ομάδας και της ομάδας του τεταρτοταγούς αμμωνίου είναι ~ 12,5 (Nishihara et al., 2005) και ~ 10 (He and Chu, 2013), αντίστοιχα.

Η παρατηρούμενη μυκητοτοξικότητα των νανοσωματιδίων που προέρχονται από HPEI είναι χαμηλότερη από εκείνη των νανοσωματιδίων όπως, AgNPs σε φυτοπαθογόνους μύκητες ($EC_{50} < 50$ ppm) (Kim et al., 2012), *Candida albicans* ($MIC = 2 \mu g mL^{-1}$) (Kim et al., 2009), nanomancozeb σε *Alternaria solani* ($ED_{50} \sim 1.31-2.79 mg L^{-1}$), *Sclerotium rolfsii* ($ED_{50} \sim 1.60-3.14 mg L^{-1}$) (Majumder et al., 2016), και τυποποιημένο σε μορφή νανοσωματιδίων validamicin έναντι του *Rhizoctonia solani* ($EC_{50} < 25 mg L^{-1}$) (Qian et al., 2010). Αντίθετα, παρουσιάζουν υψηλότερη τοξικότητα από τα νανοσωματίδια με βάση τη χιτοζάνη έναντι των *Alternaria alternata*, *Macrophomina phaseolina* ($EC_{50} > 0,06\%$, w/v) και *R. solani* ($EC_{50} > 0,1\%$, w/v) (Saharan et al., 2013). Τέτοια αποτελέσματα δείχνουν ότι τα νανοσωματίδια με βάση το HPEI, παρουσιάζουν ενδιαφέρουσα μυκητοτοξικότητα, συγκρίσιμη με εκείνη άλλων νανοσωματιδίων που έχουν μελετηθεί, η οποία υποστηρίζει την ιδέα της πιθανής χρήσης τους ως ΦΠ *per se* ή ως φορείς στην τυποποίηση νανο-ΦΠ. Επιπλέον, παρέχουν νέες πληροφορίες σχετικά με την ποσοτική σχέση δομής-δραστικότητας (QSAR) των νανοσωματιδίων που προέρχονται από το HPEI και θα μπορούσαν να αξιοποιηθούν περαιτέρω στην E&A των νανο-ΦΠ.

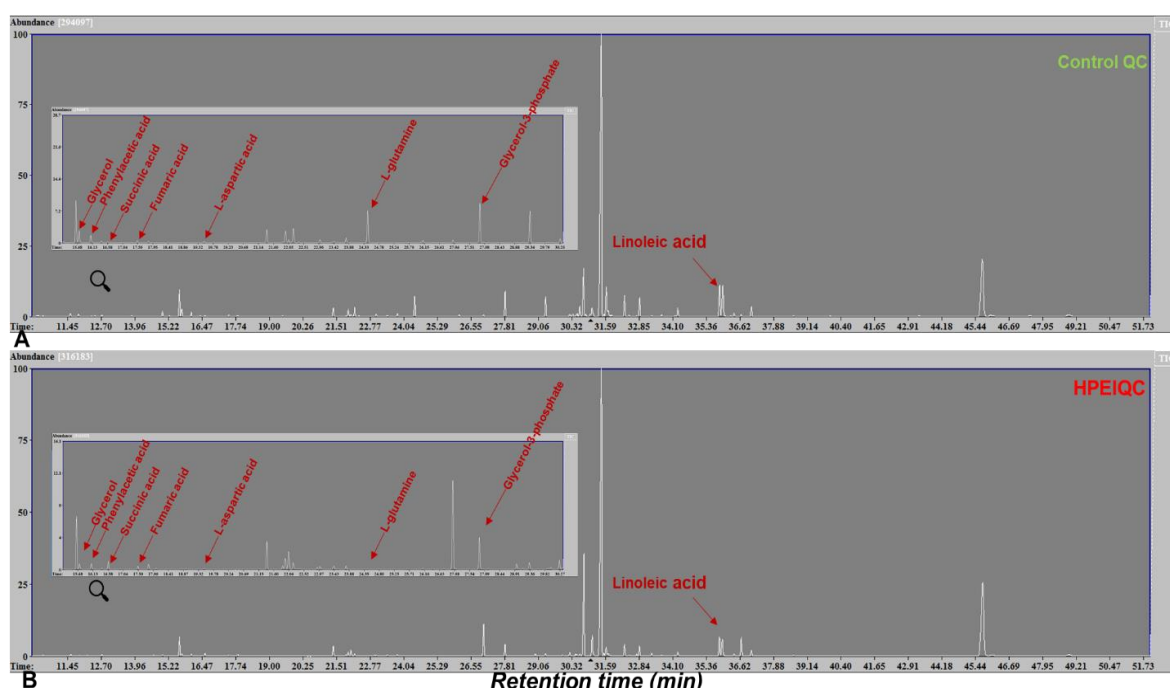
3.3.2 Κατασκευή ειδικής βιβλιοθήκης GC/EI/MS μεταβολιτών για το *Verticillium dahliae*

Για αναλύσεις μεταβολομικής υψηλής απόδοσης (robust), η χρήση βιβλιοθηκών μεταβολιτών για συγκεκριμένα είδη είναι ιδιαίτερα σημαντική (Brown et al., 2009) καθώς παρέχει εμπιστοσύνη στην αναγνώριση των μεταβολιτών και επιτρέπει την εύκολη επεξεργασία των αποκτηθέντων δεδομένων (big data) που προκύπτουν κατά την ανάλυση. Επομένως, στην παρούσα μελέτη, σε ένα πρώτο βήμα, κατασκευάστηκε η ανοιχτής πρόσβασης βιβλιοθήκη για τους GC/EI/MS μεταβολίτες του *Verticillium dahliae* v.1.0. Η βιβλιοθήκη φιλοξενείται στο αποθετήριο του Pesticide Metabolomics Group (PMG, Laboratory of Pesticide Science, Agricultural University of Athens, AUA, <http://www.aua.gr/pesticide-metabolomicsgroup/Resources/default.html>).

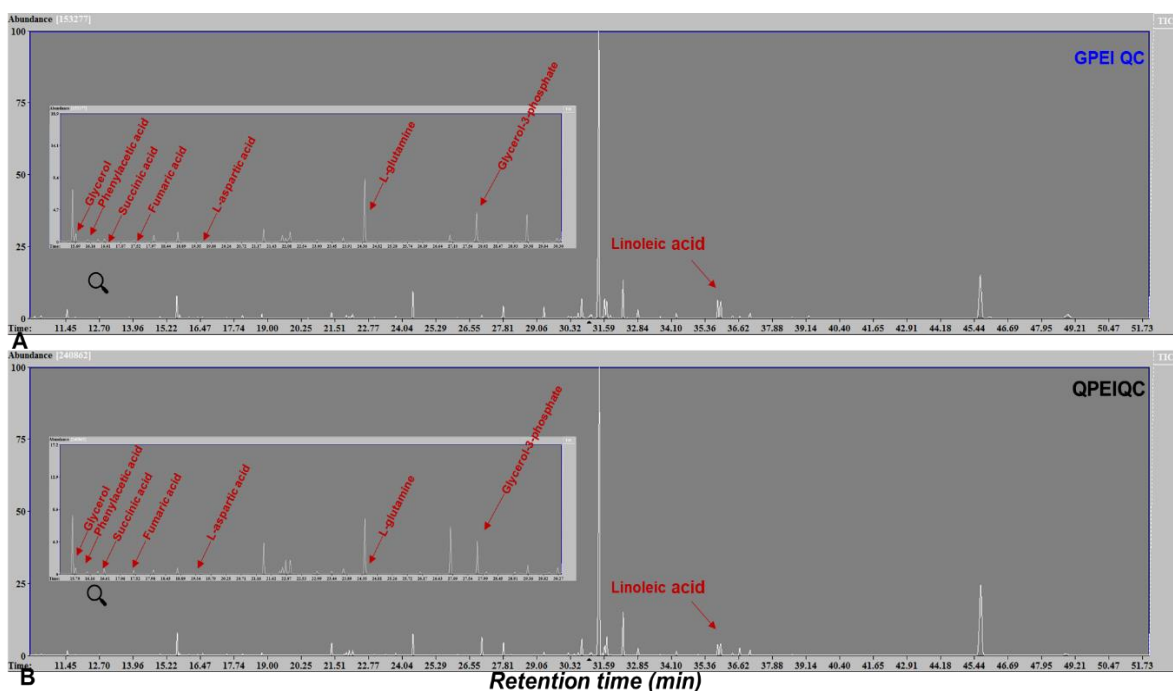
3.3.3 Επισκόπηση της GC/EI/MS μεταβολομικής ανάλυσης του μύκητα *Verticillium dahliae*

Το εφαρμοσμένο βιοαναλυτικό πρωτόκολλο επέτρεψε την καταγραφή και την επεξεργασία ενός μέρους του ενδο-μεταβολόματος του *V. dahliae*. Από όσα γνωρίζουμε, αυτή είναι η πρώτη μελέτη του μεταβολικού προφίλ σε αυτόν τον μύκητα. Τα αποκτηθέντα χρωματογραφήματα (total ion chromatograms - TIC) GC/EI/MS ήταν υψηλής ποιότητας, όπως επιβεβαιώνεται από τον μεγάλο αριθμό κορυφών, τα σχήματα και τις γραμμές βάσης τους, και τον επιτευχθέντα χρωματογραφικό διαχωρισμό (Εικόνα 3.3 και Εικόνα 3.4).

Συνολικά, καταγράφηκαν 155 μεταβολικά χαρακτηριστικά τα οποία ήταν επαναλαμβανόμενα μεταξύ των επεμβάσεων και αναγνωρίστηκαν σε διάφορα επίπεδα. Στη βάση δεδομένων που δημιουργήθηκε περιλαμβάνονται πληροφορίες για τους μεταβολίτες (π.χ. αναγνωριστικά, βιοσυνθετικές οδούς, χημική ομαδοποίηση). Οι απόλυτα ή δυνητικά αναγνωρισμένοι μεταβολίτες συμμετέχουν σε 115 βιοσυνθετικά μονοπάτια, και στην πλειονότητά τους ανήκουν σε υδατάνθρακες (27%), καρβοξυλικά οξέα (15%) και αμινοξέα (14%). Το αρχικό σύνολο δεδομένων της ανάλυσης είναι ελεύθερα προσβάσιμο στο αποθετήριο του Pesticide Metabolomics Group (<https://www.aua.gr/pesticide-metabolomicsgroup/Resources/default.html>) με το όνομα "*Verticillium dahliae* (PMG-05-19)" σε μορφή "*.cdf".



Εικόνα 3.3: (Α) Αντιπροσωπευτικά ολικά χρωματογραφήματα ιόντος (TIC) για το ενδο-μεταβόλομα του *Verticillium dahliae* 14 ημέρες μετά τις επεμβάσεις (Α) του μάρτυρα (control) και (Β) ΗΡΕΙ. Φαίνονται ενδεικτικοί μεταβολίτες. QC= δείγματα ελέγχου ποιότητας (quality control sample)



Εικόνα 3.4: (Α) Αντιπροσωπευτικά ολικά χρωματογραφήματα ιόντος (TIC) για το ενδο-μεταβόλομα του *Verticillium dahliae* 14 ημέρες μετά τις επεμβάσεις (Α) GPEI και (Β) QPEI. Φαίνονται ενδεικτικοί μεταβολίτες.

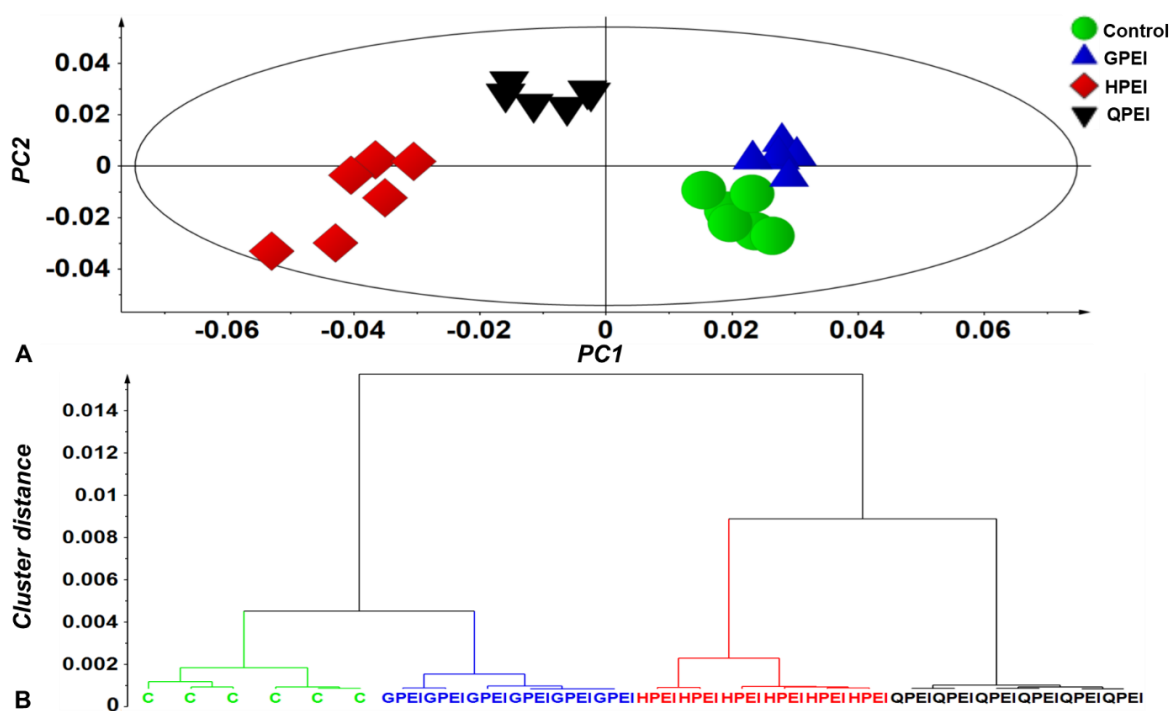
QC= δείγματα ελέγχου ποιότητας (quality control sample)

Γενικότερα, η επιτυχία των πειραματικών και βιοαναλυτικών πρωτόκολλων που ακολουθήθηκαν επιβεβαιώνεται από την ισχυρή ομαδοποίηση μεταξύ των καταγεγραμμένων μεταβολικών προφίλ των βιολογικών επαναλήψεων που ανήκουν στην ίδια επέμβαση στο διάγραμμα OPLS-DA (Εικόνα 3.5Α) και στο αντίστοιχο δενδρόγραμμα HCA (Εικόνα 3.5Β), καθώς και το αντίστοιχο Heat map (Εικόνα 3.6). Επιπλέον, δεν παρατηρήθηκαν ακραίες τιμές (Εικόνα 3.5). Η συνολική επισκόπηση των διακυμάνσεων του μεταβολώματος του μύκητα σε απόκριση των επεμβάσεων επιτεύχθηκε χρησιμοποιώντας το Heat map (Εικόνα 3.6).

3.3.4 Τα νανοσωματίδια με βάση παράγωγα της υπερδιακλαδισμένης πολυαιθυλενιμίνης προκαλούν διακριτές μεταβολές στο μεταβολικό προφίλ του *Verticillium dahliae*

Τα αποτελέσματα της μεταβολομικής ανάλυσης αποκάλυψαν διακριτές αλλαγές στο ενδομεταβόλομα του *V. dahliae* ως απόκριση στην τοξικότητα που προκαλείται από τα εφαρμοζόμενα νανοσωματίδια γεγονός που υποδεικνύει τη λειτουργία ξεχωριστών μηχανισμών δράσης ή/και μηχανισμών τοξικότητας (Εικόνα 3.5, Εικόνα 3.6, Εικόνα 3.8). Είναι προφανές ότι η έκθεση του βερτισιλλίου στα νανοσωματίδια μεταβάλλει το μεταβολικό του

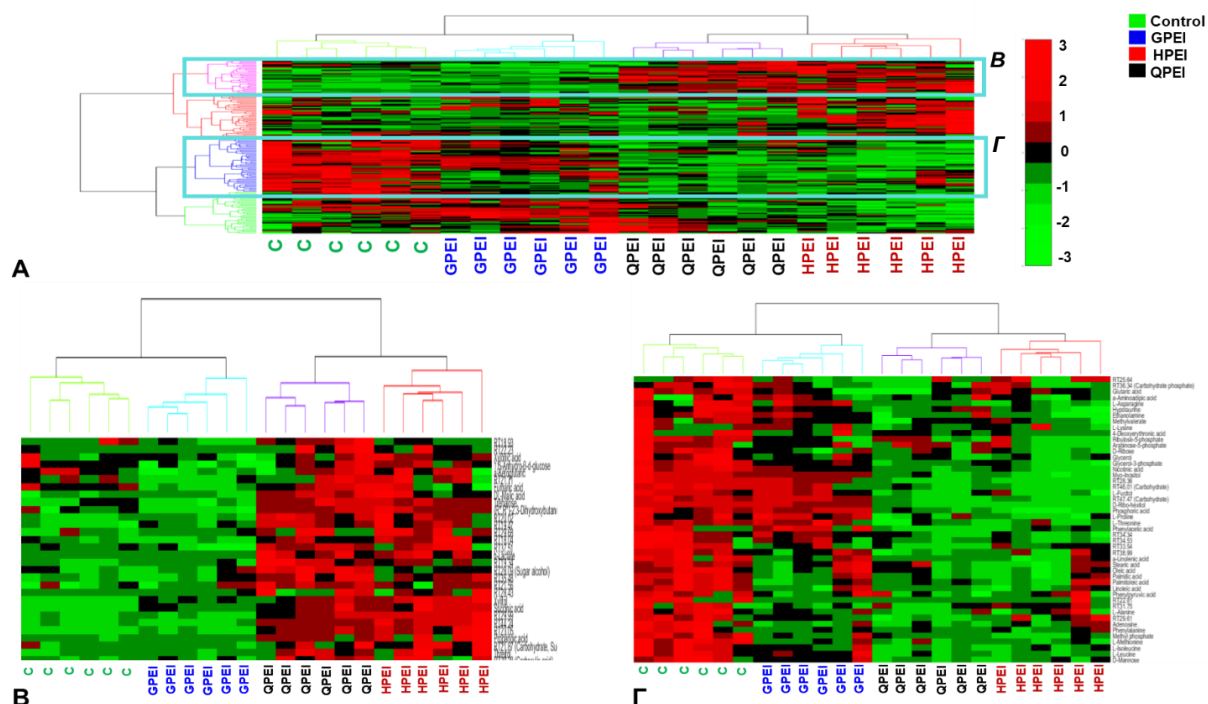
προφίλ. Αναλυτικότερα, το GPEI οδήγησε σε μεταβολικά προφίλ τα οποία ήταν πιο κοντά σε εκείνα του μάρτυρα συγκριτικά με τα μεταβολικά προφίλ που προέκυψαν από τις επεμβάσεις HPEI και QPEI (Εικόνα 3.5). Είναι ενδιαφέρον ότι αυτή η ομαδοποίηση των μεταβολικών προφίλ δεν συσχετίζεται με τη βιοδραστικότητα των νανοσωματιδίων, καθώς τα μεταβολικά προφίλ της επέμβασης HPEI ήταν κοντά στα λιγότερο τοξικά QPEI.



Εικόνα 3.5: (Α) OPLS-DA score plot και (Β) HCA δενδρόγραμμα, όπου απεικονίζεται ο διαχωρισμός μεταξύ των GC/EI/MS μεταβολικών προφίλ του *Verticillium dahliae* 14 ημέρες μετά τις επεμβάσεις με τα νανοσωματίδια υπερδιακλαδισμένης πολυαιθυλενιμίνης (HPEI, GPEI, QPEI).

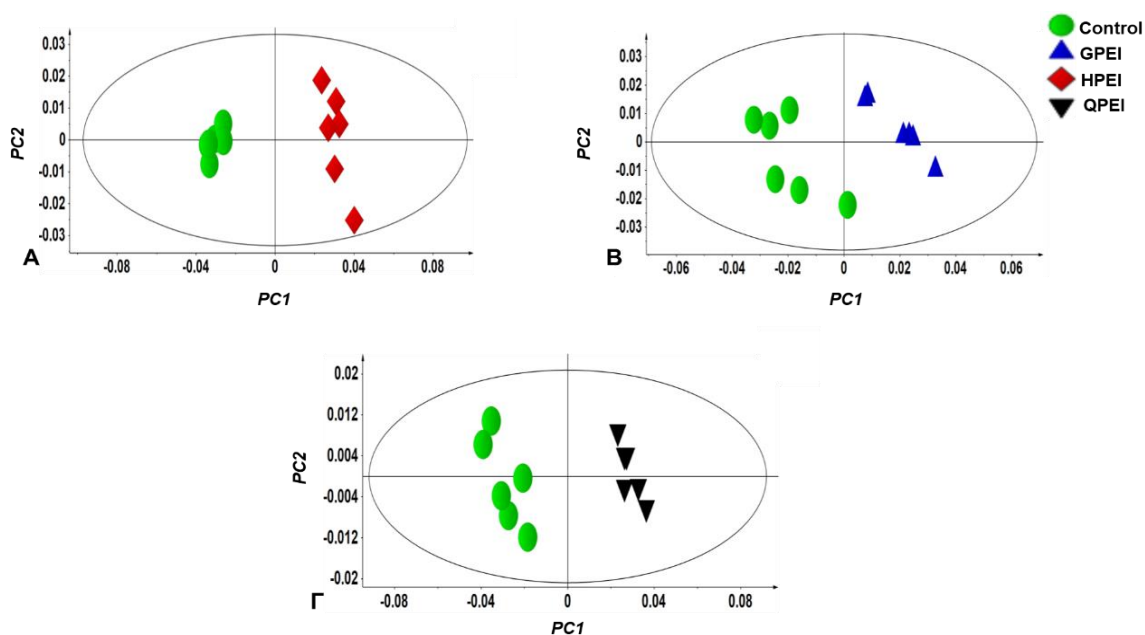
Η έλειψη στο OPLS-DA αντιπροσωπεύει το Hotelling's T^2 με 95% διάστημα εμπιστοσύνης. Η HCA πραγματοποιήθηκε εφαρμόζοντας τη μέθοδο WARD.

Η ανακάλυψη των μεταβολιτών-βιοσημαντών της τοξικότητας του κάθε νανοσωματιδίου βασίστηκε σε κατά ζεύγη συγκρίσεις εφαρμόζοντας OPLS-DA ανάλυση μεταξύ των μεταβολικών προφίλ του μάρτυρα και των νανοσωματιδίων (Εικόνα 3.7). Οι εν λόγω συγκρίσεις επιβεβαίωσαν διακριτές αλλαγές στον μεταβολισμό του βερτισιλλίου ως απόκριση στις επεμβάσεις. Επίσης, οι αναλύσεις αποκάλυψαν γενικότερη διατάραξη του μεταβολισμού, καθώς μεταβολίτες που συμμετέχουν σε διάφορα βιοχημικά μονοπάτια ανακαλύφθηκαν ως βιοσημαντές.



Εικόνα 3.6: (Α) Cluster heat map για το GC/EI/MS μεταβολικό προφίλ του *Verticillium dahliae* που καταγράφηκε 14 ημέρες μετά τις επεμβάσεις με τα νανοσωματίδια HPEI, GPEI, QPEI ή τον μάρτυρα (C) καθώς και μεγενθυμένες περιοχές αυτού (Β) και (Γ).

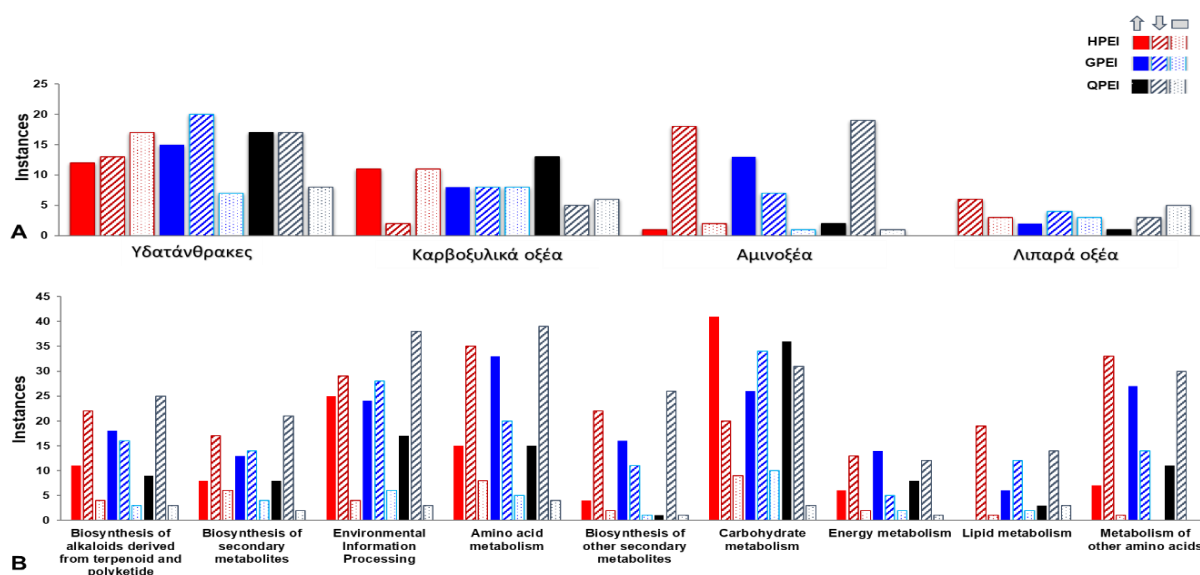
Η HCA πραγματοποιήθηκε εφαρμόζοντας τη μέθοδο WARD. Οι γραμμές αντιπροσωπεύουν τους μεταβολίτες και οι στήλες τις διαφορετικές επεμβάσεις. Το χρώμα κάθε κελιού αντιπροσωπεύει την σχετική συγκέντρωση του εκάστοτε μεταβολικού χαρακτηριστικού με κλίμακα από το ανοιχτό πράσινο (-3) έως τις υψηλές συγκεντρώσεις που παρουσιάζονται με κόκκινο (3).



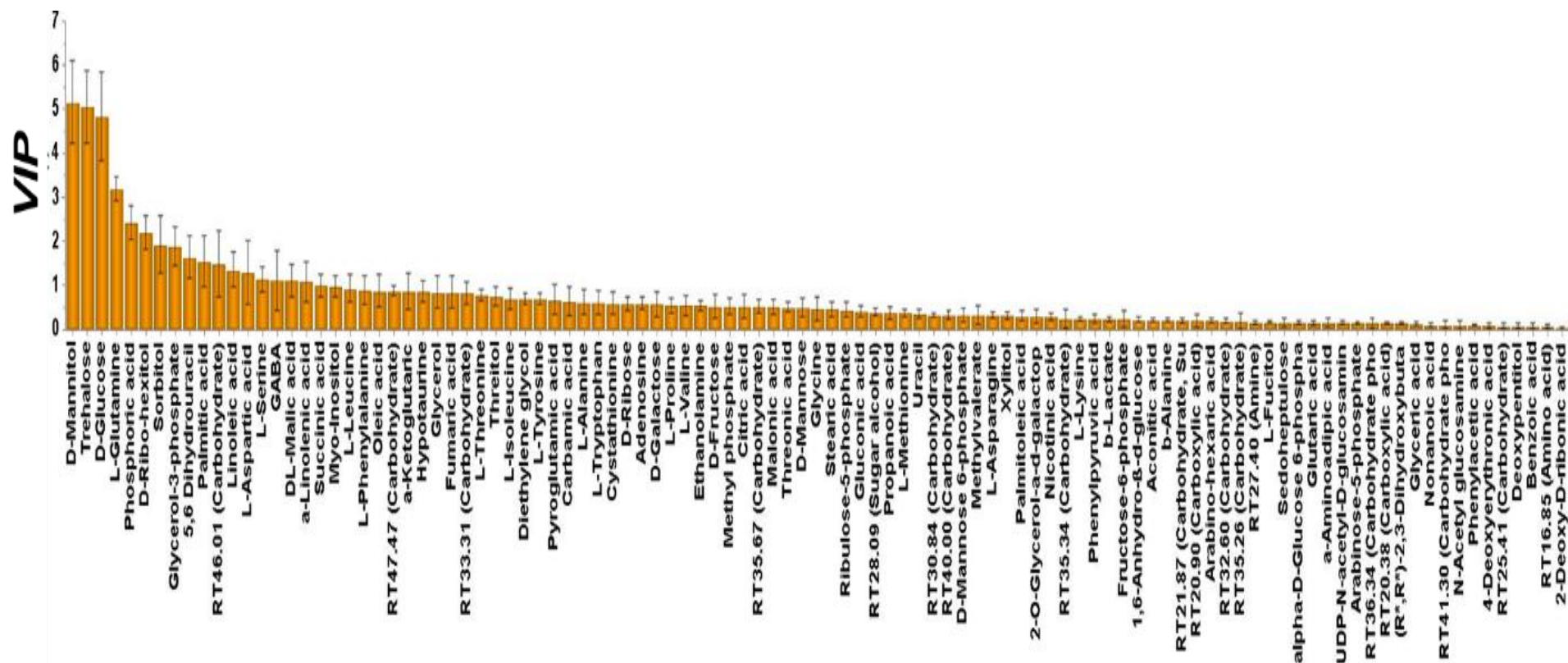
Εικόνα 3.7: OPLS-DA score plot για τις κατά ζεύγη συγκρίσεις των μεταβολικών προφίλ του *Verticillium dahliae* στις επεμβάσεις (Α) HPEI, (Β) GPEI και (Γ) QPEI με το μάρτυρα.

Με βάση τα αποτελέσματα και πληροφορίες από τη βάση δεδομένων KEGG (<https://www.kegg.jp/>), οι διαφορές στα καταγεγραμμένα μεταβολικά προφίλ αναφορικά με τα βιοχημικά μονοπάτια ομαδοποιήθηκαν σε μεταβολικές λειτουργίες (Εικόνα 3.8). Η ανάλυση, γενικότερα, αποκάλυψε αντίστοιχη μεταβολή στις επεμβάσεις από το HPEI και QPEI, ενώ οι μεταβολίτες κατά την επέμβαση από το GPEI έδειξαν διαφορετική μεταβολή. Το επίπεδο των αμινοξέων (AA – amino acids) έδειξε την πιο ενδιαφέρουσα μεταβολή, καθώς στις επεμβάσεις των HPEI κι QPEI βρέθηκε σημαντικά μικρότερη συγκέντρωση στην πλειονότητα των AA, ενώ αντίθετα κατά το GPEI καταγράφηκαν μεγαλύτερες συγκεντρώσεις συγκριτικά με το μάρτυρα. Αντίστοιχα ήταν και τα αποτελέσματα για τις μεταβολικές λειτουργίες (Εικόνα 3.8), όπου οι επεμβάσεις με τα HPEI και QPEI προκάλεσαν παρόμοιες αλλαγές στο ενδο-μεταβόλομα, ενώ η επέμβαση με το GPEI οδήγησε σε διαφορετική επίδραση. Ωστόσο, όλες οι επεμβάσεις οδήγησαν σε διατάραξη των υδατανθράκων, AA, δευτερογενών μεταβολιτών και στο ενεργειακό ισοζύγιο του μύκητα. Επιπρόσθετα, σύμφωνα με το VIP γράφημα οι υδατάνθρακες (μαννιτόλη, τρεχαλόζη, γλυκόζη), τα AA (π.χ. L-σερίνη, GABA, λευκίνη) και τα λιπαρά οξέα (παλμιτικό οξύ, λινολεϊκό οξύ) αποτέλεσαν τους πιο επιδραστικούς μεταβολίτες στην τοξικότητα των νανοσωματιδίων στο *V. dahliae* (Εικόνα 3.9).

Προκειμένου να συγκεντρωθούν τα αποτελέσματα και να καταστεί εφικτή η βιολογική τους ερμηνεία κατασκευάστηκε *de novo* το μεταβολικό δίκτυο του *Verticillium dahliae*. Πιο συγκεκριμένα, χρησιμοποιήθηκαν οι αναγνωρισμένοι μεταβολίτες του μύκητα και ανακαλύφθηκαν σημαντικές αλλαγές στο περιεχόμενο των μεταβολιτών μεταξύ των επεμβάσεων με βάση τους συντελεστές παλινδρόμησης από την OPLS-DA ανάλυση.



Εικόνα 3.8: Επίδραση των νανοσωματιδίων υπερδιακλαδισμένης πολυαιθυλενιμίνης HPEI, GPEI και QPEI (στη συγκέντρωση της εκάστοτε EC_{50}) στο μεταβολικό προφίλ του *Verticillium dahliae*. Ομαδοποίηση ανάλογα με (Α) τη χημική ομάδα των μεταβολιτών και (Β) το βιοσυνθετικό μονοπάτι στο οποίο συμμετέχουν. Οι μεταβολίτες μετρώνται ως instances καθώς κάθε μεταβολίτης μπορεί να συμμετέχει σε περισσότερα από ένα βιοχημικά μονοπάτια. Το συμπαγές χρώμα υποδηλώνει αύξηση, το ριγέ μείωση και το πουνά όχι σημαντική διαφοροποίηση στη συγκέντρωση του κάθε μεταβολίτη συγκριτικά με τον μάρτυρα.



Εικόνα 3.9: VIP γράφημα που δείχνει τις τιμές VIP για τους μεταβολίτες του *Verticillium dahliae* που ανιχνεύτηκαν, ταξινομημένους σε φθίνουσα σειρά. Οι υψηλές τιμές αντιστοιχούν στους μεταβολίτες με τη μεγαλύτερη αυξομείωση κατά τις επεμβάσεις με τα νανοσωματίδια υπερδιακλαδισμένης πολυαιθυλενιμίνης.

3.3.5 Η επίδραση των νανοσωματιδίων με βάση παράγωγα της υπερδιακλαδισμένης πολυαιθυλενιμίνης στον μεταβολισμό του μύκητα *Verticillium dahliae*

Σε αντίθεση με τη μελέτη του μεταβολισμού του *Saccharomyces cerevisiae* (Canelas et al., 2009, Ibáñez et al., 2013), εκείνη των φυτοπαθογόνων μυκήτων είναι ακόμα σε πρώιμο στάδιο. Επίσης, ενώ υπάρχει η τάση της μελέτης του δευτερογενούς μεταβολισμού των μυκήτων (Keller et al., 2005, Brakhage, 2013, Hautbergue et al., 2018), ο πρωτογενής μεταβολισμός και η σημασία του στην απόκριση των μυκήτων κατά την επίδραση βιοδραστικών μορίων είναι ανεξερεύνητος (Kalampokis et al., 2018, Sevastos et al., 2018). Επιπλέον, οι περισσότερες μεταβολομικές αναλύσεις σχετικές με την εφαρμογή νανοσωματιδίων στη γεωπονία αφορούν σε φυτά (Soria et al., 2017, Zhao et al., 2017). Οι πρωτογενείς μεταβολίτες δε χρησιμεύουν μόνο ως δομικά στοιχεία της βιοσύνθεσης πρωτογενών και δευτερογενών μεταβολιτών και πρωτεϊνών, αλλά επιπρόσθετα πολλοί από αυτούς εμπλέκονται στη ρύθμιση του μεταβολισμού δρώντας μεταξύ άλλων ως σήματα (Chevrot et al., 2006, Reyes-García et al., 2012, Mead et al., 2013, de Castro Fonseca et al., 2016, Ryan et al., 2019).

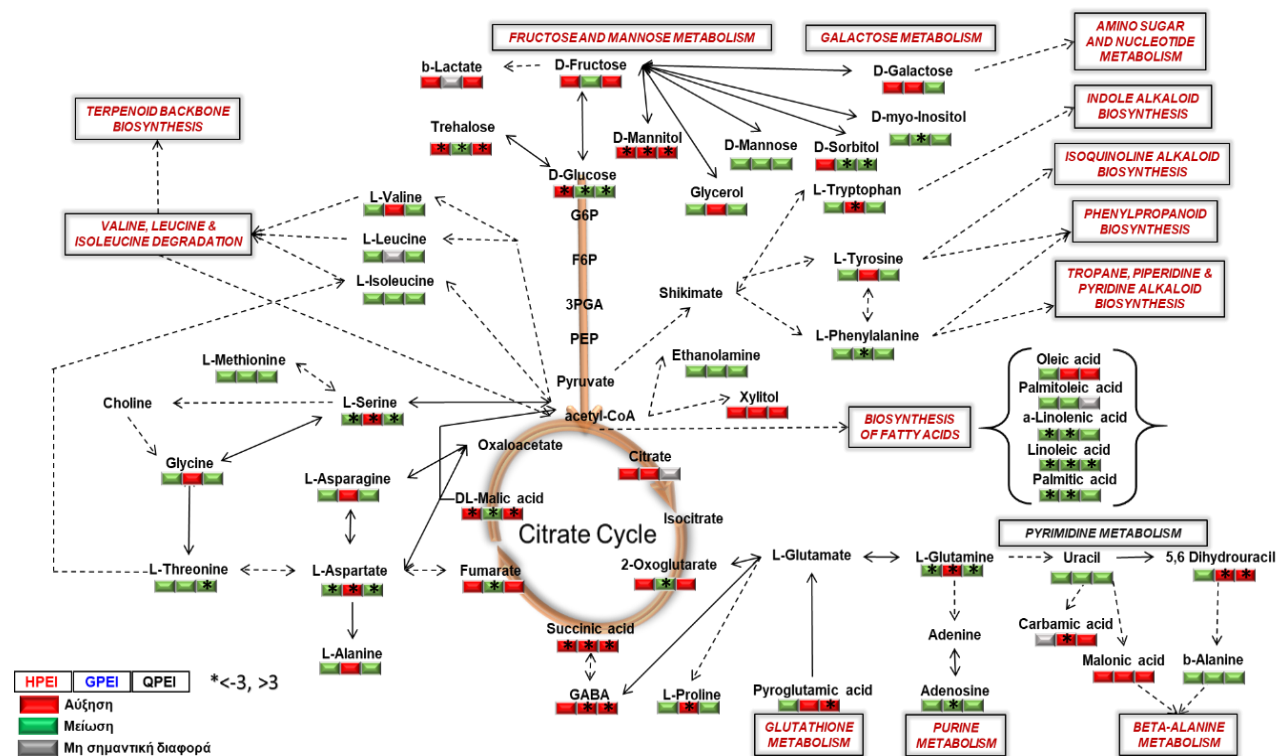
Δεδομένου ότι η ερμηνεία του συνολικού μεταβολικού προφίλ ήταν εκτός του πεδίου της παρούσας έρευνας, εδώ, συζητήθηκαν διακυμάνσεις στα επίπεδα των βασικών μεταβολιτών που ανακαλύφθηκαν ως βιοσημαντές της τοξικότητας των εξεταζόμενων νανοσωματιδίων που προέρχονται από το HPEI, σε μια προσπάθεια να κατανοηθούν οι μηχανισμοί τοξικότητας τους στο *V. dahliae*. Μεταξύ αυτών είναι τα AA όπως προλίνη, GABA, τρυπτοφάνη, τυροσίνη, ο δισακχαρίτης τρεχαλόζη, τα ενδιάμεσα του κύκλου Krebs (Krebs Cycle Intermediates - KCI) και τα λιπαρά οξέα.

3.3.5.1 Η επίδραση των νανοσωματιδίων με βάση παράγωγα της υπερδιακλαδισμένης πολυαιθυλενιμίνης στα επίπεδα των αμινοξέων του *Verticillium dahliae*

Οι επεμβάσεις των νανοσωματιδίων υπερδιακλαδισμένης πολυαιθυλενιμίνης στο *V. dahliae* οδήγησαν σε σημαντικές αλλαγές στα AA (Εικόνα 3.9). Ως επί το πλείστον, τα HPEI κι QPEI οδήγησαν σε μείωση των αμινοξέων ενώ αντίθετα το GPEI προκάλεσε αύξηση. Τα AA έχουν σημαντικό ρόλο στη φυσιολογία του μύκητα χρησιμεύοντας ως πρόδρομες ενώσεις στη βιοσύνθεση μεταβολιτών και πρωτεϊνών, και επιπλέον, πολλά από αυτά λειτουργούν ως σήματα απαραίτητα στη φυσιολογία του μύκητα (π.χ. ωσμορύθμιση) (Feehily and Karatzas, 2013, Galindo-Prieto et al., 2014, Kostoroulou et. κλπ., 2020). Συνεπώς, η παρατηρούμενη διατάραξή τους υπό την επίδραση των επεμβάσεων είναι ενδεικτική γενικότερης διατάραξης του μεταβολισμού του μύκητα και της βιοχημικής του λειτουργίας. Παρ' όλα αυτά, τα υπάρχοντα δεδομένα δεν επιτρέπουν την ασφαλή εξαγωγή συμπεράσματος σχετικά με το αίτιο της επίδρασης αυτής, καθώς αυξημένα επίπεδα AA υποδεικνύουν είτε αυξημένη πρωτεόλυση

είτε μειωμένη αξιοποίησή τους κατά τη βιοσύνθεση πρωτεϊνών. Ομοίως, τα μειωμένα επίπεδα τους θα μπορούσαν να υποδεικνύουν αυξημένη βιοσύνθεση πρωτεϊνών ή μειωμένη βιοσύνθεση AA.

Τα αυξημένα επίπεδα των αρωματικών AA τρυπτοφάνη και τυροσίνη μετά την επέμβαση με το GPEI σε συνδυασμό με τη μειωμένη παραγωγή ενέργειας στον κύκλο του Krebs και τη γενικότερη διακύμανση στα AA, πιθανώς υποδεικνύει τη μειωμένη βιοσύνθεση των αλκαλοειδών (ινδολικά, ισοκινολικά, πυριδινικά και πιπεριδινικά αλκαλοειδή κά.) (Εικόνα 3.10). Επίσης, δεδομένης της σημασίας των μεταβολιτών αυτών στη φυσιολογία του μύκητα (Keller et al., 2005, Brakhage, 2013), αναμένεται ότι τα GPEI νανοσωματίδια θα έχουν σημαντική επίδραση στις φυσιολογικές λειτουργίες του βερτισιλλίου (π.χ. παθογένεση, απόκριση σε στρες). Αντίθετα, τα HPEI και QPEI δεν φαίνεται να επηρεάζουν σημαντικά τη βιοσύνθεση των δευτερογενών μεταβολιτών.



Εικόνα 3.10: Μεταβολικό δίκτυο του *Verticillium dahliae* που δείχνει τις διακυμάνσεις στις σχετικές συγκεντρώσεις των μεταβολιτών που ανιχνεύθηκαν 14 ημέρες μετά τις επεμβάσεις με τα νανοσωματίδια HPEI, GPEI και QPEI.

3.3.5.2 Μηχανισμοί τοξικότητας των νανοσωματιδίων με βάση παράγωγα της υπερδιακλαδισμένης πολυαιθυλενιμίνης

Η επίδραση των νανοσωματιδίων με βάση παράγωγα της υπερδιακλαδισμένης πολυαιθυλενιμίνης είχε ως αποτέλεσμα τη διακύμανση μεταβολιτών όπως η προλίνη και η τρεχαλόζη, οι οποίοι έχουν περιγραφθεί ως σήματα σε οξειδωτικό κι ωσμωτικό στρες για διάφορους οργανισμούς. Η προλίνη είναι ένα αμινοξύ το οποίο συντίθεται από το γλουταμικό οξύ (Εικόνα 3.10) και είναι γνωστό για τους πολλούς ρόλους του στη φυσιολογία των μυκήτων επιδρώντας σε ποικίλες διαδικασίες όπως η ανάπτυξη, διαφοροποίηση, απόπτωση και απόκριση στο στρες (Liang et al., 2013). Επίσης, είναι απαραίτητο μόριο στη σταθεροποίηση των πρωτεϊνών και μεμβρανών μέσω της αντιοξειδωτικής του δράσης (Takagi, 2008). Επίσης, η υπερ-βιοσύνθεση της προλίνης έχει αποδειχθεί ότι καταστέλλει τα ROS (Reactive Oxygen Species) και την απόπτωση των θηλαστικών κυττάρων που προκαλείται από τα ROS (Chen and Dickman, 2005, Krishnan et al., 2008). Επιπλέον, έχει αναφερθεί ο ρόλος της έναντι του ωσμωτικού στρες σε φυτά και μικροοργανισμούς (Khedr et al., 2003, Xu et al., 2010). Η ανακάλυψη του μεταβολίτη σε σημαντικά μεγαλύτερες συγκεντρώσεις στην επέμβαση με το GPEI συγκριτικά με το μάρτυρα, αποτελεί ένδειξη ότι το νανοσωματίδιο προκαλεί την τοξικότητά του μέσω οξειδωτικού ή/και ωσμωτικού στρες.

Ωστόσο, ο μηχανισμός αυτός δεν ισχύει στην περίπτωση των HPEI και QPEI. Τα αποτελέσματα δείχνουν μεγαλύτερη χημική συγγένεια των ομάδων γουανιδίνης με τις αρνητικά φορτισμένες κυτταρικές μεμβράνες συγκριτικά με τις ομάδες τεταρτοταγούς αμμωνίου (Matsuzaki, 2009). Μάλιστα, είναι γνωστό ότι οι γουανιδινικές ομάδες αλληλεπιδρούν τόσο ηλεκτροστατικά όσο και μέσω των δεσμών υδρογόνου με τις φωσφωρικές, καρβοξυλικές και θειϊκές ομάδες που βρίσκονται στην επιφάνεια των κυττάρων λόγω της ηλεκτρικής και γεωμετρικής συμπληρωματικότητάς τους, διευκολύνοντας τη μεταφορά δενδριτικών πολυμερών μέσα σε λιποσώματα και κυτταρικές μεμβράνες (Pantos et al., 2008, Theodossiou et al., 2008). Αυτή η διαδικασία ενεργοποιεί την σταθεροποίηση των μεμβρανών, μέρος της οποίας είναι η προλίνη.

Αντίθετα, στις επεμβάσεις HPEI και QPEI παρατηρήθηκε αύξηση του δισακχαρίτη τρεχαλόζη. Η τρεχαλόζη είναι ένας από τους πιο γνωστούς μεταβολίτες στους μύκητες, και σχετίζεται με την απόκρισή τους σε διάφορα στρες, την παραγωγή κονιδίων και τη παθογένειά τους (Iturriaga et al., 2009, Lowe et al., 2009, Kalampokis et al., 2018). Επίσης, τα υψηλά επίπεδα τρεχαλόζης συνδέονται με τη στατική φάση των κυττάρων των μυκήτων (Jorge et al., 1997). Στο εδαφογενές παθογόνο *R. solani*, η συσσώρευσή της τρεχαλόζης κατά την ωρίμανση των σκληρωτίων διασφαλίζει τη δομή και τη λειτουργία των μεμβρανών σε ακραίες συνθήκες (Aliferis and Jabaji, 2010). Επιπρόσθετα, έχει αναφερθεί θετικός συσχετισμός μεταξύ της περιεκτικότητας των υφών *Fusarium graminearum* σε τρεχαλόζη και στην ευαισθησία του στη δραστική carbendazim (Sevastos et al., 2018). Με βάση τα παραπάνω, φαίνεται ότι οι επεμβάσεις με το HPEI και QPEI προκαλούν αντίστοιχο στρες και ενεργοποιούν αντίστοιχες μεταβολικές διεργασίες κατά την απόκριση του μύκητα στην αντιμετώπιση της τοξικότητάς

τους. Τέλος, τα ευρήματα αυτά βρίσκονται σε συμφωνία με τη βιβλιογραφία ότι το οξειδωτικό στρες αποτελεί έναν από τους κύριους μηχανισμούς τοξικότητας των νανοσωματιδίων (Schnackenberg et al., 2012).

3.3.5.3 Η επίδραση των νανοσωματιδίων με βάση παράγωγα της υπερδιακλαδισμένης πολυαιθυλενιμίνης στον κύκλο του Krebs

Η επέμβαση του GPEI οδήγησε σε διακριτές διακυμάνσεις στους κυριότερους μεταβολίτες που ανιχνεύτηκαν στον κύκλο του Krebs (Krebs Cycle Intermediates -KCI). Ο κύκλος του Krebs ή κύκλος του τρικαρβοξυλικού οξέους λειτουργεί στα μιτοχόνδρια και έχει ως αποτέλεσμα την οξείδωση των υδατανθράκων και την παραγωγή των FADH₂ και NADH στους μύκητες (Ryan et al., 2019). Η παραγωγή ενέργειας είναι μία σημαντική λειτουργία η οποία αποτελεί στόχο πολλών μυκητοκτόνων όπως τα SDHIs (succinate dehydrogenase inhibitors), QoIs (Quinone outside inhibitors), και QiIs (Quinone inside inhibitors) (FRAC, 2019). Επίσης, ο κύκλος του Krebs είναι σημαντικός για το μεταβολισμό των κυττάρων και την ομοιοστάση της ενέργειας, καθώς παρέχει πρόδρομα μόρια (π.χ. α-κετογλουταρικό οξύ) για τη βιοσύνθεση μεταβολιτών και πρωτεϊνών. Επίσης, πρόσφατα δεδομένα προτείνουν τη συμμετοχή πολλών μεταβολιτών που συμμετέχουν στον κύκλο του Krebs σε μη μεταβολικές διαδικασίες ως σήματα (de Castro Fonseca et al., 2016, Ryan et al., 2019).

Όλες οι επεμβάσεις των νανοσωματιδίων στο *V. dahliae* προκάλεσαν διατάραξη της λειτουργίας του κύκλου του Krebs όπως φαίνεται από τη σημαντική διακύμανση πολλών από τους μεταβολίτες που συμμετέχουν σε αυτόν (Εικόνα 3.10). Πιο συγκεκριμένα, η επέμβαση με το GPEI φαίνεται να προκάλεσε την μειωμένη λειτουργία του κύκλου του Krebs, καθώς πολλοί από τους μεταβολίτες όπως τα μηλικό, φουμαρικό, και 2-οξογλουταρικό οξύ ανιχνεύτηκαν σε σημαντικά μικρότερα επίπεδα σε σχέση με το μάρτυρα. Τέτοια διατάραξη στον κύκλο του Krebs αναμένεται να αποσταθεροποιήσει την παραγωγή ενέργειας στο μύκητα και επηρεάζει το μεταβολισμό του. Η διαφορετική επίδραση των νανοσωματιδίων στον κύκλο του Krebs δείχνει το διαφορετικό μηχανισμό τοξικότητάς τους.

Ενδιαφέρον παρουσιάζει η σημαντική αύξηση που παρατηρήθηκε στο μη πρωτεϊνικό αμινοξύ GABA (γ-αμινοβουταρικό οξύ) στο σύνολο των επεμβάσεων. Το GABA είναι παράγωγο της αποκαρβοξυλίωσης της L-γλουταμίνης, η οποία καταβολίζεται στη συνέχεια σε σουκινικό οξύ. Μάλιστα το σουκινικό οξύ ανιχνεύτηκε επίσης σε αυξημένα επίπεδα σε όλες τις επεμβάσεις. Επίσης, υπάρχουν περιπτώσεις στις οποίες το GABA χρησιμοποιείται από τους μύκητες ως πηγή άνθρακα και αζώτου (Solomon and Oliver, 2001). Επιπρόσθετα, στα φυτά (Kinnersley and Turano, 2000, Gilliham and Tyerman, 2016) και στους μικροοργανισμούς (Chevrot et al., 2006, Reyes-García et al., 2012, Mead et al., 2013) παίζει σημαντικό ρόλο ως σήμα ρυθμίζοντας διάφορες φυσιολογικές λειτουργίες. Ακόμη το GABA παράγει σουκινικό οξύ, ως εναλλακτικό μονοπάτι του κύκλου του Krebs (Kumar and Puneekar, 1997, Feehily and Karatzas, 2013). Συνολικά, φαίνεται ότι το GABA είναι μία από τις κύριες αποκρίσεις του *V.*

dahliae στην τοξικότητα των εξεταζόμενων νανοσωματιδίων. Παρ' όλα αυτά, απαιτείται επιπλέον πειραματισμός για τη διευκρίνιση αυτών των μηχανισμών. Τέλος, τα αποτελέσματα βρίσκονται σε συμφωνία με τη βιβλιογραφία καθώς έχει καταγραφεί ο ρόλος του GABA στον ασκομύκητα *Stagonospora nodorum* στην απόκρισή του σε διάφορα στρες και στην ανάπτυξή του (asexual) (Kinnnersley and Turano, 2000).

3.3.5.4 Τα νανοσωματίδια με βάση παράγωγα της υπερδιακλαδισμένης πολυαιθυλενιμίνης επιδρούν αρνητικά στη βιοσύνθεση των λιπαρών οξέων στο *Verticillium dahliae*

Με εξαίρεση τα επίπεδα του oleate στις επεμβάσεις GPEI και QPEI, αυξημένα επίπεδα των πολυακόρεστων λιπαρών οξέων (polyunsaturated fatty acids - PUFAs) καταγράφηκαν στο σύνολο των επεμβάσεων (Εικόνα 3.10). Τα PUFAs ρυθμίζουν διάφορες λειτουργίες που σχετίζονται με την παραγωγή κονιδίων, τη μορφογένεση και τη μυκηλιακή ανάπτυξη (Calvo et al., 2001, Tisch and Schmoll, 2010). Η βιοσύνθεσή τους ξεκινά κατά την καρβοξυλίωση του ακέτυλο συνένζυμου Acetyl (ακέτυλο-CoA, acetyl-CoA) σε μηλόνυλο συνενζύμο A (malonyl-CoA) από τις ακετυλο-CoA καρβοξυλάσες (ACCs), οι οποίες παρέχουν το κατάλληλο υπόστρωμα για τη σύνθεση των λιπαρών οξέων (Hunkeler et al., 2016). Ωστόσο, η εν λόγω διαδικασία είναι ένα πολύπλοκο σύμπλεγμα βιοχημικών διεργασιών όπου συμμετέχουν υδατάνθρακες, λιπίδια και αμινοξέα (Vorapreeda et al., 2012). Οι ομάδες των αρυλόξυ-φαίνυλο-προπιονικά άλατα (FOPs), κυκλοεξανοδιόνες (DIMs), και φαίνυλο-πυραζολίνες (DENS) περιλαμβάνουν ζιζανιοκτόνες δ.ο. που δρουν παρεμποδίζοντας τη βιοσύνθεση των λιπαρών οξέων (HRAC, 2019). Παρ' όλα αυτά, τα δεδομένα δεν επαρκούν για να συμπεράνουμε το αίτιο που προκάλεσε τα μειωμένα επίπεδα των PUFAs στο μύκητα. Δύο πιθανές εξηγήσεις για την παρατήρηση αυτή είναι η παρεμπόδιση της βιοσύνθεσης των λιπαρών οξέων ή να δόθηκε προτεραιότητα σε άλλα βιοσυνθετικά μονοπάτια κατά την απόκριση του μύκητα στις επεμβάσεις.

3.4 Συμπεράσματα

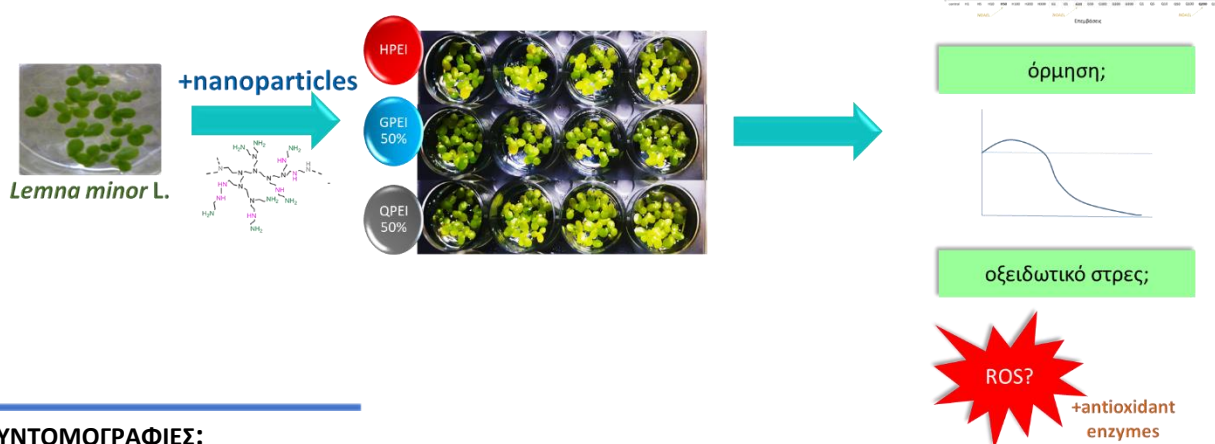
Οι πρόσφατες εξελίξεις στη νανοτεχνολογία αποτελούν μια σημαντική ευκαιρία και ταυτόχρονα μια πρόκληση για εφαρμογές στη φυτοπροστασία. Μέχρι σήμερα, λίγα είναι γνωστά σχετικά με το QSAR και τους μηχανισμούς με τους οποίους τα νανοϋλικά ασκούν τη βιοδραστικότητα τους, επομένως, απαιτείται η απόκτηση της σχετικής γνώσης με την εφαρμογή προηγμένων εργαλείων. Η μελέτη μας έδειξε ότι η βιοδραστικότητα των νανοσωματιδίων με βάση τα παράγωγα της υπερδιακλαδισμένης πολυαιθυλενιμίνης συσχετίζεται σε μεγάλο βαθμό με τις τελικές ομάδες. Η εισαγωγή γουανιδινικών ομάδων στο HPEI αυξάνει τη βιοδραστικότητα του, ενώ η εισαγωγή των ομάδων των τεταρτοταγών αμμωνιακών αλάτων την μειώνουν. Στο υποκυτταρικό επίπεδο, τα νανοσωματίδια που μελετώνται φαίνεται να εμφανίζουν

διαφορετικό μηχανισμό δράσης και μηχανισμούς τοξικότητας, όπως αποκαλύπτεται από τα αποτελέσματα της μεταβολομικής ανάλυσης με GC/EI/MS. Αν και δεν μπορούν να εξαχθούν συμπεράσματα σχετικά με τον ακριβή μηχανισμό δράσης των νανοσωματιδίων HPEI, GPEI και QPEI, η τοξικότητά τους μπορεί να αποδοθεί σε μια γενική διαταραχή της χημικής ομοιόστασης του *V. dahliae* καθώς και στην παραγωγή οξειδωτικού και οσμωτικού στρες. Τα αποτελέσματα θα μπορούσαν να αξιοποιηθούν περαιτέρω στη σύνθεση νέων νανοσωματιδίων με βάση το HPEI προς τη βελτιστοποίηση της μυκητοτοξικότητάς τους και την ανάπτυξη νέων νανο-ΦΠ όπου το υλικό αυτό θα μπορούσε να χρησιμοποιηθεί *per se* ως δ.ο. ή ως νανο-φορείς.

Ωστόσο, είναι γνωστό ότι πέραν της αποτελεσματικότητας ενός ΦΠ απαραίτητη είναι και η αξιολόγηση της τύχης και συμπεριφοράς του στο περιβάλλον, τοξικότητάς του, οικοτοξικότητάς του κ.ά.. Για αυτό το λόγο, στη συνέχεια (Κεφάλαιο 4) τα νανοσωματίδια με βάση τα παράγωγα της υπερδιακλαδισμένης πολυαιθυλενιμίνης μελετήθηκαν περαιτέρω για την επίδρασή τους στην ανάπτυξη της λέμνας.

Κεφάλαιο 4. Μελέτη της επίδρασης πολυμερικών νανοσωματιδίων στην ανάπτυξη της *Lemna minor* L. και ο ρόλος του οξειδωτικού στρες ως πιθανός μηχανισμός της τοξικότητάς τους

Γραφική περίληψη Κεφάλαιο 4



ΣΥΝΤΟΜΟΓΡΑΦΙΕΣ:

νάνο-ΦΠ: νανο-φυτοπροστατευτικό(ά) προϊόν(τα); ΦΠ: φυτοπροστατευτικό(ά) προϊόν(τα);

APOD: ascorbate peroxidase (υπεροξειδάση του ασκορβικού οξέος); CAT: καταλάση; GPEI: υπερδιακλαδισμένη πολυαιθυλενιμίνη τροποποιημένη με γουανιδινικές ομάδες; GPOD: guaiacol peroxidase (υπεροξειδάση της γουαϊακόλης); GR: glutathione reductase (ρεδουκτάση της γλουταθειόνης); GST: glutathione transferase (τρανσφεράση της γλουταθειόνης); H_2O_2 : υπεροξείδιο του υδρογόνου; HPEI: υπερδιακλαδισμένη πολυαιθυλενιμίνη; MDA: malondialdehyde (μηλονική διαλδεΐδη); NOAEL: no-observed-adverse-effect-level; $O_2^{\cdot-}$: ρίζα του σουπεροξειδίου; QPEI υπερδιακλαδισμένη πολυαιθυλενιμίνη τροποποιημένη με ομάδες τεταρτοταγών αμμωνιακών αλάτων; ROS: reactive oxygen species (δραστικές μορφές οξυγόνου); SM: Steinberg medium; SOD: superoxide dismutase (δισμουτάση του σουπεροξειδίου)

4.1 Εισαγωγή

Η νανοτεχνολογία συμβάλλει στην εξέλιξη της φυτικής παραγωγής συμβάλλοντας σε μεγαλύτερη ακρίβεια και αειφορία (Kah et al., 2019, Rodrigues et al., 2017). Μία πολλά υποσχόμενη εφαρμογή της νανοτεχνολογίας στη γεωπονία είναι τα νάνο-φυτοφάρμακα, δηλαδή καινοτόμα φυτοπροστατευτικά προϊόντα (ΦΠ) που συντελούν στην αειφορία

(Hofmann et al., 2020, Vega-Vásquez et al., 2020). Δεδομένου ότι δεν υπάρχει ακριβής ορισμός για αυτά είναι δύσκολο να αξιολογήσει κανείς την πρόοδο στην ανάπτυξή τους ως εμπορικά σκευάσματα (Grillo et al., 2021).

Λαμβάνοντας υπόψη τη μεγάλη αύξηση των επιστημονικών δημοσιεύσεων από πανεπιστήμια και ερευνητικά κέντρα σε όλο τον κόσμο σχετικά με τα νανο-ΦΠ καθώς και τον αυξανόμενο αριθμό διπλωμάτων ευρεσιτεχνίας (Grillo et al., 2021, Kah et al., 2019), είναι βέβαιο ότι τα νανο-ΦΠ θα συμβάλουν σημαντικά στην προστασία των φυτών αποτελώντας, ωστόσο, παράλληλα σημαντική εισροή ξеноβιοτικών στο περιβάλλον (Kookana et al., 2014). Μέχρι στιγμής, η τρέχουσα γνώση για την οικοτοξικότητά τους είναι ελλιπής, ενώ υπάρχει πληθώρα μελετών σχετικά με την αποτελεσματικότητα των νανο-ΦΠ στους οργανισμούς στόχους (Grillo et al., 2021).

Ωστόσο, μια σημαντική πτυχή στα κριτήρια έγκρισης νέων φυτοφαρμάκων είναι η εκτίμηση του περιβαλλοντικού τους κινδύνου (Sparks and Lorschbach, 2017). Επιπλέον, το κόστος για την αξιολόγηση του περιβαλλοντικού κινδύνου των φυτοφαρμάκων έχει σχεδόν διπλασιαστεί από το 1995 λόγω περαιτέρω περιορισμών στους κανονισμούς (McDougall, 2016). Ως εκ τούτου, πριν από την εμπορευματοποίηση ενός νέου νανο-ΦΠ, θα πρέπει να πραγματοποιηθούν αρκετές μελέτες προκειμένου να επιβεβαιωθεί ότι πληροί τα κριτήρια ασφαλείας σύμφωνα με τις ρυθμιστικές απαιτήσεις για την έγκριση. Επιπλέον, στην ΕΕ, η τρέχουσα αξιολόγηση κινδύνου για τα νανο-ΦΠ ακολουθεί τα κριτήρια αξιολόγησης για τα φυτοφάρμακα γενικά, και δεν έχουν αναπτυχθεί ειδικά πρωτόκολλα πειραματισμού για τα νανο-ΦΠ (Grillo et al., 2021).

Παρ' όλα αυτά, η καταλληλότητα των δοκιμών είναι ένα ακόμα αμφιλεγόμενο θέμα. Πιο συγκεκριμένα, έχει αναγνωριστεί ότι οι πιθανοί κίνδυνοι για την ανθρώπινη υγεία και το περιβάλλον τέτοιων υλικών μπορεί να διαφέρουν από τα συμβατικά φυτοφάρμακα και οι τρέχουσες μέθοδοι πιθανώς δεν επαρκούν για την πρόβλεψη της περιβαλλοντικής τους τύχης και συμπεριφοράς (Grillo et al., 2021). Επίσης, είναι απαραίτητο για τα νανο-ΦΠ να ληφθούν υπόψη οι μακροπρόθεσμες επιπτώσεις (Kah et al., 2019), η απόκριση χαμηλής δόσης σε οργανισμούς στόχους και μη-στόχους (Agathokleous et al., 2020), καθώς και γενικότερα να είναι περισσότεροι οι παράμετροι που αξιολογούνται (Villaverde et al., 2018). Συνολικά, είναι απαραίτητο να θεσπιστούν κατάλληλα πειραματικά πρωτόκολλα για την μελέτη των νανο-ΦΠ και να εξετάζονται σε πραγματικές συνθήκες (Grillo et al., 2021; Vega-Vásquez et al., 2020) .

Η *Lemna minor* L. ή αλλιώς «φακή του νερού» είναι ένα υδρόβιο φυτικό είδος που ανήκει στην οικογένεια Lemnaceae και αποτελεί οργανισμό-μοντέλο για την μελέτη της οικοτοξικότητας ξеноβιοτικών ουσιών όπως τα φυτοφάρμακα (OECD, 2006). Γενικότερα, τα είδη της οικογένειας Lemnaceae έχουν γρήγορη ανάπτυξη και είναι εύκολα στους χειρισμούς τους υπό ελεγχόμενες συνθήκες, χαρακτηριστικά που τα καθιστούν ιδανικά βιολογικά συστήματα (Hu et al., 2018). Χάρης σε αυτά τα χαρακτηριστικά, η *L. minor* έχει χρησιμοποιηθεί σε μελέτες επίδρασης ζιζανιοκτόνων (Kostopoulou et al., 2020, Li et al., 2022) και άλλων δραστικών μορίων (Wahman et al., 2022, Papadopoulou et al., 2022) στο υδατικό περιβάλλον

με εφαρμογή μεταβολομικής ανάλυσης αξιοποιώντας διάφορες πλατφόρμες ανάλυσης όπως GC/MS (Kostopoulou et al., 2020, Papadopoulou et al., 2022) και NMR (Aliferis et al., 2009). Σε αυτές τις μελέτες εξετάστηκαν διάφοροι παράμετροι για την επίδραση στην ανάπτυξη της λέμνας όπως το νωπό βάρος, ο αριθμός φυλλιδίων και η περιεκτικότητα σε χλωροφύλλη, επιπλέον φάνηκε η διακύμανση του μεταβολισμού του φυτού ως απόκριση στο στρες που προκάλεσαν τα ξενοβιοτικά και ανακαλύφθηκαν διάφοροι μεταβολίτες-βιοσημαντές.

Επίσης, η *L. minor* L. έχει χρησιμοποιηθεί σε πληθώρα μελετών για τη μελέτη της επίδρασης νανοσωματιδίων στο υδάτινο περιβάλλον. Πιο συγκεκριμένα, έχει μελετηθεί η επίδραση νανοσωματιδίων μετάλλων όπως ψευδαργύρου (Chen et al., 2016), αργύρου (Minogiannis et al., 2019, Gubbins et al., 2011), χαλκού (Dolenc Koce, 2017), διοξειδίου του τιτανίου (Li et al., 2013) κ.ά. στην ανάπτυξη της λέμνας (Chen et al., 2016) όπως και σε διάφορες φυσιολογικές-βιοχημικές της λειτουργίες όπως η παραγωγή χλωροφύλλης (Pereira et al., 2018, Song et al., 2012), η φωτοσύνθεση (Chen et al., 2018) και η πρόκληση οξειδωτικού στρες (Pereira et al., 2018, Song et al., 2012). Μάλιστα, πρέπει να σημειωθεί ότι η αύξηση των αντιοξειδωτικών ενζύμων αποτελεί συνήθη μηχανισμό άμυνας στην τοξικότητα που προκαλούν τα νανοσωματίδια σε διάφορα φυτά (Akanbi-Gada et al., 2019, Pinto et al., 2019, Saleh et al., 2019) και άλλα είδη λέμνας (Farrag, 2015). Ωστόσο, έχει αναφερθεί και θετική επίδραση των νανοσωματιδίων ψευδαργύρου στην αύξηση της ανοχής φυτών λέμνας σε στρες από βαρέα μέταλλα (Sun et al., 2019).

Το οξειδωτικό στρες στα φυτά είναι ένας πολύπλοκος μηχανισμός. Αρχικά, μπορεί να είναι η συνθήκη όπου η απώλεια ηλεκτρονίων υπερσχύει της πρόσληψης ηλεκτρονίων οδηγώντας σε χημική οξείδωση συστατικών των κυττάρων. Επίσης, μπορεί να είναι ένας επιπλέον παράγοντας στρες (όπως η αλατότητα κ.λπ.), ο οποίος καταστρέφει τα κύτταρα και ενεργοποιεί την άμυνα των φυτών (Demidchik, 2015). Στις περισσότερες περιπτώσεις ξεκινά από την ενεργοποίηση του οξυγόνου τριπλότητος ($^3\text{O}_2$) (Demidchik, 2015) και για αυτό συχνά ορίζεται ως η συσσώρευση δραστικών μορφών οξυγόνου (ROS – reactive oxygen species) (Hussain et al., 2013). Τα ROS είναι το υπεροξείδιο του υδρογόνου (H_2O_2), η ρίζα του υδροξυλίου ($\text{OH}^\cdot$), το μονήρες οξυγόνο ($^1\text{O}_2$) και η ρίζα του υπεροξειδίου ($\text{O}_2^\cdot$) (Sharma et al., 2012). Τα αυξημένα επίπεδα ROS είναι επιζήμια για τα φυτικά κύτταρα επιδρώντας στις φυσιολογικές και μεταβολικές τους λειτουργίες. Τα κύρια σημεία παραγωγής ROS στα φυτά είναι τα μιτοχόνδρια, οι χλωροπλάστες και τα υπεροξυσώματα (Qamer et al., 2021), και, επίσης, NADPH οξειδάσες που βρίσκονται στις μεμβράνες παράγουν ROS κατά την ανάπτυξη των φυτών ως απόκριση σε στρες (Marino et al., 2012).

Τα ROS έχουν διάφορες λειτουργίες στα φυτικά κύτταρα. Αποτελούν παράγωγα σε διάφορες μεταβολικές διεργασίες (Qamer et al., 2021) και παίζουν το ρόλο σημάτων ενεργοποιώντας το αντιοξειδωτικό σύστημα των κυττάρων (Gill and Tuteja, 2010). Ωστόσο, σε μεγάλες συγκεντρώσεις είναι τοξικά καθώς αντιδρούν με οργανικά μόρια προκαλώντας ζημιές όπως υπεροξείδωση των λιπιδίων, οξείδωση των πρωτεϊνών, ζημιές στο DNA και παρεμποδίζοντας ενζυμικές λειτουργίες οδηγώντας τελικά στην απόπτωση των κυττάρων (Arel

and Hirt, 2004). Για αυτό το λόγο, τα φυτά έχουν αναπτύξει αντιοξειδωτικούς μηχανισμούς, οι οποίοι περιλαμβάνουν εξειδικευμένα ένζυμα όπως η δισμουτάση του υπεροξειδίου (SOD – superoxide dismutase), υπεροξειδάση του ασκορβικού οξέος (APOD – ascorbate peroxidase) κ.ά. ή μη ενζυμικά μόρια (χαμηλού μοριακού βάρους μεταβολίτες όπως το ασκορβικό οξύ κλπ) (Gupta et al., 2018). Τα αντιοξειδωτικά ένζυμα μετατρέπουν τα ROS σε προϊόντα που το κύτταρο μπορεί να μεταβολίσει (Gill and Tuteja, 2010). Το πρώτο ένζυμο στον αντιοξειδωτικό μηχανισμό των φυτών είναι η SOD, η οποία καταλύει το $O_2^{\cdot -}$ σε O_2 και H_2O_2 , τα οποία μπορούν να αντιδράσουν περαιτέρω με άλλα ένζυμα όπως η καταλάση (CAT-catalase) και η APOD (Gupta et al., 2015).

Παρ' όλα αυτά, η τοξικότητα που προκαλούν τα νανοσωματίδια μετάλλων έχει μελετηθεί διεξοδικά, όπως προαναφέρθηκε. Ποια είναι, όμως, η επίδραση πολυμερικών νανοσωματιδίων; Σε προηγούμενο κεφάλαιο (Κεφάλαιο 3) εξετάστηκαν νανοσωματίδια υπερδιακλαδισμένης πολυαιθυλενιμίνης τροποποιημένα με γουανιδινικές ομάδες και τεταρτοταγείς αμμωνιακές ομάδες για τον έλεγχο της μυκηλιακής ανάπτυξης του *Verticillium dahliae in vitro*. Αναλυτικότερα, φάνηκε ότι οι διαφορετικές τελικές ομάδες στα νανοσωματίδια επηρεάζουν την αποτελεσματικότητα έναντι του μύκητα καθώς και τον μηχανισμό δράσης σε υποκυτταρικό επίπεδο. Σε αυτό το κεφαλαίο, μελετήθηκαν τα ίδια νανοσωματίδια. Συγκεκριμένα, αξιολογήθηκαν οι επιδράσεις τους στην πιθανή τοξικότητα και τις διαταραχές της οξειδωτικής ισορροπίας στον οργανισμό μοντέλο *L. minor*. Τα ευρήματά μας θα ρίξουν φως στον ρόλο των διαφορετικών τελικών ομάδων της υπερδιακλαδισμένης πολυαιθυλενιμίνης σε σχέση με τους μηχανισμούς τοξικότητας στα υδρόβια φυτά.

4.2 Υλικά και Μέθοδοι

4.2.1 Νανοσωματίδια

Τα νανοσωματίδια που χρησιμοποιήθηκαν σε αυτή τη μελέτη είναι αυτά που περιγράφονται στην παράγραφο §3.2.2. Εν συντομία το HPEI (υπερδιακλαδισμένη πολυαιθυλενιμίνη μοριακού βάρους 25000 Da) (99%, Lupasol® WF, water-free) ήταν ευγενική παροχή της BASF (Ludwigshafen, Γερμανία). Τα GPEI (υπερδιακλαδισμένη πολυαιθυλενιμίνη που φέρει γουανιδινικές ομάδες) και QPEI (υπερδιακλαδισμένη πολυαιθυλενιμίνη που φέρει τεταρτοταγείς αμμωνιακές ομάδες) συντέθηκαν στο ΕΚΕΦΕ Δημόκριτος όπως έχει περιγραφθεί σε προηγούμενες μελέτες (Sideratou et al., 2018, Sapalidis et al., 2018, Lykogianni et al., 2020).

4.2.2 Βιολογικό υλικό

Στις βιοδοκιμές που πραγματοποιήθηκαν χρησιμοποιήθηκαν φυτά λέμνας *L. minor* L. (UTCC 490, University of Toronto Culture Collection, ON, Canada). Αποστειρωμένο διάλυμα Steinberg (SM – Steinberg medium) χρησιμοποιήθηκε ως το θρεπτικό μέσο της καλλιέργειας. Ο πολλαπλασιασμός της καλλιέργειας που ήταν απαραίτητος για την πραγματοποίηση των πειραμάτων γινόταν ασυπτικά κάθε 14 μέρες, και οι νέες καλλιέργειες διατηρούνταν σε αποστειρωμένα μπουκάλια που περιείχαν SM στους 24 ± 1 °C, υπό συνεχές φως (περίπου $110 \mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$) και σχετική υγρασία $70 \pm 5\%$.

4.2.3 Πειραματικό σχέδιο και μετρήσεις ανάπτυξης

Η αξιολόγηση της επίδραση των νανοσωματιδίων με βάση τα παράγωγα της υπερδιακλαδισμένης πολυαιθυλενιμίνης στην ανάπτυξη της λέμνας πραγματοποιήθηκε σε δύο πειράματα (dose-response). Οι βιοδοκιμές παρεμπόδισης της ανάπτυξης πραγματοποιήθηκαν σύμφωνα με το πρωτόκολλο OECD 221, για περίοδο 7 ημερών, υπό τις ίδιες συνθήκες καλλιέργειας. Αποστειρωμένα πλαστικά πλακίδια 12 θέσεων (12 well plates) (Sarstedt, Nümbrecht, Γερμανία) και δύο φυτά με 5 φύλλα συνολικά, τοποθετήθηκαν σε 3 mL αποστειρωμένου SM είτε σκέτο (μάρτυρας = control) είτε με κάθε νανοσωματίδιο σε διάφορες συγκεντρώσεις. Όταν προστέθηκαν νανοσωματίδια στο SM, έγιναν προσαρμογές του pH, προκειμένου να αποκλειστεί η επίδραση του pH. Όλες οι επεμβάσεις αποστειρώθηκαν χρησιμοποιώντας υδατικά φίλτρα 0,2 μm (Whatman GmbH, Dassel, Γερμανία).

Στο πρώτο πείραμα οι δόσεις που εξετάστηκαν ήταν 0, 10, 180, 320, 560 and 1000 $\mu\text{g mL}^{-1}$ για όλα τα νανοσωματίδια με στόχο τον υπολογισμό της EC_{50} . Συνολικά πραγματοποιήθηκαν τέσσερις βιολογικές επαναλήψεις οι οποίες προέκυπταν από την ομαδοποίηση των φυταρίων από 3 θέσεις-κελιά στα πλαστικά πλακίδια. Στο δεύτερο πείραμα οι δόσεις των νανοσωματιδίων ήταν 1, 5, 10, 50, 100, 200 και 300 $\mu\text{g mL}^{-1}$. Σε αυτή τη βιοδοκιμή, οι δόσεις που εξετάστηκαν ήταν μικρότερες, ώστε να ερευνηθεί η επίδραση των νανοσωματιδίων και σε πιο χαμηλές δόσεις όπως συνίσταται στη βιβλιογραφία (Agathokleous et al., 2021a, Agathokleous et al., 2021b, Agathokleous et al., 2020, Agathokleous et al., 2019a). Επίσης, πραγματοποιήθηκε έλεγχος για «hormetic dose responses», δηλαδή αν στις μικρές συγκεντρώσεις των νανοσωματιδίων υπερδιακλαδισμένης πολυαιθυλενιμίνης παρατηρείται όρμηση (hormesis) στην ανάπτυξη της λέμνας σύμφωνα με τους Calabrese and Blain (2011). Για τον προσδιορισμό της επίδρασης στην ανάπτυξη των φυτών μελετήθηκαν ο αριθμός των φυλλιδίων (όπως προτείνεται στο OECD 221) και το νωπό βάρος. Ως EC_{50} ορίστηκαν οι αποτελεσματικές συγκεντρώσεις που προκαλούν 50% μείωση του αριθμού φυλλιδίων και 50% μείωση του νωπού βάρους της *L. minor*.

4.2.4 Μελέτη του οξειδωτικού στρες που προκαλούν τα νανοσωματίδια με βάση τα παράγωγα της υπερδιακλαδισμένης πολυαιθυλενιμίνης στα φυτά της *Lemna minor* L.

Το οξειδωτικό στρες είναι ένας πιθανός μηχανισμός τοξικότητας των νανοσωματιδίων με βάση τα παράγωγα της υπερδιακλαδισμένης πολυαιθυλενιμίνης (Lykogianni et al., 2020). Για αυτό το λόγο στην παρούσα μελέτη εξετάστηκαν η ρίζα του υπεροξειδίου ($O_2^{\cdot-}$), το υπεροξείδιο του υδρογόνου (H_2O_2) καθώς και η περιεκτικότητα σε μαλονοδιαλδεϋδη (malondialdehyde-MDA) και η δραστηριότητα διαφόρων αντιοξειδωτικών ενζύμων. Για αυτό το πείραμα, κάθε επέμβαση πραγματοποιήθηκε στο 25% της EC_{50} όπως αυτή υπολογίστηκε με βάση τον αριθμό των φυλλιδίων για κάθε νανοσωματίδιο. Η βιοδοκιμή διήρκησε 7 ημέρες και συνολικά πραγματοποιήθηκαν πέντε βιολογικές επαναλήψεις. Στο τέλος του πειράματος, κάθε βιολογική επανάληψη τοποθετήθηκε σε σωληνάριο τύπου Erpendorf (erpendorf tube) και βυθίστηκε σε υγρό άζωτο. Στη συνέχεια, ο ιστός της λέμνας κονιορτοποιήθηκε με μικρά γουδοχέρια με την προσθήκη υγρού αζώτου μέσα στο κάθε tube. Τέλος τα δείγματα αποθηκεύτηκαν στους $-80^{\circ}C$ μέχρι την περαιτέρω επεξεργασία τους.

Το σύνολο των μετρήσεων πραγματοποιήθηκε στο ίδιο φασματοφωτόμετρο (Anthos Zenyth 200, Biochrom, United States).

4.2.4.1 Προσδιορισμός της ποσότητας της ρίζας του υπεροξειδίου ($O_2^{\cdot-}$) στα φυτά λέμνας

Για τον προσδιορισμό της ρίζας του υπεροξειδίου ($O_2^{\cdot-}$) ακολουθήθηκε ένα πρωτόκολλο (Doke, 1983) με κάποιες τροποποιήσεις (Ishizawa et al., 2017). Η μέθοδος βασίστηκε στη μείωση του nitroblue tetrazolium (NBT, Sigma-Aldrich Ltd., Steinheim, Γερμανία). Εν συντομία σε 30 mg κονιορτοποιημένου ιστού, προστέθηκε 1,5 mL ρυθμιστικού διαλύματος φωσφορικών 10mM (sodium phosphate buffer) (NaH_2PO_4 and Na_2HPO_4 , Sigma-Aldrich Ltd., Steinheim, Γερμανία), pH 7,8 που περιείχε 0,05% NBT, 10 mM αζίδιο του νατρίου (NaN_3 , Sigma-Aldrich Ltd., Steinheim, Germany) σε erpendorf tube για κάθε δείγμα και ακολούθησε επώαση των δειγμάτων στους $23^{\circ}C$ για 60 min. Μετά, 1 mL από κάθε διάλυμα επώαστηκε περαιτέρω στους $85^{\circ}C$ για 15 min. Η αντίδραση σταμάτησε τοποθετώντας τα δείγματα στον πάγο και η απορρόφηση μετρήθηκε στα 580 nm. Τα αποτελέσματα εκφράστηκαν ως η αύξηση στα A_{580} ανά ώρα ανά γραμμάρια νωπού βάρους.

4.2.4.2 Υπολογισμός της περιεκτικότητας σε υπεροξείδιο του υδρογόνου (H_2O_2) των φυτών λέμνας

Η εκτίμηση του H_2O_2 βασίστηκε στο πρωτόκολλο που περιγράφηκε από τους Velikova et al. (2000). Εν συντομία, 1 mL trichloroacetic acid (TCA, 0.1%) (Fluka, Honeywell Riedel-de-Haën™,

North Carolina, USA) σε θερμοκρασία πάγου προστέθηκε σε 30 mg κονιορτοποιημένου ιστού και ακολούθησε ανάδευση (vortex) για 30 sec και φυγοκέντρηση ($10,000 \times g$, 4°C , 15 min) (Thermo Scientific Heraeus Fresco 17). 0,5 mL από το υπερκείμενο συλλέχθηκε σε ένα νέο σωληνάριο χωρητικότητας 2 mL και προστέθηκε 1 mL από διάλυμα που περιείχε 1 M KI (Sigma-Aldrich Ltd., Steinheim, Γερμανία) και 0,5 mL 10 mM ρυθμιστικό διάλυμα φωσφωρικών (potassium phosphate buffer) ($\text{pH } 7.0$) ($\text{KH}_2\text{PO}_4\text{-K}_2\text{HPO}_4$, Fisher Scientific UK Ltd., Loughborough, Ηνωμένο Βασίλειο). Ακολούθησε επώαση των δειγμάτων στους 23°C για 60 min στο σκοτάδι. Η απορρόφηση μετρήθηκε στα 390 nm. Ο υπολογισμός του H_2O_2 έγινε με πρότυπη καμπύλη από H_2O_2 (Merck KGaA, Darmstadt, Germany) σε συγκεντρώσεις που κυμάνθηκαν από 0,25-10% (Sergiev et al., 1997).

4.2.4.3 Εκτίμηση της υπεροξειδωσης των λιπιδίων

Η υπεροξειδωση των λιπιδίων εκτιμήθηκε έμμεσα, μέσω του υπολογισμού του MDA, το οποίο είναι παράγωγο της υπεροξειδωσης των λιπιδίων και βασίστηκε σε μέθοδο που έχει περιγραφεί προηγουμένως με μικρές τροποποιήσεις (Ishizawa et al., 2017). 30 mg κονιορτοποιημένου ιστού λέμνας προστέθηκαν σε 1 mL από 20% TCA που περιείχε 0.5% 2-thiobarbituric acid και 0,33N HCl (Sigma-Aldrich Ltd., Steinheim, Γερμανία), και ακολούθησε ανάδευση (vortex) για 30 sec και επώαση στους 95°C για 25 min. Η αντίδραση σταμάτησε τοποθετώντας τα δείγματα στον πάγο. Τέλος, πραγματοποιήθηκε φυγοκέντρηση στα $10,000 \times g$ για 10 min στους 2°C .

Η απορρόφηση μετρήθηκε στα 532 και 600 nm, ώστε να ανιχνευτεί πιθανή θολότητα. Το MDA υπολογίστηκε με χρήση πρότυπης καμπύλης που δημιουργήθηκε με 0,12-30 μM από 1,1,3,3-tetraethoxy-propane (TEP, Sigma-Aldrich Ltd., Steinheim, Γερμανία) σε 50:50 (v/v) μεθανόλη-νερό.

4.2.4.4 Μελέτη των αντιοξειδωτικών ενζύμων

Πριν από τις ενζυμικές αναλύσεις, έγινε εκχύλιση των πρωτεϊνών. Πιο συγκεκριμένα, 1 mL από ρυθμιστικό διάλυμα φωσφωρικών (phosphate buffer) (50 mM, $\text{pH}=7$) σε θερμοκρασία πάγου που περιείχε 1% (w/v) polyvinylpyrrolidone (Pan Reach AppliChem, Darmstadt, Γερμανία) προστέθηκε σε 50 mg κονιορτοποιημένου ιστού λέμνας. Στη συνέχεια, πραγματοποιήθηκε φυγοκέντρηση στα $20,000 \times g$ για 20 min στους 2°C . Το υπερκείμενο συλλέχθηκε και το περιεχόμενο σε πρωτεΐνη προσδιορίστηκε με βάση τη μέθοδο Bradford (1976) χρησιμοποιώντας ορό μόσχου (bovine serum albumin) (PAN-Biotech GmbH, Aidenbach, Γερμανία) ως πρότυπο (standard). Τελικά, τα αντιοξειδωτικά ένζυμα μετρήθηκαν στα πέντε πρώτα λεπτά από την έναρξη της κάθε αντίδρασης και εκφράστηκαν ως $\text{unit mg}^{-1} \text{protein}$. Οι υπολογισμοί βασίστηκαν στην παρακάτω εξίσωση:

$$\text{Enzyme capacity (U/g)} = \frac{\Delta A}{\Delta t} \frac{V_c V_b}{\epsilon d V_e m}$$

ϵ = συντελεστής απορρόφησης (millimolar extinction coefficient) ($\text{l mmol}^{-1} \text{cm}^{-1}$)

d = light path (cm) = 0,56

V_b = όγκος του ρυθμιστικού διαλύματος εκχύλισης (ml) = 1

V_c = όγκος αντίδρασης σε κάθε κελί (ml) = 0,2

V_e = όγκος που εκχυλίστηκε σε κάθε κελί

m = νωπό βάρος δείγματος (g)

Δισμουτάση του υπεροξειδίου (SOD)

Ο υπολογισμός της δισμουτάσης του υπεροξειδίου (SOD) βασίστηκε στη μέθοδο που έχει περιγραφεί από τους Giannopolitis and Ries (1977). Πριν από το διάλυμα της αντίδρασης ετοιμάστηκε stock διάλυμα από disodium-EDTA (0,5M, και το pH ρυθμίστηκε στην τιμή 8,0 με NaOH). Ακολούθως, ετοιμάστηκε το διάλυμα της αντίδρασης που περιείχε 190 μL από ρυθμιστικό διάλυμα φωσφωρικών 50 mM (sodium phosphate buffer) (pH 7.8), 75 μM μπλε χλωρίδιο του νιτρο-τετραζολίου (Nitrotetrazolium Blue Chloride, NBT, Sigma-Aldrich Ltd., Steinheim, Γερμανία), 100 μM αιθυλενοδιαμινοτετραοξικό οξύ (EDTA), 13 mM L-μεθειονίνη (Merck, KGaA, Darmstadt, Γερμανία) και 2 μM ριβοφλαβίνη (Serva GmbH, Heidelberg, Γερμανία), καθώς και 10 μL ενζυμικού εκχυλίσματος. Η απορρόφηση μετρήθηκε στα 560 nm, αφού τα δείγματα επώαστηκαν για 5 min υπό συνεχές φως ($80 \mu\text{mol}^{-2} \text{s}^{-1}$). Η ποσότητα του ενζύμου υπολογίστηκε με πρότυπη καμπύλη με συγκεντρώσεις από 0.1 - 20 $\mu\text{g mL}^{-1}$ SOD (MP Biomedicals LLC, Irvine, CA, USA).

Καταλάση (CAT)

Η εκτίμηση της CAT βασίστηκε στο πρωτόκολλο των Ntatsi et al. (2020a). Αρχικά, στο διάλυμα αντίδρασης που περιείχε 190 μL από ρυθμιστικό διάλυμα φωσφωρικών 25 mM (potassium phosphate buffer), 0,1 mM EDTA (Sigma-Aldrich Ltd., Steinheim, Γερμανία), 10 mM H_2O_2 προστέθηκαν 10 μL από το ενζυμικό εκχύλισμα. Στη συνέχεια, μετρήθηκε η απορρόφηση στα 240 nm. Η CAT υπολογίστηκε χρησιμοποιώντας τον συντελεστή απορρόφησης (absorbance coefficient) $E = 39 \text{ mM}^{-1} \cdot \text{cm}^{-1}$.

Υπεροξειδάση του ασκορβικού οξέος (APOD)

Η υπεροξειδάση του ασκορβικού οξέος (APOD – ascorbate peroxidase) υπολογίστηκε σύμφωνα με τους Nakano and Asada (1981) με κάποιες τροποποιήσεις που αναφέρονται στους Ntatsi et al. (2020b). Το διάλυμα της αντίδρασης περιείχε 25 mM ρυθμιστικό διάλυμα φωσφορικών (potassium phosphate buffer) (pH=7), 0,5 mM L-ασκορβικό οξύ (Merck, KGaA, Darmstadt, Γερμανία), 0,1 mM EDTA, 0,1 mM H₂O₂. Για να ξεκινήσει η αντίδραση 190 μL από το δ.μα προστέθηκαν σε 10 μL από το ενζυμικό εκχύλισμα. Η απορρόφηση μετρήθηκε στα 290 nm και ο συντελεστής απορρόφησης (absorbance coefficient) του οξειδωμένου ασκορβικού οξέος $E = 2,8 \text{ mM}^{-1} \cdot \text{cm}^{-1}$ εφαρμόστηκε για τον υπολογισμό της δραστηριότητας της APOD.

Υπεροξειδάση της γουαϊακόλης (GPOD)

Για την εκτίμηση της δραστηριότητας της υπεροξειδάσης της γουαϊακόλης (GPOD – guaiacol peroxidase) εφαρμόστηκε ένα πρωτόκολλο (Radioecology Exchange, 2021) με μικρές τροποποιήσεις. Αναλυτικότερα, ετοιμάστηκε ένα διάλυμα που περιείχε 130 μL ρυθμιστικό διάλυμα φωσφορικών (potassium phosphate buffer) (50 mM, pH= 7), 20 μL από 9 mM γουαϊακόλης (guaiacol, Sigma-Aldrich Ltd., Steinheim, Γερμανία), 20 μL από 0,8 mM H₂O₂, και 30 μL ενζυμικού εκχυλίσματος. Η απορρόφηση μετρήθηκε σε 436 nm με συντελεστή απορρόφησης (extinction coefficient) $E = 25,5 \text{ mM}^{-1} \cdot \text{cm}^{-1}$ εκφράζοντας το σχηματισμό της τετραγουαϊακόλης (tetraguaiacol).

Ρεδουκτάση της γλουταθειόνης (GR)

Η εκτίμηση της ρεδουκτάσης της γλουταθειόνης (GR – glutathione reductase) βασίστηκε στην οξείδωση του NADPH (Smith et al., 1988). Πιο αναλυτικά, ετοιμάστηκε ένα διάλυμα που περιείχε 30 μL ενζυμικού εκχυλίσματος και 170 μL από 0,1 M ρυθμιστικού διαλύματος τρις(υδρόξυ-μέθυλο)-αμινομεθανίου (Tris-HCL, pH=7,5), 0,1 mM EDTA, 1 mM ρυθμιστικού διαλύματος τρις(υδρόξυ-μέθυλο)-αμινομεθανίου (oxidized glutathione, GSSG) (Serva GmbH, Heidelberg, Γερμανία) και 1 mM NADPH. Το GSSG ήταν διαλυμένο σε νερό, και το NADPH ήταν διαλυμένο σε 1M NaOH (Merck, KGaA, Darmstadt, Γερμανία). Η απορρόφηση μετρήθηκε στα 340 nm και ο συντελεστής απορρόφησης (extinction coefficient) ήταν $6,22 \text{ mM}^{-1} \cdot \text{cm}^{-1}$.

Τρανσφεράση της γλουταθειόνης (GST)

Η τρανσφεράση της γλουταθειόνης (GST – glutathione transferase) έγινε σύμφωνα με τους Habig et al. (1974) με μικρές τροποποιήσεις. 171,5 μL από ρυθμιστικό διάλυμα φωσφορικών που περιείχε 0,1M KH₂PO₄ (pH=6,5), 1mM 1-χλώρο-2,4-δινιτρο-βενζόλιο (CDNB, Sigma-Aldrich Ltd., Steinheim, Γερμανία) και 5mM GSH (Fluka, Honeywell Riedel-de-Haën™, North Carolina,

USA) καθώς και 28,5 μL ενζυμικού εκχυλίσματος μετρήθηκαν στα 340 nm. Ο συντελεστής απορρόφησης (extinction coefficient) ήταν $5,3 \text{ mM}^{-1} \cdot \text{cm}^{-1}$.

4.2.5 Στατιστική ανάλυση

Η κανονικότητα των δεδομένων βασίστηκε στα skewness και kurtosis και η ομοσκεδαστικότητα ελέγχθηκε με το Levene's Test. Οι στατιστικά σημαντικές διαφορές βασίστηκαν σε ανάλυση παραλλακτικότητας (Analysis of Variance - ANOVA) που ακολουθήθηκε από το κριτήριο Duncan ($P < 0,05$). Η στατιστική ανάλυση έγινε στο Rstudio αξιοποιώντας τα πακέτα car και agricolae. Η EC_{50} υπολογίστηκε με βάση την probit analysis στο microsoft excel για το νωπό βάρος και τον αριθμό φυλλιδίων. Τα σφάλματα στα γραφήματα αντιπροσωπεύουν το τυπικό σφάλμα.

4.3 Αποτελέσματα – Συζήτηση

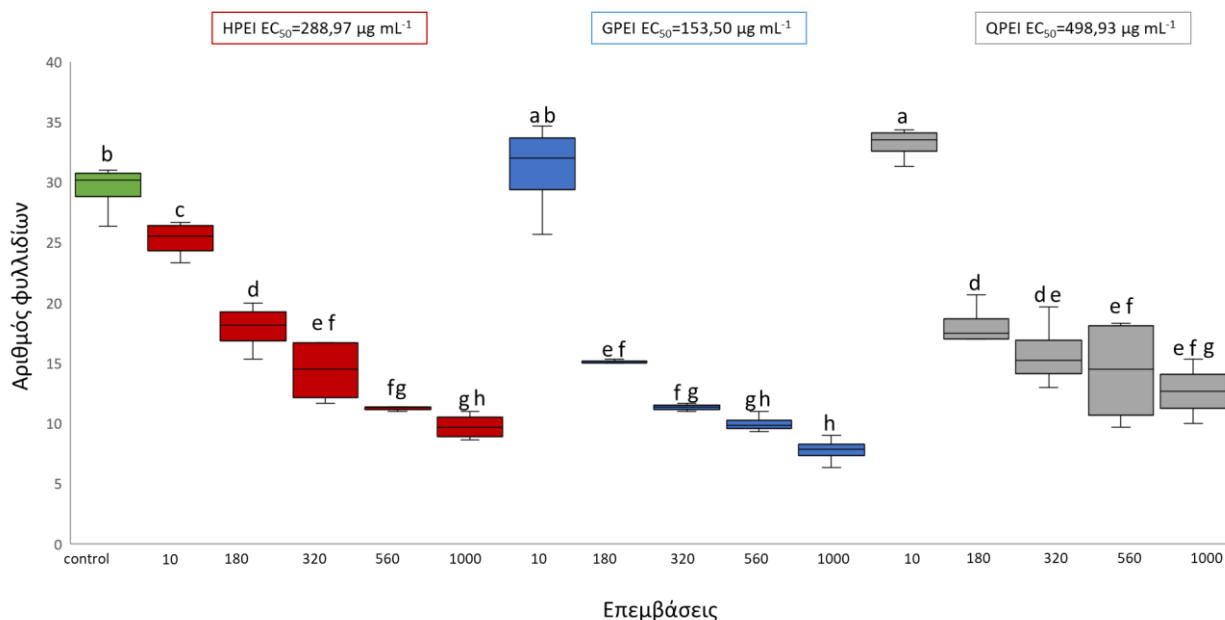
4.3.1 Η επίδραση των νανοσωματιδίων με βάση παράγωγα της υπερδιακλαδισμένης πολυαιθυλενιμίνης στην ανάπτυξη της λέμνας

Η EFSA (European Food Safety Authority) ορίζει ως νανοσωματίδια τα υλικά που έχουν μέγεθος μικρότερο των 100 nm (EFSA, 2021), έχοντας ως αποτέλεσμα αυξημένο τοξικολογικό ρίσκο (Keck and Müller, 2013) και γενικά υψηλή ροπή προς αντίδραση (Zou et al., 2013). Στην παρούσα μελέτη, η μελέτη της επίδρασης των νανοσωματιδίων HPEI, GPEI και QPEI στην ανάπτυξη της *Lemna minor* L. έδειξε ότι το QPEI ήταν το λιγότερο τοξικό συγκριτικά με τα άλλα δύο νανοσωματίδια όσον αφορά την επίδραση στον αριθμό φυλλιδίων και στο νωπό βάρος της λέμνας (Εικόνα 4.1, Εικόνα 4.2, Εικόνα 4.3 και Εικόνα 4.4). Πιο συγκεκριμένα, ακόμα και στην υψηλότερη συγκέντρωση που εξετάστηκε ($1000 \mu\text{g mL}^{-1}$) το QPEI μείωσε μόλις κατά 43% τον αριθμό των φυλλιδίων και κατά 31,3% το νωπό βάρος σε σχέση με το μάρτυρα. Επίσης, το QPEI στην πρώτη βιοδοκιμή, όμοια με το GPEI, φάνηκε να αυξάνει σημαντικά τον αριθμό των φυλλιδίων στην συγκέντρωση των $10 \mu\text{g mL}^{-1}$. Ωστόσο, η διαφορά αυτή στην δεύτερη βιοδοκιμή ήταν μόνο αριθμητική.

Στην πρώτη βιοδοκιμή υπολογίστηκε η EC_{50} των νανοσωματιδίων σύμφωνα με τον αριθμό φυλλιδίων (Εικόνα 4.1). Όπως αναφέρθηκε και νωρίτερα το QPEI ήταν το λιγότερο τοξικό με EC_{50} $498,93 \mu\text{g mL}^{-1}$, η EC_{50} του HPEI υπολογίστηκε στα $288,97 \mu\text{g mL}^{-1}$ και το GPEI, το πιο τοξικό από όλα, είχε EC_{50} $153,50 \mu\text{g mL}^{-1}$. Επίσης, στη δεύτερη βιοδοκιμή προσδιορίστηκε η NOAEL (no-observed-adverse-effect-level), δηλαδή η υψηλότερη δόση από αυτές που εξετάστηκαν η οποία δεν παρουσίασε στατιστικά σημαντική διαφορά από το μάρτυρα

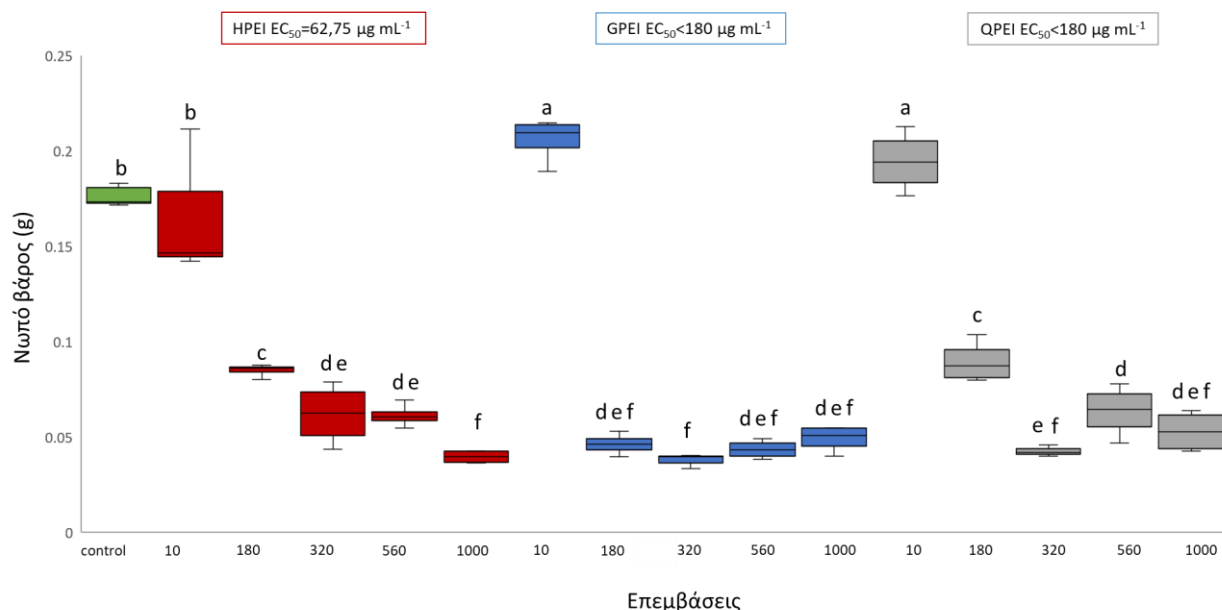
(Leisenring and Ryan, 1992). Για την παράμετρο αριθμός φυλλιδίων οι NOAEL ήταν 50 και 200 $\mu\text{g mL}^{-1}$ για τα HPEI και QPEI αντίστοιχα, ενώ για το νωπό βάρος οι NOAEL ήταν 50 και 100 $\mu\text{g mL}^{-1}$ για τα HPEI και GPEI. Για το QPEI στην δεύτερη βιοδοκιμή δεν παρατηρήθηκαν στατιστικά σημαντικές διαφορές με το μάρτυρα σε καμία από τις δόσεις που εξετάστηκαν έως τα 300 $\mu\text{g mL}^{-1}$ (Εικόνα 4.3 και Εικόνα 4.4). Για το GPEI εξετάζοντας την παράμετρο αριθμό φυλλιδίων παρατηρήθηκε ότι η συγκέντρωση NOAEL κυμαίνεται μεταξύ των 10 $\mu\text{g mL}^{-1}$ -50 $\mu\text{g mL}^{-1}$ (Εικόνα 4.3).

Τα αποτελέσματα των βιοδοκιμών δείχνουν ότι η υποκατάσταση των αμινομάδων της υπερδιακλαδισμένης πολυαιθυλενιμίνης με τεταρτοταγείς αμμωνιακές ομάδες μειώνει την τοξικότητά της στη λέμνα, ενώ η υποκατάσταση με γουανιδινικές ομάδες αυξάνει την τοξικότητα των νανοσωματιδίων. Εξ όσων γνωρίζουμε, αυτή είναι η πρώτη μελέτη επίδρασης νανοσωματιδίων με βάση παράγωγα της υπερδιακλαδισμένης πολυαιθυλενιμίνης στην ανάπτυξη της λέμνας. Σε συμφωνία με τα αποτελέσματά μας, προηγούμενη μελέτη των Lykogianni et al. (2020) είχε δείξει την μειωμένη δραστηριότητα του QPEI έναντι της μυκηλιακής ανάπτυξης του *Verticillium dahliae* συγκριτικά με το HPEI. Επίσης, το GPEI ήταν πιο αποτελεσματικό συγκριτικά με το HPEI έναντι του μύκητα. Γενικότερα, είναι γνωστό ότι το εξωτερικό φορτίο των νανοσωματιδίων επηρεάζει τη βιοδραστηριότητά τους (Lee et al., 2010, Richter et al., 2015). Επίσης, υπάρχουν αναφορές ότι η τροποποίηση των τελικών ομάδων τεταρτοταγών αμμωνιακών αλάτων αλλάζει τις αντιβακτηριακές του ιδιότητες (Liang et al., 2018). Μελέτη QSAR ουσιών που περιέχουν τεταρτοταγή αμμωνιακά άλατα και αμινομάδες στην *Daphnia magna* αποκάλυψε ότι όταν μία ουσία περιέχει λιγότερες αμινομάδες από

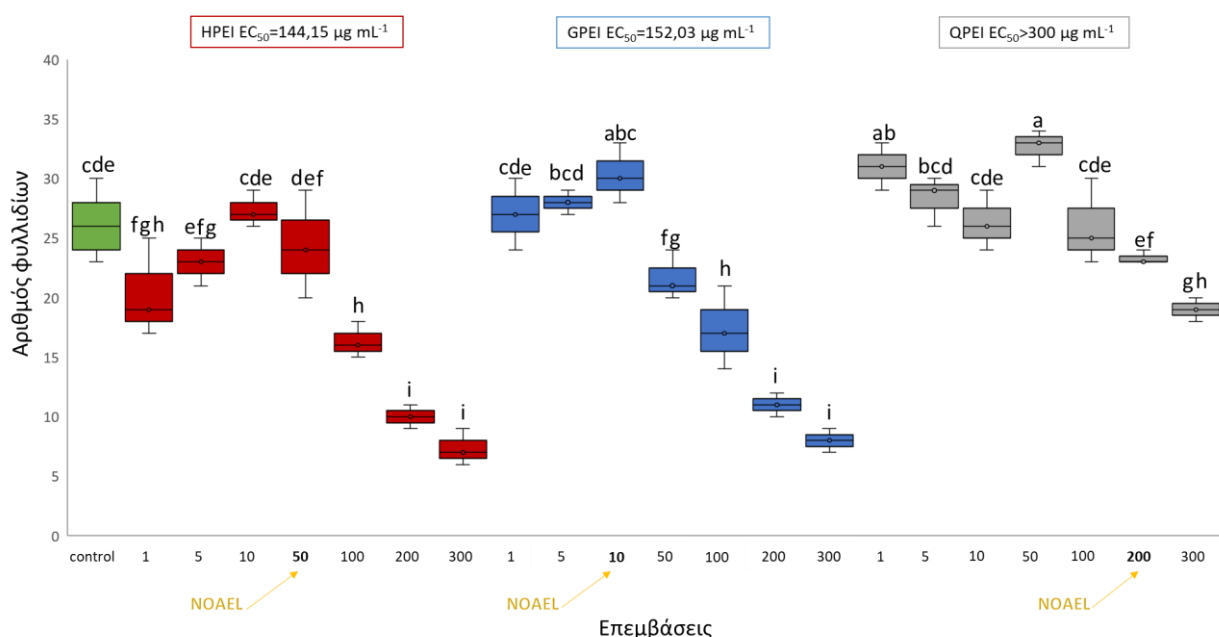


Εικόνα 4.1: Θηκόγραμμα με την επίδραση των νανοσωματιδίων με βάση παράγωγα της υπερδιακλαδισμένης πολυαιθυλενιμίνης στον αριθμό φυλλιδίων της λέμνας στην πρώτη βιοδοκιμή της μελέτης. Οι συγκεντρώσεις που εξετάστηκαν ήταν 10, 180, 320, 560 και 1000 $\mu\text{g mL}^{-1}$ για όλα τα νανοσωματίδια. Οι διαφορετικοί χαρακτήρες δείχνουν στατιστικά σημαντικές διαφορές σύμφωνα με το κριτήριο Duncan μετά από ανάλυση παραλλακτικότητας (ANOVA) ($P < 95\%$). Με κόκκινο χρώμα είναι η επίδραση του HPEI, μπλε η επίδραση του GPEI και γκρι η επίδραση του QPEI. Στο πάνω μέρος είναι σημειωμένες οι τιμές EC₅₀ όπως υπολογίστηκαν από την ανάλυση probit.

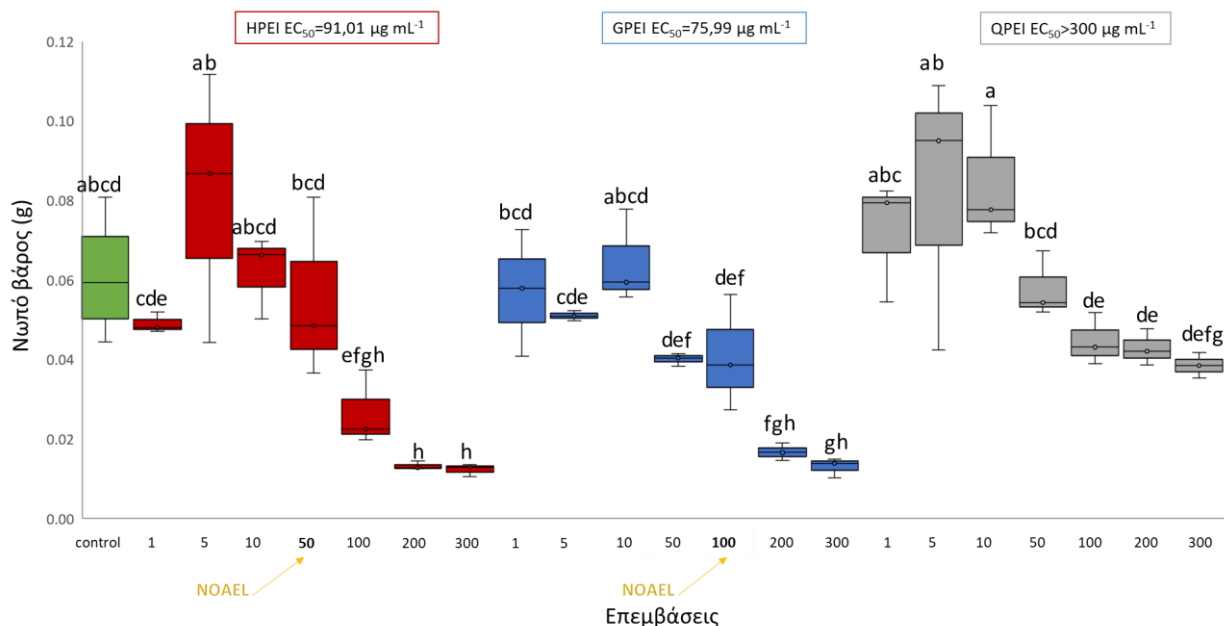
ομάδες τεταρτοταγών αμωνιακών αλάτων, δηλαδή περισσότερο θετικό φορτίο, παρουσιάζει αυξημένη αλληλεπίδραση με τις βιολογικές μεμβράνες, έχοντας ως αποτέλεσμα αυξημένη τοξικότητα (Liu et al., 2020).



Εικόνα 4.3: Θηκόγραμμα με την επίδραση των νανοσωματιδίων με βάση παράγωγα της υπερδιακλαδισμένης πολυαιθυλενιμίνης στο νωπό βάρος της λέμνας στην πρώτη βιοδοκιμή της μελέτης. Οι συγκεντρώσεις που εξετάστηκαν ήταν 10, 180, 320, 560 και 1000 $\mu\text{g mL}^{-1}$ για όλα τα νανοσωματίδια. Οι διαφορετικοί χαρακτήρες δείχνουν στατιστικά σημαντικές διαφορές σύμφωνα με το κριτήριο Duncan μετά από Ανάλυση Παραλλακτικότητας (ANOVA) ($P < 95\%$). Με κόκκινο χρώμα είναι η επίδραση του HPEI, μπλε η επίδραση του GPEI και γκρι η επίδραση του QPEI. Στο πάνω μέρος είναι σημειωμένες οι τιμές EC_{50} όπως υπολογίστηκαν από την ανάλυση probit.



Εικόνα 4.2: Θηκόγραμμα με την επίδραση των νανοσωματιδίων με βάση παράγωγα της υπερδιακλαδισμένης πολυαιθυλενιμίνης στον αριθμό φυλλιδίων της λέμνας στη δεύτερη βιοδοκιμή της μελέτης. Οι συγκεντρώσεις που εξετάστηκαν ήταν 1, 5, 10, 50, 100, 200 και 300 $\mu\text{g mL}^{-1}$ για όλα τα νανοσωματίδια. Οι διαφορετικοί χαρακτήρες δείχνουν στατιστικά σημαντικές διαφορές σύμφωνα με το κριτήριο Duncan μετά από ανάλυση παραλλακτικότητας (ANOVA) ($P < 95\%$). Με κόκκινο χρώμα είναι η επίδραση του HPEI, μπλε η επίδραση του GPEI και γκρι η επίδραση του QPEI. Στο πάνω μέρος είναι σημειωμένες οι τιμές EC_{50} όπως υπολογίστηκαν από την ανάλυση probit. Επίσης στο γράφημα φαίνονται σημειωμένες οι NOAEL για κάθε νανοσωματίδιο.



Εικόνα 4.4: Θηκόγραμμα με την επίδραση των νανοσωματιδίων με βάση παράγωγα της υπερδιακλαδισμένης πολυαιθυλενιμίνης στο νωπό βάρος της λέμνας στη δεύτερη βιοδοκιμή της μελέτης. Οι συγκεντρώσεις που εξετάστηκαν ήταν 1, 5, 10, 50, 100, 200 και 300 $\mu\text{g mL}^{-1}$ για όλα τα νανοσωματίδια. Οι διαφορετικοί χαρακτήρες δείχνουν στατιστικές σημαντικές διαφορές σύμφωνα με το κριτήριο Duncan μετά από ανάλυση παραλλακτικότητας (ANOVA) ($P < 95\%$). Με κόκκινο χρώμα είναι η επίδραση του HPEI, μπλε η επίδραση του GPEI και γκρι η επίδραση του QPEI. Στο πάνω μέρος είναι σημειωμένες οι τιμές EC_{50} όπως υπολογίστηκαν από την ανάλυση probit. Επίσης στο γράφημα φαίνονται σημειωμένες οι NOAEL για κάθε νανοσωματίδιο.

Η παρούσα μελέτη επιβεβαιώνει το φαινόμενο αυτό, καθώς οι τεταρτοταγείς αμμωνιακές ομάδες έχουν μικρότερη pK_a (10) από τις γουανιδινικές ομάδες ($\sim 12,5$), δηλαδή αντιδρούν λιγότερο με τις κυτταρικές μεμβράνες (He and Chu, 2013).

Οι γουανιδινικές ομάδες είναι μορφές κατιόντων της γουανιδίνης, και αποτελούν μέρος της αλυσίδας της αργινίνης (Tan and Coles, 2014), παρουσιάζοντας βιοδραστικότητα έναντι βακτηρίων (Zamperini et al., 2017) και άλλων οργανισμών (Fleeman et al., 2015, Wang et al., 2016). Επιπρόσθετα, έχει μελετηθεί η τοξικότητα και οικοτοξικότητα γουανιδινικών ιοντικών αλάτων (ionic liquid). Αρχικά, σε μελέτη στην καρκινική κυτταρική σειρά CaCo-2 η τοξικότητα γουανιδινικών ιοντικών αλάτων εξαρτιόταν από το μήκος της αλυσίδας και το ανιόν, και κυμαινόταν από αυξημένη τοξικότητα έως μη σημαντική επίδραση στα κύτταρα (Frade et al., 2009). Αντίστοιχα, σε μελέτες οικοτοξικότητας τα γουανιδινικά ιοντικά άλατα έδειξαν μικρή έως μέτρια τοξικότητα έναντι του *Vibrio (Aliivibrio) fischeri* (Ventura et al., 2012) όπου αυτά με τη μεγαλύτερη αλκυλική αλυσίδα και περισσότερο αρνητικό φορτίο είχαν μεγαλύτερη τοξικότητα συγκριτικά με αυτά με διακλαδισμένη αλυσίδα (Rantamäki et al., 2017).

Επιπλέον, υπάρχει πληθώρα αναφορών για την αντιμικροβιακή δράση των αλάτων τεταρτοταγούς αμμωνίου (Cheng et al., 2017, Schallenhämmer et al., 2017), όπως και δένδριτικών νανοσωματιδίων τροποποιημένων με ομάδες τεταρτοταγών αμμωνίου (Worley et al., 2014, Yang et al., 2014). Επίσης, έχει αναφερθεί αύξηση της αντιμικροβιακής δράσης της

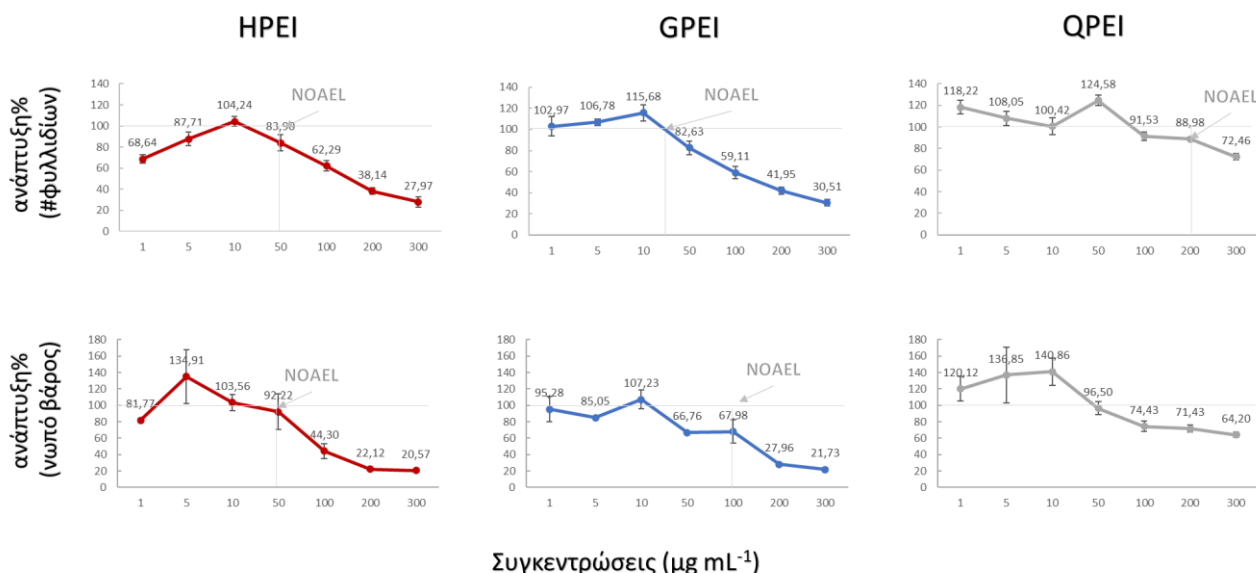
χιτοζάνης χάρης σε τεταρτοταγείς αμμωνιακές ομάδες (Hamley, 2017, Richter et al., 2015). Γενικά, ουσίες που περιέχουν ομάδες τεταρτοταγών αμμωνιακών αλάτων είναι διαδεδομένες στο νοικοκυριό και την βιομηχανία ως καθαριστικά προϊόντα (Bureš, 2019). Για αυτό το λόγο, είναι ευρέως μελετημένη η επίδρασή τους ειδικά στο υδάτινο περιβάλλον όπου είναι η πιθανότερη κατάληξή τους (DeLeo et al., 2020). Αυτές οι ουσίες είναι τοξικές στους υδρόβιους οργανισμούς που έχουν μελετηθεί όπως ψάρια, άλγη, δάφνιες, και μικροοργανισμούς (DeLeo et al., 2020, Zhang et al., 2015).

Πολλές μελέτες νανοτοξικότητας έχουν χρησιμοποιήσει τον οργανισμό μοντέλο λέμνα. Οι περισσότερες από αυτές αναφέρουν την τοξική επίδραση νανοσωματιδίων αργύρου στην ανάπτυξη της *L. minor* στα $50 \mu\text{g mL}^{-1}$ (Koçer et al., 2021, Pereira et al., 2018) ή ακόμα και στην πολύ χαμηλότερη συγκέντρωση των $5 \mu\text{g L}^{-1}$ (Gubbins et al., 2011, Minogiannis et al., 2019). Σε αυτές τις μελέτες αξιολογήθηκε ο αριθμός φυλλιδίων, το ξηρό βάρος και η σχετική ανάπτυξη. Ωστόσο, υπάρχουν αναφορές όπου εξετάστηκε η επίδραση νανοσωματιδίων αργύρου στην χλωροφύλλη (Ding et al., 2019) και στη θνησιμότητα των φυτών (Souza et al., 2021). Η θνησιμότητα ορίστηκε ως η χλώρωση των φυλλιδίων καθώς συνδέεται με την απώλεια χλωροφύλλης (Clément and Bouvet, 1993). Επίσης, έχει καταγραφεί η τοξική επίδραση στην ανάπτυξη της *L. minor* από νανοσωματίδια σελινίου στα 10 mg L^{-1} (Tarrahi et al., 2017), οξειδίου του σιδήρου στα $30 \mu\text{g mL}^{-1}$ (Souza et al., 2019) και ZnO στην συγκέντρωση του 1 mg L^{-1} (Chen et al., 2016). Μάλιστα, νανοσωματίδια CdSe στην συγκέντρωση 1 mg L^{-1} προκαλούν από τη δεύτερη μέρα μείωση στο σχετικό αριθμό φυλλιδίων (Tarrahi et al., 2019). Επιπρόσθετα, έχει αναφερθεί τοξικότητα που προκάλεσαν νανοσωματίδια CuO στα $0,1 \mu\text{M}$ (Dolenc Koc, 2017) και οι Yue et al. (2018) υπολόγισαν την EC_{50} νανοσωματιδίων CuO $149 \mu\text{g L}^{-1}$. Τέλος, νανοσωματίδια TiO_2 μειώνουν τον αριθμό φυλλιδίων σε συγκεντρώσεις μεγαλύτερες από 200 mg L^{-1} (Song et al., 2012). Και στις μελέτες αυτές εξετάστηκαν ο αριθμός φυλλιδίων, το βάρος και επιπλέον η επιφάνεια της ρίζας (Yue et al., 2018), το μέγεθος των φυλλιδίων (Tarrahi et al., 2017), ο αριθμός φυλλιδίων ανά αποικία λέμνας (Dolenc Koc, 2017) και η χλωροφύλλη α (Chen et al., 2016).

Γενικά, ο αριθμός φυλλιδίων είναι μία ευαίσθητη παράμετρος για την επίδραση της τοξικότητας νανοσωματιδίων σύμφωνα με τη βιβλιογραφία (Gubbins et al., 2011) και έχει εξεταστεί στις περισσότερες από τις μελέτες που αναφέρθηκαν παραπάνω. Για αυτό το λόγο επιλέχθηκε και στην παρούσα μελέτη για τον υπολογισμό του 25% της EC_{50} για την περαιτέρω μελέτη του οξειδωτικού στρες από τα διάφορα νανοσωματίδια που εξετάστηκαν.

Τέλος, είναι προφανές ότι η τοξικότητα των περισσότερων νανοσωματιδίων μετάλλων στη λέμνα είναι μεγαλύτερη από τα νανοσωματίδια με βάση τα παράγωγα της υπερδιακλαδισμένης πολυαιθυλενιμίνης που εξετάστηκαν στην παρούσα μελέτη. Ωστόσο, πρέπει, επίσης, να σημειωθεί ότι και τα τρία νανοσωματίδια προκαλούν τοξικότητα στη λέμνα σε συγκεντρώσεις μικρότερες από τις αντίστοιχες που φάνηκαν να είναι αποτελεσματικές στην ανάπτυξη του βερτισιλλίου (Lykogianni et al., 2020).

4.3.2 Υπολογισμός της όρμησης που προκαλούν τα νανοσωματίδια με βάση τα παράγωγα της υπερδιακλαδισμένης πολυαιθυλενιμίνης στη *Lemna minor* L.



Εικόνα 4.5: Ποσοστό σχετικής ανάπτυξης της *Lemna minor* L. (πάνω) σύμφωνα με τον αριθμό φυλλιδίων και (κάτω) σύμφωνα με το νωπό βάρος στις επεμβάσεις των νανοσωματιδίων HPEI (κόκκινο), GPEI (μπλε) και QPEI (γκρι) στη δεύτερη βιοδοκιμή που πραγματοποιήθηκε.

Στο δεύτερο πείραμα όπου εξετάστηκαν μικρότερες δόσεις (1-300 μg mL⁻¹), πραγματοποιήθηκε ποσοτική αξιολόγηση της όρμησης με βάση τα κριτήρια της «hormesis database» (Calabrese and Blain, 2011). Αναλυτικότερα, για την παράμετρο αριθμός φυλλιδίων το HPEI είχε σκορ 4, το GPEI 4,5 και το QPEI 7 και όλα αντιστοιχούν σε χαμηλή όρμηση (Εικόνα 4.5). Επίσης, για την παράμετρο νωπό βάρος τα HPEI και GPEI είχαν σκορ 5 και πάλι ορίζονται ως χαμηλή όρμηση. Για το QPEI, όπως αναφέρθηκε παραπάνω δεν παρατηρήθηκαν στατιστικά σημαντικές διαφορές με το μάρτυρα σε καμία από τις δόσεις που εξετάστηκαν έως τα 300 μg mL⁻¹. Επειδή στην πρώτη βιοδοκιμή φαίνεται ότι οι μεγαλύτερες συγκεντρώσεις παρεμπόδισαν σημαντικά την ανάπτυξη της λέμνας, αν για το QPEI θεωρηθεί για το νωπό βάρος NOAEL είναι τα 300 μg mL⁻¹ το σκορ για την όρμηση είναι 8,5 συνεπώς αντιστοιχεί σε χαμηλή προς μέτρια όρμηση.

Η όρμηση είναι ένας όρος που χρησιμοποιείται από τους τοξικολόγους για να περιγράψει μία καμπύλη δόσεων-απόκρισης ενός παράγοντα στην οποία οι μικρές δόσεις προκαλούν τη θετική ή διεγερτική απόκριση ενός βιολογικού συστήματος αντίθετα με τις μεγαλύτερες δόσεις που προκαλούν αρνητική επίδραση (Mattson, 2008). Γενικά, ως όρμηση προσδιορίζεται η θετική απόκριση των φυτών σε χημικούς παράγοντες σε λιγότερο από την αντίστοιχη διπλάσια απόκριση του μάρτυρα για συγκεντρώσεις μικρότερες της NOAEL (Agathokleous et al., 2019b). Πρόσφατα οι Agathokleous et al. (2019b) εξέτασαν βιβλιογραφικά την όρμηση στα φυτά από φυσικούς ή χημικούς παράγοντες και ανακάλυψαν περισσότερες

από 5000 σχετικές καταγραφές. Συνοψίζοντας, κατέληξαν ότι τα χαρακτηριστικά της είναι παρόμοια μεταξύ των φυτών και άλλων βιολογικών συστημάτων και ανεξάρτητα της παραμέτρου που μετρείται, του βιολογικού μηχανισμού ή του παράγοντα στρες, μιας και πρόκειται για το φαινόμενο της βιολογικής πλαστικότητας που συνδέεται με την εξέλιξη (Agathokleous et al., 2019b). Μάλιστα, θεωρείται ότι η όρμηση είναι η πρώτη ποσοτικοποίηση της βιολογικής πλαστικότητας (Agathokleous et al., 2019b, Jalal et al., 2021).

Επίσης, οι Agathokleous et al. (2019a) ανέλυσαν την πρόκληση όρμησης από νανοσωματίδια σε φυτά και άλγη και έδειξαν ότι η μέγιστη διεγερτική απόκριση ήταν μικρότερη από το διπλάσιο του μάρτυρα, διαφοροποιείτο ανάλογα με τη μέθοδο εφαρμογής, χρόνο εφαρμογής κι παράμετρο που αξιολογείται σε συγκεντρώσεις συνήθως μικρότερες των 100 $\mu\text{g mL}^{-1}$. Τα αποτελέσματα αυτά είναι σε συμφωνία με τη δική μας μελέτη καθώς η μέγιστη απόκριση της σχετικής ανάπτυξης για τα νανοσωματίδια ήταν διαφορετική για τον αριθμό φυλλιδίων όπου ήταν 104% για το HPEI (στη συγκέντρωση 10 $\mu\text{g mL}^{-1}$), 116% για το GPEI (10 $\mu\text{g mL}^{-1}$) και 125% για το QPEI (50 $\mu\text{g mL}^{-1}$) συγκριτικά με το νωπό βάρος όπου ήταν 135% για το HPEI (5 $\mu\text{g mL}^{-1}$), 107% για το GPEI (10 $\mu\text{g mL}^{-1}$) και 141% για το QPEI (10 $\mu\text{g mL}^{-1}$). Πιο πρόσφατα, όρμηση από νανοσωματίδια έχει καταγραφεί σε σπορόφυτα τομάτας (Guzmán-Báez et al., 2021), φυτά *Nigella arvensis* L. (Chahardoli et al., 2022) και *Arabidopsis thaliana* (Vega-Vásquez et al., 2021), ακόμα και σε έντομα (Seyed Alian et al., 2021). Επίσης, έχει φανεί ότι η εφαρμογή από νανοσωματίδια μετάλλων σε δόσεις που προκαλούν όρμηση θα μπορούσε να οδηγήσει σε αυξημένες αποδόσεις με μικρότερη περιβαλλοντική επίδραση συντελώντας έτσι στη βιώσιμη γεωργία (Kolbert et al., 2021).

Γενικότερα, όλα τα νανοσωματίδια φαίνεται να προκαλούν απόκριση από όρμηση έως τοξικότητα στα φυτά, και το είδος της απόκρισης εξαρτάται από τις φυσικοχημικές ιδιότητες του νανοσωματιδίου, το είδος με το οποίο αλληλεπιδρούν, το είδος της εφαρμογής/μονοπάτι πρόσληψης όπως και το περιβάλλον στο οποίο αλληλεπιδρούν (Juárez-Maldonado et al., 2021). Αν θεωρήσουμε τα νανοσωματίδια με βάση τα παράγωγα της υπερδιακλαδισμένης πολυαιθυλενιμίνης ως νέα νάνο-ΦΠ, όπως συζητήθηκε στο προηγούμενο κεφάλαιο (Κεφάλαιο 3) (Lykogianni et al., 2020), θα μπορούσαμε να πούμε ότι πιθανώς να επηρεάσουν θετικά τους πληθυσμούς λέμνας. Αντίστοιχη υπόθεση έχει διατυπωθεί από τους Agathokleous et al. (2020) γενικότερα για τα νάνο-ΦΠ, αλλά σε κάθε περίπτωση χρήζει επιπλέον έρευνας.

Σύμφωνα με τα προαναφερθέντα, στόχος της μελέτης μας δεν ήταν μόνο ο προσδιορισμός των ορμητικών δόσεων απόκρισης, αλλά και η περαιτέρω διερεύνηση των τοξικών επιδράσεων των νανοσωματιδίων καθώς και των πιθανών αλλαγών στην ισορροπία οξειδωτικών/αντιοξειδωτικών της *L. minor*. Για αυτό το σκοπό, το 25% της EC_{50} με βάση των αριθμό φυλλιδίων εφαρμόστηκε από κάθε νανοσωματίδιο, δηλαδή ποσότητα κοντά στην NOAEL του εκάστοτε νανοσωματιδίου. Αναλυτικότερα, οι συγκεντρώσεις των νανοσωματιδίων που εφαρμόστηκαν ήταν 72 $\mu\text{g mL}^{-1}$, 38 $\mu\text{g mL}^{-1}$ και 125 $\mu\text{g mL}^{-1}$ για τα HPEI, GPEI και QPEI, αντίστοιχα.

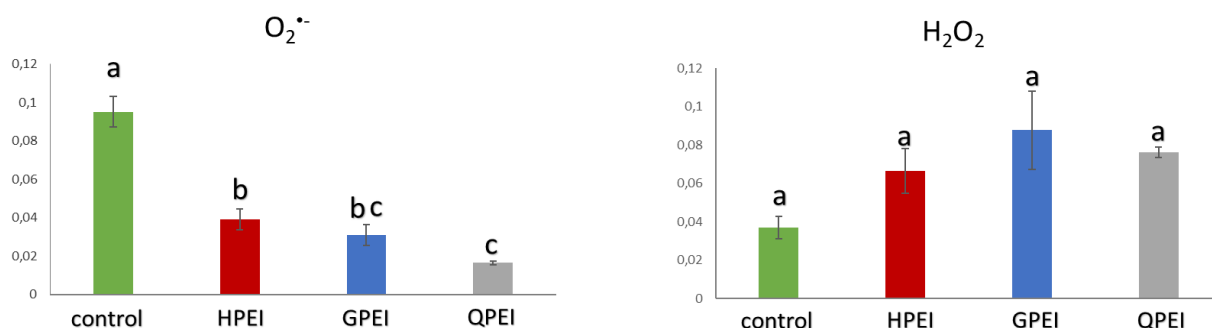
4.3.3 Η μελέτη των νανοσωματιδίων με βάση τα παράγωγα της υπερδιακλαδισμένης πολυαιθυλενιμίνης στην περιεκτικότητα σε $O_2^{\bullet-}$ και H_2O_2 στη λέμνα

Η νανοτεχνολογία αναπτύσσεται ραγδαίως με σημαντικές αρνητικές συνέπειες για το περιβάλλον, τους οργανισμούς μη-στόχους και τους ανθρώπους. Η τοξικότητα των νανοσωματιδίων έχει συνδεθεί με το οξειδωτικό στρες και τη συσσώρευση ROS σε άλγη (Perreault et al., 2012) και φυτά όπως τομάτα (Song et al., 2013), πατάτα (Bagherzadeh Homaei and Ehsanpour, 2016), αγγούρι (Mosa et al., 2018), ρύζι (Mirzajani et al., 2014, Rizwan et al., 2019), φασκόμηλο (Moazzami Farida et al., 2020), κόλιανδρος (Fatemi et al., 2021) κ.ά. (Kumar et al., 2018, Ranjan et al., 2021). Συγκεκριμένα για τα είδη λέμνας έχει μελετηθεί η πρόκληση οξειδωτικού στρες από νανοσωματίδια μετάλλων στα είδη *Lemna minor* (Yue et al., 2018), *Lemna gibba* (Oukarroum et al., 2013) και *Spirodela polyrhiza* (Hu et al., 2013). Στην παρούσα μελέτη εξετάστηκαν οι αλλαγές στα επίπεδα των ROS $O_2^{\bullet-}$ και H_2O_2 .

Στα φυτά τα ROS μπορούν να είναι σε ιονική μορφή [ρίζα του υδροξυλίου ($^{\bullet}OH$), σουπεροξειδίου του οξυγόνου ($O_2^{\bullet-}$)] ή μοριακή μορφή [υπεροξειδίου του υδρογόνου (H_2O_2) και μονήρες οξυγόνο (1O_2)] (Blokina, 2003; Apel and Hirt, 2004; Mittler et al., 2004). Έχει βρεθεί ότι στους φυτικούς ιστούς περίπου το 1-2% της κατανάλωσης οξυγόνου οδηγεί στην παραγωγή της ρίζας $O_2^{\bullet-}$ (Puntarulo et al., 1988). Το οποίο σχηματίζεται με την οξείδωση του οξυγόνου κατά την μεταφορά ηλεκτρονίων στους χλωροπλάστες και άλλα σημεία του κυττάρου (Gill and Tuteja, 2010). Στην παρούσα μελέτη, παρότι η μέθοδος που εφαρμόστηκε επηρεάζεται από τον ενζυματικό σχηματισμό της φορμαζάνης (Griending et al., 2016), τα αποτελέσματά μας δείχνουν ότι όλες οι επεμβάσεις είχαν ως αποτέλεσμα σημαντικά μικρότερη περιεκτικότητα του $O_2^{\bullet-}$ (Εικόνα 4.6). Το QPEI, συγκεκριμένα, οδήγησε σε περίπου 5,5 φορές μικρότερη συγκέντρωση από το μάρτυρα. Η σημαντική μείωση του $O_2^{\bullet-}$ θα μπορούσε να αποδοθεί σε πιθανώς αυξημένη δραστηριότητα της SOD ή μειωμένο σχηματισμό της ρίζας.

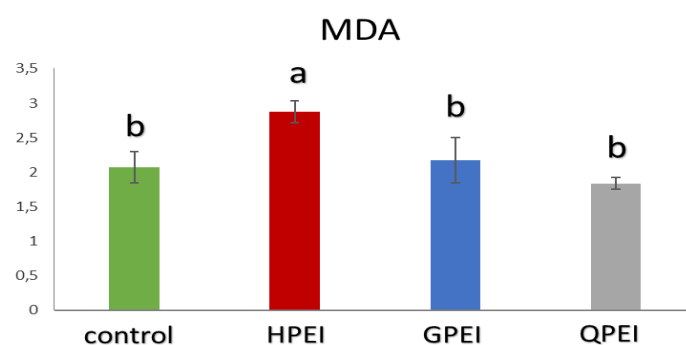
Το H_2O_2 έχει διπλό ρόλο στα φυτά όπου στις χαμηλές συγκεντρώσεις λειτουργεί ως σήμα ενεργοποιώντας την άμυνα του φυτού σε βιοτικά και αβιοτικά στρες και στις υψηλές συγκεντρώσεις οδηγεί στην απόπτωση των κυττάρων (Quan et al., 2008). Επιπρόσθετα, συμμετέχει και ρυθμίζει πολλές φυσιολογικές διεργασίες π.χ. φωτοσύνθεση, κίνηση των στομάτων και γενικότερα την ανάπτυξη (Gill and Tuteja, 2010). Μάλιστα, είναι αποδεκτό ότι αποτελεί σημαντικό σήμα για το οξειδωτικό στρες λόγω της σχετικά μεγάλης διάρκειας ζωής του και της υψηλής διαπερατότητάς του στις κυτταρικές μεμβράνες (Quan et al., 2008). Τα νανοσωματίδια με βάση τα παράγωγα της υπερδιακλαδισμένης πολυαιθυλενιμίνης δεν επηρέασαν σημαντικά την περιεκτικότητα του H_2O_2 στα φυτά της λέμνας (Εικόνα 4.6). Αυτά τα αποτελέσματα δείχνουν ότι η εξεταζόμενη συγκέντρωση (25% της EC_{50}) για το εκάστοτε νανοσωματίδιο δεν επηρέασε τη συγκέντρωση του H_2O_2 ενώ αντίθετα μείωσε σημαντικά το περιεχόμενο σε $O_2^{\bullet-}$. Τα αποτελέσματά μας συμφωνούν με το φαινότυπο των φυτών καθώς οι συγκεντρώσεις που εξετάστηκαν είναι κοντά στις τιμές NOAEL και δεν παρατηρήθηκε απόκριση

σε οξειδωτικό στρες. Συνεπώς, ο έλεγχος ύπαρξης οξειδωτικού στρες θα πρέπει να επιβεβαιωθεί ελέγχοντας την υπεροξείδωση των λιπιδίων και την ενζυμική αντιοξειδωτική δραστηριότητα όπως περιγράφεται παρακάτω.



Εικόνα 4.6: Ραβδογράμματα με την περιεκτικότητα των ROS $O_2^{\bullet-}$ (ΔA580 $h^{-1} g^{-1}$ νωπού βάρους) και H_2O_2 ($mg g^{-1}$ νωπού βάρους) που βρέθηκε στη *Lemna minor L.* στο μάρτυρα (control) και στις επεμβάσεις των HPEI, GPEI και QPEI. Για τις επεμβάσεις προστέθηκε στο Steinberg medium ποσότητα που αντιστοιχούσε στο 25% της EC_{50} του εκάστοτε νανοσωματιδίου όπως υπολογίστηκε στην πρώτη βιοδοκιμή με βάση τον αριθμό φυλλιδίων. Οι διαφορετικοί χαρακτήρες δείχνουν στατιστικά σημαντικές διαφορές με βάση το κριτήριο Duncan μετά από ανάλυση παραλλακτικότητας (ANOVA) ($P < 95\%$).

4.3.4 Η υπεροξείδωση των λιπιδίων κατά την επίδραση νανοσωματιδίων με βάση τα παράγωγα της υπερδιακλαδισμένης πολυαιθυλενιμίνης στη λέμνα



Εικόνα 4.7: Ραβδογράμματα με την περιεκτικότητα σε MDA ($mg g^{-1}$ νωπού βάρους) που βρέθηκε στη *Lemna minor L.* στο μάρτυρα (control) και στις επεμβάσεις των HPEI, GPEI και QPEI. Για τις επεμβάσεις προστέθηκε στο Steinberg medium ποσότητα που αντιστοιχούσε στο 25% της EC_{50} του εκάστοτε νανοσωματιδίου όπως υπολογίστηκε στην πρώτη βιοδοκιμή με βάση τον αριθμό φυλλιδίων. Οι διαφορετικοί χαρακτήρες δείχνουν στατιστικά σημαντικές διαφορές με βάση το κριτήριο Duncan μετά από ανάλυση παραλλακτικότητας (ANOVA) ($P < 95\%$).

Το οξειδωτικό στρες είναι ένας σημαντικός μηχανισμός τοξικότητας των νανοσωματιδίων στα φυτά και η υπεροξείδωση των λιπιδίων είναι ένας σημαντικός δείκτης της ζημίας που προκαλείται από οξειδωτικό στρες (Ma et al., 2015). Το MDA είναι ένας γενικά αποδεκτός δείκτης της

υπεροξείδωσης των λιπιδίων (Tsikas, 2017) και μία έμμεση απόδειξη της ζημίας (damage) στα κύτταρα (Wang et al., 2011, Song et al., 2012). Το MDA παράγεται από την αποσύνθεση των πολυακόρεστων λιπαρών οξέων στις μεμβράνες και η συγκέντρωσή του αυξάνεται σε συνθήκες οξειδωτικού στρες (Song et al., 2012). Γενικά, η υπεροξείδωση των λιπιδίων έχει ως αποτέλεσμα

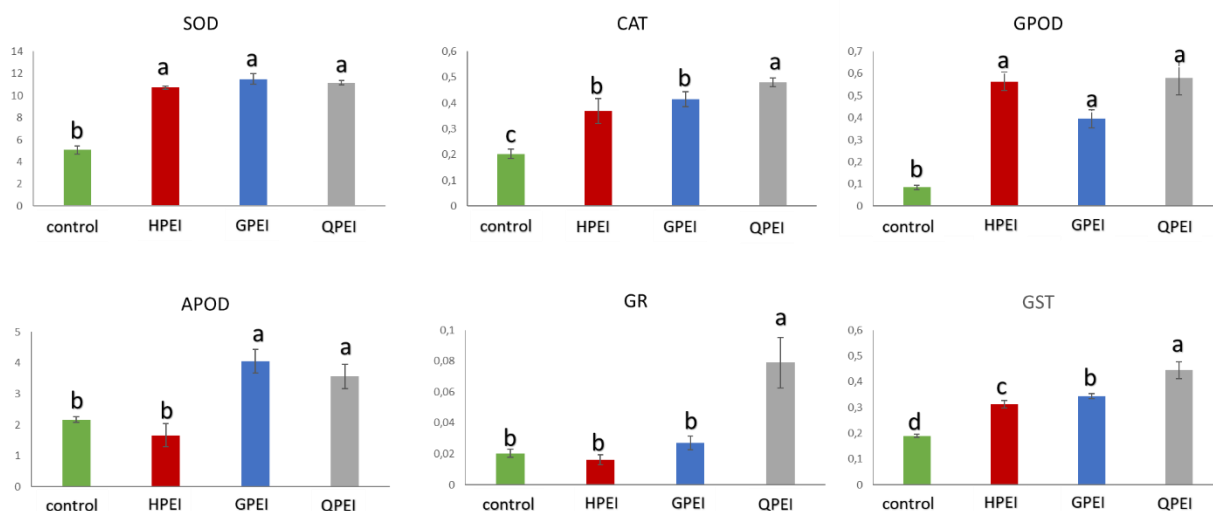
την αδρανοποίηση διάφορων ενζύμων, και την αποσταθεροποίηση της κυτταρικής μεμβράνης επιδρώντας έτσι στη μεταβολική δραστηριότητα των κυττάρων καταλήγοντας στην παρεμπόδιση της ανάπτυξης (Pinto et al., 2003).

Στην παρούσα μελέτη (Εικόνα 4.7) παρατηρήθηκε σημαντικά μεγαλύτερη ποσότητα MDA στα φυτά λέμνας μετά την επέμβαση HPEI. Αυτό υποδεικνύει ότι το HPEI οδηγεί σε αυξημένη υπεροξειδωση των λιπαρών οξέων, ενώ τα GPEI και QPEI δεν παρουσίασαν στατιστικά σημαντικές διαφορές. Αντίστοιχα στην μελέτη των Lykogianni et al. (2020) είχε φανεί ότι το HPEI οδήγησε σε μείωση των λιπαρών οξέων που ανιχνεύθηκαν με το GC/MS στο βερτισίλλιο, χωρίς όμως να μπορεί να εξηγηθεί περαιτέρω αυτό το φαινόμενο.

4.3.5 Η δραστηριότητας των αντιοξειδωτικών ενζύμων κατά την επέμβαση νανοσωματιδίων με βάση τα παράγωγα της υπερδιακλαδισμένης πολυαιθυλενιμίνης στη λέμνα

Τα νανοσωματίδια διεγείρουν την παραγωγή ROS οδηγώντας σε οξειδωτικό στρες (Horie and Tabei, 2021). Μέρος της άμυνας των φυτών έναντι του οξειδωτικού στρες αποτελούν τα αντιοξειδωτικά ένζυμα. Το SOD είναι το πιο αποτελεσματικό ενδοκυτταρικό αντιοξειδωτικό ένζυμο, το οποίο αντιδρά με το $O_2^{\cdot-}$ και βρίσκεται σε όλα τα μέρη του κυττάρου στους αερόβιους οργανισμούς (Gill and Tuteja, 2010). Η CAT είναι ένα ένζυμο το οποίο βρίσκεται κυρίως στα υπεροξεισώματα και αντιδρά με το H_2O_2 (Corpas et al, 2020). Ένα μόριο CAT μπορεί να αντιδράσει με περίπου 6 εκατομμύρια μόρια H_2O_2 το λεπτό. Τα APOD και GPOD είναι οικογένειες ενζύμων (Chen et al, 2017), που αποτελούνται από διάφορα ισοένζυμα, τα οποία βρίσκονται σε διάφορα σημεία στο κύτταρο και αντιδρούν, επίσης, με το H_2O_2 προστατεύοντας τα φυτά (Gill and Tuteja, 2010). Το GR είναι ένα αντιοξειδωτικό ένζυμο του H_2O_2 , που δρα στον κύκλο ασκορβικού οξέος-γλουταθειόνης, και βρίσκεται κυρίως στους χλωροπλάστες αλλά και στα μιτοχόνδρια και το κυτταρόπλασμα (Edwards et al., 1990). Τέλος, το GST αποτελεί μία μεγάλη ομάδα ενζύμων τα οποία είναι εξαιρετικής σημασίας για την προστασία των φυτικών κυττάρων από βιοτικά και αβιοτικά στρες (Hasan et al, 2021). Το GST βελτιώνει τη δέσμευση των ξενοβιοτικών από τη γλουταθειόνη διευκολύνοντας έτσι την αποβολή τους από τα κύτταρα (Gill and Tuteja, 2010).

Στην παρούσα μελέτη (Εικόνα 4.8), όλα τα νανοσωματίδια υπερδιακλαδισμένης πολυαιθυλενιμίνης παρουσίασαν σημαντικά αυξημένη συγκέντρωση των ενζύμων SOD, CAT, GPOD και GST συγκριτικά με το μάρτυρα. Αναλυτικότερα, το QPEI στο σύνολο των αντιοξειδωτικών ενζύμων που εξετάστηκαν είχε μεγαλύτερη συγκέντρωση σε σχέση με το μάρτυρα. Αυτό πιθανώς να συνδυάζεται με τις πολύ μεγαλύτερες συγκεντρώσεις που απαιτούνται από το QPEI σε σχέση με τα άλλα νανοσωματίδια για την παρεμπόδιση της ανάπτυξης της λέμνας.



Εικόνα 4.8: Ραβδογράμματα με τη δραστηριότητα αντιοξειδωτικών ενζύμων ($\text{units mg}^{-1} \text{protein}$) του φυτού *Lemna minor L.* όταν αναπτύχθηκε στον μάρτυρα (control) και σε διάλυμα που περιείχε τις επεμβάσεις των HPEI, GPEI και QPEI. Για τις επεμβάσεις προστέθηκε στο Steinberg medium ποσότητα που αντιστοιχούσε στο 25% της EC_{50} του εκάστοτε νανοσωματιδίου όπως υπολογίστηκε στην πρώτη βιοδοκιμή με βάση τον αριθμό φυλλιδίων. Οι διαφορετικοί χαρακτήρες δείχνουν στατιστικά σημαντικές διαφορές με βάση το κριτήριο Duncan μετά από ανάλυση παραλλακτικότητας (ANOVA) ($P < 95\%$).

Επίσης, τα αποκτηθέντα αποτελέσματα μπορούν να συσχετιστούν με τη συγκέντρωση των ROS που εξετάστηκαν νωρίτερα. Πιο αναλυτικά, η σημαντικά μικρότερη συγκέντρωση του $\text{O}_2^{\bullet-}$ μπορεί να εξηγηθεί από τη σημαντικά αυξημένη δραστηριότητα της SOD στο σύνολο των επεμβάσεων. Όσον αφορά τη συγκέντρωση του H_2O_2 , αναφέρθηκε και νωρίτερα ότι το H_2O_2 ανάγεται σε H_2O από τα ένζυμα CAT, GPOD και APOD. Κατά συνέπεια οι μη στατιστικά σημαντικές διαφορές που σημειώθηκαν στη συγκέντρωσή του H_2O_2 στο σύνολο των επεμβάσεων φαίνεται να είναι αποτέλεσμα της αυξημένης δραστηριότητας των εν λόγω ενζύμων. Επίσης, η αυξημένη δραστηριότητα του GST κατά την επίδραση όλων των νανοσωματιδίων υποδεικνύει τη δράση της γλουταθειόνης κατά την αποτοξικοποίησή τους.

Το πιο ευαίσθητο ένζυμο στην απόκριση της λέμνας στο στρες που προκάλεσαν τα νανοσωματίδια με βάση παράγωγα της υπερδιακλαδισμένης πολυαιθυλενιμίνης ήταν το GPOD. Η δραστηριότητα του GPOD ήταν περίπου 7, 5 και 7 φορές μεγαλύτερη από το μάρτυρα για τα HPEI, GPEI και QPEI, αντίστοιχα. Παρόμοια, σε προηγούμενη μελέτη το GPOD έχει αναφερθεί ως μία ευαίσθητη παράμετρος της νανοτοξικότητας σωματιδίων αργύρου στη *L. minor* (Pereira et al., 2018). Επομένως, είναι πιθανό το GPOD να είναι μία ευαίσθητη παράμετρος για τη μελέτη της νανοτοξικότητας στη λέμνα.

Γενικά, η δραστηριότητα των αντιοξειδωτικών ενζύμων μπορεί να χρησιμοποιηθεί ως μία πρακτική βιοχημική παράμετρος αξιολόγησης της συσσώρευσης των ROS. Τα αντιοξειδωτικά ένζυμα αποτελούν σημαντικό μέρος της άμυνας των φυτών έναντι των ROS, και η αυξημένη συγκέντρωσή τους δείχνει ότι το φυτό έχει συσσωρεύσει ROS, αλλά τα

απομακρύνει από τα κύτταρά του (Song et al., 2012). Αν το οξειδωτικό στρες υπερίσχυε, η δράση των αντιοξειδωτικών ενζύμων θα μειωνόταν με αποτέλεσμα τις ζημιές στα φυτά έως τον πλήρη μααρασμό (Zhang et al., 2008). Συνεπώς, στην παρούσα μελέτη, η *L. minor* έδειξε ότι αυξάνει τη δράση των αντιοξειδωτικών ενζύμων για να αντιμετωπίσει την επίδραση των νανοσωματιδίων με βάση τα παράγωγα της πολυαιθυλενιμίνης.

4.4 Συμπεράσματα

Η εφαρμογή νανο-ΦΠ θα αποτελέσει μία σημαντική εισροή ξενοβιοτικών στο περιβάλλον, με αποτέλεσμα να είναι επιτακτική η ανάγκη κατανόησης της επίδρασης τους σε οργανισμούς μη-στόχους. Στην παρούσα μελέτη φάνηκε ότι η τροποποίηση των νανοσωματιδίων υπερδιακλαδισμένης πολυαιθυλενιμίνης με γουανιδινικές ομάδες αυξάνει την τοξικότητά τους στην ανάπτυξη της λέμνας, ενώ η τροποποίηση τους με τεταρτοταγείς αμμωνιακές ομάδες την μειώνει. Ωστόσο, όταν εξετάζεται η επίδραση των νανοσωματιδίων αυτών σε χαμηλότερες της NOAEL συγκεντρώσεις παρατηρείται χαμηλή όρμηση. Παράλληλα, φαίνεται ότι ενεργοποιούνται αντιοξειδωτικά ένζυμα. Το πιο ευαίσθητο ένζυμο στην απόκριση των νανοσωματιδίων ήταν η υπεροξειδάση της γουαϊακόλης. Τέλος, το ΗΡΕΙ φάνηκε ότι εμφανίζει ξεχωριστό μηχανισμό τοξικότητας καθώς ήταν το μόνο που οδήγησε σε σημαντική υπεροξείδωση των λιπιδίων. Τα αποτελέσματα αυτά παρουσιάζουν ενδιαφέρον καθώς δείχνουν την επίδραση των διαφορετικών τελικών ομάδων στην οικοτοξικότητα των νανοσωματιδίων και δίνουν πληροφορίες σχετικά με την επίδραση χαμηλών δόσεων και την πρόκληση οξειδωτικού στρες.

Γενικότερα, τα παραγόμενα αποτελέσματα (Ειδικό μέρος Ι) παρέχουν κάποιες πρώτες ενδείξεις για τα νανοσωματίδια με βάση τα παράγωγα της υπερδιακλαδισμένης πολυαιθυλενιμίνης που μελετήθηκαν και την περαιτέρω αξιοποίησή τους ως νανο-ΦΠ. Κυρίως πάρθηκαν χρήσιμες πληροφορίες για την επίδραση των τελικών ομάδων και επιβεβαιώθηκαν (α) η ανάγκη εφαρμογής «ομικών» τεχνικών για την μελέτη τους, (β) η σημασία της εξέτασης και μικρότερων δόσεων καθώς και (γ) η αξιολόγηση της κατάλληλης παραμέτρου κατά την αξιολόγησή τους.

Ειδικό μέρος II.

Καλλιέργειες εκτός εδάφους - Απολύμανση θρεπτικού διαλύματος

Στη συνέχεια της Διατριβής (Ειδικό μέρος II), εξετάστηκε η επίδραση του υποχλωριώδους νατρίου, κοινώς χλωρίνης, που εφαρμόζεται για την αντιμετώπιση των εδαφογενών παθογόνων σε θρεπτικό διάλυμα υδροπονικής καλλιέργειας τομάτας στην ανάπτυξη, θρέψη, παραγωγή της τομάτας αλλά και ασφάλεια των τελικών προϊόντων για τον καταναλωτή. Είναι γνωστό ότι η απολύμανση του θρεπτικού διαλύματος στις υδροπονικές καλλιέργειες με εφαρμογή χλωρίνης αποτελεί συνήθη γεωργική πρακτική χωρίς όμως την απαραίτητη υποστήριξη σε πληροφορίες/γνώση από την ακαδημαϊκή κοινότητα. Ουσιαστικά, στη συνέχεια της διατριβής, αναγνωρίστηκε το κενό μεταξύ έρευνας και γεωργικής πράξης και προσπαθήσαμε να απαντήσουμε τα σχετικά ερωτήματα με στόχο την αύξηση της σχετικής πληροφορίας για τους παραγωγούς στο πλαίσιο ενίσχυσης της βιώσιμης γεωργίας.

Κεφάλαιο 5. Μελέτη της επίδρασης διαφόρων συγκεντρώσεων χλωρίου κατά την απολύμανση του θρεπτικού διαλύματος σε υδροπονική καλλιέργεια τομάτας στην ανάπτυξη, θρεπτική κατάσταση και παραγωγή των φυτών

Γραφική περίληψη

Κεφάλαιο 5



ΣΥΝΤΟΜΟΓΡΑΦΙΕΣ:

ΘΔ: Θρεπτικό διάλυμα;

DA: days after (treatment); DMC: dry matter content (περιεκτικότητα σε ξηρή ουσία); fw: fresh weight (νωπό βάρος; SLA: Specific leaf area; dw: dry weight (ξηρό βάρος)

5.1 Εισαγωγή

Η καλλιέργεια εκτός εδάφους αναπτύχθηκε στα θερμοκήπια αρχικά για την αντιμετώπιση των εδαφογενών φυτοπαθογόνων (Vallance et al., 2011, van Os et al., 2010) και ενισχύθηκε περαιτέρω μετά την απαγόρευση του βρωμιούχου μεθυλίου (Postma et al., 2008). Μάλιστα, έχει αποδειχθεί από πολύ παλιά ότι η υδροπονία αποτελεί μία επιτυχημένη εναλλακτική της χρήσης του βρωμιούχου μεθυλίου σε πολλές καλλιέργειες (Braun and Supkoff, 1994). Επίσης, στις θερμοκηπιακές καλλιέργειες δύναται να μειωθεί η χρήση των αγροχημικών καθώς η δυνατότητα ρύθμισης του περιβάλλοντος που επικρατεί στην καλλιέργεια περιορίζει την πιθανότητα προσβολών. Επιπλέον, η υδροπονία έχει το εξής μοναδικό χαρακτηριστικό: την

έναρξη μίας καλλιέργειας χωρίς παθογόνα και την αντιμετώπιση των υπαρχόντων παθογόνων στο νερό άρδευσης ή στο θρεπτικό διάλυμα μέσω διάφορων μεθόδων απολύμανσης (Postma et al., 2008).

Όμως, ο κίνδυνος ανάπτυξης εδαφογενών παθογόνων στα υδροπονικά συστήματα δεν είναι μηδενικός καθώς υπάρχει η πιθανότητα μόλυνσης των φυτών μέσω του νερού άρδευσης (Hong and Moorman, 2007), του φυτικού υλικού και των μέσων ανάπτυξης (Ehret et al., 2001). Αναλυτικότερα, έρευνες έχουν αποδείξει την παρουσία διάφορων παθογόνων (Stewart-Wade, 2011): μύκητες και ωομύκητες έχουν ανιχνευθεί σε ανακυκλωμένο νερό άρδευσης ή σε ανακυκλωμένο θρεπτικό διάλυμα υδροπονικής καλλιέργειας. Πιο συγκεκριμένα, έχουν βρεθεί στελέχη που ανήκουν σε διάφορα γένη όπως *Phytophthora*, *Pythium*, *Fusarium*, *Verticillium* (Hong and Moorman, 2007) ακόμα κι *Botrytis* (Mafia et al., 2008). Παρόλα αυτά, η καλλιεργητική εμπειρία δείχνει ότι η ανάπτυξη ασθενειών στο θρεπτικό διάλυμα είναι μικρή και λιγότερο συχνή από ότι θα αναμενόταν (Paulitz, 1997, Tu et al., 1999), ωστόσο αρκετή για να επιβάλει την εγκατάσταση συστήματος απολύμανσης του διαλύματος απορροής κατά την ανακύκλωσή του στα κλειστά υδροπονικά συστήματα (Σάββας, 2011). Σε αυτό το πλαίσιο έχουν αναπτυχθεί διάφορες μέθοδοι απολύμανσης που εφαρμόζονται στα σύγχρονα θερμοκήπια όπως η χρήση φίλτρων, θέρμανσης, υπεριώδους ακτινοβολίας και όζοντος (Son et al., 2020).

Πολύ συχνά ως απολυμαντικό μέσο εφαρμόζεται το χλώριο σε υγρή μορφή (Postma et al., 2008), ως υποχλωριώδες νάτριο (κοινώς χλωρίνη). Πιο συγκεκριμένα, η χλωρίνη χρησιμοποιείται ευρέως για επεξεργασία νερού, ειδικά σε πισίνες, συστήματα άρδευσης (Clark and Smajstrla, 1992) καθώς και σε διαδικασίες αποστείρωσης σπόρων (Miché and Balandreau, 2001) και μετά τη συγκομιδή αγροτικών προϊόντων (Ramos et al., 2013). Ωστόσο, οι πληροφορίες σχετικά με τις επεξεργασίες με υποχλωριώδες ιόν (ClO^-) ως απολυμαντικό στις υδροπονικές καλλιέργειες είναι σπάνιες (Dannehl et al., 2016). Παρ' όλα αυτά, έχουν προσδιοριστεί υπολείμματα τοξικών για τον άνθρωπο χλωρικών ιόντων σε υδροπονική καλλιέργεια τομάτας μετά από απολύμανση του θρεπτικού διαλύματος με KClO (Dannehl et al., 2016).

Στην Ελλάδα ο τομέας της αγροδιατροφής αποτελεί έναν σημαντικό πυλώνα με πολλά περιθώρια ενίσχυσης της ελληνικής οικονομίας και η υδροπονική καλλιέργεια αποτελεί έναν κλάδο με εξαιρετικές προοπτικές αύξησης κεφαλαίου που ήδη αποδεικνύεται όλο και πιο δυναμικός (Λαμπίρης, 2021). Δυστυχώς όμως, η υδροπονική καλλιέργεια στα θερμοκήπια, αν και παρουσιάζει αυξητικές τάσεις, δεν αναπτύσσεται με την ταχύτητα που επιβάλλει η ανάγκη διατήρησης της βιωσιμότητας του κλάδου μέσα στο σύγχρονο, ανταγωνιστικό, διεθνές περιβάλλον (Αλεξάκη, 2018). Σε μεγάλο βαθμό αυτό οφείλεται σε ελλείμματα τεχνογνωσίας κυρίως όσον αφορά τη θρέψη και την άρδευση των φυτών (διαχείριση θρεπτικού διαλύματος-ΘΔ) (Σάββας, 2011). Ένα παράδειγμα του παραπάνω φαινομένου αποτελεί η έλλειψη γνώσης για την επίδραση μεθόδων απολύμανσης του ΘΔ στην ανάπτυξη των φυτών.

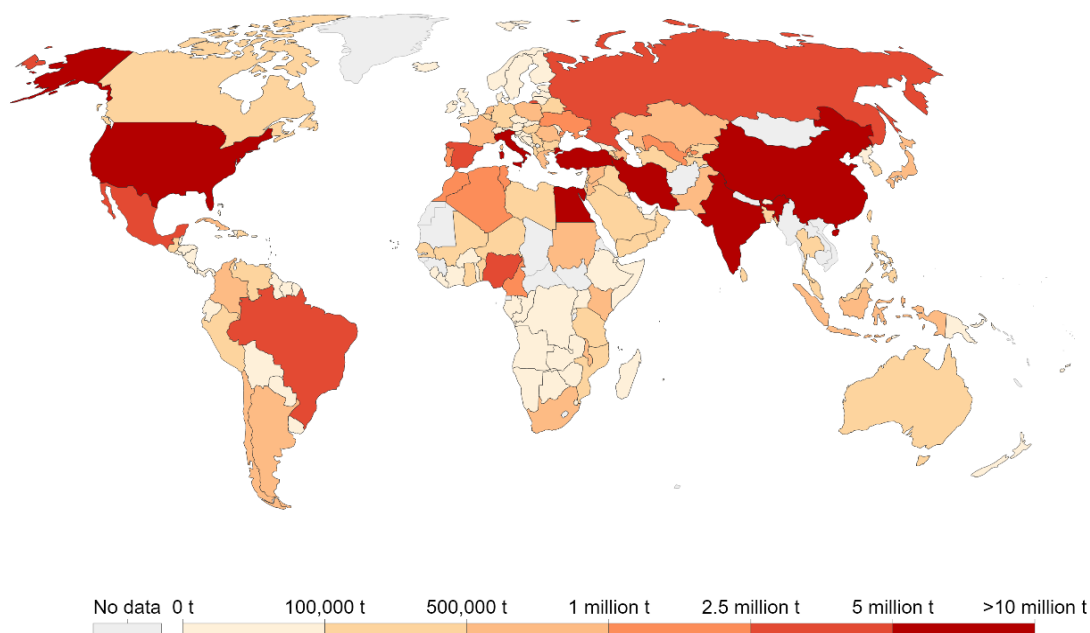
Μάλιστα, έχει ήδη επισημανθεί στη διεθνή βιβλιογραφία ότι υπάρχει έλλειψη σε μελέτες που εξετάζουν την επίδραση της απολύμανσης με χλωρίνη (Dannehl et al., 2016), μία

συχνά εφαρμοζόμενη μέθοδο στη Μεσόγειο (Postma et al., 2008). Η χλωρίνη αποτελείται από NaClO , το οποίο όταν προστίθεται στο νερό σχηματίζει ιόντα $\text{HOCl} + \text{NaOH}^-$ και ανάλογα με το pH OCl^- . Το ανιόν OCl^- αποσυντίθεται σε Cl^- και O^- (Postma et al., 2008). Συνεπώς, γίνεται εύκολα αντιληπτό ότι κατά την απολύμανση με χλωρίνη η συγκέντρωση Na^+ και Cl^- αυξάνεται στο ΘΔ χωρίς όμως να είναι γνωστή η επίδραση τους στα καλλιεργούμενα φυτά.

Σε παγκόσμια κλίμακα, το πιο σημαντικό λαχανικό είναι η τομάτα (*Solanum lycopersicum* L. var. *Lycopersicum*, SLL) (Rodríguez-Ortega et al., 2019), η οποία αποτελεί, επιπλέον, έναν σημαντικό οργανισμό μοντέλο για τη φυτική παραγωγή (Razifard et al., 2020). Για το 2019 η καλλιεργήσιμη έκταση της ήταν 6.117.242,00 εκτάρια και η συνολική παραγωγή 243.635.433,00 τόνους (FAOSTAT, 2021). Οι χώρες με τη μεγαλύτερη παραγωγή είναι: Κίνα, Ινδία και Τουρκία (Εικόνα 5.1) (FAOSTAT, 2021). Μάλιστα, πρέπει να σημειωθεί ότι η εκτός εδάφους καλλιέργεια της τομάτας έχει αυξηθεί τα τελευταία χρόνια (Rodríguez-Ortega et al., 2019). Η τομάτα στην Ελλάδα είναι το λαχανικό με τη μεγαλύτερη καλλιεργήσιμη έκταση και παραγωγή (Σάββας, 2009). Πιο συγκεκριμένα, καλλιεργείται σε 150.100,00 στρέμματα με παραγωγή 538.754,00 hg ha^{-1} (FAOSTAT, 2021).

Tomato production, 2018

Tomato production is measured in tonnes.



Source: UN Food and Agriculture Organization (FAO)

OurWorldInData.org/agricultural-production • CC BY

Εικόνα 5.1: Η παγκόσμια παραγωγή τομάτας το 2018 (πάρθηκε από την ιστοσελίδα <https://ourworldindata.org/grapher/tomato-production>) (πρόσβαση 21-12-2021)

Σε αυτό το πλαίσιο, στο κεφάλαιο 5, στις εγκαταστάσεις του Εργαστηρίου Κηπευτικών Καλλιεργειών του Γεωπονικού Πανεπιστημίου Αθηνών, πραγματοποιήθηκε πείραμα θερμοκηπίου σε υδροπονικό σύστημα ανοιχτού τύπου καλλιέργειας τομάτας, όπου

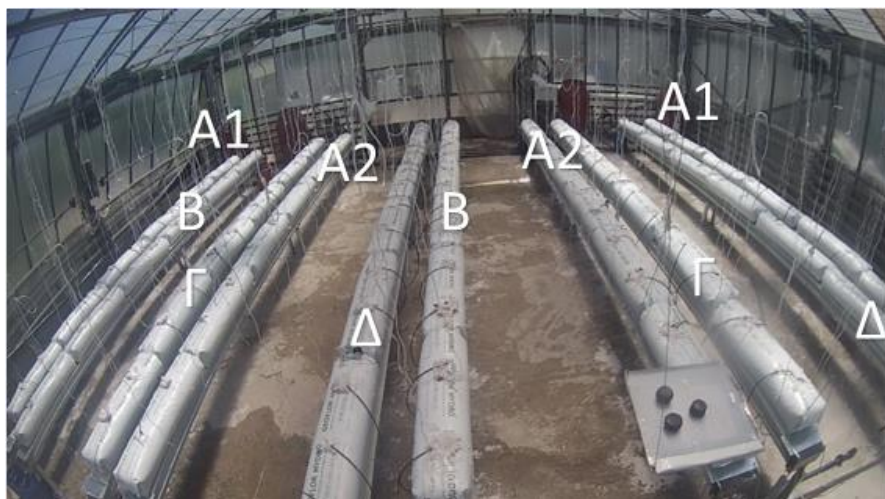
πραγματοποιήθηκε απολύμανση του ΘΔ με εφαρμογή υποχλωριώδους νατρίου. Πιο συγκεκριμένα, εξετάστηκε η επίδραση που έχει η χρήση υποχλωριώδους νατρίου στην ανάπτυξη των φυτών τομάτας, στη θρεπτική τους κατάσταση, όπως επίσης στη συνολική παραγωγή και την παραγωγή ανά εμπορικές κλάσεις τομάτας. Τέλος, προσδιορίστηκε η επίδραση της απολύμανσης στο χρώμα των καρπών.

5.2 Υλικά και Μέθοδοι

5.2.1 Πειραματικός Σχεδιασμός, βιολογικό υλικό και συνθήκες καλλιέργειας

5.2.1.1 Θερμοκηπιακή Εγκατάσταση

Το πείραμα πραγματοποιήθηκε σε γυάλινο θερμοκήπιο στην Αθήνα, Ελλάδα (N 37°59'10", E 23°42'29", altitude 24 m) από το Μάιο έως τον Ιούλιο του 2019. Ως βιολογικό υλικό επιλέχθηκε η τομάτα (*Solanum lycopersicum*), και συγκεκριμένα η αυτορριζή, εμπορική ποικιλία "Elpida". Η καλλιέργεια πραγματοποιήθηκε σε ανοιχτού τύπου υδροπονικό σύστημα, σε σάκους περλίτη. Στην υδροπονική καλλιέργεια τομάτας, ο περλίτης είναι ένα από τα υποστρώματα που χρησιμοποιείται και έχει μελετηθεί εκτενώς (Rodríguez-Ortega et al., 2019). Μάλιστα, οι Ibrahim and Elfaki (2019) έχουν δείξει ότι ο περλίτης συγκριτικά με άλλα υποστρώματα (χαλίκι, pozzolana) μπορεί να οδηγήσει σε υψηλότερη παραγωγή όταν η άρδευση γίνεται με νερό υψηλής αλατότητας (Ibrahim and Elfaki, 2019). Ακόμη ο περλίτης θα μπορούσε να οδηγήσει σε καλύτερη αξιοποίηση του νερού από την καλλιέργεια (Al-Shammari et al., 2018).



Εικόνα 5.2: Πειραματικός σχεδιασμός. Πάνω στα κανάλια σημειώνονται οι επεμβάσεις: A1='border', A2= μάρτυρας, B=2,5 $\mu\text{g mL}^{-1}$, Γ=5 $\mu\text{g mL}^{-1}$, Δ=7,5 $\mu\text{g mL}^{-1}$

Το διαμέρισμα του θερμοκηπίου, όπου πραγματοποιήθηκε το πείραμα, ήταν 56 m². Το υδροπονικό σύστημα αποτελείτο από 10 κανάλια, εκ των οποίων τα 8 χρησιμοποιήθηκαν στις επεμβάσεις (2 κανάλια ανά επέμβαση) και 2 χρησιμοποιήθηκαν ως «φράχτες» (borders). Ακολουθήθηκε το εντελώς τυχαίοποιημένο σχέδιο (Εικόνα 5.2). Σε κάθε κανάλι τοποθετήθηκαν 6 σάκοι περλίτη (33 L), και σε κάθε σάκο 2 φυτά τομάτας. Πριν από τη μεταφύτευση, οι σάκοι περλίτη ποτίστηκαν με ΘΔ μέχρι κορεσμού. Την επόμενη μέρα, στις 10 Μαΐου 2019, μεταφυτεύτηκαν τα φυτάρια τομάτας στο στάδιο των 8 φύλλων. Συνολικά, χρησιμοποιήθηκαν 120 φυτά. Τα κανάλια είχαν κλίση 1-2% για διευκόλυνση της αποστράγγισης και κάθε δύο ημέρες καταγράφονταν οι τιμές pH και ηλεκτρικής αγωγιμότητας (EC – electrical conductivity) ώστε να εντοπιστεί έγκαιρα πιθανή επίδραση της απολύμανσης με το υποχλωριώδες νάτριο στη σύσταση του διαλύματος απορροής. Για την υποβοήθηση της καρπόδεσης τοποθετήθηκε κυψέλη βομβίνων (*Bombus terrestris*) και ακολουθήθηκαν οι συνήθειες πρακτικές σχετικά με το κλάδεμα και τη φυτοπροστασία.

5.2.1.2 Θρέψη και άρδευση της καλλιέργειας

Κατά την καλλιέργεια της τομάτας χρησιμοποιήθηκαν οι συνταγές θρέψης που φαίνονται στον Πίνακα 5.1, σύμφωνα με τις προδιαγραφές που περιγράφονται αναλυτικά στη βιβλιογραφία (Savvas and Adamidis 1999). Αρχικά εφαρμόστηκε συνταγή για την διαβροχή μέχρι κορεσμού των υποστρωμάτων, και στη συνέχεια συνταγές θρέψης για την βλαστική ανάπτυξη της καλλιέργειας και για την παραγωγή καρπών. Οι συνταγές θρέψης είχαν σχεδιαστεί ώστε να καλύπτονται οι ανάγκες σε θρεπτικά στοιχεία στα διάφορα στάδια ανάπτυξης του φυτού. Όπως είναι γνωστό οι απαιτήσεις σε θρεπτικά στοιχεία διαφοροποιούνται όταν το φυτό μπαίνει στην καρποφορία π.χ. η αναλογία N:K μειώνεται στο στάδιο καρποφορίας συγκριτικά με την αντίστοιχη στη βλαστική ανάπτυξη (Bar-Tal et al., 1995). Επίσης, χρησιμοποιήθηκαν διορθωτικές συνταγές όταν αυτό κρίθηκε απαραίτητο. Για την άρδευση της καλλιέργειας χρησιμοποιήθηκε ηλιόμετρο, το οποίο ρύθμιζε την συχνότητα των ποτισμάτων με βάση την ηλιακή ακτινοβολία ώστε να υπάρχει απορροή περίπου 30% του ΘΔ. Το pH ρυθμιζόταν με νιτρικό οξύ στην τιμή 5,6.

Πίνακας 5.1: Συνταγές θρέψης που εφαρμόστηκαν κατά τη διάρκεια της υδροπονικής καλλιέργειας τομάτας

Παράμετροι	Διαβροχή	Βλαστική Ανάπτυξη	Καρποφορία
	9-5-2019	10-5-2019	25-6-2019
EC dS m ⁻¹	2,90	2,60	2,50
K ⁺ (mmol L ⁻¹)	6,80	7,00	6,80
Ca ²⁺ (mmol L ⁻¹)	6,40	5,10	4,90
Mg ²⁺ (mmol L ⁻¹)	3,00	2,40	2,40
NO ₃ ⁻ (mmol L ⁻¹)	15,50	14,30	14,30
NH ₄ ⁺ (mmol L ⁻¹)	1,10	1,400	1,10
H ₂ PO ₄ ⁻ (mmol L ⁻¹)	1,40	1,500	1,50
Fe (μmol L ⁻¹)	20,00	15,00	15,00
Mn (μmol L ⁻¹)	12,00	10,00	10,00
Zn (μmol L ⁻¹)	6,00	5,00	5,00
Cu (μmol L ⁻¹)	0,80	0,80	0,80
B (μmol L ⁻¹)	40,00	35,00	35,00
Mo (μmol L ⁻¹)	0,50	0,50	0,50

5.2.1.3 Πρόγραμμα φυτοπροστασίας

Κατά τη διάρκεια της καλλιέργειας τηρήθηκαν οι αρχές της IPM εφαρμόζοντας προστατευτικά δίκτυα στα ανοίγματα του θερμοκηπίου και κολλητικές παγίδες για την αποφυγή των εντόμων. Επιπλέον, επτά ημέρες μετά τη μεταφύτευση των φυτών στο υπόστρωμα, πληθυσμός του ωφέλιμου εντόμου *Macrolophus pygmaeus* απελευθερώθηκε ως επιπλέον μέτρο φυτοπροστασίας. Ωστόσο, δέκα ημέρες αργότερα, τα φύλλα ντομάτας προσβλήθηκαν από προνύμφες του λεπιδοπτέρου *T. absoluta*. Τα προσβεβλημένα φύλλα αφαιρέθηκαν μόλις διαπιστώθηκε η προσβολή και ακολούθησε εφαρμογή με εντομοκτόνο σκεύασμα που περιείχε spinosad (42 ημέρες πριν από την πρώτη συγκομιδή).

5.2.1.4 Απολύμανση θρεπτικού διαλύματος και δειγματοληψία

Η απολύμανση του ΘΔ πραγματοποιήθηκε με χρήση υποχλωριώδους νατρίου. Αναλυτικότερα, επιλέχθηκαν οι συγκεντρώσεις 2,5, 5 και 7,5 μg mL⁻¹ χλωρίου στο ΘΔ ώστε να ελεγχθούν δύο ακραίες και μία μέση τιμή χλωρίου με βάση την βιβλιογραφία (Σάββας, 2011) στην επίδρασή τους στα φυτά. Για να υπολογιστούν οι κατάλληλες συγκεντρώσεις χλωρίνης που προστέθηκαν στο τελευταίο πότισμα ώστε να μείνουν τα φυτά με το χλωριωμένο θρεπτικό διάλυμα

θεωρήθηκε ότι το πότισμα γινόταν με 20 λίτρα και ότι η συγκέντρωση του χλωρίου στο σκεύασμα υποχλωριώδους νατρίου είναι 2,14 gr / 100 mL σκευάσματος. Κατά συνέπεια, η ποσότητα που προστέθηκε για κάθε επέμβαση ήταν 7,009 mL χλωρίνης για την επέμβαση των 7,5 $\mu\text{g mL}^{-1}$ χλωρίου, 4,673 mL χλωρίνης για την επέμβαση των 5 $\mu\text{g mL}^{-1}$ χλωρίου και 2,383 mL χλωρίνης για την επέμβαση των 2,5 $\mu\text{g mL}^{-1}$ χλωρίου.

Συνολικά πραγματοποιήθηκαν 3 επεμβάσεις, ανά 15 ημέρες. Η πρώτη επέμβαση την 11-6-2019 πραγματοποιήθηκε περίπου ένα μήνα από την έναρξη της καρπόδεσης (16-5-2019). Πιο συγκεκριμένα, στο τελευταίο πότισμα της ημέρας προστέθηκε η κατάλληλη ποσότητα υποχλωριώδους νατρίου ώστε να παραμείνουν τα φυτά με το χλωριωμένο ΘΔ σε όλη τη διάρκεια της νύχτας. Αναλυτικά οι επεμβάσεις φαίνονται στον Πίνακα 5.2:

Πίνακας 5.2: Οι λεπτομέρειες που αφορούν τις επεμβάσεις απολύμανσης με υποχλωριώδες νάτριο κατά την υδροπονική καλλιέργεια τομάτας

Ημερομηνία	Μέρες από την μεταφύτευση	Κωδικός επέμβασης	Λοιπά σχόλια
11-6-2019	32	A	26 ημέρες από την καρπόδεση
26-6-2019	47	B	15 DAA [=ημέρες μετά την πρώτη (A) εφαρμογή]
10-7-2019	61	C	2 ημέρες πριν την έναρξη της συγκομιδής

Σχετικά με τις δειγματοληψίες, αφορούσαν: στα φύλλα, καρπούς και ρίζες. Αναλυτικότερα, πάρθηκαν δείγματα φύλλων (3^ο-4^ο πλήρως ανεπτυγμένο φύλλο από την κορυφή) πριν την πρώτη εφαρμογή με υποχλωριώδες νάτριο (0 DAA), δέκα μέρες αργότερα (10 DAA), και στα δύο χρονικά σημεία συγκομιδής των καρπών (2 DAC κι 14 DAC). Τα δείγματα καρπών συλλέχθηκαν με τις δύο συγκομιδές που πραγματοποιήθηκαν 9 και 11 εβδομάδες από την μεταφύτευση των φυταρίων. Στο τέλος της καλλιέργειας, επιλέχθηκαν δειγματοληπτικά και ρίζες (20 DAC). Επιπλέον, πάρθηκαν δείγματα από τα διαλύματα απορροής για τον έλεγχο των θρεπτικών στοιχείων και σε αυτά πριν την πρώτη συγκομιδή (1 DAC), 7 ημέρες αργότερα (8 DAC) και στο τέλος της καλλιέργειας (20 DAC).

Συνολικά συλλέχθηκαν δύο δείγματα από δύο διαφορετικά φυτά από κάθε κανάλι, συνεπώς προέκυψαν 4 επαναλήψεις ανά επέμβαση για τα φυτικά δείγματα. Επίσης, πάρθηκαν 2 δείγματα από κάθε κανάλι από τον κουβά όπου συλλεγόταν το διάλυμα απορροής, άρα πάλι 4 επαναλήψεις ανά επέμβαση.

5.2.2 Μελέτη της επίδρασης υποχλωριώδους νατρίου στην ανάπτυξη των φυτών τομάτας

Όλα τα δείγματα φυτικού ιστού ζυγίστηκαν ώστε να καταγραφεί το νωπό τους βάρος και στη συνέχεια τοποθετήθηκαν σε φούρνο στους 65°C για αποξήρανση μέχρι να σταθεροποιηθεί το βάρος τους. Στο σύνολο των δειγμάτων των φύλλων πραγματοποιήθηκαν μετρήσεις νωπού βάρους (fw-fresh weight), ξηρού βάρους (dw-dry weight) και υπολογίστηκε η περιεκτικότητά τους σε ξηρή ουσία (DMC – dry matter content). Παράλληλα, στα χρονικά σημεία της πρώτης εφαρμογής υποχλωριώδους νατρίου και των δύο συγκομιδών μετρήθηκε, επιπλέον, η φυλλική επιφάνεια, υπολογίστηκε η ειδική φυλλική επιφάνεια (SLA - specific leaf area) (Garnier et al., 2001) και έγινε προσδιορισμός της φωτοσυνθετικής δραστηριότητας των φυτών [καθαρός ρυθμός φωτοσύνθεσης (Net photosynthetic rate), στοματική αγωγιμότητα (Stomatal conductance), συγκέντρωση CO₂ στους μεσοκυττάρους χώρους (Intercellular CO₂ concentration) και ρυθμός διαπνοής (Transpiration rate)] με τη χρήση του Li-6400 (Li-Cor, Inc., Lincoln, NE, USA) (Ntatsi and Savvas, 2018). Επιπρόσθετα, υπολογίστηκε η αποτελεσματικότητα της χρήσης νερού (WUE – water use efficiency) ως ο λόγος της αφομοίωσης CO₂ προς τη διαπνοή (παράμετροι που μετρήθηκαν με το Li-6400). Τέλος, μετρήθηκαν το νωπό βάρος, το ξηρό βάρος και η περιεκτικότητα σε ξηρή ουσία στα δείγματα ρίζας.

5.2.3 Μελέτη της επίδρασης υποχλωριώδους νατρίου στη θρεπτική κατάσταση της καλλιέργειας της τομάτας

Αρχικά, τα αποξηραμένα φυτικά δείγματα αλέστηκαν σε ειδικό μύλο και κοσκινίστηκαν (40-mesh) μέχρι να πάρουν μορφή πούδρας. Ακολούθησε η ξηρή τους καύση στους 500°C για 8 ώρες κι η εκχύλισή τους με 10 ml HCl 1M. Τα εκχυλίσματα αποθηκεύτηκαν στους 4°C μέχρι την περαιτέρω επεξεργασία τους. Ακολούθησαν οι μετρήσεις των ολικό άζωτο στα φύλλα και P, K, Cl, Ca κι Mg σε όλα τα φυτικά δείγματα. Επιπρόσθετα, αναλύθηκαν τα NH₄⁺, P, K, Cl, Ca κι Mg στα δείγματα απορροών.

Το συνολικό άζωτο μετρήθηκε στα φύλλα μόνο στη δεύτερη συγκομιδή με τη μέθοδο Kjeldahl (Kjeltec™ 8200 Auto Distillation unit) (Mills and Jones Jr, 1996). Τα αμμωνιακά στα διαλύματα απορροής μετρήθηκαν φωτομετρικά (Anthos Zenyth 200, Biochrom, United States) στα 640 nm. Ο φώσφορος εκτιμήθηκε στο σύνολο των δειγμάτων με τη μέθοδο του φωσφορομολυβδαινικού αμμωνίου. Η μέτρηση έγινε στο ίδιο φωτόμετρο στα 470 nm και 680 nm. Η περιεκτικότητα όλων των δειγμάτων σε κάλιο έγινε με φλογοφωτόμετρο (φλογοφωτομετρία Sherwood Model 410, Cambridge, UK) και η περιεκτικότητα σε χλώριο έγινε με χλωριδόμετρο (ThermoScientific Orion Star A214). Το Ca και Mg μετρήθηκαν στο σύνολο των δειγμάτων με όργανο ατομικής απορρόφησης (Shimadzu AA-7000, Co., Tokyo, Japan).

5.2.4 Εκτίμηση της παραγωγής των φυτών τομάτας

Συνολικά πραγματοποιήθηκαν δύο συγκομιδές για την εκτίμηση της επίδρασης του υποχλωριώδους νατρίου στην παραγωγή των φυτών τομάτας. Η συγκομιδή, ο διαχωρισμός των καρπών σε κλάσεις (extra class, class I, class II και μη εμπορεύσιμοι καρποί), καθώς και ο υπολογισμός της παραγωγής έγινε σύμφωνα με το πρωτόκολλο που έχει περιγραφθεί από τους Savvas et al. (2018) και είναι σύμφωνο με τον Κανονισμό 543/2011 (Regulation 543/2011). Οι συγκομιδές πραγματοποιήθηκαν 12-7-2019 και 24-7-2019, δηλαδή 2 και 14 ημέρες έπειτα από την τελευταία επέμβαση με υποχλωριώδες νάτριο.

5.2.5 Εκτίμηση της επίδρασης του υποχλωριώδους νατρίου στο χρώμα των καρπών τομάτας

Μετά τον διαχωρισμό σε κλάσεις επιλέχθηκαν 3 αντιπροσωπευτικοί καρποί από την extra class για κάθε επέμβαση και πραγματοποιήθηκε μέτρηση των παραμέτρων του χρώματος [α, b και L (lightness = φωτεινότητα)] με χρωματόμετρο (Minolta CR200) ως συντεταγμένες του CIELAB σε δύο διαφορετικά σημεία στην περιφέρεια των καρπών. Επιπλέον, υπολογίστηκαν οι χρωματικοί παράμετροι hue (χροιά), chroma, ο λόγος α/b, colour index (Madrid et al., 2009) και color difference with true red (López Camelo and Gómez, 2004). Στην στατιστική ανάλυση τα δύο χρονικά σημεία εξετάστηκαν μαζί.

5.2.6 Στατιστική ανάλυση αποτελεσμάτων

Όπως αναφέρθηκε νωρίτερα, στο πείραμα ακολουθήθηκε το εντελώς τυχαίοποιημένο σχέδιο όπου εξετάστηκε ένας παράγοντας με τρία επίπεδα και 4 επαναλήψεις ανά επέμβαση. Η στατιστική ανάλυση έγινε με το πρόγραμμα Rstudio και στις αναλύσεις όπου η ανάλυση παραλλακτικότητας (Analysis of Variance - ANOVA) έδειξε στατιστικά σημαντικές διαφορές σε επίπεδο σημαντικότητας 95% ακολούθησαν post-hoc συγκρίσεις σύμφωνα με το κριτήριο Duncan με $P \leq 0,05$.

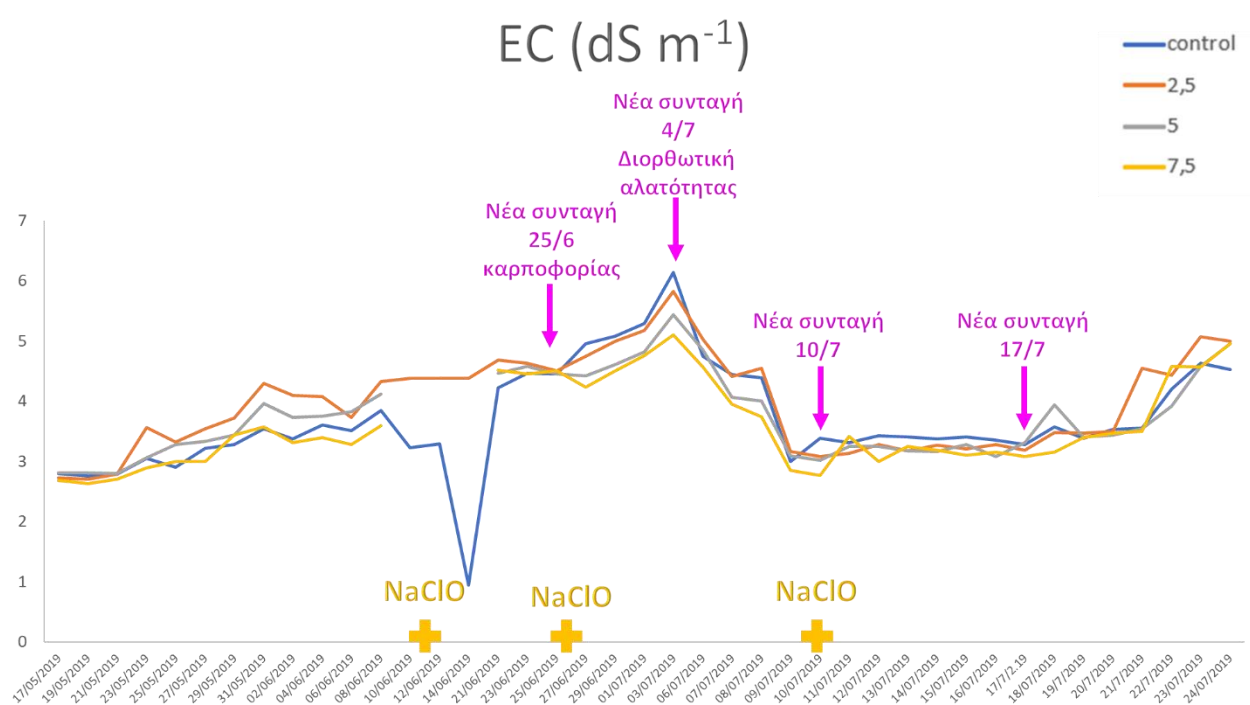
5.3 Αποτελέσματα – Συζήτηση

5.3.1 Η επίδραση της προσθήκης υποχλωριώδους νατρίου στο θρεπτικό διάλυμα στις τιμές αγωγιμότητας (EC) και pH στα διαλύματα απορροών

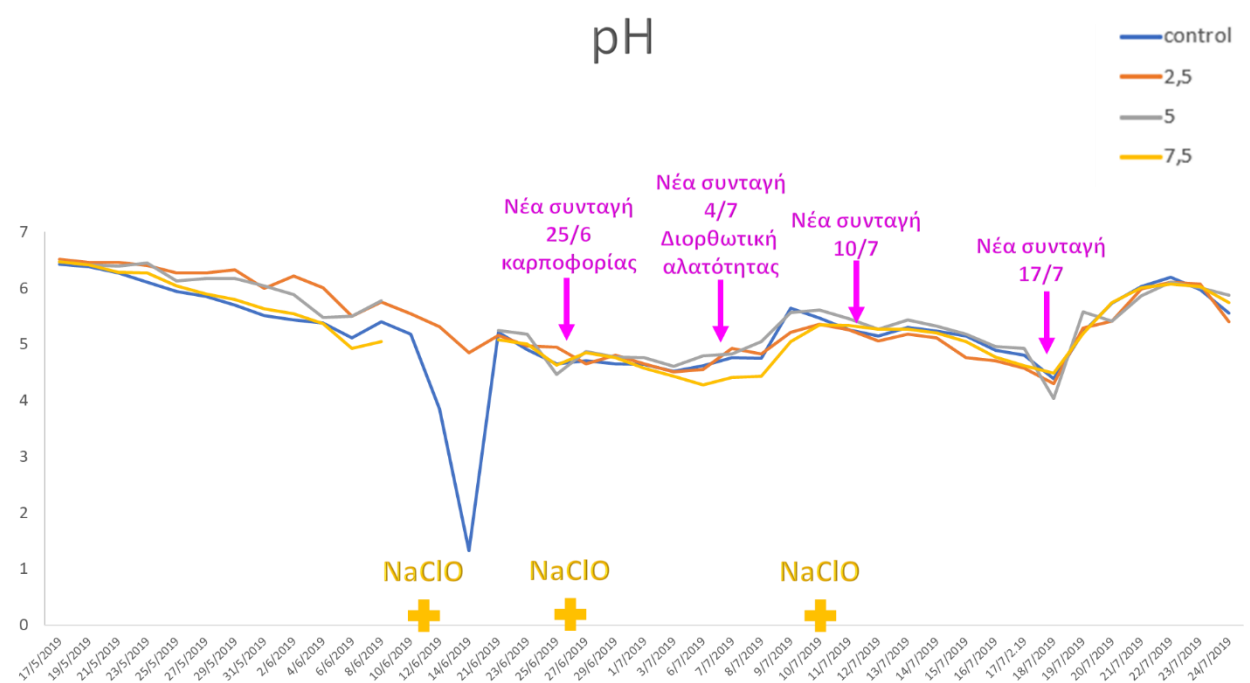
Οι τιμές pH και EC φαίνονται αναλυτικά στους: Συμπληρωματικός Πίνακας 3 και Συμπληρωματικός Πίνακας 4. Όπως φαίνεται και στις Εικόνα 5.3 , Εικόνα 5.4 η απολύμανση με το υποχλωριώδες νάτριο δεν επηρέασε τις τιμές pH και EC. Η επίδραση της απολύμανσης σε επιλεγμένα θρεπτικά στοιχεία φαίνεται, αναλυτικότερα, στην συνέχεια. Ωστόσο, κατά τον έλεγχο των τιμών pH και EC στα διαλύματα απορροών στη διάρκεια της καλλιέργειας παρουσιάστηκε αύξηση της αγωγιμότητας 8 μέρες μετά την δεύτερη απολύμανση με υποχλωριώδες νάτριο (8 DAB) με αποτέλεσμα να χρειαστεί διορθωτική συνταγή για τη ρύθμιση της αλατότητας (Πίνακας 5.3). Στη συνέχεια, αφού λύθηκε το ζήτημα της αλατότητας, εφαρμόστηκε νέα συνταγή καρποφορίας.

Πίνακας 5.3: Διορθωτικές συνταγές θρέψης που εφαρμόστηκαν κατά τη διάρκεια της υδροπονικής καλλιέργειας τομάτας

Παράμετροι	Διορθωτική αλατότητας	Καρποφορία (επαναφορά)	Καρποφορία
	4-7-2019	10-7-2019	17-7-2019
EC dS m ⁻¹	1,60	2,50	2,30
K ⁺ (mmol L ⁻¹)	3,20	7,15	6,00
Ca ²⁺ (mmol L ⁻¹)	3,50	4,80	4,50
Mg ²⁺ (mmol L ⁻¹)	1,40	2,50	2,30
NO ₃ ⁻ (mmol L ⁻¹)	9,00	13,75	13,75
NH ₄ ⁺ (mmol L ⁻¹)	0,65	0,78	0,90
H ₂ PO ₄ ⁻ (mmol L ⁻¹)	1,20	1,40	1,40
Fe (μmol L ⁻¹)	14,00	15,00	15,00
Mn (μmol L ⁻¹)	8,00	10,00	10,00
Zn (μmol L ⁻¹)	5,00	5,00	5,00
Cu (μmol L ⁻¹)	0,60	0,80	0,80
B (μmol L ⁻¹)	20,00	30,00	30,00
Mo (μmol L ⁻¹)	0,50	0,50	0,50



Εικόνα 5.3: Οι τιμές EC στα διαλύματα απορροών όπως διαμορφώθηκαν κατά τη διάρκεια της υδροπονικής καλλιέργειας τομάτας



Εικόνα 5.4: Οι τιμές pH στα διαλύματα απορροών όπως διαμορφώθηκαν κατά τη διάρκεια της υδροπονικής καλλιέργειας τομάτας

5.3.2 Η επίδραση της απολύμανσης του θρεπτικού διαλύματος στην ανάπτυξη των φυτών τομάτας και την ανταλλαγή αερίων κατά τη φωτοσύνθεση

Η απολύμανση με υποχλωριώδες νάτριο δεν φάνηκε να επηρεάζει την ανάπτυξη των φύλλων και των ριζών κατά τη διάρκεια της καλλιέργειας. Αυτό γίνεται φανερό από τις μετρήσεις μάζας και περιεκτικότητας σε ξηρή ουσία για τις ρίζες και τα φύλλα καθώς και φυλλικής επιφάνειας και ειδικής φυλλικής επιφάνειας για τα φύλλα, οι οποίες δεν έδειξαν στατιστικά σημαντικές διαφορές μεταξύ των επεμβάσεων σε κανένα χρονικό σημείο που εξετάστηκε (Πίνακας 5.4 και Πίνακας 5.5).

Γενικότερα, μελέτες που αφορούν την επίδραση του χλωρίου σε φυτά έχουν γίνει αρκετά χρόνια παλαιότερα και συνοψίζονται από τους Zheng et al. (2008). Αναλυτικότερα, στα συμπτώματα της επίδραση του χλωρίου στα φυτά έχουν καταγραφεί χλώρωση και νεκρωτικές κηλίδες (Schreuder and Brewer 2001a) καθώς και γενικότερη μείωση της ανάπτυξης (Karaivazoglou et al., 2005, Schreuder and Brewer, 2001b). Την ίδια περίοδο χρονικά οι Cayan et al. (2008, 2009) εξέτασαν την ευαισθησία στο χλώριο κατά την απολύμανση του νερού άρδευσης με υποχλωριώδες ασβέστιο διάφορων καλλωπιστικών φυτών και κατέληξαν ότι η απολύμανση με $2,4 \text{ mg L}^{-1}$ χλωρίου για 5 min είναι ασφαλής συγκέντρωση για αυτά.

Πίνακας 5.4: Μετρήσεις νωπού βάρους (fw), ξηρού βάρους (dw), φυλλικής επιφάνειας (cm^2) και υπολογισμοί ποσοστού ξηρής ουσίας (DMC) και ειδικής φυλλικής επιφάνειας (SLA) στα φύλλα.

	Επεμβάσεις	fw (mg)	dw (mg)	DMC (%)	SLA ($\text{m}^2 \text{ kg}^{-1} \text{ dw}$)	Φυλλική επιφάνεια (cm^2)
(11-6-2019) 0DAA	μάρτυρας	61,84	7,07	11,80	131,45	935,75
	2,5	53,40	5,80	10,88	146,20	846,00
	5,0	51,75	5,89	11,28	149,04	854,25
	7,5	56,42	5,93	10,56	109,61	678,00
	Σημαντικότητα	ΜΣ	ΜΣ	ΜΣ	ΜΣ	ΜΣ
(12-7-2019) 2DAC (31DAA)	μάρτυρας	28,46	3,90	13,77	85,95	330,99
	2,5	30,32	4,13	13,40	82,24	321,74
	5,0	32,30	4,32	13,52	84,75	368,51
	7,5	36,78	4,67	12,57	104,82	452,68
	Σημαντικότητα	ΜΣ	ΜΣ	ΜΣ	ΜΣ	ΜΣ
(24-7-2019) 14DAC(43DAA)	μάρτυρας	13,95	2,27	16,15	104,34	233,11
	2,5	17,01	2,65	15,20	113,17	281,17
	5,0	19,39	3,03	15,27	91,35	230,91
	7,5	23,53	3,73	15,62	80,64	221,26
	Σημαντικότητα	ΜΣ	ΜΣ	ΜΣ	ΜΣ	ΜΣ

Σε κάθε στήλη δεδομένων σημειώνονται οι μέσοι όροι των διαφορετικών μεταχειρίσεων ($n = 4$) για κάθε χαρακτηριστικό

ΜΣ= μη στατιστικά σημαντικές διαφορές

Πίνακας 5.5: Μετρήσεις νωπού βάρους (fw), ξηρού βάρους (dw), και υπολογισμός ποσοστού ξηρής ουσίας (DMC) στις 20 ημέρες μετά την τρίτη εφαρμογή σε ρίζες.

Επεμβάσεις (30-7-2019)	νωπό βάρος (mg)	ξηρό βάρος (mg)	ποσοστό ξηρής ουσίας (%)
μάρτυρας	91,72	21,65	0,25
2,5	97,07	19,58	0,20
5	85,24	17,84	0,26
7,5	82,45	19,65	0,25
Σημαντικότητα	ΜΣ	ΜΣ	ΜΣ

Σε κάθε στήλη δεδομένων σημειώνονται οι μέσοι όροι των διαφορετικών μεταχειρίσεων (n = 4) για κάθε χαρακτηριστικό

ΜΣ = μη στατιστικά σημαντικές διαφορές

Σε μελέτες που έχουν γίνει σε κηπευτικά είδη, έχουν καταγραφεί συμπτώματα φυτοτοξικότητας σε τομάτες, αγγούρια και πιπεριές για συγκεντρώσεις χλωρίου μεγαλύτερες των 5 mg L⁻¹ (Wohanka, 2002, Σάββας, 2011). Παρ' όλα αυτά, υπάρχει αναφορά εφαρμογής χλωρίου σε συγκεντρώσεις 15-25 ppm χωρίς συμπτώματα φυτοτοξικότητας (Ehret et al., 2001). Πιο πρόσφατα, συμπτώματα φυτοτοξικότητας καταγράφηκαν σε καλλιέργειες μαρουλιού και μάραθου στον αγρό που ποτίζονταν με αστικά λύματα που είχαν απολυμανθεί με υποχλωριώδες νάτριο (συγκεντρώσεις 0,5 and 10 mg L⁻¹) (Lonigro et al., 2017). Επίσης, οι Lonigro et al. (2017) έδειξαν ότι πότισμα με υποχλωριώδες νάτριο ακόμα και στη συγκέντρωση 0,2 mg L⁻¹ μπορεί να προκαλέσει στρες σε καλλιέργεια μαρουλιού σε γλαστράκια, ανάλογα με τον τύπο εδάφους, επιδρώντας αρνητικά στην βλαστική ανάπτυξη και στην ανάπτυξη των ριζών.

Ωστόσο, στις αναφερόμενες μελέτες εξετάστηκαν διαφορετικές μορφές του χλωρίου (αέριο, διοξείδιο του χλωρίου, κλπ.) με διαφορετικά πρωτόκολλα εφαρμογής της απολύμανσης. Συνεπώς, η άμεση σύγκριση των αποτελεσμάτων δεν είναι εφικτή. Σήμερα, είναι γνωστό ότι το χλώριο σε συγκεντρώσεις μεγαλύτερες των 5 mg L⁻¹ μπορεί να προκαλέσει φυτοτοξικότητα στα περισσότερα φυτά και υπάρχουν φυτά ευαίσθητα ακόμα και σε συγκεντρώσεις 0,05 mg L⁻¹ (US EPA, 2012). Εμείς επιλέξαμε την απολύμανση με χλωρίνη καθώς είναι οικονομική για τους παραγωγούς, αποτελεσματική εναντίον σημαντικών φυτοπαθογόνων, διαδεδομένη στην γεωργική πρακτική κι αντίθετα με άλλες χημικές μεθόδους το υποχλωριώδες νάτριο δεν αποδομείται γρήγορα, με αποτέλεσμα να έχει μεγαλύτερης διάρκειας απολυμαντική ικανότητα.

Τα αποτελέσματα της παρούσας μελέτης σχετικά με την επίδραση της απολύμανσης με χλωρίνη στην ανάπτυξη της τομάτας συμπίπτουν με τον κανόνα των 5 mg L⁻¹ (US EPA, 2012). Μάλιστα, φάνηκε ότι στη συγκεκριμένη μέθοδο απολύμανσης η εφαρμογή υποχλωριώδους νατρίου δεν επιδρά στην ανάπτυξη των φυτών τομάτας ποικιλίας 'ELPIDA' ακόμα και στην συγκέντρωση 7,5 mg L⁻¹ χλωρίου.

Αντίστοιχα ήταν και τα αποτελέσματα για την ανταλλαγή αερίων κατά τη φωτοσύνθεση (Πίνακας 5.6). Στις διάφορες παραμέτρους της φωτοσύνθεσης που εξετάστηκαν δεν παρατηρήθηκαν στατιστικά σημαντικές διαφορές μεταξύ των επεμβάσεων. Παρ' όλα, αυτά υπάρχουν παραδείγματα, στα οποία έχει αποδειχθεί ότι αέριο χλώριο επιδρά στη φωτοσύνθεση φυτών *Pinus* μειώνοντας τη φωτοσυνθετική τους ικανότητα (Schreuder and

Brewer, 2001b). Επίσης, είναι γνωστό ότι το χλώριο ως μακροστοιχείο μπορεί να είναι ωφέλιμο επιδρώντας στην φωτοσύνθεση στα φυτά (Wege et al., 2017), καθιστώντας έτσι δυνατή την αντικατάσταση μέρους του αζώτου στο θρεπτικό διάλυμα. Παράδειγμα αυτής της περίπτωσης αποτελούν φυτά τομάτας (Neocleous et al., 2021) και καπνού (Franco-Navarro et al., 2015) όπου επηρεάστηκε η στοματική αγωγιμότητα. Ωστόσο, οι συγκεντρώσεις που εξετάστηκαν εδώ, στο συγκεκριμένο πείραμα, ήταν χαμηλές και δεν οδήγησαν σε κάποια διαφοροποίηση.

Πίνακας 5.6: Ανταλλαγή αερίων κατά τη φωτοσύνθεση

Επεμβάσεις		Συγκέντρωση CO ₂				Αποτελεσματικότητα της χρήσης νερού
		Καθαρός ρυθμός φωτοσύνθεσης	Στοματική αγωγιμότητα	στον μεσοκυττάριους χώρους	Ρυθμός διαπνοής	
		($\mu\text{mol CO}_2 \text{ m}^{-2} \text{ s}^{-1}$)	($\text{mmol H}_2\text{O m}^{-2} \text{ s}^{-1}$)	($\mu\text{mol CO}_2 \text{ m}^{-2} \text{ s}^{-1}$)	($\text{mmol H}_2\text{O m}^{-2} \text{ s}^{-1}$)	($\mu\text{mol CO}_2 \text{ m}^{-2} \text{ s}^{-1} / \text{mmol H}_2\text{O m}^{-2} \text{ s}^{-1}$) ¹⁾
(11-6-2019)	μάρτυρας	20,94	0,54	286,70	5,30	4,04
	2,5	23,64	0,69	295,79	5,84	4,11
	5,0	20,08	0,49	263,06	4,35	5,23
	7,5	18,22	0,52	257,63	4,69	4,95
	Σημαντικότητα	ΜΣ	ΜΣ	ΜΣ	ΜΣ	ΜΣ
(12-7-2019)	μάρτυρας	11,19	0,13	223,06	1,74	6,44
	2,5	9,10	0,10	228,59	1,34	6,49
	5,0	6,62	0,07	168,89	1,06	8,28
	7,5	8,39	0,15	273,95	1,92	4,40
	Σημαντικότητα	ΜΣ	ΜΣ	ΜΣ	ΜΣ	ΜΣ
(24-7-2019)	μάρτυρας	6,45	0,18	279,08	2,07	3,25
	2,5	8,11	0,22	296,99	2,72	3,03
	5,0	6,25	0,13	298,64	2,26	2,75
	7,5	6,51	0,23	324,69	3,06	2,03
	Σημαντικότητα	ΜΣ	ΜΣ	ΜΣ	ΜΣ	ΜΣ

Σε κάθε στήλη δεδομένων σημειώνονται οι μέσοι όροι των διαφορετικών μεταχειρίσεων (n = 4) για κάθε χαρακτηριστικό
ΜΣ = μη στατιστικά σημαντικές διαφορές

5.3.3 Επισκόπηση της επίδρασης της απολύμανσης του θρεπτικού διαλύματος στη θρέψη των φυτών

Οι αναλύσεις των θρεπτικών στοιχείων έδειξαν κάποιες στατιστικά σημαντικές διαφορές. Ωστόσο, στο σύνολο των αναλύσεων στα φυτικά δείγματα δεν παρατηρήθηκε κάποια συγκεκριμένη τάση σε σχέση με τις στατιστικά σημαντικές διαφορές.

5.3.3.1 Πρόσληψη θρεπτικών στοιχείων από τα φύλλα

Η στατιστική ανάλυση των θρεπτικών στοιχείων ολικό άζωτο (N), φώσφορο (P), κάλιο (K), χλώριο (Cl), ασβέστιο (Ca) και μαγνήσιο (Mg) στα φύλλα δεν έδειξε κάποια συστηματική διαφορά μεταξύ των επεμβάσεων στα διάφορα χρονικά σημεία των δειγματοληψιών. Συνεπώς, η προσθήκη υποχλωριώδους νατρίου στην υδροπονική καλλιέργεια τομάτας έως τη συγκέντρωση των 7,5 $\mu\text{g mL}^{-1}$ δεν φάνηκε να επηρεάζει τη συγκέντρωση των θρεπτικών στοιχείων στα φύλλα. Αναλυτικά τα αποτελέσματα φαίνονται στον Πίνακα 5.7. Αξιοσημείωτο είναι ότι δεν επηρεάστηκε η συγκέντρωση χλωρίου στα φύλλα μετά τις επεμβάσεις.

Πίνακας 5.7: Μετρήσεις θρεπτικών στοιχείων ($\text{mg g}^{-1} \text{ dw}$) σε φύλλα

	Επεμβάσεις	N (%)	P	K	Cl	Ca	Mg
(11-6-2019) 0DAA	μάρτυρας		5,87	49,00	9,29 b	11,78	7,83
	2,5		5,69	60,00	10,76 ab	10,49	7,26
	5		5,66	43,50	9,52 b	10,27	9,30
	7,5		6,11	49,00	11,46 a	10,50	8,11
	Σημαντικότητα		MΣ	MΣ	*	MΣ	MΣ
(20-6-2019) 9DAA	μάρτυρας		3,60	18,00 b	7,03	68,76 a	20,59 a
	2,5		3,41	24,75 a	8,49	62,07 b	17,81 b
	5		3,61	19,50 ab	8,48	66,60 ab	19,58 ab
	7,5		3,38	24,00 ab	8,42	60,59 b	17,43 b
	Σημαντικότητα		MΣ	*	MΣ	*	*
(12-7-2019) 2DAC	μάρτυρας		6,63	84,00	8,85	28,26	7,82
	2,5		6,36	83,50	10,38	29,32	8,66
	5		7,04	81,25	7,74	28,37	9,29
	7,5		6,74	99,25	10,78	31,31	8,73
	Σημαντικότητα		MΣ	MΣ	MΣ	MΣ	MΣ
(24-7-2019) 14DAC	μάρτυρας	3,89	3,70 b	37,88	9,27	20,49	5,95
	2,5	3,46	4,74 ab	37,00	11,82	20,65	6,42
	5	3,89	5,40 a	35,25	9,86	21,20	7,25
	7,5	3,69	4,46 ab	40,50	10,98	26,59	7,35
	Σημαντικότητα	MΣ	*	MΣ	MΣ	MΣ	MΣ

Οι διαφορετικοί χαρακτήρες δίπλα στους μέσους όρους (μ.ο.) των διαφορετικών χαρακτηριστικών δηλώνουν στατιστικά σημαντικές διαφορές με επίπεδο σημαντικότητας ($P \leq 5\%$). Ο διαχωρισμός των μ.ο. πραγματοποιήθηκε με βάση το κριτήριο Duncan.

MΣ = non-significant, δλδ μη σημαντικές διαφορές και * = σημαντικές διαφορές σε επίπεδο $P \leq 0.05$

Αναλυτικότερα, η συγκέντρωση των θρεπτικών στοιχείων στα φύλλα κυμάνθηκε για το φώσφορο 3,38-7,04 mg g⁻¹, για το κάλιο 19,50-99,25 mg g⁻¹, το χλώριο 7,03-11,82 mg g⁻¹, το ασβέστιο 10,27-68,76 mg g⁻¹ και το μαγνήσιο 5,95-20-59 mg g⁻¹. Η ανάλυση ολικού αζώτου στην τελευταία δειγματοληψία έδειξε ότι τα δείγματα περιείχαν 3,46-3,89% άζωτο. Όπως προαναφέρθηκε, δεν βρέθηκαν στατιστικά σημαντικές διαφορές μεταξύ των επεμβάσεων, για αυτό το λόγο δεν κρίθηκε απαραίτητη η ανάλυση των φυτικών δειγμάτων από τα άλλα χρονικά σημεία δειγματοληψίας.

5.3.3.2 Πρόσληψη θρεπτικών στοιχείων από τους καρπούς

Αντίστοιχα με την ανάλυση θρεπτικών στοιχείων στα φύλλα δεν παρατηρήθηκαν συστηματικά στατιστικά σημαντικές διαφορές στην ανάλυση των καρπών για να βγει κάποιο συμπέρασμα σχετικά με την επίδραση της απολύμανσης στην συγκέντρωση των μακροστοιχείων που αναλύθηκαν στους καρπούς. Στην πρώτη συγκομιδή (2DAC) παρατηρήθηκαν διαφορές στην περιεκτικότητα σε μαγνήσιο (Mg), και συγκεκριμένα φάνηκε ότι η απολύμανση με υποχλωριώδες νάτριο στη συγκέντρωση των 2,5 μg mL⁻¹ οδηγεί στη σημαντική αύξηση της συγκέντρωσης του μαγνησίου στους καρπούς συγκριτικά με το μάρτυρα και την επέμβαση των 7,5 μg mL⁻¹ (Πίνακας 5.8). Επίσης, η περιεκτικότητα του χλωρίου (Cl) στους καρπούς κατά την δεύτερη συγκομιδή (14DAC) ήταν σημαντικά μεγαλύτερη στην επέμβαση των 7,5 μg mL⁻¹ συγκριτικά με τις υπόλοιπες επεμβάσεις και το μάρτυρα (Πίνακας 5.8). Τέλος, φάνηκε ότι η επίδραση της παραμέτρου χρόνος*επέμβαση είναι σημαντική στην περίπτωση του χλωρίου.

Πίνακας 5.8: Μετρήσεις θρεπτικών στοιχείων (mg g⁻¹ dw) σε καρπούς

	Επεμβάσεις	P	K	Cl	Ca	Mg
12-7-2019 2DAC	μάρτυρας	3,98	87,25	2,92	0,18	1,45 b
	2,5	3,55	98,00	3,51	0,19	1,80 a
	5	4,10	95,25	3,21	0,21	1,65 ab
	7,5	3,74	86,50	2,88	0,19	1,52 b
	Σημαντικότητα	MΣ	MΣ	MΣ	MΣ	*
(24-7-2019) 14DAC	μάρτυρας	3,16	43,50	2,53 b	0,19	1,54
	2,5	3,30	46,00	2,49 b	0,16	1,66
	5	3,65	47,25	2,72 b	0,17	1,59
	7,5	2,43	41,50	3,11 a	0,16	1,53
	Σημαντικότητα	MΣ	MΣ	**	MΣ	MΣ

Οι διαφορετικοί χαρακτήρες δίπλα στους μέσους όρους (μ.ο.) των διαφορετικών χαρακτηριστικών δηλώνουν στατιστικά σημαντικές διαφορές με επίπεδο σημαντικότητας (P ≤ 5%). Ο διαχωρισμός των μ.ο. πραγματοποιήθηκε με βάση το κριτήριο Duncan.

MΣ = μη στατιστικά σημαντικές διαφορές, * = στατιστικά σημαντικές διαφορές σε επίπεδο P ≤ 0,05, ** = στατιστικά σημαντικές διαφορές σε επίπεδο P ≤ 0,01

Γενικότερα, η συγκέντρωση των θρεπτικών στοιχείων στους καρπούς κυμάνθηκε για το φώσφορο 2,43-4,10 mg g⁻¹, για το κάλιο 41,50-98,00 mg g⁻¹, το χλώριο 2,49-3,51 mg g⁻¹, το ασβέστιο 0,16-0,21 mg g⁻¹ και το μαγνήσιο 1,53-1,80 mg g⁻¹.

5.3.3.3 Πρόσληψη θρεπτικών στοιχείων από τις ρίζες

Στον Πίνακα 5.9 φαίνονται οι μετρήσεις των θρεπτικών μακροϊόντων που αναλύθηκαν και του χλωρίου από τα δείγματα ριζών που πάρθηκαν. Η στατιστική ανάλυση έδειξε ότι η απολύμανση με υποχλωριώδες νάτριο σύμφωνα με το πρωτόκολλο που ακολουθήθηκε δεν επηρέασε τη συγκέντρωση των θρεπτικών στοιχείων σε καμία από τις συγκεντρώσεις που εξετάστηκαν. Η συγκέντρωση των θρεπτικών στοιχείων στις ρίζες ήταν για το φώσφορο 4,51-6,86 mg mL⁻¹, για το κάλιο 9,63-15,25 mg g⁻¹, το χλώριο 4,54-5,64 mg g⁻¹, το ασβέστιο 8,71-11,96 mg g⁻¹ και το μαγνήσιο 9,55-12,07 mg g⁻¹.

Πίνακας 5.9: Μετρήσεις θρεπτικών στοιχείων (mg g⁻¹ dw) στις 20DAC σε ρίζες

Επεμβάσεις (30-7-2019)	P	K	Cl	Ca	Mg
μάρτυρας	4,51	9,63	5,00	11,96	12,07
2,5	6,14	12,50	4,54	8,71	9,55
5	6,86	14,38	5,64	10,43	11,50
7,5	4,69	15,25	5,24	9,15	10,05
Σημαντικότητα	ΜΣ	ΜΣ	ΜΣ	ΜΣ	ΜΣ

Σε κάθε στήλη δεδομένων σημειώνονται οι μέσοι όροι των διαφορετικών μεταχειρίσεων (n = 4) για κάθε χαρακτηριστικό

ΜΣ = μη στατιστικά σημαντικές διαφορές

Εδώ πρέπει να επισημανθεί ότι και στις ρίζες όπως και στα υπόλοιπα φυτικά δείγματα δεν παρουσιάστηκαν συστηματικά στατιστικά σημαντικές διαφορές στη συγκέντρωση του χλωρίου στα διάφορα χρονικά σημεία. Γενικά το χλώριο (Cl⁻) θεωρείται ένα ζημιογόνο ανιόν για τα φυτά, καθώς όταν βρίσκεται στο έδαφος συνοδεύεται συνήθως και από νάτριο (Na⁺). Το χλώριο είναι απαραίτητο ιχνοστοιχείο στους χλωροπλάστες όπου συμμετέχει στην οξείδωση του νερού στο φωτοσύστημα II (Homman, 1986), και πιθανώς ελέγχει την λειτουργία κάποιων ενζύμων που συμμετέχουν στο διαχωρισμό των κυττάρων. Επίσης, μπορεί να απορροφηθεί από τα φυτά από χαμηλές [0,1-0,2 mg g⁻¹ (Wege et al., 2017)] έως υψηλές συγκεντρώσεις [2–20 mg g⁻¹ (Colmenero-Flores et al., 2019)]. Για αυτόν το λόγο του αποδίδονται λειτουργίες ωφέλιμες για τα φυτά όπως η ωσμωρρύθμιση, κ.ά. (Geilfus, 2018, Raven, 2017). Στην παρούσα μελέτη το χλώριο ανιχνεύθηκε σε συγκεντρώσεις 2,49-11,82 mg g⁻¹ στα φυτικά δείγματα που συλλέχθηκαν και φάνηκε ότι η προσθήκη χλωρίνης στο ΘΔ δεν επηρέασε την απορρόφησή του από τα φυτά. Επίσης, φάνηκε ότι το χλώριο απορροφήθηκε από τις ρίζες των φυτών και μεταφέρθηκε στα στελέχη, όπως φαίνεται από τις υψηλές συγκεντρώσεις χλωρίου στα φύλλα σε επίπεδο μακροστοιχείων, γεγονός που συμφωνεί με τους Neocleous et al. (2021).

Γενικά, η υψηλή συγκέντρωση χλωρίου στους ιστούς, θεωρείται ότι περιορίζει την ανάπτυξη στα γλυκόφυτα (Henderson et al., 2014, Teakle and Tyerman, 2010). Οι λόγοι πίσω από αυτό το φαινόμενο δεν είναι ξεκάθαροι (Geilfus, 2018) και πιθανώς διαφέρουν στα διάφορα ευαίσθητα φυτά όπως το *Lotus corniculatus* (Sanchez et al., 2011), τα εσπεριδοειδή (Brumos et al., 2010) και το αμπέλι (Henderson et al., 2014), τα οποία παρουσιάζουν φυτοτοξικότητα σε συγκεντρώσεις 4-7 mg g⁻¹ dw, ενώ λιγότερο ευαίσθητα φυτά σε συγκεντρώσεις 15-33 mg g⁻¹ dw (Xu et al., 1999). Η τομάτα έχει υψηλή ανοχή στη συγκέντρωση χλωρίου συγκριτικά με τα κηπευτικά που καλλιεργούνται στο θερμοκήπιο (Neocleous et al., 2021, Savvas et al., 2011). Επιπλέον, έχει αναφερθεί βιβλιογραφικά ότι η προσθήκη χλωριούχου ασβεστίου στο ΘΔ για την διατήρηση της συγκέντρωσης χλωρίου στα 8-10 mM μειώνει φυσιολογικές ανωμαλίες στους καρπούς της τομάτας (λευκές και πράσινες κηλίδες, blossom end rot) (Gruda, 2009, Schnitzler and Gruda, 2002). Στην παρούσα μελέτη η προσθήκη υποχλωριώδους νατρίου δεν φάνηκε να επηρεάζει τη συγκέντρωση του χλωρίου στα φυτά με εξαίρεση τους καρπούς που συγκομίστηκαν δύο εβδομάδες μετά την τελευταία εφαρμογή. Ωστόσο, οι συγκεντρώσεις χλωρίου που ανιχνεύτηκαν στα φυτικά δείγματα είναι μικρότερες από αυτές που αναφέρονται στη βιβλιογραφία ότι προκαλούν προβλήματα.

5.3.3.4 Συγκέντρωση θρεπτικών στοιχείων στα διαλύματα απορροής

Η ανάλυση θρεπτικών στοιχείων στα διαλύματα απορροής μετά την τελευταία εφαρμογή υποχλωριώδους νατρίου έδειξε στατιστικά σημαντικές διαφορές για το κάλιο, χλώριο, ασβέστιο και μαγνήσιο (Πίνακας 5.10). Φαίνεται με βάση τη στατιστική ανάλυση ότι η πρόσληψη καλίου, ασβεστίου και μαγνησίου ήταν σημαντικά μικρότερη στα φυτά του μάρτυρα συγκριτικά με τις επεμβάσεις. Ωστόσο κάτι τέτοιο δεν επιβεβαιώνεται από την ανάλυση θρεπτικών στοιχείων σε φύλλα, καρπούς και ρίζες (§5.3.3.1, §5.3.3.2, §5.3.3.3).

Σχετικά με τις διαφορές που σημειώθηκαν στην συγκέντρωση χλωρίου η στατιστικά μεγαλύτερη συγκέντρωση χλωρίου ανιχνεύτηκε στο διάλυμα απορροής της επέμβασης των 7,5 μg mL⁻¹ συγκριτικά με τον μάρτυρα και την επέμβαση των 2,5 μg mL⁻¹. Αυτό είναι πιθανώς αποτέλεσμα της επιπλέον προσθήκης χλωρίου (ως υποχλωριώδες νάτριο), χωρίς παράλληλα την επιπλέον πρόσληψή του από τα φυτά για τα χρονικά σημεία αμέσως μετά την τρίτη εφαρμογή. Αυτό με βάση τα αποτελέσματα για το χλώριο στις 2 DAC στα φυτικά δείγματα που πάρθηκαν επιβεβαιώνεται (Πίνακας 5.6, Πίνακας 5.7, Πίνακας 5.8).

Παρακάτω, στον Πίνακα 5.9, φαίνεται η συγκέντρωση των θρεπτικών στοιχείων στα διαλύματα απορροής λίγο πριν τη δεύτερη συγκομιδή (1 DAC και 8 DAC) και στον Πίνακα 5.20 φαίνονται τα αποτελέσματα στο τέλος της καλλιέργειας (20 DAC). Με βάση τα αποτελέσματα, η επέμβαση των 5 μg mL⁻¹ είχε στατιστικά την μικρότερη συγκέντρωση σε αμμωνιακά ιόντα στα διαλύματα απορροής. Ωστόσο, με βάση τα αποτελέσματα ολικού αζώτου στα φύλλα στις 14 DAC, δεν φαίνεται η μειωμένη συγκέντρωση αμμωνιακών να συνδέεται με αυξημένη απορρόφηση αζώτου στα φύλλα (Πίνακας 5.6). Δεδομένου, όμως, ότι δεν πραγματοποιήθηκε

ανάλυση αζώτου στα υπόλοιπα φυτικά δείγματα δεν ξέρουμε τι συνέβη συνολικά στα φυτά τομάτας. Δεν παρατηρήθηκαν άλλες στατιστικά σημαντικές διαφορές. Τα θρεπτικά στοιχεία που αναλύθηκαν ανιχνεύθηκαν σε συγκεντρώσεις 13,49-61,08 $\mu\text{g mL}^{-1}$ τα αμμωνιακά ιόντα, 35,92-90,93 $\mu\text{g mL}^{-1}$ ο φώσφορος, 470,00-862,50 $\mu\text{g mL}^{-1}$ το κάλιο, 6,30-9,42 $\mu\text{g mL}^{-1}$ το χλώριο, 26,84-37,90 $\mu\text{g mL}^{-1}$ το ασβέστιο και 9,31-13,36 $\mu\text{g mL}^{-1}$ το μαγνήσιο.

Πίνακας 5.10: Μετρήσεις θρεπτικών στοιχείων (mg L^{-1}) στα διαλύματα απορροής

	Επεμβάσεις	NH_4	P	K	Cl	Ca	Mg
(30-7-2019) 1DAC	μάρτυρας	37,93	42,65	862,50 a	6,30 b	37,90 a	14,32 a
	2,5	36,70	39,90	670,00 b	7,29 b	26,84 b	10,05 b
	5	24,07	37,82	715,00 b	7,49 ab	30,95 b	10,53 b
	7,5	38,17	35,92	617,50 b	9,05 a	27,38 b	9,31 b
	Σημαντικότητα	ΜΣ	ΜΣ	***	*	**	***
(18-7-2019) 8DAC	μάρτυρας	61,08 a	60,31	815,00	8,45	30,91	12,64
	2,5	55,55 a	57,76	780,00	7,93	30,80	12,69
	5	40,69 b	57,06	820,00	8,27	31,71	12,87
	7,5	53,26 a	54,97	747,50	7,64	32,92	11,31
	Σημαντικότητα	**	ΜΣ	ΜΣ	ΜΣ	ΜΣ	ΜΣ
(30-7-2019) 20DAC	μάρτυρας	22,21 a	76,99	485,00	9,42	31,46	12,16
	2,5	23,40 a	90,93	560,00	9,28	34,63	13,36
	5	13,49 b	89,36	485,00	9,04	30,93	11,88
	7,5	26,86 a	89,64	470,00	8,12	29,40	11,13
	Σημαντικότητα	**	ΜΣ	ΜΣ	ΜΣ	ΜΣ	ΜΣ

Οι διαφορετικοί χαρακτήρες δίπλα στους μέσους όρους (μ.ο.) των διαφορετικών χαρακτηριστικών δηλώνουν στατιστικά σημαντικές διαφορές με επίπεδο σημαντικότητας ($P \leq 5\%$). Ο διαχωρισμός των μ.ο. πραγματοποιήθηκε με βάση το κριτήριο Duncan.

ΜΣ = μη στατιστικά σημαντικές διαφορές, * = στατιστικά σημαντικές διαφορές σε επίπεδο $P \leq 0,05$, ** = στατιστικά σημαντικές διαφορές σε επίπεδο $P \leq 0,01$, *** = στατιστικά σημαντικές διαφορές σε επίπεδο $P \leq 0,001$

Παρά το γεγονός ότι η χλωρίωση είναι μια δημοφιλής μέθοδος απολύμανσης του ΘΔ στην υδροπονική καλλιέργεια, δεν θεωρείται ότι εφαρμόζεται στο μέγιστο των δυνατοτήτων της, κυρίως λόγω τεχνικών ζητημάτων που σχετίζονται με την παρακολούθηση του ελεύθερου διαθέσιμου χλωρίου (De Hayr et al., 1994). Τα περισσότερα φυτοπαθογόνα ελέγχονται από συγκεντρώσεις χλωρίου 1-3 $\mu\text{g mL}^{-1}$, ωστόσο απαιτούνται υψηλότερες αρχικές συγκεντρώσεις

(5-10 mg L⁻¹) καθώς το χλώριο αντιδρά με διάφορες άλλες ουσίες στο ΘΔ όπως ιόντα σιδήρου και αμμωνίου (Clark και Smajstrla 1992, De Hayr et al. 1994, Daughtry 1984).

Εδώ, η συγκέντρωση χλωρίου στα διαλύματα απορροής ήταν τουλάχιστον 6,30 μg mL⁻¹ τιμή που ανιχνεύθηκε στο μάρτυρα μία μέρα μετά την τρίτη εφαρμογή χλωρίνης, και ήταν σημαντικά μεγαλύτερη στις επεμβάσεις για το ίδιο χρονικό σημείο. Αν υποθέσουμε ότι αυτή η τιμή αντιστοιχεί σε ελεύθερο χλώριο, σύμφωνα με τη βιβλιογραφία, αυτή η συγκέντρωση είναι αρκετή για να θανατώσει στελέχη του *Pythium* sp. (Cayanan et al., 2008), ζωοσπόρια του *Phytophthora nicotianae* (Hong, 2001, Hong and Richardson, 2004), βακτήρια όπως το *Agrobacterium tumefaciens* (Poncet et al., 2001), και τον ιό cucumber leaf spot virus (CLSV) (Rosner et al., 2006). Επίσης, είναι σημαντικό ότι στο χρονικό σημείο 1 DAC η συγκέντρωση του χλωρίου διαφέρει σημαντικά μεταξύ των επεμβάσεων, γιατί φαίνεται ότι η προσθήκη χλωρίνης έστω και σε αυτές τις συγκεντρώσεις αυξάνει σημαντικά το χλώριο στο ΘΔ, χωρίς την παρουσία προβλημάτων φυτοτοξικότητας, όπως φάνηκε στο συγκεκριμένο πείραμα.

5.3.4 Η συνολική παραγωγή φυτών τομάτας μετά την απολύμανση του θρεπτικού διαλύματος

Η ανάλυση παραλλακτικότητας έδειξε ότι η απολύμανση του ΘΔ με χρήση υποχλωριώδους νατρίου στην συγκέντρωση των 2,5 μg mL⁻¹ χλωρίου οδήγησε σε σημαντικά αυξημένη συνολική παραγωγή. Αναλυτικότερα, αυτή η επέμβαση έδωσε σημαντικά περισσότερους καρπούς ανά φυτό στην extra κλάση και σημαντικά αυξημένο νωπό βάρος καρπών ανά φυτό στην extra κλάση πάλι (Πίνακας 5.11). Στη διεθνή βιβλιογραφία δεν υπάρχει κάποια αντίστοιχη μελέτη που να επιτρέπει την σύγκριση αυτών των αποτελεσμάτων. Μάλιστα, συνήθως το χλώριο αναφέρεται για την φυτοτοξική του δράση. Ωστόσο, σε μελέτη των Neocleous et al. (2021) όπου σε κλειστό υδροπονικό σύστημα μέρος του αζώτου αντικαταστάθηκε από χλώριο δεν φάνηκε κάποια επίδραση στην παραγωγή. Επίσης, έχει αναφερθεί και θετική επίδραση στην ποιότητα καρπών τομάτας όταν τα επίπεδα χλωρίου ήταν υψηλά (8–10 mM) (Schnitzler and Gruda, 2002). Το αξιοσημείωτο σε αυτά τα αποτελέσματα είναι ότι η αυξημένη παραγωγή για την επέμβαση των 2,5 μg mL⁻¹ χλωρίου δεν συνδυάζεται με στατιστική διαφορά στην ανταλλαγή αερίων που αφορούν τη φωτοσύνθεση (Πίνακας 5.6), αλλά ενδεχομένως να συσχετίζεται με τη σημαντικά αυξημένη συγκέντρωση σε Mg που καταγράφηκε αποκλειστικά σε αυτή την επέμβαση (Πίνακας 5.8). Περαιτέρω επεξεργασία των δειγμάτων απαιτείται για να ανακαλυφθεί το βιοχημικό αίτιο της αύξησης της παραγωγής στη συγκεκριμένη επέμβαση.

Πίνακας 5.11: Η παραγωγή των φυτών τομάτας στις διάφορες επεμβάσεις

επεμβάσεις	αριθμός καρπών ανά φυτό			νωπό βάρος καρπών ανά φυτό			μέσο βάρος ανά καρπό		
	Σύνολο	extra κλάση	μη εμπορεύσιμοι	Σύνολο	extra κλάση	μη εμπορεύσιμοι	Σύνολο	extra κλάση	μη εμπορεύσιμοι
μάρτυρας	9,79 ab	2,92 ab	2,04	1107,26 b	343,84 a	244,85	113,08	117,89	119,93
2.5	11,25 a	3,29 a	2,50	1338,28 a	376,09 a	310,03	118,96	114,25	124,01
5.0	9,54 ab	2,33 c	2,71	1120,53 b	273,42 b	335,19	117,44	117,18	123,76
7.5	8,00 b	2,54 bc	1,63	990,13 b	314,34 ab	215,06	123,77	123,67	132,34
Σημαντικότητα	*	*	ΜΣ	*	*	ΜΣ	ΜΣ	ΜΣ	ΜΣ

Οι διαφορετικοί χαρακτήρες δίπλα στους μέσους όρους (μ.ο.) των διαφορετικών χαρακτηριστικών δηλώνουν στατιστικά σημαντικές διαφορές με επίπεδο σημαντικότητας ($P \leq 5\%$). Ο διαχωρισμός των μ.ο. πραγματοποιήθηκε με βάση το κριτήριο Duncan.

ΜΣ = μη στατιστικά σημαντικές διαφορές, * = στατιστικά σημαντικές διαφορές σε επίπεδο $P \leq 0.05$

5.3.5 Η επίδραση της απολύμανσης του θρεπτικού διαλύματος στο χρώμα των καρπών

Στην ανάλυση των παραμέτρων του χρώματος, το χρωματόμετρο μας έδωσε τις τιμές α, b και L. Η παράμετρος “color index” είναι αυτή που περιγράφει γενικά το χρώμα, η χροιά (hue) αφορά στη διαφορά ενός χρώματος και του γκρι στην ίδια φωτεινότητα, το chroma αφορά τον κορεσμό του χρώματος και ο λόγος α/b δείχνει την φωτεινότητα του κόκκινου χρώματος στους καρπούς (Bilalis et al., 2018). Στην τομάτα το χρώμα των καρπών αποτελεί ένα σημαντικό και περίπλοκο ποιοτικό χαρακτηριστικό, λόγω της ύπαρξης διάφορων καροτενοειδών που μεταβάλλονται από γενετικούς και περιβαλλοντικούς παράγοντες (López Camelo and Gómez, 2004). Στην παρούσα μελέτη δεν παρατηρήθηκαν διαφορές μεταξύ των επεμβάσεων στις παραμέτρους του χρώματος (Πίνακας 5.12). Αυτή η εργασία αποτελεί την πρώτη μελέτη του χρώματος καρπών κατά την απολύμανση ΘΔ.

Πίνακας 5.12: Χρωματικοί παράμετροι των καρπών της extra κλάσης

επεμβάσεις	α	b	L	hue	Chroma	a/b	color index	color difference with true red
μάρτυρας	28,87	24,40	40,52	0,69	39,33	1,21	30,11	40,26
2.5	29,84	25,01	48,96	0,70	40,25	1,18	25,75	42,24
5.0	28,59	23,46	41,91	0,69	40,52	1,23	29,28	39,45
7.5	30,62	23,95	41,16	0,69	38,56	1,23	29,80	39,78
Σημαντικότητα	ΜΣ	ΜΣ	ΜΣ	ΜΣ	ΜΣ	ΜΣ	ΜΣ	ΜΣ

ΜΣ = μη στατιστικά σημαντικές διαφορές

5.4 Συμπεράσματα

Η τομάτα είναι ένα από τα λαχανικά με την μεγαλύτερη κατανάλωση παγκοσμίως. Η υδροπονική της καλλιέργεια κερδίζει συνεχώς έδαφος στην Ελλάδα, λόγω των πολλών πλεονεκτημάτων της συγκεκριμένης καλλιεργητικής τεχνικής, χωρίς όμως να παρουσιάζει την εξέλιξη που απαιτεί το ανταγωνιστικό διεθνές εμπόριο. Σε αυτό το κεφάλαιο εκτιμήθηκε η επίδραση της απολύμανσης του θρεπτικού διαλύματος με χρήση υποχλωριώδους νατρίου, μεθόδου που εφαρμόζεται στην γεωργική πρακτική για την αντιμετώπιση των εδαφογενών φυτοπαθογόνων, στην ανάπτυξη και θρεπτική κατάσταση των φυτών. Δεν παρατηρήθηκε φυτοτοξικότητα στα φυτά τομάτας σε καμία από τις επεμβάσεις και δεν επηρεάστηκαν η φωτοσύνθεση και η θρεπτική κατάστασή τους. Επίσης, στην παρούσα μελέτη η προσθήκη 2,5 mg L⁻¹ χλωρίου υπό τη μορφή υποχλωριώδους νατρίου στο ΘΔ οδήγησε σε στατιστικά σημαντική αύξησης της παραγωγής των φυτών τομάτας (αριθμός καρπών ανά φυτό). Αυτή είναι η πρώτη σχετική αναφορά στη διεθνή βιβλιογραφία. Παρόλα αυτά, η εφαρμογή υποχλωριώδους νατρίου για την απολύμανση του θρεπτικού διαλύματος στις εκτός εδάφους καλλιέργειες θεωρείται ως πιθανή αιτία συσσώρευσης τοξικών υπολειμμάτων χλωρικών και υπερχλωρικών ιόντων στα λαχανικά. Σε αυτό το πλαίσιο, στο επόμενο κεφάλαιο (Κεφάλαιο 6) ελέγχθηκε η ασφάλειά των καρπών τομάτας όσον αφορά την έκθεση του καταναλωτή.

Κεφάλαιο 6. Αξιολόγηση της επίδρασης της απολύμανσης του θρεπτικού διαλύματος στην παραγωγή των φυτών τομάτας υδροπονικής καλλιέργειας και την παραγωγή τοξικών ουσιών στους καρπούς

Γραφική περίληψη Κεφάλαιο 6



ΣΥΝΤΟΜΟΓΡΑΦΙΕΣ:

δ.ο.: δραστική(ές) ουσία(ες); ΘΔ: Θρεπτικό διάλυμα; ΦΠ: Φυτοπροστατευτικό(ά) Προϊόν(τα);

CE: Collision Energy (ενέργεια θραυσματοποίησης); ClO_3^- : chlorates (χλωρικά ιόντα); ClO_4^- : perchlorates (υπερχλωρικά ιόντα); CV: Capillary Voltage (τάση τριχοειδούς); IPM: Integrated Pest Management; IRAC: Insecticide Resistance Action Committee; LOQ: limit of quantification (όριο ποσοτικοποίησης); MRLs: Maximum Residue Levels (Ανώτατα Όρια Υπολειμμάτων); PHI: Pre-Harvest Interval; RSD: σχετική τυπική απόκλιση; RT: Retention Time (χρόνος

6.1 Εισαγωγή

Η ασφάλεια των τροφίμων περιγράφεται στα αγγλικά με δύο όρους: food security και food safety. Ο όρος food security, όπως έχει οριστεί από τον FAO (Food and Agriculture Organization), αφορά στην επαρκή κάλυψη των επισιτιστικών αναγκών του παγκόσμιου πληθυσμού και στα ελληνικά αποδίδεται ως «επισιτιστική επάρκεια». Ο όρος food safety αναφέρεται στην ασφάλεια των τροφίμων κατά την διαδικασία της παραγωγής, της συσκευασίας και της αποθήκευσής τους, όπως χημικά υπολείμματα, παθογόνοι για τον άνθρωπο μικροοργανισμοί, κ.λπ. Στα ελληνικά ο όρος food safety αναφέρεται ως «ασφάλεια των τροφίμων» (Hanning et

al., 2012). Η υδροπονία είναι μία καλλιεργητική τεχνική η οποία υπόσχεται αύξηση της ποσότητας και ποιότητας της παραγωγής με παράλληλη μείωση της χρήσης νερού, ειδικά στα κλειστά συστήματα, απαντώντας έτσι στις προκλήσεις που θέτει η ανάγκη για επισιτιστική επάρκεια (Savvas and Gruda, 2018). Επιπλέον, θα μπορούσε να ενισχύσει και την ασφάλεια των τροφίμων που παράγονται από μία καλλιέργεια καθώς επιτρέπει την μείωση της εφαρμογής αγροχημικών και συνδέεται με μικρότερη πιθανότητα μόλυνσεων από παθογόνους για τα φυτά μικροοργανισμούς, καθώς αποσυνδέει τα φυτά από το έδαφος και λαμβάνει χώρα σε ελεγχόμενο περιβάλλον (θερμοκήπιο). (Eden Green Technology, 2020).

Πρόσφατα, έξαρση του *Escherichia coli* σε μαρούλι που καλλιεργείτο στην Καλιφόρνια είχε ως αποτέλεσμα να αποθαρρύνουν οι αρμόδιες αρχές την κατανάλωση μαρουλιού από την εν λόγω περιοχή, εξαιρώντας, όμως, τις υδροπονικές καλλιέργειες (Beecher, 2020). Επίσης, οι Pérez-Urrestarazu et al. (2019) έδειξαν ότι η συγκέντρωση νιτρικών στα φυλλώδη λαχανικά μαρούλι, σέσκουλα και λαχανίδα σε υδροπονική καλλιέργεια ήταν χαμηλότερη από τα θεσπισμένα ανώτατα επιτρεπτά όρια υπολειμμάτων (Maximum Residue Levels- MRLs) καθιστώντας την κατανάλωσή τους από τον άνθρωπο ασφαλή. Παρ' όλα αυτά, στη διεθνή βιβλιογραφία έχει επισημανθεί ότι υπάρχουν κίνδυνοι για την ασφάλεια των λαχανικών που καλλιεργούνται υδροπονικά (Sawyer, 2021, Wang et al., 2020, Riggio, 2019).

Όπως αναφέρθηκε και στο προηγούμενο κεφάλαιο (Κεφάλαιο 5), οι γνώσεις σχετικά με την επίδραση των μεθόδων απολύμανσης που χρησιμοποιούνται στην υδροπονία στα καλλιεργούμενα φυτά είναι ελλιπείς. Κατά συνέπεια, δεν είναι γνωστή η επίδραση του υποχλωριώδους νατρίου στην ασφάλεια των τροφίμων για τον καταναλωτή. Συγκεκριμένα, όσον αφορά την απολύμανση με εφαρμογή υποχλωριώδους νατρίου (χλωρίνης), έχει αναφερθεί ότι η χρήση χλωρίου είναι πιθανό να οδηγήσει στη δημιουργία παραγώγων όπως χλωραμίνες, οργανικές αλογονούχες ουσίες και τριαλομεθάνια (trihalomethanes: Chloroform, Dichlorobromomethane, Dibromochloromethane και Bromoform) (Stewart-Wade, 2011). Επίσης, οι Bull et al. (1990) έχουν επισημάνει ότι η χρήση του υποχλωριώδους ανιόντος (ClO^-) κατά την απολύμανση θρεπτικού διαλύματος (ΘΔ) μπορεί να συνδέεται με την παραγωγή χλωρικών ανιόντων τα οποία μπορούν να προκαλέσουν οξεία τοξικότητα στον άνθρωπο. Μάλιστα, έγκυες μητέρες που εκτέθηκαν σε πόσιμο νερό απολυμασμένο με υποχλωριώδες νάτριο γέννησαν μωρά με μικρότερο βάρος γέννησης, μικρότερο μήκος σώματος και μικρότερη περιφέρεια του κρανίου σε σύγκριση με εκείνα που εκτέθηκαν σε μη απολυμασμένο νερό (Bull et al., 1990).

Στην Ευρωπαϊκή Ένωση υπάρχει μια μακροχρόνια συζήτηση σχετικά με αμφιλεγόμενα νέα MRLs όσον αφορά την περιεκτικότητα σε χλωρικά ιόντα (ClO_3^-) στα φρούτα και λαχανικά (BfR 2014, EFSA 2014, FAO-WHO 2008). Την τρέχουσα χρονική περίοδο, η δραστική ουσία chlorate (χλωρικά ιόντα) δεν είναι εγκεκριμένη ως φυτοπροστατευτικό προϊόν και συνεπώς το εν ισχύ MRL στα φυτικά προϊόντα σύμφωνα με το Κανονισμό 396/2005 (Regulation 396/2005) είναι $0,01 \text{ mg kg}^{-1}$. Παρ' όλα αυτά, υπολείμματα χλωρικών ιόντων προσδιορίστηκαν σε τρόφιμα το 2014 (European Commission, 2021b) γεγονός το οποίο είχε ως συνέπεια την περεταίρω

διερεύνηση και τη θέσπιση νέων MRLs από την Ευρωπαϊκή Ένωση, σύμφωνα με τον Κανονισμό 2020/749 (Regulation 2020/749). Τα υπολείμματα χλωρικών και υπερχλωρικών ιόντων θεωρούνται ότι προκύπτουν ως παραπροϊόν της χρήσης χλωριούχων απολυμαντικών κατά την μεταποίηση των τροφίμων και την επεξεργασία του νερού (Kaufmann-Horlacher, 2014). Ωστόσο, έχει αποδειχθεί ότι η χρήση KClO για την απολύμανση ΘΔ σε υδροπονική καλλιέργεια τομάτας οδηγεί στη συσσώρευση υπολειμμάτων χλωρικών ιόντων (Dannehl et al., 2016).

Παράλληλα, η καλλιέργεια της τομάτας στα θερμοκήπια αντιμετωπίζει διάφορες προκλήσεις με μία από τις σημαντικότερες για τις μεσογειακές συνθήκες να είναι το λεπιδόπτερο *Tuta absoluta* (Meyrick) (Lepidoptera: Gelechiidae). Η *Tuta absoluta*, με καταγωγή από τη Νότια Αμερική, εμφανίστηκε στην Ευρώπη τα τέλη του 2006 στην Ισπανία (Urbaneja et al., 2009) και από τότε έχει καταγραφεί σε πολλές ευρωπαϊκές χώρες, όπως και άλλες χώρες της Μεσογειακής λεκάνης (*Tuta absoluta* Information Network, 2020). Στην Ελλάδα πρώτη καταγραφή της είναι στην Κρήτη το 2009, και από τότε έχουν καταγραφεί προσβολές του εντόμου, επίσης, στην Πελοπόννησο και τη δυτική Ελλάδα (Roditakis et al., 2010).

Η αντιμετώπιση της *Tuta absoluta* είναι δύσκολη λόγω της ηθολογίας του εντόμου, της μεγάλης αναπαραγωγικής ικανότητας καθώς και του μεγάλου αριθμού γενεών ανά καλλιεργητική περίοδο, ειδικά υπό θερμοκηπιακές συνθήκες. Ο άριστος τρόπος αντιμετώπισης του εντόμου στο θερμοκήπιο στηρίζεται σε συνδυασμό μεθόδων στο πλαίσιο της ολοκληρωμένης διαχείρισης (IPM – Integrated Pest Management). Αρχικά, είναι απαραίτητη η χρήση εντομοστεγών δικτύων στα ανοίγματα του θερμοκηπίου καθώς και η χρήση καλλιεργητικών παγίδων. Επίσης, φαίνεται να είναι αποτελεσματικά στον έλεγχο του πληθυσμού της *T. absoluta* τα ωφέλιμα αρπαχτικά *Nesidiocoris tenuis* και *Macrolophus pygmaeus* (Urbaneja et al., 2009). Ωστόσο, σε περίπτωση προσβολής είναι απαραίτητη η απομάκρυνση και καταστροφή των προσβεβλημένων φύλλων κι βλαστών σε συνδυασμό με το ψεκασμό εγκεκριμένων εντομοκτόνων. Στην Ελλάδα, οι εγκεκριμένες δραστικές ουσίες (δ.ο.) για την αντιμετώπιση του λεπιδοπτέρου στην καλλιέργεια της τομάτας θερμοκηπίου ανήκουν στις ομάδες των: διαμιδίων, νεονικοτινοειδών κλπ (Πίνακας 6.1)(IRAC, 2021, MINAGRIC, 2021).

Σκευάσματα που περιέχουν τη δ.ο. spinosad είναι ανάμεσα στα εγκεκριμένα εντομοκτόνα για την αντιμετώπιση του λεπιδοπτέρου στη θερμοκηπιακή τομάτα. Τα αντίστοιχα εμπορικά προϊόντα είναι μίγματα spinosyn A και spinosyn D. Και οι δύο ενώσεις είναι δευτερογενείς μεταβολίτες του εδαφογενή μύκητα *Saccharopolyspora spinosa* (Mertz and Yao, 1990). Το spinosad συνιστάται για τον έλεγχο των προνυμφών λεπιδοπτέρων, φυλλορυκτών, θριπών, και κολεόπτρων που τρέφονται από το φύλλωμα σε ένα ευρύ φάσμα καλλιεργειών όπως αροτραίες καλλιέργειες, κηπευτικά, δενδρώδεις καλλιέργειες και καλλωπιστικά (Ζιώγας, 2010). Οι spinosyns έχουν ένα σχετικά νέο μηχανισμό δράσης (MoA), στοχεύοντας κυρίως στις θέσεις δέσμευσης των υποδοχέων νικοτινικής ακετυλοχολίνης (nAChRs) του νευρικού συστήματος των εντόμων, ο οποίος, όμως, είναι διακριτός από τα υπόλοιπα εντομοκτόνα. Το spinosad δρα επιπλέον, ανταγωνιστικά προς το γ-αμινο-βουτυρικού οξύ (GABA) (Snyder et al., 2007).

Πίνακας 6.1: Εγκεκριμένες δ.ο. έναντι του εντόμου *Tuta absoluta* στην καλλιέργεια της θερμοκηπιακής τομάτας στην Ελλάδα (IRAC, 2020, MINAGRIC, 2020)

Δραστική ουσία	Κωδικός IRAC	Μηχανισμός δράσης	Μέγιστος αριθμός εφαρμογών
Φερομόνες λεπιδοπτέρων	-	Παρεμποδιστές σύζευξης	3
Abamectin (aka avermectin)	6	Παρεμποδιστές των διαύλων των ιόντων Cl ⁻	3
Acibenzolar-s-methyl		Επαγωγείς της άμυνας των φυτών	
Azadirachtin	UN	Άγνωστος	3
<i>Bacillus thuringiensis</i> different strains	11A	Βίο εντομοκτόνο	8
Chlorantraniliprole	28	Παρεμπόδιση της λειτουργίας του μυϊκού συστήματος (Ryanodine receptor)	2
Cyantraniliprole	28	Παρεμπόδιση της λειτουργίας του μυϊκού συστήματος (Ryanodine receptor)	
Emamectin	6	Παρεμποδιστές των διαύλων των ιόντων Cl ⁻	3
Fatty acid potassium salt	UNE	Άγνωστος	4
Indoxacarb	22A	Παρεμποδιστές των διαύλων των ιόντων Na ⁺ (voltage-dependent)	3
Metaflumizone	22B	Παρεμποδιστές των διαύλων των ιόντων Na ⁺ (voltage-dependent)	2
Pyrethrins	3A	Παρεμποδιστές των διαύλων των ιόντων Na ⁺	3
Spinosad	5	Παρεμποδιστές της ακετυλοχολίνης (Site I)	3

Παρ' όλα αυτά, η εφαρμογή της χημικής αντιμετώπισης πρέπει να γίνεται σύμφωνα με τους κανόνες της Ορθής Γεωργικής Πρακτικής καθώς και ακολουθώντας τις οδηγίες κατά IRAC (Insecticide Resistance Action Committee) για την αποφυγή εμφάνισης ανθεκτικότητας. Η *Tuta absoluta* είναι ένα έντομο με αυξημένη πιθανότητα ανάπτυξης ανθεκτικότητας και ήδη στην Ελλάδα και Ιταλία υπάρχουν αναφορές για ανάπτυξη ανθεκτικότητας του εντόμου στις αβερμεκτίνες, πυρεθροειδή και πυρεθρίνες, διαμίδια, κ.ά. (IRAC, 2021).

Στο παρόν Κεφάλαιο 6 στόχο αποτέλεσε η μελέτη της επίδρασης της απολύμανσης με χρήση υποχλωριώδους νατρίου, κοινώς χλωρίνης, στην ασφάλεια των συγκομισθέντων καρπών ως προς την πιθανή παραγωγή των τοξικών χλωρικών και υπερχλωρικών ιόντων. Η χρήση χλωρίνης είναι μία διαδεδομένη μέθοδος απολύμανσης του ΘΔ στη Μεσόγειο (Postma et al., 2008). Επίσης, στην παρούσα μελέτη, τα φυτά τομάτας προσβλήθηκαν από το λεπιδόπτερο *Tuta absoluta*, επομένως, πραγματοποιήθηκε εφαρμογή εντομοκτόνου που περιείχε spinosad 42 ημέρες πριν από την πρώτη συγκομιδή. Το συγκεκριμένο εντομοκτόνο επιλέχθηκε γιατί δεν βρέθηκαν πρόσφατα αρχεία ανάπτυξης ανθεκτικότητας στο *T. Absoluta* σε αυτό. Επιπλέον, συνιστάται ως εργαλείο ολοκληρωμένης διαχείρισης καλλιεργειών και επιτρέπεται στη βιολογική γεωργία (Biondi et al., 2018, Copping, 1998). Παρακολουθώντας το επίπεδο προσβολής του *T. absoluta*, μόνο μία εφαρμογή του εντομοκτόνου κρίθηκε απαραίτητη μετά την πρόσθετη αφαίρεση των μολυσμένων φύλλων. Με στόχο α) τον προσδιορισμό υπολειμμάτων spinosad σε καρπούς τομάτας, και β) διερεύνηση εάν αυτή η στρατηγική οδηγεί σε απαλλαγμένους από υπολείμματα φυτοφαρμάκων καρπούς τομάτας, οι καρποί της extra class αναλύθηκαν με μια πλήρως επικυρωμένη αναλυτική μέθοδο.

6.2 Υλικά και Μέθοδοι

6.2.1 Πειραματικός σχεδιασμός

Το πείραμα περιεγράφηκε αναλυτικά στην παράγραφο §5.2.1.

6.2.2 Ανίχνευση υπολειμμάτων χλωρικών και υπερχλωρικών ιόντων σε καρπούς τομάτας

6.2.2.1 Ανάλυση καρπών τομάτας για τον προσδιορισμό υπολειμμάτων χλωρικών και υπερχλωρικών ιόντων

Για τον έλεγχο της πιθανής επιβάρυνσης των συγκομισθέντων καρπών τομάτας μετά την απολύμανση με χρήση υποχλωριώδους νατρίου του ΘΔ, με χλωρικά (ClO_3^-) και υπερχλωρικά (ClO_4^-) ιόντα, πραγματοποιήθηκε ανάλυση υπολειμμάτων. Συγκεκριμένα, 2 κιλά από την extra class των καρπών τομάτας ομογενοποιήθηκαν 8 ώρες μετά τη συγκομιδή τους αφού αφαιρέθηκε το μη βρώσιμο τμήμα τους. Το ομογενοποιημένο αρχικό δείγμα διαχωρίστηκε σε δύο υποδείγματα παρέχοντας δύο επαναλήψεις για κάθε κανάλι. Στη συνέχεια, τα δείγματα αυτά αποθηκεύτηκαν στους -20°C μέχρι την περαιτέρω επεξεργασία τους.

Εκχύλιση δειγμάτων καρπών τομάτας

Η εκχύλιση των δειγμάτων καρπών τομάτας πραγματοποιήθηκε με βάση τη μέθοδο QueEChERS (Anastassiades et al. 2007, Lehotay 2007). Κλάσμα δείγματος 10 ± 1 g ζυγίστηκε σε φιάλη φυγοκέντρου από Teflon και προστέθηκαν 10 mL διαλύτη εκχύλισης ακετονιτρίλιο (1% HCOOH). Το δείγμα αρχικά αφέθηκε για 30 λεπτά και στη συνέχεια ακολούθησε ανακίνηση με το χέρι για 1 λεπτό και φυγοκέντρηση στις 4000 rpm για 5 λεπτά. Έπειτα από τη φυγοκέντρηση το υπερκείμενο κλάσμα του εκχυλίσματος μεταφέρθηκε σε ένα φιαλίδιο αποθήκευσης με βιδωτό καπάκι. Πριν από την έγχυση στο χρωματογραφικό σύστημα LC/MS/MS, το τελικό έκλουσμα διηθήθηκε μέσω ενός φίλτρου σύριγγας κυτταρίνης μίας χρήσης 0,45 mm (Macherey-Nagel, Duren, Γερμανία).

6.2.2.2 Προσδιορισμός υπολειμμάτων χλωρικών και υπερχλωρικών ιόντων με τη χρήση υγρής χρωματογραφίας – φασματομετρίας μάζας (LC-MS/MS)

Για την ανάλυση των υπολειμμάτων χλωρικών και υπερχλωρικών ιόντων χρησιμοποιήθηκε υγρή χρωματογραφία συζευγμένης φασματομετρίας μάζας με τριπλό τετράπολο MS-MS της εταιρείας Varian [2 x prostar 210 (LC) και 1200L (quadrupole MS-MS)]. Το σύστημα ήταν εξοπλισμένο με πηγή αρνητικού ιονισμού ηλεκτροδιάχυσης (electrospray ionization), και αυτόματο δειγματολήπτη (Prostar 420). Ο διαχωρισμός πραγματοποιήθηκε σε αναλυτική στήλη Hypercarb (2,1 x 100 mm 5 μ m) με ρυθμό έκλουσης 0,4 mL min⁻¹. Η στήλη βρισκόταν σε θερμοκρασία δωματίου. Το σύστημα διαλυτών αποτελείτο από δύο διαλύτες, Α και Β. Ο διαλύτης έκλουσης Α ήταν υδατικό διάλυμα 1% CH₃COOH και ο διαλύτης Β ήταν μεθανόλη με 1% CH₃COOH. Το πρόγραμμα έκλουσης ήταν βαθμωτό (gradient) και ξεκινούσε με 100% του διαλύτη Α, ο οποίος γραμμικά μειωνόταν στο 70% του διαλύτη Β μέσα στα 10 λεπτά, και ακολούθως άλλαζε ακαριαία και σταθεροποιείτο για 5 λεπτά σε 100% διαλύτη έκλουσης Α, μέχρι την επόμενη έγχυση. Ο όγκος έγχυσης ήταν 10 μ L.

Οι συνθήκες που εφαρμόστηκαν στο σύστημα MS ήταν: η θερμοκρασία της πηγής ιονισμού ήταν 50°C, του αερίου ξήρανσης 300°C. Το αέριο ξήρανσης ήταν άζωτο παραγόμενο από υψηλής καθαρότητας γεννήτρια και η πίεση του ήταν 18psi. Το αέριο εκνέφωσης ήταν συνθετικός αέρας υψηλής καθαρότητας (καθαρότητας $\geq 99.99\%$) με πίεση 40 psi. Επίσης, το αέριο κελιού θραυσματοποίησης ήταν το αργό (99.999%) με πίεση 1.8 mTorr. Ο χρόνος συλλογής μεταπτώσεων ήταν 50 msec. Ο αριθμός των σημείων δεδομένων στις κορυφές ήταν τουλάχιστον δέκα. Η τάση τριχοειδούς [Capillary Voltage (CV)] και η ενέργεια θραυσματοποίησης [Collision Energy (CE)] ποικίλουν ανάλογα με το πρόδρομο και παραγόμενο ιόν όπως φαίνεται στον κάτωθι πίνακα (Πίνακας 6.2).

Πίνακας 6.2: Πρόδρομο ιόν (precursor ion), παραγόμενο ιόν (product ion), τάση τριχοειδούς [Capillary Voltage (CV)] και η ενέργεια θραυσματοποίησης [Collision Energy (CE)] για τα διάφορα χλωρικών (Chlorates) και υπερχλωρικών (Perchlorates) ιόντων που εξετάστηκαν κατά την ανίχνευση υπολειμμάτων

Αναλύτης	Πρόδρομο ιόν	Παραγόμενο ιόν	Τάση τριχοειδούς (V)	Ενέργεια θραυσματοποίησης (eV)
Χλωρικά ιόντα	83	67	72	20
Χλωρικά ιόντα	85	69	88	20
Χλωρικά ιόντα $^{13}\text{O}_3$	89	71	40	11
Υπερχλωρικά ιόντα	99	83	73	23,5
Υπερχλωρικά ιόντα	101	85	56	24,5
Υπερχλωρικά ιόντα $^{18}\text{O}_4$	107	89	21	24

Επικύρωση της μεθόδου

Η αναλυτική μέθοδος που εφαρμόστηκε για τον προσδιορισμό χλωρικών και υπερχλωρικών ιόντων στους καρπούς τομάτας έχει προταθεί από το EURLs (European Reference Laboratory for Single Residue Methods) – μονο-υπολειμματικές μέθοδοι ανάλυσης, και τα δεδομένα επικύρωσης της μεθόδου είναι διαθέσιμα. Για αυτό το λόγο μία σύντομη επικύρωση της μεθόδου πραγματοποιήθηκε για να διασφαλίσει την απόδοση της ανάλυσης. Με δεδομένο ότι χρησιμοποιήθηκε εσωτερικό πρότυπο για την ποσοτικοποίηση των αποτελεσμάτων, πρότυπες ουσίες βαθμονόμησης (calibration standards) εφαρμόστηκαν σε διαλύτη. Συγκεκριμένα, δείγματα ελέγχου ποιότητας (Quality Control samples) με περιεκτικότητα $0,01 \text{ mg kg}^{-1}$ (σε 3 επαναλήψεις, $n = 3$), και $0,1 \text{ mg kg}^{-1}$ (σε 3 επαναλήψεις, $n = 3$) σε χλωρικά και υπερχλωρικά ιόντα ετοιμάστηκαν με φόρτιση της αντίστοιχης συγκέντρωσης σε δείγματα τομάτας χωρίς επέμβαση (μάρτυρες) ώστε να προσδιοριστεί η πιστότητα-ορθότητα της μεθόδου. Τα δείγματα που χρησιμοποιήθηκαν ως μάρτυρες είχαν προηγουμένως αναλυθεί και είχε επιβεβαιωθεί ότι δεν παρουσίαζαν κάποια επίδραση στον προσδιορισμό των υπό μελέτη ουσιών. Η ορθότητα ελέγχθηκε μέσω του υπολογισμού ανάκτησης (recovery) των αναλυτών για τις επιλεγμένες συγκεντρώσεις και η επαναληψιμότητα με τη μέτρηση της σχετικής τυπικής απόκλισης (Relative Standard Deviation - RSD).

6.2.3 Ανάλυση θρεπτικού διαλύματος για τον προσδιορισμό υπολειμμάτων χλωρικών και υπερχλωρικών ιόντων

Κατά την τελευταία επέμβαση με υποχλωριώδες νάτριο πάρθηκαν δείγματα του ΘΔ από τους σταλάκτες με στόχο την εξέταση της παρουσίας υπολειμμάτων χλωρικών και υπερχλωρικών ιόντων και σε αυτά. Αναλυτικότερα, πραγματοποιήθηκε δειγματοληψία 2 δειγμάτων με 0,5 L/δείγμα ανά κανάλι.

Με στόχο την εξασφάλιση της σταθερότητας των υπολειμμάτων χλωρικών και υπερχλωρικών ιόντων στο ΘΔ και την περεταίρω διασφάλιση των παραγόμενων αποτελεσμάτων, πραγματοποιήθηκε έλεγχος της σταθερότητας των υπολειμμάτων. ΘΔ το οποίο είχε προηγουμένως αναλυθεί και δεν είχαν προσδιοριστεί σε αυτό ανιχνεύσιμα υπολείμματα των χλωρικών και υπερχλωρικών ιόντων, εμβολιάστηκε με μίγμα των εν λόγω ουσιών σε 2 συγκεντρώσεις των 2,5 και 5 $\mu\text{g mL}^{-1}$. Το ΘΔ διατηρήθηκε στη συντήρηση (4°C) για 28 ημέρες. Κατά το χρονικό αυτό διάστημα έγιναν διαδοχικές δειγματοληψίες στις 0, 1, 2, 4, 6, 8, 11, 21, 22 και 28 ημέρες και ακολουθούσε έγχυση στο χρωματογραφικό σύστημα LC/MS/MS (Commission of the European Communities 7032/VI/95 rev.5).

6.2.4 Ανίχνευση υπολειμμάτων spinosad σε καρπούς τομάτας

6.2.4.1 Βιολογικό υλικό που χρησιμοποιήθηκε στην ανάλυση υπολειμμάτων

Οι καρποί τομάτας συγκομίστηκαν 65 και 76 ημέρες μετά τη μεταφύτευση, μόλις έφτασαν στο εμπορικό στάδιο. Ένα εντομοκτόνο με βάση το spinosad εφαρμόστηκε 22 ημέρες μετά τη μεταφύτευση των φυταρίων. Σύμφωνα με την εγκεκριμένη ετικέτα του εφαρμοζόμενου ΦΠ, το διάστημα τελευταίας εφαρμογής πριν από τη συγκομιδή (PHI – Pre Harvest Interval) είναι 3 ημέρες. Για να διασφαλιστεί ότι στους παραγόμενους καρπούς τομάτας δεν θα ανιχνευτούν υπολείμματα της δ.ο. spinosad, πραγματοποιήθηκε ανάλυση των καρπών τομάτας της extra κλάσης και από τα δύο χρονικά σημεία συγκομιδής με πολυ-υπολειμματική μέθοδο ανάλυσης.

6.2.4.2 Προετοιμασία standard διαλυμάτων

Διαλύματα παρακαταθήκης (stock) που περιείχαν spinosyn A και spinosyn D παρασκευάστηκαν ζυγίζοντας 25 mg των αναλυτικών ουσιών σε ογκομετρικές φλάσκες (certified A-class) και διαλύθηκαν σε 25 ή 50 mL ακετόνης. Στη συνέχεια, αποθηκεύτηκαν στους -20 °C. Για τις αναλύσεις παρασκευάστηκε επιπλέον διάλυμα προτύπων (διάλυμα εργασίας- standard) το οποίο περιείχε και τις δύο ουσίες σε τελική συγκέντρωση 10 mg L^{-1} σε ακετονιτρίλιο, το οποίο αποθηκεύτηκε επίσης στους -20 °C.

6.2.4.3 Εκχύλιση των δειγμάτων

Η προετοιμασία των δειγμάτων για την ανίχνευση υπολειμμάτων spinosyn A και spinosyn D στην extra κλάση καρπών τομάτας πραγματοποιήθηκε με τη μέθοδο QuEChERS (quick, easy, cheap, effective, rugged, and safe). Αναλυτικότερα, 10 g ομογενοποιημένου ιστού ζυγίστηκαν σε σωλήνες φυγοκέντρωσης (centrifuge tube) περιεκτικότητας 50 mL και εκχυλίστηκαν με 10 mL ακετονιτριλίου, υπό συνεχή, δυνατή ανάδευση με το χέρι για 1 λεπτό. Ακολούθησε η προσθήκη αλάτων Quecher's (4 g magnesium sulfate anhydrous, 1 g sodium chloride, 1 g trisodium citrate dihydrate, και 0,5 g disodium hydrogen citrate sesquihydrate), πραγματοποιήθηκε εκ νέου ανάδευση και φυγοκέντρωση για τον διαχωρισμό των φάσεων. Ένα κλάσμα 6 mL της οργανικής φάσης συλλέχθηκε και «καθαρίστηκε» περεταίρω με bulk sorbents (primary secondary amine, PSA, και anhydrous MgSO_4). Το εκχύλισμα που προέκυψε αναλύθηκε χημικά εφαρμόζοντας υγρή χρωματογραφία φασματομετρία μάζας LC/MS/MS.

6.2.4.4 Χημική ανάλυση με LC/MS/MS

Ο ποσοτικός και ποιοτικός προσδιορισμός των spinosyn A και spinosyn D πραγματοποιήθηκε με LC/MS/MS χρωματογραφικό σύστημα. Πιο συγκεκριμένα, χρησιμοποιήθηκε το Agilent1200 Series Quaternary system σύστημα υγρής χρωματογραφίας με στήλη C18 (Eclipse XDB C18 column, 15 cm, ID 2.1 mm, 5 μm) με ρυθμό ροής 31 mL min^{-1} . Το πρόγραμμα που ακολουθήθηκε αποτελείτο από την κινητική φάση που περιείχε water 5 mmol L^{-1} , ammonium formate 0.1%, formic acid 0.02%, και acetonitrile (διαλύτης A) και methanol 5 mmol L^{-1} , ammonium formate 0.1%, και formic acid (διαλύτης B) και ο όγκος έγχυσης ήταν 5 μL . Ως ανιχνευτής χρησιμοποιήθηκε το φασματόμετρο μάζας Agilent 6410 εξοπλισμένο με πηγή αρνητικού ιονισμού ηλεκτροδιάχυσης (electrospray ionization). Οι παράμετροι που εφαρμόστηκαν ήταν οι εξής: τάση τριχοειδούς (CV- capillary voltage) και τάση θραυσματοποίησης (CE- collision cell energy) διαφοροποιούνταν ανάλογα με το πρόδρομο ιόν (precursor ion), η θερμοκρασία της πηγής ήταν 300 °C, η ροή του αερίου ξήρανσης (drying gas) ήταν 11 L min^{-1} και η πίεση στο αέριο εκνέφωσης (nebulizing gas) ήταν 40 psi.

Οι παράμετροι της ανάλυσης [χρόνος κατακράτησης (Retention time - RT), CV, CE κ.ά.] και στα δύο συστήματα φαίνονται στον Πίνακα 6.3. Η παρακολούθηση των ιόντων και του χρόνου κατακράτησης (Retention Time, RT) για τον προσδιορισμό των spinosyn A και D υπολειμμάτων με το σύστημα LC/MS/MS έγινε με παρακολούθηση πολλαπλών μεταπτώσεων (multiple reaction monitoring - MRM). Η επικύρωση της ανάλυσης βασίστηκε σε κριτήρια όπως ο RT, η αφθονία ιόντος τόσο για το ποσοτικό όσο και για το ποιοτικό (ion abundance of qualitative and quantitative ions) σύμφωνα με την Ευρωπαϊκή οδηγία SANTE/11813/2017 και η μέθοδος έδειξε πως είναι αποτελεσματική για την εκχύλιση των υπό μελέτη ουσιών.

Πίνακας 6.3: Παράμετροι για τον προσδιορισμό των spinosyn A και spinosyn υπολειμμάτων με LC/MS/MS

Δραστική ουσία	RT (min)	Quantification Ion transitions	CV (V)	CE (eV)	Qualification Ion transitions	CV (V)	CE (eV)
Spinosyn A	25,8	732,5 -> 142,2	51	37	732,5 -> 98,3	51	50
Spinosyn D	26,8	746 -> 142,2	66	39	746,0 -> 98,1	66	50

6.2.4.5 Επικύρωση της μεθόδου

Η μέθοδος που εφαρμόστηκε ελέγχθηκε σύμφωνα με τα κριτήρια επικύρωσης ακρίβεια, επαναληψιμότητα και ευαισθησία (trueness, precision and sensitivity), όπως περιγράφονται στη ευρωπαϊκή οδηγία SANTE/11813/2017. Η ακρίβεια (trueness) υπολογίστηκε από την ανάκτηση της ουσίας (attained recovery), ενώ η επαναληψιμότητα (precision) υπολογίστηκε από τη σχετική τυπική απόκλιση. Το όριο ποσοτικοποίησης (limit of quantification - LOQ) υπολογίστηκε επίσης. Η επικύρωση της μεθόδου πραγματοποιήθηκε σε δύο επίπεδα: 0,01 mg kg⁻¹ and 0.1 mg kg⁻¹.

6.3 Αποτελέσματα - Συζήτηση

6.3.1 Επισκόπηση της ανάλυσης υπολειμμάτων χλωρικών και υπερχλωρικών ιόντων στους καρπούς και το θρεπτικό διάλυμα

6.3.1.1 Αποτελέσματα επικύρωσης αναλυτικής μεθόδου προσδιορισμού χλωρικών και υπερχλωρικών ιόντων σε καρπούς τομάτας

Πίνακας 6.4: Αποτελέσματα επικύρωσης της μεθόδου σε δείγματα τομάτας

Αναλύτης	mg/kg (n=3)	Ανάκτηση (%)	Πιστότητα (RSD%)
Χλωρικά ιόντα	0,01	119,2	19
	0,1	111,2	7
Υπερχλωρικά ιόντα	0,01	116	7
	0,1	118,9	2

Έπειτα από τον εμβολιασμό και την ανάλυση των δειγμάτων QC στο LC/MS/MS, υπολογίστηκαν οι τιμές ανάκτησης και σχετικής τυπικής απόκλισης για κάθε ουσία και επίπεδο φόρτισης ξεχωριστά. Η ορθότητα της μεθόδου (accuracy) εκφράστηκε ως η % ανάκτηση και για τα

χλωρικά ιόντα ήταν στα επίπεδα 111,2-119,2%, ενώ για τα υπερχλωρικά ιόντα ήταν από 116-118,9% και η πιστότητα, επαναληψιμότητα εκφράστηκε ως η %RSD η οποία κυμάνθηκε για τα χλωρικά ιόντα από 7-19% και για τα υπερχλωρικά ιόντα από 2-7% (Πίνακας 6.4). Τα αποτελέσματα είναι αποδεκτά και δείχνουν ότι η μέθοδος ήταν αποτελεσματική.

6.3.1.2 Σταθερότητα υπολειμμάτων χλωρικών και υπερχλωρικών ιόντων στο θρεπτικό διάλυμα

Τα αποτελέσματα της μελέτης σταθερότητας των χλωρικών και υπερχλωρικών ιόντων στο ΘΔ, έδειξαν, όπως παρουσιάζεται και στον Πίνακα 6.5, ότι τα υπολείμματα ήταν σταθερά στις 28 μέρες που πραγματοποιήθηκε η μελέτη. Με εξαίρεση τις ημέρες 1, 8 και 22 η ανάκτηση ήταν μεγαλύτερη από 100% για την επέμβαση των 2,5 $\mu\text{g mL}^{-1}$. Όσον αφορά τη σταθερότητα στη συγκέντρωση των 5 $\mu\text{g mL}^{-1}$, παρατηρήθηκε ότι η ανάκτηση ήταν μεγαλύτερη από 100% τις ημέρες 4, 6 και 28, αλλά και τις υπόλοιπες μέρες που εξετάστηκαν τα αποτελέσματα ήταν αποδεκτά.

Πίνακας 6.5: Αποτελέσματα των αναλύσεων υπολειμμάτων χλωρικών ιόντων σε ΘΔ (2.5 % Ammonia) έως 28 μέρες μετά τη συλλογή τους

Περίοδος Αποθήκευσης (μέρες)	Υπολείμματα χλωρικών ιόντων (mg L^{-1}) σε δείγματα αποθηκευμένα σε συνθήκες συντήρησης		%μέσης ανάκτησης χλωρικών ιόντων συγκριτικά με τη μέρα 0 ²	
Επίπεδο φόρτισης (% Ammonia)	2,5	5,0	2,5	5,0
	Μέσος όρος $\pm$ Τυπική απόκλιση	Μέσος όρος $\pm$ Τυπική απόκλιση		
0 ¹	0,45 $\pm$ 0,07	1,45 $\pm$ 0,07	-	-
1	0,30 $\pm$ 0,00	0,90 $\pm$ 0,00	75,3	62,4
4	0,55 $\pm$ 0,07	1,65 $\pm$ 0,07	115,2	114,0
6	0,70 $\pm$ 0,14	2,05 $\pm$ 0,21	123,1	130,9
8	0,35 $\pm$ 0,07	1,45 $\pm$ 0,07	61,8	87,9
11	0,55 $\pm$ 0,07	1,40 $\pm$ 0,14	103,7	89,2
21	0,55 $\pm$ 0,07	1,40 $\pm$ 0,00	108,3	95,2
22	0,35 $\pm$ 0,07	1,10 $\pm$ 0,14	71,0	71,4
28	0,55 $\pm$ 0,07	1,50 $\pm$ 0,14	120,3	101,9

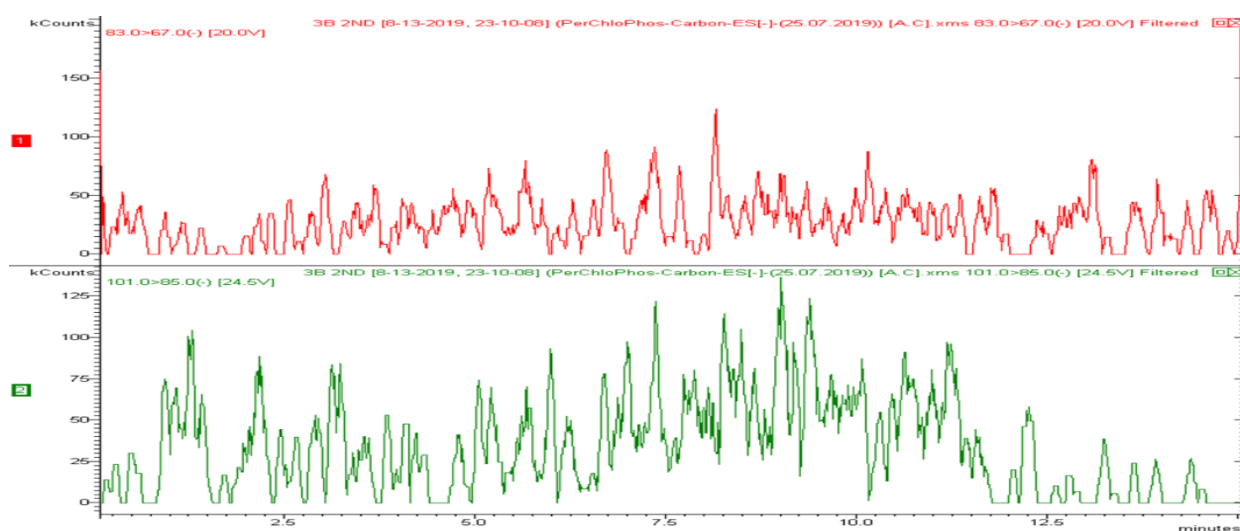
¹ Αρχική συγκέντρωση υπολειμμάτων χλωρικών ιόντων που ανιχνεύτηκαν στο ΘΔ

² Το ποσοστό μέσης ανάκτησης μεγαλύτερο του 100% υποδηλώνει σταθερότητα των υπολειμμάτων, αλλά η υψηλότερη συγκέντρωση συγκριτικά με την αρχική παρατηρείται λόγω αβεβαιότητας στις μετρήσεις, η οποία στην περίπτωση αυτή είναι 50% (SANTE/12682/2019. 2019)

6.3.2 Αποτελέσματα αναλύσεων υπολειμμάτων χλωρικών και υπερχλωρικών ιόντων σε καρπούς τομάτας

Στην ανάλυση υπολειμμάτων των καρπών τομάτας της extra κλάσης από τα δύο χρονικά σημεία συγκομιδής δεν ανιχνεύθηκαν υπολείμματα χλωρικών και υπερχλωρικών ιόντων. Συνεπώς, θα μπορούσαμε να συμπεράνουμε ότι το εφαρμοζόμενο πρωτόκολλο απολύμανσης που ακολουθήθηκε οδήγησε σε καρπούς ασφαλείς για κατανάλωση έως την συγκέντρωση των $7,5 \mu\text{g mL}^{-1}$ χλωρίου. Παρακάτω στην Εικόνα 6.1 φαίνονται τα χρωματογραφήματα που πάρθηκαν από δείγμα τομάτας από την επέμβαση των $5 \mu\text{g mL}^{-1}$ στα οποία δεν ανιχνεύθηκαν υπολείμματα.

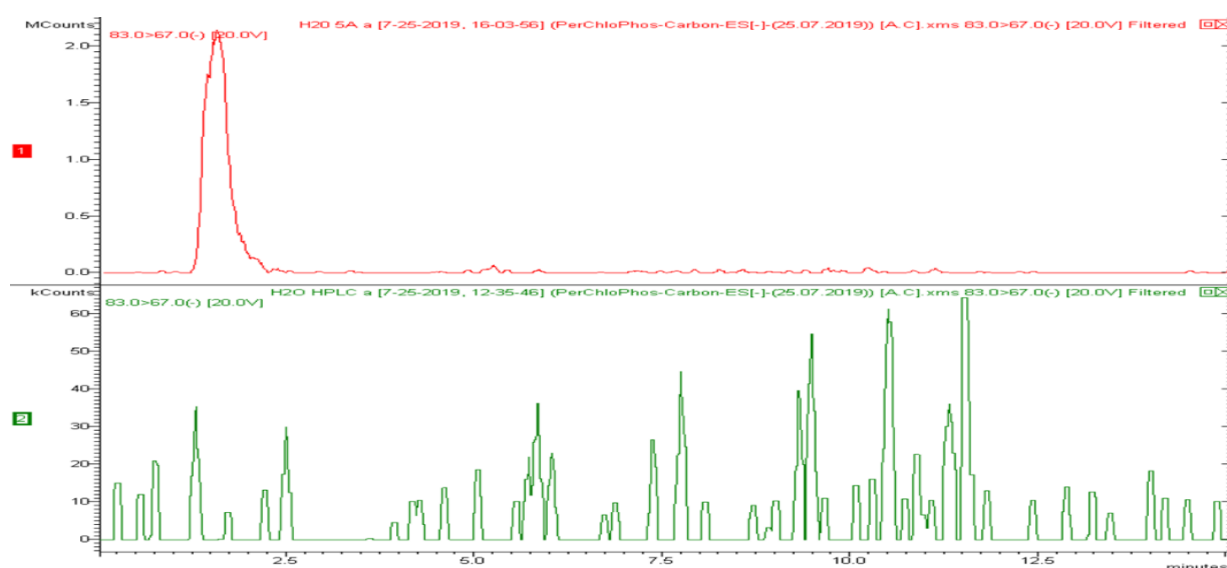
Η απολύμανση των λαχανικών με χρήση χλωρίου έχει πολλές εφαρμογές π.χ. πολλαπλασιασμός, παραγωγή, συγκομιδή και μετασυλλεκτικούς χειρισμούς των φρέσκων φρούτων και λαχανικών για πολλές δεκαετίες (Bartz et al., 1988, Goodin, 1977, Winston et al., 1957). Στο παρελθόν υψηλές συγκεντρώσεις χλωρίου εφαρμοζόταν επειδή δεν υπήρχαν φόβοι για υπολείμματα στα τελικά προϊόντα (Combrink and Visagie, 1982, Rabin, 1986). Πλέον, όμως, είναι ξεκάθαρο ότι το χλώριο μπορεί να αντιδράσει με την οργανική ύλη προκαλώντας ανεπιθύμητα παράγωγα όπως χλωροφόρμιο (CHCl_3) ή trihalomethanes τα οποία έχουν καρκινογόνο δράση σε υψηλές δόσεις (Richardson et al., 1996, Suslow, 2000). Για αυτό το λόγο γενικά, κατά την απολύμανση του ΘΔ με χρήση χλωρίνης σε υδροπονικές καλλιέργειες προτείνονται χαμηλές δόσεις χλωρίου (Leonel and Tonetti, 2021), συν των πιθανών συμπτωμάτων φυτοτοξικότητας.



Εικόνα 6.1: Μεταπτώσεις των ιόντων σε δείγμα τομάτας ($5 \mu\text{g mL}^{-1} \text{Cl}_2$) χωρίς εύρημα. Με κόκκινο φαίνεται η ανάλυση για χλωρικά ιόντα κι με πράσινο η ανάλυση για υπερχλωρικά ιόντα

6.3.3 Ανίχνευση υπολειμμάτων χλωρικών ιόντων στο θρεπτικό διάλυμα

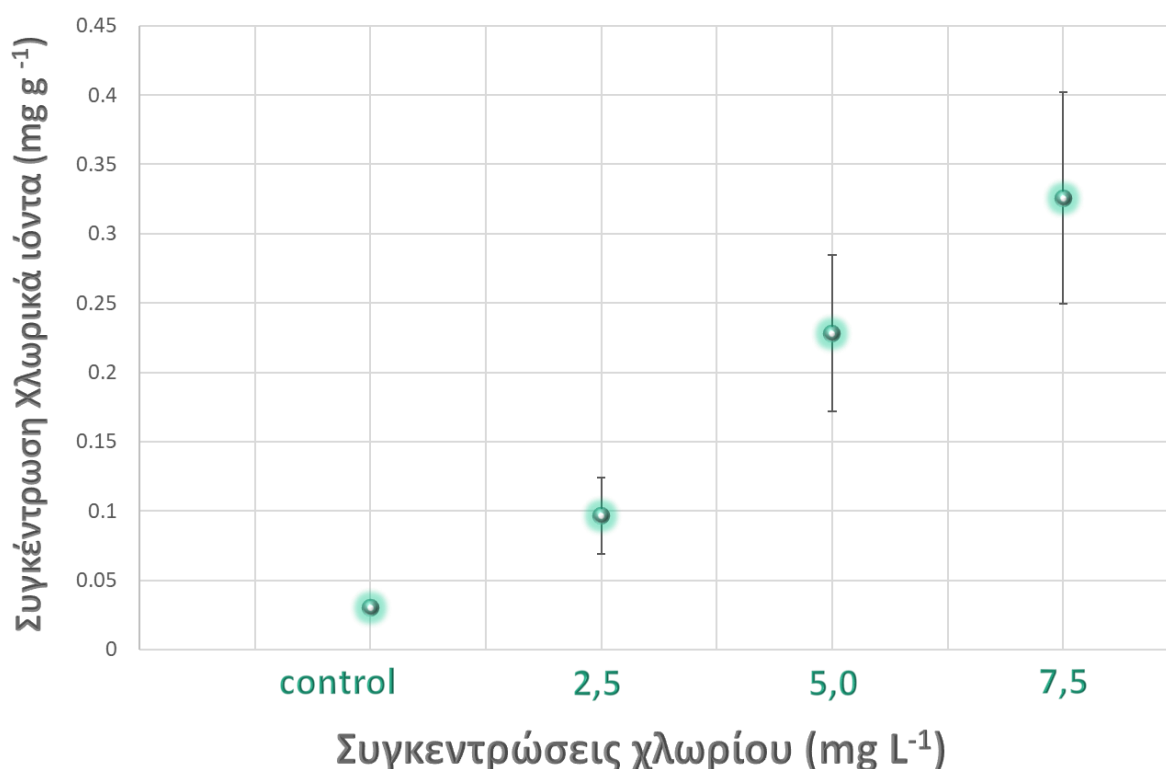
Στην παρούσα μελέτη, η προσθήκη υποχλωριώδους νατρίου οδήγησε στο σχηματισμό χλωρικών ιόντων στο ΘΔ (Εικόνα 6.2). Ωστόσο, δεν ανιχνεύθηκαν υπερχλωρικά ιόντα. Επίσης, η ανάλυση των ΘΔ στις διάφορες επεμβάσεις έδειξε ότι η συγκέντρωση των χλωρικών ιόντων αυξανόταν όσο αυξανόταν και η συγκέντρωση χλωρίνης που προστέθηκε στο ΘΔ (Γράφημα 6.1). Η μεγαλύτερη συγκέντρωση χλωρικών ιόντων που ανιχνεύθηκε ήταν $0,37 \mu\text{g mL}^{-1}$ στην επέμβαση των $7,5 \mu\text{g mL}^{-1}$ χλωρίου.



Εικόνα 6.2: Ανάλυση χλωρικών ιόντων υπολειμμάτων σε ΘΔ (κόκκινο) όπου υπάρχει εύρημα και νερό HPLC (πράσινο) χωρίς εύρημα.

Η φυτική παραγωγή παγκόσμια έχει μεταφερθεί σε εκτός εδάφους καλλιέργειες στα θερμοκήπια για την αποφυγή προβλημάτων φυτουγείας (Critten and Bailey, 2002). Παρ' όλα αυτά, στα κλειστά υδροπονικά συστήματα υπάρχουν αναφορές διάδοσης φυτοπαθογόνων τα οποία μπορεί να οδηγήσουν και σε πλήρη αποτυχία της καλλιέργειας (Martinez et al., 2010, Stewart-Wade, 2011). Μάλιστα, σε έρευνα του 2006 στο Οντάριο, το 33% των παραγωγών δήλωσαν τα προβλήματα φυτοπροστασίας που προκύπτουν κατά την ανακύκλωση του ΘΔ ως το σημαντικότερο πρόβλημα (Zheng et al., 2008). Σε αυτό το πλαίσιο, η απολύμανση του ΘΔ με εφαρμογή χλωρίνης είναι μία ευρέως διαδεδομένη μέθοδος χωρίς όμως να υπάρχουν πληροφορίες για την πιθανή πρόσληψη χλωρικών ιόντων από τα λαχανικά όταν το υποχλωριώδες ανιόν χρησιμοποιείται (Dannehl et al., 2016). Ποιοτικοί έλεγχοι στην βιομηχανία και επίσημοι έλεγχοι της ασφάλειας τροφίμων ανακάλυψαν χλωρικών ιόντων υπολείμματα σε διάφορα λαχανικά. Σχετικά υψηλές συγκεντρώσεις βρέθηκαν σε δείγματα τομάτας ($0,2 \text{ mg kg}^{-1}$) και καρότων ($0,3 \text{ mg kg}^{-1}$) (Kaufmann-Horlacher, 2014). Ωστόσο, θεωρείται ότι αυτά τα υπολείμματα προκύπτουν από μετασυλλεκτικούς χειρισμούς όπου η χλωρίνη χρησιμοποιείται ως απολυμαντικό μέσο (Goodburn and Wallace, 2013, Ramos et al., 2013, Joshi et al., 2013).

Γενικά τα υπολείμματα χλωρικών ιόντων είναι ένα σημαντικό ανόργανο παράγωγο της απολύμανσης με χλώριο, γιατί μπορεί να προσληφθεί και να συσσωρευτεί στα εδώδιμα μέρη κατά την φυτική παραγωγή (Leonel and Tonetti, 2021). Ωστόσο, όπως αναφέρθηκε νωρίτερα δεν ανιχνεύθηκαν υπολείμματα στους καρπούς τομάτας. Αντίθετα στην μελέτη των Dannehl et al. (2016) μετά την απολύμανση με υποχλωριώδες κάλιο (KClO) σε κλειστό υδροπονικό σύστημα καλλιέργειας τομάτας ανιχνεύθηκαν υπολείμματα χλωρικών ιόντων. Παρ' όλα αυτά, δεν βρέθηκε να συνυπάρχουν υπολείμματα χλωρικών και υπερχλωρικών ιόντων (Dannehl et al., 2016). Επίσης, υπολείμματα χλωρικών ιόντων έχουν καταγραφεί σε μαρούλι και σπανάκι “baby” που ποτίζονταν με χλωριωμένο νερό (Garrido et al., 2020, López-Gálvez et al., 2017). Επιπρόσθετα οι Lonigro et al. (2017) έδειξαν ότι οργανοχλωριωμένα παράγωγα σε έδαφος, ρίζες και φύλλα συνδέονται με τη συγκέντρωση του χλωρίου στο νερό άρδευσης.



Γράφημα 6.1: Ιστόγραμμα με τη συγκέντρωση χλωρικών ιόντων (mg L⁻¹) που ανιχνεύθηκαν στο ΘΔ στις διάφορες μεταχειρίσεις

6.3.4 Επισκόπηση της ανάλυσης υπολειμμάτων spinosad στους καρπούς τομάτας

Τα αποτελέσματα της επικύρωσης (Πίνακας 6.6) έδειξαν αποδεκτή ευαισθησία, ακρίβεια και επαναληψιμότητα, με βάση τα κριτήρια που καθορίστηκαν από το SANTE/11813/2017 σχετικά

με τα πρότυπα ελέγχου ποιότητας των υπολειμμάτων φυτοφαρμάκων στην Ευρωπαϊκή Ένωση που διασφαλίζουν την ποιότητα και την αξιοπιστία των αναλυτικών μετρήσεων. Πιο συγκεκριμένα, η ορθότητα της μεθόδου (accuracy), η οποία εκφράστηκε ως η %ανάκτηση ήταν στα επίπεδα 82-101% για τις spinosyn A και spinosyn D. Η πιστότητα, επαναληψιμότητα εκφράστηκε ως η %RSD και κυμάνθηκε από 2,4-6,5%. Το LOQ ορίστηκε σε 0,01 mg kg⁻¹ με βάση το χαμηλότερο επίπεδο επικύρωσης και το όριο ανίχνευσης (LOD) σε 0,003 mg kg⁻¹.

Η μέθοδος βρέθηκε να είναι αποτελεσματική για την εκχύλιση της εξεταζόμενης ένωσης και τα παρακάτω αποτελέσματα δείχνουν την αποτελεσματικότητά της για τον προσδιορισμό της spinosyn A και της spinosyn D από καρπούς τομάτας και διασφαλίζει την ακρίβεια των αποτελεσμάτων της ανάλυσης υπολειμμάτων.

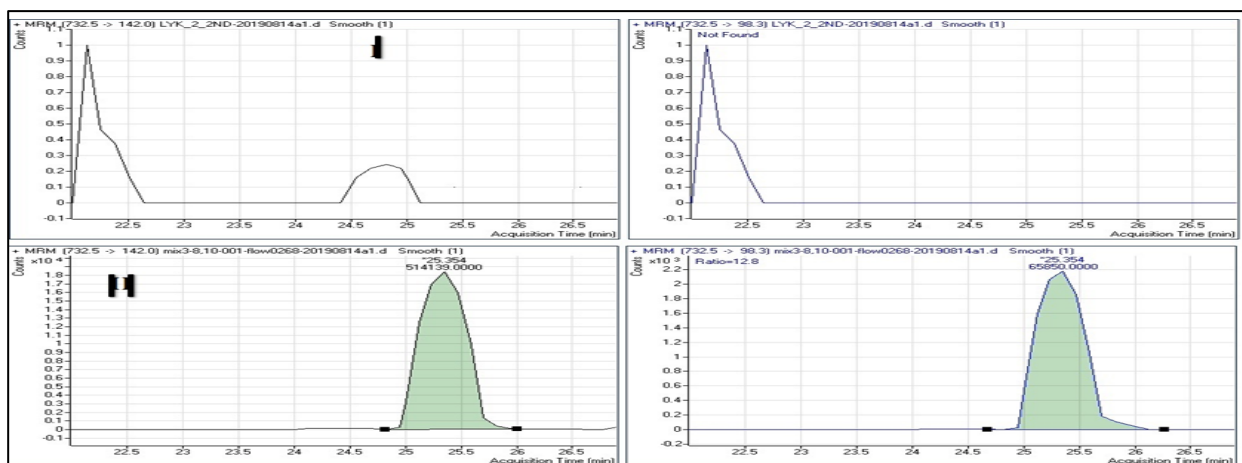
Πίνακας 6.6: Αποτελέσματα επικύρωσης της μεθόδου ανάλυσης υπολειμμάτων στους καρπούς τομάτας

Δραστική ουσία	Επίπεδα (mg kg ⁻¹)	Ανάκτηση (%) (n=5)	Επαναληψιμότητα (RSD%, n=5)
Spinosyn A	0,01	87,7	6,5
	0,1	93	3,7
Spinosyn D	0,01	82	5,3
	0,1	101	2,4

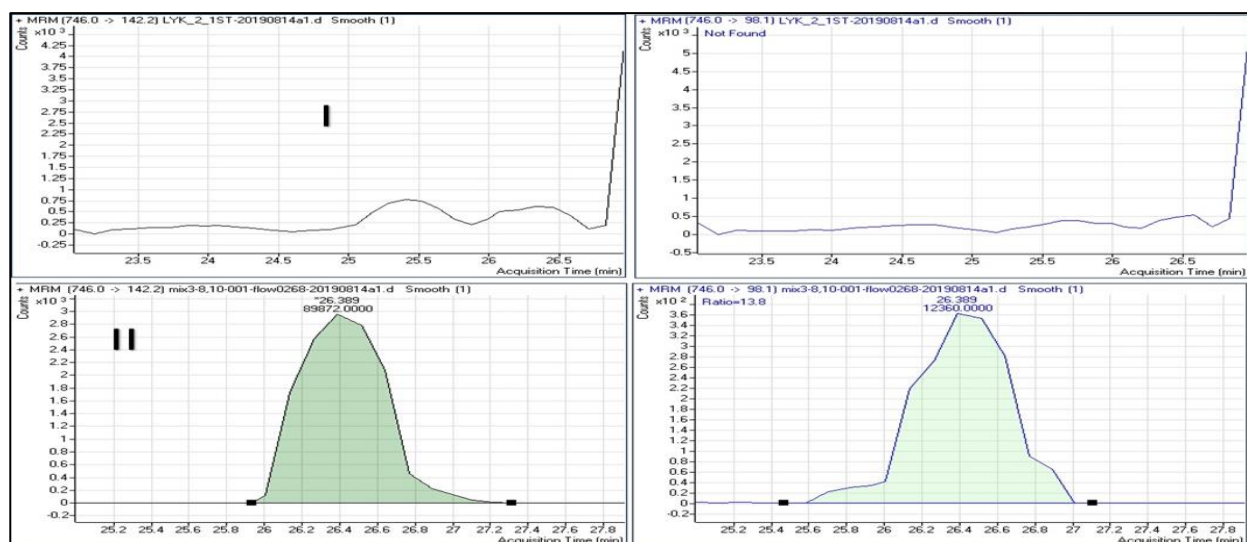
6.3.5 Αποτελέσματα ανάλυσης υπολειμμάτων spinosad

Συνολικά αναλύθηκαν 32 δείγματα καρπών τομάτας που προήλθαν και από τα δύο χρονικά σημεία συγκομιδής. Όπως φαίνεται στις: Εικόνα 6.3 και Εικόνα 6.4, δεν ανιχνεύτηκαν υπολείμματα στους καρπούς της extra κλάσης που εξετάστηκαν. Ο προσδιορισμός των υπολειμμάτων spinosad στις τομάτες βάσει της EFSA (2018b) έχει οριστεί ως το σύνολο των spinosyn A και spinosyn D. Το θεσπισμένο ανώτατο όριο υπολειμμάτων στις τομάτες είναι 0.7 mg kg⁻¹ [Reg (EU) 2015/603].

Με βάση τους Ramadan et al. (2016), η εφαρμογή spinosad σε καρπούς τομάτας σύμφωνα με την εγκεκριμένη ετικέτα οδήγησε σε απόθεση του spinosad κατά 0,205 mg kg⁻¹ την ημέρα μηδέν, και μειώθηκε σε 0,026 mg kg⁻¹ σε 5 ημέρες μετά την εφαρμογή. Επίσης, τα υπολείμματα δεν ήταν ανιχνεύσιμα μετά από 7 ημέρες εφαρμογής, παρουσιάζοντας μια ταχεία μείωση της δραστηριότητας στους καρπούς τομάτας. Αυτά τα αποτελέσματα συμφωνούν με εκείνα που ελήφθησαν στη μελέτη μας σχετικά με τη μη ανίχνευση υπολειμμάτων spinosad όταν εφαρμόζεται εκτεταμένο PHI, το οποίο μπορεί να αποδοθεί στην ταχεία μείωση του.



Εικόνα 6.3 LC/MS/MS χρωματογράφημα του spinosyn A σε I: δείγμα τομάτας, II: standard solution από spinosyn A 0,01 $\mu\text{g mL}^{-1}$.



Εικόνα 6.4 LC/MS/MS χρωματογράφημα του spinosyn D σε I: δείγμα τομάτας, II: standard solution από spinosyn D 0,01 $\mu\text{g mL}^{-1}$

6.4 Συμπεράσματα

Υπάρχει επιτακτική ανάγκη για αύξηση της παραγωγής τροφίμων παγκοσμίως. Μία από τις σημαντικότερες ανησυχίες των καταναλωτών είναι η ασφάλεια των τροφίμων σχετικά με τα υπολείμματα φυτοφαρμάκων (Ott et al., 1999, Van Boxtael et al., 2013). Ωστόσο, η χρήση φυτοφαρμάκων εξασφαλίζει τη φυτουγεία η οποία έχει ως αποτέλεσμα φθηνότερα τρόφιμα, παρατεταμένη διάρκεια ζωής, βελτιωμένη εμφάνιση πολλών τροφίμων για τους καταναλωτές και αυξημένη παραγωγή για τους παραγωγούς (Farid, 2001). Η υδροπονική παραγωγή λαχανικών συμβάλλει σε όλες τις προαναφερθείσες προκλήσεις. Ωστόσο, παρόλο που υπάρχει

πληθώρα μελετών σχετικά με τη μείωση της χρήσης ΦΠ (Savvas and Gruda, 2018), από όσο γνωρίζουμε, δεν υπάρχει συσχέτιση μεταξύ μεθόδων υδροπονικής καλλιέργειας και της σημασίας της στην παραγωγή ασφαλέστερων τροφίμων. Πιο συγκεκριμένα, η απολύμανση με χλώριο στο ΘΔ σε υδροπονικές καλλιέργειες εφαρμόζεται συχνά χωρίς όμως να υπάρχουν πληροφορίες για την επίδρασή της στην παραγωγή και ασφάλεια των λαχανικών. Στην παρούσα μελέτη, οι διαφορετικές συγκεντρώσεις μεταξύ των επεμβάσεων με χλώριο δεν επηρέασαν την τελική συγκέντρωση των χλωρικών και υπερχλωρικών ιόντων στον καρπό τομάτας, καθώς δεν ανιχνεύθηκαν υπολείμματα στους καρπούς σε καμία από τις επεμβάσεις. Ωστόσο, ανιχνεύθηκαν υπολείμματα χλωρικών ιόντων στο ΘΔ σε όλες τις επεμβάσεις. Γενικά η συγκεκριμένη εργασία επισημαίνει την ανάγκη για περαιτέρω έρευνα σχετικά με τις εφαρμοζόμενες μεθόδους απολύμανσης και σε άλλα καλλιεργούμενα κηπευτικά. Επίσης, έχουμε δείξει ότι παρ' όλο που η εφαρμογή των ΦΠ ήταν αναπόφευκτη στην υδροπονική καλλιέργεια τομάτας, το παρατεταμένο PHI συνέβαλε στην ελαχιστοποίηση των υπολειμμάτων *srpinosad* σε καρπούς τομάτας. Επομένως, μια τέτοια πρακτική μπορεί να ενισχύσει την ασφάλεια των τροφίμων.

Κεφάλαιο 7. Γενικά συμπεράσματα – Πρωτοτυπία της διατριβής

Η βιώσιμη γεωργία είναι ένα πολύπλευρο και πολύπλοκο ζήτημα. Καταρχάς πρέπει να οριστεί και στη συνέχεια να μετρηθεί, αλλά για να γίνει κάτι τέτοιο επιτυχώς, πρέπει πρώτα από όλα να διευκρινιστούν με ακρίβεια οι μεταβλητές-συνιστώσες που το επηρεάζουν (Lampridi et al., 2019). Αυτό που όμως είναι απολύτως ξεκάθαρο είναι ότι πρόκειται για ένα διεπιστημονικό ζήτημα στο οποίο πρέπει όλοι οι ενδιαφερόμενοι από τους αγρότες, συντονιστικούς φορείς, έως τους καταναλωτές κ.λπ., να λάβουν την κατάλληλη εκπαίδευση (Loha et al., 2018) ώστε να ξεπεραστούν οι δυσκολίες και οι περιορισμοί που υπάρχουν. Από άποψη, λοιπόν, φυτοπροστασίας, είναι γνωστό ότι οι βιοτικοί παράγοντες προκαλούν σημαντική μείωση της παραγωγής (FAO, 2017). Μια δύσκολα αντιμετωπίσιμη κατηγορία είναι τα εδαφογενή φυτοπαθογόνα (Katan, 2017). Μάλιστα υπάρχει έλλειψη σε φυτοφάρμακα για την αντιμετώπισή τους, με αποτέλεσμα να είναι επιτακτική η ολιστική προσέγγιση και απαραίτητη η εύρεση καινοτόμων λύσεων (Kinkel et al., 2011).

Σε αυτό το πλαίσιο, αρχικά στην παρούσα διατριβή (Ειδικό μέρος Ι) εξετάστηκαν νανοσωματίδια με βάση παράγωγα της υπερδιακλαδισμένης πολυαιθυλενιμίνης (HPEI) ως μία νέα πηγή βιοδραστικότητας. Γενικότερα, τα νανοσωματίδια είναι πολλά υποσχόμενα για την ανάπτυξη καινοτόμων φυτοπροστατευτικών προϊόντων (ΦΠ) (Balaure et al., 2017, Kah, 2015, Stadler, 2018). Τα συγκεκριμένα νανοσωματίδια εξετάστηκαν για πρώτη φορά για την εφαρμογή τους ως πιθανές δραστικές ουσίες (δ.ο.) για νανο-ΦΠ. Σε ένα πρώτο στάδιο ελέγχθηκαν 6 διαφορετικά νανοσωματίδια με διαφορετικό μοριακό βάρος και διαφορετικό βαθμό υποκατάστασης που φέρουν γουανιδινικές ομάδες (GPEI) ή τεταρτοταγείς αμμωνιακές ομάδες (QPEI) για την μυκητοτοξικότητά τους σε διάφορα εδαφογενή παθογόνα (*Rhizoctonia solani*, *Fusarium graminearum*, *Verticillium dahliae*, *Phytophthora infestans*) και φυτοτοξικότητά τους σε καλλιεργούμενα φυτά (μαρούλι, τομάτα, αγγούρι, βρώμη) και ζιζάνια (αγριοβρώμη). Τα αποτελέσματα έδειξαν ότι τα περισσότερα νανοσωματίδια μείωσαν την μυκηλιακή ανάπτυξη του μύκητα *Verticillium dahliae* και του ωομύκητα *Phytophthora infestans*. Παράλληλα, δεν εμπόδισαν την βλάστηση των σπόρων μαρουλιού. Ωστόσο, προκάλεσαν μείωση της σχετικής επιμήκυνσης του ριζιδίου του αγγουριού. Συνολικά, διαπιστώθηκε ότι το μοριακό βάρος αυτών των νανοσωματιδίων ήταν ανάλογο της δραστικότητάς τους. Επίσης, η υποκατάσταση με τεταρτοταγείς αμμωνιακές ομάδες (QPEI) φάνηκε να μειώνει την τοξικότητά τους.

Για την καλύτερη κατανόηση της αποτελεσματικότητας και των μηχανισμών τοξικότητάς τους καθώς και πως αυτές επηρεάζονται από τις διαφορετικές τελικές ομάδες, επιλέχθηκαν τρία από αυτά τα νανοσωματίδια (HPEI, GPEI και QPEI με ίδιο μοριακό βάρος) και ελέγχθηκε η επίδρασή τους στη μυκηλιακή ανάπτυξη του *Verticillium dahliae* καθώς και στο μεταβολισμό του μύκητα. Μάλιστα, πρόκειται για την πρώτη μελέτη της συγκριτικής τοξικότητας των HPEI, GPEI και QPEI σε μύκητες και την πρώτη μελέτη του μεταβολισμού του βερτισιλλίου. Για αυτό

το λόγο, δημιουργήθηκε βιβλιοθήκη με τους μεταβολίτες που ανιχνεύτηκαν στο μύκητα, αλλά και ελεύθερα προσβάσιμο αποθετήριο στην ιστοσελίδα του Γεωπονικού Πανεπιστημίου Αθηνών με τα χρωματογραφήματα της GC/EI/MS ανάλυσης. Τα αποτελέσματα έδειξαν ότι τα νανοσωματίδια της υπερδιακλαδισμένης πολυαιθυλενιμίνης έχουν υψηλότερη μυκητοτοξικότητα από νανοσωματίδια με βάση τη χιτοζάνη αλλά χαμηλότερη συγκριτικά με νανοσωματίδια αργύρου. Αυτό ενισχύει περαιτέρω τη δυνατότητα της πιθανής αξιοποίησής τους ως ΦΠ. Επίσης, όμοια με τα πρώτα πειράματα, φάνηκε ότι η τροποποίηση του HPEI με τεταρτοταγείς αμμωνιακές ομάδες (QPEI) οδηγεί σε μειωμένη αποτελεσματικότητα έναντι του μύκητα, ενώ η ενεργοποίηση με γουανιδινικές ομάδες (GPEI) έχει ως αποτέλεσμα υψηλότερη τοξικότητα στο *V. dahliae*. Η μεταβολομική ανάλυση έδειξε ότι τα τρία νανοσωματίδια έχουν ξεχωριστό μηχανισμό τοξικότητας. Συνολικά, τα δεδομένα της GC/EI/MS ανάλυσης δεν επαρκούν για να εξαχθεί ασφαλές συμπέρασμα για τον ακριβή μηχανισμό δράσης τους, αλλά καταγράφηκε γενική διαταραχή της χημικής ομοιόστασης του μύκητα και η επαγωγή οξειδωτικού και οσμωτικού στρες αποδόθηκαν στην τοξικότητά τους. Τα αποτελέσματα αυτά είναι σε συμφωνία με τη διεθνή βιβλιογραφία όπου αναφέρεται το οξειδωτικό στρες ως ένας κύριος μηχανισμός τοξικότητας των νανοσωματιδίων (Schnackenberg et al., 2012). Επιπρόσθετα, οι μεταβολίτες-βιοσημαντές που ανακαλύφθηκαν ήταν τα αμινοξέα προλίνη, GABA, τρυπτοφάνη, τυροσίνη, ο δισακχαρίτης τρεχαλόζη, τα ενδιάμεσα του κύκλου Krebs και λιπαρά οξέα. Η πειραματική αυτή εργασία και τα αποτελέσματά της δημοσιεύτηκαν στο επιστημονικό περιοδικό με κριτές Pesticide Biochemistry and Physiology.

Η μελέτη του οικοτοξικολογικού προφίλ των ίδιων νανοσωματιδίων στην ανάπτυξη της λέμνας (*Lemna minor* L.) έδειξε, όπως και στην περίπτωση του *V. dahliae*, ότι η τροποποίηση των νανοσωματιδίων της υπερδιακλαδισμένης πολυαιθυλενιμίνης με γουανιδινικές ομάδες (GPEI) αυξάνει την τοξικότητά τους στην ανάπτυξη της λέμνας, ενώ η τροποποίηση τους με τεταρτοταγείς αμμωνιακές ομάδες (QPEI) την μειώνει. Αυτή η παρατήρηση είναι σε συμφωνία με τη διεθνή βιβλιογραφία, όπου σημειώνεται ότι το περισσότερο θετικό φορτίο οδηγεί σε αυξημένη αλληλεπίδραση με τις βιολογικές μεμβράνες και τελικά αυξημένη τοξικότητα (Liu et al., 2020). Οι τεταρτοταγείς αμμωνιακές ομάδες έχουν μικρότερη pKa από τις γουανιδινικές ομάδες, και αλληλεπιδρούν ασθενέστερα με τις κυτταρικές μεμβράνες (He and Chu, 2013). Επίσης, σε βιοδοκιμή όπου εξετάστηκε η επίδραση των νανοσωματιδίων σε συγκεντρώσεις μικρότερες της NOAEL (no-observed-adverse-effect-level) στην ανάπτυξη της λέμνας παρατηρήθηκε χαμηλή όρμηση μετά την επώαση και με τα τρία νανοσωματίδια. Η όρμηση από νανοσωματίδια έχει καταγραφεί σε φυτά και άλγη (Agathokleous et al., 2019) και πιο πρόσφατα σε τομάτα (Guzmán-Báez et al., 2021), *Nigella arvensis* L. (Chahardoli et al., 2022) και *Arabidopsis thaliana* (Vega-Vásquez et al., 2021). Επιπρόσθετα, σε αυτή τη μελέτη επισημάνθηκε η σημασία της εξέτασης και μικρότερων δόσεων για την καλύτερη κατανόηση της επίδρασης των νανοσωματιδίων. Επιπλέον, παρατηρήθηκε αύξηση της δραστηριότητας των αντιοξειδωτικών ενζύμων στα φυτά λέμνας ως άμυνα στο στρες που προκαλούν τα νανοσωματίδια και το πιο ευαίσθητο ένζυμο κατά την απόκριση του φυτού ήταν η

υπεροξειδάση της γουαϊακόλης (GPOD). Η GPOD έχει προταθεί από τους Pereira et al (2018) ως μία ευαίσθητη παράμετρος στην μελέτη της νανοτοξικότητας στη λέμνα. Τέλος, μόνο το HPEI προκάλεσε σημαντική υπεροξείδωση των λιπιδίων, γεγονός που επισημαίνει την επίδραση των τελικών ομάδων στο μηχανισμό τοξικότητάς τους.

Στο Ειδικό μέρος II εξετάστηκε η επίδραση της χρήσης υποχλωριώδους νατρίου για τον έλεγχο των παθογόνων στο ΘΔ σε υδροπονική καλλιέργεια τομάτας στην ανάπτυξη, θρέψη και παραγωγή των φυτών όπως επίσης ελέγχθηκε η ασφάλεια των καρπών από τοξικά υπολείμματα χλωρικών και υπερχλωρικών ιόντων. Η απολύμανση του ΘΔ αποτελεί συνήθη γεωργική πρακτική για την αντιμετώπιση των εδαφογενών παθογόνων που αναπτύσσονται σε αυτό και έχει καταγραφεί στη βιβλιογραφία ότι 2,5 – 5,0 $\mu\text{g mL}^{-1}$ χλωρίου αντιμετωπίζουν αποτελεσματικά είδη μυκήτων και ωομυκήτων [*Pythium* sp. (Cayanan et al., 2008, 2009, Hong et al. 2003c), *Phytophthora* sp. (Hong, 2001, Hong and Richardson, 2004), *Fusarium oxysporum* f. sp. *dianthii* (Price and Fox, 1984)]. Ωστόσο, υπάρχει έλλειψη σε πειραματικά δεδομένα σχετικά με την επίδραση της μεθόδου στα καλλιεργούμενα φυτά. Είναι η γνώμη της συγγραφέως ότι τα αποτελέσματα της διατριβής στα σχετικά ερωτήματα είναι προς όφελος των παραγωγών και της βιώσιμης γεωργίας.

Γενικά, η τομάτα είναι ένα από τα λαχανικά με τη μεγαλύτερη κατανάλωση παγκοσμίως και η υδροπονική της καλλιέργεια αυξάνεται συστηματικά στην Ελλάδα, χάρις στα πολλά πλεονεκτήματα της συγκεκριμένης καλλιεργητικής τεχνικής, χωρίς όμως να έχει την εξέλιξη που απαιτεί το ανταγωνιστικό διεθνές εμπόριο. Η παρούσα μελέτη έδειξε ότι η απολύμανση του θρεπτικού διαλύματος με χρήση υποχλωριώδους νατρίου μέχρι την συγκέντρωση 7,5 $\mu\text{g mL}^{-1}$ χλωρίου δεν προκαλεί φυτοτοξικότητα στα φυτά τομάτας ("Elrida"). Βιβλιογραφικά, είναι γνωστό ότι το χλώριο είναι ασφαλές για τα περισσότερα φυτά σε συγκεντρώσεις μικρότερες των 5 mg L^{-1} (US EPA, 2012). Επίσης, στην παρούσα μελέτη δεν επηρεάστηκαν η φωτοσύνθεση και η θρεπτική κατάσταση των φυτών. Παρ' όλα αυτά, φαίνεται ότι το χλώριο σε μεγαλύτερες συγκεντρώσεις στο ΘΔ από αυτές που εξετάστηκαν εδώ επηρεάζει τη φωτοσύνθεση και συγκεκριμένα την παράμετρο stomatal conductance σε φυτά τομάτας (Neocleous et al., 2021) και καπνού (Franco-Navarro et al., 2015). Τα αποτελέσματα της παρούσας μελέτης είναι σε συμφωνία με τη διεθνή βιβλιογραφία, δεδομένου ότι έχει καταγραφεί πως η τομάτα έχει υψηλή ανοχή στη συγκέντρωση χλωρίου σε σχέση με άλλα κηπευτικά είδη στο θερμοκήπιο (Neocleous et al., 2021, Savvas et al., 2011). Επίσης, οι συγκεντρώσεις χλωρίου που ανιχνεύτηκαν στα φυτικά δείγματα που συλλέχθηκαν και εξετάστηκαν ήταν μικρότερες από αυτές που αναφέρονται στη βιβλιογραφία να προκαλούν προβλήματα φυτοτοξικότητας.

Ένα σημαντικό εύρημα ήταν ότι η επέμβαση των 2,5 $\mu\text{g mL}^{-1}$ χλωρίου είχε ως αποτέλεσμα την σημαντική αύξηση της παραγωγής των φυτών τομάτας. Μάλιστα, αυτή είναι η πρώτη φορά που αναφέρεται κάτι τέτοιο στη διεθνή βιβλιογραφία, καθώς συνήθως το χλώριο αναφέρεται για την πρόκληση φυτοτοξικότητας. Ωστόσο, τα παρόντα αποτελέσματα δεν επαρκούν για να εξηγήσουν την αύξηση στην παραγωγή και απαιτείται περαιτέρω διερεύνηση. Ακόμη, δεν επηρεάστηκαν οι χρωματικοί παράγοντες που εξετάστηκαν για τους καρπούς

τομάτας. Εδώ, είναι η πρώτη φορά που μελετάται το χρώμα των καρπών κατά την απολύμανση του θρεπτικού διαλύματος. Με δεδομένο ότι υπάρχουν αναφορές ότι η χρήση χλωρίου θα μπορούσε να οδηγήσει στη δημιουργία τοξικών παραγώγων όπως τα χλωρικά και υπερχλωρικά ιόντα, πραγματοποιήθηκε, επιπρόσθετα, ανάλυση υπολειμμάτων στους καρπούς της extra κλάσης. Τα αποτελέσματα έδειξαν ότι το εφαρμοζόμενο πρωτόκολλο απολύμανσης με χρήση υποχλωριώδους νατρίου για συγκεντρώσεις έως $7,5 \text{ mg mL}^{-1}$ χλωρίου οδηγεί σε καρπούς τομάτας χωρίς υπολείμματα χλωρικών και υπερχλωρικών ιόντων. Παρ' όλα αυτά, υπολείμματα χλωρικών ιόντων ανιχνεύθηκαν στο ΘΔ μετά τις επεμβάσεις. Αντίθετα με την παρούσα μελέτη, στην βιβλιογραφία υπάρχουν αναφορές για υπολείμματα χλωρικών ιόντων σε καλλιεργούμενα φυτά που ποτίζονταν με χλωριωμένο νερό (Garrido et al., 2020, López-Gálvez et al., 2017). Επίσης, στην καλλιέργεια, εφαρμόστηκαν αρχές της ολοκληρωμένης διαχείρισης εχθρών και ασθενειών (IPM-Integrated Pest Management) κατά την φυτοπροστασία της, αλλά λόγω έντονης προσβολής από το λεπιδόπτερο ήταν αναπόφευκτη μία εφαρμογή με εντομοκτόνο σκεύασμα που περιείχε spinosad. Η ανάλυση υπολειμμάτων δεν ανίχνευσε υπολείμματα spinosad. Πρέπει να σημειωθεί ότι βιβλιογραφικά αυτή είναι η πρώτη φορά που συσχετίζεται η υδροπονική καλλιέργεια με την IPM και τελικά την παραγωγή ασφαλέστερων τροφίμων. Η πειραματική αυτή εργασία δημοσιεύτηκε στο επιστημονικό περιοδικό με κριτές *Acta Horticulturae*.

Συνολικά τα αποτελέσματα της συγκεκριμένης διατριβής (i) επισημαίνουν την ανάγκη για τον παράλληλο έλεγχο της οικοτοξικότητας και αποτελεσματικότητας των νέων γεωργικών φαρμάκων, (ii) τονίζουν την αξία μεθόδων όπως η μεταβολομική ανάλυση καθώς ως υψηλής απόδοσης μέθοδος δίνει πολλές πληροφορίες για τον μηχανισμό δράσης/μηχανισμό τοξικότητας των ναοσωματιδίων και (iii) αναδεικνύει τις εκτός εδάφους καλλιέργειες ως καλλιεργητικό σύστημα με σημαντικά προτερήματα σχετικά με τη διαχείριση των εδαφογενών παθογόνων και για τη συμβολή τους στη βιώσιμη γεωργία. Γενικά, η βιώσιμη γεωργία και ειδικά η φυτοπροστασία είναι ένα δύσκολο έργο που είναι όμως απαραίτητο. Πρόκειται για ένα διεπιστημονικό καθήκον, στο οποίο είναι απαραίτητο όλοι οι ενδιαφερόμενοι φορείς να συνεισφέρουν (Loha et al., 2018). Η αναγκαιότητα της κοινής προσπάθειας, διεπιστημονικής έρευνας και δικτύωσης έχει αναφερθεί εκτενώς στη βιβλιογραφία (Lamichhane, 2017, Lamichhane et al., 2016). Σύμφωνα με τον FAO, οι πιθανοί εμπλεκόμενοι φορείς περιλαμβάνουν από τα υπουργεία γεωργίας, πανεπιστήμια, ερευνητικά κέντρα και NGOs έως τους τελικούς χρήστες των ΦΠ, εμπορικά σωματεία και θρησκευτικούς ηγέτες (FAO, 2010). Συλλογιζόμενοι, επομένως, το μεγάλο εύρος των φορέων καθίσταται σαφές ότι όλοι μας έχουμε ένα σημαντικό ρόλο για της επίτευξη της βιώσιμης γεωργίας.

Βιβλιογραφικές αναφορές

- Adams P (2002). Nutritional control in hydroponics. In Hydroponic Production of Vegetables and Ornamentals, D. Savvas and H.C. Passam, eds. (Athens, Greece: Embryo Publ.), p. 211–261.
- Agathokleous E, Feng Z, Iavicoli I, Calabrese EJ (2019a). The two faces of nanomaterials: A quantification of hormesis in algae and plants. *Environ. Int.*, 131, 105044. <https://doi.org/10.1016/j.envint.2019.105044>
- Agathokleous E, Kitao M, Calabrese EJ (2019b). Hormesis: A Compelling Platform for Sophisticated Plant Science. *Trends Plant Sci.*, 24, 318-327. <https://doi.org/10.1016/j.tplants.2019.01.004>
- Agathokleous E, Feng Z, Iavicoli I, Calabrese EJ (2020). Nano-pesticides: A great challenge for biodiversity? The need for a broader perspective. *Nano Today*, 30, 100808. <https://doi.org/10.1016/j.nantod.2019.100808>
- Agathokleous E, Barceló D, Fatta-Kassinos D, Moore MN, Calabrese EJ (2021a). Contaminants of emerging concern and aquatic organisms: the need to consider hormetic responses in effect evaluations. *Water Emerg. Contam. Nanoplastics*, 1, 2. <http://dx.doi.org/10.20517/wecn.2021.01>
- Agathokleous E, Barceló D, Calabrese EJ (2021b). US EPA: Is there room to open a new window for evaluating potential sub-threshold effects and ecological risks? *Environ. Pollut.*, 284, 117372. <https://doi.org/10.1016/j.envpol.2021.117372>
- Agrios GN (2005). Chapter One - INTRODUCTION. In Plant Pathology (Fifth Edition), ed. by Agrios GN. Academic Press: San Diego, 3-75. <https://doi.org/10.1016/B978-0-08-047378-9.50007-5>
- Akanbi-Gada MA, Ogunkunle CO, Vishwakarma V, Viswanathan K, Fatoba PO (2019). Phytotoxicity of nano-zinc oxide to tomato plant (*Solanum lycopersicum* L.): Zn uptake, stress enzymes response and influence on non-enzymatic antioxidants in fruits. *Environ. Technol. Innov.*, 14, 100325. <https://doi.org/10.1016/j.eti.2019.100325>
- Aliferis KA, Chrysai-Tokousbalides M (2010). Metabolomics in pesticide research and development: review and future perspectives. *Metabolomics*, 7, 35-53. <https://doi.org/10.1007/s11306-010-0231-x>
- Aliferis KA, Jabaji S (2011). Metabolomics – A robust bioanalytical approach for the discovery of the modes-of-action of pesticides: A review. *Pest. Biochem. Physiol.*, 100, 105-117. <https://doi.org/10.1007/s11306-010-0231-x>
- Aliferis KA, Materzok S, Pazirotou GN, Chrysai-Tokousbalides M (2009). *Lemna minor* L. as a model organism for ecotoxicological studies performing ¹H NMR fingerprinting. *Chemosphere*, 76, 967-973. <https://doi.org/10.1016/j.chemosphere.2009.04.025>
- Anastassiades M, Tasdelen B, Sherbaum E, Stajnbaher D (2007). Recent developments in QueChERS methodology for pesticide multiresidue analysis. In: Ohkawa H, Miyagawa H, Lee PW (eds). Pesticide Chemistry: Crop Protection, public health, environmental safety. Wiley-VCH, Weinheim.

-
- Apel K and Hirt H (2004). Reactive oxygen species: metabolism, oxidative stress, and signal transduction. *Annu. Rev. Plant Biol.*, 55(1), 373–99. <https://doi.org/10.1146/annurev.arplant.55.031903.141701>
- Arpaia S, Smagghe G and Sweet JB (2021). Biosafety of bee pollinators in genetically modified agro-ecosystems: Current approach and further development in the EU. *Pest Manag. Sci.*, <https://doi.org/10.1002/ps.6287>
- Bagherzadeh Homaei M, Ehsanpour AA (2016). Silver nanoparticles and silver ions: Oxidative stress responses and toxicity in potato (*Solanum tuberosum* L) grown *in vitro*. *Hortic. Environ. Biotechnol.*, 57, 544–553. <https://doi.org/10.1007/s13580-016-0083-z>
- Bahlai CA, Xue Y, McCreary CM, Schaafsma AW and Hallett RH (2010). Choosing organic pesticides over synthetic pesticides may not effectively mitigate environmental risk in soybeans. *Plos One*, 5(6), e11250. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0011250>
- Baker BP, Green TA, and Loker AJ (2020). Biological control and integrated pest management in organic and conventional systems. *Biol. Control*, 140, 104095. <https://doi.org/10.1016/j.biocontrol.2019.104095>
- Balaure P, Gudovan D, Gudovan I (2017). Nanopesticides: a new paradigm in crop protection. In Grumezescu AM (ed.) *New Pesticides and Soil Sensors*. 129-192. <https://doi.org/10.1016/B978-0-12-804299-1.00005-9>
- Bar-Tal A, Feigin A, Sheinfeld S, Rosenberg R, Sternbaum B, Rylski I, Pressman E (1995). Root restriction and N-NO₃ solution concentration effects on nutrient uptake, transpiration and dry matter production of tomato. *Sci. Hort.*, 63, 195-208.
- Bartz JA, Lill RE, et al. (1988). Potential for postharvest disease in tomato fruit infiltrated with chlorinated water and Chlorination of asparagus hydrocooling water for the control of post-harvest decay organisms., *Plant Dis.*, 12(1), 9-13.
- Barzman M, Bårberi P, Birch ANE, Boonekamp P, Dachbrodt-Saaydeh S, Graf B, et al. (2015). Eight principles of integrated pest management. *Agron. Sustain. Dev.*, 35(4), 1199-1215. <https://doi.org/10.1007/s13593-015-0327-9>
- Basset Y and Lamarre GPA (2019). Toward a world that values insects. *Science*, 364(6447), 1230. <https://doi.org/10.1126/science.aaw7071>
- Beckie HJ and Harker KN (2017). Our top 10 herbicide-resistant weed management practices. *Pest Manag. Sci.*, 73(6), 1045-1052. <https://doi.org/10.1002/ps.4543>
- Beecher C (2020). Safety aspects of indoor farming signal a change in agriculture. <https://www.foodsafetynews.com/2020/02/safety-aspects-of-indoor-farming-signal-a-change-in-agriculture/> [προσπελάστηκε 29-10-2021]
- BfR (2014). BfR recommendations for the health assessment of chlorate residues in food, BfR opinion No. 028/2014. The German Federal Institute for Risk Assessment, Berlin, Germany
- Bhandari G, Atreya K, Yang X, Fan L and Geissen V (2018). Factors affecting pesticide safety behaviour: The perceptions of Nepalese farmers and retailers. *STOTEN*, 631-632, 1560-1571. <https://doi.org/10.1016/j.scitotenv.2018.03.144>
-

-
- Bilalis D, Krokida M, Roussis I, Papastylianou P, Travlos I, Cheimona N, Dede A (2018). Effects of organic and inorganic fertilization on yield and quality of processing tomato (*Lycopersicon esculentum* Mill.). *Folia Hortic.*, 30(2), 321-332. <https://doi.org/10.2478/fhort-2018-0027>
- Binder CR, Feola G and Steinberger JK (2010). Considering the normative, systemic and procedural dimensions in indicator-based sustainability assessments in agriculture. *EIA Review*, 30(2), 71-81. <https://doi.org/10.1016/j.eiar.2009.06.002>
- Biondi A, Raul NCG, Fang-Hao W, Desneux N (2018). Ecology, worldwide spread, and management of the invasive south American tomato pinworm, *Tuta absoluta*: Past, present, and future. *Annu. Rev. Entomol.*, 63, 239-258. <https://doi.org/10.1146/annurev-ento-031616->
- Bisht J, Palni LM, Harsh NS (2019). Pesticide contamination and human health. In Wani, K. A., Mamta, (Ed.), Handbook of research on the adverse effects of pesticide pollution in aquatic ecosystems (pp. 137-149). IGI Global. <http://doi:10.4018/978-1-5225-6111-8.ch008>
- Blokhina O (2003). Antioxidants, oxidative damage and oxygen deprivation stress: a review. *Ann. Bot.*, 91, 179–194. <https://doi.org/10.1093/aob/mcf118>
- Boisseau P, Loubaton B (2011). Nanomedicine, nanotechnology in medicine. *CR Phys.*, 12, 620-636. <https://doi.org/10.1016/j.crhy.2011.06.001>
- Bourguet D and Guillemaud T (2016). The hidden and external costs of pesticide use. In: Lichtfouse E. (eds) Sustainable agriculture reviews. Sustainable Agriculture Reviews, vol 19. Springer, Cham, 35-120. https://doi.org/10.1007/978-3-319-26777-7_2
- Bowne J, Bacic A, Tester M, Roessner U (2018). Abiotic stress and metabolomics. *Annu. Plant Rev. online*, 61-85. <https://doi.org/10.1002/9781119312994.apr0463>
- Bradford MM (1976). A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. *Anal. Biochem.*, 72, 248-54. <https://doi.org/10.1006/abio.1976.9999>
- Brakhage AA (2013). Regulation of fungal secondary metabolism. *Nat. Rev. Microbiol.*, 11, 21-32. <https://doi.org/10.1038/nrmicro2916>
- Braun A and Supkoff D (1994). Options to methyl bromide for the control of soil-borne diseases and pests in California with reference to the Netherlands, Pest Management Analysis and Planning Program, California Environmental Protection Agency, Department of Pesticide Regulation, Sacramento, CA, July 1994.
- Brown M, Dunn WB, Dobson P, Patel Y, Winder C, et al. (2009). Mass spectrometry tools and metabolite-specific databases for molecular identification in metabolomics. *Analyst*, 134, 1322-1332. <https://doi.org/10.1039/B901179J>.
- Brumos J, Talon M, Bouhlai R, Colmenero-Flores JM (2010). Cl⁻ homeostasis in includer and excluder citrus rootstocks: transport mechanisms and identification of candidate genes. *Plant Cell Environ.*, 33, 2012-2027. <https://doi.org/10.1111/j.1365-3040.2010.02202.x>
- Brunel F, El Gueddari NE, Moerschbacher BM (2013). Complexation of copper (II) with chitosan nanogels: Toward control of microbial growth. *Carbohydr. Polym.*, 92, 1348-1356. <https://doi.org/10.1016/j.carbpol.2012.10.025>.
-

-
- Bull RJ, Gerba C, Trussell RR (1990). Evaluation of the health risks associated with disinfection. *Crit. Rev. Environ. Control*, 20(2), 77–113. <https://doi.org/10.1080/10643389009388392>
- Bundy JG, Davey MP, Viant MR (2008). Environmental metabolomics: a critical review and future perspectives. *Metabolomics*, 5, 3. <https://doi.org/10.1007/s11306-008-0152-0>
- Bureš F (2019). Quaternary ammonium compounds: simple in structure, complex in application. *Top Curr. Chem. (Z)*, 377, 14. <https://doi.org/10.1007/s41061-019-0239-2>
- Bylemans D, De Coninck B, Keulemans W (2019). Directorate-general for parliamentary research services (European Parliament). Farming without plant protection products - Can we grow without using herbicides, fungicides and insecticides? In *EPRS / European Parliamentary Research Service*. <https://doi.org/10.2861/05433>
- Calabrese EJ and Blain RB (2011). The hormesis database: The occurrence of hormetic dose responses in the toxicological literature. *Regul. Toxicol. Pharmacol.*, 61, 73-81. <https://doi.org/10.1016/j.yrtph.2011.06.003>
- Calvo AM, Gardner HW, Keller NP (2001). Genetic connection between fatty acid metabolism and sporulation in *Aspergillus nidulans*. *J. Biol. Chem.* 276, 25766-25774. <https://doi.org/10.1074/jbc.M100732200>.
- Camara MC, Campos EVR, Monteiro RA, do Espírito Santo Pereira A, de Freitas Proença PL, Fraceto LF (2019). Development of stimuli-responsive nano-based pesticides: emerging opportunities for agriculture. *J. Nanobiotechnology*, 17(1), 100. <https://doi.org/10.1186/s12951-019-0533-8>
- Caminade AM, Yan D, Smith DK (2015). Dendrimers and hyperbranched polymers. *Chem. Soc. Rev.*, 44, 3870-3873. <https://doi.org/10.1039/C5CS90049B>
- Campos EVR, Oliveira Jld, da Silva CMG, Pascoli M, Pasquoto T, et al. (2015). Polymeric and solid lipid nanoparticles for sustained release of carbendazim and tebuconazole in agricultural applications. *Sci. Rep.*, 5(1), 13809. <https://doi.org/10.1038/srep13809>
- Cañas JE, Long M, Nations S, Vadan R, Dai L, et al. (2008). Effects of functionalized and nonfunctionalized single-walled carbon nanotubes on root elongation of select crop species. *Environ. Toxicol. Chem.*, 27 (9), 1922–1931. <https://doi.org/10.1897/08-117.1>
- Canelas AB, ten Pierick A, Ras C, Seifar RM, van Dam JC, et al. (2009). Quantitative evaluation of intracellular metabolite extraction techniques for yeast metabolomics. *Anal. Chem.*, 81, 7379-7389. <https://doi.org/10.1021/ac900999t>
- Canto T, Aranda MA and Fereres A (2009). Climate change effects on physiology and population processes of hosts and vectors that influence the spread of hemipteran-borne plant viruses. *Glob. Chang. Biol.*, 15(8), 1884-1894. <https://doi.org/10.1111/j.1365-2486.2008.01820.x>
- Cao J, Guenther RH, Sit TL, Lommel SA, Opperman CH, Willoughby JA (2015). Development of abamectin loaded plant virus nanoparticles for efficacious plant parasitic nematode control. *ACS Appl. Mater. Interfaces*, 7(18), 9546-9553. <https://doi.org/10.1021/acsami.5b00940>
- Carrola J, Bastos V, Ferreira de Oliveira JMP, Oliveira H, Santos C, et al. (2016). Insights into the impact of silver nanoparticles on human keratinocytes metabolism through NMR
-

-
- metabolomics. *Arch. Biochem. Biophys.*, 589, 53-61.
<https://doi.org/10.1016/j.abb.2015.08.022>
- Carrola J, Pinto RJB, Nasirpour M, Freire CSR, Gil AM, et al. (2018). NMR metabolomics reveals metabolism-mediated protective effects in liver (HepG2) cells exposed to subtoxic levels of silver nanoparticles. *J. Proteome Res.*, 17, 1636-1646.
<https://doi.org/10.1021/acs.jproteome.7b00905>
- Carroll CL, Carter CA, Goodhue RE, Lawell CYCL, Subbarao KV (2017). A review of control options and externalities for verticillium wilts. *Phytopathology*, 108, 160-171.
<https://doi.org/10.1094/PHYTO-03-17-0083-RVW>
- Cayanan DF, Zheng Y, Zhang P, Graham T, Dixon M, et al. (2008). Sensitivity of Wve container-grown nursery species to chlorine in overhead irrigation water. *HortScience*, 43(6):1882–1887. <https://doi.org/10.21273/HORTSCI.43.6.1882>
- Cayanan DF, Dixon M, Zheng YB, Llewellyn J (2009a). Response of container-grown nursery plants to chlorine used to disinfest irrigation water. *HortScience*, 44(1):164–167.
<https://doi.org/10.21273/HORTSCI.44.1.164>
- Chahardoli A, Sharifan H, Karimi N, Kakavand SN (2022). Uptake, translocation, phytotoxicity, and hormetic effects of titanium dioxide nanoparticles (TiO₂NPs) in *Nigella arvensis* L. *STOTEN*, 806, 151222. <https://doi.org/10.1016/j.scitotenv.2021.151222>
- Chellemi DO, Gamliel A, Katan J, Subbarao KV. (2016). Development and deployment of system-based approaches for the management of soilborne plant pathogens. *Phytopathology*, 106, 216-225. <https://doi.org/10.1094/PHYTO-09-15-0204-RVW>
- Chen C, Dickman MB (2005). Proline suppresses apoptosis in the fungal pathogen *Colletotrichum trifolii*. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.*, 102, 3459-3464.
<https://doi.org/10.1073/pnas.0407960102>.
- Chen K, Fu Z, Wang M, Lv Y, Wang C, et al. (2018). Preparation and characterization of size-controlled nanoparticles for high-loading λ-cyhalothrin delivery through flash nanoprecipitation. *J. Agric. Food Chem.*, 66(31), 8246-8252.
<https://doi.org/10.1021/acs.jafc.8b02851>
- Chen M, Li K, Li H, et al. (2017). The glutathione peroxidase gene family in *Gossypium hirsutum*: Genome-wide identification, classification, gene expression and functional analysis. *Sci. Rep.*, 7, 44743. <https://doi.org/10.1038/srep44743>
- Chen X, O'Halloran J, Jansen MAK (2016). The toxicity of zinc oxide nanoparticles to *Lemna minor* (L.) is predominantly caused by dissolved Zn. *Aquat. Toxicol.*, 174, 46-53.
<https://doi.org/10.1016/j.aquatox.2016.02.012>
- Chen X, O'Halloran J, Jansen MAK (2018). Time matters: the toxicity of zinc oxide nanoparticles to *Lemna minor* L. increases with exposure time. *Water Air Soil Pollut.*, 229, 99.
<https://doi.org/10.1007/s11270-018-3759-4>
- Cheng L, Zhang K, Zhang N, Melo MAS, Weir MD, et al. (2017). Developing a new generation of antimicrobial and bioactive dental resins. *J. Dent. Res.*, 96, 855-863.
<https://doi.org/10.1177/0022034517709739>
-

-
- Chevrot R, Rosen R, Haudecoeur E, Cirou A, Shelp BJ, et al. (2006). GABA controls the level of quorum-sensing signal in *Agrobacterium tumefaciens*. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.*, 103, 7460-7464. <https://doi.org/10.1073/pnas.0600313103>
- Clark GA, Smajstrla AG (1992). Treating irrigation systems with chlorine. *Foliage Digest.*, 15(6):3–5
- Clément B and Bouvet Y (1993) Assessment of landfill leachate toxicity using the duckweed *Lemna minor*. *STOTEN*, 134, 1179–1190. [https://doi.org/10.1016/S0048-9697\(05\)80123-8](https://doi.org/10.1016/S0048-9697(05)80123-8)
- Colella C, Miicola C, Amenduni M, D'Amico M, Bubici G, Cirulli M (2008). Sources of verticillium wilt resistance in wild olive germplasm from the Mediterranean region. *Plant Pathol.*, 57, 533-539. <https://doi.org/10.1111/j.1365-3059.2007.01785.x>
- Colmenero-Flores JM, Franco-Navarro JD, Cubero-Font P, Peinado-Torrubia P, Rosales MA. (2019). Chloride as a beneficial macronutrient in higher plants: new roles and regulation. *Int. J. Mol.*, 20(19), 4686. <https://doi.org/10.3390/ijms20194686>
- Combrink JC and Visagie TR (1982). Chlorination of dump tank water to reduce postharvest rot in apples. *Deciduous Fruit Grower*, 32(pt. 2): 61-63.
- Commission of the European Communities 7032/VI/95 rev.5 (1997). Guidance on storage stability of residue samples, Appendix H. https://food.ec.europa.eu/system/files/2016-10/pesticides_mrl_guidelines_app-h.pdf
- Cook RJ and Baker KF. (1983). The nature and practice of biological control of plant pathogens. APS, USA.
- Copping LG (1998). The BioPesticide manual. A world compendium. 1st edn, ed by LG Copping, The British Crop Protection Council, Farnham, UK. [https://doi.org/10.1002/\(SICI\)1526-4998\(200003\)56:3<293::AID-PS101>3.0.CO;2-6](https://doi.org/10.1002/(SICI)1526-4998(200003)56:3<293::AID-PS101>3.0.CO;2-6)
- Critten DL and Bailey BJ (2002). A review of greenhouse engineering developments during the 1990s. *Agric. For Meteorol.*, 112, 1–22. [https://doi.org/10.1016/S0168-1923\(02\)00057-6](https://doi.org/10.1016/S0168-1923(02)00057-6)
- Daayf F (2015). Verticillium wilts in crop plants: Pathogen invasion and host defence responses. *Can. J. Plant Pathol.*, 37, 8-20. <https://doi.org/10.1080/07060661.2014.989908>
- Danilczuk M, Lund A, Sadlo J, Yamada H, Michalik J (2006). Conduction electron spin resonance of small silver particles. *Spectrochim. Acta A*, 63, 189-191. <https://doi.org/10.1016/j.saa.2005.05.002>
- Dannehl D, Schuch I, Gao Y et al. (2016). Effects of hypochlorite as a disinfectant for hydroponic systems on accumulations of chlorate and phytochemical compounds in tomatoes. *Eur. Food Res. Technol.*, 242, 345–353 <https://doi.org/10.1007/s00217-015-2544-5>
- Das R, Gang S, Nath SS, Bhattacharjee R (2010). Linoleic acid capped copper nanoparticles for antibacterial activity. *J. Bionanosci.*, 4, 82-86. <https://doi.org/10.1166/jbns.2010.1035>
- Dayan FE (2019). Current status and future prospects in herbicide discovery. *Plants*, 8(9), 341. <https://doi.org/10.3390/plants8090341>
- Daughtry B (1984). Chlorination of irrigation water. *Comb. Proc. Int. Plant Propag Soc.*, 33, 596–599
- De Hayr R, Bodman K, Forsberg L (1994). Bromine and chlorine disinfestation of nursery water supplies. *Comb. Proc. Int. Plant Propag Soc.*, 44, 60–66
-

-
- Debnath M and Khan MS (2017). Health concerns of pesticides. In *Pesticide Residue in Foods* (pp. 103–118). Cham: Springer International Publishing. https://doi.org/10.1007/978-3-319-52683-6_6
- de Castro Fonseca M, Aguiar CJ, da Rocha Franco JA, Gingold RN, Leite MF (2016). GPR91: expanding the frontiers of Krebs cycle intermediates. *Cell Commun. Signal.*, 14, 3. <https://doi.org/10.1186/s12964-016-0126-1>
- de Olde EM, Moller H, Marchand F, McDowell RW, MacLeod CJ, et al. (2017). When experts disagree: the need to rethink indicator selection for assessing sustainability of agriculture. *Environ. Dev. Sustain.*, 19(4), 1327-1342. <https://doi.org/10.1007/s10668-016-9803-x>
- de Oliveira JL, Campos EVR, Gonçalves da Silva CM, Pasquoto T, Lima R, Fraceto LF (2015). Solid lipid nanoparticles Co-loaded with simazine and atrazine: Preparation, characterization, and evaluation of herbicidal activity. *J. Agric. Food Chem.*, 63(2), 422-432. <https://doi.org/10.1021/jf5059045>
- DeLeo PC, Huynh C, Pattanayek M, Schmid KC, Pechacek N (2020). Assessment of ecological hazards and environmental fate of disinfectant quaternary ammonium compounds. *Ecotoxicol. Environ. Saf.*, 206, 111116. <https://doi.org/10.1016/j.ecoenv.2020.111116>
- Demidchik V (2015). Mechanisms of oxidative stress in plants: From classical chemistry to cell biology. *Environ. and Exp. Bot.*, 109, 212-228. <https://doi.org/10.1016/j.envexpbot.2014.06.021>
- Depotter JRL, Deketelaere S, Inderbitzin P, Tiedemann AV, Höfte M, et al. (2016). *Verticillium longisporum*, the invisible threat to oilseed rape and other brassicaceous plant hosts. *Mol. Plant Pathol.*, 17, 1004-1016. <https://doi.org/10.1007/s10658-016-1045-0>
- Dhananjayan V and Ravichandran B (2018). Occupational health risk of farmers exposed to pesticides in agricultural activities. *Curr. Opin. Environ. Sci. Health*, 4, 31-37. <https://doi.org/10.1016/j.coesh.2018.07.005>
- Diaz R. and Rosenberg R (2008). Spreading dead zones and consequences for marine ecosystems. *Science* (New York, N.Y.), 321, 926-929. <https://doi.org/10.1126/science.1156401>
- Diez-Simon C, Mumm R, Hall RD (2019). Mass spectrometry-based metabolomics of volatiles as a new tool for understanding aroma and flavour chemistry in processed food products. *Metabolomics*, 15, 41. <https://doi.org/10.1007/s11306-019-1493-6>
- Ding Y, Bai X, Ye Z, Gong D, Cao J, Hua Z (2019). Humic acid regulation of the environmental behavior and phytotoxicity of silver nanoparticles to *Lemna minor*. *Environ. Sci.: Nano*, 6, 3712-3722. <https://doi.org/10.1039/C9EN00980A>
- Dimkpa CO, McLean JE, Britt DW, Anderson AJ (2013). Antifungal activity of ZnO nanoparticles and their interactive effect with a biocontrol bacterium on growth antagonism of the plant pathogen *Fusarium graminearum*. *BioMetals*, 26 (6), 913–924. <https://doi.org/10.1007/s10534-013-9667-6>
- Directive 2009/128/EC of the European Parliament and of the Council of 21 October 2009 establishing a framework for Community action to achieve the sustainable use of pesticides. *Official Journal of the European Union*, 52, 71-86. <http://eur-lex.europa.eu/legal-content/EN/TXT/?uri=OJ:L:2009:309:TOC>
-

-
- Doke N (1983). Involvement of superoxide anion generation in the hypersensitive response of potato tuber tissues to infection with an incompatible race of *Phytophthora infestans* and to the hyphal wall components. *Physiol. Plant Pathol.*, 23, 345-357. [https://doi.org/10.1016/0048-4059\(83\)90019-X](https://doi.org/10.1016/0048-4059(83)90019-X)
- Dolenc Koce J (2017). Effects of exposure to nano and bulk sized TiO₂ and CuO in *Lemna minor*. *Plant Physiol. Biochem.*, 119, 43-49. <https://doi.org/10.1016/j.plaphy.2017.08.014>
- Dor E, Plakhine D, Joel D, Larose H, Westwood J, Smirnov E, et al. (2020). A new race of sunflower broomrape (*Orobancha cumana*) with a wider host range due to changes in seed response to strigolactones. *Weed Sci.*, 68(2), 134-142. <https://doi.org/10.1017/wsc.2019.73>
- Dubey A and Mailapalli DR (2016). Nanofertilisers, Nanopesticides, Nanosensors of Pest and Nanotoxicity in Agriculture. In E. Lichtfouse (Ed.), *Sustainable Agriculture Reviews: Volume 19* (pp. 307-330). Cham: Springer International Publishing.
- Duke SO (2012). Why have no new herbicide modes of action appeared in recent years. *Pest Manag. Sci.*, 68(4), 505-512. <https://doi.org/10.1002/ps.2333>
- Duke SO (2018). The history and current status of glyphosate. *Pest Manag. Sci.*, 74(5), 1027-1034. <https://doi.org/10.1002/ps.4652>
- Eden Green Technology (2020). How Hydroponics & Vertical Farming Can Improve Food Safety and Protect our Food Supply. <https://www.edengreen.com/blog-collection/how-hydroponics-and-vertical-farming-can-improve-food-safety> [προσπελάστηκε 29-10-2021]
- Edwards EA, Rawsthorne S, Mullineaux PM (1990). Subcellular distribution of multiple forms of glutathione reductase in leaves of pea (*Pisum sativum* L.). *Planta*, 180, 278-284. <https://doi.org/10.1007/BF00194008>
- EFSA (2014). Trilateral meeting on perchlorate risk assessment, report of the meeting on 12-02-2014. European Food Safety Authority, Parma
- EFSA (2018a). Guidance on risk assessment of the application of nanoscience and nanotechnologies in the food and feed chain: Part 1, human and animal health. *EFSA Journal*, 16, 5327. <https://doi.org/10.2903/j.efsa.2018.5327>
- EFSA (2018b). Peer review of the pesticide risk assessment of the active substance Spinosad. *EFSA J.*, 16, 5252. <https://doi.org/10.2903/j.efsa.2018.5252>
- EFSA (2021). Nanotechnology. <https://www.efsa.europa.eu/en/topics/topic/nanotechnology> [προσπελάστηκε 30-12-2021]
- Ehret DL, Alsanus B, Wohanka W, Menzies GJ, Utkhede R (2001). Disinfestation of recirculating nutrient solutions in greenhouse horticulture. *Agronomie*, 21(4), 323-339. <https://doi.org/10.1051/agro:2001127>
- Elmer W, De La Torre-Roche R, Pagano L, Majumdar S, Zuverza-Mena N, Dimkpa C, et al. (2018). Effect of Metalloid and Metal Oxide Nanoparticles on Fusarium Wilt of Watermelon. *Plant Dis.*, 102(7), 1394-1401. <https://doi.org/10.1094/PDIS-10-17-1621-RE>
- EPA –Environmental Protection Agency (USA) (2012). 2012 Guidelines for water reuse. <https://www.epa.gov/sites/default/files/2019-08/documents/2012-guidelines-water-reuse.pdf> [προσπελάστηκε 21-12-2021]
-

-
- EPA (US Environmental Protection Agency) (2020). Sources of Greenhouse Gas Emissions. <https://www.epa.gov/ghgemissions/sources-greenhouse-gas-emissions> [προσπελάστηκε 30-11-2020]
- EU Pesticides Database (2021). https://ec.europa.eu/food/plant/pesticides/eu-pesticides-db_en [προσπελάστηκε 25-03-2021]
- Eurofins agrosience services. Import Tolerance – what is it and why is it needed? <https://www.eurofins.com/agrosience-services/about-us/latest-news/import-tolerance/> [προσπελάστηκε 15-02-2021]
- European Commission (2015). Commission Regulation (EU) 2015/603 of 13 April 2015 amending Annexes II, III and V to Regulation (EC) No 396/2005 of the European Parliament and of the Council as regards maximum residue levels for 2-naphthoxyacetic acid, acetochlor, chloropicrin, diflufenican, flurprimidol, flutolanil and spinosad in or on certain products. <http://data.europa.eu/eli/reg/2015/603/oj>
- European Commission (2020). A Farm to Fork Strategy for a fair, healthy and environmentally-friendly food system. Communication from the Commission to the European Parliament, the Council, the European Economic and Social Committee and the Committee of the Regions. Brussels, 20.5.2020. <https://eur-lex.europa.eu/legal-content/EN/TXT/?uri=CELEX:52020DC0381>
- European Commission (2021a). Definition of a nanomaterial. https://ec.europa.eu/environment/chemicals/nanotech/faq/definition_en.htm [προσπελάστηκε 30-12-2021]
- European Commission (2021b). Chlorate. https://ec.europa.eu/food/plants/pesticides/maximum-residue-levels/chlorate_en [προσπελάστηκε 29-10-2021]
- Europol (2015). Huge seizures of 190 tonnes of counterfeit pesticides. Europol Press Release 18. December 2015. <https://www.europol.europa.eu/newsroom/news/huge-seizures-of-190-tonnes-of-counterfeit-pesticides> [προσπελάστηκε 17-05-2021]
- EUROSTAT (2020). Agri-environmental indicator-consumption of pesticides. https://ec.europa.eu/eurostat/statistics-explained/index.php/Agri-environmental_indicator_-_consumption_of_pesticides [προσπελάστηκε 22-05-2020].
- EUROSTAT (2021). Agri-environmental indicator-consumption of pesticides. https://ec.europa.eu/eurostat/statistics-explained/index.php/Agri-environmental_indicator_-_consumption_of_pesticides [προσπελάστηκε 28-04-2021].
- FAO (1985). The International Code of Conduct on Pesticide Management. <http://www.fao.org/3/x5562E/X5562e0a.htm>
- FAO (2005). 1. New features and recent developments. <http://www.fao.org/3/af340e/af340e05.htm> [προσπελάστηκε 12-05-2021]
- FAO (2009). How to feed the world in 2050. [http://www.fao.org/fileadmin/templates/wsfs/docs/expert_paper/How to Feed the World in 2050.pdf](http://www.fao.org/fileadmin/templates/wsfs/docs/expert_paper/How_to_Feed_the_World_in_2050.pdf)
-

-
- FAO (2010). The preparation of inventories of pesticides and contaminated materials. 4 stakeholder analysis. <http://www.fao.org/3/i1724e/i1724e00.htm> [προσπελάστηκε 12-5-2021].
- FAO (2017). The future of food and agriculture – Trends and challenges. <http://www.fao.org/3/a-i6583e.pdf>
- FAO (2018). The future of food and agriculture – Alternative pathways to 2050. 224 pp. Licence: CC BY-NC-SA 3.0 IGO. <http://www.fao.org/3/l8429EN/l8429en.pdf>
- FAO-WHO (2008). Safety evaluation of certain food additives and contaminants. Sixty-eighth meeting of the Joint FAO/WHO Expert Committee on Food Additives (JECFA). vol 59, WHO food additives series 59 edn. WHO, Geneva
- FAO-WHO (2014). The International Code of Conduct on Pesticide Management (*fourth version*). <http://www.fao.org/3/a-i3604e.pdf>
- FAOSTAT (2018). Pesticides indicators. <http://www.fao.org/faostat/en/#data/EP/visualize> [προσπελάστηκε 28-04-2021]
- FAOSTAT (2021). Crops and livestock products. <https://www.fao.org/faostat/en/#data/QCL> [προσπελάστηκε 29-10-2021]
- Farid AE (2001). Analyses of pesticides and their metabolites in foods and drinks. *TrAC*, 20, 649-661. [https://doi.org/10.1016/S0165-9936\(01\)00121-2](https://doi.org/10.1016/S0165-9936(01)00121-2)
- Farmer BH (1986). Perspectives on the 'Green Revolution' in South Asia. *Mod. Asian Stud*, 20(1), 175-199. <https://doi.org/10.1017/S0026749X00013627>
- Farrag HF (2015). Evaluation of the growth responses of *Lemna gibba* L. (duckweed) exposed to silver and zinc oxide nanoparticles. *World Appl. Sci. J.*, 33, 190-202. <https://doi.org/10.5829/idosi.wasj.2015.33.02.83>
- Fatemi H, Esmail Pour B, Rizwan M (2021). Foliar application of silicon nanoparticles affected the growth, vitamin C, flavonoid, and antioxidant enzyme activities of coriander (*Coriandrum sativum* L.) plants grown in lead (Pb)-spiked soil. *Environ. Sci. Pollut. Res.*, 28, 1417–1425. <https://doi.org/10.1007/s11356-020-10549-x>
- Feehily C and Karatzas K (2013). Role of glutamate metabolism in bacterial responses towards acid and other stresses. *J. Appl. Microbiol.*, 114, 11-24. <https://doi.org/10.1111/j.1365-2672.2012.05434.x>
- Feng QL, Wu J, Chen GQ, Cui FZ, Kim TN, Kim JO (2000). A mechanistic study of the antibacterial effect of silver ions on *Escherichia coli* and *Staphylococcus aureus*. *J. Biomed. Mater. Res.*, 52, 662-668. [https://doi.org/10.1002/1097-4636\(20001215\)52:4<662::AID-JBM10>3.0.CO;2-3](https://doi.org/10.1002/1097-4636(20001215)52:4<662::AID-JBM10>3.0.CO;2-3)
- Fiehn O, Robertson D, Griffin J, et al. (2007). The metabolomics standards initiative (MSI). *Metabolomics*, 3(3), 175-178. <https://doi.org/10.1007/s11306-007-0070-6>
- FIFRA (2010). Evaluation of the hazard and exposure associated with nanosilver and other nanometal pesticide products. U.S. Federal Insecticide, Fungicide, and Rodenticide Act (FIFRA) Scientific Advisory Panel (SAP). <http://www.epa.gov/scipoly/sap/meetings/2009/november/110309ameetingminutes.pdf>
-

-
- Fishel FM (2015). The global increase in counterfeit pesticides. Department of Agronomy, Pesticide. Information Office, University of Florida. <https://site.caes.uga.edu/sehp/files/2020/03/UF-Global-Increase-in-Counterfeit-Pesticides.pdf> [προσπελάστηκε 17-05-2021]
- Fleeman R, LaVoi TM, Santos RG, Morales A, et al. (2015). Combinatorial libraries as a tool for the discovery of novel, broad-spectrum antibacterial agents targeting the ESKAPE pathogens. *J. Med. Chem.*, 58, 3340-3355. <https://doi.org/10.1021/jm501628s>
- Fojtová D, Vašíčková J, Grillo R, Bílková Z, et al. (2019). Supplementary Material Nanoformulations can significantly affect pesticide degradation and uptake by earthworms and plants. *Environ. Chem.*, 16(6), 470-481. <https://doi.org/10.1071/EN19057>
- Fraceto LF, Grillo R, de Medeiros GA, Scognamiglio V, et al. (2016). Nanotechnology in Agriculture: Which Innovation Potential Does It Have? *Front. Environ. Sci.*, 4(20). <https://doi.org/10.3389/fenvs.2016.00020>
- Frade RFM, Rosatella AA, Marques CS, Branco LC, et al. (2009). Toxicological evaluation on human colon carcinoma cell line (CaCo-2) of ionic liquids based on imidazolium, guanidinium, ammonium, phosphonium, pyridinium and pyrrolidinium cations. *Green Chem.*, 11, 1660-1665. <https://doi.org/10.1039/B914284N>
- FRAC (Fungicide Action Committee) (2020). FRAC Code List: Fungal control agents sorted by cross resistance pattern and mode of action (including FRAC Code numbering) <https://www.frac.info/knowledge-database/downloads> [προσπελάστηκε 24-03-2021]
- FRAC, 2019. Fungal control agents sorted by cross resistance pattern and mode of action https://www.frac.info/docs/default-source/publications/frac-code-list/frac-code-list-2019.pdf?sfvrsn=98ff4b9a_2 [προσπελάστηκε Οκτώβριο-2019]
- Franco-Navarro JD, Brumós J, Rosales MA, Cubero-Font P, et al. (2015). Chloride regulates leaf cell size and water relations in tobacco plants, *J. Exp. Bot.*, 67, 873–891, <https://doi.org/10.1093/jxb/erv502>
- Franklin EL and Raine NE (2019). Moving beyond honeybee-centric pesticide risk assessments to protect all pollinators. *Nat. Ecol. Evol.*, 3, 1373–1375. <https://doi.org/10.1038/s41559-019-0987-y>
- Galindo-Prieto B, Eriksson L, Trygg J (2014). Variable influence on projection (VIP) for orthogonal projections to latent structures (OPLS). *J. Chemometr.*, 28(8), 623-632. <https://doi.org/10.1002/cem.2627>
- García JAL, Probanza A, Ramos B, Palomino M, Mañero FJG (2004). Effect of inoculation of *Bacillus licheniformis* on tomato and pepper. *Agronomie*, 24(4), 169-176. <https://doi.org/10.1051/agro:2004020>
- Gardea-Torresdey JL, Rico CM, White JC (2014). Trophic transfer, transformation, and impact of engineered nanomaterials in terrestrial environments. *Environ. Sci. Technol.*, 48(5), 2526-2540. <https://doi.org/10.1021/es4050665>
- Garnier E, Shipley B, Roumet C, Laurent G (2001). A standardized protocol for the determination of specific leaf area and leaf dry matter content. *Funct. Ecol.*, 15, 688-695. <https://doi.org/10.1046/j.0269-8463.2001.00563.x>
-

-
- Garrido Y, Marín A, Tudela JA, Truchado P, et al. (2020). Chlorate accumulation in commercial lettuce cultivated in open field and irrigated with reclaimed water. *Food Control*, 114, 107283. <https://doi.org/10.1016/j.foodcont.2020.107283>
- Giannopolitis CN and Ries SK (1977). Superoxide dismutases: I. Occurrence in higher plants. *Plant Physiol.*, 59(2), 309-14. <https://doi.org/10.1104/pp.59.2.309>
- Geilfus CM (2018). Review on the significance of chlorine for crop yield and quality. *Plant Sci.*, 270, 114-122. <https://doi.org/10.1016/j.plantsci.2018.02.014>
- Gill SS and Tuteja N (2010) Reactive oxygen species and antioxidant machinery in abiotic stress tolerance in crop plants. *Plant Physiol. Biochem.*, 48, 909-930. <http://dx.doi.org/10.1016/j.plaphy.2010.08.016>
- Gilliham M and Tyerman SD (2016). Linking metabolism to membrane signaling: the GABA-malate connection. *Trends Plant Sci.*, 21, 295-301. <https://doi.org/10.1016/j.tplants.2015.11.011>
- Glare T, Caradus J, Gelernter W, Jackson T, et al. (2012). Have biopesticides come of age? *Trends Biotechnol.*, 30(5), 250-258. <https://doi.org/10.1016/j.tibtech.2012.01.003>
- Globalnewswire (2021). Hydroponics Market Size Worth \$ 22.2 Billion By 2028; CAGR of 11.3% | Reports and Data <https://www.globenewswire.com/en/news-release/2021/03/03/2186022/0/en/Hydroponics-Market-Size-Worth-22-2-Billion-By-2028-CAGR-of-11-3-Reports-and-Data.html> [προσπελάστηκε 29-10-2021]
- Goodburn C and Wallace CA (2013). The microbiological efficacy of decontamination methodologies for fresh produce: a review. *Food Control*, 32, 418-427. <https://doi.org/10.1016/j.foodcont.2012.12.012>
- Goodin PL (1977). Chlorine for sick tomatoes (*Erwinia carotovora*). *Agri Res*, 26(4): 8-10.
- Gopalakrishnan KRC, Ragunathan V, Thamilselvan M (2012). Antibacterial activity of Cu₂O nanoparticles on *E. coli* synthesized from tridax procumbens leaf extract and surface coating with polyaniline. *Dig. J. Nanomater. Bios.*, 7(2), 833-839.
- Goulson D (2019). The insect apocalypse, and why it matters. *Curr. Biol.*, 29(19), R967-R971. <https://doi.org/10.1016/j.cub.2019.06.069>
- Grand view research (2021). Hydroponics market size, share & trends analysis report by type (aggregate systems, liquid systems), by crops (tomatoes, lettuce, peppers, cucumbers, herbs), by region, and segment forecasts, 2021 – 2028 <https://www.grandviewresearch.com/industry-analysis/hydroponics-market> [προσπελάστηκε 29-10-2021]
- Gressel J (2020). Perspective: present pesticide discovery paradigms promote the evolution of resistance – learn from nature and prioritize multi-target site inhibitor design. *Pest Manag. Sci.*, 76(2), 421-425. <https://doi.org/10.1002/ps.5649>
- Griendling KK, Touyz RM, Zweier JL, Dikalov S, et al. (2016). American heart association council on basic cardiovascular sciences. Measurement of Reactive Oxygen Species, Reactive Nitrogen Species, and Redox-Dependent Signaling in the cardiovascular system: a scientific statement from the American Heart Association. *Circ Res.* 119(5): e39-75. <https://doi.org/10.1161/RES.0000000000000110>
-

-
- Grillo R, Fraceto LF, Amorim MJB, Scott-Fordsmand JJ, et al. (2021). Ecotoxicological and regulatory aspects of environmental sustainability of nanopesticides. *J. Hazard. Mater.*, 404, 124148. <https://doi.org/10.1016/j.jhazmat.2020.124148>
- Grillo R, Pereira AES, Nishisaka CS, de Lima R, et al. (2014). Chitosan/tripolyphosphate nanoparticles loaded with paraquat herbicide: An environmentally safer alternative for weed control. *J. Hazard. Mater.*, 278, 163-171. <https://doi.org/10.1016/j.jhazmat.2014.05.079>
- Gruda N (2009). Do soilless culture systems have an influence on product quality of vegetables? <https://edoc.hu-berlin.de/handle/18452/10085> [προσπελάστηκε 24-12-2021]
- Gruda N, Gianquinto G, Tüzel Y, and Savvas D (2016). Culture Soil-less. In Encyclopedia of Soil Sciences, 3rd edn., R. Lal., ed. (CRC Press, Taylor & Francis Group), p. 533–537. <https://doi.org/10.1081/E-ESS3-120053777>
- Gruda N, Savvas D, Colla G, and Roupshael Y (2018). Impacts of genetic material and current technologies on product quality of selected greenhouse vegetables – A review. *Europ. J. Hortic. Sci.* 83(5), 319–328. <https://doi.org/10.17660/eJHS.2018/83.5.5>
- Gubbins EJ, Batty LC, Lead JR (2011)., Phytotoxicity of silver nanoparticles to *Lemna minor* L. *Environ. Pollut.*, 159, 1551-1559. <https://doi.org/10.1016/j.envpol.2011.03.002>
- Guerrero MM, Lacasa CM, Martínez V, Martínez-Lluch MC, Larregla S, Lacasa A (2019). Soil biosolarization for *Verticillium dahliae* and *Rhizoctonia solani* control in artichoke crops in southeastern Spain. *Span. J. Agric. Res.*, 17(1), e1002. <https://doi.org/10.5424/sjar/2019171-13666>
- Gupta DK, Palma JM, Corpas FJ (2015) Reactive Oxygen Species and oxidative damage in plants under stress. Springer, USA
- Gupta DK, Palma JM, Corpas FJ (2018) Antioxidants and antioxidant enzymes in higher plants. Springer, USA
- Guzmán-Báez GA, Trejo-Téllez LI, Ramírez-Olvera SM, et al. (2021). Silver nanoparticles increase nitrogen, phosphorus, and potassium concentrations in leaves and stimulate root length and number of roots in tomato seedlings in a hormetic manner. *Dose-Response*, 19. <https://doi.org/10.1177/15593258211044576>
- Habig WH, Pabst MJ, Jakoby WB (1974). Glutathione S-transferases. The first enzymatic step in mercapturic acid formation. *J. Biol. Chem.*, 249(22), 7130-9.
- Hadrup N, Lam HR, Loeschner K, Mortensen A, et al. (2012). Nanoparticulate silver increases uric acid and allantoin excretion in rats, as identified by metabolomics. *J. Appl. Toxicol.*, 32, 929-933. <https://doi.org/10.1002/jat.2779>
- Hamley IW (2017). Small bioactive peptides for biomaterials design and therapeutics. *Chem. Rev.*, 117, 14015-14041. <https://doi.org/10.1021/acs.chemrev.7b00522>
- Hammitt JK (1990). Risk Perceptions and Food Choice: An Exploratory Analysis of Organic-Versus Conventional-Produce Buyers. *Risk Anal.*, 10(3), 367-374. <https://doi.org/10.1111/j.1539-6924.1990.tb00519.x>
- Hanning IB, O'Bryan CA, Crandall PG, Ricke SC (2012). Food Safety and Food Security. *Nat. Educ. Knowledge*, 3(10), 9.
-

-
- Hardy A, Benford D, Halldorsson T, Jeger MJ, et al. (2018). Guidance on risk assessment of the application of nanoscience and nanotechnologies in the food and feed chain: Part 1, human and animal health. *EFSA J.*, 16, e05327. <https://doi.org/10.2903/j.efsa.2018.5327>
- Hasan MS, Singh V, Islam S, Islam MS, et al. (2021). Genome-wide identification and expression profiling of glutathione S-transferase family under multiple abiotic and biotic stresses in *Medicago truncatula* L. *PLOS ONE*, 16(2), e0247170. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0247170>
- Hatchett DW and White HS (1996). Electrochemistry of sulfur adlayers on the low-index faces of silver. *J. Phys. Chem.*, 100, 9854-9859. <https://doi.org/10.1021/jp953757z>
- Hatfield JL BK, Kimball BA, Ziska LH, Izaurralde RC, et al. (2011). Climate impacts on agriculture: implications for crop production. *Publications from USDA-ARS / UNL Faculty*, 103, 351–370. <https://doi.org/10.2134/agronj2010.0303>
- Hatzakis E (2019). Nuclear Magnetic Resonance (NMR) spectroscopy in food science: A comprehensive review. *Compr. Rev. Food Sci. F.*, 18, 189-220. <https://doi.org/10.1111/1541-4337.12408>
- Hautbergue T, Jamin E, Debrauwer L, Puel O, Oswald I (2018). From genomics to metabolomics, moving toward an integrated strategy for the discovery of fungal secondary metabolites. *Nat. Prod. Rep.*, 35, 147-173. <https://doi.org/10.1039/C7NP00032D>
- Heeb L, Jenner E and Cock MJW (2019). Climate-smart pest management: building resilience of farms and landscapes to changing pest threats. *J. Pest. Sci.*, 92(3), 951-969. <https://doi.org/10.1007/s10340-019-01083-y>
- He M and Chu C (2013). Dual stimuli responsive glycidyl methacrylate chitosan-quaternary ammonium hybrid hydrogel and its bovine serum albumin release. *J. Appl. Polym. Sci.*, 130. <https://doi.org/10.1002/app.39635>
- Henderson SW, Baumann U, Blackmore DH et al., (2014). Shoot chloride exclusion and salt tolerance in grapevine is associated with differential ion transporter expression in roots. *BMC Plant Biol.* 14, 273. <https://doi.org/10.1186/s12870-014-0273-8>
- Herman and Surantha N (2019). Intelligent monitoring and controlling system for hydroponics precision agriculture, 2019 7th International Conference on Information and Communication Technology (ICoICT). <https://doi.org/10.1109/ICoICT.2019.8835377>
- Hofmann T, Lowry GV, Ghoshal S, Tufenkji N, et al. (2020). Technology readiness and overcoming barriers to sustainably implement nanotechnology-enabled plant agriculture. *Nat. Food*, 1(7), 416-425. <https://doi.org/10.1038/s43016-020-0110-1>
- Hollomon DW (2015). Fungicide resistance: facing the challenge – a review. *Plant Prot. Sci.*, 51, 170-176. <https://doi.org/10.17221/42/2015-PPS>
- Hom L (2021) University of California, Berkeley. <https://www.ocf.berkeley.edu/~lhom/organictext.html> [προσπελάστηκε 23-03-2021]
- Homann PH (1986). The relation between the chloride status of the photosynthetic water splitting complex and the inhibitory effectiveness of amines. *Photosynth. Res.*, 10, 497–505. <https://doi.org/10.1007/BF00118316>
-

-
- Homburg K, Drees C, Boutaud E, Nolte D, et al. (2019). Where have all the beetles gone? Long-term study reveals carabid species decline in a nature reserve in Northern Germany. *Insect Conserv. Divers.*, 12, 268-277. <https://doi.org/10.1111/icad.12348>
- Hong CX (2001). Effect of chlorine concentration and contact time on zoospore survival of *Phytophthora nicotianae*. *SNA Res Conf*, 46, 315–316
- Hong CX and Moorman GW (2005). Plant pathogens in irrigation water: Challenges and opportunities, *Crit. Rev. Plant Sci.*, 24(3), 189-208, <https://doi.org/10.1080/07352680591005838>
- Hong C and Richardson PA (2004). Efficacy of chlorine on *Pythium* species in irrigation water. *SNA Res. Conf.*, 49, 265–267
- Hong CX, Richardson PA, Kong P, Bush EA (2003) Efficacy of chlorine on multiple species of *Phytophthora* in recycled nursery irrigation water. *Plant Dis.*, 87(10), 1183–1189. <https://doi.org/10.1094/pdis.2003.87.10.1183>
- Horie M and Tabei Y (2021). Role of oxidative stress in nanoparticles toxicity. *Free Radic. Res.*, 55, 4, 331-342. <https://doi.org/10.1080/10715762.2020.1859108>
- HRAC (Herbicide Action Committee) (2021). HRAC Mode of Action Classification. <http://www.weedscience.org/Pages/HRACHerbicidePoster2020.pdf> [προσπελάστηκε 24-03-2021]
- HRAC (2019). <https://hracglobal.com/tools/world-of-herbicides-map> [προσπελάστηκε Οκτώβριο-2019]
- Hu C, Liu Y, Li X, et al. (2013). Biochemical responses of duckweed (*Spirodela polyrhiza*) to zinc oxide nanoparticles. *Arch. Environ. Contam. Toxicol.*, 64, 643–651. <https://doi.org/10.1007/s00244-012-9859-z>
- Hu C, Liu L, Li X, Xu Y, Ge Z, Zhao Y (2018). Effect of graphene oxide on copper stress in *Lemna minor* L.: evaluating growth, biochemical responses, and nutrient uptake. *J. Hazard. Mater.*, 341, 168-176. <https://doi.org/10.1016/j.jhazmat.2017.07.061>
- Huang B, Chen F, Shen Y, Qian K, Wang Y, Sun C, et al. (2018). Advances in Targeted Pesticides with Environmentally Responsive Controlled Release by Nanotechnology. *Nanomaterials*, 8(2), 102. <https://doi.org/10.3390/nano8020102>
- Hund-Rinke K, Baun A, Cupi D, Fernandes TF, Handy R, Kinross JH, et al. (2016). Regulatory ecotoxicity testing of nanomaterials – proposed modifications of OECD test guidelines based on laboratory experience with silver and titanium dioxide nanoparticles. *Nanotoxicology*, 10(10), 1442-1447. <https://doi.org/10.1080/17435390.2016.1229517>
- Hunkeler M, Stuttfeld E, Hagmann A, Imseng S, Maier T (2016). The dynamic organization of fungal acetyl-CoA carboxylase. *Nat. Commun.*, 7, 11196. <https://doi.org/10.1038/ncomms11196>
- Hussain MB, Ali S, Azam A, Hina S, Farooq AM, et al. (2013). Morphological, physiological and biochemical responses of plants to nickel stress: a review. *Afr. J. Agric. Res.*, 8, 1596-1602. <https://doi.org/10.5897/AJAR12.407>
-

-
- Ibáñez AJ, Fagerer SR, Schmidt AM, Urban PL, et al. (2013). Mass spectrometry-based metabolomics of single yeast cells. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.*, 110, 8790-8794. <https://doi.org/10.1073/pnas.1209302110>
- IRAC (Insecticide Action Committee) (2021). The IRAC mode of Action Classification online <https://irac-online.org/modes-of-action/> [προσπελάστηκε 24-03-2021]
- IRAC (2020). "*Tuta absoluta* IRAC Archives-IRAC." <https://irac-online.org/pests/tuta-absoluta/> [προσπελάστηκε 21-9-2020]
- Ishizawa H, Kuroda M, Morikawa M and Ike M (2017). Differential oxidative and antioxidative response of duckweed *Lemna minor* toward plant growth promoting/inhibiting bacteria. *Plant Physiol. Biochem.*, 118, 667-673. <https://doi.org/10.1016/j.plaphy.2017.08.006>
- Iturriaga G, Suárez R, Nova-Franco B (2009). Trehalose metabolism: from osmoprotection to signaling. *Intl. J. Mol. Sci.*, 10, 3793-3810. <https://doi.org/10.3390/ijms10093793>
- Jaffe BD, Lois AN, Guédot C (2019) Effect of fungicide on pollen foraging by honeybees (Hymenoptera: Apidae) in cranberry differs by fungicide type. *J. Econ. Entomol.*, 112(1), 499–503, <https://doi.org/10.1093/jee/toy353>
- Jalal A, Oliveira Junior JCd, Ribeiro JS, Fernandes GC, Mariano GG, Trindade VDR, et al. (2021). Hormesis in plants: Physiological and biochemical responses. *Ecotoxicol. Environ. Saf.*, 207, 111225. <https://doi.org/10.1016/j.ecoenv.2020.111225>
- Jambhulkar PP, Sharma M, Lakshman D and Sharma P. (2015). Natural mechanisms of soil suppressiveness against diseases caused by *Fusarium*, *Rhizoctonia*, *Pythium*, and *Phytophthora*. Natural mechanisms of soil suppressiveness against diseases caused by *Fusarium*, *Rhizoctonia*, *Pythium*, and *Phytophthora*. In: Meghvansi M., Varma A. (eds) Organic Amendments and Soil Suppressiveness in Plant Disease Management. Soil Biology, vol 46. Springer, Cham. https://doi.org/10.1007/978-3-319-23075-7_5
- Jiménez-Díaz RM, Castillo P, Jiménez-Gasco MdM, Landa BB, Navas-Cortés JA (2015). Fusarium wilt of chickpeas: Biology, ecology and management. *Crop Prot.*, 73, 16-27. <https://doi.org/10.1016/j.cropro.2015.02.023>
- Jorge JA, Polizeli MdLTM, Terenzi HF, Thevelein JM (1997). Trehalases and trehalose hydrolysis in fungi. *FEMS Microbiol. Lett.*, 154(2), 165-171. <https://doi.org/10.1111/j.1574-6968.1997.tb12639.x>
- Joshi K, Mahendran R, Alagusundaram K, Norton T, Tiwari BK (2013). Novel disinfectants for fresh produce. *Trends Food Sci. Technol.*, 34(1), 54–61. <https://doi.org/10.1016/j.tifs.2013.08.008>
- Juárez-Maldonado A, Tortella G, Rubilar O, Fincheira P, Benavides-Mendoza A (2021). Biostimulation and toxicity: The magnitude of the impact of nanomaterials in microorganisms and plants. *J. Adv. Res.*, 31, 113-126. <https://doi.org/10.1016/j.jare.2020.12.011>
- Kah M (2015). Nanopesticides and Nanofertilizers: Emerging Contaminants or Opportunities for Risk Mitigation? *Front. Chem.*, 3, 64. <https://doi.org/10.3389/fchem.2015.00064>
- Kah M and Hofmann T (2014). Nanopesticide research: Current trends and future priorities. *Environ. Int.*, 63, 224-235. <https://doi.org/10.1016/j.envint.2013.11.015>
-

-
- Kah M, Beulke S, Tiede K, Hofmann T (2013). Nanopesticides: state of knowledge, environmental fate, and exposure modeling. *Crit. Rev. Environ. Sci. Technol.*, 43, 1823-1867. <https://doi.org/10.1080/10643389.2012.671750>
- Kah M, Kookana RS, Gogos A, Bucheli TD (2018). A critical evaluation of nanopesticides and nanofertilizers against their conventional analogues. *Nat. Nanotechnol.*, 13(8), 677-684. <https://doi.org/10.1038/s41565-018-0131-1>
- Kah M, Tufenkji N, White JC (2019). Nano-enabled strategies to enhance crop nutrition and protection. *Nat. Nanotechnol.*, 14(6), 532-540. <https://doi.org/10.1038/s41565-019-0439-5>
- Kah M, Walch H, Hofmann T (2018). Environmental fate of nanopesticides: durability, sorption and photodegradation of nanoformulated clothianidin. *Environ. Sci. Nano*, 5(4), 882-889. <https://doi.org/10.1039/C8EN00038G>
- Kalampokis IF, Kapetanakis GC, Aliferis KA, Diallinas G (2018). Multiple nucleobase transporters contribute to boscalid sensitivity in *Aspergillus nidulans*. *Fungal Genet. Biol.*, 115, 52-63. <https://doi.org/10.1016/j.fgb.2018.02.004>
- Karaivazoglou NA, Papakosta DK, Divanidis S (2005). Effect of chloride in irrigation water and form of nitrogen fertilizer on Virginia (flue-cured) tobacco. *Field Crops Res.* 92, 61–74. <https://doi.org/10.1016/j.fcr.2004.09.006>
- Karasali H, Kasiotis KM, Machera K, Ambrus A (2014). Case study to illustrate an approach for detecting contamination and impurities in pesticide formulations. *J Agric. Food. Chem.*, 62, 11347–11352. <https://doi.org/10.1021/jf504729g>
- Katan J (1971). Symptomless carriers of tomato Fusarium pathogen. *Phytopathology* 61: 1213-1217. <https://doi.org/10.1094/Phyto-61-1213>
- Katan J (2002). Interactions of soilborne pathogens with roots and aboveground plant organs. In: Weizel Y., Eshel A., Kafkafi V. (eds). *Plant Roots: the Hidden Half* (third edition), pp. 949-959. Marcel Dekker, USA. <https://doi.org/10.1093/aob/mcf252>
- Katan J (2017). Diseases caused by soilborne pathogens: Biology, management and challenges. *J Plant Pathol.*, 99(2), 305-315. <http://www.ijstor.org/stable/44686775>
- Katan J, Shtienberg D, Gamliel A. (2012). The integrated management concept in the context of soilborne pathogens and soil disinfestation. In: Gamliel A., Katan J. (eds). *Soil Solarization: Theory and Practice*, pp. 91-97. APS Press, USA. <https://doi.org/10.1094/9780890544198.013>
- Kaufmann-Horlacher I (2014). Chlorat-Rückstände in pflanzlichen Lebensmitteln – ein Update. CVUA, Stuttgart. https://www.eurl-pesticides.eu/userfiles/file/EurlSRM/EPRW2014_Kaufmann-Horlacher_Chlorate-Residues-in-Plant-Based-Food_116.pdf
- Keck CM and Müller RH (2013). Nanotoxicological classification system (NCS) - a guide for the risk-benefit assessment of nanoparticulate drug delivery systems. *Eur. J. Pharm. Biopharm.*, 84, 445–448. <https://doi.org/10.1016/j.ejpb.2013.01.001>
- Keller NP, Turner G, Bennett JW (2005). Fungal secondary metabolism—from biochemistry to genomics. *Nat. Rev. Microbiol.*, 3, 937. <https://doi.org/10.1038/nrmicro1286>
-

-
- Kesharwani P, Jain K, Jain NK (2014). Dendrimer as nanocarrier for drug delivery. *Prog. Polym. Sci.*, 39, 268-307. <https://doi.org/10.1016/j.progpolymsci.2013.07.005>.
- Khedr AHA, Abbas MA, Wahid AAA, Quick WP, Abogadallah GM (2003). Proline induces the expression of salt-stress-responsive proteins and may improve the adaptation of *Pancreaticum maritimum* L. to salt-stress. *J. Exp. Bot.*, 54, 2553-2562. <https://doi.org/10.1093/jxb/erg277>
- Khodakovskaya M, Dervishi E, Mahmood M, Xu Y, Li Z, Watanabe F, Biris AS (2009). Carbon nanotubes are able to penetrate plant seed coat and dramatically affect seed germination and plant growth. *ACA Nano*, 3(10), 3221-3227. <https://doi.org/10.1021/nn900887m>
- Kim JS, Kuk E, Yu KN, Kim JH, Park SJ, Lee HJ, Kim SH, Park YK, et al. (2007). Antimicrobial effects of silver nanoparticles. *Nanomedicine: NBM*, 3(1), 95-101. <https://doi.org/10.1016/j.nano.2006.12.001>
- Kim KJ, Sung WS, Suh BK, Moon SK, et al. (2009). Antifungal activity and mode of action of silver nano-particles on *Candida albicans*. *Biometals*, 22, 235-242. <https://doi.org/10.1007/s10534-008-9159-2>
- Kim SW, Jung JH, Lamsal K, Kim YS, Min JS, Lee YS (2012). Antifungal effects of silver nanoparticles (AgNPs) against various plant pathogenic fungi. *Mycobiology*, 40, 53-58. <https://doi.org/10.5941/MYCO.2012.40.1.053>
- Kinkel LL, Bakker MG, Schlatter DC. (2011). A coevolutionary framework for managing disease-suppressive soils. *Ann. Rev. Phytopathol.*, 49: 47-67. <https://doi.org/10.1146/annurev-phyto-072910-095232>
- Kinnersley AM and Turano FJ (2000). Gamma aminobutyric acid (GABA) and plant responses to stress. *Crit. Rev. Plant Sci.*, 19, 479-509. <https://doi.org/10.1080/07352680091139277>
- Klarich KL, Pflug NC, DeWald EM, Hladik ML, et al. (2017). Occurrence of neonicotinoid insecticides in finished drinking water and fate during drinking water treatment. *Environ. Sci. Technol.*, 4(5), 168-173. <https://doi.org/10.1021/acs.estlett.7b00081>
- Kobetičová K and Černý R (2017). Ecotoxicology of building materials: A critical review of recent studies. *J. Clean. Prod.*, 165, 500-508. <https://doi.org/10.1016/j.jclepro.2017.07.161>
- Koçer Zİ, Ayışığı M, Haseki S, Aktaş L (2021). Phyto-synthesized silver nanoparticle toxicity effect on aquatic plant *Lemna minor* L. *EJOSAT*, (27), 1087-1094. <https://doi.org/10.31590/ejosat.980995>
- Kolbert Z, Szóllósi R, Rónavári A and Molnár Á (2021). Nanoforms of essential metals: from hormetic phytoeffects to agricultural potential. *J. Exp. Bot.*, *erab547*, <https://doi.org/10.1093/jxb/erab547>
- Kookana RS, Boxall AB, Reeves PT, Ashauer R, et al. (2014). Nanopesticides: guiding principles for regulatory evaluation of environmental risks. *J. Agric. Food Chem.*, 62(19), 4227-4240. <https://doi.org/10.1021/jf500232f>
- Kostopoulou S, Ntatsi G, Arapis G, Aliferis KA (2020). Assessment of the effects of metribuzin, glyphosate, and their mixtures on the metabolism of the model plant *Lemna minor* L. applying metabolomics. *Chemosphere*, 239, 124582. <https://doi.org/10.1016/j.chemosphere.2019.124582>
-

-
- Krishnan N, Dickman MB, Becker DF (2008). Proline modulates the intracellular redox environment and protects mammalian cells against oxidative stress. *Free Radic. Biol. Med.*, 44, 671-681. <https://doi.org/10.1016/j.freeradbiomed.2007.10.054>
- Krishnaraj C, Ramachandran R, Mohan K, Kalaichelvan PT (2012). Optimization for rapid synthesis of silver nanoparticles and its effect on phytopathogenic fungi. *Spectrochim. Acta A Mol. Biomol. Spectrosc.*, 93, 95-99. <https://doi.org/10.1016/j.saa.2012.03.002>
- Kumar S and Puneekar NS (1997). The metabolism of 4-aminobutyrate (GABA) in fungi. *Mycol. Res.*, 101, 403-409. <https://doi.org/10.1017/S0953756296002742>
- Kurniasih IN, Keilitza J, Haag R (2015). Dendritic nanocarriers based on hyperbranched polymers. *Chem. Soc. Rev.*, 44, 4145. <https://doi.org/10.1039/C4CS00333K>.
- Lamichhane JR (2017). Pesticide use and risk reduction in European farming systems with IPM: an introduction to the special issue. *Crop Prot.* <https://doi.org/10.1016/j.cropro.2017.01.017>
- Lamichhane JR, Aubertot JN, Begg G, Birch ANE, et al. (2016). Networking of integrated pest management: a powerful approach to address common challenges in agriculture. *Crop Prot.*, 89, 139e151. <https://doi.org/10.1016/j.cropro.2016.07.011>
- Lampridi MG, Sørensen CG and Bochtis D (2019). Agricultural sustainability: A review of concepts and methods. *Sustainability*, 11(18), 5120. <https://doi.org/10.3390/su11185120>
- Lankadurai BP, Nagato EG, Simpson AJ, Simpson MJ (2015). Analysis of *Eisenia fetida* earthworm responses to sub-lethal C60 nanoparticle exposure using ¹H-NMR based metabolomics. *Ecotoxicol. Environ. Safe.*, 120, 48-58. <https://doi.org/10.1016/j.ecoenv.2015.05.020>
- Larsen AE, Patton M and Martin EA (2019). High highs and low lows: Elucidating striking seasonal variability in pesticide use and its environmental implications. *STOTEN*, 651, 828-837. <https://doi.org/10.1016/j.scitotenv.2018.09.206>
- Lechenet M, Dessaint F, Py G, Makowski D, Munier-Jolain N (2017). Reducing pesticide use while preserving crop productivity and profitability on arable farms. *Nat. Plants*, 3, 17008. <https://doi.org/10.1038/nplants.2017.8>
- Lee Y, Ishii T, Kim HJ, Nishiyama N, Hayakawa Y, Itaka K, Kataoka K (2010). Efficient delivery of bioactive antibodies into the cytoplasm of living cells by charge-conversional polyion complex micelles. *Angew. Chem. Int. Ed. Engl.*, 49(14), 2552-2555. <https://doi.org/10.1002/anie.200905264>
- Lehotay SJ (2007). Determination of pesticide residues in foods by acetonitrile extraction and partitioning with magnesium sulfate: collaborative study. *J. AOAC Int.*, 90, 485–520.
- Leisenring W and Ryan L (1992). Statistical properties of the NOAEL. *Regul. Toxicol. Pharmacol.*, 15, 161-171 (1992). [https://doi.org/10.1016/0273-2300\(92\)90047-D](https://doi.org/10.1016/0273-2300(92)90047-D)
- Lekei E, Ngowi AV, London L. (2017). Acute pesticide poisoning in children: Hospital review in selected hospitals of Tanzania. *J Toxicol.*, 1–8. <https://doi.org/10.1155/2017/4208405>
- Leonel LP and Tonetti AL (2021). Wastewater reuse for crop irrigation: Crop yield, soil and human health implications based on giardiasis epidemiology. *STOTEN*, 775, 145833. <https://doi.org/10.1016/j.scitotenv.2021.145833>
-

-
- Leppla NC, Johnson MW, Merritt JL and Zalom FG (2018). Chapter 13 - Applications and Trends in Commercial Biological Control for Arthropod Pests of Tomato. In W. Wakil, G. E. Brust, & T. M. Perring (Eds.), *Sustainable Management of Arthropod Pests of Tomato* (pp. 283-303). San Diego: Academic Press. <https://doi.org/10.1016/B978-0-12-802441-6.00013-9>
- Lewis SM, Wong CH, Owens ACS, Fallon C, Jepsen S, Thancharoen A, et al., (2020). A global perspective on firefly extinction threats. *BioScience*, 70(2), 157-167. <https://doi.org/10.1093/biosci/biz157>
- Li L, Sillanpää M, Tuominen M, Lounatmaa K, Schultz E (2013). Behavior of titanium dioxide nanoparticles in *Lemna minor* growth test conditions. *Ecotoxicol. Environ. Saf.*, 88, 89-94. <https://doi.org/10.1016/j.ecoenv.2012.10.024>
- Li R, Luo C, Qiu J, Li Y, Zhang H, Tan H (2022). Metabolomic and transcriptomic investigation of the mechanism involved in enantioselective toxicity of imazamox in *Lemna minor*. *J. Hazard. Mater.*, 425, 127818. <https://doi.org/10.1016/j.jhazmat.2021.127818>
- Liang J, Li M, Ren B, Wu T, et al. (2018). The anti-caries effects of dental adhesive resin influenced by the position of functional groups in quaternary ammonium monomers. *Dent. Mater.*, 34, 400-411. <https://doi.org/10.1016/j.dental.2017.11.021>
- Liang X, Zhang L, Natarajan SK, Becker DF (2013). Proline mechanisms of stress survival. *Antioxid. Redox Signal.*, 19, 998-1011. <https://doi.org/10.1089/ars.2012.5074>
- Lin D and Xing B (2007). Phytotoxicity of nanoparticles: inhibition of seed germination and root growth. *Environ. Pollut.*, 150, 243-250. <https://doi.org/10.1016/j.envpol.2007.01.016>
- Liu W, Wang X, Zhou X, Duan H, Zhao P, Liu W (2020). Quantitative structure-activity relationship between the toxicity of amine surfactant and its molecular structure. *STOTEN*, 702, 134593. <https://doi.org/10.1016/j.scitotenv.2019.134593>
- Loha KM, Lamoree M, Weiss JM, de Boer J (2018). Import, disposal, and health impacts of pesticides in the East Africa Rift(EAR) zone: A review on management and policy analysis. *Crop Prot.*, 112, 322-331. <https://doi.org/10.1016/j.cropro.2018.06.014>
- Lonigro A, Montemurro N, Laera G (2017). Effects of residual disinfectant on soil and lettuce crop irrigated with chlorinated water. *STOTEN*, 584-585, 595-602. <https://doi.org/10.1016/j.scitotenv.2017.01.083>
- López Camelo AF and Gómez PA (2004). Comparison of color indexes for tomato ripening. *Hortic. Bras.*, 22(3), 534-537. <https://doi.org/10.1590/S0102-05362004000300006>
- López-Gálvez F, Gil MI, Meireles A, Truchado P, Allende A (2017). Demonstration tests of irrigation water disinfection with chlorine dioxide in open field cultivation of baby spinach, *J. Sci. Food Agric.*, 98, 2973-2980. <https://doi.org/10.1002/jsfa.8794>
- Lowe RGT, Lord M, Rybak K, Trengove RD, Oliver RP, Solomon PS (2009). Trehalose biosynthesis is involved in sporulation of *Stagonospora nodorum*. *Fungal Genet. Biol.*, 46, 381-389. <https://doi.org/10.1016/j.fgb.2009.02.002>
- Lowry GV, Avellan A, Gilbertson LM (2019). Opportunities and challenges for nanotechnology in the agri-tech revolution. *Nat. Nanotechnol.*, 14(6), 517-522. <https://doi.org/10.1038/s41565-019-0461-7>
-

-
- Lykogianni M, Papadopoulou E-A, Sapalidis A, Tsiourvas D, Sideratou Z, Aliferis KA (2020). Metabolomics reveals differential mechanisms of toxicity of hyperbranched poly(ethyleneimine)-derived nanoparticles to the soil-borne fungus *Verticillium dahliae* Kleb. *Pestic. Biochem. Physiol.*, 165, 104535. <https://doi.org/10.1016/j.pestbp.2020.02.001>
- Ma C, White JC, Dhankher OP, Xing B (2015). Metal-based nanotoxicity and detoxification pathways in higher plants. *Environ. Sci. Technol.*, 49(12), 7109-7122. <https://doi.org/10.1021/acs.est.5b00685>
- Madrid R, Barba EM, Sánchez A, García AL (2009). Effects of organic fertilisers and irrigation level on physical and chemical quality of industrial tomato fruit (cv. Nautilus). *J. Sci. Food Agric.*, 89, 2608-2615. <https://doi.org/10.1002/jsfa.3763>
- Mafia RG, Alfenas AC, Ferreira EM, Machado PS, et al. (2008). Reuse of untreated irrigation water as a vehicle of inoculum of pathogens in eucalyptus clonal nursery. *Trop. Plant Pathol.*, 33(2), 96–102. <https://doi.org/10.1590/S1982-56762008000200003>
- Magarey RD, Klammer SS, Chappell TM, Trexler CM, et al. (2019). Eco-efficiency as a strategy for optimizing the sustainability of pest management. *Pest Manag. Sci.*, 75(12), 3129-3134. <https://doi.org/10.1002/ps.5560>
- Majumdar S and Keller AA (2020). Omics to address the opportunities and challenges of nanotechnology in agriculture. *Crit. Rev. Environ. Sci. Technol.*, 1-42. <https://doi.org/10.1080/10643389.2020.1785264>
- Majumder S, Shakil NA, Kumar J, Banerjee T, et al. (2016). Eco-friendly PEG-based controlled release nano-formulations of mancozeb: Synthesis and bioefficacy evaluation against phytopathogenic fungi *Alternaria solani* and *Sclerotium rolfsii*. *J. Environ. Sci. Health B*, 51, 873-880. <https://doi.org/10.1080/03601234.2016.1211917>
- Martinez F, Castillo S, Carmona E, Aviles M (2010). Dissemination of *Phytophthora cactorum*, cause of crown rot in strawberry, in open and closed soilless growing systems and the potential for control using slow sand filtration. *Sci. Hortic.*, 125(4), 756–760. <https://doi.org/10.1016/j.scienta.2010.05.010>
- Malcolm GM, Kuldau GA, Gugino BK, Jimenez-Gasco M. (2013). Hidden host plant associations of soilborne fungal pathogens: an ecological perspective. *Phytopathology*, 103, 538-544. <https://doi.org/10.1094/PHYTO-08-12-0192-LE>
- Marino D, Dunand C, Puppo A, Pauly N (2012). A burst of plant NADPH oxidases. *Trends Plant Sci.*, 17, 9–15. <https://doi.org/10.1016/j.tplants.2011.10.001>
- Mattson MP (2008). Hormesis defined. *Ageing Res. Rev.*, 7, 1-7. <https://doi.org/10.1016/j.arr.2007.08.007>
- Matsumura Y, Yoshikata K, Kunisaki Si, Tsuchido T (2003). Mode of Bactericidal Action of Silver Zeolite and Its Comparison with That of Silver Nitrate. *Appl. Environ. Microbiol.*, 69, 4278-4281. <https://doi.org/10.1128/AEM.69.7.4278-4281.2003>
- Matsuzaki K (2009). Control of cell selectivity of antimicrobial peptides. *Biochim. Biophys. Acta*, 1788(8), 1687-1692. <https://doi.org/10.1016/j.bbamem.2008.09.013>
-

-
- Maxmen A (2013). Crop pests: Under attack. *Nature*, 501(7468), S15-S17. <https://doi.org/10.1038/501S15a>
- McDougall P (2016). The Cost of New Agrochemical Product Discovery, Development and Registration in 1995, 2000, 2005-8 and 2010-2014. R&D expenditure in 2014 and expectations for 2019. *AgriFutura* (No 198). <https://croplife.org/wp-content/uploads/2016/04/Cost-of-CP-report-FINAL.pdf>
- McDougall P (2018). Evolution of the Crop Protection Industry since 1960. <https://croplife.org/wp-content/uploads/2018/11/Phillips-McDougall-Evolution-of-the-Crop-Protection-Industry-since-1960-FINAL.pdf>
- Mead O, Thynne E, Winterberg B, Solomon PS (2013). Characterising the role of GABA and its metabolism in the wheat pathogen *Stagonospora nodorum*. *PLoS One*, 8, e78368. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0078368>
- Menne H and Köcher H (2012). HRAC classification of herbicides and resistance development, In Modern Crop Protection Compounds, Vol.1: Herbicides (2nd edn).
- Mertz FP and Yao RC (1990). *Saccharopolyspora spinosa* sp. nov. Isolated from soil Collected in a Sugar Mill Rum Still. *Int. J. Syst Evol Microbio.*, 40, 34–39. <https://doi.org/10.1099/00207713-40-1-34>
- Mesa-Valle CM, Garrido-Cardenas JA, Cebrian-Carmona J, Talavera M, Manzano-Agugliaro F. (2020). Global Research on Plant Nematodes. *Agronomy*, 10(8):1148. <https://doi.org/10.3390/agronomy10081148>
- Mesnage R and Séralini GE (2018). Editorial: Toxicity of Pesticides on Health and Environment. *Front. Public Health*, 6, 268. <https://doi.org/10.3389/fpubh.2018.00268>
- Miché L and Balandreau J (2001). Effects of rice seed surface sterilization with hypochlorite on inoculated *Burkholderia vietnamiensis*. *Appl. Environ. Microbiol.*, 67(7), 3046–3052. <https://doi.org/10.1128/AEM.67.7.3046-3052.2001>
- Milgroom MG, Jiménez-Gasco MdM, Olivares García C, Drott MT, Jiménez-Díaz RM (2014). Recombination between clonal lineages of the asexual fungus *Verticillium dahliae* detected by genotyping by sequencing. *PLoS One*, 9, e106740. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0106740>
- Mills HA and Jones Jr JB (1996). Plant analysis handbook II: A practical sampling, preparation, analysis, and interpretation guide (No. 581.13 M657).
- MINAGRIC (2021). "Ministry of Rural Development and Food." http://www.minagric.gr/syspest/SYSPEST_ENEMY_dron.aspx [προσπελάστηκε 4/2/2021]
- Mineau P and Whiteside M (2013). Pesticide acute toxicity is a better correlate of U.S. grassland bird declines than agricultural intensification. *PLoS ONE*, 8(2), e57457. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0057457>
- Minogiannis P, Valenti M, Kati V, Kalantzi OI, Biskos G (2019). Toxicity of pure silver nanoparticles produced by spark ablation on the aquatic plant *Lemna minor*. *J. Aerosol Sci.*, 128, 17-21. <https://doi.org/10.1016/j.jaerosci.2018.11.003>
-

-
- Mirzajani F, Askari H, Hamzelou S, Schober Y, et al. (2014). Proteomics study of silver nanoparticles toxicity on *Oryza sativa* L. *Ecotoxicol. Environ. Saf.*, 108, 335-339. <https://doi.org/10.1016/j.ecoenv.2014.07.013>
- Mittler R, Vanderauwera S, Gollery M, Van Breusegem F (2004). Reactive oxygen gene network of plants. *Trends Plant Sci.*, 9, 490–498. <https://doi.org/10.1016/j.tplants.2004.08.009>
- Miszczyk M, Płonka M, Stobiecki T, Kronenbach-Dylong D, et al. (2018). Official control of plant protection products in Poland: detection of illegal products. *Environ. Sci. Pollut. Res.*, 25, 31906–31916. <https://doi.org/10.1007/s11356-018-1739-2>
- Moazzami Farida SH, Karamian R, Albrechtsen BR (2020). Silver nanoparticle pollutants activate oxidative stress responses and rosmarinic acid accumulation in sage. *Physiol. Plantarum*, 170, 415-432. <https://doi.org/10.1111/ppl.13172>
- Möhring N, Jansen K, Dias J, Keeley J, et al. (2021). The use of pesticides in developing countries and their impact on health and the right to food. Directorate-General for External Policies of the Union (European Parliament). <https://doi.org/10.2861/28995>
- Mordor Intelligence (2021). Hydroponics market – growth, trends, Covid-19 impact and forecasts (2021 – 2026) <https://www.mordorintelligence.com/industry-reports/hydroponics-market> [προσπελάστηκε 29-10-2021]
- Morigi V, Tocchio A, Bellavite Pellegrini C, Sakamoto JH, et al. (2012). Nanotechnology in medicine: from inception to market domination. *J. Drug Deliv.*, Article ID 389485, <https://doi.org/10.1155/2012/389485>
- Morones JR, Elechiguerra JL, Camacho A, Holt K, et al. (2005). The bactericidal effect of silver nanoparticles. *Nanotechnology*, 16, 2346-2353. <https://doi.org/10.1088/0957-4484/16/10/059>
- Mosa KA, El-Naggar M, Ramamoorthy K, Alawadhi H, Elnaggar A, Wartanian S, et al. (2018). Copper nanoparticles induced genotoxicity, oxidative stress, and changes in superoxide dismutase (SOD) gene expression in cucumber (*Cucumis sativus*) plants. *Front. Plant Sci.*, 9. <https://doi.org/10.3389/fpls.2018.00872>
- Mulé R, Sabella G, Robba L and Manachini B (2017) Systematic review of the effects of chemical insecticides on four common butterfly families. *Front. Environ. Sci.*, 5(32). <https://doi.org/10.3389/fenvs.2017.00032>
- Mushtaq YK (2011). Effect of nanoscale Fe₃O₄, TiO₂ and carbon particles on cucumber seed germination. *J. Environ. Sci. Health C*, 46 (14), 1732-1735. <https://doi.org/10.1080/10934529.2011.633403>
- Nakano Y and Asada K (1981). Hydrogen peroxide is scavenged by ascorbate-specific peroxidase in spinach chloroplasts. *Plant Cell Physiol.*, 22(5), 867-880. <https://doi.org/10.1093/oxfordjournals.pcp.a076232>
- National Academies of Sciences, Engineering, Medicine (2019). Science breakthroughs to advance food and agricultural research by 2030. Washington, DC: The National Academies Press. <https://doi.org/10.17226/25059>
- Nejad MS, Bonjar GHS, Khatami M, Amini A, Aghighi S (2016). *In vitro* and *in vivo* antifungal properties of silver nanoparticles against *Rhizoctonia solani*, a common agent of rice
-

-
- sheath blight disease. *IET Nanobiotechnol.*, 11 (3), 236–240. <https://doi.org/10.1049/iet-nbt.2015.0121>
- Neocleous D, Nikolaou G, Ntatsi G and Savvas D (2021). Nitrate supply limitations in tomato crops grown in a chloride-amended recirculating nutrient solution. *Agric. Water Manag.*, 258, 107163, <https://doi.org/10.1016/j.agwat.2021.107163>
- Ngowi A, Mrema E, and Kishinhi S (2016). Pesticide health and safety challenges facing informal sector workers. *New Solut.*, 26(2), 220–240. <https://doi.org/10.1177/1048291116650262>
- Nicol JM, Turner SJ, Coyne DL, Nijs L, Hockland S, Maafi ZT. (2011). Current nematode threats to world agriculture. In: Jones J., Gheysen G., Fenoll C. (eds) *Genomics and Molecular Genetics of Plant-Nematode Interactions*. Springer, Dordrecht. https://doi.org/10.1007/978-94-007-0434-3_2
- Nielsen CJ, Stanghellini ME, Ferrin DM (2004) *Phytophthora* in recirculating cultural systems: the influence of different irrigation regimes on disease development. *Phytopathology*, 94(6, Supplement), S153
- Nishihara M, Perret F, Takeuchi T, Futaki S, et al. (2005). Arginine magic with new counterions up the sleeve. *Org. Biomol. Chem.*, 3, 1659-1669. <https://doi.org/10.1039/B501472G>
- Nishimoto R (2019). Global trends in the crop protection industry. *J Pestic. Sci.*, 44(3), 141-147. <https://doi.org/10.1584/jpestics.D19-101>
- Nosratti I, Mobli A, Mohammadi G, Yousefi A, et al. (2020). The problem of *Orobanche* spp. and *Phelipanche* spp. and their management in Iran. *Weed Sci.*, 68(6), 555-564. <https://doi.org/10.1017/wsc.2020.61>
- Ntatsi G, Ntanasasi T, Savvas D (2020a). Standard Operating Procedure 6: Antioxidant assay 2: Catalase (CAT). Developed by the project VEG-ADAPT ('Adapting Mediterranean vegetable crops to climate change-induced multiple stress'), supported by PRIMA - Partnership for Research and Innovation in the Mediterranean Area
- Ntatsi G, Ntanasasi T, Savvas D (2020b). Standard Operating Procedure 5: Antioxidant assay 1: Ascorbate peroxidase (APX). Developed by the project VEG-ADAPT ('Adapting Mediterranean vegetable crops to climate change-induced multiple stress'), supported by PRIMA - Partnership for Research and Innovation in the Mediterranean Area
- Ntatsi G, Savvas D (2018). Standard Operating Procedure 09: Determination of Net photosynthetic rate (A), Stomatal conductance (Gs), Intercellular CO₂ concentration (Ci) and Transpiration rate. Developed by the EU-H2020 project TRUE ('Transition paths to sustainable legume-based systems in Europe'), funded by the European Union's Horizon 2020 Research and Innovation programme under Grant Agreement Number 727973.
- OECD (2006), Test No. 221: *Lemna* sp. Growth Inhibition Test, OECD Guidelines for the Testing of Chemicals, Section 2, OECD Publishing, Paris. <https://doi.org/10.1787/9789264016194-en>
- OECD (2016). No. 63: Physical-chemical parameters: measurements and methods relevant for the regulation of nanomaterials. [https://one.oecd.org/document/ENV/JM/MONO\(2016\)2/en/pdf](https://one.oecd.org/document/ENV/JM/MONO(2016)2/en/pdf)
-

-
- OECD (2021). Pesticide Compliance and Enforcement (Laws, Policies & Guidance). <https://www.oecd.org/chemicalsafety/pesticide-compliance/laws-policies-guidance.htm> [προσπελάστηκε 15-02-2021]
- OECD-FAO (2012). OECD-FAO Agricultural Outlook 2012, OECD Publishing, Paris, https://doi.org/10.1787/agr_outlook-2012-en [προσπελάστηκε 15-02-2021]
- Olaya-Arenas P, Scharf ME, Kaplan I (2020). Do pollinators prefer pesticide-free plants? An experimental test with monarchs and milkweeds. *J Appl Ecol.* 57, 2019– 2030. <https://doi.org/10.1111/1365-2664.13711>
- Oliveira HC, Stolf-Moreira R, Martinez CBR, Sousa GFM, et al. (2015). Evaluation of the side effects of poly(epsilon-caprolactone) nanocapsules containing atrazine toward maize plants. *Front. Chem.*, 3(61). <https://doi.org/10.3389/fchem.2015.00061>
- Oliveira Jld, Campos EVR, Pereira AES, Pasquoto T, et al. (2018). Zein nanoparticles as eco-friendly carrier systems for botanical repellents aiming sustainable agriculture. *J. Agric. Food Chem.*, 66(6), 1330-1340. <https://doi.org/10.1021/acs.jafc.7b05552>
- Ott SL, Huang CL, Misra SK (1991). Consumers' perceptions of risks from pesticide residues and demand for certification of residue-free produce. In: Caswell J.A. (eds) Economics of Food Safety. Springer, Dordrecht. https://doi.org/10.1007/978-94-011-7076-5_9
- Oukarroum A, Barhoumi L, Pirastru L, Dewez D (2013). Silver nanoparticle toxicity effect on growth and cellular viability of the aquatic plant *Lemna gibba*. *Environ. Toxicol. Chem.*, 32, 902-907. <https://doi.org/10.1002/etc.2131>
- Paleos CM, Tsiourvas D, Sideratou Z, Tziveleka L (2008). Multifunctional dendritic drug delivery systems: Design, synthesis, controlled and triggered release. *Curr. Top. Med. Chem.*, 8, 1204-1224. <https://doi.org/10.2174/156802608785848996>
- Pantos A, Tsogas I, Paleos CM (2008). Guanidinium group: A versatile moiety inducing transport and multicompartimentalization in complementary membranes. *Biochim. Biophys. Acta*, 1778, 811-823. <https://doi.org/10.1016/j.bbame.2007.12.003>
- Papadopoulou E-A, Giaki K, Angelis A, Skaltsounis A-L, Aliferis KA (2022). A metabolomic approach to assess the toxicity of the olive tree endophyte *Bacillus* sp. PTA13 lipopeptides to the aquatic macrophyte *Lemna minor* L. *Toxics*, 10, 494. <https://doi.org/10.3390/toxics10090494>
- Park D (1963). The ecology of soilborne fungal disease. *Ann Rev Phytopathol.* 1: 241-258. <https://doi.org/10.1146/annurev.py.01.090163.001325>
- Paulitz TC (1997). Biological control of root pathogens in soilless and hydroponic systems. *HortScience*, 32, 193–196.
- Pereira AES, Grillo R, Melo NFS, Rosa AH, Fraceto LF (2014). Poly-epsilon-caprolactone nanoparticles containing atrazine: from the preparation to evaluation of the herbicide activity and genotoxic effects. Abstracts Of Papers Of The American Chemical Society. Washington: Amer. Chemical Soc., 248, 1. <http://hdl.handle.net/11449/129920>
- Pereira SPP, Jesus F, Aguiar S, de Oliveira R, et al. (2018). Phytotoxicity of silver nanoparticles to *Lemna minor*: Surface coating and exposure period-related effects. *STOTEN*, 618, 1389-1399. <https://doi.org/10.1016/j.scitotenv.2017.09.275>
-

-
- Pérez-Urrestarazu L, Lobillo-Eguíba J, Fernández-Cañero R, Fernández-Cabanás VM (2019). Food safety concerns in urban aquaponic production: Nitrate contents in leafy vegetables. *Urban For. Urban Green.*, 44, 126431. <https://doi.org/10.1016/j.ufug.2019.126431>
- Perreault F, Oukarroum A, Melegari SP, Matias WG, Popovic R (2012). Polymer coating of copper oxide nanoparticles increases nanoparticles uptake and toxicity in the green alga *Chlamydomonas reinhardtii*. *Chemosphere*, 87, 1388-1394. <https://doi.org/10.1016/j.chemosphere.2012.02.046>
- Pham LV and Smith C (2014). Drivers of agricultural sustainability in developing countries: a review. *Environ. Syst. Decis*, 34(2), 326-341. <https://doi.org/10.1007/s10669-014-9494-5>
- Phillips D (2018). Toxic garbage will be sold here': Outcry as Brazil moves to loosen pesticide laws. *The Guardian*. <https://www.theguardian.com/world/2018/jun/26/toxic-garbage-will-be-sold-here-outcry-as-brazil-moves-to-loosen-pesticide-laws>
- Phillips MWA (2019). Agrochemical industry development, trends in R&D and the impact of regulation. *Pest Manag. Sci.*, 76: 3348-3356. <https://doi.org/10.1002/ps.5728>
- Pimentel D and Burgess M. (2014). Environmental and economic costs of the application of pesticides primarily in the United States, in Integrated Pest Management. In *Integrated Pest Management* (pp. 47–71): ed. by Pimentel D and Peshin R, Springer, Dordrecht.
- Pinto E, Sigaud-kutner TCS, Leitão MAS, Okamoto OK, et al. (2003). Heavy metal-induced oxidative stress in algae. *J. Phycol.*, 39, 1008-1018. <https://doi.org/10.1111/j.0022-3646.2003.02-193.x>
- Pinto M, Soares C, Pinto AS, Fidalgo F (2019). Phytotoxic effects of bulk and nano-sized Ni on *Lycium barbarum* L. grown *in vitro* – Oxidative damage and antioxidant response. *Chemosphere*, 218, 507-516. <https://doi.org/10.1016/j.chemosphere.2018.11.127>
- Płonka M, Walorczyk S, and Miszczyk M (2016). Chromatographic methods for the determination of active substances and characterization of their impurities in pesticide formulations. *Trends Analyt. Chem.*, 85, 67–80. <https://doi.org/10.1016/J.TRAC.2016.03.011>
- Poncet C, Ovroy M, Bonnet G, Brun R (2001). Disinfection of recycling water in rose cultures. *Acta Hortic*, 547, 121–126. <https://doi.org/10.17660/ActaHortic.2001.547.15>
- Postma J, Van Os E, and Bonants PJM (2008). Pathogen detection and management strategies in soilless plant growing systems. *Soilless Culture*, 425–457. <https://doi.org/10.1016/b978-044452975-6.50012-5>
- Price TV, Fox P (1984). Behaviour of fungicides in recirculating nutrient film hydroponic systems. In: Proceedings of the 6th international congress on soilless culture, Luntenen, 28 Apr–5 May 1984, pp 511–522
- Pu J, Wang Z and Chung H (2020). Climate change and the genetics of insecticide resistance. *Pest Manag. Sci.* 76(3), 846-852. <https://doi.org/10.1002/ps.5700>
- Puntarulo S, Sánchez RA, Boveris A (1988). Hydrogen peroxide metabolism in soybean embryonic axes at the onset of germination. *Plant Physiol.*, 86, 626-630. <https://doi.org/10.1104/pp.86.2.626>
-

-
- Qamer Z, Chaudhary MT, Du X, et al. (2021). Review of oxidative stress and antioxidative defense mechanisms in *Gossypium hirsutum* L. in response to extreme abiotic conditions. *J. Cotton Res.*, 4, 9. <https://doi.org/10.1186/s42397-021-00086-4>
- Qian K, Shi T, Tang T, Zhang S, Liu X, Cao Y (2010). Preparation and characterization of nano-sized calcium carbonate as controlled release pesticide carrier for validamycin against *Rhizoctonia solani*. *Microchim. Acta*, 173, 51-57. <https://doi.org/10.1007/s00604-010-0523-x>
- Qian L, Guan Y, He B, Xiao H (2008). Modified guanidine polymers: Synthesis and antimicrobial mechanism revealed by AFM. *Polymer*, 49, 2471-2475. <https://doi.org/10.1016/j.polymer.2008.03.042>
- Quan LJ, Zhang B, Shi WW, Li HY (2008). Hydrogen peroxide in plants: a versatile molecule of the reactive oxygen species network. *J. Integr. Plant Biol.*, 50, 2-18. <https://doi.org/10.1111/j.1744-7909.2007.00599.x>
- Rabin J (1986). Pack tomatoes for higher profits - chlorinating packing shed wash water improves quality. *American Vegetable Grower*, 34(8), 12
- Radioecology Exchange (2021). Enzyme analysis by spectrophotometry - plate reader method in STAR Protocols, manuals and videos. <https://radioecology-exchange.org/sites/default/files/Enzyme%20Analysis%20by%20Spectrophotometry%20-%20Plate%20Reader%20method.pdf> [προσπελάστηκε 20-12-2021]
- Ramadan G, Shawir M, El-bakary A, Abdelgaleil S (2016). Dissipation of four insecticides in tomato fruit using high performance liquid chromatography and QuECHERS methodology. *Chil. J. Agr. Res.*, 76, <http://dx.doi.org/10.4067/S0718-58392016000100018>
- Ramos B, Miller FA, Brandyo TRS, Teixeira P, Silva CLM (2013). Fresh fruits and vegetables—An overview on applied methodologies to improve its quality and safety. *Innov. Food Sci. Emerg.*, 20, 1–15. <https://doi.org/10.1016/j.ifset.2013.07.002>
- Ranjan A, Rajput VD, Minkina T, Bauer T, et al. (2021). Nanoparticles induced stress and toxicity in plants. *Environ. Nanotechnol. Monit. Manag.*, 15, 100457. <https://doi.org/10.1016/j.enmm.2021.100457>
- Rantamäki A, Ruokonen SK, Sklavounos E, et al. (2017). Impact of surface-active guanidinium-, tetramethylguanidinium-, and cholinium-based ionic liquids on *Vibrio Fischeri* cells and dipalmitoylphosphatidylcholine liposomes. *Sci. Rep.*, 7, 46673. <https://doi.org/10.1038/srep46673>
- Ratnasekhar ChAKS, Pathya P, Prem Narain S, Mohana Krishna RM (2015). Identifying the metabolic perturbations in earthworm induced by cypermethrin using gas chromatography-mass spectrometry based metabolomics. *Sci. Rep.*, 5, 15674. <https://doi.org/10.1038/srep15674>
- Raven JA. (2017). Chloride: essential micronutrient and multifunctional beneficial ion, *J. Exp. Bot.*, 68(3), 359–367, <https://doi.org/10.1093/jxb/erw421>
- Ray P, Alhalhooly L, Ghosh A, Choi Y, et al. (2019). Size-transformable, multifunctional nanoparticles from hyperbranched polymers for environment-specific therapeutic
-

-
- delivery. *ACS Biomater. Sci. Eng.*, 5, 1354-1365. <https://doi.org/10.1021/acsbiomaterials.8b01608>.
- Razifard H, Ramos A, Della Valle AL, Bodary C, et al., (2020). Genomic evidence for complex domestication history of the cultivated tomato in Latin America. *Mol. Biol. Evol.*, 37, 1118-1132. <https://doi.org/10.1093/molbev/msz297>
- Regulation (EC) No 396/2005 of the European Parliament and of the Council of 23 February 2005 on maximum residue levels of pesticides in or on food and feed of plant and animal origin and amending Council Directive 91/414/EEC
- Regulation (EC) No 543/2011. EN 15.6.2011 Official Journal of the European Union L 157/109. Brussels: European Union. <https://eur-lex.europa.eu/legal-content/GA/TXT/?uri=CELEX%3A32011R0543>
- Regulation (EC) No 1107/2009 of the European Parliament and of the Council of 21 October 2009 concerning the placing of plant protection products on the market and repealing Council Directives 79/117/EEC and 91/414/EEC. <http://eur-lex.europa.eu/legal-content/EN/TXT/?uri=OJ:L:2009:309:TOC>
- Regulation (EC) No 2020/749. Commission Regulation (EU) 2020/749 of 4 June 2020 amending Annex III to Regulation (EC) No 396/2005 of the European Parliament and of the Council as regards maximum residue levels for chlorate in or on certain products. <http://data.europa.eu/eli/reg/2020/749/oj>
- Ren G, Hu D, Cheng EWC, Vargas-Reus MA, Reip P, Allaker RP (2009). Characterisation of copper oxide nanoparticles for antimicrobial applications. *Int. J. Antimicrob. Agents*, 33, 587-590. <https://doi.org/10.1016/j.ijantimicag.2008.12.004>
- Revel M, Châtel A, Mouneyrac C (2017). Omics tools: New challenges in aquatic nanotoxicology? *Aquat. Toxicol.*, 193, 72-85. <https://doi.org/10.1016/j.aquatox.2017.10.005>
- Reyes-Garcés N and Gionfriddo E (2019). Recent developments and applications of solid phase microextraction as a sample preparation approach for mass-spectrometry-based metabolomics and lipidomics. *TrAC Trends Anal. Chem.*, 113, 172-181. <https://doi.org/10.1016/j.trac.2019.01.009>
- Reyes-García MG, García-Tamayo F, Hernández-Hernández F (2012). Gamma-aminobutyric acid (GABA) increases *in vitro* germ-tube formation and phospholipase B1 mRNA expression in *Candida albicans*. *Mycoscience*, 53, 36-39. <https://doi.org/10.1007/s10267-011-0130-7>
- Richardson SD, Thruston Jr AD, et al. (1996). Future use of chlorine, chlorine dioxide, and other chlorine alternatives. 140, 1082-1236
- Richter AP, Brown JS, Bharti B, Wang A, et al. (2015). An environmentally benign antimicrobial nanoparticle based on a silver-infused lignin core. *Nat. Nanotechnol.*, 10, 817. <https://doi.org/10.1038/nnano.2015.141>
- Riggio GM, Wang Q, Kniel KE, Gibson KE (2019). Microgreens—A review of food safety considerations along the farm to fork continuum. *Int. J. Food Microbiol.*, 290, 76-85. <https://doi.org/10.1016/j.ijfoodmicro.2018.09.027>
-

-
- Rizwan M, Ali S, ur Rehman MZ et al. (2019). Effect of foliar applications of silicon and titanium dioxide nanoparticles on growth, oxidative stress, and cadmium accumulation by rice (*Oryza sativa*). *Acta Physiol. Plant*, 41, 35. <https://doi.org/10.1007/s11738-019-2828-7>
- Roco MC, Williams RS, Alivisatos P (2000). Nanotechnology research directions: IWGN workshop report: vision for nanotechnology in the next decade: Springer Science & Business Media.
- Roditakis E, Papachristos D, Roditakis NE (2010). Current status of the tomato leafminer *Tuta absoluta* in Greece. *Bull. OEPP*, 40, 163-166. <https://doi.org/10.1111/j.1365-2338.2009.02367.x>
- Rodríguez-Ortega WM, Martínez V, Nieves M et al. (2019). Agricultural and physiological responses of tomato plants grown in different soilless culture systems with saline water under greenhouse conditions. *Sci. Rep.*, 9, 6733. <https://doi.org/10.1038/s41598-019-42805-7>
- Rodrigues SM, Demokritou P, Dokoozlian N, Hendren CO, et al. (2017). Nanotechnology for sustainable food production: promising opportunities and scientific challenges. *Environ. Sci. Nano*, 4(4), 767-781. <https://doi.org/10.1039/C6EN00573J>
- Rosner A, Lachman O, Pearlsman M, Feigelson L, et al. (2006). Characterisation of cucumber leaf spot virus isolated from recycled irrigation water of soil-less cucumber cultures. *Ann. Appl. Biol.*, 149(3), 313–316. <https://doi.org/10.1111/j.1744-7348.2006.00096.x>
- Ryan DG, Murphy MP, Frezza C, Prag HA, et al. (2019). Coupling Krebs cycle metabolites to signalling in immunity and cancer. *Nat. Metab.*, 1, 16. <https://doi.org/10.1038/s42255-018-0014-7>
- Saharan V, Mehrotra A, Khatik R, Rawal P, Sharma SS, Pal A (2013). Synthesis of chitosan based nanoparticles and their *in vitro* evaluation against phytopathogenic fungi. *Int. J. Biol. Macromol.*, 62, 677-683. <https://doi.org/10.1016/j.ijbiomac.2013.10.012>
- SANTE/11813/2017 (2017). Guidance document on analytical quality control and method validation procedures for pesticides residues analysis in food and feed, European Commission. https://ec.europa.eu/info/departments/health-and-foodsafety_en
- Saia S, Fragasso M, De Vita P, Beleggia R (2019). Metabolomics provides valuable insight for the study of durum wheat: A review. *J. Agric. Food Chem.*, 67, 3069-3085. <https://doi.org/10.1021/acs.jafc.8b07097>
- Saini RK, Patel S, Bajpai J, Bajpai AK (2020). Advanced controlled nanopesticide delivery systems for managing insect pests. In: K. R. R., Thomas S., Volova T., K. J. (eds) Controlled release of pesticides for sustainable agriculture. Springer, Cham. https://doi.org/10.1007/978-3-030-23396-9_7
- Saleh AM, Hassan YM, Selim S, AbdElgawad H (2019). NiO-nanoparticles induce reduced phytotoxic hazards in wheat (*Triticum aestivum* L.) grown under future climate CO₂. *Chemosphere*, 220, 1047-1057. <https://doi.org/10.1016/j.chemosphere.2019.01.023>
- Salih AAM, Baraibar M, Mwangi KK and Artan G (2020). Climate change and locust outbreak in East Africa. *Nat. Clim. Chang.*, 10(7), 584-585. <https://doi.org/10.1038/s41558-020-0835-8>
-

-
- Sánchez-Bayo F and Wyckhuys KAG (2019). Worldwide decline of the entomofauna: A review of its drivers. *Biol. Conserv.*, 232, 8-27. <https://doi.org/10.1016/j.biocon.2019.01.020>
- Sanchez DH, Pieckenstain FL, Escaray F, Erban A, et al. (2011). Comparative ionomics and metabolomics in extremophile and glycophytic Lotus species under salt stress challenge the metabolic pre-adaptation hypothesis. *Plant Cell Environ.*, 34, 605-617. <https://doi.org/10.1111/j.1365-3040.2010.02266.x>
- Sapalidis A, Sideratou Z, Panagiotaki KN, Sakellis E, et al. (2018). Fabrication of antibacterial poly (vinyl alcohol) nanocomposite films containing dendritic polymer functionalized multi-walled carbon nanotubes. *Front. Mater.*, 5, 11. <https://doi.org/10.3389/fmats.2018.00011>
- Sarwar M, Aslam M, Sarwar S, Iftikhar R. (2020). Chapter 21 - Different nematodes and plasmodiophorids as vectors of plant viruses. In *Applied Plant Virology*, ed. by Awasthi LP. Academic Press, pp. 275-290. <https://doi.org/10.1016/B978-0-12-818654-1.00021-9>
- Savary S, Willocquet L., Pethybridge SJ et al. (2019). The global burden of pathogens and pests on major food crops. *Nat. Ecol. Evol.* 3, 430–439. <https://doi.org/10.1038/s41559-018-0793-y>
- Savvas D. (2003). Hydroponics: A modern technology supporting the application of integrated crop management in greenhouse. *J. Food, Agric. Environ.*, 1, 80–86.
- Savvas D. and Gruda N. (2018). Application of soilless culture technologies in the modern greenhouse industry – A review. *Eur. J. Hortic. Sci.*, 83(5), 280-293. <https://doi.org/10.17660/eJHS.2018/83.5.2>
- Savvas D, Kalozoumis P, Yfantopoulos D (2018). Standard Operating Procedure 25: Title Tomato total yield estimation. Compiled for the EU-H2020 funded project ‘TOMRES’, ‘A novel and integrated approach to increase multiple and combined stress tolerance in plants using tomato as a model’, under Grant Agreement Number 727929.
- Savvas D, Savva A, Ntatsi G, Ropokis A, et al. (2011). Effects of three commercial rootstocks on mineral nutrition, fruit yield, and quality of salinized tomato. *Z. Pflanzenernähr. Bodenk.*, 174, 154-162. <https://doi.org/10.1002/jpln.201000099>
- Sawyer T (2021). Food safety and *E. coli* in aquaponic and hydroponic systems. *Horticulturae.*, 7(3), 36. <https://doi.org/10.3390/horticulturae7030036>
- Schallenhammer SA, Duggan SM, Morrison KR, Bentley BS, et al. (2017). Hybrid BisQACs: Potent bicationic quaternary ammonium compounds merging the structures of two commercial antiseptics. *ChemMedChem*, 12, 1931-1934. <https://doi.org/10.1002/cmdc.201700597>.
- Schebesta H and Candel JIL (2020). Game-changing potential of the EU’s Farm to Fork Strategy. *Nat. Food*, 1(10), 586-588. [10.1038/s43016-020-00166-9](https://doi.org/10.1038/s43016-020-00166-9)
- Schnackenberg LK, Sun J, Beger RD (2012). Metabolomics techniques in nanotoxicology studies. In Reineke J. (Ed), *Nanotoxicity. Methods in molecular biology (methods and protocols)*, Humana Press, Totowa, NJ., U.S.A., 926, 141-156. https://doi.org/10.1007/978-1-62703-002-1_10
- Schneider CAR WS and Eliceiri KW (2012). NIH Image to ImageJ: 25 years of image analysis. *Nat. Methods*, 9, 671-675. <https://doi.org/10.1038/nmeth.2089>
-

-
- Schnitzler WH and Gruda N (2002). Hydroponics and product quality. In Hydroponic production of vegetables and ornamentals, 373-411.
- Schönenberger U and Stamm C (2021). Hydraulic shortcuts increase the connectivity of arable land areas to surface waters, *Hydrol. Earth Syst. Sci.*, 25, 1727–1746. <https://doi.org/10.5194/hess-25-1727-2021>
- Schrand AM, Rahman MF, Hussain SM, Schlager JJ, et al. (2010). Metal-based nanoparticles and their toxicity assessment. *Wiley Interdiscip. Rev. Nanomed. Nanobiotechnol.*, 2, 544-568. <https://doi.org/10.1002/wnan.103>
- Schreuder MDJ and Brewer CA (2001a). Persistent effects of short-term, high exposure to chlorine gas on physiology and growth of *Pinus ponderosa* and *Pseudotsuga menziesii*. *Ann. Bot.*, 88, 197–206. <https://doi.org/10.1006/anbo.2001.1443>
- Schreuder MDJ and Brewer CA (2001b). Effects of short term, high exposure to chlorine gas on morphology and physiology of *Pinus ponderosa* and *Pseudotsuga menziesii*. *Ann. Bot.*, 88, 187–195. <https://doi.org/10.1006/anbo.2001.1442>
- Schulz R, Bub S, Petschick LL, Stehle S, Wolfram J (2021). Applied pesticide toxicity shifts toward plants and invertebrates, even in GM crops. *Science*. 372(6537), 81-84. <https://doi.org/10.1126/science.abe1148>
- Schwachtje J, Whitcomb SJ, Firmino AAP, Zuther E, Hinch DK, Kopka J (2019). Induced, Imprinted, and Primed Responses to Changing Environments: Do Plants Store and Process Information by Metabolic Imprinting and Metabolic Priming? *Front. Plant. Sci.*, 10, 106. <https://doi.org/10.3389/fpls.2019.00106>
- Scott N and Chen H (2012). Nanoscale science and engineering for agriculture and food systems. *Ind. Biotechnol.*, 8, 340-343. <https://doi.org/10.1089/ind.2013.1555>
- Seerat Jan, Zahida Rashid, Tanveer Ahmad Ahngar, Sadaf Iqbal, et al. (2020). Hydroponics – A Review. *Int. J. Curr. Microbiol. App. Sci.*, 9(8): 1779-1787. <https://doi.org/10.20546/ijcmas.2020.908.206>
- Sergiev I, Alexieva V, Karanov E (1997). Effect of spermine, atrazine and combination between them on some endogenous protective systems and stress markers in plants. *Compt. Rend. Acad. Bulg. Sci.*, 51, 121-124.
- Sevastos A, Kalampokis IF, Panagiotopoulou A, Pelecanou M, Aliferis KA (2018). Implication of *Fusarium graminearum* primary metabolism in its resistance to benzimidazole fungicides as revealed by ¹H NMR metabolomics. *Pest. Biochem. Physiol.*, 148, 50-61. <https://doi.org/10.1016/j.pestbp.2018.03.015>
- Seyed Alian R, Dziewięcka M, Kędzierski A, Majchrzycki Ł, Augustyniak M (2021). Do nanoparticles cause hormesis? Early physiological compensatory response in house crickets to a dietary admixture of GO, Ag, and GOAg composite. *STOTEN*, 788, 147801. <https://doi.org/10.1016/j.scitotenv.2021.147801>
- Shin TH, Lee DY, Lee HS, Park HJ, et al. (2018). Integration of metabolomics and transcriptomics in nanotoxicity studies. *BMB Rep.*, 51, 14-20. <https://doi.org/10.5483/BMBRep.2018.51.1.237>
-

-
- Sharma P, Jha AB, Dubey RS, Pessarakli M (2012). Reactive Oxygen Species, oxidative damage, and antioxidative defense mechanism in plants under stressful conditions. *J. Bot.*, 2012, 26. <https://doi.org/10.1155/2012/217037>
- Siddiqui MH and Al-Wahaibi MH (2014). Role of nano-SiO₂ in germination of tomato (*Lycopersicum esculentum* seeds Mill.). *Saudi J. Biol. Sci.*, 21 (1), 13-17. <https://doi.org/10.1016/j.sjbs.2013.04.005>
- Sideratou Z, Agathokleous M, Theodossiou TA, Tsiourvas D (2018). Functionalized hyperbranched polyethylenimines as thermosensitive drug delivery nanocarriers with controlled transition temperatures. *Biomacromolecules*, 19, 315-328. <https://doi.org/10.1021/acs.biomac.7b01325>
- Sideratou Z, Tsiourvas D, Paleos CM (2000). Quaternized Poly(propylene imine) Dendrimers as Novel pH-Sensitive Controlled-Release Systems. *Langmuir*, 16, 1766-1769. <https://doi.org/10.1021/la990829v>
- Singh A, Dhiman N, Kar AK, Singh D, Purohit MP, Ghosh D, Patnaik S (2020). Advances in controlled release pesticide formulations: Prospects to safer integrated pest management and sustainable agriculture. *J. Hazard. Mater.*, 385, 121525. <https://doi.org/10.1016/j.jhazmat.2019.121525>
- Smith IK, Vierheller TL, Thorne CA (1988). Assay of glutathione reductase in crude tissue homogenates using 5,5'-dithiobis(2-nitrobenzoic acid). *Anal. Biochem.*, 175, 408-413. [https://doi.org/10.1016/0003-2697\(88\)90564-7](https://doi.org/10.1016/0003-2697(88)90564-7)
- Snyder DE, Meyer J, Zimmermann AG, Qiao M, Gissendanner SJ, et al. (2007). Preliminary studies on the effectiveness of the novel pulicide, spinosad, for the treatment and control of fleas on dogs. *Vet. Parasitol.*, 150, 345–351. <https://doi.org/10.1016/j.vetpar.2007.09.011>
- Solomon PS and Oliver RP (2001). The nitrogen content of the tomato leaf apoplast increases during infection by *Cladosporium fulvum*. *Planta*, 213, 241-249. <https://doi.org/10.1007/s004250000500>
- Son JE, Kim HJ, Ahn TI (2020). Hydroponic systems. *Plant Factory*, 273–283. <https://doi.org/10.1016/b978-0-12-816691-8.00020-0>
- Song G, Gao Y, Wu H, Hou W, Zhang C, Ma H (2012). Physiological effect of anatase TiO₂ nanoparticles on *Lemna minor*. *Environ. Toxicol. Chem.*, 31, 2147-2152. <https://doi.org/10.1002/etc.1933>
- Song U, Jun H, Waldman B, Roh J, et al. (2013). Functional analyses of nanoparticle toxicity: A comparative study of the effects of TiO₂ and Ag on tomatoes (*Lycopersicon esculentum*). *Ecotoxicol. Environ. Saf.*, 93, 60-67 <https://doi.org/10.1016/j.ecoenv.2013.03.033>
- Soria NGC, Montes A, Bisson MA, Atila-Gokcumen GE, Aga DS (2017). Mass spectrometry-based metabolomics to assess uptake of silver nanoparticles by *Arabidopsis thaliana*. *Environ. Sci.: Nano.*, 4, 1944-1953. <https://doi.org/10.1039/C7EN00555E>
- Souza LRR, Bernardes LE, Barbeta MFS, et al. (2019). Iron oxide nanoparticle phytotoxicity to the aquatic plant *Lemna minor*: effect on reactive oxygen species (ROS) production and chlorophyll a/chlorophyll b ratio. *Environ. Sci. Pollut. Res.*, 26, 24121–24131. <https://doi.org/10.1007/s11356-019-05713-x>
-

-
- Souza LRR, Corrêa TZ, Bruni AT, et al. (2021). The effects of solubility of silver nanoparticles, accumulation, and toxicity to the aquatic plant *Lemna minor*. *Environ. Sci. Pollut. Res.*, 28, 16720–16733. <https://doi.org/10.1007/s11356-020-11862-1>
- Sparks TC and Lorsbach BA (2017). Perspectives on the agrochemical industry and agrochemical discovery. *Pest Manag. Sci.*, 73(4), 672-677. <https://doi.org/10.1002/ps.4457>
- Sparks TC and Nauen R (2015). IRAC: Mode of action classification and insecticide resistance management. *Pestic. Biochem. Physiol.*, 121, 122-128. <https://doi.org/10.1016/j.pestbp.2014.11.014>
- Squatrito S, Arena E, Palmeri R and Fallico B (2020). Public and Private Standards in Crop Production: Their Role in Ensuring Safety and Sustainability. *Sustainability*, 12(2), 606. <https://doi.org/10.3390/su12020606>
- Stadler T, Buteler M, Valdez SR, Gitto JG (2018). Particulate nanoinsecticides: a new concept in insect pest management. In (Ed. Begoum, G.) *Insecticides: Agriculture and Toxicology*. IntechOpen, London, U.K., 83. <http://dx.doi.org/10.5772/intechopen.72448>
- Stanton JM, O'Donnell WE (1994) Hatching, motility, and infectivity of root-knot nematode (*Meloidogyne javanica*) following exposure to sodium hypochlorite. *Aust. J. Exp. Agric.*, 34(1), 105–108
- Steinberg C, Moulin F, Gaillard P, Gautheron N, et al. (1994). Disinfection of drain water in greenhouses using a wet condensation heater. *Agronomie*, 14(9):627–635. <https://hal.inrae.fr/hal-02708928>
- Stewart-Wade SM (2011). Plant pathogens in recycled irrigation water in commercial plant nurseries and greenhouses: their detection and management. *Irrig. Sci.*, 29, 267–297 <https://doi.org/10.1007/s00271-011-0285-1>
- Stohs SJ and Bagchi D (1995). Oxidative mechanisms in the toxicity of metal ions. *Free Radic. Biol. Med.*, 18, 321-336. [https://doi.org/10.1016/0891-5849\(94\)00159-H](https://doi.org/10.1016/0891-5849(94)00159-H)
- Storck V, Karpouzias DG, Martin-Laurent F (2017). Towards a better pesticide policy for the European Union. *STOTEN*, 575, 1027-1033. <https://doi.org/10.1016/j.scitotenv.2016.09.167>
- Sun S, Li X, Sun C, Cao W, Hu C, Zhao Y, et al. (2019). Effects of ZnO nanoparticles on the toxicity of cadmium to duckweed *Lemna minor*. *STOTEN*, 662, 697-702. <https://doi.org/10.1016/j.scitotenv.2019.01.275>
- Suslow T (2000). Chlorination in the production and postharvest handling of fresh fruits and vegetables. Use of chlorine-based sanitizers and disinfectants in the food manufacturing industry. https://www.siphidaho.org/env/pdf/Chlorination_of_fruits_and_veggies.PDF
- Takagi H (2008). Proline as a stress protectant in yeast: physiological functions, metabolic regulations, and biotechnological applications. *Appl. Microbiol. Biotechnol.*, 81, 211. <https://doi.org/10.1007/s00253-008-1698-5>
- Tan CH and Coles M (2014). The chemistry of guanidine, guanidinium, and guanidinate compounds. *Australian J. Chem.*, 67, 963-964. <https://doi.org/10.1071/CH14384>
-

-
- Tarrahi R, Khataee A, Movafeghi A, Rezanejad F, Gohari G (2017). Toxicological implications of selenium nanoparticles with different coatings along with Se_4^+ on *Lemna minor*. *Chemosphere*, 181, 655-665. <https://doi.org/10.1016/j.chemosphere.2017.04.142>
- Tarrahi R, Movafeghi A, Khataee A, Rezanejad F, Gohari G (2019). Evaluating the toxic impacts of cadmium selenide nanoparticles on the aquatic plant *Lemna minor*. *Molecules*, 24(3), 410. <https://doi.org/10.3390/molecules24030410>
- Tarek H, Hamiduzzaman MMd, Morfin N, Guzman-Novoa E (2018). Sub-lethal doses of neonicotinoid and carbamate insecticides reduce the lifespan and alter the expression of immune health and detoxification related genes of honey bees (*Apis mellifera*). *Genet. Mol. Res.*, 17(2). <https://doi.org/10.4238/gmr16039908>
- Teakle NL and Tyerman SD (2010). Mechanisms of Cl^- transport contributing to salt tolerance. *Plant Cell Environ.*, 33, 566-589. <https://doi.org/10.1111/j.1365-3040.2009.02060.x>
- Theodossiou TA, Pantos A, Tsogas I, Paleos CM (2008). Guanidinylated dendritic molecular transporters: prospective drug delivery systems and application in cell transfection. *ChemMedChem*, 3, 1635-1643. <https://doi.org/10.1002/cmdc.200800190>
- Tisch D and Schmoll M (2010). Light regulation of metabolic pathways in fungi. *Appl. Microbiol. Biotechnol.*, 85, 1259-1277. <https://doi.org/10.1007/s00253-009-2320-1>
- Tong Y, Wu Y, Zhao C, Xu Y, Lu J, Xiang S, et al. (2017). Polymeric Nanoparticles as a metolachlor carrier: Water-based formulation for hydrophobic pesticides and absorption by plants. *J. Agric. Food Chem.*, 65(34), 7371-7378. <https://doi.org/10.1021/acs.jafc.7b02197>
- Topping CJ, Aldrich A and Berny P (2020). Overhaul environmental risk assessment for pesticides. *Science*, 367(64-76), 360-363. <https://doi.org/10.1126/science.aay1144>
- Trebicki P (2020). Climate change and plant virus epidemiology. *Virus Res.*, 286, 198059. <https://doi.org/10.1016/j.virusres.2020.198059>
- Tsikis D (2017). Assessment of lipid peroxidation by measuring malondialdehyde (MDA) and relatives in biological samples: analytical and biological challenges. *Anal. Biochem.*, 524, 13-30. <https://doi.org/10.1016/j.ab.2016.10.021>
- Tu JC, Papadopoulos AP, Hao X, Zheng J (1999). The relationship of a pythium root rot and rhizosphere microorganisms in a closed circulating and an open system in stone wool culture in tomato. *Acta Hort.*, 481, 577-583. <https://doi.org/10.17660/ActaHortic.1999.481.68>
- Tuta absoluta Information Network (2020). <https://www.tutaabsoluta.com/> [προσπελάστηκε 17-2-2020]
- Tziveleka LA, Psarra AMG, Tsiourvas D, Paleos CM (2007). Synthesis and characterization of guanidinylated poly(propylene imine) dendrimers as gene transfection agents. *J. Control. Release*, 117, 137-146. <https://doi.org/10.1016/j.jconrel.2006.10.019>
- UCDavis (2021) Agricultural Sustainability Institute, What is sustainable agriculture?. <https://asi.ucdavis.edu/programs/ucsarep/about/what-is-sustainable-agriculture> [προσπελάστηκε 23-03-2021].
- Umetsu N and Shirai Y (2020). Development of novel pesticides in the 21st century. *J Pestic. Sci.*, 45(2), 54-74. <https://doi.org/10.1584/jpestics.D20-201>
-

-
- United Nations (2019). Department of Economic and Social Affairs, Population Division World Population Prospects 2019: Highlights, ed. by (ST/ESA/SER.A/423). https://population.un.org/wpp/Publications/Files/WPP2019_Highlights.pdf
- Urbaneja A, Montón H, Mollá O (2009). Suitability of the tomato borer *Tuta absoluta* as prey for *Macrolophus pygmaeus* and *Nesidiocoris tenuis*. *J. Appl. Entomol.*, 133(4), 292-296. <https://doi.org/10.1111/j.1439-0418.2008.01319.x>
- Uwizeyimana H, Wang M, Chen W and Khan K (2017). The eco-toxic effects of pesticide and heavy metal mixtures towards earthworms in soil. *Environ. Toxicol. Pharmacol.* 55, 20-29. <https://doi.org/10.1016/j.etap.2017.08.001>
- Vallance J, Déniel F, Floch GL, Guérin-Dubrana L, et al. (2011). Pathogenic and Beneficial Microorganisms in Soilless Cultures. In: Lichtfouse E., Hamelin M., Navarrete M., Debaeke P. (eds) Sustainable Agriculture Volume 2. Springer, Dordrecht. https://doi.org/10.1007/978-94-007-0394-0_31
- Van Boxtael S, Habib I, Jacxsens L, De Vocht M, et al. (2013). Food safety issues in fresh produce: Bacterial pathogens, viruses and pesticide residues indicated as major concerns by stakeholders in the fresh produce chain. *Food Control*, 32, 190-197. <https://doi.org/10.1016/j.foodcont.2012.11.038>
- van der Sluijs JP (2020). Insect decline, an emerging global environmental risk. *Curr. Opin. Environ. Sustain.*, 46, 39-42. <https://doi.org/10.1016/j.cosust.2020.08.012>
- Van Hoesel W, Tiefenbacher A, König N, Dorn VM, et al., (2017) Single and Combined Effects of Pesticide Seed Dressings and Herbicides on Earthworms, Soil Microorganisms, and Litter Decomposition. *Front. Plant Sci.*, 8(215). <https://doi.org/10.3389/fpls.2017.00215>
- van Os EA (2010) Disease management in soilless culture systems. *Acta Hortic.*, 883, 385–394. <https://doi.org/10.17660/ActaHortic.2010.883.48>
- Vega-Vásquez P, Mosier NS, Irudayaraj J (2020). Nanoscale Drug Delivery Systems: From Medicine to Agriculture. *Front Bioeng Biotechnol.*, 8, 79. <https://doi.org/10.3389/fbioe.2020.00079>
- Vega-Vásquez P, Mosier NS and Irudayaraj J (2021). Nanovaccine for plants from organic waste: d-limonene-loaded chitosan nanocarriers protect plants against *Botrytis cinerea*., *ACS Sustain. Chem. Eng.*, 9(29), 9903-9914. <https://doi.org/10.1021/acssuschemeng.1c02818>
- Velikova V, Yordanov I, Edreva A (2000). Oxidative stress and some antioxidant systems in acid rain-treated bean plants: Protective role of exogenous polyamines. *Plant Sci.*, 151, 59-66. [https://doi.org/10.1016/S0168-9452\(99\)00197-1](https://doi.org/10.1016/S0168-9452(99)00197-1)
- Ventura SPM, Marques CS, Rosatella AA, Afonso CAM, et al. (2012). Toxicity assessment of various ionic liquid families towards *Vibrio fischeri* marine bacteria. *Ecotoxicol. Environ. Saf.*, 76, 162-168. <https://doi.org/10.1016/j.ecoenv.2011.10.006>
- Villaverde JJ, Sevilla-Morán B, López-Goti C, Alonso-Prados JL, Sandín-España P (2018). Considerations of nano-QSAR/QSPR models for nanopesticide risk assessment within the European legislative framework. *STOTEN*, 634, 1530-1539. <https://doi.org/10.1016/j.scitotenv.2018.04.033>
-

-
- Viola I and Marinelli A (2016). Life cycle assessment and environmental sustainability in the food system. *Agric. Agric. Sci. Procedia*, 8, 317-323. <https://doi.org/10.1016/j.aaspro.2016.02.026>
- Vorapreeda T, Thammamongtham C, Cheevadhanarak S, Laoteng K (2012). Alternative routes of acetyl-CoA synthesis identified by comparative genomic analysis: involvement in the lipid production of oleaginous yeast and fungi. *Microbiology*, 158, 217-228. <https://doi.org/10.1099/mic.0.051946-0>
- Wagner DL (2020). Insect Declines in the Anthropocene. *Annu. Rev. Entomol.*, 65, 457-480. <https://doi.org/10.1146/annurev-ento-011019-025151>
- Walker GW, Kookana RS, Smith NE, Kah M, et al. (2018). Ecological risk assessment of nano-enabled pesticides: A perspective on problem formulation. *J. Agric. Food Chem.*, 66(26), 6480-6486. <https://doi.org/10.1021/acs.jafc.7b02373>
- Wahman R, Cruzeiro C, Graßmann J, Schröder P, Letzel T (2022). The changes in *Lemna minor* metabolomic profile: A response to diclofenac incubation. *Chemosphere*, 287, 132078. <https://doi.org/10.1016/j.chemosphere.2021.132078>
- Wang B, Pachaiyappan B, Gruber JD, Schmidt MG, Zhang YM, Woster PM (2016). Antibacterial diamines targeting bacterial membranes. *J. Med. Chem.*, 59, 3140-3151. <https://doi.org/10.1021/acs.jmedchem.5b01912>
- Wang G, Xiao Y, Xu H, Hu P, et al. (2018). Development of multifunctional avermectin poly(succinimide) nanoparticles to improve bioactivity and transportation in rice. *J. Agric. Food Chem.*, 66(43), 11244-11253. <https://doi.org/10.1021/acs.jafc.8b03295>
- Wang HF, Zhong XH, Shi WY, Guo B (2011). Study of malondialdehyde (MDA) content, superoxide dismutase (SOD) and glutathione peroxidase (GSH-Px) activities in chickens infected with avian infectious bronchitis virus. *Afr. J. Biotechnol.*, 10, 9213-9217. <https://doi.org/10.5897/AJB11.782>
- Wang X, Liu X, Chen J, Han H, Yuan Z (2014). Evaluation and mechanism of antifungal effects of carbon nanomaterials in controlling plant fungal pathogen. *Carbon*, 68, 798-806. <https://doi.org/10.1016/j.carbon.2013.11.072>
- Wang Y-J, Deering AJ, Kim H-J (2020). The occurrence of shiga toxin-producing *E. coli* in aquaponic and hydroponic Systems. *Horticulturae*, 6(1), 1. <https://doi.org/10.3390/horticulturae6010001>
- Wani KA and Mamta (2019). Handbook of research on the adverse effects of pesticide pollution in aquatic ecosystems. IGI Global. <http://doi:10.4018/978-1-5225-6111-8>
- Weber H (2002). Fatty acid-derived signals in plants. *Trends Plant Sci.*, 7, 217-224. [https://doi.org/10.1016/S1360-1385\(02\)02250-1](https://doi.org/10.1016/S1360-1385(02)02250-1)
- Wege S, Gilliam M, Henderson SW (2017). Chloride: not simply a 'cheap osmoticum', but a beneficial plant macronutrient, *J. Exp. Bot.*, 68(12), 3057-3069, <https://doi.org/10.1093/jxb/erx050>
- WHO-FAO (2019). Global situation of pesticide management in agriculture and public health. Report of a 2018 WHO-FAO survey. <http://www.fao.org/3/ca7032en/ca7032en.pdf>
-

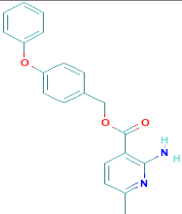
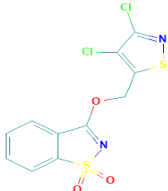
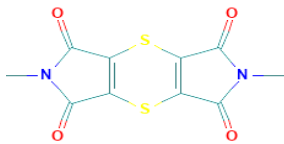
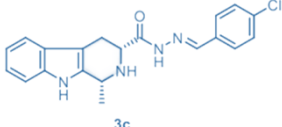
-
- Wierzbicka M and Obidzińska J (1998). The effect of lead on seed imbibition and germination in different plant species. *Plant Sci.*, 137, 155-171. [https://doi.org/10.1016/S0168-9452\(98\)00138-1](https://doi.org/10.1016/S0168-9452(98)00138-1)
- Winston JR, Johnson HB, Harvey EM (1953). "Using chemicals to stop spoilage". in Yearbook of Agriculture. USDA Printing Office. Washington D.C., 842-843
- Wohanka W (2002). Nutrient solution disinfection. In Savva, D., Passam, H.C. (eds). *Hydroponic Production of vegetables and Ornamentals*. Embryo Publications, Athens, Greece, pp. 345-372
- Worley BV, Slomberg DL, Schoenfisch MH (2014). Nitric oxide-releasing quaternary ammonium-modified poly(amidoamine) dendrimers as dual action antibacterial agents. *Bioconjug. Chem.*, 25, 918-927. <https://doi.org/10.1021/bc5000719>
- Xu G, Magen H, Tarchitzky J, Kafkafi U (1999). Advances in chloride nutrition of plants. In *Advances in Agronomy*, ed. by Sparks DL. Academic Press, pp. 97-150. [https://doi.org/10.1016/S0065-2113\(08\)60844-5](https://doi.org/10.1016/S0065-2113(08)60844-5)
- Xu JB (2017). China's new pesticide regulations become effective. <http://pesticideblog.lawbc.com/entry/chinas-new-pesticide-regulations-become-effective>
- Xu S, Zhou J, Liu L, Chen J (2010). Proline enhances *Torulopsis glabrata* growth during hyperosmotic stress. *Biotechnol. Bioproc. E.*, 15, 285-292. <https://doi.org/10.1007/s12257-009-0131-y>
- Yang B, Chengyu J, Yumin L, Wenjuan Y, Hongzhang K (2014). Metabolomic analysis on the toxicological effects of TiO₂ nanoparticles in mouse fibroblast cells: from the perspective of perturbations in amino acid metabolism. *Toxicol. Mech. Method.*, 24, 461-469. <https://doi.org/10.3109/15376516.2014.939321>
- Yimaer A, Chen G, Zhang M, Zhou L, et al. (2017). Childhood pesticide poisoning in Zhejiang, China: A retrospective analysis from 2006 to 2015. *BMC Public Health*, 17(1), 602. <https://doi.org/10.1186/s12889-017-4505-3>
- Yue L, Zhao J, Yu X, Lv K, Wang Z, Xing B (2018). Interaction of CuO nanoparticles with duckweed (*Lemna minor* L): Uptake, distribution and ROS production sites. *Environ. Pollut.*, 243, 543-552. <https://doi.org/10.1016/j.envpol.2018.09.013>
- Zamperini C, Maccari G, Deodato D, Pasero C, et al. (2017). Identification, synthesis and biological activity of alkyl-guanidine oligomers as potent antibacterial agents. *Sci. Rep.*, 7, 8251. <https://doi.org/10.1038/s41598-017-08749-6>
- Zayan SA (2019). Impact of climate change on plant diseases and IPM strategies. In: Topolovec-Pintarić, S. (Ed.), *Plant Diseases - Current Threats and Management Trends*. IntechOpen <https://doi.org/10.5772/intechopen.87055>
- Zhang Y, Tang HR, Luo Y (2008). Variation in antioxidant enzyme activities of two strawberry cultivars with short-term low temperature stress. *World J. Agri. Sci.*, 4, 458-462.
- Zhang C, Cui F, Zeng G-M, Jiang M, et al. (2015). Quaternary ammonium compounds (QACs): A review on occurrence, fate and toxicity in the environment. *STOTEN*, 518-519, 352-362. <https://doi.org/10.1016/j.scitotenv.2015.03.007>
-

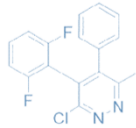
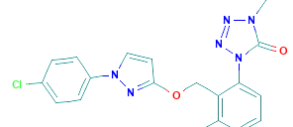
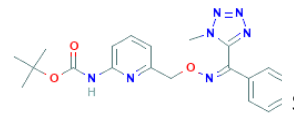
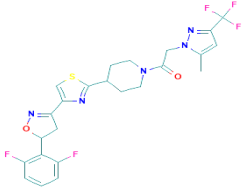
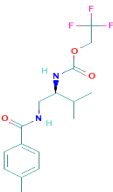
-
- Zhao L, Hu J, Huang Y, Wang H, et al. (2017). ¹H NMR and GC-MS based metabolomics reveal nano-Cu altered cucumber (*Cucumis sativus*) fruit nutritional supply. *Plant Physiol. Biochem.*, 110, 138-146. <https://doi.org/10.1016/j.plaphy.2016.02.010>
- Zhao X, Cui H, Wang Y, Sun C, Cui B, Zeng Z (2018). Development strategies and prospects of nano-based smart pesticide formulation. *J. Agric. Food Chem.*, 66(26), 6504-6512. <https://doi.org/10.1021/acs.jafc.7b02004>
- Zheng Y, Cayan DF, Dixon M (2008). Control of pathogens in irrigation water using chlorine without injury to plants. Combined Proceedings International Plant Propagators' Society, 58, 248-258. http://admin.ipps.org/uploads/58_051.pdf
- Zikankuba VL, Mwanyika G, Ntwenya JE and James A (2019). Pesticide regulations and their malpractice implications on food and environment safety. *Cogent Food Agric.*, 5(1). <https://doi.org/10.1080/23311932.2019.1601544>
- Zou XY, Xu B, Yu CP, Zhang HW (2013). Combined toxicity of ferroferric oxide nanoparticles and arsenic to the ciliated protozoa *Tetrahymena pyriformis*. *Aquat. Toxicol.*, 134–135, 66–73. <https://doi.org/10.1016/j.aquatox.2013.03.006>
- Αλεξάκη Δ (2018). Νέα πρόκληση για την εγχώρια οικονομία αποτελεί η υδροπονική καλλιέργεια. <https://m.naftemporiki.gr/story/1414581> [προσπελάστηκε 29-10-2021]
- Ζιώγας και Μαρκόγλου (2010). Γεωργική Φαρμακολογία – Βιοχημεία, Φυσιολογία, Μηχανισμοί δράσης και Χρήσεις Φυτοπροστατευτικών Προϊόντων. Αθήνα. 2010
- Λαμπίρης Γ (2021). Οι μεγαλύτεροι παίκτες στη σκακιέρα της εγχώριας υδροπονίας. <https://www.agronews.gr/food-insider/191413/oi-megaluteroi-xenoi-kai-eghorioi-paiktes-sti-skakiera-tis-udroponias/> [προσπελάστηκε 29-10-2021]
- Σάββας Δ (2009). Πρόσφατες εξελίξεις και διαφαινόμενες τάσεις στις θερμοκηπιακές καλλιέργειες κηπευτικών. 23ο Συνέδριο της Ελληνικής Εταιρείας Επιστήμης Οπωροκηπευτικών, Χανιά, 23-26, Οκτωβρίου 2007, τόμος 13B, σ. 741-748
- Σάββας Δ, 2011. Καλλιέργειες εκτός Εδάφους: Υδροπονία, Υποστρώματα. Αθήνα, Εκδόσεις ΑγρόΤυπος
-

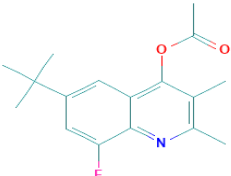
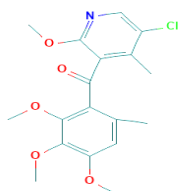
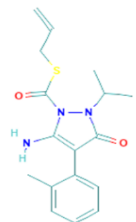
Παράρτημα

Συμπληρωματικά αρχεία Κεφάλαιο 1

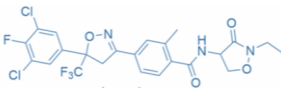
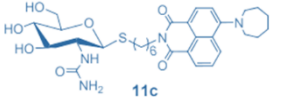
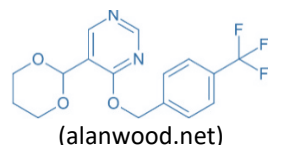
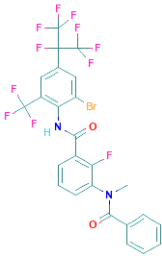
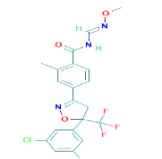
Συμπληρωματικός Πίνακας 1: Μυκητοκτόνα με νέο ή άγνωστο μηχανισμό δράσης που κυκλοφόρησαν ή είναι υπό ανάπτυξη από το 2010

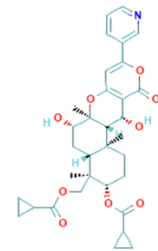
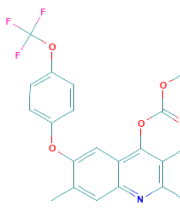
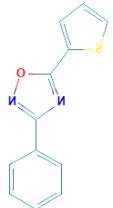
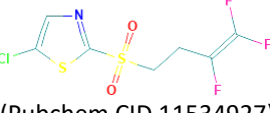
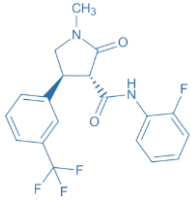
Έτος πρώτης έγκρισης	Δραστική ουσία	Χημική Δομή (Information, 2020)	Στόχος	Μηχανισμός δράσης (mode/mechanism of action)	FRAC CODE (FRAC, 2020)	Ανθεκτικότητα ((FRAC), 2020)
υπό ανάπτυξη	Aminopyrifen	 (Pubchem CID 91810812)	-	Παρεμπόδιση της πρωτεΐνης GWT-1 στην <i>Neurospora crassa</i> (Hatamoto et al., 2019)	-	-
υπό ανάπτυξη	Dichlobentiazox	 (Pubchem CID 17756624)	<i>Magnaporthe oryzae</i> (Umetsu and Shirai, 2020)	Επαγωγή της άμυνας των φυτών (Umetsu and Shirai, 2020)	-	-
υπό ανάπτυξη	Dipymetitrone	 (Pubchem CID 5236877)	<i>Phytophthora sp.</i> , περονόσποροι, <i>Venturia sp.</i> , early blight, and <i>Botrytis cinerea</i> (Umetsu and Shirai, 2020)	Άγνωστος (Umetsu and Shirai, 2020)	-	-
υπό ανάπτυξη	NK0209	 3c (Wang and Song, 2020)	tobacco mosaic virus (Wang and Song, 2020)	-	-	-

υπό ανάπτυξη	Pyridachlometyl		Μεγάλο εύρος δράσης (Matsuzaki et al., 2019b)	Πρώθηση του πολυμερισμού της τουμπουλίνης (Matsuzaki et al., 2019b)	-	-
αναμένεται έγκριση	Metiltetraprole		Μεγάλο εύρος δράσης (Suemoto et al., 2018)	Δρα στην αναπνευστική αλυσίδα (όμοια με QoI) (Matsuzaki et al., 2020), αλλά αποτελεσματικό σε QoI ανθεκτικά στελέχη των <i>Zymoseptoria tritici</i> , <i>Pyrenophora teres</i> , <i>Ramularia collo-cygni</i> , <i>Pyrenophora tritici-repentis</i> (Matsuzaki et al., 2019a)	-	-
2017	Picarbutrazox		<i>Pythium</i> sp., <i>Phytophthora</i> sp. και περονόσποροι (Nippon Soda Co., 2017) (Gilberto et al., 2018)	Παρεμπορίζει τον σχηματισμό των ζωοσπόριων (Umetsu and Shirai, 2020)	U 17	Μη γνωστή ανθεκτικότητα. Μη διασταυρωτή ανθεκτικότητα με τα PA, QoI, CAA
2015	Oxathiapiprolin		ωομύκητες, <i>Phytophthora</i> sp. και περονόσποροι (Cohen et al., 2018)	Δρα στην οξυστερόλη των ωομυκήτων (Umetsu and Shirai, 2020)	49 (Προηγούμεν ως U15)	<i>Phytophthora capsici</i> [UV ακτινοβολία (Andreassi IJL, 2013) (Miao et al., 2016)], <i>P. nicotianae</i> (Bittner and Mila, 2016)
2015	Tolprocarb		<i>Magnaporthe grisea</i> (Lewis et al., 2016)	Δρα στη βιοσύνθεση της μελανίνης (Hamada et al., 2014) Επιπλέον δράση μέσω επαγωγής άμυνας των φυτών (Hagiwara et al., 2019)	16.3	Μη γνωστή ανθεκτικότητα.
2013	Flutianil		Ωίδια σε διάφορες καλλιέργειες (OAT AgrioCo., 2020)	Παρεμπόδιση της κονιδιοποίησης (Hayashi et al., 2020, OAT AgrioCo., 2020)	U 13	<i>Sphaerotheca</i> sp. και <i>Podosphaera xanthii</i> (στελέχη αγρού) (Miyamoto et al., 2020)

2013	Tebufluoquin	 (Pubchem CID 11629002)	<i>Magnaporthe grisea</i>, <i>Cercospora kikuchii</i>, ωίδιο, ανθρακώσεις κά (Lewis et al., 2016)	Δρα στην αναπνευστική αλυσίδα κατά τη μεταφορά ηλεκτρονίων στα μιτοχόνδρια (Umetsu and Shirai, 2020)	U 16	Δεν παρουσιάζει διασταυρωτή ανθεκτικότητα με τα QoI.
2013	Pyriofenone	 (Pubchem CID 23082663)	Ωίδια (σιτάρι, κολοκυνθοειδή, φράουλα και μελιτζάνα) (Umetsu and Shirai, 2020)	Παρεμπόδιση του σχηματισμού απρεσσώριων και κονιδίων καθώς και πρόκληση μορφολογικών ανωμαλιών σε υφές (Umetsu and Shirai, 2020)	50	Λιγότερο ευαίσθητα στελέχη από τα <i>Blumeria sp.</i> <i>Sphaerotheca sp.</i> (Miyamoto et al., 2020)
2012	Fenpyrazamine	 (Pubchem CID 11493665)	<i>Botrytis cinerea</i>, <i>Sclerotinia sclerotiorum</i> (Lewis et al., 2016)	Δρα στο ένζυμο 3-keto reductase κατά τη βιοσύνθεση της εργοστερόλης (Kimura et al., 2017)	17	<i>Botrytis cinerea</i> (στελέχη αγρού) και διασταυρωτή ανθεκτικότητα με το fenhexamid (Fernández- Ortuño et al., 2018)

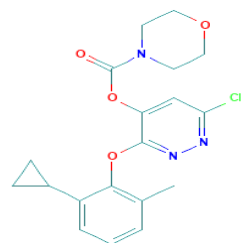
Συμπληρωματικός Πίνακας 2: Εντομοκτόνα, ακαρεοκτόνα, νηματοδοκτόνα και ζιζανιοκτόνα με νέο ή άγνωστο μηχανισμό δράσης που κυκλοφόρησαν ή είναι υπό ανάπτυξη από το 2010

Φυτοφάρμακο	Έτος πρώτης έγκρισης	Δραστική ουσία	Χημική Δομή (Information, 2020)	Στόχος	Μηχανισμός δράσης (mode/mechanism of action)	Ανθεκτικότητα ((IRAC), 2020b)
Εντομοκτόνα	υπό ανάπτυξη	Isocycloseram	 (Dayan et al., 2019)	Lepidoptera, Hemiptera, Coleoptera, Thysanoptera, Diptera (Dayan et al., 2019)	Δρά στο GABA– όμοιο με fluxametamide (Sparks et al., 2020)	IRAC classification 30 (Sparks et al., 2020)
Εντομοκτόνα	υπό ανάπτυξη	Ureido thioglycosides	 11c (Shen et al., 2020)	<i>Ostrinia furnacalis</i> (Shen et al., 2020)	Παρεμπόδιση του β-N-acetylhexosaminidase OfHex1 (Shen et al., 2020)	-
Εντομοκτόνα	Αναμένεται έγκριση (Nihon Nohyaku Co., 2019)	Benzpyrimoxan	 (alanwood.net)	Hemiptera: Delphacidae (Satoh E., 2017)	Ρυθμιστής ανάπτυξης με νέο μηχανισμό δράση (Umetsu and Shirai, 2020)	-
Εντομοκτόνα	2020	Broflanilide	 (Pubchem CID 53341374)	Lepidoptera, Coleoptera, και Thysanoptera (Katsuta et al., 2019)	Δρά στο GABA – όμοιο με isocycloseram ((IRAC), 2020b)	IRAC classification 30
Εντομοκτόνα	2019	Fluxametamide	 (Pubchem CID 136412260)	Lepidoptera, Thysanoptera, Diptera, Acari, Coleoptera, Hemiptera και Acari (Umetsu and Shirai, 2020)	Νέος παρεμποδιστής στο GABA (GABA _A Rs και Glu _{Cl} Rs) (Asahi et al., 2018)	IRAC classification 30

Εντομοκτόνα	2018(EPA), 2018, Agency, 2018, Canada, 2018)	Afidopyropen	 (Pubchem CID 54589430)	Μυζητικά έντομα όπως αφίδες, Aphids, τετράνυχτοι, θρίπες και ψυλλίδες (Lewis et al., 2016)	Παρεμποδιστής σε κανάλια TRPV (Kandasamy et al., 2017, (IRAC), 2020c)	IRAC classification 9D
Εντομοκτόνα	2018	Flometoquin	 (Pubchem CID 67119441)	Ακάρεα, Plant hoppers, Thrips, Diamond-backed moth (Lewis et al., 2016)	Παρεμπόδιση στο σύστημα μεταφοράς ηλεκτρονίων (Umetsu and Shirai, 2020)	Δεν έχει ακόμα περιγραφθεί (Sparks et al., 2020)
Εντομοκτόνα	2016	GS-omega/kappaHXT X-HV1Apeptide	-	Θρίπες, αλαυρώδεις, τετράνυχτοι και αφίδες (Vestaron)	Δρα στους μετασυναπτικούς υποδοχείς της ακετυλοχολίνης (nAChR) ((IRAC), 2020a)	IRAC classification 32
Νηματοδοκτόνα	2017	Tioxazafen	 (Pubchem CID 695679)	<i>Meloidogyne spp.</i> , <i>Heterodera sp.</i> (Lewis et al., 2016)	Παρεμπόδιση στη λειτουργία των ριβοσωμάτων (Agriculture, 2017)	Άγνωστο (IRAC, 2019)
	2014	Fluensulfone	 (Pubchem CID 11534927)	<i>Meloidogyne spp.</i> (Oka et al., 2009, Morris et al., 2016, Giannakou and Panopoulou, 2019, Oka and Saroya, 2019)	Παρεμπόδιση της ακετυλοχολινεστεράσης (Kearn et al., 2014) (Castillo et al., 2018)	Άγνωστο (IRAC, 2019)
Ζιζανιοκτόνα	Υπό ανάπτυξη	Tetflupyrolimet	 (alanwood.net)	Αγροστώδη ζιζάνια (Allen-Stevens, 2019)	Παρεμπόδιση της dihydroorotate dehydrogenase (DHODH) (Allen-Stevens, 2019)	-

2019

Cyclopyrimorate



(Pubchem CID 23013854)

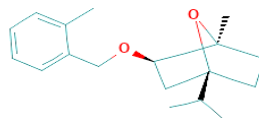
Cyperaceae και
πλατύφυλλα ζιζάνια
(Umetsu and Shirai,
2020)

Παρεμπόδιση της
homogentisate
solanesyltransferase (HTS)
(Shino et al., 2018) (Shino et al.,
2020)

-

2019
(έχει εγκριθεί
νωρίτερα αλλά
πρόσφατα
ανακαλύφθηκε ότι
έχει νέο
μηχανισμό
δράσης)

Cinmethylin



(Pubchem CID 91745)

Barnyard grass,
Velvetleaf, Crabgrass,
Pigweed, Annual
ryegrass (Lewis et al.,
2016)

Παρεμπόδιση της fatty acid
thioesterase (FTA) (Campe et
al., 2018)

HRAC classification 30
(Committee, 2020)

Συμπληρωματικά αρχεία κεφάλαιο 5

Συμπληρωματικός Πίνακας 3: Οι τιμές pH στα διαλύματα απορροών όπως διαμορφώθηκαν κατά την υδροπονική καλλιέργεια τομάτας στα διάφορα επίπεδα χλωρίου κατά την απολύμανση του ΘΔ

Ημερομηνίες	control	2,5	5	7,5	Παρατηρήσεις
17/05/2019	6,42	6,51	6,47	6,47	Συνταγή (vegetative stage)
19/05/2019	6,38	6,46	6,42	6,42	
21/05/2019	6,27	6,46	6,39	6,28	
23/05/2019	6,11	6,40	6,45	6,27	
25/05/2019	5,94	6,27	6,13	6,04	
27/05/2019	5,86	6,27	6,18	5,90	
29/05/2019	5,70	6,32	6,17	5,80	
31/05/2019	5,51	6,00	6,04	5,63	
02/06/2019	5,43	6,21	5,88	5,55	
04/06/2019	5,38	6,01	5,48	5,37	
06/06/2019	5,11	5,50	5,50	4,93	11/6 NaClO
08/06/2019	5,40	5,75	5,78	5,05	
10/06/2019	5,18	5,54	0,00	0,00	
12/06/2019	3,85	5,32	0,00	5,08	
14/06/2019	1,33	4,85	0,00	0,00	
21/06/2019	5,21	5,16	5,25	5,08	
23/06/2019	4,91	4,97	5,18	5,01	
25/06/2019	4,65	4,95	4,46	4,63	
27/06/2019	4,71	4,66	4,87	4,85	
29/06/2019	4,65	4,80	4,78	4,76	Νέα συνταγή (ωρίμανση καρπών)+26/6 NaClO
01/07/2019	4,64	4,66	4,77	4,57	
03/07/2019	4,52	4,51	4,61	4,44	
06/07/2019	4,62	4,56	4,80	4,28	
07/07/2019	4,77	4,92	4,83	4,41	
08/07/2019	4,75	4,83	5,05	4,43	
09/07/2019	5,64	5,22	5,57	5,05	
10/07/2019	5,46	5,36	5,61	5,35	
11/07/2019	5,25	5,26	5,45	5,33	
12/07/2019	5,15	5,06	5,27	5,27	1 st συγκομιδή
13/07/2019	5,31	5,18	5,43	5,27	
14/07/2019	5,23	5,12	5,32	5,20	
15/07/2019	5,15	4,76	5,18	5,05	
16/07/2019	4,89	4,71	4,96	4,77	
17/7/2019	4,80	4,57	4,92	4,62	
18/07/2019	4,38	4,30	4,04	4,49	
19/7/2019	5,22	5,29	5,57	5,19	
20/7/2019	5,74	5,41	5,42	5,75	
21/7/2019	6,03	5,98	5,87	6,00	Νέα συνταγή (καρποφορίας)
22/7/2019	6,20	6,10	6,10	6,08	
23/07/2019	5,98	6,08	6,00	6,03	
24/07/2019	5,55	5,40	5,88	5,74	
					2 nd συγκομιδή

Συμπληρωματικός Πίνακας 4: Οι τιμές EC στα διαλύματα απορροών όπως διαμορφώθηκαν κατά την υδροπονική καλλιέργεια τομάτας στα διάφορα επίπεδα χλωρίου κατά την απολύμανση του ΘΔ

Ημερομηνίες	control	2,5	5	7,5	Παρατηρήσεις
17/05/2019	2,80	2,72	2,81	2,69	Συνταγή (vegetative stage)
19/05/2019	2,76	2,71	2,81	2,63	
21/05/2019	2,79	2,79	2,80	2,70	
23/05/2019	3,05	3,56	3,06	2,89	
25/05/2019	2,90	3,33	3,28	3,00	
27/05/2019	3,21	3,55	3,33	3,00	
29/05/2019	3,28	3,72	3,44	3,44	
31/05/2019	3,54	4,29	3,96	3,58	
02/06/2019	3,37	4,10	3,73	3,31	
04/06/2019	3,60	4,08	3,75	3,39	
06/06/2019	3,51	3,73	3,83	3,28	11/6 NaClO
08/06/2019	3,84	4,33	4,12	3,59	
10/06/2019	3,22	4,38	0,00	0,00	
12/06/2019	3,29	4,38	0,00	4,19	
14/06/2019	0,95	4,38	0,00	0,00	
21/06/2019	4,22	4,68	4,46	4,52	
23/06/2019	4,47	4,64	4,58	4,46	
25/06/2019	4,46	4,50	4,45	4,50	
27/06/2019	4,96	4,75	4,42	4,24	
29/06/2019	5,08	5,00	4,61	4,50	
01/07/2019	5,29	5,18	4,82	4,76	
03/07/2019	6,14	5,83	5,44	5,11	
06/07/2019	4,75	5,03	4,85	4,57	
07/07/2019	4,44	4,41	4,07	3,95	4/7 Νέα συνταγή (Διορθωτική αλατότητας)
08/07/2019	4,39	4,55	4,01	3,75	
09/07/2019	2,99	3,17	3,10	2,85	
10/07/2019	3,38	3,09	3,02	2,77	
11/07/2019	3,31	3,14	3,25	3,42	Νέα συνταγή (καρποφορίας)+ NaClO
12/07/2019	3,43	3,28	3,25	3,00	
13/07/2019	3,41	3,17	3,18	3,25	
14/07/2019	3,38	3,27	3,16	3,19	
15/07/2019	3,40	3,21	3,28	3,10	1 ^η συγκομιδή
16/07/2019	3,35	3,28	3,09	3,15	
17/7/2019	3,28	3,19	3,31	3,08	
18/07/2019	3,57	3,48	3,94	3,15	
19/7/2019	3,38	3,47	3,41	3,40	Νέα συνταγή (καρποφορίας)
20/7/2019	3,53	3,50	3,44	3,47	
21/7/2019	3,56	4,55	3,54	3,50	
22/7/2019	4,20	4,43	3,92	4,58	
23/07/2019	4,64	5,08	4,58	4,57	2 ^η συγκομιδή
24/07/2019	4,53	5,00	4,95	4,95	

Δημοσιεύσεις/Ανακοινώσεις της Διδακτορικής Διατριβής (ΔΔ)

Επιστημονικές δημοσιεύσεις σε περιοδικά με κριτές

- **Lykogianni M**, Bempelou E, Karavidas I, Anagnostopoulos C, Aliferis KA, Savvas D (2023). Impact of sodium hypochlorite applied as nutrient solution disinfectant on growth, nutritional status, yield, and consumer safety of tomato (*Solanum lycopersicum* L.) fruit produced in a soilless cultivation. *Horticulturae*. 2023; (3):352. <https://doi.org/10.3390/horticulturae9030352>
- **Lykogianni M**, Bempelou E, Ntatsi G, Karavidas I, Ropokis A, et al. (2021). Spinosad residues in hydroponically grown tomato fruits. *Acta horticulturae*, 1320, 197-204. <https://doi.org/10.17660/ActaHortic.2021.1320.25>
- **Lykogianni M**, Bempelou E, Karamaouna F, Aliferis KA (2021). Do pesticides promote or hinder sustainability in agriculture? The challenge of sustainable use of pesticides in modern agriculture. *Science of the Total Environment*, 795, 148625. <https://doi.org/10.1016/j.scitotenv.2021.148625>
- **Lykogianni M**, Papadopoulou E-A, Sapalidis A, Tsiourvas D, Sideratou Z, Aliferis KA (2020). Metabolomics reveals differential mechanisms of toxicity of hyperbranched poly(ethyleneimine)-derived nanoparticles to the soil-borne fungus *Verticillium dahliae* Kleb. *Pesticide Biochemistry and Physiology*, 165, 104535. <https://doi.org/10.1016/j.pestbp.2020.02.001>

Δημοσιευμένες περιλήψεις σε επιστημονικά περιοδικά με περιεχόμενο της ΔΔ

- **Lykogianni M**, Sideratou Z, Tsiourvas D, Aliferis K (2018). Polymer nanoparticles as potent fungicides against *Verticillium dahliae*: Insights from a metabolomics perspective. *Phytopathology* 108 (10). <https://apsjournals.apsnet.org/doi/pdf/10.1094/PHYTO-108-10-S1.240>
- **Lykogianni M**, Papadopoulou EA, Tsiourvas D, Sideratou Z, Aliferis KA (2017). Bioactivity and effect of hyperbranched poly(ethyleneimine)-based nanoparticles on plant pathogenic fungi. *eCM Journal*.

Δημοσιεύσεις σε εκλαϊκευμένα περιοδικά

- **Λυκογιάννη M**, Μπεμπέλου E, Καραβίδας I, Αναγνωστόπουλος X, Αλιφέρης K, Σάββας Δ (2022). Η χλωρίνη στην υδροπονία: Η εφαρμογή της για την απολύμανση του θρεπτικού διαλύματος σε καλλιέργειες εκτός εδάφους. Γεωργία –Κτηνοτροφία, 08: 38-43

Ανακοινώσεις

- **Λυκογιάννη Μ**, Μαυρίκου Σ, Τσεκούρας Β, Σιδεράτου Ζ, Τσιούρβας Δ, Κίντζιος Σ, Αλιφέρης ΚΑ (2022). Η επίδραση νανοσωματιδίων υπερδιακλαδισμένης πολυαιθυλενιμίνης στην ανάπτυξη της *Lemna minor* L. και ο ρόλος του οξειδωτικού στρες ως ένας πιθανός μηχανισμός της τοξικότητάς τους. 20ο Πανελλήνιο Φυτοπαθολογικό Συνέδριο, Θεσσαλονίκη, 3-6 Οκτωβρίου 2022. Σελ. 205 βιβλίο περιλήψεων (εικονογραφημένη ανακοίνωση)
- **Λυκογιάννη Μ**, Μπεμπέλου Ελ, Καραμαούνα Φ και Αλιφέρης Κ (2021). Φυτοπροστατευτικά προϊόντα και βιώσιμη γεωργία: Σύμμαχοι ή αντίπαλοι; 16ο Συνέδριο της Εταιρείας Αγροτικής Οικονομίας (ΕΤΑΓΡΟ), 7-8 Οκτωβρίου (e-poster presentation)
- **Lykogianni M**, Bempelou E, Ntatsi G, Karavidas I, Ropokis A, Aliferis KA, Savvas D (2021). Spinosad residues in hydroponically grown tomato fruits. VIII South-Eastern Europe Symposium on Vegetables and Potatoes (International Society for Horticultural Science). 24-26 September 2021. Ohrid. North Macedonia (e-poster presentation)
- **Λυκογιάννη Μ**, Ντάτση Γ, Μπεμπέλου Ε, Καραβίδας Γ, Ροπόκης Α, Αναγνωστόπουλος Χ, Αλιφέρης ΚΑ, Σάββας Δ (2019). Επίδραση της εφαρμογής υποχλωριώδους νατρίου κατά την απολύμανση θρεπτικού διαλύματος υδροπονικής καλλιέργειας τομάτας στη συγκέντρωση υποχλωριώδων και υπερχλωρικών ιόντων στον καρπό. 29ο Συνέδριο Ελληνικής Εταιρείας της Επιστήμης των Οπωροκηπευτικών (29ο ΕΕΕΟ), 15-18 Οκτωβρίου 2019, Πάτρα. Βιβλίο περιλήψεων σ 28. (προφορική ανακοίνωση)
- **Λυκογιάννη Μ**, Ντάτση Γ, Μπεμπέλου Ε, Ανδρέου ΒΝ, Παπακώστα Α, Θεοδωρακοπούλου Μ, Καραβίδας Γ, Ροπόκης Α, Αλιφέρης ΚΑ, Σάββας Δ (2019). Μελέτη της επίδρασης διαφόρων συγκεντρώσεων χλωρίου κατά την απολύμανση του θρεπτικού διαλύματος σε υδροπονική καλλιέργεια τομάτας στη θρεπτική κατάσταση των φυτών. 29ο Συνέδριο Ελληνικής Εταιρείας της Επιστήμης των Οπωροκηπευτικών (29ο ΕΕΕΟ), 15-18 Οκτωβρίου 2019, Πάτρα. Βιβλίο περιλήψεων σ 94. (εικονογραφημένη ανακοίνωση)
- **Λυκογιάννη Μ**, Σιδεράτου Ζ, Τσιούρβας Δ, Αλιφέρης ΚΑ (2018). Μελέτη της επίδρασης οργανικών νανοσωματιδίων στο μεταβολισμό του *Verticillium dahliae* και των μηχανισμών δράσης τους με εφαρμογή μεταβολομικής, 19ο Πανελλήνιο Φυτοπαθολογικό Συνέδριο, 30 Οκτωβρίου - 1 Νοεμβρίου 2018, Αθήνα. Βιβλίο περιλήψεων σ. 55 (προφορική ανακοίνωση)
- **Lykogianni M**, Sideratou Z, Tsiourvas D, Aliferis K (2018). Polymer nanoparticles as potent fungicides against *Verticillium dahliae*: insights from a metabolomics perspective. International Congress of Plant Pathology (ICPP) 2018: Plant Health in A Global Economy, Boston USA, 28 July- 3 August 2018. Program Book p. 41 (oral presentation)
(<https://apsnet.confex.com/apsnet/ICPP2018/meetingapp.cgi/Paper/10208>)
(<https://apsnet.confex.com/apsnet/ICPP2018/videogateway.cgi/id/5798?recordingid=5798>)
- **Lykogianni M**, Papadopoulou EA, Tsiourvas D, Sideratou Z, Aliferis KA (2017). Bioactivity and effect of hyperbranched poly(ethyleneimine)-based nanoparticles on plant pathogenic fungi. 27th Griboi meeting, Athens, Greece (oral presentation)

-
- **Λυκογιάννη Μ**, Παπαδοπούλου Ε, Τσιούρβας Δ, Σιδεράτου Ζ, Αλιφέρης ΚΑ (2016). Νανοτεχνολογία στη Νέα εποχή της Φυτοπροστασίας – Αξιολόγηση της βιοδραστικότητας Καινοτόμων Δενδριτικών Νανοφορέων. 18ο Πανελλήνιο Φυτοπαθολογικό Συνέδριο, Ηράκλειο, Κρήτη. Βιβλίο περιλήψεων σ. 64 (προφορική ανακοίνωση)

Λοιπές Δημοσιεύσεις/Ανακοινώσεις

Υποχρεώσεις Υποψηφίων Διδακτόρων σύμφωνα με τον Κανονισμό Διδακτορικών Σπουδών του Τμήματος Επιστήμης Φυτικής Παραγωγής της Σχολής Αγροτικής Παραγωγής Υποδομών & Περιβάλλοντος του Γεωπονικού Πανεπιστημίου Αθηνών - Άρθρο 12 παράγραφος 11

Επιστημονικές δημοσιεύσεις σε περιοδικά με κριτές

- Kolainis S*, Koletti A*, **Lykogianni M***, Karamanou D, Gkizi D, et al. (2020). An integrated approach to improve plant protection against olive anthracnose caused by the *Colletotrichum acutatum* species complex. *PloS One*, 15(5): e0233916. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0233916>

*joint authorship

- Fotopoulou E *, **Lykogianni M ***, Papadimitriou E, Mavrikou S *, Machera K., et al. (2020). Mining the effect of the neonicotinoids imidacloprid and clothianidin on the chemical homeostasis and energy equilibrium of primary mouse neural stem/progenitor cells using metabolomics. *Pesticide Biochemistry and Physiology*, 104617, <https://doi.org/10.1016/j.pestbp.2020.104617>

*joint authorship

Δημοσιεύσεις σε εκλαϊκευμένα περιοδικά

- Κολαΐνης Σ, Κωλέττη Α, **Λυκογιάννη Μ**, Παρασκευόπουλος Α, Αλιφέρης ΚΑ (2019). Γλοιοσπόριο της ελιάς: Μολησματικότητα μορφοτύπων, ανθεκτικότητα σε μυκητοκτόνα και προτεινόμενο πρόγραμμα φυτοπροστασίας. Γεωργία –Κτηνοτροφία, 08: 40-43
- Κολαΐνης Σ, **Λυκογιάννη Μ**, Καραμάνου Δ, Γκύζη Δ, Τζάμος Σ, Παρασκευόπουλος Α, Αλιφέρης ΚΑ (2019). Γλοιοσπόριο της ελιάς: *Colletotrichum acutatum* είναι το παθογόνο και δεν χρειάζεται απαραίτητα τα νύγματα του δάκου

Ανακοινώσεις

- Καλογεροπούλου Ε, Τζάμος ΣΕ, Αλιφέρης ΚΑ, **Λυκογιάννη Μ**, Βλουτόγλου Ε και Παπλωματάς ΕΙ (2022). Μεταγραφικές και μεταβολικές αποκρίσεις των bam3 φυτών αραβίδοψης έναντι της προσβολής από το *Fusarium oxysporum*. 20ο Πανελλήνιο Φυτοπαθολογικό Συνέδριο, Θεσσαλονίκη, 3-6 Οκτωβρίου 2022. Σελ. 142 βιβλίο περιλήψεων (εικονογραφημένη ανακοίνωση)
- Kalogeropoulou EN, Aliferis KA, **Lykogianni MD**, Tjamos SE, Vloutoglou I and Paplomatas EI (2022). BAM3 plays a significant role in host resistance against *Fusarium oxysporum*. At 'Abstracts of invited, oral and poster papers presented at the 16th Congress of the Mediterranean Phytopathological Union, April 4–8, 2022, in Limassol, Cyprus', *Phytopathologia Mediterranea* 61(1): 181-239, 2022. (poster presentation)
- Kakoura S, Mavrikou S, Tsekouras V, Aliferis KA, **Lykogianni M**, Papadopoulou E-A, Moschopoulou G, Kintzios S (2021). Investigation of the anticancer impact of mistletoe (*Viscum album* L.) callus and stem protein extracts through the assessment of the cytotoxic activity and metabolic profiling of the breast MCF7 adenocarcinoma cell line. EEMBM virtual congress Chemical, structural biology and disease treatment. 3 March 2021 (e-poster presentation)
- Ντάτση Γ, Καραβίδας Γ, **Λυκογιάννη Μ**, Ροπόκης Α, Ταμπακάκη Α, Αλιφέρης ΚΑ, Σάββας Δ (2019). Μελέτη της επίδρασης διαφορετικών στελεχών αζωτοδεσμευτικών βακτηρίων και μειωμένης παροχής νερού στο μεταβολικό προφίλ υδροπονικά καλλιεργούμενου αμπελοφάσουλου (*Vigna unguiculate* L. Walp.). (29ο Συνέδριο Ελληνικής Εταιρείας της Επιστήμης των Οπωροκηπευτικών 29ο ΕΕΕΟ), 15-18 Οκτωβρίου 2019, Πάτρα. Βιβλίο περιλήψεων σ 6. (προφορική ανακοίνωση)
- Fotopoulou E, **Lykogianni M**, Papadimitriou E, Thomaidou D, Kintzios S, Mavrikou S, Aliferis K A (2019). Study of the toxicity of plant protection products to cell cultures applying metabolomics. 7th International Conference on Environmental Management, Engineering, Planning and Economics (CEMEPE 2019) and SECOTOX Conference. 19-24 May, Mykonos, Book of abstracts p. 74 (poster presentation)
- Kolainis S, Koletti A, **Lykogianni M**, Karamanou D, Gkizi D, Tjamos S, Paraskeupoulos A and Aliferis K (2019). Advancing crop protection of olive trees through metabolomics: olive anthracnose, 8th Conference of the Hellenic Scientific Society of Mikrobiokosmos, 18-20 April, Patra. Book of abstracts p. 149 (poster presentation)
- Marka S, Mavrikou S, Aliferis KA, **Lykogianni M**, Douni E, Kintzios S (2018). Comparative study of the inhibition of ochratoxin A-induced cytotoxicity to HEK293 cells by several antioxidants followed by GC/EL/MS metabolomics analysis. 69th Panhellenic Conference of the Hellenic Society for Biochemistry and Molecular Biology (HSBMB), 23-25 November, Larissa, Greece, Book of Abstracts p. 134 (poster presentation).
- Αλεξανδρή Ε, **Λυκογιάννη Μ**, Αράπης Γ, Αλιφέρης ΚΑ (2018). Αξιολόγηση της τοξικότητας και βιοδραστικότητας αποβλήτων ελαιοτριβείων και αξιοποίησή τους στη

φυτοπροστασία. 19ο Πανελλήνιο Φυτοπαθολογικό Συνέδριο, Αθήνα, Βιβλίο περιλήψεων σ. 146 (εικονογραφημένη ανακοίνωση)

- Κωλέττη Α, Κολαΐνης Σ, **Λυκογιάννη Μ**, Παρασκευόπουλος Α, Αλιφέρης ΚΑ (2018). Μορφότυποι Γλοιοσπορίου ελιάς (*Colletotrichum accutatum*): παθογένεια και ανθεκτικότητα σε μυκητοκτόνα. 19ο Πανελλήνιο Φυτοπαθολογικό Συνέδριο, Αθήνα, Βιβλίο περιλήψεων σ. 152 (εικονογραφημένη ανακοίνωση)
- Παπαδοπούλου Ε, **Λυκογιάννη Μ**, Καραογλανίδης Γ, Αλιφέρης ΚΑ (2018). Αξιολόγηση νέων πηγών βιοδραστικότητας στη φυτοπροστασία: τοξικότητα νανοσωματιδίων και biochar σε άγρια και ανθεκτικά σε μυκητοκτόνα στελέχη του *Botrytis cinerea*. 19ο Πανελλήνιο Φυτοπαθολογικό Συνέδριο, Αθήνα, Βιβλίο περιλήψεων σ. 156 (εικονογραφημένη ανακοίνωση)
- Κουτρουμάνου Μ, **Λυκογιάννη Μ**, Μπιλάλης Δ, Αλιφέρης ΚΑ (2018). Φυτοπροστασία Κάνναβης (*Cannabis sativa* L.): αξιολόγηση ενδοφύτων της ως παραγόντων φυτοπροστασίας, 19ο Πανελλήνιο Φυτοπαθολογικό Συνέδριο, Αθήνα, Βιβλίο περιλήψεων σ. 169 (εικονογραφημένη ανακοίνωση)
- Κολαΐνης Σ, Κωλέττη Α, **Λυκογιάννη Μ**, Καραμάνου Δ, Γκύζη Δ, Τζάμος ΣΕ, Παρασκευόπουλος Α, Αλιφέρης ΚΑ (2018). Γλοιοσπόριο της ελιάς (*Colletotrichum accutatum*): Νέα στοιχεία και εξελίξεις στο πεδίο έρευνας και φυτοπροστασίας, 19ο Πανελλήνιο Φυτοπαθολογικό Συνέδριο, 30 Οκτωβρίου-1η Νοεμβρίου, Αθήνα. Βιβλίο περιλήψεων σ. 60 (προφορική ανακοίνωση).
- Φωτοπούλου Ε, **Λυκογιάννη Μ**, Θωμαΐδου Δ, Παπαδημητρίου Ε, Κίντζιος Σ, Μαυρίκου Σ, Αλιφέρης ΚΑ (2018). Μελέτη της τοξικότητας φυτοπροστατευτικών προϊόντων σε κυτταρικές καλλιέργειες με εφαρμογή μεταβολομικής, 19ο Πανελλήνιο Φυτοπαθολογικό Συνέδριο, 30 Οκτωβρίου-1η Νοεμβρίου, Αθήνα. Βιβλίο περιλήψεων σ. 66 (προφορική ανακοίνωση).