

ΓΕΩΠΟΝΙΚΟ ΠΑΝΕΠΙΣΤΗΜΙΟ ΑΘΗΝΩΝ,
ΤΜΗΜΑ ΑΞΙΟΠΟΙΗΣΗΣ ΦΥΣΙΚΩΝ ΠΟΡΩΝ &
ΓΕΩΡΓΙΚΗΣ ΜΗΧΑΝΙΚΗΣ

Εργαστήριο Εδαφολογίας και Γεωργικής Χημείας

«Επίδραση αζωτούχου και θειικής λίπανσης στην παραγωγή
γλυκοσινολικών στους ιστούς της ρόκας (*Eruca sativa*) και του
μπρόκολου (*Brassica oleracea* var. *italica*) και επιπτώσεις της
ενσωμάτωσης των υπολειμμάτων του μπρόκολου και των
γλυκοσινολικών στις μικροβιακές κοινότητες του εδάφους»

ΔΙΔΑΚΤΟΡΙΚΗ ΔΙΑΤΡΙΒΗ

ΜΙΧΑΛΗΣ Δ. ΟΜΗΡΟΥ

ΑΘΗΝΑ (2009)

ΓΕΩΠΟΝΙΚΟ ΠΑΝΕΠΙΣΤΗΜΙΟ ΑΘΗΝΩΝ,
ΤΜΗΜΑ ΑΞΙΟΠΟΙΗΣΗΣ ΦΥΣΙΚΩΝ ΠΟΡΩΝ &
ΓΕΩΡΓΙΚΗΣ ΜΗΧΑΝΙΚΗΣ

Εργαστήριο Εδαφολογίας και Γεωργικής Χημείας

Επίδραση αζωτούχου και θειικής λίπανσης στην παραγωγή
γλυκοσινολικών στους ιστούς της ρόκας (*Eruca sativa*) και του
μπρόκολου (*Brassica oleracea* var. *italica*) και επιπτώσεις της
ενσωμάτωσης των υπολειμμάτων του μπρόκολου και των
γλυκοσινολικών στις μικροβιακές κοινότητες του εδάφους»

ΔΙΔΑΚΤΟΡΙΚΗ ΔΙΑΤΡΙΒΗ

ΜΙΧΑΛΗΣ Δ. ΟΜΗΡΟΥ

ΑΘΗΝΑ (2009)

Διδακτορική Διατριβή με τίτλο:

Επίδραση αζωτούχου και θειικής λίπανσης στην παραγωγή γλυκοσινολικών στους ιστούς της ρόκας (*Eruca sativa*) και του μπρόκολου (*Brassica oleracea* var. *italica*) και επιπτώσεις της ενσωμάτωσης των υπολειμμάτων του μπρόκολου και των γλυκοσινολικών στις μικροβιακές κοινότητες του εδάφους»

του
Μιχάλη Δ. Ομήρου

Επιβλέπων: Κωνσταντίνος Οιχαλιώτης, Επίκουρος Καθηγητής

Τριμελής Επιτροπή Παρακολούθησης:

Ασημακόπουλος Ιωάννης

Πασσαμ Χαρολντ-Κριστοφερ
Κωνσταντίνος Οιχαλιώτης

Καθηγητής,
Τμήμα Αξιοποίησης Φυσικών Πόρων και
Γεωργικής Μηχανικής
Καθηγητής, Τμήμα Φυτικής Παραγωγής
Επίκουρος Καθηγητής,
Τμήμα Αξιοποίησης Φυσικών Πόρων και
Γεωργικής Μηχανικής

Επταμελής Εξεταστική Επιτροπή:

Ασημακόπουλος Ιωάννης

Πασσαμ Χαρολντ-Κριστοφερ

Μπουράνης Δημήτρης

Οιχαλιώτης Κωνσταντίνος

Παπαδοπούλου Καλλιόπη

Καρπούζας Δημήτριος

Μασσας Ιωάννης

Καθηγητής,
Τμήμα Αξιοποίησης Φυσικών Πόρων και
Γεωργικής Μηχανικής, ΓΠΑ
Καθηγητής,
Τμήμα Φυτικής Παραγωγής, ΓΠΑ
Αν. Καθηγητής,
Τμήμα Γεωπονικής Βιοτεχνολογίας, ΓΠΑ
Επικ. Καθηγητής,
Τμήμα Αξιοποίησης Φυσικών Πόρων και
Γεωργικής Μηχανικής, ΓΠΑ
Επικ. Καθηγήτρια,
Τμήμα Βιοχημείας και Βιοτεχνολογίας,
Πανεπιστήμιο Θεσσαλίας
Λέκτορας,
Τμήμα Βιοχημείας και Βιοτεχνολογίας,
Πανεπιστήμιο Θεσσαλίας
Λέκτορας,
Τμήμα Αξιοποίησης Φυσικών Πόρων και
Γεωργικής Μηχανικής, ΓΠΑ

Στην αγαπημένη μου σύζυγο Στάλω
και
στα παιδιά μας Δημήτρη και Παύλο

Ευχαριστίες

Η παρούσα διδακτορική διατριβή μου ανατέθηκε από τον Επίκουρο Καθηγητή του Τμήματος Αξιοποίησης Φυσικών Πόρων και Γεωργικής Μηχανικής κ. Κωνσταντίνο Οιχαλιώτη τον οποίο και ευχαριστώ θερμά για την συνεχή και αγαστή συνεργασία μας και την πολύπλευρη καθοδήγηση που μου παρείχε κατά την διάρκεια της εκπόνησης αυτής της διατριβής.

Ευχαριστώ θερμά την Επίκ. Καθηγήτρια, κ. Παπαδοπούλου Καλλιόπη και τον Λέκτορα, κ. Καρπούζα Δημήτριο για την άψογη συνεργασία, καθοδήγηση και φιλοξενία που μου παρείχαν στα εργαστήρια τους, στο Τμήμα Βιοχημείας και Βιοτεχνολογίας του Πανεπιστημίου Θεσσαλίας, στη Λάρισα.

Θα ήταν παράλειψη να μην εκφράσω την ευχαρίστηση μου στον Δρ Παπαστυλιανού Ιωάννη και σε όλους τους συναδέλφους του Ινστιτούτου Γεωργικών Ερευνών, στη Κύπρο που με βοήθησαν σημαντικά κατά τη διάρκεια των πειραμάτων που πραγματοποιήθηκαν στον πειραματικό Σταθμό του ΙΓΕ στο Ζύγι. Ευχαριστώ θερμά τη κα. Χαρά Παπαστεφάνου, Διευθύντρια του εργαστηρίου cp FOODLAB LTD για την παραχώρηση του εργαστηριακού εξοπλισμού και βοήθεια για την εκτέλεση των αναλύσεων αλλά και για τη καθοδήγηση σε θέματα ενόργανης χημικής ανάλυσης. Ευχαριστώ επίσης την Καθ. Ουρανία Μενκίσογλου της Γεωπονικής Σχολής του Α.Π.Θ. για τη βοήθεια και καθοδήγηση στις αναλύσεις των PLFAS.

Πάνω από όλα θα ήθελα να ευχαριστήσω τη σύζυγο μου Στάλω που με στήριξε όσο κανένας άλλος τα τέσσερα αυτά χρόνια, που στάθηκε πατέρας και μάνα στα παιδιά μας κατά τη διάρκεια της απουσίας μου. Τέλος θα ήθελα να ζητήσω συγγνώμη από το Δημήτρη και τον Παύλο που δεν με είχαν κοντά τους όσο θα έπρεπε αυτή την περίοδο.

Γενική Περίληψη

Η «βιοαπολύμανση» αφορά την ενσωμάτωση στο έδαφος, υπολειμμάτων καλλιέργειας Σταυρανθών και η ταυτόχρονη υδρόλυση των γλυκοσινολικών οξέων (ΓΚΣ) σε αντίστοιχες ισοθειοκυανιούχες ενώσεις (ΙΣΘ), χρησιμοποιείται ως πρακτική για την αντιμετώπιση εδαφογενών παθογόνων καθώς και εχθρών των καλλιεργούμενων φυτών. Η καλλιέργεια των Σταυρανθών για παραγωγή προϊόντων για ανθρώπινη κατανάλωση αποτελεί σημαντική γεωργική δραστηριότητα στις παραμεσόγειες χώρες ειδικά κατά τη χειμερινή περίοδο. Μετά το πέρας της καλλιεργητικής περιόδου και της συγκομιδής των προϊόντων παραμένουν στα αγροτεμάχια σημαντικές ποσότητες υπολειμμάτων των καλλιεργειών οι οποίες ενσωματώνονται στο έδαφος. Η παρουσία των ΓΚΣ στα υπολείμματα της καλλιέργειας προσδίδουν σε αυτά ένα δυναμικό βιοαπολύμανσης, το οποίο εξαρτάται από διάφορους παράγοντες όπως, η ποσότητα των υπολειμμάτων ανά στρέμμα, η συγκέντρωση των ΓΚΣ και ο τύπος τους, ο τρόπος ενσωμάτωσής τους, και η ευαισθησία των μικροοργανισμών στα προϊόντα υδρόλυσης των ΓΚΣ. Η συγκέντρωση των ΓΚΣ στους ιστούς των φυτών εξαρτάται εκτός από το γενότυπο, και από καλλιεργητικές φροντίδες όπως είναι η λίπανση. Ειδικότερα η αζωτούχος και θειική λίπανση φαίνεται ότι επηρεάζουν σημαντικά τη συγκέντρωση των ΓΚΣ στα βρώσιμα τμήματα των καλλιεργούμενων Σταυρανθών. Συγκεκριμένα το θείο, συμμετέχει καταλυτικά στο μονοπάτι βιοσύνθεσης των ΓΚΣ και ως εκ τούτου μέρος της συνολικής ποσότητας θείου που υπάρχει στα φυτά, αφομοιώνεται σε ΓΚΣ. Το άζωτο από την άλλη πλευρά αποτελεί σημαντικό παράγοντα για την παραγωγή των καλλιεργούμενων φυτών αφού έλλειψη του στοιχείου αυτού μειώνει σημαντικά τις αποδόσεις. Ωστόσο η αλόγιστη χρήση αζωτούχων λιπασμάτων, έχει σημαντική αρνητική επίδραση στο περιβάλλον.

Στόχος της παρούσας διατριβής ήταν η διερεύνηση της συγκέντρωσης διαφόρων ειδών και ποικιλιών Σταυρανθών σε ΓΚΣ και πως το θείο κατανέμεται στις ουσίες αυτές κατά τη βιοσύνθεσή τους. Επιπρόσθετα μελετήθηκε η επίδραση της αζωτούχου λίπανσης στη συγκέντρωση των ΓΚΣ στα διάφορα φυτικά μέρη της ρόκας και του μπρόκολου και η αλληλεπίδρασή του με το θείο, ενώ καθορίστηκαν τα κρίσιμα επίπεδα συγκέντρωσης των $N-NO_3^-$ σε μίσχους των νεαρότερων πλήρως ανεπτυγμένων φύλλων ρόκας και μπρόκολου για την βελτιστοποίηση της χρήσης του αζώτου σε αυτές τις καλλιέργειες. Ακολούθως, διερευνήθηκε η επίδραση της ενσωμάτωσης των υπολειμμάτων μπρόκολου, στη λειτουργία της εδαφικής μικροβιακής κοινότητας ενώ μελετήθηκε συγκεκριμένα η επίδραση της ενσωμάτωσης των υπολειμμάτων της καλλιέργειας του μπρόκολου στη μικροβιακή κοινότητα των ασκομυκήτων και των νιτροποιητικών βακτηρίων Α' σταδίου. Τέλος, μελετήθηκε η συμπεριφορά των ΓΚΣ στο έδαφος μετά από την ενσωμάτωση στο έδαφος, υπολειμμάτων μπρόκολου αλλά και καθαρών μορφών ΓΚΣ.

Το είδος, η ποικιλία και το μέρος του φυτού επηρεάζουν σημαντικά τη συγκέντρωση των ΓΚΣ ($p < 0.001$). Από τα είδη και ποικιλίες που εξετάστηκαν στην παρούσα διατριβή, η ρόκα

παρουσιάζει εξαιρετικό ενδιαφέρον, από άποψη σύστασης και συγκέντρωσης ΓΚΣ, αφού σε σύγκριση με τα υπόλοιπα καλλιεργούμενα είδη και ποικιλίες, παρουσίασε τις υψηλότερες συγκεντρώσεις ΓΚΣ ενώ στα φύλλα της ανιχνεύθηκε η γλουκοσατιβίνη (GSV), η οποία δεν έχει μελετηθεί ακόμα για τις χημειοπροστατευτικές τις ιδιότητες. Στις ρίζες των καλλιεργούμενων φυτών, η συγκέντρωση των ΓΚΣ ήταν μεγαλύτερη σε σχέση με το υπέργειο μέρος. Η κατανομή του θείου σε ΓΚΣ κυμάνθηκε από 3% μέχρι 59% ως ποσοστό του συνολικού θείου των φυτών και αυτό εξαρτιόταν από το φυτικό μέρος που εξετάστηκε και τα μεγαλύτερα ποσοστά βρέθηκαν στις ρίζες σε σύγκριση με τα υπέργεια τμήματα των φυτών.

Η αζωτούχος λίπανση επηρέασε την απόδοση τόσο της ρόκας όσο και του μπρόκολου στην παραγωγή βιομάζας, και τα κρίσιμα επίπεδα συγκέντρωσης $N-NO_3^-$ μεταβάλλονταν στους μίσχους των νεαρότερων πλήρως ανεπτυγμένων φύλλων ανάλογα με το στάδιο ανάπτυξης των φυτών, για την επίτευξη του 90% της σχετικής μέγιστης παραγωγής βιομάζας. Συγκεκριμένα για το μπρόκολο, τα κρίσιμα επίπεδα συγκέντρωσης $N-NO_3^-$ στις 30, 50 και 70 ημέρες μετά τη μεταφύτευση των φυτών ήταν 10.29, 6.34 και 4.01 mg/g ξ.β ενώ για τη ρόκα, 13.76, 6.52 και 1.21 mg/g ξ.β, 15, 30 και 45 ημέρες μετά τη μεταφύτευση. Η συγκέντρωση των ΓΚΣ στα φύλλα του μπρόκολου και της ρόκας επηρεάστηκαν σημαντικά τόσο από το στάδιο ανάπτυξης όσο και από το επίπεδο της αζωτούχου λίπανσης ($p < 0.001$). Ωστόσο η επίδραση του αζώτου ήταν διαφορετική για τα δύο είδη που εξετάστηκαν, αφού η συγκέντρωση των ΓΚΣ στη ρόκα μειώθηκε με την αύξηση της ποσότητας της αζωτούχου λίπανσης ενώ στο μπρόκολο παρατηρήθηκε αύξηση της συγκέντρωσης των ΓΚΣ με αύξηση της αζωτούχου λίπανσης. Σε ότι αφορά τη συγκέντρωση του θείου στα φύλλα, αυτή αυξήθηκε με την αύξηση της αζωτούχου λίπανσης και στα δύο είδη, ενώ η συγκέντρωση των $S-SO_4^{2-}$ στους μίσχους μειώθηκε υποδηλώνοντας μειωμένη μεταφορά του θρεπτικού στοιχείου. Επιπρόσθετα, φαίνεται ότι η αζωτούχος λίπανση επηρεάζει σημαντικά την αφομοίωση του θείου όταν αυτό βρίσκεται σε επάρκεια.

Η μεταβολή της θειικής και αζωτούχου λίπανσης επηρέασαν σημαντικά τη συγκέντρωση των ΓΚΣ στις ανθοκεφαλές μπρόκολου, αλλά και στα φύλλα και τις ρίζες τόσο του μπρόκολου όσο και της ρόκας ($p < 0.001$). Από τα αποτελέσματα προκύπτει ότι, η επίδραση του αζώτου και του θείου είναι ξεκάθαρη αφού τα δυο αυτά στοιχεία επηρεάζουν σημαντικά την συγκέντρωση και το τύπο ΓΚΣ που παράγουν τα φυτά. Επιπρόσθετα, είναι εμφανές ότι υπάρχει εξειδικευμένη ανά είδος αντίδραση, αφού τα δύο είδη που εξετάστηκαν αντέδρασαν διαφορετικά στις διάφορες δόσεις αζωτούχου και θειούχου λίπανσης. Αύξηση της αζωτούχου λίπανσης σε συνθήκες έλλειψης θείου, είχε ως αποτέλεσμα τη σημαντική αύξηση της συγκέντρωσης των Ινδολικών ΓΚΣ σε αντίθεση με τα αλειφατικά ΓΚΣ τα οποία μειώθηκαν με αποτέλεσμα ο λόγος αλειφατικών προς ινδολικά να μειώνεται δραματικά τόσο στο μπρόκολο όσο και στη ρόκα. Από την άλλη πλευρά σε συνθήκες επάρκειας θείου η αύξηση της αζωτούχου λίπανσης είχε ως αποτέλεσμα τη δραματική αύξηση της συγκέντρωσης των αλειφατικών ΓΚΣ στο μπρόκολο ενώ, στη ρόκα παρατηρήθηκε ακριβώς το αντίθετο γεγονός που ενισχύει την υπόθεση της εξειδικευμένης κατά είδος αντίδρασης

των φυτών. Συμπερασματικά προκύπτει, ότι η μέγιστη δυνατή συγκέντρωση των ΓΚΣ στους φυτικούς ιστούς ρόκας και μπρόκολου επιτυγχάνεται σε δόσεις θειούχου λίπανσης 150kg/ha και δόσεις αζωτούχου λίπανσης 250kg/ha.

Η ενσωμάτωση στο έδαφος υπολειμμάτων καλλιέργειας μπρόκολου, μετά τη συγκομιδή είχε σημαντική επίδραση στη μικροβιακή δραστηριότητα του εδάφους, καθώς και της λειτουργικής μικροβιακής κοινότητας στο έδαφος που εκτιμήθηκε με τον ποσοτικό προσδιορισμό των φωσφολιπιδίων στο έδαφος (PLFAs). Συγκεκριμένα η μικροβιακή αναπνοή και η υδρόλυση του FDA ήταν 4.5 και 3 φορές περίπου μεγαλύτερη στο έδαφος τρεις ημέρες μετά την ενσωμάτωση υπολειμμάτων μπρόκολου με ή χωρίς την προσθήκη μυροσινάσης. Η ενσωμάτωση στο έδαφος υπολειμμάτων μπρόκολου με ή χωρίς μυροσινάση είχε ως αποτέλεσμα τη σημαντική αύξηση της βιομάζας των όλων των ομάδων μικροοργανισμών στο έδαφος. Γεγονός που καταδεικνύει ότι η περιεκτικότητα των υπολειμμάτων σε γλυκοσινολικά οξέα δεν επηρεάζει αρνητικά την μικροβιακή δραστηριότητα στο έδαφος. Αντίθετα η μικροβιακή αναπνοή, μειώθηκε από 68 μέχρι 80% μετά την προσθήκη metham sodium και PITC (το προϊόν υδρόλυσης της GST) τις πρώτες τρεις ημέρες μετά την εφαρμογή τους ενώ παρόμοια συμπεριφορά κατέδειξε και η υδρόλυση του FDA, σε μικρότερο όμως βαθμό. Όλοι οι μικροοργανισμοί στο έδαφος επηρεάστηκαν αρνητικά μετά την εφαρμογή του υποκαπνιστικού metham sodium, ενώ η προσθήκη PITC επηρέασε αρνητικά 7 ημέρες μετά την εφαρμογή του, μόνο τους μύκητες, ενώ η βιομάζα των κατά Gram (-), (+) βακτηρίων και πρωτόζωων δεν διέφερε σε σύγκριση με τον μάρτυρα. Η μικροβιακή κοινότητα στο έδαφος επανέκαμψε στα αρχικά επίπεδα (σε σύγκριση με το μάρτυρα) 60 ημέρες μετά την εφαρμογή των μεταχειρίσεων.

Λεπτομερέστερη αξιολόγηση της επίδρασης της ενσωμάτωσης υπολειμμάτων μπρόκολου και άλλων χημικών υποκαπνιστικών στην μικροβιακή κοινότητα των ασκομυκήτων και των νιτροποιητικών βακτηρίων Α' σταδίου (NBA), κατέδειξε ότι, τα NBA δεν επηρεάστηκαν από τις διάφορες μεταχειρίσεις, σε αντίθεση με τους ασκομύκητες των οποίων η σύσταση μεταβλήθηκε σημαντικά μετά την εφαρμογή του metham sodium 15 και 60 ημέρες από την εφαρμογή του. Η ενσωμάτωση στο έδαφος, υπολειμμάτων καλλιέργειας μπρόκολου με ή χωρίς μυροσινάση είχε ως αποτέλεσμα μικρή διαφοροποίηση της σύστασης της κοινότητας των ασκομυκήτων, 3 ημέρες μετά την εφαρμογή τους. Αντίθετα, το PITC δεν επηρέασε σημαντικά την μικροβιακή κοινότητα των ασκομυκήτων υποδηλώνοντας ότι η τοξικότητα του PITC μειώνεται σημαντικά στο έδαφος.

Για την ερμηνεία των αποτελεσμάτων, εξετάστηκε η συμπεριφορά των ΓΚΣ στο έδαφος, με την εφαρμογή τους σε αυτό είτε σε καθαρή μορφή είτε με την ενσωμάτωση στο έδαφος, υπολειμμάτων καλλιέργειας μπρόκολου σε δυο διαφορετικά επίπεδα εδαφικής υγρασίας. Η παρουσία των ΓΚΣ στο έδαφος, είναι πολύ σύντομη, αφού η ημιπερίοδος ζωής των μορίων, κυμάνθηκε από 3 ώρες μέχρι και 14 ώρες, ενώ υπολείμματα ΓΚΣ ανιχνεύθηκαν μέχρι και 7 ημέρες μετά την εφαρμογή τους. Επιπλέον σημαντικός παράγοντας ($p < 0.001$) για την παρουσία

των ΓΚΣ αποτελεί το ποσοστό υγρασίας του εδάφους αφού, σε συνθήκες αυξημένης εδαφικής υγρασίας (90% της υδατοϊκανότητας του εδάφους), η συγκέντρωση των ΓΚΣ στο έδαφος, ήταν μικρότερη. Η διάσπαση των ΓΚΣ όταν αυτά εφαρμόζονται στο έδαφος, σε καθαρή μορφή συσχετίζεται στατιστικά σημαντικά με την ενζυμική δραστηριότητα της μυροσινάσης στο έδαφος και αυτή συσχετίστηκε στατιστικά σημαντικά με την μικροβιακή αναπνοή εδάφους, γεγονός που υποδηλώνει την παρουσία ή την ανάπτυξη μικροοργανισμών στο έδαφος, που έχουν τη δυνατότητα παραγωγής του ενζύμου. Αντίθετα, η ενζυμική δράση της μυροσινάσης, δεν συσχετίστηκε στατιστικά σημαντικά με την μικροβιακή δραστηριότητα στο έδαφος όπου ενσωματώθηκαν φύλλα μπρόκολου.

Summary

“Biofumigation” is an alternative method to chemical fumigants for controlling soil borne pathogens and pests. The term is specifically used to describe the utilization of naturally occurring biotoxic isothiocyanates (ITC) that evolve as hydrolysis products from glucosinolate (GSL)-containing plants or plant products applied to soil. In Mediterranean countries, Brassica species are particularly important vegetables since they are major winter crops and are considered to be rich sources of health promoting substances. After harvesting, the plant residues may be incorporated into the soil. The “biofumigation” potential of these residues depends on various factors that affect the toxicity of the GSL hydrolysis products to soil microorganisms, such as the size of biomass incorporation, the GSL concentration and type and the environmental conditions, .

GSL content and profile in Brassica species are influenced by plant factors, such as species and developmental stage, as well as by environmental conditions. The later include nutrient availability, especially nitrogen (N) and sulfur (S) supply. Sulfur is a key element for the GSL biosynthetic pathway, since it is assimilated by plants into organic sulfur-rich molecules as methionine and cysteine which are precursor molecules of GSLs. N is an essential element highly related with plant growth, protein-synthesis and agricultural production; moreover it is co-related with S in several biosynthetic processes within plant including GSL biosynthesis.

The aims of this study was (1) to investigate the effects of S and N fertilization on the distribution of different GSL in different plant organs of Brassica species and varieties with emphasis to the plants broccoli (*Brassica oleracea* var. *italica*) and rocket (*Eruca sativa*) and (2) to examine the effects of the GSLs to the soil microbial community when they are introduced into the soil with the incorporation of the respective plant residues.

The extend of S assimilation in GSL as a percentage of total plant-S was examined in Chapter 3. Moreover, different N and S fertilization doses were applied in order to examine the response of GSL concentration in two different Brassica species, broccoli (*Brassica oleraceae* var. *italica*) and rocket (*Eruca sativa* M.). In addition a relationship between $N-NO_3^-$ and biomass production in terms of critical levels was established in both species in order to optimize N use (Chapter 4 and 5). The impact of the incorporation of broccoli residues as a “biofumigant” on the soil microbial community and activity was investigated in comparison with chemical fumigation (Chapter 6); whereas a more detail examination of ascomycetes and ammonia oxidizers community structure using molecular techniques was examined in Chapter 7. Finally, GSL dissipation in soils under two different %WHC regimes was examined using pure GSL and broccoli plant residues (Chapter 8).

The results of the current study clearly showed that GSL profile and concentration depends on Brassica species, variety and plant organ. Moreover N and S supply rate had a significant impact on GSL concentration found in broccoli and rocket tissues. It was evident that N

influenced the individual GSL profile in the various organs that were examined in both species whereas S had a pronounced effect on their concentration. Furthermore, besides N and S fertilization, plant developmental stage had a detrimental effect on GSL concentration. Therefore it was concluded that GSL profile and content of the plant organs, of these species could be optimized and regulated (increased) using appropriate fertilization schemes and harvesting times. However it was showed that the response of different Brassica species in N and S fertilization differs, therefore, specific research is needed for other species in order to optimize their GSL content through fertilization.

Incorporation of broccoli residues in soil didn't reduced microbial activity in comparison with conventional soil fumigation practices such as fumigation with metham sodium. Instead an increase of soil microbial activity was noticed. The differences that were observed after broccoli residues incorporation in the soil are not associated with the GSL content of the residues and their subsequent hydrolysis products (ITC). It seems that the impact of broccoli residues on the soil microbial activity and community is related with their general role in soils as carbon sources.

The persistence of GSL in soil is very short and the increase of soil water content is negatively related with their persistence in the medium. This was noticed when they were applied either as pure substances or through incorporation of broccoli residues. Dissipation of pure GSL in soils seems to be related with microbial myrosinase activity or other GSL degradating enzymes (probably sulfatases); whereas plant derived GSL dissipation is more related with plant-myrosinase activity.

In conclusion, this work indicates that the suppressive impact of broccoli residues to various soil borne pathogens, which is mentioned in literature, is not related with their GSL content. Incorporation of plant residues belonging to a different species than broccoli, with higher GSL content, could be more effective and this effect could perhaps be attributed in GSL content. Under these circumstances, optimization of plant GSL content through fertilization with N and S could be accomplished. Higher "biofumigation" potential could be also increased by incorporation of plant material at the appropriate developmental stage and by optimization of abiotic factors during incorporation that are involved in GSL hydrolysis and ITC production such as soil water content.

High GSL containing pre-selected plant species, incorporated under high soil water conditions, could be combined with other alternative techniques such as soil solarization for the control of soil borne pathogens and pests. These issues will be the target of future research activities for the development, optimization and evaluation of sustainable agricultural practices.

| Περιεχόμενα | Σελίδα |
|---|---------------|
| ΚΕΦΑΛΑΙΟ 1^ο ΕΙΣΑΓΩΓΗ | 1 |
| ΚΕΦΑΛΑΙΟ 2^ο ΓΕΝΙΚΑ ΥΛΙΚΑ ΚΑΙ ΜΕΘΟΔΟΙ | 34 |
| ΚΕΦΑΛΑΙΟ 3^ο «Η κατανομή του θείου στη συγκέντρωση ΓΚΣ σε διάφορα φυτικά όργανα ειδών της οικογένειας των Σταυρανθών» | 54 |
| Περίληψη | 54 |
| Εισαγωγή | 56 |
| Υλικά και Μέθοδοι | 58 |
| Αποτελέσματα-Συζήτηση | 60 |
| Συμπεράσματα | 66 |
| Βιβλιογραφία | 67 |
| Πίνακες και Διαγράμματα | 73 |
| ΚΕΦΑΛΑΙΟ 4^ο «Η επίδραση της αζωτούχου λίπανσης στην παραγωγή βιομάζας και στη συγκέντρωση γλυκοσινολικών οξέων» | 80 |
| Περίληψη | 80 |
| Εισαγωγή | 81 |
| Υλικά και Μέθοδοι | 83 |
| Αποτελέσματα-Συζήτηση | 86 |
| Συμπεράσματα | 94 |
| Βιβλιογραφία | 95 |
| Πίνακες και Διαγράμματα | 100 |
| ΚΕΦΑΛΑΙΟ 5^ο «Επίδραση της συνδυασμένης λίπανσης αζώτου και θείου στην παραγωγή και την σύσταση ΓΚΣ σε βρώσιμα και μη βρώσιμα μέρη μπρόκολου και ρόκας» | 112 |
| Περίληψη | 112 |
| Εισαγωγή | 113 |
| Υλικά και Μέθοδοι | 115 |
| Αποτελέσματα-Συζήτηση | 117 |
| Συμπεράσματα | 126 |
| Βιβλιογραφία | 127 |
| Πίνακες και Διαγράμματα | 132 |
| ΚΕΦΑΛΑΙΟ 6^ο «Επίδραση της ενσωμάτωσης υπολειμμάτων μπρόκολου στην εδαφική μικροβιακή κοινότητα και δραστηριότητα και σύγκριση με μεθόδους χημικής απολύμανσης των εδαφών» | 148 |
| Περίληψη | 148 |
| Εισαγωγή | 149 |

| | |
|--|-----|
| Υλικά και Μέθοδοι | 152 |
| Αποτελέσματα-Συζήτηση | 155 |
| Συμπεράσματα | 162 |
| Βιβλιογραφία | 163 |
| Πίνακες και Διαγράμματα | 166 |
| ΚΕΦΑΛΑΙΟ 7^ο «Επίδραση της εδαφικής ενσωμάτωσης υπολειμμάτων καλλιέργειας μπρόκολου στη σύσταση της μικροβιακής κοινότητας των ασκομυκήτων και νιτροποιητικών βακτηρίων Α΄ σταδίου σε σύγκριση με την επίδραση χημικών μεθόδων απολύμανσης» | 175 |
| Περίληψη | 175 |
| Εισαγωγή | 176 |
| Υλικά και Μέθοδοι | 179 |
| Αποτελέσματα-Συζήτηση | 183 |
| Συμπεράσματα | 187 |
| Βιβλιογραφία | 188 |
| Πίνακες και Διαγράμματα | 193 |
| ΚΕΦΑΛΑΙΟ 8^ο «Διάσπαση των γλυκοσινολικών οξέων στο έδαφος» | 200 |
| Περίληψη | 200 |
| Εισαγωγή | 201 |
| Υλικά και Μέθοδοι | 203 |
| Αποτελέσματα-Συζήτηση | 206 |
| Συμπεράσματα | 211 |
| Βιβλιογραφία | 212 |
| Πίνακες και Διαγράμματα | 214 |
| ΓΕΝΙΚΑ ΣΥΜΠΕΡΑΣΜΑΤΑ | 223 |

Συντομογραφίες

| | |
|-------------------------------------|--|
| HPLC | Υγρή Χρωματογραφία Υψηλής Απόδοσης |
| UV | Υπεριώδης ακτινοβολία |
| DAD | Ανιχνευτής Φωτοδιόδων |
| GC | Αέριος Χρωματογραφία |
| MS | Φασματογράφος Μάζας |
| FID | Ανιχνευτής Ιονισμού Φλόγας |
| ΓΚΣ | Γλυκοσινολικά οξέα |
| ΙΣΘ | Ισοθειοκυανιούχες ενώσεις |
| GRA | Γλουκοραφανίνη |
| SIN | Σινιγκρίνη |
| GTL | Γλουκοτροπαεολίνη |
| GNA | Γλουκοναπίνη |
| GST | Γλουκοναστουρτίνη |
| GIB | Γλουιβερίνη |
| 4-OH-GBS | 4-υδροξύ-Γλουκομπρασσικήνη |
| 4-MeO-GBS | 4-μεθόξυ-Γλουκομπρασσικήνη |
| Neo GBS | Νεο Γλουκομπρασσικήνη |
| GER | Γλουκοερουσίνη |
| GSV | Γλουκοσατιβίνη |
| PRO | Προγκοϊτρίνη |
| DGGE | Ηλεκτροφόρηση με βαθμίδωση αποδιατακτικών ουσιών |
| PCR | Αλυσιδωτή Αντίδραση Πολυμεράσης |
| MeOH | Μεθανόλη |
| ACN | Ακετονιτρίλιο |
| EtOH | Αιθανόλη |
| CH₃Cl₃ | Χλωροφόρμιο |
| FDA | Fluorescein sodium salt |
| FAME | Μεθυλεστέρες Λιπαρών Οξέων |
| BAME | Μεθυλεστέρες Λιπαρών Οξέων Βακτηρίων |
| SPE | Solid Phase Extraction, |
| αCO₂ | μεταβολικό πηλίκιο εδάφους |
| PITC | φαινυλαίθυλ-ισοθειοκυάνιο |

Κατάλογος Πινάκων και Διαγραμμάτων

Πίνακας 3.1 Περιεκτικότητα βρώσιμων τμημάτων διαφόρων ποικιλιών Σταυρανθών σε μεμονωμένα ΓΚΣ ($\mu\text{mol/g dw}$). **Σελ. 73**

Πίνακας 3.2 Περιεκτικότητα των φύλλων διαφόρων ποικιλιών Σταυρανθών σε μεμονωμένα ΓΚΣ ($\mu\text{mol/g dw}$). **Σελ.74**

Πίνακας 3.3 Περιεκτικότητα των ριζών διαφόρων ποικιλιών Σταυρανθών σε μεμονωμένα ΓΚΣ ($\mu\text{mol/g dw}$). **Σελ. 75**

Πίνακας 4.1 Παραγωγή βιομάζας σε ξηρό βάρος και η συγκέντρωση νιτρικού αζώτου στους μίσχους φύλλων μπρόκολου και ρόκας σε διαφορετικά στάδια ανάπτυξης. **Σελ. 100**

Πίνακας 4.2. Εκτίμηση παραμέτρων, τα όρια εμπιστοσύνης, ο συντελεστής προσδιορισμού και η εκτίμηση των κρίσιμων επιπέδων συγκέντρωσης N-NO_3 (mg/g ξ.β) σε μίσχους μπρόκολου και ρόκας, όπως υπολογίστηκαν από την μη-γραμμική εξίσωση του Mitscherlich. **Σελ. 101**

Πίνακας 4.3 Συσχέτιση των εκτιμώμενων παραμέτρων της μη γραμμικής εξίσωσης του Mitscherlich για τον υπολογισμό των κρίσιμων επιπέδων συγκέντρωσης όπως υπολογίστηκαν από τα πειραματικά δεδομένα. **Σελ. 102**

Πίνακας 4.4 Συγκέντρωση μεμονωμένων ΓΚΣ ($\mu\text{mol/g}$ ξ.β) σε φύλλα ρόκας, αναπτυγμένης σε διαφορετικές δόσεις αζωτούχου λίπανσης που λήφθηκαν σε διαφορετικό στάδιο ανάπτυξης. **Σελ. 110**

Πίνακας 4.5 Συγκέντρωση μεμονωμένων ΓΚΣ ($\mu\text{mol/g}$ ξ.β) σε φύλλα μπρόκολου, αναπτυγμένου σε διαφορετικές δόσεις αζωτούχου λίπανσης που λήφθηκαν σε διαφορετικό στάδιο ανάπτυξης. **Σελ. 111**

Πίνακας 5.1 Επίδραση της αζωτούχου και θειούχου λίπανσης (kg/ha) στη συγκέντρωση N και S ($\mu\text{mol/g dw}$), στη συγκέντρωση των μεμονωμένων ΓΚΣ, της ολικής συγκέντρωσης των ΓΚΣ, των ολικών Αλειφατικών και Ινδολικών ΓΚΣ ($\mu\text{mol/g dw}$) στις ανθοκεφαλές μπρόκολου. **Σελ. 141**

Πίνακας 5.2 Επίδραση της αζωτούχου και θειούχου λίπανσης (kg/ha) στη συγκέντρωση N και S ($\mu\text{mol/g dw}$), στη συγκέντρωση των μεμονωμένων ΓΚΣ, της ολικής συγκέντρωσης των ΓΚΣ, των ολικών Αλειφατικών και Ινδολικών ΓΚΣ ($\mu\text{mol/g dw}$) στα φύλλα μπρόκολου. **Σελ. 142**

Πίνακας 5.3 Επίδραση της αζωτούχου και θειούχου λίπανσης (kg/ha) στη συγκέντρωση N και S ($\mu\text{mol/g dw}$), στη συγκέντρωση των μεμονωμένων ΓΚΣ, της ολικής συγκέντρωσης των ΓΚΣ, των ολικών Αλειφατικών, και Ινδολικών ΓΚΣ ($\mu\text{mol/g dw}$) στις ρίζες μπρόκολου. **Σελ. 143**

Πίνακας 5.4 Επίδραση της αζωτούχου και θειούχου λίπανσης (kg/ha) στη συγκέντρωση N και S ($\mu\text{mol/g dw}$), στη συγκέντρωση των μεμονωμένων ΓΚΣ, της ολικής συγκέντρωσης των ΓΚΣ, των ολικών Αλειφατικών και Ινδολικών ΓΚΣ ($\mu\text{mol/g dw}$) σε φύλλα ρόκας. **Σελ. 144**

Πίνακας 5.5 Επίδραση της αζωτούχου και θειούχου λίπανσης (kg/ha) στη συγκέντρωση N και S ($\mu\text{mol/g dw}$), στη συγκέντρωση των μεμονωμένων ΓΚΣ, της ολικής συγκέντρωσης των ΓΚΣ, των ολικών Αλειφατικών και Αρωματικών ΓΚΣ ($\mu\text{mol/g dw}$) σε ρίζες ρόκας. **Σελ. 145**

Πίνακας 5.6 Μονομεταβλητή ανάλυση διακύμανσης (Univariate analysis of Variance) των μεμονωμένων ΓΚΣ που ανιχνεύθηκαν σε ανθοκεφαλές, φύλλα και ρίζες μπρόκολου στους παράγοντες N, S και της αλληλεπίδρασης τους. **Σελ. 147**

Πίνακας 5.7 Μονομεταβλητή ανάλυση διακύμανσης (Univariate analysis of Variance) των μεμονωμένων ΓΚΣ που ανιχνεύθηκαν σε φύλλα και ρίζες ρόκας στους παράγοντες N, S και της αλληλεπίδρασης τους. **Σελ. 147**

Πίνακας 6.1 Μικροβιακή αναπνοή του εδάφους (C-CO₂ mg/kg εδάφους/ημέρα), μετά την εφαρμογή μεθόδων απολύμανσης, σε διάφορους χρόνους δειγματοληψίας. **Σελ. 166**

Πίνακας 6.2 Κατάταξη διαφόρων μικροοργανισμών σε σχέση με τη σύσταση της μεμβράνης τους σε διάφορα λιπαρά οξέα των φωσφολιπιδίων. **Σελ. 166**

Πίνακας 7.1 Ομολογία των αλληλουχιών των κλώνων που επιλέχθηκαν για το χαρακτηρισμό της σύστασης της κοινότητας των ΑΣΚ σε έδαφος όπου εφαρμόστηκαν οι διάφορες μεταχειρίσεις. **Σελ. 198**

Πίνακας 8.1. Η συγκέντρωση GRA και GER (nmol/g ξ.β εδάφους) σε διάφορους χρόνους δειγματοληψίας μετά την προσθήκη στο έδαφος συγκέντρωσης καθαρών μορφών των μορίων αυτών 162nmol και 166nmol/g ξ.β εδάφους αντίστοιχα, σε δυο διαφορετικά επίπεδα υγρασίας (90 και 20% της υδατοϊκανότητας του εδάφους). **Σελ. 214**

Πίνακας 8.2. Παράμετροι που υπολογίστηκαν από τα πειραματικά δεδομένα σύμφωνα με το μοντέλο διάσπασης πρώτης τάξης (Εξίσωση 1) και η εκτίμηση της ημιπεριόδου ζωής των ΓΚΣ στο έδαφος σε ώρες. **Σελ. 215**

Πίνακας 8.3. Η συγκέντρωση ΓΚΣ που περιέχονται στα φύλλα το μπρόκολου (nmol/g ξ.β εδάφους) σε διάφορους χρόνους δειγματοληψίας μετά την προσθήκη στο έδαφος 22 g φρέσκων φύλλων μπρόκολου /g ξ.β εδάφους αντίστοιχα, σε δυο διαφορετικά επίπεδα υγρασίας (90 και 20% της υδατοϊκανότητας του εδάφους). **Σελ. 216**

Διάγραμμα 3.1 Μέση τιμή βάρους ($n=10$) σε g ξηρής ουσίας σε βρώσιμα τμήματα (A), υπέργειο τμήμα (φύλλα και βλαστό)(B) και ρίζα (C) των διαφόρων ποικιλιών που εξετάστηκαν. Διαφορετικά γράμματα υποδηλώνουν στατιστικά σημαντικές διαφορές μεταξύ των μέσων μετά από την εφαρμογή του κριτηρίου Tukey HSD σε επίπεδο σημαντικότητας $\alpha=0.05$. Η διακύμανση στα ιστογράμματα αφορά το τυπικό σφάλμα των μέσων όρων. **Σελ. 76**

Διάγραμμα 3.2 Περιεκτικότητα διαφόρων ποικιλιών Σταυρανθών σε N (%) και S (%) στα βρώσιμα τμήματα (A), στα φύλλα (B) και στις ρίζες (C). Διαφορετικά γράμματα υποδηλώνουν στατιστικά σημαντικές διαφορές μεταξύ των μέσων όρων ($n=4$) μετά από την εφαρμογή του κριτηρίου Tukey HSD σε επίπεδο σημαντικότητας $\alpha=0,05$. Οι δείκτες διακύμανσης στις ράβδους των ιστογραμμάτων εκφράζουν τα τυπικά σφάλματα των μέσων όρων. **Σελ. 77**

Διάγραμμα 3.3 Δενδρόγραμμα ομαδοποίησης των διαφόρων ποικιλιών Σταυρανθών ανάλογα με τον τύπο και τη συγκέντρωση των ΓΚΣ σύμφωνα με τη μέθοδο Single Linkage. Ως μέτρο απόστασης των ομάδων χρησιμοποιήθηκε η Ευκλείδεια απόσταση. **Σελ. 78**

Διάγραμμα 3.4 Κατανομή και ενσωμάτωση του S σε ΓΚΣ ως ποσοστό (w/w) επί του ολικού θείου που βρέθηκε στα βρώσιμα τμήματα (A), στα φύλλα (B) και τις ρίζες (C) των ποικιλιών Σταυρανθών που μελετήθηκαν. Διαφορετικά γράμματα υποδηλώνουν στατιστικά σημαντικές διαφορές μεταξύ των μετατρεπόμενων σε τόξο συνημίτονο μέσω τιμών ($n=4$) μετά από την εφαρμογή του κριτηρίου Tukey HSD σε επίπεδο σημαντικότητας $\alpha=0,05$. **Σελ. 79**

Διάγραμμα 4.1 Περιεκτικότητα σε ολικό N (% w/w) των νεαρότερων πλήρως ανεπτυγμένων φύλλων μπρόκολου σε διάφορα στάδια ανάπτυξης σε διαφορετικές ποσότητες χορηγημένου αζώτου. Οι διακυμάνσεις στα ιστογράμματα αφορούν το τυπικό σφάλμα του μέσου όρου ($n=4$). **Σελ. 103**

Διάγραμμα 4.2 Περιεκτικότητα σε ολικό N (% w/w) των νεαρότερων πλήρως ανεπτυγμένων φύλλων ρόκας σε διάφορα στάδια ανάπτυξης σε διαφορετικές ποσότητες χορηγημένου αζώτου. Οι διακυμάνσεις στα ιστογράμματα αφορούν το τυπικό σφάλμα του μέσου όρου ($n=4$). **Σελ. 104**

Διάγραμμα 4.3 Σχέση μεταξύ συγκέντρωσης των $N-NO_3^-$ και σχετικής παραγωγής ξηρού βάρους (Y/Y_{max}) στη ρόκα και το μπρόκολο. **Σελ. 105**

Διάγραμμα 4.4 Μεταβολή της συγκέντρωσης των ολικών ΓΚΣ σε σχέση με τη παραγόμενη βιομάζα σε φυτά ρόκας στα διάφορα στάδια. Οι διακυμάνσεις αφορούν το τυπικό σφάλμα του μέσου όρου ($n=4$). **Σελ. 106**

Διάγραμμα 4.5 Μεταβολή της συγκέντρωσης των ολικών ΓΚΣ σε σχέση με τη παραγόμενη βιομάζα σε φυτά μπρόκολου στα διάφορα στάδια. Οι διακυμάνσεις αφορούν το τυπικό σφάλμα του μέσου όρου ($n=4$). **Σελ. 107**

Διάγραμμα 4.6 Μεταβολή της περιεκτικότητας σε S(% w/w) και σε $S-SO_4^{2-}$ (mg / g dw) στο έλασμα και στους μίσχους των νεαρότερων πλήρως ανεπτυγμένων φύλλων ρόκας αντίστοιχα σε διαφορετικά επίπεδα χορηγημένου αζώτου σε τρία διαφορετικά στάδια ανάπτυξης. **Σελ. 108**

Διάγραμμα 4.7 Μεταβολή της περιεκτικότητας σε S(% w/w) και σε $S-SO_4^{2-}$ (mg / g dw) στο έλασμα και στους μίσχους των νεαρότερων πλήρως ανεπτυγμένων φύλλων μπρόκολου αντίστοιχα σε διαφορετικά επίπεδα χορηγημένου αζώτου σε τρία διαφορετικά στάδια ανάπτυξης. **Σελ. 108**

Διάγραμμα 5.1 Παραγωγή ξηράς ουσίας σε ανθοκεφαλές (A), φύλλα (B) και ρίζες (C) μπρόκολου σε σχέση με την αζωτούχο και θειούχο λίπανση. Οι διακυμάνσεις στα ιστογράμματα αφορούν το τυπικό σφάλμα των μέσων τιμών κάθε μεταχείρισης ($n=4$). **Σελ. 132**

Διάγραμμα 5.2 Παραγωγή ξηράς ουσίας σε φύλλα (A) και ρίζες (B) ρόκας σε σχέση με την αζωτούχο και θειούχο λίπανση. Οι διακυμάνσεις στα ιστογράμματα αφορούν το τυπικό σφάλμα των μέσων τιμών κάθε μεταχείρισης ($n=4$). **Σελ. 133**

Διάγραμμα 5.3 Συσχέτιση μεταξύ πρόσληψης αζώτου και θείου (mmol/plant) στο μπρόκολο (A) και στη ρόκα (B) στις διάφορες δόσεις αζωτούχου και θειούχου λίπανσης. Κάθε τιμή αντιπροσωπεύει το μέσο όρο των τεσσάρων επαναλήψεων της κάθε μεταχείρισης. **Σελ. 134**

Διάγραμμα 5.4 Συγκέντρωση θείου στη μορφή θειϊκών ιόντων ($\mu\text{mol/g dw}$) σε μίσχους των νεαρότερων πλήρως ανεπτυγμένων φύλλων μπρόκολου (Α) και ρόκας (Β). Οι διακυμάνσεις στα ιστογράμματα αφορούν το τυπικό σφάλμα των μέσων τιμών κάθε μεταχείρισης ($n=4$). **Σελ. 135**

Διάγραμμα 5.5 Ο λόγος αλειφατικών προς ινδολικά και αρωματικά ΓΚΣ στις ανθοκεφαλές (Α), στα φύλλα (Β) και στις ρίζες (Γ) μπρόκολου στα διάφορα επίπεδα αζωτούχου και θειούχου λίπανσης. **Σελ. 136**

Διάγραμμα 5.6 Ο λόγος αλειφατικών προς ινδολικά και αρωματικά ΓΚΣ στα φύλλα (Α) και στις ρίζες (Β) ρόκας στα διάφορα επίπεδα αζωτούχου και θειούχου λίπανσης. **Σελ. 137**

Διάγραμμα 5.7 Η ποσότητα θείου που ενσωματώνεται στους διάφορους τύπους ΓΚΣ στις ανθοκεφαλές, τα φύλλα και τις ρίζες φυτών μπρόκολου, ως ποσοστό επί της % της συνολικής συγκέντρωσης θείου στα διάφορα όργανα, σε διάφορα επίπεδα αζωτούχου και θειούχου λίπανσης. **Σελ. 139**

Διάγραμμα 5.8 Η ποσότητα θείου που ενσωματώνεται στους διάφορους τύπους ΓΚΣ στα φύλλα και τις ρίζες φυτών ρόκας, ως ποσοστό επί της % της συνολικής συγκέντρωσης θείου στα διάφορα όργανα, σε διάφορα επίπεδα αζωτούχου και θειούχου λίπανσης. **Σελ. 140**

Διάγραμμα 6.1 Η πορεία υδρόλυσης του FDA σε mg/kg εδάφους/h στην πορεία του χρόνου, σε εδάφη που δέχτηκαν υποκαπνισμό και φυτικά υπολείμματα μπρόκολου με ή χωρίς μυροσινάση. Η διακύμανση στα ιστογράμματα αφορά το τυπικό σφάλμα των μέσων όρων ($n=4$). **Σελ. 167**

Διάγραμμα 6.2 Κατανομή των δειγμάτων εδάφους ως προς την σύσταση τους σε μικροβιακά PLFAs όταν σαν παράγοντας απεικόνισης χρησιμοποιήθηκαν οι μεταχειρίσεις. Η ανάλυση έγινε με την μέθοδο των Κυρίων Συνιστωσών (PCA) και οι δύο άξονες περιγράφουν το 57.67 και 11.14% της συνολικής παραλλακτικότητας. **Σελ. 168**

Διάγραμμα 6.3 Κατανομή των δειγμάτων εδάφους ως προς την σύσταση τους σε μικροβιακά PLFAs όταν σαν παράγοντας απεικόνισης χρησιμοποιήθηκε ο χρόνος δειγματοληψίας. Η ανάλυση έγινε με την μέθοδο των Κυρίων Συνιστωσών (PCA) και οι δύο άξονες περιγράφουν το 57.67 και 11.14% της συνολικής παραλλακτικότητας. **Σελ. 169**

Διάγραμμα 6.4 Συγκέντρωση των PLFAs των πρωτόζωων στο έδαφος στους διάφορους χρόνους δειγματοληψίας (7, 15 και 60 ημέρες μετά την εφαρμογή) και στις διάφορες μεταχειρίσεις. Η διακύμανση στο ιστογράμματα αφορά την τυπικό σφάλμα του μέσου όρου. Διαφορετικά γράμματα υποδηλώνουν στατιστικά σημαντικές διαφορές μεταξύ των μέσων σε επίπεδο $p=0.05$, σύμφωνα με το κριτήριο Tukey (HSD). **Σελ. 170**

Διάγραμμα 6.5 Συγκέντρωση των PLFAs των κατά Gram (-) βακτηρίων στο έδαφος στους διάφορους χρόνους δειγματοληψίας (7, 15 και 60 ημέρες μετά την εφαρμογή) και στις διάφορες μεταχειρίσεις. Η διακύμανση στο ιστογράμματα αφορά την τυπικό σφάλμα του μέσου όρου. Διαφορετικά γράμματα υποδηλώνουν στατιστικά σημαντικές διαφορές μεταξύ των μέσων σε επίπεδο $p=0.05$, σύμφωνα με το κριτήριο Tukey (HSD). **Σελ. 171**

Διάγραμμα 6.6 Συγκέντρωση των PLFAs των κατά Gram (+) βακτηρίων στο έδαφος στους διάφορους χρόνους δειγματοληψίας (7, 15 και 60 ημέρες μετά την εφαρμογή) και στις διάφορες μεταχειρίσεις. Η διακύμανση στο ιστόγραμμα αφορά την τυπικό σφάλμα του μέσου όρου. Διαφορετικά γράμματα υποδηλώνουν στατιστικά σημαντικές διαφορές μεταξύ των μέσων σε επίπεδο $p=0.05$, σύμφωνα με το κριτήριο Tukey (HSD). **Σελ. 172**

Διάγραμμα 6.7 Συγκέντρωση των PLFAs των μυκήτων στο έδαφος στους διάφορους χρόνους δειγματοληψίας (7, 15 και 60 ημέρες μετά την εφαρμογή) και στις διάφορες μεταχειρίσεις. Η διακύμανση στο ιστόγραμμα αφορά την τυπικό σφάλμα του μέσου όρου. Διαφορετικά γράμματα υποδηλώνουν στατιστικά σημαντικές διαφορές μεταξύ των μέσων σε επίπεδο $p=0.05$, σύμφωνα με το κριτήριο Tukey (HSD). **Σελ. 173**

Διάγραμμα 6.8 Λόγος της συγκέντρωσης των PLFAs Μυκήτων προς βακτήρια στο έδαφος στους διάφορους χρόνους δειγματοληψίας (7, 15 και 60 ημέρες μετά την εφαρμογή) και στις διάφορες μεταχειρίσεις. Η διακύμανση στο ιστόγραμμα αφορά την τυπικό σφάλμα του μέσου όρου. Διαφορετικά γράμματα υποδηλώνουν στατιστικά σημαντικές διαφορές μεταξύ των μέσων σε επίπεδο $p=0.05$, σύμφωνα με το κριτήριο Tukey (HSD). **Σελ. 174**

Διάγραμμα 7.1 Εικόνα πηκτής ακρυλαμιδίου με βαθμίθωση αποδιατακτικών ουσιών (DGGE) όπου ηλεκτροφορήθηκαν τα προϊόντα PCR που ενίσχυσαν μερικώς την ITS περιοχή της κοινότητας των ΑΣΚ στο έδαφος στις διάφορες μεταχειρίσεις και σε διάφορους χρόνους δειγματοληψίας. Διαδρομές στη πηκτική όπου αναφέρεται το γράμμα L αντιστοιχούν σε ITS-PCR προϊόντα γνωστών μυκήτων οι οποίοι εμφανίζονται από πάνω προς τα κάτω: *Pleurotus djamor*, *Fusarium oxysporum* f.sp. *radici-lycopersici*, *F. solani*, *P. eryngii*, *P. ostreatus*, *P. cystidiosus*. Οι ζώνες DNA που σημειώνονται με τα βέλη, αφορούν τα δείγματα που χρησιμοποιήθηκαν για τη δημιουργία της γονιδιωματικής βιβλιοθήκης. **Σελ. 193**

Διάγραμμα 7.2 Ανάλυση Κυρίων Συντεταγμένων (Μέση τιμή Ομάδας,) των ζωνών DNA της πηκτής ακρυλαμιδίου όπου εφαρμόστηκε η μέθοδος DGGE για την αξιολογήση της επίδρασης των διαφόρων μεταχειρίσεων στη σύσταση της μικροβιακής κοινότητας των ασκομυκήτων. Κάθε τιμή αφορά το μέσο όρο 3 επαναλήψεων και τα διακύμανση στα σημεία αφορούν τη τυπική απόκλιση του μέσου των δύο συντεταγμένων (Coordinates). **Σελ. 195**

Διάγραμμα 7.3 Εικόνα πηκτής ακρυλαμιδίου με βαθμίθωση αποδιατακτικών ουσιών (DGGE) όπου ηλεκτροφορήθηκαν τα προϊόντα PCR που ενίσχυσαν μερικώς την 16sRNA περιοχή της κοινότητας των NBA στο έδαφος στις διάφορες μεταχειρίσεις και σε διάφορους χρόνους δειγματοληψίας. Διαδρομές στη πηκτική όπου αναφέρεται το γράμμα L αντιστοιχούν σε ITS-PCR προϊόντα γνωστών μυκήτων οι οποίοι εμφανίζονται από πάνω προς τα κάτω: *Deinococcus radiodurans*, *Flavobacterium* sp. *Pseudomonas entomophila*, *Rhizobium* sp., *Mesorhizobium loti*, *Agrobacterium* sp. Οι ζώνες DNA που σημειώνονται με τα βέλη, αφορούν τα δείγματα που χρησιμοποιήθηκαν για τη δημιουργία της γονιδιωματικής βιβλιοθήκης. **Σελ. 194**

Διάγραμμα 7.4 Ανάλυση Κυρίων Συντεταγμένων (Μέση τιμή Ομάδας,) των ζωνών DNA της πηκτής ακρυλαμιδίου όπου εφαρμόστηκε η μέθοδος DGGE για την αξιολογήση της επίδρασης των διαφόρων μεταχειρίσεων στη σύσταση της μικροβιακής κοινότητας των Νιτροποιητικών Βακτηρίων Α΄ Σταδίου. Κάθε τιμή αφορά το μέσο όρο 3 επαναλήψεων και τα διακύμανση στα σημεία αφορούν τη τυπική απόκλιση του μέσου των δυο συντεταγμένων (Coordinates). **Σελ. 196**

Διάγραμμα 7.5 Φυλογενετικό δένδρο αλληλουχιών του γονιδιακού 16sRNA των β-πρωτεοβακτηρίων που σχετίζονται με Νιτροποιητικά Βακτήρια Α΄ Σταδίου. Οι εξελικτικές αποστάσεις υπολογίστηκαν με τη μέθοδο Jukes and Cantor (1969) και η τοπολογία τους με τη μέθοδο “neighbor-joining” (Saitou and Nei 1987). Οι τιμές στα σημεία τομής των αποστάσεων αφορούν τιμές bootstrap>50% (1000 ψευδο-αναδειγματοληψίες) **Σελ. 197**

Διάγραμμα 8.1 Ενζυμική δράση μυροσινάσης (mg/kg εδάφους/h) στο έδαφος σε σχέση με το χρόνο και σε δυο επίπεδα υγρασίας όταν προστέθηκαν στο έδαφος καθαρές μορφές GRA και GER. Η διακύμανση των σημείων αφορά το τυπικό σφάλμα του μέσου όρου των τριών επαναλήψεων. **Σελ. 217**

Διάγραμμα 8.2 Συσχέτιση μεταξύ ενζυμικής δράσης μυροσινάσης και μικροβιακής αναπνοής στο έδαφος Α) υγρασία στο έδαφος ίση με το 20% της υδατοικανότητας και Β) υγρασία στο έδαφος ίση με το 90% της υδατοικανότητας όταν στο έδαφος εφαρμόστηκαν καθαρές μορφές GRA και GER. Οι διακεκομμένες καμπύλες γραμμές αφορούν τα όρια εμπιστοσύνης της καμπύλης παλινδρόμησης μεταξύ ενζυμικής δράσης μυροσινάσης και μικροβιακής αναπνοής. **Σελ. 218**

Διάγραμμα 8.3 Ενζυμική δράση μυροσινάσης (mg γλυκόζης/kg εδάφους/h) στο έδαφος σε σχέση με το χρόνο σε δυο επίπεδα υγρασίας όταν προστέθηκαν στο έδαφος φύλλα μπρόκολου. Η διακύμανση των σημείων αφορά το τυπικό σφάλμα του μέσου όρου των τριών επαναλήψεων. **Σελ. 219**

Διάγραμμα 8.4 Μικροβιακή αναπνοή (mg CO₂-C/kg εδάφους/ημέρα) στο έδαφος σε σχέση με το χρόνο και σε δυο επίπεδα υγρασίας όταν προστέθηκαν στο έδαφος φύλλα μπρόκολου. Η διακύμανση των σημείων αφορά το τυπικό σφάλμα του μέσου όρου των τριών επαναλήψεων. **Σελ. 220**

Διάγραμμα 8.5 Συσχέτιση μεταξύ ενζυμικής δράσης μυροσινάσης και μικροβιακής αναπνοής στο έδαφος Α) υγρασία στο έδαφος ίση με το 20% της υδατοικανότητας και Β) υγρασία στο έδαφος ίση με το 90% της υδατοικανότητας όταν στο έδαφος εφαρμόστηκαν καθαρές μορφές GRA και GER. Οι διακεκομμένες καμπύλες γραμμές αφορούν τα όρια εμπιστοσύνης της καμπύλης παλινδρόμησης μεταξύ ενζυμικής δράσης μυροσινάσης και μικροβιακής αναπνοής. **Σελ. 221**

Διάγραμμα 8.6 Μεταβολικό πηλίκιο του εδάφους (qCO₂) στο έδαφος σε σχέση με το χρόνο και σε δυο επίπεδα υγρασίας όταν προστέθηκαν στο έδαφος φύλλα μπρόκολου και καθαρές μορφές ΓΚΣ. Η διακύμανση των σημείων αφορά το τυπικό σφάλμα του μέσου όρου των τριών επαναλήψεων. **Σελ. 222**

ΚΕΦΑΛΑΙΟ 1^ο

ΕΙΣΑΓΩΓΗ

Περιγραφή, Δομή των ΓΚΣ και ο ρόλος τους στα φυτά

Οι πρώτες παρατηρήσεις σε ότι αφορά τις ιδιότητες των γλυκοσινολικών οξέων και των προϊόντων διάσπασής τους έγιναν προς το τέλος του 17^{ου} αιώνα στην προσπάθεια των ανθρώπων να εξηγήσουν που οφείλεται η έντονη πικρή γεύση των σπόρων του σινιπιού. Η πρώτη γενική, αλλά λανθασμένη δομή των γλυκοσινολικών οξέων προτάθηκε από τον (Gadamer, 1897) προς το τέλος του 19^{ου} αιώνα, ο οποίος κατέληξε ότι η πλευρική αλυσίδα του μορίου συνδεόταν στο άτομο αζώτου της θειοκυανιούχου ομάδας αντί στο άτομο του άνθρακα. Η δομή αυτή ήταν αποδεκτή μέχρι που οι (Ettlinger and Lundeen, 1956) κατέδειξαν τις αδυναμίες της, όσον αφορά την εξήγηση συγκεκριμένων ιδιοτήτων των μορίων αυτών, και πρότειναν τη σημερινή αποδεκτή πλέον δομή, όπου η πλευρική αλυσίδα συνδέεται με τον άνθρακα της θειοκυανιούχου ομάδας. Οι ίδιοι επιστήμονες ήταν οι πρώτοι που σύνθεσαν χημικά γλυκοσινολικά μόρια το 1957. Το τελευταίο ερώτημα σχετικά με τη δομή των μορίων ήταν ο γεωμετρικός ισομερισμός που αφορούσε το διπλό δεσμό του άνθρακα με το άζωτο που απαντήθηκε με την εφαρμογή κρυσταλλογραφίας ακτίνων Χ σε σινιγρίνη (Marsh and Waser, 1970). Μέχρι σήμερα έχουν ταυτοποιηθεί περισσότερα από 120 διαφορετικά γλυκοσινολικά οξέα σε διάφορα είδη φυτών (Fahey et al., 2001).

Τα γλυκοσινολικά οξέα είναι (Z)-(ή cis)-N-υδροξυμινοθειικοί εστέρες με μια πλευρική αλυσίδα (R) και ένα τμήμα β-D-γλυκοπυρανόζης που συνδέεται στο μόριο με ένα άτομο θείου (Εικόνα 1). Εξαιτίας της χαμηλής τιμής του pKa της όξινης σουλφονικής ομάδας που περιέχεται στο μόριο, τα γλυκοσινολικά οξέα στη φύση βρίσκονται σε ανιονική μορφή. Επιπλέον η παρουσία της γλυκόζης στη δομή του μορίου προσδίδει στα μόρια υδρόφιλες ιδιότητες ενώ χαρακτηρίζονται ως μη πτητικά (Prestera et al., 1996). Η πολικότητα και η πτητικότητα των διαφόρων γλυκοσινολικών οξέων εξαρτάται από τον τύπο της πλευρικής αλυσίδας και συγκεκριμένα από το μήκος της, την παρουσία αρωματικού δακτύλιου και άλλων ετεροκυκλικών δομών άνθρακα (Nastruzzi et al., 1996).

Τα γλυκοσινολικά οξέα διακρίνονται σε τρεις διαφορετικές κατηγορίες ανάλογα με την πλευρική αλυσίδα του κάθε μορίου. Συγκεκριμένα διακρίνονται στα αλειφατικά, τα αρωματικά και τα ινδολικά. Στα αρωματικά γλυκοσινολικά η πλευρική αλυσίδα αποτελείται από αρωματικό δακτύλιο, στα ινδολικά γλυκοσινολικά η πλευρική αλυσίδα αποτελείται από ινδολικό δακτύλιο ενώ τα αλειφατικά αποτελούνται από μια αλειφατική πλευρική αλυσίδα (Εικόνα 1).

Η πλευρική αλυσίδα των γλυκοσινολικών οξέων παρουσιάζει μεγάλη ποικιλότητα σε ότι αφορά τη δομή της. Τα περισσότερα γλυκοσινολικά οξέα ανήκουν στην κατηγορία των αλειφατικών όπου η πλευρική αλυσίδα αποτελείται από διακλαδισμένες ή όχι αλυσίδες ατόμων άνθρακα. Πολλά από τα μόρια που ανήκουν σε αυτή την κατηγορία περιέχουν διπλούς δεσμούς,

υδροξυλικές ή καρβονυλικές ομάδες και θείο σε διαφορετικό βαθμό οξειδωσης. Το ένα τρίτο των ΓΚΣ περιέχουν στην πλευρική τους αλυσίδα θείο (θειοαλκυλ γλυκοσιδικό εστέρες) και ο βαθμός οξειδωσής του προσδίδει στα μόρια αυτά συγκεκριμένες ιδιότητες. Τα θειοαλειφατικά γλυκοσινολικά οξέα περιέχουν στο μόριό τους τρία άτομα θείου αντί δυο που περιέχονται στις υπόλοιπες κατηγορίες γλυκοσινολικών οξέων.

Τα προϊόντα υδρόλυσης των διάφορων τύπων γλυκοσινολικών οξέων παρουσιάζουν τοξικότητα σε παθογόνους και μη οργανισμούς στο έδαφος όπως νηματώδεις, μύκητες και βακτήρια ενώ από την άλλη πλευρά παρουσιάζουν αντικαρκινική δράση (Manici et al., 1997; Mithen et al., 2000; Talalay and Fahey, 2001; Talalay et al., 2003).

Εξαιτίας της παραγωγής των τοξικών ΙΣΘ κατά την υδρόλυση τους, τα ΓΚΣ είναι σημαντικά μόρια των φυτών που καθορίζουν τη σχέση τους με διάφορα έντομα. Συγκεκριμένα έχει προταθεί ότι τα προϊόντα υδρόλυσης τους δρουν ως εντομοαπωθητικά (Noret et al., 2005; Siemens and MitchellOlds, 1996), ενώ μειώνουν σημαντικά την επιβίωση και ανάπτυξη εντόμων που προσβάλλουν τα Σταυρανθή (Agrawal and Kurashige, 2003; Burrow et al., 2006). Από την άλλη πλευρά όμως τα ίδια μόρια μπορεί να δρουν και ως προσελκυστικά για εχθρούς που προσβάλλουν αποκλειστικά τα Σταυρανθή (Mewis et al., 2002; Miles et al., 2005; Rojas, 1999). Εκτός από τα παραπάνω έχει προταθεί ότι, τα ΓΚΣ χρησιμοποιούνται από τα φυτά για την αποθήκευση S και ειδικότερα κατά το στάδιο της σποροποίησης των φυτών αφού, μπορεί σε ορισμένες περιπτώσεις να αντιπροσωπεύουν το 30% του ολικού θείου που περιέχεται στα σπέρματα (Falk et al., 2007). Έτσι κατά τη βλάστηση των σπερμάτων μπορεί να υποθέσει κανείς ότι, τα φυτά να χρησιμοποιούν τα ΓΚΣ ως πηγή S για την ικανοποίηση των αναγκών τους. Σε φύτρα μπρόκολου παρατηρήθηκε δραματική μείωση της συγκέντρωσης των ΓΚΣ μετά την πάροδο 7 ημερών (Fahey et al., 1997)

Βιοσύνθεση των ΓΚΣ

Η πλευρική αλυσίδα των γλυκοσινολικών οξέων προέρχεται από αμινοξέα, συμπεριλαμβανομένων της αλανίνης, λευκίνης, ισολευκίνης, τυροσίνης, τρυπτοφάνης, βαλίνης, μεθειονίνης, φαινυλαλανίνης καθώς επίσης και από ανάλογα με την μεθειονίνη και την φαινυλαλανίνη μόρια (Kliebenstein et al., 2005).

Η βιοσύνθεση των ΓΚΣ πραγματοποιείται σε τρία στάδια: α) την επιμήκυνση της αλυσίδας των πρόδρομων αμινοξέων, β) το σχηματισμό της κύριας δομής του μορίου και γ) την τροποποίηση της πλευρικής αλυσίδας μετά από τη βιοσύνθεση του μορίου (Grubb and Abel, 2006). Η ταυτοποίηση και ο προσδιορισμός των γονιδίων στο φυτό μοντέλο *Arabidopsis thaliana*, και ακολούθως ο *in vitro* και *in vivo* χαρακτηρισμός των προϊόντων που προκύπτουν από την γονιδιακή έκφραση, έχουν επιβεβαιώσει τα δεδομένα που προέρχονται από βιοχημικές μελέτες και αφορούσαν τα τρία στάδια βιοσύνθεσης των ΓΚΣ (Mikkelsen et al., 2002; Poulton and Møller, 1993; Wittstock and Halkier, 2002). Το βιοσυνθετικό μονοπάτι που αφορά το σχηματισμό της

κύριας δομικής μονάδας των γλυκοσινολικών οξέων, που είναι κοινή για όλα τα μόρια μελετήθηκε επισταμένα και τα κενά που παραμένουν αναπάντητα σε αυτή τη διαδικασία είναι ελάχιστα. Η επιμήκυνση της πλευρικής αλυσίδας καθώς επίσης και η τροποποίηση της επηρεάζει σημαντικά τη βιολογική δράση των προϊόντων υδρόλυσης των μητρικών ΓΚΣ και ο τομέας αυτός εξακολουθεί να αποτελεί σημαντικό πεδίο για έρευνα.

Η επιμήκυνση της πλευρικής αλυσίδας (Εικόνα 2Α) της μεθειονίνης και της φαινυλαλανίνης πραγματοποιείται με μια σειρά αντιδράσεων που περιλαμβάνουν την τρανσαμίνωση τόσο στην αρχή όσο και στο τέλος, συμπύκνωση με ακέτυλο συνένζυμο, ισομερισμό και οξειδωτική αποκαρβοξυλίωση (Mikkelsen et al., 2002; Wittstock and Halkier, 2002). Πειράματα με σημασμένο άνθρακα και αμινοξέα επιβεβαίωσαν αυτό το μονοπάτι (Graser et al., 2000; Graser et al., 2001) ενώ τα ένζυμα MAM (μεθυλθειοαλκυμικές συνθάσες) που καταλύουν την αντίδραση συμπύκνωσης του ακέτυλο συνένζυμου, έχουν απομονωθεί στη ρόκα και το *Arabidopsis* (Falk et al., 2004; Field et al., 2004; Textor et al., 2004). Σύμφωνα με τα μέχρι στιγμής δεδομένα φαίνεται ότι ο σχηματισμός των ομολόγων της μεθειονίνης (επιμήκυνση της αλυσίδας του αμινοξέως) λαμβάνει χώρα στους χλωροπλάστες (Falk et al., 2004; Textor et al., 2004) και η επιμήκυνση του μορίου μπορεί να φτάσει και τα επτά επιπλέον άτομα άνθρακα (Fahey et al., 2001).

Το βιοσυνθετικό μονοπάτι για το σχηματισμό της κύριας δομής των ΓΚΣ (Εικόνα 2Β) ξεκινά με την οξειδωση του μητρικού αμινοξέος ή του ανάλογου μορίου μεθειονίνης στην αντίστοιχη αλδοξίμη. Η αντίδραση καταλύεται από μια εξειδικευμένη μονοξυγενάση του κυτοχρώματος P450 της οικογένειας CYP79 (Falk et al., 2004; Wittstock and Halkier, 2002). Η πρώτη αντίδρασή της για την παραγωγή αλδοξίμης δεν είναι απαραίτητη κατά την βιοσύνθεση των ινδολικών ΓΚΣ που προέρχονται από την τρυπτοφάνη. Αυτό οφείλεται στο γεγονός ότι, η τρυπτοφάνη οξειδώνεται στην αντίστοιχη αλδοξίμη κατά τη βιοσύνθεση του ινδολυλ οξικού οξέος και της καμαλεξίνης (Glawischmig et al., 2004; Hansen and Halkier, 2005). Οι αλδοξίμες με τη σειρά τους οξειδώνονται περαιτέρω από την μονοξυγενάση του κυτοχρώματος P450 της οικογένειας CYP83 όπου σχηματίζεται ένα νιτρονικό οξύ που αντιδρά άμεσα με θειόλες έτσι ώστε σχηματίζονται S-αλκυλθειουδροξυλαμίνες (Bak and Feyereisen, 2001; Bak et al., 2001; Hansen et al., 2001). Η θειόλη η οποία αντιδρά *in vivo* πιθανότατα είναι η κυστεΐνη, παρόλα αυτά όμως δεν είναι γνωστό εάν η σύνδεση της κυστεΐνης στο νιτρονικό οξύ καταλύεται από κάποιο ένζυμο (Mikkelsen et al., 2004; Wittstock and Halkier, 2002). Στο φυτό *Arabidopsis* έχουν προσδιοριστεί 2 διαφορετικά ένζυμα το CYP83A1 και το CYP83B1 που καταλύουν τις αντιδράσεις οξειδωσης αλειφατικών και αρωματικών αλδοξίμων (Hemm et al., 2003; Naur et al., 2003). Ακολούθως το S-αλκυλθειουδροξυμικό σύμπλοκο με την κυστεΐνη διασπάται από την C-S λυάση και σχηματίζεται μια θειουδροξυμικό, πυρουβικό και αμμωνία (Grubb and Abel, 2006). Δεδομένου όμως ότι το θειουδροξυμικό που σχηματίζεται, είναι τοξικό για τα φυτικά κύτταρα, τότε οι επόμενες

αντιδράσεις που αφορούν την προσθήκη γλυκόζης και θείωση στο τέλος αφορούν διαδικασίες αποτοξικοποίησης των φυτικών κυττάρων (Bowles et al., 2005; Mikkelsen et al., 2002).

Η τροποποίηση της πλευρικής αλυσίδας (Εικόνα 2Γ) των ΓΚΣ αφορά αντιδράσεις αλκυλίωσης, υδροξυλίωσης, εστεροποίησης, απομεθυλίωσης (Grubb and Abel, 2006). Μέχρι σήμερα οι πληροφορίες σχετικά με την τροποποίηση της πλευρικής αλυσίδας των ΓΚΣ είναι περιορισμένες. Οι υπάρχουσες πληροφορίες αφορούν την τροποποίηση αλειφατικών ΓΚΣ στο φυτό *Arabidopsis* και σχετίζονται με τη βιοσύνθεση αλκενυλ-ΓΚΣ και υδροξυαλκυλ-ΓΚΣ. Τα ένζυμα που καταλύουν τις αντιδράσεις αυτές αντίστοιχα είναι η AOP2 και AOP3 (Kliebenstein et al., 2001). Σε υποείδη του είδους *Brassica oleracea* ορθόλογα ένζυμα συμμετέχουν στην οξείδωση των θειοαλκυλ-ΓΚΣ (Gao et al., 2004; Li and Quiros, 2003).

Παράγοντες που επηρεάζουν τη συγκέντρωση των ΓΚΣ

Τα επίπεδα των ΓΚΣ εξαρτώνται τόσο από αβιοτικούς όσο και από βιοτικούς παράγοντες. Η συγκέντρωση των ΓΚΣ εξαρτάται από το είδος το οποίο εξετάζεται καθώς επίσης και από το στάδιο ανάπτυξης του φυτού (Charron et al., 2005; Rangkadilok et al., 2002; Rosa et al., 1996). Τα διάφορα είδη σταυρανθών περιέχουν όχι μόνο διαφορετικά επίπεδα συγκεντρώσεων ΓΚΣ αλλά και διαφορετικού τύπου ΓΚΣ (Bellostas et al., 2007b; Kushad et al., 1999). Διαφορές όμως παρατηρούνται και σε ποικιλίες που ανήκουν στο ίδιο είδος (Charron et al., 2005; Kushad et al., 1999; Rangkadilok et al., 2004; Vallejo et al., 2003). Το γεγονός αυτό υποδηλώνει ότι ο γενότυπος επηρεάζει σημαντικά το τύπο και τη συγκέντρωση των ΓΚΣ στα Σταυρανθή.

Το στάδιο ανάπτυξης του φυτικού ιστού επηρεάζει την περιεκτικότητά του σε ΓΚΣ. Γενικά, οι συγκεντρώσεις ΓΚΣ είναι μεγαλύτερες στους σπόρους και στη ρίζα ενώ υψηλότερες συγκεντρώσεις παρατηρούνται σε νεαρούς φυτικούς ιστούς σε σύγκριση με μεγαλύτερους σε ηλικία (Clossaisbesnard and Larher, 1991; Fahey et al., 1997; Rosa et al., 1996). Για παράδειγμα φύτρα μπρόκολου περιέχουν 20 φορές μεγαλύτερη ποσότητα ΓΚΣ σε σχέση με τις ανθοκεφαλές. Από την άλλη πλευρά υπάρχουν αναφορές ότι τα ΓΚΣ συσσωρεύονται στους ιστούς κατά τη διάρκεια της βλαστικής ανάπτυξης και καταβολίζονται με αποτέλεσμα να μειώνεται η συγκέντρωσή τους κατά το αναπαραγωγικό στάδιο (Rangkadilok et al., 2002). Σε ανθοκεφαλές μπρόκολου, διαφορετικού σταδίου ανάπτυξης η συγκέντρωση των ΓΚΣ μειώθηκε με την πάροδο του χρόνου (Vallejo et al., 2003). Αυτή η μεταβολή αποδόθηκε σε σταθερό ρυθμό υδρόλυσης μικρής συγκέντρωσης των ΓΚΣ και απελευθέρωση πηκτικών ενώσεων, πιθανό λόγω νέκρωσης των φυτικών κυττάρων. Από την άλλη πλευρά η μείωση αυτή στους διάφορους ιστούς με τη πάροδο του χρόνου μπορεί να οφείλεται σε μεταφορά των μορίων διαμέσου του φλοιώματος (Brudenell et al., 1999). Ωστόσο και οι δυο αυτές υποθέσεις χρειάζονται περισσότερα πειράματα έτσι ώστε να μπορεί να επαληθευθούν.

Το άζωτο είναι στοιχείο που περιέχεται στην δομή του μορίου των ΓΚΣ, και ως εκ τούτου θα μπορούσε να υποθέσει κάποιος ότι η αύξηση της χορήγησης του N θα έχει ως αποτέλεσμα

την αύξηση της συγκέντρωσης των ΓΚΣ στους φυτικούς ιστούς. Το φαινόμενο όμως αυτό δεν παρατηρείται στις πλείστες των περιπτώσεων αφού, με αύξηση της χορήγησης του N παρατηρείται μείωση στη συγκέντρωση των ΓΚΣ (Kopsell et al., 2007; Li et al., 2007; Schonhof et al., 2007a; Zhao et al., 1993). Αυτό το φαινόμενο πιθανό να οφείλεται στο φαινόμενο της βιοαραίωσης, αφού με τη χορήγηση αυξημένης ποσότητας N, παράγεται μεγαλύτερη ποσότητα βιομάζας χωρίς να αυξάνεται αναλογικά η συγκέντρωση των ΓΚΣ στους ιστούς. Από την άλλη όμως η αυξημένη παροχή N στα φυτά έχει ως αποτέλεσμα την παραγωγή μεταβολιτών του κύκλου των τρικαρβοξυλικών οξέων, ενώ μειώνεται η βιοσύνθεση υδατανθράκων όπως η γλυκόζη (Josefsson, 1970). Πρόδρομες ουσίες για την βιοσύνθεση των ΓΚΣ είναι όπως αναφέρθηκε τα αμινοξέα, μεθειονίνη, τρυπτοφάνη και φαινυλαλανίνη από τα οποία προκύπτουν οι αντίστοιχες κατηγορίες των αλειφατικών, ινδολικών και αρωματικών ΓΚΣ (Falk et al., 2004; Grubb and Abel, 2006). Η αύξηση της ποσότητας αζώτου που χορηγήθηκε σε φυτά ελαιοκράμβης δεν είχε αρνητική επίδραση στη σύγκέντρωση της μεθειονίνης αφού η τελευταία παρέμεινε αμετάβλητη (Josefsson, 1970). Παρόμοια συμπεριφορά παρουσίασε και η κυστεΐνη η οποία συμμετέχει στη διαδικασία βιοσύνθεσης των ΓΚΣ. Ως εκ τούτου η επίδραση του N στη βιοσύνθεση των ΓΚΣ φαίνεται να συνδέεται με την έκφραση των γονιδίων που ελέγχουν το βιοσυνθετικό μονοπάτι, ενώ υπάρχουν ενδείξεις ότι αλληλεπιδρά και με τη διαθεσιμότητα του θείου στα φυτά.

Τα αποτελέσματα που παρουσιάζονται στη διεθνή βιβλιογραφία σχετικά με την επίδραση του αζώτου και θείου στη περιεκτικότητα των ιστών των Σταυρανθών σε ΓΚΣ είναι αντιφατικά.

Η αύξηση της χορήγησης θείου σε διάφορα είδη Σταυρανθών είχε ως αποτέλεσμα την αύξηση της περιεκτικότητάς τους σε ΓΚΣ (Chen et al., 2006; Kopsell et al., 2007; Li et al., 2007; Rangkadilok et al., 2004; Schonhof et al., 2007a). Το θείο φαίνεται ότι αλληλεπιδρά με την χορήγηση αζώτου στα φυτά και η μέγιστη περιεκτικότητα των φυτικών ιστών σε ΓΚΣ φαίνεται ότι επιτυγχάνεται όταν τα δύο αυτά στοιχεία βρίσκονται σε επαρκείς ποσότητες και σε ισορροπία. Συγκεκριμένα σε κεφαλές μπρόκολου η αύξηση του θείου είχε ως αποτέλεσμα την αύξηση της συγκέντρωσης των αλειφατικών ΓΚΣ όταν το άζωτο ήταν σε επάρκεια, ενώ καμιά αντίδραση δεν παρατηρήθηκε όταν το άζωτο βρισκόταν σε χαμηλά επίπεδα (Schonhof et al., 2007a). Οι ίδιοι ερευνητές αναφέρουν ότι τα ινδολικά ΓΚΣ παρουσίασαν μείωση στη συγκέντρωση των ΓΚΣ όταν και τα δύο στοιχεία (N και S) δεν βρίσκονταν σε επάρκεια. Παρόμοια αποτελέσματα αναφέρθηκαν και σε άλλα είδη (Chen et al., 2006; Li et al., 2007; Rangkadilok et al., 2004; Zhao et al., 1993).

Η θερμοκρασία φαίνεται ότι επηρεάζει τη συγκέντρωση ΓΚΣ στους φυτικούς ιστούς ωστόσο, οι αναφορές στη διεθνή βιβλιογραφία είναι περιορισμένες. Η Rosa και συνεργάτες (1996) διαπίστωσαν ότι η ημερήσια μεταβολή της συγκέντρωσης των ΓΚΣ σε φύτρα λάχανου ήταν μεγαλύτερη όταν τα φυτά αναπτύχθηκαν στους 30°C σε σχέση με αυτά που αναπτύχθηκαν στους 20°C. Σε συνθήκες θερμοκηπίου, η συγκέντρωση των μεμονωμένων ΓΚΣ μεταβλήθηκε σημαντικά σε ρίζες σιναπιού όταν τα φυτά εκτέθηκαν σε χαμηλές θερμοκρασίες (<4°C) για 11

ημέρες, ενώ η συγκέντρωση σε ολικά ΓΚΣ παρέμεινε σταθερή (Shattuck et al., 1991). Η περιεκτικότητα ΓΚΣ σε φύτρα μπρόκολου, ήταν αυξημένη όταν η θερμοκρασία ανάπτυξης τους ήταν χαμηλότερη ή υψηλότερη από την άριστη για την ανάπτυξη του φυτού (Pereira et al., 2002). Η διαθεσιμότητα του νερού άρδευσης επηρεάζει σημαντικά τη χημική σύσταση των λαχανικών. Η συγκέντρωση σε ΓΚΣ σε φυτά ελαιοκράμβης αυξήθηκε γραμμικά όταν το υδατικό δυναμικό των φυτών ήταν χαμηλότερο από -1.4MPa (Jensen et al., 1996). Σε μια άλλη εργασία διαπιστώθηκε σημαντική θετική συσχέτιση της έλλειψης νερού και της αύξησης της συγκέντρωσης των ΓΚΣ σε ξηρό βάρος (Mailer and Cornish, 1987). Παρόλα αυτά όμως δεν έχει διαπιστωθεί μέχρι σήμερα το ή τα αίτια που προκαλούν αυτή την διαφοροποίηση. Τέλος η αύξηση της συγκέντρωσης του διοξειδίου του άνθρακα κατά τη διάρκεια ανάπτυξης των φυτών επηρεάζει τη περιεκτικότητα σε ΓΚΣ των ανθοκεφαλών μπρόκολου θετικά (Schonhof et al., 2007b).

Υδρόλυση Γλυκοσινολικών Οξέων

Τα ΓΚΣ υπόκεινται σε ενζυμική υδρόλυση από μια θειογλυκουδρολάση (E.C. 3.2.1.147) γνωστή και ως μυροσινάση. Κατά την υδρόλυση των ΓΚΣ (Εικόνα 3) παράγονται, θειικά ιόντα, γλυκόζη και διάφοροι μεταβολίτες όπως πχ ισοθειοκυανιούχες ενώσεις, νιτρίλια, θειοκυανιούχες ενώσεις, επιθειονιτρίλια κτλ. Ποιο από τα προαναφερθέντα μόρια θα σχηματιστεί κατά τη διαδικασία της υδρόλυσης εξαρτάται από το pH, τη παρουσία μεταλλικών ιόντων και πρωτεϊνών. Σημαντικό ρόλο για τη φύση του μεταβολίτη που θα σχηματιστεί διαδραματίζει και ο τύπος του ΓΚΣ που υδρολύεται.

Η μυροσινάση εντοπίζεται στο χυμοτόπιο ή σε εξειδικευμένα κύτταρα μυροσίνης στους σπόρους. Διατάραξη των κυτταρικών μεμβρανών και αύξηση της διαπερατότητάς τους έχει ως αποτέλεσμα την επαφή του ενζύμου με τα ΓΚΣ (Bones and Rossiter, 2006). Μέχρι σήμερα έχουν απομονωθεί διάφορες ισοενζυμικές μορφές της μυροσινάσης οι οποίες διαφέρουν μεταξύ των φυτικών ειδών, ποικιλιών αλλά και ιστών στο ίδιο φυτό (Bones and Rossiter, 2006). Συγκεντρώσεις ασκορβικού οξέως μεταξύ 1 και 5μM μπορεί να αυξήσουν σημαντικά την ενζυμική δραστηριότητα της μυροσινάσης (Wilkinson et al., 1984). Οι άριστες συνθήκες για την υδρόλυση των ΓΚΣ από τη μυροσινάση είναι pH μεταξύ 5 και 7,5, θερμοκρασία 45-70 °C (Bones and Rossiter, 2006).

Σχηματισμός ισοθειοκυανιούχων

Οι συνθετέστεροι μεταβολίτες των ΓΚΣ από την μυροσινάση είναι ισοθειοκυανιούχες ενώσεις (ΙΣΘ), οι οποίες σχηματίζονται σε ουδέτερο pH ενώ η παρουσία ασκορβικού οξέος επιταχύνει το σχηματισμό τους (Gil and Macleod, 1980). Οι ΙΣΘ παρουσιάζουν εξαιρετικό ενδιαφέρον τόσο από άποψη χημειοπροστατευτικής δράσης στον άνθρωπο όσο και αντιμετώπισης εδαφογενών παθογόνων (Higdon et al., 2007; Manici et al., 1997).

Σχηματισμός νιτριλίων και επιθειονιτριλίων

Η πρώτη παρατήρηση ύπαρξης θείου σε ένωση νιτριλίου έγινε το 1966 από τον VanEtten και συνεργάτες. Αρχικά ο σχηματισμός των νιτριλίων αποδόθηκε σε μη-ενζυματικές αντιδράσεις, και θεωρήθηκε ότι εξαρτιόταν μόνο από την παρουσία ιόντων σιδήρου σε χαμηλό pH (VanEtten et al., 1966). Ωστόσο σήμερα είναι πλέον αποδεκτό ότι υπεύθυνη για το σχηματισμό νιτριλίων είναι μια επιθειοειδική πρωτεΐνη (ESP) χωρίς όμως να έχει ξεκαθαρίσει πλήρως ο μηχανισμός σχηματισμού των νιτριλίων (Tookey, 1973) ενώ η παρουσία ιόντων σιδήρου είναι απαραίτητη για την δραστηριότητα του ενζύμου (Zabala et al., 2005). Η παρουσία της ESP καθορίζει το σχηματισμό ισοθειοκυανιούχων μεταβολιτών στις κεφαλές μπρόκολου (Matusheski et al., 2003; Matusheski et al., 2004). Αποδιάταξη της πρωτεΐνης με ελαφρά θέρμανση είχε ως αποτέλεσμα την αύξηση της συγκέντρωσης ΙΣΘ αφού η μυροσινάση διατηρεί τη δραστηριότητα της μέχρι τους 70°C (Bones and Rossiter, 2006)

Σχηματισμός Θειοκυανιούχων ενώσεων

Ο σχηματισμός θειοκυανιούχων ενώσεων παρατηρήθηκε σε φύλλα ρόκας μετά την υδρόλυση του 4-μεθυλθειοβουτυλο-ΓΚΣ (Schluter and Gmelin, 1972). Πολύ ενωρίτερα, οι (Gmelin and Virtanen, 1959) παρατήρησαν το σχηματισμό θειοκυανιούχων ουσιών από σπόρους των φυτών *Thlapsi arvense* L. και *Lepidium ruderdale* L. Ο σχηματισμός θειοκυανιούχων ενώσεων είναι πιθανό να πραγματοποιείται μετά από τη δράση δυο ενζύμων, της μυροσινάσης και μιας ισομεράσης η οποία αναδιατάσσει το άτομο του άνθρακα έτσι να μετασχηματίζεται το ΙΣΘ σε θειοκυανιούχο ένωση (Bones and Rossiter, 2006). Μέχρι σήμερα δεν έχει καταστεί δυνατή η απομόνωση ενζύμου ή κάποιου άλλου παράγοντα που να ευθύνεται για το σχηματισμό θειοκυανιούχων ενώσεων.

Σχηματισμός Ινδολικών ενώσεων

Η υδρόλυση των ινδολικών ΓΚΣ έχει ως αποτέλεσμα τον σχηματισμό ΙΣΘ αλλά λόγω αστάθειας του μορίου σχηματίζονται ετεροκυκλικές ενώσεις αζώτου (Agerbirk et al., 1998). Έτσι για παράδειγμα η υδρόλυση της γλουκομπρασικίνης έχει ως αποτέλεσμα το σχηματισμό της ινδολυλ-3-καρβινόλης. Οι ινδολικές ενώσεις που παράγονται κατά την υδρόλυση των ινδολικών ΓΚΣ έχουν μεγάλη σημασία στην ανθρώπινη υγεία λόγω της υψηλής χημειοπροστατευτικής τους δράσης (Higdon et al., 2007).

Προϊόντα Υδρόλυσης ΓΚΣ και Εδαφική Μικροβιακή Κοινότητα (Ε.Μ.Κ)

Βιοαπολύμανση του εδάφους

Βιοαπολύμανση είναι η μερική ή ολική απολύμανση του εδάφους με βιολογικά μέσα. Ένας τρόπος που αυτή έχει επιχειρηθεί είναι με την ενσωμάτωση των υπολειμμάτων φυτικών ιστών από είδη που ανήκουν στην οικογένεια των Σταυρανθών με σκοπό την επίσχεση ή την αντιμετώπιση εχθρών και ασθενειών των καλλιεργούμενων φυτών. Ο μηχανισμός με τον οποίο επιτυγχάνεται το επιθυμητό αποτέλεσμα στηρίζεται στην παραγωγή ΙΣΘ ενώσεων από την υδρόλυση των αντίστοιχων ΓΚΣ που περιέχονται στους φυτικούς ιστούς που ενσωματώνονται στο έδαφος (Kirkegaard et al., 2000).

Από τα δεδομένα που υπάρχουν σήμερα στη βιβλιογραφία, φαίνεται μεγάλη συσχέτιση μεταξύ της περιεκτικότητας των φυτικών ιστών σε ΓΚΣ και της επίσχεσης ασθενειών εδάφους καθώς και νηματωδών (Kirkegaard et al., 2000; Potter et al., 1998).

Η κυτταροτοξικότητα των ΙΣΘ γενικά αποδίδεται στην αντίδραση τους με τις δισουλφιδικές, σουλφιδριλικές και αμινικές ομάδες των πρωτεϊνών ή και των αμινοξέων με αποτέλεσμα την απώλεια ενζυμικής δραστηριότητας στα κύτταρα (Brown and Morra, 1997; Zsolnai, 1966). Παρόλα αυτά όμως και άλλοι παράγοντες μπορεί να επηρεάζουν τη τοξικότητα των ΙΣΘ σε διάφορους οργανισμούς όπως για παράδειγμα η ικανότητα των μορίων να διαπερνούν τις κυτταρικές μεμβράνες, παρουσία θείου ή αρωματικού δακτυλίου στην αλυσίδα του μορίου (Manici et al., 1997; Nastruzzi et al., 1996; Sarwar et al., 1998). Ο Nastruzzi και

συνεργάτες (1996) έδειξαν ότι ο συντελεστής κατανομής οκτανόλης-νερού είναι ένας σημαντικός παράγοντας που επηρεάζει την ικανότητα των ΙΣΘ να διαπερνούν τις κυτταρικές μεμβράνες. Στις μελέτες τους διαπίστωσαν ότι, τα πιο τοξικά μόρια χαρακτηρίζονταν από χαμηλό συντελεστή κατανομής, που σχετίζεται και με την βιοδιαθεσιμότητά τους στο έδαφος. Σε *in vitro* μελέτες παρατηρήθηκε μεγαλύτερη αποτελεσματικότητα των ΙΣΘ που προέρχονταν από την υδρόλυση των θειοαλειφατικών ΓΚΣ σε ότι αφορά την ανάπτυξη μυκήτων σε σχέση με τα ισοθειοκυανιούχα μόρια που προέρχονται από αλκυλαλειφατικά ΓΚΣ. Γενικότερα φαίνεται ότι η τοξικότητα των ΙΣΘ σε όλες τις ομάδες (αλειφατικά, θειοαλειφατικά και αρωματικά) αυξάνει μειούμενου του αριθμού ατόμων άνθρακα στο σκελετό του μορίου (Sarwar et al., 1998). Η διαφορά όμως στην αποτελεσματικότητα των ΙΣΘ οφείλεται όχι μόνο στη διαφορά μήκους της πλευρικής αλυσίδας αλλά και στο συντελεστή κατανομής οκτανόλης-νερού των μορίων αυτών (Manici et al., 1997).

Επίσης η τοξικότητα των μορίων δεν εξαρτάται μόνο από το ΙΣΘ αλλά και από τον μικροοργανισμό στον οποίο εφαρμόζεται ενώ η δράση τους είναι δόσοεξαρτώμενη. Τα βακτήρια είναι πιο ανθεκτικά από τους μύκητες στο φαινυλαίθυλ-ΙΣΘ σε *in vitro* μετρήσεις όταν η χορηγούμενη δόση είναι η ίδια (Smith and Kirkegaard, 2002). Οι ίδιοι ερευνητές παρατήρησαν μεγάλη παραλλακτικότητα μεταξύ διαφορετικών ειδών που ανήκουν στο ίδιο γένος, όσον αφορά την ευαισθησία τους στο φαινυλαίθυλ-ΙΣΘ. Σε εδαφογενή παθογόνα των σιτηρών παρατηρήθηκαν σημαντικές διαφορές ως προς την τοξικότητα διάφορων μυκήτων στα ΙΣΘ. Οι μύκητες του γένους *Gaeumannomyces* και *Rhizoctonia* ήταν οι πιο ευαίσθητοι ενώ μύκητες του γένους *Pythium* και *Bipolaris* ήταν λιγότερο ευαίσθητοι (Sarwar et al., 1998).

Παράγοντες που επηρεάζουν τη βιοαπολύμανση

Η συγκέντρωση ΓΚΣ καθώς και ο τύπος τους (αλειφατικά, αρωματικά και ινδολικά) σχετίζονται άμεσα με την παραγωγή των αντίστοιχων ΙΣΘ ενώσεων. Ως εκ τούτου, όσο μεγαλύτερη είναι η συγκέντρωση των αλειφατικών και αρωματικών ΓΚΣ σε ένα φυτικό είδος τόσο μεγαλύτερο είναι το δυναμικό βιοαπολύμανσή του (Kirkegaard and Sarwar, 1998). Παράλληλα όμως η παραγωγή βιομάζας ανά μονάδα καλλιεργούμενης έκτασης είναι επίσης σημαντικός παράγοντας για την αύξηση του δυναμικού, αφού όσο μεγαλύτερη είναι η παραγωγή τόσο μεγαλύτερες ποσότητες ΓΚΣ ενσωματώνονται στο έδαφος και έχουν τη δυναμική μετατροπής τους στις αντίστοιχες ΙΣΘ ενώσεις (Kirkegaard and Sarwar, 1998) δεδομένου ότι η συγκέντρωση και η μορφή ΓΚΣ δεν αλλάζει με τη βιομάζα. Παράλληλα το στάδιο ανάπτυξης των φυτών διαδραματίζει σημαντικό ρόλο στο δυναμικό βιοαπολύμανσης. Η συγκέντρωση των ΓΚΣ μειώνεται κατά τη διάρκεια της βλαστικής ανάπτυξης αλλά ξεκινά να αυξάνει κατά το στάδιο της άνθισης και μεγιστοποιείται κατά την παραγωγή σπόρων (Bellostas et al., 2007a; Kirkegaard and Sarwar, 1998; Rangkadilok et al., 2004). Ως εκ τούτου το στάδιο ανάπτυξης των φυτών, σχετίζεται άμεσα με τον χρόνο ενσωμάτωσης στο έδαφος ώστε να επιτευχθεί η ενσωμάτωση στο έδαφος, της μέγιστης δυνατής ποσότητας ΓΚΣ. Επιπλέον, ο λόγος της υπέργεια βιομάζας προς

το ριζικό σύστημα αποτελεί σημαντικό παράγοντα για την αποτελεσματικότητα της βιοαπολύμανσης αφού, στο ριζικό σύστημα των φυτών ο κυρίαρχος τύπος ΓΚΣ είναι τα αρωματικά ενώ στο υπέργειο τμήμα παράγονται αλειφατικά και ινδολικά ΓΚΣ. Επίσης στο ριζικό σύστημα η περιεκτικότητα σε ΓΚΣ είναι υψηλότερη σε σχέση με το υπέργειο τμήμα (Kirkegaard and Sarwar, 1998).

Η παραγωγή ΙΣΘ από τα αντίστοιχα ΓΚΣ στο έδαφος και η βιοδιαθεσιμότητά τους στο εδαφικό περιβάλλον καθορίζει σημαντικά την αποτελεσματικότητα της βιοπολύμανσης αλλά και την επίδραση της ενσωματούμενης βιομάζας στην εδαφική μικροβιακή κοινότητα. Η ποσότητα ΙΣΘ που παράχθηκε μετά από ενσωμάτωση Σταυρανθών σε έδαφος σε συνθήκες εργαστηρίου, ήταν ίση με το 30% της ποσότητας που θα μπορούσε να παραχθεί από τα αντίστοιχα ΓΚΣ που περιείχαν οι φυτικοί ιστοί που ενσωματώθηκαν στο έδαφος (Morra and Kirkegaard, 2002). Ωστόσο η παραγόμενη ποσότητα ΙΣΘ μειώνεται ακόμη περισσότερο σε συνθήκες αγρού. Οι Gimsing και Kirkegaard (2006) μετά από ενσωμάτωση στο έδαφος φυτομάζας από τα είδη *Brassica juncea* και *Brassica napus* ανίχνευσαν μεμονωμένα ΓΚΣ που ανέρχονταν στο 13 και 7% της αρχικής περιεκτικότητας της φυτομάζας που ενσωματώθηκε. Στο ίδιο πείραμα μετρήθηκε η ποσότητα ΙΣΘ που ελευθερώθηκε στο έδαφος μετά την ενσωμάτωση και αντιστοιχούσε στο 26% της αρχικής περιεκτικότητας της φυτομάζας σε ΓΚΣ. Πολύ χαμηλότερες συγκεντρώσεις παρατηρήθηκαν όταν ενσωματώθηκε φυτομάζα από καλλιέργεια *B juncea* (Morra and Kirkegaard, 2002; Rumberger and Marschner, 2003). Η μειωμένη υδρόλυση ΓΚΣ και η παραγωγή ΙΣΘ σχετίζεται με την εδαφική υγρασία και τον βαθμό διατάραξης των φυτικών ιστών που ενσωματώνονται στο έδαφος (Gimsing and Kirkegaard, 2006; Morra and Kirkegaard, 2002; Rumberger and Marschner, 2003). Αύξηση της υγρασίας και ψιλοτεμαχισμός των υπολειμμάτων της καλλιέργειας αυξάνει την ποσότητα των ΙΣΘ που ανιχνεύονται στο έδαφος. Επιπρόσθετα, τα Σταυρανθή εξαιτίας της μεγάλης σχετικά περιεκτικότητας τους σε θείο σε σχέση με τις άλλες οικογένειες φυτικών ειδών, παράγουν και άλλες ενώσεις εκτός των ΓΚΣ που παρουσιάζουν ευρεία τοξικότητα σε πολλούς μικροοργανισμούς (Bending and Lincoln, 1999). Παρόλα αυτά όμως ο έλεγχος της τοξικότητας των ενώσεων αυτών στο εδαφικό περιβάλλον στην εδαφική μικροβιακή κοινότητα είναι ανύπαρκτος.

Ο τύπος του εδάφους και η περιεκτικότητά του σε οργανική ουσία είναι σημαντικός παράγοντας για την βιοδιαθεσιμότητα των ΙΣΘ και την αποτελεσματικότητά τους σε ότι αφορά την αντιμετώπιση παθογόνων εδάφους. Αύξηση του % οργανικής ουσίας στο έδαφος συσχετίζεται αρνητικά με το LD₉₅ των αλειφατικών ΙΣΘ και πολύ περισσότερο των αρωματικών ΙΣΘ (Matthiessen and Shackleton, 2005). Οι ίδιοι ερευνητές διαπίστωσαν επίσης ότι, η θερμοκρασία μειώνει σημαντικά τη τοξικότητα των μορίων παρουσία εδάφους, ενώ το αντίθετο παρατηρήθηκε σε συνθήκες *in vitro*. Η συμπεριφορά αυτή αποδόθηκε στην αύξηση της μικροβιακής δραστηριότητας και κατ' επέκταση της μικροβιακής διάσπασης των ουσιών σε υψηλότερες θερμοκρασίες. Η δραστηριότητα της μυροσινάσης των φυτικών ιστών σε συνδυασμό με άλλα

ένζυμα όπως οι σουλφατάσες στο έδαφος πιθανόν να επηρεάζουν τη συγκέντρωση των ΓΚΣ στο έδαφος και κατ' επέκταση των ΙΣΘ. Παρόλα αυτά όμως δεν υπάρχουν στοιχεία στη διεθνή βιβλιογραφία σχετικά με αυτά τα θέματα. Τα ΓΚΣ προσροφούνται μερικώς από οξείδια μετάλλων στο έδαφος με τιμές *K_d* που κυμαίνονται από 0.00 μέχρι 1.85 L/kg ενώ η προσρόφηση είναι μεγαλύτερη σε χαμηλές τιμές pH (4) σε σύγκριση με μεγαλύτερες (pH 8) γεγονός που υποδηλώνει ότι η προσρόφησή τους οφείλεται στην ανάπτυξη ηλεκτροστατικών δυνάμεων μεταξύ των αρνητικά φορτισμένων ΓΚΣ και των θετικά φορτισμένων ορυκτών της αργίλου (Gimsing et al., 2007). Οι ίδιοι ερευνητές, μελέτησαν επίσης την σχέση προσρόφησης μεταξύ των ΓΚΣ και των ορυκτών καολινίτη και μοντμοριλονιτη και διαπίστωσαν ότι, δεν υπάρχει προσρόφησή τους σε αυτά. Τέλος φαίνεται ότι, τα ΓΚΣ παρουσιάζουν υδρόφοβη αλληλεπίδραση με τα χουμικά οξέα που βρίσκονται στο έδαφος και προσροφούνται σε αυτά σε μεγαλύτερο βαθμό σε σχέση με τα υπόλοιπα εδαφικά συστατικά (Gimsing et al., 2007).

Επίδραση της ενσωμάτωσης φυτομάζας στην μικροβιακή κοινότητα του εδάφους

Η εδαφική μικροβιακή κοινότητα διαδραματίζει σημαντικό ρόλο στη γονιμότητα και παραγωγικότητα των εδαφών αφού οι μικροοργανισμοί του εδάφους συμμετέχουν στις περισσότερες από τις διεργασίες που υφίστανται στα εδάφη όπως η ανοργανοποίηση και ακινητοποίηση των θρεπτικών στοιχείων, η διάσπαση της οργανικής ουσίας, ο σχηματισμός σταθερότερων μορφών οργανικής ουσίας και ο σχηματισμός σταθερών συσσωματωμάτων στο έδαφος (Coleman and Whitman, 2005). Η ενσωμάτωση φυτικών υπολειμμάτων και χλωρής λίπανσης έχει ως αποτέλεσμα την αύξηση της μικροβιακής δραστηριότητας καθώς επίσης και την διαφοροποίηση της σύστασης της (Sekiguchi et al., 2007; Stark et al., 2007; Stark et al., 2008). Οι πλείστες αναφορές στη διεθνή βιβλιογραφία αναφέρονται στην εφαρμογή χλωρής λίπανσης χρησιμοποιώντας είδη της οικογένειας των Ψυχανθών, αφού τα είδη αυτά, λόγω της αζωτοδέσμωσης, παρέχουν σημαντικές ποσότητες αζώτου στην επόμενη καλλιέργεια (Watson et al., 2002). Η ενσωμάτωση ψυχανθών στο έδαφος, σε ξηρικές συνθήκες είχε ως αποτέλεσμα την αύξηση της μικροβιακής βιομάζας κατά 170% (Biederbeck et al., 2005).

Η χρήση των Σταυρανθών στα συστήματα παραγωγής εντοπίζεται σε επίπεδο παραγωγού στην συμμετοχή της ελαιοκράμβης σε σύστημα αμειψισποράς με σιτηρά (Yulianti et al., 2006). Η χρήση της ελαιοκράμβης αυξάνει την απόδοση του σιταριού που ακολουθεί λόγω της επίσχεσης στην ανάπτυξη εδαφογενών παθογόνων, ενώ παράλληλα παρουσιάζει οικονομικό ενδιαφέρον ως προς την παραγωγή σπορέλαιων. Αντίθετα σε ερευνητικό επίπεδο υπάρχουν πολλές αναφορές σχετικά με την επίδραση της ενσωμάτωσης φυτικών ιστών Σταυρανθών σε εδαφογενή παθογόνα, εχθρούς και νηματώδεις (Bending and Lincoln, 1999; Buskov et al., 2002; Matthiessen and Shackleton, 2005; Scott and Knudsen, 1999; Yulianti et al., 2006).

Η μελέτη της επίδρασης της ενσωμάτωσης φυτομάζας από Σταυρανθή σε ομάδες μικροοργανισμών που συμμετέχουν στην αποδόμηση οργανικών υπολειμμάτων και στην

διαθεσιμότητα των θρεπτικών στοιχείων είναι πολύ περιορισμένη. Ωστόσο οι ελάχιστες αναφορές που υπάρχουν στη βιβλιογραφία και σχετίζονται με ομάδες μικροοργανισμών στο έδαφος, είναι αντιφατικές όσον αφορά την επίδραση της ενσωμάτωσης των υπολειμμάτων καλλιέργειας Σταυρανθών ή ακόμα και καθαρών μορφών ΙΣΘ. Η ενσωμάτωση φυτικών υπολειμμάτων του *B. napus* δεν επηρέασε τη ποικιλότητα των gram αρνητικών βακτηρίων στο έδαφος (Scott and Knudsen, 1999). Αντίθετα οι Rumberger και Marschner (2003) διαπίστωσαν σημαντικές διαφορές στη ποικιλότητα βακτηρίων και ευκαριωτικών μικροοργανισμών, μετά από προσθήκη στο έδαφος φαινυλαιθυλ-ΙΣΘ. Οι πληθυσμοί των νιτροποιητικών βακτηρίων μειώθηκαν μετά από την προσθήκη καθαρής μορφής ΙΣΘ (Bending and Lincoln, 1999).

Μέθοδοι Αξιολόγησης της Εδαφικής Μικροβιακής Κοινότητας

Η αξιολόγηση της εδαφικής μικροβιακής κοινότητας παρουσίαζε μέχρι πρόσφατα σημαντικά προβλήματα εξαιτίας του μεγάλου αριθμού μικροοργανισμών οι οποίοι δεν μπορεί να αναπτυχθούν σε υποστρώματα στο εργαστήριο. Υπολογίζεται ότι, το 90-95% του ολικού αριθμού βακτηρίων στο έδαφος δεν μπορεί να καλλιεργηθούν στο εργαστήριο (Torsvik et al., 1998). Η ανάπτυξη της μοριακής βιολογίας τα τελευταία χρόνια οδήγησε στην ανάπτυξη διάφορων μεθόδων αξιολόγησης των μικροοργανισμών στο έδαφος, ανεξάρτητων από την καλλιέργεια των μικροοργανισμών σε υποστρώματα. Οι μέθοδοι αυτές βασίζονται στην ενίσχυση των γονιδίων της μικρής υπομονάδας του ριβοσωμικού RNA (rDNA), 16sRNA όσον αφορά προκαρυωτικούς μικροοργανισμούς (βακτήρια και αρχαία) και 18sRNA όσον αφορά τους ευκαρυωτικούς μικροοργανισμούς (μύκητες). Αντικαθιστούν την αναγνώριση μέσω μεθόδων καλλιέργειας και ανάπτυξης των μικροοργανισμών σε υποστρώματα (Duineveld et al., 2001; Ferris and Ward, 1997; Gremion et al., 2003; Torsvik et al., 1998). Η ανάπτυξη των τεχνικών ανάλυσης της αλληλουχίας του 16sRNA γονιδίου, σε περιβαλλοντικά δείγματα και η ανάπτυξη των αντίστοιχων βάσεων δεδομένων (βάσεων κατάθεσης αλληλουχιών) επιτάχυνε σημαντικά την ικανότητα της επιστημονικής κοινότητας για την λεπτομερή μελέτη των μικροοργανισμών σε διάφορα οικοσυστήματα (Olsen et al., 1986; Pace et al., 1986).

Η συγκέντρωση / περιεκτικότητα του rRNA έχει προταθεί ως κατάλληλος δείκτης για την αξιολόγηση αλλαγών στη λειτουργική βακτηριακή κοινότητα του εδάφους αφού η περιεκτικότητά του προσδιορίζει κατά προσέγγιση την μικροβιακή δραστηριότητα (Wagner, 1994). Έτσι εκχύλιση και παραλαβή 16S rRNA και rDNA και εφαρμογή RT-PCR πραγματοποιήθηκε για την αξιολόγηση μικροβιακής δραστηριότητας σε ριζόσφαιρα στο έδαφος. Η ηλεκτροφόρηση βαθμιδωτής αποδιάταξης (DGGE) μπορεί να διαχωρίσει προϊόντα της αλυσιδωτής αντίδρασης πολυμεράσης από περιβαλλοντικά δείγματα. Αυτή η μέθοδος προσφέρει τη δυνατότητα αποτύπωσης της εδαφικής μικροβιακής κοινότητας και είναι ανεξάρτητη από την καλλιέργεια μικροοργανισμών σε υποστρώματα τόσο στο χώρο όσο και στο χρόνο (Muyzer et al., 1993). Δεν προσφέρεται όμως για ποσοτικοποίηση, όσον αφορά τους πληθυσμούς των μικροοργανισμών που ανιχνεύει.

Οι μοριακές μέθοδοι δεν αποτελούν πανάκια αφού παρουσιάζουν περιορισμούς και σφάλματα ειδικότερα όταν αυτές εφαρμόζονται σε περιβαλλοντικά δείγματα. Τα σημαντικότερα σφάλματα παρατηρούνται κατά το στάδιο της δειγματοληψίας και αποθήκευσης των δειγμάτων πριν την εκχύλιση των νουκλεϊκών οξέων. Προβλήματα παρατηρούνται επίσης κατά τη διάρκεια της εκχύλισης του DNA/RNA που αφορά την αξιόπιστη και επαναλήψιμη λύση όλων των κυττάρων των μικροοργανισμών καθώς επίσης και της εκχύλισης μεμονωμένων και ανέπαφων νουκλεϊκών οξέων, εξωπολυσακχαριτών των κυτταρικών μεμβρανών και πρωτεϊνών που μπορεί να μειώσουν ή να παρεμποδίσουν την αλυσιδωτή αντίδραση πολυμεράσης ή την πέψη του DNA με ένζυμο περιορισμού (Clegg et al., 1997; Cullen and Hirsch, 1998; Frostegård et al., 1999; Gelsomino et al., 1999; Trevors and van Elsas, 1995; vanElsas et al., 1997). Γενικά τα δείγματα εδάφους συστήνεται όπως καταψύχονται εάν δεν πρόκειται να επεξεργαστούν περαιτέρω την ίδια ημέρα της δειγματοληψίας. Επιπλέον έχει παρατηρηθεί ότι η απώλεια DNA από κατεψυγμένο έδαφος ήταν σημαντικά μικρότερη σε σχέση με απλά συντηρημένο έδαφος στους 4°C (Miller et al., 1999).

Έτσι οι μοριακές μέθοδοι παρέχουν πολύ χρήσιμες πληροφορίες σχετικά με την ποικιλότητα της μικροβιακής κοινότητας του εδάφους λαμβάνοντας υπόψη μικροοργανισμούς που μπορεί να αναπτυχθούν σε υποστρώματα καθώς επίσης και μικροοργανισμούς που δεν μπορεί να καλλιεργηθούν στα υποστρώματα αυτά (van Elsas et al., 1998). Η συνδυασμένη χρήση μεθόδων που αφορούν την αξιολόγηση μεγάλου εύρους μικροοργανισμών, και μεθόδων που σχετίζονται με την αξιολόγηση εξειδικευμένων ομάδων μικροοργανισμών είναι μια προσεγγιστική τακτική που μειώνει σημαντικά τους περιορισμούς και τις δυσκολίες που παρουσιάζει η αξιολόγηση πολύπλοκων από άποψης δομής και λειτουργικότητας μικροοργανισμών στο έδαφος (Macnaughton et al., 1999; Muyzer, 1998; Nusslein and Tiedje, 1998; Øvreås and Torsvik, 1997; Øvreås et al., 1998; Sandaa et al., 1999). Η μεθοδολογική προσέγγιση περιλαμβάνει τα παρακάτω:

- «Γενετική αποτύπωση» η οποία παρέχει μια γενική εικόνα σχετικά με τη δομή της μικροβιακής κοινότητας του εδάφους
- «Κλωνοποίηση» των προϊόντων PCR και στη συνέχεια αλληλούχιση των ενισχυμένων περιοχών των γονιδίων – στόχων, που παρέχει σημαντικές πληροφορίες σε ότι αφορά τη μικροβιακή ποικιλότητα υπό την έννοια της διαφορετικότητας των ειδών αλλά όχι και της σχετικής αφθονίας τους στο υπό μελέτη έδαφος.

Τεχνικές μοριακής αποτύπωσης της μικροβιακής κοινότητας στο έδαφος

Το γονίδιο που κωδικοποιεί την ριβωσομικό RNA που σχετίζεται με την μικρή ριβοσωμική υπομονάδα (16S rDNA) έχει χρησιμοποιηθεί κατά κόρον τα τελευταία χρόνια για το χαρακτηρισμό της βακτηριακής κοινότητας στο έδαφος. Η χρήση του γονιδίου αυτού ενδείκνυται για τέτοιου είδους μελέτες για τους εξής λόγους:

1. Όλοι οι προκαρυωτικοί οργανισμοί περιέχουν αυτό το γονίδιο που είναι απαραίτητο για την πρωτεϊνοσύνθεση και είναι ανεξάρτητο από την εξέλιξή τους.
2. Ένας μεγάλος αριθμός της αλληλούχισης του γονιδίου είναι καταγεγραμμένος σε βάσεις δεδομένων.
3. Εκκινητές για την αλυσιδωτή αντίδραση της πολυμεράσης μπορεί να σχεδιαστούν χρησιμοποιώντας την αλληλούχιση των βάσεων σε συντηρημένες περιοχές του γονιδίου.

Η αποτύπωση των προϊόντων PCR του γονιδίου 16S μπορεί να πραγματοποιηθεί χρησιμοποιώντας την τεχνική της ηλεκτροφόρησης σε πηκτή με βαθμίδωση συγκέντρωσης αποδιατακτικών ουσιών (DGGE). Η τεχνική DGGE έχει την ικανότητα διαχωρισμού μικρών μορίων DNA (200-600 ζεύγη βάσεων) που έχουν το ίδιο μέγεθος, αρκεί να διαφέρουν μόλις σε ένα νουκλεοτίδιο, κατά την ηλεκτροφόρηση σε πηκτή με αυξημένη βαθμίδωση της συγκέντρωσης αποδιατακτικών ουσιών. Ο διαχωρισμός βασίζεται στη μειωμένη ηλεκτροφορητική κινητικότητα ενός μερικώς αποδιαταγμένου μορίου DNA σε πηκτή ακρυλαμιδίου σε σύγκριση με την κινητικότητα της πλήρως δίκλωνης μορφής του μορίου. Οι αλυσίδες ενός τμήματος DNA αποδιατάσσονται σε συγκεκριμένη θερμοκρασία η οποία εξαρτάται από: α) τους δεσμούς υδρογόνου που σχηματίζονται μεταξύ των συμπληρωματικών βάσεων (αλληλουχίες πλούσιες σε γουανίνη και κυτοσίνη αποδιατάσσονται σε υψηλότερες θερμοκρασίες) και β) από το στοίβαγμα μεταξύ των γειτονικών βάσεων στην ίδια αλυσίδα. Κατά τη διάρκεια της ηλεκτροφόρησης σε πηκτή ακρυλαμίδης, η κινητικότητα ενός μορίου επιβραδύνεται όταν μια περιοχή του μορίου του DNA έχει αποδιαταχθεί. Η ολική αποδιάταξη του μορίου του DNA αποτρέπεται από την προσθήκη στο μόριο μιας αλληλουχίας πλούσιας σε γουανίνη και κυτοσίνη (GC clamp) στο ένα άκρο του. Η προσθήκη της αλληλουχίας GC επιτυγχάνεται κατά την αλυσιδωτή αντίδραση της πολυμεράσης όπου ο εκκινητής που χρησιμοποιείται φέρει στο 5' άκρο την αλληλουχία αυτή. Οι ζώνες DNA που προκύπτουν από την ηλεκτροφόρηση αντιστοιχούν άμεσα στη γενετική ποικιλότητα στο δείγμα που εξετάζεται ενώ ο αριθμός των ζωνών αντιπροσωπεύει τον αριθμό των κυρίαρχων ειδών.

Η ανάλυση πολυμορφισμού μήκους ακραίων τμημάτων περιορισμού (T-RFLP, Terminal Restriction Fragment Length Polymorphisms) είναι μια μέθοδος με την οποία μπορεί να αποκτηθεί το γενετικό αποτύπωμα μιας μικροβιακής κοινότητας αναλύοντας τους πολυμορφισμούς ενός συγκεκριμένου γονιδίου. Παρόλο που η μέθοδος έχει μεγαλύτερη δυναμική αξιολόγησης της μικροβιακής κοινότητας στο έδαφος, το προφίλ των ζωνών που προέρχονται από ηλεκτροφόρηση σε πηκτή με βαθμίδωση αποδιατακτικών ουσιών παρέχει πιο χρήσιμες πληροφορίες όσον αφορά τη σύγκριση της μικροβιακής ποικιλότητας διαφορετικών εδαφών. Επιπρόσθετα η δυνατότητα κλωνοποίησης και αλληλούχισης των ζωνών που παρουσιάζονται στη πηκτή ηλεκτροφόρησης μπορεί να δώσουν επιπλέον πληροφορίες όσον αφορά την σύσταση της μικροβιακής κοινότητας του εδάφους και οι οποίες δεν μπορεί να

εξασφαλιστούν εφαρμόζοντας σε ένα δείγμα τη μέθοδο T-RFLP (Kowalchuk et al., 1998; Macnaughton et al., 1999; Muyzer and Smalla, 1998; Yang and Crowley, 2000).

Λειτουργική Μικροβιακή Κοινότητα του εδάφους

Οποιοσδήποτε αλλαγές επιτελούνται στην ενεργή μικροβιακή κοινότητα του εδάφους μπορεί να οδηγήσουν σε αλλαγές στο έδαφος που σχετίζονται με τη λειτουργικότητα μιας συγκεκριμένης ομάδας ή του συνόλου των μικροοργανισμών του εδάφους. Για τη μελέτη τέτοιων αλλαγών που παρατηρούνται στο έδαφος, είναι απαραίτητος ο έλεγχος της ενζυμικής δραστηριότητας, της μικροβιακής αναπνοής, των φωσφολιπιδίων και του mRNA στο υπό μελέτη δείγμα. Οι δείκτες αυτοί σχετίζονται είτε έμμεσα είτε άμεσα με την μικροβιακή δραστηριότητα του εδάφους και την λειτουργικότητα των μικροβιακών εδαφικών κοινοτήτων.

Ανάλυση Λιπαρών οξέων των φωσφολιπιδίων (PLFAS)

Τα φωσφολιπίδια είναι βασικό συστατικό των μεμβρανών των ζωντανών μικροοργανισμών που αποικούν το έδαφος και χρησιμοποιούνται τα τελευταία χρόνια ως βιοδείκτες μεταβολής της σύστασης και δομής της μικροβιακής κοινότητας του εδάφους ως αποτέλεσμα εξωγενών στρεσογόνων επεμβάσεων, αγροτικών πρακτικών ή κλιματολογικών συνθηκών (Frostegård and Bååth, 1996). Τα φωσφολιπίδια μετά το θάνατο των μικροοργανισμών αποδομούνται άμεσα σε ουδέτερα λιπίδια γεγονός που καθιστά τη μέτρηστος αξιόπιστη μέθοδο για την αξιολόγηση της ενεργής μικροβιακής κοινότητας του εδάφους (Zelles, 1999). Διαφορετικές ομάδες μικροοργανισμών χαρακτηρίζονται από συγκεκριμένους δείκτες φωσφολιπιδίων στις κυτταρικές τους μεμβράνες και κάθε ομάδα μικροοργανισμών συνεισφέρει στο αποτύπωμα της μικροβιακής κοινότητας του εδάφους ανάλογα με την αφθονία της (βιομάζα). Ως εκ τούτου μεταβολές στη συγκέντρωση των λιπαρών οξέων των φωσφολιπιδίων μπορεί να αντιπροσωπεύουν μεταβολές στη σύσταση της ενεργής μικροβιακής κοινότητας στο έδαφος. Τα επίπεδα λιπαρών οξέων των φωσφολιπιδίων μεταβλήθηκαν σημαντικά μετά από την εφαρμογή διάφορων εξωγενών πρακτικών που συνδέονται με την ανθρώπινη δραστηριότητα και τις διάφορες μορφές ρύπανσης των εδαφών (Crecchio et al., 2007; Frostegard et al., 1993; Hinojosa et al., 2005; Widmer et al., 2001). Οι διαφορές που παρατηρούνται στην σύσταση των λιπαρών οξέων των φωσφολιπιδίων, δεν μπορεί να αποδωθούν σε πληθυσμιακές αλλαγές συγκεκριμένο είδος αλλά, σε ομάδες μικροοργανισμών. Αυτό όμως αποτελεί και το πλεονέκτημα της μεθόδου όσον αφορά μια οικολογική προσέγγιση των διαταραχών στο έδαφος, μιας και αποδίδει πιο εύκολα διαταραχές σε λειτουργικές ομάδες ταξινομικά συγγενών μικροοργανισμών

Ενζυμικές δραστηριότητες στο έδαφος και μικροβιακή αναπνοή

Η ποιότητα του εδάφους είναι άμεσα συνυφασμένη με την περιεκτικότητα σε οργανική ουσία και την παρουσία ωφέλιμων μικροοργανισμών. Τα ένζυμα που υπάρχουν στο έδαφος, διαδραματίζουν σημαντικό ρόλο στις διάφορες διεργασίες που πραγματοποιούνται στο έδαφος,

όπως για παράδειγμα η αποδόμηση της οργανικής ουσίας, η ανοργανοποίηση και η ανακύκλωση των διαφόρων θρεπτικών στοιχείων σε αυτό, ενώ έχουν χρησιμοποιηθεί για την αξιολόγηση της επίδρασης διαφόρων δραστηριοτήτων ανθρωπογενούς προέλευσης στην ποιότητα των εδαφών (Dick, 1997). Οι ενζυμικές δραστηριότητες μπορεί να χρησιμοποιηθούν για την αξιολόγηση της παραγωγικότητας των καλλιεργειών, της ανακύκλωσης των θρεπτικών στοιχείων και την βελτίωση των φυσικοχημικών χαρακτηριστικών του εδάφους, ειδικότερα σε εδάφη όπου εφαρμόζονται πολυετή συστήματα αμειψισποράς, διάφορα συστήματα κατεργασίας του εδάφους και ενσωμάτωση στο έδαφος οργανικών υπολειμμάτων (Dick et al., 1988; Jordan et al., 1995; Martens et al., 1992).

Ένας από τους σημαντικότερους περιορισμούς του προσδιορισμού της ενζυμικής δραστηριότητας στα εδάφη, είναι ότι τα αποτελέσματα της δεν απεικονίζουν την πραγματική μικροβιακή δραστηριότητα του εδάφους. Επιπρόσθετα, τα αποτελέσματα ενδέχεται να αφορούν ενζυμική δράση που οφείλεται σε ένζυμα που είναι προσροφημένα στην οργανική ουσία του εδάφους ή στα κolloειδή της αργίλου. Επίσης η ενζυμική δραστηριότητα στο έδαφος μπορεί να σχετίζεται με ενεργά κύτταρα (φυτικής, ζωικής, μικροβιολογικής προέλευσης), νεκρά κύτταρα, κυτταρικά τμήματα που σχηματίζουν σύμπλοκα με τα ορυκτά της αργίλου και χουμικές ενώσεις (Burns, 1982). Έτσι οι (Visser and Parkinson, 1992) αμφισβήτησαν την καταλληλότητα των τεχνικών μέτρησης την ενζυμικής δραστηριότητας για την εκτίμηση της μικροβιακής δραστηριότητας και της ποιότητας των εδαφών, με εξαίρεση της ενζυμική δράση της αφυδρογονάσης λόγω του ότι οι ιδιότητες του ενζύμου αυτού είναι τέτοιες που είναι απίθανο να βρίσκεται στο έδαφος σε εξωκυτταρική μορφή (Skujins, 1978).

Ο Kandeler και συνεργάτες (1996) εισηγήθηκαν ότι η μελέτη της διαφόρων ενζύμων και οι σχετιζόμενες με αυτά δράσεις, αποτελούν μια αποτελεσματική προσέγγιση για την εξέταση της ενεργής μικροβιακής κοινότητας. Επιπρόσθετα η ανταπόκρισή τους σε διάφορες περιβαλλοντικές συνθήκες τα καθιστά δείκτες σχετικά με την ποιότητα των εδαφών (Dick, 1994; Kandeler et al., 1996). Ο ρυθμός υδρόλυσης του fluorescein diacetate στο έδαφος χρησιμοποιείται ως δείκτης για την μικροβιακή δραστηριότητα στο έδαφος, λόγω του ότι η υδρόλυσή του πραγματοποιείται από ζωντανά κύτταρα και από διάφορα ευρέως παραγόμενα ένζυμα συμπεριλαμβανομένων των λιπασών, πρωτεασών και εστερασών (Adam and Duncan, 2001). Συγκεκριμένα οι εστέρες του fluorescein δεν είναι πολικά μόρια και μεταφέρονται στο εσωτερικό των κυττάρων διαμέσου των κυτταρικών μεμβρανών, σε αντίθεση με το προϊόν υδρόλυσής τους που είναι πολικά μόρια και παραμένουν στο εσωτερικό των κυττάρων (Schnurer and Rosswall, 1982). Έτσι η μέθοδος μπορεί να χρησιμοποιηθεί για την αξιολόγηση της ενεργής μικροβιακής κοινότητας στο έδαφος.

Η παραγωγή στο έδαφος διοξειδίου του άνθρακα λόγω της δραστηριότητας των μικροοργανισμών αποτελεί μια από τις παλαιότερες μεθόδους αξιολόγησης της μικροβιακής κοινότητας στο έδαφος (Nannipieri et al., 1990; Nannipieri et al., 2003). Η εφαρμογή στο έδαφος διαφόρων μεταχειρίσεων, που μεταβάλλουν ή επηρεάζουν τη λειτουργία της μικροβιακής

κοινότητας του εδάφους, μπορεί να αξιολογηθεί με τη μέτρηση της εδαφικής αναπνοής (παραγωγή διαξειδίου του άνθρακα ή κατανάλωση οξυγόνου), ωστόσο ακριβέστερες μετρήσεις επιτυγχάνονται με τη μέτρηση σημασμένου άνθρακα ^{14}C (Shen and Bartha, 1996). Επιπρόσθετα, η μικροβιακή αναπνοή στο έδαφος χρησιμοποιήθηκε στο παρελθόν για την αξιολόγηση της μικροβιακής κοινότητας στο έδαφος μετά από ρύπανση από βαρέα μέταλλα (Landi et al., 2000; Nordgren et al., 1988), και, σε συνδυασμό με την χρήση εκλεκτικών αντιβιοτικών, για την διερεύνηση της συμμετοχής των διαφόρων μικροοργανισμών στο κύκλο του αζώτου στο έδαφος (Landi et al., 1993).

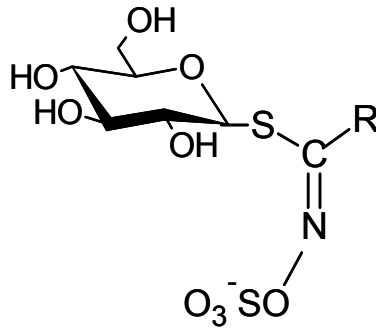
Στόχος της παρούσας Διατριβής

Η παρούσα διατριβή είχε ως κύριο στόχο την μελέτη της επίδρασης της αζωτούχου και θειικής λίπανσης στη περιεκτικότητα των ιστών ρόκας και μπρόκολου σε γλυκοσινολικά οξέα και ακολούθως τη διερεύνηση της επίδρασης της ενσωμάτωσης των υπολειμμάτων του μπρόκολου στην μικροβιακή κοινότητα του εδάφους.

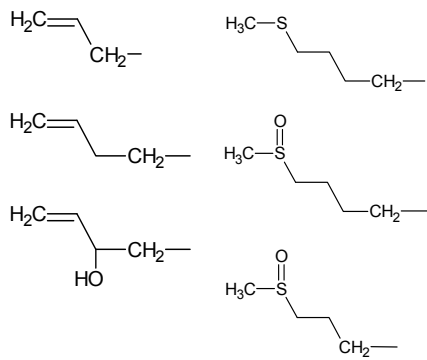
Στην παρούσα διατριβή, τέθηκαν επίσης οι παρακάτω συμπληρωματικοί επιμέρους στόχοι:

1. Η σύγκριση των διαφόρων ποικιλιών των καλλιεργούμενων Σταυρανθών όσον αφορά την περιεκτικότητά τους σε ΓΚΣ.
2. Ο καθορισμός κρίσιμων επιπέδων συγκέντρωσης νιτρικού αζώτου στους μίσχους φύλλων ρόκας και μπρόκολου για την μέγιστη σχετική παραγωγή και η διερεύνηση της σχέσης μεταξύ της αζωτούχου λίπανσης, της συγκέντρωσης των ΓΚΣ και του ποσοστού ενσωμάτωσης του θείου σε αυτά.
3. Η μελέτη της πορείας διάσπασης των ΓΚΣ στο έδαφος και η διερεύνηση της συμμετοχής της μικροβιακής κοινότητας σε αυτή τη διαδικασία.

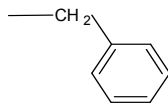
Εικόνα 1 Η βασική δομή των γλυκοσινολικών οξέων και οι τρεις κατηγορίες ανάλογα με την πλευρική αλυσίδα (R) του μορίου.



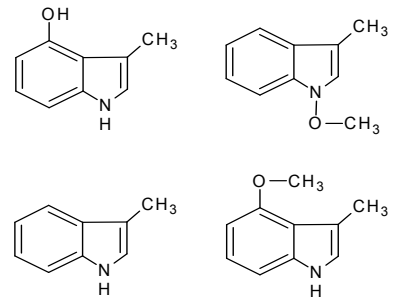
Αλειφατικά



Αρωματικά

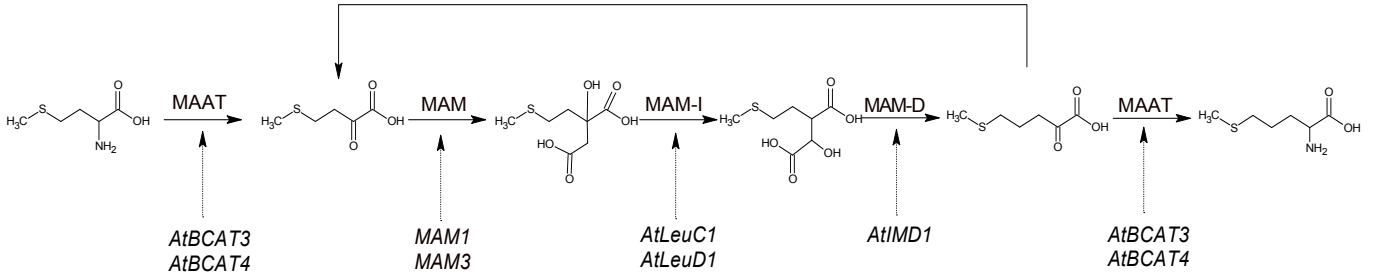


Ινδολικά

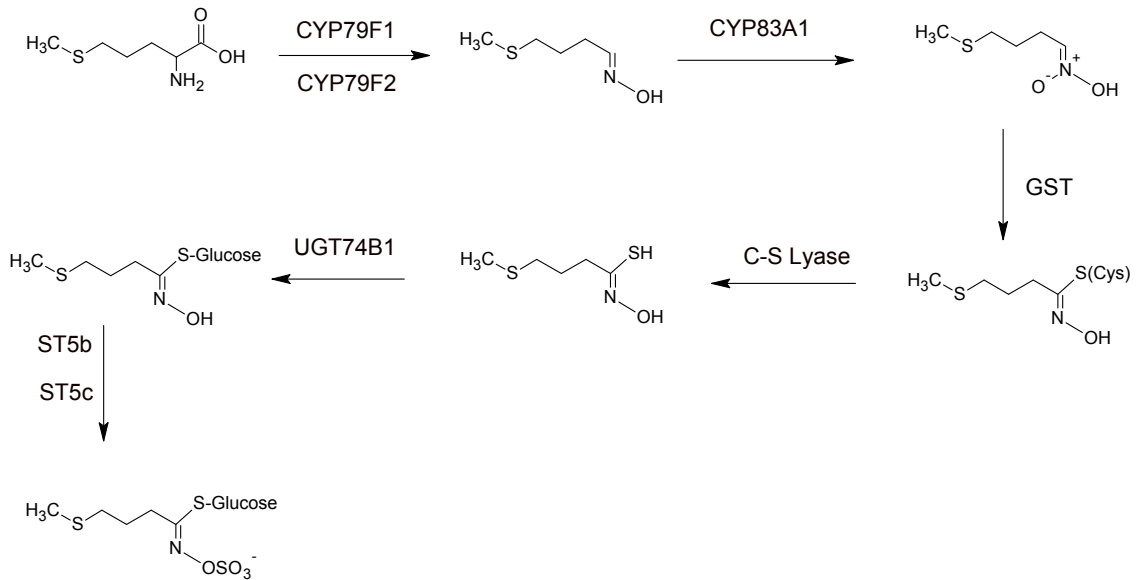


Εικόνα 2. Βιοσύνθεση και καταβολισμός αλειφατικών Γλυκοσινολικών οξέων

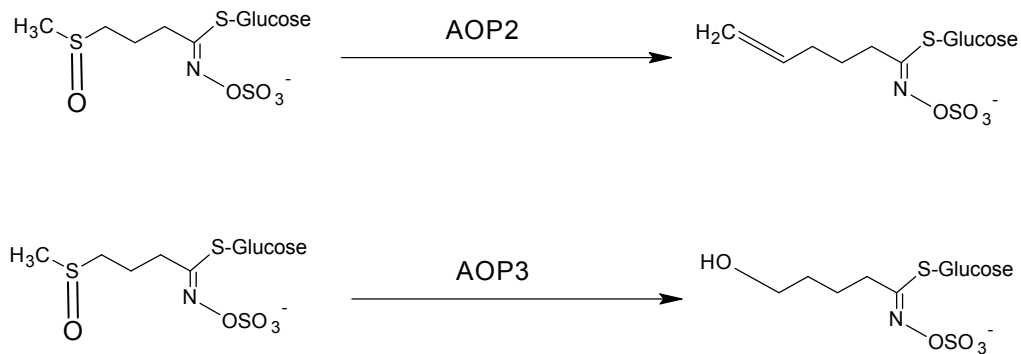
A. Στάδιο: Επιμήκυνση πλευρικής αλυσίδας Μεθειονίνης



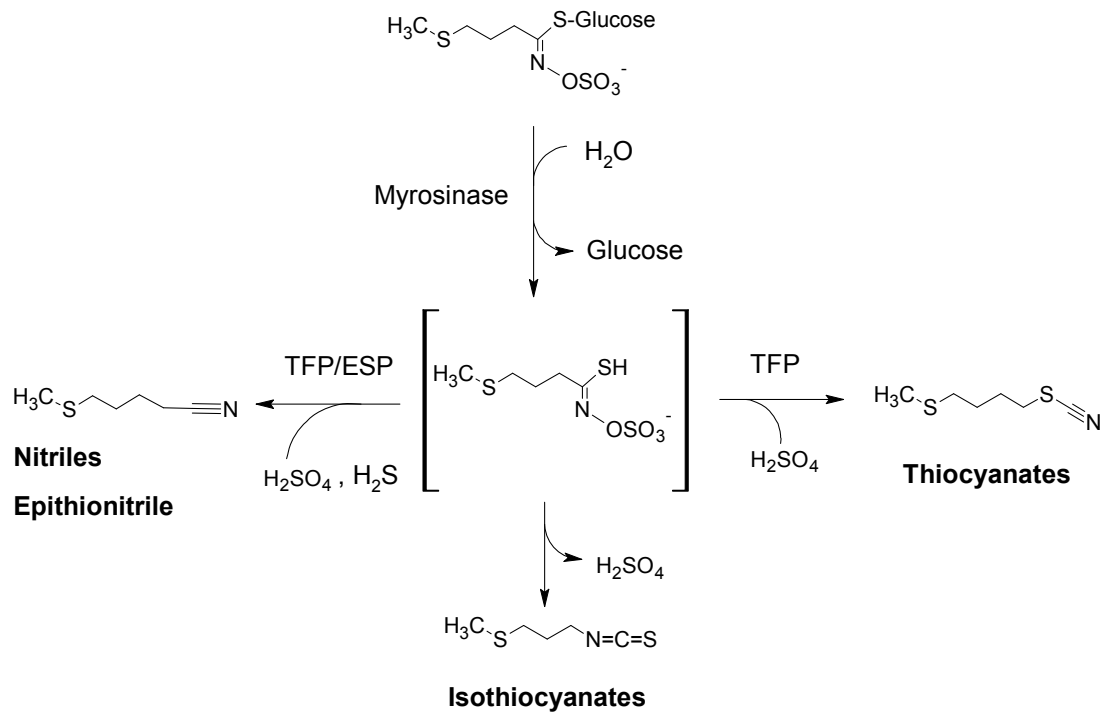
B. Στάδιο: Δημιουργία Βασικής δομής



Γ Στάδιο: Τροποποίηση Πλευρικής Αλυσίδας



Εικόνα 3. Καταβολισμός αλειφατικών Γλυκοσινολικών οξέων:



Βιβλιογραφία

- Adam, G., and H. Duncan. 2001. Development of a sensitive and rapid method for the measurement of total microbial activity using fluorescein diacetate (FDA) in a range of soils. *Soil Biology and Biochemistry* 33:943-951.
- Agerbirk, N., C.E. Olsen, and H. Sorensen. 1998. Initial and final products, nitriles, and ascorbigens produced in myrosinase-catalyzed hydrolysis of indole glucosinolates. *Journal of Agricultural and Food Chemistry* 46:1563-1571.
- Agrawal, A.A., and N.S. Kurashige. 2003. A role for isothiocyanates in plant resistance against the specialist herbivore *Pieris rapae*. *Journal of Chemical Ecology* 29:1403-1415.
- Bak, S., and R. Feyereisen. 2001. The involvement of two P450 enzymes, CYP83B1 and CYP83A1, in auxin homeostasis and glucosinolate biosynthesis. *Plant Physiology* 127:108-118.
- Bak, S., F.E. Tax, K.A. Feldmann, D.W. Galbraith, and R. Feyereisen. 2001. CYP83B1, a cytochrome P450 at the metabolic branch point in auxin and indole glucosinolate biosynthesis in *Arabidopsis*. *Plant Cell* 13:101-111.
- Bellostas, N., J.C. Sorensen, and H. Sorensen. 2007a. Profiling glucosinolates in vegetative and reproductive tissues of four Brassica species of the U-triangle for their biofumigation potential. *Journal of the Science of Food and Agriculture* 87:1586-1594.
- Bellostas, N., P. Kachlicki, J.C. Sorensen, and H. Sorensen. 2007b. Glucosinolate profiling of seeds and sprouts of B-oleracea varieties used for food. *Scientia Horticulturae* 114:234-242.
- Bending, G.D., and S.D. Lincoln. 1999. Characterisation of volatile sulphur-containing compounds produced during decomposition of Brassica juncea tissues in soil. *Soil Biology and Biochemistry* 31:695-703.
- Biederbeck, V.O., R.P. Zentner, and C.A. Campbell. 2005. Soil microbial populations and activities as influenced by legume green fallow in a semiarid climate. *Soil Biology and Biochemistry* 37:1775-1784.
- Bones, A.M., and J.T. Rossiter. 2006. The enzymic and chemically induced decomposition of glucosinolates. *Phytochemistry* 67:1053-1067.
- Bowles, D., J. Isayenkova, E.K. Lim, and B. Poppenberger. 2005. Glycosyltransferases: managers of small molecules. *Current Opinion in Plant Biology* 8:254-263.
- Brown, P.D., and M.J. Morra. 1997. Control of soil-borne plant pests using glucosinolate-containing plants, p. 167-231 *Advances in Agronomy*, Vol 61, Vol. 61.
- Brudenell, A.J.P., H. Griffiths, J.T. Rossiter, and D.A. Baker. 1999. The phloem mobility of glucosinolates. *Journal of Experimental Botany* 50:745-756.

- Burns, R.G. 1982. Enzyme activity in soil: location and a possible role in microbial activity. *Soil Biology and Biochemistry* 14:423-427.
- Burow, M., R. Muller, J. Gershenzon, and U. Wittstock. 2006. Altered glucosinolate hydrolysis in genetically engineered *Arabidopsis thaliana* and its influence on the larval development of *Spodoptera littoralis*. *Journal of Chemical Ecology* 32:2333-2349.
- Buskov, S., B. Serra, E. Rosa, H. Sorensen, and J.C. Sorensen. 2002. Effects of intact glucosinolates and products produced from glucosinolates in myrosinase-catalyzed hydrolysis on the potato cyst nematode (*Globodera rostochiensis* cv. Woll). *Journal of Agricultural and Food Chemistry* 50:690-695.
- Charron, C.S., A.M. Saxton, and C.E. Sams. 2005. Relationship of climate and genotype to seasonal variation in the glucosinolate-myrosinase system. I. Glucosinolate content in ten cultivars of *Brassica oleracea* grown in fall and spring seasons. *Journal of the Science of Food and Agriculture* 85:671-681.
- Chen, X.-j., Z.-j. Zhu, X.-l. Ni, and Q.-q. Qian. 2006. Effect of Nitrogen and Sulfur Supply on Glucosinolates in *Brassica campestris* ssp. *chinensis*. *Agricultural Sciences in China* 5:603-608.
- Clegg, C.D., K. Ritz, and B.S. Griffiths. 1997. Direct extraction of microbial community DNA from humified upland soils. *Letters in Applied Microbiology* 25:30-33.
- Clossaisbesnard, N., and F. Larher. 1991. Physiological-Role of Glucosinolates in *Brassica-Napus* - Concentration and Distribution Pattern of Glucosinolates among Plant Organs During a Complete Life-Cycle. *Journal of the Science of Food and Agriculture* 56:25-38.
- Coleman, D.C., and W.B. Whitman. 2005. Linking species richness, biodiversity and ecosystem function in soil systems. *Pedobiologia* 49:479-497.
- Crecchio, C., M. Curci, A. Pellegrino, P. Ricciuti, N. Tursi, and P. Ruggiero. 2007. Soil microbial dynamics and genetic diversity in soil under monoculture wheat grown in different long-term management systems. *Soil Biology and Biochemistry* 39:1391-1400.
- Cullen, D.W., and P.R. Hirsch. 1998. Simple and rapid method for direct extraction of microbial DNA from soil for PCR. *Soil Biology and Biochemistry* 30:983-993.
- Dick, R.P. 1994. Soil enzyme activity as indicators of soil quality., p. 107-124, *In* J. W. Doran, et al., eds. *Defining Soil Quality for a Sustainable Environment*. Soil Science Society of America, Wisconsin.
- Dick, R.P. 1997. Soil enzyme activities as integrative indicators of soil health., p. 121-156, *In* C. E. Pankhurst, et al., eds. *Biological Indicators of Soil Health*. CAB International, Oxford, UK.
- Dick, R.P., P.E. Rasmussen, and E.A. Kerle. 1988. Influence of Long-Term Residue Management on Soil Enzyme-Activities in Relation to Soil Chemical-Properties of a Wheat-Fallow System. *Biology and Fertility of Soils* 6:159-164.

- Duineveld, B.M., G.A. Kowalchuk, A. Keijzer, J.D. van Elsas, and J.A. van Veen. 2001. Analysis of bacterial communities in the rhizosphere of chrysanthemum via denaturing gradient gel electrophoresis of PCR-amplified 16S rRNA as well as DNA fragments coding for 16S rRNA. *Applied and Environmental Microbiology* 67:172-178.
- Ettlinger, M.G., and A.J. Lundeen. 1956. The structures of sinigrin and sinalbin: an enzymatic rearrangement. *Journal of the American Chemical Society* 78:4172-4173.
- Fahey, J.W., Y.S. Zhang, and P. Talalay. 1997. Broccoli sprouts: An exceptionally rich source of inducers of enzymes that protect against chemical carcinogens. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 94:10367-10372.
- Fahey, J.W., A.T. Zalcmann, and P. Talalay. 2001. The chemical diversity and distribution of glucosinolates and isothiocyanates among plants. *Phytochemistry* 56:5-51.
- Falk, K.L., J.G. Tokuhisa, and J. Gershenzon. 2007. The effect of sulfur nutrition on plant glucosinolate content: physiology and molecular mechanisms. *Plant Biology* 9:573-581.
- Falk, K.L., C. Vogel, S. Textor, S. Bartram, A. Hick, J.A. Pickett, and J. Gershenzon. 2004. Glucosinolate biosynthesis: demonstration and characterization of the condensing enzyme of the chain elongation cycle in *Eruca sativa*. *Phytochemistry* 65:1073-1084.
- Ferris, M.J., and D.M. Ward. 1997. Seasonal distributions of dominant 16S rRNA defined populations in a hot spring microbial mat examined by denaturing gradient gel electrophoresis. *Applied and Environmental Microbiology* 63:1375-1381.
- Field, B., G. Cardon, M. Traka, J. Botterman, G. Vancanneyt, and R. Mithen. 2004. Glucosinolate and amino acid biosynthesis in *Arabidopsis*. *Plant Physiology* 135:828-839.
- Frostegard, A., A. Tunlid, and E. Baath. 1993. Phospholipid Fatty-Acid Composition, Biomass, and Activity of Microbial Communities from 2 Soil Types Experimentally Exposed to Different Heavy-Metals. *Applied and Environmental Microbiology* 59:3605-3617.
- Frostegård, A., and E. Bååth. 1996. The use of phospholipid fatty acid analysis to estimate bacterial and fungal biomass in soil. *Biology and Fertility of Soils* 22:59-65.
- Frostegård, A., S. Courtois, V. Ramišse, S. Clerc, D. Bernillon, F. Le Gall, P. Jeannin, X. Nesme, and P. Simonet. 1999. Quantification of bias related to the extraction of DNA directly from soils. *Applied Environmental Microbiology* 65:5409-5420.
- Gadamer, J. 1897. Uber das Sinigrin. *Berichte Deutschen Chemischen Gesselschaft* 30:2322-2327.
- Gao, M.Q., G.Y. Li, B. Yang, W.R. McCombie, and C.F. Quiros. 2004. Comparative analysis of a Brassica BAC clone containing several major aliphatic glucosinolate genes with its corresponding *Arabidopsis* sequence. *Genome* 47:666-679.
- Gelsomino, A., A.C. Keyzer-Wolters, G. Cacco, and J.D. van Elsas. 1999. Assessment of bacterial community structure in soil by polymerase chain reaction and denaturing gradient gel electrophoresis. *Journal of Microbiological Methods* 38:1-15.

- Gil, V., and A.J.T. Macleod. 1980. The effects of pH on glucosinolate degradation by a thioglucoside glucohydrolase preparation. *Phytochemistry* 19:2547-2551.
- Gimsing, A.L., and J.A. Kirkegaard. 2006. Glucosinolate and isothiocyanate concentration in soil following incorporation of Brassica biofumigants. *Soil Biology and Biochemistry* 38:2255-2264.
- Gimsing, A.L., J.C. Sorensen, B.W. Strobel, and H.C.B. Hansen. 2007. Adsorption of glucosinolates to metal oxides, clay minerals and humic acid. *Applied Clay Science* 35:212-217.
- Glawischnig, E., B.G. Hansen, C.E. Olsen, and B.A. Halkier. 2004. Camalexin is synthesized from indole-3-acetaldoxime, a key branching point between primary and secondary metabolism in *Arabidopsis*. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 101:8245-8250.
- Gmelin, R., and A.I. Virtanen. 1959. New type of enzymic cleavage of mustard oil glucosides. Formation of allyl thiocyanate in *Thlaspi arvense* and benzyl thiocyanate in *Lepidium ruderale* and *L. sativum*. *Acta Chemica Scandinavica* 13:1474-1475.
- Graser, G., B. Schneider, N.J. Oldham, and J. Gershenzon. 2000. The methionine chain elongation pathway in the biosynthesis of glucosinolates in *Eruca sativa* (Brassicaceae). *Archives of Biochemistry and Biophysics* 378:411-419.
- Graser, G., N.J. Oldham, P.D. Brown, U. Temp, U. Temp, and J. Gershenzon. 2001. The biosynthesis of benzoic acid glucosinolate esters in *Arabidopsis thaliana*. *Phytochemistry* 57:23-32.
- Gremion, F., A. Chatzinotas, and H. Harms. 2003. Comparative 16S rDNA and rRNA sequence analysis indicates that Actinobacteria might be a dominant part of the metabolically active bacteria in heavy metal-contaminated bulk and rhizosphere soil. *Environmental Microbiology* 5:896-907.
- Grubb, C.D., and S. Abel. 2006. Glucosinolate metabolism and its control. *Trends in Plant Science* 11:89-100.
- Hansen, B., and B. Halkier. 2005. New insight into the biosynthesis and regulation of indole compounds in *Arabidopsis thaliana*. *Planta* 221:603-606.
- Hansen, C.H., L.C. Du, P. Naur, C.E. Olsen, K.B. Axelsen, A.J. Hick, J.A. Pickett, and B.A. Halkier. 2001. CYP83B1 is the oxime-metabolizing enzyme in the glucosinolate pathway in *Arabidopsis*. *Journal of Biological Chemistry* 276:24790-24796.
- Hemm, M.R., M.O. Ruegger, and C. Chapple. 2003. The *Arabidopsis* ref2 mutant is defective in the gene encoding CYP83A1 and shows both phenylpropanoid and glucosinolate phenotypes. *Plant Cell* 15:179-194.

- Higdon, J.V., B. Delage, D.E. Williams, and R.H. Dashwood. 2007. Cruciferous vegetables and human cancer risk: epidemiologic evidence and mechanistic basis. *Pharmacological Research* 55:224-236.
- Hinojosa, M.B., J.A. Carreira, R. Garcia-Ruiz, and R.P. Dick. 2005. Microbial response to heavy metal-polluted soils: Community analysis from phospholipid-linked fatty acids and ester-linked fatty acids extracts. *Journal of Environmental Quality* 34:1789-1800.
- Jensen, C.R., V.O. Mogensen, G. Mortensen, J.K. Fieldsend, G.F.J. Milford, M.N. Andersen, and J.H. Thage. 1996. Seed glucosinolate, oil and protein contents of field-grown rape (*Brassica napus* L) affected by soil drying and evaporative demand. *Field Crops Research* 47:93-105.
- Jordan, D., R.J. Kremer, W.A. Bergfield, K.Y. Kim, and V.N. Cacnio. 1995. Evaluation of Microbial Methods as Potential Indicators of Soil Quality in Historical Agricultural Fields. *Biology and Fertility of Soils* 19:297-302.
- Josefsson, E. 1970. Glucosinolate content and amino acid composition of rapeseed (*Brassica napus*) meal as affected by sulphur and nitrogen nutrition. *Journal of the Science of Food and Agriculture* 21:98-103.
- Kandeler, E., C. Kampichler, and O. Horak. 1996. Influence of heavy metals on the functional diversity of soil microbial communities. *Biology and Fertility of Soils* 23:299-306.
- Kirkegaard, J.A., and M. Sarwar. 1998. Biofumigation potential of brassicas - I. Variation in glucosinolate profiles of diverse field-grown brassicas. *Plant and Soil* 201:71-89.
- Kirkegaard, J.A., M. Sarwar, P.T.W. Wong, A. Mead, G. Howe, and M. Newell. 2000. Field studies on the biofumigation of take-all by Brassica break crops. *Australian Journal of Agricultural Research* 51:445-456.
- Kliebenstein, D.J., J. Kroymann, and T. Mitchell-Olds. 2005. The glucosinolate-myrosinase system in an ecological and evolutionary context. *Current Opinion in Plant Biology* 8:264-271.
- Kliebenstein, J.D., M.V. Lambrix, M. Reichelt, J. Gershenzon, and T. Mitchell-Olds. 2001. Gene duplication in the diversification of secondary metabolism: tandem 2-oxoglutarate-dependent dioxygenases control glucosinolate biosynthesis in Arabidopsis. *Plant Cell* 13:681-693.
- Kopsell, D.A., T.C. Barickman, C.E. Sams, and J.S. McElroy. 2007. Influence of nitrogen and sulfur on biomass production and carotenoid and glucosinolate concentrations in watercress (*Nasturtium officinale* R. Br.). *Journal of Agricultural and Food Chemistry* 55:10628-10634.
- Kowalchuk, G.A., P.L.E. Bodelier, G.H.J. Heiling, J.R. Stephen, and H.J. Laanbroek. 1998. Community analysis of ammonia-oxidising bacteria, in relation to oxygen availability in

- soils and root-oxygenated sediments, using PCR DGGE and oligonucleotide probe hybridisation. . FEMS Microbiology Ecology 27:339-350.
- Kushad, M.M., A.F. Brown, A.C. Kurilich, J.A. Juvik, B.P. Klein, M.A. Wallig, and E.H. Jeffery. 1999. Variation of glucosinolates in vegetable crops of *Brassica oleracea*. Journal of Agricultural and Food Chemistry 47:1541-1548.
- Landi, L., L. Badalucco, F. Pomare , and P. Nannipieri. 1993. Effectiveness of antibiotics to distinguish the contributions of fungi and bacteria to net nitrogen mineralization, nitrification and respiration. Soil Biology and Biochemistry 25:1771-1778.
- Landi, L., G. Renella, J.L. Moreno, L. Falchini, and P. Nannipieri. 2000. Influence of cadmium on the metabolic quotient, L-: D-glutamic acid respiration ratio and enzyme activity : microbial biomass ratio under laboratory conditions. Biology and Fertility of Soils 32:8-16.
- Li, G., and C.F. Quiros. 2003. In planta side-chain glucosinolate modification in Arabidopsis by introduction of dioxygenase Brassica homolog BoGSL-ALK. Theoretical and Applied Genetics 106:1116-1121.
- Li, S.M., I. Schonhof, A. Krumbein, L. Li, H. Stutzel, and M. Schreiner. 2007. Glucosinolate concentration in turnip (*Brassica rapa ssp rapifera* L.) roots as affected by nitrogen and sulfur supply. Journal of Agricultural and Food Chemistry 55:8452-8457.
- Macnaughton, S.J., J.T. Stephen, A.D. Venosa, G.A. Davis, Y.J. Chang, and D.C. White. 1999. Microbial population changes during bioremediation of an experimental oil spill. Applied Environmental Microbiology 65:3566-3574.
- Mailer, R.J., and P.S. Cornish. 1987. Effects of Water-Stress on Glucosinolate and Oil Concentrations in the Seeds of Rape (*Brassica napus* L) and Turnip Rape (*Brassica rapa* L Var *silvestris* [Lam] Briggs). Australian Journal of Experimental Agriculture 27:707-711.
- Manici, L.M., L. Lazzeri, and S. Palmieri. 1997. In vitro fungitoxic activity of some glucosinolates and their enzyme-derived products toward plant pathogenic fungi. Journal of Agricultural and Food Chemistry 45:2768-2773.
- Marsh, R.E., and J. Waser. 1970. Refinement of the crystal structure of sinigrin. Acta Crystallographica Section B 26:1030-1037.
- Martens, D.A., J.B. Johanson, and Frankenburger J.W. T. 1992. Production and persistence of soil enzymes with repeated additions of organic residues. Soil Science 153:53-61.
- Matthiessen, J.N., and M.A. Shackleton. 2005. Biofumigation: environmental impacts on the biological activity of diverse pure and plant-derived isothiocyanates. Pest Management Science 61:1043-1051.
- Matusheski, N.V., J.A. Juvik, and E.H. Jeffery. 2003. Sulforaphane content and bioactivity of broccoli sprouts are enhanced by heat processing: A role for epithiospecifier protein. ABSTRACTS OF PAPERS OF THE AMERICAN CHEMICAL SOCIETY:A377-A377.

- Matusheski, N.V., J.A. Juvik, and E.H. Jeffery. 2004. Heating decreases epithiospecifier protein activity and increases sulforaphane formation in broccoli. *Phytochemistry* 65:1273-1281.
- Mewis, I., C. Ulrichs, and W.H. Schnitzler. 2002. The role of glucosinolates and their hydrolysis products in oviposition and host-plant finding by cabbage webworm, *Hellula undalis*. *Entomologia Experimentalis Et Applicata* 105:129-139.
- Mikkelsen, M.D., P. Naur, and B.A. Halkier. 2004. Arabidopsis mutants in the C-S lyase of glucosinolate biosynthesis establish a critical role for indole-3-acetaldoxime in auxin homeostasis. *Plant Journal* 37:770-777.
- Mikkelsen, M.D., B.L. Petersen, C.E. Olsen, and B.A. Halkier. 2002. Biosynthesis and metabolic engineering of glucosinolates. *Amino Acids* 22:279-295.
- Miles, C.I., M.L. del Campo, and J.A.A. Renwick. 2005. Behavioral and chemosensory responses to a host recognition cue by larvae of *Pieris rapae*. *Journal of Comparative Physiology a-Neuroethology Sensory Neural and Behavioral Physiology* 191:147-155.
- Miller, D.N., J.E. Bryant, E.L. Madsen, and W.C. Ghiorse. 1999. Evaluation and optimization of DNA extraction and purification procedures for soil and sediment samples. *Applied and Environmental Microbiology* 65:4715-4724.
- Mithen, R.F., M. Dekker, R. Verkerk, S. Rabot, and I.T. Johnson. 2000. The nutritional significance, biosynthesis and bioavailability of glucosinolates in human foods. *Journal of the Science of Food and Agriculture* 80:967-984.
- Morra, M.J., and J.A. Kirkegaard. 2002. Isothiocyanate release from soil-incorporated Brassica tissues. *Soil Biology and Biochemistry* 34:1683-1690.
- Muyzer, G. 1998. Structure, function and dynamics of microbial communities: the molecular biological approach., p. 87-117, *In* G. R. Carvalho, ed. *Advances in Molecular Ecology*. IOS Press.
- Muyzer, G., and K. Smalla. 1998. Application of denaturing gradient gel electrophoresis (DGGE) and temperature gradient gel electrophoresis (TGGE) in microbial ecology. *Antonie van Leeuwenhoek* 73:127-141.
- Muyzer, G., E.C. Dewaal, and A.G. Uitterlinden. 1993. Profiling of Complex Microbial-Populations by Denaturing Gradient Gel-Electrophoresis Analysis of Polymerase Chain Reaction-Amplified Genes-Coding for 16s Ribosomal-Rna. *Applied and Environmental Microbiology* 59:695-700.
- Nannipieri, P., S. Grego, and B. Ceccanti. 1990. Ecological significance of the biological activity in soil, p. 293-355, *In* J. M. Bollag and G. Stotzky, eds. *Soil biochemistry*, Vol. 6. Marcel Dekker, New York.
- Nannipieri, P., J. Ascher, M.T. Ceccherini, L. Landi, G. Pietramellara, and G. Renella. 2003. Microbial diversity and soil functions. *European Journal of Soil Science* 54:655-670.

- Nastruzzi, C., R. Cortesi, E. Esposito, E. Menegatti, O. Leoni, R. Iori, and S. Palmieri. 1996. In vitro cytotoxic activity of some glucosinolate-derived products generated by myrosinase hydrolysis. *Journal of Agricultural and Food Chemistry* 44:1014-1021.
- Naur, P., B.L. Petersen, M.D. Mikkelsen, S. Bak, H. Rasmussen, C.E. Olsen, and B.A. Halkier. 2003. CYP83A1 and CYP83B1, two nonredundant cytochrome P450 enzymes metabolizing oximes in the biosynthesis of glucosinolates in *Arabidopsis*. *Plant Physiology* 133:63-72.
- Nordgren, A., E. Baath, and B.E. Soderstro. 1988. Evaluation of soil respiration characteristics to assess heavy metal effects on soil microorganisms using glutamic acid as a substrate. *Soil Biology and Biochemistry* 20:949-954.
- Noret, N., P. Meerts, R. Tolra, C. Poschenrieder, J. Barcelo, and J. Escarre. 2005. Palatability of *Thlaspi caerulescens* for snails: influence of zinc and glucosinolates. *New Phytologist* 165:763-772.
- Nusslein, K., and J.M. Tiedje. 1998. Characterization of the dominant and rare members of a young Hawaiian soil bacterial community with small-subunit ribosomal DNA amplified from DNA fractionated on the basis of its guanine and cytosine composition. *Applied and Environmental Microbiology* 64:1283-1289.
- Olsen, G.J., D.J. Lane, S.J. Giovannoni, and N.R. Pace. 1986. Microbial ecology and evolution: a ribosomal RNA approach. *Annual Review of Microbiology* 40:337-365.
- Øvreås, L., and V. Torsvik. 1997. Microbial diversity and community structure in two different agricultural soil communities. *Microbial Ecology* 36:303-315.
- Øvreås, L., S. Jensen, F.L. Daae, and V. Torsvik. 1998. Microbial community changes in a perturbed agricultural soil investigated by molecular and physiological approaches. *Applied Environmental Microbiology* 64:2739-2742.
- Pace, N.R., D.A. Stahl, D.J. Lane, and G.J. Olsen. 1986. The analysis of natural microbial populations by ribosomal RNA sequences. *Advances in Microbial Ecology* 9:1-55.
- Pereira, F.M.V., E. Rosa, J.W. Fahey, K.K. Stephenson, R. Carvalho, and A. Aires. 2002. Influence of temperature and ontogeny on the levels of glucosinolates in broccoli (*Brassica oleracea* var. *italica*) sprouts and their effect on the induction of mammalian phase 2 enzymes. *Journal of Agricultural and Food Chemistry* 50:6239-6244.
- Potter, J.M., K. Davies, and A. Rathjen. 1998. Suppressive impact of glucosinolates in *Brassica* vegetative tissues on root lesion nematode *Pratylenchus neglectus*. *Journal of Chemical Ecology* 24:67-80.
- Poulton, J.E., and B.L. Møller. 1993. Glucosinolates., p. 209-237, *In* P. J. Lea, ed. *In Methods in Plant Biochemistry* Vol. 9. Academic Press.

- Prester, T., J.W. Fahey, W.D. Holtzclaw, C. Abeygunawardana, J.L. Kachinski, and P. Talalay. 1996. Comprehensive chromatographic and spectroscopic methods for the separation and identification of intact glucosinolates. *Analytical Biochemistry* 239:168-179.
- Rangkadilok, N., M.E. Nicolas, R.N. Bennett, R.R. Premier, D.R. Eagling, and P.W.J. Taylor. 2002. Developmental changes of sinigrin and glucoraphanin in three Brassica species (*Brassica nigra*, *Brassica juncea* and *Brassica oleracea* var. *italica*). *Scientia Horticulturae* 96:11-26.
- Rangkadilok, N., M.E. Nicolas, R.N. Bennett, D.R. Eagling, R.R. Premier, and P.W.J. Taylor. 2004. The effect of sulfur fertilizer on glucoraphanin levels in broccoli (*B-oleracea* L. var. *italica*) at different growth stages. *Journal of Agricultural and Food Chemistry* 52:2632-2639.
- Rojas, J.C. 1999. Electrophysiological and behavioral responses of the cabbage moth to plant volatiles. *Journal of Chemical Ecology* 25:1867-1883.
- Rosa, E.A.S., R.K. Heaney, C.A.M. Portas, and G.R. Fenwick. 1996. Changes in glucosinolate concentrations in Brassica crops (*B-oleracea* and *B-napus*) throughout growing seasons. *Journal of the Science of Food and Agriculture* 71:237-244.
- Rumberger, A., and P. Marschner. 2003. 2-Phenylethylisothiocyanate concentration and microbial community composition in the rhizosphere of canola. *Soil Biology and Biochemistry* 35:445-452.
- Sandaa, R.A., V. Torsvik, O. Enger, F.L. Dane, T. Castberg, and D. Hahn. 1999. Analysis of bacterial communities in heavy metal-contaminated soils at different levels of resolution. *FEMS Microbiology Ecology* 30:237-251.
- Sarwar, M., J.A. Kirkegaard, P.T.W. Wong, and J.M. Desmarchelier. 1998. Biofumigation potential of brassicas - III. In vitro toxicity of isothiocyanates to soil-borne fungal pathogens. *Plant and Soil* 201:103-112.
- Schluter, M., and R. Gmelin. 1972. Abnormal Enzymatic Splitting of 4-Methylthiobutylglucosinolate in Fresh Plants of *Eruca-Sativa*. *Phytochemistry* 2:3427-&.
- Schnurer, J., and T. Rosswall. 1982. Fluorescein Diacetate Hydrolysis as a Measure of Total Microbial Activity in Soil and Litter. *Applied and Environmental Microbiology* 43:1256-1261.
- Schonhof, I., D. Blankenburg, S. Muller, and A. Krumbein. 2007a. Sulfur and nitrogen supply influence growth, product appearance, and glucosinolate concentration of broccoli. *Journal of Plant Nutrition and Soil Science-Zeitschrift Fur Pflanzenernahrung Und Bodenkunde* 170:65-72.
- Schonhof, I., H.P. Klaring, A. Krumbein, W. Clauen, and M. Schreiner. 2007b. Effect of temperature increase under low radiation conditions on phytochemicals and ascorbic acid in greenhouse grown broccoli. *Agriculture, Ecosystems & Environment* 119:103-111.

- Scott, J.S., and G.R. Knudsen. 1999. Soil amendment effects of rape (*Brassica napus*) residues on pea rhizosphere bacteria. *Soil Biology and Biochemistry* 31:1435-1441.
- Sekiguchi, H., A. Kushida, and S. Takenaka. 2007. Effects of cattle manure and green manure on the microbial community structure in upland soil determined by denaturing gradient gel electrophoresis. *Microbes and Environments* 22:327-335.
- Shattuck, V.I., Y. Kakuda, B.J. Shelp, and N. Kakuda. 1991. Chemical-Composition of Turnip Roots Stored or Intermittently Grown at Low-Temperature. *Journal of the American Society for Horticultural Science* 116:818-822.
- Shen, J., and R. Bartha. 1996. Priming effect of substrate addition in soil-based biodegradation tests. *Applied and Environmental Microbiology* 62:1428-1430.
- Siemens, D.H., and T. Mitchell-Olds. 1996. Glucosinolates and herbivory by specialists (Coleoptera: Chrysomelidae, Lepidoptera: Plutellidae): Consequences of concentration and induced resistance. *Environmental Entomology* 25:1344-1353.
- Skujins, J. 1978. History of abiotic soil enzyme research., p. 1-49, *In* R. G. Burns, ed. *Soil Enzymes*. Academic Press, New York.
- Smith, B.J., and a.J.A. Kirkegaard. 2002. In vitro inhibition of soil microorganisms by 2-phenylethyl isothiocyanate. *Plant Pathology* 51:585-593.
- Stark, C., L.M. Condon, A. Stewart, H.J. Di, and M. O'Callaghan. 2007. Influence of organic and mineral amendments on microbial soil properties and processes. *Applied Soil Ecology* 35:79-93.
- Stark, C.H., L.M. Condon, M. O'Callaghan, A. Stewart, and H.J. Di. 2008. Differences in soil enzyme activities, microbial community structure and short-term nitrogen mineralisation resulting from farm management history and organic matter amendments. *Soil Biology and Biochemistry* 40:1352-1363.
- Textor, S., S. Bartram, J. Kroymann, K.L. Falk, A. Hick, J.A. Pickett, and J. Gershenzon. 2004. Biosynthesis of methionine-derived glucosinolates in *Arabidopsis thaliana*: recombinant expression and characterization of methylthioalkylmalate synthase, the condensing enzyme of the chain-elongation cycle. *Planta* 218:1026-1035.
- Tookey, H.L. 1973. Crambe thioglucosidase – separation of a protein required for epithiobutane formation. *Abstracts of Papers of the American Chemical Society*:231.
- Torsvik, V., F.L. Daae, R.A. Sandaa, and L. Ovreas. 1998. Novel techniques for analysing microbial diversity in natural and perturbed environments. *Journal of Biotechnology* 64:53-62.
- Trevors, J.T., and J.D. van Elsas. 1995. *Nucleic Acids in the Environment: Methods and Applications* Springer-Verlag, Heidelberg.
- Vallejo, F., F.A. Tomas-Barberan, A.G. Benavente-Garcia, and C. Garcia-Viguera. 2003. Total and individual glucosinolate contents in inflorescences of eight broccoli cultivars grown

- under various climatic and fertilisation conditions. *Journal of the Science of Food and Agriculture* 83:307-313.
- van Elsas, J.D., G.E. Duarte, A.S. Rosado, and K. Smalla. 1998. Microbiological and molecular methods for monitoring microbial inoculants and their effects in the environment. *Journal of Microbiological Methods* 32:133-154.
- van Elsas, J.D., V. Mantynen, and A.C. Wolters. 1997. Soil DNA extraction and assessment of the fate of *Mycobacterium chlorophenicum* strain PCP-1 in different soils by 16S ribosomal RNA gene sequence based most-probable-number PCR and immunofluorescence. *Biology and Fertility of Soils* 24:188-195.
- VanEtten, C.H., M.E. Daxenbichler, J.E. Peters, and H.L. Tookey. 1966. Variation in enzymatic degradation products from the major thioglucosides in *Crambe abyssinica* and *Brassica napus* seed meals. *Journal of Agricultural and Food Chemistry* 14:426-430.
- Visser, S., and D. Parkinson. 1992. Soil biological criteria as indicators of soil quality: soil microorganisms. *American Journal of Alternative Agriculture* 7:33-37.
- Wagner, R. 1994. The regulation of ribosomal RNA synthesis and bacterial cell growth. *Archives of Microbiology* 161:100-106.
- Watson, C.A., H. Bengtsson, M. Ebbesvik, A.-K. Lùes, A. Myrbeck, E. Salomon, J. Schroder, and E.A. Stockdale. 2002. A review of farm-scale nutrient budgets for organic farms as a tool for management of soil fertility. *Soil Use and Management* 18:264-273.
- Widmer, F., A. Fließbach, E. Laczko, J. Schulze-Aurich, and J. Zeyer. 2001. Assessing soil biological characteristics: a comparison of bulk soil community DNA-, PLFA-, and Biolog(TM)-analyses. *Soil Biology and Biochemistry* 33:1029-1036.
- Wilkinson, A.P., M.J.C. Rhodes, and R.G. Fenwick. 1984. Myrosinase Activity of Cruciferous Vegetables. *Journal of the Science of Food and Agriculture* 35:543-552.
- Wittstock, U., and B.A. Halkier. 2002. Glucosinolate research in the Arabidopsis era. *Trends in Plant Science* 7:263-270.
- Yang, C.H., and D.E. Crowley. 2000. Rhizosphere microbial community structure in relation to root location and plant iron nutritional status. *Applied Environmental Microbiology* 66:345-351.
- Yulianti, T., K. Sivasithamparam, and D.W. Turner. 2006. Saprophytic growth of *Rhizoctonia solani* Kuhn AG2-1 (ZG5) in soil amended with fresh green manures affects the severity of damping-off in canola. *Soil Biology and Biochemistry* 38:923-930.
- Zabala, M.D., M. Grant, A.M. Bones, R. Bennett, Y.S. Lim, R. Kissen, and J.T. Rossiter. 2005. Characterisation of recombinant epithiospecifier protein and its over-expression in *Arabidopsis thaliana*. *Phytochemistry* 66:859-867.

- Zelles, L. 1999. Fatty acid patterns of phospholipids and lipopolysaccharides in the characterisation of microbial communities in soil: a review. *Biology and Fertility of Soils* 29:111-129.
- Zhao, F.J., E.J. Evans, P.E. Bilsborrow, and J.K. Syers. 1993. Influence of Sulfur and Nitrogen on Seed Yield and Quality of Low Glucosinolate Oilseed Rape (*Brassica-Napus* L). *Journal of the Science of Food and Agriculture* 63:29-37.
- Zsolnai, T. 1966. Die antimikrobielle wirkung von thiocyanaten und isothiocyanten (Antimicrobial effect of thiocyanates and isothiocyantes). *Arzneim. Forschung*. 16:870-876.

ΚΕΦΑΛΑΙΟ 2^ο ΓΕΝΙΚΑ ΥΛΙΚΑ ΚΑΙ ΜΕΘΟΔΟΙ

ΕΠΕΞΕΡΓΑΣΙΑ ΔΕΙΓΜΑΤΩΝ ΚΑΙ ΑΝΑΛΥΤΙΚΕΣ ΜΕΘΟΔΟΙ ΠΟΥ ΕΦΑΡΜΟΣΤΗΚΑΝ ΣΤΗΝ ΠΑΡΟΥΣΑ ΔΙΑΤΡΙΒΗ

1. Επεξεργασία Δειγμάτων

Φυτικοί Ιστοί

Στο τέλος της καλλιεργητικής περιόδου και στην περίοδο της φυσιολογικής ωρίμανσης των βρώσιμων τμημάτων όλων των φυτικών ειδών που εξετάστηκαν, πραγματοποιήθηκε η δειγματοληψία των φυτικών ιστών για να αναλυθούν ως προς την περιεκτικότητά τους σε N, S και ΓΚΣ. Συγκεκριμένα από κάθε μεταχείριση, συλλέγονταν ολόκληρα τα φυτά και τυχαία απομακρύνονταν 15 πλήρως ανεπτυγμένα φύλλα (ίδιου μεγέθους), χωρίς προσβολές και μηχανικούς τραυματισμούς. Τα φύλλα τοποθετούνταν αμέσως σε δοχεία πολυστερίνης με ξηρό πάγο μέχρι τη μεταφορά τους στο εργαστήριο.

Όσον αφορά τις ρίζες, το ριζικό σύστημα απομακρυνόταν από το υπέργειο τμήμα και υγιή τμήμα ριζικού συστήματος από όλα τα φυτά της κάθε μεταχείρισης αναμιγνύονταν σε πλαστικές σακούλες και τοποθετούνταν σε ξηρό πάγο μέχρι τη μεταφορά τους στο εργαστήριο. Όσον αφορά τα βρώσιμα τμήματα των ειδών που εξετάστηκαν, συλλέγονταν από κάθε μεταχείριση 5 ανθοκεφάλες (μπρόκολο ή κουνουπίδι) ή και κεφαλές (λάχανο), χωρίς προσβολές, οι οποίες είχαν το ίδιο μέγεθος. Ακολούθως 50g από κάθε ανθοκεφαλή, τοποθετούνταν σε κοινό πλαστικό σακουλάκι και αμέσως σε ξηρό πάγο μέχρι τη μεταφορά τους στο εργαστήριο. Μετά τη μεταφορά τους στο εργαστήριο όλοι οι φυτικοί ιστοί λειοτριβήθηκαν με τη χρήση υγρού αζώτου, λειοφιλοποιήθηκαν και αποθηκεύθηκαν στους -20°C μέχρι την ανάλυση τους.

Για τον προσδιορισμό του ξηρού βάρους τυχαία δείγματα από κάθε μεταχείριση (n=10) τοποθετούνταν σε φούρνο ξήρανσης στους 105°C για 5 ώρες. Το ξηρό βάρος υπολογίστηκε αφαιρώντας το βάρος πριν την ξήρανση από αυτό μετά την ξήρανση.

2. Προσδιορισμός γλυκοσινολικών οξέων

Ο προσδιορισμός των γλυκοσινολικών οξέων (ΓΚΣ) πραγματοποιήθηκε σύμφωνα με τη διαπιστευμένη μέθοδο ISO-9167, με κάποιες τροποποιήσεις (Barillari et al., 2005; Bennett et al., 2002; Omirou et al., 2009). Η αρχή της μεθόδου στηρίζεται στην εκχύλιση και παραλαβή των ΓΚΣ από τους φυτικούς ιστούς ή το έδαφος και στην αποθείωση των μεμονωμένων ΓΚΣ σε στήλες ιοντοανταλλακτικής ρητίνης. Ο διαχωρισμός και η ποσοτικοποίηση των μεμονωμένων αποθειωμένων ΓΚΣ πραγματοποιήθηκε με υγρή χρωματογραφία υψηλής απόδοσης (HPLC).

Χημικά αντιδραστήρια

Χρησιμοποιήθηκε ένα αλειφατικό ΓΚΣ η σινιγκρίνη (2-propenyl glucosinolate) και ένα αρωματικό ΓΚΣ (benzyl glucosinolate, γλουκοτροπαεολίνη) καθαρότητας >95%, MeOH και

ACN (Merck, HPLC grade), δις-απεσταγμένο νερό, ιοντοανταλλακτική ρητίνη DEAE-Sephadex A-25 (Sigma-Aldrich, Germany) ενεργοποιημένη με ρυθμιστικό διάλυμα οξικού οξέος 25mM pH, 5.6. Σουλφατάση *Helix pomatia* type H1 (Sigma-Aldrich, Germany) δραστηριότητας >0.3 U. Οι καθαρές μορφές ΓΚΣ παραχωρήθηκαν από τον Dr Renato Iori (ISCI/CRA, Bologna Italy).

Εκχύλιση και παραλαβή ΓΚΣ από φυτικούς ιστούς

Σε σωλήνα πολυπροπυλενίου ζυγίζονταν 200mg λυοφιλοποιημένου δείγματος στα οποία προσθέταμε 5ml ζεστού υδατικού διαλύματος αιθανόλης (70%) ακολούθως 100μl διαλύματος σινιγκρίνης συγκέντρωσης 6.65mM ή 150μl διαλύματος γλουκοτροπαεολίνης συγκέντρωσης 2.4mM ανάλογα με τη φύση του δείγματος, ως εσωτερικό πρότυπο. Στα μπρόκολο (ρίζα, φύλλα, ανθοκεφαλές) και ρόκα (ρίζα, φύλλα) χρησιμοποιήθηκε η σινιγκρίνη ενώ στο λάχανο και το κουνουπίδι η γλουκοτροπαεολίνη. Το μείγμα ακολούθως εκχυλίστηκε με U-Turrax (T18, IKA, Germany) στις 14500 στροφές ανά λεπτό. Στα δείγματα ρόκας, προστέθηκε κατά τη διάρκεια της εκχύλισης, 5ppm TCEP (tris(2-carboxyethyl)phosphine) στα 10ml εκχυλίσματος, σύμφωνα με την μέθοδο του Bennet et al (2002) για την αποφυγή παραγωγής του διμερούς της γλουκοσατιβίνης (GSV) αλλά και της δημιουργίας δισουλφιδικών δεσμών μεταξύ του μορίου αυτού και ελεύθερων σουλφιδικών ομάδων πρωτεϊνών και των αμινοξέων κυστεΐνης και μεθειονίνης. Μετά το πέρας της εκχύλισης τα δείγματα φυγοκεντρούνταν στα 8000g ανά λεπτό, για 10 λεπτά. Ακολούθως το υπερκείμενο υγρό μεταφερόταν σε ογκομετρική φιάλη των 10ml. Η εκχύλιση και φυγοκέντρωση επαναλαμβάνονταν ακόμα μια φορά κάτω από τις ίδιες συνθήκες. Τέλος τα υπερκείμενα συνενώνονταν και ο τελικός όγκος διορθωνόταν στα 10ml με ζεστή αιθανόλη (70%).

Αποθείωση και Προσδιορισμός αποθειωμένων γλυκοσινολικών οξέων

Η αποθείωση των ΓΚΣ πραγματοποιήθηκε σε ιοντοανταλλακτική ρητίνη DEAE-Sephadex A25 (θερμοκρασία δωματίου) ενεργοποιημένη προηγούμενα με ρυθμιστικό διάλυμα οξικού νατρίου συγκέντρωσης 25mM (3 x 1ml) και pH 5,6 (ISO 9167). Το δείγμα (1ml) εφαρμόζοταν στην στήλη, μετά την ενεργοποίηση της και ακολουθούσε ξέπλυμα της στήλης με 3x1ml ρυθμιστικό διάλυμα οξικού νατρίου συγκέντρωσης 25mM και pH 5,6. Τέλος εφαρμόζονταν 50μl διαλύματος σουλφατάσης *Helix pomatia* type H1 δραστηριότητας >0.3 U. Τα αποθειωμένα ΓΚΣ εκλούστηκαν από τη στήλη με απιονισμένο νερό (3x1ml) μετά από πάροδο 16 ωρών. Τα αποθειωμένα ΓΚΣ προσδιορίστηκαν σε σύστημα υγρής χρωματογραφίας υψηλής απόδοσης (HPLC) αντίστροφης φάσης (reverse phase) συνδεδεμένο με ανιχνευτή δυαδικής συστοιχίας (PDA). Ο διαχωρισμός και η έκλυση του μορίου έγινε σε στήλη αντίστροφης φάσης RP-C18 (ODS3, 4.6mm I.D., 5μm, Inertsil). Η κινητή φάση του συστήματος αποτελείτο από ACN (A) και δις-απεσταγμένο νερό (B) με βάση το πιο κάτω πρόγραμμα ροών: από 0 έως 1min, 1% A, από 1 έως 27min, 27% A, από 27 ως 30min 1% A και από 30 ως 32min 1% A.

Εκχύλιση και Παραλαβή ΓΚΣ από το έδαφος

Για την ανάπτυξη μεθοδολογίας εκχύλισης και παραλαβής ΓΚΣ από το έδαφος εξετάστηκαν: α) ο τρόπος εκχύλισης και β) ο αριθμός εκχυλίσεων. Όλες οι μέθοδοι που εξετάστηκαν αφορούσαν την ανάκτηση από το έδαφος 66,5 nmol/g εδάφους σινιγκρίνης (100ml δ/τος σινιγκρίνης 6,65mM σε 10g εδάφους). Μετά τον έλεγχο των διάφορων μεθόδων επιλέχθηκε η μέθοδος με την μεγαλύτερη ανάκτηση της σινιγκρίνης έτσι ώστε να καθοριστούν όρια ανίχνευσης και ποσοτικού προσδιορισμού (Ομίρου et al., 2009). Πιο κάτω περιγράφεται η μέθοδος που επιλέχθηκε για τις μετρήσεις που έγιναν στα πλαίσια της παρούσας διατριβής.

Διαδικασία εκχύλισης

Σε κωνική φιάλη ζυγίστηκαν 10g έδαφος και αναμίχθηκαν με 20ml MeOH/H₂O (75:25). Το δείγμα αναδεύτηκε σε μαγνητικό πεδίο για 1 ώρα. Το δείγμα διηθήθηκε υπό κενό με φίλτρο Whatman No 42. Στο διηθημένο έδαφος προστέθηκε ακόμα 20ml MeOH/H₂O (70:30) και ακολούθησε νέα ανάδευση σε μαγνητικό πεδίο για 30 λεπτά. Το δείγμα διηθήθηκε και πάλι υπό κενό και τα δυο εκχυλίσματα συνενώθηκαν και μεταφέρθηκαν σε σφαιρική φιάλη. Ακολούθησε συμπύκνωση του εκχυλίσματος (3ml), και επαναδιάλυση με διάλυμα MeOH/H₂O (70:30) μέχρι τα 10ml. Τέλος 1ml δείγματος μεταφέρθηκε σε στήλη DEAE-Sephadex A25 όπου εκτελέστηκε η αποθείωση όπως έχει ήδη περιγραφεί παραπάνω για τους φυτικούς ιστούς.

Καμπύλες αναφοράς

Οι καμπύλες αναφοράς ετοιμάστηκαν σε εκχύλισμα εδάφους αφού χρησιμοποιήθηκαν οι πιο κάτω συγκεντρώσεις για την δημιουργία 2 καμπύλων αναφοράς έτσι ώστε να μπορεί να γίνει ποσοτικοποίηση σε μεγάλο εύρος συγκεντρώσεων και να αποφύγουμε φαινόμενα κύρτωσης της καμπύλης αναφοράς. Για την καμπύλη χαμηλών συγκεντρώσεων χρησιμοποιήθηκαν διαλύματα των 0.2, 0.35, 0.5 και 0.75nmol/ml ενώ για την καμπύλη των υψηλών συγκεντρώσεων χρησιμοποιήθηκαν διαλύματα των 5, 10, 20, 50, 100 και 150 nmol/ml. Ο συντελεστής r^2 που εκφράζει την γραμμικότητα της καμπύλης αναφοράς ήταν πάντα >0.99%

Όριο Ανίχνευσης και Όριο Ποσοτικοποίησης

Ο προσδιορισμός των δύο αυτών παραμέτρων έγινε με βάση την ανταπόκριση σήματος του ανιχνευτή στο θόρυβο που λήφθηκε από εκχύλισμα εδάφους, χωρίς την παρουσία ΓΚΣ. Το όριο ανίχνευσης για τη σινιγκρίνη στο έδαφος ήταν 0,024nmol/g ενώ το όριο ποσοτικοποίησης ήταν 0,091 nmol/g.

3. Προσδιορισμός Ολικού N και S

Ο προσδιορισμός του N και του S πραγματοποιήθηκε σε CNS analyzer της Elementar, Germany. Η επαναληψιμότητα και η ακρίβεια της μεθόδου, εξασφαλίστηκε με τη χρήση πρότυπου μορίου sulfanilamide (Sigma, Germany) κατά την έναρξη λειτουργίας του

οργάνου, και κατά την διάρκεια της ανάλυσης. Συγκεκριμένα, 100mg λυοφιλοποιημένου ιστού τοποθετούνταν σε κάψουλες αλουμινίου μαζί με 300mg W_2O_3 . Τα δείγματα τοποθετούνταν σε αυτόματο δειγματολήπτη, και ακολουθούσε καύση του δείγματος και προσδιορισμός του %S και %N με τη μέθοδο Dumas (Saint-Denis and Goupy, 2004). Στο τέλος κάθε σειράς αναλύσεων, το σύστημα ελεγχόταν ως προς την επαναληψιμότητά του.

4. Προσδιορισμός NO_3^- και SO_4^{2-}

Ο προσδιορισμός των νιτρικών και θειικών ιόντων πραγματοποιήθηκε με τη χρήση ιοντικής χρωματογραφίας και σύμφωνα με την μέθοδο που έχει περιγραφεί από τους Blake-Kalff et al., (1998). Η ιοντική χρωματογραφία είναι μια αναλυτική μέθοδος που συνδυάζει της αρχές της ιοντοανταλλαγής με την τεχνική της αγωγιμομετρίας. Συγκεκριμένα το δείγμα διέρχεται από μια σειρά ιοντικών ανταλλακτών και τα προς προσδιορισμό ιόντα διαχωρίζονται με βάση τη συμβατότητά τους για μιας χαμηλής χωρητικότητας ιοντοανταλλαγή. Τα διαχωρισμένα ιόντα διέρχονται από τον καταστολέα του συστήματος (suppressor) όπου καταστέλλεται η αγωγιμότητα του διαλύτη έκλουσης και την αντίδραση των αναλυόμενων ανιόντων και τα τελευταία προσδιορίζονται με βάση την αγωγιμότητά τους.

Διαδικασία εκχύλισης

Σε δοκιμαστικό σωλήνα ζυγίστηκαν 30mg λυοφιλοποιημένου ιστού μίσχων και σε αυτά προστέθηκαν 30ml νερού αναλυτικής καθαρότητας, απαλλαγμένο από αλληλεπιδράσεις στο όριο ποσοτικού προσδιορισμού των δύο ανιόντων (Millipore Elix5). Ακολούθως τα δείγματα επωάστηκαν στους 90°C για 2 ώρες και το διάλυμα διηθήθηκε από ηθμό Whatman 42.

Ιοντική χρωματογραφία

Χρησιμοποιήθηκε ιοντικός χρωματογράφος Dionex ICS-90 ο διαχωρισμός έλαβε χώρα σε στήλη AS14A-5μm, 3x150mm ενώ στη σειρά προηγείτο προστήλη ion Pac: AG14A-5μm, 3x30mm (Dionex, Medisel CY). Τα δείγματα τοποθετήθηκαν σε αυτόματα δειγματολήπτη Dionex Model AS40-1. Ο διαλύτης έκλουσης αποτελούνταν από 0.08mM $NaHCO_3$ και 0.01mM Na_2CO_3 και ως διάλυμα αναγέννησης της ιοντοανταλλακτικής στήλης χρησιμοποιήθηκε υδατικό διάλυμα H_2SO_4 0.072N. Τα ανιόντα ανιχνεύθηκαν σύμφωνα με τον χρόνο έκλουσής τους και ποσοτικοποιήθηκαν σύμφωνα με την μέθοδο του εξωτερικού προτύπου με τη χρήση του πρότυπου διαλύματος μίγματος ανιόντων Combined Seven Anion Standard II (Dionex, P/N 57590). Τα χρωματογραφήματα επεξεργάστηκαν με το λογισμικό πακέτο, Chromeleon 6.6® Chromatography Workstation.

5. Μικροβιακή Δραστηριότητα –υδρόλυση FDA

Ο προσδιορισμός της μικροβιακής δραστηριότητας στο έδαφος, πραγματοποιήθηκε σύμφωνα με την μέθοδο που αναπτύχθηκε από τους Adam και Duncan, (2001) με κάποιες τροποποιήσεις (Ntougias et al., 2006). Η αρχή της μεθόδου στηρίζεται στην ενζυμική

υδρόλυση του fluorescein diacetate FDA (άχρωμο), και στη μέτρηση της απορρόφησης του προϊόντος υδρόλυσης fluorescein στα 490nm (Adam and Duncan, 2001).

Χημικά Αντιδραστήρια

K_2HPO_4 (Riedel-de , Sigma- Aldrich Co. Ltd, Analar), KH_2PO_4 (Merck, BDH Analar), χλωροφόρμιο (Merck, analytical grade), μεθανόλη (Merck, analytical grade). 3'6'-diacetyl-fluorescein, (Sigma-Aldrich Co. Ltd), Fluorescein sodium salt (Merck, BDH Analar), ακετόνη (Merck, analytical grade).

Διαλύματα

1. Ρυθμιστικό διάλυμα φωσφορικού καλίου, 60mM και pH 7.6

Σε ογκομετρική φιάλη του 1 λίτρου μεταφέρθηκαν 600ml απιονισμένο νερό και ακολούθως προστέθηκαν 8.7g και 1.7g K_2HPO_4 και KH_2PO_4 αντίστοιχα. Ακολούθησε ελαφρά ανάδευση και όγκος συμπληρώθηκε μέχρι τη χαραγή με απιονισμένο νερό. Η τιμή του pH ελέγχθηκε και ρυθμίστηκε στη τιμή 7.6

2. Διάλυμα χλωροφόρμιου:μεθανόλης (2:1)

Σε ογκομετρική φιάλη του 1 λίτρου μεταφέρθηκαν 666ml χλωροφόρμιου και ο όγκος συμπληρώθηκε μέχρι τη χαραγή με μεθανόλη.

3. Διάλυμα FDA 1000ppm (Πυκνό)

Σε ογκομετρική φιάλη των 100ml ζυγίστηκαν 100mg FDA, και διαλύθηκαν σε 80ml περίπου ακετόνης, ο τελικός όγκος συμπληρώθηκε με την προσθήκη ακετόνης μέχρι τη χαραγή, και το διάλυμα διατηρήθηκε στους $-20^{\circ}C$.

4. Διάλυμα fluorescein sodium salt 2000ppm (Πυκνό)

Σε ογκομετρική φιάλη των 100ml ζυγίστηκαν 226,5mg fluorescein sodium salt, και προστέθηκαν περίπου 80ml ρυθμιστικό διάλυμα φωσφορικού καλίου συγκέντρωσης 60mM και pH 7.6, αφού διαλύθηκε συμπληρώθηκε μέχρι τη χαραγή με ρυθμιστικό διάλυμα.

Πρότυπη καμπύλη αναφοράς

Ένα ml από το πυκνό διάλυμα 4, μεταφέρθηκε σε σφαιρική φιάλη των 100ml και συμπληρώθηκε μέχρι τη χαραγή με ρυθμιστικό διάλυμα φωσφορικού καλίου 60mM, pH 7.6. Ακολούθως, παρασκευάστηκαν από αυτό πρότυπα διαλύματα συγκεντρώσεων από 1 έως 5μg/ml μετά από διαδοχικές αραιώσεις με το ρυθμιστικό διάλυμα φωσφορικού καλίου. Ακολούθως μετρήθηκε η ένταση του χρώματος στα 490nm σε φασματοφωτόμετρο σε σειρά από πρότυπα διαλύματα συγκέντρωσης από 0 έως 5ppm, και η γραμμικότητα της πρότυπης καμπύλης ήταν μεγαλύτερη από 0.99.

Προσδιορισμός μικροβιακής δραστηριότητας στο έδαφος

Σε κωνική φιάλη ζυγίστηκαν 6g νωπού εδάφους και προστέθηκαν 60ml ρυθμιστικού διαλύματος φωσφορικού καλίου 60mM και pH 7.6. Ακολούθως προστέθηκαν 400μl από το πυκνό διάλυμα FDA (1000ppm) και τα δείγματα τοποθετήθηκαν σε οριζόντιο αναδευτήρα για 10 λεπτά. Με το πέρας της ανάδευσης, 15ml από το υπερκείμενο μεταφέρθηκε σε

ογκομετρικό σωλήνα πολυπροπυλενίου 50ml, και προστέθηκαν 15ml διαλύματος $\text{CH}_3\text{Cl}_3:\text{MeOH}$ (2:1). Με την πάροδο 10min ακολούθησε φυγοκέντρηση στις 6500 rpm για 10min, και το υπερκείμενο συλλέχθηκε και προσδιορίστηκε η απορρόφησή του σε φασματοφωτόμετρο (Shimadzu, Kyoto, Japan) στα 490nm. Η ίδια διαδικασία ακολουθήθηκε χωρίς την προσθήκη του FDA σε δείγματα εδάφους - μάρτυρες και η απορρόφηση που μετρήθηκε στα 490nm αφαιρέθηκε από την απορρόφηση του δείγματος στο οποίο προστέθηκε FDA.

6. Ενζυμική Δράση Μυροσινάσης στο έδαφος

Ο προσδιορισμός της ενζυμικής δραστηριότητας της μυροσινάσης στο έδαφος πραγματοποιήθηκε με τον προσδιορισμό της γλυκόζης στο έδαφος μετά από την προσθήκη γνωστής ποσότητας σινιγκρίνης (Al Turki and Dick, 2003).

Χημικά Αντιδραστήρια

TES (2-[(2-hydroxy-1,1-bis (hydroxymethyl)ethyl amino]ethanesulfonic acid) (Sigma, Germany), Τολουένιο (Merck, BDH Analar, Germany), πυκνό Θειϊκό οξύ, 2-προπένυλ ΓΚΣ (Sigma, Germany), Εμπορικό Kit προσδιορισμού γλυκόζης (Sigma, GAGO-20, Germany).

Έδαφος

Το έδαφος κοσκινίστηκε στα 2mm και οποιαδήποτε υπολείμματα φυτικών ιστών απομακρύνθηκαν με προσοχή. Το έδαφος τοποθετήθηκε σε γυάλινες φιάλες Scott στους 4°C μέχρι τη διαδικασία εκχύλισης.

Διαδικασία εκχύλισης

Σε δοκιμαστικό σωλήνα πολυπροπυλενίου 50ml ζυγίστηκαν 1g εδάφους και προστέθηκαν 200ml τολουένιο, 2300ml ρυθμιστικό διάλυμα TES 0,1M, pH 7 και 500ml 2-προπένυλ ΓΚΣ διαλυμένο σε ρυθμιστικό διάλυμα TES συγκέντρωσης 0,03mM. Το δείγμα αναμίχθηκε καλά με το χέρι και επώαστηκε στους 37°C για 8 ώρες και ακολούθως φυγοκεντρήθηκε στις 13000 στροφές/λεπτό για 15λεπτά. Το υπερκείμενο συλλέχθηκε και διηθήθηκε διαμέσου φίλτρου κελουλόζης (0,45μm). Για τη μέτρηση της γλυκόζης στο διάλυμα, μεταφέρθηκε 1ml από το εκχύλισμα σε 2ml μείγματος οξειδάσης της γλυκόζης/υπεροξειδάσης, Ο-διασινιδίνης και νερό, και επώαστηκαν για 30λεπτά στους 37°C. Η αντίδραση τερματίστηκε με την προσθήκη 2ml π. H_2SO_4 6M η οποία προκάλεσε σχηματισμό ροζ χρώματος που εξαρτάται από την περιεκτικότητα σε γλυκόζη. Η απορρόφηση μετρήθηκε σε φασματοφωτόμετρο (Shimadzu, Kyoto, Japan) στα 527nm.

Για το ίδιο δείγμα κάθε φορά εκτελέστηκε η ίδια διαδικασία με τη διαφορά ότι, η προσθήκη του 2-προπένυλ ΓΚΣ πραγματοποιούταν μετά τη φυγοκέντρηση και το φιλτράρισμα έτσι ώστε να υπολογιστεί η ποσότητα γλυκόζης στο έδαφος, που δεν οφείλεται στην ενζυμική δράση της μυροσινάσης.

7. Μικροβιακή Αναπνοή

Χημικά Αντιδραστήρια

Υδροξειδίο νατρίου (0.3M), υδροχλωρικό οξύ (0.2M Merck, BDH Analar, Germany), χλωριούχο βάριο (2M), δείκτης φαινολοφθαλεΐνης (1%).

Διαδικασία Μέτρησης

Πενήντα γραμμάρια εδάφους ($\pm 0,1g$) (τρεις επαναλήψεις για κάθε μεταχείριση) τοποθετούνταν σε φιάλες αναπνοής μαζί με ποτήρι ζέσεως που περιείχε 10ml διαλύματος NaOH 0,3M. Ταυτόχρονα προετοιμάστηκαν και δύο ακόμη φιάλες με τον ίδιο τρόπο αλλά χωρίς την παρουσία εδάφους (τυφλά δείγματα). Σε κάθε μια από τις φιάλες αναπνοής ανά τακτά χρονικά διαστήματα, το πύμα αφαιρούνταν και το ποτήρι ζέσεως απομακρύνονταν με προσοχή. Το τελευταίο αντικαθίσταται άμεσα από νέο ποτήρι ζέσεως με NaOH όπως έχει περιγραφεί παραπάνω. Το διάλυμα NaOH που απομακρύνθηκε μεταφέρονταν σε κωνική φιάλη των 250ml (ξεπλένουμε το φιαλίδιο με 10ml αποσταγμένου νερού και τα συγκεντρώνουμε και αυτά στη κωνική φιάλη). Ακολουθούσε προσθήκη 10ml νερού και 5ml διαλύματος $BaCl_2$ 2M. Στην συνέχεια προστίθενται 6 σταγόνες διαλύματος φαινολοφθαλεΐνης και ακολούθησε πιλοδότηση με 0,1M HCl έως ότου παρουσιαστεί αλλαγή του χρώματος από κόκκινο, σε άχρωμο. Ο όγκος του HCl που χρησιμοποιήθηκε καταγράφονταν. Η περιεκτικότητα του εδάφους σε νερό προσδιορίστηκε ζυγίζοντας 10g ($\pm 0,01g$) εδάφους σε φούρνο θερμοκρασίας 105°C για 24 ώρες.

8. Προσδιορισμός Φωσφολιπιδίων στο έδαφος

Η εκχύλιση και η παραλαβή των φωσφολιπιδίων από το έδαφος, πραγματοποιήθηκε σύμφωνα με αυτή του Bossio και συνεργατών (1998) με μικρές τροποποιήσεις.

Χημικά Αντιδραστήρια

Διχλωρομεθάνιο (Merck, pro analysis), μεθανόλη (Baker), ακετόνη (pro analysis), τολουόλιο Riedel (pestanal), εξάνιο (Merck, BDH Analar), όλοι αναλυτικώς καθαροί, καθώς και οξικό οξύ (Riedel-de Haen, glacial). Για την παρασκευή ρυθμιστικού διαλύματος χρησιμοποιήθηκαν K_2HPO_4 και KH_2PO_4 (Panreac, pa), KOH (Merck, PA) για την παρασκευή μεθανολικού διαλύματος KOH 0,2M. Επίσης χρησιμοποιήθηκαν δύο μείγματα μεθυλεστέρων: το Bacterial Acid Methyl Esters Mix (Supelco 47080-U) και το 37 Component FAME Mix (Supelco™ 47885-U) σε αραιώση 1:10 σε διαλύτη εξάνιο. Ως εσωτερικό πρότυπο χρησιμοποιήθηκε ο μεθυλεστέρας του δεκαενναιοϊκού οξέος (C_{19} -Me). Για την παρασκευή της πρότυπης καμπύλης αναφοράς παρασκευάστηκαν πρότυπα διαλύματα συγκεντρώσεων 25, 50, 75, 100, 150, 200 $\mu g/ml$ του συγκεκριμένου μεθυλεστέρα σε εξάνιο.

Εκχύλιση – Παραλαβή

Δείγμα εδάφους 5g εκχυλίστηκε για 2 ώρες με 19ml μείγματος χλωροφόρμιου:μεθανόλης:ρυθμιστικό διάλυμα φωσφορικών, pH 3 (1:2:0,8). Η ποσότητα του ρυθμιστικού διαλύματος φωσφορικών διορθωνόταν για κάθε δείγμα ξεχωριστά ανάλογα με το ποσοστό υγρασίας του εδάφους (Bossio et al., 1998; Spyrou et al., 2009). Ακολούθως τα

δείγματα φυγοκεντρήθηκαν για 20 λεπτά στις 2500 στροφές ανά λεπτό και το υπερκείμενο μεταφερόταν σε διαχωριστικό χωνί μαζί με 5ml χλωροφόρμιο και ρυθμιστικό διάλυμα φωσφορικών. Το μείγμα αναδεύεται για 2 λεπτά και οι δύο φάσεις διαχωρίζονται σε ηρεμία. Μετά την πάροδο 16 ωρών, ακολουθούσε συμπύκνωση του δείγματος σε αέριο N. Τα φωσφολιπίδια διαχωρίστηκαν από τα γλυκολιπίδια και τα ουδέτερα λιπίδια, σε στήλες C18 Supelco, SPE DSC-Si (Silica tube 6ml, 500mg). Οι στήλες ενεργοποιούνταν με την προσθήκη 3ml χλωροφόρμιου. Το ξηρό υπόλειμμα επαναδιαλύθηκε με 250ml χλωροφόρμιου και το δείγμα μεταφερόταν στη στήλη (4 φορές). Τα γλυκολιπίδια και τα ουδέτερα λιπίδια, εκλούστηκαν από τη στήλη με 5ml χλωροφόρμιου και 5ml ακετόνης αντίστοιχα, ενώ τα πολικά λιπίδια (φωσφολιπίδια) εκλούστηκαν με την προσθήκη στη στήλη 5ml μεθανόλης, τα οποία συλλέγονταν και συμπυκνώνονταν σε αέριο N μέχρι ξηρού. Έπειτα, ακολουθούσε ήπια αλκαλική μεθάνολυση προσθέτοντας στο ξηρό δείγμα 500ml διαλύματος μεθανόλης:τολουενίου (1:1) και μεθανολικό διάλυμα KOH. Η αντίδραση ολοκληρώθηκε σε υδατόλουτρο θερμοκρασίας 37°C για 15 λεπτά. Αμέσως μετά μεταφέρονταν στο μείγμα 500ml οξικό οξύ έτσι ώστε να εξουδετερωθεί η περίσσεια του KOH. Οι μεθυλεστέρες των λιπαρών οξέων εκχυλίστηκαν μετά από προσθήκη 2ml διαλύματος εξάνιο:χλωροφόρμιο (4:1) και 2ml νερού έτσι ώστε να επιτευχθεί ο διαχωρισμός των φάσεων. Η πιο πάνω διαδικασία πραγματοποιήθηκε εις διπλούν. Η οργανική φάση (εξάνιο), συλλέχθηκε και συμπυκνώθηκε υπό αέριο N σε θερμοκρασία δωματίου. Τέλος το ξηρό υπόλειμμα επαναδιαλύθηκε σε 200ml εξάνιου και οι μεθυλεστέρες των λιπαρών οξέων διαχωρίζονταν σε σύστημα αέριας χρωματογραφίας με ανιχνευτή FID.

Διαχωρισμός και Ανίχνευση με Αέριο Χρωματογραφία

Τα φωσφολιπίδια διαχωρίστηκαν σε τριχοειδή στήλη HP-5 (26 m μήκος x 320 nm διάμετρο) σε αέριο χρωματογράφο, Hewlett Packard HP5890 Series II GC εφοδιασμένο με ανιχνευτή FID και αυτόματο δειγματολήπτη HP7673. Η έγχυση του δείγματος συνολικού όγκου 2μl πραγματοποιούνταν σε εγχυτή που λειτουργούσε στη split-splitless θέση. Η θερμοκρασία του φούρνου διατηρούνταν στα αρχικά στάδια στους 150°C για 5 min και αυξήθηκε γραμμικά μέχρι τους 250°C με ρυθμό 5°C/min όπου και διατηρήθηκε για 5 min, ενώ ο χρόνος ανάλυσης για κάθε δείγμα ήταν 34 min. Η θερμοκρασία του εγχυτή και του ανιχνευτή ήταν 250 και 310°C, αντίστοιχα. Ως φέρον αέριο χρησιμοποιήθηκε το ήλιο με ροή 1ml/min. Η ταυτοποίηση των μεθυλεστέρων των λιπαρών οξέων βασίστηκε στο χρόνο έκλουσης αντίστοιχων πρότυπων διαλυμάτων από ευκαριωτικούς και προκαρυωτικούς οργανισμούς (FAME και BAME, Supelco, UK).

Η ποσοτικοποίηση των λιπαρών οξέων (nmol.g^{-1}) πραγματοποιήθηκε με πρότυπη καμπύλη με πρότυπο διάλυμα δεκαενναιοϊκού οξέος (19:0). Γνωστή συγκέντρωση δεκαενναιοϊκού προστέθηκε πριν την μεθάνολυση ως εσωτερικό πρότυπο.

9. Προσδιορισμός της σύστασης της εδαφικής μικροβιακής κοινότητας

Η μελέτη της σύστασης της κοινότητας επιλεγμένων μικροβιακών ομάδων στο έδαφος με μοριακές τεχνικές στηρίζεται στην εξαγωγή του DNA από το έδαφος και ενίσχυση κυρίως ριβοσομικών περιοχών του γονιδιώματος των υπό αξιολόγηση μικροοργανισμών με την αλυσιδωτή αντίδραση πολυμεράσης. Στην συνέχεια η αποτύπωση της μικροβιακής κοινότητας μπορεί να πραγματοποιηθεί με διάφορες μεθόδους όπως για παράδειγμα με ηλεκτροφόρηση σε πηκτή με βαθμίδωση αποδιατακτικών ουσιών (DGGE). Συμπληρωματικά ακολουθεί δημιουργία βιβλιοθηκών κλώνων για επιλεγμένα δείγματα, και αλληλούχιση επιλεγμένων κλώνων, για ταυτοποίηση των επιλεγμένων ζωνών από το αποτύπωμα της μικροβιακής κοινότητας. Στο Διάγραμμα 1 του παραρτήματος, φαίνεται επιγραμματικά η διαδικασία αποτύπωσης της μικροβιακής κοινότητας του εδάφους.

9.1. Εξαγωγή DNA από το έδαφος

Η δειγματοληψία του εδάφους πραγματοποιήθηκε αφού όλες οι μεταχειρίσεις συνενώθηκαν σε ένα δείγμα (pool) και το δείγμα αφού αναδεύτηκε ελαφρώς διαχωρίστηκε σε 4 ίσα μέρη (τεταρτημόρια) από τα οποία, λήφθηκε τυχαία ποσότητα εδάφους από το κάθε τεταρτημόριο. Συνολικά λήφθηκαν 3 διαφορετικά δείγματα και στα οποία εφαρμόστηκαν όλες οι τεχνικές που περιγράφονται παρακάτω.

Το DNA από το έδαφος εκχυλίστηκε με τη χρήση του εμπορικού πακέτου εκχύλισης PowerSoil™ Soil DNA isolation Kit (MOBIO, Laboratories, Inc., USA). Η αρχή της μεθόδου βασίζεται στη τεχνική της άμεσης λύσης των κυττάρων η οποία πραγματοποιείται με συνδυασμό μηχανικών και χημικών μεθόδων. Συγκεκριμένα ακολουθήθηκαν τα παρακάτω στάδια σύμφωνα με τις οδηγίες του κατασκευαστή:

1. Σε σωλήνες που περιείχαν σφαιρίδια μικρού διαμερισμού (bead tubes) ζυγίστηκαν 500mg εδάφους και ακολούθησε ελαφρά ανάδευση. Οι σωλήνες περιέχουν ρυθμιστικό διάλυμα, το οποίο εξυπηρετεί στη διασπορά των σωματιδίων του εδάφους, και ξεκινά τη διάσπαση των χουμικών οξέων.
2. Ακολούθως προστέθηκαν 60μl SDS το οποίο διασπά τα λιπαρά οξέα και τα λιπίδια των κυτταρικών μεμβρανών των μικροοργανισμών στο έδαφος. Αμέσως μετά προστέθηκαν 200μl διαλύματος απομάκρυνσης αναστολέων της αλυσιδωτής αντίδρασης της πολυμεράσης όπως είναι τα χουμικά οξέα.
3. Οι σωλήνες τοποθετήθηκαν σε συσκευή ταχείας ανάδευσης στη μέγιστη ταχύτητα για 10 λεπτά. Κατά τη διάρκεια της ανάδευσης τα σφαιρίδια προκαλούν τη μηχανική λύση των κυττάρων σε συνδυασμό με την παρουσία του SDS. Μετά τη λύση των κυττάρων τα δείγματα φυγοκεντρήθηκαν για 30sec σε μικροφυγόκεντρο υψηλών ταχυτήτων στα 10000 χg.
4. Μετά τη φυγοκέντρωση το υπερκείμενο διάλυμα συλλέχθηκε και μεταφέρθηκε σε σωληνάρια πολυπροπυλενίου 1.5ml όπου προστέθηκαν 200μl διαλύματος κατακρήμνισης των πρωτεϊνών. Το δείγμα τοποθετήθηκε στους 4°C. Μετά την πάροδο 5 λεπτών το δείγμα φυγοκεντρήθηκε στα 10000χg για ένα λεπτό.
5. Όλη η ποσότητα του υπερκείμενου διαλύματος μεταφέρθηκε σε σωληνάρια πολυπροπυλενίου 2 ml όπου προστέθηκαν 1300μl διαλύματος υψηλής συγκέντρωσης

αλάτων και το δείγμα αναδεύτηκε για 5 δευτερόλεπτα. Ακολούθως 700μl από το διάλυμα μεταφέρθηκαν σε μικροστήλη που περιέχει μεμβράνη πυριτίου για κατακράτηση του DNA, και φυγοκεντρήθηκαν στα 10000χg για 1 λεπτό. Το διάλυμα που εκπλύθηκε από τις στήλες απορρίφθηκε και η ίδια διαδικασία πραγματοποιήθηκε και για το υπόλοιπο δείγμα (600 μl).

6. Στην μεμβράνη πυριτίου όπου προσδέθηκε το DNA μεταφέρθηκαν 300μl διαλύματος αιθανόλης με σκοπό την απομάκρυνση υπολειμμάτων άλατος, χουμικών οξέων και άλλων αναστολέων της αλυσιδωτής αντίδρασης πολυμεράσης. Το δείγμα φυγοκεντρήθηκε για ένα λεπτό στα 10000 χg και το διαφυγόν διάλυμα απορρίφθηκε. Ακολούθησε και δεύτερη φυγοκέντρηση για ένα λεπτό για την απομάκρυνση των υπολειμμάτων αιθανόλης.

7. Η παραλαβή του DNA πραγματοποιήθηκε με την μεταφορά στη στήλη με την μεμβράνη πυριτίου 50μl διαλύματος Tris 10mM 8. Το δείγμα φυγοκεντρήθηκε και το έκλουσμα συλλέχθηκε σε αποστειρωμένο σωληνάριο πολυπροπυλενίου 1.5ml.

9. Το DNA αποθηκεύτηκε στους -20°C.

9.2. Αλυσιδωτή αντίδραση πολυμεράσης

Η αρχή της μεθόδου στηρίζεται στον ενζυμικό πολλαπλασιασμό *in vitro* επιλεγμένων αλληλουχιών DNA χρησιμοποιώντας ως εκμαγείο μικρή ποσότητα δείγματος. Ο ενζυμικός πολλαπλασιασμός πραγματοποιείται σε κύκλους, και ο κάθε κύκλος ολοκληρώνεται σε τρία στάδια έτσι ώστε η επιλεγμένη αλληλουχία του DNA να πολλαπλασιάζεται εκθετικά. Συγκεκριμένα, το πρώτο στάδιο της αλυσιδωτής αντίδρασης πολυμεράσης αφορά τη θερμική αποδιάταξη του δίκλωνου DNA στους 92-95°C. Το δεύτερο στάδιο, αυτό του υβριδισμού, αφορά την πρόσδεση των εκκινητών στα συμπληρωματικά προς αυτούς τμήματα DNA σε μια θερμοκρασία 50-65°C. Το τρίτο και τελευταίο στάδιο, αφορά την σύνθεση DNA με τη δράση της DNA πολυμεράσης, ξεκινώντας από τους εκκινητές και το στάδιο αυτό πραγματοποιείται σε θερμοκρασίες από 70 μέχρι 78°C. Ο βέλτιστος αριθμός κύκλων της αλυσιδωτής αντίδρασης πολυμεράσης εξαρτάται από την ποσότητα του αρχικού DNA που χρησιμοποιείται ως μήτρα και την απόδοσή της σε κάθε κύκλο. Με την ολοκλήρωση ορισμένων κύκλων το επικρατές προϊόν είναι δίκλωνο DNA του οποίου τα 5' άκρα καθορίζονται από τους εκκινητές.

Για την αποτύπωση της μικροβιακής κοινότητας στο έδαφος, με τη μέθοδο της ηλεκτροφόρησης σε πηκτή βαθμίδωσης αποδιατακτικών ουσιών είναι απαραίτητο το μέγεθος του δίκλωνου DNA που προορίζεται για την ηλεκτροφόρηση να είναι μικρότερο από 500 ζεύγη βάσεων (Muyzer et al., 1993) ενώ είναι απαραίτητη η προσκόλληση στο 5' άκρο του προϊόντος ουράς νουκλεοτιδίων εμπλουτισμένης σε γουανίνη και κυτοσίνη. Αυτό επιτυγχάνεται με την εφαρμογή της αλυσιδωτής αντίδρασης πολυμεράσης εσωτερικής ένθεσης (nested PCR). Πρόσθετα πλεονεκτήματα της μεθόδου αποτελούν η μεγαλύτερη ευαισθησία της τεχνικής και η μεγαλύτερη εξειδίκευση της σε σύγκριση με την απλή αλυσιδωτή αντίδραση πολυμεράσης. Αυτό οφείλεται στο γεγονός ότι η τεχνική αφορά δυο διαδοχικές αλυσιδωτές αντιδράσεις πολυμεράσης, όπου το προϊόν της πρώτης αντίδρασης χρησιμοποιείται ως εκμαγείο για τη δεύτερη. Ουσιαστικά η μεγαλύτερη ευαισθησία της

τεχνικής οφείλεται στο γεγονός, ότι η πρώτη αντίδραση χρησιμοποιεί ένα ζεύγος εκκινητών για μια ευρύτερη επιλεγμένη αλληλουχία DNA ενώ η δεύτερη χρησιμοποιεί ένα νέο ζεύγος εκκινητών που πολλαπλασιάζει ένα εσωτερικό τμήμα της αρχικής αλληλουχίας DNA που ενισχύθηκε κατά την πρώτη αντίδραση.

Στην παρούσα διατριβή χρησιμοποιήθηκε η τεχνική της ημiesωτερικής ένθεσης για την ενίσχυση της ITS περιοχής του rDNA των ασκομυκήτων. Στη δεύτερη αντίδραση της αλυσιδωτής αντίδρασης πολυμεράσης κατά την εφαρμογή της τεχνικής αυτής, ο ένας εκ των δύο εκκινητών που χρησιμοποιήθηκε ήταν ο ίδιος με τον ένα εκκινητή που χρησιμοποιήθηκε κατά την πρώτη αντίδραση με την μόνη διαφορά ότι κατείχε μια ουρά GC. Για τον πολλαπλασιασμό της αλληλουχίας του 16sRNA γονιδίου των νιτροποιητικών βακτηρίων χρησιμοποιήθηκε PCR εσωτερικής ένθεσης (Karrouzas et al., 2009).

Χημικά αντιδραστήρια

DyNAzyme EXT DNA πολυμεράση (Finnzymes, Finland), DyNAzyme EXT buffer (Finnzymes, Finland), μίγμα ελεύθερων 5' τριφωσφορικών δεοξυριβονουκλεοτιδίων (dNTPs) (HT Biotechnology LTD), BSA (bovine serum albumin, Sigma-Aldrich).

Οι εκκινητές που χρησιμοποιήθηκαν για τους ασκομύκητες ήταν:

1. ITS1F (5'-CTT GGT CAT TTA GAG GAA GTA A-3'),
2. ITS4A (5'-CGC CGT TAC TGG GGC AAT CCC TG-3'),
3. ITS1F-GC (5'-CGC CCG CCG CGC GCG GCG GGC GGG GCG GGG GCA CGG GGG GCT TGG TCA TTT AGA GGA AGT AA-3').

Οι εκκινητές που χρησιμοποιήθηκαν για τα νιτροποιητικά βακτήρια ήταν:

1. βAMOf (5' – TGGGGRATAACGCAYCGAAAG - 3')
2. βAMOr (5' – AGACTCCGATCCGGACTACG – 3')
3. CTO 189 f AB (5'- GGA GRA AAG CAG GGG ATC G-3'), CTO 189 f C (5'- GGA GGA AAG TAG GGG ATC G-3'),
4. CTO 654r (CTAGCYTTGTAGTTTCAAACGC),
5. 357f-GC (5'-CGC CCG CCG CGC GCC GCG GGC GGG GCG GGG GCA CGG GGG GCC TAC GGG AGG CAG CAG-3'),
6. 534r (5'-ATT ACC GCG GCT GCT GG-3').

9.2.1. Ενίσχυση της ITS περιοχής του rDNA των ασκομυκήτων με την τεχνική της ημiesωτερικής ένθεσης

Ο συνολικός όγκος κάθε αντίδρασης ήταν 50μl, και χρησιμοποιήθηκαν 5μl ρυθμιστικού διαλύματος της πολυμεράσης που περιείχε MgCl₂ σε συγκέντρωση 15 mM (10x optimized), 1μl μίγματος ελεύθερων 5' τριφωσφορικών δεοξυριβονουκλεοτιδίων dNTPs (10mM), 1μl ITS1F (20pmol/μl), 1μl ITS4A (20pmol/μl), 2μl BSA (10μg/ml), 1μl DNA πολυμεράση (1U/μl), 38μl δις αποσταγμένο αποστειρωμένο H₂O και 1μl εκχύλισμα DNA από το έδαφος. Οι θερμοκυκλοποιητικές συνθήκες εκτέλεσης της αλυσιδωτής αντίδρασης πολυμεράσης, ήταν 94°C για 2.5 λεπτά κατά την αρχική αποδιάταξη, ακολούθησαν 40 κύκλοι

με τις εξής συνθήκες: α) αποδιάταξη στους 94°C για 15 sec, β) υβριδοποίηση στους 55°C για 1 λεπτό και γ) επιμήκυνση στους 72°C για 1 λεπτό. Η τελική επιμήκυνση πραγματοποιήθηκε στους 72°C για 10 λεπτά. Το τελικό προϊόν ενίσχυσης ήταν μήκους 600-700 bp.

Η δεύτερη αντίδραση πολυμεράσης, πραγματοποιήθηκε σε συνολικό όγκο 50μl και χρησιμοποιήθηκαν οι εκκινητές ITS1F-GC και ITS2. Χρησιμοποιήθηκαν 5μl ρυθμιστικού διαλύματος της πολυμεράσης που περιείχε MgCl₂ σε συγκέντρωση 15 mM (10x optimized), 1μl μίγματος ελεύθερων 5' τριφωσφορικών δεοξυριβονουκλεοτιδίων (10mM), 1μl ITS1F-GC (20pmol/μl), 1μl ITS2 (20pmol/μl), 1μl DNA πολυμεράση (1U/ml), 40μl δις αποσταγμένο αποστειρωμένο H₂O και 1μl από το προϊόν της προηγούμενης PCR αντίδρασης. Οι θερμοκυκλοποιητικές συνθήκες εκτέλεσης της αλυσιδωτής αντίδρασης πολυμεράσης, ήταν 94°C για 5 λεπτά κατά την αρχική αποδιάταξη, ακολούθησαν 30 κύκλοι με τις εξής συνθήκες: α) αποδιάταξη στους 94°C για 15 sec, β) υβριδοποίηση στους 55°C για 1 λεπτό και γ) επιμήκυνση στους 72°C για 1 λεπτό. Η τελική επιμήκυνση πραγματοποιήθηκε στους 72°C για 10 λεπτά. Το τελικό προϊόν ενίσχυσης ήταν μήκους 300 bp.

9.2.2. Ενίσχυση τμήματος του 16S rRNA των νιτροποιητικών βακτηρίων με τη τεχνική της PCR εσωτερικής ένθεσης

Ο συνολικός όγκος κάθε αντίδρασης ήταν 50μl, και χρησιμοποιήθηκαν 5μl ρυθμιστικού διαλύματος της πολυμεράσης που περιείχε MgCl₂ σε συγκέντρωση 15 mM (10x optimized), 1.25μl μίγματος ελεύθερων 5' τριφωσφορικών δεοξυριβονουκλεοτιδίων (10mM), 1μl βΑΜΟ143f (10pmol/μl), 1μl βΑΜΟ1315r (10pmol/μl), 2μl BSA (10μg/ml), 1μl DNA πολυμεράση (1U/μl), 37.75μl δις αποσταγμένο αποστειρωμένο H₂O και 1μl εκχύλισμα DNA από το έδαφος. Οι συνθήκες εκτέλεσης της αλυσιδωτής αντίδρασης πολυμεράσης, ήταν 94°C για 5 λεπτά κατά την αρχική αποδιάταξη, ακολούθησαν 10 κύκλοι με τις εξής συνθήκες: α) αποδιάταξη στους 94°C για 30 sec, β) υβριδοποίηση στους 55°C για 30 sec και γ) επιμήκυνση στους 72°C για 2 λεπτά. Ακολούθως, εφαρμόστηκαν ακόμα 25 κύκλοι με τις εξής συνθήκες: α) αποδιάταξη στους 92°C για 30 sec, β) υβριδοποίηση στους 55°C για 30 sec και γ) επιμήκυνση στους 72°C για 2 λεπτά. Η τελική επιμήκυνση πραγματοποιήθηκε στους 72°C για 10 λεπτά. Το τελικό προϊόν ενίσχυσης ήταν μήκους 1100 bp.

Ακολούθησε δεύτερη αλυσιδωτή αντίδραση πολυμεράσης, όπου χρησιμοποιήθηκαν οι εκκινητές CTO189fABC και CTO654r οι οποίοι ενισχύουν εξειδικευμένα εσωτερικό τμήμα του 16S rRNA γονιδίου των νιτροποιητικών βακτηρίων. Ο συνολικός όγκος κάθε αντίδρασης ήταν 50μl, και χρησιμοποιήθηκαν 5μl ρυθμιστικού διαλύματος της πολυμεράσης που περιείχε MgCl₂ σε συγκέντρωση 15 mM (10x optimized), 1μl μίγματος ελεύθερων 5' τριφωσφορικών δεοξυριβονουκλεοτιδίων (10mM), 1μl CTO189fABC (10pmol/μl), 1μl CTO654r (10pmol/μl), 1μl DNA πολυμεράση (1U/μl), 40μl δις αποσταγμένο αποστειρωμένο H₂O και 1μl εκχύλισμα DNA από το έδαφος. Ο εκκινητής CTO189fABC αποτελεί μίγμα ίδιας συγκέντρωσης των εκκινητών CTO189fA, B και C. Οι συνθήκες εκτέλεσης της αλυσιδωτής αντίδρασης πολυμεράσης, ήταν 94°C για 5 λεπτά κατά την αρχική αποδιάταξη, ακολούθησαν 10 κύκλοι με τις εξής συνθήκες: α) αποδιάταξη στους 94°C για 30 sec, β) υβριδοποίηση στους 55°C για

30 sec και γ) επιμήκυνση στους 72°C για 45sec. Επιπρόσθετα, εφαρμόστηκαν ακόμα 20 κύκλοι με τις εξής συνθήκες: α) αποδιάταξη στους 92°C για 30 sec, β) υβριδοποίηση στους 55°C για 30 sec και γ) επιμήκυνση στους 72°C για 45 sec. Η τελική επιμήκυνση πραγματοποιήθηκε στους 72°C για 5 λεπτά. Το τελικό προϊόν ενίσχυσης ήταν μήκους 465 bp.

Το προϊόν που παραλήφθηκε από την δεύτερη PCR με τους εξειδικευμένους για τα νιτροποιητικά βακτήρια εκκινητές CTOs, χρησιμοποιήθηκε ως μήτρα σε τρίτη αλυσιδωτή αντίδραση πολυμεράσης με τους βακτηριακής εξειδίκευσης εκκινητές, 357f-GC και 518r (Muyzer et al., 1993). Το τελικό προϊόν (161 bp) είναι κατάλληλο για την αξιολόγηση των νιτροποιητικών βακτηρίων με την τεχνική της ηλεκτροφόρησης σε πηκτή ακρυλαμιδίου βαθμίδωσης αποδιατακτικών ουσιών (Mahmood et al., 2006). Ο συνολικός όγκος κάθε αντίδρασης ήταν 50μl, και χρησιμοποιήθηκαν 5μl ρυθμιστικού διαλύματος της πολυμεράσης που περιείχε MgCl₂ σε συγκέντρωση 15 mM (10x optimized), 1μl μίγματος ελεύθερων 5' τριφωσφορικών δεοξυριβονουκλεοτιδίων (10mM), 1μl 357f-GC (20pmol/μl), 1μl 518r (20pmol/μl), 1μl DNA πολυμεράση (1U/μl), 40μl δις αποσταγμένο αποστειρωμένο H₂O και 1μl εκχύλισμα DNA από το έδαφος. Οι θερμοκυκλοποιητικές συνθήκες εκτέλεσης της αλυσιδωτής αντίδρασης πολυμεράσης, ήταν 94°C για 5 λεπτά κατά την αρχική αποδιάταξη, ακολούθησαν 25 κύκλοι με τις εξής συνθήκες: α) αποδιάταξη στους 95°C για 30 sec, β) υβριδοποίηση στους 55°C για 30 sec και γ) επιμήκυνση στους 72°C για 45 sec. Η τελική επιμήκυνση πραγματοποιήθηκε στους 72°C για 5 λεπτά (Kargouzas et al., 2009).

9.3. Ηλεκτροφόρηση DNA σε πηκτή αγαρόζης.

Ο έλεγχος του DNA που εκχυλίστηκε από το έδαφος και τα προϊόντα των PCR ελέγχθηκαν ως προς την παρουσία τους αλλά και του μεγέθους τους (κατ' εκτίμηση) σε πηκτή αγαρόζης (Biozym, Oldendorf, Germany) 0.7% και 1% αντίστοιχα. Η πηκτή κάθε φορά προετοιμάστηκε σε 1xTAE και προστέθηκε βρωμιούχο αιθίδιο σε συγκέντρωσης 5μg/ml. Για το εκχυλισμένο DNA εδάφους, στην πηκτή φορτώθηκαν 5μl δείγματος και 3μl loading buffer 6x. Για την ηλεκτροφόρηση των προϊόντων PCR, στη πηκτή φορτώθηκαν 10μl προϊόντος, αναμεμειγμένα με 2μl loading buffer 6x. Οι συνθήκες ηλεκτροφόρησης σε κάθε περίπτωση ήταν 100 Volt για 30min σε ρυθμιστικό διάλυμα 1xTAE και οι ζώνες DNA παρατηρήθηκαν σε συσκευή UV και φωτογραφήθηκαν.

9.4. Ηλεκτροφόρηση σε πηκτή ακρυλαμιδίου με βαθμίδωση αποδιατακτικών ουσιών.

Αρχή της μεθόδου

Η ηλεκτροφόρηση σε πηκτή ακρυλαμιδίου με βαθμίδωση αποδιατακτικών ουσιών (DGGE) επιτρέπει την ανίχνευση απλών μεταβολών στην αλληλουχία μικρών θραυσμάτων DNA. Η τεχνική αυτή βασίζεται στο διαχωρισμό δίκλωνου μορίου DNA, σε πήκτωμα πολυακρυλαμιδίου, που περιέχει αποδιατακτικές ουσίες (ουρία και φορμαμίδιο) με συγκεκριμένη βαθμίδωση της συγκέντρωσής τους (Muyzer et al., 1993; Nakatsu et al., 2000; Torsvik et al., 1998). Ο διαχωρισμός δύο θραυσμάτων DNA του ίδιου μεγέθους αλλά διαφορετικής αλληλουχίας γίνεται σύμφωνα με τις διαφορές στη θερμοκρασία αποδιάταξης

(T_m), που εξαρτάται από τη συχνότητα εμφάνισης των βάσεων A-T και G-C στην αλληλουχία τους. Δύο όμοια τμήματα DNA που διαφέρουν έστω και σε ένα μόνο νουκλεοτίδιο θα έχουν και διαφορετική τιμή T_m. Κατά την ηλεκτροφόρησή τους στο πήκτωμα πολυακρυλαμιδίου, μόλις εισέλθουν σε περιοχή με κρίσιμη συγκέντρωση αποδιατακτικών ουσιών, τμήματα της δίκλωνης αλυσίδας του DNA (domain) αποδιατάσσονται,. Αυτό συνοδεύεται από μείωση της κινητικότητάς τους. Επομένως, δύο τμήματα του ίδιου μεγέθους και διαφορετικής αλληλουχίας θα ακινητοποιηθούν σε διαφορετικά σημεία του πηκτώματος, που θα αντιστοιχούν στις διαφορετικές T_m που παρουσιάζουν. Το μέγεθος των τμημάτων DNA, που μπορούν να αναλυθούν σε ένα τέτοιο πήκτωμα πολυακρυλαμιδίου, ποικίλουν από 100 μέχρι 500 ζεύγη βάσεων. Η πλήρης αποδιάταξη του δίκλωνου DNA κατά την διάρκεια της ηλεκτροφόρησης DGGE αποτρέπεται με την προσθήκη στο 5' άκρο του ενός εκ των δύο εκκινητικών μορίων ενός ολιγονουκλεοτιδίου αποτελούμενου από 40 περίπου νουκλεοτίδια εμπλουτισμένο σε γουανίνη και κυτοσίνη. Το τμήμα αυτό λειτουργεί σαν σφυκτήρας (GC-clamp) στην άκρη του τμήματος DNA που το προφυλάσσει από την πλήρη του αποδιάταξη κατά την ηλεκτροφόρηση σε αυξανόμενη συγκέντρωση ουρίας και φορμαμίδης.

Χημικά αντιδραστήρια

Ακρυλαμίδη (Acrylamide-Bisacrylamide 40% solution, 37.5:1, BioRad), απιονισμένη φορμαμίδη (Promega), ουρία (Promega), N,N,N',N' – tetramethylenediamine (TEMED, Bio-Rad), διάλυμα 10% ammonium persulfate (100mg σε 1ml ddH₂O, Sigma, Germany), tris base (Promega), οξικό οξύ(Merck), EDTA.

Εξοπλισμός

Πλήρες σύστημα ηλεκτροφόρησης σε πηκτή πολυακρυλαμιδίου με βαθμίδωση αποδιατακτικών ουσιών (INGENYphorU-2x2, Netherlands).

Παρασκευή διαλυμάτων

50xTAE

Tris base 242g

Οξικό οξύ 57.1ml

0.5M EDTA, pH 8, 10ml

Ο όγκος προσαρμόστηκε στο 1L απεσταγμένο νερό.

Διαλύματα αποδιατακτικών ουσιών

| Αντιδραστήρια | 0% | 100% |
|------------------|--------------------------------|------|
| Ακρυλαμίδιο | 20 | 20 |
| Φορμαμίδη | - | 40ml |
| Ουρία | - | 42g |
| 50xTAE | 2ml | 2ml |
| H ₂ O | ο όγκος συμπληρώθηκε στα 100ml | |

Βαθμίδωση της πηκτής ακρυλαμιδίου

Τόσο στους ασκομύκητες όσο και στα νιτροποιητικά βακτήρια, χρησιμοποιήθηκε πηκτή ακρυλαμιδίου συγκέντρωσης 8% (w/v). Για τους ασκομύκητες η πηκτή ακρυλαμιδίου είχε βαθμίδωση αποδιατακτικών ουσιών που κυμάνθηκε από 30 μέχρι 55% ενώ για τα νιτροποιητικά βακτήρια, η βαθμίδωση της πηκτής με αποδιατακτικές ουσίες κυμάνθηκε από 45 μέχρι 65%. Η επιλογή του εύρους της βαθμίδωσης των αποδιατακτικών ουσιών έγινε με βάση προκαταρκτικές ηλεκτροφορήσεις ώστε να επιτύχουμε μέγιστο διαχωρισμό και ικανοποιητική αποτύπωση της κοινότητας των παραπάνω μικροοργανισμών. Για την δημιουργία των κελιών στην πηκτή χρησιμοποιήθηκε διάλυμα ακρυλαμιδίου με 0% αποδιατακτικές ουσίες (stacker). Στον πίνακα παρακάτω φαίνονται οι ποσότητες που χρησιμοποιήθηκαν για την παρασκευή των πηκτών:

| Μικροοργανισμοί | Αποδιατακτικών ουσιών (%) | Συστατικό | Όγκος (ml) |
|------------------------|---------------------------|--------------|------------|
| Ασκομύκητες | 30 | 0% διάλυμα | 17.5 |
| | | 100% διάλυμα | 7.5 |
| | | TEMED | 10μl |
| | | APS (10%) | 100μl |
| | 55 | 0% | 11.25 |
| | | 100% | 13.75 |
| | | TEMED | 10μl |
| | | APS (10%) | 100μl |
| | stacker | 0% | 4ml |
| | | TEMED | 4μl |
| | | APS | 40μl |
| | | | |
| Νιτροποιητικά βακτήρια | 45 | 0% διάλυμα | 13.75ml |
| | | 100% διάλυμα | 11.25ml |
| | | TEMED | 10μl |
| | | APS (10%) | 100μl |
| | 65 | 0% | 8.75ml |
| | | 100% | 16.25ml |
| | | TEMED | 10μl |
| | | APS (10%) | 100μl |

Στα διαλύματα ακρυλαμιδίου που αναφέρονται στο παραπάνω πίνακα προστέθηκαν λίγο πριν ξεκινήσει η ανάμιξη τους ποσότητες APS και TEMED για να ξεκινήσει ο πολυμερισμός της ακρυλαμιδίου. Η προετοιμασία των πηκτών ακρυλαμιδίου έγινε με την χρήση κατάλληλου συστήματος ανάμιξης των δύο διαλυμάτων με τις αποδιατακτικές ουσίες συνδεδεμένο με περισταλτική αντλία για την μεταφορά του διαλύματος ακρυλαμιδίου στο σύστημα πλακών

INGENY. Με την ολοκλήρωση του πολυμερισμού της ακρυλαμίδης (περίπου 1 ώρα), στα κελιά της πηκτής φορτώθηκε κατάλληλη ποσότητα προϊόντος PCR (5μl) το οποίο αναμειχθηκε με 4μl loading buffer x10. Η ηλεκτροφόρηση έλαβε χώρα στους 60°C σε ρυθμιστικό διάλυμα 1xTAE στα 75Volt για 960 λεπτά.

Βαφή πηκτής με τη μέθοδο του νιτρικού αργύρου

Χημικά αντιδραστήρια

Αιθανόλη (Merck, Germany), οξικό οξύ (Merck, Germany), AgNO₃, NaBH₄, NaOH, φορμαλδεύδη (Merck, Germany), Na₂CO₃.

Παρασκευή Διαλυμάτων

Διάλυμα πρόσδεσης I: σε ογκομετρική φιάλη του 1L μεταφέρονταν 100ml αιθανόλης και 5ml οξικό οξύ και όγκος συμπληρώνονταν μέχρι τη χαραγή με απιονισμένο νερό.

Διάλυμα βαφής: Σε ογκομετρική φιάλη του 1L ζυγίστηκε 1g AgNO₃ και ο όγκος συμπληρώθηκε μέχρι τη χαραγή με απιονισμένο νερό.

Διάλυμα εμφάνισης: Σε σφαιρική φιάλη του 1L ζυγίστηκαν 15g NaOH, προστέθηκαν 400ml απιονισμένο νερό και ακολούθησε ανάδευση με μαγνήτη μέχρι να διαλυθεί πλήρως. Ακολούθως, στο διάλυμα προστέθηκαν 100mg NaBH₄ και 4ml φορμαλδεύδης και ο όγκος συμπληρώθηκε μέχρι τη χαραγή με απιονισμένο νερό.

Διάλυμα πρόσδεσης II: Σε ογκομετρική φιάλη του 1L ζυγίστηκαν 7.5g Na₂CO₃ και διαλύθηκαν σε 1 L απιονισμένου νερού.

Διαδικασία βαφής

Οι πηκτές απομακρύνθηκαν από τη συσκευή ηλεκτροφόρησης και ξεπλύθηκαν ελαφρώς με νερό. Ακολούθως τοποθετήθηκαν σε πλαστικό δοχείο που περιείχε 500ml διαλύματος πρόσδεσης I και ανακινήθηκαν ελαφρά σε οριζόντιο αναδευτήρα για 2 ώρες. Με την πάροδο των 2 ωρών, απομακρύνθηκε το διάλυμα πρόσδεσης I και οι πηκτές ξεπλύθηκαν ελαφρά με νερό, επανατοποθετήθηκαν στο πλαστικό δοχείο μαζί με 500ml διαλύματος βαφής και ανακινήθηκαν για 20 λεπτά. Ακολούθως το διάλυμα βαφής απομακρύνθηκε, οι πηκτές ξεπλύθηκαν με νερό και προστέθηκαν 500ml διαλύματος εμφάνισης. Οι πηκτές ανακινήθηκαν σε οριζόντιο αναδευτήρα μέχρις ότου εμφανιστεί το αποτύπωμα της μικροβιακής κοινότητας με τις ζώνες DNA. Ακολούθως, το διάλυμα εμφάνισης απομακρύνθηκε και προστέθηκαν 500ml διαλύματος πρόσδεσης II. Οι πηκτές ανακινήθηκαν επιπλέον και με την πάροδο 10 λεπτών απομακρύνθηκαν από το πλαστικό δοχείο και ξεπλήθηκαν με νερό. Κάθε πηκτική πολυακρυλαμίδης τοποθετήθηκε σε τράπεζα φωτός και φωτογραφήθηκε με υψηλής ανάλυσης ψηφιακή φωτογραφική μηχανή. Οι φωτογραφίες από κάθε πηκτική DGGE μετατράπηκαν σε κατάλληλης μορφής αρχεία (.bmp) και ψηφιοποιήθηκαν. Στην συνέχεια η φωτογραφία της κάθε πηκτής χρησιμοποιήθηκε για την δημιουργία δεδομένων δυαδικής μορφής (binary dataset) με το πακέτο CrossChecker (Wageningen, Netherlands) βασιζόμενο στην παρουσία ή απουσία ζωνών DNA στο μοριακό αποτύπωμα του κάθε δείγματος.

10. Δημιουργία βιβλιοθηκών κλώνων

Πριν την ένθεση του υπο κλωνοποίηση τμήματος DNA στο φορέα pGEM-T (Promega, UK) στα προϊόντα της αλυσιδωτής αντίδρασης πολυμεράσης όπου χρησιμοποιήθηκαν εκκινητές εξειδικευμένοι για τους ασκομύκητες (ITS1F-ITS4A) και για τα νιτροποιητικά βακτήρια (CTO189f-CTO654r) ακολουθήθηκε διαδικασία προσθήκης πολυ-Α ουράς λόγω του μεγάλου χρονικού διαστήματος αποθήκευσης των PCR προϊόντων πριν την κλωνοποίηση (2 μήνες). Η προσθήκη μορίων αδενίνης στα άκρα των προϊόντων PCR είναι απαραίτητη για βέλτιστη ένθεση του DNA στον συγκεκριμένο φορέα. Για την δημιουργία των βιβλιοθηκών κλώνων, τα προϊόντα PCR από τις επαναλήψεις της ίδιας μεταχείρισης αναμίχθηκαν λόγω της χαμηλής παραλακτικότητας που παρατηρήθηκε στην σύσταση της μικροβιακής κοινότητας μεταξύ επαναλήψεων της ίδιας μεταχείρισης Έτσι, σε 60μl προϊόντος PCR προστέθηκαν 1μl dATP (100μM) και 0.24μl Kara Taq πολυμεράση, και τα δείγματα επωάστηκαν στους 72°C για 15 λεπτά. Ακολούθησε καθαρισμός των προϊόντων πολυμεράσης με τη χρήση του εμπορικού kit NucleoSpin® Extract II (Macherey-Nagel GmbH, Germany) σύμφωνα με τις οδηγίες του κατασκευαστή. Ένθεση του προϊόντος PCR στο φορέα pGEM-T πραγματοποιήθηκε με την μεταφορά σε σωληνάριο πολυπροπυλενίου, 5μl 2X Rapid Ligation Buffer, T4 DNA Ligase (Promega) 1μl προϊόν αντίδρασης πολυμεράσης, 1μl λιγάσης (T4 DNA Ligase, Promega), 0.5 μl φορέα pGEM®-T, και 2.5μl δις απιονισμένο νερό. Το δείγμα επωάστηκε στους 4°C για 24 ώρες.

Μετασχηματισμός

Ο φορέας pGEM®-T στον οποίο πραγματοποιήθηκε η ένθεση του τμήματος DNA, εισήχθηκε στην συνέχεια σε δεκτικά βακτήρια *E.coli* με ανθεκτικότητα στην αμπικιλίνη. Συγκεκριμένα, 2μl από την αντίδραση ένθεσης μεταφέρθηκαν σε σωληνάριο πολυπροπυλενίου 1.5ml μαζί με 80μl δεκτικών κυττάρων του βακτηρίου *E.coli*. Τα σωληνάρια αφέθηκαν στον πάγο για 30 λεπτά, και αμέσως μετά μεταφέρθηκαν σε θερμαινόμενη τράπεζα όπου και επωάστηκαν για 45 sec στους 42°C. Αμέσως μετά στα σωληνάρια μεταφέρθηκαν 200μl υποστρώματος LuriaBertrani (LB). και αναδεύτηκαν στους 37°C για 50 λεπτά. Ακολούθως, προστέθηκαν 50μl X-Gal (2%) και 10μl IPTG (0.1M). Τέλος στρώθηκαν τριβλία πετρί με αποστειρωμένο στερεό υπόστρωμα LB παρουσία αμπικιλίνης (50 μg/ml) και τα οποία επωάστηκαν για 24 ώρες στους 37°C. Με την πάροδο των 24 ωρών, τα τριβλία απομακρύνθηκαν από την επώαση και επιλέχτηκαν με την χρήση αποστειρωμένων οδοντογλυφίδων 25 ως 50 λευκές αποικίες ανά μεταχείριση οι οποίες μεταφέρθηκαν για ανάπτυξη σε πιάτα 96 θέσεων στα οποία προηγουμένως τοποθετήθηκε υγρό αποστειρωμένο υπόστρωμα LB παρουσία αμπικιλίνης (50 μg/ml).

Colony PCR και αλληλούχιση επιλεγμένων κλώνων

Παράλληλα με την μεταφορά των επιλεγμένων λευκών αποικιών για ανάπτυξη, κύτταρα των ιδίων αποικιών εμβαπτίστηκαν σε κελιά πιάτου 96 θέσεων για PCR. Ο συνολικός όγκος κάθε αντίδρασης στο κάθε κελί ήταν 15μl, και χρησιμοποιήθηκαν 1.5μl ρυθμιστικού

διαλύματος της πολυμεράσης που περιείχε $MgCl_2$ σε συγκέντρωση 15 mM (10x optimized), 0.3μl μίγματος ελεύθερων 5' τριφωσφορικών δεοξυριβονουκλεοτιδίων dNTPs (10mM), 0.3μl 357f-GC (10pmol/μl), 0.3μl 518r (10pmol/μl) για τα νιτροποιητικά βακτήρια και 0.3μl ITS1F-GC (20pmol/μl), 0.3μl ITS2 (20pmol/μl) για τους ασκομύκητες, 0.06μl KapaTaq πολυμεράση (1U/μl) και 11.64μl δις αποσταγμένο αποστειρωμένο H_2O . Οι θερμοκυκλοποιητές συνθήκες της αντίδρασης ήταν οι ίδιες με αυτές που αναφέρονται πιο πάνω για τα ίδια ζεύγη εκκινητών. Τα προϊόντα αντίδρασης ακολούθως ηλεκτροφορήθηκαν σε πηκτή αγαρόζης, και στα δείγματα στα οποία ανιχνεύθηκε ένθεμα DNA του αναμενόμενου μεγέθους, εφαρμόστηκε η τεχνική της ηλεκτροφορήσης σε πηκτή πολυακρυλαμιδίου με βαθμίδωση αποδιατακτικών ουσιών. Οι κλώνοι, συγκρίθηκαν ως προς την ηλεκτροφορητική τους κινητικότητα με τις ζώνες που περιλαμβάνονται στο περιβαλλοντικό δείγμα από το οποίο προήλθαν και από την επεξεργασία των αποτελεσμάτων επιλέχθηκαν συγκεκριμένοι κλώνοι. Ακολούθως απομονώθηκε το πλασμιδιακό DNA από τους επιλεγμένους κλώνους με τη χρήση του εμπορικού kit NucleoSpin[®] Plasmid (Macherey Nagel, Germany) σύμφωνα με τις οδηγίες του κατασκευαστή. Τέλος το πλασμιδιακό DNA απεστάλλει για αλληλούχιση στην εταιρεία Macrogen (Κορέα). Τα αποτελέσματα της αλληλούχισης αναλύθηκαν με το πακέτο Chromas. Έλεγχος της ομολογίας τους με αλληλουχίες κατατεθειμένες στην βάση δεδομένων NCBI πραγματοποιήθηκε με την χρήση του εργαλείου Basic Local Alignment Search Tool (BLAST, <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/BLAST>).

Βιβλιογραφία

- Adam, G., and H. Duncan. 2001. Development of a sensitive and rapid method for the measurement of total microbial activity using fluorescein diacetate (FDA) in a range of soils. *Soil Biology & Biochemistry* 33:943-951.
- Barillari, J., D. Canistro, M. Paolini, F. Ferroni, G.F. Pedulli, R. Iori, and L. Valgimigli. 2005. Direct antioxidant activity of purified glucoerucin, the dietary secondary metabolite contained in rocket (*Eruca sativa* Mill.) seeds and sprouts. *Journal of Agricultural and Food Chemistry* 53:2475-2482.
- Bennett, R.N., F.A. Mellon, N.P. Botting, J. Eagles, E.A.S. Rosa, and G. Williamson. 2002. Identification of the major glucosinolate (4-mercaptobutyl glucosinolate) in leaves of *Eruca sativa* L. (salad rocket). *Phytochemistry* 61:25-30.
- Blake-Kalff, M.M.A., K.R. Harrison, M.J. Hawkesford, F.J. Zhao, and S.P. McGrath. 1998. Distribution of sulfur within oilseed rape leaves in response to sulfur deficiency during vegetative growth. *Plant Physiology* 118:1337-1344.
- Bossio, D.A., K.M. Scow, N. Gunapala, and K.J. Graham. 1998. Determinants of soil microbial communities: Effects of agricultural management, season, and soil type on phospholipid fatty acid profiles. *Microbial Ecology* 36:1-12.
- Clegg, C.D., K. Ritz, and B.S. Griffiths. 1997. Direct extraction of microbial community DNA from humified upland soils. *Letters in Applied Microbiology* 25:30-33.
- Karpouzas, D.G., S. Ntougias, E. Iskidou, C. Rousidou, K.K. Papadopoulou, G. Zervakis, and C. Ehaliotis. 2009. The effects of soil application of olive mill wastewaters on functional soil bacterial communities. *Applied Soil Ecology*:In press.
- Mahmood, S., T.E. Freitag, and J.I. Prosser. 2006. Comparison of PCR primer-based strategies for characterization of ammonia oxidizer communities in environmental samples. *FEMS Microbiology Ecology* 56:482-493.
- Muyzer, G., E.C. Dewaal, and A.G. Uitterlinden. 1993. Profiling of complex microbial-populations by denaturing gradient gel-electrophoresis analysis of polymerase chain reaction-amplified genes-coding for 16s ribosomal-RNA. *Applied and Environmental Microbiology* 59:695-700.
- Nakatsu, C.H., V. Torsvik, and L. Ovreas. 2000. Soil community analysis using DGGE of 16S rDNA polymerase chain reaction products. *Soil Science Society of America Journal* 64:1382-1388.
- Ntougias, S., C. Ehaliotis, K.K. Papadopoulou, and G. Zervakis. 2006. Application of respiration and FDA hydrolysis measurements for estimating microbial activity during composting processes. *Biology and Fertility of Soils* 42:330-337.
- Omirou, M., I. Papastilianou, R. Iori, C. Papastephanou, K.K. Papadopoulou, C. Ehaliotis, and D.G. Karpouzas. 2009. Microwave-assisted Extraction of Glucosinolates from *Eruca sativa* Seeds and Soil: Comparison with Existing Methods. *Phytochemical Analysis* 20:214-220.

- Saint-Denis, T., and J. Goupy. 2004. Optimization of a nitrogen analyser based on the Dumas method. *Analytica Chimica Acta* 515:191-198.
- Spyrou, I.M., D.G. Karpouzas, and U. Menkissoglu-Spiroudi. 2009. Do botanical pesticides alter the structure of the soil microbial community. *Microbial Ecology* 58:715-727
- Torsvik, V., F.L. Daae, R.A. Sandaa, and L. Ovreas. 1998. Novel techniques for analysing microbial diversity in natural and perturbed environments. *Journal of Biotechnology* 64:53-62.

ΚΕΦΑΛΑΙΟ 3^ο

Η κατανομή του θείου στη συγκέντρωση ΓΚΣ σε διάφορα φυτικά όργανα ειδών της οικογένειας των Σταυρανθών

Περίληψη

Η καλλιέργεια των Σταυρανθών στις παραμεσόγειες περιοχές αποτελεί σημαντική γεωργική δραστηριότητα, κυρίως κατά την χειμερινή περίοδο. Τα προϊόντα που παράγονται είναι πλούσια σε χημειοπροστατευτικές ουσίες και κυρίως σε ΓΚΣ ενώ με το πέρασ της συγκομιδής, αφήνουν σημαντικές ποσότητες υπολειμμάτων στα αγροτεμάχια, που δυνητικά μπορεί να αποτελέσουν πηγή επισχετικών/τοξικών ουσιών για τους μικροοργανισμούς του εδάφους. Η διερεύνηση της συγκέντρωσης των ΓΚΣ στα φυτικά όργανα των διαφόρων ειδών και ποικιλιών Σταυρανθών και της κατανομής του θείου ως ποσοστό της συνολικής περιεκτικότητας των φυτικών ιστών, αποτελεί σημαντικό εργαλείο για την κατάταξη και αξιολόγηση των διαφόρων ποικιλιών ως προς τις χημειοπροστατευτικές τους ιδιότητες αλλά και την καταληλότητά τους (το δυναμικό τους) όσον αφορά εφαρμογές βιοαπολύμανσης του εδάφους. Για το σκοπό αυτό μελετήθηκαν 3 ομάδες Σταυρανθών του είδους *B. oleraceae* (λάχανο, κουνουπίδι και μπρόκολο) καθώς και το είδος *Eruca sativa* L. (ρόκα) ως προς τη συγκέντρωσή τους σε ΓΚΣ. Από τα αποτελέσματα βρέθηκε ότι, τόσο ο γενότυπος όσο το μέρος του φυτού επηρεάζουν σημαντικά τη συγκέντρωση των ΓΚΣ στους φυτικούς ιστούς ($p < 0.001$). Η υψηλότερη συγκέντρωση βρέθηκε στις ρίζες των φυτών ρόκας. Επίσης η ολική συγκέντρωση ΓΚΣ ήταν σημαντικά μεγαλύτερη στα φύλλα της ρόκας, από τα φύλλα όλων των υπόλοιπων ειδών και ποικιλιών που εξετάστηκαν και ήταν ίση με 27.99 $\mu\text{mol/g}$ ξβ. Στα φύλλα των ποικιλιών του είδους *Brassica oleraceae* η ολική συγκέντρωση ΓΚΣ κυμάνθηκε από 3.42 μέχρι 15.07 $\mu\text{mol/g}$ ξβ, και η υψηλότερη βρέθηκε στα φύλλα της ποικιλίας λαχάνου 15G2004 ενώ η μικρότερη στα φύλλα της ποικιλίας μπρόκολου Heraklion. Η ολική συγκέντρωση ΓΚΣ στα βρώσιμα τμήματα των ποικιλιών του είδους *Brassica oleraceae* κυμάνθηκε από 6.84 μέχρι 22.50 $\mu\text{mol/g dw}$. Η υψηλότερη συγκέντρωση βρέθηκε στις κεφαλές της ποικιλίας λαχάνου 15G2004 ενώ η μικρότερη συγκέντρωση στις ανθοκεφαλές της ποικιλίας κουνουπιδιού White excel. Η σύσταση των ΓΚΣ ήταν διαφορετική τόσο μεταξύ των ποικιλιών και ειδών που εξετάστηκαν αλλά και μεταξύ των διάφορων φυτικών οργάνων της ίδιας ποικιλίας. Το αρωματικό ΓΚΣ GST ανιχνεύθηκε μόνο στις ρίζες όλων των ειδών και ποικιλιών που εξετάστηκαν.

Επιπλέον, ο γενότυπος επηρέασε σημαντικά ($p < 0.001$) τη συγκέντρωση του θείου στα φυτά, ενώ η συγκέντρωση του στοιχείου αυτού μεταβλήθηκε ανάλογα με το μέρος του φυτού που εξετάστηκε. Η χρήση του θείου από τα φυτά για τη βιοσύνθεση των ΓΚΣ διαφοροποιήθηκε ανάλογα με το είδος. Επιπρόσθετα, η κατανομή του θείου σε ΓΚΣ ως ποσοστό της συνολικής συγκέντρωσης του θείου, ήταν διαφορετική ανάλογα με το μέρος του φυτού που εξετάστηκε. Στις ρίζες των ποικιλιών και ειδών που εξετάστηκαν, η κατανομή του θείου σε ΓΚΣ κυμάνθηκε από 8 μέχρι 59% και το χαμηλότερο ποσοστό ενσωμάτωσης, παρατηρήθηκε στην ποικιλία μπρόκολου

Marathon ενώ η υψηλότερη στις ρίζες των φυτών ρόκας. Στα φύλλα από την άλλη πλευρά η κατανομή του θείου κυμάνθηκε από 2.4 μέχρι 24.7% και το μεγαλύτερο ποσοστό κατανομής παρατηρήθηκε και πάλι στη ρόκα. Σε παρόμοια επίπεδα κυμάνθηκε και η κατανομή του θείου σε ΓΚΣ στα βρώσιμα τμήματα των ποικιλιών του είδους *Brassica oleraceae* που εξετάστηκαν.

Εισαγωγή

Τα Σταυρανθή αποτελούν μια από τις σημαντικότερες οικογένειες λαχανικών για τις παραμεσόγειες περιοχές, αφού όλα τα είδη της οικογένειας καλλιεργούνται ευρέως κατά τη διάρκεια του χειμώνα, ενώ ορισμένα καθ' όλη τη διάρκεια του έτους. Τα Σταυρανθή αποτελούν σημαντική πηγή χημειοπροστατευτικών ουσιών όπως είναι τα ΓΚΣ ενώ, μετά τη συγκομιδή τους, παραμένει στην εκμετάλλευση σημαντική ποσότητα φυτικών υπολειμμάτων (Vagen et al., 2007). Τα υπολείμματα των καλλιεργειών περιέχουν συγκεντρώσεις ΓΚΣ οι οποίες καταλήγουν στο έδαφος μετά την ενσωμάτωση των υπολειμμάτων. Η υδρόλυση των ΓΚΣ στο έδαφος και η παραγωγή ισοθιοκυανιούχων ενώσεων, τοξικών για ένα ευρύτατο φάσμα μικροοργανισμών που συμπεριλαμβάνει σημαντικά παθογόνα εδάφους, συνδέεται εκτός των άλλων με την επισχετική επίδραση των φυτικών υπολειμμάτων των Σταυρανθών σε διάφορες ασθένειες των καλλιεργούμενων φυτών (Kirkegaard and Matthiessen, 2004; Manici et al., 2004; Yulianti et al., 2006).

Τα είδη των Σταυρανθών καθώς και οι ποικιλίες του ίδιου είδους, παρουσιάζουν σημαντικές διαφορές ως προς τη συγκέντρωση και τη σύστασή τους σε ΓΚΣ (Bellostas et al., 2007a; Bellostas et al., 2007b; Bennett et al., 2003; Cartea et al., 2008; Charron et al., 2005; Fahey et al., 2001; Kushad et al., 1999; Pocock et al., 1987; Shelp et al., 1993). Ωστόσο η πλειονότητα των αναφορών στη διεθνή βιβλιογραφία αφορά την διερεύνηση της συγκέντρωσης και σύστασης των βρώσιμων τμημάτων των διαφόρων ειδών σε ΓΚΣ, λόγω του μεγάλου ενδιαφέροντος που παρουσιάζουν οι ουσίες αυτές για τη δημόσια υγεία. Επιδημιολογικές μελέτες έχουν καταδείξει ότι, διατροφή που περιλαμβάνει βρώσιμα μέρη Σταυρανθών μπορεί να μειώσει το κίνδυνο εμφάνισης διαφόρων μορφών καρκίνου, με ημερήσια πρόσληψη μόλις 10g (Graham, 1983; Kohlmeier and Su, 1997; Wattenberg, 1993).

Η συγκέντρωση και η σύσταση των ΓΚΣ σε άλλους φυτικούς ιστούς (φύλλα και ρίζα) δεν έχει μελετηθεί σε βάθος και οι βιβλιογραφικές αναφορές είναι περιορισμένες. Η διερεύνηση της συγκέντρωσης σε ΓΚΣ φυτικών ιστών εκτός από βρώσιμα τμήματα πραγματοποιήθηκε στο παρελθόν για την αξιολόγηση ειδών Σταυρανθών που χρησιμοποιούνται είτε ως βιομηχανικά φυτά είτε για την παραγωγή ζωοτροφών ή χρησιμοποιούνται αποκλειστικά ως φυτά βιοαπολύμανσης εδάφους (Bellostas et al., 2007a; Gimsing and Kirkegaard, 2006; Kirkegaard and Sarwar, 1998). Μέχρι σήμερα δεν υπάρχει στη βιβλιογραφία ολοκληρωμένη αναφορά που να αφορά στην διερεύνηση της περιεκτικότητας μη βρώσιμων τμημάτων σε ΓΚΣ διαφόρων ποικιλιών Σταυρανθών που ανήκουν στο είδος *Brassica oleracea* και χρησιμοποιούνται για την παραγωγή εδωδιμων προϊόντων.

Τα ΓΚΣ περιέχουν στο μόριο τους σημαντικές ποσότητες N και S και πρόδρομες ουσίες για τη βιοσύνθεσή τους αποτελούν διάφορα αμινοξέα και κυρίως η κυστεΐνη, η μεθειονίνη, η τρυπτοφάνη και η φαινυλαλανίνη (Falk et al., 2004; Grubb and Abel, 2006). Οι αυξημένες απαιτήσεις των Σταυρανθών σε θείο οφείλονται κατά κύριο λόγο στην βιοσύνθεση σημαντικής ποσότητας αυτών των ουσιών από τα φυτά (Haneklaus et al., 2007). Σημειώνεται ότι για την

βιοσύνθεση 1 mol ΓΚΣ απαιτούνται 2 mol S, μόνο για το σχηματισμό της κύριας δομής του μορίου, ενώ εάν το τελικό μόριο προέρχεται από την μεθειονίνη τότε το μόριο περιέχει συνολικά 3 mol S. Οι ελάχιστες αναφορές που υπάρχουν στη διεθνή βιβλιογραφία σχετικά με τη κατανομή του θείου σε ΓΚΣ ως ποσοστό επί του ολικού θείου αφορούν το μπρόκολο και την ελαιοκράμβη (Fieldsend and Milford, 1994; Rangkadilok et al., 2004).

Στόχος της πειραματικής ενότητας που παρουσιάζεται στο Κεφάλαιο 2 είναι α) η διερεύνηση της συγκέντρωσης των διαφόρων τύπων ΓΚΣ σε φυτικά υπολείμματα και βρώσιμα τμήματα διαφόρων ποικιλιών Σταυρανθών που καλλιεργούνται για την παραγωγή εδωδιμων προϊόντων και β) η διερεύνηση της ενσωμάτωσης του θείου στα ΓΚΣ των φυτικών οργάνων διαφόρων ποικιλιών Σταυρανθών. Επιχειρείται τέλος η ομαδοποίηση των ποικιλιών με βάση την κατανομή των συγκεντρώσεων διαφορετικών ΓΚΣ που αυτές παρουσιάζουν μέσω ανάλυσης πολυμεταβλητών δεδομένων.

Για την επίτευξη των στόχων της πειραματικής ενότητας τέθηκαν οι παρακάτω υποθέσεις:

1. Η συγκέντρωση των ΓΚΣ εξαρτάται από το γενότυπο και το φυτικό όργανο που εξετάζεται.
2. Η κατανομή του θείου στα ΓΚΣ στα διάφορα φυτικά όργανα και ποικιλίες διαφοροποιείται ανάλογα με την ποικιλία.

Υλικά και Μέθοδοι

Συνθήκες καλλιέργειας

Η συγκέντρωση των ΓΚΣ στα διάφορα φυτικά όργανα και η κατανομή του θείου στα ΓΚΣ συγκρίθηκαν υπό τις τυπικές αριστοποιημένες συνθήκες ανάπτυξης και θρέψης των ειδών και ποικιλιών που εξετάστηκαν. Συγκεκριμένα, σποροφυτά των ειδών και ποικιλιών που αναφέρονται πιο κάτω εγκαταστάθηκαν στον πειραματικό Σταθμό του Ινστιτούτου Γεωργικών Ερευνών στο Ζύγι της Κύπρου σε έδαφος μέσης σύστασης (άμμος 28% ιλύς 49% άργιλος 23%) με pH 7.6, και οργανική ουσία 0.93%. Τα σπορόφυτα εγκαταστάθηκαν το Δεκέμβριο του 2007 και δέχτηκαν βασική λίπανση με θειική αμμωνία (20 kg/ στρέμμα), τριπλό υπερφωσφορικό (15kg/ στρέμμα) και θειικό κάλιο (25 kg/ στρέμμα). Το πειραματικό σχέδιο ήταν πλήρως τυχαίο και κάθε πειραματικό τεμάχιο (ποικιλία) επαναλαμβανόταν τρεις φορές. Σε κάθε πειραματικό τεμάχιο, εγκαταστάθηκαν 30 σπορόφυτα της κάθε ποικιλίας σε αποστάσεις φύτευσης 0.45 X 0.90 cm εκτός από τη ρόκα όπου οι αποστάσεις φύτευσης ήταν 0.10X0.10 m. Η άρδευση στα φυτά ρόκας πραγματοποιήθηκε με καταιονηστήρες μικρού όγκου 4L/h ενώ η άρδευση των υπόλοιπων ειδών με ενσωματωμένες σταγόνες με παροχή 2.5 L/h. Όσον αφορά την προστασία των φυτών από εχθρούς και ασθένειες πραγματοποιήθηκαν ψεκασμοί με *B. thuringiensis* για την αντιμετώπιση του *P. brassica* και το spinosad και Naturalis (*Bauveria bassiana*) για την αντιμετώπιση αφίδων.

Φυτικό Υλικό

Χρησιμοποιήθηκαν 11 ποικιλίες των Brassica σε ένα πλήρως τυχαίο σχέδιο με κάθε ποικιλία να επαναλαμβάνεται 4 φορές. Συγκεκριμένα εξετάστηκαν 3 ομάδες Σταυρανθών του είδους *Brassica oleraceae* (λάχανο, κουνουπίδι, μπρόκολο) καθώς και μια ποικιλία ρόκας *Eruca sativa* M.:

| Είδος | Ομάδα | Ποικιλία |
|---------------------------|------------------------|--------------------------|
| <i>Brassica oleraceae</i> | Λάχανο | Gonzales |
| | | 15G58004 (Cab 15G) |
| | | Sobrero (κόκκινο λάχανο) |
| | Κουνουπίδι | Candid cham |
| | | Encando |
| | | Flamenco |
| | | White excel |
| | Μπρόκολο | Marathon |
| | | Parthenon |
| | | Heraklion |
| | | Batavia |
| | <i>Eruca sativa</i> M. | Ρόκα |

Δείγματα λήφθηκαν στο τέλος της καλλιεργητικής περιόδου, μετά την φυσιολογική ωρίμανση των βρώσιμων τμημάτων των ειδών που εξετάστηκαν. Στη ρόκα η συγκομιδή έγινε όταν τα φυτά απέκτησαν 8 με 10 πλήρως ανεπτυγμένα φύλλα. Συγκεκριμένα από κάθε πειραματικό τεμάχιο συγκομίστηκαν τυχαία 10 φυτά τα οποία δεν είχαν εντομολογικές προσβολές και τα διάφορα όργανα (βρώσιμα τμήματα, φύλλα και ρίζες) ενοποιούνταν σε ένα δείγμα. Οι ιστοί τοποθετούνταν σε πλαστικά σακούλια και αποθηκεύονταν σε ξηρό πάγο μέχρι τη μεταφορά τους στο εργαστήριο. Συνολικά από κάθε ποικιλία τελικά συλλέγονταν 4 δείγματα το κάθε ένα από τα οποία αποτελούνταν από 10 φυτά. Η διερεύνηση της συγκέντρωσης των διαφόρων ειδών σε ΓΚΣ, N και S πραγματοποιήθηκε σε βρώσιμα τμήματα, φύλλα και ρίζες σε όλα τα είδη και ποικιλίες που αξιολογήθηκαν με τις μεθόδους που περιγράφονται στο 2^ο Κεφάλαιο της παρούσας διατριβής.

Στατιστική Ανάλυση

Για τη στατιστική επεξεργασία των αποτελεσμάτων, έγινε ανάλυση διακύμανσης (ANOVA) και οι πολλαπλές συγκρίσεις των μέσων όρων για στατιστικά σημαντικές διαφορές πραγματοποιήθηκαν σύμφωνα με το κριτήριο Tukey-Kramer HSD (Honest significant difference). Για την ανάλυση διακύμανσης των δεδομένων ενσωμάτωσης του θείου σε ΓΚΣ ως ποσοστό του ολικού θείου που βρέθηκε στους υπό μελέτη ιστούς, τα αποτελέσματα μετατράπηκαν στις αντίστοιχες τιμές του τόξου συνημιτόνου, έτσι ώστε να επιτευχθεί κανονική κατανομή τους.

Η ομαδοποίηση των διαφόρων ποικιλιών ως προς τη συγκέντρωσή τους σε ΓΚΣ στα βρώσιμα τμήματα έγινε με την ανάλυση κατά συστάδες ή ομάδες (Cluster analysis). Η μέθοδος που χρησιμοποιήθηκε ήταν αυτή της πολυβηματικής ιεραρχικής ανάλυσης (Hierarchical analysis), ο τρόπος υπολογισμού της απόστασης μεταξύ των ποικιλιών έγινε σύμφωνα με το κριτήριο του εγγύτερου γείτονα (single linkage) ενώ ως μέτρο απόστασης χρησιμοποιήθηκε η Ευκλείδεια απόσταση (Euclidian distance).

Η επεξεργασία πραγματοποιήθηκε με τη χρήση του στατιστικού πακέτου STATISTICA 7.0.

Αποτελέσματα – Συζήτηση

Παραγωγή βιομάζας

Η παραγωγή βιομάζας (εκφρασμένη σε g ξηρού βάρους) διέφερε σημαντικά μεταξύ των διαφόρων ειδών και ποικιλιών που εξετάστηκαν ($p=0,05$). Η παραγωγή βιομάζας του υπέργειου τμήματος ήταν πάντοτε μεγαλύτερη από αυτή του ριζικού συστήματος σε όλα τα είδη και όλες τις ποικιλίες (Διάγραμμα 3.1). Ποικιλίες που ανήκαν στην ίδια ομάδα Σταυρανθών δεν διέφεραν σημαντικά ως προς την παραγωγή βιομάζας στις ανθοκεφαλές με εξαίρεση την ποικιλία White excel η οποία υπολείπεται σημαντικά συγκριτικά με τις υπόλοιπες ποικιλίες κουνουπιδιού (Διάγραμμα 3.1). Η χαμηλότερη παραγωγή βιομάζας βρέθηκε στην ποικιλία Marathon χωρίς να διαφέρει σημαντικά από τις άλλες ποικιλίες μπρόκολου και τις ποικιλίες λάχανου Sombrego και Cab 15G, ενώ η υψηλότερη στη ποικιλία Candid cham (Διάγραμμα 3.1).

Αντίθετα στην παραγωγή βιομάζας του υπέργειου τμήματος (εκτός των βρώσιμων τμημάτων) παρατηρήθηκαν διαφορές μεταξύ των ποικιλιών, που εξετάστηκαν και ανήκαν στην ίδια ομάδα Σταυρανθών. Συγκεκριμένα, στο μπρόκολο η ποικιλία Marathon παρουσίασε τη μικρότερη παραγωγή βιομάζας, αν και διέφερε σημαντικά μόνο από την ποικιλία Heraklion (Διάγραμμα 3.1). Επίσης στο λάχανο η ποικιλία Gonzales, παρουσίασε τη χαμηλότερη παραγωγή βιομάζας και ήταν στατιστικά σημαντική η διαφορά σε σχέση με τις άλλες δύο ποικιλίες που εξετάστηκαν, και οι οποίες δεν διέφεραν στατιστικά σημαντικά μεταξύ τους (Διάγραμμα 3.1). Παρόμοια συμπεριφορά παρατηρήθηκε και στις ποικιλίες κουνουπιδιού όπου η ποικιλία White excel παρουσίασε τη μικρότερη παραγωγή βιομάζας χωρίς όμως να διαφέρει από τις ποικιλίες Flamenco και Encando, ενώ διέφερε σημαντικά από τη Candid cham. Οι ποικιλίες Flamenco, Encando και Candid cham δεν διέφεραν σημαντικά μεταξύ τους (Διάγραμμα 3.1). Η υψηλότερη παραγωγή βιομάζας παρατηρήθηκε στην ποικιλία κουνουπιδιού, Candid cham και στην ποικιλία λαχάνου Sombrego ενώ η μικρότερη στη ρόκα (Διάγραμμα 3.1).

Από την άλλη πλευρά στις ρίζες δεν παρατηρήθηκαν διαφορές μεταξύ των ποικιλιών που ανήκουν στην ίδια ομάδα Σταυρανθών εκτός από την ποικιλία Marathon της οποίας η βιομάζα που μετρήθηκε ήταν σημαντικά μικρότερη από τη ποικιλία Parthenon. Η μικρότερη παραγωγή ριζικής βιομάζας βρέθηκε στη ρίζα της ρόκας, ενώ η υψηλότερη στην ποικιλία μπρόκολου Parthenon (Διάγραμμα 3.1).

Περιεκτικότητα σε N και S

Οι διάφορες ποικιλίες λαχάνου και κουνουπιδιού ως επί το πλείστον δεν διέφεραν σημαντικά μεταξύ τους ως προς την περιεκτικότητά τους σε άζωτο. Ωστόσο σημαντικά υψηλότερες συγκεντρώσεις N μετρήθηκαν στις ανθοκεφαλές των ποικιλιών μπρόκολου και κυμαίνονταν από 4,70 μέχρι 5,28 % με εξαίρεση την ποικιλία Marathon όπου μετρήθηκε σημαντικά χαμηλότερη συγκέντρωση αζώτου (3,71%). Αντίθετα η χαμηλότερη περιεκτικότητα σε άζωτο (1,48%) μετρήθηκε στις ρίζες του κουνουπιδιού Candid Cham. Γενικά η συγκέντρωση των

ριζών σε άζωτο ήταν μικρότερη από αυτή των υπέργειων τμημάτων σε όλα τα είδη που εξετάστηκαν (Διάγραμμα 3.2).

Όσον αφορά το θείο, η περιεκτικότητα των ποικιλιών που εξετάστηκε δεν διέφερε από τα επίπεδα θείου που αναφέρονται αλλού (Haneklaus et al., 2007; Rangkadilok et al., 2004; Rosa et al., 2002; Rosa et al., 1996; Schonhof et al., 2007). Η συγκέντρωση του θείου διαφοροποιήθηκε σημαντικά μεταξύ των διαφόρων οργάνων και των διαφόρων ποικιλιών ($p < 0.01$) και ($p < 0.001$) αντίστοιχα, ενώ παρατηρήθηκε σημαντική αλληλεπίδραση μεταξύ της ποικιλίας και του φυτικού οργάνου που εξετάστηκε ($p < 0.001$). Η χαμηλότερη συγκέντρωση θείου βρέθηκε στις ρίζες της ποικιλίας Marathon (0.45%) ενώ η υψηλότερη στα φύλλα της ποικιλία Flamenco (1.39%). Γενικά, η περιεκτικότητα σε θείο ήταν υψηλότερη στα φύλλα σε σχέση με τα υπόλοιπα όργανα αλλά αυτά εξαρτιόταν από την ποικιλία. Για παράδειγμα στις ανθοκεφαλές των ποικιλιών μπρόκολου, Parthenon και Batavia βρέθηκε υψηλότερη συγκέντρωση θείου σε σχέση με τα φύλλα (Διάγραμμα 3.2).

Η περιεκτικότητα των ανθοκεφαλών μπρόκολου σε άζωτο και θείο βρέθηκε ότι επηρεάζεται σημαντικά από το γενότυπο (είδος και ποικιλία) ενώ σημαντικές διαφορές παρατηρήθηκαν μεταξύ των διαφόρων φυτικών οργάνων (Rosa et al., 2002) και οι παρατηρήσεις αυτές επιβεβαιώνονται από τα αποτελέσματα της παρούσας διατριβής.

Περιεκτικότητα σε ΓΚΣ

Επιχειρήθηκε η ολοκληρωμένη διερεύνηση του τύπου και της συγκέντρωσης των ΓΚΣ στα υπό μελέτη Σταυρανθή (ποια ΓΚΣ, σε ποιες ποικιλίες σε ποιους ιστούς και σε ποιες συγκεντρώσεις): Μελετήθηκαν 11 διαφορετικές ποικιλίες διαφόρων ομάδων Σταυρανθών, και τρία διαφορετικά φυτικά όργανα (ρίζα, φύλλα, ανθοκεφαλές ή κεφαλές) για κάθε ποικιλία. Ανιχνεύθηκαν συνολικά 12 διαφορετικά μεμονωμένα ΓΚΣ και από την ανάλυση διακύμανσης προκύπτει ότι, η συγκέντρωσή τους επηρεάζεται σημαντικά από την ποικιλία και το φυτικό όργανο το οποίο εξετάστηκε ($p < 0.001$), καθώς επίσης και από την αλληλεπίδραση τους ($p < 0.001$).

Η συγκέντρωση και ο τύπος των ΓΚΣ που ανιχνεύθηκαν στις διαφορετικές ποικιλίες είναι χαρακτηριστικά για την κάθε μια από αυτές. Όμως οι ποικιλίες που ανήκουν στην ίδια ομάδα του είδους *B. oleracea* ομαδοποιούνται όσον αφορά την σύνθεση των γλυκοσινολικών στις ανθοκεφαλές τους με μόνη διαφορά τις ποικιλίες Marathon και Heraklion οι οποίες σχηματίζουν μια υποομάδα διαφορετική από τις άλλες δυο ποικιλίες μπρόκολου με μικρή όμως απόσταση μεταξύ τους (Διάγραμμα 3.3). Επίσης η ομάδα των ποικιλιών λάχανου διαφοροποιείται πολύ πιο έντονα από τις ομάδες μπρόκολου και κουνουπιδιού που εμφανίζονται «συγγενέστερες» όσον αφορά την σύνθεση των ΓΚΣ τους. Από τα δεδομένα αυτά φαίνεται ότι, τα ΓΚΣ των ανθοκεφαλών ως πρότυπο σύνθεσης (composition pattern) μπορεί να χρησιμοποιηθούν ως βιοδείκτες για την ταξινόμηση των διαφόρων ποικιλιών Σταυρανθών.

Οι αναφορές στη διεθνή βιβλιογραφία που σχετίζονται με την αξιολόγηση και διερεύνηση της περιεκτικότητας σε ΓΚΣ διαφόρων ποικιλιών του γένους *Brassica oleraceae* είναι πολλές (Bellostas et al., 2007a; Bellostas et al., 2007b; Bennett et al., 2007; Bennett et al., 2003; Carlson et al., 1987; Cartea et al., 2008; Charron et al., 2005; Fahey et al., 2001; Kushad et al., 1999; Kusznierevicz et al., 2008; Padilla et al., 2007; Schonhof et al., 2007; Vallejo et al., 2003). και τα αποτελέσματα της παρούσας διατριβής συνάδουν με τις αναφορές αυτές ως προς τη σύσταση και τη συγκέντρωση των ΓΚΣ στα βρώσιμα τμήματα. Ωστόσο δεδομένα που σχετίζονται με τη σύσταση των ΓΚΣ σε μη βρώσιμα τμήματα είναι περιορισμένα και περιορίζονται κυρίως σε μη καλλιεργούμενα είδη που προορίζονται για την εφαρμογή βιοαπολύμανσης των εδαφών (Gimsing and Kirkegaard, 2006; Kirkegaard and Sarwar, 1998; Porter et al., 1991). Η GST είναι το μοναδικό αρωματικό ΓΚΣ που ανιχνεύθηκε σε όλες τις ποικιλίες και εντοπίστηκε μόνο στο ριζικό σύστημα των φυτών.

Μπρόκολο

Το προφίλ των μεμονωμένων ΓΚΣ που βρέθηκαν στις ανθοκεφαλές των ποικιλιών μπρόκολου, είναι παρόμοιο με προηγούμενα ερευνητικά αποτελέσματα (Kushad et al., 1999; Moreno et al., 2006; Shelp et al., 1993; Vallejo et al., 2003). Συγκεκριμένα στις ανθοκεφαλές των ποικιλιών μπρόκολου, κυρίαρχο ΓΚΣ ήταν η GRA (5,08 ως 8,14 μmol/g ξ.β) σε αντίθεση με άλλες αναφορές που καταδεικνύουν ως κυρίαρχο ΓΚΣ την GBS (Vallejo et al., 2003). Στην παρούσα εργασία, η GBS είχε μικρότερες συγκεντρώσεις σε σχέση με την GRA σε όλες τις ποικιλίες που εξετάστηκαν και είναι παρόμοια με αυτές που αναφέρονται αλλού (Charron et al., 2005; Faulkner et al., 1998; Kushad et al., 1999). Ωστόσο στις ποικιλίες Batavia και την Parthenon ανιχνεύθηκαν αυξημένες συγκεντρώσεις neo-GBS της τάξεως των 6,98 και 7,59 μmol/g ξ.β αντίστοιχα και ήταν στα ίδια επίπεδα με την GRA.

Σε όλες τις ποικιλίες μπρόκολου εκτός από την GRA και την neo-GBS ανιχνεύθηκαν σε χαμηλότερες συγκεντρώσεις η GIB (0.79-2.78 μmol/g ξ.β) και η GBS (0.63-1.86 μmol/g ξ.β). Τα μεμονωμένα ΓΚΣ, GER 4-MeO-GBS και 4-OH-GBS ανιχνεύθηκαν μόνο στις ποικιλίες Heraklion και Marathon όπως και η 4-OH-GBS ενώ η GER ανιχνεύθηκε μόνο στην ποικιλία Heraklion. Από την άλλη πλευρά, η 4-MeO-GBS ανιχνεύθηκε σε όλες τις ποικιλίες μπρόκολου εκτός από την ποικιλία Heraklion. (Πίνακας 3.1).

Στα φύλλα των ποικιλιών μπρόκολου, ανιχνεύθηκαν 7 μεμονωμένα ΓΚΣ (Moreno et al., 2008) σε αντίθεση με ένα, που αναφέρεται από τους Kirkegaard και Sarwar (1998). Σε όλες τις ποικιλίες μπρόκολου, ανιχνεύθηκαν η GRA και η GBS ενώ η συγκέντρωση των ολικών ΓΚΣ ήταν σημαντικά μικρότερη από αυτήν των ανθοκεφαλών. Επιπρόσθετα παρατηρήθηκαν στατιστικά σημαντικές διαφορές μεταξύ των ποικιλιών ως προς τη συγκέντρωσή τους σε μεμονωμένα ΓΚΣ ($p < 0.001$). Όσον αφορά τη σύσταση των φύλλων σε ΓΚΣ παρατηρήθηκαν σημαντικές διαφορές μεταξύ των διαφόρων ποικιλιών. Συγκεκριμένα η GIB ανιχνεύθηκε μόνο στα φύλλα της ποικιλίας Marathon (0.22 μmol/g ξ.β) ενώ η 4-OH GBS μόνο στα φύλλα της Batavia (0.07 μmol/g ξ.β).

Αντίθετα στις ανθοκεφαλές η GIB ανιχνεύθηκε σε όλες τις ποικιλίες, ενώ η 4-OH-GBS ανιχνεύθηκε μόνο στις ποικιλίες Heraklion και Marathon. Η 4-MeO-GBS στα φύλλα ανιχνεύθηκε μόνο στις ποικιλίες Parthenon (0.09μmol/g ξ.β) και Heraklion (0.16μmol/g ξ.β) ενώ η neo GBS ανιχνεύθηκε στις ποικιλίες Heraklion (1.46μmol/g ξ.β) και Marathon (0.47μmol/g ξ.β) (Πίνακας 3.2). Στις ανθοκεφαλές η 4-MeO-GBS ανιχνεύθηκε σε όλες τις ποικιλίες πλην της Heraklion και η neo GBS ανιχνεύθηκε σε όλες τις ποικιλίες. Η έντονη αυτή διαφοροποίηση της σύστασης των φύλλων σε σχέση με τις ανθοκεφαλές (Bellostas et al., 2007a) κατά το στάδιο της άνθισης πιθανό να σχετίζεται με την μεταφορά ΓΚΣ από τα φύλλα στα αναπαραγωγικά όργανα του φυτού από τη μια ενώ είναι επίσης πιθανή η διάσπαση των ουσιών και η χρήση τόσο του αζώτου όσο και του θείου για την ικανοποίηση των θρεπτικών αναγκών των φυτών (Falk et al., 2007).

Στις ρίζες ανιχνεύθηκαν 6 διαφορετικά μεμονωμένα ΓΚΣ όπως αναφέρεται και αλλού (Kirkegaard and Sarwar, 1998) ενώ, η συνολική συγκέντρωση των αλειφατικών ΓΚΣ ήταν σημαντικά μεγαλύτερη από τους άλλους τύπους ΓΚΣ εκτός από την ποικιλία Marathon (Πίνακας 3.3). Στην ποικιλία αυτή η συγκέντρωση των ινδολικών και αρωματικών ΓΚΣ ήταν περίπου στα ίδια επίπεδα. Τα ινδολικά ΓΚΣ στις υπόλοιπες ποικιλίες βρέθηκαν σε πολύ μικρότερες συγκεντρώσεις στο ριζικό σύστημα.

Όπως και στα φύλλα έτσι και στις ρίζες παρατηρήθηκε σημαντική διαφοροποίηση των μεμονωμένων ΓΚΣ που ανιχνεύθηκαν ανάλογα με τη ποικιλία ($p < 0.001$). Στην ποικιλία Batavia ανιχνεύθηκαν τα μεμονωμένα ΓΚΣ GIB, GRA, GER, GBS, GST και neo-GBS. Από αυτά τα μόρια, δεν ανιχνεύθηκαν στα φύλλα οι GIB και neo-GBS, ενώ ανιχνεύθηκε η 4-OH-GBS. Στις ανθοκεφαλές της ποικιλίας αυτής ανιχνεύθηκαν όλα τα μεμονωμένα ΓΚΣ που βρέθηκαν στις ρίζες εκτός από την GER. Τα μεμονωμένα ΓΚΣ με τις μεγαλύτερες συγκεντρώσεις στις ρίζες της ποικιλίας Batavia ήταν η GRA, GER και GST (Πίνακας 3.3). Στη ποικιλία Parthenon ανιχνεύθηκαν τα ίδια μεμονωμένα ΓΚΣ με αυτά της ποικιλίας Batavia, με τη GST να παρουσιάζει την υψηλότερη συγκέντρωση (7.69μmol/g ξ.β). Στα φύλλα της ποικιλίας Parthenon, δεν ανιχνεύθηκε GIB και η neo-GBS όπως ακριβώς και στη ποικιλία Batavia. Οι άλλες δύο ποικιλίες μπρόκολου, Heraklion και Marathon, παρουσίασαν διαφορετικό προφίλ μεμονωμένων ΓΚΣ σε σχέση με τις ποικιλίες Batavia και Parthenon αλλά και μεταξύ τους. Στις δύο αυτές ποικιλίες, δεν ανιχνεύθηκε η GIB στις ρίζες, ενώ ανιχνεύθηκε η 4-MeO-GBS. Επιπρόσθετα στην ποικιλία Marathon δεν ανιχνεύθηκε η GER.

Λάχανο

Στα φυτικά όργανα των ποικιλιών Λάχανου που εξετάστηκαν, ανιχνεύθηκαν 8 διαφορετικά μεμονωμένα ΓΚΣ (Πίνακας 3.1 ως 3.3). Σε όλες τις ποικιλίες και σε όλα τα φυτικά όργανα που εξετάστηκαν ανιχνεύθηκε η GIB, η SIN και η neo-GBS. Το προφίλ των υπόλοιπων ΓΚΣ που ανιχνεύθηκαν μεταβαλλόταν ανάλογα με το φυτικό όργανο και την ποικιλία (Kirkegaard and Sarwar, 1998). Ο Cartea και συνεργάτες (2008) ανίχνευσαν σε 29 ποικιλίες λάχανου, 11 μεμονωμένα ΓΚΣ ενώ παρόμοια αποτελέσματα αναφέρθηκαν σε αγγλικού τύπου λάχανο (Pocock

et al., 1987). Οι διαφορές που παρατηρούνται στο προφίλ των μεμονωμένων ΓΚΣ στις διάφορες εργασίες πιθανότατα οφείλονται στις διαφορετικές περιοχές καλλιέργειας και παραγωγής των ιστών που αναλύθηκαν (Kusznierewicz et al., 2008).

Στις κεφαλές και στα φύλλα των ποικιλιών λάχανου, η συγκέντρωση των αλειφατικών ΓΚΣ ήταν πάντα υψηλότερη από αυτή των ινδολικών ΓΚΣ. Η συνολική συγκέντρωση των ΓΚΣ στις ρίζες ήταν πάντα μεγαλύτερη από αυτή των υπέργειων οργάνων που εξετάστηκαν (Πίνακας 3.2) (Kirkegaard and Sarwar, 1998). Ανεξαρτήτως ποικιλίας στις κεφαλές των λάχανων κυρίαρχο μεμονωμένο ΓΚΣ ήταν η SIN (Πίνακας 3.1) και η συγκέντρωσή της να κυμάνθηκε από 4,74 ως 16,94 μmol/g ξ,β (Charron et al., 2005; Kushad et al., 1999; Kusznierewicz et al., 2008; Pocock et al., 1987). Ο Cartea και συνεργάτες (2008) αναφέρουν ως κυρίαρχο ΓΚΣ την GIB και ακολούθως τη SIN και τη GBS.

Από τα μεμονωμένα ΓΚΣ που ανιχνεύθηκαν στις κεφαλές των ποικιλιών λάχανου που εξετάστηκαν, η PRO δεν ανιχνεύθηκε στην ποικιλία 15G58004 ενώ η 4-OH-GBS ανιχνεύθηκε μόνο στην ποικιλία κόκκινου λάχανου (Πίνακας 3.1). Στα βρώσιμα τμήματα των ποικιλιών λάχανου, οι συγκεντρώσεις των ολικών ΓΚΣ διέφεραν στατιστικά σημαντικά μεταξύ τους, και η ποικιλία 15G58004 περιείχε την υψηλότερη συγκέντρωση (22,5 μmol/g ξ,β) ενώ, οι ποικιλίες Sobrero και Gonzales περιείχαν μικρότερες συγκεντρώσεις (16,61 και 13,82 μmol/g ξ,β αντίστοιχα). Οι δύο τελευταίες ποικιλίες δεν παρουσίασαν στατιστικά σημαντικές διαφορές ως προς τη συνολική περιεκτικότητά τους σε αλειφατικά ΓΚΣ, αλλά διέφεραν σημαντικά από την ποικιλία 15G58004. Όσον αφορά την περιεκτικότητά τους σε ινδολικά ΓΚΣ η μικρότερη συγκέντρωση βρέθηκε στην ποικιλία Gonzales και ήταν στατιστικά σημαντικά μικρότερη σε σύγκριση με τις άλλες δύο ποικιλίες, που δεν διέφεραν μεταξύ τους (Πίνακας 3.1). Η συνολική συγκέντρωση των ΓΚΣ που βρέθηκε στην παρούσα εργασία είναι παρόμοια με αυτή που αναφέρεται αλλού στη βιβλιογραφία (Cartea et al., 2008; Kusznierewicz et al., 2008).

Στη διεθνή βιβλιογραφία δεν υπάρχουν αναφορές σχετικά με την περιεκτικότητα των φύλλων και των ριζών ποικιλιών λάχανου όπου να γίνεται συγκριτική αναφορά μεταξύ τους. Οι Kirkegaard και Sarwar (1998) αναφέρουν την παρουσία 6 μεμονωμένων ΓΚΣ σε φύλλα καλλιεργούμενης ποικιλίας λάχανου. Στα φύλλα λάχανου η σύσταση σε μεμονωμένα ΓΚΣ διέφερε ανάλογα με την ποικιλία. Συγκεκριμένα η GRA και η 4-MeO-GBS ανιχνεύθηκε μόνο στις ποικιλίες Sobrero και 15G58004, ενώ η 4-OH-GBS μόνο στη ποικιλία 15G58004. Η μεγαλύτερη συγκέντρωση μεμονωμένου ΓΚΣ ανιχνεύθηκε στην ποικιλία 15G58004 και αυτή ήταν η GIB (Πίνακας 3.2). Από την άλλη πλευρά, η συγκέντρωση της SIN δεν διέφερε σημαντικά μεταξύ των ποικιλιών ενώ, ήταν σημαντικά μικρότερη ($p < 0.001$) σε σύγκριση με τη συγκέντρωση που ανιχνεύθηκε στις κεφαλές των λάχανων που εξετάστηκαν (Πίνακας 3.1 και 2.2).

Η συγκέντρωση των ολικών ΓΚΣ στα φύλλα, διέφερε στατιστικά σημαντικά μεταξύ των ποικιλιών, καθώς και από τη συγκέντρωση που βρέθηκε στις κεφαλές ($p < 0.001$). Η ποικιλία 15G58004, όπως και στις κεφαλές, περιείχε την υψηλότερη συγκέντρωση συνολικών ΓΚΣ (15,07 μmol/g ξ,β) ενώ οι ποικιλίες Sobrero και Gonzales περιείχαν μικρότερες συγκεντρώσεις

(10,82 και 6,2 $\mu\text{mol/g}$ ξ,β αντίστοιχα). Οι διάφορες ποικιλίες παρουσίασαν στατιστικά σημαντικές διαφορές μεταξύ τους ως προς τη συνολική συγκέντρωσή τους σε αλειφατικά ΓΚΣ. Η υψηλότερη συγκέντρωση να βρέθηκε στην ποικιλία 15G58004 και μικρότερη στην ποικιλία Gonzales. Όσον αφορά τη συνολική συγκέντρωσή τους σε ινδολικά ΓΚΣ (Πίνακας 3.2), η μικρότερη συγκέντρωση βρέθηκε στις ποικιλίες Sobrero και Gonzales και διέφερε στατιστικά σημαντικά από την ποικιλία 15G2004 ενώ οι συγκεντρώσεις που βρέθηκαν στην παρούσα διατριβή ήταν πολύ μεγαλύτερες από αυτές που αναφέρθηκαν από τον Kikergaard και Sarwar (1998).

Στις ρίζες όπως και στα υπόλοιπα φυτικά όργανα των ποικιλιών λάχανου τα προφίλ των μεμονωμένων ΓΚΣ που ανιχνεύθηκαν διέφεραν μεταξύ τους. Συγκεκριμένα η GRA και η 4-MeO-GBS ανιχνεύθηκαν μόνο στις ποικιλίες Sobrero και Gonzales αντίστοιχα ενώ, η 4-OH-GBS ανιχνεύθηκε μόνο στη ποικιλία 15G58004. Σημειώνεται ότι η GST ήταν το αρωματικό ΓΚΣ που ανιχνεύθηκε στις ρίζες όλων των ποικιλιών. Η SIN ήταν το κυρίαρχο ΓΚΣ με τις υψηλότερες συγκεντρώσεις σε όλες τις ποικιλίες (Πίνακας 3.3) με εξαίρεση την ποικιλία Gonzales στην οποία η συγκέντρωσή της SIN ήταν στα ίδια επίπεδα με την GST (Πίνακας 3.3). Η συγκέντρωση των ολικών ΓΚΣ διέφερε στατιστικά σημαντικά μεταξύ των ποικιλιών, και η ποικιλία 15G58004 να περιείχε την υψηλότερη συγκέντρωση (31.89 $\mu\text{mol/g}$ ξ,β) ενώ οι ποικιλίες Sobrero και Gonzales περιείχαν μικρότερες συγκεντρώσεις και δεν διέφεραν στατιστικά μεταξύ τους (19.12 και 19.69 $\mu\text{mol/g}$ ξ,β αντίστοιχα). Οι ποικιλίες παρουσίασαν στατιστικά σημαντικές διαφορές μεταξύ τους ως προς τη συνολική συγκέντρωσή τους σε αλειφατικά ΓΚΣ. Η υψηλότερη συγκέντρωση παρατηρήθηκε στην ποικιλία 15G58004 και μικρότερη στην ποικιλία Gonzales (Πίνακας 3.3). Όσον αφορά τα ινδολικά ΓΚΣ η μικρότερη συγκέντρωση βρέθηκε στην ποικιλία Sobrero και η διαφορά της ήταν στατιστικά σημαντική σε σχέση με την ποικιλία Gonzales ενώ δεν διέφερε σημαντικά με την ποικιλία 15G58004 (Πίνακας 3.3).

Κουνουπίδι

Στα φυτικά όργανα των ποικιλιών κουνουπιδιού που εξετάστηκαν, ανιχνεύθηκαν 8 διαφορετικά μεμονωμένα ΓΚΣ (Πίνακας 3.1 ως 3.3). Σε όλες τις ποικιλίες και σε όλα τα φυτικά όργανα που εξετάστηκαν ανιχνεύθηκε η GIB και η neo-GBS (όπως και στις ποικιλίες λάχανου), και η GBS και SIN πλην στις ρίζες της Candid Cham. Το προφίλ των υπόλοιπων ΓΚΣ που ανιχνεύθηκαν μεταβαλλόταν ανάλογα με το φυτικό όργανο και την ποικιλία.

Στις κεφαλές των ποικιλιών κουνουπιδιού, η συγκέντρωση των ινδολικών ΓΚΣ ήταν πάντα υψηλότερη από αυτή των αλειφατικών ΓΚΣ (Carlson et al., 1987; Charron et al., 2005; Kushad et al., 1999). Η GBS ήταν το ΓΚΣ με την υψηλότερη συγκέντρωση (4.09 $\mu\text{mol/g}$ ξ,β) και ανιχνεύθηκε στην ποικιλία Candid Cham ενώ, στις υπόλοιπες ποικιλίες η συγκέντρωσή της κυμάνθηκε σε συγκεντρώσεις από 1.53 μέχρι 2.53 $\mu\text{mol/g}$ ξ,β (Πίνακας 3.1). Από τα μεμονωμένα ΓΚΣ που ανιχνεύθηκαν στις ανθοκεφαλές των ποικιλιών κουνουπιδιού που εξετάστηκαν, η 4-MeO-GBS ανιχνεύθηκε μόνο στην ποικιλία Encando (Πίνακας 3.1). Η συγκέντρωση των αλειφατικών ΓΚΣ δεν διέφερε στατιστικά σημαντικά μεταξύ των διαφόρων ποικιλιών που

εξετάστηκαν. Στατιστικά σημαντικές διαφορές μεταξύ των ποικιλιών εντοπίστηκαν στη συνολική συγκέντρωση των ολικών και ινδολικών ΓΚΣ. Η μεγαλύτερη συγκέντρωση ινδολικών ΓΚΣ ανιχνεύθηκε στην ποικιλία *Candid cham* (7,28 μ mol/g ξ,β) και στην ποικιλία *Flamenco* (6,91 μ mol/g ξ,β) και η διαφορά τους δεν ήταν στατιστικά σημαντική. Σημαντικά μικρότερες συγκεντρώσεις βρέθηκαν στις άλλες δυο ποικιλίες οι οποίες όμως δεν διέφεραν σημαντικά μεταξύ τους (Πίνακας 3.1). Η ολική συγκέντρωση των ΓΚΣ που ανιχνεύθηκε στις ανθοκεφαλές των ποικιλιών *Candid cham* και *Encando* δεν διέφερε μεταξύ τους και ήταν σημαντικά μεγαλύτερη από τις άλλες δυο ποικιλίες *κουνουπιδιού* που εξετάστηκαν που επίσης δεν διέφεραν σημαντικά μεταξύ τους (Πίνακας 3.1).

Στα φύλλα *κουνουπιδιού* η σύσταση των μεμονωμένων ΓΚΣ που ανιχνεύθηκαν διέφερε ανάλογα με την ποικιλία. Συγκεκριμένα η 4-MeO-GBS ανιχνεύθηκε μόνο στις ποικιλίες *Encando* και *White excel*, ενώ η 4-OH-GBS μόνο στη ποικιλία *Encando*. Σε όλες τις ποικιλίες που εξετάστηκαν η συγκέντρωση των ινδολικών ΓΚΣ ήταν μεγαλύτερη από αυτή των αλειφατικών εκτός της *White excel* στην οποία τα επίπεδα των δυο τύπων ΓΚΣ ήταν περίπου τα ίδια (Πίνακας 3.2). Η μεγαλύτερη συγκέντρωση μεμονωμένου ΓΚΣ ανιχνεύθηκε στην ποικιλία *White excel* και ήταν ή *GIB* (5 μ mol/g ξ,β). Στις άλλες ποικιλίες η συγκέντρωση της *GIB* ήταν σημαντικά μικρότερη (Πίνακας 3.2). Η συγκέντρωση των ολικών ΓΚΣ στα φύλλα *κουνουπιδιού* διέφερε στατιστικά σημαντικά μεταξύ των ποικιλιών (Πίνακες 2.1 και 2.2). Η ποικιλία *White excel*, περιείχε την υψηλότερη συνολική συγκέντρωση ΓΚΣ στα φύλλα (11.92 μ mol/g ξ,β) ενώ οι ποικιλίες *Candid cham*, *Encando* και *Gonzales* περιείχαν μικρότερες συγκεντρώσεις (9.27, 6.80 και 8.87 μ mol/g ξ,β αντίστοιχα). Οι ποικιλίες παρουσίασαν στατιστικά σημαντικές διαφορές μεταξύ τους ως προς τη συνολική περιεκτικότητα τους σε αλειφατικά ΓΚΣ με υψηλότερη συγκέντρωση να παρατηρείται στην ποικιλία *White excel* και μικρότερη στις ποικιλίες *Candid cham* και *Encando* (Πίνακας 3.2). Όσον αφορά τη συγκέντρωσή τους σε ινδολικά ΓΚΣ, η μικρότερη συγκέντρωση βρέθηκε στην ποικιλία *Flamenco* και διέφερε στατιστικά σημαντική με τις υπόλοιπες ποικιλίες (Πίνακας 3.2).

Στις ρίζες όπως και στα υπόλοιπα φυτικά όργανα των ποικιλιών *κουνουπιδιού* η σύσταση σε μεμονωμένα ΓΚΣ που ανιχνεύθηκαν διέφερε ανάλογα με την ποικιλία. Συγκεκριμένα η *SIN* ανιχνεύθηκε σε όλες τις ποικιλίες εκτός από την ποικιλία *Candid cham*. Η *GST* ήταν το κυρίαρχο ΓΚΣ με την υψηλότερη συγκέντρωση και αυτή κυμάνθηκε από 11,55 μέχρι 19,94 μ mol/g ξ,β (Πίνακας 3.3). Η συγκέντρωση των ολικών ΓΚΣ διέφερε στατιστικά σημαντικά μεταξύ των ποικιλιών, και η ποικιλία *White excel* να περιείχε την υψηλότερη συγκέντρωση (31.57 μ mol/g ξ,β), οι ποικιλίες *Encado* και *Flamenco* περιείχαν μικρότερες συγκεντρώσεις και δεν διέφεραν στατιστικά μεταξύ τους (23.50 και 26.74 μ mol/g ξ,β αντίστοιχα) ενώ η μικρότερη συγκέντρωση βρέθηκε στην ποικιλία *Candid Cham* (15.14 μ mol/g ξ,β). Επιπρόσθετα στατιστικά σημαντικές διαφορές παρατηρήθηκαν μεταξύ των ποικιλιών ως προς τη συγκέντρωσή τους σε αλειφατικά ΓΚΣ. Η υψηλότερη συγκέντρωση παρατηρήθηκε στην ποικιλία *White excel* και η μικρότερη στην ποικιλία *Candid cham* (Πίνακας 3.3). Αντίθετα όσον αφορά τη συγκέντρωση σε ινδολικά ΓΚΣ, δεν βρέθηκαν στατιστικά σημαντικές διαφορές μεταξύ των ποικιλιών (Πίνακας 3.3).

Ρόκα

Στα φυτικά όργανα της ρόκας που εξετάστηκαν βρέθηκαν συνολικά 7 μεμονωμένα ΓΚΣ (Πίνακας 3.2 και 3.3) και συμπίπτουν με αυτά που αναφέρονται αλλού (Bennett et al., 2002; Bennett et al., 2006; Bennett et al., 2007). Ωστόσο σε φύλλα ρόκας έχει ανιχνευθεί και ένα μόριο (4-(beta-D-glucopyranosyldisulfanyl)butyl glucosinolate) το οποίο δεν ανιχνεύθηκε στην παρούσα εργασία (Kim et al., 2004; Kim et al., 2007). Επιπρόσθετα στην παρούσα διατριβή ανιχνεύθηκε η GNA και αυτή είναι η πρώτη αναφορά στη διεθνή βιβλιογραφία για την παρουσία του μορίου αυτού σε φύλλα ρόκας. Κυρίαρχο ΓΚΣ στα φύλλα ήταν η GRA σε αντίθεση με την GSV που αναφέρεται από τον Bennett και συνεργάτες (2007). Η GSV στην παρούσα εργασία ήταν το δεύτερο σε συγκέντρωση ΓΚΣ στα φύλλα της ποικιλίας ρόκας που εξετάστηκε και η συγκέντρωσή της είναι μικρότερη από αυτή που βρέθηκαν αλλού (Bennett et al., 2002; Bennett et al., 2007).

Στη ρίζα ανιχνεύθηκε η GST και είναι η πρώτη αναφορά στη βιβλιογραφία για την παρουσία αυτού του ΓΚΣ στις ρίζες ρόκας ενώ ανιχνεύθηκαν μικρές συγκεντρώσεις ινδολικών ΓΚΣ (Bennett et al., 2006). Κυρίαρχο μεμονωμένο ΓΚΣ που ανιχνεύθηκε στη ρίζα ήταν η GER (26.34 μmol/g ξ.β). Η συνολική συγκέντρωση των αλειφατικών ΓΚΣ διέφερε σημαντικά ($p < 0.001$) από αυτή των ινδολικών ΓΚΣ τόσο στο φύλλα όσο και στις ρίζες της ρόκας (Πίνακας 3.2 και 1.3).

Κατανομή του S σε ΓΚΣ

Η ενσωμάτωση του θείου σε ΓΚΣ διέφερε στις διάφορες ποικιλίες και στα διάφορα όργανα που εξετάστηκαν στην παρούσα διατριβή. Συγκεκριμένα η ποσότητα θείου που προσλήφθηκε και αφομοιώθηκε σε ΓΚΣ κυμάνθηκε από 5 ως 17% στις κεφαλές και ανθοκεφαλές, 3 μέχρι 24% στα φύλλα και 8 μέχρι 59% στις ρίζες των διαφόρων ποικιλιών που εξετάστηκαν (Διάγραμμα 3.4). Το μεγαλύτερο ποσοστό ενσωμάτωσης θείου σε ΓΚΣ τόσο στις ρίζες όσο και στα φύλλα παρατηρήθηκε στα φυτά ρόκας. Σε όλες τις ποικιλίες εκτός από την Marathon, η ποσότητα του συνολικού θείου που χρησιμοποιήθηκε για την βιοσύνθεση ΓΚΣ ήταν μεγαλύτερη στις ρίζες σε σύγκριση με τα υπόλοιπα φυτικά όργανα. Αντίθετα στα φύλλα η ποσότητα του θείου που χρησιμοποιήθηκε από τα φυτά για τη βιοσύνθεση ΓΚΣ ήταν μικρότερη από τις ανθοκεφαλές με εξαίρεση την ποικιλία Marathon όπου το ποσοστό αφομοίωσης θείου δεν διέφερε, και την ποικιλία White Excel όπου το ποσοστό αφομοίωσης θείου ήταν διπλάσιο σε σχέση με τις ανθοκεφαλές (Διάγραμμα 3.4).

Στις ανθοκεφαλές τριών διαφορετικών ποικιλιών Μπρόκολου, η ποσότητα θείου που αφομοιώθηκε σε GRA κυμάνθηκε από 4.1 μέχρι 10% της συνολικής ποσότητας θείου (Rangkadilok et al., 2004). Το ποσοστό αυτό είναι αρκετά υψηλότερο από αυτό που βρέθηκε στην παρούσα εργασία, διότι το μοναδικό ΓΚΣ που προσδιορίστηκε ήταν η GRA αφού οι ερευνητές αυτοί δεν υπολόγισαν τη ενσωμάτωση του θείου στα υπόλοιπα ΓΚΣ τα οποία υπάρχουν στους ιστούς του μπρόκολου. Οι ίδιοι ερευνητές παρατήρησαν στατιστικά σημαντική επίδραση του γενότυπου στην κατανομή του θείου και την αφομοίωση μέρους του σε GRA.

Επιπρόσθετα οι Fieldsend και Milford (1994) παρατήρησαν ότι το ποσοστό θείου που ενσωματώθηκε σε φύλλα ελαιοκράμβης δεν ξεπερνούσε το 5% του ολικού θείου στο στάδιο της άνθισης του φυτού. Τα αποτελέσματα αυτά επιβεβαιώνονται από τα αποτελέσματα που βρέθηκαν στην παρούσα διατριβή, αφού το ποσοστό θείου που ενσωματώθηκε σε ΓΚΣ στα φύλλα των ποικιλιών που εξετάστηκαν κυμάνθηκε από 2.7 μέχρι 10.5%. Στή ρόκα βρέθηκε υψηλότερο ποσοστό ενσωμάτωσης του θείου σε ΓΚΣ (24%) συγκριτικά με όλα τα άλλα σταυρανθή που εξετάστηκαν. Η υψηλή αυτή συγκέντρωση στα φύλλα της ρόκας πιθανά οφείλεται και στην έλλειψη μεταφοράς ΓΚΣ σε αναπαραγωγικά όργανα μεγάλης βιομάζας όπως οι ανθοκεφαλές των *Brassica oleraceae*. Σε φύλλα ελαιοκράμβης, το 70 με 90% του θείου που προσελήφθηκε από τα φυτά, βρέθηκε στα φύλλα με τη μορφή των θειικών ιόντων ενώ μόνο το 1% χρησιμοποιήθηκε από το φυτό για τη βιοσύνθεση γλουταθειόνης και ΓΚΣ (Blake-Kalff et al., 1998) δεδομένο που συνάδει με την παραπάνω υπόθεση.

Η αφομοίωση του θείου υπό τη μορφή ΓΚΣ σε τόσο υψηλά ποσοστά στις ρίζες πιθανόν να σχετίζεται με την αφομοίωση του θρεπτικού αυτού στοιχείου, με την μορφή των ΓΚΣ. Αυτά τα στοιχεία υποδηλώνουν ότι τα ΓΚΣ είναι απαραίτητα στο ριζικό σύστημα είτε ως μόρια αποθήκευσης θείου ή ως μόρια που δρουν προστατευτικά κατά αυτό το στάδιο ανάπτυξης. Παρόλα αυτά όμως περισσότερα στοιχεία είναι αναγκαία για την επιβεβαίωση αυτής της υπόθεσης και δεν μπορεί να απαντηθούν από την παρούσα διατριβή.

Συμπεράσματα

Από την παρούσα εργασία διαπιστώνεται ότι ο γενότυπος και το είδος του φυτικού ιστού επηρεάζουν σημαντικά τη σύσταση των ΓΚΣ καθώς επίσης και τη συγκέντρωσή τους. Διαφοροποιήσεις παρατηρούνται επίσης και στην περιεκτικότητα των ιστών σε N και S (βασικά δομικά στοιχεία για τον σχηματισμού ΓΚΣ). Τα φυτά αφομοιώνουν το θείο σε ΓΚΣ σε πολύ υψηλό ποσοστό επί του ολικού θείου στις ρίζες σε σχέση με τα υπόλοιπα φυτικά όργανα που εξετάστηκαν.

Βιβλιογραφία

- Bellostas, N., J.C. Sorensen, and H. Sorensen. 2007a. Profiling glucosinolates in vegetative and reproductive tissues of four Brassica species of the U-triangle for their biofumigation potential. *Journal of the Science of Food and Agriculture* 87:1586-1594.
- Bellostas, N., P. Kachlicki, J.C. Sørensen, and H. Sørensen. 2007b. Glucosinolate profiling of seeds and sprouts of *B. oleracea* varieties used for food. *Scientia Horticulturae* 114:234-242.
- Bennett, R., F.A. Mellona, N.P. Bottingb, J. Eaglesa, E.A.S. Rosac, and G. Williamsona. 2002. Identification of the major glucosinolate (4-mercaptobutyl glucosinolate) in leaves of *Eruca sativa* L. (salad rocket). *Phytochemistry* 61 25-30.
- Bennett, R.N., E.A.S. Rosa, F.A. Mellon, and P.A. Kroon. 2006. Ontogenic profiling of glucosinolates, flavonoids, and other secondary metabolites in *Eruca sativa* (salad rocket), *Diplotaxis erucoides* (wall rocket), *Diplotaxis tenuifolia* (wild rocket), and *Bunias orientalis* (Turkish rocket). *Journal of Agricultural and Food Chemistry* 54:4005-4015.
- Bennett, R.N., R. Carvalho, F.A. Mellon, J. Eagles, and E.A.S. Rosa. 2007. Identification and quantification of glucosinolates in sprouts derived from seeds of wild *Eruca sativa* L. (salad rocket) and *Diplotaxis tenuifolia* L. (wild rocket) from diverse geographical locations. *Journal of Agricultural and Food Chemistry* 55:67-74.
- Bennett, R.N., F.A. Mellon, N. Foidl, J.H. Pratt, M.S. Dupont, L. Perkins, and P.A. Kroon. 2003. Profiling glucosinolates and phenolics in vegetative and reproductive tissues of the multi-purpose trees *Moringa oleifera* L. (horseradish tree) and *Moringa stenopetala* L. *Journal of Agricultural and Food Chemistry* 51:3546-3553.
- Blake-Kalff, M.M.A., K.R. Harrison, M.J. Hawkesford, F.J. Zhao, and S.P. McGrath. 1998. Distribution of sulfur within oilseed rape leaves in response to sulfur deficiency during vegetative growth. *Plant Physiology* 118:1337-1344.
- Carlson, D.G., M.E. Daxenbichler, C.H. Vanetten, W.F. Kwolek, and P.H. Williams. 1987. Glucosinolates in crucifer vegetables - Broccoli, Brussels-Sprouts, Cauliflower, Collards, Kale, Mustard Greens, and Kohlrabi. *Journal of the American Society for Horticultural Science* 112:173-178.
- Cartea, M.E., P. Velasco, S. Obregon, G. Padilla, and A. de Haro. 2008. Seasonal variation in glucosinolate content in Brassica oleracea crops grown in northwestern Spain. *Phytochemistry* 69:403-410.
- Charron, C.S., A.M. Saxton, and C.E. Sams. 2005. Relationship of climate and genotype to seasonal variation in the glucosinolate-myrosinase system. I. Glucosinolate content in ten cultivars of Brassica oleracea grown in fall and spring seasons. *Journal of the Science of Food and Agriculture* 85:671-681.
- Fahey, W.J., T.A. Zalcmann, and P. Talalay. 2001. The chemical diversity and distribution of glucosinolates and isothiocyanates among plants. *Phytochemistry* 56:5-51.

- Falk, K.L., J.G. Tokuhsa, and J. Gershenzon. 2007. The effect of sulfur nutrition on plant glucosinolate content: physiology and molecular mechanisms. *Plant Biology* 9:573-581.
- Falk, K.L., C. Vogel, S. Textor, S. Bartram, A. Hick, J.A. Pickett, and J. Gershenzon. 2004. Glucosinolate biosynthesis: demonstration and characterization of the condensing enzyme of the chain elongation cycle in *Eruca sativa*. *Phytochemistry* 65:1073-1084.
- Faulkner, K., R. Mithen, and G. Williamson. 1998. Selective increase of the potential anticarcinogen 4-methylsulphanylbutyl glucosinolate in broccoli. *Carcinogenesis* 19:605-609.
- Fieldsend, J., and G.F.J. Milford. 1994. Changes in glucosinolates during crop development in single-low and double-low genotypes of winter oilseed rape (*Brassica napus*) .1. Production and distribution in vegetative tissues and developing pods during development and potential role in the recycling of sulfur within the crop. *Annals of Applied Biology* 124:531-542.
- Gimsing, A.L., and J.A. Kirkegaard. 2006. Glucosinolate and isothiocyanate concentration in soil following incorporation of Brassica biofumigants. *Soil Biology and Biochemistry* 38:2255-2264.
- Graham, S. 1983. Results of case-control studies of diet and cancer in Buffalo, New-York. *Cancer Research* 43:2409-2413.
- Grubb, C.D., and S. Abel. 2006. Glucosinolate metabolism and its control. *Trends in Plant Science* 11:89-100.
- Haneklaus, S., E. Bloem, and E. Schnug. 2007. Sulfur interactions in crop ecosystems., p. 17-59, *In* M. Hawkesford and J. L. De Kok, eds. *Sulphur in plants*. Springer, Dordrecht, The Netherlands.
- Kim, S.J., S. Jin, and G. Ishii. 2004. Isolation and structural elucidation of 4-(beta-D-glucopyranosyldisulfanyl)butyl glucosinolate from leaves of rocket salad (*Eruca sativa* L.) and its antioxidative activity. *Bioscience Biotechnology and Biochemistry* 68:2444-2450.
- Kim, S.J., C. Kawaharada, S. Jin, M. Hashimoto, G. Ishii, and H. Yamauchi. 2007. Structural elucidation of 4-(cystein-S-yl)butyl glucosinolate from the leaves of *Eruca sativa*. *Bioscience Biotechnology and Biochemistry* 71:114-121.
- Kirkegaard, J.A., and M. Sarwar. 1998. Biofumigation potential of brassicas I. Variation in glucosinolate profiles of diverse field-grown brassicas. *Plant and Soil* 201:71-89.
- Kirkegaard, J.A., and J.N. Matthiessen. 2004. Developing and refining the biofumigation concept. *Agroindustria* 3:233-240.
- Kohlmeier, L., and L. Su. 1997. Cruciferous vegetable consumption and colorectal cancer risk: Meta-analysis of the epidemiological evidence. *Faseb Journal* 11:2141-2141.
- Kushad, M.M., A.F. Brown, A.C. Kurilich, J.A. Juvik, B.P. Klein, M.A. Wallig, and E.H. Jeffery. 1999. Variation of glucosinolates in vegetable crops of *Brassica oleracea*. *Journal of Agricultural and Food Chemistry* 47:1541-1548.

- Kusznierewicz, B., A. Bartoszek, L. Wolska, J. Drzewiecki, S. Gorinstein, and J. Namiesnik. 2008. Partial characterization of white cabbages (*Brassica oleracea* var. *capitata* f. *alba*) from different regions by glucosinolates, bioactive compounds, total antioxidant activities and proteins. *LWT - Food Science and Technology* 41:1-9.
- Manici, L.M., F. Caputo, and V. Babini. 2004. Effect of green manure on *Pythium spp.* population and microbial communities in intensive cropping systems. *Plant and Soil* 263:133-143.
- Moreno, D.A., M. Carvajal, C. Lopez-Berenguer, and C. Garcia-Viguera. 2006. Chemical and biological characterisation of nutraceutical compounds of broccoli. *Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis* 41.
- Moreno, D.A., C. Lopez-Berenguer, M.C. Martinez-Ballesta, M. Carvajal, and C. Garcia-Viguera. 2008. Basis for the new challenges of growing broccoli for health in hydroponics. *Journal of the Science of Food and Agriculture* 88:1472-1481.
- Padilla, G., M.E. Cartea, P. Velasco, A. de Haro, and A. Ordas. 2007. Variation of glucosinolates in vegetable crops of *Brassica rapa*. *Phytochemistry* 68:536-545.
- Pocock, K., R.K. Heaney, A.P. Wilkinson, J.E. Beaumont, J.G. Vaughan, and G.R. Fenwick. 1987. Changes in myrosinase activity and isoenzyme pattern, glucosinolate content and the cytology of myrosin cells in the leaves of heads of 3 cultivars of english whiite cabbage. *Journal of the Science of Food and Agriculture* 41:245-257.
- Porter, A.J.R., A.M. Morton, G. Kiddle, K.J. Doughty, and R.M. Wallsgrove. 1991. Variation in the glucosinolate content of oilseed rape (*Brassica napus* L) leaves .1. Effect of leaf age and position. *Annals of Applied Biology* 118:461-467.
- Rangkadilok, N., M.E. Nicolas, R.N. Bennett, D.R. Eagling, R.R. Premier, and P.W.J. Taylor. 2004. The effect of sulfur fertilizer on glucoraphanin levels in broccoli (*B-oleracea* L. var. *italica*) at different growth stages. *Journal of Agricultural and Food Chemistry* 52:2632-2639.
- Rosa, E.A.S., S.H. Haneklaus, and E. Schnug. 2002. Mineral content of primary and secondary inflorescences of eleven broccoli cultivars grown in early and late seasons. *Journal of Plant Nutrition* 25:1741-1751.
- Rosa, E.A.S., R.K. Heaney, C.A.M. Portas, and G.R. Fenwick. 1996. Changes in glucosinolate concentrations in Brassica crops (*B. oleracea* and *B. napus*) throughout growing seasons. *Journal of the Science of Food and Agriculture* 71:237-244.
- Schonhof, I., D. Blankenburg, S. Muller, and A. Krumbein. 2007. Sulfur and nitrogen supply influence growth, product appearance, and glucosinolate concentration of broccoli. *Journal of Plant Nutrition and Soil Science-Zeitschrift Fur Pflanzenernahrung Und Bodenkunde* 170:65-72.
- Shelp, B.J., L. Liu, and D. McLellan. 1993. Glucosinolate composition of broccoli (*Brassica oleracea* Var *Italica*) grown under various boron treatments at 3 Ontario sites. *Canadian Journal of Plant Science* 73:885-888.

- Vagen, I.M., Aamlid T.S., and A.O. Skjelvag. 2007. Nitrogen fertilization to broccoli cultivars at different planting times: Yield and nitrogen use. *Acta Agriculturae Scandinavica, Section B - Plant Soil Science* 57:35-44.
- Vallejo, F., F.A. Tomas-Barberan, A.G. Benavente-Garcia, and C. Garcia-Viguera. 2003. Total and individual glucosinolate contents in inflorescences of eight broccoli cultivars grown under various climatic and fertilisation conditions. *Journal of the Science of Food and Agriculture* 83:307-313.
- Wattenberg, L.W. 1993. Inhibition of carcinogenesis by nonnutrient constituents of the diet. , p. 12-24, *In* K. W. Waldron and I. T. Johnson, eds. *Food and Cancer Prevention: Chemical and Biological Aspects*. The Royal Society of Chemistry, London, England.
- Yulianti, T., K. Sivasithamparam, and D.W. Turner. 2006. Saprophytic growth of *Rhizoctonia solani* Kuhn AG2-1 (ZG5) in soil amended with fresh green manures affects the severity of damping-off in canola. *Soil Biology and Biochemistry* 38:923-930.

Πίνακες και Διαγράμματα

Πίνακας 3.1 Περιεκτικότητα βρώσιμων τμημάτων διαφόρων ποικιλιών Σταυρανθών σε μεμονωμένα ΓΚΣ (μmol/g dw)

| | 1 ⁴ | 2 | 3 | 4 | 5 | 6 | 7 | 8 | 9 | 10 | 11 |
|------------|---|-----------------|-----------------|-----------------|-----------------|-----------------|-----------------|-----------------|-----------------|-----------------|----------------|
| GIB | 1,74 ^{1c3} ±0,15 ² | 0,89ab ±0,22 | 3,66e ±0,53 | 0,94ab ±0,26 | 0,92ab ±0,16 | 1,02ab ±0,20 | 1,29bc ±0,29 | 2,78d ±0,38 | 0,79ab ±,19 | 1,91c ±0,34 | 0,39a ±0,10 |
| PRO | 0,49a ±0,03 | - | 0,77b ±0,22 | - | - | - | - | - | - | - | - |
| GRA | - | 0,09a ±0,04 | 2,72b ±0,34 | - | 0,29a ±0,06 | - | - | 6,11cd ±0,74 | 5,08c ±0,27 | 7,16de ±1,21 | 8,14e ±0,60 |
| SIN | 9,38c ±0,26 | 16,94d ±1,16 | 4,74b ±0,41 | 1,25a ±0,23 | 1,66a ±0,20 | 1,14a ±0,25 | 1,00a ±0,21 | - | - | - | - |
| GNA | - | - | - | - | - | - | - | - | - | - | - |
| 4-OH-GBS | - | - | 0,78b ±0,23 | 0,19a ±0,05 | 0,28a ±0,06 | 1,01b ±0,23 | 0,36a ±0,05 | - | - | 2,51c ±0,46 | 0,30a ±0,08 |
| GSV | - | - | - | - | - | - | - | - | - | - | - |
| GER | - | - | - | - | - | - | - | - | - | 2,67 0,45 | - |
| GBS | 1,82bc ±0,20 | 4,28f ±0,27 | 3,49e ±0,21 | 4,09f ±0,29 | 2,11cd ±0,19 | 2,53d ±0,31 | 1,53b ±0,14 | 0,76a ±0,10 | 1,86bc ±0,09 | 0,63a ±0,15 | 0,95a ±0,16 |
| GST | - | - | - | - | - | - | - | - | - | - | - |
| 4-MeO-GBS | 0,28b ±0,07 | 0,15a ±0,03 | 0,22ab ±0,04 | - | 0,11a ±0,04 | - | - | 0,17ab ±0,06 | 0,59c ±0,08 | - | 0,70c ±0,11 |
| neo-GBS | 0,12a ±0,05 | 0,13a ±0,02 | 0,25a ±0,04 | 3,00d ±0,20 | 1,63c ±0,18 | 3,37d ±0,25 | 2,66cd ±0,20 | 6,98e ±0,55 | 7,59e ±1,63 | 0,14a ±0,04 | 0,99b ±0,08 |
| Ολικά | 11.60d | 17.93e | 11.8d | 2.19a | 2.87a | 2.16a | 2.30a | 8.89c | 5.87b | 11.74d | 8.53c |
| Αλειφατικά | ±0.26 | ±1.31 | ±1.27 | ±0.41 | ±0.31 | ±0.34 | ±0.38 | ±0.80 | ±0.38 | ±1.69 | ±0.56c |
| Ολικά | 2.21a | 4.57c | 4.73c | 7.28d | 4.13bc | 6.91d | 4.55c | 7.91d | 10.05e | 3.29b | 2.94ab |
| Ινδολικά | ±0.29 | ±0.29 | ±0.46 | ±0.16 | ±0.38 | ±0.69 | ±0.29 | ±0.65 | ±1.54 | ±0.53 | ±0.28 |
| Ολικά | - | - | - | - | - | - | - | - | - | - | - |
| Αρωματικά | - | - | - | - | - | - | - | - | - | - | - |
| Ολικά | 13.82cd | 22.50f | 16.61e | 9.41b | 6.99a | 9.06b | 6.84a | 16.80e | 15.91d e | 15.03d e | 11.47bc |
| ΓΚΣ | ±0.46 | ±1.53 | ±1.73 | ±0.47 | ±0.59 | ±0.95 | ±0.66 | ±0.92 | ±1.82 | ±1.60 | ±0.41 |

¹ Μέσος Όρος τεσσάρων επαναλήψεων (n=4), ² Τυπικό σφάλμα μέσων όρων.

³ Διαφορετικά γράμματα υποδηλώνουν στατιστικά σημαντικές διαφορές μεταξύ των μέσων όρων των διαφόρων ποικιλιών για κάθε μεμονωμένο ΓΚΣ μετά από την εφαρμογή του κριτηρίου Tukey HSD σε επίπεδο σημαντικότητας α=0,05.

⁴ Ποικιλίες που εξετάστηκαν

1. Λάχανο ποικ. Gonzales, **2.** Λάχανο ποικ. 15G2004, **3.** Λάχανο (κόκκινο) ποικ. Sombrero, **4.** Κουνουπίδι ποικ. Candid Cham **5.** Κουνουπίδι ποικ. Encando **6.** Κουνουπίδι ποικ. Flamenco, **7.** Κουνουπίδι ποικ. White excel, **8.** Μπρόκολο ποικ. Batavia, **9.** Μπρόκολο ποικ. Parthenon, **10.** Μπρόκολο ποικ. Heraklion, **11.** Μπρόκολο ποικ. Marathon

Πίνακας 3.2 Περιεκτικότητα των φύλλων διαφόρων ποικιλιών Σταυρανθών σε μεμονωμένα ΓΚΣ (μmol/g dw)

| | 1 ⁴ | 2 | 3 | 4 | 5 | 6 | 7 | 8 | 9 | 10 | 11 | 12 |
|---------------------|--|-----------------|------------------|---------------------|-----------------|-----------------|---------------------|---------------------|----------------------|---------------------|-----------------|----------------------|
| GIB | 0,86 ¹ ab ³ ±0,18 | 7,26f ±0,50 | 4,03d ±0,33 | 2,11c ±0,38 | 1,22b ±0,27 | 2,65c ±0,37 | 5,00e ±0,25 | - | - | - | 0,22a ±0,05 | - |
| PRO | 0,27a ±0,04 | 0,27a ±0,03 | 0,46a ±0,12 | - | - | - | - | - | - | - | - | - |
| GRA | - | 0,43ab ±0,08 | 1,62b ±0,20 | 0,13a ±0,04 | 0,22a ±0,05 | 0,67ab ±0,22 | 0,38a b ±0,10 | 5,42c ±0,57 | 0,31ab ±0,07 | 0,91a b ±0,19 | 4,98c ±0,60 | 15,39d ±1,63 |
| SIN | 3,79c 0,65 | 3,66c 0,32 | 3,61c 0,16 | 0,41a 0,10 | 1,03b 0,16 | 0,40a 0,10 | 0,58a b 0,14 | - | - | - | - | - |
| GNA | - | - | - | - | - | - | - | - | - | - | - | 2,53 ±0,45a |
| 4-OH-GBS | - | 0,08a ±0,02 | - | - | 3,12b ±0,39 | - | - | 0,07a ±0,01 | - | - | - | - |
| GSV | - | - | - | - | - | - | - | - | - | - | - | 5,88a 0,40 |
| GER | - | - | - | - | - | - | - | 4,03b ±0,47 | 3,52b ±0,29 | - | - | 2,78a ±0,64 |
| GBS | 1,12d ±0,13 | 3,11e ±0,28 | 0,91d ±0,04 | 4,59g ±0,37 | 0,11a ±0,02 | 3,29ef ±0,42 | 3,72f ±0,21 | 0,1ab ±0,03 | 0,38ab c ±0,05 | 0,89d ±0,06 | 0,73cd ±0,13 | 0,63bc d ±0,15 |
| GST | - | - | - | - | - | - | - | - | - | - | - | - |
| 4-MeO-GBS | - | 0,10a ±0,02 | 0,10a ±0,03 | - | 0,09a ±0,03 | - | 0,15a ±0,04 | - | 0,09a ±0,02 | 0,16a ±0,04 | - | 0,79b ±0,08 |
| neo-GBS | 0,17ab ±0,05 | 0,16ab ±0,03 | 0,08a ±0,02 | 2,03e ±0,31 | 1,03c ±0,18 | 1,86e ±0,34 | 2,08e ±0,13 | - | - | 1,46d ±0,13 | 0,47b ±0,10 | - |
| Ολικά Αλειφατικά | 4.91cd ±0.58 | 11.62f ±0.74 | 9.72e ±0.63 | 2.65a b ±0.29 | 2.46ab ±0.28 | 3.72bc ±0.68 | 5.97d ±0.23 | 9.45e ±0.77 | 3.83bc ±0.29 | 0.91a ±0.19 | 5.21cd ±0.58 | 26.58g ±1.98 |
| Ολικά Ινδολικά | 1.29c ±0.17 | 3.45e ±0.32 | 1.09bc ±0.03 | 6.62h ±0.38 | 4.34f ±0.53 | 5.15g ±0.60 | 5.95h ±0.26 | 0.24a ±0.03 | 0.48ab ±0.07 | 2.51d ±0.21 | 1.20bc ±0.20 | 1.42c ±0.21 |
| Ολικά Αρωματικά | - | - | - | - | - | - | - | - | - | - | - | - |
| Ολικά ΓΚΣ | 6.20bc ±0.63 | 15.07g ±0.98 | 10.82ef ±0.64 | 9.27e ±0.53 | 6.80cd ±0.70 | 8.87de ±1.22 | 11.92 f ±0.47 | 9.69e f ±0.78 | 4.31ab ±0.34 | 3.42a ±0.37 | 6.40bc ±0.75 | 27.99h ±2.15 |

¹ Μέσος Όρος τεσσάρων επαναλήψεων (n=4), ² Τυπικό σφάλμα μέσων όρων.

³ Διαφορετικά γράμματα υποδηλώνουν στατιστικά σημαντικές διαφορές μεταξύ των μέσων όρων των διαφόρων ποικιλιών για κάθε μεμονωμένο ΓΚΣ μετά από την εφαρμογή του κριτηρίου Tukey HSD σε επίπεδο σημαντικότητας α=0,05.

⁴ Ποικιλίες που εξετάστηκαν

1. Λάχανο ποικ. Gonzales, **2.** Λάχανο ποικ. 15G2004, **3.** Λάχανο (κόκκινο) ποικ. Sombbrero, **4.** Κουνουπίδι ποικ. Candid Cham **5.** Κουνουπίδι ποικ. Encando **6.** Κουνουπίδι ποικ. Flamenco, **7.** Κουνουπίδι ποικ. White excel, **8.** Μπρόκολο ποικ. Batavia, **9.** Μπρόκολο ποικ. Parthenon, **10.** Μπρόκολο ποικ. Heraklion, **11.** Μπρόκολο ποικ. Marathon **12.** Ρόκα ποικ. Eruca sativa M.

Πίνακας 3.3 Περιεκτικότητα των ριζών διαφόρων ποικιλιών Σταυρανθών σε μεμονωμένα ΓΚΣ (μmol/g dw)

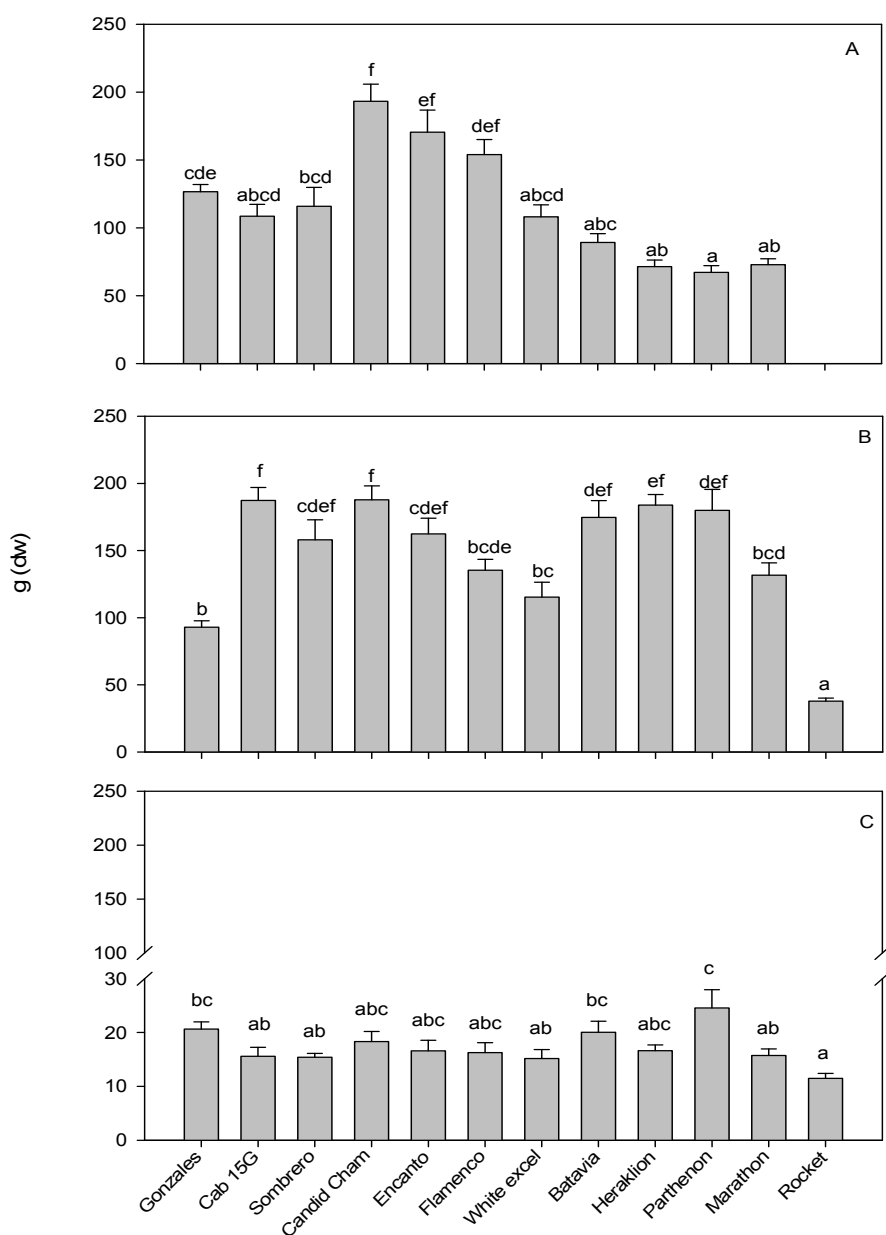
| | 1 ⁴ | 2 | 3 | 4 | 5 | 6 | 7 | 8 | 9 | 10 | 11 | 12 |
|------------------|---|---------------------|----------------------|---------------------|----------------------|---------------------|---------------------|----------------------|----------------------|----------------------|---------------------|-----------------|
| GIB | 1,28 ^{1c3} ±0,16 ² | 0,62a b | 0,34a | 2,61d e | 1,09bc | 0,65a b | 2,52d e | 2,83e | 2,13d | - | - | - |
| PRO | 0,33 ±0,09 | - | - | - | - | - | - | - | - | - | - | - |
| GRA | - | - | 0,75a ±0,20 | - | - | - | - | 5,54c ±0,64 | 4,67b ±0,52 | 9,72d ±0,46 | 0,46a ±0,12 | 10,57e ±0,67 |
| SIN | 6,88ab ±0,31 | 17,56 d | 11,48c | - | 5,24a | 5,57a | 7,96b | - | - | - | - | - |
| GNA | - | - | - | - | - | - | - | - | - | - | - | - |
| 4-OH-GBS | - | 0,28b ±0,03 | - | 0,23a b | 0,21ab | 0,42c | 0,18a | - | - | - | - | - |
| GSV | - | - | - | - | - | - | - | - | - | - | - | - |
| GER | - | - | - | - | - | - | - | 4,03a ±0,47 | 4,99b ±0,45 | 1,96a ±0,19 | - | 26,34c ±3,31 |
| GBS | 2,84e ±0,24 | 0,31b ±0,04 | - | 0,26b ±0,07 | 0,22ab ±0,07 | 0,35b ±0,04 | 0,22a b ±0,05 | 0,17a ±0,03 | 0,17a ±0,06 | 0,38bc ±0,05 | 0,65d ±0,14 | 0,62d ±0,16 |
| GST | 7,6c ±0,85 | 12,35 d ±1,24 | 5,96bc | 11,55 d ±1,10 | 16,24e ±1,33 | 19,26f ±1,11 | 19,94f ±1,91 | 4,47b ±0,36 | 7,69c ±0,47 | 7,74c ±1,01 | 2,37a ±0,63 | 2,25a ±0,43 |
| 4-MeO-GBS | 0,11a ±0,02 | - | - | - | - | - | - | - | - | 0,27b ±0,07 | 1,54d ±0,19 | 0,53c ±0,17 |
| neo-GBS | 0,06a ±0,02 | 0,77c ±0,08 | 1,16d ±0,14 | 0,49b ±0,06 | 0,49b ±0,04 | 0,49b ±0,04 | 0,75c ±0,15 | 0,67bc ±0,04 | 0,64bc ±0,06 | 0,66bc ±0,03 | 0,58b c ±0,11 | - |
| Ολικά Αλειφατικά | 8.49cd ±0.41 | 18.18f ±1.19 | 12.57e ±1.33 | 2.61b ±0.55 | 6.34b ±1.43 | 6.22b ±0.59 | 10.47 c ±0.62 | 12.40d ±1.06 | 11.79d ±0.74 | 11.68d ±0.54 | 0.46a ±0.12 | 36.92g ±3.82 |
| Ολικά Ινδολικά | 3.02c ±0.26 | 1.37b ±0.12 | 1.16ab ±0.14 | 0.98a ±0.20 | 0.92a ±0.09 | 1.25 ±0.05 | 1.16a b ±0.10 | 0.85a ±0.07 | 0.81a ±0.07 | 1.3ab ±0.15 | 2.77c ±0.11 | 1.15ab ±0.15 |
| Ολικά Αρωματικά | 7.60c ±0.85 | 12.35 d ±1.24 | 5.96bc ±0.77 | 11.55 d ±1.10 | 16.24e ±1.33 | 19.26f ±1.11 | 19.94f ±1.91 | 4.47ab ±0.36 | 7.69c ±0.47 | 7.74c ±1.01 | 2.37a ±0.63 | 2.25a ±0.43 |
| Ολικά ΓΚΣ | 19.12bcd ±1.36 | 31.89f ±2.38 | 19.6bc d ±2.08 | 15.14 b ±1.42 | 23.50d e ±2.62 | 26.74 e ±1.44 | 31.57f ±1.52 | 17.71b c ±1.00 | 20.29c d ±0.82 | 20.72c d ±1.50 | 5.6a ±0.84 | 40.32h ±3.76 |

¹ Μέσος Όρος τεσσάρων επαναλήψεων (n=4), ² Τυπικό σφάλμα μέσων όρων.

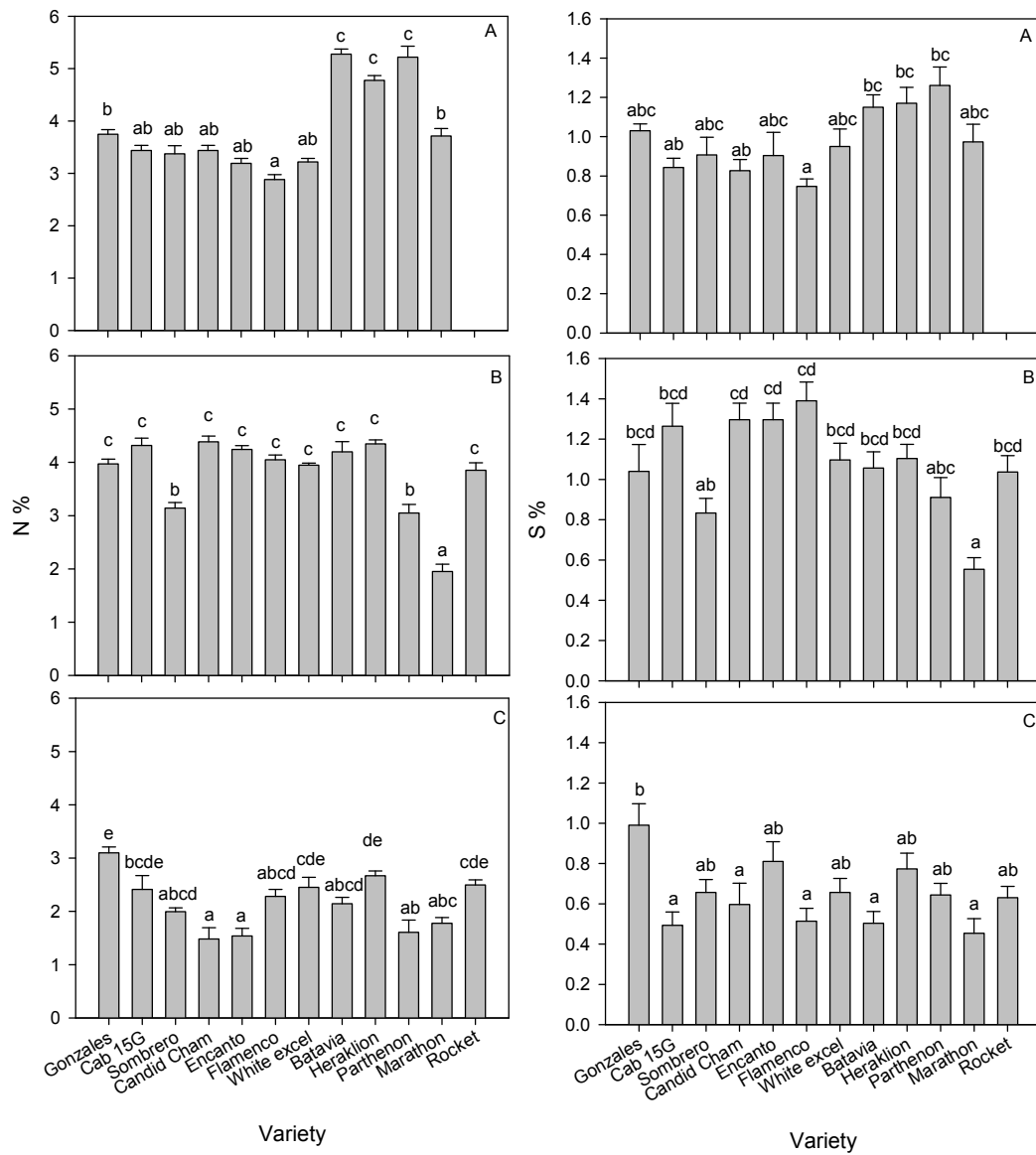
³ Διαφορετικά γράμματα υποδηλώνουν στατιστικά σημαντικές διαφορές μεταξύ των μέσων όρων των διαφόρων ποικιλιών για κάθε μεμονωμένο ΓΚΣ μετά από την εφαρμογή του κριτηρίου Tuckey HSD σε επίπεδο σημαντικότητας α=0,05.

⁴ Ποικιλίες που εξετάστηκαν

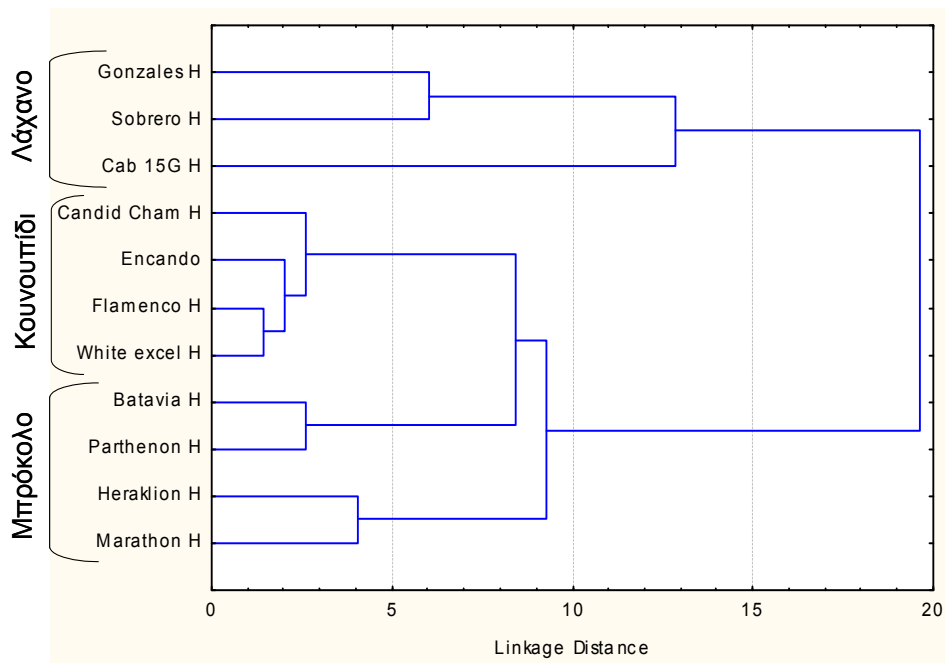
1. Λάχανο ποικ. Gonzales, 2. Λάχανο ποικ. 15G2004, 3. Λάχανο (κόκκινο) ποικ. Sombbrero, 4. Κουνουπίδι ποικ. Candid Cham 5. Κουνουπίδι ποικ. Encando 6. Κουνουπίδι ποικ. Flamenco, 7. Κουνουπίδι ποικ. White excel, 8. Μπρόκολο ποικ. Batavia, 9. Μπρόκολο ποικ. Parthenon, 10. Μπρόκολο ποικ. Heraklion, 11. Μπρόκολο ποικ. Marathon 12. Ρόκα ποικ. Eruca sativa M.



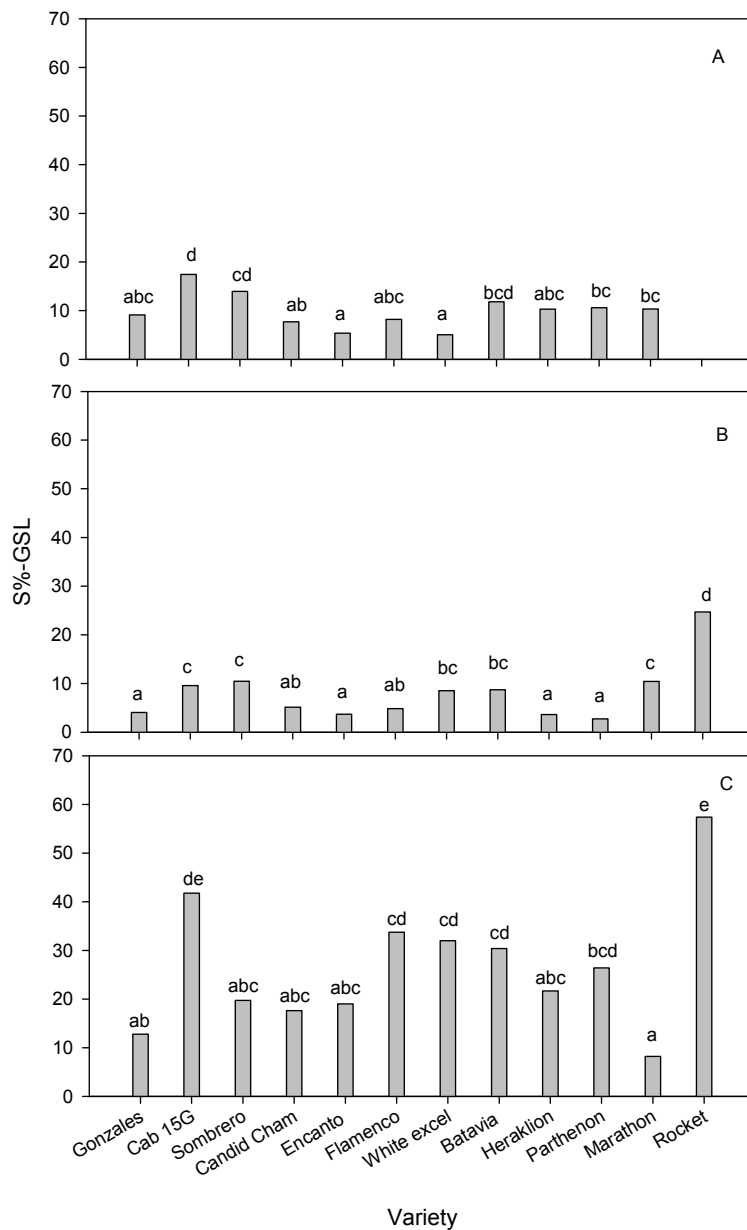
Διάγραμμα 3.1 Μέση τιμή βάρους ($n=10$) σε g ξηρής ουσίας σε βρώσιμα τμήματα (A), υπέργειο τμήμα (φύλλα και βλαστό)(B) και ρίζα (C) των διαφόρων ποικιλιών που εξετάστηκαν. Διαφορετικά γράμματα υποδηλώνουν στατιστικά σημαντικές διαφορές μεταξύ των μέσων μετά από την εφαρμογή του κριτηρίου Tukey HSD σε επίπεδο σημαντικότητας $\alpha=0.05$. Η διακύμανση στα ιστογράμματα αφορά το τυπικό σφάλμα των μέσων όρων.



Διάγραμμα 3.2 Περιεκτικότητα διαφόρων ποικιλιών Σταυραναθών σε N (%) και S (%) στα βρώσιμα τμήματα (A), στα φύλλα (B) και στις ρίζες (C). Διαφορετικά γράμματα υποδηλώνουν στατιστικά σημαντικές διαφορές μεταξύ των μέσων όρων (n=4) μετά από την εφαρμογή του κριτηρίου Tukey HSD σε επίπεδο σημαντικότητας $\alpha=0,05$. Οι δείκτες διακύμανσης στις ράβδους των ιστογραμμάτων εκφράζουν τα τυπικά σφάλματα των μέσων όρων.



Διάγραμμα 3.3 Δενδρόγραμμα ομαδοποίησης των διαφόρων ποικιλιών Σταυρανθών ανάλογα με τον τύπο και τη συγκέντρωση των ΓΚΣ σύμφωνα με τη μέθοδο Single Linkage. Ως μέτρο απόστασης των ομάδων χρησιμοποιήθηκε η Ευκλείδεια απόσταση.



Διάγραμμα 3.4 Κατανομή και ενσωμάτωση του S σε ΓΚΣ ως ποσοστό (w/w) επί του ολικού θείου που βρέθηκε στα βρώσιμα τμήματα (A), στα φύλλα (B) και τις ρίζες (C) των ποικιλιών Σταυρανθών που μελετήθηκαν. Διαφορετικά γράμματα υποδηλώνουν στατιστικά σημαντικές διαφορές μεταξύ των μετατρεπόμενων σε τόξο συννημίτονο μέσω των τιμών ($n=4$) μετά από την εφαρμογή του κριτηρίου Tukey HSD σε επίπεδο σημαντικότητας $\alpha=0,05$.

Κεφάλαιο 4^ο

Η επίδραση της αζωτούχου λίπανσης στην παραγωγή βιομάζας και στη συγκέντρωση γλυκοσινολικών οξέων

Περίληψη

Τα Σταυρανθή είναι καλλιέργειες με σημαντικές απαιτήσεις σε αζωτούχα λιπάσματα. Λανθασμένη ή αλόγιστη χρήση των αζωτούχων λιπασμάτων ειδικότερα κατά τη χειμερινή περίοδο, εγκυμονεί κινδύνους σχετικά με την ρύπανση των επιφανειακών και υπόγειων υδάτων με νιτρικά ιόντα. Η συγκέντρωση N-NO_3^- στους μίσχους των νεαρότερων πλήρως ανεπτυγμένων φύλλων μπορεί να χρησιμοποιηθεί ως δείκτης αξιολόγησης της καλλιέργειας σε ότι αφορά την επάρκειά της σε N. Στο κεφάλαιο αυτό, χρησιμοποιήθηκε η συγκέντρωση των N-NO_3^- και η σχέση της με την παραγωγή βιομάζας σε διαφορετικά στάδια ανάπτυξης τόσο του μπρόκολου όσο και της ρόκας, για τον καθορισμό των κρίσιμων επιπέδων συγκέντρωσης N-NO_3^- στους μίσχους των φύλλων, με τη εφαρμογή της εξίσωσης του Mitscherlich. Τα κρίσιμα επίπεδα συγκέντρωσης N-NO_3^- μεταβάλλονταν κατά τη διάρκεια της καλλιεργητικής περιόδου και στα δύο είδη. Στο μπρόκολο τα κρίσιμα επίπεδα συγκέντρωσης για την επίτευξη του 90% της «μέγιστης σχετικής παραγωγής βιομάζας» 30, 50 και 70 ημέρες μετά τη μεταφύτευση των φυτών (ΗΜΦ), ήταν 10.29, 6.34 και 4.01 mg/g ξ.β αντίστοιχα. Για τη ρόκα, τα κρίσιμα επίπεδα συγκέντρωσης ήταν 13.76, 6.52 και 1.21 mg/g ξ.β, 15, 30 και 45 ημέρες μετά τη μεταφύτευση αντίστοιχα.

Η μεταβολή της συγκέντρωσης ολικών και μεμονωμένων γλυκοσινολικών οξέων μελετήθηκε σε σχέση με την ποσότητα του αζώτου που χορηγήθηκε στα δύο είδη, σε διαφορετικά στάδια ανάπτυξης. Τόσο το αζωτο όσο και το στάδιο ανάπτυξης επηρέασαν σημαντικά τη συγκέντρωση των ΓΚΣ στους ιστούς των δύο ειδών που εξετάστηκαν ($p < 0.001$) ενώ οι δύο αυτοί παράγοντες αλληλεπιδρούν μεταξύ τους, σε ότι αφορά τη συγκέντρωση των ΓΚΣ ($p < 0.001$). Τα δύο είδη δεν αντέδρασαν με τον ίδιο τρόπο ως προς τη συγκέντρωσή τους σε ΓΚΣ, στην αύξηση της ποσότητας του χορηγούμενου αζώτου. Συγκεκριμένα στα φύλλα ρόκας, η συγκέντρωση των ΓΚΣ μειώθηκε με την αύξηση της χορηγούμενης ποσότητας N σε ποσοστό 33,5 και 19% στις 15 και 30 ΗΜΦ, αντίστοιχα. Όμως, 45 ΗΜΦ η ολική συγκέντρωση των ΓΚΣ, στα φύλλα της ρόκας αυξήθηκε κατά 11% με την αύξηση της ποσότητας του αζώτου που χορηγήθηκε στα φυτά. Αντίθετα στο μπρόκολο η αύξηση της ποσότητας του χορηγούμενου αζώτου, είχε ως αποτέλεσμα την αύξηση της συγκέντρωσης των ολικών ΓΚΣ σε όλα τα στάδια ανάπτυξης των φυτών. Ωστόσο η συγκέντρωση των ΓΚΣ, δεν ήταν γραμμική αφού μετά από τα 3.13g N ανά φυτοδοχείο δεν παρατηρήθηκε σημαντική αύξηση της συγκέντρωσής τους. Διαφορετική επίδραση παρατηρήθηκε στους διάφορους τύπους μεμονωμένων ΓΚΣ στη ρόκα και στο μπρόκολο. Αύξηση της συγκέντρωσης των ινδολικών ΓΚΣ παρατηρήθηκε και στα δύο φυτά με την αύξηση της ποσότητας του χορηγούμενου N στα φυτά. Επιπρόσθετα μελετήθηκε η επίδραση του αζώτου στην συνολική συγκέντρωση θείου στα φύλλα των δυο ειδών, καθώς επίσης και στη συγκέντρωση του S-SO_4^{2-} στους μίσχους των φύλλων. Η συνολική συγκέντρωση του S στα φύλλα, αυξήθηκε με την αύξηση της ποσότητας του N που χορηγήθηκε στα φυτά ενώ, αντίθετα η συγκέντρωση σε S-SO_4^{2-} στους μίσχους, μειώθηκε σημαντικά, φαινόμενο ενδεικτικό βελτιωμένης αφομοίωσης του θείου με την αύξηση της αζωτούχου λίπανσης.

Εισαγωγή

Τα τελευταία χρόνια λόγω και της αύξησης των τιμών των λιπασμάτων, υπάρχει ανάγκη για μείωση του κόστους παραγωγής και αύξησης της αποτελεσματικότητας/αποδοτικότητας των λιπάνσεων σε λαχανοκομικές καλλιέργειες. Ιδιαίτερα όσον αφορά το άζωτο, η υπερβολική χρήση αζωτούχων λιπασμάτων δεν αυξάνει μόνο το κόστος παραγωγής αλλά ταυτόχρονα επιβαρύνει τόσο τα επιφανειακά όσο και τα υπόγεια νερά με την αύξηση της συγκέντρωσης νιτρικών ιόντων σε αυτά, προκαλώντας έτσι σοβαρά περιβαλλοντικά προβλήματα και κινδύνους για τη δημόσια υγεία (Spalding and Exner, 1993; Wolfe and Patz, 2002).

Στόχος της αειφορικής και περιβαλλοντικά αποδεκτής διαχείρισης του αζώτου στα λαχανικά είναι η παροχή τέτοιων ποσοτήτων αζωτούχων λιπασμάτων στις καλλιέργειες έτσι ώστε, να επιτυγχάνεται η μέγιστη δυνατή παραγωγή με το χαμηλότερο δυνατό κόστος. Οποιαδήποτε ποσότητα N χορηγείται στη καλλιέργεια και δεν είναι εκμεταλλεύσιμη από αυτή, μπορεί δυνητικά να εκπλυθεί στα υπόγεια νερά ειδικά σε αρδευόμενες καλλιέργειες (Jaynes et al., 2001; Power et al., 2001). Η γνώση της θρεπτικής κατάστασης του φυτού μέσω της φυλλοδιαγνωστικής σε μια δεδομένη χρονική στιγμή κατά τη διάρκεια της καλλιεργητικής περιόδου, και η σύνδεσή της με την παραγωγή βιομάζας, χρησιμοποιείται για τον καθορισμό της ανάγκης παροχής θρεπτικών στοιχείων στα φυτά (Kubota et al., 1997; Papastylianou et al., 1982). Τα επίπεδα του νιτρικού αζώτου στους μίσχους των φύλλων και η σχέση τους με την παραγωγή εκφρασμένη ως ποσοστό της μέγιστης παραγωγής χρησιμοποιήθηκε από πολλούς ερευνητές για τον καθορισμό κρίσιμων επιπέδων συγκέντρωσης σε διάφορα λαχανικά (Gardner and Roth, 1989; Papastylianou et al., 1982). Για το σκοπό αυτό χρησιμοποιείται συνήθως ο μίσχος των νεαρότερων πλήρως ανεπτυγμένων φύλλων (Alva, 2007; Kubota et al., 1997; Studstill et al., 2003; Vitosh and Silva, 1994).

Το άζωτο, εκτός της επίδρασής του επί της ποσότητας παραγωγής των λαχανικών, επηρεάζει σημαντικά και την ποιότητα των παραγόμενων προϊόντων αλλά και των δευτερογενών μεταβολιτών στους διάφορους ιστούς (Custic et al., 2002; Kopsell et al., 2007; Nguyen and Niemeyer, 2008; Smolen and Sady, 2009). Το μπρόκολο και η ρόκα παράγουν προϊόντα τα οποία περιέχουν σημαντικές συγκεντρώσεις χημειοπροστατευτικών ουσιών όπως είναι τα ΓΚΣ (Bennett et al., 2007; Fahey et al., 2001; Kushad et al., 1999; Schonhof et al., 2007a). Το άζωτο αλληλεπιδρά σημαντικά με το θείο, και το ένα θρεπτικό στοιχείο επηρεάζει την αφομοίωση του άλλου (Hesse et al., 2004; Prosser et al., 2001; Vidmar et al., 1999). Συγκεκριμένα, η έλλειψη S φαίνεται ότι επηρεάζει σημαντικά την αφομοίωση του N στα φυτά η οποία και μειώνεται, ενώ επάρκεια θείου, αυξάνει την αφομοίωση του αζώτου (Prosser et al., 2001). Από την άλλη πλευρά αύξηση του N επιδρά σημαντικά στην πρόσληψη και αφομοίωση του θείου, επίδραση που έχει καταδειχθεί σε μεταγραφικό επίπεδο: Χορήγηση υψηλών επιπέδων N είχε ως αποτέλεσμα την επαγωγή γονιδίων που σχετίζονται τόσο με την αφομοίωση του S όσο και με την πρόσληψή του από τα φυτά (Wang et al., 2003). Δεδομένου ότι τα ΓΚΣ απαιτούν σημαντικές ποσότητες θείου και αζώτου για την βιοσύνθεσή τους, η συγκέντρωσή τους στους φυτικούς ιστούς επηρεάζεται από την ποσότητα αζώτου που χορηγείται στα φυτά (Chen et al., 2006; Ekbladh et al., 2007; Schonhof et al., 2007a). Ωστόσο η επίδραση της αζωτούχου λίπανσης στη συγκέντρωση των ΓΚΣ διαφέρει ανάμεσα στα είδη και τα διάφορα όργανα των φυτών (Aires et al., 2006; Kopsell et al., 2007; Li et al., 2007). Για παράδειγμα η αύξηση των επιπέδων αζωτούχου λίπανσης στη ελαιοκράμβη προκαλεί αύξηση της

συγκέντρωσης των ΓΚΣ στους σπόρους, ενώ στο μπρόκολο, η αύξηση των αζωτούχων λιπάνσεων είχε ως αποτέλεσμα τη μείωση της συγκέντρωσης των ΓΚΣ στις ανθοκεφαλές (Schonhof et al., 2007a; Zhao et al., 1993).

Εκτός από τη διαθεσιμότητα των θρεπτικών στοιχείων, το στάδιο ανάπτυξης των φυτών, διαδραματίζει σημαντικό ρόλο στην συγκέντρωση ΓΚΣ στους φυτικούς ιστούς (Brown et al., 2003; Porter et al., 1991). Φαίνεται ότι, η συγκέντρωση των ΓΚΣ μειώνεται με την διαδοχή των σταδίων ανάπτυξης των φυτών στους διάφορους ιστούς ενώ η συγκέντρωσή τους αυξάνει κατά τα στάδια άνθισης και σποροποίησης (Fahey et al., 2001). Σε σπορόφυτα του φυτού μοντέλου *Arabidopsis thaliana* και *Eruca sativa* η συγκέντρωση των ΓΚΣ μειώνεται σημαντικά με την πάροδο του χρόνου (Bennett et al., 2007; Brown et al., 2003).

Μέχρι σήμερα δεν έχει διερευνηθεί η σχέση μεταξύ $N-NO_3^-$ στους μίσχους, και της συγκέντρωσης των ΓΚΣ στα φύλλα ως μέτρο αξιολόγησης της ποιότητας των παραγόμενων προϊόντων στη ρόκα. Επιπρόσθετα δεν υπάρχουν στοιχεία στη διεθνή βιβλιογραφία σε ότι αφορά την επίδραση της αζωτούχου λίπανσης στην περιεκτικότητα των φύλλων ρόκας σε ΓΚΣ. Επιπρόσθετα δεν έχει μελετηθεί η επίδραση της αζωτούχου λίπανσης στην συγκέντρωση των ΓΚΣ σε φύλλα μπρόκολου κατά το στάδιο της βλαστικής ανάπτυξης των φυτών και η σχέση της με τη συγκέντρωση των $N-NO_3^-$ στους μίσχους των φύλλων και την παραγωγής βιομάζας.

Στόχοι της εργασίας

Στόχοι της παρούσας πειραματικής εργασίας ήταν 1) ο καθορισμός κρίσιμων επιπέδων συγκέντρωσης των $N-NO_3^-$ σε μίσχους φύλλων ρόκας και μπρόκολου σε διάφορα στάδια ανάπτυξης των φυτών σε σχέση με τη παραγόμενη βιομάζα, 2) η διερεύνηση της επίδρασης της αζωτούχου λίπανσης στη συγκέντρωση ΓΚΣ στα φύλλα των δυο ειδών και ο συσχετισμός της με την αφομοίωση του θείου στα δυο είδη και 3) η διερεύνηση της επίδρασης του σταδίου ανάπτυξης και του επιπέδου αζώτου στη συγκέντρωση ΓΚΣ στα φύλλα μπρόκολου και ρόκας.

Για την επίτευξη των στόχων του πειράματος τέθηκαν οι παρακάτω υποθέσεις:

1. Η παραγωγή βιομάζας και στα δύο είδη συσχετίζεται σημαντικά με τη συγκέντρωση των νιτρικών ιόντων στους μίσχους των νεαρότερων πλήρως ανεπτυγμένων φύλλων.
2. Η αζωτούχος λίπανση επιδρά σημαντικά στη συγκέντρωση και τη σύσταση των ΓΚΣ στα φύλλα των δύο ειδών τόσο άμεσα, όσο και έμμεσα, επηρεάζοντας την αφομοίωση του θείου όταν αυτό δεν είναι ελλειματικό
3. Το στάδιο ανάπτυξης των φυτών επηρεάζει τη συγκέντρωση των φύλλων σε ΓΚΣ.

Υλικά και Μέθοδοι

Φυτικό υλικό

Για την εκτέλεση των πειραμάτων, χρησιμοποιήθηκαν σπορόφυτα μπρόκολου (*Brassica oleraceae*, *Italica*, var. *Marathon*) και ρόκας (*Eruca sativa*) σε γλάστρες των 12L. Χρησιμοποιήθηκε υπόστρωμα ποτάμιας άμμου στην οποία είχε πραγματοποιηθεί χημική ανάλυση ως προς την περιεκτικότητά της σε θείο ($S < 0.01\%$, SO_4^{2-} μη ανιχνεύσιμο) και άζωτο (ολικό N μη ανιχνεύσιμο, $N-NO_3^- < 2\text{mg/kg}$ ξ.β εδάφους) και η οποία κρίθηκε κατάλληλη για χρήση σε πειράματα θρέψης. Οι γλάστρες τοποθετήθηκαν σε ψυχρό (μη θερμαινόμενο) θερμοκήπιο, συνολικής έκτασης 700m^2 στον Πειραματικό Σταθμό του Ινστιτούτου Γεωργικών Ερευνών, στο Ζύγι τον Οκτώβριο του 2007. Η μέση ημερήσια θερμοκρασία ήταν 25.2°C , 23.2°C και 20.4°C για τους μήνες Οκτώβριο, Νοέμβριο και Δεκέμβριο αντίστοιχα.

Πειραματικό σχέδιο - Λιπάνσεις

Σε κάθε γλάστρα πριν τη μεταφύτευση των σπορόφυτων εφαρμόστηκαν τα ακόλουθα μακροστοιχεία: $Mg(NO_3)_2 \cdot 6H_2O$ 1.27g, $CaH_4(PO_4)_2$ 2.88g για το μπρόκολο (Schonhof et al., 2007) και $Mg(NO_3)_2 \cdot 6H_2O$ 1.08g, $CaH_4(PO_4)_2$ 2.45g για τη ρόκα (Santamaria et al., 2002). Τα ιχνοστοιχεία χορηγήθηκαν στα φυτά μέσω του συστήματος άρδευσης αναμιγνύοντας 100ml από το ακόλουθο θρεπτικό διάλυμα H_3BO_3 2.86g/L, $MnSO_4 \cdot H_2O$ 3.4g/L, $CuSO_4 \cdot 5H_2O$ 1g/L, $ZnSO_4 \cdot 5H_2O$ 2.2g/L and $(Na)_2Mo_4O_4 \cdot 2H_2O$ 1g/L σε 1000L νερού. Ο σίδηρος χορηγήθηκε ξεχωριστά, διαλύοντας 25.56g Fe-EDDHA στην ίδια δεξαμενή του θρεπτικού διαλύματος. Για τον καθορισμό των κρίσιμων επιπέδων συγκέντρωσης εφαρμόστηκαν 10 διαφορετικά επίπεδα αζώτου με τη χρήση νιτρικής αμμωνίας σε ποσότητες: 0.06g, 0.37g, 0.85g, 1.48g, 2.12g, 2.75g, 3.54g, 5.12g, 5.91g και 9.08g ανά φυτοδοχείο για το μπρόκολο ενώ για τη ρόκα εφαρμόστηκαν 0.05g, 0.32g, 0.73g, 1.26g, 1.80g, 2.34g, 3.01g, 4.35g, 5.04g και 7.71g ανά φυτοδοχείο πριν τη μεταφύτευση. Αυτές οι ποσότητες σε συνδυασμό με την ποσότητα που χορηγήθηκε με τη μορφή του νιτρικού μαγνησίου αντιστοιχούν σε 0.17, 0.44, 0.85, 1.38, 1.92, 2.46, 3.13, 4.47, 5.16, 7.83 g αζώτου ανά φυτοδοχείο και για τα δύο είδη. Η κάθε γλάστρα αρδεύονταν σύμφωνα με τις συνήθεις πρακτικές και το έκπλυμα επαναφερόταν στα φυτοδοχεία αφού συλλεγόταν σε πιάτα τοποθετημένα κάτω από τα φυτοδοχεία έτσι ώστε να μην υπάρχουν απώλειες θρεπτικών στοιχείων.

Τα πειράματα εφαρμόστηκαν σε πλήρως τυχαιοποιημένο διπαραγοντικό σχέδιο, κάθε δόση επαναλήφθηκε 4 φορές και κάθε επανάληψη αποτελούνταν από 5 γλάστρες. Σε κάθε γλάστρα τοποθετήθηκαν ένα φυτό για το μπρόκολο και δυο φυτά για τη ρόκα. Δείγματα λήφθηκαν σε διαφορετικούς χρόνους, ανάλογα με το στάδιο ανάπτυξης των φυτών. Συγκεκριμένα για τη ρόκα λήφθηκαν δείγματα, 15 (4-5 πραγματικά φύλλα), 30 (8-10 πραγματικά φύλλα) και 45 (15 πραγματικά φύλλα) ημέρες μετά τη μεταφύτευση (ΗΜΦ). Στο μπρόκολο λήφθηκαν 30 (4-5 πραγματικά φύλλα), 50 (10-12 πραγματικά φύλλα) και 70 (ανάπτυξη ανθοκεφαλής) ΗΜΦ. Για το μπρόκολο σε κάθε δειγματοληψία χρησιμοποιούνταν 5 φυτά (τυχαία 5 φυτοδοχεία) από τις 4 επαναλήψεις ($n=20$ φυτά). Ενώ για τη ρόκα, σε κάθε δειγματοληψία λήφθηκαν 10 φυτά (τυχαία 5 φυτοδοχεία) από τις 4 επαναλήψεις ($n=40$ φυτά). Τόσο για το μπρόκολο όσο και για τη ρόκα, λήφθηκε το νεαρότερο πλήρως ανεπτυγμένο φύλλο, τοποθετήθηκε σε πλαστικό σακουλάκι, σε ξηρό πάγο μέχρι τη μεταφορά του στο εργαστήριο.

Επεξεργασία δειγμάτων – Μετρήσεις

Κατά τη δειγματοληψία και πριν τη λήψη του νεαρότερου πλήρως ανεπτυγμένου φύλλου, κάθε φυτό ζυγίστηκε και καταγράφηκε το νωπό του βάρος. Ακολούθως και μετά την λήψη και αποθήκευση των φύλλων σε ξηρό πάγο, όλα τα φυτά από κάθε είδος αναμίχθηκαν και τυχαία επιλέχθηκαν 10 φυτά τα οποία χρησιμοποιήθηκαν και για το προσδιορισμό του ξηρού βάρους για κάθε μεταχείριση ξεχωριστά. Ο προσδιορισμός του ξηρού βάρους έγινε με ξήρανση των ιστών στους 105°C για 5 ώρες.

Τα φύλλα τα οποία αποθηκεύτηκαν και μεταφέρθηκαν στο εργαστήριο σε ξηρό πάγο, εμβαπτίστηκαν σε υγρό άζωτο και διαχωρίστηκε το έλασμα των φύλων από τους μίσχους και το κεντρικό νεύρο (για συντομία θα αναφέρονται ως μίσχοι). Όλα τα δείγματα της κάθε μεταχείρισης συνενώθηκαν και λυοφιλοποιήθηκαν για 24 ώρες. Ακολούθως τα ξηρά (λυοφιλοποιημένα) δείγματα κονιορτοποιήθηκαν σε μύλο άλεσης και αποθηκεύτηκαν στους -20°C μέχρι την ανάλυσή τους.

Οι προσδιορισμοί ΓΚΣ, ολικού N, S, N-NO₃⁻ και S-SO₄²⁻ πραγματοποιήθηκαν με τις μεθόδους που αναφέρονται στο 1^ο Κεφάλαιο της παρούσας διατριβής.

Καθορισμός κρίσιμων επιπέδων συγκέντρωσης N-NO₃⁻

Η σχέση μεταξύ της παραγωγής ξηρού βάρους (Y) και της συγκέντρωσης των N-NO₃⁻ στους μίσχους των φύλλων της ρόκας (X) προσδιορίστηκε με τη χρήση της εξίσωσης του Mitscherlich (εξίσωση 1),

$$Y = Y_{\max} (1 - \beta e^{-kX}) \quad \text{Εξίσωση 1.}$$

Η εξίσωση (1) προκύπτει μετά από ολοκλήρωση και επίλυση της διαφορικής εξίσωσης πρώτης τάξεως:

$$dY/dX = -k(Y_{\max} - Y)$$

Όπου:

Y_{max} είναι η μέγιστη παραγωγή βιομάζας (όταν η επιπλέον αύξηση του νιτρικού αζώτου στους μίσχους δεν την επηρεάζει)

$$\beta = (Y_{\max} - Y_0) / Y_{\max}$$

k είναι ο ρυθμός ανταπόκρισης (ευαισθησία) των φυτών στην αύξηση συγκέντρωσης του νιτρικού αζώτου στους μίσχους σύμφωνα με τα πειραματικά δεδομένα

Y₀ = φυτική βιομάζα όταν η συγκέντρωση νιτρικών είναι μηδενική (X = 0)

Ως κρίσιμη συγκέντρωση του νιτρικού αζώτου στα φύλλα θεωρήθηκε αυτή που αντιστοιχούσε σε μείωση της παραγωγής ξηρού βάρους κατά 10%. Σε αυτή την περίπτωση το Y = 0,9Y_{max} και λύνοντας την εξίσωση 1 ως προς το X (X_c) τότε:

$$X_c = -\frac{\ln(0.1/b)}{k} \quad \text{Εξίσωση 2.}$$

Στατιστική ανάλυση

Για την στατιστική επεξεργασία των αποτελεσμάτων, έγινε η ανάλυση διακύμανσης (ANOVA) και οι πολλαπλές συγκρίσεις των μέσων όρων έγιναν με βάση το κριτήριο Tukey-Kramer HSD (Honest Significant Difference) σε επίπεδο σημαντικότητας $\alpha=0.05$.

Η στατιστική ανάλυση της εξίσωσης του Mitscherlich και ο προσδιορισμός των συντελεστών της εξίσωσης έγινε με τη χρήση μεθόδων μη γραμμικής παλινδρόμησης (Least Squares Regression, StatSoft). Επίσης χρησιμοποιήθηκαν οι μέθοδοι πολλαπλής παλινδρόμησης (Multiple Regression) για το καθορισμό σχέσεων μεταξύ των μεταβλητών που εξετάστηκαν στη παρούσα εργασία.

Η επεξεργασία των αποτελεσμάτων έγινε με τη χρήση του στατιστικού πακέτου STATISTICA 7.

Αποτελέσματα – Συζήτηση

Παραγωγή ξηρού βάρους, $N-NO_3^-$ και ολικού N

Η ποσότητα αζώτου που χορηγήθηκε στα φυτά ρόκας καθώς επίσης και το στάδιο ανάπτυξης του φυτού επηρέασαν σημαντικά την παραγωγή ξηρού βάρους ($p < 0.0001$). Επιπρόσθετα, οι δυο αυτοί παράγοντες παρουσίασαν μεταξύ τους σημαντική αλληλεπίδραση ως προς την παραγωγή βιομάζας. Συγκεκριμένα, σημαντική αύξηση του ξηρού βάρους ανά φυτοδοχείο ($p < 0.001$) παρατηρήθηκε με την πάροδο του χρόνου από την ημερομηνία μεταφύτευσης (ΗΜΦ). Δεκαπέντε ημέρες μετά την μεταφύτευση, η ποσότητα ξηράς ουσίας ανά γλάστρα αυξήθηκε με την αύξηση της χορηγούμενης ποσότητας αζώτου στα φυτά από 0.17 μέχρι 3.13g N ανά γλάστρα, περαιτέρω αύξηση της χορηγούμενης ποσότητας N δεν είχε στατιστικά σημαντική επίδραση της παραγωγής βιομάζας ανά γλάστρα. Παρόμοια αποτελέσματα παρατηρήθηκαν και στο επόμενο στάδιο ανάπτυξης του φυτού, 30 ΗΜΦ, ενώ στις 45 ΗΜΦ η σημαντική αύξηση της βιομάζας ανά φυτοδοχείο, σταμάτησε μετά την χορήγηση 2.47g N ανά φυτοδοχείο (Πίνακας 4.1).

Παρόμοια συμπεριφορά παρατηρήθηκε και στο μπρόκολο, όπου η παραγωγή βιομάζας ανά φυτό, επηρεάστηκε σημαντικά τόσο από την ποσότητα του χορηγούμενου αζώτου, αλλά και από το στάδιο ανάπτυξης ($p < 0.0001$). Όπως και στη ρόκα έτσι και στο μπρόκολο, η παραγωγή βιομάζας ανά φυτό αυξήθηκε με την αύξηση της χορηγούμενης ποσότητας αζώτου μέχρι τα 2.47g ανά φυτοδοχείο (30ΗΜΦ) και 3.13 g ανά φυτοδοχείο 50 και 70 ΗΜΦ. Οποιαδήποτε αύξηση της δόσης του N πέρα από αυτές που αναφέρονται προηγούμενα δεν είχαν σημαντική επίδραση στην παραγόμενη βιομάζα μπρόκολου (Πίνακας 4.1).

Η επίδραση της αζωτούχου λίπανσης είναι φυσικά αναμενόμενη σε ότι αφορά την παραγωγή βιομάζας στα καλλιεργούμενα φυτά. Αύξηση της ποσότητας του αζώτου είχε ως αποτέλεσμα την αύξηση της παραγόμενης βιομάζας στο μπρόκολο (Nkoa et al., 2003) στην πατάτα (Rodrigues, 2004) και στη ρόκα (Santamaria et al., 2002). Ωστόσο η αύξηση της βιομάζας δεν είναι ανάλογη προς την αύξηση της δόσης του αζώτου, αλλά μετά από μια ποσότητα, αυτή τείνει ασυμπτωτικά προς μια μέγιστη τιμή και την οποία δεν ξεπερνά (Munson and Nelson, 1990) τάση που επιβεβαιώνεται και από τα αποτελέσματα των πειραμάτων τόσο με τη ρόκα όσο και με το μπρόκολο, και μάλιστα σε όλα τα στάδια ανάπτυξης των φυτών.

Η συγκέντρωση νιτρικού αζώτου ($N-NO_3^-$) στους μίσχους των φύλλων ρόκας, επηρεάστηκε σημαντικά από τη δόση του N καθώς και από την ηλικία του φυτού ($p < 0.001$). Συγκεκριμένα, η δόση του N επηρεάζει θετικά τη συγκέντρωση του $N-NO_3^-$, αυξάνοντάς την στους μίσχους. Στις 30ΗΜΦ η συγκέντρωση του $N-NO_3^-$ σταμάτησε να αυξάνει στους μίσχους και παρέμεινε σταθερή πέρα από τη χορήγηση 4.47 g N ανά φυτοδοχείο, Αντίθετα στις 15 και 45ΗΜΦ η συγκέντρωση του $N-NO_3^-$ ανταποκρίθηκε στην αύξηση της χορηγούμενης ποσότητας αζώτου ανα φυτοδοχείο μέχρι και τη μέγιστη δόση αζωτούχου λίπανσης (Πίνακας 4.1). Η μέγιστη συγκέντρωση $N-NO_3^-$ βρέθηκε στις 15ΗΜΦ (17,13mg/g ξ.β) όταν η ποσότητα αζώτου που χορηγήθηκε ήταν ίση με την μέγιστη (7,38 g N ανά φυτοδοχείο), ενώ η μικρότερη 45ΗΜΦ (0.16mg/g ξ.β) όταν η ποσότητα που χορηγήθηκε στα φυτά ήταν μικρή (0.17-0,44 g N ανά φυτοδοχείο). Αντίθετα από τη ρόκα, στο μπρόκολο η συγκέντρωση των $N-NO_3^-$ στους μίσχους των φύλλων, αυξήθηκε σημαντικά όσο αυξανόταν και η ποσότητα του χορηγούμενου αζώτου σε όλα τα στάδια ανάπτυξης του φυτού που μελετήθηκαν (Πίνακας 4.1). Αντίστοιχα, η

μέγιστη συγκέντρωση $N-NO_3^-$ στους μίσχους φύλλων μπρόκολου, βρέθηκε 30 ΗΜΦ (17.63 mg N / g ξ.β) όταν η χορηγούμενη ποσότητα αζώτου ανά φυτοδοχείο ήταν 7.83g N ανά φυτοδοχείο ενώ η μικρότερη 70 ΗΜΦ (0,37mg N / g ξ.β) όταν η ποσότητα αζώτου που χορηγήθηκε ήταν 0.17g N ανά φυτοδοχείο.

Η συγκέντρωση του $N-NO_3^-$ και στα δύο είδη μειώθηκε σημαντικά με τη πάροδο του χρόνου. Η μείωση της συγκέντρωσης των $N-NO_3^-$ στους μίσχους των φύλλων έχει παρατηρηθεί και σε άλλα είδη της οικογένειας των Σταυρανθών καθώς επίσης και σε είδη που ανήκουν σε άλλες οικογένειες όπως το κριθάρι και το σιτάρι (Alcantar et al., 2002; Fontes et al., 2003; Hocking, 2001; Kubota et al., 1997; Papastylianou et al., 1982; Williams and Maier, 2002). Η μείωση της συγκέντρωσης των $N-NO_3^-$ πιθανότατα να οφείλεται στο γεγονός ότι ο ρυθμός παραγωγής βιομάζας και επομένως αφομοίωσης αζώτου είναι μεγαλύτερος από το ρυθμό πρόσληψης των $N-NO_3^-$ από το έδαφος (Smith and Lonergan, 1997).

Παρόμοια με το νιτρικό άζωτο, το ολικό άζωτο και στα δύο είδη μειώθηκε σημαντικά ($p < 0.001$) με την πάροδο του χρόνου (Διάγραμμα 4.1 και 3.2). Επιπρόσθετα αύξηση της ποσότητας N που χορηγήθηκε στα φυτά είχε ως αποτέλεσμα τη σημαντική αύξηση του συνολικού N ($p < 0.001$), ενώ παρατηρήθηκε αλληλεπίδραση μεταξύ της ποσότητας του N που χορηγήθηκε και του σταδίου ανάπτυξης των φυτών ($p < 0.001$). Στο μπρόκολο η υψηλότερη συγκέντρωση N στα φύλλα βρέθηκε όταν η ποσότητα του N που χορηγήθηκε στα φυτά ήταν ίση με 7.83g ανά φυτοδοχείο (3.85%) στις 30 ΗΜΦ, ενώ η μικρότερη στις 70 ΗΜΦ (0.58%) όταν η ποσότητα N που χορηγήθηκε στα φυτά ήταν ίση με 0.17g ανά φυτοδοχείο (Διάγραμμα 4.1).

Παρόμοια στη ρόκα η υψηλότερη συγκέντρωση ολικού N ανιχνεύθηκε στα φύλλα 15 ΗΜΦ (5.50%) όταν η ποσότητα του χορηγούμενου αζώτου ήταν ίση με 3.13 g ανά φυτοδοχείο, και η μικρότερη 45 ΗΜΦ τη χαμηλότερη ποσότητα χορηγούμενου N, 0.17g ανά φυτοδοχείο (1.10%). Αύξηση της χορηγούμενης ποσότητας N πέραν από τα 3.13 g ανά φυτοδοχείο δεν είχε στατιστικά σημαντική επίδραση της συγκέντρωσης του ολικού N στα φυτά (Διάγραμμα 4.2).

Σχέση παραγωγής ξηρού βάρους και $N-NO_3^-$

Τόσο στη ρόκα όσο και στο μπρόκολο, ανεξάρτητα από το στάδιο ανάπτυξης των φυτών, η σχετική παραγωγή ξηρού βάρους, εκφρασμένη ως το πηλίκιο Y/Y_{max} , αυξήθηκε με την αύξηση της συγκέντρωσης των $N-NO_3^-$ στους μίσχους των φύλλων. Στο τέλος της ανάπτυξης των φυτών, η μέγιστη σχετική παραγωγή ξηρού βάρους στη ρόκα (45 ΗΜΦ) παρατηρήθηκε από τη συγκέντρωση των 2 mg $N-NO_3^-$ /g ξ.β στους μίσχους και πέρα, ενώ στο μπρόκολο (70ΗΜΦ) η μέγιστη παραγωγή ξηρού βάρους παρατηρήθηκε από την συγκέντρωση των 4 mg $N-NO_3^-$ / g ξ.β στους μίσχους και πέρα. (Διάγραμμα 4.3)

Η σχέση μεταξύ της σχετικής παραγωγής ξηρού βάρους και της συγκέντρωσης των $N-NO_3^-$ στους μίσχους των φύλλων και των δυο ειδών προσδιορίστηκε με την εξίσωση του Mitscherlich η οποία λαμβάνει υπόψη της βιολογικές παράμετρος όπως τη μέγιστη παραγωγή βιομάζας (Y_{max}) και τη συγκέντρωση του $N-NO_3^-$ (X). Ο συντελεστής προσδιορισμού (R^2) της εξίσωσης του Mitscherlich για όλα τα στάδια ανάπτυξης στη ρόκα ήταν μεγαλύτερος από 0,80 ενώ στο μπρόκολο συντελεστής προσδιορισμού μεγαλύτερος από 0.80 παρατηρήθηκε 70 ΗΜΦ. Οι συντελεστές Y_{max} , β και k που υπολογίστηκαν από τα πειραματικά δεδομένα ήταν

στατιστικά σημαντικοί ($p < 0.001$). Επομένως οι εκτιμώμενες τιμές δεν διαφέρουν σε μεγάλο βαθμό από τις πειραματικές τιμές και το μοντέλο εξηγεί τα πειραματικά δεδομένα ικανοποιητικά.

Στον Πίνακα 4.2 φαίνονται τα κρίσιμα επίπεδα συγκέντρωσης $N-NO_3^-$ που απαιτούνται για την επίτευξη του 90% της μέγιστης σχετικής παραγωγής ξηρού βάρους τόσο στη ρόκα όσο και στο μπρόκολο καθώς επίσης και τα όρια εμπιστοσύνης των παραμέτρων που εκτιμήθηκαν από τα πειραματικά δεδομένα. Τα κρίσιμα επίπεδα συγκέντρωσης $N-NO_3^-$ για το μπρόκολο που βρέθηκαν στην παρούσα εργασία είναι παρόμοια με αυτά που προσδιορίστηκαν από άλλους (Gardner and Roth, 1989). Όσον αφορά τη ρόκα αυτή είναι η πρώτη αναφορά σε σχέση με τον καθορισμό κρίσιμων επιπέδων συγκέντρωσης $N-NO_3^-$ αφού δεν περιήλθαν στην αντίληψή μας αναφορές σχετικές με αυτό το θέμα στη διεθνή βιβλιογραφία.

Η κρίσιμη συγκέντρωση $N-NO_3^-$ τόσο στο μπρόκολο όσο και στη ρόκα φαίνεται ότι μειώνεται με το στάδιο ανάπτυξης των φυτών κατά το οποίο έγινε η δειγματοληψία (Διάγραμμα 4.3). Όμως η μείωση αυτή είναι σαφώς μεγαλύτερη στην ρόκα που καταλήγει σε ελάχιστη κρίσιμη συγκέντρωση $N-NO_3^-$ στους μίσχους των φύλλων στο τέλος της καλλιέργειας. Πιθανά αυτή η ελαχιστοποίηση του κρίσιμου επιπέδου συγκέντρωσης $N-NO_3^-$ να σχετίζεται με μειωμένη πρωτεϊνοσύνθεση, και επομένως μειωμένη μεταφορά νιτρικών στο τέλος της καλλιέργειας. Παρόμοια συμπεριφορά της συγκέντρωσης των $N-NO_3^-$ παρατηρήθηκε εκτός από το μπρόκολο (Gardner and Roth, 1989; Kubota et al., 1997) και σε άλλα είδη όπως η ελαιοκράμβη (Hocking, 2001), το βαμβάκι (Jenkins et al., 1982; MacKenzie et al., 1963) και το σπάρκι (Papastylianou et al., 1982).

Τα όρια εμπιστοσύνης των συντελεστών που προσδιορίστηκαν από το μοντέλο Mitscherlich είναι στενά και θεωρείται ότι κυμαίνονται σε λογικές τιμές όσον αφορά την εξαρτημένη μεταβλητή που εκφράζουν καθώς και τον παράγοντα τον οποίο προσδιορίζουν (Πίνακας 4.2). Επιπρόσθετα η συσχέτιση μεταξύ του συντελεστή Y_{max} και των άλλων δυο συντελεστών β και k δεν ήταν στατιστικά σημαντική αλλά αρκετά υψηλή (Πίνακας 4.3). Υψηλή συσχέτιση μεταξύ των συντελεστών (παραμέτρων) που αριστοποιούνται με την μη γραμμική παλινδρόμηση έχει ως αποτέλεσμα την πιθανή εξαγωγή επισφαλών εκτιμήσεων ως προς την εξαρτημένη μεταβλητή, ιδίως όταν χρησιμοποιηθούν τιμές της ανεξάρτητης μεταβλητής εκτός του πεδίου των πειραματικών τιμών της ανεξάρτητης μεταβλητής από τα οποία υπολογίστηκε η εξίσωση παλινδρόμησης (Montgomery and Peck, 1992). Ωστόσο ανάλυση παραλλακτικότητας μεταξύ των υπολοίπων των εκτιμώμενων τιμών που προσδιορίστηκαν από την εξίσωση Mitscherlich και της εξαρτημένης μεταβλητής (παραγωγή ξηρού βάρους) έδωσαν τιμές $p > 0,05$ σε όλους τους χρόνους δειγματοληψίας, γεγονός που επιβεβαιώνει ότι δεν υπάρχει γραμμική συσχέτιση μεταξύ των υπολοίπων και της εξαρτημένης μεταβλητής και ως εκ τούτου αυξάνει την αξιοπιστία των εκτιμήσεων των κρίσιμων επιπέδων $N-NO_3^-$ που υπολογίστηκαν (Vold et al., 1999).

Συγκέντρωση Γλυκοσινολικών οξέων

Τα μεμονωμένα ΓΚΣ που ανιχνεύθηκαν στη ρόκα και τα φύλλα του μπρόκολου, φαίνονται στους Πίνακες 4.4 και 4.5 και δεν παρουσιάζουν διαφορές ως προς τον τύπο τους, με αυτά που αναφέρονται στη διεθνή βιβλιογραφία (Bennett et al., 2006; Kim et al., 2007; Moreno et al., 2006; Moreno et al., 2008). Εξαιρέση αποτελούν τα φύλλα του μπρόκολου στα οποία ανιχνεύθηκαν 4 μεμονωμένα ΓΚΣ, η GRA, GIB, GBS και neo-GBS σε αντίθεση με 7 που ανιχνεύθηκαν στην ίδια ποικιλία σε υδροπονική καλλιέργεια, μπρόκολου σε

θερμοκήπιο (Moreno et al., 2008). Οι διαφορές αυτές πιθανό να οφείλονται στις διαφορετικές συνθήκες περιβάλλοντος και ανάπτυξης των φυτών καθώς επίσης και στην ηλικία των φύλλων από τα οποία λήφθηκαν τα δείγματα (Rosa et al., 1996).

Η συγκέντρωση γλυκοσινολικών οξέων τόσο στη ρόκα όσο και στο μπρόκολο, επηρεάστηκε σημαντικά τόσο από το επίπεδο N που χορηγήθηκε στα φυτά όσο και από το στάδιο ανάπτυξης των φυτών ($p < 0.001$). Επιπρόσθετα, αυτοί οι παράγοντες αλληλεπιδρούν μεταξύ τους σημαντικά σε ότι αφορά τη συγκέντρωση των ΓΚΣ στα φύλλα της ρόκας και του μπρόκολου ($p < 0.001$).

Επίδραση του σταδίου ανάπτυξης

Η ολική συγκέντρωση τόσο των ινδολικών όσο και των αλειφατικών ΓΚΣ μειώθηκε και στα δυο είδη με τη πάροδο του χρόνου. Ωστόσο στη ρόκα τα αλειφατικά ΓΚΣ η συγκέντρωσή τους μειώθηκε μεταξύ 15 και 30 ΗΜΦ ενώ 45 ΗΜΦ η συγκέντρωσή τους παρέμεινε σταθερή. Παρόμοια αποτελέσματα παρατηρήθηκαν και σε άλλα είδη όπου η συγκέντρωση των ΓΚΣ μειώθηκε με την αύξηση της ηλικίας των φυτών (Bellostas et al., 2007; Fahey et al., 2001; McGregor, 1988; Pereira et al., 2002; Vallejo et al., 2003). Η μείωση της συγκέντρωσης των ΓΚΣ με την αύξηση της ηλικίας των φυτών συνδέεται με πολύπλοκους μηχανισμούς βιοσύνθεσης και διάσπασης των μορίων αυτών κατά τη διάρκεια της ανάπτυξης των φυτών (McGregor, 1988). Επιπρόσθετα, τα Σταυρανή κατά την ανάπτυξή τους εκλύουν σταθερά μικρές ποσότητες πτητικών ουσιών που προκύπτουν από την υδρόλυση των ΓΚΣ μετά το θάνατο των φυτικών κυττάρων (Cole, 1980). Η παραπάνω υπόθεση ενισχύεται και από το γεγονός ότι, η ενζυμική δράση της μυροσινάσης, αυξάνει με την αύξηση της ηλικίας των φυτών, γεγονός το οποίο προφανώς εξηγεί μερικώς τη συμπεριφορά της συγκέντρωσης των ΓΚΣ στην παρούσα εργασία (Rask et al., 2000). Άλλος πιθανός λόγος για τη μείωση της συγκέντρωσής τους στην πορεία του χρόνου είναι ότι ο ρυθμός βιοσύνθεσης νέων ΓΚΣ σε σχέση με το ρυθμό διάσπασης τους στο φυτό να είναι πολύ μικρότερος. Ωστόσο δεν υπάρχουν στοιχεία στη βιβλιογραφία που να αποκαλύπτουν τους μηχανισμούς στους οποίους οφείλεται το φαινόμενο αυτό.

Στη ρόκα κυρίαρχο μεμονωμένο ΓΚΣ ήταν η GRA στις 15 και 30 ΗΜΦ ενώ η συγκέντρωσή της μειώθηκε σημαντικά 45 ΗΜΦ και δεν διέφερε σημαντικά από την GSV. Αντίθετα με την GRA, η GSV και GER αυξήθηκαν με την πάροδο του χρόνου, αντιθετα με τη γενική συμπεριφορά των ΓΚΣ. Η μείωση της συγκέντρωσης της GRA πιθανότατα να σχετίζεται με την βιοσύνθεση των άλλων δυο μορίων αφού οι διαφορές τους από χημικής άποψης, σπηρίζονται στην τροποποίηση της πλευρικής αλυσίδας του μορίου. Συγκεκριμένα η GRA και η GER έχουν την ίδια πλευρική αλυσίδα με μόνη διαφορά την παρουσία οξυγόνου στο άτομο θείου, της GRA. Επιπλέον, η GSV έχει πλευρική αλυσίδα με ένα άτομο άνθρακα λιγότερο και ελεύθερη στο άκρο του μορίου μια σουλφιδρική ομάδα. Για το λόγο αυτό έχει προταθεί ότι, η GER αποτελεί πρόδρομο μόριο για την βιοσύνθεση της GRA και της GSV (Bennett et al., 2007). Η συγκέντρωση της GSV παρουσιάζει αρνητική, στατιστικά σημαντική συσχέτιση με την συγκέντρωση της GRA ($-0.46, p < 0.001$) ενώ συσχετίζεται θετικά και στατιστικά σημαντικά με την συγκέντρωση της GER ($0.83, p < 0.001$). Στατιστικά σημαντική αρνητική συσχέτιση παρατηρήθηκε μεταξύ της GER και της GRA ($-0.71, p < 0.001$), γεγονός που ενισχύει την υπόθεση ότι, η μείωση της συγκέντρωσης της GRA και αύξησης της συγκέντρωσης των άλλων δυο ΓΚΣ κατά τη διάρκεια της

ανάπτυξης των φυτών πιθανό να οφείλεται σε διαδοχικές τροποποιήσεις της κοινής πλευρικής αλυσίδας, από την άλλη όμως δεν επιβεβαιώνεται η υπόθεση ότι, η GER αποτελεί το πρόδρομο μόριο για τη βιοσύνθεση των άλλων δυο. Σύμφωνα με τα αποτελέσματα της παρούσας εργασίας, φαίνεται ότι η βιοσύνθεση των τριών αυτών μεμονωμένων ΓΚΣ είναι αλληλένδετη, αφού υπάρχει υψηλή και στατιστικά σημαντική συσχέτιση μεταξύ τους. Ωστόσο επιπλέον έρευνα είναι απαραίτητη για την αποκάλυψη του μηχανισμού τροποποίησης των πλευρικών αλυσίδων των συγκεκριμένων ΓΚΣ. Η συγκέντρωση των μεμονωμένων ινδολικών ΓΚΣ, GBS και 4-MeO-GBS από την άλλη πλευρά, μειώνεται με τη πάροδο του χρόνου (Πίνακας 4.4).

Αντίθετα στο μπρόκολο, δεν παρουσιάζονται διαφοροποιήσεις στη συγκέντρωση των μεμονωμένων ΓΚΣ σε σχέση με το χρόνο, αφού με την πάροδο του χρόνου η συγκέντρωση όλων των μεμονωμένων ΓΚΣ μειώνεται σημαντικά ($p < 0.001$). Κυρίαρχο μεμονωμένο ΓΚΣ στα φύλλα του μπρόκολου είναι η GRA και αποτελεί το 60% της συνολικής συγκέντρωσης ΓΚΣ που βρέθηκαν στους ιστούς.

Επίδραση του αζώτου

Στη ρόκα η ολική συγκέντρωση ΓΚΣ μειώθηκε σημαντικά με την αύξηση της ποσότητας αζώτου που χορηγήθηκε στα φυτά 15 και 30 ΗΜΦ (Πίνακας 4.4). Συγκεκριμένα 15ΗΜΦ, η υψηλότερη συγκέντρωση ολικών ΓΚΣ (30.75 μmol/g ξ,β) παρατηρήθηκε όταν το N που χορηγήθηκε ανά φυτοδοχείο ήταν ίσο με 0.17g ενώ κατά το ίδιο στάδιο ανάπτυξης η συγκέντρωση μειώθηκε κατά 33,5% όταν η ποσότητα του N που χορηγήθηκε ήταν 7.83g ανά φυτοδοχείο. Παρόμοια συμπεριφορά παρατηρήθηκε και 30 ΗΜΦ ωστόσο η μείωση της συγκέντρωσης των ολικών ΓΚΣ στα φύλλα της ρόκας, ήταν μικρότερη στις ακραίες αυτές ποσότητες χορηγούμενου N και ήταν της τάξης του 19%. Αντίθετα στις 45 ΗΜΦ, η επίδραση της ποσότητας του N που χορηγήθηκε στα φυτά ήταν σχετικά μικρή και διαφορετική, με τις υψηλότερες συγκεντρώσεις ολικών ΓΚΣ να παρατηρούνται στα μεσαία επίπεδα αζωτούχου λίπανσης. Η ανταπόκριση της συγκέντρωσης ολικών ΓΚΣ στην αζωτούχο λίπανση που περιγράφηκε, καθορίζεται από την ανταπόκριση των αλειφατικών ΓΚΣ, τα οποία κυριαρχούν ποσοτικά στα ανιχνευθέντα ΓΚΣ και παρουσίασαν σημαντική μείωση όταν η ποσότητα του χορηγούμενου N ανά φυτοδοχείο αυξήθηκε (Πίνακας 4.4). Αντίθετα η συγκέντρωση των ινδολικών ΓΚΣ αυξήθηκε σημαντικά με την αύξηση της ποσότητας του χορηγούμενου N ανά φυτοδοχείο. Συγκεκριμένα, 15 ΗΜΦ η αύξηση της συγκέντρωσης των ινδολικών ΓΚΣ ήταν συνεχής αλλά όχι γραμμική, αφού αύξηση της ποσότητας του χορηγούμενου N πέρα από τα 2.46g ανά φυτοδοχείο δεν είχε σημαντική επίδραση στη συγκέντρωση των ινδολικών ΓΚΣ. Αντίθετα, στις 30 και 45 ΗΜΦ παρατηρήθηκε αύξηση της συγκέντρωσης των ινδολικών ΓΚΣ όταν η ποσότητα του χορηγούμενου N αυξήθηκε από 0.17 στα 3.13g ανά φυτοδοχείο, ενώ επιπρόσθετη αύξηση της ποσότητας του χορηγούμενου N είχε ως αποτέλεσμα τη σημαντική μείωση της συγκέντρωσης τους στα φύλλα (Πίνακας 4.4).

Η συγκέντρωση των ΓΚΣ στα φύλλα του μπρόκολου ανταποκρίθηκε με διαφορετικό τρόπο στην ποσότητα του χορηγούμενου N ανά φυτοδοχείο σε σύγκριση με τη ρόκα. Συγκεκριμένα η συγκέντρωση των ολικών ΓΚΣ αυξήθηκε δραματικά με την αύξηση της χορηγούμενης ποσότητας N ανά φυτοδοχείο σε όλα τα στάδια ανάπτυξης (Πίνακας 4.5). Η αύξηση αυτή ωστόσο, δεν ήταν γραμμική αφού, με αύξηση της ποσότητας του χορηγούμενου N μεγαλύτερη από τα 3.13g ανά φυτοδοχείο, η συγκέντρωση των ΓΚΣ στα φύλλα παρέμεινε

σταθερή σε όλα τα στάδια ανάπτυξης (Πίνακας 4.5). Επίσης ο λόγος ινδολικών προς αλειφατικά ΓΚΣ ήταν εξαιρετικά υψηλότερος σε σύγκριση με τη ρόκα και η συμπεριφορά που παρατηρήθηκε στη συγκέντρωση των αλειφατικών και ινδολικών ΓΚΣ ήταν παρόμοια (Πίνακας 4.5).

Η επίδραση της ποσότητας του χορηγούμενου N στα μεμονωμένα ΓΚΣ στη ρόκα είναι στατιστικά σημαντική και ανεξάρτητα από το στάδιο ανάπτυξης του φυτού, αύξησή της έχει ως αποτέλεσμα τη μείωση της συγκέντρωσής τους. Εξαίρεση αποτελούν και πάλι τα μεμονωμένα ινδολικά ΓΚΣ (GBS και 4-MeO-GBS) των οποίων η συγκέντρωση τους αυξήθηκε σημαντικά με την αύξηση της χορηγούμενης ποσότητας N. Παρόμοια συμπεριφορά παρατηρήθηκε και στο αλκυλαλειφατικό ΓΚΣ GNA (Πίνακας 4.4). Στο μπρόκολο από την άλλη, παρατηρήθηκε αύξηση της συγκέντρωσης όλων των μεμονωμένων ΓΚΣ με την αύξηση της χορηγούμενης ποσότητας N ανεξάρτητα από το στάδιο ανάπτυξης των φυτών. Ωστόσο η συγκέντρωση τους παρέμεινε σταθερή πέρα από ένα όριο αζωτούχου λίπανσης, αφού περαιτέρω αύξηση της τελευταίας δεν είχε σημαντική επίδραση στη συγκέντρωσή τους (Πίνακας 4.5).

Η επίδραση της ποσότητας του χορηγούμενου N σε ότι αφορά τη συγκέντρωση των ΓΚΣ στα δυο είδη που εξετάστηκαν είναι διαφορετική. Στη διεθνή βιβλιογραφία, υπάρχουν αρκετά δεδομένα σε ότι αφορά την επίδραση της αζωτούχου λίπανσης στη συγκέντρωση των ΓΚΣ σε Σταυρανθή σε συνδυασμό με τα επίπεδα θείου που χορηγούνται στα φυτά. Ωστόσο τα αποτελέσματα δεν προσφέρονται για γενικεύσεις, αφού η επίδραση αυτή στη συγκέντρωση των ΓΚΣ διαφέρει από είδος σε είδος (Asare and Scarisbrick, 1995; Bloem et al., 2007; Chen et al., 2006; Kopsell et al., 2007; Schonhof et al., 2007a; Zhao et al., 1993). Η συγκέντρωση του αρωματικού ΓΚΣ, GTP στο φυτό *Tropaeolum majus* L. δεν επηρεάστηκε από την ποσότητα του χορηγούμενου N στα φυτά (Bloem et al., 2007). Η συγκέντρωση των ΓΚΣ που βρέθηκαν σε σπόρους ελαιοκράμβης αυξήθηκε σημαντικά με την αύξηση της ποσότητας του χορηγούμενου αζώτου (Asare and Scarisbrick, 1995; Zhao et al., 1993). Από την άλλη πλευρά, η συγκέντρωση των ΓΚΣ σε ανθοκεφαλές μπρόκολου, μειώθηκε με την αύξηση της ποσότητας του N που χορηγήθηκε στα φυτά και σε αντίθεση με τα αποτελέσματα της παρούσας διατριβής (Schonhof et al., 2007a).

Στην παρούσα εργασία, η συγκέντρωση των ολικών ΓΚΣ στη ρόκα, σε σχέση με την παραγωγή βιομάζας, συσχετίζονται αρνητικά και στατιστικά σημαντικά (-0.49 , $p < 0.001$), δηλαδή όσο αυξάνει η παραγωγή ξηρού βάρους, τόσο μειώνεται η συγκέντρωση ΓΚΣ στους ιστούς των φυτών. Η σχέση αυτή της παραγωγής βιομάζας και της συγκέντρωσης των ΓΚΣ στα φύλλα της ρόκας ισχύει κατά τα πρώτα στάδια ανάπτυξης των φυτών (15 και 30ΗΜΦ) (Διάγραμμα 4.4). Τα παραπάνω αποτελέσματα, δείχνουν ότι, στη ρόκα η μείωση της συγκέντρωσης ΓΚΣ στα χαμηλά επίπεδα αζωτούχου πιθανότατα να συνδέεται με το φαινόμενο της βιοαραίωσης αφού, αυξανόμενη της βιομάζας τα φυτά δεν βιοσυνθέτουν πρόσθετες ποσότητες ΓΚΣ και το φαινόμενο αυτό είναι εντονότερο κατά τα αρχικά στάδια ανάπτυξης του φυτού (Falk et al., 2007). Όμως τα γονίδια που συμμετέχουν στο μονοπάτι βιοσύνθεσης των ινδολικών ΓΚΣ φαίνεται ότι επάγονται με την αύξηση της ποσότητας του χορηγούμενου N (Ομίρου et al., 2008). Το γεγονός αυτό επιβεβαιώνει την υπόθεση ότι, η αζωτούχος λίπανση επηρεάζει τη βιοσύνθεση των ινδολικών ΓΚΣ σε μεταγραφικό επίπεδο. Επιπλέον φαίνεται ξεκάθαρα σε όλα τα στάδια ανάπτυξης ότι, τα φυτά στα οποία χορηγήθηκε ποσότητα N υψηλότερη από 3.13 g

ανά φυτοδοχείο, η συγκέντρωση των ΓΚΣ μειώθηκε σημαντικά και αυτό πιθανότατα να οφείλεται στη μείωση της βιοσύνθεσης ή και την διάσπαση των ΓΚΣ.

Στο μπρόκολο συμβαίνει ακριβώς το αντίθετο δηλαδή, όσο αυξάνει η παραγωγή ξηρού βάρους στα φυτά, αυξάνει και η συγκέντρωση των ΓΚΣ στα φύλλα του φυτού. Συγκεκριμένα, η συνολική συγκέντρωση ΓΚΣ συσχετίζεται θετικά και στατιστικά σημαντικά, με την αύξηση της παραγωγής βιομάζας σε όλα τα στάδια ανάπτυξης του φυτού (0.34, $p < 0.001$). Επομένως η βιοσύνθεση των ΓΚΣ στα φύλλα του μπρόκολου, αυξάνει με την αύξηση της παραγόμενης βιομάζας, δηλαδή το φυτό συνεχίζει να διαθέτει ενέργεια και πόρους για την διατήρηση της ποσότητας των ΓΚΣ στους ιστούς του σταθερή. Τα αποτελέσματα αυτά βρίσκονται σε αντίθεση με αναφορές άλλων ερευνητών, όπου η συγκέντρωση των ΓΚΣ μειώνεται όσο αυξάνει η παραγωγή ξηρού βάρους, σε ανθοκεφαλές μπρόκολου, γεγονός που αποδίδεται σε βιοαραίωση (Schonhof et al., 2007b). Ωστόσο οι διαφορές που εντοπίζονται πιθανότατα να σχετίζονται με τη διαφορά στο τρόπο δειγματοληψίας αλλά και στο φυτικό όργανο το οποίο εξετάστηκε. Συγκεκριμένα η Schonhof et al, (2007) χρησιμοποίησαν μόνο ανθοκεφαλές ενώ στην παρούσα διατριβή η υπέργεια βιομάζα των φυτών. Στο μπρόκολο ανεξάρτητα από το στάδιο ανάπτυξης των φυτών, η συγκέντρωση των ΓΚΣ αυξήθηκε με αύξηση του ξηρού βάρους των φυτών Η συγκέντρωσή τους συνέχισε να αυξάνει, και μετά την σταθεροποίηση (3.13 g N /φυτοδοχείο) της παραγωγής βιομάζας από τα φυτά (Διάγραμμα 4.5). Ως εκ τούτου, φαίνεται ότι στο μπρόκολο πιθανό τα ΓΚΣ να χρησιμοποιούνται ως μόρια αποθήκευσης θείου και αζώτου. Ωστόσο επιπλέον έρευνα είναι απαραίτητη για την εξαγωγή ασφαλών συμπερασμάτων όσον αφορά αυτή φυσιολογική δραστηριότητα των φυτών.

Επίδραση του N στο S

Η ποσότητα του N που χορηγήθηκε στα φυτά επηρέασε σημαντικά τόσο τη συνολική συγκέντρωση του S στα φύλλα όσο και τη συγκέντρωση του $S-SO_4^{2-}$ ($p < 0.0001$) και στα δύο είδη. Η ποσότητα του θείου που χορηγήθηκε στα φυτά στην παρούσα εργασία ήταν υψηλή και ικανοποιούσε τις ανάγκες και των δυο καλλιεργειών στο στοιχείο αυτό.

Στη ρόκα η συνολική συγκέντρωση του θείου στα φύλλα αυξήθηκε με την χορήγηση N στα φυτά σε όλα τα στάδια ανάπτυξης των φυτών: Αύξηση της ποσότητας του χορηγούμενου αζώτου από τα 0.17g στα 1.92 είχε ως αποτέλεσμα σημαντική αύξηση της συνολικής συγκέντρωσης του θείου στα φύλλα. Όταν το χορηγούμενο άζωτο ξεπέρασε τα 2.46 g ανά φυτοδοχείο ή συγκέντρωση του θείου στα φύλλα συνέχισε να παρουσιάζει αυξητική τάση, η οποία όμως δεν ήταν στατιστικά σημαντική (Διάγραμμα 4.6). Αντίθετα η συγκέντρωση των θειικών ιόντων στους ιστούς των φύλλων ακολούθησε αντίστροφη συμπεριφορά αφού αύξηση της ποσότητας του χορηγούμενου N άνω των 0,44 N είχε ως αποτέλεσμα τη στατιστικά σημαντική μείωση της συγκέντρωσης των θειικών ιόντων στους μίσχους των φύλλων σε όλα τα στάδια ανάπτυξης των φυτών

Στο μπρόκολο, αύξηση της ποσότητας του χορηγούμενου N στα φυτά είχε ως αποτέλεσμα, όπως και στη ρόκα την αύξηση της συγκέντρωσης του ολικού θείου στα φύλλα. Η αύξηση αυτή όμως δεν ήταν γραμμική αφού, όταν η ποσότητα του N που χορηγήθηκε στα φυτά ξεπέρασε τα 1.92g N ανά φυτοδοχείο, η ποσότητα του συνολικού θείου παρέμεινε σταθερή, και μάλιστα στην υψηλή ποσότητα εφαρμογής του N (7,38 g N ανά φυτοδοχείο) εμφάνισε τάση μείωσης (Διάγραμμα 4.7). Αντίθετα η συγκέντρωση των θειικών ιόντων στους

μίσχους των φύλλων μειώθηκε σημαντικά με την αύξηση της ποσότητας του N και πάλι άνω των 0.44 g N που χορηγήθηκε στα φυτά μέχρι τη δόση των 2.46 g N ανα φυτοδοχείο (Διάγραμμα 4.7).

Η συγκέντρωση των νιτρικών ιόντων στους μίσχους των φύλλων μπρόκολου σε δόση N μεγαλύτερη των 0.44g ανά φυτοδοχείο, επηρέασε αρνητικά τη συγκέντρωση των θειικών ιόντων αφού εμφάνισε, στατιστικά σημαντική αρνητική συσχέτιση με τη συγκέντρωση των θειικών ιόντων (-0.43, $p < 0.05$), ενώ η συγκέντρωση του ολικού θείου στα φύλλα συσχετίζεται θετικά και στατιστικά σημαντικά (0.59, $p < 0.001$). Προηγουμένως έχει αναφερθεί ότι, η έκφραση των γονιδίων που επάγουν τη λειτουργία των πρωτεϊνών μεταφοράς/πρόσληψης θειικών ιόντων στα φυτά αυξάνει όταν η συγκέντρωση ανηγμένων μορφών θείου (κυστεΐνη, μεθειονίνη) είναι μειωμένη στα φυτικά κύτταρα (Hesse et al., 2004). Επιπρόσθετα πρόσφατες μελέτες έχουν καταδείξει την αλληλεπίδραση που παρατηρείται μεταξύ της αναγωγής των νιτρικών και των θειικών ιόντων στα φυτά, και της επίδρασης των προϊόντων αναγωγής και αφομοίωσης τους στα κύτταρα (Kopriva and Rennenberg, 2004; Kopriva et al., 2002; Koprivova et al., 2000). Συγκεκριμένα, αύξηση της χορηγούμενης ποσότητας N υπο μορφή αμμωνιακού αζώτου στα φυτά είχε ως αποτέλεσμα στην σημαντική αύξηση της ενζυμικής δραστηριότητας ενζύμων που συμμετέχουν στην αφομοίωση του θείου, ενώ η ποσότητα των θειικών ιόντων που ενσωματώθηκαν σε πρωτεΐνη αυξήθηκε (Brunold and Suter, 1984). Στις συνθήκες του παρόντος πειράματος, η συγκέντρωση του θείου αυξήθηκε με την αύξηση της χορηγούμενης ποσότητας αζώτου και στα δυο είδη (Διάγραμμα 4.6 και 3.7), γεγονός που επιβεβαιώνει αυτή την υπόθεση. Η επίδραση της αζωτούχου λίπανσης φαίνεται ότι είναι καθοριστική στην αφομοίωση του θείου και είναι σημαντική σε μεταγραφικό επίπεδο, αφού, τα επίπεδα μεταγραφικού RNA και ενζύμων σε φυτά τα οποία υπέφεραν από έλλειψη αζώτου, ήταν μειωμένα (Koprivova et al., 2000; Yamaguchi et al., 1999). Η μείωση των θειικών ιόντων στον αγωγό ιστό των φυτών που παρατηρήθηκε σε αυτό το πείραμα ενδεχομένως να οφείλεται είτε στη μειωμένη απορρόφηση των θειικών ιόντων και την μεταφοράς τους στα φύλλα λόγω υψηλής συγκέντρωσης κυστεΐνης και γλουταθειόνης στις ρίζες των φυτών, μόρια που μειώνουν τη δραστηριότητα των μεταφορέων των θειικών ιόντων (Hesse et al., 2004) είτε από την επαγωγική δράση των κυτοκινινών, η συγκέντρωση των οποίων αυξάνει με την αύξηση της χορήγησης στα φυτά νιτρικού αζώτου (Walch-Liu et al., 2000). Οι κυτοκινίνες φαίνεται ότι επιδρούν θετικά στην αφομοίωση του θείου, αφού αύξηση της συγκέντρωσής τους, είχε ως αποτέλεσμα την αύξηση της ενζυμικής δράσης της ρεδοκτάσης της αδενοσίνης-5'-φωσφοθειικής (APR) και συσσώρευσης του αντίστοιχου μεταγραφικού RNA (Ohkama et al., 2002). Τα δεδομένα της παρούσας εργασίας επιβεβαιώνουν την υπόθεση ότι, το άζωτο επάγει την αφομοίωση των θειικών ιόντων παράλληλα με την μείωση της συγκέντρωσής τους αφού αυξήθηκε η συγκέντρωση των ΓΚΣ στα φύλλα του μπρόκολου. Αντίθετα στη ρόκα, η συγκέντρωση των ΓΚΣ μειώθηκε με αύξηση της χορηγούμενης ποσότητας N σε όλα τα στάδια ανάπτυξης, ενώ η ποσότητα της συνολικής συγκέντρωσης θείου αυξανόταν συνεχώς. Τα δεδομένα αυτά δείχνουν ότι, το άζωτο ανάλογα με το φυτικό είδος επηρεάζει σημαντικά αλλά διαφορετικά την αφομοίωση των θειικών σε οργανικές θειούχες ενώσεις.

Συμπεράσματα

Η προσθήκη αζωτούχου λίπανσης τόσο στη ρόκα όσο και στο μπρόκολο αυξάνει σημαντικά την παραγωγή βιομάζας ενώ στη ρόκα υποβαθμίζει σημαντικά τη ποιότητα των βρώσιμων τμημάτων της ως προς τις χημειοπροστατευτικές ουσίες που παράγει. Ωστόσο πέρα από μια συγκεκριμένη ποσότητα, οποιαδήποτε αύξηση του αζώτου που χορηγείται στα φυτά δεν έχει σημαντική επίδραση στην πρόσθετη παραγωγή βιομάζας.

Η συγκέντρωση των νιτρικών ιόντων στους μίσχους των φύλλων και των δύο ειδών αυξήθηκε με την αύξηση της χορηγούμενης ποσότητας N και η σχέση της με την παραγωγή βιομάζας ήταν σημαντική, ενώ η επίδραση του σταδίου ανάπτυξης στη συγκέντρωση τόσο του αζώτου όσο και των νιτρικών ιόντων στους μίσχους ήταν σημαντική. Η εξίσωση του Mitscherlich, προσομοιώνει σε ικανοποιητικό βαθμό τα πειραματικά δεδομένα. Η κρίσιμη συγκέντρωση των νιτρικών ιόντων τόσο για τη ρόκα όσο και για το μπρόκολο, μειώνονται με το στάδιο ανάπτυξης της καλλιέργειας.

Η προσθήκη αζωτούχου λίπανσης επηρεάζει σημαντικά την αφομοίωση των θειικών ιόντων σε οργανικές μορφές θείου, ενώ παρατηρήθηκε αρνητική στατιστικά σημαντική συσχέτιση μεταξύ τόσο της ποσότητας αζώτου που χορηγήθηκε στα φυτά όσο και της συγκέντρωσης των νιτρικών ιόντων στους μίσχους των φύλλων με τη συγκέντρωση των θειικών ιόντων στους μίσχους των φύλλων και των δύο ειδών. Οι αρνητικές αυτές συσχετίσεις εκφράζουν πιθανά διαφοροποιήσεις της αφομοίωσης θειικών ιόντων και των ανταγωνισμό τους με τα νιτρικά ιόντα αντίστοιχα, αλλά υποστηρίζονται και από νέα δεδομένα στο επίπεδο γονιδιακής έκφρασης.

Αντίθετα η επίδραση της αζωτούχου λίπανσης στην ολική συγκέντρωση του θείου, ήταν θετική αφού παρατηρήθηκε στατιστικά σημαντική συσχέτιση μεταξύ των δύο αυτών παραγόντων.

Τέλος η επίδραση του αζώτου στη συγκέντρωση των ΓΚΣ στα φύλλα των δύο ειδών ήταν σημαντική αλλά διαφοροποιημένη. Συγκεκριμένα στη ρόκα, αύξηση της χορηγούμενης ποσότητας N είχε ως αποτέλεσμα τη μείωση της συγκέντρωσης των ΓΚΣ σε όλα τα στάδια ανάπτυξης γεγονός που πιθανό να οφείλεται στο φαινόμενο της βιοαραίωσης ειδικότερα όταν το N που χορηγήθηκε ήταν ελλειμματικό. Αντίθετα στο μπρόκολο, αύξηση της ποσότητας του χορηγούμενου αζώτου είχε ως αποτέλεσμα την αύξηση της συγκέντρωσης των ΓΚΣ στα φύλλα γεγονός που πιθανό να οφείλεται σε αποθήκευση του θείου υπό μορφή ΓΚΣ.

Βιβλιογραφία

- Aires, A., E. Rosa, and R. Carvalho. 2006. Effect of nitrogen and sulfur fertilization on glucosinolates in the leaves and roots of broccoli sprouts (*Brassica oleracea* var. *italica*). *Journal of the Science of Food and Agriculture* 86:1512-1516.
- Alva, A.K. 2007. Petiole and soil nitrogen concentrations during the growing season of two potato cultivars as influenced by different nitrogen-management practices. *Communications in Soil Science and Plant Analysis* 38:403-421.
- Asare, E., and D.H. Scarisbrick. 1995. Rate of nitrogen and sulphur fertilizers on yield, yield components and seed quality of oilseed rape (*Brassica napus* L.). *Field Crops Research* 44:41-46.
- Bellostas, N., P. Kachlicki, J.C. Sørensen, and H. Sørensen. 2007. Glucosinolate profiling of seeds and sprouts of *B. oleracea* varieties used for food. *Scientia Horticulturae* 114:234-242.
- Bennett, R.N., E.A.S. Rosa, F.A. Mellon, and P.A. Kroon. 2006. Ontogenic profiling of glucosinolates, flavonoids, and other secondary metabolites in *Eruca sativa* (salad rocket), *Diplotaxis eruroides* (wall rocket), *Diplotaxis tenuifolia* (wild rocket), and *Bunias orientalis* (Turkish rocket). *Journal of Agricultural and Food Chemistry* 54:4005-4015.
- Bennett, R.N., R. Carvalho, F.A. Mellon, J. Eagles, and E.A.S. Rosa. 2007. Identification and quantification of glucosinolates in sprouts derived from seeds of wild *Eruca sativa* L. (salad rocket) and *Diplotaxis tenuifolia* L. (wild rocket) from diverse geographical locations. *Journal of Agricultural and Food Chemistry* 55:67-74.
- Bloem, E., S. Haneklaus, and E. Schnug. 2007. Comparative effects of sulfur and nitrogen fertilization and post-harvest processing parameters on the glucotropaeolin content of *Tropaeolum majus* L. *Journal of the Science of Food and Agriculture* 87:1576-1585.
- Brown, P.D., J.G. Tokuhisa, M. Reichelt, and J. Gershenzon. 2003. Variation of glucosinolate accumulation among different organs and developmental stages of *Arabidopsis thaliana*. *Phytochemistry* 62:471-481.
- Brunold, C., and M. Suter. 1984. Regulation of sulfate assimilation by nitrogen nutrition in the duckweed *Lemna minor*-L. *Plant Physiology* 76:579-583.
- Chen, X.-j., Z.-j. Zhu, X.-l. Ni, and Q.-q. Qian. 2006. Effect of Nitrogen and Sulfur Supply on Glucosinolates in *Brassica campestris* ssp. *chinensis*. *Agricultural Sciences in China* 5:603-608.
- Cole, R.A. 1980. Volatile components produced during ontogeny of some cultivated crucifers. *Journal of the Science of Food and Agriculture* 31:549-557.
- Custic, M., M. Horvatic, and A. Butorac. 2002. Effects of nitrogen fertilization upon the content of essential amino acids in head chicory (*Cichorium intybus* L. var. *foliosum*). *Scientia Horticulturae* 92:205-215.
- Ekbladh, G., E. Witter, and T. Ericsson. 2007. Ontogenetic decline in the nitrogen concentration of field grown white cabbage—Relation to growth components. *Scientia Horticulturae* 112:149-155.
- Fahey, W.J., T.A. Zalcmann, and P. Talalay. 2001. The chemical diversity and distribution of glucosinolates and isothiocyanates among plants. *Phytochemistry* 56:5-51.

- Falk, K.L., J.G. Tokuhisa, and J. Gershenzon. 2007. The effect of sulfur nutrition on plant glucosinolate content: physiology and molecular mechanisms. *Plant Biology* 9:573-581.
- Fontes, P.C.R., E.L. Coelho, and A.A. Cardoso. 2003. Petiole sap nitrate and leaf nitrogen critical values in melon plants grown in unheated greenhouse and field conditions. *Journal of Plant Nutrition* 26:1403-1411.
- Gardner, B.R., and R.L. Roth. 1989. Midrib nitrate concentration as a means for determining nitrogen needs of broccoli. *Journal of Plant Nutrition* 12:111-125.
- (ed.) 2004.
- Hocking, P.J. 2001. Effects of sowing time on nitrate and total nitrogen concentrations in field-grown canola (*Brassica napus* L.) and implications for plant analysis. *Journal of Plant Nutrition* 24:43-59.
- Jaynes, D.B., T.S. Colvin, D.L. Karlen, C.A. Cambardella, and D.W. Meek. 2001. Nitrate loss in subsurface drainage as affected by nitrogen fertilizer rate. *Journal of Environmental Quality* 30:1305-1314.
- Jenkins, J.N., J.R. Nichols, J.C. McCarty, and W.L. Parrott. 1982. Nitrates in petioles of 3 cottons. *Crop Science* 22:1230-1233.
- Kim, S.J., C. Kawaharada, S. Jin, M. Hashimoto, G. Ishii, and H. Yamauchi. 2007. Structural elucidation of 4-(cystein-S-yl)butyl glucosinolate from the leaves of *Eruca sativa*. *Bioscience Biotechnology and Biochemistry* 71:114-121.
- Kopriva, S., and H. Rennenberg. 2004. Control of sulphate assimilation and glutathione synthesis: interaction with N and C metabolism. *Journal of Experimental Botany* 55:1831-1842.
- Kopriva, S., M. Suter, P. von Ballmoos, H. Hesse, U. Krahenbuhl, H. Rennenberg, and C. Brunold. 2002. Interaction of sulfate assimilation with carbon and nitrogen metabolism in *Lemna minor*. *Plant Physiology* 130:1406-1413.
- Koprivova, A., M. Suter, R.O. Camp, C. Brunold, and S. and Kopriva. 2000. Regulation of Sulfate Assimilation by Nitrogen in Arabidopsis. *Plant Physiology* 122:737-746.
- Kopsell, D.A., T.C. Barickman, C.E. Sams, and J.S. McElroy. 2007. Influence of nitrogen and sulfur on biomass production and carotenoid and glucosinolate concentrations in watercress (*Nasturtium officinale* R. Br.). *Journal of Agricultural and Food Chemistry* 55:10628-10634.
- Kubota, A., T.L. Thompson, A.T. Doerge, and E.R. Godin. 1997. A petiole sap nitrate test for broccoli. *Journal of Plant Nutrition* 20:669-682.
- Kushad, M.M., A.F. Brown, A.C. Kurilich, J.A. Juvik, B.P. Klein, M.A. Wallig, and E.H. Jeffery. 1999. Variation of glucosinolates in vegetable crops of *Brassica oleracea*. *Journal of Agricultural and Food Chemistry* 47:1541-1548.
- Li, S.M., I. Schonhof, A. Krumbein, L. Li, H. Stutzel, and M. Schreiner. 2007. Glucosinolate concentration in turnip (*Brassica rapa* ssp *rapifera* L.) roots as affected by nitrogen and sulfur supply. *Journal of Agricultural and Food Chemistry* 55:8452-8457.
- MacKenzie, A.J., W.F. Spencer, F.R. Stockinger, and B.A. Kranz. 1963. Seasonal nitrate-nitrogen content of cotton petioles as affected by nitrogen and plant age. *Agronomy Journal* 52:55-59.

- McGregor, D.I. 1988. Glucosinolate content of developing rapeseed (*Brassica napus* L Midas) seedlings. Canadian Journal of Plant Science 68:367-380.
- Montgomery, D.C., and E.A. Peck. 1992. Introduction to Linear Regression Analysis. 2nd ed. John Wiley & Sons, New York.
- Moreno, D.A., M. Carvajal, C. Lopez-Berenguer, and C. Garcia-Viguera. 2006. Chemical and biological characterisation of nutraceutical compounds of broccoli. Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis 41.
- Moreno, D.A., C. Lopez-Berenguer, M.C. Martinez-Ballesta, M. Carvajal, and C. Garcia-Viguera. 2008. Basis for the new challenges of growing broccoli for health in hydroponics. Journal of the Science of Food and Agriculture 88:1472-1481.
- Munson, D.R., and L.W. Nelson. 1990. Principles and practices in plant analysis, p. 359-387, *In* R. L. Westerman, ed. Soil testing and plant analysis Vol. 3. SSSA, Wisconsin.
- Nguyen, P.M., and E.D. Niemeyer. 2008. Effects of nitrogen fertilization on the phenolic composition and antioxidant properties of basil (*Ocimum basilicum* L.). Journal of Agricultural and Food Chemistry 56:8685-8691.
- Nkoa, R., Y. Desjardins, N. Tremblay, L. Querrec, M. Baana, and B. Nkoa. 2003. A mathematical model for nitrogen demand quantification and a link to broccoli (*Brassica oleracea* var. *italica*) glutamine synthetase activity. Plant Science 165:483-496.
- Ohkama, N., K. Takei, H. Sakakibara, H. Hayashi, T. Yoneyama, and T. Fujiwara. 2002. Regulation of sulfur-responsive gene expression by exogenously applied cytokinins in *Arabidopsis thaliana*. Plant and Cell Physiology 43:1493-1501.
- Omirou, M., A. Zampounis, D. Katsarou, C. Delis, C. Ehaliotis, D. Karpouzas, and K.K. Papadopoulou. 2008. Effect of S fertilization on the glucosinolate content and biosynthesis of *Eruca sativa* 7th Joint Meeting of GA, AFERP, ASP, PSI & SIF, Athens, Greece.
- Papastylianou, I., R.D. Graham, and D.W. Puckridge. 1982. The diagnosis of nitrogen deficiency in wheat by means of a critical nitrate concentration in stem bases. Communications in Soil Science and Plant Analysis 13:473-485.
- Pereira, F.M.V., E. Rosa, J.W. Fahey, K.K. Stephenson, R. Carvalho, and A. Aires. 2002. Influence of temperature and ontogeny on the levels of glucosinolates in broccoli (*Brassica oleracea* var. *italica*) sprouts and their effect on the induction of mammalian phase 2 enzymes. Journal of Agricultural and Food Chemistry 50:6239-6244.
- Porter, A.J.R., A.M. Morton, G. Kiddle, K.J. Doughty, and R.M. Wallsgrove. 1991. Variation in the glucosinolate content of oilseed rape (*Brassica napus* L) leaves .1. Effect of leaf age and position. Annals of Applied Biology 118:461-467.
- Power, J.F., R. Wiese, and D. Flowerday. 2001. Managing farming systems for nitrate control: A research review from management systems evaluation areas. Journal of Environmental Quality 30:1866-1880.

- Prosser, I.M., J.V. Purves, L.R. Saker, and D.T. Clarkson. 2001. Rapid disruption of nitrogen metabolism and nitrate transport in spinach plants deprived of sulphate. *Journal of Experimental Botany* 52:113-121.
- Rask, L., E. Andreasson, B. Ekbom, S. Eriksson, B. Pontoppidan, and J. Meijer. 2000. Myrosinase: gene family evolution and herbivore defense in Brassicaceae. *Plant Molecular Biology* 42:93-113.
- Rodrigues, M.A. 2004. Establishment of continuous critical levels for indices of plant and presidedress soil nitrogen status in the potato crop. *Communications in Soil Science and Plant Analysis* 35:2067-2085.
- Rosa, E.A.S., R.K. Heaney, C.A.M. Portas, and G.R. Fenwick. 1996. Changes in glucosinolate concentrations in Brassica crops (*B. oleracea* and *B. napus*) throughout growing seasons. *Journal of the Science of Food and Agriculture* 71:237-244.
- Santamaria, P., A. Elia, and F. Serio. 2002. Effect of solution nitrogen concentration on yield, leaf element content, and water and nitrogen use efficiency of three hydroponically-grown rocket salad genotypes. *Journal of Plant Nutrition* 25:245-258.
- Schonhof, I., D. Blankenburg, S. Muller, and A. Krumbein. 2007a. Sulfur and nitrogen supply influence growth, product appearance, and glucosinolate concentration of broccoli. *Journal of Plant Nutrition and Soil Science-Zeitschrift Fur Pflanzenernahrung Und Bodenkunde* 170:65-72.
- Schonhof, I., D. Blankenburg, S. Müller, and A. Krumbein. 2007b. Sulfur and nitrogen supply influence growth, product appearance, and glucosinolate concentration of broccoli. *J. Plant Nutr. Soil Sci.* 170:65-72.
- Smith, F.W., and J.F. Loneragan. 1997. Interpretation of Plant Analysis: Concepts and Principles., p. 3-33, *In* D. J. Reuter and J. B. Robinson, eds. *Plant Analysis: An Interpretation Manual* 2nd Ed. CSIRO Publishing, Collingwood, Victoria, Australia.
- Smolen, S., and W. Sady. 2009. The effect of various nitrogen fertilization and foliar nutrition regimes on the concentrations of sugars, carotenoids and phenolic compounds in carrot (*Daucus carota* L.). *Scientia Horticulturae* 120:315-324.
- Spalding, R.F., and M.E. Exner. 1993. Occurrence of nitrate in ground water: a review. *Journal of Environmental Quality* 22:392-402.
- Studstill, D.W., E.H. Simonne, C.M. Hutchinson, R.C. Hochmuth, M.D. Dukes, and W.E. Davis. 2003. Petiole sap testing sampling procedures for monitoring pumpkin nutritional status. *Communications in Soil Science and Plant Analysis* 34:2355-2362.
- Vallejo, F., C. Garcia-Viguera, and F.A. Tomas-Barberan. 2003. Changes in broccoli (*Brassica oleracea* L. var. *italica*) health-promoting compounds with inflorescence development. *Journal of Agricultural and Food Chemistry* 51:3776-3782.
- Vidmar, J.J., J.K. Schjoerring, B. Touraine, and A.D.M. Glass. 1999. Regulation of the hvst1 gene encoding a high-affinity sulfate transporter from *Hordeum vulgare*. *Plant Molecular Biology* 40:883-892.
- Vitosh, M.L., and G.H. Silva. 1994. A rapid petiole sap nitrate-nitrogen test for potatoes. *Communications in Soil Science and Plant Analysis* 25:183-190.
- Vold, A., L.R. Bakke, G. Uhlen, and A. Vatn. 1999. Use of data from long-term fertilizer experiments to model plant nitrogen uptake. *Nutrient Cycling in Agroecosystems* 55:197-206.

- Walch-Liu, P., G. Neumann, F. Bangerth, and C. Engels. 2000. Rapid effects of nitrogen form on leaf morphogenesis in tobacco. . *Journal of Experimental Botany* 51:227-237.
- Wang, R.C., M. Okamoto, X.J. Xing, and N.M. Crawford. 2003. Microarray analysis of the nitrate response in *Arabidopsis* roots and shoots reveals over 1,000 rapidly responding genes and new linkages to glucose, trehalose-6-phosphate, iron, and sulfate metabolism. *Plant Physiology* 132:556-567.
- Williams, C.M.J., and N.A. Maier. 2002. Use of petiolar sap nitrate for assessing nitrogen status of irrigated Brussels sprout crops. *Journal of Plant Nutrition* 25:1291-1301.
- Wolfe, A.H., and J.A. Patz. 2002. Reactive nitrogen and human health: acute and long-term implications. *Ambio* 31:120-125.
- Yamaguchi, Y., T. Nakamura, E. Harada, N. Koizumi, and H. Sano. 1999. Differential accumulation of transcripts encoding sulfur assimilation enzymes upon sulfur and/or nitrogen deprivation in *Arabidopsis thaliana*. . *Bioscience, Biotechnology and Biochemistry* 63:762-766.
- Zhao, F.J., E.J. Evans, P.E. Bilsborrow, and J.K. Syers. 1993. Influence of sulfur and nitrogen on seed yield and quality of low glucosinolate oilseed rape (*Brassica napus* L). *Journal of the Science of Food and Agriculture* 63:29-37.

Πίνακες και Διαγράμματα

Πίνακας 4.1 Παραγωγή βιομάζας σε ξηρό βάρος και η συγκέντρωση νιτρικού αζώτου στους μίσχους φύλλων μπρόκολου και ρόκας σε διαφορετικά στάδια ανάπτυξης.

| Δόση N | Μπρόκολο | | Ρόκα | |
|--------|--|---|----------------|---|
| | Ξ.Β. (g/ plant) | N-NO ₃ ⁻ (mg/g ξ.β) | Ξ.Β. (g/plant) | N-NO ₃ ⁻ (mg/g ξ.β) |
| | 30 ΗΜΦ | | 15 ΗΜΦ | |
| 0.17 | 6.64 ¹ a ² ± 0.29 ³ | 3.37 a ± 0.14 | 0.62 a ± 0.07 | 3.19 a ± 0.54 |
| 0.44 | 15.38 b ± 3.10 | 4.04 a ± 0.16 | 1.13 b ± 0.07 | 4.70 b ± 0.41 |
| 0.85 | 34.20 c ± 4.94 | 5.20 b ± 0.28 | 1.64 c ± 0.12 | 6.17 c ± 0.63 |
| 1.38 | 50.39 d ± 4.35 | 6.32 c ± 0.22 | 1.93 c ± 0.18 | 7.17 cd ± 0.38 |
| 1.92 | 57.63 d ± 3.89 | 7.67 d ± 0.17 | 2.32 d ± 0.16 | 8.00d e ± 0.23 |
| 2.47 | 67.23 e ± 3.31 | 9.58 e ± 0.30 | 2.78 e ± 0.12 | 9.16 e ± 0.41 |
| 3.13 | 70.45 e ± 1.86 | 10.92 f ± 0.29 | 2.98 ef ± 0.10 | 13.14 f ± 0.70 |
| 4.47 | 68.70 e ± 2.08 | 12.75 g ± 0.43 | 3.13 f ± 0.08 | 15.79 g ± 0.41 |
| 5.16 | 67.26 e ± 4.42 | 14.55 h ± 0.22 | 3.00 ef ± 0.19 | 16.36 gh ± 0.82 |
| 7.83 | 67.43 e ± 4.56 | 17.63 i ± 0.57 | 2.69 e ± 0.17 | 17.13 i ± 0.73 |
| | 50 ΗΜΦ | | 30 ΗΜΦ | |
| 0.17 | 16.98 a ± 4.31 | 2.43 a ± 0.08 | 0.99 a ± 0.10 | 1.03 a ± 0.17 |
| 0.44 | 35.03 b ± 5.35 | 2.71 ab ± 0.13 | 1.89 b ± 0.08 | 1.80 ab ± 0.25 |
| 0.85 | 68.06 c ± 8.07 | 3.04 b ± 0.28 | 3.17 c ± 0.12 | 2.29 bc ± 0.59 |
| 1.38 | 85.14 d ± 5.09 | 3.89 c ± 0.13 | 4.58 d ± 0.12 | 3.18 c ± 0.21 |
| 1.92 | 113.78 e ± 9.13 | 4.22 c ± 0.08 | 5.42 e ± 0.11 | 4.58 d ± 0.34 |
| 2.47 | 138.24 f ± 5.57 | 5.21 d ± 0.29 | 6.37 f ± 0.25 | 5.51 d ± 0.49 |
| 3.13 | 155.90 g ± 5.98 | 6.27 e ± 0.36 | 6.98 g ± 0.05 | 7.88 e ± 0.66 |
| 4.47 | 154.79 g ± 7.19 | 8.27 f ± 0.24 | 6.88 g ± 0.13 | 10.20 f ± 0.63 |
| 5.16 | 156.31 g ± 6.57 | 9.65 g ± 0.24 | 6.80 g ± 0.30 | 10.48 f ± 0.79 |
| 7.83 | 155.18 g ± 5.24 | 11.43 h ± 0.31 | 6.67 fg ± 0.20 | 11.39 f ± 0.53 |
| | 70 ΗΜΦ | | 50 ΗΜΦ | |
| 0.17 | 14.72 a ± 3.63 | 0.37 a ± 0.12 | 1.15 a ± 0.06 | 0.16 a ± 0.02 |
| 0.44 | 41.52 b ± 7.14 | 0.75 a ± 0.12 | 2.46 b ± 0.19 | 0.16 a ± 0.03 |
| 0.85 | 90.51c ± 9.14 | 1.20 b ± 0.16 | 4.61 c ± 0.50 | 0.20 a ± 0.05 |
| 1.38 | 149.17d ± 9.27 | 1.72 c ± 0.13 | 6.22 d ± 0.35 | 0.46 ab ± 0.07 |
| 1.92 | 180.93 e ± 9.15 | 2.30 d ± 0.12 | 8.03 e ± 0.33 | 0.68 b ± 0.13 |
| 2.47 | 239.93 f ± 6.24 | 2.89 e ± 0.11 | 9.59 f ± 0.39 | 1.08 c ± 0.07 |
| 3.13 | 256.21 fg ± 9.42 | 4.16 f ± 0.18 | 9.96 f ± 0.36 | 1.70 d ± 0.14 |
| 4.47 | 254.59 fg ± 9.78 | 5.17 g ± 0.18 | 10.03 f ± 0.13 | 2.34 e ± 0.18 |
| 5.16 | 253.14 fg ± 4.09 | 6.64 h ± 0.18 | 10.04 f ± 0.55 | 3.20 f ± 0.17 |
| 7.83 | 259.93 g ± 4.27 | 7.61 i ± 0.23 | 10.22 f ± 0.37 | 4.28 g ± 0.24 |

¹Μέση συγκέντρωση Ξ.Β. ή N-NO₃

²Διαφορετικά γράμματα σε κάθε στήλη υποδηλώνουν στατιστικά σημαντικές διαφορές σε επίπεδο σημαντικότητας α=0.05 για τις μέσες τιμές σε κάθε στάδιο ανάπτυξης σύμφωνα με το κριτήριο Tukey(HSD).

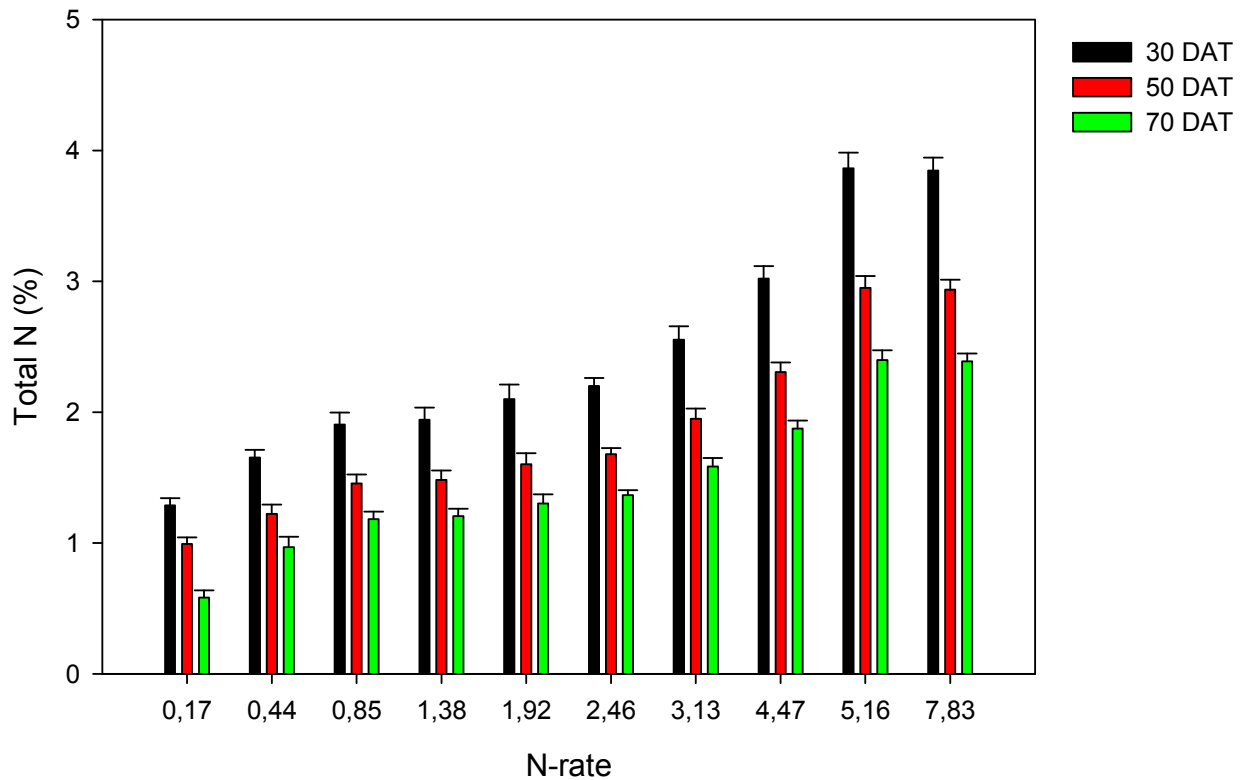
³Τυπικό σφάλμα της μέσης συγκέντρωσης (n=4)

Πίνακας 4.2. Εκτίμηση παραμέτρων, τα όρια εμπιστοσύνης, ο συντελεστής προσδιορισμού και η εκτίμηση των κρίσιμων επιπέδων συγκέντρωσης N-NO₃ (mg/g ξ.β) σε μίσχους μπρόκολου και ρόκας, όπως υπολογίστηκαν από την μη-γραμμική εξίσωση του Mitscherlich.

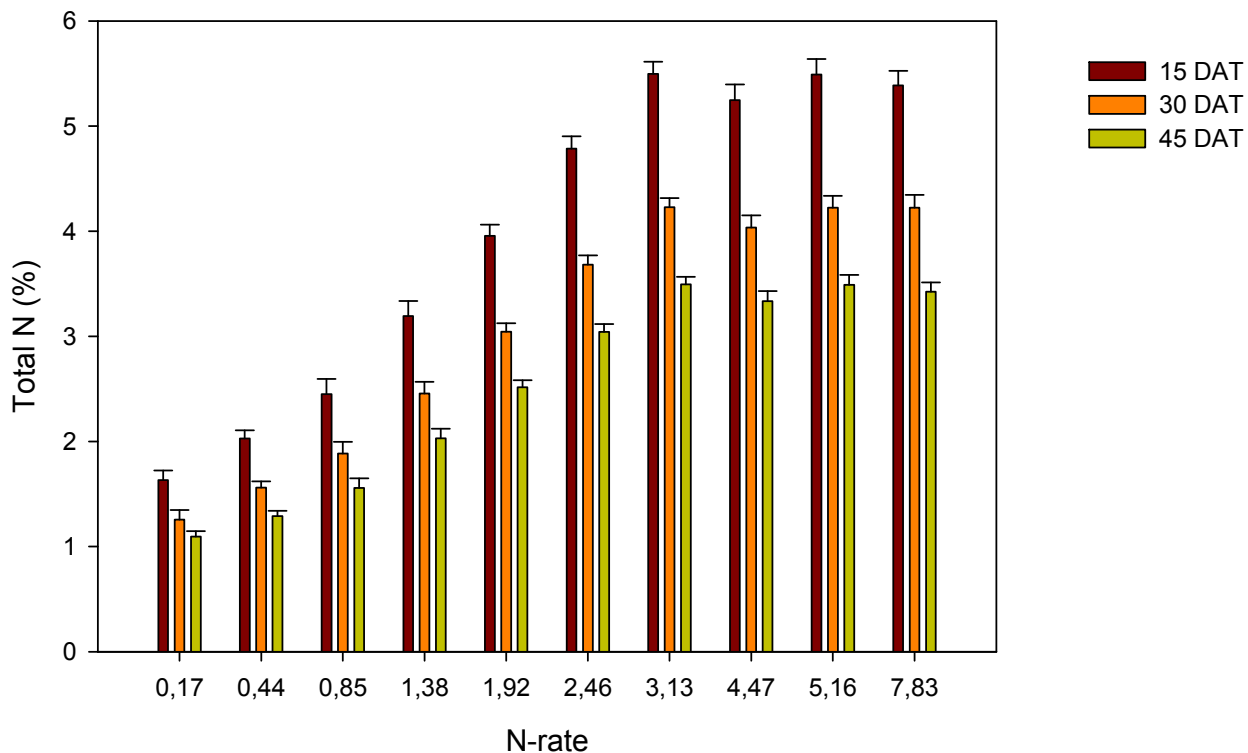
| | | Εκτίμηση παραμέτρου | | Τυπικό σφάλμα | Κάτω Όριο Εμπιστοσύνης (95%) | Άνω Όριο Εμπιστοσύνης (95%) | R ² | Κρίσιμα επίπεδα συγκ. N-NO ₃ (mg/g ξ.β) | | |
|----------|-------------|---------------------|------|---------------|------------------------------|-----------------------------|----------------|--|------|------|
| | | | | | | | | | | |
| Μπρόκολο | 30 ΗΜΦ | <i>Ymax</i> | 1.02 | 0.167 | 0.68 | 1.36 | 0.74 | 15.77 | | |
| | | <i>β</i> | 0.99 | 0.27 | 0.45 | 1.54 | | | | |
| | | <i>k</i> | 0.15 | 0.08 | 0.029 | 0.32 | | | | |
| | 50 ΗΜΦ | <i>Ymax</i> | 0.91 | 0.12 | 0.65 | 1.16 | | | 0.64 | 7.61 |
| | | <i>β</i> | 0.98 | 0.52 | 0.18 | 2.01 | | | | |
| | | <i>k</i> | 0.31 | 0.10 | 0.16 | 0.41 | | | | |
| | 70 ΗΜΦ | <i>Ymax</i> | 0.96 | 0.04 | 0.91 | 1.08 | | | 0.93 | 4.67 |
| | | <i>β</i> | 0.93 | 0.06 | 0.87 | 1.12 | | | | |
| | | <i>k</i> | 0.48 | 0.07 | 0.32 | 0.64 | | | | |
| 15 ΗΜΦ | <i>Ymax</i> | 1.00 | 0,10 | 91.21 | 104.91 | 0.83 | 16.80 | | | |
| | <i>β</i> | 1.00 | 0,16 | 0.66 | 1.33 | | | | | |
| | <i>k</i> | 0.14 | 0,05 | 0.037 | 0.24 | | | | | |
| Ρόκα | 30 ΗΜΦ | <i>Ymax</i> | 1.06 | 0,05 | 0.914 | 1.08 | 0.92 | 8.92 | | |
| | | <i>β</i> | 1.00 | 0,07 | 0.86 | 1.14 | | | | |
| | | <i>k</i> | 0.26 | 0,04 | 0.17 | 0.35 | | | | |
| 45 ΗΜΦ | <i>Ymax</i> | 0,96 | 0,02 | 0,92 | 1,01 | 0.93 | 1,08 | | | |
| | <i>β</i> | 0,94 | 0,07 | 0,86 | 1,13 | | | | | |
| | <i>k</i> | 2,07 | 0,28 | 1,48 | 2,65 | | | | | |

Πίνακας 4.3 Συσχέτιση των εκτιμώμενων παραμέτρων της μη γραμμικής εξίσωσης του Mitscherlich για τον υπολογισμό των κρίσιμων επιπέδων συγκέντρωσης όπως υπολογίστηκαν από τα πειραματικά δεδομένα.

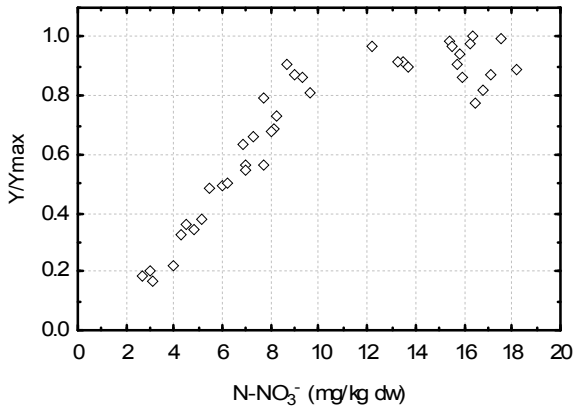
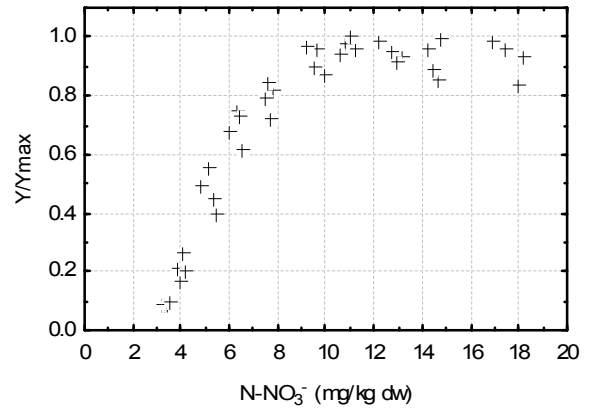
| | Ρόκα | | | | | Μπρόκολο | | | |
|--------|----------------|----------------|---------|-------|--------|----------------|----------------|---------|-------|
| | | γ_{max} | β | k | | | γ_{max} | β | k |
| 15 ΗΜΦ | γ_{max} | 1 | -0.76 | -0.94 | 30 ΗΜΦ | γ_{max} | 1 | -0.79 | -0.84 |
| | β | -0.76 | 1 | 0.91 | | β | -0.79 | 1 | 0.92 |
| | k | -0.94 | 0.91 | 1 | | k | -0.84 | 0.92 | 1 |
| 30 ΗΜΦ | γ_{max} | 1 | -0.64 | -0.88 | 50 ΗΜΦ | γ_{max} | 1 | -0.74 | -0.83 |
| | β | -0.64 | 1 | 0.84 | | β | -0.74 | 1 | 0.77 |
| | k | -0.88 | 0.84 | 1 | | k | -0.83 | 0.77 | 1 |
| 45 ΗΜΦ | γ_{max} | 1 | -0.32 | -0.59 | 70 ΗΜΦ | γ_{max} | 1 | -0.49 | -0.84 |
| | β | -0.32 | 1 | 0.82 | | β | -0.49 | 1 | 0.77 |
| | k | -0.59 | 0.82 | 1 | | k | -0.83 | 0.77 | 1 |



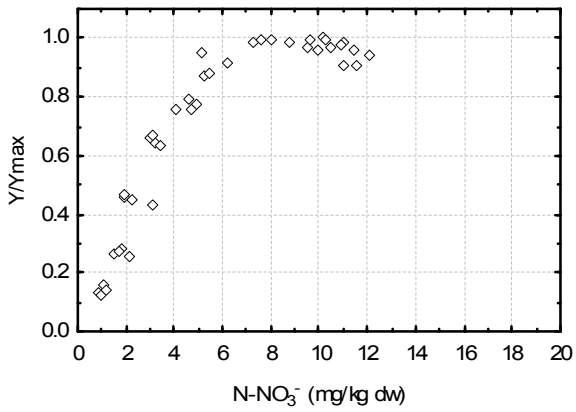
Διάγραμμα 4.1 Περιεκτικότητα σε ολικό N (% w/w) των νεαρότερων πλήρως ανεπτυγμένων φύλλων μπρόκολου σε διάφορα στάδια ανάπτυξης σε διαφορετικές ποσότητες χορηγημένου αζώτου. Οι διακυμάνσεις στα ιστογράμματα αφορούν το τυπικό σφάλμα του μέσου όρου ($n=4$)



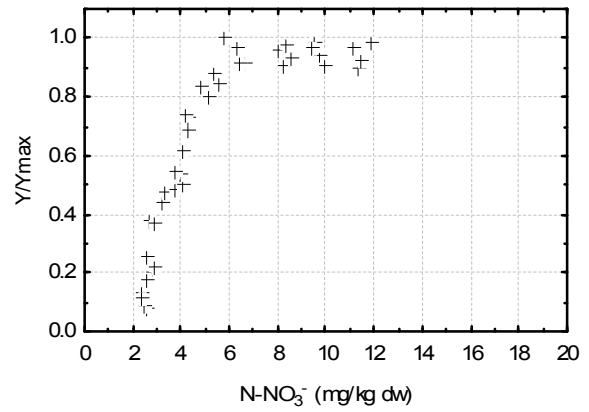
Διάγραμμα 4.2 Περιεκτικότητα σε ολικό N (% w/w) των νεαρότερων πλήρως ανεπτυγμένων φύλλων ρόκας σε διάφορα στάδια ανάπτυξης σε διαφορετικές ποσότητες χορηγημένου αζώτου. Οι διακυμάνσεις στα ιστογράμματα αφορούν το τυπικό σφάλμα του μέσου όρου (n=4)

Ρόκα**Μπρόκολο**

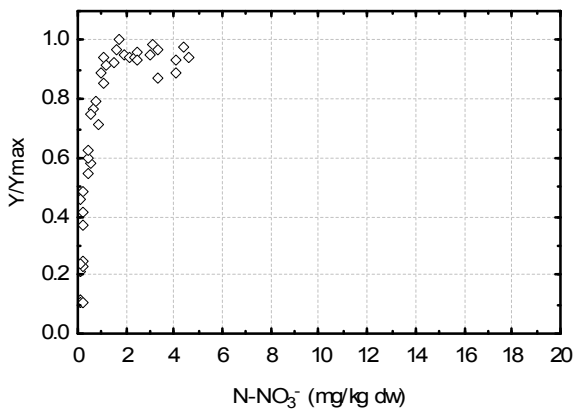
15HMΦ



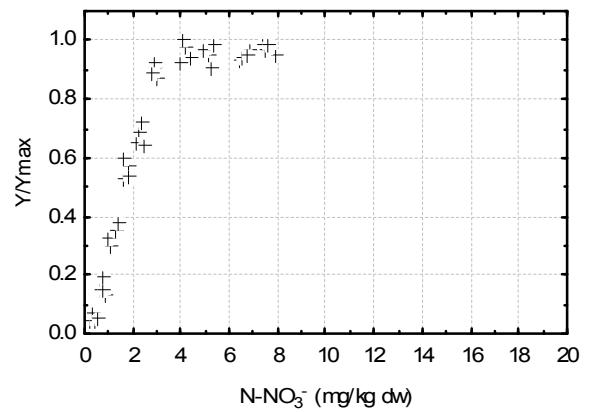
30 HMΦ



30 HMΦ



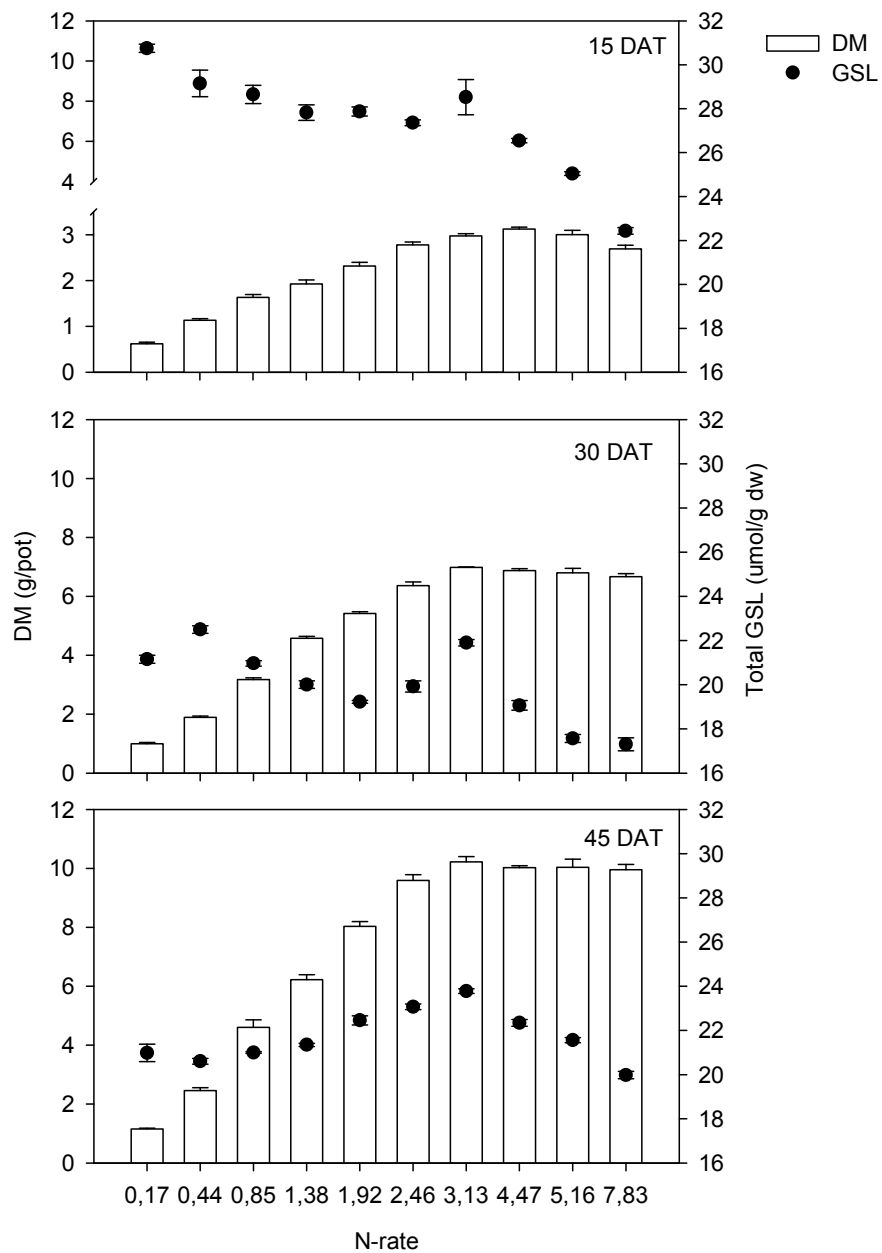
50 HMΦ



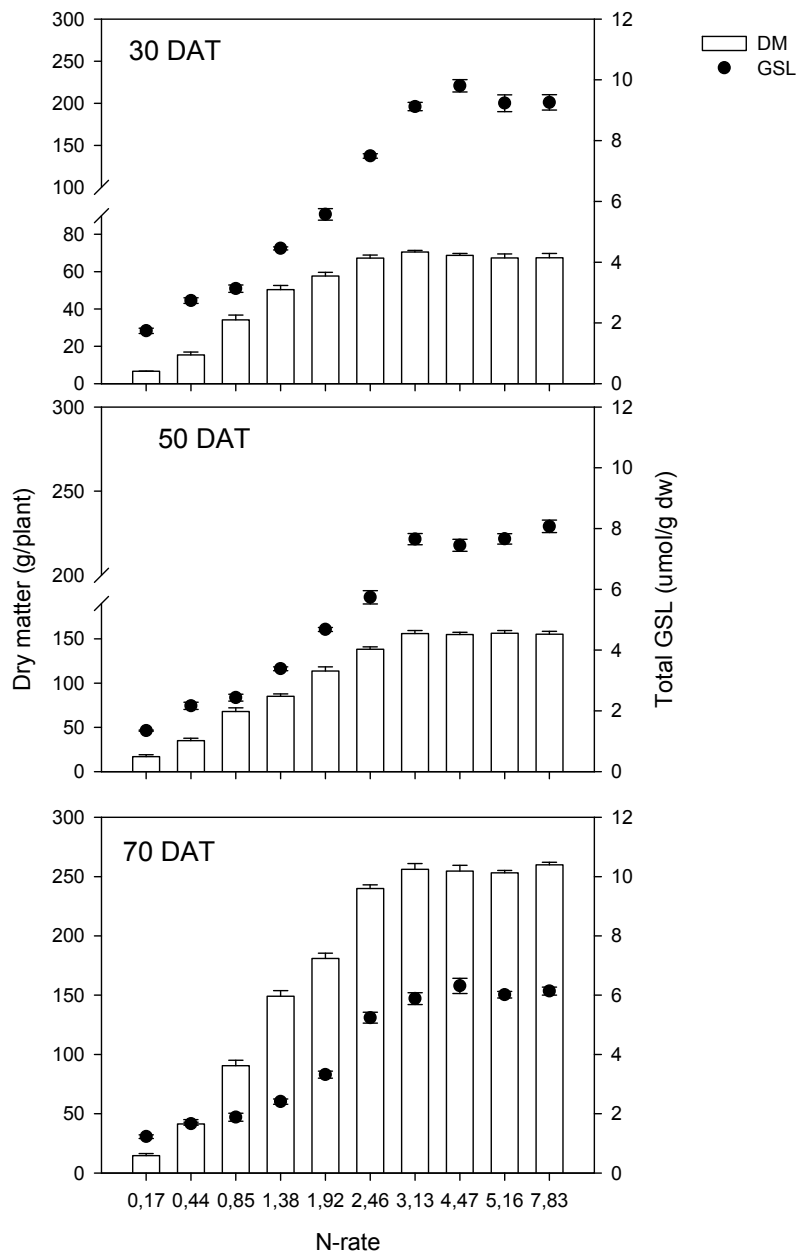
45 HMΦ

70 HMΦ

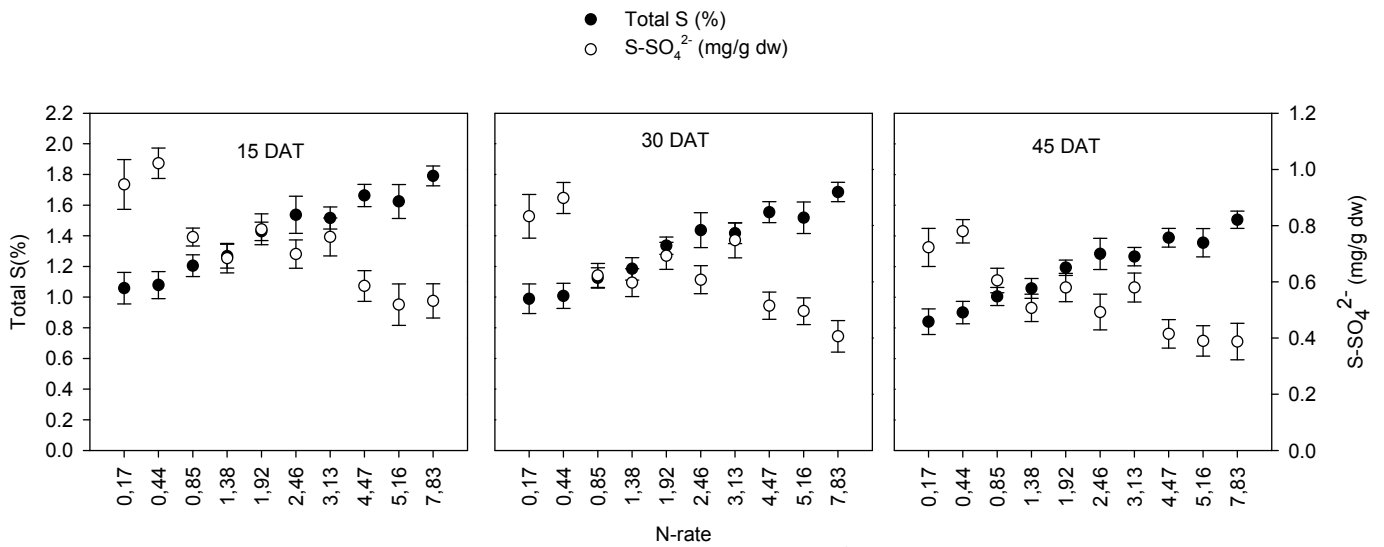
Διάγραμμα 4.3 Σχέση μεταξύ συγκέντρωσης των $N-NO_3^-$ και σχετικής παραγωγής ξηρού βάρους (Y/Y_{max}) στη ρόκα και το μπρόκολο.



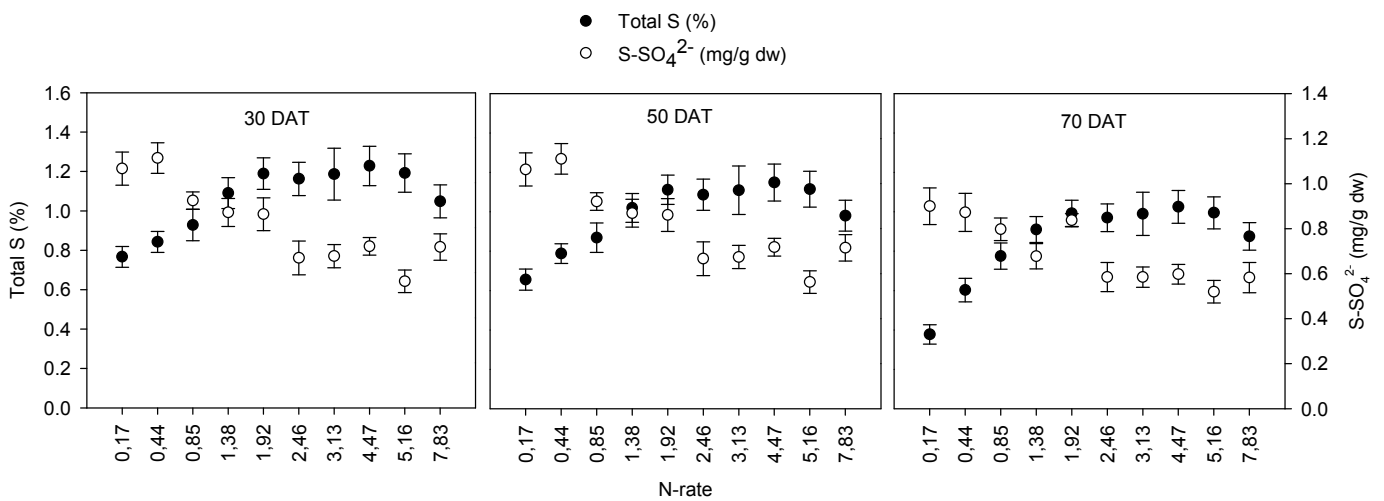
Διάγραμμα 4.4 Μεταβολή της συγκέντρωσης των ολικών ΓΚΣ σε σχέση με τη παραγόμενη βιομάζα σε φυτά ρόκας στα διάφορα στάδια . Οι διακυμάνσεις αφορούν το τυπικό σφάλμα του μέσου όρου (n=4)



Διάγραμμα 4.5 Μεταβολή της συγκέντρωσης των ολικών ΓΚΣ σε σχέση με τη παραγόμενη βιομάζα σε φυτά μπρόκολου στα διάφορα στάδια . Οι διακυμάνσεις αφορούν το τυπικό σφάλμα του μέσου όρου (n=4)



Διάγραμμα 4.6 Μεταβολή της περιεκτικότητας σε S(% w/w) και σε S-SO₄²⁻ (mg / g dw) στο έλασμα και στους μίσχους των νεαρότερων πλήρως ανεπτυγμένων φύλλων ρόκας αντίστοιχα σε διαφορετικά επίπεδα χορηγημένου αζώτου σε τρία διαφορετικά στάδια ανάπτυξης.



Διάγραμμα 4.7 Μεταβολή της περιεκτικότητας σε S(% w/w) και σε S-SO₄²⁻ (mg / g dw) στο έλασμα και στους μίσχους των νεαρότερων πλήρως ανεπτυγμένων φύλλων μπρόκολου αντίστοιχα σε διαφορετικά επίπεδα χορηγημένου αζώτου σε τρία διαφορετικά στάδια ανάπτυξης

Πίνακας 4.4 Συγκέντρωση μεμονωμένων ΓΚΣ (μmol/g ξ.β) σε φύλλα ρόκας, αναπτυσσόμενης σε διαφορετικές δόσεις αζωτούχου λίπανσης που λήφθηκαν σε διαφορετικό στάδιο ανάπτυξης.

| Δόση N (g/pot) | GRA | GNA | GSV | GER | GBS | 4-MeO GBS | Total Aliph | Total Indolyl | Total GSL |
|----------------|--|---------------|----------------|----------------|---------------|-----------------|----------------|----------------|----------------|
| 15DAT | | | | | | | | | |
| 0.17 | 18.59 ¹ e ² ±0.30 ³ | 2.00 a ±0.10 | 6.56 f ±0.18 | 2.29 e ±0.13 | 0.79 a ±0.16 | 0.51a ±0.08 | 29.44 f ±0.37 | 1.31 a ±0.17 | 30.75 e ±0.37 |
| 0.44 | 17.64 de ±0.77 | 2.26 b ±0.11 | 5.42 e ±0.19 | 2.29 e ±0.14 | 0.93 ab ±0.09 | 0.61ab ±0.09 | 27.61e ±1.13 | 1.54 a ±0.11 | 29.15 de ±1.21 |
| 0.85 | 17.13 cde ±0.75 | 2.38 b ±0.11 | 5.30 e ±0.10 | 1.97 d ±0.14 | 1.17 bc ±0.14 | 0.70 ab ±0.11 | 26.78 de ±0.87 | 1.87 b ±0.05 | 28.65 d ±0.84 |
| 1.38 | 16.38 bcd ±0.62 | 2.51 cd ±0.10 | 5.14 de ±0.15 | 1.81 d ±0.11 | 1.28 bc ±0.13 | 0.71 ab ±0.10 | 25.84 de ±0.68 | 1.99 b ±0.22 | 27.83 cd ±0.71 |
| 1.92 | 16.69 cd ±0.33 | 2.32 bc ±0.04 | 5.02 de ±0.16 | 1.80 d ±0.13 | 1.24 bc ±0.18 | 0.80 bc ±0.11 | 25.84 de ±0.52 | 2.04 b ±0.15 | 27.87 cd ±0.41 |
| 2.46 | 15.93 bc ±0.27 | 2.61 d ±0.07 | 4.80 d ±0.11 | 1.67 cd ±0.21 | 1.35 c ±0.11 | 1.00 cd ±0.09 | 25.00 cd ±0.29 | 2.36 c ±0.04 | 27.36 cd ±0.26 |
| 3.13 | 17.24 cde ±1.62 | 2.82 e ±0.06 | 4.35 c ±0.21 | 1.42 bc ±0.11 | 1.48 c ±0.12 | 1.21 de ±0.17 | 25.83 d ±1.54 | 2.70 d ±0.07 | 28.52 d ±1.61 |
| 4.47 | 16.04 bcd ±0.31 | 2.58 d ±0.08 | 3.91 b ±0.18 | 1.28 ab ±0.09 | 1.42 c ±0.12 | 1.24 de ±0.05 | 23.81 bc ±0.19 | 2.66 cd ±0.11 | 26.55 bc ±0.20 |
| 5.16 | 14.99 b ±0.14 | 2.53 cd ±0.08 | 3.77 b ±0.25 | 1.20 ab ±0.10 | 1.40 c ±0.15 | 1.16 de ±0.14 | 22.48 b ±0.18 | 2.56 cd ±0.12 | 25.04 b ±0.16 |
| 7.83 | 13.29 a ±0.44 | 2.25 a ±0.05 | 3.21a ±0.18 | 1.08 a ±0.11 | 1.31 c ±0.10 | 1.29 e ±0.10 | 19.83 a ±0.26 | 2.60 cd ±0.16 | 22.43 a ±0.30 |
| 30DAT | | | | | | | | | |
| 0.17 | 9.76 e ±0.22 | 1.79 ab ±0.11 | 5.19 b ±0.24 | 3.39 e ±0.12 | 0.59 a ±0.10 | 0.43a ±0.09 | 20.13e ±0.35 | 1.02a ±0.10 | 21.15de ±0.36 |
| 0.44 | 10.06 e ±0.19 | 1.70 a ±0.13 | 6.27 f ±0.13 | 3.29 e ±0.14 | 0.61a ±0.13 | 0.57ab ±0.09 | 21.32f ±0.29 | 1.18ab ±0.16 | 22.50f ±0.34 |
| 0.85 | 8.58 d ±0.13 | 2.06 bc ±0.12 | 5.93 ef ±0.16 | 3.09 ed ±0.12 | 0.69a ±0.12 | 0.63ab ±0.07 | 19.65e ±0.22 | 1.32abc ±0.17 | 20.97d ±0.24 |
| 1.38 | 7.76 c ±0.16 | 2.31cd ±0.13 | 5.64 de ±0.11 | 2.78 bcd ±0.13 | 0.69a ±0.10 | 0.81bc ±0.09 | 18.50d ±0.34 | 1.51bc ±0.18 | 20.00c ±0.34 |
| 1.92 | 7.23 b ±0.32 | 2.41d ±0.10 | 5.60 cde ±0.10 | 2.62 abc ±0.10 | 0.79a ±0.11 | 0.73bc ±0.09 | 17.71bc ±0.10 | 1.51bc ±0.16 | 19.23bc ±0.12 |
| 2.46 | 7.69 c ±0.28 | 2.79 ef ±0.12 | 5.41 bcd ±0.13 | 2.39 a ±0.14 | 0.88ab ±0.13 | 0.76bc ±0.17 | 18.29cd ±0.45 | 1.63cd ±0.10 | 19.92bc ±0.51 |
| 3.13 | 7.52 c ±0.39 | 3.05 f ±0.19 | 5.28 bc ±0.15 | 2.48 ab ±0.16 | 1.09b ±0.10 | 0.89c ±0.11 | 19.92e ±0.27 | 1.97d ±0.16 | 21.90ef ±0.29 |
| 4.47 | 7.04 b ±0.20 | 2.90 ef ±0.09 | 5.08 b ±0.12 | 2.50 abc ±0.12 | 0.83ab ±0.16 | 0.71bc ±0.08 | 17.53b ±0.21 | 1.54bc ±0.23 | 19.06b ±0.44 |
| 5.16 | 6.38 a ±0.14 | 2.62 de ±0.14 | 4.50a ±0.16 | 2.59 cd ±0.22 | 0.69a ±0.11 | 0.56ab ±0.13 | 16.31a ±0.27 | 1.26abc ±0.12 | 17.57a ±0.36 |
| 7.83 | 5.92 a ±0.18 | 2.44 d ±0.17 | 4.31a ±0.14 | 2.34 e ±0.21 | 0.71a ±0.10 | 0.60ab ±0.12 | 15.99a ±0.39 | 1.31abc ±0.22 | 17.30a ±0.59 |
| 45DAT | | | | | | | | | |
| 0.17 | 8.03e ±0.16 | 1.71ab ±0.12 | 6.64 ab ±0.62 | 3.99 bc ±0.19 | 0.40 a ±0.09 | 0.22 a ±0.11 | 20.37 b ±0.76 | 0.62 a ±0.16 | 20.98 bc ±0.79 |
| 0.44 | 7.48d ±0.16 | 1.64a ±0.08 | 7.03 bc ±0.18 | 3.88 bc ±0.21 | 0.31 a ±0.08 | 0.27 ab ±0.09 | 20.02 b ±0.27 | 0.58 a ±0.04 | 20.60 ab ±0.26 |
| 0.85 | 7.52d ±0.07 | 1.98bc ±0.12 | 7.17 bcd ±0.13 | 3.69 ab ±0.15 | 0.40 a ±0.09 | 0.24 a ±0.06 | 20.36 b ±0.10 | 0.64 a ±0.12 | 21.00 bc ±0.08 |
| 1.38 | 7.52d ±0.13 | 2.27cd ±0.15 | 7.40 cd ±0.10 | 3.43 a ±0.13 | 0.42 a ±0.07 | 0.32 ab ±0.08 | 20.61bc ±0.10 | 0.74 ab ±0.11 | 21.34 bc ±0.15 |
| 1.92 | 7.71de ±0.23 | 2.81fg ±0.14 | 7.30 cd ±0.12 | 3.84 bc ±0.16 | 0.46 a ±0.14 | 0.34 abc ±0.13 | 21.66 de ±0.39 | 0.80 abc ±0.05 | 22.45 e ±0.41 |
| 2.46 | 7.65d ±0.12 | 2.93g ±0.14 | 7.45 cd ±0.17 | 3.71 ab ±0.11 | 0.74 b ±0.06 | 0.59 d ±0.10 | 21.74 de ±0.23 | 1.33 d ±0.08 | 23.07 ef ±0.25 |
| 3.13 | 7.69de ±0.12 | 3.28h ±0.14 | 7.70 d ±0.12 | 3.80 abc ±0.25 | 0.76 b ±0.07 | 0.55 cd ±0.11 | 22.47 e ±0.29 | 1.31 d ±0.09 | 23.78 f ±0.21 |
| 4.47 | 7.02c ±0.19 | 2.80fg ±0.14 | 7.34 cd ±0.16 | 4.18 c ±0.15 | 0.53 a ±0.10 | 0.47 bcd ±0.10 | 21.34 cd ±0.22 | 1.00 c ±0.10 | 22.34 de ±0.30 |
| 5.16 | 6.46b ±0.08 | 2.60fe ±0.17 | 7.00 bc ±0.18 | 4.59 d ±0.13 | 0.50 a ±0.09 | 0.41 abcd ±0.08 | 20.65 bc ±0.24 | 0.92 bc ±0.11 | 21.56 cd ±0.24 |
| 7.83 | 5.80a ±0.15 | 2.34de ±0.11 | 6.26 a ±0.12 | 4.79 d ±0.12 | 0.44 a ±0.07 | 0.35 abc ±0.05 | 19.19 a ±0.26 | 0.79 abc ±0.07 | 19.98 a ±0.33 |

¹Μέση συγκέντρωση ΓΚΣ ²Διαφορετικά γράμματα υποδηλώνουν στατιστικά σημαντικές διαφορές σε επίπεδο σημαντικότητας α=0.05 για τις μέσες τιμές σε κάθε στάδιο ανάπτυξης σύμφωνα με το κριτήριο Tukey(HSD). ³Τυπικό σφάλμα της μέσης συγκέντρωσης (n=4)

Πίνακας 4.5 Συγκέντρωση μεμονωμένων ΓΚΣ (μολ/g ξ.β) σε φύλλα μπρόκολου, αναπτυσσόμενου σε διαφορετικές δόσεις αζωτούχου λίπανσης που λήφθηκαν σε διαφορετικό στάδιο ανάπτυξης.

| Δόση N (g/pot) | GIB | GRA | GBS | neo-GBS | Total Aliphatic | Total Indolyl | Total GSL |
|----------------|----------------|---------------|---------------|----------------|-----------------|---------------|---------------|
| 30DAT | | | | | | | |
| 0.17 | 0.23 a ±0.04 | 1.00 a±0.09 | 0.26 a ±0.07 | 0.25 a ±0.04 | 1.23 a ±0.11 | 0.51 a ±0.07 | 1.74 a ±0.18 |
| 0.44 | 0.38 ab ±0.09 | 1.43 a ±0.13 | 0.41 ab ±0.11 | 0.52 b ±0.09 | 1.81 a ±0.18 | 0.93 b ±0.07 | 2.73 b ±0.18 |
| 0.85 | 0.37 ab ±0.09 | 1.42 a ±0.15 | 0.57 bc ±0.06 | 0.77 c ±0.07 | 1.79 a ±0.20 | 1.34 c ±0.12 | 3.13 b ±0.24 |
| 1.38 | 0.46 bc ±0.08 | 2.55 b ±0.25 | 0.68 cd ±0.08 | 0.77 c ±0.10 | 3.01 b ±0.22 | 1.44 c ±0.18 | 4.45 c ±0.10 |
| 1.92 | 0.53 bc ±0.07 | 3.26 c ±0.19 | 0.81 de ±0.07 | 0.97 d ±0.08 | 3.79 c ±0.25 | 1.78 d ±0.15 | 5.57 d ±0.38 |
| 2.46 | 0.57 bc ±0.11 | 4.94 d ±0.25 | 0.94 e ±0.05 | 1.05 de ±0.05 | 5.51 d ±0.15 | 1.99 d ±0.06 | 7.49 e ±0.14 |
| 3.13 | 0.62 cd ±0.11 | 6.05 ef ±0.21 | 1.24 f ±0.05 | 1.22 ef ±0.05 | 6.66 ef ±0.28 | 2.46 e ±0.01 | 9.12 f ±0.28 |
| 4.47 | 0.65 cde ±0.11 | 6.53 f ±0.19 | 1.36 f ±0.08 | 1.26 f ±0.10 | 7.18 f ±0.25 | 2.62 ef ±0.18 | 9.80 f ±0.40 |
| 5.16 | 0.80 de ±0.09 | 5.50 de ±0.31 | 1.69 g ±0.16 | 1.24 f ±0.08 | 6.30 e ±0.39 | 2.93 f ±0.23 | 9.23 f ±0.55 |
| 7.83 | 0.86 e ±0.10 | 5.51 de ±0.47 | 1.80 g ±0.15 | 1.08 def ±0.09 | 6.37 e ±0.50 | 2.88 f ±0.09 | 9.26 f ±0.50 |
| 50DAT | | | | | | | |
| 0.17 | 0.16 a ±0.03 | 0.70 a ±0.11 | 0.23 a ±0.04 | 0.25 a ±0.07 | 0.87 a ±0.10 | 0.48 a ±0.09 | 1.35 a ±0.04 |
| 0.44 | 0.23 ab ±0.06 | 1.20 b ±0.15 | 0.33 ab ±0.06 | 0.41 b ±0.07 | 1.43 b ±0.17 | 0.74 b ±0.08 | 2.17 b ±0.23 |
| 0.85 | 0.28 ab ±0.04 | 1.16 ab ±0.11 | 0.47 bc ±0.08 | 0.53 c ±0.07 | 1.43 b ±0.14 | 1.00 c ±0.13 | 2.43 b ±0.22 |
| 1.38 | 0.20 ab ±0.04 | 2.06 c ±0.27 | 0.59 cd ±0.09 | 0.54 c ±0.13 | 2.26 c ±0.27 | 1.13 cd ±0.15 | 3.39 c ±0.13 |
| 1.92 | 0.27 ab ±0.04 | 2.96 d ±0.27 | 0.80 de ±0.11 | 0.64 bc ±0.07 | 3.24 c ±0.22 | 1.44 cd ±0.13 | 4.68 c ±0.13 |
| 2.46 | 0.31 ab ±0.05 | 3.89 e ±0.37 | 0.85 ef ±0.11 | 0.70 cd ±0.06 | 4.20 d ±0.40 | 1.54 de ±0.09 | 5.74 d ±0.43 |
| 3.13 | 0.40 bc ±0.10 | 5.28 f ±0.28 | 1.08 fg ±0.12 | 0.89 d ±0.07 | 5.68 e ±0.27 | 1.97 f ±0.15 | 7.65 e ±0.37 |
| 4.47 | 0.56 cd ±0.09 | 4.96 f ±0.31 | 1.19 g ±0.13 | 0.73 cd ±0.06 | 5.53 e ±0.38 | 1.92 ef ±0.15 | 7.45 e ±0.40 |
| 5.16 | 0.67 d ±0.10 | 4.73 f ±0.31 | 1.68 h ±0.11 | 0.59 bc ±0.10 | 5.40 e ±0.25 | 2.26 fg ±0.20 | 7.66 e ±0.34 |
| 7.83 | 0.71 d ±0.13 | 4.89 f ±0.23 | 1.90 h ±0.16 | 0.57 bc ±0.05 | 5.60 e ±0.36 | 2.47 g ±0.21 | 8.07 e ±0.41 |
| 70DAT | | | | | | | |
| 0.17 | 0.09 a ±0.03 | 0.66 a ±0.11 | 0.27 a ±0.06 | 0.21 a ±0.05 | 0.75 a ±0.12 | 0.48 a ±0.07 | 1.23 a ±0.12 |
| 0.44 | 0.11 a ±0.03 | 0.92 ab ±0.11 | 0.26 a ±0.06 | 0.38 abc ±0.07 | 1.03 ab ±0.11 | 0.63 ab ±0.10 | 1.66 a ±0.10 |
| 0.85 | 0.14 abc ±0.03 | 0.87 ab ±0.13 | 0.47 ab ±0.07 | 0.40 abc ±0.07 | 1.01 ab ±0.16 | 0.88 bc ±0.12 | 1.88 ab ±0.27 |
| 1.38 | 0.12 ab ±0.02 | 1.45 b ±0.15 | 0.48 ab ±0.10 | 0.36 abc ±0.08 | 1.57 b ±0.16 | 0.84 bc ±0.03 | 2.41 b ±0.18 |
| 1.92 | 0.14 abc ±0.02 | 2.26 c ±0.26 | 0.60 bc ±0.07 | 0.32 ab ±0.07 | 2.40 c ±0.27 | 0.92 bc ±0.09 | 3.32 c ±0.24 |
| 2.46 | 0.19 cd ±0.03 | 3.90 de ±0.32 | 0.78 cd ±0.04 | 0.38 abc ±0.12 | 4.08 de ±0.30 | 1.16 cd ±0.16 | 5.24 d ±0.37 |
| 3.13 | 0.18 bcd ±0.03 | 4.33 de ±0.27 | 0.97 de ±0.11 | 0.41 abc ±0.07 | 4.51 de ±0.28 | 1.38 de ±0.12 | 5.89 de ±0.40 |
| 4.47 | 0.21 d ±0.04 | 4.48 e ±0.36 | 1.16 e ±0.11 | 0.47 bc ±0.13 | 4.69 e ±0.38 | 1.63 ef ±0.21 | 6.31 e ±0.51 |
| 5.16 | 0.17 bcd ±0.02 | 3.97 de ±0.22 | 1.44 f ±0.08 | 0.43 bc ±0.11 | 4.15 de ±0.24 | 1.87 fg ±0.13 | 6.02 e ±0.22 |
| 7.83 | 0.12 ab ±0.02 | 3.86 d ±0.34 | 1.61 f ±0.19 | 0.54 c ±0.06 | 3.98 d ±0.32 | 2.15 g ±0.23 | 6.14 e ±0.27 |

¹Μέση συγκέντρωση ΓΚΣ ²Διαφορετικά γράμματα υποδηλώνουν στατιστικά σημαντικές διαφορές σε επίπεδο σημαντικότητας α=0.05 για τις μέσες τιμές σε κάθε στάδιο ανάπτυξης σύμφωνα με το κριτήριο Tukey(HSD). ³Τυπικό σφάλμα της μέσης συγκέντρωσης (n=4)

Κεφάλαιο 5^ο

Επίδραση της συνδυασμένης λίπανσης αζώτου και θείου στην παραγωγή και την σύσταση ΓΚΣ σε βρώσιμα και μη βρώσιμα μέρη μπρόκολου και ρόκας

Περίληψη

Το άζωτο και το θείο αποτελούν σημαντικά στοιχεία στο μόριο όλων των ΓΚΣ. Μεταβολή της διαθεσιμότητας των θρεπτικών αυτών στοιχείων στα φυτά επηρεάζει σημαντικά τη βιοσύνθεση των ΓΚΣ στα φυτά. Στόχος αυτού του Κεφαλαίου, ήταν η συγκριτική διερεύνηση της επίδρασης της αζωτούχου και θειούχου λίπανσης στη συγκέντρωση ΓΚΣ σε διάφορα φυτικά όργανα της ρόκας και του μπρόκολου. Η συγκέντρωση των ΓΚΣ αυξήθηκε σημαντικά και στα δύο είδη, και ανεξαρτήτως φυτικού οργάνου, με την αύξηση της δόσης της θειούχου λίπανσης (αντιστοιχούσαν σε ποσότητες από 10 μέχρι και 150kg S / ha) και αυτή η αντίδραση συσχετίστηκε σημαντικά με την ανάπτυξη των φυτών και την αζωτούχο λίπανση. Αζωτούχος λίπανση σε δόσεις μεγαλύτερες των 250 kg/ha δεν είχε σημαντική επίδραση ούτε στη συγκέντρωση των ΓΚΣ αλλά ούτε και στην παραγωγή ξηρής ουσίας. Η σύσταση των ΓΚΣ (τύπος) διέφερε ανάλογα με το φυτικό όργανο το οποίο εξετάστηκε, και τα αλειφατικά ΓΚΣ ήταν η κυρίαρχη μορφή στις ανθοκεφαλές και στα φύλλα του μπρόκολου, ενώ στις ρίζες αυτού του είδους, τα ινδολικά ΓΚΣ ήταν ο κυρίαρχος τύπος. Από την άλλη πλευρά στη ρόκα, ο κυρίαρχος τύπος ΓΚΣ που βρέθηκε τόσο στα φύλλα όσο και στις ρίζες ήταν τα αλειφατικά ΓΚΣ. Η συγκέντρωση των ινδολικών ΓΚΣ αυξήθηκε δραματικά και στα δύο είδη στις περιπτώσεις εκείνες όπου το άζωτο δεν ήταν περιοριστικός παράγοντας. Επιπλέον, όταν το θείο δεν ήταν διαθέσιμο στα φυτά, αύξηση της αζωτούχου λίπανσης είχε ως αποτέλεσμα την μείωση της συγκέντρωσης των αλειφατικών ΓΚΣ στα φυτικά μέρη και των δυο ειδών που εξετάστηκαν. Σε συνθήκες επάρκειας θείου όμως, αύξηση της δόσης της αζωτούχου λίπανσης είχε ως αποτέλεσμα τη δραματική αύξηση της συγκέντρωσης των αλειφατικών ΓΚΣ στο μπρόκολο ενώ, στη ρόκα παρατηρήθηκε ακριβώς το αντίθετο, γεγονός που ενισχύει την υπόθεση της εξειδικευμένης κατά είδος αντίδρασης των φυτών στη βιοσύνθεση και κατ' επέκταση της συγκέντρωσης των ΓΚΣ στους φυτικούς ιστούς των φυτών. Τα φυτά μπρόκολου κατά το στάδιο της άνθισης σε περιπτώσεις έντονης έλλειψης αζώτου και θείου φαίνεται ότι προσαρμόζουν τις φυσιολογικές και μεταβολικές διεργασίες τους με τέτοιο τρόπο έτσι ώστε, σε αυτές τις συνθήκες καταπόνησης να διατηρείται μια ικανή κατ ελάχιστον συγκέντρωση (2.4μmol/g ξ.β) των αλειφατικών ΓΚΣ στις ανθοκεφαλές.

Η ενσωμάτωση του θείου σε αλειφατικά ή ινδολικά ΓΚΣ επηρεάζεται σημαντικά από τη δόση της θειούχου και αζωτούχου λίπανσης, και ο συνδυασμός υψηλών δόσεων αζωτούχου και μικρών δόσεων θειούχου λίπανσης, είχε ως αποτέλεσμα τη μείωση της ενσωμάτωσης του θείου σε ΓΚΣ. Σε αυτές τις συνθήκες, η μεγαλύτερη ποσότητα θείου ενσωματώθηκε σε ινδολικά ΓΚΣ ειδικά στα φύλλα του μπρόκολου. Επιπρόσθετα αύξηση της θειούχου λίπανσης πέραν από τα 70kg/ha είχε ως αποτέλεσμα τη συσσώρευση στους μίσχους των φύλλων θείου με τη μορφή θειικών ιόντων. Σε αυτές τις συνθήκες, η αύξηση της δόσης της αζωτούχου λίπανσης είχε ως αποτέλεσμα την σημαντική μείωση των θειικών ιόντων στους μίσχους, γεγονός που συνάδει με τα αποτελέσματα του προηγούμενου κεφαλαίου και υποδηλώνει αυξημένη αφομοίωση του θείου και στα δύο είδη.

Εισαγωγή

Τα γλυκοσινολικά οξέα (ΓΚΣ), είναι προϊόντα του δευτερογενούς μεταβολισμού των φυτών και από χημικής άποψης αποτελούνται από μια ομάδα θειογλυκοκυρανόζης, μια θειική ρίζα ενωμένη με μια κυανιούχο ομάδα (C=N) και μια πλευρική αλυσίδα. Με βάση τον τύπο της πλευρικής αλυσίδας τα διάφορα ΓΚΣ διακρίνονται μεταξύ τους σε αλειφατικά, ινδολικά και αρωματικά ενώ, μέχρι σήμερα έχουν προσδιοριστεί περισσότερα από 120 μόρια (Fahey et al., 2001). Οι καλλιεργητικές φροντίδες μπορεί να επηρεάσουν σημαντικά την περιεκτικότητα των λαχανικών σε δευτερογενείς μεταβολίτες και δη των ΓΚΣ. Προηγούμενες έρευνες έχουν δείξει ότι, η φωτοπερίοδος, η θερμοκρασία, άρδευση και η λίπανση επηρεάζουν σημαντικά την περιεκτικότητα των φυτικών ιστών σε ΓΚΣ (Engelen-Eigles et al., 2006; Kopsel et al., 2007; Li et al., 2007; Schonhof et al., 2007).

Το N είναι στοιχείο που περιέχεται στην δομή του μορίου των ΓΚΣ, και σύμφωνα με τα αποτελέσματα του 3^{ου} Κεφαλαίου, φαίνεται ότι επηρεάζει τη συγκέντρωση των ΓΚΣ στα φύλλα. Προηγούμενες μελέτες έδειξαν ότι, αύξηση της χορηγούμενης ποσότητας αζώτου σε αρκετά φυτά, έχει ως αποτέλεσμα τη μείωση της συγκέντρωσης των ΓΚΣ (Kopsel et al., 2007; Li et al., 2007; Schonhof et al., 2007; Zhao et al., 1993). Αυτό το φαινόμενο πιθανά να οφείλεται στο φαινόμενο της βιοαραίωσης, αφού με τη χορήγηση αυξημένης ποσότητας N, παράγεται μεγαλύτερη ποσότητα βιομάζας και είναι δυνατό η παραγωγή άλλων ενώσεων να αυξάνεται σε ρυθμούς μεγαλύτερους από τους ρυθμούς παραγωγής ΓΚΣ στους ιστούς. Εν γένει η αυξημένη παροχή N στα φυτά έχει ως αποτέλεσμα την παραγωγή μεταβολιτών του κύκλου των τρικαρβοξυλικών οξέων, ενώ μειώνεται η βιοσύνθεση υδατανθράκων όπως η γλυκόζη (Josefsson, 1970). Πρόδρομες ουσίες για την βιοσύνθεση των ΓΚΣ είναι τα αμινοξέα, μεθειονίνη, τρυπτοφάνη και φαινυλαλανίνη από τα οποία προκύπτουν οι αντιστοιχες κατηγορίες των αλειφατικών, ινδολικών και αρωματικών ΓΚΣ (Falk et al., 2004; Grubb and Abel, 2006). Η αύξηση της ποσότητας αζώτου που χορηγήθηκε σε φυτά ελαιοκράμβης δεν είχε αρνητική επίδραση στη σύγκέντρωση της μεθειονίνης αφού η τελευταία παρέμεινε αμετάβλητη (Josefsson, 1970). Παρόμοια συμπεριφορά παρουσίασε και η κυστεΐνη η οποία συμμετέχει στη διαδικασία βιοσύνθεσης των ΓΚΣ (Grubb and Abel, 2006). Ως εκ τούτου η επίδραση του N στη βιοσύνθεση των ΓΚΣ φαίνεται να συνδέεται με την έκφραση των γονιδίων που ελέγχουν το βιοσυνθετικό μονοπάτι, ενώ υπάρχουν ενδείξεις ότι αλληλεπιδρά και με τη διαθεσιμότητα του θείου στα φυτά.

Το θείο είναι βασικό συστατικό στοιχείο τόσο των αμινοξέων που είναι οι πρόδρομες ουσίες των ΓΚΣ αλλά και των ίδιων των ΓΚΣ αφού κάθε μόριο ανάλογα με την πλευρική του αλυσίδα περιέχει από 2 έως 3 άτομα θείου. Επιπλέον, το θείο των φυτικών ιστών βρίσκεται ενσωματωμένο σε ΓΚΣ σε ποσοστά που μπορεί να φθάνουν και το 30% του συνολικού θείου (Falk et al., 2007). Επομένως, δεν εκπλήσσει η διαπίστωση ότι η αύξηση της χορήγησης θείου στα φυτά είχε ως αποτέλεσμα την αύξηση της περιεκτικότητας τους σε ΓΚΣ (Li et al., 2007; Rangkadilok et al., 2004; Schonhof et al., 2007). Το θείο φαίνεται ότι αλληλεπιδρά με την χορήγηση N στα φυτά και η μέγιστη περιεκτικότητα των φυτικών ιστών σε ΓΚΣ φαίνεται ότι επιτυγχάνεται όταν τα δύο αυτά στοιχεία βρίσκονται σε ισορροπία στα φυτά. Όμως οι αναφορές είναι σχετικά λίγες ιδιαίτερα όσον αφορά διαφοροποιήσεις στην σύσταση των ΓΚΣ, και η κατανόηση των μηχανισμών που καθορίζουν αυτές τις διαφοροποιήσεις είναι ελλιπής. Επιπλέον η υπάρχουσα βιβλιογραφία εστιάζει σχεδόν αποκλειστικά στα βρώσιμα μέρη των φυτών. Σε ανθοκεφαλές μπρόκολου η αύξηση του θείου είχε ως αποτέλεσμα την αύξηση της συγκέντρωσης των

αλειφατικών ΓΚΣ όταν το άζωτο ήταν σε επάρκεια, ενώ καμιά αντίδραση δεν παρατηρήθηκε όταν το άζωτο βρισκόταν σε χαμηλά επίπεδα (Schonhof et al., 2007). Οι ίδιοι ερευνητές αναφέρουν ότι τα ινδολικά ΓΚΣ παρουσίασαν μείωση στη συγκέντρωση των ΓΚΣ όταν και τα δύο στοιχεία δεν βρίσκονταν σε επάρκεια.

Στόχος του Κεφαλαίου 4 ήταν η συγκριτική μελέτη της επίδρασης του N και S στη συγκέντρωση των ΓΚΣ σε φυτικούς ιστούς ρόκας και μπρόκολου

Για την επίτευξη των στόχων του Κεφαλαίου τέθηκαν οι παρακάτω υποθέσεις:

1. Η παραγωγή βιομάζας εξαρτάται από την αζωτούχο και θειούχο λίπανση που χορηγείται στα φυτά.
2. Η αζωτούχος λίπανση πέραν από την άμεση επίδρασή της στα ΓΚΣ των φυτών, επηρεάζει την αφομοίωση και την μεταφορά του θείου όταν αυτό βρίσκεται σε έλλειψη ή επάρκεια και ως εκ τούτου επιδρά και έμμεσα στη συγκέντρωση και την σύσταση των ΓΚΣ στα φυτά των δύο ειδών.

Υλικά και Μέθοδοι

Φυτικό Υλικό-Καλλιεργητικές φροντίδες

Για την εκτέλεση των πειραμάτων, χρησιμοποιήθηκαν σπορόφυτα μπρόκολου (*Brassica oleraceae*, *Italica*, var. *Marathon*) και ρόκας (*Eruca sativa*) σε γλάστρες των 12L. Χρησιμοποιήθηκε υπόστρωμα αδρανούς άμμου (ποταμίσις) στην οποία είχε πραγματοποιηθεί χημική ανάλυση ως προς την περιεκτικότητα της σε θείο και άζωτο και η οποία κρίθηκε κατάλληλη για χρήση σε πειράματα θρέψης. Οι γλάστρες τοποθετήθηκαν σε ψυχρό θερμοκήπιο, συνολικής έκτασης 700m² στον Πειραματικό Σταθμό του Ινστιτούτου Γεωργικών Ερευνών, στο Ζύγι. Η μέση ημερήσια θερμοκρασία ήταν 23.2°C, 21.7°C και 20.4°C για τους μήνες Νοέμβριο, Δεκέμβριο και Ιανουάριο αντίστοιχα.

Πειραματικό Σχέδιο

Σε κάθε γλάστρα εφαρμόστηκαν τα ακόλουθα μακροστοιχεία: Mg(NO₃)₂ 1.27g, CaH₄(PO₄)₂ 2.88g για το μπρόκολο (Schonhof et al., 2007) και Mg(NO₃)₂ 1.08g, CaH₄(PO₄)₂ 2.45g για τη ρόκα (Santamaria et al., 2002). Τα ιχνοστοιχεία χορηγήθηκαν στα φυτά μέσω του συστήματος άρδευσης αναμιγνύοντας 100ml από το ακόλουθο θρεπτικό διάλυμα H₃BO₃ 2.86g/L, MnSO₄·H₂O 3.4g/L, CuSO₄·5H₂O 0.1g/L, ZnSO₄·5H₂O 2.2g/L and (Na)₂Mo₄O₄·2H₂O 1g/L σε 1000L νερού. Ο σίδηρος προστέθηκε ξεχωριστά, διαλύοντας 25.56g of Fe-EDDHA στην ίδια δεξαμενή του θρεπτικού διαλύματος.

Συνολικά εφαρμόστηκαν 3 διαφορετικά επίπεδα αζώτου και στα δυο είδη. Συγκεκριμένα στο μπρόκολο εφαρμόστηκαν με τη μορφή νιτρικής αμμωνίας σε δόσεις ίσες με 0.38g, 3.54g και 9.08g ανά φυτοδοχείο. Για τη ρόκα εφαρμόστηκαν στην ίδια μορφή αζωτούχου λίπανσης δόσεις ίσες με 0.32g, 3.01g και 7.71g ανά φυτοδοχείο. Οι δόσεις αυτές μαζί με την ποσότητα αζώτου που χορηγήθηκε στα φυτά με τη μορφή νιτρικού μαγνησίου, αντιστοιχούσαν σε δόσεις ίσες με 50, 250 και 600kg N ανά εκτάριο (ha). Το θείο χορηγήθηκε σε τέσσερις διαφορετικές δόσεις ίσες με 10, 30, 70 και 150kg/ha με τη μορφή θειικού καλίου και στο μπρόκολο προστέθηκαν σε κάθε φυτοδοχείο ποσότητες λιπάσματος ίσες με 0.22g, 0.81g, 1.96g and 4.92g αντίστοιχα ενώ στη ρόκα 0.19g, 0.69g, 1.70g και 4.18g ανά φυτοδοχείο. Η ποσότητα καλίου εξισορροπήθηκε σε όλες τις μεταχειρίσεις με την προσθήκη στα φυτοδοχεία αντίστοιχης ποσότητας χλωριούχου καλίου. Η κάθε γλάστρα αρδευόταν σύμφωνα με τις συνήθεις πρακτικές και το έκπλυμα επαναφερόταν στα φυτοδοχεία αφού συλλεγόταν σε πιάτο το οποίο ήταν τοποθετημένο κάτω από τα φυτοδοχεία έτσι ώστε να μην υπάρχουν απώλειες θρεπτικών στοιχείων.

Οι δύο παράγοντες (N και S) εξετάστηκαν με την εφαρμογή πλήρως τυχαιοποιημένου διπαραγοντικού σχεδίου και κάθε μεταχείριση επαναλαμβανόταν 4 φορές και στα δύο είδη. Κάθε μεταχείριση αποτελούνταν από 10 γλάστρες σε κάθε μια από την οποία υπήρχε ένα φυτό μπρόκολο και δύο φυτά ρόκας.

Δειγματοληψία – Επεξεργασία Δείγματος

Στο τέλος της καλλιεργητικής περιόδου, στην περίοδο της φυσιολογικής ωρίμανσης των βρώσιμων τμημάτων και των δυο φυτικών ειδών, πραγματοποιήθηκε η δειγματοληψία των φυτικών ιστών που εξετάστηκαν ως προς την περιεκτικότητά τους σε N, S και ΓΚΣ. Συγκεκριμένα από κάθε

μεταχείριση, συλλέγονταν ολόκληρα τα φυτά και τυχαία απομακρύνονταν 15 πλήρως ανεπτυγμένα φύλλα (ίδιου μεγέθους) και από τα δύο είδη, χωρίς προσβολές και μηχανικούς τραυματισμούς. Τα φύλλα τοποθετούνταν αμέσως σε σακουλάκια και ακολούθως σε δοχεία πολυστερίνης με ξηρό πάγο μέχρι τη μεταφορά τους στο εργαστήριο. Όσον αφορά τις ρίζες, το ριζικό σύστημα απομακρυνόταν από το υπέργειο τμήμα και υγιή τμήματα ριζικού συστήματος από όλα τα φυτά της κάθε μεταχείρισης αναμιγνύονταν σε πλαστικά σακουλάκια και τοποθετούνταν σε ξηρό πάγο μέχρι τη μεταφορά τους στο εργαστήριο. Για τα βρώσιμα τμήματα μπρόκολου, συλλέγονταν από κάθε μεταχείριση 5 ανθοκεφάλες χωρίς προσβολές, οι οποίες είχαν περίπου το ίδιο μέγεθος. Ακολούθως 50g από κάθε ανθοκεφαλή, τοποθετούνταν σε κοινό πλαστικό σακουλάκι και αμέσως σε ξηρό πάγο μέχρι τη μεταφορά τους στο εργαστήριο.

Μετά τη μεταφορά τους στο εργαστήριο όλοι οι φυτικοί ιστοί λειοτριβήθηκαν με τη χρήση υγρού αζώτου, λειοφιλοποιήθηκαν και αποθηκεύθηκαν στους -20°C μέχρι την ανάλυση τους.

Προσδιορισμός N και S και ξηρού βάρους

Ο προσδιορισμός του N και του S πραγματοποιήθηκε σε στοιχειακό αναλυτή CNS της Elementar, Germany όπως περιγράφεται αναλυτικά στο 2^ο Κεφάλαιο Γενικά Υλικά και Μέθοδοι. Για τον προσδιορισμό του ξηρού βάρους τυχαία δείγματα από κάθε μεταχείριση ($n=10$) τοποθετούνταν σε φούρνο ξήρανσης στους 105°C για 5 ώρες. Το ξηρό βάρος υπολογίστηκε αφαιρώντας το βάρος μετά την ξήρανση από αυτό πριν την ξήρανση.

Προσδιορισμός ΓΚΣ

Ο προσδιορισμός των ΓΚΣ έγινε σύμφωνα με μέθοδο κατά ISO, όπως αυτή περιγράφεται στο 2^ο Κεφάλαιο.

Στατιστική Επεξεργασία

Για την στατιστική επεξεργασία των αποτελεσμάτων, έγινε η ανάλυση διακύμανσης (ANOVA) και οι πολλαπλές συγκρίσεις των μέσων όρων έγιναν με βάση το κριτήριο Tukey-Kramer HSD (Honest Significant Difference). Για τις αναλύσεις χρησιμοποιήθηκε το στατιστικό πακέτο STATISTICA 7.

Αποτελέσματα – Συζήτηση

Ξηρό Βάρος

Η αύξηση της χορήγησης αζωτούχου λίπανσης από τα 50 στα 250kg N /ha είχε ως αποτέλεσμα την σημαντική αύξηση της ξηρής ουσίας σε όλα τα φυτικά όργανα του μπρόκολου που εξετάστηκαν. Περεταίρω αύξηση της ποσότητας της αζωτούχου λίπανσης στα 600kg N /ha δεν είχε καμιά επίδραση στην παραγωγή ξηράς ουσίας στις ανθοκεφαλές, τις ρίζες και τα φύλλα του μπρόκολου (Διάγραμμα 5.1). Παρόμοια αποτελέσματα παρατηρήθηκαν και στη ρόκα, όμως η θετική ανταπόκριση των φυτών ήταν εμφανής και στα 600kg N/ha (Διάγραμμα 5.2). Τα αποτελέσματα αυτά είναι αναμενόμενα και συνάδουν με τις βιβλιογραφικές αναφορές σχετικά με τη θετική επίδραση του αζώτου στην παραγωγή ξηρής ουσίας στα φυτά (Karitonas, 2003; Nkoa et al., 2003; Papastylianou et al., 1982; Schonhof et al., 2007; Shillito et al., 2009; Vagen et al., 2007).

Η θειούχος λίπανση από την άλλη πλευρά επηρέασε με διαφορετικό τρόπο την παραγωγή ξηρής ουσίας στα δύο είδη, γεγονός που υποδηλώνει τη σημασία του γενετικού υλικού στην αφομοίωση του θείου από τα φυτά. Συγκεκριμένα, σε όλα τα φυτικά όργανα του μπρόκολου, και ανεξάρτητα από τα επίπεδα αζώτου, αύξηση της θειούχου λίπανσης δεν επηρέασε σημαντικά την παραγωγή ξηρής ουσίας (Διάγραμμα 5.1) παρόλο που παρατηρήθηκαν συμπτώματα τροφοπενίας στα φυτά (χλωρωτικά φύλλα) τόσο στην έλλειψη αζώτου όσο και στην έλλειψη θείου. Αντίθετα, στη ρόκα αύξηση της θειούχου λίπανσης οδήγησε σε αύξηση παραγωγής ξηρής ουσίας, και η θειούχος λίπανση είχε σημαντική αλληλεπίδραση ($p=0.006$) με την αζωτούχο λίπανση σε ότι αφορά την παραγωγή ξηρής ουσίας στα φύλλα. Συγκεκριμένα η αύξηση της παραγωγής ξηρής ουσίας στα φύλλα ήταν πιο έντονη με αύξηση της θειούχου λίπανσης (70 και 150 kg/ha) και όταν η αζωτούχος λίπανση ήταν 250 και 600kg/ha (Διάγραμμα 5.2).

Τα αποτελέσματα στη διεθνή βιβλιογραφία σχετικά με την επίδραση της αζωτούχου και θειούχου λίπανσης στην παραγωγή ξηρής ουσίας είναι αντικρουόμενα. Σε ανθοκεφαλές μπρόκολου, παρατηρήθηκε μείωση του νωπού τους βάρους, σε συνθήκες έλλειψης θείου και επάρκειας αζώτου (Schonhof et al., 2007). Αντίθετα, σε τρεις ποικιλίες μπρόκολου, η αύξηση της χορηγούμενης ποσότητας θείου με την εφαρμογή γύψου, σε συνθήκες επάρκειας αζώτου, δεν είχε καμιά επίδραση στην παραγωγή ξηράς ουσίας σε δυο διαφορετικά στάδια ανάπτυξης του φυτού (Rangkadilok et al., 2004). Επιπρόσθετα το ξηρό βάρος 7 φυτικών ειδών παρέμεινε σταθερό όταν η έλλειψη θείου δεν ήταν έντονη (Hitsuda et al., 2005).

Η διαφορά μεταξύ των ειδών που μελετήθηκαν στην παρούσα εργασία πιθανότατα να οφείλεται στους διαφορετικούς τρόπους που διαχειρίζονται τα φυτά την έλλειψη θείου, αφού όταν το άζωτο βρισκόταν σε επάρκεια τα δύο είδη δεν συμπεριφέρθηκαν με διαφορετικό τρόπο. Συγκεκριμένα φαίνεται ότι, το μπρόκολο διαχειρίζεται καλύτερα την έλλειψη θείου σε σύγκριση με τη ρόκα και αυτο πιθανό να συνδέεται με αναστολή της μεταφοράς και αφομοίωσης των θειικών ιόντων, επαγωγή ενζύμων που συμμετέχουν στην χρησιμοποίηση πηγών θείου από εναλλακτικές πηγές και βιοσύνθεση πρωτεϊνικών ισομορφών που περιέχουν μικρότερη αναλογία κυστεΐνης και μεθειονίνης (de Hostos et al., 1988; Kopriva and Rennenberg, 2004; Takahashi et al., 2001).

Πρόσληψη N και S

Τόσο το άζωτο όσο και το θείο επηρεάστηκαν σημαντικά από το επίπεδο της αζωτούχου και θειούχου λίπανσης που χορηγήθηκε στα φυτά και στα δύο είδη (Πίνακες 5.6 και 5.7). Στο μπρόκολο δεν παρατηρήθηκε αλληλεπίδραση μεταξύ της αζωτούχου και θειούχου λίπανσης σε ότι αφορά τη συγκέντρωση του N στα φυτικά όργανα του φυτού (ανθοκεφαλές, φύλλα και ρίζες) και η επίδραση της αζωτούχου λίπανσης ήταν ανεξάρτητη από τη θειούχο. Η υψηλότερη συγκέντρωση αζώτου βρέθηκε στις ανθοκεφαλές, ακολούθως στα φύλλα και στις ρίζες (Πίνακες 5.1-5.3). Όταν η αζωτούχος λίπανση αυξήθηκε από τα 50 στα 250kg/ha παρατηρήθηκε σημαντική αύξηση της συγκέντρωσης αζώτου στις ανθοκεφαλές, της τάξης του 40%. Ωστόσο περαιτέρω αύξηση της αζωτούχου λίπανσης, δεν είχε σημαντική επίδραση στην συγκέντρωση του N στις ανθοκεφαλές (Πίνακας 5.1). Παρόμοια συμπεριφορά παρατηρήθηκε και στις ρίζες (με την αντίδραση των φυτών να είναι πιο έντονη με την αύξηση της αζωτούχου λίπανσης από τα 50 στα 250kg/ha) ενώ αντίθετα στα φύλλα, η συγκέντρωση του αζώτου αυξήθηκε εντυπωσιακά με την περαιτέρω αύξηση της ποσότητας της αζωτούχου λίπανσης στα 600 N kg/ha (Πίνακας 5.2 και 5.3).

Η συγκέντρωση του θείου αυξήθηκε με την αύξηση της ποσότητας της θειούχου λίπανσης σε όλα τα φυτικά όργανα του μπρόκολου και για όλο το εύρος των δόσεων θείου που εφαρμόστηκαν. Η συμπεριφορά αυτή παρατηρήθηκε σε όλα τα επίπεδα αζωτούχου λίπανσης και η πιο έντονη αντίδραση των φυτών παρατηρήθηκε, όταν η θειούχος λίπανση αυξήθηκε από τα 30 στα 70kg/ha (Πίνακες 5.1 – 5.3). Επιπλέον, η συγκέντρωση θείου στα φυτά αυξήθηκε με την αύξηση της δόσης της αζωτούχου λίπανσης από 50 σε 250 kg/ha. Επιπρόσθετα, σε ότι αφορά τη συγκέντρωση του θείου στα διάφορα φυτικά όργανα, παρατηρήθηκε σημαντική αλληλεπίδραση μεταξύ της θειούχου και αζωτούχου λίπανσης ($p < 0.001$), φαινόμενο το οποίο δεν παρατηρήθηκε στην περίπτωση της συγκέντρωσης του αζώτου στα φυτά. Συγκεκριμένα η θετική ανταπόκριση της συγκέντρωσης θείου στην αύξηση της αζωτούχου λίπανσης ήταν πιο έντονη, στα φύλλα και τις ρίζες όταν η δόση θείου ήταν μικρή (10kg/ha) ενώ στις ανθοκεφαλές το φαινόμενο αυτό παρατηρήθηκε σε όλα τις δόσεις θείου (Πίνακες 5.1-5.3).

Στη ρόκα δεν παρατηρήθηκε η ίδια συμπεριφορά με το μπρόκολο, σε ότι αφορά τη συγκέντρωση του αζώτου στα φύλλα και τις ρίζες. Στα φύλλα της ρόκας η επίδραση της αζωτούχου λίπανσης στη συγκέντρωση του αζώτου, εξαρτάται από την ποσότητα της θειούχου λίπανσης που χορηγείται στα φυτά ($p < 0.001$). Αύξηση της θειούχου λίπανσης από 30 στα 70kg/ha, όταν η αζωτούχος λίπανση ήταν 600 kg/ha είχε ως αποτέλεσμα την αύξηση της συγκέντρωσης του αζώτου στα φύλλα (Πίνακας 5.4) ενώ παρόμοια συμπεριφορά παρατηρήθηκε και στις ρίζες ειδικά όταν στην υψηλή δόση αζώτου (600kg/ha) (Πίνακας 5.5).

Η συγκέντρωση του θείου στα φύλλα της ρόκας, επηρεάζεται σημαντικά από την αζωτούχο και από την θειούχο λίπανση ($p < 0.01$) αλλά και από την αλληλεπίδραση των δυο αυτών παραγόντων ($p < 0.01$). Αύξηση της ποσότητας της θειούχου λίπανσης είχε ως αποτέλεσμα την εντυπωσιακή αύξηση της συγκέντρωσης του θείου στα φύλλα και στις ρίζες (Πίνακες 5.4 και 5.5). Αύξηση της αζωτούχου λίπανσης από τα 50 στα 250Kg/ha είχε ως αποτέλεσμα την αύξηση της συγκέντρωσης του θείου στις ρίζες μόνο όταν, η ποσότητα της θειούχου λίπανσης ήταν μεγαλύτερη από τα 30kg/ha. Αντίθετα στα φύλλα σε όλα τα επίπεδα θείου αύξηση της αζωτούχου λίπανσης από 50 σε 250 kg/ha είχε ως αποτέλεσμα την σημαντική αύξηση της συγκέντρωσης του θείου. Περαιτέρω αύξηση της

χορήγησης αζώτου (600kg/ha) δεν είχε σημαντική αύξηση στη συγκέντρωση θείου εκτός από την χαμηλή δόση θείου (10 kg/ha) όπου παρατηρήθηκε μείωση σε σχέση με τη δόση των 250 kg/ha ενώ δεν παρατηρήθηκε σημαντική διαφορά με στη χαμηλή δόση αζώτου (50kg/ha). Στις ρίζες, (Πίνακες 5.4 και 5.5).

Η αύξηση της αζωτούχου λίπανσης είχε ως αποτέλεσμα την αύξηση της περιεκτικότητας σε άζωτο τόσο της φυτομάζας όσο και των ανθοκεφάλων στην ποικιλία Marathon σε δύο διαφορετικά στάδια ανάπτυξης (Vagen et al., 2007). Οι ίδιοι ερευνητές διαπίστωσαν ότι ο συντελεστής συγκομιδής της καλλιέργειας μειώθηκε σε χαμηλά επίπεδα αζωτούχου λίπανσης ενώ, σε υψηλότερα επίπεδα αυτός ο συντελεστής αυξήθηκε όπως και η περιεκτικότητα των ιστών σε N. Φαίνεται ότι οι ανθοκεφαλές στο μπρόκολο είναι «δεξαμενές» αποθήκευσης αζώτου κατά τη διάρκεια της ανάπτυξής τους και για αυτό το λόγο τα επίπεδα του εν λόγω θρεπτικού στοιχείου που ανιχνεύονται είναι υψηλά (Everaarts and Willigen, 1999; Vagen et al., 2007). Η χαμηλότερη περιεκτικότητα σε άζωτο που βρέθηκε στα φύλλα σε σχέση με τις ανθοκεφαλές, ανεξάρτητα από τη δόση της αζωτούχου λίπανσης που χορηγήθηκε, ενισχύει αυτή την υπόθεση, της μεταφοράς δηλαδή του N από τα φύλλα σε άλλα όργανα του φυτού έτσι ώστε να προαχθεί η αύξηση, η ανάπτυξη και τελικά η αναπαραγωγή (Bowen et al., 1999). Με αυτό συνάδει και η ανταπόκριση των φύλλων του μπρόκολου μόνο, στην μεγάλη δόση αζώτου των 600 kg/ha.

Η αντίδραση των φυτών στην πρόσληψη του θείου με αύξηση του χορηγούμενου αζώτου, έχει παρατηρηθεί και στο παρελθόν. Για παράδειγμα σε φυτά ελαιοκράμβης η συγκέντρωση του θείου, αυξήθηκε σημαντικά με την αύξηση της αζωτούχου και θειούχου λίπανσης (Zhao et al., 1993). Παρόμοια αποτελέσματα παρουσιάστηκαν και σε είδη που δεν ανήκουν στα Σταυρανή όπως ο ηλίανθος όπου, σε φύλλα και βλαστούς των φυτών παρατηρήθηκε αύξηση της συγκέντρωσης του θείου με την αύξηση της χορηγούμενης ποσότητας αζώτου και θείου (Hocking et al., 1987). Διαφορετικά αποτελέσματα παρατηρήθηκαν από τους Schonhof et al., 2007 σε ανθοκεφαλές μπρόκολου, όπου σε επίπεδα βέλτιστης αζωτούχου λίπανσης, η περιεκτικότητα των ανθοκεφαλών σε θείο μειώθηκε ακόμα και στην περίπτωση που η χορηγούμενη ποσότητα θείου ήταν επαρκής. Οι ερευνητές αυτοί υποθέτουν ότι κάτω από συνθήκες επάρκειας θείου, μεταβολίτες όπως η κυστεΐνη ή φυτοορμόνες όπως οι κυτοκίνινες, επηρεάζουν αρνητικά την αφομοίωση του ανόργανου θείου σε οργανικές μορφές. Από την άλλη πλευρά όμως, και όπως υποστηρίζεται από τους Falk et al. (2007) η μείωση της συγκέντρωσης του S στις ανθοκεφαλές μπρόκολου σε συνθήκες αυξημένης αζωτούχου λίπανσης πιθανότατα να οφείλεται σε βιοραΐωση που προκύπτει από τον τριπλασιασμό της βιομάζας των ανθοκεφαλών στην παραπάνω μελέτη.

Ο μεταβολισμός του θείου, του αζώτου και του άνθρακα στα φυτά είναι διαδικασίες παράλληλες και οι μηχανισμοί που εμπλέκονται στην αλληλορύθμιση της αφομοίωσης των παραπάνω στοιχείων δεν είναι ξεκάθαροι. Από τα αποτελέσματα της παρούσας διατριβής φαίνεται όμως καθαρά ότι, η πρόσληψη θείου τόσο στη ρόκα όσο και στο μπρόκολο, ευνοείται από την αζωτούχο λίπανση και τα φυτά αντιδρούν θετικά. Στο μπρόκολο η πρόσληψη N από τα φυτά φτάνει σε μια μέγιστη τιμή, ενώ η πρόσληψη του S συνεχίζει να αυξάνει. Αυτό οδηγεί σε μικρότερο λόγο N/S σε υπερβολικές λιπάνσεις και με τα δυο στοιχεία. Από την άλλη πλευρά στη ρόκα η πρόσληψη του αζώτου συνεχίζει να αυξάνει με την αύξηση της αζωτούχου και θειούχου λίπανσης τουλάχιστον για τις δόσεις που εφαρμόστηκαν στην παρούσα διατριβή (600kg N/ha και 150 kg S/ha). (Διάγραμμα 5.3).

Τα αποτελέσματα αυτά υποστηρίζονται από άλλα αποτελέσματα της βιβλιογραφίας, σχετικά με τους μηχανισμούς που ρυθμίζουν την αφομοίωση του N και του S στα φυτά. Η *O*-ακέτυλο-σερίνη (πρόδρομο μόριο κατά το βιοσυνθετικό μονοπάτι της κυστεΐνης) προτείνεται ως το μόριο που ρυθμίζει την αφομοίωση του S στα φυτά και η συγκέντρωσή της εξαρτάται και από τη διαθεσιμότητα του αζώτου. Αξίζει να σημειωθεί επίσης ότι, η ρόκα προσλαμβάνει μεγαλύτερες ποσότητες N από το έδαφος με την μορφή των νιτρικών ιόντων (Santamaria et al., 2002) τα οποία και αποθηκεύει, στο χυμοτόπιο πιθανότατα για σκοπούς ωσμωρύθμισης των κυττάρων στα φύλλα (McIntyre, 1997) γεγονός που συνάδει με την αυξημένη και γραμμική πρόσληψη αζώτου σε υψηλές αζωτούχες λιπάνσεις. Όμως η διαφοροποίηση μεταξύ της ρόκας και του μπρόκολου σε ότι αφορά τη πρόσληψη του N σε σχέση με την αζωτούχο και θειούχο λίπανση χρήζει περαιτέρω διερεύνηση.

Το θείο στη μορφή θειϊκών ιόντων στους μίσχους των φύλλων αυξήθηκε δραματικά με αύξηση της ποσότητας του χορηγούμενου θείου αλλά, μειώθηκε όταν η αζωτούχος λίπανση αυξήθηκε ανεξάρτητα, από το επίπεδο του θείου που χορηγήθηκε στα φυτά. Η μείωση αυτή ήταν πιο έντονη στο μπρόκολο σε σύγκριση με αυτή στη ρόκα η οποία διατήρησε και μια σχετικά υψηλή συγκέντρωση θειϊκών ιόντων στους μίσχους $>7\text{mmol/Kg dw}$ ακόμα και στις μικρές δόσεις θείου (Διάγραμμα 5.4). Είναι γνωστό ότι, τα θειϊκά ιόντα μεταφέρονται στο φυτό μέσω του ρεύματος της διαπνοής και επιπρόσθετα έχει βρεθεί ότι η αφομοίωση των θειϊκών ιόντων συσχετίζεται αρνητικά με την θρέψη σε άζωτο στα φυτά (Brunold and Suter, 1984). Τα αποτελέσματα της παρούσας διατριβής, ενισχύουν την υπόθεση αυτή αφού, όταν η ποσότητα του χορηγούμενου αζώτου είναι χαμηλή τότε, αυξάνει η συγκέντρωση θείου στη μορφή των θειϊκών ιόντων στους μίσχους των φύλλων ενώ, το αντίθετο συμβαίνει όταν αυξάνει η δόση της αζωτούχου λίπανσης (Διάγραμμα 5.4). Επίσης κάτω από συνθήκες έλλειψης θείου οι διαλυτές μορφές του στοιχείου αυτού σε φυτά σόγιας μειώθηκαν όταν αυξανόταν η ποσότητα του χορηγούμενου αζώτου (Sunarpi and Anderson, 1997). Αυτά τα ευρήματα υποδηλώνουν ότι, κάτω από αυτές τις συνθήκες το θείο μεταφέρεται από πλήρως ανεπτυγμένα φύλλα (διαλυτές μορφές) σε άλλα μέρη του φυτού (αναπτυσσόμενα) έτσι ώστε να ικανοποιηθούν οι αυξημένες ανάγκες των ιστών αυτών. Αυτή η διαφορά μάλλον εξηγεί και τη διαφορά που παρατηρείται μεταξύ των δύο ειδών που εξετάστηκαν δεδομένου ότι το μπρόκολο σχηματίζει ανθοκεφαλή οπότε παρουσιάζει μεγαλύτερες ανάγκες για θείο σε αυτό το όργανο. Η μείωση των θειϊκών ιόντων όταν η ποσότητα του χορηγούμενου θείου και αζώτου ήταν υψηλή, πιθανότατα σχετίζεται με την αύξηση της αφομοίωσης του θείου σε οργανικές μορφές. Κάτω από αυτές τις συνθήκες ο ρυθμός αύξησης του φυτού είναι αυξημένος και ως εκ τούτου και η πρωτεϊνοσύνθεση με αποτέλεσμα, να απαιτείται και μεγαλύτερη ποσότητα θειϊκών ιόντων η οποία τελικά φαίνεται στη μείωση των θειϊκών ιόντων στον αγωγό ιστό. Τελευταίες μελέτες έχουν δείξει ότι, η δράση των πρωτεϊνών μεταφοράς θειϊκών ιόντων επάγεται όταν, η ποσότητα του χορηγούμενου αζώτου αυξάνει και κατ' επέκταση πιθανότατα να αυξάνει και η αφομοίωση των θειϊκών ιόντων (Wang et al., 2003).

Συγκέντρωση Γλυκοσινολικών οξέων στους ιστούς μπρόκολου και ρόκας, σε σχέση με το άζωτο και το θείο

Συνολικά ανιχνεύθηκαν 7 διαφορετικά μεμονωμένα ΓΚΣ στο μπρόκολο και στη ρόκα (Πίνακες 5.1-5.5). Στο μπρόκολο ανιχνεύθηκαν συνολικά 2 αλειφατικά ΓΚΣ η γλουκοραφανίνη (GRA) και η γλουκοιβερίνη (GIB), το αρωματικό ΓΚΣ, γλουκοναστουρτίνη (GST) και 4 ινδολικά ΓΚΣ, 4-υδρόξυ

γλουκομπρασιίνη, γλουκομπρασιίνη (4-OH-GBS), 4-μεθόξυ γλουκομπρασιίνη (4-MeO-GBS) και η νέο-γλουκομπρασιίνη (neoGBS). Ωστόσο τα διάφορα όργανα που εξετάστηκαν διέφεραν μεταξύ τους ως προς τη σύσταση τους στα διάφορα ΓΚΣ. Συγκεκριμένα στο μπρόκολο η 4-OH-GBS, ανιχνεύθηκε μόνο στις ανθοκεφαλές ενώ η GST μόνο στις ρίζες όπου δεν ανιχνεύθηκε η GIB. Η σύσταση των φύλλων και των ριζών της ρόκας διέφερε με αυτή του μπρόκολου. Στη ρόκα ανιχνεύθηκαν στα φύλλα τα αλειφατικά ΓΚΣ, GRA, γλουκοναπίνη (GNA), γλουκοσατιβίνη (GSV) και γλουκοερουσίνη (GER), καθώς επίσης και τα ινδολικά ΓΚΣ GBS και 4-MeO-GBS ενώ στις ρίζες μόνο η GRA, GER και GST (Πίνακες 5.4). Τα μεμονωμένα ΓΚΣ που ανιχνεύθηκαν στην παρούσα εργασία δεν διαφέρουν με αυτά που αναφέρονται στη βιβλιογραφία. Ωστόσο όσον αφορά το μπρόκολο, οι αναφορές για τη συγκέντρωση των ΓΚΣ, σε άλλα όργανα εκτός των ανθοκεφαλών είναι εξαιρετικά περιορισμένες (Moreno et al., 2006).

Στο μπρόκολο η υψηλότερη συγκέντρωση ολικών ΓΚΣ (άθροισμα της συγκέντρωσης μεμονωμένων ΓΚΣ) βρέθηκε στις ανθοκεφαλές σε αντίθεση με τα φύλλα και τις ρίζες όπου η συγκέντρωση ήταν μικρότερη πέραν του 50% (Πίνακας 5.1 – 5.3). Αντίθετα στη ρόκα, η υψηλότερη συγκέντρωση ολικών ΓΚΣ βρέθηκε στις ρίζες σε σύγκριση με τα φύλλα εκτός από την μεταχείριση όπου εφαρμόστηκε χαμηλή δόση αζώτου (50 kg/ha) (Πίνακας 5.4 - 5.5). Η υψηλότερη συγκέντρωση που παρατηρήθηκε στις ανθοκεφαλές του μπρόκολου, φαίνεται ότι συνδέεται με το φυσιολογικό ρόλο που διαδραματίζουν τα ΓΚΣ στην άμυνα των φυτών και δη των αναπαραγωγικών οργάνων (Morant et al., 2008). Αντίθετα, στη ρόκα φαίνεται ότι η συγκέντρωση των ΓΚΣ στις ρίζες, είναι μεγαλύτερη σε σύγκριση με τα φύλλα (εκτός από την μεταχείριση όπου εφαρμόστηκε η χαμηλή δόση αζώτου) και αυτό πιθανότατα να σχετίζεται με το στάδιο ανάπτυξης των φυτών (Fahey et al., 2001) καθώς, η συγκέντρωση των ΓΚΣ στο ριζικό σύστημα είναι υψηλότερη σε σχέση με τα φύλλα κατά το στάδιο της βλαστικής ανάπτυξης των φυτών (Bellostas et al., 2007).

Η επίδραση της αζωτούχου λίπανσης στη συγκέντρωση ΓΚΣ ήταν στατιστικά σημαντική και στα δύο είδη που εξετάστηκαν ($p < 0.001$) (Πίνακας 5.6-5.7) Στις ανθοκεφαλές, τα φύλλα και τις ρίζες του μπρόκολου, αύξηση της δόσης της αζωτούχου λίπανσης από 50 στα 250kg/ha είχε ως αποτέλεσμα τη σημαντική αύξηση της συγκέντρωσης των ολικών ΓΚΣ. Ωστόσο, περαιτέρω αύξηση της αζωτούχου λίπανσης δεν είχε στατιστικά σημαντική επίδραση στη συγκέντρωση των ολικών ΓΚΣ στα όργανα του μπρόκολου που εξετάστηκαν (Πίνακας 5.1 – 5.3). Αντίθετα στα φύλλα της ρόκας, η συγκέντρωση των ολικών ΓΚΣ μειώθηκε σημαντικά στην υψηλή δόση αζωτούχου λίπανσης (600 kg/ha) (Πίνακας 5.4).

Ανεξάρτητα από τη δόση της αζωτούχου λίπανσης, η αύξηση της ποσότητας του χορηγούμενου θείου είχε ως αποτέλεσμα την σημαντική αύξηση της συγκέντρωσης των ΓΚΣ που ανιχνεύθηκαν στα όργανα που εξετάστηκαν και στα δύο είδη (Πίνακας 5.1 - 5.5). Τα αποτελέσματα δείχνουν την μεγάλη εξάρτηση της συγκέντρωσης των ΓΚΣ από τη διαθεσιμότητα του θείου στα φυτά. Πέρα όμως από την άμεση επίδραση του θείου στη βιοσύνθεση των ΓΚΣ (Falk et al., 2007), η αποδόμησή τους από το ένζυμο μυροσινάση, σε συνθήκες έλλειψης θείου (Maruyama-Nakashita et al., 2003; Nikiforova et al., 2003; Schnug, 1993) μπορεί να αποτελεί ένα μηχανισμό που εμπλέκεται στην ρύθμιση του μεταβολισμού του θείου στα φυτά. Η αντίδραση των φυτών σε ότι αφορά τη συγκέντρωση των ΓΚΣ σε όλα τα όργανα και στα δύο είδη στη θειούχο λίπανση ήταν έντονη και γραμμική όταν το άζωτο δεν ήταν περιοριστικός παράγοντας.

Η συγκέντρωση των ΓΚΣ στις ανθοκεφαλές μπρόκολου, παρουσίασε μείωση σε συνθήκες έλλειψης αζώτου (50kg/ha) που πιθανότατα να συνδέεται με την επίδραση της αζωτούχου λίπανσης στη βιοσύνθεση τόσο των αλειφατικών όσο και των ινδολικών ΓΚΣ. Ωστόσο από τα αποτελέσματα φαίνεται ότι η επίδραση της αζωτούχου λίπανσης στη συγκέντρωση των ΓΚΣ εξαρτάται και από τη ποσότητα θείου που χορηγείται σε αυτά. Συγκεκριμένα τα αλειφατικά ΓΚΣ μειώθηκαν όταν η δόση του Ν που χορηγήθηκε ήταν 250kg/ha σε σχέση με τη δόση των 50 kg/ha όταν το θείο δεν ήταν διαθέσιμο. Αυτή η αλληλεπίδραση λοιπόν των δύο στοιχείων οδηγεί στο συμπέρασμα ότι το μονοπάτι βιοσύνθεσης των ΓΚΣ ρυθμίζεται ταυτόχρονα από την διαθεσιμότητα και των δύο στοιχείων. Επιπρόσθετα, στα φύλλα του μπρόκολου, σε συνθήκες έλλειψης αζώτου, αύξηση της θειούχου λίπανσης πέρα από τα 30kg/ha δεν είχε σημαντική επίδραση στη συγκέντρωση των ΓΚΣ γεγονός που υποδηλώνει πιθανή μεταφορά αποθηκευμένων μορφών ΓΚΣ στα αναπαραγωγικά όργανα του φυτού (Brudenell et al., 1999; Nour-Eldin and Halkier, 2009) στη ρόκα δεν παρατηρήθηκε ανάλογο φαινόμενο αφού τα φυτά συγκομίστηκαν πριν την ανθοφορία τους.

Η επίδραση της αζωτούχου και θειούχου λίπανσης στη συγκέντρωση των ΓΚΣ αλλά και στη σύστασή τους, έχει διερευνηθεί και σε άλλα είδη Σταυρανθών όπως το ρεπάνι (Kim et al., 2002; Li et al., 2007), η ελαιοκράμβη και η μουστάρδα (Fismes et al., 2000), το νεροκάρδαμο (Korsel et al., 2007), το λάχανο (Rosen et al., 2005) τα φύτρα φυτών μπρόκολου (Aires et al., 2006) καθώς επίσης και στις ανθοκεφαλές μπρόκολου (Schonhof et al., 2007). Από τις αναφορές αυτές είναι εμφανές ότι υπάρχει εξειδικευμένη ανά είδος αντίδραση στην παροχή του αζώτου και του θείου, Εξειδίκευση της αντίδρασης των φυτών παρατηρείται επίσης και σε άλλες περιβαλλοντικές παραμέτρους όπως η καλλιεργητική περίοδος (Vallejo et al., 2003) και η αντοχή των διαφόρων ειδών στα άλατα (Aires et al., 2006). Η υπόθεση της εξειδικευμένης αντίδρασης ανά είδος σε ότι αφορά τη συγκέντρωση των ΓΚΣ ενισχύεται εν μέρει από τα αποτελέσματα της παρούσας διατριβής, αφού η αντίδραση της ρόκας διέφερε από αυτή του μπρόκολου. Ωστόσο για να επιβεβαιωθεί αυτή η υπόθεση, στην περίπτωση της χορήγησης Ν και S στα φυτά θα πρέπει, να εξεταστεί η αντίδραση των φυτών της ρόκας κατά το στάδιο της άνθισης έτσι να μπορεί να γίνουν ασφαλείς συγκρίσεις. Επιπλέον παρατηρήθηκε έντονη διαφοροποίηση ανάμεσα στους φυτικούς ιστούς του ίδιου είδους, που σχετίζεται με τον φυσιολογικό ρόλο των ιστών αυτών.

Επιπρόσθετα παρατηρήθηκε ότι, όσο αυξάνει η αναλογία του αζώτου προς το θείο στους φυτικούς ιστούς, η συγκέντρωση των ΓΚΣ μειώνεται, πιθανά λόγω του μεγάλου ρυθμού αύξησης της βιομάζας των φυτών με την προσθήκη αζώτου, που υπερτερεί του ρυθμού βιοσύνθεσης των μορίων αυτών, και ειδικότερα των αλειφατικών ΓΚΣ που απαιτούν περισσότερα άτομα θείου κατά τη βιοσύνθεσή τους (Kim et al., 2002; Rosen et al., 2005; Schonhof et al., 2007). Τα αποτελέσματα της παρούσας διατριβής επιβεβαιώνουν το κανόνα αυτό μόνο στη ρόκα και ειδικότερα σε συνθήκες έλλειψης θείου (Πίνακας 5.4 - 5.5). Ως εκ τούτου, ο κανόνας αυτός δεν μπορεί να γενικευθεί σε όλα τα είδη και για όλα τα μέρη του φυτού ενώ, αφού και άλλοι παράγοντες πρέπει να λαμβάνονται υπόψη όπως π.χ. το στάδιο ανάπτυξης των φυτών. Στο μπρόκολο για παράδειγμα κατά το στάδιο της άνθισης, φαίνεται από τα αποτελέσματα ότι, τα πλήρως ανεπτυγμένα φύλλα και οι ρίζες, μπορεί να συμμετέχουν ενεργά στη μεταφορά των ΓΚΣ (Nour-Eldin and Halkier, 2009) στα αναπαραγωγικά όργανα, φαινόμενο που μπορεί να διατηρεί τη συγκέντρωσή τους στα όργανα αυτά υψηλή, ακόμα και σε συνθήκες μειωμένης βιοσύνθεσης ΓΚΣ.

Τα αλειφατικά ΓΚΣ ήταν η κυρίαρχη μορφή ΓΚΣ στις ανθοκεφαλές και στα φύλλα του μπρόκολου και αντιπροσώπευαν ποσοστό της τάξης του 55-81% και 29-80% αντίστοιχα της ολικής συγκέντρωσης των ΓΚΣ σε αυτά τα όργανα. Το κυρίαρχο μεμονωμένο ΓΚΣ που βρέθηκε στους ιστούς ήταν η GRA το προϊόν υδρόλυσης της οποίας, παρουσιάζει έντονη χημειοπροστατευτική δράση (Fahey et al., 1997; Zhang et al., 1992). Ωστόσο στις ρίζες του μπρόκολου, τα αλειφατικά ΓΚΣ αντιπροσώπευαν μόνο το 6-17% της ολικής συγκέντρωσης των ΓΚΣ που ανιχνεύθηκαν, ενώ τα ινδολικά και αρωματικά ΓΚΣ ήταν οι κυρίαρχοι τύποι ΓΚΣ που βρέθηκαν με την GST να αποτελεί το κυρίαρχο μεμονωμένο ΓΚΣ (Πίνακας 5.3). Στα φύλλα της ρόκας ο κυρίαρχος τύπος ΓΚΣ που βρέθηκε ήταν επίσης τα αλειφατικά ΓΚΣ και αντιπροσώπευαν ποσοστό μεγαλύτερο του 90% της ολικής συγκέντρωσης των ΓΚΣ και κυρίαρχα μεμονωμένα ΓΚΣ ήταν η GRA και GSV (Πίνακας 5.4). Στις ρίζες της ρόκας τα αλειφατικά ΓΚΣ κυριαρχούν επίσης σε αντίθεση με τις ρίζες του μπρόκολου, ενώ δεν ανιχνεύθηκαν ινδολικά ΓΚΣ και το κυρίαρχο μεμονωμένο ΓΚΣ ήταν η GER (Πίνακας 5.5).

Σε όλα τα φυτικά όργανα και των δύο ειδών αύξηση της συγκέντρωσης των αλειφατικών και ινδολικών ΓΚΣ παρατηρήθηκε με αύξηση της ποσότητας της θειούχου λίπανσης σε κάθε δόση αζωτούχου λίπανσης (Πίνακες 5.1-5.5). Τόσο στις ανθοκεφαλές και τα φύλλα μπρόκολου όσο και στα φύλλα ρόκας, αύξηση της αζωτούχου λίπανσης σε συνθήκες έλλειψης θείου είχε ως αποτέλεσμα τη μείωση της συγκέντρωσης των αλειφατικών ΓΚΣ, ενώ ακριβώς το αντίθετο παρατηρήθηκε όσον αφορά τη συγκέντρωση των ινδολικών ΓΚΣ όπου, παρατηρήθηκε σημαντική αύξηση της συγκέντρωσής τους (Πίνακες 5.1 – 5.5), οδηγώντας έτσι σε μείωση του λόγου των αλειφατικών προς τα ινδολικά ΓΚΣ (Διάγραμμα 5.5 και 5.6). Η αύξηση της συγκέντρωσης των ινδολικών ΓΚΣ σε συνθήκες έλλειψης θείου συνάδει με τα αποτελέσματα της μελέτης της έλλειψης θείου στο φυτό μοντέλο *Arabidopsis* που είχε ως αποτέλεσμα την αύξηση της τρυπτοφάνης, το πρόδρομο αμινοξύ των ινδολικών ΓΚΣ (Nikiforova et al., 2003). Επιπρόσθετα τα αλειφατικά ΓΚΣ απαιτούν μεγαλύτερες ποσότητες θείου κατά τη βιοσύνθεσή τους (3 άτομα θείου) σε σύγκριση με τα ινδολικά που απαιτούν λιγότερες (2 άτομα θείου). Η υπόθεση αυτή ενισχύεται από την ενσωμάτωση του θείου στα αλειφατικά σε σχέση με τα ινδολικά ΓΚΣ ως ποσοστό του συνολικού θείου (Διάγραμμα 5.7 και 4.8) και στα δύο είδη. Με τον τρόπο αυτό, τα φυτά διαχειρίζονται την έλλειψη του θείου με τον καλύτερο δυνατό τρόπο. Αυτή η υπόθεση στηρίζεται περαιτέρω, από τα αποτελέσματα της παρούσας διατριβής, αφού το ποσοστό της συνολικής ποσότητας θείου που αφομοιώθηκε με την μορφή των ινδολικών ΓΚΣ αυξήθηκε κατά 100% σε συνθήκες έλλειψης θείου και επάρκειας αζώτου, σε σύγκριση με συνθήκες έλλειψης και των δυο αυτών θρεπτικών στοιχείων όπου το ποσοστό ολικού θείου που αφομοιώθηκε στην μορφή των ινδολικών ΓΚΣ μειώθηκε (Διάγραμμα 5.7 και 4.8).

Στις ρίζες της ρόκας δεν ανιχνεύθηκαν ινδολικά ΓΚΣ αλλά μόνο αρωματικά και αλειφατικά ενώ στο μπρόκολο η συγκέντρωσή τους στους ίδιους ιστούς ήταν γενικά υψηλή (Bennett et al., 2006; Bennett et al., 2007). Τα ινδολικά ΓΚΣ και το ινδοϋλ οξικό οξύ (IAA) είναι δευτερογενείς μεταβολίτες οι οποίοι προέρχονται από την τρυπτοφάνη και το βιοσυνθετικό μονοπάτι και των δυο διέρχεται από το σχηματισμό της ινδοϋλ-3-ακετυλδοξύμης (IAOx) από την οποία βιοσυντίθενται τόσο η IAA όσο και τα ινδολικά ΓΚΣ (Celenza et al., 2004; Mikkelsen et al., 2004). Στις ρίζες των φυτών μπρόκολου, δεν παρατηρήθηκε αύξηση της συγκέντρωσης των ινδολικών ΓΚΣ έναντι των αλειφατικών ΓΚΣ, σε συνθήκες ανεπάρκειας θείου αλλά επάρκειας αζώτου (Πίνακας 5.3) και ο λόγος αλειφατικών προς ινδολικά και αρωματικά ΓΚΣ παρέμεινε σταθερός (Διάγραμμα 5.5). Ο προτεινόμενος μηχανισμός της

διάσπασης των ινδολικών ΓΚΣ στις ρίζες και ο σχηματισμός IAA έτσι ώστε να υποβοηθηθεί ή και να αυξηθεί η πρόσληψη του θείου από τα φυτά σε συνθήκες έλλειψης του θρεπτικού αυτού στοιχείου, ενισχύεται από τα αποτελέσματα της παρούσας διατριβής, ωστόσο χρειάζεται περαιτέρω έρευνα για την αποκάλυψη των περίπλοκων μεταβολικών διαδικασιών βιοσύνθεσης και διάσπασης των ινδολικών ΓΚΣ στις ρίζες. Πρόσθετη προσοχή πρέπει να δοθεί και στο ρόλο των αρωματικών ΓΚΣ των οποίων η συγκέντρωση παραμένει σχετικά σταθερή στις ρίζες κάτω από αυτές τις συνθήκες λίπανσης. Στη ρόκα δεν υπάρχουν αναφορές στη διεθνή βιβλιογραφία σχετικά με την επίδραση της θρέψης των φυτών στη συγκέντρωση των ΓΚΣ στις ρίζες.

Σε αντίθεση με τα ινδολικά ΓΚΣ, η συγκέντρωση των αλειφατικών ΓΚΣ ήταν μικρή στις ρίζες μπρόκολου και μειώθηκε ακόμη περισσότερο σε συνθήκες έλλειψης θείου με αποτέλεσμα, τη μείωση του λόγου αλειφατικών προς ινδολικών και αρωματικών ΓΚΣ στις ρίζες των φυτών (Διάγραμμα 5.5Γ). Παρόμοια στα φύλλα παρατηρήθηκε μείωση του λόγου αλειφατικών προς ινδολικών ΓΚΣ σε συνθήκες έλλειψης θείου αλλά ταυτόχρονα, σε συνθήκες έλλειψης θείου (10 kg/ha) αύξηση της αζωτούχου λίπανσης από 50 σε 250kg/ha είχε ως αποτέλεσμα τη σημαντική μείωση του λόγου αυτού (Διάγραμμα 5.5B). Ωστόσο στις ανθοκεφαλές μπρόκολου, η συγκέντρωση των αλειφατικών ΓΚΣ δεν μειώθηκε κάτω από τη συγκέντρωση των 2.4 $\mu\text{mol/g}$ ξ.β και ο λόγος των αλειφατικών προς τα ινδολικά ΓΚΣ δεν μειώθηκε κάτω από τη τιμή του 1.2 παρόλο που η μείωση του λόγου ήταν σημαντική σε συνθήκες έλλειψης θείου (10kg/ha) και με αύξηση της δόσης αζώτου από 50 σε 250kg/ha. Αυτή η συμπεριφορά υποδηλώνει ότι τα αλειφατικά ΓΚΣ μεταφέρονται από άλλα φυτικά όργανα στις ανθοκεφαλές έτσι ώστε να διατηρηθούν τα επίπεδα συγκέντρωσης των μορίων αυτών ακόμη και σε συνθήκες έλλειψης θείου. Τα ΓΚΣ και οι αποθειωμένες μορφές τους χαρακτηρίζονται από υψηλή πολικότητα και η μεταφορά τους μέσα στο φυτό έχει αποδειχθεί σε προηγούμενες μελέτες (Brudenell et al., 1999; Chen et al., 2001; Grubb and Abel, 2006; Nour-Eldin and Halkier, 2009).

Στα φύλλα της ρόκας, σε συνθήκες έλλειψης αζώτου και θείου, η συγκέντρωση των αλειφατικών ΓΚΣ δεν μειώθηκε σε σύγκριση με συνθήκες επάρκειας των δυο θρεπτικών στοιχείων (Πίνακας 5.4) οδηγώντας σε υψηλές τιμές του λόγου των αλειφατικών προς τα ινδολικά ΓΚΣ στα φύλλα του φυτού (Διάγραμμα 5.6). Αυτό μάλλον συνδέεται και με την περιορισμένη βιοαραίωση που παρατηρείται στους ιστούς, αφού ούτε τα ολικά ΓΚΣ επιρεάστηκαν σημαντικά και συνάδει και με τα αποτελέσματα του προηγούμενου. Στις ρίζες από την άλλη είναι αξιοσημείωτη η υψηλή συγκέντρωση ειδικά της GER η οποία είναι και το κυρίαρχο ΓΚΣ στους σπόρους του φυτού (Barillari et al., 2005). Πιθανό μεγάλο ποσοστό της βιοσύνθεσης της GER να πραγματοποιείται στις ρίζες των φυτών κατά το στάδιο της βλαστικής αύξησης των φυτών και να μεταφέρεται σε μεταγενέστερο στάδιο, στους σπόρους.

Η έλλειψη αζώτου είχε ως αποτέλεσμα τη μείωση της συγκέντρωσης των ινδολικών ΓΚΣ στις ανθοκεφαλές μπρόκολου και στα φύλλα της ρόκας με αποτέλεσμα την αύξηση του λόγου αλειφατικών προς ινδολικά ΓΚΣ (Διάγραμμα 5.5 και 5.6). Επιπρόσθετα κάτω από αυτές τις συνθήκες, η ποσότητα θείου που αφομοιώθηκε με την μορφή των ινδολικών ΓΚΣ ως ποσοστό επί της συνολικής συγκέντρωσης θείου στα φυτά μειώθηκε, ενώ αυξήθηκε το ποσοστό που αφομοιώθηκε με την μορφή των αλειφατικών ΓΚΣ (Διάγραμμα 5.7 και 4.8). Από τα αποτελέσματα προκύπτει το συμπέρασμα ότι το άζωτο είναι πολύ σημαντικός παράγοντας που καθορίζει τη σύσταση των ΓΚΣ στους φυτικούς ιστούς.

Η περίσσεια θείου σε συνθήκες έλλειψης αζώτου προφανώς οδήγησε σε μειωμένη αφομοίωση του θείου σε ΓΚΣ στα φύλλα του μπρόκολου και στις ρίζες ρόκας (Διάγραμμα 5.7 και 4.8). Σε συνθήκες καταπόνησης και έλλειψης θείου για μεγάλο χρονικό διάστημα όπως ήταν οι συνθήκες αυτού του πειράματος, πιθανόν να επάγεται η δραστηριότητα των πρωτεϊνών μεταφοράς θειικών ιόντων στον αγωγό ιστό των φυτών (Hesse et al., 2004). Αυτό το φαινόμενο συνδέεται με το φυσιολογικό ρόλο των ώριμων φύλλων ως δότες θρεπτικών στοιχείων σε φυτικούς ιστούς που αναπτύσσονται έτσι ώστε να ικανοποιηθούν οι αυξημένες ανάγκες τους σε θρεπτικά στοιχεία. Ωστόσο ο μηχανισμός ρύθμισης της μεταφοράς του θείου από ώριμα φύλλα ή τις ρίζες σε αναπτυσσόμενους ιστούς δεν είναι ξεκάθαρος (Blake-Kalff et al., 1998). Ενδιαφέρον παρουσιάζει ο συνδυασμός υψηλών και μικρών δόσεων αζωτούχου (600Kg/ha) και θειούχου (10kg/ha) λίπάνσης αντίστοιχα, όπου το ποσοστό αφομοίωσης του θείου σε ΓΚΣ μειώθηκε δραματικά (Διάγραμμα 5.7 και 4.8). Αυτή η συμπεριφορά σχετίζεται με την μείωση της συγκέντρωσης των αλειφατικών ΓΚΣ (Πίνακες 5.1 – 5.5) σε αυτές τις συνθήκες είτε λόγω μείωσης της βιοσύνθεσής τους είτε λόγω διάσπασής τους για την χρήση του θείου από τα φυτά για τον πρωτογενή μεταβολισμό του. Τα ΓΚΣ εκτός από το ρόλο τους στη προστασία των φυτών από μύκητες ή έντομα έχει προταθεί ότι λειτουργούν ως μόρια αποθήκευσης του θείου στα Σταυρανή (Hirai et al., 2005; Svanem et al., 1997). Την υπόθεση αυτή ενισχύουν δεδμεμένα πειραμάτων όπου, σε συνθήκες έλλειψης θείου στο φυτό μοντέλο *Arabidopsis* αυξήθηκε η παραγωγή θειογλυκοσιδάσης (Kutz et al., 2002) που δυνητικά μπορεί να συμμετέχει στη διάσπαση των ΓΚΣ μέσω ενός μηχανισμού που περιλαμβάνει επίσης τη βιοσύνθεση φυτοορμονών και πιο ειδικά της IAA (Wang et al., 2003). Στην παρούσα διατριβή, το θείο σε μορφή των θειικών συσσωρεύτηκε στους μίσχους των φύλλων όταν η θειούχος λίπανση ήταν μεγαλύτερη από 70kg/ha αλλά μειώθηκε δραματικά όταν αυτή εφαρμόστηκε σε ποσότητες μικρότερες των 30kg/ha.

Συμπεράσματα

Από τα αποτελέσματα του 5^{ου} Κεφαλαίου προκύπτουν τα παρακάτω συμπεράσματα:

1. Τόσο η ρόκα όσο και το μπρόκολο αντέδρασαν θετικά στην αύξηση της αζωτούχου λίπανσης ως προς την παραγωγή βιομάζας μέχρι και τα 250 kg/ha. Περαιτέρω αύξηση της αζωτούχου λίπανσης δεν επέφερε στατιστικά σημαντικές διαφοροποιήσεις στην παραγόμενη βιομάζα και στα δύο είδη. Επιπρόσθετα, αύξηση της θειούχου λίπανσης δεν είχε σημαντική επίδραση στην παραγόμενη βιομάζα.
2. Αύξηση της αζωτούχου λίπανσης είχε ως αποτέλεσμα την μείωση της συγκέντρωσης του θείου με τη μορφή θειικών ιόντων στους μίσχους των φύλλων τόσο της ρόκας όσο και του μπρόκολου. Επιπρόσθετα αύξηση της αζωτούχου λίπανσης είχε σημαντική θετική επίδραση στην αύξηση του θείου στις ανθοκεφαλές του μπρόκολου, στα φύλλα και τις ρίζες της ρόκας.
3. Η συγκέντρωση των ΓΚΣ στα διάφορα φυτικά όργανα τα οποία εξετάστηκαν διαφέρει ανάλογα με το είδος, ενώ η σύστασή τους σε μεμονωμένα ΓΚΣ διαφέρει ανάλογα με το είδος και το φυτικό όργανο το οποίο εξετάζεται.
4. Τα επίπεδα της αζωτούχου και θειούχου λίπανσης επηρεάζουν σημαντικά τη συγκέντρωση σε ΓΚΣ των διαφόρων φυτικών οργάνων. Επιπρόσθετα, φαίνεται ξεκάθαρη αλληλεπίδραση των παραγόντων αυτών στη συγκέντρωση των ΓΚΣ σε αυτά.
5. Τόσο στη ρόκα όσο και στο μπρόκολο, αύξηση της θειούχου λίπανσης είχε ως αποτέλεσμα την αύξηση της συγκέντρωσης των ΓΚΣ σε όλα τα φυτικά όργανα που εξετάστηκαν.
6. Στις ανθοκεφαλές μπρόκολου διατηρείται μια κατώτατη συγκέντρωση αλειφατικών ΓΚΣ (2.4μmol/g dw) σε συνθήκες έλλειψης και των δυο θρεπτικών στοιχείων. Η διατήρηση της συγκέντρωσης αυτής στις ανθοκεφαλές μπρόκολου, φαίνεται ότι συνδέεται με τον ευρύτερο ρόλο που διαδραματίζουν τα ΓΚΣ στην άμυνα του φυτού. Επίσης, φαίνεται ότι η διατήρηση της συγκέντρωσης σε αυτά τα επίπεδα πιθανότατα σχετίζεται με μεταφορά των ΓΚΣ από τα φύλλα στα αναπαραγωγικά όργανα.
7. Η έλλειψη αζώτου έχει ως αποτέλεσμα τη σημαντική μείωση της συγκέντρωσης των ινδολικών ΓΚΣ και κατ' επέκταση την αύξηση του λόγου αλειφατικών προς ινδολικά ΓΚΣ. Υπό τις ίδιες συνθήκες η ποσότητα ολικού θείου που αφομοιώνεται υπό τη μορφή αλειφατικών ΓΚΣ αυξάνει γεγονός που υποδηλώνει ότι το άζωτο διαδραματίζει πολύ σημαντικό ρόλο στη σύσταση των διαφόρων οργάνων τόσο της ρόκας όσο και του μπρόκολου σε ΓΚΣ.
8. Στα φύλλα της ρόκας αύξηση της αζωτούχου λίπανσης είχε ως αποτέλεσμα τη μείωση της συγκέντρωσης των ΓΚΣ και αυτό το φαινόμενο ήταν πιο έντονο στα φυτά που αναπτύχθηκαν σε συνθήκες έλλειψης θείου. Αντίθετα στο μπρόκολο αύξηση της αζωτούχου λίπανσης έχει ως αποτέλεσμα την αύξηση της συγκέντρωσης των ΓΚΣ. Τα αποτελέσματα αυτά συνάδουν με τα αποτελέσματα του προηγούμενου κεφαλαίου.

BIBΛΙΟΓΡΑΦΙΑ

- Aires, A., E. Rosa, and R. Carvalho. 2006. Effect of nitrogen and sulfur fertilization on glucosinolates in the leaves and roots of broccoli sprouts (*Brassica oleracea* var. *italica*). *J Sci Food Agric*. 86:1512-1516.
- Barillari, J., D. Canistro, M. Paolini, F. Ferroni, G.F. Pedulli, R. Iori, and L. Valgimigli. 2005. Direct Antioxidant Activity of Purified Glucoerucin, the Dietary Secondary Metabolite Contained in Rocket (*Eruca sativa* Mill.) Seeds and Sprouts. *J Agric Food Chem*. 53: 2475-2482.
- Bellostas, N., C.J. Sørensen, and H. Sørensen. 2007. Profiling glucosinolates in vegetative and reproductive tissues of four Brassica species of the U-triangle for their biofumigation potential. *J Sci Food Agr* 87:1586-1594.
- Bennett, R.N., E. Rosa, F.A. Mellon, and P.A. Kroon. 2006. Ontogenic Profiling of Glucosinolates, Flavonoids, and Other Secondary Metabolites in *Eruca sativa* (Salad Rocket), *Diplotaxis erucoidea* (Wall Rocket), *Diplotaxis tenuifolia* (Wild Rocket), and *Bunias orientalis* (Turkish Rocket). *J Agric Food Chem* 54:4005-4015.
- Bennett, R.N., R. Carvalho, F.A. Mellon, J. Eagles, and E.A.S. Rosa. 2007. Identification and Quantification of Glucosinolates in Sprouts Derived from Seeds of Wild *Eruca sativa* L. (Salad Rocket) and *Diplotaxis tenuifolia* L. (Wild Rocket) from Diverse Geographical Locations. *J Agr Food Chem* 55:67-74.
- Blake-Kalff, M.M.A., K.R. Harrison, M.J. Hawkesford, F.J. Zhao, and S.P. McGrath. 1998. Distribution of sulphur within oilseed rape leaves in response to sulphur deficiency during vegetative growth. *Plant Physiol*. 118:1337-1344.
- Bowen, P.A., B.J. Zebarth, and P.M.A. Toivonen. 1999. Dynamics of nitrogen and dry matter partitioning and accumulation in broccoli (*Brassica oleracea* var. *italica*) in relation to extractable soil inorganic nitrogen. *Canadian Journal of Plant Science* 79:277-286.
- Brudenell, A., H. Griffiths, J. Rossiter, and D. Baker. 1999. The phloem mobility of glucosinolates. *J Exp Bot*. 50:745-756.
- Brunold, C., and M. Suter. 1984. Regulation of sulfate assimilation by nitrogen nutrition in the duckweed *Lemna minor* L. *Plant Physiol*. 76:579-583.
- Celenza, L.J., A.J. Quiel, A.G. Smolen, H. Merrih, R.A. Silvestro, J. Normanly, and Bender J. 2004. The Arabidopsis ATR1 Myb transcription factor controls indolic glucosinolate homeostasis. *Plant Physiol*. 137:253-262.
- Chen, S., L.B. Petersen, E.C. Olsen, A. Schulz, and B.A. Halkier. 2001. Long-distance phloem transport of glucosinolates in Arabidopsis. *Plant Physiol*. 127:194-201.
- de Hostos, E.L., R.K. Togasaki, and A.R. Grossman. 1988. Purification and biosynthesis of derepressible periplasmic arylsulfatase from *Chlamydomonas reinhardtii*. *Journal Cell Biology* 106:29-37.
- Engelen-Eigles, G., G. Holden, J.D. Cohen, and G. Gardner. 2006. The Effect of Temperature, Photoperiod, and Light Quality on Gluconasturtiin Concentration in Watercress (*Nasturtium officinale* R. Br.). *J. Agric. Food Chem*. 54:328-334.

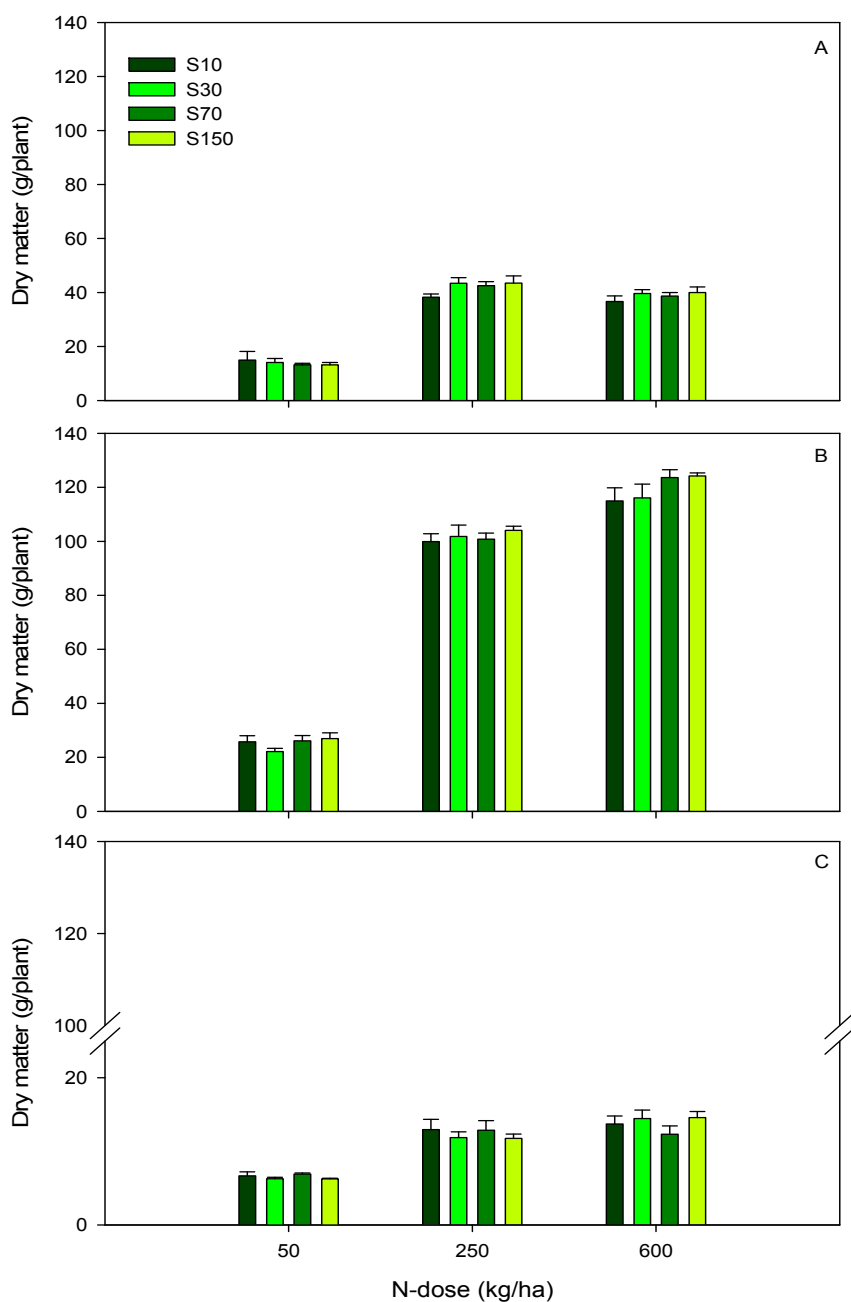
- Everaarts, A.P., and P. Willigen. 1999. The effect of the rate and method of nitrogen application on nitrogen uptake and utilization by broccoli (*Brassica oleracea var. italica*). *Netherlands Journal of Agricultural Science* 47:123-133.
- Fahey, J.W., Y.S. Zhang, and P. Talalay. 1997. Broccoli sprouts: an exceptionally rich source of inducers of enzymes that protect against chemical carcinogens. *Proc Natl Acad Sci USA* 94:10367-10372.
- Fahey, W.J., T.A. Zalcmann, and P. Talalay. 2001. The chemical diversity and distribution of glucosinolates and isothiocyanates among plants. *Phytochemistry* 56:5-51.
- Falk, K.L., J.G. Tokuhisa, and J. Gershenzon. 2007. The effect of sulfur nutrition on plant glucosinolate content: physiology and molecular mechanisms. *Plant Biology* 9:573-581.
- Falk, K.L., C. Vogel, S. Textor, S. Bartram, A. Hick, J.A. Pickett, and J. Gershenzon. 2004. Glucosinolate biosynthesis: demonstration and characterization of the condensing enzyme of the chain elongation cycle in *Eruca sativa*. *Phytochemistry* 65:1073-1084.
- Fismes, J., Vong P.C., Guckert A., and Frossard E. 2000. Influence of sulfur on apparent N-use efficiency, yield and quality of oilseed rape (*Brassica napus* L.) grown on a calcareous soil. *European Journal of Agronomy* 12:127-141.
- Grubb, C.D., and S. Abel. 2006. Glucosinolate metabolism and its control. *Trends in Plant Science* 11:89-100.
- Hesse, H., V. Nikiforova, B. Gakiere, and R. Hoefgen. 2004. Molecular analysis and control of cysteine biosynthesis: integration of nitrogen and sulphur metabolism. *J. Exp. Bot.* 55:1283-1292.
- Hirai, M.Y., M. Klein, Y. Fujikawa, M. Yano, D.B. Goodenowe, Y. Yamazaki, Y. Nakamura, M. Kitayama, H. Suzuki, N. Sakurai, D. Shibata, J. Tokuhisa, M. Reichelt, J. Gershenzon, J. Papenbrock, and K. Saito. 2005. Elucidation of gene-to-gene and metabolite-to-gene networks in *Arabidopsis* by integration of metabolomics and transcriptomics. *Journal of Biological Chemistry* 280:25590-25595.
- Hitsuda, K., M. Yamada, and D. Klepker. 2005. Sulfur requirement of eight crops at early stages of growth. *Agronomy J.* 97:155-159.
- Hocking, P.J., P.J. Randall, and A. Pinkerton. 1987. Sulphur nutrition of sunflower (*Helianthus annuus*) as affected by nitrogen supply: effects on vegetative growth, the development of yield components, and seed yield and quality. *Field Crops Research* 16:157-175.
- Josefsson, E. 1970. Glucosinolate content and amino acid composition of rapeseed (*Brassica napus*) meal as affected by sulphur and nitrogen nutrition, pp. 98-103, Vol. 21. (References incomplete ?Publisher)
- Karitonas, R. 2003. Development of a Nitrogen Management Tool for Broccoli, p. 125-129, *In* N. Tremblay, ed. XXVI IHC – Fertilization Strategies for Field vegetable production. Publisher?

- Kim, S.J., T. Matsuo, M. Watanabe, and Y. Watanabe. 2002. Effect of nitrogen and sulphur application on the glucosinolate concentration in vegetable turnip rape (*Brassica rapa* L.). *Soil Sci. Plant Nutr.* 48:43-49.
- Kopriva, S., and H. Rennenberg. 2004. Control of sulphate assimilation and glutathione synthesis: interaction with N and C metabolism. *J. Exp. Bot.* 55:1831-1842.
- Kopsel, D.A., T.C. Barickman, C.E. Sams, and J.S. Mcelroy. 2007. Influence of nitrogen and sulfur on biomass production and carotenoid and glucosinolate concentrations in watercress (*Nasturtium officinale* R. Br.). *J Agric Food Chem.* 55:10628-10634.
- Kutz, A., A. Mueller, P. Hennig, W.M. Kaiser, M. Piotrowski, and E.M. Weiler. 2002. A role for nitrilase 3 in the regulation of root morphology in sulphur-starving *Arabidopsis thaliana*. *The Plant Journal* 30:95-106.
- Li, S., I. Schonhof, A. Krumbein, L. Li, H. Stutzel, and M. Schreiner. 2007. Glucosinolate concentration in Turnip (*Brassica rapa* ssp. *rapifera* L.) roots as affected by nitrogen and sulfur supply. *J Agric Food Chem.* 55:84528457.
- Maruyama-Nakashita, A., E. Inoue, A. Watanabe-Takahashi, T. Yamaya, and H. Takahashi. 2003. Transcriptome profiling of sulfur-responsive genes in *Arabidopsis* reveals global effects of sulfur nutrition on multiple metabolic pathways. *Plant Physiol.* 132:597-605.
- McIntyre, G.I. 1997. The role of nitrate in the osmotic and nutritional control of plant development. *Australian Journal of Plant Physiology* 24:103-118.
- Mikkelsen, D.M., P. Naur, and A.B. Halkier. 2004. *Arabidopsis* mutants in the C-S lyase of glucosinolate biosynthesis establish a critical role for indole-3-acetaldoxime in auxin homeostasis. *The Plant Journal* 37:770-777.
- Morant, A.V., K. Jørgensen, C. Jørgensen, S.M. Paquette, R. Sánchez-Pérez, B.L. Møller, and S. Bak. 2008. [beta]-Glucosidases as detonators of plant chemical defense. *Phytochemistry* 69:1795-1813.
- Moreno, D.A., M. Carvajal, C. Lopez-Berenguer, and C. Garcia-Viguera. 2006. Chemical and biological characterisation of nutraceutical compounds of broccoli. *Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis* 41.
- Nikiforova, V., J. Freitag, S. Kempa, M. Adamik, H. Hesse, and R. Hoefgen. 2003. Transcriptome analysis of sulfur depletion in *Arabidopsis thaliana*: interlacing of biosynthetic pathways provides response specificity. *The Plant Journal* 33:633-650.
- Nkoa, R., Y. Desjardins, N. Tremblay, L. Querrec, M. Baana, and B. Nkoa. 2003. A mathematical model for nitrogen demand quantification and a link to broccoli (*Brassica oleracea* var. *italica*) glutamine synthetase activity. *Plant Science* 165:483-496.
- Nour-Eldin, H., and B. Halkier. 2009. Piecing together the transport pathway of aliphatic glucosinolates. *Phytochemistry Reviews* 8:53-67.
- Papastylianou, I., D.R. Graham, and D.W. Puckridge. 1982. The diagnosis of nitrogen deficiency in wheat by means of a critical nitrate concentration in stem basis. *Commun. Soil. Sci. Plant Anal.* 13:473-485.

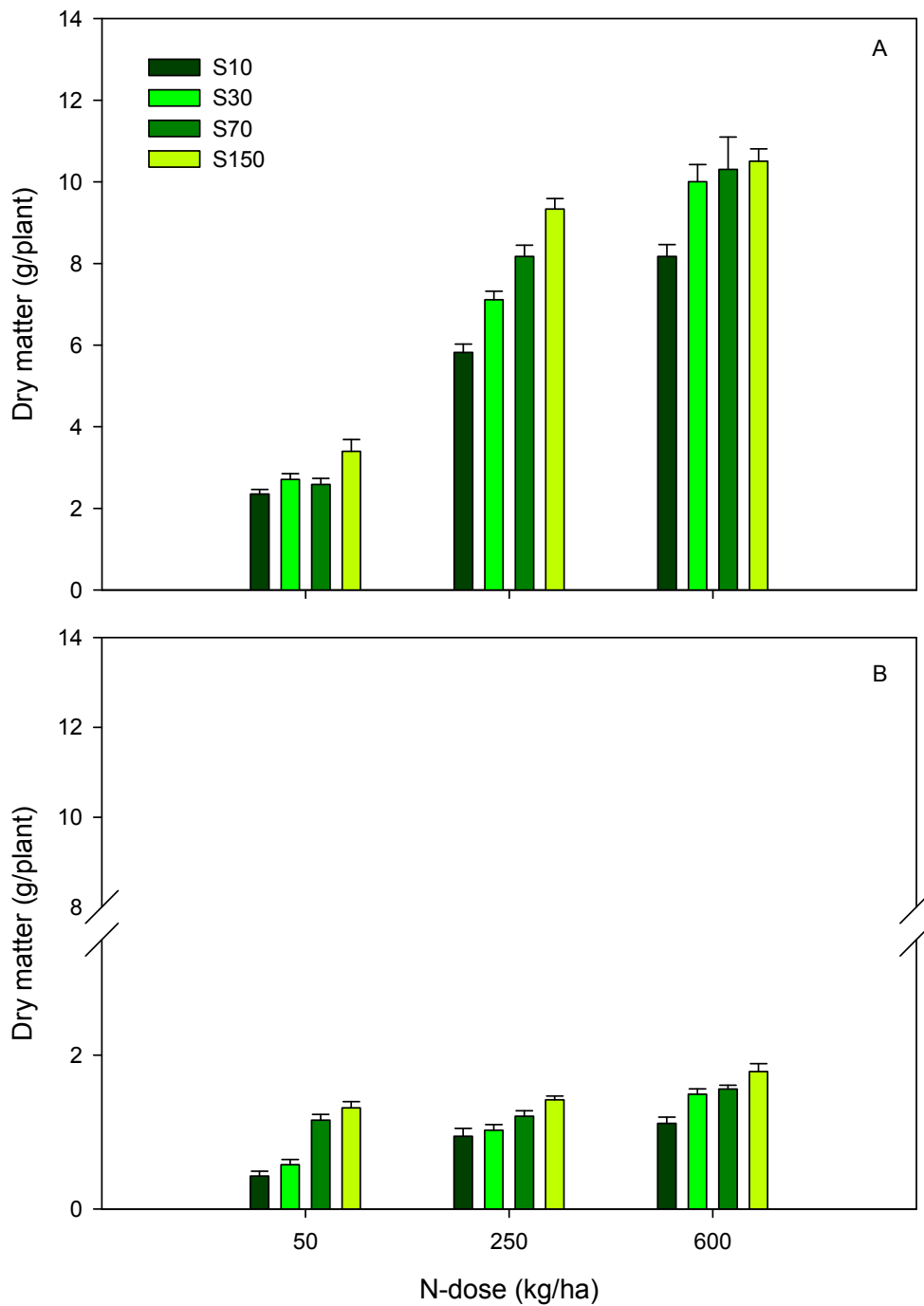
- Rangkadilok, N., M.E. Nicolas, R.N. Bennett, D.R. Eagling, R.R. Premier, and P.W.J. Taylor. 2004. The effect of sulfur fertilizer on glucoraphanin levels in broccoli (*B. oleracea L. var. italica*) at different growth stages. *J Agric Food Chem.* 52:2632-2639.
- Rosen, C.J., V.A. Fritz, G.M. Gardner, S.S. Hecht, S.G. Carmella, and P.M. Kenney. 2005. Cabbage yield and glucosinolate concentrations as affected by nitrogen and sulfur fertility. *HortScience* 40:1493-1498.
- Santamaria, P., A. Elia, and F. Serio. 2002. Effect of solution nitrogen concentration on yield, leaf element content and water and nitrogen use efficiency of three hydroponically-grown rocket salad genotypes. *Journal of Plant Nutrition* 25:245-258.
- Schnug, E. 1993. Physiological functions and environmental relevance of sulfur-containing secondary metabolites, p. 179-190, *In* De Kok L.J., et al., eds. *Sulfur Nutrition and Assimilation in Higher Plants: Regulatory, Agricultural and Environmental Aspects*. SPB Academic Publishing, The Hague, The Netherlands.
- Schonhof, I., D. Blankenburg, S. Müller, and A. Krumbein. 2007. Sulfur and nitrogen supply influence growth, product appearance, and glucosinolate concentration of broccoli. *J. Plant Nutr. Soil Sci.* 170:65-72.
- Shillito, R.M., D.J. Timlin, D. Fleisher, V.R. Reddy, and B. Quebedeaux. 2009. Yield response of potato to spatially patterned nitrogen application. *Agriculture, Ecosystems and Environment* 129:107-116.
- Sunarpi, and J.W. Anderson. 1997. Effect of Nitrogen Nutrition on Remobilization of Protein Sulfur in the Leaves of Vegetative Soybean and Associated Changes in Soluble Sulfur Metabolites. *Plant Physiology* 115:1671-1680.
- Svanem, P.J., A.M. Bones, and J.T. Rossiter. 1997. Metabolism of [α -¹⁴C]-desulpho - phenylethylglucosinolate in *Nasturtium officinale*. *Phytochemistry* 44:1251-1255.
- Takahashi, H., C.A. Braby, and A.R. Grossman. 2001. Sulfur economy and cell wall biosynthesis during sulfur limitation of *Chlamydomonas reinhardtii*. *Plant Physiol.* 127:665-673.
- Vagen, I.M., Aamlid T.S., and A.O. Skjelvag. 2007. Nitrogen fertilization to broccoli cultivars at different planting times: Yield and nitrogen use. *Acta Agriculturae Scandinavica, Section B - Plant Soil Science* 57:35-44.
- Vallejo, F., F.A. Tomas-Barberan, A. Gonzales Beavebte-Garcia, and C. Garcia-Viguera. 2003. Total and individual glucosinolate contents in inflorescences of eight broccoli cultivars grown under various climatic and fertilization conditions. *J Sci Food Agric.* 83:307-313.
- Wang, R., M. Okamoto, X. Xing, and N.M. Crawford. 2003. Microarray Analysis of the Nitrate Response in Arabidopsis Roots and Shoots Reveals over 1,000 Rapidly Responding Genes and New Linkages to Glucose, Trehalose-6-Phosphate, Iron, and Sulfate Metabolism. *Plant Physiol.* 132:556-567.
- Zhang, Y., P. Talalay, C. Cho, and H.G. Posner. 1992. A major inducer of anticarcinogenic protective enzymes from broccoli: Isolation and elucidation of structure. *Proc Natl Acad Sci USA* 89:2399-2403.

Zhao, F., E.J. Evans, P.E. Bilsborrow, and J.K. Syers. 1993. Influence of sulphur and nitrogen on seed yield and quality of low glucosinolate oilseed rapeseed (*B. napus* L.). *J Sci Food Agric.* 63:29-37.

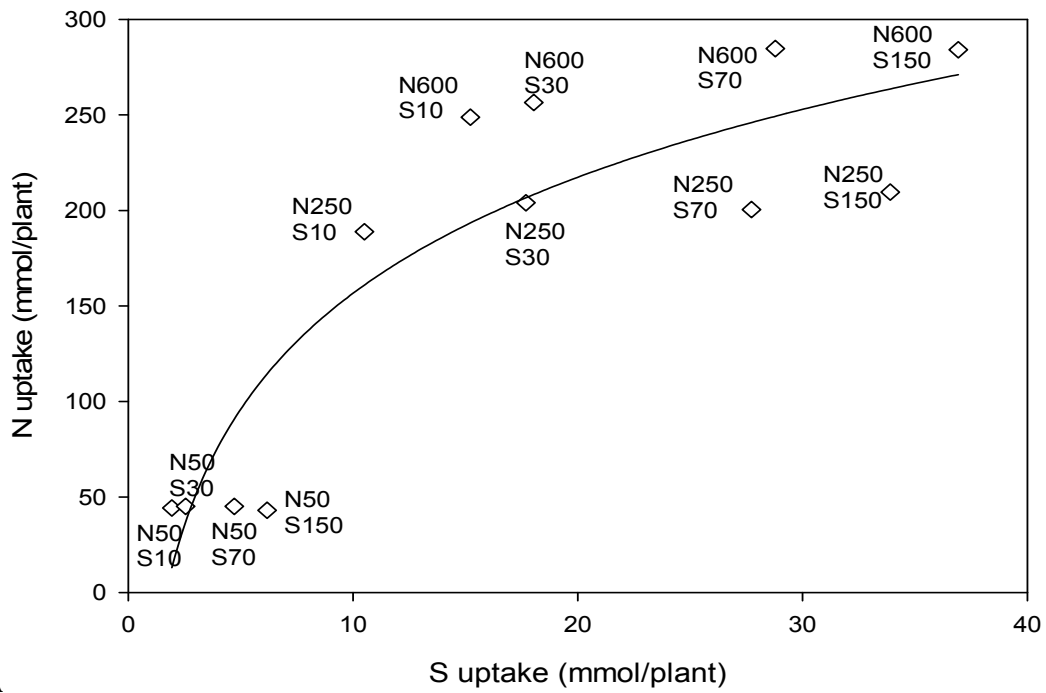
Πίνακες και Διαγράμματα



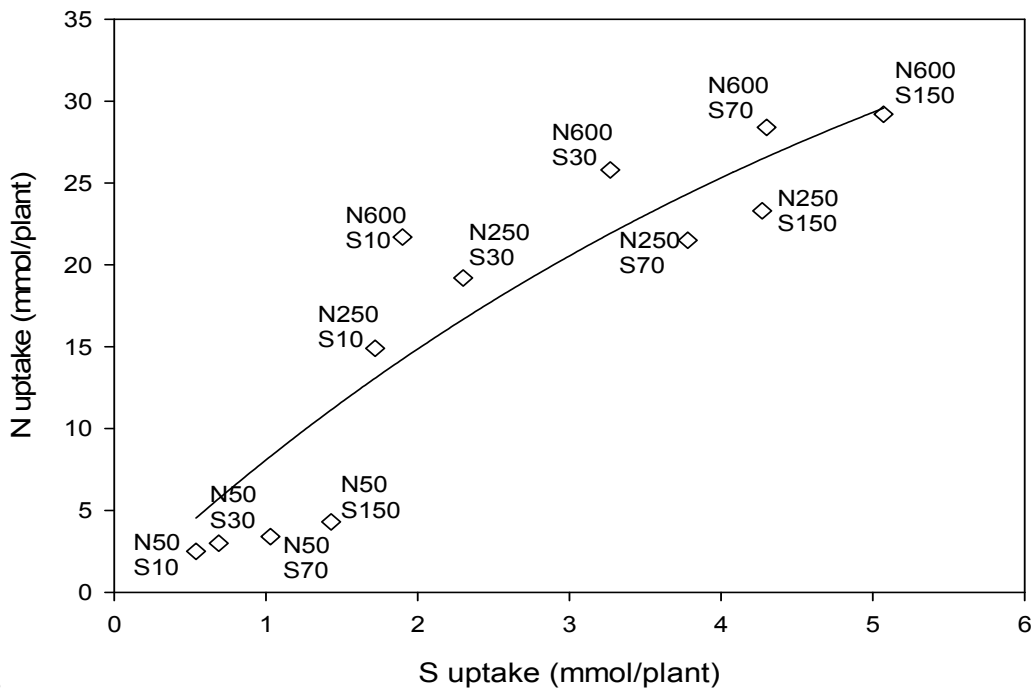
Διάγραμμα 5.1 Παραγωγή ξηράς ουσίας σε ανθοκεφαλές (A), φύλλα (B) και ρίζες (C) μπρόκολου σε σχέση με την αζωτούχο και θειούχο λίπανση. Οδιακυμάνσεις στα ιστογράμματα αφορούν το τυπικό σφάλμα των μέσων τιμών κάθε μεταχείρισης (n=4).



Διάγραμμα 5.2 Παραγωγή ξηράς ουσίας σε φύλλα (A) και ρίζες (B) ρόκας σε σχέση με την αζωτούχο και θειούχο λίπασμα. Οι διακυμάνσεις στα ιστογράμματα αφορούν το τυπικό σφάλμα των μέσων τιμών κάθε μεταχείρισης (n=4).

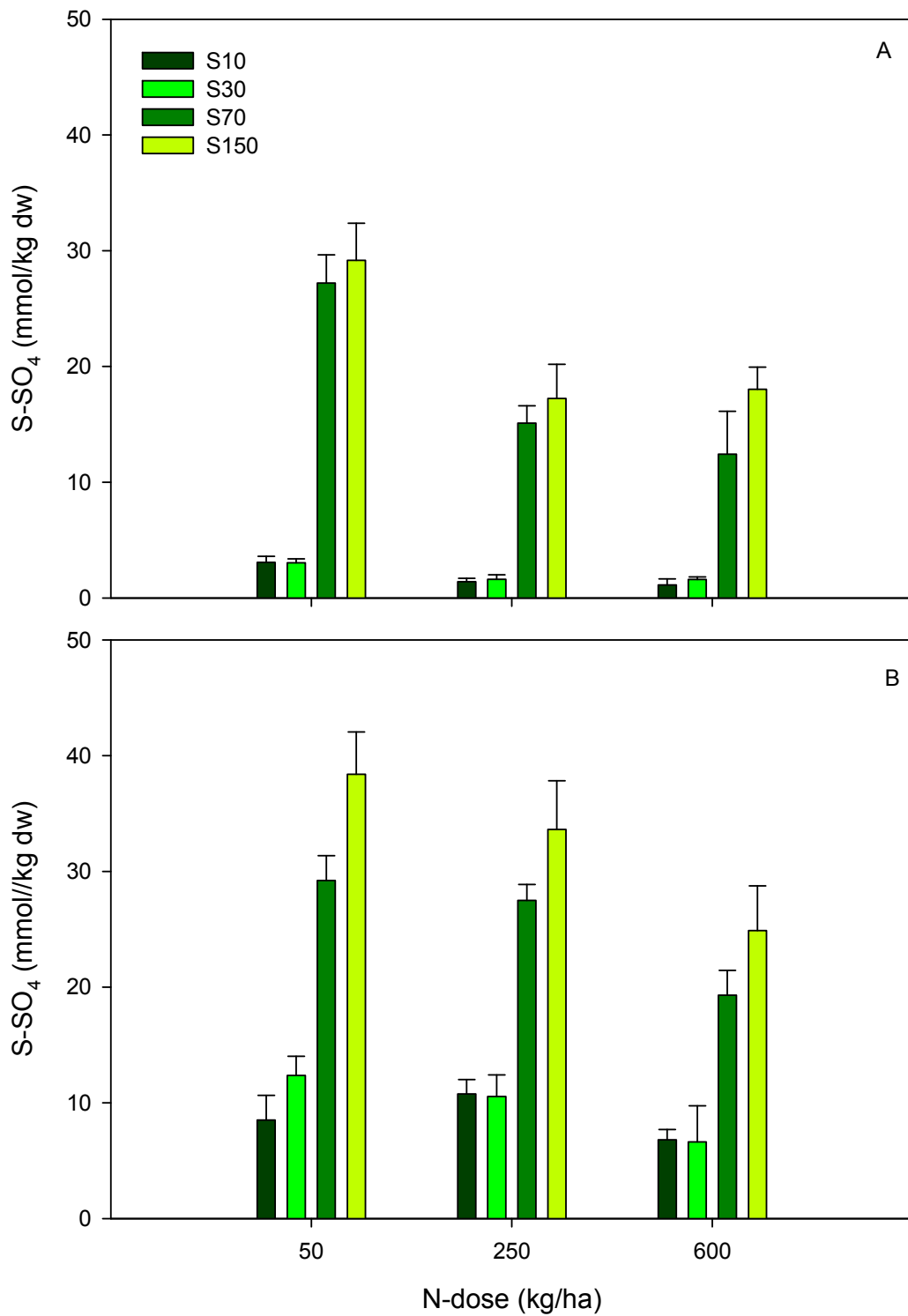


A

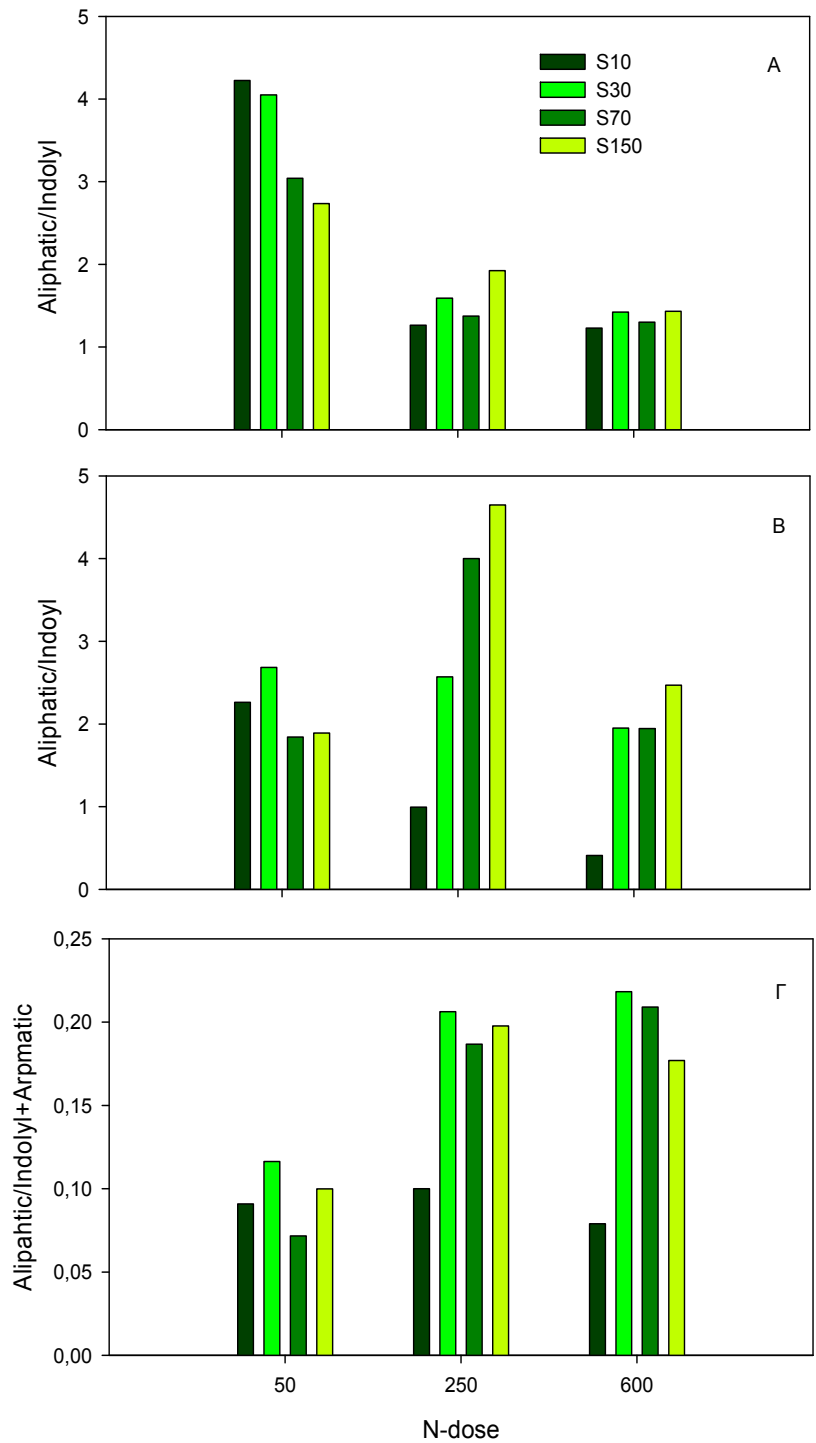


B

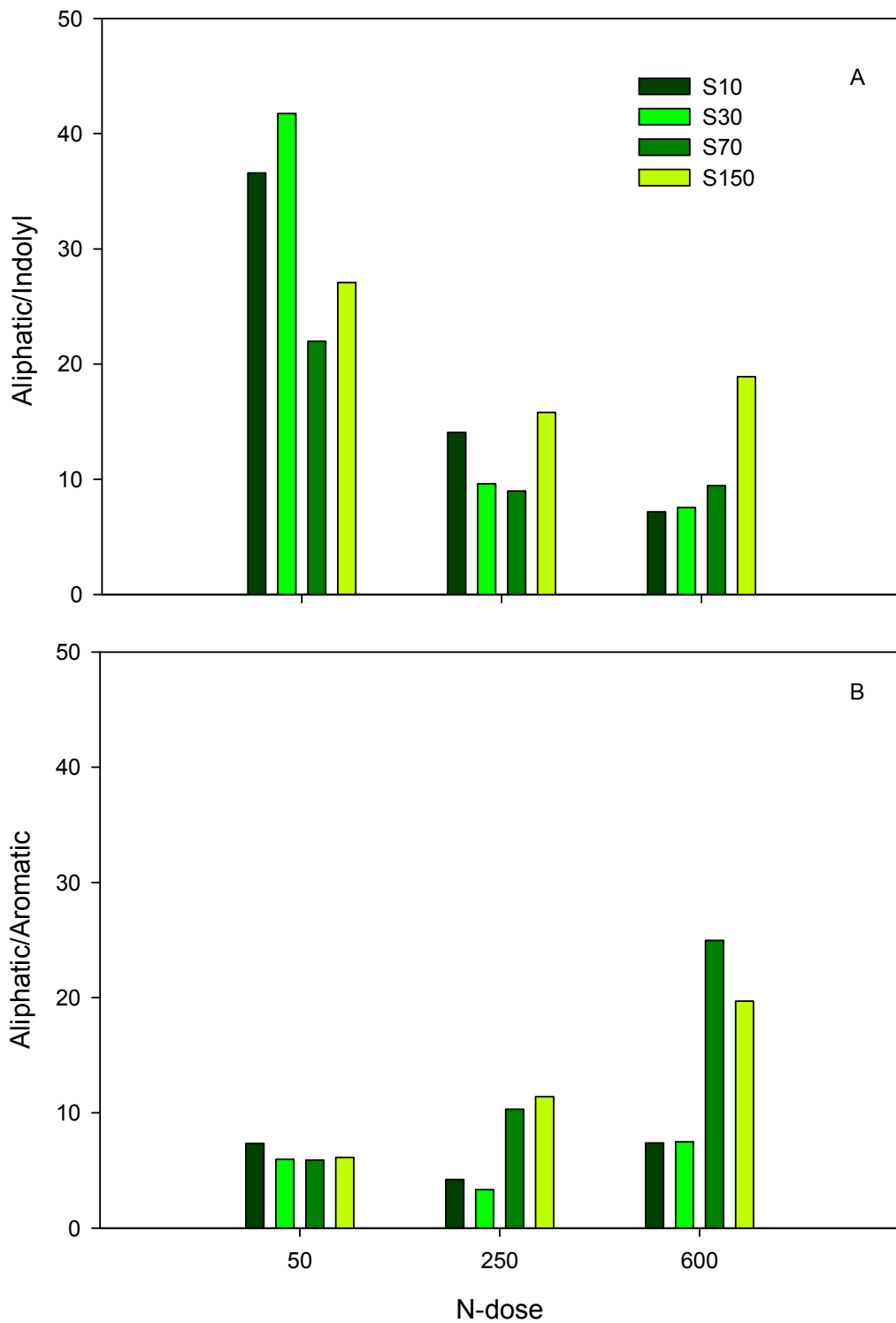
Διάγραμμα 5.3 Συσχέτιση μεταξύ πρόσληψης αζώτου και θείου (mmol/plant) στο μπρόκολο (A) και στη ρόκα (B) στις διάφορες δόσεις αζωτούχου και θειούχου λίπανσης. Κάθε τιμή αντιπροσωπεύει το μέσο όρο των τεσσάρων επαναλήψεων της κάθε μεταχείρισης.



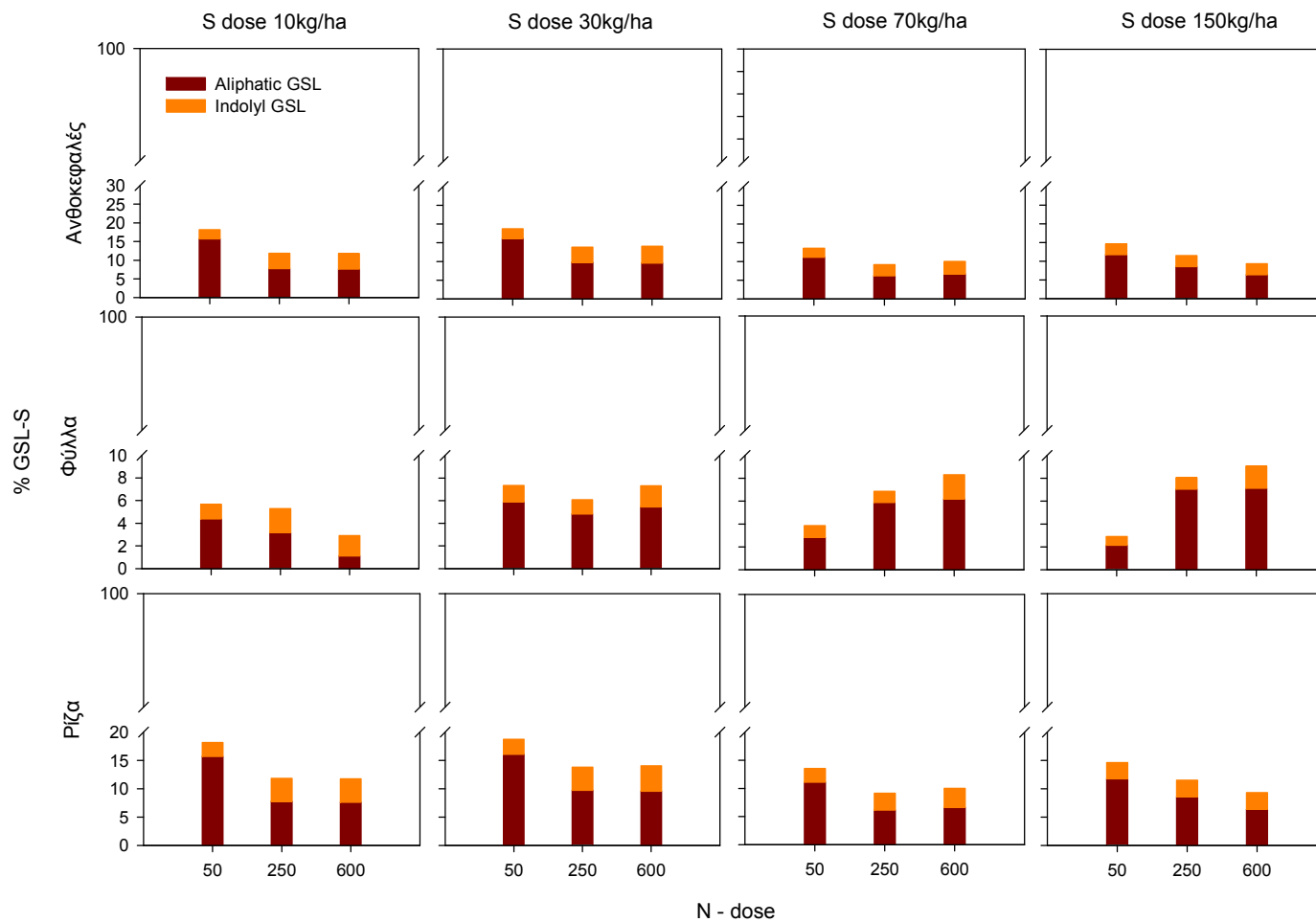
Διάγραμμα 5.4 Συγκέντρωση θείου στη μορφή θειϊκών ιόντων (μmol/g dw) σε μίσχους των νεαρότερων πλήρως ανεπτυγμένων φύλλων μπρόκολου (A) και ρόκας (B). Οι διακυμάνσεις στα ιστογράμματα αφορούν το τυπικό σφάλμα των μέσων τιμών κάθε μεταχείρισης (n=5).



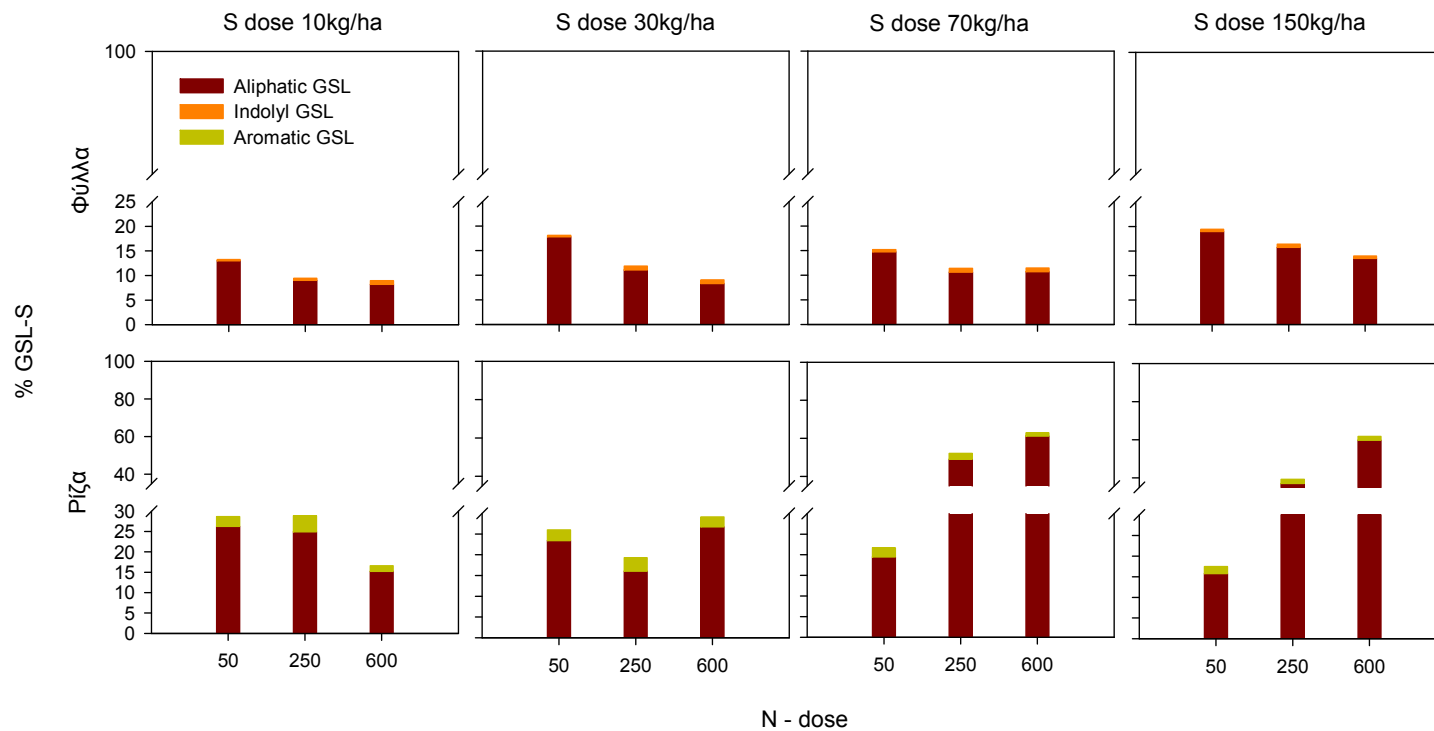
Διάγραμμα 5.5 Ο λόγος αλειφατικών προς ινδολικά και αρωματικά ΓΚΣ στις ανθοκεφαλές (Α), στα φύλλα (Β) και στις ρίζες (Γ) μπρόκολου στα διάφορα επίπεδα αζωτούχου και θειούχου λίπανσης.



Διάγραμμα 5.6 Ο λόγος αλειφατικών προς ινδολικά και αρωματικά ΓΚΣ στα φύλλα (A) και στις ρίζες (B) ρόκας στα διάφορα επίπεδα αζωτούχου και θειούχου λίπανσης.



Διάγραμμα 5.7 Η ποσότητα θείου που ενσωματώνεται στους διάφορους τύπους ΓΚΣ στις ανθοκεφαλές, τα φύλλα και τις ρίζες φυτών μπρόκολου, ως ποσοστό επί της % της συνολικής συγκέντρωσης θείου στα διάφορα όργανα, σε διάφορα επίπεδα αζωτούχου και θειούχου λίπανσης.



Διάγραμμα 5.8 Η ποσότητα θείου που ενσωματώνεται στους διάφορους τύπους ΓΚΣ Στα φύλλα και τις ρίζες φυτών ρόκας, ως ποσοστό επί της % της συνολικής συγκέντρωσης θείου στα διάφορα όργανα, σε διάφορα επίπεδα αζωτούχου και θειούχου λίπανσης.

Πίνακας 5.1 Επίδραση της αζωτούχου και θειούχου λίπανσης (kg/ha) στη συγκέντρωση N και S (μmol/g dw), στη συγκέντρωση των μεμονωμένων ΓΚΣ, της ολικής συγκέντρωσης των ΓΚΣ, των ολικών Αλειφατικών και Ινδολικών ΓΚΣ (μmol/g dw) στις ανθοκεφαλές μπρόκολου

| Δόση N | Δόση S | | | 4-OH | | | 4-MeO | | | neo | Total | Total | Total |
|-----------|-----------|--|------------|----------|---------|-----------------|---------|---------|----------|----------|-----------|----------|-------|
| | | N | S | GIB | GRA | GBS | GBS | GBS | GBS | GBS | Aliphatic | Indolyl | GSL |
| 50 | 10 | 1718,14 ¹ A ² a ³ | 60,16 Aa | 0,22 Aa | 2,92 Ba | nd ⁴ | 0,25 Aa | 0,23 Aa | 0,27 Aa | 3,15 Ba | 0,75 Aa | 3,89 Aa | |
| | 30 | 1796,25 Aa | 70,31 Aa | 0,29 Aa | 3,48 Ab | nd | 0,26 Aa | 0,32 Aa | 0,35 Aa | 3,77 Bb | 0,93 Aa | 4,70 Ab | |
| | 70 | 1803,21 Aa | 114,30 Ab | 0,28 Aa | 3,95 Ac | 0,22 Aa | 0,48 Ab | 0,30 Aa | 0,40 Aab | 4,23 Ac | 1,39 Ab | 5,62 Ac | |
| | 150 | 1766,75 Aa | 118,59 Ab | 0,34 Aa | 4,30 Ad | 0,20 Aa | 0,62 Ab | 0,34 Aa | 0,54 Ab | 4,64 Ad | 1,70 Ac | 6,34 Ad | |
| 250 | 10 | 2362,50 Ba | 93,75 Ba | 0,14 Aa | 2,29 Aa | 0,14 Aa | 0,63 Ba | 0,70 Ba | 0,46 Ba | 2,42 Aa | 1,92 Ba | 4,34 Ba | |
| | 30 | 2280,80 Ba | 109,68 Ba | 0,20 Aab | 3,36 Ab | 0,16 Aa | 0,79 Bb | 0,64 Ba | 0,65 Bb | 3,56 ABb | 2,24 Ba | 5,79 Bb | |
| | 70 | 2342,32 Ba | 233,25 Bb | 0,30 Abc | 4,49 Bc | 0,24 Aa | 1,27 Bc | 0,73 Ba | 1,25 Bc | 4,79 Bc | 3,49 Bb | 8,28 Bc | |
| | 150 | 2170,71 Ba | 251,16 Bb | 0,34 Ac | 6,82 Cd | 0,28 Aa | 1,30 Bc | 0,80 Ba | 1,35 Bc | 7,16 Cd | 3,72 Bb | 10,88 Bd | |
| 600 | 10 | 2402,14 Ca | 96,48 Ba | 0,13 Aa | 2,32 Aa | 0,19 Aa | 0,65 Ba | 0,64 Ba | 0,52 Ba | 2,45 Aa | 1,99 Ba | 4,44 Ba | |
| | 30 | 2393,57 Ba | 108,28 Ba | 0,20 Aa | 3,25 Ab | 0,21 Aa | 0,84 Bb | 0,69 Ba | 0,69 Ba | 3,45 Bb | 2,43 Bb | 5,88 Bb | |
| | 70 | 2498,57 Ca | 220,94 ABb | 0,38 Ab | 4,51 Bc | 0,29 Aa | 1,44 Bc | 0,81 Ba | 1,22 Bb | 4,89 Bc | 3,75 Cc | 8,64 Bc | |
| | 150 | 2440,71 Ba | 288,75 Bb | 0,35 Ab | 5,78 Bd | 0,27 Aa | 1,63 Cd | 1,09 Cb | 1,29 Bb | 6,13 Bd | 4,28 Cd | 10,41 Bd | |

¹. Μέσος όρος τεσσάρων επαναλήψεων της κάθε μεταχείρισης. ². Διαφορετικά κεφαλαία γράμματα δηλώνουν στατιστικά σημαντικές διαφορές ($p < 0.05$) μεταξύ των μεταχειρίσεων στο ίδιο επίπεδο θειούχου λίπανσης ³ και διαφορετικά μικρά γράμματα δηλώνουν στατιστικά σημαντικές διαφορές ($p < 0.05$) μεταξύ των μεταχειρίσεων στο ίδιο επίπεδο αζωτούχου λίπανσης (Tukey's HSD test). ⁴. nd = δεν ανιχνεύθηκε

Πίνακας 5.2 Επίδραση της αζωτούχου και θειούχου λίπανσης (kg/ha) στη συγκέντρωση N και S (μmol/g dw), στη συγκέντρωση των μεμονωμένων ΓΚΣ, της ολικής συγκέντρωσης των ΓΚΣ, των ολικών Αλειφατικών και Ινδολικών ΓΚΣ (μmol/g dw) στα φύλλα μπρόκολου

| Δόση N | Δόση S | N | S | GIB | GRA | GBS | Neo-GBS | Total Aliphatic | Total Indolyl | Total GSL |
|------------|------------|---|-------------|----------|---------|----------|---------|--------------------|------------------|--------------|
| 50 | 10 | 648,21 ¹ A ² a ³ | 31,25 Aa | 0,10 Aa | 0,36 Ba | 0,10 Aa | 0,11 Aa | 0,46 Aa | 0,20 Aa | 0,66 Aa |
| | 30 | 792,86 Aa | 56,25 Aa | 0,34 Aa | 0,77 Ab | 0,16 Aab | 0,25 Ab | 1,10 Ab | 0,41 Ab | 1,51 Ab |
| | 70 | 730,36 Aa | 103,13Ab | 0,21 Aa | 0,77 Ab | 0,26 Abc | 0,27 Ab | 0,97 Ab | 0,53 Ab | 1,50 Ab |
| | 150 | 658,93 Aa | 151,56 Ac | 0,29 Aa | 0,80 Ab | 0,29 Ac | 0,29 Ab | 1,08 Ab | 0,57 Ab | 1,65 Ab |
| 250 | 10 | 864,29 Ba | 62,50 ABA | 0,14 Aa | 0,52 Ca | 0,45 Ba | 0,22 Ba | 0,66 Ba | 0,66 Ba | 1,32 Ba |
| | 30 | 914,29 Aa | 118,75 Bab | 0,18 Aa | 1,73 Bb | 0,48 Ba | 0,27 Aa | 1,91 Bb | 0,74 Ba | 2,65 Bb |
| | 70 | 871,43 Aa | 162,50 Bbc | 0,19 Aa | 2,99 Bc | 0,50 Ba | 0,30 Aa | 3,18 Bc | 0,80 Bab | 3,98 Bc |
| | 150 | 985,71 Ba | 207,73Ac | 0,26 Aa | 4,62 Bd | 0,68 Bb | 0,36 Aa | 4,88 Bd | 1,05 Bb | 5,93 Bd |
| 600 | 10 | 1264,29Ca | 94,53 Ba | 0,11 Aa | 0,24 Aa | 0,65 Ca | 0,20 Ba | 0,35 Aa | 0,85 Ca | 1,20 Ba |
| | 30 | 1250,00 Ba | 110,16 Bab | 0,32 Ab | 1,68 Bb | 0,82 Ca | 0,21 Aa | 2,00 Bb | 1,03 Ba | 3,03 Bb |
| | 70 | 1414,29 Ba | 153,13 ABbc | 0,42 Bbc | 2,74 Bb | 1,32 Cb | 0,30 Aa | 3,15 Bb | 1,62 Cb | 4,78 Cc |
| | 150 | 1371,43 Ca | 192,97 Ac | 0,52 Bc | 4,07 Bc | 1,55 Cb | 0,31 Aa | 4,59 Bc | 1,86 Cb | 6,44 Bd |

¹Μέσος όρος τεσσάρων επαναλήψεων της κάθε μεταχείρισης. ² Διαφορετικά κεφαλαία γράμματα δηλώνουν στατιστικά σημαντικές διαφορές ($p<0.05$) μεταξύ των μεταχειρίσεων στο ίδιο επίπεδο θειούχου λίπανσης ³ και διαφορετικά μικρά γράμματα δηλώνουν στατιστικά σημαντικές διαφορές ($p<0.05$) μεταξύ των μεταχειρίσεων στο ίδιο επίπεδο αζωτούχου λίπανσης (Tukey's HSD test). ⁴ nd = δεν ανιχνεύθηκε

Πίνακας 5.3 Επίδραση της αζωτούχου και θειούχου λίπανσης (kg/ha) στη συγκέντρωση N και S ($\mu\text{mol/g dw}$), στη συγκέντρωση των μεμονωμένων ΓΚΣ, της ολικής συγκέντρωσης των ΓΚΣ, των ολικών Αλειφατικών, και Ινδολικών ΓΚΣ ($\mu\text{mol/g dw}$) στις ρίζες μπρόκολου

| Δόση N | Δόση S | N | S | GRA | GST | GBS | 4-MeO GBS | Neo GBS | Total Aliphatic | Total Indolyl | Total GSL |
|------------|------------|---|-------------|---------|---------|---------|-----------|----------|-----------------|---------------|-----------|
| 50 | 10 | 263,57 ¹ A ² a ³ | 35,00 Aa | 0,15 Aa | 1,00 Aa | 0,14 Aa | 0,37 Aa | 0,16 Aa | 0,15 Aa | 0,66 Aa | 1,80 Aa |
| | 30 | 352,14 Aa | 49,69 Aab | 0,22 Aa | 0,98 Aa | 0,15 Aa | 0,50 Aab | 0,24 Aab | 0,22 Aa | 0,89 Ab | 2,09 Aa |
| | 70 | 322,32 Aa | 74,92 Abc | 0,17 Aa | 1,09 Aa | 0,30 Ab | 0,66 Ab | 0,30 Ab | 0,17 Aa | 1,25 Ac | 2,51 Ab |
| | 150 | 330,36 Aa | 84,77 Ac | 0,26 Aa | 1,12 Ba | 0,35 Ab | 0,65 Ab | 0,44 Ac | 0,26 Aa | 1,44 Ac | 2,81 Ab |
| 250 | 10 | 939,29 Ba | 52,34 ABa | 0,18 Aa | 0,89 Aa | 0,16 Aa | 0,43 Aa | 0,27 ABa | 0,18 Aa | 0,86 ABa | 1,93 ABa |
| | 30 | 1003,57 Ba | 71,09 Aab | 0,49 Bb | 1,00 Aa | 0,31 Bb | 0,64 Aa | 0,44 Bb | 0,49 Bb | 1,39 Bb | 2,88 Bb |
| | 70 | 1008,93 Ba | 110,94 ABbc | 0,67 Bc | 1,39 Bb | 0,58 Bc | 1,10 Bb | 0,49 Bb | 0,67 Bc | 2,17 Bc | 4,23 Bc |
| | 150 | 1075,00 Ba | 115,63 Ac | 0,74 Bc | 1,35 Bb | 0,65 Bc | 1,17 Bb | 0,56 ABb | 0,74 Bc | 2,37 Bc | 4,45 Bd |
| 600 | 10 | 1125,00 Ca | 59,38 Ba | 0,15 Aa | 1,02 Aa | 0,17 Aa | 0,44 Aa | 0,31 Ba | 0,15 Aa | 0,91 Ba | 2,08 Ba |
| | 30 | 1146,43 Ba | 66,41 Aa | 0,51 Bb | 0,90 Aa | 0,40 Bb | 0,54 Aa | 0,48 Ba | 0,51 Bb | 1,43 Bb | 2,83 Bb |
| | 70 | 1071,43 Ba | 106,33 Bb | 0,75 Bc | 1,41 Bb | 0,56 Bc | 1,16 Bb | 0,46 ABa | 0,75 Bc | 2,18 Bc | 4,34 Bc |
| | 150 | 1108,93 Ba | 96,88 Ab | 0,73 Bc | 1,43 Bb | 0,67 Bc | 1,33 Cb | 0,70 Bb | 0,73 Bc | 2,71 Cd | 4,87 Cd |

¹ Μέσος όρος τεσσάρων επαναλήψεων της κάθε μεταχείρισης. ² Διαφορετικά κεφαλαία γράμματα δηλώνουν στατιστικά σημαντικές διαφορές ($p < 0.05$) μεταξύ των μεταχειρίσεων στο ίδιο επίπεδο θειούχου λίπανσης ³ και διαφορετικά μικρά γράμματα δηλώνουν στατιστικά σημαντικές διαφορές ($p < 0.05$) μεταξύ των μεταχειρίσεων στο ίδιο επίπεδο αζωτούχου λίπανσης (Tukey's HSD test). ⁴ nd = δεν ανιχνεύθηκε

Πίνακας 5.4 Επίδραση της αζωτούχου και θειούχου λίπανσης (kg/ha) στη συγκέντρωση N και S ($\mu\text{mol/g dw}$), στη συγκέντρωση των μεμονωμένων ΓΚΣ, της ολικής συγκέντρωσης των ΓΚΣ, των ολικών Αλειφατικών και Ινδολικών ΓΚΣ ($\mu\text{mol/g dw}$) σε φύλλα ρόκας

| Δόση N | Δόση S | N | S | GRA | GNA | GSV | GER | GBS | 4-MeO | Total | Total | Total GSL |
|-----------|-----------|--|----------|---------|---------|---------|---------|---------|---------|-----------|---------|-----------|
| | | | | | | | | | GBS | Aliphatic | Indolyl | |
| 50 | 10 | 925.0 ¹ A ² a ³ | 218.9 Aa | 4.71 Aa | 0.17 Aa | 3.19 Ca | 1.42 Aa | 0.14 Aa | 0.12 Aa | 9.48 Ba | 0.26 Aa | 9.74 Ba |
| | 30 | 948.2 Aa | 235.1 Aa | 5.82 Bb | 0.98 Bb | 4.30 Bb | 2.86 Bb | 0.24 Aa | 0.09 Aa | 13.96 Cb | 0.33 Aa | 14.29 Cb |
| | 70 | 1007.1 Aa | 330.1 Ab | 6.67 Cc | 1.51 Cc | 5.13 Cc | 2.92 Ab | 0.53 Ab | 0.21 Ab | 16.23 Bc | 0.74 Ab | 16.97 Bc |
| | 150 | 973.2 Aa | 335.2 Ab | 8.09 Ad | 2.08 Ad | 6.82 Bd | 4.20 Ac | 0.50 Ab | 0.28 Ab | 21.19 Bd | 0.78 Ab | 21.97 Bd |
| 250 | 10 | 2297.2 Bab | 284.5 Ba | 3.82 Aa | 0.13 Aa | 2.62 Ba | 1.98 Ba | 0.44 Ba | 0.17 Aa | 8.56 Ba | 0.61 Ba | 9.17 Ba |
| | 30 | 2481.2 Bc | 310.6 Ba | 5.98 Ab | 0.57 Ab | 2.58 Aa | 2.35 Aa | 0.69 Bb | 0.51 Ab | 11.49 Bb | 1.20 Bb | 12.68 Bb |
| | 70 | 2396.4 Bbc | 437.9 Bb | 7.07 Bc | 1.29 Bc | 3.77 Ab | 3.37 Bb | 0.79 Bb | 0.93 Cd | 15.49 Bc | 1.72 Cd | 17.21 Bc |
| | 150 | 2245.6 Ba | 424.7 Bb | 7.90 Bd | 2.80 Bd | 7.56 Cc | 4.00 Ac | 0.72 Bb | 0.69 Cc | 22.27 Cd | 1.41 Cc | 23.68 Cd |
| 600 | 10 | 2433.9 Cab | 220.6 Aa | 2.92Aa | 0.10 Aa | 1.88 Aa | 1.14 Ba | 0.52 Ba | 0.32 Ba | 6.03 Aa | 0.84 Ca | 6.87 Aa |
| | 30 | 2339.9 Ca | 310.7 Bb | 3.75 Ab | 0.39 Ab | 2.46 Ab | 2.02 Ab | 0.82 Bb | 0.32 Ba | 8.62 Ab | 1.14 Bb | 9.76 Ab |
| | 70 | 2494.2 Bb | 385.9 Bc | 5.45 Ac | 0.99 Ac | 4.57 Bc | 2.80 Ac | 0.89 Bb | 0.57 Bb | 13.81 Ac | 1.46 Bc | 15.27 Ac |
| | 150 | 2487.9 Cb | 439.2 Bc | 6.19 Ad | 2.24 Ad | 6.06 Ad | 5.29 Bd | 0.53 Aa | 0.52 Cb | 19.78 Ad | 1.05 Bd | 20.82 Ad |

¹: Μέσος όρος τεσσάρων επαναλήψεων της κάθε μεταχείρισης. ²: Διαφορετικά κεφαλαία γράμματα δηλώνουν στατιστικά σημαντικές διαφορές ($p < 0.05$) μεταξύ των μεταχειρίσεων στο ίδιο επίπεδο θειούχου λίπανσης ³: και διαφορετικά μικρά γράμματα δηλώνουν στατιστικά σημαντικές διαφορές ($p < 0.05$) μεταξύ των μεταχειρίσεων στο ίδιο επίπεδο αζωτούχου λίπανσης (Tukey's HSD test). ⁴: nd = δεν ανιχνεύθηκε

Πίνακας 5.5 Επίδραση της αζωτούχου και θειούχου λίπανσης (kg/ha) στη συγκέντρωση N και S (μmol/g dw), στη συγκέντρωση των μεμονωμένων ΓΚΣ, της ολικής συγκέντρωσης των ΓΚΣ, των ολικών Αλειφατικών και Αρωματικών ΓΚΣ (μmol/g dw) σε ρίζες ρόκας

| Δόση N | Δόση S | N | S | GRA | GER | GST | Total Aliphatic | Total Aromatic | Total GSL |
|------------|------------|--|----------|----------|----------|----------|--------------------|-------------------|--------------|
| 50 | 10 | 721.4 ¹ A ² a ³ | 60.9 Aa | 1.03 Aa | 4.31 Aa | 0.73 Aa | 5.34 Aa | 0.72 Aa | 6.07 Aa |
| | 30 | 733.9 Aa | 93.0 Ab | 1.67 Aa | 5.59 Ab | 1.21 Aab | 7.25 Ab | 1.21 Aab | 8.47 Aa |
| | 70 | 725.0 Aa | 153.9 Ac | 3.05 Ab | 6.93 Ac | 1.69 Ab | 9.98 Ac | 1.69 Ab | 11.67 Ab |
| | 150 | 723.2 Aa | 206.3 Ad | 3.77 Ab | 7.07 Ac | 1.77 Ab | 10.84 Ac | 1.76 Ab | 12.61 Ab |
| 250 | 10 | 1657.1 Ba | 61.7 Aa | 1.21 Aa | 3.92 Aa | 1.22 Aa | 5.13 Aa | 1.21 Aa | 6.34 Aa |
| | 30 | 1514.3 Ba | 88.3 Aa | 1.53 Aa | 4.83 Ab | 1.91 Ba | 6.35 Aa | 1.90 Ba | 8.26 Aa |
| | 70 | 1610.7 Ba | 177.3 Bb | 9.27 Bb | 25.44 Bc | 3.37 Cb | 34.71 Bb | 3.36 Cb | 38.07 Bb |
| | 150 | 1671.4 Bb | 216.4 Bc | 9.12 Bb | 25.99 Bc | 3.08Bb | 35.11 Bb | 3.07 Bb | 38.18 Bb |
| 600 | 10 | 1601.8 Ba | 82.0 Aa | 1.14 Aa | 4.42 Aa | 0.75 Aa | 5.55 Aa | 0.75 Aa | 6.30 Aa |
| | 30 | 1619.6 Ba | 123.4 Aa | 2.18 Aa | 13.41 Bb | 2.08 Bb | 15.60 Bb | 2.08 Bb | 17.68 Bb |
| | 70 | 1705.4 Bb | 215.6 Bb | 10.81 Cc | 52.36 Cd | 2.53 Bc | 63.17 Cd | 2.53 Bc | 65.70 Cd |
| | 150 | 1642.9 Bb | 256.3 Bb | 8.46 Bb | 42.53 Cc | 2.59 Bc | 51.00 Cc | 2.59 Bc | 53.59 Cc |

¹. Μέσος όρος τεσσάρων επαναλήψεων της κάθε μεταχείρισης. ². Διαφορετικά κεφαλαία γράμματα δηλώνουν στατιστικά σημαντικές διαφορές ($p < 0.05$) μεταξύ των μεταχειρίσεων στο ίδιο επίπεδο θειούχου λίπανσης ³. και διαφορετικά μικρά γράμματα δηλώνουν στατιστικά σημαντικές διαφορές ($p < 0.05$) μεταξύ των μεταχειρίσεων στο ίδιο επίπεδο αζωτούχου λίπανσης (Tukey's HSD test). ⁴. nd = δεν ανιχνεύθηκε

Πίνακας 5.6 Μονομεταβλητή ανάλυση διακύμανσης (Univariate analysis of Variance) των μεμονωμένων ΓΚΣ που ανιχνεύθηκαν σε ανθοκεφαλές, φύλλα και ρίζες μπρόκολου στους παράγοντες N, S και της αλληλεπίδρασης τους.

| | N | S | GIB | GRA | 4-OH GBS | 4-MeO GBS | neo GBS | GST | Total Aliphatic | Total Indolyl | Total GSL | |
|--------------------|-------|-------|-------|-------|-------------|--------------|------------|-------|--------------------|------------------|--------------|-------|
| Ανθοκεφαλές | | | | | | | | | | | | |
| N | <0.01 | <0.01 | 0.250 | <0.01 | <0.01 | <0.01 | <0.01 | - | <0.01 | <0.01 | <0.01 | |
| S | 0.235 | <0.01 | <0.01 | <0.01 | <0.01 | <0.01 | <0.01 | - | <0.01 | <0.01 | <0.01 | |
| NxS | 0.996 | 0.254 | 0.070 | <0.01 | 0.118 | <0.01 | 0.004 | - | <0.01 | <0.01 | <0.01 | |
| Φύλλα | | | | | | | | | | | | |
| N | <0.01 | <0.01 | <0.01 | <0.01 | - | <0.01 | - | 0.135 | - | <0.01 | <0.01 | <0.01 |
| S | 0.205 | <0.01 | <0.01 | <0.01 | - | <0.01 | - | 0.001 | - | <0.01 | <0.01 | <0.01 |
| NxS | 0.116 | 0.516 | 0.009 | <0.01 | - | <0.01 | - | 0.711 | - | <0.01 | <0.01 | <0.01 |
| Ρίζα | | | | | | | | | | | | |
| N | <0.01 | <0.01 | - | <0.01 | - | <0.01 | <0.01 | <0.01 | <0.01 | <0.01 | <0.01 | <0.01 |
| S | 0.189 | <0.01 | - | <0.01 | - | <0.01 | <0.01 | <0.01 | <0.01 | <0.01 | <0.01 | <0.01 |
| NxS | 0.474 | 0.721 | - | <0.01 | - | <0.01 | <0.01 | 0.357 | <0.01 | <0.01 | <0.01 | <0.01 |

Πίνακας 5.7 Μονομεταβλητή ανάλυση διακύμανσης (Univariate analysis of Variance) των μεμονωμένων ΓΚΣ που ανιχνεύθηκαν σε φύλλα και ρίζες ρόκας στους παράγοντες N, S και της αλληλεπίδρασης τους.

| | N | S | GRA | GNA | GSV | GER | GBS | 4-MeO | GST | Total Aliphatic | Total Indolyl | Total GSL |
|--------------|-------|-------|-------|-------|-------|-------|-------|-------|-------|--------------------|------------------|--------------|
| Φύλλα | | | | | | | | | | | | |
| N | <0.01 | <0.01 | <0.01 | <0.01 | <0.01 | 0.46 | <0.01 | <0.01 | - | <0.01 | <0.01 | <0.01 |
| S | 0.09 | <0.01 | <0.01 | <0.01 | <0.01 | <0.01 | <0.01 | <0.01 | - | <0.01 | <0.01 | <0.01 |
| NxS | <0.01 | 0.03 | 0.01 | <0.01 | <0.01 | <0.01 | <0.01 | <0.01 | - | <0.01 | <0.01 | <0.01 |
| Ρίζα | | | | | | | | | | | | |
| N | <0.01 | <0.01 | <0.01 | - | - | <0.01 | - | - | <0.01 | <0.01 | - | <0.01 |
| S | 0.46 | <0.01 | <0.01 | - | - | <0.01 | - | - | <0.01 | <0.01 | - | <0.01 |
| NxS | 0.44 | 0.65 | <0.01 | - | - | <0.01 | - | - | 0.02 | <0.01 | - | <0.01 |

Κεφάλαιο 6^ο

Επίδραση της ενσωμάτωσης υπολειμμάτων μπρόκολου στην εδαφική μικροβιακή κοινότητα και δραστηριότητα και σύγκριση με μεθόδους χημικής απολύμανσης των εδαφών

Περίληψη

Η ενζυμική δραστηριότητα και η εδαφική αναπνοή του εδάφους στο οποίο εφαρμόστηκαν το υποκαπνιστικό metham sodium, το χημικό παράγωγο του αρωματικού ΓΚΣ γλουκοναστουρτίνη (GST), 2-φαινυλαίθυλ ισοθειοκυάνιο (PITC), και υπολείμματα καλλιέργειας μπρόκολου με ή χωρίς την προσθήκη μυροσινάσης διαφοροποιήθηκε σημαντικά. Η μικροβιακή αναπνοή, που εκτιμήθηκε μέσω της έκλυσης CO₂-C, μειώθηκε από 68 μέχρι 80% μετά την προσθήκη metham sodium και PITC τις πρώτες τρεις ημέρες μετά την εφαρμογή τους. Παρόμοια συμπεριφορά κατέδειξε και η υδρόλυση του FDA, που χρησιμοποιήθηκε ως δείκτης ευρείας ενζυμικής δραστηριότητας, σε μικρότερο όμως βαθμό. Αντίθετα, η μικροβιακή αναπνοή και η υδρόλυση του FDA ήταν 4.5 και 3 φορές περίπου μεγαλύτερη στο έδαφος τρεις ημέρες μετά την ενσωμάτωση υπολειμμάτων μπρόκολου με ή χωρίς την προσθήκη μυροσινάσης. Αυτό καταδεικνύει σαφώς ότι, η περιεκτικότητα των υπολειμμάτων σε γλυκοσινολικά οξέα δεν επηρεάζει αρνητικά την αθροιστική μικροβιακή δραστηριότητα στο έδαφος.

Η μεταβολή της λειτουργικής μικροβιακής κοινότητας στο έδαφος εκτιμήθηκε με τον ποσοτικό προσδιορισμό φωσφολιπιδίων στο έδαφος (PLFAs). Συνολικά ανιχνεύθηκαν, 16 φωσφολιπίδια μικροβιακής προέλευσης και τα οποία αντιστοιχούν σε Gram (-) βακτήρια (16:0, 18:1ω9cis, 18:1ω9trans, 16:1ω7, cy17:0, cy19:0, 3-OH14:0) Gram (+) βακτήρια (i15:0, a-15:0, 15:0, i-16:0, i-17:0, 17:0), πρωτόζωα (20:4ω6, 18:3ω9, 20:0) και μύκητες (18:2ω6,9). Όλοι οι μικροοργανισμοί στο έδαφος επηρεάστηκαν αρνητικά μετά την εφαρμογή του υποκαπνιστικού metham sodium. Η προσθήκη PITC επηρέασε αρνητικά 7 ημέρες μετά την εφαρμογή του, μόνο τους μύκητες, ενώ η βιομάζα των κατά Gram (-), (+) βακτηρίων και πρωτόζωων δεν διέφερε σε σύγκριση με τον μάρτυρα. Η αντίδραση των βακτηρίων στην εφαρμογή του metham sodium, εκδηλώθηκε με την αύξηση των κυκλοπρότυλο- φωσφολιπιδίων και την μείωση του λόγου trans/cis φωσφολιπιδίων. Η ενσωμάτωση στο έδαφος υπολειμμάτων μπρόκολου με η χωρίς μυροσινάση είχε ως αποτέλεσμα τη σημαντική αύξηση της βιομάζας όλων των ομάδων μικροοργανισμών στο έδαφος.

Εισαγωγή

Ο όρος «βιοαπολύμανση» συνδέθηκε αρχικά με τη χρήση του ευρέως φάσματος απολυμαντικού εδάφους, metham sodium που ανήκει στην κατηγορία των διθειοκαρβαμιδικών φυτοπροστατευτικών ουσιών. Η δράση του metham sodium οφείλεται στην παραγωγή ισοθειοκυανιούχου μεθυλίου κατά την επαφή του με το νερό και χρησιμοποιείται σε παγκόσμια κλίμακα για την αντιμετώπιση φυτοπαθογόνων εδαφογενών μυκήτων, εντόμων, νηματωδών και ζιζανίων (Matthiessen and Shackleton, 2005). Ωστόσο ο όρος «βιοαπολύμανση» χρησιμοποιήθηκε για να περιγράψει την επίσχεση της ανάπτυξης εδαφογενών φυτοπαθογόνων ασθενειών και εντόμων στο έδαφος ενσωματώνοντας σε αυτό, φυτομάζα Σταυρανθών τα οποία περιέχουν ΓΚΣ (Angus et al., 1994). Η «βιοαπολύμανση» βασίζεται στην υδρόλυση των ΓΚΣ, και στην παραγωγή ισοθειοκυανιούχων ενώσεων οι οποίες παρουσιάζουν τοξική δράση σε διάφορα παθογόνα εδάφους (Manici et al., 1997).

Μια πιο συστηματική προσέγγιση της εφαρμογής της «βιοαπολύμανσης» στα διάφορα συστήματα παραγωγής, αντικατέστησε πρόσφατα τις εμπειρικές προσεγγίσεις της μεθόδου, δίνοντας έτσι τη δυνατότητα μελέτης με μεγαλύτερη λεπτομέρεια των διαφόρων μηχανισμών που συνδέονται με αυτή την μέθοδο αντιμετώπισης των διαφόρων εχθρών και ασθενειών εδάφους (Kirkegaard and Matthiessen, 2004; Matthiessen and Shackleton, 2005). Βελτίωση και επιλογή των ειδών ως προς την περιεκτικότητά τους σε ΓΚΣ και βελτίωση του τρόπου ενσωμάτωσης των καλλιεργειών στο έδαφος, έδωσαν τη δυνατότητα έμμεσης εφαρμογής (μέσω της φυτομάζας) συγκεντρώσεων ΙΣΘ που πλησιάζουν αυτές που εφαρμόζονται με το metham sodium (Matthiessen and Shackleton, 2005; Matthiessen et al., 2004; Morra and Kirkegaard, 2002). Το 2-φαινυλαίθυλ-ισοθειοκυάνιο (PITC) αποτελεί το προϊόν υδρόλυσης του αρωματικού ΓΚΣ γλουκοναστουρτίνη (GST), η οποία απαντάται στο ριζικό σύστημα των φυτών της πλειοψηφίας των Σταυρανθών φυτών (Kirkegaard and Sarwar, 1998). Σε *in vitro* δοκιμές το PITC, παρουσιάζει ευρεία τοξικότητα τόσο σε βακτήρια όσο και σε μύκητες, με τους τελευταίους να είναι σχετικά πιο ευαίσθητοι στο μόριο αυτό (Sarwar et al., 1998; Smith and Kirkegaard, 2002). Ωστόσο η τοξικότητα του PITC όταν αυτό εφαρμόζεται στο έδαφος, μειώνεται σημαντικά και πιθανότατα συνδέεται με την προσρόφηση του στην οργανική ουσία του εδάφους και στη μειωμένη τάση ατμών του μορίου σε σχέση με το ισοθειοκυανιούχο μεθύλιο (Matthiessen and Shackleton, 2005).

Το μπρόκολο περιέχει σημαντικές ποσότητες ΓΚΣ, ειδικότερα στα βρώσιμα τμήματα του (Kushad et al., 1999). Προηγούμενες μελέτες έδειξαν ότι η ενσωμάτωση υπολειμμάτων μπρόκολου στο έδαφος μειώνουν το μόλυσμα του *V. Dahliae* (Ochiai et al., 2008; Subbarao et al., 1999). Ωστόσο, σε αυτά τα πειράματα δεν μετρήθηκε η συγκέντρωση στο έδαφος, των ΓΚΣ μετά την ενσωμάτωση των υπολειμμάτων μπρόκολου, αλλά ούτε και των προϊόντων υδρόλυσης τους για να διαπιστωθεί κατά πόσο αυτή η μείωση συνδέεται αυτούς τους παράγοντες.

Παρά το γεγονός ότι, τα περισσότερα υποκαπνιστικά εδάφους τα οποία χρησιμοποιούνται σήμερα παρουσιάζουν ευρύ φάσμα δράσης, η επίδραση τους σε οργανισμούς

μη-στόχους στο έδαφος είναι σχετικά άγνωστη εξαιτίας της έλλειψης αξιόπιστων μεθόδων που να επιτρέπουν την μελέτη επιδράσεων σε διαφορετικές ομάδες της εδαφικής μικροβιακής κοινότητας κατά τις προηγούμενες δεκαετίες (Ibekwe and Donald, 2004). Αλλαγές στη σύσταση της εδαφικής μικροβιακής κοινότητας κατά τη διαδικασία της απολύμανσης των εδαφών μπορεί να οδηγήσει σε αλλαγές ως προς την λειτουργική ποικιλότητα των μικροοργανισμών στο έδαφος. Οι μικροοργανισμοί στο έδαφος, διαδραματίζουν κομβικό ρόλο σχετικά με τη διατήρηση της αιφορίας και λειτουργικότητας του. Συμβάλλουν καθοριστικά στην ολοκλήρωση της ανακύκλωσης διαφόρων στοιχείων όπως για παράδειγμα του άνθρακα, του αζώτου και του θείου τα οποία και αποτελούν κύρια θρεπτικά στοιχεία των καλλιεργούμενων ειδών.

Η αξιολόγηση της μικροβιακής δραστηριότητας στο έδαφος πραγματοποιείται με την μέτρηση του ρυθμού της μεταβολικής διαδικασίας σε αυτό όπως για παράδειγμα, η παραγωγή διοξειδίου του άνθρακα, που αντιστοιχεί στην καταβολική αποδόμηση διάφορων οργανικών ενώσεων σε αεροβικές συνθήκες (Nannipieri et al., 2003). Ένας άλλος δείκτης προσδιορισμού της μικροβιακής δραστηριότητας στο έδαφος είναι η υδρόλυση του FDA από μια σειρά μη-εξειδικευμένων ενζύμων που παράγονται ευρέως από τους μικροοργανισμούς στο έδαφος, όπως είναι οι εστεράσες, πρωτεάσες και λιπάσες και τα οποία συμμετέχουν στην αποδόμηση της οργανικής ουσίας στο έδαφος (Adam and Duncan, 2001; Nannipieri et al., 2003). Ο προσδιορισμός των φωσφολιπιδίων των λιπαρών οξέων στο έδαφος έχει χρησιμοποιηθεί ως βιοδείκτης για την αξιολόγηση της επίδρασης διάφορων καλλιεργητικών πρακτικών στην εδαφική μικροβιακή κοινότητα (Zelles, 1999). Σε περιπτώσεις καταπόνησης των μικροοργανισμών στο έδαφος μετά από την εφαρμογή μιας καλλιεργητικής πρακτικής ή από ακραία καιρικά φαινόμενα, ή μετά από ρύπανση αυτοί αντιδρούν μεταβάλλοντας συνήθως τη σύσταση των φωσφολιπιδίων των μεμβρανών τους έτσι ώστε, να προσαρμοστούν καλύτερα στις νέες συνθήκες του περιβάλλοντος μέσω της λειτουργικότητας των μεμβρανών τους (Kaur et al., 2005).

Στόχος του κεφαλαίου αυτού ήταν η αξιολόγηση της επίδρασης της ενσωμάτωσης στο έδαφος υπολειμμάτων καλλιεργείας μπρόκολου με ή χωρίς την προσθήκη μυροσινάσης, και η σύγκριση με την επίδραση της εφαρμογής στο έδαφος του καπνιστικού metham sodium (MS) και του PITC, στην εδαφική μικροβιακή αναπνοή και ενζυμική δραστηριότητα καθώς επίσης και σε λειτουργικές ομάδες μικροοργανισμών μέσω του προσδιορισμού της συγκέντρωσης στο έδαφος, των μεθυλεστέρων των φωσφολιπιδίων των λιπαρών οξέων (PLFAs) των μικροοργανισμών του εδάφους.

Στα πλαίσια της επίτευξης των στόχων του Κεφαλαίου τέθηκαν οι παρακάτω υποθέσεις:

1. Η εφαρμογή στο έδαφος, MS και PITC επηρεάζουν αρνητικά τη μικροβιακή κοινότητα και δραστηριότητα σε αυτό.
2. Η ενσωμάτωση στο έδαφος, υπολειμμάτων μπρόκολου επηρεάζει αρνητικά τη μικροβιακή κοινότητα και δραστηριότητα σε αυτό.

3. Η προσθήκη μυροσινάσης στα υπολείμματα μπρόκολου πριν την ενσωμάτωση τους στο έδαφος, επηρεάζει αρνητικά την μικροβιακή κοινότητα και δραστηριότητα σε αυτό σε σύγκριση με την απ' ευθείας ενσωμάτωσή τους.

Υλικά και Μέθοδοι

Φυτικό υλικό και έδαφος

Η επίδραση της ενσωμάτωσης των υπολειμμάτων καλλιέργειας μπρόκολου στην μικροβιακή δραστηριότητα και στις λειτουργικές ομάδες μικροοργανισμών στο έδαφος, μελετήθηκε σε πειράματα μικροκόσμων σε φυτοδοχεία. Το έδαφος που χρησιμοποιήθηκε, συλλέχθηκε από τις εγκαταστάσεις του Ε.Θ.Ι.ΑΓ.Ε στη Λάρισα και χαρακτηρίστηκε ως αμμοπηλώδες (άμμος 64%, άργιλος 11%, ιλύς, 25%), με pH ίσο με 7.8 και περιεκτικότητα οργανικής ουσίας 1.2%, ενεργό CaCO_3 (5,17%), P (2 mg/kg ξβ), K (215 mg/kg ξβ) και Mg (265 mg/kg ξβ).

Σπορόφυτα της ποικιλίας μπρόκολου (*Brassica oleraceae* var *Italica*), Marathon, αναπτύχθηκαν σε φυτοδοχεία, των 12 L σε υπόστρωμα εδάφους:φυτοχώματος για 70 ημέρες. Στο μείγμα πριν την ενσωμάτωση προστέθηκε θειικό κάλιο (4.92g ανά φυτοδοχείο) και νιτρική αμμωνία (5.42g ανά φυτοδοχείο). Με προσοχή απομακρύνθηκαν από τα φυτά μπρόκολου τα νεαρότερα πλήρως ανεπτυγμένα φύλλα και αλέστηκαν σε αναμείκτη (blender) υψηλών ταχυτήτων έτσι ώστε να επιτευχθεί η μέγιστη δυνατή καταστροφή των φυτικών ιστών. Τα αλεσμένα υπολείμματα ενσωματώθηκαν στο έδαφος σε ποσότητα ίση με 15g/kg ξηρού εδάφους (**B**). Η ίδια ποσότητα υπολειμμάτων ενσωματώθηκε στο έδαφος αφού όμως προηγουμένως στα υπολείμματα της καλλιέργειας προστέθηκαν 10ml μυροσινάσης (0.32U ml⁻¹ Sigma-Aldrich, Germany) και αναμίχθηκαν με 1 kg εδάφους τρεις ώρες αργότερα (**BM**). Προηγούμενες μελέτες στο εργαστήριο έδειξαν ότι, προσθήκη μυροσινάσης σε αλεσμένα υπολείμματα φύλλων μπρόκολου προκαλεί πλήρη υδρόλυση των ΓΚΣ και παραγωγή ΙΣΘ. Με τον τρόπο αυτό στο έδαφος ενσωματώθηκαν υπολείμματα μπρόκολου χωρίς την παρουσία ΓΚΣ. Ακολούθως το έδαφος στο οποίο έγινε η ενσωμάτωση των υπολειμμάτων της καλλιέργειας μεταφέρθηκε σε φυτοδοχείο των 2 L και προσαρμόστηκε η υγρασία του εδάφους με την προσθήκη σε αυτό απιονισμένου νερού έτσι ώστε να είναι ίση με το 45% της υδατοχωρητικότητας του.

Η επίδραση του PITC και του MS στην σύσταση της μικροβιακής κοινότητας και της μικροβιακής δραστηριότητας μελετήθηκε στο ίδιο πείραμα. Συγκεκριμένα, **PITC** προστέθηκε σε 1 kg εδάφους σε μορφή υδατικού διαλύματος συγκέντρωσης 200μg/ml έτσι ώστε η τελική συγκέντρωση στο έδαφος να είναι 10mg/kg. Το εμπορικό υποκαπνιστικό σκεύασμα metham sodium (**MS**) το οποίο κατά την υδρόλυση του στο έδαφος, παράγει την τοξική ουσία ισοθειοκυανιούχο μεθύλιο, εφαρμόστηκε με διαφορετικό τρόπο για σκοπούς ασφάλειας. Συγκεκριμένα, το MS και επιπλέον απιονισμένο νερό (για την προσαρμογή της εδαφικής υγρασίας στο 45% της υδατοχωρητικότητας) προστέθηκαν στο έδαφος και αμέσως μετά τα φυτοδοχεία καλύφθηκαν με διαφανές πλαστικό εδαφοκάλυψης έτσι ώστε να μειωθεί η εξάτμιση της δραστικής ουσίας του σκευάσματος. Το MS εφαρμόστηκε υπό τη μορφή υδατικού διαλύματος συγκέντρωσης 10,000 mg/L που ετοιμάστηκε από το σκεύασμα Varan 51SL. Η συγκέντρωση του MS στο έδαφος μετά την εφαρμογή του ήταν ίση με την προτεινόμενη από την

κατασκευάστρια εταιρεία (300μg/g εδάφους) για τον έλεγχο εδαφογενών παθογόνων. Το πλαστικό που τοποθετήθηκε στα φυτοδοχεία απομακρύνθηκε με την πάροδο 14 ημερών από την εφαρμογή του MS ενώ μετά την απομάκρυνση του το έδαφος αναμοχλεύθηκε έτσι ώστε να εξασφαλιστεί η εξάτμιση της εναπομείνουσας ποσότητας ισοθειοκυανιούχου μεθυλίου. Τέλος 1kg εδάφους στο οποίο δεν έγινε καμιά εφαρμογή εκτός από την προσαρμογή της υγρασίας του με αποιονισμένο νερό στο 45% της υδατοχωρητικότητας χρησιμοποιήθηκε ως μάρτυρας.

Εκτίμηση ενζυμικής μικροβιακής δραστηριότητας (υδρόλυση FDA)

Η εκτίμηση της μη εξειδικευμένης ενζυμικής μικροβιακής δραστηριότητας πραγματοποιήθηκε με τη μέθοδο προσδιορισμού της υδρόλυσης του FDA σύμφωνα όπως αυτή περιγράφεται στο 2^ο Κεφάλαιο της παρούσας διατριβής (Ntougias et al., 2006). Δειγματοληψία για τον προσδιορισμό της υδρόλυσης του FDA πραγματοποιήθηκε 3, 15 και 60 ημέρες μετά από την εφαρμογή των μεταχειρίσεων.

Μικροβιακή αναπνοή στο έδαφος.

Η παραγωγή διοξειδίου του άνθρακα, και ο ποσοτικός προσδιορισμός του μέσω τιτλοδότησης μετά από παγίδευση του σε υδροξείδιο του νατρίου χρησιμοποιήθηκε για την αξιολόγηση της μικροβιακής αναπνοής στο έδαφος σύμφωνα με την μέθοδο που περιγράφεται στο 1^ο Κεφάλαιο της παρούσας διατριβής. Η ποσότητα CO₂ που παγιδεύτηκε στο NaOH μετρήθηκε 1, 2, 3, 7, 15, 30 και 60 ημέρες μετά την εφαρμογή των μεταχειρίσεων.

Προσδιορισμός φωσφολιπιδίων των λιπαρών οξέων στο έδαφος.

Ο προσδιορισμός των φωσφολιπιδίων στο έδαφος πραγματοποιήθηκε με την μέθοδο που περιγράφεται στο 2^ο Κεφάλαιο της παρούσας διατριβής, ενώ δείγματα από το έδαφος στο οποίο εφαρμόστηκαν οι διάφορες μεταχειρίσεις, λήφθηκαν 7, 15 και 60 ημέρες μετά την εφαρμογή τους.

Στατιστική Ανάλυση αποτελεσμάτων

Οι συγκεντρώσεις των μεθυλεστέρων των φωσφολιπιδίων (PLFAs) που ανιχνεύθηκαν στα διάφορα δείγματα εδάφους προσαρμόστηκαν με βάση το μοριακό βάρος του κάθε PLFA σε μονάδες nmol/g εδάφους. Τα δεδομένα αυτά στη συνέχεια αναλύθηκαν με μεθόδους ανάλυσης πολυμεταβλητών δεδομένων (multivariate analysis) και ειδικότερα με την μέθοδο Ανάλυσης σε Κύριες Συνιστώσες (Principal Component Analysis) που είναι ιδανική για τη μείωση του αριθμού των εξαρτημένων μεταβλητών σε ομάδες δεδομένων που περιέχουν μεγάλο αριθμό εξαρτημένων μεταβλητών και οι οποίες πιθανόν παρουσιάζουν γραμμική συσχέτιση μεταξύ τους. Οι τιμές των δύο Κυριότερων Συνιστωσών (principal components, PC) που εμπεριέχουν και το μεγαλύτερο μέρος της παραλλακτικότητας των δεδομένων χρησιμοποιήθηκαν για την ετοιμασία

διαγραμμάτων ώστε να διαφανεί η ομαδοποίηση των δειγμάτων με βάση τις ανεξάρτητες μεταβλητές που στην προκειμένη περίπτωση ήταν οι διάφορες μεταχειρίσεις και ο χρόνος δειγματοληψίας.

Για τις μεταβλητές της μικροβιακής αναπνοής και της υδρόλυσης του FDA έγινε ανάλυση διακύμανσης (ANOVA) και πολλαπλές συγκρίσεις των μέσων έγιναν με βάση το κριτήριο Tukey-Kramer HSD (Honestly Significant Difference, $\alpha = 0.05$). Χρησιμοποιήθηκε το στατιστικό πακέτο STATISTICA 7.

Αποτελέσματα – Συζήτηση

Μικροβιακή αναπνοή

Η μικροβιακή αναπνοή στο έδαφος, επηρεάστηκε σημαντικά από τις μεταχειρίσεις, το χρόνο δειγματοληψίας και από την αλληλεπίδραση των δυο αυτών παραγόντων ($p < 0.001$). Η μικροβιακή αναπνοή ήταν σημαντικά υψηλότερη όταν σε αυτό ενσωματώθηκαν υπολείμματα μπρόκολου με προ-προσθήκη (**BM**) ή χωρίς προ-προσθήκη μυροσινάσης (**B**), σε σχέση με τον μάρτυρα (Πίνακας 6.1). Μετά την πάροδο 15 ημερών από την ενσωμάτωση υπολειμμάτων μπρόκολου, και 7 ημερών από την ενσωμάτωση υπολειμμάτων μπρόκολου με μυροσινάση η μικροβιακή αναπνοή δεν διέφερε σημαντικά σε σχέση με τον μάρτυρα (Πίνακας 6.1).

Από την άλλη πλευρά, η εφαρμογή στο έδαφος των υποκαπνιστικών metham sodium και PITC είχε ως αποτέλεσμα την σημαντική μείωση της μικροβιακής αναπνοής του εδάφους, σε σύγκριση με τον μάρτυρα. Συγκεκριμένα η προσθήκη metham sodium προκάλεσε μείωση της μικροβιακής αναπνοής μέχρι και 15 ημέρες μετά την εφαρμογή σε αντίθεση με το PITC όπου σημαντική μείωση της μικροβιακής αναπνοής προκλήθηκε μέχρι και 3 ημέρες μετά την εφαρμογή (Πίνακας 6.1). Από τις 30 ημέρες και μέχρι την τελευταία δειγματοληψία, η μικροβιακή αναπνοή του εδάφους ανά ημέρα, δεν διέφερε σημαντικά μεταξύ των διαφόρων μεταχειρίσεων (Πίνακας 6.1). Παρόμοια αποτελέσματα με αυτά που βρέθηκαν στην παρούσα εργασία, όσον αφορά την μικροβιακή αναπνοή του εδάφους παρατηρήθηκαν και από άλλους ερευνητές μετά την ενσωμάτωση σε αυτό φυτικών υπολειμμάτων τις πρώτες ημέρες μετά την εφαρμογή τους (Luxhoi et al., 2006; Puget and Drinkwater, 2001; Ros et al., 2006; Sánchez-Monedero et al., 2008; Tirol-Padre et al., 2007). Η αύξηση της παραγωγής διοξειδίου του άνθρακα στο έδαφος, αντιπροσωπεύει την ολική μικροβιακή δραστηριότητα του εδάφους και η ένταση της εξαρτάται από τη διαθεσιμότητα του υποστρώματος και τις διάφορες αλλαγές που επισυμβαίνουν στη φυσιολογία και σύσταση της μικροβιακής κοινότητας στις διάφορες περιβαλλοντικές συνθήκες (Nannipieri et al., 1990). Η μικροβιακή αναπνοή στο έδαφος μετά την προσθήκη υπολειμμάτων μπρόκολου αυξήθηκε παρουσιάζοντας συμπεριφορά παρόμοια με αυτή που παρατηρείται με άλλα φυτικά υπολείμματα παρόλο που τα υπολείμματα μπρόκολου περιέχουν στους ιστούς τους σημαντικές ποσότητες ΓΚΣ. Η προσθήκη οργανικών υποστρωμάτων στο έδαφος, κυρίως κυτταρινών και σακχάρων, που προέρχονται από φυτικά υπολείμματα όπως για παράδειγμα το μπρόκολο, μπορεί να χρησιμοποιηθούν εύκολα ως υποστρώματα από τους μικροοργανισμούς στο έδαφος, με αποτέλεσμα να αυξάνει η μικροβιακή αναπνοή (Heal et al., 1997). Από τα αποτελέσματα φαίνεται ότι, από την υδρόλυση των ΓΚΣ που περιέχονται στους ιστούς μπρόκολου δεν παράγονται σημαντικές ποσότητες ΙΣΘ που να προκαλούν αναστολή ή μείωση της μικροβιακής αναπνοής στο έδαφος. Η χαμηλότερη αναπνευστική δραστηριότητα του εδάφους και η ταχύτερη επαναφορά της δραστηριότητας αυτής στις φυσιολογικές τιμές του μάρτυρα για την επέμβαση **BM** σε σύγκριση με την **B**, δείχνει ότι η προσθήκη μυροσινάσης στα υπολείμματα του μπρόκολου πριν την ενσωμάτωσή τους στο έδαφος πιθανά δεν οδήγησε στην απελευθέρωση

και απώλεια ισοθιοκυανικών ενώσεων προ της ενσωμάτωσης, αλλά βελτίωσε την απελευθέρωσή τους στο έδαφος, μειώνοντας την αναπνευστική δραστηριότητα σε σύγκριση με την απ' ευθείας ενσωμάτωση υπολειμμάτων μπρόκολου.

Υδρόλυση του FDA

Η υδρόλυση του FDA επηρεάστηκε σημαντικά από τις μεταχειρίσεις, το χρόνο δειγματοληψίας και από την αλληλεπίδραση τους ($p < 0.001$). Παρόμοια με τη μικροβιακή αναπνοή στο έδαφος, η προσθήκη υπολειμμάτων μπρόκολου με ή χωρίς προ-προσθήκη μυροσινάσης, είχε ως αποτέλεσμα τη σημαντική αύξηση της υδρόλυσης του FDA στο έδαφος. Τρεις ημέρες μετά την έναρξη του πειράματος, η υδρόλυση του FDA ήταν σημαντικά υψηλότερη στο έδαφος όπου ενσωματώθηκε μπρόκολο σε σχέση με τον μάρτυρα (ιδιαίτερα όταν είχε προστεθεί στα υπολείμματα του μπρόκολου μυροσινάση), ενώ χαμηλότερη τιμή βρέθηκε στις μεταχειρίσεις υποκαπνισμού του εδάφους με metham sodium και PITC (Διάγραμμα 6.1). Η ενσωμάτωση του μπρόκολου χωρίς μυροσινάση (**B**) εμφάνισε καθυστερημένη κορυφή στην υδρόλυση του FDA στις 15 ημέρες συγκριτικά με την εφαρμογή μπρόκολου με μυροσινάση (**B**, 3 ημέρες).

Με την πάροδο του χρόνου, η υδρόλυση του FDA στο έδαφος όπου εφαρμόστηκαν τα υποκαπνιστικά αυξήθηκε δραματικά, αντίστροφα με την αρχική της μείωση (Διάγραμμα 6.1). Η αύξηση της μικροβιακής δραστηριότητας στο έδαφος, μετά την ενσωμάτωση οργανικών υπολειμμάτων παρατηρήθηκε και από άλλους ερευνητές (Dinesh et al., 1998; Elfstrand et al., 2007; Stark et al., 2008). Η περιεκτικότητα των υπολειμμάτων μπρόκολου σε γλυκοσινολικά οξέα και η υδρόλυση τους στα αντίστοιχα ΙΣΘ φαίνεται ότι δεν επιδρούν αρνητικά στην μικροβιακή δραστηριότητα του εδάφους στο οποίο ενσωματώθηκαν. Η υδρόλυση των ΓΚΣ από το ένζυμο μυροσινάση έχει ως αποτέλεσμα την παραγωγή ΙΣΘ οι οποίες είναι τοξικές τόσο σε μύκητες όσο και σε βακτήρια (Angus et al., 1994; Manici et al., 1997). Όμως, σύμφωνα και με άλλες αναφορές, η ενσωμάτωση υπολειμμάτων μπρόκολου στο έδαφος, είχε ως αποτέλεσμα τη σημαντική αύξηση της υδρόλυσης του FDA αλλά και της μικροβιακής βιομάζας (Ochiai et al., 2008).

Η μικρότερη επίδραση στην υδρόλυση του FDA παρατήθηκε στο έδαφος όπου εφαρμόστηκε το PITC όπου δεν παρατηρήθηκε σημαντική διαφορά σε σχέση με τον μάρτυρα (Διάγραμμα 6.2). Η μικροβιακή δραστηριότητα με την πάροδο 60 ημερών από την εφαρμογή των διαφόρων μεταχειρίσεων δεν μεταβλήθηκε σημαντικά σε σχέση με τον μάρτυρα εκτός από το **MS** και τη **BM**. Σε αυτές τις μεταχειρίσεις η υδρόλυση του FDA ήταν στατιστικά σημαντικά υψηλότερη από τις υπόλοιπες μεταχειρίσεις (Διάγραμμα 6.1).

Η προσθήκη μυροσινάσης στα υπολείμματα μπρόκολου (**BM**) πριν την ενσωμάτωση τους στο έδαφος, είχε ως αποτέλεσμα την ταχύτερη και μεγαλύτερη αύξηση της υδρόλυσης του FDA σε σχέση με την απλή ενσωμάτωση υπολειμμάτων μπρόκολου χωρίς την προσθήκη

μυροσινάσης (**B**), ενώ είχε το αντίθετο αποτέλεσμα για τις δύο αυτές επεμβάσεις όσον αφορά στην μικροβιακή αναπνοή. Μετά την ενσωμάτωση στο έδαφος, διαφορετικών οργανικών υπολειμμάτων παρατηρήθηκε διαφορετική συμπεριφορά ως προς την υδρόλυση του FDA (Ochiai et al., 2008). Η υδρόλυση του FDA μπορεί να πραγματοποιηθεί από μη εξειδικευμένα ένζυμα που βρίσκονται στο έδαφος όπως είναι οι εστεράσες, οι λιπάσες και πρωτεάσες (Adam and Duncan, 2001). Η διαφορά η οποία παρατηρήθηκε κυρίως μεταξύ των μεταχειρίσεων του μπρόκολου με και χωρίς μυροσινάση μπορεί να οφείλεται στη πειραματική διαδικασία, αφού τα υπολείμματα μπρόκολου με μυροσινάση αφήθηκαν τρεις ώρες πριν την ενσωμάτωσή τους, έτσι ώστε να πραγματοποιηθεί πλήρως η υδρόλυση των ΓΚΣ. Η άμεση αύξηση της υδρόλυσης του FDA κατά την εφαρμογή υπολειμμάτων μπρόκολου, πιθανό να οφείλεται στην ελευθέρωση εστερασών ή άλλων μη εξειδικευμένων ενζύμων φυτικής προέλευσης και τα οποία υδρολύουν το FDA. Έχει επιπλέον δειχθεί στο παρελθόν, ότι εξωκυτταρικά ένζυμα προσκολλώνται στα κολλοειδή της αργίλου και ακόμη σε ακραία περιβάλλοντα παραμένουν λειτουργικά (Nannipieri et al., 2003) γεγονός που εξηγεί την μακροπρόθεσμη παρατήρηση αυξημένης υδρόλυσης FDA, μετά την 3^η ημέρα, στην επέμβαση αυτή. Παρόμοια παρατεταμένη δράση εστερασών, που δεν δικαιολογείται από την μικροβιακή αναπνοή, έχει παρατηρηθεί και στο τέλος θερμόφιλων φάσεων κομποστοποίησης (Ntougias et al., 2006)

PLFAs

Οι μεθυλεστέρες των λιπαρών οξέων των φωσφολιπιδίων (PLFAs), των κυτταρικών μεμβρανών των μικροοργανισμών στο έδαφος, έχουν χρησιμοποιηθεί ως βιοδείκτες για την αξιολόγηση της επίδρασης στην εδαφική μικροβιακή κοινότητα διάφορων καλλιεργητικών πρακτικών (Kaur et al., 2005; Ramsey et al., 2006). Στην παρούσα εργασία προσδιορίστηκαν, συνολικά 22 φωσφολιπίδια εκ των οποίων τα 16 ήταν μικροβιακής προέλευσης και ταυτοποιήθηκαν με την χρήση GC-MS και των αντίστοιχων προτύπων μιγμάτων μεθυλεστέρων λιπαρών οξέων. Στον Πίνακα 6.2 παρουσιάζονται τα λιπαρά οξέα που ανιχνεύθηκαν και ταυτοποιήθηκαν με τη συντομογραφησή τους, καθώς και η ομάδα μικροοργανισμών στην οποία απαντώνται σύμφωνα με την βιβλιογραφία.

Η στατιστική ανάλυση των αποτελεσμάτων σε δυο κύριες συνιστώσες (Principal Components Analysis) ως προς τις επεμβάσεις φαίνεται στο Διάγραμμα 6.2. Οι μεταχειρίσεις διαχωρίζονται ως προς την πρώτη κύρια συνιστώσα (PC1) σε δύο ομάδες. Συγκεκριμένα η πρώτη ομάδα αφορά τα εδάφη στα οποία ενσωματώθηκε μπρόκολο με ή χωρίς μυροσινάση και παρουσιάζουν αρνητικές τιμές ως προς την PC1. Αντίθετα ο μάρτυρας, και οι μεταχειρίσεις P1TC, ομαδοποιούνται σε ελαφρά θετικές τιμές ως προς την PC1 και η μεταχείριση με MS καταλαμβάνει μεγαλύτερο εύρος και τείνει σε ακόμα θετικότερες τιμές. Σε όλες τις περιπτώσεις, ο διαχωρισμός των διαφόρων μεταχειρίσεων στις δυο αυτές ομάδες δεν λαμβάνει υπόψη το χρόνο

δειγματοληψίας (Διάγραμμα 6.2). Όταν λαμβάνεται υπ' όψιν και ο χρόνος δειγματοληψίας η εικόνα γίνεται πιο σαφής.

Η επίδραση του χρόνου δειγματοληψίας στη διαφοροποίηση των συγκεντρώσεων των PLFAs ανάμεσα στις μεταχειρίσεις ήταν σημαντική. (Διάγραμμα 6.4). Στις επτά ημέρες από το χρόνο εφαρμογής των μεταχειρίσεων, αυτές διαχωρίζονται καθαρά ως προς την πρώτη κύρια συνιστώσα (PC1, Διάγραμμα 6.4). Έτσι κατά την PC1 διαφοροποιούνται καθαρά τρεις ομάδες ως προς την ποσοτική σύνθεση των PLFAs, οι επεμβάσεις που περιέχουν υπολείμματα μπρόκολου (με ή χωρίς μυροσινάση), η επέμβαση με metham sodium που βρίσκονται στον αντίποδα των επεμβάσεων με μπρόκολο, και ο μαρτυρας, μαζί με την επέμβαση με PITC που βρίσκονται σε ενδιάμεση θέση. Στις 15 ημέρες παρουσιάζεται παρόμοια κατανομή ως προς την PC1, αλλά με μικρότερο εύρος: Οι μεταχειρίσεις B και BM, παραμένουν ομαδοποιημένες, το MS εξακολουθεί να κατανέμεται στον αντίποδα τους και ξεχωριστά από όλες τις υπόλοιπες μεταχειρίσεις. Όμως παρατηρείται μια παράλληλη μετακίνηση όλων των μεταχειρίσεων ως προς τον άξονα PC2, ο οποίος προφανώς εκφράζει μεταβολές ως προς το χρόνο μέσα σε κάθε επέμβαση και όχι διαφοροποιήσεις μεταξύ επεμβάσεων οι οποίες εκφράζονται από τον PC1. Στα εδάφη στα οποία δεν εφαρμόστηκε καμιά μεταχείριση (μάρτυρας) και στα εδάφη όπου εφαρμόστηκε το PITC, οι μεταχειρίσεις εξακολουθούν να παραμένουν στην ίδια ομάδα, δεν μετακινούνται ως προς την PC2 και οι τιμές τους συγκεντρώνονται ακόμα πιο κοντά (Διάγραμμα 6.4). Κατά τη τελευταία δειγματοληψία, φαίνεται ότι όλες οι μεταχειρίσεις δεν διαχωρίζονται σε ομάδες γεγονός που υποδηλώνει το πέρας της δραστηριότητας των επεμβάσεων στο χρόνο αυτό.

Από τα αποτελέσματα προκύπτει ότι, τόσο η ενσωμάτωση μπρόκολου με ή χωρίς μυροσινάση, όσο και ο υποκαπνισμός του εδάφους, επιδρούν σημαντικά στα φωσφολιπίδια των μικροοργανισμών του εδάφους. Η ίδια συμπεριφορά παρατηρήθηκε και κατά τη μέτρηση της μικροβιακής αναπνοής, του εδάφους. Η συσχέτιση της συγκέντρωσης των φωσφολιπιδίων των μικροοργανισμών και της μικροβιακής αναπνοής του εδάφους, ήταν σημαντική και υψηλή ($r > 0.70$, $n = 15$). Ωστόσο η επίδραση των διαφόρων μεταχειρίσεων στα φωσφολιπίδια του εδάφους, ήταν διαφορετική μεταξύ των μεταχειρίσεων. Τελικά, η μικροβιακή κοινότητα ανακάμπτει 60 ημέρες από την εφαρμογή εκτός από το PITC το οποίο δεν είχε σημαντική επίδραση στα φωσφολιπίδια των μικροοργανισμών του εδάφους.

Ακολούθως περιγράφεται η επίδραση των μεταχειρίσεων στις διάφορες ομάδες μικροοργανισμών του εδάφους σε σχέση με το χρόνο, όπως αυτές εκτιμώνται από την συγκέντρωση των αντίστοιχων εκχυλίσμων PLFAs,:

1) Πρωτόζωα

Η επίδραση των διαφορετικών μεταχειρίσεων, του χρόνου δειγματοληψίας και η αλληλεπίδραση τους, στην βιομάζα των πρωτόζωων ήταν στατιστικά σημαντική σε επίπεδο $p < 0.001$. Η βιομάζα των πρωτόζωων δεν επηρεάστηκε από την εφαρμογή του PITC, αφού δεν

παρατηρήθηκαν στατιστικά σημαντικές διαφορές σε σχέση με τον μάρτυρα (Διάγραμμα 6.5). Η ενσωμάτωση υπολειμμάτων μπρόκολου με ή χωρίς μυροσινάση είχε ως αποτέλεσμα την σημαντική αύξηση της βιομάζας των πρωτόζωων στο έδαφος 7 ημέρες μετά την ενσωμάτωση τους και μειώθηκε σταδιακά μέχρι το τέλος του πειράματος αλλά διατηρήθηκε σημαντικά υψηλότερη από τις υπόλοιπες μεταχειρίσεις (Διάγραμμα 5.5). Η εφαρμογή MS στο έδαφος είχε ως αποτέλεσμα τη δραστική μείωση της βιομάζας των πρωτόζωων στο έδαφος, ωστόσο φαίνεται ότι ο πληθυσμός τους στο έδαφος, τείνει να επανέρχεται σε φυσιολογικά επίπεδα και δεν διέφερε στατιστικά σημαντικά από τον μάρτυρα 60 ημέρες μετά την εφαρμογή του MS (Διάγραμμα 6.5).

2) Gram αρνητικά και θετικά βακτήρια

Όπως και στην περίπτωση των πρωτόζωων, η επίδραση όλων των μεταχειρίσεων εκτός του μάρτυρα και του PITC ήταν σημαντική σε επίπεδο $p=0.05$ στη βιομάζα των αρνητικών κατά Gram βακτηρίων. Η εφαρμογή υπολειμμάτων μπρόκολου χωρίς την προσθήκη μυροσινάσης είχε ως αποτέλεσμα στη μεγάλη αύξηση της βιομάζας των Gram αρνητικών βακτηρίων 7 ημέρες μετά την ενσωμάτωση, ωστόσο η βιομάζα αυτή μειώθηκε σταδιακά με την πάροδο του χρόνου. Παρόμοια συμπεριφορά παρατηρήθηκε και στην περίπτωση της ενσωμάτωσης υπολειμμάτων μπρόκολου με μυροσινάση, ωστόσο αυτή ήταν σημαντικά μικρότερη στις 7 ημέρες από την ενσωμάτωση των υπολειμμάτων μπρόκολου χωρίς μυροσινάση αν και παρέμενε σημαντικά μεγαλύτερη από τις υπόλοιπες μεταχειρίσεις (Διάγραμμα 6.6). Όμως η βιομάζα των Gram (-) αυξήθηκε σημαντικά στις 15 ημέρες στη μεταχείριση BM, παρουσιάζοντας μια καθυστερημένη κορύφωση ενδεικτική σχετικής αρχικής βιοτοξικότητας ενώ 60 ημέρες μετά επανήλθε στα ίδια επίπεδα με αυτά που βρέθηκαν κατά την πρώτη δειγματοληψία (7 ημέρες μετά την εφαρμογή).. Ανεξάρτητα από την εφαρμογή μυροσινάσης στα υπολείμματα μπρόκολου, η βιομάζα των Gram (-) 60 ημέρες μετά την εφαρμογή τους, παρέμενε σημαντικά μεγαλύτερη από τις υπόλοιπες μεταχειρίσεις. Η εφαρμογή MS είχε καταλυτική επίδραση στην βιομάζα των Gram (-), ωστόσο η βιομάζα τους ανακτήθηκε 15 ημέρες μετά την εφαρμογή του υποκαπνιστικού (Διάγραμμα 6.6).

Παρόμοια συμπεριφορά παρατηρήθηκε και στα Gram (+) όπου, η εφαρμογή MS είχε δραστική επίδραση στη βιομάζα τους και η οποία επανήλθε στα ίδια επίπεδα με αυτά του μάρτυρα, 60 ημέρες μετά την εφαρμογή σε σύγκριση με το συντομότερο διάστημα των 15 ημερών που χρειάστηκε η κοινότητα των Gram αρνητικών βακτηρίων (Διάγραμμα 6.7). Η ενσωμάτωση στο έδαφος μπρόκολου με ή χωρίς μυροσινάση είχε ως αποτέλεσμα την αύξηση της βιομάζας των Gram (+) βακτηρίων, και όπως και στην περίπτωση των Gram (-) βακτηρίων παρουσιάστηκε καθυστερημένη κορύφωση για την επέμβαση BM στις 15 ημέρες μετά την εφαρμογή. (Διάγραμμα 6.7). Με την πάροδο 60 ημερών από την εφαρμογή των μεταχειρίσεων η βιομάζα των Gram (+) βακτηρίων δεν διέφερε μεταξύ των μεταχειρίσεων εκτός από τη μεταχείριση **BM**. Συγκεκριμένα η βιομάζα των Gram (+) βακτηρίων ήταν σημαντικά μεγαλύτερη από τη βιομάζα που βρέθηκε στο μάρτυρα, το **MS** και το **PITC** ενώ, δεν διέφερε σημαντικά από

αυτή που βρέθηκε στο έδαφος μετά την ενσωμάτωση υπολειμμάτων μπρόκολου χωρίς την προσθήκη μυροσινάσης (Διάγραμμα 5.7). Γενικά η συμπεριφορά των βακτηρίων είναι παρόμοια με αυτή των πρωτόζωων και είναι αναμενόμενη, αφού τα βακτήρια αποτελούν τροφή για τα πρωτόζωα. Έτσι μείωση του πληθυσμού των βακτηρίων οδηγεί σε ταυτόχρονη μείωση του πληθυσμού των πρωτόζωων λόγω έλλειψης τροφής, και ο αντίστροφο. Όμως τα πρωτόζωα και η δράση τους επί των βακτηρίων επηρεάζονται από παράγοντες που προκαλούν άμεση τοξικότητα σε αυτά (Cox et al., 1999). Είναι δύσκολο να διαχωρίσει κανείς την απόδοση των πληθυσμιακών διακυμάνσεων των πρωτόζωων σε απευθείας επίδραση των επεμβάσεων ή σε έμμεση επίδραση μέσω της διακύμανσης των πληθυσμών των βακτηρίων. Πιθανότατα λόγω του οικολογικού τους ρόλου, ακολουθούσαν ως αρπακτικά την αύξηση των βακτηρίων χωρίς να επωφελούνται άμεσα από τη διαθεσιμότητα υποστρώματος (υπολείμματα μπρόκολου) αλλά δέχονταν άμεσα την τοξική επίδραση του MS.

3) Μύκητες

Οι μύκητες επηρεάστηκαν σημαντικά στην πάροδο του χρόνου από τις διάφορες μεταχειρίσεις που εφαρμόστηκαν σε επίπεδο $p=0.05$. Η εφαρμογή **PITC** δεν είχε στατιστικά σημαντική αρνητική επίδραση στη βιομάζα των μυκήτων αν και ήταν εμφανής μια τάση μείωσης σε σχέση με το μάρτυρα στις 7 ημέρες μετά την εφαρμογή (Διάγραμμα 6.8). Η επίδραση της εφαρμογής του **MS** στη βιομάζα των μυκήτων ήταν καταλυτική, αφού μειώθηκε δραματικά σε σχέση με τον μάρτυρα, 7 και 15 ημέρες μετά την εφαρμογή, όμως μετά από 60 ημέρες η βιομάζα είχε επανέλθει και δεν διέφερε σημαντικά από τον μάρτυρα (Διάγραμμα 6.8). Η ενσωμάτωση στο έδαφος, υπολειμμάτων μπρόκολου, είχε ως αποτέλεσμα την αύξηση της βιομάζας των μυκήτων, 7 ημέρες μετά την εφαρμογή (Διάγραμμα 6.8) που μειώθηκε όμως σταδιακά μέχρι τις 60 ημέρες μετά την εφαρμογή αλλά παρέμενε μεγαλύτερη από το μάρτυρα. Αντίστροφα η προσθήκη στα υπολείμματα μπρόκολου, μυροσινάσης ενώ δεν είχε σημαντική επίδραση στη βιομάζα των μυκήτων σε σύγκριση με τον μάρτυρα μέχρι και 15 ημέρες μετά την εφαρμογή τους, οδήγησε και πάλι σε καθυστερημένη κορύφωση 60 ημέρες μετά την ενσωμάτωση των υπολειμμάτων, και η διαφορά αυτή ήταν σημαντικά μεγαλύτερη από όλες τις μεταχειρίσεις.

Η εφαρμογή χλωρής λίπανσης διαφόρων μορφών, είχε ως αποτέλεσμα την μεταβολή στη σύσταση των φωσφολιπιδίων στο έδαφος (Bossio et al., 1998; Elfstrand et al., 2007). Οι ίδιοι ερευνητές παρατήρησαν ότι, η σύσταση του εδάφους, σε φωσφολιπίδια μεταβλήθηκε σημαντικά σε σχέση με το χρόνο και η μεταβολή αυτή συνδέθηκε με την ενσωμάτωση στο έδαφος χλωρής λίπανσης. Παρόμοια αποτελέσματα βρέθηκαν και σε πειράματα σύγκρισης συστημάτων παραγωγής γεωργικών προϊόντων, όπου τα φωσφολιπίδια μεταβλήθηκαν σημαντικά τόσο στο χρόνο όσο και με τις διάφορες καλλιεργητικές πρακτικές οι οποίες εξετάστηκαν, ανάμεσα τους και η ενσωμάτωση φυτικών υπολειμμάτων (Bossio et al., 1998).

Η εφαρμογή του **MS** από την άλλη είχε και καταλυτική ποιοτική επίδραση στην εδαφική μικροβιακή κοινότητα 7 και 15 ημέρες αφού ο λόγος των μυκήτων προς τα βακτήρια ήταν σημαντικά χαμηλότερος από όλες τις υπόλοιπες μεταχειρίσεις. Ωστόσο, ο λόγος αυτός αυξήθηκε 60 ημέρες μετά την εφαρμογή, υποδηλώνοντας ότι η μικροβιακή βιομάζα επανήλθε στα φυσιολογικά επίπεδα, αφού δεν παρατηρήθηκαν σημαντικές διαφορές σε σχέση με τον μάρτυρα. Τα αποτελέσματα της παρούσας εργασίας επιβεβαιώνουν προηγούμενες μελέτες που έχουν δείξει ότι το **MS** προκαλεί σημαντικές μεταβολές στην μικροβιακή κοινότητα που μπορεί να διατηρηθούν για τουλάχιστον 18 εβδομάδες (Macalady et al., 1998). Η Ibekwe et al., (2001) έδειξαν ότι η επίδραση του metham sodium ήταν άμεση αλλά η μικροβιακή κοινότητα του εδάφους επανέκαμψε σε σύσταση ανάλογη του μάρτυρα ύστερα από 8-12 εβδομάδες.

Η εφαρμογή PITC, είχε ως αποτέλεσμα τη άμεση σημαντική μείωση του λόγου, της βιομάζας των μυκήτων προς τα βακτήρια, και αυτό συνδέεται με την τοξική επίδραση που παρουσιάζει το μόριο στους μύκητες (Smith and Kirkegaard, 2002). Με την πάροδο 15 ημερών μετά την εφαρμογή, ο λόγος αυξήθηκε σημαντικά πιθανά λόγω παροδικότητας της τοξικής επίδρασης του PITC στους μύκητες (Διάγραμμα 5.9). Στο τέλος του πειράματος, ο λόγος των μυκήτων προς τα βακτήρια δεν διέφερε σημαντικά από τον μάρτυρα. Παρόλο που η τοξικότητα του PITC είναι πάρα πολύ υψηλή σε *in vitro* συνθήκες, εντούτοις η δράση του μορίου σε συνθήκες αγρού (παρουσία δηλαδή εδάφους) μειώνεται σημαντικά. Η τοξική επίδραση του PITC συνδέεται περισσότερο με την επαφή του μορίου με τους οργανισμούς στόχους στο έδαφος αφού η πηκτικότητα του μορίου είναι 2300 φορές μικρότερη σε σχέση με το ισοθειοκυανιούχο μεθύλιο. Η δράση αυτή του μορίου μειώνεται ακόμη περισσότερο παρουσία εδάφους αφού λόγω της λιποφιλικότητας του, το μόριο προσροφάται στην οργανική ουσία του εδάφους, μειώνοντας με τον τρόπο αυτό τη βιοδιαθεσιμότητα του στο έδαφος και κατ' επέκταση την τοξικότητα του. Τα αποτελέσματα της παρούσας εργασίας ενισχύουν αυτή την υπόθεση, αφού η επίδραση του PITC ήταν σημαντική μόνο στους μύκητες και αυτό μόνο 7 ημέρες μετά την εφαρμογή.

Συμπεράσματα

Η ενσωμάτωση στο έδαφος φυτικών υπολειμμάτων μπρόκολου είχε ως αποτέλεσμα την αύξηση της μικροβιακής δραστηριότητας σε σχέση με τον μάρτυρα και την αύξηση της συγκέντρωσης των εκχυλίσμων PLFAs που αντιστοιχούν σε όλες τις βασικές ομάδες εδαφικών μικροοργανισμών.

Η προσθήκη στα υπολείμματα του μπρόκολου μυροσινάσης (>5U) μείωσε σε ένταση και σε διάρκεια την αύξηση της μικροβιακής δραστηριότητας καθώς και την συγκέντρωση των εκχυλίσμων PLFAs που αντιστοιχούν σε βακτήρια και ιδιαίτερα μύκητες, πιθανά γιατί επιβροηθησε την ενσωμάτωση ισοθειοκυανικών και την ταχεία υδρόλυση ΓΚΣ των υπολειμμάτων μπρόκολου οδηγώντας σε παροδική συσσώρευση ισοθειοκυανικών με σχετική επισχετική δράση. Η καθυστερημένη κορύφωση των συγκεντρώσεων PLFAs στην επέμβαση αυτή συγκριτικά με την απλή εφαρμογή υπολειμμάτων μπρόκολου, συνάδει με την υπόθεση της αρχικής παροδικής σχετικής βιοτοξικότητας.

Αντίθετα, ο υποκαπνισμός του εδάφους (PITC, MS) είχε ως αποτέλεσμα την σημαντική μείωση της μικροβιακής δραστηριότητας και αυτό ήταν πιο έντονο όταν εφαρμόστηκε το metham sodium. Η προσθήκη PITC επηρέασε σημαντικά τη βιομάζα των μυκήτων στο έδαφος αλλά δεν επηρέασε τη βιομάζα των υπόλοιπων ομάδων μικροοργανισμών στο έδαφος, ενώ το MS επηρέασε περισσότερο τους μύκητες και τα πρωτόζωα.

Τέλος, η μικροβιακή κοινότητα ανεξάρτητα από την μεταχείριση ανέκαμψε μετά την πάροδο 60 ημερών από την εφαρμογή τους.

Βιβλιογραφία

- Adam, G., and H. Duncan. 2001. Development of a sensitive and rapid method for the measurement of total microbial activity using fluorescein diacetate (FDA) in a range of soils. *Soil Biology and Biochemistry* 33:943-951.
- Angus, J.F., P.A. Gardner, J.A. Kirkegaard, and J.M. Desmarchelier. 1994. Biofumigation: isothiocyanates released from Brassica roots inhibit the growth of the take-all fungus. *Plant and Soil* 162:107-112.
- Bossio, D.A., K.M. Scow, N. Gunapala, and K.J. Graham. 1998. Determinants of soil microbial communities: Effects of agricultural management, season, and soil type on phospholipid fatty acid profiles. *Microbial Ecology* 36:1-12.
- Cox, H.H.J., T.T. Nguyen, and M.A. Deshusses. 1999. Predation of bacteria by the protozoa *Tetrahymena pyriformis* in toluene-degrading cultures. *Biotechnology Letters* 21:235-239.
- Dinesh, R., R.P. Dubey, and G.S. Prasad. 1998. Soil microbial biomass and enzyme activities as influenced by organic manure incorporation into soils of a rice-rice system. *Journal of Agronomy and Crop Science* 181:173-178.
- Elfstrand, S., B. Bath, and A. Martensson. 2007. Influence of various forms of green manure amendment on soil microbial community composition, enzyme activity and nutrient levels in leek. *Applied Soil Ecology* 36:70-82.
- Heal, O.W., J.M. Anderson, and M.J. Swift. 1997. Plant litter quality and decomposition: an historical overview. Driven by Nature: Plant Litter Quality and Decomposition, p. 3-25, *In* G. C. K. E. Giller, ed. Driven by Nature: Plant Litter Quality and Decomposition. CAB International, Oxon.
- Ibekwe, A.M., and L.S. Donald. 2004. Effects of Fumigants on Non-Target Organisms in Soils, p. 1-35 *Advances in Agronomy*, Vol. Volume 83. Academic Press.
- Kaur, A., A. Chaudray, A. Kaur, R. Choudhary, and R. Kaushik. 2005. Phospholipid fatty acid – A bioindicator of environment monitoring and assessment in soil ecosystem. *Current Science* 89:1103-1112.
- Kirkegaard, J.A., and M. Sarwar. 1998. Biofumigation potential of brassicas I. Variation in glucosinolate profiles of diverse field-grown brassicas. *Plant and Soil* 201:71-89. .
- Kirkegaard, J.A., and J.N. Matthiessen. 2004. Developing and refining the biofumigation concept. *Agroindustria* 3.
- Kushad, M.M., A.F. Brown, A.C. Kurilich, J.A. Juvik, B.P. Klein, M.A. Wallig, and E.H. Jeffery. 1999. Variation of glucosinolates in vegetable crops of *Brassica oleracea*. *Journal of Agricultural and Food Chemistry* 47:1541-1548.
- Luxhoi, J., S. Bruun, B. Stenberg, T.A. Breland, and L.S. Jensen. 2006. Prediction of gross and net nitrogen mineralization-immobilization turnover from respiration. *Soil Science Society of America Journal* 70:1121-1128.

- Macalady, J.L., M.E. Fuller, and K.M. Scow. 1998. Effects of metam sodium fumigation on soil microbial activity and community structure. *Journal of Environmental Quality* 27:54-63.
- Manici, L.M., L. Lazzeri, and S. Palmieri. 1997. In vitro fungitoxic activity of some glucosinolates and their enzyme-derived products toward plant pathogenic fungi. *Journal of Agricultural and Food Chemistry* 45:2768-2773.
- Matthiessen, J.N., and M.A. Shackleton. 2005. Biofumigation: environmental impacts on the biological activity of diverse pure and plant-derived isothiocyanates. *Pest Management Science* 61:1043-1051.
- Matthiessen, J.N., B. Warton, and M.A. Shackleton. 2004. The importance of plant maceration and water addition in achieving high Brassica-derived isothiocyanate levels in soil. *Agroindustria* 3:5-8.
- Morra, M.J., and J.A. Kirkegaard. 2002. Isothiocyanate release from soil-incorporated Brassica tissues. *Soil Biology & Biochemistry* 34:1683-1690.
- Nannipieri, P., S. Grego, and B. Ceccanti. 1990. Ecological significance of the biological activity in soil, p. 293-355, *In* J. M. Bollag and G. Stotzky, eds. *Soil biochemistry*, Vol. 6. Marcel Dekker, New York.
- Nannipieri, P., J. Ascher, M.T. Ceccherini, L. Landi, G. Pietramellara, and G. Renella. 2003. Microbial diversity and soil functions. *European Journal of Soil Science* 54:655-670.
- Ntougias, S., C. Ehaliotis, K.K. Papadopoulou, and G. Zervakis. 2006. Application of respiration and FDA hydrolysis measurements for estimating microbial activity during composting processes. *Biology and Fertility of Soils* 42:330-337.
- Ochiai, N., M.L. Powelson, F.J. Crowe, and R.P. Dick. 2008. Green manure effects on soil quality in relation to suppression of Verticillium wilt of potatoes. *Biology and Fertility of Soils* 44:1013-1023.
- Puget, P., and L.E. Drinkwater. 2001. Short-term dynamics of root- and shoot-derived carbon from a leguminous green manure. *Soil Science Society of America Journal* 65:771-779.
- Ramsey, P.W., M.C. Rillig, K.P. Feris, W.E. Holben, and J.E. Gannon. 2006. Choice of methods for soil microbial community analysis: PLFA maximizes power compared to CLPP and PCR-based approaches. *Pedobiologia* 50:275-280.
- Ros, M., J.A. Pascual, C. Garcia, M.T. Hernandez, and H. Insam. 2006. Hydrolase activities, microbial biomass and bacterial community in a soil after long-term amendment with different composts. *Soil Biology and Biochemistry* 38:3443-3452.
- Sánchez-Monedero, M.A., C. Mondini, L. Cayuela, A. Roig, M. Contin, and M. De Nobili. 2008. Fluorescein diacetate hydrolysis, respiration and microbial biomass in freshly amended soils. *Biology and Fertility of Soils* 44:885-890.

- Sarwar, M., J.A. Kirkegaard, P.T.W. Wong, and J.M. Desmarchelier. 1998. Biofumigation potential of brassicas III In vitro toxicity of isothiocyanates to soil-borne fungal pathogens. *Plant Soil* 201:103-112.
- Smith, B.J., and J.A. Kirkegaard. 2002. *In vitro* inhibition of soil microorganisms by 2-phenylethyl isothiocyanate. *Plant Pathology* 51:585-593.
- Stark, C.H., L.M. Condon, M. O'Callaghan, A. Stewart, and H.J. Di. 2008. Differences in soil enzyme activities, microbial community structure and short-term nitrogen mineralisation resulting from farm management history and organic matter amendments. *Soil Biology and Biochemistry* 40:1352-1363.
- Subbarao, K.V., J.C. Hubbard, and S.T. Koike. 1999. Evaluation of broccoli residue incorporation into field soil for Verticillium wilt control in cauliflower. *Plant Disease* 83:124-129.
- Tirol-Padre, A., J.K. Ladha, A.P. Regmi, A.L. Bhandari, and K. Inubushi. 2007. Organic Amendments Affect Soil Parameters in Two Long-Term Rice-Wheat Experiments, pp. 442-452, Vol. 71.
- Zelles, L. 1999. Fatty acid patterns of phospholipids and lipopolysaccharides in the characterisation of microbial communities in soil: a review. *Biology and Fertility of Soils* 29:111-129.

Πίνακες και Διαγράμματα

Πίνακας 6.1 Μικροβιακή αναπνοή του εδάφους (C-CO₂ mg/kg εδάφους/ημέρα), μετά την εφαρμογή μεθόδων απολύπανσης, σε διάφορους χρόνους δειγματοληψίας.

| | Χρόνος σε ημέρες | | | | | | | | | | | | | |
|-----------------|--------------------|-------------------------------|--------|----|--------|----|--------|----|-------|----|-------|----|-------|----|
| | 1 | 2 | 3 | 7 | 15 | 30 | 60 | | | | | | | |
| Control | 25,42 ¹ | A ² b ³ | 27,59 | Ab | 29,93 | Ac | 27,74 | Ab | 27,08 | Ab | 29,12 | Aa | 29,76 | Aa |
| Broccoli | 114,52 | Dd | 141,30 | Fd | 126,62 | Ed | 105,07 | Cc | 44,79 | Bc | 25,36 | Aa | 27,18 | Aa |
| Broc+Myr | 101,49 | Cc | 116,73 | Dc | 30,52 | Bc | 29,86 | Bb | 26,96 | Ab | 21,81 | Aa | 26,95 | Aa |
| MS | 7,66 | Aa | 5,83 | Aa | 5,24 | Aa | 9,02 | Aa | 18,36 | Ba | 26,95 | Ca | 27,33 | Ca |
| PITC | 8,11 | Aa | 10,76 | Ba | 17,49 | Bb | 26,88 | Cb | 27,01 | Bb | 24,21 | Aa | 26,09 | Aa |

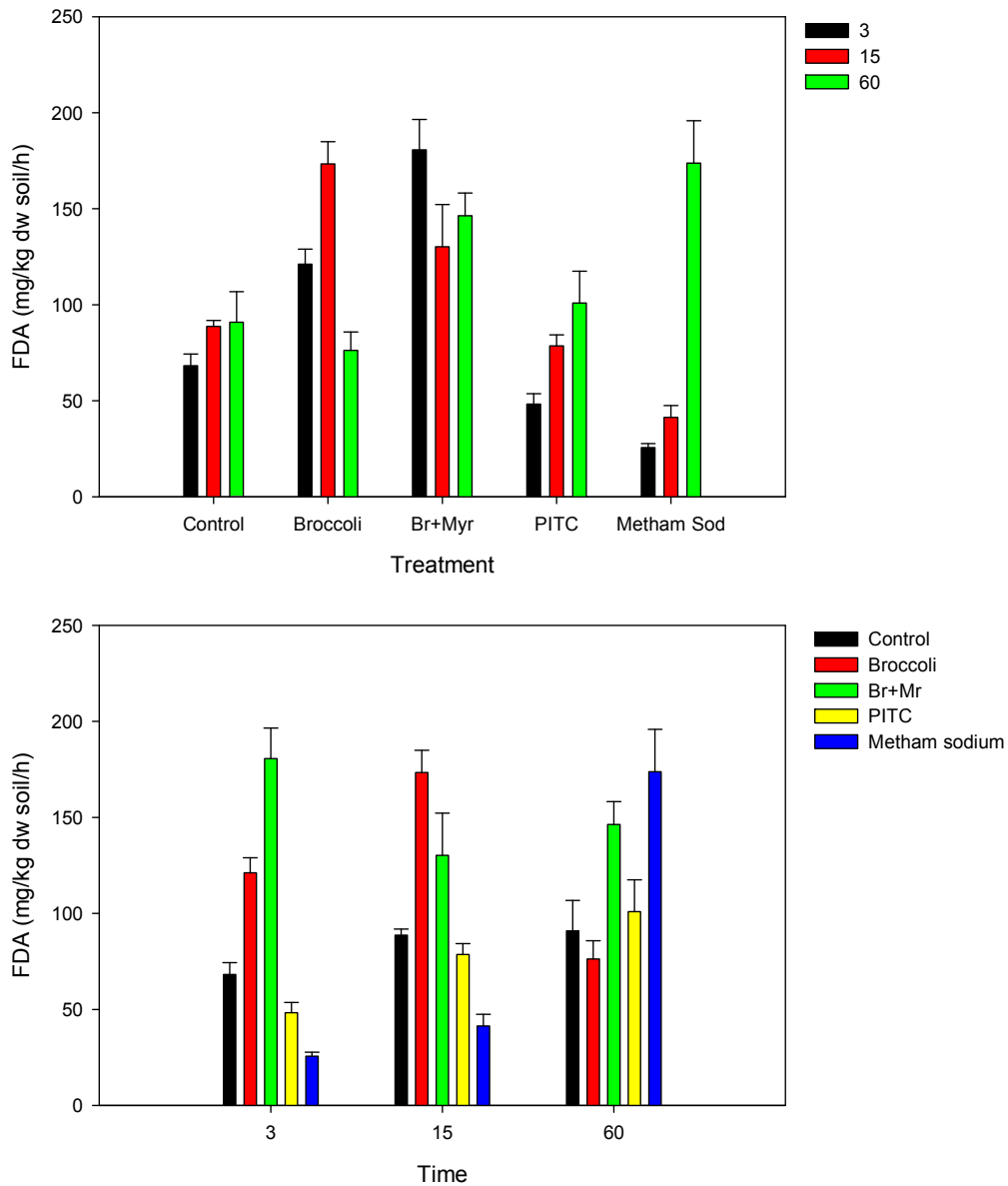
¹Μέση τιμή (n=4) C-CO₂ mg/kg εδάφους/ημέρα

²Διαφορές των κεφαλαίων γραμμάτων υποδηλώνουν στατιστικά σημαντικές διαφορές μεταξύ των μέσων τιμών της μικροβιακής αναπνοής κατά τη διάρκεια του χρόνου και αφορούν την ίδια μεταχείριση.

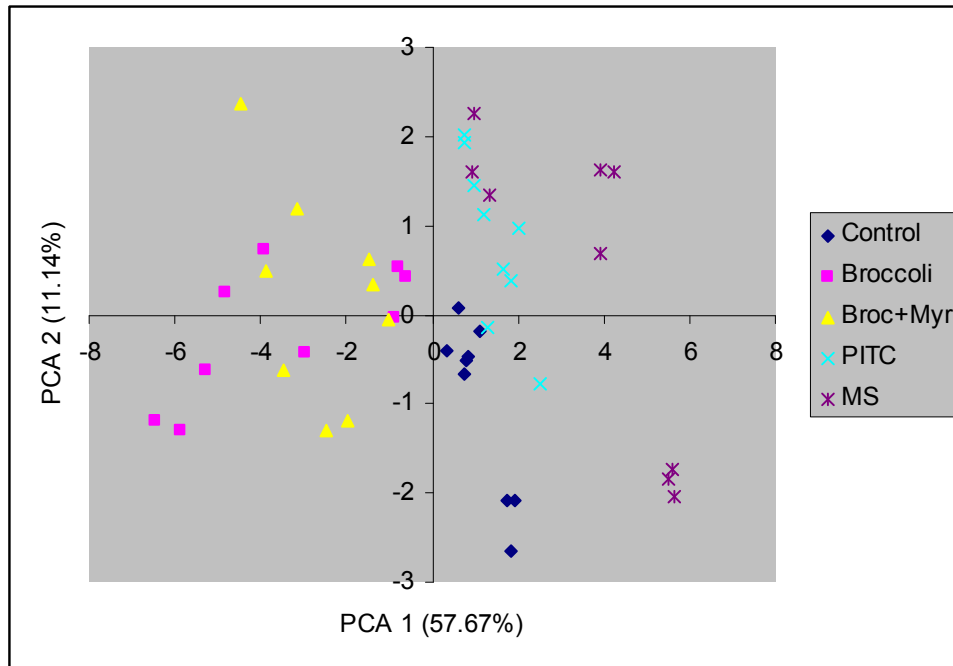
³Διαφορές των μικρών γραμμάτων υποδηλώνουν στατιστικά σημαντικές διαφορές μεταξύ των μέσων τιμών της μικροβιακής αναπνοής των μεταχειρίσεων που εφαρμόστηκαν σε κάθε δειγματοληψία.

Πίνακας 6.2 Κατάταξη διάφορων μικροοργανισμών σε σχέση με τη σύσταση της μεμβράνης τους σε διάφορα λιπαρά οξέα των φωσφολιπιδίων.

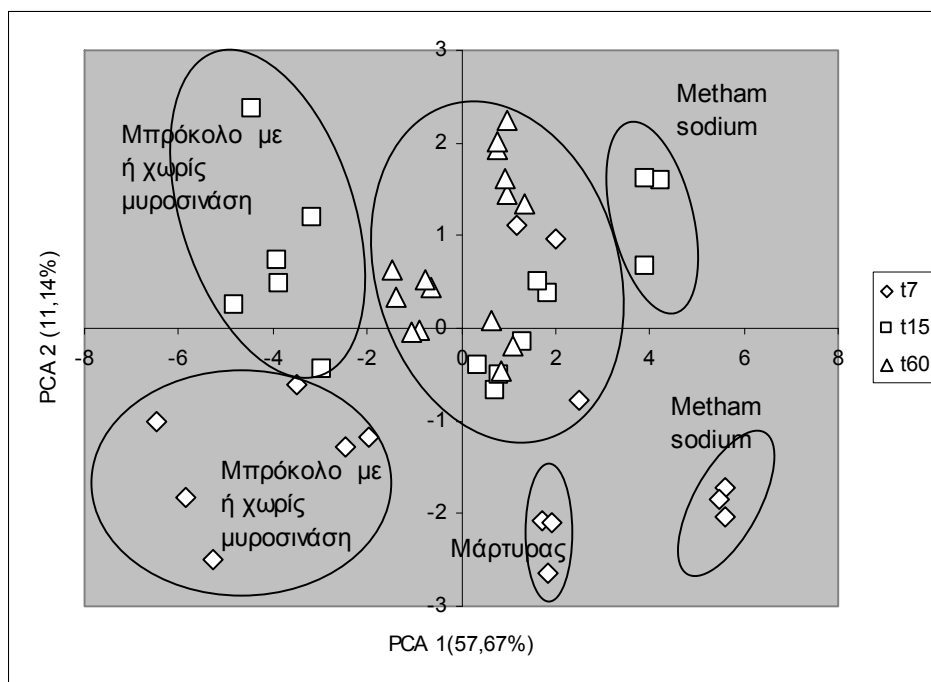
| Ομάδα μικροοργανισμών | Λιπαρά Οξέα |
|-----------------------------|--|
| Θετικά κατά Gram βακτήρια | i-15:0, a-15:0, i-16:0, i-17:0, 17:0 |
| Αρνητικά κατά Gram βακτήρια | 16:0, 18:1ω9cis, 18:1ω9trans, 16:1ω7, cy17:0, cy19:0, 3-OH14:0 |
| Μύκητες | 18:2ω6,9 |
| Πρωτόζωα | 20:4ω6, 18:3ω9, 20:0 |



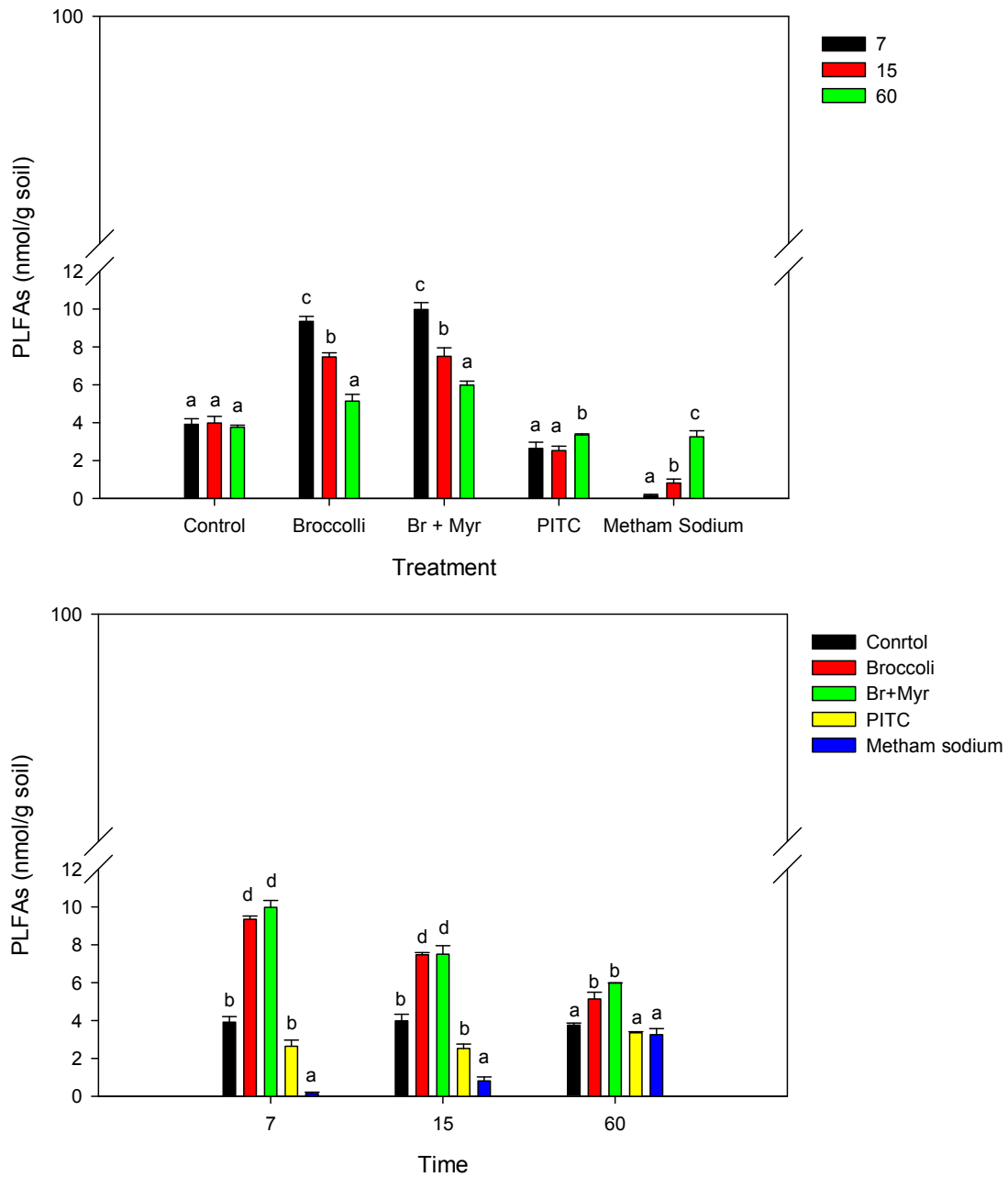
Διάγραμμα 6.1 Η πορεία υδρόλυσης του FDA σε mg/kg εδάφους/h στην πορεία του χρόνου, σε εδάφη που δέκτηκαν υποκαπνισμό και φυτικά υπολείμματα μπρόκολου με ή χωρίς μυροσινάση. Η διακύμανση στα ιστογράμματα αφορά το τυπικό σφάλμα των μέσων όρων ($n=4$).



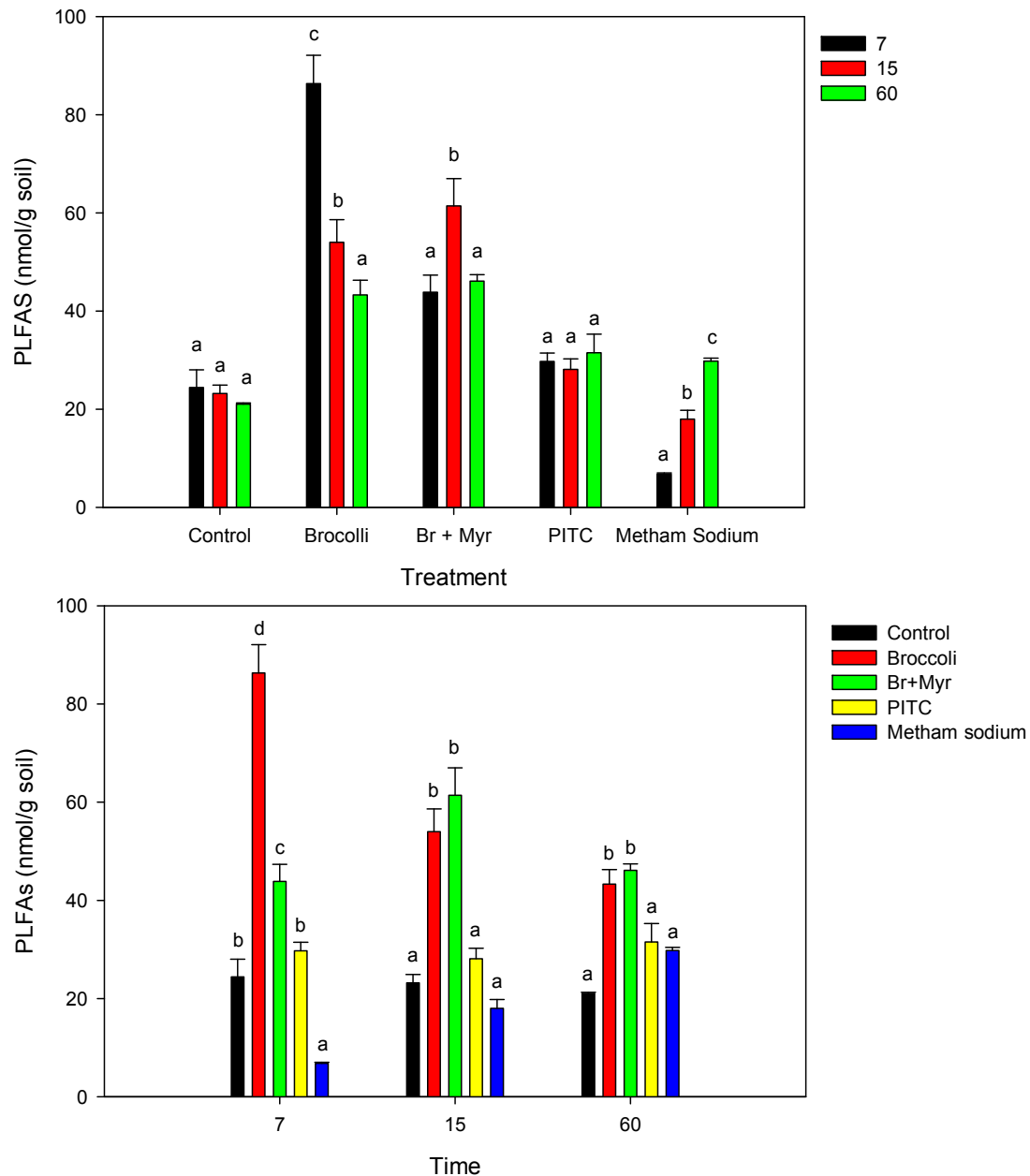
Διάγραμμα 6.2 Κατανομή των δειγμάτων εδάφους ως προς την σύσταση τους σε μικροβιακά PLFAs όταν σαν παράγοντας απεικόνισης χρησιμοποιήθηκαν οι μεταχειρίσεις. Η ανάλυση έγινε με την μέθοδο των Κυρίων Συνιστωσών (PCA) και οι δύο άξονες περιγράφουν το 57.67 και 11.14% της συνολικής παραλλακτικότητας.



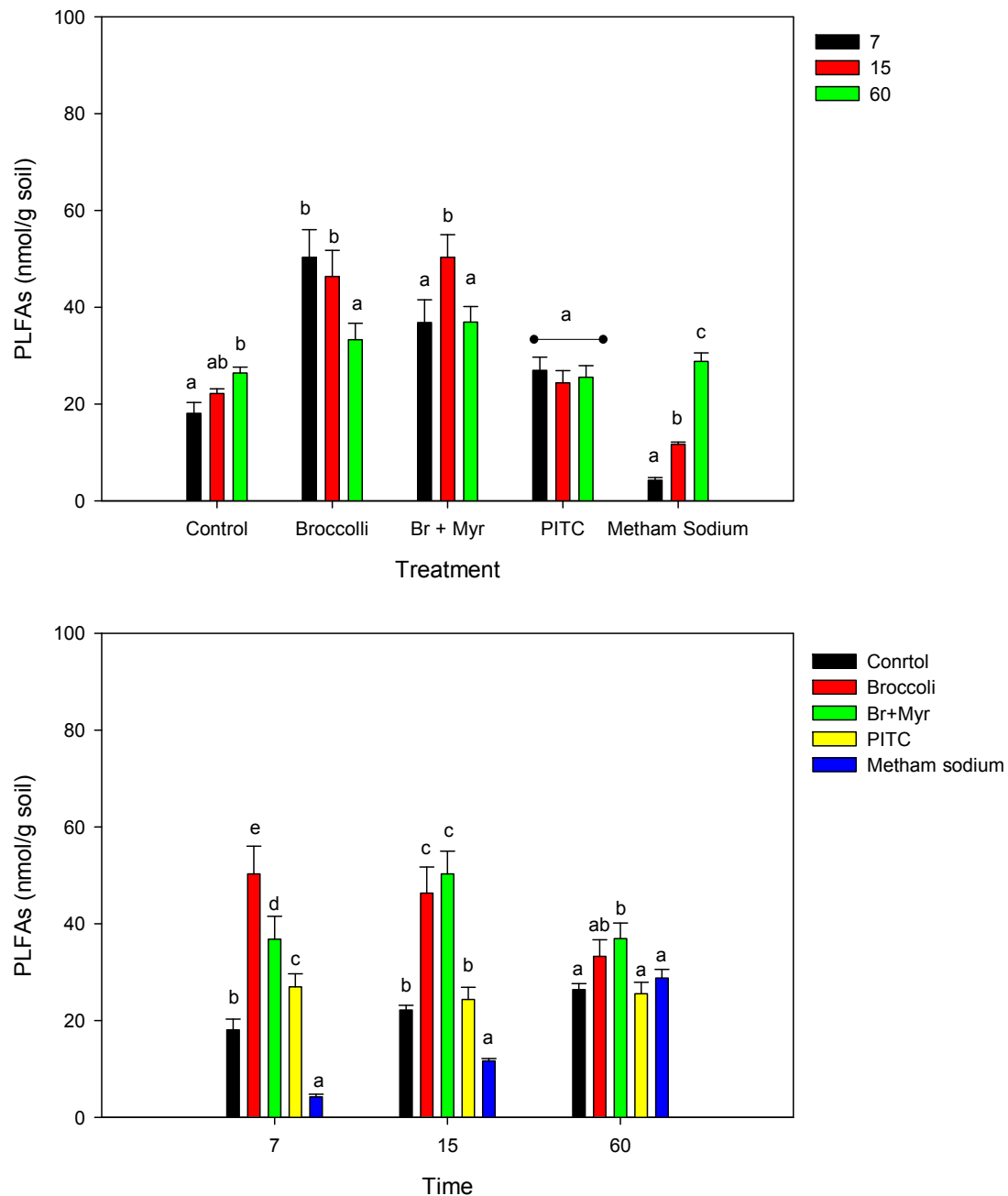
Διάγραμμα 6.3 Κατανομή των δειγμάτων εδάφους ως προς την σύσταση τους σε μικροβιακά PLFAs όταν σαν παράγοντας απεικόνισης χρησιμοποιήθηκε ο χρόνος δειγματοληψίας. Η ανάλυση έγινε με την μέθοδο των Κυρίων Συνιστωσών (PCA) και οι δύο άξονες περιγράφουν το 57.67 και 11.14% της συνολικής παραλλακτικότητας.



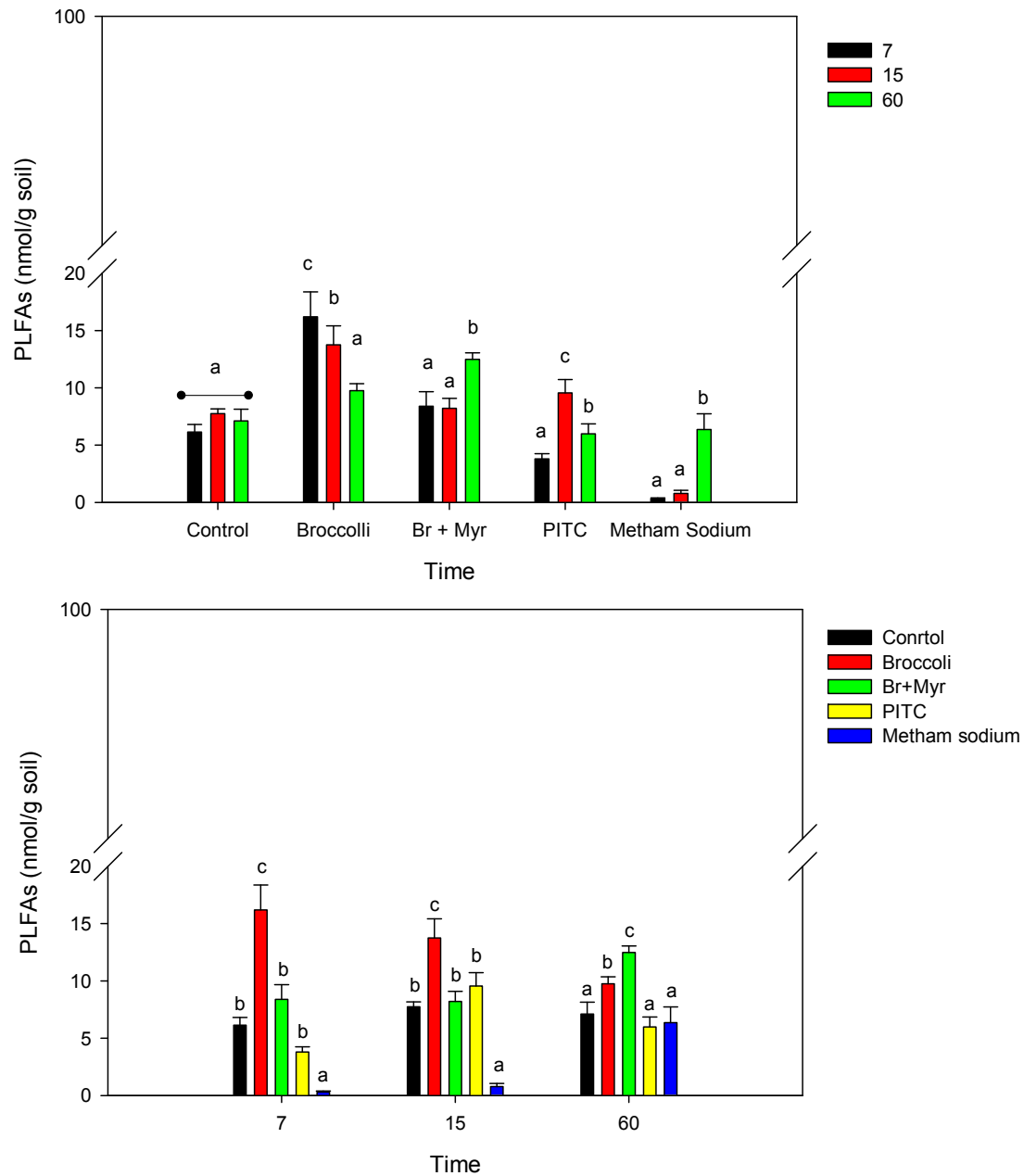
Διάγραμμα 6.4 Συγκέντρωση των PLFAs των πρωτόζων στο έδαφος στους διάφορους χρόνους δειγματοληψίας (7, 15 και 60 ημέρες μετά την εφαρμογή) και στις διάφορες μεταχειρίσεις. Η διακύμανση στο ιστόγραμμα αφορά την τυπικό σφάλμα του μέσου όρου. Διαφορετικά γράμματα υποδηλώνουν στατιστικά σημαντικές διαφορές μεταξύ των μέσων σε επίπεδο $p=0.05$, σύμφωνα με το κριτήριο Tuckey-Krammer (HSD).



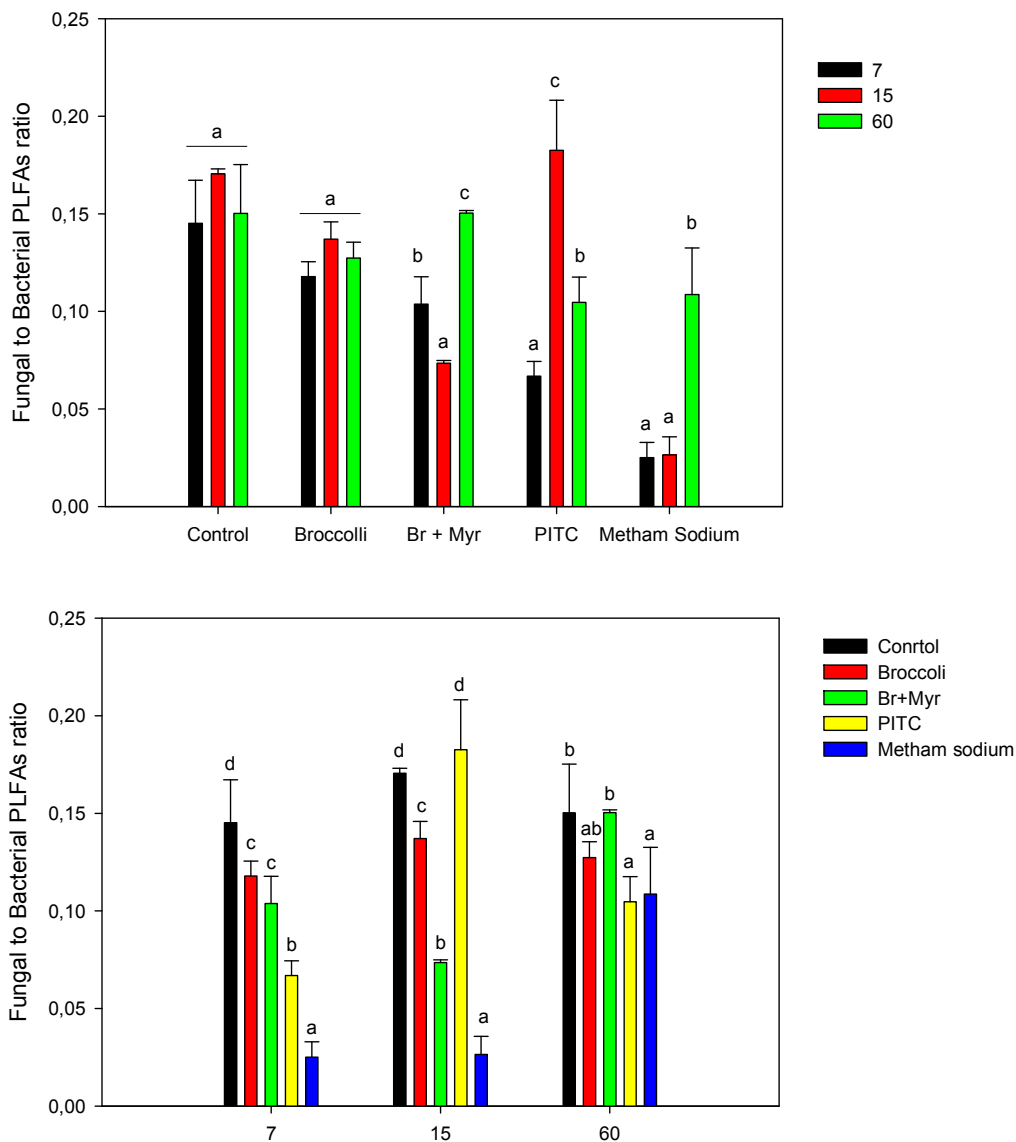
Διάγραμμα 6.5 Συγκέντρωση των PLFAs των κατά Gram (-) βακτηρίων στο έδαφος στους διάφορους χρόνους δειγματοληψίας (7, 15 και 60 ημέρες μετά την εφαρμογή) και στις διάφορες μεταχειρίσεις. Η διακύμανση στο ιστόγραμμα αφορά την τυπικό σφάλμα του μέσου όρου. Διαφορετικά γράμματα υποδηλώνουν στατιστικά σημαντικές διαφορές μεταξύ των μέσων σε επίπεδο $p=0.05$, σύμφωνα με το κριτήριο Tuckey-Krammer (HSD).



Διάγραμμα 6.6 Συγκέντρωση των PLFAs των κατά Gram (+) βακτηρίων στο έδαφος στους διάφορους χρόνους δειγματοληψίας (7, 15 και 60 ημέρες μετά την εφαρμογή) και στις διάφορες μεταχειρίσεις. Η διακύμανση στο ιστόγραμμα αφορά την τυπικό σφάλμα του μέσου όρου. Διαφορετικά γράμματα υποδηλώνουν στατιστικά σημαντικές διαφορές μεταξύ των μέσων σε επίπεδο $p=0.05$, σύμφωνα με το κριτήριο Tuckey-Krammer (HSD).



Διάγραμμα 6.7 Συγκέντρωση των PLFAs των μυκήτων στο έδαφος στους διάφορους χρόνους δειγματοληψίας (7, 15 και 60 ημέρες μετά την εφαρμογή) και στις διάφορες μεταχειρίσεις. Η διακύμανση στο ιστόγραμμα αφορά την τυπικό σφάλμα του μέσου όρου. Διαφορετικά γράμματα υποδηλώνουν στατιστικά σημαντικές διαφορές μεταξύ των μέσων σε επίπεδο $p=0.05$, σύμφωνα με το κριτήριο Tukey-Kramer (HSD).



Διάγραμμα 6.8 Λόγος της συγκέντρωσης των PLFAs Μυκήτων προς βακτήρια στο έδαφος στους διάφορους χρόνους δειγματοληψίας (7, 15 και 60 ημέρες μετά την εφαρμογή) και στις διάφορες μεταχειρίσεις. Η διακύμανση στο ιστόγραμμα αφορά την τυπικό σφάλμα του μέσου όρου. Διαφορετικά γράμματα υποδηλώνουν στατιστικά σημαντικές διαφορές μεταξύ των μέσων σε επίπεδο $p=0.05$, σύμφωνα με το κριτήριο Tukey-Kramer (HSD).

Κεφάλαιο 7^ο

Επίδραση της εδαφικής ενσωμάτωσης υπολειμμάτων καλλιέργειας μπρόκολου στη σύσταση της μικροβιακής κοινότητας των ασκομυκήτων και νιτροποιητικών βακτηρίων Α΄ σταδίου σε σύγκριση με την επίδραση χημικών μεθόδων απολύμανσης

Περίληψη

Οι ασκομύκητες αποτελούν το μεγαλύτερο φύλο των μυκήτων στο έδαφος, και σε αυτό ανήκουν μικροοργανισμοί οι οποίοι συμμετέχουν στη αποδόμηση της οργανικής ουσίας του εδάφους και το σχηματισμό χουμικών ενώσεων. Ταυτόχρονα, στους ασκομύκητες περιλαμβάνονται σημαντικοί εχθροί των καλλιεργούμενων φυτών. Τα νιτροποιητικά βακτήρια Α΄ σταδίου (NBA) είναι μια ομάδα αυτότροφων βακτηρίων που διαδραματίζει πρωτεύοντα ρόλο στον κύκλο του αζώτου στα γεωργικά οικοσυστήματα. Η αξιολόγηση της μικροβιακής κοινότητας των ασκομυκήτων και των NBA πραγματοποιήθηκε με την χρήση μοριακών τεχνικών (PCR-DGGE) και με υποκλωνοποίηση των αλληλουχιών συντηρημένων γονιδιακών τόπων προσδιοριστικών για αυτές τις ομάδες μικροοργανισμών. Αλληλουχήθηκαν συνολικά 56 κλώνοι ασκομυκήτων και NBA.

Η σύσταση της μικροβιακής κοινότητας των ασκομυκήτων και των NBA επηρεάστηκαν διαφορετικά στις διάφορες μεταχειρίσεις που εφαρμόστηκαν. Τα NBA φαίνεται ότι είναι λιγότερο ευαίσθητα σε μεταβολές αφού, καμιά μεταχείριση δεν είχε σημαντική επίδραση στη σύσταση της κοινότητάς τους στο έδαφος σε όλους τους χρόνους δειγματοληψίας.

Αντίθετα η κοινότητα των ασκομυκήτων (ΑΣΚ) επηρεάστηκε σημαντικά από την εφαρμογή των διαφόρων μεταχειρίσεων σε όλους τους χρόνους δειγματοληψίας. Η πιο έντονη επίδραση παρατηρήθηκε κατά την εφαρμογή στο έδαφος metham sodium (MS) (15 και 60 ημέρες μετά την εφαρμογή) και υπολειμμάτων μπρόκολου με η χωρίς μυροσινάση (3 ημέρες από την εφαρμογή τους). Υποκλωνοποίηση των αλληλουχιών ασκομυκήτων έδειξε ότι, η εφαρμογή MS είχε τοξική επίδραση σε εδαφογενείς φυτοπαθογόνους μύκητες του γένους *Fusarium*, *Nectria* και *Cladosporium* σε σύγκριση με τους κλώνους που λήφθηκαν από εδάφη στα οποία εφαρμόστηκαν υπολείμματα μπρόκολου και P1TC όπου δεν παρατηρήθηκε αντίστοιχη τοξική δράση. Από τα αποτελέσματα της παρούσας εργασίας φαίνεται ότι, η επίδραση των μεταχειρίσεων με υπολείμματα μπρόκολου που επιδρούν στην μικροβιακή κοινότητα του εδάφους δεν σχετίζεται με την υδρόλυση των ΓΚΣ και την επακόλουθη παραγωγή ΙΣΘ.

Εισαγωγή

Η μικροβιακή κοινότητα του εδάφους αποτελεί αναπόσπαστο μέρος του εδαφικού οικοσυστήματος αφού, οι μικροοργανισμοί ρυθμίζουν σημαντικές διεργασίες που πραγματοποιούνται σε αυτό όπως οι κύκλοι των θρεπτικών στοιχείων, η αποδόμηση της οργανικής ουσίας, ο σχηματισμός χουμικών ενώσεων και η διάσπαση διάφορων ρυπαντών. Πολλές εργασίες μέχρι σήμερα έχουν δείξει ότι, οι καλλιεργητικές πρακτικές επηρεάζουν σημαντικά την δραστηριότητα και την σύσταση της εδαφικής μικροβιακής κοινότητας. Συνήθως η ενσωμάτωση στο έδαφος, χλωρής λίπανσης κοπριάς ή κομπόστας έχει ως αποτέλεσμα την αύξηση της μικροβιακής βιομάζας και δραστηριότητας (Ehaliotis et al., 1998; Peacock et al., 2001; Tanaka et al., 2006; Toyota and Kuninaga, 2006; Tu et al., 2006; Widmer et al., 2006).

Τα Νιτροποιητικά Βακτήρια Α΄ σταδίου (NBA) διαδραματίζουν πρωτεύοντα ρόλο στον κύκλο του αζώτου στο έδαφος (Prosser and Nicol, 2008). Η νιτροποίηση, αφορά την διαδικασία μετατροπής του NH_4 σε NO_3^- και αυτή λαμβάνει χώρα σε δυο διαδοχικά στάδια, όπου κατά το πρώτο στάδιο το NH_4 μετατρέπεται σε NO_2^- ενώ κατά το δεύτερο στάδιο, τα NO_2^- σε NO_3^- . και συνήθως περιοριστικό παράγοντα για την μετατροπή των αμμωνιακών ιόντων σε νιτρικά αποτελεί το πρώτο στάδιο, αφού στα εδάφη δεν συσσωρεύονται νιτρώδη ιόντα (Belser, 1979; De Boer et al., 1990). Η απομόνωση και η καλλιέργεια των NBA είναι δύσκολη εξαιτίας του χαμηλού ρυθμού ανάπτυξης τους, της μικρής βιομάζας την οποία παράγουν και των ελάχιστων διακριτών φαινοτυπικών διαφορών που παρουσιάζουν τα διάφορα είδη μεταξύ τους (Kowalchuk and Stephen, 2001) και για το λόγο αυτό αναπτύχθηκαν μοριακές τεχνικές για την μελέτη τους σε περιβαλλοντικά δείγματα και δη στο έδαφος (Kowalchuk et al., 1997; Mahmood et al., 2006b; McCaig et al., 1994b). Ανάλυση των αλληλουχιών συντηρημένων τόπων του 16sRNA γονιδίου κατατάσσουν τα NBA σε δυο ξεχωριστά μονοφυλετικές ομάδες που ανήκουν στα γ- και β-πρωτεοβακτήρια. Η τελευταία ομάδα περιλαμβάνει τα NBA που απαντώνται στα χερσαία οικοσυστήματα και αποτελείται δύο γένη: το *Nitrosospira* (περιλαμβάνοντας και ορισμένα *Nitrosolobus* και *Nitrosovibrio*) και το *Nitrosomonas* (περιλαμβάνοντας και το *Nitrosococcus mobilis*) (Junier et al., 2008; Kowalchuk and Stephen, 2001; Purkhold et al., 2000). Αρκετοί ερευνητές μέχρι σήμερα έχουν μελετήσει την επίδραση διαφόρων καλλιεργητικών πρακτικών στην κοινότητα των NBA σε γεωργικά οικοσυστήματα (Avrahami et al., 2003; Bruns et al., 1999; Chu et al., 2007; Hastings et al., 1997; Phillips et al., 2000; Webster et al., 2005). Προηγούμενες μελέτες των Bending και Lincoln (2000) έδειξαν ότι, καθαρές μορφές ισοθειοκυανιούχων ενώσεων (ΙΣΘ) και μικρομοριακές πηκτικές ενώσεις θείου όπως τα σουλφίδια μείωσαν την νιτροποίηση στο έδαφος. Πρόσφατα προτάθηκε ότι τα προϊόντα υδρόλυσης των ΓΚΣ συμμετέχουν στην αναστολή της διαδικασίας της νιτροποίησης στο έδαφος (Brown and Morra, 2009). Παρόλα αυτά όμως, σε καμιά από τις πιο πάνω μελέτες δεν έχει διερευνηθεί η επίδραση της ενσωμάτωσης υπολειμμάτων Σταυρανθών ή καθαρών μορφών ΙΣΘ στη σύσταση της κοινότητας των NBA.

Οι μύκητες αποτελούνται από τέσσερα φύλα με μεγαλύτερο και πλουσιότερο από άποψη ποικιλότητας αυτό των Ασκομυκήτων (ΑΣΚ). Γένη και είδη των ασκομυκήτων συμμετέχουν στη διάσπαση της οργανικής ουσίας του εδάφους, και κατ' επέκταση συμμετέχουν στον κύκλο του άνθρακα (Dighton, 2007; Osono et al., 2003). Επιπλέον πρόσφατες μελέτες έδειξαν ότι οι ΑΣΚ έχουν τη δυνατότητα να συνθέτουν ή να τροποποιούν τα χουμικά οξέα στο έδαφος (Grinhut et al., 2007; Rezácová et al., 2006). Εδαφογενή παθογόνα που προκαλούν σοβαρές ασθένειες όπως αδρομυκώσεις, σήψεις λαιμού ανήκουν στο φύλο των ΑΣΚ και κυρίως στο υποφύλο *Pezizomycotina* όπου έχουν καταγραφεί περισσότερα από 3000 γένη (Berbee, 2001). Ωστόσο, εκτός από παθογόνα είδη, στους ασκομύκητες περιλαμβάνονται και διάφορα είδη τα οποία ευνοούν την ανάπτυξη των φυτικών οργανισμών όπως μη παθογόνα φουζάρια (Kavroulakis et al., 2007), ενώ άλλα λειτουργούν ως παθογόνα για διάφορους εχθρούς και ασθένειες των καλλιεργειών (Lewis and Paravizas, 1991; Schwarzenbach et al., 2009). Μέχρι σήμερα ελάχιστες είναι οι αναφορές στη διεθνή βιβλιογραφία σχετικά με την επίδραση των καλλιεργητικών πρακτικών στην κοινότητα των ΑΣΚ στο έδαφος (Viebahn et al., 2005; Wang et al., 2009) ενώ δεν υπάρχουν στοιχεία σχετικά με την επίδραση της βιοαπολύμανσης ή της ενσωμάτωσης στο έδαφος υπολειμμάτων Σταυρανθών στην μικροβιακή κοινότητα των ασκομυκήτων.

Οι διαθέσιμες πληροφορίες σχετικά με την βιοαπολύμανση των εδαφών αφορούν τη μελέτη της πρακτικής αυτής σε εδαφογενή παθογόνα, ενώ η επίδρασή της συνολικά στη σύσταση της μικροβιακής κοινότητας του εδάφους αγνοήθηκε. Η πλειονότητα αν όχι όλα τα φυτικά είδη Σταυρανθών που χρησιμοποιούνται κατά τη βιοαπολύμανση είναι φυτά που προορίζονται ειδικά για χλωρή λίπανση (Larkin and Griffin, 2007; Lazzeri et al., 2004; Matthiessen and Shackleton, 2005). Αντίθετα, οι πληροφορίες που είναι διαθέσιμες όσον αφορά την επίδραση των υπολειμμάτων καλλιεργούμενων Σταυρανθών των οποίων τα προϊόντα προορίζονται για ανθρώπινη κατανάλωση όπως για παράδειγμα το μπρόκολο, στη σύσταση της εδαφικής μικροβιακής κοινότητας είναι ανύπαρκτες. Ωστόσο υπάρχουν μερικές αναφορές σε ότι αφορά την επίδραση της ενσωμάτωσης υπολειμμάτων καλλιέργειας μπρόκολου στην μείωση της προσβολής πατατών από το παθογόνο *Verticillium dahliae*. Αυτή η μείωση αποδόθηκε στην ενσωμάτωση στο έδαφος χλωρής φυτομάζας παρά στην παραγωγή ΙΣΘ (Ochiai et al., 2008). Επιπρόσθετα έχει προταθεί ότι άλλοι παράγοντες εκτός των ΙΣΘ δυνατό να εμπλέκονται στην μείωση της προσβολής φυτών αγγινάρας, μετά από την ενσωμάτωση στο έδαφος υπολειμμάτων καλλιέργειας κουνουπιδιού (Berbegal et al., 2008).

Στόχος του 7^{ου} Κεφαλαίου είναι η μελέτη της επίδρασης της ενσωμάτωσης στο έδαφος, φυτικών υπολειμμάτων μπρόκολου με ή χωρίς μυροσινάσης στη σύσταση της μικροβιακής κοινότητας του εδάφους, με παράλληλη εφαρμογή σε αυτό του υποκαπνιστικού *metham sodium* (MS) και του γλυκοσινολικού PITS σε αντιστοιχία των παρατηρήσεων του 5^{ου} Κεφαλαίου της παρούσας διατριβής.

Για την επίτευξη των στόχων του Κεφαλαίου τέθηκαν οι παρακάτω υποθέσεις:

1. Η εφαρμογή στο έδαφος, MS και PITC μεταβάλλουν τη σύσταση της μικροβιακής κοινότητας των ασκομυκήτων και των NBA.
2. Η ενσωμάτωση στο έδαφος υπολειμμάτων μπρόκολου με ή χωρίς την προσθήκη μυροσινάσης δεν μεταβάλλουν τη σύσταση της μικροβιακής κοινότητας των ασκομυκήτων και των NBA κατά τρόπο αντίστοιχο του MS ή του PITC (2-φαινυλαιθυλ-ισοθειοκυάνιο).

Υλικά και Μέθοδοι

Φυτικό υλικό και έδαφος

Η επίδραση της ενσωμάτωσης των υπολειμμάτων καλλιέργειας μπρόκολου στη σύσταση της κοινότητας των ΑΣΚ και των ΝΒΑ μελετήθηκε σε πειράματα μικροκόσμων σε φυτοδοχεία, παράλληλα με την επίδραση των ανωτέρω υπολειμμάτων στην μικροβιακή δραστηριότητα στο ίδιο έδαφος (Κεφάλαιο 6^ο).

Σπορόφυτα της ποικιλίας μπρόκολου (*Brassica oleraceae* var *Italica*), Marathon, αναπτύχθηκαν σε φυτοδοχεία, των 12 L σε υπόστρωμα εδάφους:φυτοχώματος. Με προσοχή απομακρύνθηκαν από τα φυτά μπρόκολου τα νεαρότερα πλήρως ανεπτυγμένα φύλλα και αλέστηκαν σε πολυμηχάνημα υψηλών ταχυτήτων έτσι ώστε να επιτευχθεί η μέγιστη δυνατή καταστροφή των φυτικών ιστών. Τα αλεσμένα υπολείμματα ενσωματώθηκαν στο έδαφος σε ποσότητα ίση με 15g/kg ξηρού εδάφους (μεταχείριση **B**). Η ίδια ποσότητα υπολειμμάτων ενσωματώθηκε στο έδαφος αφού όμως προηγουμένως στα υπολείμματα της καλλιέργειας προστέθηκαν 10ml μυροσινάσης (0.32U ml⁻¹ Sigma-Aldrich, Germany) και αναμίχθηκαν με το έδαφος τρεις ώρες αργότερα (μεταχείριση **BM**). Προηγούμενες μελέτες στο εργαστήριο έδειξαν ότι, προσθήκη μυροσινάσης σε αλεσμένα υπολείμματα φύλλων μπρόκολου προκαλεί πλήρη υδρόλυση των ΓΚΣ και παραγωγή ΙΣΘ. Με τον τρόπο αυτό επιχειρήθηκε να ενσωματωθούν στο έδαφος υπολείμματα μπρόκολου χωρίς την παρουσία ΓΚΣ. Ακολούθως το έδαφος στο οποίο έγινε η ενσωμάτωση των υπολειμμάτων της καλλιέργειας μεταφέρθηκε σε φυτοδοχείο των 2 L και προσαρμόστηκε η υγρασία του εδάφους με την προσθήκη σε αυτό απιονισμένου νερού έτσι ώστε να είναι ίση με το 45% της υδατοχωρητικότητάς του. Η επώαση έγινε σε θερμοκρασία δωματίου.

Η επίδραση του PITC και του MS στην σύσταση της μικροβιακής κοινότητας των ΑΣΚ και των ΝΒΑ μελετήθηκε στο ίδιο πείραμα. Συγκεκριμένα, στη μεταχείριση **PITC** (2-φαινυλαιθυλ-ισοθειοκυάνιο) προστέθηκε PITC σε 1 kg εδάφους σε μορφή υδατικού διαλύματος συγκέντρωσης 200μg/ml έτσι ώστε η τελική συγκέντρωση στο έδαφος να είναι 10mg/kg. Το εμπορικό υποκαπνιστικό σκεύασμα metham sodium (**MS**) το οποίο κατά την υδρόλυσή του στο έδαφος, παράγει την τοξική ουσία ισοθειοκυανιούχο μεθύλιο, εφαρμόστηκε με διαφορετικό τρόπο.. Συγκεκριμένα, το MS και επιπλέον απιονισμένο νερό (για την προσαρμογή της εδαφικής υγρασίας στο 45% της υδατοχωρητικότητας) προστέθηκαν στο έδαφος και αμέσως μετά τα φυτοδοχεία καλύφθηκαν με διαφανές πλαστικό εδαφοκάλυψης έτσι ώστε να μειωθεί η εξάτμιση της δραστηκής ουσίας του σκεύασματος. Το **MS** εφαρμόστηκε υπό τη μορφή υδατικού διαλύματος συγκέντρωσης 10,000 mg/L που ετοιμάστηκε από το σκεύασμα Varam 51SL. Η συγκέντρωση του MS στο έδαφος μετά την εφαρμογή του ήταν ίση με την προτεινόμενη από την κατασκευάστρια εταιρεία (300μg/g εδάφους) για τον έλεγχο εδαφογενών παθογόνων. Το πλαστικό που τοποθετήθηκε στα φυτοδοχεία απομακρύνθηκε με την πάροδο 14 ημερών από την εφαρμογή του MS ενώ μετά την απομάκρυνση του το έδαφος αναμοχλεύθηκε έτσι ώστε να εξασφαλιστεί η εξάτμιση της εναπομείνουσας ποσότητας ισοθειοκυανιούχου μεθυλίου. Τέλος 1kg

εδάφους στο οποίο δεν έγινε καμιά εφαρμογή εκτός από την προσαρμογή της υγρασίας του με αποιονισμένο νερο στο 45% της υδατοχωρητικότητας χρησιμοποιήθηκε ως μάρτυρας.

Όλα τα φυτοδοχεία μεταφέρθηκαν σε δωμάτιο ανάπτυξης και επώαστηκαν στους 23°C για τις επόμενες 60 ημέρες. Υποδείγματα (25g) λήφθηκαν από τις γλάστρες και το έδαφος τοποθετήθηκε στην κατάψυξη (-20°C) μέχρι την εξαγωγή του DNA. Δείγματα λήφθηκαν, 3, 15 και 60 ημέρες μετά την εφαρμογή των μεταχειρίσεων.

Εξαγωγή DNA από το έδαφος, Αλυσιδωτή Αντίδραση Πολυμεράσης (PCR) και Ηλεκτροφόρηση σε πηκτή ακρυλαμιδίου με βαθμίδωση αποδιατακτικών ουσιών (DGGE)

Το DNA από το έδαφος εκχυλίστηκε από 0.25g εδάφους χρησιμοποιώντας το Power Soil DNA isolation Kit σύμφωνα με τις οδηγίες του κατασκευαστή (MoBio Laboratories, USA) (βλ. Κεφ. 2). Η τεχνική της ημιεσωτερικής ένθεσης (nested PCR) ακολουθήθηκε για την ανάλυση της σύστασης της μικροβιακής κοινότητας των ΑΣΚ και των ΝΒΑ σε πηκτή ακρυλαμιδίου με βαθμίδωση αποδιατακτικών ουσιών (DGGE) (βλ. Κεφ. 2). Συγκεκριμένα στην πρώτη αντίδραση PCR για τους ΑΣΚ, το DNA που εκχυλίστηκε από το έδαφος, ενισχύθηκε με του εξειδικευμένους εκκινητές ITS1F-ITS4A, οι οποίοι ενισχύουν τμήμα της ITS περιοχής του 18sRNA των ΑΣΚ (Larena et al., 1999) και ως αποτέλεσμα παράγεται προϊόν με μέγεθος περίπου 600 ζ.β. Το προϊόν της πρώτης αντίδρασης, ενισχύθηκε επιπλέον από τους μη εξειδικευμένους εκκινητές ITS1F+GC-ITS2 και το τελικό προϊόν της αντίδρασης είχε μέγεθος (300 ζ.β.) κατάλληλο για την εφαρμογή της τεχνικής DGGE. Ο καθοδικός (forward) εκκινητής ήταν ακριβώς ο ίδιος με αυτόν που χρησιμοποιήθηκε κατά την πρώτη αντίδραση με τη διαφορά ότι, στη δεύτερη αντίδραση, προσαρτήθηκε σε αυτόν αλληλουχία GC στο 5' άκρο έτσι ώστε να σταθεροποιηθεί συμπεριφορά των προϊόντων DNA κατά την τήξη τους. Η συνθήκες των αντιδράσεων PCR αναφέρονται στο 2^ο Κεφάλαιο.

Για τα ΝΒΑ, το DNA που εκχυλίστηκε από το έδαφος αρχικά ενισχύθηκε με τη χρήση του ζεύγους εκκινητών βΑΜΟf-βΑΜΟr οι οποίοι είναι εξειδικευμένοι για την ενίσχυση αλληλουχίας του 16sRNA γονιδίου των β-πρωτεοβακτηρίων (McCaig et al., 1994a). Το τελικό προϊόν αυτής της αντίδρασης ενισχύθηκε επιπλέον με τη χρήση του ζεύγους εκκινητών CTO189fABC – CTO654r (Mahmood et al., 2006a) οι οποίοι θεωρούνται εξειδικευμένοι για τα ΝΒΑ (βλ. Κεφ. 2). Ακολούθως το τελικό προϊόν της δεύτερης αντίδρασης PCR ενισχύθηκε με τη χρήση του ζεύγους εκκινητών 357f + GC και 534r έτσι ώστε το τελικό προϊόν να είναι κατάλληλο για την εφαρμογή της τεχνικής DGGE (194 ζβ) (Muyzer et al., 1993). Οι συνθήκες των αντιδράσεων PCR αναφέρονται στο 2^ο Κεφάλαιο της παρούσας διατριβής καθώς επίσης και οι τελικές συγκεντρώσεις των αντιδραστηρίων που χρησιμοποιήθηκαν κατά τη διάρκεια των αντιδράσεων PCR.

Η τεχνική DGGE πραγματοποιήθηκε με τη συσκευή INGENYphorU-2x2 system (Ingeny International BV, Netherlands). Για την ανάλυση των δειγμάτων, ετοιμάστηκαν πηκτές

ακρυλαμιδίου (8%) σε ρυθμιστικό διάλυμα 1xTAE με βαθμίδωση των αποδιατακτικών ουσιών 30-55% και 45-62% για τους ΑΣΚ και τα ΝΒΑ αντίστοιχα. Με την ολοκλήρωση της ηλεκτροφόρησης και τη βαφή της πηκτών, αυτές φωτογραφήθηκαν και τα αποτελέσματα αναλύθηκαν με τη χρήση του λογιστικού πακέτου CrossChecker 2.9n (Wageningen University, The Netherlands). Τα δυαδικά δεδομένα που λήφθηκαν (απουσία/παρουσία ζώνης DNA) χρησιμοποιήθηκαν για την στατιστική ανάλυση των αποτελεσμάτων. Λεπτομέρειες σχετικά με την αρχή της μεθόδου και την προετοιμασία των αντιδραστηρίων, τις συνθήκες ηλεκτροφόρησης και το βάψιμο της πηκτής αναφέρονται στο 2^ο Κεφάλαιο της παρούσας διατριβής.

Κλωνοποίηση και αλληλούχιση των προϊόντων PCR

Γωνιδοματικές βιβλιοθήκες των ΑΣΚ και των ΝΒΑ δημιουργήθηκαν από τα προϊόντα PCR που προέκυψαν από τη χρήση των εξειδικευμένων εκκινητών ITS1F-ITS4A και CTO189fABC – CTO654r αντίστοιχα. Τα προϊόντα PCR δεν παρουσίασαν σημαντικές διαφοροποιήσεις όταν αναλύθηκαν με τη μέθοδο DGGE και για το λόγο αυτό, τα προϊόντα αντίδρασης PCR της κάθε μεταχείρισης συνενώθηκαν και καθαρίστηκαν με τη χρήση του Macherey-Nagel Nucleospin II PCR clean-up kit (Macherey-Nagel GmbH, Germany) σύμφωνα με τις οδηγίες του κατασκευαστή. Η κλωνοποίηση των τμημάτων DNA που λήφθηκαν από τις αντιδράσεις PCR και για τις δυο κατηγορίες μικροοργανισμών πραγματοποιήθηκε σε φορέα pGEM-T (Promega, Madison, USA) όπως περιγράφεται αλλού ενώ ο έλεγχος της γωνιδοματικής βιβλιοθήκης περιγράφεται αναλυτικά στο 2^ο Κεφάλαιο της παρούσας διατριβής.

Ακολούθως το πλασμιδιακό DNA των κλώνων που επιλέχθηκαν εκχυλίστηκε με τη χρήση του NucleoSpin Plasmid kit (Macherey-Nagel GmbH, Germany) σύμφωνα με τις οδηγίες του κατασκευαστή. Τέλος οι αντιδράσεις αλληλούχισης, πραγματοποιήθηκαν με τη χρήση του PRISM BigDye Terminator Cycle Sequence reaction kit (Applied Biosystems, UK) σύμφωνα με τις οδηγίες του κατασκευαστή. Οι αλληλουχίες καταχωρήθηκαν στη βάση δεδομένων EMBL (European Molecular Biology Laboratory) με αριθμούς καταχώρησης (FN562026 -562072) για τους ΑΣΚ και (FN562073-562083) για τα ΝΒΑ. Ακολούθως, οι αλληλουχίες που απομονώθηκαν κατά τη διαδικασία της κλωνοποίησης αντιστοιχίστηκαν με ήδη καταχωρημένες αλληλουχίες στη βάση δεδομένων χρησιμοποιώντας το εργαλείο BLAST. Πολλαπλές αντιστοιχίες των διάφορων αλληλουχιών πραγματοποιήθηκαν με τη χρήση του λογισμικού πακέτου ClustalW ενώ οι εξελικτικές αποστάσεις για τα ΝΒΑ υπολογίστηκαν σύμφωνα με το μοντέλο Jukes και Cantor (1969), η ομαδοποίηση των αλληλουχιών σύμφωνα με τη μέθοδο “Neighbor-Joining” και ο στατιστικός έλεγχος του δειγματοληπτικού ελέγχου του σφάλματος, κατά τον υπολογισμό των φυλογενετικών αποστάσεων έγινε με την ψευδο-δειγματοληπτική μέθοδο bootstrap με τιμή επαναλήψεων 1000. Το φυλογενετικό δένδρο δημιουργήθηκε με τη χρήση του προγράμματος TREEVIEW (Page, 1996).

Στατιστική ανάλυση

Τα δυαδικού τύπου αποτελέσματα τα οποία λήφθηκαν από την επεξεργασία των πηκτών ακρυλαμιδίου (παρουσία/απουσία ζώνης DNA), αναλύθηκαν με τη μέθοδο των κυρίων συντεταγμένων (Principle Coordinate Analysis, PCoA) για τη σύγκριση της επίδραση των διαφόρων μεταχειρίσεων και του χρόνου στη σύσταση της μικροβιακής κοινότητας των ΑΣΚ και των ΝΒΑ. Η ανάλυση έγινε με τη χρήση του στατιστικού πακέτου GENSTAT 7.0v

Αποτελέσματα – Συζήτηση

Ανάλυση DGGE της κοινότητας των ασκομυκήτων

Η παραλλακτικότητα μεταξύ των επαναλήψεων των διαφόρων μεταχειρίσεων ήταν ελάχιστη, και για το λόγο αυτό ένα δείγμα από κάθε μεταχείριση χρησιμοποιήθηκε για τη σύγκριση των διαφόρων μεταχειρίσεων σε επίπεδο ανάλυσης της μικροβιακής κοινότητας (Διάγραμμα 7.1). Το αποτύπωμα της κοινότητας των ΑΣΚ μεταβλήθηκε όμως σημαντικά μεταξύ των διαφόρων μεταχειρίσεων και στις πηκτές ακρυλαμίδιου, εμφανίστηκαν από 10 μέχρι και 24 ζώνες DNA. Ο μεγαλύτερος αριθμός ζωνών παρατηρήθηκε στις μεταχειρίσεις όπου στο έδαφος εφαρμόστηκε μπρόκολο, PITS και στο μάρτυρα ενώ, ο μικρότερος αριθμός ζωνών παρατηρήθηκε στο έδαφος όπου εφαρμόστηκε το υποκαπνιστικό MS. Η ανάλυση κυρίων συντεταγμένων (PCoA) στο προφίλ των ζωνών DNA των πηκτών ακρυλαμίδιου έδειξε ξεκάθαρο διαχωρισμό των εδαφών στα οποία εφαρμόστηκε MS 15 και 60 ημέρες μετά την εφαρμογή του από τις υπόλοιπες μεταχειρίσεις (Διάγραμμα 7.2). Διαχωρισμός παρατηρήθηκε επίσης στα εδάφη όπου ενσωματώθηκε μπρόκολο με ή χωρίς μυροσινάση στις 3 ημέρες από την ενσωμάτωσή τους. Συγκεκριμένα, οι δύο αυτές μεταχειρίσεις ομαδοποιήθηκαν μαζί αλλά ξεχωριστά από τις υπόλοιπες μεταχειρίσεις στο συγκεκριμένο στάδιο δειγματοληψίας (Διάγραμμα 7.2).

Λεπτομερής παρατήρηση των πηκτών ακρυλαμίδιου δείχνει ότι συγκεκριμένες ζώνες DNA σχετίζονται με την μεταχείριση που δέχτηκε το έδαφος και για το σκοπό αυτό δημιουργήθηκε γωνιδιοματική βιβλιοθήκη έτσι ώστε να αναγνωριστούν γένη ή είδη ΑΣΚ τα οποία αντιδρούν στις διάφορες μεταχειρίσεις. Συνολικά αλληλουχήθηκαν 47 κλώνοι, που αντιστοιχούσαν σε συγκεκριμένες ζώνες DNA στην πηκτή ακρυλαμίδιου από διάφορες μεταχειρίσεις (Διάγραμμα 7.1). Οι ζώνες 3, 4,6, 10,11, 16, 24, 26 και 45 ενώ ήταν ορατές στο μάρτυρα, στο B, BM και PITS απουσίαζαν από τα εδάφη όπου εφαρμόστηκε το MS και ειδικότερα κατά τους χρόνους δειγματοληψίας 15 και 60 ημερών από την εφαρμογή των μεταχειρίσεων (Διάγραμμα 7.1). Οι κλώνοι που σχετίζονται με τις προαναφερόμενες ζώνες DNA παρουσίασαν υψηλή ομολογία αλληλουχιών που κυμάνθηκε από 88 μέχρι 100% με εδαφογενή παθογόνα φυτών των γενών *Fusarium*, *Nectria*, *Phaeoacremonium* και *Cladosporium* (Πίνακας 7.1). Από την άλλη πλευρά, οι κλώνοι 32, 33 και 37 ήταν οι κυρίαρχοι στο έδαφος όπου εφαρμόστηκε το MS και αυτοί παρουσίασαν υψηλή ομολογία με στελέχη των *Eurotium sp.* (100%), *Hypocreales* (92%) και *Fusarium Profileratum* (100%) αντίστοιχα. Επιπρόσθετα οι κλώνοι 46 και 47 ήταν κυρίαρχοι ή εμφανίστηκαν στο έδαφος όπου εφαρμόστηκε PITS 60 ημέρες μετά την εφαρμογή του. Οι κλώνοι αυτοί παρουσίασαν υψηλή ομολογία με τον μύκητα *Epicocum nigrum* (99%) και ένα μη καλλιεργούμενο μύκητα της οικ. Nectriaceae (100%) (Πίνακας 7.1). Οι ζώνες DNA 17 και 18 εμφανίστηκαν μόνο στο έδαφος όπου ενσωματώθηκε μπρόκολο, 15 και 60 ημέρες μετά την ενσωμάτωση και οι κλώνοι που αλληλουχήθηκαν παρουσίασαν σχετικά μικρή ομολογία με τις αλληλουχίες της βάσης δεδομένων με υψηλότερη ομολογία με μύκητες του γένους *Pyrenochaeta*

(88-90%) (Πίνακας 7.1). Τέλος η ζώνη DNA 40, εμφανίζεται σε όλες τις μεταχειρίσεις και παρουσίασε υψηλή ομολογία με το είδος *Fusarium oxysporum* (Πίνακας 7.1).

Ανάλυση DGGE της κοινότητας των Νιτροποιητικών Βακτηρίων Α΄ Σταδίου

Όπως και στους ΑΣΚ έτσι και στα NBA δεν παρατηρήθηκε παραλλακτικότητα μεταξύ των επαναλήψεων της ίδιας μεταχείρισης. Επίσης δεν παρατηρήθηκε διαφοροποίηση των ζωνών DNA που αποτυπώθηκαν στην πηκτή ακρυλαμιδίου, μεταξύ των διαφόρων μεταχειρίσεων και του χρόνου δειγματοληψίας, ακόμα και στην περίπτωση του MS (Διάγραμμα 7.3). Συνολικά αποτυπώθηκαν στις διάφορες μεταχειρίσεις και χρόνους δειγματοληψίας 14 μέχρι και 17 ζώνες DNA. Ανάλυση PCoA του ζωνών αυτών έδειξε ότι, η σύσταση της κοινότητας των NBA δεν επηρεάστηκε από καμία μεταχείριση (Διάγραμμα 7.4), αποτέλεσμα αναμενόμενο και από την εμφανή ομοιομορφία των ζωνών DNA μεταξύ των μεταχειρίσεων στις πηκτές ακρυλαμιδίου.

Για την δημιουργία γωνιδιωματικής βιβλιοθήκης κλωνοποιήθηκαν και αλληλουχήθηκαν συνολικά 11 ζώνες DNA από τις διάφορες μεταχειρίσεις, και οι κλώνοι παρουσίασαν υψηλή ομολογία με NBA που ανήκουν στο γένος *Nitrosospira* (Διάγραμμα 7.5). Ειδικότερα η πλειοψηφία των κλώνων παρουσίασε υψηλή ομολογία με κλώνους β-πρωτεοβακτηρίων που προέρχονταν από περιβαλλοντικά δείγματα και κατατάσσονται στην ομάδα 3 του γένους *Nitrosospira*. Συγκεκριμένες ζώνες DNA που παρατηρήθηκαν στην πηκτή ακρυλαμιδίου, φαίνεται να σχετίζονται με ορισμένες από τις μεταχειρίσεις που εφαρμόστηκαν. Συγκεκριμένα, η ζώνη DNA 6 βρέθηκε στο έδαφος 60 ημέρες μετά την εφαρμογή του PIRC ο κλώνος παρουσίασε υψηλή ομολογία με κλώνο περιβαλλοντικού δείγματος που ανήκει στα β-πρωτεοβακτήρια. Αντίθετα, η ζώνη 8 η οποία εξαφανίστηκε 15 και 60 ημέρες μετά την εφαρμογή στο έδαφος MS παρουσίασε υψηλή ομολογία με το βακτήριο *Nitrosospira* B6.

Από τα παραπάνω φαίνεται ξεκάθαρα ότι η σύσταση των μικροβιακών κοινοτήτων των ΑΣΚ και των NBA στο έδαφος αντιδρά με διαφορετικό τρόπο στις επεμβάσεις που εφαρμόστηκαν. Συγκεκριμένα, η ενσωμάτωση στο έδαφος υπολειμμάτων μπρόκολου (B, BM) προκάλεσε μια παροδική μεταβολή της σύστασης της κοινότητας των ΑΣΚ και ήταν εμφανής μόνο 3 ημέρες μετά την ενσωμάτωση. Αυτό συνάδει με την απότομη κορύφωση της μικροβιακής δραστηριότητας που προκαλείται από τον ταχύ πολλαπλασιασμό των πληθυσμών ζυμογενών μικροοργανισμών. Οι ζώνες DNA που βρέθηκαν σε αυτές τις μεταχειρίσεις και απουσίαζαν από τις υπόλοιπες παρουσίασαν σχετικά υψηλή ομολογία με μύκητες του γένους *Pyrenochaeta*. Οι μύκητες αυτού του γένους, απαντώνται συχνά στα καλλιεργούμενα εδάφη και σχετίζονται με τη πρόκληση της ασθένειας «φελλώδης σηψιριζία». Η ενσωμάτωση στο έδαφος, υπολειμμάτων μπρόκολου πιθανότατα αυξάνει ραγδαία την μικροβιακή δραστηριότητα και την κατανάλωση οξυγόνου μειώνοντας την διαθεσιμότητά του και δραστηριοποιεί τον πολλαπλασιασμό λιγότερο ανταγωνιστικών σαπροφυτικών μυκήτων και ενδεχόμενων φυτοπαθογόνων όπως είναι για παράδειγμα οι μύκητες του γένους *Pyrenochaeta*. Προηγούμενες μελέτες έχουν δείξει ότι,

υπολείμματα καλλιέργειας Σταυρανθών αύξησε τη συχνότητα εμφάνισης στο έδαφος του παθογόνου *Rhizoctonia solani* (Yulianti et al., 2006). Επίπροσθετα, ο πληθυσμός των εδαφογενών φυτοπαθογόνων μυκήτων που ανήκουν στο γένος *Fusarium* δεν μειώθηκαν σημαντικά μετά την ενσωμάτωση στο έδαφος υπολειμμάτων του είδους *Brassica hiirta* ενώ στο ίδιο έδαφος, ο πληθυσμός αυτών των ΑΣΚ μειώθηκε κατά 97% μετά την εφαρμογή των υποκαπνιστικών MS και 1,3-διχλωροπροπένιο.

Η ενσωμάτωση στο έδαφος, B και BM δεν επηρέασε τη σύσταση της κοινότητας των NBA. Τελευταία οι Brown και Morra (2009) έδειξαν ότι, ενσωμάτωση στο έδαφος υπολειμμάτων Σταυρανθών είχε ως αποτέλεσμα την αναστολή της νιτροποίησης και υπέθεσαν ότι η παρουσία των ΓΚΣ στους ιστούς των και η επακόλουθη υδρόλυση τους στα τοξικά ΙΣΘ επηρεάζει τη διαδικασία στο έδαφος. Ωστόσο, στην εργασία τους δεν μελετήθηκε ταυτόχρονα η επίδραση των μεταχειρίσεων που εφάρμοσαν στη σύσταση της κοινότητας των NBA. Επιπλέον προηγούμενες εργασίες έδειξαν ότι, η αναστολή της διαδικασίας της νιτροποίησης στα εδάφη που παρατηρείται μετά την εφαρμογή σε αυτά στρεσογόνων συνθηκών δεν συνδέεται με την μεταβολή της σύστασης της κοινότητας των βακτηρίων που σχετίζονται με την διαδικασία αυτή στο έδαφος (Chang et al., 2001; Ibekwe et al., 2002; Phillips et al., 2000) και τα αποτελέσματα αυτής της εργασίας δείχνουν ότι το ίδιο ισχύει και για τις μεταχειρίσεις που εξετάστηκαν, συμπεριλαμβανομένου και του επισχετικού στους ασκομύκητες MS.

Η γλουκοναστουρίνη (GST) εντοπίζεται στο ριζικό σύστημα των Σταυρανθών (Fahey et al., 2001) και το προϊόν υδρόλυσης της, το PITC παρουσιάζει υψηλή τοξικότητα στους μικροοργανισμούς στο έδαφος *in vitro* (Smith and Kirkegaard, 2002). Από τα αποτελέσματα τόσο του 6^{ου} όσο και του 5^{ου} Κεφαλαίου, φαίνεται ότι η εφαρμογή στο έδαφος καθαρής μορφής PITC δεν επηρεάζει τη σύσταση της εδαφικής μικροβιακής κοινότητας. Προηγούμενη μελέτη έδειξε ότι, η εφαρμογή στο έδαφος PITC στα ίδια επίπεδα δόσολογίας με αυτά που εφαρμόστηκαν στην παρούσα εργασία μείωσαν σημαντικά το ολικό πληθυσμό των NBA που αναπτύχθηκαν στο τριβλίο, ωστόσο στην εργασία εκείνη δεν μελετήθηκε η σύσταση της κοινότητας των NBA στο έδαφος (Bending and Lincoln, 2000). Πιθανά η επικράτηση ενός γένους (*Nitrospira*) στον πληθυσμό των NBA να οδηγεί σε παρόμοια καταπύηση των διαφορετικών ειδών όταν εφαρμόζεται PITC ή και MS οπότε η όποια μείωση στον πληθυσμό των NBA να μην οδηγεί και σε σημαντικές αλλαγές στην σύσταση του πληθυσμού αυτού. Η μειωμένη τοξικότητα που παρατηρείται από την εφαρμογή του PITC στο έδαφος σε σύγκριση με τις *in vitro* συνθήκες, πιθανότατα οφείλεται στη μειωμένη βιοδιαθεσιμότητα του μορίου λόγω της αυξημένης προσρόφησής του στην οργανική ουσία και τα κolloειδή της αργίλου (Matthiessen and Shackleton, 2005).

Τα αποτελέσματα του παρόντος Κεφαλαίου ενισχύουν τις παρατηρήσεις και τα συμπεράσματα του προηγούμενου Κεφαλαίου σε ότι αφορά το γεγονός ότι, η συγκέντρωση των ΓΚΣ που εντοπίζονται στα φύλλα του μπρόκολου δεν μεταβάλλουν σημαντικά την μικροβιακή

δραστηριότητα στο έδαφος αλλά και τη σύσταση των λειτουργικών ομάδων των μικροοργανισμών που εξετάστηκαν. Αυτό πιθανότατα οφείλεται στη μικρή σχετικά συγκέντρωση των ΓΚΣ που ανιχνεύονται στους ιστούς του μπρόκολου που ενσωματώθηκαν στο έδαφος με ή χωρίς την προσθήκη μυροσινάσης, την σταδιακή απελευθέρωσή τους και την πιθανή υποβοήθηση της ανθεκτικότητάς τους από συστατικά των φυτικών ιστών που γίνονται ταυτόχρονα διαθέσιμα. Από την άλλη πλευρά μπορεί να υποθέσει κανείς ότι, τα προϊόντα υδρόλυσης των ΓΚΣ που εντοπίζονται στα φύλλα του μπρόκολου να μην παρουσιάζουν τοξική επίδραση στους μικροοργανισμούς που μελετήθηκαν και ειδικότερα στην περίπτωση των NBA. Ωστόσο μια τέτοια υπόθεση δεν στηρίζεται από τα μέχρι στιγμής διαθέσιμα στοιχεία της βιβλιογραφίας.

Αντίθετα με τις μεταχειρίσεις B, BM και PITC, η εφαρμογή στο έδαφος MS μετέβαλε σημαντικά τη σύσταση της μικροβιακής κοινότητας των ΑΣΚ οι οποίες ήταν εμφανείς 15 ημέρες μετά την εφαρμογή του, (αλλά όχι των NBA). Τα αποτελέσματα αυτά βρίσκονται σε συμφωνία με προηγούμενη μελέτη, όπου διαπιστώθηκε σημαντική μείωση της βιοποικιλότητας της κοινότητας των ΑΣΚ μετά από την εφαρμογή του MS στο έδαφος (Ibekwe et al., 2001). Κλωνοποίηση των ζωνών DNA της πηκτής ακρυλαμίδιου κατέδειξε ότι το MS είχε σημαντική αρνητική επίδραση σε κλώνους οι οποίοι εμφανίζονταν σε άλλες μεταχειρίσεις και παρουσίαζαν υψηλή ομολογία με μικροοργανισμούς που προσβάλλουν καλλιεργούμενα είδη. Στη βιβλιογραφία υπάρχουν αρκετές αναφορές σχετικά με την υψηλή αποτελεσματικότητα-τοξικότητα του MS σε εδαφογενή φυτοπαθογόνους μύκητες όπως αυτούς του γένους *Fusarium* και *Pyrenochaeta* (De Cal et al., 2005; Sinha et al., 1979). Παρόλα αυτά όμως, στο αποτύπωμα της μικροβιακής κοινότητας, στο έδαφος όπου εφαρμόστηκε MS παρατηρήθηκαν ζώνες DNA οι κλώνοι των οποίων αντιστοιχούσαν σε παθογόνους μικροοργανισμούς (Band 40). Αυτό προφανώς οφείλεται στο γεγονός ότι, το υποκαπνιστικό δεν σκοτώνει το σύνολο των μικροοργανισμών στο έδαφος, αλλά σημαντικό μέρος τους.

Συμπεράσματα

Από τα αποτελέσματα του παρόντος Κεφαλαίου φαίνεται ξεκάθαρα, η σύσταση των μικροβιακών κοινοτήτων του εδάφους που εξετάστηκαν δεν επηρεάζεται σημαντικά από την ενσωμάτωση στο έδαφος υπολειμμάτων καλλιέργειας μπρόκολου με ή χωρίς μυροσινάση, ενισχύοντας με αυτό τον τρόπο τα αποτελέσματα του προηγούμενου Κεφαλαίου.

Τα αποτελέσματα των αναλύσεων PLFAs που γίνονται σε επίπεδο ευρέων μικροβιακών ομάδων, συνάδουν με την προσέγγιση της ανάλυσης DNA (PCR, DGGE, κλωνοποίηση και αναγνώριση στελεχών) και επιπλέον δίνουν σαφέστερες πληροφορίες σε οικολογικό επίπεδο για την σύσταση της μικροβιακής κοινότητας.

Λαμβάνοντας υπόψη τα πιο πάνω, (και δεδομένων των μεταχειρίσεων των ιστών του μπρόκολου με μυροσινάση), μπορεί να υποθεθεί με ασφάλεια ότι η μεταβολή της σύστασης της μικροβιακής κοινότητας των ΑΣΚ 3 ημέρες μετά την ενσωμάτωση στο έδαφος, οφείλεται στην προσθήκη σε αυτό νωπής οργανικής ουσίας. Η υπόθεσή αυτή ενισχύεται από τα αποτελέσματα και του προηγούμενου Κεφαλαίου.

Επιπρόσθετα, φαίνεται ότι η συγκέντρωση των ΓΚΣ που περιέχονται στους ιστούς μπρόκολου είτε δεν είναι αρκετά υψηλή έτσι ώστε τα προϊόντα υδρόλυσης τους να προκαλούν τοξική δράση και κατ' επέκταση να μεταβάλλουν τη σύσταση της μικροβιακής κοινότητας στο έδαφος, είτε είναι μεν υψηλή αλλά όχι αποτελεσματική διότι η απελευθέρωση των ΓΚΣ στο εδαφικό περιβάλλον γίνεται σταδιακά.

Η εφαρμογή στο έδαφος καθαρής μορφής PIRC επίσης δεν είχε σημαντική επίδραση στη σύσταση της κοινότητας και των δύο λειτουργικών ομάδων μικροοργανισμών που μελετήθηκαν.

Οι δυο λειτουργικές ομάδες μικροοργανισμών φαίνεται να αντιδρούν διαφορετικά στις διάφορες μεταχειρίσεις, και φαίνεται ότι τα NBA παρουσιάζουν σταθερότητα σε ότι αφορά τη σύσταση της κοινότητάς τους στο έδαφος, ακόμα και μετά την εφαρμογή MS, παρόλο που στη διεθνή βιβλιογραφία παρουσιάζονται δεδομένα αναστολής της διαδικασίας νιτροποίησης κατά τη διάρκεια της απολύμανσης των εδαφών.

Βιβλιογραφία

- Avrahami, S., W. Liesack, and R. Conrad. 2003. Effects of temperature and fertilizer on activity and community structure of soil ammonia oxidizers. *Environmental Microbiology* 5:691-705.
- Belser, L.W. 1979. Population ecology of nitrifying bacteria. *Annual Review of Microbiology* 33:309-333.
- Bending, G.D., and S.D. Lincoln. 2000. Inhibition of soil nitrifying bacteria communities and their activities by glucosinolate hydrolysis products. *Soil Biology and Biochemistry* 32:1261-1269.
- Berbee, M.L. 2001. The phylogeny of plant and animal pathogens in the Ascomycota. *Physiological and Molecular Plant Pathology* 59:165-187.
- Berbegal, M., J. Garcia-Jimenez, and J. Armengol. 2008. Effect of cauliflower residue amendments and soil solarization on *Verticillium* wilt control in artichoke. *Plant Disease* 92:595-600.
- Brown, P.D., and M.J. Morra. 2009. Brassicaceae Tissues as Inhibitors of Nitrification in Soil. *Journal of Agricultural and Food Chemistry* 57:7706-7711.
- Bruns, M.A., J.R. Stephen, G.A. Kowalchuk, J.I. Prosser, and E.A. Paul. 1999. Comparative diversity of ammonia oxidizer 16S rRNA gene sequences in native, tilled, and successional soils. *Applied and Environmental Microbiology* 65:2994-3000.
- Chang, Y.J., A. Hussain, J.R. Stephen, M.D. Mullen, D.C. White, and A. Peacock. 2001. Impact of herbicides on the abundance and structure of indigenous beta-subgroup ammonia-oxidizer communities in soil microcosms. *Environmental Toxicology and Chemistry* 20:2462-2468.
- Chu, H., T. Fujii, S. Morimoto, X. Lin, K. Yagi, J. Hu, and J. Zhang. 2007. Community Structure of Ammonia-Oxidizing Bacteria under Long-Term Application of Mineral Fertilizer and Organic Manure in a Sandy Loam Soil, pp. 485-491, Vol. 73.
- De Boer, W., P.J.A. Klein-Gunnewiek, and S.R. Troelstra. 1990. Nitrification in Dutch heathland soils. *Plant and Soil* 127:193-200.
- De Cal, A., A. Martinez-Treceño, T. Salto, J.M. López-Aranda, and P. Melgarejo. 2005. Effect of chemical fumigation on soil fungal communities in Spanish strawberry nurseries. *Applied Soil Ecology* 28:47-56.
- Dighton, J. 2007. Nutrient Cycling by Saprotrophic Fungi in Terrestrial Habitats, *In* K. Esser, ed. *The Mycota Vol. IV*, 2nd ed. Springer, Berlin Heidelberg New York.
- Ehaliotis, C., G. Cadisch, and K.E. Giller. 1998. Substrate amendments can alter microbial dynamics and N availability from maize residues to subsequent crops. *Soil Biology and Biochemistry* 30:1281-1292.

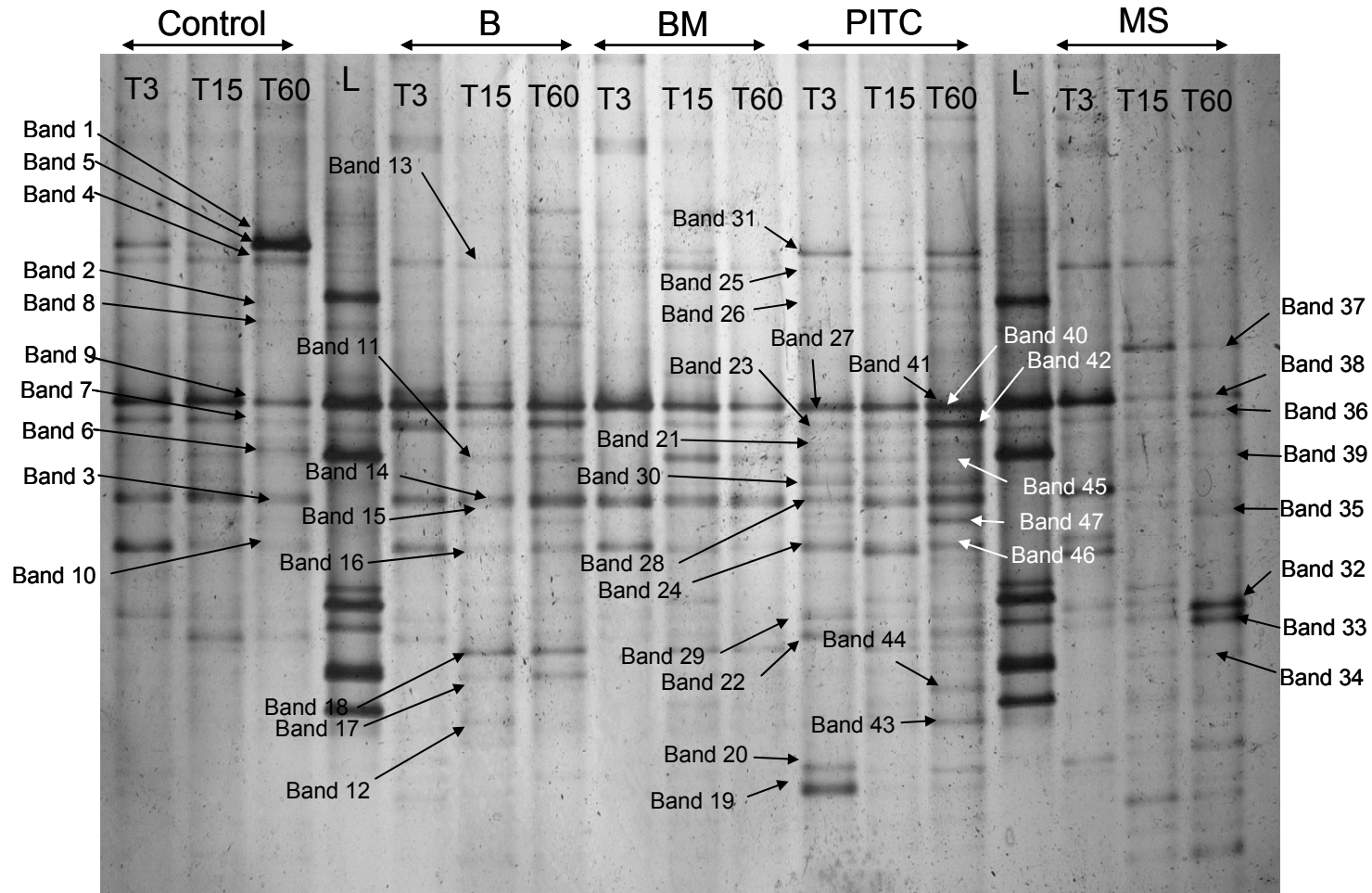
- Fahey, W.J., T.A. Zalcmann, and P. Talalay. 2001. The chemical diversity and distribution of glucosinolates and isothiocyanates among plants. *Phytochemistry* 56:5-51.
- Grinhut, T., Y. Hadar, and Y. Chen. 2007. Degradation and transformation of humic substances by saprotrophic fungi: processes and mechanisms. *Fungal Biology Reviews* 21:179-189.
- Hastings, R.C., M.T. Ceccherini, N. Miclaus, J.R. Saunders, M. Bazzicalupo, and A.J. McCarthy. 1997. Direct molecular biological analysis of ammonia oxidising bacteria populations in cultivated soil plots treated with swine manure. *FEMS Microbiology Ecology* 23:45-54.
- Ibekwe, A.M., S.K. Papiernik, J. Gan, S.R. Yates, C.H. Yang, and D.E. Crowley. 2001. Impact of fumigants on soil microbial communities. *Applied and Environmental Microbiology* 67:3245-3257.
- Ibekwe, A.M., A.C. Kennedy, P.S. Frohne, S.K. Papiernik, C.H. Yang, and D.E. Crowley. 2002. Microbial diversity along a transect of agronomic zones. *FEMS Microbiology Ecology* 39:183-191.
- Junier, P., O.S. Kim, O. Hadas, J.F. Imhoff, and K.P. Witzel. 2008. Evaluation of PCR primer selectivity and phylogenetic specificity by using amplification of 16S rRNA genes from betaproteobacterial ammonia-oxidizing bacteria in environmental samples. *Applied and Environmental Microbiology* 74:5231-5236.
- Kavroulakis, N., S. Ntougias, G.I. Zervakis, C. Ehaliotis, K. Haralampidis, and K.K. Papadopoulou. 2007. Role of ethylene in the protection of tomato plants against soil-borne fungal pathogens conferred by an endophytic *Fusarium solani* strain. *Journal of Experimental Botany* 58:3853-3864.
- Kowalchuk, G.A., and J.R. Stephen. 2001. Ammonia-oxidizing bacteria: A model for molecular microbial ecology. *Annual Review of Microbiology* 55:485-529.
- Kowalchuk, G.A., J.R. Stephen, W. DeBoer, J.I. Prosser, T.M. Embley, and J.W. Woldendorp. 1997. Analysis of ammonia-oxidizing bacteria of the beta subdivision of the class Proteobacteria in coastal sand dunes by denaturing gradient gel electrophoresis and sequencing of PCR-amplified 16S ribosomal DNA fragments. *Applied and Environmental Microbiology* 63:1489-1497.
- Larena, I., O. Salazar, V. González, M.C. Julián, and V. Rubio. 1999. Design of a primer for ribosomal DNA internal transcribed spacer with enhanced specificity for ascomycetes. *Journal of Biotechnology* 75:187-194.
- Larkin, R.P., and T.S. Griffin. 2007. Control of soilborne potato diseases using Brassica green manures. *Crop Protection* 26:1067-1077.
- Lazzeri, L., O. Leoni, and L.M. Manici. 2004. Biocidal plant dried pellets for biofumigation. *Industrial Crops and Products* 20:59-65.
- Lewis, J.A., and G.C. Papavizas. 1991. Biocontrol of plant diseases: the approach for tomorrow. *Crop Protection* 10:95-105.

- Mahmood, S., Thomas E. Freitag, and J.I. Prosser. 2006a. Comparison of PCR primer-based strategies for characterization of ammonia oxidizer communities in environmental samples, pp. 482-493, Vol. 56.
- Mahmood, S., T.E. Freitag, and J.I. Prosser. 2006b. Comparison of PCR primer-based strategies for characterization of ammonia oxidizer communities in environmental samples. *FEMS Microbiology Ecology* 56:482-493.
- Matthiessen, N.J., and A.M. Shackleton. 2005. Biofumigation: environmental impacts on the biological activity of diverse pure and plant-derived isothiocyanates. *Pest Management Science* 61:1043-1051.
- McCaig, A.E., T.M. Embley, and J.I. Prosser. 1994a. Molecular analysis of enrichment cultures of marine ammonia oxidisers. *FEMS Microbiol. Lett.* 120:363-367.
- McCaig, A.E., T.M. Embley, and J.I. Prosser. 1994b. Molecular analysis of enrichment cultures of marine ammonia oxidizers. *FEMS Microbiology Letters* 120:363-367.
- Muyzer, G., E.C. De Waal, and A.G. Uitterlinden. 1993. Profiling of complex microbial populations by denaturing gradient gel electrophoresis analysis of polymerase chain reaction-amplified genes coding for 16S rRNA. *Appl Environ Microbiol* 59:695-700.
- Ochiai, N., M.L. Powelson, F.J. Crowe, and R.P. Dick. 2008. Green manure effects on soil quality in relation to suppression of *Verticillium* wilt of potatoes. *Biology and Fertility of Soils* 44:1013–1023.
- Osono, T., Y. Fukasawa, and H. Takeda. 2003. Roles of diverse fungi in larch needle-litter decomposition. *Mycologia* 95:820-826.
- Page, R.D.M. 1996. TREEVIEW: An application to display phylogenetic trees on personal computers. *Computer Applications in the Biosciences* 2:357-358.
- Peacock, A.D., M.D. Mullen, D.B. Ringelberg, D.D. Tyler, D.B. Hedrick, P.M. Gale, and D.C. White. 2001. Soil microbial community responses to dairy manure or ammonium nitrate applications. *Soil Biology and Biochemistry* 33:1011-1019.
- Phillips, C.J., D. Harris, S.L. Dollhopf, K.L. Gross, J.I. Prosser, and E.A. Paul. 2000. Effects of agronomic treatments on structure and function of ammonia-oxidizing communities. *Applied and Environmental Microbiology* 66:5410-5418.
- Prosser, J.I., and G.W. Nicol. 2008. Relative contributions of archaea and bacteria to aerobic ammonia oxidation in the environment. *Environmental Microbiology* 10:2931-2941.
- Purkhold, U., A. Pommerening-Roser, S. Juretschko, M.C. Schmid, H.P. Koops, and M. Wagner. 2000. Phylogeny of all recognized species of ammonia oxidizers based on comparative 16S rRNA and amoA sequence analysis: Implications for molecular diversity surveys. *Applied and Environmental Microbiology* 66:5368-5382.

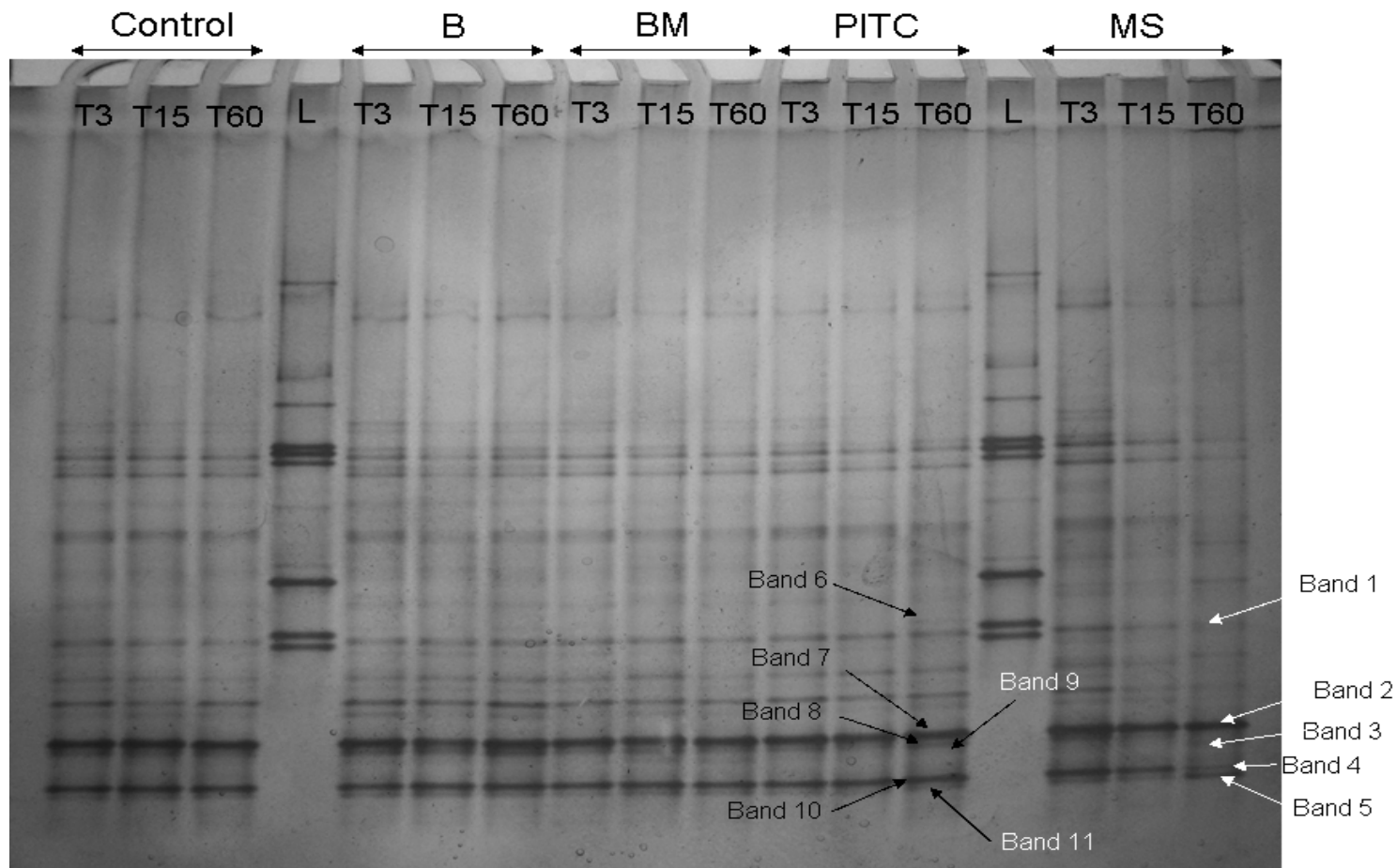
- Rezácová, V., H. Hrselová, H. Gryndlerová, I. Miksík, and M. Gryndler. 2006. Modifications of degradation-resistant soil organic matter by soil saprobic microfungi. *Soil Biology and Biochemistry* 38:2292-2299.
- Schwarzenbach, K., J. Enkerli, and F. Widmer. 2009. Effects of biological and chemical insect control agents on fungal community structures in soil microcosms. *Applied Soil Ecology* 42:54-62.
- Sinha, A., V. Agnihotri, and K. Singh. 1979. Effect of soil fumigation with vapam on the dynamics of soil microflora and their related biochemical activity. *Plant and Soil* 53:89-98.
- Smith, B.J., and a.J.A. Kirkegaard. 2002. In vitro inhibition of soil microorganisms by 2-phenylethyl isothiocyanate. *Plant Pathology* 51:585-593.
- Tanaka, H., K.M. Kyaw, K. Toyota, and T. Motobayashi. 2006. Influence of application of rice straw, farmyard manure, and municipal biowastes on nitrogen fixation, soil microbial biomass N, and mineral N in a model paddy microcosm. *Biology and Fertility of Soils* 42:501-505.
- Toyota, K., and S. Kuninaga. 2006. Comparison of soil microbial community between soils amended with or without farmyard manure. *Applied Soil Ecology* 33:39-48.
- Tu, C., J.B. Ristaino, and S. Hu. 2006. Soil microbial biomass and activity in organic tomato farming systems: Effects of organic inputs and straw mulching. *Soil Biology and Biochemistry* 38:247-255.
- Viebahn, M., C. Veenman, K. Wernars, L.C. van Loon, E. Smit, and P. Bakker. 2005. Assessment of differences in ascomycete communities in the rhizosphere of field-grown wheat and potato. *FEMS Microbiology Ecology* 53:245-253.
- Wang, G., Y. Xu, J. Jin, J. Liu, Q. Zhang, and X. Liu. 2009. Effect of soil type and soybean genotype on fungal community in soybean rhizosphere during reproductive growth stages. *Plant and Soil* 317:135-144.
- Webster, G., T.M. Embley, T.E. Freitag, Z. Smith, and J.I. Prosser. 2005. Links between ammonia oxidizer species composition, functional diversity and nitrification kinetics in grassland soils. *Environmental Microbiology* 7:676-684.
- Widmer, F., F. Rasche, M. Hartmann, and A. Fliessbach. 2006. Community structures and substrate utilization of bacteria in soils from organic and conventional farming systems of the DOK long-term field experiment. *Applied Soil Ecology* 33:294-307.
- Yulianti, T., K. Sivasithamparam, and D.W. Turner. 2006. Saprophytic growth of *Rhizoctonia solani* Kuhn AG2-1 (ZG5) in soil amended with fresh green manures affects the severity of damping-off in canola. *Soil Biology and Biochemistry* 38:923-930.

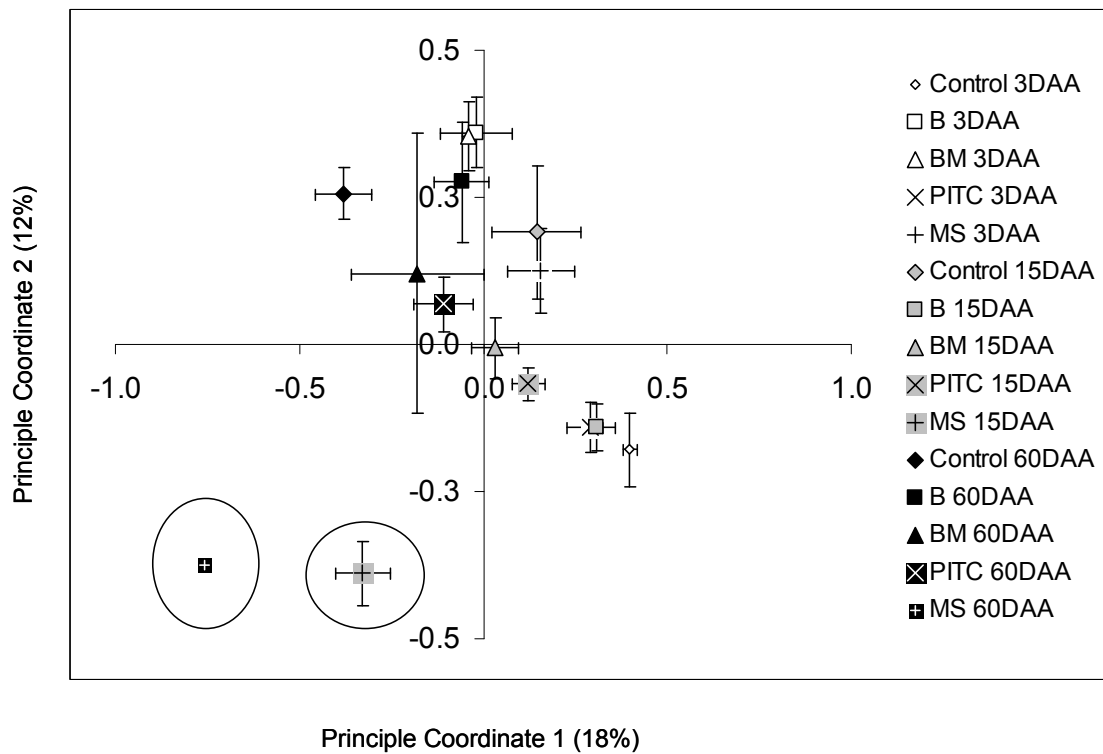
Πίνακες και Διαγράμματα

Διάγραμμα 7.1 Εικόνα πηκτής ακρυλαμιδίου με βαθμίδωση αποδιατακτικών ουσιών (DGGE) όπου ηλεκτροφορήθηκαν τα προϊόντα PCR που ενίσχυσαν μερικώς την ITS περιοχή της κοινότητας των ΑΣΚ στο έδαφος στις διάφορες μεταχειρίσεις και σε διάφορους χρόνους δειγματοληψίας. Διαδρομές στη πηκτή όπου αναφέρεται το γράμμα L αντιστοιχούν σε ITS-PCR προϊόντα γνωστών μυκήτων οι οποίοι εμφανίζονται από πάνω προς τα κάτω: *Pleurotus djamor*, *Fusarium oxysporum* f.sp. *radici-lycopersici*, *F. solani*, *P. eryngii*, *P. ostreatus*, *P. cystidiosus*. Οι ζώνες DNA που σημειώνονται με τα βέλη, αφορούν τα δείγματα που χρησιμοποιήθηκαν για τη δημιουργία της γονιδιωματικής βιβλιοθήκης.

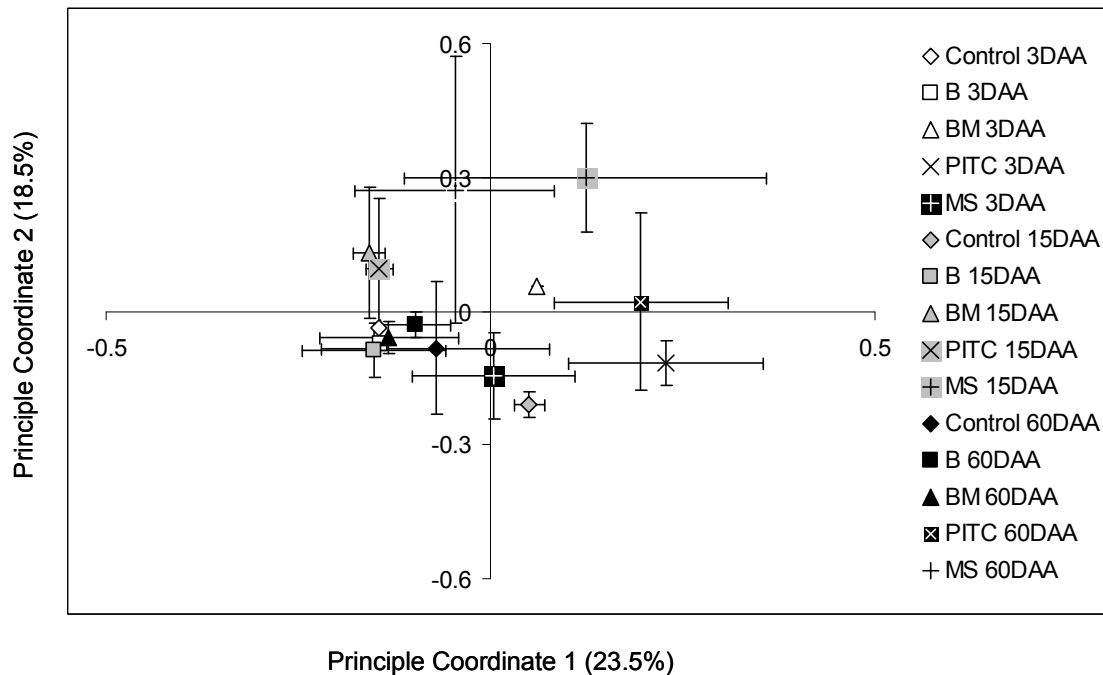


Διάγραμμα 7.3 Εικόνα πηκτής ακρυλαμιδίου με βαθμίδωση αποδιατακτικών ουσιών (DGGE) όπου ηλεκτροφορήθηκαν τα προϊόντα PCR που ενίσχυσαν μερικώς την 16sRNA περιοχή της κοινότητας των NBA στο έδαφος στις διάφορες μεταχειρίσεις και σε διάφορους χρόνους δειγματοληψίας. Διαδρομές στη πηκτική όπου αναφέρεται το γράμμα L αντιστοιχούν σε ITS-PCR προϊόντα γνωστών μυκήτων οι οποίοι εμφανίζονται από πάνω προς τα κάτω: *Deinococcus radiodurans*, *Flavobacterium* sp. *Pseudomonas entomophila*, *Rhizobium* sp., *Mesorhizobium loti*, *Agrobacterium* sp. Οι ζώνες DNA που σημειώνονται με τα βέλη, αφορούν τα δείγματα που χρησιμοποιήθηκαν για τη δημιουργία της γονιδιωματικής βιβλιοθήκης.

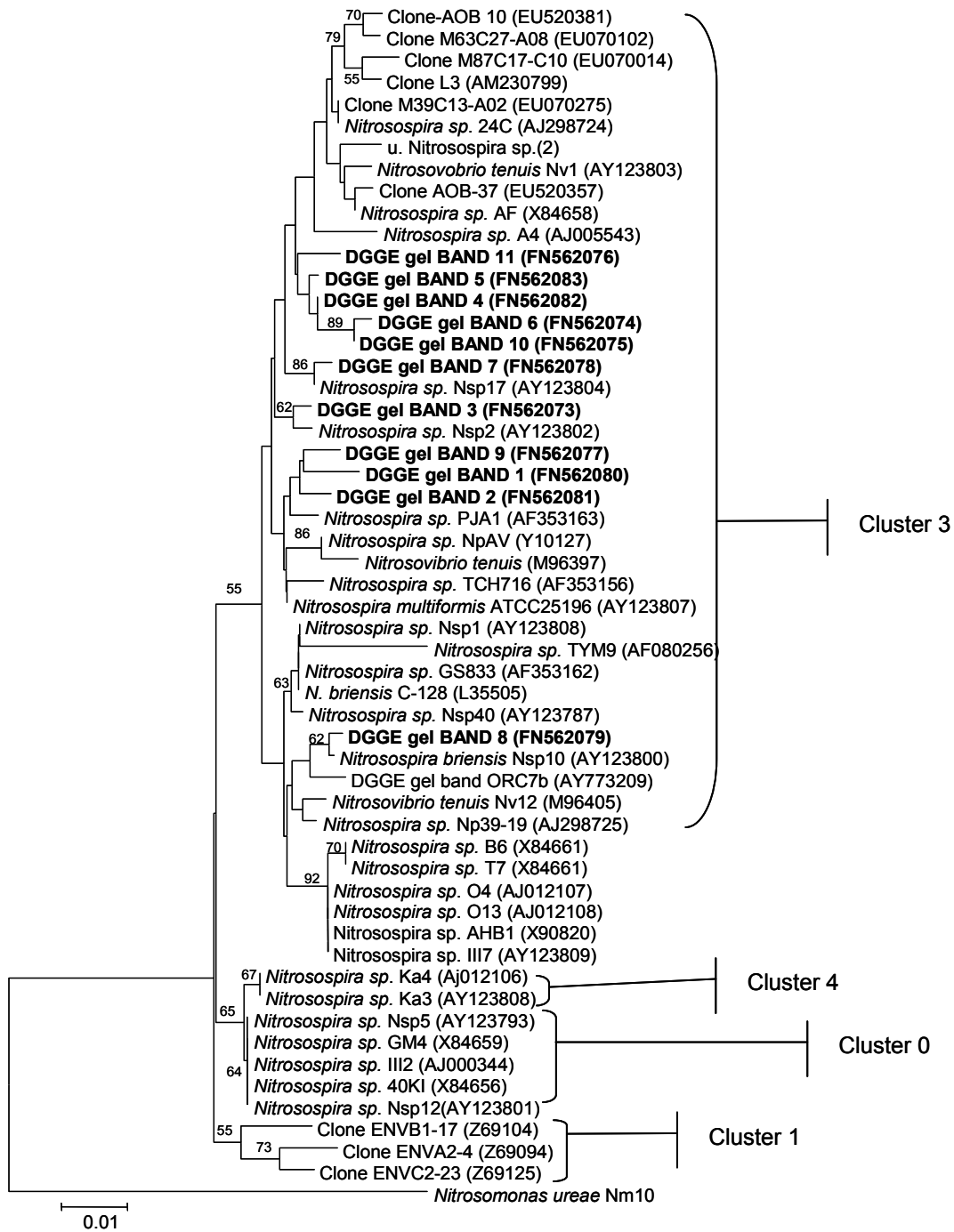




Διάγραμμα 7.2 Ανάλυση Κυρίων Συντεταγμένων (Μέση τιμή Ομάδας,) των ζωνών DNA της πηκτής ακρυλαμιδίου όπου εφαρμόστηκε η μέθοδος DGGE για την αξιολόγηση της επίδρασης των διαφόρων μεταχειρίσεων στη σύσταση της μικροβιακής κοινότητας των ασκομυκήτων. Κάθε τιμή αφορά το μέσο όρο 3 επαναλήψεων και τα διακύμανση στα σημεία αφορούν τη τυπική απόκλιση του μέσου των δυο συντεταγμένων (Coordinates).



Διάγραμμα 7.4 Ανάλυση Κυρίων Συντεταγμένων (Μέση τιμή Ομάδας,) των ζωνών DNA της πηκτικής ακρυλαμιδίου όπου εφαρμόστηκε η μέθοδος DGGE για την αξιολόγηση της επίδρασης των διαφόρων μεταχειρίσεων στη σύσταση της μικροβιακής κοινότητας των Νιτροποιητικών Βακτηρίων Α΄ Σταδίου. Κάθε τιμή αφορά το μέσο όρο 3 επαναλήψεων και τα διακύμανση στα σημεία αφορούν τη τυπική απόκλιση του μέσου των δυο συντεταγμένων (Coordinates).



Διάγραμμα 7.5 Φυλογενετικό δένδρο αλληλουχιών του γονιδιακού 16sRNA των β-πρωτεοβακτηρίων που σχετίζονται με Νιτροποιητικά Βακτήρια Α΄ Σταδίου. Οι εξελικτικές αποστάσεις υπολογίστηκαν με τη μέθοδο Jukes and Cantor (1969) και η τοπολογία τους με τη μέθοδο “neighbor-joining” (Saitou and Nei 1987). Οι τιμές στα σημεία τομής των αποστάσεων αφορούν τιμές bootstrap>50% (1000 ψευδο-αναδειγματοληψίες)

Πίνακας 7.1 Ομολογία των αλληλουχιών των κλώνων που επιλέχθηκαν για το χαρακτηρισμό της σύστασης της κοινότητας των ΑΣΚ σε έδαφος όπου εφαρμόστηκαν οι διάφορες μεταχειρίσεις.

| DGGE gel Band Number | GenBank Accession No. | Closest match from GenBank | Sequence similarity by BLAST (%) |
|-------------------------------------|----------------------------------|---|---|
| 1 | FN562027 | <i>Fusarium</i> sp. isol. (EU750695) | 98 |
| 2 | FN562028 | Unc. Ascomycete clone (AM901918) | 89 |
| 3 | FN562029 | <i>Fusarium</i> sp. isol. (DQ885388) | 100 |
| 4 | FN562030 | Ascomycete isol. PB1-R2-B Lr (EF601597) | 100 |
| 5 | FN562031 | <i>Bionectria ochroleuca</i> isol. (AB305167) | 99 |
| 6 | FN562032 | <i>Cladosporium tenuissimum</i> isol. (AJ301715) | 99 |
| 7 | FN562033 | <i>Cladosporium</i> sp. F40 isol. (FJ755823) | 100 |
| 8 | FN562034 | <i>Hypocreales</i> sp. LM481 isol. (EF060782) | 100 |
| 9 | FN562035 | <i>Fusarium oxysporum</i> strain (EU364866) | 99 |
| 10 | FN562036 | <i>Fusarium equiseti</i> isol. T151 (FJ459981) | 100 |
| 11 | FN562026 | <i>Fusarium</i> sp. isol. 19003 (EU750689) | 88 |
| 12 | FN562037 | <i>Nectria mauritiicola</i> (AJ557830) | 99 |
| 13 | FN562038 | Unc. soil fungus clone (DQ420703) | 98 |
| 14 | FN562039 | Unc. fungus clone (EU292653) | 99 |
| 15 | FN562040 | Unc. ascomycete clone (EU490176) | 99 |
| 16 | FN562041 | <i>Phaeoacremonium hungaricum</i> isol. (EU863525) | 100 |
| 17 | FN562042 | <i>Pyrenochaeta</i> sp. isol. 14009 (EU750693) | 92 |
| 18 | FN562043 | <i>Pyrenochaeta lycopersici</i> isol. (AY649596) | 85 |
| 19 | FN562044 | <i>Retroconis fusiformis</i> isol. (EU040239) | 91 |
| 20 | FN562045 | <i>Chaetomium globosum</i> isol. (EU330625) | 82 |
| 21 | FN562046 | <i>Fusarium</i> sp. isol. 19001 (EU750688) | 98 |

| | | | |
|----|----------|---|-----|
| 22 | FN562047 | Unc. soil fungus clone (DQ420780) | 99 |
| 23 | FN562048 | <i>Fusarium</i> sp. isol. 14018 (EU750682) | 100 |
| 24 | FN562049 | <i>Fusarium</i> sp. isol. MI17 (AB245442) | 99 |
| 25 | FN562050 | Unc. soil fungus clone (DQ421300) | 98 |
| 26 | FN562051 | Unc. <i>Nectria</i> clone (DQ779773) | 100 |
| 27 | FN562052 | Unc. soil fungus clone (EF601651) | 99 |
| 28 | FN562053 | Unc. soil fungus clone (AM229059) | 99 |
| 29 | FN562054 | <i>Trichocladium asperum</i> isol. (AY706336) | 99 |
| 30 | FN562055 | <i>Fusarium</i> sp. isol. FVS3 (DQ885388) | 100 |
| 31 | FN562056 | Unc. <i>Aspergillus</i> sp. clone (AM159626) | 96 |
| 32 | FN562037 | <i>Eurotium</i> sp. isol. BF78 (AM901691) | 100 |
| 33 | FN562038 | <i>Hypocreales</i> sp. isol. LM364 (EF060680) | 92 |
| 34 | FN562039 | Unc. soil fungus clone (DQ421051) | 100 |
| 35 | FN562040 | Unc. fungus clone (FJ213525) | 97 |
| 36 | FN562041 | Unc. ascomycete clone (EU490077) | 91 |
| 37 | FN562042 | <i>Fusarium proliferatum</i> isol. 16 (EU301646) | 100 |
| 38 | FN562043 | Unc. soil fungus clone (DQ421050) | 100 |
| 39 | FN562044 | Unc. fungus clone (FJ777216) | 78 |
| 40 | FN562045 | <i>Fusarium oxysporum</i> strain (EU364866) | 100 |
| 41 | FN562046 | <i>Metarhizium anisopliae</i> isol. (EU307930) | 100 |
| 42 | FN562047 | <i>Epicoccum nigrum</i> isol. (FJ903352) | 99 |
| 43 | FN562048 | Unc. ascomycete clone (EU490168) | 75 |
| 44 | FN562049 | <i>Nectria cinnabarina</i> isol. (AB237663) | 78 |
| 45 | FN562050 | <i>Bionectria ochroleuca</i> isol. (EU273558) | 91 |
| 46 | FN562051 | unc. <i>Nectriaceae</i> clone (DQ093766) | 99 |
| 47 | FN562052 | unc. <i>Nectriaceae</i> clone (AJ879658) | 100 |

Κεφάλαιο 8^ο

Διάσπαση των γλυκοσινολικών οξέων στο έδαφος

Περίληψη

Τα γλυκοσινολικά οξέα ως προϊόντα του δευτερογενούς μεταβολισμού των Σταυρανθών υδρολύονται από το ένζυμο μυροσινάση (EC 3.2.1.147) σε διάφορα προϊόντα τα οποία διαφέρουν ανάλογα με τις συνθήκες που λαμβάνει χώρα η αντίδραση της υδρόλυσης τους. Τα προϊόντα υδρόλυσής τους έχουν τοξική δράση στους διάφορους μικροοργανισμούς στο έδαφος, και ως εκ τούτου, οι συνθήκες κάτω από τις οποίες πραγματοποιείται η διάσπασή τους στο έδαφος καθορίζουν την αποτελεσματικότητα της εφαρμογής της βιοαπολύμανσης με ενσωμάτωση σταυρανθών σε συνθήκες αγρού.

Στο Κεφάλαιο αυτό μελετήθηκε η συμπεριφορά στο έδαφος καθαρών μορφών ΓΚΣ που περιέχονται στο μπρόκολο και στη ρόκα (GRA και GER) καθώς επίσης και των ΓΚΣ που περιέχονται στα φύλλα μπρόκολου μετά την ενσωμάτωση τους στο έδαφος με δυο διαφορετικά επίπεδα υγρασίας. Η τύχη των ΓΚΣ στο έδαφος, μελετήθηκε με την εφαρμογή του κινητικού μοντέλου πρώτης τάξης, και προσδιορίστηκε βάση των πειραματικών δεδομένων ο ρυθμός μείωσης της συγκέντρωσης των ΓΚΣ στο έδαφος καθώς και η ημιπερίοδος ζωής των ΓΚΣ σε αυτό. Το ποσοστό υγρασίας επηρεάζει σημαντικά ($p < 0.001$) τη διάσπαση των ΓΚΣ στο έδαφος, αφού σε συνθήκες αυξημένης εδαφικής υγρασίας (90% της υδατοικανότητας του εδάφους), η συγκέντρωση των ΓΚΣ στο έδαφος, ήταν μικρότερη. Η ημιπερίοδος ζωής των ΓΚΣ στο έδαφος κυμάνθηκε από 3 ώρες μέχρι και 14 ώρες μετά την εφαρμογή τους, ενώ υπολείμματα ΓΚΣ ανιχνεύθηκαν μέχρι και 7 ημέρες μετά την εφαρμογή τους. Ωστόσο ο ρυθμός μείωσης της συγκέντρωσης των διαφόρων ΓΚΣ διέφερε ανάλογα με τον τύπο των ΓΚΣ, και τα ινδολικά ΓΚΣ διασπάστηκαν με τριπλάσιο ρυθμό σε σύγκριση με τα αλειφατικά όταν το ποσοστό υγρασίας του εδάφους ήταν ίσο με το 90% της υδατοικανότητας του. Η διάσπαση των ΓΚΣ όταν αυτά εφαρμόζονται στο έδαφος, σε καθαρή μορφή συσχετίζεται στατιστικά σημαντικά με την ενζυμική δραστηριότητα της μυροσινάσης στο έδαφος. Η ενζυμική δράση της μυροσινάσης από την άλλη πλευρά συσχετίστηκε στατιστικά σημαντικά με την μικροβιακή αναπνοή εδάφους, γεγονός που υποδηλώνει την παρουσία ή την ανάπτυξη μικροοργανισμών στο έδαφος, που έχουν τη δυνατότητα παραγωγής του ενζύμου. Αντίθετα, η ενζυμική δράση της μυροσινάσης, δεν συσχετίστηκε στατιστικά σημαντικά με την μικροβιακή δραστηριότητα στο έδαφος όπου ενσωματώθηκαν φύλλα μπρόκολου.

Εισαγωγή

Η ενσωμάτωση στο έδαφος υπολειμμάτων Σταυρανθών έχει ως αποτέλεσμα την καταστροφή των φυτικών ιστών, την διάρρηξη των κυττάρων, και την ελευθέρωση στο εδαφικό διάλυμα των περιεχόμενων στους ιστούς ΓΚΣ και του ενζύμου μυροσινάση. Η μυροσινάση εντοπίζεται στο χυμοτόπιο ή σε εξειδικευμένα κύτταρα μυροσίνης στους σπόρους. Η μυροσινάση είναι μια θειο-γλυκοσιδάση η οποία καταλύει την αντίδραση υδρόλυσης των ΓΚΣ σε γλυκόζη, θειικό ιόν και ισοθειοκυανιούχο ένωση η δομή της οποία καθορίζεται από την πλευρική αλυσίδα του αρχικού ΓΚΣ όταν το pH του μέσου στο οποίο γίνεται η αντίδραση είναι ουδέτερο (Bones and Rossiter, 2006). Σε όξινες συνθήκες, και παρουσία ιόντων σιδήρου και μια επιθειοειδικής πρωτεΐνης (ESP) η υδρόλυση των ΓΚΣ έχει ως αποτέλεσμα το σχηματισμό των αντίστοιχων νιτριλίων (Tookey, 1973; Vanetten et al., 1966).

Τα ΓΚΣ δεν παρουσιάζουν βιολογική δράση, και για το λόγο αυτό οι μελέτες που σχετίζονται με τη διερεύνηση της συμπεριφοράς τους στο έδαφος είναι περιορισμένες (Gimsing and Kirkegaard, 2006; Gimsing et al., 2007a). Προηγούμενες μελέτες έδειξαν ότι, μόνο το 13% των ΓΚΣ που περιέχονταν στους ιστούς των φυτών που ενσωματώθηκαν στο έδαφος, ανιχνεύθηκαν σε αυτό και βρίσκονταν σε ανιχνεύσιμες ποσότητες 8 ημέρες μετά την εφαρμογή τους (Gimsing and Kirkegaard, 2006). Οι περισσότερες από τις μελέτες επικεντρώθηκαν στην ανίχνευση των προϊόντων υδρόλυσης των ΓΚΣ στο έδαφος, των ισοθειοκυανιούχων ενώσεων, για την αξιολόγηση του δυναμικού βιοαπολύμανσης των διαφόρων καλλιεργειών (Borek et al., 1996; Brown et al., 1994; Gimsing et al., 2007b; Matthiensen et al., 2004; Morra and Kirkegaard, 2002). Η υδρόλυση των ΓΚΣ και κατ' επέκταση ο σχηματισμός των αντίστοιχων ισοθειοκυανιούχων ενώσεων μετά από την ενσωμάτωση στο έδαφος υπολειμμάτων Σταυρανθών επηρεάζεται από τη κατεργασία και το βαθμό τεμαχισμού των φυτικών υπολειμμάτων, την υγρασία και τη θερμοκρασία στο έδαφος. Η αντίδραση υδρόλυσης των ΓΚΣ απαιτεί όπως τα μόρια των ΓΚΣ έρθουν σε επαφή με το ένζυμο της μυροσινάσης και αυτό απαιτεί την διάρρηξη όσο το δυνατό περισσότερων κυττάρων στους φυτικούς ιστούς που ενσωματώνονται στο έδαφος. Η ημιπερίοδος ζωής του βενζολικού ΓΚΣ αυξήθηκε σημαντικά από τις 15,5 ώρες στις 8 ημέρες σε συνθήκες μειωμένης εδαφικής υγρασίας (Gimsing et al., 2007b; Gimsing et al., 2006). Ωστόσο τα πειράματα που αναφέρονται στις πιο πάνω εργασίες δεν σχεδιάστηκαν για την αξιολόγηση της επίδρασης του ποσοστού του εδάφους σε υγρασία στη συμπεριφορά των ΓΚΣ σε αυτό. Επιπρόσθετα σε αυτά τα πειράματα, η θερμοκρασία δεν ήταν σταθερή και η συμπεριφορά των ΓΚΣ στο έδαφος δεν επηρεάζεται μόνο από το ποσοστό υγρασίας στο έδαφος αφού έχει δείχθει ότι, η αύξηση της θερμοκρασίας αυξάνει τη διάσπαση των ΓΚΣ και ευνοείται ο σχηματισμός των ισοθειοκυανιούχων ενώσεων (Price et al., 2005). Σημειώνεται ότι το σύνολο των εργασιών που αναφέρονται στη διεθνή βιβλιογραφία εξετάζουν τη συμπεριφορά των ΓΚΣ που προέρχονται από την ενσωμάτωση στο έδαφος, ειδών που χαρακτηρίζονται ως φυτά βιοαπολύμανσης και καλλιεργούνται ειδικά για τον σκοπό αυτό και όχι για τη συγκομιδή των βρώσιμων τμημάτων τους.

Η επιτυχία της βιοαπολύμανσης ως τεχνικής για την αντιμετώπιση των διαφόρων παθογόνων στο έδαφος, στηρίζεται στη παρουσία ικανοποιητικών συγκεντρώσεων ΓΚΣ στους ιστούς των φυτών που ενσωματώνονται στο έδαφος, και τη μετατροπή αυτών σε βιοδραστικές ισοθειοκυανιούχες ή άλλες ενώσεις (Bending and Lincoln, 1999). Έτσι η βελτιστοποίηση της μεθόδου απαιτεί την όσο το δυνατό γρηγορότερη υδρόλυση των ΓΚΣ κατά την ενσωμάτωσή τους στο έδαφος. Αυτή η διαδικασία πιθανότατα ενισχύεται από την παρουσία νερού ενώ φαίνεται ότι δεν είναι ανεξάρτητη της θερμοκρασίας στο έδαφος. Μελέτες που στοχεύουν στην μελέτη του ρυθμού μείωσης της συγκέντρωσης των ΓΚΣ σε διαφορά επίπεδα υγρασίας στο έδαφος δεν έχουν πραγματοποιηθεί μέχρι σήμερα ενώ η περαιτέρω διερεύνηση της σημασίας του ενζύμου μυροσινάσης κατά την ενσωμάτωση των φυτικών ιστών στο έδαφος, θα βοηθήσει στη κατανόηση των μηχανισμών εκείνων που μειώνουν ή αυξάνουν το δυναμικό βιοαπολύμανσης των διαφόρων ειδών.

Στόχος του Κεφαλαίου ήταν η μελέτη του ρυθμού μείωσης της συγκέντρωσης καθαρών μορφών ΓΚΣ της GRA και της GER, καθώς επίσης και των ΓΚΣ που περιέχονται στους ιστούς φύλλων μπρόκολου, μετά την ενσωμάτωσή τους στο έδαφος σε διαφορετικά επίπεδα εδαφικής υγρασίας. Επιπρόσθετα μελετήθηκε η επίδραση των διαφόρων μεταχειρίσεων στην μεταβολική δραστηριότητα του εδάφους και στην ενζυμική δράση της μυροσινάσης έτσι ώστε να διερευνηθεί η συμβολή του ενζύμου στην διάσπαση των ουσιών αυτών.

Για την επίτευξη των στόχων του πειράματος τέθηκαν οι παρακάτω υποθέσεις:

1. Η εδαφική υγρασία επηρεάζει σημαντικά το ρυθμό μείωσης της συγκέντρωσης των ΓΚΣ στο έδαφος.
2. Η διάσπαση των ΓΚΣ στο έδαφος συσχετίζεται σημαντικά με την παρουσία της μυροσινάσης στο έδαφος.
3. Η ενζυμική δράση της μυροσινάσης στο έδαφος συσχετίζεται σημαντικά με τη μικροβιακή δραστηριότητα του εδάφους.

Υλικά και Μέθοδοι

Φυτικό υλικό και καθαρές μορφές ΓΚΣ

Χρησιμοποιήθηκαν πλήρως ανεπτυγμένα φύλλα μπρόκολου της ποικιλίας μπρόκολου (*Brassica oleraceae* var *Italica*) Marathon με περιεκτικότητα μεμονωμένων ΓΚΣ GIB, GRA, GBS και neoGBS 1.31, 6.41, 1.12 και 0.52 μmol/g ξ.β φυτικού ιστού αντίστοιχα, ενώ το ποσοστό υγρασίας των φύλλων ήταν 89%. Επιπρόσθετα χρησιμοποιήθηκαν καθαρές μορφές (>90%) των γλυκοσινολικών οξέων GRA και GER που δόθηκαν από τον Dr Renato Iori (ISCI-CRA Bologna, Italy).

Έδαφος

Επιφανειακό έδαφος(0-10cm), στο οποίο δεν είχε καλλιεργηθεί τα τελευταία χρόνια κανένα είδος που να ανήκει στην οικογένεια των Σταυρανθών, λήφθηκε από τον πειραματικό σταθμό του Ινστιτούτου Γεωργικών Ερευνών, στο Ζύγι Κύπρου και χαρακτηρίστηκε ως αμμοπηλώδες (άμμος 31%, άργιλος 28%, ιλύς, 41%), με pH ίσο με 7.8 και περιεκτικότητα οργανικής ουσίας 1.1%, ολικό N (651 mg/kg ξβ), N-NO₃⁻ (53mg/kg ξβ) και ολικό S (157 mg/kg). Το έδαφος, ξηράνθηκε στον αέρα για 48 ώρες και κοσκινίστηκε στα 2mm.

Πειραματικό σχέδιο

Ενσωμάτωση φύλλων μπρόκολου

Σε ένα πλήρως τυχαίοποιημένο σχέδιο εφαρμόστηκαν δύο επίπεδα ποσοστού υγρασίας στο έδαφος. Συγκεκριμένα σε τρεις ποσότητες του 1,5 kg εδάφους προστέθηκε ποσότητα νερού τέτοια που αντιστοιχούσε στο 20% της υδατοικανότητας του εδάφους ενώ σε αντίστοιχο βάρος εδάφους ποσότητα νερού που αντιστοιχούσε στο 90% της υδατοικανότητας. Μετά από ανακίνηση για 24 ώρες σε οριζόντιο αναδευτήρα σε κάθε ποσότητα των 1,5 kg εδάφους προστέθηκαν 22g φρέσκων φύλλων μπρόκολου, τα οποία προηγουμένως αλέστηκαν σε τεμαχιστή υψηλών ταχυτήτων (blender). Ακολουθώντας το έδαφος, ανακατεύτηκε σχολαστικά με το χέρι για την όσο το δυνατό καλύτερη κατανομή των φυτικών υπολειμμάτων σε αυτό και μετά μεταφέρθηκαν σε κωνικές φιάλες των 500ml συνολικές ποσότητες μείγματος 150g. Οι κωνικές φιάλες μεταφέρθηκαν σε θάλαμο επώασης όπου η θερμοκρασία, διατηρήθηκε στους 25°C και λήφθηκαν δείγματα 3, 6, 12, 24, 48, 96 και 168 ώρες μετά την εφαρμογή των υπολειμμάτων. Σε κάθε δειγματοληψία, πραγματοποιήθηκαν μετρήσεις στο έδαφος όπου προσδιορίστηκε η συγκέντρωση των ΓΚΣ. Επιπλέον, μετά την πάροδο 3, 12, 24, 96 και 168 ωρών προσδιορίστηκε η ενζυμική δράση της μυροσινάσης και ο άνθρακας της μικροβιακής βιομάζας. Ως μάρτυρας χρησιμοποιήθηκε έδαφος, στο οποίο δεν ενσωματώθηκαν φύλλα μπρόκολου. Τέλος από την κάθε μεταχείριση ζυγίστηκαν 50g εδάφους σε αεροστεγείς γυάλινες φιάλες, για την εκτίμηση της μικροβιακής αναπνοής στο έδαφος. Λεπτομέρειες σχετικά με τις αναλυτικές διαδικασίες που ακολουθήθηκαν δίδονται στο 2^ο Κεφάλαιο της παρούσας διατριβής.

Εφαρμογή καθαρών μορφών GRA και GER

Για τον έλεγχο του ρυθμού μείωσης της συγκέντρωσης των καθαρών μορφών ΓΚΣ στο έδαφος, χρησιμοποιήθηκε το ίδιο πειραματικό σχέδιο όπως αυτό που περιγράφηκε πιο πάνω. Αναλυτικότερα, σε 500 g εδάφους, προστέθηκαν ανάλογες ποσότητες νερού έτσι ώστε να επιτευχθεί ποσοστό υγρασίας σε αυτό ίσο με 20 και 90% της υδατοϊκανότητας του εδάφους. Ακολούθως 10g εδάφους, ζυγίστηκαν σε ποτήρια ζέσεως των 100ml και σε αυτά προστέθηκαν 400μl πυκνών διαλυμάτων GRA και GER συγκέντρωσης 4.05mM και 4.18mM αντίστοιχα και μεταφέρθηκαν σε θάλαμο επώασης στους 25°C. Η συγκέντρωση των ΓΚΣ που προστέθηκε στο έδαφος, ήταν 162 nmol/g για την GRA και 166nmol/g εδάφους για την GER. Δείγματα λήφθηκαν τους ίδιους χρόνους δειγματοληψίας, όπως αναφέρονται πιο πάνω. Κατά τη δειγματοληψία, 5g από τα 10g του δείγματος χρησιμοποιήθηκαν για την εκτίμηση της μικροβιακής βιομάζας, 1g για τον προσδιορισμό της ενζυμικής δράσης της μυροσινάσης και 4g για τον προσδιορισμό των ΓΚΣ στο έδαφος. Για την μέτρηση της μικροβιακής αναπνοής ζυγίστηκαν 60g εδάφους τα οποία προσαρμόστηκε η υγρασία τους στο 20 και 90% αντίστοιχα. Σε κάθε μια από τις μεταχειρίσεις εφαρμόστηκαν 2.4ml GRA και GER από πυκνά διαλύματα των 4.05 και 4.18mM. Τα εδάφη αναδεύθηκαν ελαφρά για ομοιόμορφη κατανομή των ΓΚΣ και ακολούθως 20g μεταφέρθηκαν σε αεροστεγείς φιάλες που περιείχαν φιαλίδια με NaOH για τον προσδιορισμό της μικροβιακής αναπνοής 3, 6, 12, 24, 48, 96 και 168 ώρες μετά την εφαρμογή τους. Λεπτομέρειες σχετικά με τις αναλυτικές διαδικασίες που ακολουθήθηκαν δίδονται στο 2^ο Κεφάλαιο της παρούσας διατριβής.

Καμπύλες μείωσης της συγκέντρωσης ΓΚΣ στο έδαφος

Για τον προσδιορισμό του ρυθμού μείωσης της συγκέντρωσης των ΓΚΣ στο έδαφος, χρησιμοποιήθηκε το μοντέλο κινητικής πρώτης – τάξης που αντιστοιχεί στην εξίσωση:

$$y = ae^{-kx} \quad \text{Εξίσωση 1}$$

Όπου a είναι η σταθερά που υπολογίζεται από τις πειραματικές τιμές και εξαρτάται από τη αρχική συγκέντρωση των ΓΚΣ στο έδαφος και k είναι ο ρυθμός μείωσης της συγκέντρωσης των διαφόρων ΓΚΣ στο έδαφος. Η ημιπερίοδος ζωής ($t_{1/2}$) των ΓΚΣ στο έδαφος είναι ο χρόνος που απαιτείται για να διασπαστεί η μισή ποσότητα που ανιχνεύεται στο έδαφος, αμέσως μετά την εφαρμογή. Η εξίσωση με βάση την οποία υπολογίστηκε η ημιπερίοδος ζωής των ΓΚΣ στο έδαφος (για $a=y_0/2$) είναι η ακόλουθη:

$$t_{1/2} = \frac{\ln 2}{k} \quad \text{Εξίσωση 2}$$

Ο υπολογισμός των παραμέτρων του μοντέλου, πραγματοποιήθηκε με την χρήση του στατιστικού πακέτου Statistica 7.0 (StatSoft).

Στατιστική Ανάλυση

Για την στατιστική επεξεργασία των αποτελεσμάτων, έγινε η ανάλυση παραλλακτικότητας (ANOVA) και η πολλαπλή σύγκριση των μέσων όρων για στατιστικά σημαντικές διαφορές

έγινε με βάση το κριτήριο Tukey-Kramer HSD (Honestly Significant Difference).
Χρησιμοποιήθηκε το στατιστικό πακέτο STATISTICA 7.

Αποτελέσματα –Συζήτηση

Καμπύλες μείωσης της συγκέντρωσης γλυκοσινολικών οξέων στο έδαφος

Καθαρές μορφές ΓΚΣ

Η μείωση της συγκέντρωσης των ΓΚΣ GRA και GER, όταν αυτές εφαρμόστηκαν σε καθαρή μορφή, ήταν δραματική αφού 3 ώρες μετά την εφαρμογή τους, η ανάκτησή τους έφθανε το 40% περίπου, ενώ 2 ημέρες μετά την εφαρμογή η μείωση της συγκέντρωσης της GRA και 4 ημέρες για την GER, ήταν μεγαλύτερη από 90% (Πίνακας 8.1). Τόσο η επίδραση του χρόνου όσο και του επιπέδου υγρασίας στο έδαφος, ήταν σημαντική ($p < 0.001$) και για τα δύο μόρια, ενώ παρατηρήθηκε στατιστικά σημαντική αλληλεπίδραση των δύο αυτών παραγόντων ως προς τη συγκέντρωση της GRA ($p = 0.016$) ενώ για τη συγκέντρωση της GER στο έδαφος δεν παρατηρήθηκε σημαντική στατιστικά αλληλεπίδραση ($p = 0.105$). Η αύξηση της περιεκτικότητας του εδάφους σε νερό είχε ως αποτέλεσμα τη σημαντική μείωση της συγκέντρωσης και των δυο μορίων στις περισσότερους χρόνους δειγματοληψίας (Πίνακας 8.1). Αυτή είναι η πρώτη αναφορά στη διεθνή βιβλιογραφία σχετικά με τη συμπεριφορά καθαρών μορφών ΓΚΣ σε διαφορετικά επίπεδα υγρασίας στο έδαφος, ενώ είναι η πρώτη φορά που μελετάται η συμπεριφορά στο έδαφος τόσο της GRA όσο και της GER, δύο σημαντικών ΓΚΣ που περιέχονται στα καλλιεργούμενα Σταυρανθή για βρώσιμο προϊόν (Bennett et al., 2007; Fahey et al., 2001; Kushad et al., 1999).

Η συμπεριφορά της GRA και της GER στο έδαφος παρουσιάζουν σημαντικές ομοιότητες. Συγκεκριμένα ο ρυθμός μείωσης της συγκέντρωσής τους στο έδαφος (Πίνακας 8.2) ακολουθεί το κινητικό μοντέλο πρώτης τάξης (first-order model) και το οποίο εκφράζει τα αποτελέσματα με υψηλό συντελεστή συσχέτισης ($R^2 > 0.7$), σε αντίθεση με το λογιστικό μοντέλο που χρησιμοποίησε η Gimsing et al. (2006) το οποίο δεν εκφράζει αποτελεσματικά τα πειραματικά δεδομένα της παρούσας εργασίας. Συγκεκριμένα εφαρμόζοντας το μοντέλο αυτό, παρατηρήθηκε σημαντική συσχέτιση ($p = 0.034$) μεταξύ των απόλυτων τιμών των υπολοίπων που υπολογίστηκαν από την εφαρμογή του, και των πειραματικών τιμών της συγκέντρωσης των ΓΚΣ στον πληθυσμό του δείγματος ($n = 21$) και ως εκ' τούτου δεν εκφράζει με ασφάλεια τα πειραματικά δεδομένα.

Από τα αποτελέσματα προκύπτει ότι, ο ρυθμός μείωσης της συγκέντρωσης της GRA είναι σχεδόν διπλάσιος σε σύγκριση με την GER ανεξαρτητα από το επίπεδο υγρασίας που υπάρχει στο έδαφος (Πίνακας 8.2). Ο αυξημένος ρυθμός μείωσης της συγκέντρωσης της GRA σε σύγκριση με την GER πιθανό να οφείλεται στην εξειδίκευση της δράσης του ενζύμου μυροσινάση σε ότι αφορά τα διάφορα ΓΚΣ που χρησιμοποιεί ως υποστρώματα (Bones and Rossiter, 2006) Πρέπει να τονιστεί εδώ, ότι τα ΓΚΣ δεν προσροφώνται στα κolloειδή της αργίλλου και στην οργανική ουσία, επομένως η μείωση της συγκέντρωσής τους μπορεί να αποδωθεί κατά κύριο λόγο σε διάσπαση. Με την αύξηση της υγρασίας από 20 στο 90% της υδατοϊκανότητας του εδάφους ο ρυθμός μείωσης της συγκέντρωσης των μορίων αυξάνει σημαντικά και η ημιπερίοδος ζωής στο έδαφος της GRA και της GER μειώνεται από 7.84 και 15.5 ώρες σε 4.97 και 8.15 ώρες αντίστοιχα. Η συγκέντρωση των ΙΣΘ, των προϊόντων

υδρόλυσης των ΓΚΣ βρέθηκε να είναι υψηλότερη όταν η περιεκτικότητα του εδάφους σε νερό ήταν μεγαλύτερη (Gimsing et al., 2006; Matthiensen et al., 2004). Παρόλο που σε αυτή την εργασία, δεν ποσοτικοποιήθηκαν οι παραγόμενες ισοθειοκυανιούχες ενώσεις, τα αποτελέσματα ενισχύουν την υπόθεση ότι αύξηση της υγρασίας του εδάφους έχει ως αποτέλεσμα την αύξηση της συγκέντρωσης ΙΣΘ από την υδρόλυση των αντίστοιχων ΓΚΣ.

Η διάσπαση των ΓΚΣ στο έδαφος, και η μείωση της συγκέντρωσης τους μετά την πάροδο κάποιων ωρών πιθανότατα να οφείλεται στην δράση του ενζύμου της μυροσινάσης αλλά και στην παρουσία εξωκυτταρικών ενζύμων όπως οι σουλφατάσες (Galletti et al., 2008). Η παρουσία της μυροσινάσης στο έδαφος, σχετίζεται με την παρουσία σε αυτό ΓΚΣ (Al-Turki and Dick, 2003; Borek et al., 1996) ενώ δράση της παρατηρήθηκε και σε έδαφος στο οποίο δεν είχαν καλλιεργηθεί Σταυρανθή για τα προηγούμενα 5 χρόνια (Gimsing et al., 2006). Η ενζυμική δράση της μυροσινάσης στην παρούσα εργασία επηρεάζεται σημαντικά τόσο από την το επίπεδο υγρασίας του εδάφους ($p < 0.001$), όσο και από το χρόνο της δειγματοληψίας ($p < 0.001$), χωρίς όμως αυτοί οι παράγοντες να αλληλεπιδρούν μεταξύ τους. Συνεπώς η επίδραση της ποσότητας υγρασίας στο έδαφος στην ενζυμική δράση της μυροσινάσης είναι ανεξάρτητη από το χρόνο κατά τον οποίο έγινε η δειγματοληψία ($p = 0.720$). Η ενζυμική δράση της μυροσινάσης αυξάνει με την πάροδο του χρόνου ανεξάρτητα από την ποσότητα υγρασίας που υπάρχει στο έδαφος (Διάγραμμα 8.1) και φτάνει μια μέγιστη τιμή τέσσερις ημέρες μετά την εφαρμογή που είναι 3 φορές υψηλότερη από αυτή μετρήθηκε πριν την εφαρμογή των ΓΚΣ. Αυτά τα αποτελέσματα υποδηλώνουν ότι η παρουσία της μυροσινάσης στο έδαφος αυξήθηκε μετά την εφαρμογή των ΓΚΣ, και πιθανότατα αυτό συνδέεται με την παρουσία μικροοργανισμών στο έδαφος που χρησιμοποιούν τα ΓΚΣ ως πηγή άνθρακα (Rakariyatham et al., 2005; Sakorn et al., 2002). Η υπόθεση αυτή ενισχύεται από το γεγονός ότι, στο έδαφος στο οποίο εφαρμόστηκαν τα ΓΚΣ αυξήθηκε σημαντικά η εδαφική αναπνοή και παρατηρήθηκε στατιστικά σημαντική ($p = 0.02$) θετική συσχέτιση με $r = 0.58$ μεταξύ ενζυμικής δράσης της μυροσινάσης και της αναπνευστικής δραστηριότητας του εδάφους όταν η υγρασία στο έδαφος ήταν ίση με το 90% της υδατοικανότητας (Διάγραμμα 8.2β). Η σχέση αυτή της ενζυμικής δράσης της μυροσινάσης και της αναπνευστικής δραστηριότητας στο έδαφος, δεν επηρεάστηκε από την μείωση της υγρασίας του εδάφους (Διάγραμμα 8.2α). Ωστόσο η μικροβιακή βιομάζα δεν αυξήθηκε σημαντικά σε σχέση με τον μάρτυρα και στα δύο επίπεδα υγρασίας μετά την προσθήκη στο έδαφος των καθαρών μορφών ΓΚΣ, υποδηλώνοντας αύξηση του μικροβιακού μεταβολικού πηλίκου (metabolic quotient, qCO_2).

Από τα πιο πάνω, φαίνεται ξεκάθαρη σχέση μεταξύ της μείωσης της συγκέντρωσης των καθαρών μορφών των ΓΚΣ και της μικροβιακής κοινότητας στο έδαφος, και σημαντική συσχέτισης της τελευταίας με την ενζυμική δραστηριότητα της μυροσινάσης στο έδαφος, όπου η μείωση της συγκέντρωσης των ΓΚΣ συνοδεύεται από αύξηση της μικροβιακής δραστηριότητας στο έδαφος, και της ταυτόχρονης παραγωγής μυροσινάσης. Σε προηγούμενες μελέτες βρέθηκε ότι η ενζυμική δραστηριότητα της μυροσινάσης μειώθηκε αφού προηγουμένως το έδαφος αποστειρώθηκε είτε με χημικές ουσίες είτε με θερμοκρασία (Gimsing et al., 2006). Ως εκ τούτου και λαμβάνοντας υπόψη τις το γεγονός ότι τα ΓΚΣ δεν

προσροφόνται στα κολλοειδή της αργίλλου αλλά ούτε και στην οργανική ουσία, η μικροβιακή διάσπαση των ΓΚΣ αποτελεί το σημαντικότερο τρόπο μείωσης της συγκέντρωσης τους στο έδαφος. Ωστόσο και άλλα εξωκυτταρικά ένζυμα εκτός της μυροσινάσης μπορεί να ευθύνονται για τη διάσπαση των ΓΚΣ στο έδαφος. Οι Galetti et al. (2008) παρατήρησαν αυξημένη δράση της αρυλσουλφατάσης και της β-θειο-γλυκοσιδάσης, και ταυτόχρονη παραγωγή νιτριλίων παρουσία του ασκομύκητα *Aspergillus flavus*. Ωστόσο χρειάζεται περισσότερη έρευνα στο τομέα αυτό έτσι ώστε να αποκαλυφθούν οι μηχανισμοί μείωσης της συγκέντρωσης των ΓΚΣ πέρα από αυτόν που οφείλεται στην ενζυμική δράση της μυροσινάσης.

Ενσωμάτωση υπολειμμάτων μπρόκολου

Παρόμοια συμπεριφορά με αυτή των καθαρών μορφών ΓΚΣ παρατηρήθηκε και για τα ΓΚΣ που περιέχονταν στα φύλλα μπρόκολου που ενσωματώθηκαν στο έδαφος (Πίνακας 8.3). Η επίδραση του επιπέδου υγρασίας καθώς και του χρόνου της δειγματοληψίας ήταν στατιστικά σημαντική για όλα τα μεμονωμένα ΓΚΣ που ανιχνεύθηκαν στην παρούσα εργασία ($p < 0.001$) χωρίς μάλιστα να παρατηρείται αλληλεπίδραση μεταξύ τους εκτός από την περίπτωση της GBS ($p = 0.023$). Κανένα από τα μεμονωμένα ΓΚΣ εκτός από την GRA δεν ανιχνεύθηκε μετά την πάροδο 7 ημερών από την εφαρμογή των φύλλων μπρόκολου στο έδαφος (Πίνακας 8.3). Η GBS δεν ανιχνεύθηκε στο έδαφος 4 ημέρες μετά την εφαρμογή όταν το επίπεδο υγρασίας στο έδαφος ήταν ίσο με το 90% της υδατοικανότητας, ενώ η GIB δεν ανιχνεύθηκε 4 ημέρες μετά την εφαρμογή και στα δύο επίπεδα υγρασίας του εδάφους που εξετάστηκαν (Πίνακας 8.3). Γενικά η συγκέντρωση των μεμονωμένων ΓΚΣ στο έδαφος, βρέθηκε να είναι υψηλότερη στη μεταχείριση όπου η υγρασία του εδάφους ήταν ίση με το 20% της υδατοικανότητας (Πίνακας 8.3). Η διαφορά αυτή μεταξύ των μεταχειρίσεων δεν ήταν σημαντική σε όλους τους χρόνους δειγματοληψίας, αλλά εμφανίζεται ως συστηματική τάση. Συγκεκριμένα η συγκέντρωση GIB που ανιχνεύθηκε στο έδαφος ήταν σημαντικά υψηλότερη όταν το επίπεδο υγρασίας στο έδαφος ήταν ίσο με το 20% της υδατοικανότητας του εδάφους μόνο 3 και 6 ώρες μετά την εφαρμογή των φύλλων μπρόκολου στο έδαφος (Πίνακας 8.3). Η συγκέντρωση της GRA αντίθετα ήταν σημαντικά υψηλότερη 6 ώρες μετά την εφαρμογή ενώ σε όλους τους υπόλοιπους χρόνους δειγματοληψίας, η συγκέντρωση στο έδαφος δεν επηρεάστηκε σημαντικά από το επίπεδο υγρασίας στο έδαφος. Η GBS σημαντικά υψηλότερη συγκέντρωση παρουσίασε 6 και 12 ώρες μετά την εφαρμογή των φύλλων μπρόκολου, ενώ η neoGBS στις 6 και 24 ώρες μετά την εφαρμογή.

Γενικά ο ρυθμός μείωσης της συγκέντρωσης των ΓΚΣ που ανιχνεύθηκαν στο έδαφος, ήταν υψηλότερος όταν η περιεκτικότητα της υγρασίας του εδάφους ήταν ίση με το 90% της υδατοικανότητας και η ημιπερίοδος ζωής τους μικρότερη με εξαίρεση αυτόν της GIB που δεν διαφοροποιήθηκε (Πίνακας 8.2). Συγκεκριμένα η ημιπερίοδος ζωής του μορίου στο έδαφος και στις δύο μεταχειρήσεις ήταν περίπου 7 ώρες. Από την άλλη πλευρά αύξηση της υγρασίας του εδάφους από το 20 στο 90% της υδατοικανότητας του είχε ως αποτέλεσμα την μείωση του χρόνου ημιζωής της GRA, GBS και της neoGBS κατά 1.4, 3.2 και 3.5 φορές αντίστοιχα. Ο ρυθμός μείωσης της συγκέντρωσης των ινδολικών ΓΚΣ ήταν πολύ μεγαλύτερος σε σύγκριση

με αυτό των αλειφατικών ΓΚΣ. Αυτό πιθανότατα να οφείλεται στο γεγονός ότι, ο ινδολικός δακτύλιος είναι πολύ πιο ασταθής σε σύγκριση με την πλευρική αλυσίδα των αλειφατικών ΓΚΣ.

Επιπρόσθετα ο ρυθμός μείωσης της συγκέντρωσης της GRA στο έδαφος όταν αυτή προστέθηκε σε καθαρή μορφή ήταν πολύ μεγαλύτερος σε σχέση με το ρυθμό μείωσης της συγκέντρωσης που μετρήθηκε όταν η GRA προστέθηκε στο έδαφος, με τα φύλλα του μπρόκολου. Αυτό πιθανά να οφείλεται στο γεγονός ότι η ποσότητα της GRA που προστέθηκε στο έδαφος σε καθαρή μορφή ήταν 30 φορές μεγαλύτερη από τη αυτή που προστέθηκε στο έδαφος από τα φύλλα του μπρόκολου. Το φαινόμενο αυτό παρατηρείται κατά την επαναλαμβανόμενη χρήση φυτοπροστατευτικών ουσιών στο έδαφος (Walker et al., 1986) καθώς και σε περιπτώσεις αυξημένης εφαρμογής ξενοβιοτικών ουσιών σε αυτό (Gevao et al., 2000). Πιθανά όμως να υποδηλώνει και μηχανισμούς προστασίας των γλυκοσινολικών από ενώσεις των φυτικών ιστών, η παρεμπόδιση της διάσπασης που σχετίζεται με την γενικευμένη αύξηση της μικροβιακής δραστηριότητας. Πάντως η βραδύτερη διάσπαση, και επομένως η βραδύτερη απελευθέρωση ισοθειοκυανικών ενώσεων, συνάδει με την έλλειψη τοξικής επίδρασης των υπολειμμάτων μπρόκολου στην μικροβιακή κοινότητα (Κεφάλαια 6 και 7).

Με την ενσωμάτωση στο έδαφος των φύλλων μπρόκολου προστέθηκαν στο έδαφος 2.16nmol/g GIB, 10.57nmol/g GRA, 1.85nmol GBS και 0.85nmol/g neo GBS. Τρεις ώρες μετά την ενσωμάτωση των φύλλων και ανεξάρτητα από το επίπεδο υγρασίας η μείωση της συγκέντρωσης τους στο έδαφος ήταν σημαντική και αυτό πιθανότατα να οφείλεται είτε στην αυξημένη ενζυμική δράση της μυροσινάσης είτε στη μη ελευθέρωση των μορίων στο εδαφικό διάλυμα από τους φυτικούς ιστούς. Καλύτερη διάρρηξη των φυτικών κυττάρων πραγματοποιείται με διαδοχικό πάγωμα ξεπάγωμα των ιστών ωστόσο στην παρούσα εργασία δεν ακολουθήθηκε η μεθοδολογία αυτή αφού σκοπός μας ήταν η προσομοίωση των συνθηκών αγρού στο εργαστήριο.

Αυτή είναι η πρώτη αναφορά στη διεθνή βιβλιογραφία όπου μετρήθηκε η ενζυμική δράση της μυροσινάσης αμέσως μετά την προσθήκη στο έδαφος φύλλων μπρόκολου. Άλλοι ερευνητές παρατήρησαν ότι η δράση της μυροσινάσης ήταν αυξημένη σε εδάφη στα οποία καλλιεργήθηκαν τα προηγούμενα χρόνια Σταυρανθή (Al-Turki and Dick, 2003). Ωστόσο στην παρούσα εργασία η ενζυμική δράση της μυροσινάσης που μετρήθηκε ήταν κατά πολύ υψηλότερη. Αυτό πιθανότατα οφείλεται στο γεγονός ότι, τα εδαφικά δείγματα λήφθηκαν στη παρούσα εργασία αμέσως μετά την ενσωμάτωση ενώ στην εργασία των Al-Turki και Dick (2003), χρησιμοποιήθηκε έδαφος, το οποίο είχε καλλιεργηθεί ελαιοκράμβη την προηγούμενη περίοδο. Η δραστηριότητα του ενζύμου επηρεάστηκε σημαντικά τόσο από το ποσοστό υγρασίας του εδάφους ($p < 0.001$), από το χρόνο δειγματοληψίας ($p < 0.001$) και από την αλληλεπίδραση τους ($p < 0.001$). Η ενζυμική δράση της μυροσινάσης ήταν σημαντικά χαμηλότερη όταν το επίπεδο υγρασίας στο έδαφος ήταν ίσο με το 20% της υδατοικανότητας στο έδαφος σε όλους του χρόνους δειγματοληψίας εκτός από την 4^η ημέρα μετά την ενσωμάτωση των φύλλων στο έδαφος (Διάγραμμα 8.3) όπου δεν παρατηρήθηκε στατιστικά

σημαντική διαφορά. Η σχέση της δράσης της μυροσινάσης και της συγκέντρωσης των ΓΚΣ στο έδαφος δεν συσχετίζεται σημαντικά ωστόσο, η συγκέντρωση των ΓΚΣ μειώνεται με την πάροδο του χρόνου ενώ η μυροσινάση αυξάνει δραματικά ειδικά τις πρώτες ώρες μετά την εφαρμογή και σταθεροποιείται αργότερα (Διάγραμμα 8.3) και στα δύο επίπεδα υγρασίας που εφαρμόστηκαν στο έδαφος. Σημειώνεται ότι, 7 ημέρες μετά την εφαρμογή η ενζυμική δράση της μυροσινάσης παρέμενε σημαντικά υψηλότερη από την αρχή του πειράματος και πριν την ενσωμάτωση των φύλλων. Η ταχύτερη κορύφωση της δράσης της μυροσινάσης μετά την ενσωμάτωση στο έδαφος φύλλων μπρόκολου σε σύγκριση με την ενσωμάτωση καθαρών ΓΚΣ πιθανότατα εξηγείται από την συμβολή μυροσινάσης από τους ίδιους τους φυτικούς ιστούς που ενσωματώθηκαν στην πρώτη περίπτωση.

Η μικροβιακή αναπνοή του εδάφους, επηρεάστηκε σημαντικά από το επίπεδο υγρασίας του εδάφους ($p=0.009$), από το χρόνο δειγματοληψίας ($p<0.001$) και από την αλληλεπίδρασή τους ($p<0.001$). Το επίπεδο υγρασίας στο έδαφος όπου δεν εφαρμόστηκαν υπολείμματα μπρόκολου (μάρτυρας) δεν επηρέασε σημαντικά τη μικροβιακή αναπνοή στο έδαφος (Διάγραμμα 8.4). Αντίθετα η μικροβιακή αναπνοή στο έδαφος όπου ενσωματώθηκαν φύλλα μπρόκολου, και το επίπεδο υγρασίας ήταν ίσο με το 90% της υδατοικανότητας, παρουσίασε σημαντική μείωση της μικροβιακής αναπνοή μετά την πάροδο 24 ωρών, γεγονός το οποίο πιθανότατα οφείλεται σε αναεροβικές συνθήκες που δημιουργήθηκαν λόγω της παρουσίας των φυτικών υπολειμμάτων. Επιπρόσθετα το μεταβολικό πηλίκο (metabolic quotient) του εδάφους μετά την ενσωμάτωση στο έδαφος των φύλλων μπρόκολου, αυξάνει σημαντικά μέχρι και 24 ώρες από την εφαρμογή τους. Ακολουθώντας, παρατηρείται μείωση με την πάροδο του χρόνου ειδικά στο έδαφος όπου η υγρασία βρισκόταν 90% της υδατοικανότητας του εδάφους (Διάγραμμα 8.6). Η μείωση της μεταβολικής δραστηριότητας στο έδαφος στην περίπτωση αυτή συνδέεται με την δημιουργία αναεροβικών συνθηκών στο έδαφος παρά με κάποια άλλη δράση, και είναι αναμενόμενη από τη σύγχρονη παρουσία ευαποδομήσιμου οργανικού υποστρώματος και υψηλής υγρασίας. Η ενζυμική δράση της μυροσινάσης δεν συσχετίζεται σημαντικά με την μικροβιακή αναπνοή στο έδαφος, όταν η υγρασία στο έδαφος ήταν ίση με το 20% της υδατοικανότητας (Διάγραμμα 8.5α). Ενώ όταν η υγρασία στο έδαφος ήταν ίση με το 90% της υδατοικανότητας παρατηρήθηκε στατιστικά σημαντική θετική συσχέτιση (Διάγραμμα 8.5β) χωρίς όμως αυτή συσχέτιση να συνδέει τις δύο παραμέτρους ισχυρά ($r=0.52$). Από τα αποτελέσματα αυτά εξάγεται το συμπέρασμα ότι, η παρουσία της μυροσινάσης στο έδαφος και η δράση της δεν συνδέεται άμεσα με την μικροβιακή δραστηριότητα στο έδαφος στην περίπτωση της ενσωμάτωσης των φύλλων του μπρόκολου.

Το ένζυμο μυροσινάση περιέχεται στους ιστούς των Σταυρανθών και η ενσωμάτωση των ιστών τους στο έδαφος, έχει ως αποτέλεσμα τη ελευθέρωσή του στο έδαφος. Η μυροσινάση είναι ένζυμο αρκετά ανθεκτικό σε δυσμενείς συνθήκες αφού αδρανοποιείται σε θερμοκρασίες μεγαλύτερες των 60°C (Bones and Rossiter, 2006). Έτσι η αύξηση της δράσης της μυροσινάσης παρουσία φύλλων μπρόκολου περισσότερο φαίνεται να σχετίζεται με την παρουσία του ενζύμου στα φύλλα και λιγότερο στην μικροβιακή κοινότητα του εδάφους. Ως εκ

τούτου η μείωση της συγκέντρωσης των ΓΚΣ στο έδαφος οφείλεται κυρίως στην υδρόλυσή τους από την μυροσινάση που βρίσκεται στους ιστούς των φύλλων και λιγότερο στη μυροσινάση η παράγεται από μικροοργανισμούς στο έδαφος.

Συμπεράσματα

Από τα αποτελέσματα φαίνεται ότι η υψηλή υγρασία αυξάνει σημαντικά το ρυθμό μείωσης της συγκέντρωσης των ΓΚΣ στο έδαφος είτε αυτά εφαρμόζονται σε καθαρή μορφή είτε όταν εφαρμόζονται μετά από ενσωμάτωση φυτομάζας Σταυρανθών στο έδαφος.

Η ημιπερίοδος ζωής των ΓΚΣ στο έδαφος κυμαίνεται από 4 μέχρι 17 ώρες ανάλογα με τον τύπο του ΓΚΣ και την περιεκτικότητα του εδάφους σε υγρασία. Επιπλέον φαίνεται ότι το ποσοστό υγρασίας στο έδαφος επηρεάζει σε πιο έντονο βαθμό την διάσπαση των ινδολικών ΓΚΣ σε σχέση με τα αλειφατικά.

Η διάσπαση των ΓΚΣ όταν αυτά εφαρμόζονται στο έδαφος σε καθαρή μορφή οφείλεται στη μικροβιακή διάσπαση, ενώ η ενζυμική δραστηριότητα της μυροσινάσης συσχετίζεται στατιστικά σημαντικά με τη μικροβιακή δραστηριότητα.

Αντίθετα η διάσπαση των ΓΚΣ όταν αυτά εφαρμόζονται στο έδαφος μέσω της ενσωμάτωσης φυτομάζας Σταυρανθών είναι βραδύτερη και κυρίως οφείλεται στην ενζυμική δράση της μυροσινάσης που περιέχεται στους ιστούς τους. Η ενζυμική δράση της μυροσινάσης στην περίπτωση αυτή δεν συσχετίζεται σημαντικά με την αύξηση της μικροβιακής δραστηριότητας στο έδαφος.

Τέλος τα αποτελέσματα της εργασίας αυτής καταδεικνύουν ότι η διάσπαση των ΓΚΣ στο έδαφος πιθανότατα να σχετίζεται και με άλλα εξωκυτταρικά ένζυμα τα οποία υπάρχουν στο έδαφος και ως εκ' τούτου περισσότερη έρευνα είναι απαραίτητη για την αξιολόγηση των ενζύμων αυτών.

Βιβλιογραφία

- Al-Turki, A.I., and W.A. Dick. 2003. Myrosinase activity in soil. *Soil Science Society of America Journal* 67:139-145.
- Bending, G.D., and S.D. Lincoln. 1999. Characterisation of volatile sulphur-containing compounds produced during decomposition of *Brassica juncea* tissues in soil. *Soil Biology and Biochemistry* 31:695-703.
- Bennett, R.N., R. Carvalho, F.A. Mellon, J. Eagles, and E.A.S. Rosa. 2007. Identification and quantification of glucosinolates in sprouts derived from seeds of wild *Eruca sativa* L. (salad rocket) and *Diplotaxis tenuifolia* L. (wild rocket) from diverse geographical locations. *Journal of Agricultural and Food Chemistry* 55:67-74.
- Bones, A.M., and J.T. Rossiter. 2006. The enzymic and chemically induced decomposition of glucosinolates. *Phytochemistry* 67:1053-1067.
- Borek, V., M.J. Morra, and J.P. McCaffrey. 1996. Myrosinase activity in soil extracts. *Soil Science Society of America Journal* 60:1792-1797.
- Brown, P.D., M.J. Morra, and V. Borek. 1994. Gas-Chromatography of allelochemicals produced during glucosinolate degradation in soil. *Journal of Agricultural and Food Chemistry* 42:2029-2034.
- Fahey, J.W., A.T. Zalcmann, and P. Talalay. 2001. The chemical diversity and distribution of glucosinolates and isothiocyanates among plants. *Phytochemistry* 56:5-51.
- Galleti, S., E. Sala, O. Leoni, S. Cinti, and C. Cerato. 2008. *Aspergillus flavus* transformation of glucosinolates to nitriles by an arylsulfatase and a b-thio-glucosidase. *Soil Biology and Biochemistry* 40:2170-2173.
- Gevao, B., K.T. Semple, and K.C. Jones. 2000. Bound pesticide residues in soils: a review. *Environmental Pollution* 108:3-14.
- Gimsing, A.L., and J.A. Kirkegaard. 2006. Glucosinolate and isothiocyanate concentration in soil following incorporation of *Brassica* biofumigants. *Soil Biology and Biochemistry* 38:2255-2264.
- Gimsing, A.L., J.C. Sorensen, B.W. Strobel, and H.C.B. Hansen. 2007a. Adsorption of glucosinolates to metal oxides, clay minerals and humic acid. *Applied Clay Science* 35:212-217.
- Gimsing, A.L., J.L. Poulsen, H.L. Pedersen, and H.C.B. Hansen. 2007b. Formation and degradation kinetics of the biofumigant benzyl isothiocyanate in soil. *Environmental Science & Technology* 41:4271-4276.
- Gimsing, A.L., J.C. Sorensen, L. Tovgaard, A.M.F. Jorgensen, and H.C.B. Hansen. 2006. Degradation kinetics of glucosinolates in soil. *Environmental Toxicology and Chemistry* 25:2038-2044.
- Kushad, M.M., A.F. Brown, A.C. Kurilich, J.A. Juvik, B.P. Klein, M.A. Wallig, and E.H. Jeffery. 1999. Variation of glucosinolates in vegetable crops of *Brassica oleracea*. *Journal of Agricultural and Food Chemistry* 47:1541-1548.

- Matthiensen, J.N., B. Warton, and M.A. Shackleton. 2004. The importance of plant maceration and water addition in achieving high Brassica-derived isothiocyanate levels in soil. *Agroindustria* 3:277-280.
- Morra, M.J., and J.A. Kirkegaard. 2002. Isothiocyanate release from soil-incorporated Brassica tissues. *Soil Biology and Biochemistry* 34:1683-1690.
- Price, A.J., C.S. Charron, A.M. Saxton, and C.E. Sams. 2005. Allyl isothiocyanate and carbon dioxide produced during degradation of Brassica juncea tissue in different soil conditions. *Hortscience* 40:1734-1739.
- Rakariyatham, N., B. Butrindr, H. Niamsup, and L. Shank. 2005. Screening of filamentous fungi for production of myrosinase. *Brazilian Journal of Microbiology* 36:242-245.
- Sakorn, P., N. Rakariyatham, H. Niamsup, and P. Nongkunsarn. 2002. Rapid detection of myrosinase-producing fungi: a plate method based on opaque barium sulphate formation. *World Journal of Microbiology & Biotechnology* 18:73-74.
- Tookey, H.L. 1973. Crambe thioglucosidase - separation of a protein required for epithiobutane formation. *Abstracts of Papers of the American Chemical Society*:231-231.
- Vanetten, C.H., M.E. Daxenbichler, J.E. Peters, and H.L. Tookey. 1966. Variation in enzymatic degradation products from the major thioglucosides in *Crambe abyssinica* and *Brassica napus* seed meals. *Journal of Agricultural and Food Chemistry* 14:426-430.
- Walker, A., A.P. Brown, and R.A. Entwistle. 1986. Enhanced degradation of iprodione and vinclozolin in soil. *Pesticide Science* 17:183-193.

Πίνακες και Διαγράμματα

Πίνακας 8.1. Η συγκέντρωση GRA και GER (nmol/g ξ.β εδάφους) σε διάφορους χρόνους δειγματοληψίας μετά την προσθήκη στο έδαφος συγκέντρωσης καθαρών μορφών των μορίων αυτών 162 nmol και 166 nmol/g ξ.β εδάφους αντίστοιχα, σε δυο διαφορετικά επίπεδα υγρασίας (90 και 20% της υδατοϊκανότητας του εδάφους).

| | | Χρόνος (ημέρες) | | | | | | |
|-----|---------|--|-------------|-------------|-------------|-------------|-------------|------------|
| GSL | WHC (%) | 0.125 | 0.25 | 0.5 | 1 | 2 | 4 | 7 |
| GRA | 90 | 56.41 ¹ (3.6 ²)a ³ | 32.93(3.6)a | 16.67(3.5)a | 5.92(0.8)a | 3.21(0.4)a | 3.77(0.4)b | 0.84(0.2)a |
| | 20 | 76.97(6.4)a | 51.67(3.9)b | 29.77(4.8)a | 16.86(3.1)b | 8.01(0.3)b | 1.93(0.14)a | 0.63(0.2)a |
| GER | 90 | 59.88(8.3)a | 36.22(4.5)a | 21.83(3.3)a | 15.91(2.1)a | 7.15(0.64)a | 1.34(0.3)a | 0.59(0.3)a |
| | 20 | 82.97(11.6)b | 65.71(6.2)b | 40.32(4.4)b | 28.47(4.2)a | 18.93(2.2)b | 6.68(2.1)b | 0.86(0.4)a |

¹Μέσος όρος 3 επαναλήψεων ²Τυπικό σφάλμα του μέσου όρου ($n=3$) ³Διαφορετικά γράμματα υποδηλώνουν στατιστικά σημαντικές διαφορές μεταξύ των μέσων όρων ($n=3$) για κάθε χρόνο δειγματοληψίας σύμφωνα με το κριτήριο Tukey's HSD ($\alpha=0.05$).

Πίνακας 8.2. Παράμετροι που υπολογίστηκαν από τα πειραματικά δεδομένα σύμφωνα με το μοντέλο διάσπασης πρώτης τάξης (Εξίσωση 1) και η εκτίμηση της ημιπεριόδου ζωής των ΓΚΣ στο έδαφος σε ώρες.

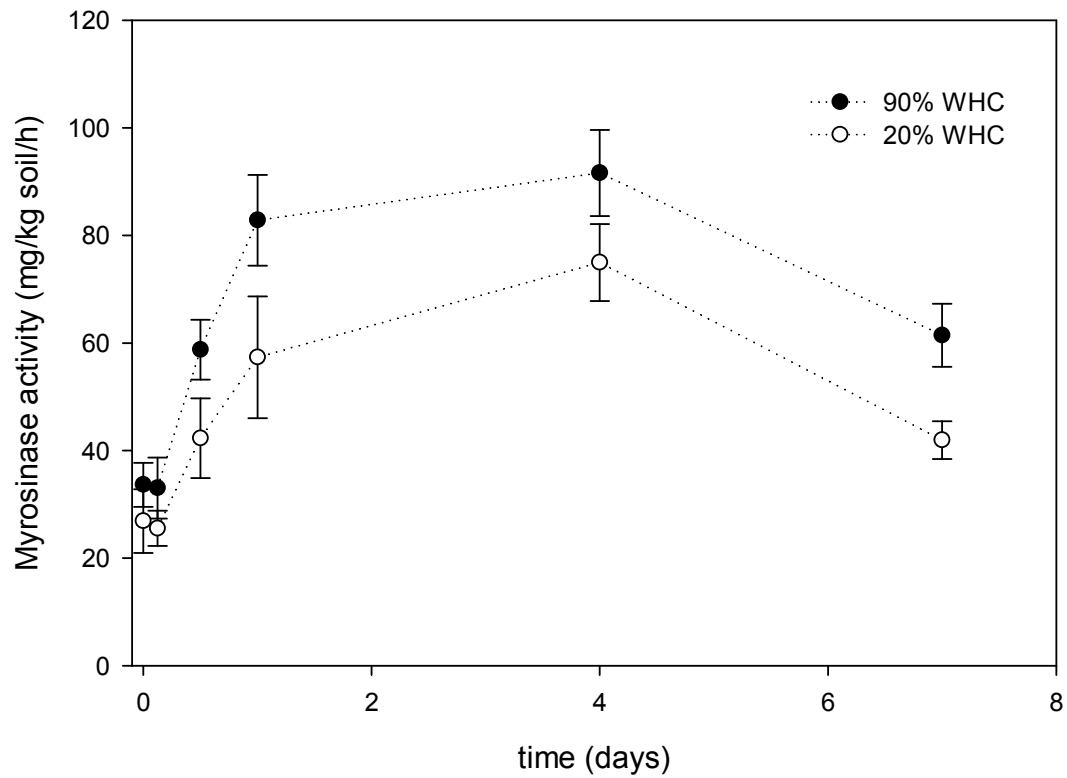
| ΓΚΣ | WHC | K | R ² adj | t _{1/2} (h) |
|---------------------------------------|-----|--------------|--------------------|----------------------|
| A. Εφαρμογή καθαρών μορφών ΓΚΣ | | | | |
| GER | 90 | 2.03 (0.32)* | 0.89 | 8.15 |
| | 20 | 1.07 (0.23) | 0.82 | 15.50 |
| GRA | 90 | 3.33 (0.51) | 0.91 | 4.97 |
| | 20 | 2.11 (0.94) | 0.94 | 7.84 |
| B. Εφαρμογή φύλλων μπρόκολου | | | | |
| GIB | 90 | 2.10 (0.31) | 0.91 | 7.68 |
| | 20 | 2.34 (0.37) | 0.90 | 7.07 |
| GRA | 90 | 1.58 (0.32) | 0.81 | 10.46 |
| | 20 | 1.11 (0.18) | 0.87 | 14.91 |
| GBS | 90 | 5.05 (1.18) | 0.79 | 3.23 |
| | 20 | 1.59 (0.24) | 0.90 | 10.38 |
| neo GBS | 90 | 3.36 (0.92) | 0.72 | 4.92 |
| | 20 | 0.98 (0.29) | 0.71 | 16.89 |

* Οι τιμές στις παρενθέσεις αφορούν το τυπικό σφάλμα της σταθεράς διάσπασης όπως αυτό υπολογίστηκε από τη μη παραμετρική παλινδρόμηση της Εξίσωσης 8.1

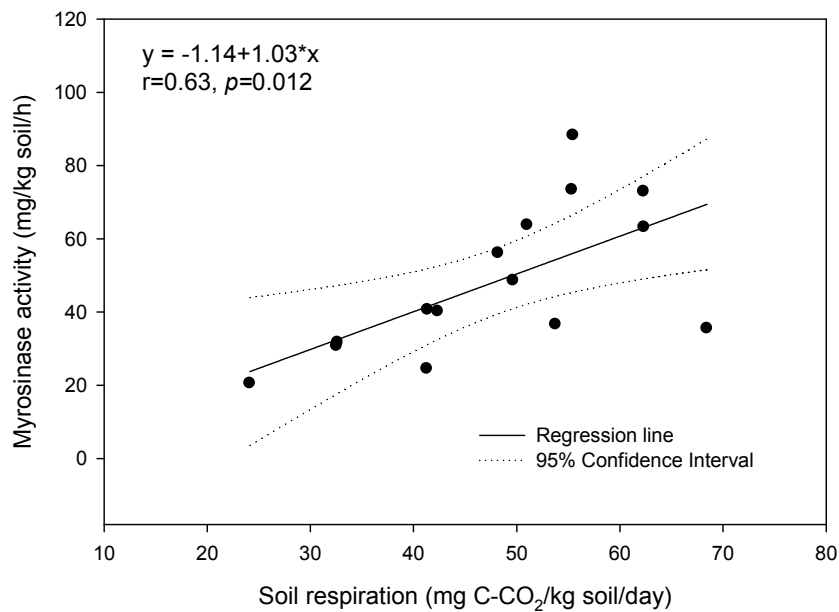
Πίνακας 8.3. Η συγκέντρωση ΓΚΣ που περιέχονται στα φύλλα το μπρόκολου (nmol/g ξ.β εδάφους) σε διάφορους χρόνους δειγματοληψίας μετά την προσθήκη στο έδαφος 22 g φρέσκων φύλλων μπρόκολου /g ξ.β εδάφους αντίστοιχα, σε δυο διαφορετικά επίπεδα υγρασίας (90 και 20% της υδατοικανότητας του εδάφους).

| | | Χρόνος (ημέρες) | | | | | | |
|-----|-----|---|-------------|-------------|-------------|-------------|-------------|-------------|
| GSL | WHC | 0.125 | 0.25 | 0.5 | 1 | 2 | 4 | 7 |
| | (%) | | | | | | | |
| GIB | 90 | 1.04 ¹ (0.2 ²)a ³ | 0.67(0.1)a | 0.43(0.1)a | 0.22(0.03)a | 0.09(0.02)a | - | - |
| | 20 | 1.45 (0.2)b | 0.93(0.1)b | 0.56(0.1)a | 0.25(0.04)a | 0.16(0.03)a | - | - |
| GRA | 90 | 3.78 (0.4)a | 2.65(0.2)a | 1.44(0.2)a | 1.04(0.1)a | 0.93(0.2)a | 0.57(0.1)a | 0.23(0.04)a |
| | 20 | 4.24 (0.3)a | 3.32(0.3)b | 2.00(0.2)a | 1.54(0.3)a | 0.88(0.2)a | 0.65(0.7)a | 0.3(0.1)a |
| GBS | 90 | 1.05 (0.1)a | 0.36(0.1)a | 0.32(0.1)a | 0.19(0.1)a | 0.15(0.04)a | 0.04(0.01)a | - |
| | 20 | 1.17 (0.2)a | 0.98(0.1)a | 0.56(0.1)b | 0.31(0.1)a | 0.14(0.02)a | 0.04(0.01)a | - |
| neo | 90 | 0.25 (0.04)a | 0.10(0.02)a | 0.08(0.02)a | 0.05(0.1)a | 0.06(0.02)a | - | - |
| GBS | 20 | 0.32 (0.1)a | 0.25(0.1)a | 0.17(0.1)a | 0.15(0.1)b | 0.03(0.01)a | 0.04(0.01) | - |

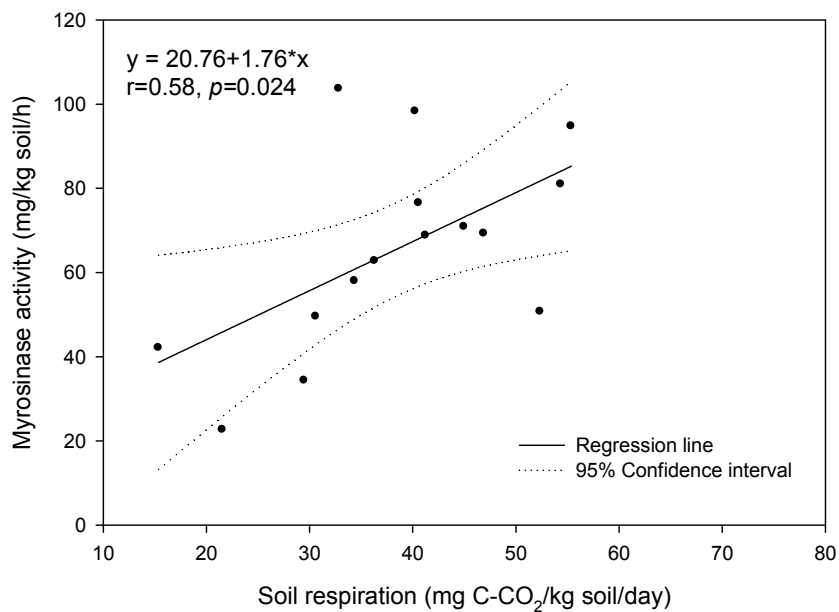
¹. Μέσος όρος 3 επαναλήψεων ². Τυπικό σφάλμα του μέσου όρου (n=3) ³. Διαφορετικά γράμματα υποδηλώνουν στατιστικά σημαντικές διαφορές μεταξύ των μέσων όρων (n=3) για κάθε χρόνο δειγματοληψίας σύμφωνα με το κριτήριο Tukey's HSD ($\alpha=0.05$). – Δεν ανιχνεύθηκε η ουσία.



Διάγραμμα 8.1 Ενζυμική δράση μυροσινάσης (mg/kg εδάφους/h) στο έδαφος σε σχέση με το χρόνο και σε δυο επίπεδα υγρασίας όταν προστέθηκαν στο έδαφος καθαρές μορφές GRA και GER. Η διακύμανση των σημείων αφορά το τυπικό σφάλμα του μέσου όρου των τριων επαναλήψεων.

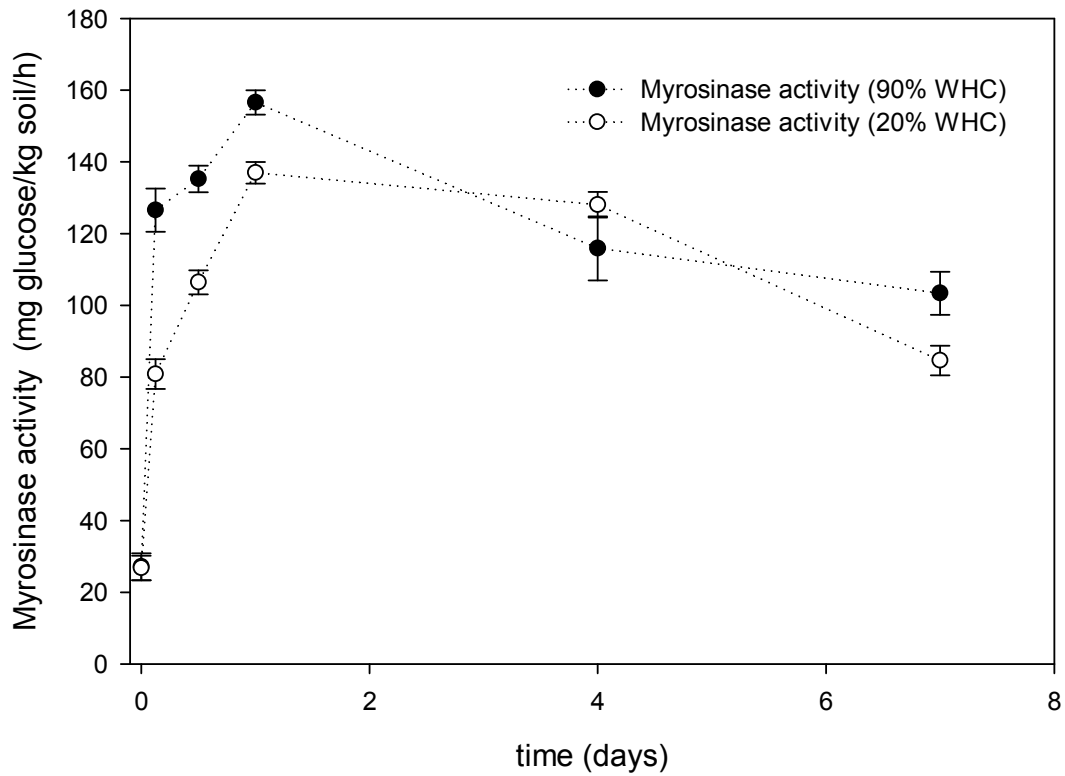


A.

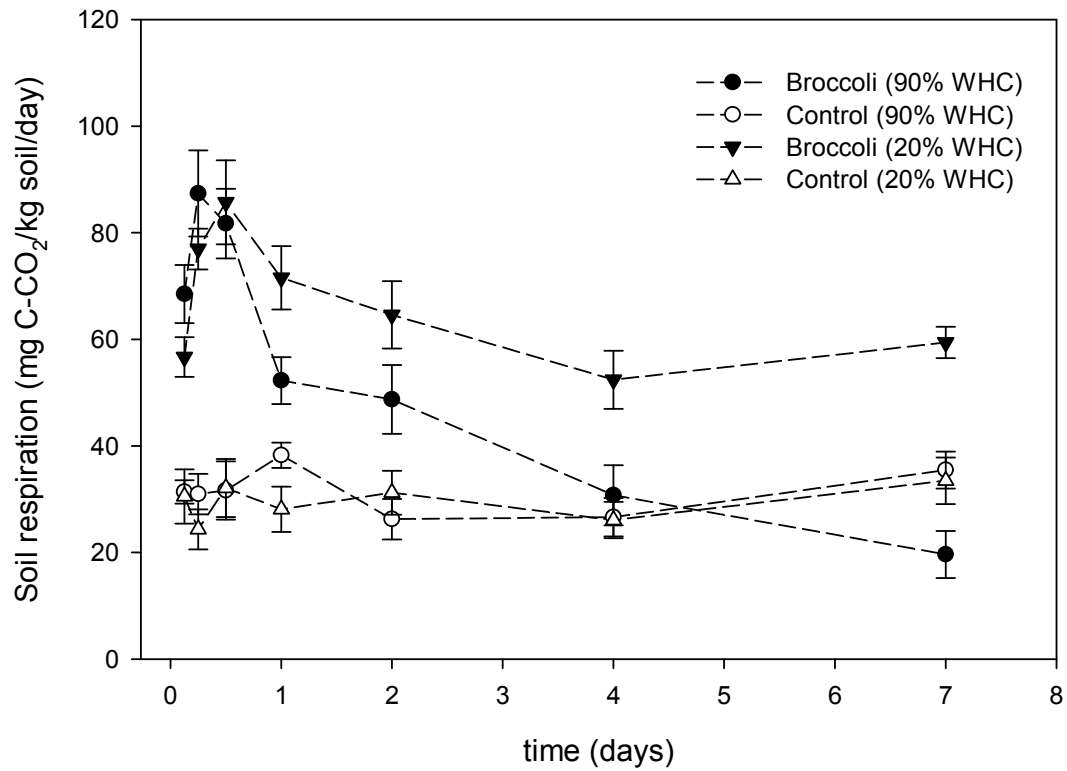


B.

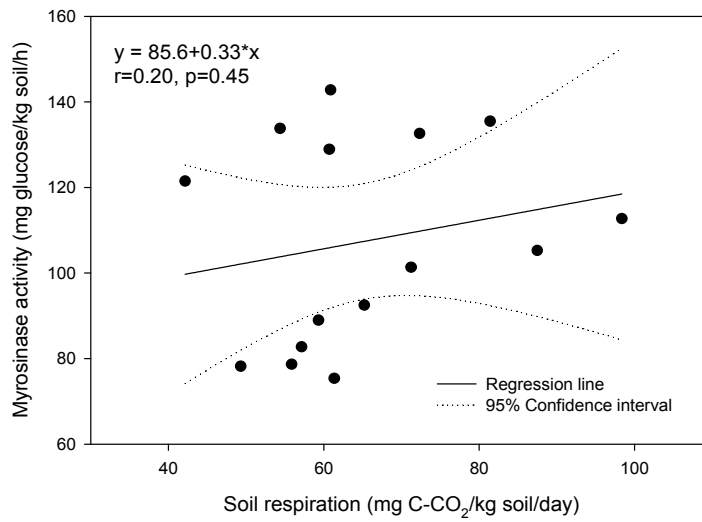
Διάγραμμα 8.2 Συσχέτιση μεταξύ ενζυμικής δράσης μυροσινάσης και μικροβιακής αναπνοής στο έδαφος A) υγρασία στο έδαφος ίση με το 20% της υδατοικανότητας και B) υγρασία στο έδαφος ίση με το 90% της υδατοικανότητας όταν στο έδαφος εφαρμόστηκαν καθαρές μορφές GRA και GER. Οι διακεκομμένες καμπύλες γραμμές αφορούν τα όρια εμπιστοσύνης της καμπύλης παλινδρόμησης μεταξύ ενζυμικής δράσης μυροσινάσης και μικροβιακής αναπνοής.



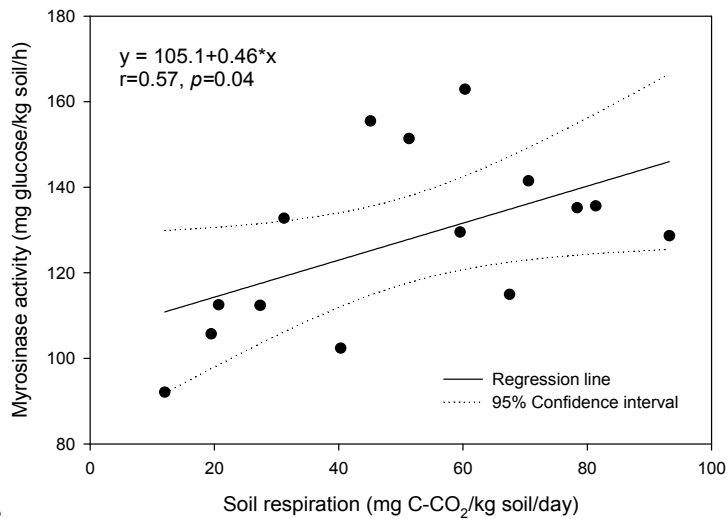
Διάγραμμα 8.3 Ενζυμική δράση μυροσινάσης (mg γλυκόζης/kg εδάφους/h) στο έδαφος σε σχέση με το χρόνο σε δυο επίπεδα υγρασίας όταν προστέθηκαν στο έδαφος φύλλα μπρόκολου. Η διακύμανση των σημείων αφορά το τυπικό σφάλμα του μέσου όρου των τριών επαναλήψεων.



Διάγραμμα 8.4 Μικροβιακή αναπνοή (mg CO₂-C/kg εδάφους/ημέρα) στο έδαφος σε σχέση με το χρόνο και σε δυο επίπεδα υγρασίας όταν προστέθηκαν στο έδαφος φύλλα μπρόκολου. Η διακύμανση των σημείων αφορά το τυπικό σφάλμα του μέσου όρου των τριών επαναλήψεων.

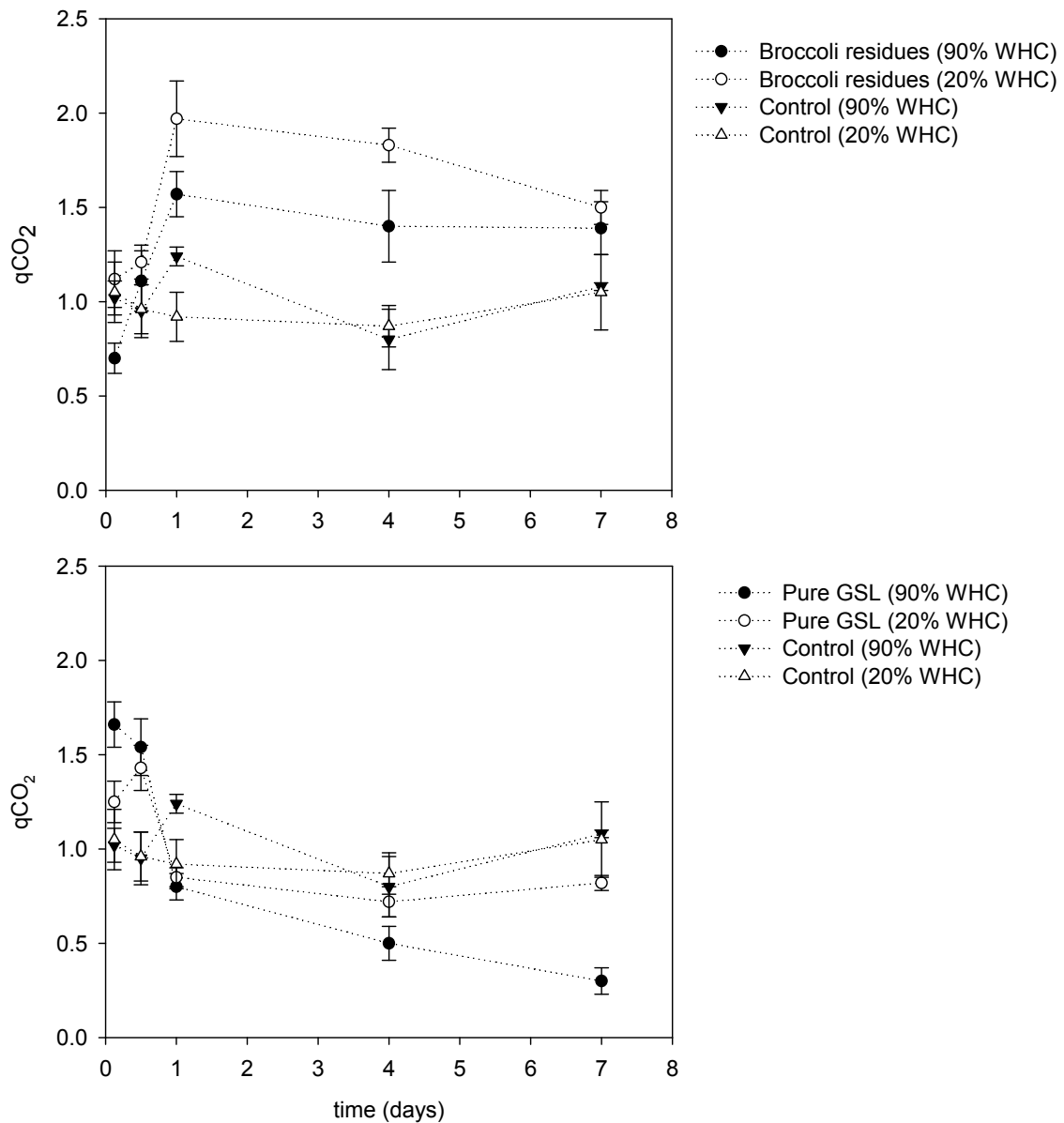


A



B

Διάγραμμα 8.5 Συσχέτιση μεταξύ ενζυμικής δράσης μυροσινάσης και μικροβιακής αναπνοής στο έδαφος A) υγρασία στο έδαφος ίση με το 20% της υδατοικανότητας και B) υγρασία στο έδαφος ίση με το 90% της υδατοικανότητας όταν στο έδαφος εφαρμόστηκαν καθαρές μορφές GRA και GER. Οι διακεκομμένες καμπύλες γραμμές αφορούν τα όρια εμπιστοσύνης της καμπύλης παλινδρόμησης μεταξύ ενζυμικής δράσης μυροσινάσης και μικροβιακής αναπνοής.



Διάγραμμα 8.6 Μεταβολικό πηλίκο του εδάφους (qCO_2) στο έδαφος σε σχέση με το χρόνο και σε δυο επίπεδα υγρασίας όταν προστέθηκαν στο έδαφος φύλλα μπρόκολου και καθαρές μορφές ΓΚΣ. Η διακύμανση των σημείων αφορά το τυπικό σφάλμα του μέσου όρου των τριών επαναλήψεων.

Γενικά Συμπεράσματα

Τα αποτελέσματα της παρούσας διδακτορικής διατριβής δείχνουν ξεκάθαρα ότι, η συγκέντρωση και η σύσταση των ΓΚΣ διαφοροποιείται σημαντικά στους ιστούς των Σταυρανθών σε επίπεδο γένους, είδους, ποικιλίας άλλα και φυτικού οργάνου. Επιπλέον, στο μπρόκολο και την ρόκα που μελετήθηκαν συστηματικά, δείχτηκε ότι η συγκέντρωση και η σύσταση των ΓΚΣ επηρεάζεται σημαντικά από την αζωτούχο και θειική λίπανση. Συγκεκριμένα φαίνεται ξεκάθαρα ότι τόσο το άζωτο όσο και το θείο ρυθμίζουν τη σύσταση των ιστών στα διάφορα μεμονωμένα ΓΚΣ καθώς και τη συγκέντρωσή τους. Εκτός από τη λίπανση η συγκέντρωση των ΓΚΣ φαίνεται ότι εξαρτάται σημαντικά από το στάδιο ανάπτυξης των φυτών και το φυτικό όργανο που εξετάζεται. Λαμβάνοντας υπόψη τα παραπάνω μπορεί να συμπεράνει κανείς ότι, η συγκέντρωση των ΓΚΣ στα διάφορα όργανα των Σταυρανθών μπορεί να ρυθμιστεί και να αυξηθεί με τις ανάλογες καλλιεργητικές φροντίδες όπως είναι η λίπανση με άζωτο και θείο. Ωστόσο δείχθηκε επίσης ότι είναι απαραίτητες μελέτες για το κάθε είδος ξεχωριστά, δεδομένου ότι, τα είδη αντιδρούν διαφορετικά στις διάφορες συνθήκες λίπανσης.

Η ενσωμάτωση στο έδαφος υπολειμμάτων καλλιέργειας μπρόκολου, δεν μειώνει τη μικροβιακή δραστηριότητα όπως παρατηρείται με τις συμβατικές μεθόδους απολύμανσης των εδαφών. Αντίθετα προκαλεί αύξηση της μικροβιακής δραστηριότητας του εδάφους. Οι διαφοροποιήσεις που επέφερε η εφαρμογή υπολειμμάτων καλλιέργειας μπρόκολου στο έδαφος δείχθηκε ότι δεν οφείλονται την τοξικότητα ισοθειοκυανικών ενώσεων από υδρολυόμενα ΓΚΣ που αυτά περιέχουν, αλλά στο ρόλο τους ως μικροβιακά υποστρώματα άνθρακα. Ως εκ τούτου η συγκέντρωση των ΓΚΣ που υπάρχει στα φυτικά όργανα του μπρόκολου δεν μπορεί να επιφέρει αρνητική επίδραση στην μικροβιακή κοινότητα του εδάφους. Από την άλλη πλευρά η εφαρμογή του χημικού απολυμαντικού εδάφους metham sodium είχε καταλυτική επίδραση στη μικροβιακή δραστηριότητα, και βιομάζα καθώς και στη σύσταση της κοινότητας των ασκομυκήτων.

Ο χρόνος παρουσίας των ΓΚΣ στο έδαφος είναι πολύ μικρός και μειώνεται όταν η εδαφική υγρασία αυξάνει. Αυτή η συμπεριφορά παρατηρήθηκε τόσο στις περιπτώσεις όπου ενσωματώθηκαν στο έδαφος υπολείμματα μπρόκολου όσο και στις περιπτώσεις όπου προστέθηκαν καθαρές μορφές ΓΚΣ. Στην τελευταία περίπτωση η διάσπαση των ΓΚΣ συσχετίστηκε με την δραστηριότητα μυροσινάσων μικροβιακής προέλευσης, ενώ στην πρώτη κύριο ρόλο φαίνεται ότι διαδραματίζουν οι μυροσινάσες των ίδιων των ιστών του μπρόκολου.

Συμπερασματικά τα αποτελέσματα υποδηλώνουν, ότι η επισχετική σε διάφορους φυτοπαθογόνους μικροοργανισμούς, επίδραση που αναφέρεται στη διεθνή βιβλιογραφία μετά την ενσωμάτωση υπολειμμάτων μπρόκολου στο έδαφος, δεν οφείλεται στην παρουσία ΓΚΣ στους ιστούς τους. Η ενσωμάτωση άλλων ειδών, με υψηλότερες συγκεντρώσεις στους ιστούς τους πιθανά να έχει επίδραση στη μικροβιακή δραστηριότητα που να σχετίζεται με την περιεκτικότητά τους σε ΓΚΣ. Σε αυτές τις περιπτώσεις η βελτιστοποίηση της συγκέντρωσης των ΓΚΣ στους ιστούς θα πρέπει να πραγματοποιηθεί μέσω της λίπανσης με θείο και άζωτο και της επιλογής του

σταδίου ανάπτυξης των φυτών κατά το οποίο, η συγκέντρωση των ΓΚΣ παρουσιάζει την υψηλότερη συγκέντρωση. Τέλος οι συνθήκες ενσωμάτωσης της καλλιέργειας και πιο συγκεκριμένα τα επίπεδα υγρασίας αλλά και θερμοκρασίας θα πρέπει να αριστοποιηθούν.

Η ταχεία διάσπαση των ΓΚΣ στο έδαφος υπό συνθήκες υψηλής υγρασίας και θερμοκρασίας υποδηλώνει ότι η βιοαπολύμανση με την εδαφική ενσωμάτωση βιομάζας επιλεγμένων και βελτιστοποιημένων ως προς την περιεκτικότητά τους σε ΓΚΣ Σταυρανθών θα μπορούσε να συνδυαστεί με μεθοδολογίες ηλιοαπολύμανσης. Αυτό αποτελεί βασικό προσανατολισμό μελλοντικής έρευνας.