

ΤΕΧΝΟΛΟΓΙΚΟ ΠΑΝΕΠΙΣΤΗΜΙΟ ΚΥΠΡΟΥ

ΣΧΟΛΗ ΓΕΩΤΕΧΝΙΚΩΝ ΕΠΙΣΤΗΜΩΝ

&

ΔΙΑΧΕΙΡΙΣΗΣ ΠΕΡΙΒΑΛΛΟΝΤΟΣ



## Πτυχιακή διατριβή

ΜΕΛΕΤΗ ΤΗΣ ΕΠΙΔΡΑΣΗΣ ΦΑΡΜΑΚΕΥΤΙΚΩΝ

ΟΥΣΙΩΝ ΣΤΗΝ ΑΝΑΠΤΥΞΗ ΤΟΥ ΦΥΤΟΥ

*MEDICAGO SATIVA*

Χαραλαμπία Χριστοδούλου

Λεμεσός 2014



ΤΕΧΝΟΛΟΓΙΚΟ ΠΑΝΕΠΙΣΤΗΜΙΟ ΚΥΠΡΟΥ  
ΣΧΟΛΗ ΓΕΩΤΕΧΝΙΚΩΝ ΕΠΙΣΤΗΜΩΝ & ΔΙΑΧΕΙΡΙΣΗΣ  
ΠΕΡΙΒΑΛΛΟΝΤΟΣ  
ΤΜΗΜΑ ΓΕΩΠΟΝΙΚΩΝ ΕΠΙΣΤΗΜΩΝ ΒΙΟΤΕΧΝΟΛΟΓΙΑΣ  
ΚΑΙ ΕΠΙΣΤΗΜΗΣ ΤΡΟΦΙΜΩΝ

## Πτυχιακή διατριβή

ΜΕΛΕΤΗ ΤΗΣ ΕΠΙΔΡΑΣΗΣ  
ΦΑΡΜΑΚΕΥΤΙΚΩΝ ΟΥΣΙΩΝ ΣΤΗΝ  
ΑΝΑΠΤΥΞΗ ΤΟΥ ΦΥΤΟΥ *MEDICAGO SATIVA*

Χαραλαμπία Χριστοδούλου

Επιβλέπων: Δρ. Βασίλειος Φωτόπουλος,  
Επίκουρος Καθηγητής  
Συνεπιβλέπουσα : Χρυστάλλα Αντωνίου

Λεμεσός 2014

## **Πνευματικά δικαιώματα**

Copyright © Χαραλαμπία Χριστοδούλου, 2014

Με επιφύλαξη παντός δικαιώματος. All rights reserved.

Η έγκριση της πτυχιακής διατριβής από το Τμήμα Γεωπονικών Επιστημών Βιοτεχνολογίας και Επιστήμης Τροφίμων του Τεχνολογικού Πανεπιστημίου Κύπρου δεν υποδηλώνει απαραίτητα και αποδοχή των απόψεων του συγγραφέα εκ μέρους του Τμήματος.

## ΠΕΡΙΛΗΨΗ

Η ξηρασία ως η κύρια αιτία των κλιματικών αλλαγών, είναι ένας από τους κύριους περιβαλλοντικούς παράγοντες που περιορίζουν την ανάπτυξη των φυτών και την παραγωγικότητά τους. Η ανάγκη εναλλακτικών λύσεων άρδευσης οδήγησαν στη χρήση του ανακυκλώσιμου νερού. Παρ' όλα αυτά, η ύπαρξη σε αυτό μικρών συγκεντρώσεων φαρμακευτικών ουσιών ανθρώπινης χρήσης, αποτέλεσε το κίνητρο στην παρούσα εργασία να μελετηθούν μεταβολές σε κυτταρικό και μοριακό επίπεδο σε φυτά *Medicago sativa*. Η μελέτη αυτή αφορά την εφαρμογή μέσω της άρδευσης 4 φαρμακευτικών δραστικών ουσιών οι οποίες κατηγοριοποιούνται ως εξής: αντιφλεγμονώδεις ουσίες (δικλοφαινάκη), αντιμικροβιακές (σουφλομεθοξαλόλη και τριμεθοπρίμη), αντισυλληπτικά (αιθυνυλοιστραδιόλη) και μείγμα αυτών των ουσιών. Οι ουσίες αυτές επιλέχθηκαν με βάση τις διαφορετικές ιδιότητες τους, τις διαφορετικές δομές και λειτουργικές ομάδες ώστε να καλύπτουν ένα ευρύ φάσμα φυσικοχημικών ιδιοτήτων. Σκοπός της εργασίας ήταν να μελετηθεί η επίδραση των ουσιών αυτών στα φύλλα και στις ρίζες του φυτού με τη χρήση φασματοφωτομετρικών και μοριακών τεχνικών. Όσον αφορά τις φασματοφωτομετρικές τεχνικές, η ποσοτικοποίηση NO και H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> έδειξε μεγαλύτερα επίπεδα και των δυο στα φύλλα σε σχέση με τις ρίζες. Ο δείκτης της κυτταρικής ζημιάς (MDA), ήταν στα μέγιστα επίπεδα στη μεταχείριση με το μείγμα των δραστικών ουσιών στις ρίζες, ενώ η συγκέντρωση της προλίνης ήταν σε χαμηλότερα επίπεδα σε σχέση με το μάρτυρα τόσο στις ρίζες όσο και στα φύλλα. Ακολούθησε η ποσοτική αλυσιδωτή πολυμεράση σε πραγματικό χρόνο με την οποία εξετάστηκαν τα επίπεδα έκφρασης αντιοξειδωτικών γονιδίων (*FeSOD*, *CuZnSOD*) καθώς και άλλων γονιδίων (*H<sup>+</sup>ATP*, *GST 7*, *GST 17*, *NR*, *Cytc<sub>ox</sub>*) η οποία έδειξε στα φύλλα μια γενική επαγωγή των γονιδίων αυτών, ενώ στις ρίζες φαίνεται να υπάρχει κάποια διαφορική ρύθμιση της γονιδιακής έκφρασης. Η σημαντική επαγωγή των δύο ισόμορφων της *GST*, αποτελεί σημαντικό εύρημα καθώς υποδηλώνει την ανάγκη του φυτού για αποτοξικοποίηση και μεταφορά ξενοβιοτικών παραγόντων εκτός του κυττάρου. Γενικά, η εφαρμογή των φαρμακευτικών δραστικών ουσιών στο νερό άρδευσης έδειξαν ότι υπάρχει κάποιου είδους καταπόνηση η οποία πιθανώς δεν οφείλεται σε νιτρο-οξειδωτική καταπόνηση αλλά η αντίδραση του φυτού να είναι αποτέλεσμα άλλου είδους καταπόνησης, η οποία ενεργοποιεί ενδογενείς αμυντικούς μηχανισμούς αποτοξικοποίησης ξενοβιοτικών ουσιών.

## ABSTRACT

Agriculture is highly dependent on the evolution of climate change. Drought is one of the main environmental factors that limit plant growth and productivity. The need for alternative irrigation sources has led to the use of recycled water. Nevertheless, the existence of low amounts of pharmaceutical substances in recycled water was the motivation of this work to study the changes induced at the cellular and molecular level in *Medicago sativa* plants. In this study, plants were irrigated with four pharmaceutical active substances separately and as a mixture. These compounds are classified into four categories, anti-inflammatory (diclofenac), antimicrobial (sulfamethoxazol & trimethoprim) and contraceptives (ethinylestradiol). The selection of these chemicals was based on different properties, different structures and functional groups to cover a wide range of physicochemical properties. The aim of this work was to study the effect of these active substances in leaves and roots of the plant using several spectrophotometric and molecular techniques. The quantification of the two well known signaling molecules NO and H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> showed higher levels in the leaves in comparison with the roots. Significant cellular damage levels were observed in plants treated with the mixture of active substances in the roots, while the concentration of proline was shown to be at lower levels compared with the control in both roots and leaves. Furthermore, molecular analysis was carried out in order to study the drug effect on the expression of several antioxidant genes (*FeSOD*, *CuZnSOD*) and other genes (*H<sup>+</sup>ATP*, *GST 7*, *GST 17*, *NR*, *CytCox*) using quantitative real-time RT-PCR. The results showed a general induction of the genes examined in leaves, while gene expression pattern demonstrated differential regulation in roots. Interestingly, both *GST* gene isoforms indicated a significant induction in the leaves. In conclusion, the presence of pharmaceutical substances in irrigation water resulted in stress imposition which is likely not due to nitro-oxidative stress but the result of another type of stress, which appears to activate endogenous plant defense mechanisms aiming to detoxify the cells from xenobiotics.