

Γ.Π.Α.

*Μελέτη των μεταβολικών αποκρίσεων του ψυχανθούς
Lens culinaris κάτω από συνθήκες υψηλής αλατότητας*



Σκληρός Γ. Δημήτριος

ΓΕΩΠΟΝΙΚΟ ΠΑΝΕΠΙΣΤΗΜΙΟ ΑΘΗΝΩΝ
ΤΜΗΜΑ ΓΕΩΠΟΝΙΚΗΣ ΒΙΟΤΕΧΝΟΛΟΓΙΑΣ
ΕΡΓΑΣΤΗΡΙΟ ΜΟΡΙΑΚΗΣ ΒΙΟΛΟΓΙΑΣ

Πρόγραμμα Μεταπτυχιακών Σπουδών:
“Βιοτεχνολογία & Εφαρμογές στη Γεωργία”,
Κατεύθυνση “Μοριακή Οικολογία και Ανίχνευση
Γενετικά Τροποποιημένων Οργανισμών”.

Μεταπτυχιακή Διατριβή

ΑΘΗΝΑ, 2012

Επιβλέπων: Εμμανουήλ Φλεμετάκης

ΓΕΩΠΟΝΙΚΟ ΠΑΝΕΠΙΣΤΗΜΙΟ ΑΘΗΝΩΝ
ΤΜΗΜΑ ΓΕΩΠΟΝΙΚΗΣ ΒΙΟΤΕΧΝΟΛΟΓΙΑΣ
ΕΡΓΑΣΤΗΡΙΟ ΜΟΡΙΑΚΗΣ ΒΙΟΛΟΓΙΑΣ

**Μελέτη των μεταβολικών αποκρίσεων του
ψυχανθούς *Lens culinaris* κάτω από συνθήκες
υψηλής αλατότητας**

Μεταπτυχιακή Διατριβή

Σκληρός Γ. Δημήτριος

**Πρόγραμμα Μεταπτυχιακών Σπουδών: «Βιοτεχνολογίας & Εφαρμογές στη
Γεωργία», Κατεύθυνση: «Μοριακή Οικολογία και Ανίχνευση Γενετικά
Τροποποιημένων Οργανισμών**

Επιβλέπων: Εμμανουήλ Φλεμετάκης

Εικόνα εξωφύλλου: Διάφορες ποικιλίες σπόρων *Lens culinaris*

ΑΘΗΝΑ 2012

Η ανάθεση της Μεταπτυχιακής Διατριβής: «Μελέτη των μεταβολικών αποκρίσεων του ψυχανθούς *Lens culinaris* κάτω από συνθήκες υψηλής αλατότητας» στον Σκληρό Γ. Δημήτριο έγινε με απόφαση της Γενικής Συνέλευσης (15η/27-06-2012) του τομέα του Τμήματος Γεωπονικής Βιοτεχνολογίας κατά την οποία εγκρίθηκαν το θέμα και η τριμελής συμβουλευτική και εξεταστική επιτροπή της μελέτης.

ΤΑ ΜΕΛΗ ΤΗΣ ΕΞΕΤΑΣΤΙΚΗΣ ΕΠΙΤΡΟΠΗΣ

- Φλεμετάκης Εμμανουήλ, Επ. Καθηγητής (Επιβλέπων)
- Σκαράκης Γεώργιος, Καθηγητής (Μέλος)
- Λάμπρου Νικόλαος, Αν. Καθηγητής (Μέλος)

Περίληψη

Η ηθική πρόκληση της επιστημονικής κοινότητας να αντιμετωπίσει την παγκόσμια πείνα είναι αυτή που πολύ συχνά ωθεί την έρευνα να κάνει προβλέψεις για την κατάσταση των αγροτικών περιοχών στο μέλλον. Το πρόβλημα της αλατότητας στα εδάφη εμφανίζεται ως η μεγαλύτερη απειλή για τον κατακερματισμό των καλλιεργούμενων εδαφών. Πλέον είμαστε πεπεισμένοι ότι οι βιοτεχνολογικές προσεγγίσεις και πιο εξειδικευμένα οι ομικές τεχνικές, σε συνδυασμό με την επιστήμη της βελτίωσης των φυτών, θα μας βοηθήσουν αρχικά να κατανοήσουμε σε μοριακό, μεταβολικό και πρωτεϊνικό επίπεδο πως αντανακλάται το πρόβλημα στα φυτά, αλλά και να μας υπαγορεύσουν πως να το αντιμετωπίσουμε στο μέλλον στοχεύοντας πιθανά σε τοπικές ποικιλίες που έχουν αναπτύξει ανθεκτικότητα, αλλά και γιατί όχι σε διαγενετικά φυτά που είναι εφοδιασμένα με ένα μεγαλύτερο γενετικό «οπλοστάσιο» για αντιμετώπιση του φαινομένου.

Προς αυτήν την κατεύθυνση είναι σχεδιασμένη και εφαρμοσμένη η παρούσα εργασία που ερευνά αποκρίσεις διαφόρων ποικιλιών φακής (*Lens culinaris*) σε συνθήκες αλατότητας, αλλά επίσης εστιάζει και σε μεταβολικό επίπεδο χρησιμοποιώντας την ολιστική τεχνική της αέριας χρωματογραφίας/φασματομετρίας μάζας (GC/MS) για να αναλύσει τους μεταβολίτες που επάγονται ή καταστέλλονται σε διάφορες συνθήκες απευθείας εφαρμογής αλατότητας, αλλά και σε διάφορες συνθήκες εγκλιματισμού. Αναλύουμε το ποσοστό αυτών ανάλογα με τις συνθήκες, αλλά και πιθανές διαφορές που παρουσιάζονται μεταξύ δύο ποικιλιών που μας έχουν προϋδεάσει από μακροσκοπική μελέτη. Βρίσκουμε μεγάλο αριθμό γνωστών μεταβολιτών που επηρεάζονται στατιστικά σημαντικά ξεχωριστά σε ρίζα και φύλλα για κάθε ποικιλία, ενώ μένει να γίνει περαιτέρω στατιστική ανάλυση των δεδομένων για πιο ασφαλή συμπεράσματα.

Τα ευρήματα αυτά αποτελούν το πρώτο βήμα για τον εντοπισμό των μεταβολικών διεργασιών που σχετίζονται με την ανθεκτικότητα σε υψηλή αλατότητα στη φακή, και θα μπορούσαν να αξιοποιηθούν τόσο σε προγράμματα κλασικής βελτίωσης όσο και για το σχεδιασμό κατευθυνόμενων γενετικών επεμβάσεων. Σημειώνουμε ότι είναι η πρώτη φορά που παρουσιάζεται στη διεθνή βιβλιογραφία μεταβολομική ανάλυση σε φυτά φακής και ελπίζουμε ότι θα είναι ένα έναυσμα για την μεγαλύτερη μελέτη στο μέλλον του συγκεκριμένου είδους.

ΑΘΗΝΑ, 2012

Λέξεις κλειδιά: *Lens culinaris*, φακή, μεταβολομική, αλατότητα, εγκλιματισμός, ποικιλίες, γενετική βελτίωση, φασματομετρία μάζας, αέρια χρωματογραφία, GC, MS, *ιόντα χλωρίου*.

Abstract

The ethical challenge, for the scientific community, to encounter the global hunger, is what boosts the researchers to predict the potential condition of the agricultural soils. The salinity problem of the soils rises up as one of the biggest threat of their fragmentation. Nowadays we are convinced that the biotechnological approaches and more specific the omic techniques, with the combination of the plant breeding science, will help us to understand in molecular, metabolic and protein level, how this problem is reflected on the agricultural land, but also will help us to solve it in the future, targeting in potential local varieties of plants, which have evolved some resistance, and why not to genetically modified plants, which will be “equipped” with a larger molecular “armory”.

Towards this direction is designed and applied this thesis, which investigates the different response of several number varieties of lentil (*Lens culinaris*) under salt stress, but also focuses in the metabolic response using the omic technique of GC/MS to analyze the metabolites which are induced or reduced, but also correlated within different salt stresses, which include initial application of salt and gradual step application. Also we compare the results between two different varieties which have given us a brief idea from macroscopic research. We find a large number of metabolites that change statistically significant between the treatments within the same variety and tissue, and remains the further analysis of the data for more correlated results.

These findings are the first step towards spotting the metabolic responses, which are correlated with the salinity stress in lentil and they could be usefull in breeding programs and in designing genetic engineering applications on the plant. At this point we note that is the first time in the international bibliography where GC/MS is applied in lentil and we hope that is going to contribute to the common interest of the scientific community regarding this specie.

ATHENS, 2012

Key words: *Lens culinaris*, lentil, metabolomics, GC, MS, acclimatization, gas chromatography, mass spectrometry, salinity, soil, chloride.

“Nothing in biology makes sense except in the light of evolution.”

Theodosius Dobzhansky (1900-1975)

Russian geneticist and Evolutionary biologist

Περιεχόμενα	
Περίληψη.....	4
Abstract.....	5
1. ΕΙΣΑΓΩΓΗ.....	10
1.1 Φαινόμενο αλατότητας.....	11
1.2 Εδάφη επηρεασμένα από την αλατότητα.....	11
1.2.1 Φυσική πηγή αλάτων στα εδάφη.....	12
1.2.2 Ανθρωπογενείς πηγές αλάτων στο έδαφος.....	13
1.3 Συσχέτιση νερού άρδευσης με καλλιέργειες	14
1.4 Η αλατότητα επηρεάζει τα φυτά σε πολλά επίπεδα.....	14
1.4.1 Οσμωτική καταπόνηση και μεταβολικές αποκρίσεις	15
1.4.2 Διαμερισματοποίηση ιόντων	16
1.4.3 Απόκριση σε πρωτεϊνικό επίπεδο.....	17
1.4.4 Συνέπειες σε μοριακό επίπεδο	18
1.4.5 Μορφολογικές αποκρίσεις	18
1.4.6 Οξειδωτική καταπόνηση.....	19
1.5.1 Αλατότητα και φυτά-μοντέλα.....	20
1.5.2 Αλατότητα και <i>A. thaliana</i>	21
1.5.3 Αλατότητα και <i>L. japonicus</i>	21
1.5.4 Αλατότητα και <i>M. truncatula</i>	22
1.6 Η φακή	22
1.7 Καλλιέργεια της φακής	25
1.8 Αλατότητα και φακή.....	26
1.9 Η φακή στο εργαστήριο.....	27
1.10 Το μέλλον της φακής	28
2. ΠΕΙΡΑΜΑΤΙΚΗ ΔΙΑΔΙΚΑΣΙΑ	29
3. ΥΛΙΚΑ ΚΑΙ ΜΕΘΟΔΟΙ	32
3.1.1 Προβλάστηση σπόρων <i>L. culinaris</i> για μέτρηση φυσιολογικών παραμέτρων φυταρίων.....	33
3.1.2 Μέτρηση φυσιολογικών παραμέτρων	33
3.2.1 Προβλάστηση σπόρων <i>L. culinaris</i> για ανάπτυξη σε συνθήκες θερμοκηπίου	34
3.2.2 Ανάπτυξη φυτών σε συνθήκες θερμοκηπίου.....	34
3.2.3 Συλλογή φυτικού υλικού.....	35
3.2.4 Προετοιμασία δειγμάτων για αέρια χρωματογραφία-φασματομετρία μάζας.....	35

3.2.5 Μέτρηση ηλεκτρικής αγωγιμότητας των υποστρωμάτων των φυτών.....	36
3.3.1 Αρχή λειτουργίας συσκευής GC/MS.....	36
3.3.2 Συσκευή GC/MS που χρησιμοποιήθηκε.....	37
ΠΑΡΑΡΤΗΜΑ Α	38
ΠΑΡΑΡΤΗΜΑ Β	40
ΣΥΝΘΕΣΗ ΔΙΑΛΥΜΑΤΟΣ ΠΟΤΙΣΜΑΤΟΣ.....	40
ΠΑΡΑΡΤΗΜΑ Γ.....	41
Χρονοδιαγραμμα Α	41
Χρονοδιάγραμμα Β	42
4. ΑΠΟΤΕΛΕΣΜΑΤΑ.....	43
4.1 Βλάστηση και ανάπτυξη των ποικιλιών της φακής σε συνθήκες αλατότητας	44
4.2 Μεταβολομική ανάλυση.....	54
5. ΣΥΖΗΤΗΣΗ.....	78
6. ΒΙΒΛΙΟΓΡΑΦΙΑ.....	82

Πρόλογος-Ευχαριστίες

Η παρούσα Μεταπτυχιακή Διατριβή έλαβε χώρο στο εργαστήριο Μοριακής Βιολογίας του Γεωπονικού Πανεπιστημίου Αθηνών υπό την άμεση επίβλεψη του Επίκουρου καθηγητή Φλεμετάκη Εμμανουήλ στα πλαίσια του προπτυχιακού προγράμματος σπουδών του τμήματος Γεωπονικής Βιοτεχνολογίας.

Στο σημείο αυτό θα ήθελα να ευχαριστήσω τον επίκουρο καθηγητή Φλεμετάκη Εμμανουήλ για την αμέριστη συμπαράστασή του και την καθοδήγησή του στη διάρκεια της πειραματικής μελέτης, όπως επίσης και στη βοήθεια κατανόησης του θεωρητικού μέρους της πτυχιακής μελέτης.

Ακόμα θα ήθελα να ευχαριστήσω την υποψήφια διδάκτορα Καλονιάτη Χρυσάνθη, για τη συμμετοχή της, τις συμβουλές και τη βοήθειά της, την υποψήφια διδάκτορα Ευαγγελία Δ. Κουρή και τον Καραλιά Γεώργιο, μεταπτυχιακό φοιτητή, για την πρακτική βοήθεια που μου προσέφερε καθ'όλη τη διάρκεια του πειραματικού μέρους.

Επίσης θα ήθελα να ευχαριστήσω όλα τα μέλη του εργαστηρίου μοριακής βιολογίας.

Τέλος ευχαριστώ θερμά τα μέλη της εξεταστικής επιτροπής.

1. ΕΙΣΑΓΩΓΗ

1.1 Φαινόμενο αλατότητας

Η συνεχώς εξελισσόμενη και ραγδαίως μεταβαλλόμενη δραστηριότητα του ανθρώπου στη φύση, έχει προκαλέσει και συνεχίζει να προκαλεί μεγάλες αλλαγές στο οικοσύστημα προς όφελος μιας υλιστικής κεντρικής ιδέας, αγνοώντας τις επιπτώσεις στο άμεσο φυσικό περιβάλλον και τα μικροπεριβάλλοντα των οργανισμών. Ένα τέτοιο παράδειγμα, που κάποιες φορές δεν είναι μόνο αποτέλεσμα ανθρώπινης δραστηριότητας, άλλα και φυσικών γεγονότων, είναι η μεγάλη αύξηση και η συσσώρευση αλάτων στα εδάφη των καλλιεργούμενων εκτάσεων. Η αλόγιστη άρδευση και η χρήση κακής ποιότητας νερού σε αυτήν, η έλλειψη εναλλασσόμενων καλλιεργειών, η χρήση λιπασμάτων χωρίς συμβουλή ειδικού από τους αγρότες και η έλλειψη πρόληψης για αποφυγή εισροής θαλασσινού νερού στον υδροφόρο ορίζοντα, έχουν καταστήσει την αλατότητα ως τον πιο σημαντικό αβιοτικό παράγοντα, όπου οφείλεται πολύ μεγάλο ποσοστό μείωσης της αγροτικής παραγωγής. Φυσικά σε έναν πλανήτη, όπου τα $\frac{3}{4}$ της επιφάνειάς του καλύπτονται από θαλασσινό νερό, ακούγεται λογικό μεγάλο ποσοστό καλλιεργούμενων εδαφών να «υποφέρουν» από υψηλή αλατότητα. Μάλιστα ως πρόβλημα εμφανίζεται σε καλλιεργούμενα εδάφη για πάνω από 3000 χρόνια (Flowers, 2006), οπότε η απόδοση ευθυνών αποκλειστικά στην ανθρώπινη δραστηριότητα δεν είναι σωστή. Όμως πλέον είμαστε σε θέση να πούμε ότι το πρόβλημα της αλατότητας των εδαφών αποτελεί παγκόσμιο πρόβλημα και τα καλλιεργήσιμα εδάφη συνεχώς συρρικνώνονται, ανεξάρτητα με το αν είναι παράκτια ή όχι και αυτό συμβαίνει εξαιτίας της εσφαλμένης αντίληψης που έχει ο άνθρωπος για το έδαφος. Έτσι λοιπόν, προτού εξετάσουμε τις συνέπειες που έχει η αλατότητα στα φυτά, θα αφιερώσουμε ένα κομμάτι στο να κατανοήσουμε πως συμπεριφέρεται το έδαφος στην ύπαρξη και την εμφάνιση αλάτων.

1.2 Εδάφη επηρεασμένα από την αλατότητα

Η παγκόσμια έκταση καλλιεργήσιμης γης υπολογίζεται στα 1,5 δισεκατομμύρια εκτάρια. Από αυτά 0,34 δισεκατομμύρια εκτάρια (23%) είναι επηρεασμένα από υψηλή συγκέντρωση αλάτων και υπάρχουν σε πάνω από 100 χώρες και σε συνδυασμό με τα 0,56 (37%) δισεκατομμύρια εκτάρια που θεωρούνται αλκαλιωμένα (sodic soils), αφήνουν μόλις το 40% της πιθανής καλλιεργήσιμης γης προς πλήρη εκμετάλλευση χωρίς αυτούς τους 2 αβιοτικούς παράγοντες (Massoud, 1981). Τα συγκεκριμένα στοιχεία έρχονται να τονίσουν ότι το γεγονός της συρρίκνωσης των εκμεταλλεύσιμων εδαφών

αποτελεί και πρέπει να αντιμετωπιστεί ως ένα μεγάλο πρόβλημα που αντιτίθεται στην ανάγκη του κόσμου για παραγωγή τροφής (Ghassemi *et al.*, 1995).

Πιο συγκεκριμένα ο όρος αλατότητα αναφέρεται στην ύπαρξη υψηλών συγκεντρώσεων ιόντων (συνήθως Na^+ και Cl^-) κυρίως στο περιβάλλον της ρίζας. Παρόλο που σε πολλές περιπτώσεις το νερό βρίσκεται εν αφθονία στην περιοχή της ριζόσφαιρας, η υψηλή συγκέντρωση ιόντων στο εδαφικό διάλυμα έχει ως αποτέλεσμα το νερό αυτό να μην είναι διαθέσιμο, λόγω του χαμηλού υδατικού δυναμικού. Έτσι επηρεάζεται άμεσα η ανάπτυξη των φυτών και αγροτική παραγωγή.

Η αλατότητα ενός εδάφους μετριέται μετά από δειγματοληψία του χώματος και παραγωγής κορέσμενου διαλύματος από αυτό. Ένα διάλυμα πλούσιο σε άλατα προσφέρει μικρή αντίσταση στο ηλεκτρικό ρεύμα και άρα η αγωγιμότητα είναι υψηλότερη από ένα φυσιολογικό δείγμα εδάφους. Έτσι το καταλληλότερο μέτρο σύγκρισης για τα εδάφη με παράμετρο την αλατότητα είναι η αγωγιμότητά τους.

Τα εδάφη με υψηλή συγκέντρωση αλάτων είναι αυτά που η αγωγιμότητά τους ξεπερνά τα 4 dS/m και είναι το σημείο που σχεδόν όλες οι αγροτικές παραγωγές παρουσιάζουν μειώσεις. Φυσικά ένα τέτοιο όριο είναι σχετικό, αφού κάθε φυτό παρουσιάζει διαφορετική ανεκτικότητα στα αλατούχα εδάφη. Έτσι για παράδειγμα, το φασόλι (*Phaseolus vulgaris*) εμφανίζει ευαισθησία στο 1 dS/m, η μηδική (*Medicago sativa*) στα 2.0 dS/m, ενώ το σιτάρι (*Triticum spp*) στα 8.0 dS/m (US salinity laboratory, 1954).

Όμως πως ένα έδαφος αποκτά αλατούχα χαρακτηριστικά;

1.2.1 Φυσική πηγή αλάτων στα εδάφη

Η προέλευση των αλάτων στο έδαφος μπορεί να είναι φυσική ή ανθρωπογενής. Η φυσιολογική παρουσία τους είναι μια αλληλεπίδραση γεωχημική και υδρολογική σε συνδυασμό με την υπάρχουσα χλωρίδα και λιγότερο την πανίδα. Η αρχική παρουσία αλάτων προέρχεται από φυσικές πηγές εδαφών, ιζημάτων και πετρών. Η διάλυση των αλάτων από αυτές τις φυσικές πηγές γίνεται στην υγρασία του εδάφους η οποία με τη σειρά της προέρχεται από φυσικές κατακρημνίσεις. Έτσι, ουσιαστικά η παρουσία αλατότητας εξαρτάται από τη διαφορά εξάτμισης της υγρασίας του εδάφους σε

σχέση με το ρυθμό βροχόπτωσης, πράγμα που φυσικά συνεπάγεται ότι στα ερημικά ή ημι-ερημικά εδάφη η αλατότητα εμφανίζεται σε μεγάλα ποσοστά, ενώ στα εδάφη που η υγρασία είναι συνεχώς υπαρκτή η αλατότητα είναι ποσοστιαία μικρότερη. Ακόμα, κατά τη διάρκεια των γεωλογικών ετών η στάθμη της θάλασσας, όπως ακόμα και η τοπογραφία της, έχει αλλάξει κατά πολύ, αφού εδάφη που σήμερα προσπαθούμε να καλλιεργήσουμε παλαιότερα βρίσκονταν κάτω από τη στάθμη της θάλασσας και τώρα έχουν ανέλθει, λόγω της κίνησης των τεκτονικών πλακών. Επίσης κάθε καιρική κατακρήμνιση εναποθέτει στο έδαφος σκόνη από την ατμόσφαιρα που περιέχει άλατα, ενώ δεν πρέπει να ξεχνάμε και τα φυσικά γεγονότα, όπως παλίρροιες, τσουνάμι και εισροή με διάφορους τρόπους, αλατών στον υδροφόρο ορίζοντα που κάνουν τα καλλιεργούμενα εδάφη αλατούχα με φυσικό τρόπο.

1.2.2 Ανθρωπογενείς πηγές αλάτων στο έδαφος

Όπως ήδη προαναφέραμε, τα αλατούχα εδάφη οφείλονται σε πολύ μεγάλο ποσοστό και στην ανθρώπινη δραστηριότητα. Οι κυριότερες δραστηριότητες του ανθρώπου που εμπλουτίζουν το έδαφος με άλατα είναι το κακής ποιότητας αρδευτικό νερό, κατάλοιπα αλάτων από χώματα και τροποποιήσεις αυτών, χημικά λιπάσματα, αποχετεύσεις κατεργασμένων ή μη λυμάτων που μολύνουν τον υδροφόρο ορίζοντα, όπως επίσης και υγρά απόβλητα, αλλά και ρήψη πετρελαϊκών αποβλήτων στα χωράφια. Φυσικά αυτές είναι πρώτου βήθμου εναποθέσεις αλάτων από ανθρώπινη δραστηριότητα. Οι δευτεροβάθμιες εναποθέσεις αλάτων από ανθρώπινες δραστηριότητες, μπορούν να είναι οποιεσδήποτε που έχουν να κάνουν με το νερό άρδευσης, την αποστράγγιση των εδαφών, την ελεύθερη βοσκή και φυσικά την αποψίλωση των δασών, αφού όλες αυτές οι δραστηριότητες οδηγούν σε μια ανισοκατανομή της εξάτμισης της εδαφικής υγρασίας σε σχέση με τις φυσικές κατακρημνίσεις.

Από τους παράγοντες που προαναφέραμε, το πιο κοινό στοιχείο ανθρωπογενούς δραστηριότητας σε παγκόσμια κλίμακα είναι το κακής ποιότητας νερό άρδευσης που παρέχεται στις αγροτικές περιοχές και είναι καλό να αναφέρουμε πως σχετίζεται με την αγροτική παραγωγή.

1.3 Συσχέτιση νερού άρδευσης με καλλιέργειες

Η ποιότητα του νερού άρδευσης αναφορικά με το ποσοστό αλατότητας, όπως προαναφέραμε εκφράζεται σε μονάδες ηλεκτρικής αγωγιμότητας EC (dS/m). Η ηλεκτρική αγωγιμότητα ποικίλει από <0.6 για το φρέσκο νερό, σε 1.5-3 για το ελαφρά αλατούχο νερό (brackfish), έως και 45 για το νερό θάλασσας (seawater). Στον πίνακα 1 γίνεται μια γενική συσχέτιση διαφορετικής ποιότητας νερού άρδευσης με την επίδρασή του στην αγροτική παραγωγή. Όπως φαίνεται, η χρησιμοποίηση ελαφρά αλατούχου νερού άρδευσης δεν επηρεάζει σημαντικά την αγροτική παραγωγή στο κριθάρι, το ζαχαρότευτλο και το βαμβάκι, όμως συμβάλλει σημαντικά στην αύξηση της ηλεκτρικής αγωγιμότητας του εδάφους και εν τέλει, στην αχρήστευση του συγκεκριμένου εδάφους, αρχικά για μη ανεκτικές καλλιέργειες και στη συνέχεια, για καμία καλλιέργεια.

Είδος νερού άρδευσης	Συνολικά διαλυμένα άλατα (ppm)	EC(dS/m)	Είδος καλλιέργειας	Κρίσιμο σημείο ανεκτικότητας (dS/m)	Βαθμός ανεκτικότητας
Φρέσκο νερό (fresh water)	<500	<0.6			
Ελάχιστα αλατούχο (slightly brackfish)	500-1000	0.6-1.5	Φασόλι	1	E
			Φράουλα	1	E
Ελαφρώς αλατούχο (brackfish)	1000-2000	1.5-3	Καλαμπόκι	1.7	ME
			Πατάτα	1.7	ME
			Μηδική	2	ME
			Ρύζι	3	ME
Μεσαία αλατούχο (moderate saline)	2000-5000	3-8	Σόγια	5	MA
			Σιτάρι	6	MA
			Σόργο	6.8	MA
			Τεύτλο	7	A
			Βαμβάκι	7.7	A
			Κριθάρι	8	A
Αλατούχο νερό (saline water)	5000-10000	8-15			
Υψηλά αλατούχο νερό (highly saline water)	10000-35000	15-45			

Πίνακας 1: Κατάταξη νερού με βάση την ποιότητά του (βασισμένη στα διαλυμένα άλατα) και ανεκτικότητα στην αλατότητα συγκεκριμένων καλλιεργειών (Hillel, 2000 and Maas, 1990). Κατάταξη ευαισθησίας καλλιεργειών: ευαίσθητη (E), μεσαία ευαίσθητη (ME), μεσαία ανεκτική (MA), ανεκτική (A).

1.4 Η αλατότητα επηρεάζει τα φυτά σε πολλά επίπεδα

Η αλατότητα επηρεάζει τα φυτά με μια ποικιλία ρόλων και σε διαφορετικό επίπεδο πολυπλοκότητας ανάλογα με το είδος του φυτού. Υπάρχει το οσμωτικό φαινόμενο που εμφανίζεται λόγω μεγάλης διαφοράς δυναμικού ανάμεσα στην υγρασία του εδάφους και τους ενδοκυτταρικούς χώρους, αλλά υπάρχει και καταπόνηση

από τα ιόντα νατρίου (Na^+) και τα ιόντα χλωρίου (Cl^-) σε μοριακό, μεταβολικό, πρωτεϊνικό, αλλά και δομικό-μορφολογικό επίπεδο.

Υπάρχουν δύο γενικές στρατηγικές για να αντιμετωπιστεί η αλατότητα από τα φυτά, η στρατηγική της αποφυγής και η στρατηγική της ανθεκτικότητας.

Τη στρατηγική της αποφυγής τη χρησιμοποιούν τα αλόφυτα, φυτά που δεν επιτρέπουν την εισαγωγή των βλαβερών για αυτά ιόντων στο εσωτερικό των κυττάρων με δύο τρόπους:

A) Φυτά που δεν απορροφούν το αλάτι, αλλά το αποκλείουν από την εδαφική υγρασία που θέλουν στο περιβάλλον της ριζόσφαιρας (π.χ. φυτό *Rhizophora mangla*)

B) Φυτά που ενώ απορροφούν το αλάτι, έχουν τη δυνατότητα να το «οδηγούν» και να το εκκρίνουν από συγκεκριμένους αδένες κρατώντας την υγρασία που επιθυμούν (π.χ. φυτό *Tamarix*)

Τη στρατηγική της ανθεκτικότητας την ακολουθούν τα φυτά που δεν είναι εξοπλισμένα με ειδικούς μηχανισμούς και η άμυνά τους απέναντι στην αλατότητα έχει να κάνει με μεταβολική ρύθμιση, αλλά και διαμερισματοποίηση των βλαβερών ιόντων. Η επιβίωση αυτών των φυτών στηρίζεται στην ταυτόχρονη πρόσληψη ιόντων από το έδαφος, αλλά και παραγωγή μεταβολιτών, που μειώνουν το δυναμικό εντός των κυττάρων και το εξισορροπούν με αυτό στο έδαφος με αποτέλεσμα να μειώνεται η πίεση σπαργής στα κύτταρα. Τα ιόντα συσσωρεύονται στο χυμοτόπιο των κυττάρων, ενώ τα επίπεδά τους στο κυτταρόπλασμα κρατιούνται σε χαμηλά επίπεδα. Ένας αντιμεταφορέας Na^+/H^- ο οποίος εδράζεται στον τονοπλάστη οδηγεί τα Na^- στο χυμοτόπιο.

Το δυναμικό του νερού στο κυτταρόπλασμα εξισορροπείται με αυτό στο χυμοτόπιο, για να μην υπάρχει αφυδάτωση και λύση αυτού, με τη σύνθεση συμβατών οσμωρυθμιστών, μέσω μιας διαδικασίας που ονομάζεται οσμωρύθμιση και είναι ουσιαστικά ο κύριος εκφραστής της άμυνας απέναντι στην οσμωτική καταπόνηση.

1.4.1 Οσμωτική καταπόνηση και μεταβολικές αποκρίσεις

Οι υψηλές συγκεντρώσεις ιόντων στο έδαφος δημιουργούν χαμηλά δυναμικά και επομένως εμφανίζεται μια μεγάλη διαφορά δυναμικού ανάμεσα στο έδαφος και τα φυτά που έχει ως αποτέλεσμα τη δημιουργία μιας οσμωτικής καταπόνησης που εμφανίζει ίδιες συνέπειες με την υδατική καταπόνηση. Η πρώτη συνέπεια που εμφανίζεται άμεσα για τα φυτά είναι η αλλαγή στο οσμωτικό δυναμικό του φυτού, φαινόμενο που ονομάζεται οσμωρύθμιση. Είναι το φαινόμενο κατά το οποίο το δυναμικό των ιστών ρυθμίζεται χαμηλότερα με τη συσσώρευση οσμωτικά ενεργών μεταβολιτών. Το

φαινόμενο αυτό δεν περιλαμβάνει την περίπτωση που ο κυτταρικός χυμός κατά τη σπαργή κυττάρων συμπυκνώνεται και επομένως αλλάζει τυχαία το δυναμικό προς τα κάτω, αλλά στην περίπτωση που το φυτό αυτόβουλα συσσωρεύει μεταβολίτες οι οποίοι επάγονται για να αντιμετωπιστεί η καταπόνηση. Έτσι ως αποτέλεσμα της οσμωρύθμισης είναι η οσμωτική εξισορρόπηση ανάμεσα στο φυτό και το έδαφος ώστε να διατηρείται η πίεση σπαργής των κυττάρων σε ανεκτικά επίπεδα. Τα φυτά που έχουν μπει στη διαδικασία της οσμωρύθμισης, έχουν τη δυνατότητα να αφομοιώνουν μεγάλα ποσά CO₂, αφού τα στομάτια μένουν ανοιχτά. Στις οσμωτικά ενεργές ουσίες περιλαμβάνονται ανόργανα άλατα (K, Ca) και οργανικές ενώσεις. Σημαντική είναι η συνεισφορά των οργανικών οξέων σε αυτήν την λειτουργία, όπως τα αμινοξέα (προλίνη), ενώσεις του τεταρτοταγούς αμμωνίου (βεταΐνη της αλανίνης και της γλυκίνης), όπως επίσης και σάκχαρα κυρίως της κατηγορίας των αλκοολών (μανιτόλη, σορβιτόλη, πινιτόλη). Η εύκολη διαλυτότητα αυτών των ουσιών δίχως να επιφέρουν καμία δυσλειτουργία στα οργανίδια των κυττάρων, κατατάσσουν τις ουσίες αυτές στην κατηγορία των συμβατών οσμωλυτών. Η λειτουργία όμως αυτών των ουσιών δεν τελειώνει εδώ. Μπορούν και προστατεύουν εξειδικευμένα πρωτεϊνικά σύμπλοκα, συσσωρευόμενα γύρω τους, που μπορούν να αποδιαταχτούν λόγω της καταπόνησης. Τέλος μια άλλη σημαντική λειτουργία τους που θα αναλυθεί παρακάτω, είναι κατά τη διάρκεια της οξειδοτικής καταπόνησης, που επέρχεται εξαιτίας της οσμωτικής, μπορούν να απομακρύνουν τις ενεργές μορφές οξυγόνου που σχηματίζονται.

1.4.2 Διαμερισματοποίηση ιόντων

Η έρευνα που έχει γίνει για να κατανοήσουμε την ανεκτικότητα των αλόφυτων σε σχέση με τα γλυκόφυτα, οδήγησε τους επιστήμονες να πειραματιστούν αρχικά με την ανεκτικότητα συγκεκριμένων ενζύμων απέναντι στην αλατότητα. Η έρευνα αυτή απέδειξε ότι μέχρι και ένζυμα από αλόφυλους μικροοργανισμούς δεν μπορούν να είναι λειτουργικά σε συγκεντρώσεις Na⁺ πάνω από 100mM (Munns *et al.*, 1983). Στα φυτά δε φάνηκε καμιά διαφορά ανάμεσα στα ένζυμα από αλόφυτα και αυτά από γλυκόφυτα (Greenway & Osmond 1972; Flowers *et al.*, 1977). Η συγκέντρωση Cl⁻ κάτω από την οποία αναστέλλεται η λειτουργία των ενζύμων είναι ακόμα μικρότερη, ενώ αναστολή της λειτουργίας φάνηκε ακόμα και κάτω από συγκεντρώσεις K⁺, Ca⁺ 100-200mM (Greenway & Osmond, 1972).

Αυτές οι έρευνες μας οδηγούν στο συμπέρασμα ότι δεν είναι τα ένζυμα των οργανισμών που είναι υπεύθυνα για την ανεκτικότητα τους απέναντι στην αλατότητα, αλλά ο τρόπος που διαχειρίζονται την παρουσία αλάτων εντός των κυττάρων.

Μιλήσαμε ήδη για τη γενική στρατηγική που ακολουθούν τα αλόφυτα, ενώ αναφέραμε ότι τα γλυκόφυτα απορροφούν το αλάτι για να εξισορροπήσουν το δυναμικό. Τα αλόφυτα, φαίνεται ότι το αλάτι που απορροφούν μπορούν και το διαμερισματοποιούν στα χυμοτόπια πολύ καλύτερα από ότι τα γλυκόφυτα, ενώ όπως προαναφέραμε μεγάλες ποσότητες αλατιού είτε της αποβάλλουν από ειδικού αδένες είτε δεν τις απορροφούν καθόλου.

Όμως αυτά που μας ενδιαφέρουν πιο πολύ είναι τα γλυκόφυτα και αυτό που γνωρίζουμε σίγουρα είναι ότι ενώ υπάρχουν κάποια ήδη που μπορούν να «διαλέξουν» να μην πάρουν το αλάτι από το έδαφος σε μεγάλο βαθμό, παρ' όλα αυτά η ποσότητα που θα πάρουν θα είναι αρκετή σε βάθος χρόνου να αποβεί τοξική για αυτά, αφού ο μηχανισμός διαμερισματοποίησης των ιόντων δεν είναι μεγάλης αποδοτικότητας όπως στα αλόφυτα.

Το πιο σύνηθες φαινόμενο είναι ότι η συγκέντρωση των ιόντων στα φυλλά μεγαλώνει συνέχεια με αποτέλεσμα η χλώρωση του φυτού να ξεκινά από εκεί. Για αυτό τα φυτά πάντα προσπαθούν να αποφύγουν να οδηγηθεί το αλάτι από τη ρίζα στα φύλλα και τα φυτά που το κάνουν καλύτερα είναι αυτά που είναι και πιο ανεκτικά συνήθως.

Ο μηχανισμός που αποτρέπει το αλάτι να φτάνει στα φύλλα έχει να κάνει με την επιλεκτικότητα που εμφανίζουν τα κύτταρα όσο πιο ψηλά βρίσκονται, να διαλέγουν τα ιόντα καλίου (K^+), έναντι των Na^+ . Έτσι λοιπόν, η διαμερισματοποίηση των ιόντων δεν γίνεται μόνο ενδοκυτταρικά, αλλά και μέσα στο φυτό σε επιλεγμένα κύτταρα, αφού το φυτό θέλει να κρατήσει τα φύλλα όσο το δυνατόν πιο μακριά από τα τοξικά ιόντα (Munns, 2002).

1.4.3 Απόκριση σε πρωτεϊνικό επίπεδο

Παραπάνω αναφέραμε ότι η απόκριση των φυτών στην καταπόνηση της αλατότητας, είναι πολυεπίπεδη και ένας άλλος τρόπος άμυνας για τα φυτά είναι η *de novo* σύνθεση νέων πρωτεϊνών. Σημαντικό παράδειγμα αυτών των πρωτεϊνών αποτελεί η ωσμοτίνη, πρωτεΐνη με μικρό μοριακό βάρος (26kDa), η οποία συντίθεται σε συνθήκες οσμωτικού σοκ που μπορεί να προκύψει από διάφορους παράγοντες, ανάμεσά τους και η υψηλή αλατότητα. Η πρωτεΐνη αυτή εντοπίζεται σε μεγάλες ποσότητες στο χυμοτόπιο και

ορισμένες φορές φτάνει και το 12% των πρωτεϊνών των ιστών κατά τη διάρκεια της καταπόνησης.

Ολιστικές τεχνικές σε φυτά κατά τη διάρκεια καταπόνησης, δείχνουν ότι οι πρωτεΐνες που επάγονται θετικά είναι κυρίως πρωτεΐνες που σχετίζονται με το μεταβολισμό του άνθρακα, τη δημιουργία υψηλά ενεργειακών μορίων (πεντόζες, εξόζες), αλλά και της Rubisco. Ακόμα πολλές πρωτεΐνες που έχουν συσχετιστεί στο παρελθόν με την επαγωγή τους σε συνθήκες άμυνας έναντι σε ασθένειες, φαίνεται ότι είναι κοινές και κατά τη διάρκεια καταπόνησης με αλατότητα. Σε μικρότερο ποσοστό επάγονται πρωτεΐνες που έχουν σχέση με τον πρωτογενή και δευτερογενή μεταβολισμό, πρωτεΐνες-σήματα και την πρωτεϊνοσύνθεση (Rudo Ngara *et al.*, 2012).

1.4.4 Συνέπειες σε μοριακό επίπεδο

Φυσικά οι αλλαγές σε μεταβολικό επίπεδο, αλλά και στο πρωτεόσωμα είναι συνέπεια των αλλαγών στην επαγωγή γονιδίων στο DNA των κυττάρων. Αλλά δεν είναι μόνο αυτή η αλλαγή που συμβαίνει σε μοριακό επίπεδο. Υπερέκφραση μιας ελικάσης σε φυτά καπνού δείχνουν σημαντική ανεκτικότητα των φυτών σε σχέση με τα αγρίου τύπου (Sanan-Mishra, 2004). Αν και δεν έχει κατανοηθεί πλήρως το γιατί συμβαίνει αυτό, παρόλα αυτά γίνονται υποθέσεις ότι, είτε η υπερέκφραση ελικάσης στο επίπεδο της μετάφρασης δυναμώνει και σταθεροποιεί καλύτερα τις αυξημένες ανάγκες της πρωτεϊνοσύνθεσης, είτε σχετίζεται με το σύμπλοκο του DNA με τις υπομονάδες και αλλάζει το ποσοστό έκφρασης πολλών γονιδίων.

Αυτό είναι ένα μόνο παράδειγμα της αλλαγής σε μοριακό επίπεδο. Έχει αποδειχθεί ότι τα mRNA που κωδικοποιούνται ως απόκριση στο στρες, είναι κοινά σε μεγάλο βαθμό με mRNA που κωδικοποιούνται κατά τη διαδικασία απόκρισης σε ασθένειες που οφείλονται σε μικροοργανισμούς. Είναι το ίδιο αποτέλεσμα που περιγράψαμε νωρίτερα στην απόκριση σε πρωτεϊνικό επίπεδο. Πιο συγκεκριμένα έχει γίνει έρευνα στο ρύζι που δείχνει την αντιμετώπιση με «κοινά» mRNA ανάμεσα σε βιοτικά και αβιοτικά στρες (ανάμεσά τους και η αλατότητα) (Sanan-Mishra, 2009).

1.4.5 Μορφολογικές αποκρίσεις

Οι μορφολογικές αποκρίσεις μακροσκοπικά, λόγω της αλατότητας είναι παρόμοιες με τις μορφολογικές αποκρίσεις εξαιτίας της υδατικής καταπόνησης. Αποβάλλονται τα γηραιότερα φύλλα για να υπάρχει εξισορρόπηση της φυλλικής επιφάνειας και επομένως λιγότερες απώλειες κατά την εξατμισοδιαπνοή, ενώ ταυτόχρονα το φυτό δεν προσπαθεί να αυξήσει τη φυλλική του επιφάνεια, αλλά

επενδύει στην αύξηση της ρίζας με αποτέλεσμα να μεταβάλλεται ο λόγος υπογείου/υπεργείου τμήματος (Pearson, 1966; Hoffman *et al.*, 1971), καθώς το φυτό προσπαθεί να βρει ριζόσφαιρα χωρίς την παρουσία αλάτων. Ακόμα εμφανίζεται πάχυνση των φύλλων που έχει αυξηθεί η αναπνευστική τους δραστηριότητα και το περιεχόμενό τους εμφανίζεται πιο υδαρές (Waissei, 1991; Shannon, 1994), όπου και η διάχυση του CO₂ γίνεται πιο εύκολα. Τέλος, εμφανίζονται τριχίδια σε ορισμένα είδη που μειώνουν τις απώλειες νερού από την εξατμισοδιαπνοή.

Σε κυτταρικό επίπεδο, παρουσιάζονται ανωμαλίες στην περατότητα των μεμβρανών και επομένως σε πιθανή παρεμπόδιση ενζύμων, διότι η υψηλή συγκέντρωση Na⁺ δρα ως αναταγωνιστής στην πρόσληψη K⁺ και Ca⁺ που είναι απαραίτητα για τη φυσιολογική λειτουργία των μεμβρανών, αλλά και την ενζυματική δράση. Ακόμα ενώ μειώνεται η φυλλική επιφάνεια και επομένως η φωτοσυνθετική δραστηριότητα, αυξάνεται η αναπνευστική δραστηριότητα για να καλυφθούν οι ανάγκες σε ενέργεια από τον ήδη αφομοιωμένο άνθρακα, γεγονός που σε μορφολογικό επίπεδο εμφανίζεται με τα σχεδόν συνεχώς ανοιγμένα στομάτια. Τέλος προκαλείται νέκρωση των κυττάρων του μεσόφυλλου, διάσπαση της εφυμενίδας και των στομάτων, κατάρρευση κυτταρικών τοιχωμάτων, καταστροφή μεμβρανών με ταυτόχρονη απέκκριση ενώσεων και καταστροφή των χλωροπλαστών και πυρήνων πολλών κυττάρων, συνέπειες υψηλών ποσοτήτων αλατότητας σε μη ανθεκτικά φυτά (Haustella *et al.* 1992; Kozlowski, 1997).

1.4.6 Οξειδωτική καταπόνηση

Όπως είπαμε και παραπάνω η επίδραση της αλατότητας στα φυτά είναι πολυεπίπεδη. Μια δευτερογενής επίδραση της αλατότητας που αναφέραμε περιλιπτικά είναι η οξειδωτική καταπόνηση. Ο όρος αυτός αναφέρεται στη ταχεία συσσώρευση ενεργών μορφών οξυγόνου (reactive oxygen species, ή αλλιώς ROS) (Lee *et al.*, 2001; Zhu, 2001). Το φαινόμενο που συμβαίνει είναι ότι οι αερόβιοι οργανισμοί, όπως τα φυτά, χρησιμοποιούν το μοριακό οξυγόνο O₂ ως δέκτη ηλεκτρονίων στην προσπάθειά τους να επιτύχουν υψηλότερες ενεργειακές αποδόσεις κατά τη διάρκεια των μεταβολικών αντιδράσεων. Έτσι προκύπτει μια συστάδα μορφών ανηγμένων μορίων, αλλά και ενώσεων, οξυγόνου. Κατανοούμε γενικά ότι ο αερόβιος μεταβολισμός σε όλους τους οργανισμούς έχει ως αποτέλεσμα την παραγωγή ROS. Αυτό προκύπτει από το ότι αν και το μοριακό οξυγόνο από μόνο του δεν έχει κάποια ιδιαίτερη δραστηριότητα, εν τούτοις όταν χρησιμοποιείται ως «κανάλι»

μεταφοράς ηλεκτρονίων μπορεί αν ανάγεται και να σχηματίζει ROS (Asada, 1996; Scandalios *et al.*, 1997 Blockina *et al.*, 2003).

Οι ROS ταξινομούνται στις εξής τέσσερις κατηγορίες: **(i)** ελεύθερες ρίζες, όπως η ρίζα υδροξυλίου (-OH), **(ii)** ιόντα, όπως το υποχλωριώδες ανιόν (ClO⁻), που προκύπτει από τη διάσταση του υποχλωριώδους οξέως (HClO), **(iii)** συνδυασμούς ελευθέρων ριζών και ιόντων, όπως το ανιόν σουπεροξειδίου (O₂⁻) και **(iv)** μόρια, όπως το υπεροξείδιο του υδρογόνου (H₂O₂). Οι ελεύθερες ρίζες, που χαρακτηρίζονται από ένα μονήρες ηλεκτρόνιο στην εξωτερική τους στιβάδα, είναι πολύ ασταθή μόρια με σύντομη διάρκεια ζωής, αφού αντιδρούν άμεσα με παρακείμενα μόρια, «κλέβοντας» από αυτά ένα ηλεκτρόνιο για να ζευγαρώσουν το δικό τους. Τα παρακείμενα μόρια μετατρέπονται έτσι τα ίδια σε ελεύθερες ρίζες διαταράσσοντας τα φυσιολογικά μεταβολικά δίκτυα. Υπό φυσιολογικές συνθήκες οι ROS αδρανοποιούνται επιτυχώς από αντιοξειδωτικά συστήματα και κυρίως από δευτερογενείς μεταβολίτες, όπως το ασκορβικό οξύ, η ανηγμένη γλουταθειόνη, η α-τοκοφερόλη, τα καροτενοειδή, οι πολυαμίνες τα φλαβονοειδή και άλλα.

Κατά τη διάρκεια λοιπόν της αλατότητας, οι ενεργές μορφές οξυγόνου συσσωρεύονται γρηγορότερα από ότι μπορούν να εκκαθαριστούν και προκαλούνται συμπτώματα, όπως κυτταρική βλάβη (Noble and Rogers, 1992; Asada, 1999), σπάσιμο νουκλεοτιδικών αλυσίδων, γήρανση και αποβολή φύλλων, αλλά και άλλα πολυάριθμα συμπτώματα.

Ανάλογα με το είδος της καταπόνησης, υπάρχει μια όχι ιδιαίτερα συγκεκριμένη κατάταξη των ενζύμων και των ουσιών που επάγονται αντίστοιχα. Για την περίπτωση της αλατότητας το φαινόμενο του χαμηλού δυναμικού φαίνεται να επάγει τα ένζυμα υπεροξειδάση του ασκορβικού και το τη ρεδοκτάση της γλουταθειόνης, ενώ από άλλες ουσίες η γλουταθειόνη και διάφορες πολυαμίνες συμμετέχουν με αντιοξειδωτική δράση.

1.5.1 Αλατότητα και φυτά-μοντέλα

Μεγάλο ποσοστό των γνώσεών μας ως σήμερα στα φυτά οφείλεται σε έρευνες που έχουν γίνει σε φυτά-μοντέλα. Το μεγαλύτερο ποσοστό έρευνας έχει πραγματοποιηθεί στο φυτό-μοντέλο *Arabidopsis thaliana*, λόγω της εύκολης μεταχείρισής του σε εργαστηριακές συνθήκες και πολλών άλλων λόγων. Όμως αν και το *A. thaliana* είναι ένα γλυκόφυτο από το οποίο μπορούμε να αντλήσουμε γενικές γνώσεις για όλα τα άλλα φυτά, παρόλα αυτά για την κατηγορία των ψυχανθών φυτών έχει χαρακτηριστεί ως φυτό

μοντέλο το *Lotus japonicus*, και αυτό λόγω των διαφορών που παρουσιάζουν τα ψυχανθή στη βιοχημεία τους, εξαιτίας της συμβίωσής τους με μικροοργανισμούς του εδάφους (ριζόβια).

Τα τελευταία χρόνια και ένα άλλο φυτό αναδεικνύεται σε φυτό-μοντέλο στην κατηγορία των ψυχανθών, το *Medicago truncatula*, που έρχεται να συμπληρώσει τις γνώσεις μας γύρω από τα ψυχανθή και πιο συγκεκριμένα στην κατηγορία των ψυχανθών που δημιουργούν μη-καθορισμένου τύπου φυμάτια, πράγμα που διαφέρει από αυτά που εκπροσωπεί το *L. japonicus*, όπου ανήκει στην κατηγορία των ψυχανθών που δημιουργούν φυμάτια καθορισμένου τύπου.

1.5.2 Αλατότητα και *A. thaliana*

Ένα από τα πιο σημαντικά στοιχεία που μας έχει δείξει η έρευνα στο *Arabidopsis thaliana*, είναι ότι πολλά γονίδια φαίνεται ότι επάγονται σε πολλά διαφορετικά αβιοτικά στρες, όπως η ξηρασία, το κρύο και η αλατότητα (Zhu *et al.*, 1997). Πολλές σειρές γενετικά τροποποιημένων *A. thaliana*, έχουν δημιουργηθεί με σκοπό το χαρακτηρισμό πολυάριθμων γονιδίων, από τη δεκαετία του '90 (Saleki *et al.*, 1993; Werner and Finkelstein, 1995; Tsugane *et al.*, 1999). Η στρατηγική τους είναι προσαρμοσμένη με τη διαδικασία της οσμωρύθμισης, παράγοντας προλίνη, γλυκιβεταΐνη,μανιτόλη και ολιγοσακχαρίτες της οικογένειας των ραφινοζών. Στρατηγική η οποία έχει αποδειχθεί ότι αν ενισχυθεί «χειραγωγώντας» τα γονίδια που ευθύνονται για την παραγωγή αυτών, αλλά και ενζύμων που σχετίζονται με τη σύνθεσή τους ή γενικότερα το βιοχημικό μονοπάτι τους, η ανεκτικότητα στην αλατότητα βελτιώνεται πολλές φορές σε μεγάλο ποσοστό (Tarczynski *et al.*, 1993; Kavi-Kishor *et al.*, 1995; Thomas *et al.*, 1995; Nanjo *et al.* 1999a, 1999b; Taji *et al.*, 2002)

Φυσικά η έρευνα γύρω από το *Arabidopsis* δεν περιλαμβάνει μεμονομένα γονίδια και γενετικές παρεμβάσεις για να αυξηθεί η ανεκτικότητα στην αλατότητα. Έχουν γίνει και ολιστικές τεχνικές, όπως γονιδιωματική (Panq *et al.*, 2010), μεταβολομική (Hill *et al.*, 2012; Kim *et al.*, 2006) και πρωτεομική (Taji *et al.*, 2010) ανάλυση κάτω από συνθήκες αλατότητας.

1.5.3 Αλατότητα και *L. japonicus*

Μετά την εμπειρία που είχαν πολλά εργαστήρια με το *Arabidopsis thaliana* ως φυτό-μοντέλο, στράφηκαν σε ένα άλλο φυτό για το οποίο χρησιμοποίησαν τις ήδη υπάρχουσες γνώσεις και εμπειρία από το *Arabidopsis*, για να προάγουν την έρευνα σε αυτό γρηγορότερα. Ο λόγος που στράφηκαν σε αυτό, ήταν ότι το *Lotus* είναι πιο κοντά

συγγενικά με καλλιεργήσιμα είδη (crop-plants), και πιο συγκεκριμένα καλλιεργήσιμα είδη της κατηγορίας των ψυχανθών. Ολιστικές τεχνικές, όπως πρωτεομική, μεταβολομική (Sanchez *et al.*, 2011a), συγκριτική λειτουργική γονιδιωματική (Sanchez *et al.*, 2011b; Sanchez *et al.*, 2008a, 2008b) τρανσκριπτομική (Sanchez, 2011b), αλλά και ιονομική (Sanchez *et al.*, 2011a) μας έχουν αποκαλύψει μεγάλο όγκο πληροφοριών για το πως αντιδρά το φυτό στα διάφορα επίπεδα απόκρισης και που θα πρέπει να εστιάσει η μελλοντική έρευνα.

1.5.4 Αλατότητα και *M. truncatula*

Η μεγάλη συγγένεια με την απλή κοινή μηδική (*M. sativa*) που παρουσιάζει το είδος *M. truncatula*, έχει τραβήξει τα τελευταία χρόνια πολλούς ερευνητές προς αυτό το φυτό, διότι πλέον μιλάμε για ένα καλλιεργήσιμο είδος με οικονομικά οφέλη, αλλά και συνεισφορά του στα εδάφη για ελάφρυνσή τους από τις περίσσειες ποσότητες αζωτούχων ενώσεων που προέρχονται κυρίως από τα λιπάσματα. Και εδώ έχουν γίνει ολιστικές έρευνες, αλλά και ενζυμικές που μας δείχνουν την απόκριση του φυτού σε συνθήκες αλατότητας, αλλά και τις διαφορές με το *L. japonicus* (Mhadhbia *et al.*, 2011; Zahaf *et al.*, 2012)

1.6 Η φακή

Η φακή ήταν ένα από τα πρώτα φυτικά είδη που καλλιεργήθηκαν από τον άνθρωπο μαζί με το σιτάρι και τον αρακά. Καλλιεργείται για πάνω από 10.000 χρόνια στα πιο απαιτητικά αγροτικά περιβάλλοντα. Το όνομα του είδους, *L. culinaris*, το έδωσε ο Γερμανός βοτανολόγος Medikus το 1787.

Βασίλειο: Φυτά (Plantae)

Συνομοταξία: Αγγειόσπερμα (Magnoliophyta)

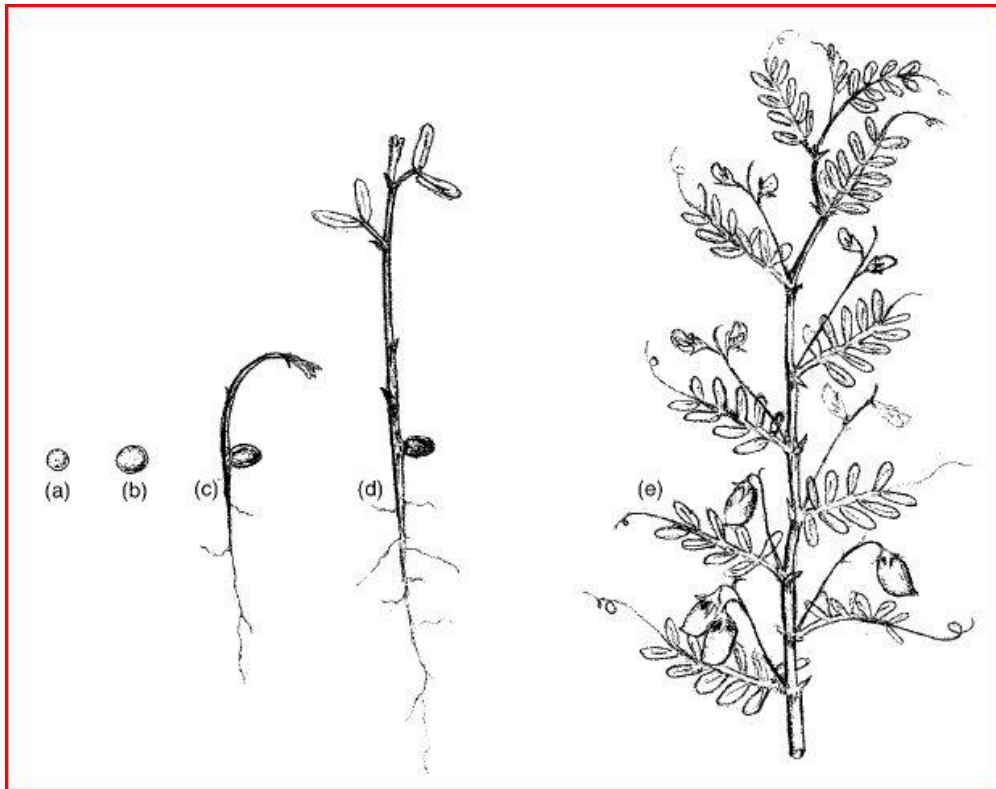
Ομοταξία: Δικοτυλήδονα (Magnoliopsida)

Τάξη: Κυαμώδη (Fabales)

Οικογένεια: Κυαμοειδή (Fabaceae)

Γένος: Φακός (*Lens*)

Διώνυμο: Φακός ο μαγειρικός (*L. culinaris*)



Εικόνα 1: Το φυτό της φακής (a) Σπόρος χωρίς υγρασία, (b) Σπόρος με υγρασία, (c) Νέο φυτάριο, (d) Νεαρό φυτάριο, (e) Φυτό φακής

Η φακή είναι αγγειόσπερμο, δικότυλο φυτό, που ανήκει στην οικογένεια των Κυαμοειδών και στην τάξη των Κυαμωδών. Καλλιεργείται δε για το μικρό ομώνυμο εδώδιμο σπόρο του, που είναι ένα από τα σημαντικότερα όσπρια. Ήταν γνωστή στους αρχαίους Έλληνες ως φακός έσθιόμενος.

Είναι ένα από τα πρώτα φυτά που ξεκίνησε να καλλιεργεί συστηματικά ο άνθρωπος.

Η φακή είναι ψυχανθές φυτό σε ό, τι αφορά στην οικογένεια και ποώδες, ετήσιο και δικοτυλήδοιο. Υπάγεται στην τάξη των Χεδρωπών. Υπάρχουν διάφορες ποικιλίες με διαφορετικού μεγέθους και χρώματος σπέρματα, όπως ξανθά, πράσινα και καστανά. Οι καρποί της κυκλοφορούν στο εμπόριο ως ξερά όσπρια. Η καλλιέργεια της φακής ήταν γνωστή στην αρχαία Αίγυπτο, ενώ Εβραίοι, Έλληνες και Ρωμαίοι την καλλιεργούσαν και την κατανάλωναν.

Στην Ελλάδα η φακή καλλιεργείται ευρέως σχεδόν σε όλα τα διαμερίσματα της χώρας αφού προσαρμόζεται σε πολλούς κλιματικούς τύπους.

Τα σπόρια της είναι όσπριο με μεγάλη θρεπτική αξία πλούσια σε σίδηρο, φώσφορο, υδατάνθρακες, πρωτεΐνες και βιταμίνη Β.

Τρώγονται κυρίως βραστάς ως σούπα η οποία ονομάζεται φακές, χρησιμοποιούνται σε διάφορες σαλάτες και σε πιάτα κρεατικών ως γαρνιτούρα. Σε ζωοτροφές χρησιμοποιούνται οι βλαστοί, τα φύλλα και οι καρποί μετά από την συγκομιδή των σπόρων.

Ο βλαστός της διακλαδώνεται και φτάνει σε ύψος το μισό μέτρο. Τα κλαδιά της είναι αναρριχώμενα και μακριά και τα φύλλα της σύνθετα που εναλλάσσονται. Καθένα από τα φύλλα της φακής αποτελείται από 6 ζεύγη μακριών φυλλαρίων που καταλήγουν σε αγκάθι. Το μήκος των φυλλαρίων αυτών ξεπερνά τα 10 εκατοστά. Ο καρπός της ή λοβός είναι μικρός, δεν ξεπερνά τα 3 εκατοστά και είναι πλατύς, φέρει δε 2-3 μικρούς σπόρους τις -γνωστές- φακές του εμπορίου. Οι φακές έχουν διάμετρο 3-10 χιλιοστά. Καλλιεργούνται με λιπάσματα φωσφόρου και καλίου σε χωράφια που είναι πλούσια σε ασβέστιο. Η σπορά λαμβάνει χώρα τους φθινοπωρινούς μήνες ή την άνοιξη, γιατί οι φθινοπωρινοί μήνες χαρακτηρίζονται από πολύ χαμηλές θερμοκρασίες. Η συγκομιδή των φυτών γίνεται το καλοκαίρι και έπειτα συντελείται η ξήρανσή τους στον ήλιο και το αλώνισμα, ώστε να δώσουν σπέρματα. Αξίζει να σημειωθεί ότι τα δεύτερης διαλογής σπέρματα χρησιμοποιούνται για ζωοτροφές.

Η φακή σχηματίζει φυμάτια με το είδος *Rhizobium leguminosorum* var. *Viciae*, αλλά έχουν αναφερθεί περιπτώσεις που εμφανίζονται φυμάτια και με άλλα είδη του γένους *Rhizobium*.

1.6.1 Σημασία της φακής

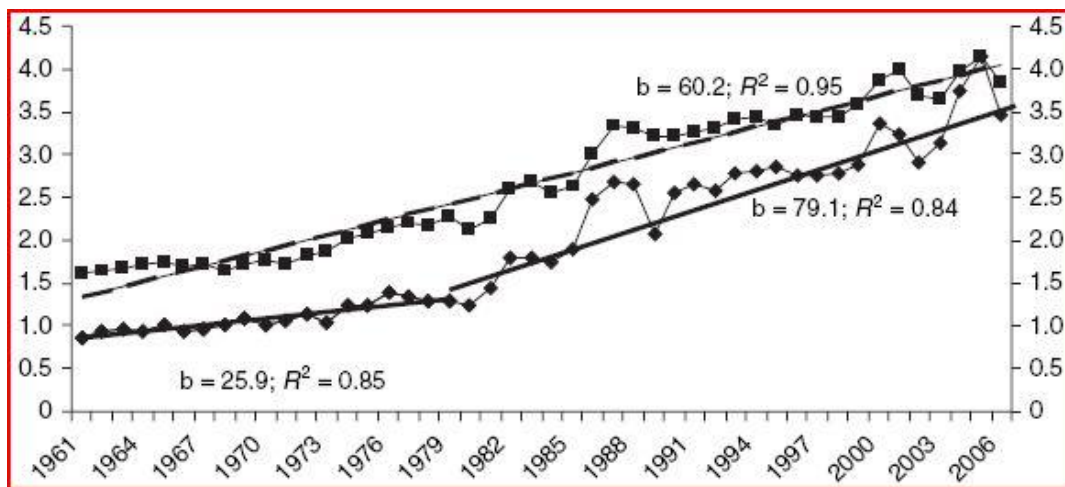
Με περίπου 30% διαθέσιμη πρωτεΐνη, οι φακές αποτελούν το τρίτο σε ποσότητα, ανάλογα με το βάρος τους, φυτό σε περιεκτικότητα πρωτεϊνών. Περιέχει αμινοξέα, όπως η ισολευκίνη και η λυσίνη, κάνοντάς την να είναι ένας φτηνός τρόπος για την κατανάλωση αυτών των σημαντικών αμινοξέων σε πολλά μέρη του κόσμου, ειδικά στην δυτική Ασία και την Ινδική χερσόνησο, όπου ο πληθυσμός δεν καταναλώνει πολύ κρέας. Περιέχει ακόμα φυτικές ίνες, φολικό οξύ, βιταμίνη Β και άλατα. Έχει επιλεγεί ανάμεσα στις 5 πιο υγιείς τροφές, ενώ όταν συνοδεύεται με ρύζι αποτελεί ένα ολοκληρωμένο γεύμα.

Από αρνητική άποψη περιέχει παράγοντες θρυψίνης οι οποίοι εμποδίζουν τη φυσιολογική λειτουργία της πέψης.

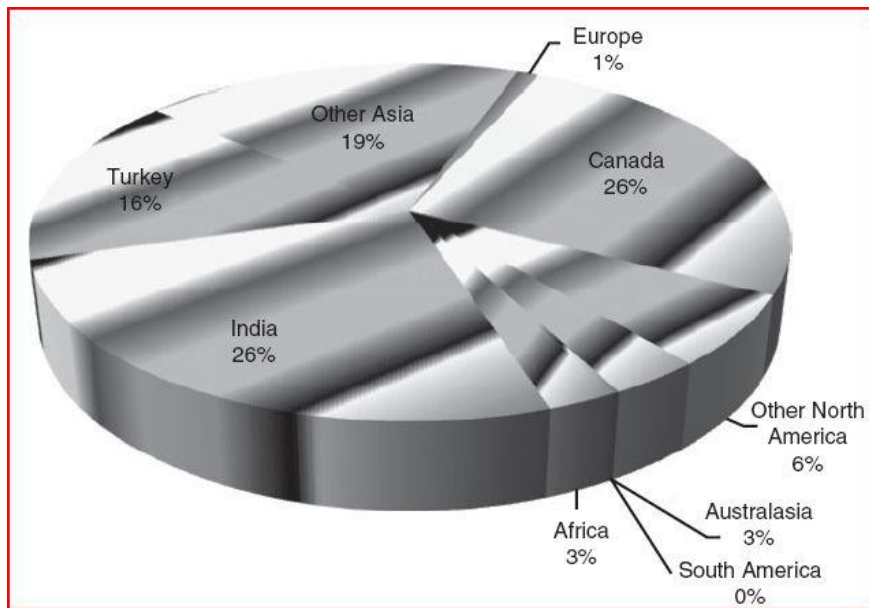
Τέλος το πιο σημαντικό θρεπτικό στοιχείο που περιέχει η φακή είναι ο σίδηρος, απαραίτητος για την ανθρώπινη ομοίωση.

1.7 Καλλιέργεια της φακής

Οι φακές είναι μια βασική παγκόσμια καλλιέργεια (4 εκκατομμύρια εκτάρια θερίστηκαν το 2005). Παρόλα αυτά είναι πίσω σε σχέση με το μπιζέλι και τα φασόλια. Η αποδοτικότητα των σοδειών είναι μικρή (0.8 τόνοι/ εκτάριο τα τελευταία 16 χρόνια σε παγκόσμια κλίμακα) (Πίνακας 2). Τρεις είναι οι κύριες χώρες παραγωγής της φακής: **i)** Βόρεια Αμερικανική ήπειρος (Αμερική, Καναδάς), **ii)** η Ινδική χερσόνησος και **iii)** η Τουρκία. Υπάρχουν και άλλες περιοχές όπου καλλιεργείται, όπως η Αυστραλία, το Ιράν, τη Συρία και την Κίνα. Όλες αυτές οι περιοχές εσοκλείουν το 90% της παγκόσμιας παραγωγής (Πίνακας 3). Στις αναπτυσσόμενες χώρες η καλλιέργεια της φακής παρουσιάζεται στατική, με τον πληθυσμό να αυξάνεται όμως συνεχώς. Αυτό έχει σαν αποτέλεσμα σε χώρες όπως η Ινδία η αναλογία φακής/ κατ'άτομο να είναι πολύ μικρή πλέον. Έτσι πολλές χώρες εισάγουν πλέν τη φακή με τον μεγαλύτερο εξαγωγέα πλέον να είναι ο Καναδάς με 576.000 τόνους το 2005. Άλλοι μεγάλοι εξαγωγείς είναι η Αμερική, η Τουρκία και η Αυστραλία με περίπου στο 1/5 της ποσότητας εξαγωγής από τον Καναδά (Πίνακας 4).



Πίνακας 2: Ετήσια παραγωγή της φακής (οριζόντιος άξονας) και εξέλιξη αυτής (δεξιός κάθετος άξονας σε εκκατομμύρια τόνους ■), αλλά και άνοδος των περιοχών που καλλιεργείται (αριστερός άξονας σε εκκατομμύρια εκτάρια ◆)



Πίνακας 3: Κατανομή της παραγόμενης φακής σε ηπείρους, αλλά και στις τρεις παραγωγικά μεγαλύτερες χώρες

Country	Exports (t)
Canada	441,925
India	140,687
Turkey	127,669
Australia	107,701
USA	105,976
Syria	39,470
Nepal	34,934
China	25,066

Πίνακας 4: Χώρες που εξάγουν τη φακή και ποσότητες σε τόνους

1.8 Αλατότητα και φακή

Η φακή είναι μια από τις πιο ευαίσθητες καλλιέργειες αναφορικά με την αλατότητα του εδάφους, ειδικά όταν πρόκειται για συνθήκες μετά από βροχή, όπου το στρες αυξάνεται, καθώς τα άλατα συσσωρεύονται στο χώμα και αφού αυτό ξεράθει η συγκέντρωσή τους αυξάνεται. Η αποδοτικότητα μιας σοδειάς, αλλά και η συνεισφορά της σε άζωτο (N) μειώνεται έως και 90-100% (Hoorh *et al.*, 2001; Katerji *et al.*, 2003), όταν η ηλεκτρική αγωγιμότητα εδάφους ξεπερνά το 3.1 dS/m. Γενικά σε ηλεκτρική αγωγιμότητα εδάφους πάνω από 0.8 έχει αποδειχτεί ότι η ανεπάρκεια καλίου (K) και ασβεστίου (Ca) (Finck, 1977), σε συνδυασμό με την τοξικότητα του Νατρίου (Na), θεικών (SO₄) και των ιόντων χλωρίου, έχει ως

αποτέλεσμα τη μειωμένη δημιουργία φυματίων στα ψυχανθή (Bhardwaj, 1975). Συνέπεια που συνεπάγεται μειωμένη απόδοση σε μια καλλιέργεια. Η καταγραφή φυματίων που έχει γίνει κατά τη διάρκεια εφαρμογής αλατότητας στο παρελθόν, έχει αποδοθεί στην επιμύκηση της ρίζας και συστροφή της, όπου με αυτό τον τρόπο αποφεύγει τα σημεία της ριζόσφαιρας που περιέχουν υψηλή αλατότητα (Sprent and Zahran, 1988).

Γενικά μια αύξηση της αλατότητας στο χώμα της φακής έχει ως συνέπεια την αύξηση της απορρόφησης νατρίου και χλωρίου, τη μείωση του ξηρού βάρους, τη μείωση της συγκέντρωσης καλίου, αλλά και την αναλογία K:Na. Η μείωση αυτής της αναλογίας αποδεικνύει τον ανταγωνισμό του νατρίου (που υπάρχει σε περίσσεια στο έδαφος), έναντι στο κάλιο (Turan *et al.*, 2007). Εκ τούτου, η προσθήκη καλίου ως μέσο αντιμετώπισης της αλατότητας είναι ένα αποτελεσματικό μέτρο, φυσικά όταν πρόκειται για μειωμένη ή μέτρια ποσότητα συσσώρευσης αυτής. Σε αντίθεση, στα υψηλής αλατότητας εδάφη, η εφαρμογή καλίου μάλλον είναι μάταιη για να παρεμποδιστεί το νάτριο από το να φτάσει στο φυτό. Τα υψηλής συγκέντρωσης ιόντα χλωρίου (Cl⁻) που εμπεριέχονται στα εδάφη με υψηλή αλατότητα πιθανά αναστέλλουν την απορρόφηση των φωσφορικών ιόντων (PO₄⁻), καθώς δρουν και αυτά ως ανταγωνιστές κατά την απορρόφησή τους από τα φυτά. (Zhukovskaya, 1973)

Η επιλογή γονοτύπων φυτών που έχουν μια κάποια ανθεκτικότητα στην αλατότητα, είναι ο πιο αποτελεσματικός τρόπος για να ξεπεράσουμε το μεγάλο πρόβλημα της αλατότητας των εδαφών (Maher *et al.*, 2003). Η εφαρμογή ασβεστίου φαίνεται ότι μπορεί να βοηθήσει, αφού έχει αποδειχτεί ότι μειώνει την αναλογία Na:Ca και μέρος των συνεπειών της αλατότητας κατά τη σπορά και το μεγάλωμα των φυταρίων της φακής κατά αναλογία 14:1 (Astaraei and Forouzan, 2000). Ακόμα η εφαρμογή ριζοβίων σε εδάφη με αλατότητα που μπορεί να ξεπερνά τα 6dS/m, έδειξε ότι το ξηρό βάρος αυξάνεται κατά 22.9% (Ahmad *et al.*, 1986). Ακόμη αυτό το μέτρο αύξησε το αφορμειωμένο άζωτο και φώσφορο από τα φυτά. Τέλος η συνεργιστική δράση ριζοβίων και CaSO₄ ενίσχυσε κατά πολύ την αποδοτικότητα της φακής σε χώμα με υψηλή αλατότητα.

1.9 Η φακή στο εργαστήριο

Η φακή θεωρείται ιδανική για μελέτη στο εργαστήριο. Τα πλεονεκτήματα που προσφέρει είναι τα εξής:

- Μικρό δπλοειδές γονιδίωμα (2n) με 14 χρωματοσώματα και συνολικό μέγεθος 4Gbp
- Μικρός κύκλος ζωής, το φυτό στις σωστές συνθήκες μπορεί να ανθίσει και να βγάλει σπόρους σε 9-12 εβδομάδες.
- Δυνατότητα αυτοαναπαραγωγής
- Ανήκει στα ψυχανθή, οπότε μας δίνει τη δυνατότητα να μελετήσουμε και συμβιωτικές δράσεις με ριζόβια
- Γενικά δε χρειάζεται ιδιαίτερη επεξεργασία για να μεγαλώσει ο σπόρος, ούτε για προβλάστηση

Τα παραπάνω πλεονεκτήματα συνηγορούν με τις γνώμες που αναφέρουμε παρακάτω για τη δυναμική και τις δυνατότητες που έχει η φακή στο εργαστήριο.

1.10 Το μέλλον της φακής

Όπως προαναφέραμε η σημαντικότητα της φακής για την ανθρώπινη υγεία είναι πολύ μεγάλη και στις αναπτυσσόμενες χώρες θα μπορούσε να είναι η κύρια πηγή πρωτεϊνών. Όμως η καλλιέργειά της έχει μείνει στάσιμη τα τελευταία χρόνια και η έρευνα έχει υποσκελιστεί σε σχέση με άλλα ψυχανθή και άλλα φυτά μεγάλης καλλιέργειας. Εκφράζεται όμως πλέον η γνώμη ότι είναι καιρός να σχηματιστεί ένα δίκτυο επιστημόνων, όπου θα χαρτογραφήσουν το γονιδίωμα του φυτού χρησιμοποιώντας τους γενετικούς δείκτες που έχουν βρεθεί ως σήμερα που στόχο είχαν να κατανοήσουμε την προέλευση του φυτού και τις συγγένειες μεταξύ των ποικιλιών. Θα μπορούσε να γίνει μια ολοκληρωμένη έρευνα που θα περιελάμβανε βιοτεχνολόγους, γενετιστές, βελτιωτές, φυσιολόγους φυτών, αλλά και πολλούς άλλους επιστήμονες σε ένα πολυεπιστημονικό δίκτυο, εκμεταλλεόμενοι την ευκολία που προσφέρει το φυτό στο εργαστήριο για γρήγορη και αποτελεσματική ανάλυση δεδομένων.

Η βιοτεχνολογική σκοπιά ενός τέτοιου εγχειρήματος θα είχε αρχικά να κάνει με μελέτη μεταλλαγμάτων σε σχέση με ανθεκτικότητα σε ασθένειες και αβιοτικές καταπονήσεις, αλλά και εφαρμογή ομικών τεχνολογιών, όπως προτεωμική και μεταβολομική για την κατανόηση των συστημάτων απόκρισης σε διάφορες καταπονήσεις, ενώ τρανσκριπτομική ανάλυση έχει ήδη γίνει (Kaur *et al.*, 2011). Τελικά με αρκετούς πόρους, ο συνδυασμός ομικών τεχνολογιών θα μπορούσε να μας δώσει δεδομένα υψηλής ποιότητας που θα μας κατευθύνουν σε γονοτύπους καλύτερους που προσαρμόζονται εύκολα και υπερνικούν τις καταπονήσεις σε μεγάλο βαθμό.

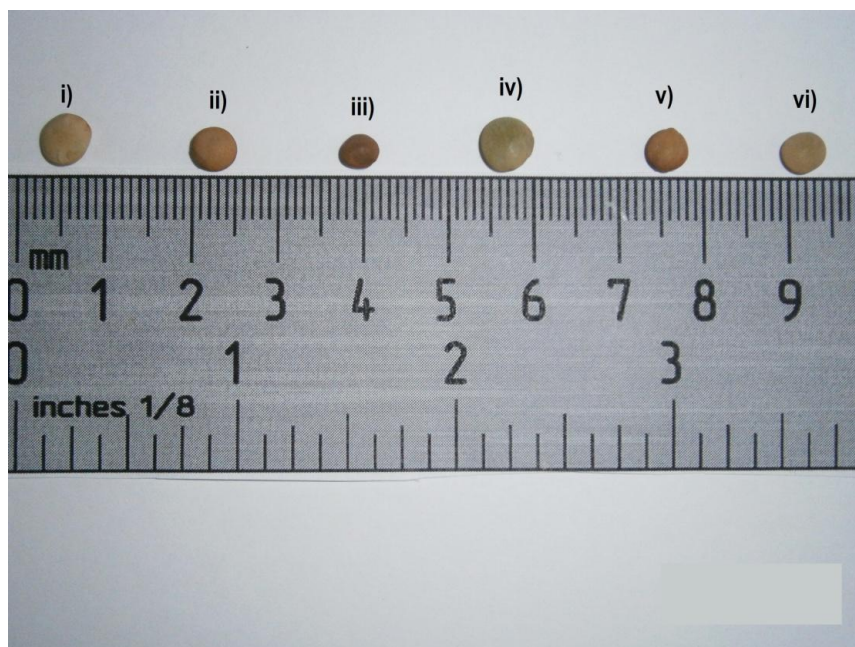
2. ΠΕΙΡΑΜΑΤΙΚΗ ΔΙΑΔΙΚΑΣΙΑ

Στην παρούσα εργασία εφοδιαστήκαμε με σπόρους φακής πολλών ποικιλιών από το ΕΘΙΑΓΕ και από σπορείο (**Εικόνα 2**) και αρχικά προβλαστήσαμε τους σπόρους σε διαφορετικές συνθήκες συγκέντρωσης NaCl, για να δούμε διαφορές στην απόκρισή τους σε επίπεδο φυταρίων. Στη συνέχεια μετρήσαμε διάφορες φυσιολογικές παραμέτρους:

- Νωπό βάρος
- Ξηρό βάρος
- Συνολικό μήκος φυταρίου
- Λόγος υπέργειου/υπόγειου τμήματος
- Συγκέντρωση αφομοιωμένων ιόντων χλωρίου

Στη συνέχεια με βάση αυτά τα αποτελέσματα διαλέξαμε τέσσερις ποικιλίες για ανάπτυξη για 32 μέρες σε συνθήκες θερμοκηπίου σε διαφορετικές συνθήκες αλατότητας, όπου και επιλέχθηκαν δύο ποικιλίες για μέτρηση των παρακάτω παραμέτρων:

- Νωπό βάρος
- Συγκέντρωση αφομοιωμένων ιόντων χλωρίου
- Ανάλυση αέριας χρωματογραφίας-φασματομετρίας μάζας (GC/MS), για έρευνα μεταβολικών αποκρίσεων στις συνθήκες αυτές.



Εικόνα 2: Οι έξι ποικιλίες σπόρων που χρησιμοποιήθηκαν. i) Αμερικάνικη ποικιλία, ii) Ελληνική ποικιλία Δήμητρα, iii) Τούρκικη ποικιλία, iv) Τουρκική ποικιλία, v) Ελληνική ποικιλία Σάμου, vi) Ελληνική ποικιλία Θεσσαλίας.

Προέλευση Ποικιλίας	Ονομασία ποικιλίας	Χαρακτηριστικά	Αριθμός ΕΘΙΑΓΕ
i) Αμερικάνικη Ποικιλία	USA	Χρώμα: Ανοιχτό καφέ Μέγεθος: Μεσσέο	LC-960254/ 14-15
ii) Ελληνική ποικιλία Δήμητρα	DIM	Χρώμα: Καφέ Μέγεθος: Μικρό	-
iii) Τούρκικη Ποικιλία	TUR	Χρώμα: Μαύρο Μέγεθος: Πολύ μικρό	ILL-590
iv) Τούρκικη Ποικιλία	GTUR	Χρώμα: Πράσινο Μέγεθος: Μεγάλο	-
v) Ελληνική ποικιλία	SAM	Χρώμα: Καφέ Μέγεθος: Μικρό	-
vi) Ελληνική ποικιλία	THES	Χρώμα: Ανοιχτό καφέ Μέγεθος: Μικρό	-

3. ΥΛΙΚΑ ΚΑΙ ΜΕΘΟΔΟΙ

3.1.1 Προβλάστηση σπόρων *L. culinaris* για μέτρηση φυσιολογικών παραμέτρων φυταρίων

Στην παρούσα φάση προβλαστήσαμε 32 σπόρους από κάθε ποικιλία σε κάθε συγκέντρωση, μετρήσαμε τις φυσιολογικές παραμέτρους και στη συνέχεια τα στατιστικά σφάλματα, αλλά και τις στατιστικά σημαντικές διαφορές μεταξύ των συγκεντρώσεων (ANOVA Test) για κάθε ποικιλία, με τη βοήθεια του προγράμματος Sigma Stat.

- Προσθήκη διαλύματος χλωρίνης 3% για 1,5-2min.
- Ξέπλυμα της χλωρίνης με κρύο νερό δέκα φορές.
- Τοποθέτηση των σπόρων σε τρυβλία με άγαρ 1% w/v και με συγκεντρώσεις NaCl: 0,001mM, 25mM, 50mM, 75mM, 100mM, 150mM.
- Τοποθέτηση τριβλύων ανάποδα στο σκοτάδι για 4 ημέρες.

3.1.2 Μέτρηση φυσιολογικών παραμέτρων

Το νωπό βάρος μετρήθηκε με ζυγαριά ακριβείας τριών δεκαδικών ψηφίων.

Το ξηρό βάρος μετρήθηκε μετά από ξήρανση των φυταρίων σε φούρνο στους 60°C για 2 ημέρες.

Το μήκος των φυταρίων, όπως επίσης και ο λόγος υπογείου/υπεργείου τμήματος μετρήθηκε με τη βοήθεια του προγράμματος ImageJ, αφού πρώτα τα φυτάρια είχαν φωτογραφηθεί με κατάλληλη κλίμακα.

Η μέτρηση των ιόντων χλωρίου έγινε ακολουθώντας το παρακάτω πρωτόκολλο:

- Ξήρανση ιστού στους 60°C για τρεις μέρες.
- Λειοτρίβιση αποξηραμένου ιστού χρησιμοποιώντας έμβολο και στη συνέχεια χρησιμοποίηση του ανακινητή (vortex).
- Πρόσθεση κατάλληλου διαλύματος ($\text{dH}_2\text{O} + 1\% \text{ Triton}$) με αναλογία 10ml/150mgr ιστού.
- Χρήση του υδατόλουτρου με υπερήχους για καλύτερη διάσπαση των κυττάρων για 2 λεπτά.
- Στη συνέχεια βάζουμε τα δείγματα σε θερμαινόμενη πλάκα στους 80°C για 5-8 λεπτά.
- Φυγοκέντρηση για να διαχωριστεί ο φυτικός ιστός από το υπερκείμενο που περιέχει τα ιόντα
- Φύλαγμα των δειγμάτων στους -20°C

Μετά τη συλλογή των ιόντων από τα κύτταρα (Ghosh and Drew, 1991), ακολουθήθηκε η ποσοτικοποίηση των ιόντων με την παρακάτω φασματομετρική μέθοδο (Zall *et al.*, 1956; O' Brien, 1962)
(ΠΑΡΑΡΤΗΜΑ Α)

3.2.1 Προβλάστηση σπόρων *L. culinaris* για ανάπτυξη σε συνθήκες θερμοκηπίου

Συνεχίσαμε με προβλάστηση των σπόρων για ανάπτυξη στο θερμοκήπιο ως εξής:

- Προσθήκη διαλύματος χλωρίνης 3% για 1,5-2min.
- Ξέπλυμα της χλωρίνης με κρύο νερό δέκα φορές.
- Τοποθέτηση των σπόρων σε τρυβλία με άγαρ 1% w/v και με συγκεντρώσεις NaCl: 0mM, 25mM, 50mM, 75mM.
- Τοποθέτηση τριβλύων ανάποδα στο σκοτάδι για 4 ημέρες.

3.2.2 Ανάπτυξη φυτών σε συνθήκες θερμοκηπίου

Τα φυτά αναπτύχθηκαν στο θερμοκήπιο του Γεωπονικού Πανεπιστημίου Αθηνών, που ανήκει στο εργαστήριο Πειραματισμού και Βελτίωσης φυτών, με τις παρακάτω παραμέτρους:

Αναπτύχθηκαν 6 φυτά από 4 ποικιλίες σε 6 διαφορετικές συνθήκες αλατότητας και μία control:

- Απουσία εφαρμογής αλατότητας (**Control**).
- Συνεχής εφαρμογή αλατότητας συγκέντρωσης 25mM (**IA 25**).
- Συνεχής εφαρμογή αλατότητας συγκέντρωσης 50mM (**IA 50**).
- Συνεχής εφαρμογή αλατότητας συγκέντρωσης 75mM (**IA 75**).
- Σταδιακή εφαρμογή αλατότητας συγκέντρωσης 25mM (**GA 25**).
- Σταδιακή εφαρμογή αλατότητας συγκέντρωσης 50mM (**GA 50**).
- Σταδιακή εφαρμογή αλατότητας συγκέντρωσης 75mM (**GA 75**).

Αρχικά έγινε και ανάπτυξη φυτών με σταδιακή εφαρμογή αλατότητας 100mM και 150mM, αλλά αποδείχτηκε θνησιγόνος συγκέντρωση για πάνω από το 90% των φυτών νωρίτερα από το προγραμματισμένο τέλος του πειράματος.

Τα φυτά αναπτύχθηκαν άνοιξη με εύρος θερμοκρασίας μέσα στο θερμοκήπιο 24-33° C.

Ο αερισμός του θερμοκηπίου γίνονταν με αερισμό από αυτόματα μηχανικά μέσα από τα πλάγια.

Το υπόστρωμα που χρησιμοποιήθηκε είναι τύρφη της εταιρείας Propeat, το οποίο είναι απαλλαγμένο από μικροοργανισμούς και ριζόβια.

Χρησιμοποιήθηκαν ατομικά γλαστράκια για κάθε φυτό.

Χρησιμοποιήθηκαν παγίδες για ιπτάμενα έντομα.

Υπήρξε απολύμανση και καθαρισμός του χώρου ανάπτυξης πριν το φύτεμα.

Τα φυτά ποτίζονταν με θρεπτικό διάλυμα B&D συγκέντρωσης 50% **(ΠΑΡΑΡΤΗΜΑ Β)**, κάθε 4 ημέρες με συγκεκριμένο πρόγραμμα **(ΠΑΡΑΡΤΗΜΑ Γ)**, όπου προσθέταμε κατάλληλη ποσότητα NaCl, ώστε να ανέλθει στην κατάλληλη συγκέντρωση που επιθυμούσαμε. Έτσι το τελικό διάλυμα του θρεπτικού ήταν που περιείχε την αλατότητα και έκανε το υπόστρωμα αλατούχο.

Τα φυτά ποτίζονταν με 45-50ml από το θρεπτικό.

Η υγρασία στα γλαστράκια κρατιόταν πάνω από 70% με καθημερινό πότισμα με dH₂O.

3.2.3 Συλλογή φυτικού υλικού

Η συλλογή φυτικού υλικού έγινε την ίδια μέρα σε διάστημα 2,5 ωρών (11:30-14:00) τηρώντας τα **χρονοδιαγράμματα (ΠΑΡΑΡΤΗΜΑ Γ)**

Η συλλογή έγινε με υγρό άζωτο, αφού πρώτα τα φυτά ζυγίζονταν και φωτογραφίζονταν. Η αποθηκείωση γινόταν στη συνέχεια στους -80°C. Συλλέχτηκαν ξεχωριστά φύλλα και ρίζα, ενώ δεν είχαν αναπτυχθεί **καθόλου** φυμάτια.

Κρατήθηκε ξεχωριστά ιστός για τη μέτρηση αφομοιωμένων ιόντων χλωρίου.

Η ανάπτυξη των φυτών με τον ίδιο τρόπο επαναλήφθηκε 3 φορές για να υπάρχει αρκετός ιστός από τις ποικιλίες στις συνθήκες που θεωρήθηκαν κατάλληλες για περαιτέρω έρευνα.

3.2.4 Προετοιμασία δειγμάτων για αέρια χρωματογραφία-φασματομετρία μάζας

Για την ανάλυση GC/MS ακολουθήσαμε το παρακάτω πρωτόκολλο:

- Λειοτριβίση παγωμένων δειγμάτων, με υγρό άζωτο.
- Συνέχεια λειοτριβίσης με 400ml από κατάλληλο διάλυμα (5mlt ribitol 1mg/ml+395ml ethanol).
- Στη συνέχεια τα βάλουμε σε φούρνο για 15 λεπτά στους 70oC με συνεχή ανάδευση.
- Προσθέσαμε χλωροφόρμιο 200mlt και αναδεύσαμε στον ανακινητή (vortex).
- Φυγοκεντρίσαμε για 5 λεπτά στις 13.000 στροφές/λεπτό.
- Στη συνέχεια πήραμε 100mlt από το υπερκείμενο το οποίο εξατμίσαμε γρήγορα με αέριο άζωτο.

3.2.5 Μέτρηση ηλεκτρικής αγωγιμότητας των υποστρωμάτων των φυτών

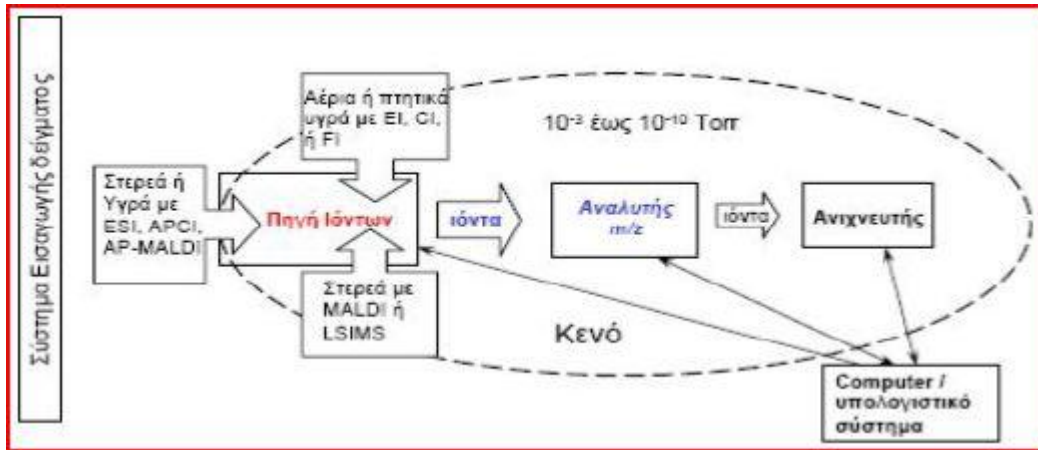
Για τη μέτρηση της αγωγιμότητας των υποστρωμάτων χρησιμοποιήθηκε το αγωγιμόμετρο ακριβείας Hanna HI993310. Το πρωτόκολλο που ακολουθήθηκε είναι:

- Συλλέχτηκε δείγμα εδάφους 5gr από κάθε υπόστρωμα.
- Αφαιρέθηκε η υγρασία με το να μείνει το χώμα σε φούρνο 42°C για 3 μέρες.
- Προστέθηκε dH₂O 100ml, ώστε να είναι 3 φορές παραπάνω η ποσότητα του νερού από το δείγμα. Τα ml του εδάφους υπολογίστηκαν χρησιμοποιώντας την πυκνότητα του χώματος.
- Αναδεύτηκε καλά και έμεινε ακίνητο το δείγμα για 1 ώρα.
- Το δείγμα φιλτραρίστηκε καλά ώστε να μην υπάρχουν καθόλου σωματίδια από το δείγμα του χώματος.
- Τέλος μετρήθηκε η αγωγιμότητα του υγρού που φιλτραρίστηκε με το αγωγιμόμετρο ακριβείας.

3.3.1 Αρχή λειτουργίας συσκευής GC/MS

Η γραμμή μεταφοράς, η οποία είναι θερμαινόμενη, διατηρεί τα διαχωρισθέντα συστατικά στην αέρια φάση κατά τη μεταφορά τους από τον αεριο χρωματογράφο στο φασματόμετρο μάζας. Στο θάλαμο ιονισμού του τελευταίου ιονίζεται κάθε συστατικό χωριστά, κυρίως με πρόσπτωση δέσμης ηλεκτρονίων ορισμένης ενέργειας. Τα θετικώς φορτισμένα ιόντα οδηγούνται στον αναλυτή μάζας, όπου και διαχωρίζονται σύμφωνα με το λόγο μάζας προς φορτίο (m/z), (Mc Murry, 2002).

Ο ανιχνευτής ταξινομεί τα ιοντικά θραύσματα σύμφωνα με το λόγο m/z και τα καταγράφει ως κορυφές. Το σήμα του ανιχνευτή ενισχύεται και μετατρέπεται σε αξιοποιήσιμη πληροφορία με τη μορφή του φάσματος μάζας. Το υψηλό κενό στο θάλαμο ιονισμού του φασματομέτρου μάζας εγγυάται ότι η πιθανότητα σύγκρουσης των ιόντων με μη ιονισθέντα μόρια είναι εξαιρετικά μικρή, ως απίθανη.



Εικόνα: Αρχή λειτουργίας GC/MS

3.3.2 Συσκευή GC/MS που χρησιμοποιήθηκε

Για την αέρια χρωματογραφία χρησιμοποιήθηκε η Agilent Technologies 7890A GC System και για την χρωματογραφία μάζας η Agilent Technologies 5975C Inert XL E1/C1.

Τα χρωματογραφήματα αξιολογήθηκαν χρησιμοποιώντας το πρόγραμμα AMDIS και οι μεταβολίτες αναγνωρίστηκαν χρησιμοποιώντας τις βάσεις δεδομένων Golm και Feihn.

ΠΑΡΑΡΤΗΜΑΤΑ

ΠΑΡΑΡΤΗΜΑ Α

ΔΙΑΛΥΜΑ Α

Fe(NO₃)₃(H₂O)	202gr
dH₂O	1000ml
HNO₃ (99%)	21ml

*Το διάλυμα μετά που παρασκευάστηκε αναμίχθηκε και φιλτραρίστηκε.

*Διάλυμα ευαίσθητο στο φως, πρέπει να φυλάσσεται στο σκοτάδι.

ΔΙΑΛΥΜΑ Β

Hg(SCN)₂	4.17gr
Methanol	1000ml

*Το διάλυμα μετά που παρασκευάστηκε αναμίχθηκε και φιλτραρίστηκε.

ΔΙΑΛΥΜΑ Γ

ΔΙΑΛΥΜΑ Α	150ml
ΔΙΑΛΥΜΑ Β	150ml
dH₂O	700ml
Brij35	0,5ml

*Διάλυμα ευαίσθητο στο φως, πρέπει να φυλάσσεται στο σκοτάδι.

*Brij35= polyoxyethylene 23 – lauryl ether (BRIJ 35, Promega).

ΔΙΑΛΥΜΑ Δ

NaCl	1.6482gr
dH ₂ O	1000ml

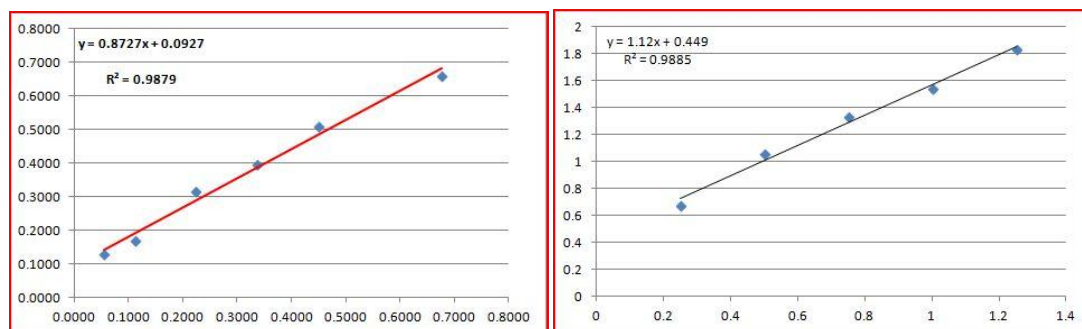
*Το συγκεκριμένο διάλυμα το χρησιμοποιούμε σαν πρότυπο για τη δημιουργία πρότυπης καμπύλης (1ml=1mg Cl⁻)

*Το NaCl έχει αποξηραθεί στο φούρνο για 2 ημέρες στους 60°C για να φύγει η υγρασία.

Στο φωτόμετρο βάζουμε 1 volume (στην περίπτωσή μας 1ml) του διαλύματος Γ με 1 volume του διαλύματος από την απομόνωση ιόντων Cl⁻ του φυτικού ιστού.

Η λογική της μεθόδου είναι ότι ιόντα SCN⁻ απελευθερώνονται, όταν σχηματίζεται η ένωση Cl₂Hg, και ενώνονται με τα ιόντα Fe⁺, όπου σχηματίζεται μια έγχρωμη ένωση [FeSCN]₂. Όσα πιο πολλά ιόντα Cl⁻ υπάρχουν για να δεσμεύσουν το Hg, τόσο πολύ σχηματίζεται η ένωση [FeSCN]₂ και άρα το χρώμα είναι πιο έντονο.

Για τον υπολογισμό της συγκέντρωσης Cl⁻ δημιουργήθηκε πρότυπη καμπύλη με γνωστά διαλύματα, όπου με τη μέθοδο των ελαχίστων τετραγώνων υπολογίσαμε την εξίσωση της ευθείας στην εκθετική φάση. Έγιναν δύο πρότυπες καμπύλες ξεχωριστά μία για τη μέτρηση των ιόντων στα φυτάρια 4 ημερών και μία για τα φυτά που αναπτύχθηκαν στο θερμοκήπιο.



Διάγραμμα 1: Οι πρότυπες καμπύλες στην εκθετική φάση μαζί με την εξίσωσή τους

ΠΑΡΑΡΤΗΜΑ Β
ΣΥΝΘΕΣΗ ΔΙΑΛΥΜΑΤΟΣ ΠΟΤΙΣΜΑΤΟΣ

Διάλυμα Β&D

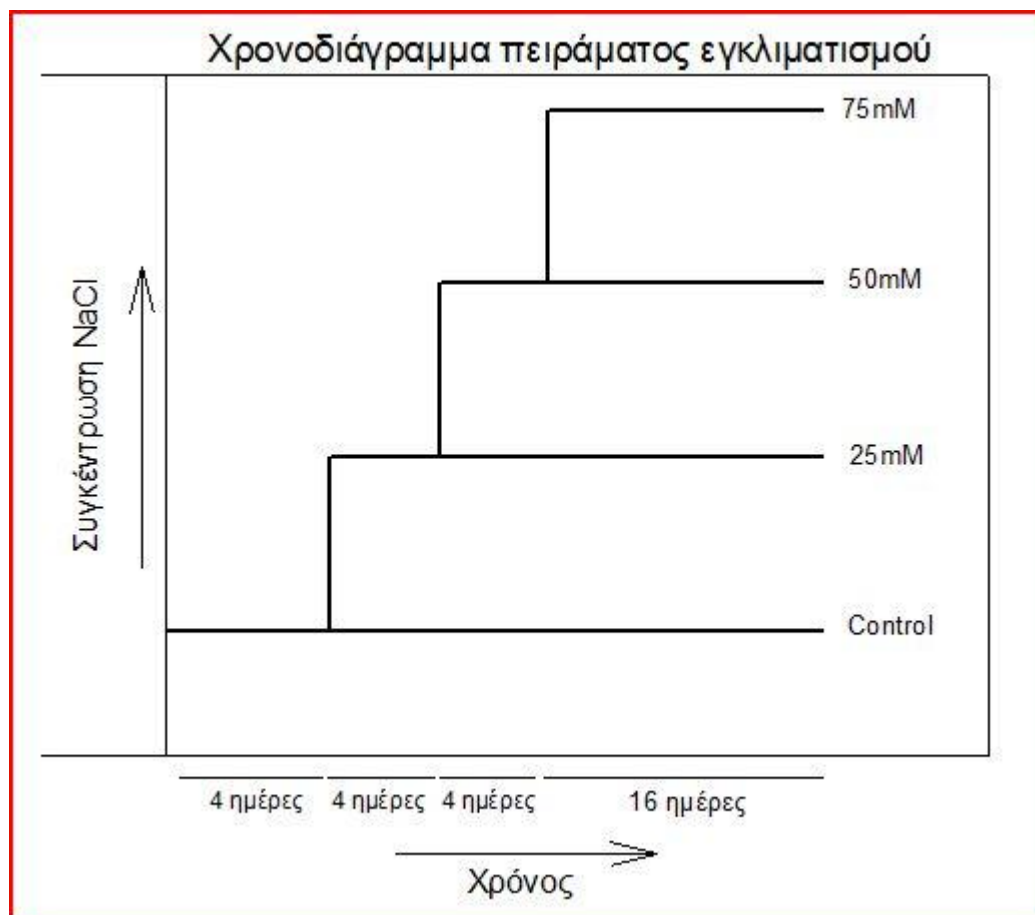
stock διαλύματα	Stock διαλύματα Συγκέντρωση	ml/lit Διαλύματα χρήσης
Microelements	-	1ml
K₂SO₄	0,5 M	0,5ml
KH₂PO₄	1 M	0,5ml
MgSO₄ 7H₂O	-	0,25ml
CaCl₂	0,5 M	2ml
KNO₃	2 M	0,25ml
FeEDTA	0,1 M	1ml

*Η συγκεκριμένη συνταγή αναφέρεται σε 1lt διαλύματος.

*Το διάλυμα προετοιμαζόταν σε συγκέντρωση 50% και υπήρχε επιπλέον ποσότητα NaCl, με συγκέντρωση ανάλογη με την περίπτωση.

ΠΑΡΑΡΤΗΜΑ Γ

Χρονοδιάγραμμα Α



Το συγκεκριμένο πείραμα ξεκίνησε με τους σπόρους προβλαστημένους σε τριβλύα στο σκοτάδι για 4 ημέρες σε συνθήκες με 0mM NaCl. Το χρονοδιάγραμμα ξεκινάει με ημέρα 1^η την ημέρα φύτευσης των φυτών και φαίνεται η σταδιακή εφαρμογή αλατότητας κάθε 4 ημέρες μέχρι την επιθυμητή συγκέντρωση NaCl, όπου και εκεί κρατήθηκαν τα φυτά μέχρι να ολοκληρωθούν οι 32 ημέρες του πειράματος.

Χρονοδιάγραμμα Β



Το συγκεκριμένο πείραμα ξεκίνησε με τους σπόρους προβλαστημένους σε τριβλύα για 4 ημέρες σε συγκεντρώσεις NaCl 25, 50 και 75 mM αντίστοιχα. Το χρονοδιάγραμμα ξεκινάει με ημέρα 1^η την ημέρα φύτευσης των φυτών και δείχνει τη συνεχή εφαρμογή αλατότητας που ήταν κάθε 4 ημέρες μέχρι να ολοκληρωθούν οι 32 ημέρες του πειράματος.

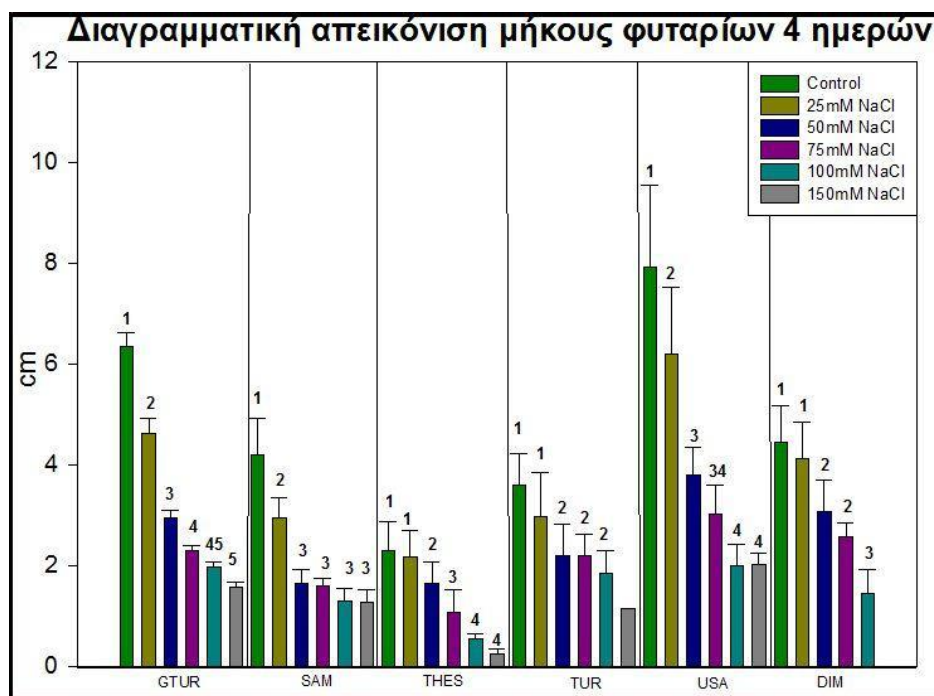
4. ΑΠΟΤΕΛΕΣΜΑΤΑ

4.1 Βλάστηση και ανάπτυξη των ποικιλιών της φακής σε συνθήκες αλατότητας

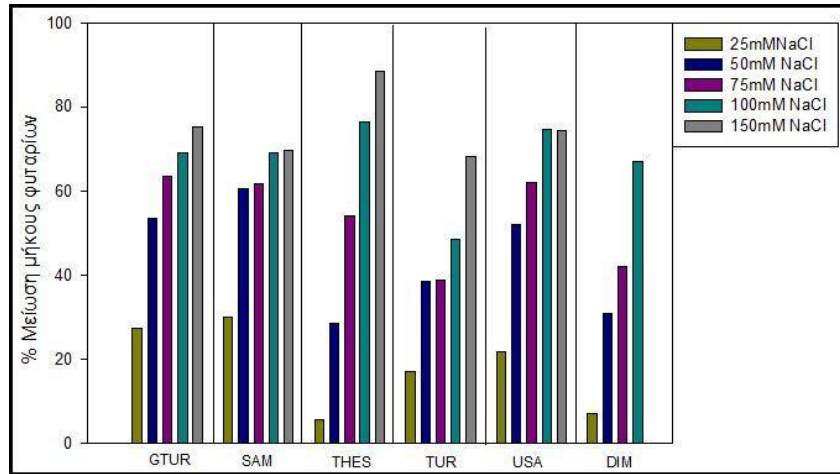
Αρχικά μελετήθηκε η βλάστηση και η ανάπτυξη φυταρίων φακής σε διαφορετικές συνθήκες αλατότητας. Στο διάγραμμα 1 παρουσιάζονται τα αποτελέσματα από τη συγκριτική μελέτη των φυταρίων στις διάφορες συνθήκες αλατότητας μετά από 4 ημέρες προβλάστησης στο σκοτάδι.

Κατά τη διαδικασία της προβλάστησης μετρήθηκαν:

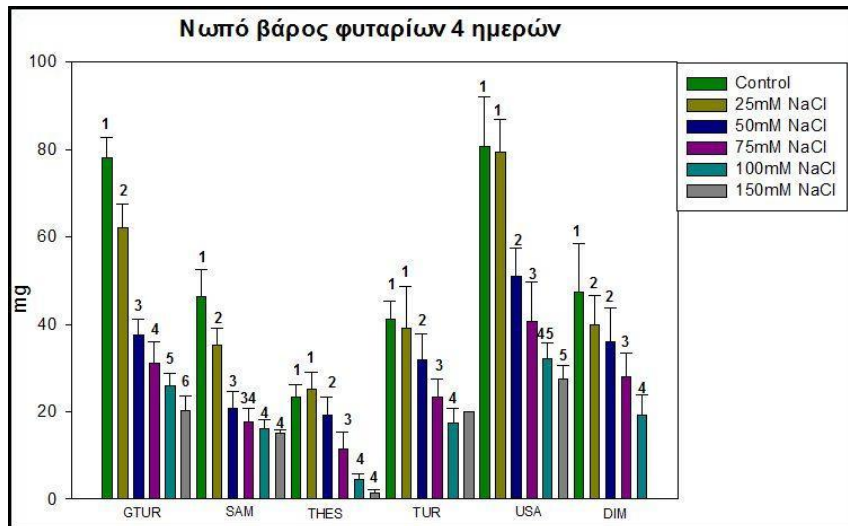
- το μήκος των φυταρίων και πως επηρεάζεται (**διαγράμματα 2,3**)
- το νωπό βάρος των φυταρίων (**διάγραμμα 4**)
- το ξηρό βάρος των φυταρίων (**διάγραμμα 5**)
- τη συγκέντρωση ιόντων Cl⁻/mg νωπού βάρους (**διάγραμμα 6**)



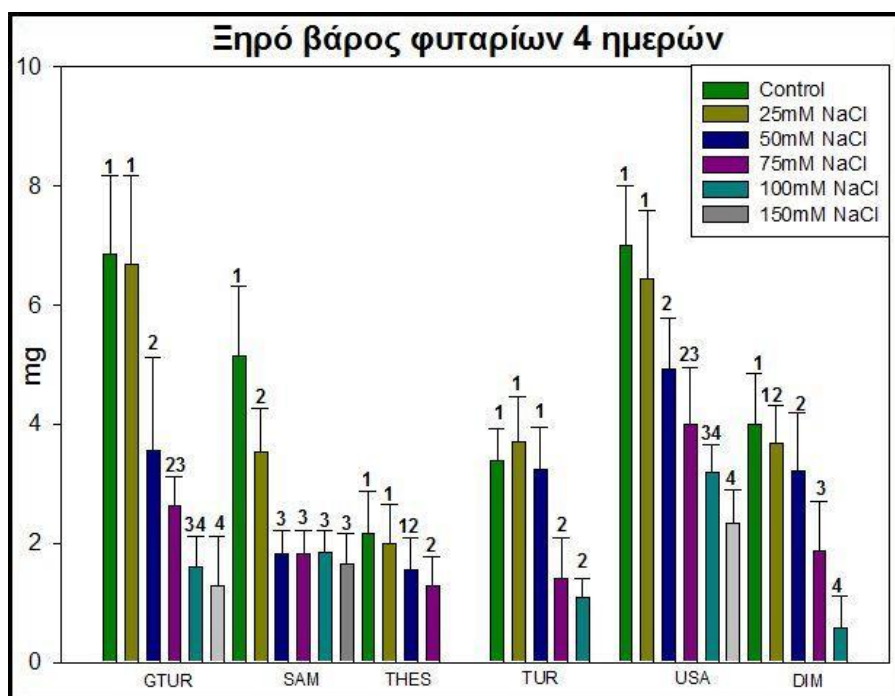
Διάγραμμα 2: Συνολικό μήκος φυταρίων και πως επηρεάστηκαν από την αλατότητα.



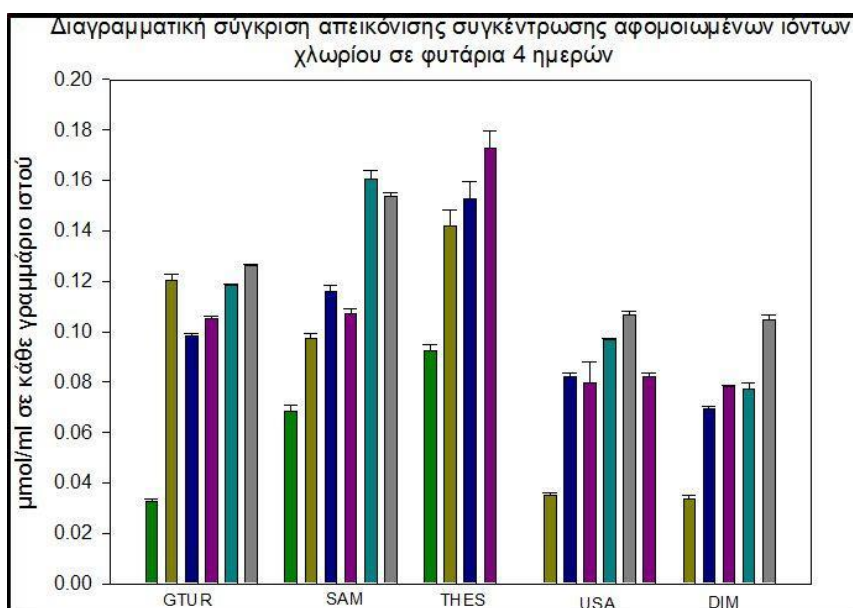
Διάγραμμα 3: Ποσοστιαία μείωση μήκους φυταρίων από την αλατότητα σε σχέση με τα Control φυτά



Διάγραμμα 4: Συνολικό νωπό βάρος των φυταρίων



Διάγραμμα 5: Συνολικό ξηρό βάρος των φυταρίων



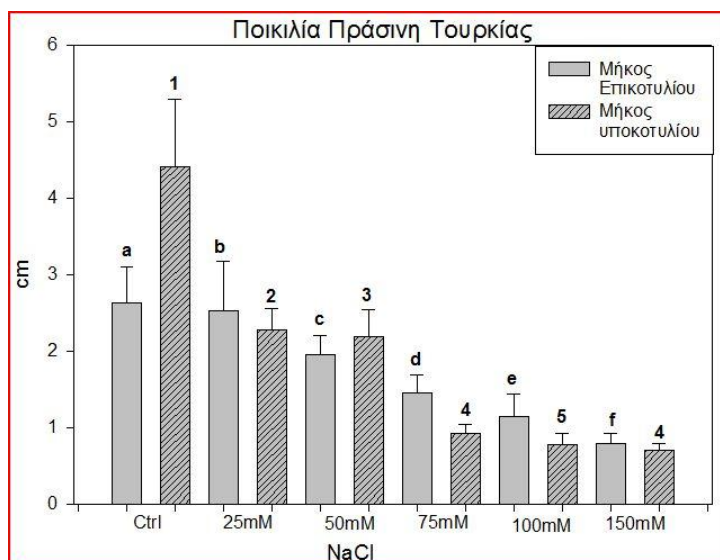
Διάγραμμα 6: Συγκέντρωση ιόντων Cl⁻/mg νωπού βάρους.

Τα διαγράμματα απεικονίζουν και συγκρίνουν σε εκατοστά, mg και $\mu\text{mol/ml}$ ανά mg νωπού βάρους τη διαφορά απόκρισης στην αλατότητα των φυταρίων σε μήκος, νωπό/ξηρό βάρος και αφομοιωμένων ιόντων Cl^- αντίστοιχα.

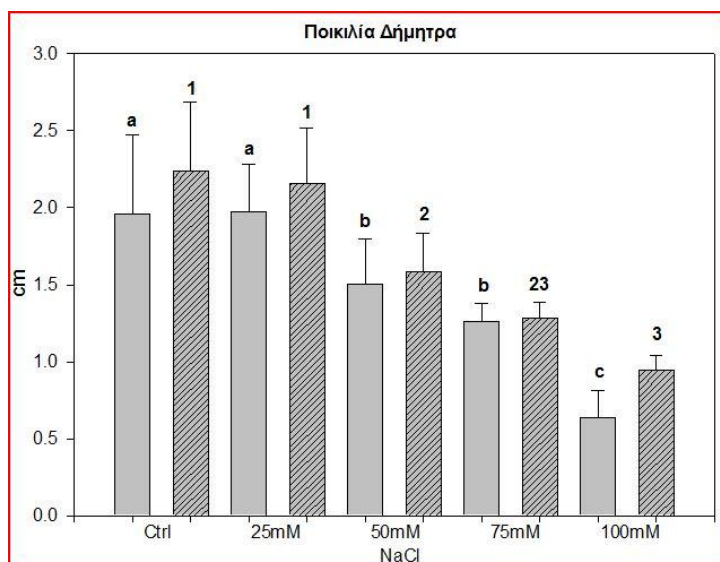
Ξεχωρίζουν οι ποικιλίες **USA και SAM**, όπου στην πρώτη περίπτωση υπάρχει μεγάλη πτώση στο μήκος των προβλαστημένων φυταρίων όσο η αλατότητα μεγαλώνει, πράγμα που φαίνεται και στα βάρη των φυταρίων, ενώ αντίθετα στην περίπτωση της SAM στις υψηλές συγκεντρώσεις δεν υπάρχει στατιστικά σημαντική διαφορά.

Αναφορικά με τις υπόλοιπες ποικιλίες φαίνεται ότι η αλατότητα επηρεάζει αναλογικά όχι μόνο το μήκος, αλλά και το νωπό-ξηρό βάρος.

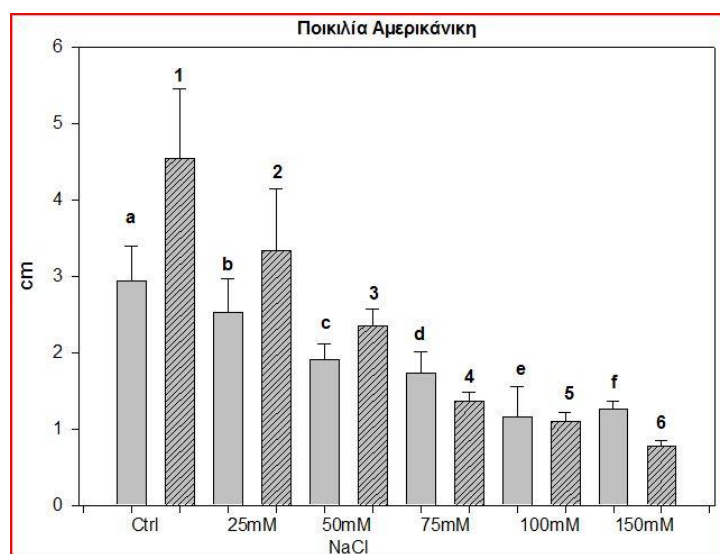
Στη συνέχεια παρουσιάζονται τα διαγράμματα που δείχνουν το μήκος των επικοτυλίων και των υποκοτυλίων ξεχωριστά για κάθε μία από τις ποικιλίες (**διάγραμμα 6-11**). Γενικά φαίνεται η τάση του λόγου επικοτυλίου/υποκοτυλίου να μικραίνει όσο αυξάνεται η αλατότητα. Οι μετρήσεις φυσικά πάρθηκαν σε φυτάρια που αναπτύχθηκαν στο σκότος, οπότε οποιεσδήποτε παρεκκλίνουσες τάσεις όσον αφορά την μείωση της τάσης αυτής είναι φυσιολογικές. Χαρακτηριστική είναι η περίπτωση της ποικιλίας από τη Θεσσαλία, όπου στη μεγαλύτερη συγκέντρωση αλατότητας (150mM) δεν παρατηρείται καθόλου επικοτύλιο.



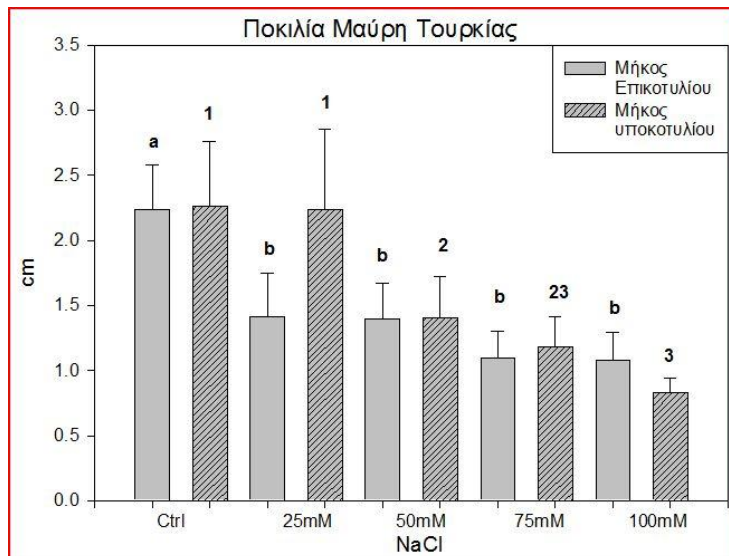
Διάγραμμα 7: Μήκος επικοτυλίων/υποκοτυλίων στην TUR



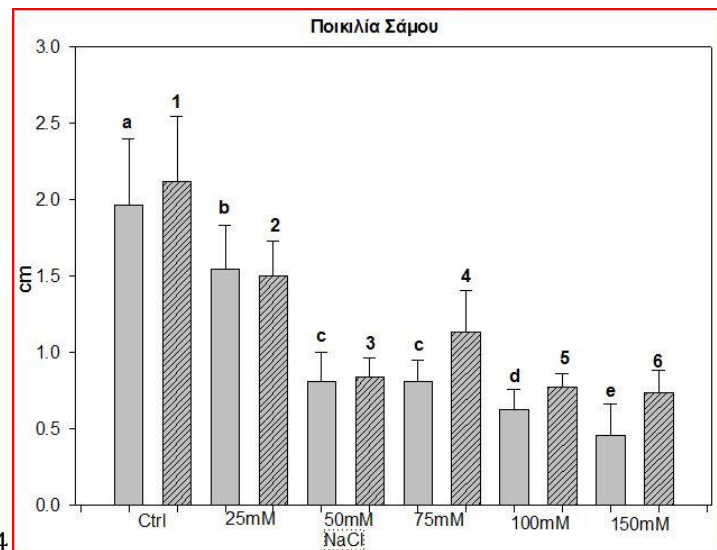
Διάγραμμα 8: Μήκος επικοτυλίων/υποκοτυλίων στην ποικιλία DIM



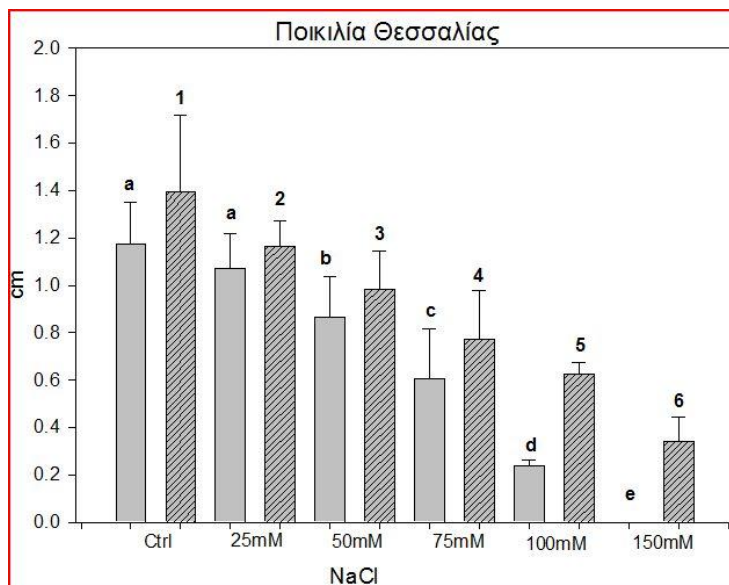
Διάγραμμα 9: Μήκος επικοτυλίων/υποκοτυλίων στην ποικιλία USA



Διάγραμμα 10: Μήκος επικοτυλίων/υποκοτυλίων στην μαύρη ποικιλία TUR



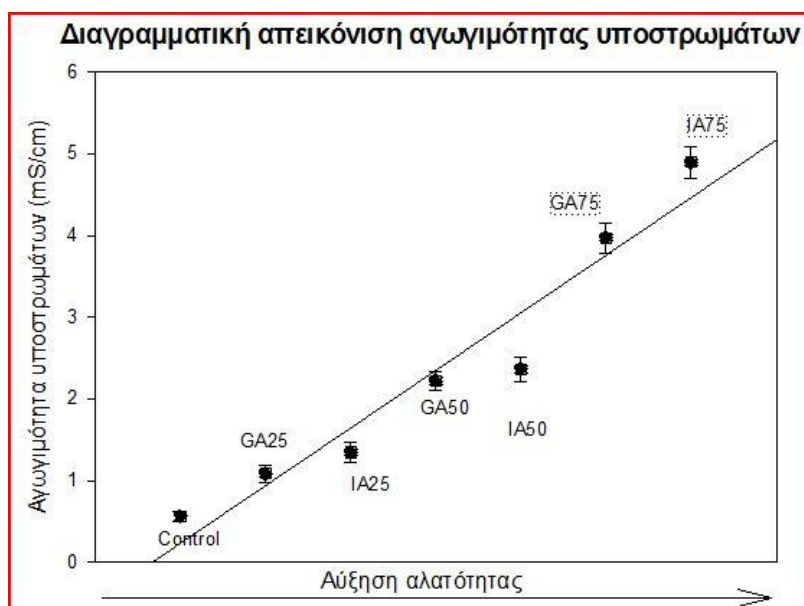
Διάγραμμα 11: Μήκος επικοτυλίων/υποκοτυλίων στην ποικιλία SAM



Διάγραμμα 12: Μήκος επικοτυλίων/υποκοτυλίων στην ποικιλία THES

Στη συνέχεια παρουσιάζουμε τις μετρήσεις που έγιναν σχετικά με τα φυτά που φυτεύτηκαν στο θερμοκήπιο και χρησιμοποιήθηκαν μετέπειτα για μεταβολομική ανάλυση.

Αρχικά παρουσιάζεται η μέτρηση της αγωγιμότητας των αλατούχων υποστρωμάτων 28 μέρες μετά τη φύτευση και κατά τη διαδικασία συλλογής του φυτικού ιστού **(διάγραμμα 13)**

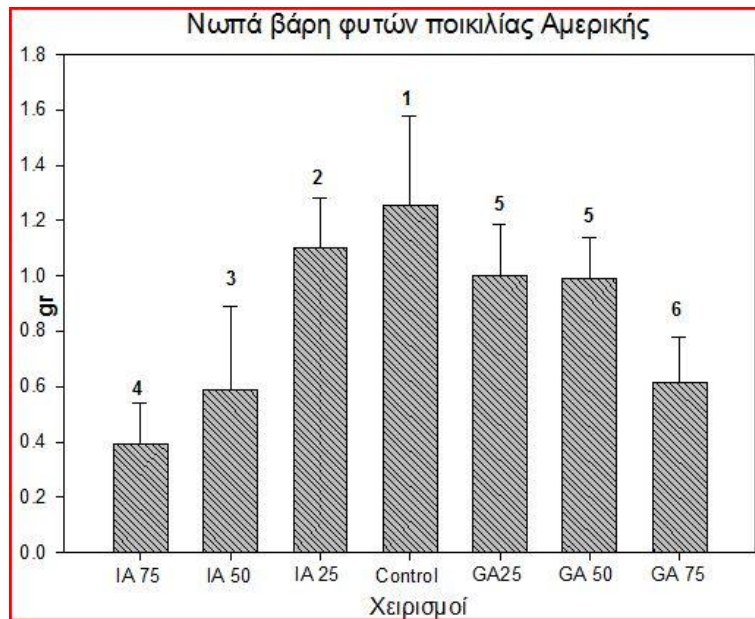


Διάγραμμα 13: Αγωγιμότητα υποστρωμάτων

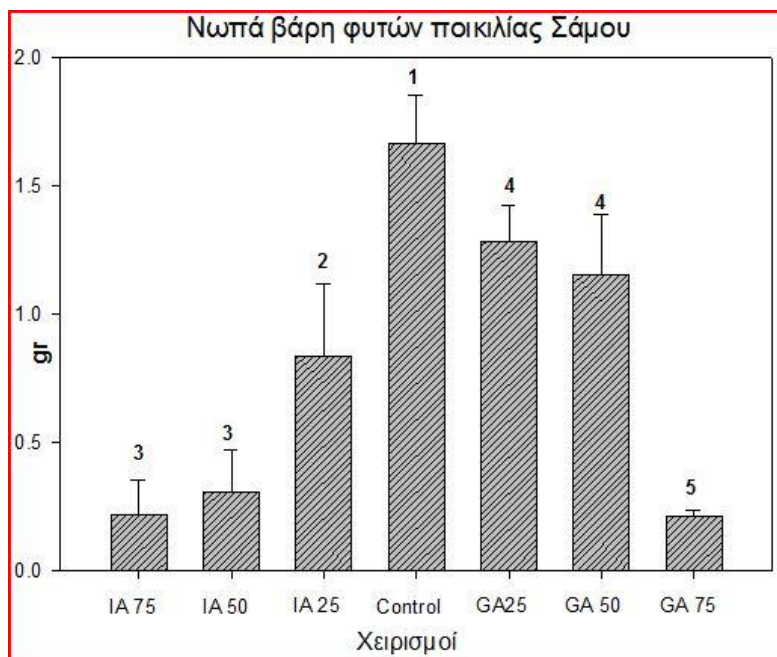
Η συσχέτιση της ποσότητας αλατιού του κάθε χειρισμού φαίνεται να συμπίπτει με την αγωγιμότητα των υποστρωμάτων στο τέλος του πειράματος.

Στη συνέχεια παρουσιάζεται το νωπό βάρος των φυτών ανά ποικιλία, λίγο πριν τη συλλογή φυτικού ιστού, στις διαφορετικές μεταχειρίσεις συγκέντρωσης αλατότητας **(διαγράμματα 14, 15)**

Έχει τοποθετηθεί στο κέντρο ο χειρισμός control για να είναι πιο ευδιάκριτες οι διαφορές με την εφαρμογή της αλατότητας.

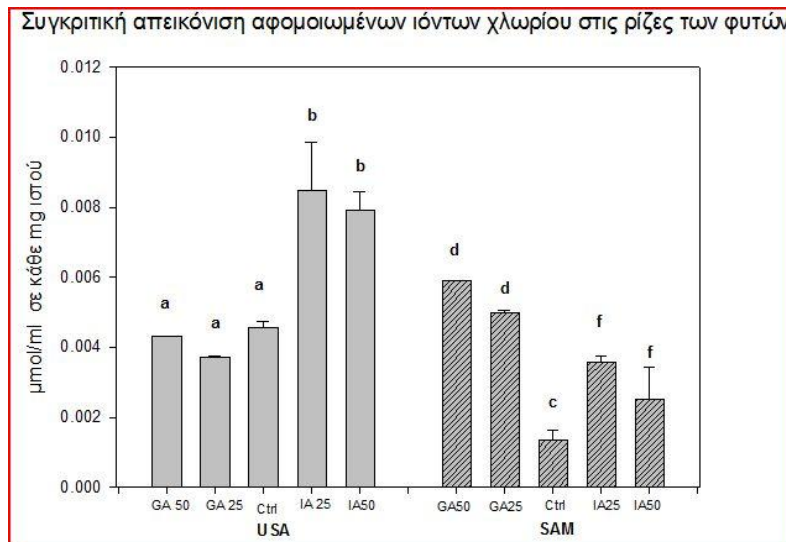


Διάγραμμα 14: Νωπά βάρη φυτών ποικιλίας USA

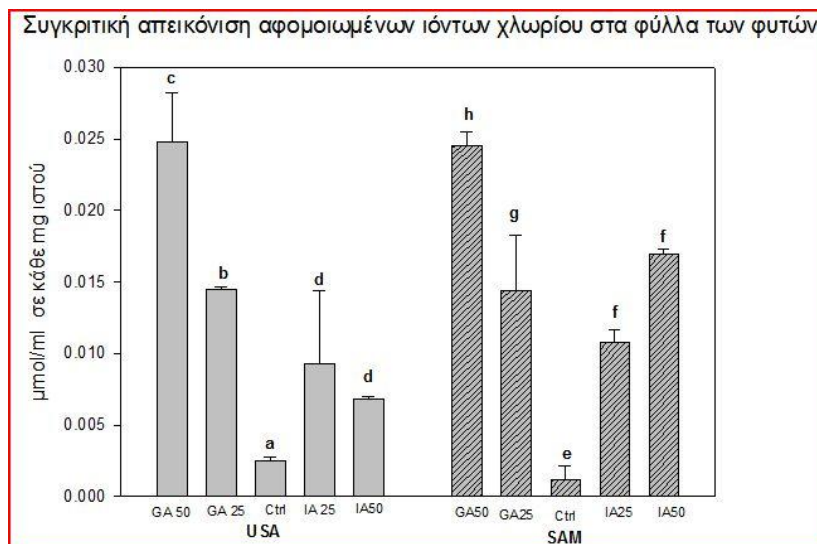


Διάγραμμα 15: Νωπά βάρη φυτών ποικιλίας SAM

Τέλος ακολουθούν οι μετρήσεις που έγιναν στα φυλλά και στις ρίζες των φυτών σχετικά με τη συγκέντρωση αφομοιωμένων ιόντων χλωρίου (**διαγράμματα 16,17**)



Διάγραμμα 16: Μέτρηση αφομοιωμένων ιόντων χλωρίου στις ρίζες



Διάγραμμα 17: Μέτρηση αφομοιωμένων ιόντων χλωρίου στα φύλλα

Τα παραπάνω διαγράμματα μας δείχνουν τη σύγκριση μεταξύ των χειρισμών αναφορικά με τα αφομοιωμένα ιόντα χλωρίου, όχι μόνο μεταξύ των ποικιλιών, αλλά και μεταξύ διαφορετικών ιστών (φύλλο, ρίζα), όπου και φαίνεται καθαρά ότι η κυρίως αφομοίωση των ιόντων χλωρίου γίνεται στα φύλλα, όπου οι χειρισμοί control παρουσιάζουν μεγάλη διαφορά σε σχέση με τους υπόλοιπους χειρισμούς. Σε αυτό το σημείο είναι καλό να σημειώσουμε ότι το συγκεκριμένο διάγραμμα προσφέρεται να μην για σύγκριση μεταξύ των χειρισμών και των ιστών, αλλά δεν είναι γενικά ποσοτικά ακριβής.

Παρακάτω παραθέτουμε ενδεικτικά φωτογραφίες των φυτών μετά από απευθείας εφαρμογή αλατότητας (NaCl mM).

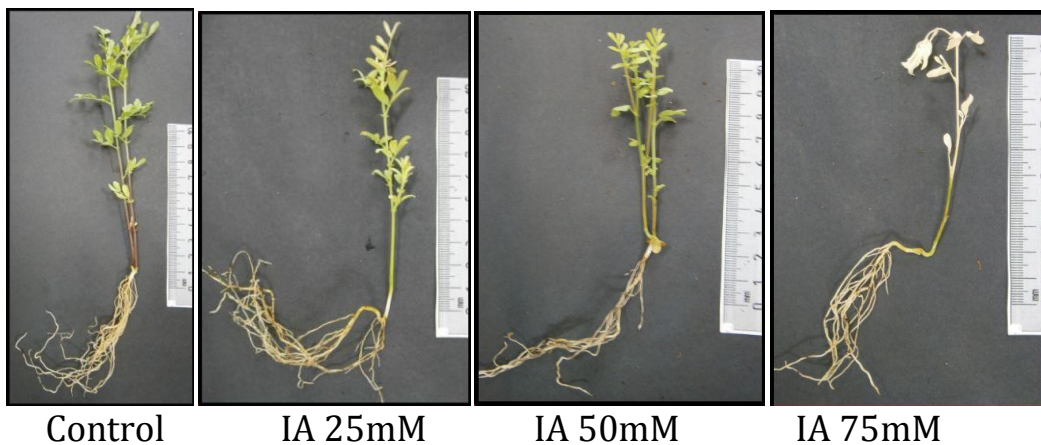
Ποικιλία Σάμου



Αύξηση αλατότητας στο υπόστρωμα



Ποικιλία Αμερικής



4.2 Μεταβολομική ανάλυση

Για την μεταβολομική ανάλυση επιλέχθηκαν οι ποικιλίες USA και SAM για συγκεκριμένους λόγους, όπως:

- Η διαφορά στην ευαισθησία που παρουσιάσαν στις συνθήκες αλατότητας κατά τη διάρκεια της προβλάστησης
- Η εμπορική σημασία τους
- Η πιθανή μερική ανεκτικότητα σε αλατούχα υποστώματα που μπορεί να έχει αποκτήσει η ποικιλία SAM που προέρχεται από νησί
- Η διαφορά που παρατηρήθηκε μακροσκοπικά στα φυτά όταν αυτά φυτεύτηκαν στο θερμοκήπιο σε ποιοτικό επίπεδο κατά τη διάρκεια του στρες (από την ποικιλία SAM φύτευαν σε πολύ μεγαλύτερο ποσοστό πιο ποιοτικά φυτά).
- Τα υγιή φυτά που αναπτύχθηκαν στους χειρισμούς Control και έδειξαν τη δυναμική της ποικιλίας σε σχεδόν ιδανικές συνθήκες

Αναλύθηκαν ξεχωριστά ιστός ρίζας και ιστός φύλλων για τις 2 ποικιλίες που επιλέχθηκαν. Η ανάλυση GC/MS μας έδειξε **συνολικά 342** ξεχωριστούς μεταβολίτες από τους οποίους οι **122** δεν έχουν αντιστοιχηθεί σε κάποια βιβλιοθήκη έως σήμερα και **220** οι οποίοι εμφανίζονται στη ρίζα και στα φύλλα ή σε έναν από τους 2 ιστούς.

Παρακάτω παραθέτουμε τους πίνακες με τα ονόματα των μεταβολιτών, τους μέσους όρους των εμβαδών των κορυφών στο φασματοφωτόμετρο για κάθε χειρισμό που αναλύθηκε χωριστά, όπως επίσης και τη στατιστική ανάλυση που έγινε με τη μέθοδο One-way ANOVA με το πρόγραμμα SPSS Statistics για κάθε ιστό και ποικιλία ξεχωριστά. Η στατιστική ανάλυση έγινε με βαθμό σημαντικότητας $P=0.05$ και οι μεταβολίτες που παρουσιάζουν στατιστικά σημαντική διαφορά, για τον ίδιο ιστό και ποικιλία, μεταξύ των χειρισμών σημειώνονται με υπογράμμιση στην περιοχή του P . Παρουσιάζονται και τα στοιχεία που αποδεικνύουν την ταυτοποίηση του μεταβολίτη (MZ, RI). Έχει γίνει και κατηγοριοποίηση των μεταβολιτών ανάλογα με τη δομή τους.

Πίνακες μεταβολιτών: Παρουσιάζονται οι στατιστικά σημαντικές διαφορές ανάμεσα στις συγκριτικά μέσες τιμές των μεταβολιτών. Πίνακας 1: μεταβολίτες φύλλων SAM, Πίνακας 2: μεταβολίτες ρίζας SAM, Πίνακας 3: Μεταβολίτες φύλλων USA, Πίνακας 4: Μεταβολίτες ρίζας USA. MZ=metal ion m/z, $P=P$ Anova

Πίνακας 1 :Μεταβολίτες φύλλων SAM

	MZ	RI	AVG Control	AVG GA 25	AVG GA 50	AVG GA75	AVG IA 25	AVG IA 50	P
Αμινοξέα									
Asparagine (2TMS)	159	19.2843	0	0	0	0	0	0	.
Asparagine (4TMS) BP1	188	20.3185	0	0	0	0	0	0	.
Asparagine (4TMS) BP2	188	25.28255	0	0	0	0	0	0	.
Asparagine (4TMS) MP	188	19.7792	0.000844	0.00048	0.000343	0.000181	0.000136	8.52E-05	<u>0.000</u>
Asparagine [+CO ₂] (4TMS)	232	27.0455	0.000351	0.0002	0.000143	7.55E-05	5.65E-05	3.54E-05	<u>0.000</u>
Asparagine [H ₂ O] (2TMS)	243	17.00445	0	0	0	0	0	0	.
aspartic acid	232	17.6857	0.000389	0.000222	0.000158	8.36E-05	6.26E-05	3.93E-05	0.218
Aspartic acid (2TMS)	160	15.17855	0	0	0	0	0	0	<u>0.014</u>
DL-isoleucine	86	8.8437	0.164496	0.093604	0.06693	0.03534	0.02644	0.016596	0.196
Glutamic acid (2TMS)	84	17.7832	0.000441	0.000251	0.000179	9.47E-05	7.09E-05	4.45E-05	0.074
glycine	174	12.2403	0.018395	0.010467	0.007484	0.003952	0.002957	0.001856	0.156
Isoleucine (1TMS)	86	8.852	0.011601	0.006601	0.00472	0.002492	0.001865	0.00117	0.107
L-alanine	116	7.1398	0.118174	0.067245	0.048083	0.025389	0.018995	0.011922	0.139
L-asparagine	231	21.1201	0.030872	0.017567	0.012561	0.006633	0.004962	0.003115	<u>0.000</u>
L-glutamine	156	23.2862	0	0	0	0	0	0	<u>0.000</u>
L-leucine	86	8.3469	0.011905	0.006774	0.004844	0.002558	0.001914	0.001201	0.068
L-leucine	158	11.3959	0	0	0	0	0	0	0.231
L-lysine	317	26.3072	0.025378	0.014441	0.010326	0.005452	0.004079	0.00256	<u>0.000</u>
L-methionine	176	17.50425	0.000662	0.000377	0.000269	0.000142	0.000106	6.68E-05	0.102
L-ornithine	174	24.2525	0.005164	0.002939	0.002101	0.00111	0.00083	0.000521	<u>0.000</u>
L-proline	142	11.9658	0.446504	0.254077	0.181674	0.095927	0.071768	0.045047	0.122
L-serine	204	13.7559	0.545671	0.310506	0.222023	0.117232	0.087708	0.055052	0.164
L-threonine	218	14.44595	0.123377	0.070206	0.0502	0.026506	0.019831	0.012447	0.135
L-tryptophan	202	31.7256	0.010618	0.006042	0.00432	0.002281	0.001707	0.001071	<u>0.035</u>
L-valine	144	9.94585	0.120616	0.068635	0.049077	0.025913	0.019387	0.012169	0.103
Lysine (3TMS)	174	24.7989	0.012005	0.006831	0.004884	0.002579	0.00193	0.001211	0.069
Phenylalanine (2TMS)	192	19.98155	0.043023	0.024482	0.017505	0.009243	0.006915	0.004341	0.065
Proline (1TMS)	70	8.7899	0.10362	0.058963	0.042161	0.022262	0.016655	0.010454	0.105
Proline [+CO ₂] (2TMS)	186	18.97775	0.007271	0.004137	0.002958	0.001562	0.001169	0.000734	0.091
Serine (2TMS)	132	10.9664	0.114191	0.064978	0.046462	0.024533	0.018354	0.011521	0.118
Tryptophan (2TMS)	202	31.4172	0.002997	0.001705	0.001219	0.000644	0.000482	0.000302	0.376
tyrosine	218	26.6306	0.010597	0.00603	0.004312	0.002277	0.001703	0.001069	<u>0.050</u>
Valine (1TMS)	72	6.7392	0.01087	0.006186	0.004423	0.002335	0.001747	0.001097	0.102
Οργανικά οξέα									
2,3-dimethylsuccinic acid	147	17.0372	0.031948	0.01818	0.012999	0.006864	0.005135	0.003223	0.786
2-isopropylmalic acid	147	18.9937	0	0	0	0	0	0	0.601
2-keto-L-gulonic acid	204	25.4942	0.047794	0.027196	0.019446	0.010268	0.007682	0.004822	0.535
2-Piperidinecarboxylic acid	156	13.65105	5.56E-06	3.16E-06	2.26E-06	1.19E-06	8.94E-07	5.61E-07	0.451
3-hydroxy-3-methylglutaric acid	247	19.56075	0	0	0	0	0	0	0.350
3-hydroxycinnamic acid	293	26.4408	0	0	0	0	0	0	<u>0.048</u>
4-guanidinobutyric acid	174	17.7631	0.132146	0.075196	0.053768	0.02839	0.02124	0.013332	0.059
4-hydroxybenzoic acid	267	19.91165	0.00097	0.000552	0.000395	0.000208	0.000156	9.79E-05	0.094
4-hydroxycinnamic acid	293	26.4337	0.004132	0.002351	0.001681	0.000888	0.000664	0.000417	0.584

Πίνακας 1	MZ	RI	AVG CTRL	AVG GA 25	AVG GA 50	AVG GA 75	AVG IA 25	AVG IA 50	<u>P</u>
6-hydroxy caproic acid	147	12.7093	0	0	0	0	0	0	<u>0.000</u>
alpha ketoglutaric acid	147	18.9726	0	0	0	0	0	0	0.597
Arabinonic acid	292	23.8275	7.92E-05	4.51E-05	3.22E-05	1.7E-05	1.27E-05	7.99E-06	0.397
arachidic acid	369	35.0895	7.53E-06	4.28E-06	3.06E-06	1.62E-06	1.21E-06	7.59E-07	0.135
benzoic acid	179	10.5887	0.001388	0.00079	0.000565	0.000298	0.000223	0.00014	0.504
Butanoic acid, 2,4dihydroxy	204	37.7802	0.000535	0.000305	0.000218	0.000115	8.6E-05	5.4E-05	0.082
Butanoic acid, 3hydroxy	147	8.53025	0.009147	0.005205	0.003722	0.001965	0.00147	0.000923	0.438
caffeic acid	396	30.2105	0.000495	0.000282	0.000201	0.000106	7.95E-05	4.99E-05	0.160
citraconic acid	147	11.3376	0.001461	0.000831	0.000594	0.000314	0.000235	0.000147	0.406
citramalic acid	147	16.5188	0	0	0	0	0	0	0.155
citric acid	347	24.46305	0.071961	0.040948	0.02928	0.01546	0.011567	0.00726	0.054
D-malic acid	147	16.9511	0.009256	0.005267	0.003766	0.001989	0.001488	0.000934	<u>0.036</u>
D-saccharic acid	333	28.46255	0.107285	0.061049	0.043652	0.023049	0.017244	0.010824	0.132
Erythronic acid (4TMS)	292	18.4479	0.000938	0.000534	0.000382	0.000202	0.000151	9.47E-05	0.482
ferulic acid	338	29.3445	0.001735	0.000988	0.000706	0.000373	0.000279	0.000175	0.571
fumaric acid	245	13.2141	0.000458	0.00026	0.000186	9.83E-05	7.35E-05	4.62E-05	0.393
galacturonic acid	333	24.297	0.003372	0.001919	0.001372	0.000724	0.000542	0.00034	0.080
galacturonic acid	333	24.2969	0	0	0	0	0	0	.
gentisic acid	355	23.0871	0	0	0	0	0	0	0.326
Glucaric acid1,4lactone	217	27.11695	0.015109	0.008598	0.006148	0.003246	0.002429	0.001524	0.219
Glucoheptonic acid1,4l-actone	217	22.8085	0.025838	0.014703	0.010513	0.005551	0.004153	0.002607	0.158
gluconic acid	333	28.1587	0.046687	0.026567	0.018996	0.01003	0.007504	0.00471	0.360
Gluconic acid	292	27.57115	0.002649	0.001507	0.001078	0.000569	0.000426	0.000267	<u>0.028</u>
gluconic acid lactone	275	25.8437	0.134653	0.076622	0.054788	0.028929	0.021643	0.013585	0.355
Glutaric acid, 2-hydroxy	247	18.962	0.000838	0.000477	0.000341	0.00018	0.000135	8.45E-05	<u>0.040</u>
glyceric acid	189	13.0112	0.018793	0.010694	0.007647	0.004038	0.003021	0.001896	0.310
glycolic acid	147	6.5166	0.001281	0.000729	0.000521	0.000275	0.000206	0.000129	0.368
Gulonic acid (6TMS)	292	27.5353	0.006719	0.003823	0.002734	0.001443	0.00108	0.000678	0.299
isocitric acid	273	24.5404	0	0	0	0	0	0	0.515
Isocitric acid (4TMS)	285	24.5457	0	0	0	0	0	0	0.440
itaconic acid	147	13.1617	0.156549	0.089082	0.063697	0.033633	0.025163	0.015794	<u>0.002</u>
L-(+) lactic acid	147	6.2038	0.025957	0.014771	0.010562	0.005577	0.004172	0.002619	0.669
lactobionic acid	217	38.6417	0.054427	0.030971	0.022145	0.011693	0.008748	0.005491	0.534
Lactobionic acid	204	38.15955	0	0	0	0	0	0	0.267
Lactobionic acid	204	42.6458	0	0	0	0	0	0	0.076
L-glutamic acid	246	19.9615	0.004044	0.002301	0.001645	0.000869	0.00065	0.000408	0.210
L-glutamic acid (dehydrated)	156	17.5561	0.022449	0.012774	0.009134	0.004823	0.003608	0.002265	<u>0.024</u>
L-pyroglyutamic acid	156	17.5617	0.013997	0.007965	0.005695	0.003007	0.00225	0.001412	<u>0.027</u>
Maleamic acid	244	17.0687	0.003403	0.001937	0.001385	0.000731	0.000547	0.000343	0.047
maleamic acid	244	17.4703	0.004708	0.002679	0.001915	0.001011	0.000757	0.000475	0.160
maleic acid	147	12.1764	0	0	0	0	0	0	<u>0.002</u>
malonic acid	147	9.636	0.009869	0.005616	0.004016	0.00212	0.001586	0.000996	0.053

Πίνακας 1	MZ	RI	AVG CTRL	AVG GA 25	AVG GA 50	AVG GA 75	AVG IA 25	AVG IA 50	P
mucic acid	333	29.04505	0.004048	0.002303	0.001647	0.00087	0.000651	0.000408	0.255
myristic acid	285	24.5506	0.000252	0.000143	0.000102	5.41E-05	4.05E-05	2.54E-05	0.273
nicotinic acid	180	11.7913	6.84E-06	3.89E-06	2.78E-06	1.47E-06	1.1E-06	6.9E-07	0.774
N-methyl-DL-glutamic acid	260	22.0909	0	0	0	0	0	0	0.513
palmitic acid	313	28.353	0.020439	0.01163	0.008316	0.004391	0.003285	0.002062	0.490
pantothenic acid	291	27.7329	0	0	0	0	0	0	.
pipecolic acid	84	11.03335	3.29E-05	1.87E-05	1.34E-05	7.06E-06	5.28E-06	3.31E-06	0.369
Propanoic acid, 2amino2meth	160	10.212	0	0	0	0	0	0	<u>0.000</u>
pyrrole -2-carboxylic acid	240	13.4392	0.000978	0.000556	0.000398	0.00021	0.000157	9.86E-05	0.505
pyruvic acid	174	5.9708	0	0	0	0	0	0	0.283
Ribonic acid (5TMS)	73.5	23.8275	0.029756	0.016932	0.012107	0.006393	0.004783	0.003002	0.598
ribonic acid-gamma-lactone	147	20.73275	1.18E-05	6.7E-06	4.79E-06	2.53E-06	1.89E-06	1.19E-06	0.405
shikimic acid	204	24.239	8.75E-05	4.98E-05	3.56E-05	1.88E-05	1.41E-05	8.83E-06	0.231
stearic acid	341	31.8528	0.027117	0.01543	0.011033	0.005826	0.004359	0.002736	0.561
succinic acid	148	12.3827	0.041821	0.023797	0.017016	0.008985	0.006722	0.004219	0.246
tartaric acid	147	23.4902	0.052518	0.029884	0.021368	0.011283	0.008441	0.005298	0.583
tartronic acid	147	14.5569	6.58E-06	3.74E-06	2.68E-06	1.41E-06	1.06E-06	6.63E-07	0.374
Threonic acid1,4lactone (2TM	147	13.98235	0	0	0	0	0	0	0.234
trans-aconitic acid	229	22.7919	0	0	0	0	0	0	0.069
Σάκχαρα									
cellobiose	204	39.8208	0.003768	0.002144	0.001533	0.000809	0.000606	0.00038	0.794
alphaDGalactopyranosyl(1,4)	217	40.5023	0	0	0	0	0	0	<u>0.000</u>
alphaD-Galactopyranosyl(1,4)	204	40.52265	0	0	0	0	0	0	<u>0.000</u>
Arabinose	103	21.15555	0.004228	0.002406	0.00172	0.000908	0.00068	0.000427	0.150
betaDAllose (5TMS)	204	25.0423	0.025653	0.014597	0.010438	0.005511	0.004123	0.002588	0.058
Cellobiose, D	204	39.2835	0.020131	0.011455	0.008191	0.004325	0.003236	0.002031	0.591
D-(+) trehalose	361	40.507	0.004537	0.002582	0.001846	0.000975	0.000729	0.000458	0.388
D-(+)altrose	205	26.581	9.03E-05	5.14E-05	3.67E-05	1.94E-05	1.45E-05	9.11E-06	0.358
D-allose	319	26.24615	0.403742	0.229744	0.164275	0.08674	0.064895	0.040733	0.070
D-glucose	319	26.25155	2.03071	1.155546	0.826258	0.436279	0.326404	0.204877	0.417
D-lyxose	217	21.2757	0.007062	0.004018	0.002873	0.001517	0.001135	0.000712	0.579
D-lyxose	217	21.2908	0.006413	0.003649	0.002609	0.001378	0.001031	0.000647	0.600
fructose 1	307	25.7453	0.080164	0.045616	0.032617	0.017222	0.012885	0.008088	0.887
Gentiobiose (1MEOX) (8TMS) BP	204	40.53205	0	0	0	0	0	0	0.119
Glucopyranose [H2O] (4TMS)	217	23.4047	0.009512	0.005413	0.00387	0.002044	0.001529	0.00096	0.420
Glucopyranose, D (5TMS)	204	31.4377	0.053304	0.030332	0.021689	0.011452	0.008568	0.005378	0.437
Glucopyranose, D (5TMS)	204	25.6601	0.013217	0.007521	0.005378	0.00284	0.002124	0.001333	0.597
Glucose, 1,6anhydro, beta	204	21.9601	6.54E-05	3.72E-05	2.66E-05	1.4E-05	1.05E-05	6.59E-06	0.445
Idose (1MEOX) (5TMS) MP	157	25.6935	0.108834	0.06193	0.044283	0.023382	0.017493	0.01098	0.061
isomaltose	361	42.065	0	0	0	0	0	0	0.062
lactose	204	37.7683	0.014438	0.008216	0.005875	0.003102	0.002321	0.001457	0.491
Laminaribiose (1MEOX) (8TMS) B	361	38.2729	0	0	0	0	0	0	0.248
leucrose	361	40.5422	0.000646	0.000368	0.000263	0.000139	0.000104	6.52E-05	0.455
maltose	361	40.5399	0.001064	0.000606	0.000433	0.000229	0.000171	0.000107	0.537
maltotriose	361	49.9415	0	0	0	0	0	0	<u>0.021</u>
melezitose	361	49.9505	0.001874	0.001066	0.000763	0.000403	0.000301	0.000189	0.817
melibiose	361	40.9785	0.005434	0.003092	0.002211	0.001168	0.000874	0.000548	0.449

Πίνακας 1	MZ	RI	AVG CTRL	AVG GA 25	AVG GA 50	AVG GA 75	AVG IA 25	AVG IA 50	P
palatinose	361	41.9482	0	0	0	0	0	0	0.606
Raffinose	87	48.9954	0.146701	0.083478	0.05969	0.031517	0.02358	0.014801	0.092
Sorbose (1MEOX) (5TMS) BP	103	25.7447	0.095738	0.054478	0.038954	0.020568	0.015388	0.009659	0.123
Sucrose	361	39.0556	2.846529	1.619776	1.1582	0.611549	0.457534	0.287184	0.952
tagatose	217	25.358	0.030863	0.017562	0.012558	0.006631	0.004961	0.003114	<u>0.022</u>
Tagatose (1MEOX) (5TMS) BP	117	18.24065	0.007966	0.004533	0.003241	0.001711	0.00128	0.000804	0.597
talose	319	26.5827	0.028774	0.016373	0.011708	0.006182	0.004625	0.002903	0.441
Trehalose, alpha, alpha', D	361	40.5075	0	0	0	0	0	0	0.000
Xylose (1MEOX) (4TMS) MP	117	18.338	0.008831	0.005025	0.003593	0.001897	0.001419	0.000891	0.468
Xylulose	205	21.6275	0.001676	0.000954	0.000682	0.00036	0.000269	0.000169	0.511
Φωσφορικές ενώσεις									
D-glucose-6-phosphate	387	34.0189	8.33E-05	4.74E-05	3.39E-05	1.79E-05	1.34E-05	8.4E-06	0.541
D-sphingosine	204	35.8787	0.000509	0.000289	0.000207	0.000109	8.18E-05	5.13E-05	0.260
glycerol 1-phosphate	357	23.3262	0	0	0	0	0	0	<u>0.000</u>
Glycerophosphoglycerol (5TMS)	357	31.7572	3.68E-05	2.1E-05	1.5E-05	7.92E-06	5.92E-06	3.72E-06	0.005
Inositol2phosphate, myo	318	35.4515	0	0	0	0	0	0	0.410
isopropyl beta-D-1-thiogalactopyranoside	217	27.27455	0.025606	0.014571	0.010419	0.005501	0.004116	0.002583	0.549
O-phosphocolamine	299	23.5977	0	0	0	0	0	0	.
phosphoric acid	299	11.4972	0.010533	0.005994	0.004286	0.002263	0.001693	0.001063	0.444
Phosphoric acid monomethyl est	241	9.0216	0.001079	0.000614	0.000439	0.000232	0.000173	0.000109	0.000
pyrophosphate	451	21.1974	0	0	0	0	0	0	.
Πολυόλες									
Erythritol (4TMS)	217	17.5934	0.00012	6.81E-05	4.87E-05	2.57E-05	1.92E-05	1.21E-05	0.099
acetol	219	18.6186	0.039158	0.022282	0.015933	0.008413	0.006294	0.003951	0.436
allo-inositol	318	27.30955	0.001224	0.000697	0.000498	0.000263	0.000197	0.000124	<u>0.000</u>
arabitol	217	22.523	0.001273	0.000724	0.000518	0.000273	0.000205	0.000128	0.286
Cellobiitol (9TMS)	204	37.7708	0	0	0	0	0	0	<u>0.040</u>
D-mannitol	319	26.8592	0.010331	0.005879	0.004204	0.00222	0.001661	0.001042	0.412
D-sorbitol	319	27.0938	0.007471	0.004251	0.00304	0.001605	0.001201	0.000754	0.159
D-threitol	217	17.415	0.003034	0.001727	0.001235	0.000652	0.000488	0.000306	0.438
galactinol	204	43.8713	0.019846	0.011293	0.008075	0.004264	0.00319	0.002002	0.483
glycerol	147	11.5528	0.086338	0.049129	0.035129	0.018549	0.013877	0.008711	0.326
Inositol, myo (6TMS)	305	29.785	0.172631	0.098233	0.07024	0.037088	0.027748	0.017417	0.203
maltotriitol	361	55.3225	0	0	0	0	0	0	<u>0.005</u>
Ononitol (5TMS)	217	27.2474	0.030312	0.017249	0.012333	0.006512	0.004872	0.003058	0.062
palatinitol	361	41.62015	0.003828	0.002178	0.001558	0.000822	0.000615	0.000386	0.121
Pinitol, D (5TMS)	260	24.8622	3.690736	2.10016	1.501692	0.792919	0.593227	0.372355	0.159
pyrogallol	239	18.11005	0	0	0	0	0	0	0.482
ribitol	217	23.6162	0.000102	5.83E-05	4.17E-05	2.2E-05	1.65E-05	1.03E-05	<u>0.010</u>
Sorbitol (6TMS)	319	26.85995	0.001522	0.000866	0.000619	0.000327	0.000245	0.000154	0.075
Αζωτούχες ενώσεις									
Serine, Nacetyl (2TMS)	186	17.2912	0.018441	0.010493	0.007503	0.003962	0.002964	0.00186	0.056
2-aminoethanethiol	174	33.8425	0	0	0	0	0	0	<u>0.000</u>
5-hydroxy-L-tryptophan	290	35.2445	0.000992	0.000565	0.000404	0.000213	0.00016	0.0001	0.492
acetyl-L-serine	174	14.54205	0.004856	0.002763	0.001976	0.001043	0.000781	0.00049	0.060

Πίνακας 1	MZ	RI	AVG CTRL	AVG GA 25	AVG GA 50	AVG GA 75	AVG IA 25	AVG IA 50	P
adenosine	236	38.4772	0.014072	0.008007	0.005726	0.003023	0.002262	0.00142	0.081
allantoin	331	25.77015	0.000518	0.000295	0.000211	0.000111	8.33E-05	5.23E-05	<u>0.039</u>
Beta- alanine	248	15.2744	0.007131	0.004058	0.002901	0.001532	0.001146	0.000719	0.068
beta-cyano-L-alanine	141	13.9466	0	0	0	0	0	0	.
citrulline	157	24.3645	0	0	0	0	0	0	0.092
D-lyxosylamine	103	21.2799	0.000106	6.01E-05	4.29E-05	2.27E-05	1.7E-05	1.06E-05	0.452
D-lyxosylamine	217	21.28435	0.008611	0.0049	0.003504	0.00185	0.001384	0.000869	0.083
Ethanolamine (3TMS)	174	11.2174	0.057625	0.032791	0.023447	0.01238	0.009262	0.005814	0.154
gly-pro	174	27.4642	0	0	0	0	0	0	.
L-norleucine	158	11.3949	0.078013	0.044392	0.031742	0.01676	0.012539	0.007871	0.083
Lysine, 5hydroxy (4TMS)	174	17.31565	6.65E-05	3.78E-05	2.71E-05	1.43E-05	1.07E-05	6.71E-06	0.734
N-acetyl-D-glucosamine	319	30.7293	0.037133	0.02113	0.015109	0.007978	0.005969	0.003746	0.600
N-acetyl-D-mannosamine	205	29.6695	0.003488	0.001985	0.001419	0.000749	0.000561	0.000352	0.058
phenylethylamine	174	17.31305	0.001366	0.000778	0.000556	0.000294	0.00022	0.000138	0.667
porphine	285	12.9069	0.028788	0.016382	0.011713	0.006185	0.004627	0.002904	0.370
putrescine	174	22.4244	0	0	0	0	0	0	<u>0.000</u>
Sphingosine (3TMS)	204	26.94475	0.004253	0.00242	0.00173	0.000914	0.000684	0.000429	0.623
trans-3-hydroxy-L-proline	230	17.7905	0	0	0	0	0	0	<u>0.000</u>
trans-4-hydroxy-L-proline	230	17.7902	0	0	0	0	0	0	<u>0.000</u>
Tryptamine, 5hydroxy (3TMS)	204	39.2835	0	0	0	0	0	0	.
Tryptophan, 5hydroxy (3TMS)	218	19.977	0	0	0	0	0	0	0.595
Tryptophan, Nacetyl (3TMS)	202	43.5752	0	0	0	0	0	0	<u>0.000</u>
uracil	241	13.4616	0.000472	0.000268	0.000192	0.000101	7.58E-05	4.76E-05	0.082
urea	147	10.4317	0.002606	0.001483	0.001061	0.00056	0.000419	0.000263	0.303
xanthine	353	28.2929	0.000218	0.000124	8.86E-05	4.68E-05	3.5E-05	2.2E-05	0.107
Άλλα									
1-methylhydantoin	171	12.7579	0.154998	0.088199	0.063066	0.0333	0.024913	0.015638	0.114
arbutin	254	37.9973	0	0	0	0	0	0	.
benzene-1,2,4-triol	342	19.5147	0.00136	0.000774	0.000554	0.000292	0.000219	0.000137	0.371
Cadaverine (4TMS)	174	24.4585	0	0	0	0	0	0	.
Calystegine B2 (4TMS)	217	29.53835	0	0	0	0	0	0	0.218
Galactopyranoside, 1Omethyl 1	174.5	25.04765	0.095757	0.054489	0.038962	0.020572	0.015391	0.009661	0.130
Galactopyranoside, 1Omethyl 2	204	26.15335	0.103801	0.059066	0.042235	0.022301	0.016684	0.010472	0.281
L-galactono-gamma-lactone	147	25.8544	0.002182	0.001242	0.000888	0.000469	0.000351	0.00022	0.304
Methyl 3,6anhydroalphaDgal	129	25.0603	0	0	0	0	0	0	<u>0.000</u>
methyl-beta-D-galactopyranoside	204	26.0499	0.104205	0.059297	0.042399	0.022388	0.016749	0.010513	0.412
Salicylic acid glucopyranoside	361	37.8887	0.000389	0.000221	0.000158	8.36E-05	6.26E-05	3.93E-05	0.331

Πίνακας 2: Μεταβολίτες ρίζας SAM

Αμινοξέα	MZ	RI	AVG Control	AVG GA 25	AVG GA 50	AVG GA 75	AVG IA 25	AVG IA 50	AVG IA 75	P
Asparagine (2TMS)	159	19.2843	0.00051	0.000614	0.00049	0.00125	0.00024	0.00153	0.0008	0.270
Asparagine (4TMS) BP1	188	20.3185	0	0.002828	0	7.8E-05	0	4.3E-05	0	<u>0.002</u>
Asparagine (4TMS) BP2	188	25.2826	2.9E-05	0.002222	0.00015	0.00258	0.00099	0.00042	0	<u>0.000</u>
Asparagine (4TMS) MP	188	19.7792	0.00208	0.033293	0.00417	0.03369	0.00738	0.00739	0.0003	<u>0.000</u>
Asparagine [+CO ₂] (4TMS)	232	27.0455	0.00066	0.010706	0.00076	0.01243	0.00075	0.00181	8E-06	<u>0.000</u>
Asparagine [H ₂ O] (2TMS)	243	17.0045	0.0001	0.002836	2.5E-05	0.0018	4.5E-05	0.00022	0	<u>0.000</u>
aspartic acid	232	17.6857	0.00287	0.019746	0.0018	0.00256	0.00279	0.00367	0.0002	0.152
Aspartic acid (2TMS)	160	15.1786	0.00019	0.00032	0.00034	0.0001	0.00042	0.00019	6E-05	0.310
DL-isoleucine	86	8.8437	0.0005	0.003671	0.00018	0.00061	0.00062	0.00092	6E-05	0.400
Glutamic acid (2TMS)	84	17.7832	0.00041	0	0	0	0.00019	0	0	<u>0.028</u>
glycine	174	12.2403	0.00096	0.006685	0.00093	0.00207	0.00185	0.00217	0.0007	0.360
Isoleucine (1TMS)	86	8.852	0.0002	0.000185	7.5E-05	0.00011	0.00017	0.00028	0	<u>0.004</u>
L-alanine	116	7.1398	0.00054	0.002231	7.8E-05	0.00044	0.00022	0.00029	0	0.586
L-asparagine	231	21.1201	0.01821	0.705509	0.01044	0.17322	0.01137	0.08978	0.0133	0.212
L-glutamine	156	23.2862	0	0.002137	0	0.00026	0	0	0	0.108
L-leucine	86	8.3469	2.9E-05	0.000526	0	0	6.2E-05	0	0	0.481
L-leucine	158	11.3959	0	0.000237	0	0	0	0.00019	0	0.554
L-lysine	317	26.3072	0	0.030707	2.6E-05	0.01164	0.00023	0.00316	0	0.210
L-methionine	176	17.5043	0	0.000203	0	7.6E-05	0	2.6E-05	0	0.239
L-ornithine	174	24.2525	0	0.007411	0	0.00161	0	0.00037	0	0.214
L-proline	142	11.9658	0.00078	0.001393	0.0004	7.4E-05	0.00019	0.00041	0	0.615
L-serine	204	13.7559	0.00099	0.013572	0.00071	0.0013	0.00089	0.00177	2E-05	0.370
L-threonine	218	14.446	0.00114	0.012582	0.00051	0.00156	0.00115	0.00174	0.0002	0.358
L-tryptophan	202	31.7256	1.5E-05	0.000685	0	0.00024	0	0	0	<u>0.000</u>
L-valine	144	9.94585	0.00125	0.009277	0.00043	0.00175	0.00082	0.00206	0.0003	0.350
Lysine (3TMS)	174	24.7989	0	0	6.9E-05	0.00031	0	9.3E-05	0	0.509
Phenylalanine (2TMS)	192	19.9816	2.1E-05	0.001746	5.4E-05	0.00148	3.1E-05	0.00068	3E-05	0.002
Proline (1TMS)	70	8.7899	0.0002	0.00018	0.00038	0	6.1E-05	0.00021	0	0.707
Proline [+CO ₂] (2TMS)	186	18.9778	0	0	6.5E-05	0	3E-05	0	0	0.459
Serine (2TMS)	132	10.9664	0.00061	0.000726	0.0009	0.00053	0.00067	0.00121	5E-05	<u>0.011</u>
Tryptophan (2TMS)	202	31.4172	1.6E-05	6.29E-05	0	7.7E-05	0	5.8E-05	0	0.080
tyrosine	218	26.6306	0	0.000274	0	0	0	0	0	0.451
Valine (1TMS)	72	6.7392	0.00021	0.000454	0.00012	0.00038	0.00029	0.00053	0	<u>0.002</u>
Οργανικά οξέα										
Butanoic acid, 3hydroxy	147	8.53025	0	0	0	0	0	0	0	.
2,3-dimethylsuccinic acid	147	17.0372	7.7E-05	0	0	0	0	0	0	0.451
2-isopropylmalic acid	147	18.9937	0	0.000724	3.1E-05	0.00034	0	0	0	0.085
2-keto-L-gulonic acid	204	25.4942	0.00025	0	0	0.00095	0.00038	0	0	0.588
2-Piperidinecarboxylic acid	156	13.6511	3.5E-06	4.63E-05	0	2.9E-05	0	0	0	<u>0.008</u>
3-hydroxy-3-methylglutaric acid	247	19.5608	0.00015	0.001397	0.00015	0.00017	0.00042	0.00023	3E-05	0.365
3-hydroxycinnamic acid	293	26.4408	0	0	0	0	0	0	0	.
4-guanidinobutyric acid	174	17.7631	0.00297	0.005432	0.00225	0.00151	0.00179	0.00267	0.0003	0.478
4-hydroxybenzoic acid	267	19.9117	0	0	0	0	0	0	0	.
4-hydroxycinnamic acid	293	26.4337	0	0	0	0	0	0	0	.
5-aminovaleric acid	174	19.9937	9.5E-05	0.000291	1.8E-05	4.7E-05	5E-05	1.2E-05	3E-05	<u>0.023</u>

Πίνακας 2	MZ	RI	AVG CTRL	AVG GA 25	AVG GA 50	AVG GA 75	AVG IA 25	AVG IA 50	AVG IA 25	P
6-hydroxy caproic acid	147	12.7093	1E-05	0.000107	0	0.00012	3.9E-05	0	0	<u>0.012</u>
alpha ketoglutaric acid	147	18.9726	4.3E-05	3.96E-05	0	7.3E-05	1.5E-05	2.3E-05	3E-05	0.858
Arabinonic acid (5TMS)	292	23.8275	3.8E-06	0	2E-05	0	0	0	5E-05	0.486
arachidic acid	369	35.0895	1.9E-05	2.11E-05	1.1E-05	3.3E-05	1.6E-05	8.8E-06	0	0.444
benzoic acid	179	10.5887	6.6E-05	0.000598	5.5E-05	0.00016	4.4E-05	4.5E-05	7E-05	0.356
Butanoic acid, 2,4dihydroxy	204	37.7802	0	0	0	0	0	0	0	.
caffeic acid	396	30.2105	0	0	0	0	0	0	0	.
citraconic acid	147	11.3376	5E-05	1.03E-05	1.4E-05	0	0	1.3E-05	0	0.280
citramalic acid	147	16.5188	5.4E-05	0.000401	0.00032	3.7E-05	0.00014	1.5E-05	0	0.335
citric acid	347	24.4631	0.07823	0.043641	0.02624	0.01021	0.03458	0.02686	0.001	0.338
D-malic acid	147	16.9511	0.06817	0.054178	0.00886	0.01219	0.027	0.01434	0.002	<u>0.049</u>
D-saccharic acid	333	28.4626	0.00095	0.004214	0.0028	0.00115	0.00235	0.00048	0.0001	0.283
Erythronic acid (4TMS)	292	18.4479	2.1E-05	3.61E-05	5.6E-05	9E-05	3.9E-05	6.5E-05	0	0.724
ferulic acid	338	29.3445	0	0	0	0	0	0	0	.
fumaric acid	245	13.2141	0.00019	0.001124	3.6E-05	0.00046	0.00016	0.0001	4E-05	0.187
galacturonic acid	333	24.297	0.00053	0.011505	0.00073	0.00141	0.00101	0.00086	7E-05	0.354
galacturonic acid	333	24.2969	0	0	0	0	0	0	5E-05	0.254
gentisic acid	355	23.0871	0	0	4.8E-06	0	0	0	0	0.451
Glucaric acid1,4lactone (4TM	217	27.117	0	0	0.00011	0	7.8E-05	0	0	0.232
Glucoheptonic acid1,4lactone	217	22.8085	0	0	0	0	0	0	0	.
gluconic acid	333	28.1587	0.00203	0.004884	0.00222	0.0011	0.00307	0.00145	0.0002	0.330
Gluconic acid (6TMS)	292	27.5712	3.2E-05	0.001219	0	0.00087	0	0.00017	0	0.062
gluconic acid lactone	275	25.8437	0.00094	0.001983	0.00156	0.00165	0.00077	0.00109	0	0.080
Glutaric acid, 2hydroxy (3TM	247	18.962	4.6E-05	7.9E-05	0	0.00011	6.2E-05	3.9E-05	0	<u>0.019</u>
glyceric acid	189	13.0112	0.00024	0.000763	0.00018	0.00017	0.00037	0.00025	5E-05	0.541
glycolic acid	147	6.5166	9.2E-05	0.000247	8.3E-05	6.1E-05	0.00015	0.0001	2E-05	0.665
Gulonic acid (6TMS)	292	27.5353	0.00061	0.000631	0.00014	0.00096	0.00027	0.00037	0.0001	0.111
isocitric acid	273	24.5404	0	0.001571	0	0.00021	0.00017	0	3E-05	0.323
Isocitric acid (4TMS)	285	24.5457	0	0.000194	0	0.00021	0.00017	0	0	0.479
itaconic acid	147	13.1617	0.00318	0.025356	0.00069	0.00332	0.00138	0.00023	0.0002	0.280
L-(+) lactic acid	147	6.2038	0.00359	0.006644	0.00452	0.00622	0.00363	0.00444	0.0065	0.665
lactobionic acid	217	38.6417	0.00013	0.080083	0.00025	0.00468	0.00152	0.00049	0.0006	0.353
Lactobionic acid (TMS) BP	204	38.1596	0	0	0	0	0	0	0	.
Lactobionic acid (TMS) MP	204	42.6458	0	0	0	0	0	0	0	.
L-glutamic acid	246	19.9615	0.00095	0.029745	0.00041	0	0	0.00615	0.0008	0.493
L-glutamic acid (dehydrated)	156	17.5561	0.00056	0.001101	0.00068	0.0018	0.00286	0.00059	6E-05	0.203
L-pyroglutamic acid	156	17.5617	0	0	0	0	0.00202	0	9E-06	0.452
Maleamic acid (2TMS) BP	244	17.0687	0	0	0	0	0	0	0	.
maleamic acid	244	17.4703	2.5E-06	0	0	9.9E-06	2.5E-05	0	0	0.548
maleic acid	147	12.1764	0.00117	0.000179	3.7E-05	0	0.00027	0	0	<u>0.000</u>
malonic acid	147	9.636	0.00627	0.002243	0.00017	8.3E-05	0.00495	0.00022	0	0.072
mucic acid	333	29.0451	0.00018	0.002945	0.00019	0.00049	0.00047	0.00024	2E-05	0.263
myristic acid	285	24.5506	0.00015	6.35E-05	0.00013	6.8E-05	7.9E-05	0.00012	0.0002	0.532
nicotinic acid	180	11.7913	0	9.64E-05	0	1.1E-05	1.2E-05	5.1E-06	0	0.316
N-methyl-DL-glutamic acid	260	22.0909	0	0.000147	0	6.3E-05	0	0.00014	0	<u>0.025</u>

Πίνακας 2	MZ	RI	AVG CTRL	AVG GA 25	AVG GA 50	AVG GA 75	AVG IA 25	AVG IA 50	AVG IA 25	P
palmitic acid	313	28.353	0.00297	0.013735	0.00195	0.00491	0.00273	0.00255	0.0036	0.319
pantothenic acid	291	27.7329	0	8.76E-06	0	7.6E-06	7.3E-06	7.4E-06	0	0.798
pipecolic acid	84	11.0334	2.8E-05	0.000289	7.5E-05	0.00018	0	1.7E-05	0	0.060
Propanoic acid, 2amino2meth pyrrole -2-carboxylic acid	160 240	10.212 13.4392	0 0	0 0	0 0	0 0	0 0	0 0	0 0	.
pyruvic acid	174	5.9708	1.9E-05	1.17E-05	6E-06	4.7E-06	3.6E-06	0	1E-05	0.470
Ribonic acid (5TMS)	73.5	23.8275	0	3.3E-05	0	0.00015	7.7E-05	0	0	0.588
ribonic acid-gamma-lactone	147	20.7328	0	0.000683	0	0	0	0	0	0.340
shikimic acid	204	24.239	0	0	0	0	7.4E-05	0	0	<u>0.002</u>
stearic acid	341	31.8528	0.00431	0.02546	0.00355	0.00855	0.00497	0.00449	0.0055	0.311
succinic acid	148	12.3827	0.00149	0.003408	0.00062	0.00077	0.00124	0.00087	0.0003	0.406
tartaric acid	147	23.4902	0.00081	0.017653	0.00125	0.00211	0.00181	0.0009	7E-05	0.321
tartronic acid	147	14.5569	0	0	0	0	2.8E-06	0	0	0.451
Threonic acid1,4lactone (2TM)	147	13.9824	0	0	0	0	0	0	0	.
trans-aconitic acid	229	22.7919	6.8E-05	0.000219	2.7E-05	0	7.9E-05	7.5E-05	0	0.324
Σάκχαρα										
cellobiose	204	39.8208	3.7E-05	3.18E-05	0.00024	8.5E-06	1.2E-05	0.00013	0	0.418
alphaDGalactopyranosyl(1,4)	217	40.5023	0	0	0	0.00013	0	0	0	0.451
alphaD-Galactopyranosyl(1,4)	204	40.5227	0	0	0	0	0	0	0	.
Arabinose	103	21.1556	9.8E-05	1.77E-05	3.9E-06	0	7.7E-05	3.1E-05	6E-05	0.164
betaDAllose (5TMS)	204	25.0423	0	7.48E-05	0	0	0	3.4E-05	0	0.530
Cellobiose, D	204	39.2835	2.4E-05	0.000373	0	0.00064	6.7E-05	2E-05	0	0.167
D-(+) trehalose	361	40.507	0.00023	0.011924	0.00026	0.02093	0.00032	0.00093	0.0085	<u>0.002</u>
D-(+)altrose	205	26.581	0.00544	0.002095	0.00031	0.00032	0.0011	0	0.0002	0.598
D-allose	319	26.2462	0.00032	0.003007	0.00041	0.00037	0.00266	0.00298	0.001	0.733
D-glucose	319	26.2516	0.11544	0.021291	0.00692	0.00209	0.02974	0.03697	0	<u>0.003</u>
D-lyxose	217	21.2757	0.00028	1.31E-05	1.2E-05	0	0.00013	6.5E-05	0	<u>0.000</u>
D-lyxose	217	21.2908	0	0	8.4E-06	0	0	0	0	0.451
fructose 1	307	25.7453	0.04035	0.002699	0.00776	0.00017	0.01497	0.02431	0	<u>0.004</u>
Gentiobiose (1MEOX) (8TMS) BP	204	40.5321	0	0	0	0	0	0	0	.
Glucopyranose [H2O] (4TMS)	217	23.4047	0.00013	0.000167	6.5E-05	0.00013	0.00025	0.00016	0	<u>0.001</u>
Glucopyranose, D (5TMS)	204	31.4377	6.3E-05	0.032846	0.00011	0.0007	8.8E-05	4E-05	0.0001	<u>0.031</u>
Glucopyranose, D (5TMS)	204	25.6601	0.00071	0.000457	8E-05	0.00026	0.00013	0.00026	0	0.242
Glucose, 1,6anhydro, beta	204	21.9601	0	0	0	0	0	0	0	.
Idose (1MEOX) (5TMS) MP	157	25.6935	0	0	0	0	0	0	0	.
isomaltose	361	42.065	6E-05	0.001406	3.2E-06	7.8E-05	4.1E-05	3.8E-05	0	0.412
lactose	204	37.7683	0.0014	0.017349	0.00128	0.00082	0.00158	0.00132	5E-05	0.386
Laminaribiose (1MEOX)	361	38.2729	0	0	0	0	0	0	0	.
leucrose	361	40.5422	0	0	0	0	0	0	0	.
maltose	361	40.5399	0.00015	6.49E-05	3.8E-05	1.4E-05	2.9E-05	2.4E-05	0	<u>0.018</u>
maltotriose	361	49.9415	0	0.002007	0	0	0	0	0	0.332
melezitose	361	49.9505	2.8E-06	0.000401	0	4.7E-05	1.3E-06	3E-06	0	0.358
melibiose	361	40.9785	0.00017	0	0.00013	0	0.00018	8.8E-05	0	<u>0.007</u>
palatinose	361	41.9482	1.6E-05	0	0	0	5.4E-05	0	0	0.141

Πίνακας 2	MZ	RI	AVG CTRL	AVG GA 25	AVG GA 50	AVG GA 75	AVG IA 25	AVG IA 50	AVG IA 25	P
Raffinose	87	48.9954	0.00114	0.024245	0.00064	0.00039	0.01042	0.00091	0.0001	0.440
Sorbose (1MEOX) (5TMS) BP	103	25.7447	0.03888	0.000429	0.0072	0.00029	0.01269	0.02431	8E-05	<u>0.008</u>
Sucrose	361	39.0556	0.454	0.757655	0.14989	0.06266	0.23983	0.19251	0.0082	0.453
tagatose	217	25.358	0.02332	0.002091	0.00433	0.00027	0.00967	0.01556	0.0002	<u>0.004</u>
Tagatose (1MEOX) (5TMS) BP	117	18.2407	0	0	0	0	0	0	0	.
talose	319	26.5827	0.02235	0.001655	0.00059	0.00068	0.00259	0.00386	2E-05	<u>0.001</u>
Trehalose, alpha,alpha', D	361	40.5075	9.3E-06	0.006073	0	0.02086	0	0.00085	0.0085	<u>0.001</u>
Xylose (1MEOX) (4TMS) MP	117	18.338	0	0	0	0	0	0	0	.
Xylulose	205	21.6275	0	0	0	0	0	0	0	.
Φωσφορικές ενώσεις										
D-glucose-6-phosphate	387	34.0189	5.4E-05	0.00101	7.6E-05	0.00011	0.00016	0.00024	0	0.412
D-sphingosine	204	35.8787	4E-05	3.96E-05	4.2E-05	6.1E-05	5.5E-05	5E-05	0	0.079
glycerol 1-phosphate	357	23.3262	6.8E-06	0.001083	1.2E-05	0.00043	9.4E-05	0.00018	0	0.282
Glycerophosphoglycerol (5TMS)	357	31.7572	0	0.000117	0	1.5E-05	1.2E-05	2.6E-05	0	0.085
Inositol2phosphate, myo	318	35.4515	9.3E-06	8.02E-05	3.9E-06	7.2E-05	7.9E-05	3.5E-05	0	<u>0.002</u>
isopropyl beta-D-1-thiogalactopyranoside	217	27.2746	0.00148	0	0	0	0	0	0	0.451
O-phosphocolamine	299	23.5977	8.6E-06	0.001136	1.2E-05	0.00023	0.0001	0.00028	0	0.374
phosphoric acid	299	11.4972	0.00632	0.303133	0.0112	0.04308	0.02155	0.04926	0.0013	0.285
Phosphoric acid monomethyl est	241	9.0216	0.00023	0.000984	4.3E-05	0.0007	0.00081	0.00101	6E-05	<u>0.013</u>
pyrophosphate	451	21.1974	6.8E-05	0.000262	0	9.5E-06	0	3.8E-06	0	0.266
Πολυόλες										
Erythritol (4TMS)	217	17.5934	9.3E-06	0	0	8.2E-05	0	0	0	0.474
acetol	219	18.6186	7E-05	0	3.9E-05	5.6E-05	8.8E-05	3.9E-05	0	<u>0.038</u>
allo-inositol	318	27.3096	0.00058	0.033972	0.00069	0.00705	0.0015	0.00312	0.0003	0.315
arabitol	217	22.523	0.00212	9.37E-05	0.00017	0.00022	9.8E-05	0.00017	0.0003	0.512
Cellobiitol (9TMS)	204	37.7708	0	0	0	0	0	0	0	.
D-mannitol	319	26.8592	0.00046	0.006698	0.00034	0.00235	0.00059	0.00056	0.006	<u>0.027</u>
D-sorbitol	319	27.0938	4.7E-05	7.21E-05	2.3E-05	0	0	0	0	0.621
D-threitol	217	17.415	0	0	0	8.2E-05	0	0	0	0.451
galactinol	204	43.8713	0.00205	0.020485	0.00025	0.01083	0.00426	0.00332	0.006	0.571
glycerol	147	11.5528	0.00161	0.007836	0.00237	0.00989	0.00192	0.00177	0.0026	<u>0.000</u>
Inositol, myo (6TMS)	305	29.785	0.04588	0.026012	0.00553	0.02449	0.04329	0.01206	0.0023	0.083
maltotriitol	361	55.3225	0	0.001426	0	2.1E-05	0	0	0	0.342
Ononitol (5TMS)	217	27.2474	0.00667	0.003885	0.00238	0.0036	0.00849	0.00489	1E-04	<u>0.037</u>
palatinitol	361	41.6202	1.8E-05	2.91E-05	1.2E-05	0	0	5.5E-06	0	0.512
Pinitol, D (5TMS)	260	24.8622	0.13153	0.261091	0.08732	0.33293	0.13795	0.12475	0.029	0.216
pyrogallol	239	18.1101	1.2E-05	0	5.7E-05	0	5.2E-06	3.5E-05	0	<u>0.040</u>
ribitol	217	23.6162	0.00177	0	4.2E-05	0.0005	0	6.5E-05	0.0027	0.607
Sorbitol (6TMS)	319	26.86	9.3E-05	0	0.00026	0	0	0	0	0.517
Αζωτούχες ενώσεις										
Serine, Nacetyl (2TMS)	186	17.2912	0	0	0	0	0	0	0	.
2-aminoethanethiol	174	33.8425	0	0.002059	0	0.00018	6.6E-05	8.7E-05	0	0.250
5-hydroxy-L-tryptophan	290	35.2445	5.5E-05	0.0002	1.8E-05	1.4E-05	1.6E-05	1.7E-05	0	0.124
acetyl-L-serine	174	14.5421	0	0	0	0	0	0	0	.

Πίνακας 2	MZ	RI	AVG CTRL	AVG GA 25	AVG GA 50	AVG GA 75	AVG IA 25	AVG IA 50	AVG IA 25	P
adenosine	236	38.4772	2.4E-05	4.9E-06	0	0	4.1E-05	2.3E-05	0	0.218
allantoin	331	25.7702	2.4E-06	0.008251	2.3E-05	0.00158	9E-05	0.00044	0	0.104
Beta- alanine	248	15.2744	7E-05	6.13E-05	5.4E-05	5.8E-05	6.7E-05	7.7E-05	9E-06	0.540
beta-cyano-L-alanine	141	13.9466	7.7E-05	0.003299	7.2E-06	0.00037	1E-05	0.00012	0	0.239
citrulline	157	24.3645	0	0.004809	0	0.00056	0	2.5E-05	0	0.159
D-lyxosylamine	103	21.2799	4.1E-05	0	4.7E-06	0	0	0	0	0.469
D-lyxosylamine	217	21.2844	2E-05	0	1.7E-05	0	6.4E-06	3.9E-06	0	0.676
Ethanolamine (3TMS)	174	11.2174	0.00524	0.005102	0.00294	0.0054	0.0048	0.00479	0.005	0.352
gly-pro	174	27.4642	0	0.000352	0	3.6E-05	9E-07	0	0	0.304
L-norleucine	158	11.3949	0.00031	0.000183	5.9E-05	0.00019	0.00027	0.00015	0	0.115
Lysine, 5hydroxy (4TMS)	174	17.3157	0.00086	0.000131	8.2E-05	3.3E-05	0.00077	0.00044	0.0004	0.468
N-acetyl-D-glucosamine	319	30.7293	0.00024	0.0008	0.00013	0.00013	0.00129	0.00014	2E-05	0.430
N-acetyl-D-mannosamine	205	29.6695	2.2E-05	0	0	0	9.2E-06	9.9E-06	0	0.278
phenylethylamine	174	17.3131	0.00017	0.001287	0.00031	0.00029	0.00015	0.00017	0.0002	0.282
porphine	285	12.9069	0.00266	0.011807	0.00235	0.00344	0.0028	0.00308	0.0052	0.456
putrescine	174	22.4244	0.00016	0.008945	4.4E-05	0.00214	9.4E-05	0.00046	4E-05	0.208
Sphingosine (3TMS)	204	26.9448	0	6.8E-06	1.7E-05	1.2E-05	8.1E-05	8.9E-06	0	0.096
trans-3-hydroxy-L-proline	230	17.7905	0	0	0	0	0	0	0	.
trans-4-hydroxy-L-proline	230	17.7902	0	0	0	0	0	0	0	.
Tryptamine, 5hydroxy (3TMS)	204	39.2835	0.0005	9.99E-06	1.4E-05	0	0.0003	0.00073	0	0.643
Tryptophan, 5hydroxy (3TMS)	218	19.977	1.5E-05	0.000348	0	1.2E-05	0.00015	0.00021	0	0.152
Tryptophan, Nacetyl (3TMS)	202	43.5752	0	0	0	0	0	0	0	.
uracil	241	13.4616	2.4E-05	0.001433	2.8E-05	0.00044	9.4E-05	0.00013	0	0.206
urea	147	10.4317	0.0002	0.015829	0.00078	0.00572	0.00114	0.00432	0.0004	0.090
xanthine	353	28.2929	0	1.42E-05	0	0	0	0	0	0.451
Άλλα										
1-methylhydantoin	171	12.7579	0	0.000284	0	0.00042	0	0	0	0.550
arbutin	254	37.9973	0	0.000349	0	5.7E-05	0	2E-05	0	0.222
benzene-1,2,4-triol	342	19.5147	0	0	0	6.2E-06	5.8E-06	1.3E-05	0	<u>0.014</u>
Cadaverine (4TMS)	174	24.4585	0.00097	0.013569	0.00098	0.00492	0.00064	0.00385	0	<u>0.001</u>
Calystegine B2 (4TMS)	217	29.5384	0	0	0	0	0	0	1E-05	0.451
Galactopyranoside, 1Omethyl 1	175	25.0477	0.00023	0.011469	0	0.00507	0.001	0.00059	0	<u>0.026</u>
Galactopyranoside, 1Omethyl 2	204	26.1534	0	0	4.9E-05	0	0	0	0	0.451
L-galactono-gamma-lactone	147	25.8544	0	0	0	0	0.00048	0	0	0.451
Methyl 3,6anhydroalphaDgal	129	25.0603	0	0	0	0	0	0	0	.
methyl-beta-D-galactopyranoside	204	26.0499	0.00037	0.075648	0.00015	0.00507	0.00095	0.00086	0.0001	0.340
Salicylic acid glucopyranoside	361	37.8887	8.3E-05	0.002116	0	0.00098	0	0	0	<u>0.005</u>

Πίνακας 3: Μεταβολίτες φύλλων USA

Αμινοξέα	MZ	RI	AVG Control	AVG GA 50	AVG IA 25	AVG IA 75	P
Asparagine (2TMS)	159	19.2843	0	0	0	0	.
Asparagine (4TMS) BP1	188	20.3185	0	0	0	0	.
Asparagine (4TMS) BP2	188	25.28255	0	0	0	0	.
Asparagine (4TMS) MP	188	19.7792	0	0.000361	0	0	0.374
Asparagine [+CO2] (4TMS)	232	27.0455	0	2.73E-06	0	0	0.474
Asparagine [H2O] (2TMS)	243	17.00445	0	0	0	0	.
aspartic acid	232	17.6857	0.032219	0.010681	0.00773	0.000625	0.072
Aspartic acid (2TMS)	160	15.17855	0.002857	0.00049	0	0	<u>0.011</u>
DL-isoleucine	86	8.8437	0.00659	0.008702	0.019434	0.000804	0.186
Glutamic acid (2TMS)	84	17.7832	0.01114	0.009572	0.005664	0	0.499
glycine	174	12.2403	0.0028	0.005553	0.005132	0.004919	0.509
Isoleucine (1TMS)	86	8.852	0.000438	0.001214	0.002042	0.000109	0.491
L-alanine	116	7.1398	0.027167	0.065825	0.042424	0.008997	0.088
L-asparagine	231	21.1201	0	0.008162	0.001394	0	0.232
L-glutamine	156	23.2862	0	0	0	0	.
L-leucine	86	8.3469	0	0	0.001649	0	0.107
L-leucine	158	11.3959	0	0.005429	0	7.58E-06	0.226
L-lysine	317	26.3072	0	0	0.000734	0.000343	0.519
L-methionine	176	17.50425	0	0	0	0	.
L-ornithine	174	24.2525	0	0	0	0.004064	<u>0.000</u>
L-proline	142	11.9658	0.003479	0.096887	0.015841	0.038659	0.089
L-serine	204	13.7559	0.051325	0.312415	0.223071	0.020722	<u>0.027</u>
L-threonine	218	14.44595	0.014286	0.04083	0.027007	0.006197	0.074
L-tryptophan	202	31.7256	0	0.000583	0.000198	0	0.573
L-valine	144	9.94585	0.007706	0.019837	0.019577	0.001865	0.081
Lysine (3TMS)	174	24.7989	0	0.001416	0.000825	0	0.621
Phenylalanine (2TMS)	192	19.98155	0	0	0.001806	0.000498	0.168
Proline (1TMS)	70	8.7899	0	0.015544	0.001583	0.012992	0.415
Proline [+CO2] (2TMS)	186	18.97775	0	0.001259	0.00052	0.001087	0.508
Serine (2TMS)	132	10.9664	0.00946	0.060548	0.030289	0.010407	0.589
Tryptophan (2TMS)	202	31.4172	0.002123	0.000524	0.001845	0.000236	0.430
tyrosine	218	26.6306	0	0	0	0	.
Valine (1TMS)	72	6.7392	0.000384	0.001283	0.0014	0.000225	0.647
Οργανικά οξέα							
Butanoic acid, 3hydroxy (2TM	147	8.53025	0	0	0	0	.
2,3-dimethylsuccinic acid	147	17.0372	0.017388	0.00359	0.006526	0.004118	<u>0.036</u>
2-isopropylmalic acid	147	18.9937	0	0	0	0	.
2-keto-L-gulonic acid	204	25.4942	0.03901	0.043741	0.053279	0	0.098
2-Piperidinecarboxylic acid	156	13.65105	0	0	0	0	.
3-hydroxy-3-methylglutaric acid (dicrotalic acid)	247	19.56075	0	0	0	0	.
3-hydroxycinnamic acid	293	26.4408	0	0.003489	0	0	0.474
4-guanidinobutyric acid	174	17.7631	0.008404	0.015623	0.022539	0.002976	0.365
4-hydroxybenzoic acid	267	19.91165	0.000439	0.000626	0.000854	0.00011	0.431
4-hydroxycinnamic acid	293	26.4337	0.006706	0.00473	0.005628	0.000784	<u>0.011</u>
5-aminovaleric acid	174	19.9937	0	0	0	0	.

Πίνακας 3

	MZ	RI	AVG Control	AVG GA 50	AVG IA 25	AVG IA 75	P
6-hydroxy caproic acid	147	12.7093	0	0	0	0	.
alpha ketoglutaric acid	147	18.9726	0	0	0	0	.
Arabinonic acid (5TMS)	292	23.8275	0	0.000137	0	0.000126	0.295
arachidic acid	369	35.0895	0	0	0	0	.
benzoic acid	179	10.5887	0.002723	0.001041	0.001465	0.000605	<u>0.006</u>
Butanoic acid, 2,4dihydroxy	204	37.7802	0.000204	0	0.000124	0	0.582
caffeic acid	396	30.2105	0.000489	0.000202	0.00028	0.000102	<u>0.015</u>
citraconic acid	147	11.3376	9.23E-05	0	0	7.42E-05	0.551
citramalic acid	147	16.5188	0.005405	0	0.001081	5.82E-05	<u>0.001</u>
citric acid	347	24.46305	1.734596	0.177483	0.238391	0.073194	<u>0.000</u>
D-malic acid	147	16.9511	0.266706	0.010677	0.040599	0.001567	<u>0.001</u>
D-saccharic acid	333	28.46255	0.295917	0.38204	0.183107	0.023236	<u>0.029</u>
Erythronic acid (4TMS)	292	18.4479	0	0	0.000167	0.000508	0.086
ferulic acid	338	29.3445	0.001422	0.00246	0.002696	0.000328	<u>0.025</u>
fumaric acid	245	13.2141	0.000658	0.000115	0.001313	0.000193	0.318
galacturonic acid	333	24.297	0.043733	0.010204	0.020091	0.001558	<u>0.000</u>
galacturonic acid	333	24.2969	0	0	0	0	.
gentisic acid	355	23.0871	0.000356	0	2.33E-05	0	<u>0.006</u>
Glucaric acid1,4lactone (4TM	217	27.11695	0.023925	0.015608	0.021228	0.000824	0.480
Glucoheptonic acid1,4lactone	217	22.8085	0.02977	0.009681	0.026578	0.004615	0.262
gluconic acid	333	28.1587	0.107906	0.062543	0.065832	0.005408	<u>0.036</u>
Gluconic acid (6TMS)	292	27.57115	0.011998	0.00835	0.003151	0	0.388
gluconic acid lactone	275	25.8437	0.049846	0.230651	0.066892	0.005798	0.108
Glutaric acid, 2hydroxy (3TM	247	18.962	0.000119	0	0.000151	0	0.623
glyceric acid	189	13.0112	0.018568	0.014212	0.015159	0.000569	<u>0.044</u>
glycolic acid	147	6.5166	0.002653	0.002538	0.003744	0.000275	0.059
Gulonic acid (6TMS)	292	27.5353	0.040714	0.006426	0.003583	0.00377	0.440
isocitric acid	273	24.5404	0	0	0.000311	0	0.474
Isocitric acid (4TMS)	285	24.5457	0.004834	0	0.00031	0	0.434
itaconic acid	147	13.1617	0.017008	0.021967	0.058343	0.011176	0.203
L-(+) lactic acid	147	6.2038	0.036756	0.071406	0.068491	0.047105	0.647
lactobionic acid	217	38.6417	0.015161	0.006911	0.017448	0.008911	0.290
Lactobionic acid (TMS) BP	204	38.15955	0.001284	0	0	0	0.474
Lactobionic acid (TMS) MP	204	42.6458	0	0	0	0	.
L-glutamic acid	246	19.9615	0.122809	0	0.107971	0	<u>0.017</u>
L-glutamic acid (dehydrated)	156	17.5561	0	0.019573	0.00469	0.003015	<u>0.026</u>
L-pyroglutamic acid	156	17.5617	0.000401	0	0.001469	0	0.555
Maleamic acid (2TMS) BP	244	17.0687	0	0	4.38E-05	0	0.170
maleamic acid	244	17.4703	0.000749	0.002182	0.002163	8.77E-06	0.393
maleic acid	147	12.1764	0.001492	0	0.00035	4.89E-05	<u>0.006</u>
malonic acid	147	9.636	0.000241	0.000236	0	0	0.646

Πίνακας 3	MZ	RI	AVG Control	AVG GA 50	AVG IA 25	AVG IA 75	P
mucic acid	333	29.04505	0.004471	0.003813	0.004527	0.001405	0.155
myristic acid	285	24.5506	0.002721	0.001599	0.000552	0.001895	0.533
nicotinic acid	180	11.7913	8.32E-05	0	0.000143	1.4E-05	0.469
N-methyl-DL-glutamic acid	260	22.0909	0	0	0	0	.
palmitic acid	313	28.353	0.023391	0.020768	0.015925	0.008055	0.132
pantothenic acid	291	27.7329	0	0	0	0	.
pipecolic acid	84	11.03335	0	0	0	7.46E-05	<u>0.014</u>
Propanoic acid, 2amino2meth	160	10.212	0	0	0	0	.
pyrrole -2-carboxylic acid	240	13.4392	0	0.000228	0	0.000153	0.485
pyruvic acid	174	5.9708	0	0	0.000128	5.79E-05	0.509
Ribonic acid (5TMS)	73.5	23.8275	0.004143	0.002507	0.003627	0.000284	0.295
ribonic acid-gamma-lactone	147	20.73275	0.002459	0	0.000253	0	<u>0.000</u>
shikimic acid	204	24.239	0.00177	0.003121	0.005536	0	<u>0.018</u>
stearic acid	341	31.8528	0.035181	0.023921	0.020619	0.010691	<u>0.041</u>
succinic acid	148	12.3827	0.027829	0.005642	0.009677	0.001582	<u>0.000</u>
tartaric acid	147	23.4902	0.081708	0.010013	0.028174	0.00081	<u>0.001</u>
tartronic acid	147	14.5569	0.000326	0	0.000223	0	0.146
Threonic acid1,4lactone (2TM	147	13.98235	0.005712	0	0	0	<u>0.004</u>
trans-aconitic acid	229	22.7919	0.006933	0	0	0	0.474
Σάκχαρα							
cellobiose	204	39.8208	0.00401	0.010979	0.001816	0.000135	0.554
alphaDGalactopyranosyl(1,4)	217	40.5023	0	0	0.00177	0.000152	0.492
alphaD-Galactopyranosyl(1,4)	204	40.52265	0	0	0	0	.
Arabinose	103	21.15555	0.002395	0.000138	0	0	0.264
betaDAllose (5TMS)	204	25.0423	0.008458	0.007286	0.009004	0	0.607
Cellobiose, D	204	39.2835	0.116114	0.520818	0.037832	0.008972	0.391
D-(+) trehalose	361	40.507	0.006818	0.002646	0.007332	0.000693	0.205
D-(+)altrose	205	26.581	0.176183	0	0	0	0.082
D-allose	319	26.24615	0.210659	0.146503	0.278742	0	0.645
D-glucose	319	26.25155	2.297872	1.737669	2.722701	0.396375	0.105
D-lyxose	217	21.2757	0.00189	0.002333	0.001246	0	0.278
D-lyxose	217	21.2908	0.001845	0	0.00105	0	0.619
fructose 1	307	25.7453	0.223079	0.228364	0.200487	0.007127	0.295
Gentiobiose (1MEOX) (8TMS) BP	204	40.53205	0.007403	0.010325	1.71E-05	0	0.543
Glucopyranose [H2O] (4TMS)	217	23.4047	0.014831	0.009221	0.012876	0.000922	0.464
Glucopyranose, D (5TMS)	204	31.4377	0.000804	0.018579	0.033942	0	0.584
Glucopyranose, D (5TMS)	204	25.6601	0.020092	0.006264	0.004061	0.003082	0.337
Glucose, 1,6anhydro, beta	204	21.9601	0.000557	0.000867	0.000875	0	0.787
Idose (1MEOX) (5TMS) MP	157	25.6935	0	2.47E-05	9.1E-05	0	0.195
isomaltose	361	42.065	0.000258	7.08E-05	0.000144	3.21E-05	0.784
lactose	204	37.7683	0.012534	0.028473	0.035719	0.001054	0.162
Laminaribiose (1MEOX) (8TMS) B	361	38.2729	0	1.46E-05	0.001562	0	0.110
leucrose	361	40.5422	0.00412	0.008274	0.01142	0	0.590
maltose	361	40.5399	0.020164	0.02659	0.044276	0.000149	<u>0.017</u>

Πίνακας 3	MZ	RI	AVG Control	AVG GA 50	AVG IA 25	AVG IA 75	P
melibiose	361	40.9785	0.016086	0.008433	0.010843	0	<u>0.001</u>
palatinose	361	41.9482	0.000338	0.016763	0.025517	0	0.399
Raffinose	87	48.9954	0.004458	0.02691	0.036477	0.000365	<u>0.003</u>
Sorbose (1MEOX) (5TMS) BP	103	25.7447	0.121702	0.000107	0.049429	0.001109	0.341
Sucrose	361	39.0556	5.545391	6.62209	7.316113	0.354049	0.091
tagatose	217	25.358	0.117271	0.017106	0.026828	0.004038	0.108
Tagatose (1MEOX) (5TMS) BP	117	18.24065	0.003814	0.003456	0.003051	0.000187	0.771
talose	319	26.5827	0.463588	0.260288	0.550096	0.0841	0.101
Trehalose, alpha,alpha', D	361	40.5075	0	0.000894	0.000469	0	0.585
Xylose (1MEOX) (4TMS) MP	117	18.338	0.003102	0.001116	0.002603	0.000174	0.682
Xylulose	205	21.6275	0	0.000465	0.000172	0	0.498
Φωσφορικές ενώσεις							
Glycerophosphoglycerol (5TMS)	357	31.7572	0.00129	0.000267	0.000179	5.07E-05	0.209
D-glucose-6-phosphate	387	34.0189	0.001152	0.000193	0.002182	0	0.171
D-sphingosine	204	35.8787	0.000579	0.00035	0.000422	0.000371	0.866
glycerol 1-phosphate	357	23.3262	0	0	0	5.74E-05	0.277
Inositol2phosphate, myo	318	35.4515	0	0	0	0	
isopropyl beta-D-1-thiogalactopyranoside	217	27.27455	0	0.01137	0.010787	0.002736	0.588
O-phosphocolamine	299	23.5977	0	0	0	0	
phosphoric acid	299	11.4972	0.011272	0.005404	0.036962	0.002311	0.137
Phosphoric acid monomethyl est	241	9.0216	5.76E-06	1.43E-05	5.48E-05	0.000198	<u>0.000</u>
pyrophosphate	451	21.1974	0	0	0	0	
Πολυόλες							
Erythritol (4TMS)	217	17.5934	0.000895	0	4.73E-05	0.000297	0.198
acetol	219	18.6186	0.020003	0.026239	0.116607	0.003188	0.099
allo-inositol	318	27.30955	0.005276	0	0.021922	0.003179	0.091
arabitol	217	22.523	0	0	0	0	
Cellobiitol (9TMS)	204	37.7708	0	0	0	0	
D-mannitol	319	26.8592	0.008049	0.008335	0.007282	0.001046	<u>0.033</u>
D-sorbitol	319	27.0938	0	0.015991	0.006648	0.001489	0.620
D-threitol	217	17.415	0.003265	0.002578	0.004836	0.00028	0.076
galactinol	204	43.8713	0.008427	0.009419	0.054965	0.000288	<u>0.009</u>
glycerol	147	11.5528	0.044013	0.066186	0.051489	0.021629	0.533
Inositol, myo (6TMS)	305	29.785	1.014762	0.099605	0.161375	0.005296	<u>0.011</u>
maltotriitol	361	55.3225	0.00028	0	0.000119	0	0.067
Ononitol (5TMS)	217	27.2474	0.153453	0.061478	0.11574	0.00233	0.388
palatinitol	361	41.62015	0.000186	0.000673	0.00047	0	<u>0.009</u>
Pinitol, D (5TMS)	260	24.8622	2.799956	0.901397	2.092183	0.294843	0.250
pyrogallol	239	18.11005	0.000178	0	0	0	<u>0.008</u>
ribitol	217	23.6162	0.001131	0.002859	0.000276	0.000467	0.455
Sorbitol (6TMS)	319	26.85995	0	0	0.000803	0.001521	0.458
Αζωτούχες ενώσεις							
2-aminoethanethiol	174	33.8425	0	0	0	0	

Πίνακας 3	MZ	RI	AVG Control	AVG GA 50	AVG IA 25	AVG IA 75	P
acetyl-L-serine	174	14.54205	0	0	0	0	.
adenosine	236	38.4772	4.51E-05	0.003572	0.003013	0.00031	0.270
allantoin	331	25.77015	0	0	0	0.000805	<u>0.000</u>
Beta- alanine	248	15.2744	0.000104	0.000657	0.001053	7.1E-05	0.053
beta-cyano-L-alanine	141	13.9466	0	0	0	0	.
citulline	157	24.3645	0	0	0	0.001114	<u>0.000</u>
D-lyxosylamine	103	21.2799	0	0.00051	0.000348	0	0.633
D-lyxosylamine	217	21.28435	0.003193	0	0	0	0.098
Ethanolamine (3TMS)	174	11.2174	0.026963	0.016925	0.023118	0.012037	0.705
gly-pro	174	27.4642	0	0	0	0	.
L-norleucine	158	11.3949	0.003779	0.008961	0.012768	0.000435	0.267
Lysine, 5hydroxy (4TMS)	174	17.31565	0.003843	0.00111	0.00263	0.000283	0.633
N-acetyl-D-glucosamine	319	30.7293	0.035853	0.07332	0.033907	0.001971	0.262
N-acetyl-D-mannosamine	205	29.6695	0	5.98E-05	4.72E-05	2.48E-05	0.358
phenylethylamine	174	17.31305	0.002203	0.002296	0.000528	0.000894	0.414
porphine	285	12.9069	0.035819	0.051848	0.043451	0.011567	0.200
putrescine	174	22.4244	0	5.45E-06	0.001032	0	0.157
Serine, Nacetyl (2TMS)	186	17.2912	0	0	0	0	.
Sphingosine (3TMS)	204	26.94475	0.001453	5.23E-05	0.00107	0	0.451
trans-3-hydroxy-L-proline	230	17.7905	0	0	0	0.00019	<u>0.012</u>
trans-4-hydroxy-L-proline	230	17.7902	0	0	0	0.000605	<u>0.000</u>
Tryptamine, 5hydroxy (3TMS)	204	39.2835	0	0	0	0	.
Tryptophan, 5hydroxy (3TMS)	218	19.977	0	0	0.002059	0	0.474
Tryptophan, Nacetyl (3TMS)	202	43.5752	0	0	0	0	.
uracil	241	13.4616	9.32E-05	0.000406	0.00012	0	0.293
urea	147	10.4317	0.002826	0.007328	0.005671	0.004383	0.585
xanthine	353	28.2929	0	0	0	0	.
Άλλα							
1-methylhydantoin	171	12.7579	0.042383	0.078647	0.213698	0.024381	0.266
arbutin	254	37.9973	0	0	0	0	.
benzene-1,2,4-triol	342	19.5147	0.00111	0.001871	0.000821	4.47E-05	0.062
Cadaverine (4TMS)	174	24.4585	0	0	0	0	.
Calystegine B2 (4TMS)	217	29.53835	0	0	0.000149	0	0.474
Galactopyranoside, 1Omethyl 1	174.5	25.04765	0.035208	0.009381	0.014659	0.001595	0.367
Galactopyranoside, 1Omethyl 2	204	26.15335	0.058634	0.002131	0.024026	0.003016	<u>0.026</u>
L-galactono-gamma-lactone	147	25.8544	0.047581	0.002509	0	0	0.489
Methyl 3,6anhydroalphaDgal	129	25.0603	0	0	0	0	.
methyl-beta-D-galactopyranoside	204	26.0499	0.082294	0.045695	0.040351	0.00453	<u>0.001</u>
Salicylic acid glucopyranoside	361	37.8887	0.004882	0.000951	0.001083	0	0.082

Πίνακας 4: Μεταβολίτες ρίζας USA

	MZ	RI	AVG Ctrl	AVG GA 25	AVG GA 50	AVG GA 75	AVG IA 25	AVG IA 50	AVG IA 75	P
Αμινοξέα										
Asparagine (2TMS)	159	19.284	0.00033	0.00099	0.00021	0.00012	0.0008	0.0018	0.00015	<u>0.000</u>
Asparagine (4TMS) BP1	188	20.319	0	0.00115	0.0105	0	7E-05	0	0	0.465
Asparagine (4TMS) BP2	188	25.283	0.00023	0.00126	0.0007	0	0	0.0004	0.00046	0.091
Asparagine (4TMS) MP	188	19.779	0.00473	0.01266	0.00981	0.00737	0.0019	0.0068	0.00579	0.448
Asparagine [+CO ₂] (4TMS)	232	27.046	0.00053	0.00412	0.00157	0.00076	0.0004	0.001	0.00109	<u>0.003</u>
Asparagine [H ₂ O] (2TMS)	243	17.004	0.00013	0.00305	0.00043	0	0.0003	0.0003	0.00022	<u>0.000</u>
aspartic acid	232	17.686	0.00607	0.00483	0.00275	0.01069	0.0086	0.0021	0.00069	<u>0.000</u>
Aspartic acid (2TMS)	160	15.179	0.00037	0.00015	0.00011	0.00078	0.0007	0.0002	4.1E-05	<u>0.000</u>
DL-isoleucine	86	8.8437	0.00033	0.00073	0.00019	2.7E-05	0.0008	0.0001	0.00014	<u>0.001</u>
Glutamic acid (2TMS)	84	17.783	0	0	0.00017	0.00036	0.0003	0	5.7E-05	<u>0.011</u>
glycine	174	12.24	0.00199	0.00236	0.00125	0.00392	0.002	0.0017	0.00136	0.478
Isoleucine (1TMS)	86	8.852	0.00021	0.00015	4.4E-05	0	0.0002	7E-06	1.7E-05	<u>0.020</u>
L-alanine	116	7.1398	0.0009	0.00114	0.00032	0	0.0009	0.0001	0.00022	<u>0.021</u>
L-asparagine	231	21.12	0.04181	0.18125	0.06826	0.03643	0.0647	0.0749	0.0522	<u>0.005</u>
L-glutamine	156	23.286	6.7E-05	0.00018	0	0	1E-05	0	0	<u>0.004</u>
L-leucine	86	8.3469	6E-05	3E-05	1.9E-05	0	0	0	0	0.476
L-leucine	158	11.396	0.00033	0.00016	0	0	0	0	0	0.451
L-lysine	317	26.307	0.00031	0.00404	0.00027	0.00015	0.0003	0.0002	0.00111	<u>0.000</u>
L-methionine	176	17.504	2.3E-05	9E-05	8.8E-06	1.2E-05	3E-05	1E-05	2.4E-05	<u>0.006</u>
L-ornithine	174	24.253	0.00019	0.00075	7E-05	4.1E-05	0.0002	8E-05	0.00033	<u>0.007</u>
L-proline	142	11.966	0.00088	0.00058	4.2E-05	5.2E-06	0.001	5E-06	4.7E-05	0.254
L-serine	204	13.756	0.00248	0.00302	0.00141	0.00031	0.0019	0.0002	0.00062	<u>0.006</u>
L-threonine	218	14.446	0.00206	0.00244	0.00072	0.00026	0.0025	0.0003	0.00047	<u>0.000</u>
L-tryptophan	202	31.726	0	0.00056	0.00019	8.6E-05	0.0001	6E-05	3.2E-05	<u>0.000</u>
L-valine	144	9.9459	0.00192	0.00385	0.00048	0.00027	0.0021	0.001	0.00076	<u>0.000</u>
Lysine (3TMS)	174	24.799	1.8E-05	8.8E-06	0	0	0	0	0.0001	0.161
Phenylalanine (2TMS)	192	19.982	0.00037	0.00162	0.00053	0.0011	0.0004	0.0012	0.00023	<u>0.001</u>
Proline (1TMS)	70	8.7899	0.00024	7.5E-05	4.1E-05	0	0.0005	0	0	<u>0.017</u>
Proline [+CO ₂] (2TMS)	186	18.978	0	0	0	0	0	0	0	.
Serine (2TMS)	132	10.966	0.00123	0.00098	0.00105	0.00022	0.0011	0.0002	0.0003	<u>0.003</u>
Tryptophan (2TMS)	202	31.417	5.6E-05	0.00012	5.7E-05	0.00026	0	0.0002	0	<u>0.000</u>
tyrosine	218	26.631	0	0	0	0	0	0	0	.
Valine (1TMS)	72	6.7392	0.00034	0.00075	0.00012	1E-04	0.0005	0.0002	0.00017	<u>0.001</u>
Οργανικά οξέα										
Butanoic acid, 3hydroxy	147	8.5303	0	0	0	0	0	0	0	.
2,3-dimethylsuccinic acid	147	17.037	0.00052	0.00012	0.00059	0.00282	0.0002	0.0006	0	<u>0.000</u>
2-isopropylmalic acid	147	18.994	1.3E-05	4.2E-05	3.5E-05	0.0002	0	0.0002	1.2E-05	0.051
2-keto-L-gulonic acid	204	25.494	0.00051	0.00026	0.00027	0	0	0	0	0.538
2-Piperidinecarboxylic acid	156	13.651	1.1E-05	5.6E-06	5.3E-06	0	0	0	0	0.532
3-hydroxy-3-methylglutaric acid	247	19.561	0.0005	0.00045	0.00024	0.00079	0.0006	0.0009	0.00038	0.339
3-hydroxycinnamic acid	293	26.441	0	0	0	0	0	0	0	.
4-guanidinobutyric acid	174	17.763	0.00217	0.00314	0.00135	0.00034	0.0013	0.002	0.00038	<u>0.000</u>
4-hydroxybenzoic acid	267	19.912	0	0	0	0	0	0	0	.
4-hydroxycinnamic acid	293	26.434	0	0	0	0	0	0	0	.

Πίνακας 4

	MZ	RI	AVG Ctrl	AVG GA 25	AVG GA 50	AVG GA 75	AVG IA 25	AVG IA 50	AVG IA 75	P
6-hydroxy caproic acid	147	12.709	2.2E-05	6.7E-06	1.4E-05	0	6E-05	8E-05	0	0.101
alpha ketoglutaric acid	147	18.973	0.00032	0.00016	4.3E-05	0.00029	0.0002	0	0	0.424
Arabinonic acid (5TMS)	292	23.828	1.9E-05	5.9E-06	2.3E-05	2.8E-05	0	5E-05	0	0.601
arachidic acid	369	35.09	0	0	1.5E-06	4.3E-06	0	2E-06	3.1E-06	0.687
benzoic acid	179	10.589	6.4E-05	0.00015	2.9E-05	6E-05	6E-05	4E-05	8.1E-05	<u>0.000</u>
Butanoic acid, 2,4dihydroxy	204	37.78	0	0	0	7.7E-06	0	0	5.2E-06	0.639
caffeic acid	396	30.211	0	0	0	0	0	0	0	.
citraconic acid	147	11.338	8E-06	4E-06	6.6E-06	0	1E-05	1E-05	3.7E-05	0.218
citramalic acid	147	16.519	0.00069	0.00043	0.00017	0.00018	0.0002	6E-05	0	0.202
citric acid	347	24.463	0.05859	0.06801	0.03697	0.02673	0.0758	0.023	0.00591	<u>0.000</u>
D-malic acid	147	16.951	0.0599	0.01744	0.00898	0.00536	0.0446	0.0085	0.00215	<u>0.003</u>
D-saccharic acid	333	28.463	0.00179	0.00259	0.00288	0.00184	0.0026	0.0013	0.00021	<u>0.015</u>
Erythronic acid (4TMS)	292	18.448	7E-05	2.6E-05	2.6E-05	7.1E-05	4E-05	0	0	0.640
ferulic acid	338	29.345	0	3.9E-06	3.4E-06	3.4E-06	4E-06	4E-06	1.8E-06	0.948
fumaric acid	245	13.214	0.00169	0.00066	0.0001	0.00011	0.0004	0.0002	4.7E-05	0.061
galacturonic acid	333	24.297	0.00073	0.00195	0.001	0.00151	0.0012	0.0009	0.00021	<u>0.000</u>
galacturonic acid	333	24.297	0	0	0	0	0	0	3.7E-05	<u>0.046</u>
gentisic acid	355	23.087	0	0	0	0	0	0	0	.
Glucaric acid1,4lactone (4TM	217	27.117	4.1E-05	9.8E-05	6.8E-05	0	0.0001	1E-05	0	0.388
Glucoheptonic acid1,4lactone	217	22.809	0	0	0	0	0	0	0	.
gluconic acid	333	28.159	0.00146	0.00247	0.00155	0.00179	0.0019	0.0016	0.00038	0.055
Gluconic acid (6TMS)	292	27.571	0.00076	0.00249	0.00013	0.00043	0.0011	0.001	7.6E-05	<u>0.000</u>
gluconic acid lactone	275	25.844	0.00074	0.00246	0.0015	0.00078	0.0013	0.0015	0.00014	<u>0.007</u>
Glutaric acid, 2hydroxy (3TM	247	18.962	0.00069	0.00049	2.9E-05	1.4E-05	9E-05	0.0002	1.2E-05	0.177
glyceric acid	189	13.011	0.00033	0.00027	0.0002	0.00042	0.0004	1E-04	3.4E-05	<u>0.021</u>
glycolic acid	147	6.5166	0.00012	0.00012	7.8E-05	0.00045	0.0001	7E-05	6.9E-05	0.466
Gulonic acid (6TMS)	292	27.535	0.00052	0.00049	0.00038	0.00044	0.0004	0.0003	0.00013	0.216
isocitric acid	273	24.54	0	0.00022	0	0	0	0	0	0.207
Isocitric acid (4TMS)	285	24.546	0	0	0	0	0	0	0	.
itaconic acid	147	13.162	0.00191	0.00267	0.00125	0.00092	0.0036	0.0006	1.7E-05	<u>0.000</u>
L-(+) lactic acid	147	6.2038	0.00382	0.0033	0.00184	0.00634	0.0027	0.0037	0.00386	<u>0.002</u>
lactobionic acid	217	38.642	0.00428	0.00493	0.00017	0.00021	0.0039	0.0012	0.00041	<u>0.040</u>
Lactobionic acid (TMS) BP	204	38.16	0	0	0	0	0	0	0	.
Lactobionic acid (TMS) MP	204	42.646	0	0	0	0	0	0	0	.
L-glutamic acid	246	19.962	0.00063	0.00382	0.00162	0	0	0.0009	8.6E-05	0.402
L-glutamic acid (dehydrated)	156	17.556	0.00136	0.00095	0.00055	0.00165	0.0011	0.0006	0.00037	0.063
L-pyroglyutamic acid	156	17.562	0	0	0	0	0	0	0	.
Maleamic acid (2TMS) BP	244	17.069	0	0	0	0	9E-06	0	0	0.451
maleamic acid	244	17.47	3.3E-06	1.6E-06	0	0	3E-05	0	0	0.084
maleic acid	147	12.176	0.00022	6.9E-05	0	0	0.0003	0	0	<u>0.029</u>
malonic acid	147	9.636	0.00315	0.00109	0.00029	0.00079	0.0015	0.0001	2.3E-05	0.096
mucic acid	333	29.045	0.00038	0.00082	0.00033	0.00062	0.0006	0.0003	0.00013	<u>0.001</u>
myristic acid	285	24.551	5.4E-05	3.8E-05	0	0.00027	0	2E-05	0.00019	<u>0.011</u>

Πίνακας 4	MZ	RI	AVG Ctrl	AVG GA 25	AVG GA 50	AVG GA 75	AVG IA 25	AVG IA 50	AVG IA 75	P
nicotinic acid	180	11.791	5.1E-06	1.9E-05	2.9E-06	1.1E-05	0	0	0	<u>0.039</u>
N-methyl-DL-glutamic acid	260	22.091	0	0.00019	2.2E-05	9.8E-06	2E-05	2E-05	3.9E-05	<u>0.000</u>
palmitic acid	313	28.353	0.00138	0.00291	0.00118	0.00249	0.0012	0.0015	0.00185	<u>0.008</u>
pantothenic acid	291	27.733	0	2.8E-05	3.7E-05	2.6E-05	0	0	1.5E-05	0.380
pipecolic acid	84	11.033	2E-05	3E-05	5.3E-06	0	2E-05	0	0	<u>0.036</u>
Propanoic acid, 2amino2meth	160	10.212	0	0	0	0	0	0	0	.
pyrrole -2-carboxylic acid	240	13.439	0	0	0	0	0	0	0	.
pyruvic acid	174	5.9708	1.5E-05	1.4E-05	1.9E-06	4.2E-05	2E-05	0	0	0.578
Ribonic acid (5TMS)	73.5	23.828	4.6E-05	2.3E-05	1.2E-05	0.00024	0.0002	0	0	0.458
ribonic acid-gamma-lactone	147	20.733	0	0	0	0	0	0	0	.
shikimic acid	204	24.239	1.9E-05	9.4E-06	0	0	4E-05	0	0	0.174
stearic acid	341	31.853	0.00235	0.00405	0.00213	0.00313	0.0019	0.0024	0.0019	<u>0.028</u>
succinic acid	148	12.383	0.00273	0.00109	0.0006	0.00078	0.0024	0.0008	0.00022	<u>0.020</u>
tartaric acid	147	23.49	0.00188	0.00324	0.00115	0.0019	0.0028	0.0018	0.00027	<u>0.000</u>
tartronic acid	147	14.557	0	0	0	0	2E-05	0	0	0.290
Threonic acid1,4lactone (2TM	147	13.982	0	0	0	0	0	0	0	.
trans-aconitic acid	229	22.792	0.00037	0.00023	7.1E-05	0.00012	0.0004	8E-05	2.5E-05	<u>0.017</u>
Σάκχαρα										
cellobiose	204	39.821	0.00034	0.00034	3.8E-05	8.6E-06	0.0001	1E-05	1.3E-05	0.366
alphaD-Galactopyranosyl(1,4)	217	40.502	0	0	0	0	0	0	0	.
alphaD-Galactopyranosyl(1,4)	204	40.523	0	0	0	0	0	0	0	.
Arabinose	103	21.156	4.8E-05	0.0001	0	0	1E-05	3E-05	6.7E-06	<u>0.035</u>
betaD-Allose (5TMS)	204	25.042	0	0.00037	0	0	0	0	0	<u>0.000</u>
Cellulose, D	204	39.284	0.00017	0.00013	4.2E-05	2.3E-05	0.0011	0.0002	6.6E-05	0.199
D-(+) trehalose	361	40.507	0.00042	0.00321	0.00078	0.00082	0.0008	0.0012	0.004	<u>0.013</u>
D-(+)altrose	205	26.581	0.01008	0.00518	0	9.7E-05	0.0002	0.0005	8.4E-05	0.417
D-allose	319	26.246	0.0012	0.00174	0.00104	0.00036	0.0043	0.0006	0.00111	0.073
D-glucose	319	26.252	0.00331	0.00174	0.00273	0.00075	0.0396	0.0003	0.00044	<u>0.000</u>
D-lyxose	217	21.276	4.8E-05	0.00016	6.5E-06	0	7E-05	1E-05	1.9E-06	0.083
D-lyxose	217	21.291	1.6E-06	8.5E-05	0	0	0	6E-06	0	0.219
fructose 1	307	25.745	0.03121	0.01247	0.00389	0.00019	0.0376	0.0006	0.0002	<u>0.049</u>
Gentiobiose (1MEOX) BP	204	40.532	0	0	0	0	0	0	0	.
Glucopyranose [H2O] (4TMS)	217	23.405	0.00016	0.00025	9E-05	6.1E-05	0.0002	7E-05	3.3E-05	<u>0.000</u>
Glucopyranose, D (5TMS)	204	31.438	4.8E-05	8.3E-05	2.8E-05	9E-05	0.0001	4E-05	4.4E-05	0.637
Glucopyranose, D (5TMS)	204	25.66	0.00013	0.00011	5.4E-05	0	0.0002	0	1.4E-05	0.345
Glucose, 1,6anhydro, beta	204	21.96	0	0	0	0	0	0	0	.
Idose (1MEOX) (5TMS) MP	157	25.694	0	0	0	0	0	0	0	.
isomaltose	361	42.065	0.00021	0.00012	0.0003	4E-05	0.0004	4E-05	0	<u>0.013</u>
lactose	204	37.768	0.00304	0.00306	0.00115	0.00029	0.0016	0.0004	0.00013	<u>0.000</u>
Laminaribiose (1MEOX) B	361	38.273	0	0	0	0	0	0	0	.
leucrose	361	40.542	0	0	0	0	0	0	0	.
maltose	361	40.54	5.2E-05	4.7E-05	3.5E-06	0.00014	3E-06	1E-04	7.3E-06	<u>0.002</u>
maltotriose	361	49.942	7.2E-06	3.6E-06	0	0	0	0	0	0.451
melezitose	361	49.951	7.8E-05	4.5E-05	8.1E-07	0	2E-05	0	0	0.270

Πίνακας 4										
	MZ	RI	AVG Ctrl	AVG GA 25	AVG GA 50	AVG GA 75	AVG IA 25	AVG IA 50	AVG IA 75	P
Sorbose (1MEOX) (5TMS) BP	103	25.745	0.0318	0.01242	0.00392	0.00026	0.0376	0.0001	0.00011	<u>0.043</u>
Sucrose	361	39.056	0.36038	0.11132	0.11378	0.03909	0.4451	0.005	0.03407	<u>0.000</u>
tagatose	217	25.358	0.01821	0.0073	0.00182	0.00021	0.0249	0.0001	0.0002	<u>0.025</u>
Tagatose (1MEOX) (5TMS) BP	117	18.241	0	0	0	0	0	0	0	.
talose	319	26.583	0.01049	0.0047	6.2E-05	0	0.0061	0.0002	0	0.333
Trehalose, alpha,alpha', D	361	40.508	0.00026	0.00324	0.00058	0.00046	0.0005	0.0012	0.00387	<u>0.016</u>
Xylose (1MEOX) (4TMS) MP	117	18.338	0	0	0	0	9E-06	0	0	0.451
Xylulose	205	21.628	0	0	0	0	0	0	0	.
Φωσφορικές ενώσεις										
D-glucose-6-phosphate	387	34.019	0.0004	0.00018	0.00013	0.00012	0.0002	0	2.7E-05	0.154
D-sphingosine	204	35.879	5.5E-05	6.5E-05	3.5E-05	2.3E-05	6E-05	3E-05	6.7E-06	0.242
glycerol 1-phosphate	357	23.326	0.00018	0.00021	8.7E-05	0.00011	6E-05	4E-05	0.00011	0.689
Glycerophosphoglycerol (5TMS)	357	31.757	0.00016	7.3E-05	3.2E-06	0	0	0	3.3E-06	0.374
Inositol2phosphate, myo	318	35.452	0.00011	5.8E-05	3.3E-05	4.3E-05	6E-05	1E-05	2.5E-05	0.477
isopropyl beta-D-1-thiogalactopyranoside	217	27.275	0	0	0	0	0	0	0	.
O-phosphocolamine	299	23.598	0.00016	0.00022	0.00011	0.00021	7E-05	2E-05	0.00037	0.434
phosphoric acid	299	11.497	0.01384	0.01905	0.03761	0.03757	0.0084	0.0097	0.0225	0.250
Phosphoric acid monomethyl est	241	9.0216	0.00028	0.00074	0.00018	0.00101	0.0006	0.0002	0.0001	<u>0.005</u>
pyrophosphate	451	21.197	9.6E-06	6.2E-06	5.4E-06	0	0	0	0	0.516
Πολυόλες										
Erythritol (4TMS)	217	17.593	2E-05	9.8E-06	0	0	0	0	0	0.451
acetol	219	18.619	1.7E-05	6.9E-05	6E-05	4.2E-05	8E-05	6E-05	0	0.130
allo-inositol	318	27.31	0.00133	0.00651	0.00135	0.00091	0.0011	0.0008	0.00096	<u>0.000</u>
arabitol	217	22.523	0.00015	0.00017	0.00011	0.0001	0.0002	0.0028	3E-05	0.413
Cellobiitol (9TMS)	204	37.771	0	0	0	0	0	0	0	.
D-mannitol	319	26.859	0.00041	0.00078	0.00049	0.00061	0.0006	0.0005	0.00239	<u>0.017</u>
D-sorbitol	319	27.094	7.6E-05	0.00015	0	0	0.0004	4E-05	0	0.223
D-threitol	217	17.415	2E-05	9.8E-06	0	0	0	0	0	0.451
galactinol	204	43.871	0.00078	0.00141	0.00027	0.00019	0.001	0.0024	0.00046	<u>0.000</u>
glycerol	147	11.553	0.00258	0.0082	0.00087	0.00738	0.0018	0.0012	0.00272	<u>0.000</u>
Inositol, myo (6TMS)	305	29.785	0.07386	0.07319	0.00653	0.00054	0.0457	0.0024	0.00317	<u>0.002</u>
maltotriitol	361	55.323	0.00015	5E-05	0	0	1E-05	0	0	0.078
Ononitol (5TMS)	217	27.247	0.01179	0.00679	0.00515	0.0018	0.012	0.0009	0.00085	0.108
palatinitol	361	41.62	1.3E-06	6.5E-07	0	0	0	0	4.6E-07	0.559
Pinitol, D (5TMS)	260	24.862	0.19033	0.33729	0.09461	0.11898	0.2314	0.0709	0.01885	<u>0.000</u>
pyrogallol	239	18.11	0	0	2.1E-05	0	0	0	0	0.052
ribitol	217	23.616	1.5E-05	7.4E-06	0	0	0	0	0	0.451
Sorbitol (6TMS)	319	26.86	0	0	3.5E-05	0	0	0	7.8E-05	0.690
Αζωτούχες ενώσεις										
Serine, Nacetyl (2TMS)	186	17.291	0	0	0	0	0	0	0	.
2-aminoethanethiol	174	33.843	0	0	0	0	0	0	1.8E-06	0.639
5-hydroxy-L-tryptophan	290	35.245	1.8E-05	8E-06	2.1E-05	1.3E-05	0	3E-05	0	0.612
acetyl-L-serine	174	14.542	0	0	0	0	8E-06	0	0	0.451
adenosine	236	38.477	1.4E-05	8.9E-06	4.8E-05	1.9E-05	5E-05	0	0	<u>0.016</u>
allantoin	331	25.77	0.00012	0.00806	0.00365	0.01677	0.0008	0.0024	0.00114	<u>0.000</u>

Πίνακας 4	MZ	RI	AVG Ctrl	AVG GA 25	AVG GA 50	AVG GA 75	AVG IA 25	AVG IA 50	AVG IA 75	P
Beta- alanine	248	15.274	8.9E-05	0.00013	9.1E-05	3.3E-05	7E-05	6E-05	2.6E-05	<u>0.001</u>
beta-cyano-L-alanine	141	13.947	6.7E-05	0.00125	0.00015	0	0.0002	0.0002	8.3E-05	<u>0.000</u>
citrulline	157	24.365	6E-05	0.00172	4.8E-05	0	7E-05	0	5.7E-05	<u>0.000</u>
D-lyxosylamine	103	21.28	6.1E-05	3.1E-05	2.6E-06	0	0	0	3.3E-06	0.474
D-lyxosylamine	217	21.284	0	0	1.9E-05	0	8E-05	2E-05	2.6E-06	0.244
Ethanolamine (3TMS)	174	11.217	0.00398	0.0052	0.00231	0.00323	0.0057	0.0038	0.0027	<u>0.000</u>
gly-pro	174	27.464	2.5E-06	3.6E-06	0	0	2E-06	0	0	0.552
L-norleucine	158	11.395	0.00041	0.00032	0.00012	3.1E-05	0.0002	2E-05	3.9E-05	0.173
Lysine, 5hydroxy (4TMS)	174	17.316	0.00116	0.00064	0.00092	0.00013	0.001	3E-05	0	0.688
N-acetyl-D-glucosamine	319	30.729	0.00039	0.00013	0.00024	9.9E-05	0.0006	0.0001	2.6E-05	<u>0.022</u>
N-acetyl-D-mannosamine	205	29.67	1.8E-05	7.6E-05	6.3E-06	0.00013	4E-05	5E-05	3.1E-05	<u>0.005</u>
phenylethylamine	174	17.313	0.00022	0.00025	0.00012	0.0003	3E-05	0.0002	0.00016	<u>0.002</u>
porphine	285	12.907	0.00238	0.00339	0.00207	0.00288	0.0022	0.0025	0.00266	<u>0.000</u>
putrescine	174	22.424	0.00042	0.00137	0.00046	4.5E-05	0.0002	0.0001	0.00011	<u>0.000</u>
Sphingosine (3TMS)	204	26.945	5.9E-05	2.3E-05	2.1E-05	0	4E-05	0	4.9E-06	0.256
trans-3-hydroxy-L-proline	230	17.791	0	0	0	0	0	0	0	.
trans-4-hydroxy-L-proline	230	17.79	0	0	0	0	0	0	0	.
Tryptamine, 5hydroxy (3TMS)	204	39.284	0	0	5.9E-05	0.0009	0	0	0	0.463
Tryptophan, 5hydroxy (3TMS)	218	19.977	0.00018	0.00047	6.9E-05	0	0	0	1973131	0.639
Tryptophan, Nacetyl (3TMS)	202	43.575	0	0	0	0	0	0	0	.
uracil	241	13.462	1.5E-05	0.00033	7.9E-05	1.1E-05	1E-05	5E-05	2.2E-05	<u>0.000</u>
urea	147	10.432	0.00042	0.00229	0.00362	0.00579	0.0011	0.0026	0.00214	<u>0.038</u>
xanthine	353	28.293	0	0	0	0	0	4E-06	0	0.451
Άλλα										
1-methylhydantoin	171	12.758	0	0	0	0	0	0	0	.
arbutin	254	37.997	5.5E-06	7.8E-05	5.7E-05	0	3E-05	0	0	0.058
benzene-1,2,4-triol	342	19.515	3.3E-06	1.7E-05	7.9E-06	8.9E-06	1E-05	1E-05	2.1E-06	<u>0.038</u>
Cadaverine (4TMS)	174	24.459	0.00224	0.01555	0.00248	0.00053	0.0051	0.0058	0.0018	<u>0.000</u>
Calystegine B2 (4TMS)	217	29.538	0	2.9E-05	0	0	2E-05	2E-05	0	0.288
Galactopyranoside, 1Omethyl 1	174.5	25.048	0.00324	0.01111	0.0001	0	0.0023	0.0007	6.8E-05	<u>0.000</u>
Galactopyranoside, 1Omethyl 2	204	26.153	0	0	6.2E-05	0	0.001	0	7.2E-05	0.484
L-galactono-gamma-lactone	147	25.854	0	0	0	0	0	0	0	.
Methyl 3,6anhydroalphaDgal	129	25.06	0	0	0	0	0	0	0	.
methyl-beta-D-galactopyranoside	204	26.05	0.00382	0.01097	0.00016	0.00024	0.0022	0.0007	0.00014	<u>0.000</u>

Οι παραπάνω πίνακες δείχνουν τη στατιστική ανάλυση για κάθε ιστό και κάθε ποικιλία ξεχωριστά σε όλους τους χειρισμούς και παρατηρούμε τις εξής στατιστικά σημαντικές αλλαγές:

Αμινοξέα

Αναφορικά με την ποικιλία SAM και τον ιστό από τα φύλλα, παρατηρούμε πτώση των επιπέδων συσσώρευσής τους σε σχέση με τον χειρισμό control και πιο συγκεκριμένα της ασπαραγίνης, της τρυπτοφάνης της λυσίνης, της ορνιθίνης και της γλουταμίνης, αμινοξέα τα οποία θεωρούνται πολύ βασικά για την φυσιολογική λειτουργία του φυτού. Αυτά τα αποτελέσματα έρχονται σε αντίθεση με την ποικιλία USA, όπου οι στατιστικά σημαντικές αλλαγές παρατηρούνται στο ασπαραγικό οξύ, το οποίο μειώνεται και στα ορνιθίνη και σερίνη τα οποία αυξάνονται.

Σχετικά με τις ρίζες φαίνεται ότι στην ποικιλία SAM φαινυλανανίνη, ασπαραγίνη, σερίνη, ισολευκίνη, βαλίνη και τρυπτοφάνη συσσωρεύονται, σε αντίθεση με κάποια από αυτά στα φύλλα, ενώ το γλουταμινικό οξύ μειώνεται. Μεγάλες διαφορές βλέπουμε σε σχέση με την ποικιλία SAM στην ποικιλία USA, όπου ασπαραγίνη, γλουταμινικό οξύ, αλανίνη, μεθουονίνη, ορνιθίνη φαίνεται να συσσωρεύονται, ενώ το ασπαραγικό οξύ, η ισολευκίνη, η λυσίνη, η θρεονίνη, η τρυπτοφάνη, η βαλίνη και η σερίνη μειώνονται. Ενδιαφέρον έχουν η προλίνη και η βαλίνη που φαίνεται να αύξονται στους χειρισμούς με τη μικρή συγκέντρωση αλατότητας (IA 25), αλλά και στη περίπτωση του εγκλιματισμού (GA 25, GA 50), αλλά μειώνονται ραγδαία στους υπόλοιπους χειρισμούς, όπου η συγκέντρωση NaCl είναι πολύ υψηλή.

Οργανικά οξέα

Σχετικά με τα οργανικά οξέα στα φύλλα της SAM παρατηρούμε μείωση αυτών, όπως το μαλαμικό οξύ, το μαλικό, αλλά και άλλων, σε αντίθεση με την ποικιλία USA, όπου και εκεί γενικά υπάρχει πολύ μεγάλη μείωση, όμως ξεχωρίζουν το D-σακχαρικό οξύ, το φερούλικό το L-γλουταμικό οξύ, το πιπεκολικό, το σχικιμικό και το στεαρικό οξύ, όπου συσσωρεύονται όσο αυξάνει και η συγκέντρωση NaCl.

Σε αντίθεση με τα φύλλα, όπου υπάρχει μεγάλη μείωση της συσσώρευσης των οργανικών οξέων, στις ρίζες και στις δύο ποικιλίες υπάρχει αύξηση πολλών από αυτών όπως του γλουταρικού

οξέος, του καπροϊκού οξέος και του γλουταμικού οξέος στην ποικιλία SAM, ενώ στην USA υπάρχει αύξηση των επιπέδων συσσώρευσης στο παλμιτικό, μυριστικό, γαλακτικό οξύ, αλλά και σε πολλά άλλα. Γενικά η ποικιλία USA φαίνεται ότι αυξάνει και συσσωρεύει περισσότερα ποιοτικά σε αριθμό οργανικά οξέα από την SAM, ενώ και στις δύο υπάρχουν πολλά που μειώνονται.

Σάκχαρα

Η ταγατόζη είναι εκείνη που μειώνεται στατιστικά σημαντικά στα φύλλα της SAM, ενώ στην USA αυξάνονται η μαλτόζη και η ραφινόζη, ενώ μειώνονται μαλτοτριόζη και μελιβιόζη.

Η συσσώρευση της τρεχαλόζης και στις δύο ποικιλίες στη ρίζα και μάλιστα σε μεγάλα ποσοστά είναι που δείχνει να μια κοινή απόκριση που παρουσιάζει ενδιαφέρον. Στην ποικιλία SAM ακόμα αυξάνεται η γλυκοκυρανόζη, ενώ μειώνονται ταγατόζη, ταλόζη, φρουκτόζη, μαλιβιόζη, μαλτόζη. Αντίθετα στην ποικιλία USA συσσωρεύονται, εκτός από την τρεχαλόζη, αραβινόζη, β-D-αλλόζη, γλυκόζη, μαλτόζη, παλατινόζη και μελιβιόζη.

Φωσφορικές ενώσεις

Το φωσφορικό οξύ είναι που κεντρίζει το ενδιαφέρον σε αυτήν την κατηγορία μεταβολιτών. Εμφανίζεται συσσωρευμένο στα φύλλα της USA, αλλά μειωμένο στα φύλλα της SAM, ενώ στις ρίζες συσσωρεύεται σε πολύ μεγάλο ποσοστά και στις δύο ποικιλίες.

Πολυόλες

Πάλι παρατηρούμε μείωση συσσώρευσης στην ποικιλία SAM στα φύλλα και πιο συγκεκριμένα της ριβιτόλης και της αλλοινοσιτόλης, σε αντίθεση με την USA, όπου γαλακτινόλη και παλατινόλη αυξάνονται και μάλιστα σε μεγάλο βαθμό, ενώ μυοινοσιτόλη και D-μανιτόλη μειώνονται.

Στις ρίζες στην ποικιλία SAM υπάρχει αύξηση συσσώρευσης γλυκερόλης, D-μανιτόλης και πυρογαλόλης, ενώ η ονονιτόλη μειώνεται. Στην ποικιλία USA, γλυκερόλη, γαλακτινόλη, D-μανιτόλη και αλλοινοσιτόλη αυξάνονται, ενώ μυοινοσιτόλη μειώνεται. Ξανά παρατηρούμε στις μικρές συγκεντρώσεις αλατότητας γαλακτινόλη

και πινιτόλη να αυξάνονται, ενώ στις μεγαλύτερες να μειώνονται σε σχέση με τον χειρισμό control.

Αζωτούχες ενώσεις

Μεγάλη διαφορά υπάρχει στα φύλλα σε αυτήν την κατηγορία μεταξύ των ποικιλιών. Ενώ στην ποικιλία SAM η ένωση αλλαντοΐνη μειώνεται, στην ποικιλία USA αυξάνεται μαζί με κιτροουλίνη, αιθαλαμίνη και τρανς μορφές της προλίνης.

Στη ρίζα των ποικιλιών SAM δεν υπάρχει στατιστικά σημαντική διαφορά σε άλλες αζωτούχες ενώσεις εκτός των αμινοξέων που προαναφέραμε. Στην ποικιλία USA όμως, ουρία, ουρακίλη, πουτρεσκίνη β-κυανο-L-αλανίνη αυξάνονται, ενώ αλλαντοΐνη και κιτροουλίνη είναι ανάμεσα σε αυτές που μειώνονται.

Άλλοι μεταβολίτες

Φυσικά η ολιστική τεχνική της μεταβολομικής ανιχνεύει και μεταβολίτες που δεν ανήκουν σε κάποια μεγάλη κατηγορία ή είναι ένζυμα. Ενδεικτικά αναφέρουμε ότι στα φύλλα της ποικιλίας USA η μεθυλ-β-D-γαλακτοπυρανοσίδη αυξάνεται, ενώ στις ρίζες η καδαβερίνη αυξάνεται και στις δύο ποικιλίες.

5. ΣΥΖΗΤΗΣΗ

Τα τελευταία χρόνια η επιστημονική κοινότητα έχει κατανοήσει τη σημαντικότητα του ότι οι αποκρίσεις των φυτών στις διάφορες περιβαλλοντικές καταπονήσεις, αλλάζουν όχι μόνο μεταξύ των ειδών, αλλά και μεταξύ των ποικιλιών του ίδιου είδους. Το γεγονός της εξέλιξης έχει διαφοροποιήσει τις αποκρίσεις ανάμεσα στις ποικιλίες, έστω και σε μικρό επίπεδο, και πλέον με τη σύγχρονη τεχνολογία είμαστε σε θέση να εντοπίσουμε διαφορές σε όλα τα επίπεδα απόκρισης, γεγονός που παλαιότερα ήταν σχεδόν αδύνατον.

Στη παρούσα εργασία εμφανίζονται τις διαφορές στις αποκρίσεις 6 ποικιλιών φακής σε επίπεδο φυταρίων σε διάφορες συγκεντρώσεις αλατότητας και βρίσκουμε ότι 2 ποικιλίες παρουσιάζουν ενδιαφέρον εξ'αιτίας της ανεκτικότητάς ή της ευαισθησίας τους σε σχέση με τους Control χειρισμούς. Έγινε το φύτεμα αυτών των ποικιλιών με συγκεκριμένο πρόγραμμα σε 7 διαφορετικούς χειρισμούς και βρέθηκε ότι σε κατάσταση εγκλιματισμού και οι 2 ποικιλίες είναι σε θέση να εμφανίσουν περισσότερο νωπό βάρος από ότι στην απευθείας εφαρμογή, όμως η μία από τις δύο ποικιλίες είναι που εμφανίζει ποιοτικά καλύτερα φυτά σε όλες τις περιπτώσεις (SAM). Με τη μέτρηση ιόντων χλωρίου στα φύλλα και τις ρίζες βρήκαμε ότι η κυρίως διαμερισματοποίηση των ιόντων από τα φυτά και στις 2 ποικιλίες γίνεται στα φύλλα, ενώ η ρίζα πιθανώς «παίζει» απλά τον ρόλο του μεταφορέα.

Στη συνέχεια χρησιμοποιώντας την τεχνολογία GC/MS αναλύθηκαν μεταβολίτες οι οποίοι είναι ουσιαστικά ένα μέρος του αποτελέσματος της απόκρισης σε ένα στρεσογόνο παράγοντα, που στην περίπτωση μας είναι η αλατότητα. Χρησιμοποιήσαμε στατιστική ανάλυση για να δείξουμε τη διαφορά απόκρισης μέσα στην ίδια ποικιλία και τον ίδιο ιστό (ρίζα/φύλλα) και βρήκαμε:

- Σχετικά με την **ποικιλία Σάμου (SAM) 38** γνωστοί μεταβολίτες παρουσιάζουν στατιστικά σημαντική διαφορά ανάμεσα στους χειρισμούς στα φύλλα και **42** γνωστοί στις ρίζες.
- Σχετικά με την **ποικιλία Αμερικής (USA) 42** γνωστοί μεταβολίτες παρουσιάζουν στατιστικά σημαντική διαφορά ανάμεσα σε όλους τους χειρισμούς στα φύλλα και **89** στις ρίζες διπλάσιοι δηλαδή σε σχέση με την ποικιλία Σάμου.

Υπάρχει μεγάλη διαφορά στις ωσμορυθμιστικές ενώσεις που φαίνεται να συσσωρεύονται σε κάθε ποικιλία ξεχωριστά. Αν και δεν μπορούμε να είμαστε σίγουροι για το ποιες ακριβώς ενώσεις παίζουν τον ρόλο των ωσμορυθμιστών, παρ'όλα αυτά σε σύγκριση με την ξένη βιβλιογραφία πολλοί μεταβολίτες συσσωρεύονται κοινά στις φακές και σε άλλα φυτά. Ανάμεσά τους η ραφινόζη, η τρεχαλόζη, η πινιτόλη, η ριβιτόλη, η γλυκερόλη.

Ακόμα οι αζωτούχες ενώσεις παρουσιάζουν μεγάλη διαφορά συσσώρευσης, εγείροντας το ενδιαφέρον γύρω από το πώς η ανάπτυξη φυματίων κάτω από συνθήκες αλατότητα θα μπορούσε να επηρεάσει το μεταβολικό προφίλ, αλλά και την ανθεκτικότητα των φυτών.

Η διαφορά ανάμεσα στον αριθμό των μεταβολιτών που παρουσιάζουν στατιστικά σημαντική διαφορά ανάμεσα στις ποικιλίες είναι ένα ακόμα ενδιαφέρον στοιχείο που αξίζει περισσότερη μελέτη.

Γενικά φαίνεται η προσπάθεια των φυτών να αυξήσουν το οσμωτικό δυναμικό, κυρίως στις ρίζες με την παραγωγή διαφορετικών πολυολών και κάποιων σακχάρων, ενώ υπάρχει ταυτόχρονη μείωση μεγάλου αριθμού οργανικών οξέων και κάποιων ενεργειακά «ακριβών» σακχάρων, καθώς το φυτό φαίνεται ότι «οδηγεί» τον περιορισμένη ποσότητα άνθρακα που έχει στην παραγωγή διαφορετικών ωσμορυθμιστικών μεταβολιτών και «παραμελεί» σε μεγάλο ποσοστό, κάποια οργανικά οξέα και σάκχαρα.

Τέλος πολλοί μεταβολίτες οι οποίοι σχετίζονται με την οξειδοτική καταπόνηση, ανάμεσα τους και το φωσφορικό οξύ, φαίνεται ότι αυξάνονται και παρουσιάζουν στατιστικά σημαντικές διαφορές μεταξύ των χειρισμών, αλλά και μεγάλο ενδιαφέρον.

Συνέχεια του πειράματος, εκτός από την περαιτέρω ανάλυση των δεδομένων, είναι πιθανή προσπάθεια να αναλύσουμε το πρωτεόσωμα των φυτών και κυρίως στον ιστό της ρίζας και να συνδυάσουμε τα δεδομένα, ενώ ενδιαφέρουσα θα μπορούσε να είναι μία τεχνική ποσοτικής Real time PCR, χρησιμοποιώντας εκκινητές για γονίδια από άλλα ψυχανθή (π.χ. *Lotus japonicus*), τα οποία έχουν βρεθεί ότι επάγονται υπό συνθήκες αλατότητας.

Είναι η πρώτη φορά που γίνεται μεταβολομική ανάλυση στο φυτό της φακής στη διεθνή βιβλιογραφία και οι χειρισμοί Control από μόνοι τους έχουν να μας δείξουν πολλά, ειδικά σε σύγκριση με τις δύο ποικιλίες. Η αλατότητα σαν παράγοντας καταπόνησης αποτελεί μεγάλο πρόβλημα για πολλά εδάφη, ενώ προβληματίζει όλο και περισσότερο αριθμό επιστημόνων και τα δεδομένα της συγκεκριμένης μεταπτυχιακής διατριβής ελπίζουμε να συμβάλλουν έστω και στο ελάχιστο στη καλύτερη κατανόησή του φαινομένου.

6. ΒΙΒΛΙΟΓΡΑΦΙΑ

Agne`s E. Ricroch, Jean B. Berge , Marcel Kuntz, Evaluation of Genetically Engineered Crops Using Transcriptomic, Proteomic, and Metabolomic Profiling Techniques, *Plant Physiology*, April 2011, Vol. 155, pp. 1752–1761

Andre Lauchli and Ulrich Luttge, *Salinity: Environment – Plants – Molecules*, 2004 Kluwer Academic Publishers, eBook ISBN: 0-306-48155-3

Ashraf, M. and Waheed, A. 1990. Screening of landraces/exotic accessions of lentil (*Lens culinaris*) for salt tolerance at two growth stages. *Plant and Soil*, 128: 167–176.

Ashraf M., Biotechnological approach of improving plant salt tolerance using antioxidants as markers, *Plant, Cell and Environment*, 2002, 25, 239–250

ASHRAF M. and A. WAHEED, Screening of local/exotic accessions of lentil (*Lens culinaris* Medic.) for salt tolerance at two growth stages, *Plant and Soil* 128: 167-176, 199

Blumenthal-Goldschmidt, S. and Poljakoff-Mayber, A. (1966), Comparison of the osmotic volume changes in chloroplasts isolated from different plants. *Plant and Cell Physiol.* 7, 357-362

Erskine W, Fred J. Muehlbauer, Ashutosh Sarker, Balram Sharma, *The Lentil Botany, Production and Uses*, ISBN 978-1-4020-6312-1 (HB), ISBN 978-1-4020-6313-8 (e-book), Published by Springer

Flowers TJ (2004), Improving crop salt tolerance. *J Exp Bot* 55: 307–319.

Flowers, T.J., and Yeo, A.R. (1995), Breeding for salinity resistance in crop plants: Where next? *Aust. J. Plant Physiol.* 22: 875-884

H. Greenway, C. B. Osmond, Salt Responses of Enzymes from Species Differing in Salt Tolerance, *Plant Physiol.* (1972) 49, 256-259

Ghassemi F, Jakerman AJ, Nix HA, Salinization of land water resources. Wallingford: CAB International 1995

Ghosh G. and M.C. Drew, Comparison of analytical methods for extraction of chloride from plant tissue using ^{36}Cl as tracer, *Plant and Soil* 136: 265-268, 1991.

Huyen T. T. Phan, Simon R. Ellwood, James K. Hane, Rebecca Ford, Michael Matern, Richard P. Oliver, Extensive macrosynteny between *Medicago truncatula* and *Lens culinaris* ssp. *Culinaris*,

Hoekenga OA (2008), Using metabolomics to estimate unintended effects in transgenic crop plants: problems, promises, and opportunities. *J Biomol Tech* 19:159–166

Hill CB, Jha D, Bacic A, Tester M, Roessner U. Characterization of ion contents and metabolic responses to salt stress of different *Arabidopsis* AtHKT1;1 genotypes and their parental strains, *Mol Plant*. 2012 Nov 6. [Epub ahead of print]

Joyce AR, Palsson BO, The model organism as a system: integrating 'omics' data sets. *NatRevMolCell Biol* 2006, 7(3):198-210

Kim JK, Bamba T, Harada K, Fukusaki E, Kobayashi A., Time-course metabolic profiling in *Arabidopsis thaliana* cell cultures after salt stress treatment, *J Exp Bot*. 2007;58(3):415-24. Epub 2006 Nov 21.

Kanani H, Bhaskar Dutta, Maria I Klapa, Individual vs. combinatorial effect of elevated CO₂ conditions and salinity stress on *Arabidopsis thaliana* liquid cultures: Comparing the early molecular response using time-series transcriptomic and metabolomic analyses, Kanani et al. *BMC Systems Biology* 2010, 4:177

Ladizinsky, G., Braun, D., Goshen, D. and Muehlbauer, F.J. 1984. The biological species of the genus *Lens* L. *Botanical Gazette*, 145: 253–261.

Munns R., Comparative physiology of salt and water stress, *Plant, Cell and Environment* (2002), 25, 239–250

Munns R (2005), Genes and salt tolerance: bringing them together, *New Phytol*, 167: 645–663.

Marva Amparo Asensi-Fabadoa, Jana Celaa, Maren Móllera, Laia Arroma, Caren Changb, Sergi Munnt-Boscha, Enhanced oxidative stress in the ethylene-insensitive (ein3-1) mutant of *Arabidopsis thaliana* exposed to salt stress, *Journal of Plant Physiology* 169 (2012) 360– 368

Meghan M Mensack, Vanessa K Fitzgerald, Elizabeth P Ryan, Matthew R Lewis, Henry J Thompson, Mark A Brick, Evaluation of diversity among common beans (*Phaseolus vulgaris* L.) from two centers of domestication using ‘omics’ technologies, Mensack et al. *BMC Genomics* 2010, 11:686

O Brien JE, Automatic analysis of chloride in sewage, *Wastes Eng* 33: 670 (1962)

Pang Q, Chen S, Dai S, Chen Y, Wang Y, Yan X., Comparative proteomics of salt tolerance in *Arabidopsis thaliana* and *Thellungiella halophila*, *J Proteome Res.* 2010 May 7;9(5):2584-99.

Robert “Bobby” Grisso, Mark Alley, W.G. Wysor, Precision Farming Tools: Soil Electrical Conductivity

Rhoades, J.D. (1972), Water quality for irrigation. *Soil Science* 113: 277-286.

Sanchez DH, Fernando L. Pieckenstain, Jędrzey Szymanski, Alexander Erban, Mariusz, Bromke1, Matthew A. Hannah, Ute Kraemer, Joachim Kopka, Michael K. Udvardi, Comparative Functional Genomics of Salt Stress in Related Model and Cultivated Plants Identifies and Overcomes Limitations to Translational Genomics, *PLoS ONE* 6(2):e17094.doi:10.1371/journal.pone.0017094

Sukhjiwan Kaur, Noel OI Cogan, Luke W Pembleton, Maiko Shinozuka, Keith W Savin, Michael Materne, John W Forster, Transcriptome sequencing of lentil based on second-generation technology permits large-scale unigene assembly and SSR marker discovery, *BMC Genomics* 2011, 12:265

Sanchez DH, Fernando L. P., Francisco E., Alexander E.,
Comparative ionomics and metabolomics in extremophile and
glycophytic *Lotus* species under salt stress challenge the metabolic
pre-adaptation hypothesis, *Plant, Cell and Environment* (2011) 34,
605–617

**Sanchez DH, Felix Lippold, Henning Redestig, Matthew A.
Hannah, Alexander Erban and Michael K. Udvardi,** Integrative
functional genomics of salt acclimatization in the model legume *Lotus*
japonicas, *The Plant Journal* (2008) 53, 973–987

Sanchez DH, Lippold F, Redestig H, Hannah M, Erban A, et al.
Integrative functional genomics of salt acclimatization in the model
legume *Lotus japonicus*. *Plant J* (2008), 53: 973–987

Shilpi Mahajan, Narendra Tuteja, Cold, Salinity and drought
stresses: An overview, *Archives of Biochemistry and Biophysics* 444
(2005) 139–158

S. K. Sharma and R. K. Chahota.. Current status of interspecific
hybridization in genus *Lens*. *Journal of Lentil Research* 2004, 1: 15–
18

Sanchez DH, Szymanski J, Erban A, Udvardi MK, Kopka J (2010),
Mining for robust transcriptional and metabolic responses to long-
term salt stress: a case study on the model legume *Lotus japonicus*.
Plant Cell Environm 33:468–480.

**Sukhjiwan Kaur, Noel OI Cogan, Luke W Pembleton, Maiko
Shinozuka, Keith W Savin, Michael Materne and John W Forster,**
Transcriptome sequencing of lentil based on second-generation
technology permits large-scale unigene assembly and SSR marker
discovery

Shyam S. Yadav, David L., McNeiland, Philip C. Stevenson *Lentil:
An Ancient Crop for Modern Times*, ISBN 978-1-84593-487-3,
Typeset by AMA Dataset Ltd, Preston, UK. Printed and bound in the
UK by the MPG Books Group.

Tsui-Hung Phang, Guihua Shao, Hon-Ming Lam, Salt Tolerance in Soybean, *Journal of Integrative Plant Biology* 2008, **50** (10): 1196–1212

Taji T, Komatsu K, Katori T, Kawasaki Y, Sakata Y, Tanaka S, Kobayashi M, Toyoda A, Seki M, Shinozaki K., Comparative genomic analysis of 1047 completely sequenced cDNAs from an Arabidopsis-related model halophyte, *Thellungiella halophila*, *Plant Biol.* 2012 November 24:10:261

Young ND, Udvardi MK (2009), Translating *Medicago truncatula* genomics to crop legumes. *Curr Opin Plant Biol*;doi 10.1016/j.pbi.2008.11.005

Zall DM, Photometric determination of Chloride in water, *Anal Chem* 28:1665 (1956)

Ons Zahafa,, Sandrine Blancheta,, Axel de Ze´ licourta,b, Benoît Alunnia,b, Julie Pleta, Carole Laffonta, Laura de Lorenzoa,c,d, Sandrine Imbeaude,f, Jean-Laurent Ichante´ e, Anouck Dieta,b, Mounawer Badrig, Ana Zabalzah, Esther M. Gonza´ lezh, Herve´ Delacroix, Ve´ ronique Grubera,b, Florian Frugiera and Martin Crespia, Comparative Transcriptomic Analysis of Salt Adaptation in Roots of Contrasting *Medicago truncatula* Genotypes, *Molecular Plant*, 2012, 1–14, 2012

Καραμπουρνιώτης Γ.Α., Φυσιολογία καταπονήσεων των φυτών, Εκδόσεις ΕΜΒΡΥΟ Αθήνα 2003. ISBN 960-8002-14-1